

*Pleurotus sajor-caju*가 生産하는 酵素에 관한 研究(I)

纖維素 分解 酵素의 生産에 관하여

洪載植 · 嚴泰鵬 · 鄭基泰 · 李康培

全北大學校 農科大學 食品加工學科

Studies on the Enzymes Produced by *Pleurotus sajor-caju*(I)

The Production of Cellulolytic Enzymes

Jae Sik Hong, Tai Boong Uhm, Gi Tae Jung and Kang Bae Lee

Department of Food Science & Technology, College of Agriculture,

Jeonbuk National University, Jeonju 520, Korea

Abstract: The effects of cultural conditions in the rice straw media for cellulolytic enzymes production by *Pleurotus sajor-caju* were investigated. The optimum moisture content, pH and temperature for enzymes production were 60%, 7.0 and 35°C in C₁-cellulase, and 60%, 5.0 and 25°C in C_x-cellulase, and 60%, 7.0 and 20°C in β-glucosidase, respectively. When light was irradiated during the cultivation period, C₁-cellulase and β-glucosidase production were decreased but C_x-cellulase production increased at 500~1,000 lux. During the cultivation period, C₁-cellulase production was contrary to C_x-cellulase and β-glucosidase. Among the various materials added, rice bran was effective to C₁-cellulase production, cotton seed cake and rice bran to C_x-cellulase production, and defatted soybean and fish meal to β-glucosidase production. The optimum concentration of rice bran for enzymes production were 20% in C₁-, C_x-cellulase and 10% in β-glucosidase.

Keywords: *Pleurotus sajor-caju*, Cellulolytic enzymes, C₁-cellulase, C_x-cellulase, β-Glucosidase, Cultural conditions.

高分子有機物質이며 植物細胞膜의 主成分인 纖維素는 自然系에 널리 存在하고 人類에게 가장 널리 풍부한 資源으로서 오래전 부터 燃料, 建築, 工藝, 化學藥品 및 食品등 러여가지 目的으로 利用되어 왔다.

纖維素는 化學적으로 6,000~10,000개 정도의 우수한 glucopyranose가 주로 β-1,4 結合에 의하여 연결되고 약간의 cross linkage로 축합되어 있는데 이를 分解하는 酵素는 β-1,4-glucan을 分解하는 β-1,4 glucan-4-glucanohydrolase 또는 β-1,4-glucanase로 定義되었는데 纖維素는 cellulose china에서 상호간의 結合으로 fibril을 形成하고 fibril은 다시 fiber로 結合되어 있어 結晶性的인 단단한 組織을 이루고 있어 β-1,4-glucanase의 作用만으로 分解가 쉽지 않다.

Mandels과 Reese(1963)은 天然結晶性 cellulose에 C₁-cellulase가 作用하여 linear cellulose로 되고 여기에 C_x-cellulase(β-1,4-glucanase)가 作用하여 cellobiose나 cellotriose가 되고 계속해서 cellobiase(β-glucosidase)가 作用하여 最後에 glucose까지 分解하는 최소한 3種의 酵素가 연속적으로 作用한다고 밝혔다.

擔子菌이 生産하는 纖維素分解酵素에 관해서는 Wakabayasi(1964~1966)등의 半合成培地에서 *Irpex lacteus*가 分泌하는 C₁, C_x-cellulase와 β-glucosidase의 特性에 관한 報告와 Wilson과 Niederpruem(1967)의 *Schizophyllum commune*가 分泌하는 α-galactosidase에 관한 報告가 있으며 *Pleurotus ostreatus*의 子實體形成過程 중의 β-glucosidase와 β-glucosidase에 관하여 研究한

Michalski와 Beneke(1969)의 報告가 있다.

Hong(1975~1981)등은 벗짚 培地에서 느타리, 팽이 표고버섯이 生産하는 cellulase, hemicellulase protease 및 xylanase의 生産條件 및 特性에 관하여 報告한 바 있다.

또한 Rosenberg(1980)는 wood-rotting fungi에서 Reid(1979)는 *Phanerochaete chrysosporium*에서 lignin을 分解하는 酵素에 관하여 報告한 바 있다.

本 研究는 纖維素資源을 飼料, 食品 및 energy 資源으로 利用할 수 있는 基礎資料로 삼고져 *Pleurotus sajor-caju*를 벗짚 培地에서 培養하여 最適酵素 生産條件을 檢討하기 위하여 수분, pH, 溫度, 光, 副原料, 培養期間 등을 달리하여 調查한 結果를 여기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

使用 菌株

전북대학교 농과대학 균이학교실에서 보관하고 있는 *Pleurotus sajor-caju*를 使用菌株로 하였다.

培地의 調製

벗짚을 약 2cm 크기로 잘라 水浸한 다음 米糠濃度 比較實驗區를 제외하고는 米糠을 10%되게 加하고, 水分含量은 水分比較實驗區를 제외하고는 65%되게 調整하였으며, 培地 pH는 pH 比較實驗區를 제외하고는 pH 6.0으로 調整하였고, 副原料別 實驗은 澱粉粕, 棉實粕, 大豆粕, 魚粉을 각각 10%씩 加한 후 500ml容 廣口 培養瓶에 200g씩 넣었으며 光實驗區에 한하여는 直徑 11cm petri dish에 80g씩 넣어 1.2kg/cm² 압력에서 한시간 멸균하였다.

培養 方法

前記 培地에 일정량의 種菌을 培養瓶의 상면 중앙에 接種하여 光實驗區는 10, 100, 500, 1,000lux에서 매일 8시간 조사하면서 培養하였고 이외에 實驗은 25°C 암소에서 22日間 培養하였다.

酵素液의 調製

培養이 끝난 培養物을 乾物로 換算하여 10倍量의 蒸溜水를 加한 후 Waring blender로 磨碎하고 toluene을 加하여 냉장고에서 하루밤 방치한 후 여과하고 遠心分離(6,000rpm/20min)하여 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

酵素的 活性度 測定

C₁-cellulase: 1% Avical solution 2ml에 McIlvaine buffer(pH4.6) 2ml를 L형 시험관에 취하고 40°C water

bath 상에서 5分間 예열하고 粗酵素液을 1ml 加하여 2hrs 反應시킨 후 遊離된 還元糖을 Somogyi Nelson法에 의하여 比色定量하고 粗酵素液 1ml가 生成한 還元糖을 glucose로 환산하여 活性의 比較單位로 하였다. (Rosenberg: 1980)

C_x-cellulase: 0.5% Na-CMC Solution을 基質로 하여 C₁-cellulase 活性測定方法과 同一하게 測定하였다 (Kim & Kim: 1982)

β-glucosidase: 0.1% salicin solution을 基質로 하여 C₁-cellulase 活性測定方法과 同一하게 測定하였다. (Lee & Park: 1977)

結果 및 考察

培地 水分 含量의 影響

벗짚培地의 水分含量이 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 培地의 水分含量을 55~75% 되게 調

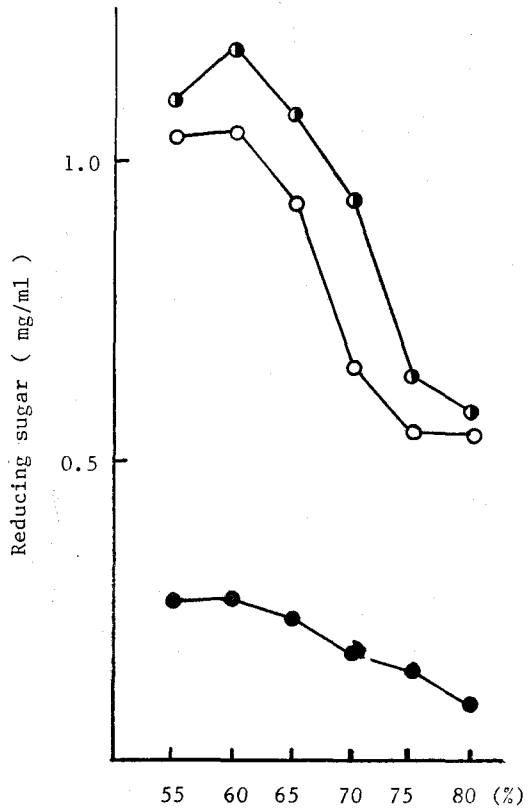


Fig. 1. Effect of moisture content to rice straw media on the enzymes production.

●—● C₁-cellulase ◐—◐ C_x-cellulase
○—○ β-glucosidase

整하여 一定時間 培養한 다음 酵素 生産力을 檢討한 結果는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1과 같이 C₁, C_x-cellulase 및 β-glucosidase 모두가 60%의 水分에서 菌絲生育과 酵素生産力이 제일 良好하였고 이보다 水分含量이 增加할수록 C_x-cellulase와 β-glucosidase는 급격히 減少하였으나 C₁-cellulase는 서서히 減少하였는데 이는 Hong과 Kim(1981)의 *Pleurotus ostreatus*와 *Lentinus edodes* 實驗에서 水分含量이 적을수록 酵素生産이 減少하였고 75%에서 제일 良好하였다는 報告와는 큰 差異가 있었다.

培地 pH의 影響

벗짚培地의 pH가 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 培地의 pH를 4.0~8.0으로 調整한 다음 一定時間 培養하여 酵素生産力을 檢討한 結果는 Fig. 2과 같다.

Fig. 2과 같이 C₁-cellulase는 pH4.0~6.0까지는 큰 變化가 없으나 그 이후부터 상승하여 pH7.0에서 酵素生産이 제일 良好하였다.

C_x-cellulase는 pH5.0~6.0에서 酵素生産이 제일 良好하였으나 이 범위를 벗어나면 점진적으로 減少하는 경향을 보였으며 β-glucosidase는 pH가 높아짐에 따라 점진적으로 상승하다가 pH7.0에서 最高値를 보였다.

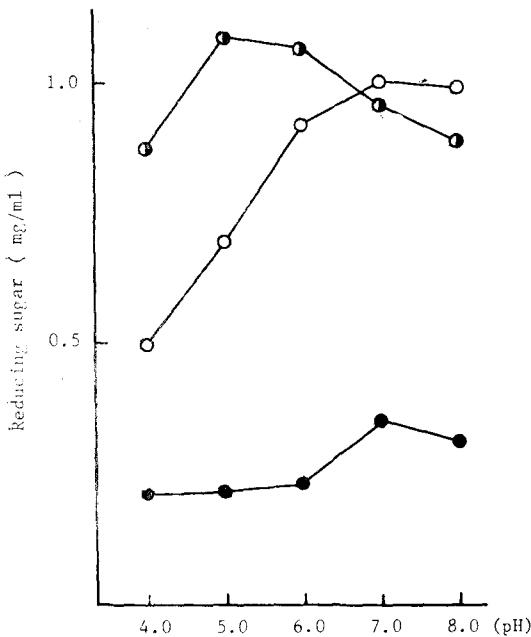


Fig. 2. Effect of initial pH to rice straw media on the enzymes production.
 ●—● C₁-cellulase ○—○ C_x-cellulase
 ○—○ β-glucosidase

그리고 菌絲生育은 培地의 pH 4.0~6.0에서 제일 良好하였다. 이는 Vilela(1977)등의 *Trichoderma viride*에서 C_x-cellulase生産의 最適 pH 3.0~4.0보다는 월등히 높았으나 Lee(1976)등의 *Aspergillus niger*實驗에서 CM case 生産最適 pH5.0과 本實驗의 C_x-cellulase와는 類似하였다.

培養 溫度의 影響

培養溫度가 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 20~40°C에서 培養하여 酵素生産力을 檢討한 結果는 Fig. 3.과 같다.

Fig. 3과 같이 C₁-cellulase는 溫度의 增加에 따라 酵素生産이 增加하여 35°C에서 제일 양호하였으나 그 以上の 溫度에서는 菌絲生育이 부진함을 알 수 있었다. C_x-cellulase는 25°C에서 가장 良好하였고 溫度가 增加함에 따라 酵素生産이 현저하게 減少되었다.

그리고 菌絲生育의 最適溫度는 25~30°C였다. 이는 Hong과 Kim(1981)의 벗짚培地를 利用한 *Pleurotus ostreatus*實驗에서 cellulase生産力이 30°C에서 제일 良

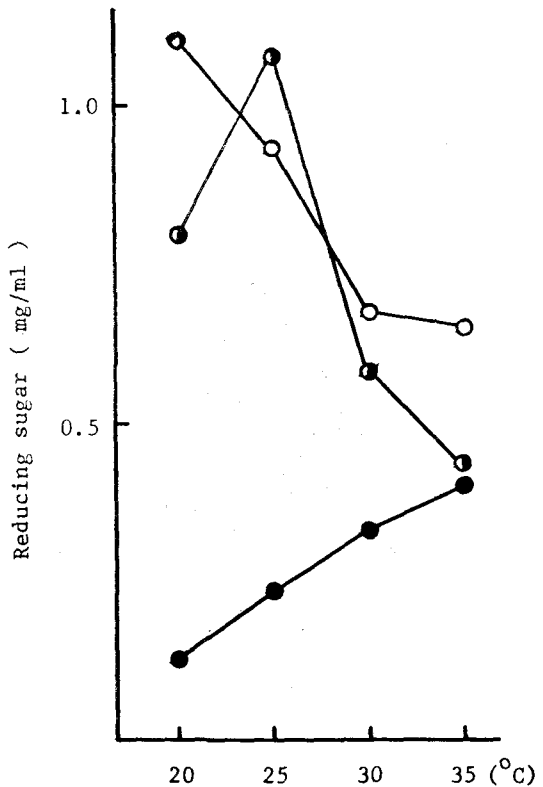


Fig. 3. Effect of cultural temperature on the enzymes production.
 ●—● C₁-cellulase ○—○ C_x-cellulase
 ○—○ β-glucosidase

好하다는 報告보다는 다소 낮았다.

β -glucosidase는 20°C에서 가장 良好하였지만 菌사생육은 20°C 이하 에서는 아주 부진하였고 C_x -cellulase와 마찬가지로 溫度가 增加함에 따라 酵素生産이 減少되었다.

光照射의 影響

光照射가 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 10, 100, 500, 1,000 lux에서 매일 8時間 照射하여 11日間 培養하여 酵素生産力을 檢討한 結果는 Fig. 4과 같다.

Fig. 4와 같이 C_1 -cellulase와 β -glucosidase는 暗黑에서 培養하였을 때가 酵素生産이 제일 良好하였으나 光의 照度가 增加할수록 점진적으로 減少하다가 500lux 이상에서는 큰 變化가 없었다.

C_x -cellulase는 10, 100 lux에서 酵素生産力이 暗黑區와 큰 차이가 없었으나 500, 1,000lux에서는 오히려 급격한 增加 추세를 보이었는데 여기에 대하여는 앞으로 더 많은 研究가 必要하다고 본다.

培養期間의 影響

培養期間이 酵素生産에 미치는 影響을 알기 위하여 25°C에서 10~31日間 培養하여 酵素生産力을 檢討한

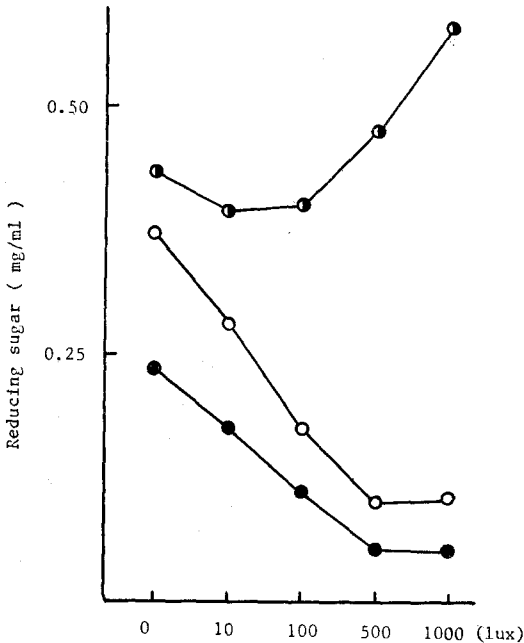


Fig. 4. Effect of light intensity on the enzymes production.

●—● C_1 -cellulase ○—○ β -glucosidase
 ●—● C_x -cellulase

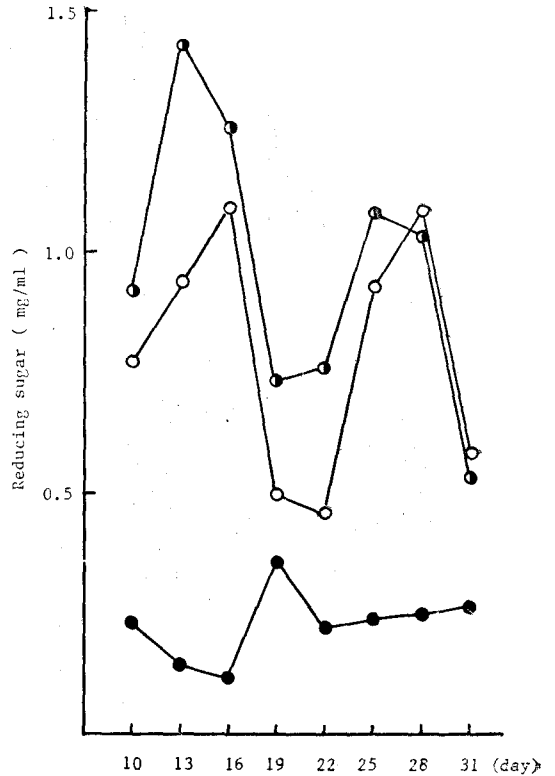


Fig. 5. Effect of cultural period on the enzymes production.

●—● C_1 -cellulase ○—○ β -glucosidase
 ●—● C_x -cellulase

結果는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5와 같이 C_1 -cellulase는 배양초기 보다는 培養期間이 經過됨에 따라서 酵素生産力이 減少하다가 培養 19일에 最高值를 나타내었으며 그 이후에는 다소 減少하였다.

C_x -cellulase는 培養 14日, β -glucosidase는 培養 16日에 最高值를 나타내다가 培養 19~20日 사이에서 급격히 減少되었으며 C_x -cellulase는 25日, β -glucosidase는 28日에 다시 上昇하기 시작하다가 그 이후 부터 급격히 減少하는 현상을 보였다.

培養 期間중 이들 세 酵素를 綜合해 보면 C_1 -cellulase가 減少하는 시기에 C_x -cellulase와 β -glucosidase는 上昇하였고 또 C_x -cellulase와 β -glucosidase가 減少하던 시 C_1 -cellulase는 增加하는 추세를 보였다.

副原料의 影響

몇箇培地에 各種 副原料를 添加하여 酵素生産力을 檢討한 結果는 Table I과 같다.

Table I. Effect of various materials added to rice straw media on the enzymes production.

Materials (10%)	Reducing sugar (mg/ml)		
	C ₁ -cellulase	C _x -cellulase	β-glucosidase
None	192	847	920
Rice bran	235	1075	929
Starch cake	125	956	890
Cottonseed cake	109	1087	1021
Fish meal	192	1032	1032
Defatted soybean	30	762	1042

Table I 과 같이 副原料를 添加했을 때가 better를 단 獨으로 使用하였을 때 보다 C₁-cellulase를 제외하고는 일반적으로 酵素生産은 좋았으나 棉實粕, 魚粉, 大豆粕을 添加時에는 無添加區 보다 菌絲生育은 오히려 不良하였다.

C₁-cellulase는 米糠添加區가 가장 良好하였고 이외는 오히려 無添加區 보다 不良하였다. C_x-cellulase는 米糠과 棉實粕 添加區에서 β-glucosidase는 魚粉과 大豆粕 添加時에 가장 양호하였다.

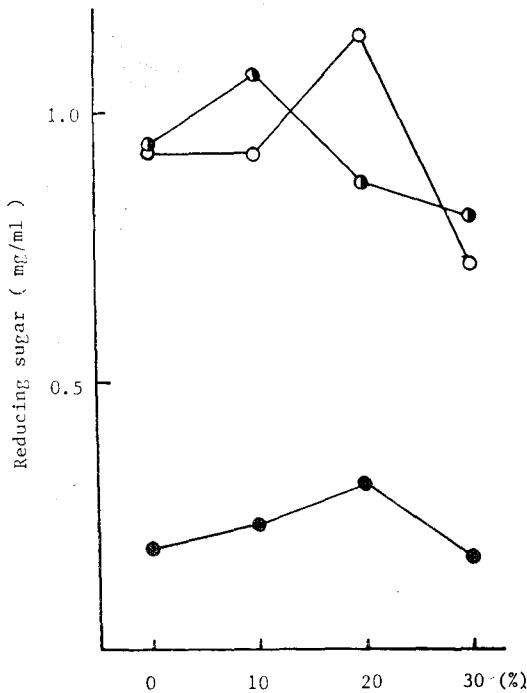


Fig. 6. Effect of the amount of rice bran added to rice straw media on the enzymes production.
●—● C₁-cellulase, ●—● C_x-cellulase, ○—○ β-glucosidase

米糠 添加量의 影響

副原料중에서 酵素生産과 菌絲生育이 一般的으로 良好한 米糠을 10~30% 添加하여 酵素生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6과 같이 C₁-cellulase와 β-glucosidase는 米糠을 20% 添加하였을 때 最良하였고 그 이상의 濃度에서는 減少하였는데 β-glucosidase는 米糠 30%에서 無添加區 보다도 현저히 減少 현상을 보였다. C_x-cellulase는 米糠 10%에서 最高値를 보였고 20%와 30%에서는 無添加區보다 오히려 減少 추세를 보였다. 菌絲生育은 米糠의 添加量이 많을수록 良好하였다.

摘 要

better培地에서 *Pleurotus sajor-caju*의 培養條件을 달리하여 纖維素分解酵素 生産에 미치는 影響을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 酵素生産의 最適 水分含量, pH 및 溫度는 C₁-cellulase가 60%, 7.0, 35°C 이었고 C_x-cellulase는 60%, 5.0, 25°C이었으며 β-glucosidase는 60%, 7.0, 20°C이었다.

2) 菌絲培養期間 중에 光을 照射하므로써 C₁-cellulase와 β-glucosidase生産은 減少하였으나 C_x-cellulase는 500~1,000 lux에서 오히려 增加되었다.

3) 培養期間 중에 C₁-cellulase가 減少하면 C_x-cellulase와 β-glucosidase가 增加하는 相反關係를 나타내었다.

4) 副原料 中에서 C₁-cellulase는 米糠, C_x-cellulase는 棉實粕과 米糠, β-glucosidase는 大豆粕과 魚粉을 添加했을 때 가장 良好했으며 C₁-cellulase와 β-glucosidase는 米糠 20%, C_x-cellulase 10%는 添加했을 때 良好하였다.

文 獻

Hong, J.S. and Namgung, H. (1975): Studies on the enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*, Part I. Properties of crude cellulase. *Bul. Agri. Col., Jeonbuk N. Univ.* 6: 101~105.
 Hong, J.S. (1976): Studies on hemicellulolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*, Part I. Properties of crude hemicellulolytic enzymes. *Bul. Agri. Col., Jeonbuk N. Univ.* 7: 89~92.
 Hong, J.S. (1978): Studies on the physio-chemical

- properties and the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Kor. Agri. Sci.* 21:150~184.
- Hong, J.S. (1978): Studies on the enzymes produced by *Flammulina velutipes*, Part I. Properties of crude cellulose. *Bul. Agri. Col., Jeonbug N. Univ.* 9: 97~100.
- Hong, J.S. and Kim, D.H. (1981): Studies on enzymes produced by Basidiomycetes, Part I. The production crude enzymes. *J. Kor. Agri. Sci.* 24, 7~14.
- Hong, J.S. and Kwon, Y.J. (1981): Studies on the enzymes produced by Basidiomycetes, Part II. Properties of cellulase and xylanase. *J. Kor. Agri. Sci.* 24:260~266.
- Kim, S.H. and Kim, W.S. (1982): Studies on the isolation, purification and characteration of C_x-enzyme produced by *Pyricularia oryzae*. *Kor. J. Mycol.* 10:67~73.
- Lee, K.H., Koh, J.S., and Park, S.O. (1976): Studies on the production of fermented feed from agricultural waste product, Part III. On the production of cellulase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *J. Kor. Agri. Chem. Sci.* 29:130~137.
- Mandels, M. and Reese, E.T. (1963): Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives, In R.L. Whistler [ed.], *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. 3, Academic Press, New York, 139~143.
- Michalski, C.J. and Beneke, E.S. (1969): Enzymatic activities during basidiocarp development of *Pleurotus ostreatus*. *Mycol.* 61:1041~1047.
- Reid, I.D. (1979): The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Can. J. Bot.* 57:2050~2058.
- Rosenberg, S.L. (1980): Patterns of diffusibility of lignin and carbohydrate-degrading systems in wood-rotting fungi. *Mycol.* 72:798~812.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 19:195.
- Vilela, L.C., Torillo, A.R., de Ocampo, A.T. and del Rosario, E.T. (1977): Cellulase production in semisolid cultures of *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* 41:235~238.
- Wakabayashi, K. and Nisizawa, K. (1964): On the cellulase system of *Irpex lacteus*. *J. Ferment. Technol.* 42:347~355.
- Wakabayashi, K., Kanda, T. and Nisizawa, K. (1965): On the fractionation and some properties of cellulase *Irpex lacteus*. *J. Ferment. Technol.* 43:738~749.
- Wakabayashi, K., Kanda, T. and Nisizawa, K. (1966): Separation of two cellulase components from a culture filtrate of *Irpex lacteus* and some of their properties. *J. Ferment. Technol.* 44:669~681.

<Received April 23, 1984>