

섬유소 분해능을 가진 불완전 균류의 분류

안원근 · 이재동

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Taxonomic Studies of Cellulose Decomposing Fungi Imperfecti

Won-Gun An and Jae-Dong Lee

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT: Twenty-one strains isolated, cellulose decomposing fungi, were identified on the basis of morphological, physiological and biochemical properties as *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Chrysonilla* sp., *Doratomyces* sp., *Fusarium* sp., *Gliomastix* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Varicosporium* sp. and *Verticillium* sp.. The optimum temperture for growth was in the range of 20-30°C. Most of the isolated stains utilized all tested carbon sources, and scarcely utilized urea as a nitrogen source. Only the strain No.2 had high activity of cellulase.

KEYWORDS: Identification, Cellulase activity.

미생물에 의한 cellulose 및 lignin의 분해는 농업 폐기물의 이용, 식량자원의 확보 및 환경정화의 측면에서 중요시 된다. 이들 식물 유래의 난분해성 물질의 분해능력을 가진 미생물로는 일부의 세균을 제외하고는 주로 불완전 균류와 담자 균류에 속하는 균류를 들 수 있으며 (Hankin, 1977) 그 분해 기작도 효소학적인 측면에서 규명되었다 (Berghem 등, 1975). 그러나, 불완전 균류의 경우 무성생식 과정만을 영위하므로 그 분류는 균사라든지 분생자형의 단순한 형태에 의존할 수밖에 없으며 완전 세대와의 관련 여부에 관해서는 항상 문제점으로 남아 있다. 본 실험은 cellulose의 분해능이 높은 야생 사상균 중 불완전 균류에 속하는 균주를 분리 선별하여 형태적 차이와 생리적 성질 등을 비교, 검토하였으며, 분리 균주의 효소활성능 등을 측정하였다.

材料 및 方法

분리용 시료

Cellulose 분해균을 분리하기 위한 분리용 시료는 주로 부산, 경남 일대의 농경지, 퇴비, 삼립 부식토

등에서 약 600여점의 토양 시료를 채취하여 분리용 시료로 사용하였다.

사용배지

탄소원으로 cellulose를 이용할 수 있는 균을 분리, 보존하기 위하여 사용된 배지의 조성은 Table I과 같다. 보다 많은 균주의 screening을 위하여 medium A, B를 동시에 사용하였으며, 분리 균주의 보존은 medium A, C를 사용하였다.

Cellulose 분해균의 분리

각 지역에서 채취한 토양 시료 1g 정도를 멸균수 10 ml에 현탁하여 30분간 방치한 후 상등액 1 ml를 0.05% chloramphenicol이 함유된 분리용 평판배지에 도말하여 28°C에서 4~10일간 배양하면서 형성되는 균의 집락을 육안으로 식별하여 순수분리될 때까지 수차례 이식하였다. 순수분리된 균은 분리용 배지와 완전 배지인 malt extract 고체사면 배지에 접종하여 28°C에서 충분히 배양시킨 후 4°C에서 보존하였다.

분리 균주의 분류 및 동정

분리 균주의 동정은 균사 및 집락의 색, 분생자병의 형태, 정낭 및 경자의 형태, 격벽의 유무, 분생자의 형태 및 색 등을 기초로 Ainsworth 분류법 (Ainswo-

Table I. Composition of isolation medium for cellulose decomposing Fungi

Medium A (for isolation)		Medium B (for isolation)	
Cellulose	25g	Mash potato	200g
NaNO ₃	3g	Chloramphenicol	0.05g
K ₂ HPO ₄	1g	Agar	15g
KCl	0.5g	Distilled water	1000 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g	pH	5.5
FeSO ₄ ·7HO	0.01g	Medium C (for stock culture)	
Chloramphenicol	0.05g	Malt extract	20g
Agar	20g	Agar	20g
Distilled water	1000 ml	Distilled water	1000 ml
pH	5.5		

rth 등, 1973), Kendrick and Carmichael 분류법 (Kendrick, 1968), Barron 분류법 (Barron, 1968), Barnett 분류법 (Barnett 등, 1972), Refai 분류법 (Refai, 1969), 균류도감 (宇田川俊一 등, 1980)에 준하여 현미경 (Nikon, phase contrast, Japan)으로 검색하였다. 특히 불완전 균류의 분류기준이 되는 분생자가 형성되는 형태, 분생자가 형성되는 위치, 분생자의 배열 등에 중점을 두었다.

분리 균주의 생리적 특징

균의 생육도는 건조균체중량을 사용하였다. 즉, 배양된 배양액을 여과지 (Toyo filter paper No.2)로 여과하여 여과지상의 균체를 증류수로 충분히 세척한 후, 105°C에서 3시간 건조시켜 칭량한 것을 균체량으로 사용하였다.

생육 pH의 검토

50 ml용 시험관에 czapek 액체배지 15 ml씩을 넣고, pH를 2~8로 조절 (pH meter : Beckman ASAR-1)하여 120°C, 15분간 멸균한 후 각 분리 균주의 포자현탁액을 0.5 ml씩 접종하여 20~45°C에서 10일간 배양 후 건조균체량으로 온도별 생육도를 조사하였다.

탄수화물의 이용성 검토

5 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl (pH 5.5)를 포함하는 기본배지에 각종 탄소원, 즉 당과 유기산을 1%씩 첨가하여 7일간 진탕배양 후 균의 생육을 확인하였다.

질소원의 이용성 검토

10 g sucrose, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl (pH 5.5)를 포함하는 기본배지에 각종 탄소원, 즉 당과 유기산을 1%씩 첨가하여 7일간 진탕배양 후 균의 생육을 확인하였다.

질소원의 이용성 검토

10 g sucrose, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl (pH 5.5)를 포함하는 기본배지에 여러 가지 유기 및 무기질소원을 첨가하여 28°C에서 7일간 진탕배양 후 균의 생육을 확인하였다.

각종 배지를 사용한 배양상의 특징 검토

사상균이 자라기에 적합한 각종 배지에 분리 균주의 포자를 접종하여 집락의 성상, 군사 및 포자의 색, 가용성 색소의 생성 등을 검토하였다.

효소활성 측정

1) 조효소액 조제

Cellulase 생성을 위한 배지 (Table II)에 tween 80을 0.2% 첨가하여 사용하였다. 배지 100 ml씩을 넣은 500 ml 삼각 flask에 각 균주의 포자 현탁액 0.5 ml씩을 접종한 후 28°C에서 120 rpm으로 8일간 왕복 진탕 배양한 다음 배양액을 20분간 원심분리 (4°C, 5,000 rpm)하여 그 상등액을 조효소액으로 하였다.

2) Filter paper의 분해활성 측정

0.05 M Na-citrate buffer (pH 4.8) 1 ml와 조효소액 0.5 ml를 첨가한 시험관에 1×6 cm 크기로 자른 filter paper (Whatmann No.1) strip (50 mg)을 시계태엽 모양으로 해서 넣고, 10초 동안 흔든 다음 50°C에서 1시간 정지 반응시켰다. 반응 후 DNS 시약을 3 ml

첨가해서 반응을 정지시키고, 끓는 물에서 5분간 처리한 후 냉각수로 식힌 다음 20 ml의 증류수를 첨가해서 생성된 환원당의 양을 540 nm에서 흡광도로 측정하였다 (Mandels 등, 1976).

3) Carboxymethyl cellulose (CMC)의 분해활성 측정

기질 CMC를 2%로 되게 0.05 M Na-citrate buffer (pH 4.8)에 녹여서 0.5 ml 취하고, 여기에 조효소액 0.5 ml를 가해 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후의 측정과정은 위와 같다.

4) β -Glucosidase의 활성 측정

0.05 M Na-citrate buffer (pH 4.8) 1 ml를 시험관에 넣고, 조효소액 0.5 ml를 첨가해서 Salicin 용액 (기질) 0.5 ml를 넣고, 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후의 측정방법은 위와 같으나 각 효소용액의 blank는 1% Salicin 용액을 첨가하지 않고 반응시켰다 (Reese

등, 1977).

結 果

Cellulose 분해균의 분리 및 동정

부산, 경남 일대의 600여 토양 시료로부터 분리용 배지에서 생육이 양호한 21균주를 순수분리하여 동정한 결과, 자낭균 아문에 속하는 No.20, No.21 균주를 제외하고는 모두 불완전 균류 (Fungi Imperfecti)로 Hyphomycetes강의 Moniliales목에 Moniliaceae와 Dematiaceae과에 속하였다. 동정 결과 *Acremonium* sp., *Doratomyces microsporus*, *Chrysonilia* sp., *Trichoderma viride*, *Aspergillus fumigatus* Fres, *Aspergillus niger*, *Verticillium intertexu*, *Verticillium malthousei*, *Penicillium* sp., *Varicosporium elodeae*, *Gliomastix murorum*, *Fusarium* sp., *Chaetomium globosum*, *Chaetomium seminudum* 등으로 동정되었다. 위의 분리균 중 속검색에 있어서 특징적으로 비교가 되는 5균주를 선택하여 분류학적 특징에 따라 비교, 검색한 결과는 다음과 같다.

No.1 균주의 검색

균사에서 드물게 돌기가 신장되어 분생자병이 생성된다. 맨 끝부분에 phialide가 형성되며 그 위에 분생자를 착생시킨다. 집락은 백색이며 발육 후기에 균사가 배지 전체에 고르게 덮는다. 격벽있는 균사로부터 되며, 얇은 격벽이 오래되면 두꺼워져 이중

Table II. Composition of medium for cellulase production

KH ₂ PO ₄	0.2%	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 ppm
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.56 ppm
Urea	0.03%	CoCl ₂	2.0 ppm
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03%	Cellulose	1.0%
CaCl ₂	0.03%	Proteose peptone	0.75%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 ppm		

Table III. Morphological characteristics of selected strains

No. of strains					
Morph.	1	2	3	4	5
Charact.					
Hyphae	+	+	+	+	+
Colonial color	white	white	white	white	white
Conidial color	white	bule green	grayish green	white	flesh blond
Vesicle shape	externally	externally	externally	externally	externally
Phialides	single	three or four	three or four	single	single
Septum	+	+	+	+	+
Perithecium	-	-	-	-	-
Conidiphore	slender long	slender short	thick long	slender long	slender long
Identification	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Verticillium intertexum</i>	<i>Verticillium malthousei</i>

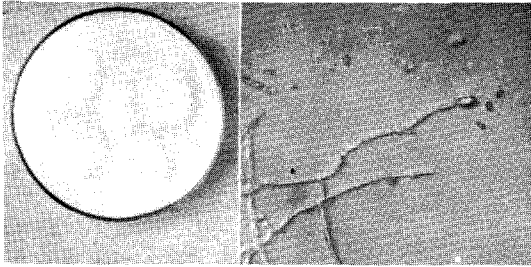


Fig. 1. Photomicrographs and diagrams of strain No.1

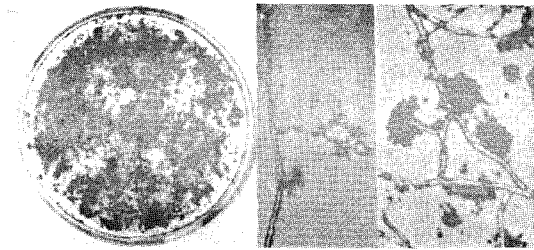


Fig. 2. Photomicrographs and diagrams of stain No.2

벽의 격벽으로 잘라져 분절형 포자로 된다 (Fig. 1). *Acremonium* sp.으로 동정되었다. *Trichoderma* sp.은 분생자병이 잘 발달되며 분생자병의 형성이 매우 양호하다. 또한 분생자의 색이 녹색 계통인 점에서 *Acremonium* sp.과 차이점을 보였다.

No.2 균주의 검색

분생자병은 기생균사에서 직립 혹은 불규칙하게 발달이 양호하며 털다발모양으로 엉겨진다. 분지될 때 아랫부분의 신장이 계속되기 때문에 전체가 둥근모양을 나타내게 된다. 분지선단에 생긴 phialide의 아랫부분에 평균 3개가 고리모양을 이루고, 직각에 가까운 각도로 생긴다. 분생자병의 가지는 길고 가

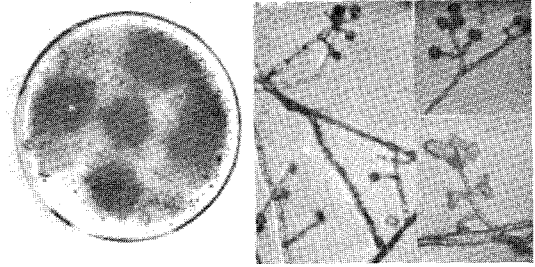


Fig. 3. Photomicrographs and diagrams of strain No.3

늘며, 균사의 색은 백색이고, 발육 후기에 짙은 청록색의 포자가 배지 전체를 덮는다 (Fig. 2). Refai 검색표의 *Trichoderma viride*와 일치한다.

No.3 균주의 검색

분생자병이 특징적으로 조밀하게 분생자 영역에서 형성되고 있다. 분생자병의 main branches는 상대적으로 두껍고 길지만 side branches는 짧고 두껍다. 회녹색의 분생자를 분생자병에 밀집하게 가진다 (Fig. 3). Refai의 검색표에서 *Trichoderma haematum*과 일치하는 점이 많으나 중요한 phialide의 정확한 관찰이 미흡해 동정 결과를 보류한다.

No.4 균주의 검색 (Isaac 등, 1955)

백색의 격벽있는 균사 위에 밝은 베이지색의 분생자를 착생시킨다. 분생자가 사슬형이 아니며 외생한다. 기중균사에서 분생자병이 세 갈래로 분지하며 그 끝의 phialide에 분생자가 밀집하여 다소 구형의 덩어리로 보여진다 (Fig. 4). Isaac 등의 연구에서 보여지는 형태적 특징과 일치하여 *Verticillium intertexum*으로 동정하였다. *Acremonium* sp.은 분생자병의 돌기가 드물게 측생하여 한 갈래로 분지하는데 비해 *Verticillium* sp.은 2~4개로 분지되는 것이 분류의 특징적인 차이점이다.

No.5 균주의 검색

분생자병은 기생균사에서 직립하여 주로 고리모양으로 분지한다. 분생자병은 보통 2~4개이며 그 위에 phialide를 형성하여 분생자를 착생시킨다. 아

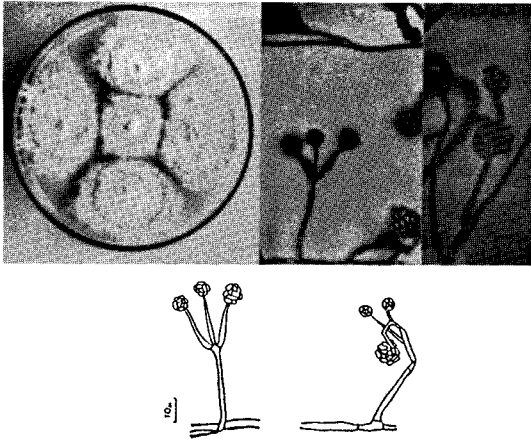


Fig. 4. Photomicrographs and diagrams of strain No.4

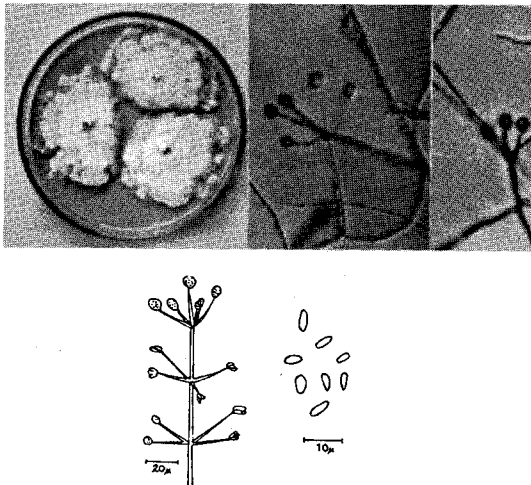


Fig. 5. Photomicrographs and diagrams of strain No.5

랫부분은 약간 부풀어 있고 앞부분은 갈수록 가늘어진다. 분생자는 무색이며 분생자병의 장축은 종축에 거의 직각으로 위치한다 (Fig. 5). 균류도감을 근거로 *Verticillium malthousei*로 동정하였다.

분리 균주의 생리적 특징

분리 균주의 적정 생육 온도는 일반적인 사상균의 경우와 마찬가지로 20~30°C였으며 pH 3~5에서 생육이 왕성하였다. 각 균주 모두 Modess agar 배지에서의 생육이 부진했으며 No.3, No.4 균주의 경우 Oatmeal agar 배지에서 생육이 매우 양호하였다. 탄소원, 질소원의 이용성 검토 시험결과는 Table IV, V에서 나타낸 바와 같다. 다만 No.3 균주만이 약간의

Table IV. Utilization of carbon sources by isolated strains

No. of strains	1	2	3	4	5
Carbon source					
Mannose	+	++	+	+	-
Xylose	++	++	++	+	+
Sorbose	+	±	-	-	-
Inositol	+	+	-	-	-
Glucose	+	±	++	+	+
Raffinose	++	±	+	+	-
Arabinose	+	±	++	+	-
Ribose	++	±	+	++	-
Levulose	++	±	++	+	+
Rhamnose	+	+	-	+	+

Table V. Utilization of nitrogen sources by isolated strains

No. of strains	1	2	3	4	5
Nitrogen source					
NH ₄ Cl	+	-	++	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	-	++	-	-
NaNO ₃	+	+	+	+	+
NH ₄ NO ₃	++	++	++	-	+
Urea	-	±	+	±	±
KNO ₃	+	+	+	+	+
Casamino acid	++	+	++	+	+

++: good utilization -: poor utilization
 +: normal utilization ±: doubtful utilization

이용성을 나타냈다.

효소활성능의 측정

분리 균주의 F.P. cellulase, CMC cellulase, β-glucosidase의 활성능을 측정 한 결과는 Table VI와 같다. 비교 균주로는 F.P. 분해활성능과 CMC 분해활성능이 가장 높은 것으로 알려진 변이주인 *Trichoderma viride* QM 9414를 사용하였다. 이는 β-glucosidase의 활성이 낮은 약점이 있으며, 야생균주보다 약 2~5배 높은 역가를 가진 것으로 알려져 있다. 효소활성의 비교 결과 분리균주인 *Trichoderma viride*로 동정된 균주가 F.P. cellulase, CMC cellulase, β-glucosi-

Table VI. Cellulase activities of selected strains

Strains selected	Cellulolytic activity		
	F.P. cellulase (O.D/0.5 ml/hr)	CMC cellulase (O.D/0.5 ml/30 min)	β -glucosidase (O.D/0.5 ml/30 min)
<i>Acremonium</i> sp.	0.24	0.49	0.15
<i>Trichoderma viride</i>	1.88	1.76	1.71
<i>Trichoderma</i> sp.	0.05	0.25	0.08
<i>Verticillium intertexum</i>	0.01	0.06	0.05
<i>Verticillium malthousei</i>	0.01	0.48	0.04
<i>Trichoderma viride</i> QM 9414	8.17	2.90	0.20

dase의 활성이 가장 높게 나타났다. 특히, β -glucosidase의 활성은 변이균주인 *T. viride* QM 9414보다 오히려 높게 나타났다.

考 察

불완전 균류의 분류 체계는 아직 확실하게 확립되어 있지 않으나, 본 실험의 분리 균주 검색에 있어서, 속까지는 동정이 가능했으나 종의 동정은 자료의 부족으로 인해 확실한 동정이 어려웠으며, 또한 참고도서에 따라 도해의 차이가 많아 기준을 정하기가 쉽지 않았다. 본 실험에서 행하지 못한 DNA의 GC 함량측정, 세포벽다당류의 구조해석, DNA-DNA 상동성에 의한 관련 분류군과의 상관관계 해석의 화학적 분류기법과 전자현미경을 통한 분생자의 미세구조 해석 등을 통하여 확실한 분류 체계를 확립해야 할 것이다. 또 효소화학적 측면에 있어서는 Mendels 등의 방법에 의해 이미 알려진 변이균주인 *Trichoderma viride* QM 9414의 cellulase 생산조건에 따라 비교 검토했기 때문에 *Trichoderma viride*로 동정된 야생 분리 균주의 활성이 비교적 높은 편이었고, 다른 균주의 활성은 대체로 낮았다. 그래서 각 균주에 따른 cellulase 생성조건을 설정하여 활성을 검토하면 좀더 정확한 비교가 될 것이고, 이들 균주의 각 단계별 효소활성이 높은 균주의 이종 또는 동종간에 세포융합을 통하여 보다 활성이 우수한 균주의 육종에 까지 실험이 진행되어야 할 것이다.

摘 要

Cellulose를 분해하는 균주를 자연토양으로부터 분리하여 형태적 관찰, 생리적 특성 등을 검토하였고 F.P. Cellulase, CMCcase, β -glucosidase의 활성을 측정하였다. 11속, 21종이 동정되었으며 속분류검색에 있어 기본적인 차이점을 보이는 5종을 선정하였다.

동정결과는 *Acremonium* sp., *Trichoderma viride*, 미동정된 *Trichoderma* sp., *Verticillium intertexum*, *verticillium malthousei* 이었다. 효소활성은 *Trichoderma viride*로 동정된 균주가 비교적 높아보였다.

參考文獻

- Ainsworth, G.C., Sparrow, and Sussman, A.S. (1973): The fungi; an advanced treatise, Vol. IVa and IVb. Academic Press, New York.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972): Illustrated Genera of imperfect fungi. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- Barron, G.L. (1968): The genera of hyphomycetes from soil. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 364pp.
- Berghem, L.E.R. and Fredricksson, U.B.A. (1975): The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem*, 53: 55-62.
- Hankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1977): Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect cellulase activity microorganisms. *J.*

- Gen. Microbiol.* **98**: 109-115.
- Isaac, I. and Davis, R.R. (1955): A new hyaline species of *Verticillium*. *Trans. brit. Mycol. Soc.* **38**(2): 143-156.
- Kendrik, B. (1971): Taxonomy of fungi imperfecti. *Univ. Toronto Pr.*, 309.
- Mandel, M., Andreotti, R. and Roche, C. (1976): Cellobiose assay. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 17.
- Reese, E.T., Sternberg, D., and Vijaykumar, P. (1977): Measurement of Cellulase activities. *Can. J. Microbiol.* **23**: 139.
- Refai, M.A. (1969): A revision of the genus. *Trichoderma. Mycol. Pap.* **116**: 55.
- 宇田川俊一, 堀江義一, 箕浦久兵衛, 横山龍夫, 椿啓介, 三浦宏一郎, 山崎幹夫, 渡邊昌平著.(1980): 菌類圖鑑(下). 講談社.

Accepted for Publication 12 March 1990