

Cellulase의 생산력이 뛰어난 *Clostridium thermocellum*의 분리

이호섭 · 최병일 · 이용현 · 박용복 · 하지홍

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Isolation of *Clostridium thermocellum* Producing High Activity of Cellulase

Lee, Ho-Sup, Byung-Il Choi, Yong-Hyun Lee,
Yong-Bok Park and Ji Hong Ha

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT: Three strains of *Clostridium thermocellum*, JH01, JH20 and JH30 which are capable of producing ethanol directly from cellulose were isolated from composts. The morphological, cultural and physiological properties of the strains were similar to the ATCC type strain, except for carbon source utilization and degree of ethanol tolerance. All of the three isolates could use glucose and maltose as a sole carbon source and two of them, strains of JH01 and JH20 were three times more tolerant to ethanol than the ATCC type strain. Cellulases secreted by the isolated strains had higher activities than those of the ATCC type strain.

KEY WORDS □ *Clostridium thermocellum*, Cellulase

고온 혐기성세균인 *Clostridium thermocellum*은 cellulosic biomass를 분해하여 직접 에탄올을 생산할 수 있는 균주로서 기존의 2단계 당화-발효 공정을 대체할 수 있다 (Cooney 등, 1978). 고온 혐기성 상태에서의 발효는 효소의 열에 대한 안정성이 높고, aeration을 할 필요가 없으며, 최종 생산물을 회수하는데 용이한 장점이 있다 (Sonnleitner 등, 1983). 그러나, *C. thermocellum*은 비교적 높은 섬유소 분해 능력은 갖고 있으나, 에탄올 생산수율과 발효속도가 낮고, 에탄올에 의하여 세포생육이 상당히 저해받는 단점이 있다 (Herrero 와 Gomez, 1981). 따라서, 이런 단점들을 극복하고 *C. thermocellum*을 산업적으로 유용하게 이용하려면 세포생육 속도를 증가시키고, 에탄올 생산성, 저항성등을 높일 필요가 있으나, 효소정제와 생산기작에 관한 연구 및 유전학적 연구의 부진함으로 인한 여러가지 어려움이 상존해 있다.

균주육종의 일환으로, Shinmyo 등 (1979)은 cellulose배지에서의 연속적인 transfer로 strain ATCC 27405로부터 TNP-CMCase와 Avicellase역가가 2배 높은 돌연변이주를 획득하였고, Herrero와 Gomez (1980)는 에탄올이 들어있는 배지에서 그 양을 증가

시키면서 에탄올 저항성 돌연변이 균주 C9를 얻은 바있다. 또한, Ng 등 (1981)은 hexose와 pentose를 기질로 사용가능하며 butyrate를 생성하지 않는 *C. thermohydrosulfuricum*과의 혼합배양을 시도하여 최종 에탄올 생산량을 3배정도 높인 바있다. 최근에는 유전자 조작기법을 이용한 cellulase 유전자 cloning과 원형질체 융합을 시도하여 균주를 개량시키려는 노력이 행해지고 있으나 대부분의 경우 ATCC 균주만이 연구 대상이 되고있다 (Robson와 Chambliss, 1989; 김, 1988).

본 연구는 *C. thermocellum*의 다양한 유전자원을 확보하고, 산업적으로 유용한 균주를 선발하기 위하여 혐기상태의 퇴비로부터 야생균주의 분리를 시도하였다. 몇몇 퇴비로부터 야생균주들을 enrichment하여 분리한 다음 각 균주들의 형태와 생리·생화학적 특성을 조사하였고, strain ATCC 27405를 표준균주로 사용하여 분리균주들이 분비하는 cellulase역가를 측정·비교하였다.

재료 및 방법

기본배지 및 배양조건

실험에 사용된 기본배지는 Weimer와 Zeikus (1977)의 CM3배지로써 그 조성은 yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.29%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.13%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015%, resazurin 0.2 mg/100 ml, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.125 mg/100 ml이며, 탄소원으로 α -cellulose를 1%되게 첨가한 다음 pH를 7.8로 조절하였다. 환원제로는 Na_2S , cystein \cdot HCl 각 0.125%를 0.2 N NaOH에 녹여 질소 gas로 치환하고, neoprene 고무마개로 밀봉한 뒤 따로 멸균하여 배지에 첨가하였다.

균주의 순수분리

벚짚퇴비와 부식토양에서 채취한 시료 5 g씩을 CM 3 배지 10 ml에 넣고 질소 gas로 치환하여 90°C에서 15분간 가열한 다음 α -cellulose를 첨가한 CM3 배지 20 ml에 접종한 후 다시 질소 gas로 치환하여 60°C에서 5-6일간 배양하였다. 배양 후 pasteurization을 위와 동일한 조건으로 한번 더 행하고 동일배지에 접종하여 5-6일간 배양한 다음 cellulose분해가 일어 나고 Ng등 (1977)의 보고처럼 노란 색소를 생성하는 균주가 배양된 bottle을 선별하였다. Bottle로 부터 배양액을 취하여 agar배지에서 수 차례 걸쳐 subculture한 다음 *C. thermocellum*을 분리하였다.

생리·생화학적 특성조사

본 실험에서 행한 여러가지 test들은 “Manual of methods for General Bacteriology” (Murray등, 1981)와 “Anaerobe laboratory manual” (Holdeman등, 1977)의 방법에 따라 실시하였다. 당 이용성은 탄소원을 첨가하지 않은 기본배지에 각각의 당을 1%되게 첨가한 뒤 접종하여 배양한 후에 pH와 흡광도를 측정하여 결정하였다. Gelatin 가수분해력은 기본배지에 12%의 gelatin을 첨가한 뒤 접종하여 60°C에서 10일간 배양한 뒤 4°C에서 gelatin의 경화 여부로 판단하였고, starch 가수분해는 0.2% soluble starch가 첨가된 agar 배지에 균을 희석 접종하여 60°C에서 7일간 배양한 뒤 iodine용액을 가하여 투명대의 생성유무로 판정하였다. Esculin 가수분해는 0.01% esculin과 0.05% ferric citrate가 첨가된 기본 배지에 접종하여 배양후의 배지색깔 변화로 판단하였다. 에탄올에 대한 내성은 cellobiose 탄소원의 배지에 에탄올을 각각 0에서 5%까지의 농도로 첨가한 다음 배양후의 흡광도를 재어 판정하였다. 균주의 판정은 “Bergey’s manual of Systematic Bacteriology” (Sneath 등, 1984)를 참조하였다.

효소 역가 측정

Endo-glucanase역가는 1% carboxymethylcellulose (CMC)용액 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 Miller (1959)의 DNS 방법으로 환원당을 측정하여 효소액 1 ml이 분당 1 μmole 의 glucose를 생성할때를 1 unit으로 하였다. Exo-glucanase역가는 50°C에서 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.8)를 사용하여 filter paper와 avicel을 기질로 한 역가를 측정하여 나타내었으며, xylanase는 1% soluble xylan 용액을 기질로 하여

endo-glucanase와 같은 방법으로 측정하여 표준균주인 ATCC 27405의 역가와 비교하였다. 다백질 정량은 Bradford (1976) 방법으로 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 측정하였다.

결과 및 고찰

C. thermocellum 균주의 순수분리

벚짚퇴비와 부식토양으로 부터 60°C에서 생육하면서 agar배지상에서 cellulose를 분해하며 노란 색소를 생성하는 3균주 JH01, JH20, JH30을 최종적으로 선별하였다. 분리된 3균주들의 현미경 사진은 Fig. 1과 같다.

3균주 모두 oval terminal endospore를 가지고 있었으며, 길이 4-5 μm 의 rod형이었다. 이들은 모두 agar배지 상에서 cellulase를 분비하여 투명한 환을 형성하였고, 균락 주위에 확산되는 노란 색소를 분비하였는데, cellobiose가 탄소원일 때에는 색소 생성이 관찰되지 않았다. 3균주의 generation time은 cellulose가 탄소원일 때는 8-11시간, cellobiose가 탄소원일 때는 2-4시간 정도였는데, 어떠한 탄소원이든 최종 생육정도는 거의 동일하였다.

생리·생화학적 특성

Table 1에서 볼 수 있는 바와같이 분리된 3균주 모두 표준균주와 비슷한 생육 특성을 보였다. 이들은 모두 그람 음성균이었으며, 최적 생육 온도가 60-64°C인 절대 혐기성 세균이었다. 3균주 모두 indole과 lipase, lecithinase, catalase를 생성하지 않았으며, nitrate를 환원시킬 수 없었고, milk를 응집시킬 수 없었으나, gelatin과 esculin은 가수분해 하였다. 또한,

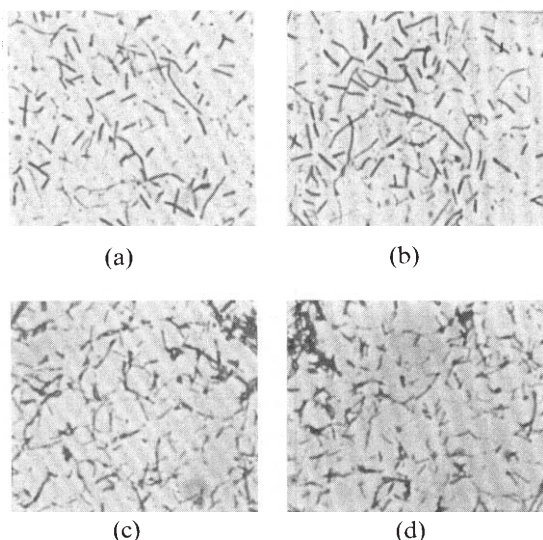


Fig. 1. Photomicrographs of *C. thermocellum* ATCC 27405(a), JH01(b), JH20(c), JH30(d). (X 1500).

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the *C. thermocellum* ATCC 27405 and the isolated strains.

Strains	ATCC 27405	JH01	JH20	JH30
Charateristics				
Gram staining	—	—	—	—
Motility	+	+	+	+
Cell form	rod	"	"	"
Spore	oval terminal	"	"	"
O ₂ sensitivity	strictly anaerobic	"	"	"
Opt temp.	60-64%	"	"	"
Pigment	yellow	"	"	"
Ethanol tolerance	≤0.5%	≤1.5%	≤1.5%	≤0.6%
Indole produced	—	—	—	—
Lipase produced	—	—	—	—
Lecithinase produced	—	—	—	—
Nitrate reduction	—	—	—	—
Milk reaction	—	—	—	—
Catalase	—	—	—	—
Hydrolysis of				
Esculin	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Glycerol	—	—	—	—
Inositol	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—
Maltose	—	—	—	—
Mannitol	—	—	—	—
Mannose	—	—	—	—
Melibiose	—	—	—	—
Ribose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Starch	—	—	—	—
Sucrose	—	—	—	—
Xylose	—	—	—	—

xylose와 같은 pentose를 탄소원으로 이용하지 못하는 전형적인 *C. thermocellum*의 종 특성을 보여주었다. 균의 형태, 생화학적 특성 및 배양상의 특성을 고려해 볼때 3균 모두 *C. thermocellum*으로 동정되었다. 그러나, 야생균주들은 비교에 사용된 표준균주와는 달리 glucose와 maltose를 이용할 수 있었으며, 이 중에서 특히 JH30은 mannitol을 이용할 수 있었다. 에탄올 내성을 조사한 결과 JH01과 JH20은 표준균주보다 3배정도 높은 내성을 나타내었다. 이것은 Herrero와 Gomez (1980)가 얻은 균주 C9의 25 g/l보다는 낮은 수치이나 내성변이주 선발 과정을 거치지 않은 야생균주로 부터 얻어진 값이므로 앞으로 이 균들의 이용가치가 클 것으로 사료된다.

효소역가 분석 및 비교

효소역가 측정을 위해서는 1% α -cellulose를 기질로 한 기본배지에 60℃에서 5일간 배양한 균 상등액을

조효소액으로 하였으며, 여러가지 기질에 대한 효소역가는 Table 2에 나타내었다.

분리된 3균주의 cellulase역가가 표준균주보다 거의 모든 경우 높게 나타났다. 분리 균주들의 endoglucanase역가는 표준균주의 0.14 unit에 비하여 0.16-0.25 unit으로 1.1-1.8배 높았으며, exoglucanase는 표준 균주의 0.09 unit에 비해 0.11-0.19 unit으로 1.2-2배정도 높았다. 분리균주들 중에서 JH30균주의 cellulase역가가 가장 높게 나타났는데, 특히 exoglucanase역가는 표준균주보다 2배 이상 높아서 endoglucanase/exoglucanase 값이 균주들 중에서 가장 낮았다. 섬유소 분해 효소들의 역가에 대한 이상의 결과들은 새로 분리된 야생주들이 천연 섬유소 분해능에 있어서 표준균주보다 우수할 수 있음을 입증해주고있다. 또한, 분리균들은 xylose를 탄소원으로 이용할 수는 없었으나, 3균주 모두 soluble xylan을

Table 2. Extracellular cellulase activities of the *C. thermocellum* 27405 and the isolated strains.

Enzyme	Substrate	Activity (Unit/ml)			
		ATCC 27405	JH01	JH20	JH30
Endoglucanase	Carboxymethylcellulose	0.14	0.16	0.22	0.25
Exoglucanase	Filter Paper	0.09	0.11	0.15	0.18
	Avicel	0.09	0.15	0.18	0.19
Xylanase	Soluble Xylan	0.38	0.34	0.41	0.46
Soluble protein (mg/ml)		0.105	0.05	0.07	0.06

분해할 수 있었고, xylanase 역시 JH01을 제외한 두 균주 즉, JH20과 JH30은 표준균주보다도 높은 역가를 나타내었다. 결국, 분리균주들은 *C. thermocellum*의 종 특성을 그대로 유지하고 있으나, 섬유소 분해 효소역가, 에탄올 저항성등에 있어서 표준균주와 상당한

차이를 보이고 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 돌연 변이주 선발에 의한 균주육종에 선행해서 다양한 야생주의 선발이 행해져야함을 보여주는 결과라고 사료된다.

적 요

Cellulose를 직접 에탄올로 발효시키는 *C. thermocellum* 야생균주 JH01, JH20, JH30을 벵질 퇴비로부터 분리하였다. 분리 균들의 형태 및 배양상의 특징과 생리·생화학적인 특성은 ATCC 표준균주와 거의 비슷하였으나, 분리균주들은 모두 glucose와 maltose를 탄소원으로 이용할 수 있었고, JH01과 JH20은 표준균주보다 에탄올에 대한 내성이 3배정도 강하였다. 또한, 분리균주들이 분비한 cellulase역가도 표준균주보다 높게 나타났다.

사 사

본 연구는 1989년도 교육부 유전공학 연구소 학술연구 조성비에 의해 수행된 것입니다.

REFERENCES

1. 김옥한, 1988. 고온 혐기성 섬유소 직접발효균주의 Cellulase특성 및 원형질체 융합. 경북대학교 대학원 박사학위 논문.
2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
3. Cooney, C.L., D.I.C. Wang, S.D. Wang, J. Gordon and M. Ziminez, 1978. Simultaneous cellulose hydrolysis and ethanol production by a cellulolytic anaerobic bacterium. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 113-114.
4. Herrero, A.A. and R.F. Gomez, 1980. Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*: effect of growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 571-577.
5. Herrero, A.A. and R.F. Gomez, 1981. In Moo Young, Robinson, C.W. (Eds.), *Adv. in Biotechnol.*, Vol. II. Proceeding from the 6th International Fermentation symposium, London, Canada, p. 213.
6. Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore, 1977. *Anaerobe laboratory manual*, Virginia Polytechnic Institute and State University Blackburg.
7. Miller, G.L., 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
8. Murray, G., C. Nester, K. Wood and M. Philips, 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, ASM, p. 1-52.
9. Ng, T.K., A. Ben-Bassat and J.G. Zeikus, 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by coculture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1337-1343.
10. Ng, T.K., P.J. Weimer and J.G. Zeikus, 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.*, **114**, 1-7.
11. Robson, L.M. and G.H. Chambliss, 1989. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme. Microb. Technol.*, **11**, 626-644.
12. Shinmyo, A., D.V. Garcia-Martinez and A.L. Demain, 1979. Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by *Clostridium thermocellum*. *J. Appl. Biochem.*, **1**, 202-209.
13. Sneath, P.H.A., N.S.S. Mair, M.E. Sharpe and J. G. Holt, 1984. *Bergey's Manual of Systematic*

- Bacteriology, Vol. 2, William and Wilkins Co.
14. **Sonnleitner, B. and A. Fiecher**, 1983. Advantage of using thermophiles in biotechnological process: expectation and reality. *Trends Biotechnol.* **1**, 74-78.
 15. **Weimer, P.J. and J.G. Zeikus**, 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium*

thermocellum in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 289-297.

(Received May 14, 1991)

(Accepted June 12, 1991)