

韓國產 高等菌類의 酵素에 관한 研究(IV)

野生 기와층버섯의 纖維素分解酵素의 分離 및 酵素學的 性質

朴 婉 熙

서울산업대학 환경공학과

Studies on Enzymes of the Higher Fungi of Korea(IV). Isolation and Enzymatic Properties of Cellulase from Wild *Cryptoderma citrinum*.

Wan-Hee Park

Department of Environmental Engineering, Seoul National Polytechnic University

Abstract—To identify biologically active enzymatic components of the higher fungi in Korea, the dried carpophores of *Cryptoderma citrinum* was smashed with cool distilled water, extracted, salted out and the precipitate was purified by dialysing with visking tube and dissolved with pH 7.8 ammonia aqua. The fraction of the filtrate was lyophilized to obtain as light brown powder and then cellulase activity was determined. Cellulolytic potency of *Cryptoderma citrinum* was 750 unit/g. The optimum condition for the enzymatic reaction was pH 4.5 and 40°. The enzyme activity was activated in the presence of Ca²⁺, Fe²⁺ and Co²⁺.

Keywords—*Cryptoderma citrinum* · cellulase activity · higher fungi

한국산 高等菌類의 酵素에 대한 연구보고는 근래에 와서 증가 일로에 있다. 1974년 Hong 등¹⁾은 3종의 食用균류의 esterase를 electrophoresis로 相互 비교 확인하였다. 1984년 Hong 등²⁾은 *Pleurotus sojor-caju*에서 cellulase, Ro³⁾는 *Fomes fermentarius*에서 protease, Park 등⁴⁾은 5종의 고등균류와 *Crataegi fructus*의 cellulase를 확인하였다. 1985년 Park⁵⁾은 *Pholiota squarrosa*에서 protease, Lee 등⁶⁾은 *Flammulina velutipes*에서 laccase의 생산 및 특성에 관하여, Min 등⁷⁾은 *Pleurotus cornucopiae*의 protease를 분리 정제하여 그 성질에 관하여 보고하였다. 1986년 Do 등⁸⁾은 *Ganoderma lucidium*의 cellulase, Lee 등⁹⁾은 *Agaricus bisporus*의 trehalase, Hong 등¹⁰⁾은 *Lentinus edodes*의 목재부후소에 대하여 보고한 바 있다. 같은 해 Park^{11~13)}은 *Sarcodon aspratus*

의 protease 및 木材腐朽菌인 *Lenzites betulina*의 cellulase와 protease를 분리 정제하여 그 효소학적 성질에 대하여 연구 보고하였다. 1987년에 들어와서 Hong 등¹⁴⁾은 *Coriolus versicolor*의 laccase의 생산 및 성질에 관한 것을 발표하였다.

저자는 한국산 野生 기와층버섯에서 cellulase를 분리 정제하여 그 역가 및 酵素學的 성질을 실험하여 약간의 지견을 얻었기에 여기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 재료는 기와층버섯(*Cryptoderma citrinum*, Mucronoporaceae)의 子實體로서, 광능에서 채집하여 그 기원을 확인하고 건

Cryptoderme citrinum

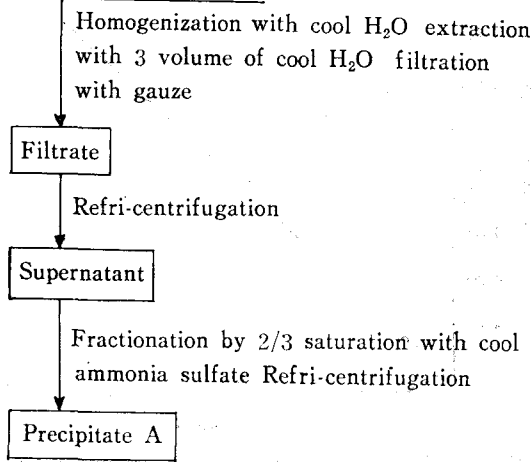


Fig. 1. Extraction of enzyme from *Cryptoderma citrinum*.

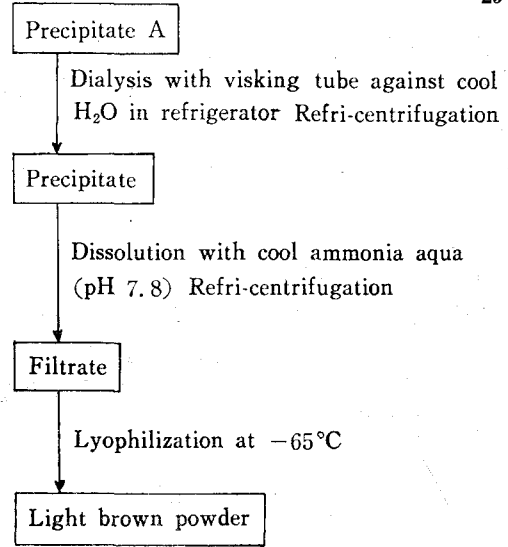


Fig. 2. Purification of enzyme from *Cryptoderma citrinum*.

조하여 유발로 분쇄하여 세말로 하였다.

2. 실험 방법

1) 추출 분리 및 정제

세말로 한 시료 500 g에 증류수를 가하여 Waring blender로 마쇄하여 24시간 냉장고에서 추출하였다. 여포로 이 추출액을 여과하고 여액을 원심분리하여 그 상등액을 포화 $(NH_4)_2SO_4$ 로 염석하였다. 이때 생성한 침전을 증류수에 현탁시켜 visking tube에 넣어 투석하였다. 이 투석한 침전을 ammonia aqua(pH 7.8)에 용해시켜 不純蛋白質을 여과하고 그 여액을 -65° 에서 냉동 건조하였다.

2) 시료 효소용액 조제

기와층비섯의 자실체에서 추출, 분리, 정제하여 얻은 沈澱을 MacIlvaine완충액(pH 4.5)에 녹혀 0.2% 시료 효소용액으로 하였다.

3) 기질용액 조제

0.1 M-acetate 완충액(pH 4.5)에 carboxymethyl-cellulase를 용해하여 1% 기질용액으로 하였다.

4) 효소 활성 측정

1% 기질용액 1 ml를 마개 있는 시험관에 취하고 40° 로 조절한 incubator중에서 5분간 豫熱시킨후 0.2% 효소용액 1 ml를 가하여 60분간 작용시켰다. 反應完了후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS試藥) 3 ml를 가하여 효소반응을 停止하고

비등수중에서 15분간 가열 발색시킨후 냉각하고 증류수 5 ml를 가하여 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 위의 조건으로 효소용액 1 ml가 1 mg의 glucose에 상당하는 환원당을 생성하는 경우를 1 unit로 하고 시료효소의 희석배수를 승하여 효소여가를 표시하였다.

5) 효소 농도와 활성

MacIlvaine완충액(pH 4.5)으로 일정하게 농도를 조절한 효소용액 1 ml에 1% 기질용액 1 ml를 가하여 40° 에서 60분간 작용시켜 효소 활성 측정때와 같은 방법으로 측정하였다.

6) 기질농도와 활성

기질 carboxymethyl cellulose를 0.1M-acetate 완충액(pH 4.5)으로 0.2~1.0%의 각 농도로 조제하여 그 각 기질 1 ml에 0.2% 효소용액 1 ml를 가하여 활성 측정때와 같은 방법으로 측정하였다.

7) 최적 pH

MacIlvaine 완충액으로 pH 3~8까지 조절한 각 0.2% 효소용액 1 ml에 1% 기질용액 1 ml를 가해 40° , 60분간 반응시켜 효소 활성때와 동일한 방법으로 측정하였다.

8) 최적 온도

0.2% 효소용액 1 ml에 1% 기질용액 1 ml를 가해 작용온도를 $30^\circ\sim 70^\circ$ 로 변화시켜 효소 활성때와 같은 방법으로 측정하였다.

9) 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향

시료 효소침전을 MacIlvaine 완충액으로 pH 3.0~7.0의 각각의 시료 효소용액을 조제하여, 40°, 24시간 방치후, 0.1M-acetate완충액으로 pH 4.5로 조절하여 각 pH 효소용액의 殘存효소 활성을 측정하였다.

10) 효소의 안정성에 미치는 염류의 영향

효소 활성 측정때와 동일한 조작을 한 作用液에 Table II에 표시한 각 농도의 염류를 첨가하여 작용 부활과 저해를 검토하기 위하여 효소 활성을 측정하였다.

실험 결과

기와층버섯의 활성을 측정하기 위하여 0.2% 시료 효소용액 1 ml와 1% 기질용액 1 ml을 40°, 60분간 작용시키고 DNS시약으로 효소반응을 정지하여 640 nm에서 흡광도를 측정할 결과는 Table I에서 보이는 바와 같이 기와층버섯의 역가는 750 units/g였다.

MacIlvaine 완충액 (pH 4.5)으로 일정하게 희석한 효소용액 1 ml에 1% 기질용액 1 ml을 가하여 40°, 60분간 작용시킨후 그 흡광도를 측정할 결과는 Fig. 3과 같다. cellulase 활성때의 흡광도가 0.5이하에서 효소량과 비례 관계를 나타내었다.

반응액중의 기질농도와 cellulase 활성과의 관계는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 기질농도 1% 이하에서 直線性을 나타 내었다.

MacIlvaine 완충액으로 pH 3~7으로 조절한 0.2% 효소용액 1 ml에 1% 기질용액 1 ml을 가해 40°, 60분간 반응시켜 pH가 효소 活性에 미치는 영향을 측정할 결과는 Fig. 5와 같이 pH 3, pH 4, pH 4.5, pH 5, pH 6, pH 7에서 효소의 활성은 각각 1.20, 1.46, 1.50, 1.40, 1.16, 0.6 mg/ml였다.

0.2% 시료 효소용액과 1% 기질용액을 30°~70°의 각각의 온도에서 60분간 작용시킨후 효소

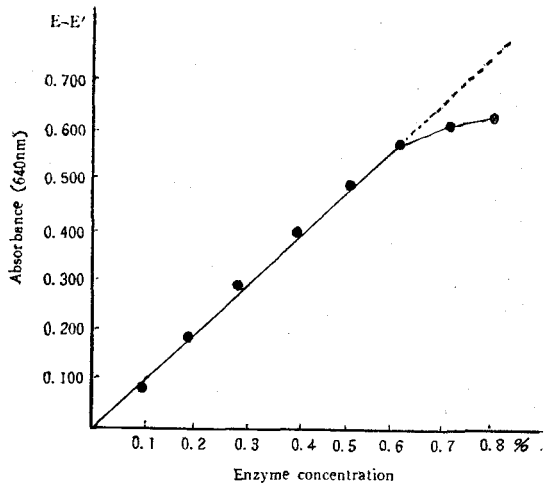


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on the enzyme activity.

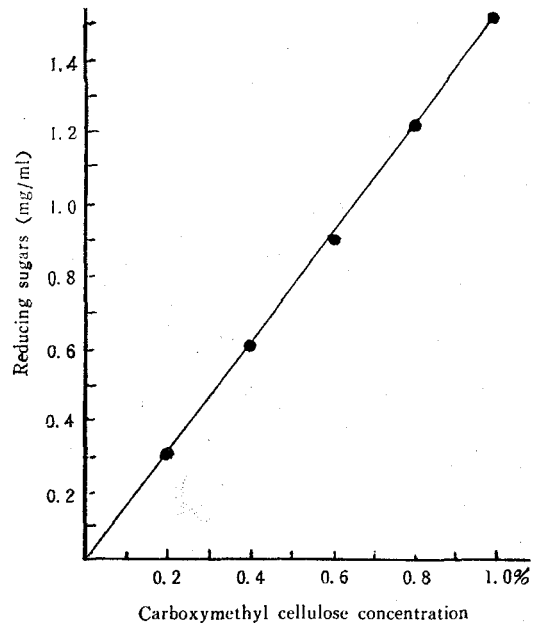


Fig. 4. Effect of substrate concentration on the enzyme reaction.

활성을 측정할 결과는 Fig. 6과 같다. 30°, 40°, 50°, 60°, 70°의 각 온도에서 효소의 활성은 각각 0.80, 1.50, 1.41, 1.00, 0.16 mg/ml였다.

효소시료를 MacIlvaine 완충액으로 pH 3.0~

Table I. Cellulolytic activity of cellulase in wild *Cryptoderma citrinum*

Scientific name	Korean name	Cellulolytic activity(units/g)
<i>Cryptoderma citrinum</i>	기와층버섯	750

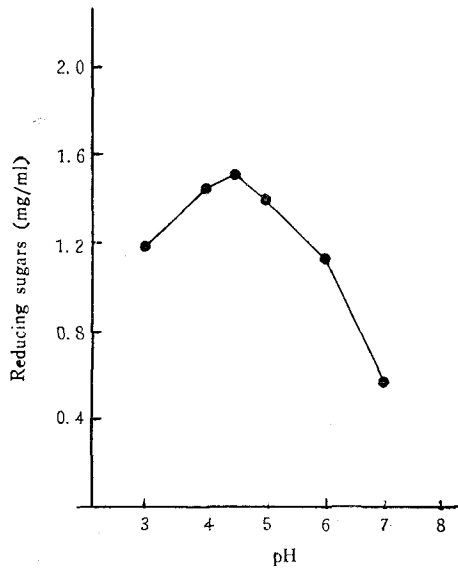


Fig. 5. Effect of pH on enzyme activity.

7.0의 각각의 효소용액을 만들어 40° 24시간 방치후 0.1M-acetate완충액 (pH 4.5)으로 조절하고 각 효소용액의 殘存효소활성을 측정된 결과 기와충버섯의 cellulase에 대한 pH 安定性은 Fig. 7와 같다. pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7에서 殘存효소활성은 각각 70%, 100%, 100%, 96%, 60%였다.

0.1M-MacIlvaine완충액 (pH 4.5)에 용해한 효용액을 30°~70°의 각 온도에서 10분간 가열 처리한 후 급냉하여 殘存효소활성을 측정된 결과는 Fig. 8와 같다. 30°, 40°, 50°, 60°, 70°

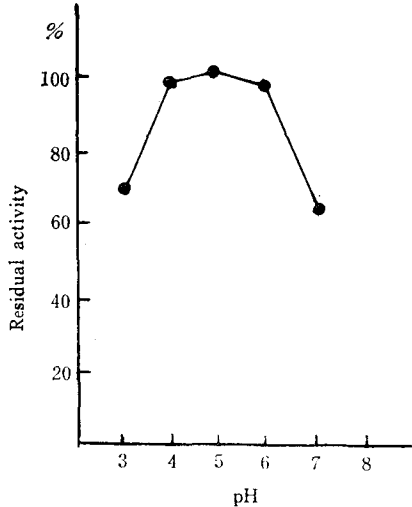


Fig. 7. pH stability of enzyme activity.

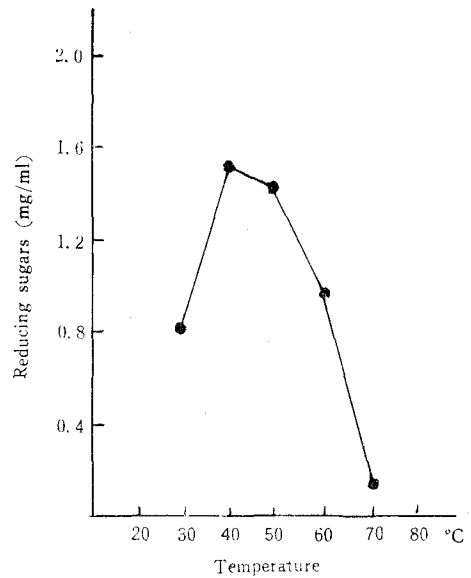


Fig. 6. Effect of temperature on enzyme activity.

에서 殘存효소활성은 각각 100%, 100%, 95%, 50%, 8%였다.

기와충버섯의 cellulase의 염류에 대한 영향을 알기 위하여 여러 농도의 염류를 첨가하여 작용 부활과 저해에 대하여 검토한 결과는 Table II와 같다. 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M의 Ca²⁺의 첨가할때에 cellulase의 활성은 각각 897, 850, 791 units/g이며 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M의 Fe²⁺는 855, 778, 772 unit/g이고 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M의 Co²⁺는 974, 884, 853 units/g였다. 그리고 10⁻²M의 Na⁺, K⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, EDTA

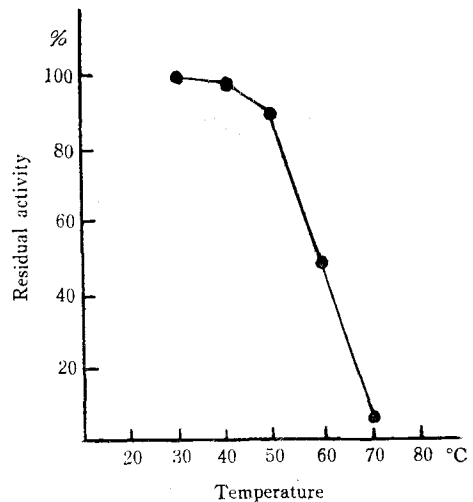


Fig. 8. Thermal stability of enzyme activity.

Table II. Effects of metallic ions on cellulolytic activity of *Cryptoderma citrinum*.

Compounds	Cellulolytic activity (units/g)		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
CaCl ₂	897	850	791
FeSO ₄	855	778	772
COCl ₂	974	884	853
NaCl ₂	605	645	742
KCl	602	660	740
MgSO ₄	741	758	752
CUSO ₄	224	685	720
ZnSO ₄	319	641	750
EDTA	725	762	752

의 첨가에는 각각 605, 602, 224, 319, 741, 725 units/g였다.

고 찰

저자는 한국산 야생 고등균류에서 protease 및 cellulase를 분리하여 보고한 바 있다. 기와층 버섯의 cellulase의 역가 750 units/g는 전보에서 보고한 느타리, 조개껍질버섯의 825 units/g보다 적은 수치이고 능이의 750 units/g와는 같고 말굽버섯의 550 units/g, 비늘버섯의 355 units/g보다는 높은 수치이다. 시료 효소용액의 농도는 일정한 농도의 시료 효소의 활성때의 흡광도가 0.5이하이면 효소량과 비례 관계를 나타내었으므로 이 범위내의 농도 즉 0.2%가 되게 시료 효소용액으로 조제하였다. 또한 반응액중의 기질농도와 효소활성과의 관계는 1%이하에서 직선성을 나타내었으므로 기질농도를 1%되게 조제하여 사용하였다.

pH가 효소활성에 미치는 영향을 고찰하면 pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0에서 1.46, 1.50, 1.4 units/g로 기와층버섯의 최적 pH는 4.5였다. 온도가 효소활성에 미치는 실험에서 나타남과 같이 40°에서 효소활성 1.50 units/g로 이때 가장 최적의 온도는 40°였다.

효소의 안정성에 미치는 pH의 영향에 있어서 pH 4.0~pH 5.0에서는 효소활성은 안정하였으나 pH 7.0의 중성, pH 3.0의 산성에서는 불안

정하였다. 또한 효소의 안정성에 미치는 온도의 실험에 있어서 효소의 활성은 30°, 40°에서는 안정하였으나 50°에서 90%로 떨어졌으며 60°에서는 활성의 절반이 줄었고 70°에서는 그 활성의 거의 전부를 알았다. 기와층버섯의 cellulase의 염류에 대한 영향 실험에서 Ca²⁺, Fe²⁺, Co²⁺의 염류의 첨가로는 부활효과가 나타났다. 그리고 10⁻²M의 Na⁺, K⁺, Cu²⁺, Zn²⁺의 첨가에는 저해작용이 나타났으나 그 보다 희석된 10⁻⁴M 농도에서는 별로 영향이 없었고 EDTA에 의한 영향은 나타나지 않았다.

결 론

한국산 野生 기와층버섯에서 추출한 효소분해 효소로 섬유소분해효소의 효소학적 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 기와층버섯의 섬유소분해효소의 역가는 750 units/g였다.

2. 기와층버섯의 섬유소분해효소의 최적 pH는 4.5이고 최적온도는 40°였다.

3. 기와층버섯의 섬유소분해효소는 Ca²⁺, Fe²⁺, Co²⁺에 의해 활성이 상승하였다. 그러나 Na⁺, K⁺, Cu²⁺, Zn²⁺의 첨가로는 저하되었으며 이 염류의 저농도에서는 거의 영향이 없었다.

<1988년 1월 7일 접수 : 1988년 1월 29일 수리>

문 헌

- Hong, S.W. and Min, C.P.: *Kor. J. Microbiol.* 12, 138 (1974).
- Hong, J.S., Uhm, T.B., Jung, G.T. and Lee, K.B.: *Kor. J. Mycol.* 12, 59 (1984).
- Ro, I.H.: Theses Collection of Sookmyoung Univ. Sci. 25, 475 (1984).
- Park, W.H., Kim, T.H. and Ro, I.H.: Theses Collection S.M. Pharm. Sci. I, 39 (1984).
- Park, W.H.: Theses Collection S.M. Pharm. Sci. 2, 93 (1985).
- Lee, J.S. and Suh, D.S.: *Kor. J. Mycol.* 13, 2, 111 (1985).
- Min, T.J., Lee, S.Y. and Kim, J.W.: *Korean Biochem. J.* 18, 2, 142 (1985).

8. Do, J.H. and Kim S.D.: *Kor. J. Mycol.* 14, 1, 79 (1986).
9. Lee, S.I. and Kim, B.M.: *Kor. J. Mycol.* 14, 3, 209 (1986).
10. Hong, S.W., Shin, K.S., Yoo, Y. and Lee, W. K.: *Kor. J. Mycol.* 24, 3, 189 (1986).
11. Park, W.H.: *Kor. J. Mycol.* 14, 1, 25 (1986).
12. Park, W.H., Kim, T.H. and Ro, I.H.: *Ibid.* 14, 225 (1986).
13. Park, W.H.: Theses Collection S.M. *Pharm. Sci.* 3, 53 (1986).
14. Hong, J.S., Kim, M.K., Kim, Y.H. and Lee, J.B.: *Kor. J. Mycol.*, 15, 2, 99 (1987).
15. Dishe, Z.: Method of Biochemical Analysis Vol. II, Academic Press, New York, p.319 (1956).
16. Ernst, H.R. and Hennig, K.: Methods in Enzymology XLV, edited by Laszlo Lorand, Academic Press, New York, p.26 (1972).
17. Gavrilova, V.P. and Falina, N.N.: *Mikol. Fito-patal (Russi)* 9, 431 (1975).
18. Hashimoto, K.: Toyo Shokuhin Kenkyusho Kenkyu Hokukusho 10, 163 (1972).
19. Kawain, M.: Jpn. Takkyocho Tokkyokoho Tokkyosyutugangkokoku. Syo-47-34953 (1968).
20. Miodecki, H., Lasota, W. and Tomezak-Nowacka: *Bromat. Chem. Toksykol.* VI, 41, 297 (1973).
21. Nobuhiko, K.: *J. Antibiotics.* 16, 139 (1963).
22. Omura, H., Tomita, Y., Murakami, H. and Nakamura, Y.: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 18, 191 (1974).
23. Umata, M.: Jpn. Tokkyocho Tokkyokoho Tokkyosyusugangkokoku, Syo-49-15793 (1974).
24. Wirnt, R. and Walf-Peter, F.: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd edition, Vol. I, Bergmeyer, p.1044 (1972).
25. Worthington: Enzymes, Enzyme Reagent Related Biochemicals, Worthington Biochemical Corporation Breehold, New Jersey (1980).
26. Lin, J.Y., Lin, Y.J., Chen, C.C., Wu, H.H., Shi, G.Y. and Jeng, T.W.: *Nature*, 252, 15 (1974).
27. Kilroe-Smith, T.A.: *J. the South Afr. Chem. Inst* 10, 29 (1957).
28. Imazeki: Common Fungi of Japan in Color, Hoi-kusha Publishing Co., Osaka (1981).
29. Singer, R.: The Agaricales in Modern Taxonomy, 3rd edition, J. Cramer (1975).