

## Cellulomonas sp. KL-6에 의한 섬유소 분해효소의 생산

권오진<sup>1\*</sup> · 정영건<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한국원자력연구소, <sup>2</sup>영남대학교 식품가공학과

**초록** : *Cellulomonas* sp. KL-6 균주가 생산하는 cellulase 중 CMCase나 FPase는 세포외로 다량 분비되나  $\beta$ -glucosidase는 cell bound form으로 존재하여 배양액에서의 생산은 극히 미약하였다. CMCase와 FPase는 배양 5일째에,  $\beta$ -glucosidase는 배양 4일째에 각각 최대생산을 나타내었다.  $\text{CaCO}_3$ (0.1%)가 첨가된 효소생산 최적 조건에서 CMCase는 82 unit/ml를, FPase는 80 unit/ml를 그리고  $\beta$ -glucosidase는 1.2 unit/ml를 각각 생산하였고 이는 기본배지에서 보다 60~70%의 생산증가를 가져왔다. KL-6 균주는 lignase와 laccase의 생산은 없었다(1995년 7월 15일 접수, 1995년 11월 6일 수리).

### 서 론

농산 폐섬유소자원은 cellulose, hemicellulose, lignin 등으로 구성되어 기질 이용을 높이기 위해서는 이들 물질을 효율적으로 가수분해하는 방법의 개발이 절실하다 하겠다. 이들의 가수분해에는 생물학적 방법과 화학적 방법이 있는데 cellulase를 이용한 생물학적 방법은 섬유소의 구조 및 작용기작이 복잡하여 효소생산에 제한을 받을 뿐 아니라 반응속도도 늦고 분해율이 극히 낮으며 효소당화에 있어 효소생산비가 차지하는 비중이 높아 섬유소자원 이용에 가장 큰 저해요인이 되고 있다.<sup>1)</sup> 그러나 생물학적 방법은 화학적 방법에 비하여 위생면에서나 공정면에서 많은 장점을 가지고 있는 바 적절한 가수분해 효소의 검색이 절실히 요청되고 있다. Cellulase는 대부분의 경우 CMCase(endo- $\beta$ -1,4-glucanase), avicelase(exo- $\beta$ -1,4-glucanase) 및  $\beta$ -1,4-glucosidase의 복합체로 되어 있어서 섬유소의 완전한 가수분해를 위해서는 이들 효소의 상호작용이 필요하다.<sup>2,3)</sup> 또한 cellulase의 효율을 증가시키기 위하여는 효소생산 조건<sup>4,5)</sup>과 효소의 특성 및 효과적인 정제과정<sup>6-8)</sup>을 검토하는 것이 중요하다. 최근에 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 cellulase의 특이성 및 활성에 대하여는 아직 논란의 대상이 되고 있다.

이러한 관점에서 본 연구는 섬유소의 효소 분해력을 향상시켜 세균 단세포단백질(single cell protein, SCP)의 수율을 향상시키고자 섬유소 분해세균인 *Cellulomonas* sp. KL-6가 분비하는 균체내·외 cellulase의 최적 생산 조건을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### Cellulase 생산균주

전보<sup>9)</sup>에서 분리한 섬유소 분해균주인 *Cellulomonas* sp.

KL-6를 사용하였다.

#### 효소액 조제

Carboxymethyl cellulose sodium salt(CMC) 배지에 KL-6 균주를 접종하여 30°C에서 50시간 배양한 seed culture액을 새로운 CMC 배지에 1.0%(v/v)를 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양한 후, 배양액을 10,000×g에서 20분간 저온 원심분리한 상등액을 crude extracellular enzyme으로 하였다. 균체는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척 후 동일 buffer로 현탁시킨 다음 sonicator로 48 watt (1 min/ml)에서 10분간 처리하여 균체를 파쇄하고 재 원심분리하여 얻은 상등액을 crude intracellular enzyme으로 하였다. CMC 배지는 CMC 10.0 g, yeast extract 1.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g, NaCl 6.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g을 1 l의 증류수에 녹여 pH 7.2로 조정하여 사용하였다.

#### 효소의 최적 생산조건

KL-6 균주의 효소생산 최적조건을 찾기 위해 기본배지인 CMC 배지에 탄소원(1.0%), 질소원(0.1%), 생육인자(0.1%), 인산원(0.05%), 금속이온(0.01%), NaCl(0~4.0%)과 pH(4.0~11.0) 및 온도(20~50°C) 등을 달리하여 이들 요소가 효소생산에 미치는 영향을 조사하였고  $\text{CaCO}_3$  (0.1%) 첨가효과를 조사하였다.

#### 효소의 활성측정

##### 1) Carboxymethyl cellulase(CMCase)

Gokhale과 Deobagkar의 방법<sup>10)</sup>에 준하여 1.0% CMC (pH 8.0) 용액 1.0 ml와 0.2 M phosphate buffer(pH 8.0) 1.0 ml에 효소액 0.5 ml를 넣어 40°C에서 1시간 반응시킨 후 즉시 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약 3.0 ml를 첨가하여 15분간 끓인다음 냉각시켜 550 nm에서 흡광도로 CMCase의 활성을 측정하였다. CMCase의 1 unit는 1분

찾는말: *Cellulomonas* sp. KL-6, cellulase, SCP

\*연락처

동안 1  $\mu$ mole의 glucose를 생산하는 효소의 양으로 하였다. DNS시약은 3,5-dinitrosalicylic acid 40 g, phenol 8 g, sodium sulfite 2 g, Rochelle salt 800 g을 2% sodium hydroxide 2l에 용해 후, 증류수로 4l가 되게 희석하여 사용하였다.

### 2) Filter paperase(FPase)

FPase의 활성은 최 등<sup>11)</sup>의 방법으로 filter paper strip (Whatman No. 1, 1 $\times$ 6 cm)을 1.0 ml의 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)에 담구고 여기에 효소액 0.5 ml를 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치한 후 DNS법으로 환원당량을 구하였다. 효소의 활성은 CMCase와 같은 unit로 표시하였다.

### 3) $\beta$ -Glucosidase

Han과 Srinivasan<sup>12)</sup>의 방법으로 0.005 M p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside(pNPG, pH 8.0) 0.5 ml에 효소액 1.0 ml를 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음 1.0 ml의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣어 효소반응을 정지시켰다. 이것을 냉각시킨 후 3,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 상등액 중에 유리된 p-nitrophenol의 양을 420 nm에서 측정하였다. 효소활성은 1분 동안 1  $\mu$ mole의 p-nitrophenol(pNP)를 생산하는 양을 1 unit로 하였다.

### 4) Laccase와 lignase

Laccase의 활성은 Leonowicz와 Grzywnowicz<sup>13)</sup>의 방법에 따라 효소액 1.9 ml와 0.02 M citrate buffer(pH 6.45) 1.7 ml를 섞어 5 mM의 p-phenylen-diamine 0.3 ml를 첨가한 즉시 525 nm에서 흡광도를 매분마다 측정하였다. 효소활성은 다음식에 의하여 계산하였다.  $A=10^6 \Delta E/E\Delta t$ , A; 임의 활성도, E; 상수(65000),  $\Delta E$ ; OD의 변화,  $\Delta t$ ; 반응시간(sec). Lignase 활성은 Ball 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 효소액 0.5 ml, 10 mM veratyl aldehyde 1.0 ml, 0.5 M Na-tartarate(pH 2.5) 1.0 ml, 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.25 ml 및 증류수 2.25 ml를 혼합하여 310 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소활성의 1 unit는 CMCase와 같이 하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소의 세포내·외의 분포

Table 1에서와 같이  $\beta$ -glucosidase는 주로 cell bound

Table 1. Distribution of cellulolytic enzymes of *Cellulomonas* sp. KL-6

Enzymes	Extracellular activity (unit/ml)	Cell-bound activity (unit/ml)
With centrifugation (10,000 $\times$ g)		
CMCase	54	6.40
FPase	58	5.70
$\beta$ -Glucosidase	0	0.67
Without centrifugation		
CMCase	50	
FPase	53	
$\beta$ -Glucosidase	0.09	

CMC medium was used for the experiment.

form에서 생산하였으며 cell-free supernatant에는 거의 생산이 없어 KL-6 균주의 생리적 성질에서 배양액 중으로 유리된 glucose를 확인하지 못한 보고<sup>9)</sup>와 일치하였다. CMCase와 FPase 생산은 그와 반대로 대부분이 extracellular form에서 생산되어 Gokhale와 Deobagkar,<sup>10)</sup> 김과 이<sup>15)</sup> 및 이 등<sup>16)</sup>의 보고와 유사하였다. 이러한 결과는 거대분자를 분해하는 효소는 세포외로 생산되거나 저분자의 물질을 분해하는 효소는 거의 cell bound form으로 존재하여 세포외로 생산이 미약하여 cellulose 분해산물의 대부분이 cellobiose로 축적되어 feed back inhibition을 가져오는 등, 본 균을 폐섬유소를 기질로 SCP 생산을 위해서는 세포외로  $\beta$ -glucosidase를 다량 생산할 수 있는 균주의 개발이나 이에 관한 기작 등이 고려되어 저야 할 것으로 생각된다. 앞으로의 효소생산 측정은 CMCase와 FPase는 균체의 활성으로,  $\beta$ -glucosidase는 균체내 활성으로 하였다.

### 배양시간에 따른 효소생산

CMC 배지에 KL-6 균주를 접종하여 배양시간별로 효소생산을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. CMCase와 FPase는 배양 5일째,  $\beta$ -glucosidase는 배양 4일째에 각각 최대생산을 나타내었고 그후에 CMCase와 FPase의 생산은 4~7%로 감소, 유지하였으나  $\beta$ -glucosidase의 생산은 11%까지 감소하였다. 이러한 결과는 분해산물인 glucose가 축적되어 저해를 받은 것으로 생각되며 최 등<sup>11)</sup>도 *Cellulomonas* sp. YE-5의  $\beta$ -glucosidase의 생산이 배양 3일 후에 급격히 감소한다고 보고하였다.

### 효소의 최적 생산조건

#### 1) 탄소원의 영향

각종 탄소원이 효소생산에 미치는 영향에 대해 조사한 결과는 Table 2와 같다. CMCase의 생산은 CMC와 raffinose에서, FPase의 생산은 CMC에서,  $\beta$ -glucosidase의 생산은 CMC와 cellulose에서 각각 좋았으며 탄소원 무첨가구에서는 CMCcase와 FPase의 생산은 없었으나  $\beta$ -

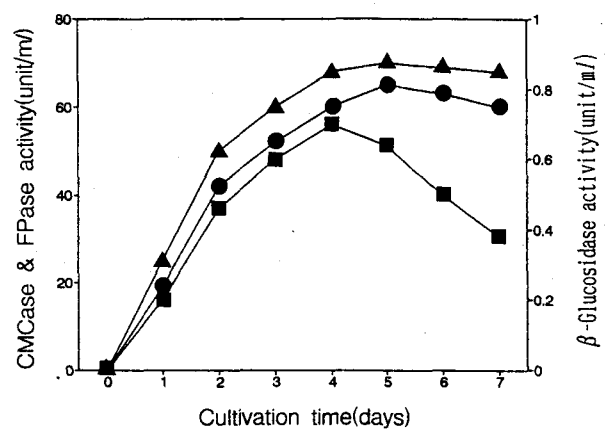


Fig. 1. Changes on the cellulase activity of *Cellulomonas* sp. KL-6 according to cultivation periods. ●—●, CMCase; ▲—▲, FPase; ■—■,  $\beta$ -Glucosidase.

Table 2. Effect of various nutritional sources on the cellulase production by *Cellulomonas* sp. KL-6

Source	Cellulase activity (%)			Source	Cellulase activity (%)		
	CMCase	FPase	$\beta$ -Glucosidase		CMCase	FPase	$\beta$ -Glucosidase
Carbon (1.0%, w/v)				Phosphate (0.05%, w/v)			
—	—	—	64	—	21	23	16
Glucose	—	—	12	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (A)	68	84	55
Xylose	47	42	—	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (B)	—	—	—
Arabinose	20	—	58	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (C)	56	51	45
Rhamnose	59	19	82	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (D)	54	72	59
Fructose	—	24	33	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (E)	10	22	—
Galactose	14	—	17	A+B <sup>b)</sup>	60	85	66
Mannose	—	—	—	A+C	99	98	96
Sucrose	—	—	—	A+D	100	100	89
Lactose	—	—	19	A+E	81	85	78
Cellulose	—	16	29	B+C	75	97	72
Raffinose	76	—	72	B+D	59	75	60
CMC <sup>a)</sup>	100	100	100	B+E	—	—	—
Cellulose	54	5	95	C+D	94	94	100
Nitrogen (0.1%, w/v)				C+E	67	81	74
—	59	33	65	D+E	35	41	48
Urea	82	81	98	Metal ion (0.01%, w/v)			
NH <sub>4</sub> Cl	96	94	100	—	26	28	26
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	73	98	72	Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	—	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	100	91	Fe <sup>2+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	—	—	—
Glycine	70	85	88	K <sup>+</sup> (KCl)	—	—	—
NaNO <sub>3</sub>	80	88	73	Hg <sup>2+</sup> (HgCl <sub>2</sub> )	—	—	—
KNO <sub>3</sub>	35	38	50	Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> )	—	—	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	28	52	20	Na <sup>+</sup> (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	—	10	—
Growth factor (0.1%, w/v)				Cu <sup>2+</sup> (CuSO <sub>4</sub> )	—	—	—
—	59	34	42	Al <sup>3+</sup> (AlCl <sub>3</sub> )	—	—	—
Bacto soytone	83	85	83	Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	83	88	80
Beef extract	42	49	20	Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	24	23	23
Casein	28	32	10	Mg <sup>2+</sup> + Ca <sup>2+</sup> <sup>c)</sup>	100	100	100
Polypeptone	55	66	38	Mineral sol. <sup>d)</sup>	20	12	16
Yeast extract	100	100	100				

<sup>a)</sup> CMC, carboxymethyl cellulose sodium salt. <sup>b)</sup> Mixtures were prepared by mixing same weight of each phosphate source, respectively. <sup>c)</sup> Same weight of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and CaCl<sub>2</sub> was used in the experiment. <sup>d)</sup> Mineral solution contains CaCl<sub>2</sub> 0.05%, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.67%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.018%, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.016%, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.018, EDTA 2.01%.

glucosidase는 생산하였다. Lactose에서  $\beta$ -glucosidase의 생산만 나타난 것은 Han과 Srinivasan<sup>12)</sup> 및 Gokhale와 Deobagkar<sup>10)</sup>가 lactose는  $\beta$ -glucosidase의 inducer로 작용한다는 보고와 유사하였다. 균체증식에 가장 좋았던 sucrose에서는<sup>9)</sup> CMCase, FPase 및  $\beta$ -glucosidase의 생산은 완전히 저해되어 catabolite repression을 받은 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 이 등<sup>16)</sup>의 *Cellulomonas* sp. CSI-1에서도 나타난 것으로 보아 KL-6 균주의 cellulase 합성도 inducer에 의해 유도됨을 알 수 있었다. CMC에서 효소생산 최적농도는 Table 3과 같이 CMCase와 FPase가 2.0%,  $\beta$ -glucosidase가 1.0%로 나타났다.

## 2) 질소원의 영향

질소원이 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. CMCase와 FPase는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서,  $\beta$ -glucosidase는 NH<sub>4</sub>Cl에서 최대생산을 나타내었고 질소원 무첨가구인 대조군에 비해 CMCase는 69%,

FPase는 203% 및  $\beta$ -glucosidase는 54%의 효소생산 증가효과가 있었다. Urea에서  $\beta$ -glucosidase 생산이 높게 나타난것은 최 등<sup>11)</sup>과 이 등<sup>16)</sup>이 보고한 *Cellulomonas* sp.의 cellulase 생산에서와 같은 동일한 결과를 보였다. 질소원에서의 최적생산 농도는 CMCase와 FPase는 0.5%에서,  $\beta$ -glucosidase는 0.3%였고 각각 2.0% 첨가시에는 오히려 cellulase 생산이 저하되었다(Table 3).

## 3) 생육인자의 영향

생육인자들이 cellulase 생산에 미치는 영향을 살펴 본 결과, CMCase, FPase 및  $\beta$ -glucosidase 생산은 Bacto soytone과 yeast extract에서 좋았고 FPase의 생산은 yeast extract에서 좋았으며 이는 대조군에 비해 194%의 효소생산 증가가 있었다. 그외의 생육인자들은 효소생산에 별다른 영향을 미치지 못하였고 대부분이 오히려 생산성이 떨어졌다. 생육인자들 중 효소생산에 가장 좋았던 yeast extract의 최적농도는 1.0%로 나타났다(Table 2, 3).

Table 3. Effect of various component concentration on the cellulase production by *Cellulomonas* sp. KL-6

Source	Conc. (%)	Cellulase activity (%)			Source	Conc.(%)	Cellulase activity (%)		
		CMCase	FPase	$\beta$ -Glucosidase			CMCase	FPase	$\beta$ -Glucosidase
CMC	0.5	82	58	70	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05	58	67	
	1.0	93	80	100		0.1	100	100	
	1.5	97	85	95		0.5	92	95	
	2.0	100	100	90		1.0	85	92	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	80	78		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05			100
	0.3	92	88			0.1			60
	0.5	100	100			0.5			13
	1.0	83	93			1.0			—
	2.0	28	40			$\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	0.005	70	33
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.1			90	0.01		82	72	80
	0.3			100	0.05		100	90	100
	0.5			83	0.1		92	100	95
	1.0			75	0.5		73	38	43
	2.0			38	NaCl	0.0	52	58	62
Yeast extract	0.01	68	25	68		0.5	95	95	95
	0.05	80	42	78		0.8	100	100	100
	0.1	92	85	90		1.0	80	82	80
	0.5	95	93	95		2.0	50	53	60
	1.0	100	100	100	3.0	30	30	40	
					4.0	—	—	—	

그러나 본 균을 산업화의 이용쪽으로 생각해 볼때 경비 절약면에서 cellulase 생산이 다소 떨어지더라도 저농도의 양을 사용하는 것이 유리하다고 생각되어 0.1%를 최적생산 농도로 하였다. 이러한 결과는 Han과 Srinivasan<sup>12)</sup>의 보고와 비슷하였다.

#### 4) 인산염의 영향

기본배지에 인산염을 단독 혹은 이들의 1:1(w/w) 혼합물을 첨가하여 cellulase 생산을 조사하였다. Table 2와 같이  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 는 단독 및  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 혼합에서는 cellulase 생산이 없었다. 일반적으로 인산염을 단독 첨가보다는 혼합하여 첨가할때가 cellulase 생산이 좋았고 단독 첨가시에는  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 가, 혼합 첨가시에는  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  및  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 혼합할 때가 좋았다. 생산최대는 CMCase와 FPase가  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 에서,  $\beta$ -glucosidase는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 이었고 최 등<sup>11)</sup>의 보고도 본 실험의 결과와 유사하였다. CMCase, FPase 및  $\beta$ -glucosidase의 최적생산 농도는 Table 3과 같이 CMCase와 FPase는 0.1%,  $\beta$ -glucosidase는 0.05%이었으며 인산염 무첨가구인 대조군에 비해 각각 316%, 244% 및 354%의 상대생산을 나타내어 인산염이 효소생산을 크게 증가시키는 것을 알 수 있었다.  $\beta$ -Glucosidase의 생산은 1.0%의 혼합물에서는 효소생산이 없었다.

#### 5) 금속이온의 영향

금속이온 무첨가구인 대조군과 비교하여 볼때 CMCase, FPase 및  $\beta$ -glucosidase 생산은 단독 첨가시에는  $\text{Mg}^{2+}$  이온을 제외한 다른 금속이온들에서는 생산이 없었다(Table 2). 최 등<sup>11)</sup>이 *Cellulomonas* sp. YE-5의 cel-

lulase 생산에  $\text{Mg}^{2+}$  이온을 제외한 금속이온들은 생산을 저해하고 이 등<sup>16)</sup>이 *Cellulomonas* sp. CS1-1의  $\beta$ -glucosidase 생산은 5 mM의  $\text{Mg}^{2+}$  이온 존재에서 크게 증가한다고 보고한 것과 본 실험 결과는 유사하였다. 기본배지 성분인  $\text{Mg}^{2+}$ 와  $\text{Ca}^{2+}$  이온을 1:1(w/w)로 혼합하여  $\text{Mg}^{2+}$  이온 단독 첨가시와 비교한 결과는 CMCase, FPase 및  $\beta$ -glucosidase 생산이 14~25%가 증가되어 대조군보다 357~385%의 상대생산을 나타내었다. Ng와 Zeikvs<sup>17)</sup>는 *Clostridium thermocellum* LQRI에서 금속이온들을 혼합할때  $\text{Mg}^{2+}$ 와  $\text{Ca}^{2+}$  이온 혼합물을 제외한 이온들의 혼합물에서는 cellulase 생산을 저해한다고 보고하였다.  $\text{Mg}^{2+}$ 와  $\text{Ca}^{2+}$  이온의 혼합물에서의 생산최적 농도는 Table 3과 같이 CMCase와  $\beta$ -glucosidase는 0.05%였고 FPase는 0.1%였다.

#### 6) NaCl의 영향

Cellulase 생산에 미치는 NaCl의 영향을 검토하여 본 결과는 Table 3과 같다. KL-6 균주의 증식에 좋았던<sup>9)</sup> 0.6%와 0.8%의 NaCl의 농도에서 cellulase 생산도 높았다. 최대생산은 NaCl 0.8%를 첨가할 때 이었으며 NaCl을 2.0% 이상 첨가시에는 cellulase 생산이 대조군보다 저해되어 4.0% 첨가시에는 생산이 없었다.

#### 7) 초발 pH 및 배양온도의 영향

기본배지의 pH를 달리하여 배양했을 때 Fig. 2에서와 같이 cellulase 생산최적 pH는 9.0 이었고 pH 8.0에서는 CMCase가 95%, FPase가 93%,  $\beta$ -glucosidase가 90%의 상대생산을 나타내었다. 이는 최 등<sup>11)</sup>과 한과 김<sup>18)</sup>이 보고한 최대생산 pH인 6.5와 상이하였다. 배양온도를 20~50°C로 하여 cellulase 생산을 조사한 결과는 Fig. 3과

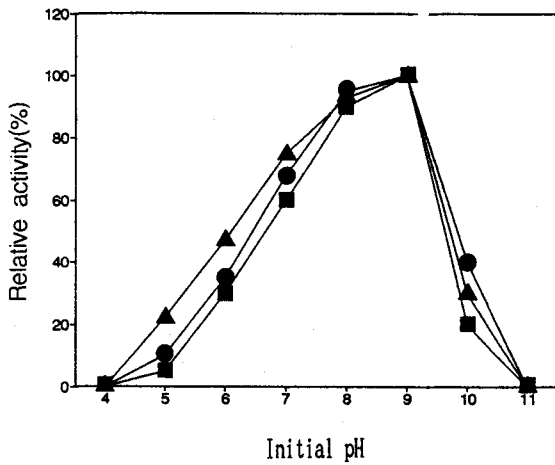


Fig. 2. Effect of pH on the callylase production by *Cellulomonas* sp. KL-6. CMC medium was used for the experiment. ●-●, CMCase; ▲-▲, FPase; ■-■, β-Glucosidase.

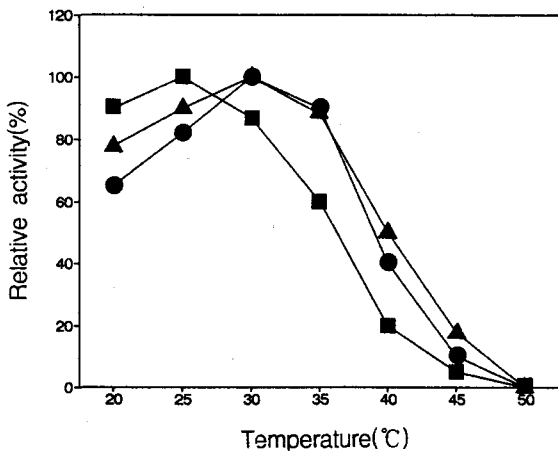


Fig. 3. Effect of temperature on the callylase production by *Cellulomonas* sp. KL-6. Medium was the same as in Fig. 2. ●-●, CMCase; ▲-▲, FPase; ■-■, β-Glucosidase.

같다. CMCase와 FPase는 30~35°C에서, β-glucosidase는 20~30°C에서 각각 배양하였을 경우가 효소생산이 높았다. 이와같은 결과는 최 등<sup>11)</sup>과 Han과 Kim<sup>18)</sup>도 본 결과와 유사하였다. 이상의 결과로 최적 생산조건은 CMCase는 CMC 2.0%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, yeast extract 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.05%, NaCl 0.8%, pH 9.0 및 온도 30°C로 나타났고 FPase는 CMC 2.0%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, yeast extract 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, CaCl<sub>2</sub> 0.1%, NaCl 0.8%, pH 9.0 및 온도 30°C 이었으며 β-glucosidase는 CMC 1.0%, NH<sub>4</sub>Cl 0.3%, yeast extract 0.1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.05%, NaCl 0.8%, pH 9.0 및 온도 25°C이었다.

#### CaCO<sub>3</sub> 첨가효과

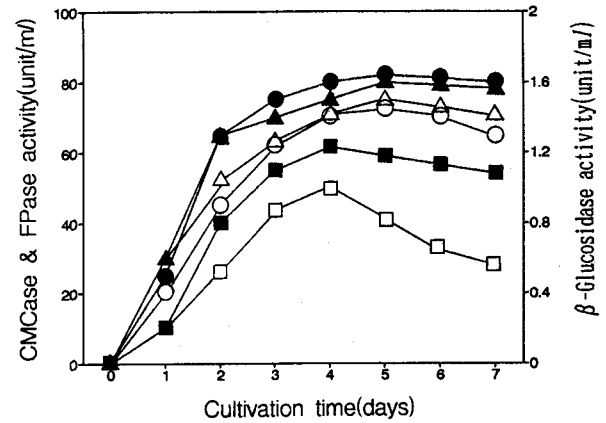


Fig. 4. Effect of calcium carbonate to optimal producing conditions of the cellulase. Control: ○-○, CMCase; △-△, FPase; □-□, β-Glucosidase. 0.1% CaCO<sub>3</sub>: ●-●, CMCase; ▲-▲, FPase; ■-■, β-Glucosidase.

0.1% 이상의 CaCO<sub>3</sub> 첨가는 배지중의 산성물질을 중화하여 균체증식을 향상시킨다고 보고<sup>9)</sup>된 바 있어 본 실험에서도 CMCase, FPase 및 β-glucosidase의 최적 생산배지에 0.1%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 cellulase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 4에서와 같이 CMCase와 FPase의 생산은 배양 5일째에 82 unit/ml와 80 unit/ml로, β-glucosidase의 생산은 배양 4일째에 1.2 unit/ml로 각각 최대생산을 나타내었고 무첨가보다는 CMCase는 14%, FPase는 4% 및 β-glucosidase는 22%의 효소생산 증가를 가져 왔으며 배양 7일째까지 효소생산을 유지하는 것으로 나타나 첨가효과가 인정되었다. 이로서 KL-6 균주의 cellulase 생산을 증가시키기 위해서는 pH를 중성에서 약 알칼리로 유지시켜 주는 것이 중요함을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 기본배지의 CMCase, FPase 및 β-glucosidase의 54, 58 및 0.67 unit/ml 보다 약 60~70% 정도의 효소생산이 증가되어 차후 KL-6 균주로 섬유소를 분해시 유리한 조건이 되리라 생각된다.

#### Laccase와 lignase의 활성

일반적으로 ligno-cellulose를 기질로 사용하였을 때는 미생물에 의한 분해나 효소에 의하여 분해를 거의 받지 않으므로 섬유소 분해를 촉진하거나 식물체를 기질로 SCP를 생산할 때 기질이용을 높이기 위해서는 lignin을 제거하는 것이 중요하다. 이에 lignin을 분해하는 laccase나 lignase의 생산을 CMC 배지의 CMC 대신 filter paper(whatman No. 1, 1×6 cm/10 ml)를 첨가한 배지에 KL-6 균주를 접종하여 7일간 배양하면서 조사한 결과, 본 균주는 laccase를 생산하지 못하였으며 lignase 생산도 전 배양기간동안 변화가 없었다. 이로 미루어 KL-6 균주는 섬유소와 결합된 lignin을 가수분해하지 못해 이를 제거하기 위한 일련의 전처리 방법이 선행 되어져야 함을 알 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 93년도 농업산학협동 용역 연구과제 연구비 지원에 의해 일부 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

## 참고 문헌

1. 정기철 (1987) 섬유소 분해효소 생산증진을 위한 *Penicillium verruculosum*의 균주개발. 산업미생물학회지 **15**(6), 388-395.
2. Reese, E. T., R. G. H. Siu, and H. S. Levinson (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* **59**, 485-497.
3. Gritzali, M., R. D. Brown (1979) The cellulase system of *Trichoderma*. *Adv. Chem.* **181**, 237-260.
4. Tamada, M., N. Kasai, and I. Kaetsu (1988) Estimation of cellulase activity based on glucose productivity. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 920-922.
5. Reese, E. T., and M. Mandels (1980) Stability of the cellulase of *Trichoderma reesei* under use conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 323-335.
6. Williams, W. S., and R. E. Cannon (1989) Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10), 2448-2452.
7. Wachinger, G., K. Bronnenmeier, W. L. Stavdenbaver, and H. Schrempf (1989) Identification of mycelium-associated cellulose from *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10), 2653-2657.
8. Kubo, K., and K. Nisizawa (1983) Purification and properties of two endo type cellulase from *Irpex lacteus*(polyporus tulipiferae). *J. Ferment. Technol.* **61**(4), 383-389.
9. 권오진, 정영건 (1994) 섬유소 분해세균의 분리 및 생리적인 특성. 한국농화학회지 **37**(4), 226-233.
10. Gokhale, D. V., and D. N. Deobagkar (1989) Differential expression of xylanases and endoglucanases in the hybrid debrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10), 2675-2680.
11. 최동철, 허남윤, 유주현, 오두환 (1990) *Cellulomonas* sp. YE-5가 생산하는 cellulase의 정제. 산업미생물학회지 **18**(4), 376-382.
12. Han, Y. W., and V. R. Srinivasan (1969) Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol.* **100**(3), 1355-1363.
13. Bollag, J. M., and A. Leonowicz (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(4), 849-854.
14. Ball, A. S., W. B. Betts, and A. J. McCarthy (1989) Degradation of lignin related compounds by *Actinomycetes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(6), 1642-1644.
15. 김도만, 이계호 (1990) *Bacillus pumilus*와 *Cellulomonas fimi*의 이속간 원형질체 융합에 의한 균체의 분비성  $\beta$ -glucosidase 생산균주의 개발. 산업미생물학회지 **18**(2), 115-120.
16. 이희순, 민경희, 배 무(1988) *Cellulomonas* sp. CS1-1으로 부터의  $\beta$ -glucosidase의 합성조절과 그의 효소학적 성질. 산업미생물학회지 **16**(2), 119-125.
17. Ng, T. K., and J. G. Zeikvs (1981) Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM 9414. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(2), 231-240.
18. Han, D. P., and T. Y. Kim (1979) Isolation and characterization of a cellulase from *Cellulomonas* sp. ATCC 21399. *Kor. Biochem. J.* **20**(3), 273-278.

### Production of Cellulase from *Cellulomonas* sp. KL-6

Oh-Jin Kwon<sup>1\*</sup> and Yung-Gun Chung<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, PO Box 105, Yusong, Taejeon 305-353, Korea; <sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

**Abstract:** Among the cellulases by *Cellulomonas* sp. KL-6, CMCCase and filter paperase, which were produced as the out enzymes of cell, had been much produced, but very small amounts of  $\beta$ -glucosidase, the enzyme of which is cell bound form, was produced by this organism. The optimal culture times for CMCCase and filter paperase productions were 5 days, while that of  $\beta$ -glucosidase was 4 days. When this strain was cultured under the optimal medium for enzyme production, CMCCase, FPase and  $\beta$ -glucosidase were 82 units/ml, 80 units/ml and 1.2 units/ml, respectively. Thus these results were showed to increase enzyme productivities as about 60~70% than those produced in basal medium.  $\text{CaCO}_3$  injected to the medium as the ratio of 0.1% was not only enhanced cellulase activities but also effective as acid neutralizing agent. The production effects of lignase and laccase by this bacterium in filter paper medium was not appeared.

\*Corresponding author