

진탕 배양에 의한 *Phanerochaete chrysosporium* Diffuse 菌絲의 Ligninase 生成에 관한 研究

金庚守* · 金永昊 · 姜安錫 · 柳昌鉉 · 車東烈 · SUKI C. CROAN¹

農村振興廳 農業技術研究所 菌茸科
美農務省 Forest Products Laboratory¹

Production of Ligninase in Agitated Submerged Cultures of *Phanerochaete chrysosporium* Diffuse Mycelia

Kyung-Soo Kim*, Young-Ho Kim, An-Seok Kang, Chang-Hyun You,
Dong-Yeul Cha and Suki C. Croan¹

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute R.D.A. Suweon 441-707
Forest Products Laboratory¹, USDA, Madison, Wisconsin 53705, USA

ABSTRACT: *Phanerochaete chrysosporium* is a white rot fungus which secretes a family of lignin-degrading enzymes under nutrient limitation. Ligninase was extracellularly produced in agitated submerged cultures of *P. chrysosporium*, SC 26. Addition of veratryl alcohol(4 mM), and benzyl alcohol(10 mM) with 0.1% Tween 20 to the culture medium stimulated ligninase production. However, ligninase was not detected when both treatments of veratryl alcohol and benzyl alcohol without Tween 20 were added to the medium. Addition of 0.1% Tween 20 to the culture medium had little effect on ligninase activity. The ligninase activity was maximum on day 5-8 for veratryl alcohol, and benzyl alcohol with 0.1% Tween 20 additive medium.

KEYWORDS: *Phanerochaete chrysosporium*, ligninase, veratryl alcohol, benzyl alcohol, Tween 20.

植物體의 成分中 리그닌은 그 分子構造가 복잡하고, 여러가지 C-C, C-O-C 結合으로 이루어진 phenylpropanoid로 이루어져 있기 때문에 分解가 상당히 어려우며(Ann 등, 1991), 이용에도 많은 제약을 받고 있다.

리그닌은 여러가지 微生物 중에서 주로 白色腐朽菌에 의해서 分解되는 것으로 알려져 있는데(Frédéric 등, 1991; Kirk 등, 1978; Lee 등, 1975), 현재까지 가장 效果의인 分解 菌株로는 *Phanerochaete chrysosporium*인 것으로 알려져 있다. *P. chrysosporium*에서 lignin을 分解시키는 酵素를 生成하는 것이 1978년 Kirk 등에 의해서 발견된 이래, 1983년에 酵素를 分離(Ming 등, 1983)하였으며, 이를 精製하여 lignin peroxidase(ligninase)라 命名하였다(Ming 등,

*Corresponding author

1984). 그리고 Gold 등과 Crawford 등은 1984년 manganese-peroxidase를 分離精製 하였으며, H₂O₂-producing enzyme으로 glucose oxidase, methanol oxidase, glyoxal oxidase(Kirk, 1988; Philip, 1990) 등을 보고하였다.

Lignin을 分解시키는 酵素는 *P. chrysosporium*의 2차 代謝作用의 結果로 알려져 있으며, 2차 대사는 培地의 營養分 즉 窒素源, 炭素源 등 여러 營養源이 枯渴되었을 때 나타난다고 보고하였다(Kirk, 1985). 그러나 *P. chrysosporium* 突然變異株에서는 營養分이 많은 조건에서도 ligninase를 많이 生成한다는 보고도 있다(Ann 등, 1991).

*P. chrysosporium*은 ligninase 生成 직전에 veratryl alcohol이 生成되며, 따라서 培地에 veratryl alcohol을 첨가할 때 ligninase의 活性이 높다고 보고

하였다(Ann 등, 1991; Kirk 등, 1986; Matti 등, 1984). 그리고 합성된 ^{14}C -lignin이 분해되면서 생성되는 $^{14}\text{CO}_2$ 를測定한 결과 충분한 산소의 공급은 리그닌의 분해력이 증가된다는 보고도 있으며(Kirk 등, 1978), Tween의 종류(Alexander 등, 1985), 培養方法 등을 비교한 研究 결과도 보고되었다(Kirk 등, 1978; Ming 등, 1988).

본 試驗은 木材, 벌집등의 農林副産物에 함유되어 있는 리그닌을 분해시켜 버섯재배나 飼料化의 이용성을 증대시키고자 *P.chrysosporium*의 diffuse 菌絲體에 veratryl alcohol, benzyl alcohol, Tween 20을 농도별로 첨가시켜 ligninase 生成의 最適條件을 究明하고 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

供試菌株

本 試驗에 사용한 菌株는 *Phanerochaete chrysosporium*, SC 26(ASI 43093)菌株로서, 이 菌株는 U.S. D.A. Forest Product Lab.의 Suki C. Croan으로부터

Table 1. Composition of medium for maintenance and spores production of *P. chrysosporium*.

Component	Contents
Glucose	10 g
Malt extract	10 g
Peptone	2 g
Yeast extract	2 g
Asparagine	1 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Tiamine-HCl	1 mg
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml

분양 받은 菌株이다.

供試培地

P. chrysosporium 培養과 spore(conidia)를 生成하기 위한 造成培地(YMPG)는 Table 1, ligninase 生成을 위한 B III培地 造成은 Table 2와 같으며, 여

Table 2. Composition of basal medium.

Medium	Component	Content	Remarks
B III (per liter)	KH_2PO_4	2.0 g	Autoclave
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g	"
	CaCl_2	0.1 g	"
	$(\text{NH}_4)_2$ tartrate	0.2 g	Filter sterilized
	Tiamine-HCl	1.0 mg	"
	100X TES	10.0 ml	"
100X TES (Trace element solution)	Nitriloacetate	1.5 g	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0 g	
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5 g	
	NaCl	1.0 g	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g	
	CoSO_4	0.1 g	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g	
	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.01 g	
	H_3BO_3	0.01 g	
	NaMoO_4	0.01 g	
	Distilled water	1,000 ml	

기에 56 mM glucose를 첨가하고, 10 mM trans acotic acid(pH 4.2)를 buffer 용액으로 사용하였다 (Ming 등, 1988).

Diffuse mycelia의 製造

P. chrysosporium 菌株을 YMPG 한천培地에 接種하여 39°C 에서 2-5일간 培養한 후 表面에 형성된 conidia 만을 순수하게 수집사용하였다. 接種方法은 Kirk(1978) 方法으로 conidia를 1,000 ml용 삼각플라스크에 50 ml의 培地를 넣어 39°C 에서 2일 동안 停滯培養하여 每균수로 잘 세척 후 10초간 homogenizer 하였다. 이 接種源을 1,000 ml 삼각플라스크에 6 mM benzyl alcohol이 첨가된 450 ml 培地에 接種하여 39°C 에서 200 rpm(2.5-cm-diameter cycle)으로 2-3일간 진탕배양하여 사용하였다.

Ligninase의 生成

Diffused된 菌絲를 증류수에 3번 정도 세척한 후 培地에 0.1% tween 20, veratryl alcohol(2, 3, 4 mM), benzyl alcohol (6, 8, 10 mM)를 농도별로 처리하여 100 ml 삼각플라스크에 45 ml씩 넣은 후 39°C 에서 200 rpm으로 진탕배양하면서 매일 산소를 1분간씩 주입하고 실리콘 마개로 막았다.

Ligninase assay

Diffused 菌絲를 培養後 매일 ligninase 역가를 測定하였다. Ligninase의 역가는 veratryl alcohol이 veratraldehyde로 산화되는 비율에 의해서 測定하는데, 測定方法은 매일 0.5 ml의 培養液을 취한 후 1분간 遠心分離하여 異物質을 제거하였다. 이 培養液 0.3 ml에 veratryl alcohol 2 mM, Na-Tartrate(pH 3) 50 mM이 되도록 잘 섞은 후 H₂O₂를 0.4 mM 되게 첨가하여 총량을 0.5 ml로 조절하였으며, UV spectrophotometer의 310 nm에서 즉시 역가를 測定하였다.

Ligninase purification

Ligninase의 역가가 높은 것은 수집하여 grass wool에서 균덩어리등 異物質을 제거하였다. 여과된 培養液 300 ml를 4°C 상태에서 질소가스를 이용하여 amicon-ultrafiltration으로 30 ml로 농축시킨 후 10 mM sodium-acetate(pH 6) 3,000 ml에서 1일 정도

dialysis 한다. Dialysis한 fluid는 0.45 µm filter(Gelman)로 여과하여 fast protein liquid chromatograph (FPLC) 分析을 하였다.

FPLC 分析은 mono Q anicon exchange colum (Pharmacia Fine Chemical)으로 405 nm에서 하였으며 buffer의 gradient는 sodium acetate 10 mM (pH)에서 1 M(pH 6)로 실시하였다.

結果 및 考察

P. chrysosporium, SC 26菌株의 diffuse mycelia를 veratryl alcohol과 0.1% Tween 20이 첨가된 培地에 接種하여 ligninase 역가를 조사한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 培地에 菌絲만 接種하거나 菌絲와 veratryl alcohol만을 첨가한 것은 ligninase의 역가가 전혀 조사되지 않았다. 菌絲와 0.1% Tween 20을 첨가했을 경우에는 그 역가가 5.0으로써 낮게 나타났으나, veratryl alcohol 및 0.1% Tween 20을 같이 첨가한 것은 ligninase의 activity가 높게 나타났으며, 특히 4 mM veratryl alcohol 및 0.1% Tween 20을 첨가한 것은 145.3으로 가장 높게 나타났다. 그리고 ligninase의 최대 역가까지의 소요 일수는 培養 후 4-7일 정도가 소요되었다. ligninase의 역가는 培養 후 4일 정도 경과하면 培養液이 약간씩 褐變되기 시작하며 ligninase가 生成되었다. 그리고 lignase의 生成은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 거의 모든 처리에서 培養 후 4일경부터였으며 최대치는 5-7일 경이었다.

Benzyl alcohol의 각 농도별 ligninase의 activity를

Table 3. Effects of veratryl alcohol with Tween 20 on ligninase activity in *P. chrysosporium*, SC 26, in agitated submerged cultures.

Conditions*	Ligninase activity (unit/liter)	Days of maximum activity
Innoculum only	0	—
1 mM VA	0	—
T-20	5.0	4
2 mM VA+T-20	133.3	5
4 mM VA+T-20	145.4	5

*VA: Veratryl alcohol, T-20: 0.1% Tween 20.

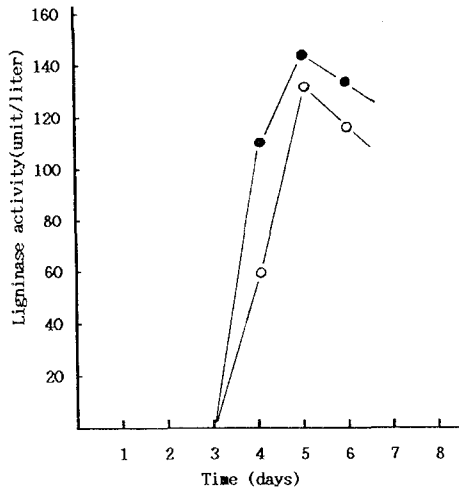


Fig. 1. Effects of veratryl alcohol(VA) with 0.1% Tween 20 (T-20) to agitated cultures on *P. chrysosporium*, SC 26.
 ○ ○ 2 mM VA + 0.1% T-20
 ● ● 4 mM VA + 0.1% T-20

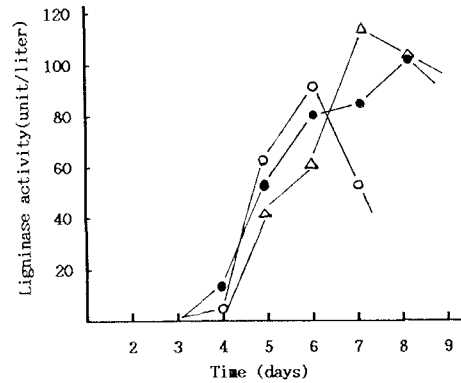


Fig. 2. Effects of benzyl alcohol(BA) with 0.1% Tween 20 (T-20) to agitated cultures on *P. chrysosporium*, SC 26.
 ○ ○ 6 mM BA + 0.1% T-20
 ● ● 8 mM BA + 0.1% T-20
 △ △ 10 mM BA + 0.1% T-20

Table 4. Effects of benzyl alcohol with Tween 20 on ligninase activity in *P. chrysosporium*, SC 26, in agitated submerged cultures.

Conditions*	Ligninase activity (unit/liter)	Days of maximum activity
Innoculum only	0	—
6 mM VA	0	—
T-20	5.0	4
6 mM BA + T-20	93.0	6
8 mM BA + T-20	103.0	8
10 mM BA + T-20	115.6	7

*BA: Benzyl alcohol, T-20: 0.1% Tween 20.

조사한 결과 Table 4와 같이培地에 10 mM benzyl alcohol과 0.1% Tween 20을 같이 사용한 것이 115.6으로 가장 높게 나타났다. 그리고 ligninase 역가의 최대활성화 소요일수는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 7-8일 정도가 소요되어 veratryl alcohol보다 다소 길었다. 그리고 菌의 培養中 菌叢形態가 pellets의 상태로 된 것은 다른 조건에 비하여 그 生長速度가 아주 느렸다.

Ligninase의 活性이 높은 300 ml의 培養液을 질

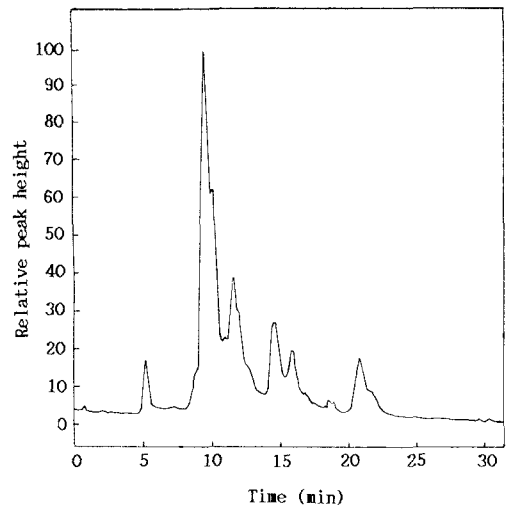


Fig. 3. FPLC profile of extracellular enzyme preparation absorbance (405nm).

소가스를 이용하여 amicon-ultrafiltration으로 30 ml로 濃縮하여 FPLC 分析을 실시하였다. FPLC 分析 결과는 Fig. 3과 같이 여러개의 peaks를 나타내었으며, 이러한 결과는 Kirk(1986)의 결과와 類似하였다.

이상과 같이 veratryl alcohol을 培地에 첨가한 결과는 Kirk 등(1986)이 disc fermenter를 사용하여 培地에 窒素源을 첨가하지 않고 0.4 mM veratryl alcohol만 첨가하여도 ligninase 역가가 22.2를 나타

낸다는 보고와 상이하였으며, ligninase의 최대 역가까지의 소요일수는 5일은 본 결과와 유사하였다. 그리고 Ann 등(1991)은 veratryl alcohol이 ligninase의 역가는 급격히 증가시키나 Mn-peroxidase에는 약간의 영향을 미치며, glyoxal oxidase의 역가는 감소시킨다고 하였다. Tween에 대한 研究로써 Rajagopalan 등은 Tween 80을 1차 대사작용이 끝난 시점 즉 영양분이 소진된 상태에서 1,000 mg/l를 첨가할 때 10일 정도 경과하면 ligninase의 생성이 급격히 증가한다고 하였다. 그리고 Alexander 등은 Tween 80을 첨가하지 않은 처리에서는 ligninase가 생성되지 않았으며 0.05-1%일 때 생성이 가장 높았고, 최대 역가까지의 소요일수는 5일 정도이나 Tween의 菌絲에 대한 역할은 단지 fatty acid로 작용한다고 할 뿐 확실한 영향에 대해서는 밝히지 못하였다.

*P. chrysosporium*는 현재까지 알려진 菌株로는 lignin의 分解力이 가장 높지만 실용화를 위해서는 이 분야에 대한 더 많은 研究가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

P. chrysosporium, SC 26 菌株를 이용하여 0.1% Tween 20, veratryl alcohol 및 benzyl alcohol이 첨가된 培地에 接種한 후 진탕배양하여 ligninase 역가를 조사한 결과는 다음과 같다.

培地에 Tween 20를 단독으로 처리했을 경우에는 ligninase의 생성이 적었으나, 0.1% Tween과 0.4 mM veratryl alcohol을 첨가했을 때 높았으며, 최대 역가까지의 소요일수는 5일이었다. 또한 0.1% Tween 20과 10 mM benzyl alcohol을 처리했을 때 ligninase의 역가가 가장 높았으며, 최대 역가까지의 소요일수는 8일이었다.

參考文獻

Alexander, J., S. Croan and T.K. Kirk. 1985. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(5): 1274-1278.
Ann, B. O., M. Denny and M. Tien. 1991. Overproduction

of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(9): 2591-2596.
Frédéric, H. P., and M. H. Gold. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(8): 2240-2245.
Kirk, T. K. 1988. Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *ISI Atlas of Sci.: Biochem.* **1**(1): 71-76.
Kirk, T. K., E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz and J. G. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**: 277-285.
Kirk, T. K. and M. Shimada. 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. In: Higuchi, T., ed. Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego, CA: Academic Press. 579-605.
Kirk, T. K., S. Croan and M. Tien. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 27-32.
Lee, B. H. 1975. Microbial treatment of saw dust for animal food. (I) Changes of lignin and protein contents. *Kor. J. Mycol.* **3**(2): 25-29.
Matti, S. A. L, D. C. Ulmer, R. Waldner and A. Fiechter. 1984. Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotech.* **1**: 331-339.
Ming, T. and T. K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Sci.* **221**: 661-663.
Ming, T. and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 2280-2284.
Ming, T. and T. K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood, W. A., Kellogg, S. T., eds. Methods in enzymology-Biomass, part b, lignin, pectin, and chitin. San Diego, CA: Academic Press. **161**: 238-249.
Philip J. K. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

87: 2936-2940.

Rajagopalan, V. and R. L. Irvine. 1990. Effect of agitation on ligninases activity and ligninase production

by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbio.* 56(9): 2684-2691.