

## 알칼리성 Cellulase를 생산하는 호알칼리성 *Bacillus* sp. HSH-810의 분리 및 효소 특성

김지연<sup>1</sup> · 허성호<sup>2</sup> · 홍정화\*

인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, <sup>1</sup>인제대학교 유전체연구소, <sup>2</sup>동의공업대학 식품생명과학과

일반 토양과 부엽토, 퇴비로부터 alkaline cellulase 생성이 우수한 균주를 분리한 후 형태적, 배양학적 및 생화학적 동정을 실시한 결과 호알칼리성 *Bacillus* sp. HSH-810 균주인 것으로 판명되었다. 분리된 *Bacillus* sp. HSH-810의 생육과 효소 활성은 30°C와 pH 10.0에서 가장 높은 것으로 나타났다. 본 균주는 배지 중에 탄소원과 질소원, 무기염으로 1.0%의 CMC와 0.5%의 peptone, 0.02%의 CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>를 사용하였을 경우 최대의 alkaline cellulase 생산성을 나타내었다. 효소의 최적 활성 pH와 온도는 각각 10.5와 50°C였다. 이 효소는 pH 6.0-13.0과 50°C의 온도에서 매우 안정하였다. 효소액에 계면활성제를 첨가하여 효소 활성을 측정된 결과, 효소액은 sodium- $\alpha$ -olefin sulfonate (AOS)와 sodium dodecyl sulfonate (SDS), Tween 20, Tween 80에 대하여 안정성이 높은 특징을 보였으나 0.1%의 linear alkyl-benzene sulfonate (LAS)를 첨가한 경우에는 효소 활성이 심하게 저해되었다.

**Key words** □ alkaline cellulase, alkalophilic, *Bacillus* sp., identification, isolation

자연계에는 생물의 생육이 불가능하다고 생각되는 고온, 고압, 강산 및 강알칼리 등과 같은 극한 환경에서도 생육이 가능한 생물군이 상당수 존재하는 것으로 알려지고 있다. 이러한 특수 환경에서 생육하는 생물은 자신의 주위 환경 조건에 적응할 수 있는 생체 체계를 구성하기 위하여 독특한 효소나 각종의 대사 산물을 생성하는데 이들은 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다. 그 대표적인 예가 호알칼리성 미생물로서 일반적으로 호알칼리성 미생물은 보통 미생물의 생육이 불가능한 pH 9.0-11.0의 강알칼리성 환경에서 왕성하게 생육하나 중성 이하에서는 생육하지 못하는 미생물이다(7). 강알칼리의 극한 환경에서 생육하는 미생물은 약산성 내지 중성에서 생육하고 있는 미생물에 비하여 효소학, 생리학, 생태학 및 분류학적인 특징이 다르다고 알려져 있다. 이 알칼리성 미생물에 대해서는 *Bacillus* 속 세균이 대부분을 차지할 정도로 많이 분리되었고 이들이 생산하는 특유한 효소는 잡곡 오염 방지와 일부 공정의 생략으로 인하여 발효공업과 식품공업, 세제공업 등 생물 화학공업에 안정성을 부여하므로 산업적으로 이용하려는 연구가 진행되고 있다. *Bacillus*는 분자유전학 측면에서 볼 때 그람 양성 세균에서 가장 잘 규명된 속 중 하나이다. *Bacillus* 속의 몇 가지 종들은 상이한 활성을 가진 세포 외 분해 효소를 다양하게 분비하여 여러 가지 기질들을 분해함으로써 유전자 및 효소 수준, 그리고 산업적으로 폭넓게 연구되고 있다. 호알칼리성 *Bacillus* 속 균주가 생성한 알칼리성 효소에 관한 연구는 protease와 amylase, cyclodextrin glucanotransferase, phosphatase,  $\beta$ -mannosidase, galactanase, phospho-diesterase,

xylanase,  $\beta$ -1,3-glucanase 등인데 기존 *Bacillus* 속의 균종과는 배양학적인 특성이 다르고 각 균주가 생성한 효소와 성질에는 많은 차이가 있는 것으로 보고 되었다(1, 4, 5, 8, 9, 18, 19, 20, 22).

일반적으로 cellulase는 복합효소 체계(multi-enzyme complex)를 가지고 있으며 endo- $\beta$ -1,4-glucanase (carboxymethyl cellulase, CMCCase)와 exo- $\beta$ -1,4-glucanase,  $\beta$ -glucosidase의 3가지 component로 구성되어 있다. 이들 복합 효소 중 endo- $\beta$ -1,4-glucanase가 endo- $\beta$ -1,4-glucosidic linkage에 무작위로 작용하여 비환원 말단을 가진 저분자의 cellulose chain을 생성하면 exo- $\beta$ -1,4-glucanase가 작용하여 cellulose chain의 비환원 말단으로부터 cellobiose와 glucose 단위로 분해하고 최종적으로  $\beta$ -1,4-glucosidase에 의하여 cellobiose 또는 short chain oligosaccharide를 glucose 단위로 전환시킨다(2). 이러한 cellulose의 분해 산물인 glucose와 xylose, oligosaccharide는 유용성 물질 생산을 위한 산업적인 중요성과 그 작용 방식의 특이성 때문에 학문적으로 매우 중요한 의미를 갖고 있으며, cellulase component 중에서 CMCCase는 세계의 효율성을 향상시키는 첨가물, 즉 효소세제로서의 효용가치가 매우 높음이 밝혀지고 있다(10, 12).

최근에는 호알칼리성 미생물의 우량 균주가 생성하는 알칼리성 cellulase를 개발하여 합성세제의 조성물인 계면활성제, 착화합물(chelating agent) 및 단백질 가수분해 효소(protease) 등에 대한 안정성이 높은 세제 첨가용 효소로서의 연구가 진행되고 있다(10). 이러한 호알칼리성 미생물의 효소 생성능이 중성균에 비하여 낮은 것이 단점으로 지적되나, pH 10.0 이상에서 최적 생육과 효소 생성능을 보이므로 잡곡의 오염을 방지할 수 있고 biomass 전처리에 알칼리를 처리하는 경우가 많으므로 중화 공정의 생략으로 인한 경비 절감에 크게 기여할 것으로 믿어진다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 055-320-3237, Fax: 055-321-0691  
E-mail: fdsnhhon@inje.ac.kr

따라서 cellulase를 세제의 첨가물로 사용하기 위해서는 알칼리 영역에서 효소 활성이 높고 계면활성제, chelating agent 및 protease 등에 안정성이 높은 cellulase의 대량 생산이 요구된다.

본 연구에서는 자연계로부터 알칼리성 cellulase 생성능이 우수한 *Bacillus* 속 균주를 분리·동정하여 배양학적 특성과 생리학적 특성, 효소학적 특성을 조사함으로써 산업적으로 활용하는데 있어서 기초토대를 마련하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 배지

알칼리성 cellulase를 생산하는 균주의 분리에는 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 조정된 pH 10.0의 PYC 평판 배지(1.0% carboxymethyl cellulose, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5% NaCl, 1.5% agar)를 사용하였다.

### 알칼리성 cellulase 생산 균주의 분리 및 배양

알칼리성 cellulase를 생산하는 균주를 분리하기 위해 일반 토양, 부엽토 및 퇴비 등 각종 균원 시료를 집적배양하여 10 ml의 0.88%(w/v) NaCl 용액에 현탁시켰다. 각 시료 0.1 ml을 PYC 분리용 평판 배지에 균일하게 도말하여 30°C에서 72시간 배양한 뒤 0.1% Congo red로 염색하여 노란색 투명환(halo)의 크기에 따라 1차 선별하였다. 그리고 PYC 배지에서 carboxymethyl cellulose (CMC)를 제거한 후 동일 농도의 avicel, cellobiose, filter paper, xylan 등을 첨가하여 조제된 배지에 선발된 균주를 접종하여 30°C에서 72시간 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리한 상등액의 cellulase complex 및 xylanase 활성을 조사하여 효소 활성이 높고 생육이 우수한 CMCase 생산 균주를 최종 선별하였다.

### 알칼리성 cellulase 생산 균주의 동정

선정된 균주의 형태적, 배양학적, 생화학적 성질 및 당 자화성은 기존의 방법인 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 따라 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's manual of determinative bacteriology 및 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의하여 동정하였다(3, 11, 16).

### 배양시간에 따른 균주의 성장과 효소 생산

선정 균주의 성장 정도는 분광 광도계를 사용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 결정하였으며, 균주를 액체 배양하여 얻은 배양 상등액으로 효소 활성을 측정하였다.

### 알칼리성 cellulase 활성 측정

효소 생산을 위한 배지에서 30°C, 72시간 진탕배양한 배양액을 10,000 × g에서 20분간 원심분리하였다. 그 상등액을 55-80% ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 하룻밤 방치하여 효소단백질을 침전시켰다. 이 침전단백질을 10,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 4°C에서

48시간 동안 연속 투석한 용액을 효소 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 0.1 ml과 0.05 M glycine-NaOH 완충용액(pH 10.0)에 용해된 1%(w/v) CMC 기질용액 0.5 ml를 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. CMC 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)에 의한 방법에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량하였으며 50°C에서 1분간 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다(17).

### 효소 활성의 최적 조건

#### 1) pH

효소 활성 최적 pH는 0.05 M McIlvaine's 완충용액(pH 3.0-6.0), 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.0-8.0), 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0-8.9), 0.05 M glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0-10.5), 0.05 M sodium phosphate-NaOH 완충용액(pH 11.0-12.0), 0.05 M KCl-NaOH 완충용액(pH 12.0-13.0)을 사용, 각각의 pH에서 최적 온도로 효소 활성을 측정하여 결정하였다.

#### 2) 온도

효소 활성 최적 온도는 40-80°C 사이에서 10°C 간격으로 온도를 달리하여 활성을 측정·비교하여 결정하였다.

### 효소의 안정성

#### 1) pH

각 pH별로 효소액을 5°C에서 24시간 동안 방치한 다음 잔존 효소 활성을 측정하는 방법으로 pH에 대한 효소의 안정성을 측정하였다.

#### 2) 온도

효소액을 일정 온도에서 1시간 동안 보존한 다음 최적 온도에서 잔여 효소 활성을 측정하였으며, 일정 온도에서 10분 간격으로 효소액을 미리 반응시킨 후 적정 온도에서 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하여 효소의 열안정성을 측정하였다.

### 계면활성제의 영향

각종 계면활성제가 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소액에 계면활성제를 첨가하여 10분동안 처리한 후 기질인 CMC 용액(0.05 M glycine-NaOH, pH 10.0)을 첨가하여 반응시키고 효소활성에 대한 영향을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 알칼리성 cellulase 생산 균주의 분리 및 배양

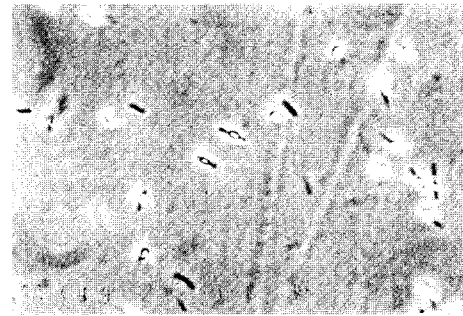
자연계로부터 분리한 200여종의 미생물 중 PYC 평판배지에서 노란색 투명환(halo)을 형성하는 균주의 H/C ratio (size of clear zone/size of colony in diameter)와 알칼리 pH에서의 생육도, 효소 활성 등을 조사하여 5균주를 선별하였다. 선별된 균주들을 PYC 액체배지(pH 10.0)에 접종하여 진탕배양한 후 원심분리하여

은은 상등액으로 avicelase와 CMCase, FPase, xylanase에 대한 효소 활성도를 측정하였으며, 이 중에서 CMCase 활성이 높고 알칼리 영역에서 생육이 우수한 HSH-810 균주를 선정하였다(자료미제시). 고체배지에서 투명환(halo)의 크기가 클수록 상등액의 CMCase 활성이 높게 나타났다. 본 연구의 목적이 알칼리성 조건하에서 cellulase 효소 활성이 높은 균주를 분리하는데 있으므로 선정된 HSH-810 균주는 분리 배지인 PYC 배지를 비롯하여 PYC 배지의 기질인 CMC 대신 avicel, cellobiose, filter paper, xylan을 첨가한 배지와 PYC 배지에 0.1%(w/v) SDS를 첨가한 6종의 배지를 조제하여 30°C에서 72시간 배양하였다. 그 후 각 기질별로 CMCase와 avicellase, cellobioase FPase, xylanase의 효소 활성을 측정한 결과 분리 선정된 HSH-810 균주는 PYC 배지에서 CMC를 기질로 사용하였을 때 CMCase 활성이 가장 우수하였으며, 0.1%(w/v) SDS를 첨가한 배지에서는 CMCase 활성이 60% 정도 감소되었다(Table 1). 본 실험에서 분리된 균주 중에서 CMCase 활성이 가장 우수한 HSH-810 균주를 본 실험의 공식 균주로 최종 선정하였으며, 이 균주는 cellulase complex 중 CMCase를 주로 생산하였으며 avicellase, cellobioase, FPase 및 xylanase는 거의 생산하지 않았다.

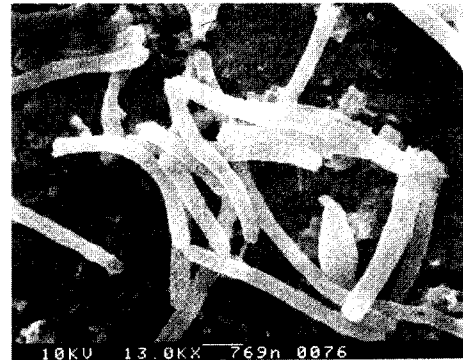
#### 알칼리성 cellulase 생산 균주의 동정 및 특성

CMCase 활성이 강한 HSH-810 균주는 pH 7.0의 nutrient broth나 1%(w/v) CMC가 첨가된 nutrient broth, glucose-peptone broth 등 중성 배지에서는 증식하지 않았으므로 균의 특성 시험은 모두 pH 10.0으로 조정된 배지를 사용하였다.

분리균 HSH-810을 동정하기 위해 특성을 조사한 결과 본 균주는 Gram 양성균의 간균으로 균체의 크기는 (0.3-0.7) × (3.0-4.2) μm이었고 호기성의 포자 형성균으로 *Bacillus* 속 균주와 유사한 것으로 동정되었으며, 위상차현미경과 전자현미경의 결과는 Fig. 1과 같다. 알칼리성 배지에서 생육하는 호알칼리성인 HSH-810 균주의 성질은 기존 중성 *Bacillus* 속 균종과는 차이가 났으며 형태, 배양학적 특성, 생리학적 특성 및 당류 이용성 등에 대한 특징은 Table 2와 같다. 호알칼리성 미생물은 금속이온 중 Na<sup>+</sup>를 첨가하면 생육이 촉진되는 특성이 있으므로 NaCl 농도를 0-10%로 조정하고 HSH-810 균주의 생육상태를 조사하였다(14, 15). NaCl을 첨가하지 않은 경우에는 생육하지 않았고 0.5-2% NaCl 농도에서는 생육 상태가 양호하였으며 5-7%에서도 생육이



(A)



(B)

Fig. 1. Phase-contrast and electron microscopy of the isolated strain HSH-810 cultured on PYC medium at 30°C for 72 hr. (A) Phase-contrast microphotograph (× 1,000) (B) Dual-stage scanning electron microphotograph (× 13,000)

가능하였으나 10%에서는 생육을 관찰할 수 없었다. 또 Kitada 등은 중성 배지에 Na<sup>+</sup>를 첨가하여 호알칼리성 *Bacillus* 속 균주를 배양하면 생육이 촉진되었다고 보고한 바 있으나 본 균주는 0.5% NaCl을 첨가한 pH 6.0-7.5의 산성 및 중성 배지에서는 거의 생육하지 않았다(13). 식염에 대한 내성은 비교적 강하여 7% NaCl을 첨가한 배지에서도 증식이 가능하였다. 이와 같은 결과로 선정된 HSH-810은 호알칼리성 *Bacillus* 속 균주로 판명되었다.

#### *Bacillus* sp. HSH-810의 생육 및 효소 활성에 미치는 영향

##### 1) 온도

*Bacillus* sp. HSH-810 균주의 배양 온도에 따른 생육과 효소 활성을 조사한 결과 본 균주는 15-40°C까지의 범위에서 생육이 가능하였으며 10°C 이하와 45°C 이상에서는 균의 증식이 거의 나타나지 않았다. 그리고 30°C에서 균주의 생육과 효소 활성이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

##### 2) pH

*Bacillus* sp. HSH-810 균주의 배양 pH별 생육과 효소 활성을 비교한 결과 본 균주는 pH 10.0에서 가장 성장이 좋았으며 가장

Table 1. Enzyme activities according to the composition of the various media by the isolated strain HSH-810

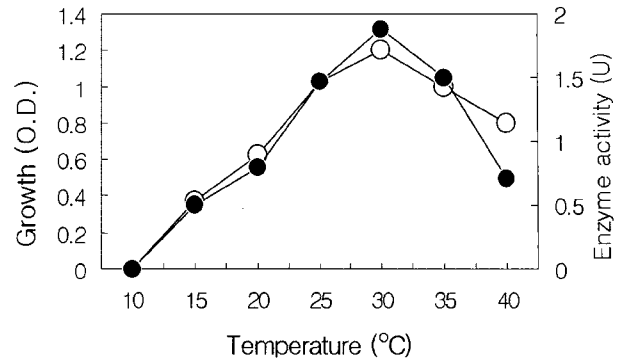
Medium Substrate	Enzyme activity (U)					
	PYF	PYA	PYX	PYCB	PYC	PYCS
CMC	0.106	0.094	0.070	0.121	1.886	0.743
Filter paper	0.018	0.004	ND	ND	0.007	0.005
Avicel	0.009	0.021	ND	ND	0.006	0.004
Xylan	0.010	0.014	0.381	0.101	0.241	0.183
Cellobiose	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Not detected

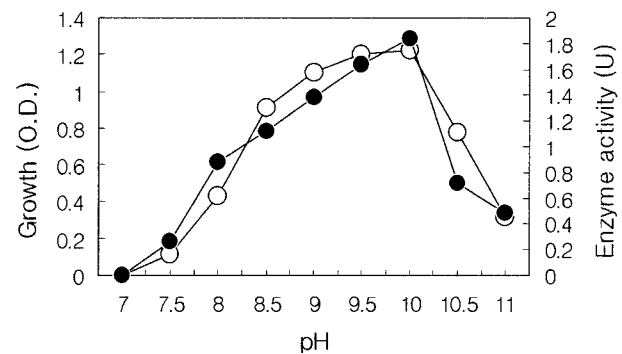
**Table 2.** Characteristics of the isolated strain HSH-810

<b>Morphology</b>	
Shape	Rod
Cell size(μm)	0.3-0.7 × 3.0-4.2
Motility	Motile
Gram stain	Positive
Spore size(μm)	0.6-0.8 × 2.2-3.0
Spore shape	Ellipsoidal
Spore position	Subterminal
<b>Characterization of cultures</b>	
On nutrient agar plates :	
Form	Circular
Surface	Smooth
Elevation	Umbonate
Margin	Entire
Opacity	Opaque
Brilliance	No glistening
<b>Growth<sup>a</sup> in</b>	
Peptone broth	+
Nutrient broth	+
Nutrient-1 CMC broth	++
Glucose-peptone broth	++
Strict aerobes in PYC medium	-
Strict anaerobes in PYC medium	
<b>Growth in NaCl</b>	
0.0	-
0.5	++
1.0	++
2.0	+
5.0	+
7.0	-
10.0	
<b>Growth conditions</b>	
Optimum Temperature(°C)	30
Optimum pH	9.0
<b>Biochemical properties</b>	
Nitrate reduction	+
Indole	-
V. P.	-
Oxidase	+
Catalase	+
Esculin	+
Utilization of citrate	+
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of gelatin	+
<b>Utilization of sugars</b>	
L-Arabinose	+
D-Sorbitol	+
D-Glucose	+
Lactose	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Sucrose	+
D-Mannitol	+
Raffinose	+
Inulin	+
D-Galactose	+
D-Xylose	+
D-Mannose	+
Inositol	-

<sup>a</sup>: -, No growth; +, Normal growth; ++, Affluent growth



**Fig. 2.** Effect of temperature on the growth and alkaline cellulase production from *Bacillus* sp. HSH-810. Symbol - ○ -, Cell growth (A<sub>600</sub>); - ● -, Enzyme activity (A<sub>550</sub>).



**Fig. 3.** Effect of pH on the growth and alkaline cellulase production from *Bacillus* sp. HSH-810. -○-, Cell growth (A<sub>600</sub>); -●-, Enzyme activity (A<sub>550</sub>).

높은 효소 활성을 나타내었다. 그러나 pH 7.0 이하의 중성 또는 산성 영역에서는 증식이 일어나지 않았으며, pH 11.0의 강알칼리에서는 증식과 효소 활성이 낮게 나타났다(Fig. 3). 따라서 본 균주는 호알칼리성 균주이며 생산하는 효소 역시 알칼리성 cellulase임을 알 수 있었다.

3) 탄소원

미생물이 생산하는 다당류 분해효소는 배지 중의 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으므로 배지 중에 첨가되는 탄소원이 효소의 생산성에 미치는 영향을 검토하였다(Table 3). 탄소원의 영향은 PYC 배지를 대조구로 하고 CMC 대신 1%의 다른 탄소원을 첨가한 것을 각 실험구로 하였다. Glucose 등의 단당류, cellobiose 등의 이당류, inulin 등의 다당류를 탄소원으로 첨가한 배지에서 효소 활성이 현저하게 나타난 것은 CMC 뿐이었다.

4) 질소원

배지에 첨가되는 유기 및 무기 질소 화합물이 효소 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 질소원에 대한 실험은 PYC 배지의 질소원을 제거한 후 0.5% peptone을 첨가한 것을

**Table 3.** Effect of various carbon sources on the alkaline cellulase production from *Bacillus* sp. HSH-810

Sources (1.0, w/v)	Relative enzyme activity (%)
Glucose	2.5
Arabinose	2.1
Galactose	0.0
Xylose	1.5
Mannose	2.0
Rhamnose	0.9
Sorbitol	0.0
Mannitol	1.4
Inositol	0.0
Salicin	0.0
Lactose	0.0
Cellobiose	0.0
Maltose	0.0
Sucrose	0.0
Raffinose	3.5
Inuline	7.5
Soluble starch	13.0
CMC	100.0

**Table 4.** Effect of various nitrogen sources on the alkaline cellulase production from *Bacillus* sp. HSH-810

Sources (0.5, w/v)	Relative enzyme activity (%)
Peptone	100.0
Tryptone	83.5
Yeast extract	76.0
Beef extract	39.4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	18.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	0.0
NaNO <sub>3</sub>	0.0

대조구로 하고 실험구는 이 peptone 대신 0.5%의 다른 질소원을 첨가하여 실험하였다. 유기 질소화합물 중에는 peptone, tryptone, yeast extract의 순으로 효소의 활성이 높게 나타났으며 무기질소 화합물은 효소 생산용으로는 부적합한 것으로 판단된다.

##### 5) 무기염류

배지 중에 첨가되는 무기염류가 효소 생산에 미치는 영향을 알아보았다(Table 5). 균의 생육에 미치는 무기염의 영향은 PYC 배지에서 모든 무기염을 제거한 것을 대조구로 하고 각종 무기염을 0.01% 첨가한 것을 실험구로 하였다. 이 때의 배양 조건은 pH 10.0으로 조정된 배지를 30°C에서 72시간 배양하였다. CaCl<sub>2</sub>와 CoCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl에 의해서는 효소의 활성이 증가하였으며, 특히 CaCl<sub>2</sub>와 CoCl<sub>2</sub>의 첨가 시에는 무기염을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 효소 활성이 2배 이상 증가하였다. 그러나 MgSO<sub>4</sub>와 CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>에 의해서는 활성이 현저히 저하되는 것으로 나타났다.

**Table 5.** Effect of mineral sources on the alkaline cellulase activity produced by *Bacillus* sp. HSH-810

Mineral sources (0.01%, w/v)	Cell growth (A <sub>600</sub> )	Relative enzyme activity (%)
Control	0.680	100.0
CaCl <sub>2</sub>	0.881	238.4
CoCl <sub>2</sub>	0.873	196.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.816	155.6
KCl	0.676	144.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.293	23.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.256	6.7
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.210	ND
ZnSO <sub>4</sub>	0.275	ND

ND: Not determined

**Table 6.** Comparison of the alkaline cellulase activity produced by *Bacillus* sp. HSH-810

Medium	Enzyme activity (U)
PYC	1.843
PYM	2.088

#### 배양시간에 따른 *Bacillus* sp. HSH-810의 성장과 알칼리성 cellulase 생산량의 변화

상기 결과에서 나타난 탄소원, 질소원, 무기염류에 의한 효소 활성의 변화를 참고하여 PYC 배지의 조성 중에서 CaCl<sub>2</sub>와 CoCl<sub>2</sub>를 각각 0.02%씩 추가하고 MgSO<sub>4</sub>를 제거한 PYM 배지를 조성하여 분리균 *Bacillus* sp. HSH-810을 배양한 후 효소 활성을 조사한 결과 PYC 배지에서 보다 효소 활성이 약 13% 증가하였다(Table 6). 그리고 개선된 배지에서의 배양 시간에 따른 효소 활성의 변화를 균 접종 후 144시간 까지 6시간 간격으로 조사하였다. 균의 증식은 접종 6시간 후 급속한 증식을 보여 48시간에 최대의 증식을 나타낸 반면 효소의 생산은 균 증식의 대수기 중반인 18시간부터 급격히 증가하여 72시간에 최대 활성을 나타내었다(Fig. 4). 본 연구의 알칼리성 cellulase를 산업적으로 활용하기 위하여 *Bacillus* sp. HSH-810의 돌연변이 유도를 통해 변이주를 개발하고, 알칼리성 cellulase 유전자를 클로닝하여 *Bacillus*에서 과잉발현 시킴으로써 효소 생산량을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

#### 알칼리성 cellulase 최적 pH와 pH에 대한 효소 안정성

알칼리성 cellulase 최적 pH를 측정하기 위하여 pH 3.0-13.0 범위를 나타내는 여섯 가지 서로 다른 완충용액을 조제하여 CMC를 1%되게 용해시키고, 이 용액에 조효소액을 가한 다음 그 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 본 효소는 반응액의 pH가 10.0-11.5일 때 비교적 높은 효소 활성을 보였으며 이 범위를 벗어나면 효소 활성이 감소하였고, 특히 pH 10.5에서 가장 높은 효소 활성을 보였다. Horikoshi 등은 *Bacillus* sp. No. N-4 균주가 생산한 cellulase의 최적 pH는 6.7이라고 보고하였고, Ito 등은 KSM-635가 생산하는 cellulase의 최적 pH는 9.5였다고 보

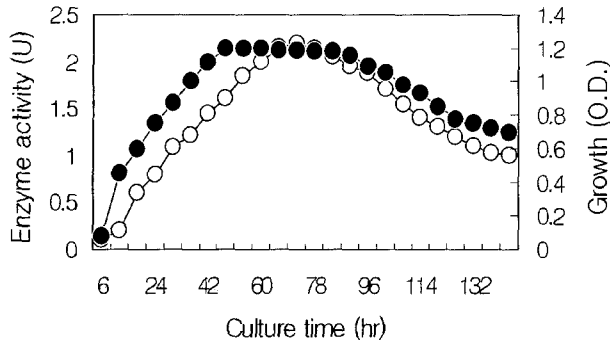


Fig. 4. Growth and alkaline cellulase activity of *Bacillus* sp. HSH-810. -○-, Enzyme activity(A<sub>550</sub>); -●-, Cell growth(A<sub>600</sub>).

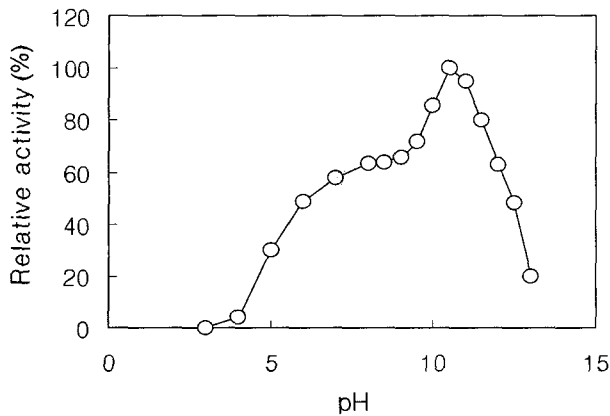


Fig. 5. Effect of pH on activity of the alkaline cellulase produced by *Bacillus* sp. HSH-810.

고한 바 있다(6, 10). 또한 Shikada 등은 *Bacillus* sp. KSM-64가 생산한 효소의 최적 pH는 8.5-9.5라고 보고한 결과와 비교하면 본 실험에서 사용한 *Bacillus* sp. HSH-810 균주가 생산한 cellulase는 훨씬 높은 pH 영역에서 활성을 나타내는 호알칼리성 효소임을 알 수 있었다(21). 또한 각각 다른 pH(pH 3.0-13.0)로 조정된 조효소액을 5°C에서 24시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정, pH에 대한 효소 안정성을 검토하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. 본 효소는 pH 6.0-13.0 범위에서 안정하였다. Horikoshi 등이 보고한 cellulase의 경우는 pH 6.0 이하나 pH 10.0 이상에서는 효소의 활성이 급격히 저하하였고 pH 4.0과 pH 12.0에서는 효소의 잔존 활성이 거의 없었다(6). 따라서 *Bacillus* sp. HSH-810 균주가 생산한 cellulase는 넓은 pH 범위에서 안정성을 나타내어 산업적 이용이 가능한 것으로 사료된다.

**알칼리성 cellulase 활성의 최적 온도와 온도에 대한 효소 안정성**

알칼리성 cellulase 활성에 미치는 반응 온도 효과를 측정하기 위하여 0.05 M glycine-NaOH 완충용액(pH 10.5)에 CMC를 1% 되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 온도를 10-80°C까지 변화시키면서 조효소액을 가하고 활성을 측정한 결과 Fig. 7에 표시되어 있는 바와 같이 50°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이

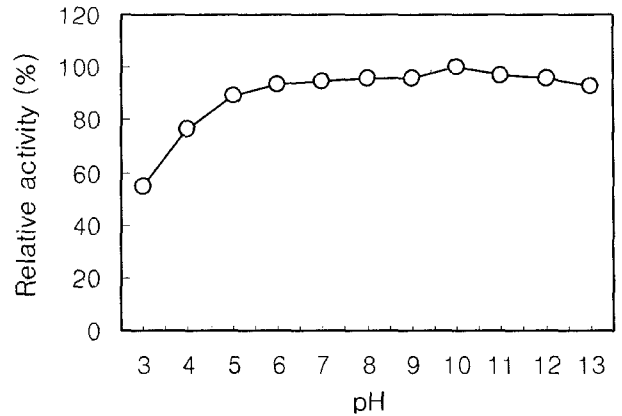


Fig. 6. pH stability of the alkaline cellulase produced by *Bacillus* sp. HSH-810.

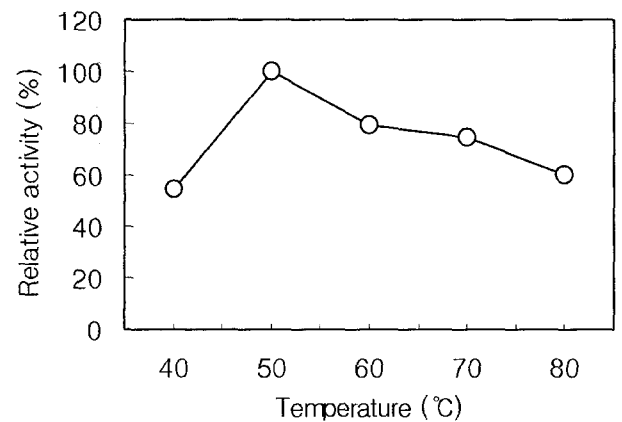
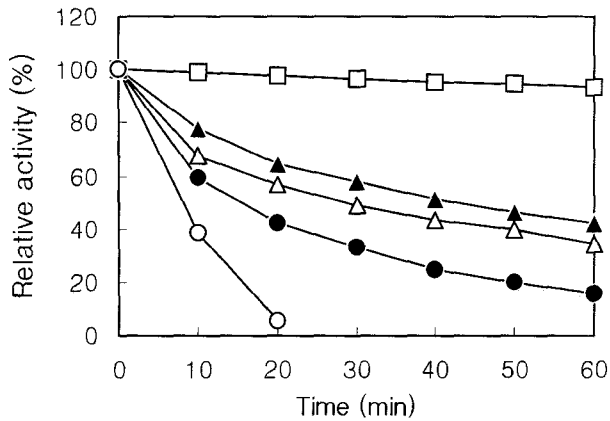


Fig. 7. Effect of temperature on activity of the alkaline cellulase produced by *Bacillus* sp. HSH-810.

는 Shikata 등이 *Bacillus* sp. K-19와 K-64가 생산한 cellulase의 최적 온도가 50°C인 점과 일치하였다(21). 이상의 결과에 따라 본 실험의 효소 활성 측정 조건은 최적 조건인 pH 10.5, 50°C에서 행하여졌으며 기질은 동일 pH의 0.05 M glycine-NaOH 완충용액에 희석하여 사용하였다. 또한 본 효소의 온도에 대한 안정성을 조사해 본 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 최적 온도인 50°C에서 60분 가열하여도 효소 활성의 변화가 거의 없었으며 60°C에서는 60분 가열 후 42%의 잔여 활성을 유지함으로써 비교적 열에 안정하다고 사료된다.

**계면활성제의 영향**

조효소액에 미치는 계면활성제의 영향을 알아보기 위하여 sodium- $\alpha$ -olefin sulfonate (AOS)와 linear alkyl-benzene sulfonate (LAS), sodium dodecyl sulfonate (SDS), Tween 20, Tween 80을 각각 0.05%, 0.1%씩 첨가하여 대조구와 비교하여 효소 활성을 측정된 결과는 Table 7과 같다. 0.05%의 LAS와 SDS를 첨가하였을 때는 19%의 저해를 받았다. 한편 0.1% 계면활성제를 첨가하였을 때 LAS에서는 95%정도 저해되었으나 다른 계면활성제에서는 변화가 없었다. Shikata 등은 *Bacillus* sp. KSM-19,



**Fig. 8.** Thermal stability of the alkaline cellulase produced by *Bacillus* sp. HSH-810. ○ —, 90°C; ● —, 80°C; △ —, 70°C; ▲ —, 60°C; □ —, 50°C.

**Table 7.** Effect of surfactants on the activity of crude enzyme toward CMC

Surfactants	Relative enzyme activity (%)	
	0.05%	0.1%
AOS <sup>a</sup>	89	87
LAS <sup>b</sup>	81	5
SDS <sup>c</sup>	81	79
TWEEN 20	91	98
TWEEN 80	95	106
Control	100	100

<sup>a</sup>: sodium- $\alpha$ -olefin sulfonate

<sup>b</sup>: linear alkyl-benzene sulfonate

<sup>c</sup>: sodium dodecyl sulfonate

KSM-64 균주를 배양하여 생산한 효소에 대한 계면활성제의 영향을 검토한 결과 pH 9.0, 40°C의 조건에서 0.15%의 SDS가 K-19와 K-64의 효소를 각각 255, 73%씩 저해하였다고 보고한 바 있다(21).

### 참고문헌

- Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of  $\beta$ -mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1459-1464.
- Bisaria, V.S. and T.K. Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic material: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* 3, 90-104.
- Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, p. 1105-1139. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hayashi, T., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1988. Production and purification of new maltohexose-forming amylases from alkalophilic *Bacillus* sp. H-167. *Agric. Biol. Chem.* 52, 443-448.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 22. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1407-1414.

- 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.
- Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. Alkalophilic microorganism: A new microbial world, p.3-213. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Horikoshi, K. and Y. Atsukawa. 1975. Production of  $\beta$ -1,3-glucanase by *Bacillus* No. 221, an alkalophilic microorganism. *Biochem. Biophys. Acta* 384, 477-483.
- Ikura, Y. and K. Horikoshi. 1990. Manganese ion-dependent production of phosphodiesterase by alkalophilic *Bacillus* No. A-40-2 and its properties. *Agric. Biol. Chem.* 54, 3205-3209.
- 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.
- John, G.H., N.R. Krieg, and P.H.A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 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.
- Kitada, M. and K. Horikoshi. 1977. Sodium ion-stimulate  $\alpha$ -[1-<sup>14</sup>C] aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 131, 784-788.
- Koyama, N., A. Kiyomiya, and Y. Nosoh. 1977. Na<sup>+</sup>-dependent uptake of amino acids by an alkalophilic *Bacillus*. *FEMS Lett.* 72, 77-78.
- Kudo, T. and K. Horikoshi. 1983. Effect of pH and sodium ion on germination of alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* 47, 665-669.
- Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Nomoto, M., C.C. Chen, and D.C. Sheu. 1986. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2701-2707.
- Nomoto, M., M. Ohsawa, H.L. Wang, C.C. Chen, and K.W. Yeh. 1988. Purification and characterization of extracellular alkaline phosphatase from an alkalophilic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1643-1647.
- Okazaki, K., T. Akiba, K. Horikoshi, and R. Akahoshi. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2033-2039.
- 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.
- Tsumura, K., Y. Hashimoto, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1991. Purification and properties of galactanases from alkalophilic *Bacillus* sp. S-2 and S-39. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1265-1271.

(Received 27 April, 2004/Accepted 10 June, 2004)

---

**ABSTRACT : Isolation and Characterization of an Alkaline Cellulase Produced by Alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810**

**Ji-Yeon Kim<sup>1</sup>, Sung-Ho Hur<sup>2</sup> and Jeong-Hwa Hong** (School of Food & Life Science and <sup>1</sup>Genome Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, <sup>2</sup>Division of Food and Biotechnology, Dong-eui institute of technology, Busan 614-715, Korea)

A bacterium producing alkaline cellulase was isolated from soil, leaf mold and compost, and was identified as alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810 by morphological, cultural and biochemical determination. The optimum culture condition of *Bacillus* sp. HSH-810 for the growth and alkaline cellulase production was 30°C and pH 10.0. The maximum alkaline cellulase production was obtained when 1.0%(w/v) CMC, 0.5%(w/v) peptone, 0.02%(w/v) CaCl<sub>2</sub> and 0.02(w/v) CoCl<sub>2</sub> were used as carbon source, nitrogen source and mineral source, respectively. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were pH 10.5 and 50°C, respectively. This enzyme was fairly stable in the pH range of 6.0-13.0 and at 50°C. For the effect of surfactants, the activity of alkaline cellulase was stable in the presence of sodium- $\alpha$ -olefin sulfonate (AOS), sodium dodecyl sulfonate (SDS), Tween 20 and Tween 80, but inhibited by the presence of 0.1 linear alkyl-benzene sulfonate (LAS) significantly.