

송이의 세포외 분비 β -Glucosidase 효소의 특성

¹민 응 기 · †한 영 환

¹동국대학교 대학원 응용생물학과, 동국대학교 생물학과
(접수 : 1999. 12. 14., 게재승인 : 2000. 2. 15.)

Characteristics of Extracellular β -Glucosidase in *Tricholoma matsutake*

Eung-Gi Min¹ and Yeong-Hwan Han[†]

¹Department of Applied Biology, Graduate School, Dongguk University, Seoul 100-715
Department of Biology, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714, Korea
(Received : 1999. 12. 14., Accepted : 2000. 2. 15.)

In order to determine the characteristics of β -glucosidase associated with cellulose degradation, the enzyme produced extracellularly by the mycelia of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001 in culture broth was partially purified. The enzyme activity was maintained in the range of temperatures from 55 to 70°C and its optimum temperature was 65°C. The β -glucosidase enzyme showed relatively high activity in the range of pH 3.0-5.0 and its optimum pH was 4.0. Under the optimal conditions, the specific activity of β -glucosidase for salicin as a substrate was 18.7 unit/mg protein. After thermal treatment of the enzyme at 55°C for 60 min, more than 90% of the enzyme activity was still sustained. Iron(Fe⁺) stimulated enzyme activity, whereas mercury(Hg⁺) and copper(Cu⁺) inhibited. Compared to salicin as a substrate, the relative activity for cellobiose was observed to be 48.6%. The apparent K_m and V_{max} of the enzyme with cellobiose were 0.12 mM and 0.02 umol/min, respectively.

Key Words : β -glucosidase, *Tricholoma matsutake*, extracellular, activity

서 론

송이(*Tricholoma matsutake*)는 독특한 맛과 향으로 인하여 가장 선호되는 식용버섯으로 외생균근성 활물기생(ectomycorrhizal parasite) 진균이다(1-2). 송이에 관련된 국내외적 연구는 생리 및 유전학적 몇몇 연구가 한정적으로 이루어져 왔다(3-9). 그러나, 대다수의 연구는 생태학 및 임학적 관점에서 연구가 이루어졌고 송이 자실체의 인공재배에 대한 연구는 세계적으로 그 성공 사례가 전무한 실정이다. 송이 인공재배의 기초가 되는 효소학적, 생리학적 연구가 미흡한 가장 큰 이유는 액체 및 고체배지를 이용한 균사체 성장시 그 속도가 매우 느리다는 점에 기인한다.

대부분의 사물기생(saprophyte) 버섯은 식물의 세포벽을 구성하는 cellulose와 hemicellulose 등의 섬유소를 분해하여 성장하나, 활물기생 버섯은 살아있는 숙주식물이 생산하는 영양소를 이용하여 성장하는 특징적 차이점이 있다. 이와 같은

활물기생 버섯의 특성은 송이를 인공적으로 재배하기 어렵게 하는 주 요인으로 지적되어 왔다. 천연의 cellulose는 단단한 조직으로 구성되어 있어, cellobiohydrolase(EC 3.2.1.91) 효소와 endo-glucanase(EC 3.2.1.4) 효소에 의한 2단계 반응으로 진행되며 이 두 효소 이외에 β -glucosidase(EC 3.2.1.21) 효소가 관여하여 최종적으로 glucose를 생산한다고 보고하였다(10). 송이균사의 액체 배양에 관한 연구 결과, cellobiose를 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있으며 cellulose 분해에 관련된 효소 중 β -glucosidase 효소 활성이 확인되었다(7,9) Cellulose 분해에 관련된 효소의 특성에 관한 연구와 유전적 분석 및 응용을 통하여 송이의 인공재배 가능성을 탐색할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구는 활물기생 송이의 인공재배를 최종 목적으로, cellulose 섬유소 분해에 관련된 세가지 효소 중 β -glucosidase의 특성을 파악하고자 송이균사를 액체배양한 다음 세포외로 분비되는 효소를 부분 정제한 후 효소의 특성 및 활성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

송이균사 배양을 위한 복합배지 및 각 성분은 Difco사에서,

†Corresponding Author : Department of Biology, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714, Korea
Tel : 0561-770-2213, Fax : 03561-770-2001
E-mail : yhhan@mail.dongguk.ac.kr

효소활성 측정시의 기질 및 효소와 TLC용 발색시약은 Sigma사에서, silica gel(60F254)은 Merk사에서 구입하여 사용하였다. 단백질분석을 위한 protein assay reagent는 Bio-Rad사에서, 기질로 cellobiose를 사용하는 효소활성의 측정은 glucose oxidase kit를 영동제약에서 구입하여 사용하였다. 기타 배양에 관련된 시약 및 배지성분, 실험에 사용된 시약은 국산 특급시약을 사용하였다.

송이 균사의 액체 배양

송이균주는 경주 남산에서 분리한 송이균사(*Tricholoma matsutake* DGUM 26001)를 사용하였다(6-8). DTM 한천배지(조성: 포도당 2%, 전분 3%, yeast extract 0.4%, soytone 0.2%, agar 1.5 %, pH 5.2)에 송이 균사를 접종한 후 24°C에서 90일간 배양하였다. 배양된 송이균사를 cork borer(직경, 8 mm)를 사용하여 한천배지에서 떼어낸 다음, DTM 액체배지(100 ml/250-ml Erlenmeyer flask)에 5개씩 접종하였다. 균사배양은 24°C에서 30일간 진탕배양(120 rpm)하였다.

조효소액의 제조

송이균사 배양액을 두점의 거즈로 여과 후 4°C에서 원심분리(5,000 xg, 10분)하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 황산암모늄을 20%에서 80%까지 포화시켜 4°C에서 24시간 방치한 후 침전된 단백질을 4°C에서 원심분리(5,000 xg, 20분)하여 침전물을 회수하였다. 24시간 동안 투석(cut-off M.W.; 12,000)한 후 투석액을 동결건조하였다. 동결건조된 조단백질을 sodium acetate buffer(20 mM, pH 4.0)에 용해하여 β -glucosidase의 조효소액(0.1 mg/ml)으로 사용하였다.

효소 활성의 측정

효소활성은 Tokao 등의 방법(11)을 사용하여 측정하였다. 조효소액 500 μ l를 sodium acetate buffer(200 mM, pH 4.6)에 첨가한 다음 기질로 500 μ l의 기질용액(17 mM)을 첨가하였다. 30°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당은 dinitrosalicylic acid법(12)을 사용하여 측정하였다. 기질로 cellobiose를 사용하여 효소활성을 측정할 경우 생성된 환원당은 glucose oxidase kit(영동제약)를 사용하여 측정하였다. 효소활성은 1분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. 단백질 함량은 protein assay reagent(Bio-Rad Co.)를 사용하여 bovine serum albumine을 표준품으로 Bradford의 방법(13)에 따라 하여 측정하였다.

효소의 열안정성은 Park 등의 방법(14)을 이용하여 측정하였다. 조효소액을 각각 55°C, 60°C, 65°C, 70°C에 30분부터 270분간까지 열처리한 다음, 최적 효소활성 온도(65°C)에서 30분간 반응시켜 상대적 효소활성으로 열안정성을 측정하였다.

TLC를 이용한 효소활성의 분석

효소반응 생성물은 TLC법(15)을 사용하여 검정하였다. 반응산물을 silica gel(60F254)에 점적한 다음, ethyl acetate:ethanol:acetic acid:boric acid 용액(50:20:10:10, cold saturated)을 전개용매로 사용하여 3시간 동안 전개하였다. Dipping solution(thymol 0.5 g/95 ml of 96% ethanol plus 5 ml conc H₂SO₄)을 chromatogram에 분무한 후, 100°C에서 10분간 건조

시켜 발색하였다.

Kinetics 측정

효소의 기질특이성 측정을 위한 Km 값은 기질 농도를 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM로 조절하여 반응시킨 다음 반응속도를 측정하고, 이를 Lineweaver-Burk plot에 도시하여 구하였다.

결과 및 고찰

적정 온도 및 pH

효소를 20°C에서 80°C까지 salicin을 기질로 일정온도에서 30분씩 반응시켜 상대 활성을 측정한 결과 효소활성의 적정 온도는 55-70°C이었고 최적 온도는 65°C이었다. 60°C에서는 약 83%, 70°C에서는 약 62%의 활성을 나타내었으나 80°C에서는 거의 효소활성이 나타나지 않았다(Figure 1). 이 결과는 *Penicillium verrucosum*의 β -glucosidase의 활성 최적 온도 70°C와 비교시 낮았지만(16), *Aspergillus sojae*의 최적 온도 60°C와 비교하였을 때 효소활성의 최적 온도가 높았다(17). 효소활성에 미치는 pH의 영향을 측정한 결과 적정 pH는

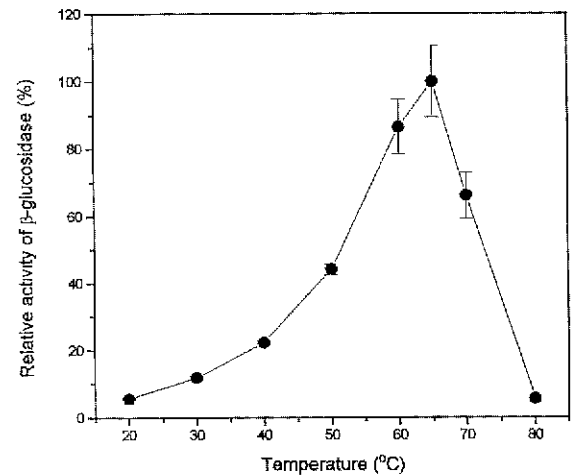


Figure 1. Effect of temperature on the activity of extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001 at pH 6.0

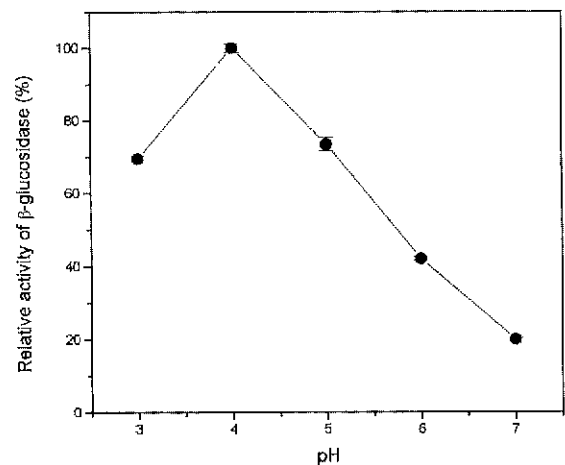


Figure 2. Effect of pH on the activity of extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001 at 65°C

3.0-5.0이었고 최적 pH는 4.0이었다. pH 3.0과 5.0에서의 상대 활성도는 각각 약 70%와 72%이었다(Figure 2). 이 결과는 Chun 등(16)의 *P. verruculosum*의 최적 pH 5.0과 Kimura 등(17)의 *A. sojae* β -glucosidase 효소의 최적 pH 5.0과 비교하였을 때 낮았다. 최적 온도 및 pH 조건하에서의 β -glucosidase 효소의 비활성도는 18.7 unit/mg protein이었다.

열안정성

효소를 각 온도에서 30분에서 270분까지 반응시켜 잔존하는 β -glucosidase 효소 활성을 측정 한 결과, 65°C 이상에서 30분간 처리시 효소활성이 거의 실패 되었다(Figure 3). 그러나 60°C에서 60분간 열처리시 90% 이상의 효소활성을 나타 내었으며, 55°C에서는 180분 동안 처리하였을 때에도 약 90%의 열안정성을 보여 주었다. 이 결과는 *P. verruculosum*의 최적 온도(70°C) 보다 10°C 낮은 온도(60°C)까지 열안정성이 있다는 결과(16)와 *A. sojae*의 최적 온도(60°C) 보다 10°C 낮은 50°C까지 열안정성이 있다는 결과와 일치하였다(17)

금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온과 EDTA의 영향을 조사 한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 Fe⁺⁺에 등에 의하여 촉

진되었다. 그러나, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺의하여 심하게 저해되었고 Co⁺⁺에 의해 어느 정도 저해를 받았다. Zn⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 이온과 양이온 chelating agent인 EDTA의 경우 2 mM에서는 비교적 안정되었으나 10 mM에서는 많이 저해됨을 보여주었다. 이 결과는 *A. sojae*와 *P. verruculosum*의 β -glucosidase 효소활성이 Fe⁺⁺에 의하여 촉진되고, Hg⁺⁺와 Cu⁺⁺에 의하여 심하게 저해된다는 결과와 일치하였다(16,17).

효소의 기질 특이성

효소의 기질 특이성 측정을 위하여 salicin, cellobiose과 esculin의 기질을 사용하여 β -glucosidase 효소 활성을 측정 하였다(Table 2). 기질로 salicin을 사용하였을 때의 효소활성을 100으로 하였을 때, cellobiose 기질에 대해 48.6%의 효소활성을 보여주었다 그러나, esculin을 기질로 사용시 효소활성은 매우 미약하였다(4.5%). 효소의 salicin에 대한 Km값 및 Vmax값을 측정한 결과 각각 0.25 mM과 0.06 μ mol/min, cellobiose에 대한 Km값 및 Vmax값은 각각 0.12 mM과 0.02 μ mol/min이었다(Table 2, Figure 4). β -glucosidase 효소의 기질 친화도는 cellobiose에 비하여 salicin에서 우수하였다. Cellobiose의 기질 친화도에 대한 본 결과는 Chun 등(16)이 보고한 *P. verruculosum* 사상균 β -glucosidase 효소의

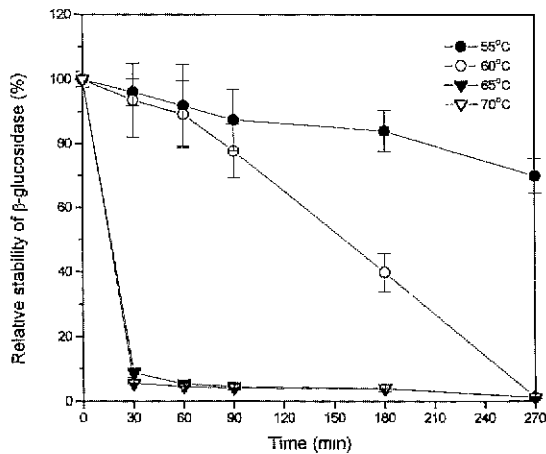


Figure 3. Effect of temperature on the stability of extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001 at pH 4.0.

Table 1. Effect of metal ions on the extracellular β -glucosidase activity in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001.

Metal ions	Relative enzyme activity (%)	
	2 mM [*]	10 mM
ZnCl ₂	85.3 ± 0.6	43.9 ± 1.7
CuSO ₄	9.0 ± 5.0	0.6 ± 0
CoCl ₂	63.4 ± 0.6	20.1 ± 0.6
CaCl ₂	95.9 ± 0.7	85.9 ± 0.3
MgSO ₂	90.4 ± 1.2	89.1 ± 0.2
FeSO ₂	108.9 ± 0.8	N/D ^{**}
HgCl ₂	7.5 ± 0.4	8.7 ± 0.9
EDTA	91.5 ± 0.8	75.2 ± 2.0
Control	100 ± 2.4	100 ± 0.7

* The final concentration in the reaction mixture

** N/D, not determined.

Table 2. Substrate hydrolysis, Km and Vmax values of the extracellular β -glucosidase activity in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001.

Substrate	Relative hydrolysis (%)	Km(mM)	Vmax(μ mol/min)
Salicin	100	0.25	0.06
Cellobiose	48.6	0.12	0.02
Esculin	4.5	N/D ^{**}	N/D

* The reducing sugar produced by β -glucosidase was measured with the glucose oxidase kit provided by Yeongdong Pharmaceutical Co.

** N/D, not determined.

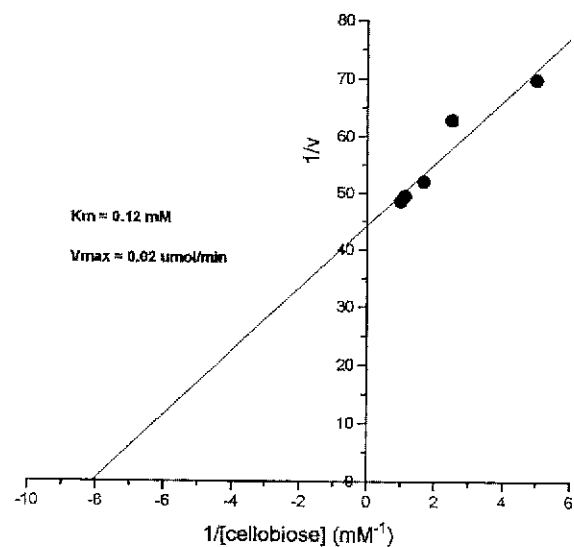


Figure 4. Lineweaver-Burk plot on the reaction rate of the extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. Cellobiose as a substrate was used and glucose was measured with glucose oxidase kit.

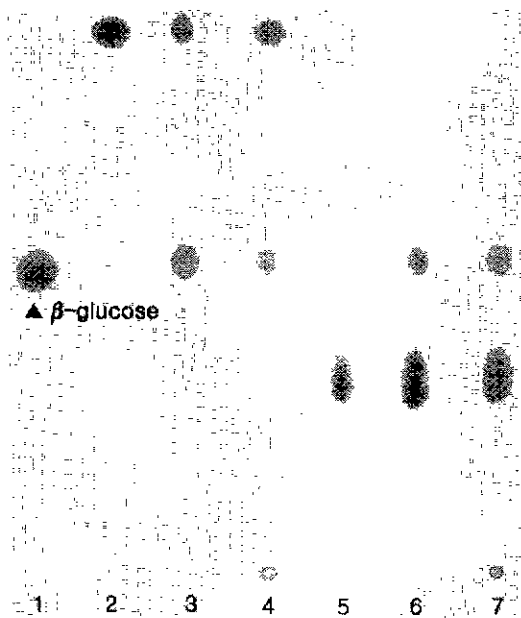


Figure 5. TLC chromatogram for determination of the product by the extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001.

1. β -glucose(standard), 2. salicin(standard), 3. salicin(β -glucosidase Sigma), 4: salicin(β -glucosidase from *T. matsutake*), 5: cellobiose(standard), 6: cellobiose(β -glucosidase Sigma), 7 cellobiose(β -glucosidase from *T. matsutake*)

cellobiose에 대한 기질 친화도(Km = 0.53 mM)와 비교시, 송이 균사의 세포외 분비 β -glucosidase 효소의 cellobiose 기질에 대한 친화도가 양호함을 나타내었다.

TLC법을 효소반응 산물의 검정

효소반응의 최적 온도(65°C) 및 pH(4.0) 조건하에서 salicin과 cellobiose를 기질로 조효소액과 구입한 정제 β -glucosidase를 사용하여 반응 산물을 동정하였다(Figure 5). 각각의 기질에 대하여 효소반응의 산물로 glucose가 검출되어 송이 균사체 배양 조효소액 중 β -glucosidase 효소가 존재하고 그 활성이 있음을 검정하였다.

본 연구를 통하여 송이 균사체의 분비 β -glucosidase 효소 활성을 확인하였다. Cellulose 섬유소 분해에 관련된 다른 두 효소(cellobiohydrolase 및 endo-glucanase)의 활성을 검정하고 이를 활용하여, 장차 목재 및 폐면 등의 섬유소로 구성된 배지를 이용하는 송이의 인공재배 방법을 계속 연구하고자 한다.

요 약

Cellulose 분해에 관련된 β -glucosidase 효소 활성의 특성 파악을 위하여, 송이균사(*Tricholoma matsutake* DGUM 26001)의 액체배양시 세포외로 분비되는 β -glucosidase 효소를 부분정제하여 그 특성을 조사하였다. 효소 활성에 미치는 최적 온도는 55-70°C이었고 최적 온도는 65°C이었다. 최적 효소활성에 영향을 주는 최적 pH는 3.0-5.0 범위였으며 최적 pH는 4.0이었다. Salicin을 기질로 최적 조건하에서 β -glucosidase 효소의 비활성도는 18.7 unit/mg protein이었다. 열안정성은 60°C 이하의 온도에 60분간 열처리시 약 90% 이

상의 효소활성을 유지하였다. Fe^{3+} 이온은 효소활성을 촉진하였으나, Hg^{2+} 및 Cu^{2+} 이온은 효소활성을 매우 억제하였다. Salicin에 대한 효소활성을 100으로 하였을 때, cellobiose는 48.6%의 상대적 효소활성을 나타내었으며, cellobiose에 대한 Km값 및 Vmax값은 각각 0.12 mM과 0.02 μ mol/min였다.

감 사

본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 연구비를 지원하여준 동국대학교에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ogawa, M. (1976), Microbial Ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and Its Allied Species II. *Tricholoma matsutake* in *Pinus pumila* var. *yezoalpina* Forest, *Trans. Mycol. Soc., Japan* **17**, 176-187.
- Ogawa, M. (1981), *Mycorrhiza in the Pine Forest-the Ecological Study of Matsutake as a Microorganism*, *Kor. J. Mycol.* **9**, 225-227.
- Terashita, T. and M. Kono (1987), Purification and Some Properties of Carboxyl Proteinases from *Tricholoma matsutake*, *Trans. Mycol. Soc., Japan* **28**, 245-256.
- Ohta, A. (1990), A New Medium for Mycelial Growth of Mycorrhizal Fungi, *Trans. Mycol. Soc., Japan* **31**, 323-334.
- Hwang, S-K and J-G. Kim (1995), Nucleotide Sequence Analysis of the 5S ribosomal RNA Gene of the Mushroom *Tricholoma matsutake*, *J. Microbiol.* **33**, 136-141.
- Lee, C.-Y., O-P Hong, M.-J. Jung, and Y.-H. Han (1997), Effect of Carbon Sources and Vitamins on Mycelial Growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001, *Kor. J. Mycol.* **25**, 226-232.
- Lee, C.-Y., O.-P. Hong, M.-J. Jung, and Y.-H. Han (1998), The Extracellular Enzyme Activities in Culture Broth of *Tricholoma matsutake*, *Kor. J. Mycol.* **26**, 496-501.
- Min, E.-G., K.-K. Chung, and Y.-H. Han (1998), Effect of Complex Nitrogen Source on Mycelial Growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001, *Kor. J. Mycol.* **26**, 361-364.
- Han, Y.-H (1998), Nutritional Factors Affecting the Mycelial Growth and Exomycelial Enzyme Activities in *Tricholoma matsutake* DGUM 26001, *Proc. Abst. of Mycol. Symp in Asian Region.* pp.32-50.
- Li, L. H., R. M. Flora, and K. W. King (1965), Individual Roles of Cellulase Components Derived from *Trichoderma viride*, *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 439-447.
- Tokao, S, Y. Kamagata, and T. Sasaki (1995), Cellulase Production by *Penicillium purpurogenum*, *J. Agar. Sci Camb.* **93**, 217-222.
- Miller, G L (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Park, J. S., I. H. Kim and Y. E. Lee (1998), Purification and Characterization of a *Bacillus* sp. DG0303 Thermostable α -Glucosidase with Oligo-1,6-Glucosidase Activity, *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 270-276.

15. Jotk, H, W Funk, W. Fischer, and H. Wimmer (1994), Thymol-Sulfuric Acid Reagent, Thin-Layer Chromatography, Vol 1b, pp.421-424, VCH, Weinheim
16. Chun, S. B, D. H. Kim, K. H. Kim, and K. C. Chung (1991), Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Penicillium verrucosum*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 188-196
17. Kimura I., N. Yoshioka, and S. Tajima (1999), Purification and Characterization of a β -Glucosidase with β -Xylosidase Activity from *Aspergillus sojae*, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 538-541.