



새만금 방조제 일대에서 분리 배양한 중온성 세균의 분류학적 특성 및 효소 활성 규명

박재영 · 신정민 · 김태희 · 기장서* 

상명대학교 생명과학과

Taxonomic characteristics and enzyme activity of mesophile bacteria isolated from the Saemangeum dyke areas

Jaeyoung Park, Jeongmin Shin, Taehee Kim, and Jang-Seu Ki* 

Department of Life Science, Sangmyung University, Seoul 03016, Republic of Korea

(Received November 23, 2022; Revised December 14, 2022; Accepted December 15, 2022)

Mesophilic bacteria occur commonly in the marine ecosystems of Korea, and they are a biological resource that produces various enzymes to be utilized for industry. In the present study, we isolated mesophilic bacteria from the Saemangeum dyke, cultured, and evaluated their 16S rRNA gene identities and enzymes activity. We collected seawater, sand, and tidal flat samples from Yami island and Munyeo island at the Saemangeum dyke, and identified the species composition of mesophilic bacteria using laboratory culture. In addition, the isolated bacteria were measured hydrolytic activities according to four enzymes (amylase, esterase, lipases, and protease). As a result, we succeed to culture 51 strains that belonged to 22 species (two species at St.1, 9 species at St.2, and 11 species at St.3), and detected high protease activity from 14 strains. These results show different community structures and hydrolytic enzymes activities of bacteria cultured from the marine environment of the Saemangeum dyke, suggesting the possibility of future industrial use of the bacteria.

Keywords: culture, enzyme activity, mesophile bacteria, protease, Saemangeum dyke

새만금 방조제는 전라북도 김제시, 군산시 및 부안군을 연결하는 33.9 km 길이의 방조제로 새만금 간척사업을 통해 2006년

최종적으로 완공되었다. 방조제 축조를 통한 인공 간척지의 조성으로 수서생태계가 파괴된다는 점이 우려되기도 했다. 하지만 조석 간만의 차가 크게 나타나는 서해 특성상, 다양한 저서 생물이 서식하는 갯벌과 더불어 내륙환경의 간척지가 발달하면서 현재 새만금은 지형적으로 다양한 생태계를 제공한다(Jung, 2017).

해양환경에서 세균은 수층, 저서 퇴적물, 생물체 등에 존재하여 물질분해와 유기물 순환의 역할을 수행하기에 매우 중요하다. 이들은 서식환경 온도에 따라 다른 분포 특성을 보이며 일반적으로 저온성(0~15°C), 중온성(10~35°C), 고온성(45°C~) 세균으로 나뉜다. 특히 우리나라는 북반구 중위도에 위치해 있어 중온성 세균이 다양하게 포진되어 있다(Lee *et al.*, 2008). 중온성 세균을 분석하는데 크게 형태학적 분석과 분자생물학적 기법이 활용되고 있다. 형태학적 분석은 환경에서 균주들을 분리할 때 육안으로 식별 가능한 colony의 특성을 관찰하는 것이다. 대표적으로 형태와 색상에 따라 1차적으로 나눌 수 있다. 형태는 colony를 위에서 바라볼 때 원형(circular)과 방사형(filamentous) 등이 있으며, 옆에서 바라볼 때 평평(flat)하거나 가운데가 볼록하게 올라와 있는 형태(raised) 등으로 구분하고, colony 가장자리 모양에 따라 매끈한 모양(entire), 울퉁불퉁한 모양(undulate)으로 구별한다. 색상으로는 흰색, 크림색, 노랑색, 분홍색 등으로 다양하게 존재한다(Das *et al.*, 2006).

또한 분자생물학적 분석은 환경에 들어있는 다양한 세균을 검출하기 위해 이루어지며, 크게 배양 유무에 따라 구분할 수 있다. 환경으로부터 세균의 분리와 배양을 진행함으로써

*For correspondence. E-mail: kijis@smu.ac.kr;
Tel.: +82-2-2287-5449; Fax: +82-2-2287-0070

genomic DNA (gDNA)를 추출한 후 대상 유전자를 증폭시켜 분석하는 방법과, 환경시료에 포함되어 있는 유전물질(environmental DNA, eDNA)만으로 환경 자체를 분석하는 metagenomics 방법이 존재한다. 두 방법 모두 특정 환경에 존재하는 모든 미생물을 파악하기 어렵다는 점에 한계를 보이지만, gDNA를 통한 생물 종 검출 방법은 분리 및 배양을 통한 미생물 자원화가 가능하다는 점에서 이점이 있다(Lee and Kim, 1997; Adzitey *et al.*, 2013).

새만금 일대에서 방조제 건설 전후로 세균에 대해 보고가 이루어지고 있다. Lee *et al.* (1994)은 방조제 축조 전 군산 인근 해역에서 종속영양 세균의 분포와 평균체적(biovolume) 등을 보고하였고, Choi and Noh (2008)는 새만금 방조제 건설 이후 내측과 외측의 중온성 세균 개체수 및 생산력의 공간 분포를 측정하여 보고하였다. 게다가 최근 군산 해양환경에서 형태 및 분자, 생리학적으로 신규 균주에 대한 분류 보고도 이루어지고 있어 생물자원 발굴에 대한 노력도 지속되고 있다(Koh *et al.*, 2017; Bae *et al.*, 2022).

이와 같이 발굴되는 해양 미생물은 생태계 내에 다양한 분류군으로 구성되어 여러가지 유용성 가수분해 효소를 생성하는데, 대표적으로 amylase, esterase, lipase 및 protease가 있다. Amylase는 전분을 가수분해하는 효소로 식품, 섬유, 제지, 세제산업 및 바이오 연료 등에 사용하며(Mobini-Dehkordi and Javan, 2012), esterase는 천연 물질 및 산업 오염 물질, 독성 화학물질의 분해에 중요한 역할을 한다(Panda and Gowrishankar, 2005). 또한 lipases는 세제와 식품 성분 및 향료산업에 사용되고(Jaeger and Eggert, 2002), protease는 식품 및 세제, 피혁, 제약 산업 등에서 사용된다(Rao *et al.*, 1998).

새만금 방조제에는 다양한 종의 세균이 서식할 수 있는 환경이 조성되어 있는 것에 비해, 서식 균주에 대한 형태 및 분자생물학적 분류와, 산업적 이용을 위한 세균의 효소 관련 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 새만금 방조제 완공 이후 해양생태계내 다른 서식지(해수, 모래 및 갯벌)에 분포하는 세균을 대상으로 유용 미생물 자원 확보를 위해 동일한 조건에서 분리 및 배양하였고, 이들의 분류학적 특성을 조망하였다. 더불어 가수분해효소 amylase, esterase, lipase 및 protease에 대한 생산 특성을 규명함으로써 산업적 응용 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

해양 미생물 시료 채집

2022년 4월 22일 새만금 방조제 일대의 정점에서 해양 미생

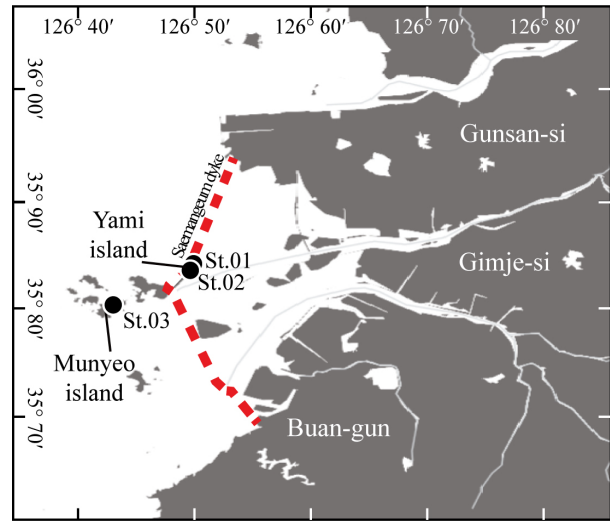


Fig. 1. A map showing three sampling sites (●) in the Saemangeum dyke area. St.1 and St.2 are located near Yami island, and St.3 is located near Munyeo island. Saemangeum dyke is indicated in a red dotted line.

물 시료를 채집하였다 (Fig. 1). 현장에서 환경요인으로 수온과 염분도를 YSI 665 (YSI)를 이용하여 측정하였다. 이후, 해양 시료를 서식지가 다르게 해수, 모래 및 갯벌에서 채집하였다. 해수시료는 야미도 인근(St.1, GPS:35°50'29.8"N 126°29'19.3"E)에서 해수 100 ml를 채수하였다. 모래와 갯벌시료의 경우, 각각 야미도 인근 모래사장(St.2, GPS:35°51'13.4"N 126°30'20.7"E)과 무녀도항 인근 갯벌(St.3, GPS:35°80'76.9"N 126°41'90.5"E)에서 10 × 10 cm 직경으로 두께는 1 cm를 시료를 확보하였다. 오염 방지를 위해 라텍스 장갑을 착용 후 멸균된 scoops를 이용하여 시료를 채집한 후 멸균된 100 ml 채집병에 담아 냉장의 아이스박스에 보관하여 실험실로 운반하였으며 분석 전까지 4°C에서 보관하였다.

해양 미생물 분리 및 배양

군산시 새만금 방조제 인근에서 채집한 토양시료(모래, 갯벌)의 경우 각각의 샘플 1 g을 PBS (Phosphate-Buffered Saline) buffer를 첨가하여 교반기로 현탁하였다. 현탁한 시료와 해수 시료는 채집한 시료로부터 미생물 분리를 위해 각 시료에서 1 ml를 분취하여 PBS buffer로 10^{-1} ~ 10^{-6} 로 단계 희석하였다. 이후 Marine broth (MB) (MB-M1512, KisanBio Inc.)에 1.5%농도의 한천을 첨가하여 해양 미생물 전용 고체배지를 제작하였고, 희석된 토양과 해수시료를 평판도말하여 중온성 세균의 최적 성장 온도인 25°C로 무광 조건에서 7~14 일간 배양하였다(Leroy *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2014). 배양 후 단일 colony를 확인하고 획선도말(streaking)하여 세균을 순수 분리하였다.

분리 미생물의 동정 및 계통학적 분석

순수 분리된 colony 고체 배지를 (주)마크로젠 분석서비스 (Macrogen)를 이용하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 규명하였다. 분석된 염기서열로부터 가장 유사한 근연 균주 파악을 위해 NCBI nucleotide blast search program (<https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>)를 사용하였고, 이를 통해 유사성이 가장 가까운 종을 확인하였다. 확인된 균주의 동정에는 참고 염기서열(reference sequence)과 가장 높은 일치율을 보일 때 특정 종으로 동정하였다. 이후 본 연구에서 동정된 균주와 GenBank로부터 얻은 근연종의 염기서열을 ClustalX (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였고, MEGA-X 프로그램(<http://www.megasoftware.net>)에서 Neighbor-joining (NJ) 모델을 이용하여 1,000회의 bootstrap을 실시함으로써 분자계통분석을 수행하였다(Kumar *et al.*, 2018).

효소 활성 테스트 탐색

분리된 중온성 미생물의 세포의 분해 효소 4종(amylase, esterase, lipase, protease)의 생산능 확인을 위해 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체 평판 선별 배지를 사용하였다. Amylase 생산능은 0.2% soluble starch (Cas No. 9005-84-9)를, esterase 생산능은 2% Tween 80 (Cas No. 9005-65-6)를, lipase 생산능은 2% Tween 20 (Cas No. 9005-64-5, Sigma-Aldrich)을, protease 생산능은 2% skim milk (SKU No. 232100, BD Difco)를 기질로 선택하여 1% 농도의 agar (SKU No. 214010, BD Difco)를 첨가함으로써 각각의 배지를 제조하였으며, 분리된 균주를 직접 접종하여 동일조건으로 2일 동안 배양한 후 저지원(clear zone)의 직경을 측정하였다. Amylase, esterase 및 lipase의 저지원 직경(mm)에 대한 평가는 직경 크기 0.01 이하(-), 0.01~1.0(+), 1.0~2.0(++), 2.0 이상(+++)으로 구분하여 실시하였다. Protease의 저지원 직경에 대한 평가는 1.0 이하(-), 1.0~1.5(+), 1.5~2.0(++), 2.0 이상(+++)으로 구분하여 파악하였다. Amylase의 경우, 배양 후 요오드를 사용하여 색상 변화를 통해 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

새만금 세균 분리 및 배양 특성

새만금 방조제 일대의 미생물 시료를 서로 다른 서식 환경(모래, 해수, 갯벌)에서 채집하였다. 채집 당시 정점 별 수온과 염분은 St.1에서 13.3°C와 29 psu, St.2에서 13.4°C와 28.9 psu,

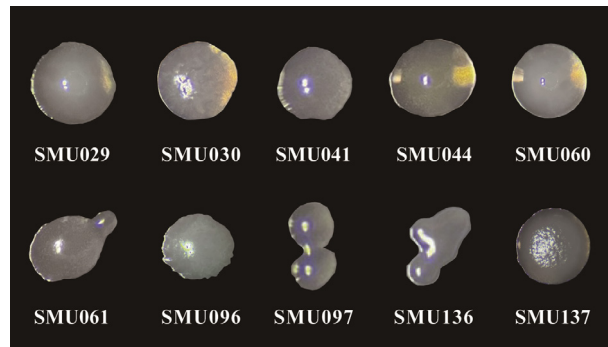


Fig. 2. Different colony forms of bacterial cultures observed in this study.

St.3에서 13.3°C와 28.8 psu로 측정되었다. 우선적으로 환경 조건에 따라 초기 배양 조건을 설정하여 배양하였으나, 유용 균주 확보를 위한 충분한 성장에 어려움을 보였다. 실제 해양 환경 조건을 묘사하여 배양성 세균의 분리는 현실적으로 어렵기에, 산업적으로 활용 가능한 유용 미생물의 발굴을 위해 중온균 최적 성장 온도로 알려진 25°C 조건에서 각 정점별로 채집한 시료들을 배양하였다(Lee and Kim, 1997; Leroy *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2014). 그 결과 colony의 다양한 색깔, 모양, 크기 등을 육안으로 확인할 수 있었다. St.1(야미도 인근 해수), St.2(야미도 인근 모래) 및 St.3(무녀도항 인근 갯벌)에서 각각 10개(SMU095~98, 136~138, 178~180), 17개(SMU049~56, 58~66), 24개(SMU025~48)로 총 51개의 균주가 분리되었다.

이들을 보다 자세하게 형태학적 특성을 확인하고자 순수 분리된 colony를 대상으로 실체현미경을 통해 관찰한 결과(Fig. 2), 대부분 원형(circular)으로 자라는 것을 관찰하였다. 색상은 하얀색 및 연한 베이지색, 연한 노란색, 진한 노란색 등으로 다양하며, SMU030 혹은 SMU060과 같이 colony의 광택 정도에도 확연히 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 게다가 SMU097, SMU136 같이 물처럼 묽거나, SMU137과 같이 견고한 colony를 확인하였다.

새만금 세균의 16S rRNA 유전자를 이용한 균주 동정 및 계통학적 특성

본 연구에서 분리된 51개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 유전자은행에 기탁하고(GenBank Nos. OQ000876~OQ000926), 이를 바탕으로 세균 동정을 실시하였다. 또한 계통학적으로 가장 가깝게 확인되는 종의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 파악하였다(Table 1).

동정된 균주를 바탕으로 각 정점 별 강, 목,과의 비율을 나타내었고, 본 연구의 균주와 표준균주 간 계통학적인 위치를 파

Table 1. Information of species and extracellular enzyme activity for cultured SMU strains

SMU No.	GenBank accession no.	Species matched closest in GenBank (Accession no.)	16S rDNA similarity (%)	Extracellular enzymes activity [#]			
				Amylase	Esterase	Lipase	Protease
25, 26	OQ000876, OQ000877	<i>Microbulbifer elongatus</i> (MZ569763)	99.66	-	-	+	-
27	OQ000878	<i>Yoonia maritima</i> (NR126190)	99.14	-	-	-	++
28	OQ000879	<i>Yoonia maritima</i> (NR126190)	99.14	-	+	++	++
29	OQ000880	<i>Lutimonas saemankumensis</i> (NR044441)	99.79	-	-	+	+++
30	OQ000881	<i>Yoonia maritima</i> (NR126190)	99.07	-	-	+	+++
31	OQ000882	<i>Algibacter agarivorans</i> (NR118326)	99.86	-	-	-	-
32	OQ000883	<i>Sulfitobacter marinus</i> (MZ262822)	98.00	-	-	-	-
33	OQ000884	<i>Sulfitobacter marinus</i> (MZ262822)	98.00	-	-	+	-
34	OQ000885	<i>Sulfitobacter marinus</i> (MZ262822)	98.00	-	+	+	-
35	OQ000886	<i>Lutimonas halocynthiae</i> (NR133774)	99.65	-	++	++	+++
36	OQ000887	<i>Litoreaibacter ponti</i> (NR134069)	98.92	-	+	+	+++
37, 38	OQ000888, OQ000889	<i>Yoonia maritima</i> (NR126190)	99.00	-	-	-	++
39	OQ000890	<i>Lutimonas vermicola</i> (NR114026)	98.00	-	-	-	-
40, 45, 46	OQ000891, OQ000896, OQ000897	<i>Asciadiaceihabitans donghaensis</i> (NR133970)	98.30	-	-	-	+++
41	OQ000892	<i>Algibacter agarivorans</i> (NR118326)	99.86	-	++	-	+++
42, 48	OQ000893, OQ000899	<i>Winogradskyella exilis</i> (NR116736)	97.00	-	-	-	+++
43	OQ000894	<i>Lutimonas halocynthiae</i> (NR133774)	99.65	-	-	-	+++
44	OQ000895	<i>Micrococcus luteus</i> (OM920840)	99.59	-	-	-	+++
47	OQ000898	<i>Roseovarius marisflavi</i> (NR125678)	99.79	-	-	-	-
49, 53	OQ000900, OQ000904	<i>Alteromonas stellipolaris</i> (KT730061)	99.93	-	-	-	-
50, 60	OQ000901, OQ000910	<i>Pseudoalteromonas translucida</i> (DQ665801)	99.87	-	-	-	-
51	OQ000902	<i>Marinobacterium profundum</i> (NR148801)	98.37	-	-	-	-
52, 56	OQ000903, OQ000907	<i>Marinobacterium profundum</i> (NR148801)	98.30	-	-	-	++
54	OQ000905	<i>Marinobacter sediminum</i> (MW675231)	99.80	-	-	-	-
55, 58	OQ000906, OQ000908	<i>Alteromonas genovensis</i> (AM887686)	99.66	-	-	-	+
59	OQ000909	<i>Alteromonas genovensis</i> (AM887686)	99.72	-	-	-	-
61	OQ000911	<i>Polaribacter reichenbachii</i> (NR118097)	99.05	-	-	-	-
62	OQ000912	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (EU365549)	99.86	-	-	-	+++
63	OQ000913	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (EU365549)	99.86	-	+	-	+++
64	OQ000914	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (EU365549)	99.86	-	++	-	+++
65	OQ000915	<i>Pseudoalteromonas translucida</i> (EU365545)	99.93	-	++	-	+++
66	OQ000916	<i>Pseudoalteromonas translucida</i> (EU365545)	99.93	-	+	-	+++
95	OQ000917	<i>Ahrensia kielensis</i> (NR113807)	98.58	-	-	-	-
96	OQ000918	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> (MG388153)	99.72	-	-	-	++
97	OQ000919	<i>Microbacterium saccharophilum</i> (MN314492)	99.57	-	-	-	-
98	OQ000920	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> (MG388153)	98.67	-	-	-	-
136	OQ000921	<i>Microbacterium saccharophilum</i> (LT223599)	99.65	-	-	-	-
137, 138	OQ000922, OQ000923	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> (MG388153)	99.86	-	-	-	-
178-180	OQ000924-OQ000926	<i>Ahrensia kielensis</i> (NR113807)	98.58	-	-	-	-

[#]Notes: Activity test of extracellular enzymes is performed by ring size (mm); ring size of amylase, esterase and lipase < 0.01: - / 0.01-1.0: + / 1.0-2.0: ++ / > 2.0: +++, ring size of protease < 1.0: - / 1.0-1.5: + / 1.5-2.0: ++ / > 2.0: +++.

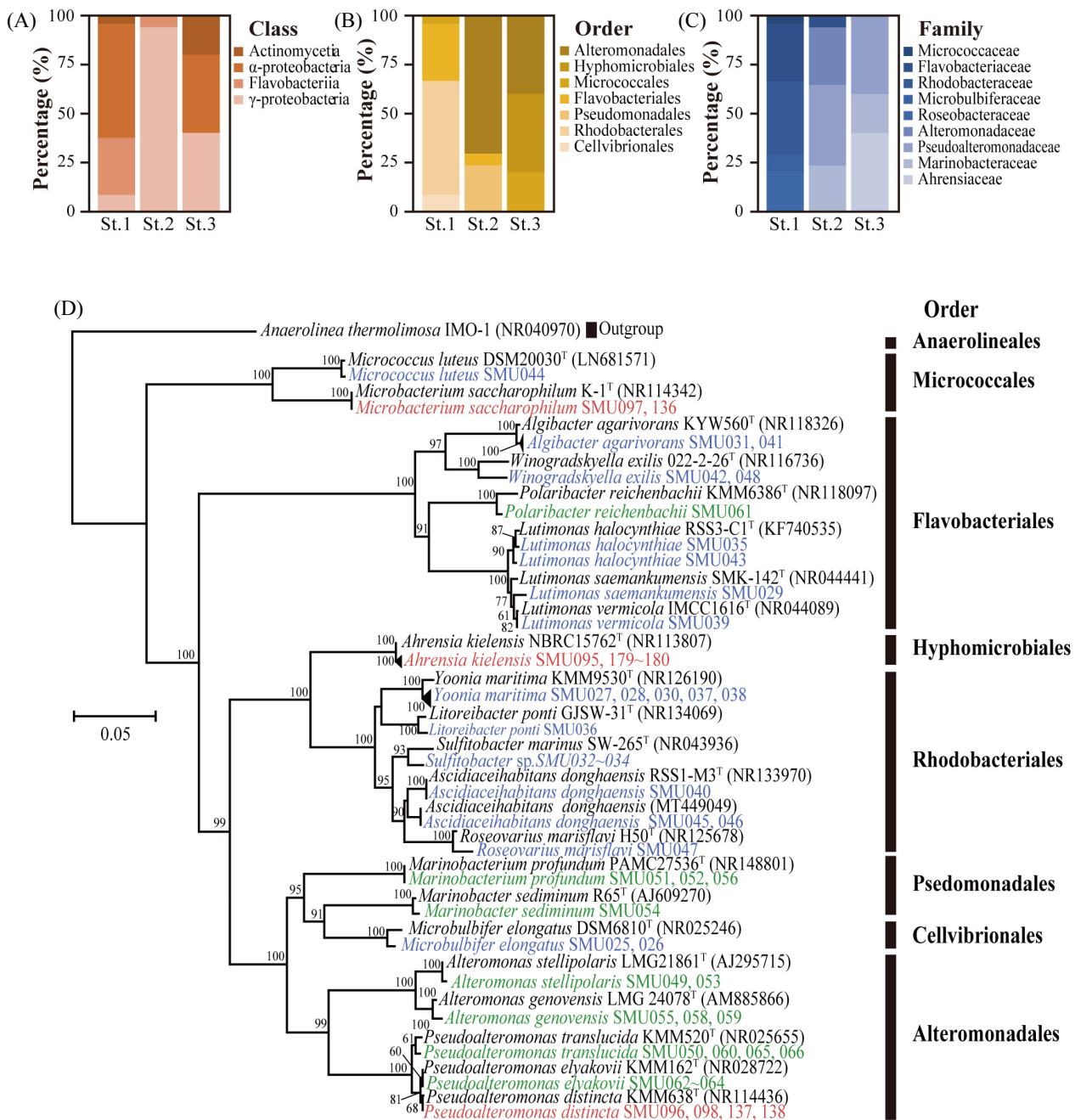


Fig. 3. Taxonomy of class (A), order (B), and family (C) level, and phylogenetic tree (D) inferred with 16S rRNA gene sequences determined in this study and GenBank reference sequences. The tree was constructed using the Neighbor-joining (NJ) algorithm with the *p*-distance. *Anaerolinea thermolimosa* (*Anaerolineales*) was used as an outgroup, and reference sequences were taken from type strains (marked superscript T). The strain name and its GenBank No. were indicated after the species name. In addition, GenBank Nos. of SMU isolates were listed in Table 1. The same taxa in order level were grouped together, and each sampling site was marked with different color words; red (St.1), green (St.2), and blue (St.3).

약하기 위해 계통수를 작성하였다(Fig. 3). 본 실험에서 분리 후 동정한 결과 3개 문(Phylum), 4개 강(Class), 7개 목(Order), 9개 과(Family), 16개 속(Genus), 22개의 종으로 구성되었다. 이들의 출현 비율은 4개의 강 중 St.1에서 α -proteobacteria (40%)와

γ -proteobacteria (40%)가, St.2에서 γ -proteobacteria (94.1%)가, St.3에서는 α -proteobacteria (58.3%)가 가장 높은 비율로 관찰되었다(Fig. 3A). 7개의 목 중 St.1에서 Alteromonadales (40%)와 Hyphomicrobiales (40%)가, St.2에서 Alteromonadales

(70.59%)가, St.3에서 Rhodobacterales (58.3%)가 가장 높은 비율로 관찰되었다(Fig. 3B). 9개의 과 중 St.1에서 Ahrensiaceae (40%)와 Pseudoalteromonadaceae (40%)가, St.2에서 Pseudoalteromonadaceae (41.2%)가, St.3에서 Rhodobacteraceae (37.5%)가 가장 높은 비율로 관찰되었다(Fig. 3C). Yu *et al.* (2009)은 주로 해양환경에서 marine bacteria, α -proteobacteria, γ -proteobacteria 위주로 순수 분리된다고 보고했는데, 본 연구에서 분리된 생물 종과 해양환경에서 분리된 종을 비교했을 때 일치함을 확인하였다.

또한 본 연구에서 분리된 균주와 표준 균주(type strain)와의 근연관계를 확인하기 위해 계통분석하였다(Fig. 3D). 이에 대한 결과로, 균주들은 모두 표준 균주와 근연관계에 있음을 확인하였다. 세 정점에서 모두 출현한 분류군은 없었으며, St.1과 St.2에서 Alteromonadales 목이, St.1과 St.3에서 Micrococcales 목이, St.2와 St.3에서는 Alteromonales 목과 Flavobacterium 목이 공통적으로 분류되었다. 독립적으로 출현한 분류군은 St.1에서 Hyphomicrobiales 목이, St.2은 Pseudomonadales 목이, St.3에서 Rhodobacterales 목이 나타났다. 22개의 분리 종 중 St.1에서는 3종이 관찰되었고, 그 중 *Pseudoalteromonas distincta* (40%)가 가장 많이 분리되었다. 또한 St.2에서 7종 중 *Pseudoalteromonas translucida* (24%)가 가장 많이 분리되었으며, St.3에서는 12종 중 *Yoonia maritima* (25%)가 가장 많이 분리되었다. Parrilli *et al.* (2021)에 따르면 γ -proteobacteria 강에 속하는 *Pseudoalteromonas* 속은 북해지역, 심해환경 등 다양한 극한 환경에서 자주 분리된다고 보고된다. 하지만 본 연구를 통해 새만금 일대에서도 출현이 확인되었기에, *Pseudoalteromonas* 속이 다양한 지역에서 분리될 수 있음을 확인할 수 있었다.

새만금 주요 균주의 protease 활성 특성

군산 새만금 방조제 일대에서 분리한 51개 균주에서 저지원을 통한 4가지 분해효소(amylase, esterase, lipase, protease)의 활성도를 측정하였다(Table 1). 오직 protease에서 -부터 +++까지 다양한 활성범위가 나타났으며(Fig. 4A~D), amylase, esterase, lipase 및 protease에 대해 활성을 보이는 균주는 각각 0개, 7개, 8개, 26개로 확인되었다(Fig. 4E). 특히 가장 우수한 protease 활성을 보이는 균주는 *Pseudoalteromonas elyakovii* (SMU062-64)와 *P. translucida* (SMU065-66)를 포함한 17개로 파악하였다. 중온균 유래 protease는 특히 육류 연화, 청주의 혼탁 방지, 맥주 등의 식품공업에서 사용된다(Kim *et al.*, 2002). 하지만 세균 유래 protease에 대한 연구는 일반적으로 극지 및 고온과 같은 극한 환경에서 연구가 초점이 이루어지

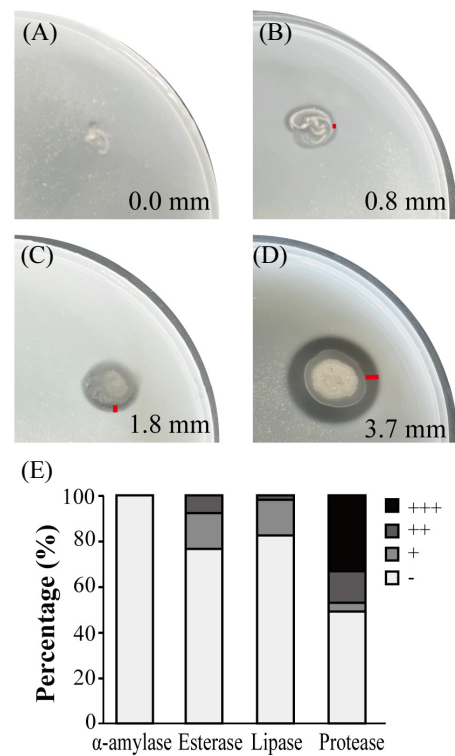


Fig. 4. Hydrolytic enzyme activity of representative strains in this study. (A) to (D) shows each protease activity rating (A, -; B, +; C, ++; D, +++), depending on the size of clear zone. In addition, percentage of amylase, esterase, lipase and protease activities was calculated in this study (E). Length of clear zone are marked in red lines and scale.

는 실정이며(Kim, 2000; Kim *et al.*, 2010), 실제로 극지에서 *P. elyakovii* 및 *P. translucida* 유래 protease 연구가 수행되었다(Lee *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2016). 미생물 효소 산업의 가장 중요한 요인은 높은 생산성을 유도하는 생물의 성장 온도가 된다(Yoon, 2010). 이에 본 실험에서 분리된 중온균들이 상온의 환경에서 원활한 성장과 protease 활성을 보인다는 점을 통해 산업적 활용가능성에 주목할 필요성을 나타낸다.

새만금 주요 균주의 amylase, esterase 및 lipase 활성 특성

Amylase는 전분을 포도당 단위로 가수분해함으로써 당으로의 분해를 촉매하는 효소이다. Amylase는 육상환경과 달리, 수계환경에서 잘 분비되지 않는다(Lee *et al.*, 1994). Lee *et al.* (1994)은 군산 인근 해역에서 세균의 amylase 활성이 거의 나타나지 않는다고 보고하였는데, 본 연구에서도 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 이는 수계환경에서 서식하는 세균에서 관찰 가능한 특성일 것이라 추측하는 바이다.

또한 본 연구에서 분리된 균주의 esterase와 lipase는 protease

에 비해 비교적 낮은 활성을 보이며 전반적으로 활성능에 대해 큰 차이가 없음을 관찰하였다. Esterase 및 lipase에서 (++) 범위의 활성을 보인 균주는 각각 4개, 2개의 균주로 확인되었다(Table 1). 지질분해효소인 esterase와 lipase는 서로 다른 길 이인 triglyceride의 에스터 결합에 활성을 보이며, 산업적으로 세계 분야에서 다양하게 응용된다(Lee *et al.*, 2017). 하지만 세계 산업환경 특성상 미생물 생장에 불리한 조건이 조성되어 미생물 효소의 효율적인 사용이 어려워진다(Kim *et al.*, 1970). 이에 해양세균은 육상세균과는 비교적 다른 생리 생화학적 특성을 가지게 되는데(Choi *et al.*, 2009), 이는 산업비용 측면에서 해양 미생물 유래 lipase의 유용성을 부각시켰다. 따라서 본 실험에서 분리한 균주 중 esterase와 lipase에 대해 활성을 보이는 종을 선별함으로써 산업적인 활용 가능성을 높일 수 있을 수 있을 것이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 새만금 방조제의 다양한 해양환경으로부터 분류학적으로 총 51 균주를 분리하여 22종에 대해 규명하였고, 더 나아가 4가지 분해효소(amylase, esterase, lipase, protease)에 대한 생리학적 특성을 조사하였다. 이러한 결과는 국내 세균 생물자원의 다양성 확보 차원에서 큰 의미를 찾을 수 있을 것이며, 생물소재로서 사용 가능성을 높일 수 있을 것이라 생각된다.

적 요

국내 해양생태계에서 중온성 세균은 가장 흔하게 존재하며, 물질대사에 관여하는 효소들이 풍부하게 포함되어 산업적으로 활용할 가치가 있는 생물군이다. 본 연구는 새만금 방조제 일대의 중온성 세균을 분리 및 배양하고, 미생물 자원화를 위한 16S rRNA 유전자 기반의 종 분류 및 효소활성을 파악하였다. 새만금 방조제 유역인 야미도와 무녀도 인근에서 해수, 모래, 갯벌시료를 채집하였고, 배양을 통해 중온성 세균의 분포 및 종 조성을 파악하였다. 또한 분리에 성공한 균주의 자원화를 위해 4종류의 가수분해 효소(amylase, esterase, lipases, protease) 활성도 저지원 크기에 따라 측정하였다. 그 결과 총 22개의 종(St.1: 2종, St.2: 9종, St.3: 11종)에 대해 51균주를 배양에 성공하였고, 그 중 14 균주에서 protease에 대한 높은 활성을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 새만금 방조제의 해양

환경에서 배양이 가능한 세균의 가수분해 효소특성을 확인하였으며, 향후 산업적인 활용 가능성을 제시하였다.

Acknowledgments

본 논문은 환경부의 재원으로 국립호남권생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(HNIBR202102121).

Conflict of Interest

Jang-Seu Ki is Editor of KJM. He was not involved in the review process of this article. Also, Authors have no conflicts of interest to report.

References

- Adzitey F, Huda N, and Ali GRR. 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech* **3**, 97-107.
- Bae SS, Jung YH, Kwon YM, Chung D, Choi G, Cho K, Yu WJ, and Baek K. 2022. *Fulvivirga lutea* sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **72**. Doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005188>.
- Choi CS, Lee SY, and Lee J. 2009. Characterization of lipase produced from the microorganisms isolated from mud-flat. *Korean J. Food Nutr.* **22**, 14-19.
- Choi DH and Noh JH. 2008. Spatial distribution of bacterial abundance and production in the Saemangeum area. *Ocean Polar Res.* **30**, 509-518.
- Das S, Lyla PS, and Khan SA. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr. Sci.* **90**, 1325-1335.
- Jaeger KE and Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390-397.
- Jung TS. 2017. Sea level change due to nonlinear tides in coastal region. *J. Korean Soc. Coast Ocean Eng.* **29**, 228-238.
- Kim JB. 2000. Purification and properties of protease from thermophilic actinomycetes. *Korean J. Food Nutr.* **13**, 176-180.
- Kim Y, Hong YM, and Yu J. 1970. Studies on amylase and protease as an additive material to the synthetic detergent. *Korean J. Food Sci. Technol.* **2**, 38-42.
- Kim SJ, Kim BG, Park HJ, and Yim JH. 2016. Cryoprotective properties and preliminary characterization of exopolysaccharide (P-Arcp 15) produced by the Arctic bacterium *Pseudoalteromonas elyakovii* Arcp 15. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **46**, 261

-266.

- Kim KP, Kim NH, Rhee CH, Woo CJ, and Bae DH.** 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 754-759.
- Kim D, Park HJ, Lee YM, Hong SG, Lee HK, and Yim JH.** 2010. Screening for cold-active protease-producing bacteria from the culture collection of polar microorganisms and characterization of proteolytic activities. *Korean J. Microbiol.* **46**, 73-79.
- Koh HW, Rani S, Kim SJ, Moon E, Nam SW, Rhee SK, and Park SJ.** 2017. *Halomonas aestuarii* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a tidal flat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 4298-4303.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K.** 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547-1549.
- Lee DH and Kim SJ.** 1997. Molecular analysis of the bacterial communities in aquatic ecosystem. *Korean J. Microbiol.* **33**, 55-65.
- Lee DS, Kim YS, Jeong SY, Kang CK, and Lee WJ.** 2008. Environmental characteristics and distributions of marine bacteria in the surface sediments of Kamak Bay in Winter and Summer. *J. Environ. Sci. Int.* **17**, 755-765.
- Lee GH, Kim JW, and Kim JH.** 1994. Distribution, biovolume and extracellular enzyme activities of heterotrophic bacteria in the sea near Kunsan, Korea. *Korean J. Environ. Ecol.* **17**, 79-90.
- Lee CM, Seo S, Kim SY, Song J, Sim JS, Hahn BS, Kim DH, and Yoon SH.** 2017. Biochemical characterization of a novel thermostable esterase from the metagenome of Dokdo islets marine sediment. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 63-70.
- Lee YK, Sung KC, Yim JH, Park KJ, Chung HS, and Lee HK.** 2005. Isolation of protease-producing Arctic marine bacteria. *Ocean Polar Res.* **27**, 215-219.
- Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, Compere C, and Combes D.** 2008. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling* **24**, 11-22.
- Mobini-Dehkordi M and Javan FA.** 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. Today's World* **1**, 39-50.
- Panda T and Gowrishankar BS.** 2005. Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 160-169.
- Park SH, Kim JY, Kim YJ, and Heo MS.** 2014. Phylogenetic diversity of bacterial community inhabited in *Callyspongia elegans*. *Korean J. Microbiol.* **50**, 152-157.
- Parrilli E, Tedesco P, Fondi M, Tutino ML, Giudice AL, de Pascale D, and Fani R.** 2021. The art of adapting to extreme environments: the model system *Pseudoalteromonas*. *Phys. Life Rev.* **36**, 137-161.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, and Deshpande VV.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Yoon YH.** 2010. Principal theory and application of predictive microbiology. *Food Sci. Ind.* **43**, 70-74.
- Yu Y, Li H, Zeng Y, and Chen B.** 2009. Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. *Polar Biol.* **32**, 1539-1547.