

느타리 버섯균의 정치배양으로부터 생산되는 중요한 망간퍼옥시데이즈(MnP3)의 N-말단 아미노산 배열 분석

하효철*

대구한의대학교 바이오산업융합학부

N-terminal amino acid sequence analysis of major manganese peroxidase (MnP3) produced by static culture of *Pleurotus ostreatus*

Hyo-Cheol Ha*

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

ABSTRACT: *Pleurotus ostreatus* No.42, known as the ligninolytic basidiomycetes, showed production of MnP and Lac, but did not show any LiP activity in static culture, grown in GPYW liquid medium. Maximum production of MnP (80U/flask) was observed on day 11 of culturing in this medium. Chromatographic purification of MnP included the use of Sepharose CL-6B and Mono-Q. The major MnP isozyme purified by column chromatography was observed to be a 36.4 KDa (single band on SDS PAGE). The 19-amino acid sequence from the N-terminal was determined by protein sequencing to be ATCADGRTTANAACCVLFP. The N-terminal sequence of the major MnP isozyme of *P. ostreatus* No.42 was found to be the same as a previously reported sequence of an MnP3 isozyme from this fungus.

KEYWORDS: Amino acid sequence, Ligninolytic enzymes, Manganese peroxidase, *Pleurotus ostreatus*, Static culture

서 론

느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 인체에 안전하며 세계적으로 양송이버섯 다음으로 많이 생산되는 식용버섯으로 국내에서도 대량으로 재배 생산되고 소비되는 백색부후균이다. 이러한 백색 부후균은 대부분 담자균류에 속하는 것으로 지구상에 가장 많이 생산되는 유기화합물인 목

질바이오매스를 분해 할 수 있는 능력을 가지고 있다. 특히 목질바이오매스의 주요 구성성분 중 하나인 리그닌은 다방향족 화합물로 구성되어 있는 난분해성 물질로 최근에는 화이트바이오와 같은 바이오 리파이너리(Bio-refinery)산업에서 재생 가능한 중요한 물질로 주목받고 있다. 따라서 리그닌을 재활용할 수 있는 기능성 유기화합물로 변환시키는데 리그닌 분해 관련효소 및 촉매제의 역할과 특성에 대한 연구들이 활발하게 진행되어 오고 있다(Beckham, *et al*, 2016; Martinez, *et al*, 2017).

리그닌 분해에 관여하는 효소로는 산화효소인 laccase (Lac; EC 1.10.3.2)와 과산화효소인 lignin peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14), manganese peroxidase(MnP; EC 1.11.1.13) 그리고 versatile peroxidase(VP; EC 1.11.1.16)이 알려져 있는데 앞에서 언급한 느타리버섯균은 이들 리그닌 분해 효소들을 생산할 수 있는 능력이 있는 것으로 연구 보고되어져 있다(Sakar *et al*, 1997, Ha *et al*, 2001; Cohen *et al*, 2002). 특히 망간퍼옥시데이즈(MnP)는 백색부후균으로 알려져 있는 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)으로부터 처음 보고(Kuwahara *et al.*, 1984)한 이후, 많은

J. Mushrooms 2019 December, 17(4):185-190
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.4.185>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : hcha@dhu.ac.kr
 Tel : +82-53-819-1498, Fax : +82-53-819-1272

Received August 28, 2019
 Revised September 9, 2019
 Accepted October 16, 2019

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.

백색부후균들이 생산하는 중요한 리그닌 분해효소로 알려져 있다(Warishi, *et al*, 1989; Hofrichter *et al*, 1999; Watanabe *et al*, 2000; Singh and Chen 2008).

일반적으로 느타리버섯균은 리그닌퍼옥시데이즈(LiP)를 생산하지 않는 것으로 보고되어 있으며 판막버섯과는 다르게 질소가 풍부한 환경 조건하에서도 관련 효소인 망간퍼옥시데이즈를 많이 생산하는 것으로 보고되었다(Kamitsuji *et al*, 2004; Ha 2013). 망간(Mn)은 목질바이오매스에 풍부하게 존재하는 무기물로 느타리버섯균과 같은 백색부후균이 생산하는 망간퍼옥시데이즈의 경우 Mn^{2+} 혹은 망간 이온을 킬레이팅 할 수 있는 촉매제의 존재 하에서 페놀, 아민, 다이(dye)등을 광범위하게 산화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 따라서 망간퍼옥시데이즈는 세포외 분비효소로서 바이오 리파이너리산업과 다양한 응용분야에 적용될 수 있는 장점을 가지고 있다고 볼 수 있다(Wang *et al*, 2018).

느타리버섯균이 생산하는 망간퍼옥시데이즈는 유전자 수준에서 mnp1~mnp9까지 유전자 패밀리에 의해 암호화되어 있으나 가장 많이 보고된 세포외 분비효소로는 VP1(=MnP2)와 MnP3가 지금까지 보고되고 있다(kamitsuji *et al*, 2005, Salame *et al*, 2013). VP1의 경우 Mn^{2+} 존재 유무와 관계없이 리그닌을 분해할 수도 있는 것으로 보고되어 LiP와 MnP의 기능을 모두 갖는 하이브리드(hybrid) 형태라고 할 수 있으나 질소원이 풍부한 조건하에서 세포외 분비효소생산량은 MnP3보다 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해 재조합 유전자기술을 활용한 동종 혹은 이종간 유전자 발현 증가 연구도 활발하게 진행되고 있는 것으로 알려져 있다(Tsukihara *et al*, 2006; Knop *et al*, 2015).

현재 국내에서는 백색부후균이 생산하는 망간퍼옥시데이즈에 대한 연구는 부족한 편이며 이에 대한 연구보고도 제한되어 있다. 따라서 본 연구자는 이전 보고(Ha, 2013)에서 느타리버섯균의 망간퍼옥시데이즈 대량 생산배지로서 글루코오스-펩톤-이스트-밀기울(GPYW; glucose-peptone-yeast-wheat bran)이 가장 적합한 것으로 확인하여 정치배양 조건하에서 실험을 진행하여 생산된 망간퍼옥시데이즈를 분리, 정제하여 N-말단 아미노산 배열 분석을 진행하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양방법

본 연구자가 이전에 보고(Ha, 2013)한 실험방법에 따라 진행하였다. 느타리 버섯균주 중 리그닌 분해효소 활성이 가장 좋은 No. 42균주를 대구한의대학교 발효공학 실험실에서 보관하며 본 실험에 사용하였다. 느타리버섯 No. 42균주를 potato-dextrose 액체배지(PDB, Difco Co.) 20 ml에서 28°C, 7일 동안 정치배양 하면서 균사체를 회수한 뒤에 증류수 20 ml를 넣고 균질화하여 본 배양을 위한 접

종원으로 사용하였다. 본 배양은 글루코오스-펩톤-이스트-밀기울 배지(GPYW)를 각각 20 ml씩 준비하여 위에서 언급한 전 배양한 접종원을 1 ml씩 접종하여 28°C에서 정치배양하면서 리그닌분해 효소활성측정을 실시하였다.

리그닌 분해효소 측정

리그닌 분해효소의 효소활성은 이전 보고의 방법(Ha, 2013)으로 진행하였다. 각각의 배양액으로부터 1 ml씩 취하여 4°C, 5000 rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)을 사용하여 아래 리그닌 분해효소 측정법에 의해 측정하였다. 리그닌퍼옥시데이즈의 효소 활성농도는 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡광도로 나타내었다. 망간퍼옥시데이즈의 효소 활성농도는 Mn 이온 존재 하에서 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 락게이즈의 효소 활성농도는 o-phenyldiamine을 기질로 하여 1분간 반응으로 생성된 물질의 440 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

조효소액 준비 및 농축

조효소액의 준비 및 농축은 다음과 같이 실시하였다. 배양액을 회수하여 박막여과장치(amicon diaflo system)에서 Diaflo PM 10(MW cut-off: 10,000)박막을 사용하여 분자량 10 KDa이상의 분획물을 농축한 다음 농축액을 4°C에서 하루 동안 투석시킨 후 사용하였다. 모든 효소의 분리 정제 과정은 4°C에서 실시하였다.

총 단백질 함량

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

효소의 정제

박막여과장치에 의해 농축시킨 조효소액을 20 mM succinate buffer(pH 4.5)로 평형화 시켜 놓은 이온교환 크로마토그래피 컬럼(Ion-exchange chromatography)에 적용하고 염농도를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 M로 단계적으로 증가하면서 분리하였다. 망간퍼옥시데이즈 분리정제는 DEAE-Sepharose CL-6B column(Amersham Phamacia Biotech., UK)으로 실시하였으며 분광광도계를 이용하여 망간퍼옥시데이즈의 활성을 갖는 분획을 모아서 박막여과장치를 이용하여 농축하였다. 농축한 망간퍼옥시데이즈의 활성분획을 최종적으로 Mono-Q anion-exchange column(Amersham Phamacia Biotech., UK)을 이용하여 염농도에 따른 gradient방법에 따라 망간퍼옥시데이즈를 분리 정제하였다.

겔 전기영동

최종 컬럼을 통해 분리된 MnP를 겔 전기영동 장치를 이용하여 실시하였다. 단백질 전기영동은 Phast System (Amersham Pharmacia Biotech., UK)에 의한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 실시하였으며 전기영동이 끝난 후 0.1% Coomassie blue R-250으로 염색하여 단백질을 밴드를 염색하였다. 분자량 마커는 standard mark(Daiichi Pure Chemicals, Japan)를 사용하여 실시하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

최종 분리한 망간퍼옥시데이즈를 SDS-PAGE 상에서 전개하여 단일 밴드를 확인한 후 semi-dry electrophoretic transfer방법에 의해 실시하였다. 즉, 전기영동 상에서 확인된 단일밴드를 0.05% SDS용액, 25 mM Tris, 20% methanol, 40mM ε-Amino-n-caproic acid를 함유한 전이 용매를 이용하여 1.2 mA/cm², 120분간 polyvinylidifluoride (PVDF, Bio-red con.)막에 옮긴 후 전이된 단백질을 자동서열 분석기를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다(Model 491A, Applied Biosystems, USA).

결과 및 고찰

글루코오스-펩톤-이스트-밀기울 배지(GPYW)에서 정치배양한 리그닌분해효소 생산

글루코오스-펩톤-이스트-밀기울 배지(GPYW)배지에서는 15일간 정치 배양한 결과, 락게이즈 활성은 9일째 50(2.4) U/flask(ml)의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 망간퍼옥시데이즈 활성은 11일째 80(3.6) U/flask(ml)의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 본 연구자의 이전 보고(Ha et al, 2001)에서 펠렛(pellet)형태로 배양한 결과 최적의 조건에서 락게이즈 효소 활성은 7일째 480 U/flask, 망간퍼옥시데이즈 효소 활성은 9일째 720 U/flask와 비교하여 낮은 효소활성 결과를 나타내었으나 효소생산 패턴은 거의 동일한 형태로 나타났으며 판막버섯에서 리그닌을 분해하는 대표적인 리그닌 분해효소인 리그닌퍼옥시데이즈는 실험 배지에서 전혀 생산되지 않는 것을 확인하였다. 한편 다른 연구자의 느타리버섯균의 연구에서, 동일한 정치배양 조건하에서 리그닌 분해효소의 생산 형태는 락게이즈가 먼저 생산된 후에 망간퍼옥시데이즈가 생산되는 것으로 보고하였으며 리그닌퍼옥시데이즈는 전혀 생산되지 않는 것으로 보고하여 본 연구결과와 일치하였다(Giardina et al, 2000; Irie et al, 2001; Cohen et al, 2002; Kamitsuji et al, 2004; Elisashvili et al, 2008).

망간퍼옥시데이즈 효소활성의 경우 이전에 본 연구자에 의해 보고(Ha and Lee, 2004)한 적이 있는 느타리버

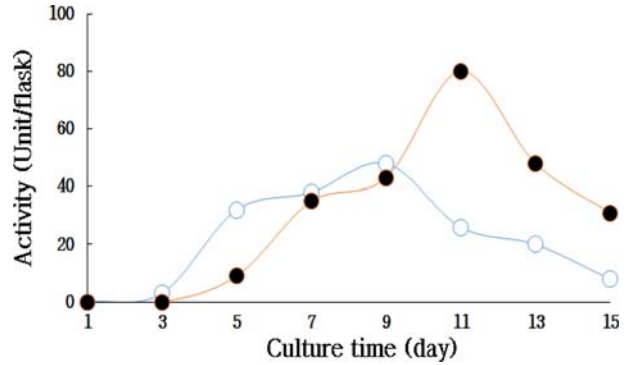


Fig. 1. lignolytic enzymes production of *P. ostreatus* No.42 by static culture with GPYW medium. ○: laccase activity; ●: manganese peroxidase activity.

섯균 K-2946균주의 경우 최대 망간퍼옥시데이즈 활성은 22(1.1)U/flask(ml), 최대 락게이즈 활성은 46(2.3)U/flask (ml) 이라고 하였으며 Elisashvili 등이 보고(2008)한 느타리버섯균 IBB 8의 경우 최대 망간퍼옥시데이즈 활성은 2(0.02)U/flask(ml), 최대 락게이즈 활성은 24(0.24)U/flask(ml)이라고 보고한 바 있어 이전 연구결과와 비교하여 *P. ostreatus* No.42균주의 G-P-Y-W배지에서의 망간퍼옥시데이즈 및 락게이즈 효소 활성이 우수한 것을 다시 확인하였다.

망간퍼옥시데이즈 분리 및 정제

느타리버섯균 No. 42로부터 리그닌분해효소인 망간퍼옥시데이즈를 분리 정제하였다. 정치배양을 통해 생산된 망간퍼옥시데이즈 조효소액을 Amicon PM-10 박막여과장치를 이용하여 셀룰로오스막(molecular cut-off, 10KDa)을 이용하여 분리하였다. 농축한 분획물을 20 mM Na-succinate buffer(pH 4.5)에서 투석시켜 안정화 한 후 이온교환 크로마토그래피인 DEAE-Sephrose CL-B 컬럼에서 stepwise 구배방법으로 NaCl용액(0~1.0M)으로 각각 시험관별 5 ml씩 분획하여 280 nm와 407 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

DEAE-Sephrose CL-B 컬럼에서 분리 정제한 망간퍼옥시데이즈를 다시 박막여과장치를 통해 농축한 다음 Mono- Q 음이온 크로마토그래피를 이용하여 최종적으로 망간퍼옥시데이즈를 분리 정제한 결과 280nm와 407nm에서 겹치는 활성을 나타내는 가장 큰 피크를 확인할 수 있었으며 효소활성 측정 결과 망간퍼옥시데이즈인 것으로 판명되었다(Fig. 3).

이러한 결과는 이전에 연구 보고된 동일한 느타리버섯균 No 42(Ha et al, 2001)를 펠렛(pellet)형태로 배양한 결과 최적의 조건에서 수확한 망간퍼옥시데이즈와 동일한 이온교환 크로마토그래피인 DEAE-Sephrose CL-B 컬럼 조건으로 분리한 결과와 마찬가지로 0.1M NaCl농도에서 망간퍼옥시데이즈 피크가 존재하는 것을 확인할 수 있었

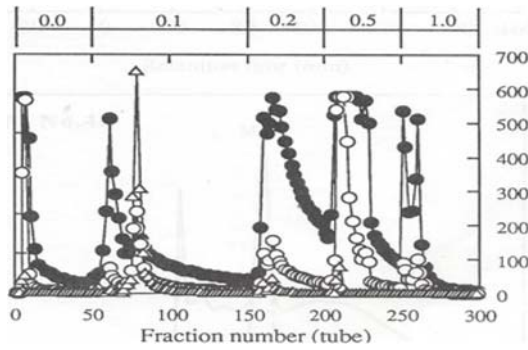


Fig. 2. Separation of MnP of *P. ostreatus* No.42 by DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography. ○: Absorbance at 407 nm ●: Absorbance at 280nm; △: manganese peroxidase activity

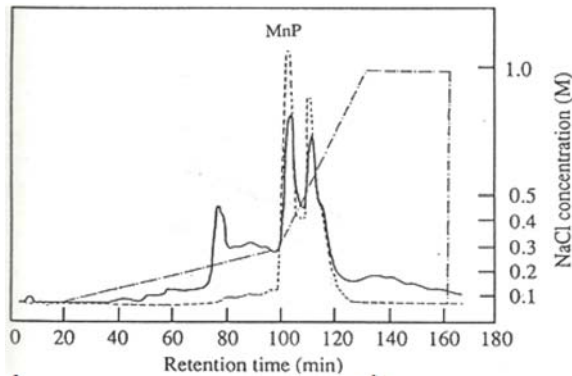


Fig. 3. Purification of MnP of *P. ostreatus* No.42 by Mono Q column chromatography. —: Absorbance at 280nm;: Absorbance at 407nm

다. 또한 최종적으로 Mono- Q 음이온 크로마토그래피를 이용한 분리 조건에서도 이전 연구 보고와 마찬가지로 retention time(RT) 100분경에 큰 피크가 나타나는 것을 확인하였으며 이를 농축하여 영하 4°C에서 보관하며 다음 실험에 사용하였다.

겔 전기영동

분리 정제한 망간퍼옥시데이즈를 전기영동장치를 이용하여 SDS-PAGE겔에서 분리하여 단백질 염색을 진행한 결과는 Fig.4와 같다. 본 연구결과는 동일한 느타리버섯균 No 42(Ha *et al*, 2001)를 G-P-Y-W 배지에서 9일간 펠렛(pellet) 형태로 배양한 결과 최적의 조건에서 수확한 망간퍼옥시데이즈의 분자량과 일치하는 약 36.4KDa을 나타내었으며 다른 연구자들이 보고한 느타리버섯균의 망간퍼옥시데이즈(MnP)분자량인 36.0 ~ 44.0 KDa 과도 비슷하였다(Asada *et al*, 1995; Sarkar *et al*, 1997; Kamitsuji *et al*, 2004).

N- 말단 아미노산 분석

아미노산 염기서열 자동분석기를 통하여 느타리버섯균



Fig. 4. Electrophoresis of purified major MnP from *P. ostreatus* No.42. Molecular weight(MW) markers is shown on the left of gel.

No.42로부터 분리한 망간퍼옥시데이즈의 아미노산을 분석한 결과 N-말단으로부터 ATCADGRTTANAACCVLFP으로 총 19개의 아미노산 배열을 확인할 수 있었다. 분석된 19개의 아미노산 배열을 이전에 보고된 연구들과 비교분석한 결과는 Table 1과 같다. 이러한 결과는 본 연구자가 이전에 보고(Ha *et al*, 2001)한 동일한 균주와 배지 조건 하에서 진탕배양하면서 펠렛형태로 생산된 주요 망간퍼옥시데이즈인 MnP3의 14개 N 말단 아미노산 배열 ATCADGRTTANAAC과도 100% 동일하였으며 다른 느타리버섯균인 IS-1 및 ATCC66376으로 G-P-Y-W 혹은 G-P-Y배지에서 정치배양하여 생산한 주요 MnP3 (GenBank AB011546, AB016519)와도 100% 동일하였다 (Irie *et al*, 2000, Kamitsuji *et al*, 2004).

Cohen 등(2001)은 느타리버섯균을 펩톤함유 고체배양으로부터 생산된 주요 MnP(P6)의 17개 N-말단 아미노산 배열을 분석한 결과 MnP3와도 100% 상동성이 동일한 것으로 보고하였다. 한편 Martinez 등(1996)이 느타리속으로 분류되는 새송이균(*Pleurotus eryngii*)을 이용하여 펩톤과 같은 질소가 충분한 배지에서 정치배양한 결과 2개의 망간퍼옥시데이즈 isozyme을 분리 정제하였으며 아미노산 배열을 밝힌 결과, 2개의 망간퍼옥시데이즈 isozyme 중 하나인 MnP1이 본 연구에서 밝혀진 MnP3와 100% 상동성이 동일한 N 말단 아미노산 배열을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 느타리버섯균은 펩톤과 같은 질소원이 풍부한 배지조건 하에서 세포외로 생산되는 망간퍼옥시데이즈 isozyme은 연구그룹에 따라 MnP isozyme의 명칭은 다르지만 모두 동일한 MnP3 isozyme으로 확인되었으며 산업적으로 활용가치가 높은 중요한 세포외 생산효소인 것으로 판단된다.

지금까지 가장 많은 연구자들에 의해 리그닌분해효소 연구에 사용되어져 온 판막버섯은 리그닌 분해효소 중에서 리그닌퍼옥시데이즈와 망간퍼옥시데이즈를 세포외로

Table 1. Comparison of N-terminal sequences of the MnP isozymes of *P. ostreatus* and other white-rot fungi

White-rot fungi	Growth type	MnP isozymes	N-terminal sequences	Reference
<i>P. ostreatus</i> No.42	mycelium	MnP 3	ATCADGRITTANAACCVLFP	This study
<i>P. ostreatus</i> No.42	pellet	MnP 3	ATCADGRITTANAAC	Ha <i>et al.</i> (2001)
<i>P. ostreatus</i> ATCC66376	mycelium	MnP 3	ATCADGRITTANA	Kamitsuji <i>et al.</i> (2004)
<i>P. ostreatus</i> F6	mycelium	MnP(P6)	ATCADGRITTANAACCVL	Cohen <i>et al.</i> (2001)
<i>P. ostreatus</i> IS-1	mycelium	MnP 3	ATCADGRITTANAAC	Irie <i>et al.</i> (2000)
<i>P. eryngii</i> CBS 613.91	mycelium	MnP 1	ATCADGRITTANAACCVLF	Martinez <i>et al.</i> (1996)
<i>P. eryngii</i> CBS 613.91	mycelium	MnP 2	ATDDDGRITTADAACCILF	Martinez <i>et al.</i> (1996)
<i>P. chrysosporium</i>	mycelium	MnP 1	AVCPDGTRVSHAACC	Godfrey <i>et al.</i> (1990)
<i>P. chrysosporium</i>	mycelium	MnP 2	ATCPDGTKVNNAACC	Mayfield <i>et al.</i> (1994)

생산하지만 많은 사상균에서 생산되는 락게이즈를 세포외로 생산하지 않는 것을 특징으로 하고 있다. 이에 판막버섯으로부터 생산되는 망간퍼옥시데이즈의 경우 느타리버섯균이 생산하는 망간퍼옥시데이즈와는 54% 정도의 상동성만 가지는 것으로 확인되었다(Gold and Alic 1993; Irie *et al.*, 2000). 이러한 이유로는 백색부후균내에서도 동일한 속(genus)에 포함되는 균류일수록 유전자 수준에서 발현되는 단백질의 상동성이 높기 때문으로 생각되어진다. 또한 판막버섯이 생산하는 망간퍼옥시데이즈의 경우 기질에 대한 산화반응 시 Mn⁺의존성이 거의 절대적인 반면 느타리속이 생산하는 망간퍼옥시데이즈의 경우 기질의 종류에 따라 Mn⁺의존성이 상대적으로 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이유로는 망간퍼옥시데이즈의 촉매 반응에 관여하는 활성부위의 아미노산의 차이 때문인 것으로 알려져 있으며 이전 연구에서도 느타리버섯균의 MnP3 N- 말단 아미노산 배열 상동성을 기준으로 구성한 분자계통도에서도 판막버섯의 MnP 1(상동성 54.3%), MnP2(상동성 54.5%)보다 판막버섯의 LiP LPOA(상동성 59.3%), LiP GLG4(상동성 59.5%)에 근접해 있는 것을 확인한 바 있다(Irie *et al.*, 2000). 또한 최근 Fernandez-Fueyo 등(2014)은 느타리버섯균으로부터 생산되는 리그닌분해 관련 퍼옥시데이즈는 9개의 유전자로부터 발현되며 그 중에서 6개의 망간퍼옥시데이즈(MnP) 및 3개의 버사틸퍼옥시데이즈(VP)를 암호화한다고 보고하였으며 단독 탄소원 및 질소원 배지조건에서 MnP3와 VP1가 가장 높은 전사수준을 나타내는 주요 리그닌 관련 퍼옥시데이즈이며 세포외 생산 효소로서도 가장 많이 생산되는 것으로 보고하였다. 이와 관련하여 본 연구에서 밝혀진 느타리버섯균이 생산하는 중요한 망간퍼옥시데이즈인 MnP3을 이용한 다양한 연구 결과들이 보고된 바 있는데 Hirano 등(2000)의 연구에서 MnP3가 Mn⁺ 존재하에서 환경호르몬으로 잘 알려져 있는 bisphenol A를 80% 정도 분해할 수 있는 것으로 보고한 바 있으며 Salame 등(2010)의 연구 결과에서 MnP3 isozyme이 오렌지 II 염료를 가장 효과적으로 분해하는 것으로 보고한 바 있다. 최근에는 느타리

버섯균으로부터 유래되는 MnP3 유전자를 표고버섯 laccase 프로모터에 결합하여 이중 발현시켜 향상된 생산수율을 나타낸 연구결과도 보고한 바 있다(Sato *et al.*, 2017). 따라서 느타리버섯균으로부터 생산되는 중요한 MnP3은 펩톤 혹은 밀기울과 같은 질소가 풍부한 조건에서 가장 많이 세포외로 생산되는 망간퍼옥시데이즈 isozyme이며 향후 국내에서도 MnP3 생산을 통해 염료분해, PAHs 등과 같은 독성물질의 무독화, 환경호르몬 분해 등과 같은 환경산업이나 바이오필링, 바이오에너지 등 다양한 산업에 적용될 수 있을 것으로 생각한다.

적 요

리그닌 분해 담자균류로 알려져 있는 느타리버섯균 No.42는 망간퍼옥시데이즈(MnP) 및 락게이즈(Lac)를 생산하였으나 글루코오스-펩톤-이스트-밀기울(GPYW)배지를 이용한 정치배양조건하에서 리그닌퍼옥시데이즈(LiP)활성은 검출되지 않았다. 한편, 동일배지에서 망간퍼옥시데이즈 활성은 11일째 80(3.6) U/flask(ml)의 최대 생산되었다. 망간퍼옥시데이즈 분리정제는 Sepha-ros CL-6B 및 Mono-Q 컬럼순으로 수행하였으며 주요 망간퍼옥시데이즈 isozyme은 단일밴드로 분자량은 36.4KDa이었다. N-말단으로부터 19개의 아미노산 배열은 단백질 자동 분석 장치로 분석한 결과 ATCADGRITTANAACCVLFP를 나타내었다. 느타리버섯균 No.42의 정치배양조건 하에서 세포외로 생산되는 중요한 망간퍼옥시데이즈 isozyme의 N-말단 아미노산 배열은 이전에 보고된 MnP3의 아미노산 배열과 동일하였다.

REFERENCES

Asada Y, Watanabe A, Irie T, Nakamura Y, Kuwahara M. 1995. Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol* 1251: 205-209.
 Beckham GT, Johnson CW, Karp EM, Salvachua D, Vardon DR. 2016. Opportunities and challenges in biological lignin

- valorization. *Curr Opin Biotechnol* 42: 40-53.
- 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.
- Cohen R, Hadar Y, Yarden O. 2001. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn²⁺. *Environ Microbiol* 3: 312-322.
- Cohen R, Yarden O, Hadar Y. 2002. Lignocellulose affects Mn²⁺ regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 3156-3158.
- Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Kharziani T, Kvesitadze G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour Technol* 99: 457-462.
- Fernandez-Fueyo E, Castanera R, Ruiz-Duenas FJ, Lopez-Lucendo M, Ramirez L, Pisabarro AG, Martinez AT. 2014. Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genet Biol* 72: 150-161.
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Rivieccio V, Sannia G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376: 171-179.
- Godfrey BJ, Mayfield MB, Brown JA, Gold MH. 1990. Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93: 119-124.
- Gold MH, Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Mol Biol 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, Lee JS. 2004. Production and characterization of manganese peroxidase from the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in liquid culture. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 22-26.
- Ha HC. 2013. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* No. 42 in various media. *J Mushrooms* 11: 87-91.
- Hirano T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1958-1962.
- Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, Hatakka A. 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma Frowardii*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1864-1870.
- Irie T, Honda Y, Ha HC, Watanabe T, 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.
- Irie T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2001. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 566-570.
- 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. Mn²⁺ 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.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 169: 247-250.
- Martinez AT, Ruiz-Duenas FJ, Camarero S, Serrano A, Linde D, Lund H, Vind J, Tovborg M, et al. 2017. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv* 35: 815-831.
- Martinez M, Ruiz-Duenas FJ, Guillen F, Martinez AT. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 237: 424-432.
- Mayfield MB, Godfrey BJ, Gold MH. 1994. Characterization of the mnp2 gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 142: 231-235.
- Salame TM, Yarden O, Hadar Y. 2010. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microb Biotechnol* 3: 93-106.
- Salame TM, Knop D, Levinson D, Yarden O, Hadar Y. 2013. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 79: 2405-2415.
- Sarkar S, Martinez AT, Martinez MJ. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol* 1339: 23-30.
- Sato T, Irie T, Yoshino F. 2017. Heterologous expression of the *Pleurotus ostreatus* MnP3 gene by the laccase gene promoter in *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1553-1556.
- Singh D, Chen S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 399-417.
- Tsukihara T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 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. *Int J Mol Sci* 19: 3373-3389.
- Wariishi H, Dunford HB, Macdonald ID, Gold MH. 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *J Biol Chem* 264: 3335-3340.
- Watanabe T, Katayama S, Enoki M, Honda Y, Kuwahara M. 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Bjerkandera adusta*. *Eur J Biochem* 267: 4222-4231.