

섬유소 분해세균의 분리 및 생리적인 특성

권오진* · 정영건

영남대학교 식품가공학과

초록 : 148종의 시료로부터 301주의 섬유소 분해세균을 분리하였고 그 중 cellulase 활성이 가장 높은 균주를 선발하여 동정한 결과, *Cellulomonas* sp. KL-6로 확인하였다. KL-6 균주는 약 50시간만에 여과지(whatman No. 1)를 붕괴하였고 congo red 반응으로 본 halo 환의 직경은 11 cm였으며 또한, CMCase의 활성은 67 unit/ml, FPase는 70 unit/ml, β -glucosidase는 0.68 unit/ml로 나타났다. 여과지를 기질로 하여 배양하였을 때 배양액 중에 유리된 glucose의 유무를 확인하였으나 추적할 만한 양이 없었다. KL-6 균주의 균체증식 최적 배양조건은 sucrose 0.5%, yeast extract 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, CaCl_2 0.01%, NaCl 0.6%, CaCO_3 0.1%, pH 7.0 및 온도 30°C 였다(1994년 5월 23일 접종, 1994년 7월 14일 수리).

서 론

새로운 단백질자원으로서 미생물 균체는 고등생물에 비해 균체증식 속도가 빠르고 생산성이 높아 크게 각광을 받고 있다. 석유 단세포단백질의 경우 영국, 불란서 등의 여러 나라에서 생산단계에 있으나 섬유소 단세포단백질(single cell protein, SCP)은 기질인 섬유소나 이를 함유하는 물질이 불용성이고 분해속도가 느려 개발이 늦어지고 있다. 섬유소를 분해할 수 있는 세균은 *Cellulomonas*속,¹⁻⁷⁾ *Actinomyces*속,^{8,9)} *Pseudomonas*속,^{10,11)} *Clostridium*속,^{12,13)} *Cellvibrio*속,¹⁴⁾ *Cytophaga*속¹⁵⁾ 등이 알려져 있다. 이들 섬유소 분해세균들은 곰팡이에 비해 cellobiose나 short chain cellooligosaccharide를 분해하는 β -glucosidase 활성이 없거나 미약한 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁾ 그러나 세균은 배양시간이 짧고 유전자조작이 용이하므로 세균에 의한 섬유소 분해가 훨씬 유리하며 효율을 증가시키기 위해서는 섬유소 분해력이 강한 균주의 분리, 선발이 가장 중요하다고 생각된다.

본 연구는 농산폐섬유소 자원을 기질로 SCP를 생산하여 이를 가축의 사료로 이용하기 위한 기초연구로서 섬유소 분해세균을 자연계에서 분리, 선발하여 동정하고 그 생리적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선발

섬유소 분해세균은 썩은 나무, 토양, 부엽토 등의 자연계에서 수집한 148종의 시료 1g을 생리식염수에 현탁하여 1ml를 탄소원으로 여과지가 들어있는 분리용 배지(FP 배지)에 접종하여 여과지 붕괴력으로 판정하여 분리하였다. 분리된 균주들은 1.0%(w/v)의 carboxymethyl cellulose sodium salt(CMC)를 함유한 분리용 배지(CMC 배지)의 평판에 재차 접종하여 30°C에서 50시간 배양 후, 0.1% congo red 용액을 주입하여 30분 동안 방치한 다음 1M NaCl을 흘려 15분 후 집락 주위에 생성된 halo 환의 직경으로 세포외로 분비 가능한 섬유소 분해효소를 생산하는 균주를 1차 선발하였다.¹⁷⁾ 선발된 균주들 중 CMCCase, filter paperase, β -glucosidase의 활성이 강한 1균주를 최종 선발하여 보존용 배지에 보관하면서 본 실험의 사용균주로 하였다. 분리용 배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, NaCl 6.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, yeast extract 1.0 g을 1 liter의 증류수에 녹여 pH 7.2로 조정한다. 다음, 배지액 10 ml에 탄소원으로 1×6 cm의 filter paper(FP, whatman No. 1)를 넣어 사용하였다. 보존용 배지는 cellulose powder 10.0 g, NaNO_3 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, KH_2PO_4 0.2 g, K_2HPO_4 1.0 g, yeast extract 0.2 g, agar 18 g을 potato 300 g에 증류수 500 ml를 첨가하여 삶은 후, cheese cloth로 여과하고

Key words : *Cellulomonas* sp. KL-6, SCP

*Corresponding author : O.-J. Kwon

중류수로 1 liter가 되게 한 potato extract에 녹여 pH 7.2 로 조정하여 사용하였다.

조효소액 조제

CMC 배지에 KL-6 균주를 seed culture 1%(v/v)가 되게 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양한 후, 배양액을 10,000×g에서 20분간 저온 원심분리한 상등액을 CM-Case와 filter paperase 활성측정을 위한 조효소액으로 하였고 균체는 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척 후 동일 buffer로 현탁시킨 다음 sonicator로 48 watt(1 min/ml)에서 10분간 처리하여 균체를 파쇄하고 재 원심분리하여 얻은 상등액을 β-glucosidase 활성측정을 위한 조효소액으로 하였다.

효소의 활성측정

1) CMCase

CMCase의 활성은 1% CMC(pH 8.0)용액 1 ml와 0.2 M phosphate buffer(pH 8.0) 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 넣어 40℃에서 1시간 반응시킨 후 즉시 dinitrosalicylic acid (DNS) 시약 3 ml를 첨가하여 15분간 가열한 다음 냉각시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 1분 동안 1 μmole의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 환산하였다.

2) FPase

FPase의 활성은 filter paper strip(whatman No. 1, 1×6 cm)을 1 ml의 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)에 넣고 여기에 조효소액 0.5 ml를 가하여 30℃에서 1시간 정치한 후, 상기와 같이 DNS법으로 환원당량을 구하였다. 효소활성의 1 unit는 CMCase와 같이 표시하였다.

3) β-Glucosidase

β-Glucosidase의 활성은 0.005 M p-nitrophenyl-β-D-glucoside(pNPG, pH 8.0) 0.5 ml에 조효소액 1 ml를 가하여 30℃에서 30분간 반응시킨 다음 1 ml의 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액을 냉각시킨 후 3,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액 중에 유리된 p-nitrophenol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1분 동안 1 μmole의 p-nitrophenol (pNP)를 생성하는 효소활성을 1 unit로 하였다.

균주의 동정

최종 선발된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology¹⁹⁾에 의해 동정하였다.

배양액에서의 균체수 변화

분리균주를 보존용 배지로부터 1백금이 따서 CMC 배지에 접종하여 30℃에서 50시간 진탕배양한 후 이것을 seed culture로 사용하여 FP 배지와 CMC배지에 seed culture 0.1 ml(10⁷~10⁸ cells/ml)를 접종하여 7일간 배양한 후 배양기간별 균체수를 측정하였다.

배양액 중의 유리당 분석

FP 배지에서 유리된 glucose를 확인하기 위하여 FP 배지에 분리균주를 접종하여 30℃에서 50시간 진탕배양한 다음 배양액을 여과, 10,000×g에서 원심분리하여 상등액을 Amberlite IR-120과 IRA-400의 이온교환수지에 차례로 통과시켜 용출된 것을 농축시켜 농축용액 10 μl를 high performace liquid chromatography(HPLC)로 분석하였다. HPLC의 분석조건은 model, Water Associate Inc. ALC-244; column, carbohydrate analysis(3.9 mm×30 cm); column temperature, 40℃; mobil phase, 75% acetonitrile; flow rate, 1.8 ml/min; detector, refractive index(16 X); injector, water U6K; chart speed, 0.5 cm/min였다.

균체증식 최적 배양조건

기본배지를 CMC 배지로 하여 여기에 탄소원(1%), 질소원(0.1%), 생육인자(0.1%), 인산원(0.05%), 금속이온(0.01%), NaCl(0~4%)과 pH(4.0~11.0) 및 온도(20~50℃) 등을 달리하여 30℃에서 50시간 진탕배양하여 균체증식에 미치는 영양요구성과 배양조건을 검토하였다. 균체증식은 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 실험도중 얻어진 배양조건은 다음실험에 적용하였으며 배양 중 생성된 산성물질을 중화하기 위해 CaCO₃(0~2%)를 첨가하여 그 효과도 살펴보았다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선발

섬유소 분해세균을 분리, 선발한 결과는 Table 1과 같다. 부엽토에서 분리한 KL-6 균주가 50시간, KL-41 균주가 70시간, 썩은 나무에서 분리한 KW-418 균주가 72시간만에 여과지를 붕괴하여 붕괴력이 좋은 것으로 나타났다. 성과 심²⁰⁾이 분리한 *Cellulomonas flavigena* 균주는 3일만에 여과지를 붕괴하였다. Congo red 반응으로 세포외로 분비하는 cellulase 활성을 halo 환의 직경으로 조사한 결과, KL-6, KL-41 균주 및 KW-418 균주가 직경 9.5~11.0 mm의 halo환을 생성하였고 그 중 KL-6 균주가 CMCase 활성이 67 unit/ml, FPase 활성이

Table 1. Isolation and screening of cellulase producing bacteria

Strains ^{a)}	Periods ^{b)}	Halo formation ^{c)} diameter (mm)	Cellulase activity (units/ml) ^{d)}		
			CMCase	FPase	β -glucosidase
KL-2	4.0	6.0	62	70	0.62
KL-6	2.5	11.0	67	70	0.68
KL-41	3.0	11.0	56	66	0.48
KD-118	4.0	6.2	46	62	0.38
KD-200	4.0	6.1	41	64	0.42
KW-418	3.0	9.5	32	53	0.30
KW-501	6.5	9.0	52	50	0.28

a) Isolated from, KL; leaf mold, KD; decomposed wood and KW, waste water.

b) Days required to degrade filter paper thoroughly.

c,d) Cells were grown for 50 hrs at 30°C by using CMC medium.

Table 2. Identification characteristics of the isolated KL-6 strain

Characteristics	KL-6	Characteristics	KL-6
Shape	Rod	H ₂ S	-
Size	0.4~0.6×1.0~1.5 μ m	IMViC test	
Motility	+	Indol	-
Gram Shape	+(-)	Voges-Poskauer	-
Colony Shape	Moderate	Voges-Proskauer	-
	Circular, Convex	Citrate	-
	Entire, Transparent	Acid production from	
Color	Yellow	Glucose	+
Growth on	Uniformly turbid	Xylose	+
broth		Arabinose	-
Filter paper	Degradation	Rhamnose	-
in pepton-		Mannose	+
yeast extract		Fructose	+
medium		Sucrose	+
Optimum temperture	30°C	Galactose	+
pH	7.0~7.2	Lactose	-
Hydrolysis of		Maltose	+
Starch	+	Cellobiose	+
Gelatin	-	Raffinose	-
Nitrate reduced	+	Manitol	-
to nitrite		Inositol	-
Catalase	+	Sorbitol	-
Urease	-		

+, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; +(-), 50~89% of strains are positive.

70 unit/ml 이었고 β -glucosidase 활성은 0.68 unit/ml로서 cellulase 활성이 가장 높아 KL-6 균주를 본 연구의 사 용균주로 최종 선발하였다.

균주의 동정

최종 선발된 KL-6 균주의 형태적, 배양적 및 생리적 특성은 Table 2와 같다. KL-6 균주는 gram 양성, 통성 혐기적인 간균으로 반유동 고층배지에서 운동성이 있었 으며 배양기간이 길어짐에 따라 쉽게 알콜에 탈색되어 gram 음성화 되었으며, 균주의 형태도 보다 더 짧은

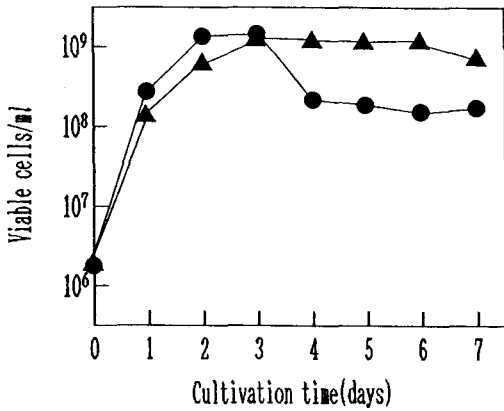


Fig. 1. Changes of cell growth of *Cellulomonas* sp. KL-6.

●-●, CMC medium; ▲-▲, FP medium.

간균으로 나타났다. 본 균주의 배양 최적온도는 30°C, 최적 pH는 7.0~7.2였고 CMC 배지에 접종하여 30°C에서 배양하면 36시간만에 균주가 발육되었고 50시간 이후에는 노란색의 집락을 나타내었다. 또한, KL-6 균주는 균체외로 cellulase를 분비하였고 FP 배지에서 여과지를 분괴하였으며 gelatin 액화력과 H₂S 생성능력이 없어 Bergey's manual상¹⁹의 *Cellulomonas fimi*의 특징과 유사하였으나 indol과 methyl red 반응이 음성이고 arabinose, lactose 및 sorbitol을 분해하지 못하는 등의 생리적 특성이 다소 달라 본 선발균주를 *Cellulomonas* sp.로 동정하였다.

배양액에서의 균체수 변화

KL-6 균주를 FP 배지와 CMC 배지에 접종하여 균체수 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체수는 배양 3일째까지 증가하다가 그후 감소하는 경향을 나타내었고 FP 배지보다 CMC 배지에서 감소폭이 더욱 컸다. 그러나 3일째의 배양액을 millipore filter(0.45 μm)로 여과 후 95°C에서 항량이 될 때까지 평량하여 균체량을 조사한 결과, 0.45 g/l으로 나타나 그 양이 극히 적었다. 이러한 결과는 KL-6 균주로 차후 SCP의 생산시 균체증식을 높이기 위한 일련의 조건들이 검토되어야 한다고 생각된다.

배양액 중의 유리당 분석

FP 배지에서 KL-6 균주를 배양하여 배양액 중에 유리된 glucose를 HPLC로 분석하였으나 배양 7일째까지 glucose가 유리되지 않았다. 이러한 결과는 KL-6 균주가

섬유소를 분해할 수 있는 cellulase 중 cellobiose를 가수분해하여 glucose 단위까지 끊어주는 β-glucosidase를 균체외로는 분비하지 않거나, 미약하여 유리된 소량의 glucose가 본 균에 의해 소비되어 추적할 수 없었던 것으로 생각된다. Gokhale와 Deobagkar²¹는 *Cellulomonas* sp.에서, 김과 이,²² 이 등²³은 *Cellulomonas fimi*에서 균체의 β-glucosidase 활성이 없다고 보고하였으며 윤과 성²⁴도 glucose를 확인하지 못한 것으로 보고한 바 있다.

균체증식 최적 배양조건

1) 탄소원의 영향

기본배지를 CMC 배지로 하여 각종 탄소원이 균체증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에서 나타난 것과 같다. 탄소원이 들어 있지 않은 대조군과 비교해서 sucrose, lactose, CMC가 균체증식에 좋았고 xylose, fructose, galactose, raffinose는 첨가시 오히려 균체증식을 억제하는 것으로 나타났다. 5탄당인 xylose에서 균체증식이 좋지 않은 것은 질류에 많이 함유된 xylan을 이용할 수 없다는 것과 일치하였다.⁹ 이 등²³은 glucose에서 균체증식이 좋다고 보고하였다. 균체증식에 가장 좋았던 sucrose의 농도를 0~2.0%에서 검토한 결과는 Table 4과 같이 각 농도에서 차이는 거의 없었으나 0.5% 첨가시에 가장 좋았다.

2) 질소원의 영향

질소원들이 균체증식에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 3), 모든 질소원들은 질소원이 들어가지 않은 대조군과 비교하였을 때 균체증식을 억제시키는 것으로 나타나 유 등²⁵이 (NH₄)₂SO₄ 첨가가 균체증식에 좋았다고 보고한 것과 다소 상이하였다. 질소원이 첨가되지 않은 대조군에서 균체증식이 좋은 것은 배지성분 중의 yeast extract가 질소원으로 이용되었다는 것을 짐작할 수 있었다.

3) 생육인자의 영향

모든 생육인자들은 균체증식에 좋았으며 그 중에서도 yeast extract 0.5% 첨가시가 가장 좋았다(Table 3, 4). 그러나 yeast extract를 0.1% 첨가시에도 분리균주의 균체증식에 거의 차이가 없어 yeast extract 0.1%를 최적농도로 하였다. Thather와 Wood¹⁷는 균체증식에 필요한 최소량의 yeast extract는 CMC의 이용에 도움을 주고, 한²⁶은 균주를 다량 배양시 yeast extract의 양이 적을수록 균주의 자가소화를 막아 생육인자로 적당하다고 보고하였다.

4) 인산염의 영향

인산염 및 이들의 혼합물(1 : 1, w/w)이 균체증식에

Table 3. Effect of various nutritional sources on the growth of *Cellulomonas* sp. KL-6

Source	Component	Cell growth (OD 660 nm)	Source	Component	Cell growth (OD 660 nm)
Carbon	—	0.25	Phosphate	—	0.40
(1.0%, w/v)	Glucose	0.30	(0.05%, w/v)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (A)	0.64
	Xylose	0.24		NaH ₂ PO ₄ (B)	0.38
	Arabinose	0.28		Na ₂ HPO ₄ (C)	0.83
	Rhamnose	0.29		K ₂ HPO ₄ (D)	0.75
	Fructose	0.24		KH ₂ PO ₄ (E)	0.38
	Galactose	0.24		A + B	0.67
	Mannose	0.40		A + C	0.79
	Sucrose	0.70		A + D	0.88
	Lactose	0.48		A + E	0.67
	Maltose	0.42		B + C	0.64
	Cellobiose	0.28		B + D	0.73
	Raffinose	0.22		B + E	0.19
	CMC	0.49		C + D	0.82
Nitrogen	—	0.79		C + E	0.73
(0.1%, w/v)	NH ₄ Cl	0.75		D + E	0.74
	NH ₄ NO ₃	0.64	Metal ion	—	—
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.72	(0.01%, w/v)	Fe ²⁺ (FeSO ₄)	—
	Urea	0.70		K ⁺ (KCl)	—
	NaN ₃	0.67		Hg ²⁺ (HgCl ₂)	—
	KNO ₃	0.64		Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	—
	Glycine	0.49		Na ⁺ (Na ₂ SO ₄)	—
Growth factor	—	0.46		Cu ²⁺ (CuSO ₄)	—
(0.1%, w/v)	Bacto soytone	0.57		Al ³⁺ (AlCl ₃)	—
	Casamino acid	0.58		Ba ²⁺ (BaCl ₂)	—
	Polypeptone	0.63		Mg ²⁺ (MgSO ₄)	0.38
	Casein	0.65		Ca ²⁺ (CaCl ₂)	0.04
	Yeast extract	0.74		Mg ²⁺ + Ca ²⁺	0.99
	Beef extract	0.62		Mineral solution	—

Mixtures were prepared by mixing same weight of each sources.

Mineral solution contains CaCl₂, 0.05%; FeCl₃·6H₂O, 1.67%, ZnSO₄·7H₂O, 0.018%; CuSO₄·5H₂O, 0.016%; CoCl₂·6H₂O, 0.018%; EDTA, 2.01%.

The bacteria were cultivated in test tubes on a reciprocating shaker at 30°C for 50 hrs.

—, No growth.

미치는 영향을 조사한 결과(Table 3), (NH₄)₂HPO₄와 K₂HPO₄의 혼합물에서 가장 좋았으며, 또한 이 혼합물에서는 질소원과 인산염을 동시에 공급할 수 있어서 유리한 영양원으로 생각되었다. 균체증식에 가장 좋은 (NH₄)₂HPO₄와 K₂HPO₄의 혼합물에서의 최적농도를 살펴본 결과는 Table 4와 같이 0.1%로 나타났다.

5) 금속이온의 영향

금속이온이 균체증식에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같이 Mg²⁺와 Ca²⁺ 이온을 제외한 나머지 금속이온들은 균체증식을 저해하였고 Mg²⁺와 Ca²⁺ 이

온을 혼합하여 첨가하였을 때가 균체증식에 가장 좋았다. 본 실험에서는 기본배지에 mineral solution을 첨가한 결과, 균체증식을 저해시켜 본 균주의 증식에는 Mg²⁺와 Ca²⁺ 이온 이외의 다른 금속이온의 첨가는 불필요한 것으로 나타났다. 환²⁶⁾은 *Cellulomonas flavigena*에서 mineral solution이 균체증식에 효과가 있다고 보고하였다. Mg²⁺와 Ca²⁺ 이온 혼합물의 첨가효과를 살펴본 결과, 최적농도는 0.01%로 나타났다(Table 4).

6) NaCl의 영향

NaCl이 균체증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Ta-

Table 4. Effect of various component on the growth of *Cellulomonas* sp. KL-6

Component	Concentration (%)	Cell growth (OD 660 nm)	Component	Concentration (%)	Cell growth (OD 660 nm)
Sucrose	0.5	0.73	Mg ²⁺ + Ca ²⁺	0.005	0.82
	1.0	0.68		0.01	0.98
	1.5	0.65		0.05	0.87
	2.0	0.64		0.1	0.78
Yeast extract	0.01	0.51	NaCl	0.1	0.72
	0.05	0.60		0.3	0.77
	0.1	0.74		0.6	0.81
	0.3	0.79		0.8	1.00
	0.5	0.84		1.0	0.90
	1.0	0.74		2.0	0.79
	0.5	0.40		3.0	0.35
(NH ₄) ₂ HPO ₄ + K ₂ HPO ₄	0.01	0.42			
	0.05	0.91			
	0.1	1.04			
	0.5	0.40			

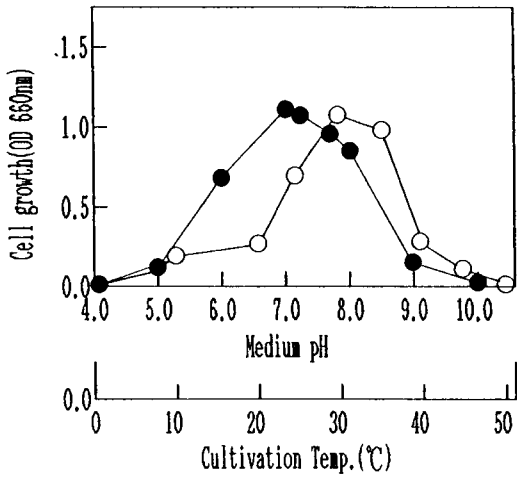


Fig. 2. Effect of pH and temperature on the cell growth of *Cellulomonas* sp. KL-6.

●—●, pH; ○—○, Temperature. Medium, sucrose; 0.5%, yeast extract; 0.1% (NH₄)₂HPO₄, 0.1%; K₂HPO₄, 0.1%; MgSO₄·7H₂O, 0.01%; CaCl₂, 0.01%; NaCl, 0.8% and cultivation time; 50 hrs.

ble 4와 같다. 0.6%와 0.8%의 NaCl 첨가시에만 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 각각 5%와 13%의 균체량이 증가되었고 그외의 농도에서는 균체증식이 억제되었다.

7) pH 및 온도의 영향

균체증식 최적 배지(sucrose 0.5%, yeast extract 0.1%, (NH₄)₂HPO₄, 0.1%, K₂HPO₄, 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, NaCl 0.8%)를 사용하여 균체증식에 미치는

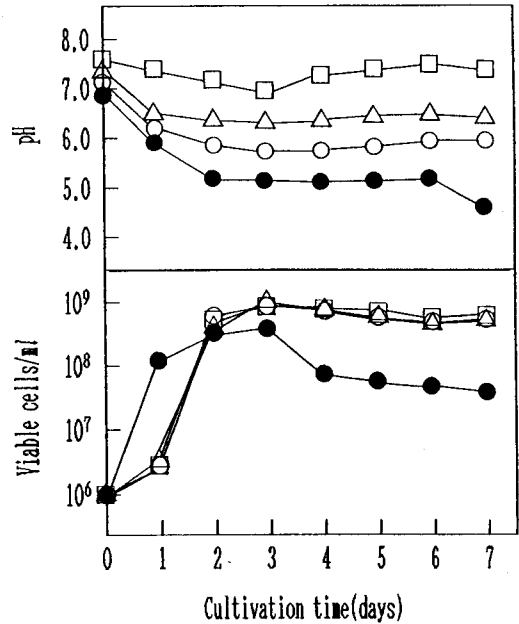


Fig. 3. Effect of calcium carbonate addition on the pH stability and cell growth during cultivation of *Cellulomonas* sp. KL-6.

●—●, 0%; ○—○, 0.1%; △—△, 0.5%; □—□, 1.0%. Medium, sucrose; 0.5%, yeast extract; 0.1% (NH₄)₂HPO₄; 0.1%, K₂HPO₄; 0.1%, MgSO₄·7H₂O; 0.01%, CaCl₂; 0.01%, NaCl; 0.8%, pH; 7.0 and cultivation temperature; 30°C.

pH 및 온도의 영향을 살펴 본 결과는 Fig. 2와 같다. KL-6 균주는 pH 6.0~9.0까지의 비교적 넓은 범위에서 잘

증식되었으며, pH 7.0~7.2에서 가장 좋았고 pH 4.0 이하, pH 10.0 이상에서는 균주가 자라지 못하였다. 온도는 30~35°C 에서 균체증식이 가장 좋았으며 그 이상의 온도에서는 억제되어 50°C 이상에서는 균주가 자라지 못하여 전형적인 *Cellulomonas* sp.의 pH 및 온도의 특성과 일치하였다.

8) CaCO₃ 첨가효과

균체증식 최적 배지(sucrose 0.5%, yeast extract 0.1%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, NaCl 0.8%, pH 7.0)에 CaCO₃ 첨가가 pH 증화효과 및 그에 따르는 균체증식의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다. CaCO₃ 첨가는 배양액의 pH를 무첨가시보다 농도에 비례하여 상승, 유지시켜 pH 증화효과가 인정되었으며 균체수는 배양 2일째까지는 CaCO₃가 영향을 미치지 않았으나 그 이후에 무첨가에서는 균체수가 현저히 감소하였으나 CaCO₃ 첨가시에는 균체수를 유지하였다. 그러나 CaCO₃ 첨가농도와 균체증식은 비례하지 않아 앞으로의 SCP 생산에 pH 증화제로 0.1%의 CaCO₃첨가가 유리함을 알 수 있었다. 이는 배와 고¹⁸⁾가 *Cellulomonas flavigena* KIST 321의 배양시 pH 증화제로 0.1%의 CaCO₃를 첨가한 것과 일치하였다.

참 고 문 헌

- Hitchner, E. V., and J. M. Leatherwood (1980) Use of a cellulase-derepressed mutant of *Cellulomonas* in the production of a single-cell protein product from cellulose, *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(2), 382-386
- Stoppok, W., P. Rapp, and F. Wagner (1982) Formation, location, and regulation of endo-1,4-β-glucosidases from *Cellulomonas uda*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(1), 44-53
- Halsall, D. M., and A. H. Gibson (1985) Cellulose decomposition and associated nitrogen fixation by mixed culture of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species or *Bacillus macerans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4), 1021-1026
- Halsall, D. M., and D. J. Goodchild (1986) Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed populations of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(4), 849-854
- Rapp, P., and E. Wagner (1986). Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(4), 746-752
- Poulsen, O. M., and L. W. Petersen (1989) Electrophoretic and enzymatic studies on the crude extracellular enzyme system of the cellulolytic bacterium *Cellulomonas* sp. ATCC 21399, *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 59-64
- Han, D. P., and T. Y. Kim (1987) Isolation and characterization of a cellulase from *cellulomonas* sp. ATCC 21399, *Kor. Biochem. J.*, 20(3), 273-278
- Ball, A. S., W. B. Betts, and A. J. McCarthy (1989) Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(6), 1642-1644
- Ball, A. S. and A. J. McCarthy (1989) Production and properties of xylanases from actinomycetes, *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 439-444
- Chung, Y. C., Y. W. Kim, S. K. kang, J. S. Rho, and N. K. Sung (1990) Molecular cloning and expression of cellulase of gene of *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 18(6), 633-639
- Yoshikawa, T., H. Suzuki, and K. Nisizawa (1974) Extracellular enzyme secretion by *Pseudomonas lemoignei*, *J. Biochem.*, 75, 531-161
- Allison, C., and G. T. Macfarlane (1989) Partial characterization of cellulase from *Clostridium thermocellum*, *J. Gen. Microbiol.*, 113, 399-402
- Ng, T. K., and J. G. Zeikvs (1981) Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM 9414, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(2), 231-240
- Oberkotter, L. V., and F. A. Rosenberg (1978) Extracellular endo-β-1,4-glucanase in *Cellvibrio vulgaris*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(1), 205-209
- Chang, W. T. H., and D. W. Thayer (1977) The cellulase system of a *Cytophaga* species, *Can. J. Microbiol.*, 23, 1285-1292
- Han, Y. W., and V.R. Srinivasan (1969) Purification and characterization of β-glucosidase of *Alcaligenes faecalis*, *J. Bactriol.*, 100(3), 1355-1363
- Teather, R. M., and P. J. Wood (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4), 777-780
- 배 무, 고영희 (1977) 농산폐자원의 미생물학적 이용에 관한 연구(제6보) 섬유소단세포단백 생산에서의 천연기질의 이용성, *산업미생물학회지*, 5(1), 18-23
- Noel, R. K. (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, p. 1325-1329

20. 성낙계, 심기환 (1977) 폐섬유자원의 발효공학적 이용에 관한 연구(제4보) 섬유질 자화세균의 분리 및 동정, 산업미생물학회지, 5(1), 1-4
21. Gokhale, D. V., and D. N. Deobagkar (1989) Differential expression of xylanases and endoglucanase in the hybrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. and *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Microbiol., 55(10), 2675-2680
22. 김도만, 이계호 (1990) *Bacillus pumilus*와 *Cellulomonas fimi*의 이속간 원형질체 융합에 의한 균체 외 분비성 β -glucosidase 생산균주 개발, 산업미생물학회지, 18(2), 115-120
23. 이희순, 민경희, 배 무 (1988) *Cellulomonas* sp. CS1-1으로부터의 β -glucosidase의 합성조절과 그의 효소학적 성질, 산업미생물학회지, 16(2), 119-125
24. 윤한대, 성낙계 (1978) 폐섬유 자원의 발효공학적 이용에 관한 연구(제8보) 섬유소 자화세균의 혼합배양, 산업미생물학회지, 6(2), 51-57
25. 유주현, 정건섭, 변유량 (1979) Methanol을 이용한 단세포 단백질의 생산에 관한 연구(제1보) Methanol 이용 미생물의 분리 및 배지조성, 산업미생물학회지, 7(2), 65-70
26. 한윤우 (1978) Cellulose 기질에서 *Cellulomonas flavigena*의 생장에 대한 영양요구성, 산업미생물학회지, 16(4), 155-160

Isolation and physiological characteristics of cellulolytic bacteria

Oh-Jin Kwon* and Yung-Gun Chung (Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

Abstract : Three hundred and one cellulolytic bacterial were isolated from the 148 screening sources such as decomposed wood, soil, compost and leaf mold. Among them, strain KL-6 was found to have the highest of cellulase activity, and identified as species belonged to the genus *Cellulomonas*. Strain KL-6 was decompose up to 90% of the filter paper (whatman No. 1) substrate within 50 hours, and showed the colony halo formation (11 cm). The activities of CMCase (67 unit/ml), FPase (70 unit/ml) and β -glucosidase (0.68 unit/ml) were obtained when this strain was cultured for 50 hrs at 30°C. Glucose was not found in detectable amounts at the FP medium. The optimum composition of nutrient medium for the cell growth by strain KL-6 was sucrose 0.5%, yeast extract 0.1%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, NaCl 0.6%, CaCO₃ 0.1% and the optimum pH and temperature were 7.0 and 30°C, respectively.