

Isolation and Characterization of Marine Microorganisms Producing Cellulase from the Seashore of the Kyungsang Province in Korea

Kang-Ick Jo, Bo-Hwa Lee, Bo-Kyung Kim and Hae-Young Jo

Sung-Koo Kim¹, Soo-Wan Nam², Jin-Woo Lee

Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea,

¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyung National University,

Busan 608-737, Korea, ²Department of Biotechnology and Bioengineering,

Dong-Eui University, 614-714, Korea.

TEL: +82-51-200-7593, FAX: +82-51-20-6536

Abstract

Marine microorganisms to produce functional biopolymers were isolated from the seashore of the Kyungsang province. Microorganisms to hydrolyze carboxymethyl cellulose(CMC) were cultured in marin broth and the other liquid medium that contained 2.0% (w/v) glucose, 0.25% yeast extract, 0.5% K₂HPO₄, 1% NaCl, 0.02% MgSO₄·7H₂O and 0.06% (NH₄)₂SO₄ to investigate the ability to produce carboxymethyl cellulase (CMCase) under aerobic conditions. Twelve microorganisms among them showed higher activities of CMCase than *B. amyloliquefaciens* DL-3, which was known as a cellulase-producing strain. The microorganism showing highest activity of CMCase in this study was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* with 16S rDNA partial sequencing and gyrase A partial sequencing and named as *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53.

서론

해양계에서 해양 미생물의 기본적인 역할은 1)해수 중의 용존 또는 입자성 유기물질을 분해하여 CO₂와 질산염 같은 무기물로 만들고, 2)유기물의 분해되는 도중에 생성되는 암모니아를 질산염으로 변환시키는 것처럼, 인, 질소, 황화합물의 산화환원 반응을 관장하며, 3)인공적으로 합성된 유기성 오염물질을 분해할 있는 능력이 있으

며, 4)또 다른 해양생물에 공생하여 다른 생물의 생존에 기여한다. 이와 같이 다양한 기능을 지닌 해양 미생물은 다양한 환경에 적응하기 위한 많은 새로운 효소 및 생리 활성 물질을 생산하고 있다. 따라서 체계적인 해양 미생물의 수집 및 분류가 필요하며 수집된 해양미생물 자원에서 생리 활성물질을 확보하기 위해 이와 같은 연구를 하게 되었다.

본 연구에서는 해양으로부터 다양한 시료를 채취하여 해양미생물을 분리하고, 분리한 미생물에 대한 다양한 기질의 분해능을 확인하였다. 산업적으로 이용가치가 높은 섬유소 분해효소의 생산을 위해 분리한 균주 가운데 섬유소 분해능력이 우수한 균주를 선발하고 기존의 섬유소 분해효소를 생산하는 균주와 생산 능력을 비교하였다.

재료 및 방법

Microorganisms and Media

대한민국 경상도의 울진, 영덕, 포항, 부산, 진해, 남해 등의 해안에서 바닷물, 모래, 해초, 따개비, 이끼 등의 시료를 채취하여 0.85% 생리식염수로 희석한 후 Marine agar, Nutrient agar, 해수에 조제한 Nutrient agar, Tryptic soy agar, 1.5% NaCl을 첨가한 Tryptic soy agar에 도말하여 30°C에서 48hr 배양하였다. 다대포, 동해, 남해의 시료로부터 각각 70개, 173개, 128개의 단일 콜로니를 확보하였다 (fig. 1).¹⁾

CMCase activity

CMCase 생산성은 marine broth와 2% glucose, nitrogen: 0.25% yeast extract, salts: 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 로 구성된 액체배지를 사용하였다. 각 균주를 접종한 후에 30에서 200rpm의 교반으로 72시간 동안 배양하고 CMCase 활성을 측정하였다. 효소의 활성은 DNS 방법에 준하였고, CMC와 배양상등액의 혼합액을 50°C에서 20분간 방치 후 DNS를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 550nm에서 흡광도를 확인하였으며 CMCase activity를 측정하였다. CMCase의 1unit는 분당 1 μ mol의 glucose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.²⁾

Protein quantity

배양액에서 균체를 제거한 상등액의 단백질 함량은 Bradford method에 준하였고, BSA(bovum serum albumin)를 표준 시약을 사용하여 배양액에서 균체를 제거한 상등액의 단백질 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Isolation of marine microorganisms

해양미생물의 생육을 위하여 사용한 다섯 종류의 배지 중 Marine agar에서 가장 높은 세포 성장을 보였다 (Fig. 2). 균주의 특성 분석을 위한 전배양 배지는 Marine broth를 이용하였다.

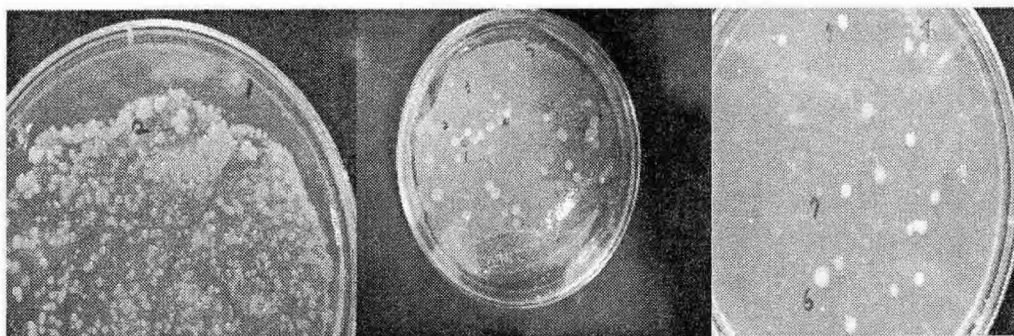


Fig. 1. Isolation of microorganism which were isolated from the seashore of the Kyungsang province in Korea (a, nutrient agar prepared with seawater; b, Tryptic soy agar added with 1.5% NaCl and c, marine agar)

Substrate-hydrolytic activity of marine microorganisms

총 371개의 해양미생물을 Starch, CMC, Protein에 대한 분해활성을 확인하기 위하여 해양미생물의 배양액에서 균체를 제거한 상등액을 $100\mu\text{l}$ 를 점적하여 건조한 disc paper를 증류수에 기질 1%와 Agar 2%를 첨가한 고체배지 위에 올려 놓고 30°C 에서 24 hr 동안 배양 후 분해환의 크기를 관찰하였다.

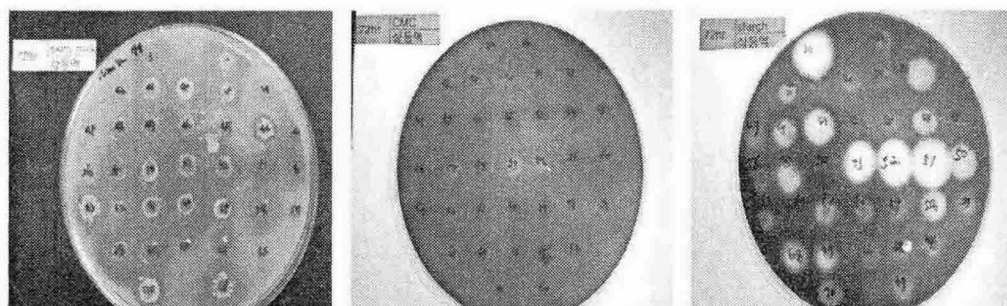


Fig. 2. Comparison of substrate-hydrolytic abilities of isolated microorganisms.

CMCase activities of marine microorganisms

CMCase 활성이 높은 해양미생물 30균주를 배양하여 12균주를 선별하였다. 선별한 해양 미생물 12 균주를 배양하여 CMCase의 활성을 측정하고 섬유소 분해효소의 생산성이 높다고 알려진 *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3와 비교하였다. 그 결과 CMCase 활성이 가장 높은 균주는 다대포의 해안에서 분리하여 명명한 A-53로 나타났다 (fig. 3 & 4). A-53 균주를 16S rDNA partial sequencing 및 gyrase A partila sequencing 하여 동정한 결과, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*로 확인되었으며 *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53으로 명명하였다.

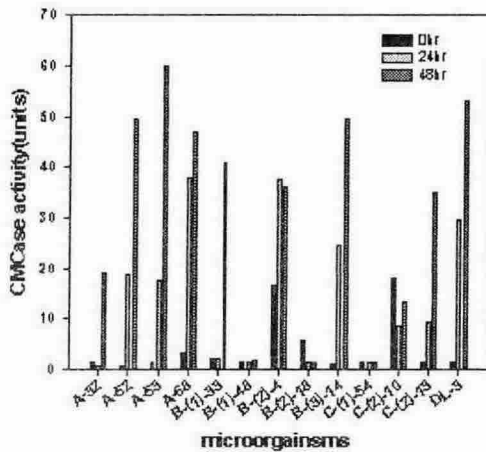


Fig 3. Comparison of CMCase activities in twelve marine microorganisms and *B. amyloliquefaciens* DL-3.

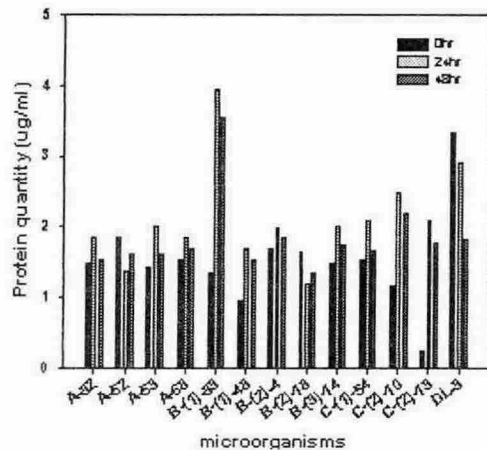


Fig 4. Protein quantity in twelve marine microorganisms and *B. amyloliquefaciens* DL-3

요약

해양에서 유용물질을 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 경상도 지역의 해안에서 시료를 채취하여 총 371 균주의 해양미생물을 얻었으며 전분, CMC 및 단백질 등과 같은 기질에 대한 분해활성을 측정하여 CMC에 대한 우수한 분해능력을 가진 30균주를 선별하였다. 이들 30 균주를 배양하여 CMCase의 생산능력이 우수한 12 균주를 선별하였다. 이들 해양미생물을 배양하고 섬유소 분해효소를 생산한다고 알려진 *B. amyloliquefaciens* DL-3와 CMCase의 활성을 비교하였다. 이 중 다대포에서 분리하여 명명한 A-53 균주가 가장 높은 CMCase 활성을 나타

를 생산한다고 알려진 *B. amyloliquefaciens* DL-3와 CMCase의 활성을 비교하였다. 이 중 다대포에서 분리하여 명명한 A-53 균주가 가장 높은 CMCase 활성을 나타내었다. A-53 균주를 16S rDNA partial sequencing 및 gyrase A partial sequencing하여 동정한 결과, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*로 확인되었으며 *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53으로 명명하였다.

References

1. Chio, H. J., M. J. Jung, Y. K. Jeong. 2000. Isolation and identification of a marine bacterium producing an immunostimulant, *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* **29(6)**, 1145-1150.
2. Kim, Y. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, S. J. Kim. 2003. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulase and xylanase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **13(1)**, 1-8.