

Cellulases of symbiotic *Elizabethkingia* sp. BM10 isolated from *Reticulitermes speratus* KMT1, a Korean termite

Moon-Jung Cho, Yoon-Hee Kim *, Hee-Hoon Ahn, Keum Shin, Tae-Jong Kim, Yeong-Suk Kim
(Department of Forest Products and Biotechnology, Kookmin University)

서론

Cellulose는 자연계에 다량으로 존재하는 유기화합물로 분해 산물인 glucose를 이용한 대체연료로 주목받고 있는 바이오 에탄올 생산의 주원료로 이용되고 있으며 흰개미는 cellulose를 분해하여 생산된 glucose를 흡수한다. 일반적으로, 흰개미는 흰개미의 장내 미생물에 의하여 cellulose 소화가 이루어진다고 알려져 있다. 흰개미 대사 작용은 흰개미 자체 뿐 아니라 원생생물, 곰팡이, 박테리아의 효소의 조화가 이루어져야만 한다.

본 연구에서는 북한산에서 채취한 흰개미의 장내 미생물을 분리하여 목질바이오매스에 대해 분해력이 높은 미생물을 선발하고 선발된 균주 *Elizabethkingia* sp. BM10 (이하 BM10)의 cellulase생산을 높이기 위해 최적 생산조건을 탐색하고 흰개미와 흰개미 장내미생물의 공생을 연구하고자 한다.

재료 및 방법

1. 흰개미 장내 미생물의 분리 및 동정

TYE배지와 M63배지에 10마리의 흰개미 장을 다음과 같은 농도(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5})로 희석하였다. 희석한 샘플 $100\mu\text{l}$ 를 방선균 배지인 HV agar, S agar, and Bennett's agar, 곰팡이 배지인 PDA, bacteria배지인 nutrient agar 와 LB agar에 분주하여 bacteria는 28°C 에서 1일간 곰팡이는 3일간 방선균은 7일간 배양하였다. Agar배지의 single colony를 분리하여 유전자 서열 분석을 의뢰하였다.

2. 효소활성측정

Endo- β -1,4-glucanase(이하 EG)는 효소액 $500\mu\text{l}$ 에 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5에 녹인 2% carboxymethylcellulose $500\mu\text{l}$ 를 첨가하여 50°C 에서 30분간 반응 시킨 후 DNS reagent 3 ml 넣고 100°C 5분간 반응시켜 540 nm에서 측정하였다. β -glucosidase (이하 BGL)와 cellobiohydrolase (이하 CBH)는 각각 기질 10 mM p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, 10 mM p -nitrophenyl- β -D-cellobioside (Sigma) 사용하여 반응 후 405 nm에서 측정하였다.

3. 최적 pH 및 온도

고역가 cellulase 활성을 보인 균주 BM10를 peptone • yeast extract 배지 (0.8% peptone, 0.2% yeast extract, 0.5% potassium phosphate monobasic, 0.5% potassium phosphate dibasic, 2% carboxymethyl cellulose, 그리고 0.025% antiform) 이용하여 pH 1.0간격으로 pH 3.0-pH 9.0 범위에서 최적 pH를 조사하였다. 균주는 7일간 25°C , 200 rpm에서 배양하였다. 최적 온도는 최적 pH 결과를 토대로 5°C 간격으로 10°C - 50°C 범위의 활성을 측정 하였다.

4. 최적 탄소원 및 질소원

선발된 균주 BM10을 탄소원 cellulose (Aldrich), carboxy-methylcellulose (Aldrich), avicel (Fluka), xylose (Sigma), xylan (Sigma), soluble starch (Duksan pure chemical), lactose (Duksan pure chemical), maltose (Sigma), rice straw, 그리고 mixed wood를 사용하여 최적 탄소원을 알아

보았다. 탄소원 결과를 토대로 최적 탄소원을 선택하여 질소원 yeast extract (BD), peptone (BD), tryptone (BD), corn steep powder (Sigma), urea (Duksan pure chemical), ammonium sulfate (Junsei), potassium nitrate (Duksan pure chemical), sodium nitrate (Duksan pure chemical), yeast extract • peptone mixture 그리고 yeast extract • tryptone mixture를 이용하여 최적 질소원을 알아 보았다.

결과 및 고찰

1. *Reticulitermes speratus* KMT1의 장내 호기성미생물의 동정

LB agar 배지를 colony-forming units (CFU)을 이용하여 colony 개수를 알아 본 결과 대략 2000개 정도의 호기성 미생물을 분리하였으며, 미생물을 형태학적으로 분리 하여 37개의 colony를 선택하고, 선택된 균주를 rRNA gene sequences를 분석한 결과 16개의 bacteria를 얻을 수 있었다 [Table 1].

Table 1. Identification of isolated microorganisms using 16S ribosomal RNA sequences.

Label (GenBank #)	Genus	The closest organism (GenBank #)	Query Coverage	Max Identity	Additional accession no.
NT2B (GU458274)	<i>Comamonas</i>	<i>C. odontotermitis</i> (DQ453128)	100%	99%	GU458261
LT2B (GU458267)	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i> sp. (GQ416371)	100%	99%	
PM2 (GU458277)	<i>Citrobacter</i>	<i>C. farmeri</i> (DQ187383)	99%	99%	
PT2B (GU458283)	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i> sp. (GQ205112)	99%	99%	
ST8D (GU458292)	<i>Citrobacter</i>	<i>C. farmeri</i> (DQ187383)	99%	99%	
ST9B (GU458293)	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> (CP000964)	99%	99%	
NM3 (GU458270)	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> (GQ889261)	100%	99%	GU458259, GU458286 GU458271, GU45828, GU458282
NT3 (GU458275)	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> (FJ530951)	100%	99%	
PT1B (GU458280)	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> (AY514434)	100%	99%	GU458279
PT3 (GU458285)	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> (GQ889261)	99%	99%	GU458269, GU458278
HT4B (GU458265)	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Elizabethkingia</i> sp. (AY468476)	100%	98%	GU458268, GU458273, GU458260
BM10 (GU458257)	<i>Elizabethkingia</i>	<i>E. meningosepticum</i> (AY468482)	99%	99%	GU458290, GU458284
ST6D (GU458291)	<i>Dyella</i>	<i>D. ginsengisoli</i> (AB245367)	99%	98%	
LT1C (GU458266)	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i> (GU003833)	100%	99%	
NT1 (GU458272)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. (FJ601644)	100%	99%	
NT4 (GU458276)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. (FJ263011)	100%	99%	

2. 분리된 16가지 bacteria의 cellulase 활성

선택된 16가지 bacteria는 cellulase의 발현을 위해 TYE • CMC 배지에서 배양되었다. Cellulase 역가는 EG, BGL, 그리고 CBH를 측정하였다.

대부분의 균주는 BGL 활성이 0.10 U/ml보다 낮았지만 NT2B, ST6D, BM10, 그리고 NT3는 0.12 U/ml 이상이 나타났다. CBH 활성은 BM10, PT1B, PT3, NT3, 그리고 NM3 가 0.14 U/ml 보다 높았으며, 다른 균주는 0.07 U/ml보다 낮은 활성을 보였다. The EG 활성은 모든 균주가 0.005 U/ml 보다 낮았다.

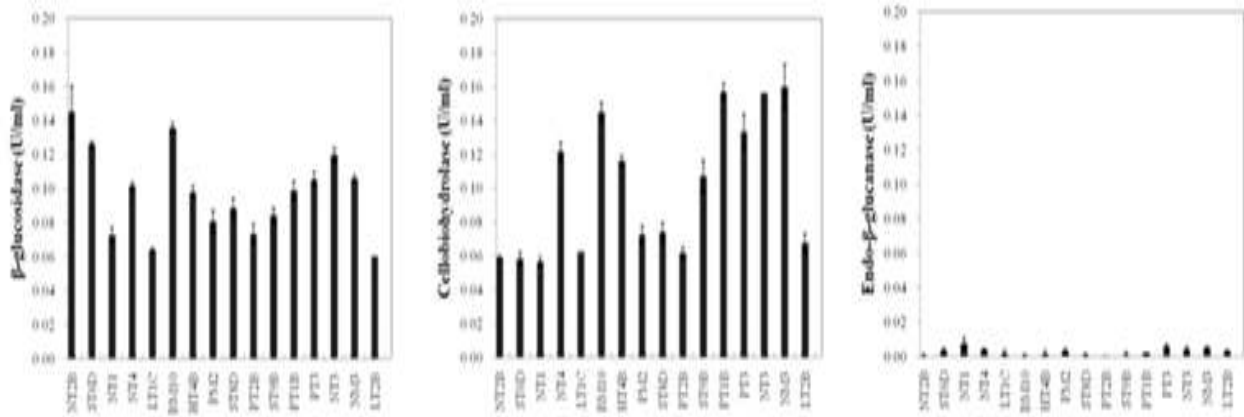


Fig. 1. Cellulase activity of isolated bacteria from *Reticulitermes speratus* KMT1. Three types of cellulase – EG, BGL, and CBH – were measured separately. The enzyme activity was assayed four times independently, and a single representative set of results is shown here.

3. 최적 pH 및 온도

활성이 높았던 균주 BM10의 최적 pH를 알아 본 결과 pH 6.0-7.0에서 BGL 활성이 0.12 U/ml로 가장 높았으며 CBH의 경우도 비슷한 양상을 나타냈다.

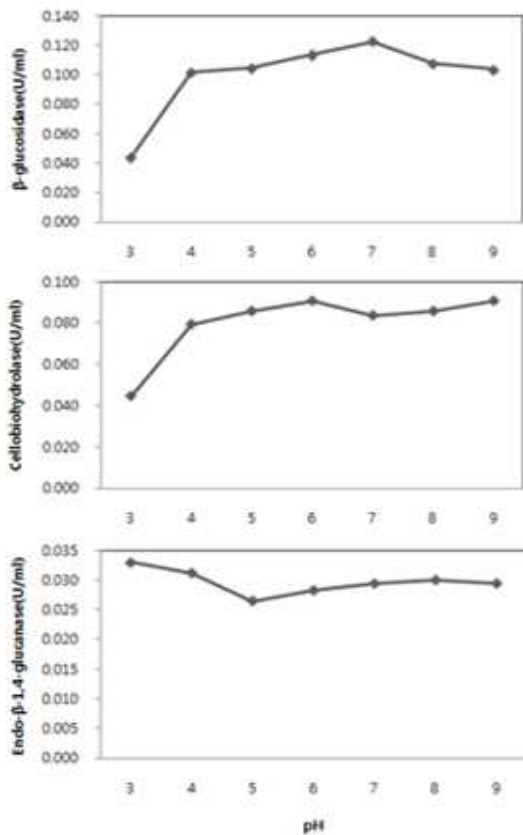


Fig. 2. Effect of pH on cellulase productions of *Elizabethkingia* sp. BM10. Three types of cellulase (EG, BGL, and CBH) were measured separately. The enzyme activity was assayed twice independently, and their average is shown here.

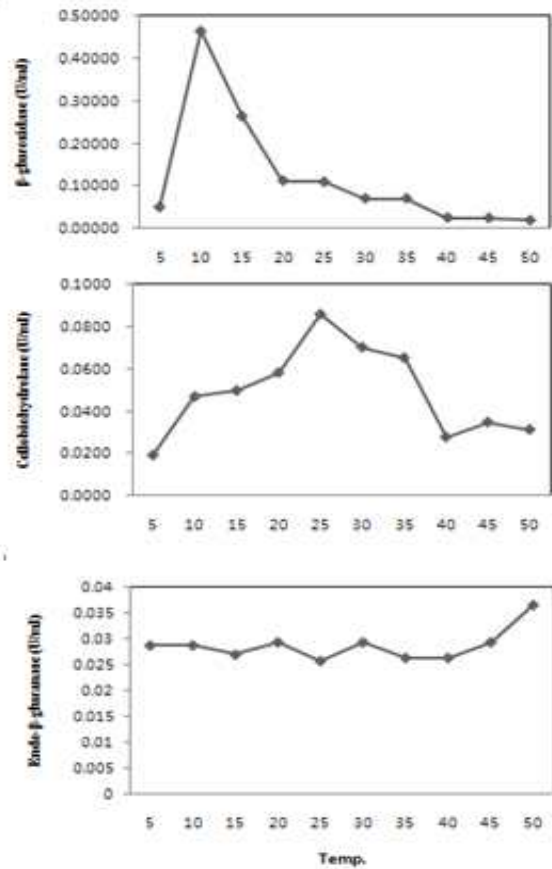


Fig. 3. Effect of temperature on cellulase productions of *Elizabethkingia* sp. BM10. The enzyme activity was assayed twice independently, and their average is shown here.

BM10의 최적 온도를 탐색 한 결과 BGL 활성은 10℃에서 0.45 U/ml을 나타냈으며, CBH는 25 - 35℃ 범위에서 0.1 U/ml활성을 나타냈다. 위와 같은 결과를 볼 때 BGL과 같은 cellulase 분해효소가 생존을 위해 낮은 온도에서도 최대로 생산되고 있었다.

4. 최적 탄소원 및 질소원

BM10의 최적 탄소원은 10℃에서 CMC 였지만 30℃에서는 xylose로 나타났다. 최적 질소원은 탄소원으로 CMC를 사용한 결과 yeast extract와 peptone mixture가 가장 높은 활성을 보였으며, 반면에 xylose를 탄소원으로 이용한 결과 yeast extract와 tryptone mixture이 가장 높은 활성을 보였다.

결론

흰개미 장내 미생물을 분리한 결과 16가지 Bacteria를 얻을 수 있었으며, 16가지의 균주의 cellulase 활성 측정을 통해서 *Elizabethkingia* sp. BM10이 가장 높은 활성을 가지는 것을 확인하였다. 흰개미 장내 미생물의 EG 활성은 낮은 것을 확인 할 수 있었다. 이는 cellulase의 효율적인 분해에 EG가 필요함을 고려하면 다른 곳에서 생산되는 EG가 이용 될 것으로 추정되며 대표적인 예는 흰개미 자체의 침샘에서 분비되는 EG이다. 이와 같은 관찰은 오랜 기간 동안 흰개미와 미생물의 공생으로 인해서 장내에 존재하는 Bacteria에는 EG가 요구되지 않아 EG의 능력이 소실 된 것으로 사료된다. *Elizabethkingia* sp. BM10의 최적 효소생산조건은 pH 6.0-7.0 범위이고, BGL의 경우 최적 효소생산 온도는 10℃이며, CBH의 경우 25-30℃가 가장 높은 활성을 나타냈다. *Elizabethkingia* sp. BM10의 최적 탄소원은 CMC와 Xylose이며, 최적 질소원은 yeast extract • peptone mixture와 yeast extract • tryptone mixture인 것으로 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1. Alan, R. L. and Weste, L. A. O. (2003) United States Department of Agriculture-Agriculture Research Service research on targeted management of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Pest Management Science*, 59: 788-800
2. Ghose, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl Chem*, 59(2); 257-268
3. König, H., Fröhlich, J., Berchtold, M., and Wenzel, M. (2002) Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites. *Recent Res Microbila*, 6: 125-156
4. Ohkuma, M. (2008) Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends Microbiol*, 16: 345-352