

Research Article

목초액에서 분리한 *Cytobacillus* 속 2균주의 특성 연구

조석철¹ · 이용직^{2*}

¹서원대학교 식품공학과

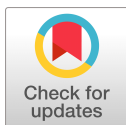
²서원대학교 바이오코스메틱학과

Characterization of the 2 Strains of *Cytobacillus* Species, Isolated from the Wood Vinegar

Seok-Cheol Cho¹ and Yong-Jik Lee^{2*}

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

²Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, Cheongju 28674, Korea



Received: Nov. 22, 2022

Revised: Dec. 13, 2022

Accepted: Dec. 15, 2022

*Corresponding author :

Yong-Jik Lee

Department of Bio-Cosmetics,
Seowon University, Chungju,
Chungbuk 28674, Korea.

Tel: +82-43-299-8496

Fax: +82-43-299-8490

E-mail: yjlee75@seowon.ac.kr

ORCID

Seok-Cheol Cho

<https://orcid.org/0000-0001-7546-5089>

Yong-Jik Lee

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

Abstract

This study aimed to isolate and identify the new strains which can be utilized in fermentation process for the production of functional materials. Isolation of the new microorganism in wood vinegar, natural liquid material generated from the carbonization of various trees was studied. Marine agar medium was used for the isolation of halo-tolerant bacteria. Using a sterilized toothpick, transfer same shape colonies to agar plates and continuous cultivation of colonies at 37°C for several days, 2 colonies were isolated. Through the 16S-based ID service, isolated strains were identified as *Cytobacillus* species. Verifying the industrial values of the two isolated strains, the productivities of various enzymes such as amylase, lipase, and protease were confirmed. As a result, isolated 2 strains showed amylase and protease activities which means the possibility of applying to biological processes in the food and cosmetic industries.

Keywords

wood vinegar, halo-tolerant, isolation, enzyme, *Cytobacillus*

서 론

우리나라의 다양한 발효식품은 과거에서 현재까지 우리에게 맛과 영양을 제공하는 것은 물론 발효 중 생산되는 다양한 생리활성 물질에 의하여 건강 기능조절 역할을 하는 경우가 많다. 기본적으로는 미생물의 가수분해효소 등에 의해 분해된 작은 크기의 분자들은 소화 흡수율을 증가시키며 높은 염 농도의 발효과정에서 다양한 생리활성을 보유한 대사산물을 생성하게 된다(Leroy and De Vuyst, 2004; Wallace *et al.*, 2011). 또한, 호염성 발효 조건에 이용되는 미생물의 경우, 이러한 미생물들이 생산하는 단백질 가수분해효소는 일반적으로 염 농도가 상대적으로 높은 수산업에서 발생하는 부산물을 활용한 피쉬 콜라겐 등과 같은 기능성 소재 개발 분야에 활용될 가능성이 있기에 호염성 미생물을 분리하거나 이들이 생산하는 가수분해효소 생산능력을 검증을 통한 이를 활용하는 방법이 연구되고 있다(Mayuri

et al., 2019).

장내 미생물의 경우, 대사산물의 역할에 의해 건강을 유지시키는 중요한 역할을 하며(Marcial et al., 2017; Schroeder et al., 2018), 균주가 보유한 다양한 기능성 물질의 생산능력에 따라 분류되기도 한다(Thaiss and Elinav, 2017). 또한, 질병 치료에 있어 수많은 장내 미생물들의 probiotics로서의 역할은 강조되고 있다(Yadav et al., 2018; Yadav and Chauhan, 2022). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* 속의 다양한 균주들이 중요한 probiotics로 사용되고 있으며, *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* 등이 상업적인 probiotics로 활용되고 있으나(Lee et al., 2019), 장내 미생물의 대부분은 그들이 가진 질병 치유 능력에도 불구하고 사용되지 못하고 있는 실정이다. 최근 지속되고 있는 장내 미생물의 분리 연구에서는 기존의 probiotics로 분류되지 않았던 *Cytobacillus* 속의 균주가 동정되어 그 기능성에 대한 연구가 진행되기도 하였다(Monika et al., 2022).

최근 산업적으로 가치가 높은, 열악한 반응 조건에서 활성을 나타낼 수 있는 극한 미생물에 관한 관심이 높아지고 있고 이에 관한 연구도 많이 진행되고 있으며(Tango and Islam, 2002), 이들이 생산하는 효소는 고분자의 분해에 유리한 극한 조건에서 활성을 유지함으로써 산업적으로 다양하게 활용이 가능하다(Cho, 1989). 최근 Lee(2021)의 연구에 따르면 강원도 경원 참숯가마에서 숯가마 주변의 토양 시료로부터 호염성 고온균 5균주를 호기적 배양을 통해 순수분리하여 이들이 생산하는 가수분해효소 활성을 검증하였다. 목초액은 일반적으로 참숯가마에서 참나무류 속 수종이나 소나무 등의 목재를 고온(400–700℃)에서 탄화시키는 과정에서 발생하는 연기와 수증기를 포집하여 냉각, 응축한 후 이를 정제한 담갈색의 액상 물질이다(Jun et al., 1998). 농업 분야나 환경 분야에서 병충해 방지, 토양살균이나 개량, 유용 미생물의 증식 효과나 식물 생장촉진 등과 같은 여러 가지 효능이 있는 것으로 밝혀져 널리 이용되고 있으나(Lee et al., 1999; Lee et al., 2004), 목초액에 존재하는 세균의 분리 및 동정 관련 연구는 거의 알려지지 않고 있다.

본 연구에서는 발효를 통한 기능성 소재의 생산에 최적화된 호염성 미생물을 목초액으로부터 분리하여 균주의 생리학적 특성을 확인하고 동정을 진행하였으며 식품 분야에서 probiotics 균주로의 활용이나 화장품 산업에서 천연물의 발효를 통한 기능성 소재 개발을 위한 발효 균주로서의 산업적 응용이 가능한지를 탐색하기 위해 산업적으로 가장 빈번하게 사용되는 amylase, lipase, protease 가수분해 효소의 활성을 측정하였다. 또한, 목초액은 식물 생장촉진 효과를 보유하고 있으며 미생물에 의해 식물호르몬 auxin의 생산

이 유도될 수 있다는 연구(Jung et al., 2006, 2007)에 따라 식물 생육촉진 기능의 유기농 소재의 생산에 분리 균주의 활용 가능성을 확인하기 위한 auxin 생산능을 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

강원도에 위치한 경원 참숯가마에서 판매하는 강원도산 참나무속(*Quercus* spp.) 목재의 재래식 전통 숯가마 목초액으로부터 균주를 분리하기 위해 목초액을 멸균된 0.85%(w/v) 식염수를 사용하여 현탁하였다. 현탁한 시료 1 mL를 증류수를 사용하여 10–10⁴배로 단계 희석한 후, 액상의 소재에서 생육하는 호염성 균주의 생육에 적합한 marine agar(BD Difco™, USA) 배지를 사용하여 희석액을 도말한 후 37℃에서 호기적으로 배양한 후 동일한 배지에서 추가적으로 single colony isolation을 수행하였다. 그리고 분리된 균주의 복합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여, nutrient agar(BD Difco™, USA), R2A agar(BD Difco™, USA) 및 tryptic soy agar(BD Difco™, USA)에 희석 도말법을 이용하여 37℃에서 7일간 정치 배양하였다. 그리고 분리된 균주들이 호염성 균주로서 3%, 6%와 9% NaCl 농도에서의 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 3%, 6%와 9% NaCl을 첨가하여 분리 균주들의 생육을 확인하였으며 최적의 생육 pH를 확인하기 위하여 pH를 5, 7, 9로 각각 조절한 marine agar 배지에서의 생육을 확인하였다. 또한, 분리된 균주들이 고온에서의 생육가능성을 확인하기 위하여 동일한 배지를 사용하여 균주들을 희석 도말법으로 접종한 후 37℃, 45℃와 55℃에서 살펴보았다.

균주의 동정

목초액 시료로부터 호기적 배양 조건에서 분리된 균주들의 동정을 위하여 유전자 증폭은 universal rRNA gene primer(27F and 1492R)를 사용하였으며, 16S rRNA 염기서열 분석은 (주)바이오팩트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 분석된 16S rRNA sequence의 염기서열 data는 National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST search program을 이용하여 DNA database와 비교하여 동정하였다.

분해 효소 생산능

분리된 균주들의 산업적 응용을 위한 amylase, lipase, protease 생산능을 확인하기 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 amylase 생

산능은 0.2% soluble starch(BD Difco™, USA)를, lipase 생산능은 1% Tween 80(Sigma-Aldrich, USA)을, protease 생산능은 2% skim milk(BD Difco™, USA)를 기질로 선택하여 marine agar 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며 분리된 균주를 2 μ L 점적하여 37℃에서 7일 배양한 후 투명환(clear zone)의 직경으로 활성을 확인하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 점종균 주위의 투명환의 지름의 크기로 판별하였다(+++ : > 7 mm, ++ : 4~6 mm, + : 1~3 mm).

옥신(Auxin) 생산능

분리된 균주의 auxin 생산능은 0.1% L-tryptophan(Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 marin broth(BD Difco™, USA)에 순수 분리된 콜로니를 접종한 후 37℃에서 5일 배양하여 Salkowski 시약 [35%(w/v) HClO₄(Sigma-Aldrich, USA) 50 mL+0.5 M FeCl₃(Sigma-Aldrich, USA) 1 mL] 800 μ L를 배양 상등액 400 μ L에 혼합한 후 어두운 곳에서 30 min 반응시켜 육안으로 확인한 붉은색 변화 정도에 따라 옥신 생성능을 표시하였다(짙은 붉은색: +++; 일반 붉은색: ++; 옅은 붉은색: +; 주황색: w; 무색: -).

결과 및 고찰

균주 분리 및 배양

목초액 시료에서 생육하는 균주의 분리를 위하여 marine agar 배지에 희석한 시료를 도말하여 배양된 콜로니를 다시 동일한 고체배지를 사용하여 2차로 단일 콜로니를 분리한 결과 2종류의 균주를 순수하게 분리할 수 있었다(Table 1). 분리된 균주의 최적의 생육 pH 조건을 확인하기 위하여 pH를 5, 7, 9로 각각 조절한 marine agar 배지에 분리 균주들의 생육을 확인한 결과, 분리된 모든 균주가 pH 7 이상에서는 생육이 가능하였으나, pH 5 조건에서는 약한 생육이 확인되었으며, 이는 분리 균주가 약산성 조건에서의 생육이 가능함을 알 수 있었다(Table 1).

또한, *Cytobacillus firmus* 균주의 경우 높은 염 농도에서도 생육이 가능한 호염성 균주라는 보고(Guffanti *et al.*, 1980)에 따라 분리된 균주가 호염성 미생물로 높은 염 농도에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 3%, 6%와 9% NaCl을 각각 첨가한 배지를 제작하여 분리 균주들의 생육을 실험한 결과, 모든 분리 균주들은 9% NaCl 조건에서도 생육이 가능하여 분리된 균주가 모두 호염성 세균의 특성을 가지고 있음을 확인하였으며, 이 결과는 기존에 보고되어져 있는 *Cytobacillus firmus* 균주와 일치하는 특성을 나타내었다(Guffanti *et al.*, 1980).

Marine agar는 구성성분의 대부분이 무기염으로 미생물 대량 배양에 적용하기에는 적합하지 않으므로 분리 균주들의 산업적으로 사용되는 복합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여 몇 종류의 복합배지(nutrient agar, R2A agar, tryptic soy agar)에서 분리 균주들을 배양한 분리된 2균주 모두 tryptic soy agar에서만 정상적인 생육이 가능한 것을 확인하였으며 나머지 2종류의 배지에서는 생육이 어려운 것으로 확인되었다(Table 1). 이 결과는 배지 성분에 따라서 분리 균주의 생육 가능성이 좌우되는 것으로 추후 산업적으로 이용하기 위해선 배지 성분의 최적화가 필요할 것으로 판단되었다. 추가적으로 분리된 균주들이 고온균의 특성도 나타내는지 확인을 위하여 37℃, 45℃와 55℃에서 정지배양한 결과, 분리 균주 모두 55℃에서 생육이 불가능하였으며 45℃에서는 생육이 가능한 것으로 확인되었다(Fig. 1).

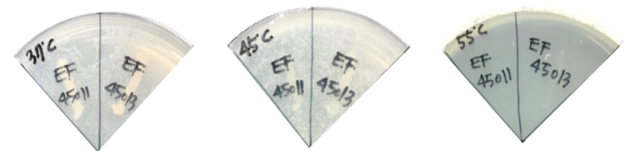


Fig. 1. Growth of 2 isolated strains on the marine agar medium at different temperature.

Table 1. Isolation and identification of aerobically cultured bacteria isolated from the wood vinegar

No	Isolate number	Media			MA*								
		NA [#]	R2A	TSA	pH			NaCl (%)			Temp. (°C)		
					5	7	9	3	6	9	37	45	55
1	EF45011	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-
2	EF45013	-	-	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-

[#]Nutrient agar, *Marine agar, -: no growth, +: weak growth, ++: well-growth.

16S rDNA 염기서열 분석을 통한 분리 균주 동정

강원도 경원 참숯가마 목초액에서 호기적으로 분리된 2균주의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 NCBI Web BLAST에서 Nucleotide BLAST의 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) database 검색을 통해 분리된 균주의 미생물 동정을 실시한 결과, 2균주 모두 *Cytobacillus* 속으로 확인하였다. Table 2에서 나타난 것처럼 2균주 모두 *Cytobacillus firmus* NBRC 15306와 유사 균주로 예상되었으며, 상동성은 97.73%와 97.64%를 각각 나타내었다. *Cytobacillus firmus*의 경우 2020년 *Bacillus firmus* 균주가 재분류되어 새롭게 명명된 균주 학명이다(Patel and Gupta, 2019).

세포의 분해효소 및 옥신 생산 활성 분석

분리된 균주들의 세포의 분해효소 활성을 확인함으로써 산업에서의 활용 가능성을 검증하고 분리된 균주 배양액의 미생물 비료로서의 활용을 위한 옥신 생산 활성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 분리된 2균주 모두 lipase 활성은 없으나 amylase와 protease 활성은 높은 것으로 확인하였고(Fig. 2), 옥신 생산 활성은 없는 것으로 나타나 농업 분야에서의 활용 가능성은 낮은 것으로 예상되었다.

일반적으로 호염성 세균을 분리하기 위하여 해수나 염이 포함되는 발효식품 등이 사용되었지만, 본 연구에서는 참숯을 제조하는 과정의 부산물인 목초액에서 호염성 세균을 분리하였으며, 분리된 두 균주의 생리학적 특성과 함께 가수분해효소 활성을 확인하여 산업적 활용 가능성을 검증하였다.

따라서 본 연구는 국내 미생물 자원의 다양성 확보 차원에서 의미를 찾을 수 있을 것이며, 분리된 균주들의 산업 생물공정에서의 활용이 가능한 가수분해 효소균 확보와 균주 개량을 위한 기본 미생물 소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다. 최근 연구는 *Cytobacillus* 속 미생물이 보유한 생리활성은 probiotics로서의 가능성을 제시하고 있어 추가실험이 진행될 경우 새로 분리된 균주가 보유한 다양한 기능성을 제시할 것으로 기대된다. 본 연구를 통하여 분리한

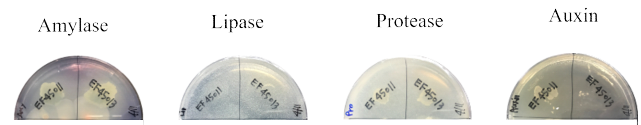


Fig. 2. Activities of proteolytic enzymes and auxin produced by 2 isolated strains.

두 종류의 균주는 한국생명공학연구원 미생물가치제고사업단에 기탁하였다.

요 약

본 연구는 기능성 소재 생산을 위한 발효과정에 이용될 수 있는 새로운 균주의 분리과 동정을 위해 수행되었다. 목초액으로부터 호염성의 새로운 미생물을 분리하기 위해 marine agar를 사용하여 37℃에서 호기적으로 배양하여 2균주를 분리하였으며, 16S-based ID 분석 프로그램으로 동정한 결과, 모든 분리 균주는 *Cytobacillus* 속으로 확인되었다. 그리고 분리한 균주들의 산업에 활용을 위하여 amylase, lipase, protease와 같은 가수분해효소 생산 활성을 확인한 결과, 2균주 모두 amylase와 protease 효소 활성을 나타내어 식품 및 화장품 산업에서의 적용 가능성을 확인하였다.

사 사

본 논문의 작성에 있어 많은 조언과 도움을 주신 신라대학교 이상재 교수님께 감사의 말씀을 드린다.

References

1. Cho MH (1989) Purification and characterization of acid-stable α -amylase of *Aspergillus niger* K-25. *Kor. J. Mycol.* **17**(8), 145-148.
2. Guffanti AA, Blanco R, Benenson RA, and Krulwich TA

Table 2. Representative sequences of an aerobically cultured bacteria isolated from the wood vinegar

No	Isolate number	Closed strain	Closed strain number	Identity (%)	Extracellular enzyme activity			Au [§]	Deposited number
					Amy [#]	Lip ^{&}	Pro [*]		
1	EF45011	<i>Cytobacillus firmus</i>	NBRC 15306	97.73	+++	-	+++	-	NMC4-B293
2	EF45013	<i>Cytobacillus firmus</i>	NBRC 15306	97.64	+++	-	+++	-	NMC4-B294

[#] Amylase, [&] Lipase, ^{*} Protease, [§] Auxin, -: no activity.



- (1980) Bioenergetic properties of alkaline-tolerant and alkalophilic strains of *Bacillus firmus*. *Journal of General Microbiology* **119**, 79-86.
3. Jun SJ, Lee GH, and Sel GS (1998) Pathogen, insect control in plants and apple, pear freshness maintenance by pyroligneous liquor. *Res. Natural. Resour.* **1**, 91-97.
4. Jung HK, Kim JR, Woo SM, and Kim SD (2006) An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 94-100.
5. Jung HK, Kim JR, Woo SM, and 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**(1), 23-28.
6. Lee NK, Kim WS, and Paik HD (2019) *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 1297-1305.
7. Lee SY, Lee JK, Lee SK, Ye SG, Jung JH, and Hwang BH (2004) Effects of wood vinegar from *Quercus mongolica* on the growth of plant pathogens and radish seedlings. *J. Kor. For. Soc.* **93**, 380-386.
8. Lee YJ (2021) Analysis of the physiological properties and enzyme productivity of halophilic thermophiles from the soil around charcoal kilns. *J. Agri. Life Environ. Sci.* **33**(3), 373-378.
9. Lee YS, Kim KS, Kim HJ, Kim JW, Chung SH, and Lee SJ (1999) Effects of charcoal and charcoal wood extracts on the population change of bacteria and hot pepper plant growth and root and fruit development. *J. Agr. Sci. Inst. of Agr. Sci. Kangwon Nat. Univ.* **10**, 78-81.
10. Leroy F and De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.
11. Marcial GE, Ford AL, Haller MJ, Gezan SA, Harrison NA, Cai D, ... and Graciela LL (2017) *Lactobacillus johnsonii* N6.2 modulates the host immune responses: A double-blind, randomized trial in healthy adults. *Front. Immunol.* **8**, 655-662.
12. Mayuri S, Yogesh G, Shalini A, Vikas K, Anil P, and Ashwani K (2019) A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology* **15**, 69-78.
13. Monika Y, Tarun K, Akshay K, Ranjeet M, Rajesh P, and Nar SC (2022) Isolation and characterization of human intestinal bacteria *Cytobacillus oceanisediminis* NB2 for probiotic potentia. *Front. Microbiol.* **13**, 1-13.
14. Patel S and Gupta RS (2019) A phylogenomics and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 406-438.
15. Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, Arike L, Johansson MEV, Hansson GC and Bäckhed F (2018) Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell Host Microbe* **23**, 27-40.
16. Tango MSA and Islam MR (2002) Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. *Energy Sources* **24**(6), 543-559.
17. Thaïss CA, and Elinav E (2017) The remedy within: will the microbiome fulfill its therapeutic promise? *J. Mol. Med.* **95**, 1021-1027.
18. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, and Sanders ME (2011) Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.* **69**, 392-403.
19. Yadav M, and Chauhan NS (2022) Microbiome therapeutics: Exploring the present scenario and challenges. *Gastroenterol. Rep.* **10**, goab046.
20. Yadav M, Verma MK, and Chauhan NS (2018) A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Arch. Microbiol.* **200**, 203-217.