

우분으로부터 *Bacillus subtilis* CH-10의 분리 및 균주가 분비하는 Cellulase의 특성에 관한 연구

김태일* · 한정대 · 전병수 · 하상우 · 양창범 · 김민균¹

농촌진흥청 축산기술연구소, 서울대학교 농생대 응용생물화학부

우분으로부터 cellulase를 생산하는 미생물을 congo red 염색과 활성측정을 통해 선별하여 cellulase 활성이 우수한 균을 분리하였다. 분리균은 생화학적, 형태학적, 균체 지방산 조성을 근거로 *Bacillus subtilis* CH-10으로 동정하였다. 분리균이 분비하는 효소학적 특성 중 효소생산 조건은 초기 pH 7.5 및 배양온도 50°C 그리고 48시간 배양이 가장 적합하였다. 조효소액에서 CMCCase 최적온도는 75°C이었고, 온도안정성은 50°C까지 70%의 효소활성을 유지하였다. 조효소액에서 CMCCase 최적 pH는 7.5이었고, pH 안정성은 pH 7.5~9.0영역에서 70%의 효소활성을 유지하였다. 분리균을 CMC 배지에서 37°C, 24시간 배양시 나타난 CMCCase와 FPase 활성은 각각 1.13 U/ml와 0.16 U/ml 였으나 avicelase와 β -glucosidase의 활성은 검출되지 않았다. CMC-SDS-PAGE방법으로 3개의 효소활성 band를 확인하였고, Cel 1 및 Cel 2 그리고 Cel 3의 분자량은 각각 약 39 및 41 그리고 57 kDa이었다.

Key words □ cellulase, CMCCase, CMC-SDS-PAGE, avicelase

Cellulase는 식물체 건조중량의 40%이상 차지하는 주된 구조 다당류인 cellulose의 β -1,4-glycosidic 결합을 가수분해시키는 효소로 endoglucanase(CMCCase, EC 3.2.1.4) 및 exoglucanase (avicelase, EC 3.2.1.91) 그리고 cellobiase(β -1,4-glycosidase, EC 3.2.1.2)로 구분되어진다(10,19). 산업적으로 이용도가 높은 cellulase는, 축산업에서는 축산분뇨의 퇴비화 촉진과 소화율을 높이기 위한 사료의 생균제, 펄프 및 제지업에서는 표백제, 의류업에서는 면직물 제품의 보습성과 촉감의 유지를 위한 세제와 indigo로 염색된 청바지의 탈색효소로 사용되고 있다. 또한 식품산업에서도 과일 음료와 맥주의 청징 등에 이용되고 있다(1,9).

일반적으로 cellulose를 분해하는 세균으로는 *Bacillus* sp. (8,12,21), *Pseudomonas* sp.(3,18), *Clostridium* sp.(7,11) 및 *Cel-lulomonas* sp.(4,5) 등이 알려져 있다.

곰팡이에서는 endoglucanase와 exoglucanase 그리고 β -glucosidase가 동시에 존재하여 이들의 상승작용에 의해 cellulose분해가 촉진되나, 일반세균에서는 cellulase계 효소를 모두 생산하지 못하여 곰팡이에 비해 상대적으로 활성이 낮다는 단점이 있다(17). 그러나 곰팡이는 산성과 중온에서 강한 활성을 보이는데 비해 일반세균은 내열성 또는 중성, 알칼리성에서 활성을 나타내는 균주가 많이 보고되고 있어 용도에 맞는 cellulase를 선택하기에 용이하며(10), 또한 분자생물학적 측면에서는 배양시간이 짧고 유전자 조작이 용이하다는 장점이 있어 세균에서 생산되는 cellulase에 관한 연구는 매우 바람직하다.

따라서, 본 연구에서는 우분으로부터 cellulose 분해효소를 분비하는 *Bacillus* sp.를 분리·동정하고 효소의 생산에 미치는 배양조건과 cellulase 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

Cellulase 우수 생산균을 분리하기 위하여 우분시료를 10⁵까지 십진희석하고 이를 0.1% peptone수 시험관에 현탁하여 실온에서 20분간 방치한 후 CMC고체배지(0.1% carboxymethyl cellulose(CMC, medium viscosity, Sigma Chem. Co.), 1.5% Bacto tryptone, 0.5% Bacto soytone, 0.5% NaCl, 1.5% agar, pH 7.0)에 도말하여 37°C, 24시간 배양하였다. 각 배지에서 얻은 단일 균주를 다시 CMC고체배지에 접종하고, 37°C에서 12시간 배양한 후 0.1% congo red(Sigma Chem. Co.)(20)를 사용하여 clear zone의 유무를 확인함으로써 cellulose를 분해하는 미생물로 선별하였다.

선발된 균주의 형태학적 및 생화학적 특징은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (2)와 "Manual of Methods for General Bacteriology"(6)에 준하여 분리·동정하였고, 균체 세포벽의 지방산 조성 분석은 Microbial Identification System (MIS, HP6890 GC, Microbial ID, USA)을 이용하여 동정하였다. FID를 장착한 GC의 분석은 methyl phenyl silicone fused silica capillary column(25 m×0.2 mm×0.33 μ m, HP 19091B-102, USA)을 사용하여 컬럼 온도를 초기온도 170°C에서 분당 5°C 증가시켜 270°C까지 하였으며 운반 기체로 H₂ 가스를 사용하고, 주입부와 검출기 온도는 각각 250°C, 300°C로 하였다. GC 분석에 의하여 분리된 각 peak 성분의 동정은 MIS Soft-

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 0331-290-1725, Fax : 0331-290-1598
E-mail : kimti@nlri.go.kr

ware(Microbial ID, Inc., USA)를 이용하여 표준 물질의 머무름 시간과 비교하여 결정하였으며, peak의 면적과 조성 비율에 따라 균주를 동정하였다.

조효소액 조제

Cellulose 분해력이 있는 균주를 CMC액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 배양액을 원심분리(14,000 rpm, 20분, 4°C)하여 잔존하는 균체를 제거하였다. 상등액에 80% 포화용액이 되도록 ammonium sulfate를 첨가한 후 4°C에서 1시간 방치한 다음 15,000 rpm에서 30분간 원심분리시켜 얻은 침전물을 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)로 용해시킨 것을 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성측정

CMCase와 avicelase : 2% CMC용액 1 ml 또는 2% avicel 현탁액 1 ml와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5) 1 ml에 조효소액 0.2 ml 첨가하여 섞은 다음 50°C 항온조에서 15분간 반응시킨 후 반응액 1 ml를 취하여 Somogyi-Nelson(19)의 환원당 정량법에 의하여 CMCase와 avicelase 활성을 측정하였다. 표준 반응조건에서 단위분당 1 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

FPase : Whatman No.1 Filter paper(1×6 cm)와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5) 2 ml에 조효소액 0.2 ml 첨가하여 섞은 다음 50°C 항온조에서 1시간 반응시킨 후 반응액 1 ml를 취하여 Somogyi-Nelson(19)의 환원당 정량법에 의하여 FPase 활성을 측정하였다. 표준반응조건에서 단위분당 1 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

β -glucosidase : 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 녹인 1 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG, Sigma Chem. Co.) 0.4 ml와 조효소액 0.1 ml를 혼합한 다음 50°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 1 ml의 1 M Na₂CO₃를 가하고 증류수 5 ml로 희석하여 유리된 PNP의 양을 420 nm에서 측정하였다. 표준 반응조건에서 단위분당 1 μ mol의 PNP를 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

효소생산조건

선발된 균의 효소생산조건을 알아보기 위하여, 초기 pH는 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 사용하여 CMC배지의 pH를 각각 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5로 조절하였고, 최적 배양온도는 각각 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 배양하여 생산된 효소의 활성을 측정하였다.

효소활성에 미치는 pH 효과

CMCase 활성에 대한 pH의 영향성을 알아보기 위해, 0.1 M Na-acetate (pH 4~5.5), 0.1 M Na-phosphate (pH 6~7), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5~9.0), 0.1 M carbonate-bicarbonate 완충용액 (pH 9.5~11)에 조효소액을 첨가하여 4°C에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정하여 pH 안정성을 조사하였다. 최적 반응 pH는 효소 반응시 사용되는 반응혼합액 중 완충용액의 pH를

달리하여 조사하였다.

효소활성에 미치는 온도 효과

최적 반응온도는 반응혼합물을 분석하고자 하는 온도로 고정시킨 후, 조효소액을 첨가하여 30~80°C범위에서 반응을 시켜 조사하였고, 온도안정성은 30~80°C범위에서 1시간 동안 기질과 반응시켜 50°C에서 잔존하는 효소활성을 측정하였다.

전기영동과 Zymogram

SDS-PAGE는 Laemmli 방법(13)에 준하여 12.5% 농도의 gel

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of the isolate, CH-10

Characteristics	Result
Gram staining/Shape	+, Rod
Catalase	+
Oxidase	-
Spore	+
Motility at 22°C	+
Acid production from:	
Glucose	+
Mannitol	-
Lactose	+
Maltose	+
Saccharose	+
Esculin	+
Arabinose	-
Arginine	-
Cellobiose	-
Galactose	-
Raffinose	-
Salicin	-
Sorbitol	-
Sucrose	+
Trehalose	+
Hydrolysis of gelatine	+
Nitrate reduction	-
Citrate utilization	+
MR test	+
VP test	+
Urea	-
Growth at:	+
55°C	
< pH 5.5	+
7% NaCl	+

+, Positive; -, Negative

을 사용하였으며, zymogram은 Park등(15)의 방법을 변형하여 사용하였다. Separating gel은 0.1%의 CMC를 포함하고 있고, gel상에 존재하는 단백질을 변성제를 제거하기 위하여 renaturation buffer(1% triton X-100, 10 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0)를 사용하였고, renaturated gel을 congo-red로 염색함으로써 활성밴드를 확인하였다. Standard marker protein은 BIO-RAD® (Richmond, CA, U.S.A)를 이용하였다.

결과 및 고찰

Cellulose 분해력이 있는 미생물 분리와 동정

CMC를 함유한 배지에서 성장한 균주를 congo red 염색을 통하여 선별된 균주중 cellulase 활성이 높은 균주로 CH-10을 선별하였으며 선별된 단일 균주는 Gram 양성균의 운동성을 가지는 간균으로, catalase 양성이며 포자를 생성하는 것으로 관찰되었고 당발효실험 결과 *Bacillus* sp.였으며(Table 1), MIS를 이용하여 미생물 세포벽의 지방산 조성을 분석한 결과, Table 2와 같이 iso-C_{15:0}와 anteiso-C_{15:0}, anteiso-C_{17:0}, anteiso-C_{17:0} 등이 주요성분으로 검출되었고 *Bacillus subtilis*의 균체 지방산 조성 과 비교하였을 때 0.578 신뢰도를 보였다. 이상의 결과에 의해 분리균을 *Bacillus subtilis* CH-10으로 동정하였다.

***B. subtilis* CH-10이 생산하는 cellulase의 기질 다양성**

분리균 *B. subtilis* CH-10이 생산하는 cellulase계 효소를 조사하기 위하여, 각기 다른 기질(Filter Paper No. 1, CMC, Avicel)을 첨가한 배지에 균을 37°C, 24시간 배양하여, CMCCase 및 FPase, avicelase, β-glucosidase활성을 측정하였다. Table 3에 제시한 것과 같이, 전체 cellulase의 활성을 나타내는 FPase활성은 모든 기질에서 유도되어졌고, 특히 endocellulase인 CMCCase가 가장 많이 유도되어졌다. 그러나, avicelase와 β-glucosidase의 활성은 유도되지 않았다. 따라서, 분리균 *B. subtilis* CH-10의 주된 cellulase계 효소는 CMCCase이며, CMCCase 활성 유도면에서 가장 적당한 기질은 CMC라고 생각되어진다. 이는 섬유소를 분해하는 세균이 생성하는 cellulase계 효소 중에서 avicelase가 가장 많이 생산된다는 Chey 등(4)의 보고와는 일치하지 않았다.

효소유도조건

Table 2. Composition of the cellular fatty acid of the isolate CH-10

Fatty acid	Composition (%)
13:0 iso	0.62
14:0 iso	1.78
15:0 iso	26.52
15:0 Anteiso	45.40
16:0 iso	2.94
16:0	2.11
17:0 iso	10.51
17:0 Anteiso	10.21

Table 3. Comparison of activities of FPase, CMCCase, avicelase and β-glucosidase on three substrates

Substrate*	Activity(unit/ml)			
	FPase	CMCase	Avicelase	β-glucosidase
Filter Paper	0.07	0.44	0	0
CM-cellulose	0.16	1.13	0	0
Avicel	0.08	0.49	0	0

*Either 0.1% avicel, 0.1% CMC or filter paper No.1 (2×12 cm) as a substrate source was added to the medium containing 1.5% Bacto tryptone, 0.5% Bacto soytone, and 5% NaCl.

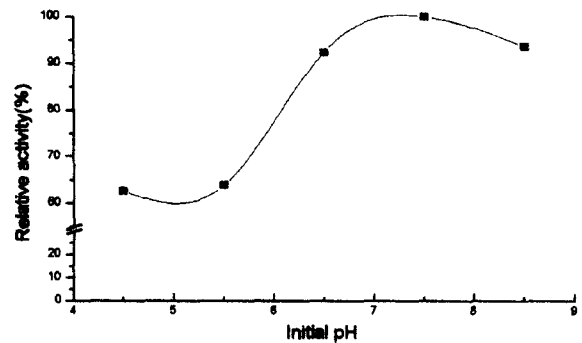


Fig. 1. Effect of initial pH of medium on the production of CMCCase from *Bacillus subtilis* CH-10. The initial pH of CMC medium composed of 0.1% CMC, 1.5% bacto tryptone, 0.5% bacto soytone, and 0.5% NaCl was adjusted by 0.1 N HCl and 0.1 N NaOH.

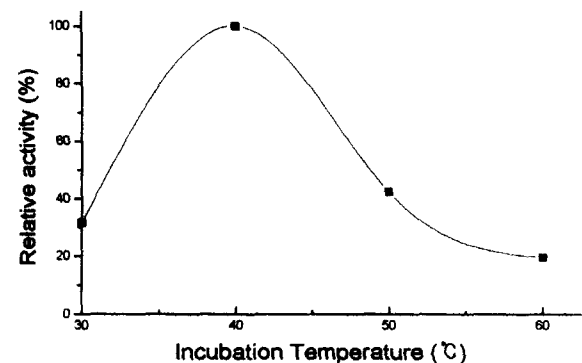


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the production of CMCCase from *Bacillus subtilis* CH-10. The CMC medium controlled initial pH 7.5 was carried out at various temperature.

분리균 *B. subtilis* CH-10의 효소 생산 효율을 높이기 위하여 배지의 초기 pH와 배양 온도를 조사하였다. 초기 pH가 효소생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 0.1% CMC와 1.5% Bacto tryptone, 0.5% Bacto soytone, 0.5% NaCl이 함유된 CMC배지를 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 초기 pH를 각각 4.5에서 8.5까지로 조정하고 CH-10을 배양하였을 때 Fig. 1에서와 같이 배지의 초기 pH가 7.5일 때 효소생산성이 가장 높게 나타났다. 배양온도가 효소 생산성에 미치는 영향은 균주의 배양온도를 30~60°C로 조절하여 조사하였다(Fig. 2).

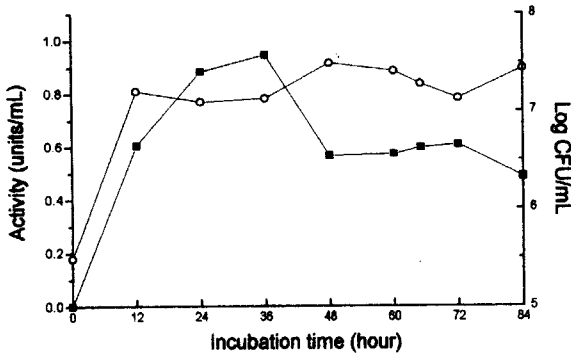


Fig. 3. Time course of microbial growth and CMCase activity. Culture medium contained 0.1% CMC, 1.5% Bacto tryptone, 0.5% Bacto soytone, and 0.5% NaCl (initial pH 7.5). 6 ml of seed culture was inoculated to 600 ml flask and the incubation temperature was at 50°C without shaking. ○, viable cell count; ■, CMCase activity.

따라서, 분리균 *B. subtilis* CH-10의 배양조건은 초기 pH 7.5, 배양온도 40°C가 효소 생산성에 가장 적합한 것으로 나타났다.

배양시간에 따른 균의 성장 및 CMCase활성변화

균의 성장과 효소활성을 초기 pH 7.5 및 배양온도 40°C에서 12시간 간격으로 조사한 결과, 36시간대에서 효소의 상대활성도가 가장 높았고, 이 때의 균수는 7.13 log cfu/ml이었다. 균수와 CMCase의 상대활성 추세는 대체로 일치하였으나, 균수는 48시간에 최대값 7.49 log cfu/ml로 가장 높았고, 효소는 배양 36시간째가 가장 높은 활성을 보여 균의 성장과 효소의 생성은 약간의 시간 차이를 보임을 알 수가 있었다 (Fig. 3).

CMCase 활성에 미치는 온도의 영향

CMCase의 최적 반응온도를 구하기 위하여 40~80°C사이에서 효소 반응을 실시하여 활성도를 측정된 결과는 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 CMCase 최적 반응온도는 75°C이며, 65~75°C

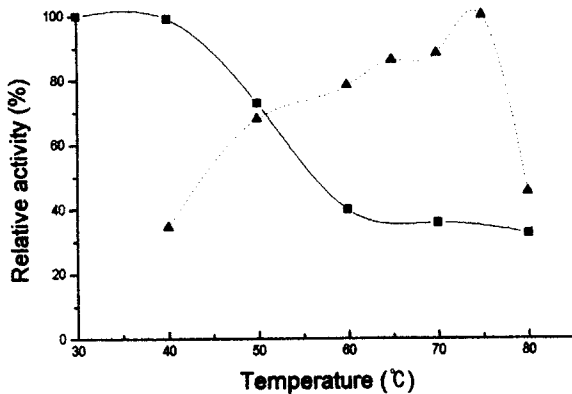


Fig. 4. Effect of temperature on activity and stability of the CMCase from *Bacillus subtilis* CH-10. The enzyme activity was assayed at various temperature for 15 min (▲) and the residual activity was measured after incubation of the enzyme at various temperature for 1 hr (■).

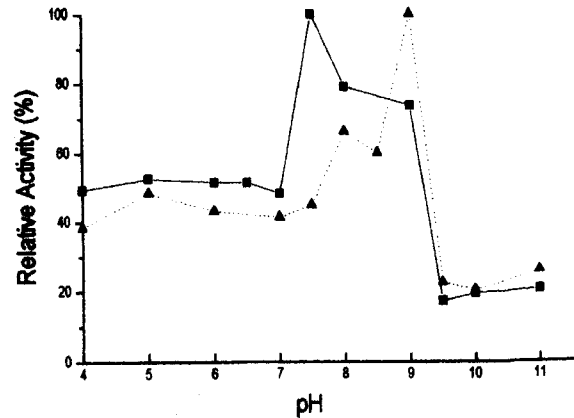


Fig. 5. Effect of pH on activity and stability of the CMCase from *Bacillus subtilis* CH-10. The enzyme activity was assayed at various pH (■) and the residual activity was measured after incubation of the enzyme at various pH for 24 hr (▲). The following buffers were used: 0.1 M Na-acetate (pH 4.0 to 5.5), 0.1 M Na-phosphate (pH 6.0 to 7.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5 to 9.0), and 0.1 M carbonate-bicarbonae (pH 9.5 to 11).

사이에서 80%이상의 상대활성을 나타내었다. CMCase의 열 안정성을 검토하기 위하여 30~80°C 사이의 온도에서 조효소액을 각각 1시간 동안 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과, Fig. 4와 같이 50°C이하에서는 70%의 잔존활성을 유지하였으나, 50°C이상에서는 급격하게 감소하는 경향을 나타냈다.

CMCase 활성에 미치는 pH의 영향

CMCase의 최적 반응 pH를 조사하기 위하여 pH 4.0~11.0 범위에서 기질과 반응시킨 후 효소활성을 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 9.0에서 최대의 효소활성을 나타내었다. CMCase의 pH 안정성을 검토하기 위하여 pH 4.0~11.0 범위의 완충용액에 일정한 조효소액을 넣고 혼합한 후 24시간 동안 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과, Fig. 5와 같이 pH 7.5에서 가장 안정하였으며, pH 7.5~9.0 범위에서 60% 이상의 잔존활성을 유지하였다.

CMC-SDS-PAGE를 이용한 효소활성 염색 및 분자량 측정

배양시간에 따른 조효소액에 존재하는 단백질의 분포와 섬유소분해효소의 활성을 직접 gel상에서 확인하기 위하여 0.1% CMC가 포함된 12.5% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동을 하였다(Fig. 6). 배양시간별로 취한 조효소액을 전기영동한 결과, 분자량 57 kDa과 41 kDa영역에서 나타난 단백질들이 시간이 경과됨에 따라 넓고 진해지는 것을 볼 수 있었고, renaturation buffer로 단백질 변성제를 제거한 후 congo red염색을 하였더니, 3개의 밴드가 활성을 보였으며, 그 중에서 41 kDa 영역의 밴드가 가장 넓어 주된 활성 밴드임을 확인 할 수 있었다.

활성 밴드의 분자량은 Fig. 7과 같이 표준 단백질이 이동한 상대 이동도(Rf)값과 분자량의 상용대수값에 대한 표준곡선을 작성하여 구하였다. Cel 1, Cel 2와 Cel 3의 분자량은 각각 약 39 및 41, 57 kDa이었다. Lim 등(14)과 Park 등(15), Saarihahti

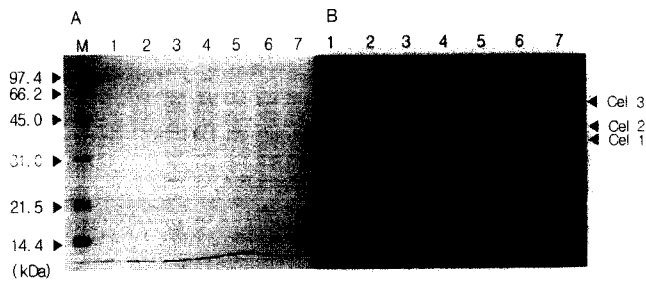


Fig. 6. Patterns of extracellular proteins and detection of CMCase activity by CMC-SDS-PAGE in the culture of *Bacillus subtilis* CH-10. Electrophoresis was carried out in SDS-polyacrylamide gel containing 0.1% CMC with constant voltage of 150 volts at room temperature. Gel A was stained for protein with coomassie blue R-250, and Gel B was stained for zymogra with 0.5% congo red, 1 N NaOH and 1 I HCl. Lane M contains the molecular weight markers: phosphorylase b(97,400), bovine serum albumin(66,200), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(31,000), soybean trypsin inhibitor(21,500), and lysozyme(14,400). Culture time for lanes: 1, 12 hr; 2, 24 hr; 3, 36 hr; 4, 48 hr; 5, 60 hr; 6, 72 hr; 7, 84 hr.

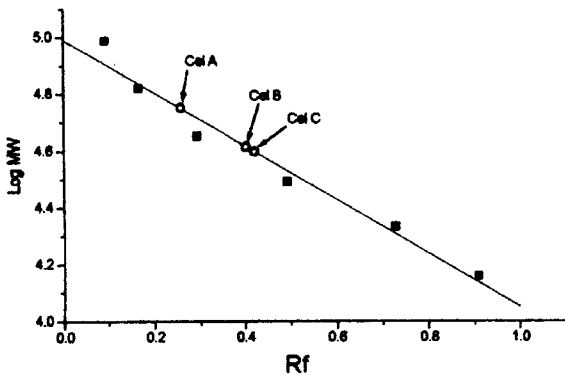


Fig. 7. Molecular weights of Cel 1, Cel 2 and Cel 3. The molecular weight of Cel 1, Cel 2 and Cel 3 was estimated by plotting the log of the molecular weights of standard markers, Cel 1, Cel 2, and Cel 3 vs. the relative mobility (Rf). Molecular weight markers used here were phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,400).

등(16)이 보고한 *Erwinia* sp.에서 생산된 섬유소 분해효소 분자량은 42, 39, 35, 31, 27 kDa으로 본 실험에서 확인된 Cel 1와 Cel 2밴드와 일치하는 것으로 추측되어진다. 그러나 Kim 등(12)과 Fumiyasu 등(8)이 보고한 *Bacillus* sp.에서 생산된 CMCase의 분자량은 95 kDa, 92 kDa으로 확인된 결과와는 많은 차이를 보였다.

감사의 말

논문은 1997년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. **Beguin, P. and J.P. Albert.** 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 25-58.
2. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol 2. 1986. Williams and Wilkins Press. pp. 1104-1207 .
3. **Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson, and U.B. Axiofredriksson.** 1976. The mechanism of enzymetic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem.* **61**, 621-630.
4. **Chey, D.C., D.S. Kim, J.H. Yu, and D.H. Oh.** 1990. Purification of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 376-382.
5. **Chey, D.C., D.S. Kim, J.H. Yu, and D.H. Oh.** 1992. Properties of cellulase produced from *Cellulomonas* sp. YE-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 164-168.
6. **Eds. Gerhardt, P., R.G.E. murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips.** 1981. Manual of methods for general bacteriology, American society for microbiology. Washington, D.C.
7. **Fagerstam, L.G. and L.G. Pettersson.** 1979. The cellulolytic complex of *Trichoderma reesei* QM 9414. *FEBS Letters.* **98**, 363-367.
8. **Fumiyasu, F., T. Kudo, and K. Horikoshi.** 1985. Purification and properties of a cellulase from Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 3339-3345.
9. **Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood.** 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 187-194. Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood
10. **Ha, J.S., Y.N. Lee, and J.Y. Lim.** 1992. Isolation and identification of exo-xylanase producing microorganism. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 14-19.
11. **Hakansson, U., L.G. Fagerstam, L.G. Pettersson, and L. Anderson.** 1978. Purification and characterization of a low molecular weight 1,4-β-glucanhydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma viride* QM9414. *Biochem. Biophys. Acta.* **524**, 385-392.
12. **Kim, S.H., S.G. Cho, and Y.J. Choi.** 1997. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 305-309.
13. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**, 680-650.
14. **Lim, S.T., Y.W. Park, S.J. Cho, and H.D. Yun.** 1997. Pytopathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and production of CMCCase isozymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 468-476.

15. **Park, Y.H., S.T. Lim, S.J. Cho, and H.D. Yun.** 1997. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 endo-1,4- β -glucanase genes and rapid identification of their gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 636-641.
16. **Saarilahti, H.T., B. Henrissat, and E.T. Palva.** 1990. A novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Gene*. **90**, 9-14.
17. **Son, Y.J., O.J. Sul, D.K. Chung, I.S. Han, Y.J. Choi, and C.S. Jeong.** 1997. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulases. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 346-353.
18. **Wood, T.M.** 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. *Biochem.* **61**, 621-630.
19. **Wood, T.M. and K.M. Bhat.** 1988. *Methods in Enzymology*. **160**, 87-144.
20. **Wood, W.A. and S.T. Kellogg(ed).** 1988. *Methods in Enzymology*. **160**, 63-65.
21. **Yoon, K.H., K.H. Jung, and S.H. Park.** 1997. Isolation and enzyme production of a Cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 546-551.

(Received November 1, 1999/Accepted November 30, 1999)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* CH-10 Secreting Cellulase from Cattle Manure

Tae-Il Kim*, Jung-Dae Han, Byoung-Soo Jeon, Sang-Woo Ha, Chang-Bum Yang and Min-Kyun Kim¹(National Livestock Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, 441-350, and ¹Division of Applied and Chemistry, School of Agricultural Biotechnology center for Plant Molecular Genetics and Breeding Research, College of Agriculture and Life science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea)

A bacterium producing the extracellular cellulase was isolated from cattle feces and screened as cellulase activity was excellent upon congo red staining method and activity measurements. Isolate was identified as *Bacillus subtilis* CH-10 on the basis of morphological and biochemical properties as well as cellular fatty acids composition. The enzyme which the isolate secretes had the optimum initial pH and temperature for its induction was 7.5 and 50°C, respectively. The maximum CMCase activity in crude enzyme solution was observed at pH 7.5 and 75°C, and was stable for pH 7.5 to 9.0 to maintain 70% activity. When the isolate was cultured in CMC media at 37°C for 24 hrs, CMCCase and FPase activity was 1.13 U/ml and 0.16 U/ml, respectively whereas Avicelase and β -glucosidase activity was not detected. When crude supernatant was used for zymogram, three major bands, cel 1, cel 2 and cel 3, were detected approximately 39, 41 and 57 KDa, respectively on CMC-SDS-PAGE.