

다시마(*Laminaria japonica*)를 single cell detritus로 분해하는 해양세균의 분리

이전욱 · 신일식*

강릉대학교 해양생명공학부

Isolation of Marine Bacterium Decomposing Sea tangle (*Laminaria japonica*) to Single Cell Detritus

Kun Wook Yi and Il Shik Shin*

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University

Abstract Seventy-one marine bacteria decomposing sea tangle (*Laminaria japonica*) into single cell detritus (SCD) were isolated from sea water, sea tangle, sea mustard (*Undaria pinnatifida*), sea urchin (*Anthocidaris crassispina*), star fish (*Acanthaster planci*), and turban cell (*Batillus cornutus*), among which 14 strains decreased cutting strength of sea tangle and had alginate-degrading activity. Marine bacterium No. 34 isolated from turban cell showed lowest cutting strength of sea tangle, strongest alginate-degrading activity, and produced high content of 5-10 μ m SCD from sea tangle. This strain was identified as *Vibrio* sp. based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and named as *Vibrio* sp. YKW-34.

Key words: single cell detritus (SCD), sea tangle, cutting strength, alginate degrading activity, *Vibrio* sp. YKW-34

서 론

미역, 다시마를 비롯한 각종 해조류는 식이 섬유소가 다량 함유되어 있고, 알칼리성 미네랄 등이 풍부하여 당뇨병(1), 나트륨배설 촉진(2) 및 중앙 세포의 성장을 저해한다고 알려져 있으며(3,4), 또한 혈압강하작용(5)을 가지고 있기 때문에 건강 보조 식품의 소재로서 각광을 받고 있다. 그러나 이러한 해조류를 건강보조식품으로 사용하기 위하여서는 분말화가 필수적이나, roll mill, pin mill, jet mill 등을 이용한 종래의 기계적 분쇄는 분말화 과정에서 마찰열로 인한 온도상승으로 생리활성성분의 열화를 가져올 수 있으며(6), 이러한 분쇄 방법에 의한 수십-수백 μ m의 분말 입자는 입자 상호간의 응집으로 인하여 유동성이 좋지 않은 단점이 있다.

식품의 혼합되지 않는 부분에는 계면이 존재하며 이 계면을 조절하는 것으로 식품 자체의 물성을 개량할 수 있다. 즉 micrometer 이하의 미소 계면을 조절하는 것으로 식품의 물성이 크게 변하고, texture의 개선, 침전방지, 새로운 풍미 부여 등 새로운 특성을 가진 식품을 만들 수 있다. 분말의 형상은 물 등의 분산 상태에 있어서 개체차가 크고, 식품의 품질에 영향을 미친다. 따라서 분말의 형상이나 입자의 크기를 조정하는 것에 의해 새로운 특성이 나타난다. 수 μ m의 미립자는 다른 식재와 융합하기 쉬우며 성형이나 농도 조정도 쉽기 때문에 유동식이나 이유식으로도

응용이 가능하며 응용한 식품에 새로운 맛을 부여할 수 있다.

따라서 해조류의 뛰어난 생리활성 기능을 극대화하기 위하여서는 해조류 성분의 미립자화가 절실하며, 종래의 기계적 분쇄가 가지고 있는 단점을 극복하기 위하여서는 미생물을 이용한 생물학적인 방법에 의한 미립자화가 가장 우수한 방법이라 할 수 있다.

미생물을 이용한 생물학적인 방법에 의한 해조류의 미립자화에 관한 연구는, 1989년 Duggins 등(7)이 대형해조를 분해하는 해양세균을 분리한 이래, 여러 가지 해조류를 미립자의 single cell detritus(SCD)로 분해하는 해양세균에 대한 연구가 계속되어 왔으나(7-10), 어패류의 대체사료 (11,12)에 한정되어 있을 뿐 식품소재로 개발한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 다시마(*Laminaria japonica*)를 기능성 식품소재로 활용하기 위한 예비단계로서 다세포의 다시마를 미립자의 single cell detritus(SCD)로 분해하는 해양세균을 분리, 동정하고 최적분해조건을 조사하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료

실험에 사용한 다시마(Sea tangle, *Laminaria japonica*)는 강릉 주문진 연안에서 생산되어 건조된 것을 구입하여 사용하였다.

해양세균의 분리

다시마를 SCD로 분해하는 해양세균을 분리하기 위하여 해수, 다시마(*Laminaria japonica*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 성게(*Anthocidaris crassispina*), 불가사리(*Acanthaster planci*), 소라(*Batillus cornutus*)를 강릉 주문진 해안에서 채취하여 실험에 사용하였다.

해수의 경우 0.22 μ m membrane filter(Whatman Co., Brentford, England)를 사용하여 세균을 포집한 후, marine broth(Difco, BD

*Corresponding author: Il-Shik Shin, Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, 120, Gangneung Daehangno Gangneung-si, Gangwon-do, 210-702, South Korea

Tel: 82-33-640-2346

Fax: 82-33-640-2410

E-mail: shinis@kangnung.ac.kr

Received August 21, 2005; accepted March 15, 2006

Diagnostic Systems, Spark, MD, USA)에서 20°C, 48시간 증균배양하였다. 증균배양액 한 백금이를 Marine agar(Difco, BD Diagnostic Systems, Spark, MD, USA) 평판에 도말하고 20°C에서 48시간 배양한 후 독립 colony를 분리하였다. 미역, 다시마는 조체 20g을 멸균해수 180 mL와 혼합하여 stomacher 400(Seward Co., London, England)으로 230 rpm에서 1분 동안 균질화한 후, marine agar 평판에 도말하여 20°C에서 3일간 배양한 후 독립 colony를 분리하였다. 성게, 불가사리, 소라는 시료 20g을 NaCl 3%의 멸균 식염수 180 mL와 혼합하여 stomacher로 230 rpm에서 1분 동안 균질화한 후, marine agar 평판에 도말하여 20°C에서 3일간 배양한 후 독립 colony를 분리하였다. 분리한 colony는 다시 동일한 평판배지에서 streak culture하여 독립 colony를 확인하고 marine broth에서 전배양 하여 본 실험에 사용하였다.

다시마의 Cutting strength 측정

분리 균주에 의하여 다시마가 연화 및 분해되는 정도를 조사하기 위하여 다시마 조체의 cutting strength를 측정하였다. 건조 다시마 4g을 일정 크기(2×3 cm)로 절단하여 Marine broth 200 mL에 침지하고 위에서 분리한 균주 전배양액 100 µL를 접종하여 20°C에서 4주간 배양한 후 rheometer(CR-100D, SUN-Scientific Co., LTD, Korea)로 다시마 조체의 cutting strength를 측정하였다. 그 결과 조체를 연화, 분해하는 균주를 대상으로 SCD 생성 여부를 조사하였다(12).

알긴산 분해활성의 측정

분리균주의 알긴산 분해활성을 조사하기 위하여 NaCl 3.0%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, sodium alginate(Sigma-Aldrich Co., LTD., St. Louis, MO, USA) 1.0%, agar 1.5%, pH 7.2의 조성으로 알긴산 평판배지를 제조하고, 분리한 균주 전배양액 100 µL를 도말하여 20°C에서 배양하면서 알긴산 분해활성을 조사하였으며, 알긴산 평판 배지를 함몰시키는 균주를 대상으로 SCD 생성 여부를 조사하였다(13).

해양세균에 의한 다시마 SCD의 생성 및 관찰

분리균주의 SCD 생성능을 조사하기 위하여 다시마 4g을 일정 크기(2×3 cm)로 절단하여 Marine broth 200 mL에 침지시키고 다시마 분해 및 알긴산 분해활성이 강한 균주의 전배양액 100 µL를 접종하여 20°C에서 70 rpm으로 15일간 진탕 배양하였다. 배양 후 SCD의 생성 및 그 크기를 1000 배율의 광학현미경(Carl Zeiss Co., Ltd., Jena, Germany)으로 관찰하였다.

다시마 SCD 생성 균주의 동정

위에서 분리한 해양세균 중에서 SCD 생성능이 가장 우수하였던 균주를 동정하기 위하여 marine agar에서 20°C, 48시간 배양한 후 gram stain, motility, catalase, oxidase 등을 조사하였고 그 외의 생화학적 특성검사는 미생물 동정기(BIO-MERIEUX Co., Montalieu-Veroieu, France)로 조사하였다.

결과 및 고찰

해양세균의 분리

다시마를 SCD로 분해하는 해양세균을 분리하기 위하여, 해수에서 19균주, 다시마 조체에서 5균주, 미역조체에서 4균주, 성게에서 14균주, 불가사리에서 12균주, 소라에서 17균주, 총 71균주

Table 1. Cutting strength of sea tangle decomposed by marine bacteria

Cutting Strength (g/cm ²)		Number of strains
<3000	(++)	14
3000-5000	(+)	15
5000<	(-)	42

++: decomposed well, +: decomposed, -: not decomposed.

를 분리하였으며, 이 균주들을 대상으로 다시마 분해활성, 알긴산 분해활성, SCD 생성능을 조사하였다.

다시마의 cutting strength

분리균주에 의하여 다시마가 연화, 분해되는 정도를 알아보기 위하여 총 71개의 분리균주를 대상으로 다시마의 cutting strength를 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

다시마의 cutting strength는 다시마의 세포간 점질다당류가 해양세균에 의하여 분해되어 용출됨에 따라, 세포조직이 붕괴되는 현상을 측정하는 가장 손쉽고 정확한 물리적인 방법으로서(13), 본 연구에서는 SCD의 생성에 직접적인 영향을 미칠 것으로 추정하여 조체가 연화, 분해되는 현상을 조사하기 위한 방법으로 이용하였다.

71개 균주 중 29개 분리균주의 cutting strength 값이 5000 g/cm² 이하로 다시마 연화능이 있었으며, 그 중 14개의 분리균주(해수 1개 균주, 미역 3개 균주, 소라 3개 균주, 불가사리 2개 균주, 성게 5개 균주)에서 cutting strength 값이 3000 g/cm² 이하로 연화 및 분해정도가 우수하였다. 특히, 소라에서 분리한 균주 No. 34는 배양 5일째 3,104±210 g/cm², 배양 10일째 754±87 g/cm²이었으며, 배양 15일째에는 cutting strength를 측정할 수 없을 정도로 다시마 조직을 완전히 붕괴시켰다(Table 2, Fig. 1). Uchida와 Nakayama(13)는 cutting strength 값을 0-200×g(++), 200-500×g(+), 500×g 이상(-)으로 구분하고, 해수에서 분리한 89개의 균주를 대상으로 다시마 분해능을 조사한 결과, 배양 4주 후 전체 분리균주 89개 균주 중에서 약 70%인 62개 균주가 cutting strength 값이 500×g 이하로 다시마 분해능이 있었다고 보고하였다. 그러나 Kim과 Bae(14)의 육지로부터 분리한 미생물에 의하여 배양 4주 만에 조체를 완전히 분해하였다는 보고와는 다소 차이가 있었다. 이는 다시마 세포간 점질다당류인 알긴산에 대한 분리균주의 분해활성의 차이에 따른 것으로 사료된다.

분리 균주의 알긴산 분해활성

다시마 조체 건조중량의 10-35% 이상을 차지하는 대표적인 세포간 점질다당류인 알긴산을 분해하는 것이 다시마의 분해 가능

Table 2. Cutting strength of sea tangle decomposed by marine bacterium No. 34 and alginate degrading activity of marine bacterium No. 34¹⁾

Incubation time (Days)	Cutting strength of sea tangle (g/cm ²)	Alginate degrading activity (Diameter of collapse zone, cm)
0	8,084 ± 132	0
5	3,104 ± 210	1.7 ± 0.1
10	754 ± 87	2.4 ± 0.1
15	Impossible	3.3 ± 0.1

¹⁾Values are the means of three replicated measurements ± standard deviation.

Table 3. Number of marine bacteria having alginate degrading activity

Source	Alginate degrading activity	
	Positive	Negative
Sea water	9	10
Star fish	8	4
Sea urchin	6	8
Sea mustard	4	0
Turban shell	4	13
Sea tangle	0	5
Total	31	40

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of marine bacterium No. 34

Characteristics	Strain No. 34	Characteristics	Strain No. 34
Gram stain	-	Lactose	-
Form	rod	Malate	+
Spore	-	Xylose	-
Motility	+	Raffinose	-
Catalase	+	Sorbitol	+
Oxidase	+	Inositol	-
O/F test	O/F	Adonitol	-
Acetate	-	H ₂ S	-
Urea	-	Rhamnose	-
Citrate	-	Arabinose	-
Maltose	-	Glucose	+
Tryptophan	-	Mannitol	+

+: positive, -: negative.

성도 높으며(15-17), SCD의 생성과도 밀접한 관련(18)이 있을 것으로 추정되어 전체 분리균주를 대상으로 알긴산 분해활성을 조사한 결과는 Table 3와 같다.

분리균주 71개 균주 중 31개의 균주가 알긴산 분해활성이 있었으며 나머지 40개의 균주에서는 분해활성이 없었다. 알긴산 분해활성을 가지고 있는 균주는 해수에서 9균주, 성계에서 8균주, 불가사리에서 6균주, 미역에서 4균주, 소라에서 4균주가 분리되었다. Table 1에서 다시마의 cutting strength 값이 3000 g/cm² 이하로 나타나 다시마 조체를 연화, 분해하는 정도가 우수하였던 14개의 균주는 모두 알긴산 분해활성이 있었다. 특히, 소라에서 분리한 No. 34 균주에 의한 알긴산 평균 함몰현상이 가장 뚜렷하였으며, 다시마의 cutting strength 값이 감소함에 따라 함몰된 크기는 증가하였다(Table 2). 이러한 결과는 Uchida와 Nakayama (13)의 알긴산 분해활성을 가지는 49개의 균주 중에서 48개의 균주가 다시마 분해활성이 우수하였다는 보고와 유사하였다.

해양세균에 의한 다시마 조체의 연화 및 분해

분리균주 중 다시마의 분해 및 알긴산 분해활성이 가장 강한 균주 No. 34의 다시마 조체의 연화 및 분해활성을 육안으로 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

배양 초기에는 다시마가 그 형태를 유지하고 있었으나(Fig. 1A), 배양시간이 지남에 따라 분해되어 배양 15일째에는 거의 연화된 것을 알 수 있었다(Fig. 1D). 이에 본 연구에서는 균주 No. 34를 대상으로 다시마 SCD의 생성여부를 조사하였다.

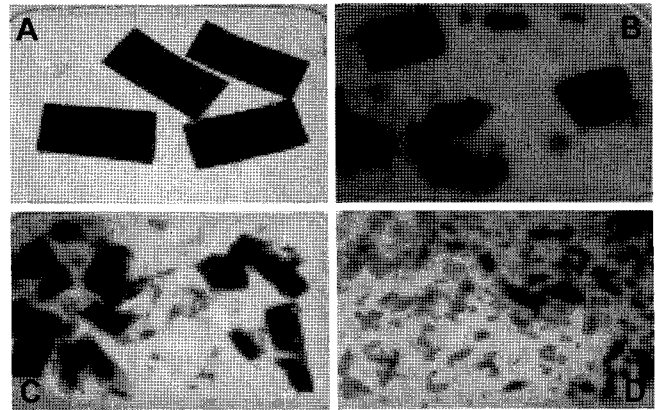


Fig. 1. Sea tangle degraded by marine bacterium No. 34 observed by light microscope (×400). A: 0 day, B: 5 days, C: 10 days, D: 15 days.

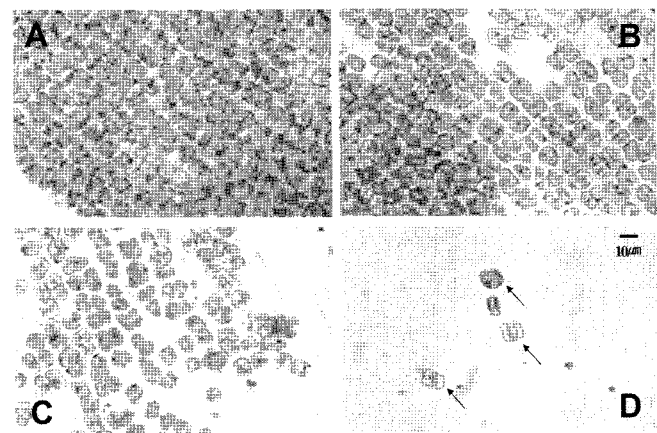


Fig. 2. Single cell detritus (SCD) of sea tangle produced by marine bacterium No. 34. A: 0 day, B: 5 days, C: 10 days, D: 15 days. SCD of sea tangle observed by light microscopy (×1000).

해양세균에 의한 다시마 SCD의 생성

다시마의 조체 연화 및 분해활성이 우수하면서 알긴산 분해활성이 강한 균주 No. 34를 대상으로 다시마 SCD의 생성여부를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

배양 초기에는 다시마가 다세포 형태를 유지하고 있었으나(Fig. 2A), 배양시간이 지남에 따라 점점 분해되어 배양 15일째는 거의 완전히 SCD 형태로 분해되었고, 그 크기는 약 5-10 μm 정도로 Uchida(18)가 보고한 4-10 μm와 거의 유사하였다(Fig. 2D). 그러나 Uchida(18)의 보고에서처럼 균주가 SCD의 표면에 부착되어 있는 현상은 관찰할 수 없었다. 이는 소라에서 분리한 균주 No. 34가 다시마 조체를 분해하는 효소를 가지고 있는 것으로 사료되며, 소라와 같은 복족류들이 해조류를 섭식한다는 보고와도 밀접한 관련이 있는 것으로 추정된다(19).

다시마를 SCD 형태로 분해하는 해양세균 strain No. 34의 동정

SCD 생성균주인 No. 34의 형태, 생리, 생화학적 특성을 검사한 결과는 Table 4와 같다. No. 34 균주는 Gram negative, 운동성을 가지는 간균으로 포자를 형성하지 않았으며 oxidase와 catalase 양성이었다. 그 외의 생화학적 특성들을 미생물 동정기로 조사한 결과 *Vibrio* sp.인 것으로 동정되었으며, 이 균주를 *Vibrio* sp. YKW-34로 명명하였다. Hallohan 등(20)은 갈조류를 부패시키거

나 조직을 붕괴시키는 세균들 중에서 *Vibrio* sp.이 가장 지배적이라고 보고하였으며, Uchida와 Nakayama(13)의 보고에서도 다시마 분해능을 가지는 대표적인 해양세균이 *Vibrio* sp.으로 동정되어 본 연구의 결과도 이와 유사하였다.

요 약

다시마(*Laminaria japonica*)를 기능성 식품소재로 활용하기 위한 예비단계로, 다세포의 다시마를 미립자의 single cell detritus(SCD)로 분해하는 해양세균을 해수, 다시마(*Laminaria japonica*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 성게(*Anthocidaris crassispina*), 불가사리(*Acanthaster planci*), 소라(*Batillus cornutus*)로부터 분리하였다. 분리한 71개의 균주 중 다시마 조체의 연화능과 알긴산 분해활성을 동시에 가지는 균주는 14개이었으며, 균주 No. 34가 가장 강한 다시마 조체의 연화능과 알긴산 분해활성을 나타내었다. 균주 No. 34는 배양 15일 만에 다세포의 다시마를 미립자의 SCD 형태로 분해하였으며, 그 크기는 5-10 μm 이었다. 균주 No. 34는 *Vibrio* sp.으로 동정되었으며, *Vibrio* sp. YKW-34로 명명하였다.

사 사

본 연구는 2002년도 수산특정연구개발사업(과제번호 20020128)의 일환으로 해양수산부의 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- Lahaye M. Marine algae as sources of fibers; Determination of soluble and in soluble dietary fiber contents in some vegetables. J. Sci. Food Agric. 54: 587-594 (1991)
- Cheun BS, Yoo JS, Suzuki T, Watanabe E. Tissue biosensor for determination of Na^+ channel blocker for chinese drug and seaweed (*Porphyra yezoensis* Ueda). Korean J. Biotechnol. Bioeng. 13: 1-6 (1998)
- Nakazawa Y, Kurodad H, Abe F, Nishino T, Otsuki M, Umezaki I. Antitumor effect of water-extracts from marine algae (I). Chemotherapy 22: 1435-1440 (1974)
- Yamamoto I, Nagumo T, Takahasi M, Fujihara M, Suzuki Y, Iizima I. Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effects of an extract from *Sargassum kjellmianum*. J. Exp. Med. 51: 187-192 (1981)
- Lee HO, Kim DS, Do JR, Ko YS. Angiotensin-I Converting enzyme inhibitory activity of algae. J. Korean Fish. Soc. 32: 427-431 (1999)
- Pothakamury UR, Canovas GVB. Fundamental aspects of controlled release in foods. Trends Food Sci. Technol. 6: 397-406 (1995)
- Duggins DO, Simenstad CA, Estes JA. Magnification of secondary production by kelp detritus in coastal marine ecosystems. Science 245: 170-173 (1989)
- Waksman SA, Allen MC. Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. J. Bacteriol. 28: 213-220 (1934)
- Linley EAS, Newell RC, Bosam SA. Heterotrophic utilization of mucilage released during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). I. Development of microbial communities associated with the degradation of kelp mucilage. Mar. Ecol. Prog. Ser. 4: 31-41 (1981)
- Robertson ML, Mills AL, Ziemann JC. Microbial synthesis of detritus-like particulates from dissolved organic carbon released by tropical seagrasses. Mar. Ecol. Prog. Ser. 7: 279-285 (1982)
- Uchida M, Nakata K, Maeda, M. Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia nauplii*. Aquaculture 154: 125-137 (1997)
- Uchida M, Murata M. Fermentative preparation of single cell detritus from sea mustard, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. Aquaculture 207: 345-357 (2002)
- Uchida M, Nakayama A. Isolation of *Laminaria*-frond decomposing bacteria from Japanese coastal waters. Nippon Suisan Gakkaishi 59: 1865-1871 (1993)
- Kim HS, Bae TJ. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. J. Korean. Fish. Soc. 35: 438-444 (2002)
- Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganism-IV. On the *Vibrio*-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 27: 339-341 (1961)
- Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganism-V. On the alginase of *Vibrio* sp. SO-20 strain. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 27: 342-347 (1961)
- Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganism-V. On the modes of action of two alginases. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 31: 552-557 (1965)
- Uchida M. Formation of single cell detritus densely covered with bacteria during experimental degradation of *Laminaria japonica* Thalli. Nippon Suisan Gakkaishi 62: 731-736 (1996)
- Onishi T, Suzuki M, Kikuchi T. The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 51: 301-308 (1985)
- Hallohan BT, Dabinett PE, Gow JA. Bacterial succession during biodegradation of the kelp *Alaria esculenta* (L.) Greville. Can. J. Microbiol. 32: 505-512 (1986)