

기질의 종류가 *Neocallimastix frontalis*에 의한 섬유소 분해 양상과 섬유소 분해 효소 생산에 미치는 영향

성하균* · 이성실** · 하종규*

서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부*, 경상대학교 동물자원과학부**

Effects of Substrates on Fiber Digestion Pattern and Fibrolytic Enzyme Production by *Neocallimastix frontalis*

H. G. Sung*, Sung. S. Lee** and J. K. Ha*

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University*,

Division of Animal Science and Technology, Gyeongsang National University**

ABSTRACT

The patterns of fungal growth and fiber digestion under the microscope, and the productions of fibrolytic enzyme were studied in an *in vitro* culture with *Neocallimastix frontalis* SA when either filter paper or rice straw was provided as sole energy source. Under the microscopic observation, active zoospores attachment, sporangium development and complex rhizoidal system were founded on the surface and at the edge of filter paper. After 7 days of incubation, a reduced fiber mass, a decreased fiber cohesion and a weakened fiber structure by fungal digestion were clearly observed. Similar fungal development was observed with rice straw, but fungal growth and digestion took place mostly on the damaged and exposed portion of rice straw. Although there were some differences in absolute concentration and pattern, the concentration of both cellulase and xylanase increased with incubation time with the higher activity being obtained with filter paper. Their differences were large especially after 48 and 96hr of incubation($P < 0.05$). The filter paper was more good inducer of cellulolytic and xylanolytic enzymes compared with complex substrate, rice straw. These findings suggest that the filter paper is the better energy source for *N. frontalis* than the complex substrate, and structural disintegration by physical process is able to help rumen fungal growth on the lignified roughage although anaerobic rumen fungi have mechanical and enzymatic functions for fiber digestion.

(**Key words** : *Neocallimastix frontalis*, Cellulase, Xylanase, Rice straw, Filter paper)

I 서 론

혐기성 곰팡이는 여러 초식동물의 소화기관에 서식하는데(Teunissen 등, 1991), *Chytridiomycetes* (강)의 *Neocallimasticeae*(과)의 *fungi*가 유일한 혐기성 반추위 곰팡이(Trinci 등, 1994; Gordon과 Phillips, 1998)이며, 반추위내 미생물 생태계의 주요 구성 집단 중 하나이다(Fonty와 Joblin, 1991).

혐기성 반추위 곰팡이는 분비하는 섬유소 분해효소의 역가가 매우 높다는 점 때문에 최근 수년 동안 계속적으로 관심의 대상이 되어왔다. Fonty와 Joblin(1991) 그리고 Ushida 등(1997)은 반추위 생태계 내에서 섬유소 분해를 위한 반추위 미생물들이 분비하는 효소들에 있어 곰팡이의 기능과 역할이 크다고 보고한 바 있는데, 이러한 사실은 식물 입자를 분해 시키

Corresponding author : Ha, Jong Kyu, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea, Phone : 02-880-4809, Fax : 02-875-8710, E-mal : jongha@snu.ac.kr.

기 위하여 반추위 곰팡이는 cellulolytic, xylanolytic, pectinolytic, amylolytic, glucohydrolytic 및 proteolytic 활성을 갖는 다양한 효소를 분비할 뿐만 아니라 이들 효소는 반추위 곰팡이가 가근을 발달시켜 식물입자를 물리적으로 붕괴하는 작용에도 기여를 한다는 보고에 의해서도 잘 알려진 바 있다(Mountfort와 Asher, 1989; 이 등, 1997, Ha 등, 2000). 특히 이들이 생산한 cellulase와 xylanase는 다른 반추위 미생물보다 섬유소 분해력이 강한데 Bernalier 등(1992)은 *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces Communis*와 *Caecomycetes Communis*가 분비하는 cellulase 역가는 *Fibrobacter succinogenes*와 *Ruminococcus flavefaciens* 보다 3~4배 높았다고 보고하였으며, Lee 등(1999)는 48시간 배양물에서 박테리아, 프로토조아와 곰팡이의 cellulase 역가가 각각 32.26, 19.21과 47.60 mmole glucose released/mim/ml, 그리고 xylanase 역가가 각각 42.56, 14.96과 64.93 mmole xylose released/min/ml로 곰팡이가 분비한 cellulase와 xylanase의 효소역가가 가장 높았다고 보고하였다. 그리고 반추위 곰팡이는 효소를 세포외로 분비하는 특성을 가지고 있는데 *N. frontalis*의 extracellular와 intracellular의 CMCase 역가를 측정된 결과 각각 0.51과 0.06 U·mg⁻¹이었고 xylanase 역가는 각각 26.6와 2.7 U·mg⁻¹이었다(Pearce와 Bauchop, 1985). 또한 이들 섬유소 분해 효소는 곰팡이의 종류, 섬유소 기질의 종류와 형태, 배양 방법과 시간에 따라 다른 분비량과 활성을 보였다(Gordon과 Phillips, 1989; Yanke 등, 1996).

박테리아와 프로토아에 비하여 반추위 곰팡이가 식물의 세포벽 물질을 더 효과적으로 분해하는 것은 높은 섬유소 분해 효소의 활성뿐만 아니라 가근조직(rhizoidal system)이 식물의 외막에 침투(penetrating)하여 식물의 견고한 조직을 붕괴(disrupting) 시키거나 섬유소를 가늘게(fibrillating)하는 물리적 분해 기능을 갖고 있기 때문이다(Orpin, 1984; Akin과 Benner, 1988). 식물입자를 분해 시키기 위한 곰팡이의 물리적 분해 기능이 이루어지기 위해서는 먼저 곰팡이가 식물입자에 부착하고 균사를 발달시키며 군집을 형성해야 하며 이와 함께 효소의 작용이

함께 이루어져야 한다. 이들 곰팡이의 섬유소 기질 표면의 부착 및 군락 형성에 관하여 Ho 등(1988)과 Chaudhry(2000)는 현미경 관찰을 통하여 보고한 바 있다. 이상과 같이 일부 연구들이 반추위내 섬유소 분해에 대한 혐기성 곰팡이의 역할을 밝히는데 기여를 하여 왔지만 반추위 곰팡이가 필요로 하는 영양소 공급을 위하여 섬유소를 분해하고 이용하는 과정에 있어서 물리적 및 효소적 기능을 명확히 이해하기 위해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

따라서 본 연구는 조사료 다급시 비교적 많이 분리되는 곰팡이 속(genus) 중에서 *Neocallimastix frontalis*을 사용하여 반추위액을 함유한 배양 환경을 이용하는 기존의 연구와는 달리 반추위액을 배제한 배양조건에 성장 에너지 공급원으로 섬유소만을 공급하였을 때 그들의 생존 및 발달을 관찰하기 위하여 단순 및 복합 섬유소 기질 즉 filter paper 또는 볏짚만을 에너지 공급원으로 사용한 배양조건에서 곰팡이를 배양하여 기질에 일어나는 현상을 현미경으로 관찰하고 그리고 섬유소 분해를 위해 분비한 효소를 평가하여 비교하고자 실시하였다.

II 재료 및 방법

1. 사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 볏짚을 위주로 급여하고 있는 반추위 캐놀라가 장착된 Holstein (550 kg)으로부터 Hungate(1950) 그리고 Bryant와 Burkey(1953)의 방법에 의하여 분리한 반추위 혐기성 곰팡이 *Neocallimastix frontalis* SA로써, 형태학적 특성(Ho와 Barr, 1995)과 분자생물학적 특성 즉, primer GM1(5'-TGTACACACCCGCCGTC-3')과 GM2(5'-CTGCGTTCTTCATCGAT-3')을 이용하여 18S rRNA 부위를 Brookman 등(2000)이 서술한 PCR 방법에 의하여 genomic DNA로부터 증폭하고 증폭된 DNA 단편은 pGEM[®]-T Easy vector system(promega, USA)에 클로닝하였으며, inset DNA를 dideoxy chain termination method (Sanger 등, 1977)에 의하여 염기서열을 결정하고 얻어진 염기서열은 NCBI BLAST

search를 이용하여 18S rRNA 염기서열의 특성에 의거하여 동정하였다. 사용 균주는 Lowe 등(1985)의 “defined medium”에서 3 또는 4일 간격으로 계대배양을 하며 유지 하였다.

2. 균주의 배양

Neocallimastix frontalis SA가 섬유소 분해에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사용한 배양액은 Lowe(1985)의 “semi-defined medium”(SDM, 반추위액이 포함되지 않은 배양액)이었으며, 탄소원으로 볏짚 또는 filter paper(Whatman No. 1)만을 첨가하여 39°C 서 7일간 혐기적으로 배양하였다. 반추위 혐기성 곰팡이의 혐기적 배양은 하 등(2003)이 서술한 방법들을 기초로 하였다.

반추위 혐기성 곰팡이가 섬유소 기질의 분해양상에 미치는 영향을 현미경적으로 관찰하기 위하여 다음과 같이 기질을 준비하였다. 우선 2 mm screen size의 willey mill로 볏짚과 filter paper를 분쇄하거나 filter paper strip(6×25mm)을 준비하고, 9.5 ml의 SDM 배양액이 들어 있는 Hungate 튜브에 볏짚과 filter paper를 각각 0.02g 씩 그리고 filter paper strip을 첨가한 후 Lowe(1985)의 “defined medium”(DM, 반추위액이 포함된 배양액)에서 3일간 배양한 곰팡이 배양액 0.5 ml을 혐기적으로 접종하여 배양 하였다. 그리고 볏짚과 filter paper를 에너지원으로 공급하였을 때 곰팡이가 분비하는 cellulase와 xylanase을 비교하기 위하여 filter paper strip을 제외한 가공형태가 같은 분쇄한 기질 즉 분쇄한 볏짚과 filter paper를 공급한 배양액을 이용하였으며, 효소 분석은 48시간 마다 현미경 관찰을 위한 시료 준비전 배양액을 처리별 3 개 이상의 곰팡이 배양물로부터 채취하여 실시하였다.

3. 현미경 관찰

분쇄한 볏짚과 filter paper, 그리고 filter paper strip이 들어 있는 SDM 배양액에 공시 균주를 접종하였으며, 현미경 관찰을 위해 배양 3~7 일 후 분쇄한 볏짚, 분쇄한 filter paper 또는 filter paper strip를 멸균된 바늘을 이용하여 배

양액으로부터 꺼내어 슬라이드 글라스와 커버 글라스를 이용하여 샘플을 고정하고, 각각의 기질에 발달한 혐기성 곰팡이를 광학 현미경 (Optiphot-2, Nikon, Japan)을 이용하여 실온에서 관찰하였다. 필요한 경우 염색 용액으로 샘플을 5분간 염색한 후 균사의 발달을 관찰하였다. 사용한 염색 용액은 0.5% phloxine 용액 이었다.

4. 효소활력 분석

배양 시간과 처리별로 채취한 곰팡이 배양액은 3,000rpm, 4°C 서 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 효소활력 분석에 사용하였다. 섬유소 분해 효소의 활력은 각각의 기질로부터 유리된 환원당의 양으로 측정하였으며, Cellulase CMCase와 xylanase(endo-β-(1,4)-xylanase)의 기질로는 citrate-potassium phosphate buffer(50 mM citrate와 10 mM potassium phosphate, pH 6.0)에 각각 1%(w/v)의 carboxymethylcellulose(CMC, Sigma C5678) 또는 1%(w/v)의 oat spelt xylan(arab inoglucuronoxylan, Sigma X0627)을 사용하였다. 섬유소 분해 효소의 활력은 조효소와 기질을 혼합하여 39°C 서 30분간 배양한 후 유리된 환원당의 양을 Miller 등(1960)이 서술한 dinitrosalicylic acid(DNS) method을 기본 원리로 하여 비색법으로 측정하였다. 효소반응이 끝난 반응액(0.25 ml 조효소와 0.25 ml 기질의 혼합액)에 0.5 ml의 DNS 용액(0.63% dinitrosalicylic acid, 18.2% Rochelle salts, 0.5% phenol, 0.5% sodium bisulfate, 2.14% sodium hydroxide)을 가하여 5분간 수조에서 끓이고 실온까지 냉각한 후 spectrophotometer(UV-1601PC, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡착도를 측정하였다. Cellulase와 xylanase의 효소 활성은 1분 동안 생산된 환원당의 양(μmole/min/ml)으로 표시하였다.

5 통계 분석

시험을 통해 얻어진 효소 활성은 SAS(1996)의 ANOVA(Analysis of Variance) Procedure로 분석하였고, t-test(Steel과 Torrie, 1980)를 이용하여 배양 시간별 두 기질간 유의성을 비교하였다.

III 결과 및 고찰

1. *Neocallimastix frontalis*에 의한 filter paper 분해 관찰

혐기성 반추위 곰팡이의 섬유소 이용을 형태

학적으로 관찰하기 위하여 에너지원으로 filter paper만을 공급하여 *N. frontalis* SA를 배양하였을 때 곰팡이의 성장 양상은 Fig. 1과 2에서 보는 바와 같다.

Fig. 1은 분쇄한 filter paper를 기질로 사용했을 때 곰팡이의 성장 양상을 보여주고 있는데,

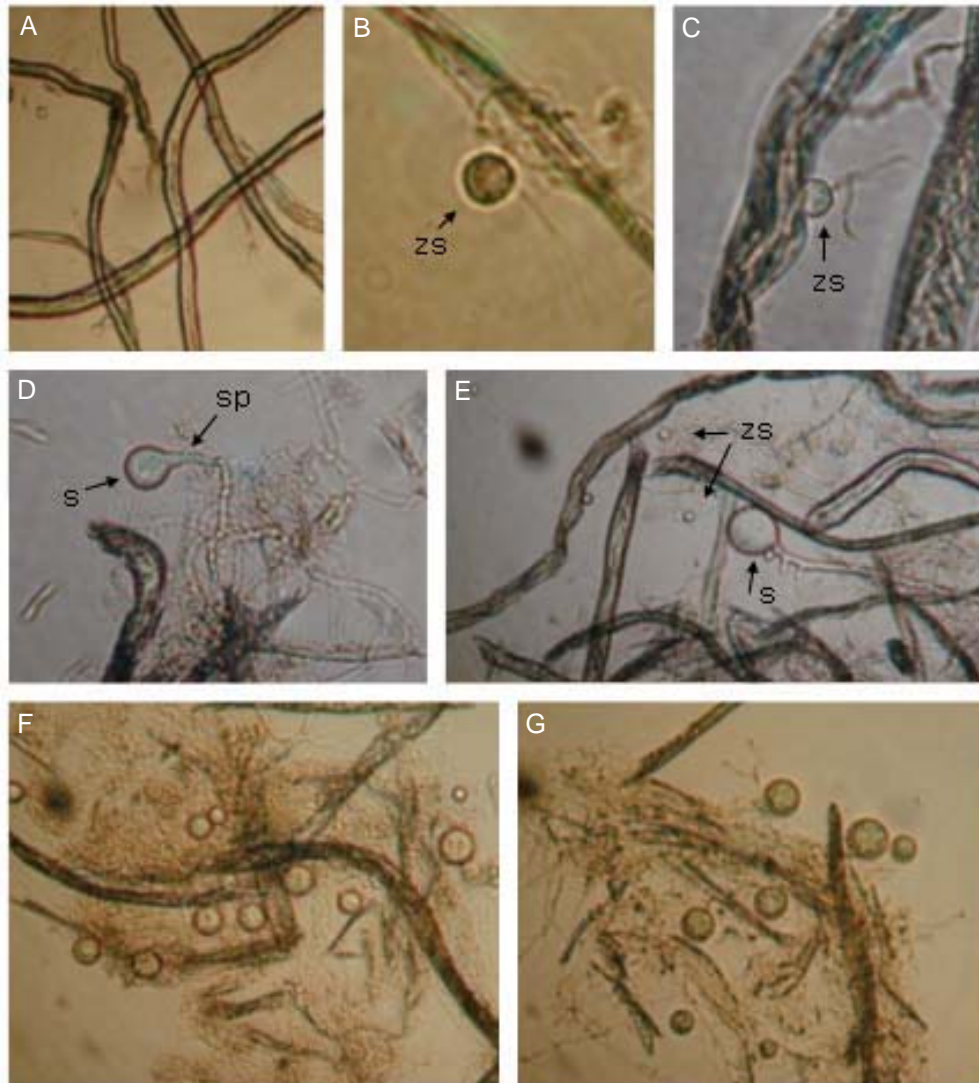


Fig. 1. Microscopic observation of colonization on milled filter paper by *Neocallimastix frontalis* SA.

A : Non-incubation, $\times 200$. B : Zoospore(ZS) swimming around paper fiber(after 3 days of incubation), $\times 360$. C : Zoospore attached on paper fiber(3 days), $\times 360$. D : Young sporangium (S) developing from sporangiophore(SP, 3 days) $\times 240$. E : Zoospore and sporangium development(4 days), $\times 240$. F : Numerous sporangia from vegetative rhizoids on paper fiber(5 days), $\times 200$. G : Sporangia and rhizoids of old culture(7 days), $\times 200$.

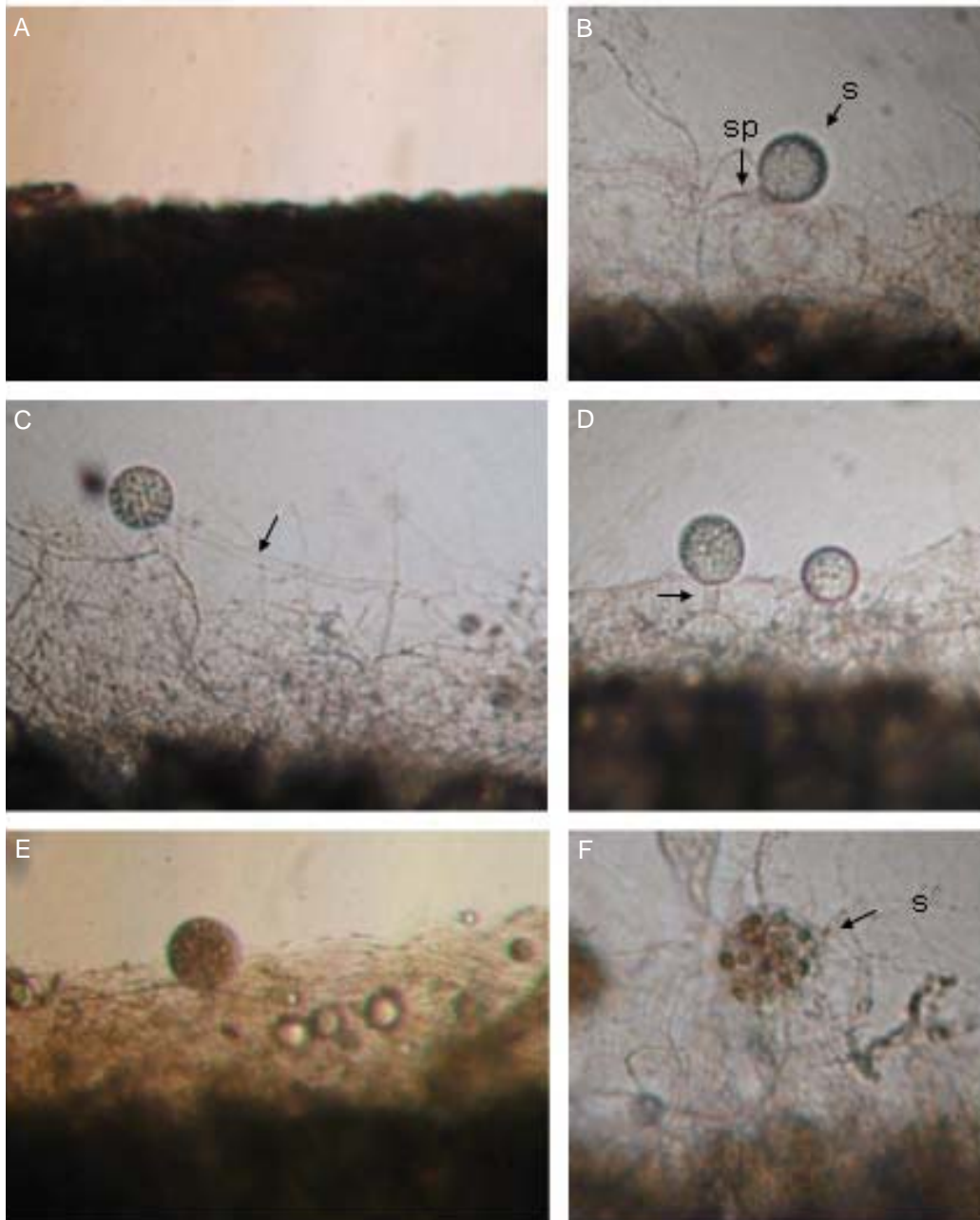


Fig. 2. Development of sporangia and rhizoid from filter paper strip in culture of *Neocallimastix frontalis* SA.

A: Filter paper shortly after fungal culture, $\times 120$. B: Sporangium(S) growing from sporangiophore(SP) with the branched rhizoids on filter paper(after 3 days of incubation), $\times 240$. C: Sporangium development from an extended rhizoid(arrow, 4 days), $\times 240$. D: Sporangium supported by rhizoid(arrow) embedding into filter paper(4 days), $\times 240$. E: Mature and young sporangia with extensive network of thallus(5 days), $\times 200$. F: Mature sporangium containing zoospores(6 days), $\times 300$.

배양액내 유주자(zospore)들은 곰팡이를 접촉한지 3일 이후에 발견 되었으며, 일부 유주자는 활발한 편모들(polyflagela)의 운동과 함께 섬유사 주위를 선회하거나(B), 섬유사 표면에 부착하였다(C). 또한 3일 배양시 분쇄한 filter paper의 표면에 많은 균사가 발달하였고 아포(sporangiospore)로부터 발달하는 포자낭(sporangium)도 관찰되었다(D). 배양 4일 후에는 포자낭으로부터 유주자들이 방출되고 확장된 균사로부터 성장한 포자낭의 존재도 관찰되었다(E). 이어 배양 5일 후에는 미성숙 및 성숙한 포자낭들과 함께 더욱 복잡한 그물망 모양의 균사엽상체(thallus)를 형성함이 관찰되었고(F), 배양 7일 후에는 반추위 곰팡이의 작용에 의해 filter paper가 분해되어 기질이 감소되고 섬유사의 결합성 및 견고성이 감소된 것이 관찰되었다(G).

Filter paper strip을 기질로 사용한 경우(Fig. 2)에도 분쇄 filter paper를 사용하였을 때와 마찬가지로 반추위 곰팡이의 성장이 매우 활발하게 일어남이 관찰되었다. 그러나 filter paper strip의 경우에는 배양 3일 후 잘리어진 모서리에서 아포로부터 포자낭이 발달하고 있는 모습이 발견되었다(B). 또한 균사체로부터 길게 확장된 균사에 포자낭이 잘 발달하였고(C), filter paper의 섬유질에 깊숙이 박힌 균사에서 발달한 포자낭들(D)도 관찰 되었다. 배양 5일 후에는 더 많은 포자낭들이 발달하였고 더 복잡하게 엉키며 길게 성장한 많은 균사들이 발견되었으며(E), 유주자 방출시기가 임박한 포자낭도 배양 6일 후에 관찰되었다(F).

이상의 결과에 의하면 filter paper의 가공형태에 상관없이 비슷한 시기에 *N. frontalis*가 부착하여 성장함을 볼 수 있었다. 그러나 filter paper strip의 경우 곰팡이의 성장 정도가 분쇄시에 비하여 낮게 관찰되었다. 비록 곰팡이가 기질내부에 침투하여 물리적으로 기질을 소화한다는 점은 기존 연구결과(Ho 등, 1988; Akin 등, 1990; Chaudhry, 2000)와 유사하였으나, 균사 발달과 포자낭의 성숙이 8~32시간 내에 완성되었다는 보고(Orpin과 Joblin,

1988)에 비하여 본 연구에서의 곰팡이 발달은 매우 늦었다. 이는 본 연구가 *in vitro*에서 한정된 배양조건 즉 에너지원으로서 filter paper만을 사용하였기 때문에 다양한 에너지원과 공존하고 있는 박테리아 또는 곰팡이로부터 영양소들이 풍부하게 공급되는 *in vivo*의 반추위액과는 반추위 곰팡이 성장을 위한 배양환경이 다르기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

2. 볏짚 공급시 *Neocallimastix frontalis*의 발달 관찰

분쇄한 볏짚만을 에너지 공급원으로 사용한 배양액에서도 *N. frontalis* SA는 filter paper에서와 마찬가지로 균락을 형성하며 성장하였다(Fig. 3).

배양 3일 후에 관찰된 바에 의하면 분쇄한 볏짚 표면, 특히 잘라지거나 부서져서 내부 조직이 노출된 부분에서 미세한 균사나 포자낭의 발달이 활발하였으며(A), 배양 4일 후에는 성숙한 포자낭과 확장된 균사가 발견되었다(B와 C). 풍성하게 자란 균사들이 주로 볏짚 줄기의 잘라진 모서리에서 균락을 형성하였으며(D), 볏짚으로부터 자란 균사에 지주를 받고 있는 포자낭들(E)도 관찰되었다. 배양 6일 후에는 볏짚 표면에 균사들이 그물망 같이 매우 복잡하게 엉키어 큰 곰팡이 균락이 형성되었다(F와 G). 배양 7일 후에는 방출이 임박한 성숙한 포자낭들을 쉽게 발견할 수 있었다(H).

분쇄한 볏짚을 기질로 사용한 경우에도 filter paper와 마찬가지로 *N. frontalis*의 성장이 관찰되었다. 그러나 성장 초기 뿐만 아니라 성장 후기에도 곰팡이의 성장은 주로 부스러지거나 손상된 부위에서 일어나고 볏짚이 표면에서는 거의 일어나지 않았다. 이는 비록 박테리아에 비하여 곰팡이가 조악한 조사료 소화 능력이 높기는 하나 여전히 볏짚 표면에는 부착하기 어렵다는 기존의 연구 결과(Orpin, 1977; Chaudhry, 2000; Pan 등, 2003)와 유사함을 볼 수 있었다. 따라서 볏짚의 물리적 또는 화학적 처리는 리

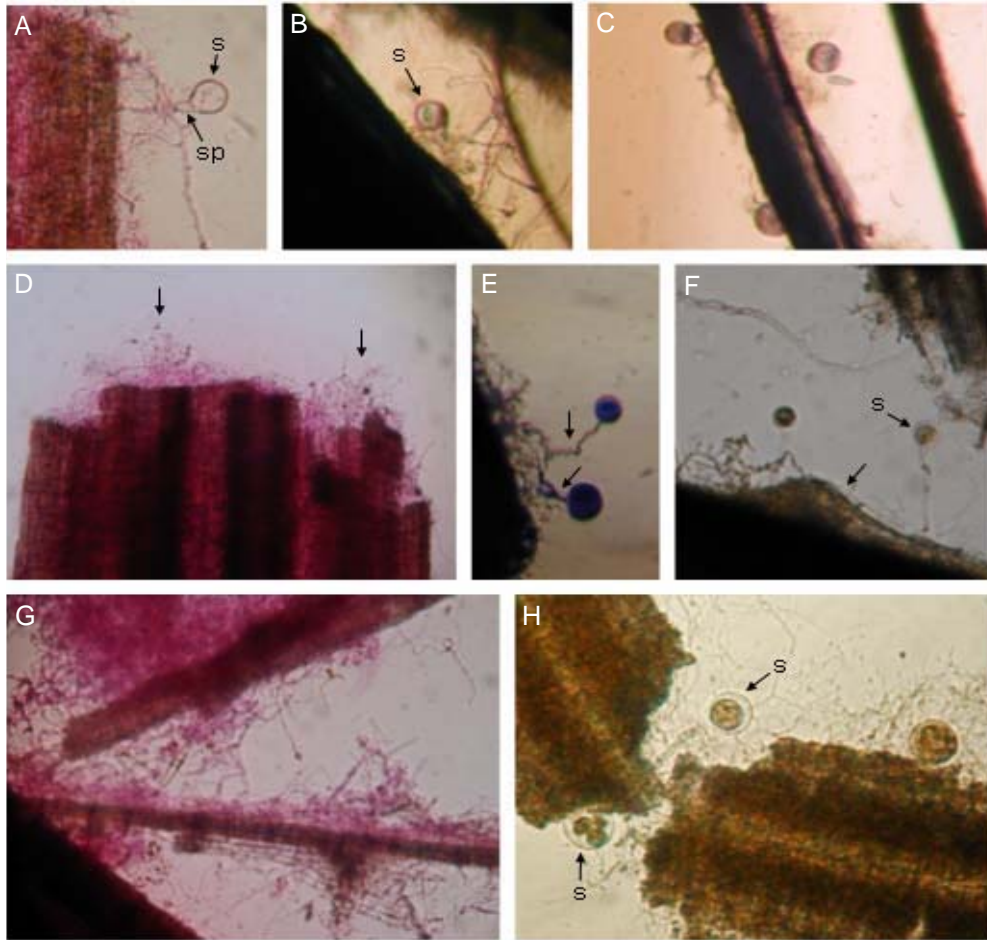


Fig. 3. Microscopic observation of colonization on milled rice straw by *Neocallimastix frontalis* SA.

A : Young sporangium(S) from sporangiospore(SP) on surface of rice straw(3 days), $\times 360$, B : Sporangium development on rice straw(4 days), $\times 360$. C : Developed sporangia with extended rhizoids(4 days), $\times 240$. D : Vegetative rhizoids grew(arrow) on cut edge of rice straw(5 days), $\times 120$. E : Sporangium supported by rhizoid(arrow) from rice straw(5 days), $\times 240$. F : Vegetative rhizoids grown(arrow) on rice straw(6 days), $\times 240$. G : Extensive network of thallosus(6 days), $\times 120$. H : Mature sporangium containing zoospores(7 days), $\times 300$.

그런화된 견고한 섬유소 구조를 파괴하기 때문에 곰팡이를 비롯한 반추미생물의 분해 작용을 향상시킬 수 있다고 사료된다.

3. Filter paper 및 볏짚 기질이 섬유소 분해 효소 생산에 미치는 영향

기질의 종류가 *N. frontalis* SA에 의한 cellulase(A)와 xylanase(B)의 분비에 미치는 영향은 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

섬유소 분해 효소, cellulase와 xylanase는 반추위 곰팡이를 접종 후 배양시간이 경과함에 따라 기질에 상관없이 계속적으로 축적되었으며, 배양 96시간 이후에는 그 축적이 둔화되는 현상을 보였다. 이와 같은 효소의 변화 경향은 혐기성 반추위 곰팡이를 *in vitro*에서 배양하는

섬유소 분해 효소, cellulase와 xylanase는 반추위 곰팡이를 접종 후 배양시간이 경과함에 따라 기질에 상관없이 계속적으로 축적되었으며, 배양 96시간 이후에는 그 축적이 둔화되는 현상을 보였다. 이와 같은 효소의 변화 경향은 혐기성 반추위 곰팡이를 *in vitro*에서 배양하는

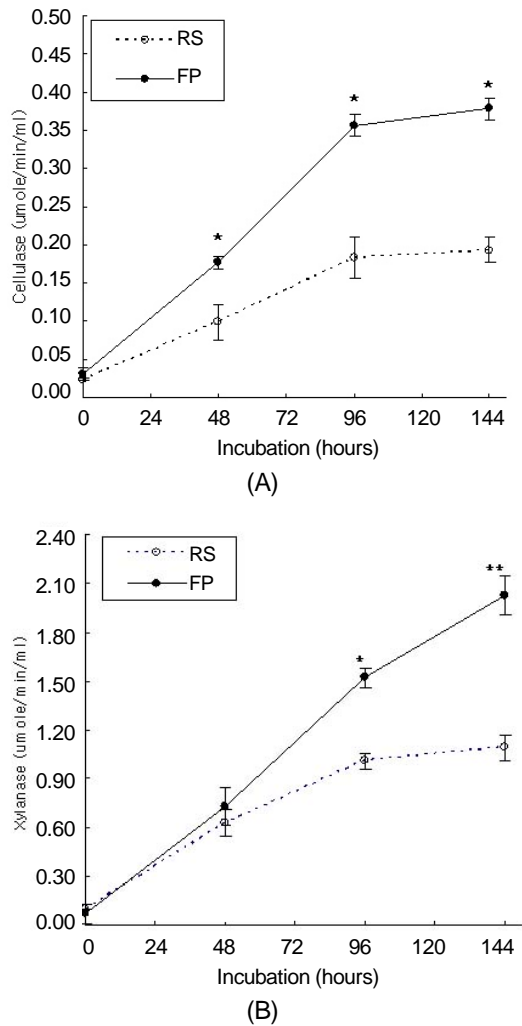


Fig. 4. The activities of xylanase (A) and cellulase (B) in fungal culture with milled filter paper (FP) and milled rice straw (RS).

* P < 0.05, ** P < 0.01.

동안 나타나는 일반적 현상으로 다양한 기질을 사용한 Lowe 등(1987)의 실험 결과에서도 유사한 경향을 보였다.

Cellulase의 농도는 filter paper를 기질로 사용하였을 때가 벼짚에 비해 배양시간에 상관없이 높았으며, 배양시간이 길어질수록 cellulase 농도는 더 큰 차이를 보였다(A). 특히 배양 48시간 이후 두 기질 간 cellulase의 차이는 통계적으로도 큰 차이를 나타내었다(P < 0.05). 이와

같은 현상은 순수한 cellulose로 구성되어 있는 filter paper가 다양한 물질과 polymer를 이루고 있는 벼짚에 비해 분해가 용이하여 *N. frontalis*에 더 많은 에너지를 공급해 줄 뿐만 아니라 효소 생산을 위한 더 좋은 유도물질이었기 때문으로 사료된다(Teunissen 등, 1992).

Xylanase의 생산에 미치는 기질의 영향(B)도 cellulase와 비슷한 경향을 나타내었다. Filter paper를 기질로 사용하였을 때 배양 전 기간 동안 더 높은 축적을 보였으며, 두 기질간 차이는 배양 96 시간(P < 0.05) 그리고 144 시간(P < 0.01)에는 현저한 차이를 보였다. 특히 cellulase와 다른 점은 filter paper를 기질로 사용한 경우 144시간까지도 지속적으로 농도가 높아지는 점이었는데, 이로 보아 *N. frontalis*의 xylanase 생산 능력은 에너지 공급이 지속되는 한 cellulase보다 더 높을 것으로 사료된다. 이와 유사한 결과로 Teunissen 등(1992)의 연구에서도 cellulolytic 효소보다 더 높은 활성을 갖는 xylanolytic 효소를 반추위 곰팡이가 생산함을 보였다.

*N. frontalis*에서 filter paper나 벼짚을 직접 비교한 연구 결과는 발표된 바 없지만 기존 연구들(Lowe 등, 1987; 이 등, 1997; Yanke 등, 1996; Ha 등, 2000)에서 보고된 것 같이 기질의 종류가 혐기성 곰팡이의 cellulase와 xylanase의 활력에 미치는 영향이 달랐듯이 본 연구에서도 기질간 차이가 뚜렷하였다.

이상의 현미경적 관찰과 섬유소 분해 효소 활력 결과를 종합해 보면 *N. frontalis*에 대한 에너지원으로서 단일 복합체인 filter paper가 복합 구조의 벼짚에 비해 더 우수하였으며, 비록 조악한 조사료를 분해하는 능력이 뛰어난 반추위 곰팡이라 할지라도, 리그닌화된 견고한 섬유소 구조를 파괴시킬 수 있는 물리적 처리는 반추위 곰팡이의 분해 작용 및 성장에 도움을 줄 것으로 사료된다.

IV 요약

Neocallimastix frontalis SA에게 에너지원으로 filter paper 또는 벼짚만을 공급하여 반추위 곰

팡이를 배양하는 동안 섬유소 분해 양상을 현미경으로 관찰하고 cellulase와 xylanase 생산에 미치는 영향을 비교하였다. 혐기성 반추위 곰팡이를 접종한 후 filter paper를 광학 현미경으로 관찰하였을 때 filter paper의 표면과 모서리에 유주자의 부착, 포자낭의 발달 그리고 복잡한 그물망의 군사 엽상체의 형성이 관찰되었으며, 배양 7일 후에는 filter paper의 소화 그리고 섬유사의 결착성 및 견고성의 감소 현상이 나타났다. 또한 분쇄한 볏짚 표면에서도 미성숙 및 성숙한 포자낭들이 관찰되었으며, 일반적으로 이들 군사들은 볏짚의 부스러진 부분이나 잘리어진 모서리에서 많이 발견되었다. cellulase와 xylanase는 배양기간 동안 filter paper와 볏짚 기질 모두에서 빠르게 그 농도가 증가하였으며, 볏짚 첨가시에 비해 filter paper 첨가시가 더 높은 경향을 보였다. 특히 두 기질간의 cellulase와 xylanase 효소 활성은 각각 48 그리고 96시간 배양 이후에 큰 차이를 보였다($P < 0.05$). 따라서 filter paper는 복합 구조를 갖는 볏짚에 비하여 cellulase와 xylanase 생산을 위한 더 좋은 유도 물질임을 발견하였다. 이상의 결과들을 *N. frontalis*에 대한 에너지원으로서 단일 복합체인 filter paper가 복합 구조의 볏짚에 비해 더 우수하였으며, 물리적 및 화학적으로 섬유소를 분해하는 혐기성 반추위 곰팡이라 할지라도, 리그닌화된 견고한 섬유소 구조를 파괴시킬 수 있는 물리적 처리는 반추위 곰팡이의 분해 작용 및 성장에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

V 인용 문헌

1. Akin, D. E. and Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1117-1125.
2. Akin, D. E., Ames-Gottfred, N., Hartley, R. D., Fulcher R. G. and Rigsby, L. L. 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Sci.* 30:394-401.
3. Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F. and Gouet, P. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic culture or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.* 25:143-148.
4. Brookman, J. L., Mennim, G., Trinci, A. P. J., Theodorou, M. K. and Tuckwell, D. S. 2000. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18SrRNA. *Microbiol.* 145:393-403.
5. Bryant, M. P. and Burke, L. A. 1953. Culture methods and some characteristics of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:201-217.
6. Chaudhry, A. S. 2000. Microscopic studies of structure and ruminal colonization in sheep of wheat treated with different alkalis. *Anaerobe* 6:115-161.
7. Fonty, G. and Joblin, K. N., 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interaction with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima, R. Academic Press, New York, pp. 655-679.
8. Gordon, G. L. R. and Phillips, M. W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutr. Res. Rev.* 11:133-168.
9. Gordon, G. L. R. and Phillips, M. W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1703-1710.
10. Ha, J. K., Kam, D. K., Jeon, H. S. and Lee, S. S. 2000. Role of xylan degrading enzymes in fiber digestion in ruminants. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:149-157.
11. Ho, Y. W., Abdullah, N. and Jalaludin, S. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134: 177-181.
12. Ho, Y. W. and Barr, G. J. S. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia.* 87:665-766.
13. Hungate, K. N. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterial Rev.* 14:1-49.
14. Lee, S. S., Shin, K. J., Kim, W. Y., Ha, J. K. and Han, In K. 1999. The rumen ecosystem: As a fountain source of noble enzymes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 12:988-1001.
15. Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J. and Hespell, R. B. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.* 131:2225-2229.
16. Lowe, S. E., Theodorou, M. K. and Trinci, A. P. J. 1987. Cellulase and xylanase of an anaerobic ru-

- men fungus grown on wheat straw, lignocellulose, cellulose, and xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1216-1223.
17. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of chaboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 2:127-132.
 18. Mountfort, D. O. and Asher, R. A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1016-1024.
 19. Orpin, C. G. 1977. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. *J. of Gen. Microbiol.* 99: 107-117.
 20. Orpin, C. G. 1984. The role ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:121-143.
 21. Orpin, C. G. and Joblin, K. N. 1988. The rumen anaerobic fungi. In *The rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson (Ed), Elsevier Applied Science, London. p. 129-150.
 22. Pan, J., Koike, S., Suzuki, T., Uda, K., Kobayashi, Y., Tanaka, K. and Okubo, M. 2003. Effect of mastication on degradation of orchardgrass hay stem by rumen microbes: fibrolytic enzyme activities and microbial attachment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:69-79.
 23. Pearce, P. D. and Bauchop, T. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1265-1269.
 24. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5464.
 25. Santra, A. and Karim, S. A. 2003. Rumen manipulation to improve animal productivity. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:748-763.
 26. SAS. 1996. *User's Guide, Version 6.12. Statistical Analysis System Inst. Inc. Cary NC. USA.*
 27. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. *Principles and Procedure of Statistics: A Biometrical Approach* 2nd ed. McGraw Hill Book Co., Inc., New York.
 28. Teunissen, M. J., Op Den Kamp, H. L. M., Orpin, C. G., Huis In't, Vwld, J. H. J. and Vogels, G. D. 1991. Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. *J. Gen. Microbiol.* 137:1401-1408.
 29. Teunissen, M. J., De Kort G. V. M., Op Den H. J. M. and Huis In't Veld J. H. J. 1992. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. *J. Gen. Microbiol.* 138:1657-1664.
 30. Trinci, A. P. J., Davies, D. R., Gull, K., Lawrence, M. I., Nielsen, B. B., Rickers, A. and Theodirou, M. K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 2:129-152.
 31. Ushida, K., Matsui, K., Fujino, Y. and Ha, J. K. 1997. Role and potential of ruminal fungi in fiber digestion. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 10:541-550.
 32. Williams, A. G. and Orpin, C. G. 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three anaerobic fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33:418-426.
 33. Yanke, L. J., Selinger, L. B., Lynn, J. R. and Cheng, K. J. 1996. Comparison of the influence of carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe.* 2:373-378.
 34. 이성실, 하중규, 강희신, McAllister, T. A., Cheng, K. J. 1997. 반추위 혐기성 곰팡이의 섬유소 분해율 및 섬유소 분해 효소의 특성에 관한 고찰. *한남농지.* 19:59-84.
 35. 하중규, 이성실, 고종열. 2003. 반추동물영양실험법. 서울대학교출판부. pp. 167-294.
- (접수일자 : 2004. 4. 8. / 채택일자 : 2004. 6. 15.)

Cellulase (umole/min/ml) Cellulase (umole/min/ml)
Xylanase (umole/min/ml) Xylanase (umole/min/ml)