

# 탄소원의 종류가 반추위 혐기 곰팡이 *Neocallimastix* sp. NLRI-3의 섬유소 분해효소 활력에 미치는 영향 비교

손호진\*\* · 송재용\*\* · 최낙진\*\*\* · 하종규\*\* · 장종수\*

한국방송통신대학교 농학과\*, 서울대학교 농업생명과학대학 식품·동물생명공학부\*\*, 축산연구소\*\*\*

## Comparison of the Influence of Carbon Substrates on the Fibrolytic Activities of *Neocallimastix* sp. NLRI-3

H. J. Son\*\*, J. Y. Song\*\*, N. J. Choi\*\*\*, J. K. Ha\*\* and J. S. Chang\*

Department of Agricultural Sciences, Korea National Open University\*, Department of Food and Animal Biotechnology, Collage of agriculture and Life Sciences, Seoul National University\*\*, National Livestock Research Institute, R.D.A\*\*\*

### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the fungal growth and enzyme production under different carbohydrate substrate conditions. The anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. NLRI-3 isolated from the rumen of Korean native goat was incubated with different carbohydrate media containing 0.2% of glucose, starch, rice straw, filter paper, carboxymethyl cellulose(CMC), Sigmacell cellulose, xylan or xylose, respectively. The culture head gas production was the highest in the culture of filter paper medium, and the lowest in the culture of CMC medium at 96h incubation (P<0.05). The fungal zoospore production reached peak at 72h incubation, and its number was the highest in rice straw medium among the treatments (P<0.05). At 96h incubation, carboxymethyl cellulase(CMCCase) activity was the highest in the culture of filter paper medium and the lowest in the culture of starch medium (P<0.05). While xylanase activity was the highest in the culture of rice straw medium and the lowest in the culture of xylose medium(P<0.05) at 72h incubation. There were no differences in culture supernatant protein expression among the treatments. However, the patterns of enzyme expression were different among the treatments with zymogram analysis. Six CMCases and 4 xylanase were detected from the results of zymogram analysis. Therefore the present study indicating that the fungal enzyme expression could be stimulated with insoluble substrates in the culture medium.

(Key words : *Neocallimastix*, CMCCase, Xylanase, Carbohydrate, Protein)

### I. 서 론

반추동물의 반추위에 존재하는 혐기성 곰팡이는 섬유소의 분해능력이 낮은 protozoa나,

단일균체에서 몇몇의 제한된 효소를 생산하는 bacteria와 달리 단일 균체에서 다양한 종류의 효소를 분비한다(Mountfort, 1994). 또한 곰팡이는 가근을 섬유소 조직사이로 침투시킴으로써

Corresponding author : Chang, Jongsoo ; Department of Agricultural Sciences, Korea National Open University, 110-791, Korea.

Tel : 02-3668-4636, Fax : 02-3668-4187, E-mail : jschang@knou.ac.kr

물리적인 방법을 통해 섬유소를 연화시키는 작용을 함으로써 저작을 용이하게 하고 기질의 입자도 감소에 큰 역할을 하므로 반추위내 섬유소 분해에 중요한 역할을 담당한다(Wilson과 Engels, 1989). 이러한 곰팡이 가근에 의한 사료 입자의 물리적인 붕괴나 연화작용은 저질조사료의 사료이용효율을 증진시킬 뿐 아니라(Akin, 1990), 사료섭취량을 증가시키는 역할을 담당한다(MacKinnon 등, 1988). 또한 박테리아의 경우에는 식물체의 세포벽에 존재하는 lipoprotein에 의해 섬유소 분해효소의 작용이 차단되어 섬유소의 분해율이 낮을 수 있으나(Engels와 Brice, 1985), 혐기성 곰팡이의 가근에서는 단백질 분해효소가 분비되어 식물체의 lipotrotein을 분해함으로써 가근의 침투가 용이하여 섬유소의 분해가 촉진된다(Wallace와 Joblin, 1985).

혐기성 곰팡이의 효소는 유주자상태(zoosporic stage)와 영양생장기(vegetative stage)에서 모두 분비되는 데(Williams와 Orpin, 1987), 사료입자의 물리적인 접촉과 화학적인 작용에 의해서 자극된다(Akin과 Borneman, 1990). Endoglucanase의 일종인 carboxymethyl cellulase(CMCase)는 cellulose의 glucosidic linkage의 중간부위에 작용함으로써 cellulose의 glucosidic linkage의 길이를 짧게하는 효소로서 *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum* 및 *Piromyces communis*의 유주자단계 및 영양생장기에 생성되어 균체 밖으로 분비되며, 배지의 기질을 glucose에서 cellulose로 전환시킬 경우 그 분비량이 촉진된다고 보고되었다(Barichievich와 Calza, 1990). *Neocallimastix frontalis*는 hemicellulase의 일종인 xylanase의 대부분을 분비하며(Mountfort와 Asher, 1989), xylanase의 분비는 수용성 탄수화물 배지에서 배양할 경우 분비량이 낮으나 복합기질을 함유하는 배지에서는 분비가 촉진된다고 보고되었다(Teunissen 등, 1992). 그러나 혐기곰팡이의 효소 체계는 multiple cellulolytic isozyme으로 cellulase와 xylanase가 동시에 복합적으로 분비되며(Teunissen 등, 1992), 각 효소의 isozyme의 구성비율 및 종류는 곰팡이의 종류에 따라 차이가 있다(Ho 등, 1994). 즉 cellulolytic activity는 *Piromyces*와 *Neocallimastix*속 간에 차이가 있

었으며(Teunissen 등, 1992), amylase 역가와 protease 역가는 *Orpinomyces*, *Neocallimastix* 및 *Piromyces* 간에 차이가 있다고 보고되었다.(Yanke 등, 1993). 또한 동일한 균주라 할지라도 배양되는 기질의 종류가 다를 경우 일정시간 배양 후 배양액 내에 존재하는 효소의 역가가 다르게 나타났다(Teunissen 등, 1992).

반추위 혐기성 곰팡이의 우수한 섬유소 분해 능력은 산업적으로 다양한 이용 가능성을 내포하고 있으며, 이의 실용화에 대한 제한적인 연구가 수행되어 왔다. Mesta등(2003)은 bioreactor용 xylanase fusion protein을 혐기곰팡이를 이용하여 제조함으로써 산업적으로 이용하는 방안을 강구하였으며, Huang 등 (2005)은 xylan과 결합하는 혐기곰팡이의 dockerin domain을 xylanase와 융합시킴으로써 xylanase의 역가를 증진시키는 방안을 보고하였다. 또한 직접적으로 혐기곰팡이 효소를 효소첨가제의 형태로 공급한 연구 결과로는 혐기곰팡이의 배양액을 첨가하거나(김과 이, 2003), 건조분말을 첨가하였을 경우 볏짚의 *in vitro* 소화율이 개선되는 효과가 있었다(손 등, 2003). 이러한 소화율 증진 효과는 혐기곰팡이 배양액에 존재하는 효소의 작용에 의한 것으로 추정되고 있다.

본 연구의 목적은 기질의 종류를 달리하였을 경우 혐기성 곰팡이의 성장 및 효소단백질의 발현특성을 비교함으로써 섬유소 분해 혐기성 곰팡이의 산업적 이용 가능성을 타진하기 위함이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배양조건

본 시험에 사용된 혐기성 곰팡이는 한국 재래산양의 반추위에서 분리된 *Neocallimastix* sp. NLRI-3(김과 이, 2003)을 0.25%의 glucose가 함유된 Lowe's medium에서 (Lowe 등, 1985) 접종한 후 39°C에서 3일간 정치배양한 후 종균으로 사용하였다. 시험에 사용된 배지는 Lowe's medium에서 탄수화물 공급원만 서로 다르게 하여 사용하였다. 탄수화물 공급원으로는 glucose, starch, 볏짚, Whatman filter paper (Whatman, UK),

carboxymethyl cellulose (CMC), Sigmacell cellulose (sigmacell), oat spelt xylan(xylan), 혹은 xylose를 이용하여 배지의 0.2%(w/v) 수준으로 처리하여 혐기배지를 제조하였다. 탄수화물의 종류가 다른 10 ml의 배지에 3일간 배양된 종균 1 ml( $330 \pm 27$  zoospore/ml)를 접종하여 39°C에서 48, 72 및 96시간 동안 배양하여 시료를 채취하여 *Neocallimastix* sp의 생육 및 효소역가를 측정하였다.

## 2. Gas 생성량, pH 및 유주자(zoospore)

배양 종료 후 시험관을 상온에서 30분간 방냉하여 culture head gas의 압력을 측정하였다. Gas의 발생량을 측정한 후 시험관을 개봉하여 상층액의 pH를 측정한 후 유주자의 생성량을 측정하기 위하여 상층액 1 ml를 15분간 500 × g에서 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 존재하는 유주자의 개수를 haemocytometer를 이용하여 측정하였다.

## 3. 단백질 추출 및 분석

배양이 종료된 배양액을 4°C에서 15,000 × g를 5분간 원심분리한 후 상층액 2 ml를 취하여 단백질 분석 및 효소분석용으로 사용하였다. 상층액에 존재하는 단백질의 함량을 분석하기 위해 100 μl의 배양액에 Bradford 용액(Bio-Rad, USA) 1 ml를 첨가하여 발색시킨 후 595 nm로 흡광도를 측정하여 단백질의 함량을 분석하였다. 또한 상층액 1 ml를 채취하여 1 ml의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후 pellet 단백질을 SDS-PAGE 및 zymogram용 시료로 사용하였다.

## 4. 효소역가 분석

Endoglucase(carboxymethyl cellulase, CMCase)의 활성을 측정하기 위하여 배양액 0.5 ml를 0.1 (w/v) carboxymethyl cellulose용액(pH 5.0)과 혼합한 후 55°C에서 30분간 배양한 후 100°C에

서 5분간 배양하여 반응을 중지시켰다. 배양 후 dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용하여 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 상층액에 존재하는 환원당의 함량을 측정하였다 (Miller 등, 1960). Carboxymethyl cellulase의 역가는 1분 동안 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소역가를 1 unit로 하였다.

Xylanase의 활성 측정은 CMCase의 함량 측정과 동일한 방법으로 수행하였으나, 기질을 carboxymethyl cellulose 대신 0.2%(w/v)의 oat spelt xylan을 이용하여 1분 동안 1 μmol의 xylose를 생성하는 효소역가를 1unit로 하였다.

## 5. SDS-PAGE 및 Zymogram

단백질 전기영동은 Laemmli(1970) 방법에 의해 수행하였다. Acrylamide가 10% 함유된 SDS gel에 용해된 단백질용액 10 μl을 각각의 well에 처리하여 40 mA의 전류로 전기영동 한 후 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 상층액에 존재하는 단백질의 전개양상을 관찰하였다.

Zymogram을 위해서는 10% acrylamide gel에 0.5%의 carboxymethyl cellulose 혹은 oat spelt xylan을 기질로 첨가하여 gel을 제조한 후 SDS-PAGE와 동일한 방법으로 전기영동을 수행하여 단백질을 전개하였다(Lin 등, 1999). 전기영동 후 1%의 Triton X100 용액으로 20분씩 3회 세척한 후 50 mM의 phosphate buffer (pH 6.5) 용액에 2시간 침지시켜 SDS-PAGE 과정에서 변성된 단백질을 복구시켰다(renaturing). 효소반응을 gel을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 용액에서 37°C의 온도조건으로 12시간 배양한 후 0.1%(v/v) congo red로 1시간 염색하였다. 탈색을 위해 1 M sodium chloride 용액에 침지시킨 후 zymograph 상의 효소단백질 위치를 확인하였다.

## 6. 통계 분석

본 시험에서 얻어진 결과는 완전임의 분석법에 의하여 기질의 종류 및 시간에 따른 결과를 분석

하였다. 전체 처리구의 F-ratio에 유의성이 있을 경우 처리간의 차이는 Fisher의 least significant difference(LSD) 방법으로 SAS program(SAS, 1996)을 이용하여 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 혐기성 곰팡이의 성장 지표

배양용기에 존재하는 gas는 혐기성 곰팡이의 발효과정 동안에 발생한 대사산물로 미생물의 성장을 확인할 수 있는 간접적인 지표라 할 수 있다. 이들 gas의 주요 구성성분은 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>로 기질의 종류에 따라 그 생성량에 차이가 있다. 반추위 혐기성 곰팡이의 gas 생성량은 배양시간이 경과함에 따라 생성량이 유의적으로 증가하였으며(P<0.05), 배양 초기인 48시간에는 볏짚배지에서 가장 많은 gas가 발생하였다(Table 1). 배양 후 72시간에서는 glucose, filter paper, sigmacell 배지에서의 gas 생성량이 높았으나, 이외의 기질에서는 gas 발생량이 저조하였다. 배양 종료시점인 96시간에 filter

paper 배지에서 가장 많은 gas가 발생되었으며, CMC 배지에서 가장 적은 gas가 발생되었다.

배양액에 존재하는 기질이 분해되어 대사산물인 휘발성 지방산을 생성하게 되면 배양액의 pH가 감소하게 되므로 배양액내 pH 변화는 혐기성 곰팡이의 성장에 간접적인 지표가 될 수 있다. *Neocallimastix* sp.를 기질의 종류를 달리 하여 배양하였을 경우 배양시간이 경과함에 따라 배양액내 pH는 감소하는 경향을 보였으며 (Table 2), 배양종료 시점인 96시간의 pH는 filter paper 배지에서 가장 낮았으며 CMC 배지에서 가장 높게 나타났다. 이러한 배지내 pH 감소현상은 배양 72시간 이후부터 현저한 것으로 미루어 기질을 분해하여 대사산물인 휘발성지방산이 축적되기 위해서는 적정량의 균체 수에 도달하여야 하며, 이들 기질이 분해되어 대사산물을 생성하기 위한 시간이 필요하기 때문인 것으로 추정된다.

혐기성 곰팡이 성장의 직접적인 지표인 배양액내 유주자(zoospore)의 수를 관찰한 결과, 배양 48시간 이후부터 유주자의 수가 증가하기 시작하여 72시간대에 정점을 이루고 배양 종료시점인 96시간대에는 유주자의 수가 감소하였

Table 1. Culture head gas production(ml) of *Neocallimastix* sp. NLRI-3 grown under different carbohydrate substrate conditions

	Incubation time(h)		
	48	72	96
Glucose	1.73 <sup>bcC</sup>	5.57 <sup>aB</sup>	7.13 <sup>bcA</sup>
Starch	1.13 <sup>cC</sup>	2.40 <sup>dB</sup>	6.30 <sup>deA</sup>
Rice straw	2.60 <sup>aC</sup>	5.00 <sup>abB</sup>	6.70 <sup>cdA</sup>
Filter paper disc	1.37 <sup>cC</sup>	5.73 <sup>aB</sup>	9.80 <sup>aA</sup>
CMC	2.00 <sup>abB</sup>	2.27 <sup>dB</sup>	3.33 <sup>gA</sup>
Sigmacell	1.73 <sup>bcC</sup>	5.83 <sup>aB</sup>	7.60 <sup>ba</sup>
Xylan	1.40 <sup>bcC</sup>	4.13 <sup>bcB</sup>	5.77 <sup>efA</sup>
Xylose	1.53 <sup>bcC</sup>	3.53 <sup>cdB</sup>	5.43 <sup>fA</sup>

<sup>abcdef</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly(p<0.05).

<sup>ABC</sup> Means with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05).

Table 2. The effects of substrates on pH in *Noecallimastix* sp. NLRI-3 cultures

	Incubation time(h)		
	48	72	96
Glucose	6.54 <sup>A</sup>	6.27 <sup>cdB</sup>	6.21 <sup>ec</sup>
Starch	6.56 <sup>A</sup>	6.44 <sup>abB</sup>	6.28 <sup>dc</sup>
Rice straw	6.51 <sup>A</sup>	6.36 <sup>bcdB</sup>	6.30 <sup>bcC</sup>
Filter paper disc	6.53 <sup>A</sup>	6.26 <sup>dB</sup>	5.91 <sup>fc</sup>
CMC	6.51 <sup>A</sup>	6.46 <sup>ab</sup>	6.47 <sup>ab</sup>
Sigmacell	6.52 <sup>A</sup>	6.27 <sup>cdB</sup>	6.20 <sup>ec</sup>
Xylan	6.48 <sup>A</sup>	6.36 <sup>bcB</sup>	6.32 <sup>bc</sup>
Xylose	6.47 <sup>A</sup>	6.34 <sup>cdB</sup>	6.28 <sup>cdC</sup>

<sup>abcdef</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly(p<0.05).

<sup>ABC</sup> Means with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05).

다(Table 3). 그러나 filter paper, sigmacell 및 starch 배지의 경우 배양이 진행됨에 따라 포자의 수가 계속 증가하는 양상을 보였다. 배양 72시간의 배양액내 유주자의 수는 벧짚배지에서 가장 높았고, sigmacell 배지에서 가장 낮았다.

단당류인 glucose 배지에서의 gas 발생량 및 pH의 감소현상이 높게 나타난 것은 glucose가 쉽게 미생물의 세포막을 통과하여 대사될 수 있는 물질이기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 같은 단당류인 xylose의 경우 세포내로 유입되어도 그 이용성이 낮아 gas 발생량과 pH 감소현상이 낮게 나타난 것으로 추정된다. 섬유소인 filter paper와 sigmacell 배지에서의 *Neocallimastix* sp의 성장이 우수하여 gas 발생량 및 배지내 pH 저하가 현저하였으나, 화학적으로 합성된 수용성의 CMC 배지에서의 곰팡이의 성장은 저조하였다. Na염 형태의 carboxymethyl기가 cellulose의 기본구조와 glucose 결합을 이룸으로써 용해도를 증진시킨 합성의 CMC는 미생물 효소의 작용으로 carboxymethyl기가 유리되어 미생물의 성장을 저해하는 것으로 추정된다. 복합기질인 벧짚은 가용성 물질이 용해되어 나오므로써 배양초기에 gas의 발생량이 높으나, 배양이 진행

됨에 따라 분해율이 감소됨으로써 다른 섬유소 기질에 비해 적은 량의 gas가 생성되는 것으로 추정된다. Microcrystal 구조인 sigmacell은 filter paper에 비해 효소에 의한 분해도가 낮아 filter paper에 비해 gas 생성량이 낮은 것으로 추정된다.

Hemin과 같은 porphyrin 계통의 화합물은 sporangium에서 zoospore의 방출을 촉진하는데 (Orpin, 1986), 벧짚과 xylan에 존재하는 porphyrin 계통의 화합물에 의해 zoospore의 방출이 촉진되어 72시간 배양시 zoospore의 방출량이 높으나 영양소의 공급이 계속적으로 이루어지지 않아 배양이 지속되면 zoospore의 함량이 감소하는 것으로 추정된다. 그러나 cellulose의 표면적이 불용성 섬유소인 filter paper나 sigmacell에 비하여 상대적으로 넓은 수용성인 CMC가 sporangia 표면을 자극함으로써 zoospore의 방출을 유도하는 것으로 추정되나 정확한 기작을 구명하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다. 반면에 filter paper, sigmacell 및 starch 배지는 계속적으로 성분이 분해되어 대사에 이용되며 이러한 영양소의 공급기간이 상대적으로 길어 배양기간 동안 zoospore의 양이 계속적으로 증가되는 것으로 추정된다.

Table 3. Zoospore counts(count/ml) in the cultures of *Neocallimastix* sp. NLRI-3

	Incubation time(h)		
	48	72	96
Glucose	243 <sup>B</sup>	6033 <sup>ba</sup>	5467 <sup>bcdA</sup>
Starch	427 <sup>C</sup>	1933 <sup>cB</sup>	3600 <sup>deA</sup>
Rice straw	1280 <sup>C</sup>	11517 <sup>aA</sup>	6250 <sup>bcB</sup>
Filter paper disc	1197 <sup>C</sup>	3811 <sup>bcB</sup>	7294 <sup>abA</sup>
CMC	317 <sup>C</sup>	9011 <sup>aA</sup>	4094 <sup>deB</sup>
Sigmacell	320 <sup>C</sup>	1344 <sup>cB</sup>	2894 <sup>eA</sup>
Xylan	910 <sup>B</sup>	9106 <sup>aA</sup>	8483 <sup>aA</sup>
Xylose	250 <sup>B</sup>	4717 <sup>ba</sup>	4861 <sup>cdeA</sup>

<sup>abcde</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly(p<0.05).

<sup>ABC</sup> Means with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05).

## 2. 단백질 함량 및 효소 역가

혐기곰팡이 배양 상층액에 존재하는 수용성 단백질은 배지성분과 미생물의 성장과정에서 분비된 효소 및 사멸된 미생물의 균체로 구성되어 있다. 배양 초기인 48시간에는 xylan 배지의 단백질 함량이 가장 높게 나타났으며, 72시간과 배양종료 시점인 96시간에는 glucose 배지의 단백질 함량이 높게 나타났다(Table 4). 또한 glucose 배지와 xylose 배지의 경우 배양이 진행됨에 따라 배양액내 단백질 함량이 감소하는 경향을 나타냈으나, 벧짚과 filter paper 배지에서는 배양기간 동안 단백질 함량이 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에 starch와 xylan 배지에서는 72시간대에 단백질 분비량이 정점에 도달하는 경향을 보였다.

Endoglucase인 carboxymethyl cellulase(CMCase)

Table 4. Extracellular enzyme activities and protein concentration of culture supernatant of *Neocallimastix* sp. NLRI-3

	Incubation time (h)		
	48	72	96
<b>CMCase(μmol/mL/min)</b>			
Glucose	130.01 <sup>ab</sup>	98.33 <sup>deB</sup>	247.34 <sup>cdA</sup>
Starch	32.02 <sup>dc</sup>	89.95 <sup>eB</sup>	229.73 <sup>dA</sup>
Rice straw	61.16 <sup>bcdC</sup>	159.95 <sup>bcdB</sup>	239.38 <sup>cdA</sup>
Filter paper disc	38.11 <sup>cdC</sup>	216.11 <sup>abB</sup>	678.34 <sup>abA</sup>
CMC	65.18 <sup>bcdB</sup>	177.89 <sup>abcAB</sup>	255.42 <sup>cA</sup>
Sigmacell	72.22 <sup>bcC</sup>	238.61 <sup>aB</sup>	588.89 <sup>bA</sup>
Xylan	92.36 <sup>bc</sup>	155.50 <sup>bcdB</sup>	247.20 <sup>cdA</sup>
Xylose	146.20 <sup>ab</sup>	136.27 <sup>cdeB</sup>	324.76 <sup>cA</sup>
<b>Xylanase(μmol/mL/min)</b>			
Glucose	581.57 <sup>cb</sup>	1289.85 <sup>cdA</sup>	1316.79 <sup>abA</sup>
Starch	840.77 <sup>cb</sup>	1611.37 <sup>ba</sup>	1349.53 <sup>abA</sup>
Rice straw	1499.46 <sup>ab</sup>	1844.88 <sup>abA</sup>	1353.78 <sup>abB</sup>
Filter paper disc	1085.12 <sup>b</sup>	1288.37 <sup>cd</sup>	1134.85 <sup>cd</sup>
CMC	1098.82 <sup>b</sup>	1215.50 <sup>d</sup>	1037.84 <sup>d</sup>
Sigmacell	1434.54 <sup>abA</sup>	1465.45 <sup>bcA</sup>	1262.76 <sup>abB</sup>
Xylan	1102.15 <sup>hb</sup>	1364.43 <sup>cdA</sup>	1182.27 <sup>bcB</sup>
Xylose	880.66 <sup>cb</sup>	1166.96 <sup>cdA</sup>	1092.14 <sup>cdA</sup>
<b>Protein(mg/mL)</b>			
Glucose	2.55 <sup>b</sup>	2.49 <sup>a</sup>	2.32 <sup>a</sup>
Starch	1.80 <sup>cdB</sup>	2.16 <sup>abA</sup>	1.83 <sup>bb</sup>
Rice straw	1.91 <sup>cb</sup>	2.21 <sup>abA</sup>	2.25 <sup>abA</sup>
Filter paper disc	1.33 <sup>cb</sup>	1.51 <sup>ca</sup>	1.57 <sup>ca</sup>
CMC	1.58 <sup>de</sup>	1.54 <sup>c</sup>	1.57 <sup>c</sup>
Sigmacell	1.57 <sup>deB</sup>	1.69 <sup>ca</sup>	1.55 <sup>cb</sup>
Xylan	1.68 <sup>cd</sup>	1.83 <sup>bc</sup>	1.69 <sup>bc</sup>
Xylose	3.54 <sup>abA</sup>	2.25 <sup>abB</sup>	2.28 <sup>abB</sup>

<sup>abcde</sup> Means with different superscripts in the same column differ significantly(p<0.05).

<sup>ABC</sup> Means with different superscripts in the same row differ significantly(p<0.05).

의 함량은 배양초기인 48시간대에 glucose와 xylose 배지와 같은 단당류의 배지에서 가장 높았으나(Table 4), 72와 96시간에는 filter paper와 sigmacell 배지와 같은 cellulose 배지에서 가장 높았다. Filter paper 배지의 경우 배양초기인 48시간대에는 CMCase의 함량이 낮았으나 배양이 진행됨에 따라 CMCase 역가가 증가하여, 배양 종료시점인 96시간에는 가장 높았다. 수용성 기질인 starch와 CMC배지, 복합기질인 벧짚과 xylan 배지의 경우 배양 종료 시 CMCase 역가가 200 unit 내외로 순수 cellulose 배지인 filter paper나 sigmacell 배지에 비해 낮게 나타났다. Carboxymethyl cellulase의 분비량은 배지 내 glucose의 함량이 증가할수록 억제된다는 기존의 결과와 일치하였다(Calza, 1990).

Xylanase의 역가는 배양초기인 48시간에 벧짚과 sigmacell 배지에서 높게 나타났으나 가용성 탄수화물인 glucose, starch 및 xylose 배지에서 낮게 나타났다(Table 4). 배양기간 동안 xylanase의 역가는 72시간 배양 시 가장 높았으며, 이 시기의 효소역가는 벧짚에서 가장 높았고 xylose 배지에서 가장 낮았다. 그러나 glucose 배지의 경우 배양시간이 경과함에 따라 xylanase의 역가가 계속적으로 증가하였다.

미생물이 생성하는 효소는 배지의 조성에 영향을 받는데 glucose나 xylose와 같은 단당류는 cellulase를 필요로 하지 않는 기질이므로 cellulase의 분비를 자극하지 않는 것으로 추정되나 filter paper나 sigmacell과 같은 cellulose 배지는 미생물의 효소분비를 촉진하기 때문에 CMCase의 분비량이 다른 배지성분에 비하여 높은 것으로 추정된다. 혐기성 곰팡이의 배지 내의 cellulase 함량이 2.0 mg/ml의 농도로 존재할 경우 cellulase 생성량이 극대화 되고, 2.0 mg/ml 이상으로 존재할 경우 cellulase의 분해에 의해 생성된 glucose로 인하여 cellulase의 분비량이 감소되나(Mountfort와 Asher, 1985), 본 실험에서 사용된 cellulose의 농도는 2.0 mg/ml 였으므로 CMCase의 생성이 촉진된 것으로 보인다. Xylanase의 분비량은 벧짚에서 가장 높았는데 이는 벧짚에 존재하는 xylan이 xylanase의 분비를 촉진한 것으로, 이는 복합기질인 밀기울이나 밀짚을 배지

에 첨가하였을 경우 xylanase의 분비가 촉진된다는 Williams와 Orpin (1987)의 결과와 일치한다. 그러나 xylan 배지에서는 xylanase의 분비가 촉진된다는 보고가 있었으나(Mountfort와 Asher, 1985), 본 결과에서는 xylan 배지에서의 xylanase 분비가 촉진되지 않았을 뿐 아니라 혐기곰팡이의 성장이 저하되는 결과를 보였다. 이는 sigma에서 판매되는 oat spelt xylan의 성분표에 명기된 바와 같이 10%의 arabinose와 15%의 glucose 성분에 의한 것으로 추정된다.

### 3. SDS-PAGE 및 Zymogram

탄수화물의 종류에 따른 상층액내 단백질 발현양상을 비교하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과 20-216 kDa의 분자량 영역대에서 단백질이 검출되었으며(Fig. 1), 다양한 단백질 중에서 112, 95, 69, 56, 및 28 kDa의 분자량을 갖는 단백질이 확연하게 구분되었다.

단백질 전기영동 후 SDS-PAGE gel 상의 효소단백질을 검출하기 위하여 zymogram을 실시한 결과 28, 32, 38, 47, 87 및 186 kDa의 분자

량을 갖는 6개의 단백질이 CMCase 역가를 갖고 있었다(Fig. 2). 이러한 CMCase의 발현양상은 기질의 종류와 관계없이 유사하게 발현되었으나, 그 구성비율 및 발현량이 기질의 종류에 따라 차이가 있었다. 그러나 coomassie blue 염색법에 의해서는 정확한 정량적인 분석이 불가능 하여 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료된다. 전반적으로 각각의 탄수화물원에 따라서 유사한 band들이 나타났는데 이는 Yanke 등 (1996)이 glucose나 xylan을 기질로 했을 때보다 혐유소성 기질에서 성장했을 때 endoglucanase activity가 높았다는 결과와 일치하였다. 그러나 본 실험의 결과는 *Neocallimastix frontalis*의 multienzyme complex는 대략적으로 7.5~10 kDa에 달한다는 (Wilson과 Wood, 1992)의 보고와는 다른 결과를 보였으며, *Neocallimastix frontalis* EB188의 배양물로부터 7개의 CMCase를 확인한 Li와 Calza(1991)의 결과보다 적은 6개의 CMCase를 본 실험에서는 검출하였다. 이는 SDS-PAGE와 zymogram을 이용한 본 연구의 결과와 cloning의 결과간의 민감성 차이로 인한 것으로 사료된다.

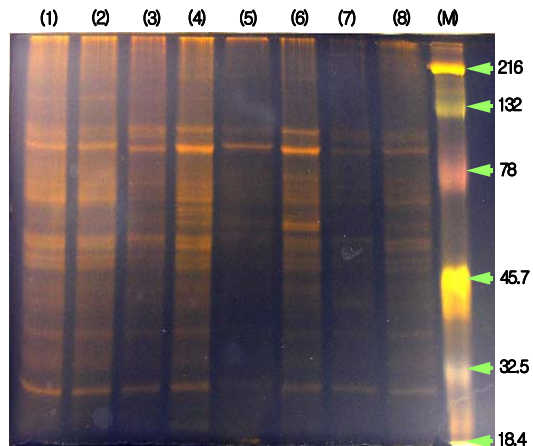


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of culture supernatant of *Neocallimastix* sp. NLRI-3 after 96h incubation. Lanes 1-8 are the extracellular protein when grown on the substrates glucose(Lane 1), starch (Lane 2), rice straw (Lane 3), filter paper(Lane 4), CMC(Lane 5), sigmacell (Lane 6), xylan(Lane 7) and xylose (Lane 8).

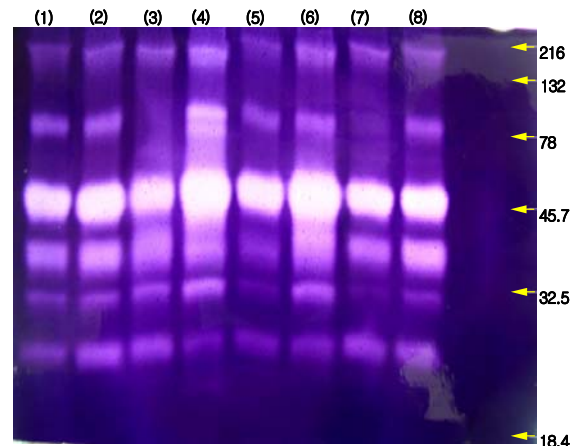


Fig. 2. CMCase zymograph of culture supernatant after 96h incubation. Lanes 1-8 are the extracellular protein when grown on the substrates glucose(Lane 1), starch(Lane 2), rice straw(Lane 3), filter paper(Lane 4), CMC(Lane 5), sigmacell(Lane 6), xylan(Lane 7) and xylose(Lane 8).

Xylanase의 역가를 갖는 단백질은 67, 73, 110 및 157 kDa의 분자량 영역대에서 검출되었으며, 섬유소성 기질인 벚짚, sigmacell 및 xylan 배지에서 효소역가가 강하게 검출되었다. Yanke 등(1996)은 *N. patriciarum*의 xylanase 역가를 나타내는 수많은 band가 40~65 kDa의 범위에서 나타낸다고 하였으나 본 실험에서는 그 이상에서 높은 xylanase 역가를 나타내는 band들이 나타나 상반되는 결과를 나타내었다.

이상의 결과를 살펴볼때 반추위 혐기성 곰팡이의 일종인 *Neocallimastix* sp NLRI-3은 섬유소를 기질로 하여 배양할 경우 CMCase 및 xylanase의 분비량이 촉진되며, 이러한 효소의 분비량 촉진 효과는 섬유소의 화학적 구조에 의해 자극되는 것으로 사료된다. 그러나 섬유소만을 기질로 이용하여 배양하였을 경우 곰팡이의 초기성장이 지연되는 결과를 초래하므로 소량의 glucose를 첨가함으로써 곰팡이의 초기성장을 촉진시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한 벚짚과 같은 xylan의 함량이 높은 기질을 섬유소와 혼합하여 배양할 경우 xylanase의 분비를 촉진시킬 수 있으므로 배지의 제조시 섬유소를 기질의

주성분으로 제조하되 소량의 glucose와 벚짚을 첨가하는 것이 가장 이상적인 배양방법이라 하겠다. 따라서 혼합배지에 대한 추가적인 연구와 함께 발현되는 효소단백질의 정확한 분석과 관련 유전정보의 분석을 통하여 반추위 혐기곰팡이의 산업적 이용이 가능할 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

한국 재래산양에서 분리된 *Neocallimastix* sp NLRI-3을 이용하여 기질의 종류에 따른 미생물의 성장 특성 및 효소단백질의 발현양상을 비교하고자 본 연구를 수행하였다. 혐기배지에 glucose, starch, 벚짚, filter paper, CMC, sigmacell, xylan 및 xylose를 0.2% 수준으로 첨가하여 배양하였다. 배양결과 가스 발생량은 96시간대에서 filter paper 배지에서 가장 높았고 CMC배지에서 가장 낮게 조사되었다( $P<0.05$ ). 곰팡이 포자 발생량은 72시간대에서 살펴보면 처리구들 중 벚짚 배지에서 가장 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ). 곰팡이가 분비하는 enzyme activity는 보통 72시간대 이후부터 급격히 증가함을 보이는데 CMCcase의 경우에 filter paper disc, sigmacell, xylose에서 활성이 높게 나타났다. xylanase 역가는 starch, rice straw, sigmacell에서 높게 나타났다. Zymogram을 이용하여 각 효소단백질의 발현을 분석한 결과 효소단백질의 발현양상은 전 처리구에 걸쳐 유사하였으나 발현정도는 기질의 종류에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한, zymogram 결과에 의해 6개의 CMCcase와 4개의 xylanase가 검출 되었다. 본 연구의 결과로 혐기성 곰팡이의 효소단백질은 배양액에 존재하는 기질의 종류에 의해 발현정도가 영향을 받을 수 있었다. 이러한 결과는 산업적으로 이용 가능한 혐기곰팡이 유래 효소제의 개발에 필요한 배양조건의 결정에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

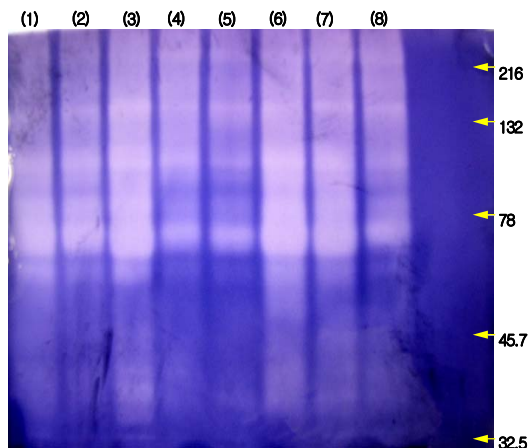


Fig. 3. Xylanase zymograph of culture supernatant after 96h incubation. Lanes 1-8 are the extracellular protein when grown on the substrates glucose(Lane 1), starch(Lane 2), rice straw(Lane 3), filter paper(Lane 4), CMC(Lane 5), sigmacell (Lane 6), xylan(Lane 7) and xylos(Lane 8).

#### V. 사사

이 논문은 학술진흥재단의 2003년도 젊은과



학자 연구활동 지원사업(과제번호: R08-2003-000-10592-0)의 연구비 지원을 받아 수행된 것으로, 이 지면을 빌어 감사의 뜻을 표합니다.

## VI. 인 용 문 헌

- Akin, D. E. and Borneman, W. S. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J. Dairy Sci.* 73(10):3023-3032.
- Barichievich, E. M. and Calza, R. E. 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1):43-48.
- Calza, R. E. 1991. Carbone source, cyclic nucleotide, and protein inhibitor effects on protein and cellulase secretions in *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1):43-48.
- Engles, F. M. and Brice, R. E. 1985. A barrier covering lignified cell walls of barley straw that resists access by rumen microorganisms. *Curr. Microbiol.* 12, 217-224.
- Ho, Y. W., Khoo, I. Y., Tan, S. G., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Kudo, H. 1994. Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. *Microbiology.* 140(6):1495-1504.
- Huang, Y. H., Huang, C. T. and Hseu, R. S. 2005. Effects of dokerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanase. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:455-460
- Li, X. L. and Calza, R. E. 1991. Fractionation of cellulases from the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(11): 3331-3336.
- Lin, Johnson, Ndlovu, L. M., Singh, S. and Pillay, B. 1999. Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *biotechnol. App. Biochem.* 30:73-79.
- Lowe, S. E., Lowe, M. K., Theodorou, A., Trinci P. J. and Robert, B. H. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *J. Gen. microbio.* 131:2225-2229.
- Mesta, L., Heyraud, A., Joseleau, J. P. and Coulet, P. R. 2003. Catalytic properties of endoxylanase fusion proteins from *Neocallimastix frontalis* and effect of immobilization onto metal-chelate matrix. *J. biochem.* 101:253-265.
- Mountfort, D. O., 1994. Regulatory constraints in the degradation and fermentation of carbohydrate by anaerobic fungi. *anaerobic fungi.* 147-168.
- Mountfort, D. O. and Asher, R. A. 1985. Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5):1314-1322.
- Mountfort, D. O. and Asher, R. A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(4): 1016-1022.
- Mountfort, D. O. and Asher, R. A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(4):1016-1022.
- Orpin, C. G., 1986. The effects of haems and related compounds on growth and zoosporegenesis of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis* H8. *J. Gen. Microbiol.* 132:2179-2185.
- Stoltz, D. B., Krell, P., Cook, D., MacKinnon, E. A. and Lucarotti, C. J. 1988. An unusual virus from the parasitic wasp *Cotesia melanoscela*. *Virology.* 162(2):311-320.
- Teunissen, M. J., de Kort, G. V., Op den Camp, H. J., Huis in't Veld, J. H. 1992. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. *J Gen Microbiol.* 138(Pt8):1657-1664.
- Teunissen, M. J., Kets, E. P., Op den Camp H. J., Huis in't Veld J. H. and Vogels G. D. 1992. Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. *Arch. Microbiol.* 157(2):176-182.
- Wallace, R. J. and Joblin, K. N. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS*

- Microbiol. Lett. 29, 19-25.
20. Williams, A. G. and Orpin, C. G. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. Can. J. Microbiol. 33(5):427-434.
  21. Williams, A. G. and Orpin, C. G. 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range
  22. Wiseman, R. F., Jacobson, D. R. and Miller, W. M. 1960. Persistence of *lactobacilli* and *streptococci* in the bovine rumen during penicillin administration. Appl. Microbiol. 8:76-79.
  23. Wood, T. M. and Wilson, C. A. 1995. Studies on the capacity of the cellulase of the anaerobic rumen fungus *Piromonas communis* P to degrade hydrogen bond-ordered cellulose. Appl. microbiol. Biotechnol. 43:572-578.
  24. Yanke, L. J., Dong, Y., McAllister, T. A., Bae, H. D. and Cheng, K. J. 1993. Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. Can. J. Microbiol. 39(8):817-820.
  25. Yanke, L. J., Selinger, L. B., Lynn, J. R. and Cheng, K. -J. 1996. COmparison of the influence of carbon substrates of the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. anaerobes, 2:373-378.
  26. Yarlett, N, Orpin, C. G., Munn, E. A. and Yarlett, N. C. 1986 Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. Greenwood Ca. Biochem. J. 15:236(3):729-739.
  27. 김창현, 이성실. 2003. 한우 및 산양의 장내 섬유소 분해 혐기곰팡이의 분리 및 특성 구명. 동물자원지, 45:1019-1030
  28. 장종수, 손호진, 김종남, 김동철, 김창현. 2003. 혐기성 곰팡이 *Neocallimastix* sp NLRI-3 분비효소의 볏짚의 *in vitro* 소화율 개선 효과. 2003 한국동물자원과학회 학술발표회. PC23082.
- (접수일자 : 2006. 3. 24. / 채택일자 : 2006. 6. 12.)