

*Pleurotus ostreatus*가 生産하는 酵素에 관한 研究

— IV. Xylanase의 性質 —

洪 載 植
(全北大學校 農科大學 農化學科)

Studies on the Enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*

— IV Properties of Xylanase —

HONG, Jai Sik

(Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Jeon-Bug National University)

ABSTRACT

Some properties of xylanase produced by *Pleurotus ostreatus* during its growth in a rice straw medium were investigated.

The results are summarized as follows:

- 1) The optimum pH of xylanase was 5.0 and the stable pH ranged from 4.5 to 6.0.
- 2) The optimum temperature for the xylanase was around 50°C and the xylanase activity was completely lost in 10 minutes at 70°C.
- 3) The activity of xylanase was inhibited by manganous ion, but was increased by other metallic ions. Especially K, Mg and Ca ions considerably increased the activity.

緒 論

중래의 擔子菌에 대한 研究는 食用茸의 栽培研究(Allison 및 Kneebone, 1962; 정 등, 1973; 김 및 조, 1972; 고, 1974; 李, 1960; 南宮, 1974; O'Donoghue, 1967; 신尹 등, 1969). 菌體制用을 위한 深部培養에 관한 研究(Block 등, 1956; Humfeld 및 Sugihara, 1952; Jennison, 1956; Szuacs, 1956; 吉田 등, 1955; 吉田 및 寺本, 1966), 子實體의 成分分析에 대한 研究(岩出, 1934; 三浦 등, 1935) 등이 대부분이었으나 근래에 와서는 擔子菌類에 의하여 生産되는 cellulase(番野 등, 1964; 洪 및 南宮, 1975; 南宮 등, 1968; 奈良 등, 1964, 1965), protease(番野 등, 1964; 洪 및 南宮, 1975; 川合,

1973; 南宮 등, 1968)에 대한 研究外에 xylanase에 대한 研究도 報告되고 있다.

高橋와 橋本(1963) 및 高橋(1963)는 自然界에서 分離한 *Bacillus subtilis* G-2 를 xylanase分泌菌으로 檢索하여 基礎적인 培養條件과 酵素化學的 性質을 檢討한 바 있고 川合(1973)는 擔子菌에 있어서 amylase, cellulase 및 xylanase 生産性的 分布를 調査한 바 있으며 竹西 및 辻阪는 *penicillium janthine'um* Biourage가 生産하는 xylanase 精製와 그의 性質에 대하여 報告한 바 있다 또한 Toda 등(1976)은 *Trichoderma*가 分泌한 工業用 cellulase가 CMC外에 xylan을 分解한다고 報告하였고 禹 및 李(1972)는 *Aspergillus niger*에서 生産한 粗酵素의 加水分解率은 63%라 하였으며 李 및 李(1975)

는 *Aspergillus niger*에 의한 xylanase의 생산과 효소의 특성에 대하여 보고한바 있다.

著者は xylanase의 活性이 높은 것을 特色으로 한 것이 아니고 다만 느타리버섯 栽培에 있어서 芻糞을 加水分解하는 一連의 酵素群을 對象으로 하였기 때문에 培養條件을 느타리버섯栽培條件과 類似하게 하여 *Pleurotus ostreatus*를 芻糞培地에 培養하여 培養중에 分泌한 cellulase와 protease의 實驗에 이어 xylanase의 酵素學的인 諸性質을 檢討하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

Pleurotus ostreatus

2. xylan의 調製

右田등(1968)의 方法에 準하여 調製하였다. 즉 적당한 크기로 자른 芻糞에 2% NH_4OH 液을 가하여 一定時間 浸漬한후 冷水洗하고 5% NaOH 液에 다시 浸漬한 다음 抽出液을 濾過, 濾液에 同量의 95% alcohol을 가하여 xylan을 沈澱시키고 이 沈澱을 2% NaOH 液으로 溶解하여 alcohol로 再沈澱을 數回행한다. 그다음 2% NaOH 液으로 溶解시킨 xylan溶液에 過剩의 Fehling液을 가하여 xylan을 銅의 結合物로 沈澱시키고 그 沈澱을 稀釋한 Fehling液으로 洗滌, 濾過後 稀鹽酸으로 洗滌을 溶解시킨 다음 alcohol로서 xylan을 다시 沈澱시킨다. 이 xylan을 alcohol로 洗滌하여 酸과 銅을 除去한 후 乾燥하여 粉末狀의 xylan을 얻어 基質로 하였다.

3. 培養과 酵素液의 調製

芻糞을 약 2.0cm 크기로 잘라 一定時間 水浸后 濾過하여 米糠 10%를 加한 다음 水分量을 70%로 다시 調整하였다. 그리고 이를 500ml容 廣口培養瓶에 210g씩 넣고 1.2 kg/cm^2 壓力에서 60分間 殺菌한 다음 上記 菌株을 接種하여 24°C에서 20日間 培養하였다.

이에 5%의 蒸溜水를 加하여 waring

blendor로 3分間 磨碎하고 여기에 toluene을 加하여 冷蔵庫에 하루밤 放置한후 遠心分離(3000r.p.m/20min)하고 上澄液에 0.8飽和度로 되게 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液을 加하여 生成된 沈澱을 少量의 蒸溜水로 溶解하여 Sephadex G-25 column을 通하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 除去하고 이 溶液을 粗酵素液으로 하였다.

4. xylanase 測定方法

川合(1973)와 日下등(1969)의 方法에 準했다. 즉 xylan(最終濃도가 0.5%되도록 製造) 50mg과 McIlvaine緩衝液(pH5.0) 4ml을 L字管에 취하고 증류수 5ml을 加하여 50°C에서 豫熱한 다음 酵素液을 1ml을 가하여 恒溫振盪水槽에서 30分間 振盪反應後 反應液 10ml에 生成된 還元糖을 Somogyi-Nelson法으로 定量하여 生成된 還元糖을 xylanase活性의 比較單位로 나타내었다.

結果 및 考察

1. 作用 pH와 活性

pH3.0~9.0사이의 各 pH에서 酵素를 反應시켜 xylanase의 活性을 調査한 結果는 Fig.1과 같다.

Fig.1과 같이 pH5.0에서 最高의 活性을 보여 最適 pH가 微酸性쪽에 있었다.

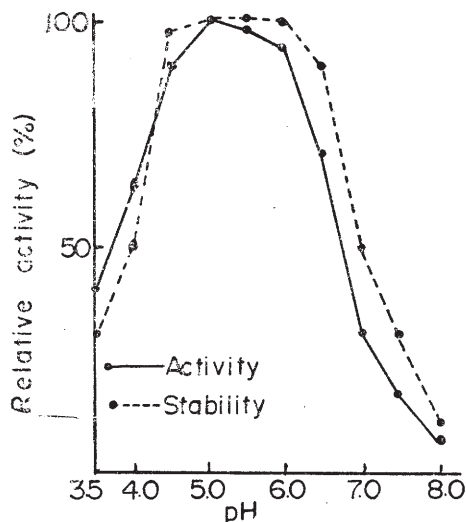


Fig. 1. Effect of pH on the activity and stability of xylanase

pH4.0이하와 pH6.0이상에서는 이들 효소의 활성이 점차 떨어져 pH3.5이하, pH7.0이상에서는 효소활성이 더욱 弱化되었다. *Bacillus subtilis* G-2가 생산하는 xylanase의最適 pH는 6.0~6.2이었고(高橋 및 橋本, 1963) *penicillium janthinellum* Biourage의 麴抽出液으로부터分離한 xylanase I, II, 및 III의 pH는 각각 pH5.3, pH4.7, pH4.7附近이었으며(竹西 및 辻阪 1973) *Trichoderma viride* cellulase製品에 含有된 xylanase는 pH5.5~6.0이었다(Toda 등, 1971). 또 *Aspergillus niger*의 xylanase는 pH 4.0(禹 및 李, 1972), *Aspergillus niger* 1701, 430 두菌株의最適 pH는 3.0(李 및 李, 1975), *Streptomyces*屬 xylanase는 pH4.5~7.0의範圍에 있었다(日下 등, 1969). 그리고 diastase중에 存在하는 xylanase의最適 pH는 緩衝液의種類에 따라 相異하여 Walpole緩衝液 사용시는 pH5.0, McIlvaine緩衝液의 경우는 pH4.9이었는데(高橋, 1952) 이는 본 효소와 비슷하였다.

2. pH와 安定性

酵素液을 각 pH의 緩液衡과 混和하여 所定の pH로 한 다음 30°C에서 120分間 放置한 후 다시 緩液衡으로 pH를 再調整하여 殘存한 효소活性을 測定한 結果는 Fig.1에서 보는 바와 같이 pH4.5~6.0의範圍에서 비교적 安定했으나 pH4.0이하와 pH7.0이상으로 옮김으로서 失活이 急速해 졌다.

*Streptomyces*屬의 xylanase는 菌株에 따라 다소 差異가 있으나 5.0~7.5의 pH範圍에서 安定하나 pH4.0이하 또는 pH8.0이상에서는 失活이 심하다고 하였고(日下 등, 1969) *Bacillus subtilis* G-2의 것은 pH安定範圍가 pH5.0~7.0(高橋 및 橋本, 1963), *penicillium janthinellum* Biourage에서分離한 xylanase I, II, III의 것은 pH5.0~8.0, pH4.0~9.0, pH5.0~9.0이라 하였다(竹西 및 辻阪, 1973).

本實驗에 있어서는 pH安定範圍가 이들 효소에 비하면 다소 좁은것 같다.

3. 作用温度와 活性

30~70°C의 各温度에서 효소를 反應시켜 xylanase 活性을 測定한 結果는 Fig.2와 같다.

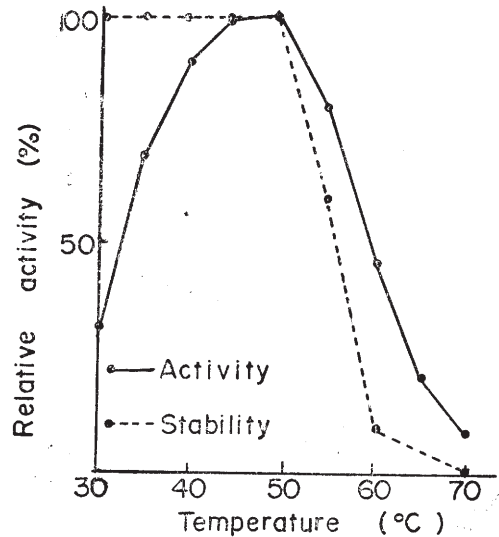


Fig. 2. Effect of temperature on the activity and stability of xylanase

Fig.2와 같이最適温度는 50°C附近이었다. *Bacillus subtilis* G-2의 xylanase最適温度는 37~40°C이었고(高橋 및 橋本, 1963) diastase中の 것은 37°C에서 最高力價를 나타낸다고 하였는데(高橋, 1952) 本實驗에서는 이들 효소의最適温度보다 다소 높은 편이며 *Aspergillus niger* 1701, 430의 것은 60°C(李 및 李, 1975). *Streptomyces*屬의 것은 55~60°C라 하였는데(日下 등 1969) 이들 효소보다는 다소 낮았다.

4. 熱安定性

酵素液을 30~70°C의 各温度에서 10分間 加熱處理한 후 急冷하여 殘存한 효소의 活性을 測定한 結果는 Fig.2와 같이 50°C이하에서는 安定했으나 그 이상의 温度에서는 점진적으로 不安定하여 70°C에서는 완전히 失活되었다.

*Streptomyces*屬 효소는 40°C, 30分間 熱處理時는 安定하나, 70°C에서 30分處理의 경

우는 90% 이상이失活된다고 하였으며(日下 등, 1969) *Bacillus subtilis* G-2의 것은 45°C에서 5分間加熱할때는安定했으나 70°C에서는 완전히失活된다고 한것과는類似하였다(高橋 및 橋本, 1963).

5. 酵素作用에 미치는 鹽類의 影響

酵素反應에 各鹽類를 M/15 또는 M/30되게 가하여 xylanase의 活性을 檢討한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of salts on xylanase activity

Salts	Conc. in the reaction mixture of salts, M	Relative activity
None		100.0
Na ₂ SO ₄	1/30	112.5
NaCl	1/15	112.5
Na ₂ HPO ₄	1/30	112.5
KCl	1/15	130.1
CaCl ₂	1/30	130.0
MgSO ₄	1/30	126.4
Ca-acetate	1/30	112.5
MnSO ₄	1/30	90.0

윗 표에서 밝힌바와 같이 Mn⁺⁺에 대해서는 다소 阻害되었으나 그밖의 鹽類는 일반적으로 增加되는 편이며 특히 K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺에 의해서 酵素力의 增加가 良好하였다. *Bacillus subtilis* G-2의 xylanase는 Mn⁺⁺에 影響을 받지 않았으나 Mg⁺⁺, Ca⁺⁺

및 Cl⁻ 의해서 酵素力이 增大된다고 하였는데 이와는 類似點이 많았다(高橋 및 橋本 1963).

6. 酵素에 의한 xylan의 分解

xylan溶液을 最適 pH로 調整하고 酵素液을 가하여 50°C에서 反應시켜 經時的으로 xylan分解를 測定한 結果는 Fig. 3과 같다.

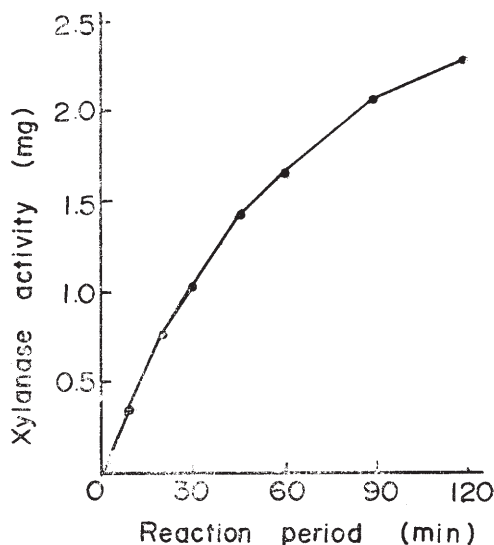


Fig. 3. Time course of xylanase activity

Fig. 3과 같이 xylan 分解는 反應初期에 急速히 進展하여 反應時間 30分까지는 거의 直線的인 관계가 나타났으나 그 이후부터는 이와같은 관계가 성립되지 않았다.

摘 要

*Pleurotus ostreatus*를 穢糞培地에 培養하여 培養中에 生成된 xylanase의 性質을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. xylanase의 最適 pH는 5.0이며 pH安定範圍는 4.5~6.0이었다.
2. 最適溫度는 50°C附近이고 熱安定性은 50°C이하이며 70°C, 10分에 완전히 失活되었다.
3. 鹽類의 影響은 Mn⁺⁺에 阻害되었으나 그 밖의 鹽類에서는 酵素力이 增加되었으며 특히 K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺에 의해서는 상당히 增加되었다.

引 用 文 獻

1. Allison, W.H.. and L.R. Kneebone, 1962. pH on mushroom production. *Mushroom Sci.*, 5, 81-90.

2. Block, S. S., T. W. Stearns, R. L. Stephens, and R.F.J. McCandless, 1956. Mushroom mycelium experiments with submerged cultures. *Mushroom Sci.*, **3**, 261—268.
3. 정환재, 김영배, 박용환, 1973. 느타리버섯 재배에 관한 실험, 시험연구보고서(농업기술연구원) 양송이편, 211—238. 4.
4. 番野剛, 奈良潔, 吉野弘, 1964. ひいろたけ酵素の生産と應用, 第1報 粗酵素中の各種酵素活性と飼料消化性, 日醸工誌, **42**, 405—409.
5. 洪載植, 南宮 熙, 1975. *pleurotus ostreatus* 가生産하는 효소에 관한 연구, I, 粗 cellulase의性質, 全北大學校 農大論文集, **VI**, 101—105.
6. 洪載植, 南宮 熙, 1975. *pleurotus ostreatus* 가生産하는 효소에 관한 연구, II. 中性 protease의性質, 全北大學校 農大論文集, **VI**, 107—110.
7. Humfeld, H. and F. Sugihara, 1952. The nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. *Mycologia*, **44**, 605—620.
8. 岩出玄之助, 1934. 菌蕈類の特殊成分に關する研究(第一報), 日林誌, **16**, 757—760.
9. Jennison, M. W., 1956. Cultivation of mushroom mycelium in submerged culture. *Mushroom Sci.*, **3**, 268—269.
10. 川合正允, 1973. 擔子菌類におけるプロテアーゼの生産性およびえの凝乳活性の分布, 日農化誌, **47**, 467—472.
11. 川合正允, 1973. 擔子菌におけるアシウーゼ, 세리우제およびキシ나제生産性の分布, 日農化誌, **47**, 529—534.
12. 김광포, 조왕수, 1972. 양송이 재배법 개선에 관한 시험, 시험연구보고서(식물환경연구소), 제2권, 269.
13. 고승구, 1974. 벗질을 이용한 느타리버섯 재배시험, 농사시험연구사업평가서(농업기술연구소), 군이분과, 246—270.
14. 日下部功, 安井恒男, 小林達吉, 1969. *Streptomyces*屬の xylanase系に關する研究(第1報), 菌體外放線菌 xylanaseの諸性質について, 日農化誌, **43**, 145—153.
15. 李泰秀, 1960. 미루나무버섯의 人工栽培과 菌絲發育에 대한 實驗的考察, 忠北大學論文集, **1**, 10—16.
16. 李啓瑚, 李炯周, 1978. 農産廢棄物에서 醱酵料의 生産에 關한 研究(第一報), *Aspergillus niger*에 의한 xylanase의 生産 및 酵素特性에 關하여 韓農化誌, **18**, 109—116.
17. 三浦伊八郎, 岩出玄之助, 澤園滿喜, 1935. 菌蕈類の化學的組成分及生理的關係に就ての研究(第1報), 日林誌, **17** (11), 899—913.
18. 南宮 熙, 梁熙天, 金鋪揮, 洪載植, 1968. 양송이 穀粒種菌의 貯藏에 관한 研究, 科學技術處, 68—91.
19. 南宮 熙, 1974. 벗질을 利用한 느타리버섯 栽培에 관한 研究, 全北大學校 農大論文集, **5**, 53—57.
20. 奈良潔, 番野剛, 吉野弘, 1964. ひいろたけ酵素の生産と應用, 第2報 세리우 제系의分離精製(えの 1), 日醸工誌, **42**, 410—414.
21. 奈良潔, 番野剛, 吉野弘, 1965. ひいろたけ酵素の生産と應用, 第5報 셀룰라제系의分離精製(その 2), 日醸工誌, **43**, 653—660.
22. O'Donoghue, B.C., 1967. Relationship between some compost factors and their effects on the yield of *Agaricus*, *Mushroom Sci.*, **6** 245—254.
23. 신관철, 김광포, 김동수, 김영섭, 1971. 발효촉진재료가 양송이 수량에 미치는 영향, 농사시험연구보고 14(식물환경연구소), 133—141.
24. Szuecs, J., 1956. Submerged culture, *Mushroom Sci.*, **3**, 269—272.
25. 高橋光雄, 1952. 키라우나제의至適 及び至適溫度について, 奈良學藝大, **1**, 279—281.
26. 高橋光雄, 橋本揚之助, 1963. 細菌키라우나제에關する研究(I), 키라우나제分泌菌의檢索, 日醸工誌, **41**, 116—119.
27. 高橋光雄, 1963. 細菌키라우나제에關する研究(II), 細菌키라우나제生産のための基礎的培養條件について(I), 日醸工誌, **41**, 119—121.
28. 高橋光雄, 橋本揚之助, 1963. 細菌키라우나제에關する細菌키라우나제의結晶化および若干の酵素化學的性質, 日醸工誌, **41**, 181—186.
29. 竹西繁行, 辻阪好夫, 1973. *penicillium janthinellum* Biourage의 xylanase의 精製とその性質, 日醸工誌, **51**, 458—468.
30. Toda, S., H. Suzuki, and K. Nisizawa, 1970. Isolation of cellulase components with

- xylanase activity from *Trichoderma viride*, *J. Ferment, Technol.*, **48**, 580—586.
31. Toda, S., H. Suzuki, and K. Nisizawa, 1971. Some enzymic properties and the substrate specificities of *Trichoderma* cellulases with special reference to their activity toward xylan, *J. Ferment, Technol.*, **49**, 499—521.
32. 右田伸彦, 米澤保正, 近藤民雄, 1968. 木材化学(上巻), 共立出版, p.260—265.
33. 禹昌命, 李瑞來, 1972. 農産廢棄物の成分分析 및 酵素分解에 관한 研究, 韓食科誌, **4**, 300—308.
34. 吉田敏臣, 田口久治, 寺本四郎, 1965. *Basidiomycetes*の深部培養に關する研究, 第1報 椎茸菌(*Lentinus edodes*)の増殖に影響する 2,3の要因について, 日醸工誌, **43**, 325—334.
35. 吉田敏臣, 寺本四郎, 1966. きのご類の深部培養とその利用(その 1), 深部培養に關する諸え特に酸素代謝問題, 日醸協誌, **24**, 1—12.
36. 尹貞求, 1969. 평나무버섯의 人工培地培養에 관한 研究, 忠北大學論文集, **3**, 161—171.