셀룰로스분해 신규 해양미생물 *Seonamhaeicola* sp. S2-3의 분리 및 동정

김다솜, 지원재*

국립생물자원관 생물자원연구부 미생물자원과

Received: September 11, 2020 / Revised: October 7, 2020 / Accepted: October 23, 2020

Isolation and Characterization of a New Cellulase-producing Marine Bacterium, *Seonamhaeicola* sp. S2-3

Da Som Kim and Won-Jae Chi*

Microorganism Resources Division, Biological Resources Research Department, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

A cellulolytic bacterial strain, S2-3, was isolated from sea water collected in Jeju island, Republic of Korea. The strain was aerobic and gram negative, and formed yellow colored colonies on marine agar medium. S2-3 cells were long rod-shaped, $0.5 \times 0.25 \mu\text{m}$ (width x length) in size, and did not have flagella. The optimal growth conditions for S2-3 were 30–35°C and pH 6.5–7.0. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of S2-3 revealed that it had the highest identity with those of *Seonamhaeicola algicola* Gy8 (97.08%), *Hyunsoonleella udonensis* JG48 (95.01%), and *Aestuariaibaculum scopimerae* I-15 (94.86%). In phylogenetic analysis, S2-3 formed the same clade as *S. algicola* Gy8, implying that S2-3 belongs to the genus *Seonamhaeicola*. The major fatty acids (>10%) comprised C_{15:1} iso G (22.29%), C_{15:0} iso (17.71%), C_{17:0} iso 3OH (16.06%), and C_{15:0} iso 3OH (10.7%), resulting in quite different ratio of the component from those of *S. algicola* Gy8. Moreover, its biochemical characteristics, including acid production and enzyme activities, were different from those of *S. algicola* Gy8. Therefore, putting all these results together, we concluded S2-3 is distinct species from *S. algicola* Gy8, and thus named it *Seonamhaeicola* sp. S2-3. In liquid culture, S2-3 produced extracellular cellulases that can hydrolyze cellulose or cellooligosaccharides into cellobiose, which is a good enzyme resource that deserves further research.

Keywords: Cellulase, *Seonamhaeicola* sp. S2-3, KACC 19205, cellooligosaccharide

Introduction

식물의 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin, lignin 등으로 구성된 복잡한 구조를 이루고 있다. 이중 cellulose는 수백에서 수천 개의 D-glucose 분자가 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 글리코사이드 결합으로 연결되어 있는 선형의 다당류 사슬로, 육상 식물뿐만 아니라 해양 식물 세포벽의 주요한 구조골격이다[1–3].

육상식물의 세포벽에는 난분해성 lignin이 다수 존재하여 미생물이 분해하는 cellulase, hemicellulase, ligninase,

pectinase 등의 효소와 같은 다수의 lignocellulosic 효소 처리에 의해서 분해될 수 있다. 반면, 해양식물에는 lignin이 존재하지 않아 lignin 제거를 위한 전처리 과정이 필요하지 않고, cellulose 분해가 보다 간단한 것으로 알려져 있다[4–7].

Cellulase는 매개하는 반응의 형태에 따라 endoglucanase (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), β -glucosidase (EC 3.2.1.21) 등으로 구분한다[8]. Endoglucanase는 긴 cellulose 체인의 내부 glycosidic 결합을 무작위로 가수분해하고, cellobiohydrolase (exocellulase)는 endoglucanase에 의해 생성된 짧은 cellulose 체인의 끝으로부터 2개 혹은 4개 단위로 당을 유리시켜 2탄당이나 4탄당을 만든다. 최종적으로 β -glucosidase (cellobiase)는 cellobiohydrolase에 의해 생성된 올리고당을 단당류로 분해한다.

*Corresponding author

Tel: +82-32-590-7371, Fax: +82-32-590-7230

E-mail: wjchi76@korea.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

해양식물 중에는 녹조류(green algae)와 같이 cellulose를 주요 구성성분으로 하는 해조류가 다수 존재하며, 이들은 해양세균이 분해하는 cellulase, hemicellulase 등의 효소에 의해서 분해될 수 있다. Cellulose는 분해 단계 중 endoglucanase에 의해서 선택적이고 특이적으로 부분 분해되어 cellobiosaccharide가 생산되는데, 이것은 각종 생리 활성이 알려져 건강기능성 식품과 화장품 등의 다양한 바이오 제품의 소재로도 사용되고 있다. 미생물 효소를 이용한 다당체의 가수분해법은 유해 부산물을 생산하는 화학적 분해법의 대안으로 인식되고 있어[9], 친환경적 바이오분해공정에 적합한 효소를 생산하는 신규한 미생물을 찾는 많은 연구가 진행되고 있다[10–13].

현재까지의 보고에 의하면, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Alteromonas* spp., *Vibrio* spp., *Brevibacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Cellulomonas* spp. 등이 식물 바이오매스를 분해할 수 있는 cellulase 생산 세균으로 잘 알려져 있으며, *Anoxybacillus* spp.와 *Geobacillus* spp. 등의 고온성세균도 cellulase 생산 균주로 주목받고 있다. 이러한 cellulose 분해 세균 탐색은 대부분 토양이나 장내에 서식하는 미생물을 대상으로 이루어졌다. 최근에는 해양생태계가 새로운 효소나 미생물을 탐색할 수 있는 거대한 소재로서 각광받고 있으며, 실제로 해양시료로부터 cellulase 등의 다당체 분해 효소를 분해하는 많은 해양 세균들이 발견되고 있다[10, 14].

본 연구에서는 해수로부터 육상 및 해양식물을 분해할 수 있는 신규의 세균을 발굴하였고, 이 세균이 생산하는 cellulase 효소가 cellulose로부터 고부가가치의 cellobiosaccharide를 생산할 수 있음을 검증하였다.

Materials and Methods

Isolation of microorganisms

제주도 성산 연안 해수를 채취하여 멸균수에 10^{-1} – 10^{-5} 으로 serial dilution 방법으로 희석하였다. 희석액을 각각 200 μ l 씩 Marine agar (MA) 배지에 도말한 후, 30℃에서 48시간 배양하였다. 생성된 콜로니를 0.2% azurine-crosslinked (AZCL)-cellulose (Megazyme, USA)가 포함된 MA 배지에 도말한 후 같은 온도조건에서 48시간 배양하였다. AZCL-cellulose 기질은 효소에 의해 분해되면 푸른색을 나타내어 분해 효소 생산 여부를 육안으로 식별이 가능하므로, 콜로니 주변에 푸른색을 형성하는 균만을 회수하여 새로운 고체배지에 계대한 후 배양하였다. 3차례 이상의 계대배양을 통해 순수한 콜로니를 회수하였다. 순수 분리된 콜로니는 0.3% carboxymethylcellulose (CMC)가 포함된 MA 배지에 배양 후 congo red로 염색하여 효소활성을 다시 확인하였다.

Cellulose 분해 활성을 갖는 콜로니들 중에서 S2-3 균주를 선택하여 선택하여 다음 실험에 사용하였다.

Phylogenetic analysis

미생물 균주의 콜로니를 Marine broth (MB) 배지에 접종하여 48시간 진탕배양(150 rpm, 30℃) 한 후, 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 genomic DNA Extraction kit (DyneBio, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하는데 사용하였다. 16S rRNA 유전자는 genomic DNA를 주형으로 하는 polymerase chain reaction (PCR)법으로 증폭하였고[15], 프라이머는 bacterial universal primer (27F와 1492R)를 사용하였다[16]. 증폭된 유전자 단편의 염기서열 분석은 바이오닉스(Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열의 상동성 검사는 BLAST program을 사용하였고, 표준 균주(type strain)들과의 유사성(similarity) 조사 및 16S rRNA 유전자 염기서열의 확보는 Ezbiocloud server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)에서 수행하였다[17]. Multialignment, 5' 및 3'의 gap의 편집 및 phylogenetic tree 제작은 Mega 6 프로그램(<https://www.megasoftware.net/>)을 사용하여 수행하였으며, bootstrap value는 1,000회의 재구성된 자료로부터 계산되었다. evolutionary distance matrices는 Kimura's two-parameter model의 algorithm에 따라서 계산하였다[18].

Analysis of morphological and physiological characteristics

선발된 균주는 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 염색 후 현미경으로 관찰하였다. MA 배지에서 24시간 배양된 균체를 1% phosphotungstic acid (PTA)로 염색한 후 투과전자현미경(JEM1010, Jeol, Japan)을 사용하여 균체 크기, 모양, 편모의 유무를 관찰하였다.

선발된 균주는 pH 4.5–11.0 (pH 0.5 간격)의 고체배지에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하면서 pH 변화에 따른 균체의 성장을 관찰하였다. 균주의 성장에 필요한 온도 조건을 알아보기 위해 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃의 조건에서 48시간 동안 배양하면서 성장 유무를 관찰하였다.

API ZYM kit, Staph kit (Biomérieux, France)를 사용하여, 제조사의 제시된 방법에 따라 미생물 균주가 생산하는 세포의 효소 생산능력, 기질 이용능력, 유기산 생산능력에 관한 생리적 특성을 판별하였다.

Analysis of biochemical characteristics

선발된 미생물주의 지방산 함량 및 polar lipid 등의 생화

학적 특성 분석은 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 의뢰하여 수행하였다. S2-3과 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성 및 N-J tree로부터 계통분석발생적 유연관계가 가장 높은 표준 균주를 선발하여 비교 분석에 사용하였다. 표준균주는 *Seonamhaicola algicola* KCTC 42396, *Aestuuriibaculum scopimarae* KCTC 32459, *Seonamhaicola aphaedonensis* KCTC 42396, *Gaetbulibacter aestuarii* KACC 17489, *Aestuuriibaculum suncheonense* KACC 16186을 선정하였다. 모든 균주는 MA 배지에서 동일 조건으로 배양하였고, 지방산 분석은 Miller 등[19]의 방법에 준하여 methyl ester화 시킨 fatty acid methyl esters (FAME) mixture를 제작한 후, microbial identification system (MIDI)의 지침에 따라 gas chromatography (GC)를 사용하였다[20]. Polar lipid 분석은 Minikin 등[21]의 방법에 따라 시료 준비 및 high performance TLC (HPTLC plate, 10 cm × 10 cm, Merck)를 수행하였다.

DNA-DNA hybridization

S2-3과 선발된 5종의 표준 균주와의 DNA-DNA hybridization (DDH) 분석을 한국미생물보존센터(KCCM)에 의뢰하여 수행하였다. S2-3 및 표준균주는 MA 배지에서 배양하고 각 균체로부터 genomic DNA를 DNA Extraction Kit로 추출하여 준비하였다. 탐침용 DNA 준비 및 hybridization 반응은 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Germany)를 사용하여 수행하였다. Hybridization signal은 Quantity One Program (Bio-rad, USA)으로 측정하였고, S2-3의 signal을 100%로 하여 hybridization 정도를 환산하였다. 각 균주들에 대한 hybridization 값은 세 번의 반복 실험을 통하여 얻은 평균 값으로 표시하였다. Negative standard 균주는 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820 균주를 사용하였다.

Determination of cell growth and enzyme production

S2-3을 MB 액체배지에서 24시간 진탕배양한 후 100 ml MB 액체배지가 들어있는 500 ml flask에 1%가 되도록 접종하여 96시간 동안 추가 배양하였다. 접종 후 24시간까지는 6시간과 12시간에 샘플링하였으며, 24시간 이후부터는 24시간 간격으로 샘플링하였다. 각 샘플의 세포 농도는 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 측정하였고, cellulase 활성은 carboxymethylcellulose (Sigma, USA)를 기질로하여 DNS 법으로 측정하였다. 효소반응은 50 mM Tris-Cl (pH 7.5) 완충액을 37℃에서 30분간 수행하였다.

Thin layer chromatography

S2-3을 200 ml의 MB 액체배지에 접종하여 37℃에서 48시간 진탕배양한 후 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 취하였다. 상등액은 0.22 µm syringe filter (Millipore, USA)를 이용하여 여과한 후 amicon ultracentrifugal filter (Millipore)로 농축하여 최종 2 ml의 배양여액을 준비하였다. S2-3이 세포외부로 분비하는 cellulase에 의한 분해산물을 분석하기 위해서, 준비된 배양여액과 carboxymethylcellulose (Sigma), cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose (Megazyme, USA)를 기질로하여 효소반응을 수행하였다. 농축액 100 µl를 동량의 기질액(0.3% CMC solution in 50 mM Tris-Cl, pH 7.5)에 섞은 후 37℃에서 24시간 반응시켰다. 각 기질에 대한 효소반응액의 산물은 TLC(박층크로마토그래피) 방법으로 분석하였다. 각 반응액 10 µl를 Silica gel 60 plate (Merck, USA)에 스폿팅 한 후 이동상(n-부탄올:아세트산:중류수 = 2:1:2) 용액으로 전개하였다. 분리된 spot은 발색시약(에탄올:황산 = 9:1)을 스프레이로 plate 위에 골고루 뿌린 후 120℃에서 색이 나타날 때까지 가열하여 확인하였다.

Fig. 1. Phenotypic characteristics of S2-3. (A) Formation of yellow colored colonies of S2-3 grown on marine agar medium at 30 °C. (B) Detection of cellulase activity based on blue color appearing around colonies due to decomposition of AZCL-cellulose by S2-3 on marine agar medium. (C) Transmission electron microscopy of S2-3 cell grown on marine agar medium at 30 °C. Scale bar is presented at the bottom.

Results

Identification of strain S2-3

제주도 연안 해수로부터 cellulose 분해 활성을 갖는 해양 미생물 균주 S2-3을 분리하여, Korean Agricultural Culture collection (KACC)에 기탁(기탁번호: KACC 19205)

하였다. S2-3은 그람 음성균으로서 콜로니에 짙은 노란색을 띄고, 매끈한 표면의 콜로니를 형성하였다(Fig. 1A). S2-3의 cellulose 분해 활성은 고체배지에 함유된 AZCL-cellulose의 분해로 콜로니 주위에 푸른색을 띠는 색상의 변화로 확인하였다(Fig. 1B). 전자현미경 분석 결과, S2-3 세포는 긴 막대기 형태이며 균체의 크기는 $2.85 \times 0.25 \mu\text{m}$ (가로 $\times$ 세로)이

Fig. 2. Genetic analysis of S2-3. (A) Phylogenetic tree of S2-3 constructed from the nucleotide sequence of 16S rRNA gene using the neighbor-joining method. The scale bar indicates a genetic distance of 0.01. The number shown next to each node indicates the percentage bootstrap value of 1,000 replicates. Accession nos. of the 16S rRNA sequences are given in parentheses. (B) DNA-DNA hybridization of S2-3 with the five phylogenetically close type strains. (1) S2-3, (2) *Seonamhaecicola algicola* KCTC 42396, (3) *Seonamhaecicola aphaedonensis* KCTC 32578, (4) *Aestuariibaculum scopimerae* KCTC 32459, (5) *Aestuariibaculum suncheonense* KACC 16186, (6) *Gaetbulibacter aestuarii* KACC 17489, (7) *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820.

고, 편모를 갖지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 1C). S2-3은 10–45℃의 범위에서 성장이 가능하고 30–35℃에서 가장 잘 자랐으며, pH 5.5–8.5의 범위에서 성장이 가능하고 pH 6.5–7.0에서 가장 잘 자랐다. S2-3은 API ZYM kit 및 Staph kit 테스트에서 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -glucosidase 효소가 양성반응을 보였으며, lipase (C14), cystine arylamidase, Trypsin protease, α -chymotrypsin protease, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, α -fucosidase, nitrate reduction, arginine dihydrolase, urease 등의 효소는 음성반응을 보였다. S2-3은 Staph kit를 이용한 당성분의 acidification 테스트에서 D-glucose, D-fructose (약함), D-maltose (약함), D-mannitol (약함), D-xylose에서 양성반응을 보였고 D-mannose, D-lactose, D-trehalose, xylitol, D-melibiose, D-raffinose, D-sucrose, methyl- α -D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine에서 음성반응을 보였다.

S2-3의 16S rRNA 유전자의 염기서열 정보를 토대로 NCBI와 Ezbiocloud 서버에서 상동성 검색을 수행하여

Seonamhaeicola algicola Gy8, *Hyunsoonleella udonensis* JG48, *Aestuuriibaculum scopimerae* I-15, *Aestuuriibaculum suncheonense* SC17, *Seonamhaeicola aphaedonensis* AH-M5, *Gaetbulibacter aestuarii* KYW382, *Hyunsoonleella pacifica* SW033, *Gaetbulibacter aquiaegeris* KEM-8 등과 각각 97.08, 95.01, 94.86, 94.778, 94.72, 94.72, 94.60, 94.58%의 높은 상동성을 보였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 상동성 검색결과를 토대로 하는 N-J 계통수 제작을 통한 계통발생적 연관성 분석결과, 군주 S2-3은 *S. algicola* Gy8와 *S. aphaedonensis* AH-M5와 가장 가까운 연관관계를 형성하고 있는 것으로 분석되었다(Fig. 2A).

S2-3을 탐침으로 하는 DDH 결과에서 *S. algicola* Gy8와 가장 높은 32%의 hybridization 수치를 보였으며, *S. algicola* Gy8을 탐침으로 하는 DDH 실험에서는 33%의 hybridization 수치를 보였다. 그 외의 표준균들과는 24–26%의 hybridization 수치를 보였다(Fig. 2B). 이러한 결과를 토대로 S2-3은 *Seonamhaeicola* 속의 한 종으로서 신종일 것으로 판단되었다. 이후 본 논문에서는 군주 S2-3을 *Seonamhaeicola* sp. S2-3으로 명명하였다.

Seonamhaeicola sp. S2-3의 세포내 주요 지방산(>5%)은

Table 1. Cellular fatty acid compositions (>1%) of strain S2-3 and its closest members.

Strains: 1, S2-3; 2, *Seonamhaeicola algicola*; 3, *Aestuuriibaculum scopimerae*; 4, *Seonamhaeicola aphaedonensis*; 5, *Gaetbulibacter aestuarii*; 6, *Aestuuriibaculum suncheonense*

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
C _{13:0} iso	0.68	0.48	0.67	0.41	1.99	0.64
C _{14:0} iso	0.83	2.12	1.51	0.42	1.93	1.26
C _{15:1} iso G	22.29	7.37	10.15	17.26	20.49	8.92
C _{15:1} anteiso A	1.21	0.34	2.48	1.53	0.86	0.82
C _{15:0} iso	17.71	26.52	13.22	16.41	26.02	23.11
C _{15:0} anteiso	6.89	5.35	9.31	7.03	5.33	6.82
C _{15:1} ω 6c	0.44	0.80	1.52	-	0.45	0.52
C _{16:1} iso H	-	0.49	1.11	-	0.35	0.70
C _{16:0} iso	0.51	5.46	1.00	1.53	1.19	1.35
C _{16:0}	2.24	6.81	5.88	2.55	1.03	5.81
C _{15:0} iso 3OH	10.7	4.99	6.98	10.31	7.20	5.72
C _{15:0} 2OH	1.59	1.06	2.65	1.53	0.90	1.23
C _{17:1} ω 6c	-	1.16	0.93	-	0.29	0.36
C _{16:0} iso 3OH	6.01	9.13	4.73	7.27	6.62	4.39
C _{16:0} 3OH	0.69	1.87	1.22	0.63	0.76	4.01
C _{17:0} iso 3OH	16.06	12.77	11.31	13.68	14.74	17.10
C _{17:0} 2OH	-	1.67	3.09	2.59	1.76	2.29
3*	9.06	5.19	15.09	17.29	3.31	8.87
9**	0.19	0.71	1.2	-	0.46	1.84

3*, C_{16:1} ω 7c/C_{16:1} ω 6c or C_{16:1} ω 6c/C_{16:1} ω 7c; 9**, C_{16:0} 10-mehtyl or C_{17:1} iso ω 9c.

Fig. 3. Polar lipid analysis of S2-3 cells by molybdophosphoric acid staining (A) and ninhydrin staining (B). PE, phosphatidylethanolamine; AL, unidentified aminolipids; L, unidentified lipid.

$C_{15:1}$ iso G (22.29%), $C_{15:0}$ iso (17.71%), $C_{17:0}$ iso 3OH (16.06%), $C_{15:0}$ iso 3OH (10.7%), summed feature 3 (9.06%), $C_{15:0}$ anteiso (6.89%), $C_{16:0}$ iso 3OH (6.01%) 등으로 분석되었는데, 이들 주요 지방산은 다른 표준균주들에서도 주요 지방산으로 나타났으나, 그 함량 및 비율 등에서 큰 차이를 보이고 있다(Table 1).

Seonamhaeicola sp. S2-3의 polar lipid 성분을 분석한 결과, 1개의 phosphatidylethanolamine, 2개의 unidentified aminolipid와 5개의 unidentified lipid를 확인하였다(Fig. 3).

Seonamhaeicola sp. S2-3의 셀룰로스 분해 활성

Seonamhaeicola sp. S2-3은 AZCL-cellulose 가 함유된 배지에서 기질을 분해하여 푸른색을 띄었고, 액체배지 배양

Fig. 4. Determination of cell growth (filled circle) and cellulase activity (filled square) depending on cultivation time in marine broth. Cell growth was measured at 600 nm and cellulase activity was measured by DNS method using carboxymethylcellulose as a substrate at 540 nm.

액의 균체를 제거한 상등액에서 cellulose 분해능력을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터, *Seonamhaeicola* sp. S2-3가 세포의 외부로 cellulose 분해효소를 분비하고 있음을 예상하였다. 실제 액체배양에서, *Seonamhaeicola* sp. S2-3은 액체배지 접종 후 24시간에 stationary phase에 진입하여 48시간에 최대성장을 보였고, 72시간 이후 급격히 사멸하는 것으로 관찰되었는데, 이러한 현상은 배지성분 내 특정 영양성분의 고갈에 따른 영향으로 알려져 있다[22]. *Seonamhaeicola* sp. S2-3의 cellulase 생산능력 역시 배양 24시간까지 급격히 증가하여 48시간에 최대생산을 보인 후 급격히 감소하였다(Fig. 4). 액체배양 48시간 배양액으로부터 배양여액을 제조하여, cellulose 및 cellooligosaccharides 기질과 반응시킨 후 분해산물의 TLC 분석을 실시하였다. 그 결과, *Seonamhaeicola* sp. S2-3가 세포외부로 분비하는 cellulase는 polysaccharide인 cellulose를 분해하여 다양한 길이의 cellooligosaccharides를 생산하며, triose 이상의 cellooligosaccharide를 biose까지 분해하는 것을 확인 하였다(Fig. 5). 이러한 TLC pattern은 일반적인 endo-type cellulase의 가수분해 활성 특성과 일치한다. 또한 *Seonamhaeicola* sp. S2-3의 배양여액은 기질로 사용된 다른 cellooligosaccharide에 대한 활성과 비교하여 CMC에 대한 활성이 비교적 약한 것으로 관찰되었는데, 이는 crystalline cellulose의 복잡한 삼차구조가 효소의 접근을 방해하기 때문으로 추측된다.

Fig. 5. Thin layer chromatographic analysis of the hydrolysates of various substrates by crude cellulase prepared from S2-3 culture broth. 1, D-glucose; 2, cellobiose; 3, cellotriose; 4, cellotetraose; 5, cellopentaose; 6, cellohexaose; 7, carboxymethylcellulose + S2-3 cellulase; 8, cellobiose + S2-3 cellulase; 9, cellotriose + S2-3 cellulase; 10, cellotetraose + S2-3 cellulase; 11, cellopentaose + S2-3 cellulase; 12, cellohexaose + S2-3 cellulase. Spots corresponding to cellobiose are indicated by arrow.

Table 2. Biochemical characteristics of strain S2-3 and its closest members.Strains: 1, S2-3; 2, *Seonamhaeicola aphaedonensis*[23]; 3, *Seonamhaeicola algicola*[24]

Symbol: N, no data

Reaction type	Characteristics	1	2	3
Enzyme reaction	Alkaline phosphatase	+	+	+
	Esterase(C4)	+	-	+
	Esterase Lipase(C8)	+	-	+
	Lipase(C14)	-	-	-
	Leucine arylamidase	+	+	+
	Valine arylamidase	+	-	+
	Cystine arylamidase	-	-	-
	Trypsin	-	-	+
	α -Chymotrypsin	-	-	+
	Acid phosphatase	+	-	+
	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	-	+
	α -Galactosidase	-	-	-
	β -Galactosidase	-	-	+
	β -Glucuronidase	-	-	-
	α -Glucosidase	-	-	+
	β -Glucosidase	+	-	-
	N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	+	-
	α -Mannosidase	-	-	-
	α -Fucosidase	-	-	-
	Arginine dihydrolase	-	N	N
	Urease	-	N	-
	Nitrate reduction	-	N	-
vodes proskauer		-	-	-
Acidification	D-glucose	+	+	N
	D-fructose	+-	-	N
	D-mannose	-	+	N
	D-maltose	+-	-	+
	D-lactose	-	-	+
	D-trehalose	-	-	N
	D-mannitol	+-	-	N
	Xylitol	-	N	N
	D-melibiose	-	N	N
	D-raffinose	-	-	N
	D-xylose	+	+	N
	D-sucrose	-	+	N
	Methyl- α D-glucopyranoside	-	N	N
	N-acetyl-glucosamine	-	N	N

Discussion

Seonamhaeicola 속은 2014년 Park 등[23]에 의해서 처음 소개된 후 현재까지 6개의 종이 알려져 있으며, 모든 종은 해양시료로부터 유래되었다. *Seonamhaeicola* 속 균주는 그

람 음성균으로 주요 퀴논으로 menaquinone-6 (MK-6)을 포함하고 있고 주요 세포 지방산으로 iso-C_{15:0}으로 구성되어 있으며, 유전체 DNA G+C 농도는 약 33–36 mol%로 알려져 있다. 이번 연구로부터 분리된 균주 S2-3은 형태적, 생리적, 유전적 특성 분석을 통해 *Seonamhaeicola* 속에 속하는 새

로운 종으로 분류되었다.

Seonamhaeicola 속에 속하는 6개의 종에 관한 문헌은 모두 분류학상의 특징만을 기술하고 있고, 그 중에서 *S. algicola* Gy86가 cellulose를 분해하는 것으로 언급이 되어 있을 뿐이다. 이 번에 분리한 균주 *Seonamhaeicola* sp. S2-3는 cellulose 분해활성을 갖는 신 종이며, 이 균주의 배양액은 cellulose를 분해하여 다양한 길이의 cellooligosaccharides를 만들고, 최종적으로 cellobiose까지 분해할 수 있음을 확인하였다. 따라서, *Seonamhaeicola* sp. S2-3은 세포외부로 cellulase를 분비하여 다당체인 cellulose를 최소단위인 cellobiose까지 분해하여 세포내로 흡수한 후, β -glucosidase 등과 같은 효소를 이용하여 단당인 glucose로 완전분해하여 에너지원으로 사용할 것으로 추측된다. *Seonamhaeicola* sp. S2-3 유래의 cellulase가 어떤 생화학적 특성을 갖는지는 추후 연구가 필요하며, 이러한 연구를 통해 지구상의 탄소 재순환을 위한 해결책이 마련되길 기대한다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR202020101).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Beguín P, Aubert JP. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
- Carpita NC. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 445-476.
- Warren RA. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 183-212.
- Studer MH, DeMartini JD, Davis MF, Sykes RW, Davison B, Keller M, et al. 2011. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 6300-6305.
- Si S, Chen Y, Fan C, Hu H, Li Y, Huang J, et al. 2015. Lignin extraction distinctively enhances biomass enzymatic saccharification in hemicelluloses-rich *Miscanthus* species under various alkali and acid pretreatments. *Bioresour. Technol.* **183**: 248-254.
- Vermaas JV, Petridis L, Qi X, Schulz R, Lindner B, Smith JC. 2015. Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. *Biotechnol. Biofuels* **8**: 1-16.
- Patyshakuliyeva A, Falkoski DL, Wiebenga A, Timmermans K, Vries RP. 2019. Macroalgae derived fungi have high abilities to degrade algal polymers. *Microorganisms* **8**: 52.
- Bhat MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Adv. Biotechnol.* **1**: 355-383.
- Biely PJ, Schneider H. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**: 80-84.
- Yin LJ, Huang PS, Lin HH. 2010. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 9833-9837.
- Fan C, Li S, Li C, Ma S, Zou L, Wu Q. 2012. Isolation, identification and cellulase production of a cellulolytic bacterium from intestines of giant panda. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **52**: 1113-1121.
- Gaur R, Tiwari S. 2015. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol.* **15**: 19.
- Kim DS, Chi WJ, Hong SK. 2019. Molecular characterization of an endo- β -1,4-glucanase, CelA_{J93}, from the recently isolated marine bacterium, *Cellulophaga* sp. J9-3. *Appl. Sci.* **9**: 4061-4073.
- Dos Santos YQ, de Veras BO, de Franca AFJ, Górlach-Lira K, Velasques J, Migliolo L, et al. 2018. A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine *Bacillus* sp. Strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1078-1085.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541-555.
- Galkiewicz JP, Kellogg CA. 2008. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7828-7831.
- Chun J, Lee JH, Jung YY, Kim MJ, Kim SI, Kim BK, et al. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259-2261.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Miller L, Berger T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. *Hewlett-Packard Application note* pp. 228-241. Hewlett-Packard Co, Avondale, Pa.
- Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *MIDI Technical Note* 101. pp. 1-7. Newark, DE: MIDI Inc.
- Minikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, et al. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J. Microbiol. Methods* **2**: 233-241.
- Zhang Z, Chen Y, Wang R, Cai R, Fu Y, Jiao N. 2015. The fate of marine bacterial exopolysaccharide in natural marine microbial communities. *PLoS One* **10**: e0142690.
- Park S, Won SM, Park DS, Yoon JH. 2014. *Seonamhaeicola aphaeodensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from a tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1867-1881.
- Zhou YX, Du ZJ, Chen GJ. 2016. *Seonamhaeicola algicola* sp. nov., a complex polysaccharide-degrading bacterium isolated from *Gracilaria blodgettii*, and emended description of the genus *Seonamhaeicola*. *Int. J. Syst. Microbiol.* **66**: 2064-2068.