

# 느타리로부터 리그닌-셀룰로오스분해효소 생산 균주 선발 및 효소 생산

하효철

대구한의대학교 한방식품약리학과

## Screening and production of lignocellulolytic enzymes secreted by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*

Ha Hyo-Cheol

Department of Herbal Food Science, Daegu Haany University, 1, Hanui-daero, Gyeongsan 712-715, Korea

(Received May 8, 2012, Revised May 25, 2012, Accepted May 28, 2012)

**ABSTRACT:** Sixty strains of *Pleurotus ostreatus*, white-rot fungi, were screened for production ability of their lignocellulolytic enzymes to selectively wood degradation. That results were shown that all of screened strains were produced lignocellulolytic enzymes on 2nd screening liquid culture medium. However, cellulase activity of selected six strains of *P. ostreatus* was low in avicel-yeast-peptone liquid culture medium. In the case of xylan degrading enzyme, No. 6 and No. 38 strains produced a xylanase(above 1.0U/ml) and a 1,4- $\beta$ -xylosidase (above 0.15 U/ml). Examination of the ligninolytic enzyme profiles of selected thirteen strains of the *P. ostreatus*, in the presence of Remazol Brilliant Blue R(RBBR), were observed that laccase(Lac) activity were earlier reached maximum level(0.8-2.0 U/ml) and then Mn-dependent peroxidase (MnP) were reached maximum level(0.5-1.5 U/ml) in glucose-yeast-peptone(GYP) medium. On the other hand, activity of lignin peroxidase(LiP) was not detected in this medium. I selected the No. 42 strain of *P. ostreatus* produced high levels of Mn-dependent peroxidase and laccase based on the screening method.

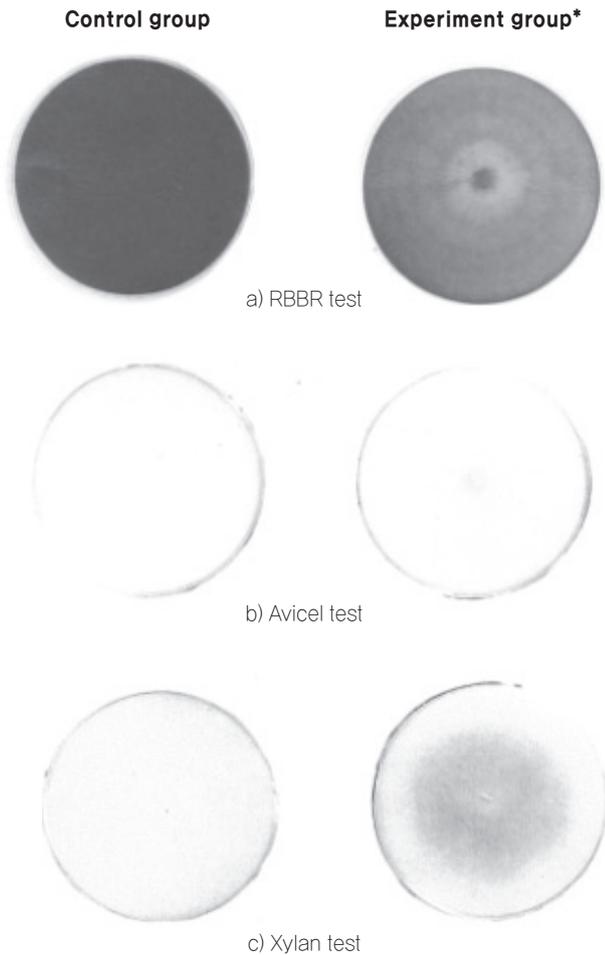
**KEYWORDS :** Lignocellulolytic enzymes, *Pleurotus ostreatus*, Remazol brilliant blue R, Avicel, Xylan

### 서론

목질 바이오매스는 지구상에서 가장 풍부한 재생 가능한 자원으로 알려져 있으며 40~55% 셀룰로오스, 20~30% 헤미셀룰로오스, 그리고 15~35% 리그닌으로 구성되어 있는 거대 분자 복합물이다. 일반적으로 버섯이라 불리는 담자균류(basidiomycetes)에 속하는 대부분의 백색부후균은 목질 바이오매스를 분해 할 수 있는 능력을 가지고 있으며 특히 난분해성 물질로 알려져 있는 다방향족 화합물인 리그닌을 분해할 수 있으며 이러한 분해과정에서 리그닌을 분해할 수 있는 리그닌 분해효소들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 많은 연구자들이 다양한 스크리닝 방법을 이용한 효율적인 리그닌 분해균주를 선발하기 위해 노력해 왔으며 목질 내에 함유하고 있는 리그닌 또는 리그닌셀룰로오스의 감소는 클라손방법(Klason method)과 같은 중량분석에 의해 리그닌 함량을 직접 측정하여 왔다. 그러나 중량분석법은 많은 시간을 필요로 하는 단점을 가지고 있다(Kirk와 Farrell, 1987).

리그닌을 분해하는 미생물의 단순한 선별법을 개발하기 위해 페놀화합물의 축합반응에 의해 얻어진 페놀, 리그놀과 그들의 다이머(dimer), 올리고머(oligomer) 그리고 Dehydrogenation polymer(DHP)를 합성한 리그닌 모델 화합물을 기질로 사용하여 왔다. 염료(Dyes)는 구조 내 발색단을 갖고 있기 때문에 리그닌 활성을 갖는 균류나 리그닌분해효소를 선별하기 위한 기질로 사용되어져 왔는데 이것은 산화에 의한 염료의 탈색은 생물학적 효소반응에 의한 구조의 변화를 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 고분자 염료의 사용은 Glenn과 Gold(1983)에 의해 처음 보고된 이래 많은 연구자에 의해 리그닌 분해효소의 선발 기질로 사용되어져 왔다(Paszczynski 등, 1991; Santos 등, 2004; Barrasa 등, 2009). 특히 본 연구에 사용한 Anthron계 형태인 Remazol Brilliant Blue R(RBBR) 염료의 경우 Ulmer 등(1984)이 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)에서 처음으로 RBBR 색소분해와 판막버섯의 리그닌 분해 능력간의 관계를 보고한 이래 많은 연구자들이 리그닌 분해균주 선발에 적용하여 왔으며(Olikka, 등, 1993; Eichlerov 등, 2005; Levin 등, 2004; 2010) 최근에는 백색부후균이 생산하는 정제된 망간 퍼옥시데이즈 혹은 락케이즈에 의해 리그닌이 분해되는 것

\* Corresponding author (hcha@dhu.ac.kr)



**Fig. 1.** Result of chromogenic reaction of *Pleurotus ostreatus* on lignocellulosic substrates used for selection.  
\* Incubated at 28° C for 7days.

으로 보고되었다(Boer 등, 2004; Palmieri 등, 2005).

리그닌 분해효소는 백색부후균인 판막버섯에서 처음 보고(Tien 등, 1983; Kuwahara 등, 1984)된 이후 현재까지 다른 많은 백색부후균에서 리그닌 분해효소들이 생산되는 것으로 보고되어 왔다(Orth 등, 1993; Hatakka, 1994; Elisashvili 등, 2009). 현재까지 백색부후균이 생산하는 리그닌분해효소는 망간 퍼옥시데이즈(Mn-dependent peroxidase; MnP; EC 1.11.1.13), 리그닌 퍼옥시데이즈(lignin peroxidase; LiP; EC 1.11.1.14) 그리고 락케이즈(laccase; Lac; EC 1.10.3.2)가 일반적으로 알려져 있다.

최근에 다양한 산업에서 리그닌-셀룰로오스분해효소의 사용에 관심을 갖기 시작하였으며 이들 효소의 대량생산을 위해 생산 공정, 균주개량, 유도제 개발, 생물반응기 개발 등의 연구들이 진행되고 있다. 특히 유전공학 기술을 이용하여 자연계에서 존재하는 균주보다 리그닌분해효소 생산능력이 높은 형질 전환체에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직까지

가시적인 성과는 미비한 실정이다(Martinez 등, 2009).

느타리 속 균주는 전 세계적으로 재배가 쉽고 식용이 가능한 버섯이며 리그닌-셀룰로오스를 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 전 세계적으로 생산량이 2위를 차지하는 대표적인 식용버섯이자 백색부후균인 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 60개 균주로부터 RBBR 염료탈색 능력, Avicel 및 Xylan 분해 능력을 이용한 스크리닝을 방법을 통해 리그닌-셀룰로오스 분해효소를 생산하는 우수균주를 선발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

일본 교토대학교 목질과학연구소에서 보관중인 느타리버섯 60개 균주를 대상으로 실험을 실시하였다. 이들 균주는 25°C, Potato Dextrose Agar(PDA, Difco Co.)에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### 리그닌-셀룰로오스 분해 효소 측정 배지 조건

느타리버섯 60개 균주의 리그닌분해효소 활성을 나타내는 1차 선발 배지 조건은 포도당(glucose) 2%(w/v), 펩톤(peptone) 0.5%(w/v), 효모추출물(yeast extract) 0.2%(w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%(w/v), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%(w/v), RBBR 0.1%(w/v), 증류수 1000 ml, pH 5.8의 한천배지를 만들어 사용하였으며 2차 선발 배지는 RBBR과 한천을 제외한 포도당 2%(w/v), 펩톤 0.5%(w/v), 효모추출물 0.2%(w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%(w/v), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%(w/v), 증류수 1000 ml, pH 5.8의 액체배지를 만들어 사용하였다. 셀룰로오스 분해 효소 활성을 나타내는 1차 선발 배지 조건은 리그닌분해효소 활성을 나타내는 1차 선발 배지 조건 중 포도당 대신 아비셀(Avicel)을 동일 농도로 첨가하고 RBBR을 제외한 나머지 조성 및 비율은 동일하게 제조하였으며 2차 선발 배지는 한천을 제외하고 나머지 조성 및 비율은 동일하게 제조하였다. 자일로오스 분해 효소 활성을 나타내는 1차 선발 배지 조건은 리그닌분해효소 활성을 나타내는 1차 선발 배지 조건 중 포도당 대신 자일란(Xylan)을 동일 농도로 첨가하고 RBBR을 제외한 나머지 조성 및 비율은 동일하게 제조하였으며 2차 선발 배지는 한천을 제외하고 동일한 조성 및 비율로 제조하였다.

### 1차 균주선발을 위한 리그닌-셀룰로오스 분해 효소 활성 측정 및 배양방법

느타리버섯 60균주를 각각 PDA배지에 접종하여 28° C에서 5일간 배양한 다음 접종용 균주로 사용하였다. 접종용

**Table 1.** Screening of *P. ostreatus* 60 strains producing ligninolytic enzyme by RBBR decolorization

Capability	Strain No.
Stronga)	3, 17, 22, 24, 26, 42, 43, 48, 49, 50, 51, 58, 59
Moderateb)	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 21, 32, 34, 35, 40, 41, 44, 53, 54, 60
Weakc)	9, 10, 11, 16, 18, 19, 20, 23, 25, 28, 31, 33, 36, 37, 38, 39, 45, 46, 47, 52, 55, 56, 57

a) Strong : halo zone ratio > 6.0 cm in 7days

b) Moderate : halo zone ratio of 6.0~4.0 cm in 7days

c) Week : halo zone ratio < 4.0 cm in 7days.

**Table 2.** Screening of *P. ostreatus* 60 strains producing cellulolytic enzyme by Avicel degradation

Capability	Strain No.
Stronga)	14, 15, 18, 24, 45
Moderateb)	1, 17, 35, 39, 42, 53, 57
Weakc)	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 60

a) Strong : halo zone ratio > 1.0 cm in 7days

b) Moderate : halo zone ratio of 0.1~1.0 cm in 7days

c) Week : halo zone ratio < 0.1 cm in 7days.

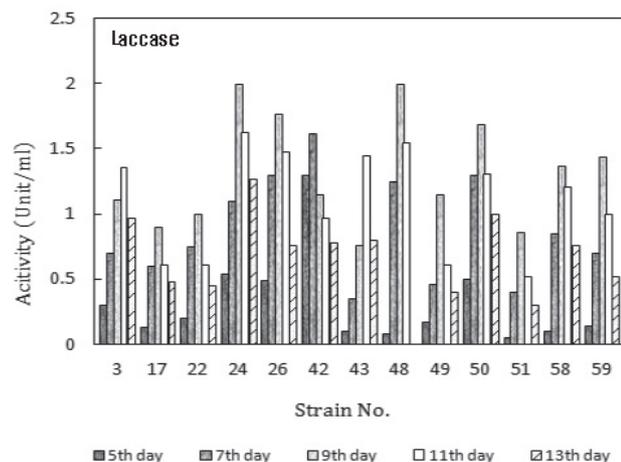
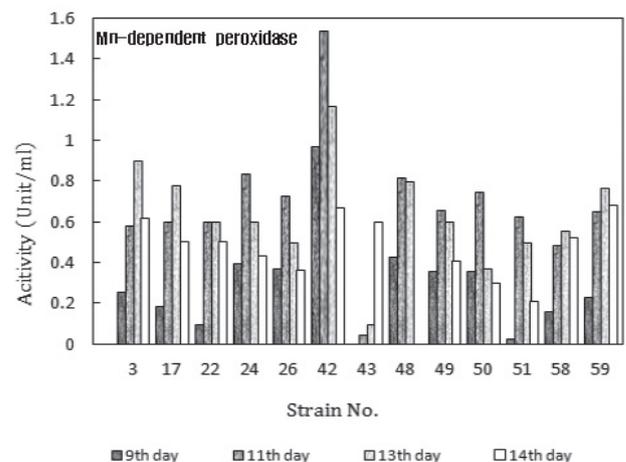
**Table 3.** Screening of *P. ostreatus* 60 strains producing xylolytic enzyme by xlyan degradation

Capability	Strain No.
Stronga)	6, 17, 19, 24, 34, 37, 38
Moderateb)	10, 11, 20, 23, 32, 40, 46, 59
Weakc)	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 33, 35, 36, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60

a) Strong : halo zone ratio > 3.0 cm in 7days

b) Moderate : halo zone ratio of 0.1~3.0 cm in 7days

c) Week : halo zone ratio < 0.1 cm in 7days.

**Fig. 2.** Time course of laccase(Lac) production by *P. ostreatus*.**Fig. 3.** Time course of Mn-dependent peroxidase(MnP) production by *P. ostreatus*.

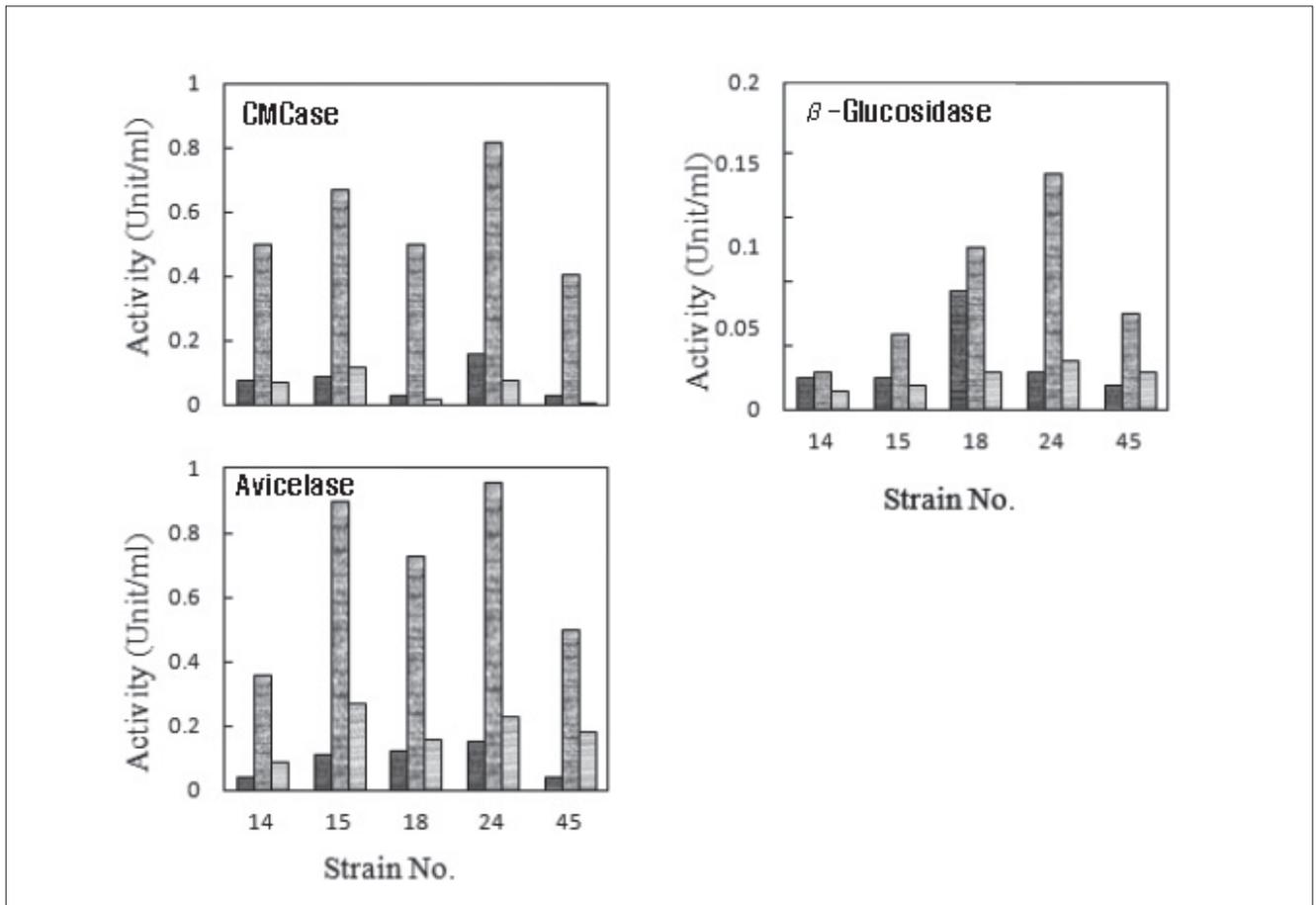


Fig. 4. Time course of cellulolytic enzyme production by *P. ostreatus*.

균주의 가장자리에 준비된 지름 0.2cm의 살균된 cork borer 을 사용하여 구멍을 뚫고 일정 크기의 균주를 떼어내어 스크리닝 배지 중앙에 각각 하나씩 접종하였다. 28°C 배양기에서 7일간 배양 후 각각의 분해효소 활성정도를 측정하였다. 리그닌 분해효소의 활성은 RBBR 첨가 스크리닝 배지가 청색에서 주황색으로 변색되는 정도를 측정하였다. 셀룰로오스 분해 효소의 활성은 아비셀 첨가 스크리닝 배지가 투명환을 형성하는 정도를 측정하였다. 자일로오스 분해 효소의 활성은 자일란 첨가 스크리닝 배지가 투명환을 형성하는 정도를 측정하였다. 각각의 배지 변색 혹은 투명환을 형성하는 정도에 따라 강함(Strong), 중간(Moderate), 약함(Weak)으로 나누어 구분하였다.

#### 2차 균주선발을 위한 리그닌-셀룰로오스 분해 효소활성 측정 및 배양방법

1차 균주선발배지에 의해 선별된 각각의 균주들을 28°C에서 3.9%(w/v)의 Potato Dextrose Broth(PDB, Difco Co.)에서 7일 동안 정치 배양한 후 균사체를 회수하여 증류수 20ml를

넣고 균질화를 실시하였다. 본 배양은 300ml 삼각플라스크에 각각의 배지액 15ml씩 첨가하여 고압 멸균한 후 전 배양한 균사체액을 3 ml씩 접종하여 28°C에서 정치배양을 하면서 15일간 배양하였으며 3일째부터 이틀에 한번 씩 각각의 효소 활성을 측정하였다. 각각의 효소 활성은 각각의 액체배양으로부터 1ml씩 취하여 4°C, 5000 rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취해 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)을 사용하여 측정하였다.

Lignin peroxidase(LiP)의 효소 활성은 Tien과 Kirk(1983)의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 1nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡광도로 나타내었다. Mn-dependent peroxidase(MnP)의 효소 활성은 Kofujita 등(1991)의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. Laccase(Lac)의 효소 활성은 Kofujita 등(1991)의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 o-phenylenediamine을 기질로 하여 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 440nm에서의 흡광도로 나타내

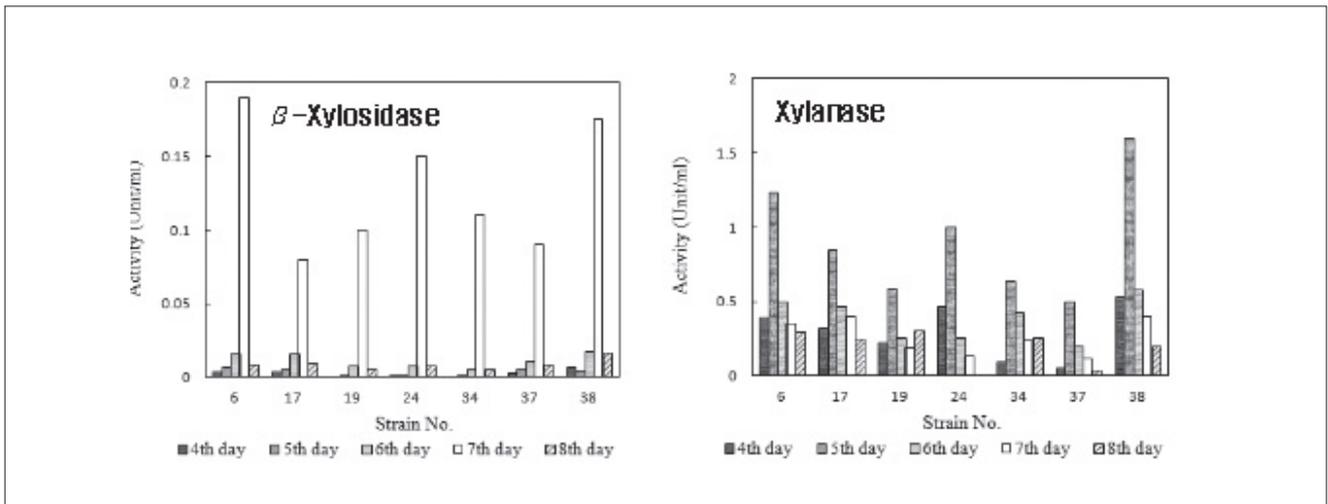


Fig. 5. Time course of xylolytic enzyme production by *P. ostreatus*.

었다. Avicelase의 효소 활성 및 Carboxymethyl cellulase (CMCase)의 효소 활성은 Somogyi(1952)법으로 확인하였으며 활성농도는 1분간 1umol의 포도당(glucose)을 방출할 수 있는 효소의 양으로 520nm에서의 흡광도로 나타내었다. 1,4- $\beta$ -glucosidase의 효소 활성은 0.5%  $\rho$ -nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranoside( $\rho$ -NPG, Sigma Chemical Co.)를 기질로 하여 측정하였으며 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 1umol  $\rho$ -nitrophenol의 400 nm에서의 흡광도로 나타내었다. Xylanase의 효소 활성은 birch-wood xylan(Nacalai Co.)을 기질로 하여 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 1 umol xylose를 방출할 수 있는 효소의 양으로 나타내었다. 1,4- $\beta$ -xylosidase의 효소 활성은 0.5%  $\rho$ -nitrophenol- $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\rho$ -NPX, Sigma Chemical Co.)를 기질로 하여 측정하였으며 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 1 umol  $\rho$ -nitrophenol의 400nm에서의 흡광도로 나타내었다. 각 효소의 활성측정은 배양중의 각각의 플라스크 3개를 선발하여 평균값으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 느타리버섯 60균주로부터 리그닌-셀룰로오스 분해효소 활성 능력의 1차 선발

느타리버섯 60균주로부터 RBBR염료의 탈색능을 갖는 리그닌 분해효소 생산 균주를 선발하였다. RBBR의 본래 색깔인 청색으로부터 주황색으로 탈색되는 정도를 측정할 결과 28℃에서 1주일간 배양 후 탈색의 정도 차이는 있었으나 60균주 모두 탈색이 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 1-a). 실험방법에 표시된 배지 구성에 따라 제조된 RBBR함유 평

판배지에 1주일간 배양 후 6cm이상 탈색이 된 균(Strong), 6~4cm 탈색이 된 균(Moderate), 4cm 이하 탈색이 된 균(Weak)으로 나누어 선발하였다. 그 결과, 13개 균주가 6cm 이상 탈색이 된 것으로 확인 되었으며 이들 균주를 가지고 2차 리그닌 분해효소 활성 능력을 검증하였다(Table 1).

느타리버섯 60균주로부터 아비셀 함유 평판배지를 이용하여 셀룰로오스 분해효소 생산 균주를 선발하였다. 아비셀이 분해되어 가용화되는 정도를 측정할 결과 28℃에서 1주일간 배양 후 거의 가용화 되지 않는 것으로 나타났다(Fig 1-b). 실험방법에 표시된 배지 구성에 따라 제조된 아비셀 함유 한천평판배지에 1주일간 배양 후 1cm이상 투명한(halo)이 생성된 균(Strong), 1~0.1cm 투명환이 생성된 균(Moderate), 0.1cm 이하 투명환이 생성된 균(Weak)으로 나누어 선발하였다. 그 결과, 5개 균주가 1cm이상 투명환이 생성된 것으로 확인 되었으며 이들 균주를 가지고 2차 셀룰로오스 분해효소 활성 능력을 검증하였다(Table 2).

느타리버섯 60균주로부터 자일란 함유 평판배지를 이용하여 자일란 분해효소 활성 능력을 기준으로 선발하였다. 자일란이 분해되어 가용화되는 정도를 측정할 결과 28℃에서 1주일간 배양 후 가용화되어 뚜렷한 투명환이 나타났다(Fig 1-c). 실험방법에 나타난 배지 구성에 따라 제조된 자일란 함유 한천평판배지에 1주일간 배양 후 3cm이상 투명환이 생성된 균(Strong), 3~0.1cm 투명환이 생성된 균(Moderate), 0.1cm 이하 투명환이 생성된 균(Weak)으로 나누어 선발하였다. 그 결과, 7개 균주가 2 cm이상 투명환이 생성된 것으로 확인 되었으며 이들 균주를 가지고 2차 자일란 분해효소 활성 능력을 검증하였다(Table 3).

본 연구자는 느타리버섯으로부터 생산되는 리그닌-셀룰로오스 분해효소 생산 균주를 선발하기 위해 1차적으로

RBBR, Avicel, Xylan을 기질로 하는 평판배지를 선택하였다. 리그닌 분해효소 활성 균주 선발을 위해 사용한 RBBR의 경우 Ulmer 등(1984)이 판막버섯의 리그닌 분해와 RBBR 염료 탈색 간에 상관관계가 있는 것으로 보고한 이래 리그닌 분해효소 생산 균주를 선발하기 위한 기질로 연구되어져 왔다. 본 실험에서도 RBBR 염료 탈색이 좋고 균사성장도 빠른 13개 균주를 1차 선발할 수 있었으며 RBBR 탈색에 리그닌 분해효소가 관여함이 최근에 몇몇 연구자에 의해 보고된 바 있다(Olikka 등, 1993, Eichlerov 등, 2005, Levin 등, 2004, 2010). Vyas와 Molitoris(1995)에 의하면 느타리버섯을 벗집으로 고체 배양할 경우 RBBR 염료 탈색을 하는 과산화수소를 요구하는 효소(RBBR peroxidase)를 생산하는 것으로 보고한 바 있다. 그들은 느타리버섯이 생산하는 망간퍼옥시데이스는 RBBR염료 탈색에는 관여하지 않는 것으로 보고하였으며 Shin 등(1997)은 느타리버섯을 액체 배양하여 생산된 RBBR peroxidase를 정제하여 특성을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구자는 느타리버섯으로부터 생산되는 리그닌 분해효소 중 하나인 망간퍼옥시데이스도 RBBR염료 탈색에 관여하는 것으로 확인하였으며(자료생략) 최근에는 정제된 리그닌 분해효소로부터 RBBR 염료 탈색이 되는 것을 보고하는 논문들도 발표되고 있다(Boer 등, 2004; Palmieri 등, 2005). 따라서 리그닌 분해효소와 RBBR 염료의 탈색은 어느 정도 상관성을 갖는다고 할 수 있으나 백색부후균들이 생산하는 대부분의 산화환원효소들과 관련이 있기 때문에 정량적인 평가법이라고 할 수는 없다고 판단된다. 따라서 본 연구자는 1차 선발된 13개 균주를 대상으로 리그닌분해효소 측정법을 이용하여 정량적인 평가를 실시하였다.

셀룰로오스 분해효소 생산 균주 선발을 위해 탄소원으로 사용한 아비셀은 *Trichoderma* sp. 등의 효소활성 측정을 위해 일반적인 기질로 많이 사용되어져 왔다. 그러나 본 실험에서는 뚜렷한 투명환을 생성하는 균주는 관찰되지 않았다.

자일로오스 분해효소 생산 균주 선발을 위해 탄소원으로 자일란을 사용하였을 때 No. 6, No. 38 균주의 경우 자일란이 가용화 되어 넓고 뚜렷한 투명환을 생성하는 것을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 셀룰로오스 분해효소를 생산하는 백색부후균은 자일로오스 분해효소도 함께 생산하는 것으로 알려져 있다. 그러나 자일란-효모추출물-펩톤을 기질로 하였을 경우 특정한 자일로오스 분해효소를 생산하거나 혹은 셀룰로오스 분해효소를 생산하지 않는다는 연구결과(Gong 등, 1981, Stewart 등, 1983)와 마찬가지로 본 실험 결과에서도 No. 6, No. 38의 경우 자일란-효모추출물-펩톤 배지에서는 자일로오스 분해 효소 활성이 높았으나 아비셀-효모추출물-펩톤 배지에서는 셀룰로오스 분해 정도가 높지 않았던 것으로 생각된다.

### 느타리버섯 60균주로부터 리그닌-셀룰로오스 분해효소 활성 능력의 2차 선발

1차 선발된 RBBR 탈색능력이 우수한 13개 균주를 가지고 리그닌 분해효소인 LiP, MnP, Lac를 측정하기 위하여 글루코오스-효모추출물-펩톤(GYP) 액체배지에서 배양하였다. Lac 활성은 배양개시 후 5일째부터 활성이 나타나서 7일-11일째 최대 활성(0.8~2.0U/ml)을 나타내었으며 MnP 활성은 배양개시 후 9일째부터 활성이 나타나서 11일-13일째 최대 활성(0.5~1.5U/ml)을 나타내었다(Fig 2~3). 13개 균주 중 대부분은 Lac활성이 7일째 최고점에 도달한 후 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 11일째 최고점에 도달한 후 감소하는 경향을 나타내었다. 그 중 일부인 No. 3, No. 43균주의 경우 Lac활성이 11일째 가장 높았으며 MnP활성은 13일째, 14일째 가장 높게 나타났는데 이는 균주 성장 속도에 따른 세포 밖으로 분비되는 효소의 생산량에 의한 차이로 해석된다. 그러나 실험에 사용된 모든 균주의 경우 리그닌 분해효소인 Lac 활성이 먼저 최대 활성을 나타낸 후 감소한 뒤에 MnP 활성이 최대 활성을 나타내는 패턴은 동일하였다. 이러한 결과는 본 연구자(2004)가 보고한 *P. ostreatus* K-2946, Kamitsuji 등(2004)이 보고한 *P. ostreatus* ATCC66376과도 동일한 리그닌 분해효소 생산 패턴을 나타내었다. 따라서 느타리버섯균주에 있어서 리그닌 분해효소인 Lac가 먼저 세포 밖으로 분비되고 그 이후에 MnP가 세포 밖으로 분비되는 것으로 생각되어진다.

본 실험결과 1차 선발에서 리그닌 분해효소 활성이 높은 13개 균주 중에서 No. 24균주가 9일째 가장 높은 Lac활성(2.0 U/ml)을 나타내었으며 No. 42균주가 11일째 가장 높은 MnP활성(1.5 U/ml)을 나타내었다. 특히 No. 42균주의 경우 동일한 GYP 배지조성에서 Kamitsuji 등(2004)이 보고한 *P. ostreatus* ATCC66376균주가 생산하는 Lac 최대 활성(0.68 U/ml)과 MnP 최대 활성(0.70 U/ml)보다 높았으며, 본 연구자가 보고(2004)한 *P. ostreatus* K-2946균주의 MnP 최대 활성(1.1 U/ml) 보다 높은 것을 확인하였다.

리그닌 분해 관련 연구가 가장 많이 보고되어져 있는 판막버섯의 경우 LiP, MnP가 주로 생산되는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험을 통해 연구한 느타리버섯 60 균주에서 LiP는 생산되지 않았다. 이러한 결과는 이전에 본 연구자가 느타리버섯균주를 연구하여 보고한 내용과도 일치하였으며(하와 이, 2004; Ha 등, 2001) 다른 연구자들의 보고와도 일치하는 결과(Ruiz-Rodriguez 등, 2011; Iwamoto 등, 1997; Kerem 등, 1992)를 나타내었다. 또한 많은 다른 백색부후균에서도 LiP가 생산되지 않는다는 연구내용과도 일치하였다(Elisashvili 등, 2009; Hatakka, 1994).

셀룰로오스 분해능이 우수한 5개 균주를 아비셀 분해 효

소(Avicelase), CMCase, 1,4- $\beta$ -glucosidase 활성을 측정하기 위해 아비셀-효모-펩톤(AYP) 액체배지에서 배양하였다. 아비셀 분해 효소의 경우 배양개시 후 9일째 높은 활성(0.35~0.92 U/ml)을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다. CMCase의 경우 배양개시 후 9일째 높은 활성(0.40~0.82 U/ml)을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 1,4- $\beta$ -glucosidase의 경우 배양개시 후 9일째 높은 활성(0.02~0.14 U/ml)을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 4). 이러한 결과는 1차 스크리닝의 결과와 일치하는 경향을 나타낸 것으로 Buswell 등(1996)이 사철느타리버섯이 아비셀을 탄소원으로 사용하였을 때 셀룰로오스 분해 효소 활성이 높지 않았다는 연구결과와 비슷하였으며 Valásková와 Baldrian(2006)의 연구결과에서도 느타리버섯 균이 다른 백색부후균인 *Trametes versicolor* 혹은 갈색부후균인 *Piptoporus betulinus*보다 셀룰로오스 분해효소 활성이 낮은 것으로 보고한 바 있다.

자일로오스 분해능이 우수한 6개 균주를 자일로오스 분해 효소(xylanase)와 1,4- $\beta$ -xylosidase 활성을 측정하기 위해 자일란-효모추출물-펩톤(XYP) 액체배지에서 배양하였다. 자일로오스 분해 효소의 경우 배양개시 후 5일째 높은 활성(0.6~1.7U/ml)을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 1,4- $\beta$ -xylosidase 활성은 배양개시 후 7일째 높은 활성(0.08~0.18 U/ml)을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 5). 리그닌-셀룰로오스 분해 연구에 있어서 상대적으로 헤미셀룰로오스에 해당하는 자일로오스 분해 효소에 관한 연구는 부족한 실정이다. 최근에 Baldrian 등(2005)의 연구결과에 의하면 *P. ostreatus* CCBAS477균주가 벗집 고체 배양에서 자일로오스 분해 효소의 경우 28일째 최대 활성이 0.048 U/g, 1,4- $\beta$ -xylosidase의 경우 98일째 0.012U/g을 나타낸 것으로 보고한 바, 최대 활성에 다다른 일수는 차이가 있었으나 고분자 분해효소인 자일로오스 분해효소가 먼저 최대 활성을 나타낸 뒤에 1,4- $\beta$ -xylosidase 최대 활성을 나타내는 패턴은 동일하였다. 그러나 자일로오스 분해 효소의 최대 활성에 다다른 일수의 차이는 배지 조성의 차이와 균주의 생산 속도에 기인하는 것으로 생각된다. 한편 다른 백색부후균인 *Ceriporiopsis subvermispota*가 생산하는 자일로오스 분해효소 생산 패턴과는 유사한 결과를 나타내었다(Sethuraman 등, 1998).

현재까지 많은 연구자들에 의해 리그닌-셀룰로오스 분해효소 생산 균주를 선발하여 왔다. 그러나 다양한 생산 배지조건(탄소원 혹은 질소원) 혹은 효소측정방법에 의해 직접적인 상호 비교가 어려웠다. 따라서 동일한 화학배지조건에서 동일한 효소측정방법을 통해 리그닌-셀룰로오스 분해효소 활성이 높은 생산균주를 선발하는 것이 필요하다고 판단된다. 이에 본 연구자는 버섯연구에 많이 이용되고 있

는 GYP 배지를 가지고 느타리버섯 60균주를 대상으로 리그닌 분해효소 활성이 높은 No. 42균주를 선발하였으며 향후 본 균주를 중심으로 다양한 리그닌 분해 관련연구를 하고자 한다. 또한 No. 42균주는 고분자인 아비셀 혹은 자일란 조건하에서 셀룰로오스 분해효소나 자일로오스 분해 효소 활성이 상대적으로 낮아 리그닌 분해 균주로 적합할 것으로 판단된다.

본 연구에서 보고하는 느타리버섯의 리그닌-셀룰로오스 분해효소 활성이 높은 균주 선발 방법과 생산되는 관련효소의 생산프로파일은 리그닌-셀룰로오스분해 체계를 이해하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다. 본 연구가 향후 많은 연구자들에 의해 리그닌-셀룰로오스 분해효소 활성이 높은 균주를 선발하는데 기초자료로 사용되었으면 한다.

## 적 요

백색부후균인 느타리버섯 60균주로부터 목재를 분해하는 리그닌-셀룰로오스 분해효소 생산 능력이 우수한 균주를 선발하였다. 그 결과 1, 2차 스크리닝을 통해 실험한 모든 균주에서 리그닌-셀룰로오스 분해효소를 생산하는 것을 확인하였다. 그러나, 아비셀 함유 평판배지에서 선발된 6개 균주의 경우 2차 스크리닝 아비셀-효모추출물-펩톤 액체 배지에서 셀룰로오스 분해효소 활성이 낮은 것을 확인하였다. 자일란 분해효소의 경우 자일란-효모추출물-펩톤 액체 배지에서 No. 6, No. 38균주에서 xylanase 1.0 U/ml 이상, 1,4- $\beta$ -xylosidase 0.15 U/ml 이상 생산되었다. RBBR 함유 평판배지에서 선발된 13개 균주를 가지고 글루코오스-효모-펩톤 배지 조건하에서 리그닌 분해 효소의 생산 실험을 한 결과 락케이즈가 먼저 최대 활성(0.8~2.0U/ml)을 나타낸 뒤 Mn-dependent peroxidase가 최대활성(0.5~1.5U/ml)를 나타내었다. 한편, 글루코오스-효모-펩톤 배지 조건하에서 실험한 모든 균주에서 lignin peroxidase는 생산되지 않았다. 특히 본 연구자는 이러한 스크리닝 방법에 의해 Mn-dependent peroxidase와 laccase 생산 능력이 높은 No. 42균주를 선발하였다.

## 감사의 글

본 연구자의 박사학위 지도교수이신 일본 교토대학교 구와하라 마사키(Kuwahara Massaki) 명예교수님께 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- 하효철, 이재성 2004. 액체배양한 느타리버섯균(*Pleurotus ostreatus*)으로부터 망간퍼옥시데이즈의 생산 및 특성. 응용생명화학회지 47 : 22-26.
- Baldrian, P., Valášková V., Merhautová V. and Gábríel, J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. Res Microbiol. 156 : 670-676.
- Barrasa, J. M., Martínez, A. T. and Martínez, M. J. 2009. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. Folia Microbiol (Praha). 54 : 59-66.
- Boer C. G., Obici L., Souza CG. M. and Peralta, R. M. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula(Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresour Technol. 94 : 107-112.
- Buswell, J. A., Cai, Y. J., Chang, S. T., Peberdy, J. F., Fu, S. Y. and Yu, H-S. 1996. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. 12 : 537-542.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Lisá, L. and Nerud, F. 2005. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calypratus*. Chemosphere. 60 : 398-404.
- Elisashvili, V. and Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by White-rot Basidiomycetes. J. Biotech. 144 : 37-42.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1983. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1741-1747.
- Gong, C. S., Chey, L. F., Flickinger, M. C. and Tsao, G. T. 1981. Conversion of hemicellulose carbohydrates. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 20 : 93-118.
- Ha, H.-C., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 : 704-711.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol Rev. 13 : 125-135.
- Iwamoto, K., Ha, H.-C., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. 1997. Isolation and characterization of manganese(II) peroxidase(MnP) produced by *Pleurotus ostreatus*. Wood Res. 84 : 34-36.
- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isoenzymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65 : 287-294.
- Kerem, Z., Friesem, D. and Hadar, Y. 1992. Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 1121-1127.
- Kirk, T. K. and Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41 : 465-505.
- Kofujita, H., Asada, Y. and Kuwahara, M. 1991. Alkyl-aryl cleavage of phenolic b-O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. Mokuzai Gakkaishi. 37 : 555-561.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169 : 247-250.
- Levin, L., Papinutti, L. and Forchiassin, F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. Bioresour Technol. 94 : 169-176.
- Levin, L., Malignani, E. and Ramos, A. M. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. Bioresour Technol. 101 : 4554-4563.
- Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Del Río, J. C. and Gutiérrez, A. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. Curr Opin Biotechnol. 20 : 348-357.
- Ollikka, P. K., Alhonmaki, K., Lepparen, V. M., Glumoff, T., Rajjola, T. and Suominen, I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4010-4016.
- Orth, A. B., Royse, D. J. and Tien, M. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-

- degrading fungi. *Appl Environ Microbiol.* 59 : 4017-4023.
- Palmieri, G., Cennamo, G. and Sanna, G. 2005. Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme Microb Technol* 36 : 17-24.
- Paszczynski, A. and Crawford, R. L. 1991. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 : 1056-1063.
- Ruiz-Rodriguez, A., Polonia, I., Soler-Rivas, C. and Wichers, H. J. 2011. Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, spawn and substrates. *Int. Biodeter. Biodegra.* 65 : 285-293.
- Santos, A. Z., Neto, J. M. C., Tavares, C. R. G. and Costa, S. M. G. 2004. Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye. *J. Basic Microbiol.* 44 : 288-295.
- Sethuraman, A., Akin, D. E. and Eriksson, K. E. L. 1998. Plant-Cell-Wall-Degrading Enzymes Produced by the White-Rot Fungus *Ceriporiopsis Subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27 : 37-47.
- Shin, K. S., Oh, I. K. and Kim, C. J. 1997. Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture Filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 1744-1748.
- Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.
- Stewart, J. C., Lester, A., Milburn, B. and Poulos, T. L. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus fresenius*. *Biotechnol. Lett.* 5 : 543-548.
- Tien, M. and Kirk, T. K. 1983. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 221 : 660-661.
- Ulmer, D. C., Leisola, M. S. A. and Fiechter, A. 1984. Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 1 : 13-24.
- Valásková, V. and Baldrian, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Res. Microbiol.* 157 : 119-124.
- Vyas, B. R. and Molitoris, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. *Appl Environ Microbiol.* 61 : 3919-3927.