

Bacterial Carotenoids를 생산하는 광합성세균 *Erythrobacter longus* SY-46의 분리 및 특성

김윤숙 · 이대성 · 정성윤* · 이원재

부경대학교 미생물학과, *부산대학교 한국 Bio-IT 파운드리 센터

(2008년 2월 14일 접수; 2008년 3월 6일 채택)

Isolation and Characteristics of Photosynthetic Bacterium, *Erythrobacter longus* SY-46 which Produces Bacterial Carotenoids

Yun-Sook Kim, Dae-Sung Lee, Seong-Yun Jeong* and Won-Jae Lee

Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 14 February, 2008; accepted 6 March, 2008)

Abstract

The aerobic photosynthetic bacterium, which produces bacterial carotenoids was isolated and identified from coastal marine environments. This bacterium was identified by 16S rDNA sequencing and designated as *Erythrobacter longus* SY-46. *E. longus* SY-46 was Gram negative and rod shape, and the optimal culture conditions were 25°C, pH 7.0, and 3.0% NaCl concentration, respectively. The carbon and nitrogen sources required for the optimal growth were lactose and tryptone, respectively. Fatty acid compositions of *E. longus* SY-46 were C_{18:1}(78.32%), ν -linolenic acid(C_{18:3n9,12,15c}: 3.83%), margaric acid(C_{17:0}: 3.38%), palmitic acid(C_{16:0}: 3.07%), and docosahexaenoic acid(C_{22:6n3}: 2.21%). In addition, *E. longus* SY-46 showed the characteristic absorption peaks of bacterial carotenoids(in the region of 450 to 480 nm) and bacteriochlorophyll(770 to 772 nm). Major carotenoids of *E. longus* SY-46 were polyhydroxylated xanthophylls such as fucoxanthin and zeaxanthin.

Key Words : Aerobic photosynthetic bacterium, Bacterial carotenoids, Bacteriochlorophyll, *Erythrobacter longus* SY-46

1. 서론

광합성세균(photosynthetic bacteria)은 1885년 Englemann이 주광성을 보이는 홍색세균을 발견함으로써 그 존재가 인식되어 연구가 시작되었다. 광합성세균은 intracytoplasmic membrane이라는 독특한 형태의

세포막계를 형성하고 있고¹⁾, 광합성을 담당하는 reaction center를 가지고 있다²⁾. 또한 광합성세균은 광합성 색소로서 크게 bacteriochlorophyll과 carotenoids를 가진다. Bacteriochlorophyll a는 tetrapyrrole ring 구조를 가지며, 반응 중심색소로서 빛 에너지를 전자에너지로 변화시키는 중요한 기능을 수행하고 있고³⁾, 산소와 빛에 의해 합성저해를 받는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 광합성세균의 생리적 특징과 분류학적 연구는 활발하게 진행되어 지금까지 총 27속의 혐기성(anoxigenic) 광합성세균이 분류되었다⁵⁾.

Corresponding Author : Seong-Yun Jeong, Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone: +82-51-510-3402
E-mail: jsymicro@pusan.ac.kr

세균의 광합성은 오랫동안 혐기적 조건에서 빛에너지를 이용하여 에너지를 얻는다고 알려져 왔다. 그러나 소량의 bacteriochlorophyll a를 가지고 있는 호기성 methane-utilizing bacteria가 발견되었고⁶⁾, 해양의 종속영양세균의 연구 도중 1978년 bacteriochlorophyll a를 합성하는 호기성 광합성세균이 발견되었다⁷⁾. Bacteriochlorophyll을 함유한 절대호기성 (obligate aerobic) 광합성세균은 동경만과 그 인근 지역의 해수, 해초, 모래 및 저니에서 처음으로 분리되어 보고되었다^{8,9)}. Shiba와 Simidu¹⁰⁾는 bacteriochlorophyll a를 합성하고 혐기상태에서 성장이 전혀 불가능한 호기성세균을 *Erythrobacter*속으로 분류하였는데, 이러한 호기성(aerobic) 광합성세균은 해초의 엽상체, 해변의 모래, 해수 등 호기적 해양환경에 널리 분포한다⁸⁻¹⁰⁾고 하였다. 현재까지 호기성 광합성세균은 해양에서 *Erythrobacter*와 *Roseobacter* 두 개의 속과 담수에서 6개의 속으로 분류되어져 있다. 지금까지 호기성 광합성세균에 대한 연구들을 살펴보면, bacteriochlorophyll의 광화학 반응¹¹⁾, 치어의 영양 강화 등의 수산 사료로서의 이용, 유용한 색소생산¹²⁾, carotenoids와 ubiquinone¹³⁾, bacteriochlorophyll의 합성에 미치는 산소분압¹⁴⁾에 관한 연구 등이 수행되어져 왔다. 이들 호기성 광합성세균은 처음 발견된 이래 분류학적으로 다양한 세균이 발견되고 있으나¹⁵⁾ 전 세계적으로 검출사례가 드물고, 국내에서 호기성 광합성세균에 대한 보고는 이등¹⁶⁾ 이외에는 극히 드문 실정이다.

Carotenoids는 식물에 있어서는 광합성을 도와주며 동물에게는 아름다운 색소를 제공하며, 생체 내에서는 대사경로를 통하여 노화 등의 원인이 되는 free radical을 중화시키는 항산화제로 잘 알려져 있다^{17,18)}. 해양생물의 천연 지용성 색소인 carotenoids는 hydrocarbons계열인 carotenes와 이들의 산화유도체인 xanthophylls로 나누어지며, 8개의 isoprenoid의 단위로 구성되어져 있다. 지금까지 알려진 많은 종류의 carotenoids는 해양미생물, 조류 및 동물에 분포하고 있으며 항산화¹⁹⁾, 항종양^{20,21)}, 면역증강²²⁾, 체색 개선 등의 효과가 있는 것으로 밝혀져 기능성 소재로서 가치가 높아²³⁾ 식품, 화장품, 어류의 체색 개선제 등으로 사용되고 있다. 또한 carotenoids는 생체 내에 필수불가결한 요소로서 식품첨가물의 천연색

소로서 그 사용량도 증가하고 있으나, 대부분의 carotenoids는 과일류나 생선의 외피²⁴⁾ 등에 제한된 범위로 존재하기 때문에 해양 미생물을 이용한 대량 배양²⁵⁾을 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 가막만의 해수 및 저니에서 색소를 생산하는 호기성 광합성세균을 분리, 동정하고, 분리균주의 생리적 특성 및 최적 배양조건을 확립하였으며, 또한 분리균주의 세포내 지방산 조성과 색소를 추출하여 식품첨가물, 착색제, 항산화제, 양식 사료로서의 응용 가능성을 검토하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 호기성 광합성세균의 분리

시료는 여수 가막만에서 무균적으로 채취(채수; MB 채수기, 채니; 주상채니기)하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, 초기 pH 7.6) 평판 배지²⁶⁾에 평판도말법으로 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 orange와 pink색의 특징이 있는 colony를 선택하여 순수분리 하였다. 이들 분리균주를 PPES-II 액체배지에 접종하여 25°C에서 7일간, 암환경에서 교반배양(200 rpm)하여 12,000 rpm에서 원심분리한 후, pellet을 acetone-methanol(7:2) solution으로 색소를 추출하고 spectrophotometer(Shimadzu, UV-160)를 이용하여 bacteriochlorophyll의 특이파장(770~772 nm)을 가지는 균주를 선별하였다^{8,10)}.

2.2. 분리균주의 동정

분리된 광합성세균 SY-46 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin²⁷⁾과 Gerhardt 등²⁸⁾의 방법을 참고하여 형태학적, 배양학적, 생화학적인 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. Gram staining은 Benson의 방법²⁹⁾으로 염색하여 광학현미경(Zeiss Co., RMS 16)으로 검정하였고, biotin 등의 요구성 실험은 Shiba와 Simidu¹⁰⁾의 방법으로 수행하였다.

또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 sequencing을 행하였다³⁰⁾. AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit(Bioneer)를 사용하여 to-

tal genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 49F(5'-AGAATTCTNANACATGCAAGTCGAICG-3')와 1492R(5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTTACGAC TT-3')을 사용하였다³¹⁾. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 *Eco*RI의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 *Bam*HI의 인식부위를 첨가하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix(Bioneer)를 사용하여 Minicycler(MJ Research, USA)로 PCR 반응을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector(Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 μ l의 XL1-blue competent cell에 transformation 시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법³²⁾으로 plasmid를 mini-prep 하였다. 이와 같이 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank 데이터베이스에서 가장 상동성이 높은 균주와 염기서열을 비교하였으며, MEGA 2.1 package를 이용하여 계통도를 그렸다.

2.3. 분리균주의 최적 성장조건

광합성세균 SY-46 균주의 성장에 미치는 최적 온도, pH, NaCl 농도는 각 구간별로 PPES-II 액체배지에서 전배양한 초기배양액을 각각의 배지에 1%로 접종하여 25°C에서 배양한 후, 640 nm에서 흡광도를 측정하여 균증식을 조사하였다. 성장곡선은 PPES-II 액체배지에 최적 배양조건(25°C, pH 7.0, NaCl 3.0%)으로 접종하여, 암환경에서 교반배양하면서 12시간 간격으로 흡광도를 측정하였다.

탄소원과 질소원이 SY-46 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Shioi³³⁾의 방법에 따라 기본배지에 각각의 탄소원 및 질소원을 1%가 되게 첨가한 후, 상기 실험으로 결정된 최적 배양조건으로 배양하여 생육도를 측정하였다. 기본배지의 조성은 다음과 같다: yeast extract 0.02 g, ferric citrate 0.001 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, KNO₃ 0.5 g, biotin 10.0 μ g, tris(hydroxymethyl)-aminomethane 0.12 mL, thiamine hydrochloride 1.0 g, nicotinic acid 1.0 g, trace element solution 1.0 mL(MnSO₄ · 4H₂O 210 mg, Cu(NO₃)₂ ·

3H₂O 4 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 75 mg, H₃BO₃ 280 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 24 mg, CoCl₂ · 6H₂O 4.5 mg, D.W. 100 ml), final concentration of organic substrate 0.1%, final pH 7.5, aged seawater(70%) 1 L.

2.4. 지방산 분석

총지질의 추출은 Bligh와 Dyer의 방법³⁴⁾에 따라 SY-46 균주의 배양액을 CHCl₃:MeOH(2:1, v/v) 혼합액으로 추출하고 CHCl₃만으로 3회 반복 추출하였다. Fatty acid methyl ester(FAME)의 조제는 총지질에 0.05% BHT를 함유한 hexane을 넣고 sodium methoxidemethanol과 methyl acetate를 가하여 잘 흔들어 섞은 뒤, 50°C에서 하룻밤 방치한 다음, 여분의 시약을 N₂기류 하에서 제거하였다. 여기에 hexane과 물을 가하여 FAME을 hexane층으로 이행시키고, hexane층을 감압 농축하여 얻어진 FAME을 florisil column에 흡착시켜 hexane-acetone(99:1, v/v)으로 순수한 FAME을 용출시켰다.

FAME GC 분석은 Trace gas chromatography (Thermo Finnigan Trace GC ultra, Germany)를 이용하였으며, column은 carbowax 30 M이 coating된 quadrex(0.25 mm I.D. × 0.25 μ m film)를 사용하였다. Column의 온도는 175°C에서 3분간 유지한 후 205°C까지 4°C/min로 승온하여 30분간 유지하였으며, 검출기는 FID를 사용하였고 검출기 온도는 270°C로 유지하여 분석하였으며, carrier gas로 H₂ gas를 사용하였다. 표준품은 NuChek Prep사(Elysian, MN, USA)에서 구입하였고, 분석한 지방산은 표준품의 retention time과 비교하여 동정하였다.

2.5. 색소 분석

SY-46 균주가 생성하는 색소를 분석하기 위하여 먼저 PPES-II 액체배지에서 25°C로 7일간 암배양한 배양액을 원심분리하여 균체를 얻었다. 여기에 acetone-methanol(7:2) 용액으로 추출한 색소 추출물을 anhydrous sodium sulphate를 처리하여 40°C에서 감압 하에서 농축하였다. Dried pigment는 analytical chloroform으로 이동하고, chloroform층도 감압 건조하여 농축하였다. Dried pigment를 methanol 1 mL에 녹이고 pore size 0.2 μ m의 친수성필터(hydrophilic filter)로 여과한 뒤 역상(reverse phase) HPLC로 분석³⁵⁾하였으며, 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 각

Table 1. Condition of HPLC analysis for carotenoids produced from strain SY-46

| Items | Conditions |
|--------------------|---|
| Instrument | Agilent 1100 series |
| Consist of system | 4-channel gradient pump(G1311A) UV-detector(G1316A) Column compartment(G1316A) Vacuum degasser(G1322A) Injector |
| Column | LiChrosorb RP 18(250 × 45 mm) |
| Mobile phase | A: methanol/acetonitrile/D.W. (83:13:4, v/v) B: acetone(100%) |
| Gradient condition | 0~7 min 100% A 7~11 min linear increase to 60% B 11~20 min 60% B 20~28 min liner decrease to 100% A |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Chart speed | 0.5 cm/min |

peak의 동정은 용출되는 순서와 retention time, 표준품과 co-HPLC를 행하여 동정하였다. Astaxanthin, bacteriochlorophyll a, β-carotene, fucoxanthin, lycopene, zeaxanthin 등의 표준품은 sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 호기성 광합성세균의 분리 및 동정

본 실험에서 pink 또는 orange색의 colony를 형성하는 60여종의 색소균이 분리되었으나, 770~772 nm에서 bacteriochlorophyll의 특이파장을 보이는 호기성 광합성세균은 SY-46 균주만이 분리되었다. SY-46 균주는 메탄올 추출법으로 색소의 파장을 조사한 결과 bacteriochlorophyll의 특이파장 외에도 460~480 nm에서 carotenoids의 특이파장도 나타내었다(Fig. 1). 호기성 광합성세균은 호기성 해양환경에 널리 분포한다고 보고¹⁵⁾되었으나, 본 연구에서 분리한 60여종의 색소균 중 오직 한 균주만이 bacteriochlorophyll의 특이파장을 보였다. 770 nm에서의 흡수 파장대는 광합성을 할 수 있는 잠재력이 있음을 나타낸다³⁶⁾.

SY-46 균주의 형태학적 및 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. SY-46 균주는 PPES-II 평판배지에서 orange색의 colony를 형

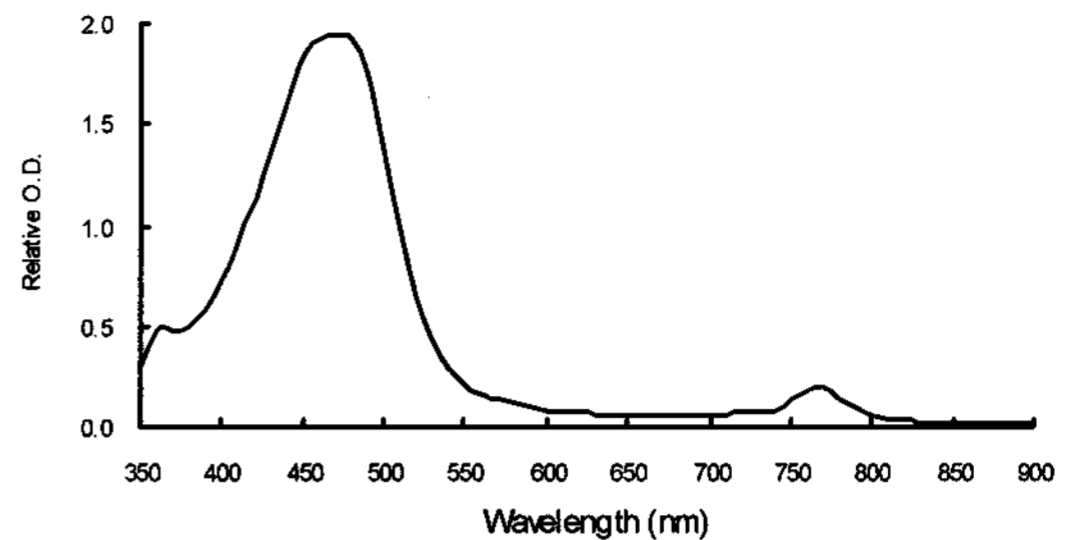


Fig. 1. Absorption spectrum of pigment extract of strain SY-46.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of strain SY-46 and *Erythrobacter longus* ATCC 33941

| Contents | Strain SY-46 | <i>E. longus</i> ATCC 33941 |
|--|--------------|-----------------------------|
| Color | Orange | Orange |
| Cell shape | rod | long rod |
| Gram staining | - | - |
| Motility | + | + |
| Oxidase | + | + |
| Catalase | + | + |
| Indole production | + | + |
| Methyl Red test | - | - |
| Voges-Proskauer reaction | - | - |
| Requirement of | | |
| Biotin | + | + |
| Nicotinic acid | - | - |
| Ca-panthothenate | + | - |
| Thiamine | - | - |
| Vitamin B ₁₂ | - | - |
| Utilization as a sole carbon source | | |
| Acetate | - | - |
| Pyruvate | + | + |
| Glucose | + | + |
| Methanol | - | - |
| Succinate | - | - |
| Malate | - | - |
| Citrate | - | + |
| Butyrate | + | - |
| Glutamate | + | + |
| NO ₃ reduction to NO ₂ | + | + |

성하였으며, Gram 음성, 간균으로 운동성을 가졌다. Oxidase와 catalase test는 양성, MR-VP test는 음성이었으며, indole 생성능을 가지며 biotin과 Ca-panthothenate 요구성을 가지고 있었다. SY-46 균주는 *Erythrobacter longus* ATCC 33941 균주와 생화학적 성상이 유사하였으나, Ca-panthothenate 요구성과

butyrate 및 citrate 이용능에서 차이를 보였다. 보다 정확한 동정을 위하여 SY-46 균주의 16S rDNA 염기서열(1421 bp)을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 상동성이 높은 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *E. longus*와 99% 이상의 가장 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 2). 이상의 결과에 따라 본 호기성 광합성세균을 *Erythrobacter longus* SY-46으로 명명하여, Genbank에 등록하여 accession number(EU 543273)를 부여받았다.

3.2. 분리균주의 최적 성장조건

E. longus SY-46의 최적 성장조건에 대해 조사한 결과, 최적 온도는 25°C, 최적 pH는 7.0, 최적 NaCl 농도는 3.0%로 나타났다(Fig. 3). 본 균주는 pH 6.0에서 10.0까지의 비교적 넓은 범위의 pH 조건에서도 잘 성장하였으며, NaCl 농도의 경우 2.0~3.5%까지의 농도에서 잘 성장하나 0%와 5.0% 이상에서는 거의 성장하지 않았다. *E. longus* ATCC 33941 균주의 경우 28°C, pH 7.0~8.0, 2.5% NaCl 농도에서 최적 성장을 나타내어 본 균주와는 차이가 있었다. 이상의 최적조건에서 *E. longus* SY-46의 성장곡선을 조사한 결과, 본 균주는 배양 후 12시간까지 유도기를 거친 뒤 52시간 만에 정지기에 이르렀다(Fig. 4).

E. longus SY-46 균주를 상기의 최적 조건에서 배

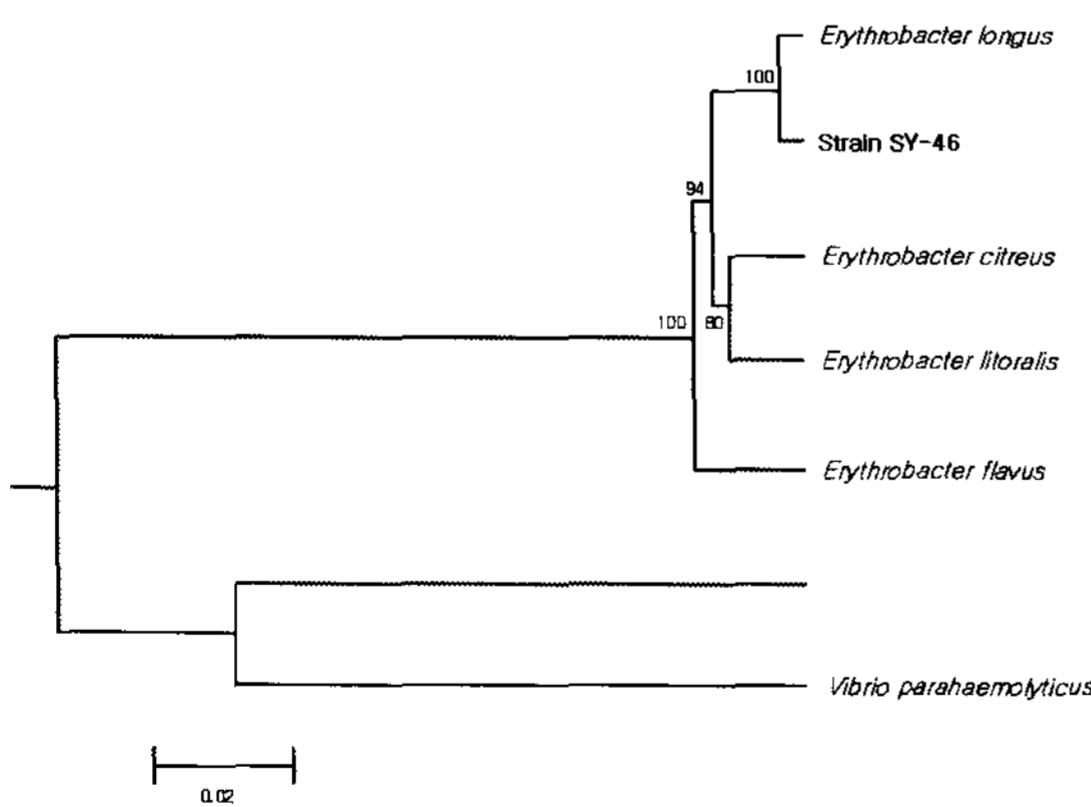


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequence indicating the position of strain SY-46. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branching points. Bar, 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

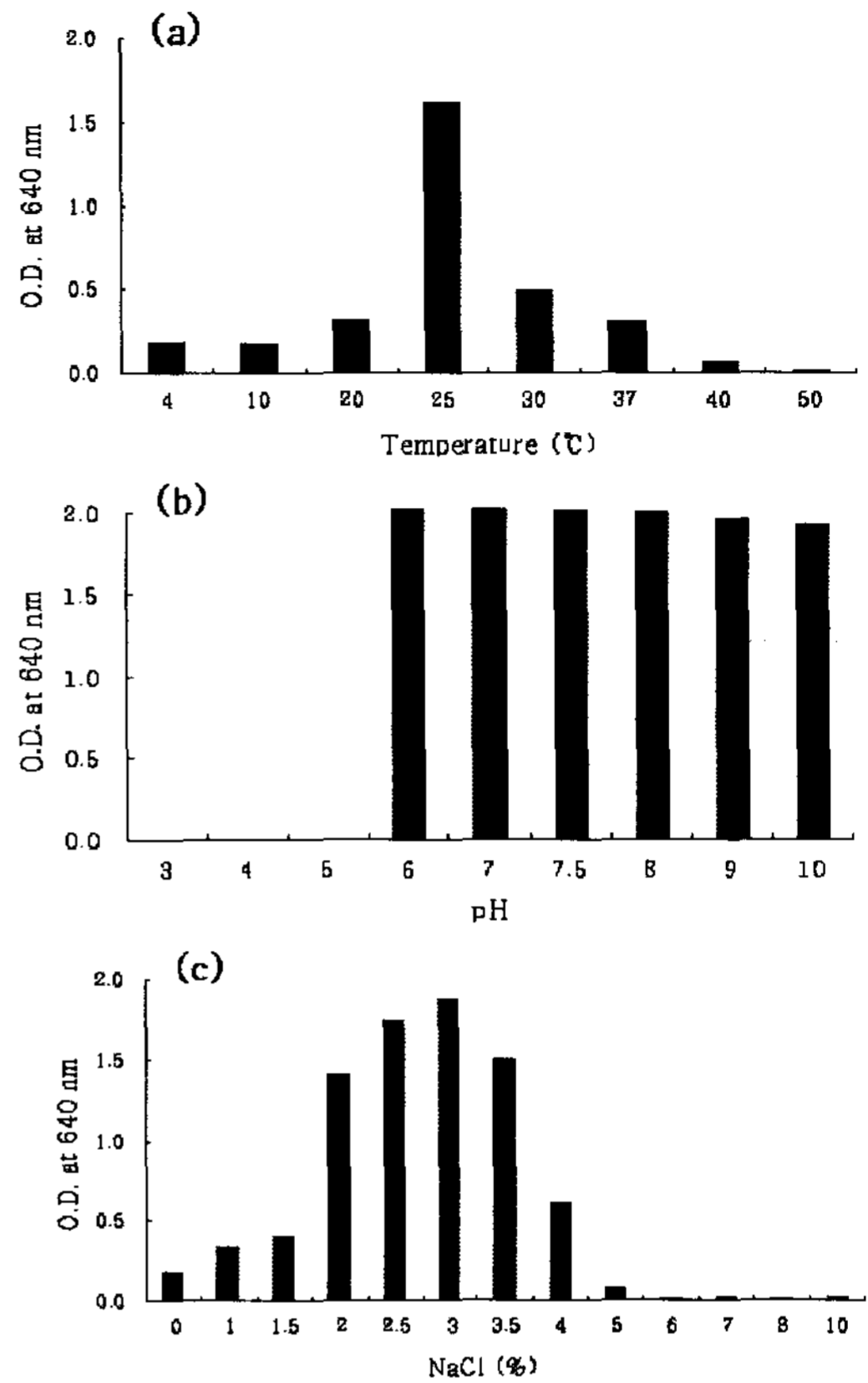


Fig. 3. Effects of temperature, initial pH, and NaCl concentrations on the growth of *Erythrobacter longus* SY-46 in PPES-II medium.

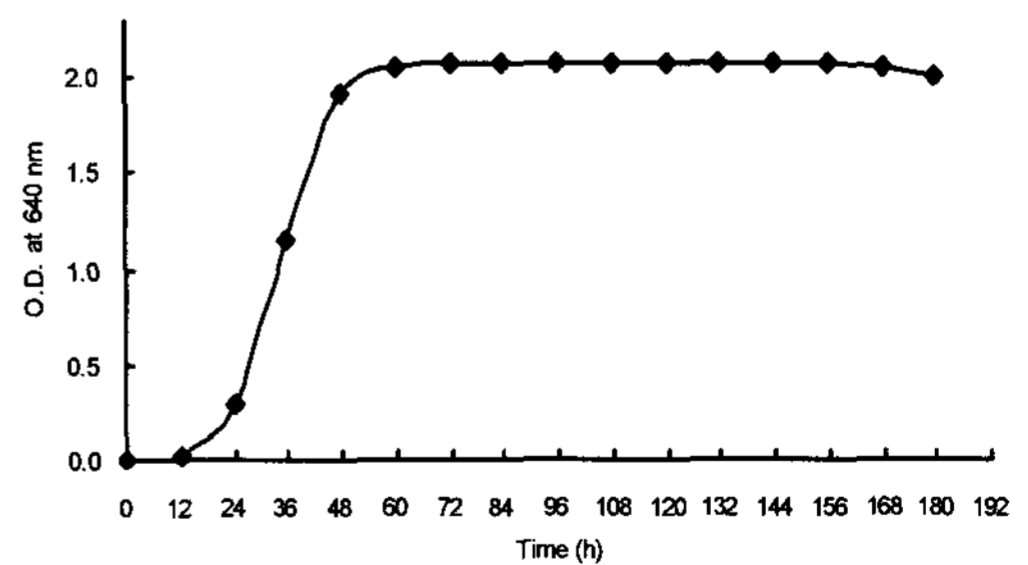


Fig. 4. Growth curve of *Erythrobacter longus* SY-46 at optimal culture conditions(25°C, pH 7.0, and NaCl 3.0%).

양하여 탄소원과 질소원 이용능을 조사한 결과는 Fig. 5와 6에 나타내었다. *E. longus* SY-46 균주는 lactose, glucose 및 starch를 잘 이용하였으나, sucrose, galactose, fructose는 거의 이용하지 않았다. 질

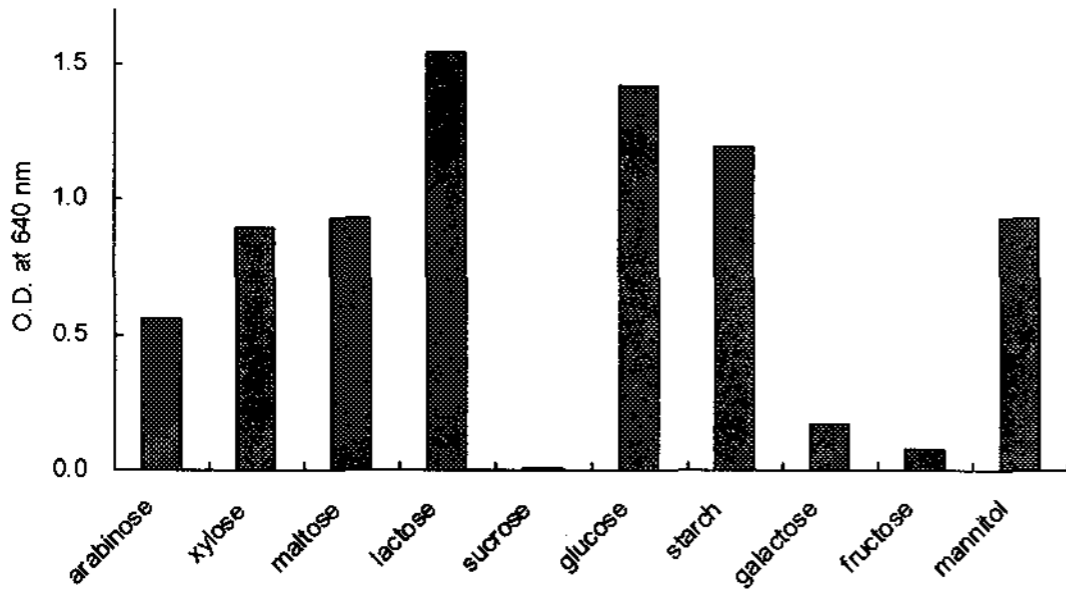


Fig. 5. Effect of carbon sources on the growth of *Erythrobacter longus* SY-46 at optimal culture conditions(25°C, pH 7.0, and NaCl 3.0%).

소원으로는 tryptone을 가장 잘 이용하여 최적 성장을 보였고 malt extract, soytone 및 yeat extract 등의 유기질소원은 잘 이용하였다. 그러나 무기질소원은 본 균주의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.

3.3. 지방산 분석

E. longus SY-46의 세포지방산 조성을 분석한 결과는 Table 3에 나타내었다. 주 세포지방산은 Shiba와 Simidu의 보고¹⁰⁾와 동일한 C_{18:1}로 전체 세포지방산 함량의 78.32%였으며, 그 다음으로 *v*-linolenic acid(C_{18:3n9.12.15c}) 3.83%, margaric acid(C_{17:0}) 3.38%, palmitic acid (C_{16:0}) 3.07%의 순으로 나타났다. 이러

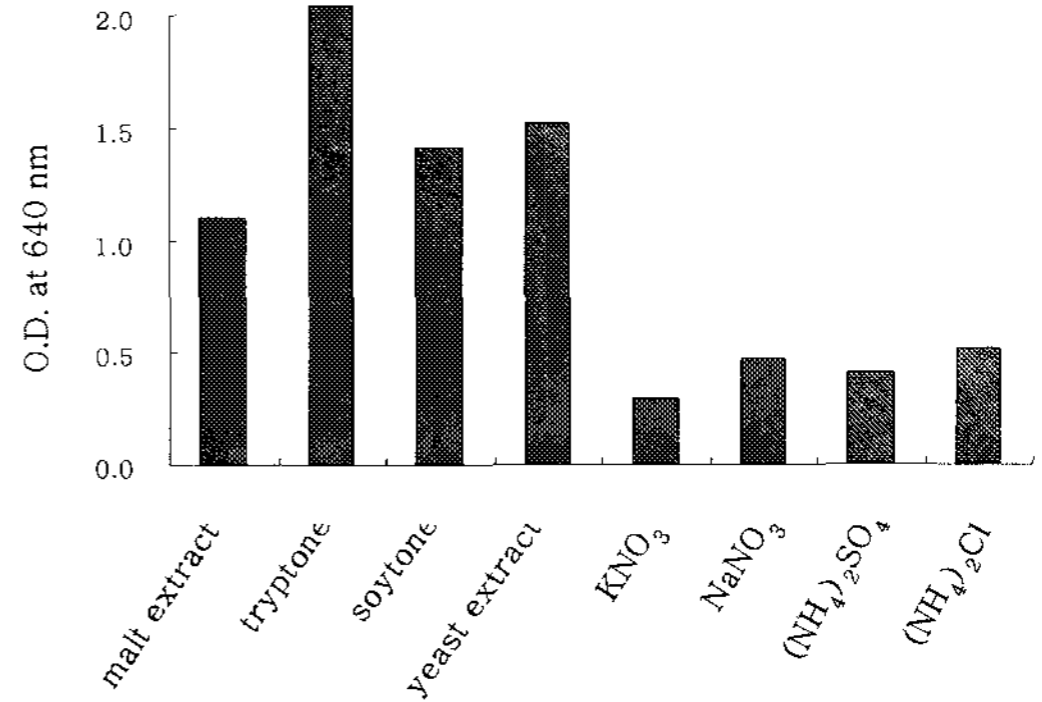


Fig. 6. Effect of various inorganic and organic nitrogen sources on the growth of *Erythrobacter longus* SY-46 at optimal culture conditions(25°C, pH 7.0, and NaCl 3.0%).

한 결과는 *E. longus*의 주 세포지방산의 분포가 C_{18:1} 73.3%, C_{16:0} 10.3%라고 보고한 Urakami와 Komagata³⁷⁾의 연구 결과와는 약간의 차이가 있었다.

E. longus SY-46은 특이하게도 고도불포화지방산(HUFA: high unsaturate fatty acid)인 DHA(docosahexaenoic acid, C_{22:6n3})를 2.21%로 함유하고 있었다. 미생물 균체내의 지방산은 10~20개의 탄소 사슬을 가지고 있으며, 일부 미생물을 제외하고 균체지방산 중 가장 많은 것은 포화지방산과 단순 불포화지방산이다³⁸⁾. 필수지방산(essential fatty acid)인 고도

Table 3. Fatty acid compositions of *Erythrobacter longus* SY-46

| Standard | Fatty acid(%) | Standard | Fatty acid(%) |
|---|---------------|--|---------------|
| Butyric acid C _{4:0} | 1.56 | Linoleic acid C _{18:2n9c} | - |
| Caproic acid C _{5:0} | - | Linoleadic acid C _{18:2n9c} | - |
| Caprylic acid C _{8:0} | 1.59 | Linolenic acid C _{18:3n9.12.15c} | 0.73 |
| Capric acid C _{10:0} | - | <i>v</i> -Linolenic acid C _{18:3n6.9.12c} | 3.83 |
| Undecanoic acid C _{11:0} | - | Arachidic acid C _{20:0} | - |
| Lauric acid C _{12:0} | - | Eicosenoic acid C _{20:1} | - |
| Tridecanoic acid C _{13:0} | - | Eicosadienoic acid C _{20:2} | - |
| Myristic acid C _{14:0} | - | cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid C _{20:3} | - |
| Myristoleic acid C _{14:1} | - | Arachidonic acid C _{20:4} | - |
| Pentadecanoic acid C _{15:0} | - | Heneicosanoic acid C _{21:0} | - |
| cis-10-Pentadecenoic acid C _{15:1} | - | Eicosapentaenoic acid C _{20:5} | - |
| Palmitic acid C _{16:0} | 3.07 | Erucic acid C _{22:1} | - |
| Palmitoleic acid C _{16:1} | - | Tricosanoic acid C _{23:0} | - |
| Margaric acid C _{17:0} | 3.38 | cis-13,16-Docosadienoic acid C _{22:2} | - |
| Margaroleic acid C _{17:1} | 2.94 | Lignoceric acid C _{24:0} | - |
| Stearic acid C _{18:0} | 2.36 | Nervonic acid C _{24:1n15c} | - |
| Oleic, Elaidic acid C _{18:1n9c.1n9c} | 78.32 | Docosahexaenoic acid C _{22:6n3} | 2.21 |
| Total | | | 99.99 |

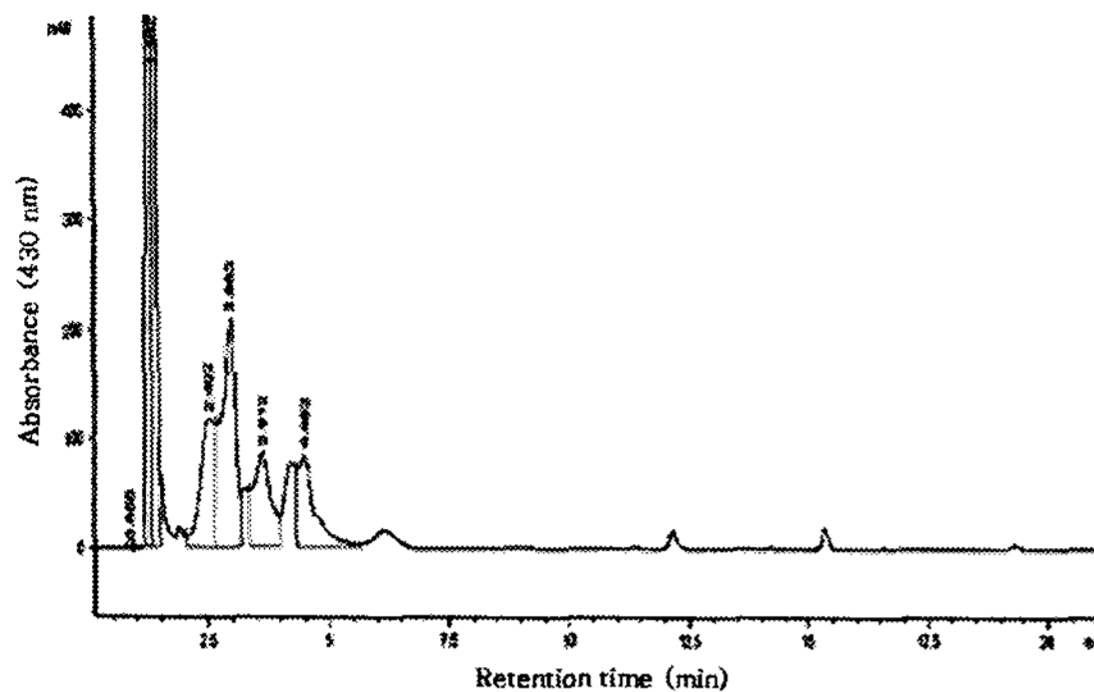


Fig. 7. HPLC chromatogram of total pigment extract of *Erythrobacter longus* SY-46 at 430 nm.

불포화지방산은 치·자어의 성장과 생존에 필수적인 영양성분이라고 밝혀져 있으며, 특히 EPA(eicosapentaenoic acid, $C_{20:5n3}$)와 DHA는 해산 어류에 있어서 매우 중요한 고도불포화지방산이다³⁹⁾. 본 실험에서 분리한 호기성 광합성세균 *E. longus* SY-46은 *Chlorella*와 비슷한 수준의 DHA를 함유¹⁶⁾하고 있으므로, 해산 치·자어의 초기 먹이사료로서의 개발 가능성도 높을 것으로 판단된다.

3.4. 색소 분석

E. longus SY-46이 생산하는 색소를 메탄올 추출 방법으로 추출하여 역상 HPLC를 통해 분석한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 또한 표준품과 co-HPLC를 행하여 분석한 결과 fucoxanthin(retention time: 3.612 min)과 zeaxanthin(4.483 min)이 다량으로 존재하였으며, bacteriochlorophyll(12.156 min)도 소량으로 검출되었다. 이러한 결과는 *Erythrobacter*속은 major carotenoids로 polar carotenoids를 가지고 있고 bacteriochlorophyll a_p 를 가지며⁴⁰⁾, *Roseobacter*속은 major carotenoids로 spheroidenone을 가지고 있다⁴¹⁾는 보고와 잘 일치하였다. 또한 *E. longus* SY-46은 fucoxanthin과 zeaxanthin을 다량으로 함유하고 있어, bacterial carotenoids는 carotene보다 polyhydroxylated xanthophylls라는 Ciegler의 보고⁴²⁾와 잘 일치하였다.

4. 결론

우리나라 연안해역에서 60여종의 색소균을 1차적으로 분리하였으나, 그중 770 nm에서 bacteriochlorophyll의 absorption peak를 나타내는 호기성 광

합성세균은 오직 한 균주만이 탐색되었다. 광합성세균은 에너지 획득 과정이 깨끗하고 경제적이며, 성장이 빠르고 다양한 유기물과 무기물의 이용능력을 가지고 있어 미생물 산업에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 분리된 bacteriochlorophyll을 함유한 호기성 광합성세균의 생화학적 특성을 조사하고, 16S rRNA gene을 이용하여 염기서열을 분석하고 상동성을 비교한 결과 *E. longus* SY-46으로 명명하였다. *E. longus* SY-46은 orange색의 colony를 형성하는 Gram 음성, 간균으로 biotin과 Ca-pantothenate 요구성을 가졌다. 탄소원으로 lactose를 가장 잘 이용하였으나 sucrose, galactose, fructose는 거의 이용하지 않았고, 질소원으로는 tryptone을 잘 이용하였으며 무기질소원 보다는 유기질소원을 잘 이용하였다. *E. longus* SY-46의 최적 성장조건은 25°C, pH 7.0, 3.0% NaCl 농도였다.

E. longus SY-46의 주 세포지방산은 $C_{18:1}$ 로 전체 세포지방산 함량의 78.32%였으며, 그 다음으로 ν -linolenic acid($C_{18:3n9,12,15c}$): 3.83%, margaric acid($C_{17:0}$): 3.38%, palmitic acid($C_{16:0}$): 3.07%의 순으로 나타났다. *E. longus* SY-46은 유용한 지방산과 특히 DHA $C_{22:6}$ (2.21%)를 함유하고 있어 치·자어의 영양 강화를 위한 먹이사료로도 개발이 가능할 것으로 판단된다. 또한 carotenoids로서 fucoxanthin과 zeaxanthin을 다량 생산하고 있어 양식 및 축산 사료, 식품 첨가물, 착색제, 향산화제, 식의약품 개발 등의 다양한 분야에서 응용이 가능할 것으로 판단된다.

참고 문헌

- Holt S. C., Marr A. G., 1965, Isolation and purification of the intracytoplasmic membranes of *Rhodospirillum*, J. Bacteriol., 89, 1413-1420.
- Reed D. W., Clayton R. K., 1968, Isolation of a reaction center fraction from *Rhodopseudomonas sphaeroides*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 471-475.
- Jose A., Cavaleiro S., Smith K. M., 1986, Chromatography of chlorophylls and bacteriochlorophylls, Talanta., 33, 963-971.
- Lascelles J., 1978, Regulation of pyrrole synthesis, In: the photosynthetic bacteria, 1st ed., Clayton R. K., Sistrom W. R., Plenum Press, New York and London, 795-808pp.
- Pfennig N., Trüper H. G., 1984, Anoxygenic photo-

- synthetic bacteria, In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st ed., Staley J. T., Bryant M. P., Prennig N., Holt J. G., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1635-1709pp.
- 6) Sato K., 1978, Bacteriochlorophyll formation by facultative methylotrophs, *Protaminobacter ruber* and *Pseudomonas* Am1, FEBS Lett., 85, 207-210.
 - 7) Harashima K., Shiba T., Totsuka T., Simidu U., Taga N., 1978, Occurrence of bacteriochlorophyll a in a strain of and aerobic heterotrophic bacterium. Agric. Biol. Chem., 42, 1627-1628.
 - 8) Shiba T., Simidu U., Taga N., 1979, Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll a, Appl. Environ. Microbiol., 38, 43-45.
 - 9) Shiba T., Simidu U., Taga N., 1979, Another aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll a, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 45, 801.
 - 10) Shiba T., Simidu U., 1982, *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll a, Int. J. Syst. Bacteriol., 32, 211-217.
 - 11) Harashima K., Nakagawa M., Murata N., 1982, Photochemical activities of bacteriochlorophyll in aerobically grown cells of heterotrophs, *Erythrobacter* species(Och 114) and *Erythrobacter longus*(Och 101), Plant Cell Physiol., 23, 185-193.
 - 12) 紫田李雄, 1965, 生體中における光合成色素, 蛋白質 核酸 醱酵 10, 1377-1385pp.
 - 13) Harashima K., Nakada H., 1983, Carotenoid and ubiquinone in aerobically grown cells of an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* species Och114, Agric. Biol. Chem., 47, 1057-1063.
 - 14) Shiba T., 1987, O₂ regulation of bacteriochlorophyll synthesis in the aerobic bacterium *Erythrobacter*, Plant Cell Physiol., 28, 1313-1320.
 - 15) Raphael L., Cottrell M. T., Ras J., Ulloa O., Obernosterer I., Claustre H., Kirchman D. L., Lebaron P., 2007, High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean, Appl. Environ. Microbiol., 73, 4198-4205.
 - 16) Lee W. J., Park Y. S., Park Y. T., Kim S. J., Kim K. Y., 1997, Studies on the availability of marine bacteria and the environmental factors for the mass culture of the high quality of rotifer and *Artemia*, J. Kor. Fish. Soc., 30(3), 319-328.
 - 17) Hoffmann J., Linseisen J., Riedl J., Wolfram G., 1999, Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans, Eur. J. Nutr., 38(6), 278-285.
 - 18) Farombi E. O., Britton G., 1999, Antioxidant activity of palm oil carotenes in peroxy radical-mediated peroxidation of phosphatidyl choline liposomes, Redox Rep., 4(1-2), 61-68.
 - 19) Murtaugh M. A., Ma K. N., Benson J., Curtin K., Caan B., Slattery M. L., 2004, Antioxidants, carotenoids, and risk of rectal cancer, Am. J. Epidemiol., 159, 32-41.
 - 20) Bertram J. S., Vine A. L., 2005, Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target, Biochim. Biophys. Acta, 1740, 170-178.
 - 21) Kurihara H., Koda H., Asami S., Kiso Y., Tanaka T., 2002, Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress, Life Sci., 70, 2509-2520.
 - 22) Chew B. P., Park J. S., 2004, Carotenoid action on the immune response, J. Nutr., 134, 257-261.
 - 23) Matsuno T., 1994, Mechanism of carotenoid, carotenoid of marine of organisms, 1st ed., Kanshohen Kouseisha Kouseikaku, Tokyo, 9-22pp.
 - 24) Macrae R., Robbison R. K., Sader M. J., 1992, Encyclopedia of food science and technology, 1st ed., Academic Press, London, 293pp.
 - 25) Johnson E. A., 1991, Astaxanthin from microbial sources, Cri. Rev. Biotech., 11, 297-301.
 - 26) Taga N., 1968, Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current, Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ., 12, 65-76.
 - 27) MacFaddin J. F., 1980, Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 36-308pp.
 - 28) Gerhardt P., Murray R. G., Costilow E. R. N., Nester E. W., Wood W. A., Krieg N. R., Phillips G. B., 1981, Manual of method for general bacteriology, 1st ed., Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., 135-154pp.
 - 29) Benson H. J., 1990, Microbiological applications; A laboratory manual in general microbiology, 5th ed., Wm. C. Brown Publishers, 40-134pp.
 - 30) Seong C. S., 1997, Identification of Microorganism Responsible for Anaerobic Degradation of Pentachlorophenol Using RFLP Analysis of PCR Amplified 16S rDNAs, Ph. D. Dissertation, Dept. of Biology, Inje University, Busan.
 - 31) Moyer C. L., Dobbs F. C., Karl D. M., 1994, Estimation of diversity and community structure through RFLP distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent, Loihi Seamount, Hawaii, Appl. Environ. Microbiol., 60, 871-879.
 - 32) Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold

- Spring Harbor Laboratory, New York, 25-28pp.
- 33) Shioi Y., 1986, Growth characteristics and substrate specificity of aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp.(Och114), Plant Cell Physiol., 27, 567-572.
- 34) Bligh E. G., Dyer W. J., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917.
- 35) Jeong Y. K., Choi B. D., Kang S. J., Jeong S. H., Lee Y. K., Kim H. Y., Jung M. J., 2000, Characteristic of carotenoid component from halophilic bacteria, *Haloarcula* sp. EH-1, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 15, 673-676.
- 36) Pfennig N., Trüper, H. G., 1974, The photosynthetic bacteria, In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., Buchanan R. E., Gibbons N. E., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 24-64pp.
- 37) Urakami T., Komagata K., 1988, Cellular fatty acid composition with special reference to the existence of hydroxy fatty acids, and occurrence of squalece and sterols in species of *Rhodospirillaceae* genera and *Erythrobacter longus*, J. Gen. Appl. Microbiol. 34, 67-84.
- 38) Show N., 1974, Lipid composition as a guide to the classification of bacteria, Adv. Appl. Microbiol., 17, 63-108.
- 39) Navarro J. C., Hontoria F., Varo I., Amat F., 1988, Effect of alternate feeding with a poor long-chain polyunsaturated fatty acid *Artemia* strain and a rich one for sea bass(*Dicentrarchus labrax*) and prawn (*Penaeus Kerathurus*) larvae, Aquaculture, 74, 307-317.
- 40) Takaichi S., Shimada K., Ishitsu J., 1990, Carotenoid from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*: β -carotene and its hydroxyl derivatives, Arch. Microbiol., 153, 118-122.
- 41) Shiba T., 1991, *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a, Syst. Appl. Microbiol., 14, 140-145.
- 42) Ciegler A., 1965, Microbial carotenogenesis, Adv. Appl. Microbiol, 7, 1-34.