

코코피트로부터 분리한 섬유소 분해세균의 특성 및 섬유소 분해능에 관한 연구

장 재 은

가톨릭대학교 환경공학과

Study on the Characterization of Cellulose Degrading Microorganism from Cocopeat

JANG, Jae-Eun

Department of Biotechnology and Environmental Engineering,
The Catholic University of Korea, Bugeon 429-743, 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. and *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% and 6%, respectively, compared with that of the standard strain *Cellulomonas* sp..

Key words : *Bacillus* sp., cocopeat, cellulose degrading microorganism, *Pseudomonas* sp.

서 론

최근 석유에너지를 대체할 목적으로 대체에너지에 대한 개발에 활발한 연구가 진행되고 있는 현실에서 목재의 주요 구성분인 섬유소는 바이오에너지의 일종인 에탄올 등으로 전환될 수 있는 유용한 바이오매스 자원으로 많은 주목을 받고 있다. 섬유소(cellulose)는 목재를 구성하고 있는 3성분, 즉, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌 등 주요 구성분 중의 하나로, 목재는 지구의 바이오매스 중 반 이상을 차지하는 중요한 자원으로 그 활용가치가 매우 높다 할 것이다. 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(설 등, 2005), 이로부터 각종 미생물 및 발효세균에 의해 에탄올 및 유용 화학물질로의 전환이 용이하게 이루어지고 있다. 코코피트는 열대야자수의 열매인 코코넛 껍질에서 일부 섬유질을 제거한

후 2~5년간 자연 부식시켜 형성된 물질로 가공 및 부숙 정도에 따라 다양한 물리화학적 성질을 나타내고 있다. 이들은 보수력 및 보비력, 통기성이 우수하며, 용적밀도가 낮고 양이온 치환능력이 높으며, 위생적이며 양분이 풍부한 장점(김이열, 2003) 등의 이유로 원예용 상토를 비롯하여 축사 깔개 등으로 이용되고 있으며, 퇴비 제조 시 수분조절재로 사용되는 톱밥의 대용재로서 최근 각광을 받고 있는 물질이다.

이에, 본 연구에서는 코코피트의 형성과정에 다수의 섬유소 분해세균이 작용하였을 것이라는 사실에 주목하여 부식기작 및 형성과정에 차이가 있는 다수의 코코피트를 대상으로 코코피트 내에 존재하는 섬유소 분해세균을 분리하여 이를 동정하고 그 특성을 비교, 분석하여, 차후 바이오에너지를 생성하는 우수 세균 및 코코피트를 이용한 퇴비화 공정과정에 유용한 미생물 소재로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

섬유소 분해세균의 분리를 위하여 사용된 코코피트는 시중에서 수입, 유통되고 있는 제품을 구입하여 사용하였으며, 이들의 주요 원산지는 베트남과 인도네시아산으로 파악되었다. 섬유소 분해세균 배지인 CMC induction medium(CMC 2.5g/L, Yeast extract 2.5g/L, Tryptone 2.5g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, MgSO_4 0.2g/L, Agar 15g/L)을 이용하여 분리하였다. 0.9%의 NaCl에 희석한 코코피트를 CMC 배지에서 30℃, 2일간 배양한 후, 생성되는 콜로니를 분리하였다. 분리된 세균은 그람염색 및 형태학적 특성을 파악하며, API test를 실행하여 생리학적, 생화학적 특성을 분석하였다(최와 배, 2004). 분리된 세균의 섬유소 분해능을 비교, 분석하기 위하여 각각의 분리된 세균을 30℃에서 4일간 액체 배양한 후, 세포배양액을 원심분리(15,000×g at 4℃ for 15 min)한 상등액을 대상으로 가수분해 활성측정 실험을 수행하였다. 효소 활성측정을 위해 CMC 1%(0.05M phosphate buffer, pH 7.0) 0.5mL에 효소액 0.5mL를 가하고, 30℃에서 30분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시키고, 생성된 환원당을 DNS법을 이용하여 550nm에서 흡광도로서 측정하였다(임 등, 1998).

결 과

1. 섬유소 분해 세균의 분리 및 동정

각각 제작회사 및 원산지가 다른 5종의 코코피트를 이용하여 섬유소 분해균을 분리한 결과, 4종의 각각 다른 균주를 선별하였다. 이들의 그람염색을 통한 형태학적 특징은 모두 그람음성의 간균이었고, 생리학적 특성을 알기 위한 API test 및 16S rDNA를 이용한 동정 test 결과, 본 연구에서 분리한 4종은 *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas luteola*로 각각 97.9%, 98.9%, 99.0%, 98.3%의 유사성을 가졌고, API 50CH 및 API 20NE kit를 사용한 각 균주의 생리화학적 특성은 Fig. 1과 같다.

Bacillus subtilis

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
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Pseudomonas aeruginosa

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
+	+	+	+	+	-	+

Pseudomonas stutzeri

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
+	+	+	+	+	-	+

Pseudomonas luteola

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
+	-	-	+	+	-	+

Fig. 1. Biochemical characteristics of the isolated strains.

Table 1. Comparison of cellulase activity for cellulose degrading Microorganism

No	Species	CMcase activity(U/mL)	Relative activity
A	<i>Bacillus subtilis</i>	12	8.33
B	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	57	39.58
C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	120	83.33
D	<i>Pseudomonas luteola</i>	9	6.25
E	<i>Cellulomonas sp.</i>	144	100.00

2. 분리된 세균의 섬유소 분해능 비교 및 분석

분리한 4가지 섬유소 분해균의 효소활성능을 판단하기 위해 각각 A, B, C, D로 명명하여, cellulase 활성이 비교적 높은 것으로 알려진 *Cellulomonas sp.*를 한국생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 상대적인 섬유소 분해능을 비교해 보았다. 효소활성의 1U(unit)은 CMC로부터 1분간 1 μ mol의 glucose를 생산하는 효소의 양으로 하였다.

고 찰

퇴비 제조 시 유용한 수분조절제로 각광 받고 있는 코코피트를 이용하여 섬유소 분해 균주를 분리하기 위해 각각 제작회사 및 원산지가 다른 5종의 코코피트를 이용하여 4종의 균주를 동정 및 생화학적 특성을 본 결과, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas luteola*를 분리할 수 있었고, *Cellulomonas sp.*와 분리된 균주들의 cellulase 활성도를 환원당 정량분석을 통해 비교해본 결과, *Pseudomonas aeruginosa*가 *Cellulomonas sp.*의 cellulase 활성도의 약 83.33%에 미치는 비교적 높은 활성도를 보였다. 그 밖에 cellulase 생산 *Bacillus*속 균주로 보고된 바 있는 *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53의 활성도가 109U/mL인 것(지 등, 2011)과 비교할 때 분리된 *Bacillus subtilis*의 활성도는 매우 낮은 것으로 판단되며, 나머지 두 개의 *Pseudomonas sp.* 또한 그러한 결과를 나타냈다. 이러한 결과에 따라 코코피트로부터 분리한 섬유소 분해세균 중 *Pseudomonas aeruginosa*가 가장 섬유소 분해에 활용도가 있을 것으로 보인다. 또한 분리한 균주가 바이오매스 분해에 효과적으로 이용될 수 있도록 각 균주의 최적의 cellulase 생성 조건 및 cellulase 활성도가 더 높은 다양한 섬유소 분해균 분리에 대한 추가 연구가 필요하다.

인용문헌

- 김이열. 2003. 코코피트와 피트모스의 특성. 토양과 비료 13: 14-21.
- 설옥주, 정대균, 한인섭, 정춘수. 2005. 새로운 섬유소분해 균주 *Trichoderma sp.* C-4에서 분리한 Endoglucanase(F-I-III)에 대한 연구. 한국미생물학회지 41: 81-86.
- 임상호, 윤민호, 최우영. 1998. 호알칼리성 섬유소분해세균 *Pseudomonas sp.*의 분리 및 특성. 충남대학교 농업과학연구집 25: 124-130.
- 지원재, 박다연, 이종열, 장용근, 홍순광. 2011. 제주 연안의 해수로부터 분리한 Cellulase 생산균 *Bacillus*

sp. GC-1과 GC-4의 동정. 한국미생물생명공학회지 39: 97-103.

최원석, 배동훈. 2004. 토양으로부터 분리한 균주로부터 섬유소 분해효소 생산. 단국대학교 신소재 연구논집 12: 181-192.

요 약

최근 석유에너지를 대체할 목적으로 대체에너지에 대한 개발에 활발한 연구가 진행되고 있는 현실에서 바이오매스의 주요 구성분인 섬유소는 바이오에너지의 일종인 에탄올 등으로 전환될 수 있는 유용한 바이오매스자원으로 많은 주목을 받고 있다. 코코피트는 코코넛 껍질에서 야자섬유 추출 시 발생하는 부산물로서 퇴비 제조 시 수분조절제로 사용되는 톱밥과 유사한 성상을 가지지만, 수분흡수율이 단위 체적당 톱밥의 3배 이상, 발효기간이 톱밥의 0.5배로 현재 존재하는 수분조절제 중 최고의 조건을 가진 물질이다. 이에 본 연구는 코코피트 내 존재하는 섬유소 분해세균을 분리하여 이를 동정하고 그 특성을 분석하였다. 먼저 코코피트 내 섬유소 분해세균을 분리하여 그람염색 및 형태학적 특성을 파악하고, API test를 실행하여 생화학적 특성을 분석하였다. 분리된 4종의 균주의 동정 결과, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas luteola*와 각각 97.9%, 98.9%, 99.0%, 98.3%의 유사성을 가진 균주임을 알 수 있었다. 그리고 분리 균주의 섬유소 분해능을 환원당 분석(DNS법)을 통해 효소 활성능을 측정함으로써 섬유소 분해능이 비교적 뛰어난 것으로 알려진 *Cellulomanas* sp.와 비교하였다. 이러한 결과를 통해 섬유소 분해능이 우수한 균주를 분리함으로써 바이오매스를 활용한 바이오에너지 생성공정이나 코코피트를 이용한 우수퇴비의 생산에 활용될 것으로 기대된다.

검색어 : 바실러스, 코코피트, 셀룰로오스 분해 미생물, 슈도모나즈