

Trametes sp. CJ-105에 의한 Laccase 생산

오광근* · 김현수 · 이재흥 · 전영중
제일제당주식회사 종합기술원

Production of Laccase by *Trametes* sp. CJ-105. Oh, Kwang-Keun*, Hyun-Soo Kim, Jae-Heung Lee, and Yeong-Joong Jeon. Institute of Science and Technology, CHEILJEDANG Corporation, Ichon 467-810, Korea - For *Trametes* sp. CJ-105, a kind of white-rot fungi which was collected from the mountain of Korea and was proven to be effective in decolorizing a wide range of structurally different synthetic dyes, the optimum conditions for mycelial growth and laccase(E.C. 1.10.3.2) production were investigated. Among various carbon sources, glucose showed the highest potential for the mycelial growth and laccase production, the optimum concentration being 2% glucose. For the nitrogen source, asparagine was good for the mycelial growth, while ammonium tartrate for laccase production(optimum concentration: 0.04%). The addition of thiamine and biotin increased both the mycelial growth and laccase production. When 2,5-xylydine was added as an inducer after the first day of culture, the production of laccase was seven-times higher than that in the absence of the inducer. The optimum pH and temperature conditions for laccase production by *Trametes* sp. CJ-105 were pH 5.0 and 25°C, respectively. In the 5L fermentation, the production of laccase reached a maximum of 340 U/ml at the time when the ammonium ion was being rapidly depleted.

Key words : laccase production, ligninolytic enzyme, *Trametes* sp. CJ-105

담자균류(Basidiomycetes)에 속하는 백색부후균(white rot fungi; WRF)은 각종 난분해성 물질을 비특이적으로 분해할 수 있는 리그닌 분해효소(ligninolytic enzymes)를 생산하는 것으로 보고되어 있다[7]. 이러한 리그닌 분해효소로는 lignin peroxidase(LiP; E.C.1.11.1.14), Mn(II)-dependent peroxidase(MnP; E.C.1.11.1.13), laccase(ρ -diphenol oxidase, E.C. 1.10.3.2)등이 있으며 그 중에서 리그닌 분해에는 LiP와 MnP의 역할이 주로 보고되었고[3, 9, 16, 21, 25], laccase는 별로 관심을 끌지 못했다. 그러나, 최근에 laccase가 리그닌 유래의 phenolic, non-phenolic 화합물을 분해한다는 보고가 있으며[17, 18] 또한, sporulation, pigment production, rhizomorphic formation에도 관여하는 것으로 알려져 있다[4, 26].

Laccase는 copper를 함유한 polyphenol oxidase로서 blue copper proteins 또는 blue copper oxidase로 불리고 있다. 즉, oxidative enzyme으로서 산소분자가 물분자로 환원될 때 polyphenols, methoxy-substituted monophenols, aromatic amines 등의 방향족 화합물의 전자를 유리시켜 phenoxy radical을 형성시킨다. 이후 산화되어 quinone을 형성하고 중합반응으로 phenoxy polymer를 형성한다. 따라서, laccase는 phenol 화합물의 hydroxy group으로 부터 전자를 유리시켜 방향족 화합물을 산화시키는 multicopper blue oxidase라고

할 수 있다[2, 4, 13, 17, 23]. 또한, 이러한 phenol 화합물뿐만 아니라 ABTS(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulpho-nate))가 mediator로서 작용할 때 non-phenolic 화합물도 산화시킨다고 보고되었다[4]. 이러한 laccase를 생산하는 미생물로서 최근에 *Azospirillum lipoferum*이 세균으로서 유일하게 알려졌다[23] 대부분은 목재 부후에 관여하는 백색부후균에 광범위하게 존재한다. 즉, *Agaricus bisporus*, *Pholiota aegerita*, *Podospora anserina*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* 등의 백색부후균과 *Rhus vernicifera*, *Rhus succedanea*와 같은 식물에도 존재하며 각기 분자량과 copper함량 및 기질선택성이 다른 것으로 보고되었다[15,23].

본 연구에서는 자연으로부터 분리하여 각종 염료(dye)에 대한 분해성이 우수한 것으로 확인된 *Trametes* sp. CJ-105에 대한 배양특성을 연구하고 리그닌을 비롯한 각종 유해 화합물분해에 작용하는 것으로 보고된 laccase의 생산관계를 비교하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 경기도 광릉, 강원도 설악산, 오대산지역에서 채취한 버섯들로부터 분리한 *Trametes* sp. CJ-105로서 한국중균협회에 기탁, 보관되어 있는 균주(KFCC 10941)이며[10] YM배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, glucose 10 g/l, peptone 5 g/l, agar 17 g/l,

*Corresponding author

Tel. 82-336-639-4317, Fax. 82-336-632-2784

E-mail: wupaloh@www.cheiljedang.com

pH 6.8)의 사면배지에서 27°C로 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

전배양

상기의 *Trametes* sp. CJ-105 균사체의 선단을 코크보러(직경 6 mm)로 취하여 YM평판배지의 중앙에 접종하였으며, 25~28°C의 항온기(Precision, GCA, USA)에서 1주일 동안 배양하였다. 그후 평판배지에서 배양된 균사체의 선단을 코크보러로 취하여 한천을 제외한 같은 조성의 YM 액체배지 50 ml를 함유하는 250 ml 플라스크에 접종하여 25 ± 1°C의 항온기에서 5일간 정치 배양하였다.

플라스크배양 및 5L-Jar fermenter배양

상기 전배양 액체 배양액을 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻어진 균사체를 멸균 증류수로 2회 세척하여 배지성분을 제거한 후에 증류수 50 ml를 첨가하여 블랜더로 1분간 균질화 하였다. 그리고 Table 1에 나타난 기본배지의 조성으로 제조한 배지를 100 ml 함유한 500 ml 플라스크에 5%(v/v)씩 접종한 후 25 ± 1°C의 진탕회전 배양기(Vision, VS-8480SR, Korea)를 사용하여 150 rpm으로 7일간 배양하였다.

Fermenter에서의 배양은 플라스크 배양실험으로 얻어진 최적조건을 기준으로 하여 효소생산 최적화배지의 조성으로 제조한 배지 3 l를 함유한 5l-jar fermenter(Korea Fermenter Co., KF-5L, Korea)에 상기의 균질화 전배양액을 5%(v/v)씩 접종한 후 25°C, pH 5.0, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 100 rpm으로 하여 10일 동안 배양하였다.

Laccase induction

효소생산을 증진시키기 위해 inducer로서 2,5-xylidine(Acros No. 14669)을 선택하여 첨가 농도 및 시기에 대하여 실험을 진행하였다. 2,5-xylidine을 50%의 ethanol에 용해시킨 후 플라스크와 5l-jar fermenter를 사용하여 *Trametes* sp. CJ-105를 배양하면서, 배양 1~4일 후에 2,5-xylidine의 최종농도가 0.1~5 mM이 되도록 여러 가지로 조정하여 각

Table 1 Composition of medium for culture of *Trametes* sp. CJ-105

Ingredients	Contents
Glucose	10 g
Ammonium tartrate	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	100 µg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	100 µg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	20 µg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 µg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 µg
2,2,-Dimethylsuccinate	4 g/l
	pH 5.0

각 첨가한 후 생산된 laccase의 활성을 비교하였다[6].

Glucose 및 ammonium ion의 농도 측정

Glucose의 농도는 Sugar-Pak I column(Millipore, USA)이 장착된 HPLC(Shimadzu, C-R64, Japan)를 사용하여 Refractive Index Detector(Shimadzu, RID-6A, Japan)로 측정하였다. 이때 용매는 물을 사용하였고, column의 온도는 70°C 이고, 유속은 0.6 ml/min이었다.

Ammonium이온의 농도는 Ionpac CS12 column(Dionex, USA)이 장착된 Ion chromatography를 이용하여 측정하였으며 용매는 15 mM의 methanesulfonic acid를 사용하였고, 온도는 25°C, 유속은 1.0 ml/min이었다.

균체의 성장측정

배양액 전체를 미리 무게를 측정한 filter paper (Whatman No. 2)를 사용하여 여과한 후 균사체를 증류수로 2회 세척하고 90°C dry oven에서 12시간 건조하여 건조 균사체량을 측정하였다.

Laccase의 효소 활성도 측정

플라스크와 5l-jar fermenter에서 배양하는 동안 배양액 1 ml의 표본을 취하여 4°C에서 5분간 원심분리한 후(Vision, VS15000CFN, Korea) 상등액을 효소원으로 하여 반응액과 반응시킨 다음 분광광도계(Miltonroy, Genesys2, USA)에서 laccase의 활성도를 측정하였다. 효소 반응액은 0.1 M sodium acetate(pH 5.0) 완충액 2.5 ml, 배양 상등액 0.17 ml을 혼합하고 5 mM ABTS 0.33 ml을 첨가한 것이며 1분간 420 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=36,000 M⁻¹cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 µmol의 ABTS를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다[20].

세포내 효소의 활성도 측정

균사체내에 존재하는 효소의 활성(intracellular activity)을 측정하기 위해 배양 10일째에 배양액으로부터 균사체만 회수하여 멸균수로 2회 세척하여 세포의 효소의 활성을 완전히 제거하였다. 균사체를 드라이아이스에 채워 넣고 블랜더로 완전히 분쇄하여 균질화시킨 후 균질액을 20%(v/v) glycerol과 0.04 mM reduced glutathione이 함유된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)에 1:3으로 현탁시켰다. 현탁액을 10,000 g에서 20분간 원심분리(Sorval RC-3 centrifuge)하여 상등액을 얻어 세포내 효소의 활성을 측정하였다[22].

결과 및 고찰

탄소원의 영향

각종 탄소원이 *Trametes* sp. CJ-105의 성장과 laccase

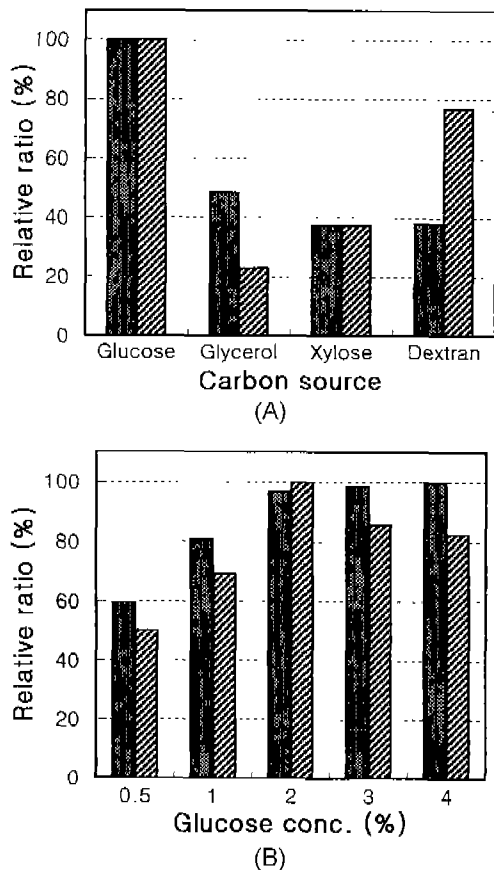


Fig. 1. Effect of various carbon source(A) and glucose concentration(B) on the mycelial growth and laccase activity. ■, Growth; ▨, Laccase activity

생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각각의 탄소원을 1% 농도로 조정된 배지성분을 사용하여 배양 3일 후에 균사체량과 laccase의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 glucose가 다른 탄소원에 비하여 균체성장 및 laccase 생산이 월등하게 우수함을 알 수 있다. 이는 Nicolini등[15]이 *Trametes versicolor*의 경우에 주로 glucose를 laccase생산에 이용한다고 보고한 것과 일치하는 결과였다. 또한 Schlosser등[22]은 *T. versicolor*를 glucose를 탄소원으로 배양하였을 때 12일까지 laccase의 활성이 증가하여 최대 활성은 40 unit/l 이었으며 그 후에는 감소하는 것을 보고하였다. 한편 *Agaricus bisporus*의 경우에 여러 가지 탄소원을 사용하여 laccase의 생산을 비교한 결과 glucose를 사용한 경우가 다른 탄소원(예: mannitol, fructose, xylose, cellobiose, maltose, sucrose)을 사용했을 때 보다 약간 또는 2배 정도 까지 laccase의 활성이 높았다는 보고가 있다[27].

한편, 최적 탄소원인 glucose를 0.5~4% 범위의 여러 농도로 조정하여 *Trametes* sp. CJ-105의 성장과 laccase 생산을 비교한 결과 Fig. 1과 같이 glucose의 농도가 증가함에 따라 균체성장이 증가하다가 glucose 농도 2% 이상에서

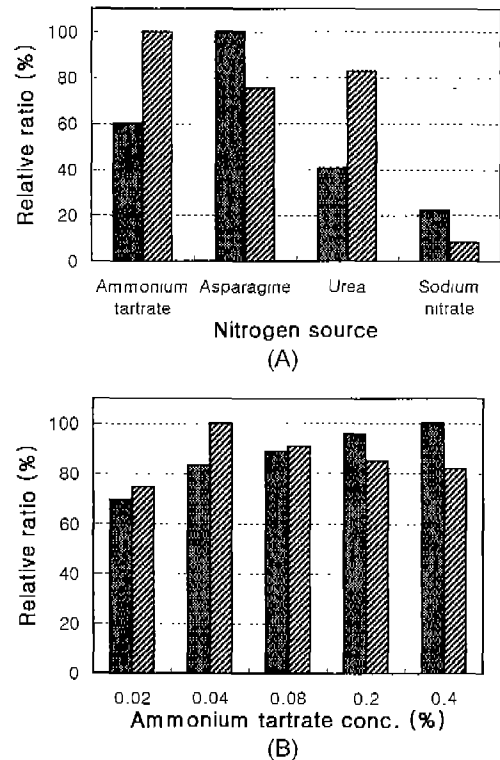


Fig. 2. Effect of various nitrogen source(A) and ammonium tartrate concentration(B) on the mycelial growth and laccase activity.

■, Growth; ▨, Laccase activity

는 거의 비슷하였으나, laccase 생산은 glucose의 농도가 2%인 경우에 가장 우수하였다. 따라서, 이후의 실험은 glucose를 탄소원으로 사용하였고 농도는 2%로 조정하여 진행하였다.

질소원의 영향

각종 질소원이 *Trametes* sp. CJ-105의 성장과 laccase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각각의 질소원을 0.2% 농도로 조정된 배지성분을 사용하여 배양 3일 후에 균사체량과 laccase의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 균체의 성장에는 asparagine이 가장 좋았으나 laccase의 생산에는 ammonium tartrate가 가장 우수하였다. 이는 염색폐수에서 분리한 담자균류를 이용하여 laccase를 생산하는 연구에서 asparagine을 질소원으로 사용하여 배양하였다는 보고와는 상이한 결과였다[4].

한편, ammonium tartrate를 0.02~0.4% 범위의 여러 농도로 조정하여 *Trametes* sp. CJ-105의 성장과 laccase 생산을 비교한 결과 Fig. 2와 같이 균체성장은 ammonium tartrate의 농도가 증가함에 따라 증가하였으나, laccase의 생산은 ammonium tartrate의 농도가 0.04%인 경우에 가장 높게 나타났다. 이와 같은 결과에서 질소성분이 증가하면 균체의 성장은 증가되지만 laccase의 생산은 감소됨을 알

수 있다. 이것은 탄소원과 질소원의 비율(C/N 비율)이 laccase의 생산에 중요함을 암시하며, Rogalski등[19]은 *T. versicolor*를 이용하여 효율적인 laccase를 생산하기 위해 적당한 C/N 비율과 자극제가 필요하다고 보고하였으며, 4가지 다른 *T. versicolor*를 여러 농도의 glucose와 질소원을 사용하여 laccase를 생산할 때 방향족 화합물이 미치는 영향을 조사하였는데 균주 종류에 따라 가장 효율적으로 효소를 생산할 수 있는 C/N 비율이 현저하게 차이가 있음을 보고하였다. 한편 Eggert등은 *Pycnoporus cinnabarinus*를 C/N 비율을 15로 하여 7일간 배양 후 1,200 unit/l의 laccase 활성을 얻었고 질소 농도를 높여 주면 균사체의 성장은 증가하였으나 laccase의 활성은 감소하였슴(예: C/N 비율 1.5일 때 최대활성의 60%인 700 unit/l 정도)을 보고하였다[5]. 상기 결과를 바탕으로하여 향후 실험에서는 ammonium tartrate의 농도를 0.04%로 조정하여 실험하였다.

비타민 첨가의 영향

Trametes sp. CJ-105의 성장과 laccase 생산에 미치는 비타민의 영향을 알아보기 위하여 thiamine과 biotin의 첨가 유무에 따른 비교실험을 진행하였다. Thiamine과 biotin을 첨가하지 않은 경우를 control로 하고 thiamine과 biotin을 각각 100 µg씩 첨가한 경우와 thiamine, biotin 모두 첨가한 경우에 대하여 균체의 성장과 laccase의 생산을 조사하였다. 배양 3일후에 각각을 측정할 결과 Table 2에서와 같이 thiamine, biotin을 모두 첨가했을 때 균체의 성장과 laccase의 생산이 모두 우수하게 나타났다. 이는 *Trametes versicolor*의 경우에 균체성장에 thiamine, biotin을 이용한 보고와 같이 균체의 성장과 효소의 생산에 비타민이 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다[1].

pH와 배양 온도의 영향

배양조건 중에서 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양배지의 초기 pH를 3.0~9.0으로 조정하여 *Trametes* sp. CJ-105를 3일간 배양한 후 균체의 성장과 laccase의 생산을 측정할 결과 Fig. 3과 같이 pH가 5.0인 경우에 균체 성장과 laccase의 생산이 가장 좋았다. 이는 *Trametes versicolor*의 경우는 pH를 주로 5.0으로 배양한 것[1, 6]과 일치하는 결과이며, 균류의 일반적인 배양조건이 pH가 4.5~5.5인 것과

Table 2. Effect of the addition of vitamins on the mycelial growth and laccase activity^a

Vitamin	Relative growth(%)	Relative activity(%)
Control ^b	100	100
Thiamine	114	116
Biotin	127	118
Thiamine+ Biotin	159	122

^aCell growth and laccase activity were measured after 3 days of culture.

^bControl was cultured without vitamins.

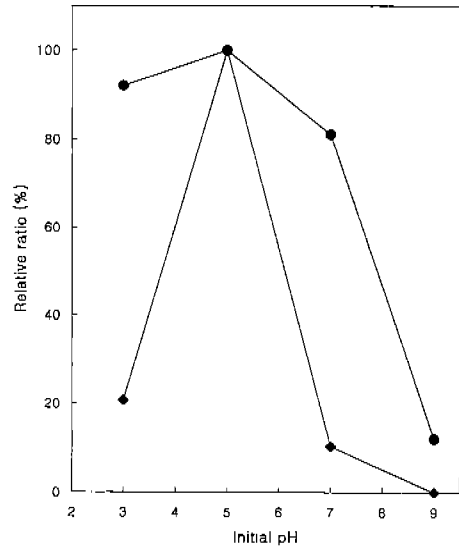


Fig. 3. Influence of initial pH on the mycelial growth and laccase activity.

●, Growth; ◆, Laccase activity

도 동일한 것이다[12]. 한편 배양에 따른 pH의 변화를 살펴본 결과 배양 기간 동안 pH의 변화는 미미하였다.

Trametes sp. CJ-105의 배양온도가 균체성장과 laccase 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 온도를 20~40°C의 범위에서 여러 가지로 조정하여 배양하여 조사한 결과 Fig. 4와 같이 25°C에서 균체의 성장과 laccase의 생산이 가장 높게 나타났으며, 그 이상의 온도에서는 점차 감소하였다

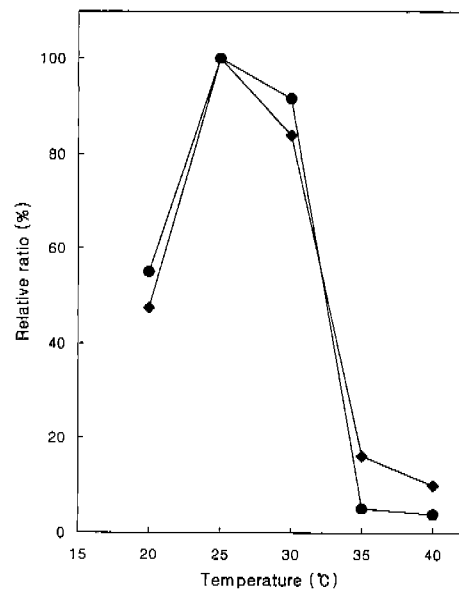


Fig. 4. Influence of temperature on the mycelial growth and laccase activity.

●, Growth; ◆, Laccase activity

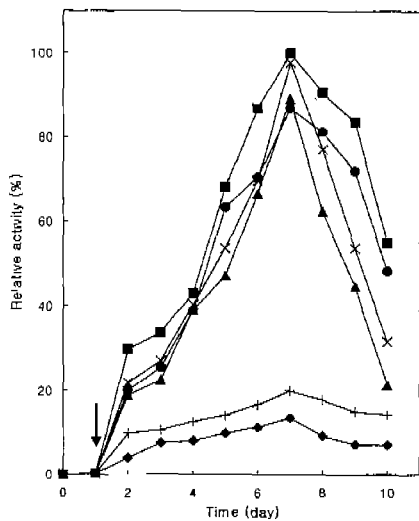


Fig. 5. Effect of the addition of various amounts of 2,5-xylydine on the laccase activity. +, Control; ▲, 0.1 mM; ×, 0.25 mM; ■, 0.5 mM; ●, 1 mM; ◆, 5 mM. The arrow (↓) indicate the time of 2,5-xylydine addition.

2,5-Xylydine의 농도별 첨가에 따른 laccase의 생산

효소생산을 증진시키기 위해 inducer로서 2,5-xylydine을 선택하여 첨가 농도에 대하여 실험을 진행하였다. *Trametes* sp. CJ-105를 배양할 때, 배양 1일 후에 2,5-xylydine의 최종농도가 0.1~5 mM이 되도록 여러 가지로 조정하여 각각 첨가한 후 inducer를 첨가하지 않은 경우와 각각 laccase의 생산을 비교하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 것과 같이 2,5-xylydine의 농도가 증가할수록 효소생산이 증가했으나 5 mM 되도록 첨가한 경우는 첨가하지 않았을 때에 비하여 오히려 효소생산이 저하되었다. 이는 2,5-xylydine이 균체에 독성을 미치기 때문인 것으로 판단되며[6] 실제로 균체 성장도 2,5-xylydine을 첨가하지 않았을 때에 비하여 현저히 감소하였다. 따라서, 적정농도로 inducer를 첨가하는 것이 중요하다고 할 수 있으며 본 연구에서 *Trametes* sp. CJ-105를 배양하여 laccase의 생산을 높이기 위해서는 2,5-xylydine를 최종농도가 0.5 mM이 되도록 첨가해야 하며 이로써 2,5-xylydine을 첨가하지 않았을 때에 비하여 laccase의 생산이 7배 증가한 결과를 얻었다. 이는 Eriksson등[5]이 laccase의 최적생산을 위하여 10 μM의 2,5-xylydine을 첨가한 것과는 상이한 결과이며, Nicolini등[15]이 2,5-xylydine을 0.5 mM 첨가한 것과는 동일한 결과이다.

2,5-Xylydine의 첨가시기에 따른 laccase의 생산

Trametes sp. CJ-105를 배양하여 laccase의 생산을 증가시키기 위하여 inducer로서 2,5-xylydine을 첨가하게 되면 균체에 독성을 미치므로 그 첨가시기를 조정하는 것도 효소생산을 최적화 하기 위해 중요할 것이다[6]. 따라서, *Trametes* sp. CJ-105를 배양할 때 1일, 2일, 3일, 4일 후

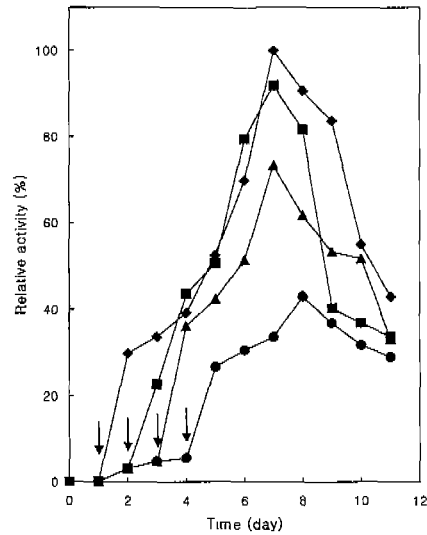


Fig. 6. Effect of the addition time of 2,5-xylydine on the laccase activity. ◆, 1 day; ■, 2 day; ▲, 3 day; ●, 4 day. The arrow (↓) indicate the time of 2,5-xylydine addition

에 2,5-xylydine의 최종농도를 0.5 mM 되게 조정하여 첨가 하면서 laccase의 생산을 비교하였다. 그 결과는 Fig. 6에 나타내었으며 배양 1일 후에 2,5-xylydine을 첨가한 경우가 다른 것과 비교하여 laccase의 생산이 상대적으로 높았으며 첨가시기가 늦을수록 laccase의 생산이 낮게 나타났다. 따라서, 균체의 성장이 어느 정도 이루어진 다음에 inducer를 첨가[6]하기 보다는 균체의 성장초기에 첨가하는 것이 laccase의 생산을 증가시키기 위해서는 효과적이며, 이는

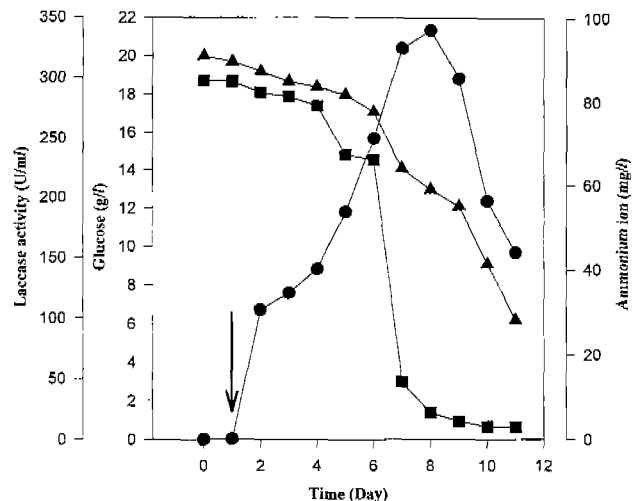


Fig. 7. Time course of laccase production by *Trametes* sp. CJ-105 in 5L jar fermenter. ▲, Glucose; ■, Ammonium ion; ●, Laccase. The arrow (↓) indicate the time of 2,5-xylydine addition.

laccase의 생산과 관련한 또 다른 조건들이 있을 것으로 예상할 수 있고 이를 밝히기 위해서는 효소생산의 기작에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

5L-Jar fermenter에서 laccase의 생산

상기 플라스크 배양을 통해 얻어진 조건을 조합하여 최적 조건하에서 *Trametes* sp. CJ-105를 배양하여 laccase를 생산할 때 배양액내의 경시적인 변화를 확인하기 위하여 fermenter를 사용하여 실험을 진행하였다. laccase 생산 최적화배지 3 L를 함유한 5 L-jar fermenter에서 *Trametes* sp. CJ-105를 10일 동안 배양하였으며, 배양 1일후에 2,5-xy-lidine을 최종농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하였다. 배양에 따른 배지성분의 변화 및 효소생산의 변화를 Fig. 7에 나타내었으며 그림에서 보는 것과 같이 배양액내에 ammonium ion의 농도가 glucose의 감소보다 빨리 일어나며, 질소원 농도가 급속히 감소하는 시기에 laccase의 생산이 최대로 되어 활성이 가장 높게 나타났고 이 때의 효소 활성은 340 U/ml이었다. laccase의 생산은 균사체의 성장이 증가하는 것과 동일한 패턴으로 증가하였으며, 리그닌 분해 효소는 질소성분이 결핍된 영양상태에서 생산이 우수하다는 보고[24]와 동일한 결과를 얻었다.

한편 균사체 내에 세포내 효소로서의 존재를 확인하기 위해 균사체만 회수하여 완전히 분쇄하여 균질화시킨 후 균질액의 상등액을 세포내 효소원으로 사용하여 laccase의 활성을 측정된 결과 세포내 효소의 활성 비율이 5.9% 정도 되었다. 이는 리그닌 분해효소가 주로 세포외 효소이지만 백색부후균의 세포내 효소로의 존재에 대한 증거로서 보고 [8, 14]된 것과 같이 laccase가 세포내에도 존재함을 확인한 결과였다. Schlosser[22]등은 *Trametes versicolor*를 glucose를 탄소원으로 배양하였을 때 14일 후에 세포내 효소의 활성 비율이 14.8%이었으나 밀짚과 너도밤나무 목재를 잘게 자른 것을 탄소원으로 사용함으로써 세포외로 laccase를 훨씬 더 많이 생산(각각의 세포내 효소의 활성 비율은 97.5%, 93.0%)할 수 있었다고 보고했다. 실제적으로 리그닌 분해나 다른 난분해성 화합물을 분해하기 위해서는 세포외로 효소를 많이 생산할 수 있는 조건을 찾는 것이 중요하다고 할 수 있다.

요 약

자연으로부터 분리하여 각종 염료(dye)에 대한 분해성이 우수한 것으로 확인된 *Trametes* sp. CJ-105에 대한 배양특성을 연구하였다. 또한, 리그닌 분해효소군(ligninolytic enzymes)중의 하나이며 리그닌을 비롯한 각종 유해 화합물의 분해에 작용하는 것으로 보고된 laccase(p-diphenol oxidase, E.C. 1.10.3.2)의 생산관계를 조사하였다. 탄소원으로는 glucose를 사용하였을 때 균체의 성장과 laccase의 생

산이 가장 우수하였으며 glucose 농도는 2%가 최적이었다. 질소원의 경우에 균체성장에는 asparagine이 가장 좋았으나 효소생산은 ammonium tartrate를 사용하였을 때 높게 나타났으며 최적 농도는 0.04%이었다. Thiamine과 biotin을 첨가한 경우 균체성장과 효소활성을 증가시켰으며, inducer로서 2,5-xylidine을 배양 1일 후에 0.5 mM 첨가한 경우에 laccase의 생산이 약 7배 증가하였다. Laccase를 생산하는 최적 pH는 5.0이며 온도는 25°C이었다. 또한, 5 L Jar fermenter를 이용하여 상기 조건에서 배양했을 때 ammonium ion이 급속히 감소하는 시기에 laccase의 활성이 가장 높게 나타났으며 그때의 효소활성은 340 U/ml이었다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 산업자원부 공업기반기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Archibald, F., M. G. Paice, and L. Jurasek. 1990. Decolorization of kraft leachery effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 846-853.
2. Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(5): 1876-1880.
3. Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(1): 154-158.
4. Coll, P. M., J. M. Fernandez-abalos, and P. Perez. 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase(laccase) from the lignin-degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(8): 2607-2613.
5. Eggert, C., U. Temp, and K. E. Eriksson. 1996. The ligninolytic system of white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laaccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(4): 1151-1158.
6. Fahraeus, G. and B. Reinhammar. 1967. Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. *Acta Chemica Scandinavica.* **21**: 2367-2378.
7. Field, J. A. and G. Feijoo-Costa. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Tibtech. February* **11**: 44-49.
8. Haars, A. and A. Huttermann. 1983. Laccase induction in the white-rot fungus *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus* Fr. Cooke) *Arch. Microbiol.* **134**: 1309-1313.
9. Jager, A., 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.
10. Kim, H. S., K. K. Oh, C. W. Lee, and Y. J. Jeon. 1997. Decolorization of dyes by *Trametes* sp. CJ-105. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(6): 630–635.
 11. Kirk, T. K., E. Schultz, W. J. Connors, and L. F. Lorent. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**: 277–285.
 12. Manzanares, P., S. Fajardo, and C. Martin. 1995. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* **43**: 125–132.
 13. Milstein, O. and B. Nicklas. 1989. Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 70–74.
 14. Nicole, M., H. Chamberland, J. P. Geiger, N. Lecours, J. Va lero, B. Rio, and G. B. Oulette. 1992. Immunocytochemical localization of laccase L1 wood decayed by *Rigidoporus lignosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1727–1739.
 15. Nicolini, L., C. V. Hunolstein, and N. Orsi. 1986. Production of laccase A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 185–191.
 16. Pease, E. A., A. Andrawis, and M. Tien. 1989. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13531–13535.
 17. Renganathan, V. and M. Chivukula. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(12): 4374–4377.
 18. Roch, P., J. A. Buswell, and R. B. Cain. 1989. Lignin peroxidase production by strains of *Phanerochaete chrysosporium* grown on glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 587–591.
 19. Rogalski, J., T. Lundell, A. Leonowicz, and A. Hattaka. 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiol. Polon.* **40**: 221–234.
 20. Roy-Arcand, L. and F. S. Archibald. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 194–203.
 21. Sayadi, S. and R. Ellouz. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3): 1098–1103.
 22. Schlosser, D., R. Grey, and W. Fritsch. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*: Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 412–418.
 23. Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19–26.
 24. Ulmer, D., M. Leisola, J. Puhakka, and A. Fiechter. 1983. *Phanerochaete chrysosporium*: Growth pattern and lignin degradation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 153–157.
 25. Vares, T., M. Kalsi, and A. Hatakka. 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10): 3515–3520.
 26. Wessels, J. G. H. and W. H. C. F. Kooistra. 1986. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* Dikaryon. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2817–2826.
 27. Wood, D. A. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**: 327–338.

(Received May 27, 1999)