



코코피트로부터 분리한 섬유소분해세균의 분리, 동정 및 특징에 관한 연구

장재은, 김진환, 김영준[†]

가톨릭대학교 생명환경공학부 환경공학전공

(2011년 12월 05일 접수, 2011년 12월 26일 수정, 2011년 12월 27일 채택)

Study on the Isolation and Characterization of Cellulose degrading Microorganism from Cocopeat

Chang, Jea-eun, Jin-Whan Kim, Young-Jun Kim[†]

School of Biotechnology and Environmental Engineering, The Catholic University, Bucheon, Korea

ABSTRACT

Cellulose-degrading bacteria were isolated and identified from cocopeat which has a good quality as a bulking agent in composting. Various bacteria from different sources of cocopeat were detected on CMC agar media, and these were found to be *Burkholderia sp.*, *Bacillus subtilis*, *Sphingomonas sp.*, *Rhodotorula sp.* & *Pseudomonas sp.* etc. Among these, four bacteria were further selected and analyzed for their biochemical characteristics and CMCase activities. CMCase activities of four bacteria, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *B. subtilis*, and *P. luteola* were found to be 83%, 40%, 8%, 6%, respectively, compared with that of the standard strain *Cellulomonas sp.*

Keywords : Cellulose, Degradation, Cocopeat, Bacillus, Pseudomonas

초 록

퇴비 제조 시 유용한 수분조절제로 각광받고 있는 코코피트를 대상으로 섬유소 분해능을 지닌 세균을 분리·동정하였다. 각기 다른 코코피트를 시료로 하여 섬유소 분해세균을 분리한 결과 각 시료로부터 다양한 세균들이 검출되었으며 이들을 동정한 결과 *Burkholderia sp.*, *Bacillus subtilis*, *Sphingomonas sp.*, *Rhodotorula sp.*를 비롯하여 여러 *Pseudomonas sp.* 등이 동정되었다. 이들 중 4종류의 균주, 즉 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. luteola* 를 선별하여 이들의 생화학적 특성을 분석하였으며 배양액을 대상으로 섬유소 분해효소의 일종인 CMCase의 활성을 비교·분석하였다. CMCase의 활성비교를 위한 표준균주로 *Cellulomonas sp.* 를 사용하였으며 비교결과 *P. aeruginosa*,

[†]Corresponding author(yjunkim@catholic.ac.kr)

P. stutzeri, *B. subtilis*, *P. luteola* 균주에서 각각 표준균주 효소활성의 83%, 40%, 8%, 6% 정도인 것으로 분석되었다.

핵심용어 : 셀룰로오스, 분해, 코코피트, 바실러스, 슈도모나스

1. 서론

최근 석유에너지를 대체할 목적으로 대체에너지에 대한 개발에 활발한 연구가 진행되고 있는 현실에서 목재의 주요 구성분인 섬유소는 바이오에너지의 일종인 에탄올 등으로 전환될 수 있는 유용한 바이오매스자원으로 많은 주목을 받고 있다. 섬유소(cellulose)는 목재를 구성하고 있는 삼성분, 즉, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌 등 주요 구성분 중의 하나로 목재는 지구의 바이오매스중 반 이상을 차지하는 중요한 자원으로 그 활용가치가 매우 높다 할 것이다¹⁾. 특히, 섬유소는 포도당의 β -1,4 glucosidic linkage에 의해 생성된 다당류성 물질로써 다른 목재성분과 달리 여러 미생물이 분비하는 섬유소 분해효소 (cellulase)에 의해 올리고당 및 포도당으로의 생물학적 분해가 수월히 이루어지고 있으며, 이로부터 각종 미생물 및 발효세균에 의해 에탄올 및 유용 화학물질로의 전환이 용이하게 이루어지고 있다²⁾.

코코피트는 열대야자수의 열매인 코코넛 껍질에서 일부 섬유질을 제거한 후 2 - 5년간 자연 부식시켜 형성된 물질로 가공 및 부숙정도에 따라 다양한 물리화학적 성질을 나타내고 있다. 이들은 보수력 및 보비력, 통기성이 우수하며 용적 밀도가 낮고 양이온 치환능력이 높으며 위생적이며 양분이 풍부한 장점 등의 이유로 원예용 상토를 비롯하여 축사 깔개 등으로 이용되고 있으며, 퇴비 제조 시 수분조절재로 사용되는 톱밥의 대용재로서 최근 각광을 받고 있는 물질이다³⁾.

코코피트의 수분보유력은 매우 강력하여 보통 점토가 포화대기중에서 10-20%의 수분을 흡수하는 것에 반해 코코피트는 약 80-90%의 물을 흡수하는 것으로 알려져 있다. 또한 토양내에서 미생물의 활동을 촉진하는 기능이 있으며 토양내

에서 장기간 부패하지 않아 토양의 물리성을 개선시키는 기능을 발휘하고 있다. 코코피트의 화학성분은 대부분이 리그닌과 셀룰로오스 등의 섬유질성분으로 구성되어 있으며 질소, 인산, 규산, 석회 유황 등의 유용성분을 함유하여 식물양분의 저장고와 같은 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁾ [Table 1].

본 연구에서는 코코피트의 형성과정에 다수의 섬유소 분해세균이 작용하였을 것이라는 사실에 주목하여 부식기작 및 형성과정에 차이가 있는 여러 코코피트를 대상으로 코코피트 내에 존재하는 섬유소 분해세균을 분리하여 이를 동정하고 그 특성을 비교, 분석함으로써 차후 바이오에너지를 생성하는 우수세균 및 코코피트를 이용한 퇴비화공정과정에 유용한 미생물 소재로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 시료의 채취, 세균의 분리 및 배양

섬유소분해세균의 분리를 위하여 사용된 코코피트는 시중에서 수입·유통되고 있는 시료를 구입하여 사용하였으며 이들의 주요 원산지는 베트남과 인도네시아산인 것으로 파악되었다. 분리에 사용된 배지는 CMC induction medium으로 그 조성은 다음과 같다²⁾. CMC배지 : CMC 2.5g/L, Yeast extract 2.5g/L, Tryptone 2.5g/L, (NH₄)₂SO₄ 1g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, MgSO₄ 0.2g/L, Agar 15g/L. 섬유소세균의 분리를 위하여 각각의 코코피트로부터 시료 5g를 취하여 250ml 삼각플라스크에 증류수 95mL과 혼합한 후 0.9%의 NaCl을 첨가하여 진탕배양기에서 30℃, 12시간동안 충분히 혼합하였고 이로부터 0.1mL를 취하여 CMC agar 배지

[Table 1] Physico-Chemical Properties of Cocopeat⁴⁾

Items	Measure	Items	Measure
Organic Matter(%)	95-99	Oranic Carbon(%)	29.00
pH	5.5-6.5	N	0.3-0.6%
Cation Exchange	60-120 meq/100g	NH ₃	0
Conductivity	200-400 us/cm	Mn	0.001%
Water Holding	8-9 times	Potassium(%)	0.78
Porous ratio	94%	Calcium(%)	0.40
C:N ratio	80-112:1	Magnesium(%)	0.36
Toxicity	None	Zinc(ppm)	7.50
Malodor	None	Copper(ppom)	3.10
Lignin(%)	41-46	Phosphorous(%)	0.01
Cellulose(%)	36-43		

에 도달하여 30℃, 2일간 배양한 후, 생성되는 콜로니를 분리하였다.

2.2 세균의 형태학적, 생리학적, 분자생물학적 동정실험

분리된 세균의 형태 및 생리, 생화학적 특성을 알아보기 위하여 그람염색실험, API test 등을 수행하였으며, 세균의 계통분류학적 특성을 파악하기 위하여 세균의 염색체를 분리한 후 16S rDNA를 이용한 염기서열의 비교·분석실험을 의뢰하여 최종적으로 컴퓨터분석을 통하여 분리된 균주를 동정하였다.

2.3 섬유소 분해능 비교 및 분석실험

분리된 세균의 섬유소 분해능을 비교, 분석하기 위하여 각각의 분리된 세균을 CMC 액체배지에서 30℃, 4일간 배양한 후, 세포배양액을 원심분리(15,000 xg at 4℃ for 15min)하여 상등액을 대상으로 섬유소 가수분해 활성측정 실험을 수행하였다. 효소 활성측정을 위한 반응액으로 0.5mL의 CMC 1%(0.05M phosphate buffer, pH 7.0) 용액에 효소액 0.5mL을 가하고 30℃에서 30분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 이후 생성된 환원당을 DNS법⁵⁾을 이용하여 550nm에서 흡광도의 값으로 측정하였다.

3. 결과

3.1. 섬유소 분해 세균의 분리, 생화학적 특성 및 분자생물학적 동정

각각 제작회사 및 원산지가 다른 5종의 코코피트 (A, B, C, D, & E)로부터 시료를 채취하고 적당량을 취하여 CMC배지에 도달한 결과 각각 다른 시료로부터 다양한 모양의 콜로니가 형성됨을 관찰하였다. 이들 각각의 시료로부터 생성된 콜로니로부터 각기 모양이 다른 콜로니를 취하여 새로운 배지에 재배양한 후, 이들을 분자생물학적으로 동정한 결과 다양한 종류의 세균들이 존재하고 있음이 밝혀졌다 [Table 2].

시료A에서 다양한 세균이 검출되었으며 시료D의 경우 세균의 생성을 관찰할 수 없었는데 이는 본 시료에서 곰팡이균이 우점하는 것으로 나타나 세균의 생성이 억제된 것으로 판단되어 진다. 대부분의 시료에서 기존에 섬유소를 분해하는 것으로 알려진 *Pseudomonas*종이 발견되었으며^{5),7)} 따라서 이들과 함께 같은 섬유소 분해세균으로 보고된 *Bacillus subtilis*⁶⁾를 대상으로 API 50CH 및 API 20NE kit를 사용하여 각 균주의 생리화학적 특성을 분석하였으며 그 결과는 [Table 3]과 같다.

3.2 분리된 세균의 섬유소 분해능 비교 및 분석

[Table 2] Various Strains Isolated from Different Cocopeats (A, B, C, D, E)

A	<i>Burkholderia sp</i> <i>Microbacteriaceae bacterium</i> <i>Curtobacterium sp.</i> <i>Bacillus subtilis sp.</i> <i>Bacterium CAGY8 strain</i> <i>Sphingomonas sp.</i> <i>S. estrogenivorans strain</i> <i>Sphingobium amiense strain</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>
B	<i>Dyella ginsengisoli strain</i> <i>Dyella sp.</i> <i>Frateuria sp.</i> <i>Gamma proteobacterium</i> <i>Bordetella sp.</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	<i>Pseudomonas sp.</i>
D	<i>Not detected</i>
E	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodospiridium babjevae</i> <i>Pseudomonas luteola</i>

선택한 4종류의 섬유소 분해균을 대상으로 섬유소분해능을 분석하였다. 섬유소분해능은 CMC 액체배지에서 배양한 균주의 배양액을 원심분리한 후 상등액을 대상으로 CMC 분해정도를 기존에 알려진 섬유소 분해세균과 비교하여 분석하였다. 비교균주로 사용된 표준균주는 섬유소분해능이 높은 것으로 알려진 *Cellulomonas sp.*로서 한국 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 실험하였다.

선택한 4종류의 균주중 *Pseudomonas aeruginosa*를 제외한 3종류는 표준균주인 *Cellulomonas sp.*의 섬유소분해능에 크게 못 미치는 것으로 나타났으며 *P. aeruginosa*는 표준균주의 83%수준의 분해능을 나타내는 것으로 분석되었다. 본 결과에서는 섬유소분해능이 비교적 높은 것으로 알려진 *Bacillus subtilis*종에서 표준균주 대비 8%정도의 매우 미미한 활성이 측정되었다. 이는 균주마다 배양방법 및 조건에 따라 섬유소분해능이 달리 나타나고 있기 때문에 동일한 균주를 대상으로 한 보다 정밀한 비교실험이 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

지금까지 섬유소 분해효소를 생산하는 미생물은 곰팡이, 세균, 및 방선균 등으로 자연계로부터 많이 분리되어 왔다. 또한 섬유소 분해세균에는 *Cellulomonas sp.*, *Actinomycetes sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, *Cellvibriosp.*, *Cytophaga. sp* 등이 보고되고 있다¹⁾. 이들 중 *Cellulomonas sp.*종이 cellulase 활성이 가장 우수한 것으로 알려져 있으며 *B. subtilis*종 또한 비교적 높은 것으로 보고되고 있다¹⁾. 섬유소 분해에 관여하는 효소로는 CMCase를 비롯하여 avicelase, β -glucosidase 및 xylanase 등이 있으며 세균에 따라 각각 효소를 생성하는 기작 및 종류를 달리하고 있는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 예를 들어, *Pseudomonas sp.*는 *Cellulomonase sp.*와 *Clostridium thermocellulum* 등과 비교하여 CMCase 활성은 비슷한 수준이나 avicelase, β -glucosidase 및 xylanase의 활성은 높은 것으로 보고되고 있다⁷⁾. 본 연구에서도 기 분리·동정된 세균을 대상으로 보다 정밀한 분해능실험과 함께 CMCase 이외 다른 섬유소 분해효소에 대한 활성정도를 측정하여 섬유소분해능에 대한 종합적인 판단이 필요할 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 퇴비 제조시 유용한 수분조절제로 각광받고 있는 코코피트를 대상으로 섬유소분해능을 지닌 세균을 분리·동정하였다. 각기 다른 코코피트를 시료로 하여 섬유소 분해세균을 분리한 결과 각 시료로부터 다양한 세균들이 검출되었으며 이들을 동정한 결과 *Burkholderia sp.*, *Bacillus subtilis*, *Sphingomonas sp.*, *Rhodotorula sp.*를 비롯하여 여러 *Pseudomonas sp.* 등이 동정되었다. 이들 중 4종류의 균주, 즉 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. luteola*를 선별하여 이들의 생화학적 특성을 분석하였으며 배양액을 대상으로 섬유소 분해효소의 일종인 CMCase의 활성을 비교·분석하였다. CMCase의 활성비교를 위한 표준균

[Table 3] Biochemical Characteristics of Four Selected Bacteria

<i>Bacillus subtilis</i>									
Control	Glycerol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose	Ribose	D-Xylose	L-Xylose	Adonitol	β-Methyl-xyloside
-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Galactose	D-Glucose	D-Fructose	D-Mannose	L-Sorbose	Rhamnose	Dulcitol	Inositol	Mannitol	Sorbitol
-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
α-Methyl-D-mannoside	α-Methyl-D-glucoside	N-Acetyl glucosamine	Amigdaline	Arbutine	Esculine	Salicine	Cellobiose	Maltose	Lactose
-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Melibiose	Saccharose	Trehalose	Inuline	Melezitose	D-Raffinose	Amodon	Glycogene	Xylitol	β-Gentiobiose
-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	D-Arabitol	L-Arabitol	Gluconate	2-Keto-gluconate	5-Keto-gluconate
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
Potassium nitrate	L-tryptophane	D-glucose (fermentation)	L-arginine	Urea	Eesculin ferric citrate	Gelatine
+	-	-	-	-	-	+
4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	D-glucose (assimilation)	L-arabinose	D-mannose	D-mannitol	N-acetyl-glucosamine	D-maltose
-	+	-	-	-	+	-
Potassium gluconate	Capric acid	Adipic acid	Malic acid	Trisodium citrate	Phenylacetic acid	Oxidase
+	+	+	+	+	-	+

<i>Pseudomonas stutzeri</i>						
Potassium nitrate	L-tryptophane	D-glucose (fermentation)	L-arginine	Urea	Eesculin ferric citrate	Gelatine
+	-	-	-	-	-	-
4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	D-glucose (assimilation)	L-arabinose	D-mannose	D-mannitol	N-acetyl-glucosamine	D-maltose
-	+	-	-	-	+	-
Potassium gluconate	Capric acid	Adipic acid	Malic acid	Trisodium citrate	Phenylacetic acid	Oxidase
+	+	+	+	+	-	+

<i>Pseudomonas luteola</i>						
Potassium nitrate	L-tryptophane	D-glucose (fermentation)	L-arginine	Urea	Eesculin ferric citrate	Gelatine
+	-	-	+	-	+	-
4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	D-glucose (assimilation)	L-arabinose	D-mannose	D-mannitol	N-acetyl-glucosamine	D-maltose
+	-	+	+	+	+	+
Potassium gluconate	Capric acid	Adipic acid	Malic acid	Trisodium citrate	Phenylacetic acid	Oxidase
+	-	-	+	+	-	+

(+ : growth, - : no growth)

[Table 4] Comparison of Cellulase activity for Cellulose Degrading Microorganism

species	CMCase activity (U/mL)*	Rerelative activity (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	12	8.33
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	57	39.58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	120	83.33
<i>Pseudomonas luteola</i>	9	6.25
<i>Cellulomonas sp.</i>	144	100

* 1 unit is equivalent to the amount of the enzyme to produce 1 μmol of glucose from CMC for one minute.

주로 *Cellulomonas sp.* 를 사용하였으며 비교결과 *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *B. subtilis*, *P. luteola* 균주에서 각각 표준균주 효소활성의 83%, 40%, 8%, 6% 정도인 것으로 분석되었다.

사사

본 연구는 2010년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드리며 장재은에 대한 (사)한국자연환경보전협회의 대학원생 학술연구지원에도 감사드립니다.

참고문헌

1. 정영철, 강신권, 김희숙, 노종수, “섬유소 분해효소 생성 미생물의 분리 및 특성”, 진주전문대 학 논문집, 14, pp. 581~600. (1991).
2. 최원석, 배동훈, “토양으로부터 분리한 균주로부터 섬유소 분해효소생산”, 단국대학교 신소재 기술연구소 신소재연구논문집, 12(2), pp. 181~

192. (2004).
3. 김혁수, “원예용 상토 재료 피트모스, 코코피트, 펄라이트, 버미큘라이트의 혼합비율에 따른 물리성 특성변화”, 서울시립대학교 석사학위논문 (2009).
4. 김이열, “코코피트와 피트모스의 특성”, 한국토양비료학회지, 13, pp. 14~21. (2003).
5. 임상호, 윤민호, 최우영, “호알칼리성 섬유소분해세균 *Pseudomonas sp.*의 분리 및 특성”, 충남대학교 농업과학연구논문집, 25(1), pp. 124~130. (1998).
6. 지원재, 박다연, Uyangaa Temuujin, 이종열, 장용근, 홍순광, “제주 연안의 해수로부터 분리한 Cellulase 생산균 *Bacillus sp.* GC-1과 GC-4의 동정”, 한국미생물·생명공학회지, 39(2), pp. 97~103. (2011).
7. 정영철, 강신권, 김희숙, 노종수, “*Pseudomonas sp.* LBC505의 섬유소 분해효소 특성”, 진주전문 대학논문집, 18, pp. 713~727. (1995).