

합성배지에서 저온성 느타리(*Pleurotus ostreatus* 201)의 섬유소분해효소 생산조건

이 극 로 · 강 춘 기
서강전문대학 식품영양과

Cultural Conditions of *Pleurotus ostreatus* 201 for the Production of Cellulolytic Enzymes in Synthetic Medium

Keuk-Ro Lee, Choon-Ki Kang

Dept. of Food and Nutrition, Seo-Kang Junior College, Kwangju 500-742, Korea

Abstract

Cultural conditions and carbon sources affecting the productivity of cellulolytic enzymes of *Pleurotus ostreatus* 201 were examined in synthetic media. The optimum cultural temperature and initial pH for the production of enzymes were 25°C and 5.5 in avicelase, and 30°C and 5.0 in CMCCase, and 30°C and 6.5 in β -glucosidase. Among carbon sources, cellulose powder was the best for the production of avicelase, and Na-CMC for CMCCase, and cellobiose for β -glucosidase. The optimum concentration of cellulose powder was 1.0%(w/v), and glucose depressed the production of enzymes remarkably.

Key words : *Pleurotus ostreatus* 201, cellulase, avicelase, CMCCase, β -glucosidase

서 론

섬유소는 화학적으로 3,000~10,000개의 무수 glucopyranose가 주로 β -1,4 결합에 의하여 연결되고 다시 수소결합에 의해 결정성을 이루며 약간의 cross linkage를 갖는 고분자의 유기물질로, 자연상태에서는 cellulose의 무정형 영역에서 hemicellulose 와 lignin이 서로 뒤엉켜 있다.^{1~3)} 이러한 섬유소는 자연계에서는 서서히 분해되기 때문에 사람이 직접 또는 간접적으로 이용하는 것은 연료, 사료, 화공약품, 식품 등 극히 일부에 지나지 않고 대부분은 그대로 폐기되어 여러가지 경로로 자연계에 귀환되며 효과적으로 이용되지 못하고 있다. 이렇게 폐기되고 있는 식물섬유성 물질의 주체인 섬유소는 지구상에 존재하는 유기물 중 가장 많은 물질로서 식물의 약 50%를 점유하는데 이 섬유소를 탄소원으로 이용하는 방안을 모색하는 식

량자원 개발이라는 점에서 의의가 클 것으로 생각된다. 섬유소분해효소(cellulase:E.C.3214, β -1,4-D-glucan-4-glycanohydrolase 또는 β -1,4-glucanase)는 cellulose를 가수분해하는 효소로서, 천연 섬유소의 분해는 exo- β (1,4)-glucanase, endo- β (1,4)-glucanase, β -glucosidase 등 여러 종류의 효소가 복합적으로 작용한다고 한다^{4~6)}.

섬유소 분해효소를 생산하는 곰팡이로는 *Trichoderma viride*^{7,8)}, *Myriococcum albomyces*⁹⁾ 등이 알려져 있으며, 담자균이 생산하는 섬유소분해효소에 관해서는 若林 등^{10,11)}의 반합성 배지에서 *Irpex lacteus*가 생산하는 avicelase, CMCCase 및 β -glucosidase의 특성에 관한 보고와 Wilson et al¹²⁾의 *Schizophyllum commune*이 생산하는 β -glucosidase, Michalski 등¹³⁾의 *Pleurotus ostreatus*의 자실체 형성과정 중에 α -galactosidase와 β -glucosidase에 관한 보고 등이 있다. 또한 홍 등^{14,15)}은 벗짚 배지에서 느타리가 생산하는 cellulase 및 xylanase의 생산조건 및 특성에 관하여 보고한 바 있다.

본 연구는 섬유소를 사료, 식품 및 energy 등의 자원으로 이용할 수 있는 기초자료를 얻고자 저온성 느타리 (*Pleurotus ostreatus* 201)를 합성배지에서 진탕 배양하여 섬유소 분해효소 생산에 미치는 배양조건 및 각종 탄소원의 영향을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시균주

전북대학교 식품공학과 균이학 연구실에 보관하고 있는 저온성 느타리 (*Pleurotus ostreatus* 201)를 분양받아 공시 균주로 사용하였다.

2. 배지의 조제

보관용 배지의 조성은 malt extract 20g, glucose 20g, peptone 2g, agar 15g, distilled water 1,000ml, pH 5.5이고 종배양 배지의 조성은 glucose 10g, peptone 2g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, thiamine-HCl 50 μg , distilled water 1,000ml, pH 5.5 이었다.

진탕배양을 위한 기본배지의 조성은 Table 1과 같다. 탄소원 비교실험 시에는 Table 1의 기본배지에서 cellulose powder 대신에 avicel, Na-CMC, salicin, glucose를 1.0% 씩 가하고 250ml 삼각 flask에 50ml씩 넣어 조제한 후 1.0kg/cm² 압력에서 15분간 살균하였다. 단, 탄소원중에서 효소 생산에 비교적 양호한 cellulose powder 의 농도 실험은 0.1~3.0% 되게 가하여 조제하였고 glucose 농도 실험은 glucose를 0~1.0%로 조제하여 cellulose powder와 glucose 진탕을 1.0%로 하였다.

3. 배양방법

종배양배지에 보관 균주를 일정량 접종하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양한 것을 종배양으로 하여 이를 waring blender로 1분간 마쇄하여 이 현탁액을 기본배지에 3ml씩 접종하여 왕복 진탕배양기(100 rpm) 에서 온도와 배양기간 비교실험을 제외하고는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 9일간 배양하였다.

4. 효소액 조제

9일간 배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min.) 한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

5. 효소의 활성도 측정

Avicelase 의 활성^{10,16)}은 1% avicel 용액 2ml에 Mcllvaine완충액 2ml을 L형 시험관에 취하고 조효소액 1 ml을 가하여 40 $^{\circ}\text{C}$ 진탕수조에서 120분간 반응시킨 후 유리된 환원당을 Somogyi-Nelson법^{17,18)}에 의하여 비색 정량하고 효소액 1ml가 생성한 환원당(glucose)의 μg 을 활성의 비교단위로 하였다.

CMCase 활성¹⁶⁾은 0.5% Na-CMC 용액을 기질로 하여 avicelase 측정 방법과 동일하게 측정하였고, β -glucosidase 활성¹⁶⁾은 0.1% salicin용액을 기질로 하여 avicelase 측정방법과 동일하게 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 배양온도의 영향

배양온도를 20~35 $^{\circ}\text{C}$ 로 달리하여 섬유소 분해효소 생산을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 배양온도가 증가함에 따라 효소생산도 증가하여 avicelase 는 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서, β -glucosidase는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 생산이 높았고 그 이상의 온도에서는 이들 효소의 생산은 감소하였다. 이는 *Phanerochaete chrysosporium* 의 cellulase 생산 최적 온도가 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 이었던 김¹⁹⁾의 보고에 비해서는 낮으나 *Pleurotus ostreatus*의 CMCase생산은 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서, *Ganoderma lucidum*¹⁶⁾의 avicelase와 CMCase는 30 $^{\circ}\text{C}$, β -glucosidase는 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양할 때 이들 효소의 생산이 높았다는 보고와 대체로 일치하는 것으로 볼 수 있다.

2. 배지 pH 의 영향

배지의 초기 pH를 달리하여 효소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

Table 1. Composition of basal medium

Cellulose power	1.0 g
Peptone	0.2 g
KH_2PO_4	0.02 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 μg
pH	5.5
Distilled water	100 ml

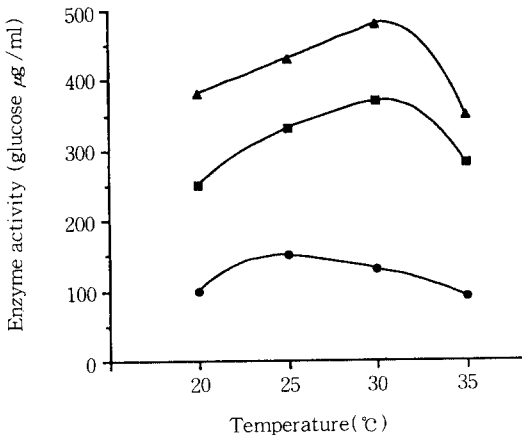


Fig. 1. Effect of cultural temperature on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201.

●—● : Avicelase, ▲—▲ : CMCase,
■—■ : β-glucosidase, * : relative activity

세 효소의 생산 최적 pH는 각각 달라 avicelase는 pH가 증가함에 따라 점진적으로 증가하여 pH 5.5에서 최고를 보이며, 그 이상에서는 서서히 감소하였고 CMCase는 pH가 증가함에 따라 급격히 증가하여 pH 5.0에서 최고를 보인 후 그 이상의 pH에서는 완만하

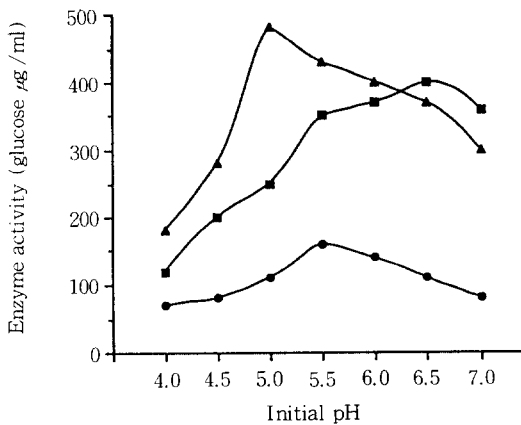


Fig. 2. Effect of initial pH on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201.

●—● : Avicelase, ▲—▲ : CMCase,
■—■ : β-glucosidase, * : relative activity

게 감소하였으며 β-glucosidase는 pH가 증가함에 따라 점진적으로 증가하여 pH 6.5에서 최고치를 보였다.

Avicelase와 CMCase의 생산이 pH 5.0~6.5사이에서 변화가 완만하였던 것은 섬유소와 결합된 cellulase가 pH 6.5 부근에서 잘 유리되며²⁰⁾ cellulase에 의한 섬유소의 분해가 복합적으로 일어나고⁴⁾ avicelase와 CMCase의 반응산물인 cellobiose가 end product inhibition 작용²¹⁾을 하기 때문에 β-glucosidase의 활성이 증가하였던 것으로 사료된다.

3. 배양기간의 영향

배양기간을 달리하여 효소생산을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. Avicelase 활성은 9일까지 점진적으로 증가하다가 그 이후는 감소하였고, CMCase 활성은 9일까지는 급격히 증가하였으나 12일 이후부터는 서서히 감소되는 추세를 보였으며, β-glucosidase 활성은 9일까지 신속한 증가를 보였으나 그 이후부터는 완만하게 증가하다 18일 이후에는 감소하였다. 이는 홍 등¹⁴⁾의 *Pleurotus ostreatus*의 볏짚을 이용한 효소실험에서 cellulase 생산력은 30일에서 가장 양호하였다고 한 것과 큰 차이가 있었는데 본 실험에서는 *Pleurotus ostreatus* 201을 합성배지에서 진탕 배양하였기 때문

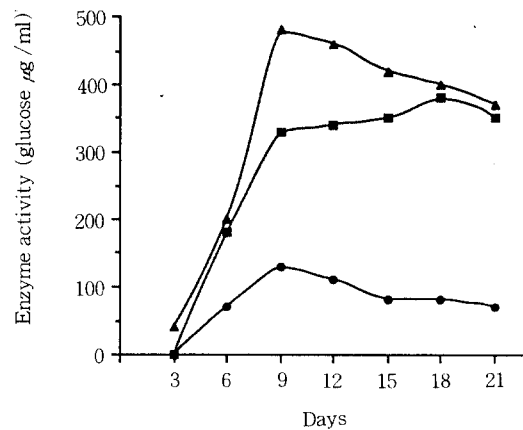


Fig. 3. Effect of cultural period on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201.

●—● : Avicelase, ▲—▲ : CMCase,
■—■ : β-glucosidase, * : relative activity

에 배양조건이 전혀 다른 데 그 원인이 있는 것으로 생각된다.

4. 탄소원의 영향

각종 탄소원이 cellulase 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. Avicelase는 cellulose powder, CMCase는 Na-CMC, β -glucosidase는 cellobiose를 첨가하였을 때 효소생산이 가장 좋았다. 반면에 avicel 첨가시는 β -glucosidase, cellobiose 첨가시는 avicelase 생산이 불량하였으며 glucose를 탄소원으로 하였을 때는 균사 생육은 매우 양호하였으나 효소 생산이 되지 않았다.

이상의 결과는 Gunasekaran²²⁾의 *Phymatotrichum* sp.의 실험에서 CMC 첨가시 CMCase의 생산이 양호하였으며 glucose 첨가시는 CMCase생산이 억제되었고 Wilson 등¹²⁾의 *Schizophyllum commune* 실험에서 cellobiose를 탄소원으로 하였을 때 β -glucosidase의 생산이 가장 좋았다는 보고와 일치하는 것으로 볼 수 있다. 본 실험의 결과에서 다당류를 탄소원으로 하였을 때 avicelase와 CMCase의 생산이 많았고 cellobiose를 탄소원으로 하였을 때는 이들 효소의 생산이 불량한 반면 β -glucosidase의 생산이 촉진된 것으로 보아 이들 효소들은 유도 효소일 것으로 추정된다.

5. Cellobiose powder 농도의 영향

탄소원 중에서 비교적 효소의 생산이 양호한 cellulose powder 농도의 영향을 검토한 결과는 Fig.4와 같다. Cellulose powder를 저농도로 첨가하였을 때는 효소생산이 불량하였으나 첨가 농도의 증가에 따라 효소생산이 점진적으로 증가하여 avicelase와 CMCase

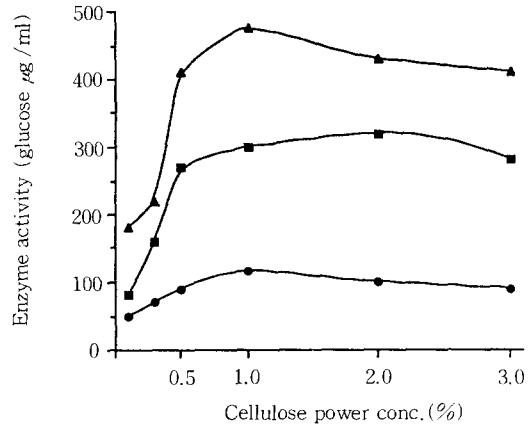


Fig. 4. Effect of cellulose power concentration on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201.

●—● : Avicelase, ▲—▲ : CMCase, ■—■ : β -glucosidase, * : relative activity

는 1.0%에서 β -glucosidase는 2.0%에서 가장 양호하였으며 그 이상의 농도에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. 이는 정⁹⁾의 *Micrococccum albomyces* 실험에서 avicelase와 CMCase는 1%에서 가장 좋았고 β -glucosidase는 2.0%에서 가장 양호하였다는 보고와 일치하나 Gunasekaran²²⁾의 *Phymatotrichum omnivorum* 실험에서 CMCase 생산이 2.0%에서 가장 좋았다는 보고와는 다소 차이가 있다.

6. Glucose의 영향

Glucose와 cellulose powder를 각종 농도로 혼합하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig.5와 같다. Glucose의 첨가비율이 높을수록 효소 생산

Table 2. Effect of carbon sources on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201

Carbon sources 1%(w/v)	Avicelase activity	CMCase activity	β -glucosidase activity
Avicel	89.2	393.4	—
Cellulose powder	116.0	472.2	332.5
Na-CMC	76.8	521.8	75.4
Cellobiose	—	163.5	352.0
Glucose	—	—	—

* Relative activity(glucose μ g/ml)

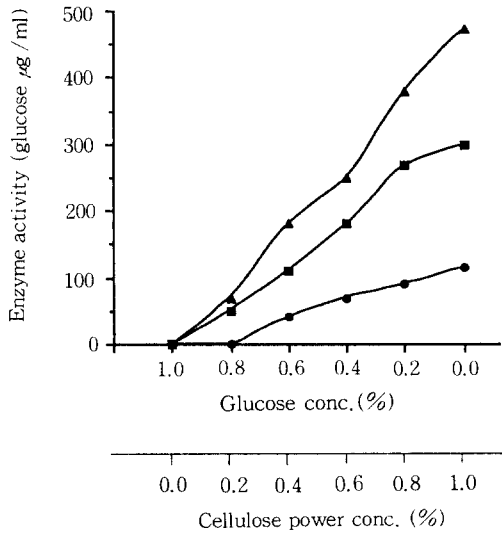


Fig. 5. Effect of the mixing ratio of glucose and cellulose power on the production* of cellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* 201.

●—● : Avicelase, ▲—▲ : CMCase,
 ■—■ : β-glucosidase, * : relative activity

은 억제되었고 glucose 첨가 비율이 낮을수록 효소 생산은 증대되었다. 岩原 등²³⁾은 *Pleurotus ostreatus* 실험에서 glucose를 첨가한 액체배지에서 cellulase 생산은 저해된다고 하였고 Gunasekaran²²⁾은 *Phymatotrichum* sp. 의 효소실험에서 glucose 첨가량이 증가함에 따라 CMCase의 생산은 감소한다고 하였는데 이는 본 실험 결과와 일치하는 경향이다.

요 약

합성배지에서 저온성 느타리(*Pleurotus ostreatus* 201)의 섬유소 분해효소 생산이 미치는 배양조건 및 탄소원의 영향을 검토하였다. 효소생산에 최적인 배양온도와 배지 pH는 avicelase가 25℃, 5.5이었고 CMCase는 30℃, 5.0이었으며 β-glucosidase는 30℃, 6.5이었다. Avicelase와 CMCase 활성은 9일 배양하였을 때 최대치를 보였으며 β-glucosidase 활성은 18일 배양하였을 때가 가장 높았다. 탄소원 중에

서 avicelase생산은 cellulose powder, CMCase생산은 Na-CMC, β-glucosidase생산은 cellobiose를 첨가하였을 때 가장 좋았다. 효소 생산은 cellulose powder 1.0%에서 가장 양호하였으며 glucose는 농도의 증가에 따라 현저하게 감소되었다.

참고문헌

1. Bisaria, V.S., and Ghose, T.K.: Biodegradation of cellulosic materials, substrates, microorganisms, enzymes and products, *Enzyme Microb. Technol.*, 3,90(1981)
2. Rose, A.H. : *Economic microbiology 5, microbial enzymes and bioconversions*, Academic Press. 283(1980).
3. Shafizadeh, F. and Meginnis, G.D.: *Morphology and biogenesis of cellulose and plant cell walls*, Academic press, 26, 297(1971).
4. Ryu, D.D.Y., and Mandels: Cellulase, biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 91(1980).
5. Tanaka, M., Taniguchi, M., Morinaga, T. Mafsun, R. and Kamikubo, T.: Cellulase productivity of *Enpenicillium javanicum*, *J. Ferment. Technol.*, 58, 149(1980).
6. Reese, E.T., Siu, R.G.H. and Levinson, H. S.: The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, *J. Bacteriol.*, 59, 485(1950).
7. Berghem, L.E.R. and Petterson, L.G.: The mechanism of enzymatic cellulose degradation; purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose, *European J. Biochem.*, 37, 21(1973).
8. Berghem, L.E.R. and Petterson, L.G.: The mechanism of enzymatic cellulose degradation, Isolation and some properties of a β

- glucosidase from *Trichoderma viride*, *European J. Biochem.*, **46**, 295(1974)
9. 정동효: *Myriococcum albomyces*가 생산하는 cellulase에 관한 연구, 한국농화학회지, **14**, 59 (1971)
 10. 若林和正, 西澤一俊: *Irpex lacteus*의 cellulase 系について, 日 酵 工, **42**, 347(1964).
 11. 若林和正, 神田久, 西澤一俊: *Irpex lacteus*의 cellulase의 分割と 各成分의 性質, 日 酵 工, **43**, 739(1965).
 12. Willson, R.W. and Niederprum, D.J.: Control of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*, *Can. J. Microb.*, **13**, 1009(1967).
 13. Michalski, C. J. and Beneke, E.S.: Enzymatic activities during basidiocarp development of *Pleurotus ostreatus*, *Micrologia*, **61**, 1041(1969).
 14. 홍재식, 김동환: 담자균이 생산하는 효소에 관한 연구. I. 조효소 생산에 관하여, 한국농화학회지, **24**, 7(1981).
 15. 홍재식, 권용주: 담자균이 생산하는 효소에 관한 연구 II, Cellulase 및 Xylanase 의 성질, 한국농화학회지, **24**, 260(1981).
 16. 최윤희: 합성배지에서 *Ganoderma lucidum* 이 생산하는 섬유소 분해 효소에 관한 연구. 전북대학교 대학원 석사학위논문(1986).
 17. Nelson, N. : A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1944).
 18. Somogyi, M. : Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **95**, 19(1952).
 19. 김동환: *Phanerochaete chrysosporium*에 의한 cellulase 생산 및 이용에 관한 연구, 전북대학교 대학원 박사학위논문(1987).
 20. Eriksson, K.E. and Larsson, K.: Fermentation of waste mechanical fibers from a newsprint mill by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 327(1975).
 21. Freer, S.N. and Detroy, R.W.: Characterization of cellobiose fermentations to ethanol by yeasts, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 541(1983).
 22. Gunasekaran, M. : Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum* XI, cellulolytic enzymes, *Mycologia*, **72**, 759(1980).
 23. 岩原博樹, 善本和孝, 福住俊郎: ヒラタケ 生育時の 菌體外 酵素活性의 變化, 木材學會誌, **27**, 331(1981).

(1993년 4월 9일 수리)