

## 아교버섯 형질전환체가 생산한 리그닌분해 고정화효소에 의한 염료 탈색

민동숙<sup>1</sup> · 유선화<sup>2</sup> · 김명길<sup>2</sup> · 최형태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생화학과

<sup>2</sup>국립산림과학원 화학미생물학과

### Decolorization of a Dye by Immobilized Lignin Degrading Enzymes Generated from Transformants of *Merulius tremellosus* Fr.

Dongsuk Min<sup>1</sup>, Sunhwa Ryu<sup>2</sup>, Myung Kil Kim<sup>2</sup>, and Hyoung T. Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Republic of Korea

(Received September 3, 2012 / Accepted September 26, 2012)

**Lignin degrading enzymes from white rot fungi show broad substrate specificities, and therefore they can degrade variety of recalcitrant compounds. We have used three different protocols for the generation of immobilized laccase and manganese peroxidase crude enzymes from the genetically transformed strains of *Merulius tremellosus* Fr. These immobilized enzymes were used in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R (RBBR), and they showed about 75% decolorization rates during the 48 h reactions. Although the decolorization efficiency decreased by 10–15% after a repeated use of the immobilized enzymes, these can be reused in various degrading reactions.**

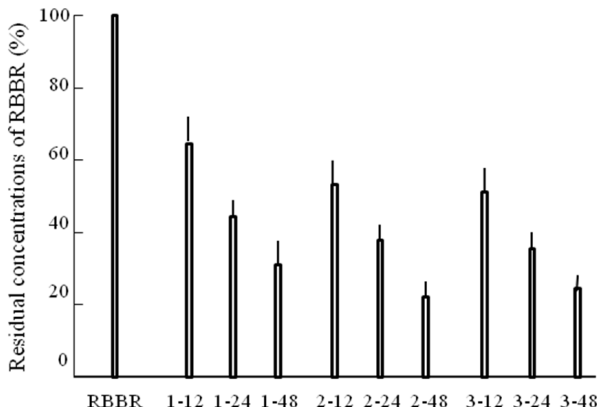
**Keywords:** *Merulius tremellosus*, decolorization, immobilized enzyme, laccase, manganese peroxidase

리그닌은 자연계에서 분해가 매우 느리게 진행되는 가장 많은 폐놀계 화합물이다. 리그닌을 분해하는 백색부후균류는 분해에 필요한 효소를 가지고 있는데, laccase, lignin peroxidase 및 manganese peroxidase 등이 보고되었다. 이 효소들은 기질특이성이 강하지 않기 때문에 폭약류(Cheong *et al.*, 2006), 내분비계 장애물질(Kim *et al.*, 2008; Yeo *et al.*, 2008)과 다양한 난분해성 물질(Baldrin, 2006)을 분해한다고 보고되었다. 경기도 광릉의 숲에서 분리한 아교버섯은 다양한 내분비계 장애물질을 더한 potato dextrose 한천배지에서 잘 성장하였기 때문에 이 균이 가지고 있는 리그닌 분해효소들에 대하여 연구를 수행하였다. 이 균의 laccase 유전자를 분리하고 phthalate류에 의한 발현 상수를 보고하였고(Yeo *et al.*, 2008), 정제한 laccase에 의한 4가지 내분비계 장애물질의 분해를 보고하였다(Kim *et al.*, 2008). 또한 아교버섯 laccase 유전자를 도입한 형질전환체와 구름버섯의 manganese peroxidase 유전자를 도입한 형질전환체를 대상으로 methyl green과 remazol brilliant blue R (RBBR)의 탈색효과를 보고하였다(Kum *et al.*, 2010).

효소를 이용한 물질의 합성 및 분해반응에서 효소의 손실을 줄이기 위하여 고정화 효소를 제조하고 사용하는 것은 오래 전부터 시도되었다. 담체를 사용한 효소의 고정화는 열 안정성과 다양한 염류에 대한 안정성 등을 증대시키는 효과가 있으므로 적절한 고정화 효소의 제조가 효소를 이용한 물질의 분해에도 시도되고 있다(Mogharabi *et al.*, 2012; Songulashvili *et al.*, 2012). 난분해성 물질을 분해하는 반응에 균주를 사용할 경우 분해반응 종료 후 투입한 균주의 처리문제가 남는다. 그러나 균주 대신 효소를 사용하면 최종 분해 산물을 처리하는데 더 효과적 이므로 저자들은 고정화 효소를 사용하기 위하여 알긴산에 첨가 물을 더한 담체를 사용하여 고정화 효소의 안정성을 증대시키고자 시도하였다. 또한 알긴산 담체를 만든 후에 효소를 고정화하는 기존의 방법 외에 알긴산을 직접 효소용액에 녹여 효소활성이 증가된 담체의 사용가능성을 제시하였다. 리그닌 분해효소는 이미 생성된 laccase와 manganese peroxidase 유전자를 도입한 아교버섯(Kum *et al.*, 2010)의 형질전환체들로부터 얻은 효소액을 고정화 효소로 제조하고 이들에 의한 염료(RBBR)의 탈색을 실험하였다.

리그닌 분해효소를 생산하는 균주는 아교버섯 laccase 유전자를 도입한 아교버섯 형질전환체(TF2-1)와 구름버섯 manganese

\*For correspondence. E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8511; Fax: +82-33-242-0459



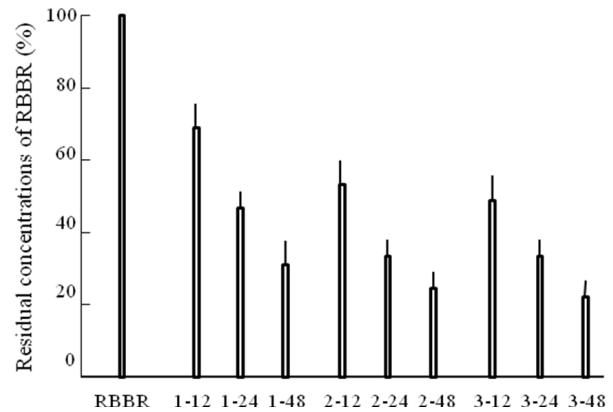
**Fig. 1.** Decolorization of RBBR by three differently immobilized crude laccase produced from *Merulius tremellosus* (*Phlebia tremellosa*) transformant strain TF2-1. 1-12, 12 h reaction by the immobilized enzyme generated by protocol 1; 1-24, 24 h reaction with the same immobilized enzyme; 1-48, 48 h reaction with the same immobilized enzyme; 2-12, 12 h reaction by the immobilized enzyme generated by protocol 2; etc.

peroxidase 유전자를 도입한 아교버섯 형질전환체(T5)를 각각 laccase와 manganese peroxidase 생산용으로 사용하였다. 두 균주는 모두 potato dextrose 액체배지(30°C)에서 3일 동안 배양한 후 Waring blender로 균체를 갈아 동일한 배지 100 ml (250 ml flask)에서 5일 동안 배양하고 배양상등액을 효소용액으로 사용하였다.

고정화 효소의 제조는 다음의 3가지 방법을 사용하였다. 알긴산(sodium alginate) 1.5% 용액을 0.4 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 주사기를 사용하여 떨어뜨리면서 혼합하여 bead를 만들었다. 생성된 bead를 실온에서 24시간 동안 효소용액과 반응시킴으로써 고정화 효소를 얻었다(방법 1). 알긴산을 효소용액에 1.5% 농도로 용해시킨 후 이를 방법 1과 동일한 순서로 고정화 효소를 제조하였다(방법 2). 알긴산을 효소용액에 녹이고(1.5%) 여기에 글리세롤 10% 용액을 1:1 비율로 혼합하였다. 이 용액을 방법 1과 동일하게 처리하여 bead를 얻었다(방법 3).

이상의 방법으로 제조한 bead를 RBBR 염료의 탈색실험에 사용하였다. RBBR (300 μM) 2 ml 용액에 고정화 효소 4 g (wet weight)을 더하고 실온 또는 냉장실(4°C)에서 반응하면서 590 nm에서 흡광도 변화를 분석하였다.

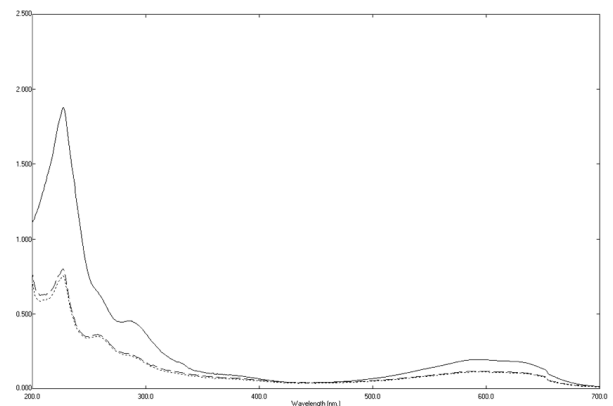
Laccase 효소액을 사용하여 고정화 효소를 제조하고 RBBR의 탈색을 분석한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 알긴산을 이용하여 담체를 만든 후에 효소액을 더한 고정화 효소(방법 1, 32.7% 잔존)에 비하여 알긴산을 효소용액에 녹여서 제조한 고정화 효소(방법 2, 24.1% 잔존)가 48시간 반응 후 약 8% 포인트 더 우수한 탈색 효과를 보였다. 한편 글리세롤을 더한 고정화 효소(방법 3)는 반응 시간대에 따라 방법 2와 오차 범위 내에서 비슷한 수준을 보였다. Manganese peroxidase 효소액을 사용하여 고정화 효소를 제조하고 동일한 실험을 수행한 결과 laccase 경우와 같이 방법 2와 방법 3이 방법 1에 비하여 7-9% 범위의 우수한 탈색 효과를 보였다(Fig. 2). 이상의 결과는 laccase 및 manganese



**Fig. 2.** Decolorization of RBBR by three differently immobilized crude manganese peroxidase produced from *Merulius tremellosus* (*Phlebia tremellosa*) transformant strain T5. The numbers are same as in Fig. 1.

peroxidase 유전자를 각각 도입한 형질전환체의 배양체에 RBBR을 더하여 탈색을 분석한 보고(Kum et al., 2010)와 비교할 때 유사한 탈색을 보였다. 이상의 고정화 효소를 사용한 RBBR의 탈색 효과가 산도의 변화 또는 RBBR 구조의 단순한 변화에 의한 것이 아니고, 진정한 탈색임을 확인하고자 방법 2로 제조한 고정화 효소를 사용하여 RBBR의 탈색을 UV-Visible spectrophotometer로 분석하였다. 자외선 파장에서 RBBR (300 μM)의 흡광도가 높아 RBBR 용액을 10배 희석하여 사용하였고 (30 μM 용액), laccase와 MnP 고정화 효소로 탈색시킨 반응액은 각각 5배씩 희석하여 UV-Visible spectrum을 분석하여 Fig. 3에 나타냈다. 이 결과는 590 nm에서의 흡광도는 물론 자외선 파장대 (220-230 nm)에서의 흡광도가 크게 감소한 것을 확인함으로써 RBBR의 탈색이 진행되었음을 시사한다.

고정화 효소의 가장 큰 장점은 효소를 여러 번 사용할 수 있다는 것이므로 48시간 동안 반응에 사용하였던 효소를 증류수로 세척하고 즉시 동일한 농도의 RBBR 탈색 실험을 수행한 결과



**Fig. 3.** Determination of RBBR degradation by comparison of UV-visible spectra of enzyme-treated solutions. Straight line, RBBR (30 μM) solution; dashed line, crude laccase treated RBBR (60 μM) solution; dotted line, crude MnP treated RBBR (60 μM) solution.

전체적으로 처음 사용한 고정화 효소에 비하여 10-15% 포인트 낮은 탈색을 보였다(결과 미 제시). 이러한 효소 활성의 감소를 방지하기 위하여 글리세롤을 첨가한 실험을 수행하였으나 기대할 수준의 효과를 얻지 못하였다. 알긴산 외에 polyvinyl alcohol을 사용(Stanescu *et al.*, 2010)하거나 알긴산과 함께 gelatin을 보조제로 사용한 논문(Mogharabi *et al.*, 2012)들이 있으니 이 논문들은 알긴산과 보조제의 농도에 따른 효소 활성을 분석하였을 뿐 재사용한 고정화 효소에 대한 보고는 없다. 알긴산 담체를 안정화 시키기 위하여 효소단백질과 결합된 담체를 glutaraldehyde와 반응시키는 방법이 흔히 사용되는데 이렇게 제조한 담체는 1차 사용할 때 이미 탈색이 방법 2와 방법 3으로 제조한 담체에 비하여 절반 수준의 탈색능을 보였기 때문에 결과를 제시하지 않았다.

한편 방법 1-3으로 제조한 담체를 냉장고에 1주-3주 동안 보관 한 후에 탈색실험을 수행하였을 때, 탈색능이 전혀 감소되지 않았다. 이는 고정화 효소를 만들고 냉장 보관하면 언제든지 사용할 수 있음을 시사한다. 우리는 고정화 효소의 가장 큰 장점인 재사용 문제를 완벽하게 해결하지 못하였으나 담체를 만드는 방법을 개량함으로써 리그닌 분해효소의 활용도를 높였다고 판단하기에 이를 보고한다.

## 적요

백색부후균류가 가지는 리그닌 분해효소들은 기질특이성이 넓기 때문에 다양한 난분해성 화합물들을 분해할 수 있다. 본 실험에서는 3가지 다른 방법을 사용하여 laccase와 manganese peroxidase가 각각 도입된 아교버섯 형질전환체의 배양 상등액 효소를 고정화 효소로 만들어 대표적 염료의 하나인 Remazol Brilliant Blue R (RBBR)의 탈색을 실험하였다. 그 결과 알긴산을 효소 용액과 직접 반응하여 만든 고정화 효소에서 48시간 반응 후 약 75% 탈색을 보였다. 비록 한번 사용했던 고정화 효소를 재사용하였을 경우 탈색능이 10-15% 정도 감소되었으나 본 실험

에서 제시한 방법이 리그닌 분해효소의 고정화 효소 활용에 기여할 것으로 기대한다.

## 감사의 말

이 연구의 일부는 국립산림과학원의 위탁연구비로 수행되었음.

## 참고문헌

- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215-242.
- Cheong, S., Yeo, S., Song, H-G., and Choi, H.T.** 2006. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiol. Res.* **161**, 316-320.
- Kim, J., Yeo, S., Kim, M.K., and Choi, H.T.** 2008. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**, 172-175.
- Kum, H., Lee, S., Ryu S., and Choi, H.T.** 2010. Dye removal by *Phlebia tremellosa* and lignin degrading enzyme transformants. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 93-95.
- Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Naffisi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G., and Faramarzi, M.A.** 2012. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. *Bioinorg. Chem.* doi:10.1155/2012/823830.
- Songulashvili, G., Jimenez-Tobon, G.A., Jaspers, C., and Penninckx, M.J.** 2012. Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal Biol.* **116**, 883-889.
- Stanescu, M.D., Fogorasi, M., Shaskolskiy, B.L., Gavrilas, S., and Lozinsky, V.I.** 2010. New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1947-1954.
- Yeo, S., Kim, M.K., and Choi, H.T.** 2008. Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 72-77.