

## 호열성 사상균 *Thermoascus aurantiacus*의 알코올분해대사 관련 효소학적 특성

고희선<sup>1</sup> · 김현수<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 전통미생물개발 및 산업화연구센터, <sup>2</sup>계명대학교 미생물학과

**Enzyme Production Related to Alcohol Metabolism from Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Ko Hee-Sun<sup>1</sup> and Hyun-Soo Kim<sup>1,2\*</sup>.** <sup>1</sup>Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Collage of Natural Science, Keimyung University, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea - Thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* showed excellent growth and produced high amount of alcohol oxidase and catalase in a pectin medium. Besides, the strain produced enzymes which related with pectin or alcohol decomposition. We detected extracellular pectin esterase (EC 3.1.1.11) activity and, both intracellular and extracellular pectinase (EC 4.2.2.10) activity, as pectinolytic enzymes produced by *T. aurantiacus*. The production of methanol decomposition enzymes, such as alcohol oxidase (AOD, EC 1.1.3.13), alcohol dehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1), formaldehyde dehydrogenase (FADH, EC 1.2.1.1) and formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) follows by pectin esterase reaction which is converted to methanol. We concluded that *T. aurantiacus* has pectinolytic and alcohol - oxidative enzymological mechanism which produced carbon dioxide as a final material, started from pectin.

**Key words:** *Thermoascus aurantiacus*, pectinolytic enzyme, alcohol decomposition, metabolism, catalase, alcohol oxidase

호열성 사상균 *Thermoascus aurantiacus*는 전분, 펙틴 등 다당류의 이용성이 우수하며 amylase[1], cellulose[2], xylanase[3] 등의 열 안정성을 지닌 다당가수분해효소의 활성을 보인다. 또한, 본 균이 생산하는 산화효소인 catalase는 배양여액 중에 대량으로 생산되며 80°C까지 열에 안정한 것으로 나타나[4], 기존의 시판 중인 소 간장이나 *Aspergillus niger*류의 catalase보다 내열성이 우수한 것으로, 현재 시판 중에 있으며, 반도체 공업, 염료 공업에 응용되고 있다. 본 균에서는 catalase의 기질이 되는 과산화수소를 생산하는 효소로서 유일하게 alcohol oxidase만이 발견되어 있다[5]. 본 균에서의 alcohol oxidase활성은 methanol 또는 ethanol에 가장 반응성이 좋은 반면, 알코올의 탄소쇄가 길어질수록 반응성이 낮아지는 특징을 가지고 있다[6]. 메탄올 자화성 효모의 경우에도 methanol 배지에서 자랐을 경우, alcohol oxidase와 catalase를 생산하는 것으로 알려져 있다[7]. 그러나, *T. aurantiacus*와 같은 흑국균과인 *Aspergillus oryzae*나 *Penicillium chrygesonum*와 같은 곰팡이의 경우는 주로 glucose oxidase와 catalase의 커플링 관계가 알려져 있어[8], *T. aurantiacus*의 alcohol oxidase와 catalase의 커플링은 본 균의 특이한 성질로 보여진다. 특히, 본 균은 메탄올만을 유일한 탄소원으로 할 경우 생육이 불가능하므로, 메탄올을 유

일한 탄소원으로 생육 가능한 메탄올 자화성 효모와 비교해서도 그 알코올 이용성이 같다고 볼 수는 없다[5]. 본 균은 전분이나 펙틴과 같은 다당을 이용해서 비로소 생육이 가능하며, 메탄올 등의 알코올을 첨가할 경우 생육이 더욱 활발해지는 것으로 나타났다[5]. 본 연구에서는 *T. aurantiacus*의 생육 및 alcohol oxidase의 생산성이 가장 우수했던 탄소원으로 펙틴을 이용하여, 펙틴분해대사관련 및 알코올대사관련의 여러가지 산화효소적 메커니즘을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

*T. aurantiacus* 균주는 일본의 National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center (Chiba, Japan)로부터 분양받아 사용하였으며, potato dextrose agar(PDA, Difco) 배지에서 보존하였다. 액체배지의 조성(g per liter)은 탄소원, 20; NaNO<sub>3</sub>, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; yeast extract, 0.2; trace salt solution, 2 ml; vitamin solution 0.2 ml이고, trace salt solution의 조성(g per 100 ml) FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·nH<sub>2</sub>O, 0.6, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.4; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.01; KI, 0.01; 6(NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.01; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01; H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.01; NaCl, 0.5, 그리고 vitamin solution의 조성(g per 100 ml)은 biotin, 0.002; Ca-pantothenate 0.4; pyridoxin-HCl, 0.4; p-aminobenzoate, 0.2으로 제조하였다. 500 ml Erlenmeyer 플

\*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-5509

E-mail: hskim@kmu.ac.kr

라스크에 150 ml씩의 배지를 넣어 121°C에서 20분간 고압 멸균하였으며, 접종이 끝난 각 플라스크는 rotary shaker (180 rpm, 42°C)에서 배양하였다. 배양 3일 후에 각 세포들을 한외여과하여 회수하였고, 회수된 세포는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 두번씩 세정하여 -20°C에서 사용하기 전까지 보관하였다.

### 효소 활성 측정

**Catalase Assay** : Catalase 활성은 Aebi법[9]을 변형하여 측정하였다. 반응조성액은 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하고 있는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml에 효소액을 첨가하여 30°C에서 반응을 진행하였다. 효소 활성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 소멸율을 240 nm에서의 흡광도를 측정하여 산출하였으며, Shimazu UV-240 spectrophotometer(Kyoto)를 사용하였다. Catalase의 활성단위 1 U는 상기의 효소 반응 조건 하에서 1분간 분해된 과산화수소량 1 μmol으로서 표시하였고, 과산화수소의 분자흡광계수 0.043(mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)를 사용하였다.

**Alcohol Oxidase Assay** : Alcohol oxidase 활성은 산소전극(Oxygraph 9, Central Science, Tokyo)을 이용해서 산소 소비량을 측정하여 계산하였다. 산소전극의 incubation cell (1 ml) 안에 100 μmol alcohol이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)를 넣고 효소액 100 μl을 넣어 30°C에서 배양하였다. alcohol oxidase 활성의 1 U는 상기의 반응조건 하에서 1분간에 1 μmol의 산소를 소비하는 효소량으로 정의하였다.

**Pectinolytic Enzyme Assay** : Pectin esterase의 활성은 Klavons와 Bennett의 방법[10]을 변형해서 측정하였다. 에스테르화된 pectin(60% esterified, Sigma) 2.5 g이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 2 ml를 45°C에서 3분간 예열한 후 alcohol oxidase(0.1 U, sigma)와 효소액을 첨가하여 반응을 개시하였다. 이 혼합액을 20분간 반응시킨 후, pectin 유래의 methanol로부터 alcohol oxidase 반응으로 생성된 formaldehyde의 양을 Hantzsh 반응[11]에 의해 측정하였다. Pectin esterase의 1 U는 1분당 반응혼합액 중의 기질인 pectin으로부터 methanol 1 μmol을 유리시키는 효소량으로 정의하였다. 전체 pectinase 활성은 2% pectin으로부터 유리된 환원당의 양을 측정하여 얻었다. Pectinase의 1 U는 1분당 반응혼합액 중의 기질인 pectic acid로부터 galacturonic acid 1 μmol을 유리시키는 효소량으로 정의하였다.

**Alcohol Dehydrogenase, Formaldehyde Dehydrogenase, Formate Dehydrogenase Assay** : ADH의 활성측정은, NAD 2 μmol과 ethanol 2 μmol이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 1 ml에, 효소액을 넣어 반응을 개시하였다[12]. 또한 FADH의 활성은 NAD 2 μmol, formaldehyde 2 μmol, 환원 glutathion 2 μmol이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 1 ml에, FDH의

활성은 NAD 2 μmol, sodium formate 2 μmol이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 1 ml에, 효소액을 넣어 반응을 개시하였다. 세 효소의 효소활성 1 U는 1분간에 생성된 NADH량으로 표시하였고, NADH의 분자흡광계수는 6.22(mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)을 이용하였다. 흡광도의 변화의 측정에는 Shimazu UV-240 spectrophotometer(Kyoto)를 사용하였다.

**Protein Assay** : 단백질의 양은 Lowry의 방법[13]으로 측정하였으며, bovine serum albumin 으로 검량선을 작성하여 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### Catalase 활성관련 Oxidase의 검색

*T. aurantiacus* 가 생산하는 catalase는 80°C에서 1시간 정도 방치해 두어도 활성을 거의 잃지 않으므로 내열성을 가지며, 이는 기존의 catalase 생산균으로서 현재에도 시판되고 있는 소간장유래나 *Aspergillus*속 유래의 효소보다 더욱 안정한 효소인 것으로 나타났다(Fig. 1). 본 균이 생산하는 세포의 catalase의 생산량은 습식균체 mg중량 당 약 5000 unit의 상당히 높은 활성으로 나타났다. 일반적으로 catalase는 과산화수소를 산화시켜 물과 산소로 전환시키는 산화효소이며, 과산화수소를 공급하는 다른 산화효소와 공역하고 있을

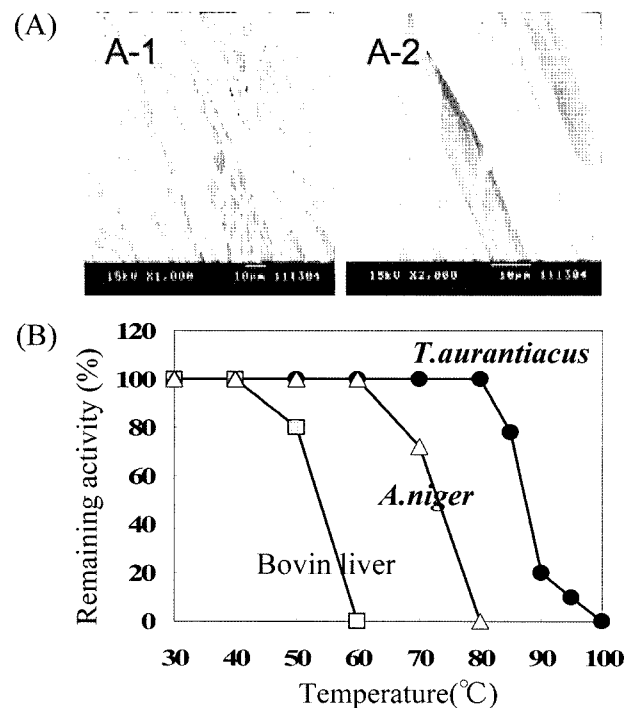


Fig. 1. The scanning electron micrographs (A : A-1, ×1,000; B, ×2,000) of *Thermoascus aurantiacus* grown on wheat bran medium and the comparison with catalase-heat stability (B) among *T. aurantiacus*, *A. niger* and bovin liver.

**Table 1. Effect of various substrates on consumption of oxygen by cell-free extract of culture filtrate.**

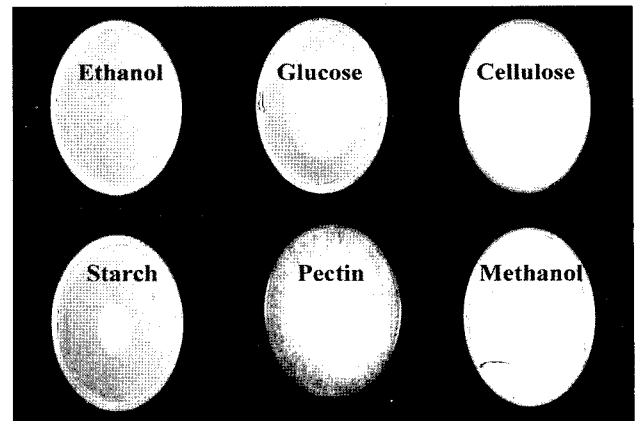
Substrate (100 $\mu$ mol)	Consumption of Oxygen	
	Cell-free extract	Culture filtrate
Methanol	+ <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>
Ethanol	+	-
Glucose	-	-
Galactose	-	-
Mannose	-	-
Arabinose	-	-
Xylose	-	-
Maltose	-	-
Arabitol	-	-
Cellobiose	-	-
Xylitol	-	-
Glycerol	-	-
Glycine	-	-
L-Malate	-	-

<sup>a</sup> Detected oxygen consumption<sup>b</sup> Not detected oxygen consumption.

가능성이 있다[7, 8]. 본 균을 전분배지에서 42°C에서 4일간 액체배양하여 얻은 무세포추출액과 배양여액을 가지고 산소 전극을 이용하여 각종 기질에 대한 산소 소비량을 조사하였다(Table 1). 각 기질에 대한 oxidase의 검사를 행한 결과, methanol 과 ethanol과 같은 알코올에 산소 소비 반응을 유일하게 검출하였다. 그리하여 본 균은 알코올 산화효소를 생산하고 있는 것으로 추정 가능하였다. Catalase와 공역하고 있는 산화효소로서 효모의 경우에는 alcohol oxidase와 공역하고 있다고 보고되어 있으나[7, 12], *T. aurantiacus*와 같은 흑국균인 *Aspergillus niger*나 *Penicillium chrygesonum*[8]과 같은 경우에는 glucose oxidase와 공역하고 있다고 보고되어 본 균의 특이적인 성질로 사료되었다.

#### 각종 탄소원 배지에서 Catalase와 Alcohol Oxidase 생산성

평판배지에서의 생육 : 각종 탄소원을 포함하는 한천평판배

**Fig. 2. The carbon source utilization of *T. aurantiacus*.** Growth of the fungus on 2% agar plate containing various carbon sources after 3 days of the incubation.

지에서의 본 균의 생육을 조사했다. 본 균은 전분, 글루코스 등의 각 탄소원을 이용해서 양호한 생육을 보였고, 특히 펙틴을 이용한 경우에는 현저히 빠르게 생육하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

액체배지 생육 : 탄소원으로 전분과 펙틴을 이용하여 본 균을 42°C에서 7일 동안 액체배양하여 세포내 catalase와 alcohol oxidase의 생산성의 경시적 변화를 비교하였다. 양효소의 생산량은 세포의 생육도와 일치하는 것으로 나타났다. 전분배지에서는 배양 5일째에 alcohol oxidase의 생산량이 최대에 도달하는 것에 비해, 펙틴배지에서는 배양 3~4일째에 이미 최대에 도달하였으며, alcohol oxidase의 생산량은 전분배지의 약 15배로 나타났다. Catalase의 생산량은 양배지 상에서 alcohol oxidase만큼의 큰 차이는 보이지 않았으나, 펙틴배지에서 catalase의 생산량이 비교적 더 높아지는 것으로 나타났다(Fig. 2).

펙틴분해효소의 생산성 : 본 균은 펙틴에서 생육이 빠르며, 높은 catalase 생산성과 alcohol oxidase 생산성을 보였으므로, 본 균의 펙틴 대사에 관련된 효소로 펙틴분해효소의 존재성을 검토하였다(Table 2). 본 균은 세포외로 다량의 pectin esterase를 분비하는 것으로 나타났으며, 이로써 pectin의 구

**Table 2. The time course of pectin-, methanol decomposing enzymes and catalase production from *T. aurantiacus* grown by submerged cultivation on 2% pectin medium.**

Day	Pectinolytic enzyme $\times 10^{-2}$ (U/ml)			Methanol decomposing enzyme (U/ml)					
	Pectin esterase <sup>a</sup>	Pectinase <sup>b</sup>	Pectinase <sup>a</sup>	Alcohol oxidase <sup>b</sup>	ADH <sup>b</sup>	FDH <sup>b</sup>	FADH <sup>b</sup>	Catalase <sup>b</sup>	Catalase <sup>a</sup>
2	5.74	6.40	-	0.16	-	-	0.02	29.4	-
3	5.04	15.8	-	0.27	0.02	0.02	0.04	33.0	-
4	0.90	38.0	4.40	1.07	0.12	0.20	0.13	826	36.7
5	0.66	32.0	6.80	0.65	0.05	0.16	0.15	734	110
6	0.49	16.2	8.20	0.39	0.03	0.08	0.08	569	119
7	0.82	7.42	8.60	0.40	-	0.09	0.08	440	73.4

<sup>a</sup> Culture filtrate: 150 ml; <sup>b</sup> Cell-free extract: 20 ml.

- : No detection of enzyme activity.

성성분인 methoxy기를 유리시켜 생성된 methanol을 이용하는 것으로 보인다. 또한 pectin 본체의 글리코실결합을 끊는 pectinase의 존재성도 확인하였다. Pectin esterase의 생산량은 배양 2일째에 이미 최대에 도달하는 것으로 나타나 포자가 발아하는 시기에 빠르게 생산되는 것으로 추정되며, 이후 pectin의 O-glycosyl bond를 가수분해하는 효소인 pectinase의 활성이 뒤따르는 것으로 보였다(Fig. 3). 이와 같은 pectinolytic enzyme의 생산은 본 균이 주로

생육하고 있는 서식처가 펙틴이나 리그닌 등이 풍부한 식물이나 퇴비, 토양 등이라는 점과 상당히 관련되는 것으로 사료되었다.

**알코올대사 관련 산화효소의 생산성** : 본 균이 alcohol oxidase를 생산하는 것과 관련하여 그 반응생성물로 생기는 formaldehyde 및 formate를 산화하는 dehydrogenase의 활성을 경시적으로 조사하였다(Table 2). FADH와 FDH는 alcohol oxidase가 최대에 도달하는 배양 4일째에 동시에 최대에 도달하는 양상을 보여, 생성된 formaldehyde와 formate는 비교적 빠르게 분해되는 것으로 보였다. 본 균과 메탄을 자화성 효모의 알콜 이용성의 차이점은 본 균은 탄소원을 메탄을 단독으로 하는 배지에서는 생육이 거의 불가능하지만 [5], 전분이나 pectin과 같은 다당류의 첨가와 함께 배양할 경우에 생육이 최적 상태에 도달하게 되고, 효모의 경우와 같이 메탄을 등의 알코올을 자화하는 과정에서 생성되는 물질인 formaldehyde, formate, carbon dioxide로의 분해과정이 존재하며 ATP 생산관련 대사메카니즘을 가지고 있는 것으로 나타났다. 본 균의 메탄을 이용성과 관련된 이러한 일련의 알코올 산화효소의 생산은 앞서 기술한 바 있는 본 균의 pectin esterase의 생산으로 펙틴에서 유리시킨 메탄올을 에너지 대사에 이용하고 있음을 뒷받침하고 있는 것으로 사료된다. 본 연구의 결과에서 *T. aurantiacus*의 포자 상태에서 conidia 발아 단계 사이에서 pectin esterase의 생산성이 일시적으로 높아지는 것에 주목하고 본 균의 생육 단계별 pectin esterase의 생산성과 대사적인 특징을 살펴보는 것을 후행 연구로 수행하고 있다.

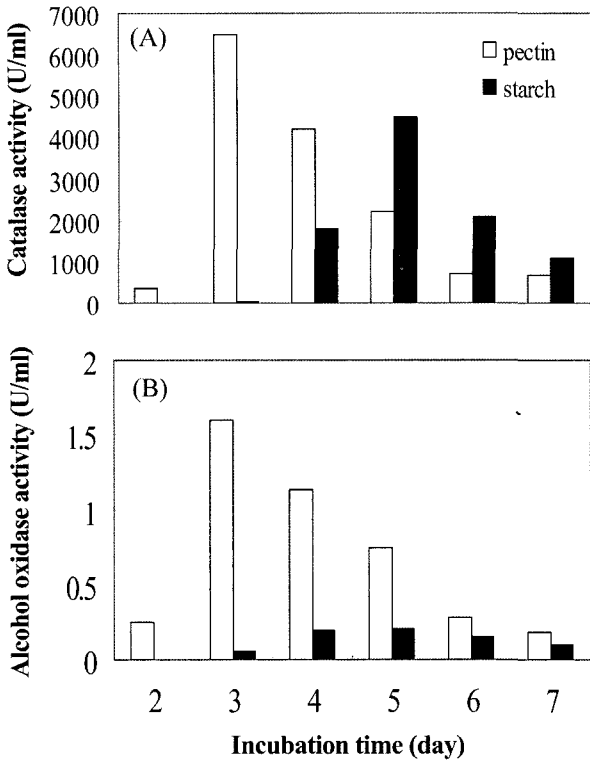


Fig. 3. Time course of intracellular production of catalase (A) and alcohol oxidase (B) by *T. aurantiacus*.

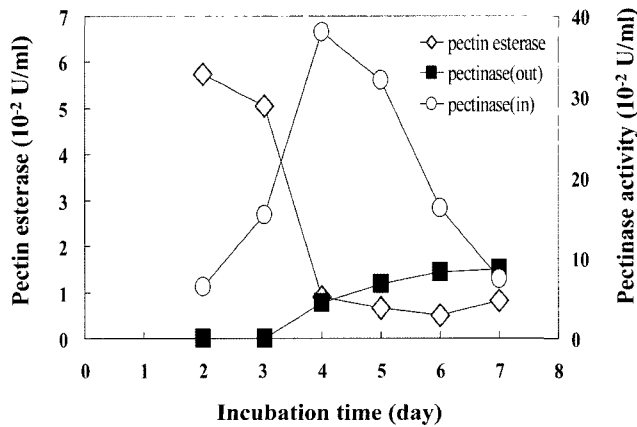


Fig. 4. Pectinolytic enzyme production of *T. aurantiacus*. The fungus was grown on liquid medium containing 2% pectin as a carbon source.

요약

본 균의 생육 및 효소생산에 유용한 탄소원으로서 자연계의 식물에 풍부한 펙틴을 탄소원으로 할 경우, 그 생육도는 전분보다 뛰어났으며, alcohol oxidase와 catalase의 생산량도 높아지는 것으로 나타났다. 특히 alcohol oxidase의 경우는 전분의 15배 이상의 생산량을 보여 본 균과 펙틴 이용성과의 관계를 시사하였고, 세포외 pectin esterase, pectinase 등의 높은 활성이 검출되어 이를 증명하였다. 또한 alcohol oxidase 반응에서 생성되는 물질인 formaldehyde를 산화하는 formaldehyde dehydrogenase와, formate를 산화하여 CO<sub>2</sub>를 생성하는 formate dehydrogenase의 반응을 발견하여, 본 균의 pectin 이용성과 관련한 일련의 에너지 대사계의 존재를 추정할 수 있었다.

감사의 말

본 논문은 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## REFERENCES

1. Ohno, N., H. Fukuda, H. Wang, M. Kasamura, H. Shinoyama, and T. Fujii. 1998. Amylase produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and some of their properties. *Seibutsu-kogaku* **76**: 113-119.
2. Khandke, K. M., P. J. Vithayathil and S. K. Murthy. 1989. Purification of xylanase,  $\beta$ -glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 491-500.
3. Yu, E. K. C., U. L. Tan, M. K. -H. Chan, L. Deschatelets, and N. S. John. 1987. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 16-24.
4. Wang, H., Y. Tokusige, H. Shinoyama, T. Fujii, and T. Urakami. 1998. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 169-173.
5. Ko, H., H. Fujiwara, Y. Yokoyama, N. Ohno, S. Amachi, H. Shinoyama, and T. Fujii. 2005. Inducible production of alcohol oxidase and catalase in a pectin medium by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 290-292.
6. Ko, H., Y. Yokoyama, N. Ohno, M. Okadome, S. Amachi, H. Shinoyama, and T. Fujii. 2005. Purification and characterization of intracellular and extracellular, thermostable and alkali-tolerant alcohol oxidases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* NBRC 31693. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 290-292.
7. Veenhuis, M., J. P. Van Dijken, and W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts, pp. 2-82. In A.H. Rose, J. Gareth Morris, and D. W. Tempest (ed.), *Advances in microbial physiology*, vol. 24, Academic Press, London.
8. Fiedurekl, J. and A. Gromada. 1997. Screening and mutagenesis of molds for improvement of simultaneous production of catalase and glucose oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 344-347.
9. Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol.* **105**: 121-126.
10. Klavons, J. A., R. D. Bennet. 1986. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 597-599.
11. Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**: 416-421.
12. Fujii, T. and K. Tonomura. 1972. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2297-2306.
13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.

(Received July 4, 2006/Accepted Sep. 4, 2006)