

## 한국 토양으로부터 전분가수분해효소를 생산하는 고온성 균주의 선별과 동정

최원석 · 배동훈\*  
단국대학교 식품공학과

### Isolation and Characterization of Thermophilic Microorganism Producing Starch-hydrolyze Enzyme

Wonseok Choi and Dong-Hoon Bai\*

Department of Food Engineering, Dankook University

#### Abstract

A thermophilic microorganism, which is able to hydrolyze starch, was isolated from soil and compost in Korea. It was Gram-positive, rod-shaped, catalase positive, nonmotile, glucose and mannitol fermentative, xylose oxidative, and spore forming microorganism. It also has an ability to hydrolyze casein and gelatin. The color of colony was yellowish white. The sequence of 16S rDNA of strain 2719 showed 99.5% sequence homology with the sequence of 16S rDNA of *Bacillus thermoglucosidasius*. On the basis of biochemical and physiological properties and phylogenetic analysis, the isolated strain was named as *Bacillus thermoglucosidasius* 2719.

**Key words:** *Bacillus thermoglucosidasius*, Thermophile, Amylase

#### 서 론

석유자원의 고갈과 가격 급등으로 인하여 전분을 원료로 하는 ethanol 발효가 주목을 받고 있다(Kim et al., 1995b). 전분을 ethanol로 전환하기 위하여서는 일차적으로 화학적인 방법이나 미생물에 의한 전분의 액화와 당화 과정이 필요하다. 미생물에 의한 전분의 액화 및 당화과정의 경우 다양한 미생물과 식물로부터 전분 분해효소인 amylase를 분리, 정제하여 사용해 왔다(Wilson et al., 1982). Amylase는  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase와 isoamylase로 크게 구분할 수 있는데(Greenwood & Milne, 1962; Windish, 1965)  $\alpha$ -amylase(endo-amylase)는 amylose나 amylopectin의  $\alpha$ -1,4 결합을 무작위적으로 가수분해하여 dextrin을 형성하고  $\alpha$ -amylase의 지속적인 작용에 의해 maltose, maltotriose, maltotetraose 등의 oligosaccharide를 형성한 뒤 glucose와 maltose로 분해하는 효소이다.  $\beta$ -amylase(exo-amylase)는 starch의 비환원성 말단으로부터 maltose단위로 가수분해하는 효소로서  $\alpha$ -1,6 결합을 포함하는 한계 dextrin을 형성한다. Glucoamylase는 starch에 작용하여  $\alpha$ -amylose와 amylo-

pectin의  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 결합을 가수분해하여 glucose를 생성하는 당화효소이며, isoamylase는 starch의  $\alpha$ -1,6 결합에만 작용하는 효소이다. 이러한 전분의 분해에 관련하는 효소는 효모, 곰팡이, 세균, 맥아 및 동물체내에 널리 존재한다. 과거 amylase 공업에 맥아나 동물체장에서 추출한 amylase를 이용했으나 amylase 생산 비용이 비싸고 생산원이 부족하여 오늘날에는 amylase 공업에 생산비용이 저렴하고 생산원이 풍부한 미생물 amylase를 널리 이용하고 있으며(Igarashi et al., 1998), 그 수요는 제조공업, 방직공업, 식품공업 및 의약품 제조부문에 널리 증가하고 있다.

호열성 미생물은 일반적으로 55°C 이상의 고온에서 활발히 생육하는 균을 말하는 것으로 이러한 호열성 미생물은 토양, 퇴비, 온천지역 등에 널리 분포하고 있다(Brock, 1978). 50°C 이상의 고온에서 생육이 가능한 원핵생물은 상당히 많으며, 내열성  $\alpha$ -amylase를 생산하는 종류도 자연계 내에 널리 분포하고 있다(Windish, 1965). 최근 들어 고온 내산성 또는 호알칼리성 성질을 지닌 효소에 관한 연구들이 많이 진행되고 있다. 그 중에서 고온성 균주가 생산하는 내열성 단백질 분해효소에 관한 연구(Forarty, 1983; Kim et al., 1995a; Kim et al., 1988; Watanabe et al., 2002)에 따르면 이들은 식품가공과정에서 손쉽게 얻을 수 있는 탈지 대두박으로부터 고가의 정미성분을 만들어내고자 토양으로부터 물에 대한 용해도가 낮은 탈지 대두박을 잘 분해하는 단백질 가수분해 효소를 생산하는 미생물을 탐색하

Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea  
Tel: +82-41-550-3562; Fax: +82-41-550-3566  
E-mail: baidh@dankook.ac.kr  
Received October 22, 2009; revised November 24, 2009; accepted January 12, 2010

였고 그 결과 탐색된 고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4 이 생산하는 내열성 단백질 분해효소를 분리 정제하고 효소의 생화학적 특성을 조사하였다. 내열성 효소의 다른 예를 보면 단백질 분해효소 활성을 가진 균주인 *Methanococcus jannaschii*는 심해에서 분리한 methane 생산균에서 탐색되었으며 효소활성을 116~130°C에서 갖는다 (Michels & Douglass, 1997). 고온성 미생물이 생산하는 내열성 효소들은 열에 안정한 특성을 가지고 있어 산업적으로 사용될 때 효소비용이 줄어드는 효과가 있으며 반응 온도도 고온에서 가능하게 되어 효소반응 공정을 보다 효율 있게 하며 (Adams et al., 1995) 최근에는 amylase 및 cellulase 등도 호열성 세균으로 분리되어 보고되어 지고 있다 (Emtiazzi & Nahvi, 2004).

본 연구에서는 이러한 여러 가지의 목적으로 국내의 여러 지역에서 수집한 토양을 분리원으로 하여 고온성 미생물들을 분리하였고 그중에서 전분분해효소의 활성이 우수한 균주를 분리하여 균주의 물리 화학적 성질을 규명하였고 ribosomal DNA의 염기 분석을 통하여 균주의 동정을 시도하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 고온성 균주의 선별

고온성 amylase를 생산하는 세균의 분리를 목적으로 전국 각지의 토양을 채취하여 60°C에서 생육하는 균주를 분리하고, 각 균주들 중 생육 온도가 가장 높은 균주를 선정하였다. 선정방법은 토양시료 1 g을 취하여 4 mL 생리식염수에 현탁 후 30분간 방치한 후 그 상등액 100 µL를 취하여 LB평판 배지(Yeast extract 5 g/L, Tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, Gelite gellan gum 8 g/L, pH 7.0)에 도말하였다. LB 평판 배지에는 고형제로 한천 대신에 Gelite gellan gum을 사용하였다. 이를 60°C의 배양기에서 24-48시간동안 배양하여 생육한 균주들을 1차로 선정하였다. 1차로 선정된 균주들을 LB액체 배지에 각각 접종하여 60°C에서 24시간 동안 진탕 배양하고 이를 중 배양액으로 하여 1%를 취해 새로운 LB액체 배지에 접종하고 40-80°C에서 각각 24시간 동안 진탕 배양하여 고온에서 생육이 활발한 균주들을 확인하여 이들을 2차 선정균주로 하였다.

### 효소활성 탐색

토양으로부터 선정된 균주를 대상으로 하여 amylase의 효소활성을 가진 균주를 선별하기 위하여 전분이 함유된 LB평판 배지에 2차로 선정된 균주를 접종하였다. 이를 60°C 배양기에서 24시간동안 배양한 후 1% iodine(iodine : potassium iodine = 1 : 1)용액을 가하여 균체 주변의 clear zone 생성 여부를 확인하였다(Whelan, 1965). 이들 중 균체 주위에 clear zone을 보이는 균주들을 선별하여 이들을

다시 액체 배양하고 그 배양 상등액 1000 µL가 흡수된 paper disc를 soluble starch(Yakuri 사, Osaka, Japan) 1%를 첨가한 LB평판 배지에 위치하여 60°C에서 24시간 반응 후 0.1% iodine solution과의 반응 후 발색여부로 효소활성을 재차 확인 하였다.

### 형태학적 및 생화학적 특성

균주의 형태적 특성 및 생화학적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kreig & Halt, 1984)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (Macfaddin, 1990)에 준하여 시행하였다. 균주의 형태학적인 특성은 그람 염색 후 광학현미경에 의한 관찰과 주사전자현미경(SEM)에 의한 관찰법으로 확인하였다. 생화학적 특성을 확인하기 위한 위의 모든 실험에는 60°C에서 24시간동안 LB배지에서 배양한 균체를 사용하였다. 포자 형성 능력은 60°C에서 24시간 배양한 균주 배양액 중 일부를 취하여 100°C에서 10분간 증탕처리한 후 LB배지에 pour plate법으로 1%를 접종하고 이를 다시 60°C에서 24시간 동안 배양한 결과와 균체를 slide glass 위에 넓게 도말하고 malachite green 처리하여 30초간 증기를 쬐고 증류수로 세척한 후 safranin O로 20초 동안 염색하여 이를 증류수로 세척하여 현미경으로 관찰하였다. Carbohydrate로부터 산 생성여부의 확인 실험은 peptone 1%, beef extract 0.1%, NaCl 0.5%, Phenol red 0.0018%를 함유한 배지에 glucose, arabinose, xylose, mannitol, fructose, galactose, inositol, maltose, lactose, mannose, raffinose, rhamnose, sorbose, sorbitol, sucrose를 각각 1%가 되도록 첨가하여 60°C에서 24시간 배양하여 Phenol red의 색깔 변화로 acid 생성 여부를 관찰하였다.

### 세포벽 지방산 조성 분석

균주의 whole cell fatty acid 조성은 Hewlett-Packard사 (Palo Alto, USA)의 GC HP 6890 을 사용하여 분석하였다. 표준 지방산으로는 Hewlett-Packard(Palo Alto, USA)사의 표준 지방산(calibration standard kit)을 사용하였다. 선별된 균주는 LB배지에 60°C에서 24시간 동안 배양한 후 균체를 취하여 다음과 같이 처리하였다. Saponication은 reagent 1 (Table 1)을 1 mL 가한 후 30분간 100°C에서 증탕 후 흐르는 물에 냉각하였다. Methylation은 reagent 2(Table 1)를 2 mL 가한 후 80°C에서 10분간 반응시키고 흐르는 물에 냉각하였다. Extraction은 reagent 3(Table 1)을 1.25 mL를 가한 후 10분간 상온에서 천천히 진탕한 후 하층액을 제거하였다. Washing은 reagent 4(Table 1)를 3 mL 가하여 5분간 천천히 진탕하였으며 층분리를 위하여 포화 NaCl 용액 500 µL를 가하였다. 분리된 상등액을 취하여 분석용 시료로 사용하였다. 분석용 시료는 GC를 사용하여 분석 후 Sherlock program(MIDI Labs Inc., Newark, U.S.A.)를 통

**Table 1. Composition of reagent for analysis of whole cell fatty acid**

Reagent	Composition
No.1(Saponification)	45 g Sodium hydroxide
	150 mL Methanol
	150 mL Deionized distilled water
No.2(Methylation)	325 mL 6N Hydrochloric acid
	275 mL Methanol
No.3(Extraction)	200 mL Hexane
	200 mL Methyl <i>t</i> -butyl ether
No.4(Base washing)	10.8 g Sodium hydroxide
	150 mL Deionized distilled water

하여 분석하였다.

### 16S rDNA의 염기서열 분석

16S rDNA를 분석하기 위해 본 연구에 사용하는 균주인 strain 2719를 LB배지에 접종하여 60°C, 250 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고, strain 2719의 chromosomal DNA를 lysozyme-sodium dodecyl sulfate-proteinase K 방법 (Frederick et al., 1992)으로 분리하였다. 분리된 strain 2719의 chromosomal DNA를 template로 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)방법에 의하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR에 사용된 primer는 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal primer (forward primer: Eubacterial 27F: 5'-AGAGTTTGA TCATGGCTCAG-3', reverse primer: Universal 1492R: 5'-GGATACCTTGTTA CGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응액의 조성은 10 µL template (50 ng/µL), 5 µL 10× reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 500 µg/mL BSA, pH 8.3), 5 µL 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µL deoxynucleoside triphosphates (2.5 mM each), primer 각 1 µL (100 pmol/mmmml) 씩, 22 µL의 멸균 3차 증류수로 전체를 50 µL로 조정하였다. 이 혼합액을 thermocycler(Perkin Elmer Co., Waltham, USA)를 사용하여 증폭하였다. 증폭을 하기 위한 PCR 조건으로는 denaturation을 94°C에서 1분간, annealing을 60°C에서 1분간, polymerization을 72°C에서 1분 30초 동안, 총 30 cycle를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 증폭시켰다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 그 크기를 확인하였다. 확인된 1,400 bp의 PCR 산물은 Bio 101 gene cleaning kit(Bio rad Co, Hercules, USA)를 사용하여 정제한 후 topovector(Invitrogen Co, Carlsbad, USA)에 ligation 시킨 후 cloning하였다. 선별된 균주로부터 다시 plasmid DNA를 분리하여 이를 T-vector sequencing primer(M13 forward, M13 reverse)를 이용하여 Alfred automated sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden)로써 rDNA의 염기서열을 결정하였다. 그 결과는 Blastn 프로그램을 이용하여 gene bank 와 RDP(RNA database project)의 염기서

열과 비교하여 동정하였다.

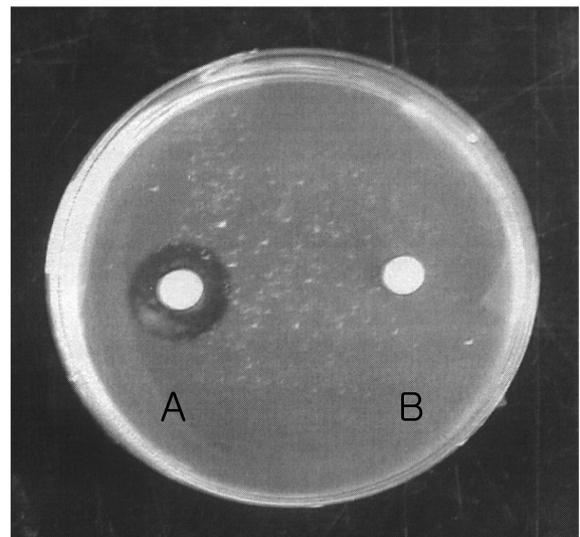
## 결과 및 고찰

### 균주의 선정

고온에서 생육하는 균주를 선정하기 위하여 전국 각지로부터 토양을 취하여, 여기에 생리식염수 10 mL을 가하여 현탁한 후 30분간 방치하였다. LB평판배지를 만들고, 현탁 30분 후 상등액 100 µL을 취해 도말하였다. 이를 60°C에서 배양하여 생육하는 1250여 균주를 일차 선정하였다. 일차 선정된 균주를 액체 배양법에 의해 배양한 후 60°C에서 상대적으로 생육도가 빠른 균주를 60여주 2차적으로 선정하였다. 이들을 다시 전분이 함유된 배지에 접종하여 생육된 colony의 주변에 전분 분해효소 활성을 보이는 균주 23주를 확인하였고 이들을 각각 한천 평판배지에 도말하여 순수 분리하였다. 최종적으로 이들 23균주를 LB 액체배지에 다시 접종 후 60°C에서 24시간 배양 하고 이들 배양 상등액의 효소활성을 paper disc법으로 검정하여 투명한 크기가 가장 넓은 균주 1주를 선정하여 이를 strain 2719로 명명하였다(Fig. 1).

### 형태적학 특성

전분 분해 효소를 생산하는 strain 2719의 형태적 특성은 scanning electron microscopy와 gram 염색을 통하여 확인하였다. Crystal violet을 사용하여 Gram 염색법으로 염색하여 광학 현미경으로 살펴본 결과 Gram 양성균 인지 음성균 인지의 여부가 확실치 나타나지 않았다. 따라서 KOH ring test법(Bourgault & Lamothe, 1988)으로 다시 한번 관찰해 본 결과 Gram 양성균으로 판정할 수 있었다.



**Fig. 1. Formation of digested clear zone on the LB media containing 2% soluble starch.**

A : *Bacillus thermoglucosidasius* 2719, B : *E.coli*

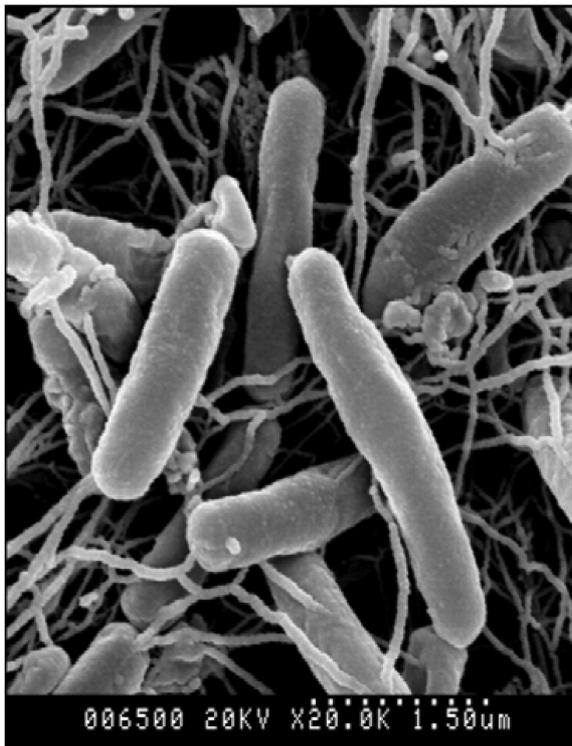


Fig. 2. Scanning electron micrograph ( $\times 20,000$ ) of the *Bacillus thermoglucosidasius* 2719.

Gram 염색의 결과가 확실히 나타나지 않은 것은 본 실험 균주가 다른 *Bacillus* 속 균주들과는 달리 고온에서 생육하는 특성을 가지는 것이 기인하는 것으로 생각된다. 또한 전자현미경으로 관찰해 본 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 전체적으로는  $0.7 \times 1.3 \sim 2.0 \mu\text{m}$  사이의 크기를 가지는 간균 형

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of the strain 2719

Strain	2719	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram staining	+	+
Spore forming	+	+
Catalase	+	+
Anaerobic	-	-
Voges-proskauer test		
< 6	-	d
> 7	-	-
Acid from		
D-glucose	+	+
L-arabinose	+	+
D-xylose	-	+
D-mannitol	+	+
Hydrolysis		
casein	+	+
gelatin	+	+
starch	+	+

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of the strain 2719 (continued)

Utilization		
citrate	+	+
Degradation of tyrosine	-	-
Deamination of phenylalanine	-	-
Egg-yolk lecithinase	-	-
Nitrate reduced to nitrite	-	+
Formation of indole	-	-
NaCl and KCl required	-	-
Growth at pH		
6.8, nutrient broth	+	+
5.7	+	+
Growth with lysozyme present	-	d
Autotrophic with $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ or CO	-	-
Oxidase	-	d
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Gas from nitrate	-	-
Growth at pH 5	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Reduction of methylene blue	-	-
Acid from		
fructose	-	-
galactose	-	-
glycerol	+	-
inositol	-	-
lactose	-	-
maltose	+	-
mannose	+	-
raffinose	+	-
rhamnose		alkaline(-)
sorbose	-	-
sorbitol	+	-
sucrose	+	-
Motility	-	-
SIM	-	-
Growth at NaCl(%)		
2	-	+
5	-	+
7	-	+
10	-	ND
Growth at temp( $^{\circ}\text{C}$ )		
60 $^{\circ}\text{C}$		
5	-	-
10	-	d
30	-	+
40	-	+
50	-	d
55	+	-
65	+	-

d : 11-89% of strains are positive, ND : No Data

태의 균으로 관찰되었으나 다른 *Bacillus* 속 간균과는 달리 균체의 표면이 매우 불규칙적이었으며 작은 돌기들이 형성되어 있었다. 또한 각 균과 균 사이가 균사체로 보이는 것

들에 의해 서로 연결되어 있는 형태를 보이고 있었다.

**생화학적 특성**

Strain 2719의 생화학적 성질들을 실험한 결과를 *Bacillus subtilis*와 비교하여 검토한 결과는 Table 2에 보인 바와 같다. Catalase test는 slide glass에 넓게 도말한 균체에 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 한 방울 떨어뜨린 후 기포의 생성 여부를 확인하여 catalase 양성 균임을 확인하였다. 2719 균주의 포자 형성 능력을 확인하기 위해 2719 균주 배양을 100°C에서 10분간 증탕처리한 후 배양한 결과 2719 균주가 생육하는 것으로 보아 포자 생성능이 있음을 1차로 확인하였으며, 2차로 safranin O로 염색하여 현미경으로 관찰하여 초록색으로 염색된 포자를 확인 할 수 있었다.

Carbohydrate로부터 산 생성여부의 확인 실험 결과 본 균주는 glucose, arabinose, mannitol, maltose, mannose, raffinose, sorbitol, sucrose에서는 산을 생성하지만, 그 외의 탄소원이 첨가된 배지에서는 산을 생성하지 않음을 알 수 있었다. Arginine dehydrolase test와 lysine decarboxylase test는 모두 음성을 나타내었으며, Oxidase test에서는 음성을 보임이 확인되었다. SIM배지에 본 균주를 접종하여 60°C에서 24시간 배양한 후 kovac's 용액을 가하여 색 변화를 관찰한 결과 indole을 생성하지 않았고, citrate를 이용하지 않았으며, 운동성이 없는 것으로 확인되었다. Tyrosine의 분해여부는 실험의 결과 tyrosine의 결정이 확인되지 않음으로써 tyrosine을 분해하지 못하는 것으로 판정되었다. Phenylalanine의 deamination 실험에서는 음성의 결과를 나타냄으로써 phenylalanine을 분해하지 못하는 것을 관찰하였다. Casein, gelatin, starch의 가수분해 실험은 이들을 함유한 배지에서 균체 colony 주변의 clear zone의 형성 관찰을 통하여 각각의 성분을 분해하는지 확인하였다. Starch의 경우는 clear zone의 직경이 크게 형성되었고,

casein은 상대적으로 작게 형성되었다. 또한 gelatin은 4°C에서 쉽게 액화되었다. Egg-yolk lecithinase test에서는 60°C에서 총 14일간 배양한 결과 난황의 색과 표면에 진한 하얀색 침전물이 생기지 않았다. 그러므로 lecithin을 분해할 수 있는 lecithinase를 가지고 있지 않음으로 확인되었다. Methyl red test와 voges-proskauer test는 종배양액 1%를 접종하여 60°C에서 24시간 동안 배양한 후 관찰한 결과 균체의 색이 엷은 적색으로 음성을 나타내었다. 균체의 생육 온도 범위는 60°C에서 24시간 배양한 종배양액을 1% 접종하여 각각의 온도에서 진탕 배양하여 생육도를 확인하여 본 결과 55°C-65°C의 범위 내에서 생육이 가능함을 확인하였다. 균체의 생육 pH 범위는 60°C에서 24시간 배양한 종배양액을 1% 접종하여 각각의 pH에서 진탕 배양하여 생육도를 확인하여 본 결과 pH 6-8 사이로 pH 7 부근에서 가장 활발한 생육을 보였다. 2719 균주는 포자를 형성하며 carbohydrate로부터 산 생성여부정도와 catalase 양성등인 성질은 일반적인 *Bacillus subtilis*와 흡사한 결과를 나타 내었으나, 생육 온도와 motility에서 상당한 차이를 보였다.

**균체의 지방산 조성**

Strain 2719의 whole cell fatty acid를 GC(gas chromatography)로 분석하였다. 그 결과 Table 3에 보인바와 같이 strain 2719는 C<sub>15:0 iso</sub> 27.23%, C<sub>16:0 iso</sub> 15.60%, C<sub>16:0</sub> 11.55%, C<sub>17:0 iso</sub> 24.37%, C<sub>17:0 anteiso</sub> 11.12%로 분석되었다. 이 분석 결과는 C15:0 iso 27.23%인 *Bacillus* 계열과 매우 유사한 지방산 분포를 보여 *Bacillus* 계열로 동정되었다. 하지만 *Bacillus subtilis*의 지방산 조성은 C<sub>15:0 iso</sub> 25.40%으로, C<sub>15:0 iso</sub> 이외의 C<sub>16:0 iso</sub>, C<sub>17:0 iso</sub>, C<sub>17:0</sub>의 지방산 조성에 있어서는 strain 2719와 *Bacillus subtilis*간의 상이한 차이가 보였다. 이것은 2719균주가 *Bacillus subtilis*에 비하여 비교적 높은 온도범위에서 생육하기 때문인 것으로 생각된다 (Igarashi et al., 1998).

**Table 3. Cell wall fatty acid composition of the strain 2719**

Strain 2719		<i>Bacillus subtilis</i>	
Fatty acid	(%)	Fatty acid	(%)
C <sub>14:0 ISO</sub>	1.01	C <sub>14:0 ISO</sub>	1.20
C <sub>14:0</sub>	1.72	C <sub>14:0</sub>	0.87
C <sub>15:0 ISO</sub>	27.23	C <sub>15:0 ISO</sub>	25.40
C <sub>15:0 ANTEISO</sub>	3.92	C <sub>15:0 ANTEISO</sub>	37.41
C <sub>15:0</sub>	1.64	C <sub>15:0</sub>	0.20
C <sub>16:0 ISO</sub>	15.60	C <sub>16:0 ISO</sub>	2.47
C <sub>16:0</sub>	11.55	C <sub>16:0</sub>	5.50
C <sub>17:0 ISO</sub>	24.37	C <sub>17:0 ANTEISO</sub>	8.87
C <sub>17:0 ANTEISO</sub>	11.12	C <sub>17:0 ISO</sub>	9.66
C <sub>17:0</sub>	0.52	C <sub>18:0</sub>	0.50
C <sub>18:0 ISO</sub>	0.66		
C <sub>18:0</sub>	0.65		

a : isomer, b : anteisomer

**16S rDNA 염기서열 분석**

*Bacillus* sp. strain 2719의 염색체 DNA를 정제하여 16S rDNA 염기를 분석하였다. 그 결과 1,499 bp의 염기서열을 확인하였으며, 이를 gene bank에 등록된 다른 균주들의 16S rDNA sequence와 비교하여 *Bacillus* sp. strain 2719의 dendrogram을 작성하였다(Fig. 3). 이를 gene bank에서 확인한 결과 등록된 균주 중 *Bacillus* sp. strain 2719와 유사성이 높은 균주는 *Bacillus thermoglucosidasius*로 확인되었다 (Lee, 1998). *Bacillus* sp. strain 2719는 *Bacillus thermoglucosidasius*와 99.52%의 유사성을 보였으나, 16S rDNA sequence가 100% 일치하는 균주는 검색되지 않았다. 이와 같은 결과에 따라 strain 2719를 *Bacillus thermoglucosidasius* 2719로 명명하였다.

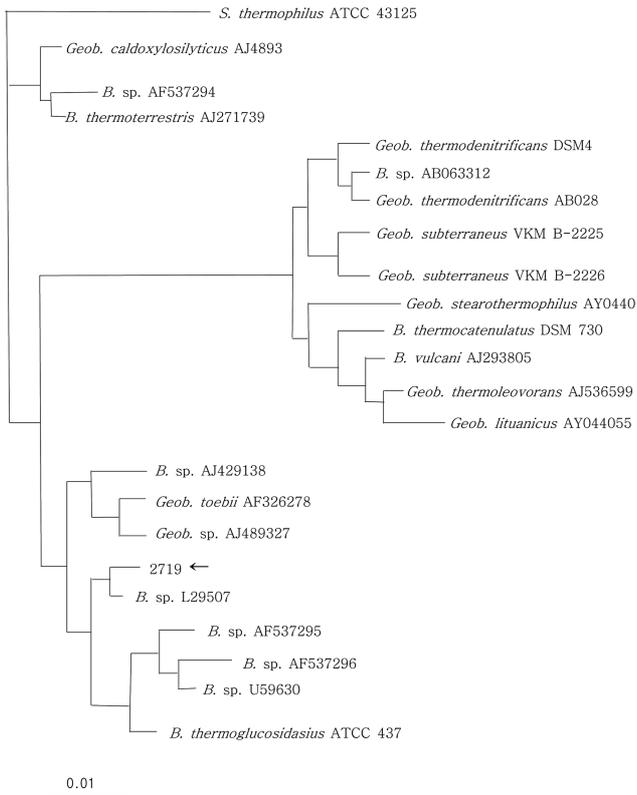


Fig. 3. Dendrogram of the *Bacillus thermoglucosidasius* 2719 through 16S rDNA gene sequence homology.

## 요 약

호열성 미생물을 검토했기 위하여 전국 각지로부터 토양과 두엄을 채취하여 그로부터 호열성 미생물을 분리하였다. 토양과 두엄으로부터 분리된 호열성 미생물 1250여 균주를 선별하였고, 이들을 대상으로 미생물이 생산하는 효소 활성을 검토했으며 호열성 전분 분해 효소를 생산하는 1주의 미생물을 확인하였다. 확인된 1주의 미생물을 strain 2719로 명명하였다.

Strain 2719 균주는 형태학적으로 gram 양성 간균의 특징을 나타냈고, 균주의 표면은 매끄럽지 않았으며, 비교적 다양한 길이를 가지고 있었다. 또한 다른 gram 양성 간균들에 비해서 많은 수의 균사들이 각 균주들 사이에 복잡하게 얽혀있었다. 생화학적 특성을 확인한 결과 catalase 양성, glucose 발효, arabinose 발효, mannitol 발효, casein-gelatin-starch 가수분해의 특징을 가지고 있었으며, 이는 *Bacillus* sp.로 추정되었다. 생육 pH의 범위는 pH 6-pH 8 범위에서 생육이 가능했으며, 생육 온도의 범위는 50-70°C였다. 16S rDNA sequence 분석결과 *Bacillus thermoglucosidasius*의 16S rDNA와 99.52%가 일치하였으나, sequence의 일부분이 다른 부분이 있고, 생육 특성에서 약간의 차이를 보였다. 또한 gene bank에 등록되어 있는 균주들의

16S rDNA sequence들과 비교하여도 일치하는 균주는 확인되지 않았다. 이와 같은 실험결과에 따라 2719 균주는 기존에 발표되지는 않았으나, *Bacillus thermoglucosidasius*와 매우 유사한 균주로 판단되어 *Bacillus thermoglucosidasius* 2719로 명명하였다.

## 참고문헌

- Adams MW, Perler FB, Kelly RM. 1995. Extremozymes; expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnol.* 13: 662-668.
- Bourgault AM, Lamothe F. 1988. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2144-2166.
- Brock DT. 1978. Thermophilic microorganism and life at high temperatures. Springer series, Springer Publishing Company, New York, NY, USA, pp. 51-56.
- Emtiazi G, Nahvi I. 2004. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase and cellulase from *Cellulomonas* sp.. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 1196-1199.
- Forarty WM. 1983. Microbial amylases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London, UK, pp 1-92.
- Frederick M, Roger AB, Kingston RE, More D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1992. Short protocols in molecular biology. Fourth edition. Wiley John & Sons Inc., Somerset, NJ, USA.
- Greenwood CF, Milne EA. 1962. Advances in carbohydrate chemistry, Academic press, New York, NY, USA, pp. 23-281.
- Igarashi K, Hatada Y, Hagihara H, Saeki K, Takaiwa M, Uemura T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Kobayashi T, Ito S. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3282-3289.
- Kim, HK, Kim KH, Lee JK, Kim YO, Nam HS, Oh, TK. 1995a. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 322-328
- Kim IC, Jang SY, Cha JH, Go YH, Park GH. 1988. Cloning and expression of thermostable alpha-amylase gene in *Escherichia coli* from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811, *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16: 369-369.
- Kim JW, Kim SH, Jin IR. 1995b. The fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1. a thermotolerant yeast isolated for fuel alcohol production at elevated temperature, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 23: 624-631.
- Kreig NR, Halt JG. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., London, UK.
- Lee YE. 1998. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. producing a thermostable  $\alpha$ -glucosidase. *Korean J. Life Sci.* 8: 387-394.
- Macfaddin JF. 1990. *Biochemical test for identification of Medical Bacteria*. second edition. Williams & Wilkins, London, UK.
- Michels, PC, Douglass C. 1997. Pressure-enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep-sea methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3985-3991.
- Watanabe K, Fujiwara H, Inui K, Suzuki Y. 2002. Oligo-1,6-glucosidase from thermophile, *Bacillus thermoglucosidasius*

- KP1006, was efficiently produced by combinatorial expression of GroEL in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 35-43.
- Whelan W. 1965. *Methods in Carbohydrate chemistry*, IV, Academic press, New York, NY, USA, p. 252.
- Wilson JJ, Ingledew WM. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 301-307.
- Windish WW. 1965. Microbial amylasees. In: *Advances in Applied Microbiology*, 7: 273-299, Academic Press, New York, NY, USA.