J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45(2), 124-127 (2002)

Note

# 느타리 버섯균으로부터 wood meal-wheat bran 배지에서의 리그닌분해효소 생산

하효철* · 이재성

영남대학교 자연자원대학 생물자원공학부 식품가공학과

(2002년 1월 9일 접수, 2002년 3월 18일 수리)

**Key words:** 백색부후균, 느타리버섯, 리그닌 분해효소, wood meal-wheat bran 배지

## 서 론

목질바이오매스는 양적으로 지구상에서 가장 많이 생산되는 생물자원으로서 이들의 구성성분은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 그리고 리그닌으로 이루어져 있다.

특히 리그닌은 재생가능한 자원으로 페닐프로판을 기본골격으로 하는 복잡한 입체구조를 형성하고 있는 중합체로서, 식물의 형태를 유지하고, 미생물에 의한 부식을 방지하는 중요한 역할을 담당한다. 그러나 이러한 난분해성 물질로 알려진 리그닌을 분해할수 있는 능력을 가지고 있는 것이 담자균류로 불리는 백색부후균이다.

지금까지 가장 많이 연구되어져 있는 리그닌 분해균인 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)은 lignin peroxidase(LiP; EC 1.11.1.14), manganese peroxidase(MnP; EC 1.11.1.13)를 생산하는 것으로 알려져 있으며 이들 효소들은 분자량이 38-49 KDa인 헴을 갖는 당 단백질로서 활성의 발현에 과산화수소를 필요로 한다.[1-2] 또한 리그닌 분해 효소들은 복수의 isoenzyme을 생산하는 것으로 알려져 있으며 유전자 수준에서 조절되고 있는 것으로 보고 되어있다.[3]

LiP는 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)의 리그닌 분해에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되어져 왔다. 그러나, 많은 다른 백색부후균의 경우 여러 배양조건에서 LiP는 생산하지 않고 MnP를 생산하는 것으로 보고 되어져 있다.[4]

백색부후균에 의한 리그닌분해 효소의 생산은 크게 액체배양법과 고체배양법에 의해 실험되어져왔다. 그중 백색부후균에 의한 리그닌 분해에 있어서 보다 자연적인 조건에 가까운 고체배양법에 의한 리그닌 분해 효소의 생산에 대해서도 많은 정보가 필요하다.

백색부후균이 생산하는 리그닌분해효소인 MnP에 관한 연구보고는 국내에서 아직 미비한 것으로 알려져있다. 이에 본 연구는 백색부후균이면서 식용버섯으로 알려진 느타리 버섯균으로부터 고체배양조건에서 생산되는 리그닌분해 효소에 관하여 보고하고자 한다.

*연락저자
Phone: 82-53-810-2955; Fax: 82-53-816-7365
E-mail: hyocheolyn@yahoo.co.kr

## 재료 및 방법

**공시균주.** 본 연구에 사용한 균주는 리그닌 분해능 선발실험에서 선발된 느타리균주(*Pleurotus ostreatus*)중에서 교토대학교 목질과학 연구소 바이오매스 변환 연구실에서 보관중인 No. 26를 28°C, Potato-dextrose agar(Nissui Co.)배지에서 계대배양하면서 공시균주로 사용하였다.

**목분(wood-meal)의 탈지.** Beech(*Fagus crenata* Blume)목분을 탈지시키기 위하여 32-64 mesh의 체를 이용하여 목분 400 g에 에탄올 : 벤젠(2 : 1, v/v)용액 3 *l*를 냉각관이 부착된 환류장치(Soxhlet's extractor)에 넣고 85°C에서 가온하면서 48시간 환류시켰다. 그후, 벤젠냄새가 없어질 때까지 에탄올에 세정하고 건조시켰다.

**배양방법.** 느타리균주(*P. ostreatus*)를 28°C에서 potato-dextrose broth(Difco Co.)에서 7일동안 정치배양으로 전배양을 실시한 후 균사체를 회수하여 증류수 20 m*l*를 넣고 균질화를 실시하였다. 본배양은 300 m*l* 삼각플라스크에 wood meal-wheat bran(9 : 1, w/w) 배지를 넣고 증류수 15 m*l*를 첨가하여 고압멸균한 후 균사체 혼합액을 3 m*l*씩 접종하여 30°C에서 정치배양을 실시하였다.

**효소측정.** MnP활성은 Kofujita 등[5]의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

Laccase 활성은 Kofujita 등[5]의 방법으로 확인하였다. 즉 *o*-phenylendiamine을 기질로 하여 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 440 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

LiP활성은 Tien and Kirk[6]의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 310 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 각효소의 활성측정은 배양중의 각각의 플라스크 3개를 선발하여 평균값으로 나타내었다.

**조효소의 회수 및 농축.** 조효소의 회수 및 농축은 Yoshida 등[7]의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, 본 배양한 wood meal-wheat bran 배지 5 g당 20 mM Na-succinate buffer(pH 4.5) 20 m*l*를 첨가한 뒤, 28°C, 80 rpm에서 1시간 진탕하여 배양추출액을 cheese cloth를 가지고 여과하였다. 이 배양액을 4°C, 8000 rpm에서 원심분리한 후 회수하여 상징액을 사용하였다.

**박막여과에 의한 분획.** 회수한 조효소액을 Diaflo PM10(MW cut-off: 10,000)의 박막을 이용하여 농축하여 농축액을 4℃에서 하룻밤 투석시킨 뒤 사용하였다.

**이온크로마토그래피.** 박막여과에 의해 농축시킨 조효소액을 20 mM succinate buffer(pH 4.5)로 평형화 시켜놓은 이온 교환 크로마토크래피 컬럼(ion exchange chromatography column)에 주입하고 염농도를 0, 0.1, 0.2, 0.3 N로 단계적으로 증가하여 분리하였다. MnP의 부분 분리정제는 DEAE-Sepharose CL-6B column(Amersham Phamacia Biotech, UK)으로 실시하였다. 모든 효소의 정제과정은 4℃에서 실시하였다.

**겔 전기영동.** 단백질의 등전점 전기영동은 Multiphor II system(Pharmacia Co.)을 이용하여 Yoshida 등[7]의 방법에 의해 실시하였다. 즉, 단백질의 밴드 염색은 Coomassie blue로, MnP의 활성염색은 3,3'-diaminobenzidine을 기질로 염색하였다. 전기영동한 겔은 Ampholine PAG plate를 사용하였으며 마커는 broad pI calibration kit(pI 3.5-9.3)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**배양조건에 따른 리그닌분해 효소의 활성변화.** Potato-dextrose broth(PDB)배지와 Wood meal-wheat bran배지에서 배양한 느타리 버섯균으로부터 리그닌 분해 효소의 생산에 대한 경시변화를 나타낸 결과이다(Fig. 1, 2). 리그닌분해 조건이 아닌 PDB 배지에서 배양하였을 때 laccase 활성은 배양개시후 5일째 0.05 U/ml, MnP활성은 배양개시후 거의 생산되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 wood meal-wheat bran 배지에서 배양하였을 때 laccase 활성은 배양개시후 5일째 4.3 U/ml, MnP활성은 배양개시후 9일째 0.8 U/ml를 나타내었다.

*P. chrysosporium*으로부터 생산되는 것으로 알려져 있는 리그닌 분해효소인 LiP는 이 조건에서 생산되지 않았으며 *Pleurotus* 종에서 LiP가 생산되지 않는다는 다른 보고와 일치한 결과를 나타냈다.[8-9]

느타리 균주 IFO 30160를 목분배지(wood-meal medium)에서 배양한 결과 laccase 최대활성이 먼저 나타나고 나중에 MnP의 활성이 최대가 된다는 Kofujita 등[10]의 보고와 비슷하였으나 리그닌분해효소의 생산일수는 본연구에서 3-10배 가량 빨리 생산됨을 보여주었다. 이는 본 실험과는 균주가 다르므로 확실히 비교할 수는 없으나 wheat bran은 유기질소원으로서 느타리 균주의 생육과도 관계가 있으므로 고질소원에서 MnP생산이 높아진다는 보고와 관계가 있을 것으로 사료된다.[11-12]

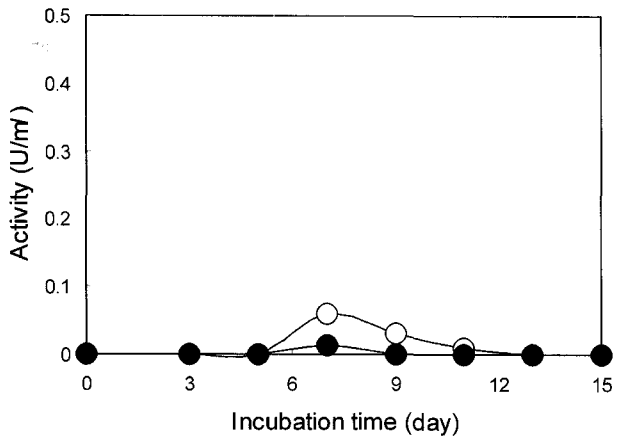


**Fig. 1 . Time course of ligninolytic enzyme activities produced by *P. ostreatus* in potato-dextrose broth.** ○ : laccase activity; ● : MnP activity.

**이온교환 크로마토그래피를 이용한 망간퍼옥시데이즈의 분리.** 조효소액을 이온교환크로마토그래피에 의해 분획한 결과 염농도가 0.1 N의 분획에서 MnP 활성이 나타났다(Fig. 3). 이러한 분획현상은 느타리균주를 액체배양에서 분획한 이전의 결과[5, 12]와 거의 같은 결과를 보여주었다.

**분리한 망간퍼옥시데이즈 활성염색.** 이온교환크로마토그래피에 의해 MnP 활성을 갖는 분획을 모아서 전기영동장치를 이용하여 .IEF gel(pI 3.5-9.5)을 가지고 전기영동한 결과 coomassie brilliant blue에 의한 단백질 염색에서는 여러개의 밴

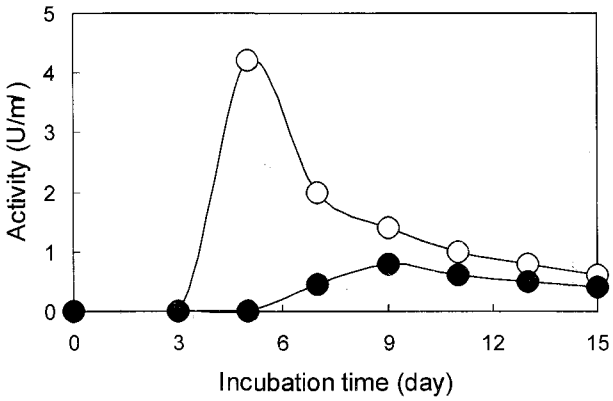


**Fig. 2. Time course of ligninolytic enzyme activities produced by *P. ostreatus* in wood meal-wheat bran medium.** ○ : laccase activity; ● : MnP activity.

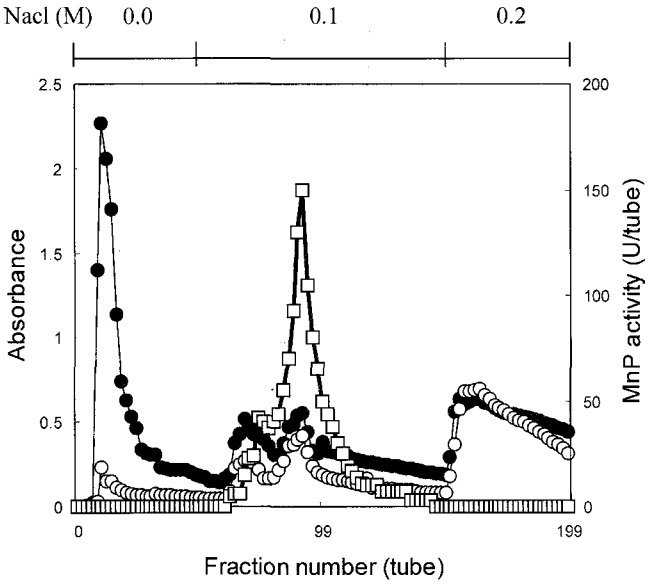


**Fig. 3. Fractionation of manganese peroxidase (MnP) produced by wood meal-wheat bran medium on DEAE-Sepharose ion exchange chromatography.** ● : absorbance at 280 nm; ○ : absorbance at 407 nm; □ : MnP activity.

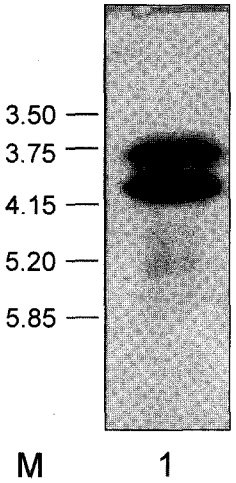


**Fig. 4. IEF of isolated manganese peroxidase (MnP) from DEAE-Sepharose ion exchange chromatography.** M: standard mark (pI); lane 1: active staing.

드가 나타나 완전히 분리정제되지 않았음을 보여주었으나 활성염색에 의해서는 2개의 뚜렷한 밴드가 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

두 개의 MnP활성을 갖는 밴드는 pI가 각각 3.75 3.95로 나타났으며 이전에 보고된 느타리버섯 균주로부터 액체배양하였을 경우와 비슷한 결과를 나타내었다.[12,13]

Giardina 등[14]은 톱밥배지로부터 생산되는 *P. ostreatus*의 MnP는 두 개의 isoenzyme을 갖는 것으로 보고한 바 있으며 본 연구와 비슷한 결과를 보여주었다. 특히 이들 isoenzyme의 아미노산 말단 배열을 조사한 결과 그중 하나는 액체배양에서 생산되는 isoenzyme인 MnP 3과 일치하는 것으로 보고하여 본 연구에서 생산되는 pI 3.95의 isoenzyme과 같은 것으로 추정된다.

리그닌분해를 일으키는 자연조건과 비슷한 본 실험 조건 하에서 백색부후균으로 알려진 느타리버섯균으로부터 적어도 두 개의 MnP isoenzyme이 생산되며 이들 효소들의 생화학적 특성 및 기능에 대해서는 연구가 진행중에 있다.

## 참고문헌


1. Tien, M. and Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium. Science* **221**, 660-661.
2. Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. (1984) Separation and characterization of two extracellular $H_2O_2$-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium. FEBS Lett.* **169**, 247-250.
3. Gold, M. H. and Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium. Microbiol. Rev.* **57**, 605-622.
4. Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125-135.
5. Kofujita, H., Asada, Y. and Kuwahara, M. (1991) Alkyl-aryl cleavage of phenolic β-*o*-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus. Mokuzai Gakkaishi* **37**, 555-561.
6. Tien, M. and Kirk, T. K. (1984) Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique $H_2O_2$-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2280-2284.
7. Yoshida, S., Yonehara, S., Minami, S., Ha, H.-C., Iwahara, K., Watanabe, T., Honda, Y. and Kuwahara, M. (1996) Production and characterization of ligninolytic enzymes of *Bierkandera adusta* grown on wood meal/wheat bran culture and production of these enzymes using a rotary-solid fermenter. *Mycoscience* **37**, 417-425.
8. Masaphy, S. and Levanon, D. (1992) The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 828-832.
9. Fu, S. Y., Yu, H.-S. and Buswell, J. A. (1997) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju. FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 133-137.
10. Kofujita, H., Mastushita, A., Ohsaki, T., Asada, Y. and Kuwahara, M. (1992) Production of phenol oxidizing enzyme in wood-meal medium by white rot fungi. *Mokuzai Gakkaishi* **38**, 950-955.
11. Martinez, M. J., Ruiz-Duenas, F. J., Guillen, F. and Martinez, A. T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii. Eur. J. Biochem.* **237**, 424-432.
12. 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.
13. Irie, T., Honda, Y., Ha, H.-C., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2000) Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isoenzyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus. J. Wood Sci.* **46**, 230-233.
14. Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Rivieccio, V. and Sannia, G. (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 171-179.

**Production of Ligninolytic Enzymes from *Pleurotus ostreatus* Grown on Wood Meal-Wheat Bran Culture**

Hyo-Cheol Ha* and Jae-Sung Lee (*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea*)

Key words: white-rot fungi, *Pleurotus ostreatus*, ligninolytic enzymes, wood meal-wheat bran medium
*Corresponding author