

## Cellulomonas sp. YE-5 가 생산하는 Cellulase 의 정제

최동철 · 허남윤 · 유주현 · 오두환\*

연세대학교 공과대학 식품공학과

### Purification of Cellulase Produced from *Cellulomonas* sp. YE-5

Chey, Dong-Cheol, Nam-Youn Hur, Ju-Hyun Yu and Doo-Hwan Oh

Department of Food Engineering, Yonsei University,  
Seoul 120-749, Korea

An extracellular cellulase producing bacterium YE-5 was isolated from soil, and identified as a *Cellulomonas* sp. by its taxonomical characteristics. The maximal activities of avicelase (0.35 units/ml), CMCase (3.18 units/ml), FPase (0.315 units/ml) and  $\beta$ -glucosidase (0.882 units/ml) were obtained when this strain was cultured for 48 hrs at 30°C in a medium containing 0.8% (w/v) Solka floc, 0.06% (w/v) urea, 0.1% (w/v)  $K_2HPO_4$ , 0.1% (w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2% (w/v) bacto peptone, 0.2% (w/v) yeast extract and pH 6.5. The cellulase was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography from culture filtrate of *Cellulomonas* sp. YE-5. The molecular weights of purified avicelase, CMCase I, and CMCase II were estimated to be about 95,000~105,000, 46,000~47,000 and 120,000~125,000, respectively.

섬유소 (cellulose)의 이용은 전통적으로 화학적, 효소적 분해에 대해 비교적 안정한 천연상태를 직접 pulp, 건축재, 의류, 연료로 이용하였으나, 70년대 초 석유파동을 거치면서 섬유소가 화석자원과는 달리 계속 축적되는 탄소원이라는 점에서 식량과 에너지원으로서 섬유소를 이용하고자 섬유소를 가수분해하여 SCP(Single Cell Protein)나 알콜생산 등의 간접적 이용 및 폐수처리에 이르기까지 많은 연구가 보고되고 있다.

섬유소를 자화할 수 있는 세균에는 *Cellulomonas* 속(1-9), *Pseudomonas* 속(10-12), *Clostridium* 속(13-16), *Cellovibrio* 속(17, 18), *Acetivibrio* 속(19, 20), *Cytophaga* 속(21) 등이 알려지고 있으며 이들이 생산하는 cellulase는 avicelase(exo-1,4- $\beta$ -glucanase, EC 3.2.1.91), CMCase(endo-1,4- $\beta$ -glucanase, EC 3.2.1.4),  $\beta$ -1,4-glucosidase(cellobiase,  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.2) 중에서 결정성 cellulose

를 분해하는 avicelase( $\beta$ -1,4-D-glucanocellobiohydrolase)가 대부분이고 cellobiose나 short chain cello-oligosaccharide를 분해하는  $\beta$ -glucosidase 활성은 없거나 곰팡이에 비해 미약한 것으로 보고되고 있다. 그러나 세균은 배양시간이 짧고 영양요구량이 적으며 유전자 조작이 용이하므로 세균에 의한 효소의 생산이 훨씬 유리하며, 따라서 높은 활성의 avicelase와  $\beta$ -glucosidase를 생산할 수 있는 세균의 개발이 필요로 된다.

본 연구에서는 토양과 퇴비 등에서 섬유소 자화력이 있는 세균을 분리하고 이 균주 중 cellulase 생산능이 가장 우수한 균주를 선별하여 동정하고, 최적 배양조건을 검토한 후, 이 균주가 생산하는 avicelase, CMCase 그리고  $\beta$ -glucosidase를 정제하였다.

#### 재료 및 방법

##### 섬유소 자화세균의 분리

섬유소를 자화하는 세균은 각종 초식동물의 배설물, 퇴비, 부엽토, 하천토양 및 일반토양 등의 시료에서 분

Key words: *Cellulomonas* sp., avicelase, CMCase,  $\beta$ -glucosidase

\*Corresponding author

리하였다.

수집된 시료 약 1g씩을 취하여 멸균 생리 식염수 5 ml에 현탁시킨 후 60°C에서 10분간 처리한 후 상등액 1 ml를 탄소원으로 여과지를 사용한 분리용배지 (isolation medium) 5 ml에 접종하여 30°C에서 여과지가 완전히 분해될 때까지 진탕배양하였으며, 이 배양액을 swollen cellulose가 들어 있는 선택배지(selective medium)에 평판배양하여 clear zone을 형성하는 colony를 취해 CMC 한천배지(CMC-agar medium)에 사면배양하여 보존하였다(Table 1).

### 섬유소 자화세균의 동정

분리균의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(22)에 따라 결정하였다.

배양학적 특성은 최적 배양온도, 산소요구성, peptone-yeast extract 한천배지상에서의 colony 형태 및 생육인자의 영향을 검토하였으며, 균주의 형태는 scanning electron micrograph로 관찰하였고, gram 염색은 Hucker의 변법으로 행하였다.

세포벽의 amino acids 분석은 균체 5mg을 sonication한 후 차등 원심분리를 통하여 세포벽 성분을 분리하여 6N HCl 1 ml에 현탁시킨 뒤 밀폐된 시험관에서 120°C로 18시간 동안 가열, 원심분리하여 상등액을 취하고 이를 완전히 건조시킨 다음 소량의 3차 증류수에 녹여 amino acid analyzer로 분석하였다(22).

세포벽의 monosaccharides 분석은 세포벽 분석시료 50mg을 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml에 현탁시켜 밀폐된 시험관에서 100°C로 2시간 동안 가열하고, 포화 Ba(OH)<sub>2</sub> 용액으로 pH를 6.0 정도로 중화시킨 후 sample을 제조하고 HPLC를 사용하여 분석하였다(23).

그밖의 생리적 특성은 일반적인 검정방법에 따라 조사하였다(24).

### Cellulase 활성 측정

**Avicelase 활성** : 2% (w/v) avicel 현탁액 1 ml와 0.1 M acetate buffer (pH 5.5) 1 ml에 효소액 0.4 ml를 가하고 45°C에서 60분간 진탕반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켜 상등액내의 환원당의 양을 DNS 법(25)을 이용하여 550 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Avicelase의 1 unit는 1분 동안 1 μmole의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

**CMCase 활성** : 2% (w/v) CMC 용액 1 ml와 0.1 M acetate buffer (pH 5.5) 1 ml에 효소액 0.2 ml를 가하

**Table 1. Compositions of medium used in experiments.**

Medium	Composition (per liter)
Isolating medium	Filter paper (Whatman No. 1) 10g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1g, NaCl 6g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1g, CaCl <sub>2</sub> 0.1g Yeast extract (Bacto, Difco) 1g pH 7.0 (adjusted with NaOH)
Selective medium	Swollen cellulose 5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.65g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.9g NaNO <sub>3</sub> 1g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g Casamino acid (Difco) 0.5g Yeast extract (Bacto, Difco) 1g Agar 18g
CMC-agar medium	CMC-sodium salt (Sigma) 10g Yeast extract (Bacto, Difco) 1g Peptone (Bacto, Difco) 1g Agar 18g pH 7.0
Basal medium	Avicel (Fluka) 10g, NaNO <sub>3</sub> 1g K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.3g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g, KCl 0.5g Yeast extract (Bacto, Difco) 1g

고 45°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 환원당 정량 및 효소의 unit 결정은 avicelase에서와 동일하게 행하였다.

**Filter paper activity (FPA)** : Whatman No.1 filter paper strip (0.5×12.0 cm)을 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) 2 ml에 넣고 효소액 0.8 ml를 가하여 45°C에서 60분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 환원당 정량 및 효소의 unit 결정은 avicelase에서와 동일하게 행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 섬유소 자화세균의 분리

2,000여종의 토양, 퇴비 등의 시료에서 분리용 배지내의 여과지를 72시간 이내에 완전히 파괴시키는 65 균주를 분리하였다. 이 중 선택배지 상에서 가장 큰 clear zone을 형성하며, 기본배지에서 진탕배양하였을 때 가장 높은 cellulase 활성을 나타낸 YE-5를 선정하여 본 실험균주로 하였다.

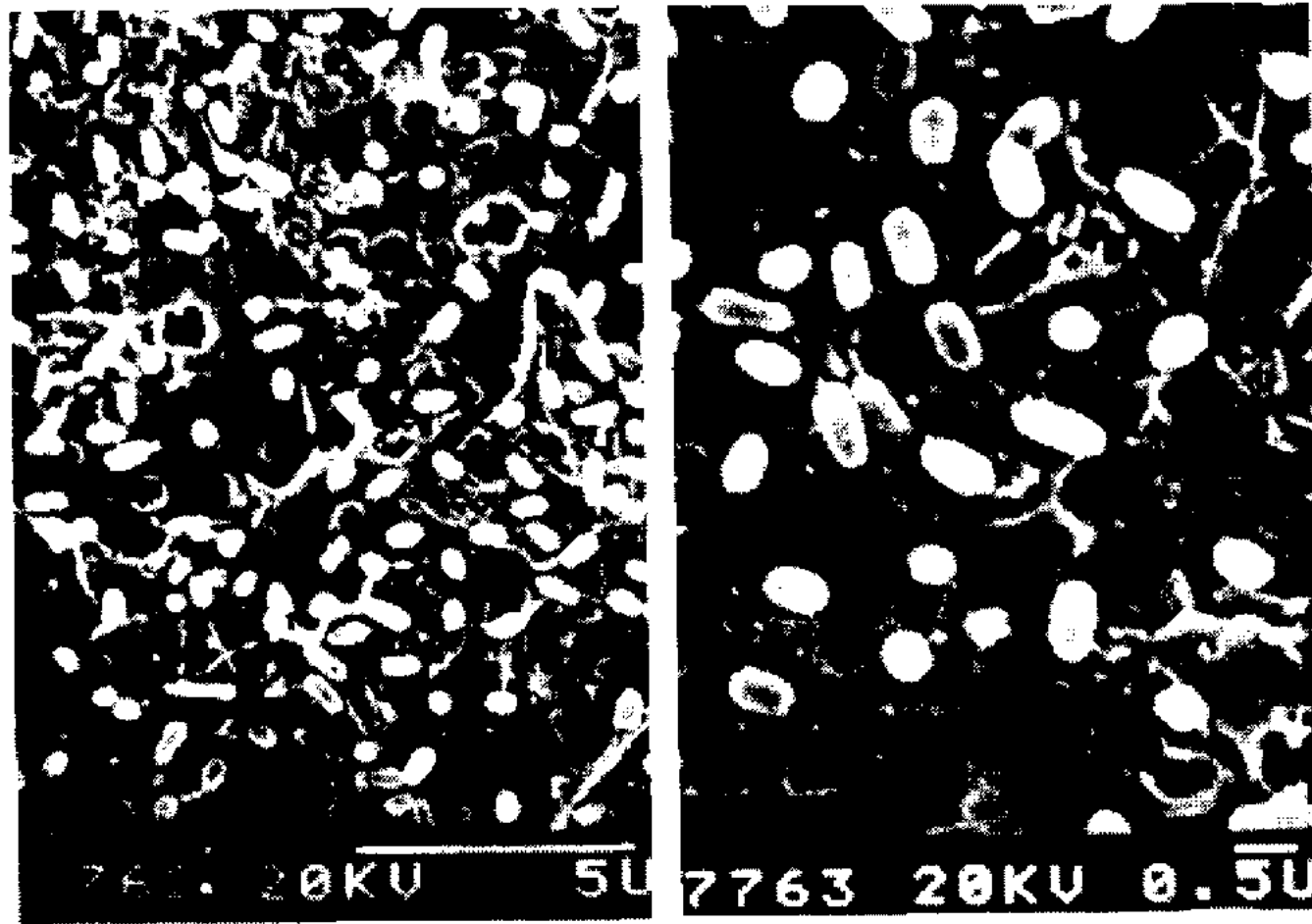


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Cellulomonas* sp. YE-5.

**섬유소 자화세균의 동정**

실험균주 YE-5의 크기는 0.3~0.4×0.4~0.8 μm인 간균이며 (Fig. 1), 형태학적 특성, 배양특성 및 생리적 특성은 Table 2와 같다. 세포벽 amino acids에는 *Cellulomonas* 속의 특성인 ornithine이 존재하였고 aspartic acid와 glycine이 존재한 반면 lysine은 존재하지 않았다.

세포벽 monosaccharides 분석은 glucose가 주요 당 성분이었으며 galactose는 존재하지 않았다.

이상과 같은 결과로 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"에서의 *Cellulomonas* 속의 특성과 거의 일치하였으나 당 자화성이 일치하는 종이 없었으므로 본 실험균주를 *Cellulomonas* sp. YE-5로 동정하였다(22).

**최적 배양조건외 검토**

**Initial pH와 배양온도의 영향**: 배지의 pH를 4.0~10.0의 범위에서 배양했을 때 pH6.5에서 avicelase는 최대활성, CMCase는 94%의 상대활성을 나타내었고, pH7.0에서 avicelase는 91%의 상대활성, CMCase는 최대활성을 나타내었으므로 cellulase 생산 최적 pH는 6.5로 결정하였다. 배양온도의 영향은 *Cellulomonas* 속의 최대 생육온도 30°C에서 균체생육, avicelase 및 CMCase 활성이 최대를 나타내었다.

**탄소원의 영향**: Solka floc(control), avicel, filter paper, CM-cellulose, cellobiose, glucose, starch, xylan, lactose, cotton 등의 탄소원을 1%(w/v)되게 각각 첨가하여 cellulase의 활성을 검토한 결과, Solka floc를 첨가했을 때 avicelase, CMCase 및 β-glucosidase의 활성이 가장 높았고, avicel을 첨가하였을 때 avicelase 60%, CMCase 72%, β-glucosidase 81%의 상대활성을

Table 2. Comparison of characteristics of strain YE-5 with those of *Cellulomonas* species.

Characteristic	<i>Cellulomonas</i> species	Strain YE-5
Cell morphology		
Size (μm)	0.5-0.6×2.0-4.0	0.3-0.4×0.4-0.8
Shape	irregular rods, some coccus forms	irregular rods, some coccus forms
Gram stain	+	+
Motility	+	+
Growth on		
peptone-yeast extract media	moderate	moderate
Colony shape	opaque, convex	opaque, convex
Colony color	yellow	yellow
Oxygen requirement		
Strictly aerobic	-	-
Facultatively aerobic	+	+
Strictly anaerobic	-	-
Cell wall Contains		
Ornithine	+	+
Lysine	-	-
Glycine	-	-
Aspartate	-	-
Glucose	+	+
Galactose	-	-
Mycellium production	-	-
Acid from		
glucose	+	+
Catalase activity	+	+
Hydrolysis of		
Starch	+	+
Gelatin	+	+
Nitrate reduced to		
nitrite	+	+
Growth factor		
Biotin	+	+
Thiamine	+	+
Optimum temperature	30°C	30°C

나타내었다. 또한 glucose와 cellobiose를 첨가한 경우에는 avicelase와 CMCCase 활성이 나타나지 않았으며  $\beta$ -glucosidase의 활성도 Solka floc 첨가시에 비해 10% 내외로 낮게 나타났다. 이는 *Cellulomonas uda*의 경우 avicel을 2% 첨가하였을 때 avicelase와 CMCCase 활성이 최대였다는 Nakamura와 Kitamura(1), Choi 등(6)의 보고와는 차이가 있었으나, *Cellulomonas uda*와 *Cellulomonas sp.*의 경우 1%의 glucose나 cellobiose를 첨가하였을 때 cellulase의 활성이 나타나지 않으며, 0.1%의 glucose와 cellobiose를 첨가하였을 때도 cellulase의 활성이 크게 억제되는 catabolite repression이 일어났다는 Nakamura와 Kitamura(1), Stewart와 Leatherwood(5) 및 Choi 등(6) 보고와 일치하였다.

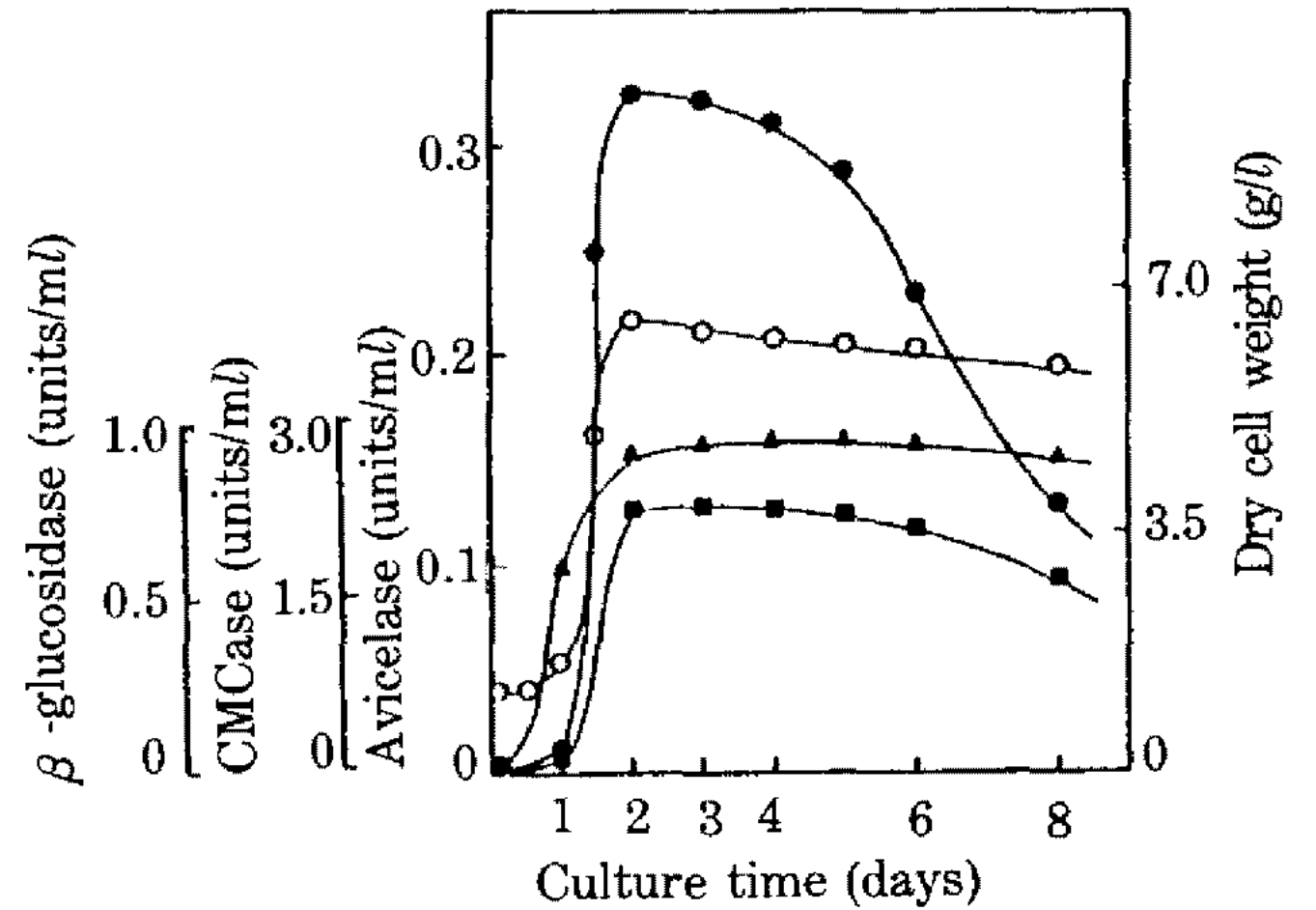
한편, Solka floc의 최적농도를 0~1.4%(w/v) 범위에서 검토한 결과, 최적농도는 0.8%(w/v)로 나타났으며, avicelase의 활성이 매우 높은 것으로 알려진 Nakamura와 Kitamura(1)의 *Cellulomonas uda*의 최적 avicel 농도 2%에 비해서는 상대적으로는 낮은 값을 보였다.

**질소원의 영향** : Avicel 대신 Solka floc을 0.8%(w/v) 첨가한 기본배지에 sodium nitrate(control), ammonium sulfate, ammonium citrate, ammonium oxalate, ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium acetate, sodium nitrate, potassium nitrate, urea 등을 0.1%(w/v)씩 첨가하여 검토한 결과, urea 첨가시 avicelase, CMCCase 및  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 높았으며 ammonium acetate를 첨가한 경우도 70% 이상의 활성을 보였다.

한편 0~0.12%(w/v)의 urea를 첨가하여 검토한 결과 0.06%(w/v)에서 avicelase, CMCCase 및  $\beta$ -glucosidase 최대활성을 나타내었다.

**천연영양원의 영향** : Solka floc 0.8%(w/v)와 urea 0.06%(w/v)를 첨가한 기본배지에 bacto peptone, polypeptone, yeast extract, casamino acid 및 이들의 혼합물을 0.1%(w/v)되게 첨가하여 cellulase의 활성을 검토하였다. 그 결과 bacto peptone과 yeast extract를 1:1(by weight)로 첨가하였을 때 최대활성을 보였으며, bacto peptone과 yeast extract의 1:1 혼합물을 0~1.0%(w/v) 범위에서 첨가하여 활성을 검토한 결과 최적농도는 0.4%(w/v)이었다.

**무기염의 영향** : Solka floc 0.8%, urea 0.06%, bacto peptone과 yeast extract 1:1 혼합물 0.4%에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 를 0.1% 되게 각각 첨가해 검토한 결과 커다란 차이를 보이지 않았으나  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 가



**Fig. 2. Time course of the cellulase production under the optimal culture condition.**

● : Avicelase activity, ▲ : CMCCase activity, ■ :  $\beta$ -glucosidase activity, and ○ : Dry cell weight.

가장 좋았으며, 0~0.35% 사이에서 검토한 결과 최적농도는 0.1%이었다.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  등을 사용하여 cellulase 생산에 대한 금속 ion의 영향을 검토한 결과, 기본배지 성분인  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 제외한 나머지 무기염류는 cellulase의 활성을 저해하였다.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 경우 avicelase의 최적농도는 0.1%(w/v), CMCCase는 0.15%(w/v)이었으나 2가지 효소 모두 0.1%와 0.15%에서 큰 차이점을 보이지 않아  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 최적농도를 0.1%(w/v)로 결정하였다.

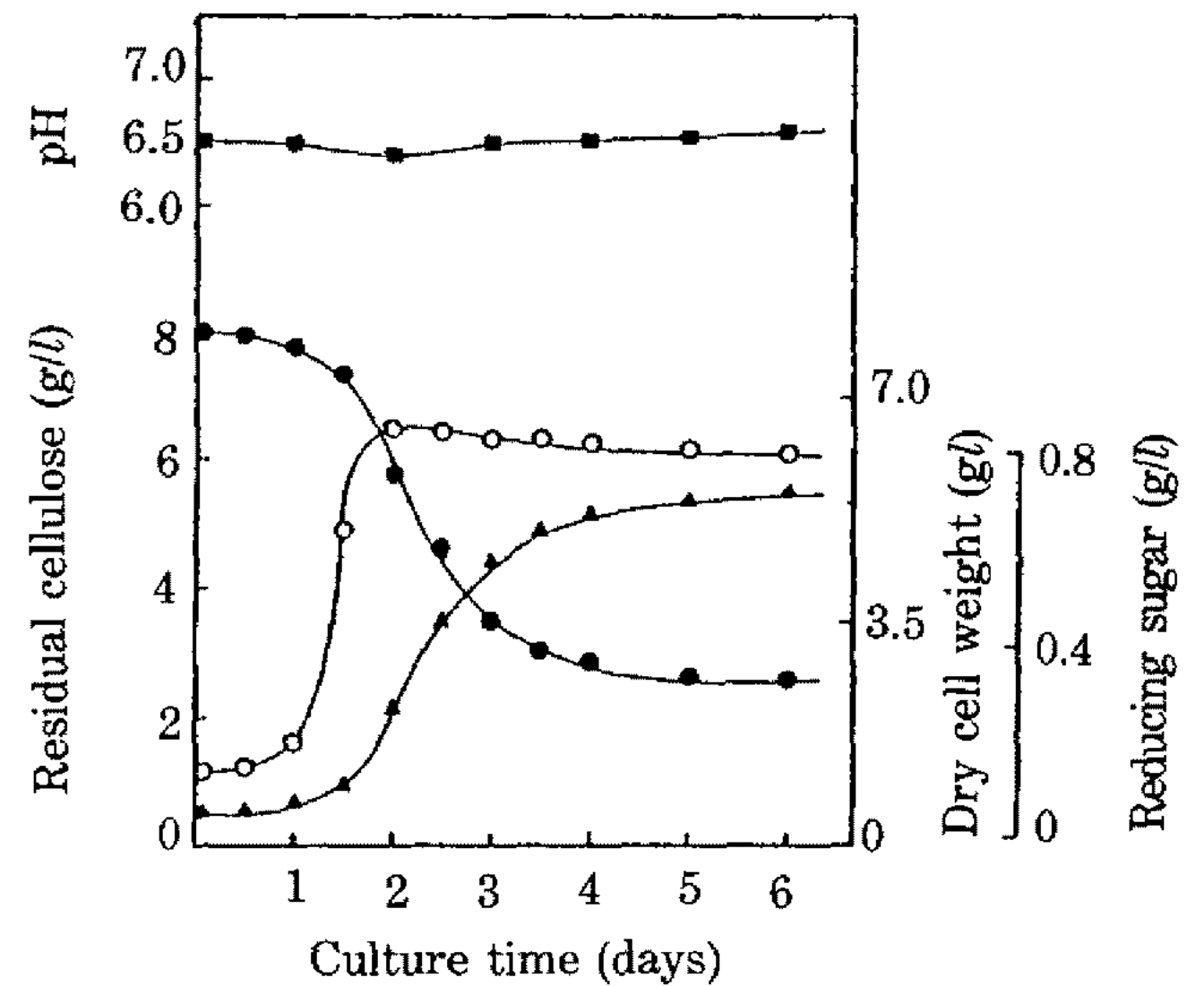
**배양시간에 따른 영향** : Solka floc 0.8%, urea 0.06%, bacto peptone 0.2%, yeast extract 0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%, 30°C, pH 6.5로 설정된 최적배지를 사용하여 cellulase 생산에 대한 배양시간의 영향을 검토한 결과(Fig.2), avicelase는 2일에서 최대활성을 나타내었으며 그 이상의 배양에서는 활성이 급격히 감소되었다. 이는 Stewart와 Leatherwood(5)가 보고한 *Cellulomonas sp.*의 결과와 같이 cellulase의 분해산물인 cellobiose의 축적에 의한 저해작용 때문이라 생각되며, CMCCase는 2~4일에서 최대활성을 보였으며 8일까지 거의 일정한 활성을 유지하였다.  $\beta$ -glucosidase는 2~3일에서 최대활성을 나타내었으며 서서히 감소하여 8일에는 30% 정도 감소하였다. 이 역시 분해산물인 glucose가 축적되어 저해를 받은 때문이라 생각되었다. 이러한 결과들은 *Cellulomonas uda*가 생산하는 CMCCase는 48~80시간에서 최대활성을 나타내었으며,  $\beta$ -glucosidase는 30~80시간에서 최대활성을 나타내었

**Table 3. Optimal culture conditions for the cellulase production by *Cellulomonas* sp. YE-5.**

Medium composition	Solka floc; 0.8%, urea; 0.06%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0.1%, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0.1%, Bacto peptone; 0.2%, Yeast extract; 0.2%
	pH 6.5
Temperature	30°C
Culture time	48 hours

다는 Nakamura와 Kitamura(1), Choi 등(6) 그리고 Stoppok 등(7)의 보고와 일치하였다.

이상에서 결정한 최적배지(Table 3)를 사용하여 배양 시간에 따른 배지내의 남은 cellulose의 양, 축적된 환원 당량, pH 및 생육과의 관계는 Solka floc은 배양 1일부터 급격히 농도가 감소되기 시작하여 4일부터는 일정한 값을 유지하였으며, 환원당량은 Solka floc 농도의 감소와 함께 증가하였으며 4일 이후부터는 일정한 값(0.75 g/l)을 보였고, pH는 배양시간에 따라 거의 변화를 보

**Fig. 3. Fermentation profile of *Cellulomonas* sp. YE-5.**

●: Solka floc, ▲: Reducing sugar, ○: Dry cell weight, and ■: pH.

이지 않았다(Fig. 3).

#### 효소의 분리 및 정제

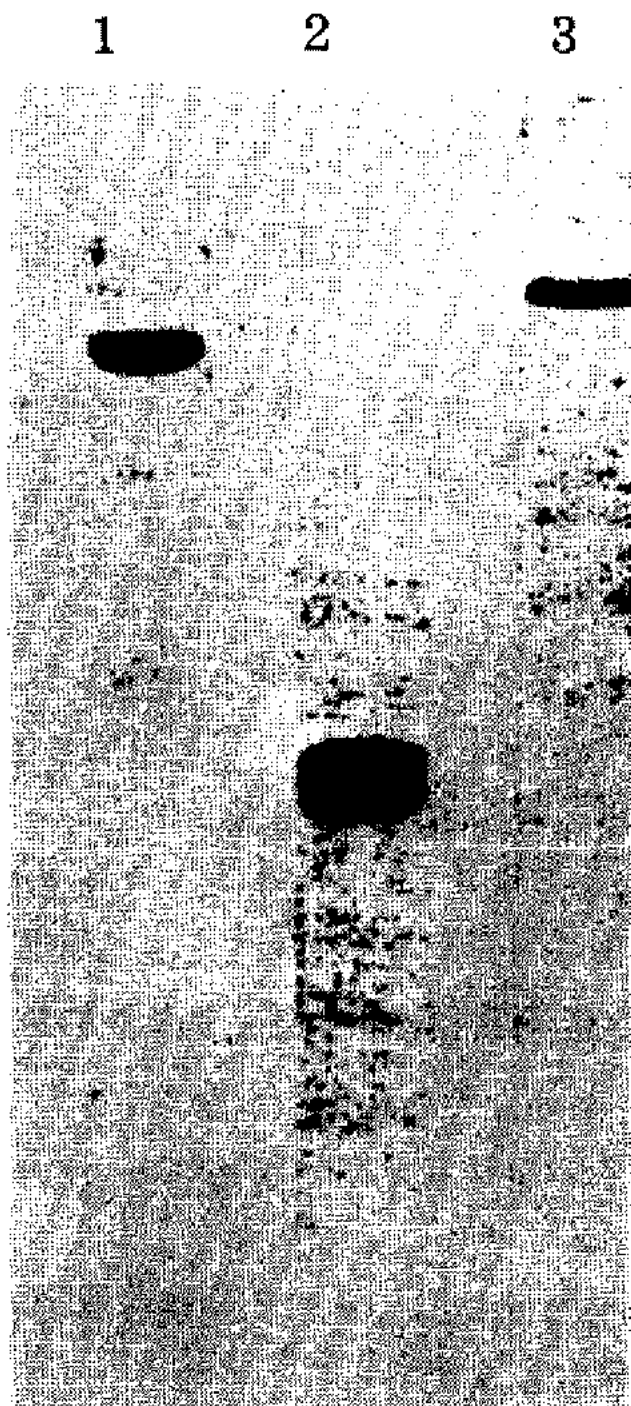
**Column chromatography:** Cellulase 생성 최적조건하에서 *Cellulomonas* sp. YE-5를 배양하여 배양액을 원

**Table 4. Summary of purification of avicelase, CMCCase and  $\beta$ -glucosidase.**

Purification Step		TP	TA	SA	Y	PF
Culture supernatant	Avicelase	6,160	501.9	0.0815	100.0	1.0
	CMCase	6,160	4,995.6	0.811	100.0	1.0
	$\beta$ -glucosidase	6,160	1,209.6	0.196	100.0	1.0
60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	Avicelase	1,890	427.4	0.2261	85.2	2.8
	CMCase	1,890	4,079.7	2.159	81.7	2.7
	$\beta$ -glucosidase	1,890	999.6	0.529	82.6	2.7
DEAE-Sephadex chromatography	Avicelase	121	81.3	0.6719	16.2	8.2
	CMCase	226	1503.7	13.671	30.1	
	(CMCase I)	(121)	(579.5)	(4.789)	(11.6)	(5.9)
	(CMCase II)	(105)	(924.2)	(8.802)	(18.5)	(10.9)
	$\beta$ -glucosidase	105	191.4	1.823	15.8	9.3
Sephadex G-100 gel filtration	Avicelase	53	43.2	0.8115	8.6	10.0
	CMCase	50	489.6	19.087	9.8	
	(CMCase I)	(21)	(168.3)	(8.012)	(3.4)	(9.9)
	(CMCase II)	(29)	(321.3)	(11.075)	(6.4)	(13.7)
	$\beta$ -glucosidase	24	109.2	4.550	9.0	23.2

a) TP: Total protein (mg), b) TA: Total activity (units), c) SA: Specific activity (units/mg), d) Y: Yield (%), e) PF: Purification fold





**Fig. 4. Patterns of purified cellulase on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.**

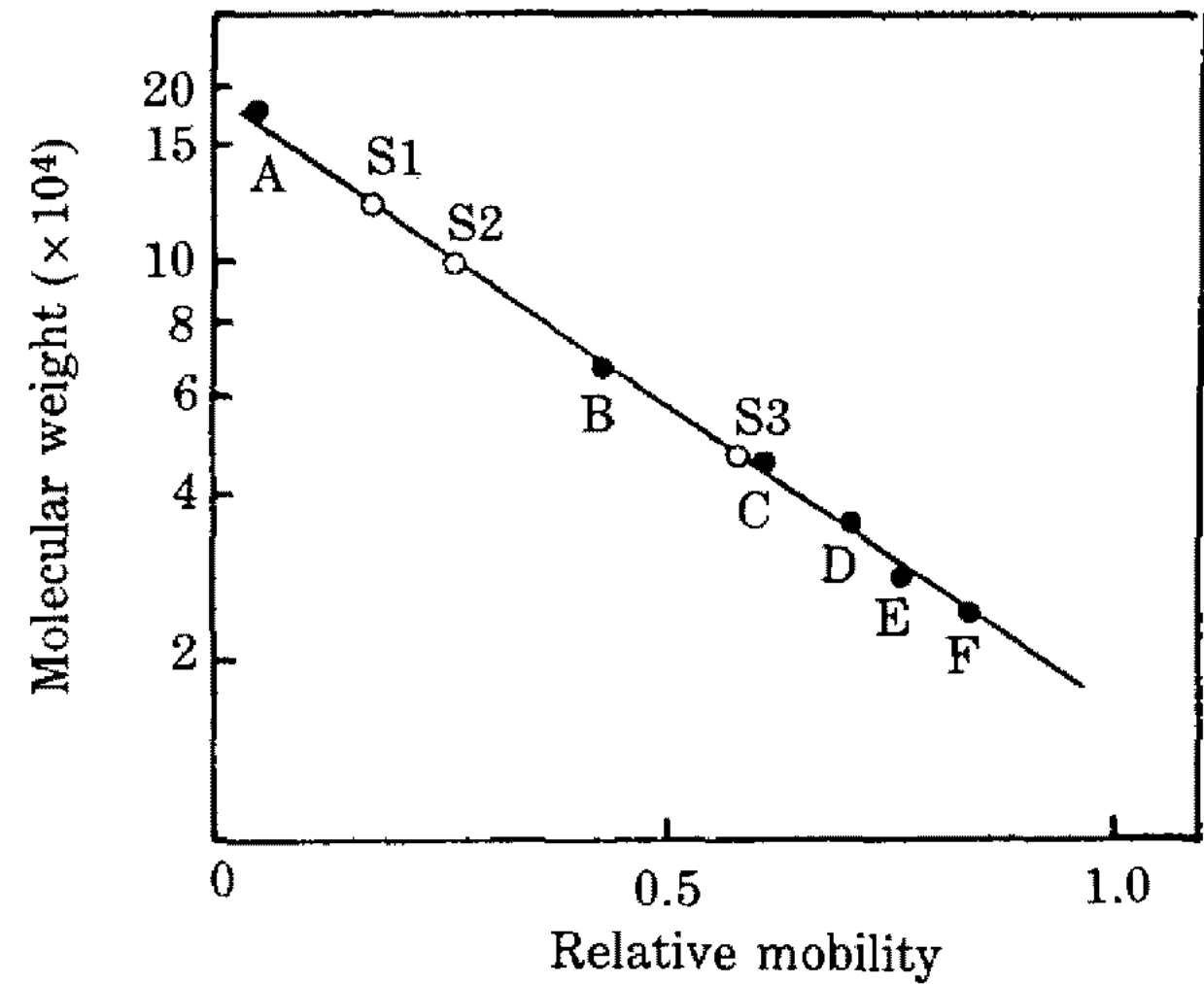
Lane 1: Avicelase, Lane 2: CMCase I, and Lane 3: CMCase II

심분리하여 상등액을 얻은 다음 ammonium sulfate (60% 포화농도)로 염석하였다.

침전물을 원심분리하여 회수한 후 소량의 0.05 M Tris buffer (pH 7.0)에 녹여 동일 buffer로 24 시간 투석한 효소액을 0.05 M Tris buffer (pH 7.0)으로 평형시킨 DEAE-Sepharose column (4.5×28 cm)에 흡착시킨 후 NaCl로 gradient 용출 (0.4 M)을 하여 6 ml씩 분획하면서 ion exchange column chromatography를 행하였다.

그 결과 avicelase는 fraction No. 68~128,  $\beta$ -glucosidase는 No. 100~184 사이에서 각각 활성 peak를 분리할 수 있었으며, CMCase는 No. 70~108과 108~198에서 분리됨을 알 수 있었으며 이를 CMCase I, CMCase II라 명명하였다. 이 결과는 *Cellulomonas flavigena*와 *Cellulomonas* sp.가 생산하는 두 가지 종류의 CMCase에 관한 Kim과 Wimpenny (9)와 Beguin 등 (3)의 보고와 유사하였다.

Ion exchange chromatography에서 활성을 보인 fraction들을 avicelase와 CMCase I, CMCase II와  $\beta$ -glucosidase 두 부분으로 나누어 각각 gel filtration을 행하였다. 두 fraction을 0.05 M Tris buffer (pH 7.0)로 평형시킨 Sephadex G-100 column (2.6×105 cm)에 가



**Fig. 5. Molecular weights estimation of purified cellulase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.**

A:  $\alpha_2$ -Macroglobulin (MW 180,000), B: Bovine serum albumin (MW 66,000), C: Egg albumin (MW 45,000), D: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), E: Carbonic anhydrase (MW 29,000), F: Trypsinogen (MW 24,000),

S1: CMCase II, S2: Avicelase, and S3: CMCase I.

하고 동일 buffer로 용출시켜 4 ml씩 분획하였다.

그 결과 avicelase와 CMCase I은 각각 fraction No. 30~60, 80~100 사이에서 분리되었으며 비활성은 0.8115, 8.012 units/mg이었으며 정제도는 10.0, 9.9 배이었다 (Table 4).

CMCase II와  $\beta$ -glucosidase는 fraction No. 42~58, 78~100에서 분리되었으며 비활성은 11.075, 4.550 units/mg, 정제도는 13.7, 23.2 배이었다 (Table 4).

**SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 분자량 측정:** 효소의 정제를 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide 전기영동을 행한 결과 Fig. 4와 같이 avicelase, CMCase I, CMCase II는 각각 단일 band로 나타났으나  $\beta$ -glucosidase는 단일 band를 얻지 못하였다. 분자량 24,000~180,000 사이의 표준 단백질을 사용하여 정제된 효소의 분자량을 측정해 본 결과 Fig. 5에서와 같이 avicelase는 95,000~105,000, CMCase I은 46,000~47,000, CMCase II는 120,000~125,000 사이의 분자량을 나타내었다. 이 결과는 Nakamura와 Kitamura (2)가 보고한 *Cellulomonas uda*의 avicelase 분자량 66,000과는 많은 차이를 보였으나 Beguin 등 (3)이 보고한 *Cellulomonas flavigena*가 생산하는 두 가지 성분의 CMCase 분자량 118,000, 49,000~52,000과는 거의 일치하였다.

## 요 약

토양과 퇴비 등에서 섬유소 소화력이 있는 세균을 분리하고 이 균주들 중 cellulase 생산능이 가장 우수한 균주를 선별하여 *Cellulomonas* sp.로 동정하였다. *Cellulomonas* sp. YE-5의 최적 배양조건은 pH 6.5 Solka flocc 0.8% (w/v), urea 0.06% (w/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1% (w/v), bacto peptone 0.2% (w/v), yeast extract 0.2% (w/v) 그리고 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1% (w/v)이었으며, 이러한 배지를 사용하여 30°C에서 48시간 배양하였을 때 avicelase, CMCase 그리고 β-glucosidase는 각각 0.350, 3.180, 0.882 units/ml의 활성을 나타내었다. 배양액 으로부터 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sepharose 및 Sephadex G-100 column chromatography를 통해 정제하였으며, 정제된 avicelase, CMCase I, CMCase II 분자량은 약 95,000~105,000, 46,000~47,000, 120,000~125,000으로 각각 추정되었다.

## 참고문헌

1. Nakamura, K. and K. Kitamura: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 343 (1982).
2. Nakamura, K. and K. Kitamura: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 379 (1983).
3. Beguin, P. and H. Eisen: *J. Gen. Microbiol.*, **101**, 191 (1977).
4. Beguin, P. and H. Eisen: *Eur. J. Biochem.*, **87**, 252 (1978).
5. Stewart, B.J. and J. M. Leatherwood: *J. Bacteriol.*, **128**, 609 (1976).
6. Choi, W.Y., K.D. Haggett and N.W. Dunn: *Aust. J. Biol. Sci.*, **31**, 553 (1978).
7. Stoppok, W., P. Rapp and F. Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 44 (1982).
8. Langsford, M.L., N.R. Gilkes, W.W. Wakarchuk, D.G. Kilburn, R.C. Miller Jr. and R.A.J. Warren: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1367 (1984).
9. Kim, B.H. and J.W.T. Wimpenny: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 25 (1985).
10. Yamane, K., T. Yoshikawa, H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Biochem.*, **69**, 771 (1971).
11. Yoshikawa, T., H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Biochem.*, **75**, 531 (1974).
12. Ramasamy, K. and H. Verachert: *J. Gen. Microbiol.*, **117**, 181 (1980).
13. Ng, T. K. and J.G. Zeikus: *Biochem. J.*, **199**, 341 (1981).
14. Ng, T.K. and J.G. Zeikus: *J. Bacteriol.*, **50**, 1391 (1982).
15. Johnson, E.A., M. Sakajoh, G. Halliwell, A. Madia and A.L. Demain: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1125 (1982).
16. Lee, S.F., C.W. Forsberg and L.N. Gibbins: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 220 (1985).
17. Oberkotter, L.V. and F.A. Rosenbergh: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 205 (1978).
18. Berg, B., V. Hofsten and G. Pettersson: *J. Appl. Bacteriol.*, **35**, 201 (1972).
19. Patel, G.B. and C.R. MacKenzie: *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **16**, 212 (1982).
20. Mackenzie, C.R., D. Bilous and G.B. Patel: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 243 (1985).
21. Chang, W.T.H. and D.W. Thayer: *Can. J. Microbiol.*, **23**, 509 (1977).
22. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Williams & Wilkins, Vol. 2, 1325-1329 (1986).
23. Kim, J.W., E.C. Choi and B.K. Kim: *Kor. J. Microbiol.*, **12**, 85 (1984).
24. Collins, C.H. and P.M. Lyne: "Microbiological Methods", 5th ed., Butterworths, 97-113 (1984).
25. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
26. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
27. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).

(Received June 21, 1990)