

RESEARCH ARTICLE

담수환경에서 분리한 곰팡이의 세포외분해효소 활성 탐색

문혜연*, 오유선, 고재덕

국립낙동강생물자원관 미생물연구실 균류연구팀

Evaluation of Extracellular Enzyme Activity of Fungi from Freshwater Environment in South Korea

Hye Yeon Mun*, Yoosun Oh, and Jaeduk Goh

Fungal Research Team, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

*Corresponding author: outcastm@nnibr.re.kr

ABSTRACT

This study aimed to isolate and characterize fungi from freshwater environments in South Korea and evaluate their extracellular enzyme activities. Fungal strains were collected from various freshwater sources and identified using phylogenetic analysis. The isolated fungi included known aquatic hyphomycetes and previously unreported species. Extracellular enzyme, including those of protease, amylase, lipase, cellulase, laccase, and chitinase, activities were evaluated. Among the isolated strains, several showed high enzyme activity, suggesting their potential role in organic matter decomposition in freshwater ecosystems. This research expands our knowledge of the diversity and enzyme activities of the fungi in freshwater environments, contributing to our understanding of their ecological roles.

Keywords: aquatic hyphomycetes, extracellular enzyme, freshwater fungi, laccase



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2023 December, 51(4): 265-276
<https://doi.org/10.4489/KJM.20230029>

Received: September 26, 2023

Revised: October 19, 2023

Accepted: October 31, 2023

© 2023 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

곰팡이는 복합적인 유기물에서 영양분과 탄소원 등을 얻기 위해 세포외분해효소를 생산한다. 이러한 효소들은 일반적으로 다당체를 가수분해하여 단당체로 만들어 세포내로 흡수되도록 한다. 이러한 작용들은 자연상태에서 유기물 분해 및 무기물화를 통해 생태계 순환이 이루어지도록 한다. 곰팡이가 분비하는 세포외분해효소는 다양하며 산업적으로도 많이 이용되고 있다[1]. proteinase는 자연계에 널리 퍼져 있는 중요한 효소로서 식품산업[2], 의약품[3], 세제[4] 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. amylase와 cellulase는 섬유산업[5], 세제[6], 펄프 및 제지 산업 등에 널리 사용되며, cellulase는 lingo-cellulose의 에탈올로 생물전환 시키는데 중요한 역할을 한다[7]. Lipase 역시 산업적 응용이 광범위하며 폐수 처리에도 사용하고 있다[8]. 미생물을 이용한 생물학적 방제로 키틴을 분해할 수 있는 chitinase에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 키틴은 각종 갑각류의

외피, 곰팡이 세포벽의 구성성분으로 chitinase를 생성하는 미생물을 이용한 살충 및 살균제에 이용하고 있다[9]. Laccase는 최근에는 바이오연료 및 바이오센서 연구에 이용되며, 생촉매 작용을 통해 식품, 화장품 산업 등에서 널리 활용된다[10].

담수에서 서식하는 곰팡이(aquatic hyphomycetes)는 물 속의 오래된 나뭇잎 등 유기물에서 주로 발견된다. 목재는 수용성 당, 지질, hemicellulose, cellulose, 리그닌 같은 성분으로 이루어져 있어 이들을 분해하기 위해서는 복합적인 세포외분해효소를 생산한다[11].

본 연구에서는 담수의 토양, 유기물 등에서 분리한 곰팡이 40개 균주들의 proteinase, cellulase 등 6가지 세포외분해효소를 생성하는지를 조사하였다.

재료 및 방법

채집 및 균류 분리

담수환경에서 서식하는 곰팡이를 분리하기 위해, 다양한 담수환경에서 시료를 채집하였다. 균주별 채집지 및 분리원은 Table 1에 보여지는 바와 같다. 담수시료는 현장에서 바로 핸드펌프를 사용하여 50 mL 현장수를 MCE membrane filter (HAWP04700, MF-Millipore™, Tullagreen, Ireland)를 이용하여 여과한 후 여과지를 water agar (WA; 20 g/L agar, 1 L distilled water, streptomycin 100 ppm)배지에 올려놓는다. 실험실로 가져와 15°C에서 배양하며 단포자 분리하였다. 순수분리된 균류는 potato dextrose agar (PDA; Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)배지에 접종하고 20°C에 배양하였다.

Table 1. Information of fungal strains from freshwater environments.

No.	Strain No.	Species	Isolation source	Locations (GPS)	GenBank Acc. NO. (ITS)
1	NNIBRFG36	<i>Colletotrichum godetiae</i>	Plantlitter	Sohan-cheon, Hamaengbang-ri, Geundeok-myeon, Samcheok-si, Gangwon-do 37°23'14.4"N, 129°11'53.1"E	KU751867
2	NNIBRFG41	<i>Aquanelectria penicillioidea</i>	Plantlitter	Sohan-cheon, Hamaengbang-ri, Geundeok-myeon, Samcheok-si, Gangwon-do 37°23'14.4"N, 129°11'53.1"E	MZ771259
3	NNIBRFG65	<i>Phomopsis liquidambari</i>	Plantlitter	Sohan-cheon, Hamaengbang-ri, Geundeok-myeon, Samcheok-si, Gangwon-do 37°23'14.4"N, 129°11'53.1"E	KU751869
4	NNIBRFG108	<i>Didymella segeticola</i>	Plantlitter	Sohan-cheon, Hamaengbang-ri, Geundeok-myeon, Samcheok-si, Gangwon-do 37°23'14.4"N, 129°11'53.1"E	MZ771260
5	NNIBRFG164	<i>Nothophma spiraeae</i>	Plantlitter	Bukcheon, Sangju-si, Naeseomyeon, Gyeongsangbuk-do (36°24'26.7"N, 128°41'7.8"E)	MW841132
6	NNIBRFG202	<i>Discosia rubi</i>	Plantlitter	Buk-cheon, Namjang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 36°24'34.8"N, 128°6'50.8"E	MZ771261
7	NNIBRFG203	<i>Discosia rubi</i>	Plantlitter	Buk-cheon, Namjang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 36°24'34.8"N, 128°6'50.8"E	MZ771262
8	NNIBRFG206	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Plantlitter	Buk-cheon, Namjang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 36°24'34.8"N, 128°6'50.8"E	MZ771263
9	NNIBRFG207	<i>Mucor moelleri</i>	Plantlitter	Buk-cheon, Namjang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 36°24'34.8"N, 128°6'50.8"E	MZ771264
10	NNIBRFG210	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Plantlitter	Geum-cheon, Daeha-ri, Sanbuk-myeon, Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do 36°39'58.8"N, 128°15'46.4"E	MZ771265

Table 1. Information of fungal strains from freshwater environments (continued).

No.	Strain No.	Species	Isolation source	Locations (GPS)	GenBank Acc. NO. (ITS)
11	NNIBRFG243	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	Plantlitter	Geum-cheon, Daeha-ri, Sanbuk-myeon Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do 36°46'23.3"N, 128°18'43.7"E	KU751878
12	NNIBRFG245	<i>Neosetophoma italica</i>	Plantlitter	Geum-cheon, Daeha-ri, Sanbuk-myeon, Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do 36°46'23.3"N, 128°18'43.7"E	KU751879
13	NNIBRFG247	<i>Microdochium paspali</i>	Plantlitter	Geum-cheon, Daeha-ri, Sanbuk-myeon, Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do 36°46'23.3"N, 128°18'43.7"E	MZ771266
14	NNIBRFG267	<i>Volutella delonicis</i>	Freshwater foam	Jukgye-cheon, Cheonggu-ri, Sunheung-myeon, Yeongju-si, Gyeongsangbuk-do 36°55'37.7"N, 128°34'54.7"E	MZ771267
15	NNIBRFG334	<i>Trichosporon porosum</i>	Freshwater foam	Jukgye-cheon, Cheonggu-ri, Sunheung-myeon, Yeongju-si, Gyeongsangbuk-do 36°55'37.7"N, 128°34'54.7"E	KU892286
16	NNIBRFG339	<i>Margaritispora aquatica</i>	Plantlitter	Jukgye-cheon, Cheonggu-ri, Sunheung-myeon, Yeongju-si, Gyeongsangbuk-do 36°55'37.7"N, 128°34'54.7"E	MZ771268
17	NNIBRFG396	<i>Monochaetia dimorphospora</i>	Plantlitter	Nakdong-river, Togye-ri, Dosan-myeon, Andong-si, Gyeongsangbuk-do 36°43'21"N, 128°51'49.6"E	MZ771269
18	NNIBRFG435	<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	Plantlitter	Naeseong-cheon, Daeun-ri, Yonggung-myeon, Yecheon-gun, Gyeongsangbuk-do 36°35'13"N, 128°19'38.5"E	MZ771270
19	NNIBRFG450	<i>Didymella segeticola</i>	Plantlitter	Naeseong-cheon, Daeun-ri, Yonggung-myeon, Yecheon-gun, Gyeongsangbuk-do 36°35'13"N, 128°19'38.5"E	MZ771271
20	NNIBRFG813	<i>Lemonniera fraxinea</i>	Plantlitter	Geomryongso, Changjuk-dong, Taebaek-si, Gangwon-do 37°14'2.3"N, 128°54'57.2"E	OP351699
21	NNIBRFG814	<i>Tetracadium fraxineum</i>	Plantlitter	Geomryongso, Changjuk-dong, Taebaek-si, Gangwon-do 37°14'2.3"N, 128°54'57.2"E	ON922528
22	NNIBRFG843	<i>Monochaetia kansensis</i>	Plantlitter	Geomryongso, Changjuk-dong, Taebaek-si, Gangwon-do 37°14'2.3"N, 128°54'57.2"E	MZ771272
23	NNIBRFG868	<i>Monochaetia kansensis</i>	Plantlitter	Sohan-cheon, Hamaengbang-ri, Geundeok-myeon, Samcheok-si, Gangwon-do 37°23'6.5"N, 129°11'27.9"E	MZ771273
24	NNIBRFG1139	<i>Didymella ellipsoidea</i>	Sediment	Namsaengi-mot, Sinchon-ri, Jocheon-eup, Jeju-si, Jeju-do 33°31'57.7"N, 126°36'51.7"E	MZ771274
25	NNIBRFG1470	<i>Penicillium scabrosum</i>	Sediment	Mureung-cheon, Masan-ri, Guseong-myeon, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do 36°2'54.6"N, 127°57'42.9"E	MT1995062
26	NNIBRFG1480	<i>Didymella aeria</i>	Sediment	Mureung-cheon, Masan-ri, Guseong-myeon, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do 36°2'54.6"N, 127°57'42.9"E	MZ771275
27	NNIBRFG1552	<i>Filosporella exilis</i>	Sediment	Namsaengi-mot, Sinchon-ri, Jocheon-eup, Jeju-si, Jeju-do 33°31'57.7"N, 126°36'51.7"E	MZ771276
28	NNIBRFG1555	<i>Filosporella fistucella</i>	Sediment	Namsaengi-mot, Sinchon-ri, Jocheon-eup, Jeju-si, Jeju-do 33°31'57.7"N, 126°36'51.7"E	MZ771277
29	NNIBRFG2631	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Sediment	Hapcheon-ho, Heoyang-ri, Daeyeong-myeon, Hapcheon-gun, Gyeongsangnam-do 35°31'37.7"N, 128°18'3"E	MZ771278
30	NNIBRFG2634	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Sediment	Hapcheon-ho, Heoyang-ri, Daeyeong-myeon, Hapcheon-gun, Gyeongsangnam-do 35°31'37.7"N, 128°18'3"E	MZ771279

Table 1. Information of fungal strains from freshwater environments (continued).

No.	Strain No.	Species	Isolation source	Locations (GPS)	GenBank Acc. NO. (ITS)
31	NNIBRFG2714	<i>Didymella aeria</i>	Sediment	Sicheon-cheon, Jungsan-ri, Sicheon-myeon, Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do 35°17'30.6"N, 127°45'20.9"E	MZ771280
32	NNIBRFG2943	<i>Stagonospora trichophoricola</i>	Endophyte	Yongsu-jeosuji, Yongsu-ri, Hangeong-myeon, Jeju-si, Jeju-do 33°19'2.7"N, 126°11'15.4"E	MZ771281
33	NNIBRFG3280	<i>Sarocladium kiliense</i>	Sediment	Ulsukdo, Hadan-dong, Saha-gu, Busan 35°68.2"N, 128°56'38.2"E	MW237690
34	NNIBRFG3775	<i>Monochaetia kansensis</i>	Sediment	Yongchu-valley, Wanjang-ri, Gaeun-eup, Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do 36°40'31.8"N, 127°57'38"E	MZ771282
35	NNIBRFG4092	<i>Sarocladium strictum</i>	Plantlitter	Hyang-ho, Hangho-ri, Jumunjin-eup, Gangneung-si, Gangwon-do 36°40'31.8"N, 127°57'38"E	MZ771283
36	NNIBRFG4126	<i>Phialemoniopsis pluriloculosa</i>	Sediment	Dal-cheon, Beopju temple, Sanae-ri, Sokrisan-myeon, Boeun-gun, Chungcheongbuk-do 36°32'27.3"N, 127°49'56.7"E	MZ771284
37	NNIBRFG4173	<i>Paramyrothecium viridisporum</i>	Sediment	Jecheon-cheon, Okjeong-ri, Bongyang-eup, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 37°10'27.3"N, 127°49'56.7"E	MZ771285
38	NNIBRFG4211	<i>Preussia typharum</i>	Sediment	Jecheon-cheon, Okjeong-ri, Bongyang-eup, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 37°10'27.3"N, 127°49'56.7"E	MZ771286
39	NNIBRFG4454	<i>Microdochium lycopodium</i>	Sediment	Danjangcheon Gorye-ri, Danjang-myeon, Milyang-si, Gyeongsangnam-do 35°29'15"N, 128°55'53"E	MZ771287
40	NNIBRFG4843	<i>Microdochium paspali</i>	Sediment	Gapyeong-cheon, Jeokmok-ri, Buk-myeon, Gapyeong-gun, Gyeonggi-do 37°57'52.7"N, 127°26'24.6"E	MZ771289

ITS: internal transcribed spacer.

채집한 담수침전식물체를 멸균수에 2번 세척한 후 멸균수에 넣고 20°C에서 일주일 정도 배양한 후, 배양된 물 100 μ L를 WA 배지에 도말하고 2일 동안 15°C에서 배양하였다. 채집한 토양시료는 10^2 , 10^3 , 10^4 으로 희석하여 200 μ L를 PDA 배지에 도말한 후 15°C에서 배양하며 균을 분리하였다. 분리된 곰팡이는 15% 글리세롤에 담은 후 -80°C에 저장하였다.

분리된 균류의 동정

분리된 균주를 동정하기 위해 PDA에 배양한 균사체를 수확하여 glass bead가 담긴 tube에 넣고 균질화시킨 후 Nucleospinn® Plant II DNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, German)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 internal transcribed spacer (ITS) rDNA 유전자 분석을 위해 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 및 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다[12]. DNA 염기서열 정렬 및 편집, 계통수 작성을 위해 MEGA 11을 사용하였다[13].

Proteinase 활성 탐색

분리된 곰팡이의 proteinase 활성을 측정하기 위해 1% malt extract agar (1% MEA; 1% malt extract, 15% agar)에 1% skim milk과 0.05% congo red를 첨가하여 조제한 배지에 곰팡이를 접종하였다. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 붉은색 배지가 투명하게 변하는지 관찰하였다.

Amylase 활성 탐색

분리된 곰팡이의 amylase 활성을 측정하기 위해 1% malt extract agar (1% MEA; 1% malt extract, 15% agar)에 0.5% soluble starch과 0.05% congo red를 첨가하여 조제한 배지에 곰팡이를 접종하였다. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 붉은색 배지가 투명하게 변하는지 관찰하였다.

Lipase 활성 탐색

분리된 곰팡이의 lipase 활성을 측정하기 위해 1% malt extract agar (1% MEA; 1% malt extract, 15% agar)에 0.5% tween20 (Sigma, St. Louis, USA)과 0.05% congo red를 첨가하여 조제한 배지에 곰팡이를 접종하였다. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 붉은색 배지가 투명하게 변하는지 관찰하였다.

Cellulase 활성 탐색

분리된 곰팡이의 cellulase 활성을 측정하기 위해 1% malt extract agar (1% MEA; 1% malt extract, 15% agar)에 1% carboxymethyl cellulose (CMC)과 0.05% congo red를 첨가하여 조제한 배지에 곰팡이를 접종하였다. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 붉은색 배지가 투명하게 변하는지 관찰하였다.

Laccase 활성 탐색

분리된 곰팡이의 laccase 활성을 측정하기 위해, 1% malt extract agar (1% MEA; 1% malt extract, 15% agar)에 0.02% guaiacol을 첨가하여 조제한 배지에 접종하였다[14]. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 배지가 붉은색으로 변하는지 관찰하였다.

Chitinase 효소 활성 탐색

분리된 곰팡이의 chitinase 활성을 측정하기 위해, 1 L 당 colloidal chitin 4.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, NH_4SO_4 3 g, KH_2PO_4 1 g, bromo cresol purple 0.15 g, tween80 0.2 mL agar 15 g을 넣어 조제한 배지에 곰팡이를 접종하였다[15]. 25°C에서 7-10일 동안 관찰하면서 배지 색이 변하는지 관찰하였다.

결과

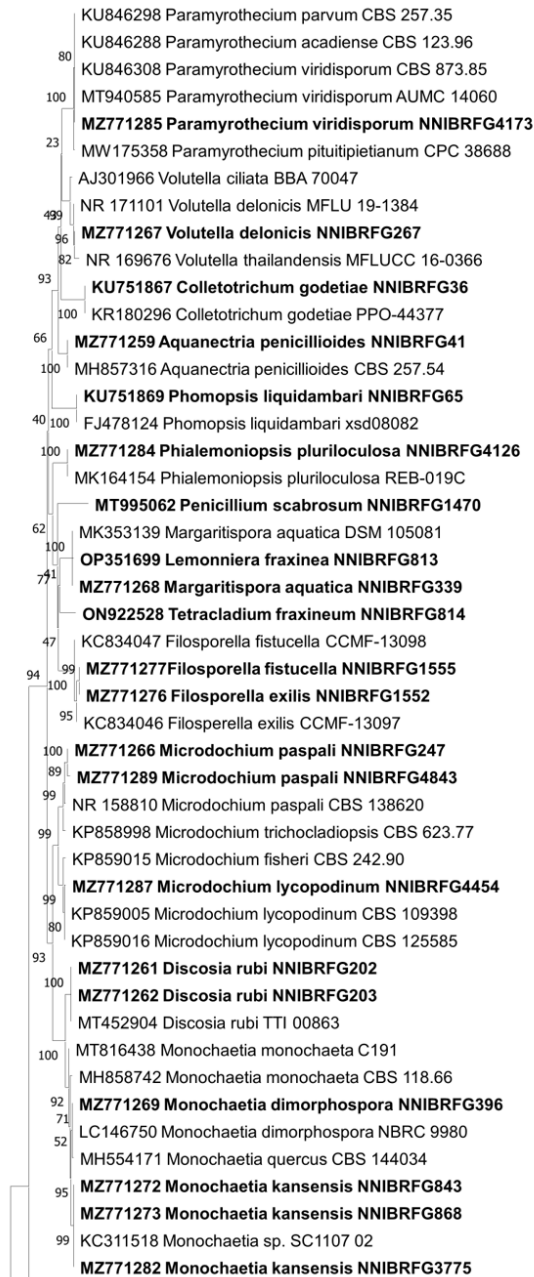
곰팡이의 동정

실험에 사용된 균주들은 2015-2018년에 걸쳐 담수환경에서 채집된 시료에서 분리한 곰팡이로 담수식물침전물에서 22개, 담수퇴적토에서 15개, 담수포말 및 담수시료에서 2개, 식물내생균 1개 균주가 분리 동정되었다(Table 1). 이들 곰팡이는 담수환경에서 유기물을 분해하는 분해자 역할을 하는 것으로 알려져 있는 수생균류(aquatic hyphomycetes) 중 국내에 보고된 *Aquanectria penicillioidea*, *Margaritispora aquatic*, *Filospora exilis*, *F. fistucella*, *Lemonniera fraxinea*, *Tetracladium fraxineum*이 포함되어 있으며[16-19], 담수환경에서 분리된 것으로 보고된 *Colletotrichum godetiae*, *Discosia rubi*, *Monochaetia dimorphospora*, *Didymella segeticola*, *Did. ellipsoidea*, *Did. aerea*, *Nothophoma spiraeae*, *Mucor moelleri*, *Paraphaeosphaeria michotii*, *Penicillium scabrosum*, *Sarocladium kiliense* 도 포함되어 있다[19-26]. 한편, 국내에 아직 보고되지 않은 *Neostrophoma italica*, *Microdochium paspali*, *Microrosphaeropsis arundinis* 등 다양한 곰팡이들이 확인되었다. 각 균주들의 정보는 Table 1과 Fig. 1에 보여지고 있다.

세포외분해효소 활성

Proteinase 활성

Proteinase 활성을 검정한 결과, 40개 균주 중 21개 균주에서 활성이 나타났다. 이 중 *Microdochium*, *Monochaetia* 속 등 13개 균주에서 높은 활성을 보였다. *Penicillium scabrosum* NNIBRFG1470, *Sarocladium kiliense* NNIBRFG2180 균주는 protease 활성만 보였다(Table 2).



(Continues)

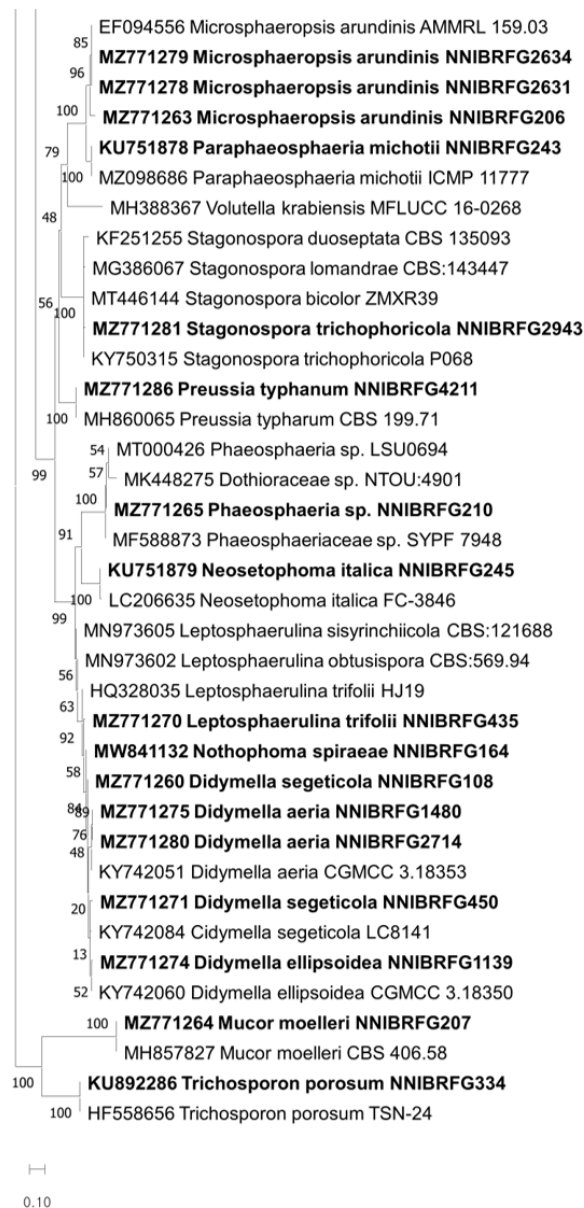


Fig. 1. The phylogenetic tree of the 84 strains using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter=1). The differences in the composition bias among sequences were considered in evolutionary comparisons. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 634 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11.

Amylase 활성

Amylase 활성을 가진 균주는 40개 중 15개 균주였으며, 이 중 *Trichosporon porosum* NNIBRFG334, *Filosporella exilis* NNIBRFG1552 균주에서 높은 활성을 보였다. *T. porosum* NNIBRFG334 균주는 protease, amylase, lipase, cellulase 효소에서 높은 활성을 보였으며 laccase 효소 활성도 보였다(Table 2).

Lipase 활성

Lipase 활성을 보이는 균주는 15개로 7개 균주에서 높은 활성을 보였다. 높은 활성을 보이는 균주들은 protease와 laccase 에서도 높은 활성을 보였다. 그 중에서도 *Monochaetia*와 *Microdochium* 속 균주들의 효소 활성이 높았다(Table 2).

Table 2. Extraenzyme activity of fungal strains.

No.	Strain No.	Species	Enzyme activity ^a					
			Protease	Amylase	Lipase	Cellulase	Laccase	Chitinase
1	NNIBRFG36	<i>Colletotrichum godetiae</i>	-	-	-	-	+	-
2	NNIBRFG41	<i>Auanectria penicilliioides</i>	++	+	-	-	+++	-
3	NNIBRFG65	<i>Phomopsis liquidambari</i>	-	-	-	-	++	-
4	NNIBRFG108	<i>Didymella segeticola</i>	+++	-	-	-	+	+
5	NNIBRFG164	<i>Nothophoma spiraeae</i>	-	-	-	-	-	++
6	NNIBRFG202	<i>Discosia rubi</i>	-	-	++	-	++	-
7	NNIBRFG203	<i>Discosia rubi</i>	++	++	+++	+	+	-
8	NNIBRFG206	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	+++	++	++	+	+	-
9	NNIBRFG207	<i>Mucor moelleri</i>	-	++	++	+	++	-
10	NNIBRFG210	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	+++	-	-	-	+	-
11	NNIBRFG243	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	-	-	-	-	++	-
12	NNIBRFG245	<i>Neosetophoma italica</i>	+++	+	-	++	+	-
13	NNIBRFG247	<i>Microdochium paspali</i>	+++	-	++	-	+	+
14	NNIBRFG267	<i>Volutella delonicis</i>	+++	-	-	-	++	-
15	NNIBRFG334	<i>Trichosporon porosum</i>	+++	+++	+++	+++	+	-
16	NNIBRFG339	<i>Margaritispora aquatica</i>	-	++	-	-	+	++
17	NNIBRFG396	<i>Monochaetia dimorphospora</i>	+++	+	+++	-	+++	+++
18	NNIBRFG435	<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	-	-	-	-	+	++
19	NNIBRFG450	<i>Didymella segeticola</i>	-	-	-	-	++	-
20	NNIBRFG813	<i>Lemonniera fraxinea</i>	-	-	+-	-	+	-
21	NNIBRFG814	<i>Tetracladium fraxineum</i>	+	+	+	-	+	-
22	NNIBRFG843	<i>Monochaetia kansensis</i>	+++	++	+++	-	+	-
23	NNIBRFG868	<i>Monochaetia kansensis</i>	+++	-	+++	-	+++	-
24	NNIBRFG1139	<i>Didymella ellipsoidea</i>	-	-	-	-	++	-
25	NNIBRFG1470	<i>Penicillium scabrosum</i>	+	-	-	-	-	-
26	NNIBRFG1480	<i>Didymella aerea</i>	-	++	-	-	++	-
27	NNIBRFG1552	<i>Filosporella exilis</i>	-	+++	+-	-	++	-
28	NNIBRFG1555	<i>Filosporella fistucella</i>	+++	-	-	-	++	-
29	NNIBRFG2631	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	-	-	-	-	+	-
30	NNIBRFG2634	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	-	-	-	-	+	++
31	NNIBRFG2714	<i>Didymella aerea</i>	++	++	-	-	+	-
32	NNIBRFG2943	<i>Stagonospora trichophoricola</i>	-	+	-	-	+++	-
33	NNIBRFG3280	<i>Sarocladium kiliense</i>	++	-	-	-	-	-
34	NNIBRFG3775	<i>Monochaetia kansensis</i>	+++	-	++	-	+++	++
35	NNIBRFG4092	<i>Sarocladium strictum</i>	-	-	-	-	+++	-
36	NNIBRFG4126	<i>Phialemoniopsis pluriloculosa</i>	++	-	-	-	+++	-
37	NNIBRFG4173	<i>Paramyrothecium viridisporum</i>	-	-	-	-	+++	-
38	NNIBRFG4211	<i>Preussia typharum</i>	-	-	-	-	++	-
39	NNIBRFG4454	<i>Microdochium lycopodium</i>	++	-	+++	-	+	-
40	NNIBRFG4843	<i>Microdochium paspali</i>	+++	++	+++	-	+	-

a -: no activity; +-: 0<clear zone<1; +: 1<clear zone<4; ++: 4<clear zone<6; +++: 6< clear zone.

Cellulase 활성

Cellulase 활성은 *Discosia rubi* NNIBRFG203, *Paraconiothyrium* sp. NNIBRFG206, *Mucor moelleri* NNIBRFG207, *Neosetophoma italica* NNIBRFG245, *Trichosporon porosum* NNIBRFG334 5개 균주에서 나타났으며, 그 중 NNIBRFG334 균주에서 높은 활성을 보였다(Table 2).

Laccase 활성

Laccase 활성을 검정한 결과, 40개 균주 중 37개 균주에서 활성이 나타났다. 이 중 *Auanectria penicilloides* NNIBRFG41, *Monochaetia dimorphospora* NNIBRFG396, *M. kansensis* NNIBRFG868, *Monochaetia* sp. NNIBRFG3775, *Stagonospora trichophorica* NNIBRFG2943, *Sarocladium strictum* NNIBRFG4092, *Phialemoniopsis pluriloculosa* NNIBRFG4126, *Paramyrothecium viridisporum* NNIBRFG4173의 8개 균주에서 높은 활성을 보였다(Table 2).

Chitinase 활성

Chitinase 활성을 검정한 결과, 40개 균주 중 *Didymella segeticola* NNIBRFG108, *Nothophoma spiraeae* NNIBRFG164, *Microdochium paspali* NNIBRFG247, *Margaritispora aquatica* NNIBRFG339, *Monochaetia dimorphospora* NNIBRFG396, *Monochaetia* sp. NNIBRFG3775, *Leptosphaerulina trifolii* NNIBRFG435, *Microsphaeropsis arundinis* NNIBRFG2634의 8개 균주에서 활성을 보였으며, NNIBRFG396 균주의 활성이 가장 높았다(Table 2).

고찰

담수환경에서 분리된 곰팡이 중 수생균류(aquatic hyphomycetes)로 알려진 곰팡이들은 대부분 부식된 목재나 식물잎에서 서식하면서 다양한 세포외분해효소를 생성하여 목재 등을 이루고 있는 지질, 당, 펩타이드, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등을 분해하여 양분을 얻는다. 목재는 20-30%의 리그닌으로 구성되어 있어 이에 서식하는 곰팡이는 리그닌, 셀룰로오스 등을 분해할 수 효소 활성을 가진다[11]. 본 연구에서도 담수환경에서 분리된 균주 40개 중 37개에서 laccase 활성을 보이는 것을 확인하였다. 담수환경에 서식하는 곰팡이들은 lignocellulytic 효소(laccase, cellulase 등)를 생성하여 식물체 유기물을 분해하여 생태계 순환하도록 하는 역할을 한다.

Colletotrichum, *Phomopsis*, *Didymella* 속 등은 다양한 기주식물에 기생 또는 부생하여 병을 일으키는 병원균 또는 식물내생균으로도 알려져 있다. 이들 곰팡이는 amylase, pectinase 또는 laccase 등을 생성하여 식물의 방어시스템을 억제시키거나 살균제를 무독화시키는 등 식물에 침투가 용이할 수 있게 한다. 이러한 작용은 곰팡이가 환경에 적응하여 식물 유기물을 분해하는데 최적의 조건을 만들어준다[24].

플라스틱 오염 문제가 대두됨에 따라 미생물을 활용하여 난분해성 물질의 생분해 관련 연구가 이루어지고 있다. 곰팡이가 생성하는 laccase 같은 산화효소를 이용한 비스페놀A를 분해하는 것이 보고되어 있으며, 다양한 세포외분해효소 활성을 이용한 플라스틱 분해에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[25,26].

본 논문에서 연구에 사용한 균주들은 최근 보고되었거나 국내에 잘 알려지지 않은 미기록종으로 많은 연구가 이루어지지 않은 실정이다. 세포외분해효소에 대한 정보는 다양한 연구분야의

기초자료로서 활용 가능하므로 본 연구를 통해 확보된 담수에서 분리된 곰팡이들의 세포외분해 효소 활성에 대한 기초자료는 향후 다른 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out with support from Nakdonggang National Institute of Biological Resources grant (project no. NNIBR202301106, NNIBR202303107) funded by the Ministry of Environment (MOE), South Korea.

적요

본 연구는 담수 환경에서 분리한 곰팡이의 특성을 알아보기 위해 효소 활성을 평가하였다. 40개의 곰팡이들은 다양한 담수 시료로부터 분리되었으며, 계통분석을 통해 동정하였다. 실험에 사용된 균주들은 최근에 국내에 보고되었거나, 아직 보고되지 않은 종으로서 이에 대한 특성 정보가 거의 알려지지 않았다. 본 연구에서는 40개 균주를 대상으로 protease, amylase, lipase, cellulase, laccase, chitinase의 효소에 대해서 활성을 검정하였다. 대부분의 균주가 laccase 활성을 보였으며, protease, amylase 순으로 높게 나타났다. 담수 환경에서의 효소 활성 정보는 이들의 생태적 역할을 이해하고 산업적으로 활용하는데 기여할 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. El-Gendi H, Saleh AK, Badoerah R, Redwan EM, El-Maradny YA, El-Fakharany EM. A comprehensive insight into fungal enzyme: structure, classification, and their role in Mankind's challenges. *J of Fungi* 2022;8:23. DOI:10.3390/jof8010023.
2. Akhtaruzzaman A, Mozumder NHM, Ripa J, Rahman A, Tanjina RT. Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agric Sci Res J* 2012;2:434-40.
3. Garwal DA, Patidar P, Banerjee T, Patil S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem* 2004;39:977-81.
4. Devi MK, Banu AR, Gnanaprabhal GR, Pradeep BV, Palaniswamy M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents *Ind J Sci Technol* 2008;1:1-6. DOI:10.17485/ijst/2008/v1i7.8.
5. Carrasco M, Villarreal P, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiol* 2016;16:21. DOI:10.1186/s12866-016-0640-8.
6. Kasana RC, Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J Basic*

- Microbiol 2011;51:572-9.
7. Lewis GE, Hunt CW, Sanchez WK, Treacher R, Pritchard GT, Feng P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J Animal Sci* 1996;74:3020-8.
 8. Senthil Raja K, Vasanthi NS, Saravanan D, Ramachandran T. Use of bacterial lipase for scouring of cotton fabrics. *Indian J Fibre* 2012;37:299-302.
 9. Kim SJ, Kim MY, Koo BS, Yoon SH, Yeo YS, Park IC, Kim YJ, Lee JW, Whang KS. Isolation and Phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Korean J Microbiol* 2005;41:293-9.
 10. Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda RC, Narayani T. Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnol Reports* 2019;23:e00344.
 11. Abdel-Raheem AM, Ali EH. Lignocellulolytic enzyme production by aquatic hyphomycetes species isolated from the Nile's delta region. *Mycopathologia* 2004;157:277-86.
 12. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
 13. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 2021. DOI:10.1093/molbev/msab120.
 14. Coll PM, Fernández-Abalos JM, Villanueva JR, Santamaría R, Pérez P. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT2971). *Appl and Environ Microbiol* 1993;59:2607-13.
 15. Agrawal T, Kotasthane A. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. *SpringerPlus* 2012;1:73. DOI:10.1186/2193-1801-1-73.
 16. Mun HY, Goh J, Oh Y, Chung N. New records of three aquatic fungi isolated from freshwater in Samcheok and Yeongju, Korea. *Kor J Mycol* 2016;46:247-51.
 17. Mun HY, Oh Y, Goh J, Chung N. First report of three *Filospora* species isolated from freshwater ecosystem in Korea. *Kor J Mycol* 2019;47:165-72.
 18. Crous PW, Osieck ER, Shivas RG, Tan YP, Bishop-Hurley SL, Esteve-Raventós F, Larsson E, Luangsa-ard JJ, Pancorbo F, Balashov S, et al. Fungal planet description sheets:1522. *Persoonia* 2023;50:250-1.
 19. Goh J, Jeon YJ, Mun HY. New records of the psychrophilic *Tetracladium* species isolated from freshwater environment in Korea. *Diversity* 2022;14:789. DOI:10.3390/d14100789.
 20. Goh J, Mun HY, Park YH, Park S, Jeon YJ, Chung N. First report of six unrecorded Sordariomycetes fungi isolated from plant litter in freshwater environment of Korea. *Kor J Mycol* 2020;48:103-16.
 21. Mun HY, Goh J, Oh Y, Chung N. First report of three *Didymella* species isolated from freshwater ecosystem in Korea. *Kor J Mycol* 2018;46:1-8.
 22. Goh J, Mun HY, Oh Y. Seven previously unrecorded fungal species isolated from freshwater ecosystems in Korea. *Kor J Mycol* 2021;49:183-97.
 23. Nguyen TTT, Jeon YJ, Mun HY, Goh J, Chung N, Lee HB. Isolation and characterization of four unrecorded *Mucor* species in Korea. *Mycobiology* 2020;48:29-36.
 24. Goh J, Mun HY, Oh Y, Chung N. Four species of Mongtagnulaceae unrecorded in Korea and isolated from plant litter in freshwater. *Kor J Mycol* 2016;44:263-70.

25. Mun HY, Jeon YJ, Goh J. New record of three *Penicillium* species isolated from the freshwater environment in Korea. Kor J Mycol 2020;48:491-8.
26. Jeon YJ, Goh J, Mun HY. Diversity of fungi in brackish water in Korea. Kor J Mycol 2020;48:457-73.