

최 종
연구보고서

버섯유래 복합효소를 이용한 미강으로부터의
생리활성물질 생산기술 및 가공제품 개발

Development of arabinoxylan production
technology and manufactured goods
with rice bran using carbohydrases complex
derived from mushroom

주관연구기관 : 강원대학교

협동연구기관 : 서강대학교

협동연구기관 : 고려대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯유래 복합효소를 이용한 미강으로 부터의 생리활성물질 생산기술 및 가공제품 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003. 12. 10.

주관연구기관명 : 강원대학교
총괄연구책임자 : 홍 역 기
연 구 원 : 박 점 석
협동연구기관명 : 서강대학교
협동연구책임자 : 최 정 우
협동연구기관명 : 고려대학교
협동연구책임자 : 지 영 민

요 약 문

I. 제 목

버섯유래 복합효소를 이용한 미강으로부터의 생리활성물질 생산기술 및 가공제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 균사체 배양을 통한 생리활성물질 생산공정 및 가공기술 개발

아라비녹실란은 면역계에서 매우 중요한 역할을 하는 NK(natural killer)세포를 활성화시켜 암치료에 있어서 화학요법 및 호르몬 요법에 대한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있으며 AIDS 치료에 있어서 잠재적 가치가 있다고 보고되고 있다. 자일로즈(xylose)를 주쇄로하여 측쇄에 아라비노즈(arabinose)를 갖는 아라비녹실란은 면역부진에 기인한 질병환자가 증가하는 요즈음 면역력을 강화시키는 물질로서 새로운 식물소재의 가치가 대단히 크다. 따라서 일본 및 미국을 비롯한 여러 선진국에서 항암 및 면역강화 등 인체에 탁월한 효능을 지닌 아라비녹실란을 제품화하고자 분리정제기술을 개발하고 있다. 그러나 국내에서는 아라비녹실란의 분리정제기술 및 생산기술 개발에 대한 연구가 거의 전무한 실정으로 이에 대한 연구개발이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 표고버섯 (*Lentius edodes*) 균사체 액체배양공정을 개발하므로써 복합효소를 생산하여 미강중의 헤미셀룰로스를 효소처리하여 아라비녹실란을 생산하는 공정기술을 개발하고자 하였고, crude한 아라비녹실란을 분말화하여 여러 가지 기능성 가공제품에 응용하고자 하였다.

나. 생리활성물질 분리정제공정 개발

쌀겨, 보리, 밀 등과 같은 벼과식물의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로오스의 주성분이고 분자량이 3 000~5000 dalton정도인 물질인 아라비녹실란은 항암, 혈당 및 혈압강하, 인체면역체계의 강화, 소화기능을 증진에 탁월한 효능을 보이는 관계로 많은 관심을 불러일으키고 있으나, 국내에서는 아라비녹실란의 효능 검증 및 분리·정제공정 개발에 대한 연구가 거의 전무한 상태로 연구가 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 항암, 인체면역기능 향상에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질인 아라비녹실란을 벼과식물 중 면역조정물질로 특히 주목이 되는 쌀겨에서 추출하고, 기존의 분리·정제기술에 있어서의 문제점을 극복하기 위한 새로운 분리·정제공정 기술을 개발하고자 하였다.

다. 가수분해 복합효소 활성평가

본연구의 대상물질인 *Lentinus edodes*로부터 생산된 endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 정제와 xylan을 효과적으로 가수분해하기 위한 두 효소의 각각의 활성의 특징과 두 효소 간의 synergistic effect에 대하여 연구하였다. 해당 두 효소의 다양한 특질을 바탕으로 정제과정을 수행하였으며, Sephadex G-75 컬럼을 이용한 겔 크로마토그래피의 단계에서 endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 활성 분획이 분리 정제 되었으며 이들은 각각의 효소의 분자량을 측정하고 연속된 실험에 쓰였다. Endo-1,4-xylanase의 반응 최적온도는 40°C이며 α -glucuronidase는 50°C였다. Endo-1,4-xylanase의 경우 45°C 이상의 온도가 오를 경우 효소 안정성이 급격히 감소하는 현상을 보였다. Endo-1,4-xylanase와 α -glucuronidase의 optimal pH는 각각 4.0과 6.0으로 나타났다. endo-1,4-xylanase의 pH에 대한 안정성은 pH 3.0 ~ 6.0 범위에서 40°C, 60분간 동일하게 안정함을 보였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 균사체 배양을 통한 생리활성물질 생산공정 및 가공기술 개발

본 연구에서는 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 액체배양에서 균사체 성장을 위한 최적 조건으로 온도, pH, 교반속도, 배지액량에 대해 검토하였고, 최적 배지 조성으로는 탄소원, 질소원, 무기염류에 대해 검토하였다. 또한 탄수화물 복합가수분해효소의 생산을 위한 최적배지조성을 확립하였다. 생물반응기를 이용한 응용 회분식 배양에서는 기본배지외 탄소원으로 glucose를 첨가해 줌으로써 탄수화물 복합가수분해효소의 생산성을 향상시켰다. 여기에 미강으로부터 추출된 헤미셀룰로스를 반응시켜 최종 아라비녹실란을 생산하였고, 아라비녹실란을 기능성 제품으로 개발하기 위하여 분말화를 통한 가공기술을 개발하였다.

나. 생리활성물질 분리정제공정 개발

미강으로부터 헤미셀룰로스를 추출하기 위해 유기용매와 pH 조절을 하여 리그닌과 셀룰로스가 제거된 헤미셀룰로스 A와 B를 얻었다. 이렇게 추출된 헤미셀룰로스와 아라비녹실란의 구조적 특성을 검토기 위하여 ¹³C-NMR 스펙트럼과 FT-IR 스펙트럼을 사용하였고, HPLC를 사용하여 헤미셀룰로스와 아라비녹실란의 구성당을 검토하였다. 또한 헤미셀룰로스와 아라비녹실란의 주쇄결합을 확인하기 위하여 Fungi-Fluor Kit을 사용해 형광으로써 주쇄 결합이 α 인지 β 인지를 확인하였다. 헤미셀룰로스 B와 표고버섯 배양여액의 반응시간(3시간, 6시간, 12시간, 24시간)에 따른 crude한 아라비녹실란의 구성당 변화를 검토하였다.

다. 가수분해 복합효소 활성평가

Endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 상호작용의 효과는 xylan과 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 하였을 때 연구 되었으며, 이 두 효소의 기질 종류에 따른 활성에 의한 xylooligomer와 4-*O*-methylglucuronic acid의 정량은 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 쓰였을 때가 xylan을 기질로 썼을 때 보다 2배 정도 값이 커짐을 보였다. Endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 혼합액을 이용하여 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan을 가수분해한 경우 α -glucuronidase에 의해 생산되는 4-*O*-methylglucuronic acid의 양은 α -glucuronidase을 독립적으로 처리 할 때 보다 24배 증가를 보였고, 반면 endo-1,4-xylanase를 처리할 경우 생산되는 xylooligomers의 양은 endo-1,4-xylanase를 개별적으로 처리할 때보다 3배만이 증가 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

가. 균사체 배양을 통한 생리활성물질 생산공정 및 가공기술 개발

탄수화물 가수분해효소의 생산을 위해 먼저 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 액체배양에서 균체 성장을 위한 최적 조건은 배양온도 24 °C, 교반속도 200rpm, 접종량 10 %, working volume 100 mL, 초기 pH 5.5에서 효과적이었다. 최적 배지조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 20g/L이었다. 최대 균체량은 배양 8.5일째 약 18 g/L의 결과를 나타내었다. 플라스크 배양에서 가수분해효소 생산을 위한 최적배지조성을 검토한 결과 배지조성은 cellulose 1 %(w/v), yeast extract 1 % (w/v), CaCl₂ · 2H₂O 0.1 %(w/v)이었다. 이때 배양 10일째 β -glucosidase 43.5 U/mL, β -glucuronidase 0.33 U/mL, 그리고 β -galactosidase 0.8 U/mL의 효소활성을 나타내었다. 생물 반응기를 이용한 응용 회분배양에서는 최적배지조성으로 배양중 4일, 5일째 glucose (5 g/L) 100mL을 pulse feeding한 결과 기본 회분배양

에서와 비교했을 때 균체량을 살펴보면 약 2.5 g/L정도의 증가된 결과를 나타내었고, 가수분해효소 활성의 경우 β -glucosidase는 약 5 U/mL, β -glucuronidase는 약 0.1 U/mL, β -galactosidase는 약 0.2 U/mL정도 증가된 결과를 나타내었다. 여기에 미강으로부터 추출된 헤미셀룰로스를 반응시켜 crude한 아라비녹실란을 생산하였다. 이 아라비녹실란을 분말화하여 capsule이나 Tea-bag등으로 가공하면 기능성제품 및 건강보조식품 소재으로 활용이 가능하다고 판단되어졌다.

나. 생리활성물질 분리정제공정 개발

미강으로부터 헤미셀룰로즈 B의 추출과정에서 반응온도를 65°C에서, 에탄올 volume을 3배로 하였을 때 헤미셀룰로즈 B의 수율이 38.5 %로 최대를 나타내었다. 이로써 헤미셀룰로즈 B의 추출과정에서의 최적조건을 확립하였다.

^{13}C -NMR 스펙트럼, FT-IR 스펙트럼을 통해 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 구조적인 특성을 검토하였다. 그리고 HPLC를 이용해 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 구성당의 조성비를 검토한 결과 헤미셀룰로즈 B는 xylose 15.4 %, arabinose 13.9 %, glucose 67.2 %, galactose 3.5 %였고, ara/xyl ratio는 0.9이었다. 이 헤미셀룰로즈 B를 효소처리하여 얻은 아라비녹실란의 구성당 조성비는 xylose 63.5 %, arabinose 11.1 %, glucose 18.9 %, galactose 2.7 % glucuronic acid 3.8 %였고 ara/xyl ratio는 0.17의 결과를 나타내었다. 또한, 헤미셀룰로즈 B와 표고버섯 배양여액의 반응시간에 따른 아라비녹실란 구성당 조성비를 검토한 결과 반응시간이 지나감에 따라 glucose가 분해되어 glucose의 조성비는 크게 감소하는 경향을 나타내었고, 반면에 상대적으로 자일로즈와 아라비노즈의 조성비는 증가하는 경향을 나타내었다. 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 주쇄 결합형태를 확인하기 위하여 Fungi-Flour Kit을 사용하여 형광을 측정하였다. 예상대로 아라비녹실란에서는 β -결합이 아주 적기 때문에 희미한 형광을 나타내어 주된 결합형태가 α -결합임을 확인 할 수 있었고, 헤미셀룰로즈 B에서는 아라비녹실란에 비해 β -결합이 더 많이 존재함을 알 수 있었다.

다. 가수분해 복합효소 활성평가

두 효소의 상호작용의 결과는 α -glucuronidase 활성의 정도에 대한 4-*O*-methyl glucuronic acid의 정량적 비교를 통해 알 수 있었다. 이를 통해 α -glucuronidase는 endo-1,4-xylanase의 xylose 주쇄의 가수분해에 크게 의존적이라는 것을 알 수 있었다. 즉, endo-1,4-xylanase의 xylan 주쇄의 가수분해 정도의 증가는 α -glucuronidase의 활성을 증가시키는 것과 연관되어 있음을 보였다. 그러므로 arabinoxylan 또는 그에 유사한 물질을 생산하기 위한 효소적 처리 방법은 각 해당 효소의 optimal condition에서 endo-1,4-xylanase와 α -glucuronidase가 적용되어야 한다. 또한 해당 효소들의 기질인 xylan 주쇄를 분해 할 수 있는 endo-1,4-xylanase의 처리가 선행되어야 한다. 그리고 이러한 효소 반응에 의해 생산된 4-*O*-methyl glucurono xylooligomer를 4-*O*-methyl glucuronic acid 단위체에 활성이 있는 α -glucuronidase를 처리함으로써 xylan 복합체로부터 목적하고자 하는 물질 또는 그 유도체를 얻을 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of arabinoxylan production technology and manufactured goods with rice bran using carbohydrases complex derived from mushroom

II. Purpose and significance of the study

A. Process development and manufacturing technology of arabinoxylan by mycelium cultivation of mushroom

Recently in United States and Japan, arabinoxylan has been well recognized as a plants-derived source of immunomodulators. It has been reported that arabinoxylan activates NK(natural killer) cell in the immune system and reduces side effects of chemical or hormone therapeutics in cancer treatment. Although arabinoxylan has been well recognized in overseas, little effort has been made to study the process of arabinoxylan production in Korea. Thus, it has been necessary to research and develop the isolation, purification and production technology of arabinoxylan.

This project was carried out to study the process of arabinoxylan production by liquid cultivation of mycelium from *Lentinus edodes* specie and its application to functional products.

B. Process development for isolation and purification of arabinoxylan

Arabinoxylan is a main component of hemicellulose in cell wall of plants such as rice bran, barley, and wheat. Arabinoxylan has xylose as a main chain and arabinose as a branched unit. Its molecular weight is about 3000~5000 dalton.

Arabinoxylan is known to be effective for anti-cancer treatment, blood sugar and blood pressure dropping, enhancement of human immune system and strengthening digestive tract. As little research has been done on the arabinoxylan production in domestic, this project attempted to produce arabinoxylan. Among the plant sources, rice bran has been getting enormous attention as a immune modulating agent. Thus it was chosen in this study for the source of arabinoxylan. Besides, an attempt to develop new technology for isolation and purification was made in order to overcome problems caused from the existing technology.

C. Estimation of carbohydrases complex

Endo-1,4-xylanase and α -glucuronidase, among the extracellular enzymes produced by *Lentinus edodes*, were purified and investigated with respect to their individual activities and the synergistic effect between both enzymes on the efficient hydrolysis of xylans. The purification steps were done on several characters of both enzyme. On gel filtration using Sephadex G-75 column, the active fractions of endo-1,4-xylanase and α -glucuronidase were separated respectively. The separated enzyme pools were used to determined their M.W. and do following reactions. The temperature optima were 40°C for endo-1,4-xylanase and 50°C for α -glucuronidase. On endo-1,4-xylanase it show the stability decreased above 45°C in course of time significantly. The pH optima of the purified endo-1,4-xylanase and α -glucuronidase were pH 4.0

and 6.0, respectively. In addition, endo-1,4-xylanase shows stable between 3.0 ~ 6.0 under the condition of 40°C, 60min incubation.

III. Contents and scope of the study

A. Process development and manufacturing technology of arabinoxylan by mycelium cultivation of mushroom

In this project, optimum conditions such as temperature, pH, agitation speed and amount of liquid media were studied for mycelium growth from the liquid cultivation of *Lentinus edodes*. In terms of optimal media compositions, carbon, nitrogen and mineral sources were examined. Optimal media compositions for the production of carbohydrases were also formulated.

In modified batch-culture, productivity of carbohydrases was enhanced by adding glucose as a carbon source. Then by reacting these carbohydrases with hemicellulose extracted from rice bran, final arabinoxylan was produced. Manufacturing technology producing a powder form of arabinoxylan was developed for the application to various functional products.

B. Process development for isolation and purification of arabinoxylan

Hemicellulose A and B without lignin and cellulose in their structure were obtained from rice bran by adjusting organic solvent and pH level. In order to study structural characteristics of the hemicellulose and arabinoxylan,

C-NMR Spectrum and FT-IR Spectrum were used. Compositional sugar of arabinoxylan was examined using HPLC. In order to determine the structures of main chain in hemicellulose and arabinoxylan, Fungi-Fluor Kit was used. Changes of compositional sugar of crude arabinoxylan were examined according to the reaction time (3hrs, 6hrs, 12hrs and 24hrs) of hemicellulose B with the culture broth of *Lentinus edodes* .

C. Estimation of carbohydrases complex

The hydrolysis products of xylan were xylobiose, and xylotriose by endo-1,4-xylanase. Xylobiose, xylotriose, and 4-*O*-methyl-glucuronoxyloligomer were produced from 4-*O*-methyl-glucuronoxylan by endo-1,4-xylanase. The synergistic effect between endo-1,4-xylanase and α -glucuronidase was investigated using xylan or 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan as the substrate. The hydrolyzing activities of both enzymes in the cleavage of xylooligomers and the liberation of 4-*O*-methylglucuronic acid groups from the 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan were approximately 2.0-fold higher than the oat spelt's xylan.

IV. Results and recommendation

A. Process development and manufacturing technology of arabinoxylan by mycelium cultivation of mushroom

For the production of carbohydrases, optimum culture temperature of 24°C, agitation speed of 200rpm, inoculum of 10%, working volume of 100mL

and initial pH 5.5 were effective in liquid cultivation of mycelium. Optimal glucose and yeast extract concentration for the growth of mycelium were determined as 30g/L and 20g/L, respectively. Maximum cell mass were about 18g/L at 8.5th day of the cultivation. As a result of flask culture, the optimum media composition for the production of carbohydrases were determined as cellulose 1%(w/v), yeast extract 1%(w/v) and CaCl₂.2H₂O 0.1%(w/v). At 10th day of cultivation, activities of β -glucosidase, β -glucuronidase and β -galactosidase were determined as 43.5U/mL, 0.33U/mL and 0.8U/mL, respectively.

For the modified batch culture, additional 100mL of glucose (5g/L) was fed to the basal batch culture at 4th and 5th day. Pulsed feeding strategy was applied to feed the glucose.. Compared with the results between basal batch culture and modified batch culture, cell mass of 2.5g/L was increased in modified batch culture. For the activities of carbohydrases, 5U/mL of β -glucosidase, 0.1U/mL of β -glucuronidase and 0.2U/mL β -galactosidase were increased repectively.

It appeared that powdered arabinoxylan could be utilized as a sources of the functional or health supplement foods in a form of capsule or tea-bag.

B. Process development for isolation and purification of arabinoxylan

The highest Yield of hemicellulose B was 38.5% when volume of ethanol was increased three times at the reaction temperature 65°C. From the result of this, it was proved that they were the optimum condition. Structural characteristics of hemicellulose B and arabinoxylan were observed using C-NMR and FT-IR spectrums.

Component ratio of compositional sugars of arabinoxylan were examined

by HPLC. In the results, hemicellulose B consists of xylose 15.4%, arabinose 13.9%, glucose 67.2% and galactose 3.5%. The ratio of ara/xly was 0.9. Compositional sugars of enzyme treated hemicellulose B were determined as xylose 63.5%, arabinose 11.1, glucose 18.9%, galactose 2.7% and glucuronic acid 3.8%. The ratio of ara/xly in this case was 0.17.

The component ratio of compositional sugars in arabinoxylan was also examined through the observation of reaction time of hemicellulose B with the culture broth of *Lentinus edodes*. The longer the reaction time was, the lower the component ratio of glucose was. On the other hand, the ratio of xylose to arabinose tended to increase.

In order to examine the respective binding structures of hemicellulose B and arabinoxylan, UV fluorescences were measured using Fungi-Flour Kit. As expected, it was confirmed that the main chain of arabinoxylan was a α -linkage, and hemicellulose B showed more β -linked structure than arabinoxylan did.

C. Estimation of carbohydrases complex

The results of synergy reaction indicated that 4-*O*-methyl glucuronic acid release by α -glucuronidase depended largely on the hydrolysis of the xylan backbone by endo-1,4-xylanase. The increasing hydrolysis-degree of xylan backbone by endo-1,4-xylanase may increase α -glucuronidase activity on 4-*O*-methyl glucuronic acid unit linked D-xylopyranose backbone.

Therefore, to produce an arabinoxylan or its derivatives, the catalytic property of α -glucuronidase must make to release 4-*O*-methyl glucuronic acid unit form D-xylopyranose backbone, after endo-1,4-xylanase cuts xylan backbone on the condition of optimal temperature and pH of both enzymes.

Contents

Summary in Korean	-----1
Summary in English	----- 13
Chap. 1 Purpose and significance of the study	-----19
Chap. 2 Trends and scope of the study	-----22
Chap. 3 Results and recommendation	-----24
§1. Process development and manufacturing technology of arabinoxylan by mycelium cultivation of mushroom	
1. Introduction	-----24
2. Materials and Methods	-----30
2.1. Experimental materials	-----30
2.2. Culture conditions	-----32
2.3. Analysis	----- 32
3. Results and Discussion	----- 37
3.1. Development of technology for liquid cultivation	----- 37
3.2. Process development for liquid cultivation	----- 49
3.3. Development of optimized for liquid culture processing	-----65
3.4. Development of techology for manufactured goods	-----71
4. Conclusions	-----77

§2. Process development for isolation and purification of arabinoxylan	
1. Introduction	79
2. Materials and Methods	82
2.1. Isolation and purification of hemicellulose B from rice bran	82
2.2. Characterization of hemicellulose B	82
3. Results and Discussion	88
3.1. Development of isolation and purification for arabinoxylan production	88
3.2. Process development for isolation of arabinoxylan	94
3.3. Optimization of process development and establish of system	110
4. Conclusions	115
§3. Estimation of carbohydrases complex	
1. Introduction	117
2. Materials and Methods	124
2.1. Optimum media composition for α -glucuronidase and endo-1,4-Xylanase production	124
2.2. Optimum media composition	126
2.3. Inoculation and cultivation	126
2.4. Confirmation of protein production	126
2.5. Confirmation of endo-1,4-Xylanase activity	126
2.6. Confirmation of α -Glucuronidase activity	127
3. Results and Discussion	128
3.1. Estimation of carbohydrases complex for reaction characterization	128
3.2. Estimation of carbohydrases complex (1)	132
3.3. Estimation of carbohydrases complex (2)	140

4. Conclusions	-----	163
Chap. 4 Achievement and contribution in related areas	-----	164
Chap. 5 Application of the results and plan	-----	166
Chap. 6 Information of science technology collected from overseas	-----	167
Chap. 7 References	-----	168

목 차

국문요약문	1
영문요약문	13
제 1장 연구개발과제의 개요	19
제 2장 국내외 기술개발 현황	22
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1절 균사체 배양을 통한 생리활성물질 생산공정 및 가공기술개발	24
1. 서 론	24
2. 재료 및 방법	30
가. 실험 재료	30
나. 배양 조건	32
다. 분석 방법	32
3. 결과 및 고찰	37
가. 액체배양기술 개발	37
나. 액체배양공정 개발	49
다. 액체배양공정 최적화 기술개발	65
라. 가공기술 개발	71
4. 결 론	77
제 2절 생리활성물질 분리정제공정 개발	79
1. 서 론	79

2. 재료 및 방법	82
가. 미강으로부터 헤미셀룰로즈 B의 분리·정제	82
나. 헤미셀룰로즈 B의 정량·정성적 특성 분석	82
3. 결과 및 고찰	88
가. 생리활성물질 분리정제기술 개발	88
나. 생리활성물질 분리공정기술 개발	94
다. 분리정제공정 최적화 및 시스템 구축	110
4. 결 론	115
 제 3절 가수분해 복합효소 활성평가	 117
1. 서 론	117
2. 연구수행 방법	124
가. α -glucuronidase와 endo-1,4-Xylanase의 생산을 위한 최적 배양액조성	124
나. 최적 배양액 조성(g/L)	126
다. 접종 및 배양	126
라. 단백질 생산 확인	126
마. endo-1,4-Xylanase 활성 확인	126
바. α -Glucuronidase 활성 확인	127
3. 연구수행 내용 및 결과	128
가. 복합효소 반응특성 평가	128
나. 가수분해효소 특성평가	132
다. 가수분해 복합효소 특성평가	140
4. 결 론	163
 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	 164
 제 5장 연구개발결과의 활용계획	 166

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----167

제 7장 참고문헌 -----168

제 1장 연구개발과제의 개요

최근에 미강(쌀겨), 보리, 밀 등과 같은 벼과 식물의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로스의 주성분이고 분자량이 3000 ~ 5000 KD 정도인 아라비녹실란(arabinoxylan)은 항암, 혈당 및 혈압강하, 면역체계강화, 소화기능 등을 증진시키는 탁월한 효능을 보이고 있어 많은 관심을 불러일으키고 있다.

아라비녹실란은 면역계에서 매우 중요한 역할을 하는 NK(natural killer)세포를 활성화시켜 암치료에 있어서 화학요법 및 호르몬 요법에 대한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있으며 AIDS 치료에 있어서 잠재적 가치가 있다고 보고되고 있다. 크실로즈(xylose)를 주쇄로하여 측쇄에 아라비노스(arabinose)를 갖는 아라비녹실란은 면역부진에 기인한 질병환자가 증가하는 요즘 면역력을 강화시키는 물질로서 새로운 식물소재의 가치가 대단히 크다. 또한 저분자의 신소재 식이섬유로서 아라비녹실란은 소화기관에서의 흡수력이 매우 우수하여 면역강화 증대는 물론 지질대사 개선, 당질대사 개선 및 식이성 유래물질 독성저지 등의 작용을 가지고 있어 많은 관심이 집중되고 있다.

따라서 일본 및 미국을 비롯한 여러 선진국에서 항암 및 면역강화 등 인체에 탁월한 효능을 지닌 아라비녹실란을 제품화하고자 분리정제기술을 개발하고 있다. 그러나 국내에서는 아라비녹실란의 분리정제기술 및 생산기술 개발에 대한 연구가 거의 전무한 실정으로 이에 대한 연구개발이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 버섯유래 균사체 액체배양공정을 개발함으로써 복합효소를 생산하여 미강중의 헤미셀룰로스를 효소처리하여 아라비녹실란을 생산하는 공정기술을 개발하고자한다. 분리정제기술을 개발하여 생산성을 높이므로써 국가경쟁력을 확보하고자 한다. 또한 아라비녹실란 생산에 관여하는 복합효소를 검색하여 상업화에 필요한 마케팅 전략을 확립하므로써 고부가가치의 기능성 가공제품을 개발하고자 한다.

1) 기술적 측면

- 미강에 존재하는 양은 매우 미미하기 때문에 항암 및 면역강화 효능을 지닌 아라비녹실란의 대량생산기술 개발이 필요
- 액체배양공정을 최적화하여 생리활성물질의 생산성을 극대화
- 분리정제공정을 최적화하여 생리활성물질 생산을 산업화
- 가수분해 복합효소 반응 특성 및 활성을 평가하여 기능성 가공제품 개발 촉진
- 가공제품 개발을 위한 가공기술 개발 필요

2) 경제·산업적 측면

- 항암 및 면역계 관련 기능성 가공제품의 수입대체 효과 및 국제시장에 수출할 수 있는 경쟁력 강화
- 최적 생산기술 개발을 통하여 기능성 천연물질 함유 가공제품을 개발함으로써 기능성식품 산업 활성화
- 배양 및 분리정제 공정 최적화 기술을 국내 자체적으로 개발함으로써 시장 경쟁력 강화 및 생물산업관련 경제 발전에 기여
- 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 미강 및 버섯재배 관련 농가의 소득증대 기여

3) 사회·문화적 측면

- 아라비녹실란은 최근 미국, 일본을 중심으로 의약품 또는 건강보조식품 소재로서 많은 관심을 받기 시작하여 관련 제품을 개발하고 있음
- 건강식품에 관심이 많은 국내의 사회·문화적 환경변화에 따른 소비자의 요구도를 충족시킬 수 있는 과학적으로 효능이 검증된 다기능 가공제품 개발 필요

- 항암 및 면역강화 기능에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질 관련 다양한 가공제품을 개발하여 국민건강 증진에 기여
- 가공제품 개발을 통하여 경증환자의 치료식 및 예방식 개발 가능
- 대표적인 질병인 암 또는 염증치료과정에서의 부작용을 최소화하고 복용이 간편한 기능성 가공 제품의 개발이 절실히 필요

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 관련 기술의 현황과 문제점

- 현재 국내에서는 아라비녹실란에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 일본에서는 현재 미강(쌀겨)에서 벼싧 균사체로부터 생산된 탄수화물 분해효소를 이용하여 분리정제된 아라비녹실란을 상품화하여 판매하고 있으나 생산기술이 아직 미흡하다.
- 미국에서는 아라비녹실란의 의학적 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 최근 캐나다, 미국 및 유럽 선진국에서 벼과식물에 함유된 아라비녹실란의 추출인자 변화에 따른 분리정제에 관한 기술개발 및 특성 분석이 연구되고 있으나 미미한 상황이다.
- 따라서 본 연구과제를 통해 국내기술을 개발하여 자체적으로 생산된 아라비녹실란에 대해 이미 밝혀진 생리활성 검토는 물론 새로운 생리활성 역가의 가능성을 검토할 필요가 있다.
- 미국, 캐나다 및 유럽 지역은 건강식품에 대한 관심이 높아 시장규모는 대단히 크지만 생산은 활발하지 못하다. 따라서 국내 차체기술을 개발하여 아라비녹실란에 대한 분리정제기술 및 대량생산기술을 바탕으로 가공제품을 개발할 필요성이 절실히 요구된다.

2. 앞으로 전망

- 건강에 대한 국민 인식의 질이 향상되면서 항암 및 면역기능강화에 효능이 있는 기능성 식품에 대한 수요가 급증할 것으로 예상된다.
- 따라서 치료 및 예방 효과를 얻을 수 있는 생리활성물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 기술 개발이 필요한 것으로 전망된다.

- 생산공정 기술개발을 통하여 다양한 기능성 물질의 생산성을 높임으로써 폭넓은 가공 제품개발을 촉진시킬 수 있는 발효기술이 개발되어야 할 것으로 판단된다.

3. 기술도입의 필요성

- 현재 아라비녹실란에 대한 연구는 일본을 중심으로 진행중에 있으나 아직 초기 단계이므로 기술도입의 필요성은 없다고 판단된다. 현시점에서 국내 연구개발을 바탕으로 독자적인 개발 기술 및 전략을 확보하는 방향이 국내시장 증가 및 국가 경쟁력 강화에 기반이 될 것으로 판단된다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 균사체 배양을 통한 생리활성물질 생산공정 및 가공기술개발

1. 서론

최근에 미강(쌀겨), 보리, 밀 등과 같은 벼과 식물의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로스의 주성분이고 분자량이 3000 ~ 5000 Da 정도인 아라비녹실란(arabinoxylan)은 항암, 혈당 및 혈압강하, 면역체계강화, 소화기능 등을 증진시키는 탁월한 효능을 보이고 있어 많은 관심을 불러일으키고 있다(1,2).

아라비녹실란은 면역계에서 매우 중요한 역할을 하는 NK(natural killer)세포를 활성화시켜 암치료에 있어서 화학요법 및 호르몬 요법에 대한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있으며 AIDS 치료에 있어서 잠재적 가치가 있다고 보고되고 있다(3). 자일로즈(xylose)를 주쇄로하여 측쇄에 아라비노즈(arabinose)를 갖는 아라비녹실란은 면역부진에 기인한 질병환자가 증가하는 요즈음 면역력을 강화시키는 물질로서 새로운 식물소재의 가치가 대단히 크다. 또한 저분자의 신소재 식이섬유로서 아라비녹실란은 소화기관에서의 흡수력이 매우 우수하여 면역강화 증대는 물론 지질대사 개선, 당질대사 개선 및 식이성 유래물질 독성저지 등의 작용을 가지고 있어 많은 관심이 집중되고 있다(4,5).

아라비녹실란의 구조(Fig. 1)를 살펴보면 자일로즈가 α -(1→4)결합으로 이루어진 중합체에 5탄당인 아라비노즈가 부분적으로 결합되어 있는 형태인데, 자일로즈와 아라비노즈의 비율에 따라 점성, 용해도, 입체구조에 영향을 준다고 보고되어 있다(6-8). 이러한 아라비녹실란은 여러 가지 기능을 가지고 있는데 그 중 첫 번째는 면역 강화 기능이다. β -glucan 이 면역력을 강화시켜 함암 효과가 있는 것과 유사하게 아라비녹실란은 저분자 상태로 장내로 흡수되어 혈중에 있는

Crude Hemicellulose model in extract of rice bran

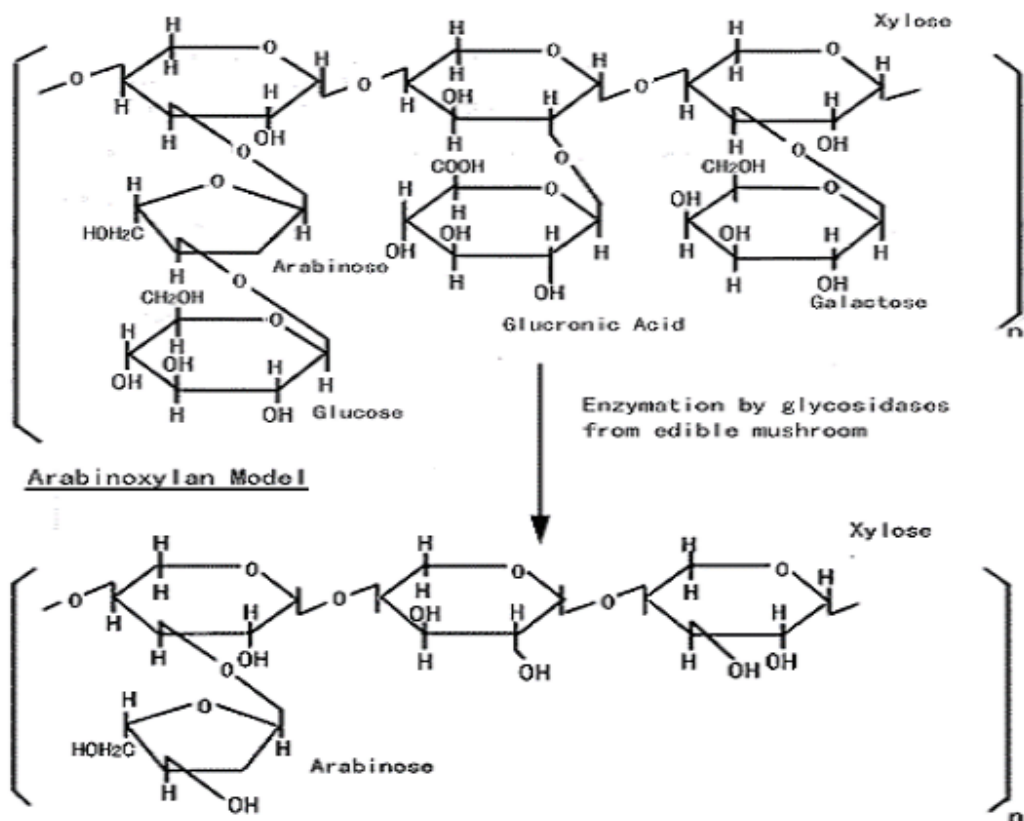


Figure 1. Crude hemicellulose model in extract of rice bran treated enzymatically by glycosidases from edible mushroom. The structure of arabinoxylan(3)

임파구와 매크로파지를 담당하는 세포를 자극해 NK(Natural Killer) cell을 활성화시켜 항암 효과를 나타낸다는 보고가 있다(9). 이렇게 NK cell을 활성화 시키는 생물학적 반응 조절제 (Biological Response Modifiers)에는 아라비녹실란 뿐 아니라 운지버섯으로부터 생산되어지는 단백질다당체(Krestin)(12)와 표고버섯균사체(LEM)(10), killed streptococcal preparations(OK432)(13), *Corynebacterium parvum*(11), 그리고 bacille Calmette-Guerin(14) 등이 있다고 보고되어 있다.

그 밖에 아라비녹실란은 항바이러스 및 항균활성(3), 당뇨 예방 활성(16), 콜레스테롤 저해효과(5) 등 여러 가지 기능을 가지고 있다. 이러한 아라비녹실란은 원료물질(source), ara/xyl ratio, ferulic acid 함량 등에 따라 물리화학적 성질이 달라진다(21). Rye water-extractable 아라비녹실란의 경우 평균 분자량이 275,000 이라고 보고되었고(17), Vinkx 등(7)은 rye water-extractable 아라비녹실란의 40%가 분자량이 약 160,000에 가깝다고 보고하였다. 또한 rye 아라비녹실란의 intrinsic viscosity는 5.9 dL/g, water-binding capacity는 0.47g/g이라고 보고되었다(19). Wheat 아라비녹실란의 경우 intrinsic viscosity는 6.12 dL/g, ara/xyl ratio는 0.5, 분자량은 65,000 이라고 보고되었다(8). 또 barley, rice, sorghum에서 추출되어지는 아라비녹실란의 물리화학적 특성이 각기 다른데, 이는 추출방법(물, 알칼리)에 따라서 달라진다고 보고되어 있다(21). 이러한 물리화학적 특성에 따라 밀가루 반죽이나 빵의 품질에 영향을 준다는 보고도 있다(21). 또 water binding capacity를 이용한 생체의료공학 소재로서의 이용도 연구되어지고 있다(22,47). 이처럼 다양한 기능을 가지고 있는 아라비녹실란 생산을 위해서는 전구물질인 헤미셀룰로즈가 필요한데, 헤미셀룰로즈는 대부분의 식물체에 포함되어 있는 자연계에 풍부한 polysaccharide중 하나이며, 식물체의 종류마다 함량이 조금씩 달라진다(23). 헤미셀룰로즈는 xylose가 α -(1→4)결합으로 이루어진 중합체에 arabinose, glucose, galactose, glucuronic acid, mannose, rhamnose 등이 결사슬에 결합되어 있는 구조를 가진다. 헤미셀룰로즈는 작은 분자량을 갖는 polysaccharide이며, 식물체의 세포벽에 셀룰로즈, 리그닌과 함께 연결되어 있고 주로 알칼리 추출방법에 의해 분리되어진다(24). 추출되어지는 fraction에 따라 헤미셀룰로즈 A, 헤미셀룰로즈 B로 나뉘어 지는데 헤미셀룰로즈

B의 구조는 일반적으로 알려져 있으나, 헤미셀룰로즈 A의 구조는 아직 알려져 있지 않은 상태이다. Fang 등(25)은 wheat straw에서 추출되어지는 헤미셀룰로즈를 fraction 별로 A, B, C로 나타내었는데, 비율은 각각 7.3, 25.7, 1.0% 이라고 보고하였다. 그리고 헤미셀룰로즈 B의 당 구성비는 xylose(73.5%), arabinose(12.2%)로 major component를 이루고 minor sugar로는 glucose(7.7%), galactose(5.7%), rhamnose(1.1%)로 구성되어 있다고 하였다. 한편 Anis 등(24)은 ara/xyl ratio가 높을수록 water holding capacity가 더 높다고 보고하였다. 이러한 헤미셀룰로즈는 에탄올 생산이나, xylitol 생산의 원료물질로도 이용되어지고 있다(26,27).

이처럼 아라비녹실란의 생산에 있어서 필수적인 또 다른 요소는 헤미셀룰로즈의 결사슬에 결합되어 있는 잔당(glucose, galactose, glucuronic acid 등)의 제거에 필요한 탄수화물 가수분해효소이다. 탄수화물 가수분해효소는 여러 미생물에 의해 생산되는데, 본 연구에서는 버섯을 사용하였다. 버섯은 식물계의 균류 중 진균류에 속하며 대부분은 담자균류의 일종으로 고등식물과는 달리 엽록소가 없기 때문에 광합성을 하지 못하므로 유기물질을 생체내 여러 효소의 작용으로 분해하여 영양 성분으로 섭취하여 균사의 발육과 자실체의 구성에 이용하는 기생생활을 하는 것이 특징이다(28,29). 이러한 버섯은 예로부터 식용 뿐 아니라 약용으로 이용되어졌으며, 영양학적으로 여러 가지 영양성분이 포함되어 있고, 요즘에 들어서는 버섯에 함유되어 있는 β -glucan이 항암작용에 효과를 보인다는 연구보고가 늘어나고 있는 추세이다(30-33). 이러한 버섯들중 표고버섯에 함유되어 있는 PBP(Protein-bound Polysaccharide)는 인터페론을 생성하는 물질을 자극하여 종양세포를 간접적으로 저해하고, macrophage의 수를 증가시켜 종양세포 및 기타 다른 병원균을 사멸시키는 역할을 한다고 알려져 있다. 또 이런 항종양 효과를 나타내는 PBP는 자실체에서보다 균사체에 더 많이 함유되어 있고 이 물질이 바이러스성 질환에 효과적이며, 암 치료에 이용되는 인터페론같은 물질을 생성하는데 큰 역할을 담당한다고 보고되고 있다(34-36). 또 다른 버섯의 하나인 운지버섯으로부터는 PSK(Polysaccharide krestin)이라는 다당체가 생산되어지는데 추출방법에 따라 polysaccharide와 protein의 비율이 약간씩 달라지게 된다.

PSK 역시 여러 가지 종양세포에 저해활성을 나타내고, 부작용과 독성이 없다는 것이 큰 장점으로 부각되고 있다(37-41). 이 밖에 다른 버섯들중에도 항암효과를 나타내는 것들이 많이 보고되어지고 있다(42,48).

표고버섯(*Lentinus edodes*)은 분류학상 진균식물문, 담자균강, 송이버섯목, 느타리과에 속하며, 예전부터 향기성분과 약리효과 때문에 식용 뿐아니라 약용으로 널리 이용되어 왔다(43). 이러한 표고버섯의 자실체로부터 생산되어지는 다당체의 항암효과에 대한 연구가 진행되고 있으며, 기타 다른 담자균류에서 생산되어지는 다당체에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다(30,44-46). 표고버섯에서 생산되어지는 다당체인 베타(1-3)글루칸은 glucose가 다수 결합한 polymer 상태의 탄수화물이다. 이 물질은 T임파구(흉선임파구)를 증진시키고 B임파구로 하여금 항체를 만들도록 돕는 역할을 하여 암의 억제, 항종양효과 등 인체의 면역을 강화하는 작용을 한다. 그 밖에 간장세포 및 신장세포의 활성화는 대표적인 효능으로 꼽힌다(31,32). 표고버섯은 균사 액체배양을 통해 antibacterial, antifungal activity를 나타내는 황을 포함하고 있는 lenthionine이라는 물질을 생산하고(50), lenthionine의 유도체 물질인 bis[(methylsulfonyl)methyl]disulfide는 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 그리고 *Escherichia coli*에 대해 강한 저해효과를 나타낸다는 보고가 있다(51). 표고버섯은 액체배양시 여러 효소들을 분비하는데 이중 본 연구와 밀접한 관계가 있는 탄수화물 가수분해효소에 대한 특성은 Table 1에 나타내었다. 이처럼 여러 미생물에서 탄수화물 가수분해효소들이 생산되어지는데 본 연구에서 표고버섯을 사용한 이유는 다른 종에 비해 안정성이 뛰어나다는 이유에서이다.

본 연구내용은 탄수화물 가수분해효소 고수율 생산균주의 개발 및 안정화, 최적 배지조성, 최적 성장조건을 검토하고, 가수분해효소 생산수율 촉진 및 저해 요인, 가수분해효소의 대량생산공정 및 안정화 기술을 개발하는 것이다. 또한 고농도 배양공정을 개발하여 가수분해효소의 생산성을 극대화시키는 것이 본 연구의 목적이다. 따라서 본 연구에서는 이렇게 생산된 가수분해효소를 미강으로부터 추출된 헤미셀룰로스와 반응시켜 최종 아라비녹실란을 생산하는 기술을 개발하고자 하였다.

Table 1. Properties of carbohydrases in
microorganism(52-70)

	Strain	Optimum pH	Optimum temperature(°C)
β -glucosidase	<i>L. edodes</i> (52)	3.5	60
	<i>A. niger</i> (53)	4.8	60-70
	<i>T. reesei</i> (54)	4.0	60
	<i>S. commune</i> (55)	5.3	30
	<i>V. volvacea</i> (56)	7.0	60
	<i>X. regalis</i> (57)	5.0	50
	<i>T. aurantiacus</i> (58)	5.0	70
	<i>S. cerevisiae</i> (59)	6.4-6.8	45
	<i>C. guilliermondii</i> (60)	6.8	37
	<i>C. peltata</i> (61)	5.0	50
β -glucuronidase	<i>A. niger</i> (62)	6.5	60
	<i>B. vulgaris</i> (63)	4.0	37
	<i>E. coli</i> (64)	7.3	37
β -galactosidase	<i>A. fonsecaeus</i> (65)	2.6-4.5	50
	<i>P. chrysogenum</i> (66)	4.0	30
	<i>A. oryzae</i> (67)	5.0	50
	<i>K. marxianus</i> (68)	7.5	50
	<i>Thermoanaerobacter</i> (69)	6.0	70
	<i>A. caviae</i> (70)	7.0	37

2. 재료 및 방법

가. 실험 재료

1) 균주 및 보존

본 실험에 사용된 균주는 *Lentinus edodes*(KCTC 6734)를 사용하였으며 보존용 배지로는 PDA (potato dextrose agar)를 사용하였으며 8주마다 계대배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 YMK medium(Table 1)을 사용하였으며 7일간 배양한 후 homogenizer (Heidolph Co., DIAX 600)를 이용하여 균질화(homogenization)한 후 8 mL을 취하여 멸균된 glycerol 2 mL을 20 mL vial에서 잘 혼합한 후 -75°C 에서 냉동 보관하였다.

2) 배지

가) 균체성장을 위한 배지

균체성장을 위해 사용된 배지들은 전배양에서는 YMK medium(Table 2)을 사용하였으며 본배양의 플라스크배양에서는 YMK medium과 modified medium(Table 3)을 사용하여 실험을 수행하였다.

나) 가수분해효소 생산을 위한 배지

가수분해효소 생산을 위해 사용된 배지들은 전배양에서는 modified medium을 사용하였고 본배양의 플라스크 및 생물반응기에서는 optimum medium(Table 4)을 사용하여 실험을 수행하였다.

Table 2 Compositions of the YMK medium

Components	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Yeast extract	5.0
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0

Table 3. Compositions of the modified medium

Components	Concentration (g/L)
Glucose	30.0
Yeast extract	20.0

Table 4. Compositions of the optimum medium

Components	Concentration (g/L)
Cellulose	10.0
Yeast extract	10.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0

나. 배양조건

1) 플라스크 배양

균체는 PDA 평판배지에서 60일간 증식시킨 후, 균체를 1 cm² 크기로 분리하여 액량 100 mL의 배지성분에 혼입한 후, homogenizer로 균질화한 다음 24 °C, 200 rpm에서 10일간 1차 종균배양을 하였다. 본배양에서는 250 mL 삼각플라스크를 사용하여 100 mL의 배지에 접종비 10 %인 10 mL의 전배양액을 접종하였다.

2) 생물반응기 배양

생물반응기에서의 배양은 5 L 생물반응기 (Ko Bio Tech Co., KF-5L)에서 전배양액을 10 %로 접종하여 배양온도 24 °C, working volume 3 L로 하였고, 공기의 주입속도는 1 vvm 및 교반속도는 200 rpm으로하여 10일간 배양을 실시하였다. 배양기간동안 pH는 조절하지 않았다.

다. 분석방법

1) 균체량 분석

균체량 측정은 건조균체량을 이용하여 행하였다. 건조균체량은 세포 배양액을 filter paper (Whatman #4)를 사용하여 여과한 후 2회 세척한 후, 60 °C에서 향량이 될 때까지 약 24시간 건조시켜 균체량을 측정하였다.

2) Polysaccharide 정량

Polysaccharide 정량은 세포 배양액을 filter paper (Whatman #4)를 사용하

여 균체와 배양여액을 분리한 후 배양여액에 2배부피의 ethanol을 가하여 4 °C에서 24시간 방치하였다. 상층부에 있는 부유물을 filter paper (Whatman #4)를 사용하여 걸러낸 후 60 °C에서 항량이 될 때까지 약 24시간 건조시켜 crude polysaccharide를 정량하였다.

3) Glucose 분석

배양액중의 glucose 농도는 세포 배양액을 filter paper(Whatman #4)를 사용하여 균체와 배양액을 분리한 후 얻은 배양여액을 glucose kit(Sigma Chemical Co., 510-A)를 사용하여 측정하였다. 분석범위는 0.25~3.0 g/L로 하여 배양여액에서의 glucose 농도가 이 범위에 들어가도록 희석하여 사용하였으며, 낮은 농도(0.25 g/L 이하)에서는 분석 절차상 희석을 생략하였다. 반응은 37 °C에서 30 분간 행하였으며, 반응이 끝난 후 분광광도계(Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Glucose (g/L)} = \frac{\text{OD sample}}{\text{OD standard}} \times 100$$

4) 효소반응 및 활성측정

탄수화물 가수분해 복합효소의 활성은 발색기질(Chromogenic substrate)를 이용해 발색정도를 측정하여 활성을 측정하였다. 발색기질로서는 PNPNG, ONPG(Sigma)를 사용하였다(Fig. 2). 탄수화물 가수분해 복합효소 1U은 1분당 유리되어지는 1 μmol의 *p*-nitrophenol 또는 *o*-nitrophenol의 양으로 정의하였다. 탄수화물 가수분해 복합효소 반응에서 β-glucosidase와 β-glucuronidase는 0.1M citric acid - Na₂HPO₄ (McIlvaine) buffer (pH 4.0) 1 mL에 표고버섯 배양여액 0.5 mL과 0.01 M의 PNPNG(*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside/ *p*-nitrophenyl-β

-D-glucuronide) 0.5 mL을 첨가한 후 water bath에서 60 °C, 10분간 반응시킨 후 반응 정지액으로는 0.2 M의 NaOH 2 mL을 첨가후 분광광도계(Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 405 nm에서 OD값 측정후 p-nitrophenol standard curve(Fig. 3)를 이용해 효소활성을 계산하였다. 그리고 β -galactosidase 는 citric acid - Na₂HPO₄(McIlvaine) buffer (pH 3.0) 1 mL에 배양여액 0.5 mL 과 0.01 M의 ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 0.5 mL을 첨가후 water bath에서 50 °C, 10분간 반응시켰다. 그리고 반응정지액으로 0.2 M의 NaOH 2 mL을 첨가한 후 분광광도계를 사용하여 405 nm에서 OD값 측정후 *o*-nitrophenol standard curve(Fig. 4)를 이용해 효소활성을 계산하였다.

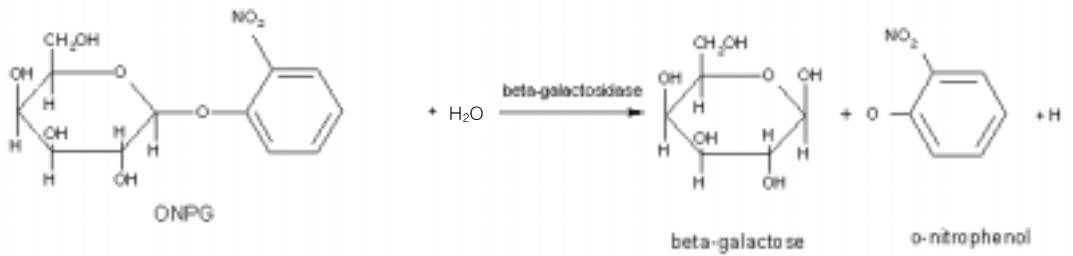
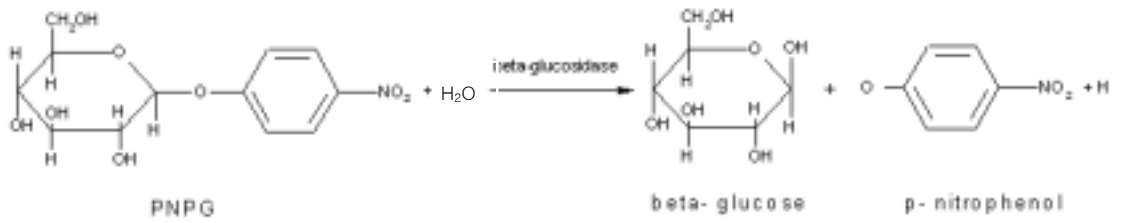


Figure 2. Reaction mechanism of enzyme with PNPG and ONPG as substrate

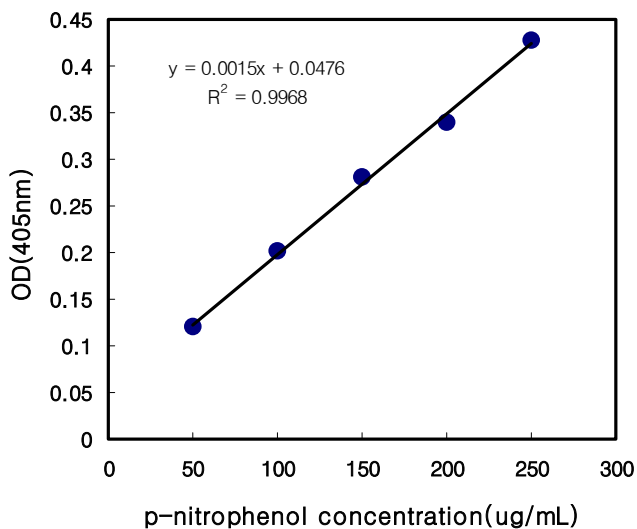


Figure 3. Standard curve of p-nitrophenol

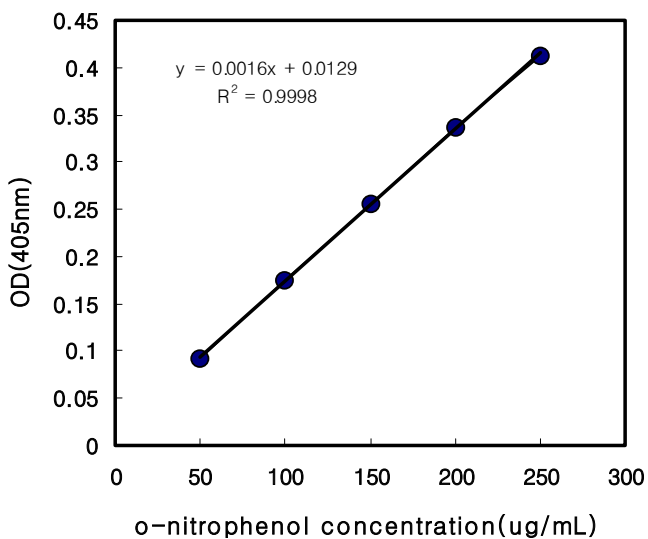


Figure 4. Standard curve of o-nitrophenol

3. 결과 및 고찰

가. 액체배양기술 개발

1) 복합효소 고수율 생산균주 개발 및 안정화

여러 균주를 확보하여 활성이 높은 균주를 선별하였다. 이 균주를 여러 차례에 걸친 계대배양을 하여 균체의 안정성을 검토하였다. 본배양은 250 mL flask에서 working volume 100 mL로하여 YMK medium (Table 2)을 이용해 shaking incubator(Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 24 °C, 200 rpm으로 실시하였고, 초기 pH는 조절하지 않았다. Fig. 5는 기본배지의 조성(YMK medium)에서 균체량의 경시변화를 관찰한 결과이다. 배양 2일까지는 lag phase를 나타내다가 3일째부터 급격한 성장을 보였으며 6일이후부터는 성장속도가 완만해졌고, 12일째 최대 균체량을 나타내었다. 그러나 최대 균체량이 약 2.5 g/L에도 미치지 못하는 결과이기 때문에 균체의 성장에 영향을 주는 요인에 대한 검토가 실행되어졌다.

2) 최적 성장조건 검토

가) 온도와 pH의 영향

일반적으로 담자균류의 균체배양은 20~35 °C의 온도범위에서 양호하다고 보고되고 있다(71-74). 이 보고를 토대로 본 균주 또한 20~35 °C 범위에서 균체의 성장에 대한 영향을 검토한 결과 24 °C에서 가장 높은 균체량을 나타내었다 (Fig. 6). 하지만 22~28 °C사이에서의 균체량을 비교해 보면 거의 차이가 나지 않는 것으로 보아 온도에 대한 영향을 그리 크지 않다고 판단되어졌다. Fig. 7은 pH에 대한 영향을 검토한 결과이다. 일반적인 담자균류에서 균체의 생육에 적합한 최적 초기 pH는 약산성 내지 중성으로 알려져 있다. *Phellinus linteus*의 경우

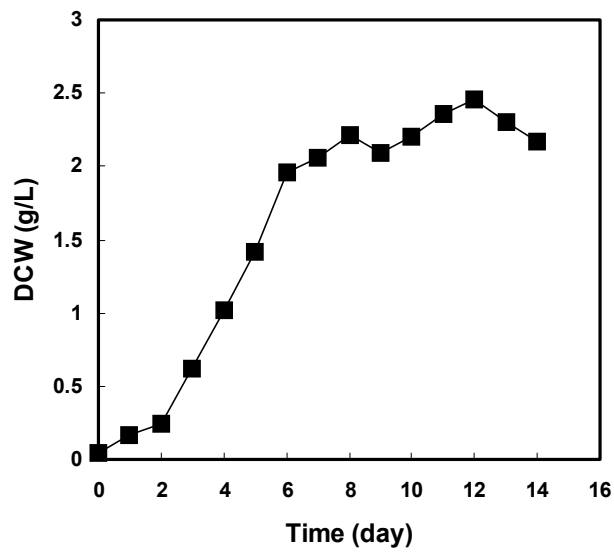


Figure 5. Profiles of cell growth in flask culture

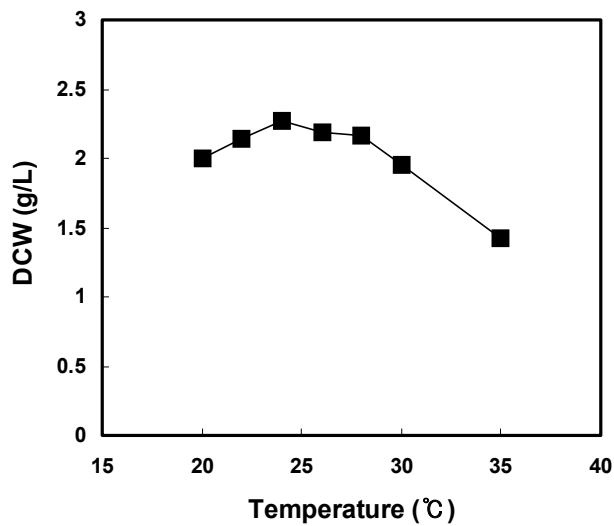


Figure 6. Effect of Temperature on cell growth in flask culture

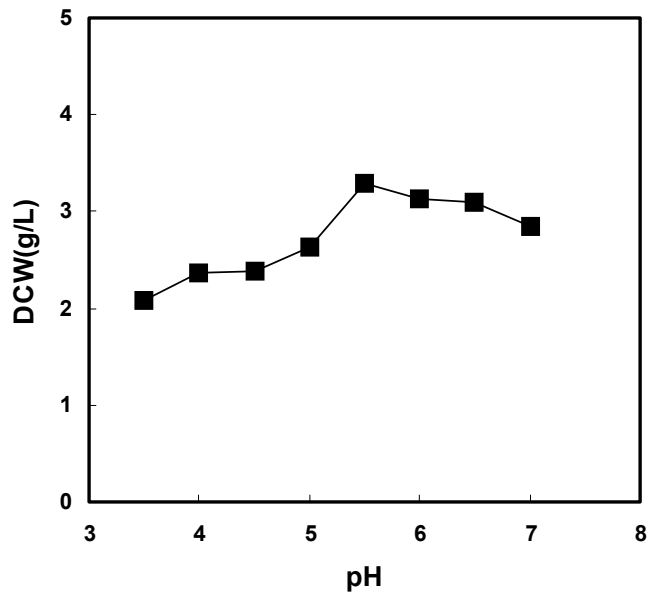


Figure 7. Effect of pH on cell growth in flask culture

pH 범위는 6~7정도이며, *Coriolus versicolor*는 중성범위인 5.2~5.6, *Tricholoma matsutake*는 pH 5~5.5에서 균체성장이 가장 우수하다고 보고되어 있고, *Lentinus edodes*는 비교적 낮은 pH 범위인 4.3~4.8에서 균체성장이 좋다고 보고되어 있다(75-79). 본 균주도 역시 이러한 범위의 pH인 5.5에서 최대 균체량을 나타내었다.

나) 교반속도, 접종량, 배지액량의 영향

Fig. 8은 교반속도가 균체성장에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 50과 100 rpm에서는 균체량이 낮은 결과를 나타내었는데 이는 낮은 rpm에서는 균체 clump이 커지면서 외부로부터의 영양공급이 원활하지 않아 성장에 저해를 준 것으로 판단되어지며, 250 rpm에서는 shear stress로 인해 균체의 성장에 저해를 준 것으로 판단된다. 결국 최대 균체량은 200 rpm에서 약 3.3 g/L를 나타내었다. Fig. 9는 본배양시 접종량이 균체의 성장에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 접종량 10%일 때 가장 높은 균체량을 나타내었다. 5~15%사이에서는 균체량의 변화가 크게 나타나지 않았지만, 2%에서는 유난히 낮은 균체량을 나타내었는데 이는 균체가 자랄 때 cell to cell communication이 원활하지 못해 발생한 결과라고 추측되어진다. Fig. 10은 배지액량이 균체성장에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 50~125 mL에서 거의 유사한 균체량을 나타내었지만, 최대 균체량은 100 mL의 배지액량에서 약 3.2 g/L의 균체량을 나타내었다.

다) 최적 성장조건에서의 경시변화

Fig. 11은 기본배지인 YMK medium을 사용하여 배양조건은 지금까지 살펴본 결과를 토대로 250 mL flask에서 working volume은 100 mL로 하여 접종량 10%, 24 °C, 200 rpm, 초기 pH는 5.5로 조절한 후 균체의 성장을 검토한 결과이다. Fig. 6과 비교했을 때 최대 균체량은 최적 성장조건하에서 약 1 g/L 정도 상승한 결과를 나타내었고, Fig. 6에서는 배양 6일째부터 균체성장 속도가 감소하

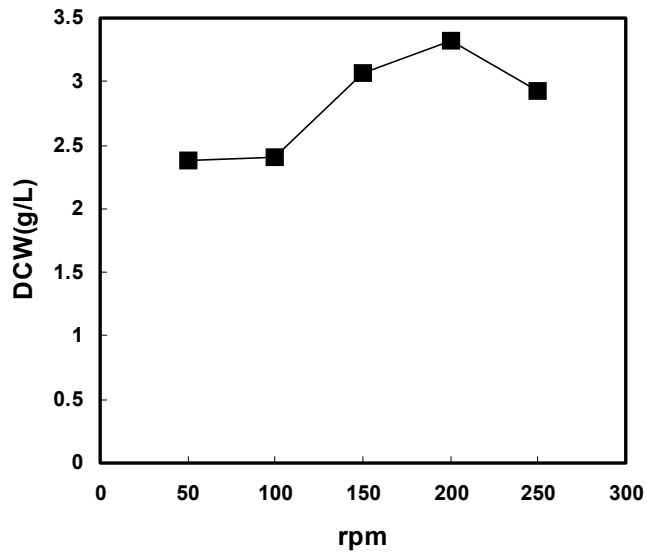


Figure 8. Effect of rpm on cell growth in flask culture

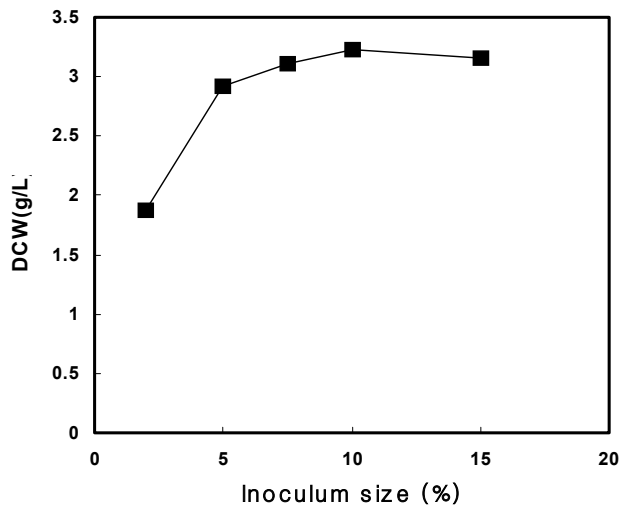


Figure 9. Effect of inoculum size on cell growth in flask culture

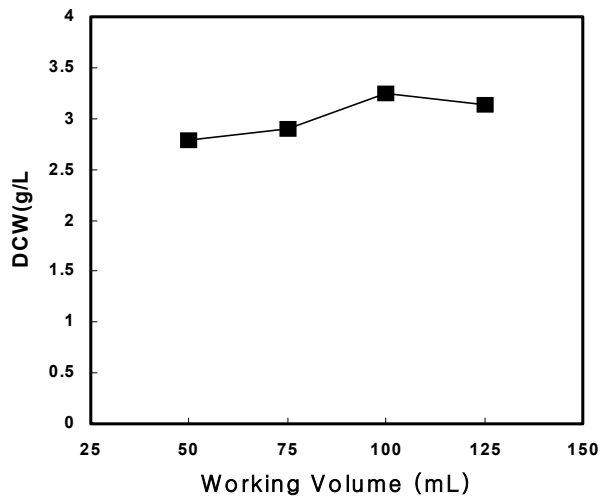


Figure 10. Effect of working volume on cell growth in flask culture

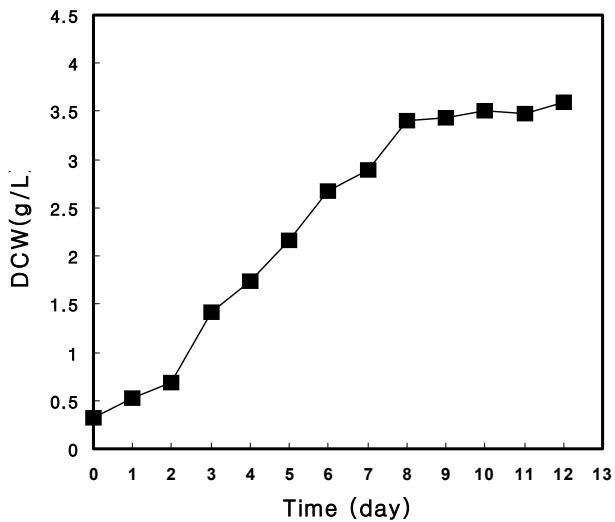


Figure 11. Profile of cell growth in flask culture with optimal culture conditions

는 경향을 나타었는데 Fig. 11에서는 배양 8일째부터 균체성장이 멈추는 추세를 보였다. Fig. 6과 비교해 배양기간은 다소 길어지긴 했지만 균체량의 증가와 배양말기에도 cell의 활성이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 증가된 균체량이 매우 낮은 수준이기 때문에 성장조건외에 배지성분에 대한 검토가 필요하다고 판단되어졌다.

3) 최적 배지조성 검토

가) 탄소원의 영향

일반적으로 버섯의 배양에서 탄소원은 세포구성 및 에너지원으로 이용되어진다고 알려져 있다. 탄소원으로는 다당류, 이당류, 단당류 등이 배지성분으로 주로 사용되어지는데 Fig. 12에서는 단당류에 glucose, galactose, fructose, 이당류에는 maltose, lactose, sucrose, 다당류로는 starch를 검토하였다. 배양은 질소원인 yeast extract를 5 g/L로 고정시킨 후 각각의 탄소원들은 20 g/L 씩 첨가하여 최적 성장조건에서 10일간 배양하였다. 검토 결과 예상대로 glucose에서 약 3.5 g/L로 최대 균체량을 나타내었다. maltose, starch, fructose의 경우에서도 비교적 높은 결과를 나타냈지만, 경제성을 고려해서 탄소원으로는 glucose를 선택하였다.

나) 질소원의 영향

질소원 역시 탄소원과 같이 생물체가 생명을 유지하고, 성장하기 위한 필수적인 성분으로 알려져 있다. 질소원에는 유기질소원과 무기질소원으로 분류되는데 일반적으로 담자균류는 유기질소원에서 균체의 성장이 좋은 것으로 알려져 있다. Fig. 13에서는 유기질소원과 무기질소원이 균체의 성장에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 알려진 바와 같이 유기질소원인 yeast extract에서 약 3.3 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 다른 유기질소원에서도 무기질소원에 비해 좋은 성장을 보였지만 yeast extract에 비해 다소 낮은 결과를 나타내 질소원으로는

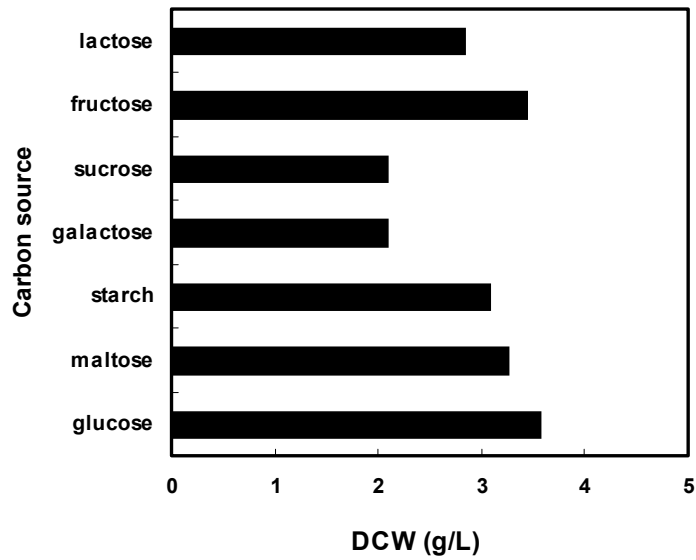


Figure 12. Effect of carbon sources on cell growth in flask culture

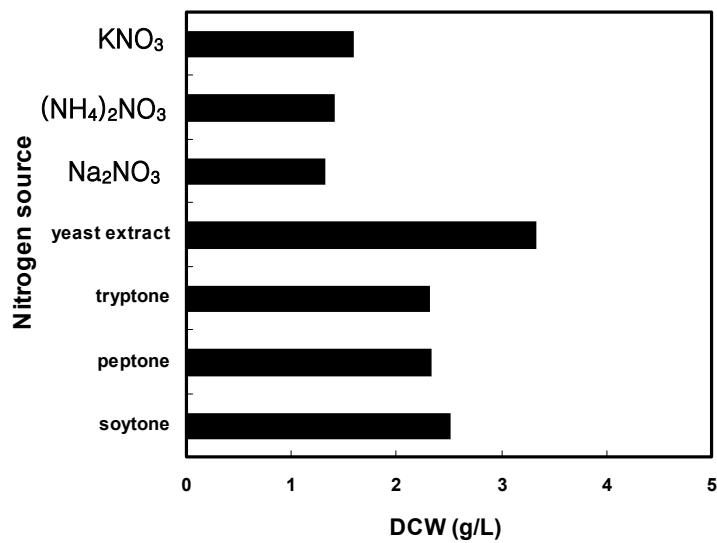


Figure 13. Effect of nitrogen sources on cell growth in flask culture

유기질소원인 yeast extract를 선택하였다.

다) 무기염류의 영향

Fig. 14에서는 균체 성장에 대한 무기염류의 영향을 검토한 결과이다. 담자균류의 배양에 주로 사용되어지는 무기염류인 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 농도변화와 조합을 통해 균체량을 검토한 결과 일반적인 담자균류와는 다르게 무기염류를 첨가하지 않았을 경우(control)에서 더 높은 균체량을 나타내었다. KH_2PO_4 0.5 g/L에서와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L에서는 다른 성분들과 비교했을 때 다소 높은 결과를 나타내었지만 control과 비교했을 경우에는 다소 떨어지는 균체량을 나타내었기 때문에 균체 성장에 대해 무기염류의 영향은 좋지 않은 것으로 판단되어졌다.

라) C/N ratio의 영향

탄소원과 질소원의 비율, 즉 C/N ratio는 균체의 성장에 중요한 영향을 주기 때문에 Fig. 15과 Fig 15-1에서는 glucose 농도를 10 ~ 100 g/L까지 변화를 주었고, yeast extract 농도는 1 ~ 30 g/L까지 변화를 주어 균체량을 검토하였다. YMK medium(Table 2)을 이용한 배양에서 균체량은 약 4 g/L인데 비해 glucose 30 g/L와 yeast extract 20 g/L에서는 2배 이상인 약 9 g/L를 나타내었다. 따라서 최적의 비율은 glucose 30 g/L, yeast extract 20 g/L 즉, C/N ratio 1.5에서 최대 균체량을 나타내었다.

마) 최적배지에서의 경시변화

Fig. 16에서는 지금까지 검토되어졌던 최적 성장조건과 최적 배지조성에서의 균체량, pH, 잔존당을 검토한 결과이다. 균체량의 경우를 살펴보면 배양 10일째 약 9 g/L로 최대 균체량을 보였고, pH는 5.8부터 시작해서 3.5~4.0을 계속 유

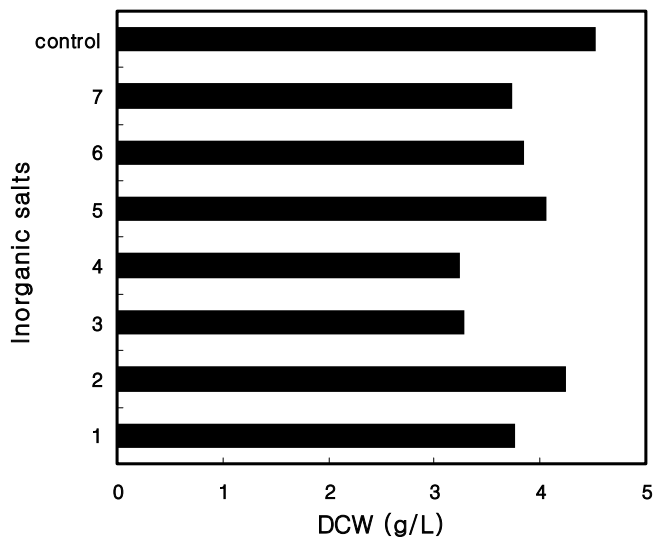


Figure 14. Effect of inorganic salts on cell growth in flask culture

(1: KH_2PO_4 1 g/L, 2: KH_2PO_4 0.5 g/L, 3: K_2HPO_4 1 g/L, 4: K_2HPO_4 0.3 g/L, 5: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, 6: KH_2PO_4 1 g/L + K_2HPO_4 0.3 g/L + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, 7: KH_2PO_4 1 g/L + K_2HPO_4 0.3 g/L + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, **control**: none)

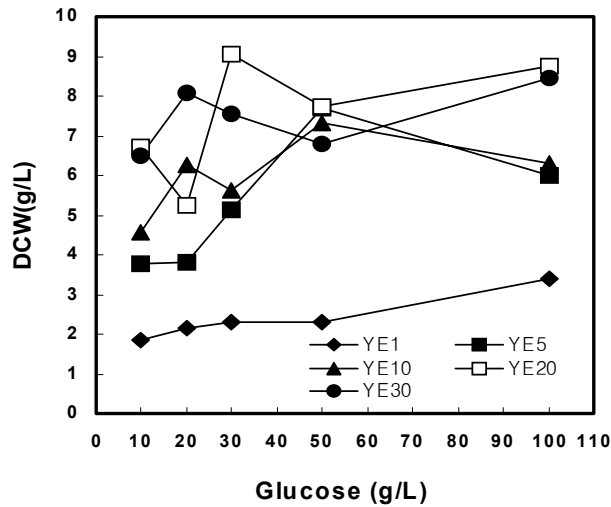


Figure 15. Effect of various glucose and yeast extract concentrations on the cell growth in flask culture. The legend indicates the concentration of yeast extract (g/L).

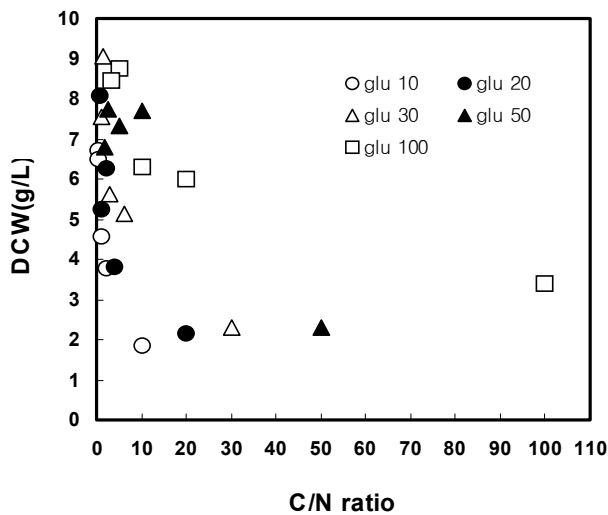


Figure 15-1. Effect of C/N ratio on the cell growth in flask culture. The legend indicates the concentration of glucose (g/L).

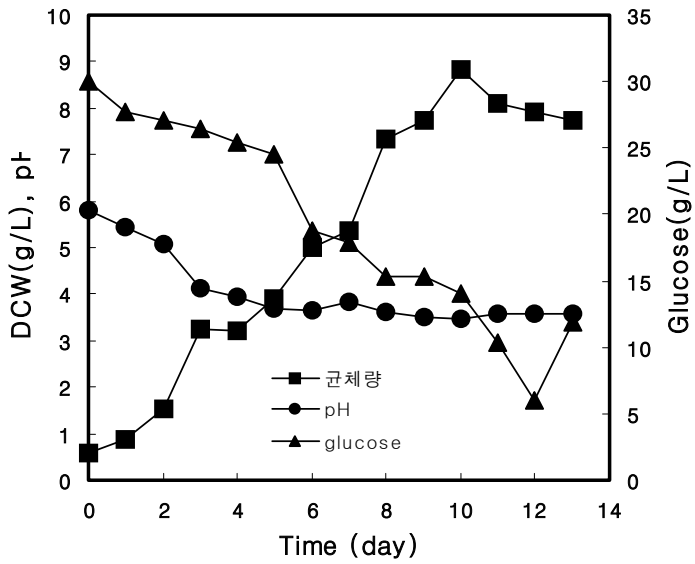


Figure 16. Profiles of cell growth, pH and glucose at 24 °C and 200 rpm in modified medium

지되는 것을 관찰할 수 있었다. 잔존당의 경우는 처음 glucose 30 g/L로 시작으로 해서 배양초기에는 천천히 감소하는 추세를 나타내다가 배양 5일째 이후부터 급속히 감소해 배양말기에는 약 10 g/L 정도까지 소모되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 다른 담자균류 버섯들에 비해 탄소원의 소모속도와 소모량 모두 떨어지는 것을 알 수 있었다. 탄소원의 빠른 소비속도와 균체의 성장속도는 비례하는 것으로 추측되어지나, 다당체 생산의 경우는 배지내에 어느 정도의 탄소원이 유지될 때 더 효과적이라는 보고(73)가 있는데 이는 탄소원이 고갈되면 균체 내부로부터 다당체를 분해해서 탄소원으로 사용할 수 있는 효소를 분비해 다당체를 에너지원으로 이용하기 때문에 다당체의 생산에 저해를 일으킨다고 판단되어진다.

지금까지 표고버섯의 균사 액체배양의 최적 성장조건과 최적 배지조성을 검토하였다. 이 결과는 본 실험의 목적인 표고버섯으로부터 생산되어지는 탄수화물 가수분해 효소의 활성을 높이기 위한 기초자료로 활용되었다. 따라서 이후 실험은 가수분해효소의 활성 및 생산을 높이기 위한 배지조성 검토가 이루어졌다.

나. 액체배양공정 개발

1) 복합효소 생산수율 촉진 및 저해요인 검토

가) 기본배지성분의 영향

Fig. 17은 가수분해효소 생산을 위한 탄소원의 영향 검토에 앞서 modified medium을 이용하여 최적 조건으로 배양한 결과이다. Agar plate의 계대배양에 의해 균주의 활성이 좋아져 균체량은 배양 8.5일째 약 18 g/L의 높은 균체량을 얻을 수 있었다. 가수분해효소의 활성은 β -glucosidase의 경우 배양 8.5일째 7.8 U/mL로 최대치를 나타내었고, β -glucuronidase와 β -galactosidase의 경우는 배양 9일째 각각 0.037 U/mL, 0.028 U/mL로 최대치를 나타내었다. 그러나 본 실험에

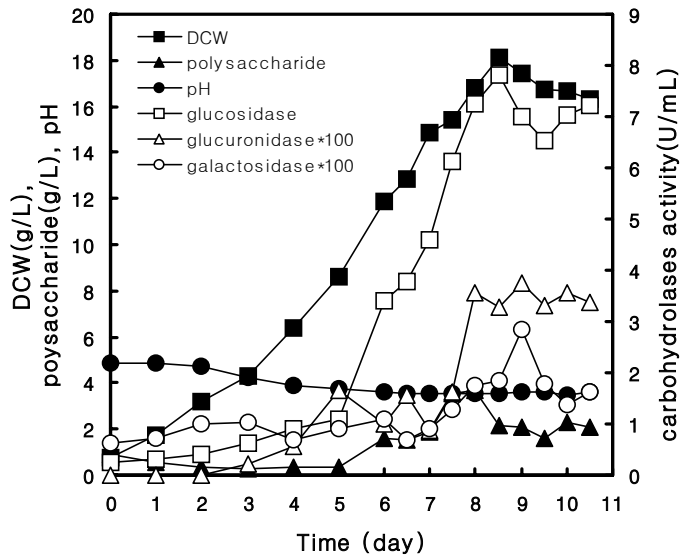


Figure 17. Profiles of cell growth, pH, polysaccharide and carbohydrases activity at 24 °C and 200 rpm in modified medium

서 목표로 하는 가수분해효소의 활성에는 너무 떨어지는 수치이기 때문에 먼저 탄소원의 영향에 대해 검토하였다. Fig. 18는 기본적인 탄소원으로써 단당류에는 glucose, fructose, galactose, mannose, 이당류에는 maltose, lactose, sucrose, 다당류에는 starch를 사용하여 각각 1%(w/v)를 첨가하였으며 이 때 질소원은 yeast extract 1%(w/v)로 고정시켜 배양 8일째 검토한 결과이다. 균체량을 살펴 보면 sucrose와 control을 제외하고는 나머지 탄소원에서는 큰 차이가 없지만, 가수분해효소의 활성을 보면 β -glucosidase는 mannose와 maltose에서 다른 탄소원보다 다소 높은 효과를 나타내었고, β -glucuronidase와 β -galactosidase는 거의 차이가 나타나지 않았다. 균체량과 가수분해효소의 활성을 같이 검토할 때 maltose, mannose, starch가 나머지 탄소원 보다 나아 보이지만 균체 성장이 비교적 좋은 glucose와 비교했을 때 그리 큰 차이가 아니기때문에 경제성을 고려해서 가수분해 효소생산을 위한 기본 탄소원으로는 glucose를 선택하였다. Fig. 19과 Fig. 20은 유기질소원과 무기질소원의 영향을 검토한 결과이다. 먼저 Fig. 19에서 탄소원은 glucose 1%(w/v)로 고정시킨 후 유기질소원들을 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 배양 8일째 검토한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 yeast extract에서 균체량, 가수분해효소의 활성 모두 나머지 유기질소원에 비해 높은 결과를 나타내었다. Fig. 20에서도 Fig. 19와 같은 방법으로 무기질소원에 대한 영향을 검토한 결과 control에 비해서 균체량은 KNO_3 에서 약간 높은 결과를 나타내었고, 가수분해 효소의 활성에서는 NH_4Cl 이 control과 비슷한 수치를 나타내었지만 유기질소원들과 절대 수치로 비교하였을 경우 무기질소원에서의 균체량, 가수분해효소의 활성 두가지 모두 매우 저조한 결과를 나타내어 질소원으로는 yeast extract가 가장 적당하다고 판단되어졌다. Fig. 21은 무기염류에 대한 영향을 살펴본 결과이다. Fig. 14에서 이미 균체량에 대한 영향을 검토한 결과 좋은 효과를 나타내지 않았던 것과 같이 가수분해효소의 활성도 무기염류의 첨가에 의해 향상되는 효과는 보이지 않았다. 다만 control보다 약간 떨어지는 결과를 나타내었으나 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 는 추후에 다시 검토되어야 한다고 판단되어졌다.

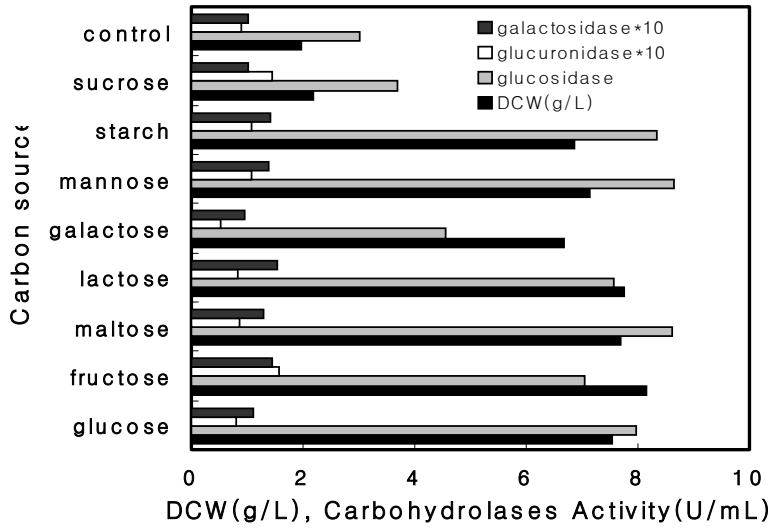


Figure 18. Effect of carbon sources on carbohydrolases activity in flask culture

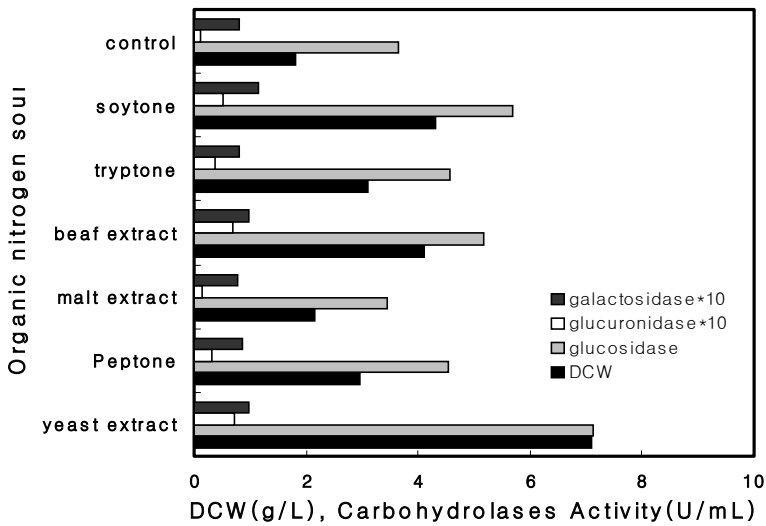


Figure 19. Effect of organic nitrogen sources on carbohydrolases activity in flask culture

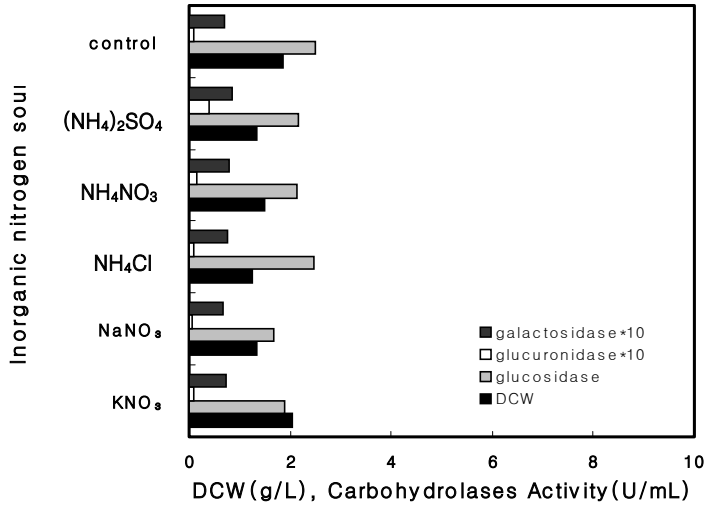


Figure 20. Effect of inorganic nitrogen sources on carbohydrases activity in flask culture

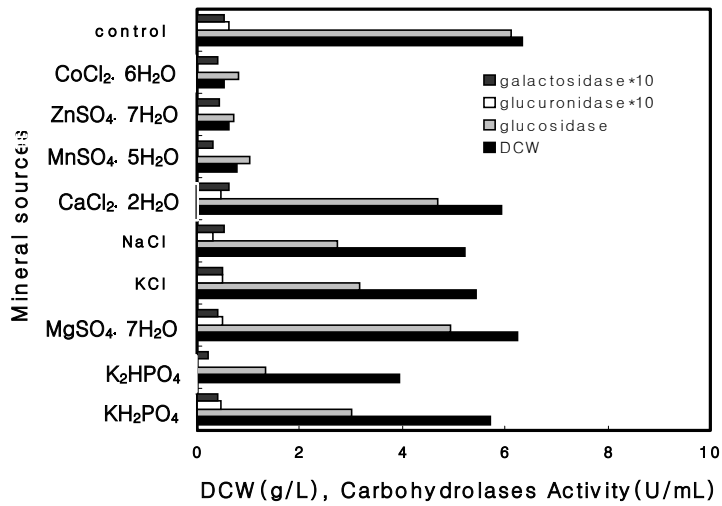


Figure 21. Effect of mineral sources on carbohydrases activity in flask culture

나) 응용배지성분의 영향

앞 절에서 기본 배지성분들이 가수분해효소의 활성화에 미치는 영향을 검토하였으나 여전히 가수분해효소의 활성화는 낮은 수준이었다. 따라서 기본 배지성분들에서 검토되어지지 않았던 성분들중 cellobiose, CMC(carboxymethyl cellulose), cellulose 등 polymer 위주의 탄소원을 검토해 보았다. Fig. 22는 탄소원으로 cellobiose를 농도별로 변화를 주고 질소원은 yeast extract 1 %(w/v)로 고정시킨 후 검토한 결과이다. Cellobiose 4 %(w/v)에서 β -glucosidase의 활성이 약 17.2 U/mL로 지금까지의 결과중 최대치를 나타내었다. 그러나 cellobiose가 고가인데다가 배지에 첨가되어지는 양 또한 4 %(w/v)의 많은 양이어서 경제성을 고려할 때 배지성분으로 사용하기가 곤란하였다. Cellobiose나 CMC를 β -glucosidase의 inducer로써 사용되었다는 보고(49)가 있어 CMC를 농도별 변화를 주고 질소원은 역시 yeast extract를 1 %(w/v)로 고정하여 가수분해효소의 활성을 검토하였다(Fig. 23). 그러나 보고와는 상이한 결과로 균체 성장 및 가수분해효소의 활성 모두 기본 배지성분에서보다 더 낮은 수준의 결과를 나타내었다. Woodward 등(59)은 glucose가 배지내에 존재할 경우 β -glucosidase의 생산을 저해하였고, fructose와 cellobiose 역시 β -glucosidase의 생산에는 효과적이지 못하였으나 탄소원으로 cellulose를 사용했을 때 가장 좋은 효과를 나타내었다고 보고하였다. 한편 Grajek(15)은 β -glucosidase를 생산할 때 탄소원으로 wheat bran과 sugar-beet pulp를 사용했을 때 가장 효과적이었으며, β -glucosidase의 생산에 있어 가장 중요한 요인은 탄소원과 배지내의 pH라고 하였다. 또 Chen 등(18)은 β -glucosidase의 생산을 자극하는 인자로 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} 이 있고, 저해인자로는 Ag^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , SDS, *p*-chloromercuribenzoate가 있다고 보고하였다. 그러나 Patchett 등(20)은 β -glucosidase의 생산에 있어서 활성인자로 I^- , EDTA, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol가 있고, 저해인자로는 Chen 등(18)이 보고한 것과 유사한 Ag^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} 등 대체적으로 중금속 이온들에 의해 β -glucosidase의 생산이 저해되어진다고 하였다. 이 밖에 β -glucosidase의 생산에 있어 배지성분이나 배양 조건 등 여러 가

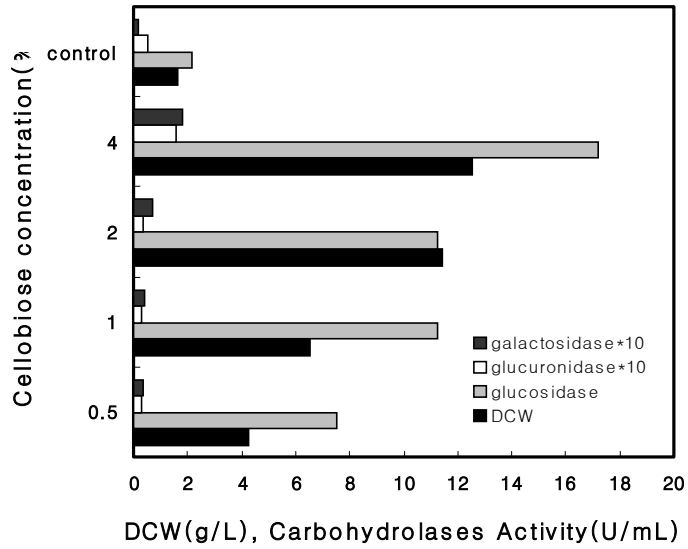


Figure 22. Effect of cellobiose concentration on carbohydrases activity in flask culture

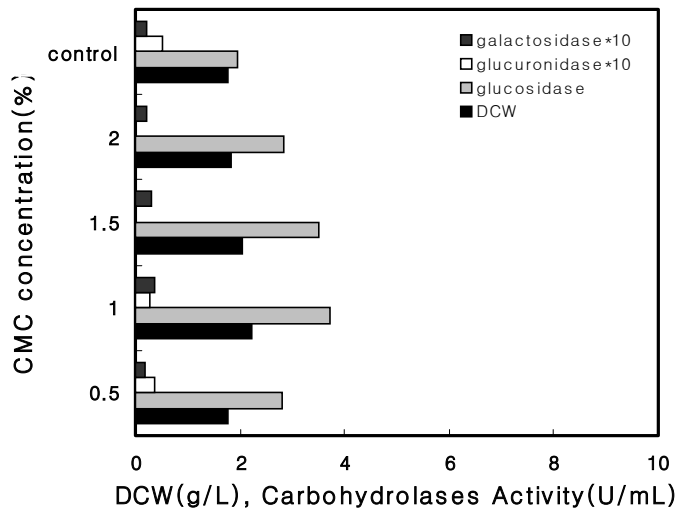


Figure 23. Effect of CMC concentration on carbohydrases activity in flask culture

지 요인들에 의해 생산성이 향상된다는 보고들이 있다.(49,80,81,84) Fig. 24와 Fig. 25는 Fig. 18에서 검토되어진 탄소원 중에서 비교적 좋은 효과를 보인 starch와 lactose의 농도를 변화시키면서 질소원은 yeast extract 1 %(w/v)로 고정 시킨 후 가수분해효소의 활성을 검토한 결과이다. Fig. 24에서는 starch 2 %(w/v)에서 균체량과 β -glucosidase의 활성이 가장 높게 나타났고, β -glucuronidase와 β -galactosidase의 활성은 starch 0.5 %(w/v)에서 높게 나타났으나, 이 역시 가수분해효소의 활성들이 대체로 낮은 수준이었다. Fig. 25에서는 lactose의 농도별로 균체량에만 약간의 차이를 보였을 뿐 가수분해 효소의 활성들은 낮은 수치를 나타내었다. 특히 lactose를 사용하였을 때 β -galactosidase의 생산성이 향상된다는 보고(82,83)와는 달리 본 실험에서는 β -galactosidase의 활성에 효과를 나타내지 못했다. Fig. 26은 cellulose를 탄소원으로 사용하였을 경우 β -glucosidase의 활성에 효과적이라는 보고들(49,59,80,81,84)을 토대로 cellulose를 농도별로 변화를 주고 질소원은 yeast extract 1 %(w/v)로 고정시킨 후 가수분해효소의 활성을 검토한 결과이다. Fig. 27에서 보는 바와 같이 cellulose 1 %(w/v)의 농도에서 균체량은 지금까지 탄소원으로 사용되어졌던 것과 별 차이가 없지만, 가수분해 효소의 활성 면에서 보면 cellobiose 4 %(w/v)에서 보다 β -glucosidase의 경우는 2배 이상인 34.1 U/mL을 나타내었고 β -glucuronidase와 β -galactosidase의 경우에서도 각각 약 3배 정도 높은 0.42 U/mL과 0.69 U/mL의 수준을 각각 나타내었다. 이로써 본 실험에서 목적하는 수준의 가수분해효소의 활성에 도달하였다는 판단하에 최종 가수분해효소의 생산을 위한 탄소원으로는 cellulose 1 %(w/v)를 선택하였다. Fig. 27에서는 탄소원인 cellulose를 1 %(w/v)로 고정시킨 후 yeast extract를 농도별로 변화를 주어 검토한 결과이다. Yeast extract 역시 cellulose와 같이 1 %(w/v)에서 가수분해효소의 활성이 최대치를 나타내어 최종 가수분해효소의 생산을 위한 질소원으로 yeast extract 1 %(w/v)를 선택하였다. Fig. 28에서는 mineral source의 영향을 살펴보았다. Mineral source의 종류는 기본배지 성분의 영향 검토시 추후 검토되어질 성분들인 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 를 농도 0.05 % ~ 0.5 %(w/v)의 범위에서 각각 변화를 주어 가수분해 효소의 활성

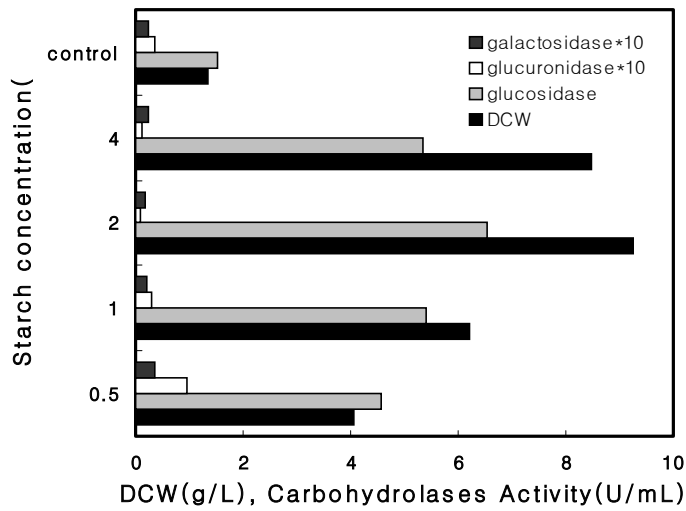


Figure 24. Effect of starch concentration on carbohydrolases activity in flask culture

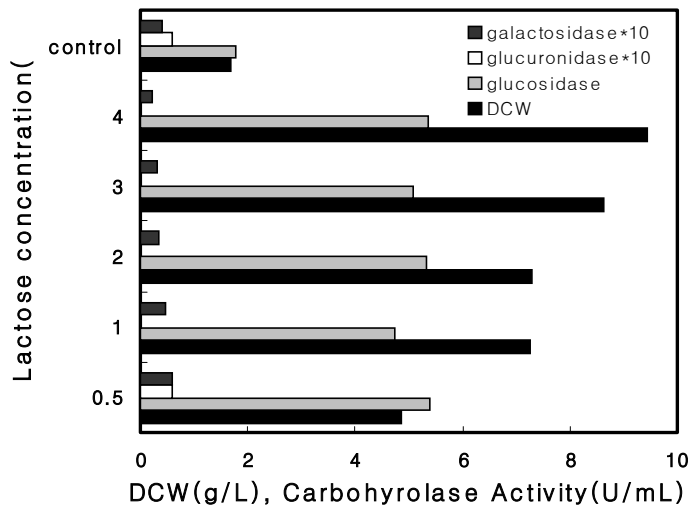


Figure 25. Effect of lactose concentration on carbohydrolases activity in flask culture

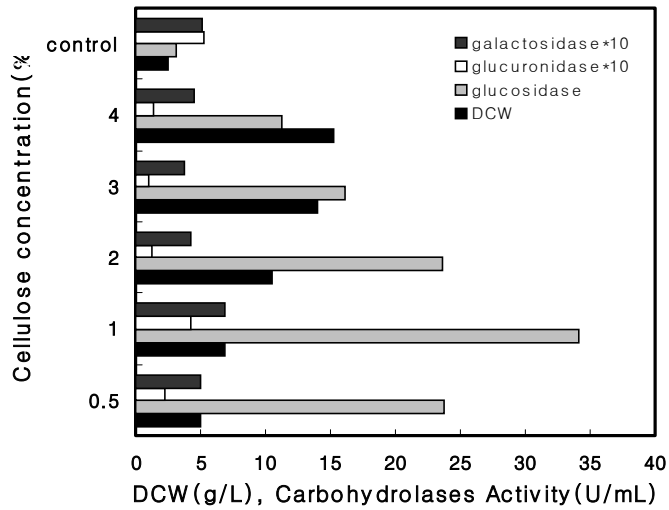


Figure 26. Effect of cellulose concentration on carbohydrases activity in flask culture

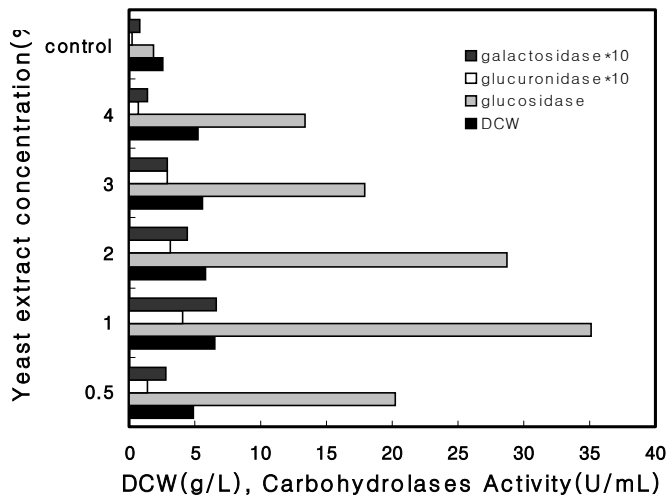


Figure 27. Effect of yeast extract concentration on carbohydrases activity in flask culture

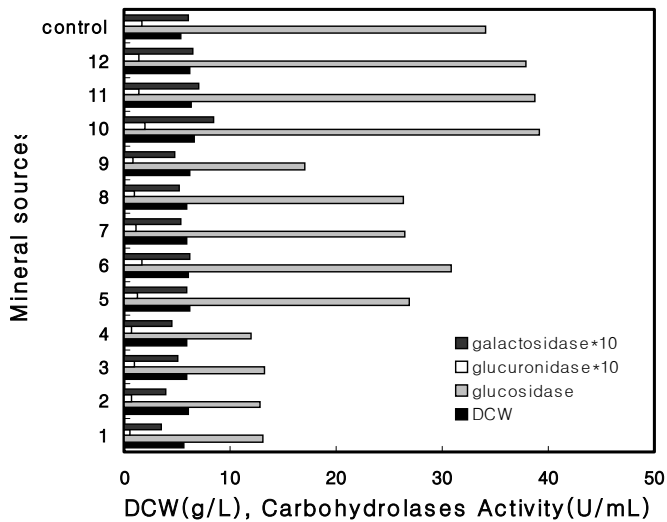


Figure 28. Effect of mineral sources on carbohydrases activity in flask culture

(1: KH_2PO_4 0.05 %, 2: KH_2PO_4 0.1 %, 3: KH_2PO_4 0.3 %, 4: KH_2PO_4 0.5 %, 5: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, 6: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %, 7: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 %, 8: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %, 9: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, 10: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, 11: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 %, 12: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %, control: none)

을 검토하였다. 이 때 탄소원으로는 cellulose 1 %(w/v), 질소원으로는 yeast extract 1 %(w/v)으로 하였다. 그 결과 기본배지 성분에서의 mineral의 영향과는 달리 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %(w/v)에서 control에 비해 균체량과 가수분해효소의 활성 모두 조금씩 향상된 결과를 나타내었다. 따라서 가수분해효소 생산을 위한 최종 배지성분은 탄소원으로 cellulose 1 %(w/v), 질소원으로는 yeast extract 1 %(w/v), mineral source로서는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %(w/v)로 결정하였다.

다) 최적 배지성분에서의 경시변화

Fig. 29는 플라스크배양에서 최적 배지성분을 이용하여 가수분해효소의 활성을 검토한 결과이다. 균체량은 배양 5일째까지 급격히 상승해 약 8 g/L에 도달한 후 배양말기까지 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다. pH는 5.5에서 시작해 배양 5일째 약 pH 3.3까지 떨어지다가 배양말기에 pH 6까지 상승하는 경향을 나타내었으며, polysaccharide는 배양기간동안 거의 바닥에 가까운 수준을 나타내었다. 가수분해효소의 활성을 살펴보면 모두 배양 10일째 최대치를 나타내었는데 β -glucosidase는 43.5 U/mL, β -glucuronidase는 0.33 U/mL, β -galactosidase는 0.8 U/mL의 활성을 각각 나타내었다. 배양 10일째 이후에 β -glucosidase는 활성이 떨어지는 경향을 나타내었으며, β -glucuronidase와 β -galactosidase의 경우 비록 낮은 수준이나 활성이 유지되는 경향을 보여 가수분해효소 생산에 있어서 플라스크배양에서는 10일까지 배양하는 것이 최적임을 알 수 있었다.

2) 복합효소 추출물 대량생산공정 개발

가) pH의 영향

Fig. 30은 배양 초기 pH에 의한 영향을 검토한 결과이다. pH 4일때 β

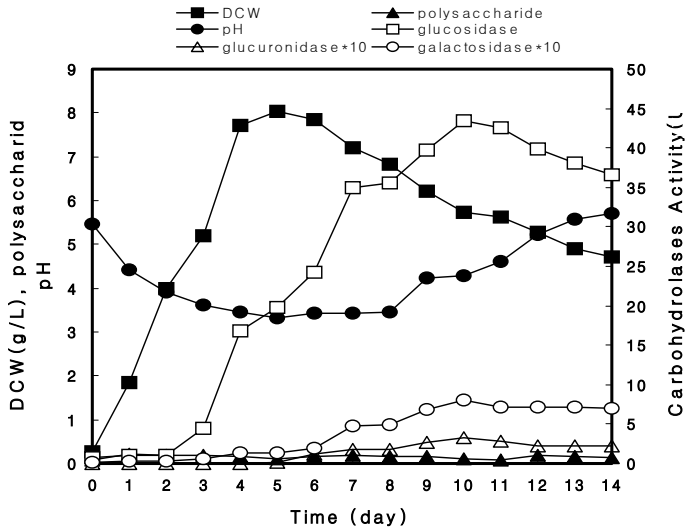


Figure 29. Profiles of cell growth, pH, polysaccharide and carbohydrate activity at 24 °C and 200 rpm with optimum medium in flask culture

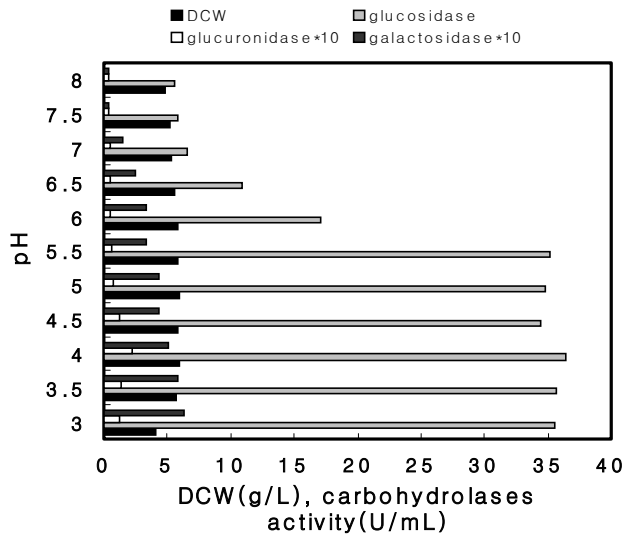


Figure 30. Effect of initial pH on carbohydrate activity in flask culture

-glucosidase와 β -glucuronidase가 다른 조건에 비해 조금 높은 결과를 나타내었고 β -galactosidase의 경우는 pH 3일때 다른 조건에서보다 높은 결과를 나타내었다. 여기서 가수분해효소의 활성들은 산성 영역이 알칼리성 영역에서보다 더 높은 활성을 나타냄을 알 수 있는데 이는 표고버섯의 균사체 액체배양에서 배양액의 pH 역시 약산성에서 잘 자라기 때문이라고 판단되어진다.

나) 온도에 의한 영향

Fig. 31은 배양온도에 따른 가수분해효소의 활성을 검토한 결과이다. 배양 온도 24 °C에서 세 가지 효소의 활성이 모두 최대치를 나타내었으나 온도에 의한 영향 역시 pH에 의한 영향과 마찬가지로 가수분해효소의 생산에 큰 영향을 미치지 않는았다. 따라서 가수분해효소의 활성에는 배지성분 중 탄소원의 영향이 가장 크게 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다.

3) 복합효소 추출물 안정화 기술 개발

가) 최적 반응온도 및 pH 검토

Fig. 32과 Fig. 33은 가수분해효소의 최적 온도와 최적 pH를 검토한 결과이다. 먼저 Fig. 32에서는 최적 온도를 검토하였는데 β -glucosidase와 β -glucuronidase는 60°C에서 최대 활성을 나타내었고, β -galactosidase는 50°C에서 최대 활성을 나타내었다. Fig. 33에서는 최적 pH를 검토하였는데 β -glucosidase와 β -glucuronidase는 pH 4에서 최대 활성을 나타내었고, β -galactosidase는 pH 3에서 최대 활성을 나타내었다. 본 균주로부터 생산되어지는 가수분해효소의 특성은 다른 미생물로부터 생산되어지는 가수분해효소의 특성과 약간의 차이를 나타내고 있음을 Table 1에서 확인할 수 있었다. 또 같은 종의 균주라 하더라도 생산되어지는 가수분해효소의 특성은 다를 수 있다는 것 또한 알 수 있었다.

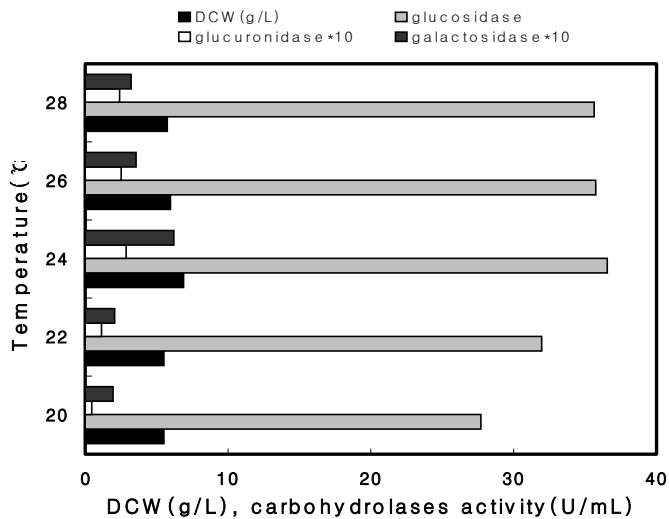


Figure 31. Effect of culture temperature on carbohydrases activity in flask culture

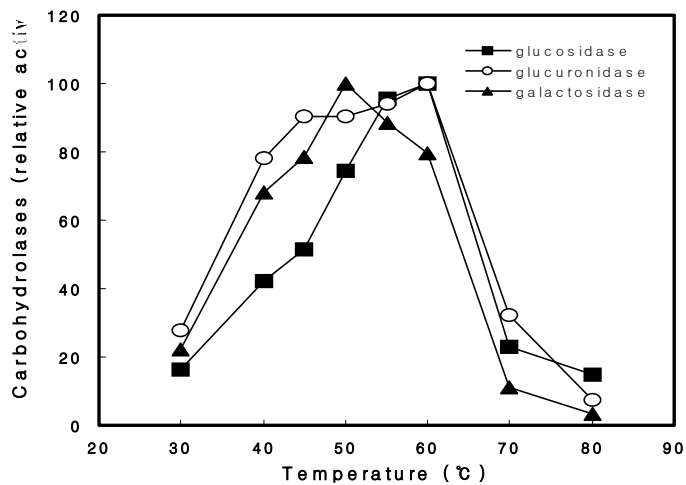


Figure 32. Optimum temperature of carbohydrases

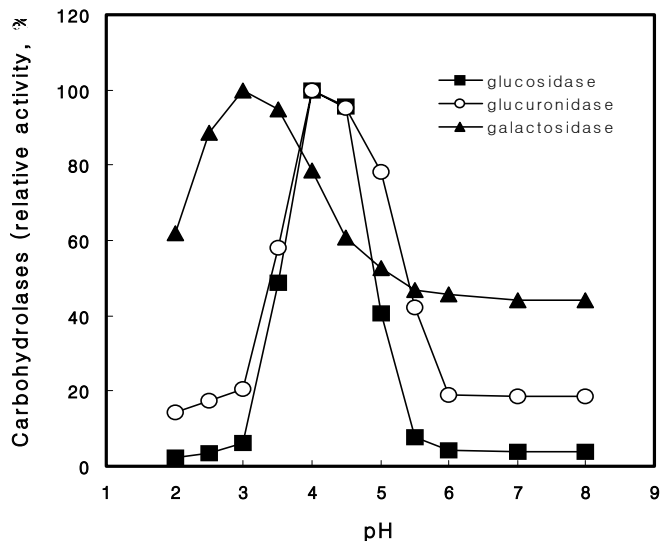


Figure 33. Optimum pH of carbohydrases

나) 열 안정성 및 pH 안정성 검토

Fig. 34과 Fig. 35는 가수분해효소에 대한 열 안정성 및 pH 안정성에 대해 검토한 결과이다. Fig. 34은 각각의 온도에서 1시간동안 방치한 후 가수분해효소의 활성을 검토한 결과인데 β -glucosidase의 경우 45 °C까지는 매우 안정하였으며 60 °C까지 어느 정도 안정성이 유지되다가 60 °C이상부터는 급격히 활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. β -glucuronidase와 β -galactosidase의 경우 45 °C까지는 매우 안정하였으며 50 °C까지 활성이 어느 정도 유지되다가 그 이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소하는 결과를 나타내었다. Fig. 35에서는 pH 안정성을 검토하기 위해 각각의 pH에서 4 °C로 overnight시킨 결과이다. β -glucosidase의 경우 pH 4~4.5의 좁은 영역에서 안정성을 보였고, β -glucuronidase의 경우 pH 3~4.5의 영역에서 안정성을 나타내었으며, β -galactosidase의 경우는 강산성 쪽인 pH 2~3.5의 영역에서 안정성을 나타내었다. 이 결과들로부터 본 실험에서 사용한 표고버섯 균주로부터 생산되어지는 가수분해효소의 특성은 열에 어느 정도 안정한 편이며, pH는 주로 약산성 영역에서 안정하다는 사실을 알 수 있었다.

다. 액체배양공정 최적화 기술 개발

1) 고농도 배양공정 개발

회분배양에서의 배양조건은 5 L 생물반응기(Ko Biotech Co., KF-5L)에서 working volume을 3 L로 하여 배양온도 24 °C, 교반속도 200 rpm, 통기량 1 vvm으로 하여 배양하였으며, 배지는 optimum medium(Table 5)으로 하여 배양을 실시하였다. Fig. 36에서는 배양 8일째 약 6.1 g/L로 최대 균체량을 나타내었으며, 가수분해효소의 활성은 배양 10일째 β -glucosidase 40.54 U/mL, β

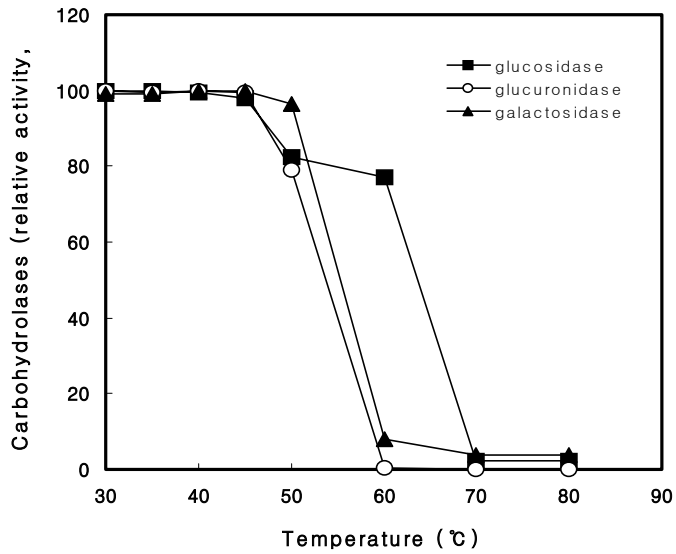


Figure 34. Thermostability of carbohydrases

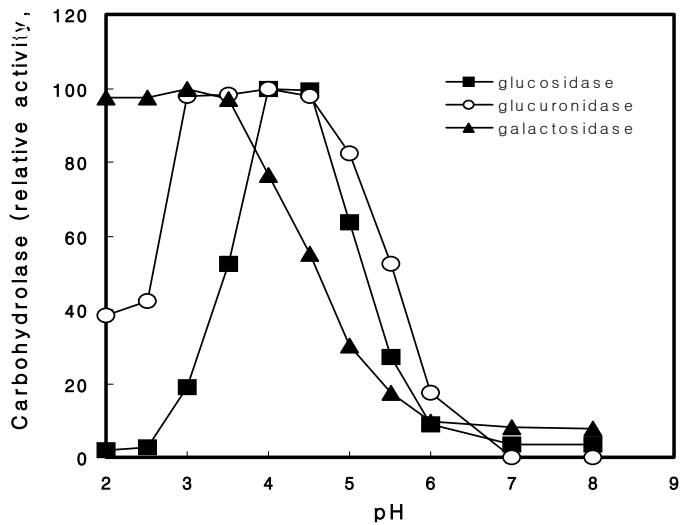


Figure 35. pH stability of carbohydrases

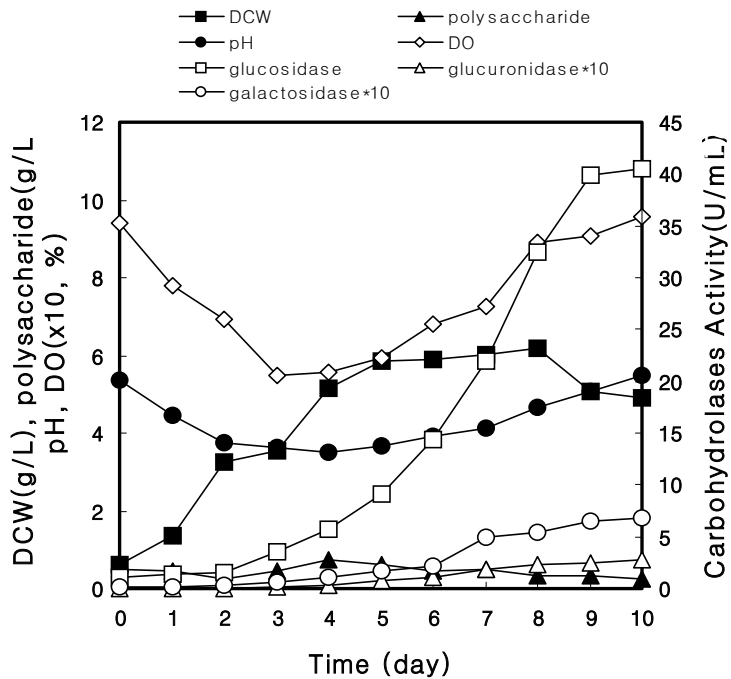


Figure 36. Profiles of cell growth, pH, DO, polysaccharide and carbohydrases activity at 24 °C and 200 rpm in bioreactor with optimum medium

-glucuronidase 0.28 U/mL, β -galactosidase 0.68 U/mL로 최대치를 나타내었다. 플라스크배양(Fig. 29)에서의 결과와 비교해보면 균체량이나 가수분해효소의 활성 모두 비슷한 수치를 나타내고 있으나, 균체량의 경우 플라스크배양에서는 배양 4일째까지 급격히 증가하는 반면에 생물반응기에서는 배양 5일째까지 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 가수분해효소의 경우 β -glucosidase의 활성은 균체량과 비슷한 경향을 나타내었고 β -glucuronidase와 β -galactosidase의 활성은 플라스크배양과 생물반응기에서의 배양 모두 배양 7일째 소폭 상승하여 유지되는 모습을 나타내었다.

2) 복합효소 생산성 최대화

Fig. 37에서는 회분배양의 배양조건으로 배양을 진행하다가 배양 4일째와 5일째 glucose (5 g/L) 100mL을 pulse feeding한 결과이다. 기본 회분배양(Fig. 36)에서와 비교했을 때 균체량을 살펴보면 약 2.5 g/L정도의 증가된 결과를 나타내었고, 가수분해효소 활성의 경우 β -glucosidase는 약 5 U/mL, β -glucuronidase는 약 0.1 U/mL, β -galactosidase는 약 0.2 U/mL정도 증가된 결과를 나타내었다. Fig. 38은 회분배양조건으로 배양을 진행하다가 배양 4일째와 5일째 cellulose (5 g/L) 100mL을 pulse feeding한 결과이다. 균체량에서 보면 Fig. 36과 Fig. 37에서보다 소폭 증가했지만, 가수분해효소의 활성에서 보면 특히 β -glucosidase의 경우 약 20 U/mL이 감소하는 결과를 나타내었다. 따라서 기본 회분배양에서보다 배양도중 저농도 (5 g/L)의 glucose를 feeding해 주는 것이 균체량과 가수분해효소의 활성 면에서 모두 유리하다는 판단을 하였다.

3) 생산성 극대화를 위한 생산공정 최적화

기본 회분배양에서 배양 중 glucose를 feeding 했을 경우에 가수분해효소의 활성이 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이 결과를 토대로 배양 10일째 rice bran을 feeding 하여 30 °C에서 12시간 반응을 시켰을 경우 생산성 극대화 및 생산공

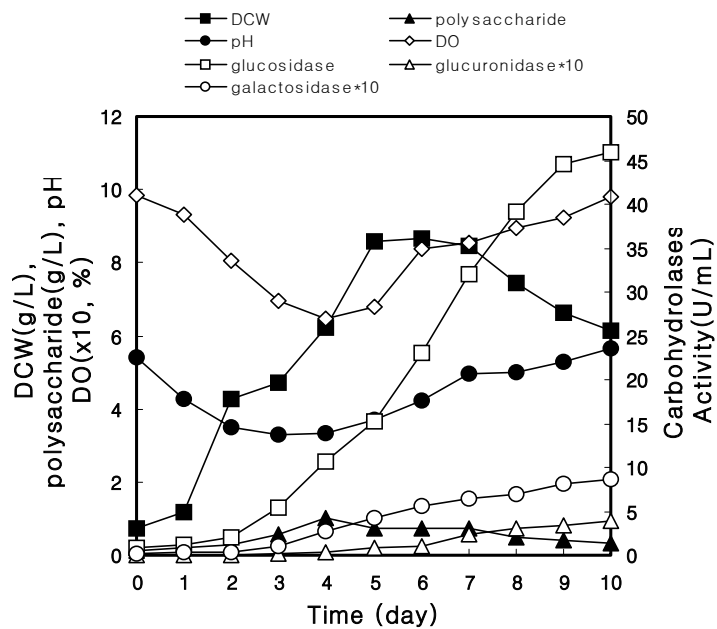


Figure 37. Profiles of cell growth, pH, DO, polysaccharide and carbohydrases activity at 24 °C and 200 rpm in bioreactor with optimum medium(adding 100mL glucose 5 g/L)

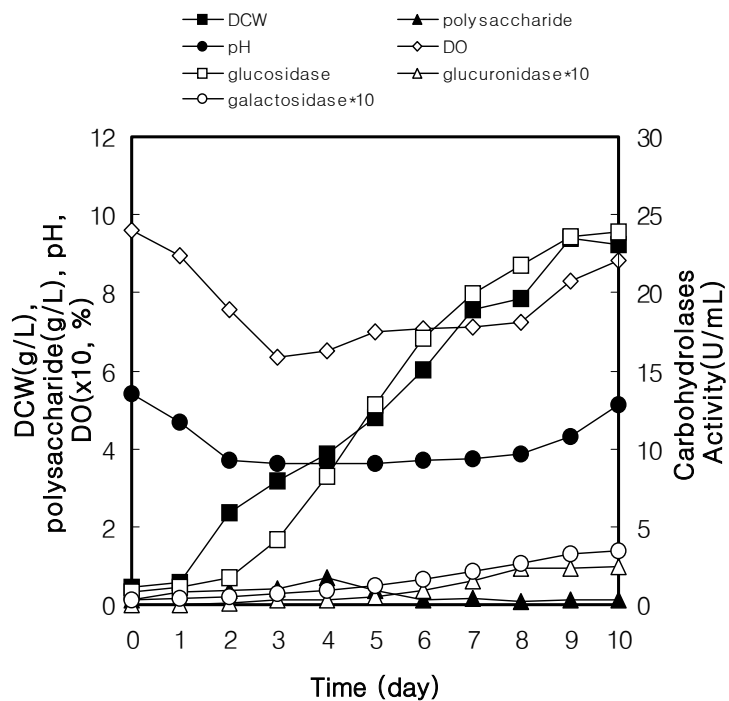
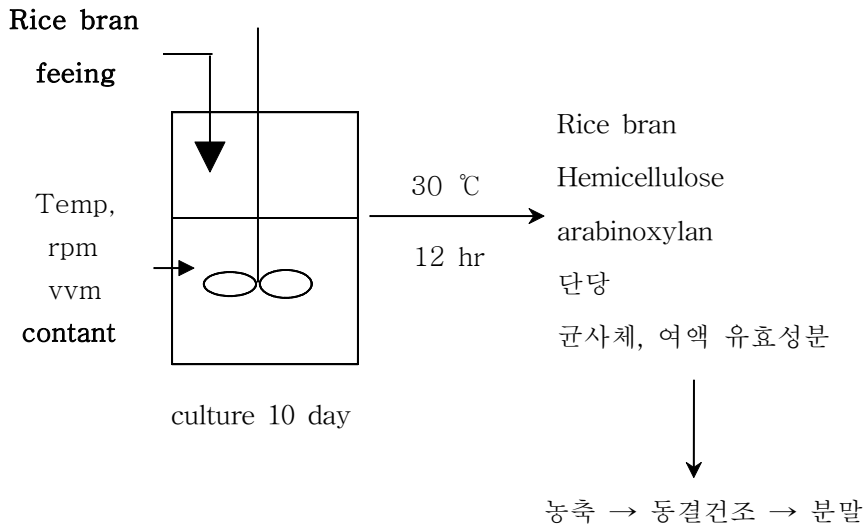


Figure 38. Profiles of cell growth, pH, DO, polysaccharide and carbohydrases activity at 24 °C and 200 rpm in bioreactor with optimum medium(adding 100mL cellulose 5 g/L)

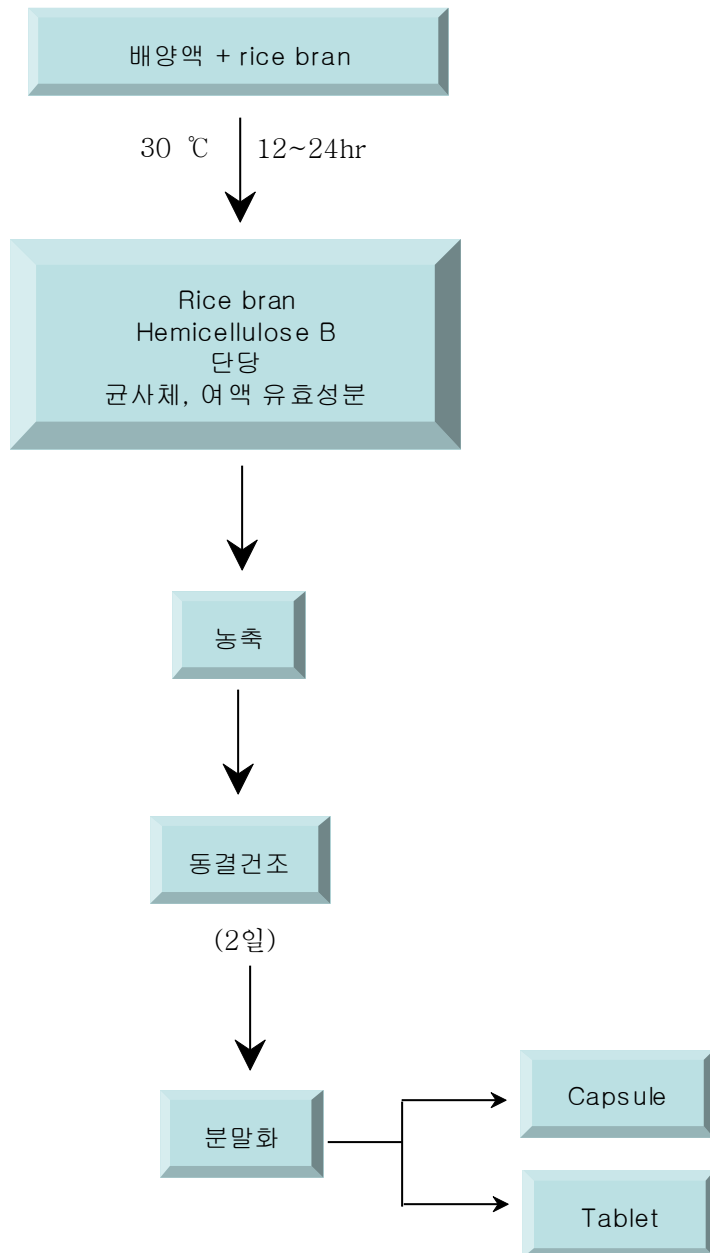
정을 최적화하였다. 이를 모식도를 통해 나타내었다.



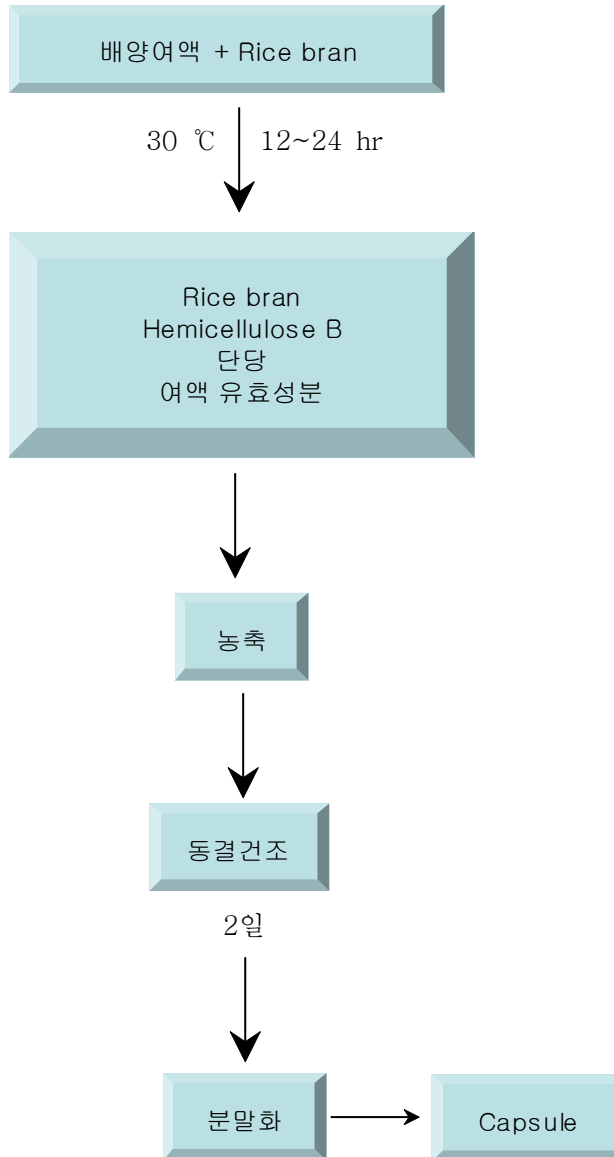
라. 가공기술 개발

본 연구에서는 가공제품 개발 유형을 크게 4가지로 나누었다. 먼저 첫 번째 (Type 1)로 배양액에 rice bran을 첨가하여 30 °C에서 12~24 hr 동안 반응을 거쳐 생성물(rice bran, hemicellulose B, 단당, 균사체, 여액 유효성분)을 농축하였다. 그 후 동결건조 과정을 거쳐 최종 분말화를 하여 capsule이나 tablet 등과 같은 제품으로 생산할 수 있다. Type 2에서는 균사체가 제거된 배양액과 rice bran을 첨가하여 30 °C에서 12~24 hr 동안 반응을 거쳐 생성물(rice bran, hemicellulose B, 단당, 여액 유효성분)을 농축하였다. 그 후 동결건조 과정을 거쳐 최종 분말화를 하여 capsule 형태의 제품으로 생산이 가능하였고, Type 3에서는 균사체가 제거된 배양액과 hemicellulose B를 첨가하여 30 °C에서 72 hr

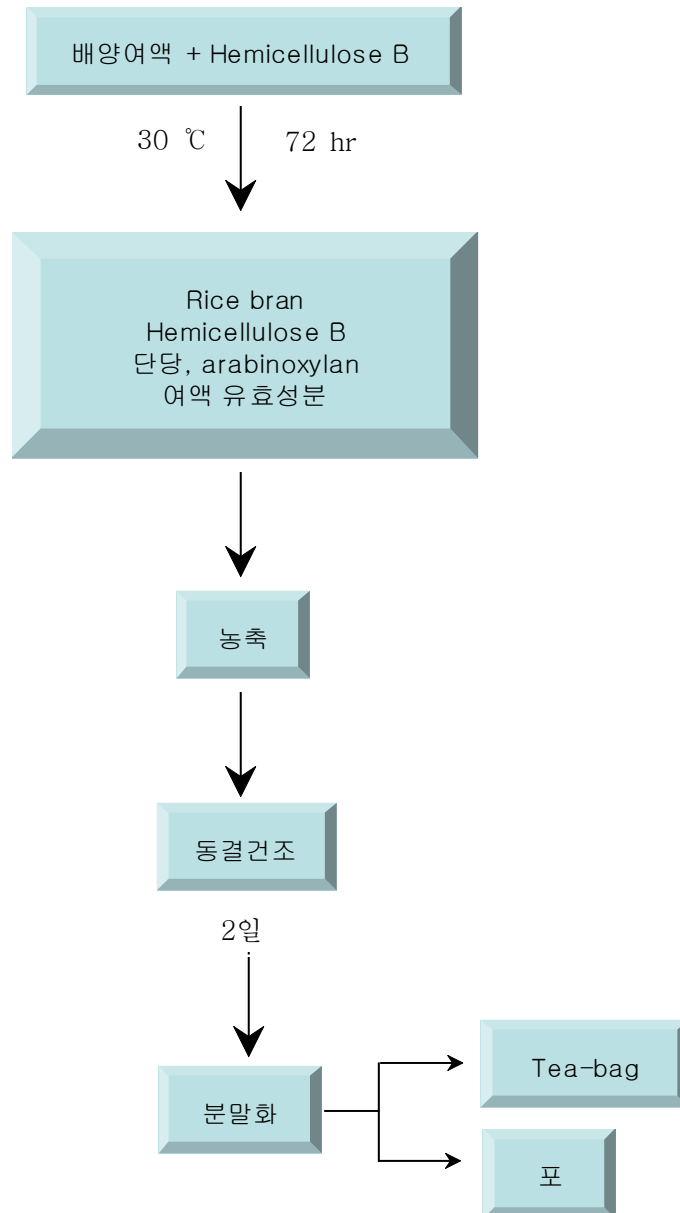
가공기술 Type 1



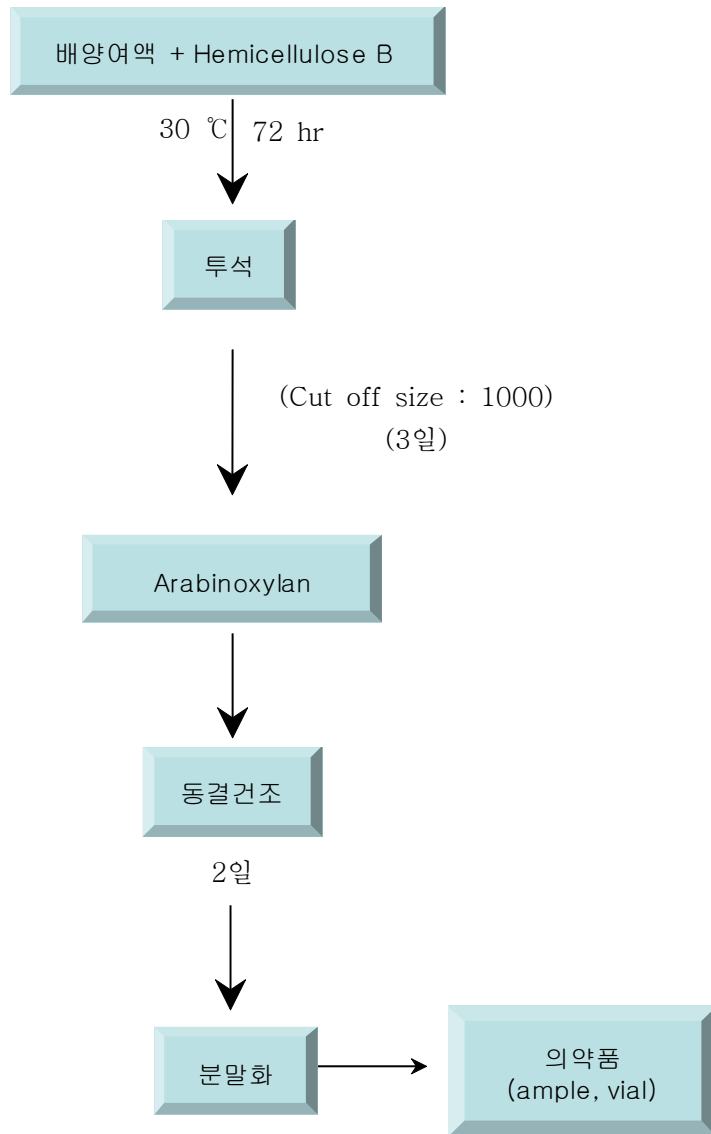
가공기술 Type 2



가공기술 Type 3



가공기술 Type 4



동안 반응을 거쳐 생성물(hemicellulose B, 단당, arabinoxylan, 여액 유효성분)을 농축하였다. 그 후 동결건조 과정을 거쳐 최종 분말화를 하여 tea-bag이나 포 등으로 제품화가 가능하였다. 마지막인 Type 4는 균사체가 제거된 배양여액과 hemicellulose B를 첨가하여 30 ℃에서 72 hr 동안 반응을 거치고 난후 cut off size가 1,000인 membrane을 사용하여 투석을 한 후 생성물인 arabinoxylan을 동결건조하여 분말화 하였다. 이는 의약품중 ampule이나 vial등으로 이용되어질 것으로 판단되어졌다. 이중 경제적이고 효율적인 가공방법은 Type 1, 2로써 분리정제에서의 비용이 저렴하기 때문이고, 고부가가치의 면에서보면 Type 4의 가공기술이 유리하다고 판단되어졌다.

4. 결 론

본 연구는 아라비녹실란 생산에 필요한 미강으로부터 헤미셀룰로즈 B를 추출하는 것과 탄수화물 가수분해효소의 생산성 향상을 위해 *Lentinus edodes*의 액체배양 공정개발을 위해 진행되었다.

탄수화물 가수분해효소의 생산을 위해 먼저 *Lentinus edodes*의 액체배양에서 균체 성장을 위한 최적 조건은 배양온도 24 °C, 교반속도 200rpm, 접종량 10%, working volume 100 mL, 초기 pH 5.5에서 효과적이었다. 최적 배지조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 20g/L이었다. 최대 균체량은 배양 10일째 9 g/L이었으나, 지속되는 agar plate의 계대배양을 통해 균주의 활성이 개선되어 최대 균체량은 배양 8.5일째 약 18 g/L까지 상승되는 결과를 나타내었다.

플라스크 배양에서 가수분해효소 생산을 위한 배지조성을 검토한 결과 기본적으로 사용되어지는 탄소원에서 가수분해효소의 활성이 미약하여 polymer 위주의 탄소원을 검토한 결과 cellulose 1 %(w/v)를 탄소원으로 사용했을 때 가수분해효소의 활성에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 질소원으로는 yeast extract 1 % (w/v)에서 가장 좋은 활성을 나타내었고, 무기염류로는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %(w/v)에서 좋은 활성을 보였다. 따라서 최적 배지조성은 cellulose 1 %(w/v), yeast extract 1 % (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %(w/v)으로 하였다. 이때 배양 10일째 β -glucosidase 43.5 U/mL, β -glucuronidase 0.33 U/mL, 그리고 β -galactosidase 0.8 U/mL의 효소활성을 나타내었다.

생물 반응기를 이용한 응용 회분배양에서는 optimum medium으로 배양중 4일, 5일째 glucose (5 g/L) 100mL을 pulse feeding한 결과 기본 회분배양(Fig. 36)에서와 비교했을 때 균체량을 살펴보면 약 2.5 g/L정도의 증가된 결과를 나타내었고, 가수분해효소 활성의 경우 β -glucosidase는 약 5 U/mL, β -glucuronidase는 약 0.1 U/mL, β -galactosidase는 약 0.2 U/mL정도 증가된 결과를 나타내었다.

기본 회분배양에서 배양 중 glucose를 feeding 했을 경우에 가수분해효소의 활성이 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이 결과를 토대로 배양 10일째 rice bran

을 feeding 하여 30 °C에서 12시간 반응을 시켰을 경우 생산성 극대화 및 생산공정을 최적화하였다. 또한 4가지 유형의 가공기술을 개발하여 기능성식품이나 건강보조식품의 원료로서의 활용이 기대된다.

제 2절 생리활성물질 분리정제공정 개발

1. 서 론

최근에 미강(쌀겨), 보리, 밀 등과 같은 벼과 식물의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로오스의 주성분이고 분자량이 3000 ~ 5000 KD 정도인 아라비녹실란(arabinoxylan)은 항암, 혈당 및 혈압강하, 면역체계강화, 소화기능 등을 증진시키는 탁월한 효능을 보이고 있어 많은 관심을 불러일으키고 있다.

아라비녹실란은 면역계에서 매우 중요한 역할을 하는 NK(natural killer)세포를 활성화시켜 암치료에 있어서 화학요법 및 호르몬 요법에 대한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있으며 AIDS 치료에 있어서 잠재적 가치가 있다고 보고되고 있다. 크실로즈(xylose)를 주쇄로하여 측쇄에 아라비노즈(arabinose)를 갖는 아라비녹실란은 면역부진에 기인한 질병환자가 증가하는 요즘 면역력을 강화시키는 물질로서 새로운 식물소재의 가치가 대단히 크다. 또한 저분자의 신소재 식이섬유로서 아라비녹실란은 소화기관에서의 흡수력이 매우 우수하여 면역강화 증대는 물론 지질대사 개선, 당질대사 개선 및 식이성 유래물질 독성저지 등의 작용을 가지고 있어 많은 관심이 집중되고 있다. 따라서 일본 및 미국을 비롯한 여러 선진국에서 항암 및 면역강화 등 인체에 탁월한 효능을 지닌 아라비녹실란을 제품화하고자 분리정제기술을 개발하고 있다. 그러나 국내에서는 아라비녹실란의 분리정제기술 및 생산기술 개발에 대한 연구가 거의 전무한 실정으로 이에 대한 연구개발이 절실히 요구되고 있다.

벼과식물의 세포벽을 구성하고 있는 재료 중의 하나가 헤미셀룰로오스이며, 헤미셀룰로오스의 주성분이 생리활성물질인 아라비녹실란이다. 헤미셀룰로오스는 몇종류의 단당류로 구성되는 헤테로글리칸으로 매우 복잡한 구조를 가진 물질이며, 이들 중에서 면역조정물질로 주목되는 것이 쌀겨의 헤미셀룰로오스 B의 아라비녹실란이다. 쌀겨의 헤미셀룰로오스 B는 본 연구의 목적산물인 생리활성물질인 아라비녹실란의 전구체로서 고도로 분지된 복잡한 당조성을 가지고 있으며,

주된 구성당은 아라비노오즈, 크실로오즈이며 그 외에도 람노오즈, 갈락토오즈, 만노오즈, 글루코오즈, 우론산, 등이 포함되어 있다고 알려져 있다.

일반적으로 생물학적으로 유용한 생리물질들은 그 추출수율이 매우 낮은 경우가 많고 다양한 불순물과 함께 혼합되어 있으며, 분리·정제 공정에 있어서 추출용매, pH, 완충용액, 충전 물질, 염 등의 다양하고도 많은 변수들에 따라 추출물의 분리정도 및 회수율이 크게 달라진다. 또한, 기존의 분리·정제방법으로 사용되고 있는 용매추출 및 크로마토그래피법은 유기용매의 유독성에 따른 식품의 적용 부적절성, 환경 오염 문제 발생, 분리 매체로 외부로부터 공급되는 용리액의 사용에 따른 후농축 공정의 필요성으로 인하여 산업화에 있어서 많은 문제점이 발생된다. 때문에 생리활성물질을 고순도로 대량으로 생산하기 위해서는 분리·정제기술에 대한 연구는 필수적이라 사료되며, 실제 제품생산에 있어서 생산단가에 분리정제 비용이 높은 비중을 차지하고 있으므로 제품의 시장경쟁성을 확보하기 위해서는 이 분야에 대한 연구가 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 항암, 인체면역기능 향상에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질인 아라비녹실란을 벚과식물 중 면역조절물질로 특히 주목이 되는 싹겨에서 추출하고, 기존의 분리·정제기술에 있어서의 문제점을 극복하기 위한 새로운 분리·정제공정 기술을 개발하고자 하였다.

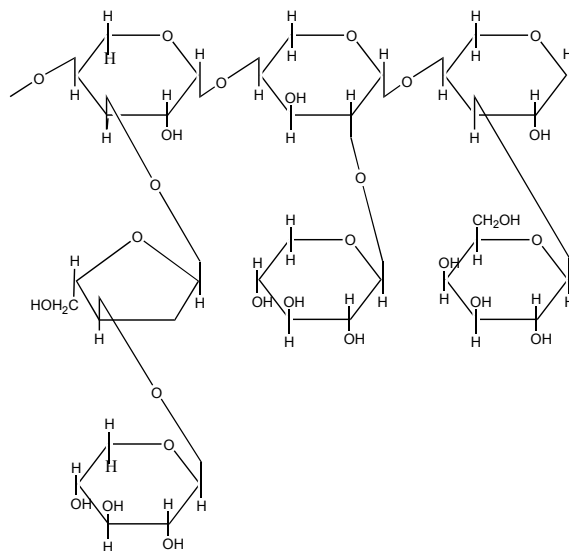


Figure 1. Structure of hemicellulose B

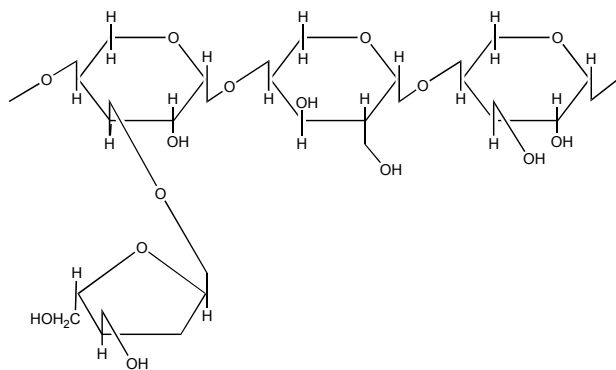


Figure 2. Structure of arabinoxylan

2. 재료 및 방법

가. 미강으로부터 헤미셀룰로오스 B의 분리·정제

벼과식물의 세포벽을 구성하고 있는 재료 중의 하나가 헤미셀룰로오스이며, 헤미셀룰로오스의 주성분이 생리활성물질인 아라비녹실란이다. 헤미셀룰로오스는 몇종류의 단당류로 구성되는 헤테로글리칸으로 매우 복잡한 구조를 가진 물질이며, 이들 중에서 면역조절물질로 주목되는 것이 쌀겨의 헤미셀룰로오스 B의 아라비녹실란이다. 헤미셀룰로오스 B와 아라비녹실란의 구조는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 쌀겨의 헤미셀룰로오스 B는 본 연구의 목적산물인 생리활성물질인 아라비녹실란의 전구체로서 고도로 분지된 복잡한 당조성을 가지고 있으며, 주된 구성당은 아라비노오스, 크실로오스이며 그 외에도 램노오스, 갈락토오스, 만노오스, 글루코오스, 우론산, 글루크론산 등이 포함되어 있다고 알려져 있다. 일반적으로 쌀겨 100g당 3-5mg 정도 포함되어 있으며 물에 녹는 성질을 가지고 있다. 아라비녹실란을 얻기 위한 전구체인 헤미셀룰로오스 B를 쌀겨로부터 Fig. 3에 도식화된 방법으로 분리·정제하였다.

나. 헤미셀룰로오스 B의 정량·정성적 특성 분석

1) 헤미셀룰로오스 B의 구조적 특성

- ^{13}C -NMR 스펙트럼은 대체로 자일로스의 ^{13}C -NMR 스펙트럼과 비슷하며 이는 헤미셀룰로오스 B를 구성하는 주 구성성분이 자일로스이기 때문이다. Fig. 5에서 제시한 헤미셀룰로오스 B의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 나타나는 99.8, 73.5, 72.8, 71.7, 69.5ppm에 해당하는 피크신호는 각각 헤미셀룰로오스 B의 주쇄를 구

성하는 자일로즈의 C-1, C-4, C-3, C-2, C-5에 해당하는 피크이며, 107.7, 84.5, 81.2, 76.9, 60.6에 해당하는 피크신호는 헤미셀룰로즈 B의 측쇄 중에서 가장 많은 성분으로 구성된 아라비노오즈의 C-1, C-4, C-3, C-2, C-5에 해당된다. 또한 57.5에 해당하는 피크신호는 주쇄인 자일로즈의 측쇄에 붙어있는 우론산의 4-O-methoxyl 그룹의 C-6에 해당하는 피크이다.

2) 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 단당류의 결합구조 분석

- FT-IR 스펙트럼을 측정하여 이들을 구성하는 단당류의 결합구조를 분석하였으며, 이를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 897cm^{-1} 파수대에 뾰족한 피크를 볼 수 있는데, 이는 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 여러 단당류들 사이의 β -glucosidic linkages에 해당하는 피크이다. 이는 헤미셀룰로즈 B의 주쇄를 구성하고 있는 자일로즈의 β 형태의 결합을 하고 있음을 나타내며, 일반적인 헤미셀룰로즈 B의 결합구조와 상동한다. 또한 전형적인 헤미셀룰로즈에서 나타나는 1030cm^{-1} , 1370cm^{-1} 파수대의 피크가 나타나는 걸로 봐서 본 연구에서 싹겨로부터 분리·정제한 물질이 헤미셀룰로즈 B임을 재차 확인할 수 있었다.

3) 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 구성당 분석

- 미강으로부터 추출되어진 헤미셀룰로즈와 가수분해 효소처리를 통해 생산된 arabinoxylan의 구성당 분석을 위해서 먼저 산 가수분해를 통한 전처리를 하였다. 전처리 과정은 2M TFA(Trifluoroacetic acid)로 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간동안 가수분해를 거친후 동결건조를 통해 산을 제거한 powder 시료를 알맞게 희석하여 HPLC를 사용해서 다음과 같은 조건에서 분석하였다.

Column : carbosep column CHO-682

Detector : Refractive Index detector(16*)(shodex RI-71)

Mobile phase : DI water

Running temperature : 90 °C

Flow rate : 0.4 mL/min

Injection volume : 20 µL

4) Glucuronic acid 정량 (Carbazole assay)

재료

A : Dissolve sodium tetra decahydrate (0.8g) + 10 mL water +
add 90 mL of ice-cold 98% H₂SO₄

B : Dissolve 100 mg of carbazole in 100 mL of absolute ethanol

방법

1. Preparation of samples, standards, and controls(250µl)
2. Add ice- cold reagent A (1.5ml) with mixing and cooling in the ice-bath
3. Heat the mixtures at 100 °C for 10 min
4. Add 50 µl of reagent B and mix well
5. Re-heat at 100 °C for 15 min
6. Determined the absorbance at 525 nm

5) 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 주쇄 결합구조 분석

헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 주쇄를 이루고 있는 polymer의 결합형태가 α 결합인지, β 결합인지 확인하기 위하여 Fungi-Fluor Kit(Polysciences, Inc., USA)를 사용해 α 또는 β 결합인지를 구별하였다. Kit의 사용방법은 먼저 Slide에 sample을 올려놓고 dry oven(or air dried)에 약 5분간 건조시켰다. 그리고 5분 후 메탄올을 첨가시키고 약 20분간 건조시킨 다음 solution A를 몇 방울 떨어뜨리고 약 3분간 염색시킨 후 증류수로 가볍게 washing후 UV table에서 형광유, 무를 확인하여 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 주쇄 결합형태를 확인하였

다. 또한 육안으로 확인하기 위하여 solution B를 몇 방울 떨어뜨리고 약 1분간 염색시킨 후 증류수로 가볍게 washing후 형광 유, 무를 재확인 하였다.

▶ Solution A : 0.05 % disodium salt of 4-4'-bis[4-anilino-6-bis-(2-hydroxyethyl) amino-triazin-2-ylamino]-2,2'-stilbenedisulfonic acid in deionized H₂O with KOH

▶ Solution B : counter-staining solution

6) 아라비녹실란의 반응시간대별 구성당 분석

미강으로부터 추출되어진 헤미셀룰로즈 B와 표고버섯 배양여액을 시간대별로 반응시켜 반응시간에 따른 구성당의 변화를 HPLC로 확인하였다. 먼저 헤미셀룰로즈 B와 배양여액을 3시간, 6시간, 12시간, 24시간동안 각각 30 °C에서 반응시킨 후 membrane(MWCO : 1000)을 이용하여 분해 된 잔당들을 제거한 후 동결건조한 후 이를 산 가수분해하여 시간대별 구성당 변화를 확인하였다.

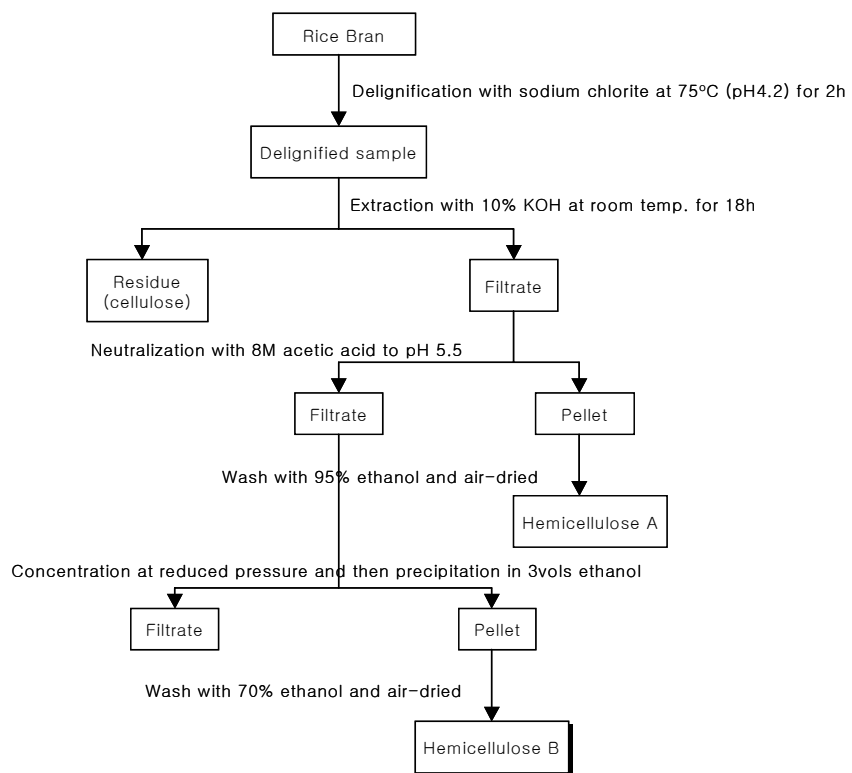


Figure 3. Extraction procedure of hemicellulose B from rice bran

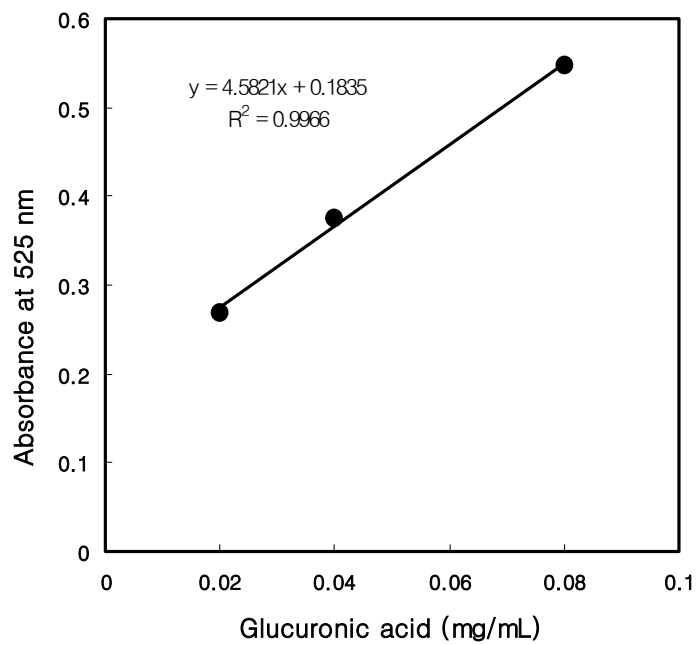


Figure 4. Standard curve of glucuronic acid

3. 결과 및 고찰

가. 생리활성물질 분리정제기술 개발

1) 복합효소 처리에 의한 목적산물 분리정제기술 개발

먼저 정미소에서 구입한 쌀겨를 oven내에서 55℃에서 16시간 동안 건조시킨 후 사용하였다. 건조된 쌀겨를 NaClO₂이 1:25(w/v) 비율로 용해된 acetic solution(pH 4.2, 아세트산으로 적정)에 1:15(w/v)의 비율로 혼합한 후 75℃에서 2시간동안 교반시키면서 반응시킴으로써 각질을 분리하였다. 이 물질을 10%KOH용액과 1:20(v/v) 비율로 혼합하여 18시간동안 상온에서 교반시키면서 반응시킨 후 여과시켜 셀룰로즈가 제거되고 헤미셀룰로즈가 용해되어있는 여과액을 얻었다. 여과액을 아세트산(8M)을 이용하여 pH 5.0~5.5로 적정시킴으로써 헤미셀룰로즈 A를 침전시킨 후 이를 원심분리(8000 rpm, 12분, 10℃)하여 제거하였다. 헤미셀룰로즈 A가 제거된 용액을 95% ethanol(1:3(v/v))을 이용하여 재침전시키고, 이를 원심분리(8000 rpm, 12분, 10℃)하여 헤미셀룰로즈 B를 pellet상태로 얻은 후 이를 70%의 ethanol로써 세척시키고 건조기에서 40℃로 5시간 건조시킴으로써 powder상태의 헤미셀룰로즈 B를 얻었다. 쌀겨로부터 분리·정제된 헤미셀룰로즈 B의 수율은 대략 20%정도가 된다.

2) 추출물의 정량·정성적 특성 분석

가) 헤미셀룰로즈 B의 구조적 특성 분석

생리활성물질인 아라비녹실란을 얻기 위한 전구체인 헤미셀룰로즈 B의 구

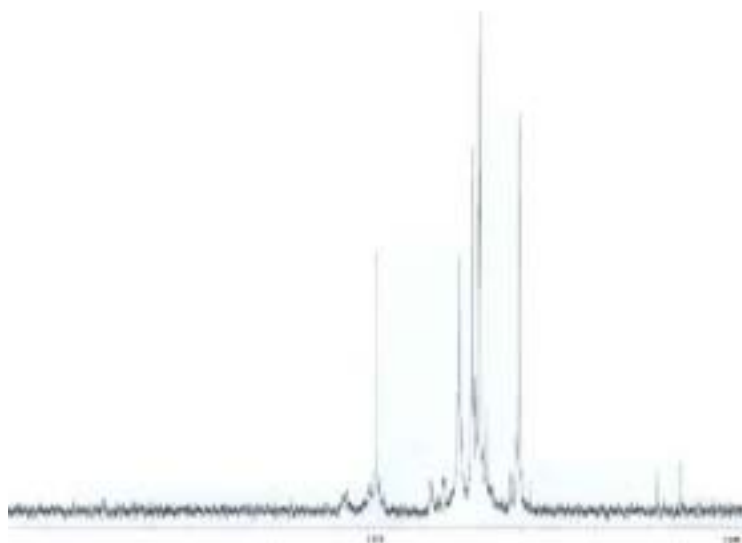


Figure 5. ¹³C-NMR spectrum of hemicellulose B

조적 특성을 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 측정하여 분석하였다. 이를 Fig. 5에 나타내었다. 일반적인 헤미셀룰로즈 B의 구조를 살펴보면, 주쇄 부분은 자일로즈로 구성되며 측쇄부분은 아라비노오즈, 글루코오즈, 갈락토오즈, 람노오즈, 우론산, 만노오즈으로 구성된다. 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 단당류 중 자일로즈와 아라비노오즈가 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 전체 단당류의 약 85%이상을 차지하며, 본 연구의 목적산물인 아라비녹실란은 이들 단당류로 구성된다고 알려져 있다.

헤미셀룰로즈 B의 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 대체로 자일로즈의 ^{13}C -NMR 스펙트럼과 비슷하며 이는 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 주 구성성분이 자일로즈이기 때문이다. Fig. 5에서 제시한 헤미셀룰로즈 B의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 나타나는 99.8, 73.5, 72.8, 71.7, 69.5ppm에 해당하는 피크신호는 각각 헤미셀룰로즈 B의 주쇄를 구성하는 자일로즈의 C-1, C-4, C-3, C-2, C-5에 해당하는 피크이며, 107.7, 84.5, 81.2, 76.9, 60.6에 해당하는 피크신호는 헤미셀룰로즈 B의 측쇄 중에서 가장 많은 성분으로 구성된 아라비노오즈의 C-1, C-4, C-3, C-2, C-5에 해당된다. 또한 57.5에 해당하는 피크신호는 주쇄인 자일로즈의 측쇄에 붙어있는 우론산의 4-O-methoxyl 그룹의 C-6에 해당하는 피크이다. 이를 통하여 본 연구에서 싼겨로부터 분리·정제한 물질이 헤미셀룰로즈 B임을 확인할 수 있었으며, 이를 구성하는 주성분이 본 연구의 목적산물인 아라비녹실란임을 또한 확인할 수 있었다. 또한 헤미셀룰로즈 B의 FT-IR 스펙트럼을 측정하여 이들을 구성하는 단당류의 결합구조를 분석하였으며, 이를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 897cm^{-1} 과수대에 뾰족한 피크를 볼 수 있는데, 이는 헤미셀룰로즈 B를 구성하는 여러 단당류들 사이의 β -glucosidic linkages에 해당하는 피크이다. 이는 헤미셀룰로즈 B의 주쇄를 구성하고 있는 자일로즈의 β 형태의 결합을 하고 있음을 나타내며, 일반적인 헤미셀룰로즈 B의 결합구조화 상동한다. 또한 전형적인 헤미셀룰로즈에서 나타나는 1030cm^{-1} , 1370cm^{-1} 과수대의 피크가 나타나는 걸로 봐서 본 연구에서 싼겨로부터 분리·정제한 물질이 헤미셀룰로즈 B임을 재차 확인할 수 있었다. 일반적으로 벵과식물로부터 헤미셀룰로즈를 분리하게 되면, 1510cm^{-1} , 1460cm^{-1} , 1420cm^{-1} , 1245cm^{-1} , 1150cm^{-1} 과수대에서 약한 피크들이 나타나는데 이는 헤미셀룰로즈의 리그닌에 해당하는 피크들이다. 그러나, 본 연구에서 분리된

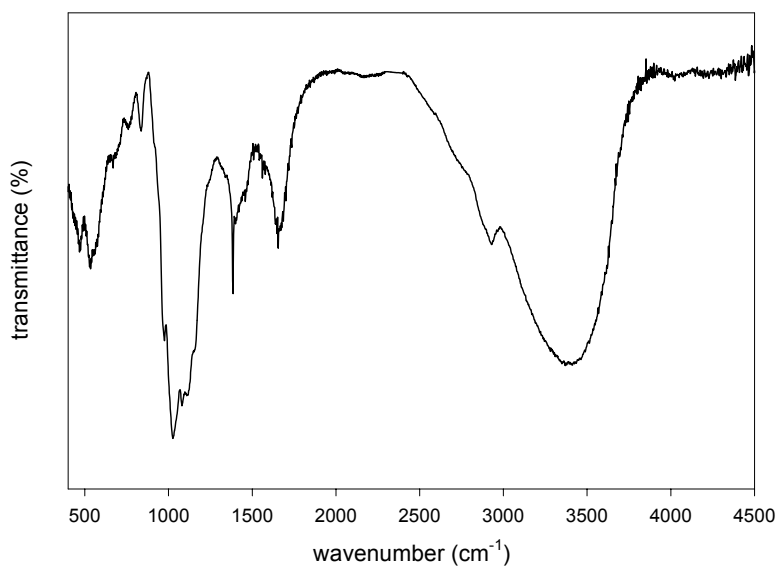


Figure 6. FT-IR spectrum of hemicellulose B

헤미셀룰로즈 B에서 이러한 약한 피크들이 거의 보이지 않은 것으로 봐서, 쌀겨로부터 리그닌의 제거가 잘 이루어졌음을 의미한다.

나) 헤미셀룰로즈 B의 단당 분석

본 연구의 목적산물인 아라비녹실란의 전구체로서 쌀겨로부터 분리된 헤미셀룰로즈 B는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 일반적으로 고도로 분지된 복잡한 당 조성을 가지고 있으며, 주된 구성당은 아라비노오즈, 자일로즈이며 그 외에도 램노오즈, 갈락토오즈, 만노오즈, 글루코오즈, 우론산(글루크론산) 등이 포함되어 있다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 Fig. 3 도식화된 방법을 토대로 쌀겨로부터 헤미셀룰로즈 B를 분리하여 그 구성단당들의 조성비를 검토하였으며, 이를 Table 1에 나타내었다. 실험은 헤미셀룰로즈 B를 가수분해시켜 실시하였으며,

분석결과를 살펴보면, 본 과제에서 쌀겨로부터 분리한 아라비녹실란의 전구체인 헤미셀룰로즈 B는 일반적으로 알려진 헤미셀룰로즈 B의 구성당인 아라비노오즈, 자일로즈, 램노오즈, 갈락토오즈, 만노오즈, 글루코오즈, 우론산(글루크론산) 중 램노오즈와 만노오즈를 제외한 아라비노오즈, 자일로즈, 갈락토오즈, 글루코오즈, 우론산으로 이루어져 있음을 알 수 있다. 위의 결과는 주쇄의 성분인 자일로즈의 함량이 측쇄 성분 중 하나인 글루코오즈에 비해 상당히 적음을 나타낸다. 이는 쌀겨로부터 헤미셀룰로즈 B를 분리할 때, 글루코오즈를 주성분으로 하는 셀룰로오즈의 제거가 완전히 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다. 따라서, Fig. 3에 나타내는 쌀겨로부터 헤미셀룰로즈 B 분리과정에서 셀룰로즈 제거를 위한 단계가 추가될 필요가 있다고 사료된다. 그러나, 각 구성성분을 살펴보면, 상대적으로 글루코오즈를 제외한 다른 당에 비해 아라비녹실란의 주 구성성분인 아라비노오즈와 자일로즈가 커다란 부분을 차지함을 알 수 있으며, 이 결과를 토대로 본 과제에서 쌀겨로부터 분리해낸 헤미셀룰로즈 B는 충분히 아라비녹실란을 얻기 위한 전구체로 사용 가능함을 알 수 있다.

Table 1. Compositional sugars of hemicellulose B

Sugars	Xylose	Arabinose	Glucose	Galactose	Glucuronic acid	mannose	Ara/Xyl ratio
Composition (%)	15.4	13.9	67.2	3.5	0	0	0.9

나. 생리활성물질 분리정제공정 개발

1) 아라비녹실란 분리정제공정 개발

가) 헤미셀룰로즈 B의 수율검토

Fig. 7은 헤미셀룰로즈 B의 분리정제공정 단계에서 중요하다고 판단되어지는 단계가 변화에 따라 헤미셀룰로즈 B의 수율이 어떻게 변화하는지를 검토한 결과이다. 먼저 첫 번째 변화를 준 곳은 10% acetic solution(pH 4.2) 75°C, 2hr 이 단계에서 65°C, 75°C, 85°C로 반응온도의 변화를 주어 수율을 검토하였다. 그다음 두 번째 변화는 hemicellulose B가 얻어지는 에탄올 침전단계이다. 에탄올의 volume을 2배, 3배, 4배로 변화를 주어 수율을 검토하였다.

먼저 65°C, 에탄올 volume 2배에서는 리그닌이 52.1%, 헤미셀룰로즈 A가 1.4%, 헤미셀룰로즈 B가 28.9%의 수율이 나왔다. 그리고 65°C, 에탄올 volume 3배에서는 리그닌, 헤미셀룰로즈 A는 변화가 없었고 헤미셀룰로즈 B가 38.5%가 나왔다. 또 65°C, 에탄올 volume 4배일 경우에는 마찬가지로 리그닌, 헤미셀룰로즈 A는 변화가 없었고 헤미셀룰로즈 B에서는 37.4%를 나타냈다. 결국 65°C, 에탄올 volume 3배에서 헤미셀룰로즈 B의 수율이 가장 높게 나타났다.

위와 같은 방법으로 75°C, 85°C에서 에탄올 volume의 변화를 주어 수율을 검토한 결과 에탄올 volume 3배에서 65°C에서와 마찬가지로 가장 높은 수율을 나타냈다. 위의 실험결과를 토대로 첫 번째 반응온도에서는 65°C에서, 두 번째 에탄올 volume의 변화에서는 3배가 가장 높은 수율을 나타냈다.

나) 아라비녹실란 분리·정제공정

항암, 인체면역기능 향상에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질인 아라비녹실

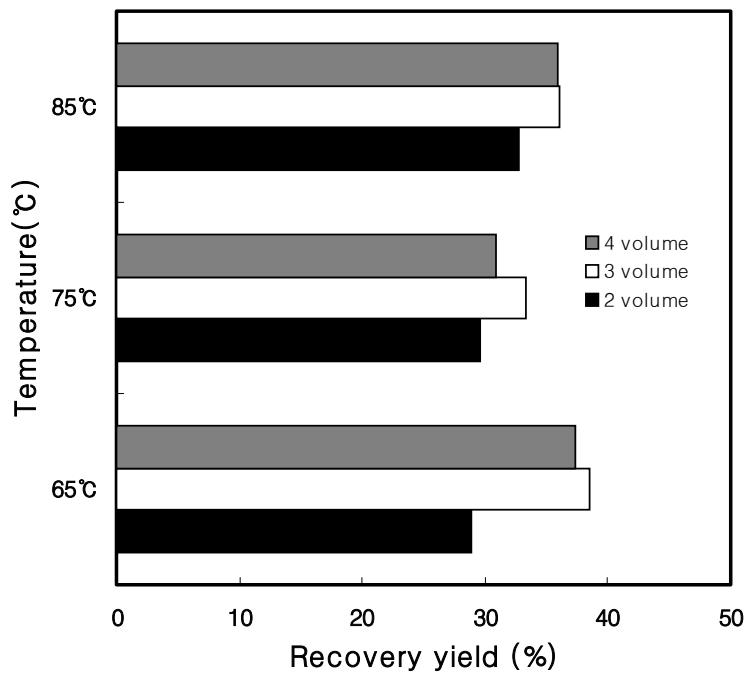


Figure 7. Recovery yields of hemicellulose B from rice bran

란은 쌀겨로부터 분리·정제한 헤미셀룰로즈 B를 Table 1에 기술한 자료를 토대로 구성된 탄수화물 복합효소과 반응시킴으로서 얻어낼 수 있었다. 헤미셀룰로즈 B를 탄수화물 복합효소와 반응하기에 앞서 다음과 같은 방법으로 Fig. 3에서 도식화된 방법으로 얻은 헤미셀룰로즈 B 산물 중의 불순물을 제거하였다. 먼저 헤미셀룰로즈 B를 증류수에 용해시킨 후, 원심분리기(12000rpm, 20분)를 통해서 잔존 불순물이 제거된 상층액을 얻었으며, 이를 α -amylase와 반응시킴으로서 헤미셀룰로즈 B에서 잔존되어있는 starch를 완전히 제거하였다. 사용된 효소는 100°C, 10min의 조건에서 불활성화시킨 후, 원심분리기(13000rpm, 20분)를 이용하여 제거하였다. 마지막으로 얻어진 산물을 ethanol를 이용하여 두번 재침전시킴으로서 starch를 포함한 잔존 불순물이 제거된 헤미셀룰로즈 B를 얻었다. 불순물이 제거된 헤미셀룰로즈 B는 Table 1을 토대로 구성된 탄수화물 복합효소 (β -glucosidase, cellobiohydrolase, cellulase, β -galactosidase)와 0.2M sodium acetate buffer(pH 4.5)하에서 40°C, 30분동안 반응시킴으로서 자일로즈 주쇄에 측쇄로 연결된 글루코오즈, 갈락토오즈를 제거시킨 후 ethanol로 재침전시켜 아라비녹실란을 얻었다. 얻어진 아라비녹실란의 구성 단당 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험은 위의 실험방법을 통해서 얻어진 아라비녹실란을 가수분해시켜 실시하였다.

본 연구에서 헤미셀룰로즈 B와 탄수화물 복합효소와의 반응 결과로서 얻은 아라비녹실란은 위에서 제시한 Table 2의 결과를 토대로 살펴보면, 주요 구성당류는 주쇄인 자일로즈와 측쇄인 아라비노오즈가 차지함을 알 수 있다. 물론 불순물로 글루코오즈가 상당 부분 차지하고 있으며 그 밖에 갈락토오즈와 글루크론산도 소량 포함되어 있음을 알 수 있다. 불순물 중 가장 많은 부분을 차지하고 있는 글루코오즈는 아라비녹실란을 얻기 위해서 사용한 헤미셀룰로즈 B를 얻는 과정 중에서 셀룰로즈의 완전 제거가 이루어지지 않았기 때문으로 사료되며(표 1. 참조), 갈락토오즈는와 글루크론산은 이를 분해하는 효소인 β -galactosidase와 β -glucuronidase의 반응의 최적화를 통해 해결될 수 있을 것이라 사료된다.

Table 2. Compositional sugars of arabinoxylan

Sugars	Xylose	Arabinose	Glucose	Galactose	Glucuronic acid	mannose	Ara/Xyl ratio
Composition (%)	63.5	11.1	18.9	2.7	0	3.8	0.17

다) 아라비녹실란의 구조적 특성 분석

생리활성물질인 아라비녹실란을 헤미셀룰로즈 B와 탄수화물 복합효소와 반응시켜 얻어냈으며, 이에 대한 구조적 특성을 FT-IR 스펙트럼을 측정하여 분석하였다. 이를 Fig. 8에 나타내었다. 일반적인 아라비녹실란 구조를 살펴보면, 주쇄 부분은 자일로즈, 측쇄부분은 아라비노오스로 각각 구성된다.

Fig. 8에서 나타나는 3350cm^{-1} 과수대의 피크와 $2800\text{--}3000\text{cm}^{-1}$ 과수대 피크는 각각 물의 hydrogen결합을 포함한 다당류의 hydroxyl-stretching vibration과 C-H stretching vibration에 의해 생성되는 피크들이다. 또한 1650cm^{-1} 과수대 피크는 역시 물에 관계된 피크이다. 일반적으로 $800\text{--}1500\text{cm}^{-1}$ 과수대의 피크들이 고분자 주쇄의 C-C, C-O, C-OH 그리고 C-O-C에 관여된 피크들로 위의 결과를 토대로 본 연구에서 헤미셀룰로즈 B에서 얻은 아라비녹실란이 xylooligosaccharides 특성을 나타냄을 알 수 있다. 특히, 990cm^{-1} 대 피크는 키시로스 주쇄의 O-3위치에 아라비노오스의 결합을 나타내는 피크로서, 본 연구에서 헤미셀룰로즈 B에서 얻은 아라비녹실란의 FT-IR 스펙트럼을 나타내는 Fig. 8에 분명히 살펴볼 수가 있었다. 이 결과로부터 쌀겨로부터 헤미셀룰로즈 B를 얻고, 이와 탄수화물 복합효소와의 반응 산물로 아라비녹실란을 얻는 일련의 과정으로 쌀겨로부터 아라비녹실란을 분리·정제할 수 있음을 알 수가 있었다.

2) 아라비녹실란의 수율 검토

아라비녹실란의 수율을 검토하기 위해 먼저 미강으로부터 헤미셀룰로즈 B의 수율을 검토한 결과 38 %의 수율을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 헤미셀룰로즈 B 100 mg을 배양여액과 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간동안 반응시킨 후 각각의 시간대별로 투석을 통해 분해된 단당을 제거한 후 동결건조를 통해 수율을 검토하였다. Table 3.은 시간대별 수율을 나타낸 것이다. 반응시간이 지남에 따라 가수분해효소에 의해 분해된 단당들이 제거되어

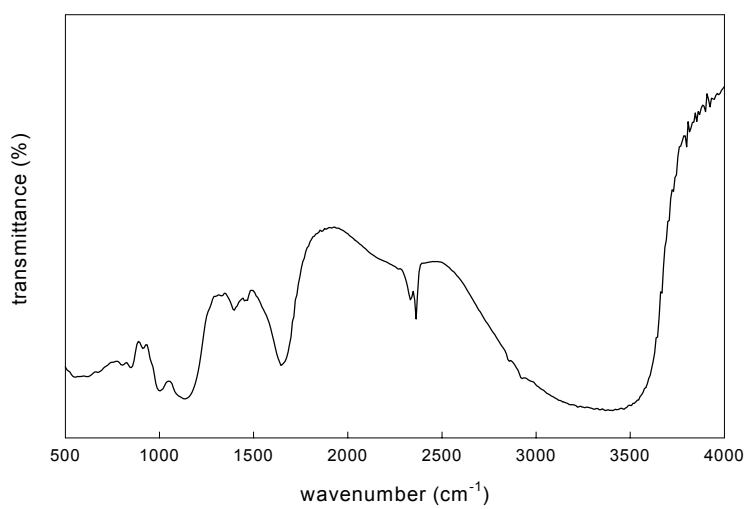


Figure 8. FT-IR spectrum of arabinoxylan

수율이 떨어지는 것을 볼 수 있다. 72시간에서 수율이 가장 낮은 것을 볼 수 있는데 이는 정제된 아라비녹실란에 가장 가깝다고 볼 수 있다. Fig. 9는 이 수율을 막대그래프로 나타낸 것이다. 역시 시간에 따라 수율이 감소되어지는 경향을 쉽게 알 수 있다.

3) 생산성 향상을 위한 추출공정 개발

헤미셀룰로즈 B와 표고버섯 배양여액과의 반응을 통한 아라비녹실란의 생산에 있어서 반응시간에 따른 아라비녹실란의 구성당의 변화를 검토하기 위하여 먼저 쌀겨로부터 추출된 헤미셀룰로즈와 표고버섯 배양여액을 3시간, 6시간, 12시간, 24시간동안 반응을 시킨 후 분해된 단당 (glucose, galactose, glucuronic acid)을 제거하기 위하여 membrane을 통해 투석을 실시한 후 동결건조를 하여 분말화 하였다. 이를 2M TFA (Trifluoroacetic acid)로 110 °C에서 4시간동안 가수분해를 거친 후 다시 동결건조를 통해 분말화 된 시료를 HPLC에 사용하였다. Fig. 11의 결과를 보면 처음 헤미셀룰로즈 B에서 반응시간이 지남에 따라 글루코우즈의 양이 상당히 감소하는 경향을 볼 수 있다. 상대적인 조성비로 보면 자일로즈와 아라비노우즈는 증가하는 추세를 나타내었다. 이때 갈락토우즈와 글루크론산의 비율도 상대적으로 상승하는 경향을 나타내지만 증가율이 자일로즈와 아라비노우즈에 비해 떨어지기 때문에 이는 β -galactosidase와 β -glucuronidase에 의해 갈락토우즈와 글루크론산이 분해되어지지만 β -glucosidase에 의해 분해되는 글루코우즈의 양에 비하면 극도로 낮은 수치를 나타내기 때문에 이와 같은 결과를 나타낸 것이다. Fig. 11을 막대그래프로 나타낸 것이 Fig. 12이다. Fig. 12에서 볼 수 있듯이 반응시간이 지남에 따른 glucose의 조성비가 감소함에 따라 자일로즈와 아라비노즈의 조성비가 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. Fig. 13은 Fig. 12를 상대농도로 표현한 결과이다. 역시 glucose의 조성비가 감소하면서 자일로즈와 아라비노즈의 조성비가 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 볼 수 있다. Fig. 14와 Table 4는 glucose의 감소율과 나머지 당들의 증가율을 나타낸 결과이다.

Table 3. Yields in production of arabinoxylan

reaction time	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Yield(%)	67	59.2	53.4	51.3	49.7	46.5

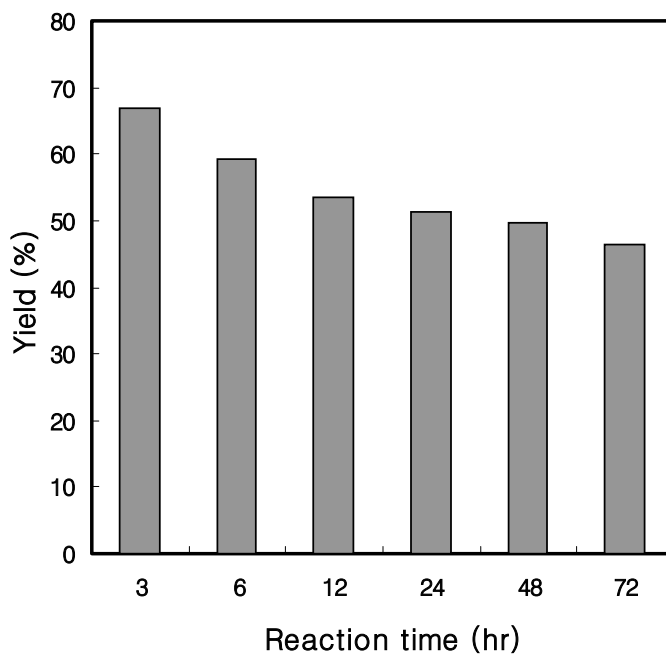
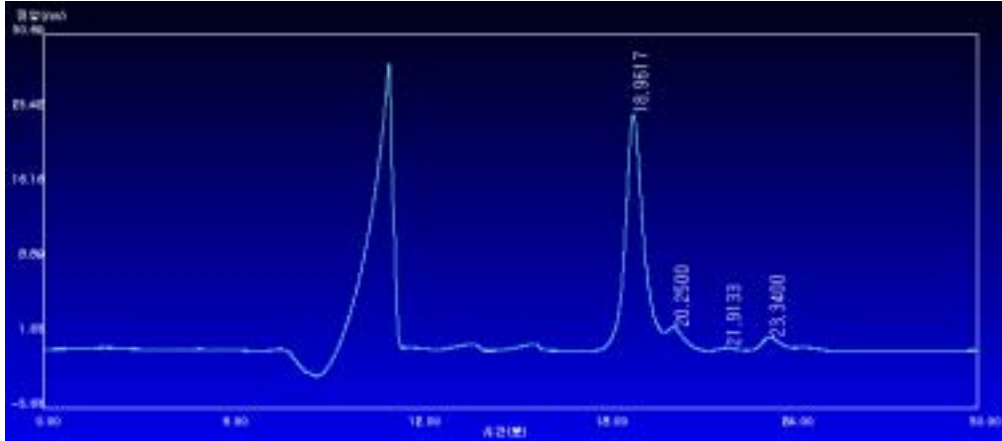
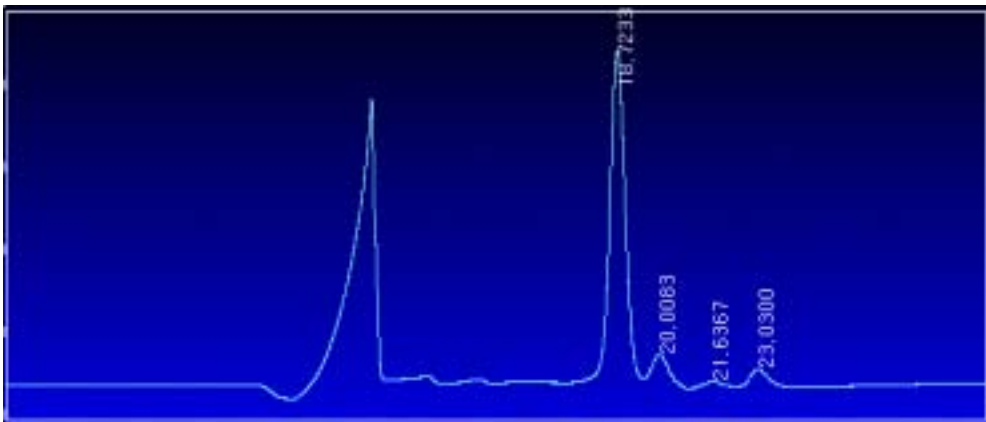


Figure 9. Yields in production of arabinoxylan

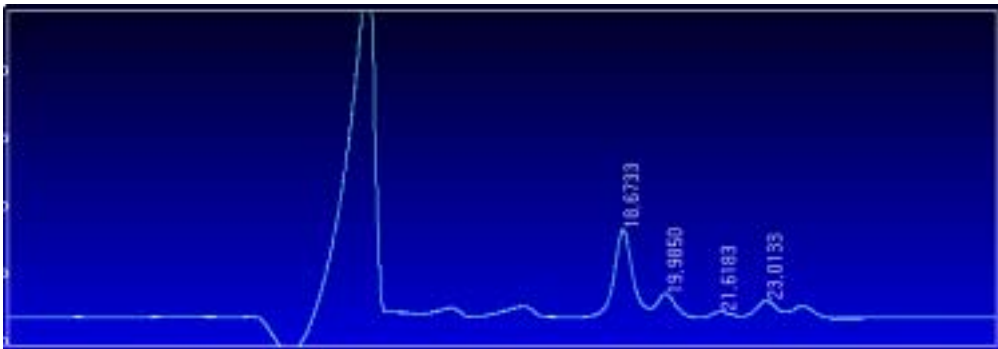


헤미셀룰로즈 A

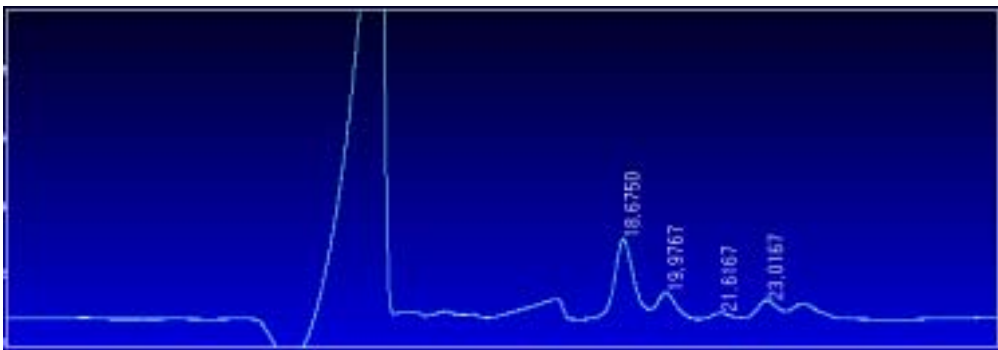


헤미셀룰로즈 B

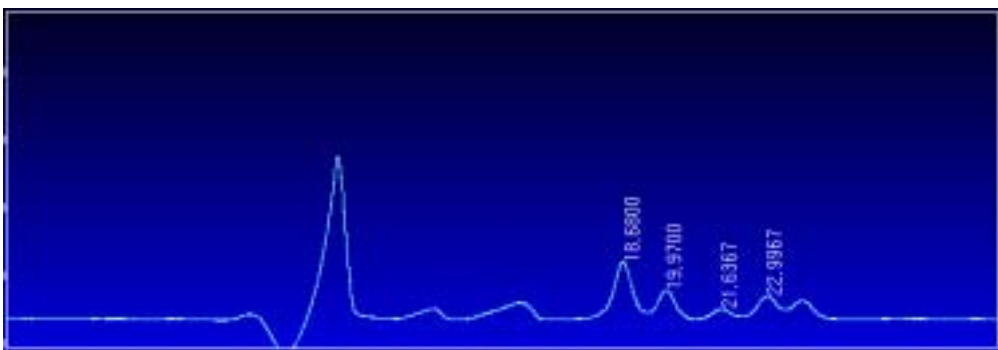
Figure 10. HPLC peak diagram of hemicellulose A, B



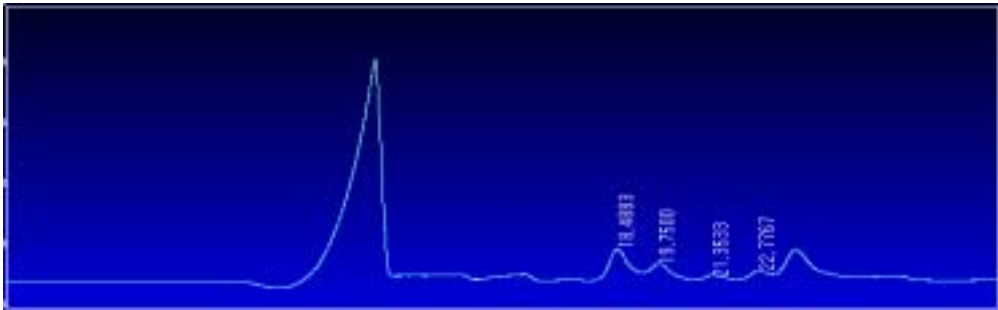
반응시간 3시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당



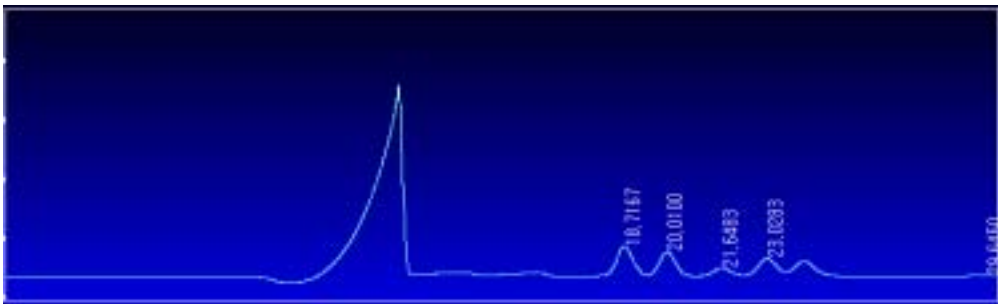
반응시간 6시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당



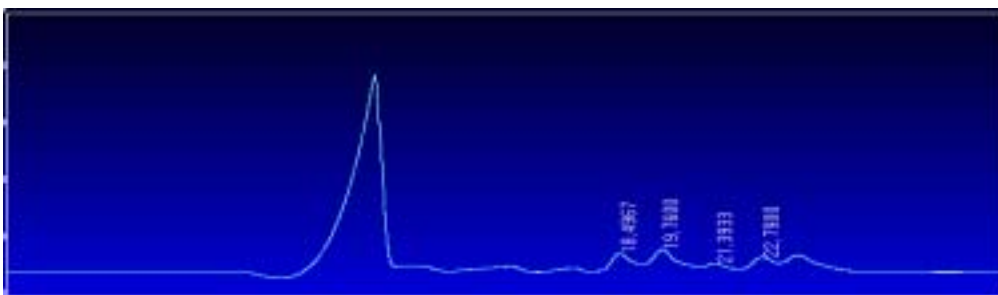
반응시간 12시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당



반응시간 24시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당



반응시간 48시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당



반응시간 72시간 후 헤미셀룰로즈 B의 구성당

Figure 11. HPLC peak diagram according to the reaction time of hemicellulose B with culture broth

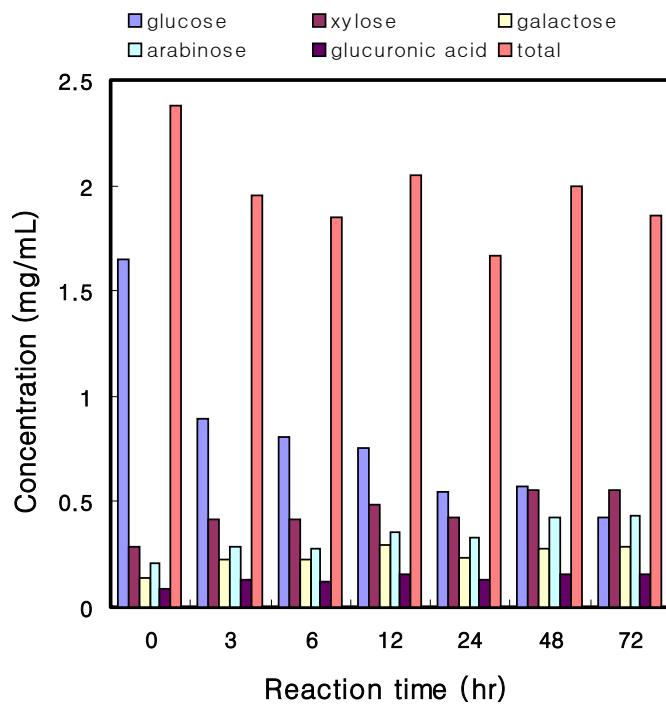


Figure 12. Change of compositional sugars in hemicellulose B on reaction time (Absolute concentration)

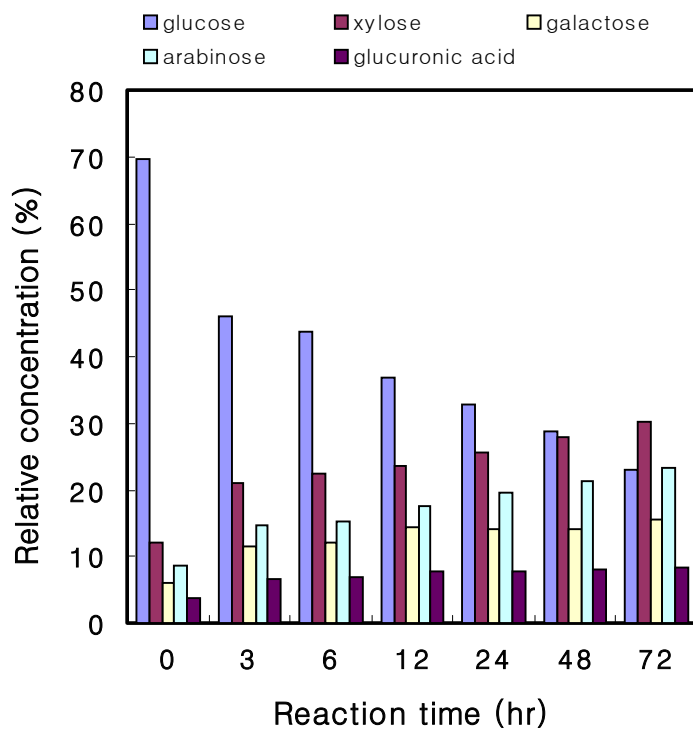


Figure 13. Change of compositional sugars in hemicellulose B on reaction time (Relative concentration)

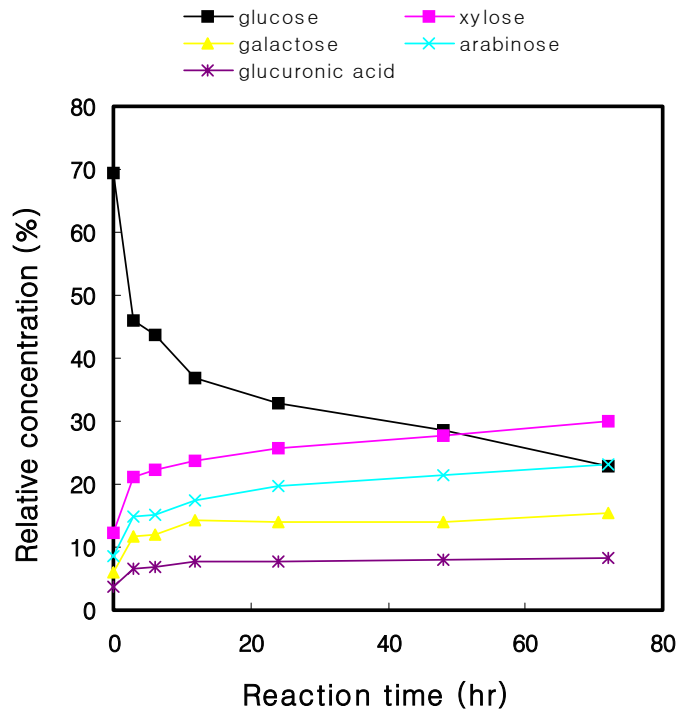


Figure 14. The tendency of increasing rate and decreasing rate of the compositional sugar concentration

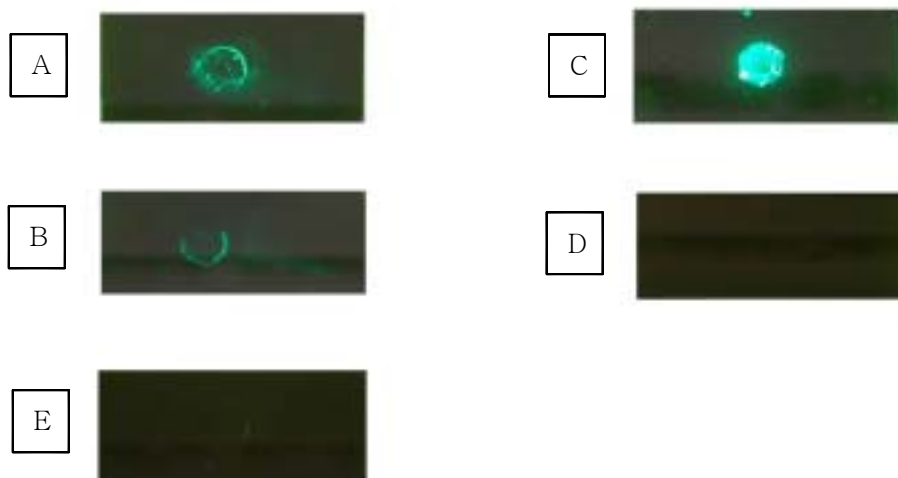
Table 4. Reaction rate of each reaction time in compositional sugar concentrations

	1st step	2nd step	3rd step	4th step	5th step	6th step
Glucose	-7.83	-0.8	-1.13	-0.325	-0.175	-0.237
Xylose	2.96	0.43	0.2	0.17	0.092	0.096
Galactose	1.9	0.13	0.4	-0.03	0.004	0.054
Arabinose	2.07	0.13	0.38	0.183	0.071	0.075
Glucuronic acid	0.9	0.1	0.15	0.008	0.008	0.012
Σ reaction rate	0	+0.01	0	+0.006	0	0

Fig. 15는 Fungi-Flour Kit (Polysciences, Inc., USA)을 사용하여 헤미셀룰로즈 A 및 B의 주쇄 결합형태를 확인한 결과이다. Fungi-Fluor Kit에서 사용된 staining solution A는 증류수에 용해시킨 고순도의 Cellufluor에 clearing agent 로써 potassium hydroxide를 첨가시킨 용액으로 주로 미생물 유래 다당류의 β -결합에 비특이적으로 반응하여 형광을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 반응이 식물 유래인 헤미셀룰로즈에도 적용되는지 확인해 본 결과 헤미셀룰로즈에서는 미생물 유래 다당류에 비해 명확하지는 않으나 주된 결합형태가 α 인지 또는 β 인지를 알기에 충분할 정도의 유의적 해석은 가능한 것으로 판단되었다. 각 시료를 10 mg/mL의 농도로 먼저 A slide에는 헤미셀룰로즈 A, B slide에는 헤미셀룰로즈 B, C slide에는 curdlan, D slide에는 dextran, E slide에는 arabinoxylan 시료를 놓고 staining solution A로 염색한 후 UV table에서 관찰하였다. 그 결과 curdlan (C slide)에서와 같이 헤미셀룰로즈 A (A slide)에서 형광을 나타내어 주된 결합형태가 β 결합임을 알 수 있었다. 반면에, α 결합을 하는 dextran (D slide)에서는 형광을 띄지 않았다. 또한 헤미셀룰로즈 B(B slide)의 경우 주쇄는 α 결합, 결사슬 결합은 β 결합을 하고 있는 것으로 알려져 있어 예상대로 형광을 띄나 헤미셀룰로즈 A에서보다 형광이 약함을 나타내었다. 따라서 헤미셀룰로즈 B의 주쇄 결합형태가 α 결합임을 알 수 있었다. 더욱이 아라비녹실란 (E slide)의 경우 주쇄 결합이 α 결합형태이며 결사슬 결합은 β 결합이다. 구성당의 조성비를 고려할 때, α 결합 3번마다 β 결합이 한번 존재하므로 결사슬인 β 결합에 의한 형광도는 매우 낮은 것으로 예상되었으며 그 결과 예상보다도 다소 더 낮은 형광도를 나타냄을 알 수 있었다. Fig. 16은 Fungi-Flour Kit solution B로 염색후 육안으로 확인한 결과이다. UV table에서의 사진 같은 결과를 나타내었다.

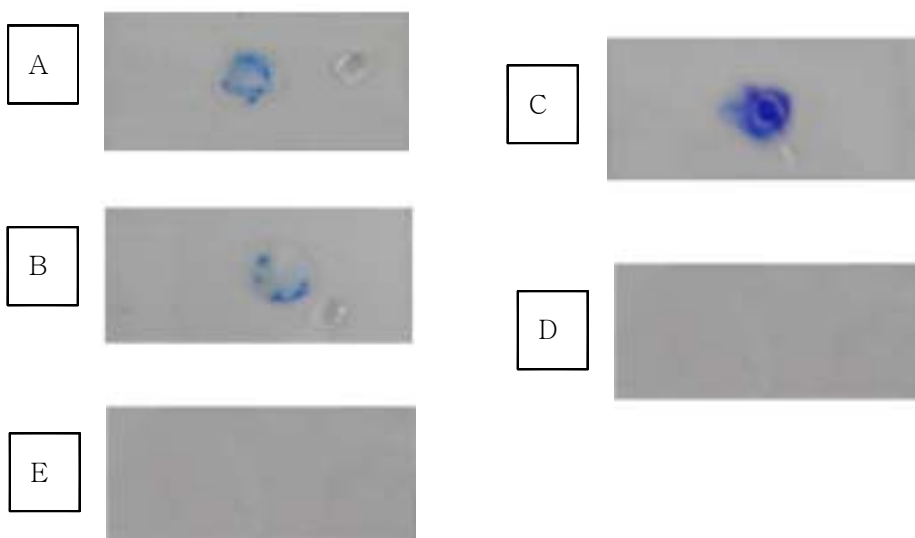
다. 분리정제공정 최적화 및 시스템 구축

1) 분리정제공정 최적화



A : Hemicellulose A, B : Hemicellulose B, C: Curdlan, D : Dextran
E : Arabinoxylan (reaction time 72hr)

Figure 15. Visualization of β -linked polysaccharides by use of Fungi-Fluor Kit (solution A)



A : Hemicellulose A, B : Hemicellulose B, C: Curdlan, D : Dextran
E : Arabinoxylan (reaction time 72hr)

Figure 16. Visualization of β -linked polysaccharides by use of Fungi-Fluor Kit (solution B)

Fig. 17은 최적 배지조성인 cellulose 1 %(w/v), yeast extract 1 % (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %(w/v)으로 회분배양을 하다가 배양 4일, 5일째 glucose 5 g/L (100 mL)를 feeding하여 배양 10일째 균사체와 배양여액을 분리하였다. 여기에 미강으로부터 유기용매와 pH 조절에 의해 셀룰로스와 리그닌이 제거된 헤미셀룰로스 B를 투여한 후 30 °C, 72 hr 동안 반응을 시켰다. 그 후 cut off size 1,000 인 membrane으로 투석과정을 3일간 거친 후 동결건조를 통한 분말화로 아라비녹실란 생산의 분리정제공정의 최적화를 하였다.

2) 분리정제공정 시스템 구축

분리정제공정 최적화를 통해 먼저 고수율을 고려한 공정단계로 배양여액과 헤미셀룰로스 B의 반응조건에 있어서 반응시간을 12시간으로 하였을 경우 72시간과 비교해 높은 수율을 얻을 수 있었다. 그러나 수율이 높은 반면 정제도에서는 72시간이 더 유리 함을 알 수 있었다. 그리고 저비용을 고려한 공정단계는 배양액 자체에 헤미셀룰로스 B를 첨가해서 12시간동안 반응 후 농축과정을 거친 후 동결건조를 통해 분말화함으로써 분리정제공정에서의 비용을 감소시키는 결과를 얻을 수 있었다.

3) 대량생산 최적공정의 scale-up을 위한 데이터베이스 구축

분리정제공정 최적화를 통해 배양여액과 헤미셀룰로스 B를 반응시킬때 scale-up (1 L, 10 L, 100 L)에서의 효율 및 수율을 예측할 수 있는 기본적인 데이터베이스를 구축할 수 있었다.

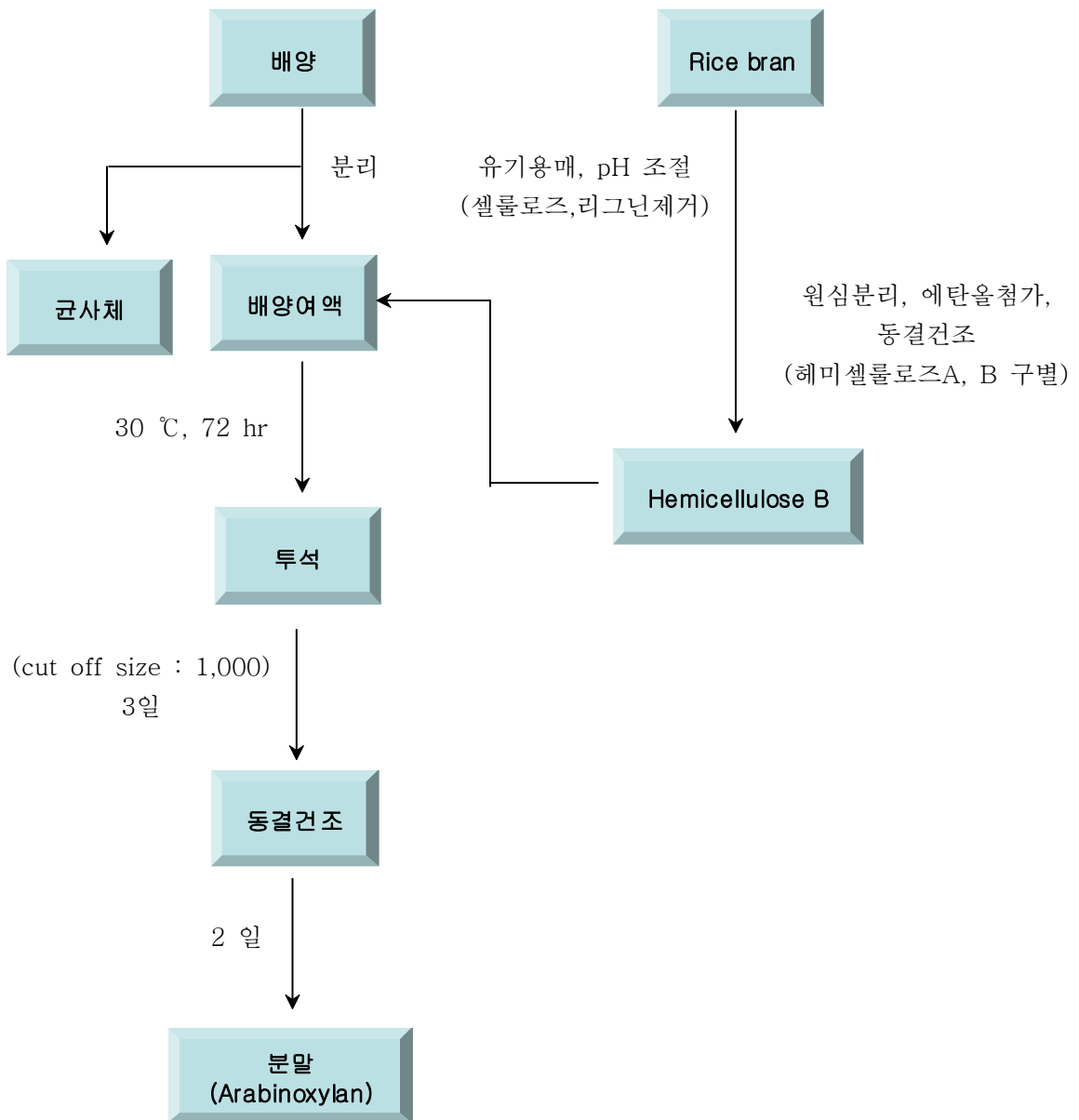


Figure 17. Diagram in production of arabinoxylan

4. 결 론

미강으로부터 헤미셀룰로즈 B의 추출과정에서 반응온도를 65℃에서, 에탄올 volume을 3배로 하였을 때 헤미셀룰로즈 B의 수율이 38.5 %로 최대를 나타내었다. 이로써 헤미셀룰로즈 B의 추출과정에서의 최적조건을 확립하였다.

¹³C-NMR 스펙트럼, FT-IR 스펙트럼을 통해 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 구조적인 특성을 검토하였다. 그리고 HPLC를 이용해 헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 구성당의 조성비를 검토한 결과 헤미셀룰로즈 B는 xylose 15.4 %, arabinose 13.9 %, glucose 67.2 %, galactose 3.5 %였고, ara/xyl ratio는 90.1이었다. 이 헤미셀룰로즈 B를 효소처리하여 얻은 아라비녹실란의 구성당 조성비는 xylose 63.5 %, arabinose 11.1 %, glucose 18.9 %, galactose 2.7 % glucuronic acid 3.8 %였고 ara/xyl ratio는 17.5의 결과를 나타내었다.

또한, 헤미셀룰로즈 B와 표고버섯 배양여액의 반응시간에 따른 아라비녹실란 구성당 조성비를 검토한 결과 반응시간이 지나감에 따라 glucose가 분해되어 glucose의 조성비는 크게 감소하는 경향을 나타내었고, 반면에 상대적으로 자일로즈와 아라비노스의 조성비는 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 헤미셀룰로즈 B와 배양여액의 반응조건은 반응온도 30 ℃에서 반응시간은 24 시간이 가장 최적이라는 판단을 하였다.

헤미셀룰로즈 B와 아라비녹실란의 주쇄 결합형태를 확인하기 위하여 Fungi-Flour Kit을 사용하여 형광을 측정하였다. 예상대로 아라비녹실란에서는 β-결합이 아주 적기 때문에 희미한 형광을 나타내어 주된 결합형태가 α-결합임을 확인 할 수 있었고, 헤미셀룰로즈 B에서는 아라비녹실란에 비해 β-결합이 더 많이 존재함을 알 수 있었다.

최적 배지조성인 cellulose 1 %(w/v), yeast extract 1 % (w/v), CaCl₂ · 2H₂O 0.1 %(w/v)으로 회분배양을 하다가 배양 4일, 5일째 glucose 5 g/L (100 mL)를 feeding하여 배양 10일째 균사체와 배양여액을 분리하였다. 여기에 미강으로부터 유기용매와 pH 조절에 의해 셀룰로즈와 리그닌이 제거된 헤미셀룰로즈

B를 투여한 후 30 ℃, 72 hr 동안 반응을 시켰다. 그 후 cut off size 1,000인 membrane으로 투석과정을 3일간 거친 후 동결건조를 통한 분말화로 아라비녹실란 생산의 분리정제공정의 최적화를 하였다.

제 3절 가수분해 복합효소 활성평가

1. 서론

Hemicellulose는 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 탄수화물이다. Hemicellulose는 식물 조직에서 cellulose와 함께 발견되는 구조가 복잡한 다당류이다. 고등 식물의 세포벽을 이루는 hemicellulose의 주성분 중에 하나인 Xylan은 D-xylopyranose 잔기를 주쇄로 가진 거대 분자이다. Xylan을 이루는 D-xylopyranose 잔기의 중합의 비율은 종에 따라 다르며 목재의 경우 20 ~ 25%를 차지한다. 침엽수(softwood) xylan의 경우 70 ~ 130개 정도의 D-xylopyranose 잔기들이 중합체를 형성하며 주로 4-O-methyl glucuronoxylan과 4-O-methyl glucuronoarabinoxylan으로 구성되어 있으며 arabinose 잔기가 존재하고 acetyl기는 존재하지 않으며 uronic acid 잔기가 xylose 잔기 4 ~ 9 개당 1개의 비율로 존재하고 있다. 활엽수(hardwood) xylan의 경우 150 ~ 200개의 D-xylopyranosyl 잔기들이 중합체를 형성하며 4-O-methyl glucuronoxylan으로 주로 구성되어 있으며 arabinose 잔기가 존재하지 않고 많은 부분에 acetyl기가 존재하며 uronic acid 잔기는 xylose 잔기 5 ~ 15 개당 1개를 가지고 있다. xylan의 주쇄를 형성하고 있는 몇몇의 잔기들은 D-xylopyranose의 두 번째 탄소나 세 번째 탄소에 acetylation되어 다양한 당의 형태를 보여준다. 주쇄와 곁가지를 이루는 보조 잔기의 분포 역시 종에 따라 다양하며 보조 잔기를 형성하는 당류들은 glucuronic acid 또는 4-O-methylglucuronic acid 그룹이 D-xylopyranose와 α -1,2 결합을 하여 glucuronoxylan의 형태를 가지고 arabinofuranose 잔기와는 α -1,3결합을 하여 arabinoxylan을 형성하며 많은 수의 ferulic 와 coumaric acid와의 결합을 가지고 있다.

식물체의 기관마다도 구성된 xylan의 조성이 다르며 식물체 내 xylan의 종류에 따라서도 식물의 진화상 분포와 양태를 설명할 수도 있다(Fig. 1). 모든 고등 식물들의 xylan은 β -(1 \rightarrow 4) 결합을 가진 xylopyranose unit들을 주쇄로 가지

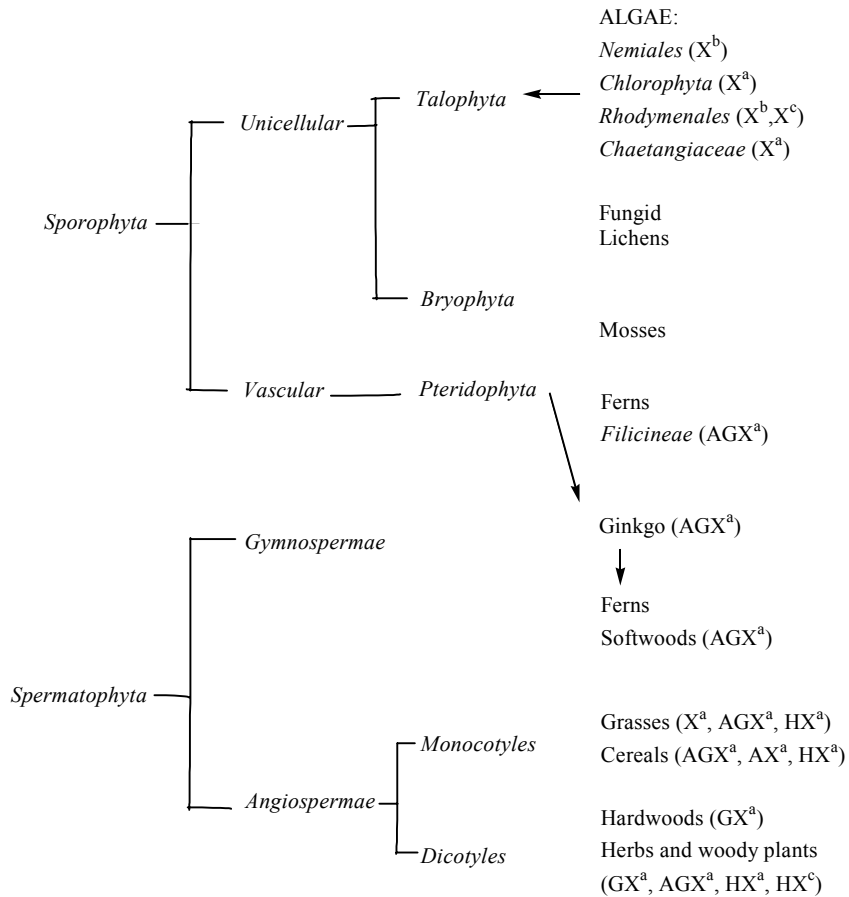


Figure 1. 식물계내에 존재하는 xylan형의 다당류

- a) β -1,4-D-Xylopyranosyl backbone,
 - b) β -1,3-D-Xylopyranosyl backbone,
 - c) β -1,3 and 1,4-D-Xylopyranosyl backbone,
 - d) pentosan 또는 xylose를 포함하고 있는 다당류
- X : homoxylan, GX : 4-O-methylglucuronoxylan,
 AGX : arabino(glucurono)xylan, AX : arabinoxylan,
 HX : heteroxylan → : 진화의 방향

고 있으나 순수한 xylopyranose 중합체로 이루어진 homoxylan은 거의 고등식물체 내에는 발견되지 않으며 다양한 보조 당 잔기들이 연결된 heteroxylans이 널리 분포되고 있다고 한다. 이러한 heteroxylans에서 4-O-methyl-glucurono-xylan 형태는 고등 식물체에 많이 분포하고 있는데 2-또는 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyl uronic acid 단위체들은 단독으로 D-xylose 주쇄와 연결되어 있는 형태를 갖는다(Fig. 2-A). Glucuronoxylan에서 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyl uronic acid 단위체는 주쇄 상의 분포가 xylose에 대해 4~16 : 1로써 존재되고 있다고 한다. Arabio(glucurono)xylan 형태는 주쇄의 D-xylose의 두 번째 탄소와 연결된 (methyl)- α -D-glucopyranosyl uronic acid 단위체와 세 번째 탄소와 결합된 α -L-arabinofuranose 단위체가 단독으로 연결되어 있는 조합으로 이루어져 있다(Fig. 2-B). 천연 arabinoxylan은 xylopyranose 중합체의 세 번째 탄소나 두 번째 와 세 번째 탄소에 α -L-arabinofuranose가 연결되어 존재 한다. 이와 같이 각 형태 별로 존재하는 xylan은 heterocellulose로써 더 나가 xylopyranose 주쇄에 다양한 치환기가 연결되어 xylan 복합체를 형성하게 된다(Fig. 2-C).

공업적으로 Hemicellulose인 xylan의 가공은 제지공업에서 활용되며 염소 표백법으로 Kraft 펄프를 표백함으로써 종이의 휘도를 높이는데 있었다. 최근에는 기존의 염소 표백법을 대신하여 환경적 오염을 줄일 목적으로 cellulase의 활성이 없는 xylanase의 사용이 제지의 표백 효과를 얻기 위한 염소 표백법에 대한 대체 방법으로써 활용 가능성이 있다고 한다.

식물체를 구성하는 heteroxylan의 단편은 xylopyranose를 주쇄로 하여 다양한 당류를 포함한 다당류이며 Fig. 3의 모식도로써 나타낼 수 있다(Fig. 3). Heteroxylan 복합체의 완벽한 분해 작용에 참여하는 가수 분해 효소들은 endo-1,4-xylanase (E.C. 3.2.1.8), β -xylosidase (E.C. 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55), α -glucuronidase (E.C. 3.2.1.131)와 acetyl xylan esterase (E.C. 3.1.1.6)이다.

다양한 종류의 가수분해 효소들 중에 endo-1,4-Xylanase (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8)는 heteroxylan 주 사슬의 내부 glycosidic 결합을

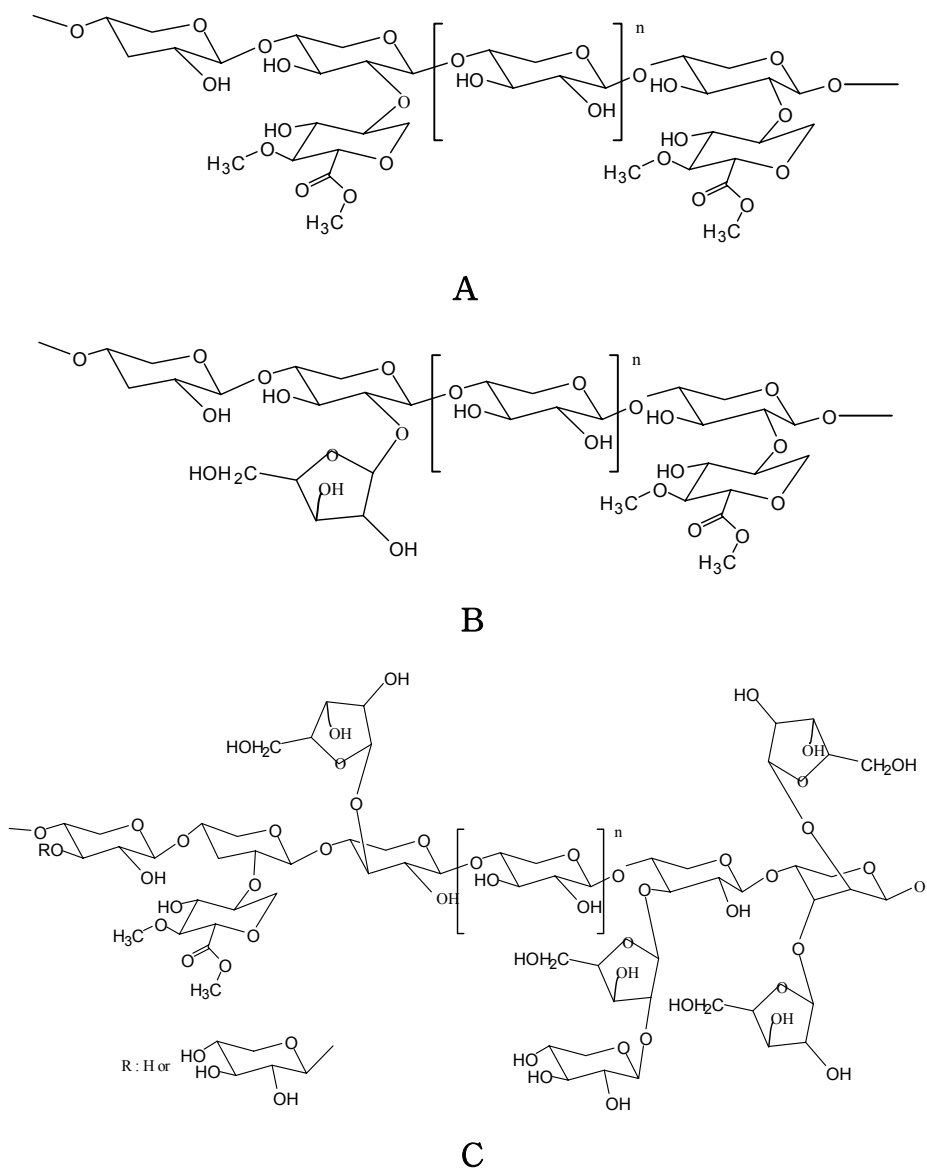


Figure 2. (A) 4-*O*-methyl-glucuronoxylan 모식도 (B) Arabino(glucurono)xylan 모식도 (C) water-soluble corn cob xylan 모식도 : β -D-xylopyranose 으로 이루어져 있는 주쇄와 주쇄에 연결된 arabinofuranose와 4-*O*-methyl- α -D-glucopyranosyl uronic acid 단위체로 이루어져 있는 xylan의 모식도

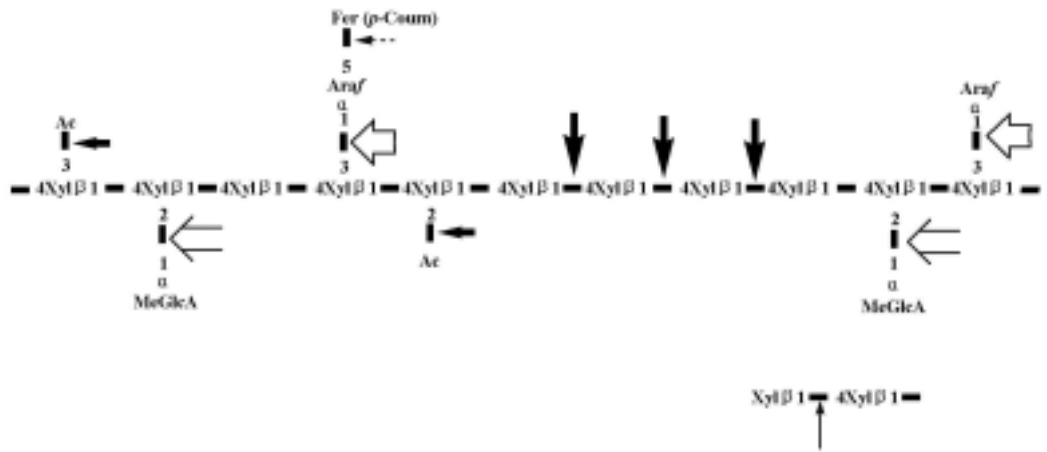


Figure 3. Xylan의 가수분해과정에 관여되는 효소들의 xylan 상의 활성 자리들에 대한 모식도

약자: **Ac**, acetyl group; **Araf**, L-arabino-furanose;
MeGlcA, 4-O-methyl-D-glucuronic acid; **Xyl**, D-xylose;
Fer, ferulic acid; **p-Coum**, p-coumaric acid.

- ◄ ; Endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8)
- ◁ ; α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)
- ⇐ ; α-Glucuronidase (EC 3.2.1.131)
- ◄ ; Acetyl xylan esterase (EC 3.1.1.6) or acetyl xylan esterase
- ← ; Feruloyl (p-coumaroyl) esterase
- ◄ ; β-Xylosidase (EC 3.2.1.37)

분해하여 기질의 중합도(Degree of Polymerization)를 낮춘다. 가수 분해에 의해 형성되는 산물은 보조 잔기가 달려있거나 달려 있지 않는 xylo-oligo 당이며 가수분해의 진행 정도에 따라 이 oligo 당이 더욱 짧은 xylo-oligo 당의 형태로 변한다.

β -xylosidase (1,4- β -D-xyloside xylohydrolase, E.C.3.2.1.37)는 비환원성 말단으로부터 짧은 xylo-oligo 당을 가수분해 하여 최종 산물로 xylose를 생산하는 exoglycosidase이다. β -xylosidase는 세균이나 효모에서 주로 cell과 회합 되어 있는 형태로 나타난다. 효모인 *Cryptococcus albidus* 에서의 β -xylosidase는 xylo-oligo 당 (xylobiose와 xylotriose)이 β -xyloside permease transport system 을 통해 cell 내로 들어가 xylose로 전환되는 과정에 관여된다. 대부분의 경우 β -xylosidase는 xylan 복합체를 분해하지 못한다. 하지만 xylan 복합체를 공격하여 xylose를 생성하는 xylosidase에 대한 보고가 가끔 있다. 그러한 exoxylanase는 heteroxylan의 결사슬 분지점에 의해 활성이 제한되게 된다.

α -L-Arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55)는 보조 잔기에 L-arabinose가 존재하는 arabinoxylan, arabinan, arabinose-substituted xylooligosaccharides, *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside의 α -L-arabinose 잔기에 대해 활성을 가진다. arabinoxylan에 대한 이 효소의 작용으로 L-arabinose가 떨어져 나온다.

α -Glucuronidase (E.C. 3.2.1.131)는 glucuronoxylan에서 4-O-methyl-D-glucuronose 잔기 부분에 활성을 가지며 glucuronic acid와 xylose 간의 α -1,2결합을 가수분해 한다. α -glucuronidase는 4-O-methyl-glucuronic acid로 치환된 xylo-oligo당에서 4-O-methyl-glucuronic acid를 생산하며 xylose 중합체에는 직접 작용하지는 않는다고 알려져 있다. Glucuronose 치환기 옆에 있는 acetyl 그룹은 α -glucuronidase의 활성에 영향을 미쳐 효소 작용을 방해시킨다고 한다.

Acetyl xylan esterase (E.C. 3.1.1.6)는 acetylxylan에서 xylose 잔기의 C-2와 C-3위치의 O-acetyl 치환기를 제거한다. *p*-coumaric acid 와 ferulic acid 잔기 부분에 각각의 활성을 가지고 있는 esterase의 존재도 보고 되었다. Acetyl화 되어 있는 glucuronoxylan을 endoxylanase에 의해 반응시키면 가수분해가 잘 일

어나지 않으며 많은 양의 치환된 oligomer가 남아있게 된다. 완전한 가수분해를 위해서는 acetyl xylan esterase에 의한 탈 acetyl화 작용이 필요하다. Xylan 분해 효소 시스템의 연구에 이용된 대부분의 xylan은 알카리 추출법을 이용하여 탈 acetyl화시킨 것을 대상으로 한다.

천연의 xylan으로부터 heteroxylan의 종류 중에 하나인 arabinoxylan을 생산을 주 목적으로 하고 자연계에서 얻어지는 xylan 가수 분해 효소를 사용하여 xylan의 겔사슬 중 4-O-methyl- α -glucuronic acid의 제거라는데 본 연구의 초점을 맞추고 해당 가수 분해 부분에 활성을 가지는 α -glucuronidase의 활성 측정과 정제가 필요하다. 아울러 α -Glucuronidase는 arabinoxylan의 생산에 가장 유력한 효소이나 arabinoxylan에 근접된 적당한 기질을 얻기 위한 방법으로써 *Lentinus edodes*로부터 생산된 endo-1,4-xylanase가 xylan 복합체의 주쇄 부분을 가수 분해하여 적당한 xylooligomer 형태의 산물을 생산하기 위하여 endo-1,4-xylanase의 정제 및 활성측정을 통한 해당 효소의 연구가 필요하다. 아울러 endo-1,4-xylanase의 가수 분해 산물에 대한 분석을 통해 endo-1,4-xylanase의 기질 분해 정도를 측정하고 자 한다. Xylan 과 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan에 대한 endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 개별적인 활성도를 비교하고 분리 정제 과정을 거친 endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase가 xylan과 가공 처리된 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 하였을 때 해당 두 효소의 상호 영향 관계를 관찰하여 두 효소의 향후 이용에 대한 방법을 제시하고자 하였다.

2. 연구 수행 방법

가. α -glucuronidase와 endo-1,4-Xylanase의 생산을 위한 최적 배양액 조성

α -glucuronidase와 endo-1,4-Xylanase의 생산을 위한 최적 양액 조성을 위하여 다양한 탄소원과 무기물이 첨가된 각종 배양액을 조성하여 *Lentinus edodes*의 균사체를 접종하여 본 연구의 α -glucuronidase와 endo-1,4-Xylanase의 생산율과 총 단백질 생산량을 비교하였다.

배양액에 탄소원으로 첨가되는 배지를 따로 121℃, 20분간 가압 멸균하였으며, FeSO₄ · 7H₂O는 0.45 μ m 필터를 이용하여 멸균하였다. 그 외의 다른 양액 성분은 121℃, 20분간 가압 멸균하였다. 배지의 pH는 5N NaOH를 이용하여 5.5로 조정하였다(Table 1). 배양액에 접종하는 방법은 2% potato dextrose agar plate에서 자란 균사를 1cm×1cm 크기로 절단하여 본 양액에 접종하는 방법과 접종한 다음 14일간 배양 후 균사만 회수하여 접종하는 두 가지 방법을 이용하였다. 26℃, 120r.m.p rotatory shaker에서 14일간 배양을 하였다. 균사를 회수하여 접종한 경우 glucose 25g/L를 탄소원으로 사용한 배양액(양액 1)외의 양액에서는 균사가 생장을 하지 못 하였거나 느린 성장 속도를 보였다. Glucose 25g/L를 탄소원으로 사용한 배양액(배양액 1)에서 가장 왕성한 균사의 생장을 보였고 2, 3, 4, 5번 양액에서의 경우 균사 접종 방법과 상관없이 균사의 생장이 관찰되지 않았다. Avicel (10g/L, 양액 6)과 xylan(10g/L, 양액 7) 양액의 경우 균사는 생장을 하나 glucose (25g/L, 양액 1) 양액과 비교하면 초기 성장속도가 상대적으로 감소됨을 관찰할 수 있었다. 배양 배지에 균사 외부로 분비된 단백질의 총량을 분석을 통해 효율적인 양액의 선정을 하고자 하였다. 균사가 생장하지 못한 양액에서는 단백질이 극히 소량만이 검출되거나 검출되지 않았으며 균사가 생장한 glucose (25g/L, 양액 1), avicel (10g/L, 양액 6)과 xylan(10g/L, 양액 7) 양액의 경우 미량의 단백질 검출되었다. 14일 배양시 xylan(10g/L, 양액 7) 배양액에서 최고 145.26 μ g/ml, avicel(10g/L, 양액 6) 배양액에서 최고 88.79 μ g/ml의 단백질이 정량

양액	배양액 조성 <단위* (g/L)>
1	<u>glucose</u> 25, yeast extract 8, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.6, K ₂ HPO ₄ 0.3
2	<u>xylan</u> (from oat spelts) 10, yeast extract 0.2, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5, KH ₂ PO ₄ 1
3	<u>xylan</u> (from oat spelts) 5, peptone 5, NaCl 5, K ₂ HPO ₄ 1, MgSO ₄ 2, CaCl 1
4	<u>glucose</u> 5(1), (<u>xylan</u> 5(2)), (NH ₄) ₂ SO ₄ 14, urea 3, KH ₂ PO ₄ 20, MgSO ₄ ·7H ₂ O 3, CaCl ₂ 3, trace elements (FeSO ₄ ·7H ₂ O 1ppm, ZnCl ₂ 0.8ppm, MnSO ₄ ·H ₂ O 0.5ppm, CoCl ₂ ·6H ₂ O 0.5ppm)
5	<u>xylan</u> 5, ammonium chloride 10(1), (sodium nitrate 10(2)), KH ₂ PO ₄ 2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.3 CaCl ₂ 0.3, trace elements
6	<u>avicel</u> 10, NH ₄ NO ₃ 2.0, KH ₂ PO ₄ 0.6, NaH ₂ PO ₄ 0.2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.0005, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.06, yeast extract 1.0
7	<u>xylan</u> (from oat spelts) 10, NH ₄ NO ₃ 2.0, KH ₂ PO ₄ 0.6, NaH ₂ PO ₄ 0.2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.0005, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.06, yeast extract 1.0

Table 1. α-glucuronidase와 endo-1,4-Xylanase의 생산을 위한 배지 내 조성
 밑줄()은 양액에 첨가된 탄소원을 나타낸다.

* ppm 단위를 제외한 수치는 g/L의 농도값을 갖는다.

되었다. 수거된 배양액은 동일하게 40배씩 농축하여 단백질 정량을 수행하였고 단백질의 정량은 Bradford법을 이용하였으며 BSA를 표준물질로 이용하였다..

나. 최적 배양액 조성(g/L)

*Lentinus edodes*의 균사체를 배양하기 위한 배양액의 조성은 carbon source로 xylan (from oat-spelts, 10g)을 따로 121 °C, 20분간 가압 멸균하였으며, FeSO₄ · 7H₂O (0.0005g)는 0.45µm 필터를 이용하여 멸균하였다. 그 외 다른 배지 성분(NH₄NO₃ 2.0g, KH₂PO₄ 0.6g, NaH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001g, CaCl₂ · 2H₂O 0.06g, yeast extract 1.0g)은 121 °C, 20분간 가압 멸균 하였다.

다. 접종 및 배양

배양액에 2% potato dextrose agar(PDA) plate에서 14일간 배양된 균사를 1cm×1cm크기로 절단하여 본 배지에 접종하는 방법을 이용하였다. 접종된 배양액은 30°C, 130rpm rotatory shaker에서 5, 10, 15, 20일간으로 나누어 배양을 하였다.

라. 단백질 생산 확인

*Lentinus edodes*의 균사체에서 양액으로 분비된 단백질의 정량은 Bradford법을 이용하였으며 BSA를 표준물질로 이용하였다.

마. endo-1,4-Xylanase 활성 확인

endo-1,4-Xylanase의 기질로 1% xylan (from oat spelts)현탁액을 이용 (50 mM acetate buffer, pH 5.0)하였다. 기질과 수거된 양액을 10분간

pre-incubation시킨 후 기질 100ul에 배양액 50ul를 혼합하여 반응을 개시하였다. 적정시간의 반응 후 끓는 물에 5분간 중탕하여 반응을 종결시켰다. 산물의 정량은 DNS법에 의해 xylan의 분해로 생성된 환원력을 측정하였다. xylose를 표준물질로 이용하였으나 양액내의 잔존 당으로 인한 발색으로 인하여 DNS법에 의한 분석이 불가능 하였다. 반응산물의 분석을 위해서 배지내의 잔존 당의 제거가 필요성이 제기되었다. 1분 1umol 해당되는 환원당의 유리를 촉매하는 효소의 활성을 1Unit으로 정의 하였다.

바. α -Glucuronidase 활성 확인

기질은 Reduced aldouronic acids 2mg/dl (50 mM acetate buffer, pH 5.0)를 이용하였다. 표준물질은 glucuronic acid를 이용하였고 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다. 기질 100ul, crude enzyme 100ul를 incubation시킨 후 200ul를 취하여 5분간 끓는 물에 중탕하여 반응을 종결시켰다. Ice에서 반응액을 식혀 copper solution 1ml를 넣고 20분간 끓인 후 식히고 마지막으로 arsenomolybdate 1ml를 넣어 mix후 5분간 실온에서 반응을 시킨다. 그런 후 12000rpm에서 5분간 원심 분리하여 660nm에서 측정한다. 1분간 1umol의 glucuronic acid에 해당하는 환원력이 생성되는 효소의 활성을 1Unit로 정의하였다

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 복합효소 반응특성 평가

1) 버섯유래 복합효소의 분리정제

가) 균사와 배양액 분리, 잔존 당 제거, 단백질 농축

최초 배양액과 균사를 분리하기 위하여 배양액을 2000g로 30분간 원심 분리하였다. 원심분리로 분리된 상등액을 따로 취하여 0.45 μ m 여과지를 이용하여 상등액을 여과한 후 5KD cut-off membrane을 이용하여 단백질을 농축하였으며 이 방법을 통해 양액 내 잔존 당의 제거가 가능하였다. 반응 완충액으로 농축액을 2회 세척하여 $\times 40$ 농축한 용액을 crude enzyme solution으로 이용하였다.

나) 단백질 정량

배양액을 여과하여 농축($\times 40$)한 효소 용액의 단백질을 Bradford법에 의하여 정량하였다.

2) α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성측정

가) endo-1,4-xylanase 활성 측정

endo-1,4-xylanase의 기질로 1% xylan (from oat spelts)현탁액을 이용 (50 mM acetate buffer, pH 5.0)하였다. Xylose를 표준물질로 이용하여 산물의 정량은 DNS법에 의해 xylan의 분해로 생성된 환원력을 측정하였다. 기질과 배양액을 10분간 반응온도에서 pre-incubation시킨 후 기질 100ul에 배양액 50ul를 혼합하여 반응을 개시하였다. 적정시간의 반응 후 끓는 물에 5분간 중탕하여 반응을

종결시켰다. 1분간 1umol 해당되는 환원당의 유리를 촉매하는 효소의 활성을 1Unit으로 정의 하였다.

나) α -Glucuronidase 활성 측정

α -Glucuronidase의 기질은 Reduced aldouronic acids 2mg/dl (50 mM acetate buffer, pH 5.0)를 이용하였다. 표준물질은 glucuronic acid를 이용하였고 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다. 기질 100ul, crude enzyme 100ul를 incubation시킨 후 200ul를 취하여 5분간 끓인다. Ice에서 식혀 copper solution 1ml를 넣고 20분간 끓인 후 식히고 마지막으로 arsenomolybdate 1ml를 넣어 mix후 5분간 실온에서 반응을 시킨다. 그런 후 12000rpm에서 5분간 원심 분리하여 660nm에서 측정한다. 1분간 1umol의 glucuronic acid에 해당하는 환원력이 생성되는 효소의 활성을 1Unit로 정의하였다

다) α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 배양기간에 따른 의존도

*Lentinus edodes*의 배양기간에 따른 단백질 생산량을 확인하기 위하여 xylan 배양액에서 5일 간격으로 20일간 배양하여 각 양액을 10kD membrane으로 40배로 농축하여 단백질을 정량하였다. 효소의 활성 측정은 전술한 방법에 따라 측정되었으며, 반응온도는 50°C에서 이루어 졌다. 그 결과 배양기간이 길어질 수록 총 단백질량은 증가를 하나 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성은 10일에서 가장 높게 나왔다. 정제의 용이성을 위해서는 specific activity가 가장 높은 15일에 균사를 분리한 양액을 회수하는 것이 가장 효율적 이었다(Fig. 4, Table 2).

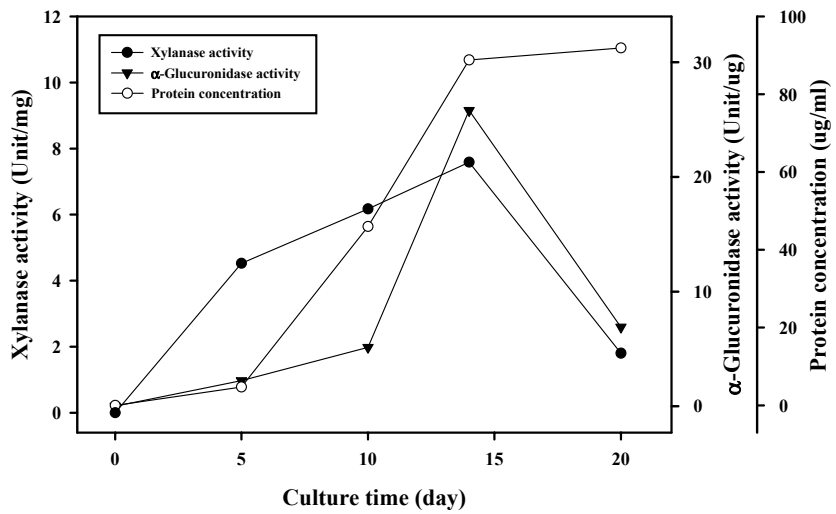


Figure 4. *Lentinus edodes*의 배양기간에 따른 endo-1,4-xylanase와 α-glucuronidase의 specific activity와 배양 여액의 단백질 농도

Table 2. 배양기간에 따른 단백질 생산량과 endo-1,4-xylanase와 α -glycoronidase의 specific activity

배양기간 (일)	단백질양 (ug/ml)	endo-1,4-xylanase activity (U/mg)	α -Glycoronidase activity (U/ug)
5	4.70	4.52	2.23
10	46.00	6.17	5.13
15	88.79	7.59	25.80
20	91.90	1.80	6.89

나. 가수분해효소 특성평가

1) 효소의 정제

가) 음이온 교환 크로마토그래피

상기 방법으로 배양한 배양액을 membrane filter를 이용하여 농축한 농축액을 crude enzyme으로 이용하여 효소의 정제를 수행하였다. 음이온 교환수지인 Q-sepharose(ϕ 2.5 × 10 cm)를 이용하여 정제를 시도 하였다. 50 mM MES buffer (pH 5.0)을 이용하여 평형화 한 후 같은 완충액으로 pH를 조절한 crude enzyme solution을 로딩 후, 동일 완충 용액으로 세척하여 비흡착 단백질을 세척하고 0.5 ml/min의 유속으로 0 ~ 1.0 M NaCl 기울기로 이온강도를 조절하여 용출되는 단백질을 분획분취기를 이용하여 분취하였다. 각 분획의 단백질 농도는 Bradford method를 이용하여 595nm에서의 흡광도로 측정하였으며 각 분획의 활성을 측정하여 원하는 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획을 확인하였다(Fig. 5). 활성이 확인된 분획들을 모아 4°C에 보관하고 다음 정제 과정에 사용하였다. 각각의 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성 피크는 Q-sepharose를 이용한 음이온 교환 크로마토그래피 수행시 부분적으로 겹침을 확인할 수 있었다.

나) Sephadex G-100을 이용한 Gel filtration

Q-sepharose를 이용한 음이온교환 크로마토그래피에서 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성이 확인되는 분획만을 모아 10 KDa molecular weight cut-off membranes을 사용해 농축하고 다음 단계의 정제를 수행하였다. 다음 단계의 정제는 Sephadex G-100(ϕ 1.5 × 75 cm)을 이용한 gel filtration으로 50 mM의 citrate phosphate buffer (pH 5.0)을 이용해 평형화 시킨 후 전단계의 과정에서 얻어져 농축된 단백질용액을 로딩하고 동일한 완충액을 0.5 ml/min의 유

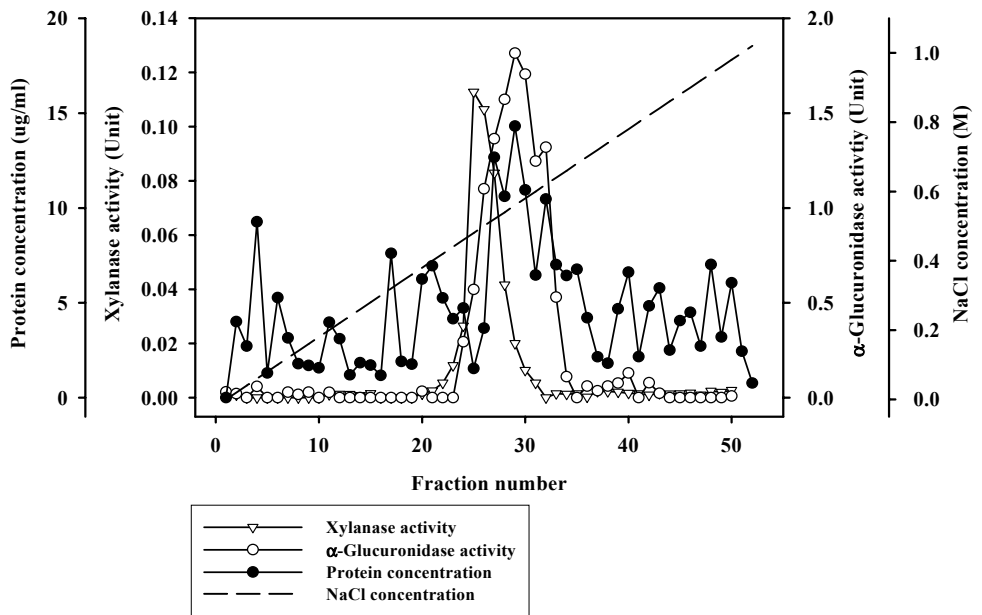


Figure 5. *Lentinus edodes*에서 유래한 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 Q-sepharose를 이용한 음이온 교환 크로마토그래피

속으로 흘러주었고 분획분취기로 각 분획을 얻었다. 분획의 단백질 농도는 Bradford method를 이용하여 595nm에서의 흡광도로 측정하였으며 각 분획의 활성을 측정하여 원하는 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획을 확인하였다(Fig. 6). Q-sepharose를 이용한 음이온교환 크로마토그래피에서 피크 겹침 정도가 Sephadex G-100을 이용한 gel filtration에서 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 피크 분리가 개선됨을 알 수 있었다. 해당 효소들의 피크 분리를 위해 정제 과정이 더 필요하였다.

다) Sephadex G-75를 이용한 Gel filtration

상기의 과정인 Sephadex G-100을 이용한 겔 크로마토그래피에서 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성이 겹쳐짐에 따라 더욱 높은 해상도와 pick의 분리를 위해 Sephadex G-75를 이용한 Gel filtration을 수행하였다. Sephadex G-100을 이용한 겔 크로마토그래피에서 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성이 확인되는 분획만을 모아 membranes (10 KDa molecular weight cut-off)을 사용해 농축하고 다음 단계의 정제를 수행하였다. 50 mM의 citrate phosphate buffer (pH 5.0)을 이용해 equilibration 후 전단계의 과정에서 얻어져 농축된 단백질용액을 Sephadex G-75 컬럼(ϕ 1 × 100 cm)에 로딩하고 동일한 완충액을 분당 0.5 ml씩으로 흘러주었고 분획분취기로 각 분획을 얻었다. 이렇게 얻은 분획의 단백질은 280nm의 흡광도를 통해 확인하였고 각 분획의 활성을 측정하여 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획을 확인하였다. 그 결과 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획이 분리되었음을 확인하였다(Fig. 7).

라) α -Glucuronidase분획의 Mono-Q를 이용한 음이온크로마토그래피

Sephadex G-75을 이용한 겔 크로마토그래피에서 α -Glucuronidase의 활성이 확인되는 분획만을 모아 membranes (10 KDa molecular weight cut-off)을

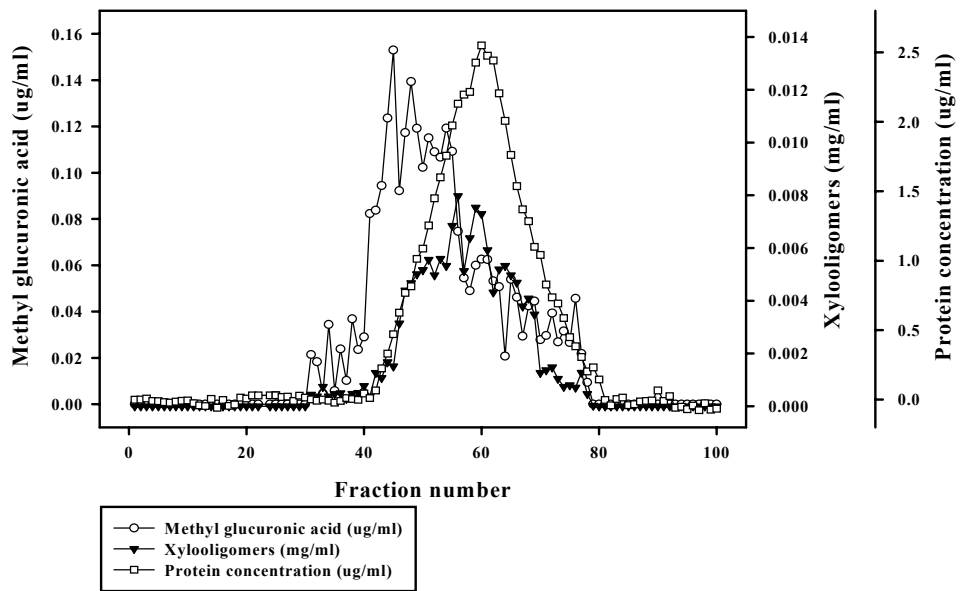


Figure 6. *Lentinus edodes*에서 유래한 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 Sephadex G-100을 이용한 겔 크로마토그래피

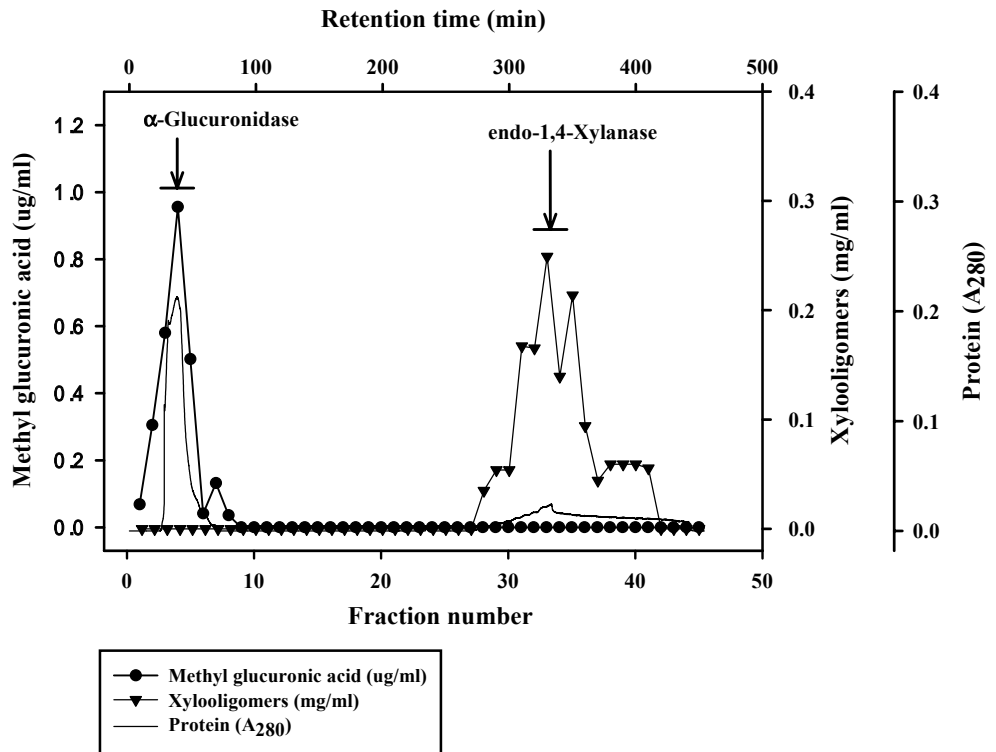


Figure 7. *Lentinus edodes*에서 유래한 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 Sephadex G-75를 이용한 겔 크로마토그래피

사용해 농축하고 다음 단계의 정제를 수행하였다. 다음 단계의 정제는 Mono-Q를 이용한 음이온 크로마토그래피로 50 mM MES buffer (pH 5.0)을 이용해 equilibration 후 전단계의 과정에서 얻어져 농축된 단백질을용액(α -Glucuronidase)을 로딩하고 동일한 완충액을 1ml/min의 유속으로 흘려주었고 분획분취기로 각 분획을 얻었다. 이렇게 얻은 분획의 단백질은 280nm의 흡광도를 통해 확인하였고 각 분획의 활성을 측정하여 α -glucuronidase의 분획을 확인하였다(Fig. 8). α -glucuronidase 활성을 갖는 분획들을 모아 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 이용해 효소의 순도와 분자량을 결정하였고 효소의 특성 조사에 사용하였다.

마) α -Glucuronidase분획의 Mono-Q를 이용한 음이온크로마토그래피

Sephadex G-75을 이용한 겔 크로마토그래피에서 endo-1,4-xylanase의 활성이 확인되는 분획만을 모아 membranes (10 KDa molecular weight cut-off)을 사용해 농축하고 Mono-Q를 이용한 음이온 크로마토그래피를 수행하였다. 50 mM MES buffer (pH 5.0)을 이용해 equilibration 후 전단계의 과정에서 얻어져 농축된 단백질을용액(endo-1,4-xylanase)을 로딩하고 동일한 완충액을 1ml/min의 유속으로 흘려주었고 분획분취기로 각 분획을 얻었다. 이렇게 얻은 분획의 단백질은 280nm의 흡광도를 통해 확인하였고 각 분획의 활성을 측정하여 endo-1,4-xylanase의 분획을 확인하였다(Fig. 9). endo-1,4-xylanase 활성을 갖는 분획들을 모아 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 이용해 효소의 순도와 분자량을 결정하였고 효소의 특성 조사에 사용하였다.

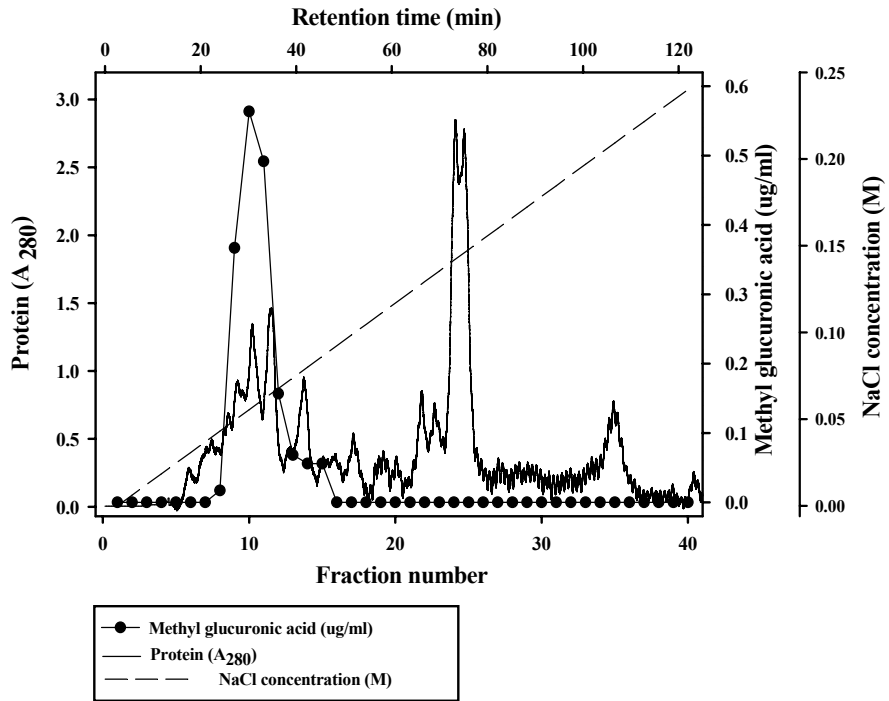


Figure 8. *Lentinus edodes*에서 생산된 α -Glucuronidase 분획들의 Mono-Q를 이용한 음이온 크로마토그래피

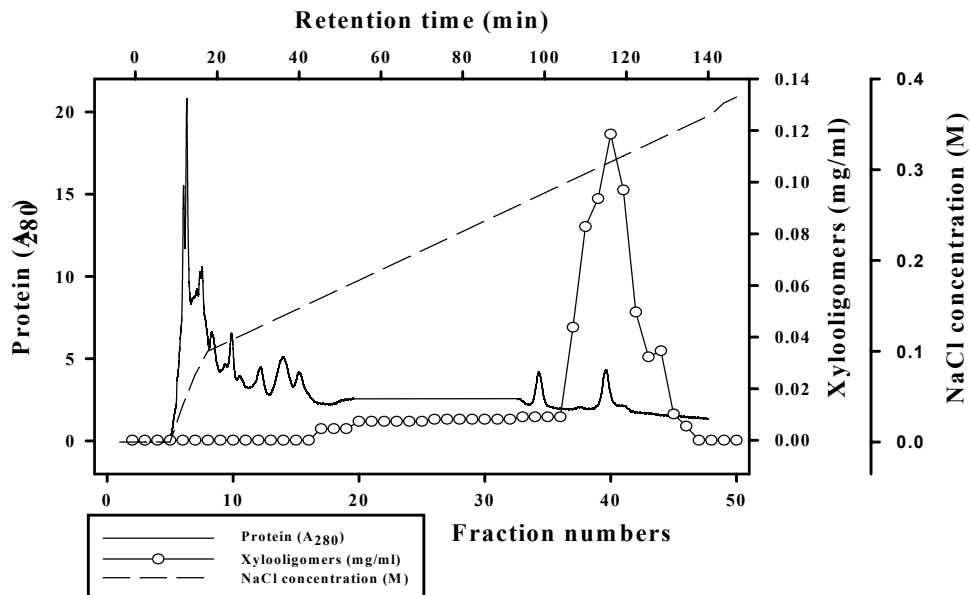


Figure 9. *Lentinus edodes*에서 생산된 endo-1,4-xylanase 분획들의 Mono-Q를 이용한 음이온 크로마토그래피

2) 정제된 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분자량 결정 및 purification table

상기의 방법으로 정제과정을 수행한 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분자량 결정 및 순도의 검증을 위하여 Mono-Q 음이온 교환 크로마토그래피를 수행한 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획을 모은 최종 sample을 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 수행하였다. SDS-PAGE상의 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분자량은 110 kD과 52KD으로 추정할 수 있었다(Fig. 10). Purification table에서는 정제과정 및 정제 단계별 효소의 활성도와 단백질의 수율을 나타내었다(Table 3).

다. 가수분해 복합효소 특성평가

1) 정제된 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획 내 가능성 있는 다른 효소의 촉매작용 관찰

*Lentinus edodes*에서 분리 정제 과정을 통하여 얻어진 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성을 보인 분획 내에, xylan의 가수 분해에 관여될 가능성이 있는 glucosidase와 galactosidase의 활성의 존재 유무를 측정했다. glucose와 galactose는 xylan 주쇄의 곁가지에 달려 있는 잔기로써 xylan 복합체의 구조에 영향을 미치며 glucosidase와 galactosidase의 활성이 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 활성 측정에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있다. 그러므로 순수하게 정제된 시료는 glucosidase와 galactosidase를 배제하여야 하며 glucosidase와 galactosidase의 활성 측정을 통해 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 정제가 올바르게 수행되었는지 평가할 수 있는 자료로써 활용했다. 정제 과정을 통해 얻어진 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획에 기질을 glucosidase에 활성이 있는 pNP-Glc (*p*-nitrophenyl glucose,

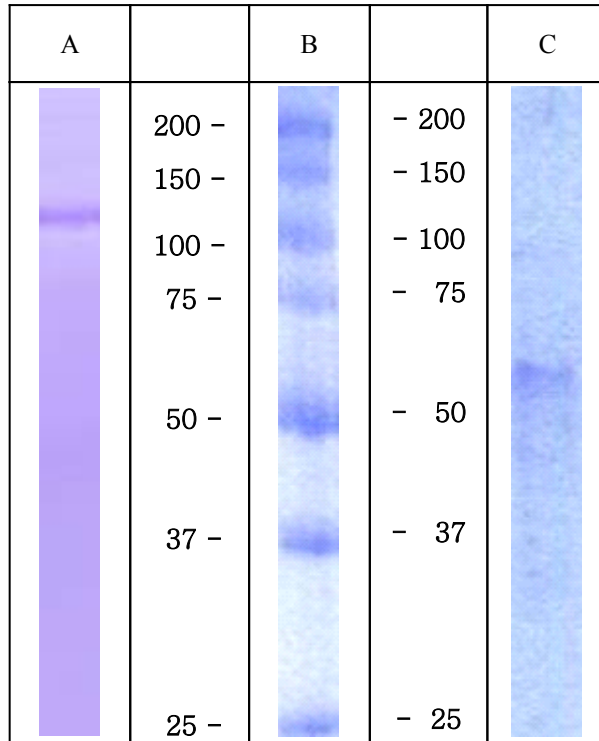


Figure 10 . *Lentinus edodes*로부터 유래한 α -glucuronidase 와 endo-1,4-xylanase의 SDS-PAGE.

lane A : α -Glucuronidase

lane B : Molecular weight standard

lane C : endo-1,4-xylanase

Table 3. *Lentinus edodes*로부터 유래한 α -g lucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 purification table

<i>Enzyme preparation</i>	<i>Yield (%)</i>	<i>Total protein (ug ml⁻¹)</i>	<i>Endo--1,4-Xylanase</i>				\square - <i>Glucuronidase</i>			
			<i>Protein conc. (ug ml⁻¹)</i>	<i>Total activity (Unit)</i>	<i>Specific activity (Unit mg⁻¹)</i>	<i>Fold</i>	<i>Protein conc. (ug ml⁻¹)</i>	<i>Total activity (Unit)</i>	<i>Specific activity (Unit mg⁻¹)</i>	<i>Fold</i>
Crude	100	206.27		0.0135	0.0652	1.00		0.1581	0.7665	1.00
Q-sepharose	72.82	150.31		0.0135	0.0901	1.38		0.3337	2.2201	2.90
Sephadex G-100	32.27	66.56	27.78	0.0651	2.3441	35.93	38.78	0.3566	9.1945	12.00
Sephadex G-75	19.50	40.23	4.84	0.0238	4.9127	75.30	35.39	0.3686	10.4164	13.59
Mono Q	0.01	2.85	0.83	0.0111	13.2777	203.52	2.02	0.0492	24.4151	31.85

2mM, 0.5ml)와 galactosidase에 활성이 있는 *p*NP-Gal(*p*-nitrophenyl galactose, 2mM, 0.5ml)를 각각 50 mM acetate buffer (pH 6.0, 1ml) 녹인 후, 정제 과정상 분리된 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 효소여액을 적당히 희석하여 50°C에서 50분간 반응을 수행하였다. 반응 종료는 0.5M sodium carbonate (1ml)로 하고, 410nm에서 활성을 측정하였다. 1분간 1 μ mol의 *p*-nitrophenol이 생성되는 효소의 활성을 1Unit로 정의하였다. 상기의 실험을 바탕으로 정제 과정을 통해 얻어진 α -Glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획에서는 glucosidase와 galactosidase의 활성이 존재하지 않았다. 아울러 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase는 xylan 복합체에 작용할 때 주쇄의 결사슬에 존재하는 glucose나 galactose에 활성이 없는 것으로 추정되었다(Fig 11, Table 4).

2) endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase 반응 조건의 최적화

가) endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 온도에 대한 최적화

*Lentinus edodes*에서 유래한 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 최적 반응 온도에 대한 조사를 위하여 다양한 온도에서 반응을 수행하고 해당하는 방법으로 각 효소의 활성을 측정하였다.

(1) endo-1,4-xylanase의 최적 반응 온도 및 온도 안정성

endo-1,4-xylanase를 25, 30, 40, 50°C에서 각각 10분간 incubation 한 후 해당 온도에서 xylan 분해 활성을 측정하였다. endo-1,4-xylanase는 40°C에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 12). endo-1,4-xylanase의 온도 안정성을 알아보기 위하여 30, 40, 45, 50°C에서 각각 10분간 incubation 하였으며 각각의 온도에서 10분, 30분, 60분, 120분 180분 300분간 incubation 된후 40°C에서 xylan 분해 활성을 측정하였다. 30, 40°C에서 endo-1,4-xylanase는 90%이상의 활성을 유지하였으며 30°C에서 300분 incubation 시 80%가까운 활성을 유지하였다(Fig. 13).

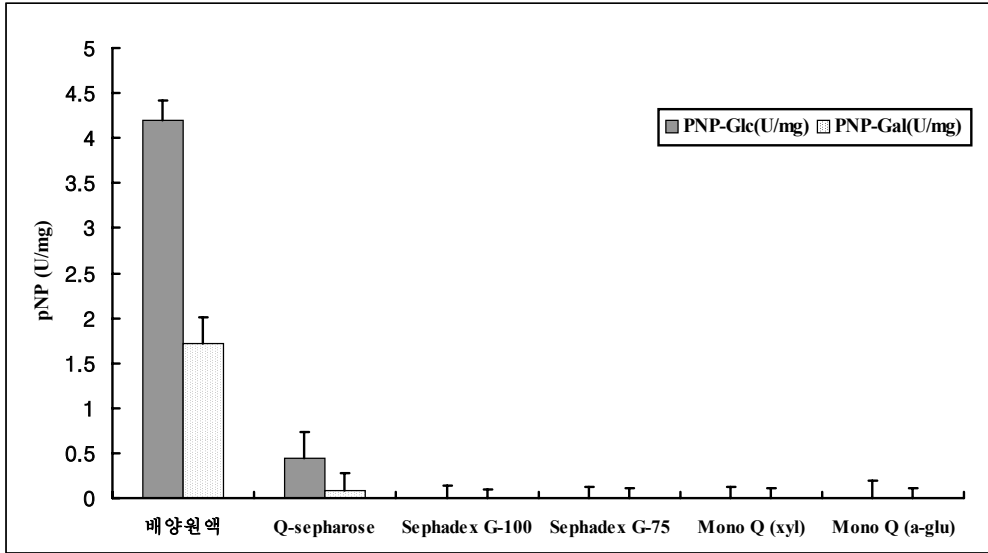


Figure 11. 각 정제 과정에서 얻어진 α-glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획 내 glucosidase와 galatosidase의 활성도

Table 4 각 정제 과정에서 얻어진 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 분획
 내 glucosidase와 galactosidase의 활성화도

Purification steps	Glucosidase activity		Galactosidase activity	
	PNP-Glc (U/mg)	relative activity	PNP-Gal (U/mg)	relative activity
배양원액	4.20	100	1.72	100
Q-sepharose	0.44	10.5	0.083	0.48
Sephadex G-100	0	0	0	0
Sephadex G-75	0	0	0	0
Mono Q (xyl)	0	0	0	0
Mono Q (a-glu)	0	0	0	0

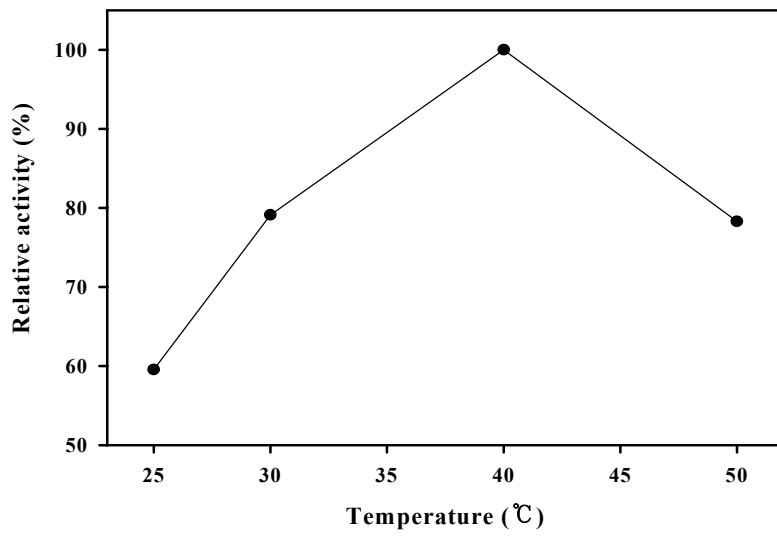


Figure 12. endo-1,4-endo-1,4-xylanase 반응의 온도의존성

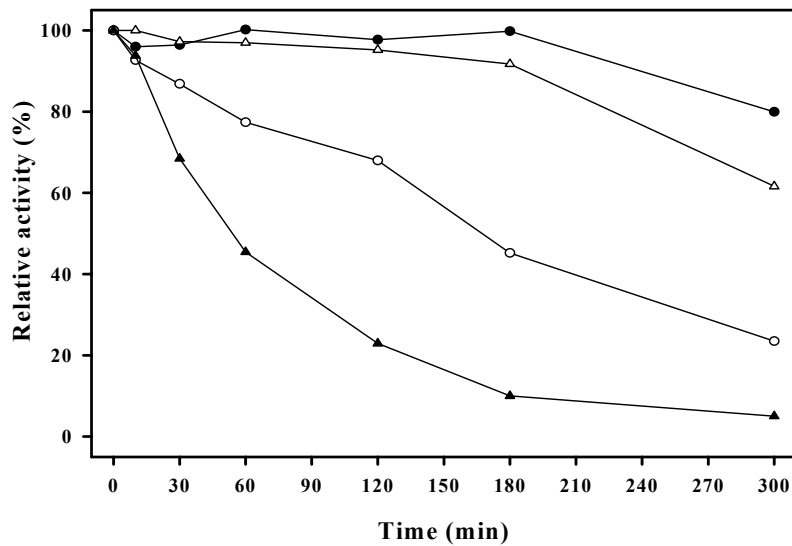


Figure 13. endo-1,4-xylanase의 온도 안정성
 -●- : 30°C, -△- : 40°C, -○- : 45°C, -▲- : 50°C

(2) α -glucuronidase의 최적 반응 온도 및 온도 안정성

α -glucuronidase를 25, 35, 45, 50, 60°C에서 각각 10분간 incubation 한 후 해당 온도별로 aldouronic acid 가수 분해 활성을 측정하였다. α -glucuronidase는 50°C에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 14).

나) endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 pH에 대한 최적화

*Lentinus edodes*에서 유래한 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase의 최적 반응 pH에 대한 조사를 위하여 각각의 효소액을 다양한 온도에서 해당 기질과 반응을 수행하고 활성을 측정하였다.

(1) endo-1,4-xylanase의 최적 반응 pH 및 pH 안정성

*Lentinus edodes*에서 생산된 endo-1,4-xylanase의 최적 반응 pH에 대한 조사를 위하여 다양한 완충용액을 이용하여 넓은 pH범위에 대한 활성을 측정하였다. pH 3 ~ 5의 범위에서는 50 mM의 citrate buffer를 이용하였고 pH 5 ~ 7의 범위에서는 50 mM citrate-phosphate buffer를 이용하였으며, pH 7 ~ 9의 범위에서는 50mM Tris-HCl buffer를 이용하여 pH범위를 조절하였다. 각 완충용액으로 pH가 조절된 효소용액을 40°C에서 1시간동안 incubation을 한 후 활성을 측정하여 각 pH에 대한 효소의 안정성을 확인 하였으며(Fig. 15) 해당 pH로 조절된 효소용액을 각각의 완충용액으로 제조한 기질용액에서 반응을 시켜 반응의 pH의존성을 확인하였다 (Fig. 16). endo-1,4-xylanase는 pH 3~6사이에서 80%이상의 활성을 유지하였으며 pH 4.0에서 가장 높은 활성을 보였다.

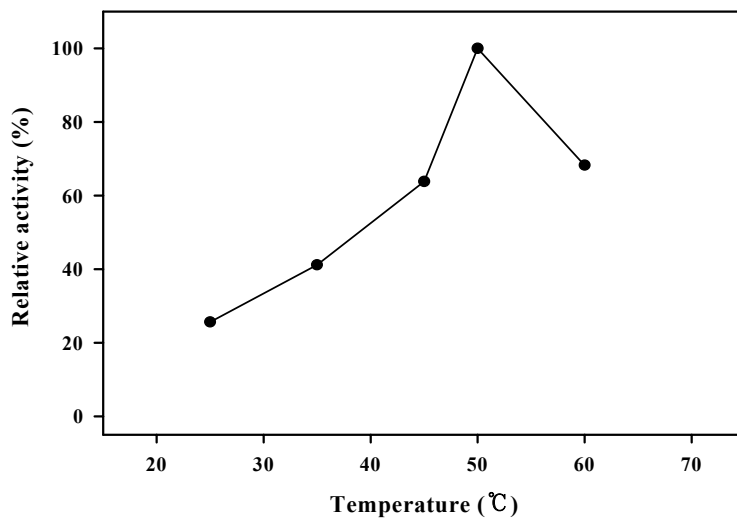


Figure 14. α -glucuronidase 반응의 온도의존성

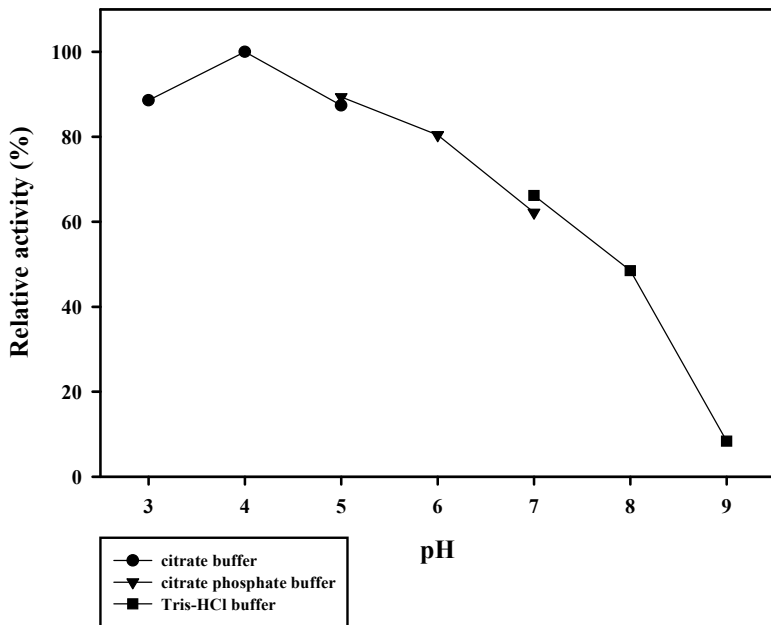


Figure 15. 정제된 endo-1,4-xylanase의 pH에 대한 안정성

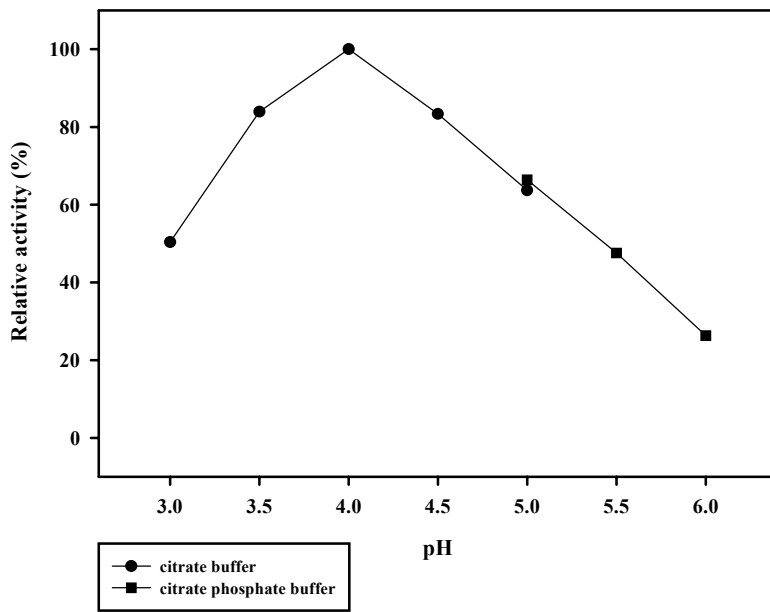


Figure 16. 정제된 endo-1,4-Xylanase 반응의 pH 의존성

(2) α -Glucuronidase의 최적 반응 pH

*Lentinus edodes*에서 유래한 α -glucuronidase의 최적 반응 pH에 대한 조사를 위하여 다양한 완충용액을 이용하여 넓은 pH범위에 대한 활성을 측정하였다. pH 3~5의 범위에서는 50 mM의 citrate buffer를 이용하였고, pH 5~7의 범위에서는 50 mM citrate-phosphate buffer를 이용하였으며, pH 7~8의 범위에서는 50mM Sod. phosphate buffer를 이용하여 pH범위를 조절하였다. 각 완충용액으로 pH가 조절된 효소용액을 40°C에서 해당 pH로 조절된 효소용액을 각각의 완충용액으로 제조한 기질용액에서 반응을 시켜 반응의 잔존 활성을 측정하여 pH 의존성을 확인하였다. α -Glucuronidase는 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 17).

3) endo-1,4-xylanase에 의한 xylan과 4-O-methyl-glucuronoxylan의 가수분해 산물의 측정

xylan과 4-O-methyl-glucuronoxylan이 endo-1,4-xylanase의 촉매작용에 의하여 생산되는 산물을 분석하기 위하여 얇은막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)를 수행하여 당의 양상을 조사하였다. 50mM citrate buffer (pH4.0)에 녹인 oat spelt xylan (1%)과 4-O-methyl-glucuronoxylan (1%) 현탁액 1ml를 각각의 기질로 하여 동일 buffer내의 endo-1,4-xylanase 100ul 와 잘 혼합해 30°C에서 최대 24 시간 동안 반응시킨 후 얻어지는 가수 분해 산물을 분석 물질로써 이용하였다. 준비된 sample들은 thin layer chromatography용 silica gel plate 60 F₂₅₄에 5ul 씩 점적하였고n-propanol-ethanol-water (7: 1: 2, v/v/v)를 전개용매로 사용하였다. 충분히 전개 시킨 후 5% sulfuric acid (in ethanol)를 판상에 골고루 분무하여 110°C에서 5분간 말려 가수 분해 산물을 확인하였다. 기준 물질은 Xylose, xylobiose, xylotriose, xylotetraose와 xylopentaose를 사용하였다.

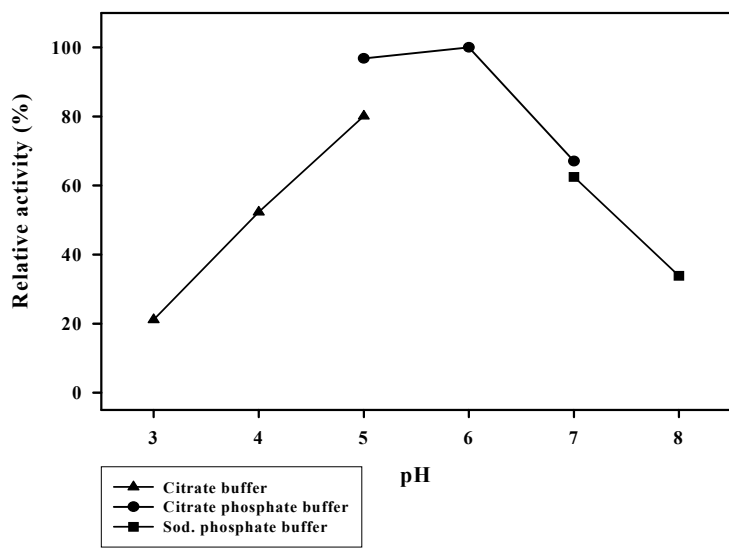


Figure 17. α -Glucuronidase 반응의 pH 의존성

시간이 경과 될수록 xylan과 4-*O*-methyl-glucuronoxylan 및 xylo-oligo 당이 감소하면서 endo-1,4-xylanase에 의한 xylan의 가수분해 주된 산물은 xylobiose, xylotriose를 이루고 (Fig. 18) 4-*O*-methyl-glucuronoxylan의 가수분해 주요 산물은 xylobiose, xylotriose 와 glucuronoxyloligomer을 이루었다(Fig. 19). 소량의 xylose의 생산도 관찰 되었다.

4) endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase의 상호작용에 대한 연구

Endo-1,4-xylanase에 의한 xylans의 가수분해의 결과 xylobiose, xylotriose 와 glucurono-xylooligomer를 주로 생산하는 양상을 보이며 α -glucuronidase의 가수분해는 glucuronic acid 단위체에 활성이 있으므로 xylan의 완전 분해를 위해서는 endo-1,4-xylanase와 α -glucuronidase의 활성이 동시에 필요하다. *Lentinus edodes*에서 생산된 이 두 효소의 상호 작용은 1% (w/v) oat spelts xylan와 같이 복잡한 구조를 갖은 중합체를 대상으로 하였을 때와 xylan 중합체의 구조가 단순화되어 glucuronic acid 단위체만을 결가지에 가지고 있는 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan 현탁액에서의 활성을 비교함으로써 해당 기질의 종류에 따른 각각의 효소 활성에 미치는 영향을 관찰할 수 있다. 특히 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan의 경우 glucuronic acid 단위체 외에는 다른 치환기가 주쇄에 연결되어 있지 않기 때문에 endo-1,4-xylanase와 α -glucuronidase 외의 효소의 활성이 배제될 수 있는 기질이므로 해당 두 효소의 상호작용에 대한 연구에 적합한 물질이다.

*Lentinus edodes*에서 생산된 endo-1,4-xylanase 와 α -glucuronidase사이의 상호작용을 연구하기 위해 각각 1% (w/v) oat-spelts xylan 또는 1% (w/v) 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan 현탁액을 기질로 하였다. 각각의 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase를 해당 기질에 처리하였을 때 서로 다른 조합으로 기질에 처리함으로써 얻어진 각각의 해당 효소의 활성도와 해당 효소만으로 처리하였을 때의 활성도를 0, 30, 60, 분의 시간대 별로 비교하였다. 해당 효소에 대한 각각의 기질의 가수 분해에 대한 반응 조건은 반응 초속도 구간 안에

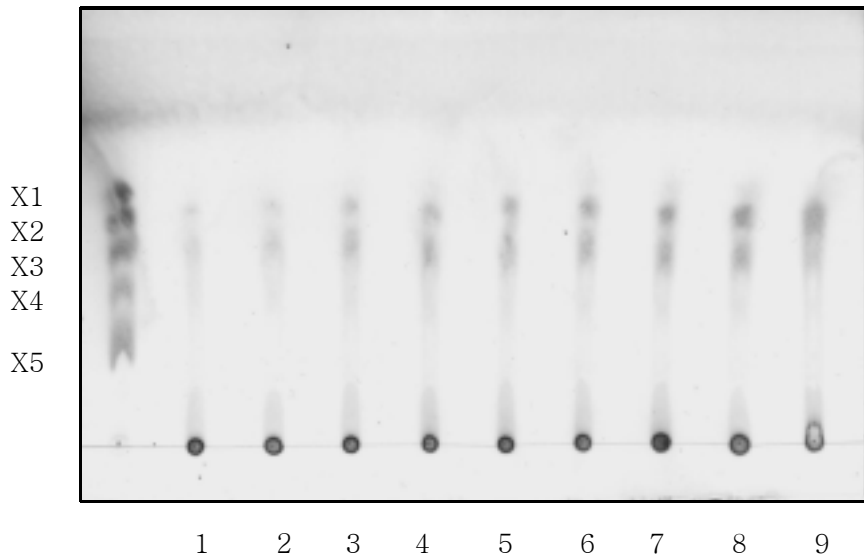


Figure 18. 30°C, 50 mM citrate buffer pH 4.0에서 1% oat-spelt xylan과 endo-1,4-xylanase의 촉매 작용에 의한 가수 분해 산물의 Thin layer chromatography을 이용한 분석

- 반응 시간

lane 2 (30분), lane 3 (1시간), lane 4 (2시간),
 lane 5 (3시간), lane 6 (5시간),
 lane 7 (9시간), lane 8 (15시간),
 lane 9 (20시간), lane 10 (24시간)

- 표준 물질 (lane 1)

X₁ : xylose, X₂ : xylobiose, X₃ : xylotriose,
 X₄ : xylotetraose, X₅ : xlopentaose

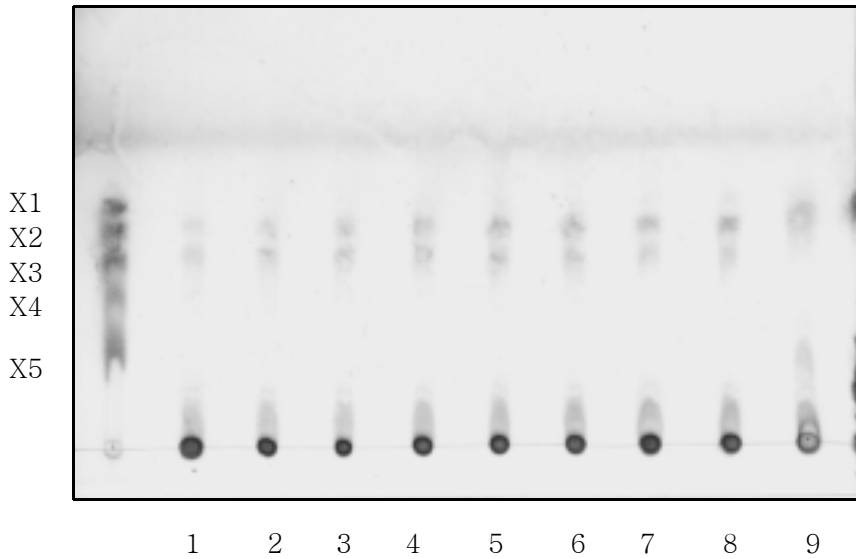


Figure 19. 30°C, 50 mM citrate buffer pH 4.0에서 1% 4-O-methylglucurono-xylan과 endo-1,4-xylanase의 촉매 작용에 의한 가수 분해산물의 Thin layer chromatography을 이용한 분석

- 반응 시간

lane 2 (30분), lane 3 (1시간), lane 4 (2시간),
 lane 5 (3시간), lane 6 (5시간),
 lane 7 (9시간), lane 8 (15시간),
 lane 9 (20시간), lane 10 (24시간)

- 표준 물질 (lane 1)

X₁ : xylose, X₂ : xylobiose, X₃ : xylotriose,
 X₄ : xylotetraose, X₅ : xlopentaose

서 정의하였으며 상기의 방법으로 endo-1,4-xylanase의 활성은 환원성 말단의 정량을 통해 측정하고 α -glucuronidase의 활성은 Somogyi/Nelson 시약으로 free acid의 환원력을 측정하였다.

(1) 기질 종류에 따른 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase 활성의 의존성

*Lentinus edodes*로부터 생산된 α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase를 oat-spelt xylan과 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan에 각각 처리하였을 때 가수 분해 되어 생성된 산물의 정량 비교를 하였다. 이 결과 α -glucuronidase를 각각의 기질에 처리하였을 때 유리되는 4-O-methyl-D-glucuronic acid과 endo-1,4-xylanase를 각각의 기질에 처리하였을 때 유리되는 xylooligomer의 산물의 양은 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 하였을 때가 xylan을 기질로 하였을 때 보다 생성 산물이 2배정도 증가됨을 보였다(Fig. 20). 최근에 α -glucuronidase는 xylo-oligo당에 치환되어 있거나 천연의 xylan 복합체에 결합 지로써 존재하는 4-O-methylglucuronic acid 단위체에만 기질 특이성이 있다는 점에 주목받고 있다. 최근의 α -glucuronidase의 연구는 4-O-methylglucuronic acid 단위체만이 치환되어 있는 xylo-oligo당에서 활발히 이루어지고 있으나 천연의 xylan 복합체에서의 α -glucuronidase의 활성에 관한 연구는 아직 미흡하다. 단지 *Thermoascus aurantiacus*, *Aspergillus niger*와 *Schizophyllum commune*에서 생산된 α -glucuronidases만이 xylan 복합체와 xylo-oligo당에 존재하고 있는 4-O-methylglucuronic acid 단위체에 대한 활성 평가를 하였고 두 기질에 대한 활성도는 거의 비슷한 결과 값을 보여주었다. 본 실험에서 *Lentinus edodes*로부터 생산된 α -glucuronidase는 두 기질의 활성도의 차이를 보였으며 이는 xylan 복합체 구조상 4-O-methylglucuronic acid 단위체 주변에 있는 다른 치환 그룹이 α -glucuronidase의 작용에 장애를 일으키는 현상으로 예상된다.

(2) α -glucuronidase와 endo-1,4-xylanase 혼합액 내의 효소활성도 및 상호작용 결과

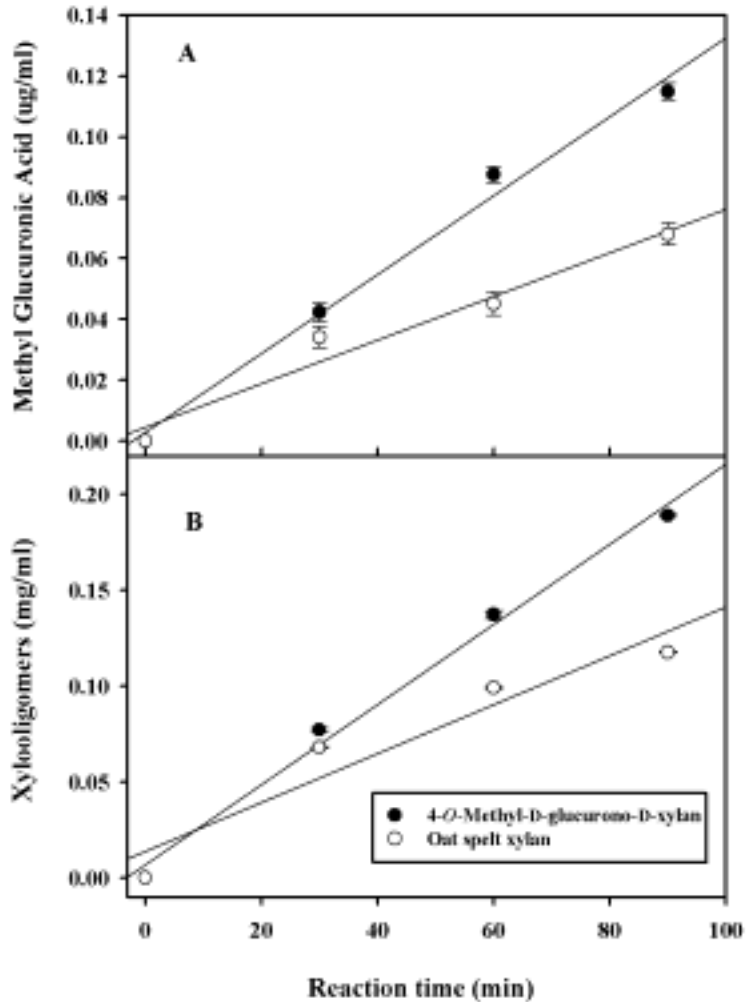


Figure 20. *Lentinus edodes*로부터 생산된 α -glucuronidase 와 endo-1,4-xylanase 가수분해 특성

- (A) 반응 시간별 α -glucuronidase의 가수 분해에 의한 4-O-methylglucuronic acid의 유리 정도
- (B) 반응 시간 별 endo-1,4-xylanase의 가수 분해에 의한 xylooligomer의 유리 정도

해당 기질 : 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan 과 Oat spelt xylan

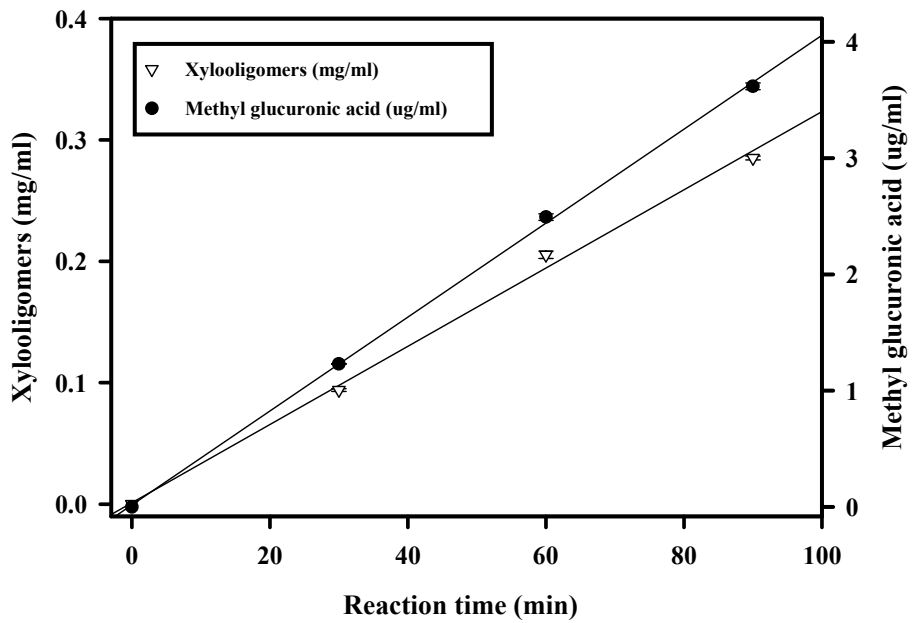


Figure 21. *Lentinus edodes*로부터 생산된 endo-1,4-xylanase와 α -glucuronidase의 혼합액을 이용한 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan의 가수분해 양상

실험 조건 : 45°C, 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0)

Symbol : (▽) ; Xylooligomers, (●); Methyl glucuronic acids

*Lentinus edodes*로부터 생산된 α -glucuronidase 와 endo-1,4-xylanase를 혼합하여 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan에 처리하였을 때 가수 분해 산물의 정량 비교의 결과는 4-*O*-methylglucuronic acid의 유리 정도가 각각의 효소를 혼합하지 않고 α -glucuronidase만을 효소액으로 사용했을 때 보다 24 배 가량 증가하였고 endo-1,4-xylanase의 산물인 xylo-oligo당의 경우 3배 가량 증가하였다 (Fig. 21). Endo-1,4-xylanase에 의하여 얻어지는 가수 분해 산물을 다시 α -glucuronidase 로 처리하였을 때 얻어지는 4-*O*-methylglucuronic acid의 정량적 비교는 oat-spelt xylan을 기질로 하는 경우 α -glucuronidase만을 해당 기질에 독립적으로 처리 하였을 때 보다 대략 7.5배 증가 하였고 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan을 분해 대상으로 하는 경우는 5.5배 증가를 하였다(Fig. 22). endo-1,4-xylanase의 처리 후 얻어지는 산물을 이용하여 α -glucuronidase의 처리하였을 때 가수 분해에 의한 4-*O*-methyl glucuronic acid 와 xylooligomer의 정량적 증가 양상과는 달리 α -glucuronidase 처리 후 얻어지는 산물을 이용하는 endo-1,4-xylanase의 촉매 작용에 의한 산물의 증가폭은 상대적으로 매우 작았다(Fig. 23).

Siika-aho의 연구에 따르면 *Trichoderma reesei*로부터 얻어진 α -glucuronidase는 주쇄의 비환원성 말단에 있는 xylose에 치환되어 있는 4-*O*-methylglucuronic acid에만 활성이 있다고 보고 되었다. Vries의 연구에 따르면 xylanase에 의한 xylan의 가수 분해 작용 양상은 xylan 주쇄에 치환기가 붙어 있지 않는 부분에 대한 활성을 보일 뿐만 아니라 말단 부위의 xylose 잔기와 인접의 잔기 사이의 가수분해 작용도 하는 것으로 보고 되었다.

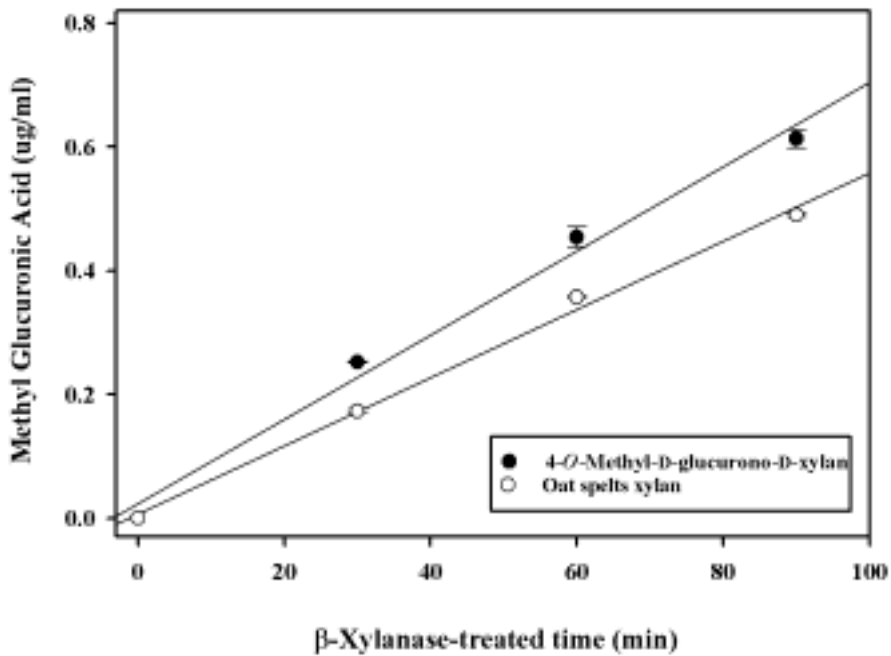


Figure 22 . Oat spelt xylan과 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 하여 endo--1,4-xylanase에 의한 가수분해 산물을 α -glucuronidase로 반응시킬 때 얻어지는 4-O-methyl-D-glucuronic acid의 정량

실험 조건 : 45°C, 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0)

Symbol : (○) ; oat spelt xylan,

(●) ; 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan

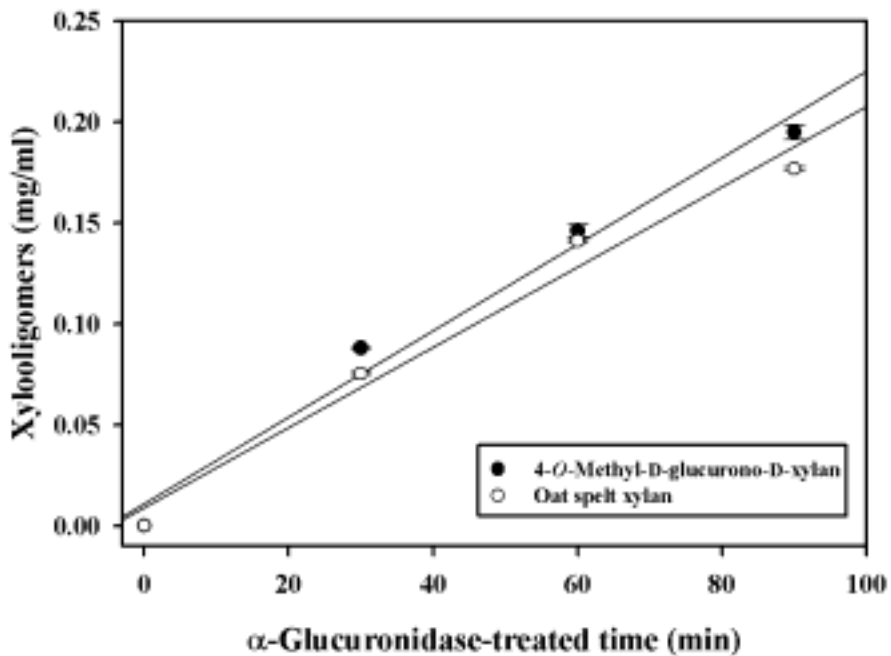


Figure 23 . Oat spelt xylan과 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan을 기질로 하여 α -glucuronidase에 의한 가수분해 산물을 endo-1,4-xylanase로 반응시킬 때 얻어지는 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid의 정량

실험 조건 : 45°C, 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0)

Symbol : (○) ; oat spelt xylan,

(●) ; 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan

4. 결 론

본 실험에서의 α -glucuronidase 와 endo-1,4-xylanase의 상호작용에 관한 결과는 endo-1,4-xylanase가 α -glucuronidase의 활성화에 중요한 역할을 하고 있음을 보여준다. 상기한 결과를 토대로 α -glucuronidase 와 endo-1,4-xylanase의 상호작용은 endo-1,4-xylanase의 xylan 주쇄에 대한 가수 분해 정도에 따라 α -glucuronidase에 의한 4-O-methyl glucuronic acid의 유리 정도가 크게 좌우됨을 의미한다. 그러므로 xylan의 효소 분해 과정에서 endo-1,4-xylanase에 의한 xylooligomer의 비환원성 말단과 인접부위에 위치한 D-xylopyranose 단위체의 가수 분해 현상은 4-O-methyl glucuronic acid 단위체와 D-xylopyranose의 α -1,2 결합에 특이성을 갖는 α -glucuronidase에 의한 가수 분해 작용보다 선행되어야 해당 기질의 효율적인 분해과정이 이루어 질 수 있다고 볼 수 있다. *Lentinus edodes*의 xylan 가수 분해 시스템에서 xylan의 효과적인 가수 분해를 위한 해당 효소의 상호작용은 endo-1,4-xylanase에 α -glucuronidase가 크게 의존적임을 결론지었다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구목표 달성도

세 부과제 및 주요내용	연 도			가중 치	비 고
	2000 (1차년도)	2001 (2차년도)	2002 (3차년도)		
◆ 군사체 배양을 통한 생리활성 물질 및 생산공정 개발 - 액체배양기술 개발 - 액체배양공정 개발 - 액체배양공정 최적화 기술 개 발 - 가공적성 검색 - 가공기술 개발 - 가공제품 개발 및 마케팅 전략 확립				40	
◆ 생리활성물질 분리정제공정 개 발 - 분리정제기술 개발 - 분리정제공정 개발 - 분리정제공정 최적화 및 시스템 구축				30	
◆ 가수분해 복합효소 활성평가 - 복합효소 반응특성 평가 - 가수분해효소 활성평가 - 가수분해 복합효소 특성평가				30	
목표달성도 (%)	30	30	40	100	

2. 관련분야의 기여도

가. 기술적 측면

- 최적 생산공정기술을 개발함으로써 고부가가치의 기능성 가공제품의 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 커다란 기여
- 가공기술을 개발함으로써 고부가가치의 기능성 가공제품 생산성 제고
- 개발된 생산공정을 다양한 생물산업 제품생산에 확대 적용함으로써 생물산업 제품의 국가경쟁력 강화
- 초임계 유체 추출공정 및 마이크로웨이브 이용 추출공정을 개발함으로써 시간 및 비용 절감을 통한 생산성 제고
- 국내기술 개발을 통하여 생리활성물질 생산에 관여하는 복합효소에 대한 연구결과를 확보함으로써 가공제품 개발 및 응용을 확대

나. 경제·산업적 측면

- 본 연구가 성공적으로 수행된다면 외국의 항암 및 면역계 관련 기능성 가공 제품의 수입대체 효과를 이룸과 동시에 국내시장 뿐아니라 국제시장에 수출할 수 있는 경쟁력을 갖출 것으로 기대
- 배양 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발함으로써 생산비용 절감에 따른 시장경쟁력 강화
- 암 질환자의 치료식 또는 예방식으로 섭취가능한 기능성 식품의 개발을 통하여 새로운 가공제품 시장 창출 및 고부가가치 생물산업 발전에 기여
- 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 버섯재배관련 농가의 소득증대 기여

제 5장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구결과를 활용할 수 있는 분야로는 미강 및 버섯관련 생리활성물질을 이용한 기능성 가공제품 개발분야등으로 예상
- 생물산업 관련업체에 기술을 이전하여 기능성 가공제품 생산에 활용
- 가공시제품 제작을 통한 고부가가치의 가공제품 개발 가능성을 제시하며 마케팅 전략 수립에 필요한 기초자료를 확보하므로써 식품 및 제약업계에서의 가공제품 대량생산 유도
- 최적 생산공정기술을 개발하므로써 가공제품 판매망 확보시 수요증대에 따른 가공제품 원료를 원활히 공급
- 다양한 기능성 식품소재 생산공정에 응용하여 관련 가공제품 생산성 향상에 활용

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

아라비녹실란은 면역계에서 매우 중요한 역할을 하는 NK(natural killer)세포를 활성화시켜 암치료에 있어서 화학요법 및 호르몬 요법에 대한 부작용을 현저히 감소시킬 수 있으며 AIDS 치료에 있어서 잠재적 가치가 있다고 보고되고 있다. 크실로즈(xylose)를 주쇄로하여 측쇄에 아라비노즈(arabinose)를 갖는 아라비녹실란은 면역부진에 기인한 질병환자가 증가하는 요즈음 면역력을 강화시키는 물질로서 새로운 식물소재의 가치가 대단히 크다. 또한 저분자의 신소재 식이 섬유로서 아라비녹실란은 소화기관에서의 흡수력이 매우 우수하여 면역강화 증대는 물론 지질대사 개선, 당질대사 개선 및 식이성 유래물질 독성저지 등의 작용을 가지고 있어 많은 관심이 집중되고 있다.

따라서 일본 및 미국을 비롯한 여러 선진국에서 항암 및 면역강화 등 인체에 탁월한 효능을 지닌 아라비녹실란을 제품화하고자 분리정제기술을 개발하고 있다. 그러나 국내에서는 아라비녹실란의 분리정제기술 및 생산기술 개발에 대한 연구가 거의 전무한 실정으로 이에 대한 연구개발이 절실히 요구되고 있다.

현재 아라비녹실란에 대한 연구는 일본을 중심으로 진행중에 있으나 아직 초기 단계이므로 기술도입의 필요성은 없다고 판단된다. 현시점에서 국내 연구개발을 바탕으로 독자적인 개발 기술 및 전략을 확보하는 방향이 국내시장 증가 및 국가 경쟁력 강화에 기반이 될 것으로 판단되므로 앞으로 지속적인 연구를 수행하여 생물산업에 있어서 활용도를 높일 필요가 있다.

제 7장 참고문헌

1. Ghoneum, M. and A. Jewett (1998), Production of tumor necrosis factor- α and interferon- γ from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro, *Cancer Detection and Prevention*, 24(4), 314-324
2. Ghoneum, M. (1998), Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran (MGN-3), *Int. J. Immunotherapy*, 14(2), 89-99
3. Ghoneum, M. (1998), Anti-HIV activity *in vitro* of MGN-3, an activated arabinoxylan from rice bran, *Biochem. and Biophysical Res. Comm.*, 243, 25-29
4. Lu, Z. X., P. R. Gibson, J. G. Muir, M. Fielding, and K. O'Dea (2000), Arabinoxylan fiber from a by-product of wheat flour processing behaves physiologically like a soluble, fermentable fiber in the large bowel of rats. *J. Nutr.*, 130, 1984-1990
5. Lopez, H. W., M. A. Levrat, C. Guy, A. Messenger, C. Demigne, and C. Remesy (1999), Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cereal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 10, 500-509
6. Vinkx, C. J. A., H. R. Reynaert, P. J. Grobet, and J. A. Delcour (1993), Physicochemical and functional properties of rye non starch polysaccharides. V. Variability in the structure of water-soluble arabinoxylans, *Cereal Chem.*,

70, 311-317

7. Vinkx, C. J. A., I. Stevens, H. Gruppen, P. J. Grobet, and J. A. Delcour (1995), Physicochemical and functional properties of rye non starch polysaccharides. VI. Variability in the structure of water-soluble arabinoxylans, *Cereal Chem.*, 72, 411-418

8. Andrewartha, K. A., D. R. Phillips, and B. A. Stone (1979), Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans, *Carbohydr. Res.*, 77, 191-204

9. Ghoneum, M. (1998), Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran (MGN-3), *Int. J. Immunotherapy.*, 14(2), 89-99

10. Morinaga H., Tazawa K., Tagoh H., and et al. (1994), An in vitro study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Japn. J. Cancer Res.*, 85, 1298-1303

11. Ghoneum M., Gill G., Wojdani A., and et al, (1987), Suppression of basal and *Corynebacterium parvum* - augmented NK activity during chemically induced tumor development, *Int. J. Immunopharmacol.*, 9, 71-78

12. Yunoki S., Tanaka N., Hizuta A., and et al. (1994), Enhancement of antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes by oral administration of PSK, *Int. J. Immunopharmacol.*, 16, 123-130

13. Sugimoto F., Tsukada K., Hatakeyama K., and et al. (1994), OK432

inhibits experimental hepatic metastasis of colon adenocarcinoma ACL-15 in F344 rats, *Surg. Today*, 24, 694-700

14. Kurosawa S., Harada M., Shinomiya Y., and et al. (1996), The concurrent administration of OK432 augments the antitumor vaccination effect with tumor cells by sustaining locally infiltrating natural killer cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 43, 31-38

15. Grajek, W. (1987), Hyperproduction of thermostable β -glucosidase by *Sporotrichum(Chrysosporium) thermophile*, *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 744-748

16. Ohara, I., D. Agr, R. Tabuchi, and K. Onai (2000), Effects of modified rice bran on serum lipids and taste preference in streptozotocin-induced diabetic rats, *Nutr. Res.*, 20, 59-68

17. Girhammar, U. and B. M. Nair (1992), Certain physical properties of water soluble non-starch polysaccharides from wheat, rye, triticale, barley and oats, *Food Hydrocolloids*, 6, 329-343

18. Chen, H., X. Li, and L. G. Ljungdahl (1994), Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(1), 64-70

19. Girhammar, U. and B. M. Nair (1992), Isolation, separation and characterization of water soluble non-starch polysaccharides from wheat and rye, *Food Hydrocolloids*, 6, 285-299

20. Patchett, M. L., R. M. Daniel, and H. W. Morgan (1987), Purification and properties of a stable β -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Biochem. J.*, 243, 779-787
21. Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (1995), Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties, *Carbohydr. Polymers*, 28, 33-48
22. Delcour, J. A., Vanhamel, S., and Hosenev, R. C. (1991), Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. II. Impact of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins on gluten-starch loaf volumes. *Cereal Chem.* 68, 72-78
23. Sun, R. C. (1996), Extraction, fractionation, isolation, and structural characterization of polysaccharides and lignin from wheat straw, PhD thesis, University of Walse, Bangor, 5-10
24. Sun, R. C., J. M. Lawther, and W. B. Banks (1996), Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses, *Carbohydr. Polymers*, 29, 325-331
25. Fang, J. M., R. C. Sun, J. Tomkinson, and T. P. Fowler (2000), Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system, *Carbohydr. Polymers*, 41, 379-387
26. Nigam, J. N. (2001), Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*, *J. Biotechnol.*, 87, 17-27

27. Kim, S. Y., D.-K. Oh, and J.-H. Kim (1999), Evaluation of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by *Candida parapsilosis*, *Biotechnol. Letters*, 21, 891-895
28. Park, W.-H. (1988), Studies on inorganic components of Korea mushrooms (I) - Inorganic components of *Laccaria laccata*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria tortilis* and *Laccaria vinaceoavellanea*, *Kor. J. Mycol.*, 16(4), 242-246
29. Lee, S.-I. and B.-M. Kim, (1986), Properties of crude trehalase from *Agaricus bisporus*, *Kor. J. Mycol.*, 14(3), 209-214
30. 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(2), 58-69
31. Kim. S.-W., E.-S. Kim, and Y.-S. Kim (1995), Studies on the polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 24(91), 147-153
32. Cho, S.-M., J.-H. Lee, S.-B. Han, H.-M. Kim, S.-H. Yu, and I.-D. Yoo (1995), Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (I): Charaterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution, *Kor. J. Mycol.*, 23(4), 332-339
33. Seviour, R. J., S. J. Stasinopoulos, D. P. F. Auer, and P. A. Gibbs (1992), Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi, *Critical Rev. Biotechnol.*, 12(3), 279-298

34. Chihara, G. (1985), Immune modulation agents and their mechanisms (lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator), *NY and Basel.*, 19, 409-436
35. Takehara, M. (1979), Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake), *Arch Virol.*, 59, 269-280
36. Tsunoda, A. (1969), A mushroom extract as an interferon inducer, *Ann. NY Acad. Sci.*, 173, 719-725
37. Nakano, T., K. Oka, K. Hanba, and S. Morita (1996), Intratumoral administration of schizophyllan activates langerhans cell and T-cell infiltration in cervical cancer, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 79(1), 79-86
38. Oliver, H., J. Rosebrough, A. Lewis, and R.J. Randall (1999), PSP - a powerful biological response modifier from the mushroom *Coriolus versicolor*, *Hong Kong Association for Health Care Ltd.*, 16-28
39. Ikuzawa, M., K. Matsunaga, S. Nishiyama, S. Nakajima, Y. Kobayashi, T. Andoh, A. Kobayashi, M. Ohhara, Y. Ohmura, T. Wada, and C. Yoshikumi (1988), Fate and distribution of an antitumor protein-bound polysaccharide, PSK (Krestin), *Int. J. Immunopharmacol.*, 10(4), 415-423
40. Kaibara, N., K. Soejima, T. Nakamura, and K. Inokuchi (1976), Postoperative long-term chemotherapy for advanced gastric cancer, *Jpn. J. Surg.*, 6(2), 54-59
41. Fujimoto, S., M. Takahashi, T. Minami, H. Ishigami, M. Miyazaki, and K. Itou (1979), Clinical value of immunochemotherapy with OK-432, *Jpn. J.*

Surg., 9(3), 190-196

42. Kashiwagi. Y., T. Norisuye., and H. Fujita (1981), Triple helix of *Schizophyllum commune* polysaccharide in dilute solution. 4. light scattering and viscosity in dilute aqueous sodium hydroxide, *Macromolecules.*, 14, 1220-1225

43. Park, K.-M. and B.-W. Lee (1998), Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 30(5), 1236-1242

44. Parris, M. (2000), The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment, *Altern. Med. Rev.*, 5(1), 4-27

45. Park, K.-S., J.-Y. Lee, S.-J. Lee, S.-H. Kim, and J.-S. Lee (1992), Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor*(Fr) Quel., *Kor. J. Mycol.*, 20, 72-76

46. Kwag, S.-D., J.-W. Bok, J.-W. Hyun, E.-C. Choi, and B.-K. Kim (1992), Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXXIII): Antitumor components of the cultured mycelia of *Paxillus atrotomentosus*, *Kor. J. Mycol.*, 20, 240-251

47. Kennedy, J. F., P. Methacanon, L. L., M. Paterson, and C. J. Knill (1998), Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydr. Polymers*, 34, 31-37

48. Kishida. E., Y. Sone. and A. Misaki (1992), Effects of branch distribution

and chemical modifications of antitumor (1→3)- β -D-glucans, *Carbohydr. polymers.*, 17, 89-95

49. Busto, M. D., N. Ortega, and M. Perez-Mateos (1995), Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures, *Soil Biol. Biochem.*, 27(7), 949-954

50. Yasumoto, K., K. Iwami, and H. Mitsuda (1971), A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine, *Agr. Biol. Chem.*, 35(13) 2059-2069

51. Hatvani, N. (2001), Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture, *Int. J. Antimicrobial Agents*, 17, 71-74

52. Zheng, Z. and K. Shetty (2000), Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 895-900

53. Kang, S.-W., E.-H. Ko, J.-S. Lee, and S.-W. Kim (1999), Over-production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass, *Biotechnol. Letters*, 21, 647-650

54. Chen, H. M. Hayn, and H. Esterbauer (1992), Purification and characterization of two extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1211, 54-60

55. Desrochers, M., L. Juras[‡], and M. G. Paice (1981), High production of β -

glucosidase in *Schizophyllum commune* : Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(1), 222-228

56. Cai, Y. J., J. A. Buswell, and S. T. Chang (1998), β -glucosidase components of the cellulytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*, *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 122-129

57. Wei, D. L., K. Kirimura, S. Usami, and T. H. Lin (1996), Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*, *Current Microbiol.*, 33, 297-301

58. Gomes, I., J. Gomes, D. J. Gomes, and W. Steiner (2000), Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 461-468

59. Woodward, J. and A. Wiseman (1982), Fungal and other β -D-glucosidases - their properties and applications, *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 73-79

60. Saha, B. C. and R. J. Bothast (1996), Production, purification, and characterization of a high glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9), 3165-3170

61. Sengupta, S. and S. Sengupta (1990), β -glucosidase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 309-314

62. Buehler, H. J., P. A. Katzman, and E. A. Doisy (1951), Studies on β -glucuronidase from *E. coli*. (18591), *P.S.B.E.M.*, 76, 672-676
63. Wozniak, C. A. and L. D. Owens (1994), Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*), *Physiologia Plantarum*, 90, 763-771
64. Gottschalk, T. E., J. E. Nielsen, and P. Rasmussen (1996), Detection of endogenous β -glucuronidase activity in *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 240-244
65. Bailey, M. J. and M. Linko (1990), Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation, *J. Biotechnol.*, 16, 57-66
66. Nagy, Z., T. Kiss, A. Szentirmai, and S. Biro (2001), β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*. production, purification, and characterization of the enzyme, *Protein Expression and Purification*, 21, 24-29
67. Gonzalez, R. R. and P. Monsan (1991), Purification and some characteristics of β -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 349-352
68. Karunakaran, T. and B. G. Devi (1994), Factors influencing β -galactosidase activity of *Aeromonas caviae*, *J. Basic Microbiol.*, 34(4), 245-252
69. Lind, D. L., R. M. Daniel, D. A. Cowan, and H. W. Morgan (1989), β -galactosidase from a strain of the anaerobic thermophile,

Thermoanaerobacter, *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 180-186

70. Brady, D., R. Marchant, L. McHale, and A.P. McHale (1995), Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media, *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 696-699

71. McNeil, B. and B. Kristiansen (1990), Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullans* in stirred tanks, *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 521-526

72. Chi, J.-H., T.-M. Ha, Y.-H. Kim, and Y.-D. Rho (1996), Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*, *Kor. J. Mycol.*, 24(3), 214-222

73. Choi, J.-H., S.-Y. Kim, D.-K. Oh, and J.-H. Kim (1998), Optimization of culture conditions for production of a high viscosity polysaccharide, methylan, by *Methylobacterium organophilum* from Methanol, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26(3), 244-249

74. Park, K.-S., and J.-S. Lee (1991), Optimization of media composition and culture conditions for the mycelia growth of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 6(1), 91-98

75. Ohta, A. (1990), A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi, *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 31, 323-334

76. Ryosuke.S., Y. Oiso, Y. Matsumoto, and H. Ohmori (2001), Production of

an immunosuppressive polysaccharide, AZ9, in the culture of *Klebsiella sxytoa* strain TNM3, *J. Biosicen. Bioeng.*, 92(5), 485-487

77. Quagliano. J.C. and S. S. Miyazaki (1997), Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 662-664

78. Kurane. R. and Y. Nohata (1994), a new water-absorbing polysaccharide from *Alcaligenes latus*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(2), 235-238

79. Lee, J.-H. (1994), Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharide, *The Microorganisms and Industry.*, 20, 14-21

80. Duff, S. J. B., D. G. Cooper, and O. M. Fuller (1987), Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and β -glucosidase by a mixed fungal fermentation, *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 47-52

81. Brown, J. A., S. A. Collin, and T. M. Wood (1987), Development of a medium for high cellulase, xylanase and β -glucosidase production by a mutant strain(NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*, *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 355-360

82. Champluvier, B., B. Kamp, and P. G. Rouxhet (1988), Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp., *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 611-617

83. Fiedurek, J., A. Gromada, and J. Jamroz (1996), Effect of medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1, *J. Basic Microbiol.*, 36(1), 27-32
84. Bata, J. and C. Gerbi (1997), Glycoside hydrolase production by an anaerobic rumen fungus *Caecomyces communis*, *Res. Microbiol.*, 148, 263-269
85. Ryu, K., K.-Y. Lee, and E.-K. Lee (2001), The structure analysis and biosynthesis of β -glucan by *Alcaligenes faecalis*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 16(4), 409-414
86. Anna Ebringerova. (2000) Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 542-555.
87. Arantza C., Alister J.H., Alex H.G., Sheila I.M., Thomas M.W. (1995) D-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaetes chrysosporium*: isolation and partial characterization of an α -(4-O-methyl)-D-glucuronidase. *J. Biotechnol.* **43**, 183-194
88. Bakalova NG, Petrova SD, Atev AP, Bhat MK, Kolev DN. (2002) Biochemical and catalytic properties of endo--1,4-xylanases from *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). *Biotechnol. Letters* **24**, 1167-1172
89. Bataillon, M., Cardinali, A. - P. N., Castillon, N., and Duchiron, F. (2000) Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus sp.* strain SPS-O. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 187-192.

90. Biely P., Vranska M., Tenkanen M., Kluepfel D. (1997) Endo--1,4-xylanases families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57**, 151-166.
91. Biely, P., Hirsch, J., Grange, D. C., van Zyl, W. H., and Prior, B. A. (2000) A chromogenic substrate for a β -xylosidase-coupled assay of a -glucuronidase. *Anal. Biochem.* **286**, 289-294.
92. Breccia, J. D., Siñeriz, F., Baigorí, M. D., Castro, G. R., and Hatti, -K. R. (1998) Prification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 42-49.
93. Brisaria, V. S., and T. K. Ghose. (1981) Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 90-104.
94. Campbell AC., Racjan M. (1999) The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). *Internat. Biodeterio. & Biodegr.* **43**, 101-107.
95. Castanares A., Hay A.J., Gordon A.H., McCrae S.I., Wood T.M. (1995) D-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*: isolation and partial characterization of -(4-O-methyl)-D-glucuronidase. *J. Biotechnol.* **43**, 183-194.
96. Chivero, E. T., Mutukumira, A. N., and Zvauya, R. (2001) Partial purification and characterisation of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe. *Food*

chem. **72**, 179–185.

97. Christakopoulos, P., Mamma, D., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B., and Claeysens, M. (1996) Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. *Bioresour. Technol.* **58**, 115–119.

98. Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P. (1993) Hemi-cellulose and Hemicellulase pp. 30–34, Portland Press, London.

99. Daniela Farani de Souza, Cristina Giatti Marques de Souza, Rosane Marina Peralta. (2001) Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation *Process Biochemistry* **36**, 835–838

100. Elisashvili, V. I., and Khardziani, T. A. (1993) Induction and catabolite repression of synthesis of cellulase by *Cerrena unicolor* 062. *Biochemistry (Moscow)* **58**, 915–920.

101. Elisashvili, V. I., Khardziani, T. Sh., Tsiklauri, N. D., and Kachlishvili, E. T. (1999) Cellulase and xylanase activities in higher basidiomycetes. *Biochemistry (Moscow)* **64**, 858–863.

102. Filho, E. X. F. (1994) The xylan-degrading enzyme system. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 1093–1109.

103. Ghoneum, M. (1995) Abstract Cancer: The Interference between Basic and Applied Research. An American Association for Cancer Research (AACR) Special Conference, Baltimore MD, November, pp. 5–8

104. Ghoneum, M., and Manattala, G. (1996) Abstract 87th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Washington DC, April, pp. 22-24
105. Ghoneum, M. (1997) Anti-HIV activity in vitro of MGN-3, an activated arabinoxylane from rice bran. *Biochem. biophys. res. commun.* **243**, 25-29.
106. Godfrey, T., and West, S. (1996) Industrial enzymology : The application of enzymes in industry. MacMillan, New York.
107. Ishihara M., Nojiri M., Hayashi N., Nishimura T., Shimizu K. (1997) Screening of fungal α -xylanases for production of acidic xylooligosaccharides using *in situ* reduced 4-*O*-methyl-glucuronoxylan as substrate. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 170-175.
108. Johnson K.G., Harrison B.A., Scheiner H., MacKenzie C.R., Fontana J.D. (1989) Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20**, 245-258.
109. Khandke, K. M., Vithayathil, P. J., and Murthy, S. K. (1989) Degradation of larchwood xylan by enzymes of a thermusfungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 501-510.
110. Lee C.C., Wong W.S., Robertson G.H. (2001) Cloning and characterization of two cellulose genes from *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Letters* **205**, 355-360.
111. Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, J., and Ma, G. (1998) Production, partial

purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochemistry*. **33**, 331–336.

112. Maiga, Tenkanen. (2000) An α -Glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan, *Journal of Biotechnology*. **78**, 149–161

113. Marian, A. Verbruggen. (1998) Enzymic degradation of sorghum glucuronoarabinoxylans leading to tentative structures. *Carbohydr. Res.* **306**, 275–282

114. Michael, P. Coughlan, and Geoffrey P. Hazlewood (1993) *Hemicellulose and Hemicellulases*, Portland Press, London

115. Milagres, A. M. F. and Sales, R. M. (2001) Evaluating the basidiomycetes *Poria medula-penis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 522–526.

116. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.

117. Milner, Y., and Avigad, G. (1967) A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr. Res.* **4**, 359–361.

118. Mitsuro Ishihara, (1997) Screening of fungal β -xylanases for production of acidic xylooligosaccharides using *in situ* reduced 4-*O*-methylglucuronoxylan as substrate. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 170–175

119. Mizuno T. (1995) Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for

medicinal and food purpose. *Food Rev. Int.* **11**, 111–128.

120. Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **195**, 375–380.

121. Nilsson, M., Åman, P., Härkönen, H., Hallmans, G., Bach Knudsen, K. E., Mazur, W., and Adlercreutz, H. (1997) Nutrient and lignan content, dough properties and baking performance of rye samples used in Scandinavia. *Acta Agriculturae Scandinavica* Section B. Plant Science. **47**, 26–34.

122. Odilia, P-A., Teresa, P-N., Ignacia, M-P., and Mayra, T. (1996) Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 405–409.

123. R. J. Redgwell, (2001) Xylanase Induced Changes to Water- and Alkali-Extractable Arabinoxylans in Wheat Flour: Their Role in Lowering Batter Viscosity. *Journal of Cereal Science* **33**, 83–96

124. Ronald, P., (1997) *aguA*, the Gene Encoding an Extracellular α -Glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, Is Specifically Induced on Xylose and Not on Glucuronic Acid, *Journal of Bacteriology.* **180**, 243–249

125. Ronald P. de Vries (2000) Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **327**, 401–410

126. Shao W., Obi S.K.C., Puls J., Wiegel J. (1995) Purification and characterization of the α -glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain

JW/SL-YS485, an important enzyme for the utilization of substituted xylans. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1077-1081.

127. Siika-aho, M., Tenkanen, M., Buchent, J., Puls, J., and Viikari, L. (1994) An α -glucuronidase from *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 813-819.

128. Simão, R. C., Souza, C. G. M., and Peralta, R. M. (1997) Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl β -D-xyloside. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 267-271.

129. Salles, B. C., Cunha, R. B., Fontes, W., Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. (2000) Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J. Biotechnol.* **81**, 199-204.

130. Souza, D. F., Souza, C. G. M., and Peralta, R. M. (2001) Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* **36**, 835-838.

131. Tatjana cesar, (1996) Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 289-296

132. Tenkanen, M., and Siika-aho, M. (2000) An α -glucuronidase of *Schizophyllum commune*, acting on polymeric xylan. *J. Biotechnol.* **78**, 149-161.

133. Tolan, J. S., Olson, D., and Dines, R. E. (1996) Survey of mill usage of xylanase. In Jeffries, T. W., and Viikari, L. (ed) *Enzymes for pulp and paper*

processing pp. 25-35, American Chemical Society, Washington DC.

134. Törrönen A., Kubicek C.P., Henrissat B. (1993) Amino acid sequence similarities between low molecular weight endo-1,4- β ,D-xylanases and family H cellulases revealed by clustering analysis. *FEBS Letts.* **321**, 135 - 139.

135. Verbruggen M.A., Beldmen G., Voragen A.G.J (1998) Enzymic degradation of sorghum glucuronoarabinoxylans leading to tentative structures. *Carbohydr. Res.* **306**, 275-282.

136. Vinkx C.J.A, Delcour J.A. (1996) Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: A Critical Review. *J. Cereal. Sci.* **24**, 1-14.

137. de Vries R.P., Poulsen C.H., Madrid S., Visser J. (1998) aguA, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *J. Bacteriol.* **180**, 243-249.

138. de Vries R.P., Kester H.C.M., Poulsen C.H., Benen J.A.E., Visser J. (2000) Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **327**, 401-410.

139. Weilan Shao, Samuel K. C. Obi, Jurgen Puls, and Juergen Wiegel. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1077-1081.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.