

Phanerochaete chrysosporium PSBL-1의 배양조건 최적화를 통한 Lignin Peroxidase의 과량생산

한윤전 · 장승욱 · 정욱진¹ · 원유정² · 정병철*

명지대학교 생명과학과/환경생명공학원, ¹화학공학과/정정기술원, ²인수환경

지금까지의 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용한 lignin peroxidase(LiP)의 생산은 최적화 되지 못한 배양 조건으로 인해 매우 낮은 활성만을 얻을 수 있었으며, 그 배양조건 또한 100% 산소의 주입을 요하는 일반적으로는 재현하기 어려운 조건이었다. 본 연구에서는 *P. chrysosporium* PSBL-1 균주를 이용, 다양한 배양조건의 변화를 통해 LiP의 과량생산과 그에 따른 isozyme 조성의 변화를 확인하고자 하였다. 최종적으로 Mn^{2+} 를 제거한 배지에 질소원인 diammonium을 48 mM로 첨가하고, 안정제로서 veratryl alcohol을 2 mM로 첨가하여, sponge에 의한 고착배양을 실시한 결과 1,800 units/l의 LiP가 생산되었다. 이러한 활성의 증가는 기존에 보고된 PSBL-1 균주의 LiP 최대생산량인 700 units/l와 비교, 약 2.57배의 생산량 증대를 나타낸다. 생산된 LiP isozyme 분석 결과 Mn^{2+} (2.73 mM)와 diammonium(48 mM)을 첨가하였을 경우 H1 isozyme의 과량생산이 확인되었다. 생산된 LiP(0.4 units)를 이용하여 각각의 아조계 염료(acid yellow 9, congo red, orange II; each 50 μM)에 대한 탈색능을 확인한 결과, 2분 이내에 이들 염료에 대한 탈색이 이루어지는 것을 확인할 수 있었고, 분해 산물이 축적되는 것을 확인할 수 있었다.

Key words □ isozyme profile, lignin peroxidase over production, manganese deficient culture, *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1

주요 수질오염원인 염색폐수의 처리에 대한 심각성이 대두됨에 따라 선진국에서는 일찍부터 미생물을 이용한 염색폐수 분해를 목적으로 한 연구들이 활발히 진행되어 왔다. 특히 강력한 산화력을 지니는 peroxidase를 생산하는 미생물의 탐색이 주로 수행되었다. 1983년 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 분리된 lignin peroxidase(LiP)는 염색료 및 PAH(polycyclic aromatic hydrocarbon) 등에 대한 분해능이 다른 형태의 peroxidase보다 탁월한 것으로 나타났으며(17), *P. chrysosporium*을 이용한 리그닌 분해 기작 및 응용 가능성을 모색하기 위한 연구가 중점적으로 이루어졌다. 이후 LiP가 분리·정제되고, LiP에 의한 다양한 난분해성 물질의 분해가 보고되어 현재까지 PCP(pentachlorophenol)(16), 아조계 염료(6) 등의 난분해성 물질에 대한 분해능이 확인되었다.

P. chrysosporium BKM-F1767의 경우 LiP 과량 생산을 위해서는 질소원의 농도를 제한해 주어야 하므로, 효소생산이 시작되는 이차대사단계에서 소량의 균사체를 통해서만 효소를 얻게 되는 비효율적인 생산 과정을 거치게 된다 또한 균사체 배양과정 중 방출되는 여러 부산물들로 인해 LiP생산 억제 및 불활성화가 초래된다(5). 특히, 성장과정 중 생산되는 protease에 의한 LiP의 생산량 감소, glyoxal oxidase의 과량생산으로 배양액 중 H_2O_2 의 방출이 증가하면서 LiP를 불활성화시키는 것 등이 문제된다. 이러

한 문제들은 광범위한 연구와 환경정화에 적용시킬만한 충분한 LiP의 확보를 어렵게 만드는 요인들로서 나타났다(2,8,21).

이러한 문제점들을 해결하기 위해 *P. chrysosporium* BKM-F1767로부터 INA-12와 ME446 같은, 질소원에 의한 LiP 생산억제를 최소화하거나, glyoxal oxidase의 활성을 감소시킨 균주들이 개발되었다(9,15). *P. chrysosporium* BKM-F1767의 UV-mutation에 의해 만들어진 PSBL-1 균주의 경우 질소가 충분한 배지 상에서 LiP의 생산이 가능한 것으로 보고되었는데 INA-12나 ME446에 비하여 5배 이상의 LiP 생산량 증가를 이룬 것으로 알려졌다(15). 그러나 PSBL-1의 경우도 아직 최적화 되지 못한 배양조건과 효소생산을 저해하는 인자들의 배제가 이루어지지 못하여 700 units/l 정도의 LiP 생산에 머무르고 있어 균사체 자체의 이용이나 생산된 LiP를 이용한 폭넓은 연구를 수행하기에는 부족한 상태이다.

본 연구에서는 *P. chrysosporium* PSBL-1으로 부터 LiP의 과다 생산을 이루기 위하여 LiP의 생산을 억제하는 인자를 확인하고, 생산촉진인자의 첨가 효과를 확인하였다

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 연구에서 사용된 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1은 Tienzyme사 (Utah, USA)로부터 분양 받았다. 균주의 보존을 위해서는 YMPG 배지(yeast extract 2 g, malt extract 10 g, peptone 2 g, glucose 10 g, asparagme 1 g, KH_2PO_4 2 g,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-6196, Fax: 031-335-8249
E-mail: bcjeong@bioserver.myongji.ac.kr

MgSO₄ 1 g, thiamin-HCl 1 mg, adjusted to 1 liter by distilled water)를 사용하였고. 효소의 생산을 위해서는 Tien이 사용한 배지들 (basal medium (KH₂PO₄ 20 g, MgSO₄ 5 g, CaCl₂ 1 g adjusted to 1 liter by distilled water) 100 ml, trace element solution (MgSO₄ · 7H₂O 3 g, NaCl 1 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CoCl₂ · 6H₂O 0.1 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CuSO₄ · 5H₂O 0.1 g, AlK(SO₄)₂ · H₂O 10 mg, H₃BO₃ 10 mg, Na₂NmO₄ · 2H₂O 10 mg adjusted to 1 liter by distilled water) 70 ml, 10% glucose 100 ml, 3 mM lysine 100 ml, ammonium tartarate(80 g/l) 2.5 ml, thiamin(1 g/l) 1 ml, 100 mM veratryl alcohol 1 ml, 10% tween 80 5 ml, 100 mM succinate buffer(pH 4.5) 100 ml, adjusted to 1 liter by distilled water) 바탕으로 하였다(19). YMPG 배지에서 7일간 배양하여 획득한 균사체를 50 mM succinate buffer(pH 4.5)로 세척하고 homogenizer(IKA labortechnik, Germany)로 분쇄하여(13,500 rpm) -70°C로 보관하였다. 효소생산을 위해서는 효소생산 배지에 0.4 mg dry mycelium weight/ml의 농도로 균사체를 접종하여 각각의 배양 조건으로 배양을 실시하였다

효소활성 측정

LiP 활성 측정은 시료 500 μ l, 125 mM tartrate buffer(pH 2.5) 400 μ l, 40 mM veratryl alcohol 50 μ l의 반응액 조성으로, H₂O₂ 존재 시 LiP가 veratryl alcohol을 veratryl aldehyde(ϵ 310=9,300/M/cm)로 산화시키는 반응을 사용하였다. 반응은 8 mM H₂O₂ 50 μ l의 첨가를 통해 시작되며 생성되는 veratryl aldehyde에 의한 흡광도의 증가를 310 nm에서 2분 동안 연속적으로 spectrophotometer(Ultrospec III, Pharmacia)로 측정하였고(19), 분당 1 mole의 veratryl aldehyde를 생성시킬 때의 효소 역가를 1 unit로 정의하였다. 반응 시 사용한 모든 용액은 30°C로 보정하여 반응을 실시하였다.

Protease 활성은 azo-casein을 기질로 사용하여 protease에 의해 분해되어 casein으로부터 유리되는 아조계 염료의 흡광도로 결정하였다. Protease 활성 측정은 시료 300 μ l, 200 mM citrate buffer(pH 5.0) 500 μ l, 1% azo-casein 200 μ l을 혼합하여, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 20% TCA 150 μ l로 반응을 정지시키고, 8,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액 400 μ l를 취한다. 여기에 2 N NaOH 400 μ l를 혼합하여 색도를 증가시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(2)

염료분해능 확인

P. chrysosporium PSBL-1의 염료분해능을 육안으로 확인하기 위하여 YMPG 배지에 각각 100 mg/l의 아조계 염료(Acid Yellow 9, Congo Red, Orange II)를 함께 첨가한 고체배지를 제조하고, 균주를 접종한 후 균주의 성장에 따라 염료가 분해되어 나타나는 투명대를 확인하였다. 배양액의 염료 탈색능을 확인하기 위해 제작한 plate에 *P. chrysosporium* PSBL-1의 배양액을 농축하여 paper disk를 통해 반응 시켰다. 또한 배양액을 이용하여 직접 염료에 대한 분해능을 확인하였다. 반응액의 조성은 배양액 500 μ l (LiP 0.4 unit/ml), 100 mM tartrate buffer(pH 4.5) 430

μ l, 8 mM H₂O₂ 20 μ l, 1 mM dye 50 μ l로, 각 염료의 최대 파장(Acid yellow 9: 386 nm, Congo red, 501 nm, Orange II; 485 nm)에서 흡광도의 감소를 spectrophotometer를 사용하여 3분간 측정하였다.

배양조건 변화

효소의 과량생산을 위하여 교반속도의 변화, 고착제에 의한 고착배양, 생산촉진인자의 첨가등의 배양조건의 변화를 시도하였다. 배양은 250 ml의 baffled flask에 50 ml의 접종액을 투여하여 38°C에서 실시하였다. 교반속도에 의한 효소생산 비교는 교반속도를 50, 100, 200 rpm 및 정치상태로 하여 실시하였고, 고착제에 의한 고착배양의 경우 ring형 고착제(HBC-Ring; 대신산업), lock형 고착제(BIO-MOL; 동성랩테크), sponge를 일정한 크기(2 cm \times 2 cm \times 1 cm)로 절단하여 250 ml의 baffled flask에 넣어 멸균한 후 50 ml의 접종액을 투여하여 배양을 실시하였다. 생산 촉진 인자들의 첨가를 통한 LiP 생산 비교는 veratryl alcohol, veratrol, veratryl aldehyde 및 L-tryptophan을 효소생산배지 내에 최종 2 mM의 농도로 투여하여 배양과정 중의 LiP 활성변화를 확인하였다

LiP 생산저해인자 추적

배지 안에 LiP의 활성 및 생산을 저해하는 물질의 존재를 알아보기 위해 배지성분들을 각각 분리한 후 효소생산배지에 투여되는 농도와 같은 농도가 되도록 하여 0.1 unit의 LiP와 1:1로 반응, 활성의 변화를 확인하였다. Protease에 의한 영향을 확인하기 위해서는 protease의 생산이 최대인 시점의 배양액을 YM10 membrane(M.W. 10 kDa cut-off, Amicon)을 이용하여 농축한 후 0.1 unit의 LiP와 1:1로 반응시켜 LiP 활성의 변화를 확인하였다. 대조구로는 100°C에서 30분간 고온 처리한 protease 농축액을 0.1 unit의 LiP와 반응시켰다.

LiP isozyme 분석

질소원과 MnSO₄ 첨가농도에 따른 LiP isozyme의 생산 변화를 확인하기 위한 분석과정은 Tien의 방법과 동일하게 실시하였다(19) LiP 활성이 최대인 시점의 배양액을 모아 0.45 μ m membrane filter로 여과하고 YM10 membrane으로 20배 농축 후 10 mM Na-acetate buffer(pH 6.0)로 투석하여 Mono-Q column(Mono-Q HR 5/5, Pharmacia)으로 분리하였다. HPLC system(Waters 626, Waters)을 사용하여 10~500 mM Na-acetate(pH 6.0) linear gradient 상에서 용출속도 1 ml/min으로 40분 동안 분석하였고 409 nm에서 heme site를 감지하고, veratryl alcohol에 대해 산화능을 가진 것들을 LiP isozyme으로 결정하였다(19)

결과 및 고찰

P. chrysosporium PSBL-1의 염료분해능 확인

염료분해능을 확인하기 위하여 YMPG 배지에 아조계 염료 혼합액(Acid Yellow 9, Congo Red, Orange II, each concentration 100 mg/l)을 첨가한 고체배지에서 염료가 분해되는 현상을 관찰

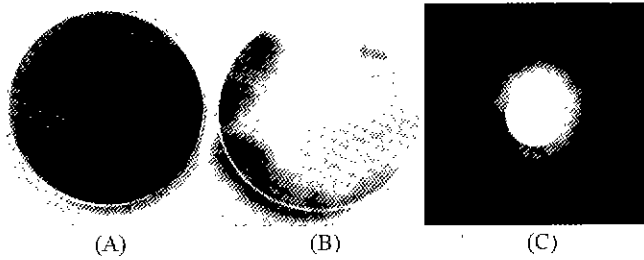


Fig. 1. Degradation of azo dye mixture by *P. chrysosporium* PSBL-1 (A) no inoculation; (B) after 7 day cultivation; (C) clear zone formation by culture broth. Used azo dye concentration was 100 mg/l and LiP activity was 3 units/ml.

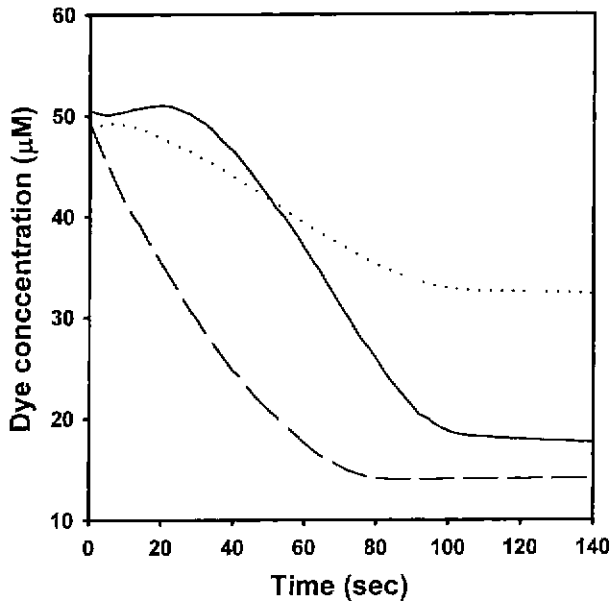


Fig. 2. Azo dye degradation by extracellular fluid from *P. chrysosporium* PSBL-1. — Congo red at 501 nm; - - - - - Orange II at 485 nm; ····· Acid yellow 9 at 386 nm. Final azo dye concentration was 50 µM/ml, LiP activity 0.4 unit/ml, reaction was performed at 30°C for 3 min.

한 결과 배양 4일부터 염료가 탈색되는 현상을 확인하였다(Fig. 1 (A), (B)). 또한 탈색현상이 균사체 외부로 방출되는 효소에 의한 것이라는 확인을 위해 위에서 제작한 plate에 *P. chrysosporium* PSBL-1의 배양액을 농축하여 paper disk를 통해 반응시킨 결과, disk 주위로 투명대가 형성되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1 (C)). 각각의 아조계 염료(50 µM)와 4일 배양한 배양액을(0.4 unit LiP) 반응시켜 흡광도의 변화를 관찰한 결과 Cripps등(6)이 BKM-F1767의 LiP를 이용하여 발표한 결과 보다 높은 분해활성을 나타냈으며, orange II, congo red, acid yellow 9의 순서로 분해가 잘 일어났다(Fig. 2). 또한 반응전, 후의 흡광도 변화를 관찰한 결과 세종류의 염료 모두 분해되어 흡광도가 감소함과 동시에 380 nm에서 흡광도를 나타내는 반응산물이 생성되어 축적되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Acid yellow 9의 경우 반응산물의 흡광도가 측정과정과 유사하여 분해능이 실

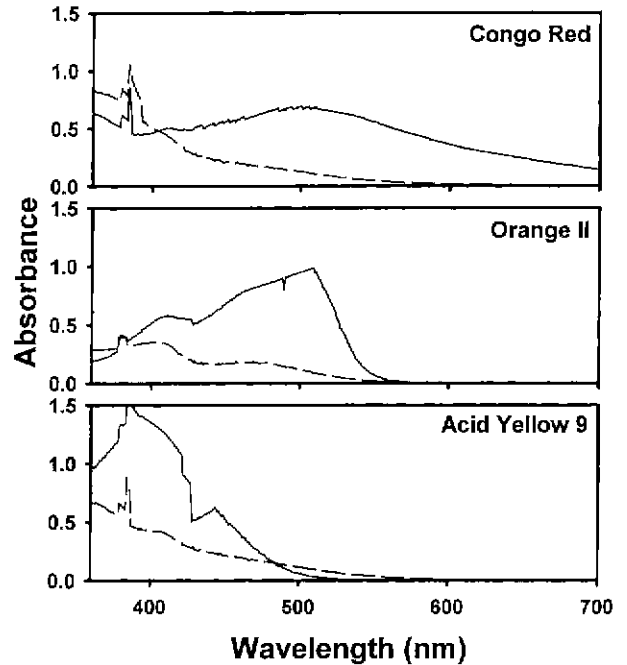


Fig. 3. Wave scan of azo dyes and degraded products by extracellular fluid from *P. chrysosporium* PSBL-1. Solid line indicates before reaction, broken line indicates after reaction. Final azo dye concentration was 50 µM/ml, LiP activity 0.4 unit/ml, reaction was performed at 30°C for 3 min

제보다 낮은 것처럼 나타난 것으로 사료된다.

교반속도 및 교착제 종류에 따른 LiP 생산

교반속도별로 PSBL-1 균주의 효소생산양상을 살펴본 결과 100 rpm 까지의 저속 교반배양 시에는 효소의 생산이 거의 이루어지지 않은 반면 200 rpm의 고속 교반배양 시에는 약 2일경에 LiP의 생산이 시작되어 배양 3일경에 최대 412 units/l의 LiP 생산을 이루었다(Fig. 4). 이러한 결과는 100 rpm이하의 교반속도로는 LiP 생산에 중요한 역할을 하는 산소의 공급이 원활하지 못하기 때문이라 생각된다. Michael 등(13)은 *P. chrysosporium*로부터 LiP 생산시 충분한 산소공급을 통해서만 LiP의 생산이 가능하다고 하였으며 *P. chrysosporium*을 mycelial pellet 형태로 배양을 할 경우 pellet의 직경이 20 mm 이상이면 충분한 산소의 공급이 있을지라도 pellet 내부로의 산소공급이 부족하기 때문에 LiP의 생산이 한계를 가진다고 보고하였다. 실제로 본 실험에서는 기준에 보고된 PSBL-1 균주의 LiP 최대생산량인 700 units/l에 못 미치는 결과를 얻었다. 이 후의 실험에서는 다양한 교착제를 이용하여 PSBL-1이 mycelial pellet 형태로 자라지 않고 산소와 접촉할 수 있는 표면적을 최대한 넓힐 수 있도록 하였다. 결과는 교착배양에 사용된 3가지 교착제중 sponge에 균체를 지지시켜 배양한 경우가 가장 LiP의 생산이 뚜렷하였으며 생산된 LiP의 활성 또한 최대 800 units/l를 나타냈다(Fig. 5). 그러나 효소의 활성이 지속적으로 유지되지 못하고, 배양 6일째의 LiP 활성이 400 units/l 이하로 감소되는 현상이 관찰되었다.

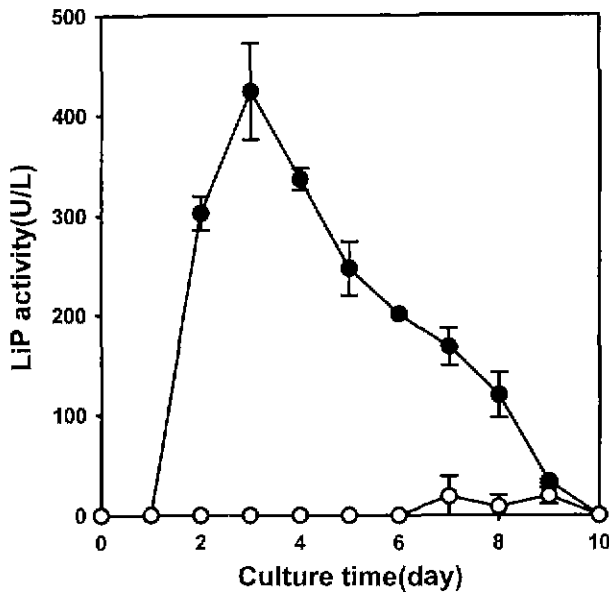


Fig. 4. Time courses of LiP activity from *P. chrysosporium* PSBL-1 according to agitation speed. (○) 100 rpm; (●) 200 rpm.

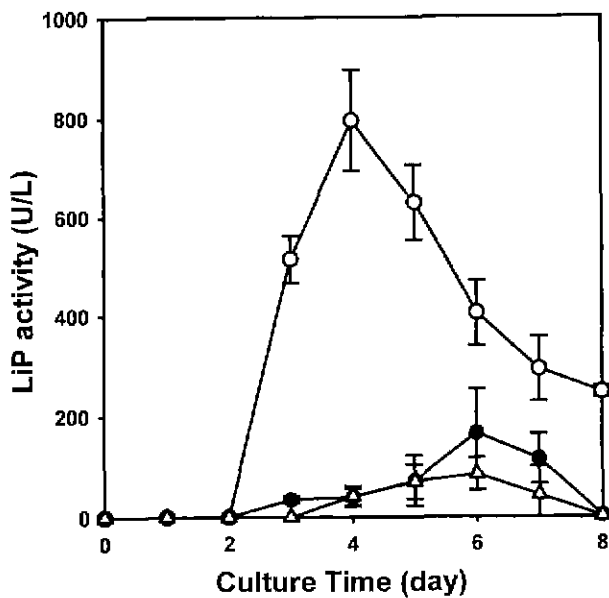


Fig. 5. Time courses of LiP activity from *P. chrysosporium* PSBL-1 cultivated using different immobilizing carriers. (○) sponge type carrier; (●) ring type carrier; (△) lock type carrier.

이러한 현상에 대한 원인을 추적하기 위하여 PSBL-1이 생산하는 protease와 배지성분을 대상으로 LiP 활성과의 관계를 살펴 보았다.

Protease에 의한 영향

PSBL-1은 배양 2일째 활성을 나타내는 primary protease와 배양 9일 이후에 활성이 나타나는 secondary protease의 두 종류의 protease를 분리하는 것으로 사료된다(Fig. 6) 배양 2일째와

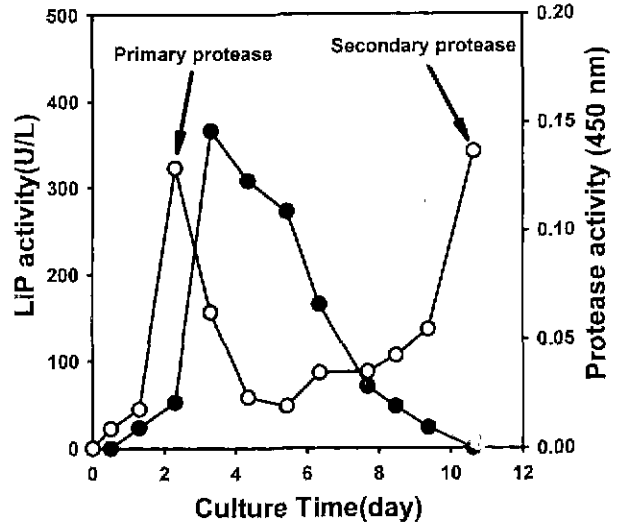


Fig. 6. Time course of LiP activity and protease activity from *P. chrysosporium* PSBL-1. (○) proteases; (●) lignin peroxidase.

Table 1. The effect of protease on lignin peroxidase

Primary protease		Secondary protease		Control ^c
Heating ^a	No heating ^b	Heating	No heating	
81.7±12.3 ^d	71.7±9.2	96.9±3.5	93.7±9.0	109.5±13.7

^aLiP concentrate and heat treated protease, ^bLiP concentrate and non-heat treated protease, ^cLiP concentrate only, ^dResidual LiP activity(%), data are mean ± standard error from three times measurements.

10일째 획득한 배양액을 각각 농축하여 LiP에 대한 protease의 영향을 확인하였다(Table 1). primary protease에 의한 LiP 활성 저하의 경우 primary protease 농축액을 열처리하여 불활성화시킨 경우에도 나타났으며, 열처리를 하지 않은 경우의 활성저하가 더 높았으나 전반적으로 오차범위에 들어가는 정도의 차이였다. Secondary protease에 의해서는 LiP의 활성저하가 거의 일어나지 않았으며 열처리를 실시하지 않은 경우에도 대조구의 오차범위 내에 들어가는 정도의 활성저하만 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어보아 primary protease와 secondary protease 모두 LiP에 대한 활성저하는 거의 미미한 정도인 것으로 보여진다. 이러한 사실은 *P. chrysosporium* BKM-F1767의 경우 질소제한배지 상에서 이차대사기간 중 생산되는 secondary protease에 의해 LiP 활성이 감소된다는 보고(8)와 상이한 결과이며, 또한 *P. chrysosporium* BKM-F1767로부터 분리된 *P. chrysosporium* INA-12의 경우 primary protease가 LiP의 활성을 감소시킨다는 보고(2)와도 다른 결과였다. 따라서 본 PSBL-1 균주의 경우 protease에 의한 LiP 활성의 감소는 매우 미약한 정도이고, 배양 후반기의 LiP 활성 감소는 균주의 성장 억제에 의한 inhibitor의 증가, 또는 glyoxal oxidase에 의한 H₂O₂ 발생의 증가에 의한 결과로 사료된다 한편 primary protease 농축액과 LiP를 반응시켰을 경우 활성의 감소가 관찰되었는데, 열처리를 실시하여 protease를 불활성화시킨 경우에도 활성저해를 나타내었다. 따라서 배지성분으로 첨가된 어느 물질의 영향일 것으로 생각되어 이후 배지

Table 2. The effect of medium ingredients on the activity of lignin peroxidase

	Residual LiP activity (%)
Control	100.0
Medium source*	
Ammonium tartate	103.4
Thiamin-HCl	103.2
Veratryl alcohol	105.8
Tween 80	120.7
L-lysine	103.6
D-glucose	105.7
Basal III medium	96.9
Trace element*	
Magnesium	96.0
Manganese	1.3
Sodium	98.3
Ferrous	91.3
Cobalt	98.1
Zinc	106.3
Copper	92.2
Aluminium	92.5
Boric acid	83.2
Molybdenum	97.2

*Concentration of all the elements were the same as the concentration used in the production medium. Control was no addition of medium source.

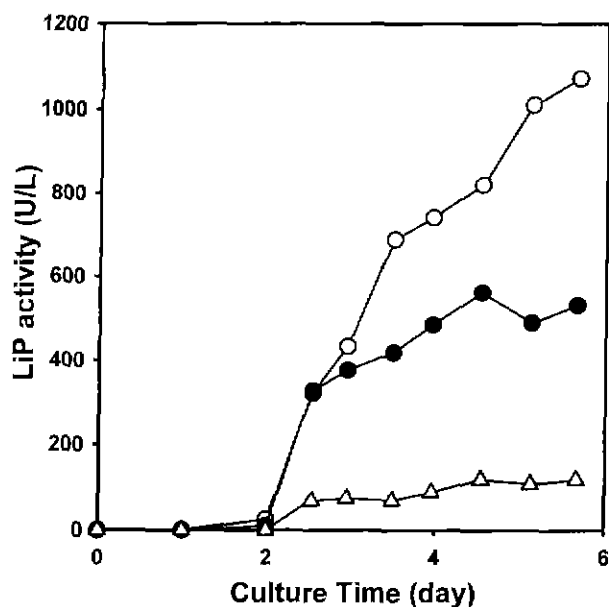


Fig. 7. Time courses of LiP activity from *P. chrysosporium* PSBL-1 according to $MnSO_4$ concentration in enzyme production medium. (○) no $MnSO_4$; (●) $273 \mu M MnSO_4$; (△) $2.73 mM MnSO_4$.

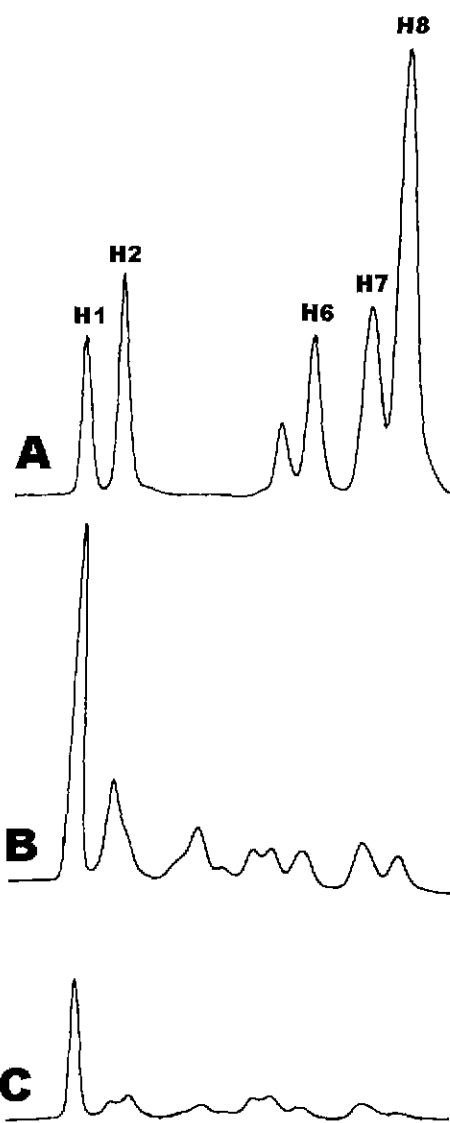


Fig. 8. Heme protein profiles of the extracellular fluids of cultures of *P. chrysosporium* PSBL-1 grown with various $MnSO_4$ concentrations. Effluent was monitored at 409 nm. (A) no $MnSO_4$; (B) $273 \mu M MnSO_4$; (C) $2.73 mM MnSO_4$.

성분에 대한 LiP 활성 저해 효과를 확인하는 실험을 실시하였다.

배지성분에 의한 영향

효소생산매지를 성분별로 분리하여 LiP의 활성저해 유무를 살펴본 결과 $MnSO_4$ 에 의해 LiP의 활성이 거의 완전히(98%) 저해되는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이 결과를 바탕으로 $MnSO_4$ 의 농도를 변화시켜 배지에 첨가한 후 효소의 생산정도를 살펴본 결과 $MnSO_4$ 를 전혀 첨가하지 않은 경우, 최대 1,071 units/l의 LiP생산이 이루어졌다(Fig. 7). $MnSO_4$ 를 과량으로 투여한 경우는 LiP의 생산량이 100 units/l에도 도달하지 못했는데, 이러한 결과는 LiP의 생산량만을 비교하여 보았을 때 10배 정도의 차이를 나타내는 것으로, Table 2의 결과로 미루어 보아 이미 생산된 LiP가 $MnSO_4$ 에 의해 활성을 잃었을 가능성을 고려할 수

있을 것이다. 그러나 $MnSO_4$ 농도를 달리하여 생산된 LiP의 isozyme을 분석한 결과, isozyme의 양상이 확연히 다르게 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig 8). 이러한 결과는 $MnSO_4$ 가 생산된 LiP에 대한 저해효과만을 나타내는 것이 아니라 LiP의 전사단계부터 영향을 끼치는 것으로 보여진다. 또한 Rothschild 등(17)은 *P. chrysosporium* BKM-F1767로부터 Mannose-6-phosphatase (M6Pase)를 분리하여 특성을 파악한 결과 M6Pase가 H_2 isozyme을 H1 isozyme으로 전환시키며, Mn의 첨가에 의해 두 배 이상의 활성증가가 일어난다는 결과를 발표하였다. 본 실험에서도 $MnSO_4$ 의 양이 증가할수록 H1 isozyme의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었는데 이것은 Rothschild 등이 밝힌 M6Pase가 본 균주에서도 발견되어, 생산된 H_2 isozyme을 H1 isozyme으로 전환시킨 것으로 사료된다. 따라서 효소생산배지에 첨가되는 $MnSO_4$ 는 LiP의 전사단계와 발현된 LiP의 활성 저하에 영향을 끼치며, 또한 생산된 LiP isozyme 비율변화를 야기하는 M6Pase의 촉매체로서 사용되어지는 등 LiP생산에 여러 방향으로 영향을 끼치는 것으로 보인다. LiP의 생산량 증감에 대한 $MnSO_4$ 와 의 관계는 좀 더 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

질소원 농도에 따른 LiP생산

질소원 농도를 달리하고 $MnSO_4$ 첨가를 배제시킨 PSBL-1배양으로부터 LiP 생산 시 48 mM의 diammonium을 질소원으로 첨가시켰을 때 최대 1056 units/l의 LiP가 생산되었다(Fig. 9). 이러한 결과는 질소원의 농도와 비례하여 생산된 보다 많은 균체량을 통해 과량의 LiP가 생산된 것으로 판단되었다. Isozyme 분석 결과 24 mM의 diammonium이 첨가되었을 경우는 H8 isozyme의 비율이 특히 높게 나타났지만, 48 mM의 diammonium 첨가 시 H1, H2, H7 등의 isozyme들이 전체적으로 높게 생산되는 양

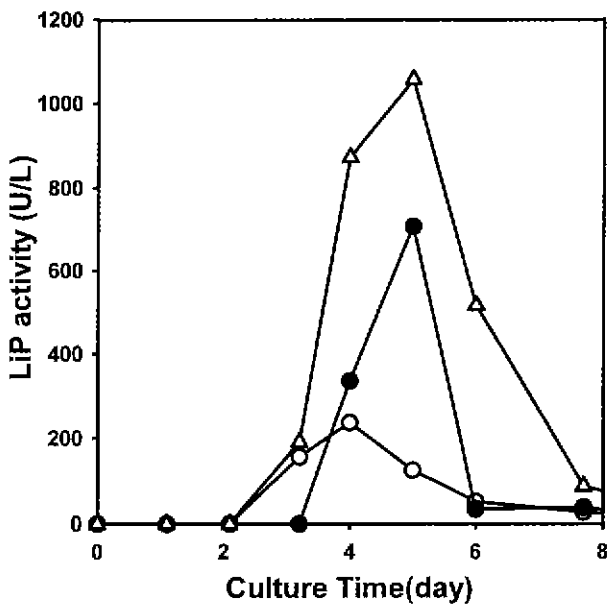


Fig. 9. Time courses of LiP activity from *P. chrysosporium* PSBL-1 according to NH_4^+ concentration in enzyme production medium. (○) 2.4 mM NH_4^+ ; (●) 24 mM NH_4^+ ; (△) 48 mM NH_4^+ .

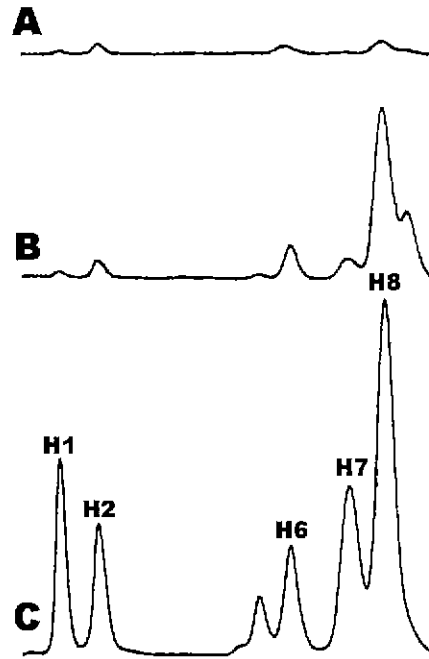


Fig. 10. Heme protein profiles of the extracellular fluids of cultures of *P. chrysosporium* PSBL-1 grown with various NH_4^+ concentration. Effluent was monitored at 409 nm. (A) 2.4 mM NH_4^+ ; (B) 24 mM NH_4^+ ; (C) 48 mM NH_4^+ .

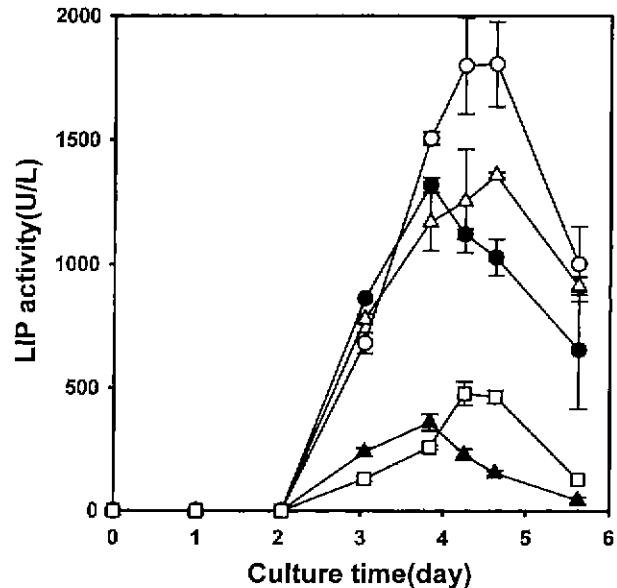


Fig. 11. Time courses of LiP activity from *P. chrysosporium* PSBL-1 according to stabilizer additions in enzyme production medium. (○) 2 mM veratryl alcohol; (●) 2 mM veratrol; (△) 2 mM veratryl aldehyde; (▲) 2 mM L-tryptophan; (□) no addition.

상을 나타냈다(Fig. 10). 이러한 결과는 Orth등(15)이 PSBL-1의 N-sufficient culture(24 mM diammonium tartrate 첨가)를 통해 H1, H2 isozyme만을 과량생산 하였다는 보고와 isozyme 생산양상이 다른 것을 알 수 있는데, 이것은 $MnSO_4$ 를 첨가하지 않고

배양을 실시하였기 때문에 사료된다. Rothschild등(17)은 *P. chrysosporium* BKM-F1767에서 LiP의 H2 isozyme을 H1 isozyme으로 전환시키는 M6Pase의 활성이 과량의 질소원(45 mM diammonium)을 첨가시켜 배양을 할 경우에만 나타난다고 보고하였는데, 본 결과에서도 과량의 질소원을 첨가시켜 배양을 실시한 경우에 H1 isozyme의 비율이 H2 isozyme에 비해 높게 나타났다. 이로 미루어 보아, 본 PSBL-1 균주의 경우에도 M6Pase가 생산되어 H2 isozyme을 H1 isozyme으로 전환시키는 것으로 보여진다.

Stabilizer의 첨가를 통한 LiP과량생산유도

LiP의 활성을 안정화시킬 수 있는 물질들을 선별하여, 효소 생산배지에 투여함으로써 보다 효과적인 효소생산을 유도하였다. 실험에 사용한 물질들은 LiP의 안정화와 재활성화에 효과적이라 보고(21)된 veratryl alcohol과 유사구조를 가진 물질들을 대상으로 하였다. 이들은 모두 dimethoxy benzene ring을 공통적으로 가지고 있는 물질들로서 veratryl aldehyde와 veratrol을 우선적으로 선별하였다. 또한 대조군으로서 LiP의 안정화에 효과가 있다고 보고(5)된 L-tryptophan을 효소생산배지에 투여하였다. 결과는 2 mM로 veratryl alcohol이 첨가된 경우 1804.1 units/l의 LiP 생산이 이루어졌으며, veratrol과 veratryl aldehyde을 첨가한 경우에는 각각 1029.05와 1360.15 units/l의 LiP가 생산되었다(Fig. 11). L-tryptophan은 LiP의 안정화에 효과적이라는 보고(5)와는 달리 359.15 units/l의 생산량을 나타내었다. Stabilizer를 전혀 첨가하지 않은 경우에는 478.20 units/l가 최대생산량으로서 stabilizer의 첨가 유무에 따라 LiP생산량의 차이가 뚜렷하였다(Fig. 11). 이러한 결과를 바탕으로 첨가된 각각의 stabilizer에 의한 생산된 LiP의 안정화 여부와 안정화 능력에 대한 연구를 실시중이다.

본 연구에서는 배양조건을 변화시켜 *P. chrysosporium* PSBL-1로부터 LiP의 과량생산을 이루고자 하였다. 최종적으로 trace element 조성 변화, 영양원으로 질소원의 과량첨가, 또한 고착제에 의한 고착배양을 통하여 기존에 보고된 PSBL-1균주의 LiP 최대생산량 700 units/l와 비교하여 약 2.57배(1,800 units/l)의 LiP생산량의 증가를 이루었다. 향후 이러한 결과를 바탕으로 과량 생산된 LiP에 대한 고정화를 실시하고 균주 배양 시 첨가되었던 stabilizer의 LiP에 대한 재활성능을 확인하여, 효율적인 염색폐수의 처리를 위한 경제적인 효소반응기의 제작을 모색하고자 한다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 학술연구조성비(생물화학공학)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다

참고문헌

1. Archibald F.S. 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3110-3116.
2. Bonnarne P. 1993. Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity. *J. Biotechnol.* 30, 271-282.
3. Bonnarne P. and T.W. Jeffries 1990. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and Mn-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217.
4. Brown J.A., J.K. Glenn, and M.H. Gold 1990. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 172, 3125-3130.
5. Collins P.J., J.A. Field, A. Teunissen, and A.D.W. Dobson 1997. Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2543-2548.
6. Cripps C. and D.A. Steven. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1114-1118.
7. Dass S.B. and C.A. Reddy. 1990. Characterization of extracellular peroxidases produced by acetate-buffered cultures of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene.* 60, 93-102.
8. Dosoretz C.G. 1995. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*(BKM-F1767) under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. *Arch. Microbiol.* 163, 254-285.
9. Dosoretz C.G., N. Rothschild, and Y. Hadar. 1993. Overproduction of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*(BKM-F1767) under nonlimiting nutrient condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1919-1926.
10. Glenn J.K., L. Akleswaran, and M.H. Gold. 1988. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 688-696.
11. Gold M.H., M. Kuwahara, A.A. Chiu, and J.K. Glenn. 1984. Purification and characterization for an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 353-362.
12. Hammel K.E. 1989. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11, 776-777.
13. Michael F.C.Jr., E.A. Grulke, and C.A. Reddy 1992. Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1740-1745.
14. Michael F.C.Jr., S.B. Dass, E.A. Grulke, and C.A. Reddy 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2368-2375.
15. Orth A.B., M. Denny, and M. Tien. 1991. Overproduction of lignin degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2591-2596.
16. Orth A.B., E.A. Pease, and M. Tien. 1994. Properties of lignin-degrading peroxidases and their use in bioremediation. Edited by Chaudhry, G.R. Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Dioscorides press. p. 345-402.
17. Rothschild N., L. Ayala, H. Yitzhak, and C. Dosoretz. 1999. Extracellular mannose-6-phosphatase of *Phanerochaete chrysosporium*. A lignin peroxidase-modifying enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 107-111.
18. Sergei L., R. Scott, and D.A. Steven. 2000. Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 147-153.
19. Tien M. and T.K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161, 238-249.

20. Trevor M.D., S.M. Carlos, and C.R. Adinarayana. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5307-5313.
21. Warishi H. and M.H. Gold. 1990. Lignin peroxidase compound III: Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070-2077.
22. Zhou. W. and W. Zimmermann. 1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by acinomyces. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 157-162.

(Received July 20, 2000/Accepted September 1, 2000)

ABSTRACT: Overproduction of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* PSBL-1

Yun-Jon Han, Seung-Wook Jang, Wook Jin Jung,¹ You Jung Won,² and Byeong Chul Jeong*(*Department of Biological Sciences and BK21 Graduate Program in Environmental and Biological Engineering, and ¹Department of Chemical Engineering and Research Institute for Clean Technology, Myongji University, Yongin 449-728, ²InSoo Environmental Co., Yubang-dong, Yongin 449-728, Korea)

Until now, it was difficult to overproduce lignin peroxidase(LiP) from *Phanerochaete chrysosporium* since the lack of optimized growth conditions. In this paper, we optimized the LiP production conditions and monitored LiP isozymes of *P. chrysosporium* PSBL-1. The optimized condition includes sponge matrix support, no addition of MnSO₄, excess addition of nitrogen source(48 mM diammonium), and addition of stabilizer(2 mM veratryl alcohol). Finally we obtained LiP activity of 1,800 units/l. H1 isozyme was overproduced when mycelium was cultivated in media containing Mn²⁺ (2.73 mM) and excess nitrogen(48 mM diammonium). Three azo dyes(acid yellow 9, congo red, orange II; each concentration of 50 μM) were rapidly decolorized within 2 mins by 0.4 unit of LiP.