

擔子菌이 生産하는 酵素에 關한 研究

第二報 Cellulase 및 Xylanase의 性質

洪 載 植 · 權 涌 周

全北大學校 農科大學 食品加工學科

(1981년 12월 28일 수리)

Studies on the Enzymes Produced by *Basidiomycetes*

Part II. Properties of Cellulase and Xylanase

Jai-Sik Hong and Yong-Ju Kwon

Department of Food Science and Technology

College of Agriculture, Jeonbug National University, Jeon Ju, Korea

Abstract

Some properties of cellulase and xylanase produced from *Pleurotus ostreatus* 301 and *Lentinus edodes* 3-1 during its growth in rice straw medium were investigated. The cellulase activities of *P. ostreatus* 301 and *L. edodes* 3-1 were increased in proportion to substrate concentration within 0.6% and 0.8%, respectively, and xylanase activities of two strains were increased within 1%. The reducing sugar production of cellulase and xylanase in two strains were proportionally increased until 30 min. and 60 min., respectively. The optimum pH for cellulase activities of *P. ostreatus* 301 and *L. edodes* 3-1 were pH 4.0 and pH 4.5, respectively, and xylanase activities of two strains were pH 5.0. The stable pH range for cellulase activities of *P. ostreatus* 301 was within 4.0 to 6.0 and *L. edodes* 3-1 was within 3.0 to 5.0. Xylanase activities of *P. ostreatus* 301 was within 4.5 to 6.0 and *L. edodes* 3-1 was within 3.5 to 6.0. The optimum temperature for cellulase activities of *P. ostreatus* 301 and *L. edodes* 3-1 were 40°C and 50°C, respectively, but xylanase activities of *P. ostreatus* 301 and *L. edodes* 3-1 were 50°C and 45°C, respectively. Thermal stability of enzymes were below of optimum temperature and these were mostly inactivated at 70°C for 10 min. of the metallic ions tested, cellulase activities of *L. edodes* 3-1 was increased by Co^{++} , Mg^{++} at the concentration of 10^{-2}M , but were greatly inhibited by Hg^{++} , Cu^{++} in two strains. Xylanase activities were increased by Ca^{++} , Co^{++} , Mg^{++} and Cd^{++} but was greatly inhibited by Hg^{++} .

緒 論

高等植物의 主成分을 이루고 있는 纖維素는 hemicellulose, xylan, pectin 등과 같이 植物 細胞膜의 主要成分을 이루고 있으며 자연계에 널리 분포하고 있고 그 構造가 견고하여 化學的인 分解나 微生物에 의한 分解 혹은 消化가 어려우며 특히 酵素作用에 의해서 分解가 잘안되는 lignin이 結合되어 있어 纖維素 分解酵素가 基質인 纖維素와 접촉하기 어렵게 構成되어 있다. 그러나 食品이나 飼料의 효율적인 消化 흡수를 돕기 위한 醱酵飼料化 및 食品加工分野에 利用하기 위해서는 그중에 포함된 纖維素를 可消化 또는 崩壞 除去하는 것이 이상적이다. 이러한 纖維素를 分解하는 酵素에 대하여는 많은 研究들이 있으며 酵素生産에 대해서 苦澤¹⁾ 등의 *Trichoderma koningi*에 의한 木材纖維의 分解에 대한 研究, *Asp niger*에 대해 King²⁾ 등과 Iwasaki³⁾, *Myriococcum albomyces*에 관해 鄭⁴⁾, *Papulaspora thermophila*에 대한 Chapman 등⁵⁾의 研究를 비롯하여 李⁷⁾ 등은 한국산 *Aspergillus*의 纖維素 分解活性을 比較하였고 *Thermophilic* 및 *Thermotolerant fungi*의 Cellulose 및 Lignocellulose 分解에 관해 Rosenbery⁸⁾, *Talaromyces emersonii*에 대한 Oso⁹⁾의 研究등이 있으며 川合^{10,11)}등은 擔子菌類間의 酵素生産 比較와 分布에 대하여 報告한 바 있다. 또한 이들 纖維素 分解酵素의 性質에 대해서 *Asp.saitoi*에 대한 松材 등^{12,13,14,15)}의 研究를 비롯하여 *Chaetomium globosum*,^{16,17,18)} *Asp. niger*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus japonicus*의 酵素活性의 比較,^{19,20,21)} *Poronia punctata*²²⁾, *Rhizopus niveus*²³⁾에 대한 研究등이 있다. 한편 xylanase에 대해서 高橋^{24,25,26)} 등은 *Bacillus subtilis* G-2의 培養條件과 酵素化學的 性質, *Streptomyces* 속에 대한 日下²⁷⁾ 등의 研究, *Trichoderma viride*에 관한 乃材²⁸⁾과 Toda²⁹⁾ 등의 研究와 竹西³⁰⁾ 등은 *Penicillium janthinellum* biourage가 生産하는 xylanase의 精製와 性質, *Myriococcum albomyces*에 대해 김³¹⁾ 등의 研究가 있으며 김³²⁾ 등은 酵素基質로서 纖維醇의 性質에 대하여 報告하였다. 著者는 農産廢棄物을 擔子菌類를 利用하여 酵素처리에 의한 직접 飼料로서 혹은 廢棄物 自體나 그 分解物에 培養하여 醱酵飼料로의 利用에 必要한 基礎資料로 삼고

저 前報의 酵素生産條件에 이어서 이들 酵素의 性質을 調査하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試 菌株

本 實驗室에서 保管하고 있는 *Pleurotus ostreatus* 301과 *Lentinus edodes* 3-1을 供試菌株로 使用하였다.

培地 및 培養方法

벗짚培地에 米糖 30%, CaCO₃ 5%, CaSO₄ 2%를 添加한 다음 前報³³⁾와 같은 方法으로 25°C에서 30日間 培養하였다.

酵素液의 調製

培養이 끝난 培養物에 同量의 蒸溜水를 가하여 waring blender로 3분간 磨碎하고 toluene을 가하여 냉장고에서 하루밤 방치후 濾過하고 遠心分離 (6,000rpm, 20 min. KUBOTA KR 1200 B)하여 上澄液에 (NH₄)₂SO₄를 0.2 飽和度되게 가하여 生成된 沈澱物을 버리고 0.8 飽和度에서 生成된 沈澱物을 소량의 蒸溜水에 녹여 sephadex G-25 column을 통하여 (NH₄)₂SO₄를 제거하고 이 용액을 粗酵素液으로 하였다.

酵素의 活性度 測定

- 1) Cellulase 糖化活性 : 前報와 같은 方法으로 60分間 反應시켜 測定했다.³³⁾
- 2) Xylanase : 前報와 같은 方法으로 測定했다.^{31,33)}

結果 및 考察

基質濃도에 따른 酵素活性의 影響

酵素의 濃度를 고정하고 反應液의 CMC 및 xylan 濃度를 0.1~2.0%로 하여 反應시켜 酵素液 1ml로 生成된 還元糖을 表示한 結果는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1과 같이 基質의 濃도가 높아질수록 還元糖이 增加되었으나 *P. ostreatus* 301의 cellulase는 0.6%, *L. edodes* 3-1은 0.8% 이상의 濃度에서는 比例的으로 增加하지 않았으며 兩菌株의 xylanase는 1%까지는 比較的 xylose의 增加도 비

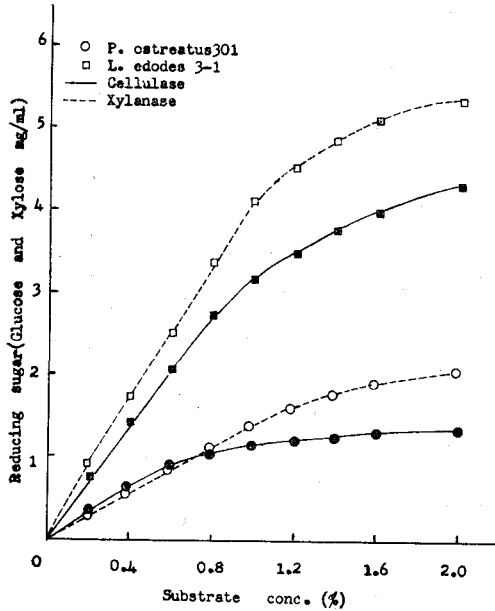


Fig. 1. Relationship between substrate concentration and enzyme activity

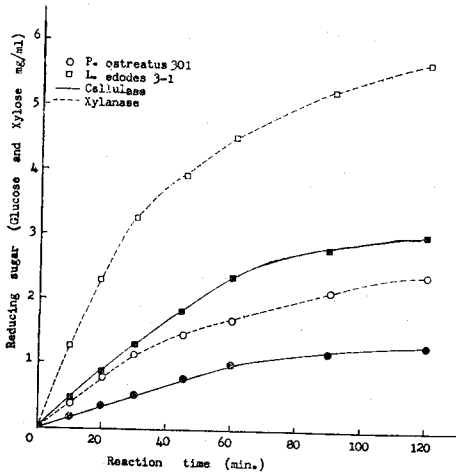


Fig. 2. Relationship between reaction time and enzyme activity

례의이었다. 鄭⁴⁾은 *Myriococcum albomyces*의 cellulase 活性에서 Avicel은 12시간의 作用에서 0.5%, CMC는 10分間 作用에서 3%까지 比例의 으로 增加하였고 李²⁰⁾ 등은 *Asp. niger* SM 6은 CMC 2%, *Trichoderma viride* SM 10은 CMC 3 % 濃度까지 거의 比例의 으로 增加하였다는 報告 와는 基質濃度가 낮은 범위에서 比例의 이었다.

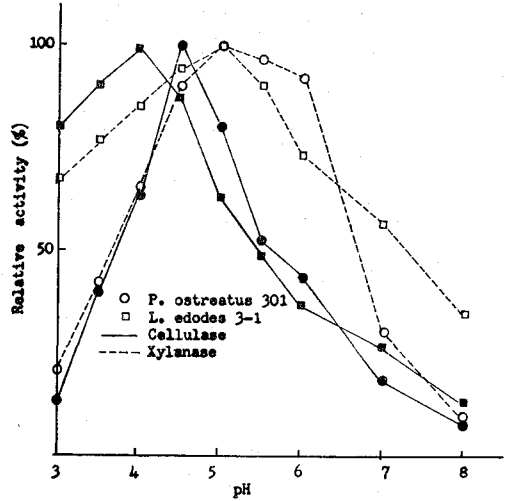


Fig. 3. Effect of pH on the activity of cellulase and xylanase

反應時間의 影響

酵素의 反應時間에 따른 影響을 檢討하기 위하여 反應時間을 10~120分間 經時的으로 反應시킨 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2와 같이 反應時間이 經過함에 따라서 糖의 生成은 漸進的으로 增加되었고 cellulase는 兩菌株에서 60分, xylanase은 30分까지는 比例의인 關係를 나타냈으나 그 이후에는 反應時間의 經過에 따라 生成物의 量이 比例의인 關係를 볼 수 없었다. 李³⁴⁾ 등은 *Irpex lacteus*의 cellulase 活性에서 2시간까지 比例의 이었다고 報告한 바 있는데 이와는 다소 차이가 있었다.

最適活性 pH

pH 3.0~8.0 사이의 각 pH에서 酵素作用을 시켜 그 活性을 調査한 結果 Fig. 3과 같이 cellulase의 最適活性 pH는 *P. ostreatus* 301에서 pH 4.5, *L. edodes* 3-1은 pH 4.0 이었으며 xylanase는 兩菌株가 pH 5.0에서 最適活性을 보였으며 이 범위를 벗어나면 급격히 酵素活性이 弱화되었다. *Trametes sanguinea*³⁵⁾의 hydrocellulose 比濁法 活性의 最適 pH는 pH 4.0, *Irpex lacteus*³⁶⁾의 CMCase는 pH 3.7이었으며 *Asp. saitoi*¹²⁾는 枳壳 cellulose 분말에서 pH 3.0, CMC-Na은 pH 4.0, salicin은 pH 5.0로 각기 基質에 따라 달랐다고 報告했으며 xylanase는 *Myriococcum albomyces*³¹⁾에서 pH 5.0, *T. viride*²⁹⁾는 pH 5.5~6.0 부근이

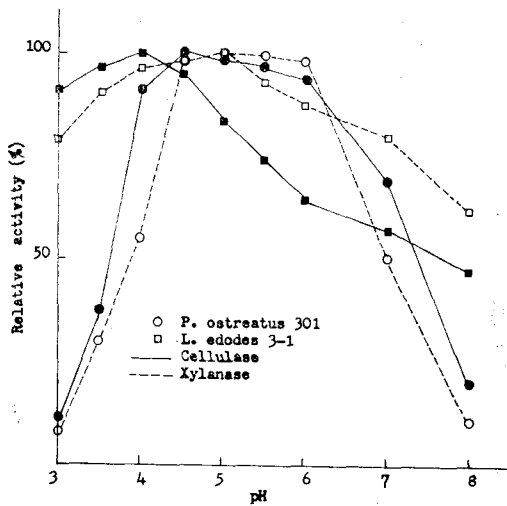


Fig. 4. Effect of pH on the stability of cellulase and xylanase

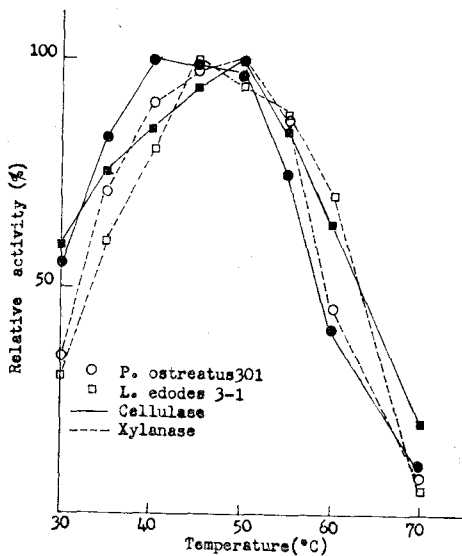


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of cellulase and xylanase

最適 pH 였다는 報告와는 差異가 있었다. 本實驗에서는 cellulase가 xylanase 보다 酸性側이었으며 酵素生産의 最適 pH가 *P. ostreatus* 301의 cellulase와 xylanase가 각각 pH 5.0, pH 6.0이며 *L. edodes* 3-1의 cellulase와 xylanase가 각각 pH 6.0, 이었던 것과 活性 pH는 一致하지 않았다.

pH와 安定性

酵素液을 각 pH의 緩衝液과 混化하여 소정의 pH로 한다음 30°C에서 120分間 방치한후 다시 緩衝液으로 pH를 再調整하여 殘存한 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서와 같이 cellulase의 경우 *P. ostreatus* 301이 pH 4.0~6.0, *L. edodes* 3-1은 pH 3.0~5.0의 範圍에서, xylanase의 경우 *P. ostreatus* 301은 pH 4.5~6.0, *L. edodes* 3-1은 pH 3.5~6.0의 範圍에서 比較的 安定하였다. 菌株間的 差異는 *P. ostreatus* 301은 pH 安定範圍를 벗어나면 급격히 失活되었으나 *L. edodes* 3-1은 比較的 서서히 失活되었다. *Flammulina velutipes*³⁷⁾의 cellulase의 pH 安定範圍는 pH 5.0~7.0, *Asp.saitoi*¹²⁾는 pH 3.0~6.0, *T. viride*¹⁹⁾는 pH 3.0~6.0, *Trametes sanguina*¹⁶⁾는 pH 3.0~9.0 이었으며 xylanase의 pH 安定範圍도 *streptomyces* 속에서 pH 5.0~7.5²⁷⁾, *Myriococcum albomyces*에서 pH 4.0~7.0³¹⁾ *Penicillium janthinellum biourage*²⁰⁾의 xylanase I, II, III은 각각 pH 5.0~8.0, pH 4.0~9.0, pH 5.0~9.0이라 報告한 바 있어 本實驗에 있어서의 pH 安定範圍가 이들 酵素에 비하여 다소 좁은 것 같다.

作用溫度와 活性

30°C에서 70°C까지 각 溫度에서 粗酵素를 作用시킨 후 生成된 還元糖을 定量하여 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 *P. ostreatus* 301의 cellulase는 40°C, *L. edodes* 3-1의 xylanase는 45°C에서 最高의 酵素活性을 보였고 *P. ostreatus* 301의 xylanase와 *L. edodes* 3-1의 cellulase는 50°C이었으며 그 이하와 이상의 溫度에서는 酵素活性이 급격히 감소하였다. *Flammulina velutipes*³⁷⁾의 cellulase는 50°C, *Trametes sanguina*²⁵⁾의 酵素는 60°C, *Myriococcum albomyces*⁴⁾의 CMC 糖化活性은 65°C이었고 *Asp. saitoi*¹²⁾의 cellulase는 基質에 따라 다른 溫度를 보여 CMC-Na는 45°C, 팽윤 cellulose 분말을 50°C, salicin은 60°C이었다고 報告했으며 xylanase는 *Asp. niger*²⁸⁾에서 60°C, *Myriococcum albomyces* 50~55°C, *Streptomyces* 속 酵素는 55~60°C이었다²⁷⁾는 報告보다 낮은 溫度이었고 本兩擔子菌의 cellulase의 最高生産溫度는 30°C xylanase는 25°C³³⁾인 것으로 미루어 보아 酵素生産과 活性의 適溫은 서로 달랐다.

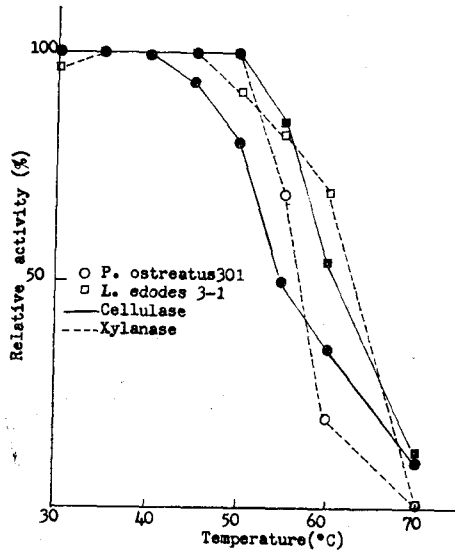


Fig. 6. Effect of temperature on the stability of cellulase and xylanase

熱安定性

酵素液을 30~70°C의 각 온도에서 10분간 放置한 후 殘存 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 *P. ostreatus* 301의 cellulase는 40°C, *L. edodes* 3-1의 xylanase는 45°C, *P. ostreatus* 301의 xylanase와 *L. edodes* 3-1의 cellulase는 50°C 이하에서는 安定했으나 그 이상의 온도에서는 酵素活性이 甚한 失活을 보였고 xylanase는 70°C, 10분에 完全히 失活되었다.

*Flammulina velutipes*¹⁷⁾의 cellulase는 50°C 이하에서는 安定했으나 70°C, 10분에는 完全히 失活되었다 하였고, *Asp. saitoi*¹²⁾에서도 70°C, 10분에 完全히 失活되었다는 報告와는 유사하였으나 *Chaetomium globosum*¹⁶⁾의 CMC 糖化活性은 70°C, 30분에 完全히 失活되었으며 李²⁴⁾ 등은 *T. viride*의 酵素活性이 70°C에서 90분후에야 10% 이하로 감소하였다는 報告와는 차이가 있었다. Xylanase의 경우 *streptomyces* 속 酵素는 70°C, 30분 처리의 경우 90% 이상 失活되었다 하였고²⁷⁾ *Myriococcum albomyces*²¹⁾의 xylanase는 65°C에서 65분간은 安定하나 그후 급격히 저하되었다는 報告와는 상당히 차이가 있었다.

酵素作用에 미치는 鹽類의 影響

酵素反應에 각 鹽類의 최종 濃度를 10⁻²M 되게 하여 酵素의 活性을 測定한 結果는 Table 1과 같이 각 鹽類의 酵素活性에 대한 效果는 菌株, 酵素에 따라 차이가 있었으나 cellulase는 *L. edodes* 3-1의 경우 Co⁺⁺, Mg⁺⁺에서 약간 增加되었을 뿐 Ca⁺⁺, K⁺, Ba⁺⁺, Na⁺은 酵素活性에 약간 阻害되었고 Hg⁺⁺, Cu⁺⁺은 甚한 阻害를 보였다. 반면 xylanase는 Ca⁺⁺, Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Cd⁺⁺ 등은 약간의 增加를 보였으나 Mg⁺⁺은 阻害가 甚했다. *Flammulina velutipes*³⁷⁾의 CMC糖化活性은 Cd⁺⁺, Co⁺⁺, Hg⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Ag⁺ 등은 阻害가 甚했고 Mg⁺⁺, Ba⁺⁺, Na⁺에 의해서는 阻害가 없었다

Table 1. Effect of salts on enzymes activity.

Salts	<i>Pleurotus ostreatus</i> 301		<i>Lentinus edodes</i> 3-1	
	Cellulase	Xylanase	Cellulase	Xylanase
None	100	100	100	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96	102	98	110
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	84	105	104	118
KCl	90	99	99	105
MgSO ₄ ·7H ₂ O	98	100	106	109
FeSO ₄ ·7H ₂ O	79	105	96	99
HgCl ₂	29	59	40	46
AgNO ₃	85	103	84	106
CuSO ₄ ·5H ₂ O	57	93	78	100
BaCl ₂	91	98	96	105
CdSO ₄	68	101	94	109
NaCl	92	99	90	105

고 했으며 *Myriococcum albomyces*⁴⁾는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺의 10⁻³M 濃度에서 CMC糖化活性을 復活시키나 Hg⁺⁺, Ag⁺, Cu⁺⁺는 阻害가 심했고 *Asp. saitoi*¹⁵⁾는 Co⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺에 의해서 심한 阻害작용을 받았으며 xylanase는 *Bacillus subtilis* G-2²⁶⁾의 경우 Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻에 의해서 酵素活性이 增加되었다고 報告한 바 있으나 本實驗과는 상당한 차이가 있었다.

抄 錄

Pleurotus ostreatus 301과 *Lentinus edodes* 3-1을 벗짚培地에 培養하여 培養中에 生成된 cellulase와 xylanase의 性質을 檢討한 結果 *P. ostreatus* 301의 cellulase 活性은 基質濃度 0.6%, *L. edodes* 3-1은 0.8%, xylanase는 兩菌株에서 1%까지는 比例的으로 增加하였다. 反應時間에 따른 還元糖의 生成은 兩菌株에서 cellulase는 60分, xylanase는 30分까지 比例的으로 增加하였다. 最適 pH는 cellulase에서 *P. ostreatus* 301은 pH 4.0, *L. edodes* 3-1은 pH 4.5이었으며 xylanase는 兩菌株가 pH 5.0이었다. pH 安定範圍는 *P. ostreatus* 301의 cellulase에서 pH 4.0~6.0, *L. edodes* 3-1은 pH 3.0~5.0이었고 xylanase는 *P. ostreatus* 301에서 pH 4.5~6.0, *L. edodes* 3-1에서는 pH 3.5~6.0이었다. 最適溫度는 *P. ostreatus* 301의 cellulase에서 40°C, *L. edodes* 3-1의 xylanase는 45°C 이었고 *L. edodes* 3-1의 cellulase와 *P. ostreatus* 301의 xylanase는 50°C 이었으며 熱安定性은 最適溫度 이하이었고 70°C, 10分으로 대부분 失活되었다. 鹽類의 影響은 *L. edodes* 3-1의 cellulase는 Co⁺⁺, Mg⁺⁺에 의해서 酵素力이 增加되었으며 Mg⁺⁺, Cu⁺⁺에 의해서는 兩菌株에서 심한 阻害를 보였고 xylanase는 Ca⁺⁺, Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Cd⁺⁺ 등은 약간 增加를 보였고 Hg⁺⁺은 阻害가 심했다.

參 考 文 獻

1. 若澤正, 丹羽富造, 一文淑炯次, 田中長雄: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 40 (1963)
2. King, K.W., Smibert, R.M.: Appl. Microbiology, 11 : 315 (1963)
3. Iwasaki, Y.: J. Ferm. Tech, 42 : 469 (1964)
4. 鄭東孝: 韓國農化學會誌, 14 : 59 (1971)
5. Chapman, E.S., Evans, E., Jacobelli, M.C.

- and Logan, A.A.: Mycologia, 67 : 609 (1975)
6. 襄武, 金炳弘, 李啓準: 産業微生物學會誌, 41 : 105 (1976)
7. 李永祿, 朴龍根: 微生物학회지, 15 : 113 (1977)
8. Rosenberg, S.L.: Mycologia, 70 : 1(1978)
9. Oso, B.A.: Mycologia, 70 : 577 (1978)
10. 川合正允: 日本農藝化學會誌, 47 : 524 (1973)
11. 川合正允: 日本農藝化學會誌, 47 : 633 (1973)
12. 松村親, 前島一孝: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 154 (1963)
13. 松村親, 前島一孝: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 158 (1963)
14. 松村親, 前島一孝: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 164 (1963)
15. 松村親, 前島一孝: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 169 (1963)
16. 鄭東孝: 韓國農化學會誌, 10 : 23 (1968)
17. 渡邊敬: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 238 (1963)
18. 渡邊敬: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 231 (1963)
19. 成洛癸: 韓國農化學會誌, 12 : 99 (1969)
20. 李啓瑚, 高正三, 李康治, 韓國農化學會誌 : 19 : 139 (1976)
21. 松葉豊, 若松靖弘, 岡本昇, 小卷利章: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 47 (1963)
22. Robertson, L.D., Koehn, R.D.: Mycologia, 70 : 113 (1978)
23. 前田英勝, 鈴木英雄: 日本農藝化學會誌, 44 : 547 (1970)
24. 高橋光雄, 橋本揚文助: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 116 (1963)
25. 高橋光雄: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 119 (1963)
26. 高橋光雄, 橋本揚文助: 日本醱酵工學雜誌, 41 : 181 (1963)
27. 日下部功, 安井恒男, 小林遠吉: 日本農藝化學雜誌, 43 : 145 (1969)
28. 乃村和宏, 安井恒男, 清岡繁夫, 小林遠吉: 日本醱酵工學雜誌, 47 : 313 (1969)
29. Toda, S., Suzuki, S. and Nisizawa, K.: Ferment. Technol, 41 : 580 (1970)
30. 竹西繁行, 辻阪好夫, 日本醱酵工學雜誌, 51 : 458 (1973)
31. 김관, 김양희, 정동효: 産業微生物學會誌, 2 : 133 (1974)
32. B. Hong Kim: 産業微生物學會誌, 6 : 192(1978)

33. 洪載植, 金東翰: 韓國農化學會誌, 24: 7 (1981)
34. 李啓瑚, 高正三: 韓國農化學會誌, 18: 117 (1975)
35. 奈良潔, 番野剛, 吉野弘: 日本醱酵工學雜誌, 43: 653 (1965)
36. 尾崎入郎, 西澤一俊, 田崎龍一: 日本醱酵工學雜誌, 42: 415 (1964)
37. 洪載植: 全北大農大論文集, 9: 97 (1978)
38. 李啓瑚, 李炯周: 韓國農化學會誌, 21: 109 (1978)