

보 문

β -Glucosidase를 생성하는 호염성 *Roseivivax roseus* 균주의 분리 및 분류동정

조건영 · 한송이*

목원대학교 미생물나노소재학과

Isolation and identification of β -glucosidase producing halophilic *Roseivivax roseus*

Geon-Yeong Cho and Song-Ih Han*

Department of Microbial and Nanomaterials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received June 8, 2015; Accepted June 25, 2015)

ABSTRACT: Four halophilic bacteria were isolated from a salt water tank of more than 25% above salinity used for production of salt. HJS1 and HJS6 strains were identified as having β -glucosidase producing capabilities at high salinity. β -Glucosidase produced from these bacterial strains showed the best activity at 56-79 U/ml in NaCl (0-5%), showing the highest β -glucosidase activity at NaCl 3%. A salt tolerant β -glucosidase can maintain at least 75% activity of the enzyme in 0-20% NaCl concentration. The 16S rRNA gene sequences of strains HJS1 and HJS6 shows 99.8% similarity with *Roseivivax roseus* BH87090^T. Those sequences were registered as AB971835 and AB971836 in the NCBI GenBank. DNA-DNA hybridization test revealed that both strains showed 90.1 to 90.3% hybridization values with *R. roseus* BH87090^T, which was the closest phylogenetic neighbor. Major Cellular fatty acids of strains HJS1 and HJS6 were C_{16:0}, C_{18:1} ω 7c, C_{19:0} cyclo ω 8c and 11-methyl C_{18:1} and the major quinone was Q-10. Their fatty acid composition and quinone were very similar to *Roseivivax roseus* BH87090^T. Meanwhile, *Roseivivax roseus* BH87090^T did not produce any β -glucosidase. Based on the molecular and chemotaxonomic properties, strains HJS1 and HJS6 were identified as members of *Roseivivax roseus*.

Key words: *Roseivivax roseus*, β -glucosidase, halophilic

호염성 세균은 0.5-2.5 M의 NaCl 농도에서 정상적으로 성장하는 세균으로 소금호수, 염전, 해양 및 염장식품 등으로부터 *Achromobacter*, *Halobacterium*, *Pediococcus*, *Actinopolyspora*, *Marinococcus*, *Salinicoccus*, *Bacillus* 속에 속하는 많은 세균들이 분리 보고되었다(Ventosa *et al.*, 1998; DasSarma and Arora, 2002; Das *et al.*, 2006). 호염세균에 관한 연구는 주로 호염기작과 세포형태학적 특성 및 생체내 대사 효소의 특성에 대한 연구를 중심으로 진행해 왔다. 균체의 효소에 대한 연구 보고로 cellulose, amylase, nuclease, lipase, protease 등이 있으며, 호염성 세균이 생산하는 효소는 일반 미생물이 생산하는 효소보다 내염성이 높아 산업적으로 다양한 효소의 응용성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Onish, 1972; Fukami *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2008).

고분자 섬유소인 cellulose로부터 glucose를 완전히 유리시키는 데 작용하는 β -glucosidase는 탄수화물 잔기뿐만 아니라 alky- β -D-glucoside 및 aryl- β -D-glucoside 등의 β -glucosidic linkage를 비환원성 말단으로부터 가수분해시키는 것으로 알려져 있다(Woodward and Wiseman, 1982). 또한 cellulose뿐만 아니라 다양한 기질을 인식할 수 있어 식품, 화학, 세제 및 직물공업 등에서 유용하게 이용되고 있다(Tamas *et al.*, 2003). 이들 β -glucosidase의 생산 균주 분리나 효소의 대량생산을 위한 여러 가지 배양조건에 대한 연구와 효소학적인 성질을 규명하는 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다(Ketudat Cairns and Esen, 2010). 미생물이 생산하는 β -glucosidase는 *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum* 등의 곰팡이와 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* 등의 효모 그리고 토양세균으로 *Streptomyces reticuli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

*For correspondence. E-mail: h1882@mokwon.ac.kr;
Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

polymyxa, *Bacillus circulans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Cellulomonas* sp. CS1-1 및 초고온성 고세균 *Pyrococcus furiosus* 등 다양한 계통군에 속하는 균주들이 알려져 있고 이들이 생산하는 β -glucosidase에 대한 효소학적 특성과 유전자도 다수 밝혀졌다(Lee *et al.*, 1988; Kengen *et al.*, 1993; Takashima *et al.*, 1999; Tamas *et al.*, 2003; Kado *et al.*, 2011). 반면, 호염성균이 생성하는 β -glucosidase에 관한 연구는 *Bacillus* 속과 *Gracilibacillus* 속에 속하는 그람 양성균이나, *Halobacterium* 속과 *Halothermothrix* 속에 속하는 고세균(Kori *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015; Yu and Li, 2015)이 다수 밝혀졌을 뿐 Proteobacteria 계통군의 그람 음성세균의 균주가 생산하는 호염성 β -glucosidase에 대한 보고는 매우 미흡한 실정에 있다. 본 연구에서는 호염성 β -glucosidase를 생성 미생물 유전자원 다양성을 확보하기 위하여 염전의 25% 이상의 함수를 저장해 놓는 염전의 해주로부터 높은 염분농도에서도 생육가능한 호염성 세균을 분리하고 β -glucosidase 효소 특성을 확인하고 분류 동정하여 미생물 유전자원으로 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

호염성 세균의 분리

전라남도 신안 신의도 지역(35°35'43. 64"N 126°36'44. 86"E) 일대의 염전에서 소금생산을 위한 25% 이상의 함수를 저장해놓는 해주 내 퇴적물 시료를 채취하였다. 채취한 해주 퇴적층 시료를 10 g 정량하여 90 ml의 멸균수에 넣고 초음파기 (Sonics VCX750, Vibra Cell)로 30 W에서 2분간 분산 처리하였다. 분산 처리한 시료를 9 ml 멸균수에 순차적으로 희석하였다. 희석 시료 100 μ l를 10% NaCl을 첨가한 marine agar (MA) 배지에 도말하고, 28°C에서 7일간 배양하면서 평판배지 상에 형성된 호염성 세균 콜로니를 계수하고 분리하였다. 분리된 균주 중 20% NaCl 첨가한 MA 배지에서 생장 가능한 균주를 호염성 세균으로 순수분리하였다.

β -Glucosidase 활성균주의 분리

호염성 세균의 β -glucosidase 효소 활성을 확인하기 위해 3%, 10% 그리고 20%의 NaCl 농도를 첨가한 esculin agar 배지 (Difco Co.)에 각각 접종하고 28°C에서 3일 동안 배양한 후 esculin을 가수분해하여 배지를 흑갈색으로 변색시키는 세균을 β -glucosidase 생성 균주로 분리하였다.

β -Glucosidase 활성 측정

분리된 β -glucosidase 생성 균주의 효소 활성은 Hong 등 (2009)의 방법을 변형하여 수행하였다. 세포가 제거된 상등액을 조효소액으로 이용하였고, p-nitrophenol 용액(Sigma-Aldrich)을 여러 농도로 희석한 뒤 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 표준선을 작성하였다. 기질은 sodium acetate/acetic acid 완충액(50 mM, pH 5)에 p-nitrophenyl- β -p-glucocyanoside (Sigma Chemical)의 농도가 5 mM이 되도록 용해 시킨 후, 70 μ l의 조효소액에 기질용액을 30 μ l 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응하였다. 100 μ l 0.5 M Na₂CO₃를 주입하여 반응을 종결 시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitrophenol 농도를 측정하였다. 효소 활성(unit)은 1분 동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 산출하였다(Na *et al.*, 2009; Jang and Kim, 2010).

NaCl 농도에 따른 β -glucosidase 활성 측정

금속이온에 대한 β -glucosidase의 효소활성 변화를 조사하기 위하여 효소반응 sodium acetate/acetic acid 완충액에 NaCl를 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 그리고 30% 첨가하고 효소 활성을 측정하였다. β -Glucosidase 활성에 미치는 NaCl 농도의 영향을 검토하기 위해 반응완충용액에 NaCl를 0-30%까지 첨가하여 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였다. 또한 NaCl에 대한 안정성을 측정하고자 0-30%의 농도에 따라 NaCl을 첨가한 반응완충용액과 효소를 37°C에서 1시간 동안 정치시킨 후 기질을 첨가하여 효소의 잔존활성을 측정하였다. 상대활성은 가장 높은 활성을 가지는 NaCl 농도의 활성을 100%로 하여 백분율로 나타내었다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

순수 배양된 단일 콜로니를 주형으로 사용하여 직접 PCR 증폭을 수행하였다. *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAG-CCGC-3') primer를 이용하였다. PCR 조건은 1× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M primer, 5× Band doctor, 2.5 U Taq DNA polymerase (Solgent Co.), template는 10-50 ng으로 하였다. 16S rRNA PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응은 94°C에서 2분간 반응 한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extension 하고, 4°C로 내려 종료하였다. 증폭된 PCR 반응물은 QIAquick

PCR Purification Kit (QIAGEN)으로 정제한후 염기서열 분석을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)에서 계통군을 확인하고 각 균주는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 homology를 비교하였다. 각 염기서열은 SeqMan software (DNASar)와 BioEdit program (Hall, 1999)를 이용하여 alignment되고 근린 결합법에 의거한 MEGA 5.0 program을 이용하여 계통도를 작성하였다(Hall, 2013).

세균의 생리·생화학적 특성 분석

선발된 호염성 균주의 생리·생화학적인 특성은 API 20NE (bioMérieux), API 50 CHE (bioMérieux)와 API ZYM (bioMérieux)을 이용하였다. 호염성 균주의 전배양액을 API kit의 strip에 접종하기 전에 AUX medium (bioMérieux)에 sea salt (Sigma)를 10%을 가하고 bacterial suspension을 접종하여 사용했다. 추가적으로 그람 염색 및 배양학적 특성을 확인하였다(Mcfaddin, 1980; Yang and Kim, 2002).

균체지방산조성

균체지방산 분석을 위하여 MB (Marine broth) 배지에 균체를 접종하고 28°C에서 5일간 배양한 후 대수기의 균체를 회수하였다. 회수한 균체 약 50 mg (wet weight)을 teflonlinedscrew cap tube (13 × 100 mm, pyrex)에 옮긴 후, DW를 넣고 현탁한 후 원심분리를 하여 washing 한 후, Ikemoto 등(1978)의 방법에 의해 균체지방산을 methyl ester화 시켜 추출하였다. 지방산 분석은 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc.)을 이용하였다(Hadden and Black, 1986).

Quinone 분석

Isoprenoid quinone 분자종의 동정은 Collins 등(1997)의 방법을 이용하여 분석하였다. 동결 건조된 균체로부터 지질혼합물을 추출하고, silica-gel TLC plate에 전개하여 표준물질과 동일한 R_f를 갖는 밴드를 분리·정제하였다. 정제된 Quinone 혼합물과 각각의 표준물질은 HPLC (SPD-10AV, SHIMADZU, Inc.)를 이용하여 분자종을 동정하였다(Park *et al.*, 2005).

DNA-DNA 상동성 분석

세균의 DNA-DNA 상동성 분석은 DIG-High prime (Roche Diagnostics)을 이용하여 실시하였다. 각 균주의 genomic DNA를 변성시키고 nylon membrane에 spot하고 DIG-labeled probe가 담긴 hybridization solution에 넣고 42°C에서 overnight

하여 혼성화 시킨 후 CSPD를 이용하여 형광반응 시켜 X-ray film에 노출시켰다(Ezaki *et al.*, 1989).

결과 및 고찰

β-Glucosidase 생성 호염성 세균의 분리

염전에서 소금생산을 위해 25% 이상의 함수를 저장해 놓는 해주의 퇴적물 내 호염성 세균의 밀도를 측정하기 위해 10% NaCl이 첨가된 MA배지에 퇴적물 시료를 접종하고 30°C에서 5일간 배양한 결과, 2.4 × 10⁶ CFU/g으로 계수되었다. 상기의 평판배지로부터 분리된 세균을 20% NaCl 농도의 MA배지에서 생육능을 조사한 결과, 4균주(HJS1, HJS6, HJS9, HJS10)가 호염성 세균으로 순수분리 되었다.

분리된 호염균에 대하여 esculin 분해능을 확인하기 위하여 NaCl 3%, 10% 그리고 20%의 배지에서 esculin를 기질로 하여 분해활성을 측정 한 결과, HJS과 HJS6 균주는 NaCl 3%, 10% 그리고 20% 첨가 배지에서 esculin을 glucose와 esculetin 단위로 분해하는 β-glucosidase를 생산하는 것으로 판단되었다 (Table 1).

이들 β-glucosidase 생성 HJS1과 HJS6 균주에 대하여 NaCl를 0-30% 첨가한 MB배지에서 5일간 배양하고 NaCl 농도에 따른 생육능과 β-glucosidase 활성능을 확인하였다. 분리균주 (HJS1, HJS6)는 NaCl 0-20%에서 생육이 가능하고 NaCl 1-10% 농도에서 생육이 왕성하게 나타났다. 또한, β-glucosidase 활성의 경우, 미생물의 생육과 일치하여 증가됨을 보였으며, NaCl 3%에서 β-glucosidase 최대 활성을 나타내었고 NaCl 15% 이상이 되면 생육이 점차 감소하고 효소 활성도 증가되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

NaCl의 농도에 따른 내염성 β-glucosidase 안정성

최대 활성을 나타낸 NaCl 3%에서 추출한 조효소의 효소 안

Table 1. Isolation of β-glucosidase producing halophilic bacteria by using Esculin agar medium

Strain	β-Glucosidase activity using by Esculin agar		
	3%	10%	20%
HJS1	+	+	w
HJS6	+	+	w
HJS9	-	-	-
HJS10	-	-	-

+, Positive; w, weakly positive; -, negative.

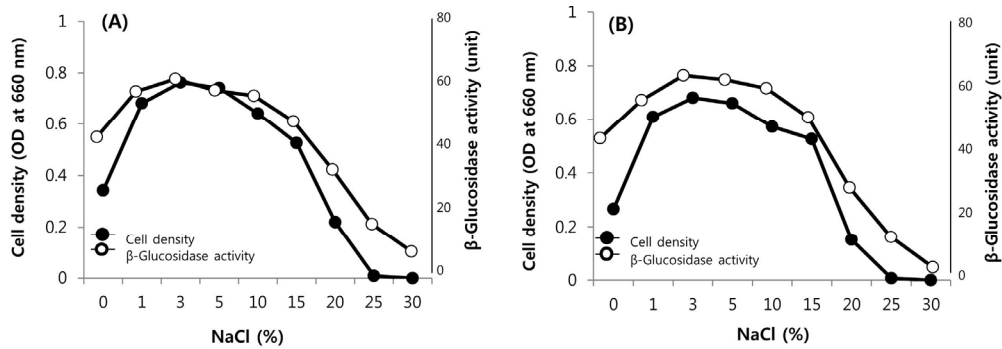


Fig. 1. Effect of NaCl concentration on the growth and enzyme production by isolates HJS1 (A) and HJS6 (B).

정성을 평가한 결과, HJS1과 HJS6균주는 NaCl 0-15% 농도에서 90% 이상의 효소활성을 유지하였다. 20% NaCl에서도 HJS1과 HJS6 균주는 각각 83.5%, 75.8%의 잔존 활성을 유지하였다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 HJS1과 HJS6 균주는 매우 안정한 내염성 β -glucosidase를 생성하는 것으로 판단되었다. 다양한 환경에서 분리된 β -glucosidase 생성 균주들은 염농도 1-3%에서 최적 생육을 보이며, NaCl 5% 이상에서 생육과 효소 활성 저해를 받는 것으로 나타내었다. Hong 등(2009)의 연구에 의하면 김치에서 분리된 *Weissella cibaria* K-M1-4는 세포 β -glucosidase 효소활성이 110 U/mg이었으며, 청국장에서 분리된 *Bacillus licheniformis* 균주의 β -glucosidase 효소활성이 46.8 U/mg으로 보고된 바 있다(Joo *et al.*, 2009). 본 연구에서 분리된 HJS1과 HJS6 균주는 NaCl 3%에서 77-79 U/mg를 나타내며 NaCl 0-20%의 넓은 농도 범위에서 작용되는 특이성을 보여 고농도의 염 존재하에서 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

β -Glucosidase 생성균주 HJS1과 HJS6 균주의 계통분류

내염성 β -glucosidase 생성균주 HJS1과 HJS6 균주의 계통

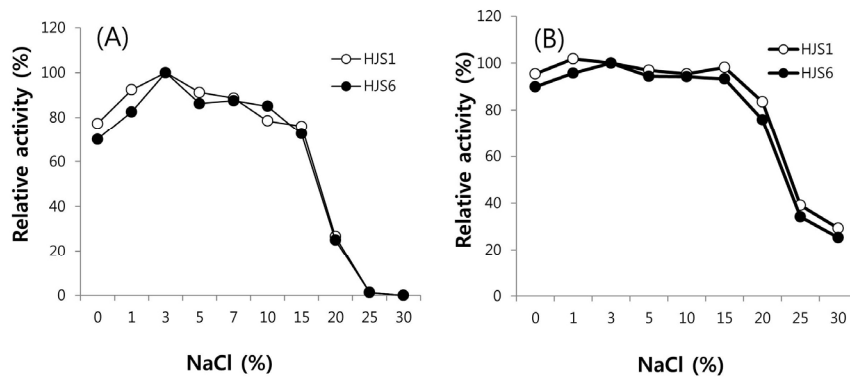


Fig. 2. Effect of reaction NaCl concentration on the activity (A) and stability (B) of β -glucosidase produced by isolates HJS1 and HJS6.

학적 위치를 검토하기 위하여, 16S rRNA 유전자 염기서열 (HJS1, 1,408 bp; HJS6, 1,410 bp)을 결정하고 NCBI/ RDP/ GenBank의 database와 상동성을 검색하였다. 분리된 HJS1과 HJS6 균주는 *a-proteobacteria*계통군의 *Roseivivax* 속에 속하며, 서로 99.8%의 높은 상동성을 나타내었다. 또한, HJS1과 HJS6 균주는 *R. roseus* BH87090^T (FJ897782)과 99.8%, *R. pacificus* JCM18866^T (KC018453)와 95.7% 그리고 *R. sediminis* DSM21977^T (KC018453)와 94.6%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 3). 상기 균주들의 염기서열은 NCBI GenBank에 각각 accession no. AB971835와 AB971836로 등록하였다.

선발된 HJS1과 HJS6 균주와 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과, 99.8%의 상동성을 나타낸 *Roseivivax roseus* KCTC 22650^T과 근연균주 *R. pacificus* JCM18866^T 그리고 *R. sediminis* DSM21977^T 균주와 종 수준에서 구별하기 위해 DNA-DNA 상동성을 실시하였다. 내염성 β -glucosidase 생성 균주 HJS1과 HJS6는 DNA-DNA 상동성 94.3%로 동일 종으로 확인되었으며, *R. roseus* KCTC 22650^T와 각각 90.3% 그리고 90.1%의 높은 상동성을 나타내어 *R. roseus*로 동정되었다(Table 2).

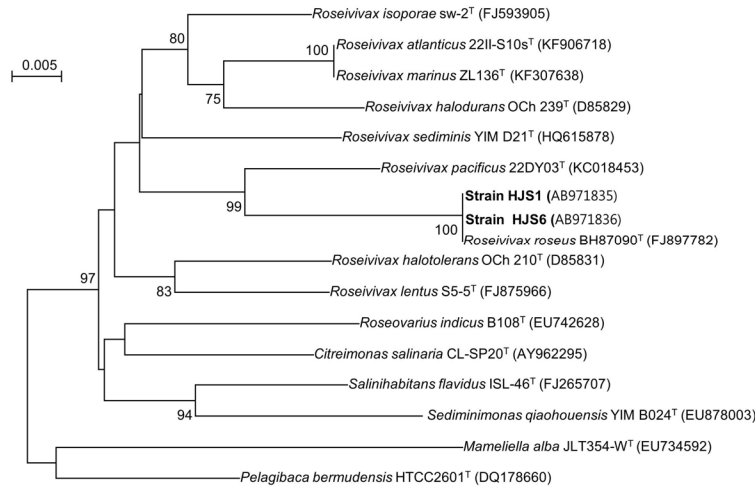


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on complete 16S rRNA gene sequences, showing relationships between halophilic isolates and member of the genus *Roseivivax*. Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets. Bar, 0.005 nucleotide substitutions per position.

내염성 β-glucosidase 생성균주 *Roseivivax roseus* HJS1과 HJS6 균주의 생리·생화학적 특성비교

내염성 β-glucosidase 생성균주 HJS1과 HJS6 균주의 배양 특성, 당분해능 및 산화 환원능 등 생리 생화학적 특성을 확인 하였다. β-Glucosidase 생성균주 HJS1과 HJS6 균주의 최적 생육온도는 28℃로 확인되었으며, 45℃에서 생육하지 않았다. 생육 가능한 NaCl 농도는 0-20%이며 최적 NaCl 농도는 3%로 나타났다. 생육 pH의 범위는 pH 5-11이며, 최적 pH는 pH 7로 확인되었다. 균체지방산을 분석한 결과, 주요 지방산으로 C_{16:0}, C_{18:1 ω7c}, C_{19:0 cyclo ω8c} 그리고 11-methyl C_{18:1 ω7c}를 함유하는 특성을 나타내었으며, isoprenoid quinone 종을 HPLC에 의해 정량분석 분석한 결과, ubiquinone을 함유하는 Q-10으로 나타내었다. 이상의 생리·생화학적 특성은 비교균주인 *R. roseus* BH87090^T와 동일하게 나타내었다. 반면, 분리균주 HJS1과 HJS6은 cyctine arylamidase, urease에 양성반응을 나

타내었으며, citrate, alkaline phosphatase, Napthol-AS-BI-phospho hydrolase에 음성반응을 나타내었다(Table 3). 특히, *R. roseus* HJS1과 HJS6는 내염성 β-glucosidase에 탁월한 활성을 나타낸 반면, 비교균주 *Roseivivax roseus* BH87090^T (FJ897782)은 β-glucosidase 생성능을 나타내지 않아 계통학적으로 동일 종이지만 표현형적 특성에는 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

염 내성(halotolerant) 세균 그리고 중호염성 세균들이 생성하는 세포의 효소들은 일반 미생물이 생산하는 효소보다 모두 높은 염농도에서도 강한 활성을 나타내기 때문에 이용범위가 넓고 효소 생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있다. 특히, 자연계에 다량으로 존재하는 목질계의 biomass로부터 유용한 화학물질, 식량 및 에너지를 산업적으로 이용하기 위해서 일반적으로 강산이나 강알칼리 조건에서의 화학적 처리가 필수적으로 이루어 지고 있으며, 이러한 화학적 처리에 기인한 고농도의 염 존재하에서 효과적으로 작용할 수 있는 효소가 요구 된다. 현재까지 호염조건에서 cellobiose, acetyl cellobiose 및 cellooligosaccharide에 작용하여 포도당을 생성하는 효소인 β-glucosidase 생성 세균은 *Bacillus* 속, *Halobacterium* 속, *Haloferax* 속이 보고가 되었으나, α-proteobacteria에 속하는 *Roseivivax* 속에 속하는 균주가 생성하는 β-glucosidase에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서 분리된 *Roseivivax roseus* HJS1과 HJS6 균주가 생성하는 내염성 β-glucosidase는 효소의 정제 및 대량 생산 최적조건 구축 등의 기초 및 응용 연구를 통하여 내염성 β-glucosidase에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. DNA-DNA hybridization values of β-glucosidase producing isolates strain HJS1, HJS6 and related species

Strain	HJS1	HJS6	<i>R. roseus</i> KCTC 22650 ^T	<i>R. pacificus</i> JCM18866 ^T
HJS6	94.3			
<i>R. roseus</i> KCTC 22650 ^T	90.3	90.1		
<i>R. pacificus</i> JCM18866 ^T	59.4	53.6	51.2	
<i>R. sediminis</i> DSM21977 ^T	49.8	46.8	47.8	40.6

Table 3. Physiological and biochemical features of strain HJS1, HJS6 and *R. roseus* BH87090^T

Characteristic	HJS1	HJS6	<i>R. roseus</i> BH87090 ^T
Source	Sediment in salt water tank	Sediment in salt water tank	Solar saltern
Colony colour on MA	Light pink	Light pink	pink
Growth at/with:			
45°C	-	-	-
NaCl (% w/v)	0-20	0-20	3-15
pH	5-11	5-11	5.5-9
Enzyme activities:			
Citrate	-	-	+
Esculin (β-glucosidase)	+	+	-
Urea	+	+	-
Assimilation of:			
Alkaline phosphatase	-	-	+
Esterase Lipase	-	-	+
Crystine arylamidase	+	+	-
Esterase	-	-	+
Naphthol-AS-BI-phospho hydrolase	-	-	+
Acid production from:			
Glycerol	-	-	+
Raffinose	-	-	+
Chemotaxonomic marker:			
Major fatty acids (>10%)	C _{16:0} C _{18:1 ω7c} C _{19:0 cyclo a8c} 11-methyl C _{18:1 ω7c}	C _{16:0} C _{18:1 ω7c} C _{19:0 cyclo a8c} 11-methyl C _{18:1 ω7c}	C _{16:0} C _{18:1 ω7c} C _{19:0 cyclo a8c} 11-methyl C _{18:1 ω7c}
Quinone	Q-10	Q-10	Q-10

All strains are negative for Gram stain and activity of β-galactosidase, Lipase, α-chymotrypsin, N-acetyl-β-glucosaminidase and α-mannosidase.

적 요

소금생산을 위해 25% 이상의 함수를 저장해 놓는 염전의 해주로부터 호염성 세균 4균주를 분리하고 높은 염분농도에서도 β-glucosidase를 생성하는 HJS1과 HJS6 균주를 선별하였다. 이들 β-glucosidase 생성세균은 NaCl 1-10%에서 70-79 U/mg의 최적 활성을 나타내었고, NaCl 3%에서 최대 활성을 나타내었으며 NaCl 0-20% 농도에서 최대 효소 활성대비 75% 이상의 효소활성을 유지하는 내염성 β-glucosidase를 생성하는 것으로 확인되었다. 내염성 β-glucosidase 생성 HJS1과 HJS6 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 검토한 결과, *Roseivivax roseus* BH87090^T (FJ897782)와 99.8%의 상동성을 나타내었고 상기 균주들의 염기서열은 NCBI GenBank에 각각 AB971835와 AB971836로 등록하였다. 계통학적으로 근연종인 *Roseivivax roseus* BH87090^T와의 DNA-DNA 상동성을 비교 검토한 결과, 90.1-90.3%를 나타내었다. 이들 균주의 주

요 균체지방산은 C_{16:0}, C_{18:1 ω7c}, C_{19:0 cyclo a8c} 그리고 11-methyl C_{18:1 ω7c}를 함유하고 Quinone종은 Q-10로 근연종 *Roseivivax roseus* BH87090^T 균주와 동일한 특징을 나타내어 *Roseivivax roseus*로 동정되었다. 반면, 비교 균주 *Roseivivax roseus* BH87090^T는 β-glucosidase 생성하지 않는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리된 *Roseivivax roseus* HJS1과 HJS6 균주는 내염성 β-glucosidase 효소 개발을 위한 유전자원으로 활용 가능하리라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 농업유전자원관리기관사업 지원에 의해 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Collins, M.D., Goodfellow, M., and Minnikin, D.E. 1997. Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 127-136.
- DasSarma, S. and Arora, P. 2002. Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences, Vol. 8, pp. 458-466. Nature Publishing Group, London, UK.
- Das, S., Lyla, P.S., and Khan, S.A. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr. Sci.* **90**, 1325-1335.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 224-229.
- Fu, X.T., You, S.G., and Kim, S.M. 2008. Characterization of a salt-tolerant acid protease produced by *Bacillus megaterium* KLP-98 and its potential as a fermentation starter for the manufacture of fish sauce. *J. Food Biochem.* **32**, 279-298.
- Fukami, K., Satomi, M., Funatsu, Y., Kamasaki, K.I., and Watabe, S. 2004. Characterization and distribution of *Staphylococcus* sp. implicated for improvement of fish sauce odor. *Fish. Sci.* **70**, 916-923.
- Hadden, J.F. and Black, L.L. 1986. The status of ripe rot in Louisiana peppers, p.14. National Pepper Conferences.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hall, B.G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 1229-1235.
- Hong, S.W., You, L.K., Jung, B.M., Kim, W.S., and Chung, K.S. 2009. Characterization of α -galactosidase and β -glucosidase by *Weissella cibaria*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 204-212.
- Ikemoto, S., Kuraishi, H., Komagata, K., Azuma, R., Suto, R., and Murooka, H. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**, 199-213.
- Jang, M.H. and Kim, M.D. 2010. Exploration of β -glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Food Engineer. Prog.* **14**, 243-248.
- Joo, A.R., Jeya, M., Lee, K.M., Sim, W.I., Kim, J.S., Kim, I.W., Kim, Y.S., Oh, D.K., Gunasekaran, P., and Lee, J.K. 2009. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 285-294.
- Kado, Y., Inoue, T., and Ishikawa, K. 2011. Structure of hyperthermophilic β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Acta Cryst.* **F67**, 1473-1479.
- Kengen, S.W., Luesink, E.J., Stams, A.J., and Zehnder, A.J. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* **213**, 305-312.
- Ketudat Cairns, J.R. and Esen, A. 2010. β -Glucosidases. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 3389-3405.
- Kori, L., Hofmann, A., and Patel, B.K.C. 2011. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the recombinant beta-glucosidase (BglA) from the halothermophile *Halothermothrix orenii*. *Acta. Crystallogr F Struct. Biol. Commun.* **67**, 111-113.
- Lee, H.S., Min, K.H., and Bae, M. 1988. Biosynthetic regulation and enzymatic properties of β -glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS1-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 119-125.
- Lee, J.M., Kim, Y.R., Kim, J.K., Jeong, G.T., Ha, J.C., and Kong, I.S. 2015. Characterization of salt-tolerant β -glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (In press)
- Mcfaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, pp. 308-320. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Na, J.R., Kim, Y.J., Kim, S.H., Kim, H.B., Snim, J.S., Kim, S.Y., and Yang, D.C. 2009. Conversion of ginsenoside Rb1 by ginseng soil bacterium *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235 according to various culture broths. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 55-61.
- Onish, H. 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*. *J. Bacteriol.* **109**, 570-574.
- Park, J.S., Whang, K.S., and Cheon, J.S. 2005. Procedure of microbial classification and identification. Worldscience. Korea.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Msaki, H., and Uozumi, T. 1999. Molecular cloning and expression of the novel β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* **125**, 728-736.
- Tamas, J., Krisztina, K., Zsolt, S., and Kati, R. 2003. Production of β -glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, 49-53.
- Yang, C.S. and Kim, J.S. 2002. Experiment method of soil microorganism. Worldscience. Korea.
- Yu, H.Y. and Li, Xin. 2015. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in ligno-cellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass Bioenergy* **81**, 19-25.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504-544.
- Woodward, J. and Wiseman A. 1982. Fungal and other β -d-glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**, 73-74.