

양식장 배출수 퇴적층에서 분리된 미생물의 다당분해효소 활성 및 특성

김만철 · 장태원 · Ramasamy Harikrishnan · 문영건 · 송창영 · 김기영¹ · 허문수*

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과, ¹제주대학교 해양생명과학과

Received December 3, 2008 / Accepted February 21, 2009

Amylase Activity and Characterization of Microorganism Isolated from in Aquacultural Effluents Sediment Layer. Man-Chul Kim, Tae-Won Jang, Ramasamy Harikrishnan, Young-Gun Moon, Chang-Young Song, Gi-Young Kim¹ and Moon-Soo Heo*. *Department of Aquatic Life Medicine, Faculty of Marine Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea, ¹Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea* - In the course of screening of useful enzyme-producing microorganisms from marine sedimentary layers, we isolated 2 amylase producing strains and tested their amylase producing activities. Analyses of 16S rDNA sequences and biochemical methods (BIOLOG) of two isolates showed that they were confirmed to be a gram positive *Bacillus* sp. and gram negative *Pseudoalteromonas* sp., respectively. Excellent amylase producing strains were termed *Bacillus* sp. ST-63 and *Pseudoalteromonas* sp. ST-140, and further studies were conducted on their amylase producing characteristics. Optimum conditions for cell growth in amylase activity were obtained when the isolate (*Bacillus* sp. ST-63 and *Pseudoalteromonas* sp. ST-140) was cultured at 30°C and pH 7~8.

Key words : Amylase, 16S rDNA, BIOLOG, *Bacillus* sp., *Pseudoalteromonas* sp.

서 론

일반적인 육상 양식시설은 넓은 부지와 다량의 해수를 이용한 사육방식이기 때문에 유지 관리 차원에서 비경제적이며, 배출수는 그 수량이 막대하고, 오염물질 배출농도의 변화폭이 대단히 크다는 점 등의 제한요인들에 의하여 기존의 통상적인 물리·화학적, 생물학적인 폐수처리공법의 도입이 거의 불가능한 특성을 가지고 있다. 또한 양식장이 해안가를 중심으로 넓게 분포하고 있다는 점은 국내외를 불문하고 많은 연구자들의 표준적인 처리법 개발에 걸림돌이 되고 있어 이에 대한 방안이 시급한 실정이다. 이러한 취지에서 이들 배출수의 관리 방안 연구는 절실히 요구된다[1,10].

또한 배출물 오염을 저감시키기 위한 별도의 처리 방법이 확립되어있지 않을 뿐만 아니라 이러한 배출물을 이용한 사료 등의 재활용에 있어, 아직 안전성에 대한 검토가 전무한 실정이다. 따라서 양식장 배출수에 존재하고 있는 유기물 성분들은 일차적인 해안에 퇴적층을 이루며 환경적인 문제점을 일으키고 있기 때문에 이에 대한 환경친화적인 처리 방안이 절실하다. 미생물을 이용한 오폐수처리는 일본에서 처음 시도되었으며[7], 국내에서는 양식장 배출물의 제거를 위한 여과장치의 개발 및 순환여과식 양식법 개발에 따른 수질관리기술 확립과 관련된 연구들이 보고되고 있다[5,6]. 일반적으로 육상 양식장의 대부분의 배출물은 양식어류가 섭취하고 남은 잔류 생사료이며, 탄수화물, 지방, 단백질 함량이 높은 것이 특징이다[12]. 따라서 이러한 유기물들을 효과적 및 친환경적으로 분해할

수 있는 미생물 자원의 개발이 필요하다.

Glucose 중합체인 starch는 가장 널리 이용되는 식물체의 탄수화물로서 amylase는 이러한 starch를 분해하는 효소이다. Amylase는 α -amylase, β -amylase, glucoamylase와 isoamylase로[2,14,15] 크게 구분할 수 있는데 α -amylase (endo- amylase)는 amylose나 amylopectin의 α -1,4결합을 무작위로 가수분해하여 dextrin을 형성하고 α -amylase의 계속적인 작용에 의해 maltose, maltotriose, maltotetraose 등의 oligosaccharide를 형성한 뒤 glucose와 maltose로 분해하는 효소이다. β -amylase (exo-amylase)는 starch의 비환원성 말단으로부터 maltose 단위로 가수분해하는 효소로서 α -1,6결합을 포함하는 dextrin을 형성한다.

Gluconamylase는 starch에 작용하여 amylose와 amylopectin의 α -1,4, α -1,6 결합을 가수분해하여 glucose를 생성하는 당화효소이며, isoamylase는 starch의 α -1,6 결합에만 작용하는 효소이다[3,4,9]. 이러한 전분의 분해에 관련하는 효소는 효모, 곰팡이, 세균, 맥아 및 동물체내에 널리 존재한다.

본 연구에서는 제주도 육상수조양식장의 밀집지역의 배출수 배출 지역을 중심으로 퇴적층 분해에 관련된 미생물을 탐색하여 amylase 활성을 측정하였으며, 활성이 강한 균주를 선별하여 amylase의 생산을 위한 조건을 검토하였다. 또한 차후 미생물의 생태적 지위를 파악하여 환경적 및 산업적인 이용가능성을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주의 선별

본 연구에 사용된 균주는 제주도 양식장(표선, 성산) 배출수

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

연안에 형성된 퇴적층으로부터 분리되었으며, 멸균된 모종삼을 이용하여 멸균 위생팩에 시료를 넣고 채집 후, 4°C를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다. 채집된 퇴적층 1 g를 멸균해수 9 ml에 넣고 충분히 섞어준 후, 이 시료를 원액으로 10의 지수로 희석한 후, 각각의 멸균된 배지에 100 µl씩 접종하고 25°C에서 7일간 배양하였다.

중속영양세균의 분리 및 배양은 marine agar (MA; Difco. Co. USA) 배지, 성장속도가 느린 세균의 배양은 R2A agar (Difco. Co. USA) 배지, 영양이 풍부한 일반적인 배지로 일반 세균의 배양을 nutrient agar (NA; Difco. Co. USA) 배지, 효모, 곰팡이 또는 내산균의 배양은 YM agar (Difco. Co. USA) 배지를 사용하여 균주를 분리하였다.

Amylase 생산 미생물 분리

높은 다당 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 다당 분해능 측정 실험에 이용하였다.

본 실험의 경우 soluble starch (Difco. Co. USA) 1%를 첨가한 NA (nutrient agar) 배지를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이를 이용하여 도말하고, 25°C 배양기에서 48시간 동안 배양한 후, 배지에 1 M 요오드용액을 떨어뜨려 전분이 가수분해 되어 투명환(clear zone or halo)을 보이는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다. 또한 본 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 냉동 보관하였으며, 실험은 전분분해능의 활성유지를 위해 1% soluble starch가 첨가된 NA 배지에서 계대 배양하면서 실험에 이용하였다.

분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 3%로 KOH를 이용하여 간이그람동정을 한 후, Biolog사(BIOLOG Inc., USA)의 GN2, GP2 plate를 이용하여 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며, 분석은 MicroLog™ system (release 4.05) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 BUGM (Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양 한 후, 현탁하여 탁도계(Biolog 21907, USA)를 이용하여 균주 현탁액을 각각 GP의 경우 20%, GN의 경우 52~59%가 되도록 조절한 후 GP2와 GN2 micro plate의 각 well에 150 µl씩 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양 후, 보라색을 발색되는 well을 양성으로 판정하였다.

이때 현탁액은 NaCl 150 g, MgCl₂ · 6H₂O 51 g, KCl 3.7 g을 증류수 912 ml에 녹인 MCS stock solution [13]을 증류수로 10배 희석한 후, 멸균하여 사용하였다.

16S ribosomal DNA 염기서열 분석

분리 균주의 동정을 위해 16S ribosomal DNA 염기서열을

이용하였으며, 16S rDNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기 서열을 결정하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 27F (forward primer; AGAGTTTIGATCCTGGCTCAG)와 1492R (reverse primer; GGTTACCTTGTACGACTT)을 사용하였고, ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 이용하여 sequencing 분석을 하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상, codon usage 및 각 개체 · 개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0[8] 프로그램의 pair-distance를 이용하여 작성하였다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 Genbank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였으며, Genbank에 분리균주의 유전자 염기서열을 등록한 후, Accession number를 각각 부여 받았다.

다당분해 효소 생산 미생물의 온도별 생육도 및 amylase 활성 측정

Amylase 활성이 확인된 균주를 MB broth (Difco. Co. USA)에 배양 후, 각각의 시간대별로 균주 배양액을 1 ml씩 취하여 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 각각의 성장도를 측정하였으며, 분리균주의 증식과 amylase 생산의 최적 조건을 알기 위하여 증식 온도와 초기 배지의 pH에 변화를 주면서 효소활성을 조사하였다. 기본배지로 MB broth를 사용하였으며, 배양 온도를 20~40°C 까지 10°C 간격으로 각각 액체 배양하였다. 초기 배지의 pH는 4~10 까지 조성하여 실험을 수행하였다.

선별된 균주는 MB broth(Difco, USA)에 배양 후, 시간대별로 배양액을 9,600× g에서 3분간 원심분리하여, 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

분리된 균주의 amylase 활성은 1% soluble starch 0.1 ml에 조효소액 0.1 ml를 넣고 37°C에서 5분간 반응시킨 후, 생성된 환원당을 DNS법[11]을 변형하여 700 nm에서 흡광도에서 당 분해능을 측정하였다.

결과 및 고찰

다당 분해 효소 생산 미생물의 분리 및 동정

다당분해 효소를 생산 하는 미생물을 분리하기 위하여 총 200여 균주를 대상으로 실험해본 결과 colony 주변위에 0.2% (W/V) KI-I2용액으로 염색하여 clear zone이 생기는 균주만을 amylase 분해능이 있는 균주로 확인되어, 총 10균주를 선별하였으며, 이들 중 가장 amylase 활성이 좋은 균주를 선정하여 각각 ST-63, ST-140라 명명하였다.

분리된 효소생산 균주의 생화학 특성을 조사한 결과를 Table 1, Table 2에 나타내었다. 분리균주 ST-63은 β-cyclodextrin, dextrin, tween 40, glycogen, arbutin, D-cellobiose, D-fructose, genfiobiose, maltose, maltotriose, D-mannitol,

Table 1. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (ST-63)

A1 Water	A2 α -Cyclodextrin	A3 β -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween40	A9 Tween80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	+	—	—	+	±	±	±	±
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	±	—	+	±	+	+
C1 α -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α -Methyl-D-Galactoside	C10 β -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 α -Methyl-D-Glucoside
—	±	+	+	+	+	—	±	—	—	+	±
D1 β -Methyl-D-Glucoside	D2 α -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Starchyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	±	—	—	+	±	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turannose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α -Hydroxybutyric Acid	E8 γ -Hydroxybutyric Acid	E9 γ -Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenyl acetic Acid	E11 α -Ketoglutaric Acid	E12 α -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	±
F1 Lactonide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-Methyl Eser	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succine amic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	+	+	±	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	±	±	+	+	+	±	+	—	+	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenocine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- α -Glycerol Phosphate
—	±	+	+	±	—	—	—	—	—	—	+

Table 2. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (ST-140)

A1 Water	A2 α -Cyclodextrin	A3 β -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween40	A9 Tween80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	±	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C1 α -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α -Methyl-D-Galactoside	C10 β -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 α -Methyl-D-Glucoside
—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	±	+
D1 β -Methyl-D-Glucoside	D2 α -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Starchyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	±	—	±	—	—	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turannose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α -Hydroxybutyric Acid	E8 γ -Hydroxybutyric Acid	E9 γ -Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenyl acetic Acid	E11 α -Ketoglutaric Acid	E12 α -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	±
F1 Lactonide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-Methyl Eser	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succine amic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	—	±	±	+	—	—	±	—	—	—
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenocine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- α -Glycerol Phosphate
—	—	±	+	+	—	±	+	+	+	+	±

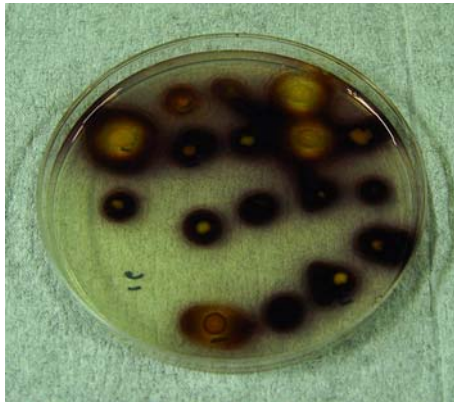


Fig. 1. Photos of amylase producing bacteria by using nutrient Agar (Added soluble starch) agar plates.

D-mannose, palatinose, D-psicose, salicin, D-sorbitol, sucrose 및 turanose, 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다. 또한 분리균주 ST-140은 dextrin, glycogen, arbutin, D-cellobiose, D-fructose, gentiobiose, α-D-glucose, palatinose, D-sorbitol, thymidine 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다. 최종적으로 분리균주 ST-63은 BIOLOG 분석 결과에서 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주와 가장 유사한 생화학적 특성을 보이는 것으로 나타났으며, 분리균주 ST-140은 *Alteromonas* sp.종들과 *Pseudoalteromonas marina*의 생화학적 특성이 가장 유사하게 나타났다. 분리균주의 확실한 동정을 위해서 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 실시하였으며, 분리균주 ST-63, ST-140의 계통학적 분석결과를 Fig. 2, Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 리보솜 RNA (rRNA)는 전 생물에 보편적으로 존재하는 보존성이 높은 핵산분자이며, 미생물의 진화계통의 연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있다. 특히 범

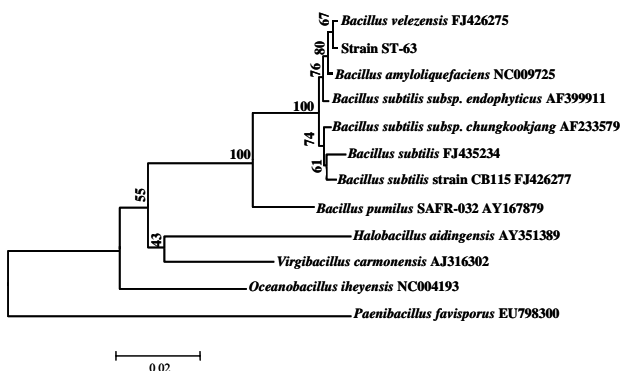


Fig. 2. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ST-63 and member of the *Bacillus* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Virgibacillus carmonensis*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Paenibacillus favisporus* was used as an outgroup. Bar, 0.02 nucleotide substitution per position.

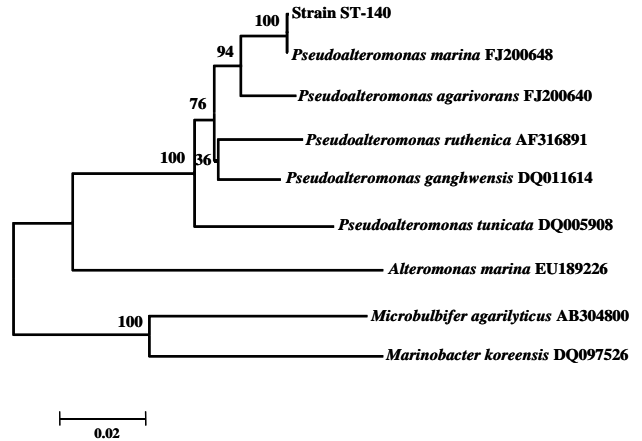


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ST-140 and member of the *Pseudoalteromonas* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Microbulbifer agarilyticus* AB304800, *Marinobacter koreensis* DQ097526 was used as an outgroup. Bar, 0.02 nucleotide substitution per position.

용성이 높은 분자는 small subunit rRNA (AAU rRNA)로서 분류에 이용되는 16S 및 16S유사(18S) rRNA가 이에 속한다. 현재 미생물의 분류체계는 SSU rRNA의 정보를 근거로 재구성되어 있으며, 이 방법은 미생물 분류학에 필수적인 것으로 인식되기에 이르렀다. 특히 미지의 분리균주의 계통학적 위치를 알기위한 최초의 실험단계에서 SSU rRNA 분석은 필수적이다.

분리균주 ST-63, ST-140의 16S rRNA PCR 증폭을 통해 얻은 염기서열을 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 수행한 결과 균주 ST-63은 *Bacillus velezensis* FJ426275, *Bacillus amyloliquefaciens* NC009725 균주와 유전적 99% 상동성을 보였으며, 분리균주 ST-63을 BIOLOG의 생화학적 분석 결과 및 염기서열 분석결과를 종합했을 때 *Bacillus* sp.로 동정되었으며, 최종적으로 *Bacillus* sp. ST-63으로 명명하였다. 또한 분리균주 ST-140의 염기서열 분석결과 *Pseudoalteromonas marina* FJ200648, *Pseudoalteromonas agarivorans* FJ200640 균주와 99%의 상동성을 보였으며, 최종적으로 BIOLOG의 생화학적 특성 및 염기서열 분석결과를 기초로하여 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140으로 명명하였다. 또한 분석된 염기서열 데이터들은 Genbank에 각각 등록한 후, 분리균주 *Bacillus* sp. ST-63은 FJ595989, *Pseudoalteromonas* sp. ST-140은 FJ595990으로 Accession number를 부여받았다.

배양 온도 및 pH에 따른 균체증식 및 효소 활성의 영향
분리 균주 *Bacillus* sp. ST-63과 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른

다당 분해 효소 활성의 변화를 조사하였으며, 이를 위하여 배양 온도를 20°C에서 40°C까지 10°C간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 다당분해 효소의 활성을 조사하였다.

Bacillus sp. ST-63은 초기 배양온도가 20°C에서 약 10시간의 유도기를 거친 후, 대수기로 접어들어 24시간대에 가장 높은 미생물 성장을 보였으며, 24시간 이후에는 정체기를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만, 30°C와 40°C의 경우 유도기가 30°C의 경우 6시간 지속된 반면, 40°C배양의 경우 이보다 짧은 3시간으로 나타났다. 대수증식기의 경우 20°C배양에서는 24시간대에 가장 높은 증식을 보인 후, 바로 정체기와 사멸기를 거친 것으로 나타난 반면, 30°C배양의 경우, 30시간대에 최대의 증식을 보였으며, 40°C배양의 경우 다른 온도의 배양보다는 더욱 빠른 대수기를 진행하였으나, 결론적으로 최대 증식량은 30°C배양보다 떨어지고 대수기는 길게 나타났다(Fig. 4).

Pseudoalteromonas sp. ST-140은 배양온도가 20°C의 경우 36시간의 유도기를 거친 후 대수기로 접어들어 48시간대에 최대 증식량을 보인 후 바로 정체기 없이 사멸기로 접어들었다.

30°C배양의 경우, 6시간의 유도기를 거친후 대수증식기로 접어들고 48시간대에 최대 증식량을 보였다. 반면, 40°C배양의 경우 30°C배양과 비슷한 시간대에 대수증식기에 접어들었으나 최대 증식량은 30°C배양에 비하여 현저히 낮은 증식량을 보였다(Fig. 5).

분리균주 *Bacillus* sp. ST-63과 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140의 각각의 온도별 증식 속도 및 증식에 따른 효소활성의 변화를 Fig. 6~7에 나타내었다.

균주 *Bacillus* sp. ST-63의 경우 Fig. 6와 같이 20°C와 30°C배양에서는 시간의 흐름에 따라 amylase 활성이 시간이 흐름에 따라 점차적으로 증가하는 양상을 나타내었으나, 40°C의 경우 최초 3시간에도 amylase 활성이 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 *Bacillus* sp. ST-63균주의 40°C배양의 경우 유도기가 거의 없이 바로 대수 증식기로 접어드는 양상을 보였기 때문인 것으로 사료된다. 또한 전체적으로 배양온도에 따라서 20~40°C

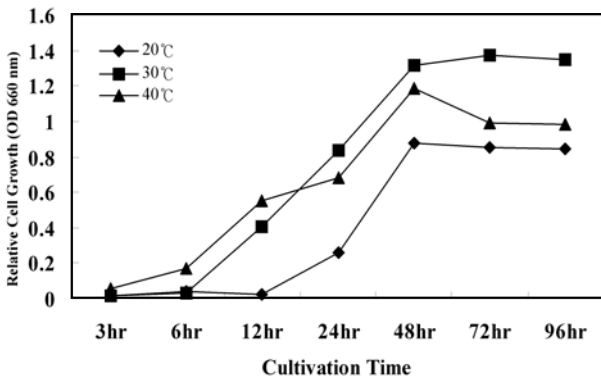


Fig. 4. Effect of temperature in marine broth medium on the cell growth of strain *Bacillus* sp. ST-63.

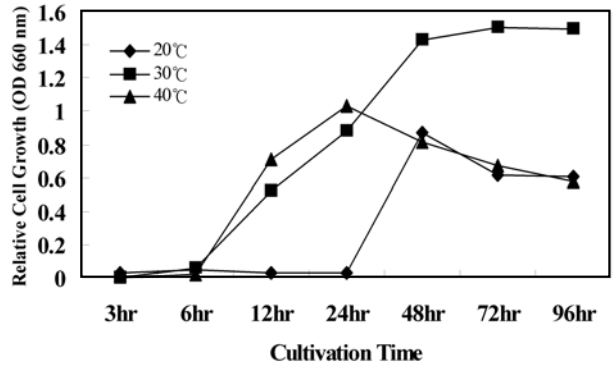


Fig. 5. Effect of temperature in marine broth medium on the cell growth of strain *Pseudoalteromonas* sp. ST-140.

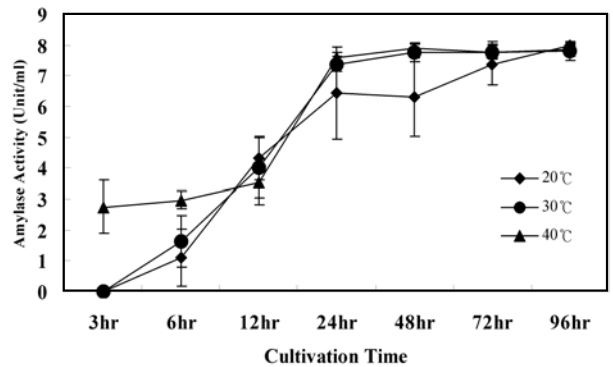


Fig. 6. Effect of temperature on bacterial growth and activity *Bacillus* sp. ST-63 produced enzyme by the 96 hours culture in marine broth.

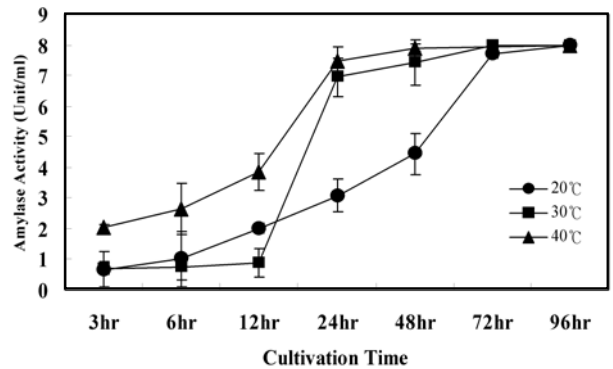


Fig. 7. Effect of temperature on bacterial growth and activity *Pseudoalteromonas* sp. ST-140 produced enzyme by the 96 hours culture in marine broth.

모든 실험구에서 24시간 배양 후, 최대 효소활성을 보였으며, 배양일수가 길어져도 효소활성이 거의 떨어지지 않는 것으로 확인되어, 본 균주가 온도에 대한 효소활성에 크게 민감하게 작용하지는 않는 것으로 사료 된다(Fig. 6). 그리고 균주가 배지의 초기 pH에 따른 효소활성을 조사하기 위하여 pH 4~10 범위의 배지를 사용하여 조사하였다(Fig. 8). 초기 pH 4인 배지에서는 균체의 증식을 관찰 할 수 없었으며, pH 6인 배지

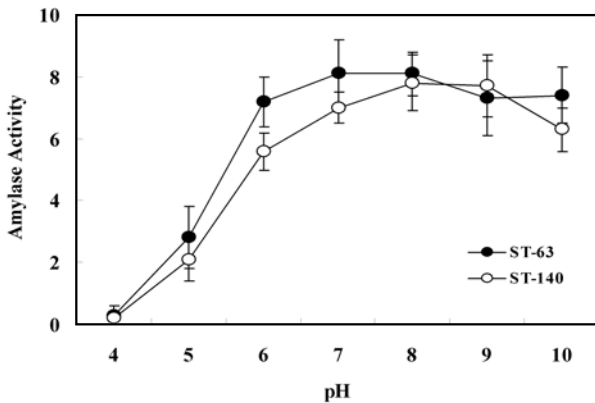


Fig. 8. Effect of pH of medium at the beginning of the culture on amylase activity of *Bacillus* sp. ST-63 and *Pseudoalteromonas* sp. ST-140.

에서부터 왕성하게 증식이 이루어져 pH 7배지에서 가장 높은 효소활성을 보였다.

또한 균주 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140의 경우 20°C와 40°C배양의 경우 시간의 흐름에 따라 amylase 활성의 차이는 있었으나, 활성의 점진적으로 증가하는 양상을 보인 반면, 30°C배양의 경우 12시간까지는 효소활성의 거의 없다가 24시간대에 들면서 급격한 효소활성을 보이면서 96시간까지 지속적인 높은 활성을 보였다. 이는 대수증식기를 거쳐 최대 증식 시간과 비슷한 양상으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 그리고 모든 실험구에서 배양시간 24시간을 기준으로 효소활성이 증가하는 것을 보였으며, 30°C와 40°C 실험구에서는 배양 시간 96시간에도 높은 효소활성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 7). 그리고 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140 균주 또한 배지의 초기 pH에 따른 효소활성을 조사하기 위하여 pH 4~10 범위의 배지를 사용하여 조사하였으며(Fig. 8), 초기 pH 4인 배지에서는 균체의 증식 및 효소활성을 거의 관찰 할 수 없었으며, pH 6인 배지에서부터 왕성하게 증식이 이루어져 pH 8배지에서 가장 높은 효소활성을 보였다.

요약

제주도 양식장 배출수 퇴적층에서 다당 분해효소를 생산하는 세균을 분리되었으며, 각각 ST-63, ST-140라고 명명하였다. 분리균주 ST-63의 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus velezensis*의 염기서열과 99%의 상동성을 보였으며, BIOLOG를 이용한 생화학적 분석에서도 *Bacillus amyloliquefaciens*와 가장 유사한 특성을 보여 최종적으로 분리균주 ST-63을 *Bacillus* sp. ST-63으로 명명하였다. 또한 분리균주 ST-140의 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 *Pseudoalteromonas marina*와 *Pseudoalteromonas agarivorans*의 염기서열과 99%의 상동성을 보였으며, BIOLOG를 이용한 생화학적 분석에서도 *Pseudoalteromonas* 종과 유사한 특성을

보여 최종적으로 분리균주 ST-140을 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140이라고 명명하였다. 다당 분해효소 생산 균주인 *Bacillus* sp. ST-63과 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 다당 분해효소 활성의 변화를 조사하였다. 그 결과 균주 *Bacillus* sp. ST-63은 20°C 및 40°C 배양실험구 보다 30°C 배양실험구에서 가장 높은 균 생육도를 보였으며, 효소활성에 대한 영향을 확인해본 결과 20~40°C 모든 실험구에서 24시간 이후 매우 높은 활성을 보이는 것으로 나타나서 본 균주는 효소활성의 생산에 있어서 온도에 매우 민감하게 작용하지 않는 것으로 나타났다. 또한 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140 균주는 20°C 및 40°C 배양실험구 보다 30°C 배양실험구에서 가장 높은 균 생육도를 보였으며, 효소활성에 대한 영향을 확인해본 결과 20~40°C 배양실험구 모두에서 24시간을 기준으로 효소활성이 계속적으로 증가하였으며, 30°C와 40°C 배양 실험구에서는 배양 시간 96시간에도 높은 효소활성을 보이는 것으로 나타났다. 그리고 분리균주가 배지의 초기 pH에 따른 효소활성의 변화를 확인하기 위하여 pH 4~10 범위의 배지를 사용하여 조사하였다. 그 결과 *Bacillus* sp. ST-63과 *Pseudoalteromonas* sp. ST-140 균주 모두다 비슷한 결과를 보였으며, pH 6을 기준으로 효소활성이 급격히 증가하다가 7~8에서 최고 활성을 보였다. 차후 분리균주의 효소생산을 위한 최적배양조건 및 물질분리 방법을 통하여 미생물 유래의 효과적인 효소를 생산하는 기술을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 제주지역환경기술개발센터의 연구개발사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Folmar, L. C. 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 337-375.
- Gerrenwood, C. F. and E. A. Milne. 1965. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*. M. L. Wolfrom, Academic Press, N. Y.
- John, R. and Dexter French. 1963. *arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 451.
- John, R. Whitaker. 1972. *Principles of Enzymology for the Food Science*. pp. 442, Marcel Dekker Inc. N. Y.
- Kim, J. K. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.* **19**, 179-193.
- Kim, S. K., I. S. Kong, J. K. Seo, B. J. Kim, M. G. Lee, and K. H. Suh. 1997. Removal of total ammonia-nitrogen(TAN) using immobilized nitrifier consortium. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 543-549.

7. Kobayashi, M. 1972. Utilization of photosynthetic bacteria. *Proc. IV. Internal. Ferment. Sympo.* 527-531.
8. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics.* **5**, 150-163.
9. Kung, J. T., V. M. Hanraan, and M. L. Caldwell. 1953. *J. AM. Chem. Soc.* **75**, 5548.
10. McDonald, D. G. and C. L. Milligan. 1992. Chemical properties of the blood, pp. 55-133, *In* Hoar, W. S., D. J. Randall, and A. P. Farrell (eds.), *Fish Physiology* Academic Press Inc., San Diego.
11. Miler, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426.
12. Moon, S. W., J. B. Lee, Y. D. Lee, S. J. Kim, B. J. Kang, and Y. B. Go. 2002. Recycling marine fish farm effluent by microorganisms. *J. Aquaculture* **15**, 261-266.
13. Noble, L. D. and J. A. Gow. 1998. The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GNMicroPlate substrates by *Vibrionaceae* bacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**, 251-258.
14. Wayne, W. 1965. *Umbreit, Advances in Applied Microbiology.* pp. 273, 7th eds., Academic Press Inc., N. Y.
15. Whwlan. 1965. *In Methods in Carbohydrate Chemistry.* pp. 252, 4th eds., Whistler.