

젓갈로부터 *Bacillus safensis* JIF 17718 효소활성 균주의 분리 및 최적 배양 조건 확립

김민선¹ · 한인준¹ · 정은선¹ · 조영진¹ · 장한수¹ · 한소천^{1,2} · 채종찬³ · 이승제^{1,*}

¹전라북도생물산업진흥원, ²전북대학교 분자생물학부, ³전북대학교 생명공학부

Isolation and Optimal Culture Conditions of *Bacillus safensis* JIF 17718 Enzymatically Activated Strains Isolated from *Jeotgal*

Min-Sun Kim¹, In-Jun Han¹, Eun-Seon Jeong¹, Young-Jin Cho¹, Han-Su Jang¹,
So-Chon Han^{1,2}, Jong-Chan Chae³ and Seung-Je Lee^{1,*}

¹Jeonbuk Institute for Food-Bioindustry, Jeonju 54810, Korea

²Department of Molecular Biology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

³Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

*Corresponding author: sjlee@jif.re.kr

ABSTRACT

In order to select the strains for the decomposition of food waste, salt and heat resistant strains were separated from the fermented *Jeotgal* and enzyme activities of protease, amylase and cellulase were evaluated. A total of 225 strains were isolated from the fermented *Jeotgal*. Among them, 75 strains were selected which can tolerate 5% NaCl and grow at 50℃. As a result of molecular genetic identification of the selected strains, 11 strains with high enzyme activity and no redundancy were finally selected. Among them, *Bacillus safensis* JIF 17718, which is resistant to salt tolerance and easy to cultivate, was finally selected. It was confirmed that the culture time was 24 hours, the incubation temperature was 30℃ and the optimum pH was 9.0.

Additional key words: *Jeotgal*, Food waste decomposition, Enzyme activity, *Bacillus safensis*, Optimal culture condition

서 론

국내 음식물 쓰레기 하루 발생량은 2014년 기준 1만 3,222톤에 이른다. 국민 1인당 음식물 쓰레기 발생량은 0.26 kg(2010년 기준)으로 프랑스

0.16 kg, 스웨덴 0.086 kg 등 선진국에 비해 월등히 높은 편이다. 음식물 쓰레기로 인해 발생하는 온실가스, 악취, 수질오염 등 환경 문제를 유발할 뿐만 아니라 연간 처리비용이 8천억 원 이상, 식량 자원의 가치로는 20조원 이상이 버려지는 경제적

피해도 매우 심각하다¹⁾.

우리나라는 2009년 런던협약 런던의정서 가입으로 2014년부터 육상 폐기물의 해양투기를 원칙적으로 금지함에 따라, 2013년 1월부터 음폐수의 해양배출이 전면 금지됨에 따라 음식물 쓰레기와 같은 유기물을 분해하기 위한 국내 연구는 다양하게 이루어지고 있다. 대표적인 연구로는 음식물류 폐수 처리를 위한 유기물분해 미생물의 분리 및 동정²⁾, 다양한 유기물을 분해하는 *Bacillus subtilis* CK-2의 분리³⁾, 지렁이로부터 분리한 *Bacillus pumilus* JS-01 균주의 유기물 분해능 및 응집능⁴⁾, α -amylase 생성 균주 *Bacillus* sp. AIV1940의 분리, 특성 및 합성페수 분해능⁵⁾ 등이 보고된 바 있지만 산업화 는 초기 단계라 할 수 있다.

본 연구는 음식물 쓰레기를 감소시키기 위한 효소 활성능을 갖는 균주를 개발할 목적으로 진행되었다. 균주 확보를 위해서 내염성과 내열성 그리고 음식물 분해가 가능한 각종 효소활성을 지닌 유용한 균주를 전통 발효식품인 젓갈로부터 분리·동정을 시도하였다. 그리고 동정된 균주의 생육조건 및 배양학적 특성을 확립하였기에 다음과 같이 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 미생물의 분리 및 선별

음식물 쓰레기의 분해가 가능한 유용 균주를 선별하기 위하여 6종의 젓갈(새우젓, 멸치젓, 굴젓, 명란젓, 창란젓, 밴댕이젓)로부터 균주를 분리하였다⁶⁾. 채취한 시료 10 g을 각각 멸균된 증류수에서 3시간 동안 침지시킨 후 Nutrient Agar (0.3% beef extract, 0.5% peptone, 1.5% agar) 배지(Difco, USA)에 도말하여 30℃에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후 배지에 나타난 colony의 크기와 형태에 따라 서로 다른 colony를 선별하여 각각 NA 배지에 옮겨 배양한 후 단일 균주를 분리하였다.

2. 분리균주의 내염성 및 내열성 평가

가. 내염성 활성

분리된 균주의 내염성을 확인하기 위하여 염분

의 농도를 달리한 배지에서의 균주의 성장을 확인하였다. NaCl (99%, Sigma, USA)을 0%, 3%, 5% 농도로 첨가하여 NA 배지를 제조하였으며, 미리 액체배지에서 배양한 균주 배양액 5 μ L를 염분 농도를 달리한 배지에 접종한 후 30~50℃에서 24시간 동안 배양하였다. Colony의 크기와 선명도를 기준으로 내염성 여부를 판정하였다⁷⁾.

나. 내열성 활성

분리된 균주의 내열성을 측정하기 위하여 30℃, 40℃, 50℃에서의 균주의 성장도를 확인하였다. 미리 액체 배지에서 배양한 균주 배양액 5 μ L를 NA 배지에 접종한 후, 각각의 온도에서 24시간 동안 배양하였다. Colony의 크기와 선명도를 기준으로 내열성 여부를 판정하였다.

3. 효소활성 평가

분리된 균주의 효소활성 유무를 확인하기 위하여 protease, amylase 및 cellulase 활성을 평가하였다^{8,9)}. 효소활성이 높은 균주를 선별하기 위해 paper disc (Advantec, Japan) 방법을 이용하였고, 각 효소와 특이적으로 반응하는 기질성분이 포함된 고체 선별배지를 사용하였다. Protease 활성은 1% skim milk (Difco, USA)를 첨가한 NA 배지에 6 mm paper disc를 올리고, 각 균주 배양액을 5 μ L씩 분주하여 30℃에서 48시간 반응하여 분해능을 억제환의 직경으로 조사하였다. Amylase 활성 확인은 starch agar (0.3% beef extract, 1% soluble starch, 1.2% agar) 배지(Difco, USA)에 6 mm paper disc를 올리고 각 균주 배양액을 5 μ L씩 분주하여 30℃에서 48시간 배양한 뒤 lugol solution (Sigma, Switzerland)으로 염색하고 분해능을 억제환(clear zone)의 직경으로 조사하였다. Cellulase 활성 확인을 위하여 1% CMC가 포함된 NA 배지에 6 mm paper disc를 올리고, 각 균주 배양액을 5 μ L씩 분주하여 30℃에서 48시간 배양 후 0.1% congo red로 30분간 염색하고, 1N NaCl로 세척한 뒤 나타난 억제환의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 disc 주위의 억제환의 크기(+++++ : 25~30 mm, ++++ : 20~25 mm, +++ : 15~20 mm,

++ : 10~15 mm, + : 0~10 mm, - : trace)로 나타내었다.

4. 분리된 균주의 동정

효소활성을 갖는 분리된 균주로부터 염색체를 분리한 후 16s-rRNA를 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통하여 증폭하였다. PCR primer sequence로는 785F 5'(GGATTAGATACCCTGGTA) 3', 907R5'(CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)3'를 사용하였다. PCR로 증폭된 RNA는 vector를 이용하여 형질전환시킨 후, 형질전환된 plasmid RNA를 분리하여 염기서열을 분석한 다음 계통분류학적 비교·분석을 통하여 균주를 동정하였다¹⁰⁾.

5. 최적 배양 공정

가. 생장곡선, 온도 및 pH에 따른 효소활성 평가

Bacillus safensis JIF 17718 균주의 효소활성 최적 배양공정을 확립하고자 미생물의 생장곡선, 온도 및 pH에 의한 효소활성 정도를 평가하였다. 먼저 미생물의 생장곡선에 따른 효소활성 정도를 확인하기 위하여 12시간마다 600 nm에서 흡광도(Micro-Reader, VERSAmax, USA)를 측정하였다. 온도에 따른 효소활성은 배양된 균주 1%를 접종한 다음 30℃에서 48시간 동안 효소활성을 각각 평가하였다. pH에 따른 효소활성의 변화는 nutrient broth의 pH를 3, 5, 7, 9, 11로 맞춘 다음 배양균주 1%를 접종하여 30℃에서 36시간 동안 배양한 효소활성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 젓갈로부터 내염성 및 내열성 미생물의 분리

젓갈 6종으로부터 음식물쓰레기를 분해할 수 있는 효소활성 균주를 분리한 결과(Table 1), 225종의 균주를 분리하였으며, 이 중 5% NaCl 내염조건과 30~50℃에서 생육이 가능한 균주 75종을 확보하였다.

2. 분리 균주의 내염성 평가

분리된 균주의 내염성 활성평가를 위하여 0%,

Table 1. Single strains isolated from fermented *Jeotgal*

NaCl Temp(℃)	0%	3%	5%	Total
30	26	33	29	88
40	36	19	26	81
50	20	16	20	56
Total	82	68	75	225

3%, 5% NaCl이 첨가된 고체 배지상에서 균주의 성장 여부를 확인하였다. 우리나라 음식에 포함되는 염분 농도는 대체로 고염의 특성을 가지므로 5% NaCl 내염성을 가진 균주가 음식물 쓰레기 분해 균주로 활용이 가능하다고 판단하였다. 젓갈에서 분리한 225균주 중에서 5%의 염도에서는 75균주가 생육 및 배양이 가능함을 확인하였다(Table 1).

3. 분리균주의 내열성 평가

분리된 균주의 내열성 활성평가를 위하여 30℃, 40℃, 50℃의 배양 조건(WIG-155, DAEHAN science, Korea)에서 분리 균주의 성장 여부를 확인하였다. 각각의 온도에서 분리 균주를 배양한 결과, 젓갈에서 분리한 225균주 중 5% NaCl 조건에서 내염성을 가지면서 30℃에서 생육이 가능한 균주는 29균주, 40℃에서는 26균주 그리고 50℃에서 20균주가 배양이 가능하였다(Table 1).

4. 분리균주의 선발 및 평가

국내에서 배출된 음식물 음폐수의 평균 염도는 약 3~5% 수준이므로 본 연구에서는 5%에서 분리된 75균주를 대상으로 protease, amylase 및 cellulase 효소활성을 평가하였다. 분리된 균주의 효소활성을 평가한 결과(Table 2), 젓갈에서 분리된 225 균주 중 30℃에서 protease 활성을 보이는 균주 19종, amylase 활성을 보이는 균주 10종, cellulase 활성을 보이는 균주를 16종을 확보하였다. 40℃에서 protease 활성을 보이는 분리균주를 20종, amylase 활성을 보이는 균주 13종, cellulase 활성을 보이는 균주를 16종을 확보하였으며, 50℃에서 protease 활성을 보이는 분리균주를 19종, amylase 활성을

Table 2. Evaluation of enzyme activity by NaCl 5% salt and culture temperature condition

Enzyme activity ¹⁾											
No	30℃			No	40℃			No	50℃		
	Amylase	Protease	Cellulase		Amylase	Protease	Cellulase		Amylase	Protease	Cellulase
JIF17635	—	—	++++	JIF17712	—	++	—	JIF17775	++	+++	++++
JIF17636	—	++	—	JIF17713	—	++	—	JIF17776	++	++	++++
JIF17637	—	—	++++	JIF17714	++++	++++	++++	JIF17777	++	++++	++++
JIF17638	—	—	++++	JIF17715	++	++++	—	JIF17778	+++	++++	++++
JIF17639	++	++++	—	JIF17716	—	++	+++	JIF17779	—	+++	++++
JIF17640	++	++++	—	JIF17717	++	+++	++	JIF17780	+++	++++	++++
JIF17641	—	++	++++	JIF17718	+++	++++	++++	JIF17781	—	+++	++++
JIF17642	—	++	++++	JIF17719	++	++++	++++	JIF17782	+++	++++	++++
JIF17643	++	++++	++++	JIF17720	—	+++	+++	JIF17783	+++	++++	++++
JIF17644	+++	++++	++++	JIF17721	—	+++	+++	JIF17784	+++	++++	++++
JIF17645	++	++++	++++	JIF17722	+++	++++	++++	JIF17785	++	++++	++++
JIF17646	—	+++	++++	JIF17723	—	++	+++	JIF17786	—	—	++
JIF17647	—	—	—	JIF17724	++	++++	++++	JIF17787	+++	++++	++++
JIF17648	+++	++++	++++	JIF17725	++	++++	++++	JIF17788	++	++	+
JIF17649	—	++	—	JIF17726	++	++++	++++	JIF17789	—	+++	+++
JIF17650	—	++	—	JIF17727	+++	++++	++++	JIF17790	—	++	+++
JIF17651	—	—	—	JIF17728	+++	++++	+++	JIF17791	—	+++	++++
JIF17652	—	—	—	JIF17729	+++	++++	++++	JIF17792	+++	++++	++++
JIF17653	—	—	—	JIF17730	—	+	—	JIF17793	+++	++++	++++
JIF17654	—	+	—	JIF17731	—	—	—	JIF17794	+++	++++	++++
JIF17655	—	+++	++++	JIF17732	—	—	—				
JIF17656	+++	++++	++++	JIF17733	+	—	—				
JIF17657	+++	++++	++++	JIF17734	—	++	+++				
JIF17658	++	++++	++++	JIF17735	—	—	—				
JIF17659	—	—	—	JIF17736	—	—	—				
JIF17660	—	—	—	JIF17737	—	—	—				
JIF17661	+++	++++	++								
JIF17662	—	+++	+++								
JIF17663	—	—	—								

¹⁾ Size of halo zone

(+++++ : 25~30 mm, ++++ : 20~25 mm, +++ : 15~20 mm, ++ : 10~15 mm, + : 0~10 mm, — : trace)

보이는 균주 14종, cellulase 활성을 보이는 균주 20종을 확보하였다. 본 연구에서는 3가지 이상의 효소활성을 가지며, 15mm 이상의 clear zone을 나타내는 균주 19종을 우선 선발하였다.

5. 효소활성을 갖는 균주의 동정

3가지 이상의 효소활성을 가지며, 15mm 이상의 clear zone을 나타내는 균주 19종을 대상으로 분자생물학적 동정을 진행한 결과(Fig. 1), *Bacillus safensis* JIF 17718 균주를 포함하여 5종의 균주가 동정되었다. *Bacillus safensis* 균주는 그람 양성, 포자 형성 막대 균주로서 10~50℃의 최적 온도 범위를 가지며, 0~10%의 내염성을 가지고 있는 균주로 알려져 있어 음식물쓰레기 분해과정 중 내염성에 적합한 균주로 판단되었다.

6. *Bacillus safensis* JIF 17718 균주의 최적 배양조건 확립

가. 생장곡선에 따른 효소활성 평가

B. safensis JIF 17718 균주에 대한 미생물의 생육곡선과 배양시간에 따른 효소활성도를 조사한 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 30℃ 배양조건에서 균체량을 측정한 결과, 미생물의 개체수가 24~36 시간사이에서 최고치를 보였다. 그리고 배양시간에 따른 protease, amylase 및 cellulase 활성도는 24시간에서 최고치를 보였다(Fig. 3). 이러한 결과로부터 균체량에 따른 protease, amylase 및 protease의 효소활성도는 비례적인 관계임을 알 수 있었다.

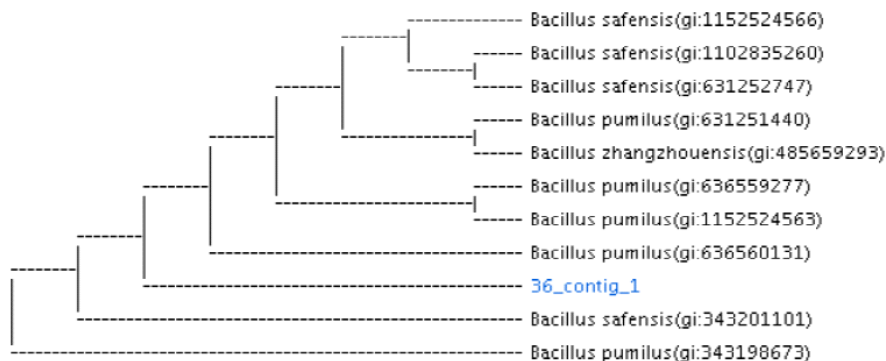


Fig. 1. Genetic identification of *Bacillus safensis* JIF 17718 strain.

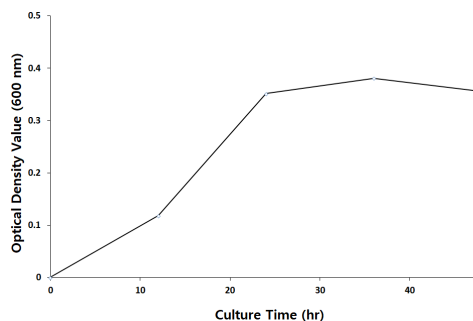


Fig. 2. Growth curves of *Bacillus safensis* JIF 17718 strain by incubation time.

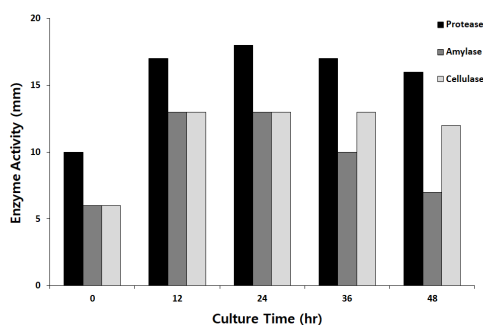


Fig. 3. Enzyme activity of *Bacillus safensis* JIF 17718 according to incubation time.

나. 배양 온도에 따른 시간별 효소활성 평가

B. safensis JIF 17718 균주의 배양온도에 따른 protease, amylase 및 cellulase의 효소활성을 평가한 결과(Fig. 4~6), 30℃에서 24시간 배양조건에서 각각의 효소활성이 최대치로 확인되었다.

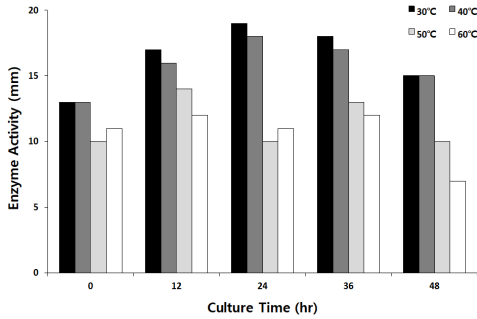


Fig. 4. Protease enzyme activity by incubation temperature.

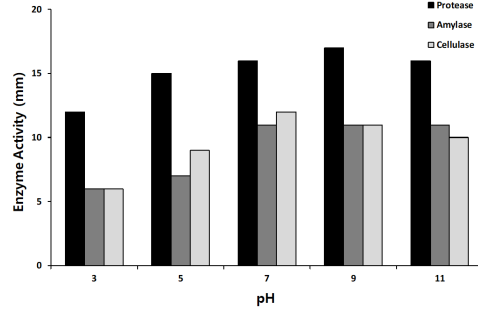


Fig. 7. Protease, amylase and cellulase enzyme activity according to pH condition.

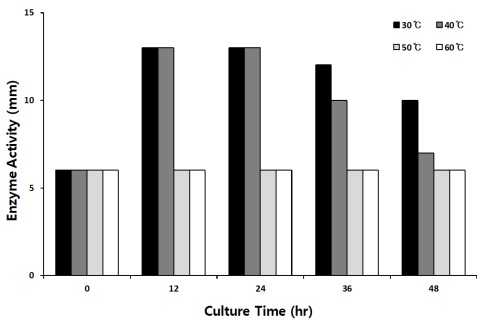


Fig. 5. Amylase enzyme activity by incubation temperature.

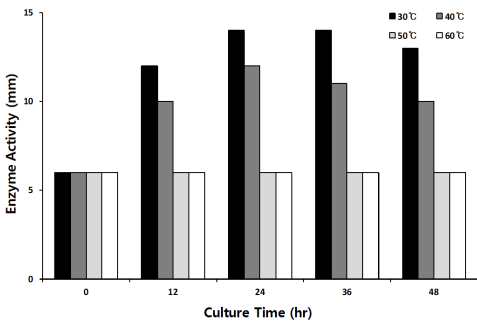


Fig. 6. Cellulase enzyme activity by incubation temperature.

다. PH에 따른 효소활성 평가

B. safensis JIF 17718 균주의 pH에 따른 효소 활성평가 수행 결과(Fig. 7), pH 7의 조건에서 cellulase의 활성이 부분적으로 우수하였으나, 전반적으로 pH 9의 조건이 protease와 amylase의 활성

이 높은 것으로 확인되어 최적 pH 조건은 9 부근인 것으로 판단되었다.

요 약

음식물쓰레기 분해용 균주를 선발하기 위하여 젓갈로부터 내염성과 내열성을 갖는 균주 분리를 시도하였으며, protease, amylase 및 cellulase의 효소활성도를 평가하였다. 젓갈로부터 분리된 균주는 총 225종이었으며, 이 중 3가지 이상의 효소활성을 가지며 15 mm 이상의 clear zone을 나타내는 균주 19종을 우선 선발하였다. 선발된 균주를 대상으로 분자유전학적 동정을 진행한 결과, 중복성을 배제하고 효소활성이 강한 5종의 균주를 최종적으로 선발하였다. 이 중에서 내염성이 강하면서 배양학적으로 용이한 *Bacillus safensis* JIF 17718 균주를 최종 선발하였으며, 최적 배양조건으로는 배양시간은 24시간, 배양 온도는 30℃ 그리고 pH의 최적 조건은 9.0 부근인 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 첨단생산기술개발사업(과제번호 : 316001-03)에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 환경부. 2015. 전국 폐기물 발생 및 처리 현황(2014년도). 환경부.
2. 정두영, 송인근, 김영준. 2007. 음식물류폐수처리를

- 위한 유기물분해 미생물의 분리 및 동정. 유기물자원화. 15(2): 128-135.
3. 김철호, 이상협. 2011. 다양한 유기물을 분해하는 *Bacillus subtilis* CK-2의 분리. 한국생명과학회지. 21(12): 1716-1720.
 4. 정두영, 송안근, 김영준. 2006. 지렁이로부터 분리한 *Bacillus pumilus* JS-01 균주의 유기물 분해능 및 응집능. 유기물자원화. 14(4): 141-150.
 5. 박형수, 김무훈, 양선영, 조미영, 고범준, 박용근. 2002. α -Amylase 생성균주 *Bacillus* sp. AIV 1940의 분리, 특성 및 합성페수분해능. 미생물학회지. 38(1): 1-6.
 6. Bal, J., Yun, S. H., Yeo, S. H., Kim, J. M. and Kim, D. H. 2016. Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-Based fermentation starter *nuruk*. Food Microbiol. 60: 73-83.
 7. Yang, S. Y., Park, H. Y., Kim, C. W. and Park, K. K. 2001. Isolation of halotolerant lactic acid bacteria for fermentation of food wastes. 축산시설환경학회지. 7(2): 137-140.
 8. Wirth, S. J. and Wolf, G. A. 1992. Micro-plate colourimetric assay for Endo -acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. Soil Biology and Biochemistry 24(6): 511-519.
 9. Katsuya Morimoto, Hiroaki Suzuki. 2006. Micro analysis system for pH and protease activities with an integrated sample injection mechanism. Biosensors and Bioelectronics 22(1): 86-93.
 10. Chun, J. S., Lee, J. H., Jung, Y. Y., Kim, M. J., Kim, S. I., Kim, B. K. and Lim, Y. W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2259-2261.