

The effect of the dissolved oxygen concentration on the production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*

최수형 · 구만복*

광주과학기술원 환경공학과

전화 (062) 970-2440, FAX (062) 970-2434, e-mail mbgu@kjist.ac.kr

Abstract

The effect of the dissolved oxygen (DO) concentration on the production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* was studied in the immobilized reactor system. The oxygen levels significantly affected the production of manganese peroxidase (MnP) as well as that of H₂O₂. It is known that a high oxygen level is required to produce this enzyme. In this study, however, higher DO concentrations above a critical DO concentration inhibited MnP production. It is thought that a greater H₂O₂ production seen with higher DO concentrations caused adverse effects on the MnP production. On the other hand, with lower DO concentrations, H₂O₂ did not accumulate enough to stimulate MnP production.

서론

*Phanerochaete chrysosporium*으로부터 생산되는 lignin peroxidase(LiP)와 manganese peroxidase(MnP)는 다양한 종류의 난분해성 물질을 분해할 수 있는 것으로 알려져 있어서^{1,2} 최근 들어 biopulping이나 목재의 biobleaching과 같은 환경정화공정에 많이 응용되고 있는 실정이다. 따라서 효율적으로 ligninase를 생산하기 위한 많은 연구들이 진행되었으며, 그 중에서도 *Phanerochaete chrysosporium*은 절대 호기성 균주로 LiP와 MnP를 생산하기 위해서는 높은 oxygen tention을 요구하는 것으로 알려져 있다. 하지만 이들 연구는 주로 flask 배양을 중심으로 이루어 졌으며, 배양중의 산소의 양이나, pH 변화 등을 조절할 수 없다는 한계가 있으므로 순수하게 산소효과만을 연구하지는 못했다³.

따라서 체계적으로 DO농도를 달리하며 MnP의 생산동향을 관찰한 연구는 지금까지 진행된 바 없으며, 더욱이 산소의 긍정적인 효과에 대한 연구결과는 많이 발표되었지만 산소의 부정적인 효과에 대한 연구는 아직까지 발표된 바 없었다. 본 연구에서는 모든 조건을 동일하게 유지할 수 있는 bioreactor를 이용하여 체계적으로 DO 농도만을 달리하며 MnP의 생산동향을 살펴보았으며, 그 결과 MnP

생산에 있어서 산소는 긍정적인 효과뿐만 아니라 과량으로 공급될 시 부정적인 효과를 가져올 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라 이러한 경향을 가능케 하는 원인을 제시하기 위하여 산소농도에 따른 H_2O_2 의 생산량을 측정하였으며, 이 생산량을 MnP 생산과 함께 비교 설명함으로써 과량의 산소공급에 따른 MnP 생산의 저해 원인을 제시하고자 하였다.

실험방법

Phanerochaete chrysosporium(ATCC24725)을 37°C malt agar plate에서 일주일간 배양하여 spore를 형성한 후 멸균한 glass wool을 통과시켜 6×10^5 /mL가 되도록 접종하였다. 배지의 성분은 질소제한 배지(Ammonium tartrate 0.2 mM)를 이용하였으며 기타 조성은 Tien and Kirk⁴에 명시된 조성을 따랐다. 먼저 0.5 cm x 0.5 cm x 0.5 cm 크기의 polyurethane foam(광주과학기술원 신소재공학과 제조) 15 g을 1.5 L 용량의 reactor에 800 mL의 배지와 함께 멸균시킨 후 여기에 준비된 spore를 6×10^5 /mL접종하였다. 배양 조건은 pH 4.5, 온도 39 °C, 교반속도 120 rpm으로 모든 조건의 실험을 동일하게 유지하였으며, 산소의 농도(DO)만을 달리하여 모든 실험을 진행하였다. 산소의 농도를 조절하기 위하여 질소와 공기를 이용하여 0 %와 100 %를 보정 하였고 배양중의 100 % 이상의 DO 농도를 조절하기 위하여 pure oxygen을 사용하였으며, 일정량의 DO 수준의 유지를 위하여 autoregulator를 이용하였다. 각기 다른 조건에서 생산되는 manganese peroxidase활성도는 Mn(II)를 기질로 이용하여 측정하였다⁵.

결과 및 고찰

본 연구에서는 70 %, 100 %, 150 %, 260 %, 345 %의 5가지 DO 농도를 설정하여 이에 따른 H_2O_2 의 생산과 MnP의 생산을 비교하였다. 먼저 공기만으로 70 %의 DO를 유지해 준 경우에 있어서는 25일 동안에 glucose가 모두 소비되는 경향을 보였으나, H_2O_2 나 MnP의 생산은 나타나지 않았다(data not shown). 반면, 순수산소를 이용하여 100 %이상으로 DO농도를 유지해 준 경우에는 MnP의 생산과 H_2O_2 의 생산을 확인할 수 있었다.

그림 1은 이들 다양한 조건 중 100 %와 260 %로 DO를 유지하였을 경우의 결과들을 보여주고 있다. 그림에서 보는바와 같이 배양시간이 지남에 따라 배양액 내에서는 H_2O_2 가 생산되어 축적되며 산모양의 곡선을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 260 %로 DO를 유지해 준 경우가 100 %로 DO를 유지해준 경우보다 높은 농도의 H_2O_2 가 생산되는 것으로 나타났다. 반면, MnP의 생산에 있어서는, 산소공급이 풍부했던 260 % DO에서 보다 빠른 생산경향을 나타내고 있지만 그 최대 MnP 생산량을 비교해 보면 H_2O_2 가 낮은 농도로 생산되었던 100 % DO에서

MnP의 활성이 보다 높고 안정되게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 260 % DO에서는 H₂O₂가 최대로 축적된 다음 지점으로부터 MnP 생산에 심각한 저해가 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 과대하게 산소를 계속하여 공급해 줄 경우 배지중의 축적되는 H₂O₂의 양은 증가되어 어느 수준 이상에서는 심각한 MnP 생산 저해를 나타내고 있는 것으로 보인다 (그림 1).

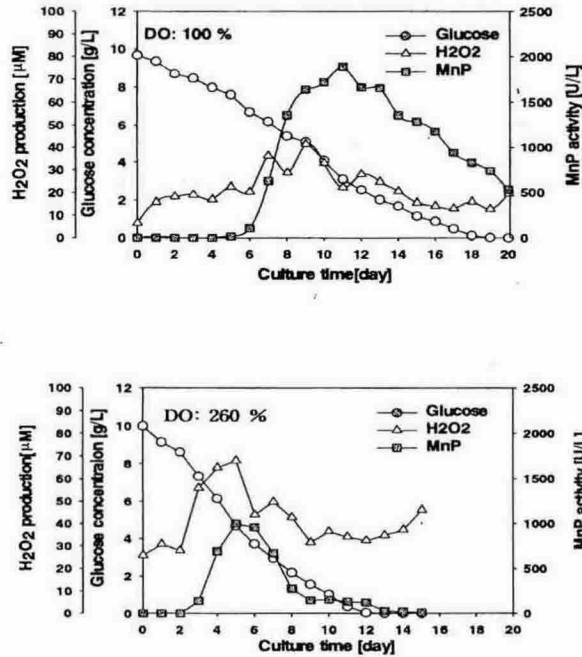


그림 1. 다양한 산소조건에서의 MnP 및 H₂O₂생산과 glucose의 소모

그림 2는 다양한 종류의 산소조건에서 나타났던 결과들을 나타내고 있다. 산소공급이 증가함에 따라 배지 중에 생산되는 H₂O₂의 농도도 함께 증가되고 있음을 확인할 수 있으며, glucose의 소비율과 MnP의 초기생산시기도 산소가 증가함에 따라 빨라지는 경향을 보였다. 하지만 최대 MnP 생산에 있어서는 260 % 이상의 DO 농도에서 심각하게 저해되고 있는 것으로 보이는데, 이는 배지 중에 과량으로 축적되어 존재하는 H₂O₂가 MnP의 생산을 저해하고 있는 것으로 보인다. 따라서 MnP의 생산을 최대로 유지하기 위해서는 배양액 중에 생산되는 H₂O₂의 농도를 critical concentration 이하의 적정농도를 유지할 수 있어야 할 것으로 보인다. 배양액 중에 생산되어 축적되는 H₂O₂의 양을 줄이면서 효율적으로 산소를 공급하기 위하여 또 다른 산소공급 방법인 간헐적 (Pulsed supply) 주입방법을 도입하였으며, 이 경우가 연속적 공급의 경우보다 효율적으로 MnP를 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이 경우에도 과량의 산소는 MnP 생산에 비효율적으로 나타났다(Data not shown).

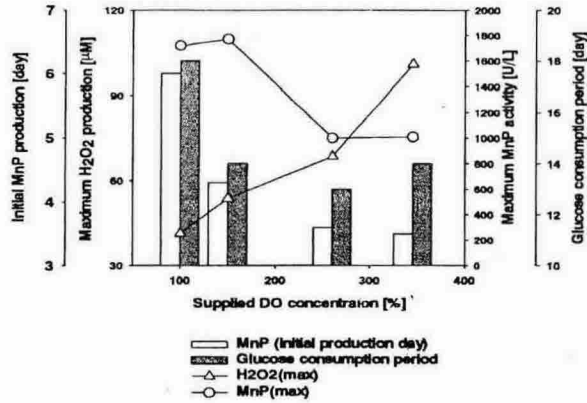


그림 2 다양한 산소조건에서의 MnP, H₂O₂의 생산 및 glucose 소비율 비교 요약

본 연구는 용존산소의 양에 따른 MnP의 생산양상을 체계적으로 연구하였으며, 과량의 산소 공급 시 MnP 생산이 저해될 수 있음을 산소공급에 따른 과량의 H₂O₂생산 측면에서 설명하고 있다. 또한 보다 높은 MnP 생산을 위한 산소공급방법을 제시하고자 하였다.

감사의 글

본 연구는 '99 과학기술부 출연기관고유사업 지원에 의해 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 최수형, 송은, 구만복, 문승현, *P. chrysosporium*에 의한 lignin peroxidase의 생산과 pentachlorophenol의 분해, 한국생물공학회지, 13, 223-230, 1998.
2. Sue Hyung Choi, Eun Song, Ken W. Lee, Seung-Hyun Moon, and Man Bock Gu. Pentachlorophenol Degradation using Lignin Peroxidase produced from *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in polyurethane foam. Proceedings of the 1st international conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds (Battelle Symposium) Bioremediation and Phytoremediation, Monterey, CA, USA. pp.161-166. (May 18-21)
3. Pothschild, N., Hadar, Y., and Dosoretz C, Lignolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air, Appl. Environ. Microbiol., 61, 1833-1838.
4. Tien, M. and T. K. Kirk, Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, Methods Enzymol., 161, 238-249, 1988.
5. Gold, M. H. and Glenin, J. K., Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Method Enzymol., 161, 258-264, 1988.