

## 호알칼리성 *Cephalosporium* sp. RYM-202가 생산하는 carboxymethyl cellulase의 부분정제 및 특성

강명규 · 박희문 · 이영하\* · 김윤석<sup>1</sup> · 김여경<sup>1</sup>

충남대학교 자연과학대학 미생물학과  
(주) 럭키 생활용품연구소<sup>1</sup>

## Partial Purification and Some Properties of Carboxymethyl Cellulases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202

Myoung-Kyu Kang, Hee-Moon Park, Young-Ha Rhee\*,  
Yun-Seog Kim<sup>1</sup> and Yeo-Kyung Kim<sup>1</sup>

Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

\*Department of Microbiology, Lucky Householdgoods Research Institute, Cheongju 360-290, Korea

**ABSTRACT:** An alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202 capable of producing cellulase components was isolated from soil. This organism grew best at an initial pH 9.0 and produced cellulase maximal at an initial pH 9.5-10.0. Three carboxymethyl cellulases(CMCases), P-I-I, P-I-II and P-II-I, were partially purified by DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column followed by Sephadex G-150 gel filtration. The optimum pH values for activity were 7.5 for P-I-I, 8.0-9.5 for P-I-II and 7.5-10.0 for P-II-I. All CMCases were stable between pH 4.5 and 12.0. Temperature optima for activity ranged between 40 and 60°C and more than 50% of the maximum activity was observed at 20°C for both of P-I-I and P-II-I. The activity of CMCases was significantly stable in the presence of various laundry components, such as, surfactants, chelating agents and alkaline proteinases.

**KEYWORDS:** alkalophilic *Cephalosporium* sp., alkaline CMCCase, cellulase

### 서 론

미생물이 생합성하는 cellulase는 자연계내에 가장 풍부하게 존재하는 섬유질자원의 산업적 활용과 관련하여 많은 연구가 이루어진 multi-enzyme complex로서, 적어도 endo-β-1,4-glucanase(EC 3.2.1.4), exo-β-1,4-glucanase(EC 3.2.1.91)와 β-glucosidase(EC 3.2.1.21)의 3가지 components로 구성되어 있다(Bisaria and Ghose, 1981).

이러한 cellulase component중에서 최근 carboxymethyl cellulase(CMCCase, endo-β-1,4-glucanase)가 세제의 효율성을 향상시키는 첨가물, 즉 효소세제로서의 효용가치가 매우 높음이 밝혀지고 있다(Mu-

rata 등, 1982; Kawai 등, 1988; Ito 등, 1989). 그러나 지금까지 연구되어 온 미생물의 CMCases는 대부분 pH 4-6의 산성 또는 중성의 수소이온 농도하에서 최적의 효소활성을 보임으로써, 그 조성성분에 의해 알칼리성을 나타내는 세제에의 활용은 어려움이 많다. 뿐만 아니라 미생물로부터 생산된 기존의 CMCCase는 대부분이 50°C 이상의 고온에서 최고의 효소활성을 가지는 반면에 낮은 온도(20-30°C)에서는 활성이 매우 낮아 효과적인 세척효과를 가질 수 없으며, 합성세제의 조성물인 계면활성제, 착화합물(chelating agent) 및 단백질가수분해 효소 등에 대한 안정성이 낮아 이들에 의하여 쉽게 효소 활성이 상실되는 단점을 지니고 있다(Ito 등, 1989).

이러한 문제점들을 극복하기 위한 방안으로서 호

\*Corresponding author

알칼리성(alkalophilic) 미생물 또는 알칼리내성(alkaline tolerant) 미생물 등으로부터 alkaline cellulase를 생산하고 이를 효소제제로서 활용키 위한 연구가 최근 수행되고 있다(Kawai 등, 1988; Ito 등, 1989; Shikada 등, 1990; Ozaki 등, 1990; Okoshi 등, 1990). 그러나 지금까지 보고된 alkaline cellulase는 모두 *Bacillus*속 균주로부터 생산되었을 뿐이며, cellulase 효소계의 생성능이 우수한 것으로 알려진 *Trichoderma*속, *Aspergillus*속 등의 균류에 비하여 그 활성이 매우 낮다. 일반적으로 세균의 cellulase 효소계는 균류에 비하여 효소 생합성능이 뒤떨어지며 또한 cellulase 효소계의 3가지 components를 고루 갖추지 못함으로써 균류보다 산업적 실효성이 미약한 것으로 알려져 있다(Bisaria and Ghose, 1981; Coughlan, 1985). 실제로 *Bacillus*속 균주로부터 생산된 alkaline cellulase는 endo-cellulase 활성만 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Horikoshi 등, 1984; Fukumori 등, 1985).

최근 본 실험실에서는 alkaline cellulase 생성능이 우수한 미생물들을 자연계로부터 분리하기 위한 균주탐색 실험을 수행하였으며, 그 결과 넓은 작용온도 범위를 가지며 alkaline cellulase components를 고루 생산하는 호알칼리성 균류를 분리하였다. 본 논문에서는 이 균류를 동정하고, 이 미생물이 생산하는 alkaline cellulase components중 부분정제된 CM-Cases의 효소학적 성질을 조사함으로써 세제용 효소로서의 산업적 활용 가능성을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 배지

평판배지상에서 alkaline cellulase 생성능을 갖는 호알칼리성 및 알칼리내성 균류의 분리를 위하여서는 1%(w/v) carboxymethyl cellulose (CMC)을 탄소 원으로서 Czapek broth에 대체 첨가하고 0.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0075% trypan blue, 1.5% Bacto Agar를 함유시킨 배지 (medium-I)를 사용하였으며, 분리된 균류의 효소유도를 위해서는 Czapek broth에 탄소 원으로서 2% 밀기울(wheat bran)을 대체 첨가하고, 0.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 함유시킨 pH 10.5의 알칼리배지 (medium-II)와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 함유시키지 않은 중성배지

(medium-III)를 사용하였다. 또한 분리된 균주는 Czapek broth 조성에 1.5% yeast extract, 0.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5% Bacto Agar를 첨가한 알칼리배지 (medium-IV)에서 보존하면서 2개월마다 동일배지에서 계대배양하였다.

### 균주분리

충남 금산군 일원의 석회암지대에서 채취한 토양 시료(0.5 g)를 saline-용액(10 ml)에 현탁시킨 후, 10<sup>-1</sup> - 10<sup>-3</sup>으로 희석하여 medium-I에 접종하고 20°C 에서 4-5일간 배양하였다. 배양 후 청색 계통의 배지 바탕색을 배경으로 하여 주위에 clear zone이 형성된 콜로니들을 섬유소 분해능을 지닌 균주로 1차 분리하였다. 1차 분리과정에서 선별된 각각의 균주를 medium-IV에 접종시켜 30°C 에서 5일간 배양하고 이로부터 분생포자(conidia)를 수확하였으며, 이를 배지 1 ml당 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup>개 정도의 분생포자가 함유되도록 알칼리배지 (medium-II)와 중성배지 (medium-III)에 각각 접종하고 25°C 로 4-6일간 진탕배양하면서 정기적으로 효소활성을 조사하였다. 그 결과 medium-III에 비해 medium-II에서 배양하였을 경우에 균체생성과 효소활성이 보다 높은 균주를 alkaline cellulase 효소계를 지닌 호알칼리성 균주로 선택하였다.

### 균주 동정

균사의 형태, 격막의 유무, 무성포자 및 유성포자, 콜로니의 색 및 형태 그리고 cleistothecium 형태 등 형태학적 및 기타 분류학적 특징을 조사한 후 Koneman 등(1979)의 방법에 의거하여 동정하였다.

### 조효소액의 제조

*Cephalosporium* sp. RYM-202의 분생포자 현탁액을 2.5 L medium-II에 분생포자가 1 ml당 5 × 10<sup>6</sup>개에 해당되도록 접종한 후 5 L 발효기를 이용하여 호기상태로 30°C 에서 3일간 배양하고, 배양액을 4°C 에서 20분간 원심분리(5,000 × g)하여 상등액을 취하였다. 상등액은 20-80%의 황산암모늄으로 염색한 후, 원심분리(4°C, 8,000 × g, 20분)하여 침전물을 수집하였다. 이 침전물을 10 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후, ultrafiltration (Amicon, PM 10)으로 농축한 효소액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소의 정제

**DEAE-Sephadex A-50에 의한 이온교환 chromatography:** 조효소 용액을 DEAE-sephadex A-50 chromatography column (5×25 cm)에 적하하고 400 ml의 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 용출한 후, 다시 동일한 인산완충용액에서 0-0.5 M의 NaCl을 이용하여 일정한 농도기울기로 용출시켰다. 용출속도는 20 ml/hr이었으며 5 ml씩 분획하였다.

**Sephadex G-150 Gel filtration chromatography:** DEAE-Sephadex A-50에 의해 분리된 P-I과 P-II 부분을 각각 Diaflo membrane PM 10(Amicon)으로 공히 15 ml로 농축한 후, Sephadex G-150 column (3×90 cm)에 적하하고 10 mM 인산완충용액 (pH 7.0)으로 용출하였다. 용출속도는 20 ml/hr로 하였고, 5 ml씩 분획하였다.

### 효소활성의 측정

Alkaline CMCase 및 exoglucanase의 효소활성은 각각의 기질인 carboxymethyl cellulose와 Avicel이 0.5%되게 첨가된 0.05 M glycine-NaOH 완충용액 (pH 9.5) 0.9 ml에 효소액 0.1 ml을 가하고, 37°C 에서 1시간 반응시킨 후, 생성된 환원당량으로 측정하였다. 환원당의 측정은 3,5-dinitrosalicylic acid 방법 (Miller, 1969)을 이용하여 575 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성도의 1 unit는 위의 반응조건 하에서 1분 동안에 1 μmole의 glucose(또는 glucose equivalent)를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Alkaline β-glucosidase의 효소활성 측정을 위하여서는 0.05 M glycine-NaOH 완충용액(pH 9.5)에 녹인 1 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(PNPG) 0.9 ml와 효소용액 0.1 ml를 섞어 37°C 에서 30분간 반응시킨 뒤, 2 ml의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하고 증류수 7 ml로 희석시켜서 유리된 PNP의 양을 420 nm에서 측정하였다. 효소활성도 1 unit는 1분 동안 1 μmole의 PNP를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 효소활성의 측정치는 3개의 반응시료로부터 얻은 측정치를 평균하여 나타내었다.

### 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다.

## 結 果

### 선별균주의 동정

Alkaline cellulase 생성 미생물의 검색실험의 결과 호알칼리성 균으로서 CMCase 효소 생성능이 가장 뛰어난 RYM-202 균주를 분리하였다. 이 균류는 medium-IV에서 4-5일간 배양하였을 때 노란색 내지는 진노란색의 밀집형 콜로니를 형성하며, 가늘고 긴 비분지형의 균사를 지니고 격막을 가지고 있다. 또한 분생포자는 타원형(2-3×4-8 μm)의 모습을 하며 하나 혹은 두개의 세포로 구성되어 있는데 분생포자는 균사의 끝 phialides에 cluster를 이루고 있다(Fig. 1). 이러한 형태학적 특징은 불완전균류인 *Cephalosporium*속 균의 전형적인 양상이라 할 수 있으며(Koneman 등, 1979; Larone, 1987), 이로부터 분리된 이 균을 *Cephalosporium* sp. RYM-202로 명명하였다.

### 효소생산을 위한 배양조건

배양시간에 따른 *Cephalosporium* sp. RYM-202의 효소생성능을 살펴보기 위해 pH 10.5의 효소유도용 알칼리배지에서 30°C 로 6일간 배양하면서 세포외로 분비하는 alkaline cellulase 활성변화를 살펴보았다. Fig. 2에서와 같이 이 균은 cellulase의 3 components를 모두 생산하였으며, CMCase의 경우에는 배양 3일째에 가장 많은 효소가 생성되는 것으로 나타

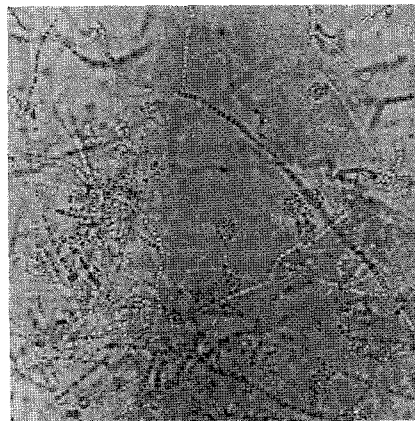


Fig. 1. Photograph of the isolate, *Cephalosporium* sp. RYM-202.

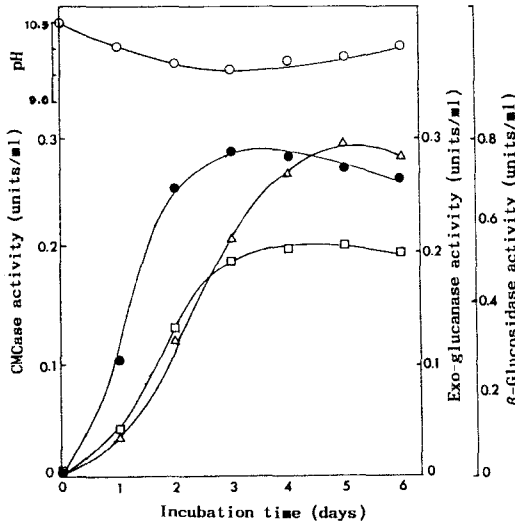


Fig. 2. Time course of cellulase production from *Cephalosporium* sp. RYM-202.  
●, CMCase; □, exo-glucanase; △, β-glucosidase

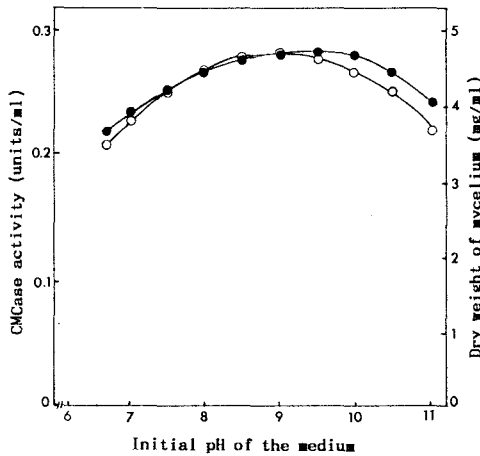


Fig. 3. Effect of initial pH of culture medium on growth and the production of CMCase.  
●, CMCase activity; ○, dry weight of mycelium

났다.

한편, *Cephalosporium* sp. RYM-202 균주의 성장과 alkaline CMCase 생합성에 미치는 배양액내 pH의 영향을 살펴보기 위하여  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액으로 pH를 달리한 배양액에서 30°C로 3일간 배양한 후, 형성된 균사체의 양과 효소활성을 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 균 성장을 위한 최적 pH는

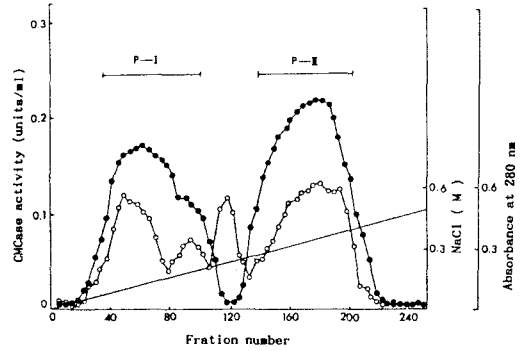


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of crude extract from *Cephalosporium* sp. RYM-202.  
●, CMCase activity; ○, protein (absorbance at 280 nm)

9.0으로 나타났으며, 최대의 효소합성은 pH 9.5-10.0의 범위에서 나타났는데, 전체적으로 pH 8.0-10.5 범위에서 최고치의 90%를 상회하는 높은 수준의 균체 성장과 효소합성을 보였다. 이러한 결과는 *Cephalosporium* sp. RYM-202가 전형적인 호알칼리성 균임을 보여 준다.

### 효소의 정제

*Cephalosporium* sp. RYM-202의 조효소액을 DEAE-Sephadex A-50을 이용한 이온교환 chromatography 결과, 완전히 분리되는 2개의 CMCases(P-I과 P-II)을 얻었다(Fig. 4). 분획된 P-I을 ultrafiltration하여 농축한 후 Sephadex G-150 gel filtration chromatography를 수행한 결과 1개의 major peak(P-I-I)와 1개의 minor peak(P-I-II)로 분리되었다(Fig. 5). 또한 동일한 방법으로 Sephadex G-150 gel filtration chromatography에 의해 P-II로부터는 하나의 peak(P-II-I)을 획득하였다(Fig. 6). 이와같이 하여 본 실험에서는 3개의 CMCase 성분(P-I-I, P-I-II 및 P-II-I)이 부분정제되었는데, 조효소액으로부터 정제과정의 단계별 CMCase의 고유활성도 및 회수율은 Table 1에 나타낸 바와 같다. P-I, P-II 및 P-III는 조효소액에 비하여 각각 6.6, 0.8 및 14.6%의 회수율을 보였지만 조효소액에 비하여 각각 14.4, 38.0 및 20.4배의 정제효과를 나타내었다.

### 효소활성과 안정성에 미치는 pH의 영향

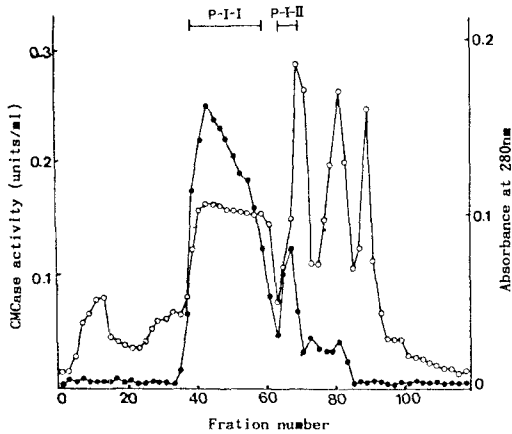


Fig. 5. Gel filtration chromatography of P-I on Sephadex G-150.  
●, CMCCase activity; ○, protein (absorbance at 280 nm)

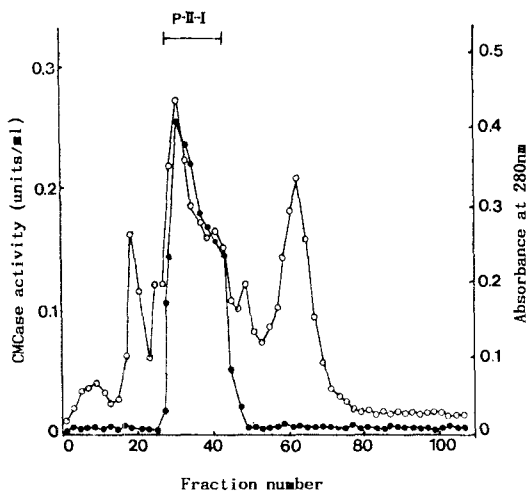


Fig. 6. Gel filtration chromatography of P-II on Sephadex G-150.  
●, CMCCase activity; ○, protein (absorbance at 280 nm)

Table 1. Purification steps of CMCase from *Cephalosporium* sp. RYM-202.

Purification step	Total activity (units)	Protein (mg)	specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	192	408.9	0.46	100
DEAE-Sephadex A-50				
P-I	52.5	25.2	2.08	27.4
P-II	45.2	44.5	1.02	23.5
Sephadex G-150				
P-I-I	12.6	1.9	6.63	6.6
P-I-II	1.4	0.1	17.50	0.8
P-II-I	28.2	3.0	9.40	14.6

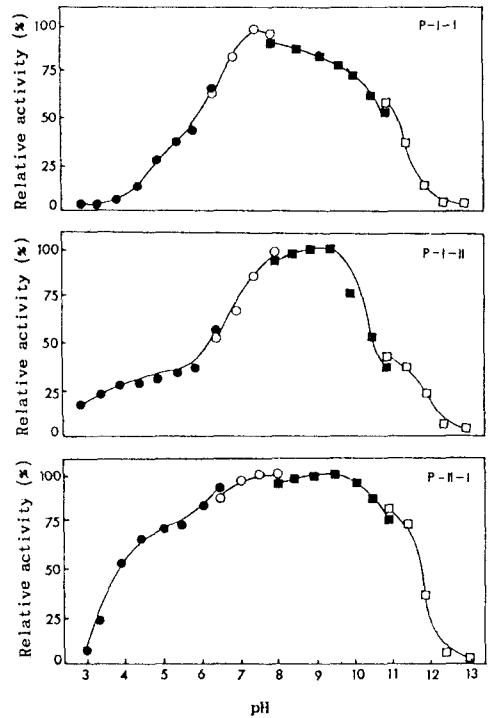


Fig. 7. Effect of pH on the activity of partially purified CMCases. The following buffer systems were used: 100 mM Macilvaine's(●); 50 mM phosphate(○); 100 mM glycine-NaOH(■); 100 mM KCl-NaOH(□).

부분정제된 3가지 CMCase의 활성을 위한 최적 pH를 살펴 본 결과는 Fig.7에서 나타난 바와 같다. P-I-I의 경우 최적 pH는 7.5이며 그 이상의 pH에서는 점점 활성도의 감소를 초래하여 pH 10에서의 활성은 최대치의 60% 수준이었다. 반면에 P-I-II와 P-II-I는 각각 8.0-9.5 및 7.5-10.0의 비교적 넓은 pH 범위에서 최고의 효소활성을 나타냈으며, 특히 P-II-I은 pH 6.0에서 pH 11.0에 이르는 높은 알칼리의 pH

범위까지 최대치의 75% 이상의 효소활성을 보였다. 또한, pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 서로 다른 pH의 완충용액에 효소를 가하고 4°C에서 24

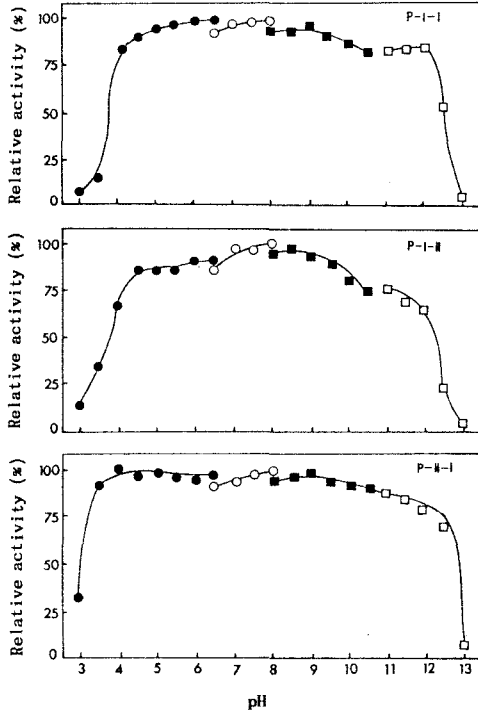


Fig. 8. Effect of pH on the stability of partially purified CMCases. Buffer systems used were the same as those described in Fig. 7.

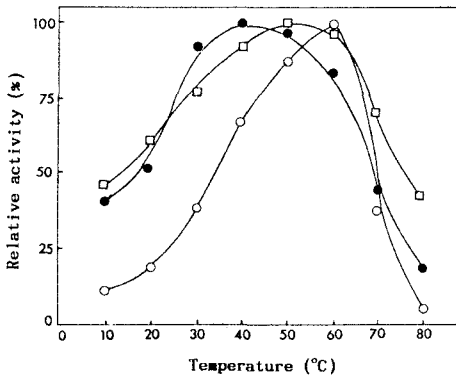


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of partially purified CMCases.  
●, P-I-I; ○, P-I-II; □, P-II-I.

시간 방치 후에 효소활성을 조사한 결과, 세 효소 모두 넓은 pH 범위(pH 4.5-11.0)에서 안정성을 보였고, 특히 P-I-II과 P-II-I의 경우 pH 12.0에서 80% 이상의 활성을 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

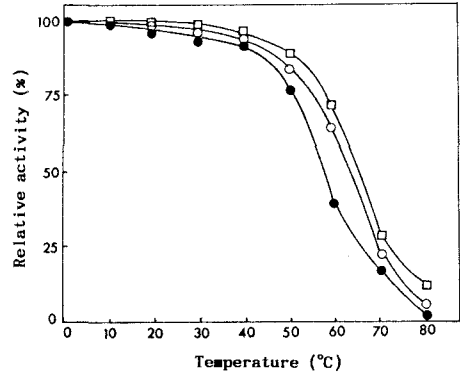


Fig. 10. Effect of temperature on the stability of partially purified CMCases.  
●, P-I-I; ○, P-I-II; □, P-II-I.

**효소활성과 안정성에 미치는 온도의 영향**

CMCase의 활성을 위한 최적온도는 P-I-I, P-I-II 그리고 P-II-I의 경우 각각 40°C, 60°C 그리고 50°C로서, P-I-I과 P-II-I은 보다 넓은 온도 범위를 지니어 30°C와 60°C에서도 최대활성의 80% 정도를 나타내었고, 20°C에서도 50% 이상의 효소활성을 보였다(Fig. 9). 또한 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 각각의 온도에서 1시간 동안 전처리한 후에 남아 있는 효소활성을 측정 한 결과, CMCase의 세 동위효소는 0°C-30°C 범위에서는 효소활성이 거의 영향을 받지 않았으며, 특히 P-II-I의 경우 60°C에서도 70% 이상의 활성을 유지함으로써 3 효소중 열에 대한 안정성이 가장 높았다(Fig. 10).

**금속이온, 계면활성제 및 착화합물의 영향**

여러가지 금속이온 및 합성세제의 조성물로 이용되고 있는 다양한 종류의 계면활성제와 착화합물이 CMCase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 효소 반응액에 금속이온, 계면활성제 및 착화합물을 첨가하고 효소활성을 비교하였다(Table 2). 조사된 금속이온에 대하여 P-I-I은  $Mn^{2+}$ 와  $Ca^{2+}$ 에 의해, P-I-II는  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$  및  $Ca^{2+}$ 에 대해, 그리고 P-II-I은  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  및  $Ca^{2+}$ 에 의해서 10-20%의 효소활성 상실을 보였다. 그러나 CMCase에의 영향이 큰 것으로 알려진  $Hg^{2+}$  (Fukumori 등, 1985; Kume 등, 1991)에 의한 저해 효과는 세 효소 모두에서 나타나지 않았다. 한편 조사된 계면활성제와 착화

**Table 2.** Effect of metal ions, surfactants and chelating agents on the activity of partially purified CMCase. CMCase activity was measured in glycine-NaOH buffer(pH 9.5) at 30°C in the presence of various additives at the concentrations indicated.

Reagent	Concentration	Relative activity (%)		
		P-I-I	P-I-II	P-II-I
None	—	100	100	100
KCl	50 mM	98	100	100
NaCl	50 mM	115	87	103
HgCl <sub>2</sub>	1 mM	104	107	109
CoCl <sub>2</sub>	1 mM	97	116	87
ZnCl <sub>2</sub>	1 mM	101	82	83
FeCl <sub>2</sub>	1 mM	92	90	94
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	87	82	87
MnCl <sub>2</sub>	1 mM	80	121	85
Soap	0.05%	101	98	103
AES	0.05%	87	82	103
AOS	0.05%	83	82	109
AS	0.05%	85	82	90
LAS	0.05%	75	72	85
Softanol	0.05%	96	108	104
Sodium silicate	0.05%	74	65	79
Zeolite	0.05%	93	82	101

합물 가운데에서는 세 효소 모두 규산소다(sodium silicate)와 linear alkyl benzene sulfonate(LAS)에 의해서 약 15-35%의 효소활성 감소를 보였으나, 비누 수지(soap),  $\alpha$ -olefin sulfonate(AOS), alkyl ethoxy sulfonate(AOS), softanol, zeolite 등의 기타 첨가물에 대해서는 비교적 계면활성제와 착화합물에 대하여 보다 안정하였다. 한편, 본 실험에 사용한 계면활성제와 착화합물을 효소액에 첨가하여 30분 동안 방치한 후 활성도를 측정하였을 때에도 역시 비슷한 결과를 보임으로써(미제시 자료) 세 CM-Case가 계면활성제와 착화합물에 대하여 비교적 안정성이 뛰어난 것으로 나타났다.

**단백질 가수분해효소에 대한 안정성**

세제용 효소로 시판되고 있는 몇가지 alkaline proteinase에 의한 CMCase 활성의 변화를 살펴 본

**Table 3.** Effect of alkaline proteinases on the activity of partially purified CMCase. CMCase activity was measured in glycine-NaOH buffer (pH 9.5) at 30°C in the presence of various proteinases at a concentration of 0.01%.

Additive	Relative activity (%)		
	P-I-I	P-I-II	P-II-I
None	100	100	100
Maxacal	92	74	99
Opticlean M	104	85	100
Savinase	99	96	124

결과, P-I-II만이 Maxacal(IBIS사, 네덜란드)과 Opticlean M(MKC사, 독일)에 의해 각각 26 및 15%의 효소활성 감소를 보였을 뿐이며 다른 CMCase는 비교적 처리된 단백질 가수분해효소들에 대하여 안정한 것으로 나타났다(Table 3). 특히 P-II-I은 Savinase(Novo사, 덴마크)에 의해 효소활성의 증가가 이루어지는 특징을 보였다.

**考 察**

Horikoshi 등(1984)에 의해 alkaline cellulase 생성능을 갖는 *Bacillus*속의 세균이 보고된 이래로 여러가지 alkalophilic *Bacillus* spp. (Fukumori 등, 1985; Shikata 등, 1990)와 neutrophilic *Bacillus* spp. (Kawai 등, 1988; Ito 등, 1989; Okoshi 등, 1990)에서의 alkaline cellulase 연구가 이루어져 왔으나, *Bacillus*속 세균을 제외한 다른 미생물에서의 alkaline cellulase에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서 분리동정된 *Cephalosporium* sp. RYM-202는 alkaline cellulase를 생성하는 진균이라는 점과 또 3가지 cellulase components를 모두 생성할 수 있다는 점에서 cellulase components중 CMCase만 생성할 수 있는 것으로 알려진 기존의 *Bacillus*속 균주들과 크게 비교가 된다. 또한 *Cephalosporium*속의 균주중에서는 alkaline proteinases를 생성할 수 있음이 알려져 있는데(Tsuchiya 등, 1987), 이러한 균주들이 모두 중성의 pH에서 최고의 생장을 나타내는데 반하여 *Cephalosporium* sp. RYM-202는 알칼리의 pH 범위에서 최대의 균체 생장과 cellulase

생산을 보일 뿐 아니라(Fig. 3) alkaline xylanase 생성능도 매우 높아(미제시 자료) 이 균의 생리생태학적 특징이 크게 구별된다.

Alkaline cellulase는 alkaline xylanase와 함께 폐섬유질의 효소학적 처리에 활용될 수 있으며(Vyas 등, 1990; Rhyum, 1993), 특히 alkaline CMCase는 합성세제의 첨가물 즉 효소세제로의 활용가치가 큰 것으로 알려져 있다(Kawai 등, 1988; Ito 등, 1989; Shikada 등, 1990; Okoshi 등, 1990). 이 효소가 어떠한 기작에 의해 세척효과를 가지고 있는가에 대하여서는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않지만, 반복세척에 의해 형성되는 면섬유의 보프라기가 쉽게 cellulase의 작용으로 제거되기 때문이거나 또는 면섬유에 여러가지 물리화학적 방법에 의해 결합되어 있던 오염물질이 cellulase와 치환됨으로써 면섬유로부터 제거되는 것으로 추정된다(Murata 등, 1982). 본 연구에서는 효소세제로서의 효용성이 강조되고 있는 CMCase를 *Cephalosporium* sp. RYM-202로부터 부분정제한 결과 P-I-I, P-I-II, 및 P-II-I의 3가지 CMCases를 획득하였다(Fig. 4-6). 이 CMCases는 모두 넓은 pH 범위(4-12)에서 비교적 안정성이 높았으나 pH에 따른 효소활성의 양상은 서로 다르게 나타났는데(Fig. 7-8), 최고 활성이 pH 7.5에서 나타난 P-I-I과는 달리 각각 8.0-9.5과 7.5-10.0의 pH 범위에서 최고활성을 보인 P-I-II 및 P-II-I은 alkaline CMCase의 특성을 지니는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp.로부터 최적 pH가 6인 하나의 CMCase와 최적 pH가 7-10인 두개의 alkaline CMCase를 분리한 Okoshi 등(1990)의 결과와 유사하다. 한편 P-I-I과 P-II-I은 효소활성을 위한 최적온도가 각각 40°C 와 50°C 이지만 작용온도 범위가 매우 넓어 30°C 와 60°C 에서도 최대활성의 80% 정도를 나타내었고, 20°C 에서도 50% 이상의 효소활성을 보였다(Fig. 9). 저온(20-30°C)에서의 이와 같은 효소활성은 *Bicillus* spp.의 CMCases(Kawai 등, 1988; Shikata 등, 1990; Okoshi 등, 1990)와 비교하여 볼 때 매우 높은 수준이다. 이외에도 *Cephalosporium* sp. RYM-202의 CMCases는 합성세제의 조성물인 여러가지 계면활성제와 착화합물에 대한 안정성이 높을 뿐 아니라(Table 2), 단백질가수분해효소에 대한 안정성도 높았다(Table 3). 이러한 결과는 cellulase가 비교적 단백질가수분해효소에 안정하지

나(Kawai 등, 1988), 오히려 단백질가수분해효소의 작용에 의해 활성이 증가될 수 있다는 보고(Chen and Grethlein, 1988)와 잘 부합된다. 결론적으로 본 연구에서 조사된 *Cephalosporium* sp. RYM-202의 CMCase는 cellulase 생성균으로 많은 연구가 이루어진 *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* 등의 CMCases(Maeng 등, 1980; Enari, 1983; Gusakov 등, 1983; Durand 등, 1984)와는 여러가지 구분되는 효소학적 특성을 가지고 있으며, 특히 알칼리 pH와 저온에서의 높은 효소활성, 계면활성제 및 단백질가수분해효소에 대한 안정성 등은 효소세제로서 활용가치가 높음을 시사해 준다.

## 摘 要

토양으로부터 cellulase compoenets를 생성할 수 있는 호알칼리성균 *Cephalosporium* sp. RYM-202를 분리하였다. 이 균의 성장을 위한 배지의 최적 pH는 9.0이었으며, pH 9.5-10.0의 배지에서 최대의 효소생산이 일어났다. *Cephalosporium* sp. RYM-202의 배양 여액으로부터 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피와 Sephadex G-150 gel filtration 크로마토그래피에 의해 부분정제된 세개의 CMCases(P-I-I, P-I-II 및 P-II-I)를 획득하였다. 효소활성을 위한 최적 pH는 P-I-I이 7.5, P-I-II는 8.0-9.5, P-II-I은 7.5-10.0이었으며, 모두 4.5-12.0의 pH 범위에서 안정한 것으로 나타났다. 세 CMCases 활성의 최적온도는 40-60°C 범위이었으나, P-I-I 및 P-II-I의 경우에는 20°C 에서도 최고활성의 50% 이상을 유지하였다. 또한 이 CMCases는 세제조성물로 사용되고 있는 여러가지 계면활성제, 착화합물 및 단백질가수분해효소에 대하여 안정성이 높은 특징을 보였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 (주)럭키의 산학협동 연구비(1991-1992)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 參考文獻

Bisaria, V. S. and T. K. Ghose. 1981. Biodegradation



- of cellulosic material: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microb. Technol.* **3**, 90-104.
- Chen, H. C. and H. E. Grethlein. 1988. Effect of cellulase size reduction on activity and stability. *Biotechnol. Lett.* **10**, 913-918.
- Coughlan, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment of their production and application. *Biotechnol and Bioeng. Reviews* **3**, 39-109.
- Durand, H., P. Soucaille and G. Tiraby. 1984. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 175-180.
- Enari, T-M, 1983. Microbial cellulases. in *Microbial Enzymes and Biotechnology* (ed. by W. M. Fogarty). pp 183-223, Appl. Sci. Pub., London.
- Fukumori, F., T. Kudo and K. Horikoshi. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 3339-3345.
- Gusakov, A. V., A. P. Sinitsyn and A. A. Klesov. 1983. Enzymatic hydrolysis of cellulose: inactivation and stabilization of enzymes of cellulase complex. *Biochimiya*, **47**, 1322-1331.
- Horikoshi, K., M. Nakao, Y. Kurono and N. Sashihara. 1984. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can. J. Microbiol.* **30**, 774-779.
- Ito, S., S. Shikata, K. Ozaki, S. Kawai, K. Okamoto, S. Inoue, A. Takei, Y. Ohta and T. Satoh. 1989. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1275-1281.
- Kawai, S., H. Okoshi, K. Ozaki, S. Shikata, K. Ara and S. Ito. 1988. Neutrophilic *Bacillus* strain, KSM-522, that produces an alkaline carboxymethyl cellulase. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1425-1431.
- Koneman, E. W., G. D. Roberts and S. F. Wright. 1979. Practical Laboratory Mycology(2nd ed.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Kume, S. and Y. Fujio. 1991. Production of two types of thermophilic cellulases in a mixture of thermophilic bacilli. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **34**, 25-34.
- Larone, D. H. 1987. *Medically important fungi-A Guide to Identification* (2nd ed.) Elsevier.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Maeng, P. J., S. W. Hong and Y. C. Hah. 1980. Purification and properties of carboxymethyl cellulase from *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Microbiol.* **18**, 133-147.
- Miller, G. L. 1969. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Murata, M., K. Horikoshi and A. Suzuki. 1982. UK patent 2 095 275 A.
- Okoshi, H., K. Ozaki, S. Shikata, K. Oshino, S. Kawai and S. Ito. 1990. Purification and characterization of multiple carboxymethyl cellulases from *Bacillus* sp. KSM-522. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 83-89.
- Rhyum, S. B. 1993. Purification and characterization of alkali-tolerant xylanase from alkalophilic *Streptomyces* sp. S-510 *Master Thesis*, Chungnam National University.
- Shikata, S., K. Saeki, H. Okoshi, T. Yoshimatsu, K. Ozaki, S. Kawai and S. Ito. 1990. Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 91-96.
- Tsuchiya, K., T. Arai, K. Seki and T. Kimura. 1987. Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp. KM388. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2959-2965.
- Vyas, P., V. Chathaiwale, S. Phadatare and M. C. Srinivasan. 1990. Studies on the alkalophilic *Streptomyces* with extracellular xylanolytic activity. *Biotechnol. Lett.* **12**, 225-228.