

## 산성 Cellulase를 분비하는 *Bacillus amyloliquefaciens* ATC6의 분리

이세형 · 채종표 · 김민정 · 강대경\*

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

### Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* ATC6 Producing Acidic Cellulase

Se Hyung Lee, Jong Pyo Chae, Min Jeong Kim and Dae-Kyung Kang\*

Department of Animal Resources Science, College of Bio-Resources Science, Dankook University

#### ABSTRACT

A bacterium producing acidic cellulase was isolated from pig feces. The isolate, ATC6 strain, was found to be Gram-positive, non-motile, catalase-positive, and spore-forming stain. Under an electron microscope, the cells were observed to be rod-shaped. The isolate was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* ATC6 on the basis of morphological and biochemical properties as well as 16S rRNA gene sequences. Optimum pH and temperature for the cellulase activity of the culture supernatant of *B. amyloliquefaciens* ATC6 were found to be pH 4.5 and 55°C, respectively. More than 80% of its maximum activity was maintained at pH 4.0. The cellulase activity was maintained at temperatures ranging from 35 to 55°C after 2 h incubation at pH 4.5, whereas its activity decreased rapidly at 65°C.

(Key words : Enzyme, Acidic cellulase, *Bacillus amyloliquefaciens*)

#### 서 론

일반적으로 식물체에는 난소화성 탄수화물이 다량 함유되어 있는데, 그 중에서도 cellulose는 식물체 건조 중량의 40% 이상을 차지하는 주된 다당류로서, 글루코스가 β-1,4-glycosidic 결합으로 구성되어 있다. 국제 곡물가격의 급등에 따라 사료곡물에 함유되어 있는 난소화성 탄수화물, 특히 cellulose를 효율적으로 이용하기 위해 cellulase (EC 3.2.1.4)가 사료첨가용 효소로서 널리 이용되고 있다. 이는 가축의 장내에서 곡물 사료의 이용성을 높임으로써 사료효율 및 가축의 생산성을 향상시킬 뿐만 아니라 (Beguin과 Aubert, 1994; Campbell 등, 1992; Chiang 등, 2005; Kim<sup>b</sup> 등, 2003; Kiarie 등, 2007), 가축분뇨의 퇴비화 촉진 (Kim 등, 1999) 등 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있기 때문이다. 또한, 혐기성 섬유소분해세균 배양액을 한우에 급여할 경우 반추위 발효에 개선효과가 있는 것으로 보고된 바 있다 (Park 등, 2009). 지금까지 다양한 종류의 미생물이 cellulase를 분비하는 것으로 알려져 있는데, 곰팡이 중에서는 주로 *Trichoderma* 속이나 *Aspergillus* 속에서 주로 보고되고 있으며 (Oh 등, 2003; Sohail 등, 2009), 재래산양과 한우의 장내에서도 혐기성 곰팡이가 분리된 바 있다 (Kim<sup>a</sup> 등, 2003). 세균으로부터는 *Bacillus* 속, *Clostridium* 속, *Streptomyces* 속 등이 보고되었다 (Kim 등, 1999; Mosolova 등, 1993). Jeong 등 (2003)은 사료첨가용 cellulase 및 xylanase 효소를 생산

하기 위한 배지 및 배양조건을 보고한 바 있다.

Cellulase는 각각의 효소마다 최대 활성을 나타내는 pH 영역이 다른데, 곰팡이가 분비하는 cellulase는 일반적으로 약산성 영역에서 높은 활성을 보이는 반면, 세균 유래의 cellulase는 중성 또는 알칼리 조건에서 최대 활성을 주로 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Kim 등, 1999). 동물용 사료에 첨가하는 효소의 경우에는 동물 위내의 낮은 pH를 통과하면서 작용해야 하므로, 최적 pH가 산성이거나 내산성 특성을 가지는 것이 바람직하다 (Castanon 등, 1997). 하지만, 곰팡이보다 생육속도가 빠르고 대량생산을 위한 발효공정 적용이 용이한 세균으로부터 분리한 cellulase 중에서 산성 조건에서 최적 활성을 가진 예는 거의 보고된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 사료곡물의 효율적인 이용을 목적으로 acidic cellulase를 분비하는 세균을 분리하였으며, 형태학적 및 생화학적 특성과 분리한 미생물이 분비하는 효소의 특성에 대해 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 균주 분리 및 배지

축사 부근의 토양, 돈분, 퇴비 등으로부터 시료를 채취하여 멸균된 생리식염수 (0.85% NaCl)에 현탁시켰으며, 각 단계별 희석액을 0.5% Na-carboxymethyl cellulose (Sigma, USA)를 함유한

\* Corresponding author : Dae-Kyung Kang, Department of Animal Resources Science, Dankook University, Anseo-dong 29, Cheonan 330-714, Korea. Tel: +82-41-550-3655, Fax: +82-41-564-3655, E-mail: dkkang@dankook.ac.kr

Nutrient agar (Difco, USA)에 도말하고 37°C에서 배양하였다. 각 배지에서 얻은 단일 균주의 replica plate를 만들고 24시간 동안 배양한 후에, 0.35% congo red (Sigma, USA) 용액으로 염색하였으며, 1 M NaCl로 세척한 후에 나타나는 노란색의 투명환이 큰 균주들을 선발하였다. 선발된 균주를 CNY (0.5% Na-carboxymethyl-cellulose, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 0.3% peptone, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8) 액체배지에 접종하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 상등액을 조효소액으로 사용하여 pH 4의 조건에서 활성이 높은 균주를 최종 선발하였다. Na-carboxymethyl cellulase (Na-CMCase)의 활성도는 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다(Miller 등, 1960).

## 2. 분리균주의 동정

선발된 균주의 동정을 위해 형태, 생리적 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석함으로써 균주를 최종적으로 동정하였다. 형태학적인 특징은 전자현미경 (Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하였으며, Sohn 등 (2004)의 방법에 준하였다. 즉, CNY 고체배지에 배양한 colony를 filter paper에 옮긴 후에 cacodylate buffer (8% paraformaldehyde, 3% glutaraldehyde)로 하룻밤동안 고정시켰다. 이를 세척하고 건조시킨 후에 금으로 코팅하여 시료를 준비하였으며, 전자현미경 (Philips, XL30CP)으로 관찰하였다.

생화학적 특성 조사는 API 50 CHB kit (Biomereux, France)를 이용하여 37°C에서 48시간 배양한 후 실시하였다. 선발된 균주의 16S rDNA 서열을 분석하기 위해 genomic DNA extraction kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 분리균주로부터 genomic DNA를 추출하였으며, forward primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') set를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 50 pmole primer, 50ng template DNA, 10×Taq DNA polymerase buffer 5 µL, 2.5 mM dNTP mixture 4µL, Taq DNA polymerase (TaKara, Japan) 1 µL가 포함된 PCR mixture 50 µL를 95°C에서 5분간 변성시킨 후에 95°C에서 1분, 55~60°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30 cycle을 반복함으로써 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pSTBlue-1 (Novagen, USA)에 클로닝한 다음, BigDye™-terminator sequencing kit과 ABI PRISM377 sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 분석하였다.

## 3. 배양시간에 따른 균주의 성장과 효소 생산

균의 성장 및 효소생산 패턴을 조사하기 위해, Nutrient broth (Difco, USA)에 접종하고, 37°C, 150 rpm에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하였다. 선발된 균주의 성장 정도는 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도로 측정하였으

며, 균주를 배양하면서 채취한 상등액을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성은 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다 (Miller 등, 1960).

## 4. 조효소액의 조제 및 효소활성 측정

선발된 균주를 Nutrient broth에 접종하고 37°C에서 24시간동안 진탕 배양한 후에, 배양액을 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 배양 상등액을 Amicon Ultra 10K (Milipore, USA)를 사용하여 10배 정도 농축한 후에 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

Na-carboxymethyl cellulase (Na-CMCCase)의 활성도는 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다(Miller 등, 1960). 즉, 증류수에 녹인 1.0% CMC 600 µL, 200 mM citrate-NaOH buffer (pH 4.5) 250 µL와 조효소액 100µL, 증류수 50 µL를 혼합하고 55°C에서 1시간 30분 반응시킨 후에 Na-carboxymethyl cellulase(Na-CMC)으로부터 유리된 glucose 함량을 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다(Miller 등, 1960). 효소의 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 Na-CMC로부터 1 µmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

## 5. 효소의 활성에 미치는 pH 및 온도 효과

Cellulase의 활성 및 반응에 미치는 pH 및 온도의 영향을 조사하기 위해, 선발된 균주가 생산하는 조효소액을 반응에 사용하였다. 효소의 최적 pH를 조사하기 위해서는, 조효소액을 아래의 각 pH 별 완충용액에 넣고 55°C에서 반응시킨 후, 활성을 비교하였다. 사용한 완충용액으로서, pH 3.0~5.0 사이는 50 mM citrate-NaOH buffer, pH 6.0~8.0 사이는 50 mM potassium phosphate buffer, pH 9.0~10.0 사이는 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다. 효소 반응의 최적 온도를 조사하기 위해, 50 mM citrate-NaOH 완충용액(pH 4.5)에서 1.0% Na-CMC 용액을 기질로 사용하여 15°C에서 75°C까지 구간별로 반응시킨 후, 상기 서술한 효소 활성 측정법으로 효소 활성을 비교하였다.

## 6. Cellulase의 온도 안정성

효소의 온도 안정성을 검토하기 위해, 50 mM citrate-NaOH buffer (pH 4.5)에 조효소액을 첨가하여 35°C에서 65°C까지의 각 온도에서 120분간 처리한 후에 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

축사 주변의 토양, 돈분, 퇴비 등으로부터 시료를 채취한 후에, 0.5% Na-carboxymethyl cellulose (Na-CMC) (Sigma, USA)를 포함한 Nutrient agar (Difco, USA)에 도말하고, 37°C에서 24시간

동안 배양하였다. 배양이 끝난 고체배지를 0.35% congo red (Sigma, USA)로 염색하였으며, 노란색 투명한을 나타내는 균주를 선발하였다(Fig. 1). 최종적으로 선발된 ATC6 균주를 동정하기 위해 특성을 조사한 결과, Gram 양성의 간균으로서(Fig. 2), 호기성의 포자 형성균이었다. ATC6 균주의 당 발효/이용성을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같으며, *Bacillus amyloliquefaciens*에 속하는 것으로 나타났다(신뢰도 99.9%). 또한, ATC6 균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 후에(Fig. 3), NCBI의 BLAST search program을 이용하여 상동성을 비교한 결과, 99.9%의 신뢰도로 *B. amyloliquefaciens*에 속하는 것으로 나타났다. 또한, 선발된 균주를 *B. amyloliquefaciens* ATC6로 명명하였다. 한편, *B. amyloliquefaciens* ATC6가 생산하는 cellulase계 효소를 조사한 결과, avicelase 및  $\beta$ -glucosidase 활성은 유도되지 않았기 때문에, *B. amyloliquefaciens* ATC6가 생산하는 효소는 endo- $\beta$ -1,4- glucanase인 CMCase인 것으로 추정되었다(data not shown).

*B. amyloliquefaciens* ATC6 균주의 배양시간에 따른 세포의 효소의 생산량을 분석한 결과(Fig. 4), cellulase 활성은 대수성장기 중반부터 급격히 증가하였고, 균의 생장이 정체기에 이르르면 효소의 활성도 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로, *Bacillus* 속 유래의 탄수화물 분해효소는 세포의 성장과 더불어 지속적으로 증가하고 정체기에 이르러 최대 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있는데(Kim 등, 2004; Kim 등, 2008), *B. amyloliquefaciens* ATC6가 분비하는 cellulase는 이러한 경향과 일치하였다.

*B. amyloliquefaciens* ATC6가 생산하는 cellulase 활성에 미치



Fig. 1. Detection of cellulase activity of ATC6 strain, by congo-red staining of solid medium containing 0.5% Na-CMC. Clear zone around cells indicates degradation of Na-CMC.

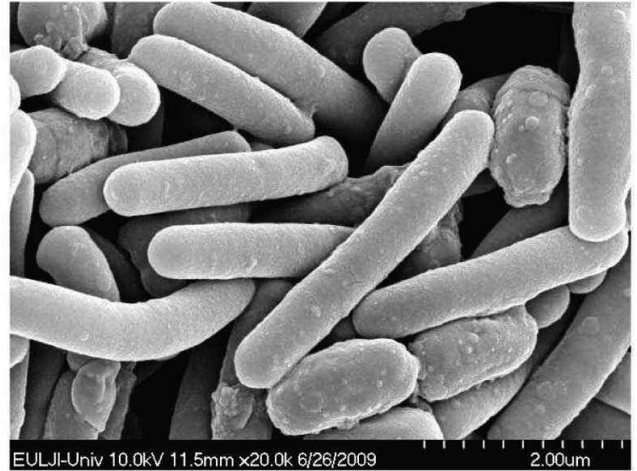


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) micrograph (x20,000) of ATC6 strain.

Table 1. Characteristics of ATC6 strain

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	+
Catalase	+	Esculin	+
Control	-	Salicin	+
Glycerol	+	Celliobiose	+
Erythritol	-	Maltose	-
D-arabinose	-	Lactose	-
L-arabinose	+	Melibiose	+
D-ribose	+	Sucrose	+
D-xylose	-	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	-	Melezitose	-
Methyl-B-D-xylopyranoside	-	Raffinose	+
D-galactose	-	Starch	+
D-glucose	+	Glycogen	+
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	+	Gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	-
Rhamnose	-	D-lyxose	-
Dulcitol	-	D-tagatose	-
Inositol	+	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl, D-Mannopyranside	-	L-arabitol	-
$\alpha$ -Methyl, D-glucoside	+	Gluconate	-
N-Acethyl-glucosamine	-	2-keto-gluconate	-
Amygdalin	-	5-keto-gluconate	-

1) +: positive result, -: negative result  
2) API 50CHB kit was used.

```

1 GTGCCTAATA CATGCAAGTC GAGCGGACAG ATGGGAGCTT GCTCCCTGAT GTTAGCGGCG
61 GACGGGTGAG TAACACGTGG GTAACCTGCC TGTAAGACTG GGATAACTCC GGGAAACCGG
121 GGCTAATACC GGATGGTTGT CTGAACCGCA TGGTTCAGAC ATAAAAGGTG GCTTCGGCTA
181 CCACTTACAG ATGGACCCGC GGCGCATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC
241 GACGATGCGT AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG
301 ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAGGGAATCT TCCGCAATGG ACGAAAGTCT GACGGAGCAA
361 CGCCGCGTGA GTGATGAAGG TTTTCGGATC GTAAAGCTCT GTTGTTAGGG AAGAACAAGT
421 GCCGTTCAA TAGGGCGGCA CCTTGACGGT ACCTAACCAG AAAGCCACGG CTAACTACGT
481 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC GGAATTATTG GGCGTAAAGG
541 GCTCGCTGGC GGTTCCTTAA GTCTGATGTG AAAGCCCCCG GCTCAACCGG GGAGGGTCAT
601 TGGAAACTGG GGAACCTGAG TGCAGAAGAG GAGAGTGGAA TTCCACGTGT AGCGGTGAAA
661 TGCGTAGAGA TGTGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGACT CTCTGGTCTG TAACTGACGC
721 TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA
781 CGATGAGTGC TAAGTGTTAG GGGGTTTCCG CCCCTTAGTG CTGCAGCTAA CGCATTAGC
841 ACTCCGCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT GAAACTCAA GGAATTGACG GGGGCCCGCA
901 CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA GAACCTTACC AGGTCTTGAC
961 ATCCTCTGAC AATCCTAGAG ATAGGACGTC CCCTTCGGGG GCAGAGTGAC AGGTGGTGCA
1021 TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT
1081 TGATCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGTG ACAAACCGGA
1141 GGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC ACACGTGCTA
1201 CAATGGACAG AACAAAGGGC AGCGAAACCG CGAGGTAAAG CCAATCCCAC AAATCTGTTC
1261 TCAGTTCGGA TCGCAGTCTG CAACTCGACT GCGTGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGCGG
1321 ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGTACA CACCGCCCGT CACACCACGA
1381 GAGTTTGTAA CACCCGAAGT CGGTGAGGTA ACCTTTATGG AGCCAGCCCG CGAAGGTGGG
1441 ACAGATGATT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG T
    
```

Fig. 3. 16S rDNA sequences of the isolated strain, ATC6.

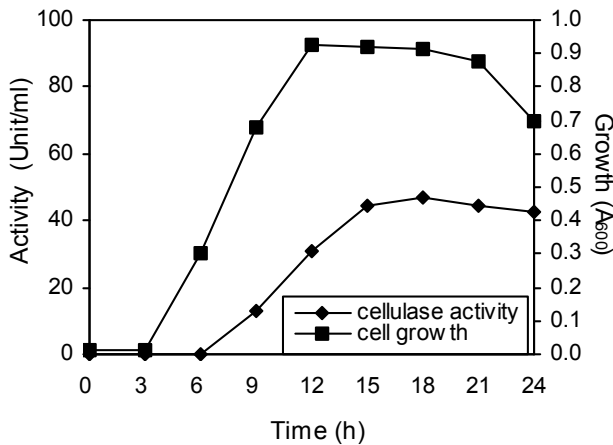


Fig. 4. Growth and enzyme production of *B. amyloliquefaciens* ATC6. *B. amyloliquefaciens* ATC6 was grown in Nutrient broth at 37°C with vigorous shaking. The cell growth was determined by measuring OD<sub>600</sub> of the cell culture. Enzyme activity was determined with the culture supernatants.

는 pH의 영향을 조사하였다. 배양 상등액을 Amicon Ultra 10K (Milipore, USA)를 사용하여 농축한 후에 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였으며, pH 3.0~10.0 범위로 조정한 후에 효

소 활성을 측정된 결과, pH 4.5에서 최대의 효소 활성을 나타내었다 (Fig. 5). 또한 pH 4.0에서도 최대 활성의 80% 이상을 유지하는 것을 확인할 수 있었으며, pH 4.0~pH 8.0까지 상대적으로 넓은 범위에서 최대 활성의 60% 이상을 유지하였다. *B. subtilis* CH 10이 분비하는 cellulase의 최적 pH는 9.5 이었고 (Kim 등, 1999), *Cellulomonas* 유래의 cellulase의 최적 pH는 6.0 이었으며 (Emtizi and Nahvi, 2004). 한편, 곰팡이 유래의 cellulase는 산성에서 활성이 높은 경우가 많은데, *Trichoderma* sp. SO-571의 최적 pH는 5.0 이었으며 (Oh 등, 2003), 최근 들어 *Aspergillus fumigatus*로부터 산성 cellulase가 분리된 바 있다. (Grigorevski-Lima 등, 2009).

*B. amyloliquefaciens* ATC6이 세포외로 분비하는 cellulase가 기질을 가수분해하는데 있어서 온도가 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 배양 상등액을 Amicon Ultra 10K (Milipore, USA)를 사용하여 농축시킨 후에 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였으며, 반응온도를 달리하여 cellulase 활성을 측정하였다. Cellulase 활성의 최적 온도는 55°C이었으며, 37°C~65°C의 비교적 넓은 범위에서 높은 효소활성을 나타내었다. 또한 37°C 이하의 온도에서는 cellulase 활성이 급격히 감소한 반면, 75°C의 높은 온도에서도 최고 활성의 50% 정도에 해당하는 활성을 나타내었다. 세균 유래의 cellulase는 내열성을 가진 경우가 많으

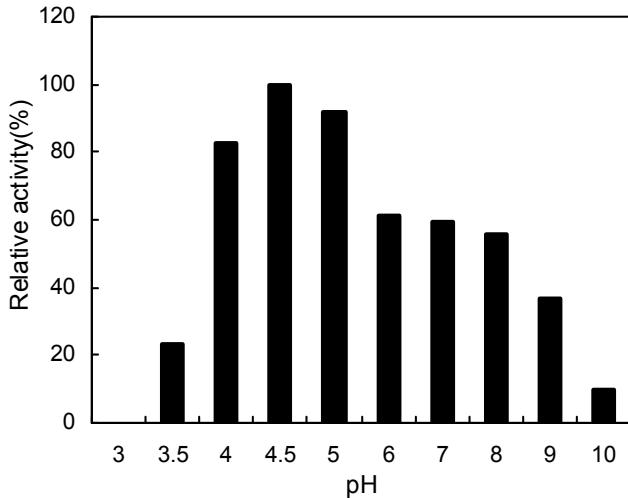


Fig. 5. Effect of pH on the activity of the cellulase from *B. amyloliquefaciens* ATC6. The maximum specific activity of crude enzymes was set as 100%. The buffer solutions used were 50 mM citrate-NaOH (pH 3-5), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6-8), and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9-10).

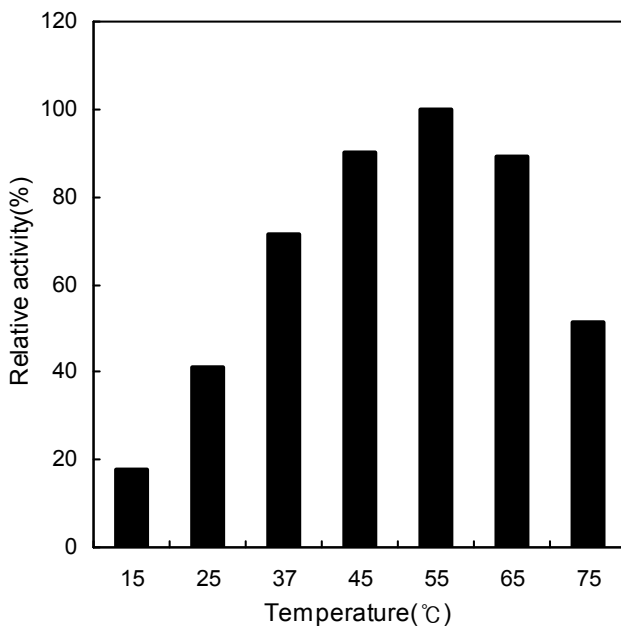


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of the cellulase from *B. amyloliquefaciens* ATC6. The maximum specific activity of crude enzymes was set as 100%. Assays were performed in 50 mM citrate-NaOH buffer (pH 4.5).

나, *Trichoderma* sp. SO-571의 경우는 최적 반응온도가 60°C 이었으며 (Oh 등, 2003), *Aspergillus niger* MS82의 최적 반응온도는 35°C 이었다 (Sohail 등, 2009).

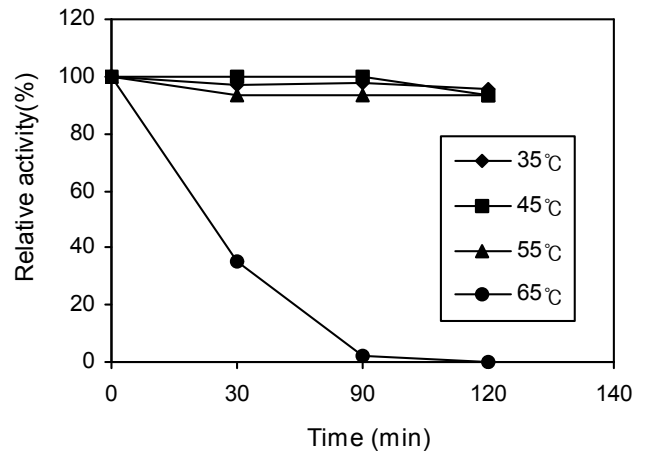


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of the cellulase from *B. amyloliquefaciens* ATC6. Assay was carried out after exposure to different temperatures for 2 hr.

*B. amyloliquefaciens* ATC6 균주가 분비하는 cellulase의 열안정성을 조사하기 위해, 조효소액을 각 온도에서 시간별로 방치한 후 남아있는 효소의 잔존활성을 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, 45°C 및 55°C에서는 2시간 후에도 효소의 활성이 안정하게 유지되었으나 65°C에서는 시간의 경과와 함께 효소 활성이 급격히 감소하였다.

이상의 결과에서 보는 바와 같이, *B. amyloliquefaciens* ATC6 균주가 분비하는 cellulase는 산성 조건에서 최대 활성을 나타내는 acidic cellulase인 것으로 밝혀졌다. 사료곡물의 이용률을 높이기 위해서는, 단위동물 위내의 낮은 pH에서도 안정성을 유지하는 것이 중요하기 때문에, 단위동물 급여용 효소제를 선택하는 기준의 하나로 알려져 있다. 본 연구를 통해 분리한 *B. amyloliquefaciens* ATC6가 cellulase를 최대한 생산할 수 있도록 배양조건을 최적화하거나, cellulase 유전자 클로닝 및 대량발현 연구를 통해 효소의 내산성 기작 규명 및 산업적 응용 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

사료곡물을 효율적으로 이용하기 위해, 산성 cellulase를 분비하는 ATC6 균주를 선발하였다. 선발된 ATC6 균주의 형태, 당 이용성 및 16S rDNA 서열분석 등을 통해 동정한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*에 속하는 것으로 나타났으므로, *B. amyloliquefaciens* ATC6로 명명하였다. *B. amyloliquefaciens* ATC6가 분비하는 cellulase 효소의 활성은 대수생장기 중반부터 급격히 증가하였고, 균의 생장이 정체기에 이르면 효소의 활성도 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 효소의 최적 pH를 조사한 결과, pH 4.5에서 최대의 효소 활성을 나타내었으며, pH 4.0에서도 최고 활성의 80% 이상을 유지하였다. 또한 pH 4.0~pH 8.0까지 상대적으로 넓은 범위에서 최대 활성의 60% 이상을 유지하였다. Cellulase

활성의 최적 온도는 55℃ 이었으며, 75℃의 고온에서도 최대 활성의 50% 정도의 활성을 나타내었다. 효소의 열 안정성을 조사한 결과, 45℃ 및 55℃에서는 2시간 후에도 효소의 활성이 안정하게 유지되었으나, 65℃에서는 시간의 경과와 함께 효소 활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2008년도 산학협력실 지원 사업 (No. S5108L19500)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## 인 용 문 헌

- Beguín, P. and Aubert, J. P. 1994. The biological degradation of cellulase. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Campbell, G. L. and Bedford, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72:449-453.
- Castanon, J. I. R., Flores, M. P. and Pettersson, D. 1997. Mode of degradation of non-starch polysaccharides by feed enzyme preparations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68:361-365.
- Chiang, C. -C., Bi Y. and Peter, W. -S. C. 2005. Effects of xylanase supplementation to wheat-based diet on the performance and nutrient availability of broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(88):1141-1146.
- Emtizi, G. and Nahvi, I. 2004. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase and cellulase from *Cellulomonas* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1196-1199.
- Grigorevski-Lima, A. L., Da Vinha, F. N., Souza, D. T., Bispo, A. S., Bon, E. P., Coelho, R. R. and Nascimento, R. P. 2009. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155:321-329.
- Jeong, W. H., Yang, S. Y., Song, M. D., Ha, J. G. and Kim, C. W. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. producing xylanase and cellulase and optimization of medium conditions for its production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(4):383-388.
- Kiarie, E., Nyachoti, C. M., Slominski, B. A. and Blank, G. 2007. Growth performance, gastrointestinal microbial activity, and nutrient digestibility in early-weaned pigs fed diets containing flaxseed and carbohydrase enzyme. *J. Anim. Sci.* 85(11):2982-2993.
- Kim<sup>a</sup>, C. -H. and Lee, S. -S. 2003. Isolation and characterization of cellulolytic anaerobic fungi from the guts of the Hanwoo cattle and the Korean native goat. *J. Anim. Sci. & Tech. (Kor).* 45(6):1007-1018.
- Kim<sup>b</sup>, I. H., Park, J. S., Hancock, J. D., Hines, R. H., Cobb, C., Cao, H., Hong, J. W. and Kwon, O. S. 2003. Effects of amylase and cellulase supplementation in sorghum-based diets for finishing pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(11):70-76.
- Kim, J. -Y., Hur, S. -H. and Hong, J. -H. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Kor. J. Microbiol.* 40(2):139-146.
- Kim, M. J., Lim, S. J. and Kang, D.-K. 2008. Isolation of a *Bacillus licheniformis* DK42 producing cellulase and xylanase, and properties of the enzymes. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor).* 50(3):1-10.
- Kim, T. -I., Han, J. -D., Jeon, B. -S., Ha, S.-W., Yang, C. -B. and Kim, M.-K. 1999. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH-10 secreting cellulase from cattle manure. *Kor. J. Microbiol.* 35:277-282.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* 2:127-132.
- Oh, S. -H., Moo Sung Kim, Sung So, and Hyung Joo Suh. 2003. Studies on the Production of Cellulase by *Trichoderma* sp. SO-571 and the Enzyme Treatment for Cellulosic Fabrics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3):42-45.
- Park, J. -K., Chan Sung Jeong, Do Yeun Park, Hyun Cheol Kim, Seung Cheol Lee and Chang-Hyun Kim. 2009. Effects of Increasing Inclusion Levels of Rumen Cellulolytic Bacteria Culture on *In vivo* Ruminant Fermentation Patterns in Hanwoo Heifers. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor).* 51(1):45-52.
- Sohn, J. H., Lee, J. H., Yi, H., Chun, J., Bae, K. S., Ahn, T. Y. and Kim, S. J. 2004. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:675-680.
- Sohail M, Siddiqi R, Ahmad A, Khan SA. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnol.* [Epub ahead of print]. (접수일자 : 2009. 8. 14 / 수정일자 : 2010. 1. 9 / 채택일자 : 2010. 2. 3)