

섬유소 분해균 *Cellulomonas uda* CS 1-1의 분류학적 연구

김미석¹ · 윤민호¹ · 최우영^{1*}

Taxonomic Studies on the Cellulolytic Bacterium *Cellulomonas uda* CS 1-1

Mi-Seog Kim¹ · Min-Ho Yoon¹ · Woo-Young Choi^{1*}

ABSTRACT

Cellulomonas sp. CS 1-1 was studied for its morphological, physiological and biochemical characteristics, together with DNA homology and fatty acid pattern to elucidate its taxonomical position in the species level. Colony morphology of CS1-1 exhibited circular form, opaque, convex, entire edge and pale yellow. Cells were of rod with the size of 0.3~0.5 × 0.8~1.2 μm, while coryneforms were formed at the early stage of culture. D-ribose, raffinose, rhamnose, acetate, propionate, L-lactate, D-gluconate, aspartate and proline were not utilized as a sole source of carbon, whereas saccharose, arabinose, and amylose were utilized. Biochemical characteristics of CS1-1 were Gram positive, catalase positive, oxidase negative, nonmotile, facultative anaerobic, mesophilic and G+C content of 74.7 mol %. The major fatty acid and menaquinone were 12-methyltetradecanoic acid(anteiso-C_{15:1}) and MK-9(H₄), respectively. These results were correspondent with the characteristics reported for member of the genus *Cellulomonas*. The strain CS 1-1 exhibited a high level of DNA homology as 70% with *C. uda* ATCC491, compared to

¹ 충남대학교 농업생명과학대학 응용생물환경화학식품학부 생물환경화학전공(Division of Applied Biology, Chemistry & Food Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

*교신저자 : 최우영(E-mail: wychoi@cnu.ac.kr, Tel: 042-821-6733)

those of 54~59% with *C. fimi* ATCC 15724, 46~48% with *C. biazotea*, *C. gelida* and *C. bibula*. Finally, strain CS1-1 could be classified as a novel species belongs to *C. uda*.

Key words : Taxonomy, Cellulolytic Bacterium, *Cellulomonas uda* CS 1-1.

I. 서 론

Cellulomonas 속은 내생 포자를 형성하지 않는 호기성 세균으로서 섬유소를 자화하며 포도당으로부터 산을 생성하는 균류로 초기에 *Corynebacteriaceae* 과(family)의 다른 속으로 분류 되었으나(Bergey 등, 1923), 세포벽 성분중 peptidoglycan 종류(Fielder 등 1973), DNA의 G+C 함량(Yamada 등, 1970), 당 발효성(Stackebrandt 등 1974) 및 면역학적 특성(Braden 등, 1976)을 이용한 화학적 분류법과 DNA의 상동성 실험(Stackebrandt 등 1979)에 근거하여 *Cellulomonas* 속은 현재 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 에는 *Cellulomonas flavigena*, *C. biazotea*, *C. fimi*, *C. gelida*, *C. uda*, *C. cellasea*, *C. cellulans*의 7가지 type species로 분류 기술되어 있다.

Stackebrandt 등(1979)에 의한 DNA의 상동성과 16S rRNA의 염기서열 분석의 결과에 따라 *C. cellulans*는 *Cellulomonas* 속내 어떤 종보다 *Oerskovia* 속과 근연성이 깊은 것으로 알려져 있으며, 실제 *Oerskovia xanthineolytica*는 *C. cellulans*와 같은 종으로 취급되고 있으며, 또한 *O. turbata*는 cellulase 활성을 갖고 있어서 *C. turbata*로도 명명이 가능하다고 하겠다.

DNA의 상동성에 의하여 균주를 동정하는 실험은 근래에 Forster등(1985)에 의해 비동위원소법인 streptavidin-alkaline phosphatase를 이용한 photobiotin labeling법이 개발되어 편리하게 정색,

검출이 가능함에 따라 *Camphylobacter*, *Legionella* 등의 species 분류에 응용되기 시작하였으며, 또한 Ezaki등(1988)은 microplate에 시료 DNA를 고정하는 방법으로 nitrocellulose filter에서 보다 *Streptococcus* 속 균주의 DNA 상동성 비교에 있어서 실험 오차를 줄일 수 있었음을 보고한 바 있다.

지방산은 종류가 다양하나, 합성 경로가 명확하여 분류학에 응용되어왔으며 특히 Gram-variable인 *Arthrobacter*의 동정에 C_{15:0}와 C_{17:0}의 anteiso-acid를 gram-positive로 판정하는 근거로 삼고 있다. Minnikin등 Suzuki등은 지방산 조성 및 불포화 지방산의 이중 결합 위치에 근거하여 *Corynebacterium* 속의 분류에 관하여 보고한 바 있다.

본 실험에서는 최근 보고된 *Cellulomonas* sp. CS 1-1 균주의 16S rDNA의 염기서열을 근거로 한 유전학적 계통분석 결과(Yoon과 Choi, 2007)로 얻어진 분류학적 위치를 종 수준으로부터 정확히 동정하기 위하여, CS 1-1 균주의 생리적 특성, DNA 상동성 및 균주간 지방산 조성과 quinone의 종류 등을 7종의 *Cellulomonas* 속 type strain과 비교 분석을 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주

시험균주인 *Cellulomonas* sp. CS 1-1(Yoon 과

Choi, 2007)을 동정하기 위하여 다음 표 1에 정리한 바와 같이 type strain을 포함한 다수의 *Cellulomonas* 속 균주를 실험에 사용하였다.

2. 형태 및 생화학적 특성

20ml nutrient broth에서 2일 배양한 CS 1-1의 배양액을 15ml 원심분리용 tube로 옮기고 3,000×g에서 15분간 원심 시킨 후 균체를 멸균수로 2회 세척하고, 0.02% yeast extract를 함유한 saline (0.85% NaCl)에 현탁 시킨 후 API 20NE kit에 접종하여 생화학적 특성을 검토하였다.

3. 탄소원의 이용성

각 탄소원이 0.5% 함유된 Dubos염(Yoon 등 2007) 배지에 시험균주들을 각각 3, 5, 7일 진탕 배양한 배양액 1.3ml씩을 microtube에 취하여 10,000×g에서 10분간 2회 원심 분리하고 그 상정액을 HPLC 또는 TLC로 분석하였다. Aspartate 및 proline 이용성 시험에는 0.05% glucose를 첨가한 것을 병용하여 비교하였다. D-ribose 및 L-rhamnose는 75%, raffinose는 87.5%의 acetonitrile을 용매로 Carbohydrate analysis (Waters, Part No. 84038) 컬럼을 이용하여 Liquid Chromatograph

Table 1. Type strains of the genus *Cellulomonas* tested

Strains	KCTC	ATCC	IFO	JCM	NCIB	DSM
<i>C. flavigena</i>	3024	8188	-	-	-	-
	1038	482*	3754	1489	8074	20109
<i>C. biazotea</i>	1370	486*	12680	1340	8980	20112
<i>C. fimi</i>	1436	484*	-	1341	8980	20113
	-	15724	-	1491	-	20114
<i>C. gelida</i>	1439	488*	3748	1490	8076	20111
<i>C. uda</i>	1411	491*	3747	1492	8200	20107
	1442	21339	-	-	11494	20108
<i>C. cellulasea</i>	-	487*	3753	-	8078	20118
<i>C. cellulans</i>	-	21681	-	-	11440	20106
	-	12830*	-	-	8868	43189
<i>C. fermentans</i>	-	-	-	-	-	3133
<i>C. tubata</i>	-	25835**	13506	-	10587	20577
<i>C. bibula</i>	1435	483***	-	-	8142	-
<i>C. sp. CSI-1</i>	1371					

* Type strain listed in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2(1986).

** described as *Oerskobia turbata*

*** as unidentified in ATCC catalogue(1989).

(Waters Associates) 및 Differential Refractometer R 401로 분석하였고, acetate, propionate 및 L-lactate는 Inertsil C8컬럼을 사용하여 0.1% H₃PO₄로 분리하였다. Aspartate 및 proline의 이용성은 ethanol-water(70:30)을 전개용매로, 발색제로 ninhydrin 용액(0.3g ninhydrin을 100ml n-butanol에 용해시키고 acetic acid 3mL 첨가)을 사용하여 TLC plate(Kieselgel 60 GF 254, Merck)위에 분리 후고, Ethanol-water (70:30)로 분석하였다. Xylitol의 TLC 분석에는 isopropanol-ethyl acetate-water(83:11:6)의 혼합액을 전개 용매로 사용하였고, potassium permanganate 용액(0.5g potassium permanganate를 1N sodium hydroxide 100ml에 용해한 것)을 분무하고 100°C에서 약 10분간 발색시켰다. Gluconic acid의 이용성은 Dubos 염+0.5% sodium gluconate 배지에서 배양한 후, Benedict 시약(sodium citrate 17.3g, Na₂CO₃ 10g, CuSO₄ · 5H₂O 1.73g/100ml)을 첨가하여 가열한 후 색의 변화로서 이용성을 판정하였다. 즉 푸른 색은 음성(-), 주황색의 침전물 형성 시에는 양성(+이었다.

4. DNA의 상동성 분석

DNA 상동성 실험을 위해 Forster등(1985)의 photobiotin 표지법을 변형하여 microplate 상에서 직접 hybridization 후 Microplate Reader로 비색 검출하는 Ezaki등(1988)이 개발한 Streptavidin-HRP conjugate를 사용하는 방법을 수행하였다. 시험균주의 염색체 DNA를 추출 한 후 photobiotin 표지된 probe DNA를 제작하였다. Probe DNA와 DNA-DNA hybridization 반응 후 microwell에 효소액을 넣고 streptavidin-HRP conjugate 반응 시키면서 경시적으로 BioRad Microplate Reader를 사용하여 665nm에서 peroxidase activity를 측

정하였다.

5. G + C 함량의 측정

각 균주 DNA의 효소적 가수분해는 Gehrke 등(1982)의 tRNA 가수분해법을 변형한 방법을 사용하였다. 가열 변성시킨 각 균주의 DNA 용액을 calf intestinal phosphatase(CIP, 2.4 unit/ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.1)에 의해 가수분해 하였다. 분해물로서 얻은 nucleoside 혼합액(5 μL)를 Radialpak C₁₈ 역상 컬럼을 사용하여 Liquid Chromatograph(Shimazu LC 4A) 및 Lamda-Max Model 481 LC Spectrophotometer (Waters Associates), Chromatopac C-R2 AX (Shimazu) Data Analyzer로 분석하였다. 이 때 용매는 0.6M NH₄H₂PO₄(pH 4.0)과 acetonitrile의 20:1 (v/v) 혼합 용액을 사용하였고, 실온에서 1 ml/min의 유속으로 용출 시켰으며 각 nucleoside의 G + C mol %는 270 nm에서의 흡광도 비교로 계산하였다.

6. 지방산의 추출 및 methyl ester 화

시험균주의 지방산 분석을 위해 Minnikin등(1979)의 방법에 의해 지방산의 추출 및 methyl ester화를 실시하였다. 지방산은 OV-1(30 m) capillary 컬럼을 사용하여 Gas Chromatograph (Shimazu, GC-12A) 및 Chromatopac C-R 4A Data Analyzer로 분석하였으며 컬럼 온도는 180°C, injector와 detector 온도는 250°C, detector는 FID를 사용하였고, 시료는 1 μl를 주입하였으며 N₂가스로 30 ml/min의 속도로 용출시켰다.

7. Quinone 분석

동결 건조한 균체 200mg을 chloroform-methanol (2:1) 혼합액을 이용하여 추출한 반응액을 300 μl의 아세톤에 용해하여 TLC plate(Kieselgel 60 GF

254, Merck, 20×20 cm)에 점적하고 비타민 K 표준 용액과 함께 petrloeum benzine-ethyl ether (85:15)를 용매로 하여 2 시간 이상 전개 시켰다. UV를 조사하여 quinone의 위치를 확인하고 그 자리를 긁어내어 아세톤을 이용하여 추출, 여과 농축한 Quinone물질을 HPLC 분석을 통해 확인하였다. Radialpak-Novapak C₁₈ 컬럼 (Waters Associates)을 사용하여 Liquid Chromatograph (Shimadzu LC 4A)로 분석하였고, methanol-isopropanol (2:1) 혼합액으로 1 ml/min의 유속으로 용출 시켰으며 270 nm에서 검출하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Cellulomonas* sp. CS 1-1의 형태적 및 생화학적 특성

형태적 특성: *Cellulomonas* sp. CS 1-1을 nutrient

agar 평판 배지에 접종하여 30°C에서 3 일간 배양 후 콜로니의 형태적 특징을 관찰한 결과, 콜로니 주위가 등글고 1.5~1.8 mm의 크기로서 생육속도가 빠르지 않은 편이었고 외관으로 보아 *C. uda* ATCC 491과 비슷하였다. 형태는 rod 형으로, 어릴수록 coryneform한 것이 많이 관찰되었으며, 세포 크기는 0.3~0.5 × 0.8~1.2µm 로서 편모를 갖고 있지 않은 비운동성 세균이었으며 그 형태적 특징을 표 2에 정리하였다.

생화학적 특성: Yeast extract 0.02 %를 함유한 saline으로 균체를 현탁 시킨 후 Pasteur 피펫으로 API 20NE kit의 소시험관에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 결과 β-galactosidase 양성, indole test 양성, Voges-Proskauer test 양성, oxidase 음성, catalase 양성, 질산염 환원 시험에서 양성을 나타내었고, glucose, saccharose, amylose, arabinose는 이용하였으나, inositol, sorbitol은 이

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of *Cellulomonas uda* CS 1-1

Morphological characteristics		Biochemical characteristics	
Colony morphology :		1) Gram stain	+
Shape	circular	2) Oxidase	-
Diameter of colony	1.5-1.8mm	3) Catalase	+
Chromogenesis	pale yellow	4) Carbohydrate O/F	F
Opacity	opaque	5) β-Galactosidase	+
Elevation	convex	6) Urease	-
Surface	smooth	7) Indole test	+
Edge	entire	8) Voges-Proskauer	+
Cell morphology :		9) Niterate reduction	+
Form	rod	10) H ₂ S	-
size	0.3-0.5 µm	11) Gelatin liquefaction	-
	× 0.8-1.2µm	12) Saccharose, amylose	+
Motility	non motile	arabinose	+

Abbreviation : +, positive response ; -, negative response ; O, oxidative ; F, fermentative.

Table 3. Utilization of some carbohydrates as sole carbon source by the *Cellulomonas* strains

Species	D-ribo	Raff	Rham	Xyli	Acet	L-lata	D-gluc	Prop	Aspa	Prol
<i>C. flavigena</i>										
ATCC 482	+	-	-	-	- ^b	-	- ^b	+	-	-
ATCC 8188	+	-	+ ^a	-	+	- ^b	-	-	-(+)	-(+)
<i>C. biazotea</i>										
ATCC 486	-	- ^b	-	-	- ^b	- ^b	-	-	-	-
<i>C. fimi</i>										
ATCC 484	-	+ ^a	+	- ^d	+ ^{a,c}	+	-	-	-	-
ATCC 15724	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. gelida</i>										
ATCC 488	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-(+ ^e)
<i>C. uda</i>										
ATCC 491	-	-	-	-	+	-	-	+ ^d	-	-(+ ^e)
ATCC 21399	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. cellasea</i>										
ATCC 487	+ ^a	-	-	-	- ^b	- ^b	-	-	-(+)	-
<i>C. cellulans</i>										
ATCC 21681	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ATCC 21830	+	-	+	-	-	+	-	-	-(+ ^e)	-
<i>C. turbata</i>										
ATCC 25835	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>C. bibula</i>										
ATCC 483	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. sp.</i> CS 1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviation : D-ribo, D-ribose : Rham, rhamnos : Raff, raffinose : Acet, acetate : L-lata, L-latate :

D-gluc, D-gluconate : Prop, propionate : Aspa, aspartate : Prol, proline : +, groth : -, no groth.

a. Negative reaction according to Stackebrandt and Kandler (1979).

b. Positive reaction according to Stackebrandt and Kandler (1974).

c. Positive reaction according to Yamada and Komagata (1974).

d. 11 - 89 % of strains are positive reaction according to Stackebrandt and Kandler (1974).

e. Weak positive reaction.

() : Result of amino acid utilization in the presence of glucose, that is, from the culture on Dubos salts + 0.02 % yeast extract + 0.05 % glucose + 0.5 % amino acid.

용하지 못하였으며, rhamnose 및 raffinose의 이용성은 확인하기가 어려웠으므로 다음 항에서 HPLC로 분석하였다. 또한 G + C의 mol %는 Tamaoka등(1984)의 방법을 이용하여 nucleoside로서 측정된 결과 74.76%로서 *C. uda* 74.8%, *C. gelida* 74.7 %와 비슷한 수준이었다.

2. 탄소원의 이용성

Cellulomonas 속의 type strain들 간에는 몇 가지 탄소원의 이용성에 차이가 있는 것으로 알려져 있고 이것이 종 수준으로 균주를 동정하는데 유용한 특징으로 인정되므로 D-ribose, L-rhamnose, raffinose, xylitol 등의 당 및 당 알콜과 acetate, propionate, L-lactate 등의 유기산과, aspartate, proline 등의 아미노산을 각각 0.5% 농도로 첨가

한 Dubos염 + 0.02% yeast extract 배지에서 7일간 진탕 배양한 후 그 배양 여액을 HPLC 및 TLC로 분석하여 각 탄소원의 잔존 함량을 비교하였다.

각 균주별 탄소원 이용성에 관하여 얻은 결과를 종합하여 표 3에 나타내었다. 여기에서 주목되는 점은 본 실험의 결과가 기왕에 보고된 것과 일치하지 않은 경우가 있었으며, 또한 현재 같은 종으로 분류되고 있는 균주 간에도 탄소원의 이용성에 차이가 있었다는 점이다. 특히 Stackebrandt등(1979)의 보고와 상반되는 결과에 대하여는 표에서 a 및 b로 표시하여 구분하였으며 *C. fimi* ATCC 484의 acetate 이용성에 있어서 본 실험의 결과는 positive로서 Yamaha등(1972)의 보고와는 일치하였으나, Stackebrandt등(1979)의 것과는

Table 4. Comparison of DNA homology(%) of the *Cellulomonas* strains determined by nonradioactive photobiotin labeling system

Strain		<i>C. sp.</i> CS 1-1	<i>C.fimi</i> ATCC 15724	<i>C.uda</i> ATCC491
<i>C. sp</i> CS 1-1	KCTC1371	100	54	70
<i>C. flavigena</i>	ATCC482	23	26	21
	ATCC8188	24	-	-
<i>C. biazotea</i>	ATCC486	46	52	32
<i>C. fimi</i>	ATCC484	48	86	44
	ATCC15724	59	100	49
<i>C. gelida</i>	ATCC488	46	42	35
<i>C. uda</i>	ATCC491	70	38	100
<i>C. cellasea</i>	ATCC487	31	37	20
<i>C. turbata</i>	ATCC25835	28	23	21
<i>C. bibula</i>	ATCC483	47	-	-
<i>E. coli</i>	JM109	1	2	1
<i>B. subtilis</i>	JCM1465	2	5	4

Table 5. Fatty acid patterns of type strains belong to the genus *Cellulmonas*

Strains	Iso					Anteiso			Normal						Anteiso A
	i-13	i-14	i-15	i-16	i-17	a-13	a-15	a-17	n-13	n-14	n-15	n-16	n-17	n-18	15:1
<i>C. flavigena</i>															
ATCC482	+	+	+	+	-	-	+++	+	+	+	++	++	-	-	+
ATCC 8188	-	+	+	+	+	-	+++	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>C. fimi</i>															
ATCC484	-	+	++	+	-	-	+++	+	++	++	+	++	+	-	+
ATCC15724	-	+	+	+	+	-	+++	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. cellasea</i>															
ATCC 487	-	+	+	+	-	-	+++	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>C. cellulans</i>															
ATCC 21681	-	+	+	++	+	-	+++	+	-	+	+	+	-	-	-
ATCC 21830	-	+	+	++	+	-	+++	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>C. fermentans</i>															
DSM 3133	-	+	+	+	+	-	+++	+	-	++	+	++	-	-	-
<i>C. bizotea</i>															
ATCC486	-	+	+	+	+	-	+++	++	+	+	+	++	+	+	+
<i>C. turbata</i>															
ATCC 25835	-	+	+	++	-	-	+++	++	+	+	+	++	-	-	-
<i>C. gelida</i>															
ATCC 488	-	+	+	+	-	+	+++	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. ucla</i>															
ATCC 491	-	-	+	+	-	-	+++	+	+	+	+	++	-	-	+
ATCC 21399	-	+	-	+	+	-	+++	++	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. bibula</i>															
ATCC 483	-	+	+	++	+	+	+++	+	+	++	++	++	+	-	+
<i>C. sp. CS 1-1</i>															
	+	+	++	+	+	+	+++	+	-	+	+	++	+	-	+

* +++ : Concentration is over 30%, ++ : Concentration is between 10 and 30%
 + : Concentration is below 10%, - : not detection.

상반되는 결과를 보였다. 본 실험에서는 유일한 탄소원으로서의 이용 여부를 쉽게 판가름하고자 생육 인자로서 0.02% yeast extract를 함유하는 Dubos염을 기본 배지로 하고 여기에 각각 0.5%의 탄소원을 첨가하여 배양하였으나, Stackbrandt 등은 peptone을 1% 함유하는 rich medium 기본 배지로 사용하는 데서 오는 차이로 생각되었다. *C. flavigena* ATCC 482와 ATCC 8188 균주 간에는 *C. fimi*, *C. cellulans*, *C. uda* 등의 동종 균주 간보다 탄소원의 이용성에서 더욱 큰 차이를 보인 반면에, *C. uda* ATCC 491과 ATCC 21399간의 경우에는 타종보다 높은 근연성을 나타내었다. CS 1-1 균주는 공시한 탄소원 중 한가지도 이용하지 못하는 결과를 나타내었고 *C. bibula*, *C. uda* 및 *C. gelida*와 매우 유사한 경향을 보여 주었으며, 특히 *C. biazotea*와는 동일한 경향을 나타내었으나 Stackbrandt 등(1979)의 보고서와는 차이가 있었다.

3. DNA의 상동성

균주 CS 1-1과 *Cellulomonas* 속의 각 type strain 과의 DNA 상동성을 구명하기 위하여 photobiotin-labeling system으로 DNA-DNA hybridization 실험을 하였으며, 그 결과를 상동성 비율로써 표 4에서 비교하였다. Type strain중 *C. uda*와 70%의 상동성을, *C. fimi* 균주 중 ATCC 15724가 54~59%의 상동성을 나타낸 반면에 ATCC 484는 48%, *C. biazotea*는 46~47%의 상동성을, *C. bibula*는 47%, *C. gelida*는 46%의 상동성을 보여 주었다. DNA의 상동성에 의한 균의 종 분류에 있어서, 70% 이상 일때는 동일한 종 (species)으로, 50~70%는 아종(subspecies), 50~70%는 아종(subspecies), 50%이하는 동일한 속(genus)으로 판별하는 것이 보통이다. 따라서 CS 1-1은 *C.*

fimi, *C. biazotea*, *C. bibula*, *C. gelida* 등과의 근연성은 인정 되었으나 같은 종으로는 볼 수 없으며, *C. uda*에 속하는 novel species로서의 가능성을 보여 주었다.

4. 지방산 분석

세포로부터 총 지방산을 추출하고, methyl ester화 하여 GC로 분석 한 *Cellulomonas* 속 14 균주와 CS 1-1의 지방산 분석결과를 표 5에서 종합하여 비교하였다. CS 1-1의 지방산 조성은 12-methyltetradecanoic acid (anteiso-C_{15:0})을 주 성분으로 iso-C_{13:0}, iso-C_{14:0}, normal-C_{14:0}, iso-C_{15:0}, normal-C_{16:0}, iso-C_{17:0}, anteiso-C_{17:0}, normal-C_{17:0}, 및 normal-C_{18:0} unsaturated anteiso A-C_{15:0}를 함유하고 있었다. CS 1-1은 anteiso-C_{15:0}을 40% 이상 함유하고 있었고 13-methylpentadecanoic acid(anteiso-C_{16:0})의 peak를 나타내지 않음으로서 *Cellulomonas*속 균주의 공통적인 특징을 나타내고 있다. iso-C_{13:0}은 CS 1-1외에 *C. flavigena* ATCC 482에서만 검출되었고 anteiso C_{13:0} *C. gelida* 및 *C. bibula*에서 normal C_{17:0}은 *C. fimi*, *C. biazotea* 및 *C. bibula*에서, 그리고 anteiso C_{15:1}은 *C. flavigena* ATCC 482, *C. fimi*, *C. cellulasea*, *C. biazotea*, *C. uda* ATCC 491 및 *C. bibula*에서 각각 검출됨으로서 지방산 조성에 차이를 보였으나, CS 1-1과 크게 근연성을 나타내는 균주는 찾지 못하였다.

5. Quinone 분석

Komagata 등(1987)의 방법에 따라 세포로부터 menaquinone을 추출하여 분석한 결과 CS 1-1의 주요 quinone은 MK-9(H₄) : tetrahydrogenated quinone with none isoprene units가 주요 구성성분이었다. 이것은 Yamada 등(1976) 및 Collins 등

(1979)이 보고한 *Cellulomonas* 속의 공통적인 특성과 일치하므로 CS 1-1이 *Cellulomonas*속 균주로서 확실하다는 증거의 하나가 되는 것으로 해석할 수 있겠다.

이상의 결과는 CS1-1이 현재 *Cellulomonas* 속에 인정된 7개의 type species 중 *C. uda* ATCC 491 균주와 가장 높은 근연성을 나타내었고, 최근 보고된 16S rDNA의 염기서열을 근거로 한 phylogenetic tree 분석(Yoon과 Choi, 2007)에서도 ATCC 491 균주와 99% 이상의 근연성을 보임으로서 *Cellulomonas* sp. CS1-1 균주는 *C. uda*에 속하는 novel species로 분류될 수 있다.

IV. 적 요

섭유소 분해균 *Cellulomonas* sp. CS 1-1에 대하여 종 수준으로 분류학적 위치를 규명하기 위하여 7개 type strain 균주와 함께 생리적 및 생화학적 특성을 조사하고 DNA 상동성 및 지방산의 조성 등을 분석하여 비교한 결과, CS 1-1의 콜로니 형태는 circular, entire, smooth, convex하며, 담황색을 띠는 0.3~0.5 × 0.8~1.2 μm 크기의 간균이었다. 생리학적 특징으로서 비운동성의 통성 혐기성·중온균으로서 Gram 양성, catalase 양성, oxidase 음성, 탄수화물 발효성 등의 표현형은 *Cellulomonas* 속의 타종과 동일하였으며, 특히 D-ribose, raffinose, rhamnose, xylitol, acetate, L-lactate, propionate, aspartate, proline 등 조사한 모든 탄소원의 이용성이 없었으며, 반면에 sacchrose, arabinose 및 amylose의 이용성은 양성으로 판정되었다. G+C 함량 74.76 mol %, 주요 지방산과 quinone 성분은 전형적인 *Cellulomonas* 의 12-methyltetradecanoic acid (anteiso-C_{15:0})

과 MK-9(H₄)이었으며, DNA의 상동성 비율은 *C. uda* ATCC 491과 70%, *C. fimi* ATCC 15724와 54~59 %, *C. gelida* 및 *C. bibula*와도 46~48%의 상동성을 나타내었다. 이상의 결과는 CS1-1이 현재 *Cellulomonas* 속에 인정된 7개의 type species 중 *C. uda* ATCC 491 균주와 가장 높은 근연성을 나타냄으로서 *C. uda*에 속하는 novel species로 분류될 수 있다.

참고문헌

1. Bergey, D. H., R. S. Breed, R. W. Hammer, F. C. Harison, and F. M. Huntoon. 1923. Bergey's manual of determinative bacteriology, 1st ed. The Willilams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Braden, A. R. and D. W. Hayer. 1976. Serological study of *Cellulomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26 : 123-126.
3. Collins, M. D., M. Goodfellow, and D. E. Minnikin. 1979. Isoprenoid quionones n the classification of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 110 : 127-136.
4. Ezaki, T., Surang Dejsirilert, Hroyuki Yamamoto, Noviko Takeuchi, Shulin Liu, and Eiko Yabuuchi. 1988. J. Gen. Appl. Microbiol. 34 : 191-199.
5. Forster, A. C., J. L. McInnes, D. C. Skingle, and R. H. Symons. 1985. Nucl. Acids Res. 13 : 745.
6. Gehrke, C. W., K. C. Kuo, R. A. McCune, K. O. Gerhardt, and P. F. Agris. 1982. J. Chromatogr. 230 : 297-308.
7. Komagata, K. and Ken-Ichiro Suzuki. 1987. Methods in microbiology. 19 : 163-190.
8. Minnikin, D. E., M. D. Collins, and M. Goodfellow. 1979. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. J. Appl. Bacteriol.

- 47 : 87-95.
9. Stackebrandt, E. and O. Kandler. 1974. Biochemischtaxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reich A 228 : 128-135.
 10. Stackebrandt, E. and O. Kandler. 1979. Taxonomy of the Genus *Cellulomonas*, Based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 29 : 273-282.
 11. Tamaoka, J. and K. Kazuo. 1984. FEMS Microbiol. Letters, 25 : 125-128.
 12. Yamada, K. and K. Komagata. 1970. Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. base composition of coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 16 : 215-224.
 13. Yamada, K. and K. Komagata. 1972a. Taxonomic studies on coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural biochemical and physiological characteristics. J. Gen. Appl. Microbiol. 18 : 399-416.
 14. Yamada, Y., G. Inouye, Y. Tahara, and K. Kondo. 1976. The menaquinone system in the classification of aerobic gram-positive cocci in the genera *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* and *Sporosacina*. J. Gen. Appl. Microbiol. 22 : 227-236.
 15. Yoon M. H. and W. Y. Choi. 2007. Characterization and action patterns of two 1,4-glucanases purified from *Cellulomonas uda* CS1-1. J. Microbiol. Biotechnol. 17(8) : 1291-1299.