

## Optimizing Culture Conditions to Maximize the Production of Laccase from *Pholiota highlandensis*

Hye-Ju Choi<sup>1</sup>, Soo-Jung Moon<sup>1</sup> and Sung-Jong Jeon<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Smart-Biohealth, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received February 24, 2015 / Revised June 4, 2015 / Accepted June 9, 2015

The culture conditions needed to maximize the production of laccase from *Pholiota highlandensis* mycelia were investigated. Among the tested media for laccase production, *Coriolus versicolor* medium (CVM; 2% dextrose, 0.4% peptone, 0.6% yeast extract, 0.046% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) showed the highest activity for the enzyme. Then, to optimize culture conditions for laccase activity, the influences of various carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic salt sources in CVM were investigated. The optimum culture medium was 2% fructose, 0.4% peptone with 0.6% yeast extract, 0.05% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O as carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic salt sources, respectively. Several aromatic compounds in the medium enhanced laccase activity to varying degrees. Guaiacol induced maximum laccase production, yielding 114.1 U/ml laccase activity after cultivation for 11 days at 25°C. The optimum pH and temperature for laccase production were 8.0 and 35°C, respectively. Native polyacrylamide-gel electrophoresis (PAGE) followed by laccase-activity staining with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as the substrate was performed to identify the presence of laccase under the optimum conditions studied. Zymogram analysis of the supernatant culture showed an enzymatic band with a molecular mass of about 90 kDa.

**Key words :** Laccase, lignin, ligninolytic enzyme, *Pholiota highlandensis*, polyphenol oxidase

### 서 론

Laccase는 구리를 함유하는 multi-copper blue oxidase의 일종으로 monophenols, polyphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic amines, lignin을 포함하는 많은 폐활화합물을 산화시키고 산소분자의 환원과 물 분자의 방출을 동반하는 반응을 촉매 한다[19]. 이 효소는 다양한 기질 특이성 뿐만 아니라 폭넓은 효소 반응성 때문에 염료 탈색[5], 펄프 표백[25], 생물학적 환경 정화[23], 폴리머 합성[14], 바이오센서[28] 및 바이오 연료전지[38] 등의 여러 분야에서 활용되고 있다. Laccase는 고등식물, 곤충, 세균, 균류(fungi) 등에서 공통적으로 발견되고, 주된 생산자는 백색부-후균으로 알려진 리그닌 분해 균류이다[5]. 균류의 laccase생산에 있어 가장 큰 단점은 제한된 성장 조건 하에서 효소의 생산량이 한정되어 있고[22], 단백질 변역 후 수식과정으로 인하여 이종 생물에서 효율적인 활성형의 발현이 어렵다는 점이다[15]. 따라서

균류의 배양조건을 조절하여 laccase의 생산성을 향상시키기 위한 연구가 주목을 받고 있다[33]. 균류의 laccase 생산은 배지 조성, 탄소원 및 질소원 비율, pH, 온도, 산소량과 같은 다양한 배양 조건에 영향을 받는다[2]. 또한 laccase 유전자의 전사(transcription) 수준은 배지 속의 금속이온[12], 폐활 및 방향족 화합물[32], 탄소원[31] 및 질소원[6]의 종류에 따라 조절되고 효소 생산량이 크게 증가할 수 있다.

버섯은 자실체로부터 항암, 면역증강, 항균 및 혈압 상승 억제 등의 효능이 밝혀져 식품 및 의약품으로 이용되고 있으며[17], 자연생태계의 물질순환과정에서 생성되는 다양한 부산물을 분해하는 기능이 있어 산업적인 활용에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[24]. 재비늘버섯(*Pholiota highlandensis*)은 주름버섯목 독청버섯과 비늘버섯속으로 봄부터 가을 사이에 불 피웠던 장소 또는 불에 탄 나무주위에 무리져 발생하며, 한국, 일본, 유럽 및 북반구 온대에 분포한다. 재비늘버섯에 대해서는 기능성 버섯 개발을 목적으로 버섯의 phytosterol 함량[4]과 균사체 배양액의 항산화 활성[16]에 대하여 연구된 바 있으나, 그밖의 다른 특성에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 재비늘버섯으로부터 리그닌 분해활성을 확인하고, 리그닌 분해효소인 laccase의 분비 생산성을 향상시키기 위하여 최적 배양조건을 조사하였으며, 활성염색을 통하여 laccase의 존재 유무를 확인하였다.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2278, Fax : +82-505-182-6897

E-mail : jeon.sj@deu.ac.kr

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.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에서 사용한 *P. highlandensis*는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터에서 분양 받아 사용하였고, 보관용 배지는 potato dextrose agar (PDA) 사면배지를 사용하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였다. 본 균주의 리그닌 분해능을 조사하기 위하여 0.2% lignin (Sigma-Aldrich) 및 0.1% guaiacol (Sigma-Aldrich)을 첨가한 PDA 배지에 균주를 접종하고 25°C에서 22일 동안 배양시킨 후 형성된 갈색환을 확인하였다.

### 배양 조건

*P. highlandensis* 균사체로부터 laccase의 최적 생산을 위한 배지조성을 조사하기 위해 *Coriolus versicolor* medium (CVM), *Czapex dox* medium (CDM), *Lentinus edodes* medium (LEM), mushroom complete medium (MCM), malt yeast glucose medium (MYGM), yeast malt extract medium (YM), laccase production medium (LPM) 및 YpSs medium (YSM)을 사용하였으며, 각 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. *P. highlandensis*를 PDA 평판배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 한천배지 상의 균사를 직경 5 mm의 cork borer로 punching하여 얻은 균사 disk를 각각의 액체배지 100 ml에 접종하여 25°C에서 18일간 120 rpm으로 진탕배양 하였다.

### 효소활성측정

Laccase의 효소활성은 ullrich 등[35]의 방법을 인용하여 측정하였다. *P. highlandensis* 배양액을 Whatman No. 1 filter

paper을 사용하여 여과하고 원심분리(10,000 × g, 10분)를 통하여 균체를 완전히 제거한 후 상동액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. Laccase 활성은 50 mM sodium acetate buffer (pH 3.4)에서 2 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)을 기질로 사용하여 50°C에서 5분간 효소와 반응시켰으며, ABTS의 산화에 의해 생성된 산화물은 420 nm ( $\epsilon=36,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )에서 측정하였다. 효소활성의 단위는 분당 1 μM의 기질을 산화시키는 효소의 양을 1 unit (U)로 정의하였다.

### 활성 염색

배양액 중에 생산된 laccase의 존재유무를 알아보기 위하여 조효소액을 10% Native-PAGE를 사용하여 비변성 조건에서 전기영동한 후 활성염색법을 수행하였다. 전기영동한 겔은 0.5 M citrate buffer (pH 3.4)에서 30분간 방치한 후 새로운 buffer로 교환하는 과정을 3회 반복하였다. 이후에 전기영동 겔은 0.5 M citrate buffer (pH 3.4)에서 조제한 2 mM ABTS 용액과 50°C에서 5분간 반응시키고 생성되는 단백질 band를 확인하였다[27].

## 결과 및 고찰

### 리그닌 분해능 확인

본 실험에 사용된 *P. highlandensis*의 균사체에 대한 리그닌 분해능을 확인하기 위하여 리그닌이 첨가된 PDA 배지상에서 균사체를 배양하면서 형성되는 갈색환의 유무를 확인하였다. 그 결과 갈색환의 크기는 배양 시간 별로 각각 16일째 2 cm, 22일째 5 cm를 형성하여 *P. highlandensis*는 리그닌을 분해하

Table 1. Composition of various media used for cultivation of *P. highlandensis* mycelia and laccase activity in the various media

Component and laccase activity	Media (g/100 ml)							
	CVM <sup>a</sup>	CDM <sup>b</sup>	LEM <sup>c</sup>	MCM <sup>d</sup>	MYGM <sup>e</sup>	YM <sup>f</sup>	LPM <sup>g</sup>	YSM <sup>h</sup>
Dextrose	2.0		2.0	2.0	0.4	1.0	1.0	2.0
Sucrose		0.3						
Starch			2.0					
Peptone	0.4			0.2		0.5		0.5
Malt extract					1.0	0.3		
Yeast extract	0.6		0.6	0.2	0.4	0.3	0.5	0.2
NaNO <sub>3</sub>		0.3						
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.046			0.046	0.05		0.2	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	0.1	0.1					
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	0.05	0.05			0.05	0.05
KCl		0.05					0.05	
CaCl <sub>2</sub>							0.01	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.001						
Urea							0.5	
Laccase activity (U/ml) <sup>i</sup>	82.0	17.0	52.5	44.8	51.5	51.9	35.8	10.4

<sup>a</sup>CVM (*Coriolus versicolor* medium), <sup>b</sup>CDM(*Czapex dox* medium), <sup>c</sup>LEM (*Lentinus edodes* medium) <sup>d</sup>MCM (mushroom complete medium), <sup>e</sup>MYGM (malt yeast glucose medium), <sup>f</sup>YM (yeast malt extract medium), <sup>g</sup>LPM (laccase production medium), <sup>h</sup>YSM (YpSs medium). <sup>i</sup>All values are means ± SE.

는 것으로 나타났고, 배양시간이 경과함에 따라 리그닌 분해 활성이 증가하는 것으로 확인 되었다(Fig. 1).

### 배지의 영향

*P. highlandensis* 균사체로부터 리그닌 분해에 관여하는 laccase를 생산하기 위하여 Table 1에 나타낸 여러 종류의 복합 배지를 사용하여 최적 배지 조건을 조사하였다. 각각의 배지 조건에서 25°C로 15일간 균사체를 배양한 후 배양 상등액의 laccase 활성을 조사한 결과, CVM을 사용하여 배양하였을 때 82.0 U/ml로 가장 높은 laccase 활성을 나타내었다(Table 1).

### 탄소원의 영향

효소 생산을 위한 탄소원의 효과를 알아 보기 위하여 복합 배지 중에서 최대 활성을 나타낸 CVM의 조성으로부터 dextrose를 제거하고 각 종류별 탄소원을 각각 2%씩 첨가하여

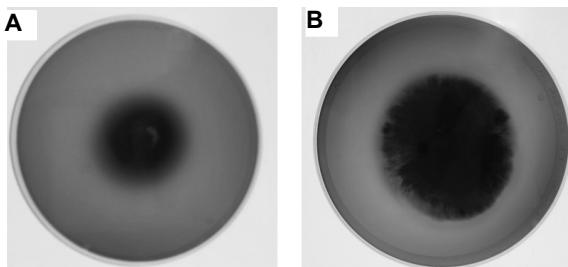


Fig. 1. Activity of lignin degradation by *P. highlandensis*. Mycelia of *P. highlandensis* were cultivated on PDA agar medium containing 0.2% lignin and 0.1% guaiacol. (A) Brown color zone after 16 day of cultivation (diameter 20 mm). (B) Brown color zone after 22 day of cultivation (diameter 50 mm).

Table 2. Effect of carbon sources on the laccase production from *P. highlandensis* mycelia

Carbon source (2%)	Activity (U/ml)
Control <sup>a</sup>	0.0
CVM <sup>b</sup>	82.0
Fructose	95.0
Galactose	89.2
Mannose	85.6
Xylose	62.5
Maltose	78.1
Sucrose	66.6
Lactose	32.2
Celllobiose	48.6
Starch	17.6
Cellulose	17.2
Mannitol	85.7
Glycerol	94.1

<sup>a</sup>The CVM without carbon source, <sup>b</sup>*Coriolus versicolor* medium. All values are means ± SE.

균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 fructose 가 탄소원으로 첨가되었을 때 효소 활성이 가장 우수하였고, 원 성분인 dextrose와 비교하여 약 1.15배 정도 효소 활성이 증가하였다(Table 2). *Trametes hirsute*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sajor-caju* 및 *Agaricus heterocystis*의 경우, laccase를 생산하기 위한 탄소원 중에서 fructose가 가장 우수한 효과를 나타낸다고 보고된 바 있어, 본 연구의 결과와 일치하였다[3, 7, 9, 20]. 반면에 *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* 및 *Pycnoporus cinnabarinus* 유래 laccase들은 dextrose에서 배양할 때 최대 활성을 나타낸다고 보고되었고[18, 21, 26], *Peniophora* sp. 및 *Cynodon dactylon* 유래 laccase는 maltose에서 최대활성을 나타내는 것으로 보고되었다[30, 37]. 이와 같이 laccase 생산을 위한 최적 탄소원은 곰팡이의 종류에 따라 제각기 다른 성향을 나타내는 것으로 추정되었다.

### 질소원의 영향

효소 생산을 위한 질소원의 효과를 알아 보기 위하여 최대 활성을 나타낸 CVM의 조성으로부터 혼합질소원(0.4% peptone, 0.6% yeast extract)을 제거한 후 각 종류별 질소원을 각각 0.4%씩 첨가하여 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 CVM 조성인 혼합 질소원을 첨가하였을 때 효소활성이 가장 높았고, 다른 질소원을 첨가한 경우에는 효소활성이 매우 감소하였다(Table 3). 지금까지 보고된 바에 의하면, *botryosphaeria* sp. [36], *T. versicolor* [21], *Peniophora* sp. [30], *C. dactylon* [37], *T. hirsute* [7] 및 *P. sajor-caju* [3] 유래 laccase들은 각각 yeast extract, peptone, tryptone, ammonium tartrate, ammonium sulfate 및 casein과 같이 제각기 다른 질소원에서 최대활성을 나타내었다. 이와 같이 laccase 생산을 위한 최적 질소원은 탄소원과 마찬가지로 곰팡이의 종류에 따라 제각기 다른 성향을 나타내었다.

### 인산원 및 무기염의 영향

각 종류별 인산원 및 무기염이 *P. highlandensis*의 laccase

Table 3. Effect of nitrogen sources on the laccase production from *P. highlandensis* mycelia

Nitrogen source (0.4%)	Activity (U/ml)
Control <sup>a</sup>	0.0
CVM <sup>b</sup>	82.0
Sodium nitrate	12.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	21.1
Peptone	15.6
Malt extract	13.0
Tryptone	15.8
Yeast extract	25.6

<sup>a</sup>The CVM without nitrogen source, <sup>b</sup>*Coriolus versicolor* medium. All values are means ± SE.

생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CVM의 인산원 및  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 을 각각 제거하고 각 종류별 인산원과 무기염을 각각 0.05%씩 첨가하여 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 인산원은  $NaH_2PO_4$ 가 첨가되었을 때 효소활성이 가장 우수하였고(Table 4), 이것은 *Fomitopsis pinicola* 유래 laccase에 대해서 보고된 것과 동일한 결과를 나타내었다[27]. 지금까지 보고된 많은 곰팡이들(*Trametes versicolor* [6], *Ceriporiopsis subvermispora* [1], *Coriolopsis rigida* [29]은 구리이온에 의해 laccase 유전자의 전사수준이 조절되어 효소 생산량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 *P. highlandensis*의 laccase 생산량은 구리 존재 유무에 따라 크게 영향을 받지 않았고 무기염은  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 존재할 때 가장 높은 효소 생산량을 나타내었다(Table 4).

#### 방향족 화합물의 영향

리그닌 및 리그닌 유도체와 구조적으로 연관된 폐놀과 방향족 화합물들은 곰팡이 배양 시에 첨가할 경우 laccase 생산량이 증가하는 것으로 알려져 있다[8]. 앞서 결과에 따라 *P. highlandensis* 균사체의 laccase 생산을 위한 최적 배지조성은 2% fructose, 0.4% peptone, 0.6% yeast extract, 0.05%  $NaH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 결정하였다. 이 배지 조건에서 다양한 방향족 화합물들(2,5-dimethyl aniline, 4-hydroxybenzoic acid, guaiacol, gallic acid, humic acid, lignin)을 laccase 생산을 위한 유도인자로 첨가하고 균사체를 배양하면서 시간대별로 효소활성을 측정하였다. 그 결과 guaiacol과 2,5-dimethyl aniline을 유도인자로 첨가할 경우 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었고, guaiacol의 경우 배양 후 11일째에 114.1 U/ml의 최대 효소 생산량을 나타내었다(Fig. 2). Guaiacol은 *Daedalea flava* [2], *Marasmius* spp. [11], *Pleurotus ostreatus* [13]에서 laccase 생산을 위한 유도인자로 보고 된 바 있다. 곰

Table 4. Effect of phosphorus sources and inorganic salts on the laccase production from *P. highlandensis* mycelia

Phosphorus source (0.05%)	Activity (U/ml)
CVM <sup>a</sup>	82.0
Control <sup>b</sup>	70.7
$NaH_2PO_4$	94.9
$Na_2HPO_4$	79.9
$K_2HPO_4$	71.4
Inorganic source (0.05%)	Activity (U/ml)
CVM <sup>a</sup>	82.0
Control <sup>c</sup>	70.2
NaCl	74.5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	76.4
KCl	71.3

<sup>a</sup>*Coriolus versicolor* medium, <sup>b</sup>The CVM without phosphorus source, <sup>c</sup>The CVM without inorganic source. All values are means  $\pm$  SE.

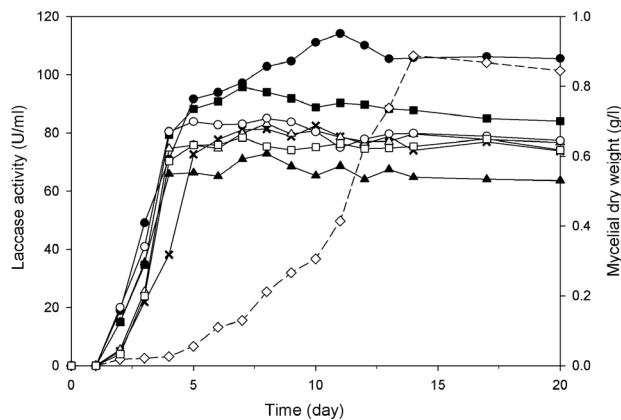


Fig. 2. Effects of inducer on the laccase production by *P. highlandensis*. Cultivation was carried out at 25°C in the optimized medium (2% fructose, 0.4% peptone, 0.6% yeast extract, 0.05%  $NaH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ( $\times$ ) with different inducers (5mg/ml): 2,5-dimethyl aniline (■), 4-hydroxybenzoic acid (▲), guaiacol (●), gallic acid (□), humic acid ( $\triangle$ ), lignin ( $\circ$ ). The mycelial dry weight ( $\diamond$ ) was assayed with cultivation in the optimized medium. All values are means  $\pm$  SE.

팡이로부터 유도 생산된 laccase는 폐놀 및 방향족 화합물의 중합반응을 촉매 함으로써 이들 화합물에 의해 곰팡이에게 유발되는 산소 radical의 산화 스트레스를 감소시키는 것으로 알려져 있다[34]. 한편, 본 균주의 배양시간에 따른 건조 균체량을 조사한 결과, laccase 생산량은 유도기(lag phase)에 효소활성이 급격히 증가하기 시작하여 5일 만에 최대 활성을 나타내었고, 그 이후 거의 일정하게 유지되었다(Fig. 2). 따라서 배양시간에 따른 laccase 생산량은 균체량과 비례하지 않았고, 유도기에 일정량의 효소가 생산되면 그 이후로는 효소 생산이 정지 되는 것으로 확인되었다.

#### 배양 pH 및 온도의 영향

Laccase 생산을 위한 최적 pH를 확인하기 위하여 pH 5.0~10.0의 범위에서 서로 다른 완충용액을 사용하여 효소활성을 측정하였다. pH 5.0은 0.05 M sodium acetate buffer, pH 6.0~7.0은 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 8.0~9.0은 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 10.0은 0.05 M glycine-NaOH buffer를 이용하여 배지의 pH를 조정하였고 25°C에서 18시간 배양한 후 배양 상등액을 취하여 효소활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 *P. highlandensis* 균사체는 pH 7.0~9.0의 범위에서 비교적 높은 효소활성을 나타냈고, 그 중 pH 8.0에서 가장 높은 값을 나타내어 효소 생산을 위한 최적 pH는 8.0으로 확인하였다. 한편 효소 생산을 위한 최적 온도를 측정하기 위하여 15~45°C까지 5°C 간격으로 배양한 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 35°C에서 가장 높은 효소 활성을 나타내어 최적 온도는 35°C로 나타났다(Fig. 4). 이 결과는 *Monotospora* sp.를 pH 8.5, 30°C에서 배양할 때 laccase 활성이 가장 우수하다는

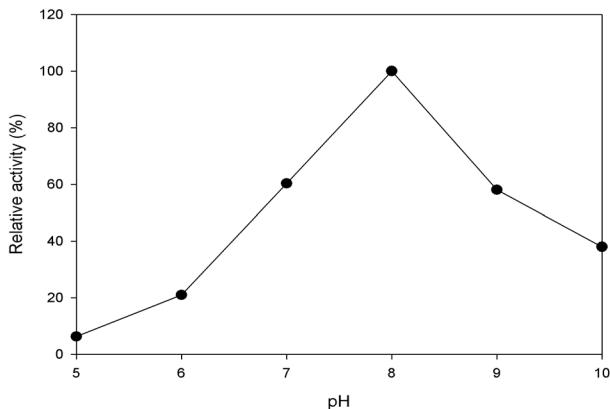


Fig. 3. Effect of pH on laccase production. Cultures were grown at 25°C for 18 days in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.0-7.0), 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0-9.0), 0.05 M glycine-NaOH buffer (pH 10.0). Enzyme activity was assayed with culture supernatant.

Wang 등[37]의 결과와 유사하였다.

#### 활성 염색

*P. highlandensis* 균사체 배양액 중에 생산된 laccase의 존재 유무를 확인하기 위하여 유도인자를 제외한 최적 배지조성에서 18일간 균사체를 배양하였고, 그 조효소액을 Native-PAGE로 전기영동한 후 기질인 ABTS를 사용하여 활성염색을 수행하였다. 그 결과 laccase 활성을 나타내는 1개의 band 가 약 90 kDa 부근에서 확인되었다(Fig. 5). 이것은 *M. quercophilus* 유래 laccase가 분자량 60 kDa 부근에서 2종류의 isozyme 형태로 존재한다는 보고와 상이하였다[10]. 그러나 *Pycnoporus sanguineus* 유래 laccase는 45 - 55 kDa 및 76 - 97 kDa 부근에서 2개의 band를 보였고, 이중 분자량이 큰 band 는 본 효소의 분자량과 거의 유사하였다[9].

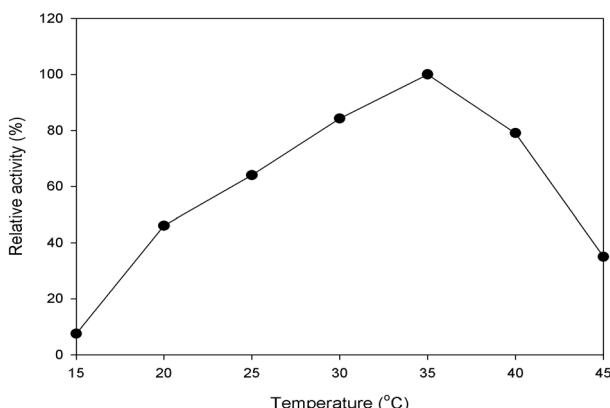


Fig. 4. Effect of temperature on laccase production. Cultures were grown at a temperature range from 15 to 45°C and pH 8.0 for 18 days. Enzyme activity was assayed with culture supernatant.

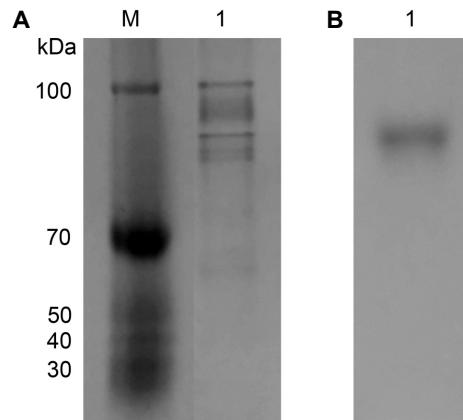


Fig. 5. Zymogram analysis of laccase from *P. highlandensis*. The culture supernatant was run under non-denaturing conditions using 10% Native-PAGE and stained with coomassie brilliant blue (A) or ABTS (B). M, molecular mass marker; lane 1, culture supernatant.

#### 감사의 글

이 논문은 2014학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

#### References

- Alvarez, J. M., Canessa, P., Mancilla, R. A., Polanco, R., Santibáñez, P. A. and Vicuña, R. 2009. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 104-111.
- Arora, D. S. and Gill, P. K. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresour. Technol.* **77**, 89-91.
- Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T. A., Silveira, M. M. and Dillon, A. J. 2009. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1-9.
- Cho, S. M., Seo, G. S., Kim, M. K. and Lee, J. S. 2009. Content of phytosterol composition of *Pholiota* spp. *Kor. J. Mycol.* **37**, 195-197.
- Claus, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**, 93-96.
- Collins, P. J. and Dobson, A. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3444-3450.
- Dhakar, K. and Pandey, A. 2013. Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Res.* **2013**, 1-9.
- de Souza, C. G. I., Tychanowicz, G. K., de Souza, D. F. and Peralta, R. M. 2004. Production of laccase isoforms by

- Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microbiol.* **44**, 129-136.
9. Eugenio, M. E., Carbajo, J. M., Martín, J. A., González, A. E. and Villar, J. C. 2009. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* **49**, 433-440.
  10. Farnet, A. M., Criquet, S., Taqer, S., Gill, G. and Le Petit, J. 2000. Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can. J. Microbiol.* **46**, 189-194.
  11. Farnet, A. M., Tagger, S. and Le Petit, J. 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *C R Acad. Sci. Paris, Sciences de vie/Life Sciences* **322**, 499-503.
  12. Galhaup, C. and Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 225-232.
  13. Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. and Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its us. *Process Biochem.* **39**, 1415-1419.
  14. Huttermann, A., Mai, C. and Kharazipour, A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 387-394.
  15. Jönsson, L. J., Saloheimo, M. and Penttilä. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lccl and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* **32**, 425-430.
  16. Kweon, D. J. and Bae, Y. S. 2009. Antioxidant activity of the mycelium and culture broth of *Pholiota highlandensis*. *Proceedings of the 2009 conference on forest*. 306-308. Korea.
  17. Lee, J. H., Cho, S. M., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1997. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 52-55.
  18. Lee, Y., Park, C., Lee, B., Han, E., Kim, T. and et al. 2006. Effect of nutrients on the production of extracellular enzymes for decolorization of reactive blue 19 and reactive black 5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 226-231.
  19. Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. and Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* **41**, 185-227.
  20. Manimozhi, M. and Kaviyarasan, V. 2012. Screening the effect of nutritional parameters on biomass and laccase production in submerged medium by litter decomposing basidiomycete *Agaricus heterocystis*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 592-599.
  21. Mikashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S. and Neve, E. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* **27**, 955-959.
  22. Moreira, M. T., Torrado, A., Feijoo, G. and Lema, J. M. 2000. Manganese peroxidase production by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Bioprocess Eng.* **23**, 657-661.
  23. Murugesan, K. 2003. Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 1239-1248.
  24. Nonaka, T., Ishikawa, H., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y. and Dohmae, N. 1995. Characterization of a thermostable lysinespecific metallopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola frondosa*. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 1014-1020.
  25. Palonen, H. and Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 550-557.
  26. Park, E. H. and Yoon, K. H. 2003. Characterization of laccase purified from Korean *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3. *J. Microbiol.* **31**, 59-66.
  27. Park, N. and Park, S. S. 2009. Optimal condition for the Laccase production from *Fomitopsis pinicola* mycelia. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 62-68.
  28. Peter, M. G. and Wollenberger, U. 1997. Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS.* **80**, 63-82.
  29. Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J. and Jurado, M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriolopsis rigidula* LPSC No. 232. *Fungal Biol.* **114**, 999-1006.
  30. Shankar, S. and Shikha. 2012. Laccase production and enzymatic modification of lignin by a novel *Peniophora* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1082-1094.
  31. Soden, D. M. and Dobson, A. D. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* **147**, 1755-1763.
  32. Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A. D. and González, A. E. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 954-962.
  33. Tien, M. and Kirk, T. K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2280-2284.
  34. Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
  35. Ullrich, R., Huong le, M., Dung, N. L. and Hofrichter, M. 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 357-363.
  36. Vasconcelos, A. F. D., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Scarminio, I. S. and Rezende, M. I. 2000. Optimizaton of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem.* **35**, 1131-1138.
  37. Wang, J. W., Wu, J. H., Huang, W. Y. and Tan, R. X. 2005. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresour. Technol.* **97**, 786-789.
  38. Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P. and Cosnier, S. 2001. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nat. Commun.* **2**, 1-6.

---

## 초록 : *Pholiota highlandensis* 유래 laccase 생산을 위한 배양조건의 최적화

최혜주<sup>1</sup> · 문수정<sup>1</sup> · 전승종<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 생명공학과, <sup>2</sup>동의대학교 스마트바이오헬스학과)

본 연구에서는 재비늘버섯(*Pholiota highlandensis*)의 리그닌 분해 활성을 확인하고, laccase 생산을 위한 최적 배양 조건을 조사하였다. 재비늘버섯 균사체로부터 laccase를 생산하기 위한 배지조건을 조사한 결과, 다양한 합성 배지 중에서 *Coriolus versicolor* 배지(2% dextrose, 0.4% peptone, 0.6% yeast extract, 0.046% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)가 가장 높은 laccase 활성을 나타내었다. Laccase생산에 대한 배양 조건을 최적화하기 위하여 *Coriolus versicolor* 배지의 조성 중에서 탄소원, 질소원, 인산원, 무기염에 대한 영향을 조사하였다. 탄소원, 질소원, 인산원, 무기염은 각각 2% fructose, 0.4% peptone 및 0.6% yeast extract, 0.05% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O의 경우에 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 본 균주는 몇 가지 방향족 화합물에 의해 laccase 생산이 유도되었고, guaiacol을 첨가할 경우 25°C에서 11일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 최대치(114.1 U/ml)에 도달하였다. 또한 본 균주의 laccase 생산을 위한 최적 pH와 온도는 각각 8.0과 35°C를 나타내었다. 최적 조건에서 배양된 균사체 배양 상등액을 Native-PAGE로 전기영동한 후 ABTS를 기질로 사용하여 활성염색을 수행한 결과, 약 90 kDa 부근에서 laccase 활성을 가지는 1개의 밴드를 확인하였다.