

## *Pseudomonas* sp. YD-15가 생산하는 CMCCase의 특성

이정우 · 김창남 · 허남윤 · 오두환

연세대학교 식품공학과

**초록 :** 토양으로부터 분리된 섬유소분해 활성이 우수한 균주를 동정하고, 효소의 생산조건, 효소의 분리 및 정제와 정제한 효소의 물리화학적 특성을 검토하였다. 분리된 미생물은 동정을 통하여 *Pseudomonas* sp. YD-15라고 명명하였고 avicel 1.2%, yeast extract 0.6%, KNO<sub>3</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%의 배지(pH 8.0)를 사용하여 30 °C에서 60~80시간 배양하였을 때 최대 효소생산을 보였으며, 배양액으로부터 85% ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex CL-6B chromatography, Sephadex G-100 gel filtration 과정을 통하여 14%의 수율로 정제도 15.3배의 효소단백질을 얻었다. 정제효소의 최적 작용 pH는 6.0 이었고 pH 5.0~8.0 사이에서 안정하였다. 최적 작용온도는 50 °C였으며, 50 °C까지는 안정하였다. 효소의 분자량은 약 100,000으로 추정되었으며, 기질인 carboxymethylcellulose(CMC)에 대한 K<sub>m</sub> 값은 40 mg/ml 이었다(1992년 3월 31일 접수, 1992년 5월 8일 수리).

섬유성 biomass는 식물의 광합성 작용에 의해 대량 생산되며 매년 재생산되는 탄소원이다. 따라서 이를 대체에너지자원 및 식량자원으로 개발하여 그 이용성을 높이고자 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>1,2)</sup>

섬유소 분해효소에 대한 연구는 *Trichoderma*,<sup>3)</sup> *Aspergillus*,<sup>4)</sup> *Penicillium*,<sup>5)</sup> *Fusarium*,<sup>6)</sup> *Sporotrichum*<sup>7)</sup> 등과 같은 곰팡이가 생산하는 cellulase가 있으며, 이중에서도 *Trichoderma reesei*로 대변되는 *Trichoderma* 속의 cellulase에 대한 연구가 가장 많이 알려져 있다. 그러나 곰팡이에서 생산되는 cellulase는 유전자조작 등에 많은 어려움이 있어 그의 활용에 제한이 되고 있다. 따라서 최근에는 유전자조작이나 균주의 개량이 보다 용이한 세균에서의 섬유소 분해균의 탐색과 유전자 분리 및 조작에 대한 연구가 많이 진해되고 있다. Cellulase를 생산하는 세균에는 *Cellovibrio*,<sup>8)</sup> *Clostridium*,<sup>9)</sup> *Pseudomonas*,<sup>10,11)</sup> *Cellulomonas*<sup>12-14)</sup> 등이 알려져 있고 이들이 생산하는 효소에 대한 연구가 보고되고 있으며, 세균류를 이용한 섬유소 물질의 분해 활용은 주로 섬유소 분해 효소의 고생산 균주나 constitutive mutant의 분리 개발 및 bioconversion의 효율을 높이고자 하는 연구가 진행되어 왔다.<sup>15-19)</sup>

본 연구는 *Pseudomonas* sp. YD-15의 섬유소 분해효소의 효소생산 능력 향상 및 유전자의 분리 및 특성에

대한 연구의 기초단계로서 *Pseudomonas* sp. YD-15가 효소단백질을 생산하기 위한 최적조건을 알아보고 효소를 정제하여 특성을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 선별 균주의 동정

분리된 세균 중 selective medium 상에서 cellulose 자화력이 가장 강한 균주를 선별하여 배양학적, 형태적 및 생리적 특성을 조사하였다.

균주에 대한 형태학적 특성은 selective medium에 분리균을 접종하여 30 °C에서 전자현미경을 통해 관찰하였다. 생리적, 생화학적 특성은 "Analylab Product, Inc."에서 시판하는 API 20NE kit를 사용하여 검색하고 그 결과를 API 20NE Analytical Profile Index를 사용하여 동정하였다.

#### 선별 균주의 배양조건의 검토

선별 균주의 cellulase 생산조건은 avicel 1.0%, NaNO<sub>3</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.03%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%와 yeast extract 0.1%의 기본배지를 사용하여 온도, pH 및 영양원 등이 cellulase의 생산에 미치는 영향에 대해 검토하였다.

Key words : CMCCase

Corresponding author : D. H. Oh

효소 활성 측정

2%(w/v) CMC용액 1 ml와 0.1 M acetate buffer(pH 5.5) 1 ml에 200 μl의 조효소액을 첨가하여 45 °C에서 30 분간 반응시킨 후 100 °C에서 10분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 그 후 반응액을 흐르는 물에 냉각하고 반응 상등액 1 ml에 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)용액 3 ml를 가하고 DNS법<sup>19)</sup>으로 정량하여 효소의 활성을 비교 측정하였다.

효소활성의 1 unit는 1분동안 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소액의 양으로 환산하였다.

효소의 분리 및 정제

효소의 분리 및 정제의 전과정은 4 °C에서 행하였다. *Pseudomonas* sp. YD-15를 최적 배양조건에서 배양하여 얻은 배양액을 8,000 rpm(Hitachi rotor RPR12)에서 20 분간 2회 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 ammonium sulfate를 85%(w/v) 포화되게 녹여 하룻밤 방치한 다음, 형성된 침전물을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 모은 후, 소량의 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 증류수에서 충분히 투석하였다. 투석한 효소는 미리 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 DEAE-Sephrose CL-48 column(Pharmacia)에 흡착시킨 후 0.0~0.5 M NaCl로 gradient elution하여 탈착시켜, 앞에서와 같은 유안침전 방법으로 다시 농축한 다음 Sephadex G-100을 사용하여 최종

정제하였다.

결과 및 고찰

Cellulose 자화 세균의 동정

본 연구실에서는 2,000여종의 토양, 퇴비 등의 시료에서 isolating medium내의 filter paper를 72시간 이내에 파괴시키는 세균 65주를 분리하였다.<sup>18)</sup> 이들중 selective medium 상에서의 clear zone과 basal medium에서 진탕배양하였을 때 효소활성이 높은 균주를 선정하여 YD-15라고 명명하였다. YD-15의 형태학적 특성은 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 간균이며, 운동성이 있고 호기성이며 Gram 음성의 세균이었고, colony 색깔은 fluorescent yellow로 나타났다. 한편 YD-15의 생리학적 특성은 API microtube system(Analytab Products Inc.) 중 Enterobacteriaceae와 gram negative rods type을 동정할 수 있는 API 20 kit를 사용하여 분석한 결과 Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 sucrose와 amygdaline을 자화시키며 β-galactosidase, cytochromeoxydase가 존재하고 nitrate를 nitrite로 환원시킬 수가 있었다.

이상과 같은 결과를 통해 검토한 결과 본 연구에서 분리한 YD-15 균주는 *Pseudomonas paucimobilis*와 *Pseudomonas cepacia*와의 identification percent가 각각 58.3%, 27.7%로 *Pseudomonas*속의 일부 균주와 비슷하였으나 당 자화성에 있어서는 종별간의 특성에 일관성이 없었고 일치하는 종이 없었다. 따라서 본 실험의 균주를 *Pseudomonas* sp. YD-15로 명명하였다.



Fig. 1. Scanning electron micrograph of a strain YD-15. (×20,000)

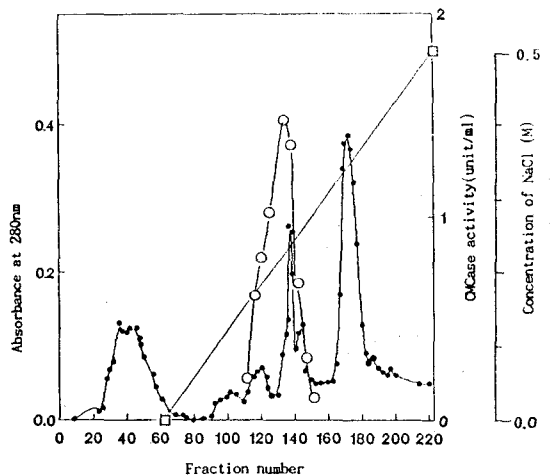


Fig. 2. Column chromatography of CMCase on DEAE-Sephrose.

●—● : Protein, ○—○ : CMCase activity

## 최적 배양 조건의 검토

## 1) pH 및 온도

Cellulase 생산을 위한 기본배지의 초기 pH를 4.0~10.0의 범위로 조절하고 증배양액을 1%(v/v)되게 집중한 뒤 30℃에서 60시간 배양하여 배지의 pH에 따른 cellulase의 활성을 비교한 결과 pH 8.0에서 최대 활성을 나타내었다. Oh 등<sup>18)</sup>의 *Cellulomonas* sp.의 pH 7.0과 비교하면 다소 높은 pH에서 최대 활성을 나타내었다.

## 2) 탄소원

Cellulase 생산을 위한 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 기본배지 중의 avicel 대신 각 탄소원을 1%(w/v)씩 첨가하고 증배양액을 1%(v/v)되게 집중하여 같은 조건 하에서 배양하였다. 그 후 cellulase 활성을 측정된 결과 avicel, CM-cellulose, wheat bran 등의 cellulosic mate-

rial이 존재할 경우 cellulose의 생산이 유도되었으며, avicel을 첨가한 경우 cellulase의 활성이 가장 높았고, glucose나 lactose와 같은 단당류나 이당류에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 따라서 본 *Pseudomonas* sp. YD-15가 생산하는 효소는  $\beta$ -1,4-linkage의 가수분해에 작용하는 cellulase로 생각되었다.

Avicel의 cellulase 생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여 avicel을 배지에 0.2~1.4%(w/v) 농도로 첨가하여 30℃에서 60시간 배양한 뒤 cellulase 활성을 측정된 결과 avicel의 농도가 1.2%일 때 최대의 활성을 보였다.

## 3) 질소원 및 기타

Basal medium에 avicel을 1.2%로 하고 yeast extract, polypeptone, tryptone, soybean meal 등의 유기질소원을 각각 1.0%(w/v)씩 첨가하여 30℃에서 60시간 배양한 후

Table 1. Characteristics of strain YD-15 compared with those *Pseudomonas* species

Characteristics	Strain YD-15	<i>Ps. paucimobilis</i>	<i>Ps. cepacia</i>
Cell morphology			
Size	0.2~0.4×1.0~1.2 $\mu$ m	0.7×1.4 $\mu$ m	0.8~1.0×1.6~3.2 $\mu$ m
Shape	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilli</i>
Gram staining	—	—	—
Colony color	Fluorescent yellow	Fluorescent yellow	
Motility	+	+	+
Growth on MacConkey medium	—	—	+
Fermentation/Oxidation of			
Glucose	—	—	—
Manitol	—	—	—
Inositol	—	—	—
Sorbitol	—	—	—
Rhamnose	—	—	—
Sucrose	+	+	—
Melibiose	—	—	—
Amygdaline	+	—	+
Arabinose	—	—	—
$\beta$ -Galactosidase	+	+	+
Arginine dehydrolase	—	—	—
Lysine decarboxylase	—	—	+
Ornithine decarboxylase	—	—	—
Urease	—	—	—
Gelatinase	—	—	+
Tryptophane deaminase	—	—	—
Cytochrome-oxidase	+	+	+
Citrate utilization	—	+	+
H <sub>2</sub> S production	—	—	—
Indol production	—	—	—
Acetone production	—	+	—
NO production	+	—	+
Reduction of N <sub>2</sub> gas	—	—	—

cellulase의 활성을 비교한 결과 yeast extract를 첨가하였을 때 가장 좋은 활성을 나타냈다. 한편 yeast extract의 농도를 0~1.0%(w/v)까지 변화시켜 cellulase 활성을 비교한 결과, 0.6%에서 가장 좋은 활성을 나타냈다.

Cellulase 생산에 미치는 무기 질소원의 영향을 조사하기 위하여 각각의 무기 질소원을 0.1%(w/v)씩 첨가하고 30 °C에서 60시간 배양하여 활성을 측정하였다. 그 결과 KNO<sub>3</sub>가 가장 높은 활성을 보였으며, KNO<sub>3</sub>의 농도를 2.0%까지 변화시키면서 cellulase의 활성을 측정할 결과 0.1%일 때 가장 높은 활성을 나타내었다.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 0.1%(w/v)씩 첨가하여 K 및 P원의 종류와 농도에 따른 CMCase 활성을 검토한 결과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 가장 높은 활성을 보였으며, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 0.3%(w/v) 농도까지 변화시키면서 CMCase 활성을 측정한 결과 0.2%일 때 최대를 보였다.

Cellulase 생산에 미치는 무기염의 영향을 알아보기 위하여 MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> 및 FeSO<sub>4</sub>를 첨가시켜 배양한 결과 MgSO<sub>4</sub>에 의한 영향이 가장 좋았으며, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%에서 최대의 활성을 나타내었다.

Cellulase 생산을 위한 배양 온도의 영향을 검토하고자 24~37 °C 사이에서 배양한 30 °C에서 최대활성을 보였다.

이상에서와 같이 *Pseudomonas* sp. YD-15가 cellulase를 생산하기 위한 최적 배지 조건을 조사한 결과 avicel 1.2%(w/v), yeast extract 0.5%(w/v), KNO<sub>3</sub> 0.6%(w/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%(w.v), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%(w/v)를 첨가시켜 pH 8.0, 30 °C에서 3일간 배양하였을 때 이었다.

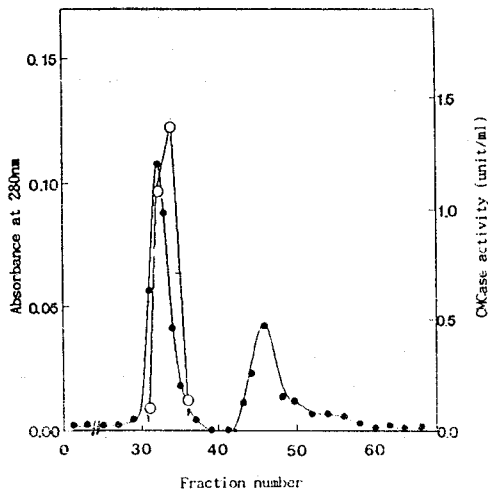


Fig. 3. Gel filtration of CMCCase on Sephadex G-100. ●—● : Protein, ○—○ : CMCCase activity

**효소의 분리와 정제**

*Pseudomonas* sp. YD-15가 생산하는 cellulase를 분리, 정제하기 위하여 앞서 검토한 배양조건에서 배양한 배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 85%의 ammonium sulfate를 포화시켜 효소를 침전시켰다.

침전된 효소를 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 다음 dialysis를 행하고 동일한 buffer로 미리 평형화시킨 DEAE-Sephrose column(φ 3.5×25.0 cm)에 흡착시킨 다음 0.0~0.5 M NaCl로 gradient elution을 하여 용출시켰다.

DEAE-Sephrose column chromatography를 통해서 얻어진 효소액에 ammonium sulfate를 85% 되게 첨가시킨 뒤 다시 소량의 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹이고 이를 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(φ 1.8×80 cm)으로 gel filtration을 행하여 정제하였다(Fig. 2, 3). 이러한 정제과정을 통해 수율은 14%이고 비활성도는 12.7 unit/mg, 정제도 15.3배의 효소단백질을 얻을 수 있었다(Table 2).

Gel filtration을 하여 정제한 효소단백질을 정제과정 중의 효소용액과 함께 SDS-PAGE를 행한 결과 Fig. 4와 같이 분자량 100,000 부근에서 단일 band를 확인할 수 있었다.

**효소의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향**

효소작용에 대한 최적 작용 pH를 알아보기 위하여 pH 3.0~11.0 사이의 buffer 1ml에 2%(w/v) CMC 용액 1ml와 효소액 0.2 ml를 첨가하여 45 °C에서 30분간 반응시킨다음, 10분간 끓여 반응을 정지시키고 효소활성을 측정할 결과 pH 6.0에서 최적 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이는 Oh 등<sup>18)</sup>이 보고한 *Cellulomonas* sp. YE-5와 *Petre*

Table 2. Purification of the CMCCase

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	708.0	588	0.83	100	1.0
Ammonium sulfate(85%) precipitation	159.0	311	1.96	53	2.4
DEAE-Sephrose chromatography	23.4	181	7.74	31	9.3
Sephadex G-100 gel filtration	6.4	81	12.70	14	15.3

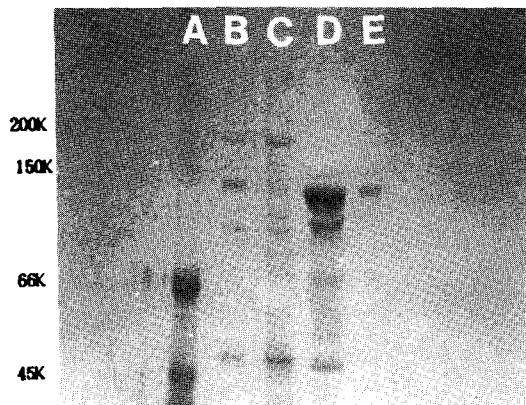


Fig. 4. Analysis of the CMCCase on SDS-PAGE. A : Standard protein molecular marker, B : Crude extract of *Pseudomonas* sp. YD-15, C : After 85% ammonium sulfate precipitation, D : After DEAE-Sephacel column chromatography, E : After Sephadex G-100 gel filtration

등<sup>19)</sup>의 pH 6.0과 일치되는 결과였다.

효소의 pH에 대한 안정성은 동일한 buffer를 사용하여 각 pH 영역별로 효소액을 4℃에서 24시간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하여 검토하였다. 그 결과 pH 5.0~8.0 사이에서 안정하였으며 pH 9.0에서는 78%, pH 4.0에서는 57%의 잔존 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이의 결과는 Oh 등<sup>18)</sup>의 *Cellulomonas* sp. YE-5 CMCCase의 경우 pH 5.0~9.5 사이에서 안정하였다는 결과와 거의 유사하였다.

**효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향**

효소활성의 최적 작용 온도를 알아보기 위하여 30~80℃ 사이의 각 온도에서 효소활성을 측정한 결과, 50℃에서 최대활성을 나타내었고 60℃에서는 60% 정도의 상대활성을 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 거의 활성을 보이지 않았다(Fig. 6).

한편 본 효소의 열안정성을 검토하기 위하여 각 온도별로 1시간 처리후 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 6과 같았다. 50℃까지는 비교적 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소되었다.

**사 사**

본 연구는 동력자원부에서 시행한 대체에너지 개발 관련사업인 "901C201-349FG" 과제의 일부로 깊은 사의를 표합니다.

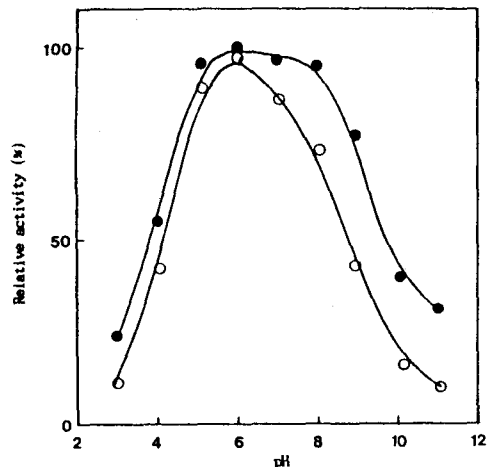


Fig. 5. Effect of pH on stability and activity of CMCCase. ●—● : Stability, ○—○ : Activity

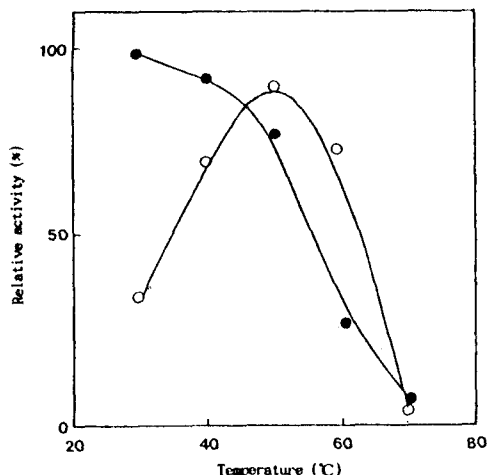


Fig. 6. Effect of temperature on stability and activity of CMCCase. ●—● : Stability, ○—○ : Activity

**참 고 문 헌**

- Mandels, M. : Annual reports of fermentation process, 7 : 35(1984)
- Pibber, M. and Toha, J. C. : J. Ferment. Technol. 60 : 247(1982)
- Wood, T. M. : Biochem. J., 121 : 353(1971)
- Streamer, M., Eriksson, K. E. and Pettersson, B. : Eur. J.Biochem., 59 : 607(1975)
- Storvick, W. O. and King, K. W. : J. Biol. Chem.

- 235 : 303(1960)
6. Ng, T. K. and Zeikus, J. G. : Biochem. J., 199 : 341 (1981)
  7. Lee, S. F., Forsberg, C. W. and Gibbin, L. N. : Appl. Environ. Microbiol., 50 : 220(1985)
  8. Yamane, K., Yoshikawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. : J. Biochem., 69 : 771(1971)
  9. Ramasamy, K. and Verachtert, H. : J. Gen. Microbiol., 117 : 181(1980)
  10. Nakamura, K. and Kitamura, K. : J. Ferment. Technol., 60 : 343(1982)
  11. Nakamura, K. and Kitamura, K. : J. Ferment. Technol., 61 : 379(1983)
  12. Kim, B. H. and Wimpenny, J. W. T. : Kor. J. Microbiol., 23 : 25(1985)
  13. Bailey, M. J. and Nevalainen, K. M. H. : Enzyme Microb. Technol., 3 : 153(1981)
  14. Roy, S. K., Raba, S. K., Dey, S. K. and Chakrabarty, S. L. : Enzyme Microb. Technol., 12 : 710(1990)
  15. Labudosa, I. and Farkas, V. : FEMS Microbiol. Lett., 20 : 211(1983)
  16. Kubicek-Pranz, E. M., Vollenhofer, S., Fritscher, C., Plicka, A., Hample, W. A. and Kubicek, C. P. : Enzyme Microb. Technol., 13 : 39(1991)
  17. Zhu, Y. S., Wu, Y. Q., Chen, W., Tan, C., Gao, J. H., Fei, J. X. and Shin, C. N. : Enzyme Microb. Technol., 4 : 3(1982)
  18. Oh, D. H. and Chey, D. C. : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18 : 376(1990)
  19. Petre, J., Longin, R. and Millet, J. : Biochem., 63 : 629(1981)
  20. Miller, L. : Anal. Chem., 31 : 426(1959)

#### Properties of the CMCase produced by *Pseudomonas* sp. YD-15

Jeong-Woo Lee, Chang-Nam Kim, Nam-Yun Hur and Doo-Hwan Oh(Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

**Abstract :** A bacterium having CMCase activity was isolated from soil and identified as a *Pseudomonas* sp YD-15. The optimum conditions for the production of CMCase were avicel 1.2%, yeast extract 0.5%, KNO<sub>3</sub> 0.06%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%, pH 8.0, 30 °C and 60 hours cultivation. The CMCase was purified 15.3 folds with 14% yield through ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose column chromatography and sephadex G-100 gel filtration chromatography. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 6.0 and 50 °C, respectively. The enzyme was stable between pH 5.0 and 8.0, below 50 °C. The molecular weight was calculated about 100,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. K<sub>m</sub> value for CMC used as a substrate was 40 mg/ml.