

# 회전식 통풍관 생물반응기로부터 생산된 느타리균의 다목적 과산화효소(VP) 정제 및 특성

하효철\*

대구한의대학교 바이오산업융합학부

## Purification and characterization of versatile peroxidase from *Pleurotus ostreatus* produced in a rotary draft tube bioreactor

Hyo-Cheol Ha\*

Department of bio-technology and convergence, Daegu Haany University, 1, Hanui-daero, Gyeongsan 712-715, Korea

**ABSTRACT:** In this study, *Pleurotus ostreatus* No.42 was cultured in glucose-peptone-yeast-wheat bran medium using a previously reported novel rotary draft tube bioreactor. Versatile peroxidase (VP), a lignin-degrading enzyme, was isolated from a pellet-type mycelium culture grown in the medium for seven days. The VP was purified by sequentially applying ultra-filtration, DEAE-Sepharose CL-6B column, and Mono Q column. SDS-PAGE analysis revealed the molecular weight of VP to be 36.4 KDa with an isoelectric point of 3.65. The amino acid sequence was confirmed as VTCATGQTT. The purified VP was observed to possess the property of not only oxidizing Mn ions but also decomposing veratryl alcohol, a non-phenolic compound. The catalytic ability of VP is a subject for future research.

**KEYWORDS:** Amino acid sequence, Lignin degrading enzyme, Pellet, *Pleurotus ostreatus*, Versatile peroxidase

### 서 론

백색부후균의 리그닌 분해 시스템에 있어서 주요 구성 요소 중 하나는 여러 구성원으로 이루어진 과산화 효소 계열이다. 리그닌 분해 관련 과산화 효소는 다양한 기질의 산화 반응을 촉매하기 위해 과산화수소를 이용하는 산화 환원효소로 잘 알려져 있다. 이러한 리그닌 분해 관련 과산화 효소는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 반응하여 페놀성 화합물, 염

료, 다방향족 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs), 폴리염화비페닐 (Polychlorinated biphenyl; PCBs), 살충제, 소수성 휘발성 유기물(hydrophobic volatile organic compounds; VOCs)과 같은 다양한 기질들을 촉매하여 산화시킬 수 있는 것으로 보고되고 있어 리그닌 분해 능력뿐만 아니라 탄소 저감화, 바이오 연료, 표백, 바이오 기반 화합물 합성, 식품, 화장품, 생물학적 정화 등 산업적으로도 매우 가치가 높은 효소로 알려져 있다 (Singh *et al*, 2023; Sellami *et al*, 2022; Wang *et al*, 2018).

리그닌 분해 시스템에서 가장 많이 연구 발표된 관막버섯균(*Phanerochaete chrysosporium*)의 경우 효소적으로 생성된 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 리그닌 분해 과산화 효소인 망간 과산화 효소 (MnP)와 리그닌 과산화 효소(LiP)에 의해 촉매 되는 반응에서 리그닌 중합체를 산화시키는 효소적 연소 과정에서 핵심 반응으로 설명하고 있다(Gold MH and Alic M, 1993). LiP의 경우 리그닌의 비 페놀 단위를 산화하여 방향족 고리에 양이온 라디칼을 생성하여 차례로 고분자를 분해할 수 있는 것으로 알려져 있으며 (Tien M and Kirk TK, 1983), MnP의 경우 Mn<sup>2+</sup> 결합 부위를 갖고 Mn<sup>2+</sup>를 Mn<sup>3+</sup>로 산화한 후 페놀 기질을 산화시

J. Mushrooms 2023 December, 21(4):209-214  
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2023.21.4.209>  
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853  
 © The Korean Society of Mushroom Science

Hyo-Cheol Ha(Professor)  
 \*Corresponding author  
 E-mail : hcha@dhu.ac.kr  
 Tel : +82-53-819-1498, Fax : +82-53-819-1272

Received October 4, 2023  
 Revised November 7, 2023  
 Accepted November 7, 2023

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

키는 것으로 보고되어 있다(Wariishi *et al.*, 1989).

Vesatile peroxidase(EC 1.11.1.16)는 많은 산화 활성 영역을 결합하는 하이브리드 분자 구조를 가진 헴(Fe) 함유 산화환원효소로, 처음에는 MnP의 isozyme으로 연구되었지만  $Mn^{2+}$ 에 의존하지 않고 베라트릴 알코올(veratryl alcohol; VA)과 같은 비 페놀성 화합물도 산화시킬 수 있어 LiP와 같은 기능도 갖는 것으로 알려져 있으며 백색부후균인 큰느타리균(*Pleurotus eryngii*)으로부터 처음 보고(Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001; Martinez, 2002)된 이래 많은 연구자들에 의해 밝혀져 왔다 (Tsukihara *et al.*, 2006; Salame *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2017). 특히 MnP의 중요한 특성인  $Mn^{+}$  이온과 결합하는 부위와 LiP의 중요한 특성인 비 페놀성 화합물을 산화시킬 수 있는 높은 전위차를 일으키는 트립토판(triptophan) 잔기를 갖는 특징 때문에 생화학적 특성 측면에서 LiP와 MnP의 하이브리드로 평가받고 있다. 따라서 2개의 활성 부위를 지닌 VP는 낮은 산화환원 전위뿐만 아니라 높은 산화환원 전위로 인해 리그닌을 직접 산화시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다 (Knop *et al.*, 2016). 그러나 백색부후균이 생산하는 VP의 경우 기질 산화를 위한 뚜렷한 활성 부위가 복잡하여 이중 발현에 어려움이 있는 것으로 보고되고 있으며 현재까지 큰느타리균 유래 VP만이 생화학적, 구조적으로 특성화되어있다(Perez-Boada *et al.*, 2005). 최근에는 VP의 단백질 구조를 확립하고 단백질 공학 기법을 이용하여 페놀성 및 비 페놀성 화합물, 살충제, 산화환원 전위가 높은 염료, 다환 방향족 탄화수소 및 리그닌을 포함한 광범위한 물질을 보다 안정적이고 효율적으로 산화하는 방법을 보고한 바 있다(Barber-Zucker *et al.*, 2022).

느타리균(*Pleurotus ostreatus*)은 전 세계에서 두 번째로 많이 소비되는 상업적으로 중요한 식용버섯이며 리그닌을 분해하는 백색부후균으로 리그닌 생분해와 관련된 메커니즘 연구를 위한 좋은 모델로 많은 연구자들에 의해 연구되어 왔다(Knop *et al.*, 2015; Saez-Jimenez *et al.*, 2016; Nakazawa *et al.*, 2017). 특히 느타리균에서는 리그닌 분해 시스템을 구성하는 세포 외 과산화 효소인 MnP, VP를 생산하는 것으로 알려져 있으며 앞에서 언급한 리그닌을 선택적으로 광물화하는 특징을 가지는 판막버섯균과는 다르게 LiP는 생산되지 않는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 백색부후균으로 잘 알려져 있는 느타리균을 회전식 통풍관 생물반응기 (Rotary draft tube Bioreactor)에서 펠렛 형태로 액체 배양한 조건에서 처음으로 VP를 생산하여 분리, 정제하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 공시균주 및 배양방법

이전 보고의 방법(Ha, 2021)으로 대구한의대학교 생물

공학 연구실에서 보관하고 있는 느타리균 No. 42를 potato-dextrose액체배지(PDB, Difco Co.) 20 mL에서 28°C, 7일 동안 정치 배양한 후 균사체를 회수한 뒤에 증류수 20 mL를 넣고 균질화하여 글루코오스-펩톤-효모추출물-밀기울(glucose-peptone-yeast-wheat bran; GPYW) 250 mL에서 28°C, 7일 동안 120 rpm의 조건으로 진탕 배양한 후 본 배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 본 배양은 3,500 mL 회전식 통풍관 생물반응기(Rotary draft tube Bioreactor, Kawasaki Heavy Industry Co.)를 사용하였으며 전배양 조건과 동일한 GPYW배지에 접종하여 최종적으로 2,000 mL로 되도록 하였다. 배양조건은 28°C, 120 rpm의 속도를 유지하면서 글루코오스 함량이 완전히 고갈되는 7일 이후 배양액을 회수하여 분리, 정제 여액으로 사용하였다.

### 다목적 과산화 효소 측정

VP의 효소활성은 이전 보고의 방법(Ha *et al.*, 2001)으로 진행하였다. 각각의 배양액으로부터 1mL씩 취하여 4°C, 5000 rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)을 사용하여 아래 다목적 과산화 효소 측정법에 의해 측정하였다. VP 효소활성 농도는 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡광도로 측정하였다. 또한 Mn 이온 존재 하에서 guaiacol을 기질로 하여 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

### 총 단백질 함량

총 단백질 함량은 Bradford 방법(Bradford, 1976)에 준하여 Bradford reagent 1ml를 시료와 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Bovine serum albumin (Sigma Co.)를 표준곡선으로 시료 중 단백질의 함량을 측정하였다.

### Vesatile peroxidase(VP)의 분리 및 정제

VP 효소의 정제는 이전의 방법(Ha *et al.*, 2001)에 준하여 실시하였다. 즉, 배양액을 회수하여 박막여과장치에 의해 농축시킨 조효소액을 20 mM succinate buffer(pH 4.5)로 평형화시켜 놓은 DEAE-Sepharose CL-6B column (Amersham Pharmacia Biotech., UK)에 적용하고 염 농도를 0.1, 0.2 M로 단계적으로 증가하면서 활성을 갖는 분획을 모아서 농축, 분리하였다. 최종적으로 Mono-Q anion-exchange column(Amersham Pharmacia Biotech., UK)을 이용하여 염 농도에 따른 점진적인(gradient) 방법으로 분리 정제하였다.

### 겔 전기영동 및 등전점

최종 겔링을 통해 분리된 VP를 겔 전기영동 장치를 이

용하여 실시하였다. 단백질 전기영동은 Phast System (Amersham Pharmacia Biotech, UK)에 의한 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 2.5% glycerol)에서 1시간 실시하였으며 등전점 (Isoelectric point; IEF) 측정은 Servalyt precoats polyacrylamide gels (Serva Fine Biochemical Inc., pH 3-5)을 구입하여 사용하였으며 전기영동이 끝난 후 0.1% Coomassie blue R-250로 단백질 밴드를 염색하였으며 VP활성은 3,3'-diamino-benzidine을 기질로 염색하였다. 분자량 마커는 standard mark (Daiichi Pure Chemicals, Japan)를 사용하였으며 등전점 마커는 calibration kit (pI 2.4~5.65, BDH BmbH, Germany)를 사용하여 실시하였다.

### N-말단 아미노산 서열분석

최종 분리 정제한 VP의 N-말단 아미노산 서열분석을 진행하기 위해서 semi-dry electro-phoretic transfer 방법으로 실시하였다. 즉, 전기영동 상에서 확인된 단일밴드를 0.05% SDS용액, 25 mM Tris, 20% methanol, 40 mM  $\epsilon$ -Amino-n-caproic acid를 함유한 전이 용매를 이용하여 1.2 mA/cm<sup>2</sup>, 120분간 polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-red con.)막에 옮긴 후 전이된 단백질 부분을 절단하였다. 절단한 단백질 부분을 단백질 자동서열 분석기를 이용하여 에드만 (Edman) 분해법으로 아미노산 서열을 분석하였다 (Model 491A, Applied Biosystems, USA).

## 결과 및 고찰

### 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용한 느타리균의 다목적 과산화 효소(VP) 분리 정제

이전에 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용한 조건 (Ha, 2021)에 따라 느타리 No. 42가 생산하는 과산화 효소 여액을 박막여과, DEAE-Sepharose CL-6B 컬럼, Mono Q 컬럼을 순차적으로 적용하여 분리 정제하였으며 최종 Mono Q 컬럼 크로마토그래피의 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이전의 보고한 연구 결과 (Ha, 2019; Ha, 2021)에서 MnP3의 경우 컬럼에 머무는 시간 (retention time; RT)이 100분경에 염의 농도를 0.3M에서 1.0M로 급격히 증가시킬 때 용출되는 것으로 보고한 바 있으나 이에 반해 이번에 보고하는 다목적 과산화 효소의 경우 80분 전 후 시간에서 용출되는 것으로 확인하였다. 이러한 결과는 Kamitsuji 등 (2005)이 무기 질소원인 ammonium oxalate를 함유한 배지 조건에서 과산화 효소를 분리하여 최종적으로 양이온 Mono Q 컬럼에서 두 개의 과산화 효소를 분리, 정제하였으며 다목적 과산화 효소가 먼저 용출되고 그 이후에 MnP3가 용출되는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

Kamitsuji 등 (2004)은 글루코오스-펩톤-효모추출물 (glucose-peptone-yeast; GPY) 배지 조건에서 MnP3만 생산되었으

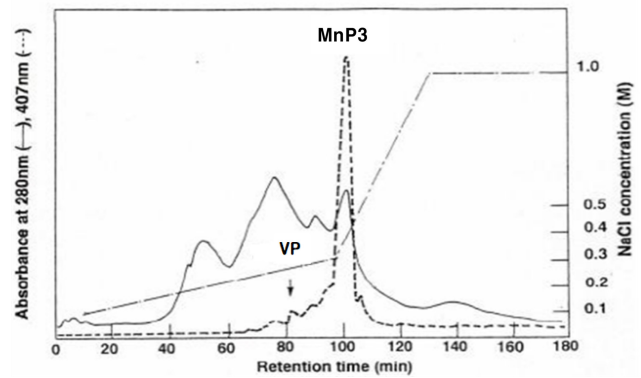


Fig. 1. Profiles of vesatil peroxidase (VP) by Mono Q column chromatography.

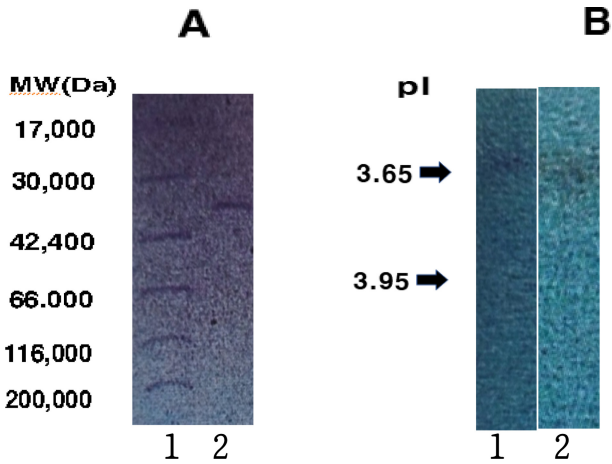
—: Absorbance at 280nm; ...: Absorbance at 407nm

며 또 다른 조건인 글루코오스-효모추출물 (glucose-Yeast; GY) 배지 조건에서는 VP만 생산하는 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 GPY배지 조건에서는 MnP3가 가장 많이 생산되지만 GY배지 조건에서 가장 많이 생산되는 리그닌 분해 효소는 MnP가 아니라 VP를 생산하는 것으로 이러한 결과는 질소원인 펩톤 (peptone)의 영향에 따른 것으로 기술하였다.

본 연구 결과에 따르면 GPYW배지 조건에서 가장 많이 생산되는 과산화 효소가 MnP3인 것은 Kamitsuji 등 (2004)의 연구 보고와 일치하였으나 이번 실험에서는 소량이지만 VP도 생산되는 것으로 확인하여 연구 결과가 약간 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 Sarkar 등 (1997)의 보고에 의하면 느타리균을 GPY배지 조건에서 정지 배양한 결과, 두 개의 망간 과산화 효소를 생산하였으며 VP의 특징인 비페놀성 화합물인 베라트리알 알코올 (veratryl alcohol; VA)을 산화 시키는 능력이 있는 것으로 확인되어 본 연구 결과와 일치하였다. 이러한 결과는 질소원으로 효모 추출물 (yeast extract)만 첨가하면 VP만을 생산하나 효모추출물에 또 다른 질소원인 펩톤을 첨가하면 가장 많이 생산되는 MnP3와 함께 효모추출물에서 생산되는 VP도 같이 생산될 수 있다는 것을 의미한다. 한편, 느타리균 No.42가 생산한 VP의 분리 정제 결과는 Table 1에 나타내었다. 먼저 회전식 통풍관 생물반응기에서 생산한 과산화 조효소액 2099U/2,000mL을 박막여과, DEAE-Sepharose CL-6B 컬럼, Mono Q 컬럼의 순서대로 분리, 정제하였으며 최종적으로 비활성도 244.8 units/mg, 9.1배의 정제도를 갖는 VP를 2.9% 회수하였다. Kamitsuji 등 (2004)의 보고에 따르면 느타리균의 GY배지 조건하에서 최종적으로 Mono Q 컬럼에서 정제한 결과 비활성도 369.0 units/mg, 23배의 정제도를 갖는 VP를 회수하였다고 보고하여 약간의 차이를 나타내었는데 이러한 결과는 VP를 생산하는 배지 조건 및 배양 조건의 차이 때문인 것으로 생각된다.

**Table 1.** Purification of vesatile peroxidase(VP) produced by a rotary draft tube bioreactor (RTB)

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg)	Yield(%)	Purification(fold)
Crude enzyme	2099.0	77.90	26.9	100.0	1.0
Ultrafiltration	1757.0	43.90	40.0	84.0	1.5
DEAE-Sepharose	263.6	1.30	202.8	12.6	7.5
Mono Q	61.2	0.25	244.8	2.9	9.1



**Fig. 2.** Electrophoresis of purified vesatile peroxidase(VP) enzyme.

A. SDS-PAGE; Lane 1; MW marker, Lane 2; VP  
 B. IEF; Lane 1; VP, Lane 2; active stain of VP

**겔 전기영동 및 등전점**

회전식 통풍관 생물반응기(RTB)로부터 7일간 배양한 후, VP를 최종적으로 Mono Q 컬럼으로 분리 정제한 후, 전기영동장치를 이용하여 단일밴드로 분리하였다. Fig. 2에서와 같이 SDS-PAGE(A) 및 Servalyt Precoats polyacrylamide gels(B)상에서 단백질 염색을 진행한 결과, 분자량 36.4 KDa, 등전점(IEF)은 3.65를 나타내었다. 또한 과산화 효소의 특징인 활성 염색을 실시한 결과 갈색으로 산화되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 이전에 본 연구자가 보고(Ha, 2021)한 MnP3와 비교하면 같은 분자량(36.4KDa)을 나타내었으며 등전점(3.95)은 0.3 정도 차이가 나는 것으로 확인하였다. 한편 Kamitsuji 등(2004)이 보고한 GY배지의 정지배양 조건 하에서 생산한 VP의 분자량은 약 42KDa, 등전점은 3.77로 보고하여 본 연구 결과와는 약간의 차이가 있는 것을 확인하였다. 이러한 차이는 단백질 합성에 있어서 글리코실화하는 과정에 있어 결사슬에 결합하는 당의 분자량에 따라 전체 효소의 분자량이 약간 차이가 나는 것으로 생각되며 아미노산 배열은 331개의 잔기로 구성되어 있으며 순수한 단백질 분자량은 34.6KDa인 것으로 보고(Perez-Boada, M *et al*, 2005)되고 있어 본 연구 결과는 VP의 분자량 범위에 있는 것으로 판단된다. 한편 GPY배지에서 생산된 MnP3과 비교하

면 VP와 분자량은 같고 등전점은 0.4 정도 차이가 나는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 유사한 패턴을 나타내었다. 한편 아미노산 염기서열 자동분석기를 통하여 회전식 통풍관 생물반응기에서 대량 생산하여 단일밴드로 정제한 VP의 아미노산을 분석한 결과 N-말단으로부터 총 9개의 아미노산 배열 VTCATGQTT을 확인할 수 있었으며 지금까지 다른 연구자들이 보고한 VP 및 MnP3와 비교 분석하였다(Table 2).

**느타리 속 균주가 생산하는 다목적 과산화 효소(VP)의 기질 산화비교**

Table 2에서와 같이 아미노산 배열 분석 결과, VP의 경우 발린(Val)부터 시작하였으며 이전에 보고(Camarero *et al*, 1998; kamitsuji *et al*, 2004; Fernandez-Fueyo *et al*, 2014)한 VP도 발린부터 시작하였으며 9개의 동일한 아미노산 배열을 나타내었다. 또한 이러한 특성은 다른 백색 부후균인 줄버섯균(*Bjerkandera adusta*)에서도 매우 높은 상동성을 갖는 것으로 보고하였다 (Wang Y *et al*, 2002). 또한 이들 VP들은 액체배양 및 고체 배양, 균사형태, 배지조건 등에 관계없이 베라트릴 알코올과 망간을 산화시키는 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. Kamitsuji 등(2005)에 따르면 GY배지에서 생산된 VP는 베라트릴 알코올과 Poly R-478 및 RNaseA와 같은 고분자 화합물을 직접 산화할 수 있다고 보고하였으며 모든 VP에서 보존되어 있는 트립토판 잔기도 함유되어 있음을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 확인된 VP 역시 베라트릴 알코올과 망간을 산화시키는 특성 이외에 고분자 화합물을 직접 산화하는 트립토판 잔기도 함유하는 특성을 갖고 있을 것으로 추론하는 바이다. 한편, 펩톤 혹은 밀기울(wheat bran)과 같은 질소원 첨가 배지에서 다량으로 생산되는 것으로 보고 되어 있는 MnP3의 경우 모두 알라닌 (Ala)부터 시작하였으며 이전에 본 연구자가 보고한 것처럼 동일한 아미노산 배열과 함께 망간 이온은 산화시키는 반면 비페놀성 화합물인 베라트릴 알코올은 산화시키지 않는다는 것을 확인하였다 (Giardina *et al*, 2000; Cohen *et al*, 2001). 이와 같이 VP는 MnP3와 혼재되어 있어 분리 정제 하는데 어려운 점이 있으나 비 페놀성 화합물을 산화시킬 수 있으며 아미노산 배열에서도 차이가 있는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 느타리균이나 줄버섯균이 생산하는 VP

**Table 2.** Comparison of ligninolytic peroxidase isozymes produced by *Pleurotus* sp

Organism	Culture	Peroxidase	Oxidation activity		N-terminal sequence	Reference
			VA	Mn <sup>2+</sup>		
<i>P. ostreatus</i>	액체펠렛배양	VP	+	+	VTCATGQTT	this study
<i>P. ostreatus</i>	액체정채배양	VP	+	+	VTCATGQTTANE	kamitsuji <i>et al</i> , 2004
<i>P. ostreatus</i>	툽밥고체배양	VP	+	+	VTCATGQTT	Fernandez-Fueyo <i>et al</i> , 2014
<i>P. eringii</i>	벚집고체배양	VP(PS1)	+	+	VTCATGQTT	Camarero <i>et al</i> , 1998
<i>P. ostreatus</i>	액체펠렛배양	MnP3	-	+	ATCADGRRTANAAC	Ha, 2021
<i>P. ostreatus</i>	액체정채배양	MnP3	-	+	ATCADGRRTANAAC	Ha, 2019
<i>P. ostreatus</i>	액체펠렛배양	MnP3	-	+	ATCADGRRTANAAC	Ha <i>et al</i> , 2001
<i>P. ostreatus</i>	툽밥고체배양	MnP3	-	+	ATCADGRRT	Giardina <i>et al</i> , 2000
<i>P. ostreatus</i>	고체배양	MnP3	-	+	ATCADGRRT	Cohen <i>et al</i> , 2001

가 아조 염료인 Orange II, Reactive Black 5 및 Amaranth를 탈색(Salame *et al*, 2012)시킬 수 있으며 5가지 내분비 교란화합물(endocrine disrupting compounds; EDC)인 비스페놀 A(BPA), 트리클로산(TCS), 에스트론(E1), 17b-에스트라디올(E2) 및 17a-에티닐에스트라디올(EE2)에 대해 높은 분해율(Taboada-Puig R *et al*, 2016)을 나타내었으며, 2단계 막 생물반응기를 적용하여 VP가 노닐페닐(Nonylphenol)을 효과적으로 연속 제거하는데 성공하였다고 보고(Mendez- Hernandez JE *et al*, 2015) 하였다.

최근에는 폐수로부터 선발한 새로운 백색부후균으로부터 생산된 VP가 다양한 산업용 폐수 염료를 분해하는 것으로 보고(Juarez- Hernandez *et al*, 2021)하여 다양한 기질에 대해 산화할 수 있는 능력을 확인하였다. 따라서 LiP나 MnP와 같은 다른 리그닌 분해 관련 과산화 효소와 마찬가지로 VP도 현재까지는 낮은 기질 농도 및 제한된 환경 조건(예; 온도, pH)에서만 반응 하기 때문에 앞으로는 이러한 문제를 해결하기 위해 고부가가치 재조합 효소 개발 및 대량생산 방법 등을 연구하는 방향으로 나아가야 할 것으로 생각한다.

## 적 요

본 연구에서 *Pleurotus ostreatus* No.42는 이전에 보고된 새로운 유형의 회전식 통풍관 생물반응기(RTB)를 사용하여 포도당-펙톤-효모-밀기울(GPYW) 배지에서 배양하였다. 이 배지에서 7일 동안 펙렛형 균사체 배양 후, 리그닌 분해효소인 다목적 과산화 효소(VP)를 분리 및 정제하였다. 다목적 과산화 효소의 정제 과정은 한외여과, DEAE-Sepharose CL-6B 컬럼, Mono Q 컬럼을 순차적으로 적용하여 정제하였다. 그 결과, SDS-PAGE상에서 분자량(MW)은 36.4 KDa, 등전점(IEF)은 3.65로 나타났으며, 아미노산 조성은 VTCATGQTT로 확인되었다. 정제된 다목적 과산화 효소는 Mn 이온을 산화시킬 뿐만 아니

라 비페놀성 화합물인 베라트릴 알코올을 분해하는 특성을 갖는 것으로 나타났다.

## REFERENCES

- Barber-Zucker S, Mindel V, Garcia-Ruiz E, Weinstein JJ, Alcalde M, Fleishman SJ. 2022. Stable and functionally diverse versatile peroxidases designed directly from sequences. *J Am Chem Soc* 144: 3564-3571.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274: 10324-10330.
- Cohen R, Hadar Y, Yarden O. 2001. Transcript and activity levels of different *Pleurotostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn<sup>2+</sup>. *Environ Microbiol* 3: 312-322.
- Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Duenas FJ, Martínez MJ, Romero A, Hammel KE, Medrano FJ, Martínez AT. 2014. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol Biofuels* 7: 2-24.
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376: 171-179.
- Gold MH, Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev* 57: 605-622.
- Ha HC, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 704-711.
- Ha HC. 2019. N-terminal amino acid sequencing analysis of major manganese peroxidase (MnP3) produced by static culture of *Pleurotus ostreatus*. *J Mushrooms* 17: 185-190.
- Ha HC. 2021. Production and characterization of manganese

- peroxidase from *Pleurotus ostreatus* using a rotary draft tube bioreactor (RTB). *J Mushrooms* 19: 316–321.
- Juarez-Hernandez J, Castillo-Hernandez D, Perez-Parada C, Nava-Galicia S, Cuervo-Parra JA, Surian-Cruz E, Díaz-Godínez G, Sanchez C, Bibbins-Martínez M. 2021. Isolation of fungi from a textile industry effluent and the screening of their potential to degrade industrial dyes. *J Fungi* 7: 805–822.
- Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 287–294.
- Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2005. Mn<sup>2+</sup> is dispensable for the production of active MnP2 by *Pleurotus ostreatus*. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 871–876.
- Knop D, Yarden O, Hadar Y. 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 1025–1038.
- Knop D, Levinson D, Makovitzki A, Agami A, Lerer E, Mimran A, Yarden O, Hadar Y. 2016. Limits of versatility of versatile Peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 82: 4070–4080.
- Kong W, Fu X, Wang L, Alhujaily A, Zhang J, Ma F, Zhang X, Yu H. 2017. A novel and efficient fungal delignification strategy based on versatile peroxidase for lignocellulose bioconversion. *Biotechnol Biofuels* 10: 218–233.
- Martinez AT. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* 30: 425–444.
- Mendez-Hernandez JE, Eibes G, Arca-Ramos A, Lu-Chau TA, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM. 2015. Continuous removal of nonylphenol by versatile peroxidase in a two-stage membrane bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 175: 3038–3047.
- Nakazawa T, Izuno A, Kodera R, Miyazaki Y, Sakamoto M, Isagi Y, and Honda Y. 2017. Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Environ Microbiol* 19: 261–272.
- Perez-Boada, M, Ruiz-Duenas, FJ, Pogni, R, Basosi, R, Choinowski, T, Martinez, MJ, Piontek, K, Martinez, AT. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J Mol Biol* 354: 385–402.
- Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Perez-Boada M, Martinez MJ, Martinez AT. 2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem Soc Trans* 29: 116–122.
- Saez-Jimenez V, Rencoret J, Rodriguez-Carvajal MA, Gutierrez A, Ruiz-Dueñas FJ, Martinez AT. 2016. Role of surface tryptophan for peroxidase oxidation of nonphenolic lignin. *Biotechnol Biofuels* 9: 198–211.
- Salame TM, Knop D, Tal D, Levinson D, Yarden O, Hadar Y. 2012. Predominance of a versatile-peroxidase-encoding gene, *mnp4*, as demonstrated by gene replacement via a gene targeting system for *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 78: 5341–5352.
- Salame TM, Knop D, Levinson D, Mabejesh SJ, Yarden O, Hadar Y. 2012. Release of *Pleurotus ostreatus* versatile-peroxidase from Mn<sup>2+</sup> repression enhances anthropogenic and natural substrate degradation. *PLoS ONE* 7: e52446.
- Sarkar S, Martinez AT, Martinez MJ. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem Biophys Acta* 1339: 23–30.
- Sellami K, Couvert A, Nasrallah N, Maachi R, Abouseoud M, Amrane A. 2022. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. *Sci total environ* 806: 150500–150518.
- Singh AK, Iqbal HMN, Cardullo N, Muccilli V, Fernandez-Lucas J, Schmidt JE, Jesionowski T, Bilal M. 2023. Structural insights, biocatalytic characteristics, and application prospects of lignin-modifying enzymes for sustainable biotechnology (review). *Int J Biol Macromol* 242: 124968–124996.
- Taboada-Puig R, Eibes G, Lloret L, Lu-Chau TA, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM. 2016. Fostering the action of versatile peroxidase as a highly efficient biocatalyst for the removal of endocrine disrupting compounds. *N Biotechnol* 33: 187–195.
- Tien M, Kirk TK. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661–663.
- Tsukihara T, Honda Y, Watanabe T, Watanabe T. 2006. Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP2. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 114–120.
- Wang X, Yao B, Su X. 2018. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification (review). *Int J Mol Sci* 19: 3373–3390.
- Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard MA. 2002. Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr Microbiol* 45: 77–87.
- Warishi H, Dunford HB, Macdonald ID, Gold MH. 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 264: 3335–3340.