

호기성 대마침지 중 그람음성세균 군집의 군락형성

임종락·*정계호·한홍의
인하대학교 이과대학 생물학과
*서울기독병원

Colonization of Gram-negative Bacterial Community in Aerobic Hemp Retting

Lim, C.R., *G.H. Chung and H.E. Han

Dept. of Biology, College of Science, Inha University, *Seoul Christian Hospital

ABSTRACT: Dynamics of bacterial communities and its colonization under aerobic hemp retting were observed in air lift fermentor as a closed system, unlike conventional hemp retting as an open system.

Dried hemp which was harvested in both 1986 and 1987 was retted at room temperature. Predominant community was facultatively anaerobic Gram-negative rods, and its density was increased from 3.0×10^7 cells/ml to 9.0×10^8 cells/ml. The density of facultatively anaerobic Gram-positive rods was maintained at the level of 5.0×10^6 cells/ml, and this Gram-positive bacterial community was not participated in retting. In the Gram-negative bacterial community during the retting, five types of colonies were developed at early stage of pH 7.0-8.0, and thereafter, only three types were colonized till later stage, which were identified as pectolytic strain *Erwinia salicis*, *Erwinia tracheiphila* and *Enterobacter agglomerans*.

A community of facultatively Gram-negative rods was mainly proliferated in stems and dispersed into liquor after 6-8 hours. Retting was terminated within 70-80 hours.

KEY WORDS □ retting, hemp, bacterial community, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia salicis*, *Enterobacter agglomerans*.

식물성 섬유질의 이용성은 석유자원의 점진적 고갈로 인하여 최근에 와서 재인식되기 시작하였다. 식물성 섬유질 중 인피섬유는 주로 외국에서는 아마(flax), 저마(ramie)로부터 산업적인 규모로 생산하고 있으나, 국내에서는 저마와 대마(hemp)로부터 가내공업적으로 이를 생산하고 있다.

식물성 섬유질 중 줄기의 표피에 있는 인피섬유를 회수하기 위하여 일반적으로 침지법을 사용하고 있다. 침지란 표피에 있는 펙틴질을 식물줄기의 표면에 서식하는 다양한 미생물군에 의하여 연화(marcellation)시킴으로서 인피섬유를 회수하는 과정을 말한다. 이 과정은 일반적으로 이슬침지법(dew retting)과 수조침지법(tank retting)으로

구분하여 사용하고 있으며, 전자는 호기성 과정이고, 후자는 혐기성 과정에 해당된다. 이중에서도 외국에서는 혐기성 수조침지법에 의한 아마침지를 연구해 오고 있다(Chesson, 1980). 반면에 국내에서는 혐기성이 아닌 호기성 수조침지법으로 대마를 침지하는 공장규모의 공정이 특허출원 되었으며, 또한, 식물성 인피섬유회수의 유일한 방법으로 보고되어 있다(장, 1985).

혐기성 침지과정에 관여하는 미생물들은 *Clostridium butyricum*, *Clostridium felsineum* (Avrova, 1975b; Chesson, 1980)과 호기성 침지과정에서는 *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*와 *Rhodotolula* 등의 곰팡이와 효모가

분리되었으며, 호기성세균으로는 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* 등도 분리, 동정되었다고 보고하였다(Rosemberg, 1965). 그리고 국내에서 호기성세균을 분리하였다고 했을 뿐 동정은 하지않았다(장, 1985).

이상과 같이 침지에 관여하는 세균들은 혐기성이거나 호기성을 막론하고 주로 그람양성세균 들임을 알 수 있다. 그리고 이들의 연구는 미생물개체군의 분리 및 동정만을 시도하였으며, 분리된 개체군들의 침지에 대한 역할 즉 침지과정의 우점종의 여부, 침지의 적응 및 도태 그리고 군락형성 등을 명확히 밝히지 못하였다. 즉, 분리된 세균의 침지시의 효과에 대한 확인이 요구된다.

따라서 현재까지 사용되고 있는 미생물개체군의 분리보다는 총괄적으로 군집의 동역학적 변화를 우선적으로 관찰하여야 한다고 생각할 수 있다. 본 연구는 호기성 침지과정에서 그람염색법에 의한 그람양성 및 음성세균군집의 동적변화를 관찰하였고, 군집이 극상으로 되었을 때의 세균들을 분리동정하였다.

재료 및 방법

대마 및 대마침지조(tank)

실험에 사용한 대마는 1986년과 1987년에 경상북도 안동에서 재배된 것을 수확하여 썬지 않게 태양에 건조한 것을 사용하였다.

본 실험에 이용한 침지용 수조는 22×70 cm 아크릴 원형관으로 제작하였다. 공기주입과 침지액의 순환을 위해 아크릴원형관 내부의 중앙에 위치하도록 12×50 cm 아크릴원형관을 삽입 고정시킨 air lift fermentor이었다. 이 침지수조의 용량은 20l 이었다.

대마 침지와 세균군집 관찰

대마는 길이 60 cm로 절단하여 증류수 20l에 건조대마 400g을 첨가하여 25°C ± 1에서 공기를 4l/min 속도로 주입하면서 침지하였다.

침지 중 세균군집 변화는 6-8시간 간격으로 침지액과 대마줄기로 구분하여 각각 관찰하였다. 시료 채취방법은 침지액은 그대로 사용하였고, 대마줄기는 0.5g을 멸균증류수 5ml에 첨가한 후 강하게 진탕한 후 이 용액을 각각 10 μl를 사용하였다.

Gram 양성 및 음성세균 군집의 세균수는 Gram 염색법(Jang, et al., 1987)에 의하여 측정하였다.

침지 중의 세균 분리 및 동정

침지 중의 세균의 동적변화를 파악하기 위하여 합성배지가 아닌, 침지 중 시료채취시간에 해당되는 침지액에 agar를 1.5%되게 첨가한 대마배지를 멸균하여 사용하였다. 상기 대마배지에 침지액과 대마줄기의 세균을 적당히 희석하여 도말한 후 실온에서 48시간 배양한 후 우점종인 세균군락을 분리하였다.

세균의 동정은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(Krieg, N. R. et al., 1984)를 기준하였으며, 분리에 사용한 세균의 생화학적 성질은 Manual of methods for General Bacteriology(Gerhardt, P. et al., 1981)와 Identification of Enterobacteriaceae(Ewing, W. H. 1986)에 의하여 시험하였다.

결과 및 고찰

침지 중의 세균동정

종과 속(species and genus)은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Krieg, N. R. et al., 1984)와 Identification of Enterobacteriaceae(Ewing, W. H. 1986)의 생화학적 성질 중에서 속과 종 들간에 차이점이 90% 이상이 되는 성질을 이용하여, 체계적인 동정표를 작성하여(Table 1, 2, 3), 분리된 세균을 동정하였다. 본 연구실에서 작성된 동정표의 유의성을 검토하기 위하여 기지의 *Escherichia coli* K-12와 ATCC 11775를 시험균주로 사용하여 동정한 결과 속을 검색하는 동정표와 일치하였다.

호기성침지 중 우세한군락을 형성한 Gram 음성 세균군집에서 분리한 세균들은 통성혐기성으로 간균이었다. 이는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 Section 5에 해당하는 즉 통성혐기성 그람음성 간균(Facultatively Anaerobic Gram negative Rods)인 Enterobacteriaceae에 속한다. 동정된 통성혐기성 그람음성 간균들은 *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia salicis*와 *Enterobacter agglomerans*이었다(Table 4).

Table 1. Key for the presumptive identification of genera in *Enterobacteriaceae*.

| | | | |
|--|------------------------|---|---------------------|
| 1. Nitrate reduction + | 3 | 16. D-glucose, gas production + | <i>Escherichia</i> |
| - | 2 | - | <i>Yersinia</i> |
| 2. Sucrose, acid production + | <i>Erwiniae</i> | 17. D-xylose, acid production + | <i>Escherichia</i> |
| - | <i>Xenorhabdus</i> | - | <i>Shigella</i> |
| 3. Phenylalanine diaminase + | 4 | 18. DNase at 25°C + | <i>Serratia</i> |
| - | 8 | - | 19 |
| 4. Motility + | 6 | 19. Lipase, corn oil + | <i>Cedecea</i> |
| - | 5 | - | 20 |
| 5. MR/VP +/+ | <i>Rahnella</i> | 20. Cellobiose, acid production + | 21 |
| -/- | <i>Tatumella</i> | - | 24 |
| 6. Lipase + | <i>Proteus</i> | 21. D-glucose, gas production + | 22 |
| - | 7 | - | <i>Erwiniae</i> |
| 7. Ornithine decarboxylase + | <i>Morganella</i> | 22. VP + | <i>Enterobacter</i> |
| - | <i>Providencia</i> | - | 23 |
| 8. Motility + | 18 | 23. Esculin hydrolysis + | <i>Kluyvera</i> |
| - | 9 | - | <i>Citrobacter</i> |
| 9. KCN growth + | 10 | 24. Lysine, Ornithine decarboxylase + | 26 |
| - | 11 | - | 25 |
| 10. Myo-inositol + | <i>Klebsiella</i> | 25. D-glucose, gas production + | <i>Escherichia</i> |
| - | <i>Escherichia</i> | - | <i>Erwiniae</i> |
| 11. Lysine decarboxylase + | 12 | 26. D-xylose, acid production + | 28 |
| - | 15 | - | 27 |
| 12. L-arabinose, acid production + | 13 | 27. Rhamnose, acid production + | <i>Salmonella</i> |
| - | 14 | - | <i>Edwardsiella</i> |
| 13. D-xylose, acid production + | <i>Escherichia</i> | 28. Hydrogen sulfide (TSI) + | <i>Salmonella</i> |
| - | <i>Edwardsiella</i> | - | 29 |
| 14. Trehalose, acid production + | <i>Obesumbacterium</i> | 29. Indole + | <i>Escherichia</i> |
| - | <i>Edwardsiella</i> | - | <i>Hainia</i> |
| 15. Esculin hydrolysis + | 16 | | |
| - | 17 | | |

위의 분리 동정된 세균이 대마침지기간 중의 출현은 *E. tracheiphila*가 침지 전과정 중에 나타났고, *E. stewartii*는 침지초기에서 약 35시간까지 나타났으며, *E. salicis*와 *E. agglomerans*는 침지 30시간부터 침지 후기까지 나타났었다.

위 결과로 볼때, 호기성 대마침지 중 30시간 이후 그람음성간균 군집이 군락을 형성(colonization)할 때, 나타나는 세균군집은 *E. tracheiphila*, *E. agglomerans* 개체군과 pectolytic activity가 있는 *E. salicis* 개체군임을 알 수 있다.

세균군집과 pH의 변화

호기성 대마침지 중 세균군집의 변화는 Fig. 1과

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 1986년과 1987년 2년간에 걸쳐 수확된 대마 모두에서 동일하였다. 그람음성세균군집은 침지 초기에는 $0.7-3.0 \times 10^7$ cells/ml에서 빠르게 증식하여 30시간 이후에는 $5.0-9.0 \times 10^8$ cells/ml를 유지하였으나, 그람양성세균군집은 침지기간 중 5.0×10^6 cells/ml로 세균수의 변동을 나타내지 않았다. Chesson(1978)과 Avrova(1975 b)는 각각 아마의 수초침지와 *Clostridium felsineum*의 순수배양에 의한 아마침지에서 침지 초기에는 세균수가 빠르게 증식하고 30시간 이후에는 3×10^8 cells/ml를 유지한다고 보고하였다.

Table 2. Key for the presumptive identification of species in *Erwinia*.

| | | |
|--------------------------------------|-------|------------------------|
| 1. Urease + | | <i>E. nigrifluens</i> |
| - | | 2 |
| 2. Pink diffusible pigment (YDC) + | | 3 |
| - | | 4 |
| 3. Nitrate reduction + | | <i>E. rhaponticii</i> |
| - | | <i>E. rubrifaciens</i> |
| 4. Yellow pigment (NA) + | | 5 |
| - | | 8 |
| 5. Nitrate reduction + | | 6 |
| - | | 7 |
| 6. Indole + | | <i>E. uredotora</i> |
| - | | <i>E. herbicola</i> |
| 7. Indole + | | <i>E. ananas</i> |
| - | | <i>E. stewartii</i> |
| 8. Growth factor requirement + | | 9 |
| - | | 12 |
| 9. Trehalose, acid production + | | 10 |
| - | | 11 |
| 10. Xylose, acid production + | | <i>E. mallotivora</i> |
| - | | <i>E. amylovora</i> |
| 11. Mucoid growth(NA + 5% sucrose) + | | <i>E. quercina</i> |
| - | | <i>E. tracheiphila</i> |
| 12. Nitrate reduction + | | 13 |
| - | | <i>E. salicis</i> |
| 13. Indole + | | <i>E. chrysanthemi</i> |
| - | | 14 |
| 14. Raffinose, acid production + | | <i>E. cartovora</i> |
| - | | <i>E. cyripedii</i> |

YDC; 1% yeast extract, 1% D-glucose, 2% ppt. chalk, 2% agar

NA; nutrient agar

Table 3. Key for the presumptive identification of species in *Enterobacter*.

| | | |
|------------------------------|-------|-----------------------|
| 1. Ornithine decarboxylase + | | 2 |
| - | | <i>E. agglomerans</i> |
| 2. Urease + | | 3 |
| - | | <i>E. gergoviae</i> |
| 3. Lysine decarboxylase + | | <i>E. aerogenes</i> |
| - | | 4 |
| 4. Arginine decarboxylase + | | 5 |
| - | | <i>E. intermedium</i> |
| 5. Yellow pigment formed + | | <i>E. sakazakii</i> |
| - | | 6 |
| 6. Gelatinase + | | <i>E. cloacae</i> |
| - | | <i>E. amnigenus</i> |

침지 중 대마줄기와 침지액에서의 그람양성 및 음성세균군집의 변화는 동일한 양상이었다. 대마줄기에서 증식된 세균이 6-8시간이 지난 후 침지액으로 용출되어 번식하였다.

대마침지 중 침지액의 pH는 침지초기에는 떨어지지만 10시간 이후부터 증가하여 30시간 이후에는 pH 8.0-8.5를 유지하였다. 아마의 혐기성 수조 침지 중 pH의 변화는 호기성 대마침지와는 반대로 침지초기(약 30시간)에 급격히 떨어져 pH 4.5를 유지하였다(Rosemberg, J. A. *et al.*, 1967; Avrova, N. P., 1975 a, Chesson, A., 1978). 식물성 섬유질의 정착물질인 pectin의 분해는 첫 단계가 demethylation으로 pectin methylesterase의 작용이며, 둘째단계는 첫단계 생성물인 polygalacturonic acid의 분해단계로 두 가지 효소의 각각 작용에 의해 이루어지며, 이들 효소는

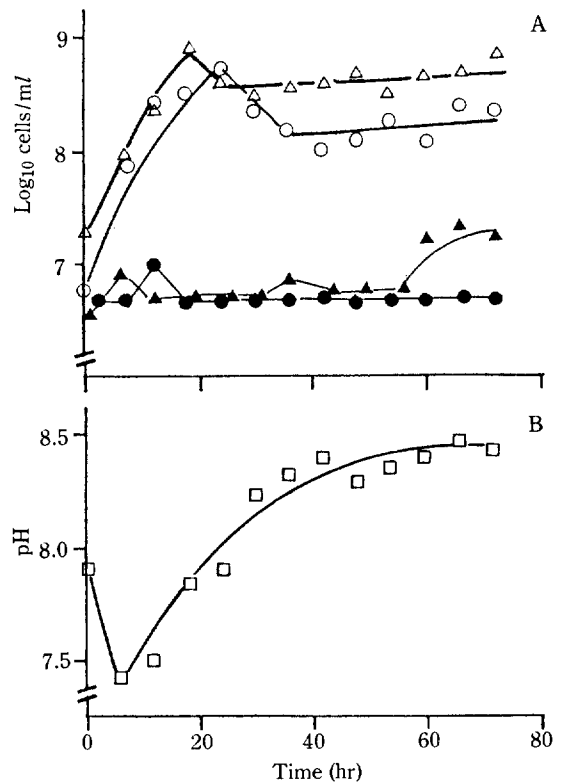


Fig. 1. Dynamics of Gram negative (open symbols) and positive (closed symbols) bacterial communities (A) in the ret liquor (○-○) and stems (△-△) and changes in pH (B) during aerobic hemp retting. Hemp was harvested in 1986.

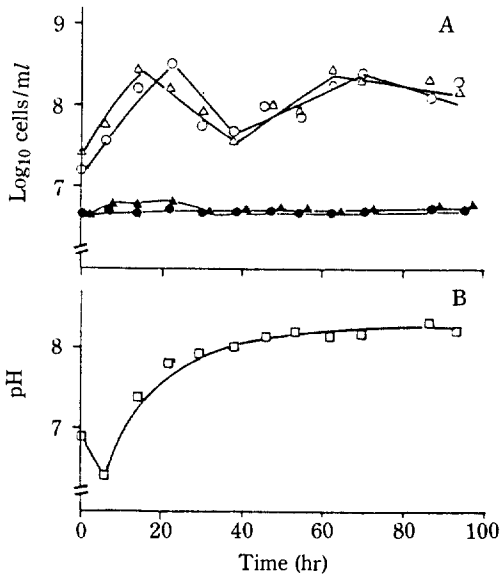
Table 4. Characters of bacteria isolated from aerobic retting of hemp.

| Characteristics | Isolated strains | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|
| | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Nitrate reduction | - | - | - | + |
| Sucrose, acid production | + | + | + | + |
| Phenylalanine diaminase | - | - | - | - |
| Motility | + | + | + | + |
| DNase at 25°C | - | - | - | - |
| Lipase, corn oil | - | - | - | - |
| Cellobiose, acid production | - | - | - | + |
| D-glucose, gas production | - | - | - | + |
| VP | - | - | - | + |
| Ornithine decarboxylase | - | - | - | - |
| Yellow pigment (NA) | - | + | - | - |
| Urease | - | - | - | - |
| Indole | - | - | - | - |
| Growth factor requirement | + | - | - | - |
| Trehalose, acid production | - | - | - | + |
| Pink diffusible pigment (YDC) | - | - | - | NT |
| Mucoid growth (NA + 5% sucrose) | - | + | + | NT |
| Identified strains | <i>Erwinia tracheiphila</i> | <i>Erwinia stewartii</i> | <i>Erwinia salicis</i> | <i>Enterobacter agglomerans</i> |

NT; not tested

YDC; 1% yeast extract, 1% D-glucose, 2% ppt. chalk, 2% agar

NA; nutrient agar

**Fig. 2.** Dynamics of Gram negative (open symbols) and positive (closed symbols) bacterial communities (A) in the ret liquor (-○-) and stems (-△-) and changes in pH (B) during aerobic hemp retting. Hemp was harvested in 1987.

pectate lyase와 exopolysaccharuronase이다 (Van Gijsegem, 1986). Pectate lyase와 exopolysaccharuronase의 적정 pH는 각각 8.5-9.5와 5.0-6.5이다 (Chesson, A., 1980; Samuel, K. C., 1981; Whitaker, J., 1984). Pectin methylesterase의 적정 pH는 5.2 (Avrova, N.P., 1975a), 8.6 (Samuel, K.C., 1981)으로 보고하였고, 식물이나 세균에서 분리된 이 효소의 적정 pH는 7.0-8.5이고, 균류에서 분리된 것은 pH 4-6이었다 (Chesson, A., 1980).

따라서, 호기성 대마침지 중 pH가 알칼리성을 유지하므로, 적정 pH가 알칼리성인 pectin methylesterase와 pectate lyase의 작용에 의해 pectin이 분해된다고 생각된다.

또한 Hankin, et al (1971)은 *Erwinia carotovora*와 *Erwinia aroideae*의 pectin 분해능이 pH 5-6 보다 pH 7-8에서 높음을 보고하였고, 또 *Erwinia carotovora*의 진탕배양에서 pectate lyase의 활성도가 pH 8에서 pH 7 보다 2배 큰 것

을 보고하였다. 그러므로, 대마침지에 air lift fermentor의 이용은 *Erwinia* spp.의 pectate lyase의 활성도를 높일 수 있다고 볼 수 있다.

침지단계를 다섯단계로 나누어 관찰한 우점종 세균균락의 변화 관찰은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 침지 중의 대마줄기와 침지액 모두 첫단계에서는 5종류의 균락이 나타났으나, 2단계가 지난 후 2종류의 균락이 균락형성 (colonization)함을 볼 수 있었다. 호기성 대마침지에서도 개체수가 적을 때는 종류가 다양했지만 개체수가 많아지면 종류의 다양성이 감소하는 것을 볼 수 있다.

개체군의 동적변화에 대한 실험을 하기 위하여서는 몇가지 고려할 점이 있다. Samual(1981)은 *Clostridium* 등 4속의 8가지 균주의 펙틴분해 활성도 실험에서 합성배지에서는 활성도를 나타내지 않았지만, 식물조직연화 실험에서는 활성도를 나타냈다고 보고하였다. 이 결과는 어떤 생태계에서 중요역할을 하는 세균의 분리 및 관찰에는 인위적 합성배지보다는, 그 생태계와 동일한 자연배지 (natural media)를 사용해야 한다는 것으로 설명할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 세균분리에 사용한 대마배지는 대마침지 중 균분리에 최적의 조건이라 볼 수 있다. 그러므로, 자연생태계의 세균 분포의 관찰 및 우점종 확인과 분리에는 자연배지의 사용이 고려되어야 할 것이다.

침지의 종말점 (end point)의 생물학적 지표를 찾기위해 Rosemberg(1967)는 galacturonic acid의 양적변화를 기준하여 galacturonic acid가 최고점일 때를 종말점이라 하였고, 아미의 산업적인 침지에서는 경험에 의해 결정하며, 대체로 침지 70시간을 종말점으로 이용한다고 하였다(Avrova,

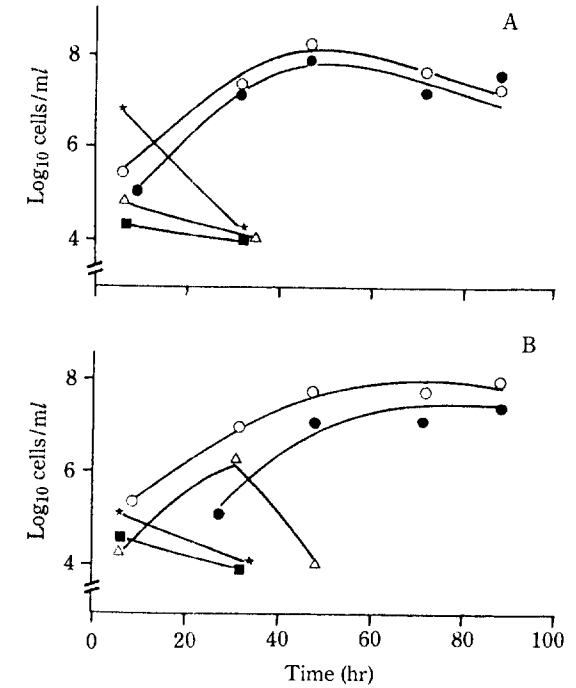


Fig. 3. Colonization of populations in Gram negative bacterial community in stems (A) and liquor (B) during aerobic hemp retting.

Symbols of colonies on hemp agar medium ○; milky, ●; transfer pale blue, ◆; white, ▲; yellow, ■; red.

N. P., 1975 b; Chesson, A., 1978; 1980). 본 연구에서 대마침지 종말점으로는 대마줄기 표피층의 연화정도를 기준할 때 침지 70-80시간이 적절하다고 생각된다. 따라서 침지종말점으로 이용될 수 있는 생물학적 지표에 대한 연구가 계속되어야 하겠다.

적 요

대마침지는 재래적방법인 개방계 (open system)와는 달리, air lift fermentor를 이용한 폐쇄계 (closed system)에서 호기적으로 침지하면서 세균군집의 변화와 균락형성 (colonization)을 관찰하였다.

1986년, 1987년도에 수확한 건조대마를 실온에서 침지하였을 때, 우세한 군집은 통성혐기성 그람음성간균 이었으며, 세균의 밀도는 3.0×10^7 cells/ml에서 9.0×10^8 cells/ml로 증가하였다. 통성혐기성 그람양성간균 군집의 밀도는 5.0×10^6 cells/ml로 유지되었으며, 침지에는 관여하지 않았다.

대마침지 중 pH7.0-8.0에서 5종류의 균락이 존재하였으나, pH8.3으로 증가하면서 3종의 개체군 균락만이 균락을 형성 (colonization)하였다. 그 개체군은 *Erwinia salicis*, *Erwinia tracheiphila*와 *Enterobacter agglomerans*이었다.

대마침지 중 통성혐기성 그람음성간균 군집은 줄기에서 먼저 번식하였으며, 6-8시간 이후부터 침지액으로 분리되었으며, 침지종료는 70-80시간이 적절하였다.

REFERENCES

1. Avrova, N.P. and A.A. Goshko, 1975^a. Pectolytic activity of *Clostridium felsinum* strains as determined by different methods. *Appl. Biochem. Microbiol.* **9**, 340-343.
2. Avrova, N.P., 1975^b. Synthesis of Pectolytic enzymes by *Clostridium felsinum* and their hydrolysis of the Pectin substance of Flax Straw. *Appl. Biochem. Microbiol.* **9**, 340-343.
3. Chesson, A., 1987. The Maceration of Linen Flax under Anaerobic Conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 219-230.
4. Chesson, A., 1980. A Review: Maceration in Relation to the Post-harvest Handling and Processing of Plant Material *J. Appl. Bacteriol.* **48**, 1-45.
5. Ewing, W.H., 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae 4th ed. pp. 509-530.
6. Gerhardt, P., R.G.E. Murray R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips, 1981. Manual of methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology. pp. 409-443.
7. Hankin, L., M. Zucker, and D.C. Sands, 1971. Improved Solid medium for the Detection and Enumeration of Pectolytic *Bacteria*, *Appl. Microbiol.* **22**(2), 205-209.
8. Jang, J.G., C.R. Lim, G.H. Chung and H.E. Han, 1987. Differentiation of mixed bacterial populations by modified Gran stain, *Kor. Jour. Microbiol.* **25**(3) in press.
9. Krieg, N.R., and J.G. Holt, 1984. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Williams & Wilkins, pp. 408-516.
10. Rosemberg, J.A., 1965. Bacteria Responsible for the Retting of Brazilian Flax, *Appl. Microbiol.* **13**(6), 991-992.
11. Rosemberg, J.A. and F.P. DE Franca, 1967. Importance of Galacturonic Acid in Controlling the Retting of Flax, *Appl. Microbiol.* **15**(3), 484-486.
12. Samual, K.C. OBI, 1981. Pectinase Activity of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria Associated with Soft Rot of Yam (*Dioscorea rotundata*), *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(3), 563-567.
13. Van Gijsegem, 1986. Analysis of the Pectin-degrading Enzymes Secreted by three Strains of *Erwinia chrysanthemi*, *J. Gen. Microbiol.* **132**, 617-624.
14. Whitaker, J.R. 1984. Pectic Substances, Pectic enzymes and haze formation in fruit juices, *Enzyme Micro. Technol.* **6**, 341-349.
15. 장대익, 1985, 공개특허공보 (A) 제 163호 p. 236.

(Received Oct. 23, 1987)