

Fomitopsis pinicola 균사체로부터 Endoglucanase의 최적생산

구지민, 박상신*

동국대학교 과학기술대학 생명공학과

Received : January 14, 2013 / Revised : February 27, 2013 / Accepted : March 4, 2013

Optimization of Endoglucanase Production from *Fomitopsis pinicola* Mycelia. Gu, Ji-Min and Sang-Shin Park*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

The culture conditions to maximize the production of endoglucanase (EC 3.2.1.4) from the brown rot fungus *Fomitopsis pinicola* MKACC 54347 mycelia were investigated. Among the tested media for endoglucanase production, Mandel's mineral salts medium (MSM; 1% cellulose, 0.1% peptone, 0.14% (NH₄)₂SO₄, 0.03% urea, 0.2% KH₂PO₄, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.03% CaCl₂, and 0.1% trace metal solution (19.8 mM FeSO₄, 13.0 mM MnSO₄, 12.2 mM ZnSO₄, and 15.4 mM CoCl₂) produced the highest activity of the enzyme. To optimize the medium composition for enzyme activity, the effects of various carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic sources were investigated in MSM. Maximal enzyme production was accomplished using a medium containing 2% carboxymethyl cellulose (CMC), 2% yeast extract, 0.2% KH₂PO₄, 0.03% MnSO₄, and 0.3% trace metal solution. Different physiological conditions, like incubation period and temperature, were also examined to assess their influence on enzyme production. Enzyme production from *F. pinicola* reached its highest level after cultivation for 8 days at 25°C. Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), followed by the endoglucanase activity staining using CMC as the substrate, was performed to identify the endoglucanase under the culture conditions studied. Zymogram analysis of the culture supernatant revealed an endoglucanase band with a molecular mass of 52 kDa. The optimum pH and temperature for enzyme activity were 5.5°C and pH 5.0, respectively.

Keywords: Endoglucanase, brown rot fungus, optimization, *Fomitopsis pinicola*

서 론

Cellulose는 포도당이 β-1,4-glycosidic linkage로 연결된 중합체로 지구상에서 가장 풍부한 재생가능 biomass 자원이다[11, 22]. 불용성의 cellulose계 자원은 적절한 처리가 이루어지지 않으면 축적되는 환경오염원이거나, 이를 발효시켜 생산하는 ethanol은 화석자원의 고갈에 따른 대체에너지원으로 각광받고 있어 자연계에 존재하는 cellulosic material을 효율적으로 분해하여 이용하기 위한 방법에 대한 연구가 요구되는 실정이다[14]. Cellulose를 가수분해하는 효소인 cellulase는 glycosyl hydrolase의 일종으로 endoglucanase (CMCase, EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (avicelase, exoglucanase, EC 3.2.1.91) 및 β-glucosidase (cellobiase, EC

3.2.1.21) 세 종류의 주요 효소로 구성되어 있는 복합효소계이다[1, 11, 22, 24, 27]. 이들 세 효소는 서로 다른 작용기작을 나타내므로 하나의 효소복합체로 존재하여 협동작용을 통해 결정성의 미세섬유 형태로 존재하는 천연 cellulose를 효율적으로 분해할 수 있다[1, 22, 27].

Endoglucanase는 cellulose 분해반응의 초기에 작용하며 가장 중요한 역할을 수행하는 endo-type의 cellulase로서 cellulose 사슬의 내부에 존재하는 β-1,4-glycosidic linkage를 무작위적으로 분해하여 비환원성 말단을 지닌 oligomer를 형성하는 작용을 한다고 알려져 있다[15, 23, 27]. Endoglucanase는 중요한 산업적 효소로 불용성의 cellulose계 자원을 수용성 탄수화물, ethanol 및 산업적으로 유용한 여러 산물로 분해하므로[15, 22] 바이오에너지산업 뿐만 아니라 식품, 사료, 의약품, 섬유, 제지 및 펄프산업을 비롯한 다양한 산업 분야에서 사용되고 있어 연구가치가 매우 높다[11, 21, 22, 25].

버섯은 풍부한 영양과 고유의 맛과 향을 함유하고 있어 국내외에서 널리 사용되고 있는 건강식품으로 식품적 가치뿐

*Corresponding author

Tel: +82-54-770-2225, Fax: +82-54-770-2287

E-mail: sspark@dongguk.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

만 아니라, 지금까지 많은 연구에 의해 항암, 면역증강, 혈액 순환, 혈압 상승 억제 및 항균 등의 생리활성이 우수하다는 것이 밝혀져 의약품으로도 중요한 역할을 하고 있다. 또한 생태계의 물질순환과정에서 생성되는 각종 부산물을 분해하는 기능이 있어 산업적으로 다양하게 이용할 수 있으므로 버섯 자실체가 생산하는 효소 단백질에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[12, 17].

소나무잔나비버섯(*Fomitopsis pinicola*)은 담자균류 민주름버섯목 구멍장이버섯과에 속하는 버섯으로, 항균, 항암, 혈당강하, 항혈관형성, 면역증강 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 약용버섯이다[2, 9, 13]. 또한 *F. pinicola* 균사체로부터 cellulose와 lignin을 분해하는 효소를 생산하는 것으로 보고되어 있다[18-20, 25].

본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 함유하는 버섯의 산업적 활용을 위한 기초연구로 *F. pinicola* MKACC 54347 균사체로부터 액체배양법을 이용하여 cellulose 분해효소인 endoglucanase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며, 배양액으로부터 효소적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 사용한 소나무잔나비버섯의 균주(MKACC 54347)는 한국농생명과학연구정보센터에서 분양받았으며, potato dextrose agar (PDA, BD, USA) 배지에 접종하여 25°C에서 7일 동안 사면배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였으며 약 1개월마다 계대배양하였다.

시험배지 및 균사배양

F. pinicola 균사체로부터 endoglucanase의 생산을 위한 배양 최적배지를 조사하기 위하여 *Coriolus versicolor* medium (CVM), *Czapek Dox* medium (CDM), *Lentinus edodes* medium (LEM), mushroom complete medium (MCM), malt yeast glucose medium (MYGM), potato dextrose medium (PDM), yeast malt extract medium (YM), modified Mandel's medium (MMI), basal salt medium (BSM) 및 Mandel's mineral salts medium

Table 1. Composition of various media used for the endoglucanase production from *Fomitopsis pinicola* mycelia.

| Component | Media (g/100 ml) | | | | | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | CVM ^a | CDM ^b | LEM ^c | MCM ^d | MYGM ^e | PDM ^f | YM ^g | MMI ^h | BSM ⁱ | MSM ^j |
| Dextrose | 2.0 | | 2.0 | 2.0 | 0.4 | 2.0 | 1.0 | | | |
| Sucrose | | 0.3 | | | | | | | | |
| Starch | | | 2.0 | | | | | | | |
| Cellulose | | | | | | | | 6.2 | 1.0 | 1.0 |
| Peptone | 0.4 | | | 0.2 | | | 0.5 | | | 0.1 |
| Malt extract | | | | | 1.0 | | 0.3 | | | |
| Yeast extract | 0.6 | | 0.6 | 0.2 | 0.4 | | 0.3 | 1.2 | | |
| Potato | | | | | | 20.0 | | | | |
| NaNO ₃ | | 0.3 | | | | | | | 0.3 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | | | | | | 1.2 | | 0.14 |
| Urea | | | | | | | | | | 0.03 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.046 | | 0.046 | 0.05 | | | | 0.5 | 0.01 | 0.2 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.1 | 0.1 | 0.1 | | | | | 0.5 | | |
| MgSO ₄ | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | | | | 0.12 | 0.05 | 0.03 |
| KCl | | 0.05 | | | | | | | 0.05 | |
| FeSO ₄ | | 0.001 | | | | | | | | |
| CaCl ₂ | | | | | | | | 0.01 | | 0.03 |
| NaCl | | | | | | | | 3.9 | | |
| Trace metal solution ^k | | | | | | | | | | 100 ul |

^aCVM (*Coriolus versicolor* medium), ^bCDM (*Czapek Dox* medium), ^cLEM (*Lentinus edodes* medium), ^dMCM (mushroom complete medium), ^eMYGM (malt yeast glucose medium), ^fPDM (potato dextrose medium), ^gYM (yeast malt extract medium), ^hMMI (modified Mandel's medium), ⁱBSM (basal salt medium), ^jMSM (Mandel's mineral salts medium), ^kTrace metal solution: 19.8 mM FeSO₄, 13.0 mM MnSO₄, 12.2 mM ZnSO₄, and 15.4 mM CoCl₂.

(MSM)을 사용하였으며, 각 배지의 조성은 Table 1과 같다. *F. pinicola*를 PDA 평판배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 한천배지 상의 균사를 5 mm cork borer로 punching하여 얻은 균사 disk 5개씩 각각의 액체배지 100 ml에 접종하여 25°C에서 8일간 80 rpm으로 진탕 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다. 탄소원, 질소원, 인산원, 무기질원 및 trace metal 등의 영양원에 따른 효소 생산성을 관찰하기 위하여 복합배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 MSM의 조성으로부터 해당 영양원을 제거하고 탄소원, 질소원, 인산원, 무기질원과 trace metal solution을 각각의 농도별로 첨가하여 실험하였다.

효소 활성도 측정

Endoglucanase (carboxymethyl cellulase, CMCase)의 효소활성은 Ghose 등[5]의 방법을 변형하여 측정하였다. *F. pinicola* 배양액을 10,000 ×g에서 10분 동안 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, endoglucanase 활성을 측정하기 위하여 기질인 1.0% carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma-Aldrich, USA)를 포함하는 0.1 M 아세트산나트륨 완충용액(pH 5.0) 0.1 ml에 조효소액 0.1 ml를 가한 후 50°C 항온 수조에서 30분간 반응시키고, dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma-Aldrich, USA) 시약을 사용하여 유리된 환원당을 540 nm에서 비색 정량하였다[16]. 이 때 대조구로 조효소액을 100°C에서 5분간 가열처리하여 효소를 불활성화시켜 사용하였다. Endoglucanase의 활성도는 1분 동안 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Activity staining

배양액 중의 효소활성을 확인하기 위하여 0.1% CMC를 기질로 포함하는 10% acrylamide gel을 제조한 후 nondenaturing PAGE를 수행하였다. 이 때 조효소액은 nondenaturing PAGE sample buffer와 혼합하여 33°C에서 30분간 반응시켜 사용한다. 전기영동한 gel을 0.1 M 아세트산나트륨 완충용액(pH 5.0)상에 20분 동안 방치한 후 0.2% Congo red (benzidinediazo-bis-1-naphthylamine-4-sulfonic acid, Sigma-Aldrich, USA) 용액으로 30분간 염색하고, 1 M 염화나트륨 (Sigma-Aldrich, USA) 용액에서 탈색시켜 endoglucanase 활성을 나타내는 단백질 band의 위치를 확인하였다[21].

최적 pH와 최적 온도

균사체로부터 생산된 효소활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.1 M 글리신 완충용액(pH 2.0-3.0), 0.1 M 구연산나트륨 완충용액(pH 3.0-5.0), 0.1 M 인산나트륨 완충용

액(pH 5.0-8.0), 0.1 M Tris 완충용액(pH 8.0-10.5)을 사용하여 효소활성도를 측정하였다. 효소활성에 대한 온도의 영향은 조효소액의 반응온도를 40°C에서 70°C까지 5°C 간격으로 변화시키며 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배지의 영향

F. pinicola 균사체로부터 endoglucanase를 생산하기 위한 최적 배지조건을 확립하기 위하여 종류별 복합배지를 사용하여 균사체를 배양한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험에 사용한 복합배지 중 MSM을 사용하여 25°C에서 9일간 배양하였을 때 endoglucanase의 활성이 2.0 U/ml로 가장 우수함을 알 수 있었다. 지금까지 보고된 endoglucanase의 생산에 관한 연구[3, 4, 6-8, 10]에서는 본 논문에서 연구한 다양한 복합배지의 영향에 대하여 연구된 바가 없으며, basal salt medium (BSM) 또는 cellulose 계열의 단일 배지에 대한 효소 생산성을 확인하였다. 또한 다양한 담자균류로부터 endoglucanase의 최적생산[3, 6, 10]을 위한 배양시간은 7-15일로서 본 논문의 *F. pinicola* 균사체로부터 endoglucanase의 배양시간이 비교적 길지 않음을 알 수 있었다.

탄소원의 영향

각종 탄소원이 *F. pinicola* endoglucanase의 생산에 미치는

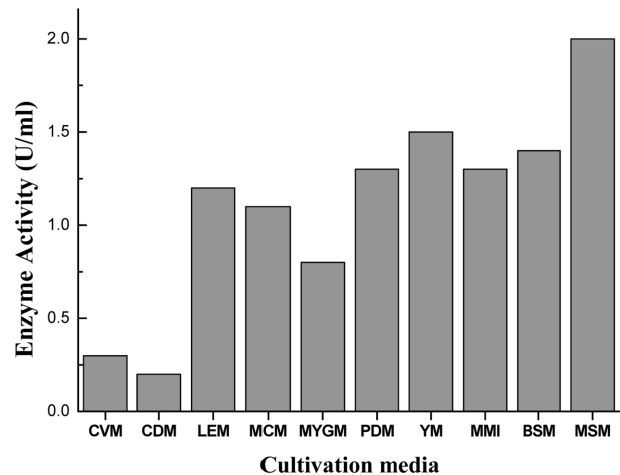


Fig. 1. Endoglucanase activity of *F. pinicola* cultivated in the various media.

Cultivation was carried out at 25°C for 9 days. The endoglucanase activity was assayed with culture supernatant. CVM (*Coriolus versicolor* medium), CDM (*Czapex Dox* medium), LEM (*Lentinus edodes* medium), MCM (mushroom complete medium), MYGM (malt yeast glucose medium), PDM (potato dextrose medium), YM (yeast malt extract medium), MMI (modified Mandel's medium), BSM (basal salts medium), MSM (Mandel's mineral salts medium).

Table 2. Effect of carbon sources on the endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia.

| Carbon source (%) | Enzyme activity (U/ml) | | | |
|----------------------|------------------------|-----|-----|-----|
| | 0.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| Control ^a | 1.2 | | | |
| Glucose | | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Maltose | | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Sucrose | | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Cellulose | | 2.0 | 1.4 | 1.4 |
| CMC | | 2.4 | 3.0 | 2.0 |

^aThe MSM without carbon source.

는 영향을 조사하기 위하여 복합배지 중 최대 활성을 나타낸 MSM으로부터 탄소원인 1.0% cellulose를 제거한 후, 종류별 탄소원을 다양한 농도로 첨가하여 균사체를 배양하고 효소활성을 측정하였다. 2.0% CMC를 탄소원으로 첨가하였을 때 효소의 활성이 가장 높게 나타났으며 MSM의 원 성분과 그 농도인 1.0% cellulose를 첨가하였을 때도 효소의 활성이 우수하였으나, glucose, maltose 및 sucrose를 첨가할 때는 효소활성이 나타나지 않았다(Table 2). 이 결과는 *Trametes trogii* [10]로부터 endoglucanase를 생산하기 위해 탄소원으로 cellulose 및 CMC를 첨가하였을 때 효소 생산이 증가되었다는 보고와 유사하였으나, *Trichoderma sp.*와 *Aspergillus niger* [4] 중의 endoglucanase는 sucrose를, *Bacillus sp.* [7] 중의 endoglucanase는 glucose를 탄소원으로 사용하였을 때 최대 활성을 나타내었다는 것과는 상이하였다.

질소원의 영향

효소의 생산을 위한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 MSM의 질소원인 0.1% peptone과 0.14% ammonium sulfate, 0.03% urea를 제거한 후 각 종류별 질소원을 농도별로 첨가하여 배양한 결과를 Table 3에 나타내었다. 전체 질소원 중 2.0% yeast extract를 첨가하였을 때 가장 높은 효

Table 3. Effect of nitrogen sources on the endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia.

| Nitrogen source (%) | Enzyme activity (U/ml) | | | |
|----------------------|------------------------|-----|-----|-----|
| | 0.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| Control ^a | 1.2 | | | |
| Peptone | | 2.2 | 1.8 | 2.6 |
| Yeast extract | | 2.2 | 2.7 | 2.6 |
| Ammonium sulfate | | 2.4 | 1.3 | 1.7 |
| Urea | | 0.6 | 0.4 | 0.9 |

^aThe MSM without nitrogen source.

소활성을 나타내었고, 무기질소원 중에서는 1.0% ammonium sulfate를 첨가하였을 때 비교적 효소활성이 우수하였으나, urea를 질소원으로 첨가하였을 때 효소의 생산성은 상대적으로 감소되는 것으로 나타났다. 이는 *Trichoderma sp.* [4]와 *A. niger* [4], *Bacillus sp.* [7]로부터 효소활성이 yeast extract를 질소원으로 사용하였을 때 효소활성이 우수하다는 결과와 일치하였으나, Kim 등[10]이 *T. trogii*로부터 endoglucanase를 생산하기 위해 ammonium tartrate를 질소원으로 사용하였을 때 활성이 최대로 나타났다고 보고한 결과와 상이하였다.

인산원, 무기질원 및 trace metal의 영향

인산원과 무기질원, trace metal 용액(19.8 mM FeSO₄, 13.0 mM MnSO₄, 12.2 mM ZnSO₄ 및 15.4 mM CoCl₂)이 *F. pinicola*의 endoglucanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 MSM에서 각각의 영양원을 제거한 후 5가지 인산원을 각각 다른 농도로 첨가하여 효소활성을 측정하였을 때 MSM의 원 성분인 0.2% KH₂PO₄의 첨가가 최대의 활성을 나타내었다(Table 4). 이 결과는 *T. trogii* endoglucanase [10]의 효소활성이 KH₂PO₄을 인산원으로 첨가할 때 크게 증가한다는 보고와 일치하였다. 무기질원의 경우 0.03% MnSO₄를 첨가하였을 때 효소생산이 가장 크게 증가되었으나 ZnSO₄

Table 4. Effect of phosphorus sources and inorganic salts on the endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia.

| Phosphorus source (%) | Enzyme activity (U/ml) | | | |
|--|------------------------|-----|-----|-----|
| | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |
| Control ^a | 0.8 | | | |
| KH ₂ PO ₄ | | 1.9 | 2.0 | 1.9 |
| K ₂ HPO ₄ | | 1.0 | 0.7 | 0.7 |
| NaH ₂ PO ₄ | | 1.6 | 1.9 | 1.6 |
| Na ₂ HPO ₄ | | 0.9 | 0.5 | 0.7 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | | 0.7 | 0.4 | 0.9 |

| Inorganic salts (%) | Enzyme activity (U/ml) | | | |
|----------------------|------------------------|------|------|------|
| | 0.0 | 0.03 | 0.06 | 0.09 |
| Control ^b | 1.2 | | | |
| CaCl ₂ | | 2.0 | 1.9 | 2.1 |
| MgSO ₄ | | 1.3 | 1.5 | 1.6 |
| FeSO ₄ | | 1.7 | 2.1 | 2.3 |
| MnSO ₄ | | 2.9 | 2.5 | 1.8 |
| CuSO ₄ | | 1.0 | 1.0 | 0.8 |
| CoCl ₂ | | 0.9 | 1.0 | 1.2 |
| ZnSO ₄ | | 0.7 | 0.7 | 0.6 |

^aThe MSM without phosphorus source.

^bThe MSM without inorganic salts.

Table 5. Effect of trace metal on the endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia.

| Trace metal solution (%) | Enzyme activity (U/ml) |
|--------------------------|------------------------|
| Control ^a | 1.6 |
| 0.1 | 2.0 |
| 0.2 | 2.4 |
| 0.3 | 2.5 |

^aThe MSM without trace metal solution.

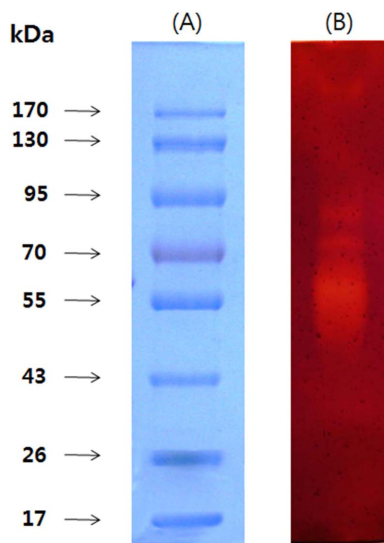


Fig. 2. Zymogram analysis of the endoglucanase of *F. pinicola*. (A) Molecular weight marker. (B) The activity staining of endoglucanase from *F. pinicola* using 10% nondenaturing PAGE were run under pre-incubating the enzyme sample at 33°C for 30 min. After electrophoresis, the gel stained 0.2% Congo red solution for 30 min and destained 1 M NaCl.

를 첨가하였을 때는 효소 활성이 억제되었다(Table 4). 이는 *Roseofomes subflexibilis* 중의 endoglucanase 생산[6]이 KCl 및 LiSO₄의 첨가에 의해 크게 증가한다는 결과와 *Bacillus* sp. 중의 endoglucanase 생산성이 MnCl₂에 의하여 감소하고 CaCl₂에 의하여 증가한다는 결과[7]와는 상이하였다. 그리고 다양한 농도의 trace metal 용액을 첨가하여 배양한 결과 0.3% trace metal 용액을 첨가하였을 때 최대 활성을 나타내었다(Table 5).

Activity staining

F. pinicola 배양액 중의 효소 활성을 확인하기 위하여 배양액 시료를 0.1% CMC를 기질로 포함하는 gel 상에서 nondenaturing PAGE 및 activity staining을 수행한 결과 endoglucanase 활성을 나타내는 band가 43-70 kDa 사이에서 확인되었다(Fig. 2). 이는 Yoon 등[26]이 *F. palustris*로부

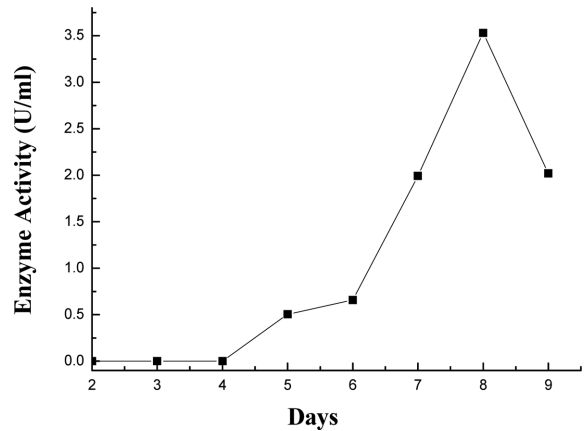


Fig. 3. Time course of endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia.

Cultivation was carried out at 25°C for 10 days in the optimal culture medium. The endoglucanase activity was assayed with culture supernatant.

터 endoglucanase 활성을 확인한 결과와 유사하였으나, Yoon 등[25]이 *F. pinicola* MKACC 53896로부터 확인한 endoglucanase의 분자량이 32 kDa인 결과와는 상이함을 알 수 있었다.

배양기간의 영향

이상의 실험결과에 따라 *F. pinicola* 균사체로부터 endoglucanase를 생산하기 위한 최적 배양배지 조성을 2.0% CMC, 2.0% yeast extract, 0.2% KH₂PO₄, 0.03% MnSO₄ 및 0.3% trace metal 용액으로 결정하였으며, 이와 같은 최적 효소생산조건에서 *F. pinicola* 균사체로부터 endoglucanase 생산에 대한 배양기간의 영향을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 배양기간이 경과함에 따라 배양 5일째부터 점차 효소활성이 증가하기 시작하여 배양 8일째 최대 활성을 나타내었으며, 그 이후에는 급격히 감소하였다. *F. pinicola* 균사체를 최적 배양배지 상에서 8일 동안 배양하였을 때 효소활성이 3.5 U/ml로, MSM에서 배양하였을 때 endoglucanase 활성이 2.0 U/ml인 결과(Fig. 1)와 비교하여 175% 증가하는 것으로 나타났다. *T. trogii* [10]와 *Fomitopsis* sp. RCK2010 [3] 중의 endoglucanase가 배양 11일 후 최대 활성을 보인 결과와 비교하면 *F. pinicola*로부터 최대 효소활성을 위한 배양기간이 비교적 짧다는 것을 알 수 있었다.

배양온도의 영향

Endoglucanase의 생산을 위한 최적 배양온도를 조사하기 위하여 배양온도를 15-40°C에서 *F. pinicola* 균사체를 최적 배양기간인 8일 동안 배양하여 효소활성을 측정할 결과, *F. pinicola* 균사체를 25°C에서 배양하였을 때 효소의 활성이

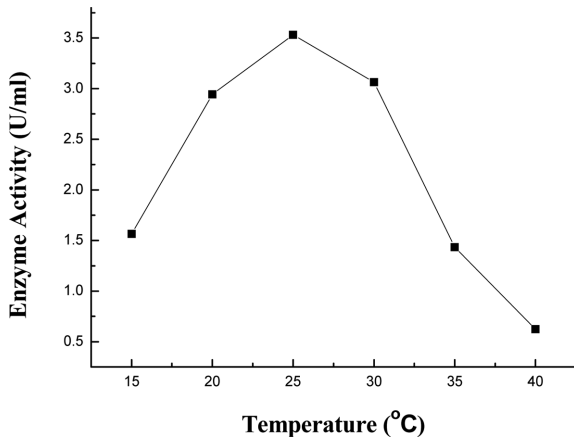


Fig. 4. Effect of temperature on the endoglucanase production from *F. pinicola* mycelia. Cultivation was carried out for 8 days in the optimal culture medium. Endoglucanase activity was assayed with culture supernatant.

가장 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). 이는 *Fomitopsis* sp. RCK2010 [3]와 *T. trogii* [10]를 25-30°C에서 배양하였을 때 효소활성이 점차 증가하여 30°C에서 최대활성을 나타낸다는 결과와 유사하였으며, *A. niger*와 *Trichoderma* sp. 중의 endoglucanase가 각각 40°C, 40-50°C에서 최대활성을 나타낸다는 결과와는 상이하였다[4].

효소 활성의 최적 pH와 최적 온도

F. pinicola 균사체 배양액 중의 효소활성을 위한 pH의 영향을 확인하였을 때, 효소의 활성은 pH 5.0에서 최대 활성을 나타내었고 pH 5.5 이후로는 효소의 활성도가 30% 이하

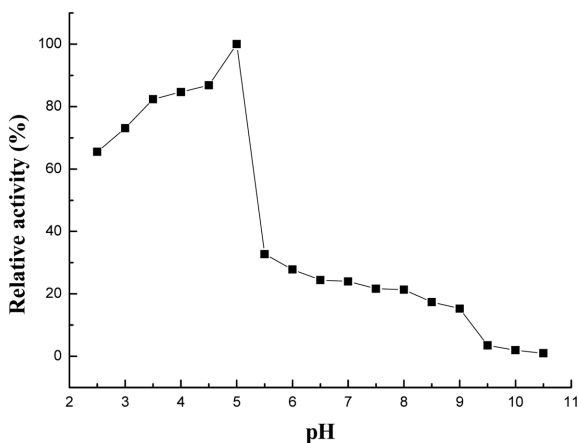


Fig. 5. Effect of pH on the endoglucanase activity from *F. pinicola*. The endoglucanase activity was assayed in the pH range 2.0-11.0 (0.1 M glycine-HCl buffer for pH 2.0-3.0, 0.1 M citrate buffer for pH 3.0-5.0, 0.1 M sodium phosphate buffer for pH 5.0-8.0, and 0.1 M Tris-HCl buffer for pH 8.0-11.0) at 25°C.

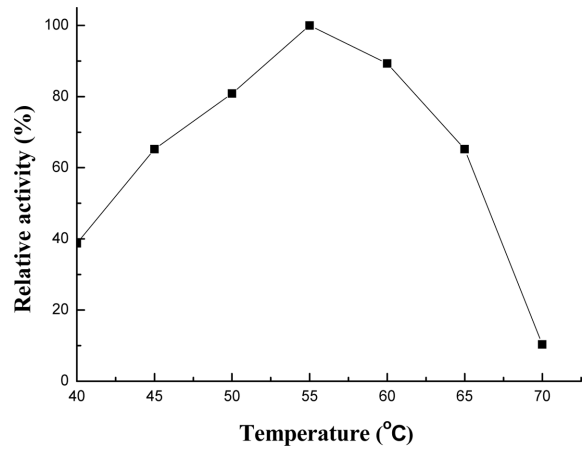


Fig. 6. Effect of temperature on the endoglucanase activity from *F. pinicola*. The endoglucanase activity was assayed at various temperatures of 40-70°C in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0).

로 급격히 감소하였으며 pH 3.0-4.5 사이에서 비교적 높은 효소 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이 결과는 *F. pinicola* MKACC 53896 [24]와 *Clostridium thermocellum*[8]로부터 분리정제한 endoglucanase의 최적 pH가 5.0라는 보고와 일치하였으나, *Trichoderma* sp. [4]와 *A. niger* [4] endoglucanase의 최적 pH가 6-7이라는 결과와는 상이하였다. 한편 균사체 배양액 중의 효소활성을 위한 온도의 영향을 확인한 결과, 균사체 배양액 중 효소는 50-60°C의 조건에서 80% 이상의 비교적 높은 효소활성을 나타내었고, 최적 온도는 55°C로 나타났다(Fig. 6). 이 결과는 *C. thermocellum* endoglucanase의 최적 온도인 65°C [8], *F. pinicola* MKACC 53896 중의 endoglucanase의 최적 온도인 60°C [25]와는 상이하였다.

기질특이성

F. pinicola 균사체로부터 생산된 endoglucanase의 기질특이성을 조사하기 위해 cellulose계 기질 중 수용성 기질인 CMC와 불용성 기질인 Avicel, α-cellulose, filter paper 및 xylan을 사용하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Avicel에

Table 6. Substrate specificity of the enzyme of *F. pinicola* mycelia.

| Substrate | Activity (U/ml) | Relative activity (%) |
|----------------------|-----------------|-----------------------|
| CMC | 3.5 | 100 |
| α-Cellulose | 13.8 | 394.3 |
| Avicel | 1.5 | 42.9 |
| filter paper | 0.3 | 8.6 |
| Xylan from birchwood | 0.5 | 14.3 |

대하여 효소활성이 13.8 U/ml로 가장 우수하였으며 CMC에 대하여 비교적 높은 3.5 U/ml의 효소활성을 나타낸 것을 확인하였다(Table 6). Zhang 등에 따르면 microcrystalline cellulose인 Avicel은 cellobiohydrolase의 효소활성을 측정하기 위해 널리 사용되는 기질이나 몇몇 endoglucanase에 의해서도 분해반응이 일어나는 것으로 보고되어 있으며[27], 현재의 연구결과는 *F. pinicola* 균사체로부터 생성된 전체 배양액 중의 효소활성을 확인한 것이므로 이러한 기질특이성에 관한 연구결과가 endoglucanase의 활성에서 기인한 것인지를 정확하게 확인하기 위해서는 배양액으로부터 endoglucanase를 분리 및 정제하여 생화학적 특성에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 *F. pinicola* MKACC 54347 균사체로부터 cellulose 분해효소 중 하나인 endoglucanase 활성을 확인하고 이를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며, 향후 최적 조건에서 생산된 효소의 분리 정제 및 생화학 특성 연구를 통해 본 버섯의 산업적 활용을 위한 기초자료로 이용될 것으로 예상된다.

요 약

소나무잔나비버섯(*Fomitopsis pinicola* MKACC 54347)의 균사체로부터 endoglucanase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였다. 복합배지 중 MSM이 가장 높은 endoglucanase 활성을 나타내었으며, MSM의 성분과 농도를 각각 2.0% CMC, 2.0% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.03% MnSO_4 및 0.3% trace metal 용액으로 첨가하였을 때 효소활성이 가장 우수하였다. 따라서 *F. pinicola*로부터 endoglucanase를 생산하기 위한 최적 배지조건은 2.0% CMC, 2.0% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.03% MnSO_4 및 0.3% trace metal 용액이다. 이상의 배지를 사용하여 배양온도 25°C에서 8일 동안 배양하였을 때 최대 효소 활성이 나타내는 것을 확인하였다. CMC를 기질로 사용한 activity staining의 결과를 통해 *F. pinicola* 균사체의 endoglucanase 활성여부를 확인할 수 있었으며 그 분자량이 43-70 kDa임을 확인하였고, 배양액 중의 효소활성의 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.0과 55°C인 것으로 나타났다.

Acknowledgements

This work was supported by the Dongguk University Research Fund of 2013.

References

1. Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998.

- Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Cur. Opi. Strucral. Biolo.* **8**: 548-557.
2. Cheng, J. J., C. Y. Lin, H. S. Lur, H. P. Chen, and M. K. Lu. 2008. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Process Biochem.* **43**: 829-834.
3. Deswal, D., Y. P. Khasa, and R. C. Kuhad. 2011. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* **102**: 6065-6072.
4. Gautam, S. P., P. S. Bundela, A. K. Pandey, J. Khan, and M. K. Awasthi. 2011. Optimization for the production of cellulose enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**: Article ID 810425.
5. Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure. Appl. Chem.* **59**: 257-268.
6. Hyung, S. C. 2003. Studies on the cultural characteristics of cellulose production by *Roseofomes subflexibilis*. *Korean J. Mycol.* **31**: 77-83.
7. Jeong, W. H., S. Y. Yang, M. D. Song, J. K. Ha, and C. W. Kim. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. producing xylanase and cellulase and optimization of medium conditions for its production. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 383-388.
8. Jung, K. H., J. H. Lee, Y. T. Yi, H. K. Kim, and M. Y. Park. 1992. Properties of a novel *Clostridium thermocellum* endo- β -1,4-glucanase expressed in *Escherichia coli*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 505-510.
9. Keller, A. C., M. P. Maillard, and K. Hostertmann. 1996. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochem.* **41**: 1041-1046.
10. Kim, M. S., J. S. Hong, M. K. Kim, S. Yoon, and Y. H. Choi. 1997. Effects of carbon and nitrogen sources in the production of cellulolytic enzymes by *Trametes trogii*. *Korean J. Mycol.* **25**: 68-76.
11. Kuhad, R. C., R. Gupta, and A. Singh. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* **2011**: Article ID 280696.
12. Kweon, M. H., H. Jang, W. J. Lim, H. I. Chang, C. W. Kim, H. C. Yang, H. J. Hwang, and H. C. Sung. 1999. Anticomplementary properties of polysaccharides isolated from fruit bodies of mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 450-456.
13. Lee, S. I., J. S. Kim, S. H. Oh, K. Y. Park, H. G. Lee, and S. D. Kim. 2008. Antihyperglycemic effect of *Fomitopsis pinicola* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food.* **11**: 518-524.
14. Liu, D., R. Zhang, X. Yang, Y. Xu, Z. Thang, W. Tian, and Q. Shen. 2011. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Express. Purif.* **79**: 176-186.
15. Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and bio-

- technology. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **76**: 506-577.
16. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 17. Nonaka, T., H. Ishikawa, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, and N. Dohmae. 1995. Characterization of a thermostable lysine-specific metallopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola frondosa*. *J. Biochem.* **118**: 1014-1020.
 18. Park, N. and S. S. Park. 2009. Optimal conditions for the lacase production from *Fomitopsis pinicola* mycelia. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 62-68.
 19. Purnomo, A. S., I. Kamci, and R. Kamei. 2008. Degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **105**: 614-621.
 20. Ren, G., X. Y. Liu, H. K. Zhu, S. Z. Yang, and C. X. Fu. 2006. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia.* **77**: 408-410.
 21. Sugimura, M., H. Watanabe, and H. Saito. 2003. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris*. *Eur. J. Biochem.* **270**: 3455-3460.
 22. Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian, and A. Pandey. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* **64**: 832-844.
 23. Tomme, P., R. A. Warran, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbial. Physiol.* **37**: 1-81.
 24. Wood, T. M. 1992. Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* **20**: 46-53.
 25. Yoon, J. J., C. J. Cha, Y. S. Kim, and W. Kim. 2008. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1373-1378.
 26. Yoon, J. J., C. J. Cha, Y. S. Kim, D. W. Son, and Y. K. Kim. 2007. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 800-805.
 27. Zhang, Y. H., M. E. Himmel, and J. R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* **24**: 452-481.