

혐기성 세균 *Ruminococcus albus* F-40에 의한 목재 cellulose의 분해특성*1

김윤수*2 · 위승곤*2 · 명규호*2

Degradation Characteristics of Wood Cellulose by Ruminant Cellulolytic Anaerobic Bacterium *Ruminococcus albus* F-40*1

Yoon-Soo Kim*2 · Seung-Gon Wi*2 · Kyu-Ho Myung*2

ABSTRACT

The degradation mode of lignocellulose by anaerobic ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* F-40 was investigated. Birchwood holocellulose and filter paper were incubated as the sole carbohydrate sources with using the Hungate techniques. After 2 or 4 days of incubation, samples were employed for chemical and electron microscopic evaluations. The degradation rate of cellulosic substrates and the adhesion rate of bacteria to the substrates increased proportionally with the decrease of relative crystallinity of cellulose, indicating the preferential breakdown of amorphous cellulose by this bacterium. X-ray diffraction analyses and polarized light microscopy showed, however, that crystalline cellulose was also degraded by *R. albus*. FT-IR spectra indicated that not only cellulose but hemicellulose was also degraded by this bacterium.

Electron microscopic investigations showed the protuberant structures on the surface of *R. albus*. These structures were much more significant when bacterial cells were grown in the media containing insoluble substrates, such as cellulose, indicating clearly that bacterial protuberant structures were induced by the substrates. Protuberant structures extended from the bacterial cells adhered tightly to the substrates and numerous vesicles covered the surface of cellulosic substrates affected. Cellulosome-like structures were distributed on the cellulose matrix. Electron microscopic works showed that diverse surface organells of *R. albus* were involved in the degradation of cellulosic materials. SEM examinations showed the breakdown of cellulose by *R. albus* was proceeded by severel routes : short fiber formation, defibrillation and destrafication of cellulose microfibril.

Keywords : *Ruminococcus albus*, cellulose, degradation modes, surface structure

*1 접수 1997년 7월 24일 Received on July 24, 1997

본 연구는 한국과학재단의 지원(KOSEF 951-0607-011-2)에 의해 이루어졌음.

*2 전남대학교 농과대학 College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

1. 서 론

세균에 의한 섬유소 분해는 진균류와는 달리 혐기성 상태에서 이루어진다. 반추위 내에 존재하는 혐기성 섬유소분해성 세균(ruminant cellulolytic anaerobic bacteria: 이하 RCB로 약함)중에서 대표적인 것으로는 *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* 및 *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes* 등을 들 수 있다(Hobson, 1988). 이들 RCB들은 사상균류의 cellulase와는 달리 소위 "cellulosome"이라는 고분자량의 섬유소 분해효소 복합군(multicomponent cellulolytic complex)에 의해 섬유소를 분해하는 것으로 생각되고 있지만(Couglan, 1991; Flint & Forsberg, 1995; Lamed & Bayer, 1988). 이같은 cellulosome이 모든 RCB에 존재하는 것인지는 아직 확인되지 않고 있다.

RCB에 의한 섬유상 물질의 분해는 lignocellulose성 물질의 소화율과 직접 관계된다(Jung *et al.*, 1993). 목재의 경우 2차벽 내의 리그닌과 결정성 섬유소 때문에 RCB에 의한 분해가 더딘 관계로 RCB의 기질로는 거의 사용되지 않고 있다(Haigler & Weimer, 1991). 세균류에서 기원하는 cellulase에 대한 연구는 목질섬유소가 반추위 동물의 사료원으로서 잠재력이 매우 크다는 점에서, 또한 화학 원료원으로서의 전환 가능성이 높다는 점에서 그 중요성이 인정되고 있지만 임산학분야에서의 연구는 진균류의 그것에 비해 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 반추위 동물의 중요한 섬유소 분해세균으로서 섬유소 분해능이 월등한 *R. albus*를 대상으로 목재섬유소의 분해양태를 미시구조적 측면에서 고찰하고, 이같은 결과를 화학적 결과와 비교를 통해서 lignocellulose로서 목재의 분해특징을 파악하고자 한다. 그것은 RCB에 의한 목질재료의 분해양태 연구를 통해서 목질재료의 조사료로서의 가치를 재평가할 수 있을 뿐 아니라, 혐기성 세균에 의한 목재세포벽의 분해양태에 관한 지식을 얻을 수 있으며 동시에 혐기성세균이 분비하는 섬유소분해효소에 의한 섬유소분해기작의 이해에 기여할 수 있기 때문이다. 본 연구에서는 주로 화학적 분석과 전자현미경적 관찰을 통해 *R. albus*에 의한 자작나무 cellulose의 분해 패턴을 파악하였다.

2. 재료 및 방법

2. 1 사용 균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 균주는 *R. albus* F-40으로서 日本 三

重大 Kunio Ohmiya교수로부터 분양 받아 사용했다. 배지는 Hungate(1950)의 조성에 따라 만들었으며, 배지의 pH 6.8, 배양온도 39℃의 조건아래 절대 혐기성 상태를 유지하면서 incubation시켰으며, cellulose원은 배지의 1%로 하여 배양했다.

2. 2 시료 및 전처리

탈지시킨 자작나무 목분을 Wise법에 따라 holocellulose를 제작하였다. 한편 순수한 섬유소로만 조성된 물질과의 비교를 위해 Whatman filter paper No. 1을 2M HCl로 실온에서 48시간 또는 85% 인산으로 0℃에서 30분간 처리하여 팽윤시킨 다음, 각각 24시간 증류수에 세척한 후 기진시키고 Wiley mill로 1mm크기로 분쇄한 것을 사용하였다.

2. 3 시료의 분석

2. 3. 1 섬유소의 상대결정화도(Relative crystallinity index of cellulose : RCI)의 측정

섬유소 물질의 결정화도는 X선 회절장치(Rigaku, Geiger flex D/max-3C)를 사용하여 회절도를 구한 다음 Segal법에 따라 구했다.

2. 3. 2 FT-IR 분석

100mesh로 마쇄시킨 시료 1mg과 분광기용 KBr 300mg을 혼합하여 500kg/cm²의 압력으로 5분간 압착시켜 직경 1cm의 disk를 만든 다음 Shimadzu FT-IR-435를 사용하여 4000~400cm⁻¹에서의 spectra를 구하였다.

2. 3. 3 시료에 대한 세균의 부착율(adhesion rate) 측정

탄수화물원으로서 목분 또는 여과지 0.25g과 7ml 세균 suspension을 Hungate tube에 넣고 39℃에서 24시간 incubation시킨 다음 glass filter로 여과한 뒤 650nm에서 OD값을 측정하여 부착율을 계산했다(Bhat *et al.*, 1990).

2. 3. 4 건물분해율(degradation of dry matter)의 측정

10ml 기본배지에 종균 0.2ml를 접종하여 목분 또는 여과지 100mg을 넣고 39℃에서 72시간 배양시킨 뒤 glass filter로 여과시킨 다음 잔사중량을 측정하여 분해율을 계산했다.

2. 4 세균 및 시료의 전자 현미경 관찰

2. 4. 1 SEM 관찰

세균의 관찰을 위해 세균배양액을 직경 0.45μm의

membrane filter 위에서 suspension시킨 다음 glutaraldehyde(2% in cacodylate buffer)로 2시간 전 고정시켰다. 이어 OsO₄로 1시간 후고정시킨 후 ethanol로 탈수시키고, t-butyl alcohol로 냉동치환 후 냉동건조시키고(Inoue & Osatake, 1988) 이어 ion sputter로 gold coating시켜 Hitachi SEM을 사용하여 관찰하였다.

목재 및 여과지의 관찰은 *R. albus* F-40로 배양이 끝난 뒤 phosphate buffer로 세척한 후 위의 방법(2. 4. 1)에 따라 고정, 탈수, 건조시켜 SEM관찰을 실시했다. 세균의 표면구조의 관찰을 위해 glutaraldehyde로 전고정하기 전에 1% NaCl 1ml에 cationized ferritin (CF) 1mg을 용해시켜 실온에서 1시간 전처리하였다(Lamed & Bayer, 1986).

2. 4. 2 TEM 관찰

자작나무 holocellulose 및 여과지는 배양 완료 후 2% glutaraldehyde(in cacodylate buffer)와 1% osmium tetroxide(in cacodylate buffer)로 고정시킨 후 ethyl alcohol로 계열탈수하고, London Resin White에 포매시켰다. Reichert사의 Ultramicrotome을 사용 초박절편(두께 : 100~80nm)을 제작한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 염색시켜 JEOL TEM-1200을 사용 70~80kV의 조건에서 관찰하였다.

세포조직학적(cytochemical) 관찰을 위해 ruthenium red(Luft, 1971), CF(negatively charged polysaccharide 검색용), PATAg(β -1,4결합 糖 검색용), KMnO₄ 등의 염색기법을 사용하였다. 세포화학적 검색에서는 osmium tetroxide를 사용한 후고정은 생

략했다. 아울러 negative staining에는 4% uranyl acetate 또는 ammonium molybdate와 bacitricin (Knutton, 1995)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1 섬유소의 상대결정화도(RCI)의 변화

자작나무의 RCI는 48%였으나, holocellulose의 RCI는 59%로 증가했다. 이같은 증가는 holocellulose의 제작시 리그닌의 제거에 따른 결정형 섬유소의 상대적 증가에 기인한 것일 뿐, 결정형 섬유소량의 절대적 증가는 없었다. 무처리 자작나무를 *R. albus* F-40에 배양시킬 경우 RCI의 변화는 찾아볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 리그닌을 제거시킨 자작나무 holocellulose의 경우 Fig. 2에 나타난 바와 같이 결정형 섬유소를 나타내는 22.8°에서와 비결정형 섬유소의 peak인 19°에서 모두 현저한 감소를 나타냈다. X선 회절분석 결과 *R. albus*는 비결정형 섬유소뿐 아니라 결정형 섬유소도 동시에 분해시키는 것으로 나타났다. 이같은 결과는 편광현미경관찰에 의해서도 확인되었는바, 부분적으로 복굴절성의 소실이 *R. albus*에 의해 배양된 자작나무의 holocellulose 시편에서 관찰되었다(Fig. 3).

지금까지의 연구에 따르면 *R. albus*는 그 효소체계가 주로 endocellulase로 돼있기 때문에 (Leatherwood, 1973; Wood et al., 1982; Yu & Hungate, 1979), 고도로 질서 정연한 결정형 섬유소를 분해시키는 *R. flavefaciense*와 *F. succigenes*와는 달리 결정형 섬유소를 분해할 수 없는 것으로 생각되어왔다(Coughlan, 1991). 그

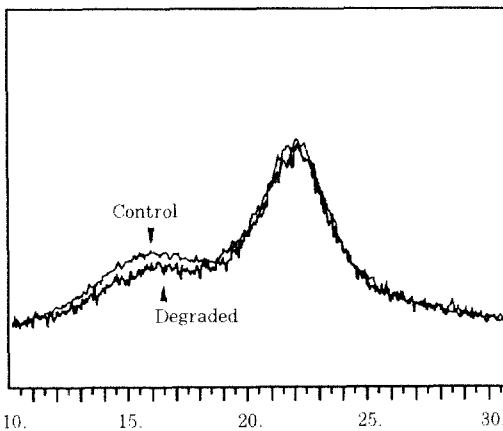


Fig. 1. X-ray diffractograms of birch wood degraded by *R. albus* F-40.

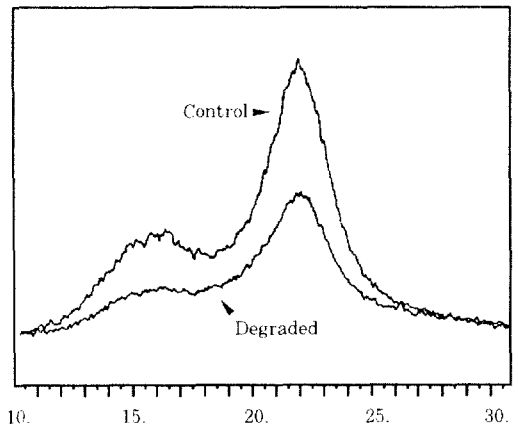


Fig. 2. X-ray diffractograms of birch wood holocellulose degraded by *R. albus* F-40.



Fig. 3. Loss of birefringences in birchwood holocellulose after incubation with *R. albus* F-40 for 72hrs ($\times 400$).

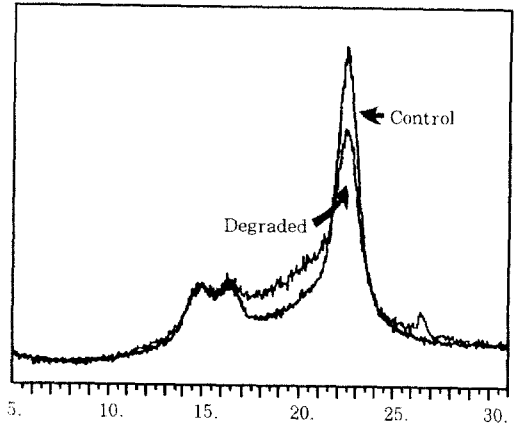


Fig. 4. X-ray diffractograms of H_3PO_4 - pre-treated filter paper degraded by *R. albus* F-40.

러나 본 실험 결과 *R. albus* F-40은 비결정형 섬유소 뿐만 아니라 결정형 섬유소도 분해시키고 있는 것으로 분명히 드러났다. Ohmiya 등(1989)은 *R. albus* F-40로 부터 결정형 섬유소의 분해에 관여하는 exoglucanase를 단리하였다. 그럼에도 불구하고 *R. albus* F-40에 의한 결정형 섬유소의 분해능은 그리 높지 않은 것으로 생각되는 바, 이는 Segal법으로 계산할 경우 holocellulose의 RCI는 59%에서 55%로써 4%의 감소에 그치고 있기 때문이다.

한편 filter paper의 RCI는 염산처리의 경우 81.1%, 인산처리의 경우 82.1%로서 control의 67.6%보다 상대 결정화도가 크게 증가하였다. 이같은 결과는 인산 또는 염산과 같은 산처리로 비결정형 섬유소가 우선적으로 분해됨으로써 결정형 섬유소만 남아있게 된 것으로 해석된다. 여과지의 *R. albus*의 배양 후 상대결정화도의 패턴은 배양 전과 동일한 형태를 유지하였으나(Fig. 4), RCI의 값은 10% 정도의 감소를 보임으로서 결정형 섬유소의 분해도 진행됨을 나타내주었다.

섬유소는 대단히 단순한 화학적 구조를 갖고 있음에도 불구하고, 고도로 결정화된 부분과 비결정화 부분이 공존하여 생분해의 과정이 다른 물질에 비해 복잡하다. 진균류의 경우 결정화도가 섬유소의 분해 속도에 지대한 영향을 미친다는 것은 잘 알려진 사실이다(Haigler & Weimer, 1991; Flint & Forsberg, 1995). 그러나 반추위 내 미생물의 경우 섬유소의 결정화도는 가수분해 속도에 크게 영향을 미치지 않는다는 보고도 있다. Weimer 등(1990)은 결정화도가 서로 다른 순수한 섬유소를 기질

로 사용하여 실험한 결과 RCB에 의한 섬유소 분해 속도는 cellulosome이 접근 가능한 표면적에 의해 크게 좌우됨을 밝힌 바 있다. 이같은 결과는 결정화도는 다르지만, 표면적이 동일한 섬유소의 경우 RCB에 의한 분해는 거의 유사하다는 Smith 등(1973)의 결과를 뒷받침해 주는 것이라 하겠다. 여과지의 경우 순수한 섬유소로만 구성되어 있음에도 불구하고 자작나무의 holocellulose보다 분해가 더딘 이유는 높은 결정화도와 함께 섬유소분해효소의 접촉표면적의 축소뿐만 아니라 세균부착물의 현저한 감소가 주요 원인(Roger *et al.*, 1990)인 것으로 생각된다. Dehority와 Johnson(1981)은 섬유소 시료의 크기가 클수록 RCB에 의한 분해는 더딘 것으로 보고한 바 있다. micron단위로 마쇄된 ball-milled cellulose와 달리본 실험에 사용된 여과지의 크기가 1mm정도였던 것도 *R. albus*에 의한 여과지의 분해가 더딘 이유의 하나(Weimer, 1996)로 추론된다. X선 회절분석 결과 섬유소의 높은 결정화도와 함께 리그닌의 존재는 RCB에 의한 섬유소물질의 분해에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(Borneman & Akin 1990).

3.2 건물 분해율의 변화

자작나무 holocellulose의 분해율은 62.4%로서 무처리 자작나무의 10.4%에 비해 무려 6배의 증가율을 보였다. 볏짚의 분해율이 보통 40% 내외인 점을 감안한다면 RCB에 의한 holocellulose의 분해율은 매우 높은 것으로 나타났다. 이같은 결과는 리그닌의 제거에 따른 것으로 생각된다(Chesson, 1993). 따라서 목재를 반추

Table 1. Changes of relative crystallinity, dry matter digestion and adhesion rate after incubation with *R. albus* F-40.

Substrate	Relative Crystallinity(%)		Digestion rate (%)	Adhesion rate (%)
	Before incubation	After incubation		
Birch wood	48.1	50.9	10.4	50
Birch holocellulose	59.1	55.0	62.4	300
Filter paper	67.6	61.8	10.2	25
HCl-pretreated filter paper	81.8	70.1	7.6	25
H ₃ PO ₄ -pretreated filter paper	82.1	63.9	13.7	25

위동물의 사료로 사용할 경우, 경제적이면서도 효과적인 탈리그닌화법의 개발이 중요함을 시사하였다. 한편 여과지의 경우 분해율은 전처리한 경우에도 10%이하를 나타냈다(Table 1). 이같은 결과는 X선 회절분석 결과에서 이미 논의된 바와 같이 여과지의 높은 상대결정화도와 상대적으로 낮은 표면적에 기인하는 것으로 사료된다.

3.3 Adhesion rate

무처리 자작나무에의 세균부착율에 비해 holocellulose에의 세균부착율은 6배의 증가를 보임으로써(Table 2) holocellulose는 분해율의 증가 뿐만 아니라 세균의 부착도 아울러 증진시키는 것으로 나타났다. 이와는 대조적으로 여과지의 *R. albus* 부착율은 0.5로 매우 낮았다. 이같은 결과는 상대결정화도 및 건물분해율과 그 값을 같이 하고 있음을 보여주었다. 즉 높은 섬유소 결정화도 뿐만 아니라 hemicellulose의 결핍과 세균과의 접촉을 제한하는 표면적의 부족 등이 여과지의 낮은 부착율의 원인으로 생각된다. Ford(1983)는 식물 세포벽을 탈리그닌화 시킬 경우 섬유소 분해율은 변화가 없음을 발견하고, 오히려 탈리그닌보다는 표면적을 증가시키는 것이 RCB에 의한 식물세포벽물질의 분해(소화)에 더욱 효과적이라고 보고했다.

3.4 FT-IR Spectra의 특징

R. albus F-40에 의한 lignocellulose성 물질의 화학적 성분 변화와 아울러 이들 물질들의 전처리에 의한 구성성분의 화학적 변화의 특징을 FT-IR로 분석하였다. 무처리 자작나무를 *R. albus*로 배양시킨 후의 FT-IR spectra는 배양전과 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 그러나 자작나무의 holocellulose는 무처리 자작나무에 존재하였던 리그닌 귀속 흡수대가 완전 소멸되었으나, 있다고 하더라도 그 peak의 강도가 매우 낮게 나타났다(Fig. 6). 즉 1600, 1275cm⁻¹의 흡수대가 거의 소멸되

었으며, 다만 holocellulose 내의 잔류리그닌으로 인해 리그닌에 귀속되는 1500cm⁻¹에서의 흡수대를 찾아볼 수 있었다. *R. albus* F-40으로 배양시킨 holocellulose는 control과는 현저한 차이가 있었으며, hemicellulose 특히 xylan에 귀속되는 1730, 1370, 1230cm⁻¹에서의

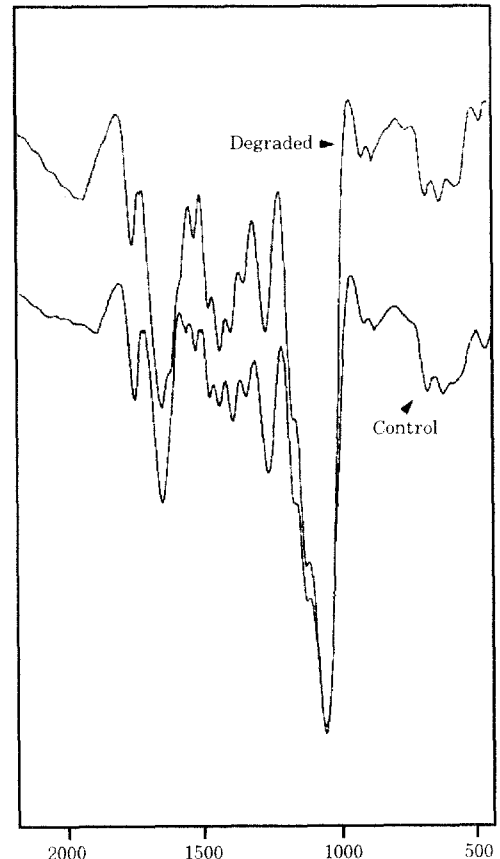


Fig. 5. FT-IR spectra of birch wood.

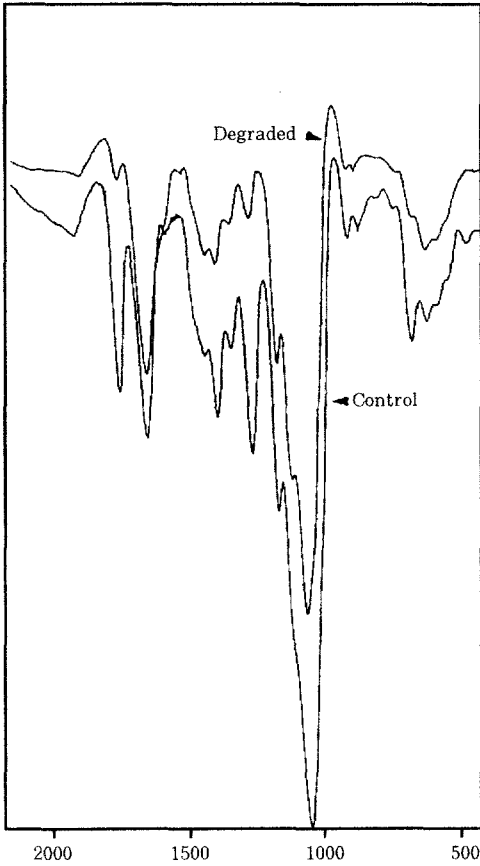


Fig. 6. FT-IR spectra of birch wood degraded by *R. albus* F-40, holocellulose degraded by *R. albus* F-40.

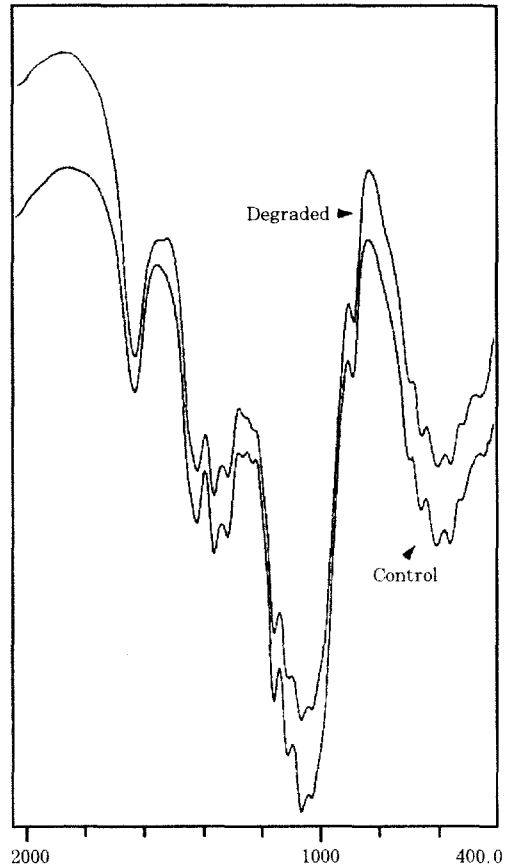


Fig. 7. FT-IR spectra of H_3PO_4 -pretreated filter paper degraded by *R. albus* F-40.

흡수대의 peak가 현저히 감소하거나 소멸되었다(Fig. 6). FT-IR 분석 결과 *R. albus*에 의해 목재의 hemi-cellulose가 현저히 분해되고 있음을 보여줌으로써 본 연구에 공시된 *R. albus* F-40은 섬유소뿐 아니라 hemi-cellulose도 잘 분해시키고 있음을 보여주었다. Ohmiya 등은 본 연구의 공시균으로부터 최근 xylan분해효소인 xylanase을 단리하였다(personal communication). Xylan의 분해가 섬유소의 분해에 앞서 이루어지는 것인지, 아니면 섬유소와 xylan의 분해가 동시에 이루어지는 것인지는 공시 세균의 효소분해체계의 sequence를 이해하는데 중요하지만 이 실험에서는 탐색할 수 없었다.

여과지의 경우 *R. albus*로 배양한 후에도 IR spectra 상의 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 7). 따라서 여과지의 분해를 촉진시키기 위해서는 상대결정화도의 감소와

표면적의 증대를 위한 화학적, 물리적 전처리가 필요함을 시사하였다(Kerley *et al.*, 1988).

3.5 초미시구조적 연구

3.5.1 *R. albus*의 표층구조의 특징

본 연구에 공시된 *R. albus* F-40은 coccus타입으로서 그 크기는 $0.4\sim 0.7\mu m$ 이며 일반 세균에 비해 그 크기는 약간 작은 편이다. *R. albus*는 outer membrane 아래에 peptidoglycan layer(층)를 갖고 있다(Fig. 8-A). *R. albus*와 같이 비활주성(nonmotile) 세균의 경우 기질에 부착과 분해를 위한 표면구조물을 갖고 있을 것으로 사료되어, 다양한 세포 화학적 기법을 사용해 표면구조를 탐색하였다. 대부분의 세포 화학적 기법은 glycocalyx와 vesicle만을 보여주었을 뿐 세균의 특이한 표층구조는

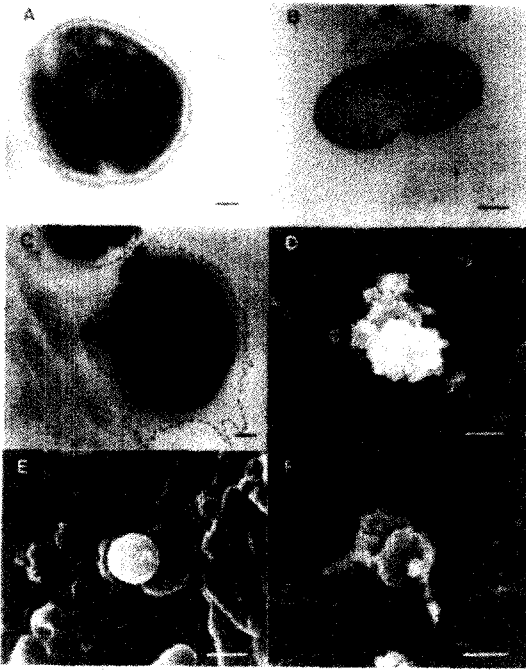


Fig. 8. Electron microphotographs on the surface structures of *R. albus* F-40.

- Notes: A : general view of bacterium stained with uranyl acetate and lead citrate(bar=100nm).
 B : glycocalyx (=slime) extended from outer membrane of bacterium. Note the vesicle (bar=200nm).
 C : *R. albus* stained with ruthenium red suggesting the existence of negative-charged carbohydrates in the surface of bacterium (bar=100nm).
 D : protuberant structures after treatment with cationized ferritin(bar=500nm).
 E : smooth surface of *R. albus* incubated in cellobiose(bar=500nm).
 F : appendiges of *R. albus* adhere tightly to the birchwood holocellulose(bar=500nm).

관찰되지 않았다(Fig. 8-B). 다만 ruthenium red와 PATAg 염색에서 양성반응을 보임으로써 다당류로 구성된 표층구조물이 존재(Luft, 1971)한다는 것이 확인되었다(Fig. 8-C). 이에 따라 *R. albus*를 CF로 처리한 후 SEM관찰을 시도한 결과 공시세균의 표면에 돌출구조(protuberant structure)가 확인되었다(Fig. 8-D).

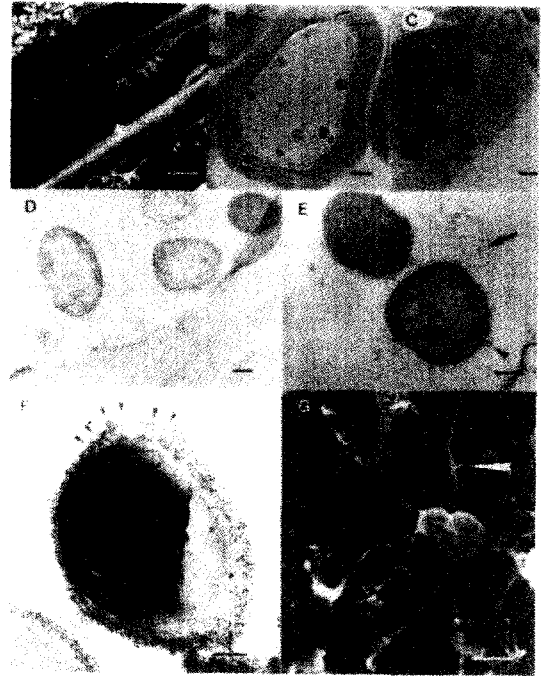


Fig. 9. Microphotographs on the degradation of birchwood holocellulose by *R. albus* F-40.

- Notes: Distribution of bacteria on the holocellulose(A: bar=5 μ m), in cell lumina(B: bar=2 μ m) and the previous site of compound middle lamella(C: bar=500nm). Numerous vesicles covered the substrates at the initial stage of degradation(D: bar=200nm) and the last stage of degradation(E: bar=200nm). Note the vesicles around the outer membrane (arrowhead) and in the cellulose microfibrils(arrow). Cellulosomes around the bacterium (arrowheads: F: bar=100nm) and on the cellulose microfibrils(G: bar=500nm).

이 돌출구조는 CF로 처리한 세균에만 관찰될 뿐, CF로 처리하지 않는 세균은 그 표면이 매우 매끈(smooth)하게 나타났다. *R. albus*의 표면구조가 CF에 양성반응을 보인다는 사실은 이 세균의 표면에 존재하는 돌출구조의 화학적 구성이 음이온성 다당류로 구성되어 있음(Chesson, 1993; Flint & Forsberg, 1995)을 입증해 주는 것이다.

표면의 돌출구조물은 기질의 종류에 따라 그 발현이 달라졌다. 즉 cellobiose와 같은 수용성 탄수화물을 기질로 사용했을 경우(Hiltner & Dehority, 1983), CF로 전

처리해도 돌출구조물은 세균의 표면에서 관찰되지 않았으나(Fig. 8-E), 비수용성 기질 즉 ball-milled cellulose, 또는 자작나무의 holocellulose를 기질로 하여 세균을 배양시킬 경우 현저한 돌출구조물이 세균의 표면에서 관찰되었다. 이같은 결과는 목초를 기질로 하여 관찰한 Miron 등(1989)의 결과와 동일한 것으로서, 돌출구조물이 기질의 종류에 따라 유도되며, 특히 섬유소와 같은 난분해성 물질의 분해를 위해서는 세균은 수용성 기질의 분해와는 또 다른 분해기작을 갖고 있음을 보여주는 것이라 하겠다. Lamed와 Bayer(1986·1988)는 혐기성세균의 표면에 나타나는 돌출상 구조물의 출현과 섬유소의 분해와는 분명한 상관관계가 있음을 보고하였다. 이후 다양한 RCB에서 관찰되고 있으며 기질에의 부착과 그 분해에 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다 (Cheng *et al.*, 1983·1984; Latham, 1980; Mayer *et al.*, 1987; Miron *et al.*, 1989).

돌출구조물은 기질인 목재섬유소에 마치 낙지발과 같은 구조물(appendage-like structure)모양으로 단단히 부착되어 있음이 관찰되었다(Fig. 8-E). 지금까지의 전자현미경 관찰에서는 주로 염주상의 돌출구조물이 세균 표면에 관찰되었으나(Cheng *et al.*, 1983·1984; Lamed & Bayer, 1986; Latham, 1980; Mayer *et al.*, 1987; Miron *et al.*, 1989), 본 연구에서처럼 기질에 낙지발처럼 부착되는 표면구조물이 관찰된 것은 본 연구팀이 아는 한 처음 관찰된 구조물이다. 이와 같은 *R. albus*의 표면구조물이 섬유소의 분해에 직접 관여하는 물질인지, 아니면 분해에 관여하는 효소체계의 운반 또는 수

송에만 관여하는 구조물인지는 SEM 및 TEM 관찰 결과로는 확인할 수 없었다. RCB에 의한 섬유소분해는 진균류와는 달리 기질과의 물리적 접촉을 유지하는 것으로 알려져 있다(Cheng *et al.*, 1983·1984; Dinsdale *et al.*, 1978; Latham, 1980; Patterson *et al.*, 1975; Wiegel & Dykstra, 1984). Moris와 Cole(1987)은 *R. albus*의 경우 섬유소기질에 세균이 부착하지 않을 경우, 섬유소의 분해는 거의 없음을 발견하였다. 그러나 Miron 등(1989)은 식물세포벽의 분해에는 cell-bound cellulase 뿐만 아니라 세균에서 유리된 cell-free cellulase를 비롯, 다양한 hemicellulase 등에 의해서도 이루어지기 때문에 섬유소물질에 세균이 부착하지 않고도 섬유소가 어느 정도 분해됨을 보고한바 있다. 뒤에 언급되겠지만 전자현미경 관찰 결과 *R. albus* F-40에 의한 섬유소기질의 분해는 Miron 등(1989)의 보고와 유사함을 보여주었다. 그러나 *R. albus*가 갖는 다양한 분해체계의 이해를 위해서는 면역전자현미경적 연구를 비롯, 다양한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

3. 5. 2 자작나무 holocellulose의 *R. albus*에 의한 분해양태

SEM 관찰 결과 *R. albus*는 자작나무 섬유소에 random 상태로 부착하였다(Fig. 9-A). Kudo 등(1987)은 *Fibrobacter*의 경우 cellulose microfibril의 주행방향과 일치하게 세균이 배열되고 부착되고 있음을 관찰하였으나 이같은 배열은 *R. albus*의 경우에는 관찰되지 않았다. 본 연구에 사용된 시료가 탈리그닌화된 holocellulose인 관계로 Fig. 9-B에 나타난바와 같이 중간층이

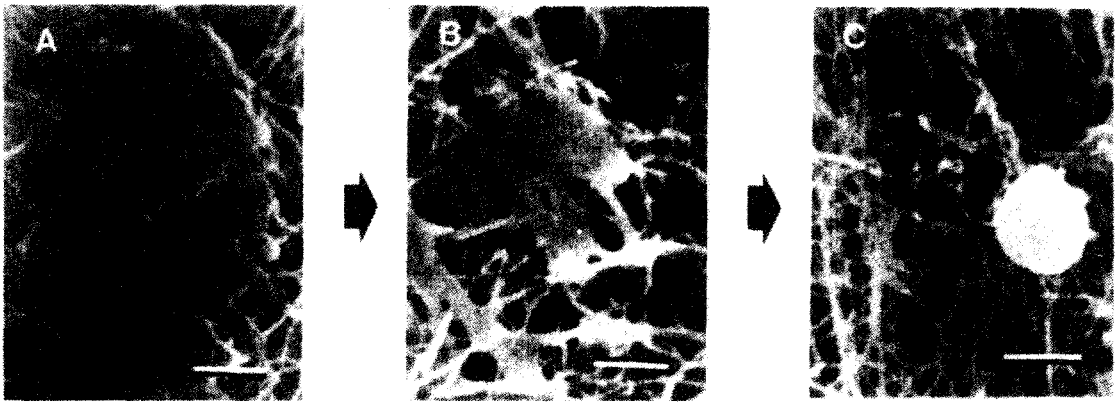


Fig. 10. Electron microphotographs on the degradation sequences of holocellulose by *R. albus* F-40.
Notes: A : Cut-off of cellulosic materials forming numerous holes along the cellulose microfibrils.
B : Splitt-off of cellulose microfibrils. Note the various width of cellulosic substrates.
C : Defibrillation in the last stage of degradation(bar=500nm).

소멸되어 나타난다. 이에 따라 공시 세균인 *R. albus*는 세포내강쪽뿐만 아니라 복합중간층이 있었던 부위에도 존재하였다(Fig. 9-C).

전자현미경 관찰 결과 다수의 소포들(vesicles)이 기질에 부착되어 나타났다(Fig. 9-D). 소포의 치수는 다양하였으나 대체로 20~80nm의 범위에 있으나 대체로 30nm의 것들이 대부분으로, 세균의 1/10~1/20의 크기였다. 소포들은 분해된 목재세포벽 부위와 목재섬유소의 내부에 존재하기도 하였다(Fig. 9-E). Fig. 9-E는 30nm 정도의 소포들이 세균표면에 부착돼 있음을 보여줌으로써 이 소포들이 *R. albus*의 outer membrane으로부터 기원하고 있음을 보여주고 있다. Gaudet와 Gailard는(1987) 소포의 형성이 섬유소의 분해에 주요한 역할을 하고 있음을 RCB의 하나인 *B. succinogenes*의 전자현미경 관찰을 통해 밝힌 바 있다. 그러나 이 소포가 섬유소분해효소를 단순히 운반하는 것에 그치는 것인지 아니면 섬유소의 분해에 직접 관여하는 것인지는 본 연구에서는 확인할 수 없었다. 본 연구에서 나타난 전자현미경 관찰은 소포들이 분해된 기질에 주로 부착되어 있음을 보여줌으로써 섬유소의 분해에 직접 관여하고 있음을 강력히 시사해주고 있다.

소포 뿐만 아니라 cellulose microfibril(이하 CMF로 약함)에 부착 또는 결합되어 있는(Fig. 9-F) cellulosome과 유사한 구조물 역시 관찰되었다. Lamed와 Bayer(1986)는 非rumen性 세균인 *Clostridium* spp.에서 섬유소분해효소 집합체인 cellulosome을 전자현미경적 연구를 통해 관찰하였던 바, 본 연구에서도 이같은 효소집합체와 유사한 구조물이 ammonium molybdate를 사용한 negative staining 결과 확인되었다. 이 구조물은 세균의 세포벽 주위뿐만 아니라, 섬유소에

원형상(globular)의 구조물로 부착되어 나타났다. Coughlan 등(1985)과 Lamed와 Bayer(1988)에 따르면, cellulosome의 분자량은 매우 다양해서, 수만 dalton에서 일 백만 dalton 이상인 것으로 보고되고 있으며 따라서 이들은 아주 작은 구형상의 모습으로 독립적으로 나타나기도 하며, 3~6개씩 집단으로 존재하여 마치 포도송이와 같은 모습으로도 나타난다(Fig. 9-G). 이들 구조물들의 크기는 10~20nm로서 cellulose microfibril에 직접 부착되어 있는 것로부터 cellulosome이 섬유소의 분해에 직접 관여하고 있음을 알 수 있었다. Mayer 등(1987) 역시 *Clostridium* spp.의 cellulosome이 avicel에 부착되어 분해하고있음을 전자현미경 관찰을 통해 확인하였다.

전자현미경 관찰 결과 공시 세균에 의한 섬유소의 공격은 세균의 표면에 노출된 부분에 주로 국한되어 일어났다. 자각나무의 holocellulose는 분해말기 단계에서의 목재세포벽의 전자밀도가 현격한 차이를 나타내고 있어서 세포벽이 분해되고 있음을 보여주었으며 특히 무처리 목분과는 달리 많은 세균이 부착되어 있어서 리그닌의 제거가 RCB의 분해에 긍정적으로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

SEM 및 TEM 사진들의 판독결과 *R. albus*에 의한 holocellulose의 분해단계에 따라 CMF들이 다양한 형태로 노출되고 있음을 보여주었다. 즉 Fig. 10-B와 10-C에서처럼 net상의 CMF가 나타남으로써 MF사이에 존재하는 hemicellulose가 *R. albus*에 의해 cellulose에 앞서 분해됐음을 시사하였다. 이같은 전자현미경 결과는 앞서 언급한 FT-IR의 결과를 보완하는 것으로 섬유소분해에 어떤 sequence가 있음을 시사하고 있다. *R. albus*에 의한 목재세포벽 내의 cellulose의 분해는 최소한 3단



Fig. 11. Electron microphotographs on the degradation of filter paper by *R. albus* F-40.
 Notes: A : Protuberant structures were not significantly revealed as in the holocellulose (bar=500nm).
 B : Occurrrence of bacteria mainly on the disrupted area of fiber (bar=2μm).
 C : No or little bacteria on the smooth(=intact) area of fiber (bar=2μm).

계를 거치는 것으로 전자현미경 관찰 결과 나타났다. 즉 기질인 섬유소물질에의 부착(Fig. 9-A, B, C)에 이어 섬유소의 축방향에 수많은 천공이 형성(Fig. 10-A)됨으로써 길이가 짧은 섬유가 형성되고 이어 0.2~0.6 μ m의 폭을 갖는 CMF가 나타나며(Fig. 10-B) 마지막으로 한 가닥의 CMF가 나타난다(Fig. 10-C). 전자현미경 사진으로부터 *R. albus*는 섬유소와 결합하고 있는 hemicellulose를 분해(CMF만 남는 모습)할 뿐 아니라 cellulose chain을 길이방향에서 절단하며(천공의 형성), cellulose와 cellulose를 상호 결합시켜 주고있는 수소결합을 절단시켜 CMF의 폭이 좁아지는 현상을 자아내게 했다. 즉 cellulose chain의 축방향의 cut off와 함께 CMF의 횡적 분할과 destrafication이 되어짐을 알 수 있었다(Fig. 10-B, C). 섬유소의 축을 따라 그 분해가 이루어지고 있다는 사실은 endocellulase가 섬유소를 random하게 공격하고 있다는 것을 반증하는 것이다.

진균류의 섬유소분해는 단일의 효소가 아닌 endo- β -glucanase, cellobiohydrolase 및 β -glucosidase의 공동작용에 의해 섬유소를 분해하는 것으로 이해되고 있다(Haigler & Weimer 1991). 전자현미경 관찰 결과 *R. albus*에 의해 섬유소가 random하게 분해될 뿐만 아니라 CMF의 횡적분열과 destrafication이 일어난다는 사실로부터 *R. albus*는 endocellulase 이외에도 섬유소의 분자간 결합을 깨뜨리는 exocellulase 및 hemicellulase 등 다양한 가수분해 대사물질들을 가지고 있음을 추론할 수 있다. 전자현미경 관찰 결과 endo-type과 exo-type의 cellulase들이 *R. albus*에 의한 holocellulose의 분해에 관여하고 있음을 추론할수는 있으나, 이것들이 세균에 결합된 소위 cell-bound type인지, 아니면 cell-free type의 효소(Wood *et al.*, 1982)인지는 확인할 수 없었다.

3.5.3 여과지(filter paper)의 분해양태

여과지는 100% 섬유소로만 구성됐다는 점에서 섬유소 분해세균인 *R. albus*의 섬유소 분해기작의 파악에 좋은 시료로 생각되었다. 그러나 여과지의 분해는 앞서 언급한 바와 같이(3. 1~3. 3) 그 분해정도가 매우 미미하였으며 염산 또는 인산으로 전처리한 것의 경우 역시 분해율은 향상되지 않았으며, 이같은 현상은 전자현미경 관찰에서도 마찬가지였다.

전자현미경 관찰 결과 여과지에 존재하는 *R. albus*는 자작나무의 holocellulose에 존재하는 *R. albus*와는 달리 다양한 표면구조물이 현저하지 않았다. CF처리시에도 돌출구조물의 정도는 많지 않았다(Fig. 11-A). 공기 세균은 부분적으로 사전에 분해된 여과지의 섬유다발의 부위

에 많이 분포되어 나타났으나(Fig. 11-B), 섬유다발의 표면이 매끄러운 부위에는 거의 분포하지 않았다(Fig. 11-C). 세균분포의 밀도 역시 자작나무의 holocellulose보다 매우 적었으며 섬유다발의 분해 역시 확연하게 드러나지 않았다. 전처리한 섬유소 즉 ball-milled cellulose를 사용해 배양한 *R. albus*의 표면에는 돌출구조가 확연히 나타난 반면 여과지의 cellulose에는 이같은 분포가 현저하지 않다는 사실로부터 섬유소의 분해를 위해서는 세균 또는 효소의 접촉면적의 확대 및 particle size의 축소(Dehortiy & Johnson, 1961; Weimer, 1996)도 결정화도의 감소와 함께 섬유소의 효소분해를 촉진시키는 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

반추위내 혐기성세균인 *Ruminococcus albus* F-40에 의한 섬유소분해 특성을 파악하고자, 자작나무 holocellulose와 filter paper를 시료로 하여 *R. albus*에 의한 cellulose성 물질의 분해 양태를 화학적 분석과 전자현미경 관찰을 통해 고찰하였던 바 상대결정화도가 낮을수록 공시재료의 분해율과 세균의 부착율이 상대적으로 증가함으로써 무정형 섬유소가 결정형 섬유소보다 빨리 분해됨을 보여주었다. *R. albus*는 그러나 결정형 섬유소도 부분적으로 분해시키는 것으로 X선 회절분석과 편광현미경 관찰 결과 나타났다. *R. albus*는 또한 섬유소 뿐 아니라 hemicellulose도 동시에 분해하는 것으로 FT-IR 스펙트럼은 보여주었다. 전자현미경 관찰을 통해 세균의 표면에는 많은 돌출구조물이 존재하며, 이 돌출구조는 비수용성 탄수화물에서 배양된 세균에서만 현저히 나타남으로써 이 구조물이 배지의 종류에 따라 유도되는 구조물임이 밝혀졌다. 세균의 돌출구조물은 기질에 단단히 부착하고 있었으며 또한 많은 소포체들이 기질표면에서 관찰되었다. 섬유소 matrix에 cellulosome과 유사한 구조물이 관찰되어 다양한 표면구조물들이 목질섬유소의 분해에 관여하고 있음을 보여주었다. 전자현미경 분석 결과 *R. albus*에 의한 섬유소의 분해는 cellulose chain의 절단을 통한 섬유소 길이의 단축, microfibril의 횡적분열 및 destrafication의 단계를 거쳐 분해됨이 파악되었다.

사 사

본 연구의 진행을 위해 귀중한 세균을 제공해주시고 많은 조언을 아끼지 않은 日本國 三重大學 Kunio Ohmiya

교수와 동 대학 분자생물 및 유전공학센터의 Shuichi Karita 박사에 심심한 사의를 드린다. 아울러 전자현미경 해석과 편광현미경관찰에 협조해주신 New Zealand Forest Research Institute의 Dr. A. Singh에게도 깊은 감사를 드린다.

참 고 문 헌

1. Bhat, S., R. J. Wallace, and E. R. Orskov. 1990. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2698~2703
2. Borneman, W. S., and D. E. Akin. 1990. Lignocelulose degradation by rumen fungi and bacteria: Ultrastructure and cell wall degrading enzymes. In D. E. Akin *et al.* (eds.) Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocelulose Utilization by Ruminants. Elsevier Sci. Publ. Co. New York : 325~329
3. Cheng, K. J., C. S. Stewart, D. Dinsdale, and J. W. Costerton. 1983 : 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Tech.* 10 : 93~120
4. Chesson, A. 1993. Mechanistic models of forage cell wall degradation. In H. G. Jung *et al.* (eds.). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Am. Soc. Agronomy. Madison, USA : 347~376
5. Coughlan, M. P. 1991. Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. *Anim. Feed Sci. Tech.* 32 : 77~100
6. Coughlan, M. P., K. Hon-Nami, H. Hon-Nami, L. G. Ljungdahl, J. J. Paulin, and W. E. Rigsby. 1985. The cellulolytic enzyme complex from *Clostridium thermocellum* is very large. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 : 904~909
7. Dehority, B. A., and R. R. Johnson. 1961. Effects of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 44 : 2242~2249
8. Dinsdale, D. E., J. Morris, and J. S. D. Bacon. 1978. Electron microscopy of the microbial populations present and their modes of attack on various cellulosic substrates undergoing digestion in the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 160~168
9. Flint, H. J., and C. W. Forsberg. 1995. Polysaccharide degradation in the rumen: Biochemistry and genetics. In Ruminant Physiology : Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction Proc. 8th. Int. Symp. Ruminant Physiology. Ferdinand Enke Verlag : 43~70
10. Ford, C. W. 1983. Effect of particle size and delignification on the rate of digestion of hemicellulose and cellulose by cellulase in the mature pangola grass species. *Aust. J. Agric. Res.* 34 : 241~248
11. Gaudet, G., and B. Gaillard. 1987. Vesicle formation and cellulose degradation in *Bacteriodes succinogenes* cultures : ultrastructural aspects. *Arch. Microbiol.* 148 : 150~154
12. Haigler, C. H., and P. J. Weimer. 1991. Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose. Marcel Dekker. New York
13. Hiltner, P., and D. A. Dehority. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 642~648
14. Hobson, P. N. 1988. Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Appl. Sci. London : 527
15. Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14 : 1~49
16. Inoue, T., and H. Osatake. 1988. A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze drying method. *Arch. Histol. Cytol.* 51 : 53~59
17. Jung, H. G. *et al.* 1993. Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Am. Soc. Agronomy. Madison, USA
18. Kerley, M. S., G. C. Fahey Jr., M. Gould, and E. L. Jannotti. 1988. Effects of lignification, cellulose crystallinity and enzyme

- accessible space on the digestibility of plant cell wall carbohydrates by the ruminant. *Food Microstruct.* 7 : 59~65
19. Kim, Y. S., and R. Newman. 1995. Solid state ¹³C NMR study of wood degraded by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Holzforschung* 49 : 109~114
 20. Knutton, S. 1995. Electron microscopical methods in adhesion. In R. J. Doyle, and I. Ofek, eds. *Adhesion of Microbial Pathogens*. Methods of Enzymology, Vol. 253. Academic Press, San Diego : 145~158
 21. Kudo, H., K. J. Cheng, and J. W. Costerton. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33 : 267~272
 22. Lamed, R., and E. A. Bayer. 1986. Contact and cellulolysis in *Clostridium thermocellum* via extensile surface organelles. *Experientia* 42 : 72~73
 23. Lamed, T., and E. A. Bayer. 1988. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Adv. Appl. Microbiol.* 33 : 1~46
 24. Latham, M. J. 1980. Adhesion of rumen bacteria to plant cell walls. In R. C. W. Berkeley *et al.* (eds.) *Microbial Adhesion to Surfaces*. Ellis Horwood Ltd, Chichester : 339~350
 25. Leatherwood, J. M. 1973. Cellulose degradation by *Ruminococcus*. *Fed. Proc.* 32 : 1815~1819.
 26. Luft, J. H. 1971. Ruthenium red and violet I. Chemistry purification methods and use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Res.* 171 : 348~368
 27. Mayer, F., M. P. Coughlan, Y. Mori, and L. Ljungdahl. 1987. Macromolecular organization of the cellulolytic enzymes complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2785~2792
 28. Miron, J., M. T. Yokoyama, and R. Lamed. 1989. Bacterial cell surface structures involved in lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 218~222
 29. Morris, E. J., and O. J. Cole. 1987. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1023~1032
 30. Ohmiya, K., T. Kajino, A. Kato, and S. Shimazu. 1989. Structure of a *Ruminococcus albus* endo-1,4-B-glucanase gene. *J. Bacteriol.* 171 : 6771~6775
 31. Patterson, H., R. Irvin, J. W. Costerton, and K. H. Cheng. 1975. Ultrastructure and adhesion properties of *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 122 : 278~287
 32. Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony, and P. Goudet. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of ruminal bacterial *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibriobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 3081~3087
 33. Smith, W. R., I. Yu, and R. E. Hungate. 1973. Factors affecting cellulolysis by *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 114 : 729~833
 34. Wada, M., T. Okano, and J. Sugiyama. 1995. Characterization of tension and normally lignified wood cellulose *Populus maximowiczii*. *Cellulose* 2 : 223~233
 35. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* 79 : 1496~1502
 36. Weimer, P. J., J. M. Lopez-Guisa, and A. D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2421~2429
 37. Wiegel, J., and M. Dykstra. 1984. *Clostridium thermocellum*: Adhesion and spore formation adhered to cellulose and hemicellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20 : 59~65
 38. Wood, T. M., C. A. Wilson, and C. S. Stewart. 1982. Preparation of the cellulase from

the cellulolytic anaerobic *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochem. J.* 205 : 129~137

39. Yu. I. and R. E. Hungate, 1979. The extracellular cellulase of *Ruminococcus albus*. *Ann. Res. Vet.* 10 : 251~254