

Cellulophaga lytica PKA 1005의 Cellulose 분해 조효소 생산 최적 조건과 조효소의 특성

박시우¹, 김꽃봉우리², 김민지², 강보경¹, 박원민¹, 김보람¹, 박홍민¹, 임성미³, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³동명대학교 식품영양학과

Received: November 11, 2013 / Revised: January 13, 2014 / Accepted: January 22, 2014

Optimization and Characterization of Conditions for Cellulose-degrading Crude Enzymes Produced by *Cellulophaga lytica* PKA 1005

Si-Woo Bark¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Min-Ji Kim², Bo-Kyeong Kang¹, Won-Min Pak¹, Bo-Ram Kim¹, Hong-Min Park¹, Sung-Mee Lim³, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Republic of Korea

³Department of Food Nutrition and Science, Tongmyong University, Busan 608-711, Republic of Korea

This study was conducted to investigate optimum conditions for the production of cellulose-degrading crude enzymes by an isolated marine bacterium. A marine microorganism producing an extracellular cellulose-degrading enzyme was isolated from the red seaweed, *Grateloupia elliptica* Holmes. The isolated bacterium was identified as *Cellulophaga lytica* by 16S ribosomal RNA gene sequence analysis and physiological profiling and designated as *Cellulophaga lytica* PKA 1005. The optimum conditions for the growth of *Cellulophaga lytica* PKA 1005 were pH 7, 2% NaCl, and 30°C with 36 h incubation time. To obtain the crude enzyme, the culture medium of the strain was centrifuged for 30 min at 12,000 × g and 4°C, and the supernatant was used as crude enzyme. The optimum conditions for the production of the cellulose-degrading crude enzyme were pH 8, 35°C, 8% carboxyl methyl cellulose, and 60 h reaction time.

Keywords: *Cellulophaga lytica*, cellulose-degrading crude enzyme

서 론

Cellulose는 자연계에 존재하는 가장 풍부한 탄수화물 자원으로 포도당이 β-1,4-glycosidic 결합으로 이루어진 중합체로 식물체의 약 40%를 차지하는 식물체 세포벽의 주요 구성 성분이다[17, 18]. 이러한 cellulose를 활용하기 위해서는 cellulose를 가수분해하여 glucose로 전환함으로써 각종 산업에 이용할 수 있다. 그 중에서 섬유소 분해 효소를 이용한 방법은 물리, 화학적 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있

나, 반응 속도가 늦고 분해율이 낮으며 효소 비용이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 따라서, 섬유소 자원을 효율적으로 이용하기 위해 분해 능력이 우수한 섬유소 분해효소의 탐색과 대량 회수 방법을 확립하여야 한다[5].

Cellulase는 복합효소로서 endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) 및 β-glucosidase (EC 3.2.1.21) 등 3가지 유형의 효소들로 구성되어 있으며, 이들 세 가지 효소가 동시에 존재할 때 상승작용에 의하여 결정형 섬유소가 효과적으로 분해될 수 있으며, 기질의 활성화도 특성에 따라 각각 CMCase, avicelase 및 PNPGase로 구분하기도 한다[9]. Cellulase는 전분가공, 동물성 식품 생산, 곡물 알콜발효, 맥아 및 양조, 과일 및 야채류의 추출, 펄프 및 제지 산업, 섬유산업에 이용되고 있으며, 최근에는 바이오매스 및 바

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

이오에탄을 생산에 이용되고 있다[1, 7].

Cellulose 분해용 cellulase는 주로 미생물이 분비하는 것이 사용되어지고 있으며, 이는 곰팡이 및 세균에 의해서 주로 생산되어지고 있는 실정으로, 현재까지 *Tricoderma harzianum* FJ1 [10], *Melanocarpus* sp. [8], *Penicillium purpurogenum* [12], *Aspergillus terreus* [15] 및 *Paenibacillus barcinonensis* [3], *Bacillus* sp. [25], *Cellulomonas* spp. [19] 등의 많은 균주들로부터 유래한 cellulase 연구가 진행되고 있다. 곰팡이가 분비하는 cellulase는 약산성 영역에서 높은 활성을 보이는 반면, 세균이 생산하는 cellulase는 중성 또는 약 알칼리성 영역에서 높은 활성을 보이는 것으로 알려져 있다 [13].

현재까지 연구된 균주들은 주로 토양 및 육상생물에서 분리된 균주가 대부분인데 이는 현재 산업에 이용되고 있는 에너지원인 cellulose가 주로 초본 및 목본계 cellulose를 이용하고 있기 때문이다. 그러나 초본 및 목본계 cellulose에는 hemicellulose, lignin, 및 pectin이 복합체를 이루고 있어 cellulase 단일 처리에 의해 분해 효율이 떨어진다. 반면, 해조류는 육상식물처럼 lignin과 같은 복합체를 이루고 있지 않고 주로 α -cellulose로 구성되어 있는데 α -cellulose는 단일 사슬의 삼사구조의 결정형을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 [22], 이는 초본 및 목본계 cellulose에 비하여 효소처리에 의하여 분해되기 쉬운 구조를 가지고 있다. 해조류 유래 cellulose를 이용하기 위한 연구가 수행되고 있으나 [20], 국내에서는 이러한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 해조류 cellulose를 이용하기 위한 기초 연구로서 분해가 진행중인 해조류와 주변 해수로부터 cellulose 분해 활성이 우수한 미생물을 탐색하고 분리하여 cellulose 분해 효소를 생산하는 미생물의 최적 생육조건 및 그 조효소액의 cellulose 분해 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 기질은 carboxyl methyl cellulose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며, 배지는 marine broth (MB, Difco, Detroit, MI, USA) 및 marine agar (MA, Difco)를 사용하였다.

Cellulose 분해 미생물의 분리 및 동정

Cellulose 분해 미생물은 부산의 송정 연안에서 분해중인 해조류 및 그 주변 해수를 채집하였으며, 멸균된 2% NaCl phosphate buffer (pH7.4)를 이용하여 해수 및 해조류를 희석하였다. 희석액은 MA 배지에 분주·도말 후, 30°C에서 48시간 배양하였으며, 생성된 colony를 확인하고 형태적으로 다

른 colony를 선택하였다. 선택된 균주는 cellulose 분해 활성 측정을 위하여 균체 배양액과 carboxyl methyl cellulose (CMC)를 1:1로 혼합하여 30°C에서 24시간 배양 후, 환원당 생성량 및 점도 측정으로 cellulose 분해능을 확인하였다. 이 중 cellulose 분해능이 우수한 단일 colony는 염기서열 분석을 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA sequence analysis로 분석하여 16S rDNA 염기서열을 구하여 NCBI blast를 통해 동정하였다.

분리·동정된 Cellulose 분해 미생물 생육조건 확인

분리·동정된 알긴산 분해 미생물의 최적 pH, NaCl 농도, 배양온도 및 배양 시간 조건을 확인하기 위해, 각 조건에서 균을 배양한 후, 600 nm에서 흡광도를 2회 반복 측정하였다. MB 배지를 기본 배지로 사용하였으며, 균은 10^6 cfu/ml 농도로 배지 5 ml당 100 μ l씩 접종하였다. pH 확인을 위해 MB 배지를 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH로 pH 2-10으로 조정하였으며 균을 접종 후, 30°C에서 24시간 배양하였다. 최적 pH로 조정된 MB 배지의 NaCl 농도를 2-7%로 조정된 후, 30°C에서 24시간 배양하여 NaCl 농도 조건을 확인하였고, 또한 최적 pH 및 NaCl 농도로 조정된 MB 배지에 균을 접종 후, 배양 온도를 10-40°C로 달리하고 24시간 배양하여 최적 온도 조건을 확인하였고, 최적 pH, NaCl 농도 및 온도조건에서 균을 72시간까지 배양하며 최적 배양 시간조건을 확인하였다.

Cellulose 분해 조효소액 제조

분리·동정된 cellulose 분해균을 최적 생육 조건으로 대량 배양 후, 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil Science Co., Seoul, Korea)로 4°C에서 12,000 \times g, 30 min 조건으로 원심 분리하여 상층액을 조효소액으로 하였다.

Cellulose 분해 조효소액의 특성 확인

분리·동정된 cellulose 분해균으로부터 얻은 cellulose 분해 조효소액의 초기 pH, 온도, CMC 농도 및 배양 시간 특성을 확인하였으며, CMC 분해능은 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 점도 측정은 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 이용하여 Stevens와 Levin [21]의 방법을 참고하여 25°C에서 각 조건별로 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson법[16]으로 520 nm에서 표준당 (glucose)으로 작성한 검량곡선으로부터 환원당 함량을 측정하였다. 최적 pH 조건을 확인하기 위해 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH를 이용하여 pH 2-10까지 조정하였으며, CMC와 조효소액을 1:1 혼합 후 30°C에서 24시간 배양하여 실험하였다. 최적 pH 조건에서 온도를 10-40°C로 달리하여 CMC와 조효소액 1:1 혼합물을 24시간 배양한 후 최

적 온도 조건을 확인하였으며, 최적 CMC 농도를 확인하기 위해 1-11% 농도의 CMC를 pH 8 및 35°C 조건에서 24시간 배양하여 실험하였다. 또한 최적 시간 조건을 확인하기 위해 최적 pH, 온도 및 CMC 농도 조건으로 72시간까지 배양하며 실험하였다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 SAS program (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산 분석한 후 Duncan의 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

Cellulose 분해균의 분리 및 동정

부산 송정 연안에서 채취한 분해중인 *Grateloupia elliptica* 와 그 주변 해수로부터 형태적으로 다른 colony를 분리하였으며, cellulose 분해능이 우수한 단일 colony는 (주)마크로젠에서 16S rRNA sequence analysis로 16S rDNA 염기서열을

확인한 후(Fig. 1), NCBI blast를 통하여 동정하였다. 그 결과, *Cellulophaga lytica* sp. IFO16021(GenBank: AB032512.1)와 99% 유사성을 보였으며, 본 연구에서 분리한 cellulose 분해균을 *Cellulophaga lytica* PKA 1005으로 명명하였다.

Cellulose 분해균의 최적 생육 조건

초기 pH를 2에서 10까지 변화시키면서 배양한 균주의 생육 특성을 측정한 결과(Fig. 2A) pH 7에서 0.505으로 가장 높은 생육활성을 보였으며, pH 5 이하와 pH 9 이상에서는 생육이 정지하는 것을 확인하였다. 이 결과는 *Cellulophaga lytica* LBH-14 [4] 균주가 pH 7.5에서 최적 cell growth를 보인다는 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 해양유래 미생물인 *C. lytica* PKA 1005 균주와 NaCl 농도와의 생육관계를 알아보기 위하여 NaCl 농도를 변화시키면서 균주의 생육 정도를 확인한 결과(Fig. 2B) *C. lytica* PKA 1005 균주의 경우 NaCl 농도 2, 3 및 4%에서 각각 흡광도 값이 0.557, 0.530 및 0.523로 높은 생육활성을 보였으며, 그 중에서 2% NaCl 농도에서 균주의 성장이 가장 활발하였고, 5% 이상의 NaCl 농도에서는 균 생육이 억제되는 것으로 나타났다. 이는 해양

```

1 GATGAACGCT AGCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGG GGTAACAGAG
51 GAGCTTGCTT CTGCTGACGA CCGGCGCACG GGTGCGTAAC GCGTATACAA
101 TCTGCCTTNC ACTAAGGGAT AGCCCAGAGA AATTTGGATT AATACCTTAT
151 GGTTTATTTAA GATGGCATCA TTTTAATAAT AAAGATTACG GTGTAAGATG
201 AGTATGCGTA CCATTAGTTT GTTGGTAAGG TAACGGCTTA CCAAGACTAC
251 GATGGTTAGG GGCCCTGAGA GGGGGATCCC CCACACTGGT ACTGAGACAC
301 GGACCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGA GGAATATTGG ACAATGGAGG
351 AGACTCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGCAGG AAGACGGTCC TATGGATTGT
401 AACTGCTTT TATACAGGAA GAATAAGGAC TACGTGTAGT CTGGTGACGG
451 TACTGTAAGA ATAAGGACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA
501 CGGAGGGTCC GAGCGTTATC CGGAATTATT GGGTTTAAAG GGTCCGTAGG
551 CGGG-CATTA AGTCAGGGGT GAAAGTTTGC AGCTCAACTG TAGAATTGCC
601 TTTGATACTG ATGGTCTTGA ATTATTGTGA AGTGGTTAGA ATATGTAGTG
651 TAGCGGTGAA ATGCATAGAT ATTACATAGA ATACCGATTG CGAAGGCAGA
701 TCACTAACAA TATATTGACG CTGATGGACG AAAGCGTGGG TAGCGAACAG
751 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGGATA CTAGCTGTGT
801 GGTTCCTCGGA CTGCGCGGCC AAGCGAAAGT GATAAGTATC CCACCTGGGG
851 AGTACGTTTCG CAAGAATGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA
901 GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGATGAT ACGCGAGGAA CCTTACCAGG
951 GCTTAAATGT AGATTGACAG GTTTAGAGAT AGACTTTCCT TCGGGCAATT
1001 TACAAGGTGC TGCATGGTTG TCGTCAGCTC GTGCCGTGAG GTGTCAGGTT
1051 AAGTCCTATA ACGAGCGCAA CCCCTGTTGT TAGTTACCAG CACATTATGG
1101 TGGGGACTCT AGCAAGACTG CCGGTGCAA CCGTGAGGAA GGTGGGGATG
1151 ACGTCAAATC ATCACGGCCC TTACGTCCTG GGCCACACAC GTGCTACAAT
1201 GGTAGGTACA GAGAGCAGCC ACTTAGCGAT AAGGAGCGAA TCTATAAAAC
1251 CTATCACAGT TCGGATCGGA GTCTGCAACT CGACTCCGTG AAGCTGGAAT
1301 CGCTAGTAAT CGGATATCAG CCATGATCCG GTGAATACGT T-CCCGGGCC
1351 TTGTACACAC CGCCGTCAA GCCATGG-AA GTGGGGGGTA CCTGAAGTTC
1401 GTCACCGCAA GGAGCGACCT AGGGTAAACT

```

Fig. 1. 16S rDNA nucleotide sequence of *Cellulophaga lytica* PKA 1005.

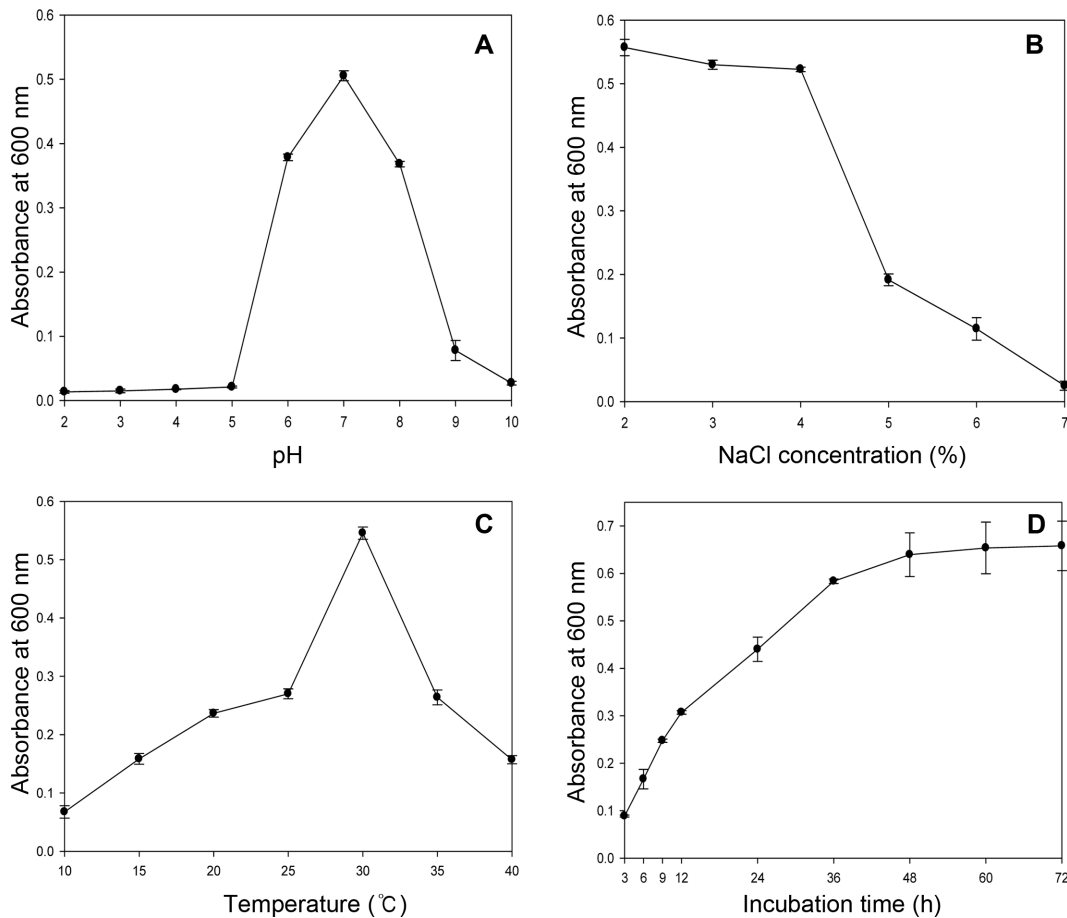


Fig. 2. Effect of culture conditions on growth of *Cellulophaga lytica* PKA 1005. (A) pH, (B) NaCl concentration, (C) temperature, (D) incubation time.

유래 미생물의 경우 NaCl 농도가 3% 내외의 범위에서 최적 생육활성을 보인다는 결과와 유사하였으며[11], 녹조류인 *Ulva lactuca*로부터 분리한 *Bacillus flexus* [24]가 최적 NaCl 농도 3.5%에서 높은 생육활성을 보인다는 결과와 유사하였다. 이러한 결과로 보아 해양에서 분리한 미생물은 NaCl의 일정농도 요구되어질 때 생육활성이 높을 것으로 사료되어지며, 본 연구에서 분리한 *C. lytica* PKA 1005 균주도 NaCl 2% 농도에서 최적 생육활성을 보이는 것을 확인하였다.

C. lytica PKA 1005 균주의 최적 배양 온도를 확인하기 위하여, 10-40°C의 온도에서 배양한 결과(Fig. 2C), 30°C에서 0.546으로 가장 높은 활성을 보였으며, 그 이외의 온도에서는 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과는 *Cytophaga lytica* 균주[6]의 최적온도가 22-30°C라는 결과와 같은 결과를 나타냈다. 앞서 결정한 최적배양 조건에서 배양시간을 달리하며 *C. lytica* PKA 1005의 균성장을 확인한 결과(Fig. 2D) 배양 36시간까지 균의 성장속도가 급격히 증가하였고

이후 균의 성장 속도가 감소하였으며, 48시간 이후에는 균체의 성장이 거의 없었다. 따라서 36시간을 최적 배양시간으로 하였다.

C. lytica PKA 1005의 최적 생육조건은 pH 7, 2% NaCl, 30°C 및 36시간의 배양조건인 것으로 나타났으며, *C. lytica* PKA 1005는 중성 및 중온 영역에서 대량 배양하여 cellulose 분해효소를 효율적으로 획득할 수 있을 것으로 사료된다.

Cellulose 분해 조효소의 특성 확인

C. lytica PKA 1005 균주가 생산하는 조효소의 cellulose 분해 활성을 확인하기 위해 pH, 온도, cellulose 농도 및 반응시간을 달리하여 cellulose 분해 활성을 측정하였다.

조효소의 pH 특성을 확인하기 위해 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH를 이용하여 초기 pH를 조정하여 cellulose 분해 활성을 실험한 결과(Table 1), pH 8에서 환원당 함량이 344.70 µg/ml로 가장 높았고, 점도가 0.33 cP로 가장 낮았다. 이로부터 pH 8에서 *C. lytica* PKA 1005 균주가 생산하는 조효소의

Table 1. Effect of pH on CMC degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay and viscometry.

	Viscosity (cP)		Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)	
	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾	Untreated	Treated
pH 2	5.64 \pm 0.01 ^{Bg3)}	5.94 \pm 0.01 ^{Aa}	18.22 \pm 2.32 ^{Aa}	18.61 \pm 1.22 ^{Af}
pH 4	5.93 \pm 0.01 ^{Ae}	1.53 \pm 0.01 ^{Bc}	18.61 \pm 1.77 ^{Ba}	252.82 \pm 13.52 ^{Ae}
pH 6	6.80 \pm 0.01 ^{Ab}	0.59 \pm 0.02 ^{Bd}	18.84 \pm 0.77 ^{Ba}	298.89 \pm 2.08 ^{Accd}
pH 7	7.04 \pm 0.01 ^{Aa}	0.35 \pm 0.01 ^{Be}	18.76 \pm 3.52 ^{Ba}	316.66 \pm 8.33 ^{Ab}
pH 8	6.68 \pm 0.02 ^{Ac}	0.33 \pm 0.02 ^{Be}	18.30 \pm 1.63 ^{Ba}	344.70 \pm 16.76 ^{Aa}
pH 9	6.17 \pm 0.01 ^{Ad}	0.58 \pm 0.01 ^{Bd}	17.75 \pm 1.44 ^{Ba}	310.74 \pm 1.22 ^{Abc}
pH 10	5.71 \pm 0.01 ^{Af}	4.62 \pm 0.01 ^{Bb}	17.88 \pm 0.92 ^{Aa}	18.30 \pm 3.45 ^{Af}

¹⁾Mixture of CMC and MB.

²⁾Mixture of CMC and crude enzyme adjusted to pH 2-10.

³⁾Means in the same row (A-B) and column (a-f) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The untreated and treated samples were incubated at 30°C for 24 h.

Table 2. Effect of temperature on CMC degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay and viscometry.

	Viscosity (cP)		Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)	
	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾	Untreated	Treated
10°C	7.55 \pm 0.01 ^{Aa3)}	1.11 \pm 0.01 ^{Ba}	17.36 \pm 0.68 ^{Ba}	151.27 \pm 2.32 ^{Ad}
20°C	7.44 \pm 0.01 ^{Ab}	0.44 \pm 0.01 ^{Bb}	18.92 \pm 2.21 ^{Ba}	265.09 \pm 4.75 ^{Ac}
25°C	7.11 \pm 0.01 ^{Ac}	0.43 \pm 0.01 ^{Bb}	18.06 \pm 1.44 ^{Ba}	265.40 \pm 6.08 ^{Ac}
30°C	6.68 \pm 0.01 ^{Ad}	0.38 \pm 0.01 ^{Bc}	19.16 \pm 0.33 ^{Ba}	273.38 \pm 3.43 ^{Ac}
35°C	6.10 \pm 0.01 ^{Ae}	0.38 \pm 0.01 ^{Bc}	20.56 \pm 2.54 ^{Ba}	363.82 \pm 4.64 ^{Aa}
40°C	5.59 \pm 0.01 ^{Af}	0.38 \pm 0.02 ^{Bc}	18.56 \pm 1.31 ^{Ba}	314.89 \pm 5.53 ^{Ab}

¹⁾Mixture of CMC and MB.

²⁾Mixture of CMC and crude enzyme adjusted to pH 8.

³⁾Means in the same row (A-B) and column (a-f) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The untreated and treated samples were incubated for 24 h.

cellulose 분해 활성이 가장 뛰어남을 확인하였다. 이러한 결과는 *Salinivibrio* sp. NTU-05 [26]와 *Bacillus halodurans* CAS 1 [2]이 각각 pH 7.5 및 pH 9 부근에서 cellulose 분해 효소의 활성이 최대인 결과와 유사한 것으로 나타났으며, 세균이 분비하는 cellulase는 주로 중성 및 약알칼리성 영역에서 높은 활성을 보인다는 보고와 같은 결과를 보였다[14].

조효소액의 온도에 따른 특성을 확인하기 위하여 pH 8에서 10-40°C로 온도를 달리하며 실험한 결과(Table 2), 35°C에서 환원당 함량 363.82 $\mu\text{g/ml}$, 점도가 0.38 cP로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 *Salinivibrio* sp. NTU-05 [26] 및 *Bacillus* sp. H9-1 [27]이 각각 35°C 및 40°C에서 최적 cellulose 분해 활성을 보였다는 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 토양 및 뽕짚에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 [14] 및 *Trichoderma* sp. C-4 [23]이 생산하는 cellulose 분해효소의 최적온도가 각각 50°C 및 55°C에서 최적 활성을 보여준 것과는 상이하게 해양에서 분리한 *C. lytica* PKA

Table 3. Effect of CMC concentration on CMC degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay.(Unit : $\mu\text{g/ml}$)

	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾
1%	2.51 \pm 1.04 ^{Bc3)}	215.30 \pm 2.25 ^{Ad}
3%	2.75 \pm 0.67 ^{Bc}	239.82 \pm 4.86 ^{Accd}
5%	12.09 \pm 1.84 ^{Bbc}	267.44 \pm 5.92 ^{Abc}
7%	13.82 \pm 2.05 ^{Bab}	295.34 \pm 6.20 ^{Ab}
8%	16.94 \pm 1.62 ^{Bab}	343.12 \pm 4.30 ^{Aa}
9%	18.72 \pm 2.66 ^{Bab}	289.20 \pm 5.45 ^{Ab}
11%	23.14 \pm 2.16 ^{Ba}	290.78 \pm 6.72 ^{Ab}

¹⁾Mixture of CMC and MB.

²⁾Mixture of CMC and crude enzyme adjusted to pH 8.

³⁾Means in the same row (A-B) and column (a-d) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The untreated and treated samples were incubated at 35°C for 24 h.

Table 4. Effect of reaction time on CMC degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay and viscometry.

	Viscosity (cP)	Reducing sugar (Unit : $\mu\text{g/ml}$)
3 h	$0.90 \pm 0.11^{a1)}$	158.31 ± 2.12^f
6 h	0.65 ± 0.02^b	195.72 ± 4.85^e
12 h	0.51 ± 0.01^{bc}	342.10 ± 5.22^d
24 h	0.40 ± 0.02^{cd}	380.42 ± 3.64^c
36 h	0.21 ± 0.04^{de}	390.24 ± 2.53^c
48 h	0.13 ± 0.01^e	418.14 ± 1.86^b
60 h	0.09 ± 0.01^e	456.88 ± 3.26^a
72 h	0.08 ± 0.01^e	454.17 ± 4.48^a

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The mixture of CMC and crude enzyme adjusted to pH 8. The treated samples were incubated at 35°C.

1005 균주가 생산한 cellulose 분해효소의 활성이 35°C로 낮은 것은, 각각의 미생물이 서식하는 환경의 차이에 의하여 생산하는 효소의 최적온도가 차이를 보이는 것으로 사료된다.

조효소액의 최적 기질 농도를 확인하기 위하여 pH 8 및 35°C 조건에서 cellulose 농도를 1-11%로 달리하여 실험한 결과(Table 3), cellulose 농도 8%에서 환원당 함량이 343.12 $\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높은 cellulose 분해 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

조효소액의 시간에 따른 활성조건을 확인하기 위하여 pH 8, 35°C, cellulose 농도 8%의 최적 조건에서 시간을 달리하여 실험한 결과(Table 4), 60시간에서 점도가 0.09 cP 및 환원당 함량이 456.88 $\mu\text{g/ml}$ 으로 최대 분해 활성을 나타내었으며, 이 후에는 환원당 값이 감소하여 60시간을 최적 활성 조건으로 하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, *C. lytica* PKA 1005이 생산하는 조효소액의 최적 cellulose 분해 조건은 pH 8, 35°C, 8% CMC 및 반응시간 60시간임을 확인하였으며, 다른 미생물이 분비하는 cellulose-degrading enzyme

Table 5. Comparison of properties of cellulose-degrading crude enzyme from *Cellulophaga lytica* PKA 1005 with other microorganism.

Microorganisms	pH	Temperature (°C)	Substrate	Reaction time (h)	MW (kDa)	Reference
<i>Cellulophaga lytica</i> PKA 1005	8	35	CMC (8%)	60	-	Present study
<i>Salinivibrio</i> sp.strainNTU-05	7.5	35	CMC (8%)	-	29	[26]
<i>Bacillus amyoliquefaciens</i> DL-3	7	50	CMC	-	54	[14]
<i>Bacillus halodurans</i> CAS1	9	60	CMC	-	44	[2]
<i>Trichoderma</i> sp. C-4	5	55	CMC	-	56	[23]
<i>Bacillus</i> sp. H9-1	8	40	CMC	-	-	[27]

특성을 비교 시(Table 5), 해수유래 *C. lytica* PKA1005 균주가 35°C에서 최적 온도를 가지는 것에 비하여 육상 미생물 유래 효소가 40-60°C에서 최적온도를 나타내고 있어 육상미생물보다 낮은 온도에서 최적 활성을 가지므로 산업적인 대량배양 이용 시 낮은 온도에서 반응을 유도할 수 있어 효과적일 것으로 사료된다.

요 약

부산 송정 연안에서 분해중인 해조류를 채집하여 cellulose 분해 미생물을 분리·동정하고 미생물의 생육조건 및 미생물이 생성한 조효소의 cellulose 분해 특성을 확인하였다. *Grateloupia elliptica*로부터 분리한 cellulose 분해균을 동정한 결과, *Cellulophaga lytica* strain로 확인되었으며, *Cellulophaga lytica* PKA 1005 명명하였다. *C. lytica* PKA 1005의 최적생육 조건을 확인한 결과, pH 7, 2% NaCl, 30°C 및 배양 36시간에서 최적생육활성을 확인하였다. 또한 *C. lytica* PKA 1005가 생성하는 cellulose 분해 조효소는 pH 8, 35°C, 8% CMC 및 반응 60시간에서 최적분해활성을 보이는 것을 확인하였다.

Acknowledgements

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2013 Year : 20130572).

References

- Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, Gokhale DV. 2007. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulose production. *Bioresour. Technol.* **98**: 1467-1473.
- Annamalai N, Raheswari MV, Elayaraja S, Balasubramanian T. 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydr. Polym.* **94**: 409-415.

3. Asha, Malini B, Revathi M, Yadav A, Sakthivel N. 2012. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic Strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1501-1509.
4. Gao W, Lee EJ, Lee SU, Li JH, Chung CH, Lee JW. 2012. Enhanced carboxymethylcellulase production by a newly isolated marine bacterium, *Cellulophaga lytica* LBH-14, using rice bran. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1412-1422.
5. Heo HY, Jeong YJ, Shin ES, Kwon EJ, Kim YJ, Kim JH, et al. 2005. Characterization of cellulolytic activity from *Pseudomonas* sp. JH1014. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 322-325.
6. Johansen JE, Nielsen P, Sjöholm C. 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1231-1240.
7. Kang HJ, Uegaki K, Fukada H. 2007. Improvement of the enzymatic activity of the hyperthermophilic cellulase from *Pyrococcus horikoshii*. *Extremophiles* **11**: 251-256.
8. Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Saini HS. 2007. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresour. Technol.* **98**: 74-81.
9. Kim DW, Chung CH, Kim TS. 1992. Sugar production mechanism by the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase components. *Polymer.* **16**: 436-442.
10. Kim KC, Kim SW, Kim MJ, Kim SJ. 2005. Saccharification of foodwastes using cellulolytic and amylolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* FJ1 and its kinetics. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**: 52-59.
11. Lee JH, Bae MJ, Kim YC, Nam SW. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 350-354.
12. Lee KM, Jeya M, Joo AR, Singh R, Kim IW, Lee JK. 2010. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme Microb. Technol.* **46**: 206-211.
13. Lee SH, Chae JP, Kim MJ, Kang DK. 2010. Isolation of *Bacillus amyloliquenfaciens* ATC6 producing acidic cellulase. *J. A. S. T.* **52**: 65-70.
14. Lee YJ, Kim BK, Lee BH, Jo KI, Lee NK, Chung CH, et al. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquenfaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* **99**: 378-386.
15. Nazir A, Soni R, Saini HS, Manhas RK, Chadha BS. 2009. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β -glucan and xyloglucan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 1189-1197.
16. Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
17. Nishida Y, Suzuki KI, Kumagai Y, Tanaka H, Inoue A, Ojima T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie.* **89**: 1002-1011.
18. Saha S, Roy R, Sen SK, Ray AK. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquac. Res.* **37**: 380-388.
19. Saxena S, Bahadur J, Varma A. 1991. Production and localisation of carboxymethyl cellulase, xylanase and β -glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 668-670.
20. Siddhanta AK, Prasad K, Meena R, Presad G, Mehta GK, Chhatabar MU, et al. 2009. Profiling of cellulose content in Indian seaweed species. *Bioresour. Technol.* **100**: 6669-6673.
21. Stevens RA, Levin RE. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 896-899.
22. Sugiyama J, Persson J, Chanzy H. 1991. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules* **24**: 2461-2466.
23. Sul OJ, Chung DK, Han IS, Jeong CS. 2005. Characterization of Endoglucanase (F-I-III) Purified from *Trichoderma* sp. C-4. *Korean J. Microbiol.* **41**: 81-86.
24. Trivedi N, Gupta V, Kumar M, Kumari P, Reddy CRK, Jha B. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydr. Polym.* **83**: 891-897.
25. Vijayaraghavan P, Vincent SG. 2012. Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Bacillus* sp. Isolated from a Paddy Field. *Pol. J. Microbiol.* **61**: 51-55.
26. Wang CY, Hsieh YR, Ng CC, Chan H, Lin HT, Tzeng WS, et al. 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme Microb. Technol.* **44**: 313-379.
27. Yoon YM, An GH, Kim JK, Cha YL, Park YR, Ahn JW, et al. 2013. Optimization of cellulolytic enzyme production for newly isolated *Bacillus* sp. H9-1 from herbivore feces. *KSBB. J.* **28**: 42-47.