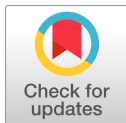


Research Article

참조기 내장에서 분리한 균주들의 옥신과 세포외 가수분해효소 활성 분석

김명기¹ · 이상재^{2*} · 이용직^{3*}

¹서원대학교 식품공학과, ²신라대학교 바이오식품공학과, ³서원대학교 바이오코스메틱학과



Analysis of Auxin Productivity and Activity of Extracellular Hydrolases of Bacteria Isolated from a Gut of *Larimichthys polyactis*

Myong Ki Kim¹, Sang-Jae Lee^{2*} and Yong-Jik Lee^{3*}

¹Department of Food Science & Engineering, Seowon University, Cheongju 28674, Korea

²Department of Food Biotechnology, Silla University, Busan 46958, Korea

³Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, Cheongju 28674, Korea

Received: May 30, 2023

Revised: Jun. 28, 2023

Accepted: Jul. 6, 2023

*Corresponding author :

Yong-Jik Lee

Department of Bio-Cosmetics,
Seowon University, Cheongju
28674, Korea.

Tel: +82-43-299-8496,

Fax: +82-43-299-8490

E-mail: yjlee75@seowon.ac.kr

Sang-Jae Lee

Department of Food
Biotechnology, Silla University,
Busan 46958, Korea.

Tel: +82-51-999-5447,

Fax: +82-51-999-5458

E-mail: sans76@silla.ac.kr

ORCID

Myong-Ki Kim

<https://orcid.org/0000-0002-2956-7006>

Yong-Jik Lee

<https://orcid.org/0000-0002-0047-2302>

Sang-Jae Lee

<https://orcid.org/0000-0002-9516-3165>

Abstract

This research focused on the isolation and characterization of the new strains which can be used as microbial resources for auxin production in the agriculture industry. For the isolation of the new microorganism in the gut of *Larimichthys polyactis*, a marine agar medium was used and 3 colonies were isolated. Through the 16S-based ID service, isolated strains were identified as 1 strain of *Niallia circulans* and 3 strains of *Proteus mirabilis*. Verifying the agriculture industrial values of these isolated strains, the productivity of auxin and activity of various enzymes such as amylase, lipase, and protease were confirmed. As a result, isolated 3 strains showed auxin activity and only protease activities which means the possibility of applying them to the production of effective microorganisms in the agriculture industry.

Keywords

Niallia circulans, auxin, gut, activity, enzyme

서 론

프로바이오틱스(probiotics)는 정해진 양만큼 사람이 섭취하였을 경우, 인체에 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물로 유산균이 가장 대표적이며, 일부 *Bacillus* sp. 균주들이 프로바이오틱스로 활용되고 있다(Kim and Park, 2021). 또한, *Bacillus* sp. 일부 균주들은 농업 분야에서 미생물제제로 많이 활용되고 있으며, 유산균, 효모, 광합성세균, 방선균 등도 이용되고 있다. 이들 균주들은 식물 성장, 병충해 예방 및 생산성 증대를 위한 농업과 임업 분야, 육질 개선 및 악취 개선을 위한 축산과 어업 분야, 악취 제거 및 수질 정화 등의 환경 분야에서 다양하게 활용되고 있다(Moon, 2011). 하지만 프로바이오틱스로 사용 가능한 *Bacillus* sp. 균주의 식물생장조절로서 농업 분야에 활용 가능성을 높이기 위한 천연 호르몬 생산과 관련된 연구는 미미하다(Jung *et al.*, 2006, Jung *et al.*, 2007).

현재 농업에서 사용 중인 대표적인 식물의 생장 조절 호르몬은 옥신(auxin)이며, 천연적으로 존재하는 옥신은 indole-3-acetic acid (IAA)와 indole butyric acid (IBA)이고, 인공적으로 합성된 옥신은 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D)와 naphthalene acetic acid (NAA)가 있다. 옥신의 주요 기능은 줄기 끝의 분열 조직과 어린잎에서 생성, 생장 촉진, 각 기관 사이의 조화 유지, 세포벽을 신장시켜 길이 생장 촉진, 결눈의 생장 억제, 열매의 생장과 발근 촉진, 낙엽과 낙과 방지 등 적정 농도에서 식물에 이로운 작용을 하지만, 지나치게 많으면 생장을 억제한다. *Rhizobium* 균이 옥신을 생산한다는 보고(Kwon et al., 2004) 이후 *Aeromonas veronii* (Mehnaz et al., 2001), *Arthrobacter* sp. (Kim et al., 2022), *Azotobacter* sp. (Joshi et al., 2006), *Bacillus* sp. (Jung et al., 2006; Jung et al., 2007), *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* sp. (Anrout et al., 1998), *Klebsiella mobilis* (Bak et al., 2010), *Pseudomonas* sp. (Kang and Cho, 2014) 등 다양한 균의 옥신 생성 활성에 대한 연구결과가 보고되고 있다.

또한 가수분해효소 중에서 protease는 펩타이드 제조, 주류의 청징, 품질 증진용으로 사용되고 있고, lipase는 식품뿐만 아니라 산업폐기물처리 화장품 산업에서 이용되고 있으며, amylase는 전분을 이용하여 텍스트린, 올리고당 등을 제조하는 데 많이 사용하는 효소로 알려져 있다.

본 연구에서는 삼천포 수산자원 중 참조기 내장에서 호기적으로 세균을 분리하고 동정하였으며, 옥신 생성 활성을 측정하여 식물의 미생물 생육조절 호르몬 생산 균주로서의 활용 가능성과 함께 가수분해효소 활성을 평가하여 식품산업에 효소 생산 균주로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

세균 분리 및 배양

경남 삼천포의 참조기에서 분리한 내장 시료로부터 호염성 세균 분리를 위해 샘플을 멸균된 0.85% 생리식염수에 첨가하여 현탁한 후 샘플 1 mL를 사용하여 10^{-1} ~ 10^{-4} 배로 serial dilution한 후 희석액을 준비하였다. 희석한 샘플로부터 균을 분리하기 위한 증균 배지로 marine broth (BD, USA) 배지에 agar를 첨가한 고체배지를 제작하였으며, 희석액을 도말하고 37°C에서 호기적으로 정치배양하였으며, 동일한 고체배지를 사용하여 추가적인 single colony 분리를 수행하여 최종적으로 순수배양체를 획득하였다.

순수 분리된 균주들이 complex 배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여 nutrient agar (BD, USA), R2A agar (BD, USA)와

tryptic soy agar (BD, USA)에 각각 평판 도말법을 이용하여 접종하고, 37°C에서 7일간 정치배양을 하였다. 또한, 분리된 균주들이 호염성 균주로써 바닷물의 염 농도와 유사한 3% NaCl 농도와 그 이상의 NaCl 농도에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 3%와 9% NaCl을 첨가한 배지를 제작하여 분리 균주들의 생육을 확인하였으며, 최적 생육 pH를 확인하기 위하여 pH를 4.0, 7.0, 9.0으로 각각 조절한 marine agar 배지에서 분리 균주들의 생육을 확인하였다. 추가적으로, 분리된 균주들의 배양 온도에 대한 생육 가능 유무를 확인하기 위해 같은 배지를 사용하여 균주들을 희석 도말법으로 접종한 후 순수 분리 실험 시 설정한 37°C를 기준으로 낮은 온도(30°C)와 높은 온도(40°C, 45°C)로 조정된 배양기에서 정치배양을 통해 생육 가능 배양 온도를 확인하였다.

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

경남 삼천포의 참조기에서 분리한 내장 시료로부터 호기적 배양 조건에서 순수 분리된 균주들의 분자생물학적 동정을 위해 marine 고체배지에 각각 분리된 균주의 colony가 배양된 상태의 고체 배지를 (㈜바이오팩트에 보내 universal primers (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYT-ACCTTGTACGACTT-3')를 사용한 16S rDNA 염기서열의 분석을 의뢰하였으며, 분석된 16S rDNA 염기서열(약 1.5kb)로부터 가장 유사한 근연 균주의 확인을 위하여 (㈜천랩의 웹 기반 분석 데이터베이스인 EzBioCloud에 접속하여 16S-based ID 분석 앱 (<https://www.ezbiocloud.net/>)을 사용하였다.

옥신(Auxin) 생성능 분석

분리된 균주의 옥신 생성능은 0.1% L-tryptophan이 첨가된 Nutrient broth (BD, USA) 배지에 순수 분리된 콜로니를 tooth-picking 한 후 37°C에서 7일간 배양하여 원심분리(13,000 rpm, 5 min)를 수행하였다. Salkowski 시약(35% HClO₄ 50 mL + 0.5 M FeCl₃ 1 mL) 800 μ L를 배양 상등액 400 μ L에 섞어준 후 어두운 곳에서 30 min 반응시켜 흡광도(535 nm)를 측정하여 옥신 생성 활성을 확인하였다.

세포외 분해 효소 생산능 분석

분리된 세균들의 세포외 분해 효소 amylase, lipase, protease 생산능을 확인하기 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 amylase 생산능은 0.2% soluble starch (BD, USA)를, lipase 생산능은 1% Tween 80 (Sigma, USA)을, protease 생산능은 2% skim milk

(BD, USA)를 기질로 선택하여 marine agar (BD, USA) 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며, 분리된 균주를 직접 접종하여 37°C에서 7일 배양한 후 투명환(clear zone)의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소 활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 접종균 주위의 투명환의 크기(+++ : > 7 mm, ++ : 4~7 mm, + : 1~4 mm)로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 배양

경남 삼천포 참조기 내장으로부터 균을 분리하기 위해 marine agar 배지에 희석한 시료를 도말하였다. 배양된 colony를 다시 동일한 고체배지를 사용하여 2차로 single colony를 분리한 결과, 3종류의 균을 순수하게 분리하여 M311, M343, M344로 나타냈다(Table 1). 분리된 균주의 최적의 생육 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 4.0, 7.0, 9.0으로 각각 조절한 marine agar 배지에 분리 균주들의 생육을 확인한 결과, 분리된 모든 균주가 pH 7.0 이상에서는 생육이 가능하였으나, pH 4.0 조건에서는 생육이 확인되지 않았다(Table 1). 또한 분리된 균주가 호염성 미생물로 높은 염 농도에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 3 및 9% NaCl을 각각 첨가한 배지를 제작하여 분리 균주들의 생육을 실험한 결과, 모든 분리 균주들은 3% NaCl 조건에서도 생육이 가능하여 분리된 균주가 모두 호염성 세균의 특성을 가지고 있음을 확인하였으며, M343과 M344 균주의 경우 9% NaCl 첨가 농도에서도 생육이 가능한 것으로 확인하였다(Table 1). 또한, 참조기 내장에서 분리한 균주들의 배양학적 측면에서의 산업적 활용 가능성을 확인하고자 complex 배지에서의 생육 가능성을 확인하였다. 실험 결과, 테스트한 3종류의 complex 배지(nutrient agar, R2A agar, tryptic soy agar)에서 분리 균주들의 정상적인 생육이 가능한 것을 확인하였다(Table 1). 이 결과는 본

연구에서 분리된 균주들의 농업 분야 등과 같이 산업적으로 활용하기 위해 추가적인 배지 성분의 최적화와 같은 배양학적 측면에서의 연구개발과정은 줄일 수 있을 것으로 판단되었다. 추가적으로 분리된 균주들이 나타내는 배양 온도 특성을 확인하기 위해 45°C에서 정치배양한 결과, 분리 균주 모두 45°C에서는 생육이 가능한 것으로 확인되었다.

16S rDNA 염기서열 분석을 통한 분리 균주 동정

분리된 3균주의 colony가 각각 배양된 상태의 고체 배지를 균 동정을 위한 분석 서비스가 가능한 분석회사에 송부하여 분석을 의뢰하고 염기서열을 분석한 결과, M311 균은 *Niallia circulans*, M343과 M344 균은 모두 *Proteus mirabilis*로 확인되었다(Table 2). M343과 M344균은 *P. mirabilis*와의 유사도가 각각 99.86%로 높게 나타났으나, M311균의 경우 *N. circulans*와의 유사도가 95.15%로 다소 낮은 유사도를 보였으며, 이는 신 균주일 가능성도 있을 것으로 판단되었다. *N. circulans*는 *Bacillus circulans*로 2020년 *Bacillus* 속에서 *Niallia* 속으로 재 분류되어 명명된 속으로 Bacillaceae 과의 균(Gupta *et al.*, 2020)이며, 같은 과, 속의 종으로 향후 이에 대한 연구가 더 필요한 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 분리한 모든 균주들은 Kribb 미생물가치 제고사업단에 기탁하였다(Table 2).

옥신 생산능과 세포외 분해효소 활성능 분석

Fig. 1에서 나타낸 것처럼 분리된 3균주의 농업적 활용 가능성을 확인하기 위해 옥신 생성 활성을 평가한 결과, *N. circulans* M311에서 1.635로 가장 높은 옥신 생성 활성을 보였다(Table 3). *P. mirabilis* M343과 *P. mirabilis* M344는 각각 1.192와 1.368의 *N. circulans*보다 낮은 옥신 생성 활성을 보였다. 가장 높은 옥신 생성 활성을 보인 *N. circulans*균주의 경우, 2022년에 Sarmiento-López 등의 연구에 따르면 *N. circulans* E9을 pea

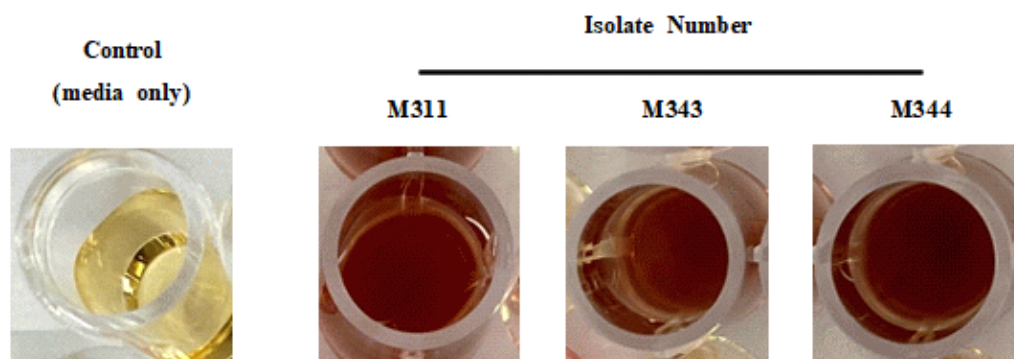
Table 1. Isolation and identification of aerobically cultured bacteria isolated from the gut of *L. polyactis* in Samcheonpo

No	Isolate number	Media			MA ⁺							
		NA [#]	R2A	TSA	pH			NaCl (%)		Temp. (°C)		
					4	7	9	3	9	30	40	45
1	M311	+ ^a	+	+	- ^b	+	+	+	-	+	+	+
2	M343	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3	M344	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

[#]: Nutrient agar, ⁺: Marine agar, ^a: Well growth, ^b: No growth.

Table 2. Identification of an aerobically cultured bacteria isolated from the gut of *L. polyactis* in Samcheonpo

No	Isolate number	Closed strain	Top-hit strain	Similarity (%)	Deposited number
1	M311	<i>Niallia circulans</i>	ATCC 4513(T)	95.15	NMC8-B319
2	M343	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	99.86	NMC8-B352
3	M344	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	99.86	NMC8-B353


Fig. 1. Confirmation of auxin production by using cultured media of isolated strains.

fluor medium (PYM)에서 배양한 결과, IAA 생성량이 증가되었다고 하는 보고(Sarmiento-López *et al.*, 2022)가 있었던 것처럼 분리된 *N. circulans* M311의 배양 배지 성분 중 탄소원이나 배양 조건을 달리하여 옥신 생성 활성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되며, 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. *P. mirabilis* M343과 *P. mirabilis* M344는 16S rDNA 분석 결과에서는 종과 속이 같은 균으로 확인되었으나, 염 농도에 대한 생육 특성이나 옥신 생성 활성이 차이가 나는 것으로 보아, 정확한 동정을 위해서 추가적인 전장유전체 분석 등이 필요할 것으로 생각된다. *P. mirabilis*의 경우, *P. mirabilis* PD25 균주에서 옥신의 한 종류인 IAA 생성능이 있으며, 밀에 직접 처리하여 생육을 확인한 결과, 농작물 성장에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다(Verma *et al.*,

2021). 본 연구를 통해 분리한 3균주도 농업 분야에서의 식물성장조절제 생산 유용 균주로서의 활용 가능성은 있을 것으로 판단된다. 추가적으로 분리된 3균주의 세포외분비 가수분해효소들의 활성을 평가한 결과, amylase, lipase의 활성은 나타나지 않은 반면, protease 효소의 활성은 2균주의 *P. mirabilis* M343과 *P. mirabilis* M344에서 우수한 결과를 보였으며, *N. circulans* M311은 *P. mirabilis* M343과 M344보다 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다(Table 3). 하지만 protease 효소는 알러지 반응과 내열성의 이유로 산업적으로 *Bacillus* 속 균주가 활용되어지는 경우(Kook *et al.*, 2011)가 많아 효소 활성 부분은 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서 분리한 균주는 국내 어류 내장 치료로부터 분

Table 3. The production profile of auxin and extra-cellular enzymes of an aerobically cultured bacteria isolated from the gut of *L. polyactis* in Samcheonpo

No	Isolate number	Closed strain	Auxin productivity (A ₅₃₅) [§]	Extracellular enzyme activity		
				Amy [#]	Lip ^{&}	Pro [*]
1	M311	<i>Niallia circulans</i>	1.635	- ^a	-	++
2	M343	<i>Proteus mirabilis</i>	1.192	-	-	+++
3	M344	<i>Proteus mirabilis</i>	1.368	-	-	+++

[§]: Absorbance 535nm, [#]: Amylase, [&]: Lipase, ^{*}: Protease, ^a: No activity.



리한 옥신 생산 활성과 함께 protease 활성을 갖는 프로바이오틱스 자원의 농업 분야에서의 활용 가능성을 검증했다는 측면과 함께 국내 농생명 자원의 다양성 확보 차원에서 의미를 찾을 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 산업적 응용에서 옥신 생산을 위한 미생물 자원으로 이용될 수 있는 새로운 균주의 분리과 특성 분석을 위해 수행되었다. 국내 참조기 내장으로부터 새로운 미생물을 분리하기 위해 marine agar를 사용하였으며, 3균주를 분리하였다. 16S-based ID 분석 프로그램으로 동정한 결과, 분리 균주들은 1균주의 *Niallia circulans*와 3균주의 *Proteus mirabilis*로 확인되었다. 분리한 균주들의 산업 활용을 위하여 옥신 생산 활성과 amylase, lipase, protease와 같은 가수분해효소 생산 활성을 확인하였다. 그 결과, 3균주 모두 옥신 생산과 protease 효소의 활성을 나타내었으며, 이는 농업 분야에서의 미생물제재로의 생산 가능성을 확인한 결과를 나타낸다.

사 사

이 논문은 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0, 2023-90-017)과 사천시의 재원으로 사천시미생물발효재단의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Anroun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R and Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*. **204**, 57-67.
- Bak HS, Jung YP and Yoon MH (2010) Isolation and characterization of the auxin producing plant growth promoting *Rhizobacterium* from soil in a ginseng field. *J. Agric. Sci*. **37**, 377-382.
- Gupta RS, Patel S, Saini N and Chen S. (2020) Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the subtilis and cereus clades of species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 5753-5798.
- Joshi, KK, Kumer V, Dubey RC, Masheshwari DK, Bajapai VK and Kang SC (2006) Effect of chemical fertilizer-adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 and *Azotobacter chroococcum* ACI, on *Macrophomia paseolina* causing charcoal rot of *Brassica juncea*. *Kor. J. of Envir. Agri.* **25**, 228-235.
- Jung, HK, Kim JR, Woo SM and Kim SC (2006) An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 94-100.
- Jung, HK, Kim JR, Woo SM, and Kim SC (2007) Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *Appl. Biol. Chem.* **50**, 23-28.
- Kang YM and Cho KM (2014) Identification of auxin from *Pseudomonas* sp. P7014 for the rapid growth of *Pleurotus eryngii* mycelium. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 15-21.
- Kim BY and Park SS (2021). The concepts and applications of postbiotics for the development of health functional food product. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics*. **7**, 14-22.
- Kim DS, Shin HY and Han SI (2022) Isolation of indole-3-acetic acid (IAA) producing *Arthrobacter* sp. and plant growth promotion effect. *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **39**, 831-838.
- Kook MC, Cho SC, Park H, Kim SS, Pyun YR, Choi YW and Lee HY (2011) Protease activity of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food. *Food Eng. Pro.* **15**, 182-187.
- Kwon DH, Choi JH, Jung HK, Lim JH, Joo GJ and Kim SD (2004) Selection and identification of auxin-producing plant growth promoting *Rhizobacteria* having phytopathogen-antagonistic activity. *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **47**, 17-21.

12. Mehnaz S, Mirza MS, Haurat J, Bally R, Normand P, Bano A and Malik KA (2001) Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* **47**, 110-117.
13. Moon YH, Lee KB, Kim YJ, and Koo YM (2011) Current status of EM (effective microorganisms) utilization. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **26**, 365-373.
14. Sarmiento-López LG, López-Meyer M, Maldonado-Mendoza IE, Quiroz-Figueroa FR, Sepúlveda-Jiménez G, and Rodríguez-Monroy M (2022) Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* **134**, 21-28.
15. Verma S, Verma R, Verma P, Bharti C, and Arora NK (2021) Salt tolerant endophytic and diazotrophic strain of *Proteus mirabilis* Pd25 and its effect on the growth of wheat under saline conditions. *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, **8**, 13172 -13183.