



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0117550
(43) 공개일자 2013년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0040487
(22) 출원일자 2012년04월18일
심사청구일자 2012년04월18일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
김중균
부산광역시 해운대구 해운대해변로 163 현대베네
시티아파트 104동 1103호
강경환
제주특별자치도 제주시 광평동로 12
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 7 항

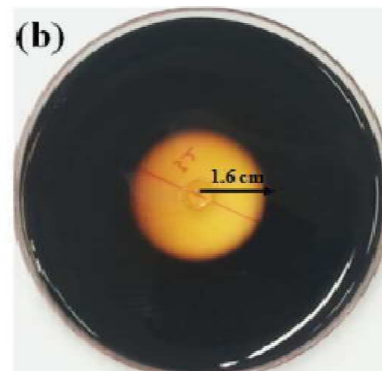
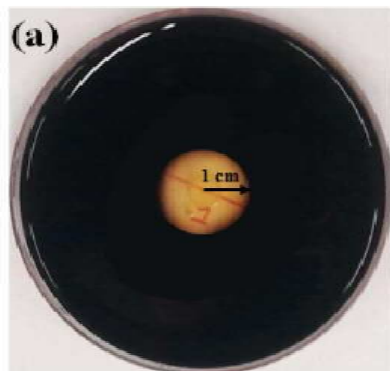
(54) 발명의 명칭 셀룰로오스, 단백질 및 지질 분해능을 가지는 신규 미생물

(57) 요약

본 발명은 셀룰로오스, 단백질 및 지방 분해능을 가지는 신규주인 바실러스 리케니포미스 및 상기 바실러스 리케니포미스를 이용하여 셀룰로오스 함유 바이오매스와 단백질 및 지질함유 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 신규 바실러스 리케니포미스 균주는 셀룰로오스 분해능과 단백질 및 지질 분해능이 뛰어나, 녹조류 처리공정 부산물 및 생선폐기물의 주요 다당류 성분인 셀룰로오스와 수산폐기물에 포함된 단백질 및 지질을 효과적으로 분해하여 글루코오스나 아미노산 등의 유용물질을 생산할 수 있어, 환경보호 효과가 있으며, 본 발명에 따라 분해된 폐기물을 생리활성물질이나 바이오에탄올 생산 및 비료 등으로 재활용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100576

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림수산식품연구개발사업

연구과제명 탄소 저감을 위한 미생물을 이용한 수산폐기물 재활용 기술 개발 및 대규모화

주관기관 부경대학교

연구기간 2010.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 16s rRNA 유전자 서열을 가지는 바실러스 리케니포미스.

청구항 2

제1항에 있어서, 바실러스 리케니포미스 TK3-Y(KACC 91709P)인 것을 특징으로 하는 바실러스 리케니포미스.

청구항 3

제1항에 있어서, 셀룰로오스, 단백질 및 지방 분해능을 가지는 것을 특징으로 하는 바실러스 리케니포미스.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 바실러스 리케니포미스로 셀룰로오스 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 함유 바이오매스의 당화방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 셀룰로오스 함유 바이오 매스는 해조류 부산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 바실러스 리케니포미스로 단백질 또는 지질 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 단백질 또는 지질함유 바이오매스의 분해방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 단백질 또는 지질 함유 바이오매스는 생선 폐기물 또는 수산가공폐기물인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 셀룰로오스, 단백질 및 지방 분해능을 가지는 신균주인 바실러스 리케니포미스 및 상기 바실러스 리케니포미스를 이용하여 셀룰로오스 함유 바이오매스와 단백질 및 지질함유 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 세계적으로 기후변화협약과 환경규제 강화에 의해서 석유 및 석탄을 대체할 수 있고 안정적이며 환경 친화적인 에너지를 개발하기 위한 바이오, 수소, 태양 등의 신재생에너지의 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오 에너지 생산의 원료로는 주로 사탕수수, 옥수수 등의 곡물류와 임업 및 농업 부산물인 목질계 자원들을 이용하여, 미국, 브라질, 독일과 같은 신재생에너지 생산의 선도국가에서 이에 관한 연구 및 생산이 진행되고

있으나, 식량난 문제와 작물 종류에 따른 지배 면적 한정성 및 영양분 공급의 어려움 그리고 목질계 성분의 추가 전처리 공정에 의한 경제성과 같은 문제로 곡물류와 목질계 자원을 이용한 바이오 연료 생산의 한계가 드러나고 있다.

[0003] 이러한 문제점들을 해결하기 위하여, 최근에는 많은 섬유질 및 다양한 다당류에 의해 세포벽이 구성되어 있는 해양조류가 새로운 바이오 에너지 원료로서 주목을 받고 있다. 해조류를 주로 생산하는 나라는 한국, 일본, 중국, 인도네시아 등의 아시아 국가들이며 육상보다 재배 가능한 바다 면적이 넓다. 또한, 해조류는 식용작물과 목질계보다 빠른 속도로 성장하며 광합성 반응으로 공기 중 이산화탄소를 흡수하므로 온실 가스를 줄일 수 있는 효과가 있고, 해조류 내 리그닌의 함량이 적어 전처리 공정을 간소화할 수 있을 뿐만 아니라 이러한 대형 해조류에는 60~95 % 정도가 수분이며 나머지 성분들 가운데 50% 이상이 탄수화물로 이루어져 있어서 바이오 연료 원료로서의 많은 잠재성을 내포하고 있다. 우리나라의 전체 수산물 생산량 중 해조류는 약 25% 정도를 차지하고 있는데, 미역, 다시마와 같은 갈조류, 김과 같은 홍조류 그리고 파래, 매생이와 같은 녹조류가 많이 양식되고 있다. 특히 파래, 청각, 매생이와 같은 녹조류는 녹색식물과 유사성이 많으며, 주요 다당류로 셀룰로오스가 약 38~53 %, 그 밖에 펙틴, 자일로글루칸, 글루쿠로난 등으로 구성되어 있다.

[0004] 녹조류 가공 공정 및 추출에서 발생하는 주요 다당류 부산물인 셀룰로오스는 β -1,4-글루코시드 결합으로 구성되어 있으며, 기본단위는 셀로비오스이며, β -D-글루코오스의 1번 탄소와 4번 탄소가 결합된 β -1,4-글루코시드 결합을 통해 선형구조를 이룬 것으로, 글루코오스 단위체가 번갈아가며 뒤집힌 모습을 띠고 있다. 따라서 토양, 갯벌, 해저 동물의 내장 등에서 순수 분리한 셀룰로오스를 분해하는 미생물을 이용하면, 분해 결과로 에탄올 생산에 필요한 글루코오스 생산뿐만 아니라, 분해 반응 시 생성되는 이당(셀로비오스), 삼당(셀로 트리오스), 올리고당 등과 같은 분해 대사산물들이 유용한 생리활성물질이 될 수 있다. 현재까지 녹조류로부터 알칼리, 산 또는 효소 처리 등의 가공 방법을 통해 여러 해조 다당류를 추출하여 식품 첨가제, 건강 식량 자원으로서 산업적으로 많이 유용하게 이용되고 있다.

[0005] 그러나 녹조류 자체의 분해하기 어려운 복잡한 구조로 인해 바이오 연료 생산용 기질로서 사용하기에 어려움이 있으며, 현재 이용되고 있는 물질 이외에 발생하는 부산물 및 폐기물들의 처리가 문제점으로 남아 있다. 우리나라는 OECD 가입 회원국으로서 폐기물 해양투기를 규제하는 런던협약이 채택한 '96 의정서'를 의무적으로 따라야 할 입장이어서, 2012년 이후에는 해조류 및 생선폐기물 등의 수산폐기물 처리문제로 인한 대란이 발생할 가능성을 배제할 수 없다.

[0006] 한편, 종래에 사용되고 있는 셀룰라아제는 *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Humicola insolens* 등의 사상균과 곰팡이에서 셀룰라아제를 추출하여 상업화용으로 사용하였으나, 이러한 사상균 또는 곰팡이들은 세균들에 비해 성장속도가 느리고 세포당 생산율이 낮아 시판되는 셀룰라아제의 가격이 높았다. 이에 따라, 다양한 생물체로부터 분리된 셀룰라아제가 보고되고 있으며, 지금까지 셀룰라아제는 주로 세균과 곰팡이 등의 미생물로부터 분리된 것들이 많이 알려져 왔다. 이러한 셀룰라아제를 합성하는 유전자를 대장균에 재조합시켜 대량생산을 꾀하는 연구가 진행되고 있으나, 아직까지는 미흡한 단계에 있다 (Eberhardt *et al.*, *Microbiology*, 146:1999, 2000; Guiseppi *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2:159, 1988; Hagen *et al.*, *Gene*, 150:163, 1994; Nakatani *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64:1238, 2000; Takashima *et al.*, *J. Biotechnol.*, 67:85, 1999; Cornet *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, 16:137, 1983; Gilkes *et al.*, *Journal of Biological chemistry*, 259:10455, 1984).

[0007] 셀룰라아제 관련 특허를 살펴보면, 서머스 칼도필러스(*Thermus caldophilus*) GK24 균주로부터 분리된 신규 셀룰로오스 분해효소 및 상기 효소를 이용하여 셀로비오스를 포함한 짧은 길이의 베타-글루칸 생산방법(한국공개특허 제2008-0055552호), 뽕나무하늘소(*Apriona germari*) 유래 셀룰라아제 유전자 (한국공개특허 제2004-0079249호), 갈색부후담자균 포미톱시스 팔루스트리스(*Fomitopsis plaustri*) 유래 엔도글루카나제(한국공개특허 제2009-0039972호), 잔토모나스 균주의 엔도뉴클라아제의 발현 및 정제방법(한국공개특허 제2007-0098344호) 및 글리코실 가수분해 효소의 패밀리 9에 속하는 엔도- β -1,4-글루카나제 (W000/073428) 등이 보고되고 있다.

[0008] 이 밖에도 지금까지 녹조류의 대표적 다당류인 셀룰로오스를 효소적 방법으로 분해한다고 알려진 미생물로는 *Xantomonas sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Bacillus sp.*, *Psuedomonas sp.*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma reesei*, *Streptomyces sp.*, *Penicillium iriensis*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Clostridium sp.* 등이 있다(<http://www.brenda-enzymes.info>).

[0009] 그러나 아직까지 셀룰로오스를 함유하고 있는 녹조류를 직접적으로 분해하는 미생물에 대해 개발된 바는

없으며, 동시에 단백질과 지질을 함께 분해하는 미생물 역시 현재 보고되지 않았다.

- [0010] 이에, 본 발명자들은 셀룰로오스를 포함하는 녹조류 가공공정 또는 추출 공정 중에 발생하는 부산물과 생선 내장 또는 뼈 등의 생선폐기물과 혼합되어 있는 폐기물을 재활용하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 바실러스 리케니포미스 신균주가 녹조류 부산물에 포함된 셀룰로오스와 생선폐기물에 포함된 단백질 및 지질을 효과적으로 분해하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 셀룰로오스와 단백질 및 지질 분해능을 가지는 새로운 균주를 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 셀룰로오스와 단백질 및 지질 분해능을 가지는 새로운 균주를 이용한 셀룰로오스 함유 바이오매스와 단백질 및 지질함유 바이오매스의 분해방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 16s rRNA 유전자 서열을 가지는 바실러스 리케니포미스를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 바실러스 리케니포미스로 셀룰로오스 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 함유 바이오매스의 당화방법을 제공할 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 바실러스 리케니포미스로 단백질 또는 지질 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 단백질 또는 지질함유 바이오매스의 분해방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 신규 바실러스 리케니포미스 균주는 셀룰로오스 분해능과 단백질 및 지질 분해능이 뛰어나, 녹조류 처리공정 부산물 및 생선폐기물의 주요 다당류 성분인 셀룰로오스와 수산폐기물에 포함된 단백질 및 지질을 효과적으로 분해하여 글루코오스나 아미노산 등의 유용물질을 생산할 수 있어, 환경보호 효과가 있으며, 본 발명에 따라 분해된 폐기물을 생리활성물질이나 바이오에탄올 생산 및 비료 등으로 재활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 카르복시메틸셀룰로오스 고체 평판 배지에 분리한 TK3-Y 균주를 37℃에서(a) 2일, (b) 4일 간 배양하였을 때, 셀룰로오스 분해에 의한 투명환(clear zone)을 형성하는 모습을 나타낸 결과이다.
- 도 2는 과래분말 고체 평판 배지에 분리한 TK3-Y 균주를 37℃에서 a) 2일, (b) 4일 간 배양한 후, 투명환(clear zone)을 형성하는 모습을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 분리한 TK3-Y 균주를 6일간 250 ml 플라스크에서 배양 시, 10 g · l⁻¹ 카르복시메틸셀룰로오스의 분해반응을 나타낸 결과이다[pH (▲); Cell density (●); Total reducing sugars (■)].
- 도 4은 분리한 TK3-Y 균주를 6일간 250 ml 플라스크에서 배양 시, 10 g · l⁻¹ 과래분말의 분해 반응을 나타낸 결과이다[pH (▲); CFU (●); Total reducing sugars (■)].
- 도 5는 탈지분유 고체 평판 배지에 분리한 TK3-Y 균주를 (a) 2일(b) 4일 간 37℃에서 배양하였을 때 단백질 분해에 의한 투명환(clear zone)을 형성하는 모습을 나타낸 결과이다.
- 도 6은 Sprit blue 고체 평판 배지에 분리한 TK3-Y 균주를 37℃에서 배양하였을 때 지질 분해에 의한 푸른색을

나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 일 관점에서, 본 발명은 서열번호 1의 16s rRNA 유전자 서열을 가지는 바실러스 리케니포미스에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서는 녹조류 가공공정 및 추출공정에서 발생하는 해조다당류 유래 셀룰로오스뿐만 아니라 생선폐기물에 포함된 단백질 및 지질을 효율적으로 분해할 수 있는 미생물을 흙, 해수, 갯벌 등 다양한 환경에서 수집된 샘플로부터 분리하고, 상기 순수분리 미생물이 셀룰로오스를 분해한다는 것을 확인하였고, 상기 미생물에 의해 셀룰로오스가 분해되면, 분해 산물로서는 글루코오스 및 셀로비오스, 셀로 트리오스와 같은 올리고당들이 생성됨을 확인하였다. 또한, 상기 미생물이 단백질 및 지질을 분해하는 능력이 있음을 확인하였다. 상기 미생물을 동정한 결과, 16S rRNA 유전자 서열이 바실러스 리케니포미스와 98%의 상동성을 나타내어, 바실러스 리케니포미스로 동정하였으며, 100% 일치하는 균주가 없어 새로운 균주임을 확인하였다. 상기 균주는 바실러스 리케니포미스 TK3-Y로 명명하고, 2012년 2월 16일자로 농업생명공학연구원에 수탁번호 KACC91709로 기탁하였다.
- [0020] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 바실러스 리케니포미스로 셀룰로오스 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 함유 바이오매스의 당화방법에 관한 것이다.
- [0021] 또 다른 관점에서, 본 발명은 바실러스 리케니포미스로 단백질 또는 지질 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 단백질 또는 지질함유 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 바실러스 리케니포미스 TK3-Y는 녹조류인 파래의 셀룰로오스 분해능이 우수하고, 단백질 및 지질의 분해능을 가지고 있어, 녹조류 가공공정 또는서 녹조류 추출공정 중에 발생하는 처리하기 어려운 부산물인 셀룰로오스로부터 글루코오스 등의 환원당을 생산할 수 있고, 단백질 및 지질 분해능이 뛰어나, 양식폐사 생선 등의 폐기물이나 수산물가공 잔재물이 포함하는 단백질 및/또는 지질을 분해하여 유용한 아미노산 등을 생산할 수 있다.
- [0023] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시 예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 국한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0024] **실시예 1. 셀룰로오스 배지상의 콜로니 형성 미생물의 순수분리**
- [0025] 토양, 갯벌 및 해산 동물의 내장으로부터 채취한 샘플에서 효과적으로 셀룰로오스를 분해하는 세균을 분리하였다.
- [0026] 채취해온 샘플을 250ml 플라스크의 파래 첨가 배지(tap water, NH_4Cl $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 파래 조각 1.5 g, pH 7.0)에 접종하여 8일간 37℃, 180 rpm에서 진탕배양한 후, 각각 0.8% 영양 배지(Nutrient broth, pH 7.0)에 1.5% 한천을 첨가한 고체배지에 도말하였다. 배양된 각 미생물은 순수한 콜로니로 분리될 때까지 계속하여 새로운 고체배지에 도말하여 각 균주를 최종 순수 분리하였다. 순수 콜로니를 형성하는 7종의 균주를 TS1, TS2, TS3, TK1, TK2, TK3-P, TK3-Y으로 명명하였다. 분리된 순수 균주는 4℃에 보관하면서 2주에 한 번씩 계대배양 하였다.
- [0027] 상기 분리된 순수 균주에서 유용한 미생물을 스크리닝하기 위하여, 카르복시메틸셀룰로오스 배지(tap water, carboxymethylcellulose sodium salt $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, NH_4Cl $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, yeast extract $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7.0)에 1.5% 한천을 첨가한 고체배지에 상기 순수 균주를 도말하였다.
- [0028] 그 결과, 카르복시메틸셀룰로오스 한천배지에서 7종의 균주들이 콜로니를 형성함을 확인하였다.
- [0029] **실시예 2: 셀룰로오스 및 파래 분말 분해 미생물의 선별**
- [0030] 실시예 1에서 분리한 7종의 균주 중에서 셀룰로오스 및 파래 분말 분해능이 있는 미생물을 선별하기 위해서 카르복시메틸셀룰로오스 한천배지(tap water, carboxymethylcellulose sodium salt $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, NH_4Cl $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

yeast extract $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ pH 7.0)와 파래분말 배지(tap water, NH_4Cl $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 파래 분말 $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7.0)에 1.5% 한천을 첨가한 고체 평판 배지의 중앙에 2일간 영양 액체 배지(0.8 % Nutrient broth)에서 배양한 7종의 균주 배양액을 각각 $5\mu\text{l}$ 씩 점적(drop)하여 건조시킨 후, 37°C 에서 배양기에서 배양하였다. 각 균주가 형성한 배지 위에 콜로니를 확인한 후, 각 평판배지에 그람 요오드 용액(Gram's iodine solution) 10 ml를 투여하여 5분간 염색하고 나서 액을 세척한 다음, 그람 요오드 용액으로 인해서 검게 염색된 평판배지 상의 콜로니 주변에 형성된 투명환(clear zone)의 형성 유무 및 시간에 따른 환의 크기 변화를 관찰하였다.(Kasana et al., Curr Microbial, 57, 503, 2008).

[0031] 상기의 방법대로 실험한 결과, 분리된 7종 중 TK3-Y이 카르복시메틸셀룰로오스 및 파래분말 고체 평판배지에서 높은 분해능을 가지는 균주임을 확인하였다. TK3-Y 균주는 카르복시메틸셀룰로오스 고체 평판배지에서 자란 콜로니 주변이 2일, 4일이 지남에 따라 반지름이 각각 1cm, 1.6 cm의 투명한 환이 형성되어 시간이 경과하면서 카르복시메틸셀룰로오스의 분해에 의해 그 환의 크기가 점차 커지는 것을 확인하였고(도 1), 파래분말 고체 평판배지에서도 콜로니 주변의 투명한 환이 2일, 4일이 지남에 따라 1cm에서 1.8 cm로 점차 커지는 것을 확인하였다(도 2),

[0032] 실시예 3. 셀룰로오스 분해 미생물의 동정

[0033] 실시예 2에서 뚜렷한 셀룰로오스 분해능을 보인 TK3-Y 균주를 그람염색(Gram staining), 내생포자 염색(Endospore staining), 카탈라아제 테스트(Catalase test), 콜로니 형태 및 현미경 검사를 통하여 일차적으로 동정하였다.

[0034] 상기 TK3-Y 균주는 영양 상태에서 활발한 운동성을 가지고, $0.5\sim 1 \mu\text{m}$ 의 넓이와 $2\sim 4 \mu\text{m}$ 의 길이를 가지는 그람 양성균의 간균이며, 내생포자를 형성하였다. 0.8 % 영양 고체 배지, 0.5 % 카르복시메틸셀룰로오스 고체 배지, 0.5% 파래 가루가 포함된 고체 배지에 37°C , 2일간 배양하였을 때, 아이보리색 콜로니와 흰색 콜로니를 형성하였으며, 카탈라아제 테스트 결과, 양성임을 나타내었다(표 1).

표 1

배지	카르복시메틸 셀룰로오스		파래 powder		영양배지 (Nutrient broth)	Skim milk agar	Spirit blue agar
배지 상태	고체	액체	고체	액체	고체	고체	고체
균 형태	간균 (rod형)						
균 길이(μm)	3-4	2-3	2-5	2-3	2-3	2-3	2-4
균 넓이(μm)	1	0.5-1	1-1.5	0.5-1	0.5-1	1	1
운동성	+	+	+	+++	+	+	++
사슬 (개)	1-3	1-2	1-3	2-3	1-3	1-2	1-2
포자 형태	타원형						
포자 위치	세포중심부 혹은 말단						
콜로니 색상	아이보리	-	흰색	-	아이보리	흰색	파란색
콜로니 형태	lobate	-	undulate	-	irregular	irregular	circular
그람 염색	+						
카탈라아제	+						

[0035]

[0036] 2차 동정은 16S-rRNA 서열을 분석하여 수행하였다. 각 균주의 염색체 DNA는 AccuPrep 염색체 DNA 추출 키트(바 이오니아, 한국)를 사용하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 주형으로 하여 하기의 프라이머를 이용하여 PCR을 사용하여 수행하였으며, 그 결과, 각각의 균주에서 약 1660 bp 크기 단편의 16S-rRNA 유전자가 증폭되었다.

[0037] 518F 프라이머: 5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3' (서열번호 2)

[0038] 800R 프라이머: 5'-TACCAGGTATCTAATCC-3' (서열번호 3))

[0039] DNA의 PCR product를 16S-rRNA sequencing 분석(마크로젠, 한국)을 의뢰한 후, (주)마크로젠에서 분석하여 결정된 16S-rRNA 부분 서열을 서열번호 1에 나타내었다.

[0040] 상기 결과를 BioEdit Sequence Alignment Editor(ver. 5.0.9, Hall, T., *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95, 1999)를 이용하여 GenBank의 Advanced BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 상동성 검색을 수행하였다(Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389, 1997). 그 결과, 약 1660 bp 크기 단편의 16S-rRNA 유전자가 증폭되었다. 그 결과, TK3-Y 균주는 바실러스 리케니포미스 종과 98%의 상동성을 가지고 있어, 바실러스 리케니포미스로 동정되었으며, 100% 일치하는 균주는 없어 새로운 균주로 확인되었다 (표 2).

표 2

[0041]	미생물	16S-rDNA 크기	GenBank Accession No.	균주명	상동성
	TK3-Y	1662 bp	AB374301.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	98%

[0042] 실시예 4. TK3-Y에 의한 셀룰로오스 및 파래 분말의 분해 반응

[0043] 본 실시예에서는 TK3-Y 균주가 셀룰로오스를 분해하여 유용물질 생산 가능성을 확인하였다.

[0044] TK3-Y 균주는 $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 셀룰로오스 액체 배지에서 대수 증식기가 끝났을 때 원심분리로 수확한 후 사용하였다. $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 카르복시메틸셀룰로오스 및 파래 분말이 첨가된 150 ml 액체 배지가 담겨진 250 ml 플라스크를 사용하여, 상기 TK3-Y 균주 80 μg (wet cell)을 접종하여 37°C, 180rpm에서 6일간 분해 반응을 수행하였다.

[0045] 상기와 같이 생분해 반응을 수행하는 동안 1일 간격으로 플라스크 내의 샘플을 채취하여 분해 반응의 특성을 분석하였다. 분해 반응 동안 배양 배지 내 pH의 변화는 pH meter (이스텍, 한국)을 이용해 측정하였으며, 미생물의 농도는 카르복시메틸셀룰로오스 이 첨가된 액체 배지에서는 샘플을 증류수에 3배 희석한 후 큐벳에 담고, 분광광도계(한빛 나노 바이오테크, 한국)를 이용하여 특정 파장(375 nm)에서 측정하였고, 파래분말이 첨가된 배지의 샘플은 10^4 , 10^5 , 10^6 배로 희석하여 CFU(colony forming unit) 방법으로 측정하였다. 분해 반응에서 생성되는 총 환원당 (Total Reducing sugars) 농도는 배양액을 원심 분리(7000 rpm, 10분) 한 상등액 100 μl 과 1 ml DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 vortex를 이용하여 균일하게 혼합한 다음, 끓는 물에서 10분간 반응시킨 후, 5분간 냉수에서 식힌 다음, 분광광도계를 이용하여 570 nm 파장에서 그 값을 측정하였다.

[0046] TK3-Y 균주에 의한 카르복시메틸셀룰로오스 및 파래분말의 분해 결과를 살펴보면, $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 카르복시메틸셀룰로오스가 첨가된 액체 배지에서는 배양 초기 7.0 이었던 pH는 배양 1일 후, 6.26 으로 감소하다가 점점 증가하여 배양 6일의 최종 pH 값은 각각 8.18이었다. 미생물의 농도는 배양 1일 째 가장 높은 0.40을 나타내었으며, 그 이후 점차 감소하여 일정한 농도 0.32 로 유지되는 것을 확인하였다. TK3-Y 균주에 의하여 최종 생성된 총 환원당농도는 $1.26 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 이었다.

[0047] $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 파래 분말이 첨가된 액체 배지에서는 배양 초기 7.0 이었던 pH는 배양 1일 후, 6.47으로 감소하다가, 이후 점점 증가하여 배양 6일의 최종 pH 값은 7.99 이었으며, 미생물의 농도는 배양 5일째 3.1×10^8 CFU/ml로 가장 높은 값을 보였으나, 그 이후 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 최종적으로 TK3-Y균주의 분해 능력에 의해 생성되는 총 환원당이 $0.82 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 임을 확인하였다 .

[0048] 실시예 5. TK3-Y 균주에 의한 단백질 및 지질 분해 능력 측정

[0049] 본 실시예에서는 분리 균주 TK3-Y이 녹조류의 대표적 다당류인 셀룰로오스 외에 수산물 가공 잔재물 및 양식 과정에서 폐사된 생선 폐기물에 함유되어 있는 단백질을 분해할 수 있는 능력이 있음을 확인하였다.

[0050] 탈지분유(Skim milk $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)에 1.5% 한천을 첨가한 고체 평판 배지의 중앙에, 2일간 영양 액체 배지(0.8 %

Nutrient broth)에서 배양한 TK3-Y 균주 배양액 $5\mu\text{l}$ 을 점적(drop)하여 건조시킨 후, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 배양하였다. 또한 지질 분해능을 알아보기 위해서 spirit blue agar (spirit blue agar $3.215\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, lipase substrate $30\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$)에 TK3-Y 균주를 스트리킹 하였다. TK3-Y 균주가 각 배지 위에 콜로니를 형성한 후, 탈지분유 배지에는 콜로니 생성과 동시에 생성되는 콜로니 주변의 투명한 환의 크기를 관찰하였다. 그리고 spirit blue agar 배지에서는 콜로니가 푸른색을 띠는지 여부를 관찰하였다.

[0051] 상기의 방법대로 실험한 결과, 탈지분유 평판배지에서도 콜로니 주변의 투명한 환이 2일, 4일이 지남에 따라 TK3-Y 균주의 단백질 분해에 의한 환의 반지름이 1cm, 1.6cm 으로 점차 커지는 것을 확인하였다 (도 5). 또한 spirit blue agar 배지에서 배양한 TK3-Y균주의 콜로니가 푸른색을 나타냄을 확인하였다(도 6).

[0052] 따라서 순수 분리한 TK3-Y 균주는 녹조류가 함유하는 다당류 셀룰로오스 외에도 파래의 세포벽 다당류 및 단백질, 지질을 분해하는 능력도 가지고 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0053]

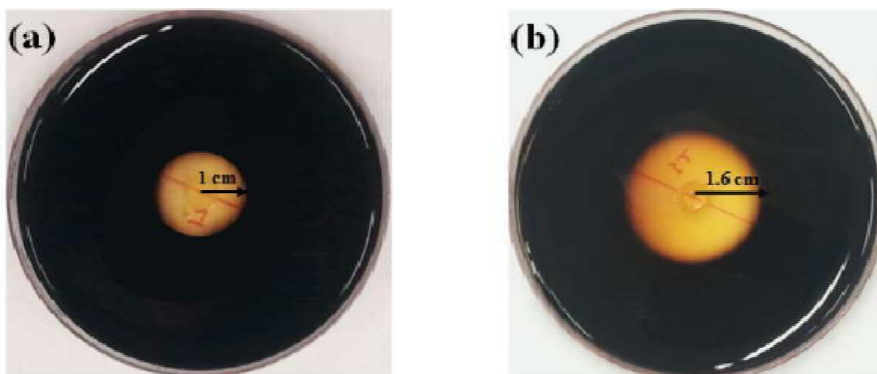
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91709

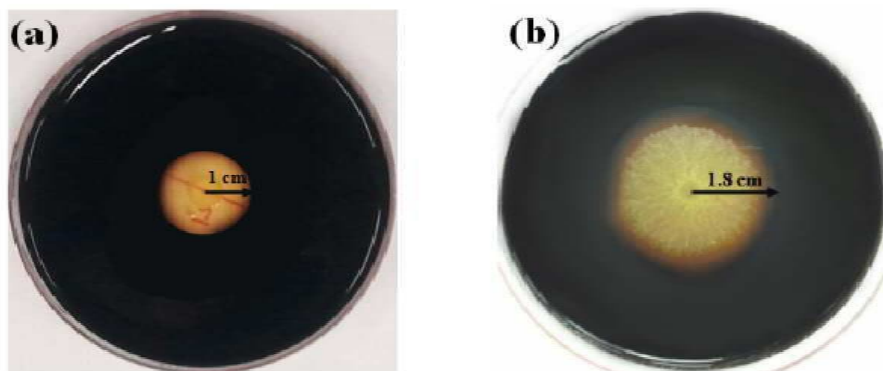
수탁일자 : 20120216

도면

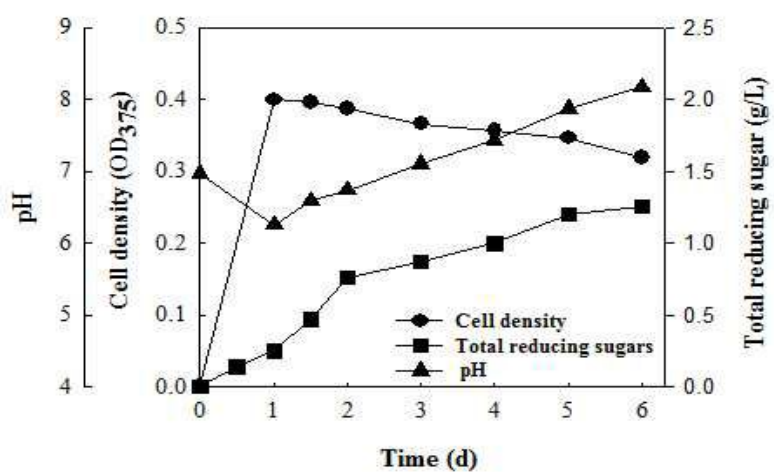
도면1



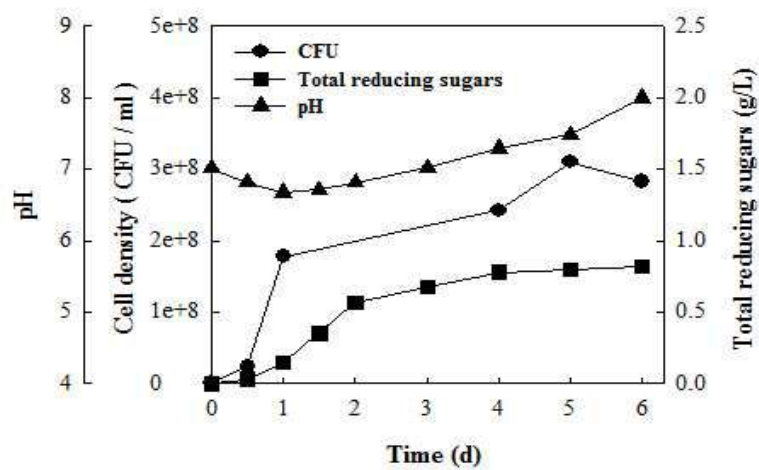
도면2



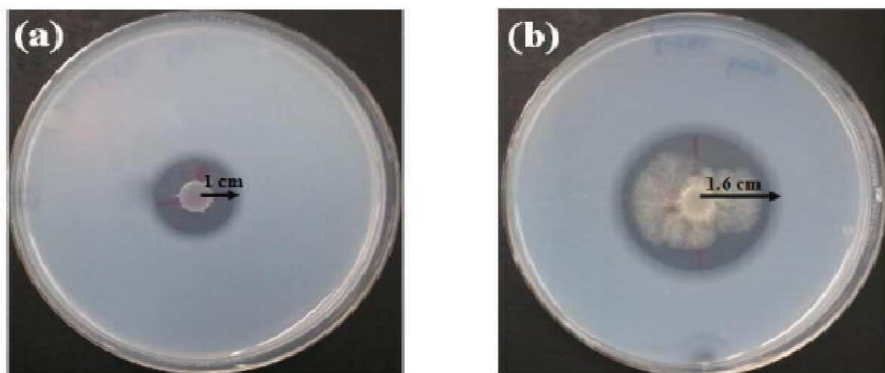
도면3



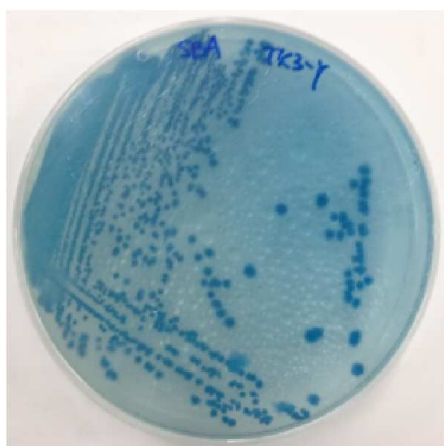
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Novel Microorganism Having Degrading Activity of Cellulose,
Protein and Lipid

<130> P12-B079

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1662

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis TK3-Y

<400> 1

aaatttaggt acgtaattct tggattttga gtttggattc ttgcctcaag gacgaaccgc 60

tggcggggcgt gccttaatac atgcaagtcg agcggaccga cggaagctt gcttcctta 120

ggttaagcgc cgaccggtga agtacaagtg ggtaaccttc ctggtaggat tggattactt 180

ccggaaaccc ggggttattc cggaatgctg gatggaccgc aatgtttcaa tcataaaagg	240
tggttttttag ctaccactta cagatggacc cgcggcgcgc tagctagttag gtgaggtaac	300
ggctcaccaa ggcgacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcggccac actgggactg	360
agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag	420
tctgacggag caacgccgcg tgagtgaatga aggttttcgg atcgtaaaac tctgttgta	480
gggaagaaca agtaccgttc gaataggcgc gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca	540
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggtg gcaagcgttg tccggaatta	600
ttgggcgtaa agcgcgcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac	660
cggggagggt cattggaac tggggaactt gactgcagaa gaggagagtg gaattccacg	720
tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt	780
ctgtaaactg acgctgaggc gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta	840
gtccacgccg taaacgatga gtgctaagtg ttagagggtt tccgcccttt agtctgcag	900
caaacgcatt aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt	960
gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct	1020
taccaggtct tgacatcctc tgacaacct agagataggg cttcccttc gggggcagag	1080
tgacaggtgg tgcattggtg tcgtcagtc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga	1140
acgagcgcaa cccttgatct tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc	1200
ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg	1260
ctacacacgt gctacaatgg gcagaacaaa gggcagcgaa gccgcgagcg taagccaatc	1320
ccacaatct gttctcagtt cggatcgagc tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc	1380
gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc	1440
ccgtcacacc acgagagttt gtaacaccgc aagtcggtga ggtaaccttt tggagccagc	1500
cgccgaaagt gggacagatg attgggtga atctacaagg gggcccccta aaaaaggttt	1560
tcggggggcc cgggggcccc gaaaaggga ccggggggcc gggaaaaggg agccccggc	1620
gccccaaaaa ccaaccccc ccaaccccc aaaaaaaaaa cc	1662
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
ccagcagccg cggtaatacg	20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

taccagggtg tctaatcc

18