

*Fomitella fraxinea*에 의한 Laccase의 대량생산

윤재돈 · 이종숙 · 이경아 · 정민욱 · 하효철¹ · 이재성*

영남대학교 식품가공학과, ¹(주)풀무원 식문화 연구원

Production of Laccase by *Fomitella fraxinea*

Jae Don Yoon, Jong Suk Lee, Kyung A Lee, Min Wook Chung, Hyo Cheol Ha¹ and Jae Sung Lee*

Dept. Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan, Korea

¹Institute of Food & Culture, Pulmuone Co. Ltd., Seoul 120-600, Korea

(Received November 7, 2003)

ABSTRACT: The production of laccase by *Fomitella fraxinea* was studied. The addition of minerals were necessary for laccase production by *Fomitella fraxinea*. Jar fermentor and Air-sparging fermentor performed high productivity in laccase activity by *F. fraxinea*. Laccase activity reached 3,540 in 8 days (Jar fermentor) and 3,100 in 6 days (Air-sparging fermentor) respectively.

KEYWORDS: Airlift fermentor, Balloon type bioreactor, *Fomitella fraxinea*, Jar fermentor, Laccase, Manganese peroxidase, Rotary draft tube fermentor

식물의 성분 중 리그닌은 분자 구조가 복잡하고, 여러 가지 C-C, C-O-C 결합으로 이루어진 phenylpropanoid로 분해가 어렵고, 이용에도 많은 제약이 있다. 이러한 난분해성 물질로 알려진 리그닌을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있는 것이 백색부후균이라 불리는 담자균이다.

지금까지 가장 많이 연구되어진 리그닌 분해균은 *Phanerochaete chrysosporium*으로 lignin peroxidase(LiP)와 manganese peroxidase(MnP)를 생산하는 것으로 알려져 있는데, lignin peroxidase 생산에 관한 연구가 특히 많이 있다. 리그닌 분해효소는 이차대사 산물로 알려져 있으며, 이차대사는 배지의 영양분이 고갈되었을 때 나타난다. Lignin peroxidase와 manganese peroxidase의 경우는 대개 질소제한 상태에서 생산되나(Kirk 등, 1981), laccase는 질소가 충분한 상태에서도 생산되는 특징이 있다(Garzillo and Colao, 1998). 많은 백색부후균이 리그닌 분해효소를 생산하지만 효소생산에 잘 알려진 균주로는 *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Trametes* sp. 등이 있으며, 백색부후균의 종에 따라 생산되는 리그닌 분해효소의 종류도 각각 다를 뿐만 아니라 생육환경 조건, 배지 조성 등에 따라 서로 각각의 효소활성에 차이가 나는 것으로 알려져 있다(Buswell 등, 1995; Ha, 2001; Mester and Tien, 2000; Tien and Kirk, 1983).

지금까지 리그닌 분해균이나 효소에 대한 연구는 바이오매스(리그노 셀룰로오즈)의 이용에 관심이 많았으나, 효

소의 비용이 높다는 장벽이 문제가 되어왔다. 본 논문은 바이오매스의 에너지원으로서의 활용이 아니라 리그닌 분해산물로부터 새로운 기능성 물질의 탐색에 초점을 맞춘 연구로 일차적으로 수행된 효소의 생산에 관한 실험결과를 보고한다. 균주선발과정에서 세가지 리그닌 분해효소(lignin peroxidase, laccase, manganese peroxidase)를 검정하였으며, 선발된 *F. fraxinea*를 이용하여 laccase 대량 생산 실험을 수행하였다.

실험재료 및 방법

사용 균주

리그닌 분해효소 고생산 균주의 선발을 위하여 80종의 담자균(Table 1)을 대상으로 실험을 실시하였다. 이들 균주를 25°C, potato dextrose agar(PDA)에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

균주 선발

먼저 80종의 담자균을 대상으로 리그닌 분해효소 생산 유무를 검정하였다. 즉, Kirk 등(1981)이 *P. chrysosporium*의 리그닌 분해효소 생산에 사용한 배지를 기본으로 Poly-R(0.1%)을 첨가하고 탄소원, 질소원의 농도를 달리하여(Table 2) 배양하면서 배양 5일, 10일, 15일째에 육안으로 배지의 탈색정도를 관찰하였다.

2차 선발은 1차 선발에서 배지의 탈색정도가 높은 균주를 선택하여 액체배양(stationary culture)을 하면서 2일

*Corresponding author <E-mail: jslee@yumail.ac.kr>

Table 1. Basidiomycetes for first screening

No	Scientific name	Korean name	Source	No	Scientific name	Korean name	Source
1	<i>Coriolus versicolor</i>	구름버섯	Gurum	41	<i>Grifola frondosa</i>	앞새버섯	Mai(white)
2	<i>C. versicolor</i>	구름버섯	Hingurum	42	<i>G. frondosa</i>	앞새버섯	Mai(black)
3	<i>C. versicolor</i>	구름버섯	KCCM11512	43	<i>Calvatia gigantea</i>	말장버섯속	ASI31004
4	<i>C. versicolor</i>	구름버섯	ASI16001	44	<i>C. craniiformis</i>	말장버섯	ASI31001
5	<i>C. versicolor</i>	구름버섯	ASI16000	45	<i>Lyophyllum ulmarium</i>	만가닥버섯	ASI8025
6	<i>Lentinus edodes</i>	표고버섯	Nonggi #3	46	<i>Rhizopogon rubescens</i>	알버섯	ASI62001
7	<i>L. edodes</i>	표고버섯	Nonggi #3po	47	<i>Hericium erinaceum</i>	노루궁둥이	ASI48001
8	<i>L. edodes</i>	표고버섯	ASI3046	48	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	-	KCTC6706
9	<i>Pleurotus ostreatus</i>	느타리버섯	Wonheung	49	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	조개버섯속	KCTC6356
10	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	Chunchu #1	50	<i>Phlebia radiata</i>	가는구름버섯속	KCTC6759
11	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	Chunchu #2	51	<i>Hypocrea lactea</i>	-	KCTC6518
12	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	PO9	52	<i>Wolfiporia extensa</i>	복령속	KCTC6663
13	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	PO24	53	<i>W. cocos</i>	복령	KCTC6480
14	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	PO26	54	<i>Phellinus igniarius</i>	상황버섯	PI26004
15	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	PO38	55	<i>P. igniarius</i>	상황버섯	ASI26005
16	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	PO42	56	<i>Phellinus linteus</i>	상황버섯	ASI26004
17	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-1	57	<i>P. linteus</i>	상황버섯	ASI26011
18	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-2	58	<i>Ganoderma lucidum</i>	영지버섯	3-1
19	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-3	59	<i>G. lucidum</i>	영지버섯	Ga
20	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-4	60	<i>Phanerochaete sordida</i>	-	KCTC6757
21	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-7	61	<i>Hypocrea citrinan var citrina</i>	-	KCTC6863
22	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	2-8	62	<i>Bondarzewia montana</i>	-	KCTC6715
23	<i>P. ostreatus</i>	느타리버섯	Ckennetary	63	<i>Peniophora quercina</i>	분홍겉질	KCTC6758
24	<i>P. florida</i>	사철느타리	ASI2016	64	<i>Merulius tremellosus</i>	아교버섯	KCTC6762
25	<i>P. sajor-caju</i>	사철	Sachel	65	<i>Oxyporus latemarginata</i>	흰살버섯속	KCTC6661
26	<i>Flammulina verutipes</i>	팽이버섯	Enokii	66	<i>Rigidoporus vincius</i>	-	KCTC6672
27	<i>F. verutipes</i>	팽이버섯	KCTC6367	67	<i>Lenzites betulina</i>	조개겉질버섯	KCTC6354
28	<i>F. verutipes</i>	팽이버섯	Enomii	68	<i>Laetiporus sulphureus</i>	덕다리버섯	KCTC6358
29	<i>Fomitella fraxina</i>	장수버섯	81001	69	<i>Clitocybe clavipes</i>	갈대기버섯속	KCTC6727
30	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	81002	70	<i>Inonotus obliquos</i>	차가버섯	ASI74006
31	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	81003	71	<i>I. obliquos</i>	차가버섯	ASI74009
32	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	ASI17004	72	<i>I. obliquos</i>	차가버섯	ASI74016
33	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	ASI17006	73	<i>Rhizopogon rubescens</i>	알버섯	ASI62001
34	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	ASI17007	74	<i>Boletopsis leucomelas</i>	흰굴뚝버섯	ASI91001
35	<i>F. fraxina</i>	팽이버섯	ASI17017	75	<i>Paecilomyces japonica</i>	동충하초	PJ
36	<i>Grifola frondosa</i>	앞새버섯	ASI9013	76	<i>Agricus blazei</i>	아기리쿠스	Agaricus
37	<i>G. frondosa</i>	앞새버섯	ASI9006	77	<i>Trametes versicolor</i>	송편버섯속	KCTC6714
38	<i>G. frondosa</i>	앞새버섯	ASI9019	78	<i>Pholiote nameko</i>	맛버섯	ASI5008
39	<i>G. frondosa</i>	앞새버섯	ASI9022	79	<i>Volvariella volvacea</i>	플버섯	ASI12001
40	<i>G. frondosa</i>	앞새버섯	ASI9034	80	<i>Agrocybe cylindracea</i>	버들송이버섯	AC-1

*KCTC; 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행 *ASI; 농업과학기술원.

Table 2. Composition of culture media for screening

Ingredient	Medium (g/l)			
	M1	M2	M3	M4
Glucose	20	20	20	
Yeast ext.		0.2	0.2	
Bacto-peptone	5			
Ammonium tartrate		0.22	5.53	
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	
MnSO ₄ · 6H ₂ O	0.12	0.12	0.12	
0.4 N Na-phthlate		50 ml		
Kirt's salt ^a		10 ml		
PDB				24

^aKirk's salt: MgSO₄ 3 g, MnSO₄ 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CoCl₂ 0.1 g, ZnSO₄ 0.1 g, CuSO₄ 0.1 g, Al₄(SO₄)₂ · 12H₂O 10 mg, H₃BO₃ 10 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 10 mg, Nitritotriacetate 1.5 g, Distilled water 1 l.

간격으로 시료를 채취하여 리그닌 분해효소를 측정하고 효소활성이 높은 균주를 선발하였다.

효소생산 실험

선별된 장수버섯 균주를 PDA에서 배양하였다. 먼저, 300 ml flask에 일정량의 배지를 넣어 고압 멸균후 장수버섯 균사체 colony를 5개씩 접종하여 정치배양한 후 이것을 접종원으로 사용하였다. 선별된 균주의 효소생산성을 검증하기 위하여 300 ml 플라스크에 배지를 100 ml씩 분주하여 121°C, 15분간 고압멸균 후, 배지조성(Table 3)과 배양방법(정치배양, 진탕배양; 120 rpm)을 달리하여 실험하였다. 배양중 2일 간격으로 배양액을 채취하여 효소활성 측정, 세포의 단백질정량, 총 당함량 그리고 최종 건조 균체량을 측정하였다. 단백질정량은 Bradford법(1976)에

Table 3. Composition of culture medium for *Fomitella fraxinea* (g/l)

	Glucose	Malt ext.	Yeast ext.	Minerals
Medium I	10	10	6	-
Medium II	10	10	6	addition ^a
Medium III	10	10	6	Cu 1 mM
Medium IV	10	10	6	Mn 1 mM

^aKH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, FeSO₄·7H₂O 10 mg, MnCl₂·4H₂O 7 mg, ZnSO₄·7H₂O 4 mg, CuSO₄·5H₂O 1 mg.

의하여, UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 Bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다. Glucose 함량은 당분석기(YSI, 2700-D Biochem.)를 사용하여 측정하였다.

효소의 대량생산

리그닌 분해효소의 대량생산을 위해 10 l jar fermentor (MDL BEM, Marubish Co.), 10 l 풍선형 배양기(Balloon type air bubble bioreactor; Lee 등, 2002) 그리고 13 l 폭기의존형 배양기(Air-sparging fermentor)를 이용하여 효소의 대량 생산실험을 하였다.

효소활성 측정

Laccase 활성은 *o*-phenylenediamine을 기질로 하여 활성 농도는 1분간 반응 후 생성되는 반응 생성물질의 흡광도를 440 nm에서 측정하여 표시하였다(Kofujita 등, 1991). Lignin peroxidase 활성은 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol 이 veratryl aldehyde로 산화하는 것을 310 nm에서의 흡광도로 나타내었다(Tien and Kirk 1984). Manganese peroxidase활성은 Kofujita 등(1991)의 방법으로 확인하였는데 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 농도를 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 모든 효소의 활성측정은 배양중인 플라스크 3개를 선발하여 활성의 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주 선발

담자균을 사용하여 배지의 탈색정도를 조사한 1차 선발 (Table 4)에서 리그닌 분해효소 생산이 높다고 생각되는 10여종의 균주를 선발하여 2차 실험을 실시하였다. Manganese peroxidase는 *P. ostreatus*(PO42), lignin peroxidase는 *P. igniarius*(ASI26005), laccase는 *F. fraxinea* (ASI17017)에서 가장 높은 활성이 나타났다. 다른 균에

Table 4. First screening of Basidiomycetes strains producing ligninolytic enzyme by POLY-R decolorization (M2 medium)

Capability	Strains
Strong	<i>Coriolus versicolor</i> (Gurum), <i>Coriolus versicolor</i> (KCCM16001), <i>Lentinus edodes</i> (Nonggi #3), <i>Pleurotus ostreatus</i> (Chunchu #1), <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO24), <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO26), <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO42), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-1), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-4), <i>Fomitella fraxinea</i> (ASI17006), <i>Fomitella fraxinea</i> (ASI17017), <i>Rhizopogon rubescens</i> (ASI62001), <i>Phlebia radiata</i> (KCTC6759), <i>Phellinus igniarius</i> (PI26004), <i>Phellinus igniarius</i> (ASI26005), <i>Phellinus linteus</i> (ASI26004), <i>Phellinus linteus</i> (ASI26011), <i>Phanerochaete sordida</i> (KCTC6757), <i>Oxyporus latemarginata</i> (KCTC6661), <i>Lenzites betulina</i> (KCTC6354), <i>Trametes versicolor</i> (KCTC6714)
Medium	<i>Coriolus versicolor</i> (Hingurum), <i>Coriolus versicolor</i> (KCCM11512), <i>Coriolus versicolor</i> (ASI16000), <i>Lentinus edodes</i> (Nonggi #3pogo), <i>Pleurotus ostreatus</i> (Wonheung), <i>Pleurotus ostreatus</i> (Chunchu #2), <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO9), <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO38), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-2), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-3), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-8), <i>Pleurotus ostreatus</i> (Chenitary), <i>Pleurotus florida</i> (ASI2016), <i>P. sajor-caju</i> (Sachel), <i>Fomitella fraxinea</i> (81002), <i>Fomitella fraxinea</i> (81003), <i>Fomitella fraxinea</i> (ASI17004), <i>Fomitella fraxinea</i> (ASI17007), <i>Grifola frondosa</i> (ASI9006), <i>Grifola frondosa</i> (ASI9013), <i>Grifola frondosa</i> (ASI9019), <i>Grifola frondosa</i> (ASI9022), <i>Grifola frondosa</i> (ASI9034), <i>Grifola frondosa</i> (Mai(white)), <i>Grifola frondosa</i> (Mai(black)), <i>Calvatia craniiformis</i> (ASI31001), <i>Ganoderma lucidum</i> (Ga), <i>Inonotus obliquus</i> (ASI74006), <i>Inonotus obliquus</i> (ASI74009), <i>Inonotus obliquus</i> (ASI74016), <i>Boletopsis leucomelas</i> (ASI91001), <i>Pholiote nameko</i> (ASI5008)
Weak	<i>Lentinus edodes</i> (ASI3046), <i>Pleurotus ostreatus</i> (2-7), <i>Flammulina verutipes</i> (Enokii), <i>Flammulina verutipes</i> (KCTC6367), <i>Flammulina verutipes</i> (Enomii), <i>Fomitella fraxinea</i> (81001), <i>Calvatia gigantea</i> (ASI31004), <i>Lycophyllum ulmarium</i> (ASI8025), <i>Hericium erinaceum</i> (ASI48001), <i>Phlebiopsis gigantea</i> (KCTC6706), <i>Gloeophyllum abietinum</i> (KCTC6356), <i>Hypocrea lactea</i> (KCTC6518), <i>Wolfiporia extensa</i> (KCTC6663), <i>Wolfiporia cocos</i> (KCTC6480), <i>Ganoderma lucidum</i> (3-1), <i>Hypocrea citrinan</i> var <i>citrina</i> (KCTC6863), <i>Bondarzewia montana</i> (KCTC6715), <i>Peniophora quercina</i> (KCTC6758), <i>Merulius tremellosus</i> (KCTC6762), <i>Rigidoporus vinctus</i> (KCTC6672), <i>Lenzites betulina</i> (KCTC6358), <i>Clitocybe clavipes</i> (KCTC6727), <i>Rhizopogon rubescens</i> (ASI62001), <i>Paecilomyces japonica</i> (PJ), <i>Agricus blazei</i> (Agaricus), <i>Volvariella volvacea</i> (ASI12001), <i>Agrocybe cylindracea</i> (AC-1)

*Strong : decolorization zone >3 cm in 10 days, Medium : decolorization zone of 1~3 cm in 10 days, Weak : decolorization zone <1 cm in 10 days.

Table 5. Second screening of Basidiomycetes for ligninolytic enzyme (M2 medium)

Basidiomycetes	Mnp (U/ml)	Laccase (U/ml)	Lip (U/ml)
Gurum	0.05 (12)	0.2 (12)	-
Nonggi #3	-	0.3 (20)	-
Chunchu #1	-	<0.1	-
ASII7017	-	1.4 (20)	-
PO26 ^a	0.1 (16)	0.5 (20)	-
PO42 ^a	1.1 (14)	0.7 (10)	-
KCTC6757	-	0.2 (20)	-
KCTC6759	-	-	-
ASII6001	0.6 (20)	0.3 (20)	-
KCTC6714	-	0.5 (20)	-
ASII26005	-	-	1.8 (16)

^aobtained from Ha (2001), -, not detected, () shows the incubation days.

비해 월등히 높은 laccase 활성이 나타난 *F. fraxinea* (ASII7017)를 이용하여 laccase의 생산에 관한 연구를 실시하였다. 우선 균사체 성장을 기준으로 탄소원, 질소원을 선택한 후, 무기염류(Kim 등, 1992)를 선별적으로 첨가하면서 효소활성이 높은 배지 조성을 확립하였다.

효소 활성

배지조성과 배양방법에 따라 리그닌 분해효소의 생산량과 생산량은 큰 차이를 나타내었다. 먼저 glucose, malt extract, yeast extract만 사용된 배지(Medium I)에서는 manganese peroxidase가 생성되었고(Fig. 1), Cu 등 다수의 무기염류가 포함된 배지(Medium II)에서는 laccase만 생산되었으나(Fig. 2) 두 종류의 배지 모두에서 균사의 생장은 좋았다. 즉, 무기질의 첨가유무에 따라 생산되는 효소가 달랐다. Jeffries 등(1981)은 Ca, Mg이나 미량원소들도 리그닌분해에 중요한 역할을 미친다고 보고하고 있는데, 본 실험의 결과 laccase의 생산에는 Cu가 가장 큰 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

배양방법에 따른 리그닌 분해효소의 활성을 측정한 결과 배양 6일째부터 조금씩 생산되기 시작하여 배지의 영양소모가 가장 많은 12~16일에 효소의 생산량이 급격히 증가하여 18일에는 5.43 U/ml, 20일째에 5.56 U/ml로 최대활성을 나타내었다(Fig. 2). 이것은 질소충분 배지에서 균체의 성장이 증가하면 laccase의 생산량도 증가한다(Garzillo and Colao, 1998; Ryu, 2001)는 보고와 일치하였다. 또, laccase생성의 대표로 알려진 균주인 *Lentinus*

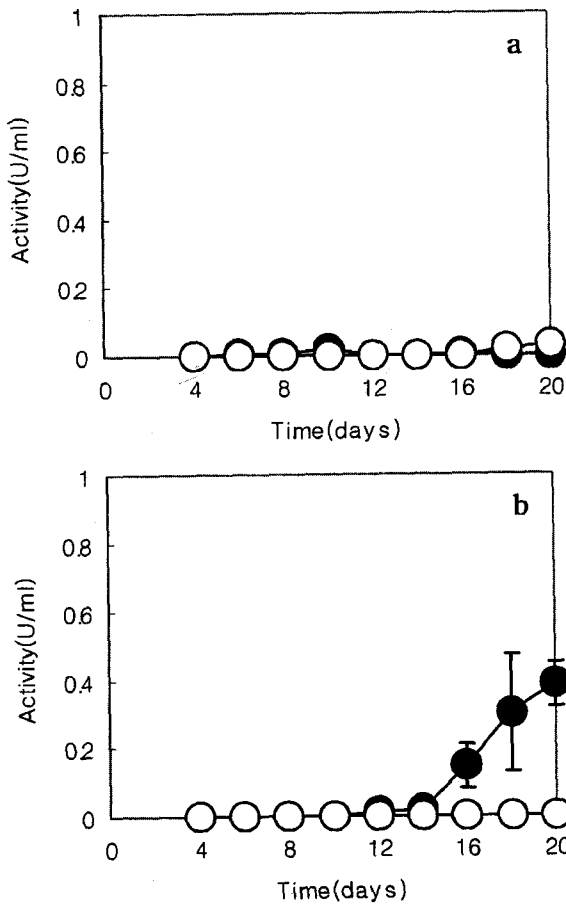


Fig. 1. Time course of manganese peroxidase by *F. fraxinea* 17017. a : stationary culture, b: shaking culture, ● : Medium I, ○ : Medium II.

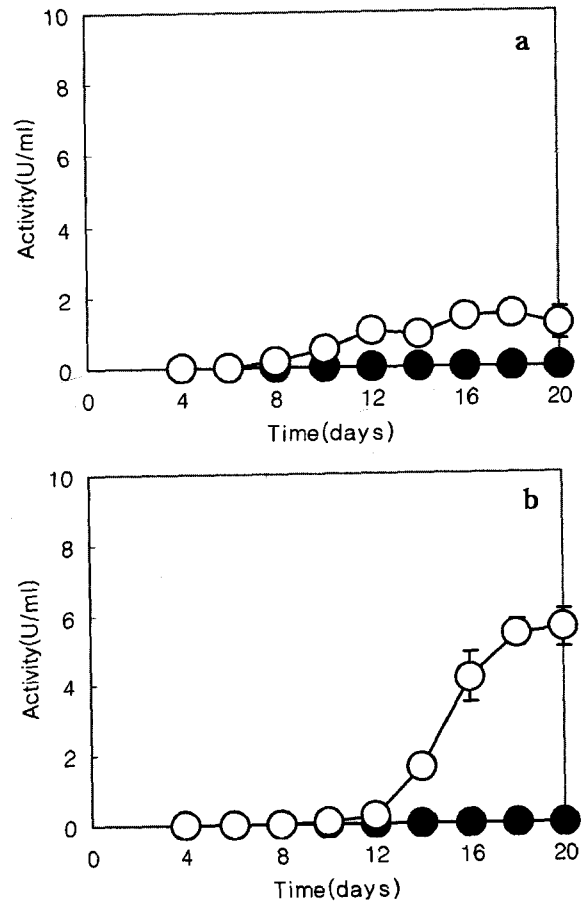


Fig. 2. Time course of laccase by *F. fraxinea* 17017. a : stationary culture, b: shaking culture, ● : Medium I, ○ : Medium II.

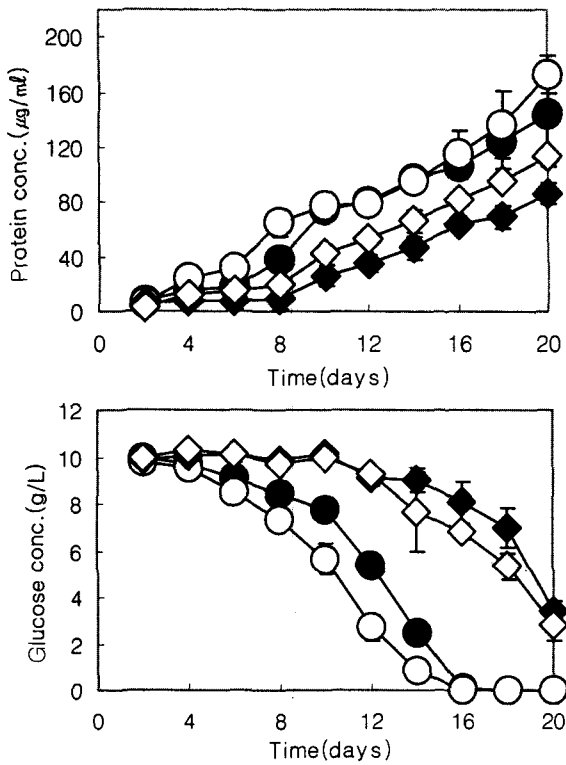


Fig. 3. Profiles of glucose concentration and protein concentration by *F. fraxinea* 17017. ● : Medium I (shaking culture), ○ : Medium II (shaking culture) ◆ : Medium I (stationary culture), ◇ : Medium II (stationary culture).

edodes, *Pleurotus* sp. 등과 비교하여도 손색없는 결과이다(Hatvani and Mece, 2001; Choi, 1993).

효소의 대량생산

Jar fermentor, balloon type bioreactor 그리고 air-sparging fermentor의 세가지 배양기로 효소의 대량생산을 조사하였다(Table 6). Jar fermentor에서는 배양 8일째 (3,540 U/l)에 최고의 활성을 나타내었다. Air-sparging fermentor에서는 배양 6일째에 3,100 U/l로 최대의 활성이 나타났다. 반면에 이것과 배양방법이 비슷한 balloon type bioreactor에서는 활성이 나타나지 않았다. Ha(2001)는 manganese peroxidase의 생산과정에서 배양액의 교반에 의한 전단력이 효소활성에 절대적인 부정적 효과를 나타내기 때문에 전단력을 가장 낮게 유지하면서 교반효과를 낼 수 있는 rotary draft tube fermentor를 개발하였다. Balloon type bioreactor는 균사생장이 느린 *Tricholoma*

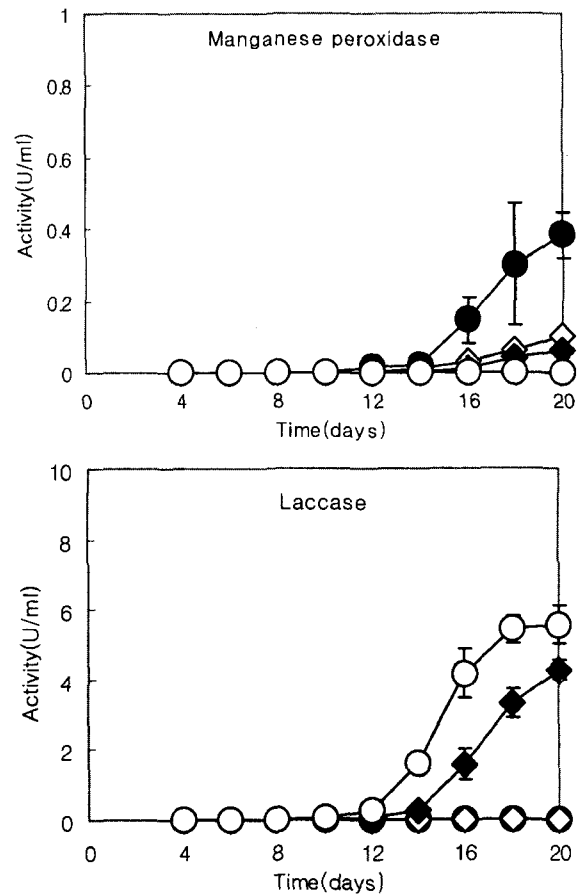


Fig. 4. Time course of lignolytic enzyme by *F. fraxinea* 17017. ● : Medium I, ○ : Medium II, ◆ : Medium III, ◇ : Medium IV.

*matsutake*의 균사배양에 탁월한 효과를 보였고(Lee 등, 2002), 전단력이 가장 낮은 생물반응기이므로 laccase생산에 활용하였으나 효소활성이 나타나지 않았다. 오히려 전단력이 상당히 높은 air-sparging fermentor에서 활성이 높게 나타나서 manganese peroxidase와는 생산조건이 많이 다른 것으로 확인되었다. 이 결과는 균사체의 생산량이 증가하면 laccase의 생산량도 증가한다는 보고(Ryu, 2001)와는 일치하지 않았다. Air-sparging fermentor는 아래쪽에서 고압으로 폭기 함으로써 산소공급과 동시에 교반을 하는 구조인데 균사체의 성장속도도 빠르고 laccase의 생산성도 높아서 scale up하여 대량생산에 활용될 가능성이 가장 높은 bioreactor라고 생각된다. Rancano 등(2003)도 여기서 말하는 air-sparging fermentor보다는 폭기정도가 낮은 airlift fermentor를 사용하여 laccase생산에

Table 6. Laccase activity according to culture condition

	Culture condition	Activity (day)	Dry weight (g/l)
Jar fermentor	25°C, 120 rpm, 0.8 vvm	3540 U/L(8)	12.8
Balloon type bioreactor	25°C, 0.8 vvm	0 U/l	11.9
Air-sparging fermentor	25°C, 1.2 vvm	3100 U/l(6)	13.5

성공한 보고를 하고 있다.

적 요

담자균류 80여종에서 laccase 고생산 균주(*Fomitella fraxinea*; 장수버섯)를 선발하고, *F. fraxinea*를 이용한 리그닌 분해효소의 생산 및 효소의 대량생산 조건을 검토하였다. 먼저 배지 구성에 따른 생산성을 조사한 결과 Cu 등의 무기물의 첨가 유무에 따라 생산되는 효소가 달랐다. 무기물이 첨가되지 않은 배지(Medium I)에서는 manganese peroxidase가 생산되었고, 무기물이 첨가된 배지(Medium II)에서는 laccase가 생산되었는데 플라스크 배양 18일째에는 5.43 U/ml, 20일째에는 5.56 U/ml의 효소활성이 나타났다. 배양방법에서 영양이 충분한 조건에서는 정치배양보다는 진탕배양(120 rpm)에서 효소의 활성이 높았다. 이 균주를 이용한 laccase 대량생산 실험에는 jar fermentor, balloon type bioreactor, air-sparging fermentor를 이용하였다. laccase는 jar fermentor와 air-sparging fermentor에서 3,540 U/ml(8일), 3,100 U/ml(6일)의 생산성을 나타내었다. Balloon type bioreactor는 균사의 생장은 좋았지만 효소는 생산되지 않았다. *F. fraxinea*를 사용하여 air-sparging fermentor로 scale up하여 laccase의 대량생산을 할 수 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 사업의 일환으로 수행된 연구결과의 일부로 농촌진흥청의 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Buswell, J. A., Cai, Y. and Chang, S. T. 1995. Effect of nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinus edodes*. *FEMS Microbiology Letter* **128**: 81-88.
- Choi, D. H. 1993. The degradation of lignin by laccase from *Pleurotus cornucopia* (Pers.) Rolland. Ph. D. Thesis. Seoul National University.
- Garzillo, A. M. V. and Colao, M. C. 1998. Laccase from the white rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **49**: 545-551.
- Ha, H. C. 2001. Production of ligninolytic enzymes by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Ph. D. Thesis. Kyoto University, Japan.
- Hatvani, N. and Mecs, I. 2001. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochemistry* **37**: 491-496.
- Jeffries, T. W., Choi, S. and Kirk, T. K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerocheate chrysosporium*. *Apple. Environ. Microbiol.* **42**: 290-296.
- Kim, B. K., Kwun, J. Y. and Park, Y. I. 1992. Antitumor components of the cultured mycelia of *Calvatia craniformis*. *J. Kor. Cancer Association* **24**: 1-18.
- Kirk, T. K., Higuchi, T. and Chang, H. M. 1981. Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications. CRC press Inc. Florida, USA. pp. 51-63.
- Kofujita, H., Asad, 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.
- Lee, W. Y., Ahn, K. A., Kwon, O. W., Ka, K. H. and Kwon, Y. J. 2002. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium by balloon type air bubble bioreactor. *J. Korean For. Soc.* **91**: 260-267.
- Mester, T. and Tien, M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**: 51-59.
- Rancano, G., Lorenzo, M., Molares, N., Couto, S. R. and Sanroman, M. A. 2003. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry* **100**: 1-7.
- Ryu, W. Y. 2001. A study on production of ligninases by white rot fungi and biodegradation of xenobiotics. Ph. D. Thesis. Yeungnam University.
- Tien, M. and Kirk, T. K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerocheate chrysosporium* burds. *Science* **221**: 661-663.
- _____ and _____. 1984. Lignin degrading enzyme from *Phanerocheate chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2280-2284.