

合成培地에서 不老草가 生産하는 纖維素 分解酵素에 관한 研究

洪 載 植 · 崔 允 熙 · 尹 世 億
全北大學校 農科大學 食品加工學科

Studies on the Cellulolytic Enzymes Produced by *Ganoderma lucidum* in Synthetic Media

Jae-Sik Hong, Yoon-Hee Choi and Se-Eok Yun
Department of Food Science and Technology, College of Agriculture
Chonbuk National University, Chonju 520, Korea

Abstract: Factors affecting the productivity of cellulolytic enzymes and the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* CAFM 9065 were examined in synthetic media. Among the carbon sources tested, Na-CMC was the best for the production of avicelase CMC ase, and cellobiose for β -glucosidase. Soluble starch and cellobiose were the best for the mycelial growth. The optimum concentration of Na-CMC for the production of the enzymes was 1.0%, and mycelial growth increased remarkably with the higher concentration of Na-CMC. Glucose inhibited the production of the enzymes, but stimulated the mycelial growth. Among the nitrogen sources used, peptone was the most effective for the production of the enzymes, and the appropriate concentration of peptone was 0.2%. The mycelial growth was stimulated with the increase of the concentration of peptone up to 0.5%. The optimum concentration of KH_2PO_4 for the production of the enzymes and mycelial growth was 0.3 and 0.2%, respectively. The optimum concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for the production of the enzymes and mycelial growth was 0.02%. The production of the enzymes was facilitated by folic acid at a low concentration (0.03 mg/l), and mycelial growth by inositol. The optimum temperature for the production of the enzymes and mycelial growth was 30°C. The optimum pH for the production of avicelase and β -glucosidase was 5.0 equally and CMCase 5.5. The activities of avicelase and CMCase were the highest at 8 and 10 days of culture, respectively and that of β -glucosidase at 16 day culture. The growth of mycelium was the highest at 12 days of culture at pH 5.0.

Keywords: Cellulolytic enzymes, *Ganoderma lucidum*, Avicelase, CMCase, β -Glucosidase, Na-CMC, Cellobiose.

纖維素(cellulose)는 植物 細胞膜의 主要成分을 이루고 있으며 自然界에 널리 分布되어 있는 매우 豐富한 資源임에도 불구하고 利用面에 있어 制限의이며, 營養의 攝取라는 觀點에서는 극히 部分的으로 反芻動物이나 일부의 微生物에 의해 分解 利用될 뿐 대부

분이 그대로 廢棄되어지고 있다(Lee, 1976; Lee 등, 1976).

이렇게 廢棄되고 있는 植物 纖維性 物質의 主體인 纖維素는 地球上에 존재하는 有機物 중 가장 많은 物質로서 植物의 약 50%를 占有하는데, 이 纖維素를

炭素源으로 利用하는 方案을 摸索함은 食糧 資源 開發이라는 點에서 意義가 클 것으로 생각된다.

纖維素는 6,000~10,000個 정도의 glucopyranose가 주로 β -1,4結合에 의해 연결되고 약간의 cross linkage로 縮合된 高分子 化合物로서(Chung, 1971) 이를 分解하는 纖維素 分解 酵素는 單一物質이 아니며 최소한 3種 이상의 物質로 構成되어 있음이 確認되었는데 纖維素 分解 酵素의 基質인 cellulose의 分解 過程도 3種 이상의 酵素가 連續적으로 作用하는 것으로 알려져 있다(Lee, 1976; Gunasekaran, 1980).

纖維素 分解 酵素(cellulase; E.C. 3214, β -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase 또는 β -1,4-glucanase)는 Reese 등 (Reese, 1956; Mandels and Reese, 1963; KATZ and Reese, 1968)에 의하여 纖維素의 酵素 加水分解에 대한 機作이 研究되기 시작하였는데 아직도 確實한 것이 밝혀져 있지는 않으나 endo- β -glucanase와 exo- β -glucanase (cellulase), 그리고 β -glucosidase(cellubiase)가 相助의 作用하여 glucose까지 分解하는 parallel model이 提案되고 있다.

높은 活性의 纖維素 分解 酵素를 生産하는 菌株의 發見과 生産 條件의 設定을 위한 研究가 많이 進行되고 있으나 實用面에 있어서는 아직 만족할 만한 段階에 있지 못하다.

纖維素 分解 酵素를 生産하는 菌株로서 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride* (Koningi), *Myriococcum albomyces* 등 (Lee and Koh, 1975)이 있으며 擔子菌이 生産하는 纖維素 分解 酵素에 관해서는 Wakabayashi 등 (1964, 1965, 1966)의 半合成 培地에서 *Irpex lacteus*가 生産하는 avicelase, CMCase와 α -glucosidase의 特性에 관한 報告와 Wilson과 Niederpruem (1967)의 *Schizophyllum commune*이 生産하는 β -glucosidase에 관한 報告가 있으며, *Pleurotus ostreatus* α -galactosidase의 子實體 形成 過程중의 β -galactosidase와 β -galactosidase에 관하여 研究한 Michalski와 Beneke (1969)의 報告가 있다. Hong 등 (1975, 1976, 1978)은 벌집 培地에서 느타리, 팽이표코가 生産하는 cellulase, hemicellulase, protease 및 xylanase의 生産 條件 및 特性에 관하여 報告한 바 있다.

本 研究에서는 最近 生産量이 크게 늘고 있는 *Ganoderma lucidum* CAFM 9065가 주로 木材를 培地로 하여 栽培되고 있음에 착안, 이 菌의 纖維素 資化性이 클 것으로 豫想되어 纖維素 分解 酵素의 生産을 提高할 수 있는 培地 組成과 培養 條件을 設定하기 위하여

菌絲 生育 狀態와 生成된 Avicelase, CMCCase 및 β -glucosidase에 관하여 檢討하였다.

材料 및 方法

供試 菌株

全北大學校 食品加工學科 菌茸學研究室에서 保管하고 있는 *Ganoderma lucidum* CAFM 9065를 供試菌株로 使用하였다.

培地의 調製

1) 保存培地의 組成

malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 2 g, agar 15 g, distilled water 1,000 ml, pH 5.5

2) 種培養培地의 組成

glucose 10 g, peptone 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, thiamine-HCl 500 μg , distilled water 1,000 ml, pH 5.5

3) 振盪培養培地

① 炭素源

Table I의 基本 培地에서 Na-CMC 대신에 avicel, cellulose powder, filter paper, soluble starch, cellobiose를 1.0%씩 가하고 培地의 pH는 比較實驗을 除外하고는 5.5로 調整하여 250 ml 삼각 flask에 50 ml씩 넣어 調製한 후 1.2 kg/cm² 壓力에서 15 分間 殺菌하였다. 단 炭素源 중에서 酵素 生産이 비교적 良好했던 Na-CMC의 경우에는 이의 濃度를 0.1%로 부터 3.0%의 사이에서 달리하여 調製하였고, glucose濃度 實驗은 glucose를 0~1.0% 사이에서 添加하되 Na-CMC와 glucose의 全量이 1.0%가 되도록 調製하였다.

② 窒素源

基本 培地에 炭素源으로서 Na-CMC를 1.0%씩 가하고 peptone 대신에 casamino acid, urea, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3 를 窒素量이 0.026% 되게 調製하였다. 단 窒素源 중에서 酵素 生産

Table I. Composition of the basal medium.

Na-CMC	1.0 g
Peptone	0.2 g
KH_2PO_4	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
Thiamine-HCl	50 μg
Distilled water	100 ml
pH	5.5

이 良好한 peptone의 濃度實驗은 0~0.5 % 되게 調製하였다.

③ KH_2PO_4

②의 培地에서 peptone의 濃度를 0.2 % 되게 加하고 KH_2PO_4 는 0~0.5 %의 濃度로 調製하였다.

④ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

③의 培地에서 KH_2PO_4 를 0.3 % 加한후 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 0~0.05 %의 濃度로 調製하였다.

⑤ 기타 無機鹽類

④의 培地에서 $MgSO_4$ 의 濃度를 0.04 % 되게 加하고 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.3 mg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.1 mg/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.3 mg/l), $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.1 mg/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 mg/l)를 加하여 調製하였다.

⑥ Vitamin

④의 培地에서 $MgSO_4$ 의 濃度를 0.04 % 되게 加하고 thiamine-HCl 대신에 Ca-pantothenate(0.3 mg/), folic acid(0.03 mg/l), inositol(3 mg/l), riboflavin(0.3 mg/l)을 加하여 調製하였다.

培養 方法

種培養培地에 保存菌株을 일정량 接種하여 30 °C 暗所에서 7日間 培養한 것을 種培養으로 하여 이를 waring blender(15,000 rpm)로 1分間 磨碎하였고 이 懸濁液을 基本培地에 3 mg씩 接種하여 往復振盪培養器(100 rpm)에서 溫度와 培養期間實驗을 除外하고는 30 °C로 8日間 培養하였다.

酵素液 調製

8日間 培養한 다음 濾過하여 遠心分離한 後 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였으며 菌體는 蒸溜水로 水洗한 다음 70 °C vacuum oven에서 乾燥, 秤量하였다.

酵素的 活性度 測定

1) Avicelase 活性(Lee, 1984; Wakabayashi and Nisizawa, 1964)

1 % avicel 溶液 2 ml에 McIl vaine 緩衝液 2 ml를 L型 試驗管에 取하고 40 °C water bath 中에서 5分間 豫熱한 후 粗酵素液 1 ml를 加하여 40 °C 振盪水槽에서 120分間 反應시킨 후 遊離된 還元糖을 DNS法(Miller, 1959)에 의하여 比色定量하고, 酵素液 1 ml로 生成된 還元糖(glucose)의 μM 을 活性的 比較單位로 하였다.

2) CMCase 活性(Hong, 1978; Lee, 1984) 0.5 % Na-CMC 溶液을 基質로 하여 avicelase 測定方法과 同一하게 測定하였다.

3) β -Glucosidase 活性(Lee, 1984)

0.1 % salicin 溶液을 基質로 하여 avicelase 測定方法과 同一하게 測定하였다.

結果 및 考察

炭素源의 影響

各種 炭素源이 *Ganoderma lucidum* CAFM 9065의 纖維素 分解酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table II와 같다

Table II와 같이 avicelase와 CMCase 生産은 Na-CMC를 炭素源으로 하였을 때 가장 좋았고, β -glucosidase는 cellobiose를 炭素源으로 하였을 때 가장 좋았으며, 菌絲 生育은 soluble starch, cellobiose의 添加時에 良好하였다. 한편 glucose를 炭素源으로 하였을 때는 酵素 生産이 되지 않았으나 菌絲 生育은 매우 良好하였다.

以上の 結果는 Wilson과 Niederpruem (1967)의 *Sc hizophyllum commune* 實驗에서 cellobiose를 炭素源으로 하였을 때 β -glucosidase의 生産이 가장 좋았다는 報告와 *phymatotrichum omnivorum* 實驗에서 CMC 添加時 CMCase의 生産이 良好하였다는 Gunasekaran (1980)의 報告와 一致하였으나, Lee (1984)의 *Pleurotus sajor-caju* 實驗에서 cellulose powder가 纖維素 分解 酵素 生産에 가장 良好하였다는 報告와는 차이가 있었다.

또한 菌絲 生育은 炭素源 中에서 溶解되지 않는 것이 있기 때문에 肉眼으로 觀察했을 때 soluble starch와 cellobiose가 良好하였는데 이는 glucose와 starch가 *Agaricus bitoquis*와 *Pleurotus ostreatus*의 生育에 가장

Table II. Effect of carbon sources on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

Carbon sources (1%)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (Ne*)
Avicel	0.77**	7.11	1.36	+
Cellulose powder	1.58	7.88	4.33	++
Na-CMC	1.64	8.25	4.40	++
Filterpaper powder	0.38	4.59	3.49	+
Soluble starch	1.27	2.86	3.42	##
Cellobiose	0	1.89	5.20	##
Glucose	0	0	0	##

* Ne : Naked eye observation; +: growth present, ++: moderate growth; ##: heavy growth.

** Enzyme activity: glucose $\mu M/ml$.

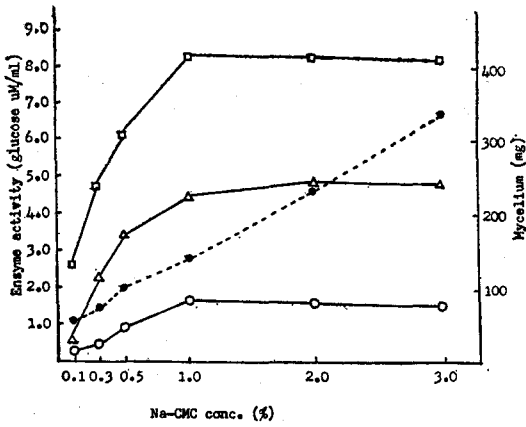


Fig. 1. Effect of Na-CMC concentration on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCase
 △—△: β-glucosidase ●—●: Mycelium

優秀한 炭素源이라는 Hong 등 (1981)의 報告와 類似한 傾向이었다.

本 實驗의 結果에서 多糖類를 炭素源으로 하였을 때에 avicelase와 CMCase의 生産이 많았고, cellobiose를 炭素源으로 하였을 때에는 이들 酵素의 生産이 不良한 반면 β-glucosidase의 生産이 促進된 것으로 보아 이들 酵素들은 誘導酵素일 것으로 推定된다.

Na-CMC 濃度의 影響

炭素源 중에서 Na-CMC가 酵素 生産과 菌絲 生育에 있어 가장 良好한 結果를 얻었으므로 最適 濃度를 알아 보기 위하여 Na-CMC 濃度의 影響을 檢討하였다.

Fig. 1 에서와 같이 低濃度下에서는 酵素 生産이 不良하였으나 添加 濃度의 增加에 따라 酵素 生産이 점진적으로 增加하여 CMCase와 avicelase는 1.0%에서 β-glucosidase는 2.0%에서 가장 良好하였으며 그 이상의 濃度에서는 다소 減少하는 傾向을 보였다. 한편 菌絲 生育은 Na-CMC 濃度가 增加함에 따라 비례적으로 增加하였다.

Gunasekaran(1980)은 *Phymatotrichum omnivorum* 實驗에서 CMCase 生産이 2.0%에서 가장 良好하였고 그 이상의 濃度에서는 減少되었으며 CMC 濃度가 0.5~1.0%로 增加할 때 酵素 生産도 급격히 增加한다는 報告와는 약간의 차이는 있으나 비슷한 傾向이었다.

Glucose의 影響

菌絲 生育에 良好한 glucose와 酵素 生産에 良好한

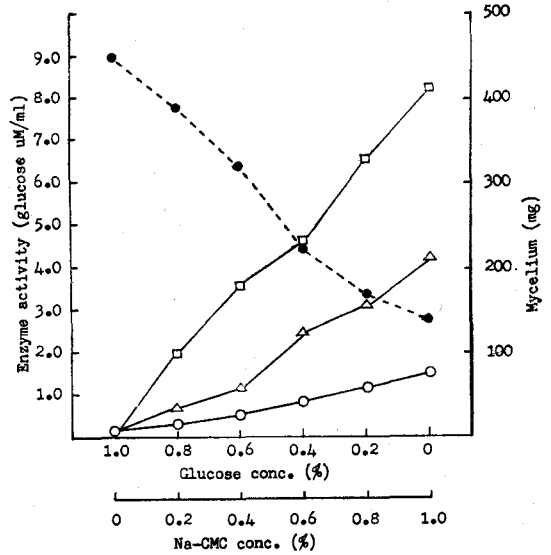


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCase
 △—△: β-glucosidase ●—●: Mycelium

Na-CMC를 各種 濃度로 混和하여 檢討한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2와 같이 酵素 生産은 glucose의 添加 比率이 높을수록 억제되었으나 glucose 量이 낮을수록 增加되었으며 반면에 菌絲 生育은 glucose의 添加 比率이 높을수록 增加되었다.

Iwahara (1981)등은 *Pleurotus ostreatus* 實驗에서 glucose를 添加한 液體培地에서 菌絲는 정상으로 生育하였으나 cellulase의 生産은 阻害한다고 報告하였고, Gunasekaran (1980)은 *Phymatotrichum* sp.의 酵素 實驗에서 glucose添加量이 增加함에 따라 CMCase 生産은 減少하였으며 菌絲 生育은 glucose의 濃度가 增加할수록 增加한다고 報告한 바 있는데 이는 本 實驗 結果와 一致하는 傾向이었다.

以上的 結果로 미루어 보아 glucose와 Na-CMC의 各各의 濃度를 적절히 配合(예를 들면 glucose: Na-CMC=4:6)함으로써 菌絲 生育을 旺盛하게 하면서 酵素 生産을 높일 수 있는 培地를 構想해 보거나 glucose로 初期 培養을 함으로써 菌絲 生育을 旺盛하게 해준 다음 Na-CMC를 添加해줌으로써 酵素 生産을 높이는 方法도 可能할 것으로 보이나 앞으로 研究해 볼 課題이다.

Table III. Effects of nitrogen sources on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

Nitrogen sources (0.026%)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (mg)
None	0.56	4.59	2.31	102.5
Peptone	1.60	8.27	4.42	137.3
Casamino acid	0.89	10.00	3.19	118.0
Urea	1.66	5.97	4.40	93.8
NH ₄ NO ₃	1.68	8.05	4.40	99.9
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.71	7.17	3.49	92.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.68	6.76	2.21	86.5
KNO ₃	1.17	2.64	2.31	75.6
NaNO ₃	1.38	5.20	3.08	102.1

Enzyme activity : glucose μ M/ml.

窒素源의 影響

酵素生産과 菌絲生育에 미치는 各種 窒素源의 影響을 檢討한 結果는 Table III과 같다.

Table III과 같이 酵素生産은 有機態 窒素인 peptone과 암모니아窒酸態 窒素인 NH₄-NO₃가 일반적으로 良好하였으나 窒酸態 窒素은 不良하였다.

菌絲生育은 有機態 窒素인 pepton과 casamino acid에서 良好하였으며 그 밖의 窒素源은 對照區에 비하여 不良하였다.

*Myriococcum albomyces*가 polypeptone과 casamino acid를 窒素源으로 添加하였을 때 CMCase生産이 增加하였다는 Chung (1971)의 報告와 *Trichoderma reesei*가 peptone 添加時 filter paper 活性, CMCase, cellobiase가 增加하였다는 Kim과 Yoo(1978)의 報告와 本實驗과는 잘 一致하였으며, 또한 Kawai와 Abe(1976)의 *Tricholoma matsutake*의 液體 培養 實驗에서 菌絲生育이 有機態 窒素에서 가장 優秀하였고 암모니아態 窒素, 窒酸態窒素 順이었다는 報告와는 類似한 傾向을 보였다.

Peptone 濃度의 影響

窒素源 중에서 酵素生産이 良好하고 菌絲生育에 가장 效果가 컸던 peptone의 濃度 變化에 따른 影響을 檢討한 結果는 Fig. 3과 같다.

peptone의 濃度가 增加함에 따라 0.2%까지는 avicelase와 CMCase 및 β -glucosidase가 급격히 增加하였으나 그 이후부터는 CMCase와 β -glucosidase는 完만한 增加 추세를 보였으며 avicelase는 다소 減少하는 傾向이었다.

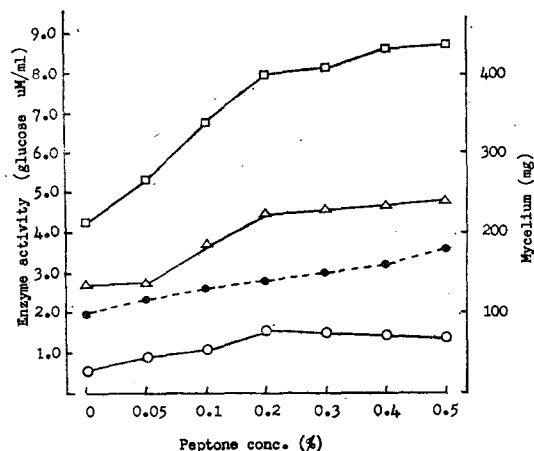


Fig. 3. Effects of peptone concentration on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCase
 △—△: β -Glucosidase ●—●: Mycelium

그러나 菌絲生育은 peptone 濃度의 增加에 따라 점차 增加하는 傾向을 보였는데 이는 Lee (1984)의 *Pleurotus sajor-caju*實驗에서 urea 濃度가 增加함에 따라서 cellulase生産이 增加하였다는 報告와 類似한 傾向을 보였으며, Hong과 Kang(1983)의 peptone 濃度 0.1%까지는 菌絲量이 급격히 增加되었으나 그 이후부터는 서서히 增加되었다는 報告와 같은 傾向이었다.

KH₂PO₄濃度의 影響

酵素生産과 菌絲生育에 미치는 KH₂PO₄ 濃度의 影響을 檢討한 結果는 Table IV와 같다.

Table IV와 같이 avicelase와 CMCase生産은 KH₂PO₄

Table IV. Effects of potassium dihydrogen phosphate concentration on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

KH ₂ PO ₄ conc. (%)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (mg)
None	0.93	5.97	3.19	115.8
0.05	1.38	7.31	3.85	131.7
0.1	1.60	8.25	4.40	138.0
0.2	1.64	8.34	4.42	143.4
0.3	1.71	8.43	4.52	141.4
0.4	1.58	8.40	4.76	139.5
0.5	1.44	8.37	4.71	138.2

Enzyme activity: glucose μ M/ml.

濃度 0.3%까지는 增加하였고 그 이후부터는 서서히 減少되는 傾向이었으며 β -glucosidase는 0.4%까지 增加하였고 그 이후부터 減少되는 傾向이었다.

菌絲生育은 0.2%까지는 서서히 增加하다가 그 이후부터는 다소 減少趨勢를 보였다.

*Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride*에 의한 cellulase 生産에 관한 Lee(1976)의 報告와 *Trichoderma* sp.의 cellulase 生産에 관한 Kim 등(1981)의 報告에서 KH_2PO_4 0.2% 添加區가 다른區 보다 酵素生産이 增加하였다는 報告와 類似하였고, Hong 등(1978, 1983)의 *Pleurotus ostreatus*의 菌絲生育에 良好한 KH_2PO_4 의 濃度는 0.2%라는 報告와는 一致하는 傾向이었다.

本 實驗에서 酵素 生産과 菌絲 生育이 對照區에 비해 添加區에서 상당히 增加되었으므로 P와 K가 必須 元素인 것으로 보인다.

MgSO₄ 濃度の 影響

酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 MgSO_4 濃度の 影響을 檢討한 結果는 Table V와 같다.

Table V와 같이 MgSO_4 濃度에 따른 큰 影響은 볼 수 없었으나, 比較的 0.02%의 濃度에서 酵素 生産과 菌絲 生育이 良好한 편이었으며, 그 以上の 濃度에서는 별다른 變化가 없었다.

이는 Kim 등 (1974)의 *Penicillium* sp.의 實驗에서 MgSO_4 0.015% 添加區가 cellulase 生産이 좋았다고 하였는데, 이보다는 약간 높은 濃度이었으며, Lee (1984)의 *Pleurotus sajor-caju* 酵素生産이 MgSO_4 0.04%에서 優秀하였다는 報告와는 차이가 있었다. 또한 Hong(1978, 1983)의 *Pleurotus ostreatus* 菌絲 生育이 0.02%의 濃度에서 가장 優秀하였다는 報告와는 一致하였으나, Sugimori 등 (1971)의 *Pleurotus ostreatus* 實驗에서 0.03%의 濃度에서 良好하였다는 報告와는 차

Table V. Effects of magnesium sulfate concentration on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ conc. (%)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (mg)
None	1.64	8.31	4.37	113.1
0.01	1.68	8.37	4.47	116.5
0.02	1.71	8.43	4.52	139.5
0.03	1.72	8.46	4.54	136.6
0.04	1.75	8.49	4.56	135.4
0.05	1.72	8.46	4.54	134.7

Enzyme activity: glucose $\mu\text{M}/\text{ml}$.

이가 있었다.

其他 無機 鹽類의 影響

各種 無機 鹽類가 酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table W와 같다.

Table W와 같이 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加時 對照區와 비슷했으며, 그밖의 無機 鹽類는 對照區에 비해 오히려 減少하는 傾向이었다.

菌絲 生育은 CaCl_2 와 FeSO_4 를 添加했을 때 良好하였으며 그밖의 無機 鹽類는 별 차이가 없었고, 오히려 對照區에 비해 減少하는 傾向이었다.

이는 Murao (1978)등의 *Aspergillus* sp. 實驗에서 各種 無機 鹽類는 纖維素 分解 酵素 生産에 效果가 없었다는 報告와 Hong (1983) 등의 *Pleurotus florida* 實驗에서 K 및 P 이외의 無機鹽類 添加가 菌絲 生育에 큰 도움이 되지 못했다는 報告와 거의 類似한 傾向을 보였다.

Table VI. Effects of various minerals on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

Inorganic salts	Conc. (mg/l)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (mg)
None		1.77	8.49	4.59	135.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	0.91	8.46	4.59	140.2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	1.85	7.31	3.53	130.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	1.68	7.59	4.66	138.3
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	1.83	8.40	4.52	132.4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	1.79	7.25	3.55	133.8

Enzyme activity: glucose $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Table VII. Effects of various vitamins on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

Vitamins	Conc. (mg/l)	Avicelase	CMCase	β -Glucosidase	Mycelium (mg)
None		0.75	8.02	3.06	104.4
Ca-pantothenate	0.3	1.87	8.60	4.49	120.0
Folic acid	0.03	1.85	8.64	4.56	129.0
Inositol	3	0.81	7.73	3.76	137.5
Riboflavin	0.3	1.69	8.46	2.21	130.5
Thiamine-HCl	0.5	1.77	8.52	4.54	135.0

Enzyme activity: glucose $\mu\text{M}/\text{ml}$.

各種 Vitamin의 影響

酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 各種 Vitamin의 影響을 檢討한 結果는 Table VII과 같다.

Table VII과 같이 vitamin이 酵素 生産에 미치는 影響은 현저한 차이를 나타내지 않았으나 그 중에서도 folic acid가 低濃度에서 avicelase, CMCCase, β -glucosidase 生産에 良好하였고, 菌絲 生育은 일반적으로 增加되었으나 그 중에서도 inositol의 效果가 컸다.

Stutzenberger (1972)는 *Thermonospora curvata* 實驗에서 thiamine이나 biotin 添加區로 cellulase 生産이 增加한다고 하였고, Lee(1984)는 *Pleurotus sajor-caju* 實驗에서 folic acid와 thiamine-HCl이 酵素 生産에 良好하다고 하였는데 이는 本 實驗 結果와 類似하였다.

또한 Kitamoto와 Kasai(1968)는 *Favolus arcularius*의 各種 vitamin 實驗에서 thiamine 添加時 菌絲 生育이 현저하게 促進되었으며, inositol과 Ca-pantothenate도 促進效果가 있었다고 하였는데 이는 本 實驗의 結果와 類似하였다.

培養 溫度의 影響

培養 溫度가 酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4와 같이 avicelase와 CMCCase는 30°C에서 가장 優秀하였고, β -glucosidase는 25°C에서 가장 良好하였으며, 菌絲 生育은 25~30°C에서 優秀하였으나, 20°C에서는 酵素 生産과 菌絲 生育이 不良하였다.

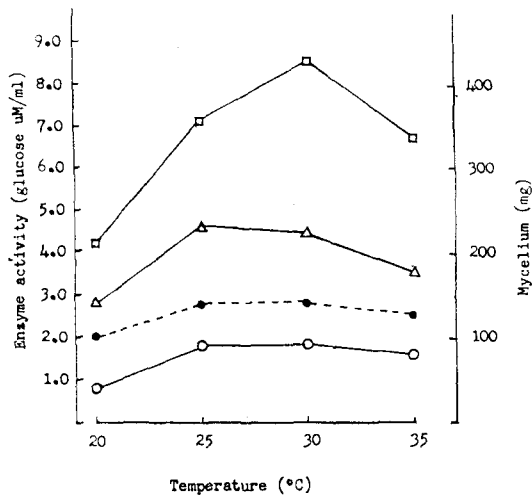


Fig. 4. Effects of cultural temperature on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCCase
 △—△: β -Glucosidase ●—●: Mycelium

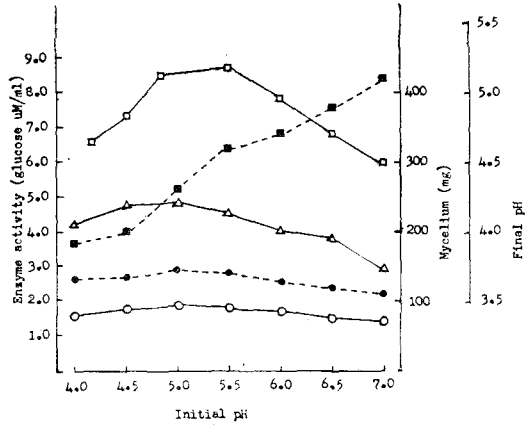


Fig. 5. Effects of initial pH on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCCase
 △—△: β -Glucosidase ●—●: Mycelium
 ■—■: Final pH

이는 *Pleurotus ostreatus*의 CMCCase 生産이 30°C에서 가장 優秀하였다는 Hong과 Kim(1981)의 報告와 Gunasekaran(1980)의 *Phymatotrichum omnivorum* 實驗에서 cellulase 生産의 最適 溫度는 30°C였으며, 그 이상의 溫度에서는 현저히 減少 되었다는 報告와 一致하였다.

또한 Kim(1980) 등은 *Ganoderma lucidum*의 液體 培養에서 最適 培養 溫度는 25~30°C이며, 30°C에서 菌絲 生育이 가장 良好하였고, 20°C 이하와 35°C 이상에서는 菌絲 生育이 부진하였다는 報告와 一致하였다.

pH의 影響

酵素 生産과 菌絲 生育에 미치는 pH의 影響을 檢討한 結果는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5와 같이 avicelase와 β -glucosidase는 pH 5.0, CMCCase는 pH 5.5에서 가장 良好하였고, 培地의 pH가 中性側으로 기울어 질수록 酵素 生産의 減少가 더 심한 傾向을 보였으며, 菌絲 生育은 pH 5.0에서 良好하였다.

培養이 끝난후 培養液의 pH는 培養 初期의 pH보다 일반적으로 떨어지는 傾向을 보였는데 이는 培養 期間 중 菌絲가 生成한 有機酸에 의한 것이 아닌가 생각되어 진다.

이는 Hong과 Kim(1981)의 *Pleurotus ostreatus* 實驗에서 cellulase 生産 最適 pH가 5.0이었다는 報告와 Kitamoto와 Kasai(1968)의 *Favolus arcularius*의 菌絲

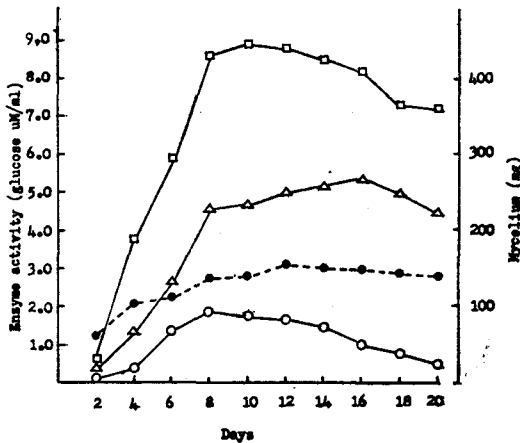


Fig. 6. Effects of cultural periods on the cellulolytic enzyme productivities and mycelial growth by *Ganoderma lucidum* CAFM 9065.

○—○: Avicelase □—□: CMCCase
 △—△: β-Glucosidase ●—●: Mycelium

生育 最適 pH가 5.1이었다는 報告와 비슷한 傾向이었다.

培養期間의 影響

培養 期間을 달리하여 酵素 生産과 菌絲 生育을 檢討한 結果는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6과 같이 avicelase는 培養 8日까지, CMCCase는 培養 10日까지, β-glucosidase는 16日까지 增加하다가 그 이후부터는 점차적으로 減少하는 傾向이었다. 菌絲 生育은 12日까지 점차 增加하다가 그 이후부터는 다소 減少하는 傾向이었다.

이는 Lee(1984)의 *Pleurotus sajor-caju* 實驗에서 10日까지는 avicelase, CMCCase가 급격히 增加하였다는 報告와 Kitamoto와 Kasai(1968)의 *Favolus arcularius*의 菌絲 生育은 12日까지 增加하고 그 이후부터는 다소 減少하였다는 報告와 類似하였다.

摘 要

合成 培地에서 *Ganoderma lucidum* CAFM 9065의 纖維素 分解 酵素 生産과 菌絲 生育에 관한 培養 條件을 檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

炭素源 중에서 avicelase와 CMCCase 生産은 Na-CMC를, β-glucosidase 生産은 cellobiose를 添加하였을 때 가장 좋았으며, 菌絲 生育은 soluble starch와 cellobiose가 良好하였다. 酵素 生産은 Na-CMC 1.0%에서 가

장 良好하고 菌絲 生育은 Na-CMC의 濃度 增加에 따라 현저히 增加되었다. Glucose는 濃度의 增加에 따라 酵素의 生産이 減少되었으나 菌絲 生育은 增加되었다.

酵素 生産이 良好한 窒素源은 peptone이었고 酵素 生産에 適當한 peptone의 濃度는 0.2%이었으며, 菌絲 生育은 peptone 濃度의 增加에 따라 점차 增加되었다.

酵素 生産의 KH_2PO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 最適 濃度는 각각 0.3%, 0.02%이었으며, 菌絲 生育은 0.2%, 0.02%에서 가장 좋았다. folic acid는 低濃度(0.03 mg/l)로 酵素 生産을 增加시켰고, 菌絲 生育은 inositol에서 良好하였다.

酵素 生産과 菌絲 生育의 最適 溫度는 30°C, avicelase와 β-glucosidase의 最適 pH는 5.0, CMCCase는 pH 5.5이었으며, 菌絲 生育은 pH 5.0에서 良好하였다. 培養 期間은 avicelase가 8日, CMCCase가 10日, β-glucosidase는 16日間 培養하였을 때 最大值를 보였고, 菌絲 生育은 12日 培養했을 때 가장 良好하였다.

文 獻

Chung, D.H. (1971): Studies on the cellulase produced by *Myriococum albomyces*. *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 14:59.
 Gunase, K.M. (1980): Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum* XI. Cellulolytic enzymes. *Mycologia* 72:759.
 Hong, J.S. and Namgung, H. (1975): Studies on the enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*. I. Properties of crude cellulase. 全北大學校 農大論文集 6:101.
 Hong, J.S. (1976): Studies on hemicellulolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*. I. Properties of crude hemicellulolytic enzymes. 全北大學校 農大論文集 7:89.
 Hong, J.S. (1978): Studies on the enzymes Produced by *Flammulina velutipes*. I. Properties of crude cellulase. 全北大學校 農大論文集 9:97.
 Hong, J.S. (1978): Studies on the physicochemical properties and the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 21:150.
 Hong, J.S., Lee, K.S. and Choi, D.S. (1981): Studies on basidiomycetes. I. On the mycelial growth of *Agaricus bitorquis* and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J.*

- Mycol.* 9:19.
- Hong, J.S. and Kang, K.H. (1983): Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* 11:121.
- Hong, J.S., Kwon, Y.J. and Jung, G.T. (1983): Studies on basidiomycetes. 2. Production of mushroom mycelium (*Pleurotus ostreatus* and *Auricularia auricula-judae*) in shaking culture. *Kor. J. Mycol.* 11:1.
- Hong, J.S. and Kim, D.H. (1981): Studies on the enzymes produced by basidiomycetes. 1. The production of crude enzymes. *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 24:7.
- Iwahara, H., Yoshimoto, T. and Fukuzumi, T. (1981): Change in activities of extracellular enzymes during life cycle of the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *日本材學會誌* 27:331.
- Katz, M., and Reese, E.T. (1968): Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol.* 16:419.
- Kim, J.M. and Yoo, D.Y. (1978): Studies on cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Kor. J. Mycobiol.* 16:141.
- Kawai, M. and Abe, S. (1976): Studies of the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. 1. Effects of carbon and nitrogen sources in media on the vegetative growth of *T. matsutake*. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 17:159.
- Kim, K.C., Kim, C.K. and Kim, C.H. (1981): Studies on the microbial decomposition of cellulosic materials. I. Isolation of cellulase producing microorganisms and characterization of the enzyme activities. *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 24:85.
- Kim, Y.B., Yi, P.K. and Choi, S.H. (1974): Studies on the cellulase of *Penicillium* sp. Isolated from soils. II. culture conditions of *Penicillium* sp. C13-13 strain. *Kor. J. Mycol.* 2:25.
- Kitamoto, Y. and Kasai, Z. (1968): Fruit-body formation of *Favolus arcularius* on a synthetic medium. *Japan. J. Agric. Chem.* 42:255.
- Kim, S.S. and Kim, K.J. (1980): Selection of some species for artificial cultivation from the wild mushrooms. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9(3):109.
- Lee, K.J. (1976): Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Kor. J. pharmacogn.* 7:85.
- Lee, K.H., Koh, J.S. and Park, S.O. (1976): Studies on the production of fermented feeds from agricultural waste products. III. On the production of cellulase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 19:130.
- Lee, K.H. and Koh, J.S. (1975): Studies on the production of fermented feeds from agricultural waste products. II. On the production and characteristics of cellulase by *Irpex lacteus*. *Kor. J. Agric. Chem. Soc.* 18:117.
- Lee, J.B. (1984): Studies on the cellulolytic enzymes produced by *Pleurotus* sp. on the synthetic medium. 全北大學校 大學院 碩士學位論文.
- Mandels, M. and Reese, E.T. (1963): Enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives. In R.L. Whistler [ed.]. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press. New York, 61:1041.
- Michalski, C.J. and Beneke, E.S. (1969): Enzymatic activities during basidiocarp development of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 61:1041.
- Miller, G.L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426.
- Murao, S., Kanamoto, J. and Arai, M. (1979): Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. *Japan J. Ferm. Technol.* 57:151.
- Reese, E.T. (1956): Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol.* 4:39.
- Sugimori, T., Oyama, Y. and Omichi, T. (1971): Studies on basidiomycetes. 1. Productions of mycelium and fruiting body from noncarbohydrate organic substances. *Japan J. Ferm. Technol.* 49:435.
- Stutzenberger, F.J. (1972): Cellulolytic activity of *Thermonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. *Appl. Microbiol.* 24:77.
- Wakabayashi, K. and Nisizawa, K. (1964): On the cellulase system of *Irpex lacteus*. *Japan J. Ferm. Technol.* 42:347.
- Wakabayashi, K., Kanda, T. and Nisizawa, K. (1965): On the fractionation and some properties of cellulase from *Irpex lacteus*. *Japan J. Ferm. Technol.* 43:739.

Wakabayashi, K., Kanda, T. and Nisizawa, K. (1966):
Separation of two cellulase components from a cul-
ture filtrate of *Irpea lacteus* and some of their
properties. *Japan J. Ferm. Technol.* 44:669.
Wilson, R.W. and Niederpruem, D.J. (1967): Control

of β -glucosidases in *Schizophyllum commune*. *Can
J. Microbiol.* 13:1009.

<Received April 7, 1986;

Accepted May 23, 1986>