

韓國產 高等 菌類의 酵素에 관한 研究(Ⅱ)

木材腐朽菌인 조개껍질버섯의 섬유소 분해효소의 확인

朴婉熙·金泰姬*·魯一協*

京畿工業開放大學 環境工學科·淑明女子大學校 藥學大學*

Studies on Enzymes of the Higher Fungi of Korea(Ⅱ)

Identification of Cellulolytic Enzyme in *Lenzites betulina*

Wan Hee Park, Tae Hee Kim* and Ihl-Hyeob Ro*

Department of Environmental Engineering, Kyonggi Technical Open University, Seoul 132-02,
and College of Pharmacy, Sookmyung Women's University*, Seoul 140, Korea

Abstract: Cellulosic substance which plays an important role in carbon cycle is most abundant in the nature world. Some higher fungi are able to digest cellulose directly to satisfy their carbohydrate requirement. Then, in order to investigate the enzymatic components of *Lenzites betulina* (Fr.) being wood rot, that fungus was collected in Kwangneung area. The carpophore of the fungus was smashed with cool distilled water, extracted and salted out by ammonium sulfate. And then the precipitate was purified by dialysing with visking tube and dissolved with pH 7.8 ammonia water, and the extract was filtrated. The fraction of filtrate was obtained as light brown powder after lyophilization, and determined cellulolytic activity. Cellulolytic potency of *Lenzites betulina* (Fr.) was 1.65 unit/ml. The cellulase of *Lenzites betulina* (Fr.) was stable at below 45°C and range of pH 4.5~6.0 and is completely inactivated at 60°C for 15 minutes. The optimum condition for the enzymatic reaction was 40°C and pH 4.0. The enzyme activity was not influenced by the presence of Ca²⁺ and Fe²⁺.

Key words: *Lenzites betulina*, Cellulolytic activity, Cellulose.

버섯류에 대한 연구가 국내외적으로 활발하여 그 분류, 영양 성분 및 약효 성분에 관한 연구가 보고 되어 있다. 지난 10 여 년간 효소학의 급속한 발전으로 인하여 amylolytic, cellulolytic, proteolytic 및 pectolytic enzyme이 산업, 의학, 약학, 농업 등의 많은 분야에서 실용적으로 이용되고 있다. 이에 따라 고등 균류로부터 효소를 추출하려는 연구도 급속도로 진행되고 있다.

Kawai는 1968년 담자균으로부터 protease를 제조하였으며 Umata는 1969년 7 종류의 고등균류로부터 진균류 세포 용해효소를 추출한 바 있다. Hashimoto는 1972년 *Pholiota nameko* 등의 식용 버섯에서 carboxy methylcellulase를 분리하였다. Omura 등은 1974년 호

박으로부터 ascorbic oxidase와 *Lentinus edodes*로부터 polyphenol-oxidase를 추출하여, 이 효소가 sarcoma-180 과 MH-134 종양세포에 항암 효과가 있음을 보고하였다. Gavrilova는 1975년 식용버섯에서 단백질 분해 효소를 추출하여 fibrin, hemoglobin, serumalbumin, ovalbumin 등의 복합단백질에 대하여 그 분해력을 검토하였다.

한국산 고등 균류의 효소에 대한 연구보고도 근래에 와서 증가되고 있다. 1974년 Hong 등은 5종의 식용 균류의 estrase와 단백질을 전기영동으로 비교 하였다.

1984년 Hong 등은 *Pleurotus sojor-caju*에서 cellulase를, 같은 해에 Ro는 *Fomes fermentarius*(Fr.) Kicky에서 protease를 추출하여 연구 발표하였다. 1985년

Lee 등은 *Flammulina velutipes*에 의한 laccase의 생산 및 효소적 특성에 관하여, Min 등은 *Pleurotus cornucopiae* 중의 protease를 분리정제하여 그 성질에 관하여 보고 하였다.

저자들은 조개껍질버섯이 목재를 갈색으로 부후시키는 것에 착안하여 이것에 섬유소 분해효소가 다량 존재할 것으로 사료되어 이를 실험한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

구멍장이파에 속하는 조개껍질버섯 *Lenzites betulina* (Fr.)은 광능에서 채집하여 그 기원을 확인하고 그 사실체를 적외선등 하에서 건조해서 유발로 분쇄하여 사용하였다.

분 리

세말로 한 시료 500 g에 증류수를 가하여 mixer로 마쇄하여 24시간 냉장고내에서 추출하였다. gauze로 여

Material

Homogenation with cool H₂O
Extraction with 3 volume of cool H₂O
Filtration with gauze

Filtrate

Refri-centrifugation

Supernatant

Fractionation by 2/3 saturation with cool (NH₄)₂SO₄
Refri-centrifugation

Precipitate A

Fig. 1. Extraction of enzyme from *Lenzites betulina* (Fr.).

Precipitate A

Dialysis with visking tube against cool H₂O in refrigerator
Refri-centrifugation

Precipitate

Dissolution with cool NH₄OH aqua (pH 7.8)
Refri-centrifugation

Filtrate

Lyophilization at -65°C

Light brown powder

Fig. 2. Purification of enzyme from *Lenzites betulina*.

과하고 여액을 다시 원심분리하여 그 상등액을 황산암모니움으로 염석하였다. 침전을 증류수에 현탁시켜 visking tube에 넣어 투석하였다. 이 투석한 침전을 암모니아수에 용해하여 불순단백질을 여과하고 그 여액을 -65°C에서 냉동건조하여 갈색 침전을 얻었다.

효소 활성 측정

효소 추출에서 얻은 침전을 pH 4.5의 MacIlvaine buffer solution에 녹여 0.2% 시료 용액으로 하였다.

Carboxymethyl cellulose(Junsei Chemical Co.)를 0.1M-acetate buffer solution(pH4.5)에 용해하여 1% 기질 용액으로 하였다.

기질 용액 1ml를 마개 있는 시험관에 취하고 40°C 항온조 중에서 5분간 예열시킨후 효소 용액 1ml를 가한후 60분간 작용시켰다. 반응 완료 후 3,5-dinitrosalicylic acid 시약 3ml를 가하고 비등수중에서 15분간 가열 발색시켜 냉각한 다음 증류수 5ml를 가하여 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 단 이때 물을 사용하여 상기와 동일한 조작으로 얻어진 반응액을 대조액으로 하였다.

역가표시 : 효소 활성 측정 법과 같은 조작으로 반응시킨 효소액 1ml중에 1mg의 glucose에 상당하는 환원당을 생성함을 1 unit라 하였다.

기질 농도와 활성

기질의 농도를 0.1 M acetate buffer(pH 4.5)로 일정하게 조절하여 그 기질 1ml에 0.2% 효소 1ml를 가하여 효소 활성 측정때와 같은 방법으로 측정하였다.

효소 농도와 활성

pH 4.5의 MacIlvaine buffer solution으로 일정하게 농도를 조절한 효소 용액 1ml에 1% 기질 용액 1ml를 가하여 40°C에서 60분간 반응시켜 효소 활성 측정때와 같은 방법으로 측정하였다.

최적 온도

0.2% 효소 용액 1ml에 1% 기질 용액 1ml를 가해 작용 온도를 20°C~60°C로 변화시켜 효소 활성때와 같은 방법으로 측정하였다.

최적 pH

MacIlvaine buffer solution으로 pH 3~8까지 조절한 효소 용액 1ml에 기질 용액 1ml를 가해 40°C, 60분간 반응시켜 효소 활성때와 동일한 방법으로 측정하였다.

효소 활성에 대한 염류의 영향

10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ M의 calcium chloride, sodium chloride, magnesium chloride, ferrous sulfate의 각 농도의 염류를 작용액에 첨가하여 효소 활성때와 같은 방

법으로 측정하였다. 효소작용 촉진과 저해에 대하여 검토하였다.

결과 및 고찰

0.2% 시료 효소 용액과 기질 농도의 관계는 Fig. 3과 같이 기질 농도가 1%이하에서 직선성을 나타내었으므로 기질의 농도를 1%가 되게 조절하여 사용하였다.

pH 4.5의 MacIlvaine buffer solution으로 일정하게 희석한 효소용액 1 ml에 1% carboxy methyl cellulose 용액 1ml을 가하여 40°C, 60분간 작용시킨후 그 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. carboxymethyl cellulase 활성때의 흡광도가 0.5 이하이면 효소량과 비례관계를 표시하므로 이 범위내의 농도, 즉 0.2%가 되게 조절하였다.

온도가 효소에 미치는 영향을 검토하기 위하여 pH 4.5로 조절한 0.2% 효소 용액과 1% carboxymethyl cellulose를 각 온도에서 60분간 작용시킨후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타난바와 같이 최적온도는 40°C였다.

MacIlvaine buffer solution으로 pH 3~8로 조절한 0.2% 효소액 및 1% 기질 용액을 사용하여 40°C, 60분간 반응시켜 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 관

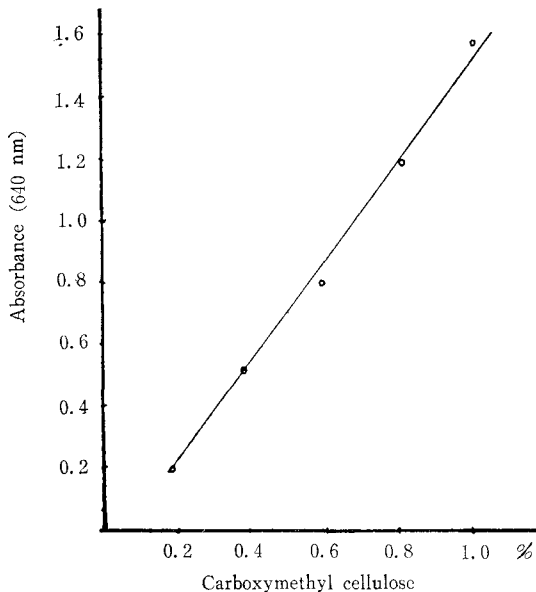


Fig. 3. Effects of carboxymethyl cellulose concentrations on the enzyme reaction.

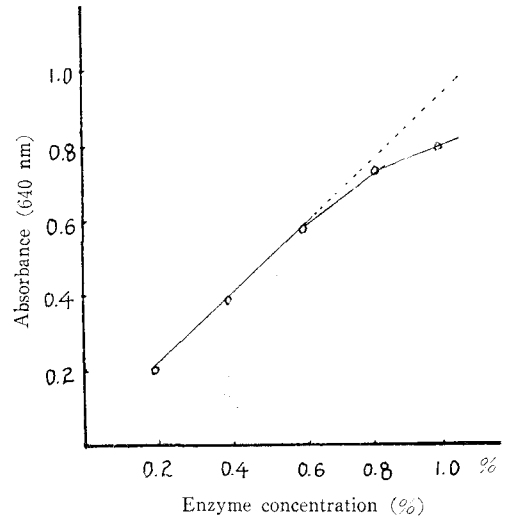


Fig. 4. Effects of enzyme concentrations on the carboxymethyl cellulase activity.

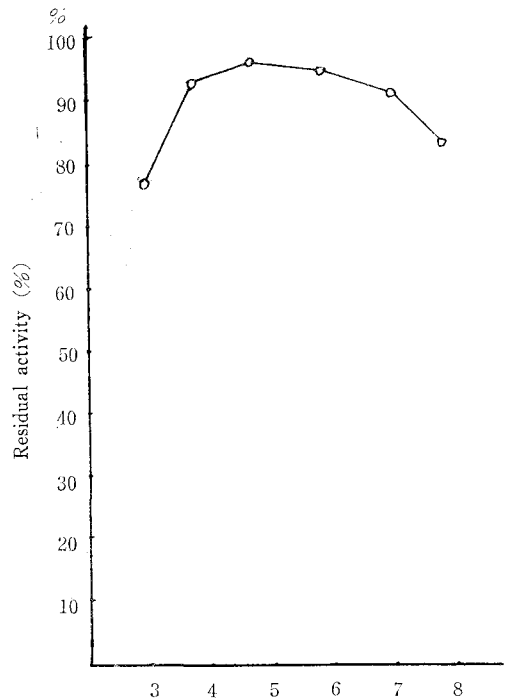


Fig. 5. Effects of temperature on the stability of carboxymethyl cellulase.

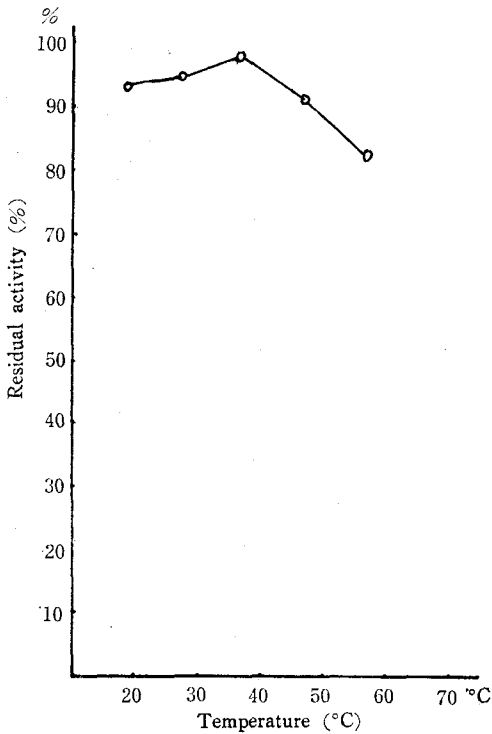


Fig. 6. Effects of pH on the stability of carboxymethyl cellulase.

찰한 결과는 Fig. 6과 같다. 실험한 조개껍질버섯의 최적 pH는 4.0~6.0으로 나타났다.

조개껍질버섯의 carboxymethyl cellulase의 활성도는 Table I에 나타난바와 같이 1.65 unit/ml였다.

효소활성에 대한 염류의 영향을 검토하기 위하여 조

Table I. Cellulolytic activity of cellulase in *Lenzites betulina*.

Cellulolytic activity*	1.65 unit/ml
------------------------	--------------

* After 3,5-dinitrosalicylic acid was added, the color was measured at 640 nm.

Table II. Effects of metallic ions on carboxymethyl cellulase activity of *Lenzites betulina*.

Metallic ions	Carboxymethyl cellulase activity (unit/ml)		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
NaCl	0.56	0.62	0.79
CaCl ₂	1.42	1.38	1.31
MgCl ₂	1.38	1.37	1.35
FeSO ₄	1.40	1.35	1.30

개껍질버섯에서 추출한 효소 작용액에 각 농도의 염류를 첨가하여 작용 촉진과 저해를 관찰한 결과는 Table II와 같다. 10⁻²M의 Na⁺의 첨가는 저해작용을 나타내었으나 더 묽은 10⁻⁴M농도 정도에서는 별로 영향을 받지 않았다. Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺은 효소활성을 별로 억제하지 않았다.

현재까지 cellulase는 여러 분야에서 다양하게 이용되고 있으며 의약품으로는 사람 및 가축의 소화제, 농산업계에서는 두류로부터 단백질을 추출할때 조직파괴에 널리 사용되고 있다. 그리고 자연계에서 가장 탄소원이 풍부한 섬유소는 육생계 biomass로 그 자원이 풍부하다. 이것에서 bioenergy를 개발할 때에 고등 균류에서 분리한 성능좋은 섬유소 분해효소를 이용함이 좋을 것으로 기대된다.

적 요

Lenzites betulina(Fr.)에서 효소 분획을 추출하여 carboxymethyl cellulose에 대한 분해 작용을 실험하였다. carboxymethyl cellulase의 활성도는 1.65 unit/ml였다.

감사의 말씀

이 실험을 함에 아낌없는 조언과 격려를 주신 연세대학교 의과대학 환경공학연구소 권숙포 교수님과 서울대학교 약학대학 김병각교수님께 깊이 감사함을 드리는 바입니다.

문 헌

Dishe, Z. (1956): *Method of Biochemical Analysis* Vol. II, Academic Press, New York, p.319.
 Ernst, H.R. and Henning, K. (1972): *Methods in Enzymology* XLV, edited by Laszlo Lorand, Academic Press, New York, p.26.
 Gavrilo, V.P. and Falina, N.N. (1975): (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. *Mikol. Fitopatol.*9:431-433.
 Hashimoto, K. (1972): Biochemical studies on the mushroom, *Toyo Shokuhin Kenkyusho Kenkyu Hokukusho* 10:163.
 Hong, J.S., Uhm, T.B., Jung, G.T. and Lee, K.B.

- (1984): Studies on the enzyme produced by *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* 12:59-64.
- Hong, S.W. and Min, C.P. (1974): Electrophoretic comparison of mycelial protein and enzyme patterns in their interspecies of some edible fleshy fungi. *Kor. J. Microbiol.* 12:138-146.
- Kawaai, M. (1968): Preparation of basidiomycetes protease. *Jpn. Tokkyocho Tokkyokoho Tokkyosyutugangkokoku*. Syo-47-34953.
- Kim, B.H. and Wimpenny, J.W.T. (1985): Fractionation of extracellular cellulase produced by *Cellulomonas* and reaction mechanisms of the isolated enzymes. *Kor. J. Microbiol.* 23:25-33.
- Lee, J.S. and Suh, D.S. (1985): Production and enzymatic properties of laccase from *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* 13:111-114.
- Min, T.J., Lee, S.Y. and Kim, J.W. (1985): Purification and properties of protease from *Pleurotus cornucopiae* (Per.) Rolland. *Korean Biochem. J.* 18:142-146.
- Miodecki, H., Lasota, W. and Tomczak-Nowacka (1973): Hygienic evaluation of *Sarcodon imbricatum* (I). *Bromat. Chem. Toksykol.* 6:41.
- Miodecki, W., Lasota, B. and Tomczak-Nowacka (1973): Hygienic evaluation of *Sarcodon imbricatum* (II). *Bromat. Chem. Toksykol.* 6:3.
- Nobuhiko, K. (1963): Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J. Antibiotics* 16:139-143.
- Omura, H., Tomita, Y., Murakami, H. and Nakamura, Y. (1974): Antitumor potentiality of enzyme preparations of pumpkin ascorbate oxidase and shiitake mushroom polyphenol oxidase. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 18:191-200.
- Park, W.H. (1982): Studies on antitumor components of wild *Pholiota squarrosa* (Fr.) Quel. *Yakhak Hoeji* 25:185-188.
- Park, W.H., Kim, B.K. and Ro, I.H. (1983): Studies on the component of *Pholiota squarrosa*. *Kor. J. Mycol.* 11:35-37.
- Park, W.H. (1986): Studies on enzymes of the higher fungi of Korea (I). *Kor. J. Mycol.* 16:25-30.
- Ro, I.H. (1984): Studies on protease activity of *Fomes fermentarius* (Fr.) Kicky. *Theses Collection of Sookmyoung Univ. Sci.* 25:475-485.
- Song, H.I., Ku, T.S. and Chung, K.T. (1981): Enzymatic properties of pectin esterase from *Aspergillus* sp. *Kor. J. Mycol.* 9:39-43.
- Umata, M. (1967): Preparation of fungal lytic enzyme. *Jpn. Tokkyocho Tokkyokoho Tokkyosyutugangkokoku*. Syo-49-15793.
- Wirnt, R. and Walf-Peter, F. (1972): *Methods of Enzymitic Analysis*, 2nd edition, Vol. 1, Bergmeyer, p.1046.
- Worthington(1980): *Enzymes, Enzyme Reagent Related Biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation Breehold, New Jersey.

<Received June 19, 1986; Accepted July 4, 1986>