

발효 균주 탐색을 위한 목장 주변 토양에서 분리한 내염성 미생물의 다양성 및 효소 생산능 분석

이용직 · 신기선¹ · 이상재^{2*}

서원대학교 바이오코스메틱학과, ¹한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터
²신라대학교 식품공학전공&해양극한미생물연구소

A Research on the Diversity and Enzyme Productivity of Halophilic Microorganisms Isolated from the Soil around the Ranch for the Exploration of Fermentation Strains

Yong-Jik Lee, Kee-Sun Shin¹, and Sang-Jae Lee^{2*}

Department of Bio-Cosmetics, Seowon University

¹Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

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

Abstract

The diversity and characterization of microorganisms isolated from the soil around several ranches in Korea were confirmed in this study. To isolate halophilic microorganisms, the marine agar medium was basically used and cultivated at 37°C for several days. After single colony isolation, a total of 116 pure colonies were isolated and phylogenetic analysis was carried out based on the result of 16S rDNA sequencing, indicating that isolated strains were divided into 4 phyla, 23 families, 30 genera and 51 species. To confirm whether isolated strain can be a candidate for the fermentation of diverse food ingredients, amylase, lipase, and protease enzyme assays were performed individually, showing that 92 strains possessed at least one enzyme activity. Especially 4 strains, identified to *Jonesia quinghaiensis* (isolate name: JSF 19-2), *Halomonas alkaliantarctica* (isolate name: JSF 21), *Bacillus velezensis* (isolate name: NWFY-36), and *Staphylococcus capitis subsp. urealyticus* (isolate name: MSY-5), showed all enzyme activity tested. Moreover, 17 strains showed the ability for auxin production. This result indicated that isolated strains have shown the possibility of the application for the food and feed industries. Therefore, this study has contributed to securing domestic biological resources and the improvement of hydrolytic enzyme activity by using isolated strains.

Key words: ranch, diversity, microorganisms, enzyme, fermented strains

서 론

효소는 고도의 초정밀성, 특이성, 선택성 및 고효율성의 특성을 가진 생산 수단으로 미래 친환경산업에 그 활용이 확대되고 있으며 이미 많은 식품소재의 가공은 효소반응을 통하여 이루어지고 있고, 그 활용범위는 크게 확대되고 있다(Singh et al., 2016). 미생물 유래의 효소를 이용한 산업

적 응용은 대다수가 식품산업에서 사용하는 효소의 응용에서 시작되었기 때문에 이 분야에 대한 연구는 많이 되어 왔다. 효소의 식품가공에의 사용은 시럽 제조, 맥주 등 알코올 발효, 낙농, 제빵, 과일 및 야채주스, 곡물 가공, 식품 보존, 계란 가공, 식품유지 가공, 생선 가공, 향기 및 맛 제조, 동물사료 등 많은 분야에 이용되고 있으며(Singh et al., 2016), 식품유지, 생선가공, 향료 및 맛 제조와 동물사료를 제조하는데 있어서 protease, amylase, lipase 등을 적용하고 있다(Mayuri et al., 2019).

산업계에서 이용되고 있는 효소는 단백질 분해효소(약 60%)와 탄수화물 분해효소(약 28%)가 대부분 사용되고 있으며 특히 단백질 분해효소의 경우 식품산업에서 어육단백질 분해를 통한 액젓의 숙성발효(Park et al., 2005) 및 조미료의 제조(Kim et al., 2000), 식물단백질의 가수분해에

*Corresponding author: Sang-Jae Lee, Major in Food Biotechnology and Research Center for Extremophiles & Marine Microbiology, Silla University, 140 Baegyang-daero, 700beon-gil, Sasang-Gu, Busan 46958, Korea
Tel: +82-51-999-5447; Fax: +82-51-999-5458
E-mail: sans76@silla.ac.kr
Received January 30, 2020; revised February 20, 2020; accepted February 21, 2020

의한 조미 소재의 제조(Jeong et al., 2005; Chae et al., 1997) 등이 보고되고 있다. 또한 건강증진 식품으로 가장 많이 사용되고 있는 홍삼의 효소 처리에 의한 추출 수율 향상과 항산화 활성 향상 및 우수한 진세노사이드로 전환을 위하여 amylase와 glucoamylase를 활용한 연구(Kim et al., 2011)와 함께 최근에는 홍삼 추출물의 제조에서 단백질 분해효소를 활용하는 연구도 보고되고 있다(Kim et al., 2019).

또한, 호염성 미생물이 생산하는 protease는 염장식품뿐만 아니라 수산부산물에 이용한 분야에서도 널리 사용되어 호염성 protease를 이용하여 수산물의 껍질에서 동물성 콜라겐의 가수분해산물을 얻을 수 있으며 수산 폐기물을 처리하는 산업에 있어서도 이러한 protease 또는 protease를 생산하는 미생물을 이용하는 방법이 연구되고 있다(Wu et al., 2008). 그리고 염장식품의 풍미를 증가시키고 숙성 기간을 줄여주기 위한 starter로서 protease를 생성하는 호염성 미생물은 염장 산업에서 중요하며, protease에 의한 분해산물이 풍미를 증진시킬 뿐만 아니라 여러 가지의 생리활성이 있음이 밝혀짐에 따라 다양한 분야에서 protease의 활용을 위한 연구가 진행되고 있다(Mayuri et al., 2019). 염장식품을 위한 미생물은 고염농도 뿐만 아니라 다양한 온도범위 및 산성 또는 혐기성 조건에서도 생장이 가능하며 강력한 protease 활성을 지닌 것이 보다 이용 가능성이 높다. 식물호르몬 auxin은 다양한 미생물에 의해 식물의 세포신장, 발아, 기관의 분화 등에 관여하는 식물호르몬으로 작물의 생육을 촉진하는 기능이 있다(Jung et al., 2006; Jung et al., 2007).

따라서 본 연구에서는 목장 주변의 토양으로부터 호염성 미생물을 분리하고 식품 산업용 효소시장에 응용 가능한 효소 3종(amylase, lipase, protease)의 활성을 중심으로 분리된 미생물의 다양한 분해 효소 생산 특성 탐색과 화학비료를 대체하는 미생물비료로서의 활용 가능성을 확인하기 위한 auxin 생산능 분석을 실시하였다. 이는 국내 호염성 미생물 자원의 가치를 제고하고 식품 산업용 효소 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

재료 및 방법

호염성 세균 분리 및 배양

국내의 제주 양떼 목장(제주시 애월읍 소재), 녹원 목장(제주시 한림읍 소재), 아침미소 목장(제주시 월평동 소재)의 토양으로부터 호염성 미생물 분리를 위해 각각의 샘플을 멸균된 0.85% 생리식염수에 첨가하여 vortexing으로 현탁하였다. 현탁한 샘플 1 mL을 사용하여 10^{-1} - 10^{-4} 배로 단계희석 한 후, 일반 증식배지로 해양미생물 전용배지인 marine agar (BD, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

배지에 3% NaCl을 첨가한 고체배지를 제작하여 희석액을 도말하여 37°C에서 호기적으로 호염미생물을 배양하였다. 배양 후 선택적으로 배지상에 나타나는 균의 크기, 모양, 색깔 등 형태학적 모습을 관찰한 후 동일한 고체배지를 사용하여 추가적으로 single colony isolation을 수행하였다. 순수분리된 균주의 혼합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여, nutrient agar (BD, Difco Laboratories), R2A agar (BD, Difco Laboratories), 및 tryptic soy agar (BD, Difco Laboratories)에 평판 도말법을 이용하여 37°C에서 7일간 정지 배양을 하였다. 그리고 분리된 균주들이 호염성 균주로써 5%와 10% NaCl 농도에서도 생육이 가능함을 확인하기 위하여 marine agar 배지에 5%와 10% NaCl을 첨가한 배지를 제작하여 분리 균주들의 생육을 확인하였으며 최적의 생육 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 5, 7, 9로 각각 조절한 marine agar 배지에 분리 균주들의 생육을 확인하였다.

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

국내의 다양한 염전으로부터 호기적 배양 조건에서 분리된 균주들의 분자생물학적 동정을 위해 marine agar (BD, Difco Laboratories) 배지에 각각 분리된 균주의 colony가 배양된 상태의 고체 배지를 (주)바이오팩트에 보내어 16S rDNA 염기서열의 분석을 의뢰하였으며 분석된 16S rDNA 염기서열로부터 가장 유사한 근연 균주의 확인을 위하여 (주)천랩의 Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)를 사용하였다. 계통학적 분석은 Clustal W 및 MEGA X 프로그램을 이용하여 확인하였다.

세포외 분해 효소 생산능 분석

분리된 호염성 미생물의 세포외 분해 효소 amylase, lipase, protease 생산능 확인을 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 amylase 생산능은 0.2% soluble starch (BD, Difco Laboratories)를, lipase 생산능은 1% Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을, protease 생산능은 2% skim milk (BD, Difco Laboratories)를 기질로 선택하여 marine agar (BD, Difco Laboratories) 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며 분리된 균주를 직접 접종하여 37°C에서 7일 배양한 후 투명환(Clear zone)의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 접종균 주위의 투명환의 크기(+++: > 7 mm, ++: 4-6 mm, + : 1-3 mm)로 나타내었다.

옥신(Auxin) 생산능 분석

분리된 균주의 auxin 생산능은 0.1% L-tryptophan이 첨가된 Marin broth (BD, USA) 배지에 순수분리된 colony를 tooth-picking 한 후 37°C에서 5일 배양하여 Salkowski 시

약(35% HClO₄, 50 mL + 0.5 M FeCl₃, 1 mL) 800 μL을 배양 상등액 400 μL에 섞어준 후 어두운 곳에서 30 min 반응시켜 육안으로 확인하여 붉은 색깔 변화 정도에 따라 옥신 생성능 정도를 표시하였다(깊은 붉은색: +++, 일반 붉은색: ++, 옅은 붉은색: +, 주황색: w, 무색: -).

결과 및 고찰

호염성 세균 분리

국내의 제주 양떼 목장, 녹원 목장, 아침미소 목장의 토양으로부터 식품 산업에의 활용이 용이할 것으로 생각되는 호기적으로 생육 가능한 호염성 미생물을 분리하고자 marine agar 배지에 시료를 희석, 도말하여 배양한 후, 배양된 colony의 모양, 색깔 등 형태학적 특징을 육안으로 구분이 가능한 균주들을 대상으로 동일한 고체배지를 사용하여 2차로 단일 균주 분리를 수행하였다. 그 결과 Table 1에서 나타난 것처럼 제주 양떼 목장 토양으로부터 38 균주, 녹원 목장 토양에서 64 균주, 아침미소 목장의 토양으

Table 1. Isolation and identification of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea

No.	Source	Isolate number	NA [#]	R2A	TSA	MA [*]				
						NaCl (5%)	NaCl (10%)	pH 5	pH 7	pH 9
1		JSF-1	W ^b	- ^c	+ ^a	+	+	-	+	+
2		JSF-3	+	+	+	+	+	-	+	+
3		JSF-4	+	+	+	+	+	W	+	+
4		JSF-5	+	+	+	+	+	W	+	+
5		JSF-6	+	+	+	+	W	W	+	+
6		JSF-7	+	+	+	+	W	-	+	+
7		JSF-8-1	+	+	+	+	-	-	+	+
8		JSF-8-2	+	+	+	+	+	W	+	W
9		JSF-8-3	+	+	+	+	+	-	+	W
10		JSF-9	+	+	+	+	+	W	+	+
11		JSF-10	+	+	+	+	w	-	+	+
12		JSF-11-1	W	+	+	+	-	-	+	W
13		JSF-11-2	+	+	+	+	w	-	+	W
14		JSF-11-3	W	+	+	+	-	-	+	W
15		JSF-12-1	+	+	+	+	w	-	+	+
16		JSF-13-1	-	W	+	+	-	-	+	+
17		JSF-13-2	-	+	+	+	+	-	+	W
18		JSF-13-3	+	+	+	+	+	-	+	W
19	Jeju yangtte farm	JSF-13-4	-	W	+	+	-	-	+	+
20		JSF-13-5	-	+	+	+	+	-	+	W
21		JSF-13-6	+	+	+	+	+	-	+	W
22		JSF-14-1	+	+	+	+	w	-	+	+
23		JSF-16	W	-	+	+	+	-	+	+
24		JSF-17-1	+	+	+	+	+	-	+	+
25		JSF-17-2	+	+	+	+	+	-	+	+
26		JSF-18	+	+	+	+	+	-	+	+
27	JSF-19-1	+	+	+	+	-	-	+	W	
28	JSF-19-2	+	+	+	+	-	-	+	W	
29	JSF-20	+	+	+	+	+	-	+	+	
30	JSF-21	-	-	W	+	+	-	+	W	
31	JSF-23	-	W	W	+	+	-	+	W	
32	JSF-24-1	W	+	+	+	-	-	+	+	
33	JSF-24-2	+	+	+	+	+	-	+	+	
34	JSF-24-3	W	+	+	+	-	-	+	+	
35	JSF-27-1	W	W	+	+	+	-	+	+	
36	JSF-27-2	W	+	+	+	w	-	+	+	
37	JSF-28	+	+	+	+	W	W	+	+	
38	JSF-29	+	+	+	+	+	-	+	+	
39	Nokwon farm	NWFY-8	-	+	+	-	-	-	W	-
40	Nokwon farm	NWFY-9	+	+	+	+	+	-	-	+

Table 1. Isolation and identification of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea (continued)

No.	Source	Isolate number	NA [#]	R2A	TSA	MA [*]				
						NaCl (5%)	NaCl (10%)	pH 5	pH 7	pH 9
41		NWFY-11-1	+	+	+	+	+	-	+	+
42		NWFY-11-2	+	+	+	+	+	-	+	+
43		NWFY-11-3	+	-	+	+	w	W	+	-
44		NWFY-11-4	+	-	+	+	-	-	+	-
45		NWFY-12	-	+	-	+	-	-	+	-
46		NWFY-14	W	W	+	+	-	-	W	-
47		NWFY-16	+	+	+	+	+	-	+	+
48		NWFY-17	W	+	+	+	-	-	+	+
49		NWFY-18-1	+	+	+	+	+	-	+	+
50		NWFY-18-2	-	+	+	+	w	-	+	-
51		NWFY-19	+	+	+	+	+	-	+	+
52		NWFY-20-1	-	+	-	+	-	-	+	-
53		NWFY-20-2	+	+	+	+	+	-	+	W
54		NWFY-20-3	-	+	-	+	w	-	+	-
55		NWFY-20-4	W	+	-	w	-	-	+	-
56		NWFY-20-5	W	+	-	+	-	-	+	-
57		NWFY-21	-	+	-	+	-	-	+	-
58		NWFY-22	-	-	-	+	+	-	+	+
59		NWFY-23-1	-	+	-	+	-	-	+	-
60		NWFY-23-2	-	W	-	+	-	-	+	-
61		NWFY-23-3	-	W	-	+	w	-	+	-
62		NWFY-25	+	+	+	+	+	-	+	W
63		NWFY-26	+	+	+	+	+	-	+	+
64		NWFY-27	+	+	+	+	w	W	+	+
65		NWFY-29	+	+	+	+	+	-	+	+
66	Nokwon farm	NWFY-30-1	+	+	+	+	+	W	+	+
67		NWFY-30-2	+	+	+	+	+	-	+	+
68		NWFY-31	W	W	-	+	+	-	+	+
69		NWFY-32	+	+	+	+	+	-	+	+
70		NWFY-33-1	+	+	+	+	+	-	+	+
71		NWFY-33-2	+	+	+	+	-	-	+	+
72		NWFY-33-3	+	+	+	+	+	-	+	+
73		NWFY-35	+	+	+	+	w	+	+	-
74		NWFY-36	+	+	+	+	+	+	+	+
75		NWFY-37	+	+	+	+	+	+	+	+
76		NWFY-38	+	+	+	+	-	-	+	+
77		NWFY-39	+	+	+	+	w	+	+	-
78		NWFY-40	+	+	+	+	-	+	+	-
79		NWFY-41	+	+	+	+	+	-	+	+
80	NWFY-42	-	-	-	+	+	-	+	-	
81	NWFY-43-2	W	W	+	+	-	-	+	-	
82	NWFY-43-3	+	+	+	+	-	-	+	+	
83	NWFY-43-4	+	+	+	+	-	-	+	-	
84	NWFY-43-5	+	+	+	+	-	-	+	W	
85	NWFY-44	+	+	+	+	-	+	+	-	
86	NWFY-45	+	+	+	+	-	+	+		
87	NWFY-46	+	+	+	+	-	+	+		
88	NWFO-1	+	+	+	+	+	-	+	+	
89	NWFO-2	+	+	+	+	+	-	+	W	
90	NWFO-5-2	-	+	W	+	-	-	+	W	
91	NWFO-6	+	+	+	+	+	-	+	W	

Table 1. Isolation and identification of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea (continued)

No.	Source	Isolate number	NA [#]	R2A	TSA	MA [*]				
						NaCl (5%)	NaCl (10%)	pH 5	pH 7	pH 9
92	Nokwon farm	NWFO-7	+	+	+	+	+	-	+	+
93		NWFO-8	+	+	+	+	-	-	+	+
94		NWFO-9	+	+	+	+	+	-	+	+
95		NWFO-13	-	+	-	+	-	-	-	-
96		NWFO-14-1	+	+	+	+	+	-	+	-
97		NWFO-14-2	+	+	+	+	+	-	+	-
98		NWFO-15	+	+	+	+	+	W	+	+
99		NWFO-16	+	+	+	+	+	-	+	+
100		NWFO-17	+	+	W	+	+	W	+	+
101		NWFO-18	+	+	+	+	+	-	+	+
102	NWFO-19	+	+	+	+	+	-	+	+	
103	Morning-smile farm	MSY-5	+	+	+	+	+	-	+	-
104		MSY-7	+	+	+	+	+	+	+	+
105		MSY-9	+	+	+	+	+	+	+	
106		MSY-10	+	+	+	+	+	+	+	
107		MSY-14-1	-	-	-	+	+	W	+	+
108		TY-SF 3A	+	-	+	+	+	-	+	-
109		TY-SF 4A	+	+	+	+	-	-	+	-
110		TY-SF 2B	+	+	+	+	-	W	+	-
111		TY-SF 4B	+	W	+	+	-	-	+	-
112		TY-SF 1C	-	+	-	-	-	-	+	-
113		TY-SF 2C	+	+	+	+	-	-	+	-
114		TY-SF 3C	+	+	+	+	+	-	+	-
115		TY-SF 1D	-	-	+	+	+	-	+	-
116		TY-SF 2D	-	-	-	+	+	W	+	-

[#]: Nutrient agar, ^{*}: Marine agar, ⁺: Well-growth, ^b: Weak growth, ^c:No growth.

로부터 14 균주가 각각 분리되었으며 본 실험을 통하여 호염성 미생물 총 116 균주를 순수 분리하였다. 또한 주요성분이 무기염으로 이루어진 marine agar 배지는 해양 미생물 배양에 유리한 배지이기에 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 116균주 중 4균주(No. 58, 80, 107, 116)을 제외한 112균주(96.5%)가 최소 1 종류 이상의 혼합 배지에서 생육이 가능(weak growth 포함)한 것을 확인하였다. 그리고 분리 균주가 높은 염농에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 5%와 10% NaCl을 각각 첨가한 배지를 제작하여 분리 균주들의 생육을 확인한 결과, 5% NaCl 조건에서는 2균주를 제외한 모든 균주에서 생육이 가능(weak growth 포함)하였으며 10% NaCl 조건에서는 78균주가 생육이 가능(weak growth 포함)한 것을 확인하였다. 또한 최적의 생육 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 5, 7, 9로 각각 조절한 marine agar 배지에 분리 균주들의 생육을 확인해본 결과 분리된 균주 중 1균주(No. 95)를 제외한 모든 균주가 pH 7에서 생육이 가능하였으며 이중 25균주는 pH 5에서도 생육이

가능(weak growth 포함)하였으며, pH 9에서 생육 가능(weak growth 포함)한 균주는 78균주였다(Table 1). 특히 제주 양떼 목장에서 분리한 균주들은 모두 pH 9에서 생육이 가능한 것을 확인하였는데, 이는 섬이라는 지리적 위치로 인하여 토양이 내륙에 위치하는 목장의 토양보다 알칼리화되어 있는 것으로 추측된다.

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

국내의 제주 양떼 목장, 녹원 목장, 아침미소 목장의 토양으로부터 호기적으로 분리된 116균주의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 Ezbiocloud 분석서비스를 사용하여 미생물 동정을 실시한 결과 크게 4문 6강 14목 23과 30속 51종으로 나타났으며(Table 2), 분리 균주와 근연 균주 및 상동성을 Table 3에 나타내었다. 또한 분리 동정된 균주들 간의 유연관계를 확인하기 위하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1). Table 2에서 보는 바와 같이 Firmicutes (Bacilli)가 41.4%로 가장 우점도가 높았고, Actinobacteria (Actinobacteria_c)가 32.8%, Proteobacteria (Gammaproteobacteria 11.2%, Alphaproteobacteria 6.9%, Betaproteobacteria 6.0%)가 24.1%, Bacteroidetes는 1.7%로 나타났다. 가장 우점도가 높은

Table 2. Phylum analysis of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	No	
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Micrococcales	Demequinaceae	Demequina	<i>Demequina aestuarii</i>	1	
			Jonesiaceae	Jonesia	<i>Jonesia luteola</i>	1	
					<i>Jonesia quinghaiensis</i>	4	
			Microbacteriaceae	Sanguibacter	<i>Sanguibacter antarcticus</i>	2	
				Curtobacterium	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	4	
				Leucobacter	<i>BD359510_s</i>	2	
				Microbacterium	<i>Microbacterium shaanxiense</i>	1	
					<i>Microbacterium suwonense</i>	2	
				Micrococcaceae	Arthrobacter	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	3
						<i>Arthrobacter rhombi</i>	1
			<i>NRGU_s</i>			2	
			Micrococcus		<i>Micrococcus luteus</i>	1	
			Paenarthrobacter		<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i>	1	
			Mycobacteriales	Promicromonosporaceae	Isoptericola	<i>Isoptericola halotolerans</i>	3
				Ruaniaceae	Ruania	<i>Ruania albidiflava</i>	3
				Corynebacteriaceae	Corynebacterium	<i>LT821240_s</i>	2
				Nocardiaceae	Nocardia	<i>Nocardia vermiculata</i>	2
Propionibacteriales	Nocardiodiaceae	Aeromicrobium		<i>Aeromicrobium halocynthiae</i>	2		
Streptomyetales	Streptomycetaceae	Streptomyces		<i>Streptomyces avermitilis</i>	1		
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales		Flavobacteriaceae	Galbibacter	<i>Galbibacter marinus</i>	2
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Aeribacillus	<i>Aeribacillus pallidus</i>	1	
				Bacillus	<i>Bacillus aryabhatai</i>	2	
					<i>Bacillus firmus</i>	2	
					<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	7	
					<i>Bacillus licheniformis</i>	7	
					<i>Bacillus thermolactis</i>	4	
					<i>Bacillus timonensis</i>	2	
					<i>Bacillus velezensis</i>	9	
					<i>Bacillus vietnamensis</i>	1	
					Geobacillus	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	2
					Planococcaceae	Planococcus	<i>Planococcus maitriensis</i>
						<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	1
				Staphylococcaceae		Staphylococcus	<i>Staphylococcus capitis</i>
					<i>Staphylococcus equorum</i>		3
					<i>Staphylococcus schleiferi</i>		2
					<i>Staphylococcus warneri</i>		1
				Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	<i>Paracoccus alcaliphilus</i>			1	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	<i>EU332828_s</i>			2	
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Pusillimonas		<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	3	
					<i>Pusillimonas harenae</i>	2	
		Oxalobacteraceae	Massilia		<i>Massilia agri</i>	1	
					<i>Massilia varians</i>	1	
Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea		<i>Flavobacterium acidificum</i>	1	
					<i>Pantoea ananatis</i>	1	
	Lysobacterales	Lysobacteraceae	Luteimonas		<i>Luteimonas aestuarii</i>	1	
					<i>Luteimonas lutimaris</i>	2	
	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas		<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	2	
					<i>Halomonas zhanjiangensis</i>	3	
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	2			
			<i>Pseudomonas nitritolerans</i>	1			

Table 3. Representative sequences of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea

No	Isolate Name	Closed strain	Closed strain number	Similarity (%)	Extracellular enzyme activity			Auxin	Deposited number
					Amylase	Lipase	Protease		
1	JSF-1	<i>Halomonas zhanjiangensis</i>	JSM 078169	99.35	+++	- ^a	-	+++	NMC6-B390
2	JSF-3	<i>Isoptericola halotolerans</i>	YIM 70177	98.45	+++	-	++	++	NMC6-B391
3	JSF-4	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>Equorum</i>	ATCC 43958	98.89	-	-	+++	-	NMC6-B392
4	JSF-5	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>Equorum</i>	ATCC 43958	99.09	-	-	++	-	NMC6-B393
5	JSF-6	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	R 5812	98.33	-	+	-	-	NMC6-B394
6	JSF-7-1	<i>Pseudomonas nitritolerans</i>	GL14	98.18	-	-	-	-	NMC6-B395
7	JSF-8-1	<i>Microbacterium shaanxiense</i>	CCNWSP60	99.81	+++	-	+	-	NMC6-B396
8	JSF-8-2	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	97.96	+++	-	-	+	NMC6-B397
9	JSF-8-3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22	98.63	+++	-	+	-	NMC6-B398
10	JSF-9	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	ATCC 43958	98.52	+++	-	+	-	NMC6-B399
11	JSF-10	<i>Paracoccus alcaliphilus</i>	DSM 8512	99.72	-	-	+++	-	NMC6-B400
12	JSF-11-1	<i>Sanguibacter antarcticus</i>	DSM 18966	99.27	+++	-	+++	-	NMC6-B401
13	JSF-11-2-1	<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	IFO 12536	98.64	-	-	+++	-	NMC6-B402
14	JSF-11-3	<i>Sanguibacter antarcticus</i>	DSM 18966	99.27	+++	-	+++	-	NMC6-B403
15	JSF-12-1	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	R 5812	98.8	-	-	-	-	NMC6-B404
16	JSF-13-1-1	<i>LT821240_s</i>	Marseille-P2417	98.07	-	-	+	-	NMC6-B405
17	JSF-13-2-1	<i>Planococcus maitriensis</i>	S1	97.89	-	-	+++	-	NMC6-B406
18	JSF-13-3	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	GTC 510	97.66	-	-	++	-	NMC6-B407
19	JSF-13-4	<i>LT821240_s</i>	Marseille-P2417	98.07	-	-	+	-	NMC6-B412
20	JSF-13-5	<i>Planococcus maitriensis</i>	S1	97.89	-	-	+++	-	NMC6-B417
21	JSF-13-6	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	GTC 510	97.66	-	-	++	-	NMC6-B418
22	JSF-14-1	<i>Demequina aestuarii</i>	NBRC 106260	100	-	-	-	-	NMC5-B320
23	JSF-16	<i>Halomonas zhanjiangensis</i>	JSM 078169	98.9	-	-	+	-	NMC5-B321
24	JSF-17-1	<i>BD359510_s</i>		98.34	-	-	++	-	NMC5-B322
25	JSF-17-2	<i>BD359510_s</i>		98.34	-	-	++	-	NMC5-B323
26	JSF-18	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	CGMCC 1.9095	99.28	-	-	-	-	NMC5-B324
27	JSF-19-1	<i>Jonesia luteola</i>	YIM 93067	97.8	+++	-	+	-	NMC5-B325
28	JSF-19-2	<i>Jonesia quinghaiensis</i>	DSM 15701	99.37	+++	+	+++	-	NMC5-B326
29	JSF-20	<i>Aeromicrobium halocynthiae</i>	KME 001	99.13	-	-	+++	-	NMC5-B327
30	JSF-21	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	CRSS	98.63	+++	+	+	+++	NMC5-B328
31	JSF-23	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	CRSS	97.91	+++	-	-	+++	NMC5-B329
32	JSF-24-1	<i>Jonesia quinghaiensis</i>	DSM 15701	98.45	++	-	+	-	NMC5-B330
33	JSF-24-2	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	CGMCC 1.9095	99.28	-	-	-	-	NMC5-B331
34	JSF-24-3	<i>Jonesia quinghaiensis</i>	DSM 15701	99.19	+++	-	-	-	NMC5-B332
35	JSF-27-1	<i>Halomonas zhanjiangensis</i>	JSM 078169	99.27	-	-	-	-	NMC5-B333
36	JSF-27-2	<i>Jonesia quinghaiensis</i>	DSM 15701	97.7	+++	-	+	-	NMC5-B334
37	JSF-28	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	R 5812	98.33	-	+	-	-	NMC5-B335
38	JSF-29	<i>Aeromicrobium halocynthiae</i>	KME 001	99.13	-	-	+++	-	NMC5-B336
39	NWFY-8	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.33	+++	-	++	-	NMC5-B337
40	NWFY-9	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	99.18	+	-	+	-	NMC5-B338
41	NWFY-11-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.91	-	-	+++	-	NMC5-B339
42	NWFY-11-2	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.54	+++	-	+++	-	NMC5-B340
43	NWFY-11-3	<i>Bacillus thermolactis</i>	R-6488	99	-	-	-	-	NMC5-B341
44	NWFY-11-4-1	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	98.14	-	-	-	-	NMC5-B342
45	NWFY-12	<i>Bacillus thermolactis</i>	R-6488	98	+	-	+	-	NMC5-B343
46	NWFY-14	<i>Bacillus thermolactis</i>	R-6488	99.54	-	-	++	-	NMC5-B344
47	NWFY-16	<i>Ruania albidiflava</i>	DSM 18029	98	-	-	++	-	NMC5-B345
48	NWFY-17	<i>Microbacterium suwonense</i>	MIT8B9	99.25	+++	-	-	-	NMC5-B346

Table 3. Representative sequences of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea (continued)

No	Isolate Name	Closed strain	Closed strain number	Similarity (%)	Extracellular enzyme activity			Auxin	Deposited number
					Amylase	Lipase	Protease		
49	NWFY-18-1	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.91	-	-	-	-	NMC5-B347
50	NWFY-18-2	<i>Ensifer shofinae</i>	CCBAU 251167	96.99	-	-	-	+++	NMC5-B348
51	NWFY-19	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.07	+++	-	+++	-	NMC5-B349
52	NWFY-20-1-1	<i>EU332828_s</i>	LnR5-44	97.2	-	-	-	-	NMC5-B350
53	NWFY-20-2	<i>Luteimonas lutimaris</i>	G3	96.95	-	-	++	-	NMC5-B351
54	NWFY-20-3-1	<i>Ensifer shofinae</i>	CCBAU 251167	96.7	-	-	-	+++	NMC5-B352
55	NWFY-20-4	<i>Luteimonas aestuarii</i>	B9	98.5	-	-	++	+++	NMC5-B353
56	NWFY-20-5	<i>Luteimonas lutimaris</i>	G3	98.73	-	-	++	-	NMC5-B354
57	NWFY-21	<i>EU332828_s</i>	LnR5-44	97.4	-	-	-	-	NMC5-B355
58	NWFY-22-1	<i>Galbibacter marinus</i>	ck-I2-15	95.47	++	-	-	-	NMC5-B356
59	NWFY-23-1	<i>Ensifer shofinae</i>	CCBAU 251167	97.39	-	-	-	+++	NMC5-B357
60	NWFY-23-2	<i>Ensifer shofinae</i>	CCBAU 251167	97.29	-	-	+	+++	NMC5-B358
61	NWFY-23-3	<i>Ensifer shofinae</i>	CCBAU 251167	97.29	-	-	-	+++	NMC5-B359
62	NWFY-25	<i>Arthrobacter rhombi</i>	F.98.3HR.69	98.19	-	-	+	-	NMC5-B360
63	NWFY-26	<i>NRGU_s</i>	BW78	98.53	-	-	++	-	NMC5-B361
64	NWFY-27	<i>Ruania albidiflava</i>	DSM 18029	97.59	-	-	+	-	NMC5-B362
65	NWFY-29	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.56	+++	-	+	-	NMC5-B363
66	NWFY-30-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.42	+++	-	+	-	NMC5-B364
67	NWFY-30-2	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.84	+++	-	+	-	NMC5-B365
68	NWFY-31	<i>NRGU_s</i>	BW78	98.15	-	-	+	-	NMC5-B366
69	NWFY-32-1	<i>Ruania albidiflava</i>	DSM 18029	97.45	-	-	++	-	NMC5-B367
70	NWFY-33-1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC 31317	99.26	-	-	+++	+++	NMC5-B368
71	NWFY-33-2	<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	DCY25	98.54	-	-	-	++	NMC5-B369
72	NWFY-33-3	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC 31317	99.26	-	-	+++	+++	NMC5-B370
73	NWFY-35	<i>Nocardia vermiculata</i>	NBRC 100427	99.08	-	-	-	-	NMC5-B371
74	NWFY-36	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.71	+++	+	+++	-	NMC5-B372
75	NWFY-37	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	99.08	++	-	+++	-	NMC5-B373
76	NWFY-38	<i>Pusillimonas harenae</i>	B201	97.65	-	-	-	+++	NMC5-B374
77	NWFY-39	<i>Nocardia vermiculata</i>	NBRC 100427	99.08	-	-	-	-	NMC5-B375
78	NWFY-40	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC 31317	99.72	-	-	+	-	NMC5-B376
79	NWFY-41	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.62	+++	-	+++	-	NMC5-B377
80	NWFY-42	<i>Galbibacter marinus</i>	ck-I2-15	98.24	-	-	-	-	NMC5-B378
81	NWFY-43-2	<i>Microbacterium suwonense</i>	MIT8B9	99.15	-	-	+	-	NMC5-B379
82	NWFY-43-3	<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	DCY25	98.82	-	-	-	-	NMC5-B380
83	NWFY-43-4	<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	DCY25	98.81	-	-	-	-	NMC5-B381
84	NWFY-43-5	<i>Pusillimonas harenae</i>	B201	97.17	-	-	-	-	NMC5-B382
85	NWFY-44	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC 31317	99.72	-	-	+	-	NMC5-B383
86	NWFY-45	<i>Pantoea ananatis</i>	LMG 2665	99.09	+++	-	+++	+++	NMC5-B384
87	NWFY-46	<i>Flavobacterium acidificum</i>	LMG 8364	98.62	-	++	+++	+++	NMC5-B385
88	NWFO-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.09	-	-	+++	-	NMC5-B386
89	NWFO-2	<i>Bacillus firmus</i>	NBRC 15306	99.09	-	-	+++	-	NMC5-B387
90	NWFO-5-2	<i>Streptomyces avermitilis</i>	MA-4680	99.54	-	-	-	-	NMC5-B388
91	NWFO-6	<i>Bacillus firmus</i>	NBRC 15306	98.81	-	-	+++	-	NMC5-B389
92	NWFO-7	<i>Isoptericola variabilis</i>	MX5	99.35	+++	-	+	-	NMC5-B390
93	NWFO-8-1	<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i>	DSM 20126	98.44	-	-	+	-	NMC5-B391
94	NWFO-9	<i>Isoptericola variabilis</i>	MX5	99.35	+++	-	+	-	NMC5-B392
95	NWFO-13	<i>Bacillus thermolactis</i>	R-6488	98.26	-	-	++	-	NMC5-B393
96	NWFO-14-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.18	+++	-	+++	-	NMC4-B482
97	NWFO-14-2	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.37	+++	-	+++	-	NMC4-B483
98	NWFO-15	<i>Bacillus timonensis</i>	10403023	98.09	+++	-	-	-	NMC4-B484
99	NWFO-16	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.63	+++	-	-	-	NMC4-B485

Table 3. Representative sequences of halophilic microorganisms isolated from the soil around the several ranches in Korea (continued)

No	Isolate Name	Closed strain	Closed strain number	Similarity (%)	Extracellular enzyme activity			Auxin	Deposited number
					Amylase	Lipase	Protease		
100	NWFO-17	<i>Bacillus vietnamensis</i>	15-1	98.92	+++	-	-	-	NMC4-B486
101	NWFO-18	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	99.18	+++	-	-	-	NMC6-B408
102	NWFO-19	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.44	+++	-	++	-	NMC6-B427
103	MSY-5	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>Urealyticus</i>	GTC 727	99.26	+++	+	+	-	NMC6-B428
104	MSY-7	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>Urealyticus</i>	GTC 727	99.26	-	+	+	-	NMC6-B429
105	MSY-9	<i>Massilia varians</i>	CCUG 35299	98.39	+++	-	-	-	NMC6-B430
106	MSY-10	<i>Massilia agri</i>	K-3-1	98.07	+++	-	-	-	NMC6-B431
107	MSY-14-1	<i>Micrococcus luteus</i>	NCTC 2665	98.99	+++	-	-	-	NMC6-B432
108	TY-SF 3A	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	-	+++	+	-	NMC6-B433
109	TY-SF 4A	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> subsp. <i>Calidus</i>	F84b	99.86	++	+	-	-	NMC6-B434
110	TY-SF 2B	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> subsp. <i>Calidus</i>	F84b	99.86	++	+	-	-	NMC6-B435
111	TY-SF 4B	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	-	++	++	-	NMC6-B440
112	TY-SF 1C	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	-	++	++	-	NMC6-B450
113	TY-SF 2C	<i>Aeribacillus pallidus</i>	KCTC3564	99.8	+++	-	-	-	NMC5-B316
114	TY-SF 3C	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	+++	-	-	-	NMC5-B317
115	TY-SF 1D	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	-	-	-	-	NMC5-B318
116	TY-SF 2D	<i>Bacillus kokeshiiformis</i>	MO-04	100	-	-	-	-	NMC5-B319

^a: No activity

Firmicutes 문은 Bacillaceae 77.1%, Staphylococcaceae 16.7%, Planococcaceae 6.2%로 구성되었으며, 총 3과로 5속 16종이 분리되었다. 총 38균주가 분리된 Actinobacteria 문에서는 Microbacteriaceae 23.7%, Micrococcaceae 21.1%, Jonesiaceae 18.4%, Promicromonosporaceae와 Ruaniaceae 각 각각 7.9%, Corynebacteriaceae, Nocardiaceae, Nocardiodaceae가 각각 5.3%, Demequinaceae와 Streptomycetaceae가 각각 2.6%로 구성되었으며, 총 10과로 15속 19종이 분리되었다.

총 28균주가 분리된 Proteobacteria 문에서는 Gammaproteobacteria 강에서 Halomonadaceae 17.9%, Lysobacteraceae와 Pseudomonadaceae가 각각 10.7%, 그리고 Erwiniaceae가 7.1%로 구성되었으며, Alphaproteobacteria 강에서는 Rhizobiaceae 17.9%, Sphingomonadaceae 7.1%, 그리고 Rhodobacteraceae가 3.6%로 구성되었으며, Betaproteobacteria 강에서는 Alcaligenaceae 17.9%와 Oxalobacteraceae가 7.1%로 구성되어 있는 것을 확인하였으며 총 9과로 9속 15종이 분리되었다. Bacteroidetes 문에서 Galbibacter 속 1종이 분리되었다. 또한 NWFY-22 (isolate name)로 나타난 분리균주는 근연 균주와의 16S rDNA 염기서열 상동성이 95.47%로 *Galbibacter marinus*로 동정되었으며 이는 신종 균주 가능성을 나타내는 것으로 녹원 목장 토양에서 분리(과제기탁번호: NMC5-B356) 되었으며 이는 국내 생물 자원의 다양성 확보 차원에서 의미가 있을 것으로 생각된다

(Table 3).

분해 효소 및 옥신 생산능 분석

토양 미생물들은 토양으로 유입되는 낙엽, 볏짚 등 유기물들을 세포외 분해효소를 분비하여 영양물질 등으로 분해하기 때문에 호르몬(hormone), 비타민(vitamin), 식물생장 촉진물질 등을 생산하여 식물의 성장을 돕는다고 알려져 있기에 분리된 호염성 미생물 균주들의 식품 산업에 적용 가능한 신규 분해 효소 탐색 자원 및 미생물비료로써의 산업적 응용가능성을 확인하기 위하여 세포외 분해 효소 생산능 및 옥신 생산능 분석을 실시하였다.

Table 3에 나타낸 것처럼 분리된 116 균주에서 24 균주를 제외한 모든 균주에서 한 가지 이상의 분해 효소 활성이 존재하는 것을 확인하였으며, 두 가지 이상의 효소 활성을 가지는 균주 중 특히 세 가지 효소에 대하여 활성을 모두 가지고 있는 4균주(과제기탁번호: NMC5-B326, NMC5-B328, NMC5-B372, NMC6-B428)도 확인되었다. 또한 옥신 생산능을 확인한 결과, 17균주에서 생산능이 확인되었으며 제주 양떼 목장 토양시료에서 5균주, 녹원 목장 토양시료에서 12균주가 분리되었으며 아침미소 목장 토양시료에서는 옥신 생산능을 가진 균주는 분리되지 않았다. 이는 국내 목장 주변의 토양이 식물생장을 촉진시킬 수 있는 미생물비료 연구에 활용할 수 있는 미생물 탐색 소재로써 중요한 원천소재로써의 활용가치가 높을 것으로

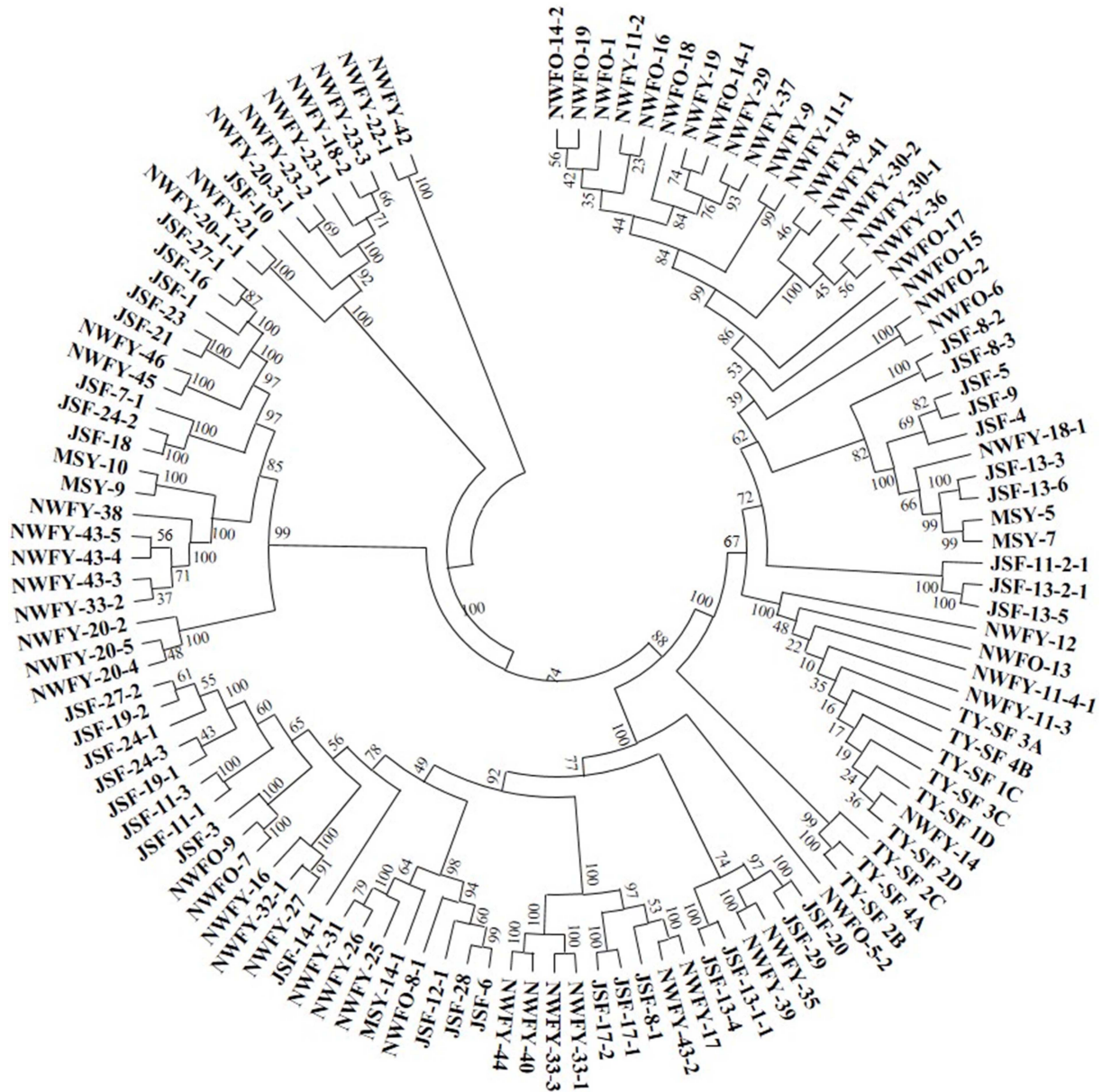


Fig. 1. Evolutionary relationships of taxa by using the 16S rDNA sequences of bacteria from the soil around the several ranches in Korea. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 2.72807696 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 116 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1599 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018).

예상되었다. 본 연구에서 수행한 결과들은 국내 미생물 생물 자원의 다양성 확보 차원에서 큰 의미를 찾을 수 있을 것이며 국내 목장 주변 토양시료에서 분해 효소 탐색을 위한 새로운 균주 탐색 가능성과 식품 산업용 효소 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다. 또한 본 연구를 통하여 분리한 모든 균주들은 한 국생명공학연구원 미생물가치제고사업단에 기탁하였다.

요 약

본 연구는 국내 목장 토양 시료로부터 분리한 호염성 미생물들의 다양성 및 특성에 관하여 조사하였다. 호염성 미생물의 순수 분리를 위하여 marine agar 배지를 사용하였으며 37°C에서 호기적으로 배양하였다. 순수 분리 후, 116 균주를 분리하였으며 16S rRNA 염기서열 분석 결과를 바

탕으로 계통학적 분석을 실시한 결과, 4문, 23과, 30속, 51종으로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 그리고 분리한 균주들이 amylase, lipase, protease 같은 산업적으로 유용한 효소를 생산하는지 확인하기 위하여 효소 활성 평가를 실시하였으며, 92균주가 최소 한 종류 이상의 효소 활성을 가지고 있는 것을 확인하였으며 세 가지 효소에 대하여 모든 활성을 가지고 있는 균주도 4균주가 확인되었으며 auxin 생산능을 가진 균주도 17균주가 확인되었다. 이는 본 연구를 통하여 분리한 미생물들의 산업적 활용 가능성을 나타내었다. 그러므로 이번 연구는 국내 유전자원 확보 및 염전 시료의 호염성 미생물의 다양성과 특성에 관한 과학적 지식 확장에 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 한국연구재단 이공분야기초연구사업(NRF-2019R1F1A1060737)과 2016년도 바이오·의료기술개발사업(NRF-2013M3A9A5076603)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

Chae HJ, In MJ, Kim MH. 1997. Production and characteristic of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using protease. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 784-787.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.

Jeong KH, Seo JH, Jeong YJ. 2005. Characteristics of soybean hydrolysates prepared with various protease. *Korean J. Food Preserv.* 12: 460-464.

Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SC. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 94-100.

Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 23-28.

Kim BG, Choi SY, Suh HJ, Park HJ. 2011. Bitterness reduction and enzymatic transformation of ginsenosides from Korean red ginseng (*Panax ginseng*) extract. *J. Food Biochem.* 35: 1267-1282.

Kim DC, Lee TJ, In MJ. 2019. Potential of proteolytic enzyme treatment for production of Korean red ginseng extract. *J. Appl. Biol. Chem.* 62: 385-389.

Kim SK, Park PJ, Kim KH. 2000. Preparation of sauce from enzymatic hydrolysates of cod frame protein. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 635-641.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.

Mayuri S, Yogesh G, Shalini A, Vikas K, Anil P, Ashwani K. 2019. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Ind. Biotechnol.* 15: 69-78.

Park JH, Kim YM, Kim DS, Kim SM. 2005. Functionality of low molecular weight peptides of accelerately manufactured anchovy sauce with *Bacillus subtilis* JM3 protease. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 827-832.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 6: 174.

Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11030-11035.

Wu JL, Lu BJ, Du MH, Liu GM, Hara KJ, Su WJ, Cao MJ. 2008. Purification and characterization of gelatinase-like proteinases from the dark muscle of common carp. *J. Agr. Food Chem.* 56: 2216-2222.

Author Information

이용직: 서원대학교 BIT융합대학 바이오코스메틱학과 조교수

신기선: 한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터 책임연구원

이상재: 신라대학교 의생명과학대학 식품공학전공 조교수