

해양 미생물을 이용한 EPA 화합물 개발에 관한 연구  
( 2 차 년 도 )

A Study on the EPA Production Using Marine Microorganism

1993. 8

연구 기관  
한국 해양 연구 소

과 학 기 술 처

# 제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “해양 미생물을 이용한 EPA화합물 개발에 관한 연구” 과제의 2 차년도 보고서로 제출합니다.

1993 년 8 월

연구기관: 한국해양연구소

연구책임자 : 조 기 용

연구 원 : 김 상 진

이 홍 금

박 영 옥

모 상 준

권 개 경

# 요 약 문

## I. 제목

해양 미생물을 이용한 EPA화합물 개발에 관한 연구

## II. 연구의 목적 및 중요성

어유(魚油)에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는 고도 불포화 지방산 (高度 不飽和 脂肪酸) 중 Eicosapentaenoic acid (EPA) 나 Docosahexaenoic acid (DHA) 등 n-3 계열의 지방산들은 혈액내 지질감소, 관상동맥, 심장질환의 억제, 암세포의 선택적 파괴, 류머치스성 관절염 치료등의 효능을 보이고 있는 것으로 보고되어 있다. 이에 따라 고도 불포화 지방산들을 추출, 정제하여 의약 및 건강 식품으로 개발하려는 시도가 이루어져 왔으며 미국, 일본 등지에서 이미 몇년전 부터 시판 단계에 이르고 있고 국내에서도 이러한 추세가 점차 확산되고 있다. 그 원료로 주로 사용되어온 등푸른 생선에서 추출한 어유이외에 EPA를 생산하는 미생물을 이용하여 발효 공정을 통해 대량생산을 꾀하려는 시도가 대두되고 있다. 이러한 미생물에서의 EPA 생산은 어유에서의 추출에 비해 Fermentation등의 생물공학적인 공정을 통해 공급원을 안정화 시킬 수 있으며 공정의 규모에 따라 대량생산이 가능한 이점이 있다. 또한 일반적으로 세균의 경우 고도 불포화 지방산을 거의 포함하고있지 않아 EPA 생산 균주는 EPA 이외의 여타 고도 불포화 지방산이 매우 적게 함유되어 있어 미생물을 이용한 EPA 생산

방법은 분리추출 공정이 손쉽다는 장점도 있다. 이러한 추세에 적극적으로 부응하고 EPA 생산 균주를 독자적으로 확보하기 위하여 본 연구실에서도 한국 연근 해역에서 서식하는 해양 동물의 장내에서 EPA생산 균주를 탐색하여 우수 균주를 선발하고 이의 EPA생산의 최적조건을 수립하여 산업화의 기초를 마련하고자 한다.

### III. 연구 내용 및 범위

1. 해양 세균 균주 확보
2. EPA생산 균주 확보
3. 산업화 가능성이 있는 EPA생산 균주 확보
4. EPA 생산 균주의 동정 및 생리 생화학적 특성 조사
5. EPA생산 최적 조건 확립

### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 1991 년 가을 부터 1992 년 겨울까지 약 일년반에 걸쳐 한반도 해역에서 채취한 고등어, 멸치, 꽂치, 청어등 어류와 해삼, 가리비, 조개 등 저서 생물 100 여종의 내장에서 약 3,100 여종의 장내세균을 분리 배양하였다.

2. 이들로 부터 지방산을 추출하여 methyl ester 형태로 전환한후 Thin Layer Chromatography 로 일차 검정한 후 일차 선별된 100 여종을 대상으로 Gas Chromatography 로 EPA 존재 유무와 그 함량을 확인하였다. 그 결과 20 종의 EPA 생산 해양 미생물을 발견하였다.

3. 이들중 EPA 생산능이 가장 뛰어난 3 종 (#1513, #2100, #2101)을 대상으로 균주의 동정 작업을 완료하였다. Gram 염색, 운동성, 형태학적 특성, 당의 이용능력등 70 여 종의 생화학적 시험 결과 3 종 모두 *Vibriobaceae* family 에 속하며 *Aeromonas* Geneous 임을 확인 하였다.

4. 이들중 #1513 균주와 #2100 균주를 대상으로 EPA 생산의 최적조건을 수립하였다. 약 20 - 80 %의 속성 해수 (또는 NaCl)를 포함한 Heart infusion 배지에서 성장 및 EPA 생산이 가장 높았고 최적 온도는 18 °C 이며 pH 7.5 근처에서 균체 성장과 EPA 생산이 최적이었고 원활한 산소의 공급이 균체의 성장과 EPA 생산에 필수적이었다. 실험실 내에서의 최적 배양 조건에서는 처음 5 - 7 %의 EPA함량이 20 -22 % 까지 약 4 배 증가되었고 균체의 회수량도 2 배이상 증가하였다.

5. EPA생산 균주로 부터 plasmid 를 발견하였으며 chromosomal DNA를 분리하여 유전자 colning 의 준비를 완료하였다.

본 연구결과에 따라 균주 특허출원준비 중에 있으며 앞으로 EPA 생산에 관련된 유전자를 분리하여 유전공학적인 방법을 이용하여 EPA 생산을 증대시키고자 준비하고 있다. 본 연구는 EPA라고하는 유용물질 생산의 산업화를 궁극적인 목적으로하고 있으며 국내에서 산업화를 위한 준비가 시급히 요구된다. 특히 의약 및 식품 업계의 산업체의 참여가 요망되는데 현재 국내에서 이 관련 분야의 산업체는 중소기업 수준으로 본 연구에 대해 많은 관심을 보이고 있으나 적극적인 투자 보다는 원료를 수입 판매하는 수준에 안주하고 있는 실정이다. 이들의 참여에 대한 유인동기를 부여하기 위해서는 앞에서 언급한바와 같이 EPA 생산에 관련된 유전자를 분리하여 유전공학적인 방법을 이용하여 EPA 생산할 수 있는 길을 시급히 개발하여야하며 이를 위하여 산학연 합동으로 본 과제를 확충 추진할 필요가 있다.

# Summary

## I. Title

A Study on the EPA production Using Marine Microorganism

## II. Objectives and Significance

Among the polyunsaturated fatty acids usually contained in blue backed fish oil, n-3 series fatty acids such as Eicosapentaenoic acid (EPA) or Docosahexaenoic acid (DHA) show some beneficial effects on human health such as preventing disease in circulating system, decreasing blood lipid content, selective destruction of cancer cells, and curing of some inflammation. Recently, these polyunsaturated fatty acids were purified and marketed as health food as well as curing medicine in United State, Japan and this trend has begun in Korea. To overcome some problems using fish oil for the EPA production such as unstable supply and easy decomposition during transport and storage, an microbial EPA become more promising source as an alternative EPA source other than fish oil. This microbial EPA production will guarantee a stable supplication of source for EPA through biotechnical process such as fermentation, and eventually mass production can be easily processed. Another advantage of the microbial EPA production is microbial fatty acid source contains very

little other polyunsaturated fatty acid than EPA which greatly facilitate the purification process. To follow this trend actively, first of all high EPA producing bacteria must be obtained and the optimal cultivating condition should be established for the eventual industrialization of microbial EPA production.

### III. Contents and Scope

1. Marine bacterial strains stocks have been established for this project as well as other screening of biologically active substance or novel compounds
2. EPA producing bacteria have been isolated
3. Strains of high EPA production activity have been secured which can be good candidate for microbial mass EPA production
4. Identification and physiological and biochemical characterization of high EPA producing bacteria
5. Establishing the optimal condition for EPA production

### IV. Results and Suggestions

1. About 3,100 strains of bacteria were collected from the intestine of 100 kinds of marine animals including sardine, mackerel, sea cucumber, and so on obtained from the sea around Korea peninsula.

2. 20 strains of EPA producing bacteria were obtained after screening with thin layer chromatography and gas chromatography and

stored.

3. 3 strains of high EPA producing bacteria (#1513, #2100, #2101) were isolated and identified as *Aeromonas* genera through morphological and standard biochemical tests.

4. Optimal conditions for the growth and EPA production were established for #1513 and #2100 strains. Heart infusion media containing about 20 - 80 % aged sea water (or NaCl) and incubation temperature of 18 °C, pH 7.5, and high oxygen supply should be employed for the best growth and EPA production. At optimal condition in laboratory scale, about 2 fold increase of cell mass and 4 fold increase of EPA were obtained.

5. Chromosomal and plasmid DNA were isolated and purified from these high EPA producing bacteria.

The strains of high EPA production are ready for application for microbial cell patent, and the enzyme and gene involved for the EPA production should be isolated and eventually cloned and expressed in other organisms such as *E. coli*, yeast, or higher plants to increase further the EPA production yield. For the eventual purpose of this research, industrial mass production of EPA, the active participation of industrial companies is highly required. This project should be increased in research scope to the cloning and expression and obtaining of genetically engineered organism, and so should be performed by a collaboration of industrial companies and research institute.



## 목차

요약문	5
목차	11
그림 목차	14
표 목차	21
제 1 장. 서론	23
제 2 장. 연구 재료 및 방법	26
제 1 절. 시료 채취, 처리 및 균주 순수 분리	26
제 2 절. 분리 균주의 보존 및 자료정리	27
제 3 절. 균주 동정 및 특성	28
제 4 절. EPA 함유 여부 분석	36
제 5 절. 인지질 및 지방산 조성 분석	38
제 6 절. EPA 생산 최적조건의 확립	41
제 7 절. EPA 생산 균주로부터 DNA 분리	43
제 3 장. 연구결과	46
제 1 절. 균주 분리 및 보존	46
제 2 절. EPA 다량 생산 균주의 발견 및 확보	46
제 3 절. EPA 고 생산 균주의 동정 및 특성	50
제 4 절. EPA 생산 균주중 #1513의 EPA 생산 최적 조건	57
제 5 절. DNA 분리	91
제 4장. 고찰	96
참고자료	101



# Content

Summary	8
Content	13
List of Figures	17
List of Tables	22
Part 1. Introduction	23
Part 2. Materials and Methods	26
Section 1. Sampling, Isolation and Culture of bacteria	26
Section 2. Culture collection	27
Section 3. Identification and Characterization	28
Section 4. Screening for EPA production	36
Section 5. Analysis of lipid and fatty acid composition	38
Section 6. Optimization of EPA production	41
Section 7. DNA Isolation	43
Part 3. Results	46
Section 1. Isolation and Stock	46
Section 2. Screening for EPA production	46
Section 3. Identification and Characterization	50
Section 4. Optimization of EPA production	62
Section 5. DNA Isolation	91
Part 4. Discussion	96
References	101

## 그림 목차

그림 1. EPA 생산 균주 #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c) 의 분리 시점에서 의 지방산 조성의 Gas chromatogram. -----	49
그림 2. EPA 생산 균주 #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c) 의 전자 현미경 사진.-----	51
그림 3. EPA 생산 균주 #1513 의 ubiquinone 생성 -----	61
그림 4. EPA 생산 균주 #1513 의 해수 농도별 성장과 EPA 생산.-----	64
그림 5. EPA 생산 균주 #2100 의 해수 농도별 성장과 EPA 생산.-----	65
그림 6. EPA 생산 균주 #1513 의 해수와 단순 소금물에서의 혼합비에 따른 성장과 EPA 생산. -----	66
그림 7. EPA 생산 균주 #2100 의 해수와 단순 소금물에서의 혼합비에 따른 성장과 EPA 생산. -----	67
그림 8. EPA 생산 균주 #2100 의 NaCl과 KCl 농도별 혼합비에 따른 성장과 EPA 생산. -----	68
그림 9. NaCl을 유일한 염으로 사용했을 때의 EPA 생산 균주 #2100 의 성장	

과 EPA 생산. -----	69
그림 10. 인공 해수의 각 구성 성분을 각각 제거했을 때의 EPA 생산 균주 #1513의 성장과 EPA 생산. -----	70
그림 11. 인공 해수의 각 구성 성분을 각각 제거했을 때의 EPA 생산 균주 #2100의 성장과 EPA 생산. -----	71
그림 12. 초기 산성도의 변화에 따른 #1513의 성장과 EPA 생산. -----	74
그림 13. 초기 산성도의 변화에 따른 #2100의 성장과 EPA 생산. -----	75
그림 14. EPA 생산 균주 #1513의 성장과 EPA 생산에 미치는 최종 산성도의 변화의 영향. -----	76
그림 15. 3 종류의 다른 배지 (Heart infusion media, Peptone-yeast extract media, and Tryptone-yeast extract media)에서의 EPA 생산 균주 #1513(a) 과 #2100 (b)의 성장-----	77
그림 16. 배지내 소심장 추출물의 농도에 따른 EPA 생산 균주 #1513의 성장과 EPA 생산. -----	78
그림 17. 배지내 소심장 추출물의 농도에 따른 EPA 생산 균주 #2100의 성장과 EPA 생산. -----	79

그림 18. 배지내 Tryptose 농도 변화에 따른 EPA 생산 균주 #1513 의 성장 과 EPA 생산. -----	80
그림 19. 배양온도에 따른 EPA 생산 균주 #1513 의 성장과 EPA 생산. —	86
그림 20. 배양온도에 따른 EPA 생산 균주 #2100 의 성장과 EPA 생산. —	87
그림 21. #1513 의 성장과 EPA 생산에 미치는 산소 공급의 영향 -----	88
그림 22. #2100 의 성장과 EPA 생산에 미치는 산소 공급의 영향 -----	89
그림 23. 최적화 과정을 거친후의 EPA 생산 균주 #1513, #2100, #2101의 지 방산 조성의 Gas chromatogram. -----	90
그림 24. EPA 생산 균주 #1513 과 #2100의 chromosomal DNA의 온도 상승에 의한 흡광도의 증가 곡선 -----	92
그림 25. EPA 생산 균주 #1513, #2100 and #2101에서 분리된 plasmid —	93
그림 26. EPA 생산 균주 #1513, #2100 and #2101에서 분리된 plasmid의 25 °C 에서의 배양에 의한 Thermal curing. -----	94
그림 27. EPA 생산 균주 #1513에서 분리된 plasmid를 <i>E. coli</i> HB101에 이식 하여 유도된 지방산 조성의 변화 -----	95

## List of Figures (in English)

- Figure 1. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c) at the time of isolation----- 49
- Figure 2. Electron Microscopic Photographs of EPA Producing Bacteria #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c).----- 51
- Figure 3. Production of ubiquinone and menaquinone in EPA producing bacteria #1513. ----- 61
- Figure 4. Growth and EPA production of #1513 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water.----- 64
- Figure 5. Growth and EPA production of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water.----- 65
- Figure 6. Growth and EPA production of #1513 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water at constant salinity corresponding to 22 g NaCl per liter.----- 66
- Figure 7. Growth and EPA production of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water at constant salinity corresponding to 14 g NaCl per liter.----- 67

Figure 8. Growth and EPA production of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of NaCl and KCl at constant salinity corresponding to 14 g NaCl per liter.----- 68

Figure 9. Growth and EPA production of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of NaCl as the sole salt source, 100 % NaCl is 35 g of NaCl per liter.----- 69

Figure 10. Growth and EPA production of #1513 at Heart infusion broth media depleting each components of artificial sea water.----- 70

Figure 11. Growth and EPA production of #2100 at Heart infusion broth media depleting each components of artificial sea water.----- 71

Figure 12. Effect of initial pH on the growth and EPA production of #1513.----- 74

Figure 13. Effect of initial pH on the growth and EPA production of #2100.----- 75

Figure 14. Effect of final pH on the growth and EPA production of #1513.----- 96

Figure 15. The growth of #1513 and #2100 at Heart infusion media, Peptone-yeast extract media, and Tryptone-yeast extract media.----- 77



Figure 16. Effect of Heart infusion concentration on the growth and EPA production of #1513.----- 78

Figure 17. Effect of Heart infusion concentration on the growth and EPA production of #2100.----- 79

Figure 18. Effect of Tryptose content (1 - 4 %) on the growth and EPA production of #1513.----- 80

Figure 19. Effect of temperature of on the growth and EPA production of #1513 in heart infusion broth.----- 86

Figure 20. Effect of temperature of on the growth and EPA production of #2100 in heart infusion broth.----- 87

Figure 21. Effect of air supply on the growth and EPA production of #1513 through the change of the surface to volume ratio, in heart infusion broth at 18 °C.----- 88

Figure 22. Effect of air supply on the growth and EPA production of #2100 through the change of the surface to volume ratio, in heart infusion broth at 18 °C.----- 89

Figure 23. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #1513, #2100

and #2101 after EPA production optimization (Omegawax 320 column at 240 °C).----- 85

Figure 24. Thermal melting curve of #1513 and #2100 chromosomal DNA- 92

Figure 25. Isolated plasmids of #1513, #2100 and #2101.----- 93

Figure 26. Thermal curing of plasmid when grown at 25 °C. Lane 1 and 8 are  $\lambda$  DNA, lanes 2, 3, and 4 are plasmids from #1513, #2100, and #2101 grown at 18 °C, respectively, and lanes 5, 6, and 7 are plasmids from #1513, #2100, and #2101 grown at 25 °C, respectively.----- 94

Figure 27. The gas chromatogram of fatty acid methyl ester composition *E. coli* HB101 grown at 20 °C transformed with plasmid isolated from #1513. ----- 95

## 표 목 차

표 1. 해양동물 장내 서식세균 분리 현황 및 EPA 생산균주 탐색결과	47
표 2. EPA 생산 균주들의 생리, 생화학적 특성	54
표 3. EPA 생산 균주들의 당 이용 능력	55
표 4. EPA 생산 균주들의 아미노산 이용 능력	56
표 5. EPA 생산 균주들의 항생제에 대한 내성	57
표 6. EPA 생산 균주 #1513 과 #2100의 지방성분 분석	59
표 7. EPA 생산 균주 #1513의 각 구성 지방성분내에서의 지방산 조성 비교	60
표 8. EPA 생산 균주 #2100 의 성장 온도에 따른 지방산 조성의 변화	85

## List of Tables (in English)

Table 1. The screening results of EPA producing bacteria from the intestine of marine animals-----	47
Table 2. Basic characterization of EPA producing bacteria-----	54
Table 3. Carbohydrate utilization of EPA producing bacteria -----	55
Table 4. Aminoacid utilization of EPA producing bacteria -----	56
Table 5. Resistance of EPA producing bacteria to antibiotics -----	57
Table 6. Lipid composition of bacterium #1513 and #2100-----	59
Table 7. Distribution of Major Fatty acid in different lipid class in #1513 strain-----	60
Table 8. Fatty acid composition (%) of #2100 grown at different temperature.-----	85

## 제 1 장. 서론

현재 인류의 주된 사망 원인으로서는 전쟁, 사고, 질병, 노쇠등을 들 수 있는데 이들중 사망의 원인이 되는 질병은 고혈압, 동맥 경화, 뇌졸중, 심장질환등의 순환기 질병이 간질환, 암, AIDS, 전염병등보다 훨씬 많은 요인이 되고있다. 이러한 현상은 의학 발전에 따른 평균 수명 연장으로 노령 인구가 증가함으로써 노화된 생체 기관을 갖는 인구수가 증가함에 따른 필연적 귀결이라 할수 있다.

이러한 관점에서 볼 때 Greenland Eskimo 에서 매우 낮은 빈도의 순환기 장애 발생을 등푸른 생선을 주된 동물성 단백질 공급원으로 사용해 왔다는 사실과 결부시켜 등푸른 생선에 다량 포함되어 있는 고도 불포화 지방산 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA), 특히 EPA (Eicosapentaenoic acid)의 역할을 밝혀낸 Dyberg 등의 연구 결과는 주목할 만하다 (Dyberg et al., 1981). 즉, 추운 지방이므로 동물성 단백질 및 지방질이 다량 필요하나 이를 등푸른 생선으로 부터 주로 섭취하여 돼지 기름을 상식하는 Russian 에서 순환기 장애가 주된 사망 원인임을 대비하여 과연 생선의 무엇이 순환기 장애를 감소 시키는가 하는 흥미로운 문제를 제기 시켰다. 연구 결과 어유(魚油)에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는 고도 불포화 지방산중 Eicosapentaenoic acid (EPA) 나 Docosahexaenoic acid (DHA) 등 n-3 계열의 지방산들은 혈액내 지질감소, 혈전 용해, 관상동맥, 심장질환의 억제, 암세포의 선택적 파괴, 류머치스성 관절염 치료등의 효능을 보이고 있는 것으로 보고되었다 (진 등, 1985, 녹산, 1982).

이에 따라 어유로 부터 고도 불포화 지방산들을 추출, 정제하여 의약 및 건강 식품으로 개발하려는 시도가 선진 각국에서 이루어져 왔다. 어유

로부터의 EPA 생산에는 정어리, 고등어, 청어 등의 등푸른 생선에 EPA의 함량이 30% 이상으로 비교적 높고 화학적 합성 보다는 손쉽다는 장점, 또 어류가 전통적으로 많이 이용되어 온 식품이라는 점등에서 EPA생산의 주된 원료로 사용되어 왔다. 그러나 어유로부터의 생산에는 다음과 같은 문제점들이 있는 데 우선 어종에 따른 어획시기에 영향을 크게 받으므로 원료공급의 안정성이 결여 되어 있고 어획 장소로부터 EPA 생산 장소로 이동이 필요하므로 화학적으로 불안정한 EPA의 함량 유지를 위해 냉동 등의 특수보관 및 이동 설비가 필요하며 어체 자체의 지방을 포함한 EPA 이외의 불순물이 다량 포함되어 있어 EPA의 분리, 정제에 많은 어려움이 있다.

그런데 어유에 포함된 EPA의 원천은 어류 자체가 다량의 EPA를 생산하는 경우는 거의 확인된 바 없고 먹이 사슬에 따라 소형 등푸른 어류의 먹이인 microalgae 등에 다량으로 함유된 EPA를 섭취한 것과 최근들어 고등어, 정어리등 등푸른 생선들의 장내에 EPA 생산 균주가 서식하고 있는 것으로 밝혀져 (Yazawa, 1989) 이로부터 EPA를 섭취할 가능성이 제시되었다.

이에 따라 선진 제국의 EPA 생산에 관한 연구는 우선 미국의 경우 Columbia의 Martek사, Michigan의 Henry Ford병원 등 대학과 Scripps 해양연구소에서 microalgae를 이용 EPA 생산 과제를 수행중이며 최고 생체량의 6% 까지 도달하였다고 보고되어 있다. 또 이스라엘은 국립해양연구소 및 대학 등에서 연구중이며 역시 Microalgae인 *Nannochloropsis* sp.를 이용하여 EPA 생산의 최적조건 연구중이다. 현재 연구 결과는 microalgae 건조중량 1g 당 50-60mg 정도로 매우 낮으며 2주일 정도의 배양 시간이 걸리는 단점이 있으나 배양시 빛을 이용하여 수득율을 증대한다는 장점도 있다.

그러나 전반적으로 microalgae로부터의 EPA생산은 그배양 조건을 세밀하게 조절해 주어야 한다는 단점을 극복하지 못하고 있다. 일본은 Tosoh사 및 Sagami 화학 연구소, 해양연구소, Ibaraki 대학, Osaka 대학, 동경 대학

등에서 활발히 연구를 수행중이며 이중 Sagami 화학 연구소의 Yazawa 박사 team은 등푸른 생선 장내세균 20,000 주 이상에서 EPA 생산 균주 500주 획득하였고 이 중 EPA 최고 생산 균주는 SCRC-2738 (*Shewanella putrefaciens*)로서 최적 배양 조건에서 1 당 300 mg 까지 생산하는 것으로 보고되어 있다 (Yazawa et al., 1989).

이러한 미생물에서의 EPA 생산은 어유에서의 추출에 비해 Fermentation등의 생물공학적 공정을 통해 공급원을 안정화 시킬 수 있으며 이에 따라 대량생산이 가능한 이점이 있다. 이는 채집 경제로부터 경작 경제로의 진보라는 개념으로 이해할 수 있다. 또한 Yazawa 등에 의해 분리된 SCRC-2738 균주등의 경우와 같이 EPA 이외의 여타 고도 불포화 지방산이 매우 적게 함유되어 있어 미생물을 이용한 EPA생산방법은 어유에서의 추출에 비해 분리추출 공정이 손쉽다는 장점도 있다. 이외에도 미생물 배양의 경우 특히 세균의 경우 짧은 배양기간도 큰 장점이라 하겠으며 균주 개량 및 생산 조건 개선등 개량의 여지가 많다. 또한 원핵생물인 bacteria의 유전자 조작은 그 genome 크기가 작으므로 genome크기가 비교가 되지 않게 큰 어류나 algae등에서의 작업에 비해 훨씬 현실적인 가능성이 크다는 점도 장점으로 작용한다.

## 제 2 장. 연구 재료 및 방법

### 제 1 절. 시료 채취, 처리 및 균주 순수 분리

1991 년 가을 부터 1992 년 겨울까지 서해안의 전라북도 군산, 남해안의 전라남도 목포, 경상남도 사천, 그리고 동해안의 강원도 속초, 주문진등에서 고등어, 청어등 어류와 해삼, 가리비등 저서 생물들을 살아있는 상태로 채취하였다. 채취한 시료들은 현장에서 내장을 꺼내 5 등분한 후 미리 준비한 Aged Sea Water 1 ml 에 현탁한 후 준비된 고형 배지 혹은 액체 배지에 (아래표시) 접종하여 실험실로 운반하여 25 °C 의 배양기에서 균체 집락이 관찰될 때까지 배양하였다. 형성된 균체 집락들을 그 집락 형태 특성 (색깔, 집락 형태등) 에 따라 새로운 고형 배지에 접종하여 동일 형태의 순수 집락을 형성하도록 2 일간 25 °C 에서 배양한 후 형성된 각 집락들을 각각 백금이를 사용하여 3 단계 희석 도말법으로 순수 분리하였다.

### 주로 사용된 배지 조성

PYM-G : 1 % peptone, 0.5 % yeast extract, 0.25 % meat  
extract, 2 % glucose. Aged Sea Water 50 % (pH 7.0).

ZoBell : 0.5 % peptone, 0.1 % yeast extract,  
Aged Sea Water 50 % (pH 7.0).

Heart infusion : 1 % Heart infusion, 1 % tryptose,  
Aged Sea Water 70 % (pH 7.5).

TY medium : 1 % yeast extract, 1 % tryptose,



Aged Sea Water 70 % (pH 7.5).

## 제 2 절. 분리 균주의 보존 및 자료정리

고형 배지에 순수 배양된 균체를 장기 보존을 위하여 약 50 mg 정도의 균체를 Eppendorf tube 에 들어 있는 Glycerol 20 % 수용액 (1/2 ASW) 1 ml 에 현탁하여 영하 80 °C 의 Deep-freezer에 보관하였다. 특히 EPA 생산균주로 밝혀진 균주들에 대해서는 Glycerol stock외에 동결건조 하여 보존하였으며 EPA 고 생산균주로 밝혀진 #1513, #2100, #2101 등은 따로 진공에서 동결 건조 시켜 보관하였으며 동시에 액체 질소에 담가둔 상태로도 보관하였다. EPA화합물의 효율적인 탐색을 위하여 보존된 분리균주의 자료를 균주 보존번호 (예: B1234XY), 시료명, 시료 채취 장소와 일시, 사용 배지, 배양 조건, 검색 결과 등의 양식으로 정리하였다.

### 해양 연구소 해양미생물연구실 내에 보존된 균주의 이용방법

(예: B1234XY)

B: 보관된 균주가 Bacteria 임을 나타냄.

1234: 분리 후 보존 순서에 따른 일련 번호

XY: 균주가 얻어진 장소 또는 시료명

\* XY의 예

FI : fish intestine

MA : marine animal (intestine)

AE : antarctic sediment

AS : antarctic sand

AW : antarctic sea water

SE : southern sea sediment

PD : petroleum degradation

### 제 3 절. 균주 동정 및 특성

#### 가. 형태학적 특성

Heart infusion medium (Difco)에서 18 °C 에서 5일간 배양하였다. 균체의 편모를 관찰하기 위해서 8 % glutaraldehyde 용액로 1일간 예비고정한후 건조제로 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 들어있는 밀폐용기에 넣어 -20 °C에서 2일간 건조하고 Bio-Rad E 5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating한후 scanning electron microscope (Phillips model 515) 상에서 관찰하였다.

또 다른방법으로 Heart infusion broth에 균을 접종한후 18 °C 에서 12시간 배양하였다. 균체의 편모 관찰을 위해 carbon coating하여 2시간 건조시킨 후 다시 negative staining 하였다. 그런 다음 transmission electron microscope (JEOL model JEM 100 C X II)에서 관찰하였다.

#### 나. 생리 생화학적 특성

##### 1) 온도 및 염농도에 따른 성장특성

Heart infusion agar (Difco)에 균을 접종하여 4 °C, 35 °C, 40 °C에서 배양한후 성장 유무를 관찰하였다. 염농도에 따른 성장은 Heart infusion agar (Difco)에 sodium chloride를 최종농도가 0, 3, 6, 8, 10 %가 되게 첨가한 후에 균을 접종하고 18 °C에서 5일간 배양한후 성장을 관찰하였다.

## 2) 당 이용능

여러가지의 당을 유일한 탄소원으로로서 이용하는지의 여부를 실험하였다. 사용된 당의 종류는 D-fructose, sucrose, D(+)-xylose, L(+)-arabinose,  $\alpha$ -L-rhamnose, myo-inositol, mannitol, dulcitol, D(+)-mannose, D(+)-raffinose, lactose, maltose, galactose, salicin, adonitol, inulin, sobitol, trehalos 등이며 당을 포함하지 않은 기본배지 (ammonium sulfate 1 g, potassium phosphate (dibasic) 7 g, potassium phosphate (monobasic) 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, agar 20 g, aged sea water 75 %, pH 7.4) 에 10 %의 당 용액을 여과 멸균하여 최종 농도가 1 % 되도록 첨가하였다. 당을 첨가하지 않은 것을 음성 대조군으로 하여 결과를 비교하였다.

## 3) 아미노산 이용능

유일한 질소원으로로서 아미노산을 이용할 수 있는지의 여부를 검사하였다. 사용된 아미노산의 종류는 L-tyrosine, L-serine, L-alanine, L-histidine HCl, DL-cystein free base, L-valine, L-phenylalanine, Hydroxyl-L-proline, L-leucine, L-isoleucine, L-threonine, L-methionine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-glutamic acid, L-glutamine, glycine, L-arginine, L-lysine HCl, L-tryptophan, L-arginine HCl, L-proline 등이며 기본배지 (glucose 10 g, potassium phosphate (dibasic) 7 g, potassium phosphate (monobasic) 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, agar 20 g, aged sea water 75 %, pH 7.4) 에 121 °C에서 3 분간 멸균한 1 % 의 아미노산 용액을 최종농도가 0.1 % 되도록 첨가하여 아미노산이 포함되어 있지 않은 것을 대조군으로하여 결과를

관찰하였다.

#### 4) Respiratory-enzyme 실험

1. Oxidase test : Heart infusion agar에서 배양한 균체를 filter paper (Whatman no.1)에 올려놓고, Kovacs reagent (1 % tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)와 1 %  $\alpha$ -Naphthol (in ethanol)을 각각 1 - 2 방울을 가한다. 그후 균체가 어두운 보라색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

2. Catalase test : Heart infusion agar에서 배양한 균체를 filter paper (Whatman no. 1)에 올려놓고, 3 % hydrogen peroxide를 1 - 2 방울 떨어뜨려 거품이 생기는 것을 양성으로 판정하였다.

#### 5) 질소함유 기질의 대사 실험

1. Nitrate 환원능 : Nitrate broth (Difco)에 agar를 2 % 되게 넣고, 균을 접종한 다음 Griess-Ilosvay reagent를 1 - 2 방울 가한후, 붉은색으로 변하는 것을 양성반응으로 하였다.

2. Urea 가수분해능 실험 : 기초배지 (glucose 1 g, casein-peptone 1 g, disodium hydroxy phosphate 1.98 g, potassium phosphate(monobasic) 1.51 g, magnesium sulfate 0.5 g, phenol red 0.012 g, pH 9.0, distilled water 900ml)에 urea 용액 (urea 20 g, distilled water 100ml)을 여과멸균하여 첨가하였다. Agar slant상에서 균을 접종하고 37 C에서 7 일간 배양한 후 배지의 색깔이 적색으로 변하면 양성반응으로 하였다.

3. Indole 생성능 실험 : Tryptophan (BBL)을 deionized water에 1 % 되게 만든 다음, 여과 멸균한다. 균을 접종한후 18 °C 에서 5 일간 배양한후 Kovacs reagent를 5 방울 첨가한후 빨간색으로 변한것을 양성으로 판

정한다.

4. Decarboxylase-Dehydroxylase에 의한 분해능 실험 : Thornley Semisolid Arginine Medium (peptone 1.0 g, NaCl 5.0 g, dipotassium hydrogen phosphate 0.3 g, phenol red 0.01 g, agar 0.3 %, pH 7.2, aged sea water 75%)에 L-arginine.HCl, L-lysine.2HCl, L-ornithine dihydrochloride를 최종농도가 1 % 되게 넣고 121 °C 에서 10분간 멸균한다. 균을 접종한후 18 °C에서 7 일간 배양한후, 음성대조균으로 3 가지 amino acid를 넣지않은것과 비교하여 배지가 노란색으로 변하는것을 양성으로 판단하였다.

#### 6) 유황 대사 실험

Hydogen sulfide 생성능 : Tryple sugar iron agar (Difco) 에서 실시하였고, 균체를 배지에 접종한 후 18 °C 에서 5 일간 배양시킨후 배지색이 검게 변하는것을 양성으로 판단하였다.

#### 7) 당 대사 실험

1. Oxidation-Fermentation 생성능 : OF basal medium (Difco)를 사용하여 glucose의 최종농도가 1 % 되게 첨가한다. 균체를 접종한 후에 멸균된 liquid praffin을 test tube에 1 - 2 ml 첨가하여 배지가 공기중에 노출이 되지 않게하고, 다른 하나는 liquid praffin을 덮지않고 균을 접종한다.

음성대조균으로 glucose를 넣지않은 배지를 위에서 열거한 방법과 동일하게 처리한다. Liquid praffin을 덮은것과 덮지않은 것이 모두 노란색으로 변하면 fermentation으로 판독하고, 덮지않은 것만 노란색으로 변하면 oxidation으로 판독하였다.

2. Methyl red : MR-VP broth (Difco)에 균을 접종한후 18 °C에서 5일

간 배양하였다. 그런 다음 methy red를 2 - 3 방울 떨어뜨려 배지가 빨간색으로 변하는것을 양성으로 판독한다.

3. Voges-Proskauer 실험 : MR-VP broth (Difuco)에 균을 접종한 다음, 18 °C에서 5 일간 배양한다. Varrits VP reagent를 사용하여 2 - 3 방울 떨어뜨린후 배지가 붉은색으로 변하는 것을 양성으로 판독하였다.

4. ONPG(o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)실험 : 0.85 % NaCl 0.2 ml에 균을 접종하고 ONPG filter paper disk (Difco)를 넣는다. 37 °C에서 20분간 활성시킨후, 관찰하여 용액이 노란색으로 변한 것을 양성으로 판정한다.

6. Aesculin 가수분해능 : Bile aesculin medium (Difco)를 사용하여 균체를 접종한후 18 °C에서 5일간 배양하여 배지가 검은색으로 변하는것을 양성으로 판정하였다.

#### 8) Gas 생성능

Phenol red broth base (Difco)에 최종농도가 1 % 되게 glucose, arabinose, mannitol, xylose등을 첨가하고 공기가 들어가지 않게 durham tube를 넣고 121 °C 에서 10분간 멸균한 다음, 균을 접종하였다. 18 °C 에서 5일간 배양한 다음 durham tube에 공기가 찬것을 양성으로 판정하였다.

#### 9) MacConkey 배지 성장실험

MacConkey agar (Difco)를 사용하여 균을 접종한후 18 °C에서 5 일간 배양하여 성장유무를 관찰하였다.

#### 10) Salicin 발효실험

OF basal medium(Difco)을 사용하여 최종농도가 1% 되게 salicin을 첨가한다. liquid paraffin을 균접종후 1-2 ml 분주한후 18 °C에서 5일간 배양한후 배지색이 노란색으로 변하는것을 양성으로 판정하였다.

#### 11) 유기산 발생능

OF basal 배지에 glucose, fructose, sorbitol, arabinose, maltose, galactose, sucrose, cellobinose, mannitol, lactose, p-hydroxybenzoate, gorguncate, lactate 들을 최종농도가 1 % 되게 넣어준 후 균을 접종하여 18 °C에서 5 일간 배양한후 배지색이 노란색으로 되는것을 양성으로 판정하였다.

#### 12) 분해능

1. DNA 분해능 : DNase test agar (Difco)를 사용하여 균을 접종한후 Toluidine blue를 균체가 자란 부분에 떨어뜨려 배지주위가 맑아진것을 양성으로 판정하였다.

2. Lipid 분해능 : Egg yolk enrichment 50 % (Difco) 배지에 균을 접종하여 18 °C 에서 5 일간 배양하여 균체주위 배지가 불투명하게 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

3. Xanthine, starch, gelatin, casein등의 분해능 : 각기질들은 complex medium에 첨가 하였고 gelatin은 agar 대신에 12 % 농도가 되도록 첨가 하였다. Xanthin과 casein은 최종농도가 1 %가 되도록 첨가 하였고 starch는 0.2 %가 되도록 첨가하였다. 37 °C 에서 7 일간 배양한후 gelatin은 저온에서 방치하여 기울여 보았을때 응고되지 않은것을 양성반응으로 하였고 Xanthin과 casein은 균체주위에 투명지대가 형성된 것을 양성반응으로 하였다. Starch는 iodine용액을 떨어뜨린 후 투명지대가 형성되

는 것을 양성반응으로 하였다.

### 13) 성장억제제에 대한 특성

Phenol, potassium tellurite, sodium azide, crystal violet에 대한 성장특성을 관찰 하였다. Complex Medium에 phenol 0.1 %, sodium azide 0.01 %, crystal violet 과 potassium tellurite는 0.0001 %로 각 첨가하여 실험하였다.

### 14) 항생제 내성

Penicillin G, ampicillic, nalidixic acid, methicillin, amoxicillin, cyclohexamide, streptomycin sulfate, spectinomycin, novobiocin, neomycin, gentamicin, kanamycin, polymyxin B, sulfadimethoxine, bacitracin등의 항생제에 대한 저항성을 관찰 하였다. Complex medium에 위의 각 항생제들을 10 mg/ml, 100 mg/ml, 1000 mg/ml 의 농도가 되도록 첨가하고 18 C에서 7 일간 배양한 후 결과를 관찰하였다.

## 다. 세포내 지표 성분 분석

### 1) Sugar 분석

Cap tube에 건조균체 약 0.5 g 을 넣고 2 ml의 2 N 황산을 넣은 다음 밀봉하고 100 °C 에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 centrifuge tube에 옮긴다음 포화된 barium hydroxide 용액을 이용하여 pH가 5.0 - 5.5가 되도록 조정하였다. 6000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액은 Vacuum evaporator로 80 °C 에서 감압건조 하였다. 여기에 0.5 ml의 증류수를 넣어 녹인 다음 cellulose F254s HPTLC plate (Merck 15036) 에 점적



하였다. 전개방법은 ethyl acetate-pyridine-water (100:35:25) 용액으로 밤새 전개한 후 건조하고 발색시켰다. 당의 발색은 aniline-phthalate 시약 (aniline 2ml, phthalic acid 3.3g, water saturated butanol 100ml) 을 분무한 후 건조하고 100 °C 에서 5분간 가열하였다. 당의 판정은 각 1 % 용액으로 만든 표준당과의 전개거리와 발색된 색을 비교하여 나타내었다.

### 2) Mycolic acid 분석

0.5 g의 젖은 균체에 10ml의 10% KOH-Methanol 용액을 넣고 100 C에서 2 시간 동안 반응 시킨후 6 N HCl로 pH가 2 이하가 되도록 조정하였다. 10 ml의 hexane을 넣어 혼합한후 분리된 hexane층을 nitrogen gas로 건조하였다. 여기서 3 ml의 benzene-methanol-sulphuric acid (10:20:1) 용액을 넣고 100 °C 에서 3 시간 동안 반응 시킨후 1 ml의 water와 4 ml의 hexane을 넣고 혼합하였다. Hexane층을 분리 농축하여 silica gel TLC판에 점적한 후 hexane-diethyl ether(4:1)의 전개용매로 전개하였다. Mycolic acid의 검출은 50% sulphuric acid를 분무한 후 150 C에서 5 분간 가열하여 관찰하였다.

### 3) Isoprenoid quinones 분석

2 g의 균체에 cold acetone을 넣고 homogenasion 한후에 ultrasonification을 1 - 2 분간 행한다. 원심분리한후 여과하여 nitrogen gas로 용매를 제거한 후 silica gel TLC 판에 점적한후 전개용매로 benzene을 사용하여 전개하였다. Ubiquinone과 menaquinone동정은 Vitamin K 표준시료와 전개거리로 확인하였다.

#### 제 4 절. EPA 함유 여부 검색

##### 1) Fatty Acid Methyl Ester의 제조

n-Hexane, Acetyl chloride, chloroform, methanol, ethanol, diethylether, BHT (Butyl hydroxy toluene) 등은 Merck 사의 제품을 사용했으며 fatty acid 들과 fatty acid methyl ester 표준 시료는 Sigma Chemical Co. 의 제품을 사용하였다. Bactopeptone, bactotryptone, yeast extract, tryptose, heart infusion broth 등은 Difco 제품을 사용하였고 여타 시약은 일급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용한 모든 용매에는 지방산 조성 분석을 위한 특별한 경우를 제외하고는 항 산화제로서 50 - 100 mg/l 의 BHT 를 첨가하였으며 지방산의 methylation 에 사용된 methanolic HCl 의 제조는 acetyl chloride 30 ml을 4 °C 로 식힌 메틸알콜 300 ml에 천천히 부으면서 섞어 아래 반응식에 의해 형성된 HCl이 메틸알콜에 용해된 용액을 제조하였다.

PYM-G 고체 배지에서 2 일간 배양한 균체를 접종용 loop를 사용하여 약 50 mg 가량 취하여 Eppendorf tube (2.2 ml) 에 들어 있는 0.3 ml 의 methanolic HCl 에 옮긴 후 5 초간 Vortex로 흔들어 현탁 시킨다. 현탁된 시료를 55 °C 항온조에서 2 시간 동안 반응시켜 methylation 을 완결한 후 0.4 ml 의 5 % NaCl 용액과 1.5 ml 의 n-hexane 을 가한 후 30 초간 Vortex 로 흔들어 형성된 fatty acid methyl ester 를 n-hexane 층으로 추출한다. 깨끗한 층 분리를 위하여 약 1 분간 15,000 rpm 에서 원심분리한 후 n-hexane 층을 pasteur pipet 을 사용하여 새로운 1.5 ml 들이 Eppendorf tube 로 옮긴 후 이를 40 °C 에서 Heto 사의 Speed-Vac 과 aspirator를 사용하여 시료 부피를 약 0.1 ml 로 감압 농축시킨다.

## 2) Thin Layer Chromatography

농축된 n-hexane 추출액 내의 EPA 검색을 일차로 박막 크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography, TLC) 를 사용하여 수행하였다. 사용된 박막은 Merck 제품인 silica gel 60 F254 를 사용하여 약 10 ul 의 시료를 가하여 n-hexane 과 diethylether 의 9:1 혼합 액을 전개 용매로 사용하여 전개시켰다. 결과 검색은 전개 종료 후 박막 판을 말린 후 요오드 ( $I_2$ ) 증기에 의한 지질의 착색법에 의한 검출하였다. 이 경우는 밀폐된 유리 상자 안에 요오드 몇 조각을 넣어 방치하여 요오드 증기로 포화 시킨 후 전개 종료 후 말린 박막판을 넣고 방치하여 요오드가 지질에 짙은 갈색으로 착색되는 반점을 관찰하였다.

## 3) Gas Chromatography

TLC 를 사용한 일차 검색의 결과 EPA methyl ester 에 해당되는 위치에 전개 반점이 나타난 100 여 종의 시료를 대상으로 Gas chromatography 를 사용하여 EPA 함유 여부를 확인 하였다. EPA이외의 여타 고도불포화 지방산들도 본 TLC조건하에서는 동일 위치에 반점이 나타나므로 Hewlett-Packard gas chromatography (model HP5890) 와 Hewlett-Packard integrator (HP3396) 를 사용했고 Omegawax 320 capillary column 을 사용하여 240 °C 에서 분리하였고 Flame Ionization Detector로 검출하였고 carrier gas로는 헬륨 또는 고순도 질소를 사용하였다.

### chromatography conditions

column head pressure :10 psi

split ratio: 50:1

column temperature: 240 °C (isothermal mode)

injector temperature : 250 °C

detector temperature : 260 °C

## 제 5 절. 인지질 및 지방산 조성 분석

### 1) 인지질 조성의 분석

EPA 생산 균주들의 생리학적 특성을 알기위하여 우선 인지질 조성과 지방산 조성을 검사 하였다. Heart infusion 액체 배지에서 24 시간 배양한 균체를 원심분리하여 수확한후 약 10 g 가량 취하여 무게를 달고 lyophilizer vial에 옮긴후 동결 건조하여 건조 중량을 측정하고 나서 (대략 15 % 정도의 건조 중량이 얻어짐) 20 ml 의 Folch solution (Chloroform:Methanol = 2:1 mixture)을 가한후 약 1 분간 sonication 하여 지방 성분을 추출하고 4 °C 에서 15,000 rpm 에서 3 분간 원심분리하여 침전을 제거한다. 이 침전에 다시 20 ml 의 Folch solution을 가하여 2 차 추출한후 지방 성분이 녹아있는 유기용매층을 새로운 비이커에 옮긴후 10 ml의 0.9 % KCl 용액을 가하여 separatory funnel에서 흔들어 수용성분을 역추출하고 지방 성분이 녹아있는 Folch solution 층을 pasteur pipet 을 사용하여 무게를 달아둔 250 ml 둥근 flask로 옮긴 후 이를 40 °C 에서 rotary evaporator를 사용하여 사용한 용매를 모두 날린후 다시 무게를 측정하여 지방 성분의 전체 무게를 구한뒤 약 10 ml의 Chloroform을 가하여 용해시킨다. 이 지방용액을 미리 Chloroform에 충전 시켜둔 silica column (1 cm X 5 cm)에 가한후 1 ml/분 의 속도로 우선 10 배의 column volumn의 Chloroform으로 simple lipid를 elution 시키고 다시 40 배의 column volumn의 acetone으로 glycolipid를 분리하였다. 그리고 끝으로 10 배의 column volumn의 methanol로 phospholipid를 분리하여 각분리액을 미리 무

계를 달아둔 100 ml 둥근 flask로 옮긴 후 이를 40 °C 에서 rotary evaporator를 사용하여 사용한 용매를 모두 날린후 다시 무게를 측정하여 각지방 성분의 무게를 구한뒤 약 10 ml의 Chloroform을 가하여 용해시킨다. 이 시료를 TLC를 사용하여 전개시켜 chloroform:methanol:중류수 = 65:25:5의 전개 용매를 써서 각지질성분을 분리한후 각 발색반응을 통하여 순도를 확인하였다. Phospholipid의 경우 해당 반점을 긁어내어 methanol에 용해시켜 phosphorous 발색 반응을 사용하여 정량하였다.

이외에도 지질의 추출을 Bligh과 Dyer의 변형된 방법에 따라 분리하였고, 각 인지질 구성 성분은 TLC를 사용하여 분리시킨 후 표준시료와의 전개 거리를 비교하고 여러가지 염색방법에 의한 염색상태에 따라 동정하였다.

먼저 100 mg의 건조균체를 같은 다음 0.3 % saline 2 ml 를 넣은 다음 methanol 20 ml을 넣고 잘 섞은 다음 100 °C 에서 5 분간 방치하였다. 식힌후, 10 ml chloroform과 6 ml saline을 넣고 2 - 3 시간 shaking한 후, Whatman no. 1 paper로 여과한 다음 여과액에 chloroform과 saline을 각각 10 ml 씩 넣고 두층으로 분리하였다. 아래층을 회수하여 nitrogen gas 하에서 건조시킨 다음 silica gel TLC plate (Merck 5735)에 점적 하였다.

#### 사용된 전개용매

1. chloroform-methanol-water (65:25:4)
2. chloroform-acetic acid-methanol-water (80:18:12:5)
3. chloroform-methanol-7N ammonia (65:30:4)
4. chloroform-methanol-acetic acid-water (170:25:25:6)

Phospholipid의 분석: phosphorus 발색반응은 Dittmer reagent (Dittmer, 1964)를 사용하여 푸른색 반점을 검색하였다.

Dittmer reagent

Solution I: Ammonium molybdate reagent

4.4 g Ammonium molybdate in 500 ml 증류수  
14 ml of conc-sulfuric acid.

Solution II: Reducing reagent,

2.5 g sodium bisulfate, 0.5 g sodium sulfite,  
42 mg ANS (1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid)  
in 250 ml distilled water,  
then filtered into brown bottle.

solution I 과 solutionII 를 1:1 로 섞어 증류수로 2 배 희석하여 사용한다.

Glycolipid 의 분석: Glycolipid 의 분석은 cell wall의 당 분석과 마찬가지로 TLC 전개후  $\alpha$ -Naphthol solution (10.5 ml of 15 % (w/v)  $\alpha$ -Naphthol ethanol solution, 6.5 ml of conc sulfuric acid, 40.5 ml of ethanol, 4 ml of water) 을 분사하고 95% sulphuric acid를 분사하여 푸른 색 반점이 나타나는 것을 검색하거나 anilin phthalate solution (3.25 g of phthalic acid dissolved in 100 ml of water saturated buthanol and 2 ml of aniline)을 사용하였다. 후자의 경우는 6 탄당은 갈색으로 5 탄당은 붉은 보라색으로 나타난다.

Aminolipid의 분석: phosphatidyl ethanolamine 이나 phosphatidyl serine등과 같은 amino group을 갖고 있는 lipid의 분석에는 Ninhydrin 발색 반응을 사용하였다.

## 2) 지방산 조성 분석:

추출된 각지방 성분을 methanolic HCl 을 이용하여 methyl ester 형태

로 전환 시킨뒤 GC를 사용하여 Ultra-1 column 또는 Omegawax 320 column을 사용하여 195 °C 에서 분석하였고 Gas chromatogram 에서 각 peak 는 ECL (Equivalence Chain Length) 값을 구하여 해당되는 fatty acid로 동정하였다.

#### Equivalent Chain Length (ECL)의 결정

Fatty acid의 동정을 ECL 값을 그 retention time 으로 부터 구하는 것은 한종류의 column을 사용하고 동일 조건에서 분석할때 가능한 것으로 여러개의 이중결합들을 갖고 있는 지방산의 분석에 유용한 방법이다. ECL 계산을 위한 표준 물질로는 tetradecanoic acid methyl ester (C14:0)와 hexadecanoic acid methyl ester (C16:0) 을 사용하였다. 그 계산식은 아래와 같다.

$$ECL = 14 + 2 \times \frac{\log(Rt_x - Rt_s) - \log(Rt_{14} - Rt_s)}{\log(Rt_{16} - Rt_s) - \log(Rt_{14} - Rt_s)}$$

$Rt_x$  : Retention time of unknown peak

$Rt_s$  : Retention time of solvent

$Rt_{16}$  : Retention time of hexadecanoic acid methyl ester

$Rt_{14}$  : Retention time of tetradecanoic acid methyl ester

#### 제 6 절. EPA 생산 최적조건의 확립

EPA 생산 최적조건은 배양 온도, 해수의 필요성 및 농도 의존성 여부, 염도 및 무기 염류의 영향, 산소의 공급량, 배지의 초기 및 전과정 pH, 기종의 알려진 배지 종류 및 배지 조성, EPA 생산의 전구체 이용능력 등을 조사하였다. 한국 발효기의 5 l 들이 Jar Fermentor (working volume 2.5 l)

를 사용하였고 진탕 flask를 병행하여 사용하였다. 진탕 flask에는 진탕을 통한 공기의 공급을 원활히하기 위해서 사면을 따라 4 개의 홈을 파서 회전에 따라 배지가 따라서 단순 회전하지 않고 부서져서 공기의 공급을 원활하게 하였다. 또한 균체 증가 과정과 EPA 증가 과정을 분리하여 우선 성장 최적 온도에서 배양하여 균체의 양을 증가 시킨 후 EPA 생산 최적 온도로 전환 시켜 EPA 를 배양량당 최대로 수확하는 방법도 사용하였다. 폐자원의 활용의 측면에서 가정 및 업소에서 다량으로 나오는 폐식용유를 EPA 생산의 원료로 사용하는 방법도 검토 되었다.

균체의 양은 600 nm에서 absorbance를 측정하여 이를 수확한 wet cell mass와 보정하여 사용하였고 이 경우 600nm 에서 absorbance 1 에 해당하는 cell 의 양은 대략 liter당 0.3 g 정도였다. 또한 EPA의 양은 추출 가능한 total fatty acid 대비 함량으로 표시하였다.

EPA 생산의 생리 과정을 추적하기 위하여 Omegawax 320 capillary column을 사용하여 190 °C 에서 #1513등 EPA생산 균주들의 fatty acid composition을 분석해보면 몇가지 흥미있는 현상이 발견된다. 즉 배양초기에는 EPA함량이 매우 적다가 배양시간이 경과 할수록 약 18 시간 까지 증가하는 데 EPA의 전구체로 여겨지는 물질들의 함량도 EPA와 비슷한 연계를 가지고 변화하고 있음을 볼수 있다. 저온에서는 일반적으로 효소의 활성도가 약해지므로 저온에서 성장한 균주의 경우 EPA의 전구체로 작용하는 물질들이 검출될 가능성이 높아진다.

우선  $\Delta 6$ -desaturase activity를 측정하기 위해서는 1.5 ml의 phosphate buffer (pH 7.4, 0.25 M sucrose, 0.15 M KCl, 40mM NaF, 0.7 mM N-acetylcystein)에 ATP (1.3 mM), NADH (0.8 mM), Coenzyme A (0.06 mM), NAD (0.3 mM),  $MgCl_2$  (5 mM)을 각각 가하고 0.1 mM linolenic acid (C18:3 n-3)와 EPA생산 균주의 crude extract 0.1 ml 를 가하여 25 °C에서 30 분간



흔들면서 배양하여 반응을 진행한후 2 ml 의 10 % methanolic KOH를 사용하여 반응을 정지시키고 지방산을 saponification한후 10 N HCl으로 pH를 낮추어 n-hexane 으로 추출하였다. 추출된 시료를 speed-vac 으로 농축시킨 뒤 methy ester 형태로 전환시켜 gas chromatography를 사용하여 C18:4(n-3) 이 형성되었는지를 확인하였다.  $\Delta$ 5-desaturase activity 확인에서는 C20:4(n-3) 를 사용하여야 하나 이 시약이 판매되고 있지 않을 뿐더러 제조하기도 어려워 그대신으로 C20:3(n-6)를 사용하고 product로 C20:4(n-6)가 형성되는 것을 관찰 하였다. 이외의 buffer조성은  $\Delta$ 6-desaturase activity 의 경우와 동일 하였다.

## 제 7 절. EPA 생산 균주로 부터 DNA 분리

### 1) Plasmid DNA 분리

배양된 균체 약 30 mg정도를 1.5 ml eppendorf tube 에 넣고 100  $\mu$ l lysis buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 가하여 현탁한 후 10  $\mu$ l Lysozyme 용액 (50 mg/ml)을 가하여 실온에서 5 분간 방치한 후 0.2 ml의 SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 (1 % SDS, 0.2 N NaOH) 를 가하여 섞어 준 후 얼음에서 5 분간 방치하여 cell membrane을 용해시킨다음 150  $\mu$ l 의 potasium acetate 용액을 가하여 SDS를 침전 시키고 4 C 에서 5 분간 원심 분리하여 SDS와 cell debris 를 제거한다. 상층액을 취하여 phenol:chloroform =1:1 solution으로 추출하여 단백질등을 제거한후 원심 분리하여 층을 나누고 다시 상층액만을 취하여 2 배 부피의 absolute ethanol 을 가하여 plasmid DNA를 침전시킨다. 4 °C 에서 10 분간 원심 분리하여 DNA를 얻은후 70 % Ethanol로 씻어 준후 50  $\mu$ l 의 Tris

buffer 로 녹인다. Bromophenol blue 와 xylene cyanol FF 가 포함된 loading solution (50 % glycerol) 2  $\mu$ l 를 DNA 시료 10  $\mu$ l 에 가한후 0.7 % agarose gel 에 loading 하고 100 volt 에서 약 30 분간 전개한다. 전개가 완료된 gel plate 를 ethidium bromide 용액에 담가 염색시킨 후 자외선등 아래서 DNA band 를 관찰하였다. 이단계에서는 DNA 이외에 다량의 RNA 가 포함되어 있으므로 DNase free RNase 를 처리하여 RNA 를 분해한뒤 다시 Phenol extraction 과 Ethanol precipitation step 을 거쳐 chromosomal DNA 를 정제한다.

## 2). Chomosomal DNA 분리:

25  $^{\circ}$ C 에서 배양되어 plasmid DNA 가 자연적으로 제거된 균체 약 20 mg 정도를 1.5 ml eppendorf tube 에 넣고 15  $\mu$ l lysozyme 용액 (2 mg/ml in 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) 를 가하여 잘 현탁한 후 37  $^{\circ}$ C 에서 cell lysis 가 관찰될 때까지 10 분에서 20 분간 방치한다. Dry-ice/ethanol bath 에서 급히 얼린후 여기에 다시 125  $\mu$ l 의 SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 (1 % SDS, 0.1 N NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0) 을 가하여 천천히 녹인다. 다시 150  $\mu$ l 의 Tris buffer 에 충만된 Phenol 을 가하고 잘 섞어준 다음 4  $^{\circ}$ C 에서 3 분간 원심 분리하여 층을 나누고 DNA 가 포함된 상층액을 취하여 300  $\mu$ l 의 95 % ethanol 을 가한후 잘 섞어서 -70  $^{\circ}$ C 에서 30 분간 방치하여 DNA 를 침전시킨다. 다시 4  $^{\circ}$ C 에서 3 분간 원심 분리하여 DNA pellet 을 얻은뒤 70 % Ethanol 로 씻어 준후 DNA pellet 을 0.1 ml 의 0.1 X SSC buffer 에 녹인후 20 X SSC buffer 를 5  $\mu$ l 가하여 buffer strength 를 조절하고 여기에 4  $\mu$ l 의 DNase free RNase (2 mg/ml) 를 가하여 37  $^{\circ}$ C 에서 30 분간 처리한뒤 phenol extraction 하여 단백질을 제거한후 원심 분리하여 층을 나누고 다시 상층액만을 취하여 2 배 부피의 absolute

ethanol 을 가하여 DNA를 침전시킨다. 4 °C 에서 10 분간 원심 분리하여 DNA를 얻은후 70 % Ethanol로 씻어 준후 50  $\mu$ l 의 Tris buffer 로 녹인다. 전기영동과 염색은 plasmid DNA 와 동일하게 수행하였다.

## 제 3 장. 연구 결과

### 제 1 절. 균주 분리 및 보존

시료채취는 8 개 지역에서 일년 반에 걸쳐 고등어, 멸치, 청어 등 푸른 생선과 도미, 넙치 등 일반 어류, 또 해삼, 멧게, 조개 등 저서동물, 파래, 미역, 다시마 등 해조류의 해양 식물 등 시료 100여개를 채취하여 3300여종의 균주를 분리, 순수 배양하여 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C 상태로 보존하여 EPA 생산성 검색에 이용하였다. 이렇게 분리된 균주들은 본 연구실에서 수행하고 있는 또다른 연구 과제인 “생리 활성 선도 물질 탐색에 관한 연구 (PN00219)”에 균주를 제공하여 항 virus, 항암제 등의 원료 물질 탐색에 이용되고 있다.

### 제 2 절. EPA 다량 생산 균주의 발견 및 확보

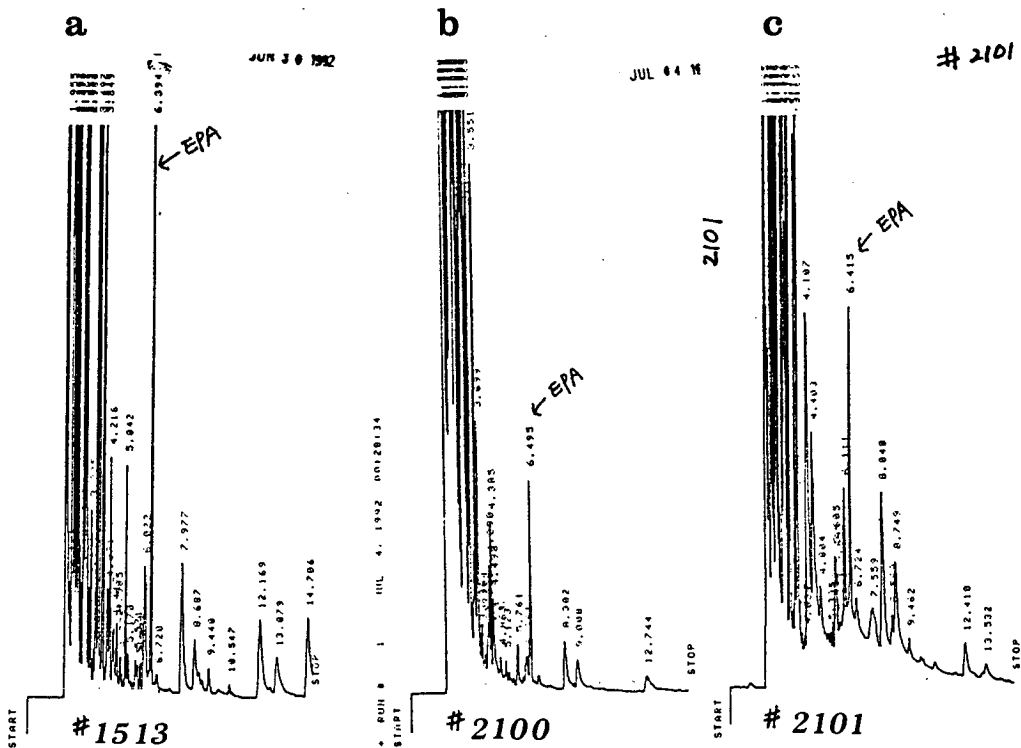
Gas chromatography 에 의해 #1513, #2100, #2101 등 20 개 균주를 EPA 다량 생산 균주로 확인하였다 (Table 1, Figure 1). 구조 확인에 관하여서는 EPA (eicosapentaenoic acid) 가 신규 활성 물질이 아니라 이미 그 구조와 약리 작용이 잘 알려져 있는 상태이므로 본 연구에서 미생물로부터 분리된 물질이 EPA 인지를 동정하였는데 확인은 여러가지 조건에서의 Thin layer chromatography 와 gas chromatography에서 Retention time 및 Equivalent chain length (ECL) 값이 표준 EPA 완전히 동일할 뿐 아니라 이중결합을 완전히 환원 시켰을때 eicosanoic acid (C20:0)으로 전환됨으로부터 본 화합물이 EPA임을 확인하였다.

Table 1. 해양동물 장내 서식세균 분리 현황 및 EPA 생산균주 탐색결과

날 짜	장 소	시 료	분리균주수	EPA +
90. 3.	남극기지	sediment sea weater 유류분해균주	71	ND
91. 9.	노량진 수산시장	콩치. 삼치. 청어. 고등어. 아지. 삼치.	272	1
91. 9.	군산수협	갈치. 몰치. 몽어. 준치. 새와. 소라. 뒤피리. 도다리. 망등어. 병어	103	ND
91. 9.	서포어구	민어. 도다리. 홍합. 전어. 살게. 가자미. 뽕라기. 조기. 새우. 까만칼대기. 전어. 까대기. 오돌이. 볼록게. 노래미. 우럭.	167	ND
91.10.	거문도	sea weed	29	ND
91.11.	인 천	sediment	19	ND
91.10.	괘	해삼. sea weed. sediment. sand soil.	143	ND
92. 2.	서 포	떡조개. 노래미. 게. 낙지. 우럭조개. 칼대기. 맛조개. 문저리. 도다리. 해삼. 바지락.	289	1

92. 2.	목완	포도	갯벌. 세발낙지. 김. 아나고. 미역. 멍게. 멍게채액. 피조개. 돋. 널래미. 송어. 해삼. 소라.	267	ND
92. 2.	강릉	룽	양미리. 멍게. 전복. 가시고기. 해파리. 도루묵. 청어. 아구. 열갱이. 해삼. 성게. 미더덕. 물곰새끼. 이면수. 친주조개. 등가시. 가리비.	590	2
92. 4.	주문진		청어. 양미리. 아지. 가리비. 병어. 물곰.	240	9
92. 6.	주문진		청어. 정어리. 멸치. 가리비.	240	1
92. 7.	주문진		오징어. 멍게. 멸치. 정어리. 아구. 파래. 고등어. 조개. 양태. 쥐취어. 다시마. 김.	311	2
92. 8.	주문진		해삼. 가자미. 양태. 가리비. 멍게. 아구. 오징어. 양미리. 멍어리.	139	3
92. 10.	주문진		메가리. 넓치. 아구. 양미리. 고등어. 쥐취어.	102	ND
92. 12.	주문진		고등어. 메가리.	144	ND
	총	계		3126	19

Figure 1. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c) at the time of isolation (Omegawax 320 column at 240 °C). Compare with Figure 23.

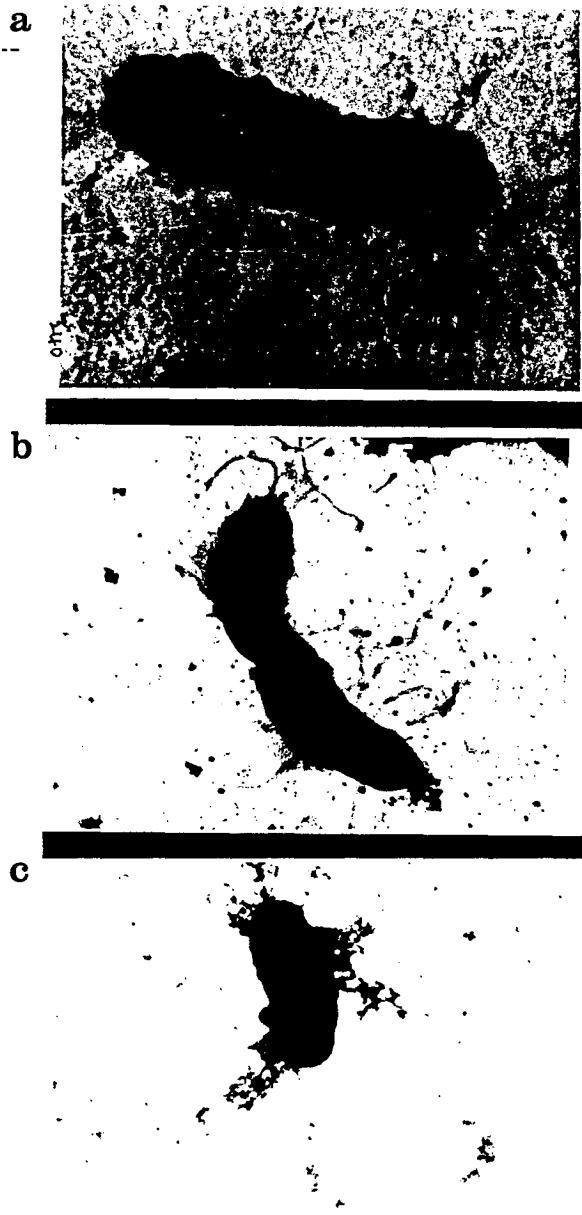


### 제 3 절. EPA 고 생산 균주의 동정 및 특성

EPA 고 생산 균주로 밝혀진 B1513MA, B2100FI, B2101FI 등 3 균주의 동정을 위하여 그 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. Table 2 에서 Gram 염색에서 음성이었고, 운동성을 갖고 있었으며, 형태학적 특성은 Rod form으로, 당의 이용 능력등 70 여 종의 생화학적 시험 결과 3 종 모두 *Vibrionaceae* family 에 속함을 알수 있었고 Vibriostat 시약인 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) 검사 결과 음성으로 확인되어 *Vibrionaceae* family 의 4 종류의 속 (genera)중 이 반응에 양성인 *Vibrio* 속과 *Plesiomonas* 속이 아님을 확인하였다. 남아있는 2 속중 *Photobacterium* 속은 생체 발광 (Bioluminescence)의 특징을 갖고 있어 발광 현상을 보이지 않는 본균주들은 *Aeromonas* 속임을 짐작하게 하는데 실제로 oxidation/fermentation test, oxidase, catalase test, aesculin 가수분해, ornithine decarboxylase 양성, lysine decarboxylase 양성, cystein 배지에서 hydrogen sulfide gas 형성등 *Aeromonas* Geneous 특유의 성질을 확인 하였다. 특히 *Aeromonas* 속 특유의 성격인 DNA의 [G+C](%)에서 약 57 % 의 [G+C](%) 값을 보임으로써 50 % 미만인 여타 species와 다른 *Aeromonas* 속임을 알수 있었다. [G+C](%) 값 결정에는 chromosomal DNA를 분리하여 온도 변화에 따른 denaturation에 따른 흡광도 변화를 관찰 하였으며 비교를 위한 대조 균주로는 *E. coli*, *Bacillus subtilis*, 일본에서 공여 받은 *Schewanella putrefaciens* SCRC-2738, 그리고 *Aeromonas hydrophilla* 등을 사용하였다. 전자 현미경으로 확인한 결과 3 균주 모두 peritrichous 형태의 flagella를 갖고 있다 (Fig. 2).



Figure 2. Electron Microscopic Photographs of EPA Producing Bacteria #1513 (a), #2100 (b), #2101 (c).



이들 균주의 carbohydrate 이용 능력과 amino산 이용능력은 Table 3 과 Table 4 에 명시하였다. 또한 항생제에 대한 저항성을 Table 5에 명시 하였는데 #1513의 경우 streptomycin 과 kanamycin에 대하여 비교적 높은 저항성을 보였다. 이외의 특징으로 본균주 모두 extracellular polymer를 생산 체외로 방출함이 확인되었다. 본 extracellular polymer의 성격에 관 하여서는 본 과제의 성격상 깊이있는 연구는 수행되지 않았으나 구상성분이 적어도 3 종류이상의 당으로 구상된 복합 다당류이며 amine group으로 추정 되는 basic functional group을 갖고 있었고 pH 2 이하의 수용액에 용해성을 보였다.

생체 지방의 구성 성분중 세포막에서 전자전달계의 일원으로 최근에 미 생물 동정의 주요 인자로 부각되고 있는 quinoid complex의 존재 유무에서 이들중 #1513 이 ubiquinone 과 menaquinone 을 모두 갖고 있으나 #2100 과 #2101 등은 이러한 quinonid complex를 함유하지 않는 것으로 밝혀졌다 (Figure 3).

#1513 균주와 #2100 균주의 phospholipid 및 중성 지방 조성을 Table 6 에서 보였다. 상온에서 진탕 배양한 균주의 경우 세포내 총지방의 함량은 건조 중량의 5.5 % 와 4.3 %의 함량을 보였고 phospholipid의 함량은 각각 26 % 와 29 % 정도로 Gram negative 균주들의 전형적인 조성이었다. 이들 phospholipid 내에서는 phosphatidyl ethanolamine (PE)이 가장 많은 성분으로 각각 61 % 와 50 %를 점하고 있었으며 그다음으로 많은 것이 phosphatidyl glycerol로서 19.4 % 와 20 %를 점하고 있었다. 이외에도 소량의 lysophosphatidyl ethanolamine 이 약 4 % 와 8 % 검출되었고 이외에 동정되지 않은 phospholipid가 소량 (4 % 와 7 %) 검출되었다. Lipid 구성 성분에서 본균주들의 특징중의 하나는 9 % 와 4 % 정도의glycolipid가 검출된다는 사실로 이러한 현상은 *Vibrio* 나 *Pseudomonas* 속의 균주들에서

는 보고되지 않은 현상이어서 *Aeromonas* 속으로 고도불포화 지방산을 생산하는 본균주 특유의 성격으로 생각된다. 중성 지방의 함량이 비교적 높게 나타났는데 특히 #2100의 경우 60 % 이상이 중성 지질로 밝혀졌다.

각 지방군 내에서 지방산 조성 비율을 Table 7 에 명시하였는데 최적화하지 않은 일반 배양조건 (PYM-G media 에서 상온에서의 진탕배양) 에서 전체 지방의 지방산 조성은 #1513의 경우 palmytoleic acid (16:1)이 25 %로 가장 많았고 iso-pentadecanoic acid (i-15:0)의 함량이 24 %로 그다음으로 많아 이 두종류의 fatty acid가 50 %를 차지하였다. 그다음으로 많은 것이 palmytic acid(16:0)로 15.7 % 였으며 EPA는 6.1 % 로서 다섯번째로 많은 지방산이었다. EPA는 phosphatidyl glycerol에서 전체 지방산 대비 10.9 % 로 나타나 phosphatidyl glycerol이 EPA를 가장 많이 함유하는 지방군으로 밝혀졌다. 반면에 phosphatidyl ethanolamine 은 불과 2.8 %의 EPA를 함유하고 있어 이들 지방군의 조성이 전체 EPA함량에 영향을 미침을 짐작하게하였다. 특기할 사실은 free fatty acid 군에서 EPA함량이 무려 19.7 %를 점하고 있는데 이것은 본균주내에 phospholipase A<sub>2</sub>의 존재를 시사해주고 있으며 이것은 free fatty acid 군에서 palmytoleic acid (16:1)이 50 %를 점하여 주로 phospholipid내에서 sn-2 위치의 fatty acid가 free fatty acid로 이탈되었음을 보여준다. 이러한 현상은 정도의 차이는 있지만 #2100 에서도 비슷하게 확인되었다.

Table 2. Basic characterization of EPA producing bacteria

	1513	2100	2101	<i>E. coli</i> A	<i>B. subtilis</i>	
Colony color	(Reddishbrown)					
Flagella	(Peritrichous)					
Motility	+	+	+	+	+	
Gram	-	-	-	-	+	
G+C (%)	57	56	57			
Growth at 4 °C	+	+	+	-	+	-
35 °C	-	-	-	+	-	+
Brown pigment	-	+	++			
O/129	-	-	-			
O/F	F	F	F	F	F	O
Oxidase	+	+	+	-	+	
Catalase	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-			
Indole	-	-	-	+		
Citrate	-	-	-	-	-	+
Esculin	+	+	+	-	+	
Starch/Amylase	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	+	+	+	+	+	

Table 3. Carbohydrate utilization of EPA producing bacteria

Carbohydrate	#1513	#2100	#2101	<i>E. coli</i>
L(+)-Arabinose	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+
Ducitol	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+
myo-Inositol	-	+	+	+
Inulin	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+
D(+)-Mannose	-	-	-	+
Mannitol	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+
D(+)-Raffinose	+	-	-	+
$\alpha$ -L-Rhamnose	+	-	+	+
Salicin	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D(+)-Trehalose	+	+	+	+
D(+)-Xylose	-	+	+	+

Table 4. Aminoacid utilization of EPA producing bacteria

Amino acid	#1513	#2100	#2101	<i>E. coli</i>
L-Alanine	-	+	+	+
L-Arginine HCl	-	-	-	+
L-Asparagine	-	-	-	+
L-Aspartic acid	-	+	-	+
L-Cysteine, free base	+	+	+	+
L-Glutamic acid	+	+	-	+
L-Glutamine	-	-	-	+
Glycine	-	+	-	+
L-Hystidine, HCl	-	+	-	+
Hydroxyl-L-Proline	-	+	-	+
L-Isoleucine	-	-	-	+
L-Leucine	-	-	-	+
L-Lycine, HCl	-	+	-	+
L-Methionine	-	+	+	+
L-Phenylalanine	-	-	-	+
L-Proline	-	-	-	+
L-Serine	-	-	-	+
L-Threonine	-	+	-	+
L-Tryptotane	-	-	-	+
L-Valine	-	+	-	+

Table 3. Carbohydrate utilization of EPA producing bacteria

Carbohydrate	#1513	#2100	#2101	<i>E. coli</i>
L(+)-Arabinose	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+
Ducitol	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+
myo-Inositol	-	+	+	+
Inulin	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+
D(+)-Mannose	-	-	-	+
Mannitol	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+
D(+)-Raffinose	+	-	-	+
$\alpha$ -L-Rhamnose	+	-	+	+
Salicin	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D(+)-Trehalose	+	+	+	+
D(+)-Xylose	-	+	+	+

Table 4. Aminoacid utilization of EPA producing bacteria

Amino acid	#1513	#2100	#2101	<i>E. coli</i>
L-Alanine	-	+	+	+
L-Arginine HCl	-	-	-	+
L-Asparagine	-	-	-	+
L-Aspartic acid	-	+	-	+
L-Cysteine, free base	+	+	+	+
L-Glutamic acid	+	+	-	+
L-Glutamine	-	-	-	+
Glycine	-	+	-	+
L-Hystidine, HCl	-	+	-	+
Hydroxyl-L-Proline	-	+	-	+
L-Isoleucine	-	-	-	+
L-Leucine	-	-	-	+
L-Lycine, HCl	-	+	-	+
L-Methionine	-	+	+	+
L-Phenylalanine	-	-	-	+
L-Proline	-	-	-	+
L-Serine	-	-	-	+
L-Threonine	-	+	-	+
L-Tryptotane	-	-	-	+
L-Valine	-	+	-	+



Table 5. Resistance of EPA producing bacteria to antibiotics

Antibiotic	Conc(ug/l)	#1513	#2100	#2101	<i>E. coli</i>
Ampicillin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Amoxicillin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Carbenicillin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Cephaloridine	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Kanamycin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	50	+	+	+	-
	100	+	-	-	-
Methicillin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Streptomycin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	50	+	+	-	+
	100	+	-	-	-

Table 5. continued.

Antibiotic	Conc(ug/1)	#1513	#2100	#2101	E. coli
Streptomycin sulfate	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	50	+	+	+	-
	100	+	+	+	-
Sulfornamide	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
Rifamcillin	1	+	-	+	+
	10	+	-	-	+
	100	-	-	-	-
Tetracyclin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	100	-	-	-	+
Tovomycine	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	-
	50	+	+	-	-
	100	-	-	-	+
Vancomycin	1	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	50	-	+	+	-
	100	-	-	+	-

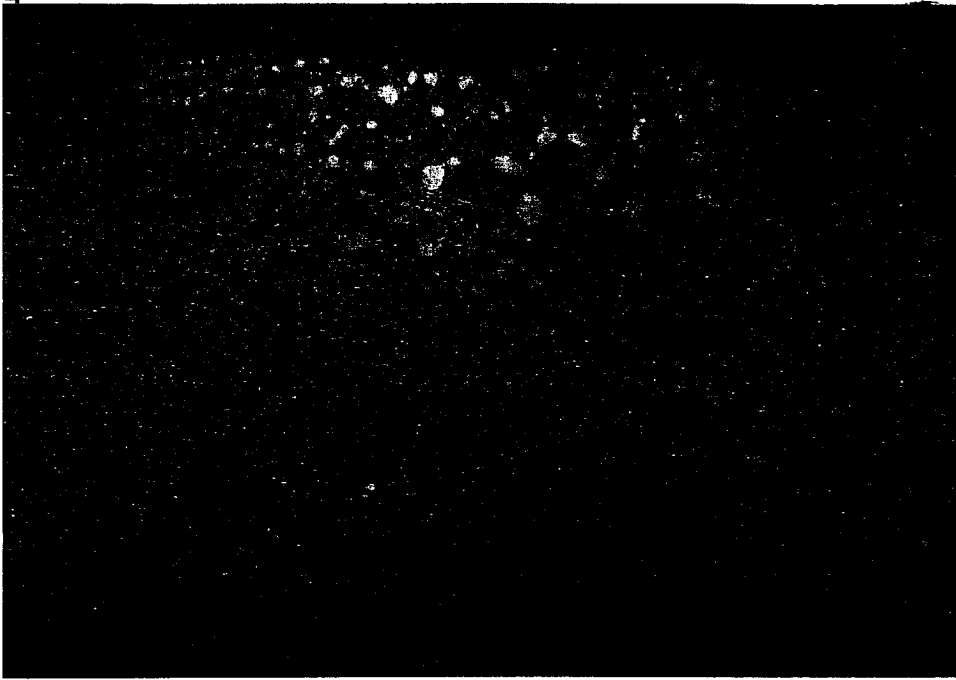
Table 6. Lipid composition of bacterium #1513 and #2100

	#1513	#2100
Total lipid (% of dry weight)	5.13	3.41
Neutral lipid (% of total lipids)	40.3	64.3
Glycolipid	9.1	3.9
Phospholipids	26.0	29.1
Phosphatidylethanolamine (% of PL)	61.0	50
Phosphatidylglycerol	19.4	12
Diphosphatidylglycerol	10.5	8
Phosphatidylcholine	ND	15
Unidentified phospholipid	5.2	8
Lysophosphatidylethanolamine	4.0	7

Table 7. Distribution of Major Fatty acid in different lipid class in #1513 strain (TL: total lipid, FFA: free fatty acid, DPG: Diposphoglyceride, PG: phospatidyl glyceride, PE: phosphotidyl ethanolamine).

FA name	TL	FFA	DPG	PG	PE
12:0	.40	.20	.30	.20	.20
i-13:0	7.10	2.60	8.10	3.60	8.10
13:0	.10				
i-14:0	.50	.20	.50	.30	.60
14:1	.30	.70	.30	.20	.20
13.84		.10			
14:0	4.20	1.70	4.90	2.50	5.20
i-15:0	24.10	6.60	28.8	15.1	29.40
a-15:0	1.90	.70	2.30	1.20	2.40
15:1	.10			.10	.10
15:0	.80	.40	1.0	.60	.90
i-16:0	.20	.20	.20	.20	.20
16:1(n-7)	25.0	50.50	21.10	28.1	21.70
16:0	15.70	5.80	15.20	16.60	16.60
i-17:0	2.10	.40	1.80	3.20	2.10
a-17:0	1.30	1.90	1.20	1.80	1.10
17:1	.10			.20	
17:0	.40		.30	.60	.40
18:4(n-3)	.30	.70	.40	.60	.30
18:1(n-9)	3.10	4.10	3.10	5.1	2.40
18:1(n-7)	4.0	2.50	3.20	5.50	3.50
18:0	1.10	.60	1.0	2.20	1.20
10M-18:1	.30			.30	.30
20:4(n-6)	.20	.20	.10	.30	.10
20:4(n-3)	.40	.30	.20	.50	.20
20:5(n-3)	6.10	19.70	6.0	10.9	2.80

Figure 3. Production of ubiquinone and menaquinone in EPA producing bacteria #1513.



#### 제 4 절. EPA 생산 균주중 #1513의 EPA 생산 최적 조건

##### 1) 염도의 영향

본 연구에서 분리된 EPA생산 균주들은 해양동물의 장에서 추출된 것들이므로 해양 세균으로서 해수에 의한 염도의 영향을 우선적으로 조사하였다. #1513의 경우 해수 함량 약 20-60 % 에서 최적 성장을 보여 해수가 없는 조건에서의 배양에 비해 거의 2 배의 성장을 보였으며 해수 함량 100 % 나 80 % 보다도 30 % 내지 40 % 높은 성장을 보였고 EPA함량은 비교적 해수 농도에의 의존도가 낮았으며 60 % 정도의 해수 함량에서 최대값을 보였다 (Fig. 4). #2100의 경우는 이보다 해수 농도 의존도가 뚜렷하여 약 20 %의 해수에서 성장이 담수에서의 성장에 비해 거의 4 배의 성장을 보였고 EPA함량에서도 20 % 해수 함량에서 최대값을 보였는데 100 % 해수는 20 % 해수 함량에서의 약 절반 정도의 성장을 보였다 (Fig. 5).

또한 해수농도의 영향이 단순한 염도의 영향인지 해수에 존재하는 미량원소들의 영향인지를 확인하기 위하여 일정 염도 (#1513의 경우 약 60 %의 해수 함량에 해당되는 염도, #2100의 경우는 20 %)에서 해수와 NaCl의 조성비를 0 %부터 100 % 까지 달리해 균체의 성장과 EPA생성을 관찰 하였다. 이경우 두 대상 균주 모두에서 오히려 100 % 해수에서의 성장이 100 % NaCl 에서의 성장에 다소 못미치는 경향을 보였고 EPA함량에서도 비슷한 결과를 나타내었다 (Fig. 6, Fig. 7). NaCl을 KCl로 대체 할수 있는 지, 즉 Na ion에 대한 의존도를 일정 염도에서 NaCl 과 KCl의 함량을 0% 에서 100 % 까지 변화하며 배양하였을 경우 NaCl함량 60 % 이상에서 좋은 성장을 보였고 그이하에서는 성장이 저해 되어 염도이외에 Na<sup>+</sup> 이온의 필요성이 확인되었다 (Fig. 8). 또한 이러한 결과를 토대로 NaCl을 유일한 염으로 농도 의존도를 조사하였는데 35 g의 NaCl을 100%로 하였을때 40 %, 즉 14 g NaCl

per liter의 함량에서 성장 및 EPA함량이 최대로 나타나 이를 사용하는것이 좋으리라고 사료된다 (Fig. 9). 소금물이 해수보다 배양에 유리하다는 사실은 해수내의 어떠한 성분이 본 균주의 성장과 이에 따른 EPA 생성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 사료되어 보고되어 있는 해수의 성분 조성을 참조하여 각 미량 원소들을 하나씩 제거한 인공해수 (결핍해수)를 만들어 그 조건에서의 성장을 관찰하였는데 모든 종류의 결핍해수가 완전 인공해수보다 다소 높은 성장을 보여 자연 해수내의 미량 염들이 본 균주의 성장을 저해함을 시사해준다 (Fig. 10, Fig. 11). 자연 해수의 경우 오염물질들이 포함되어 있을 가능성도 배제할 수는 없다.

이러한 실험 결과는 본균주들의 배양에 속성 해수 대신 NaCl 로 대체해도 성장 및 EPA생산에는 큰 영향이 없음을 확인한 것인데 이것은 매우 바람직한 현상으로 대량 배양시 가격이 저렴하고 구하기가 용이한 NaCl (소금)을 배지 첨가물로 사용할수 있다는 이점을 제공해준다. 실제로 오염되지 않은 속성해수를 대량으로 구하는 것은 3 면이 바다인 우리나라의 형편에서도 용이한 일이 아니다.

Figure 4. Growth of #1513 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water (a). EPA production is shown in (b).

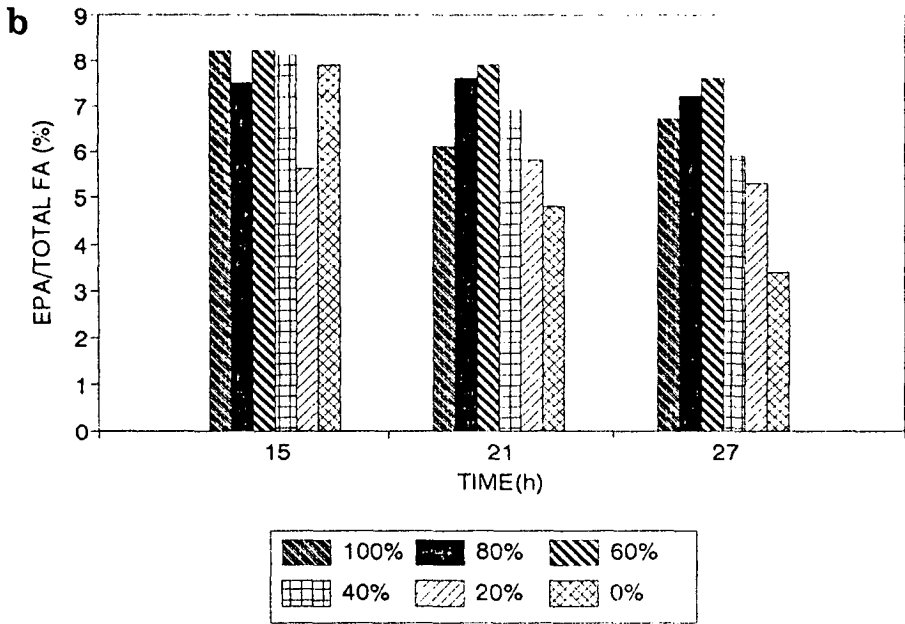
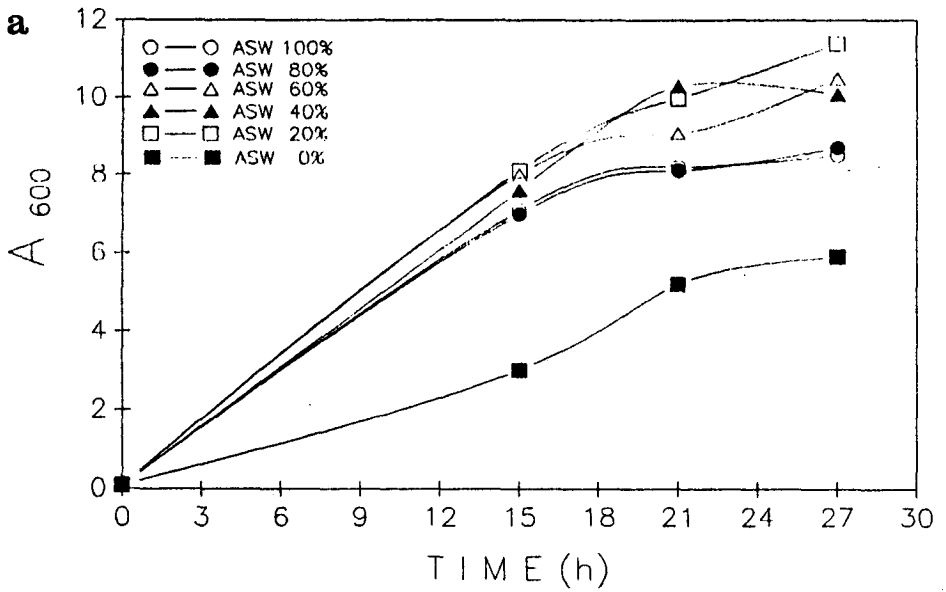




Figure 5. Growth of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water (a). EPA production is shown in (b).

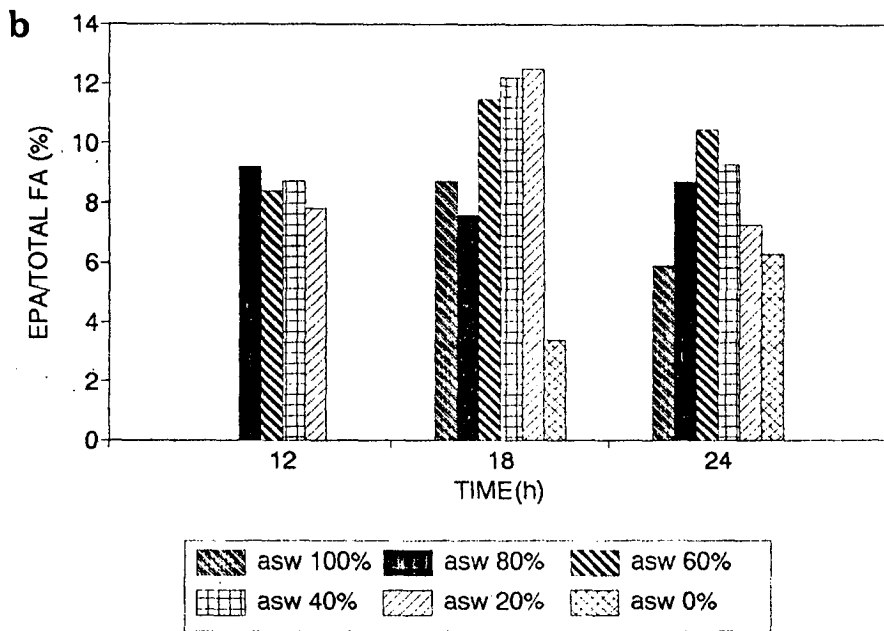
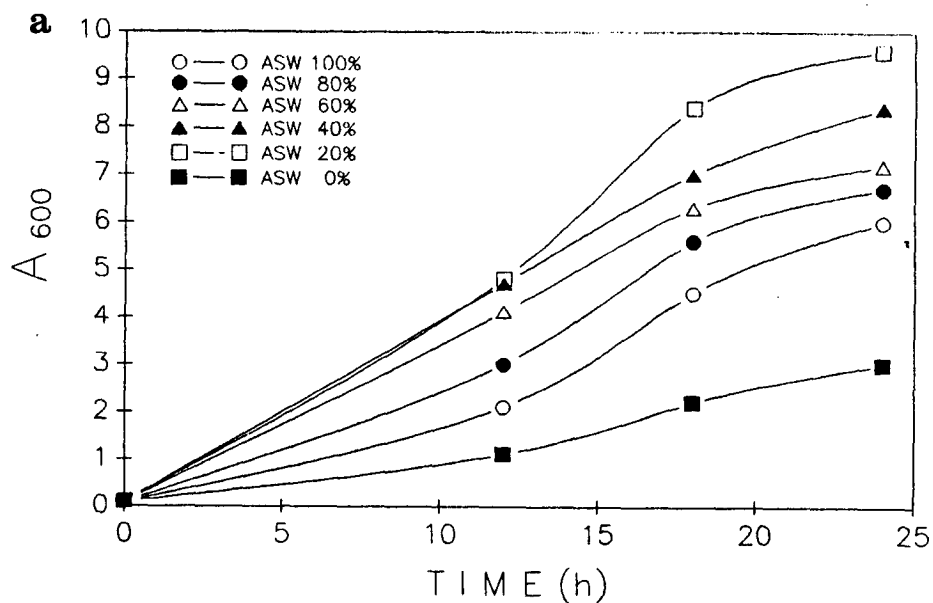


Figure 6. Growth of #1513 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water at constant salinity corresponding to 22 g NaCl per liter (a). EPA production is shown in

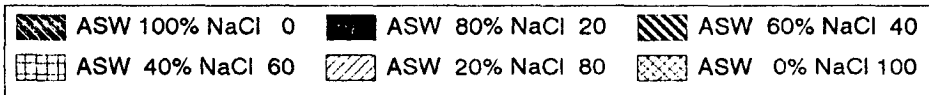
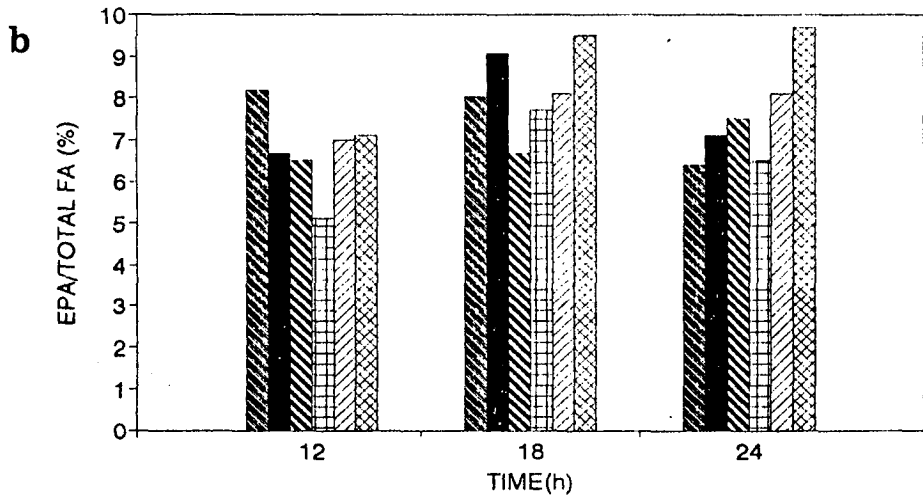
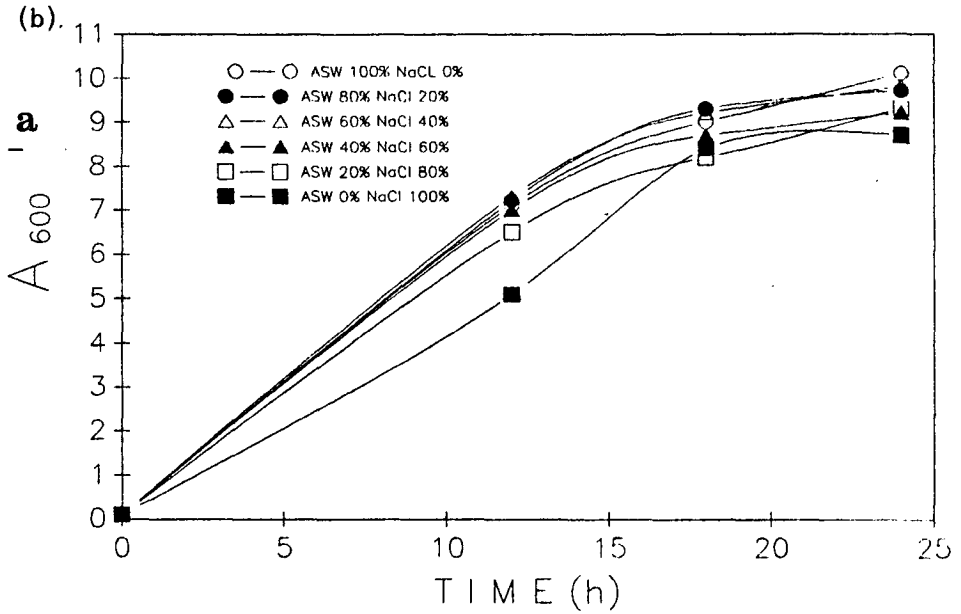


Figure 7. Growth of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of sea water at constant salinity corresponding to 14 g NaCl per liter (a). EPA production is shown in

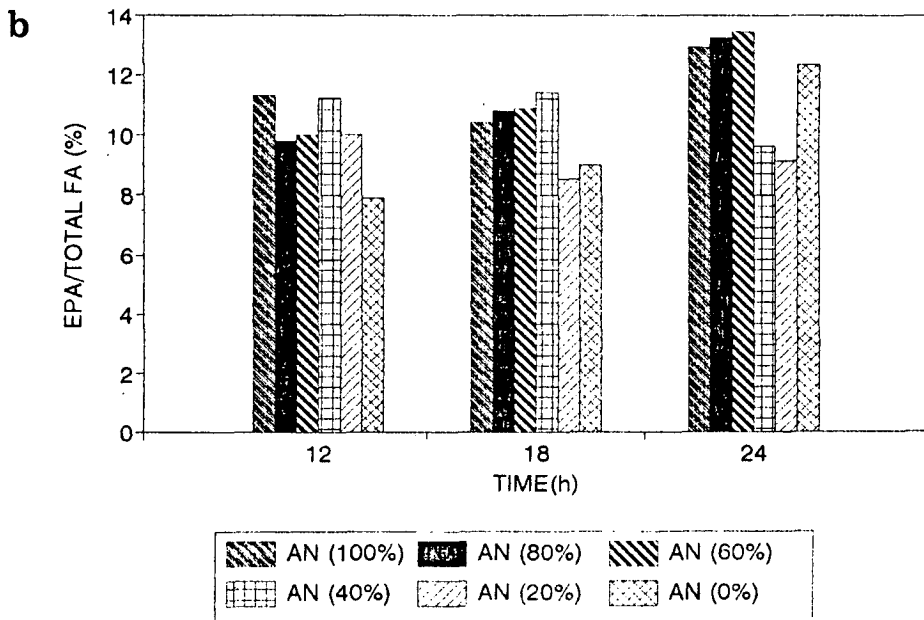
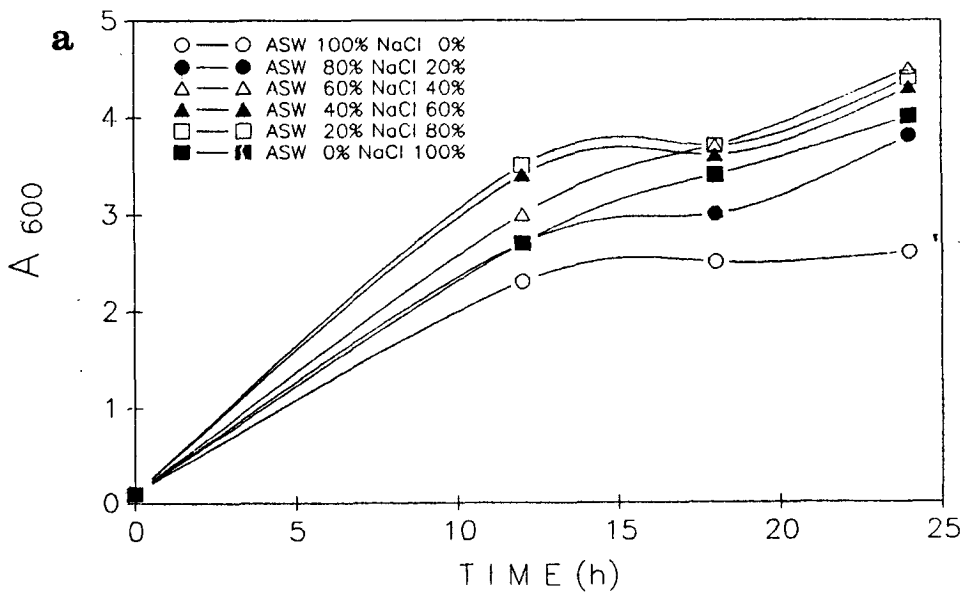


Figure 8. Growth of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of NaCl and KCl at constant salinity corresponding to 14 g NaCl per liter (a). EPA production is shown in (b).

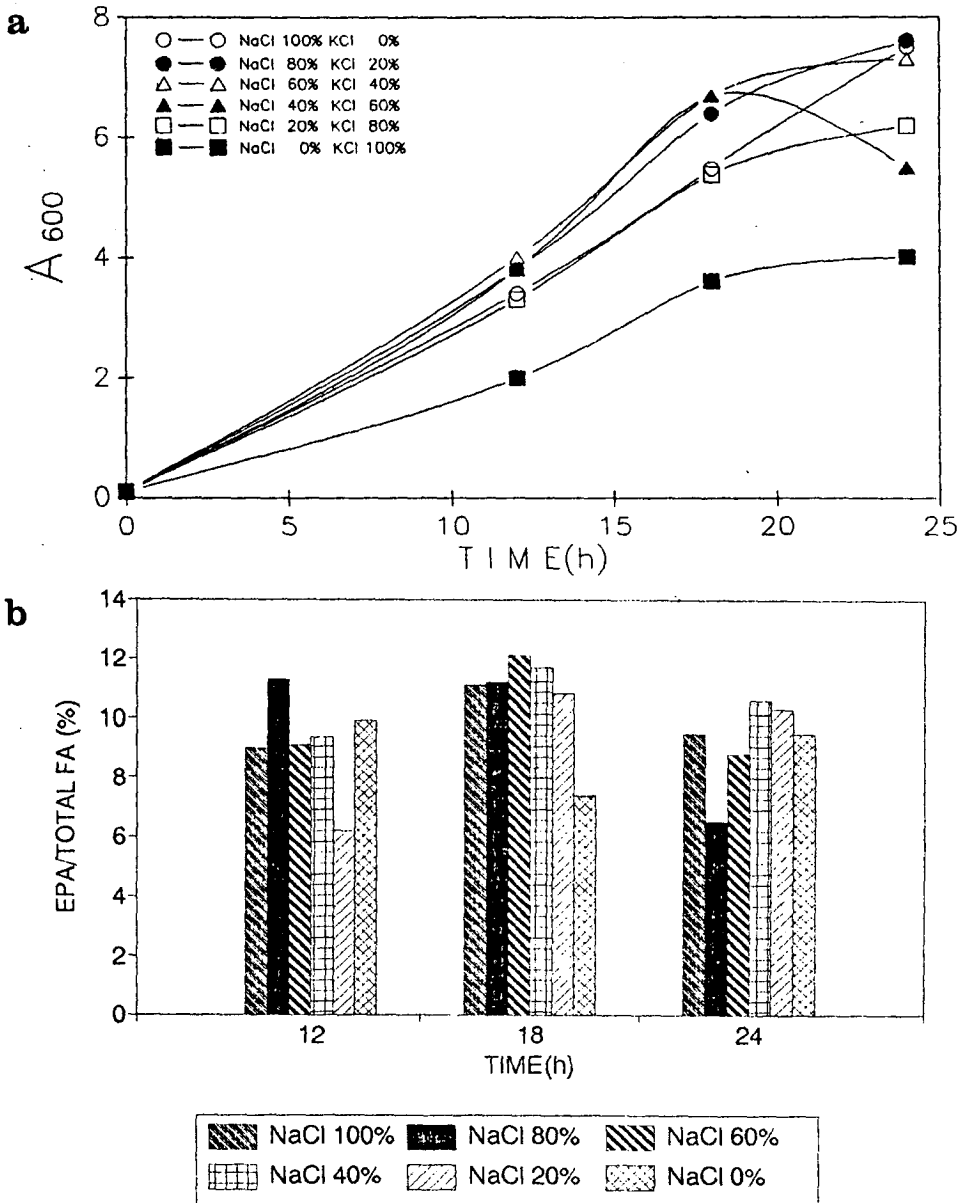


Figure 9. Growth of #2100 at Heart infusion broth media containing different amount (0 - 100 %) of NaCl as the sole salt source, 100 % NaCl is 35 g of NaCl per liter (a). EPA production is shown in (b).

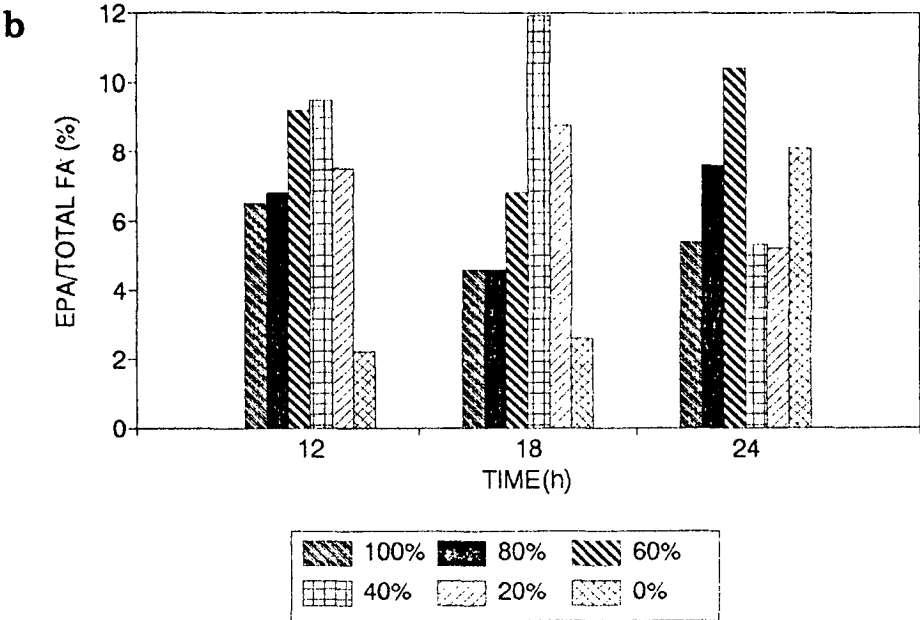
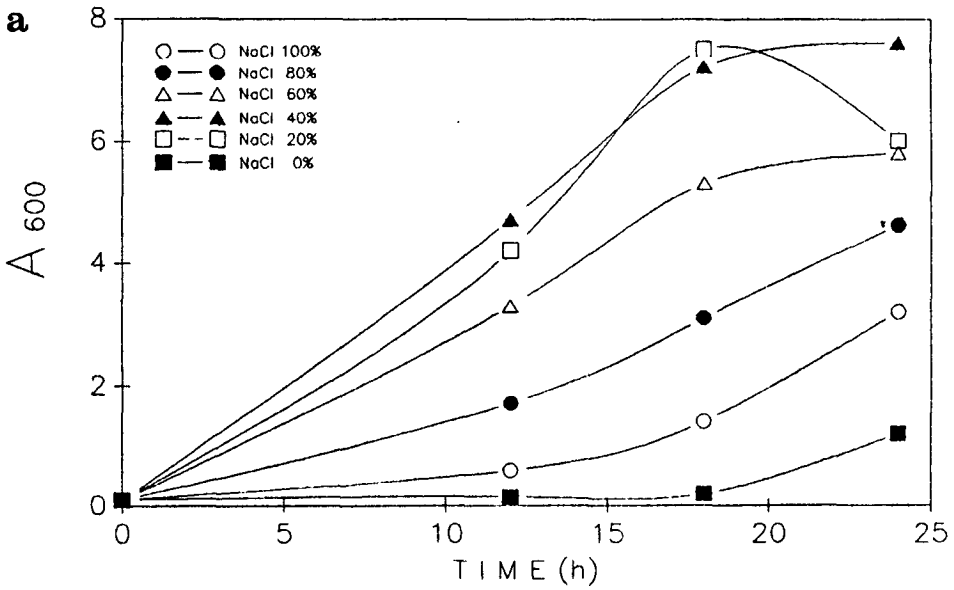


Figure 10. Growth of #1513 at Heart infusion broth media depleting each components of artificial sea water (a). EPA production is shown in (b).

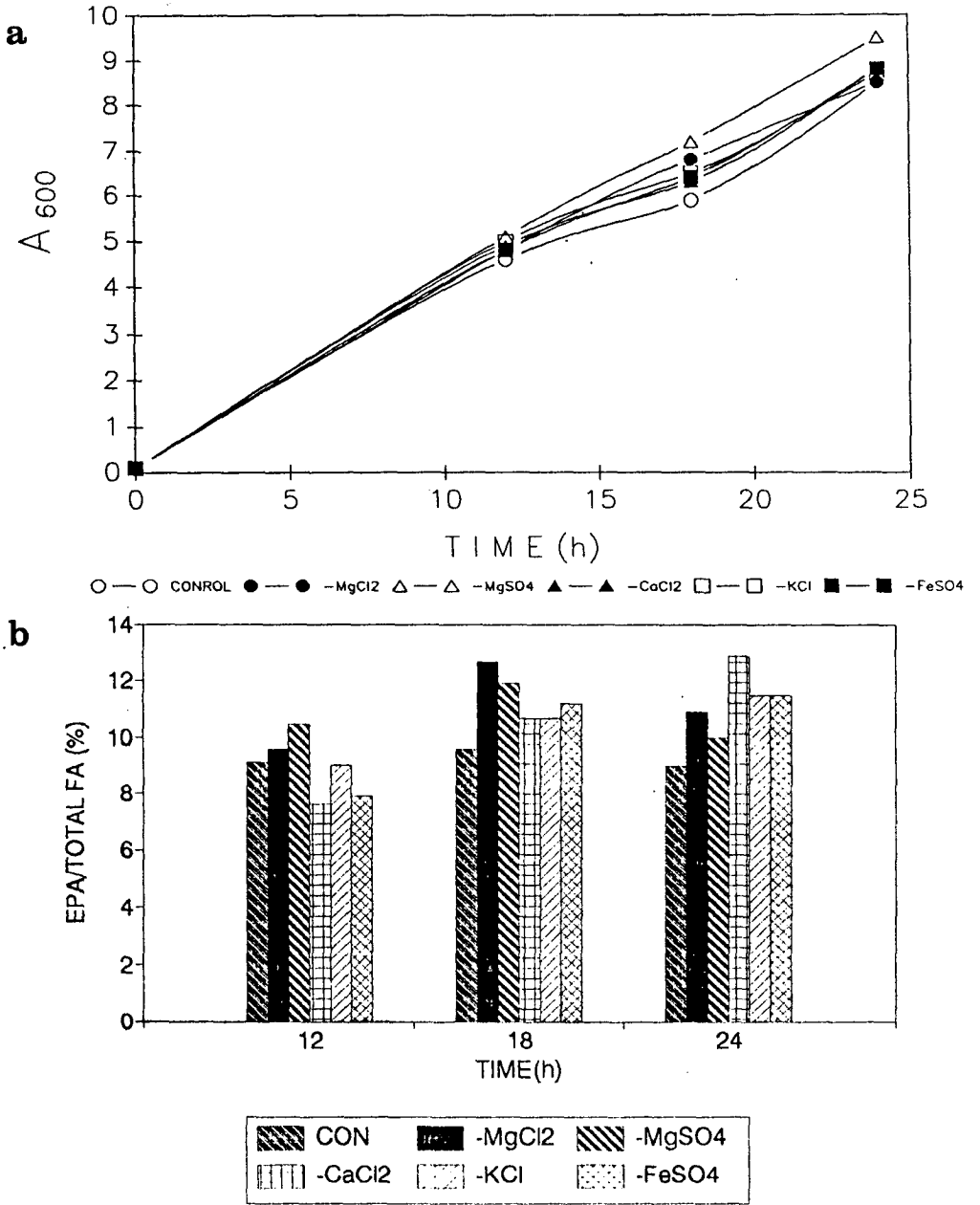
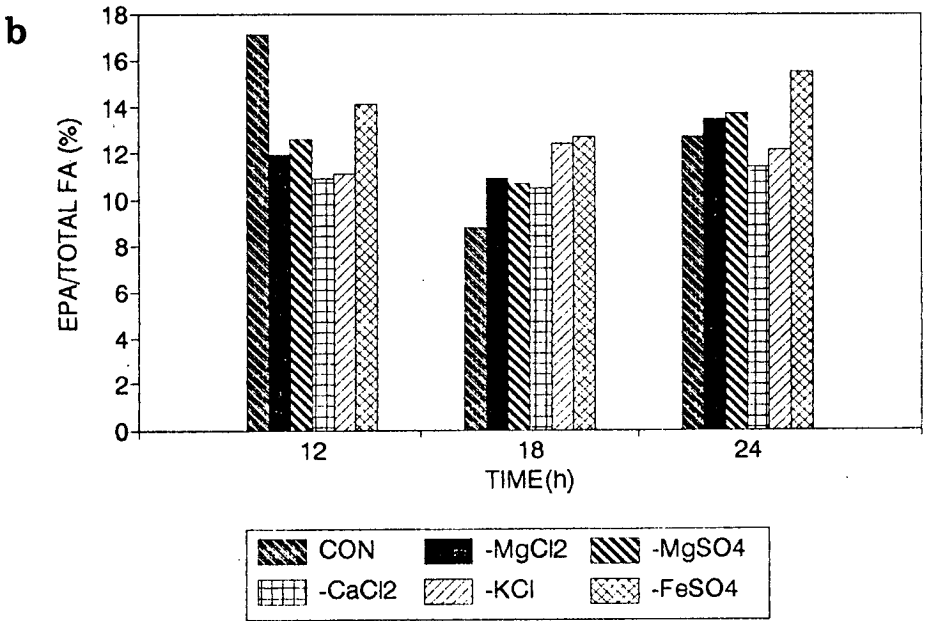
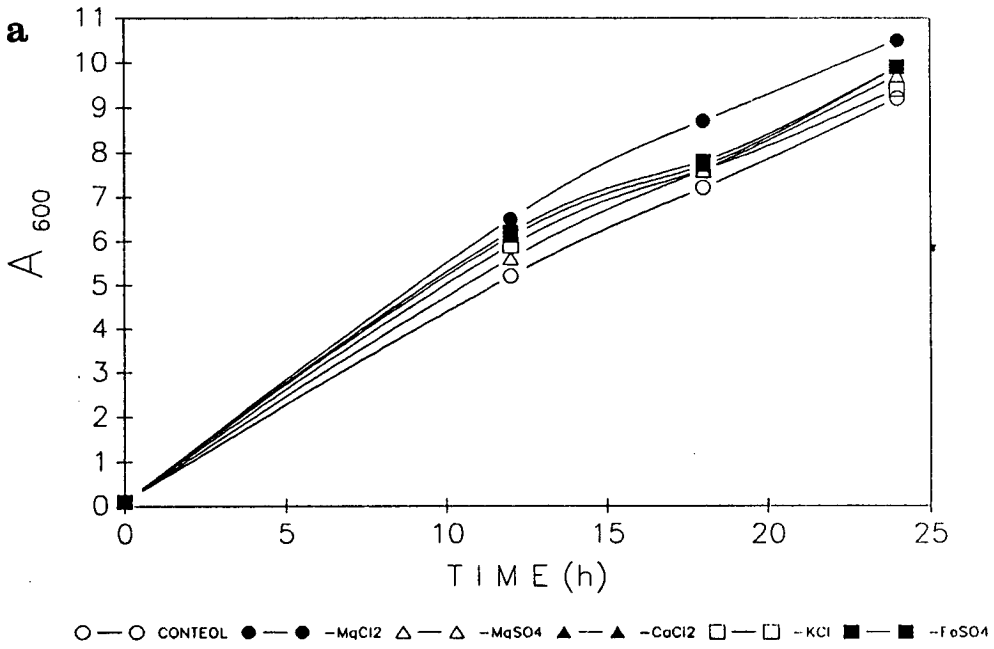


Figure 11. Growth of #2100 at Heart infusion broth media depleting each components of artificial sea water (a). EPA production is shown in (b).



## 2) pH 의 영향

본 균주의 분리에는 일반적으로 사용되는 산성도 (pH) 7 의 배지를 사용하였다. 그러나 보다 정확한 최적 생성도를 알기위하여 pH 5.5 에서 9 까지의 최초 pH 를 조절한 배지를 사용하였는데 놀랍게도 초기 단계를 제외 하고는 최종 균체의 양에는 그 차이는 크지않았다 (Fig. 12, Fig. 13). 그것은 배양후 약 10 시간 경과후 배지의 pH가 모두 pH 8.5 정도로 변화되는 현상 때문인 것으로 밝혀 졌는데 그 원인은 균체가 생성하는 다당류 고분자 물질 때문인 것으로 여겨진다. Buffer를 사용하여 pH를 유지하였을 경우 pH 6 과 pH 6.5 에서는 거의 성장을 보이지 않았고 pH 7 과 pH 9 에서도 비교적 낮은 성장을 보였으나 pH 7.5 에서 pH 8.5 사이에서 높은 성장을 보였다 (Fig. 14).

## 3) 최적 배지 조성:

최초에 본균주들을 분리할 때 사용되었던 배지는 PYM-G 배지와 ZoBell 배지를 사용하였는데 이들 배지를 사용한 진탕 배양의 경우 균체의 성장은 각각 600 nm에서의 흡광도로 4 와 2 정도에 불과하였고 EPA함량도 5 % 내지 7 % 정도였다. 배지 차이에의한 균주의 성장을 관찰하기 위하여 여러가지 배지를 시험하였는데 사용된 배지 중에서 Beef Heart infusion broth에서 성장과 EPA생산이 가장 높게 나타났다 (Fig. 15). 그러나 Heart infusion broth (소심장의 추출물 배지)는 비교적 고가의 배지이므로 이와 유사하고 가격이 저렴한 배지조성을 얻기위하여 Heart infusion 대신 가격이 저렴한 Yeast extract를 사용하였을 경우 (TY 배지) 균체량이 절반정도로 감소함을 확인하여 heart infusion을 대체할 수없었다. 이 경우 기존의 PYM-G 배지에 비해 거의 3 배이상의 균체를 얻을수 있었는데 이 배지의 조성은 소심장의 추출물 10 g, tryptose 10 g 그리고 5 g의 소금을 함유하고 있으므로



어느 성분이 균체의 성장을 촉진하는 가를 알아보기 위하여 각 조성분의 함량을 변화 시켜 그 의존도를 관찰하였다. 우선 tryptose 함량을 1 %로 고정하고 소심장의 추출물의 양을 0 %에서 1 %로 변화시켰을 때 균체량은 소심장의 추출물의 배지내 함량에 거의 비례하여 증가함을 관찰하였다 (Fig. 16, Fig. 17).

이러한 결과는 PYM-G 배지에서 사용된 meat extract 보다 소심장의 추출물이 훨씬 효율적이며 소심장의 추출물내의 어느 조성 성분이 균체 성장의 촉진 요인으로 작용함을 시사해준다. 소심장의 추출물은 수용성 추출물이며 확인을 위하여 Folch extraction 으로 지방성분을 제거한후 사용하여도 동일한 결과가 얻어지는데 이러한 균체 성장의 촉진 요인으로 작용하는 소심장의 추출물내의 수용성 조성성분을 확인하기 위한 실험이 계속되고 있다. 또 tryptose의 함량 변화에서는 균체의 양에는 큰 영향이 없었으나 약 4 %의 tryptose 함량에서 EPA 생산이 가장 높았고 (17 % of total fatty acid) 이 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 18).

본 실험에서는 배지 성분을 용해시키는데 주로 증류수를 사용하여 실험하였으나 증류수 제조시 냉각수로 사용되는 Deionized water (증류기의 내부 냉각 관에 침착되는 것을 방지하기 위해 미세 입자를 제거하는 filter 와 ion 교환 수지를 통과시킴) 를 사용하여도 수율에는 큰 영향이 없으므로 실제 대량 배양시에는 이를 사용할 경우 크게 생산 원가 절감을 이룰 수 있으리라고 사료된다.

Figure 12. Effect of initial pH on the growth of #1513 (a). EPA production is shown in (b).

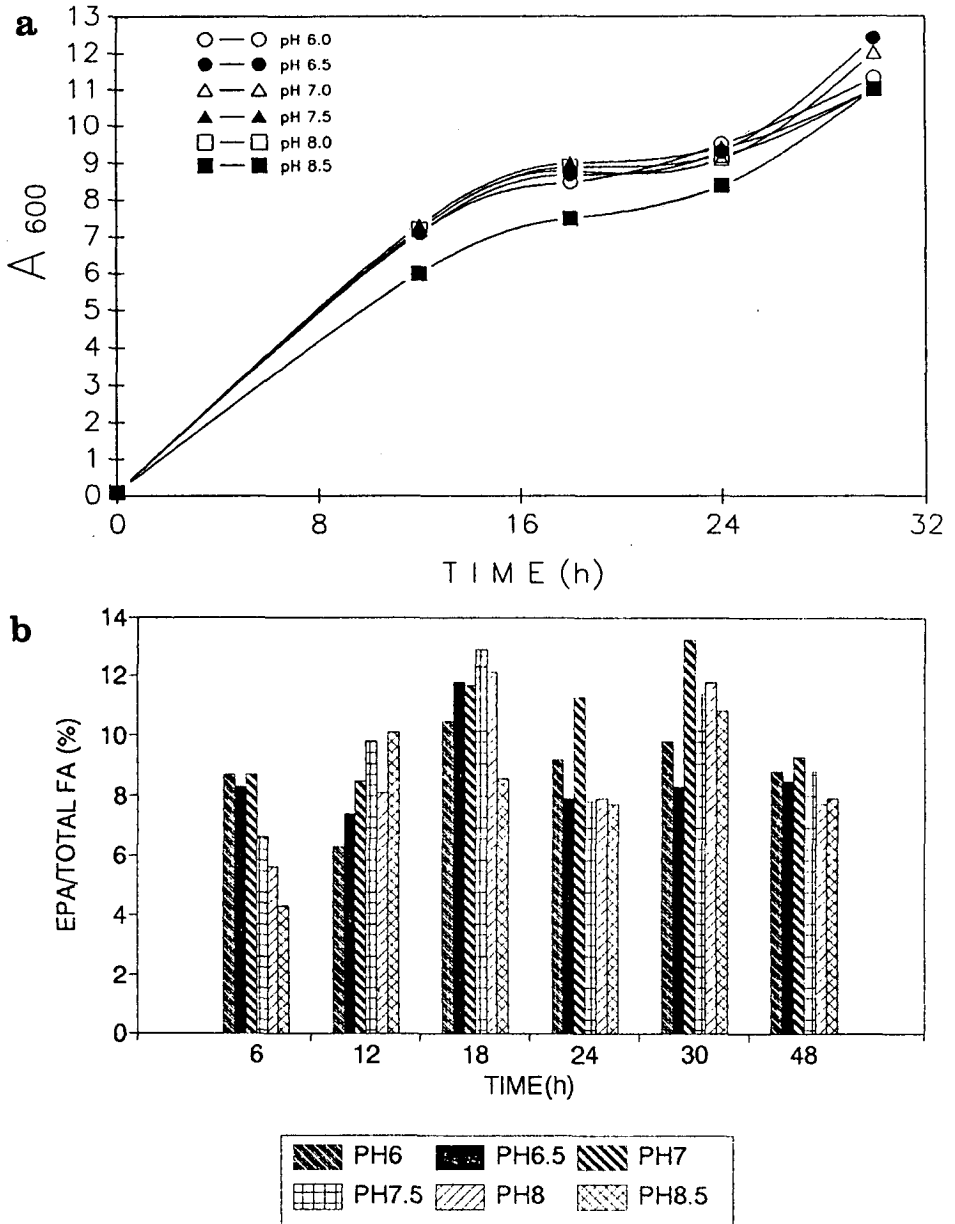


Figure 13. Effect of initial pH on the growth of #2100 (a). EPA production is shown in (b).

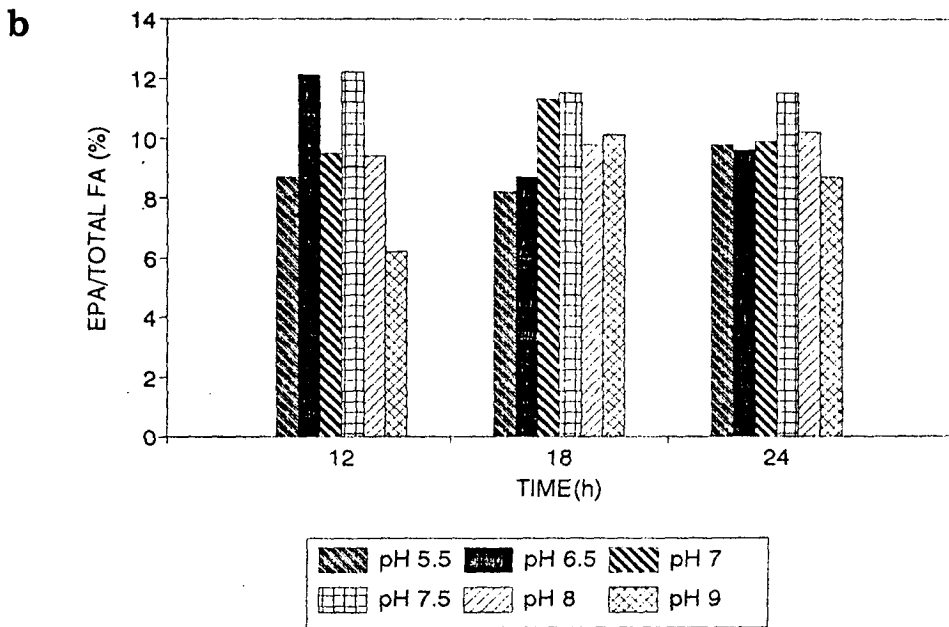
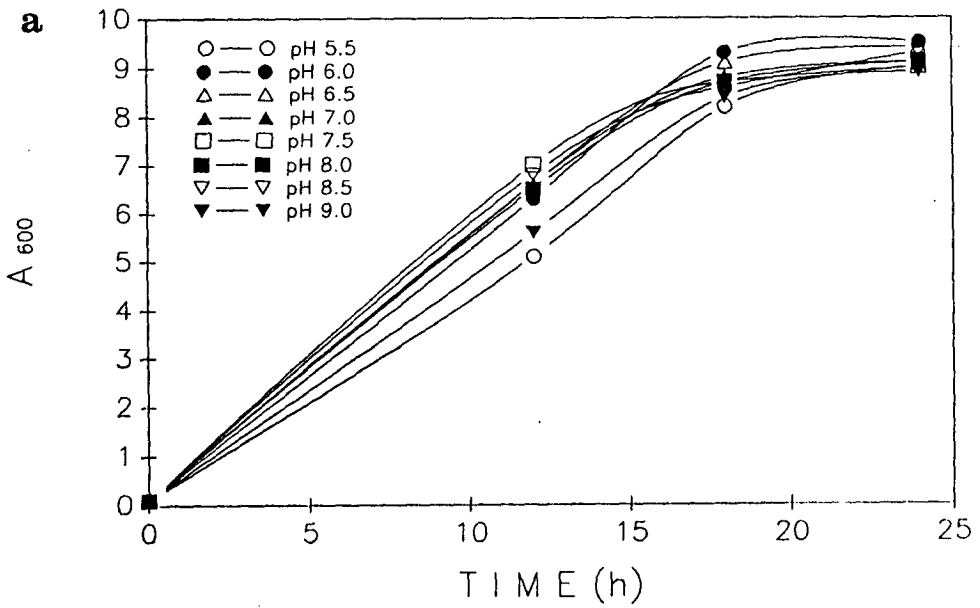


Figure 14. Effect of final pH on the growth of #1513 (a). EPA production is shown in (b).

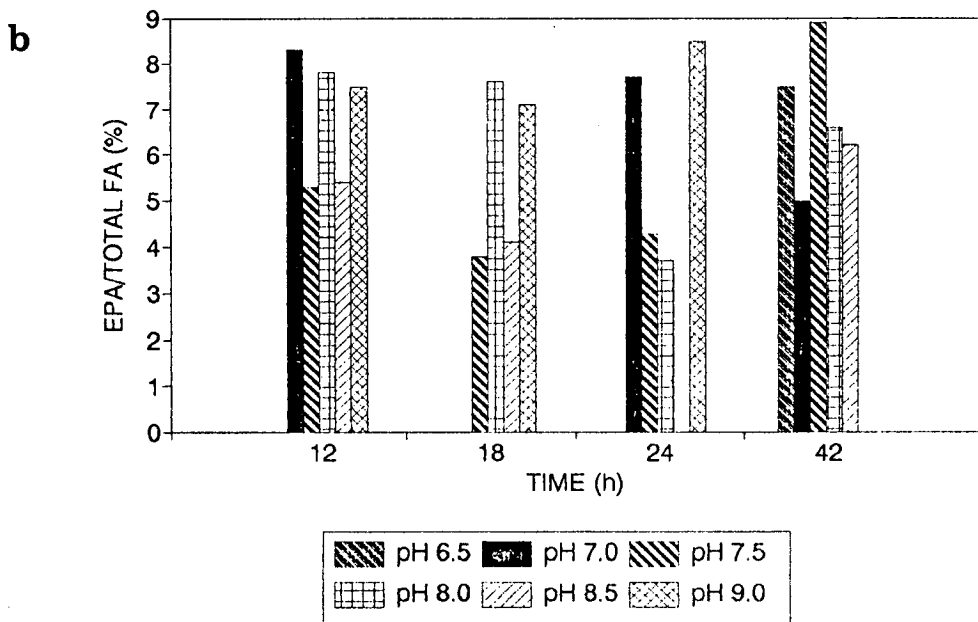
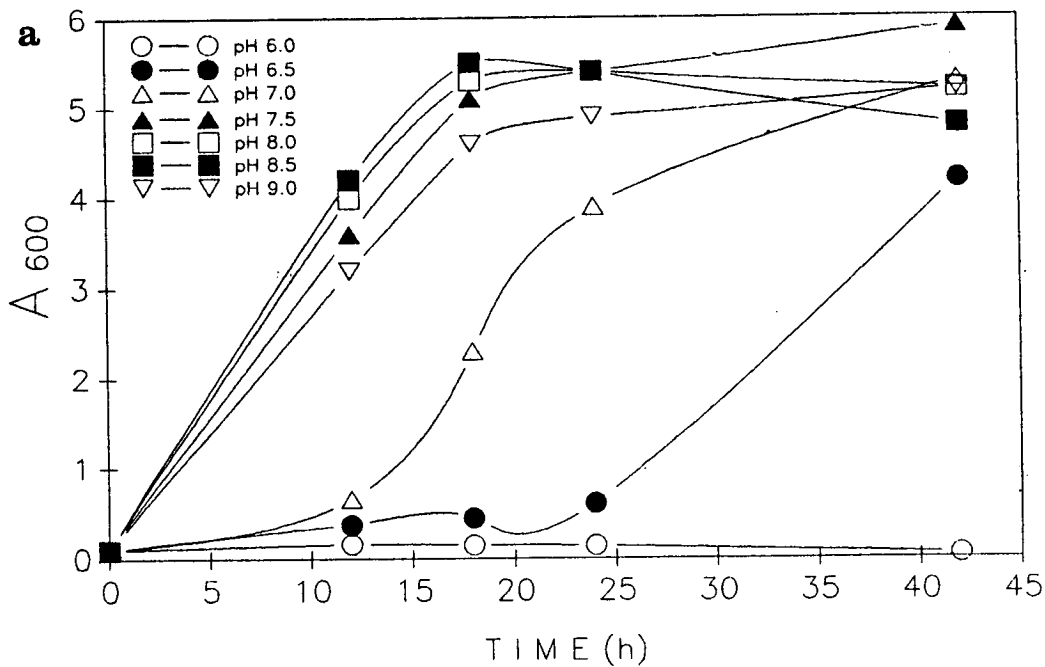


Figure 15. The growth of #1513(a) and #2100 (b) at Heart infusion media, Peptone-yeast extract media, and Tryptone-yeast extract media.

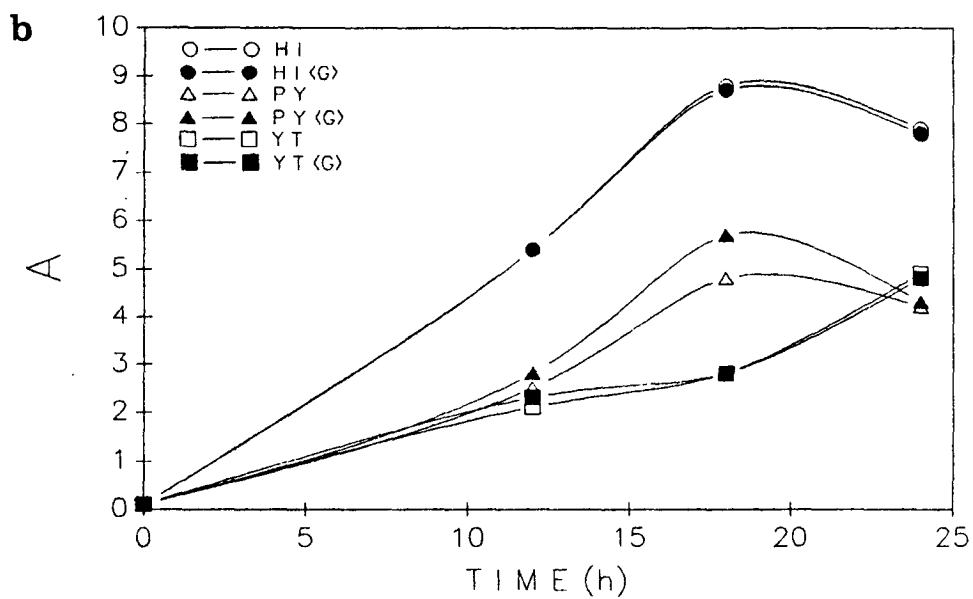
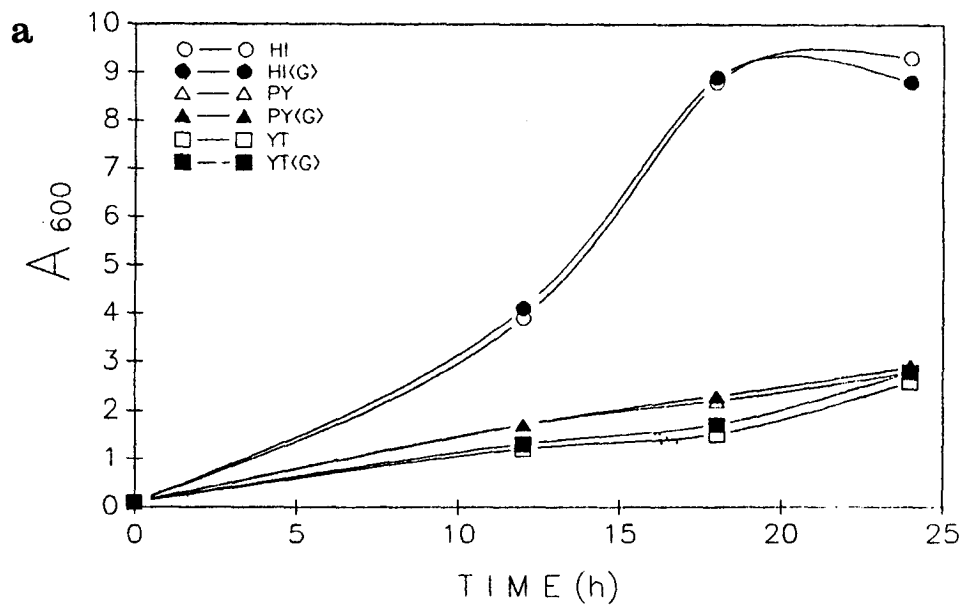


Figure 16. Effect of Heart infusion concentration on the growth of #1513 (a). EPA production is shown in (b).

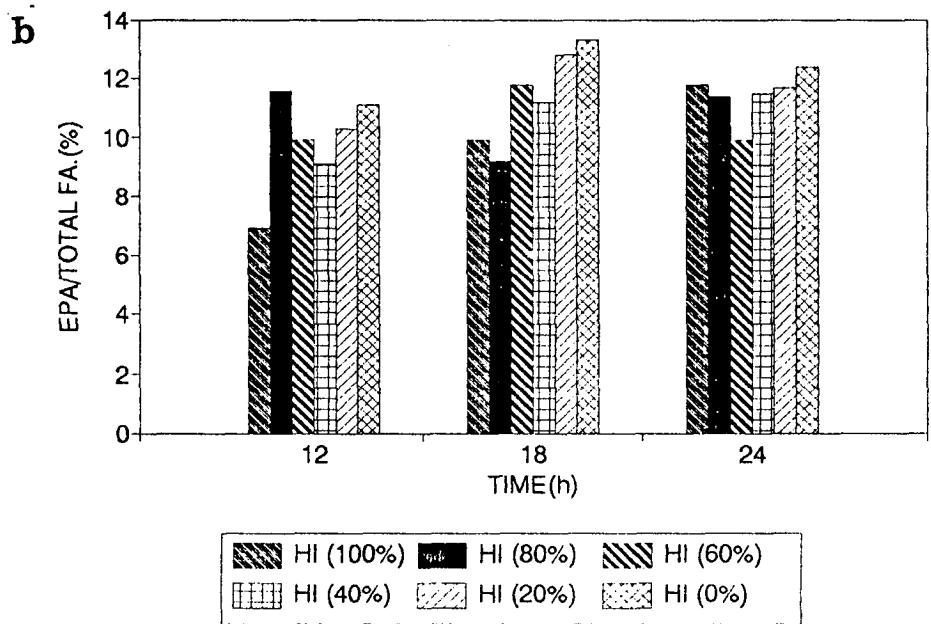
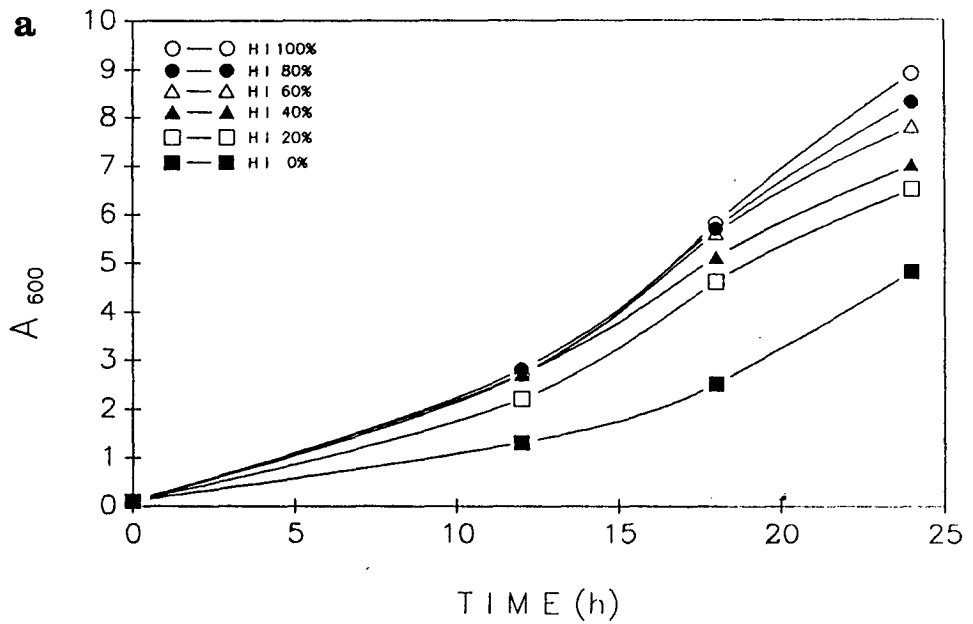


Figure 17. Effect of Heart infusion concentration on the growth of #2100 (a). EPA production is shown in (b).

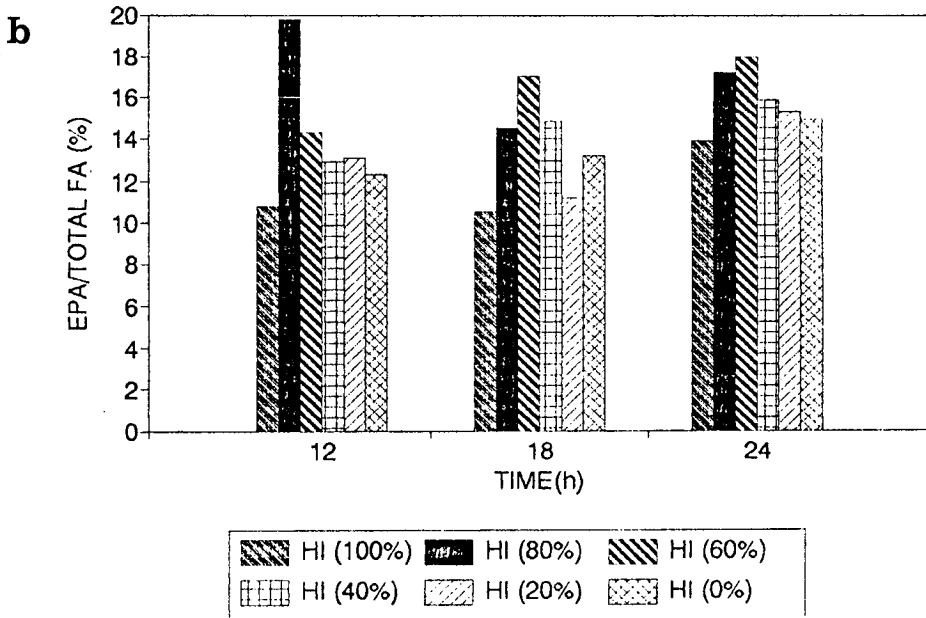
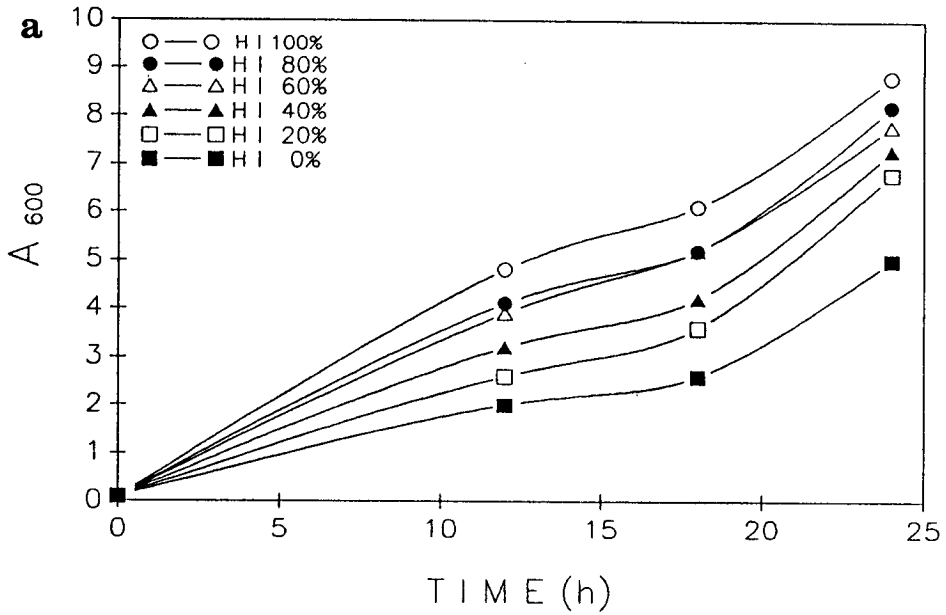
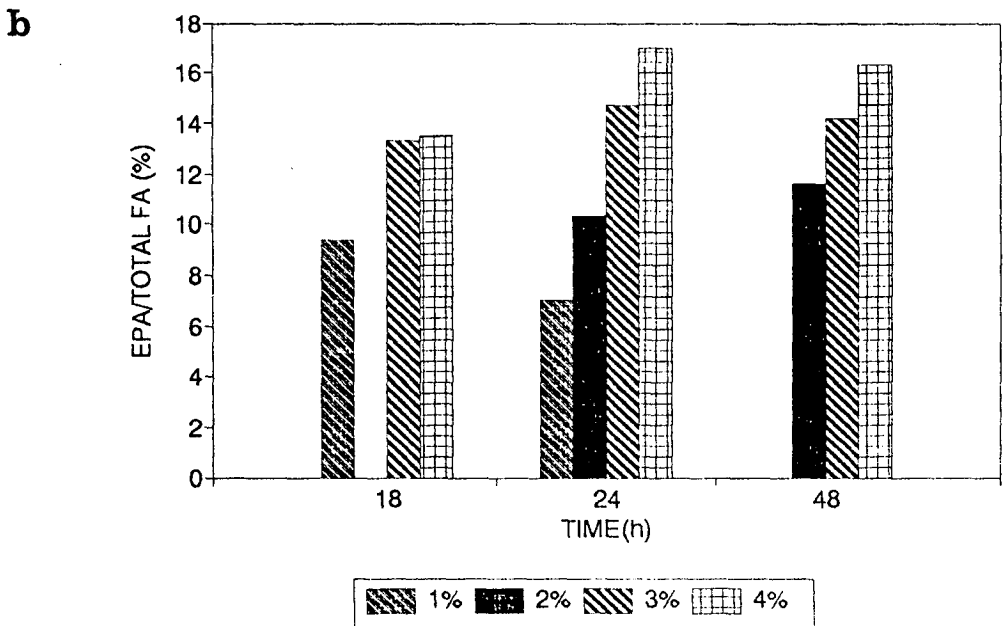
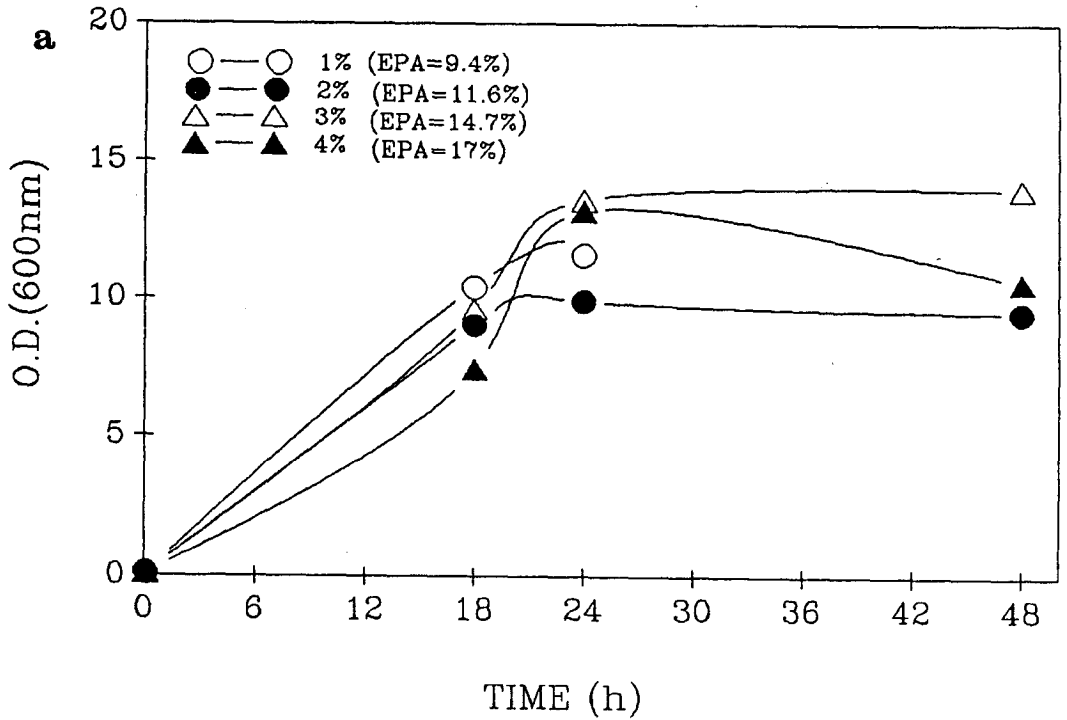


Figure 18. Effect of Tryptose content (1 - 4 %) on the growth of #1513

(a). EPA production is shown in (b).





#### 4) 최적 성장 온도

3 개 균주중 #1513의 경우 약 25 °C 전후에서 그 생장이 가장 빨랐다. 반면에 #2100 과 #2101 의 경우에는 이보다 약간 저온성이어서 약 18 °C 근처에서 최적 성장을 보였다 (Fig. 19, Fig. 20). 또 cell 내의 EPA 함량은 25 °C 에서는 18 °C 등 저온에서 배양 했을때에 비하여 매우 적게 나타나는 것을 알 수 있었고 특히 이러한 현상은 성장가능한 저온으로 내려갈수록 단위 세포 무게당 EPA함량은 증가하였다. 특히 #2100의 경우는 5 °C 에서 약 23 %의 전체 지방산 대비 EPA함량을 보였다. 5 °C 와 15 °C, 그리고 25 °C 에서 배양했을 때의 각 균주의 EPA함량의 변화를 Table 8 에서 표시하였다.

이러한 현상은 저온에서 성장한 세포의 경우 세포막의 구성 지방산의 불포화도를 증가시킴으로써 세포막의 유동성을 증가시키려는 경향 때문으로 알려져 있는데 이러한 현상이 본 균주에서도 발견됨으로써 본 균주들이 EPA를 생산하는 이유를 부분적이나마 시사해주고 있다. 즉 본 균주들은 EPA를 거의 유일한 고도불포화지방산으로 함유하고 있는데 EPA의 생리적인 기능이 최소한 세포막의 유동성을 변화하는 외부 조건에 맞추어 유지하려는 목적에 사용됨을 알수 있었다.

그러나 여타의 고도불포화 지방산의 경우도 동일한 기능을 나타낼수 있음에도 불구하고 구태어 EPA를 생산하여 사용하는 이유는 알수 없으나 공생 관계에 있는 숙주의 필요에 따른 선택의 결과로 여겨진다. 이러한 현상의 연장선상에서 이미 성장한 세포들을 저온으로 옮겨 추가 배양함으로써 세포의 성장은 중지 또는 감소되었으나 세포막의 조성만이 변화하는 현상도 보고된 바가 있는데 본균주의 경우도 EPA의 함량이 성장후 저온처리에 의해 증가됨을 관찰하였다. 따라서 EPA의 생산을 극대화 하기위해서는 저온 배양이나 배양후 저온 처리가 요망되는데 이것은 대량 배양에있어 걸림돌이 된다. 즉, 상온에서의 배양에 비해 저온으로 유지하는 것은 상당한 생산원

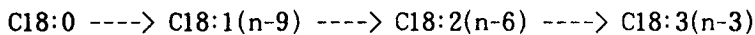
가의 상승을 가져오기 때문이다.

#### 5) 산소 공급의 영향:

본 분리 균주들은 호기성 배양 조건에서 분리한 것들로 원활한 산소 공급이 성장에 필수적이었다. 그 산소 의존도를 알아보기 위하여 300 ml 들이 삼각 flask에 각각 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml 씩 배지를 넣고 동일한 속도로 진탕 배양함으로써 배지 내로 산소의 공급을 서로 다르게 조절하여 세균의 성장과 EPA 생산을 검토하였다 (Fig. 21, Fig. 22).

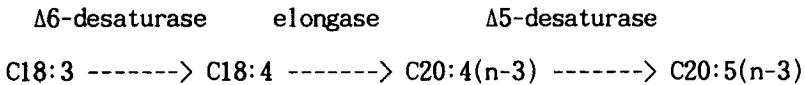
균체의 성장과 EPA 생산에 원활한 산소의 공급이 필수적임을 알수 있었는데 이 결과는 본 균주가 어류의 내장에서 분리되었다는 점을 생각하면 다소 의외의 결과라할수 있다. 그이유는 동물의 내장에는 일반적으로 산소의 분압이 비교적 낮은 상태로 알려져 있기 때문인데 이 균주는 어류와 완전한 공생 관계라기보다는 협력 관계정도에 해당되는 불완전 공생이라고 할수있다. 또한 EPA의 전구체로 확인된 oleic acid (C18:1)로 부터 EPA를 생합성하기 위해서는 1 회의 chain elongation step (18 → 20) 과 4 회의 desaturation 과정을 거쳐야 하는데 이 desaturation 과정에는 산소와 NAD(P)H 가 필요한 aerobic desaturation과 산소를 필요로 하지 않는 anaerobic desaturation 이 알려져있는데 본균주의 경우는 전자의 경우에 해당되는 것으로 사료된다.

EPA의 생산 경로는 acetyl Co-A 로부터 생합성되어 형성되는 포화 지방산인 stearic acid (C18:0)을 시점으로 할때 우선 EPA의 직접 전구체로 알려진 linolenic acid (C18:3 n-3)까지 3 차례의 desaturation 과정을 거친다. 즉



그러나 이보다 더 관심의 초점이 되고 있는 것은 이렇게 형성된 C18:3(n-3)

으로 부터 어떻게 EPA (C20:5 n-3)가 형성되는가 하는 것으로 이에 대해서는 전혀 연구된바가 없는 실정이다. 일반적으로 지방산 대사에 관여하는 효소들은 세포막에 부착 또는 연계되어 복합체를 형성하고 있는 경우가 일반적으로 그 반응 중간체들은 외부로 이탈되지않고 최종 산물까지 단일 과정으로 생산되는 경우가 대부분이다. 본 관심사에 대한 정보를 얻고자 우선 작용하는 효소들의 반응성이 비교적 떨어지는 조건인 저온에서 배양함으로써 대사 중간체들이 효소 복합체에서 세포내로 유출될 기회를 증대 시켰다. 즉 5 °C에서 배양했을 경우 전체 지방산의 조성에서 C18:4(n-3), 와 C20:4(n-3)가 관찰되었다 (Table 8). 특히 C20:4(n-3)의 경우는 비교적 높은 온도에서도 항상 관찰되어 EPA가 이 C20:4(n-3)에서 1 회의 desaturation에 의해 형성됨을 시사하고 있으나 C18:4(n-3)의 경우는 저온 배양한 균체의 지방산에서만 관찰되었다. 이러한 사실은 EPA가 C18:3(n-3)에서 C18:4(n-3)와 C20:4(n-3)를 거쳐 생성될 가능성을 강력하게 시사하고 있다. 이과정에는 Δ6-desaturase와 elongase 그리고 Δ5-desaturase가 연계되어 작용하리라고 여겨진다.



EPA 생산 균주의 Crude cell extract에서 이러한 Δ6-desaturase, Δ5-desaturase 활성을 gas chromatography를 이용하여 확인하였으며 이들 2 효소의 순수 분리 정제를 위한 실험이 계속되고 있으며 순수 분리후 이들의 특성에 관한 연구와 함께 얻어진 aminoacid 서열로 부터 DNA염기 서열을 추정, 합성하여 EPA합성에 관련된 유전자의 탐색에 이용할 예정이다.

또한 EPA의 전구체로 사용할 수 있는 값싼 원료로 가정 및 식품 업소

에서 지속적으로 배출되는 폐식용유가 좋은 후보 물질로 대두되었다. 식용유는 주로 식물성 유지로서 그 구성성분이 EPA의 전구 물질로 밝혀진 Palmitoleic acid (16:1) 와 Oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) 등을 다량 함유하고 있고 사용후 하수구를 통해 방출될 경우 가정 폐수에 의한 오염의 주역중의 하나로 현재 이 폐식용유로부터 손쉽게 비누를 제조하여 사용하자는 움직임이 환경 보호 측면에서 활발히 일어나고 있는데 이 폐식용유를 효과적으로 수집하는 방법이 확립된다면 EPA 생산과 같은 산업적 이용도 가능하리라고 사료된다. 실제로 이 폐식용유를 사용하여 본 균주를 배양했을 경우 균체내의 전체 지방함량이 증가하였다. 그러나 EPA합성과정 이 병목으로 작용하여 상대적 EPA함량은 증가하지 않았고 폐식용유의 주구성성분인 palmitoleic acid (16:1) 와 oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) 등의 함량이 증가하였다.

결론적으로 이상과 같이 수립된 EPA생산을 위한 최적 조건 (Heart infusion media, 8 °C, 원활한 산소 공급, pH 7.5) 에서의 상기 3 균주의 지방산 조성을 나타내는 gas chromatogram을 Fig. 23 에서 제시하였으며 최적화 이전 분리 시점에서의 지방산 조성인 Fig. 1 과 비교하여 괄목할 EPA 함량 증가를 보여준다.

Table.8. Fatty acid composition (%) of #2100 grown at different temperature.

Fatty acid	ECL	4 °C	15 °C	25 °C
a-12:0	11.746	0.297	0.640	
12:0	11.950	0.264	0.772	0.007
i-13:0	12.496	2.251	3.791	3.105
13:0	12.821	0.264	0.504	10.081
i-14:0	13.517		0.363	0.296
a-14:0	13.791			2.486
14:0	13.967	1.323	2.296	
i-15:0	14.492	3.560	10.701	0.796
a-15:0	14.662			21.123
15:0	14.907	3.125	6.15	2.479
i-16:0	15.498			0.393
a-16:0	15.752	0.077	0.135	0.141
16:0	15.932	8.028	9.471	8.112
16:1(n-9)	16.255	22.141	23.223	21.969
16:2(n-4)	16.819	1.022	1.731	
a-17:0	16.677			2.898
17:0	16.997			3.313
a-17:1	16.934	1.283	1.719	
17:1	17.296	2.825		
17:1(n-9)	17.314		2.966	0.121
i-18:0	17.638		0.191	0.117
a-18:0	17.793		0.316	1.437
18:0	17.919	1.826	1.400	
18:1(n-11)	18.152	0.861	1.071	
18:1(n-9)	18.221	3.859	2.918	
18:2(n-6)	18.612			0.221
19:0	18.936	0.105		0.343
18:3(n-3)	19.149	0.644		
18:4(n-3)	19.584	0.694	0.478	0.082
20:4(n-6)	21.042	0.275	0.225	0.077
20:4(n-3)	21.454	0.632	0.358	0.255
20:5(n-3)	21.693	23.010	11.532	1.967
Others		21.267	12.592	12.892

Figure 19. Effect of temperature of on the growth of #1513 in heart infusion broth (a). EPA production is shown in (b).

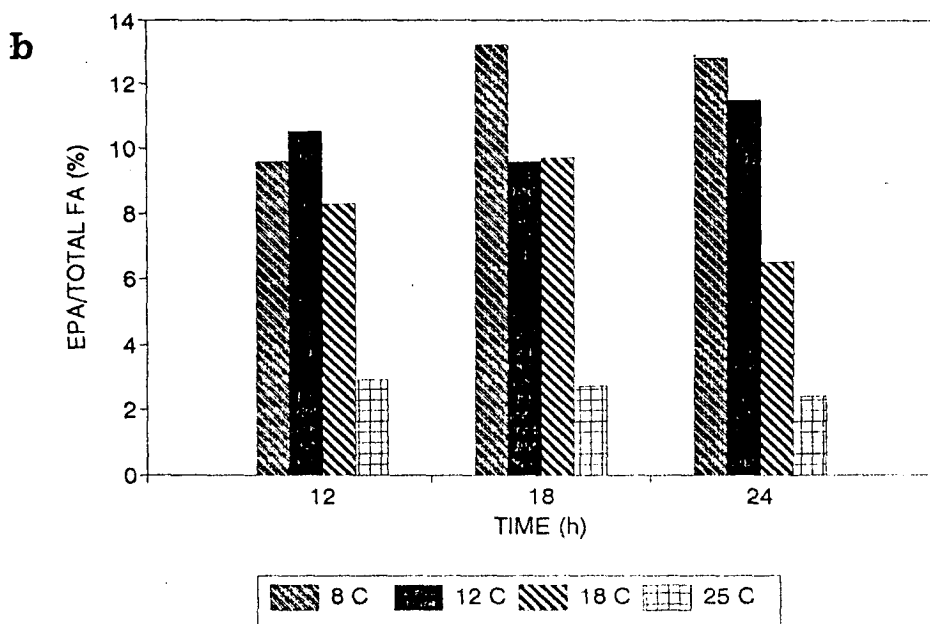
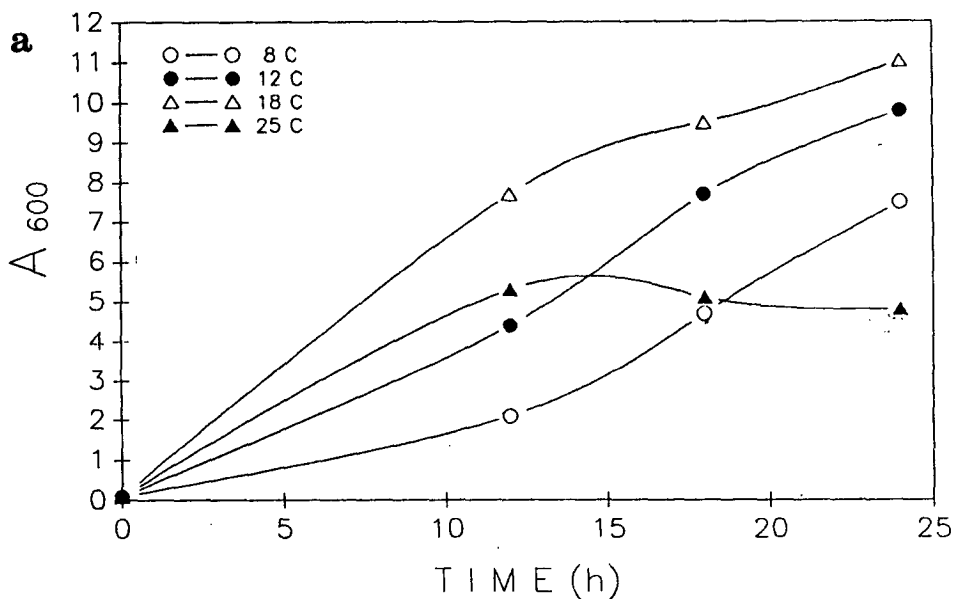


Figure 20. Effect of temperature of on the growth of #2100 in heart infusion broth (a). EPA production is shown in (b).

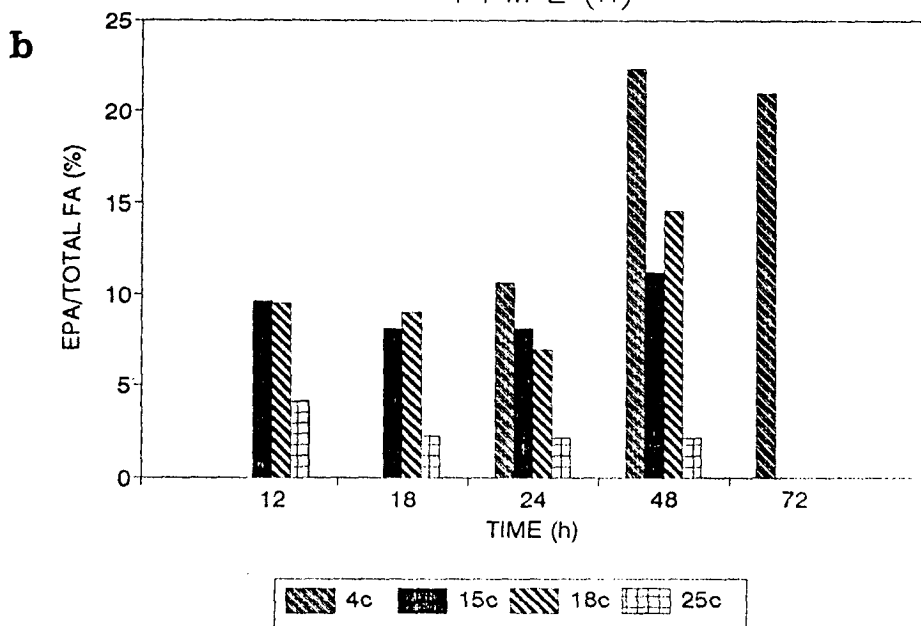
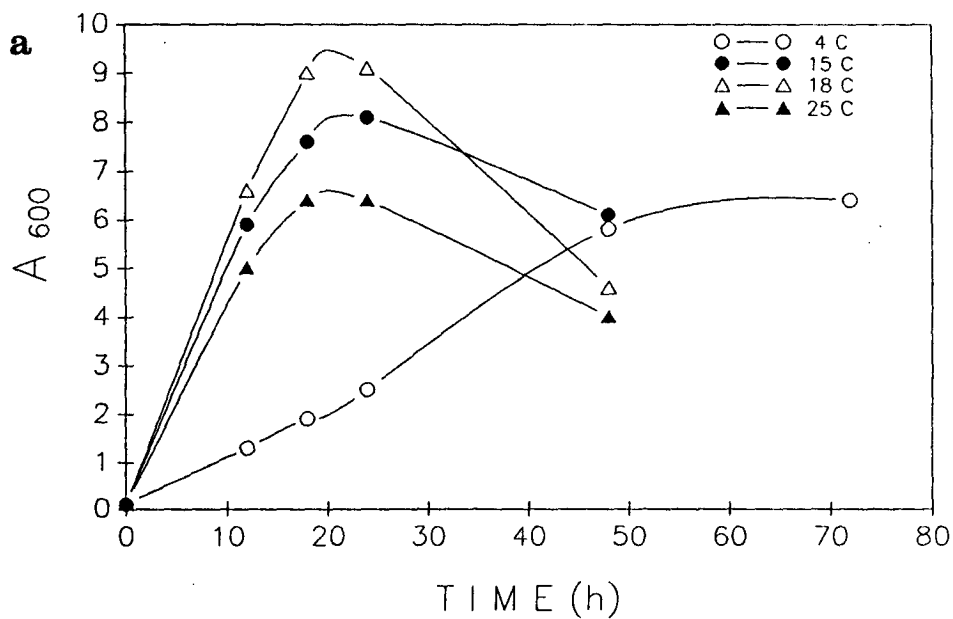


Figure 21. Effect of air supply on the growth of #1513 through the change of the surface to volume ratio, in heart infusion broth at 18 °C (a). EPA production is shown in (b).

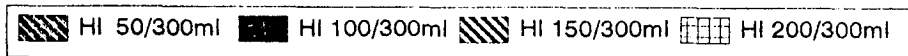
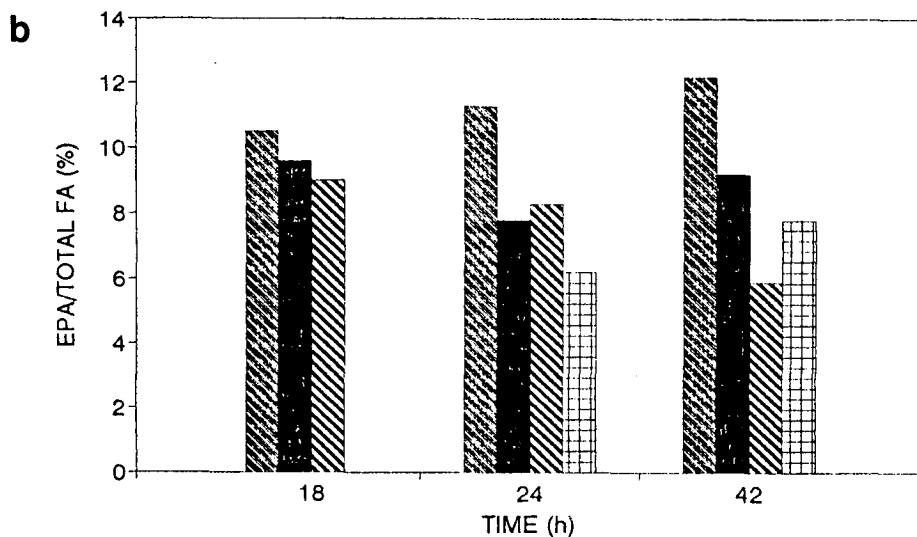
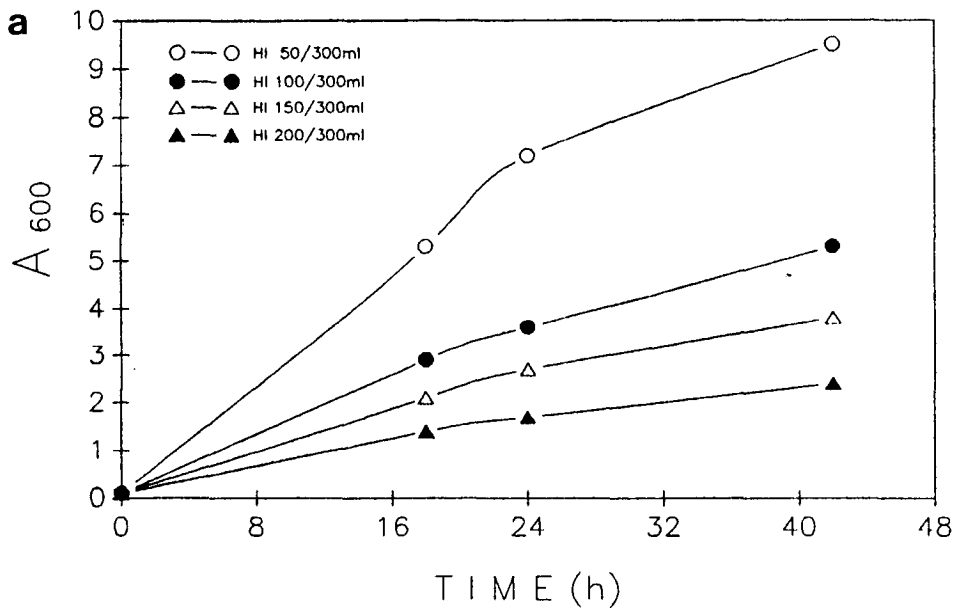




Figure 22. Effect of air supply on the growth of #2100 through the change of the surface to volume ratio, in heart infusion broth at 18 °C (a). EPA production is shown in (b).

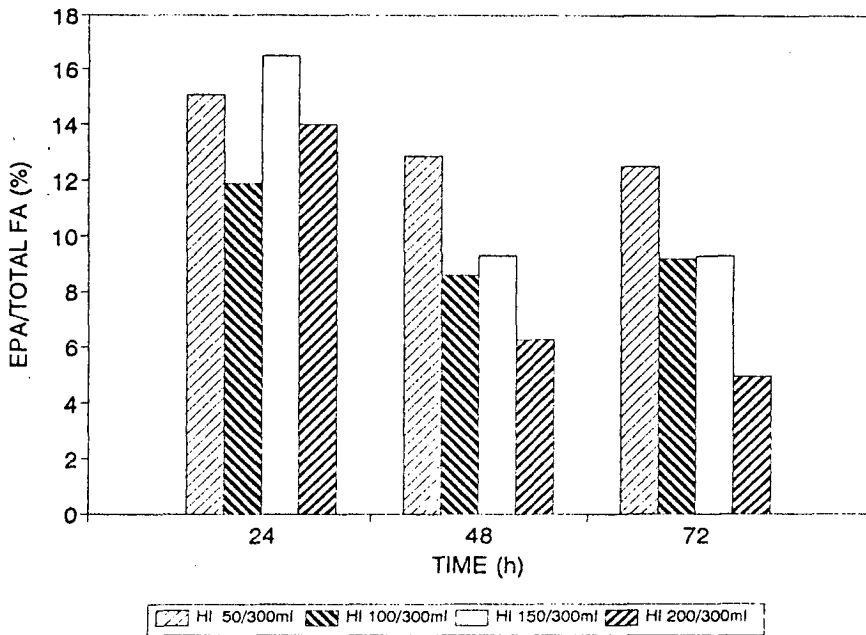
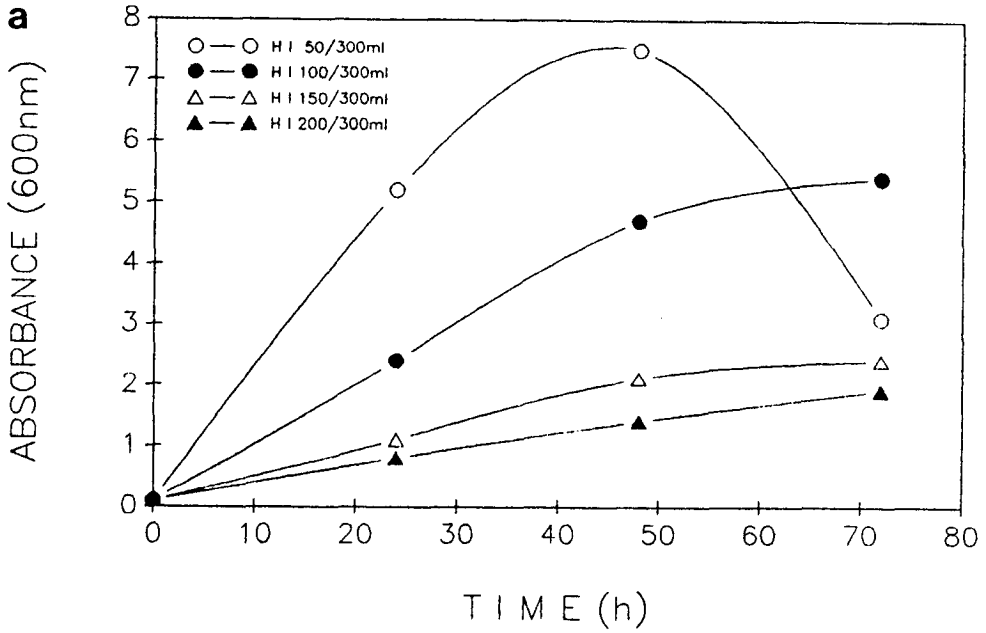
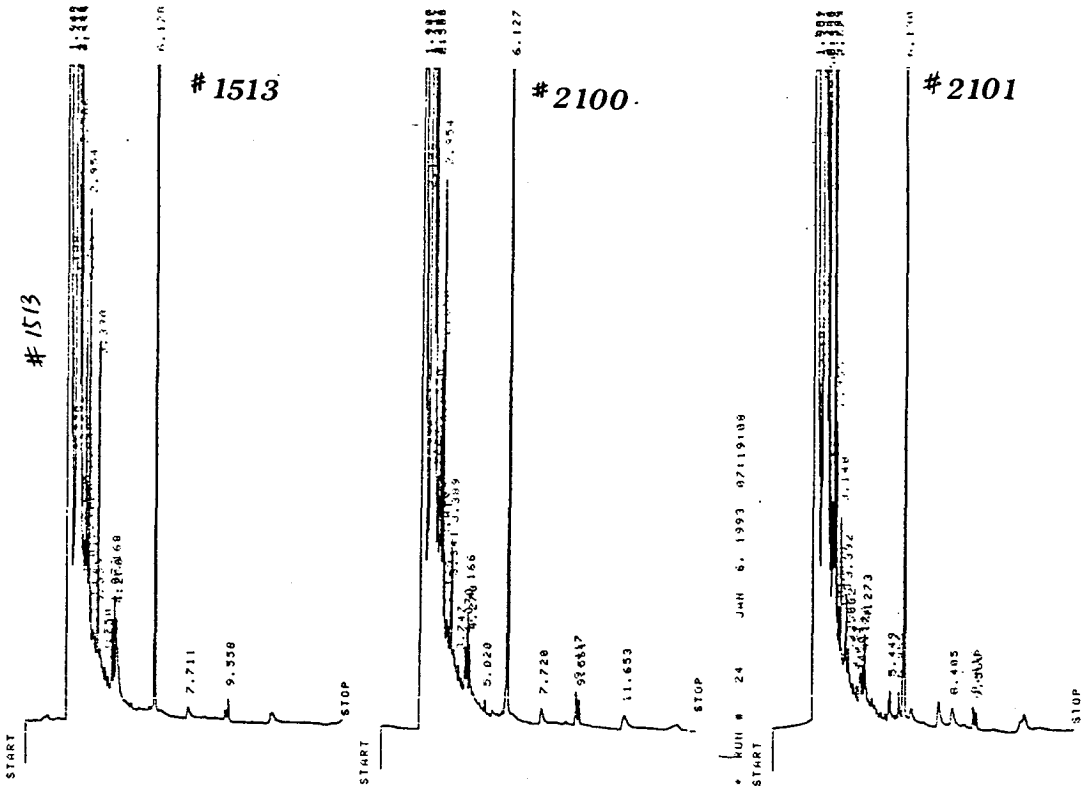


Figure 23. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #1513, #2100 and #2101 after EPA production optimization (Omegawax 320 column at 240 °C), compare with Fig. 1.



## 제 5 절. DNA 분리

### 1) Chromosomal DNA 분리

본 연구에서의 EPA 생산 균주의 [G+C](%) 함량을 결정하기 위하여 Chromosomal DNA 를 분리하였다. 이 Chromosomal DNA 는 3차 년도의 연구 계획인 EPA생산 유전자를 검색하고 분리하여 재조합 미생물을 만드는 과정에서 필요하며 EcoRI등 제한효소에 의한 Restriction pattern 을 구하여 미생물간의 분류의 지표로도 사용될수있다. EPA 생산 균주의 [G+C](%)함량 결정은 분리된 DNA를 spectrophotometer 를 사용하여 250 nm에서 온도 변화에 따른 흡광도의 변화를 구하여 변성온도 (melting temperature,  $T_m$ ) 와 [G+C](%) 함량의 상관 관계에 의하여 결정하였다 (Fig. 24).

### 2) Plasmid 분리

미생물에 존재하는 plasmid는 대개 그 미생물 특유의 성격 (항생제에 대한 내성, 난분해성물질의 분해능력 등) 나타내는 유전자를 포함하고 있는데 본 EPA 생산 미생물에서도 약 25 kB 정도 동일한 크기의 plasmid 가 발견되었다 (Fig. 25). 이 plasmid는 각 균주를 25 °C 이상의 온도에서 배양했을 경우는 나타나지 않아 고온 배양에서의 EPA함량 감소와 연관이 있을 가능성이 있어 (Fig. 26), *E. coli* HB101에 transformation 하였을 때 소량 (1-2 % total fatty acid)의 동정되지 않은 peak 가 검출되었으나 EPA의 생산은 관찰되지 않아 (Fig. 27) EPA생산 관련 유전자는 plasmid가 아니라 chromosomal DNA에 존재하는 것으로 사료되어 이를 분리하는 연구가 계속하여 수행되고 있다.

Figure 24. Thermal melting curve of #1513 and #2100 chromosomal DNA

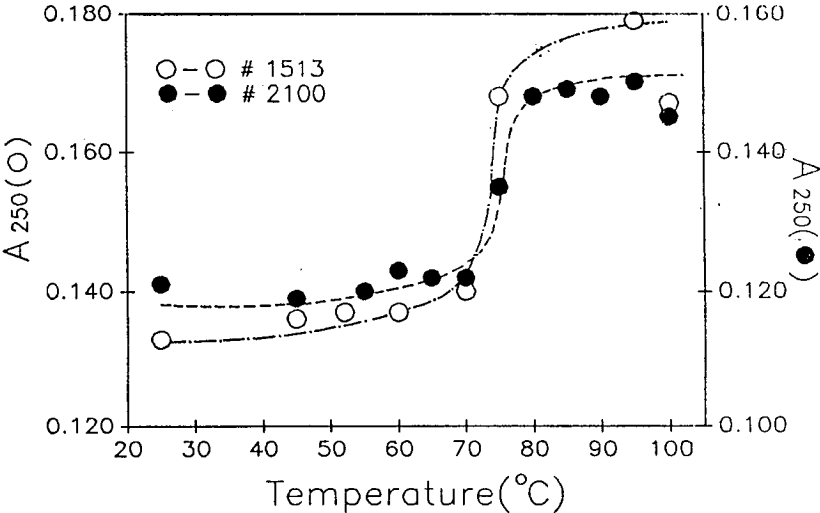


Figure 25. Isolated plasmids of #1513 (lane 1 and 2), #2100 (lane 3) and #2101 (lane 4).



Figure 26. Thermal curing of plasmid when grown at 25 °C. Lane 1 and 8 are  $\lambda$  DNA, lanes 2, 3, and 4 are plasmids from #1513, #2100, and #2101 grown at 18 °C, respectively, and lanes 5, 6, and 7 are plasmids from #1513, #2100, and #2101 grown at 25 °C, respectively.

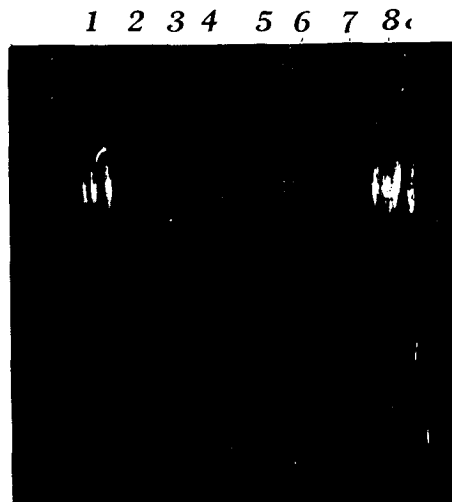
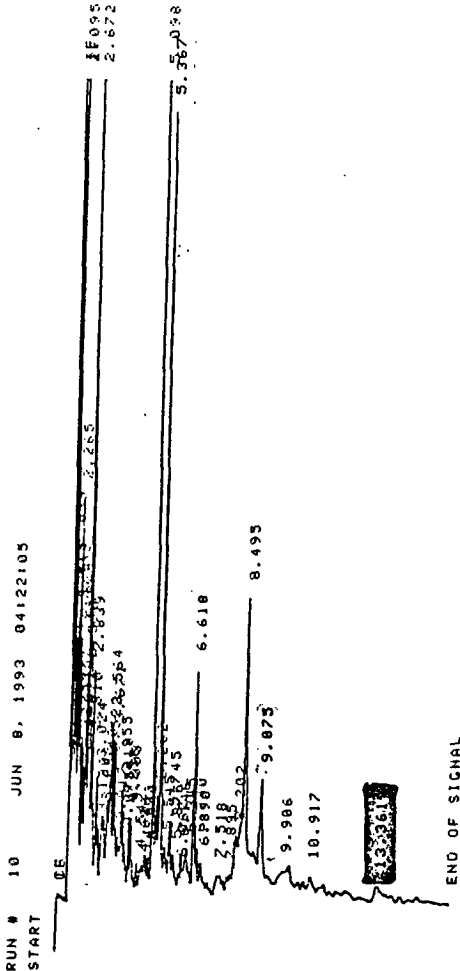
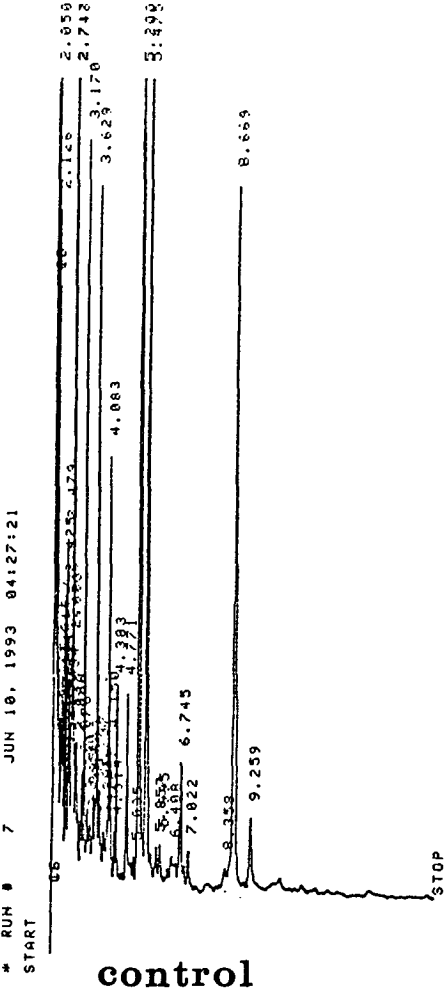


Figure 27. The gas chromatogram of fatty acid methyl ester composition *E. coli* HB101 grown at 20 °C transformed with plasmid isolated from #1513. Ultra-1 capillary column, oven temperature of 195 oC, detected with FID.



## 제 4 장. 고 찰

본 연구의 개발 대상 핵심 기술은 미생물 특히 해양 세균으로 부터 EPA 를 생산하는 것이다. 현재 국내에서는 이 분야의 연구는 어유로부터 EPA를 추출, 분리, 정제하는 수준에 머물러 있다. 이는 저렴한 폐자원 (정어리등의 어유) 으로 부터 고 부가가치 상품을 얻는다는 측면에서 추진 되어 일부 산업화에 들어서고 있다. 또 EPA와 같은 고도불포화 지방산의 경우 안정성에 문제점인 산화 방지를 위한 기초 연구도 수행되고 있다. 최근들어 국내에서도 EPA를 함유하고 있는 몇 종류의 상품이 건강 식품으로 시판 되고 있으며 DHA (Docosahexaenoic acid)를 두뇌 기능 강화 효과를 강조하여 참치 통조림 혹은 분유에 첨가한 상품이 선보이고 있다.

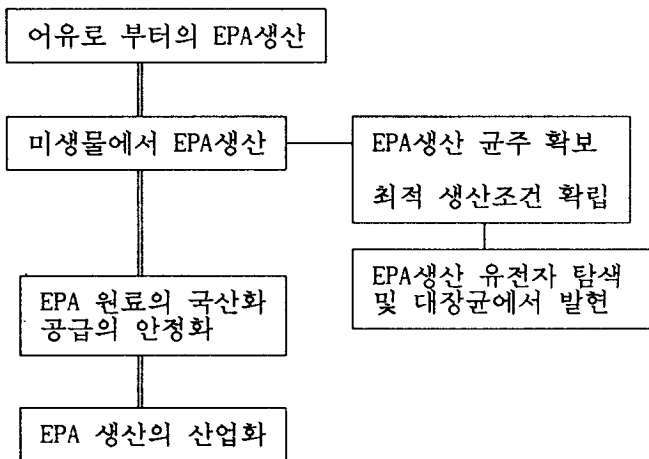
해양 미생물에서의 EPA 생산은 Fermentation 등의 미생물 공학적인 방법을 통하여 지속적으로 그 산물을 공급할 수 있으므로 어유로부터의 추출에 비해 수확량이나 수확기등의 영향을 덜 받고 안정된 원료 공급을 가능하게 한다는 잇점과 함께 일본의 EPA 최고 생산 균주인 SCRC-2738 (*Shewanella putrefaciens*)나 본 연구 결과 발견된 #1513 균주의 경우 처럼 EPA 이외의 여타 불포화 지방산 함량이 적으므로 분리 정제시에 비교적 용이하다는 장점이 있다. 따라서 단위 배양량당 추출가능한 EPA 함량이 어유로부터의 추출에 비해 크게 모자라지만 않는다면 전체 공정을 총괄적으로 볼때 경제성이 있으므로 미생물 공정법이 주된 EPA 생산법이 될수 있으리라고 사료된다.

본 연구의 결과 3,300 여종의 세균종을 확보하였으며 이들중 EPA를 세포막 구성 지방산으로 형성하는 20 종을 발견하였다. 이들 중 3 종(#1513)은 EPA 함유도가 매우 우수하여 현재까지 EPA함량이 가장 높은 것으로 알려진 일본의 SCRC-2738 번 균주 (*Shewanella putrefaciens*)에 비교할 만 하



다. 또한 EPA생산 균주의 효과적인 검색을 위한 시료 채취의 방향 설정, 시료 분석을 위한 최적조건을 확립하였고 상기 균주들에서 EPA를 생산하는 배양 최적 조건을 확립하였다. 본 연구의 최종 목표는 미생물을 이용한 EPA생산의 산업화로 건강 식품 및 의약품으로의 개발 가능성이 높은 EPA 제재의 국산화 및 고 품질 원료의 안정된 공급등인데 이를 위한 첫 단계로 EPA 생산능력이 뛰어난 3 종의 균주를 이미 확보하였으며 생산을 공정화하기 위하여 최대 생산 조건의 확립, 추출 및 분리, 정제 기술의 개발, 그리고 산화 방지 기술 개발 및 EPA생산에 관여하는 유전자를 분리하여 유전공학적인 기법을 통한 EPA의 대량생산등에 관한 연구를 기업체와 공동으로 수행할 예정이다.

Scheme: 기술개발의 전후방 연결 체계



미생물 배양 및 추출에 의한 EPA 생산이 산업화될 경우 원료 가격의 안정화와 안정된 공급이 예상되며 EPA 의 효능이 알려진 동맥 경화 치료제로 개발이 가능하며 1989 년 시점에서 연간 약 60 억원의 시장규모로 볼 때

매년 약 20 %의 성장을 가산하여 95년에는 약 100 억원의 시장이 예상된다. 현재 세계 최초로 EPA를 동맥 경화 치료용 의약품으로 상품화하여 판매 중인 일본의 Monchida 제약은 1970년 6월부터 1991년 3월까지 30 억엔의 폭발적인 판매고를 올렸고 현재 임상 시험 중인 고지혈증 치료제로까지 용도가 확대된다면 년 100 억엔 이상의 매출이 기대되는 것으로 분석하고 있다.

본 연구를 위하여 일본 Sagami Chemical Research Center 의 Dr. Yazawa 와 유기적인 협조 체제를 갖고 SCRC 표준 균주 입수 및 많은 토론을 통하여 연구에 도움을 얻을수있었으며 또한 1992년 Dr. Yazawa 를 초청 Seminar를 갖고 해양연구소 해양미생물 연구실의 본과제 수행에 공동 연구를 추진하고 있다. 한편 소련의 IMB (Institute of Marine Biology) 연구소의 지방산 전문가와 전문가 교환 및 공동연구를 진행하기 위하여 1992년 9월 부터 12월 사이에 러시아 전문가 V.I. Svetashev 박사가 본 연구실을 방문하여 연구를 수행하였다.

유용 균주 검색에서 가장 중요한 2 가지 문제는 우선 가능한 한 많은 종의 다양한 대상 균주를 체계적으로 확보하는 것이고 또 다른 하나는 검색 방법의 개선을 통하여 효율화를 꾀하는 것이라 할수있다. 본 연구의 경우 보통 등푸른 생선에 EPA 등의 고도 불포화 지방산들이 많이 포함되어 있으므로 이들의 장내에서 EPA 생산 균주를 찾고자 하는 시도는 매우 당연하다 할수 있다. 실제로 일본의 경우 생산능이 우수한 균주는 대부분 고등어, 정어리등의 내장으로부터 분리되었다. 본 연구에서는 이들 이외에 해삼, 조개등의 저서 동물들도 검색 대상에 포함시켰다. 이는 이러한 저서 동물들이 해양에서의 먹이 사슬의 비교적 높은 단계에 위치하므로 다양한 기능의 균주를 갖고 있을 가능성이 높기 때문인데 실제로 가장 높은 생산능을 보이는 #1513 번 균주를 해삼에서 분리함으로써 이를 확인하였다. 이러한

해양 생태학적 지식 및 정보에 근거한 접근 방법의 방향 설정은 보다 효율적인 목표 접근을 가능하게 하므로 앞으로의 검색과정에서 신중히 고려될 만 하다. 또한 검색 방법의 효율성은 사용 시약과 수행 시간에 의하여 좌우되는데 이를 단축하기 위하여서는 각 단위 검색의 소규모화가 필수적이며 고감도의 분석 방법이 선결되어야 한다. 본 연구에서는 사용되는 분석 방법인 TLC 와GC의 분석 감도내에서 검색 크기를 최소화하기 위하여 각 과정을 소형화, 자동화, 규격화하여 단위 소요 시간당 검색 물량을 극대화하였다. 한 예로 하루에 검색할 수 있는 대상 균주의 수를 200 종 까지 가능하게 하였다.

본 연구에서 확립된 수집, 보존, 분석 방법과 축적된 여타 know-how 들은 EPA 생산 균주의 검색뿐만 아니라 다음 단계로 추진할 수있는 또다른 고도 불포화 지방산인 Docosahexaenoic acid (DHA) 의 생산 균주 검색등 여러가지 균주 검색에 적용될 수있는 기본 기술로 기술 개발 여건 변화에 무관하게 필수적이라고 할 수 있다. 또 다음 단계 기술로 개발 중인 새로운 검색 방법의 개발 및 생산 최적 조건 수립, 나아가서는 유전자 재조합 기술을 통한 생산의 극대화등도 예상되는 기술 개발 여건 변화에 능동적으로 대처하는 필수 기술이라고 할수있다.

이웃 일본에서 이미 지난 1987 년에 EPA생산 세균을 확보하였고 (본연구에서 확보한 미생물과는 다른 종류임) 그 균주 특허를 취득한 상태로 유전자 재조합에 관한 연구도 상당 부분 진척되어 있다. 자연 미생물을 이용한 EPA의 공업적 생산은 생산원가등을 고려할때 값싸거나 폐자원을 활용한 발효공정을 통한 생산이 그한계이다. 이한계를 극복하기 위해서는 유전자 재조합을 통한 신규 생물의 개발이 그 관건이라고 할수있다. EPA생산 미생물의 확보의 의미를 EPA를 생산하는 원료의 확보 못지않게 EPA를 생산할 수있는 유전자의 확보라는 의미로 해석해야 한다. 왜냐하면 bacteria수

준에서의 유전자 조작은 그 genome 크기가 작으므로 어류나 algae등에서의 작업에 비해 훨씬 현실적인 거리로 다가오기 때문이다. 본연구자와 일본 Sagami 연구소의 Dr. Yazawa (EPA 생산 미생물의 최초 발견자)는 EPA유전자의 발견과 대장균에의 이식 및 발현, 나아가서는 Yeast (특히 식용 Yeast) 그리고 EPA의 전구물질인 linolenic acid를 다량함유하는 콩과 식물에 EPA 유전자를 발현시키는 것이 연구소 수준에서의 궁극적인 목표로 경쟁적 협력 관계를 갖는 다는 점에 견해를 같이 하고 있다. 물론 이 모든 과정을 다음 연구 년도 1 년내에 수행하는 것은 거의 불가능할것으로 생각되나 EPA생산의 산업화를 위해 기업등에 협력 동기를 부여한다는 측면에서도 우선적으로 대장균으로의 EPA합성 유전자 이식과 발현은 필히 수행되어야한다고 사료된다.

## 참고문헌

Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. (1980) in Manual of clinical Microbiology, 3rd edition (Lennette E.H. ed.), pp. 303-304.

Bang, H.O. and Dyerberg, J. (1972) Plasma lipids and lipoproteins in Gleenlandic west coast Eskimos. Acta Med. Scand., 192, 85-94.

Bang, H.O., Dyerberg, J. and Nielsen, A.B. (1971) Plasmalipid and lipoprotein pattern in Gleenlandic west-coast Eskimos. Lancer, i, 1143-1146.

Baumann, P., Gauther, M.J., and Baumann, L. (1984) in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1 (Krieg, N.R. and Holt, J.G., eds.), pp. 343-352.

Delong, E.F. and Yayanos, A.A. (1985) Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. Science, 228, 1101-1102.

Delong, E.F. and Yayanos, A.A. (1986) Appl. Envir. Microbiol., 51, 730-737

Dittmer, J.D. and Lester, R.L. (1964) J. Lipid Res., 5, 126-129.

Dubos, R., Schaedler, R.W., Castello, R., and Hoet, P. (1965) Indigenous,

normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.*, 122, 67-76.

Dyerberg, J., and Bang, H.O. (1979) Lipid metabolism, atherogenesis, and haemostasis in Eskimos : the role of the prostaglandin-3 family. *Haemostasis*, 8, 227-233.

Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffensen, E., Moncada, S., and Vane, J.R. (1978) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, ii, 117-119.

Folch, J., Lees, M. and Sistanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-499.

Freter, R. (1974) Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora, *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 1409-1416.

Gellerman, J., and Schlenk, H. (1979) Methyl-directed desaturation of arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 23-30.

Harris, W.S., Conner, W.E., and McMurry, M.P. (1980) Reduction of Plasma lipids and lipoproteins By dietary omega-3 fatty acids. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 33, 928-931.

Hasegawa, Y., Kawada, N., and Nosoh, Y. (1980) Change in chemical composition of membrane of *Bacillus caldotenax* after shifting the growth temperature. *Arch. Mikrobiol.*, 126, 103-108.

Iritani, N., Inoguchi, K., Endo, M., Fukuda, E., and Morita, M. (1980) Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 618, 378-382.

Itoh, T., Funabashi, H., Katayama-Fujimura, Y., Iwasaki, S. and Kuraishi, H. (1985) Structure of methylmenaquinone-7 isolated from *Alteromonas putrefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 840, 51-55.

Jones, R.D. and Prah, F.G. (1985) Lipid composition of a marine ammonium oxidizer growth at 5 and 25 °C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26, 157-159.

Kaneda, T., Arai, K., and Tokuda, S. (1964) Studies on the effects of Marine products on cholesterol metabolism in rats-II. The comparison of the effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 30, 419-423.

Kayama, M. (1972) *Lipids. Suisanzoushoku*, 20, 247-262.

Kayama, M., Tsuchiya, Y., and Mead, J.F. (1963) A model experiment of

aquatic food chain with special significance in fatty acid conversion.  
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 29, 452-458.

Kayama, M., Iijima, N., Kuwabara, M., Sado, T., Araki, S. and Sakurai, T.  
(1985) Effect of water temperature on the fatty acid composition of  
Porphyra. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 51, 687-691.

Kinsella, J.F. (1987) Seafoods and Fish Oils in Human Health and  
Disease. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kroman, N. and Green, A. (1980) Epidemiological studies in the Upernavik  
district, Greenland. Acta Med. Scand., 208, 401-406.

Kungsuwan, A., Noguchi, T., Arakawa, O., Simidu, U., Tsukamoto, K.,  
Shida, Y. and Hashimoto, K. (1988) Tetrodotoxin-Producing Bacteria from  
the Horseshoes Crab *Carcinoscorpius rotundicauda*. Nippon Suisan  
Gakkaishi, 54, 1799-1802.

Lands, W.E.M. (1986) Fish and human health. Academic Press Inc.,  
London.

MacDonell, M.T. and Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae*,  
and recommendation for two new genera, *Lisonella* and *Shewanella*.  
System. Appl. Microbiol., 6, 171-182.



Marr, A.G. and Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 84, 1260-1267.

Monteoliva-Sanchez, M. and Ramos-Cormenzana, A. (1987) Cellular fatty acid composition of *Planococcus Halophilus* NRCC14033 as affected by growth temperature and salt concentration. Current Microbiol., 15, 133-136.

Moule, A. and Wilkinson, S.G. (1987) Polar Lipids fatty acids and isoprenoid quinones of *Alteromonas putrefaciens* (*Shewanella putrefaciens*). System. Appl. Microbiol., 9, 192-198.

Murota, S. and Morita, I. (1984) Eicosapentaenoic acid. Igakunoayumi, 130, 787-798.

Needleman, P., Raz, A., Minkes, M.S., Ferrendelli, J.A., and Sprecher, H. (1979) Triene prostaglandins : Prostacyclins and thromboxane biosynthesis and unique Biological properties. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 76, 944-948.

Noguchi, T., Joen, J.K., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., and Hachimoto, K. (1986) Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergratis floridius*. J. Biochem., 99, 311-314.

Noguchi, T., Hwang, D.F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y. and Hashimoto, K. (1987) *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fuguvermicularis vermicularis*. *Marine Biology*, 94, 625-630.

Oshima, M., and Miyakawa, A. (1974) Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria. *Lipids*, 9, 476-480.

Puska, P., Nissinen, A., Vartiainen, E., Dougherty, R., Mutanen, M., Iacono, J.J., Korhonen, H.J., Pietinen, P., Leino, U., Moisio, S. and Huttunen, J. (1983) Controlled, randomised trial of the effect of dietary fat on blood pressure. *Lancet*, i, 1-5.

Sanders, T.A.B., Vickers, M., and Haines, A.P. (1981) Effect on Blood Lipids and haemostasis of a supplement of cod-liver oil, rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, in healthy young men. *Clinical Science*, 61, 317-324.

Scherhag, R., Kramer, H.J. and Busing, R. (1982) Dietary administration of eicosapentaenoic and linolenic acid increase arterial Blood pressure and suppresses vascular prostacyclin synthesis in the rat. *Prostaglandins*, 23, 369-382.

Schoene, N.W. and Fiore, D. (1982) Effect of a diet containing fish oil on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Prog. Lipid Res.*, 20, 569-570.

Seto, A., Wang, H.L., and Hasseltine, C.W. (1984) Culture conditions affect eicosapentaenoic acid contents of *Chlorella minutissima*. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61, 892-894.

Simopoulos, A.P., Kifer, R.R. and Martin, R.E. (1986) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. Academic Press, INC., London.

Singer, P., Jaeger, W., Wirth, M., Voigt, S., Naumann, E., Zimontkowski, S., Hajdu, I., and Goedicke, W. (1983) Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. *Atherosclerosis*, 49, 99-108.

Singer, P., Worth, M., Voigt, S., Zimontkowski, S., Godicke, W., and Heine, H. (1984) Clinical studies on lipid and blood pressure lowering effect of eicosapentaenoic acid-rich diet. *Biomed. Biochim. Acta*, 43, s421-s425.

Sugita, H., Ueda, R., Noguchi, T., Arakawa, O., Hachimoto, K. and Deguchi, Y. (1987) Identification of a Tetrodotoxin-producing Bacterium Isolated from the Xanthid Crab *Atergatis Floridae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1693.

Terano, Y., Hirai, A., Hamazaki, T., Kpbayashi, S., Fujita, T., Tamura, y. and Kumagai, A. (1983) Effect of oral administration of Highly purified eicosapentaenoic acid on platelet funcion, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis*, 46, 321-331.

Von Rossonczy, T.O., Ruitter, A., Bronsgeest-Schoute, H.C., Van Gent, C.M. and Hermus, R.J. (1978) The effect of a fish diet on serum lipids in healthy human subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 31, 1340-1346.

Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., Wakeham, S.G. and Cannel, E.A. (1987) Membrance lipids of a Psychrophilic and Barophilic deep-sea bacterium. *Current Microbiol.*, 14, 319-322.