



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월15일
 (11) 등록번호 10-1716209
 (24) 등록일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 11/14* (2006.01)
C12R 1/63 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 11/14 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0107992
 (22) 출원일자 2015년07월30일
 심사청구일자 2015년07월30일
 (65) 공개번호 10-2017-0014498
 (43) 공개일자 2017년02월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20130210086 A1
 US20040265946 A1
 J. Microbiol., Biotechnol., Vol.14,
 pp.41-47(2004.)*
 World Journal of Microbiology &
 Biotechnology, Vol.19, pp.375-379(2003.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
배재대학교 산학협력단
 대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)
 (72) 발명자
최창원
 대전광역시 서구 도안동로 123 (도안동, 도안리슈빌아파트) 1701-1903
오성
 대전광역시 서구 동서대로997번길 5-8, 3층
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 3 항

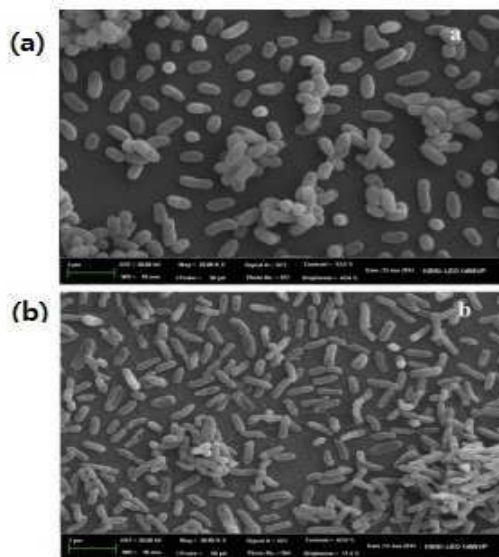
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **염류토양으로부터 분리된 비브리오 파라헤모리티쿠스의 셀룰로오스 분해활성능**

(57) 요약

본 발명은 간척지 토양으로부터 분리한 비브리오 파라헤모리티쿠스(Vibrio parahaemolyticus) PCU1 균주의 셀룰로오스(cellulose) 분해활성에 관한 것으로, 보다 상세하게는 염류토양으로부터 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 분리하고 상기 균주를 접종한 배지에서 배양시간 및 기질농도에 따른 세포 밖 분비 셀룰레이즈(cellulase)의 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose) 분해능력을 조사함으로써 이를 이용하여 미생물 제제 또는 바이오에너지의 생산 및 나무로부터 원료를 추출하기 위한 바이오리파이너리(biorefinery)에 활용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12R 1/63 (2013.01)

(72) 발명자
나가라잔 비노드

대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동) 생물의약
학과

박복희

서울특별시 강동구 고덕로80길 13 주공아파트 327
동 504호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425079807

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 한국산학연합회

연구사업명 첫걸음 R&D

연구과제명 토양염류장애 개선 및 토양선충조절을 위한 기능성 토양개량제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 배재대학교산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

염류토양으로부터 분리된, 셀룰로오스 분해능력이 있는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주(KCTC 12871BP)의 세포, 균주 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해용 미생물제제.

청구항 5

a) 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose)가 0.1 ~ 3wt% 함유된 배양배지를 준비하는 단계;

b) 상기 배양배지에 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 30 내지 50 시간 배양하는 단계;

c) 상기 배양단계에서 수득한 배양액을 담체와 혼합한 후 건조하는 단계;

를 포함하는 미생물제제 제조방법.

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 간척지 토양으로부터 분리한 비브리오 파라헤모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) PCU1 균주의 셀룰로오스(cellulose) 분해활성에 관한 것으로, 보다 상세하게는 염류토양으로부터 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 분리하고 상기 균주를 접종한 배지에서 배양시간 및 기질농도에 따른 세포 밖 분비 셀룰레이즈(cellulase)의 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose) 분해능력을 조사함으로써 이를 이용하여 미생물제제 또는 바이오에너지의 생산 및 나무로부터 원료를 추출하기 위한 바이오리파이너리(biorefinery)에 활용할 수 있다.

배경기술

[0002] 최근 리그노셀룰로오스계(Lignocellulosic) 재료는 알코올 및 기타 화학물질로 생물학적전환(bioconversion)이 가능한 원료물질로서 각광받고 있다.

[0003] 셀룰로오스는 식물의 중요한 바이오매스(biomass)로서 무수 글루코스단위체(Anhydroglucose Unit)가 베타-1,4-글루코시드(β -1,4-glycoside)결합에 의해 서로 연결되어 이루어진 긴사슬형의 고분자 물질이다. 셀룰로오스는 농업의 부산물로부터 쉽게 획득할 수 있으며, 지구상에서 가장 풍부하고 재생이 가능한 생체고분자이다. 따라서 표적 대사물질 혹은 바이오에너지 생산을 위해서 리그노셀룰로오스 부산물을 미생물로 분해한 후, 미생물로 분해한 결과로서 생산되는 환원당을 발효하는 방법이 이러한 재생자원으로 가장 효율적으로 활용될 수 있는 전략이다.

[0004] 일반적으로 바이오에너지 생산을 위한 탄수화물원으로서 사탕수수 즙 또는 옥수수 전분이 이용되어 왔으나, 이

러한 제1세대 원료들은 식품 및 가축사료와의 경쟁, 재배 면적의 포화 등 많은 문제에 봉착해 있다. 따라서, 이러한 문제를 극복하기 위한 방안으로 목본 및 초본류의 리그노셀룰로오스로부터 생산하는 제 2세대 셀룰로오스에 관한 연구가 미국을 중심으로 활발히 진행되고 있다.

[0005] 제 2세대 셀룰로오스 원료의 바이오매스로부터 바이오에너지를 생산하는 반응 메커니즘은 '당화(saccharification)와 '발효(fermentataion)' 일 수 있다. '당화'는 다양한 미생물은 셀룰레이즈(cellulase)를 이용하여 불용성 기질을 수용성 소중하베(cellooligomers)로 전환시켜 최종적으로 셀로바이오스(cellobiose) 혹은 포도당(glucose)으로 만드는 과정을 말한다. '발효'는 당화 과정에서 생성되는 글루코스가 효모 등의 미생물에 의해 혐기성 조건 하에서 에탄올과 이산화탄소로 전환되는 과정을 말한다.

[0006] 이러한 바이오매스로부터 바이오에너지를 생산하는 '당화' 과정에서 셀룰레이즈(cellulase)는 촉매활성의 방법에 근거하여 엔도-1,4-베타-글루케네이즈(endo-1,4-β-glucanase, EC 3.2.1.4), 셀로바이오하이드로레이즈(cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) 및 베타-글루코시테이즈(β-glucosidase, EC 3.2.1.21)의 3 종류로 구분할 수 있다. 엔도-1,4-베타-글루케네이즈는 셀룰로오스 분자의 내부 부위를 임의로 절단하며, 셀로바이오하이드로레이즈는 단계적으로 다당류 사슬의 말단 부위에 작용하는 반면에, 베타-글루코시테이즈는 수용성 셀로덱스트린(cellobextrins)과 셀로바이오스를 포도당으로 가수분해한다.

[0007] 국제 효소시장에서 상당 부분을 점유하고 있는 셀룰레이즈(cellulase)는 섬유, 세정제, 곡물사료 및 펄프 및 제지산업에 광범위하게 활용된다. 그동안 일부 동물을 포함하여 다양한 세균 및 진균으로부터 셀룰레이즈(cellulase)가 분리되었고, 그 특성이 규명되었다. 대다수는 pH 4~6에서 활성을 나타내었으나, 염기성에서는 일반적으로 불활성화되었다. 따라서 극심한 환경에서 안정한 효소활성에 나타내는 염기성(alkaline) 셀룰레이즈에 관심이 집중되었다. 이에 다양한 바실러스(Bacillus)종으로부터 염기성 혹은 내염기성(alkali-tolerant) 셀룰레이즈가 분리되어 세탁용 세정제로 활용되는 반면에 내염성(salt-tolerant) 혹은 호염성(halophilic) 셀룰레이즈는 거의 보고되지 않았다.[J Biotechnol 126:26-36; Antonice Van Leeuwenho다 89:211-219]

[0008] 분류학적으로 비브리오 파라헤모리티쿠스는 비브리오종(Vibrio), 비브리오과(Vibrionaceae), 호염성, 중온성(mesophilic), 화학유기영양체 및 그람음성세균에 속한다. 이 균에 오염된 어패류를 날 것으로 섭취 시 장염, 구토, 복통 및 설사를 일으킨다. 해양 서식처에 널리 분포하는 비브리오는 현재 70종 이상이 보고되었으며 그 개체 수는 해마다 빠르게 증가하고 있다. 최근 다른 종의 비브리오로부터 셀룰레이즈가 분리되어 특성이 규명되고 있으나(Vibrio sp. LX-3 [Li 등, 2003], Vibrio xiamenensis sp. nov. [Gao 등, 2010, 2012]), 국내에 널리 분포하는 비브리오 파라헤모리티쿠스의 셀룰레이즈는 국제적으로도 미비하다.

[0009] 한편, 전 세계적으로 유기합성 화학제제의 무차별한 남용으로 인한 중독사태 증가, 유기합성 화학제제에 의한 지하수 및 토양오염, 농축수산물 중의 잔류독성, 화학제제에 의한 생태계에 영향을 끼치는 환경과피 등의 기존의 유기합성 화학제제의 과다사용으로 인한 심각한 문제점이 대두되면서 유기합성 화학제제를 대체할 수 있는 미생물을 이용한 친환경 천연제제의 사용이 급격하게 증가하는 추세이다. 따라서, 본 발명자는 셀룰로오스 분해능을 가진 비브리오 파라헤모리티쿠스 균주를 선별 및 동정하여 미생물제제로 활용함으로써 유기합성 화학제제의 무차별한 남용으로 인한 중독사태 또는 지하수 및 토양오염 등을 극복할 수 있는 친환경 천연제제로서의 우수한 활용성을 가질 수 있는 새로운 셀룰로오스 분해능을 가진 비브리오 파라헤모리티쿠스 균주를 분리하고 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010]

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 2007-0132386호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev 66:506??577

(비특허문헌 0002) Hirasawa K, Uchimura K, Kashiwa M, Grant WD, Ito S, Kobayashi T, Horikoshi K (2006)

Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89:211-219

(비특허문헌 0003) Voget S, Steele HL, Streit WR (2006) Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulose. *J Biotechnol* 126:267-276

(비특허문헌 0004) 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

(비특허문헌 0005) Gao ZM, Ruan LW, Chen XL, Zhang YZ, Xu X (2010) A novel salt-tolerant endo-beta-1,4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1373-1382

(비특허문헌 0006) Gao Z, Xiao J, Wang X-N, Ruan LW, Chen, X-L, Zhang, Y- Z (2012) *Vibrio xiamenensis* sp. Nov., a cellulose-producing bacterium isolated from mangrove soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1958-1962

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 바이오에너지 생산을 위한 탄수화물원으로서 사탕수수 즙 또는 옥수수 전분등의 제1세대 원료들을 바이오매스로 사용함으로써 생기는 식품 및 가축사료와의 경쟁, 재배 면적의 포화 등 의 많은 문제점을 극복하기 위해서 본 발명에서는 셀룰로오스 분해능이 우수한 비브리오 파라헤모리티쿠스 균주를 분리 및 동정하고, 기질인 카복시메틸셀룰로오스를 첨가한 배양액으로 분비된 셀룰레이즈 활성을 통해 셀룰로오스 분해용 미생물 제제를 제공하고 자 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 셀룰로오스 분해능력이 있는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주(KCTC 12871BP)를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 상기 균주는 염류토양으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주의 세포, 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해용 미생물제제를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 a) 카복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose)가 0.1 ~ 3wt% 함유된 배양배지를 준비하는 단계;
- [0019] b) 상기 배양배지에 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 30 내지 50 시간 배양하는 단계;
- [0020] c) 상기 배양단계에서 수득한 배양액을 담체와 혼합한 후 건조하는 단계;
- [0021] 를 포함하는 미생물제제 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 상기 담체는 제올라이트, 맥반석, 질석, 모래, 활성탄인 것을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 염류토양으로부터 분리한 셀룰로오스 분해능력이 우수한 신규한 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 제공함으로써 상기 균주를 포함하는 미생물제제로 활용될 수 있으며, 산업용 생촉매제가 필요한 섬유, 세정제, 곡물사료, 펄프, 제지 및 바이오에너지와 같은 바이오리파이너리(Biorefinery) 산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 콜로니가 세포밖으로 셀룰레이즈를 분비하여 기질인 CMC를 분

해하여 투명환을 형성하는 사진이다.

도 2는 본 발명 CMC 무첨가 액체배지에서 배양한 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1(a)와 1% CMC를 첨가한 액체배지에서 배양한 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1(b)의 전자현미경 사진이다.

도 3은 본 발명 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1의 16s rDNA 분석으로 동정한 염기서열 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1을 1% CMC 액체배지에서 시간별 성장에 따른 셀룰레이즈의 활성을 분석한 결과이다.

도 5는 본 발명 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1의 기질농도에 따른 셀룰레이즈의 활성을 분석한 결과이다.

도 6은 본 발명 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1이 분비하는 셀룰레이즈의 최적 pH를 결정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 셀룰로오스 분해능력이 있는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주(KCTC 12871BP)를 제공한다.
- [0026] 보다 자세하게는, 본 발명의 상기 균주는 염류토양으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 제공한다.
- [0027] 이하 본 발명은 보다 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명에서는 상기의 과제를 달성하기 위한 균주를 먼저 확보하기 위해 셀룰로오스를 분해하는 균주를 탐색하였다.
- [0029] 본 발명의 목적에 따른 일례로 셀룰로오스 분해능을 가진 균주를 분리하기 위해 갯벌토양에서 채취한 채취 시료 토양을 미생물원으로 사용하였고, 탄소원을 함유하는 미생물 균주 분리용 배지는 고체배지를 사용하였으며, 보다 바람직하게는 카복시메틸셀룰로오스 아가(carboxymethylcellulose agar) 고체배지를 사용하였으나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0030] 상기 채취 시료 토양을 상기 배지에 도말하여 균주를 분리해낼 수 있다. 보다 구체적으로는 분리된 균주를 상기 배지에 접종하고 10 내지 50℃에서 24 내지 48시간 동안 배양하여 배지에서 균주를 선별할 수 있으나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0031] 또한 본 발명은 상기 선별된 균주를 형태적인 특성, 배양학적 특성 또는 운동성, 산화효소(oxidase), 카제인 가수분해, 젤라틴 가수분해 및 키틴 가수분해 등의 생화학적 특성분석 또는 16s rDNA 분석 등을 기초로 하여 본 발명의 목적을 달성하기 위한 셀룰로오스 분해성을 갖는 균주임을 확인하였다.
- [0032] 또한, 상기 분석한 결과 상기 균주는 비브리오 파라헤모리티쿠스(Vibro parahaemolyticus)로 확인되었으며, 본 발명자들은 상기 균주를 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1으로 명명하였다. 이를 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에 2015년 07월 17일 자로 기탁하였다.
- [0033] 상기에서 분리된 셀룰로오스 분해 균주는 16s rDNA 분석으로 동정한 결과는 도 3에 나타내었으며, 상기 균주의 형태 관찰, 배양학적 특성 및 생화학적 특성 분석 결과는 표 2에 나타내었다.
- [0034] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 일례로, 상기 분리 및 동정한 PCU1 균주의 셀룰로오스 분해능력을 확인하기 위해서 상기 균주의 셀룰레이즈(cellulase) 생산 및 효소활성을 분석하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태로는 본 발명은 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주의 세포, 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 셀룰로오스 분해용 미생물제제를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태로는,
- [0038] 본 발명은 a) 카복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose)가 0.1 ~ 3wt% 함유된 배양배지를 준비하는 단계;
- [0039] b) 상기 배양배지에 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 20 내지 150 시간 배양하는 단계;
- [0040] c) 상기 배양단계에서 수득한 배양액을 담체와 혼합한 후 건조하는 단계;

- [0041] 를 포함하는 미생물제제 제조방법을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 목적을 달성하기 위해 상기 분리 및 동정한 셀룰로우스 분해능을 갖는 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주를 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose) 액체 배지에 배양하여 수득된 배양액을 담체와 혼합하여 미생물제제를 제조할 수 있다.
- [0043] 보다 바람직하게는 상기 액체 배지는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose)가 0.1 ~ 3wt% 로 함유된 배양배지를 사용하는 것이 가장 좋으나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 상기 균주를 CMC 액체배지에 접종한 후, 20~150시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 상기 배양조건에서 배양하여 수득된 배양액을 담체와 혼합하여 미생물제제를 제조할 수 있으며, 상기 미생물제제를 제조하는 방법은 당업계에서 사용하는 통상의 방법으로 제조하는 것이면 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주는 균주 자체, 또는 이의 배양물 또는 이들의 혼합물에 담체와 혼합하여 분말, 펠렛, 과립 또는 용액 등으로 제형화하여 가축 사료 첨가용 미생물 제제로서 사용할 수 있으며, 상기 담체는 당업계의 기술분야에서 사용되는 담체는 모두 사용가능하나, 바람직하게는 제올라이트, 맥반석, 질석, 모래, 활성탄일 수 있으나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0047] 상기 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주 자체, 또는 이의 배양물 또는 이들의 혼합물에 담체와 혼합하여 제형화된 미생물 제제는 특정 토양에 선택적으로 작용하여 우수한 셀룰로오스 분해능을 가진 미생물 균주를 고농도로 배양하여 농축하여 담체에 고정화하여 상기 미생물 균주를 담체에 고정하여 미생물제제로 제조하여 농작물 또는 가축사료 등에 첨가함으로써 유기합성 화학제제를 대체하여 사용할 수 있는 친환경 천연제제로서 용도에 맞게 유용하게 사용될 가능성을 가진 미생물제제를 제공할 수 있다.
- [0048] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0049] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0050] **실시예 1: 셀룰로오스 분해 미생물의 분리 및 동정**

[0051] (1) 셀룰로오스 분해 미생물 분리 및 선별

[0052] 새만금 간척지 및 금강하구 갯벌에서 채집해온 갯벌토양에서 토양을 채취하여 채취시료토양으로 사용하였다. 상기 채취 시료 1g을 멸균된 2차 증류수 10ml에 현탁하고, 이 현탁액을 10⁻⁶ 배까지 멸균증류수로 희석한 후 CMC agar 고체배지(1% carboxymethylcellulose, 1% peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.03% MgSO₄ · 7H₂O, 0.25% (NH₄)₂SO₄, 0.2% gelatin, 1% agar, pH 7.0)에 도말한 후 콜로니를 형성하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주를 상기 배지에 접종하고 24-48 시간 후 투명환 형성 유무를 0.5% Congo red로 30분 염색하고 1 M 염화나트륨으로 세척하여 확인하였다 [도 1]. 상기의 배지에서 선별한 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과 [도 2a]과 같이 단간균(0.5~0.8 x 2.0~5.0 μ m)으로 확인되었다.

[0053] <표 1> 배양 배지의 조성

Component	Concentration(w/v)
Carboxymethylcellulose	1%
peptone	1%
K ₂ HPO ₄	0.2%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.03%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25%
gelatin	0.2%
agar	1%
pH	7.0
DW	1000ml

[0054]

[0055] (2) 셀룰로오스 분해 미생물의 동정 및 생화학적 특성분석

[0056] 상기 균주의 생화학적 특성을 분석하기 위해 표 2와 같이 운동성, 산화효소(oxidase), 카제인 가수분해, 젤라틴 가수분해, 키틴 가수분해 반응을 분석하였다. 그 결과 운동성, 산화효소(oxidase), 카제인 가수분해, 젤라틴 가수분해, 키틴 가수분해에서 양성반응을 보였으며, 16s rDNA 분석을 실시하여 동정한 결과 [도 3]과 같았다. 상

기 균주의 형태 관찰, 생화학적 특성분석 및 NCBI Blast search program을 사용하여 database로부터 16s rDNA 비교분석 결과, 비브리오 파라헤모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)로 확인되었으며, 이를 비브리오 파라헤모리티쿠스 PCU1 균주로 명명하였다.

[표 2]

생화학적 특성		반응
그람 염색		-
운동성		+
LB배지에 첨가된 NaCl(w/v)	0% NaCl	+
	4% NaCl	+
	8% NaCl	+
	10% NaCl	-
키틴 가수분해		+
카제인 가수분해		+
젤라틴 가수분해		+
산화효소		+

(2) 셀룰로오스 분해 미생물의 배양학적 특성분석

상기 균주의 배양학적 특성을 분석하기 위해 상기 표 2와 같이 고체배지에 NaCl(w/v)의 농도를 달리하여 상기 균주의 배양학적 특성을 분석한 결과 염화나트륨(NaCl) 8%에서는 성장되었으나 10%에서는 성장이 제한되는 것을 알 수 있다.

실시예 2: 셀룰로오스 분해 미생물의 배양시간에 따른 셀룰레이즈(cellulase) 생산 및 효소활성.

상기 실시예 1에서 분리 및 동정된 균주를 멸균된 CMC 액체배지(1% carboxymethylcellulose(CMC), 1% peptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.03% MgSO₄ · 7H₂O, 0.25% (NH₄)₂SO₄, pH 7.0)에 접종한 후 24시간에서 120시간 동안 배양하여 배양시간에 따른 활성변화를 측정하였다. 상기 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 상등액을 조효소액 시료로 수확하였다. 셀룰레이즈(cellulase) 활성은 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 이용하여 50mM citrate(pH 4.8) 용액에 용해된 CMC로부터 방출되는 환원당을 측정하였다. 조효소액 0.5mL를 0.5mL citrate 용액에 첨가하여 50도에서 30분 처리하고 3mL DNS 시약을 첨가한 후 100도에서 10분 가열 후 반응을 종료하였다. 반응시킨 시료는 540nm에서 blank(시료를 제외한 모든 반응액) 값에 대한 흡광도로 결정하였다. 셀룰레이즈(cellulose) 활성 1U는 1μM 포도당을 방출하는데 필요한 효소량으로 표현하였다.

상기의 방법으로 수행한 실험결과, 48시간 배양한 상기 균주의 배양액에서 가장 높은 활성이 측정되었다. 그 이후(75-120시간)에는 활성이 점차 감소되는 경향을 보였다[도 4]. 따라서 상기의 실험조건에서는 배양 후 48시간이 셀룰레이즈 분비의 최적조건임이 암시되었다.

실시예 3: 셀룰로오스 분해 미생물의 기질농도 및 배양시간에 따른 셀룰레이즈(cellulase) 효소활성.

상기 균주를 다양한 기질 농도의 CMC(0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%)가 첨가된 액체배지에 접종한 후 24, 48, 72, 96 및 120시간 동안 배양하였다. 각 기질농도 및 시간별로 배양액을 상기와 같이 수확하여 조효소액 시료로 사용하였다.

상기의 방법으로 다양한 기질 농도 및 배양시간 별로 배양을 수행한 실험결과, 2% CMC가 첨가된 액체배지에서 상기 균주를 48시간 배양한 시료에서 최대 효소활성을 보였다. 48시간에서의 최대 활성은 배양시간이 증가함에 따라서 점차 감소하였다. 주어진 48시간에서는 농도에 따른 효소활성이 선형적 관계를 보였다(0.1%: 0.15 U/mL, 0.5%: 0.17 U/mL, 1.0%: 0.19 U/mL, 1.5%: 0.23 U/mL, 2%: 0.28 U/mL) [도 5].

실시예 4: 셀룰로오스 분해 미생물의 셀룰레이즈(cellulase) 생산의 최적 pH 조건 결정.

셀룰로오스 분해 미생물의 셀룰레이즈 생산에 적합한 pH를 결정하기 위해서 실시예 1에서 사용된 1% CMC가 첨가된 액체배지에 1N HCl 혹은 1N NaOH를 첨가하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 및 9.0으로 적정하여 주어진 pH 별로 상기 배지를 준비하였다. 상기 균주를 각 배지에 접종하고 37도에서 24시간 배양한 후 배양액을 상기와 같이 수확하여 조효소액 시료로 사용하였다.

[0069] 상기의 방법으로 수행한 실험결과, 셀룰레이즈 활성 최적 pH는 7.0으로 나타났으나 주어진 산성 및 염기성 pH에서도 최대활성의 70%를 유지하였다. 따라서 상기 균주가 분비한 셀룰레이즈는 기존의 셀룰레이즈에 비해 광범위한 pH에서 활성을 갖는 특성을 보였다 [도 6].

[0070]

[0071] **실시예 5: 셀룰로오스 분해 미생물 균주의 기질에 따른 형태학적 비교실험.**

[0072] 실시예 1에서 사용된 1% CMC를 첨가한 액체배지(pH 7.0)와 무처리한 액체배지에서 배양한 상기 균주를 형태학적으로 비교하기 위해서 1% CMC를 첨가한 액체배지(pH 7.0)와 무처리한 액체배지에서 배양한 세포를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 배양 후 수확한 상기 균주를 PBS 용액으로 세척한 후 2.5% glutaraldehyde 용액에 4도에서 2시간 고정하였다. 고정한 상기균주를 1% osmium tetroxide로 4도에서 1.5시간 동안 후고정하고 10%, 30%, 50%, 70% 및 100% 에탄올을 이용하여 단계 세척한 후 건조된 시료를 금-팔라듐 코팅하여 주사전자현미경(Leo 1455VP, 기초과학연구원)으로 관찰하였다.

[0073] 상기의 방법으로 관찰한 결과, 상기 CMC를 첨가하지 않은 액체배제에서 성장한 상기 균주와 비교하여 [도 2a], CMC를 첨가한 액체배지에서 성장한 상기 균주의 형태가 광범위하게 변형됨을 관찰하였다 [도 2b]. 이러한 결과는 기질인 CMC가 상기 균주로부터 셀룰레이즈(cellulase)의 합성을 유도하여 세포표면 구조에 변형을 초래한 것을 유추할 수 있다.

[0074] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0075] 수탁번호 : KCTC12871BP

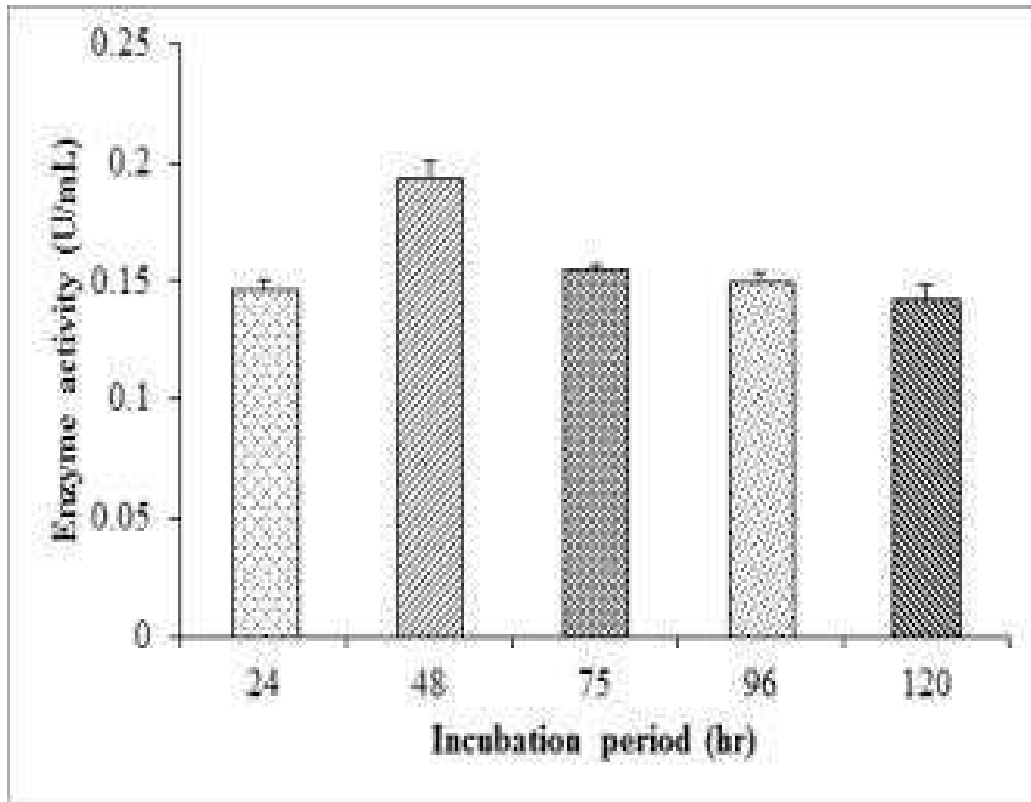
[0076] 수탁일자 : 20150717

도면

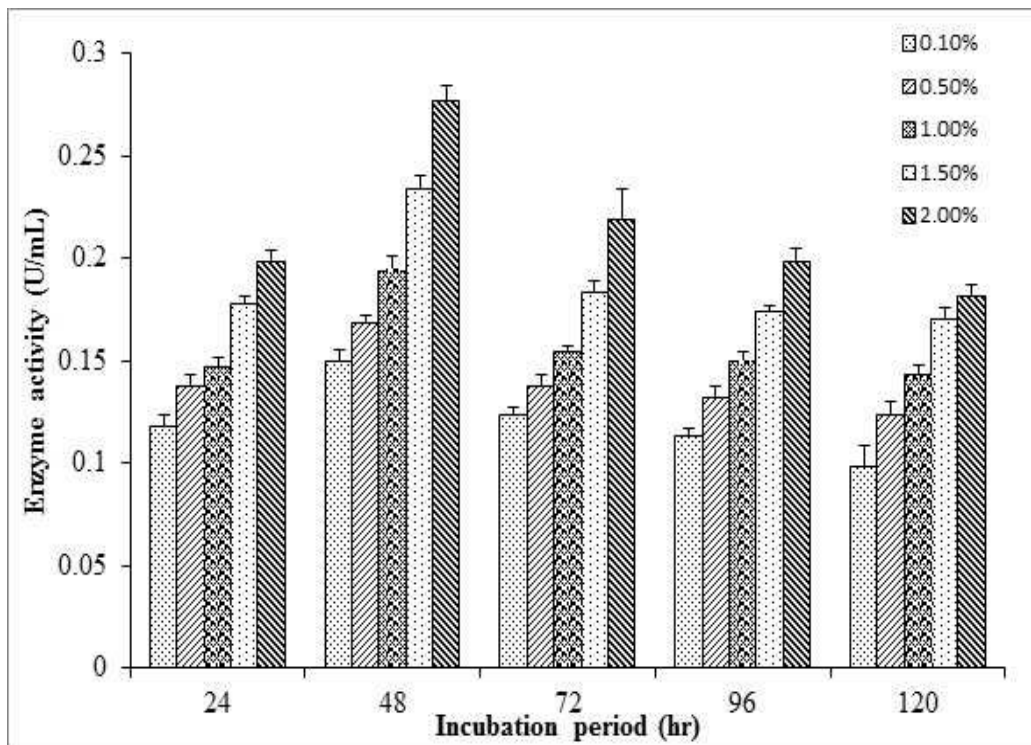
도면1



도면4



도면5



도면6

