

## 유기질분해능력이 높은 세균 *Bacillus velezensis* 2383의 분리동정

김동률, 방현아, 문혜경

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리는 가까운 앞날에 전반적인 과학기술분야에서 세계를 디디고 올라설수 있다는 배심을 가지고 첨단돌파의 기적들을 련이어 창조하여야 합니다.》

유기폐설물들을 재자원화하여 집집승먹이와 유기질비료, 미생물비료, 생물농약 등을 생산하는데서 중요한것은 유기질분해능력이 높은 균그루를 분리하여 적용함으로써 제품생산공정을 간소화하며 원가를 낮추는것이다.[2, 4]

우리는 몇가지 분리원으로부터 농마, 단백질, 섬유소분해능이 높은 세균 *Bacillus velezensis* 2383을 분리동정하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

균분리원으로는 유기질발효종균제품, 소두엄, 돼지두엄, 버짚퇴비 등을 리용하였다. 먼저 표준합성배지인 R2A배지에서 균그루들을 분리한 다음 농마, 단백질, 섬유소분해능을 검토하는 방법으로 균그루를 선발하였다.

#### R2A배지[2]

효모엑스 0.5g, 프로테오즈펩톤 0.5g, 카자미노산 0.5g, 텍스트로즈 0.5g, 가용성농마 0.5g, 피루빈산소다 0.3g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3g, MgSO<sub>4</sub> 0.05g, NaCl 30g, 우무 15.0g, 증류수 1L, pH 7.0

#### 농마분해능검토배지[6]

펩톤 10g, 소고기엑스 5g, 가용성농마 2g, NaCl 5g, 우무 15.0g, 증류수 1L, pH 7.0

#### 단백질분해능검토배지[3]

카제인우무배지—카제인(또는 기름뽕젓) 20g, 펩톤 5g, 효모엑스 2g, NaCl 3g, 우무 20g, pH 7.0

#### 섬유소분해능검토배지[1, 5]

NaNO<sub>3</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02g, KCl 0.2g, CMC-Na 0.5g, 펩톤 0.2g, 우무 20g, 증류수 1L, pH 7.5

분리균그루에 대한 동정은 선행연구[4]에 준하여 진행하였으며 16S rRNA염기배열분석은 전문기관에 의뢰하여 진행하였다.

실험에서는 PCR장치(《Eppendorf》), 전기영동장치(《Mupid-2plus》), 자외선전기영동검측기(《ZF-90》), 광학현미경(《Olympus BX51》), 탁상원심분리기 5415D(《Eppendorf》), 랭동원심분리기 5417R(《Eppendorf》), 자동회전식현탁기(《HY-1》) 등을 리용하였다.

PCR를 위한 Taq폴리메라제(Mg<sup>2+</sup>, dNTP, PCR완충액이 함께 들어있음.)와 프라이머들은 《TaKaRa》의것을 리용하였다.

상류프라이머 27F GAGTTTGATCCTGGCTCAG

하류프라이머 1492R TACGGTTACCTTGTACGACTT

## 결과 및 논의

채취한 시료로 희석계렬을 만들어 R2A배지에 도말한 다음 27℃에서 2일동안 배양하여 얻은 균무지들 가운데서 직경이 큰 균무지 48개를 순수분리하였다. 이것들을 농마, 단백질, 섬유소분해능검토배지에 각각 접종하여 27℃에서 분해띠직경/균무지직경값을 조사하였다.(표 1, 2, 3)

표 1. 분리균그루들의 농마분해능검토

균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경	균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경
1	소두엄	20.0	4.0	5.0	26	유기질발효종균제품	12.0	6.0	2.0
2	소두엄	24.0	4.0	6.0	27	유기질발효종균제품	8.0	5.0	1.6
3	소두엄	21.0	4.0	5.3	35	유기질발효종균제품	8.0	5.0	1.6
4	소두엄	18.0	4.0	4.5	42	유기질발효종균제품	6.0	2.5	2.4
5	소두엄	19.0	4.0	4.7	43	유기질발효종균제품	8.0	2.5	3.2
6	소두엄	18.0	4.0	4.5	48	유기질발효종균제품	12.0	2.5	4.8
15	벼짚퇴비	6.0	2.5	2.4					

배양온도 27℃, 농마분해능검토배지에서 48h 배양

표 2. 분리균그루들의 단백질분해능검토

균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경	균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경
1	소두엄	20.0	5.0	4.0	12	벼짚퇴비	14.0	4.0	3.5
2	소두엄	22.0	5.0	4.5	15	벼짚퇴비	12.0	3.5	3.4
3	소두엄	19.0	5.0	3.8	17	유기질발효종균제품	8.0	2.5	3.2
4	소두엄	18.0	5.0	3.6	22	유기질발효종균제품	14.0	6.0	2.3
5	소두엄	19.0	5.0	3.8	25	유기질발효종균제품	15.0	6.0	2.5
6	소두엄	20.0	5.0	4.0	42	유기질발효종균제품	14.0	4.0	3.5
8	돼지두엄	15.0	4.0	3.7					

배양온도 27℃, 단백질분해능검토배지에서 48h 배양

표 3. 분리균그루들의 섬유소분해능검토

균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경	균 번호	분리원	분해띠 직경 /mm	균무지 직경 /mm	분해띠직경/ 균무지직경
1	소두엄	27.0	2.5	10.8	11	벼짚퇴비	16.0	4.0	4.0
2	소두엄	29.0	2.5	11.6	15	벼짚퇴비	10.0	2.0	5.0
3	소두엄	28.0	2.5	11.2	17	유기질발효종균제품	16.0	3.0	5.3
5	소두엄	5.0	1.5	3.3	19	유기질발효종균제품	11.0	2.0	5.5
7	돼지두엄	6.5	5.0	1.3	21	유기질발효종균제품	20.0	3.0	6.7
8	돼지두엄	5.5	5.0	1.1					

배양온도 27℃, 섬유소분해능검토배지에서 3d 배양

표 1, 2, 3에서 보는바와 같이 48개의 분리균그룹들가운데서 소두염시료로부터 분리한 No. 1, 2, 3균그룹의 농마, 단백질, 섬유소분해활성이 특별히 높았다.

가장 활성이 높은 균그룹 No. 2의 형태학적 및 생리생화학적특성들을 조사한 결과는 표 4, 5와 같다.

표 4. 분리균그룹 No. 2의 형태학적특성

세포특성			균무지특성						액체배양특성	
그람염색성	크기 / $\mu\text{m}$	모양	직경 /mm	색갈	모양	자름면	접성	겉면	막형성능	혼탁도
그람양성	0.5×(1.5~3.5)	막대	2~3	젓색	둥근형	평평함	중	과도 모양	두터운 흰색막형성	점차 흐림

R2A배지, 배양온도 27℃, 배양시간 24h

표 5. 분리균그룹 No. 2의 생리생화학적특성

탄소원리용능								옥시 다제 활성	카탈 라제 활성	아르기닌 물작용분해	트윈 물작용분해
포도당	젓당	사탕	과당	아라비 노즈	소르비트	말토즈	만니트				
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

R2A배지, 배양온도 27℃, 배양시간 24h

분리균그룹 No. 2의 순수성을 확인한 다음 핵산추출과 PCR, 전기영동을 진행(사진)하고 16S rRNA염기배열을 분석한 결과(1 395bp)는 다음과 같다.

TCTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG  
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAAC  
CGCATGGTTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA  
TGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA  
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG  
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC  
AAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG  
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG  
TCATTGGAAGTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAT  
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA  
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCG  
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGC  
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAA  
GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA  
GATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA

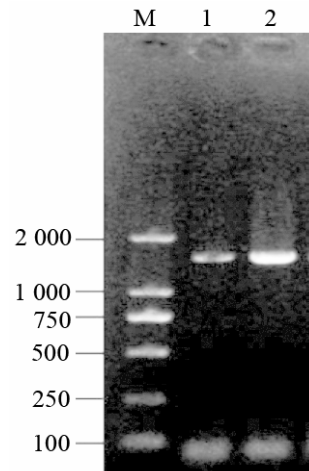


사진. 분리균그룹 No. 2의 16S rRNA염기배열증폭피의 전기영동상

1-대조균 *Pseudomonas mandelii* CIP 105273(T), 2-분리균그룹 No. 2, M은 분자크기표식자 (DL2000)

TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTA  
AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACA  
AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG  
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG  
TAACACCCGAAGTCGGGTG

이 염기배열자료를 인터넷상에서 다른 세균들의 16S rRNA염기배열자료들과 비교 (Ezbiocloud <http://www.ezbiocloud.net/>)하여 종 검색을 진행한 결과는 표 6과 같다.

표 6. 16S rRNA염기배열비교분석법에 의한 분리균그루의 종검색

균번호	비교되는 종의 이름 및 등록번호	상동률 /%
No. 2	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502(T)	99.79

표 6에서 보는바와 같이 16S rRNA염기 배열비교분석법으로 밝힌 분리균그루 No. 2의 분류학적위치는 *Bacillus velezensis*였다.

우리는 국가균주보관소에 분리균그루를 *Bacillus velezensis* 2383으로 등록하였다.

## 맺 는 말

농마, 단백질, 섬유소분해능력이 높은 세균을 분리하고 그 형태학적 및 생리생화학적특 성과 16S rRNA염기배열자료를 분석한데 기초하여 *Bacillus velezensis* 2383으로 등록하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] 강원호 등; 섬유소분해효소와 그 리용, 김일성종합대학출판사, 72~80, 주체91(2002).
- [2] 김동률 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 59, 주체103(2014).
- [3] P. T. Kathleen et al.; Foundations in Microbiology, McGraw-Hill Education, 89~159, 2018.
- [4] Paul De Vos et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3, Springer, 198~778, 2009.
- [5] R. C. Kasana et al.; Curr. Microbiol., 57, 503, 2008.
- [6] 李振高等; 土壤与环境微生物研究法, 科学出版社, 49~88, 2008.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

## Isolation of *Bacillus velezensis* 2383 with High Degradation Capacity on Organic Material

Kim Tong Ryul, Pang Hyon A and Mun Hye Gyong

We newly isolated *Bacillus velezensis* 2383 with high degradation capacity on organic matter from cattle compost.

Keywords: cattle compost, *Bacillus velezensis*, organic matter, degradation