

논두렁 물의 미생물군으로부터 해조분해능을 갖는 균주의 분리

김해섭 · 최옥수¹ · 강동수 · 박육민 · 백승한¹ · 배태진*

여수대학교 식품공·영양학부, ¹순천제일대학 식생활부

Isolation of Seaweed Hydrolytic Strains from Microfloras in Rice Field Ditch Water

Hae-Sub KIM, Ok-Soo CHOI¹, Dong-Soo KANG, Uk-Min PARK,
Seung-Han BAEK¹ and Tae-Jin BAE*

Division of Food Technology and Nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

¹Division of Food Science, Sunchon First College, Sunchon 540-744, Korea

Various bacterial strains were isolated from rice field ditch water, and their seaweed degrading activities were investigated. They were incubated in a liquid medium of sea tangle (*Laminaria japonica*) and sea mustard (*Undaria pinnatifida*) powder for 3 weeks. Ratios of reduced sugar to total sugar of the liquid medium were measured once a week. Ratios of reduced sugar to total sugar of 27A311, 27C221, 27A111 and 27B121 strains were highest. Accordingly, these four strains were incubated in 3 different liquid media of sodium alginate, sea tangle powder, and sea mustard powder for 3 or 4 weeks. The ratios of reduced sugar to total sugar and cell growth were measured once a week. Cell growth was higher in 27A111 and 27C221. Ratios of reduced sugar to total sugar was higher for 27C221 in the liquid mediums with sodium alginate and sea mustard powder, and for 27A111 in the liquid medium with sea tangle powder.

Key words: Seaweed, Hydrolysis, Microflora, Sea tangle (*Laminaria japonica*), Sea mustard (*Undaria pinnatifida*)

서 론

미생물 효소에 의한 알gin산의 분해에 관한 연구로는 해수 및 해양토양으로부터 분리한 네 종류의 미생물이 정제된 알gin산 뿐만 아니라 해조도 분해한다고 Waksman and Allen (1934) 이 처음 보고한 이래 몇몇 연구자들의 계속적인 보고가 있었다. Joo et al. (1995)은 알gin산 분해균 *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체내 효소의 정체 및 특성에 관하여 연구하였다. 특히, 알gin산 이용의 범위를 확대하기 위해 여러 가지 연구가 행해지고 있으며, 그 한 분야로 미생물에 의한 알gin산의 분해에 대한 연구이다 (Kaneko et al., 1990a, b; Sawabe et al., 1992a, b; Kashiwabara et al., 1969).

해조류 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해가 어렵다는 특성을 지니고 있기 때문이다 (Jung et al., 1999). 특히 다시마는 미역에 비해 조체가 매우 강인하여 생으로 먹기에 알맞지 않고 자숙 등 가열처리에 의해서도 조직이 쉽사리 부드러워지지 않아서 우리의 식생활에 부합되지 못하고 있다 (Jeong et al., 1994). 다시마를 가공하여 조미료로 이용하고자 할 때 복합다당류인 알gin산이 많이 함유되어 있어 추출액의 여과, 농축 또는 건조시 많은 제약이 있는 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 1993). 이처럼 다시마는 훌륭한 건강식량자원이면서도 해조류를 이용한 가공에서 가장 문제가 되는 것은 조체의 강인함으로 인한 세포벽 충진

물질인 세포간 다당의 유용성분을 추출하기가 어렵고, 추출한다 하여도 기호성의 저하로 제대로 활용되지 못하고 있을 뿐만 아니라 많은 비용을 필요로 하여 풍부한 자원이면서도 연안 어민에게 소득으로 연결되지 못하고 있다 (Jeong et al., 1994; Bae et al., 2002).

본 연구는 예비실험을 통해 해조의 조작파괴, 즉 다시마, 미역, 돌가사리, 톳 및 가시파래에 접종하여 환원당, 전당, 추출율 및 분해율을 검토한 결과에서 그 가수분해가 인정되었던 (Kim and Bae, 2002a, b) 논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료를 사용하여, 몇 단계의 반복배양과 성분분석을 통하여 해조분해능을 갖는 미생물을 분리하였다.

재료 및 방법

실험 재료

해조류

실험에 사용한 재료 중 다시마 (*Laminaria japonica*)는 전남 완도연안에서, 미역 (*Undaria pinnatifida*)은 전남 여수연안에서 각각 생산되어 건제품으로 판매되는 것을 구입하여 전조시켜 -40°C 동결고에 보관하여 두고, 실험 직전에 고속분쇄기를 이용하여 100 mesh 이하로 분쇄한 것을 사용하였다.

미생물 채취 시료

미생물군 시료를 다시마, 미역, 돌가사리, 톳 및 가시파래에 접종하여 환원당, 전당, 추출율 및 분해율을 검토한 결과에서 그 가수분해가 인정되었던 (Kim and Bae, 2002a, b) 논두렁

*Corresponding author: bae5658@yosu.ac.kr

물에서 채취한 미생물군 시료를 사용하였다. 미생물시료는 6자리의 번호로 표기하였다. 즉, 처음 두자리의 27은 논두령 물에서 채취한 것을 의미하며, 세 번째의 A, B, C는 논두령 물에서 채취한 미생물군 시료를 1차 순수배양에서 얻은 것을, 네 번째, 다섯 번째 및 여섯 번째 숫자도 각각 2차, 3차 및 4차에 의한 순수배양에 의해 얻어진 미생물시료라는 것을 의미한다.

실험 방법

알긴산 배지 제조

알긴산 분해능을 관찰하기 위한 알긴산 배지는 Kitamikado et al. (1989)이 보고한 peptone 배지 조성 중 일부를 변형하여 만든 배지로서 Table 1에 나타내었다. 우선 액체배지 A에 분리 균주를 접종하여 72시간 전배양하였다. 이 배양액을 100 mL의 액체배지 B에 2 mL 씩 접종하고 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양에서 7일간 배양한 액으로 알긴산 분해능 측정에 사용하였다.

Table 1. Compositions of alginic acid media

	Medium A	Medium B
Bacto-peptone	5.0 g	KH_2PO_4 1.0 g
Sodium alginate	5.0 g	NaCl 8.5 g
NaCl	8.5 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
Distilled water	1,000 mL	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
pH	7.6	KCl 0.5 g
		Sodium alginate 10 g
		Distilled water 1,000 mL
		pH 7.6

다시마와 미역 배지 제조

다시마 분해능이 있는 균주의 분리에 사용한 배지는 KH_2PO_4 , NaCl, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl 및 bacto-agar를 함유하는 pH 7.6의 하층배지와 다시마분말과 bacto-agar를 함유하는 pH 7.6의 상층배지를 사용하였다 (Groleau and Yaphe, 1977). 한편 다시마의 분해능과 균체의 성장률을 측정하기 위한 배지는 Table 1의 알긴산배지에서 sodium alginate 대신에 다시마 또는 미역분말을 첨가하여 조제한 액체배지들을 사용하였다.

전당 측정

전당은 phenol-sulfuric acid법으로 시료용액 1 mL (10-100 $\mu\text{g/mL}$)를 시험관에 취하여, 5% phenol 용액 1 mL를 가한 후 혼합하고, 여기에 진한 황산 5 mL를 가하여 빌열시키며 잘 혼합하였다. 이 반응액을 실온에서 30분 방치한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고, 환원당 함량을 구하였다.

환원당 측정

환원당 함량 측정은 Somogyi-Nelson법으로 먼저 조제한 시료용액 1 mL와 구리시약 1 mL를 시험관에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제1구리(Cu_2O)를 생성시켰다. 여기에 몰리브덴용액 1 mL를 가하여 발색시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하고, 환원당 표준시약에 의한 검량선

으로부터 환원당을 정량 하였다.

추출율과 분해율

환원당과 전당의 추출율은 원료 해조의 전당에 대한 환원당과 전당의 비율로 각각 나타내어 원료 해조에서 어느 정도로 가수분해되면서 당이 용출되어 나왔는가를 나타내었고, 분해율은 추출액 중의 전당에 대한 환원당의 비율로 나타내었다.

균체 성장을

각각의 배양조건에서 배양한 액을 충분히 교반한 다음, 620 nm에서 흡광도를 측정하고, 균을 접종하지 않은 액체배지의 흡광도 값으로 보정한 것을 균체 성장의 지표로 하였다.

결과 및 고찰

단일 균주 분리와 분해능

논두령 물에서 채취한 미생물군 시료에 대하여 다시마분말 첨가 고체배지를 이용하여 4차에 걸쳐 반복배양을 실시하였다. 그 결과 19균주를 분리하였으며, 이들 균주를 다시마분말 첨가 액체배지에서 3주간 배양하며, 1주간격으로 전당과 환원당의 함량을 측정하고, 그 결과로 이들 균주의 다시마 추출율을 계산하여 Table 2에 나타내었다. 분리한 19균주는 모두 대조구에 비해 배양 전 기간에 높은 추출율을 나타내었다. 배양 1주에 대조구의 0.82%에 비해 논두령 물에서 채취한 미생물군에서 분리한 균주들을 접종한 실험구에서는 2.20-10.05%로, 배양 2주에서는 대조구 1.03에 비해 5.25-11.20%, 배양 3주에서는 대조구 1.26에 비해 5.89-11.75%로 각각 배양 기간이 길어짐에 따라 대조구와 실험구와의 차이는 더욱 크게 나타났다. 배양 1주에서는 27B121균주가 10.05%로 가장 높은 추출율을 나타내었으며, 배양 2주에서는 27A111균주가 11.20%로 가장 높은 추출율을 그리고 배양 2주에서는 27A311

Table 2. Ratio (%) of reducing sugar to total sugar in medium added by sea tangle (*Laminaria japonica*) powder

Sample No.	1 week	2 weeks	3 weeks
Control	0.8152	1.0284	1.2635
27A111	10.0304	11.2003	11.5625
27A121	7.2629	8.3282	8.9953
27A211	2.2033	6.7737	7.0056
27A221	6.5406	6.6790	6.8276
27A311	9.0417	10.1199	11.7542
27A312	3.1987	8.4320	9.0259
27B111	8.0691	8.4937	8.6128
27B112	3.5461	8.4443	9.1297
27B121	10.0506	10.1231	10.1761
27B122	7.3527	7.4488	7.5022
27B211	7.8175	8.0111	8.0375
27B212	7.7970	8.0092	8.2228
27B221	3.3789	7.4395	8.9103
27B311	4.0743	5.2487	6.1586
27C111	3.6264	6.4017	7.2631
27C121	4.1609	6.0404	6.5552
27C211	5.5317	5.7773	5.8862
27C221	9.5788	10.4388	11.7324
27C222	7.6448	7.8008	7.8683

균주가 11.75%로 가장 높은 추출율을 나타내었다. 이들 3균주 외에 27C221균주도 배양 3주에 11.73%로 27A311 다음으로 높은 추출율을 보였다. 이들 4균주 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주들은 배양 1주부터 9.00% 이상의 높은 추출율을 보여 배양 3주후에는 10% 이상의 추출율을 나타내 어 대조구에 비해 10배 이상의 추출 효과를 나타내었다. 따라서 이들 4균주에 대한 좀더 많은 검토를 통하여 해조를 효과적 으로 가수분해시키는 균주를 선택하고자 다음 실험을 진행하였다.

알긴산 분해능

균의 성장율

논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주에 대하여 sodium alginate가 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 균의 성장율을 620 nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 모든 균주에서 대조구에 비하 여 월등히 높은 성장률을 보였으며, 27A111균주는 배양 1주에 0.22와 2주에 0.23 및 3주에 0.25로 전 배양기간 동안 가장 높은 성장률을 나타내었다. 다음으로 27A311, 27B121 및 27C221균주의 순이었다. 27C221균주는 배양 초기부터 3주 까지 급격히 증가하는 형태를 보인 반면 나머지 3균주는 배 양 1주까지 급격히 증가하고 그 후 완만히 증가하는 형태를 보였다.

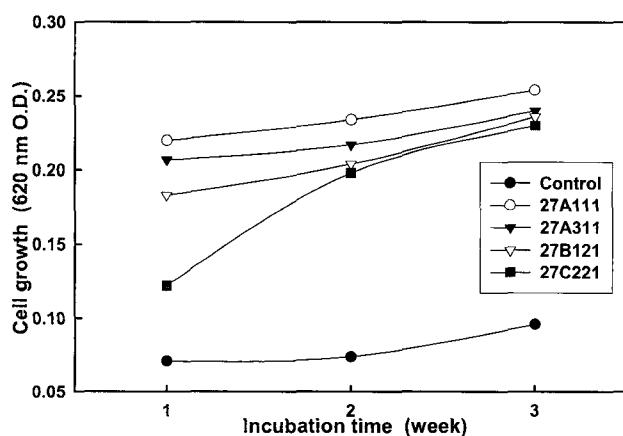


Fig. 1. Cell growth of 4 bacterial strains in liquid medium added by sodium alginate.

알긴산 분해율

Fig. 2에는 논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주에 대하여 sodium alginate가 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 계산하여 나타내었다. 배양기간이 경과함에 따라 대조구의 분해율은 크게 변화가 없는데 비해 모든 실험

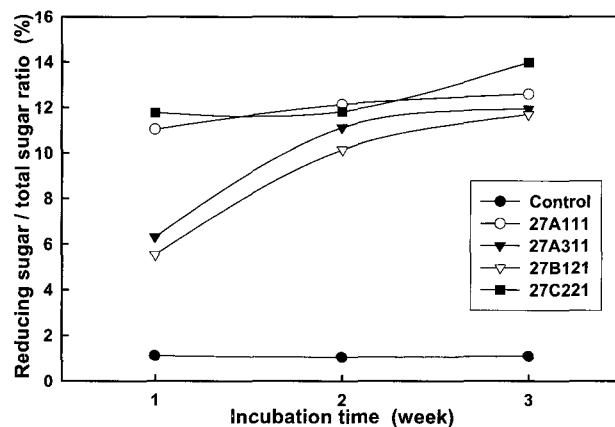


Fig. 2. Ratios of reducing sugar to total sugar for 4 bacterial strains in liquid medium added by sodium alginate.

구는 큰 변화를 보였는데, 균체의 성장률이 가장 낮았던 27C221균주가 배양 1주와 3주에 각각 11.77%와 13.97%로 가장 높은 분해율을 보였다. 다음으로 균체성장율이 가장 높았던 27A111균주가 각각 11.04%와 12.58%를 나타내었다. 27C221균주의 경우 알긴산의 분해 작용이 상당히 강할 것으로 추정된다. Yonemoto et al. (1991)은 토양에서 알긴산 분해 활성이 강한 균주를 분리하였고, 알긴산 함량이 높은 배지일 수록 효소의 생산과 효소 활성은 높았다고 하였다. 일반적으로 알긴산을 분해하는 효소는 알긴산을 분해하여 점도를 저하시키는 경우와 환원당을 생성하는 경우로 크게 두 가지로 대별되는데, 이러한 차이는 효소가 알긴산 구조 중 어느 부위에 작용했느냐에 따라 달라진다. 일반적으로 mannuronic acid 결합에 작용할 경우 환원당 생성을 증가시키고, glucuronic acid 결합에 작용할 경우는 점도를 저하시킨다(Kitamikado et al., 1989; Davidson et al., 1976; Boyd and Turvey, 1977; 1978; Ando and Inoue, 1965).

다시마 분해능

균의 성장율

다시마는 종류와 용도가 다양하지만 김과 미역의 조작과 비교하여 매우 강인함으로 현재는 삶고, 찌고, 자르는 과정을 거친 후 식용으로 이용하는 경우가 많은데, 이는 다시마는 다른 식용해조에 비해서 복잡성을 가지고 있기 때문이다. 논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주를 다시마 분말이 첨가된 액체배지에 4주간 배양 하면서, 1주 간격으로 균체성장율을 측정하고 Fig. 3에 나타내 었다. 알긴산배지에서 성장률이 가장 낮았던 27C221균주가 다시마배지에서는 가장 높은 성장률을 보였는데, 1주배양에 0.75, 4주 배양 후 1.20로 나타났으며, 나머지 3균주는 배양4주 후 대조구의 0.32보다 높은 0.89-1.06의 값을 나타내어 대조구 와는 큰 차이를 보였다.

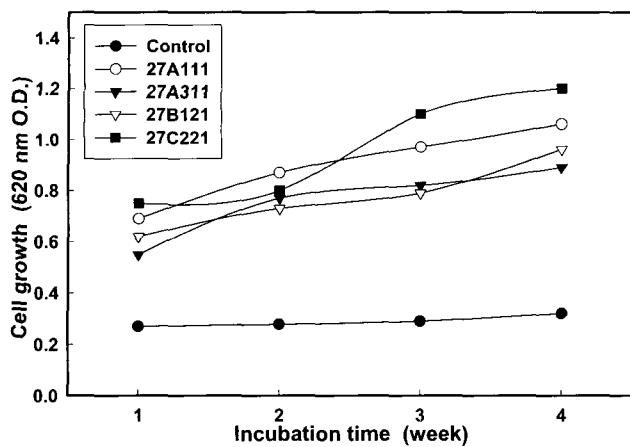


Fig. 3. Cell growth of 4 bacterial strains in liquid medium added by sea tangle powder.

다시마 분해율

Fig. 4에는 논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주에 대하여 다시마 분말이 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 계산하여 나타내었다. 배양1주에 27A111균주가 가장 높은 분해율을 보였으며, 다음으로 27A311, 27B121 및 27C221순으로 나타났으며 모두 대조구에 비해 4배 이상 높은 값을 보였다. 한편 배양 기간이 경과함에 따라 분해율도 증가하였는데, 모든 실험구에서 유사한 경향을 나타내었다. 배양 4주 후에도 27A111균주가 가장 높은 분해율을 나타내었고, 다음으로 27A311, 27B121 및 27C221균주의 순이었으며, 모든 값은 Fig. 2의 알긴산의 분해율보다도 높은 값을 나타내었다.

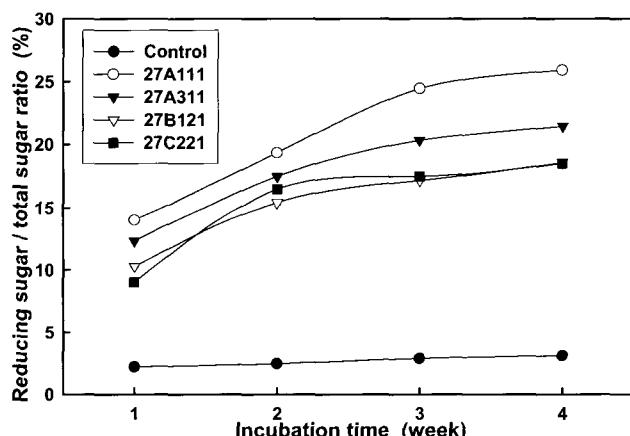


Fig. 4. Ratios of reducing sugar to total sugar for 4 bacterial strains in liquid medium added by sea tangle powder.

미역 분해능

균의 성장을

다시마 분말 첨가 액체배지와 같은 방법으로 미역분말을 첨가한 액체배지에 선택된 4균주를 각각 접종하고, 4주간 배양하면서 620 nm에서 흡광도를 측정함으로 균체성장률을 관찰하여 Fig. 5에 나타내었다. 배양기간동안 대조구 0.22-0.28에 비해 27C221균주는 0.66-0.98로 가장 높은 성장률을 보였으며, 나머지 균주들도 0.60-0.91로 높은 성장률을 보였다. 모든 균주의 경우 배양 1주까지 급격히 증식하고, 그후 배양 4주까지는 완만히 증가하여, 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 모든 값은 대체로 알긴산 배지에 비해서는 높았으나, 다시마 배지에 비해서는 낮은 값을 보였다.

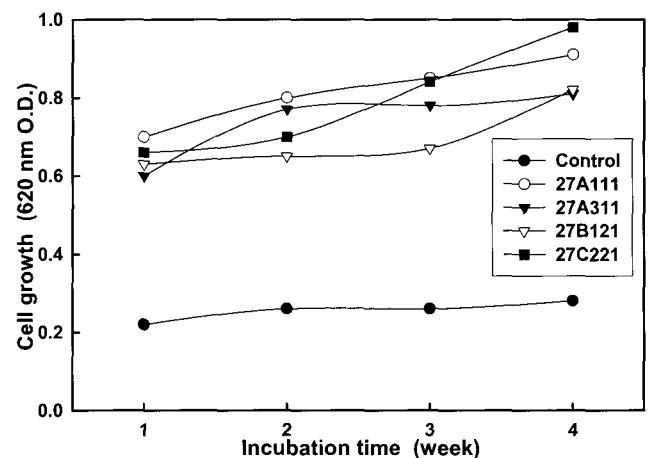


Fig. 5. Cell growth of 4 bacterial strains in liquid medium added by sea mustard powder.

미역 분해율

논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주에 대하여 미역 분말이 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 계산하여 Fig. 6에 나타내었다. 모든 실험구는 배양 전 기간에서 대조구의 3.04-5.14%보다 월등히 높은 분해율을 보였으며, 특히 알긴산 분해율과 다시마와 미역의 성장률이 가장 높았던 27C221균주가 전 배양기간에서 가장 높은 분해율을 보였는데, 1주에 16.33%, 2주에 18.47%, 3주에 19.00% 및 4주에 20.88%를 나타내었다. 이를 값은 알긴산 분해율보다는 약 2배 정도 높은 값이지만 다시마 분해율보다는 약 5% 정도 낮은 값이다. Cho와 Lee (1974)는 해조 다당류의 추출에 미치는 방사선 조사의 효과를 검토한 결과 0.3-1.5 Mrad의 감마선 조사로 6-10%의 수율이 증가시켰다. 그리고 나머지 3균주 즉 27A111, 27A311 및 27B121균주는 거의 유사한 값을 나타내었다.

이상에서 살펴본 논두렁 물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 4균주, 즉 27A111, 27A311, 27B121 및 27C221균주의 분해능을 검토한 결과, 공통적으로 모든 균주가 알긴산, 다시마 및 미역 분말을

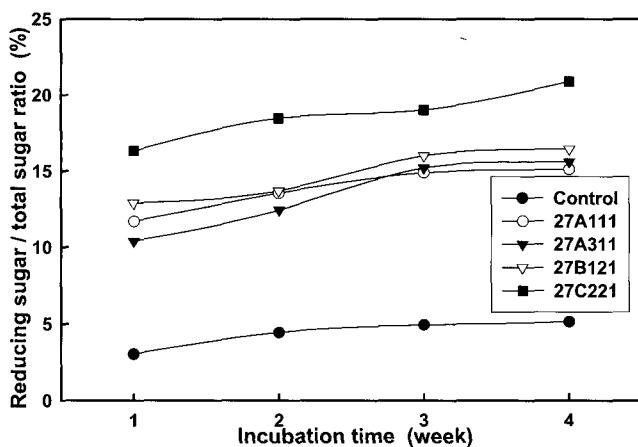


Fig. 6. Ratios of reducing sugar to total sugar for 4 bacterial strains in liquid medium added by sea mustard powder.

첨가한 액체배지에서 균체성장을과 분해율이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 균주들에 해조의 담당 또는 다른 성분을 가수분해시키는 효소가 존재 할 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

- Ando, Y. and K. Inoue. 1965. Decomposition of alginic acid by microorganisms V. On the modes of action of two alginases. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 31, 552-557. (in Japanese)
- Bae, T.J., J.M. Kwak, H.S. Kim and K.S. Kim. 2002. Processing of leaflike and powder tea using sea tangle. Kor. J. Life Sci., 12, 16-25. (in Korean)
- Boyd, J. and J.R. Turvey. 1977. Isolation of a poly- α -L-guluronate lyase from *Klebsiella aerogenes*. Carbohydr. Res., 57, 163-171.
- Boyd, J. and J.R. Turvey. 1978. Structural studies of alginic acid, using a bacterial poly- α -L-guluronate lyase. Carbohydr. Res., 66, 187-194.
- Davidson, I.W., I.W. Sutherland and C.J. Lawson. 1976. Purification and properties of an alginase from a marine bacterium. Biochem. J., 159, 707-713.
- Groleau, D. and W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar, purification and characterization of β -neoglycosidase from *Pseudomonas atlantica*. Can. J. Microbiol., 23, 672-679.
- Jeong, I.H., S.S. Lee and K.H. Lee. 1994. The effect of additives to the texture of kelp blade. Bull. Kor. Fish. Soc., 27, 149-154. (in Korean)
- Joo, D.S., J.S. Lee, J.J. Park, S.Y. Cho, C.B. Ahn and E.H. Lee. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 432-438.
- Jung, J.Y., S.S. Hur and Y.H. Choi. 1999. Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. Food Eng. Prog., 3, 90-97. (in Korean)
- Kaneko, Y., Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura and K. Murata. 1990a. Symbiotic formation of alginic lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. J. Ferment. Bioeng., 69, 192-194.
- Kaneko, Y., Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura and K. Murata. 1990b. Bacterial alginic lyase properties of the enzyme formed in a mixed culture bacteria isolated from soil. J. Ferment. Bioeng., 70, 147-149.
- Kashiwabara, Y., S. Hiroshi and K. Nisizawa. 1969. Alginic lyases of *Pseudomonas* sp. J. Biochem., 66, 503-512.
- Kim, H.S. and T.J. Bae. 2002a. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. I. Screening of microfloras involved in hydrolysis of sea tangle (*Laminaria japonica*) and sea mustard (*Undaria pinnatifida*). J. Kor. Fish. Soc., 35, 438-444. (in Korean)
- Kim, H.S. and T.J. Bae. 2002b. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. II. Screening of microfloras involved in hydrolysis of seaweed tenella, seaweed fusiforme and green laver. Kor. J. Food Nutr., 15, 257-266. (in Korean)
- Kitamikado, M., C.H. Tseng, T. Aoki, K. Yamaguchi and T. Araki. 1989. Isolation of bacteria capable of producing alginic-degrading enzyme from natural environment. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 709-713.
- Lee, J.K. H.S. Choi, S.K. Yoon and W.J. Kim. 1993. Effect of extraction temperature on some quality of sea tangle extract. J. Kor. Soc. Food Nutr., 22, 771-776. (in Korean)
- Sawabe, T., Y. Ezura and T. Kimura. 1992a. Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishiri-kombu *Laminaria japonica* var ochotensis. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 141-145. (in Japanese)
- Sawabe, T., Y. Ezura and T. Kimura. 1992b. Purification and characterization of an alginic lyase from marine *Alteromonas* sp. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 521-527. (in Japanese)
- Waksman, S.A. and M.C. Allen. 1934. Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. J. Bacteriol., 28, 213-220.
- Yonemoto, Y., K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi and K. Okayama. 1991. Bacterial alginic lyase; characterization of alginic lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. J. Ferment. Bioeng., 72, 152-157.