

발효수산물로부터 분리된 호염성 미생물의 특성 분석

정가을[†] · 간빻 다리마[†] · 염유정 · 최보경 · 이한승 · 박미화¹ · 신기선² · 이용직^{3*} · 이상재^{*}

신라대학교 바이오식품공학과&해양극한미생물연구소, ¹신라대학교 식품영양학과
²한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터, ³서원대학교 바이오코스메틱학과

A Study on the Characterization of Halophilic Microorganisms Isolated from Fermented Seafood

Ga Eul Jeong[†], Dariimaa Ganbat[†], YuJeong Yeom, Bo Gyeong Choi, Han-Seung Lee, Mi-Hwa Park¹, Kee-Sun Shin², Yong-Jik Lee^{3*}, and Sang-Jae Lee^{*}

Department of Food Biotechnology and Research Center for Extremophiles & Marine Microbiology, Silla University

¹Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Science, Silla University

²Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

³Department of Bio-Cosmetics, Seowon University

Abstract

To identify the diversity of halophilic bacteria from fermented seafoods, 86 strains were isolated and a phylogenetic analysis was carried out based on the results of 16S rRNA gene sequencing. The isolated strains were divided into 3 phyla, 7 families, 9 genera, and 24 species. Bacilli class, the main phyletic group, comprised 84.9% with 4 families, 6 genera, and 19 species of Bacillaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae, and Enterococcaceae. The strains were tested for amylolytic, cellulolytic, lipolytic, and proteolytic activity and 55 strains showed at least one enzyme activity. Furthermore, auxin activity was determined in two strains. These results indicate that the isolated strains have the possibility for application in the food and feed industries and of being important genetic resources in Korea.

Key words: Fermented seafood, Halophiles, Characterization, Enzyme

서 론

해양미생물은 높은 수압과 염분, 낮은 수온 등의 환경에서 진화를 통해 적자생존의 경쟁에서 살아남기 위해 육상 미생물과는 다른 이화학적 특성을 가진 2차 대사산물을 생성한다(McCarthy et al., 2004). 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 해양 국가이기 때문에 확보할 수 있는 다양한 해양생물자원을 갖고 있고 이를 이용한 새로운 기능성 식품이나 약효 식품의 개발은 많은 잠재력을 가진 분야로 주목

받고 있다(Mehbub et al., 2014). 특히 어류나 패류를 발효시킨 젓갈류, 해초를 이용하여 제조하는 장아찌류나 무침, 젓이나 어류 등이 첨가되는 칩채류 등의 다양한 발효식품 제조가 이루어지고 있다(Park et al., 2017).

수산발효식품은 염을 첨가하여 자가소화효소 및 미생물이 분비하는 효소 반응에 의해 숙성된 것으로, 내염 또는 호염적인 특성을 나타내는 세균이 많이 자라며, g당 10^3 - 10^5 CFU의 생균수를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Park et al., 2017). 수산발효식품에서 분리한 호염성 미생물은 염분 함량이 높은 다양한 자연환경에서 유래하며 계통학적 다양성뿐만 아니라 소화효소 및 세제용 내염성 효소의 개발과 더불어 수산 부산물과 폐기물을 처리 및 재활용 등 다양한 산업분야에 응용되고 있다. 특히 산업용 효소시장에서 가장 큰 비율로 사용되고 있는 단백질가수분해효소는 식품, 세제, 섬유 펄프와 피혁 공업, 의약품 등에 이용된다(Singh et al., 2016). 숙성발효법으로 수산발효식품의 숙성을 단축시키기 위한 starter로서 protease를 생성하는 호염성 미생물의 균집분석(Mayuri et al., 2019), 염장 식품의 풍미 증가와 향미 발달, 육질 분해 등을 위한 protease를

[†]These authors contributed equally to this article

*Corresponding author: Sang-Jae Lee, Department of Food Biotechnology and Research Center for Extremophiles & Marine Microbiology, Silla University, 140 Baegyong-daero, 700beon-gil, Sasang-Gu, Busan 46958, Korea.

Tel: +82-51-999-5447; Fax: +82-51-999-5458

E-mail: sans76@silla.ac.kr

Yong-Jik Lee, Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, 377-3 Musimseo-ro, Seowon-gu, Cheongju-si, Chungbuk, 28674, Korea.

Tel: +82-43-299-8496; Fax: +82-43-299-8490

E-mail: yjlee75@seowon.ac.kr

Received February 1, 2021; revised February 22, 2021; accepted March 4, 2021

생성하는 미생물의 특성 규명 등 활발한 연구가 수행되고 있다(Giyatmi and Irianto, 2017; Zang et al., 2020). Protease 뿐 아니라, 미생물 유래 효소를 이용하는 산업적 응용은 많은 수가 식품산업분야의 효소 활용에서 시작되었다. 이에 식품 분야에 대한 연구와 함께 식품가공분야에 효소의 사용은 식품 보존, 식품유지 가공, 곡물 가공, 계란 가공, 생선 가공, 제과/제빵, 과일/야채주스, 시럽 제조, 향기 및 맛 제조, 맥주 등 알코올 발효, 낙농, 동물사료 등 많은 분야에 이용되고 있다(Singh et al., 2016). 언급한 분야뿐 아니라 거의 모든 식품관련 분야에 식품의 보존, 가공, 제조, 발효 등에 있어서 protease, amylase, lipase 등으로 적용되고 있다(Mayuri et al., 2019).

본 연구에서는 다양한 발효식품으로부터 호염성 미생물을 순수 분리 후, 산업적으로 응용 가능한 효소 4종 (amylase, lipase, cellulase, protease)의 활성을 탐색하였다. 또한 작물의 생육을 촉진하는 기능을 함으로써 화학비료를 대체하는 미생물비료로의 활용을 위한 auxin 생산능 분석을 실시하여 호염성 미생물 자원의 가치를 제고하고 산업용 효소 관련 생물공학 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 해양 유래 발효수산물은 남(서)해안의 쿠로시오 난류가 흐르는 지역에서 얻은 것으로 곰소 전통 젓갈 가게에서 구입한 밴대이 젓 무침, 순천만에서 구입한 간장게장과 오징어 젓갈, 서귀포 올레시장에서 구입한 갈치숙젓, 통영에서 구입한 멸치젓, 대마도에서 구입한 조개맛 오이로 총 6가지 시료를 사용하였다. 또한 본 연구를 통하여 분리한 모든 균주들은 KRIBB 미생물가치제고사업단에 기탁하였다.

호염성 세균 분리 및 배양

국내의 다양한 해양 유래 발효수산물로부터 호염성 미생물을 분리하기 위해 각 샘플을 멸균된 0.85% saline solution에 첨가하여 vortex로 현탁 후 10^{-1} - 10^{-6} 배로 단계 희석해 샘플을 준비하였다. 일반 증식배지로 해양미생물 전용배지인 marine agar (BD, Franklin, NJ, USA)를 제작하여 희석액을 도말하고 25, 37, 50°C에서 호기적으로 호염미생물을 배양한 후 선택적으로 배지상에 나타나는 균의 크기, 모양, 색깔 등 형태학적 모습에 따라 동일한 고체배지에 추가적으로 single colony isolation을 수행하였다. 혼합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위해 순수 분리된 균주를 nutrient agar (BD), R2A agar (BD), 및 tryptic soy agar (BD)에 선상도말법을 이용하여 25, 37, 50°C에서 7일간 정지 배양하였다.

16S rRNA 유전자 DNA 염기서열의 계통학적 분석

국내의 다양한 해양 유래 발효수산물로부터 호기적 배양 조건에서 분리된 균주들의 분자생물학적 동정을 위해 marine agar (BD) 배지에 각각 분리된 균주의 단일 colony가 배양된 상태의 고체 배지를 (주)바이오팩트에 보내어 16S rRNA 염기서열의 분석을 의뢰하였으며 분석된 16S rRNA 염기서열로부터 가장 유사한 근연 균주의 확인을 위하여 (주)천랩의 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)를 사용하였다. 계통학적 분석은 Clustal W 및 MEGA 6 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

세포의 분해 효소 활성 분석

분리된 호염성 미생물의 세포의 분해 효소 amylase, lipase, cellulase, protease 활성 확인을 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별 배지를 사용하였다. 먼저 amylase 활성은 0.2% soluble starch (BD)를, lipase 활성은 1% Tween 80 (BD)을, cellulase 활성은 1% CMC (BD)를, protease 활성은 20% skim milk (BD)를 기질로 선택하여 marine agar (BD) 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며 분리된 균주를 직접 접종하여 25, 37, 50°C에서 7일 배양한 후 저지원(Clear zone)의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 점종균 주위의 Clear zone의 크기(+++: >7 mm, ++: >4-6 mm, +: 1-3 mm)로 나타내었다.

옥신(Auxin) 생산능 분석

0.1% L-tryptophan이 첨가된 marine broth (BD) 배지에 single colony를 접종하여 25, 37, 50°C에서 5일간 배양 후 Salkowski 시약(35% HClO₄, 2% 0.5 M FeCl₃)과 배양 상등액을 2:1 비율로 섞어주고 암실에서 30 min 반응시켜 육안으로 auxin 생산능을 표시하였다(붉은색: + / 무색: -).

결과 및 고찰

호염성 세균 분리

국내의 해양 유래 발효수산물로부터 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 곰소 밴대이 젓 무침으로부터 10균주, 순천만 간장 게장으로부터 27균주, 순천만 오징어 젓갈로부터 9균주, 올레시장 갈치숙젓으로부터 25균주, 조개맛 오이로부터 13균주, 통영 멸치젓으로부터 2균주가 각각 분리되었으며 본 실험을 통하여 호염성

Table 1. Isolation and identification of halophiles isolated from the fermented seafood

No	Source	Isolate	NA [#]	R2A	TSA	MA [*]			No	Source	Isolate	NA [#]	R2A	TSA	MA [*]		
						pH 5	pH 7	pH 9							pH 5	pH 7	pH 9
1		GS-BC 1A	+	+	+	+	+	+	44	순천만	GS-BC 1A	+	+	+	+	+	+
2		GS-BC 6A	+	+	+	-	+	-	45	오징어	GS-BC 6A	+	+	+	-	+	-
3		GS-BC 7A	+	+	+	-	+	-	46	젓갈	GS-BC 7A	+	+	+	-	+	-
4		GS-BC 9A	+	+	+	-	+	-	47		GS-BC 9A	+	+	+	-	+	-
5	곰소 밴댕이 젓 무침	GS-BC 1B	-	+	+	-	+	-	48		GS-BC 1B	-	+	+	-	+	-
6		GS-BC 2B	+	+	+	-	+	-	49		GS-BC 2B	+	+	+	-	+	-
7		GS-BC 3B	+	+	+	-	+	-	50		GS-BC 3B	+	+	+	-	+	-
8		GS-BC 4B	-	+	+	-	+	-	51		GS-BC 4B	-	+	+	-	+	-
9		GS-BC 5B	+	+	+	-	+	-	52		GS-BC 5B	+	+	+	-	+	-
10		GS-BC 1C	-	+	+	-	+	+	53		GS-BC 1C	-	+	+	-	+	+
11		SB-SC 1A	+	+ ^a	- ^b	+	+	+	54		SB-SC 1A	+	+ ^a	- ^b	+	+	+
12		SB-SC 2A	+	+	+	-	+	+	55		SB-SC 2A	+	+	+	-	+	+
13		SB-SC 3A	-	-	-	-	+	+	56		SB-SC 3A	-	-	-	-	+	+
14		SB-SC 4A	+	+	+	-	+	+	57		SB-SC 4A	+	+	+	-	+	+
15		SB-SC 5A	+	-	-	-	+	+	58	올레 시장치 속젓	SB-SC 5A	+	-	-	-	+	+
16		SB-SC 6A	+	+	+	-	+	+	59		SB-SC 6A	+	+	+	-	+	+
17		SB-SC 7A	+	-	-	-	+	+	60		SB-SC 7A	+	-	-	-	+	+
18		SB-SC 8A	+	+	+	-	+	+	61		SB-SC 8A	+	+	+	-	+	+
19		SB-SC 9A	-	-	-	-	+	+	62		SB-SC 9A	-	-	-	-	+	+
20		SB-SC 10A	+	+	+	+	+	+	63		SB-SC 10A	+	+	+	+	+	+
21		SB-SC 1B	-	-	+	+	+	-	64		SB-SC 1B	-	-	+	+	+	-
22		SB-SC 2B	-	-	+	+	+	-	65		SB-SC 2B	-	-	+	+	+	-
23	순천만 간장 게장	SB-SC 3B	-	-	+	+	+	-	66		SB-SC 3B	-	-	+	+	+	-
24		SB-SC 4B	+	+	+	+	+	-	67		SB-SC 4B	+	+	+	+	+	-
25		SB-SC 5B	-	+	+	+	+	+	68		SB-SC 5B	-	+	+	+	+	+
26		SB-SC 6B	-	-	+	-	+	-	69		SB-SC 6B	-	-	+	-	+	-
27		SB-SC 7B	-	+	+	+	+	+	70		SB-SC 7B	-	+	+	+	+	+
28		SB-SC 1C	+	+	+	-	+	+	71		SB-SC 1C	+	+	+	-	+	+
29		SB-SC 2C	+	+	+	+	+	+	72		SB-SC 2C	+	+	+	+	+	+
30		SB-SC 4C	-	-	+	+	+	+	73		SB-SC 4C	-	-	+	+	+	+
31		SB-SC 5C	-	+	+	-	+	+	74		SB-SC 5C	-	+	+	-	+	+
32		SB-SC 6C	+	+	+	+	+	+	75		SB-SC 6C	+	+	+	+	+	+
33		SB-SC 1D	-	+	+	-	+	+	76		SB-SC 1D	-	+	+	-	+	+
34		SB-SC 3D	-	+	+	-	+	+	77	조개맛 오이	SB-SC 3D	-	+	+	-	+	+
35		SB-SC 4D	-	-	-	+	+	+	78		SB-SC 4D	-	-	-	+	+	+
36		SB-SC 5D	+	+	+	-	+	-	79		SB-SC 5D	+	+	+	-	+	-
37		SB-SC 6D	+	+	+	-	+	-	80			SB-SC 6D	+	+	+	-	+
38		SB-CC 1A	+	+	+	-	+	-	81		SB-CC 1A	+	+	+	-	+	-
39		SB-CC 2A	+	+	+	-	+	-	82		SB-CC 2A	+	+	+	-	+	-
40	순천만 오징어 젓갈	SB-CC 3A	+	-	-	-	+	-	83		SB-CC 3A	+	-	-	-	+	-
41		SB-CC 4A	+	+	+	-	+	-	84		SB-CC 4A	+	+	+	-	+	-
42		SB-CC 5A	+	+	+	-	+	+	85	통영	SB-CC 5A	+	+	+	-	+	+
43		SB-CC 7A	+	+	+	-	+	-	86	멸치젓	SB-CC 7A	+	+	+	-	+	-

[#]Nutrient agar

^{*}Marine agar

^aWell-growth

^bNo growth

미생물 총 86균주를 순수 분리하였다. 순천만 간장 게장으로 부터 가장 많은 27균주가 분리되었다. 이것은 발효시키는 원료에 따라 호염성 미생물의 분리가 상이하게 나타난

결과로 예상된다. 또한 주요 성분이 무기염으로 이루어진 marine agar 배지는 해양 미생물 배양에 유리한 배지이기 에 산업적 활용가능성을 확인하기 위하여 대량 배양 등에

많이 활용되는 혼합배지(nutrient agar, R2A agar, tryptic soy agar)에서의 분리 균주들의 생육 가능성을 확인한 결과 86균주 중 6균주를 제외한 80균주(93.0%)가 최소 1종류 이상의 혼합 배지에서 생육이 가능한 것을 확인하였다. 이는 해양 유래 발효산물의 호염성 미생물 탐색에 있어서 분리 배지의 구성성분이 어느 정도 영향을 미치는 것으로 생각되며, 본 연구 결과를 바탕으로 해양 유래 발효산물 호염성 미생물 분리를 위한 최적 배지는 marine agar 배지로 나타났다. 또한 최적의 생육 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 5, 7, 9로 각각 조절한 marine agar 배지에 분리 균주들의 생육을 확인해 본 결과 분리된 균주 중 *Staphylococcus epidermidis* CTC-1-2-2를 제외한 모든 균주가 pH 7에서 생육이 가능하였으며 이중 31균주는 pH 5에서도 생육이 가능하였으며 pH 9에서 생육이 가능한 균주는 45균주였다(Table 1).

16S rRNA 유전자 DNA 염기서열의 계통학적 분석

국내의 다양한 해양 유래 발효산물로부터 호기적으로 분리된 86균주의 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 NBLAST program과 EzBioCloud를 사용하여 미생물 동정을 실시한 결과 크게 3문 5목 7과 9속 24종으로 나타났으며 (Table 2), 분리 균주와 근연 균주 및 상동성을 Table 3에 나타내었다. 또한 분리 동정된 균주들 간의 유연관계

를 확인하기 위하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1). Table 2에서 보는 바와 같이 Firmicutes (Bacilli)가 84.9%로 가장 우점도가 높았고, Actinobacteria 1.1%, Proteobacteria (Gammaproteobacteria) 14.0%로 나타났다. 가장 우점도가 높은 Firmicutes 문은 Bacillaceae 63.0%, Staphylococcaceae 30.1%, Planococcaceae 5.5%, Enterococcaceae가 1.4%로 구성되었으며, 총 4과 6속 19종이 분리되었다. 본 연구에서 가장 많이 분리된 Bacillaceae과는 *Bacillus* sp.이 해양 생물 중에서도 담수어에서 많이 분리되며 발효식품 중에서도 젓갈류에서 주로 분리된다는 것이 알려져 있기에 해양 유래 발효산물의 미생물 균총에서 가장 많이 분리된 것으로 예상된다(Yang, 2005; Hur, 1996; Lee, 1969; Nam, 2012). 또한 metagenome 분석에 기반을 둔 미생물상 분석이 전통발효식품에 적용되면서 기존 해양 유래 발효균총 연구에 알려지지 않았던 Staphylococcaceae과 *Staphylococcus* 속의 22종이 확인되었다(Guan et al, 2011). 이들 균주는 coagulase를 생산하지 않아 식품위해균 *Staphylococcus aureus*와 구분되며, 항생제 내성이 있고, 위해성은 보고되지 않은 coagulase-negative staphylococci (CNS)로 분류된다(Blaiotta et al., 2004). Actinobacteria 문에서 1속 1종 (*Micrococcus luteus*)이 분리되었으며 Proteobacteria 문에서 2속 4종이 분리되었다. 또한 분리 균주 중 근연 균주와의 16S rDNA 염기서열 상동성이 낮은 10균주(98.7% 이하)는

Table 2. Taxonomic analysis of halophiles isolated from the fermented seafood

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Number		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	<i>Micrococcus luteus</i>	1		
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	<i>Bacillus altitudinis</i>	20		
					<i>Bacillus licheniformis</i>	3		
					<i>Bacillus mojavensis</i>	1		
					<i>Bacillus paranthracis</i>	1		
					<i>Bacillus pumilus</i>	1		
					<i>Bacillus vallismortis</i>	1		
					<i>Bacillus velezensis</i>	13		
					Oceanobacillus	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	2	
					<i>Oceanobacillus manasiensis</i>	1		
					Paralkalibacillus	<i>Bacillus clausii</i>	2	
					<i>Bacillus rhizosphaerae</i>	1		
					Planococcaceae	Planococcus	<i>Planococcus citreus</i>	1
							<i>Planococcus plakortidis</i>	3
					Staphylococcaceae	Staphylococcus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Staphylococcus equorum</i>	8							
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5							
<i>Staphylococcus sciuri</i>	3							
<i>Staphylococcus warneri</i>	4							
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	1							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	<i>Psychrobacter celer</i>	2		
					<i>Psychrobacter marincola</i>	1		
		Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	<i>Vibrio litoralis</i>	1		
<i>Vibrio rumoiensis</i>	8							

Table 3. Characterization of halophiles isolated from the fermented seafood

No	Isolate Name	Closest strain	Closest strain number	Identity (%)	Extracellular enzyme activity				Aux ^c	Deposited number
					Amy ^a	Cel ^b	Lip ^c	Pro ^d		
1	GS-BC 1A	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B234
2	GS-BC 6A	<i>Bacillus clausii</i>	DSM 8716	99.39	++	-	-	+++	-	NMC4-B238
3	GS-BC 7A	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B239
4	GS-BC 9A	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3	99.80	+++	-	-	-	-	NMC4-B240
5	GS-BC 1B	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B241
6	GS-BC 2B	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B242
7	GS-BC 3B	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.79	+++	-	-	-	-	NMC4-B243
8	GS-BC 4B	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B244
9	GS-BC 5B	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1	99.93	+++	-	-	-	-	NMC4-B245
10	GS-BC 1C	<i>Bacillus clausii</i>	DSM 8716	99.39	+	-	-	-	-	NMC4-B246
11	SB-SC 1A	<i>Planococcus plakortidis</i>	DSM 23997	99.65	-	-	-	-	-	NMC4-B198
12	SB-SC 2A	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DSM 20345	100.00	-	-	-	+++	-	NMC4-B199
13	SB-SC 3A	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	-	-	+++	-	-	NMC4-B200
14	SB-SC 4A	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DSM 20345	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B201
15	SB-SC 5A	<i>Planococcus plakortidis</i>	DSM 23997	99.65	-	-	-	+++	-	NMC4-B202
16	SB-SC 6A	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DSM 20345	100.00	-	-	-	+++	-	NMC4-B203
17	SB-SC 7A	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	-	-	+++	-	-	NMC4-B204
18	SB-SC 8A	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B205
19	SB-SC 9A	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	-	+++	-	-	NMC4-B206
20	SB-SC 10A	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B207
21	SB-SC 1B	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	+	-	-	-	NMC4-B208
22	SB-SC 2B	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	-	-	-	-	NMC4-B209
23	SB-SC 3B	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	+	-	-	-	NMC4-B210
24	SB-SC 4B	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B211
25	SB-SC 5B	<i>Planococcus plakortidis</i>	DSM 23997	99.65	-	-	-	+++	-	NMC4-B212
26	SB-SC 6B	<i>Vibrio littoralis</i>	MANO22D	100.00	-	+	-	-	-	NMC4-B213
27	SB-SC 7B	<i>Planococcus citreus</i>	DSM 20549	99.93	-	-	-	+++	-	NMC4-B214
28	SB-SC 1C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B215
29	SB-SC 2C	<i>Psychrobacter celer</i>	SW-238	100.00	-	-	+++	+++	+	NMC4-B216
30	SB-SC 4C	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	-	-	+++	-	NMC4-B217
31	SB-SC 5C	<i>Psychrobacter celer</i>	SW-238	100.00	+++	-	+++	-	-	NMC4-B218
32	SB-SC 6C	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B219
33	SB-SC 1D	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	X50	100.00	++	-	-	-	-	NMC4-B220
34	SB-SC 3D	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	X50	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B221
35	SB-SC 4D	<i>Vibrio rumoiensis</i>	S-1	100.00	+++	-	-	-	-	NMC4-B222
36	SB-SC 5D	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B223
37	SB-SC 6D	<i>Psychrobacter marincola</i>	KMM 277	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B224
38	SB-CC 1A	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B225
39	SB-CC 2A	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	+++	-	-	-	-	NMC4-B226
40	SB-CC 3A	<i>Oceanobacillus manasiensis</i>	YD3-56	100.00	-	-	-	+++	-	NMC4-B227
41	SB-CC 4A	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B228
42	SB-CC 5A	<i>Bacillus rhizosphaerae</i>	SC-N012	100.00	+++	-	-	-	-	NMC4-B229
43	SB-CC 7A	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	+++	-	-	-	-	NMC4-B230
44	SB-CC 1B	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B231
45	SB-CC 2B	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B232
46	SB-CC 3B	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B233
47	OGH-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	98.91	+++	-	-	-	-	NMC5-B213
48	OGH-2	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.71	+++	-	-	-	-	NMC5-B214
49	OGH-3	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99.09	+++	-	-	-	-	NMC5-B215
50	OGH-4	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.62	+++	-	-	-	-	NMC5-B216
51	OGH-5	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.57	+++	-	-	++	-	NMC5-B217

Table 3. Characterization of halophiles isolated from the fermented seafood

No	Isolate Name	Closest strain	Closest strain number	Identity (%)	Extracellular enzyme activity				Aux ^e	Deposited number
					Amy ^a	Cel ^b	Lip ^c	Pro ^d		
52	OGH-6	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.53	+++	-	-	-	-	NMC5-B218
53	OGH-8	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.62	+++	-	-	+++	-	NMC5-B220
54	OGH-9	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.45	-	-	-	+++	-	NMC5-B221
55	OGH-10	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99.18	-	-	-	+++	-	NMC5-B222
56	OGH-11	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.44	+++	-	-	+	-	NMC5-B223
57	OGH-12	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.44	+++	-	-	-	-	NMC5-B224
58	OGH-13	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.53	+++	-	-	-	-	NMC5-B225
59	OGH-14	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99.18	+++	-	-	+	-	NMC5-B226
60	OGH-15	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99.46	-	-	-	-	-	NMC5-B227
61	OGH-16	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.83	-	-	-	-	-	NMC5-B228
62	OGH-17	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	99.55	-	-	-	-	-	NMC5-B229
63	OGH-18	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.81	+++	-	-	+++	-	NMC5-B230
64	OGH-19	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	99.54	+++	-	-	+++	-	NMC5-B231
65	OGH-21	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99.46	-	-	-	+	-	NMC5-B233
66	OGH-22	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.91	-	-	-	+++	-	NMC5-B234
67	OGH-23	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	97.99	-	-	-	-	-	NMC5-B235
68	OGH-24	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.43	+++	-	-	+++	-	NMC5-B236
69	OGH-25	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	99.82	-	-	-	+++	-	NMC5-B237
70	OGH-26	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	99.10	-	-	-	-	-	NMC5-B238
71	OGH-27	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	98.44	+++	-	-	-	-	NMC5-B239
72	CTC-1-1-1-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.62	++	-	-	+++	-	NMC6-B15
73	CTC-1-1-2-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.62	+	-	-	+++	-	NMC6-B16
74	CTC-1-1-2	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.71	+++	-	-	-	-	NMC6-B211
75	CTC-1-2-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NCTC 11047	99.28	-	-	+	-	-	NMC6-B212
76	CTC-1-3-2	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	98.09	-	-	-	+++	-	NMC6-B213
77	CTC-2-1-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	99.01	-	-	+	-	-	NMC6-B64
78	CTC-2-1-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NCTC 11047(T)	99.28	-	-	-	-	-	NMC6-B264
79	CTC-2-2-1	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.10	-	-	-	-	-	NMC6-B65
80	CTC-2-6-1	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.15	+	-	-	+++	-	NMC6-B67
81	CTC-2-7-1	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.35	-	-	-	-	-	NMC6-B68
82	CTC-3-1-1	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.36	-	-	-	-	-	NMC6-B124
83	CTC-3-1-2	<i>Micrococcus luteus</i>	NCTC 2665	98.23	-	-	+	+++	+	NMC6-B331
84	CTC-3-2-1	<i>Bacillus paranthracis</i>	Mn5	99.37	-	-	++	+++	-	NMC6-B125
85	TY-AC 3B	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100.00	-	-	-	-	-	NMC4-B196
86	TY-AC 1C	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	DSM 20339	99.93	-	-	-	-	-	NMC4-B197

^aAmylase^bCellulase^cLipase^dProtease^eAuxin

신종 균주 가능성을 나타내는 것으로 올레시장 갈치속젓(8종)과 조개맛오이(2종)에서 분리(KRIBB기탁번호: NMC5-B217, 218, 221, 223, 224, 225, 235, 239, NMC6-B213 및 331) 되었으며, 동정관련 실험을 정밀하게 진행중이다. 이는 국내 생물 자원의 다양성 확보 차원에서 의미가 있을 것으로 생각된다.

분해 효소 및 옥신 생산능 분석

수산 발효식품은 어류 또는 패류의 근육, 내장 등에 염

을 첨가하여 자가소화 및 미생물이 분비하는 효소반응에 의해 숙성시킨 전통 발효식품으로 알려져 있기에(Park et al., 2017) 분리된 호염성 미생물 균주들의 식품 산업에 적용 가능한 신규 분해 효소 탐색 자원 및 미생물 비료로써의 산업적 응용가능성을 확인하기 위하여 세포의 분해 효소 생산능 및 옥신 생산능 분석을 실시하였다. Table 3에 나타난 것처럼 분리된 86균주 중 55균주(64.0%)에서 한 가지 이상의 분해 효소 활성이 존재하는 것을 확인하였으며, amylase 활성을 보이는 35균주, cellulase 활성을 보이

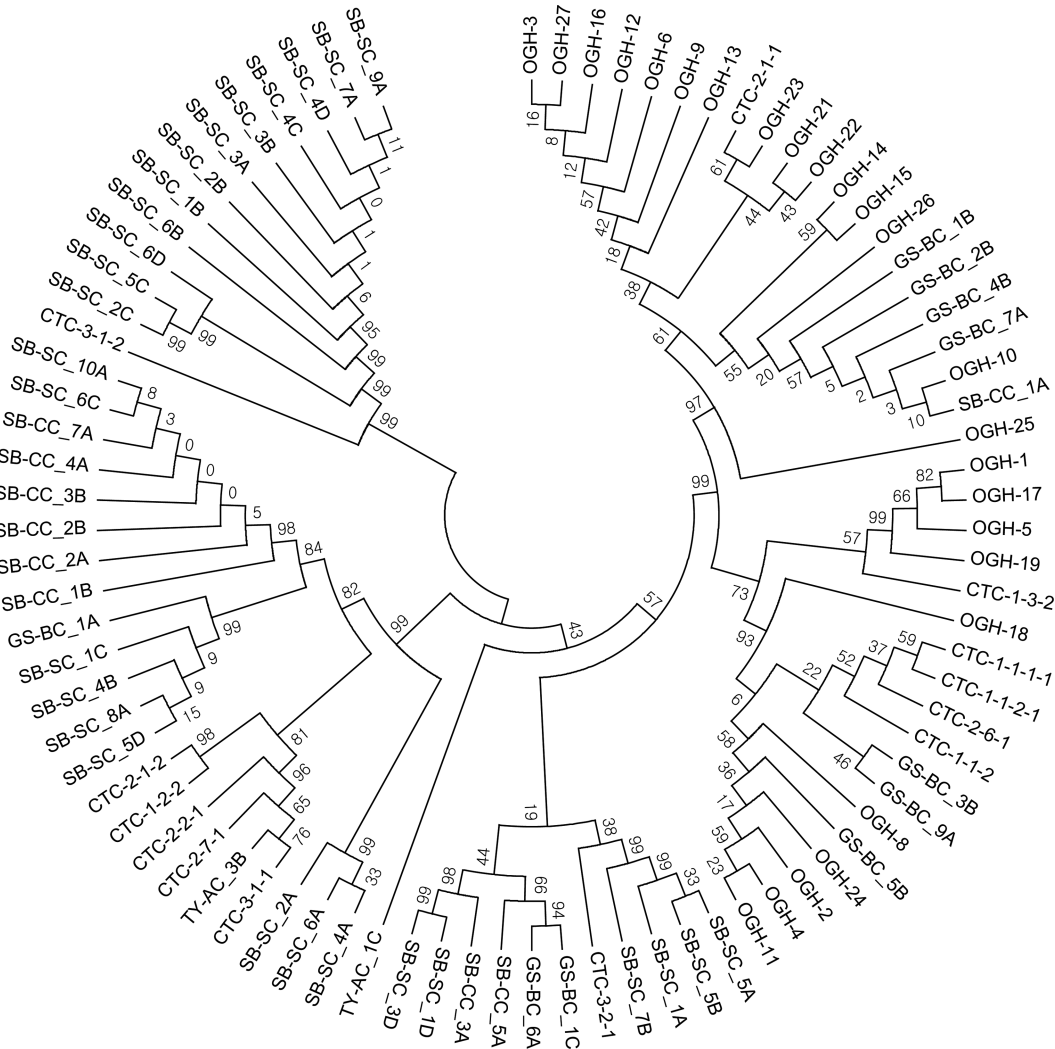


Fig. 1. Evolutionary relationships of taxa by using the 16S rDNA sequences of bacteria from the fermented seafoods. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 0.90619112 is shown. The percentage of replicate 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 86 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There was a total of 973 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al., 2013).

는 3균주, lipase 활성을 보이는 9균주, protease 활성을 보이는 27균주를 확보하였고, 이 중 두 가지 이상의 효소 활성을 가지는 19균주도 확인되었다. 특히 cellulase 활성을 보이는 3균주(*Vibrio rumoiensis* SB-SC 1B, 3B 및 *V. littoralis* SB-SC 6B)는 순천만 간장 계장에서 분리된 *Vibrio* sp. 이었다. 해양 서식처에 널리 분포하는 *Vibrio*는 현재 70종 이상이 보고되었으며 그 개체 수는 해마다 빠르게 증가하고 있다(Park et al., 2003). 최근 다른 종의 *Vibrio*로부터 cellulase가 분리되어 특성이 규명되었다는 보고와 함께 알코올 발효(맥주, 주정), 생선가공, 동물사료 등 다양한 식품산업에 적용 가능할 것으로 생각된다(Li et al., 2003). 또한 육신 생산능을 확인한 결과, 2균주(*Psychrobacter*

celer SB-SC 2C와 *Micrococcus luteus* CTC-3-1-2)에서 생산능이 확인되었으며 순천만 간장 계장과 조개맛 오이에서 각각 분리된 *Psychrobacter celer*와 *Micrococcus luteus* 모두 생산능이 매우 높은 것을 알 수 있었다. 이는 식물 생장을 촉진시킬 수 있는 미생물비료 연구에 활용할 수 있는 미생물 탐색 소재로서의 활용가치가 높을 것으로 예상된다. 본 연구에서 수행한 결과들은 국내 미생물 생물 자원의 다양성 확보 차원에서 큰 의미를 찾을 수 있을 것이며 국내외 해양유래 발효산물로부터 분해 효소 탐색을 위한 신균주의 활용 가능성과 산업용 효소 관련 생물공학 및 미생물비료 연구의 기본 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 국내의 해양유래 발효산물 시료로부터 분리한 호염성 미생물들의 다양성 및 특성에 관하여 조사하였다. 호염성 미생물의 순수 분리를 위하여 marine agar 배지를 사용하였으며 25, 37, 50°C에서 호기적으로 배양하였다. 순수 분리 후, 86균주를 분리하였으며 16S rRNA 염기서열 분석 결과를 바탕으로 계통학적 분석을 실시한 결과, 3문, 7과, 9속, 24종으로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 특히 Firmicutes문 Bacilli강은 84.9%의 분포를 나타내었으며 4과, 6속, 19종으로 Bacillaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae와 Enterococcaceae로 분포하는 것을 확인하였다. 그리고 분리한 균주들이 amylase, lipase, cellulase, protease 같은 산업적으로 유용한 효소를 생산하는지 확인하기 위하여 효소 활성 평가를 실시하였으며, 55 균주가 최소 한 종류 이상의 효소 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 육신 생산능을 가지는 균주도 2 균주가 확인되었으며 이는 본 연구를 통하여 분리한 미생물들의 산업적 활용 가능성을 나타내었다. 그러므로 이번 연구는 국내 유전자원 확보 및 시료의 호염성 미생물의 다양성과 특성에 관한 과학적 지식 확장에 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 한국연구재단 이공분야기초연구사업(NRF-2019R1F1A1060737), 2020년도 신진연구지원사업(NRF-2020R1C1C1006299) 및 2013년도 바이오·의료기술개발사업(NRF-2013M3A9A5076603)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

Blaiotta G, Pennacchia C, Villani F, Ricciardi A, Tofalo R, Parente E. 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J. of Appl. Microbiol.* 97: 271-284.

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

Giyatmi, Irianto HE. 2017. Enzymes in Fermented Fish. *Adv. Food Nutr. Res.* 80: 199-216.

Guan L, Cho KH, Lee JH. 2011. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.* 28: 101-113.

Hur SH. 1996. Critical Review on the Microbiological Standardization of Salt-Fermented Fish Product. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 885-891.

Lee KH. 1969. Microbiological and Enzymological Studies on the Flavor Components of Sea Food Pickles. *J. Appl. Biol. Chem.*

11: 1-27.

Li X, Dong X, Zhao C, Chen Z, Chen F. 2003. Isolation and some properties of cellulose-degrading *Vibrio* sp. LX-3 with agar-liquefying ability from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 375-379.

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.

McCarthy PJ, Pomponi SA. 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Marine Biomed. Res.* 22: 1-2.

Mehub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. 2014. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Mar. Drugs.* 12: 4539-4577.

Nam YD, Seo MJ, Lim SI, Lee SY. 2012. Genome Sequence of *Lysinibacillus boronitolerans* F1182, Isolated from a Traditional Korean Fermented Soybean Product. *J. Bacteriol.* 194: 5988.

Park PJ, Lee HK, Kim SK. 2003. Preparation of Hetero-Chitooligosaccharides and Their Antimicrobial Activity on *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 41-47.

Park WJ, Lee SH, Lee HJ. 2017. Antibacterial and Proteolytic Activities of Bacterial Isolates from Ethnic Fermented Seafoods in the East Coast of Korea. *Food Eng. Prog.* 21: 88-92.

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. U.S.A.* 101: 11030-11035.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Fillipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.

Yang WS, Lim HS, Chung KT. 2005. Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Pickled Anchovy. *J. Life Sci.* 15: 434-438.

Zang J, Xu Y, Xia W, Regenstein JM. 2020. Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60: 1228-1242.

Author Information

정가을: 신라대학교 바이오식품공학 대학원생(석사과정)
 간빔 다리마: 신라대학교 바이오식품공학 대학원생
 (박사과정)
 염유정: 신라대학교 바이오식품공학 대학원생(석사과정)
 최보경: 신라대학교 바이오식품공학 대학원생(석사과정)
 이한승: 신라대학교 바이오식품공학 교수
 박미화: 신라대학교 식품영양학과 조교수
 신기선: 한국생명공학연구원 책임연구원
 이용직: 서원대학교 BIT융합대학 바이오코스메틱학과
 조교수
 이상재: 신라대학교 바이오식품공학 부교수