

## 섬유소-펙틴 분해력이 있는 새로운 *Aspergillus tubingensis*의 분리와 특성 규명

서원숙 · 홍진영 · 최홍서 · 김주환 · 김영민\*  
한남대학교 자연과학부 생명과학과

**Isolation and Characterization of a Novel *Aspergillus tubingensis* with a Hydrolyzing Activity of Cellulose-pectin Complex.** Seo, Won-Sook, Jin-Young Hong, Hong-Soe Choi, Ju-Hwan Kim, and Young-Min Kim\*. Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea – In order to isolate and characterize a novel fungal strain capable of producing cellulase, each samples of the old rice straw, soil, and the old tree were screened by congo red test. One of the fungi screened has been identified as *Aspergillus tubingensis* strain from the results of the phylogenetic analysis based on partial DNA sequence and the basis of its biochemical properties. A carboxymethyl cellulase activity of the strain was higher than that of *A. oryzae* KCTC 6291. In CMCase activity measurement, it wasn't sensitive about pH 2.0, 3.0, 4.0, but the enzyme was more stable than *A. oryzae* under the various pH and temperature conditions and the enzyme activity was more similar to neutrality and alkali. Therefore, it could be suggested that the isolated strain has a potential possibility for the developing of the probiotics.

**Key words:** Cellulase, cellulose, probiotics, *Aspergillus tubingensis*

대부분 육지식물의 줄기나 잎의 세포벽은 섬유소(cellulose), hemicellulose, lignin으로 구성되어 있으며, cellulose는 포도당이  $\beta$ -1,4-glycosidic 결합으로 이루어진 중합체로서 식물생체 건조중량의 약 40% 이상을 차지하고 있다. 광합성 작용에 의하여 매년 지구상에 가장 풍부하게 생산되고 있는 섬유성 biomass인 cellulose를 다당류(oligosaccharide) 또는 단당류(monosaccharide)로 분해 시킬 수 있다면, 가축의 귀중한 사료원으로서 이용할 수 있음은 물론, 알코올 생산과 같은 대체 에너지로의 전환이 가능하여 새로운 산업적 기반을 조성하는 것이 가능하다[6].

자연계의 식물체를 에너지원으로 이용하고 있는 소와 같은 반추동물은 그들이 청초와 같은 사료를 섭취하였을 때, *Ruminococcus*와 같이 섬유소를 분해할 수 있는 장내 미생물을 통하여 섬유소를 영양원으로서 적극 활용하고 있다[10]. 하지만 우리나라 축산업의 현실로 미루어 볼 때, 부족한 초지사정으로 말미암아 가축은 자연계에서 섭취하는 섬유질과는 달리, 옥수수나 곡류와 같은 전분을 많이 함유하는 농후 사료를 섭취함으로써 가축의 장내 pH가 저하된 결과, 유익한 장내 미생물들의 활동이 저하되고, 특히 장내 cellulase 분비 균주의 생육이 방해를 받게 되어 이로 인해 소화 체계에도 많은 장애를 일으키는 것으로 알려져 왔다[15].

이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 가축의 장내에 있

는 미생물들의 활동을 돕기 위하여 생균제(probiotics)를 사용하게 되는데, 현재 시판되고 있는 생균제의 미생물로는 효모균(*Saccharomyces sp.*), 고초균(*Bacillus sp.*), 유산균(*Lactobacillus sp.*) 등이 주종을 이룬다. 이들 생균제의 특성은 여러 보고서에서 발표된 바와 같이 가축의 체중을 증가시키고, 유생산량을 증가시키며, 면역력 강화와 사료의 흡수율을 증가시키는 등의 효과를 보이고 있다[12]. 그러나 생균제로 사용되고 있는 이러한 균주는 섬유소(cellulose) 분해 능력이 대단히 약하거나[3, 13], 거의 없는 실정이다. 섬유소 분해 능력이 있는 균주를 개발하기 위하여 자연계에 존재하는 중온성, 고온성, 산성, 염기성, 중성, 혐기성, 호기성 등 여러 종류의 곰팡이와 세균에서 다양한 cellulase를 분리, 정제하여 효소의 특성이 밝혀졌지만[9, 11, 19, 20], 축산현장에서 사용하기에는 아직 미흡한 실정이다. 특히 외국과는 달리 조사료로서 대부분 볏짚을 사용하는 우리나라의 경우, 볏짚의 주성분인 섬유소(cellulose) 및 펙틴(pectin) 분해 능력이 있는 효소를 분비하는 생균제를 개발하는 것이 시급한 실정이다. 현재까지 이러한 섬유소와 펙틴을 분해하는 효소는 *Aspergillus* 계통의 균주가 가장 우수한 것으로 보고 되었으며, 따라서 본 연구의 목적은 섬유소(cellulose) 및 펙틴(pectin) 분해 능력이 우수한 *Aspergillus* 계통의 균주를 분리하여 이들의 특성을 밝히고, 더 나아가서는 탁월한 효과를 가진 고기능성의 생균제를 개발하여 산업화하고자 하는 것이다.

\*Corresponding author

Tel: 82-42-629-7486, Fax: 82-42-629-7487

E-mail: kym@mail.hannam.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 배양

본 실험을 수행하기 위하여 대전광역시 근교의 야산과 들판 등지에서 썩은 나뭇잎, 흙 등 여러 장소에서 샘플을 수거하여 일차 스크리닝 작업을 수행하였다. 이들 샘플들 각각 1 g을 10 ml의 0.9% NaCl에 현탁시켰다[23]. 현탁액을 약 10분간 실온에서 정치한 후에 상등액 100  $\mu$ l를 취하여 Sabour'd's dextrose agar medium(peptone 10 g, dextrose 40 g, agar 20 g, D.W. 1 l, pH 6.0)에 0.005% chloramphenicol를 첨가하여 배양한 후, 단일 colony를 선택하여 Czapek-dox agar에 CMC(5%)을 첨가한 배지에서 28°C의 조건으로 5~7일 동안 배양하였다. 배양을 한 후 Congo red test를 하기 위해 0.5% congo red 용액을 첨가하고 30분 후에 1 N NaCl 용액을 첨가하여 실온에서 5분 방치한 후 투명화를 생성하는 균주들을 선별하여 cellulase의 생성 여부를 재차 확인하여 cellulase 활성이 있는 균을 우선적으로 선별하였다[16].

### 분리 균주의 동정

곰팡이 계통을 제외한 최종적으로 분리된 균주의 동정은 형태학적, 생화학적인 특성을 조사하여[4, 18] Bergey's Manual[2]의 방법에 따라 행하였다.

전체적인 형태는 광학 현미경(Axioskop2, Carl-ZEISS, Germany)을 통해 관찰하였고, 포자, 균사의 특징을 알아보기 위해서는 주사전자현미경을 이용하였다. 28°C에서 4일 동안 PDA(diced potato dexttract agar 39 g/l, pH 5.6) 배지에서 배양한 균주를 slide glass 위에 놓고 cover glass를 덮고 광학현미경으로 관찰했으며, 배양한 균주를 시료대에 놓고, 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 다시 1% osmium tetroxide로 후기 고정하였으며, alcohol로 순차적으로 탈수를 실시하여 n-amylacetate로 20분간 2회 처리, 건조하고 gold coating 한 후 주사전자현미경(AKASHI ISI-SS40, Japan)으로 검경하였다.

일반 세균과는 달리 fungal DNA의 분리는 lysis buffer (50 mM EDTA, 0.2% SDS)를 이용하여 genomic DNA를 얻은 후 ITS(internal transcribed spacer) region에서 sense primer 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'과 antisense primer 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3'를 이용하여 initial denaturation 95°C, 4분 30초, each cycle denaturation 95°C, 30초, annealing step 50°C, 30초, extention: step 72°C, 1분, final extention 72°C, 3분의 조건으로 PCR(Perkin-Elmer 480, USA)을 실시[7, 21] 하였으며, 여기서 얻어진 단일 PCR band는 PCR purification kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 정제하였고, Solgent사 (Korea)에 의뢰하여 DNA sequencing을 실시하였다. 확인된 DNA sequence는 현재까지 보고된 genus내의 모든 표준 균

주의 서열과 비교하여 evolutionary distance를 계산하였고 이를 바탕으로 분석하였다.

### Crude enzyme 추출

Crude enzyme의 활성을 측정하기 위하여 분리한 균을 250 ml Erlenmeyer flask에 PDB medium(diced potato dexttract broth 39 g/l, pH 5.6) 40 ml을 넣고, 28°C, 200 rpm으로 4~5일간 배양한 다음, 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 추출하였다. Cellulase 활성 비교를 위한 대조균주로써 cellulose 분해 능력이 있는 것으로 밝혀진 *A. oryzae* KCTC 6291를 MEB 배지(malt extract 20 g, peptone 5 g, D.W. 1 l, pH 5.6)에서 4~5일간 28°C, 200 rpm으로 배양한 후 분리한 균과 같은 조건에서 crude enzyme를 추출하였다.

### 효소 활성의 측정

Cellulase 활성은 CMC(carboxymethylcellulose)를 기질로 하여 효소 반응을 한 후에, 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic(DNS) 방법[14]으로 다음과 같이 정량화함으로써 측정하였다. 증류수에 1%(w/v) CMC 용액 0.5 ml와 각각 100 mM citrate 완충용액(pH 2~6)[11], 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7~8), 100 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 9~13)[16] 0.4 ml을 혼합하여 각 온도에서 1분간 방치함으로써 반응 용액의 온도를 맞춘 다음, 효소 용액 100  $\mu$ l를 첨가하여 각 온도에서 20분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고, 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[1, 8, 22]. 이것을 glucose를 표준 시료로 사용하여 동일 조건 하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건 하에서 1분 동안 CMC로부터 1  $\mu$ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

온도와 pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해서 효소액을 조사하고자 하는 pH 2.0~13.0의 범위와 온도 25°C~85°C에서 각각 일정 시간 방치한 후, 위에서 기술한 효소 활성 측정 조건에서 반응을 수행하여 각각의 효소 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리

채집한 썩은 짚으로부터 선별배지인 PDA 배지를 사용하여 섬유소를 분해할 수 있는 *Aspergillus* 계통의 균주를 분리하기 위한 수차례의 스크리닝을 반복 실시하였다.

일차적으로 Czapek solution agar에 CMC(5%)를 첨가하여

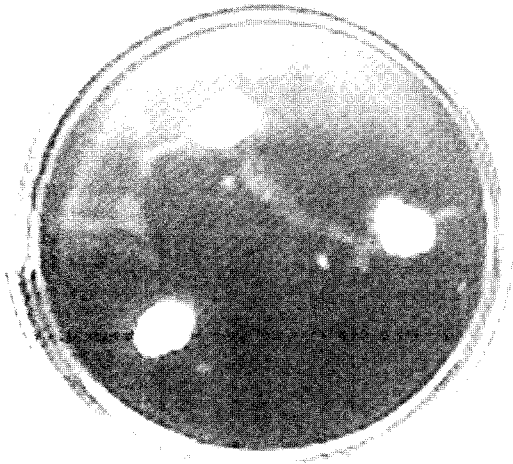


Fig. 1. CMC activity of isolated *Aspergillus* sp.

사용한 배지에서 성장한 균주를 Congo red test를 이용하여 총 12개의 균주를 확보하였다. Congo red 용액과 NaCl을 첨가하여 Congo red test한 결과 노란색(황색)을 띠는 CMC 활성이 가장 우수한 균주 3개(Fig. 1)를 선발하였다.

**균주의 동정**

형태학적인 특성을 관찰하기 위해 광학 현미경(Fig. 2)과 주사전자현미경(Fig. 3)을 이용하여 1차적으로 분류하였다. 육안으로 관찰한 결과 청록색을 띠는 검정색이었으며, 포자와 균사가 뚜렷하게 관찰되었다. 분리된 균주 중에서 1개의 fungal genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용한 결과 1개

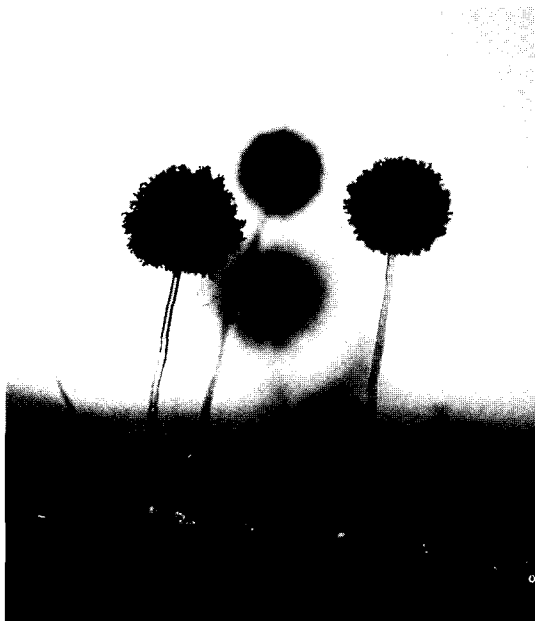


Fig. 2. Microphotograph of *Aspergillus* sp. showing conidial heads and conidiophore ( $\times 50$ ).

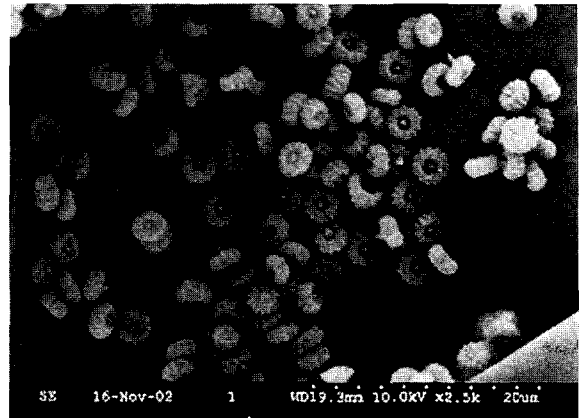


Fig. 3. Scanning electron microscope photograph of *Aspergillus* sp. showing conidiophore ( $\times 2,500$ ).

의 뚜렷한 PCR band를 확인할 수 있었다. 얻어진 PCR 산물을 분리 정제한 후, DNA의 염기서열을 밝히고 Gene Bank를 통하여 분석한 결과, 분리된 균주는 *A. tubingensis*로 판명되었다.

**효소활성의 측정**

분리·동정한 *A. tubingensis* 균주와 cellulose 분해력이 있는 *A. oryzae* KCTC 6291 균주를 각각의 선별배지에서 배양하여 원심 분리한 후 상등액을 추출하여 온도와 pH를 달리하여 활성을 측정하였다(Fig. 4, Fig. 5).

pH는 6.0에서 25°C에서 85°C까지 온도를 달리하면서 활성을 측정한 결과(Fig. 4), 35°C에서는 활성정도가 적었으나, 45°C에서 85°C까지는 활성이 거의 비슷하여 위 같은 범위

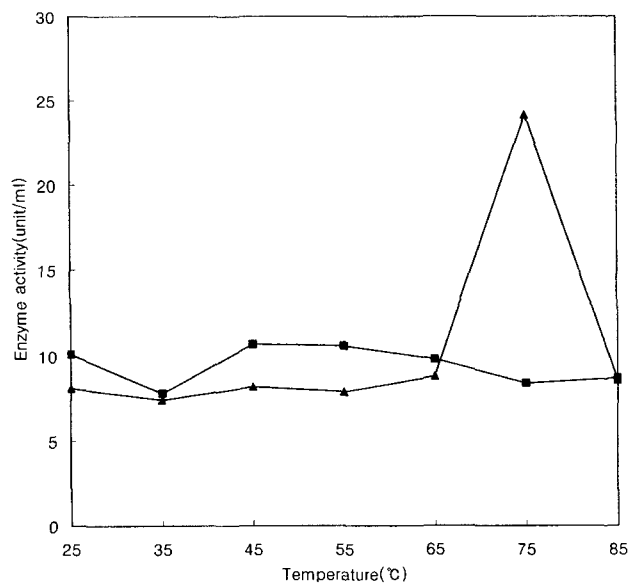


Fig. 4. Effects of temperature on the CMCase activity. The reaction was done at pH 6.0. -■-, *A. tubingensis*; -▲-, *A. oryzae*.

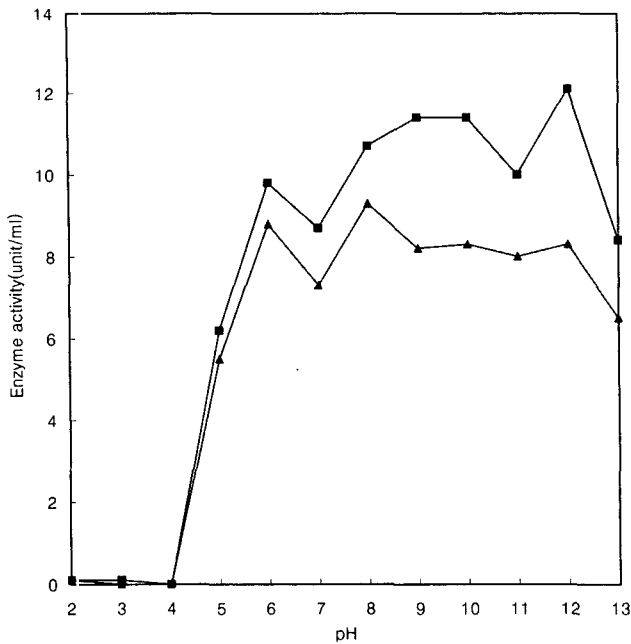


Fig. 5. Effects of pH on the CMCase activity. The reaction was done at 65°C. -■-, *A. tubingensis*; -▲-, *A. oryzae*.

에서는 *A. tubingensis*가 온도에 대하여 다소 안정성을 보이는 것으로 판명되었다. 효소 반응의 최적 pH를 알아보기 위해서 65°C로 온도를 정하고, pH 별로 완충용액을 사용하여 기질용액을 만든 후 효소액과 반응시켜 효소 활성을 측정할 결과 Fig. 5에서와 같이 pH 2.0, 3.0, 4.0에서는 양쪽 모두 활성이 없었으며, *A. tubingensis* cellulase는 pH 12에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 특히 pH에 있어서 *A. tubingensis* cellulase는 *A. oryzae* KCTC 6291 cellulase에 비하여 pH 5.0 이상의 범위에서 활성이 높은 것으로 판명되었으며, 다양한 온도의 변화에 있어서도 더 안정된 특성을 나타내었다. *Bacillus sp.* 79-23의 경우 60°C와 pH 6.0에서 최고의 CMCase 활성을 보였으며, pH 7.0에서도 약 90% 이상의 활성을 나타내어 중성 pH에서 활성이 우수한 것으로 보고 되고 있으며[23], *A. oryzae*를 이용한 CMCase 활성 실험에서는 60°C에서 pH 6~7일 때 가장 높은 활성을 보였다 [17]. CMC를 이용한 cellulase의 활성은 온도가 45~60°C의 범위에서, pH는 6.5~8에서 활성이 나타났고, 이 범위를 넘어서도 85%의 활성을 보였다[5]. 위와 같이 대부분의 효소들은 중성에서 활성을 나타내지만, *A. tubingensis*가 생산하는 cellulase는 중성뿐만 아니라, 약염기에서도 활성을 나타내므로 그 이용 범위가 넓다고 여겨진다.

## 요 약

대전광역시 근교의 야산과 들판 등지에서 썩은 나뭇잎, 짚, 흙을 채취하여 각각을 배양한 다음 Congo red test에 의해

cellulase 활성을 보이는 균주를 선별하였다. Genomic DNA를 분리한 후 PCR을 수행하여 DNA sequence를 Gene Bank를 통해 분석한 결과 *A. tubingensis*로 밝혀졌다. 이것을 배양하여 상등액을 crude enzyme으로 사용하여 온도와 pH를 달리하면서 효소의 활성정도를 측정하였다. 대조균주로 *A. oryzae* KCTC 6291를 이용하였고, 본 연구를 통하여 분리한 균주인 *A. tubingensis*가 생산하는 cellulase는 *A. oryzae*의 cellulase에 비하여 각각 다른 온도와 pH에서 높은 안정성을 보여주었다. *A. tubingensis*는 각각의 온도에서 활성의 정도가 비슷했으며, 45°C, 55°C에서 높은 활성을 나타내고 있지만, 고르게 활성이 나타났다. 또한 pH 12.0에서 가장 높은 활성을 보여 주었고, pH 2.0, 3.0, 4.0에서는 양쪽 모두 거의 활성이 없었으며, 중성, 염기성에 대해서 활성에는 큰 변화가 없었다. 따라서, 분리 동정한 *A. tubingensis*는 온도와 pH에서 고르게 활성을 나타내므로 생균제로 활용할 수 있는 범위가 클 것으로 여겨진다.

## 감사의 글

이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단 신진교수연구과제(과제번호 G00020)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Adney, B. and J. Baker. 1996. Measurement of cellulase activities. *Chemical Analysis and Testing Task Laboratory Analytical Procedure*.
- Baumann, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 343-352. Williams Wilkins, Baltimore.
- Beguín, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 219-248.
- Benson, H. J. 1998. *Microbiology Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. pp.58-204. 7th ed. WCB/McGraw-Hill, New York.
- Cao, Y. and H. Tan. 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr. Res.* **337**: 1291-1296.
- Cooney, C. L., D. I. C. Wang, S.D. Wang, J. Gordon, and M. Zimenez. 1978. Simultaneous cellulose hydrolysis and ethanol production by a cellulolytic anaerobic bacterium. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **8**: 113-114.
- Emma, E. M. Jaeger, N. M. Carroll, S. Choudhury, A. A. S. Dunlop, H. M. A. Towler, M. M. Matheson, P. Adamson, N. Okhravi, and S. Lightman. 2000. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in ocular samples using nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2902-2908.
- Ghose, T. K. 1987. International union of pure and applied chemistry. *Pure Appl. Chem.* **59**: 257-268.

9. Gilkes, N. R., B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller, Jr., and R. A. J. Warren. 1991. Domains in microbial -1, 4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**: 303-315.
10. Groleau, D. and C. W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogens*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 517-530.
11. Manadels, M. and J. Weber. 1969. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Adv. Chem. Ser.* **95**: 391-413.
12. Martin, S. A. and D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **75**: 1739-1744.
13. Mega, T. and Y. Matsushima. 1979. Comparative studies of three exoglucosidases of *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* **85**: 335-341.
14. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
15. Mould, F. L., E. R. Orskov, and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds: Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* **10**: 15-30.
16. Shin, P. G., J. B. Ahn, C. Y. Kim, W. H. Jeong, and J. C. Ryu. 1998. Identification of multiple active forms in cellulase-xylanase of *Aspergillus* sp. 8-17 by active staining. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 49-52.
17. Shunichi, A., K. Yoshiharu, Y. Kenji, and Hidehiko, K. 1995. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 125-130.
18. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
19. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
20. Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**: 1-81.
21. Travis, Henry, Peter C. Iwen, and Steven H. Hinrichs. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1510-1515.
22. Yang, Y. K., J. S. Lee, H. N. Park, M. N. Moon, H. S. Kim, J. S. Kim, C. Y. Kim, Y. H. Rhee. 1966. Purification of carboxymethyl cellulase from hybrid between *Aspergillus niger* and *Penicillium verrucosum*. *J. Microbiol.* **34**: 90-94.
23. Yoon, K. H., K. H. Jung, and S. H. Park. 1996. Isolation and enzyme production of a cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 546-551.

(Received Dec. 3, 2002/Accepted Apr. 7, 2003)