

목질 재료의 자기가수분해 및 효소당화에 관한 연구(IV)^{*1}

-Laccase 및 Cellulase의 동시 이용 가능성-

조 남 석^{*2}· 임 창 숙^{*2}· 이 재 성^{*3}

Autohydrolysis and Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Materials(IV)^{*1}

- Simultaneous Utilization of Laccase and Cellulase -

Nam Seok Cho^{*2}· Chang Suk Lim^{*2}· Jae Sung Lee^{*3}

SUMMARY

This study was carried out to know the possibility of simultaneous utilization of laccase from white-rot fungus with cellulase on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate from autohydrolyzed oak wood.

Laccases from 3 white-rot fungi, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, and *Phanerochaete chrysosporium*, were isolated, purified and measured their activities. The highest activity was shown in *Pleurotus ostreatus* and the lowest in *Phanerochaete chrysosporium*. Laccase from *Pleurotus ostreatus* has optimum pH of 5.94, Km value of 3.209 mM and appeared to be stable at relatively wide pH range, 4.7-8.72. Temperature stability showed that 60% activity was preserved after 40 minutes at 50°C.

Laccase from *Ganoderma lucidum* reached to the maximum activity during 15-20 days incubation. This enzyme has optimum pH of 6.45, Km value of 6.71 mM and pH range of 5.0-9.0 for stabilization. 95% activity was preserved at 30°C and 58% activity at 50°C.

Concerned to the enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate with both enzymes, cellulase and laccase, simultaneously, mixed culture filtrates and mycellium extracts were shown higher hydrolysis rates than those of *Trichoderma viride*. There were no significant differences in the extent of hydrolysis among various mixed culture filtrates and mycellium extracts.

Keywords : laccase, enzymatic hydrolysis, white-rot fungus, cellulase, lignocellulosic material.

1. 서 론

유한자원인 화석자원의 대체 자원으로서 지구

*1. 接受 1989年 5月 2日, Received May 2, 1989.

본 연구는 1986년도 한국 과학재단의 연구비 지원으로 수행되었음.

*2. 영남대학교 농축산대학 (College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

*3. 영남대학교 농축산대학, College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

상에 가장 축적량이 풍부(1.84×10^{12} ton)하고, 그 분포도 비교적 광범위하며, 그리고 재생산 가능(년간 1.7×10^{11} ton)한 바이오매스 자원(1)의 이용에 관한 많은 관심이 집중되었고, 따라서 이들 자원을 원료로 하여 식료품, 가축사료, 에너지원 및 화학공업 원료로의 전환기술을 개발하려는 연구가 세계적으로 활발히 추진되고 있는 사실은 결코 우연이 아니라 할 수 있다.

지금까지 제안되고 있는 전환기술로서는 열분해, 가스화, 액화 등과 같은 열화학적 방법(Thermochemical Process)과 가수분해, 발효 등의 미생물로부터 생산한 효소를 이용하는 미생물학적 방법(Microbial Process) 등을 들 수 있다(2-4).

목질계 자원을 구성하는 cellulose와 hemicellulose는 lignin이라고 하는 방향족의 유기 고분자 화합물에 의해 둘러싸여 있으며, 이들 cellulose와 hemicellulose를 이용하기 위해서는 이러한 lignin을 제거하여야 하며, 이들 다당류의 결정성이 매우 크기 때문에, 이들 성분을 미생물학적 방법으로 이용하기 위해서는 이들과 효소와의 반응성을 높여야 한다. 이와 같이 다당류 및 목질재료의 효소 반응성을 높일 목적으로 여러가지의 전처리 방법이 제안되고 있는바, 목재를 자기가수분해(Autohydrolysis)(5-7)하여 목재 주성분을 효율적으로 분리시키며, 셀룰로오스의 효소에 의한 가수분해를 용이하게 하는 방법들이 보고되고 있다. 아울러 필자 등은 자기가수분해한 시료의 성분 분획 특성과 이들 기질의 효소적 당화와 관련된 일련의 연구를 수행하여 왔으며, 이 과정에서 탈리그닌 처리가 효소적 가수분해를 상당히 촉진시키는 사실을 확인하였는바, 이와같은 탈리그닌을 미생물에 의해 손쉽게 달성할 수 있을지의 여부에 관심을 가지게 되었다.

한편 에너지 절약적 측면에서 목재의 리그닌을 제거하는데 미생물을 효율적으로 이용하려는 시도와 함께 효소학의 발달은 지금까지의 물리

적·화학적 전처리가 아닌 미생물이 분비하는 효소처리에 의하여 목재로부터 리그닌을 제거하려는 목적의 연구(8-15)가 이루어졌으며, 리그닌 분해효소의 하나인 laccase가 일본의 Yoshida에 의하여 발견되었는바, 이 효소는 polyphenol oxidase의 일종으로서 식물 및 버섯류에 널리 분포한다.

필자등(16-19)은 백색부후균이 분비하는 리그닌 분해효소인 laccase를 몇 종류의 균주로부터 추출·분리하여 이들의 효소적 특성에 관하여 살펴보았는바, 이들 효소들이 리그닌을 분해할 수 있기 때문에 이들 효소를 탈리그닌 혹은 전처리로서의 과정에 사용하지 않고, 목질계 다당류의 cellulase를 이용한 효소분해시 동시에 직접 첨가하여 효소분해 하였을 때 어떠한 결과가 나올지의 여부도 흥미있는 실험으로 생각된다.

본 연구에서는 우리나라에서 최대의 축적량을 보유하고 있는 활엽수재로서의 신갈나무를 공시재료 하여, 목질재료의 전처리로서 자기가수분해법(Autohydrolysis)을 채용, 처리 시료를 효소적으로 가수분해를 행할때 백색부후균이 분비하는 리그닌 분해효소인 Laccase와 Cellulase를 동시 이용할 경우 Laccase에 의한 기질의 리그닌 분해가 cellulase에 의한 효소당화 반응의 촉진 여부를 검토하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시수종

공시수종인 신갈나무(*Quercus mongolica*)는 서울대학교 연습림(백운산)에서 벌채한 38년생의 건전재였다.

2.2 자기가수분해 시료조제

전보(18)에서와 동일한 조건에서 자기가수분해한 시료를 사용하였다.

2.3 리그닌 분해효소인 laccase의 분리

2.3.1 공시균으로서

- *Pleurotus ostreatus*(16)
- *Ganoderma lucidum*(17-18)
- *Phanerochaete chrysosporium*(13-15)

의 3종의 백색부후균을 선정하여 배양하고,

2.3.2 laccase 활성 측정 및 분리

조효소액 1.9ml와 citrate phosphate buffer(pH 6.48, 0.02M) 1.7ml를 섞은 다음, 5mM의 p-phenylenediamine 0.3ml를 첨가한 즉시 525nm에서 흡광도를 측정하고, 이후 매분마다 흡광도를 측정하여 활성을 다음식으로 계산하였다(21).

$$\text{Activity} = \frac{10 \times \Delta E}{E \times \Delta t} \text{ (unit / sec)}$$

E: 65,000

ΔE : O.D.의 변화

Δt : 반응시간(sec)

2.3.3 최적 pH, pH 안정성, 온도 안정성 및 Km value 등 효소적 특성조사

최적 pH는 조효소액 1.9ml에 citrate phosphate buffer(pH 3-12) 및 Clark lub's buffer(pH 7-12)를 섞은 다음, 0.3ml의 기질을 첨가하여 525nm에서 O.D.를 매분마다 초기속도를 측정하고, 이로부터 최적 pH를 구하였다.

pH 안정성은 조효소액 1.9ml에 buffer 1.7ml를 혼합후 각 pH에서 60분간 방치후, 다시 최적 pH를 조절한 후 활성을 측정하였다.

온도 안정성은 조효소액 1.9ml에 citrate phosphate buffer(pH 6.45) 1.7ml를 혼합 후, 40분간 각 온도에서 방치후, 급냉한 다음 초기속도를 측정하여 구하였으며, Km 값은 정제된 효소에 기질의 농도를 2, 3, 5, 10, 30, 50, 60m M로 변화시키면서 활성을 측정하여 이로부터 Line weaver Burk plot를 그린 다음 Km값을 구하였다.

2.4 효소분해

소정의 시료와 일정 농도의 효소를 30ml의 L

형 삼각 후라스크에 넣고 40°C에서 산도 4.5의 sodium acetate 완충 용액을 가하여 소정시간 동안 효소분해를 행하였으며, 그 후 당화 잔사를 glass filter 1G4를 사용, 여과하고, 이를 105°C의 전기 항온 건조기에서 항량이 될때까지 건조, 평량하여 다음식에 의거하여 가수분해율을 구하였다.

$$\text{가수분해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{잔사의 중량}(g)}{\text{시료의 중량}(g)}\right) \times 100$$

2.5 환원당의 측정

시료 1g과 일정 농도의 효소를 70ml 용량의 삼각 후라스크 혹은 L형 후라스크에 넣고 40°C에서 pH 4.5의 sodium acetate의 완충용액을 가하여 효소분해를 행하였으며, 생성되는 환원당을 Somogyi-Nelson법(22)으로 측정하였다.

2.6 효소 활성의 측정

pH 4.5의 0.1M sodium acetate 완충용액을 사용하여 40°C에서 다음과 같은 방법(23)으로 측정하였다.

2.6.1 Endo- β -1,4-glucanase(CMCCase): carb-oxymethyl cellulose(CMC) 1% 수용액 0.5ml에 완충용액 0.4ml를 가하고, 5분간 예열한 다음, 0.012%의 효소 용액 0.1ml를 가해 10분간 진탕, 반응시켜 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson 법으로 정량하였다.

2.6.2 Cellobiohydrolase(Avicelase): avicel 200 mg을 기질로 하여 효소농도 0.00436%가 되도록 전 용액량을 11ml로 하여 1시간 반응시켜, 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson법으로 정량하였다.

2.6.3 Exo- β -1,4-glucanase(F P Activity): Whatman No. 1 여과지 50mg을 1ml의 증류수에 넣고 1% 효소액 1ml와 함께 50°C에서 1시간 반응시켜 생성되는 환원당을 Somogyi-Nelson법으로 정량하였다.

2.7 가수분해시 리그닌 분해효소의 동시 이용

리그닌 분해효소는 *Pleurotus ostreatus* 및 *Phanerochaete chrysosporium*의 액체 배양액을 각각 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획하여 회수하고, cellulase는 *Trichoderma viride*의 액체 배양액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 60-80% 포화시켜 침전물을 회수하여 사용하였다. 또한 균사 추출액도 사용하였다.

목질 분해실험은 40mesh로 분쇄한 시료 0.5g에 상기방법으로 준비한 균주 배양액과 그 균사 추출액을 효소로 사용하여 각각 30ml씩 가하고 40°C에서 24시간 가수분해 시킨후, 가수분해율, 환원당 및 잔사의 리그닌 함량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 리그닌 분해효소의 활성 및 분리

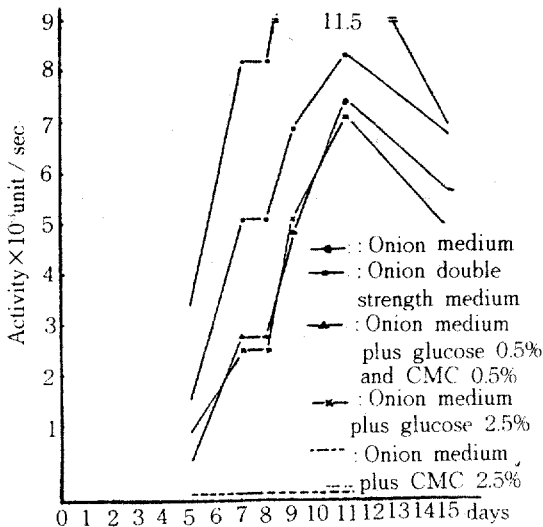


Fig. 1. Laccase activity from various liquid media during incubation.

3.1.1 *Pleurotus ostreatus*로부터의 Laccase

균주를 PDA 사면배지에 순수배양후 양과 기본배지, 양과 200g 배지, glucose 첨가배지, glucose+CMC 첨가배지, CMC 첨가배지, 톱밥 첨가배지 및 보리짚 배지 등에 무균적으로 접종하여 진탕, 배양하였으며 배양시간의 경과

에 따른 laccase 활성 변화는 Fig. 1과 같다. 균사 접종후 5일부터 활성이 나타나서 급격한 활성 증가를 기록하였고, 11일째 최대 활성치를 보여 주었다. 배지별로는 양과 200g 배지에서 효소활성이 매우 높았고, glucose나 CMC는 효소활성을 오히려 억제하는 것으로 나타났다. 그 원인으로 생각할 수 있는 것은 glucose 및 CMC와 같은 탄소원이 충분하므로 리그닌 분해효소의 생산 필요성이 없기 때문인 것으로 생각된다.

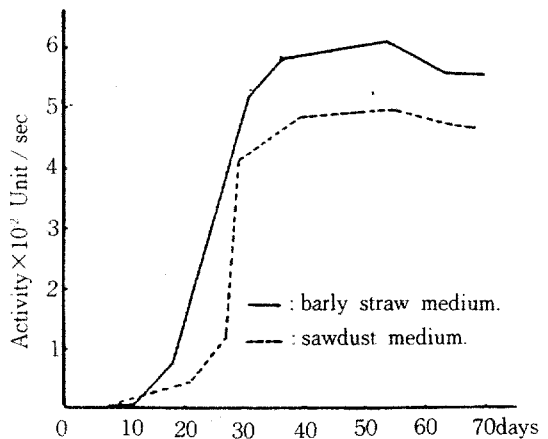


Fig. 2. Laccase activity from sawdust and barley straw extracts media.

Fig. 2는 보리짚 배지와 톱밥배지의 활성을 나타낸 것으로서 2배지 모두 laccase의 활성이 매우 좋은 것으로 나타났는데, 보리짚 배지의 최대 활성치는 양과 기본배지의 최대 활성치보다 약 7.3배, 양과 200g 배지의 그것보다 약 5.3배 이상의 강한 활성을 보여주었다. 톱밥 배지는 보리짚 배지보다는 약하였지만, 양과기본 배지의 최대 활성치의 5.9배였으며, 양과 200g 배지보다는 약 4.3배 활성을 나타냈다.

Table 1은 최적 pH를 나타낸 것으로, 이 효소의 최적 pH는 5.94로 나타났다. 그리고 citrate phosphate buffer(pH 3-7)과 Clark lubs buffer(pH 7-12)로 측정된 pH 안정성은 4.7-8.72로서 비교적 넓은 pH 영역에서 안정하였다.

온도 안정성에 있어서는 Table 2에서 보는 바

Table 1. Optimum p H of laccase from *Pleurotus ostreatus*

Buffer	pH	ΔE	Δt	Activity unit / sec
		O.D.	sec	
Citrate	3.87	0.001	300	5.13×10^3
phosphate buffer	4.70	0.083	300	4.26×10^3
	4.70	0.047	120	6.03×10^3
	5.54	0.19	180	1.62×10^2
	5.94	0.202	180	1.73×10^2
	6.62	0.126	180	1.08×10^2
Clark lub's buffer	7.44	0.051	180	4.36×10^3
	7.07	0.304	690	6.78×10^3
	7.53	0.145	520	4.29×10^3
	8.72	0.036	610	9.08×10^4
	10.10	0.012	730	2.53×10^4
	12.05	0.005	840	9.16×10^5

Table 2. Temperature stability of laccase at 40°C for 40 min.

Temperature °C	Activity unit / sec	Activity index	Inactivity %
Blank	0.0035897	1	-
30	0.0033333	0.93	7.1
40	0.0028205	0.79	21.5
50	0.0021538	0.60	40.0
60	0.0004615	0.13	87.0
70	0.0001025	0.03	97.2
80	0.0000512	0.01	98.6

와 같이 30°C에서 40분간 방치하였을 때 약 93%의 높은 활성이 보존되었으며, 40°C에서도 약 79%의 활성을 나타냈고, 50°C에서는 약 60%로서 60°C 이상에서는 급격히 활성이 감소하여 강한 실활현상을 일으켰다.

Km 값은 3.209m M이었으며, Table 3은 이러한 Km 값에 대한 각 기질농도 변화에 따른 laccase 활성을 나타낸 것으로서, 효소 반응의 최대속도의 1/2까지 도달하는데 필요한 기질의 농도가 그다지 높지 않다는 것은 효소의 이용면에서 매우 유리할 것으로 생각된다.

3.1.2 *Ganoderma lucidum*으로 부터의 Laccase

균주를 PDY 사면배지에 순수배양후 양과 기본배지, 양과 200g 배지, 염류배지, 감자배지

Table 3. Laccase activity against substrate concentration.
(Km 3.209 m M)

Substrate m M	ΔE O.D.	Δt sec	Activity velocity	1	1
				Substrate	Velocity
40	0.222	120	2.85×10^2	0.025	35.1
30	0.300	180	2.56×10^2	0.033	39.0
10	0.184	120	2.36×10^2	0.100	42.3
5	0.146	120	1.87×10^2	0.200	53.4
3	0.062	60	1.59×10^2	0.333	62.9
2	0.140	180	1.20×10^2	0.500	83.6

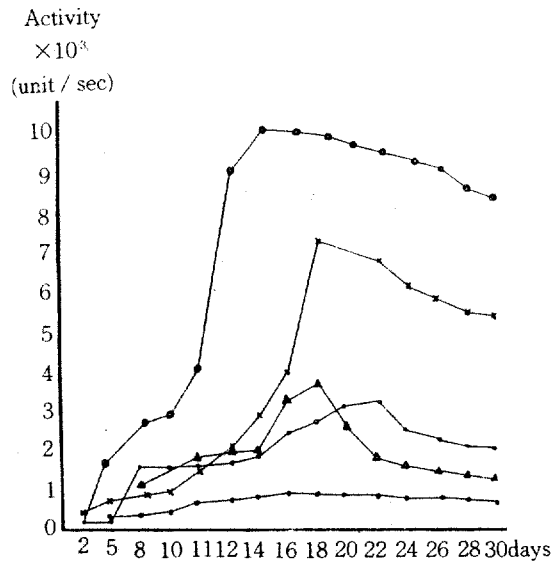


Fig. 3. Laccase activity from various liquid media during incubation.

O : onion, X : onion 200g, ● : salts
△ : potato. ⊙ : PYD medium

및 PYD 배지 등에 무균적으로 접종하여 26-28°C에서 진탕 배양하였으며 배양시간의 경과에 따른 laccase 활성변화는 Fig. 3과 같다. 양과 기본배지에서는 균사 접종후 8일부터 활성이 나타나서 급격한 활성 증가를 기록하였고, 20일경 최대 활성치를 보여주었다.

배지별로는 양과 200g 배지에서 양과 기본배지 보다도 훨씬 효소활성이 높았는데, 이는 양과중의 성분이 활성에 많은 영향을 미치는 것이기 때문인 것으로 생각된다. 염류배지는 대체로 낮은 활성을 나타냈는데 이는 inducer로 작용하

는 탄소원이 전혀 없기 때문에 리그닌 분해효소도 생산되지 못한 것으로 생각된다. 감자배지는 18일경 활성이 최대값에 도달하였고, PYD 배지는 14-16일경 최대 활성을 나타낸 후 서서히 감소하였으며, 여러가지 배지가운데 laccase의 생산능력이 가장 높게 나타났다. 이 배지가 가장 높은 활성을 나타내는 이유로서는 yeast extract 성분이 활성에 큰 영향을 주는 것으로 생각된다. 전체적으로 이 균은 접종후 15-20일경 최대 활성치를 나타냈다.

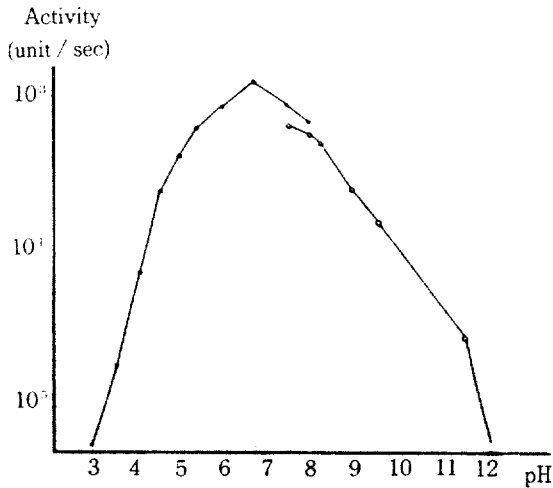


Fig. 4. Optimum pH of laccase from *Ganoderma lucidum*.

- : Citrate phosphate buffer
- : Clark lub's buffer

Table 4. Temperature stability of laccase at 40°C for 40 min.

Temperature °C	Activity unit / sec	Activity index	Inactivity %
Blank	0.00646	1	-
30	0.00616	0.95	4.8
40	0.00410	0.63	36.5
50	0.00374	0.58	41.9
60	0.00307	0.48	52.0
70	0.00107	0.17	82.4
80	0.00010	0.01	98.5
90	0.0	0.0	100

Fig. 4은 최적 pH를 나타낸 것으로, 이 효소의 최적 pH는 6.45로 나타났는데, 전술한

*Pleurotus ostreatus*의 5.94보다 약간 높은 것으로 나타났다. 그리고 citrate phosphate buffer(pH 3-7)과 Clark lub's buffer (pH 7-12)로 측정된 pH 안정성은 5.0-9.0의 범위로서 *Pleurotus ostreatus*의 4.7-8.72보다 훨씬 넓은 pH 영역에서 안정됨을 알 수 있었다.

온도 안정성에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이 30°C에서 40분간 방치하였을 때 약 95%의 높은 활성이 보존되었으며, 40°C에서도 약 64%의 활성을 나타냈고, 50°C에서는 약 58%로서 비교적 열에 안정하였으며 70°C 이상에서는 급격히 활성이 감소하여 강한 실활현상을 일으켰다.

Km 값은 6.71mM이었으며, *Pleurotus ostreatus*의 3.209mM 보다는 다소 높았다. Table 5은 이러한 Km 값에 대한 각 기질농도 변화에 따른 laccase 활성을 나타낸 것으로서, 효소 반응의 최대속도의 1/2까지 도달하는데 필요한 기질의 농도가 그다지 높지 않다는 것은 효소의 이용면에서 매우 유리할 것으로 생각된다.

Table 5. Laccase activity against substrate concentration. (Km 6.71m M)

Substrate m M	ΔE O.D.	Δt sec	Activity velocity	1	
				Substrate	Velocity
60	0.130	180	1.11×10 ²	0.016	90.0
30	0.117	180	1.00×10 ²	0.033	99.6
10	0.078	180	6.66×10 ³	0.100	150.1
5	0.056	180	4.75×10 ³	0.200	210.6
3	0.042	180	3.57×10 ³	0.333	280.7
2	0.029	180	2.47×10 ³	0.500	404.8

3.2 효소적 가수분해시 리그닌 분해효소의 동시 이용

Table 6은 *Trichoderma* 및 백색 부후균의 laccase 활성 및 cellulase 활성을 나타낸 것으로서, laccase 활성에 있어서는 *Trichoderma*가 가장 낮은 값을 보여주었고, 리그닌 분해력이 가

장 높은 것으로 알려지고 있는 *Phanerochaete*가 *Pleurotus* 보다도 훨씬 낮은 활성을 결과하였다. 또한 균 배양액과 균사 추출액의 활성을 비교한 결과, 배양액의 효소 활성이 균사 추출액의 그것보다 높은 것으로 나타났다.

cellulase 활성에 있어서는 본시험에 사용된 *Trichoderma viride*의 효소 활성이 리그닌을 주로 분해하는 것으로 알려진 다른 백색 부후균 *Pleurotus ostreatus* 및 *Phanerochaete chrysosporium*의 활성보다 낮은 결과를 주었는바, *Trichoderma*의 경우 cellulase를 효과적으로 생산하기 위해서는 α -cellulose같은 inducer의 첨가가 필요하나, 본 실험에서는 백색 부후균과 동일한 배지에서 inducer를 첨가하지 않은채 배양하였기 때문에 *Trichoderma*의 cellulase 활성이 매우 낮게 나타났으며, 이와같은 조건에서는 *Trichoderma*의 cellulase 효소생성능이 백색부후균의 그것보다 훨씬 낮아짐을 알 수 있었다.

Table 6. Laccase and cellulase activities of various enzyme sources.

Source	Enzyme	Laccase unit / sec	Cellulase, IU		
			β -gluco- sidase	CMC ase	FP Ac- tivity
Culture Filtrates					
	<i>T. viride</i>	1.03×10^4	0.07	0.05	0.07
	<i>P. ostreatus</i>	3.22×10^2	0.44	0.63	0.36
	<i>Ph. chrysosporium</i>	2.05×10^4	0.59	0.53	0.50
Mycellium Extracts					
	<i>T. viride</i>	-	0.15	0.13	0.12
	<i>P. ostreatus</i>	1.58×10^2	0.49	0.33	0.29
	<i>Ph. chrysosporium</i>	0.05×10^3	0.59	0.66	0.66

**T.*, *P.* and *Ph* stand for *Trichoderma*, *Pleurotus* and *Phanerochaete* respectively.

*Trichoderma viride*의 경우 inducer 등을 첨가하게 되면 cellulase 활성도 매우 높을 것으로 예상되며, 따라서 가수분해율도 상승할 것으로 기대되어 금후 이에 관하여서도 검토코져 한다.

cellulase와 laccase를 동시에 사용하였을 경우 목질재료의 가수분해에 어떠한 영향이 있는가를 검토하고자 *Trichoderma viride*, *Pleurotus*

ostreatus 및 *Phanerochaete chrysosporium*의 균주 배양액과 그 균사 추출액을 효소로 사용하여 자기 가수분해 처리한 목질 시료를 40°C에서 24시간 당화하였는 바, 그 결과는 Table 7과 같다.

당화율에 있어서는 *Trichoderma* 및 다른 백색 부후균으로 부터의 효소를 단독으로 사용한 경우, 가수분해율이 16.2% 전후로서 거의 같은 값을 보여주었으며, cellulase 효소 활성이 낮은 *Trichoderma*의 경우가 가장 낮은 효소분해율과 환원당 생성을 결과하였다. 이들 효소들을 혼합하여 사용함으로써 가수분해율도 18.6% 이상으로 향상되었으며, 환원당 생성량도 단독 효소 처리보다 약 57%나 증가하였다. 그리고 균주 배양액과 균사추출액의 효소적 가수분해율에는 큰 차이가 인정되지 아니하였다.

Table 7. Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed oak wood with mixed enzymes.

Enzymes	Extent of hydrolysis	Reducing sugar	Lignin
	%	mg / ml	%
Control	3.2	0	24.5
Culture filtrates			
<i>T. viride</i>	16.2	0.30	
<i>P. ostreatus</i>	16.2	0.49	
<i>Ph. chrysosporium</i>	-	0.50	23.8
<i>T+P</i>	20.2	0.55	
<i>T+Ph</i>	16.2	0.46	20.9
<i>T+P+Ph</i>	20.4	0.58	20.4
Mycellium extracts			
<i>T. viride</i>	14.4	0.35	
<i>P. ostreatus</i>	16.8	0.50	
<i>Ph. chrysosporium</i>	16.6	0.51	21.9
<i>T+P</i>	18.6	0.58	24.4
<i>T+Ph</i>	18.9	0.57	
<i>T+P+Ph</i>	18.9	0.59	22.1

**T.*, *P.* and *Ph* stand for *Trichoderma*, *Pleurotus* and *Phanerochaete* respectively.

리그닌 함량과 효소적 가수분해율의 관계에 있어서는 *T+Ph*의 경우 리그닌 함량이 낮음에도 불구하고 가수분해율 및 환원당 생성량이 매

우 낮았으며, T+P의 경우 거의 탈리그닌이 일어나지 않았음에도 가수분해율과 환원당 생성량에 있어서는 매우 높은 결과를 보였다는 사실로부터 리그닌 함량 그 자체와 가수분해율과는 큰 상관성이 없다고 하는 것을 인정할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구는 자기가수분해처리 시료를 효소적으로 가수분해를 행할 때 백색부후균이 분비하는 리그닌 분해효소인 Laccase와 Cellulase를 동시 이용할 경우 Laccase에 의한 기질의 리그닌 분해가 cellulase에 의한 효소당화 반응의 촉진 여부를 검토하기 위하여 실시하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

배양한 두종의 백색 부후균 *Pleurotus ostreatus*, *Genoderma lucidum*에서 Laccase의 활성이 인정되었으며, 가장 강력한 리그닌 분해균으로 알려진 *Phanerochaete chrysosporium*에서의 laccase 활성은 2.05×10^{-1} 로서 *Pleurotus*보다 낮았다.

*Pleurotus ostreatus*로부터 추출된 laccase는 최적 pH 5.94였고, pH 4.7-8.72의 비교적 넓은 범위에서 안정하였으며, 온도 안정성도 50°C까지는 매우 좋았고, Km 값은 3.209mM 이었다.

*Genoderma lucidum*으로부터 추출된 laccase는 균사 접종후 15-20일 사이에 높은 활성을 보여 주었고, 최적 pH는 6.45, pH 5.0-9.0 범위에서 안정성을 보여 주었다. 온도 안정성에 있어서는 30°C에서 95% 이상의 활성을 보존하였고, 50°C에서도 58% 활성을 유지하였으며, Km 값은 6.71mM 이었다.

목질시료의 당화와 관련하여 *Trichoderma viride*, *Pleurotus ostreatus* 및 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 유래한 배양액 및 균사 추출액을 사용하여 가수분해한 결과, *Trichoderma* 단독보다는 백색부후균 효소와 혼합시킨 효

소액의 당화율이 다소간 높은 것으로 나타났으며, 배양액과 균사추출액 간에는 큰 가수분해율의 차이가 인정되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Goldstein, I.S. 1981. Organic chemicals from Biomass, CRC Press
2. Shimizu, K. 1979. High Polymer, 860
3. Huruya, K. 1981. Materials, 657
4. Millett, M.A., A.J. Baker & L.D. Satter. 1975. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5: 193-197
5. Tanahashi, M. & T. Higuchi. 1983. Wood Research 69: 36
6. Tanahashi, M. 1983. Biomass & Biotechno. 4: 1-9
7. Tanahashi, M. & T. Higuchi. Japan Tappi 39(1): 118-127
8. Hartley, R.D et al. 1974. J. Sci. Food. Agri., 25: 433-436
9. Kirk, T.K. & W.E. Moore. 1973. Wood and Timber, 4: 72-77
10. Kirk, T.K. & T.L. Highley. 1973. Phytopathology 63: 1338
11. Iwahara, H., T. Yoshimoto and T. Fukuzumi. 1981. Mokuzaigakkaishi 27(4): 331-336
12. Tien, Ming & T.K. Kirk. 1984. Proc. Nat. Acad. Sci., 81: 2280-2284
13. Takahashi, M. & K. Nishimoto. 1976. Wood Research 59/60: 19-32
14. Kirk, T.K. et al. 1978. Arch. Microbiol. 117: 277-285
15. Leonowicz, A. & K. 1981. Graynowicz. Enzyme Microb. Technol. 3(1): 55-58
16. Lee, J.S. et al. 1985. J. Korean Appl. Microbiol. 13(3): 65-70

17. _____, 1985. J. Korean Fungal Sci. Soc. 13(2): 111-114
18. _____, 1986. J. Korean Appl. Microbiol. Soc. 14(2): 139-143
19. Lee, J.S. & Nam Seok. Cho. 1987. J. Tappik 19(2): 9-15
20. Cho, Nam Seok. 1989. J. Tappik, in press
21. Morohoshi, N., T. Nakamura & T. Hara-guchi. 1985. Bull. Exp. For., Tokyo Univ. Agri. and Technol. 21: 101-105
22. Somogyi, J. 1952. J. Biol. Chem. 195: 19
23. Fujishima, S., F. Yaku & T. Koshijima. 1987. Recovery and reutilization of cellulases used for the hydrolysis of woods IV., Mokuzaigakkaishi 33(6): 530-533