

A Study of the Diversity and Profile for Extracellular Enzyme Production of Aerobically Cultured Bacteria in the Gut of *Muraenesox cinereus*

Yong-Jik Lee^{1†}, Do-Kyoung Oh^{2†}, Hye Won Kim², Gae-Won Nam¹, Jae Hak Sohn², Han-Seung Lee², Kee-Sun Shin^{3*} and Sang-Jae Lee^{2*}

¹Department of Cosmetics, Seowon University, Chung-Ju 28674, Korea

²Major in Food Biotechnology and Research Center for Extremophiles & Marine Microbiology, Silla University, Busan 46958, Korea

³Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Korea

Received January 26, 2019 / Revised February 24, 2019 / Accepted February 27, 2019

This research confirmed the diversity and characterization of gut microorganisms isolated from the intestinal organs of *Muraenesox cinereus*, collected on the Samcheonpo Coast and Seocheon Coast in South Korea. To isolate strains, Marine agar medium was basically used and cultivated at 37°C and pH7 for several days aerobically. After single colony isolation, totally 49 pure single-colonies were isolated and phylogenetic analysis was carried out based on the result of 16S rRNA gene DNA sequencing, indicating that isolated strains were divided into 3 phyla, 13 families, 15 genera, 34 species and 49 strains. Proteobacteria phylum, the main phyletic group, comprised 83.7% with 8 families, 8 genera and 26 species of Aeromonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, and Vibrionaceae. To confirm whether isolated strain can produce industrially useful enzyme or not, amylase, lipase, and protease enzyme assays were performed individually, showing that 39 strains possessed at least one enzyme activity. Especially the *Aeromonas* sp. strains showed all enzyme activity tested. This result indicated that isolated strains have shown the possibility of the industrial application. Therefore, this study has contributed for securing domestic genetic resources and the expansion of scientific knowledge of the gut microbial community in *Muraenesox cinereus* of South Korea.

Key words : Bacteria, diversity, extracellular enzyme, gut microorganism, *Muraenesox cinereus*

서론

마이크로바이옴(Microbiome)은 자연계에 존재하는 모든 미생물군집의 집합체 혹은 군총을 의미하며 동물의 장내에 존재하는 미생물 군총은 장내 마이크로바이옴(Gut microbiome)이라 하여 최근 많은 연구를 통하여 매우 다양한 미생물로 구성되며 영양학적, 생리학적, 및 병리학적으로 숙주의 대사활성에 관여하여 숙주의 건강 및 질병과의 연관성이 알려지고 있다[1]. 이와 같이 장내미생물의 기능적 역할이 확인되면서 최근 장내미생물에 대한 연구가 꾸준히 증가하고 있다. 최근 국립낙동강생물자원관에서는 어류인 병어의 장내 마이크로바이옴을 분석하여 프로바이오틱스로 활용 가능한 유산균이 많이 분포하고 있음을 확인하였으며, 붉은 멧게의 경우,

장에서 분리한 신종 미생물에서 새로운 항생물질이 발견되어 보고된 바 있다[13]. 이처럼 어류의 장내세균은 해당 숙주의 서식처 주변 환경 조건 및 먹이 등에 영향을 많이 받기 때문에 숙주마다 매우 다양한 장내미생물이 서식하며, 이는 해당 어류의 생활사 연구의 중요한 지표가 되기도 하며 해양바이오소재 응용분야의 중요한 한 부분인 극한환경미생물과 해양미생물을 활용한 산업효소소재 개발을 위한 핵심적인 자원이 된다 [11].

작년 국내에서도 “나고야 의정서”의 발효에 따른 자국의 생물자원 확보가 중요한 이슈로 떠오르며 국립낙동강생물자원관에서 유용 담수세균 254 균주를 발견함과 동시에 수입 의존도가 높은 국내 산업용 효소시장에 활용할 수 있는 효소 활성 평가 정보를 확보함으로써 국내 담수생물자원에 산업적 가치를 부여하고 국내 바이오산업 발전에 기여할 것으로 기대되는 만큼, 본 연구에서는 국내 어류로부터 장내 미생물의 분리 뿐만 아니라 전분가공용, 식품 및 세계 산업용 효소시장 등에 응용 가능한 효소 3 종(amylase, lipase, protease)의 활성을 중심으로 분리된 미생물의 특성 탐색이 진행되었다. 이는 국내 미래 산업의 지향점이 무공해 고효율의 탄소 자원 절약형 산업이라고 규정되면서, 생물 효소 시장이 미래 산업을 만족시킬 수 있는 한 축을 담당하고 있으므로 유용한 산업용

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5447, Fax : +82-51-999-5458

E-mail : sans76@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

효소 생산능을 가진 미생물 탐색은 국내 생물자원 가치를 제고하고 생물공학 연구 기초 소재로 활용될 것으로 예상된다.

본 연구에 사용된 어류인 갯장어(*Muraenesox cinereus*)는 뱀장어목(Anguilliformes) 갯장어과(Muraenesocidae)에 속하며 대한민국에서는 주로 서해안과 남해안에서 서식하는데 몸길이는 보통 60~80 cm 정도 되지만 최대 2 m 까지 자라는 개체도 존재한다. 갯장어의 등은 녹회색, 배는 은백색을 띠고 있으며 날카로운 이빨로 작은 물고기나 갑각류, 두족류 따위를 잡아 먹으며 양식은 불가능하다. 최근 해양유래생물로부터 장내 미생물 분리연구 사례는 무지개송어, 넙치, 볼락, 감성돔, 참돔, 자리돔, 독가시치, 청어 및 불가사리 등이 사용되었음이 보고[2, 5, 6, 9, 12, 16-18]되었으나 갯장어를 해양생물로 사용한 경우는 없었으며 따라서 해양에서 섭취한 작은 생물체와 같은 먹이들을 소화시키기 위해선 장내 미생물들이 다양한 분해 효소를 생산할 것으로 예상되어 남해안의 삼천포 및 서해의 서천에서 잡은 갯장어로부터 장내미생물을 순수 분리한 후, 분리된 미생물 균의 효소 생산능 분석을 실시하였다. 또한 auxin 생산 능력 등을 가진 미생물은 작물의 생육을 촉진하는 기능을 함으로써 화학비료를 대체하는 미생물비료로 사용될 수 있기에 추가적으로 갯장어에서 분리된 장내 미생물들의 auxin 생산능 분석도 실시하였다[8]. 본 연구를 통하여 국내 갯장어의 생물자원으로써의 가치를 제고하고 산업용 효소 관련 생물공학 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

재료 및 방법

실험어 채취

본 실험에 사용된 시료어는 남해안 삼천포 연안 및 서해안 서천 연안에서 채집된 갯장어 5 마리씩을 사용하였으며 장내 미생물을 분리하기 위하여 채집한 갯장어의 내장은 분리하여 바로 얼음이 들어있는 아이스박스(4℃)에 보관 운송 하였다.

장내미생물 분리 및 배양

갯장어로부터 장내세균의 분리를 위해 내용물이 제거된 내장을 절단하여 멸균된 0.85% 생리식염수에 현탁하였다. 그 뒤 잘 현탁되도록 vortexing 해준 뒤 현탁액 1 ml를 넣고 $10^1 \sim 10^4$ 배로 단계희석 하였다. 그 뒤 일반 증식배지로 해양미생물 전용배지인 Marine agar (BD, USA) 고체배지를 제작하여 희석액을 도말 한 후, 37℃에서 호기적으로 장내 미생물을 배양하여 선택적으로 배지상에 나타나는 균의 크기, 모양, 색깔 등 형태학적 모습을 관찰한 후 동일한 고체배지를 사용하여 추가적으로 single colony isolation을 수행하였다. 순수 분리된 균주의 혼합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여, Nutrient agar (BD, USA), R2A agar (BD, USA), 및 Tryptic soy agar (BD, USA)에 평판 도말법을 이용하여 37℃에서 7

일간 정치 배양을 하였다.

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

갯장어의 내장으로부터 호기적 조건에서 분리된 균주의 분자생물학적 동정을 위해 Marine agar (BD, USA)에 각각의 분리된 균주의 colony가 배양된 상태의 agar plate를 (쥬바)이오 팩트에 보내어 16S rDNA 염기서열의 분석을 의뢰하였다. 분석된 16S rDNA 염기서열은 NCBI의 BLAST search program 과 (쥬천랩)의 Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)를 사용하여 가장 유사한 근연 균주를 확인하였다. 계통학적 분석은 Clustal W 및 MEGA 6.0 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

분해 효소 생산능 분석

분리된 균주의 세포의 분해 효소 amylase, lipase, protease 생산능 분석을 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 amylase 생산능은 0.2% soluble starch (BD, USA)를, lipase 생산능은 1% Tween 80 (Sigma, USA) 을, protease 생산능은 2% skim milk (BD, USA)를 기질로 선택하여 Marine agar (BD, USA) 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며 분리된 균주를 직접 접종하여 37℃에서 7 일 배양한 후 저지원(Clear zone)의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 점종균 주위의 억제환의 크기(+++ : > 7 mm, ++ : 4~6 mm, + : 1~3 mm)로 나타내었다.

옥신(Auxin) 생산능 분석

분리된 균주의 auxin 생산능은 0.1% L-tryptophan이 첨가된 Marine broth (BD, USA) 배지에 순수분리된 colony를 tooth-picking 한 후 37℃에서 5일 배양하여 Salkowski 시약 (35% HClO₄ 50 ml + 0.5 M FeCl₃ 1 ml) 800 ul을 배양 상등액 400 ul에 섞어준 후 어두운 곳에서 30 min 반응시켜 옥산으로 확인하여 붉은 색깔 변화 정도에 따라 옥신 생성능 정도를 표시하였다(깊은 붉은색: +++; 일반 붉은색: ++; 옅은 붉은색: +; 주황색: w; 무색: -).

결과 및 고찰

갯장어 호기적 장내세균 분리

남해안에 위치한 삼천포와 서해안에 위치한 서천에서 포획한 갯장어를 대상으로 산업적 활용이 용이할 것으로 생각되는 호기적으로 생육 가능한 장내 미생물을 분리하고자 1차로 Marine agar 배지에 시료를 도말하여 배양한 후, 배양된 colony의 모양, 색깔 등 형태학적 특징을 육안으로 구분이 가능한 균주들을 2차로 단일 균주 분리를 수행하였다. 그 결과 Table 1에서 나타난 것처럼 삼천포 갯장어에서는 40 균주, 서천 갯장

Table 1. Isolation and identification of aerobically cultured microorganisms isolated from the gut microbiomes of *Muraenesox cinereus*

No	Source	Isolate	NA ^I	R2A ^{II}	TSA ^{III}	MA ^{IV}		
						pH5	pH7	pH9
1		SC-MG 3C	+ ^a	+	+	- ^b	+	+
2		SC-MG 5D	+	+	+	w ^c	+	+
3		YS-PG 2B	+	+	+	w	+	-
4		YS-PG 3B	+	+	+	-	+	-
5		YS-PG 3C	+	+	+	-	+	-
6		YS-PG 3D	+	+	+	+	+	w
7		SC-MG 1A	+	+	+	-	+	-
8		YS-PG 2D	+	+	+	-	+	-
9		SC-MG 1C	+	+	+	w	+	+
10		YS-PG 2C	-	-	-	-	+	-
11		SC-MG 4D	+	+	+	w	+	+
12		SC-EG 22D	+	+	+	w	+	-
13		SC-EG 21D	+	+	+	w	+	+
14		SC-EG 4D	w	w	w	-	+	-
15		SC-EG 7C	+	+	+	-	+	+
16		SC-EG 5C	+	+	+	+	+	-
17		SC-EG 1C	+	+	+	w	+	-
18		SC-MG 1B	+	+	+	w	+	+
19		SC-EG 1D	+	+	+	w	+	+
20	Sam cheon po	SC-EG 3D	+	w	-	-	w	w
21		YS-PG 1A	w	+	+	w	+	-
22		SC-MG 2A	+	+	+	w	+	w
23		SC-MG 3B	+	+	+	w	+	w
24		SC-MG 4B	+	+	+	-	+	+
25		SC-EG 6C	+	+	+	w	+	+
26		SC-EG 2B	+	+	+	w	+	w
27		SC-EG 1B	+	+	+	w	+	-
28		SC-EG 5A	+	+	+	-	+	-
29		SC-MG 2B	+	+	+	w	+	w
30		SC-EG 5B	+	+	+	-	+	-
31		SC-MG 6D	+	w	-	w	+	+
32		SC-EG 3C	-	-	w	-	+	-
33		SC-EG 1A	-	w	+	w	+	+
34		SC-EG 4B	-	-	+	w	+	-
35		SC-EG 2C	-	-	+	-	+	+
36		SC-EG 4A	-	-	+	-	+	-
37		SC-MG 2C	+	+	+	+	+	+
38		YS-PG 4C	+	+	+	+	+	-
39		YS-PG 4D	+	+	+	+	+	w
40		SC-EG 3A	-	-	-	-	+	-
41		SF-SG 1A	+	+	+	-	+	w
42		SF-SG 4B	+	+	+	w	+	+
43		SF-SG 3B	+	+	+	w	+	+
44	Seo cheon	SF-SG 3C	+	+	+	w	+	+
45		SF-SG 4D	+	+	+	+	+	+
46		SF-SG 1C	-	-	-	w	+	+
47		SF-SG 1D	+	+	+	+	+	+
48		SF-SG 2B	+	+	+	-	+	+
49		SF-SG 1B	+	-	+	w	+	+

^I: Nutrient agar, ^{II}: Reasoner's 2A agar, ^{III}: Tryptic soy agar, ^{IV}: Marine agar, ^a: Well-growth, ^b: No growth, ^c: Weak growth.

어에서는 9 균주를 순수 분리하였다. 상대적으로 삼천포에서 포획한 갯장어에서 훨씬 많은 장내 호기적 미생물이 분리된 것은 포획된 갯장어의 먹이활동, 지역적 특징, 건강상태, 호기적 미생물군집 차이, 배양방법 등의 여러 가지 원인의 가능성이 있을 것으로 추측된다. 또한 주요성분이 무기염으로 이루어진 Marine agar 배지는 해양미생물 배양에 유리한 배지이기 때문에 산업적 활용가능성을 확인하기 위하여 대량 배양 등에 많이 활용되는 혼합 배지(Nutrient agar, R2A agar, Tryptic soy agar)에서의 분리 균주들의 생육 가능성을 확인한 결과 분리 균주 3 종을 제외한 모든 균주가 최소 1 종류 이상의 혼합 배지에서 생육이 가능한 것을 확인하였다. 이는 어류의 호기성 장내 미생물세균의 탐색에 있어서 분리 배지의 구성성분이 어느 정도 영향을 미치는 것으로 생각되며, 본 연구 결과를 바탕으로 어류 호기성 장내 미생물 분리를 위한 최적 배지는

marine agar 배지로 나타났다.

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

삼천포 및 서천 갯장어의 장내 미생물로부터 호기적으로 분리된 49 균주의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 NCBI Nucleotide BLAST program, Ezbiocloud를 사용하여 세균 동정을 분석한 결과 크게 3 문, 8 목, 13 과, 15 속, 34 종으로 나타났다(Table 2), 분리 균주와 근연 균주 및 상동성을 Table 3에 나타내었다. 또한 분리 동정된 장내 세균들 간의 유연관계를 확인하기 위하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1). Proteobacteria (Gamma- proteobacteria)가 83.7%로 가장 우점도가 높았고, Actinobacteria 6.1%, Firmicutes 10.2%로 각각 나타났다. Proteobacteria 문은 Aeromonadaceae 39.0%, Shewanellaceae 24.3%, Morganellaceae 9.8%, Moraxellaceae

Table 2. Isolation and identification of aerobically cultured microorganisms isolated from the gut microbiomes of *Muraenesox cinereus*

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Number	
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Micrococcales	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i>	<i>Janibacter hoylei</i>	1	
			Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus aloeverae</i>	1	
					<i>Micrococcus antarcticus</i>	1	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus nealsonii</i>	1	
				<i>Bacillus idriensis</i>	1		
				<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	1	
		Lactobacillales	Planococcaceae	<i>Kurthia</i>	<i>Kurthia gibsonii</i>	1	
				<i>Desemzia</i>	<i>Desemzia incerta</i>	1	
			Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas bivalvium</i>	7
						<i>Aeromonas encheleia</i>	1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Aeromonas media</i>	1	
					<i>Aeromonas popoffii</i>	1	
					<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i>	1	
					<i>Aeromonas veronii</i>	2	
					<i>Aeromonas rivipollensis</i>	1	
					<i>Haemophilus piscium</i>	2	
					<i>Pseudoalteromonas undina</i>	1	
		Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella upenei</i>	1		
				<i>Shewanella baltica</i>	1		
				<i>Shewanella indica</i>	4		
				<i>Shewanella xiamenensis</i>	2		
				<i>Shewanella seohaensis</i>	2		
				<i>Citrobacter freundii</i>	2		
Enterobacteriales	Morganellaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus hauseri</i>	1			
			<i>Proteus alimenterum</i>	1			
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	1			
			<i>Proteus terrae</i>	1			
			<i>Psychrobacter pulmonis</i>	1			
			<i>Psychrobacter sanguinis</i>	2			
			<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	1			
			<i>Pseudomonas parafulva</i>	1			
			<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>Oleovorans</i>	1			
Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>Piscicida</i>	1			
			<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	1		

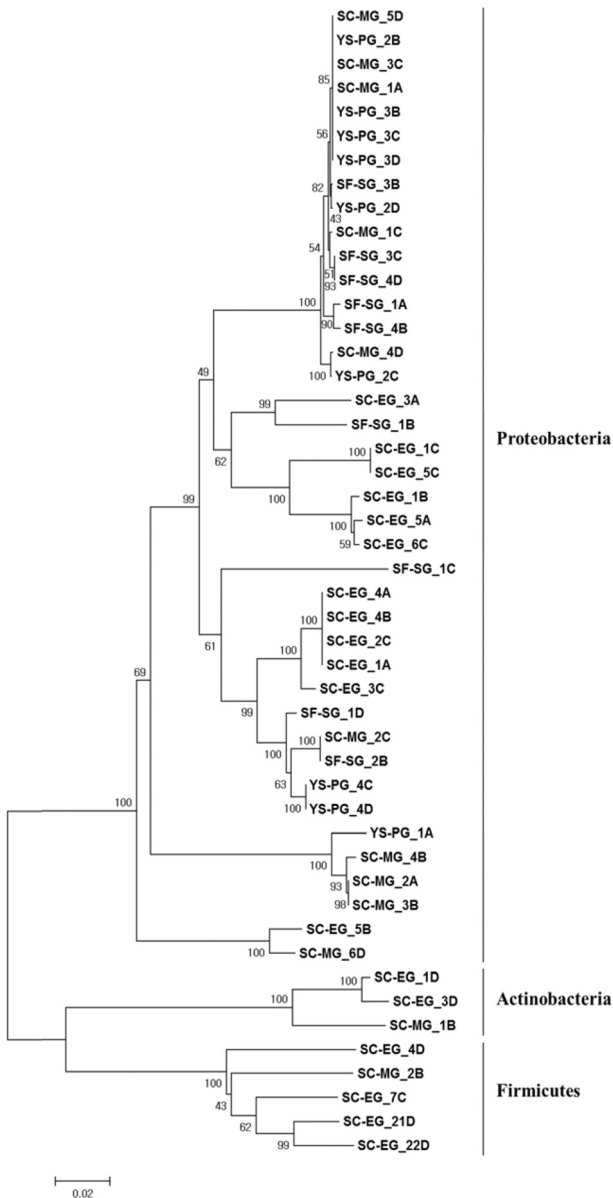


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences of bacteria from the gut of *Muraenox cinereus*. Bootstrap values calculated (from 1,000 replications).

9.8%, Enterobacteriaceae 4.9%, Pseudomonadaceae 4.9%, Vibrionaceae 4.9%, Pseudoalteromonadaceae 2.4%로 구성되었으며, 총 8 과로 9 속, 25 종이 분리되었다. 가장 많이 분리된 *Aeromonadaceae* 과는 *Aeromonas* sp.이 수중환경에서 많이 분리되며 유럽의 뱀장어에서도 분리된다는 것이 알려져 있기에 갯장어의 장내 미생물 군총에서 가장 많이 분리된 것으로 예상되며[4], 해양유래 프로바이오틱 균주로 어류의 장에 서식하며 성장률과 면역능 증가에 도움이 되는 것으로도 알려진 Moraxellaceae과 *Psychrobacter*속의 5 종이 확인되었다[19]. Actinobacteria 문에서 3 속, 3 종이 분리되었으며 Firmicutes

문에서 4 속, 5 종이 분리되었다. 본 연구에서는 *Bacteroides* 문의 균주는 분리되지 않았으며 이전에 보고된 해수어 및 담수어 장내 세균총에서 대부분이 Proteobacteria 문이 우점하였다는 연구결과와 마찬가지로 갯장어에서도 Proteobacteria 문이 우점하고 있는 것을 확인할 수 있었다 [3, 10, 12, 15]. 또한 *Photobacterium* 속, *Vibrio* 속과 같은 어류병원체 균주도 삼천포 및 서천 갯장어에서 각각 1 균주씩 분리되었으며 이는 대부분의 해산어 장내기관에서 분리되었다는 보고와 일치한다[3, 5, 12, 14]. 이런 병원체 균주는 먹이와 함께 체내로 들어와 장내에서 잠복했다가 숙주어의 면역력이 저하되면 기회감염을 일으키는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 장내미생물은 생활환경, 방식 등 여러 요인에 따라 다양한 차이를 나타내는 것을 알 수 있다.

분해 효소 및 옥신 생산능 분석

갯장어처럼 작은 해양 생물체를 먹이로 섭취하는 경우, 섭취한 먹이들을 소화시키기 위해 소화기관내에 존재하는 장내 미생물들의 다양한 분해 효소 분비등과 같은 상호작용이 필요할 것으로 예상되어 분리된 장내 미생물 균주들의 신규 분해 효소 탐색 자원 및 미생물비료로서의 산업적 응용가능성을 확인하기 위하여 세포외 분해 효소 생산능 및 옥신 생산능 분석을 실시하였다.

Table 3에 나타난 것처럼 분리된 49 균주에서 10 균주를 제외한 모든 균주에서 한 가지 이상의 분해 효소 활성이 존재하는 것을 확인하였으며, 두 가지 이상의 효소 활성을 가지는 20 균주 중 특히 세 가지 효소에 대하여 활성을 모두 가지고 있는 것으로 확인된 3 균주(과제기탁번호: NMC4-B106, NMC4-B108, NMC4-B151)는 모두 *Aeromonas* sp. 인 것으로 확인하였다. 이는 거머리에서 분리된 *Aeromonas veronii*는 혈액 분해, 영양분 공급 및 외부 박테리아의 생육저해능이 있을 것으로 보고 된 것처럼 이러한 기능이 다양하게 존재하는 분해 효소의 도움에 의한 것으로 생각된다[7]. 또한 옥신 생산능을 확인한 결과, 12 균주에서 생산능이 확인되었으며 특히 *Proteus* sp. 의 4 균주들의 생산능이 매우 높은 것을 알 수 있었으며 이는 식물생장을 촉진시킬 수 있는 미생물비료 연구에 활용할 수 있는 미생물 소재로서의 활용가치가 존재할 것으로 예상된다. 동물 유래의 장내 미생물은 매우 다양하며 배양조건이 까다롭기 때문에 순수 분리에 한계가 있을 것을 생각되지만 본 연구에서는 남해안 및 서해안에서 포획한 갯장어에서 분리된 장내 세균군의 일부분이라도 국내 생물 자원의 다양성 확보 차원에서 의미를 찾을 수 있을 것이며 갯장어의 장내세균으로부터 분해 효소 탐색을 위한 신규균주의 활용 가능성과 산업용 효소 관련 생물공학 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다. 또한 본 연구를 통하여 분리한 모든 균주들은 한국생명공학연구원 미생물가치제고사업단에 기탁하였다.

Table 3. Representative sequences of an aerobically isolated strains from the gut microbiomes of *Muraenesox cinereus*

No	Isolate Name	Closed strain	Closed strain number	Similarity (%)	Extracellular enzyme activity			Auxin	Deposited number
					Amylase	Lipase	Protease		
1	SC-MG 3C	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+++	+	-	NMC4-B106
2	SC-MG 5D	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+	++	-	NMC4-B108
3	YS-PG 2B	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B149
4	YS-PG 3B	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	++	+++	-	+	NMC4-B150
5	YS-PG 3C	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B152
6	YS-PG 3D	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B155
7	SC-MG 1A	<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113	100.00	+++	+++	+	+	NMC4-B98
8	YS-PG 2D	<i>Aeromonas encheleia</i>	LMG 16331	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B154
9	SC-MG 1C	<i>Aeromonas popoffii</i>	CIP 105493	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B104
10	YS-PG 2C	<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4257	100.00	+++	+++	++	-	NMC4-B151
11	SC-MG 4D	<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4257	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B107
12	SC-EG 22D	<i>Bacillus nealsonii</i>	DSM 15077	98.15	-	-	-	-	NMC4-B126
13	SC-EG 21D	<i>Bacillus idriensis</i>	SMC 4352-2	99.05	+++	-	-	-	NMC4-B125
14	SC-EG 4D	<i>Desemzia incerta</i>	DSM 20581	98.94	-	-	-	-	NMC4-B128
15	SC-EG 7C	<i>Ficitibacillus phosphorivorans</i>	Ca7T	98.94	+++	+++	-	-	NMC4-B123
16	SC-EG 5C	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	99.07	-	-	-	-	NMC4-B121
17	SC-EG 1C	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	99.07	-	-	-	-	NMC4-B118
18	SC-MG 1B	<i>Janibacter hoylei</i>	DSM 21601	100.00	-	+++	+++	-	NMC4-B100
19	SC-EG 1D	<i>Micrococcus aloeverae</i>	AE-6	99.04	-	-	-	+++	NMC4-B124
20	SC-EG 3D	<i>Micrococcus antarcticus</i>	T2	100.00	+	-	-	-	NMC4-B127
21	YS-PG 1A	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	CECT 5989	99.78	-	+++	-	++	NMC4-B148
22	SC-MG 2A	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	13983	100.00	-	+	-	+	NMC4-B99
23	SC-MG 3B	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	13983	100.00	-	+	-	+	NMC4-B101
24	SC-MG 4B	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	NBRC 102152	99.86	-	+	-	-	NMC4-B103
25	SC-EG 6C	<i>Proteus terrae</i>	N5/687	99.34	-	-	-	+++	NMC4-B122
26	SC-EG 2B	<i>Proteus hauseri</i>	ATCC 700826	99.93	-	-	-	+++	NMC4-B115
27	SC-EG 1B	<i>Proteus alimentorum</i>	08MAS0041	98.74	-	+++	-	+++	NMC4-B114
28	SC-EG 5A	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 29905	100.00	-	+++	-	+++	NMC4-B113
29	SC-MG 2B	<i>Kurthia gibsonii</i>	NCIMB 9758	100.00	-	-	-	-	NMC4-B101
30	SC-EG 5B	<i>Pseudomonas parafulva</i>	NBRC 16636	98.53	-	-	-	-	NMC4-B117
31	SC-MG 6D	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i>	DSM 1045	100.00	-	+++	-	++	NMC4-B109
32	SC-EG 3C	<i>Shewanella upenei</i>	20-23R	99.07	-	++	-	-	NMC4-B120
33	SC-EG 1A	<i>Shewanella indica</i>	KJW27	98.41	-	-	+++	-	NMC4-B110
34	SC-EG 4B	<i>Shewanella indica</i>	KJW27	98.94	-	++	-	-	NMC4-B116
35	SC-EG 2C	<i>Shewanella indica</i>	KJW27	99.07	-	++	-	-	NMC4-B119
36	SC-EG 4A	<i>Shewanella indica</i>	KJW27	98.68	-	-	-	-	NMC4-B112
37	SC-MG 2C	<i>Shewanella xiamenensis</i>	S4	100.00	-	+++	+	-	NMC4-B105
38	YS-PG 4C	<i>Shewanella seohaensis</i>	S7-3	100.00	-	+++	-	-	NMC4-B153
39	YS-PG 4D	<i>Shewanella seohaensis</i>	S7-3	100.00	-	+++	-	-	NMC4-B156
40	SC-EG 3A	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	NCIMB 2058	99.08	-	+++	-	-	NMC4-B120
41	SF-SG 1A	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	P2G1	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B173
42	SF-SG 4B	<i>Aeromonas media</i>	CECT 4232	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B177
43	SF-SG 3B	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ATCC 33658	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B176
44	SF-SG 3C	<i>Haemophilus piscium</i>	CIP 106116	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B179
45	SF-SG 4D	<i>Haemophilus piscium</i>	CIP 106116	100.00	+++	+++	-	-	NMC4-B181
46	SF-SG 1C	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	NCIMB 2128	100.00	++	+++	-	-	NMC4-B178
47	SF-SG 1D	<i>Shewanella baltica</i>	NCTC 10735	100.00	-	+++	-	+++	NMC4-B180
48	SF-SG 2B	<i>Shewanella xiamenensis</i>	S4	100.00	-	+++	-	-	NMC4-B175
49	SF-SG 1B	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	NBRC 103148	100.00	+++	-	-	+	NMC4-B174

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(NRF-2013M3A9A5076603)과 과 공학 개인기초연구지원사업(NRF-2016R1D1A1B03936183)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Andoh, A. 2016. Physiological role of gut microbiota for maintaining human health. *Digestion* **93**, 176-181.
2. Choi, G. G., Lee, O. H. and Lee, G. H. 2003. The diversity of heterotrophic bacteria isolated from intestine of starfish (*Asterias amurensis*) by analysis of 16S rDNA sequence. *J. Ecol. Environ.* **26**, 307-312.

3. Einar, R. G., Sigmund, S., Reider, M. B., Stale, R. and Ashild, K. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* **261**, 829-841.
4. Esteve, C., Gutiérrez, M. C. and Ventosa, A. 1995. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 462-466.
5. Hasen, G. H., Strom, E. and Olafsen, J. A. 1992. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 461-470.
6. Huber, I. 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* **96**, 117-132.
7. Indergand, S. and Graf, J. 2000. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4735-4741.
8. Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M. and Kim, S. D. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH 18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 94-100.
9. Kim, A. R. and Kim, D. H. 2015. Diversity of cultured and uncultured bacteria in the gut of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Aquat. Sci.* **48**, 447-453.
10. Kim, D. H. and Kim, D. Y. 2013. Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **414-415**, 103-108.
11. Kim, M. S., Lee, S. J. and Heo, M. S. 2018. Research on the diversity of intestinal microbial communities of Red tilefish (*Branchiostegus japonicus*) by 16S rDNA sequence analysis. *J. Life Sci.* **28**, 361-368.
12. Kim, S. R., Jung, S. J. and Oh, M. J. 2007. Bacterial flora and antibiotics resistance of intestinal bacteria in the wild and cultured black rockfish *Sebastes inermis*. *J. Fish Pathol.* **20**, 221-227.
13. Kim, Y. O., Nam, B. H., Kim, D. G., An, C. M., Lee, J. S. and Kim, W. J. 2016. Novel microorganism having antibacterial activity and method for producing pseudane using same. Korea patent 10-2015-0056985.
14. Kim, Y. O., Nam, B. H., Kim, D. G., An, C. M., Lee, J. S. and Kim, W. J. 2016. Novel microorganism having antibacterial activity and method for producing pseudane using same. Korea patent 10-2015-0056985.
15. Kristiansen, M., Merrifield, D. L., Gonzalez Vecino, J. L., Myklebust, R. and Ringo, E. 2011. Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Aquac. Res. Development* **7**, 1-9.
16. Muroga, K., Higashi, M. and Keioku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* **65**, 79-88.
17. Nielsen, S., Walburn, J. W., Verges, A., Thomas, T. and Egan, S. 2017. Microbiome patterns across the gastrointestinal tract of the rabbitfish *Siganus fuscescens*. *PeerJ* **5**, e3317.
18. Parris, D. J., Brooker, R. M., Morgan, M. A., Dixon, D. L. and Swtewart, F. J. 2016. Whole gut microbiome composition of damselfish and cardinalfish before and after settlement. *PeerJ* **4**, e2412.
19. Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Zhang, C. X. and Lin, W. Y. 2010. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquacult. Nutr.* **3**, 733-740.

초록 : 갯장어(*Muraenesox cinereus*) 장으로부터 호기적 조건에서 분리된 미생물의 다양성 및 세포외 효소 생산능 분석에 관한 연구

이용직^{1*} · 오도경^{2*} · 김혜원² · 남개원¹ · 손재학² · 이한승² · 신기선³ · 이상재^{2*}

(¹서원대학교 화장품학부, ²신라대학교 식품공학전공 & 해양극한미생물연구소, ³한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터)

국내 삼천포 및 서천에서 채집한 갯장어(*Muraenesox cinereus*)의 장내기관으로부터 분리된 미생물들의 다양성 및 특성에 관하여 조사하였다. 장내 미생물의 순수 분리를 위하여 marine agar 배지를 사용하였으며 37°C에서 호기적으로 배양하였다. 순수 분리 후, 49 균주를 분리하였으며 16S rRNA 염기서열 분석 결과를 바탕으로 계통학적 분석을 실시한 결과, 3문, 13과, 14속, 34종으로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 특히, Proteobacteria 문은 83.7%의 분포를 나타내었으며 8과, 8속, 26종으로 Aeromonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae, Enterobacteriaceae, Morganellaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae와 Vibrionaceae로 분포하는 것을 확인하였다. 그리고 분리한 균주들이 amylase, lipase, protease와 같은 산업적으로 유용한 효소를 생산하는지 확인하기 위하여 효소 활성 평가를 실시하였으며, 39 균주가 최소 한 종류 이상의 효소 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 특히 *Aeromonas* 속의 균주들은 테스트한 모든 효소의 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구를 통하여 분리한 미생물들의 산업적 활용 가능성을 나타내었다. 그러므로 이번 연구는 국내 유전자원 확보 및 갯장어의 장내마이크로비옴의 과학적 지식 확장에 도움이 될 것으로 생각된다.