

다양한 배지에서 느타리버섯 No. 42균주로부터 리그닌분해효소 생산

하호철*

대구한의대학교 한방식품약리학과

Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* No. 42 in various culture media

Hyo-Cheol Ha*

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

(Received June 5, 2013. Accepted June 20, 2013)

ABSTRACT –When No. 42 strain of *Pleurotus ostreatus* was cultivated at five different media, MnP and Lac but no LiP activity was detected throughout the culture period in the media. The production of MnP and Lac by No. 42 strain of *Pleurotus ostreatus* were correlated with wheat bran composition in the medium. In the liquid culture, maximum production of MnP and Lac were observed in the medium contained glucose-peptone- yeast-wheat bran(GPYW). However, in solid medium, maximum production of MnP was observed in wood meal-wheat bran(WMW) medium, but that of Lac was observed in wheat bran(W) medium.

KEYWORDS –Laccase, Ligninolytic enzymes, Mn-dependent peroxidase, *Pleurotus ostreatus* No. 42

서 론

백색 부후균은 리그닌과 다당류를 동시에 분해하거나 리그닌을 우선적으로 분해하여 목질자원을 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 리그닌 분해 시스템의 메커니즘(방법)은 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)을 중심으로 광범위하게 연구되어져 왔으며(Kirk and Chang 1981, Gold and Alic, 1993), Keyser 등 (1978)이 제안한 것처럼 리그닌 분해효소들은 이차대사산물로서 질소가 고갈되거나 당류나 황이 고갈되어질 때 촉진되는 것으로 보고되어져 있다.

리그닌 연구에 가장 많이 이용된 판막버섯의 경우 리그닌 분해 과정에 두 개의 리그닌 분해 효소인 리그닌 퍼옥시데이즈(Lignin peroxidase; LiP)와 망간 퍼옥시데이즈(Mn-dependent peroxidase; MnP)를 분비하는 것으로 알려져 있다. 그리고 수많은 연구자들에 의해 이들 두 효소들을 다양한 배지 조건하에서 분리하고 정제하여 보고한 바 있다(Glenn과 Gold 1985, Kirk 등 1986, Leisola 등 1987, Palma 등 2000 등). 그러나 판막버섯에서 보고한 것과 다르게 많은 다른 백색 부후균들은 망간 퍼옥시데이즈를 질소가 풍부한 배지 조건하에서 생산하는 것으로 여러 연구자들에 의해 보고한

바 있다(Kall 등, 1995; Stajic 등, 2006). 더욱이 많은 백색 부후균들은 다양한 배지 조건 하에서 리그닌 퍼옥시데이즈를 생산하지 않으면서도 리그닌을 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다(Forrester 등, 1990; Martinez 등, 2009). 한편 락게이즈(Laccase; Lac) 또한 백색 부후균에 의해 생산되며 리그닌 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다(Thurston, 1994; Piscitelli 등, 2011).

리그닌 분해효소들은 식물 바이오매스의 효율적인 변환을 위해 매우 중요하며 제지산업, 환경산업, 식품산업 등에 다양하게 적용될 수 있어 대량생산을 하기 위한 노력들이 필요하다. 따라서 리그닌 분해효소들을 대량으로 생산하기 위해서는 리그닌 분해효소 고 생산 균주 선발, 발효 방법, 생산 배지 조성 및 단가 인하 등의 노력들이 필요하다고 판단된다. 이에 본 연구에서는 이전 보고(하, 2012)에서 선발한 리그닌 분해효소 고 생산 균주인 느타리 버섯균주 No. 42로부터 5가지 다른 배지 조건 하에서 리그닌 분해 효소 종류 및 활성을 비교 하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지조성

*Corresponding author: hcha@dhu.ac.kr

Table 1. Composition(w/v) of culture medium

(1) Potato dextrose broth(PDB)	
Potato dextrose broth	24.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	5.8
(2) Glucose-Peptone-Yeast(GPY) medium	
Glucose	20.0 g
Peptone	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
Distilled water	1000 ml
pH	5.8
(3) Glucose-Peptone-Yeast-Wheat bran(GPYW) medium	
Glucose	20.0 g
Peptone	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄	0.5 mM
Wheat bran	175.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	5.8
(4) Wood meal-Wheat bran(WMW) medium	
Wood meal(beech)	4.5 g
Wheat bran	0.5 g
Distilled water	15 ml
(5) Wheat bran(W) medium	
Wheat bran	5.0 g
Distilled water	15 ml

본 연구자가 이전에 보고한 느타리 버섯균주 중 리그닌 분해효소 활성이 가장 좋은 No. 42균주를 본 실험에 사용하였다(하, 2012). 느타리 버섯 No. 42균주를 potato-dextrose 액체배지(PDB, Difco Co.) 20 ml에서 28°C, 7일 동안 정치배양 하면서 균사체를 회수한 뒤에 증류수 20 ml를 넣고 균질화하여 본 배양을 위한 접종원으로 사용하였다.

본 배양은 Table 1에 나타난 것처럼 300 ml 삼각 플라스크에 3종류의 액체배지인 potato-dextrose broth 배지(PDB), glucose-peptone-yeast 배지(GPY), GPY + wheat bran 추출 배지(GPYW)와 2종류의 고체배지인 wood meal + wheat bran 배지(WMW), wheat bran 단독배지(W)를 각각 20 ml와 5 g씩 준비하여

위에서 언급한 전 배양한 접종원을 1 ml씩 접종하여 28°C에서 정치배양하면서 본 실험을 실시하였다.

조효소액 준비

액체배양으로부터 실험일자별로 1 ml씩 취하였으며 고체배양의 경우 20 mM Na-succinate buffer(pH 4.5) 20 ml를 분주하고 1시간 동안 진탕 추출한 뒤에 각각의 배양액을 4°C, 8000 rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취해 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1201)을 사용하여 아래 리그닌 분해효소 측정법에 의해 측정하였다.

리그닌 분해효소 측정

리그닌 분해효소의 효소활성은 이전 보고의 방법(하, 2012)으로 확인하였다. Lignin peroxidase(LiP)의 효소 활성농도는 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡광도로 나타내었다. Mn-dependent peroxidase(MnP)의 효소 활성농도는 Mn 이온 존재 하에서 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. Laccase(Lac)의 효소 활성농도는 o-phenylenediamine을 기질로 하여 1분간 반응으로 생성된 물질의 440 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 각 효소의 활성측정은 배양 중의 각각의 플라스크 3개를 선발하여 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Potato dextrose broth(PDB)배지에서 15일간 정치 배양한 결과, laccase 활성은 7일째 0.3 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 거의 생산되지 않는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). Glucose-peptone-yeast(GPY)배지에서는 15일간 정치 배양한 결과, laccase 활성은 7일째 1.7 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 5일째부터 활성이 나타나기 시작하여 11일째 1.6 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). Glucose-peptone-yeast-wheat bran(GPYW)배지에서는 15일간 정치 배양한 결과, laccase 활성은 9일째 2.4 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 11일째 3.6 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

고체배지인 wood meal-wheat bran(WMW)배지에서는 15일간 정치 배양한 결과, laccase 활성은 5일

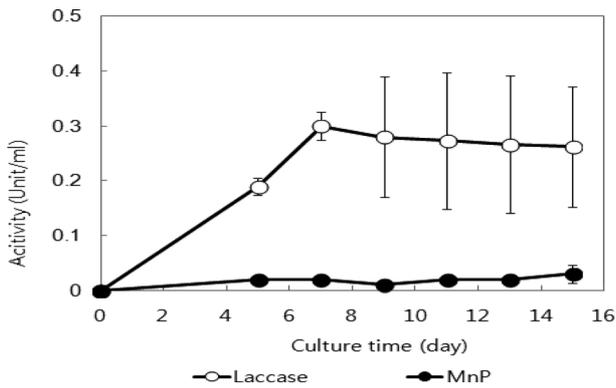


Fig. 1. Time course of ligninolytic enzymes production by *P. ostreatus* No.42 in potato dextrose broth(PDB).

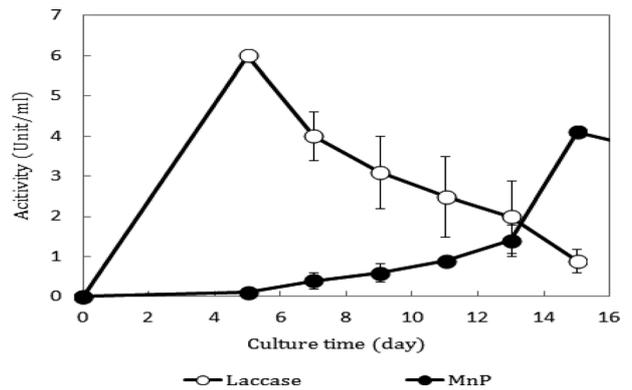


Fig. 4. Time course of ligninolytic enzymes production by *P. ostreatus* No.42 in wood meal-wheat bran(WMW) medium.

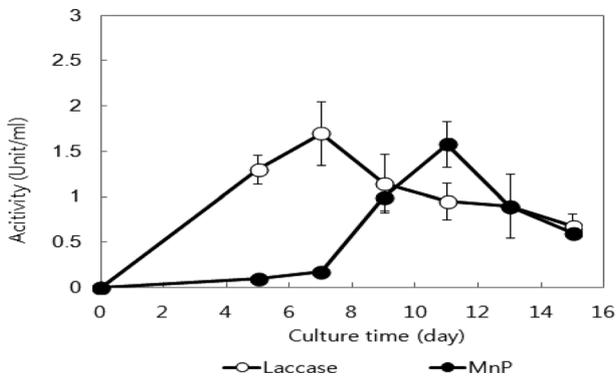


Fig. 2. Time course of ligninolytic enzymes production by *P. ostreatus* No.42 in glucose-peptone-yeast(GPY) medium.

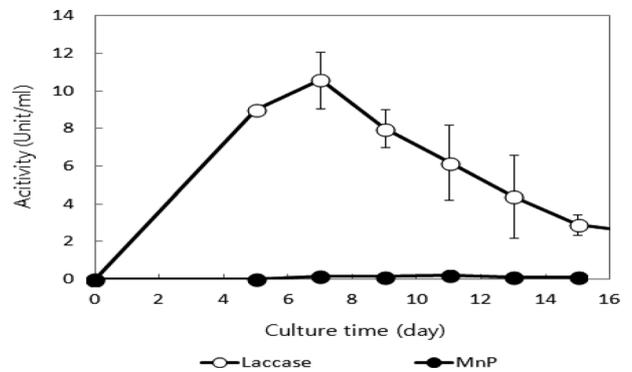


Fig. 5. Time course of ligninolytic enzymes production by *P. ostreatus* No.42 in wheat bran(W) medium.

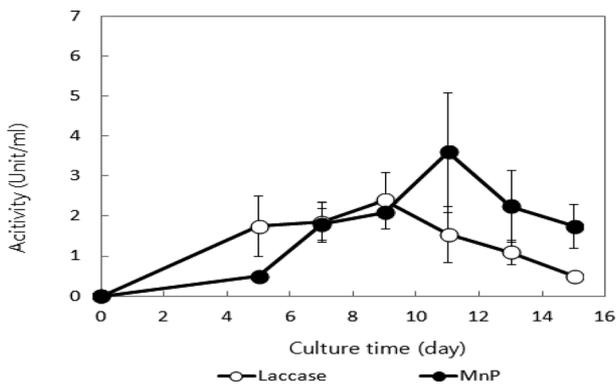


Fig. 3. Time course of ligninolytic enzymes production by *P. ostreatus* No.42 in glucose-peptone-yeast-wheat bran(GPYW) medium.

제 6.0 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 15일째 4.0 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 한편 또 다른 고체배지인 wheat bran(W) 배지에서는 15일간 정치 배양한 결과, laccase 활성은

7일째 11.0 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 MnP 활성은 11일째 0.3 U/ml의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

위와 같이 느타리 버섯 No.42균주를 5가지 다른 배지에서 배양하고 리그닌 분해효소의 생산을 실험한 결과 모든 실험 배지에서 Lac와 MnP가 생산되는 것을 확인하였다. 그러나 판막버섯에서 리그닌을 분해하는 대표적인 리그닌 분해효소인 LiP는 모든 본 실험 배지에서는 전혀 생산되지 않는 것을 확인하였으며 본 실험 결과는 느타리 버섯 균주로부터 이전에 보고한 몇몇 연구자들의 결과와 동일하였다(Iwamoto 등, 1997; Kamitsuji 등, 2004; Ruiz-Rodriguez 등, 2011). 따라서 이러한 결과는 대표적인 리그닌 분해균인 판막버섯(*P. chrysosporium*)과는 다르게 질소가 풍부한 조건하에서도 리그닌 분해효소를 생산하는 것으로 판단된다.

실험한 5가지 다른 배지에서 느타리 버섯 No.42균주가 생산하는 리그닌 분해효소의 생산 형태는 먼저

laccase가 초기에 생산되어 최대 활성을 나타낸 후 MnP가 최대 활성을 나타내는 것을 확인 하였으며 이러한 결과는 느타리 버섯 균주로부터 이전에 보고한 결과와 동일하였다(Ha 등, 2001; 하와 이, 2004; 하, 2012). 이것은 laccase는 일차대사산물로 생산되는 효소인 반면에 MnP는 이차대사산물로 생산되는 효소인 것으로 생각되며 이전 연구(Ha 등, 2001)에서 본 실험과 동일한 균주로 GPYW액체 배지에서 진탕배양을 실시한 결과 탄수화물 에너지원인 포도당(glucose)이 거의 고갈된 후에 MnP가 생산되는 것을 확인하여 보고한 바 있다. G. F. Leatham(1985)에 의하면 표고버섯을 참나무-귀리첨가 고체배지에서 배양하면서 리그닌 분해효소 생산을 실험한 결과 고분자 탄수화물인 글루칸이 고갈될 때 리그닌 분해효소 활성도 가장 높았다고 보고 한 바 있어 본 실험과 비슷한 결과를 나타내었다.

5가지 배지 구성에 따른 리그닌 분해 효소의 활성 비교에서 리그닌 분해효소인 Lac의 최대 활성은 GPY배지에서 PDB배지보다 5.6배 향상되었으며 GPY배지에 밀기울(wheat bran)을 첨가한 GPYW배지의 경우 PDB배지보다 8배 향상되었음을 알 수 있었다. 반면에 MnP의 최대 활성은 GPY배지에서 PDB배지보다 80배 향상되었으며 GPY배지에 밀기울을 첨가한 GPYW배지의 경우 PDB배지보다 180배 향상되었음을 알 수 있었다. 한편 고체배지인 WMW배지에서 Lac의 최대 활성은 PDB배지보다 20배 향상되었으며 밀기울 단독(W)배지에서는 PDB배지보다 36.7배 향상되었음을 알 수 있었다. 반면에 MnP의 최대 활성은 WMW배지에서 PDB배지보다 200배 향상되었으며 밀기울 단독(W)배지에서 PDB배지보다 15배 향상되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 느타리버섯 No.42의 액체배양에서 Peptone은 리그닌 분해효소의 활성에 영향을 미치는 인자로 판단되며 이는 이전에 보고한 다른 연구 결과와 비슷하였다(Iwamoto 등, 1997; Stajic 등, 2006).

한편 또 다른 질소원인 밀기울의 경우, 액체배지인 GPY배지에 17.5% 첨가하였을 때 Lac의 최대 활성은 1.4배, MnP의 최대 활성은 2.3배 증가하는 경향을 나타내었으며 고체배지인 WM배지에 3.3% 첨가하였을 때 GPY배지보다 Lac의 최대 활성은 3.5배, MnP의 최대 활성은 2.5배 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 밀기울 단독배지인 W배지에서는 Lac 최대 활성은 11 U/ml로 실험한 모든 결과 중에서 가장 높게 나타났으나 MnP활성은 0.3 U/ml로 매우 낮게 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 배지 조성은 리그닌

분해효소의 활성과 매우 밀접한 관계가 있음을 알 수 있으며 본 실험결과에서 밀기울 단독배지에서 MnP 활성이 매우 낮게 나타난 이유는 과도한 질소원의 함량 때문인 것으로 판단된다. 따라서 Lac 활성은 질소원의 농도에 비례하여 생산되는 것으로 생각되나 MnP 활성의 경우 질소원이 어느 정도의 농도까지는 활성에 영향을 미치지 않으나 너무 높은 농도에서는 활성이 억제되는 것으로 판단되며 추후 질소원의 농도에 따른 두 효소의 단백질 발현 연구를 진행할 필요가 있다고 생각한다. 최근에 Elisashvili와 Kachlishvili의 연구 결과(2009)에 의하면 백색부후균인 단색구름버섯(*Cerrena unicolor*)을 밀기울 단독배지에 배양시켰을 경우 Lac활성은 매우 높게(151.6 U/ml) 나타났으나 MnP활성은 상대적으로 매우 낮게(0.7 U/ml) 나타났다는 보고와도 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 peptone과 함께 밀기울(wheat bran)이 느타리 버섯 No.42균주의 리그닌 분해효소활성에 영향을 미치는 인자인 것으로 생각되며 밀기울의 질소함량 뿐만 아니라 목분(wood meal)에 함유되어 있는 구리(Cu)나 망간(Mn)과 같은 금속이온이 리그닌 분해효소의 활성에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 결론적으로 본 연구결과를 활용하여 느타리버섯 균주를 이용한 리그닌 분해효소의 대량생산을 할 수 있는 기초 연구 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

적 요

느타리 버섯 No. 42균주를 5가지 배지에서 연구한 결과, 리그닌 분해효소인 Lac와 MnP는 생산되었으나 LiP는 생산되지 않았다. 실험한 본 균주의 경우 리그닌 분해효소인 Lac와 MnP의 생산에 밀기울이 관여하는 것을 확인 할 수 있었다. 액체배지에서는 GPYW에서 Lac(2.4 U/ml)와 MnP(3.6 U/ml)가 최대 생산됨을 알 수 있었으며 고체배지에서는 WMW에서 MnP(4.0 U/ml)가 최대 생산되었으며 W에서는 Lac(11.0 U/ml)가 최대 생산되었다.

감사의 글

이 논문은 2011년 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의하여 연구되었기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

하효철 2012. 느타리로부터 리그닌 셀룰로오스분해효소 생산

- 균주 선발 및 효소 생산. 한국버섯학회지 **10** : 74-82.
- 하효철, 이재성 2004. 액체배양한 느타리버섯균(*Pleurotus ostreatus*)으로부터 망간퍼옥시데이즈의 생산 및 특성. 응용생명화학회지 **47** : 22-26.
- Elisashvili, V. and Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by White-rot Basidiomycetes. *J. Biotech.* **144** : 37-42.
- Forrester, I. T., Grabski, A., C., Mishra, C., Kelley, B., L., Strickland, W., N., Leatham, G. F. and Burgess, R. R. 1990. Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** : 359-365.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **242** : 329-341.
- Gold, M. H. and Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* **57** : 605-622.
- Kall, J. E. E., Field, J. A., and Joyce, T. W. 1995. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresour. Technol.* **53** : 133-139.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K., E. and Farrell, R. L. 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.
- Kirk, T. K. and Chang, H.-M. 1981. Potential applications of bio-ligninolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* **3** : 189-196.
- Keyser, P., Kirk, T. K. and Zeikus, J. G. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of liginin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **135** : 790-797.
- 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.
- 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.
- Leathan, G. F. 1985. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinula edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 859-867.
- Leisola, M. S. A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F. and Fiechter, A. 1987. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **262** : 419-424.
- Martnez, A. T., Ruiz-Dueas, F. J., Martnez, M. J., Del Ro, J. C. and Gutierrez, A. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol.* **20** : 348-357.
- Palma, C., Martinez, A. T., Lema, J. M. and Martinez, M. J. 2000. Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **77** : 235-245.
- Piscitelli, A., Del Vecchio, C., Faraco, V., Giardina, P., Macellaro, G., Miele, A., Pezzella, C. and Sannia, G. 2011. Fungal laccases: versatile tools for lignocellulose transformation. *C. R. Biol.* **334** : 789-794.
- 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. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **65** : 285-293.
- Stajic M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E. and Vukojevic, J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidase production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.* **38** : 65-73.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140** : 19-26.