Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19, No. 6, 543-547 (1991)

호알칼리성 미생물의 분리, 동정 및 중성에서 생육 가능한 변이주의 분리

심창환 · 신원철* · 유주현[1]
강원대학교 공과대학 발효공학과, [1]연세대학교 공과대학 식품공학과

Isolation and Identification of Alkalophilic Microorganism and Its Mutant Growing at Neutral pH

Shim, Chang-Whan, Won-Cheol Shin*, Ju-Hyun Yu[1]
Department of Fermentation Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[1]Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — An alkalophilic microorganism, SH-8, was isolated from soil samples. It was a Gram-positive, catalase-positive, spore-forming and motile rod which was capable of growth in aerobic condition at the initial pH 9.0 or above up to 11.0 and between 15 and 42℃. The characteristics of this strain resembled those of the *Bacillus* group of bacteria. The mutant, *Bacillus* sp. SH-8M, was selected from *Bacillus* sp. SH-8 by U.V. mutagenesis and was able to grow at pH 6.9 up to 11.0. These two strains will be suitable for the comparative study on growth and enzyme production at various pH conditions.

물리화학적 요인들인 pH, 온도 및 염농도 등은 일반적인 미생물이 생존할 수 없는 극한 환경조건으로 존재할 수가 있다(1-4). 그러나 호알칼리성(5), 호산성(6), 호열성(7), 호냉성(8) 및 호염성(4) 미생물은 특수한 환경조건에서도 생육이 가능한 미생물로 발견되었다. 이 중에서도 호알칼리성 미생물은 알칼리성 protease의 생산(9), cyclodextrin의 생산(10) 및 알칼리성 산업폐수의 처리(11)에 사용되는 등 공업적 이용성이 많기 때문에 관심이 높아지고 있다. 토양으로부터 호알칼리성 세균의 분리는 1969년부터 활발히 진행되어 호알칼리성 *Bacillus*(12)를 비롯하여 *Micrococcus*(13), *Streptomyces*(14) 및 *Corynebacterium*(15)과 같은 그람 양성 세균과 *Flavobacterium*(1), *Pseudomonas*(16) 및 *Halobacterium*(17)과 같은 그람 음성 세균에서도 발견되었다. 또한, 호알칼리성 세균 이외에도 내알칼리성 효모의 분리(18) 및 내알칼리성 광합성 세균의 분리(19, 20)도 진행되었다.

Key words: Alkalophilic, *Bacillus* sp., mutant growing at neutral pH
***Corresponding author**

현재까지 보고된 호알칼리성 미생물에 관한 연구는 알칼리 pH에서의 생태학적 연구(21) 및 호알칼리성 미생물이 생산하는 효소와 그 이용에 관한 연구(22, 23)가 대부분이며 호알칼리성 미생물이 중성 pH에서 생육이 불가능한 기구에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 pH 환경 변화에 따른 호알칼리성 미생물의 생리학적 특성을 통해 분리균주의 생육과 효소생산에 대한 연구를 수행할 목적으로 토양으로부터 알칼리 pH에서만 생육하는 호알칼리성 미생물을 분리, 동정하였으며 분리균주로부터 중성 pH에서도 생육이 가능한 변이주를 분리하였다.

재료 및 방법

배지

호알칼리성 미생물의 분리용배지는 Horikoshi 등(5)의 배지(glucose 10g, peptone 5g, yeast extract 5g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, Na_2CO_3 10g, 1 liter, pH 10.2)를 사용하였으며, 실험 목적에 따라 Na_2

CO_3의 %(w/v) 농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 조절하였다.

균주분리 및 보존

호알칼리성 미생물을 분리할 목적으로 춘천 근교에서 채취한 토양을 분리용 액체배지(pH 10.2)에 백금이로 1회 접종하여 30℃에서 1일 진탕배양하였다. 배양액을 알칼리성 평판배지(pH 10.2)에 streak하여 30℃에서 1일간 배양하면서 colony를 형성하는 균주들을 분리하였다. 일차 분리된 미생물을 Na_2CO_3의 농도를 조절하여 pH를 알칼리성과 중성으로한 평판배지에 각각 streak하여 30℃에서 1일간 배양하면서 알칼리성 배지에서는 생육하나 중성 배지에서는 생육하지 않는 호알칼리성 미생물을 분리하였다. 분리균주를 사면배지(pH 10.2)에 이식, 배양한 후 4℃에서 보존하면서 실험에 사용하였다.

균주의 동정

분리균주의 동정은 Manual of methods for general bacteriology(24), 微生物の分類と同定(25), Bergey's manual of determinative bacteriology(26) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology(27) 등에 수록되어 있는 일반적인 세균 동정법에 따라 행하였다.

중성에서 생육 가능한 변이주의 분리

액체배지(pH 10.2)를 사용하여 30℃에서 하룻밤 진탕배양시킨 종균 배양액을 새로운 액체배지(pH 10.2) 10 ml에 0.5%(v/v)되게 접종하여 30℃에서 O.D.$_{550}$가 0.5될 때까지 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리한 후 균체를 멸균증류수에 현탁하여 3 ml를 petri dish에 넣고 U.V. lamp(10 Watt)로부터 약 30 cm의 거리에서 6분 동안 U.V.를 조사하였다. 조사된 균액을 새로운 액체배지(pH 10.2) 2 ml가 들어있는 시험관에 0.1 ml씩 접종하여 알루미늄박으로 싼 후, 30℃에서 하룻밤 진탕배양하였다. 이 배양액을 0.1 ml씩 취하여 중성 평판배지(pH 7.7)에 도말하여 30℃에서 4~5일간 배양하면서 colony를 형성하는 변이주들을 1차 선별하였다. 일차 분리된 변이주들을 암조건하에서 중성 평판배지(pH 7.7)에 10회 계대배양하면서 생육의 안정성을 나타내는 균주를 중성에서 생육 가능한 변이주로 분리하였다.

결과 및 고찰

호알칼리성 균주의 분리

알칼리성 평판배지(pH 10.2)에서 생육이 가능한 12균주를 1차로 분리하였다. 이들을 다시 초기 pH를 조절한 각각의 평판배지(pH 6.9~10.2)에 streak하여 알칼리성 배지에서는 생육하나 중성배지(pH 6.9, 7.7)에서 생육하지 않는 균주 SH-8을 2차 분리하였다(Table 1). 분리균주 SH-8을 액체배지에서 배양시킨 경우에도 같은 결과를 얻었다. 따라서 알칼리성 액체 및 고체배지에서는 생육을 하나 중성 액체 및 고체배지에서는 생육하지 않는 SH-8을 호알칼리성 균주로 선정하였다.

형태학적 특성

SH-8 균주 및 포자의 전자현미경 사진은 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 SH-8 균주는 간균 형태이었고 포자는 난형이었으며 세포의 중심에 위치하였다. 또한 Table 2에 나타낸 바와 같이 SH-8 균주는 그람 양성이었고 편모가 존재하였으며 운동성이 관찰되었다.

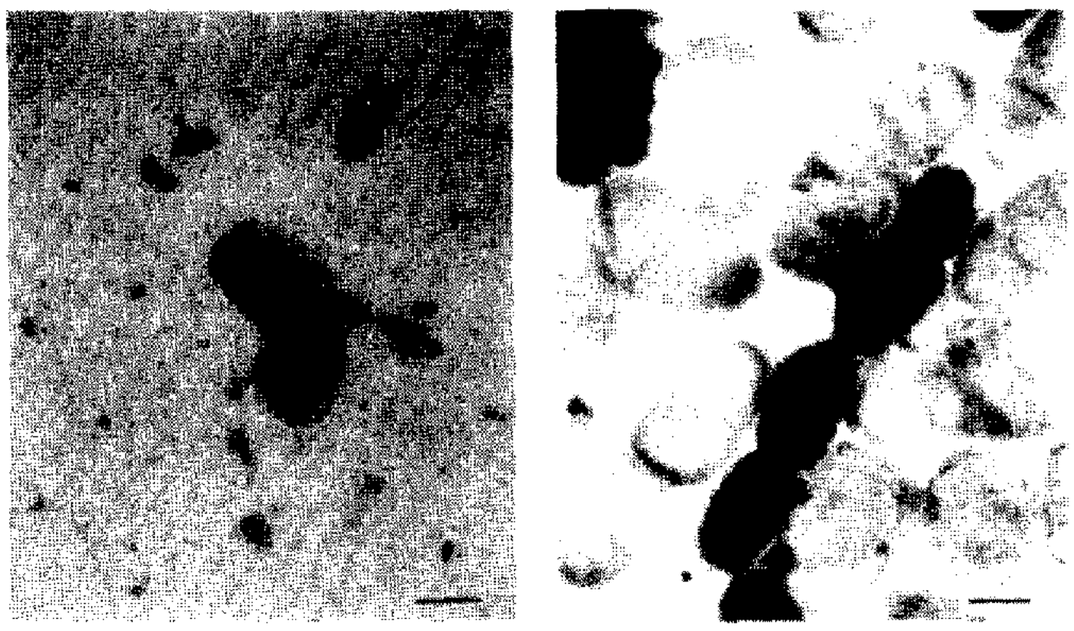
배양학적 특성

SH-8 균주의 배양학적 특성은 Table 3에 나타낸

Table 1. Growth of isolated strains on the solid medium at various initial pH

Strain	pH				
	6.9	7.7	9.0	9.6	10.2
SH- 1	+	+	+	+	+
SH- 2	±	+	+	+	+
SH- 3	+	+	+	+	+
SH- 4	±	+	+	+	+
SH- 5	±	+	+	+	+
SH- 6	+	+	+	+	+
SH- 7	±	±	+	+	+
SH- 8	−	−	+	+	+
SH- 9	±	+	+	+	+
SH-10	±	+	+	+	+
SH-11	±	+	+	+	+
SH-12	±	+	+	+	+

Growth was checked after 24 hours cultivation at 30℃.
−: no growth, ±: poor growh, +: normal growth



A B

Fig. 1. Electron micrograph of the strain SH-8.
TEM(×7,000): phosphotungstate negative staining
Bar equals 1 μm.
A: Vegetative cell B: Spores

Table 2. Morphological properties of the strain SH-8

Shape	Rod
Cell size	0.8~0.9×1.5~2.0 μm
Motility	Motile
Flagella	Found
Spore	Oval, central
Gram stain	Positive

Morphological properties were examined after 24 hours cultivation of the strain SH-8 in the liquid medium at initial pH 10.2.

Table 3. Cultural characteristics of the strain SH-8

A) Colony on the solid medium at initial pH 10.2(30℃, 1~2 days)	
Form	Circular
Surface	Smooth
Elevation	Convex
Margin	Entire
Opacity	Opaque
Brilliancy	No glistening
Color	Yellowish
Chromogenesis	None
B) Liquid medium at initial pH 10.2(30℃, 1~2 days)	
Growth abundant, turbid without sediment	

바와 같이 알칼리성 평판배지(pH 10.2)에서 colony 형태는 원형이었고 색깔은 노란색이었으며 표면은 매끄러운 상태였다. 또한 알칼리성 액체배지(pH 10.2)에서 생육이 좋았고 호기성이었으며 균체의 침전 현상은 관찰되지 않았다.

Table 4. Physiological properties of the strain SH-8

Temperature range for growth	15~42℃
pH range for growth	9.0~11.0
NaCl tolerance for growth	≤10%
Catalase	+
Oxidase	+
Lecithinase	+
Lipase(Tween 80)	−
Phenylalanine deaminase	−
Hydrolysis of;	
Starch	+
Casein	+
Cellulose	+
Esculin	+
Indole production	−
Levan formation from sucrose	−
NH_3 production from arginine	+
NH_3 production from peptone	+
Gelatin liquefaction	+
Methyl red test	−
Voges-Proskauer reaction	+
Nitrate reduction	+
Action on milk ;	
Coagulation	−
Peptonization	+
Oxidation-Fermentation test	Fermentative
Growth on nutrient plate	−

−: negative, +: positive

생리학적 특성

SH-8 균주의 생리학적 특성을 조사한 결과, Table 4에서와 같이 생육온도의 범위는 15~42℃이었고, 생육 pH 범위는 pH 9.0~11.0이었다. 또한 염농도가 10%까지 생육이 가능하였으며, catalase 양성, oxidase 양성 및 starch, casein, cellulose 분해능이 있었다. 당의 이용성을 검토한 결과(Table 5), raffinose를 이용하지 못하였으며 arabinose, fructose, galactose, inositol 및 xylose의 이용성은 약하였으나 glucose와 다당류인 cellulose, starch 등은 잘 이용하였다. 그리고 당의 발효성(Table 6)은 glucose를 비롯한 일부 당으로부터 산은 생성되었지만 가스는 모든 당으로부터 생성되지 않았다.

Horikoshi 등(5)은 호알칼리성 세균 중에서 *Bacillus*속의 특징으로 그람 양성이고 spore를 형성하며 운동성이 있고 catalase 양성 및 aerobic rods이라고

Table 5. Utilization of carbohydrates by the strain SH-8

Carbohydrate	Utilization
Arabinose	±
Cellobiose	+
Cellulose	+
Dextrin	+
Fructose	±
Galactose	±
Glucose	+
Glycerol	+
Inositol	±
Inulin	+
Lactose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Mannose	+
Raffinose	−
Soluble starch	+
Sorbitol	+
Sucrose	+
Xylose	±

Basal medium: 0.1% NH_4NO_3, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02% KCl
Concentration of each carbohydrate was 1%(w/v).
Sodium carbonate solution was added to the final concentration of 1%(w/v) for alkaline pH.
−:no utilization, ±:slight utilization, +:good utilization

Table 6. Fermentation of carbohydrates by the strain SH-8

Carbohydrate	Acid	Gas
Arabinose	−	−
Cellobiose	−	−
Cellulose	−	−
Dextrin	−	−
Fructose	+	−
Galactose	−	−
Glucose	+	−
Glycerol	+	−
Inositol	−	−
Inulin	+	−
Lactose	−	−
Maltose	+	−
Mannitol	+	−
Mannose	−	−
Raffinose	−	−
Soluble starch	+	−
Sorbitol	−	−
Sucrose	+	−
Xylose	+	−

Basal medium: peptone water(1% peptone, 0.5% NaCl)
Concentration of each carbohydrate was 1%(w/v).
Sodium carbonate solution was added to the final concentration of 1%(w/v) for alkaline pH.
−: negative, +: positive

Table 7. Stability test of the mutant strains of *Bacillus* sp. SH-8 on the solid medium at initial pH 7.7

Mutant strain	Number of transfer									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8M-1	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
8M-2	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
8M-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

−: no growth, +: normal growth

언급한 바가 있다. 따라서 본 실험에서 분리균주 SH-8의 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 생리학적 특성을 검토하여 본 결과, *Bacillus*속으로 판단되었기 때문에 SH-8 균주를 *Bacillus* sp. SH-8로 명명하였다. *Bacillus* sp. SH-8은 glucose, sucrose, maltose, mannitol, xylose 및 glycerol로부터 산을 생산하는 특성이 *Bacillus alcalophilus* NCTC 4553, NRRL B-3881 및 ATCC 21591과 같았으나(5), lactose, arabinose 및 sorbitol로부터는 산 생성을 못하여 type 균주와는 차이를 보였다. 또한 생육을 위한 온도, 염농도의 범위 및 포자의 위치에 있어서도 type 균주와 차이를 보여 SH-8은 호알칼리성 *Bacillus*속의 새로운 종으로 판단되었다.

변이주의 선별

Bacillus sp. SH-8을 U.V. 처리에 의해 중성 평판배지(pH 7.7)에서 생육하는 변이주 3주를 분리하였다. 이들 변이주를 중성 평판배지에 10차례 계대배양한 결과(Table 7), 3주 중 1주만이 계속 생육의 안정성을 나타내었으며, 이 변이주를 *Bacillus* sp. SH-8M으로 명명하였다.

변이주 *Bacillus* sp. SH-8M을 초기 pH를 조절한 각각의 고체 및 액체배지(pH 6.9~10.2)에 접종하여 배양시킨 결과, Table 8에서와 같이 알칼리성과 중

Table 8. Growth of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at various initial pH

Strain	Solid and liquid medium				
	pH				
	6.9	7.7	9.0	9.6	10.2
Bacillus sp. SH-8	−	−	+	+	+
Bacillus sp. SH-8M	+	+	+	+	+

Growth was checked after 24 hours cultivation at 30℃.
−: no growth, +: normal growth

성의 고체 및 액체배지에서 모두 생육이 가능하였다.

요 약

토양으로부터 호알칼리성 미생물을 분리하여 동정한 결과, *Bacillus*속의 특성을 나타내어 *Bacillus* sp. SH-8로 명명하였다. *Bacillus* sp. SH-8은 초기 pH 9.0 이상의 알칼리에서만 생육이 가능하였으며 중성 pH에서는 불가능하였다. *Bacillus* sp. SH-8로부터 U.V. 조사에 의해 중성배지에서도 생육이 가능한 변이주를 분리하여 *Bacillus* sp. SH-8M으로 명명하였으며, 초기 pH 6.9부터 11.0까지 생육이 가능하였다. 따라서 이들 두 균주는 pH 변화에 따른 생육과 효소생산을 비교, 검토하는데 적합한 균주로 생각되었다.

참고문헌

1. Souza, K.A., P.H. Deal, H.M. Mack and C.E. Turnbill: *Appl. Microbiol.*, **28**, 1066 (1974)
2. Belly, R.T. and T.D. Brock: *J. Gen. Microbiol.*, **73**, 465 (1972)
3. Zeikus, J.G.: *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 243 (1979)
4. Kushner, D.J.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **10**, 73 (1968)
5. Horikoshi, K. and T. Akiba: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan Scientific Societies press, Tokyo (1982)
6. Darland, G. and T.D. Brock: *J. Gen. Microbiol.*, **67**, 9 (1971)
7. Cometta, S., B. Sonnleitner, W. Sidler and A. Fiechter: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 151 (1982)
8. Ingraham, J.L. and J.L. Stokes: *Bacteriol. Rev.*, **23**, 97 (1959)
9. Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971)
10. Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 87 (1977)
11. Ikura, Y. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1373 (1977)
12. Boyer, E.W. and M.B. Ingle: *J. Bacteriol.*, **110**, 992 (1972)
13. Akiba, T. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1845 (1976)
14. Nakanishi, T., Y. Matumura, N. Minamiura and T. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 37 (1974)
15. Souza, K.A. and P.H. Deal: *J. Gen. Microbiol.*, **101**, 103 (1977)
16. Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1353 (1977)
17. Tindall, B., A.A. Mills and W.D. Grant: *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 257 (1980)
18. Matsushima, K., I. Mori, N. Ito and K. Shimada: *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **54**, 875 (1980)
19. Kallas, T. and R.W. Castenholz: *J. Bacteriol.*, **149**, 229 (1982)
20. Kallas, T. and R.W. Castenholz: *J. Bacteriol.*, **149**, 237 (1982)
21. Akiba, T., M. Kitada and K. Horikoshi: *Hakkotokogyo*, **39**, 118 (1981)
22. Ito, S. and K. Okamoto: *Bio industry*, **6**, 9 (1989)
23. Nakamura, N.: *Bio industry*, **6**, 15 (1989)
24. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington (1981)
25. 長谷川武治: 微生物の分類と同定, 學會出版センター (1975)
26. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbson: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1974)
27. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holf: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore (1986)

(Received July 25, 1991)