

## 토양으로부터 Cellulose 분해효소를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 최적배양조건의 결정

함병권 · 김윤근 · 유주현\* · 배동훈

단국대학교 식품공학과

\*연세대학교 생명공학과

### Isolation and Identification of Cellulase-producing Microorganism, and Determination of Optimal Culture Condition

Byoung-Kwon Hahm, Yoon-Keun Kim, Ju-Hyun Yu\* and Dong-Hoon Bai

Department of Food Engineering, Dankook University

\*Department of Biotechnology, Yonsei University

#### Abstract

The strain No. 33, which produces cellulose-degrading enzyme, was isolated from soil. Yellow halo was identified when the culture supernatant of the strain was loaded onto agar plate containing 2.0% CMC using paper disc method. From scanning electron microscopic observation, the morphology of the stain was rod-shaped. For identification, several biochemical characteristics were tested, and this strain was identified to *Bacillus* sp. So, we named this strain as *Bacillus* sp. No. 33. The maximal growth was observed when the stain was cultured in the medium containing 1.0% glucose, 3.0% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0 at 30°C for 39 hours with shaking. The maximal enzyme production was accomplished using the medium containing 4.0% CMC, 2.0% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0 at 30°C for 42 hours with shaking.

Key words: Cellulose-degrading enzyme, *Bacillus* sp.

#### 서 론

Cellulose는 6,000~10,000개 정도의 glu-copyranoside가 주로  $\beta$ -1,4 결합에 의해 연결되고 약간의 cross linkage로 축합된 고분자 화합물이며, 식물세포막의 주요 구성성분으로서 자연계에 널리 분포되어 있는 풍부한 탄수화물이다. 그러나, 그 이용면에 있어 매우 제한적이며 영양적 섭취라는 관점에서는 극히 부분적으로 반유동물이나 일부의 미생물에 의해 분해·이용될 뿐이다. Cellulose는 전통적으로 화학적, 효소적 분해에 대해 비교적 안정한 천연상태로 직접 pulp, 건축재, 의류 및 연료로써 이용되었다. 그러나, 1970년대 초 석유파동을 거치면서 cellulose가 화석자원과는 달리 계속 축적되는 탄소원이라는 점에서 식량과 에너지자원으로 이용하고자 cellulose를 가수분

해하여 SCP (Single cell protein)나 알콜생산 등의 간접적 이용 및 폐수처리에 이르기까지 많은 연구가 보고되어 있다<sup>(1)</sup>.

Cellulose를 분해하는 효소인 cellulase ( $\beta$ -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase 또는  $\beta$ -1,4-glucanase)는 단일효소가 아닌 3종류의 성분, 즉, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (CMCase), exo- $\beta$ -1,4-glucanase (Avicellase), 그리고  $\beta$ -glucosidase (Cellobiase)로 이루어져 있다<sup>(2)</sup>. Endoglucanase는 cellulose 분자에 무작위적으로 작용하여 비환원성 말단을 지닌 oligomer를 형성하며, 이들은 exoglucanase에 의해 차례로 cellobiose 단위로 분해되고 최종적으로  $\beta$ -glucosidase에 의해 glucose로 분해된다<sup>(3)</sup>. Cellulose 분해효소를 생산하는 미생물로는 *Cellulomonas* 속<sup>(4,6)</sup>, *Pseudomonas* 속<sup>(7,8)</sup>, *Clostridium* 속<sup>(9,11)</sup>, *Cellobivrio* 속<sup>(12,13)</sup>, 그리고 *Cytophaga* 속<sup>(14)</sup> 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 토양과 퇴비 등에서 cellulose 자화력이 있는 미생물을 분리하고, 이들 균주 중 cellulose 분

Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Anseo-dong, Chunan, Chungnam 330-714, Korea

해능이 우수한 균주를 선별하여 균주의 동정, 최적생육조건, 그리고 효소생산 최적조건 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### Cellulose 자화미생물의 분리

Cellulose 분해효소를 생산하는 미생물의 분리를 목적으로 충청남도 지역의 토양을 채취하여 토양시료로서 사용하였다. Carboxymethyl cellulose (CMC)가 0.5%의 농도로 함유된 선택배지 (0.5% CMC, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0)를 사용하여 3일간 평판희석 배양한 후, plate에 0.5% Congo red 용액을 처리하여 30분간 염색하였다. 반응하지 않은 Congo red 용액을 제거 후, 1 M NaCl 용액으로 15분간 처리하여 colony 주위에 노란색의 환을 형성하는 colony를 취하여 CMC 한천배지(1.0% CMC, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, pH 7.0)에 사면 배양하여 4°C에서 보관하였다.

### 균주의 동정

본 효소를 생산하는 균주를 동정하기 위하여 균주의 형태학적, 생리학적 특성 등을 검토하였다. 본 균주를 전자현미경을 이용하여 그 형태를 확인하였으며, 생리학적 특성은 Microbiological applications<sup>(15)</sup>의 방법에 준하여 조사하였다. 세포벽에 존재하는 지방산의 조성은 본 균주를 Tryptic Soy Agar (TSA, 1.5% Pancreatic digest of casein, 0.5% Pancreatic digest of soybean meal, 0.5% NaCl, 1.5% agar, pH 7.3) 배지와 TSA 배지에 5%의 sheep blood가 함유된 CLNI 배지를 이용하여 배양 후 MIDI사의 Sherlock program을 이용하여 결정하였으며, 각종 탄소원에 대한 자화성은 bioMerieux 사의 api 50 CH kit를 이용하여 결정하였다. 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>(16)</sup>에 준하여 동정하였다.

### 균주의 생육 및 효소생산 최적조건의 결정

선정된 균주의 생육과 최적 효소생산의 검토는 기본배지(1.0% CMC, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0)를 이용하여 각종 탄소원, 질소원 및 무기염류 등을 달리하여 검토하였다. 30°C에서 48시간 동안 배양한 중배양액을 본 배양액에 1.0% (v/v)로 접종하여 3일 간 배양하였다.

### 효소활성의 측정

1.0% CMC가 함유된 반응액(50 mM phosphate buffer,

pH 7.0) 0.5 mL에 효소액 0.5 mL을 가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열처리하여 효소반응을 정지시켰다. 이 때 효소액을 100°C에서 20분간 가열처리하여 효소를 불활성화시킨 것을 대조구로 사용하였다. 생성된 환원당의 양은 DNS법<sup>(17)</sup>을 이용하여 측정하였다. 반응액 300  $\mu\text{L}$ 에 DNS 용액 3 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열처리한 후 냉각하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose를 standard로 하여 1분 동안 1  $\mu\text{mole}$ 의 glucose를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리

토양으로부터 cellulose 분해활성을 나타내는 미생물을 분리하기 위하여 0.5% CMC가 함유된 평판배지에서 토양시료로부터 분리한 균주들을 배양한 후, 상기의 방법으로 cellulose 분해효소를 생산하는 균주들을 1차적으로 선별하였다. 이 중 선택배지 상에서 가장 큰 환을 형성하며 진탕배양시 가장 높은 효소활성을 나타내는 strain No. 33 균주를 선정하여 본 실험에 사용하였다(Fig. 1).

### 균주의 동정

본 균주의 형태를 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 본 균주는 간균의 형태였으며, 표면은 매끄러운 형태였다. 생리학적 및 배양학적 특성을 검토한 결과, 본 균주는 그람양성의 통성형 기성균이었으며 포자를 형성하였고, catalase test는 양

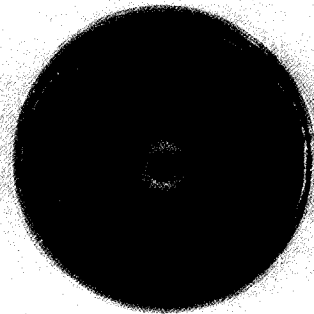


Fig. 1. Degradation of CMC by culture supernatant of strain No. 33.



Fig. 2. The morphology of strain No. 33 ( $\times 13,000$ ).

성의 결과를, acid-fast staining과 oxidase test는 음성의 결과를 나타내었다(Table 1). 본 균주의 각종 탄소원에 대한 자화성을 검토한 결과 glucose, glycerol, fructose, ribose, cellobiose, maltose, trehalose, sucrose, salicine 등은 이용하였으나, arabinose, xylose, mannitol, inositol, lactose, sorbitol, galactose, mannose 등은 이용하지 못하였다(Table 2). 이상의 결과와 세포벽 내의 지방산 조성분석으로부터(data not shown) 본 균주는 *Bacillus*속으로 동정되었다. 이에 본 균주를 *Bacillus* sp. No. 33으로 명명하였다.

#### 균체생육에 미치는 배지성분 및 함량의 영향

균체생육을 위한 최적 배지조성을 검토하기 위하여 기본배지에 각종 탄소원을 1.0% (w/v)로 첨가하고 균주의 증배양액을 1.0% (w/v)로 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양한 후 균체생육을 검토하였다. 그 결과 glucose를 탄소원으로 사용하였을 때 가장 좋

Table 1. Biochemical characteristics of strain No. 33

| Tests              | Results              |
|--------------------|----------------------|
| Gram's staining    | +                    |
| Spore staining     | +                    |
| Acid-fast staining | +                    |
| Motility           | +                    |
| Oxidase test       | ---                  |
| Catalase test      | +                    |
| Oxygen requirement | Facultative anaerobe |

Table 2. Utilization of carbon sources of strain No. 33

| Carbon sources | Result |
|----------------|--------|
| Glycerol       | +      |
| Arabinose      | ---    |
| Ribose         | +      |
| Xylose         | ---    |
| Galactose      | ---    |
| Glucose        | +      |
| Fructose       | +      |
| Mannose        | ---    |
| Inositol       | ---    |
| Mannitol       | ---    |
| Sorbitol       | ---    |
| Salicine       | +      |
| Cellobiose     | +      |
| Maltose        | +      |
| Lactose        | ---    |
| Sucrose        | +      |
| Trehalose      | +      |

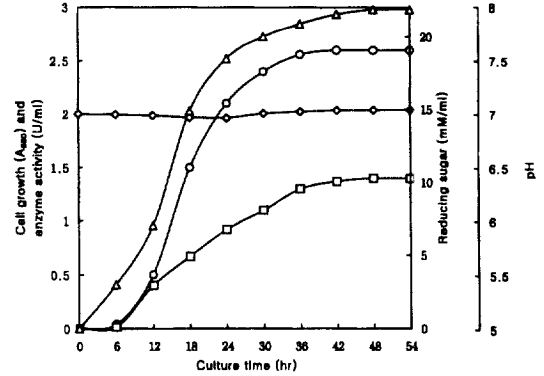
은 생육을 나타내었으며, maltose와 CMC의 경우는 glucose를 사용하였을 경우에 비해 각각 88%, 80%의 생육을 나타내었다. Glucose의 농도별 영향을 검토한 결과 1.0%의 농도로 사용하였을 때 가장 좋은 생육효과를 나타내었다. Glucose가 1.0%로 함유된 기본배지에 peptone, tryptone, yeast extract, ammonium sulfate, ammonium oxalate, ammonium citrate, ammonium chloride, ammonium acetate, urea 등의 각종 질소원을 1.0%의 농도로 첨가하여 질소원의 영향을 검토한 결과 yeast extract 첨가시 가장 효과가 좋았으며, 이와 비교하여 tryptone의 경우는 72%, peptone의 경우는 69%의 생육을 나타내었다. 각종 ammonium염을 질소원으로 사용한 경우는 균의 생육이 관찰되지 않았다. 또한 3.0%의 yeast extract를 사용하였을 때 가장 생육이 잘 되었다. 1.0% glucose, 3.0% yeast extract가 함유된 기본배지 상에서  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4$  등의 각종 무기염이 균체생육에 미치는 영향을 검토한 결과,  $Mg^{2+}$  이온을 제외한 금속류는 오히려 균체생육을 저해하였다.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도별 영향을 검토한 결과, 농도에 따른 큰 영향은 나타나지 않았으나, 비교적 0.02%의 농도에서 균체생육이 양호하였고, 그 이상의 농도에서는 대조구와 비교시 별다른 차이를 나타내지 않았다. 균체생육에 미치는 최적 배양초기 pH 및 배양온도는 각각 pH 7.0, 30°C였으며, 이상의 조건에서 균체의 생육은 배양 12시간부터 점차 증가하기 시작하여 39시간에서 최대의 생육을 나타내었고, 42시간 이후부터는 정지기의 형태를 나타내었다. 균체생육에 대한 최적조건을 Table 3에 나타내었다.

**Table 3. Optimal culture condition for cell growth and enzyme production**

|                    | Cell growth  | Enzyme production  |
|--------------------|--|--|
| Medium composition | 1.0% Glucose<br>3.0% Yeast extract<br>0.5% $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 4.0% CMC<br>2.0% Yeast extract<br>0.5% $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| pH                 | 7.0  | 7.0  |
| Temperature        | 30°C   | 30°C   |
| Culture time       | 39 hours   | 42 hours   |

### 효소생산에 미치는 배지성분 및 함량의 영향

효소생산을 위한 최적 배지조성을 검토하기 위하여 각종 탄소원을 최적 균체생육조건 결정시의 방법과 동일하게 실험하였다. 그 결과 CMC를 사용하였을 때 가장 좋은 효과를 나타내었으며, 균체생육시의 최적 탄소원인 glucose는 CMC와 비교하였을 때 67%의 활성을 나타내었다. 이는 *Cellulomonas*속이 생산하는 cellulase 분해효소가 1.0%의 glucose를 첨가하였을 경우 cellulase 분해활성이 나타나지 않았다는 보고와는 차이가 있었다<sup>(6)</sup>. 또한 *Bacillus cereus* RW1이 생산하는 cellulase 분해효소의 경우 배양액에 glucose를 첨가하였을 때 균체의 생육보다는 효소의 생산이 증가하였다는 보고와도 차이가 있었다<sup>(8)</sup>. 그러나, *Clostridium cellulovorans*가 생산하는 cellulase 분해효소의 경우, 탄소원으로서 cellulase가 첨가되었을 때 효소의 생산이 증가되었다는 보고와는 일치하였다<sup>(10)</sup>. 효소생산의 최적 CMC의 농도는 4.0%로 확인되었다. 질소원의 경우는 균체생육시와 마찬가지로 yeast extract를 사용하였을 때 가장 좋은 효과를 나타내었으며, 이와 비교하여 tryptone의 경우는 69%, peptone의 경우는 77%의 활성을 나타내었다. 한편, 무기질소원을 사용하였을 경우는 매우 낮은 활성을 나타내었으며, ammonium acetate나 urea의 경우는 대조구와 비교해 별다른 차이를 나타내지 않았다. Yeast extract의 경우 2.0%의 농도로 배양하였을 때 가장 좋은 효소생산을 얻을 수 있었다. 각종 금속이온을 0.1%의 농도로 첨가 후 효소생산에 대한 영향을 검토한 결과,  $\text{MgSO}_4$ 를 사용할 때 가장 좋은 생산을 나타내었으며,  $\text{MnSO}_4$ 와  $\text{ZnSO}_4$ 의 경우 각각 95%, 91%의 상대활성을 나타내었다. 최대 효소생산은 0.04%의  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 배양하였을 때 얻을 수 있었다. 효소생산에 미치는 배양초기 pH의 영향을 검토한 결과 pH 7.0에서 최대 효소생산을 나타내었고, pH 6.0에서는 73%의 상대활성을 나타내었다. 최적 배양온도를 검토한 결과



**Fig. 3. Time course of cellulase production, pH and reducing sugar contents during cell growth.** ○—○: cell growth, □—□: enzyme activity, ◇—◇: pH, △—△: reducing sugar.

30°C에서 최대 효소생산을 나타내었으며, 35°C의 경우는 11%의 상대활성을 나타내었다. 이는 *Clostridium acetobutylicum*이 생산하는 cellulase 분해효소생산의 최적 pH 및 배양온도가 각각 pH 4.6, 37°C라는 보고와 차이가 있었다<sup>(11)</sup>. 이상의 조건에서 배양하였을 때 42시간에서 최대의 효소생산을 나타내었다(Table 3).

최적 효소생산조건에서 균체를 배양하며 각 시간별로 균주의 생육과 효소생산, pH의 변화 및 환원당량의 변화를 검토한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 균체의 생육은 접종 후 36시간이 지나면서 정지기에 들어갔으며 효소생산은 배양 12시간부터 점차 증가하기 시작하여 42시간에서 최대의 효소생산을 나타내었고 배양 54시간까지 효소활성이 발효상등액에서 안정적으로 유지되었다. 환원당량은 배양 48시간에 최대량을 나타내었으며, 그 이후에도 안정한 값을 유지하였다. pH는 배양시간에 따라 거의 변화를 나타내지 않았다.

## 요 약

Cellulose를 효과적으로 분해하는 효소를 생산하는 미생물인 strain No. 33 균주를 토양으로부터 분리하였다. 본 균주의 배양상등액을 2.0%의 CMC가 함유된 agar 평판배지에 paper disc법을 이용하여 loading 후 cellulase 분해활성을 검토하였을 때, disc 주위로 노란색의 환이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 본 균주를 동정하기 위하여 전자현미경으로 그 형태를 관찰한 결과 본 균주는 간균의 형태였으며, 생리학적 특성을 검토한 결과 *Bacillus*속으로 동정되었다. 이에 본 균주를 *Bacillus* sp. No. 33으로 명명하였다. 본 균주는 1.0% glucose, 3.0% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O가 함유된 pH 7.0의 배지에서 30°C로 39시간 동안 진탕배양하였을 때 최대 균체생육을 나타내었다. 효소생산은 4.0% CMC, 2.0% yeast extract, 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0의 조건에서 30°C, 42시간 동안 진탕배양하였을 때 최대 효소생산을 나타내었다.

### 감사의 글

본 연구는 1996년도 단국대학교 교내 학술연구비 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- Chey, D.C., Hur, N.Y., Yu, J.H. and Oh, D.H.: *Celulomonas* sp. YE-5가 생산하는 cellulase의 정제. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 376 (1990)
- Malik, K.A., Kausar, F. and Azam, F.: Effect of sodium chloride on the cellulolytic ability of some aspergilli. *Mycologia*, **72**, 322 (1980)
- 유주현 : 유전공학 국내연수 VII. Screening. 한국유전공학 연구조합. p.65 (1988)
- Beguín, P. and Eisen, H.: Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from *Celulomonas* sp. *Eur. J. Biochem.*, **87**, 525 (1978)
- Stewart, B.J. and Leatherwood, J.M.: Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *J. Bacteriol.*, **128**, 609 (1976)
- Gilkes, N.R., Langsford, M.L., Kilburn, D.G., Miller, R. C.Jr. and Warren, R.A.: Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.*, **259**, 10455 (1984)
- Yamane, K., Yoshikawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K.: Localization of cellulase components in *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **69**, 771 (1971)
- Yoshikawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K.: Biogenesis of multiple cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. I. Effects of culture conditions on the multiplicity of cellulase. *J. Biochem. (Tokyo)*, **75**, 531 (1974)
- Ng, T.K. and Zeikus, J.G.: Purification and characterization of an endoglucanase (1,4-beta-D-glucan glucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.*, **199**, 341 (1981)
- Matano, Y., Park, J.S., Goldstein, M.A. and Doi, R.H.: Cellulose promotes extracellular assembly of *Clostridium cellulovorans* cellulosomes. *J. Bacteriol.*, **176**, 6952 (1994)
- Allcock, E.R. and Woods, D.R.: Carboxymethyl cellulase and cellobiase production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 539 (1981)
- Oberkotter, L.V. and Rosenbergh, F.A.: Extracellular endo-beta-1,4-glucanase in *Cellvibrio vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 205 (1978)
- Berg, B., Hofsten, B.V. and Pettersson, G.: Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **35**, 201 (1972)
- Chang, W.T. and Thayer, D.W.: The cellulase system of a *Cytophaga* species. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1285 (1977)
- Benson, H.J.: *Microbiological Applications*, 5th ed. WCB (1990)
- Sneath, P.H.A., Mair N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Vol. 2, p.1105 (1986)
- Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- Thayer, D.W.: Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J. Gen. Microbiol.*, **106**, 13 (1978)

(1997년 6월 25일 접수)