

톱밥배양한 느타리버섯 군사생장시 생산되는 각종 효소변화

장현유* · 김광포 · 차동열
농업과학기술원 응용미생물과

Changes in activities of protease, phenoloxidase and cellulase during mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* in sawdust cultures

Hyun-You Chang*, Gwang-Po Kim and Dong-Yeul Cha
Division of Applied Microbiology, Agricultural Sciences
and Technology Institute, RDA Suwon, Korea

ABSTRACT: Effects of various kinds of sawdusts, supplements and culture conditions on activities of several enzymes such as protease, phenoloxidase and cellulase produced from mycelium of *P. ostreatus* grown on sawdust medium were studied and the results are as follows; Higher specific activity of these enzymes was observed when oak tree sawdust and poplar tree sawdust were supplemented with rice bran or wheat bran at rate of 30%, 20% and 10% in total volume respectively. Higher total activities of protease, phenoloxidase and cellulase were observed at 70% of the moisture contents of culture media, while lower activity of these enzymes was observed with 40% moisture contents of sawdust culture medium. The pH 4 and 9 of the sawdust media appeared to be optimum pH for the production of protease while pH 5 and 7 were optimal for the production of phenoloxidase. The pH 6 of the sawdust medium was optimal for the production of cellulase. The optimum incubating temperature for the production of protease, phenoloxidase and cellulase was 25°C. Higher total activities of protease and phenoloxidase were observed when culture medium was added with wood vinegar at the control, and 0.5% for cellulase.

KEYWORDS: Cellulase, *Pleurotus ostreatus*, phenoloxidase, protease, total activity

느타리버섯 군사를 톱밥 배지에 배양할 때 분비하는 extracellular enzyme의 종류는 여러가지이지만 그중 cellulase(1.4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase)는 섬유소를 가수분해하는 효소로 중합도에 따라 이에 작용하는 cellulase의 종류가 달라진다고 하며 Reese(1950) 등은 천연섬유소중 어느 정도 중합도를 가진 β-1.4-glucan을 분해하는 C₁-cellulase(exo-β-1.4-cellobiohydrolase)와 부분적으로 분해된 glucan이나 재생 섬유소와 같이 결정성을 잃은 섬유소에 작용하는 C_x-cellulase(endo-β-1.4-glucanase)와 최후에 glucose까지 분해하는 β-glucosidase의 3종의 효소가 연속적으로 작용한다고 보고한바 있다. 赤屈은 phenoloxidase는 동물, 식물, 미생물등에 널리 알려져있는 효소라고 하였으며 그 기질특이성에 대하여 laccase와

tyrosinase로 나누어 설명되어진다고 하였다. 原口, Haars, Selin, Wasilewska등은 laccase(E.C. 1.10.3.2.: *p*-diphenol: oxygen oxidoreductase)가 리그닌 화합물 중합에 관여한다고 하였으며 또한 Ander, Highley, Ishihara, Noguchi, Raiha등은 리그닌분해에도 관여된다 하여 주목이 집중되고 있다. 그러나 Hiroi는 laccase가 리그닌분해에 관여한다고 하는 것에 부정적인 점이 많아 laccase의 작용성에 대해서는 아직 불분명한 점이 많다고 하였다.

Tyrosinase (E.C.1.10.3.1; *o*-diphenol:oxygen oxidoreductase)는 monophenol류를 *o*-dihydro화합물에 산화해 그것을 다시 대응하는 *o*-키논류에 산화하는 2단계 반응을 촉매하는 효소이며 전자를 기질로 하여 측정하며 각각 cresolase 및 catecholase라고 부른다. Protease는 버섯류에서도 다른 일반 미생물과 마찬가지로 배양액중에 pro-

*Corresponding author

tease를 분비하여 버섯 성장에 필요한 아미노산 공급을 하기 위해 배지중에 존재하는 단백질과 peptide를 분해한다. 또 Oda는 자실체의 성장과 담자 포자의 성숙에 중요한 역할을 갖고 있다고 보고하였다. 또한 Terashita는 영양균사증의 산성 protease의 활성을 protease의 inhibitor인 S-PI로 저해하면 자실체 형성의 현저한 촉진효과가 있다고 하는 흥미있는 사실을 발표하였다. 이러한 3가지 효소에 대하여 톱밥에서 느타리버섯균사 배양중 몇 가지 처리에 의한 효소생성의 변화에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지조제, 배양

본 실험에 공시한 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에 보존중인 *P. ostreatus*(ASI 2081)를 사용하였다. 배지재료로서는 포플라나무톱밥 80%에 미강첨가 농도별 처리구를 제외하고는 미강을 20% 첨가하고 수분함량은 수분첨가 비율별 처리구를 제외하고는 65%되게 조정하였다. 배지의 pH는 pH 별 처리구를 제외하고는 6.0으로 조정하여 유리관(직경 2.5 cm, 길이 12 cm)에 톱밥배지를 넣고 1.2 Kg/cm²기압으로 40분간 살균한후 그 위에 미리 petri-dish(직경 9 cm)상의 PDA(감자배지)에 5일간 배양한 균총을 사방 1 cm길이를 잘라 접종하여 배양온도 처리구를 제외하고는 25°C에서 15일간 배양하였다. 배양기간의 균사생장 길이를 측정하고 그 균사가 분비하는 extracellular enzyme activity를 측정하였다. 또한 목초액(pH 3.2, 정제품)을 농도별로 희석한후 톱밥배지에 첨가하여 수분함량이 65%되도록 조절하여 균사생장과 효소활성을 측정하였다.

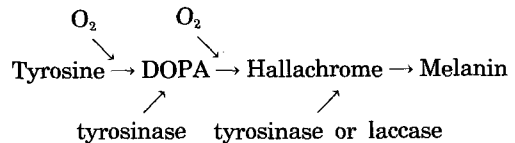
효소액의 조제

균사를 접종하여 배양이 완료된 톱밥배지를 유리관으로 부터 꺼내어 잘게 부수워 혼합한 후 그중 5 g을 채취하여 멸균수 50 ml를 가한 후 waring blender로 마쇄하고 methylbenzene (C₆H₅CH₃, 분자량 92.14)을 넣어서 10°C 냉장고에 하루밤 방치한 후 여과하고 원심분리(12,000 rpm, 15 min.)하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성도 측정

Cellulase 효소액 0.5 ml를 마개있는 시험관에 넣어 0.5 ml의 1% CM-cellulose를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨후 유리된 환원당을 Somogyi-Nelson법에 의하여 비색 정량하고 Rosenberg가 사용한 방법으로 조효소액 1 ml가 생성한 환원당을 1분간에 1 μmol의 glucose로 유리될때 1U로 계산하였다.

Phenoloxidase 기질로서 L-dihydroxyphenylalanine(DOPA)를 사용하였으며 5 mM L-DOPA를 함유한 McIlvaine buffer(pH 5.0) 1 ml에 효소액 0.5 ml를 넣어 30°C에서 15분간 incubate하여



475 nm에서 0.001흡광도의 변화를 1unit로 계산하였다. PO enzyme과 hallachrome 생산은 Lerner가 사용한 다음과 같은 반응에 준하여 측정하였다.

Protease Oda의 Casein-Folin법을 일부 변경한 방법으로 측정하였으며 기질로서 hemoglobin을 사용하였다. hemoglobin 1.2 g에 대해 0.05 M Na₂HPO₄ 160 ml로 가온 용해한후 pH 5.8로 맞추어 살균수로 200 ml되게 mess up하였다. 기질 5 ml를 30°C에 보온하여 효소액 1 ml를 넣어 30°C에서 반응시킨 후 TCA(trichloroacetic acid)로 단백질 제거에 의해 반응을 멈춰 Folin 비색법에 의해 OD₆₆₀으로 측정하여 매분당 반응 혼합물 1 ml가 1 μg의 tyrosine을 유리하는 효소량을 1U로 계산하였다.

단백질량 톱밥배지의 첨가제인 미강과 밀기울 혼합비율에 의한 처리(Table 1)는 미강과 밀기울 자체의 단백질 함유량이 효소액 활성에 미치는 영향을 배제하기 위하여 각각의 효소액에 대한 단백질을 Lowry법으로 정량하여 총활성도를 단백질량을 나누어 비활성도(specific activity)를 표시하였으며, 그의 수분함량, pH, 배양온도, 목초액의 농도에 따른 처리는 총활성도로 나타내었다.

결과 및 고찰

Table 1. Effect of sawdust and supplements on specific activity of *P. ostreatus*

Sawdust and supplements (%)	Mycelial growth (mm/15days)	Specific activity (U)		
		Protease (U/mg · protein × 10 ⁻¹)	Cellulase (U/mg · protein)	Phenoloxidase (U/mg · protein)
P+RB 10	98	4.78	0.09	0.95
P+RB 20	96	6.52	0.11	1.24
P+RB 30	92	9.95	0.18	1.69
P+WB 10	116	4.66	0.09	0.77
P+WB 20	115	6.45	0.12	0.99
P+WB 30	107	9.64	0.13	1.07
O+RB 10	103	4.62	0.11	0.76
O+RB 20	99	5.45	0.14	1.15
O+RB 30	94	9.19	0.17	1.88
O+WB 10	120	4.51	0.10	0.51
O+WB 20	117	3.23	0.10	0.51
O+WB 30	119	6.87	0.11	0.87

*P: poplar, O: oak, RB: rice bran, WB: wheat bran

톱밥종류 및 첨가제 혼합비율에 따른 효소활성

톱밥종류와 첨가제 혼합비율에 따른 protease, phenoloxidase, cellulase의 specific activity 변화를 구명하기 위하여 참나무 및 포플라톱밥에 미강과 밀기울의 혼합비율은 각각 30, 20, 10%로 조정하여 각각 효소의 비활성을 측정된 결과 미강과 밀기울 모두 혼합비율이 30, 20, 10%순으로 높았으며, 참나무와 포플라 톱밥 종류별로는 참나무톱밥에 비해 포플라톱밥의 specific activity가 약간 높은 경향이였으며, 미강과 밀기울의 첨가제 종류별로는 밀기울에 비해 미강의 경우가 약간 높은 경향을 나타내었다. 각종 효소활성은 첨가제 혼합비율이 많은 순으로 30, 20, 10%이었고 균사생장은 10, 20, 30% 혼합순으로 빨랐다(Table 1).

톱밥배지 수분함량에 따른 효소활성

수분함량에 따른 protease, phenoloxidase, cellulase의 total activity의 변화를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 이들 효소는 수분함량이 40%에서 70%까지 많을수록 균사생장과 효소활성이 모두 증가하였고 이보다 많아지면 급속히 감소하는 경향이 있었다. Hong 등은 벧짚배지에서 C₁, C_x-cellulase 및 β-glucosidase 모두가 60% 수분에서 효소활성이 제일 높다고 하였고, Hong과 Kim은 *pleurotus ostreatus*와 *Lentinus edodes*는 수분함량이 적을수록 효소생산이 감소하였고 75%에서 제일 양호하였다.

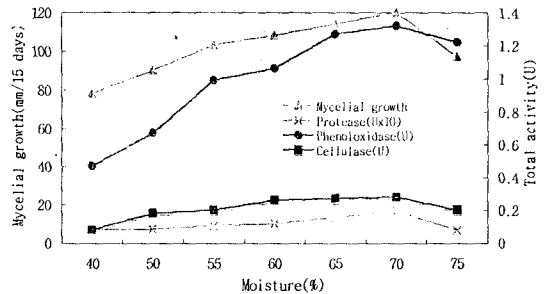


Fig. 1. Effect of moisture content to sawdust media on total activity of *P. ostreatus*.

고 하는 보고와 거의 일치하였다.

톱밥배지 pH에 따른 효소활성

pH에 따른 효소활성의 변화를 나타내기 위하여 배지의 pH를 3.0~11.0으로 조정된 다음 균사생장과 효소활성을 조사한 결과 균사생장은 pH 7에서 가장 좋았으며 protease는 pH 4와 9, cellulase는 pH 6, phenoloxidase는 pH 5와 7에서 각각 peak를 나타냈다. Hong 등은 C₁-cellulase는 pH 4.0-6.0까지는 큰 변화가 없으나 그 이후부터 상승하여 pH 7.0에서 효소생산이 제일 양호하다고 보고한것과 본 실험은 비슷한 경향이였으나, Vilela 등은 *Trichoderma viride*에서 C_x-cellulase 생산의 최적인 pH 3.0-4.0 보다는 월등히 높았으나

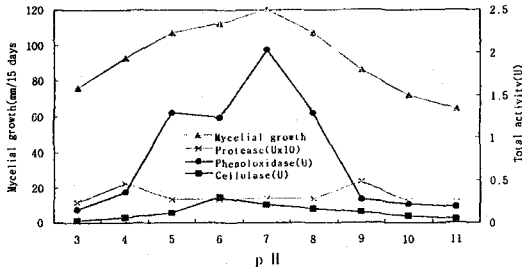


Fig. 2. Effect of initial pH to sawdust media on total activity of *P. ostreatus*.

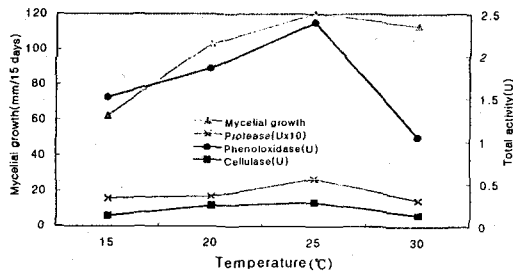


Fig. 3. Effect of cultural temperature to sawdust media on total activity of *P. ostreatus*.

Terashita T. 등은 표고 자실체에서 추출한 carboxyl protease의 최적 pH는 2.5-2.8로 본 실험에서의 pH 4와 9와는 큰 차이가 있는데 이는 배지(톱밥), 균주, 정제단계의 차이라고 생각된다. Leonard. T. J.는 *Schizophyllum commune*의 cell-free extract에서 polyphenoloxidase activity는 pH 6.5에서 peak를 나타낸다고 보고한 것과 본 실험에서의 pH 4와 7과는 약간의 차이를 나타내었다 (Fig. 2).

배양온도에 따른 효소활성

배양온도에 따른 느타리버섯 톱밥배지에서의 균사생장시 효소활성 변화를 검토하기 위하여 15~30°C에 배양한 결과 각 효소활성은 모두 25°C에서 높았으며 균사생장도 25°C에서 가장 양호하여 효소활성과 균사생장이 일치하였다.

Hong 등은 C_x-cellulase는 25°C에서 가장 양호하였다고 보고하였으며, Hong과 Kim의 벗짚배지를 이용한 *P. ostreatus* 실험에서 cellulase 생산력이 30°C에서 제일 양호하다는 보고와 약간의 차이가 있었다. 또한 Zhu H. 등은 *Hebeloma crus-*

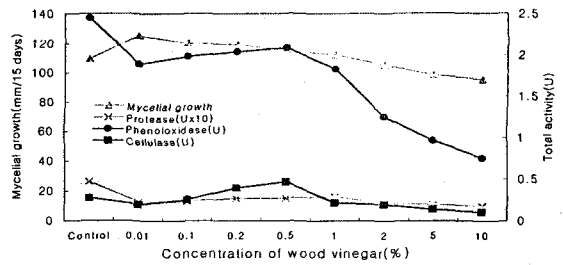


Fig. 4. Effect of wood vinegar on total activity change of *P. ostreatus*.

*tuliniforme*의 extracellular acid protease의 순수 정제품의 maximum activity의 적정온도는 50°C이었으며 이는 순수정제된 효소의 성질을 나타낸 것이며, 본 실험에서의 protease는 25°C에서 균사생장과 함께 활성이 가장 양호하였다. Tsuruta T. 등은 tyrosinase type의 phenoloxidase를 생산하는 *P. ostreatus*를 catechol을 기질로 검색한 결과 30°C에서 가장 높다고 보고한 것과 비슷한 경향이 있었다(Fig. 3).

목초액 첨가에 따른 효소활성

간이정제된 목초액을 무처리, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10% 농도로 조절하여 톱밥배지에 첨가 후 균사생장시 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과 목초액을 처리하므로서 무처리에 비해 protease와 phenoloxidase는 낮아지는 경향이 있었으며 cellulase는 목초액 0.5%농도 처리시 높아졌다. 균사생장은 0.1%에서 가장 양호하였으며 무처리에 비해 목초액 첨가구에서 비교적 균사생장이 양호하였다. Terashita T.는 영양균사 중 산성 protease의 활성을 SP-I(Streptomyces-Pepsin Inhibitor)로 저해하면 균사생장과 자실체 형성을 현저히 촉진한다는 보고와 비슷하게 본 실험에서 목초액을 톱밥배지에 처리하면 비교적 균사생장을 촉진하면서 protease와 phenoloxidase의 활성을 저해하는 역할을하여 금후 protease와 phenoloxidase의 inhibitor 역할에 대한 기작은 검토해야 할 과제이다(Fig. 4).

적 요

느타리버섯 균사를 톱밥에 배양할 때 분비되는

여러 가지 extracellular enzyme 중 protease, phenoloxidase, cellulase가 배양조건을 달리하였을 때 변화양상을 요약하면 먼저 톱밥의 종류에 따라서는 참나무톱밥에 비해 포플라톱밥이 specific activity가 높은 경향이였다. 첨가제 종류에 따라서는 밀기울에 비해 미강이 약간 높았으며 혼합비율이 30, 20, 10%순으로 높았다. 수분함량은 3가지 효소 모두 70%에서, 배지의 pH에 따라서 protease는 pH 4와 9, cellulase는 pH 6, phenoloxidase는 pH 5와 7, 배양온도는 3가지 효소 모두 25°C, 목초액 농도에따른 protease와 phenoloxidase는 무처리보다 처리보다 총활성이 높았으며, cellulase는 0.5%에서 총활성이 가장 높았다.

참고문헌

- Haars, A., Huttermann. A. 1980. Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**: 233-237.
- Ander, P., Eriksson K. E. 1976. The importance of phenoloxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **109**: 1-8.
- Highley, T. L., Kirk T. K. 1979. Mechanisms of wood decay and the unique features of heartrots. *Phytopathology.* **69**: 1151-1157.
- Hiroi, T., Eriksson K. E. 1976. Microbiol. degradation of lignin part I. sven. *Papperstidn.* **5**: 157-161.
- Hong, J. S. and Kim, D. H. 1981. Studies on enzymes produced by Basidiomycetes, Part I. The production crude enzymes. *J. Kor. Agri. Sci.* **24**: 7-14.
- Hong J. S., Uhm T. B., Jung G. T., Lee K. B. 1984. Studies on the enzymes produced by *pleurotus sajor-caju* (I), *Kor. J. Mycol.* **12**(2): 59-64.
- Ishihara T., Miyazaki M. 1974. Demethylation of lignin and lignin models by fungal laccase. *J. Jap. wood Res. Soc.* **20**: 39-41.
- Kaplan, D. H. 1979. Reactivity of different oxidases with lignins and lignin compounds. *Phytochem.* **18**: 1917-1919.
- Lerner. A. B., and Fitzpatrick T.B. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 90-126.
- Leonard T. J., 1971. Phenoloxidase activity and fruiting body formation in *Shizophyllum commune*. *J. of Bacteriology*, **106**(1): 162-167.
- 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.
- Noguchi, A., M. Shimada., T. Higuchi. 1980. Studies on lignin biodegradation impossible role of non-specific oxidation of lignin by laccase. *Holzforsch.* **34**: 86-89.
- Oda, K., Murao, S. 1974. Purification and some enzymatical properties of acid protease A and B. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 2435.
- Raiha, M. Sundmann V. 1975. Characterization of lignosulfonate-induced phenoloxidase activity in the atypical white rot-fungus *polyporus dichrous*. *Arch. Microbiol.* **40**: 1003-1006.
- Reese, E.T., Siu, R.G.H., and Levinson, H.S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulase hydrolysis. *J. bacteriol.* **59**: 485-497.
- Rosenberg, S .L., 1980. Patterns of diffusibility of lignin and carbohydrate-degrading systems in wood-rotting fungi. *Microbiol.* **72**: 798-812.
- Selin, J. F., Sundmann V., Raiha M. 1975. Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch. Microbiol.* **103**: 63-70.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **19**: 195.
- Tsuruta T., Kawai M. 1983. Catecol-oxidizing activities of basidiomycetes fungi. *Trans. mycol. sci. Japan* **24**: 65-77.
- Terashita T., Kono M. 1987. Purification and some properties of carboxyl proteinases from *Tricholoma matsutake*. *Trans. mycol. sci. Japan* **28**: 245-256

- Terashita T., Oda K., Kono M., Murao S. 1985. Purification and some properties of metal proteinases from *Lentinus edodes*. *Agric. Biol. Chem.* **49**(8): 2293-2300.
- Vilela, L. C., Torillo, A. R., de Ocampo, A. T. Rosario, E. T. 1977. Cellulase production in semisolid cultures of *Trichoderma viride*. *Agri. Biol. chem.* **41**: 235-238.
- Wasilewska, M. W., Trojanowski J. 1975. Studies on the decomposition of lignosulfonates by the fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes pubescens*. *Acta. Microb. polonica ser. 7*: 77-90.
- Zhu H., Guo D. C., Dancik B. P. 1990. Purification and characterization of an extracellular acid proteinase from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(4): 837-843.
- 赤屈四郎(監修). 1966. 酵素ハンドブック. 朝倉書店. 東京. 157p.
- 原口隆英. 1976. リグニンを食う微生物. 化学と生物. **14**: 626-623.