

*Phanerochaete chrysosporium*과 *Ceriporiopsis subvermispora* 菌株의 Ligninase 및 Laccase 생산최적조건에 관한 研究

姜安錫¹ · 車東烈¹ · 金庚守¹ · 洪仁杓¹ · SUKI C. CROAN² · 劉勝憲³

¹農村振興廳 農業技術研究所 菌茸科

²美農務省 Forest products Laboratory

³忠南大學校 農生物學科

Improved Production of Ligninase and Laccase by *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora*

An-Seok Kang¹, Dong-Yeul Cha¹, Kyung-Soo Kim¹, In-Pyo Hong¹,
Suki C. Croan² and Seung-Hun Yu³

¹Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute,
R.D.A., Suwon 441-707

²Forest Products Laboratory, USDA, Madison, Wisconsin 53705, USA

³Chung-Nam National University, Daejeon 302-764, Korea

ABSTRACT: The ever increasing demand for energy and the shortage of resources all over the world have generated interest in recycling renewable sources such as lignocelluloses which otherwise would go to waste and cause environmental pollution. Lignin is the incrustation material for cellulose and hemicellulose, therefore, cellulose and hemicellulose are not easily degraded. Recycling lignocellulosic wastes as agricultural material are benefit to everybody and everything. In order to improve ligninase and laccase production of *Phanerochaete chrysosporium*, BKM-F-1767 and *Ceriporiopsis subvermispora*, FP 90031-SP, were compared. The ligninase activity of *P. chrysosporium* was maximum on day 4.5 of shaking culture at 150 rpm 2.5 cm in a back and forth cycle. The laccase activity of *C. subvermispora* was maximum on day 5.5 for 2% malt extract+0.1% yeast extract+0.1% Tween 20+6 mM Benzyl alcohol culture medium at stationary state.

KEYWORDS: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*, ligninase, laccase, detergent-effects, veratryl alcohol, benzyl alcohol.

리그닌 분해성인 白色腐朽菌은 리그닌을 선택적으로 분해하여 CO₂와 H₂O로 변화시킨다(B. D. Faison, 1985). 이 백색부후균은 세포의 효소인 리그닌 peroxidase(ligninase)를 생성하며(Ming과 Kirk, 1983)이 효소는 리그닌을 분해하면서 H₂O₂를 유리시킨다(Leisola 등, 1985). 이 효소는 활성을 갖기 위해서는 H₂O₂를 필요로 하는 독특한 酵素이다(Ming과 Kirk, 1984). 리그닌네이저는 리그닌 중합

*Corresponding author

구조를 산화 분해하는데 촉매작용을 하는 同位酵素의 一郡이다. 리그닌 分解酵素 中 10-15개의 단백질들은 FPLC(Mono Q Column) 280 nm에서 측정된다(Becker와 Sinitsyn, 1993). 다른 리그닌 분해 효소들은 heme protein 들로써 405 nm에서 측정한다(Kirk 등, 1986). 405 nm에서 peak에 달하는 리그닌 분해효소로는 H1, H2, H6, H7, H8, H10 등이다(Kirk 등, 1986). 또, 다른 리그닌 분해효소는 Mn-dependent peroxidase 들이다.

리그닌 분해효소는 균사가 질소 등이 부족한 상태에서 유발되는 2차 대사 기간에 생성되는 細胞外 酵素들이다(Jefferies 등, 1981). 2차 대사는 질소원, 탄소원, 유황 등 營養成分의 고갈로부터 비롯되며 리그닌 분해성 菌으로 가장 많이 研究된 *P. chrysosporium*은 菌絲生長을 위해서 最少限의 탄수화물: 질소: 황의 비율이 1500:3:1로 밝혀진 바 있다(Jefferies 등, 1981). 또한, *P. chrysosporium*에서 리그닌 分解酵素인 lignin peroxidase의 生産은 veratryl alcohol, 균사체 pellet의 크기와 농도, 배지의 양, 진탕 횟수, 진탕 방법(산소의 分壓)에 따라 다름을 報告한 바 있다(Leisolor 등 1985; 金等, 1993).

本 研究는 *P. chrysosporium*의 lignin peroxidase, *C. subvermispora*의 lignin peroxidase, laccase의 酵素生産提高를 위하여 培養條件을 달리한 試驗을 수행한 結果를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

供試菌株

本 試驗에 使用된 菌株는 美國 U.S.D.A. Forest product Lab.에서 분양받은 *P. chrysosporium*(BKM-F-1767)과 *C. subvermispora*(Fp.90031-SP)이었다.

供試培地

분양받은 菌株는 먼저 malt extract agar(2%) 배지상(pH 6.5)에서 *P. chrysosporium*은 39°C, *C. subvermispora*는 28°C 에서 각각 배양하였다. Lignin peroxidase 活性 提高를 위한 *P. chrysosporium*의 기본배지는 B III 배지로 그 조성은 Table 1과 같으며 여기에 炭素源으로는 glucose를 最終 濃度가 56 mM가 되도록 각각 조절하여 첨가하였고 배지의 산도 변화를 막기 위해 buffer 용액으로는 10 mM trans aconitic acid(T.A.A. pH 4.2)를 사용하였다. *C. subvermispora*의 배지로는 10%의 malt extract(M. E.)와 1%의 yeast extract(Y.E)를 원액으로 하여 최종 2%의 M.E와 0.1%의 Y.E의 농도로 조절하였다.

Blended mycelia의 제조

*P. chrysosporium*의 경우, 1000 ml 삼각 flask에

Table 1. Composition of basal medium

Medium	Component	Contents	Remarks
B III	KH ₂ PO ₄	2.0 gr	Autoclaved
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 gr	"
	CaCl ₂	0.1 gr	"
	(NH ₄) ₂ tartrate	0.2 gr	Filter sterilized
	Thiamine-HCl	1.0 mg	Filter sterilized
	700×TES		10.0 ml
700×TES (Trace element solution)	Nitriloacetate	10.5 gr	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	21.0 gr	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.5 gr	
	NaCl	7.0 gr	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 gr	
	CoCl ₂	0.7 gr	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 gr	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.07 gr	
	AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.07 gr	
	H ₃ BO ₃	0.07 gr	
	NaMoO ₄	0.07 gr	
	Distilled water		1000 ml

Table 2. Activity of ligninase and days required for the maximum activity in *C. subvermispora*

Medium composition	Maximum activity (Unit)	Days required
ME + YE	38 ± 2	6.5
ME + YE + TW	53 ± 5	6.5
ME + YE + VA	38 ± 6	6.5
ME + YE + BA	62 ± 4	5.5
ME + YE + TW + VA	539 ± 31	6.5
ME + YE + TW + BA	134 ± 13	6.5
ME + YE + TW + VA + BA	58 ± 15	6.5

上記의 배지와 시험관에서 배양된 균사, conidia 및 배양액을 합쳐 40 ml를 주입한 후 39°C 에서 3-4일 停置培養한 菌絲體(mycelial mat)를 멸균수로 2-3회 세척한 후 5 秒間 homogenizer(Nissei, AM-7; Japan)로 균질화시켜 blended mycelia로 하였다.

*C. subvermispora*의 경우, 시험관에서 배양된 mycelia와 멸균수 및 상기의 배지혼합액을 1000 ml용 삼각 플라스크에 40 ml를 넣어 28°C 에서 10일간 停置培養하였고 기타방법은 *P. chrysosporium*과 동일하게 하였다.

培養條件

*P. chrysosporium*의 경우 125 ml Erlenmeyer flask에 blended mycelia(최종 20% 농도)와 detergent인 Tween 20(T.20)을 0.1%, veratryl alcohol(V.A.)을 1mM 농도로 각기 조절하여 첨가하였고, 배양액 용량에 따른 효소생산의 차이를 검토하고자 배양액을 15 ml, 30 ml, 45 ml, 50 ml, 60 ml로 하였으며 이와는 별도로 T.20 및 V.A.를 넣지 않고 benzyl alcohol(B.A.)을 6 mM로 조절하여 blended mycelia(20% 농도)와 배지 혼합액을 45 ml로 하여 대조하였다. 모든 처리는 2반복으로 실시하였고, 배양은 39°C 왕복진탕기(150 rpm, 2.5 cm-diameter cycle)를 사용하였고 매일 산소를 1분간 주입시켜 포화상태로 한 후 마개를 막아 배양하였다.

*C. subvermispora*의 경우는 125 ml Erlenmeyer 삼각플라스크에 blended mycelia(최종 20% 농도)와 기본배지를 놓고 T.20은 0.1% , B.A.는 6 mM로 하

거나, T.20은 0.1% , V.A.는 1 mM , B.A.는 6 mM로 조절하는 것과 대조로 기본 배지만을 처리하여, 처리별 배양액량을 10 ml로 각 2 반복씩 停置培養하였다.

Ligninase 酵素 活性度 測定

리그닌 peroxidase(Ligninase)의 활성은 V.A.의 H₂O₂-dependent 산화법을 이용하여 측정하였는데 배양 후 2일부터 매일 80 μl의 배양액을 취하여 1-2분 원심분리를 하여 상등액 50 μl, 증류수 265 μl, 10 mM V.A. 40 μl, 10 mM H₂O₂ 20 μl, 0.25 N의 Tartrate buffer(pH 3.0) 125 μl를 각각 혼합하여 UV-비색계(Beckman Du ① 650, U.S.A.)를 kinetics/time 상태로 둔채 310 nm에서 5초 간격으로 scanning 하여 1분간 효소 활성도를 측정하였다. 이때 사용된 V.A. 용액(10 mM)은 제품자체(Aldrich)에 불순물이 있으므로 V.A. 5 μl를 5 μl의 메틸알콜에 녹여 2 μl의 diazomethane에서 overnight 시킨 다음 진공 증류장치로 증류시킨 것을 使用하였다.

Laccase 酵素 活性度 測定

Laccase 효소 활성도는 산화 활성도법으로 측정하였다. 배양액을 매일 50 μl 씩 취해서 1-2분 원심 분리하여 상등액 25 μl, 23.3 mM ABTS(2,2-azinobis, Sigma N.A. 1888) 100 μl, glycine buffer(pH 3.0) 100 μl, H₂O 275 μl를 혼합하여 436 nm에서 ligninase 측정과 같은 비색계로 15초 간격으로 scanning 하여 2분간 효소 활성도를 측정하였다.

건물증 조사

시험이 끝난 *C. subvermispora* 배양액을 여과지(No 1, Whatman)를 사용하여 균체를 걸러서 80°C 에서 건조시켜 3회 건물증을 평량하여 평균치를 사용했다.

結果 및 考察

H₂O₂-dependent oxygenase(Ming, & Kirk, 1984) 또는 diaryl propane oxygenase(Gold *et al.*, 1984)라고 불리는 lignin peroxidase(Lip)는 H₂O₂의 유리 산소 원자는 혐기상태에서도 활력이 있음을 밝힌 바 있으며 따라서 균사의 供給이나, 진탕속도, 진탕방법

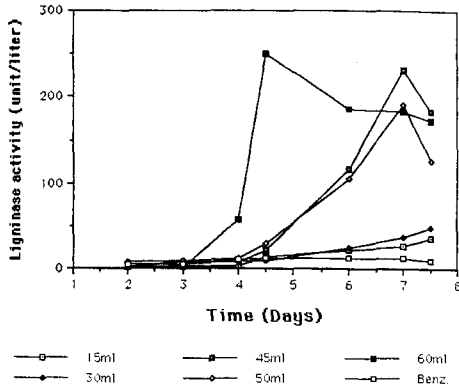


Fig. 1. Daily changes in ligninase activity of *Phanerochaete chrysosporium* grown with different inocula size.

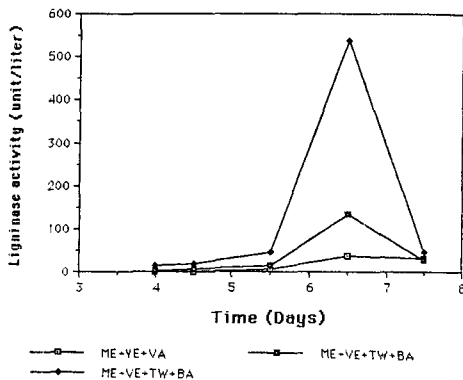


Fig. 2. Effect of culture medium containing different detergents on ligninase activity of *C. subvermispora*.

등의 배양조건 같은 시험법에 따라서 Lip의 생성도 달라진다(E. Moyson and H. Verachtert, 1993). 이 시험에서 처리된 125 ml Erlenmeyer 플라스크에 주입된 15 ml, 30 ml, 45 ml, 60 ml, 배양액 처리의 용기내 산소의 양은 4.7, 4.07, 3.48, 2.85 nmole이 된다.

진탕배양에서 배양액량이 다르면 균체의 pellet 크기가 다르게 되고 pellet가 작게 될 때 효소의 활성도는 높아지게 된다(Reid 등, 1985). 본 시험의 결과는 배양액량이 60 ml일 때 4.5일에서 가장 활성도가 높았으며 45 ml를 배양할 때는 6.5일에 최대치를 나타내었다(Fig. 1). 배양액량에 따라서 酵素活性도가 다른 것은 아마도 진탕시 산소분압이 달라지기 때문인 것으로 생각된다(Reid 등, 1985). 또,

Table 3. Activity of laccase and days required for the maximum activity in *C. subvermispora*

Treatment	Maximum activity (Unit)	Days required
ME+YE	123± 1	7.5
ME+YE+TW	202± 3	5.5
ME+YE+VA	118± 13	5.5
ME+YE+BA	222± 21	5.5
ME+YE+TW+VA	192± 16	5.5
ME+YE+TW+BA	405± 43	5.5
ME+YE+TW+VA+BA	167± 7	4.5

detergent를 넣지 않고 B.A. 만을 처리한 것은 detergent와 V.A.를 처리한 것에 비하여 현저하게 효소의 활성이 낮게 나타난 것은 Rajagoplan과 Robert (1990), Jager 등(1985), Asthar 등(1987)의 보고와 일치하였다.

C. subvermispora 균의 ligninase 활성을 제고시키기 위한 배양조건을 검토한 바, Fig. 2와 같이 가장 활성이 높은 처리는 2% M.E.+0.1% Y.E.+0.1% T. 20+1 mM V.A.이었으며 최대 활성의 출현 일수는 6.5일이었다.

그런데 Johnson 등(1993)의 *C. subvermispora*에서는 lignin peroxidase의 생성이 없다고 보고한 바와 본 연구 결과는 상이하였다.

*C. subvermispora*의 경우도 detergent 첨가는 효소생산을 향상시키는 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Table 3). V.A.와 B.A. 각각의 효소활성제고 효과를 보면 B.A.의 효과가 다소 컸으나 detergent를 첨가했을 경우 V.A.가 B.A.보다 다소 큰 것으로 나타났다(Fig. 2, Table 3). Laccase는 백색부후균이 분해하는 lignin 분해를 촉진하거나 동시에 응축시키는 균체의효소이다(Gallino 등, 1991).

Laccase 활성제고를 위한 적정 배지시험의 결과, ligninase의 경우와는 달리 2% M.E.+0.1% Y.E.+0.1% T.20+6 mM B.A.에서 활성이 가장 높았으며 최대치가 나타난 배양 일수는 5.5일이었다(Fig. 3). 대체적으로 V.A.의 효과보다는 B.A.의 효과가 컸고 detergent의 효과는 ligninase와 유사한 경향이었다(Table 3). Galliano 등(1991)은 白色腐朽菌인 *Rigi-*

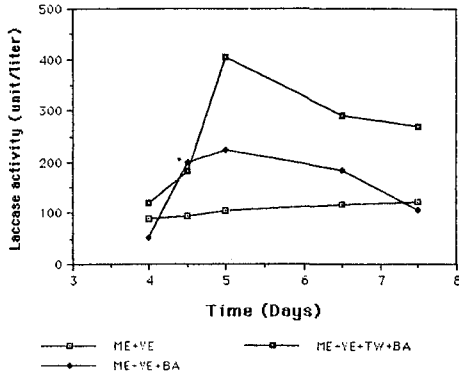


Fig. 3. Effect of culture medium containing different detergents on laccase activity of *C. subvermisporea*.

Table 4. Dry weight of mycelial mass of *C. subvermisporea* grown in different culture media

Treatment	Mycelial dry weight (mg/10 ml flask)
ME + YE	104.8
ME + YE + TW	112.4
ME + YE + VA	88.5
ME + YE + BA	84.6
ME + YE + TW + VA	102.3
ME + YE + TW + BA	85.5
ME + YE + TW + VA + BA	96.5

doporus lignosus Imaz.에서 laccase 활성이 pH 4.5에서 가장 높았음을 보고하였다. Laccase의 lignin 분해에 대한 기작은 금후 연구하여야 할 과제이다.

C. subvermisporea 菌絲의 乾物重生産은 laccase 활성과는 달리 detergent가 V.A.나 B.A. 효과를 상승시키지 못하는 것으로 나타났다. 2% M.E+0.1% Y.E.+0.1% T.W.20에서 균사의 건물중 생산이 가장 높은 결과를 나타내었다(Table 4).

摘 要

P. chrysosporium BKM-F-1767 및 *C. subvermisporea* FP90031-SP. 균사를 이용하여 ligninase와 laccase 활성제고를 위한 배양방법을 검토한 결과는

다음과 같다. *P. chrysosporium*의 왕복진탕배양시 (150 rpm) 배양액량은 45-60 ml가 ligninase 활성제 고에 적합하였으며 60 ml 배양은 최대활성 출현일이 빨리 나타났다. *C. subvermisporea*의 정지배양시, 2% M.E.+0.1% Y.E.+0.1% T.W.20+1 mMVA 처리에서 ligninase 활성이 가장 높았고 laccase의 활성은 2% M.E.+0.1% Y.E.+0.1% T.W.20+6 mMBA에서 최고 수준을 나타내었다.

參考文獻

Asther, M., G. Corrieu, R. Drapron, and E. Odier. 1987. Effect of Tween 80 and Oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Tech.* 9: 245-249.

Becker, H. G. and A. P. Sinitsyn. 1993. Mn-Peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: The action on the lignin. *Biotech. Letters.* 15(3): 289-294.

Faison, B. D. and T. K. Kirk. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied. Environ. Microbiol.* 49 (2): 299-304.

Galliano H., G. Gas, J. L. Seris and A. M. Boudet. 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 478-482.

Gold, M. H., M. Kuwahara, A. A. Chiu, and J. K. Glenn, 1984. Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring, *P. Chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 353-362.

Jager, A., S. Croan, and T. K. Kirk. 1985. Production of ligninase and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1274-1278.

Jeffries, T. W., S. Choi and T. K. Kirk. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.

Johnson, C. R., Loreto Salas, Rafael Vicuna, and T. Kent Kirk. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermisporea*. *Applied. Environ. Microbiol.* 59(6): 1792-1797.

Kirk, T. K., S. Croan, and Ming. 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.
- 金庚守, 金永昊, 姜安錫, 柳昌鉉, 車東烈, Suki C. Croan. 1993. 진탕배양에 의한 *Phanerochaete chrysosporium* Diffuse 균사의 ligninase 생성에 관한 연구. 韓菌誌 **21**(4): 310-315.
- Leisola Matti S. A., Ursula Thanei-Wyss and Armin Fiechter. 1985. Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. of Biotech.* **3**: 97-107.
- Moyson E., H. Verachtert. 1993. Factors influencing the lignin peroxidase producing ability of *Phanerochaete chrysosporium*. *App. Microbiol. Biotech.* **39**: 391-394.
- Ming T. and T. K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science* **221**: 661-663.
- Ming T. and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from the *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. *Pro. Nat'l. Acad. Sci.* **81**: 2280-2284.
- Rajagopalan V. and R. L. Irvine. 1990. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied. Environ. Microbiol.* **56**(9): 2684-2691.
- Reid L. D. , E. E. Chao, and P. S. S. Dawson. 1985. Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures. *Can. J. Microbiology.* **31**: 88-90.