

Pseudomonas sp. JH1014의 섬유소분해 활성 특성

허희연 · 정유진 · 신은선 · 권은주 · 김유정 · 김정호 · 김 훈*

순천대학교 생명환경과학부 생물환경전공

Characterization of Cellulolytic Activity from *Pseudomonas* sp. JH1014

Hee-Yeon Heo, Yu Jin Jeong, Eun Sun Shin, Eun Ju Kwon,
Yu Jeong Kim, Jungho Kim and Hoon Kim*

Department of Agricultural Chemistry, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

Received August 26, 2005; Accepted September 21, 2005

Pseudomonas sp. JH1014 was isolated from stream water as a detergent-compatible alkaline protease producing microorganism. The strain produced no detectable cellulolytic activity in LB medium. The addition of carboxymethyl cellulose induced the production of carboxymethyl cellulase (CMCase) without causing any significant change in the growth pattern of the strain. The strain reached its maximum growth after 9 to 12 h at 37°C, and the production of CMCase in the presence of the substrate reached its maximum after 21 h of growth at 37°C. The optimum pH of the crude enzyme preparation was pH 6.0. The enzyme had an optimal temperature at 55°C, and retained 70% of its original activity when preincubated at 70°C for 10 min. Activity staining of the crude enzyme preparation separated on an SDS-PAGE gel showed two active bands with molecular masses of 54 and 30 kDa, indicating that *Pseudomonas* sp. JH1014 produced at least 2 kinds of CMCase.

Key words: Cellulolytic microorganism, *Pseudomonas* sp. JH1014, enzyme induction, CMCase

서 론

섬유소(cellulose)는 지구상에 존재하는 가장 풍부한 천연 고분자 유기물의 하나로서 매년 수천억 톤씩 생산되고 있고, 자연계의 법칙에 의하여 생성, 분해, 이용, 생성의 cycle을 반복하는 무한정한 자원이다. 이에 따라 미래에너지, 화학약품 또는 식량 등의 자원으로서 식물체의 섬유소 성분을 활용하려고 하는 기술개발이 활발하게 이루어지고 있다.¹⁾ 한편, 막대한 양의 섬유소 폐자원이 임산물과 농산물의 등의 가공처리과정에서 발생하고 있으며, 도시 고형 폐기물 중에도 40~60%가 섬유소 폐자원이어서 이들의 처리 문제도 해결되어야 할 매우 중요한 과제이다.

섬유소를 분해하는 방법 중 섬유소분해효소(cellulase)를 이용한 효소적 분해방법은 화학적 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있으나, 반응 속도가 늦고 분해율이 낮으며 효소생산 비용이 높다는 단점을 가지고 있다.²⁾ 따라서 섬유소 자원을 효율적으로 이용하기 위해서는 높은 분해력을 가진 섬유소분해효소를 경제적으로 대량 생산하는 방법이 확립되어야 한다.

섬유소분해효소는 일반적으로 미생물로부터 얻어지고 있으며, 생산 미생물의 종류에 따라 다스간의 차이가 있으나, 대부분의 경우 endo-β-D-glucanase(β-1,4-glucan 4-glucohydrolase, EC 3.2.1.4), exo-β-D-glucanase(EC 3.2.1.91) 및 β-glucosidase(EC 3.2.1.21) 등으로 구성되어 있으며, 이 세 가지 효소가 동시에 존재할 때 이들의 상승작용에 의하여 결정형 섬유소가 효과적으로 분해될 수 있다^{3,7)}. 섬유소분해효소를 생산하는 미생물은 *Trichoderma* 속을 비롯한 각종의 곰팡이,⁸⁾ *Clostridium*속 등의 세균, *Saccharomyces*속 등의 효모 및 *Thermomonospora*속 등의 방선균^{9,10)} 등이 보고되고 있으나 실제 생산에 이용되고 있는 균종은 *Trichoderma*속이 대표적이다. 그러나 *Trichoderma*속의 곰팡이가 생산하는 cellulase는 β-glucosidase의 활성 부족이 큰 단점으로 지적되고 있다. 효율적인 섬유소의 이용을 위해서는 일차적으로 분해속도가 빠른 효소를 생산하는 새로운 균주의 지속적인 탐색이 요구되며, 유전 공학 기술을 이용한 효소의 생산성 향상¹¹⁾과 다양한 용도에 맞는 산업용 효소의 개발이 이루어져야 할 것이다.

본 실험에서는 하천수로부터 분리한 세제 첨가용으로 사용 가능한 알칼리성 단백질 분해효소 생산균주인 *Pseudomonas* sp. JH1014로부터 섬유소분해효소 활성을 확인하고 이의 특성을 조사하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-61-750-3294; Fax: +82-61-752-8011
E-mail: hoon@sunchon.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주 및 배지. 본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. JH1014는 여수시 연동천의 물 시료로부터 세제 첨가용으로 사용 가능한 알칼리성 단백질 분해효소를 생산하는 균으로 분리되었다.¹²⁾ 섬유소 분해효소 생산용 배지는 LB(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl)와 LB에 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose, medium viscosity)를 첨가한 LBC를 사용하였다.

사용시약. CMC, DNS(3,5-dinitrosalicylic acid), MUC(4-methylumbelliferyl cellobioside), Congo red와 polyacrylamide gel electrophoresis용 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, silver 염색용 시약은 Pharmacia(Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다.

섬유소분해효소 생산. 고체배지에서의 섬유소 분해효소(carboxymethyl cellulase, CMCase) 생산을 확인하기 위하여 *Pseudomonas* sp. JH1014를 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양한 후 나타난 콜로니를 멸균된 이쭉시개를 사용하여 LBC 고체배지에 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후, 배지 위에 0.1% Congo red 용액을 적당량 붓고 30분 동안 염색한 다음, 1.0 M NaCl 용액으로 60분 동안 2번 탈색시켜 콜로니 주위의 clear zone을 관찰하여 CMCase 활성을 확인하였다. 액체 배지에서 균의 증식 및 효소 생산을 조사하기 위해서 37°C에서 16시간 배양 한 *Pseudomonas* sp. JH1014 배양액 2 ml를 17 flask에 든 200 ml의 LB 배지와 LBC 배지에 각각 접종한 후 37°C에서 교반배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고, 배양액을 원심분리한 상등액을 사용하여 CMCase 활성도를 조사하였다.

효소활성정량. CMCase의 활성도는 DNS 방법¹³⁾에 의하여 CMC로부터 유리된 환원당을 측정하여 정량하였다. 즉, 이 실험의 표준 측정을 위하여 증류수에 녹인 CMC(1.0%, w/v) 500 μ l, 200 mM Na-citrate 완충용액(pH 5.5) 250 μ l와 효소용액을 혼합하여 최종 1 ml로 한 후 55°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3.0 ml와 glucose 용액(0.1 mg/ml) 0.1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 5분 동안 끓인 다음 식힌 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 환원당의 양은 glucose 표준용액을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 CMC를 기질로 하여 55°C 조건 하에서 1분 동안에 1.0 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

조효소원 준비. *Pseudomonas* sp. JH1014를 총 2 l(200 ml \times 10 flasks)의 LBC 배지에 접종하여 37°C에서 21시간 동안 배양하였다. 배양액을 4°C에서 7,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액 1,850 ml를 회수하고, 이를 ultrafiltration kit(500 ml, Amicon, Beverly, MA, USA)을 사용하여 4°C에서 65 m까지 농축한 후 투석하여 염을 제거하고 동결건조를 하였다. 이를 50 mM Na-citrate 완충용액(pH 5.5) 15 ml에 녹여 조효소원으로 사용하였다.

pH 및 온도의 영향. 효소 활성에 미치는 pH의 영향은 50 mM Na-acetate(pH 4.0-6.0), 50 mM Na-phosphate(pH 6.0-9.0) 또는 50 mM glycine-NaOH(pH 9.0-10.5) 완충용액을 사용하여

55°C에서의 활성도를 측정하여 조사하였다. 효소 활성에 미치는 온도의 영향은 반응온도를 30, 40, 50, 60, 65, 그리고 70°C로 달리하여 표준 측정 방법으로 활성도를 측정하여 조사하였다. 효소의 열 안정성은 기질을 넣지 않은 상태에서 효소 용액을 70°C에서 각각 0, 10, 30, 그리고 60분 동안 전처리한 후, 남아있는 효소의 활성도를 표준 측정 방법으로 조사하였다.

활성염색 및 활성띠의 분자량 결정. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli 방법¹⁴⁾에 따라 11.5%의 gel을 사용하여 수행하였으며, 효소용액은 loading buffer(4 \times)와 혼합하여 2분 동안 끓인 다음 상온에서 5분 동안 원심 분리하여 gel에 주입하였다. 전기영동이 끝난 후 SDS를 제거하기 위해 gel을 실온에서 20%(v/v) isopropanol로 15분씩 3번 세척하고, 단백질을 재생시키기 위해 50 mM Na-citrate 완충용액(pH 5.5)에 넣고 45분 동안 3번 세척하였다. 세척한 gel은 2 mM MUC 용액에 적신 후 랩으로 싸서 55°C 배양기에 넣고 30분 간격으로 UV-lamp를 사용하여 활성띠를 관찰하였다.¹⁵⁾ 관찰이 끝난 gel은 Pharmacia의 silver 염색 kit를 사용하여 염색한 후 표준 단백질의 분자량과 비교하여 활성띠의 분자량을 결정하였다. 표준 단백질로 bovine serum albumin(66 kDa), ovalbumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), trypsinogen(24 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), trypsin inhibitor(21 kDa), 그리고 lysozyme(14 kDa)을 사용하였다.

결과 및 고찰

***Pseudomonas* sp. JH1014의 증식 및 섬유소 분해효소의 생산.** *Pseudomonas* sp. JH1014는 LBC 고체배지에서 섬유소분해 효소를 생산하는 것으로 확인되었다(결과 미제시). *Pseudomonas* sp. JH1014는 37°C에서 교반배양하였을 때 LB 배지에서는 CMCase를 생산하지 않았으며, CMC 첨가는 균의 증식에는 큰 영향을 미치지 않았으나 CMCase의 생산을 유도하는 것으로 나타났다. CMC를 첨가한 배지에서 *Pseudomonas* sp. JH1014는 3시간 후부터 급격히 증식하기 시작하였으며, 12시간 후에는 정지기에 들어갔고, 효소의 생산은 9시간 후부터 시작하여 21시간에 생산량이 최대에 도달한 후 감소하였다(Fig. 1). 배지에 잔존하는 CMC의 양은 배양 3시간 후부터 서서히 감소하기 시작하여 18시간 이후에는 거의 존재하지 않았다(결과 미제시). 배양 24시간 이후에는 LB 배지에서보다 LBC 배지에서 균의 증식이 약간 많은 것으로 나타났는데(Fig. 1), 이는 기질인 CMC가 CMCase의 생산을 유도하고, 이 효소에 의한 CMC의 분해 산물이 균의 증식에 이용되었기 때문인 것으로 보인다.

조효소의 활성에 미치는 pH와 온도의 영향. *Pseudomonas* sp. JH1014가 생산하는 CMCase의 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 55°C이어서, 본 실험실에서 분리 보고한 *Bacillus* sp. KD1014의 CMCase와는 다른 것으로 나타났다(최적 pH 4.5, 최적 온도 60°C).^{15,16)} 조효소액은 pH 6.0에서 최대 활성을 보였으며, pH 6.0과 8.0 사이에서는 최대 활성의 70% 이상을 나타내었고, pH 5.0 이하와 9.0 이상에서는 최대 활성의 60% 이하의 낮은 활성을 보였다(Fig. 2). *Pseudomonas* sp. JH1014가 생산하는 CMCase는 55°C에서 최대 활성을 보였으며, 40°C와

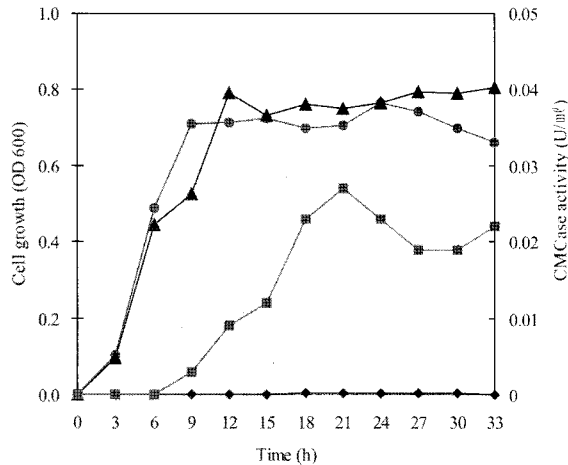


Fig. 1. Cell growth and CMCase production of *Pseudomonas* sp. JH1014. Cells were grown in 1l flasks containing 200 ml of the medium at 37°C with rotary agitation. LBC medium was supplemented with 0.5% CMC. Symbols: ●, growth in LB; ▲, growth in LBC; ◆, CMCase activity in LB; ■, CMCase activity in LBC.

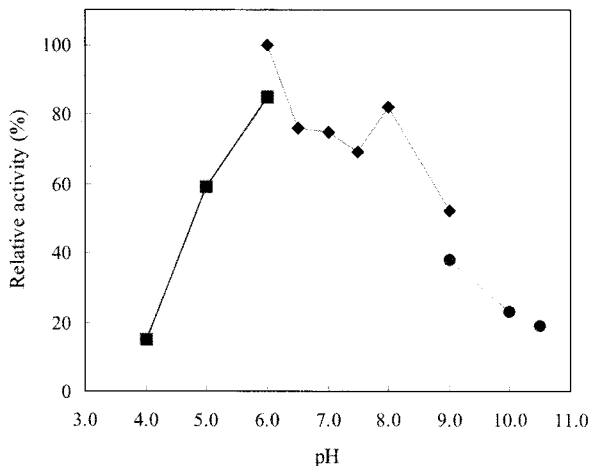


Fig. 2. Effect of pH on the CMCase activity. Symbols: ■, Na-acetate buffer; ◆, Na-phosphate buffer; ●, Glycine-NaOH buffer.

60°C 사이에서는 최대활성의 60% 이상을 나타내었고, 70°C에서는 최대 활성의 23%를 나타내었으며, 80°C에서는 전혀 활성을 보이지 않았다(Fig. 3). 조효소액을 70°C에서 열처리한 후 잔존 활성을 측정할 결과 10분 동안 열처리한 후에는 70%의 잔존 활성을 나타내었으나, 그 후에는 급속히 불활성화되어 30분 후에는 16%, 60분 후에는 10%의 잔존 활성을 나타내었다(Fig. 4).

***Pseudomonas* sp. JH1014가 생산하는 CMCase의 분자량.**
Pseudomonas sp. JH1014가 생산하는 CMCase의 종류와 분자량을 측정하기 위하여 농축 조효소액을 SDS-PAGE를 한 후 MUC를 기질로 사용하여 활성염색을 실시하였다. 활성염색 결과 약간 넓은 범위를 가진 두 개의 활성띠가 나타났으며, silver 염색 후 표준단백질의 분자량과 비교한 결과 이들의 분자량은 각각 54와 30 kDa인 것으로 결정되었다(Fig. 5). 이로써, *Pseudomonas* sp. JH1014는 적어도 두 종류의 CMCase를 생산하는 것으로 보인다. *Bacillus* sp. KD1014의 경우에는 활성염

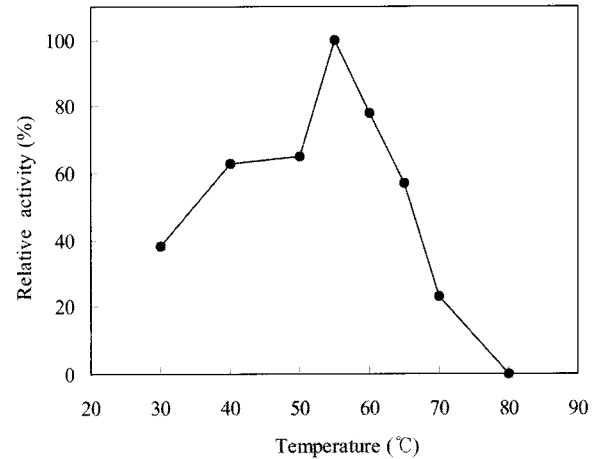


Fig. 3. Effect of temperature on the CMCase activity.

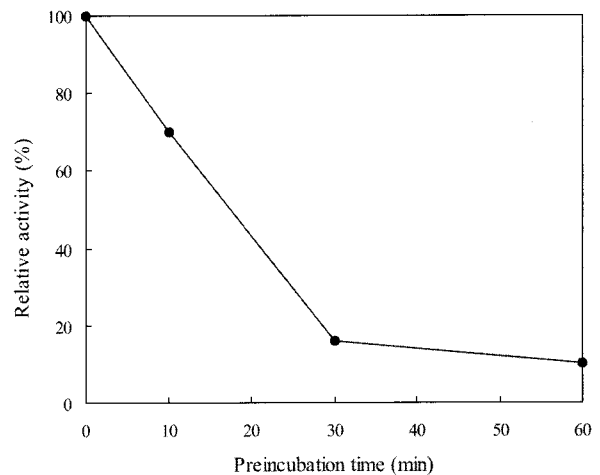


Fig. 4. Heat stability of the CMCase. The enzyme was preincubated at 70°C in the absence of CMC for the designated time periods prior to activity determination at 55°C and pH 5.5.

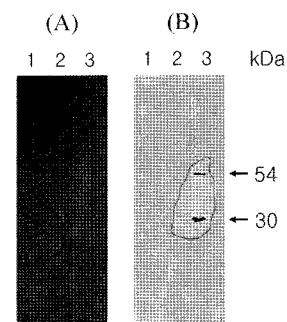


Fig. 5. CMCase activity staining of the crude enzyme preparation after SDS-PAGE (A) and its illustration (B). Lanes 1 and 2, size marker proteins as shown in text; lane 3, the concentrated supernatant.

색에서 32 kDa 하나의 띠만이 관찰되었는바^{15,16)}, 이 결과와 효소의 최적 온도 및 최적 pH로 판단하여 *Pseudomonas* sp. JH1014와 *Bacillus* sp. KD1014가 생산하는 CMCase는 서로 다른 것으로 판단된다.

초 록

Pseudomonas sp. JH1014는 세제 첨가용으로 사용 가능한 알칼리성 단백질 분해효소를 생산하는 균주로 하천수에서 분리되었다. 이 균주는 LB 배지에서는 CMCase를 생산하지 않았으나, 배지에 기질인 carboxymethyl cellulose를 첨가하면 분해효소인 CMCase의 생산이 유도되었으며, CMC 첨가에 따른 증식 양상의 변화는 없었다. CMC를 첨가한 배지로 37°C에서 진탕배양하였을 때 균의 증식은 9~12시간 후에 최대에 도달하였으며, 생산된 효소의 활성은 21시간 후에 최대에 도달하였다. 조효소액의 CMCase 활성 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 55°C였으며, 70°C에서 10분 동안 열처리한 후의 잔존활성은 70%였다. 부분 정제된 효소를 SDS-PAGE 후 활성염색한 결과 분자량이 54와 30 kDa인 두 개의 활성띠가 관찰되어, *Pseudomonas* sp. JH1014는 적어도 두 종류의 CMCase를 생산하는 것으로 보인다.

Key words: 섬유소분해 활성, *Pseudomonas* sp. 미생물, 효소 유도, CMCase

참고문헌

- Cowling, E. B. and Kirk, T. K. (1976) Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 95-123.
- Wilke, C. R., Yang, R. D. and Stockar, U. V. (1976) Preliminary cost analyses for enzymatic hydrolysis of newsprint. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 135-175.
- Bucht, B. and Eriksson, K. E. (1969) Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. IV. Separation of cellobiase and aryl beta-glucosidase activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 416-420.
- Eriksson, K. E. and Wood, T. M. (1985) Biodegradation of cellulose. In *Biosynthesis and biodegradation of wood components* (Higuchi, T. ed.) Academic Press, New York, pp. 469-503.
- Wood, T. M. (1985) Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 407-410.
- Gow, L. A. and Wood, T. M. (1988) Breakdown of crystalline cellulose by synergistic action between cellulase components from *Clostridium thermocellum* and *Trichoderma koningii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**, 247-252.
- Boisset, C., Fraschini, C., Schulein, M., Henrissat, B. and Chanzy, H. (2000) Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1444-1452.
- Parry, J. B., Stewart, J. C. and Heptinstall. (1983) Purification of the major endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochem. J.* **213**, 437-444.
- Ishaque, M. and Kluepfel, D. (1980) Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can. J. Microbiol.* **26**, 183-189.
- Malfait, M., Godden, B. and Penninckx, M. J. (1984) Growth and cellulase production of *Micromonospora chalconae* and *Pseudonocardia thermophila*. *Ann. Microbiol. (Paris)* **135B**, 79-89.
- Park, S. R., Cho, S. J., Kim, M. K., Ryu, S. K., Lim, W. J., An, C. L., Hong, S. Y., Kim, J. H., Kim, H., and Yun, H. D. (2002) Activity enhancement of Cel5Z from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removing C-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 425-430.
- Kim, H. and Kim, J. (2002) Isolation and identification of a detergent-compatible alkaline protease producing *Pseudomonas* sp. JH1014. *Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 61-65.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, K. D., Kim, J. and Kim, H. (1996) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. KD1014 producing carboxymethyl-cellulase. *J. Microbiol.* **34**, 305-310.
- Lee, K. D., Kim, J. and Kim, H. (1999) Purification and characterization of carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus* sp. KD1014. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 107-112.