

*Ganoderma lucidum*으로부터 Polygalacturonase의 생산

윤 속 · 김명곤 · 홍재식* · 김명숙
전북대학교 농과대학 식품공학과

Production of Polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

Sook Yoon, Myung-Kon Kim, Jai-Sik Hong and Myeong-Sook Kim

Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756

ABSTRACT: The optimum nutritional and cultural conditions of polygalacturonase by *Ganoderma lucidum* in liquid culture were studied. The optimal temperature, pH, and the duration of culture for production of the enzyme was 30°C, 5.5 and 14 days, respectively. The maximal production of the enzyme was obtained in a synthetic medium containing 10 g of pectin, 10 g of soluble starch, 1 g of yeast extract, 2 g of peptone, 1 g of phenylalanine, 2 g of KH_2PO_4 , 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g of CaCl_2 and 100 g of thiamin-HCl in 1000 ml of distilled water.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, endo- and exo-polygalacturonase, cultural condition

민주름버섯목(Aphyllophorales), 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 활엽수의 그루터기나 뿌리 밑동에서 서식하고 6~9월 경의 고온기에 활발히 생육하는 1년생 담자균류에 속하는 백색부후균(中村, 1983)으로 2000년 이전부터 중국에서는 각종 질병에 효능이 있어 만병통치, 불로장수 등에 진귀한 약재로 활용(박, 1985; Hyun 등, 1990; Chang 등, 1993)되어 오고 있다. 현재도 건강지향적 사고에 의해 현대인들의 건강보조식 또는 건강 drink제의 원료로 사용되고 있으며 영지 중의 미지의 특수 생리활성성분 및 약효성분들이 계속 밝혀지고 있기 때문에 이의 사용범위는 훨씬 더 증대될 것으로 생각된다.

많은 미생물들은 복잡한 형태로 여러가지 pectin 분해효소를 생산하는데, 식물체의 구성성분인 pectin을 분해하여 식물체의 연화(Gross and Wallner, 1979; Hobson, 1964; 藤井, 1956)에 깊이 관여하고, 옛부터 삼의 발효정련, 과즙의 청정(Endo, 1965, 岡田 등, 1969; 綾野.井上, 1959; 島英, 1985) 등에

사용되어 온 효소이다.

Pectinase의 생산 균주로는 *Coniothrium diplocladia* (Endo, 1963a; Endo, 1963b), *Aspergillus niger* (Mill, 1966a; Mill, 1966b; Tuttobello and Mill, 1961; Hara 등, 1983; Hara 등, 1984), *Aspergillus japonicus* (Ishii and Yokotsuka, 1972), *Acrocyllindrium* sp. (Kimura and Mizushima, 1973; Kimura and Mizushima, 1974), *Erwinia carotovora* (Kragt and Starr, 1953; Nasuno and Starr, 1966), *Monilia fructicola* (Paynter and Jen, 1974), *Aureobasidium pullulans* (Sakai and Takaoka, 1985), *Trichosporon penicillatum* (Sakai and Okushima, 1978; Sakai and Okushima, 1982; Sakai and Okushima, 1982), *Galactomyces reessii* (Sakai and Yoshitake, 1984; Sugiyama 등, 1983), *Kluyveromyces fragilis* (Sakai 등, 1984), *Verticillium albo-atrum* (Wang and Keen, 1970), *Aspergillussaitoi* (Yamasaki 등, 1966a; Yamasaki 등, 1966b), *Saccharomyces fragilis* (畑中.小澤, 1968; Demain and Phaff, 1954; Phaff and Demain, 1956), *Aspergillussojiae* (石井 등, 1970), *Penicillium chrysogenum* (綾野.井上, 1959), *Erw-*

*Corresponding author

inia aroidae (藤井, 1956), *Botritis cinerea* (Endo and Miura, 1961), *Penicillium citrinum* (Endo and Miura, 1961), *Penicillium islandicum* (Arima 등, 1964), *Sclerotinia libertiana* (Endo and Miura, 1961), *Carpenteles javanicus* (Endo and Miura, 1961), *Neurospora* sp (Roboz 등, 1952) 등 그 종류들이 다양하다.

영지버섯은 자실체 뿐만 아니라 균사체에도 유용한 생리활성물질을 함유하고 있어 향후 균체를 대량생산할 때 배양액에 다량 잔존하게 되는 pectinase의 유용한 자원으로도 활용할 수 있으며, 밀감 주우스 산업에서 대량으로 폐기되는 밀감껍질 폐자원의 유용활용을 위한 기초 실험 결과 담자균류 중 다른 담자균류에 비하여 영지버섯균에서 다량의 균사체와 강력한 pectin 분해효소를 생산할 수 있음을 확인하였기에 본 연구에서는 영지버섯 균사체로부터 polygalacturonase의 생산을 위한 체계적인 연구의 일환으로 polygalacturonase의 생산에 미치는 배양 기간, 배양 pH, 배양 온도, 탄소원, 질소원, KH_2PO_4 , 무기염류, 비타민류의 영향등 배양특성을 밝히고자 한다.

材料 및 方法

공시균주

전북대학교 농과대학 식품공학과 미생물학 실험실에 보관중인 균주 중에서 polygalacturonase 생산 능력이 가장 우수한 균주로 *Ganoderma lucidum* A001 균주를 선발하여 공시균주로 사용하였다.

사용배지

보관용 배지로는 2.5% malt extract(Difco), 2% agar(Difco)를 함유한 배지(pH 5.5)를 사용하였고, 종배양용 배지는 1% malt extract 배지(pH 5.5)를 사용하였다.

액체 배양용 기본 배지 조성은 pectin 10 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 0.2 g, peptone 2 g, thiamin·HCl 50 µg, distilled water 1000 ml, pH 5.5로 하였다.

배양 방법

보존균주를 종배양용 배지 50 ml에 직경 0.5 cm의

균편을 접종하여 25°C 에서 7일간 종배양한 후 Omni mixer로 2분간 무균적으로 마쇄한 균사 현탁액 4 ml를, 250 ml 삼각 flask에 배양액을 50 ml 씩 넣어 1.2 kg/cm² 압력에서 15분간 살균한 배지에 접종하여 온도와 배양 기간 비교실험을 제외하고는 30°C 에서 10일간 배양하였다.

Endo- 및 exo-polygalacturonase 활성 측정

*Ganoderma lucidum*을 액체배지에서 10일간 정지배양한 배양물을 여과하여 endo- 및 exo-polygalacturonase의 조효소액으로 하였으며, endo-polygalacturonase의 활성은 1% pectin을 함유한 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.6) 5.6 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 40°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지 후 반응액 250 µl를 취하여 HAAKE viscometer로 (Roboz 등 (1952)의 방법에 준하여 아래와 같이 점도의 감소활성을 측정하였으며, 이때 효소를 여러 농도로 희석하여 50%의 점도감소를 나타내는 효소량을 1 unit로 하였다.

$$A = (T_a - T) / (T_a - T_o) \times 100$$

A ;Reducing rate of viscosity (%)

T_a;Flow time (sec) of pectin soln. added to the heat inactivated enzyme.

T ;Flow time (sec) of the reaction mixture

T_o;Flow time (sec) of water added to the heat-inactivated enzyme

Exo-polygalacturonase 활성은 endo-polygalacturonase에서와 동일한 조건으로 반응시킨 후 반응액 1 ml를 취하여 유리된 환원당을 DNS 법(Miller, 1959)에 의하여 540 nm에서 비색정량하였다. Galacturonic acid를 사용하여 같은 방법으로 표준곡선을 작성하였으며 효소활성도는 galacturonic acid를 1 분당 1 µM 생성하는 능력을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법에 준하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

結果 및 考察

전북대학교 농과대학 식품공학과 미생물학 실험실에 보관 중인 73종의 담자균류를 대상으로 pectin 분해능을 검토한 결과 담자균류중 민주름버섯목의 버섯균류에서 높은 pectin 분해능을 확인하였다. 이 중 우수했던 영지버섯균(*Ganoderma lucidum*)을 pectin 분해효소 생산용 균주로 선발하고 배양조건과 기본배지의 조성을 달리하여 polygalacturonase 생산을 위한 배양 최적 조건과 각종 영양원의 효과를 검토하였다.

배양 기간의 영향

기본 배지상에서 배양 기간에 따른 polygalacturonase 생산 과정을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

Pectin을 효소반응 기질로 하여 DNS 환원력(당화력)과 점도감소활성(액화활성)을 검토한 결과 배양 기간이 경과함에 따라 polygalacturonase의 생산도 점진적으로 증가하여 배양 14일에 최고를 나타내고 그 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 균체량은 배양 10일까지는 현저히 증가하였으나 그 이후는 비교적 완만한 증가를 나타냈으며, 배양액의 단백질 농도는 배양 7일까지는 급격히 감소하다 그 이후는 점진적인 감소추세를 나타냈고, 배지 중에 함유된 peptone은 배양 초기에 활발히 이용되는 것으로 나타났다. *Aspergillus niger*와 같은 사상균류의 경우는 일반 담자균류보다 생육속도가 빨라

polygalacturonase의 생산은 7일 정도의 배양 기간(岡田 등, 1969)이 소요되었던 반면, *Verticillium sp.*와 *Aspergillus sp.*는 3일 정도에서 우수한 것으로 알려져 있다(유 등, 1982; 이 등, 1976).

배양 온도의 영향

15~35°C 에서 배양 온도를 달리하여 배양 14일에 polygalacturonase 생산 과정을 검토해 본 결과는 Fig. 2와 같다. 배양 온도를 상승시킴에 따라 효소 생산 및 균사 생육도 증가하여 30°C에서 가장 생산량이 많았고 그 이상의 온도에서는 급격한 감소를 나타냈다. *Ganoderma lucidum*의 생육한계 온도는 20~34°C 로, 35°C 이상에서는 균사 생장이 현저히 감소하는 것으로 보고(車 등, 1989; 洪 등, 1986)되었고, polygalacturonase의 생산도 생육 최적 온도인 30°C 내외에서 가장 활발함을 나타내었다. 배양액 내의 단백질 농도는 반대로 30°C 내외의 온도에서 가장 낮아 배지 중 peptone의 이용성도 또한 최적 생육 온도에서 가장 높았다. Polygalacturonase의 생산은 생산 미생물에 따라 *Verticillium sp.*는 27°C, *Aspergillus sp.*는 30~35°C 의 온도에서 양호한 것으로 보고(유 등, 1982; 이 등, 1976)되었다.

배지 pH의 영향

배지를 pH 3.0~8.0으로 달리하여 *Ganoderma lucidum*의 polygalacturonase 생산에 미치는 영향을

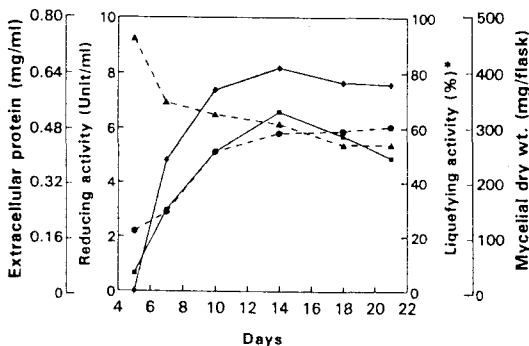


Fig. 1. Influence of cultural periods on polygalacturonase produced from *Ganoderma lucidum*. -■-; reducing activity, -◆-; liquefying activity, -▲-; extracellular protein, -●-; mycelial dry weight

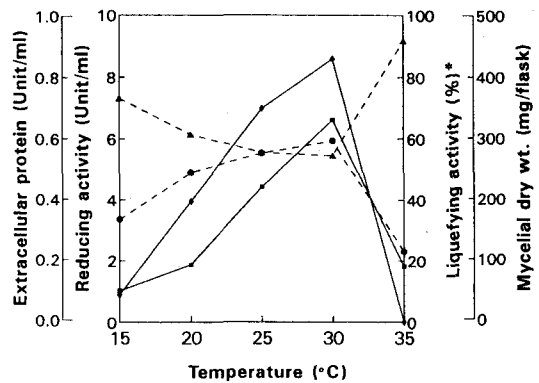


Fig. 2. Influence of temperature on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*. -■-; reducing activity, -◆-; liquefying activity, -▲-; extracellular protein, -●-; mycelial dry weight

Table 1. Influence of pH on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

pH	Final pH	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
3.0	4.0	3.57	78.10	262.9	0.55
4.0	5.4	5.54	75.64	296.6	0.51
4.5	5.5	6.37	85.65	295.6	0.49
5.0	5.5	6.48	85.89	296.8	0.51
5.5	5.5	6.50	85.99	296.7	0.51
6.0	5.7	4.01	73.50	296.1	0.51
6.5	5.9	2.67	63.65	281.5	0.57
7.0	5.9	1.26	35.20	279.5	0.62
8.0	6.3	1.24	7.87	270.0	0.67

*Percent viscosity decrease

검토한 결과는 Table 1과 같다. 각종 배양 pH에 따른 pectin 분해효소 생산 및 균사생육은 pH 4.0~5.5의 범위에서 비교적 양호하였고, pH 5.5에서 가장 많은 양을 나타냈다. 그러나 5.5 이상의 pH에서는 효소 생산이 심한 감소추세를 나타냈는데 특히 pectin 분해효소의 점도감소 활성보다 환원당 생산능(DNS 환원력)에 미치는 영향이 더 컸다. 따라서 polygalacturonase의 점도감소활성과 DNS 환원력이 차이를 나타낸 것으로 미루어 *Ganoderma lucidum*이 생산하는 pectin 분해효소는 적어도 두 종류 이상의 효소군(endo-polygalacturonase와 exo-polygalacturonase)이 존재하는 것으로 추정된다. *Ganoderma lucidum*의 최적 생육 pH는 4.2~5.3으로 그 이상의 pH에서는 균사생육이 현저히 감소하는 것으로 보고(車 등, 1989; 洪 등, 1986)되어 있어 polygalacturonase의 생산도 최적 pH 범위에서 활발함을 알 수 있었다. 정(1978)은 *Aspergillus* sp.에 의한 pectic enzyme 생산시 pH 3.0~5.0 범위에서 우수하였다고 보고한 바 있다.

탄소원의 영향

각종 탄소원이 *Ganoderma lucidum*의 polygalacturonase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 기본배지의 1% pectin에 일반적으로 담자균류가 많이 이용하는 각종 당류를 1% 되게 첨가하여 그 영향을 검토해 본 결과는 Table 2와 같다. Pectin을 단일 탄소원으로 첨가했을 때보다 담자균류가 잘

이용하는 각종 당류를 보조 탄소원으로 첨가했을 때 dextrin 구를 제외하고는 효소 생산에 크게 기여하는 것으로 나타났다. 그 중에서도 arabinose, fructose, sucrose, xylose, cellulose, soluble starch, galactose, mannitol, sorbitol 등이 효소생산에 상당한 효과를 나타내어, pectin을 단일 탄소원으로 사용하는 것보다 담자균류가 잘 이용할 수 있는 보조 탄소원들을 첨가했을 때 polygalacturonase의 생산이 촉진되었으며, 이들 보조탄소원 중 polygalacturonase 생산과 균체생산에 현저한 효과를 나타내는 것으로는 cellulose와 soluble starch이었다. 따라서 보조 탄소원 중 효과가 가장 우수하였던 soluble starch와 pectin의 적정 혼합비율을 검토하기 위하여 농도를 달리하여 그 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. Pectin과 soluble starch의 농도를 달리한 결과, polygalacturonase 생산은 pectin 무첨가 구보다 pectin 첨가 구에서 현저하게 높게 나타나, *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase는 pectin 질에 의해서 유도되는 전형적인 유도효소이었으며, DNS 환원력에 의한 polygalacturonase의 생산역가 검정에서는 1% pectin에 0.5~1%의 soluble starch를 첨가했을 때 우수 반면, 점도감소 활성은 soluble starch의 첨가량과는 무관하게 pectin 함량이 많을 수록 효소의 생산량이 많이 나타나 2% pectin에서 가장 우수하였다. 그러나 전체적으로 polygalacturonase의 생산(점도감소 활성과 DNS 환원력)과 균체 생산 면에서는 1% pectin과 1% soluble starch의

Table 2. Effect of different sugar added in 1% pectin medium for polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Sugars (1%, w/v)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	6.60	85.54	294.9	0.53
Arabinose	10.37	91.80	293.9	0.53
Fructose	10.54	91.60	292.2	0.55
Sucrose	8.57	90.70	286.7	0.56
Xylose	10.54	87.10	290.3	0.53
Galactose	8.35	91.10	322.8	0.51
Cellulose	10.54	91.70	336.9	0.50
Soluble starch	10.54	91.87	318.7	0.53
Maltose	6.82	89.78	310.1	0.55
Rhamose	7.33	86.78	273.4	0.54
Starch	7.16	89.24	289.5	0.59
Mannose	6.88	88.70	320.0	0.55
Glucose	7.38	86.51	314.8	0.59
Dextrin	6.57	85.97	300.0	0.59
Mannitol	9.47	85.96	295.2	0.54
Sorbitol	6.64	85.00	253.3	0.64

*Percent viscosity decrease

Table 3. Effect of pectin and soluble starch concentration on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Concentration (%)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
2% Pectin	5.61	93.36	312.7	0.52
1.5% Pectin+0.5% Soluble starch	8.36	92.29	318.7	0.50
1% Pectin+1% Soluble starch	10.54	91.86	318.7	0.53
1% Pectin	6.79	91.54	294.9	0.53
0.5% Pectin+1.5% Soluble starch	6.07	80.66	278.8	0.56
2% Soluble starch	1.52	8.16	327.2	0.33
1% Soluble starch	1.24	7.74	310.0	0.33

*Percent viscosity decrease

첨가구가 가장 양호하였다. Yamasaki 등(1966)도 *Aspergillus saitoi*가 생산하는 polygalacturonase는 구성적으로도 생성되기는 하나 pectin 첨가시 현저하게 효소생산이 증가하였으며, 4% sucrose와 2% pectin의 혼합 탄소원에서 우수한 효소생산을 이룰

수 있었다고 보고한 바 있다.

질소원의 영향

각종 질소원이 *Ganoderma lucidum*의 polygalacturonase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여

Table 4. Effect of different nitrogen source on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Nitrogen sources (0.028% N, w/v)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	2.31	72.38	171.2	0.15
Casamino acid	2.72	83.35	222.3	0.46
Peptone	10.54	91.87	318.7	0.52
Proteose peptone	10.37	89.93	229.4	0.52
Tryptone	10.09	86.29	224.4	0.54
Urea	4.62	64.31	209.3	0.45
Ammonium phosphate	8.85	89.83	127.8	0.38
Ammonium sulfate	8.79	43.12	107.2	0.41
Ammonium tartarate	10.00	84.20	164.4	0.43
Ammonium nitrate	9.70	58.95	127.9	0.32
Potassium nitrate	7.55	74.72	175.9	0.31
Sodium nitrate	5.36	74.62	164.5	0.31
Sodium nitrite	0	0	0	0

*Percent viscosity decrease

각종 질소원을 질소량으로 0.028% 되게 조정하여 그 첨가 효과를 검토한 결과는 Table 4와 같다. Polygalacturonase 생산 및 균체 생산은 무기태 질소원에 비하여 유기태 질소원에서 우수한 경향을 나타내었는데 유기태 질소원에서는 peptone, proteose peptone, tryptone 등이 양호하였고, 이 중 bacto-peptone이 질소원중 가장 우수하였다. 무기태 질소원에서는 ammonium phosphate, ammonium sulfate, ammonium tartarate, ammonium nitrate 등과 같은 ammonia 태 질소원은 비록 균체 생산에는 효과가 미약하였지만 polygalacturonase 생산면에는 거의 유기태 질소원에 버금가는 효과를 나타내었다. 그 중에서도 특히 ammonium tartarate가 polygalacturonase 생산에 우수하였다. Ammonium tartarate는 담자균류들이 무기 질소원 중에서는 비교적 잘 이용(홍 등, 1983)하는 것으로 알려져 있다. 반면에 무기 질소원 중 아질산태 질소원은 효소 생산 뿐만 아니라 균사 생육에도 완전히 저해적인 것으로 나타났다.

Peptone 농도의 영향

질소원 중 polygalacturonase 생산에 가장 우수하였던 peptone의 농도를 0~0.5%로 달리 조정하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과

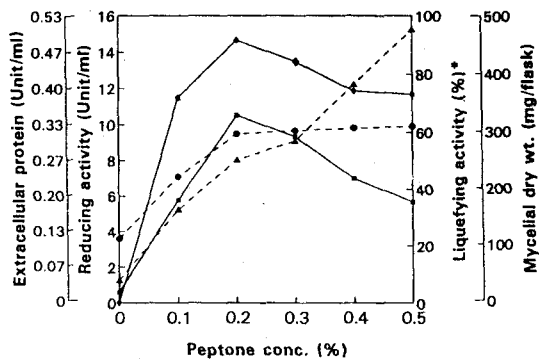


Fig. 3. Effect of peptone concentrations on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

—■—; reducing activity, —◆—; liquefying activity, —▲—; extracellular protein, —●—; mycelial dry weight

같다. 0.2%의 peptone 농도에서 polygalacturonase 생산이 가장 우수하였는데 peptone의 농도가 증가함에 따라 endo-polygalacturonase 생산은 0.2%까지 급격히 증가하였으나 0.3% 이상에서는 비교적 완만한 감소 추세를 나타낸 반면, exo-polygalacturonase의 생산은 0.1~0.2%의 peptone 농도에서 급격한 증가 추세를 나타내다가 그 이후의 농도에서는

Table 5. Effect of amino acids added on polygalacturonase production in the presence of 0.2% peptone from *Ganoderma lucidum*.

Amino acids	Conc. (%)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	0	10.54	91.87	338.7	0.62
Arginine	0.05	10.34	88.09	312.1	0.64
	0.1	11.01	88.98	311.9	0.65
Aspartic acid	0.05	10.64	83.67	336.4	0.53
	0.1	9.88	89.07	375.6	0.55
Cysteine	0.05	8.58	83.76	345.4	0.81
	0.1	10.33	91.17	244.0	1.31
Glutamic acid	0.05	10.43	87.24	362.5	0.59
	0.1	10.50	87.64	351.5	0.55
Leucine	0.05	9.98	88.44	341.0	0.61
	0.1	10.61	90.88	346.3	0.65
Lysine	0.05	10.36	88.42	372.4	0.53
	0.1	10.75	90.45	279.9	0.64
Methionine	0.05	10.19	87.74	432.1	0.61
	0.1	10.28	89.10	334.1	0.62
Phenyl alanine	0.05	10.44	89.44	354.2	0.70
	0.1	11.22	93.00	385.1	0.65
Tryptophan	0.05	10.44	89.72	334.4	1.98
	0.1	10.41	88.08	333.3	3.46
Valine	0.05	10.06	86.13	301.0	0.63
	0.1	10.50	90.31	315.3	0.65

*Percent viscosity decrease

심한 감소 추세로 나타났다. 균체량은 0.2%까지는 증가 속도가 빠른 반면 그 이후의 농도에서는 균체량의 증가가 비교적 완만하였다.

Amino acid의 영향

배지 중의 질소원을 0.2% peptone으로 하고 각종 amino 산을 0.05%와 0.1% 씩 첨가할 때 pectin 분해효소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. 첨가 amino 산 중 aspartic acid, cysteine, glutamic acid, leucine, lysine, methionine, phenylalanine 등을 첨가할 때는 균체의 생산에는 다소 첨가 효과가 인정되나 phenylalanine 첨가구에서 polygalacturonase 생산이 가장 좋았고 0.05%

보다 0.1% 첨가가 더 양호하였다.

KH_2PO_4 농도의 영향

배지 중의 KH_2PO_4 의 농도를 0~0.5%로 달리하여 polygalacturonase 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. KH_2PO_4 의 농도가 증가함에 따라 endo- 및 exo-polygalacturonase 생산도 증가하여 0.2~0.3%의 범위에서 양호하였는데 이 중에서도 0.2%의 농도가 제일 우수하였다. 밀기를 배지 상에서 *Aspergillus* sp.로부터 pectinase 생산시 정(1978)은 K원으로 K_2HPO_4 를 0.2% 첨가할 때 효소 생산이 양호하였다고 보고하였으나, 유 등(1982)은 0.015%에서 양호하였다고 보고한 바 있다.

MgSO₄ 농도의 영향

Polygalacturonase 생산에 미치는 MgSO₄·7H₂O 농도를 0~0.05%로 달리하여 그 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. Endo-polygalacturonase 생산은 0.01%보다 0.02%에서 약간 우수한 경향을 보였으며, exo-polygalacturonase의 생산은 0.01%까지는 급격한 증가 추세를 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 거의 차이를 나타내지 않았다. 따라서 0.02%의

MgSO₄·7H₂O 첨가가 pectin 분해효소 생산에는 대체적으로 적당하였다. 홍 등(1986)의 영지버섯균으로부터 cellulase 생산시 MgSO₄·7H₂O 0.02%의 농도가 효소 및 균체생산에 가장 우수했던 결과와 비록 효소의 종류는 다르지만 유사하였다.

기타 무기염류의 영향

기타 각종 무기염류가 polygalacturonase의 생산

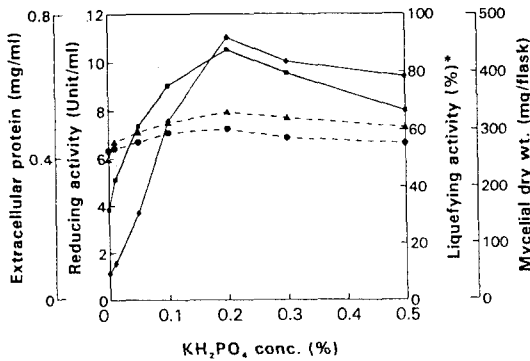


Fig. 4. Effect of KH₂PO₄ conc. on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

—■—; reducing activity, —◆—; liquefying activity, —▲—; extracellular protein, —●—; mycelial dry weight

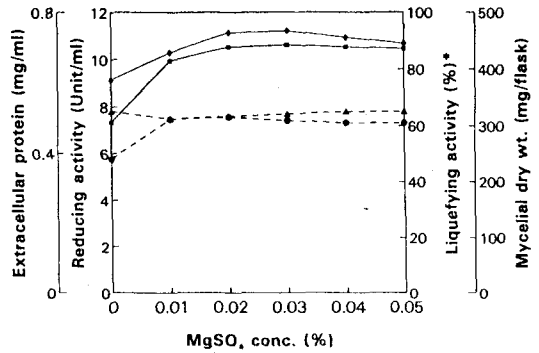


Fig. 5. Effect of MgSO₄ conc. on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

—■—; reducing activity, —◆—; liquefying activity, —▲—; extracellular protein, —●—; mycelial dry weight

Table 6. Effect of mineral salts on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Mineral salts	Conc. (mg%)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	0	11.4	94.01	389.0	0.60
CaCl ₂	1	11.56	94.35	389.1	0.52
	5	11.69	94.42	389.5	0.59
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2	10.46	87.79	349.9	0.57
	1	8.71	85.84	305.7	0.62
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	9.81	85.22	375.9	0.57
	1	8.74	88.68	372.9	0.50
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.1	10.94	89.64	386.3	0.53
	0.5	9.25	85.50	383.1	0.54
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	6.68	70.08	276.4	0.54
	0.5	8.63	61.67	289.9	0.61

*Percent viscosity decrease

에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 6과 같다. 각종 미량원소들은 CaCl_2 의 첨가 구를 제외하고는 무첨가 구에 비하여 polygalacturonase의 생산 촉진 효과를 나타내지 않았다. CaCl_2 에서는 1 mg/l보다 5 mg/l가 약간 더 효과적이었다. 그러나 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 첨가는 오히려 polygalacturonase 생산에는 저해적으로 나타났다. 유 등(1982)도 *Verticillium* sp.로부터 protopectinase 생산 실험에서 밀기를 배지에 CaCl_2 첨가지 효소 생산이 촉진되었다는 보고와

유사하였다.

Vitamin의 영향

각종 vitamin이 polygalacturonase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 일반적으로 담자균류의 생육 및 효소 생산에 영향을 주는 vitamin으로 보고된 (Chang 등, 1993) ascorbic acid, biotin, folic acid, nicotinic acid, Ca-pantothenate, thiamin·HCl 등의 첨가효과를 검토한 결과는 Table 7과 같다. 각종 vi-

Table 7. Effect of vitamins on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Vitamins	Conc. (mg/l)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	0	4.72	43.00	215.1	0.60
Ascorbic acid	250	3.44	75.99	290.3	0.59
	1000	7.77	92.17	270.8	0.56
Biotin	0.01	6.08	87.19	291.0	0.59
	0.05	11.33	94.27	275.0	0.54
Folic acid	0.03	6.88	85.16	291.6	0.60
	0.15	7.05	92.96	295.9	0.55
Nicotinic acid	0.1	7.72	87.09	277.0	0.53
	0.5	8.34	81.47	319.9	0.56
Ca-Pantothenate	0.1	7.83	78.31	283.1	0.58
	0.5	11.45	84.78	333.4	0.57
Thiamin·HCl	0.05	11.67	94.27	387.0	0.57
	0.1	11.71	94.51	389.0	0.60

*Percent viscosity decrease

Table 8. Effect of organic nutrients on polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*.

Organic nutrients	Conc. (mg/l)	Reducing activity (Unit/ml)	Liquefying activity* (%)	Mycelial dry wt. (mg/flask)	Extracellular protein (mg/ml)
None	0	11.70	94.45	389.5	0.59
Malt ex.	0.05	11.50	93.89	370.9	0.62
	0.1	11.62	93.21	366.3	0.66
Soybean ex.	0.05	10.81	92.06	361.1	0.61
	0.1	10.63	92.30	366.1	0.64
Yeast ex.	0.05	11.71	94.58	390.6	0.63
	0.1	11.76	94.72	392.1	0.67

*Percent viscosity decrease

tamin의 첨가는 무첨가 구에 비하여 거의 모든 첨가 구에서 polygalacturonase의 생산 및 균체 생산에서 다소 양호한 촉진효과를 나타내어 *Ganoderma lucidum*의 생육 및 효소 생산에는 vitamin 유의 첨가는 필수적인 것으로 나타났다. 첨가된 각종 vitamin 중 endo-polygalacturonase 생산에는 biotin 0.05 mg/l, thiamin·HCl 0.05 및 0.1 mg/l에서, 균체 생산에는 biotin 0.05 mg/l, folic acid 0.03 및 0.15 mg/l, thiamin·HCl 0.05 및 0.1 mg/l에서 양호하였다. 전체적으로는 thiamine.HCl 0.1 mg/l 첨가가 polygalacturonase 생산 및 균체 생산에 가장 효과적이었으며, exo-polygalacturonase 생산에는 biotin 0.01 및 0.05 mg/l, Ca-pantothenate 0.5 mg/l, thiamin·HCl 0.05 및 0.1 mg/l에서 우수하였다.

기타 유기물질의 영향

기타 유기물질로서 일반 미생물의 생육 및 효소 생산에 촉진효과가 있는 malt extract, soybean extract, yeast extract를 0~0.1% 되게 첨가하여 그 영향을 검토한 결과는 Table 8과 같다. 각종 유기물의 첨가는 *Ganoderma lucidum*의 생육에는 어느 정도 기여하고 있으나 polygalacturonase 생산에는 효과가 미진하였다. 그러나 yeast extract는 0.05% 첨가하였을 때 무첨가 구에 비하여 약간의 효과는 있었다. 이는 분해성이 좋지 못한 pectin보다도 이용성이 보다 용이한 각종 유기물의 이용이 먼저 이루어 지기 때문으로 생각된다.

이상과 같이 기본배지의 각종 영양원의 종류와 농도를 개선하여 pectin 10 g, soluble starch 10 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, phenylalanine 1 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄ 0.2 g, CaCl₂ 50 mg, thiamin·HCl 100 g, D.W. 1000 ml의 영양 조건을 확립하였으며, 개선 결과 환원당 생성능을 기준으로 기본배지의 효소 생산량인 6.48 unit/ml보다 약 1.8배 증가한 11.7 unit/ml의 효소생산을 이룰 수 있었다.

摘 要

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 유용 활용 방안을 위한 최적 생산조건을 검토한 결과는 다음과 같다. Polygalacturonase 생산을 위한 최적 배양조건은 30℃, pH 5.5에서 14일

이었다. Polygalacturonase 생산을 위한 최적 영양 조건은 pectin 10 g, soluble starch 10 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, phenylalanine 1 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄ 0.2 g, CaCl₂ 50 mg, thiamin·HCl 100 µg, D.W. 1000 ml이었다.

参考文献

Arima, K., M. Yamasaki and T. Yasui. 1964. Studies on pectic enzymes of microorganisms, Part I. Isolation of microorganisms which specifically produce one of several pectic enzymes. *Agr. Biol. Chem.* **28**: 248-254.

Chang, S. T., J. A. Buswell and S. W. Chiu. 1993. Ed. "Mushroom biology and mushroom products", The Chinese University Press, Hong Kong p 267-274.

Demain, A. L. and H. J. Phaff. 1954. Hydrolysis of the oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* **210**: 381-393.

Endo, A. 1963a. Studies on pectolytic enzymes of molds. Part V. The fractionation of pectolytic enzymes of *Coniothyrium diploidiella* (II). *Agric. Biol. Chem.* **27**: 741-750.

Endo, A. 1963b. Studies on pectolytic enzymes of molds. Part VI. The fractionation of pectolytic enzymes of *Coniothyrium diploidiella* (I). *Agric. Biol. Chem.* **25**: 751-757.

Endo, A. 1965. Studies on pectolytic enzymes of molds. Part XIII. Clarification of apple juice by the joint action of purified pectolytic enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 129-136.

Endo, A. and Y. Miura. 1961. Studies on pectolytic enzymes of molds, Part I. Survey of enzyme-producing microorganisms by fruit juice clarification. *Agr. Biol. Chem.* **25**: 382-388.

Gross, K. C. and S. J. Wallner. 1979. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.* **63**: 117-120.

Hara, T., J. Y. Lim, Y. Fujio and S. Ueda. 1983. Purification and properties of endo-polygalacturonase of *Aspergillus niger* cultured in the medium containing satsuma mandarin peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **30**: 610-617.

Hara, T., J. Y. Lim, Y. Fujio and S. Ueda. 1984. Purification and some properties of exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* cultured in the medium containing satsuma mandarin peel. *Nippon Shoku-*

- hin Kogyo Gakkaishi* **31**: 581-586.
- Hobson, G. E. 1964. Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem. J.* **92**: 324-332.
- Hyun, J. W., E. C. Choi and B. K. Kim. 1990. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVII), Antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **18**: 58-69.
- Ishii, S. and T. Yokotsuka. 1972. Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1885-1893.
- Kimura, H. and S. Mizushima. 1973. An exopolygalacturonase from a strain of *Acrocyndrium*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2589-2593.
- Kimura, H. and S. Mizushima. 1974. Induction of pectinases in *Acrocyndrium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**: 33-45.
- Kraght, A. J. and M. P. Starr. 1953. Pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**: 271-274.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mill, P. J. 1966a. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*-A mercury-activated exopolygalacturoase-. *Biochem. J.* **99**: 557-561.
- Mill, P. J. 1966b. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*-A second exopolygalacturoase-. *Biochem. J.* **99**: 562-566.
- Mill, P. J. and R. Tuttobello. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 2. Endopolygalacturonase. *Biochem. J.* **79**: 57-60.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Nasuno, S. and M. P. Starr. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.* **241**: 5298-5306.
- Paynter, V. A. and J. J. Jen. 1974. Pectic enzymes in ripening peaches infected with *Monilia fructicola*. *J. Food Sci.* **39**: 1195-1197.
- Phaff, H. J. and A. L. Demain. 1956. The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* **218**: 875-884.
- Roboz, E., R. W. Barratt and E. L. Tatum. 1952. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **195**: 459.
- Sakai, T. and A. Takaoka. 1985. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 449-458.
- Sakai, T. and M. Okushima. 1978. Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2427-2429.
- Sakai, T. and M. Okushima. 1982. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 667-676.
- Sakai, T. and S. Yoshitake. 1984. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1941-1950.
- Sakai, T., M. Okushima and M. Sawada. 1982. Some properties of endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2223-2231.
- Sakai, T., M. Okushima and S. Yoshitake. 1984. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1951-1961.
- Sugiyama, J., J. D. Lee and T. Sakai. 1983. Redescription of *Galactomyces reessii* based upon and isolate producing a new protopectinase. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **24**: 53-63.
- Tuttobello, R. and P. J. Mill. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochem. J.* **79**: 51-56.
- Wang, M. C. and N. T. Keen. 1970. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**: 749-757.
- Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima. 1966a. Studies on pectic enzymes of microorganisms. Part II. Production of endo-polygalacturonase with *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 142-148.
- Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima. 1966b. Studies on pectic enzymes of microorganisms. Part III. Endopolygalacturonase of *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 1119-1128.
- 岡田茂孝, 井上雅資, 福本壽一郎. 1969. 果汁清澄酵素剤に関する研究 (第1報) 柑橘果汁清澄促進因子について. *日本農藝化学會誌* **43**: 99-104.
- 綾野雄幸, 井上憲政. 1959. *Penicillium chrysogenum* Q 176のりんご果汁清澄作用について (第4報) *Penicillium chrysogenum* Q176のもつペクチン質分解酵素の性状とりんご果汁の清澄効果について. *日本農藝化学會誌* **33**: 410-414.
- 島英治. 1985. 食品工業と酵素. 朝倉書店 p 73-81.
- 藤井義紹. 1956. 野菜軟腐病原菌によるペクチン物質の酸化的分解について (第1報). *日本農藝化学會誌* **30**:

- 363-366.
- 藤井義紹. 1956. 野菜軟腐病原菌によるペクチン物質の酸化分解について (第2報). 日本農藝化學會誌 **30**: 367-371.
- 石井茂孝, 川村敏, 横斉保. 1970. 植物組織の酵素的分解に関する研究 (第3報) *Aspergillus sojae* No. 48の生産するpectolytic enzymes. 日本農藝化學會誌 **44**: 299-305.
- 畑中千歳, 小澤潤二郎. 1968. 酵素によるペクチン酸の分解 (第6報) ペクチン質のDEAE-セルロ-スカラムクロマトグラフィ-(2). 日本農藝化學會誌 **42**: 645-650.
- 中村克哉. 1983. キノコの事典. 朝倉書店 p 450-454.
- 박영재. 1985. 영지. 표고. 느타리. 내외출판사 p 114-151.
- 유주현, 진효상, 이봉기, 오두환. 1982. *Verticillium* sp.가 생산하는 protopectin 용해효소에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 **10**: 45-52.
- 이봉기, 유주현, 양 응, 조세훈, 유 준. 1976. *Aspergillus* sp.가 생산하는 pectic enzyme에 관한 연구-제2보 endo-polygalacturonase의 정제와 물리·화학적인 성질. 한국산업미생물학회지 **4**: 63-69.
- 정만재. 1978. 식품공업에 이용되는 효소의 생산과 제 품화에 관한 연구. 한국식품과학회지 **10**: 237-244.
- 차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배 기술. 상록사 p 382-384.
- 홍재식, 강귀환. 1983. 합성배지를 이용한 고온성 느타리버섯의 자실체 형성에 관한 연구. 한국균학회지 **11**: 121-128.
- 홍재식, 최윤희, 윤세억. 1986. 합성배지에서 불로초가 생산하는 섬유소 분해효소에 관한 연구. 한국균학회지 **14**: 121-130.