Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 20, No. 2, 164-168 (1992)

Cellulomonas sp. YE-5가 생산하는 Cellulase의 특성

최동철 · 김동섭 · 유주현 · 오두환*
연세대학교 공과대학 식품공학과

Properties of Cellulase Produced from *Cellulomonas* sp. YE-5

Chey, Dong-Cheol, Dong-Seob Kim, Ju-Hyun Yu and Doo-Hwan Oh*
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — Enzymatic properties of avicelase, carboxymethyl cellulase (CMCase) and β-glucosidase produced by *Cellulomonas* sp. YE-5 were studied. Optimal temperature and pH of avicelase were 40℃ and 6.0, and those of CMCase and β-glucosidase were 45℃ and 6.5. Avicelase and CMCase were stable between pH 5.0 and 9.5, and β-glucosidase was stable between pH 5.5 and 8.0. Avicelase and β-glucosidase were inactivated when incubated at 35℃ for 6 hrs, and CMCase was at 40℃ for 6 hrs. All cellulases were strongly inhibited by Cu^{2+} and Zn^{2+}. K_m values of avicelase for avicel, CMCase I and CMCase II for CM-cellulose, and β-glucosidase for p-nitrophenyl-β-D-glucoside (PNPG) were 4.76, 16.4, 16.4 μg/ml and 3.51 mM, respectively.

섬유성 biomass는 식물의 광합성작용에 의해 대량 생산되며 매년 재생산되는 탄소원이다. 따라서 대체 에너지자원 및 식량자원으로 개발하여 그 이용성을 높일 가치가 있다. 최근에는 섬유소를 분해하여 알콜생산 및 폐수처리에 이르기까지 많은 연구가 진행되고 있다.

섬유소를 자화할 수 있는 세균에는 *Cellulomonas*속(2, 3), *Pseudomonas*속(4, 5), *Clostridium*속(6, 7), *Cellovibrio*속(8), *Acetivibrio*속(9, 10) 등이 알려지고 있으며 이들이 생산하는 cellulase는 avicelase(exo-1, 4-β-glucanase, EC 3.2.1.91), CMCase(endo-1,4-β-glucanase, EC 3.2.1.4), β-1,4-glucosidase(cellobiase, β-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.2) 중에서 결정성 cellulose를 분해하는 avicelase(β-1,4-D-glucancellobiohydrolase)가 대부분이고 cellobiose나 short chain cellooligosaccharide를 분해하는 β-glucosidase 활성은 없거나 곰팡이에 비해 미약한 것으로 보고되고 있다. 그러나 세균은 배양시간이 짧고 영양요구량이 적으며 유전자 조작이 용이하므로 세균에 의한 효소의 생산이 훨씬 유리하며, 따라서 높은 활성의 avicelase와 β-glucosidase를 생산할 수 있는 세균의 개발이 필요된다.

본 연구는 cellulase 생산균인 *Cellulomonas* sp. YE-5의 분리 및 효소 생산조건과 정제에 대해 보고한 전보(1)에 이어 *Cellulomonas* sp. YE-5로부터 정제한 avicelase, CMCase I, CMCase II 및 β-glucosidase의 특성에 대하여 검토하였다.

Key words: Avicelase, CMCase, β-glucosidase
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주, 배지, 균주의 배양 및 효소의 정제

전보에서 분리 동정한 *Cellulomonas* sp. YE-5를 사용하였으며, solka floc 0.8%, urea 0.06%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, Bactopeptone 0.2%, yeast extract 0.2%, pH 6.5의 배지를 사용하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다(1).

효소의 정제는 ammonium sulfate fractionation, DEAE-sepharose chromatography 및 Sephadex G-100 filtration을 통하여 정제하였다(1).

실험과정중 측정하는 모든 cellulase의 활성은 전보(1)에서와 같은 방법으로 측정하였다.

효소의 반응산물 분석

효소의 반응산물 분석은 TLC를 이용하여 Nakamura와 Kitamura(11)의 방법에 따라 행하였다.

Avicelase는 2%(w/v) avicel을, CMCase는 2%(w/v) CMC 용액을 기질로하여 6시간 동안, β-glucoside는 1%(w/v) cellobiose를 기질로하여 6시간 동안 최적반응 조건에서 반응시킨 다음 반응액에 ethanol을 첨가하여 효소를 침전시키고 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 효소를 제거한 다음 감압농축하였다.

농축한 반응액들은 Silica gel TLC plate(Merck)와 n-butanol : ethanol : water(2 : 2 : 1)을 전개용매로 하여 전개하였으며, aniline phthalate 용액을 사용하여 100℃에서 2~3분간 가열하여 발색하였다.

결과 및 고찰

온도에 따른 효소의 활성과 안정성

Avicelase, CMCase 및 β-glucosidase의 반응 최적 온도를 30~70℃ 사이에서 검토해 본 결과 Fig. 1과 같이 avicelase와 β-glucosidase는 40℃에서, CMCase는 45℃에서 가장 높은 활성을 보였다.

한편 이들 효소의 열안정성을 검토하기 위하여 30~60℃ 사이의 온도에서 효소를 각각 6시간 처리한 다음 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같았다. Avicelase와 β-glucosidase는 50℃ 이상에서 거의 실활하였으나, CMCase는 50℃에서도 약 40%의 활성을 유지하여 CMCase가 avicelase나 β-glucosidase에 비해 열안정성이 높음을 알 수 있었다.

이러한 결과는 42℃에서 최대의 활성을 보이고 50℃ 이상에서는 실활되는 Lee 등(18)의 보고와 일치하나 Lee 등(19)의 보고와는 약간의 차이를 보이고 있다.

pH에 따른 효소의 활성과 안정성

효소의 반응 최적 pH를 검토하기 위하여 pH 4.0~10.0 사이에서 반응한 결과 Fig. 3과 같았다. Avicelase는 pH 5.5에서 최대 활성을 보였고, CMCase와 β-glucosidase는 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 보였다.

이들 효소의 pH에 대한 안정성을 검토하기 위해 25℃에서 각각의 pH로 효소를 24시간 처리한 후 잔존활성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 avicelase와 CMCase는 pH 5.0~9.5 사이에서 안정하였으며 β-glucosidase는 pH 5.0~8.0 사이에서 안정하였다.

한편 Lee 등(18)은 pH 6.5, Lee 등(19)은 pH 6.0 그리고 Kim 등(20)은 pH 6.0에서 최대의 활성을 보이는 것으로 보고하여 약간씩의 차이를 나타내고 있다.

금속이온의 영향

효소활성에 미치는 금속이온들의 영향을 검토하기 위하여 효소반응액에 각각의 금속이온들을 첨가하여

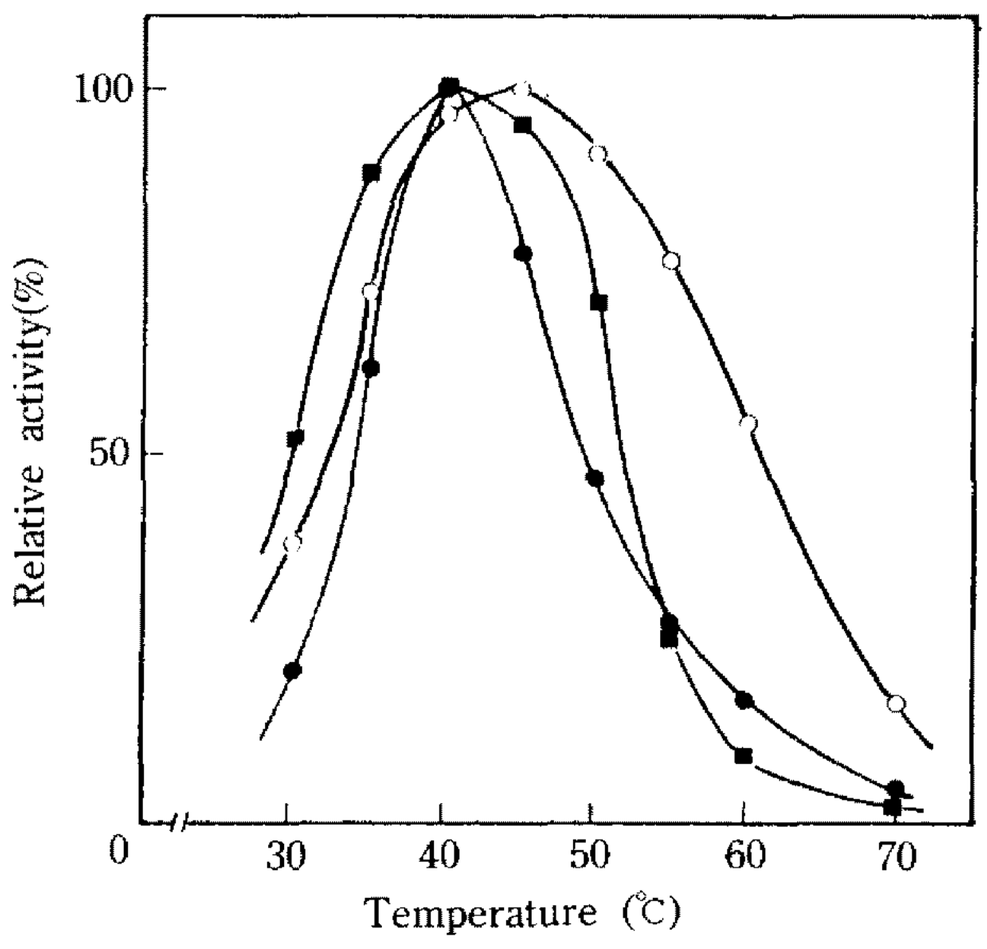

Fig. 1. Effect of temperature on enzyme activity.
●: Avicelase activity, ○: CMCase activity, ■: β-Glucosidase activity

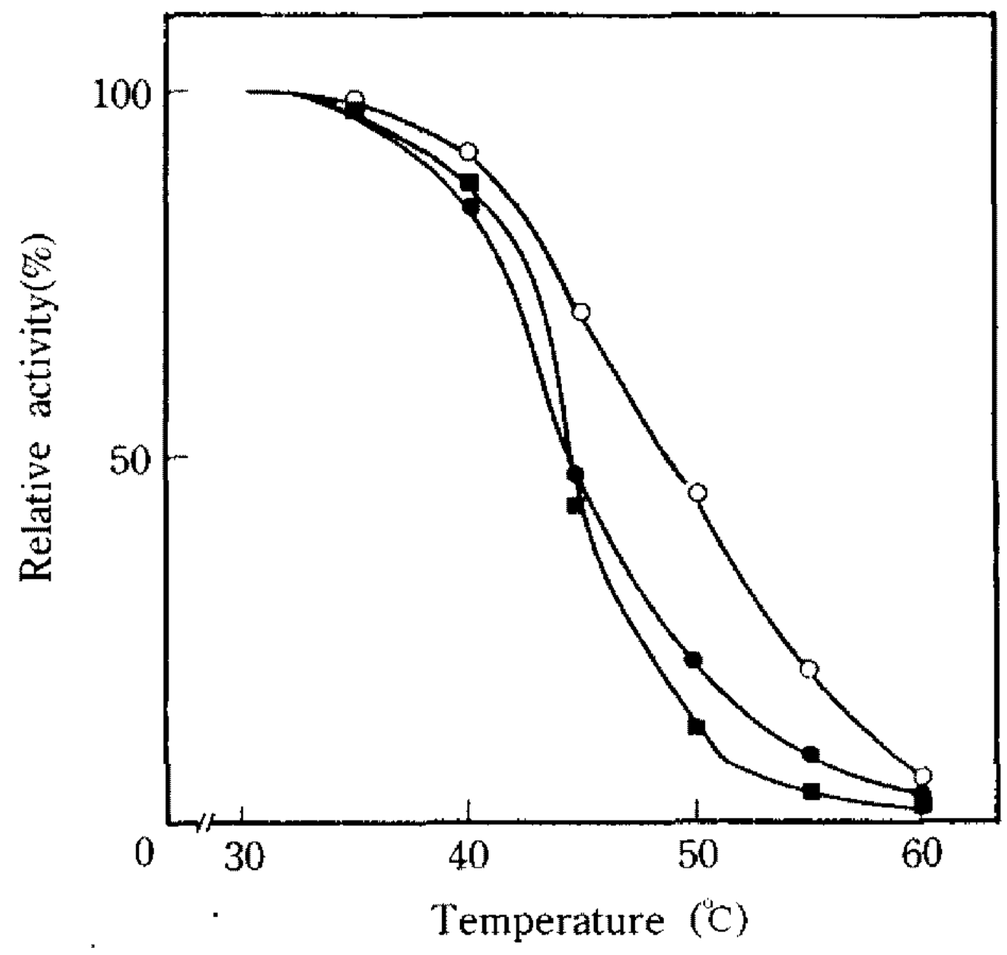

Fig. 2. Effect of temperature on enzyme stability.
●: Avicelase activity, ○: CMCase activity, ■: β-Glucosidase activity

효소활성을 측정하였다. Mn^{2+} 이온과 Co^{2+} 이온에 의해 avicelase 활성이 각각 약간의 증가를 보였다. Cu^{2+} 이온과 Zn^{2+} 이온에 의해서는 avicelase, CMCase, β-glucosidase가 모두 크게 저해되었다.

효소의 기질특이성

정제된 효소를 각각 avicel, CM-cellulose, filter paper, PNPG에 작용시켜 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과 avicelase는 avicel에만 높은 활성을 보였고 다른 기질에는 10% 미만의 상대활성을 보였으며 CMCase I, II 모두 CM-cellulose에 가장 높은 활성을 보였고 filter paper에는 약 1%의 활성을 보였다. β-glucosidase는 PNPG에 가장 높은 활성을 보였고, 수용성 oligosaccharide, 특히 cellobiose에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다.

한편 Fig. 5는 각 기질에 대한 효소의 반응산물을 thin layer chromatography로 분석한 결과로서 avicel의 avicelase에 의해 반응산물은 cellobiose와 cellotriose이고, CM-cellulose의 CMCase I에 의한 반응산물은 cellobiose, CMCase II에 의한 반응산물은 cellobiose와 glucose였다. Cellobiose의 γ-glucosidase에 의한 반응산물인 glucose도 확인하였다.

Table 1과 Fig. 5의 결과로 미루어 보아 정제한 avicelase는 β-1,4-glucan cellobiohydrolase 형태이고, CMCase II는 β-1,4-glucan glucanohydrolase 형태임을 확인할 수 있었다.

효소의 기질 친화력

Avicel, CM-cellulose, PNPG의 각 효소에 대한 기질 친화력을 Lineweaver-Burk plot을 통해 K_m값을 검토하였다.

Avicel에 대한 avicelase의 apparent K_m값은 4.76

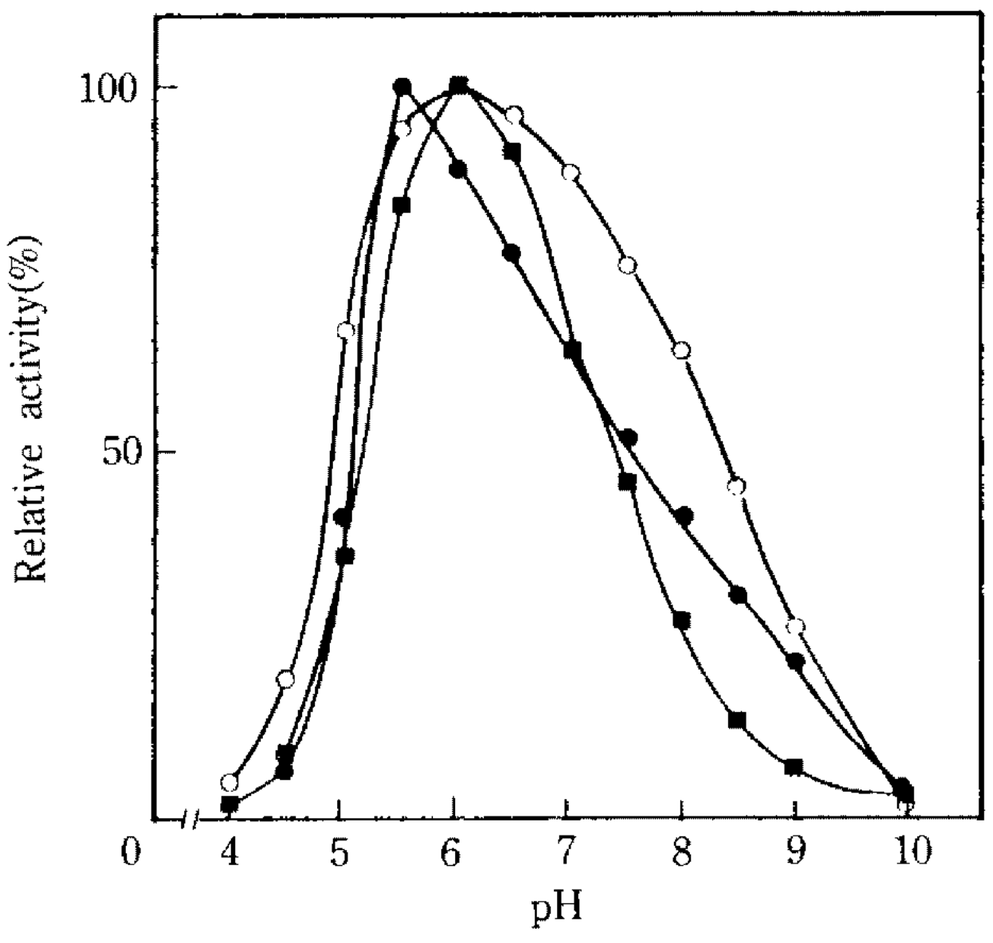

Fig. 3. Effect of pH on enzyme activity.
●: Avicelase activity, ○: CMCase activity, ■: β-Glucosidase activity

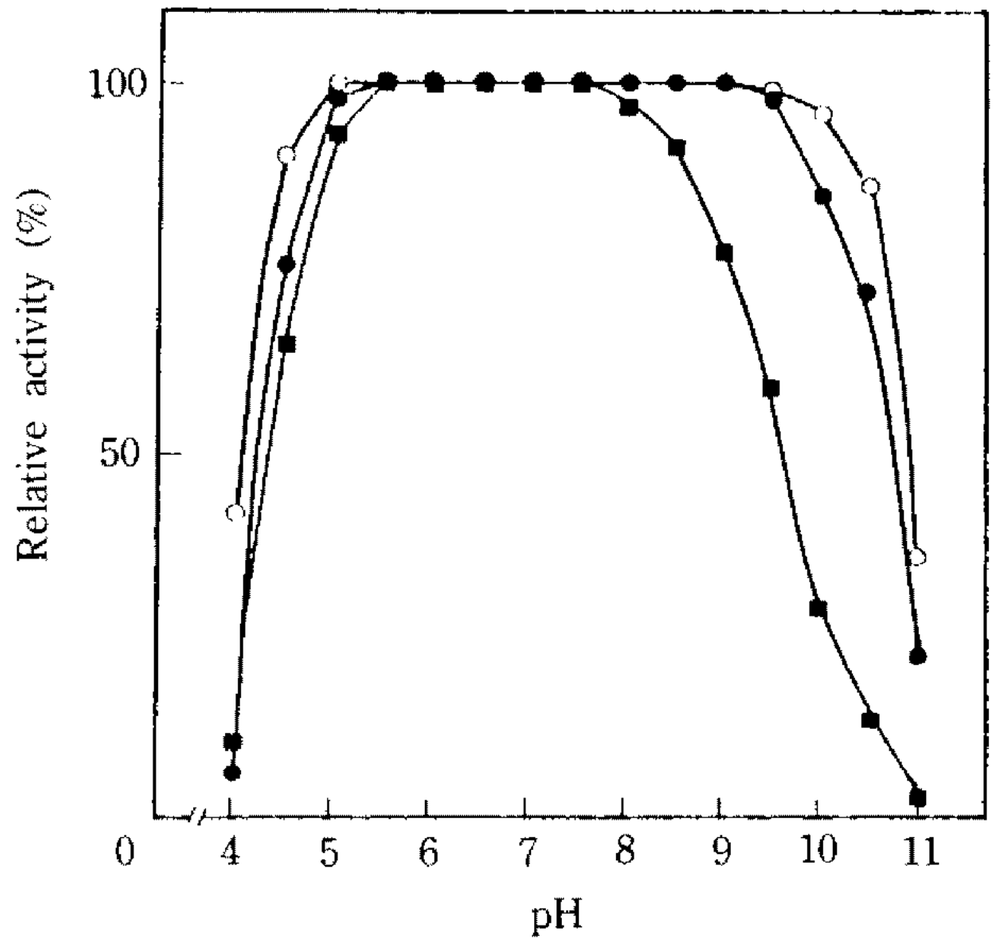

Fig. 4. Effect of pH on enzyme stability.
●: Avicelase activity, ○: CMCase activity, ■: β-Glucosidase activity

Table 1. Substrate specificity of purified cellulases

Substrate	Activity (units/ml × 10^3)			
	Avicelase	CMCase I	CMCase II	β-Glucosidase
Avicel	5.0	1.9	1.1	0
CM-cellulose	7.9	94.2	82.1	5.3
Filter paper	5.5	35.7	29.8	0
PNPG	0	0	0	64.5

Concentrations of avicel, CMCase I, CMCase II and β-glucosidase were 0.8, 0.45, 0.49 and 0.38 mg/ml, respectively.

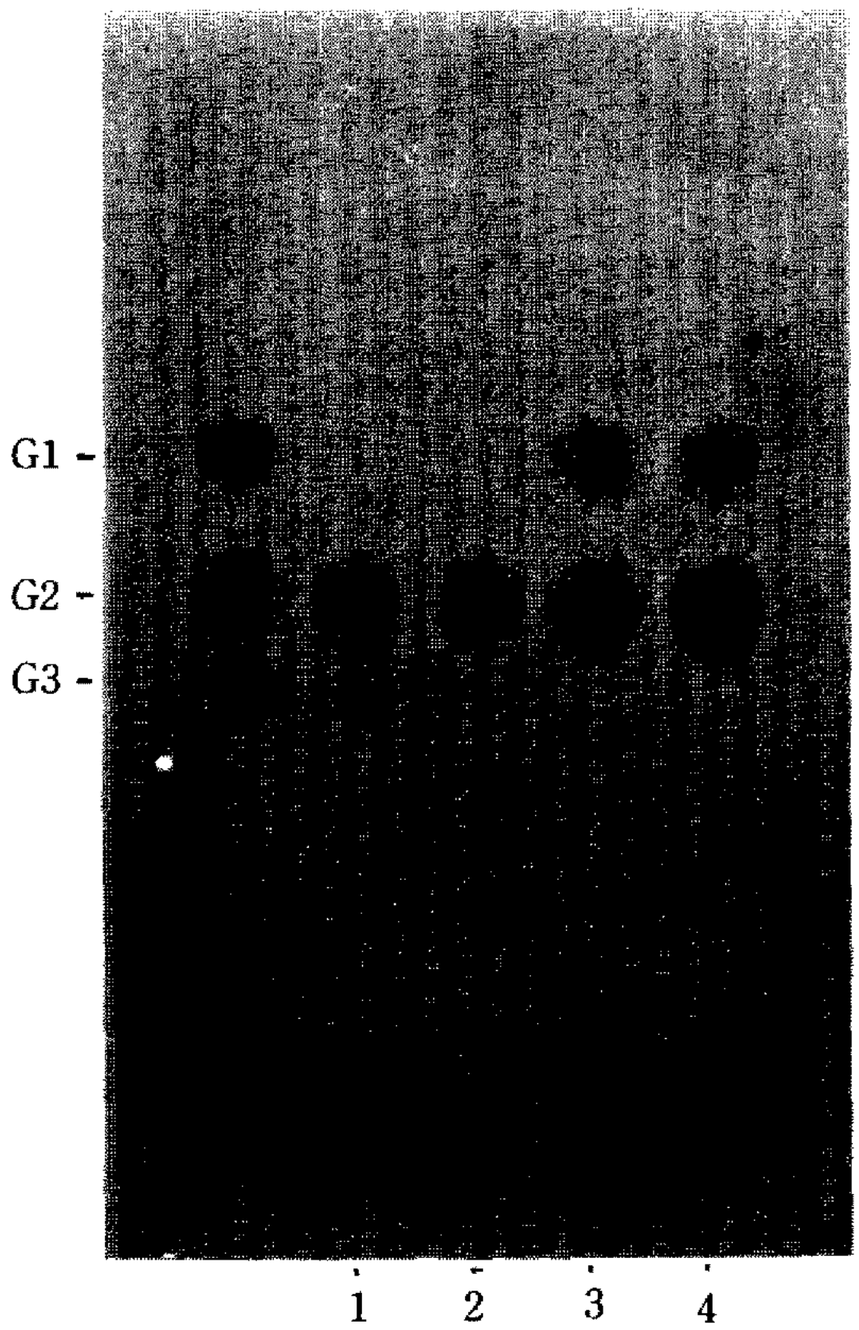

Fig. 5. TLC chromatogram of cellulase treated avicel, CM-cellulose and cellobiose.
G1: Glucose, G2: Cellobiose, G3: Cellotriose, 1: Avicel+avicelase, 2: CM-cellulose+CMCase I, 3: CM-cellulose+CMCase II, 4: Cellobiose+β-glucosidase

μg/m*l*로 측정되어 Nakamura 등이 보고한 *Cellulomonas uda*가 생산하는 avicelase의 apparent K_m값 2.9 mg/m*l*와 Halliwell과 Griffin(12)이 보고한 *Trichoderma koningii*가 생산하는 C_1성분(avicelase)의 cellulose에 대한 apparent K_m값인 0.05 mg/m*l*에 비해 친화력이 더 높은 것으로 나타났다.

CM-cellulose에 대한 CMCase I, II의 apparent K_m값은 각각 27.8, 16.4 μg/m*l*였다. 이는 Okada(13, 14)가 보고한 *Trichoderma viride*가 생산하는 세가지 CMCase의 apparent K_m값 0.081%(810 μg/m*l*), 0.096%)(960 μg/m*l*), 0.054%(540 μg/m*l*)와 역시 Okada(15)가 보고한 *Aspergillus niger*가 생산하는 CMCase의 apparent K_m값 0.086%(860 μg/m*l*)보다 친화력이 더 높게 나타났다.

한편 PNPG를 기질로 했을 때 β-glucosidase의 apparent K_m값은 3.51 mM이었다. 이는 Stoppok 등(16)이 보고한 *Cellulomonas uda*가 생산하는 β-glucosidase의 PNPG에 대한 apparent K_m값 103.5 mM보다는 친화력이 더 높게 나타났으나 Shin 등(17)과 Sternberg(10)가 보고한 *Trichoderma viride*가 생산하는 β-glucosidase의 cellobiose에 대한 각각의 apparent K_m값 1.11 mM, 1.50 mM보다는 친화력이 낮은 것으로 나타났다.

Table 2. K_m values of purified cellulases

Enzyme	K_m value	Substrate
Avicelase	4.76 μg/m*l*	Avicel
CMCase I	27.80 μg/m*l*	CM-cellulose
CMCase II	16.40 μg/m*l*	CM-cellulose
β-Glucosidase	3.51 mM	PNPG

요 약

Cellulomonas sp. YE-5가 생산하는 cellulase를 분리, 정제하여 효소의 특성을 알아보았다. Avicelase, CMCase, β-glucosidase의 반응 최적온도는 각각 40, 45, 40℃이었고, 반응 최적 pH는 5.5, 6.0 그리고 6.0이었다. 효소의 열안정성은 30~70℃에서 6시간 처리하였을 때 avicelase와 β-glucosidase는 50℃ 이상에서 거의 실활하였고, CMCase는 50℃에서 약 40%의 활성을 유지하였다. 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향은 25℃에서 24시간 처리하였을 때 avicelase와 CMCase는 pH 5.0~9.0 사이에서 안정하였으며, β-glucosidase는 pH 5.0~8.0 사이에서 안정하였다. 효소활성에 미치는 금속이온의 영향은 Mn^{2+}와 Co^{2+}에 의해 avicelase의 활성이 약간 증가하였고, Cu^{2+}와 Zn^{2+}에 의해서는 세 효소가 크게 저해를 받았다. 효소의 기질친화력(K_m)은 avicel에 대한 avicelase가 4.76 μg/m*l*, CMC에 대한 CMCase I이 27.80 μg/m*l*, CMCase II가 16.40 μg/m*l*이었으며, PNPG에 대한 β-glucosidase는 3.51 mM이었다.

참고문헌

1. Chey, D.C., N.Y. Hur, J.H. Yu and D.H. Oh. 1990. Purification of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 376-382.
2. Halsall, D.M. and D.J. Goodchild. 1986. Nitrogen fixation associated with development and locali-

zation of mixed populations of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 849-854.
3. Halsall, D.M. and A.H. Gibson. 1986. Comparison of two *Cellulomonas* strains and their interaction with *Azospirillum brasilense* in degradation of wheat straw and associated nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 855-861.
4. Wood, T.M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *Tricoderma koningii*. *Biochem. J.* **109**: 217-227.
5. Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson and U.B. Axio-Fredriksson. 1976. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem.* **61**: 621-630.
6. Fagerstam, L.G. and L.G. Pettersson. 1979. The cellulolytic complex of *Tricoderma reesei* QM9414. *FEBS Letters.* **98**: 363-367.
7. Hakansson, U., L.G. Fagerstam, L.G. Pettersson and L. Andersson. 1978. Purification and characterization of a low molecular weight 1,4-β-glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus *Tricoderma viride* QM9414. *Biochem. Biophys. Acta.* **524**: 385-392.
8. Shoemaker, S.P. and R.D. Brown Jr. 1978. Enzymatic activities of endo-1,4-β-D-glucanases purified from *Tricoderma viride*. *Biochem. Biophys. Acta.* **523**: 133-146.
9. Berghem, L.E.R. and L.G. Pettersson. 1973. Mechanism of enzymic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem.* **37**: 21-30.
10. Sternberg, D. 1976. β-Glucosidase of *Tricoderma*: Its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 648-654.
11. Nakamura, K. and K. Kitamura. 1983. Purification and some properties of a cellulase active on crystalline cellulose from *Cellulomonas uda*. *J. Ferment. Technol.* **61**: 379-382.
12. Halliwell, G. and M. Griffin. 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic component C_1 of *Tricoderma koningii* on native cellulose. *Biochem. J.* **135**: 587-594.
13. Okada, G. 1975. Enzymatic studies on a cellulose system of *Tricoderma viride*. *J. Biochem.* **77**: 33-42.
14. Okada, G. 1976. Enzymatic studies on a cellulase system of *Tricoderma viride*. *J. Biochem.* **80**: 913-922.
15. Okada, G. 1985. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1257-1265.
16. Stoppok, W., P. Rapp and F. Wagner. 1982. Formation, location and regulation of endo-1,4-β-glucanases and β-glucosidases from *Cellulomonas uda*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 44-53.
17. Shin, S.B., Y. Kitagawa, ak. I. Suga and K. Ichikawa. 1978. Cellulose biosynthesis by *Tricoderma viride* on soluble substrate. *J. Ferment. Technol.* **56**: 396-402.
18. Lee, H.S., K.H. Min, and M. Bae. 1988. Biosynthetic regulation and enzymatic properties of β-glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS 1-1, *Kor. J. Appl. Microbiol. and Bioeng.* **16**: 119-125.
19. Lee, J.W., C.N. Kim, N.Y. Hur, and D.H. Oh. 1992. Studies on the CMCase produced by *Pseudomonas* sp. YD-15. *Kor. J. Biotechnol. and Bioeng.* In press.
20. Kim, J.M., I.S. Kong, and J.H. Yu. 1987. Molecular cloning of an endoglucanase gene from an alkalophilic *Bacillus* sp. and its expression in *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2656-2659.

(Received December 24, 1991)