

큰느타리버섯 수확 후 배지로부터 리그닌섬유소분해효소 생산

임선화¹ · 김종균^{1,2} · 이윤혜³ · 강희완^{1,2*}

¹한경대학교 바이오·정보기술 전문대학원, ²JK 바이오테크, ³경기도농업기술원 버섯연구소,

Production of Lignocellulytic Enzymes from Spent Mushroom Compost of *Pleurotus eryngii*

Sun-Hwa Lim¹, Jong-Kun Kim^{1,2}, Yun-Hae Lee³ and Hee-Wan Kang^{1,2*}

¹Graduate School of Bio. & Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea,

²JK BioTech Co. Ltd. Gyeonggi, Ansong 456-749, Korea,

³Mushroom Research Institute, GARES, Gyeonggi Province Gwang-Ju 464-870, Korea

(Received 10, September 2012., Revised 12, September 2012., Accepted 16, September Month 2012)

ABSTRACT : The lignocellulytic enzymes including α -amylase (EC 3.2.1.1), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14), laccase (EC 1.10.3.2), xylanase (EC 3.2.1.8), β -xylosidase (EC 3.2.1.37), β -glucosidase (EC 3.2.1.21) and cellulase (EC 3.2.1.4) were extracted from spent mushroom compost (SMC) of *Pleurotus eryngii*. Different extraction buffers and conditions were tested for optimal recovery of the enzymes. The optimum extraction was shaking incubation (200 rpm) for 2 h at 4°C. α -Amylase was extracted with the productivity range from 1.20 to 1.6 Unit/SMC g. Cellulase was recovered with the productivity range from 2.10 to 2.80 U/gf. β -glucosidase and β -xylosidase productivities showed lowest recovery producing 0.1 U/g and 0.02 U/g, respectively. The *P. eryngii* SMCs collected from three different mushroom farms showed different recovery on laccase and xylanase, cellulase. Furthermore, the water extracted SMC was compared to commercial enzymes for its industrial application in decolorization and cellulase activity.

KEYWORDS : *Pleurotus eryngii*, Spent mushroom compost, Lignocellulytic enzymes

서 론

국내의 농산버섯 총생산량은 연간 158,642톤이 생산되고 있고 느타리버섯, 큰느타리버섯(새 송이), 팽이버섯이 우리나라 총 버섯 생산량의 88% 차지한다. 큰느타리버섯의 생산량(29%)는 팽이버섯(34%)다음으로 많이 생산되며 년 46,000톤에 이른다(Jang, 2011). 백색부후균(white rot fungi)인 큰느타리버섯(*P. eryngii*)은 주로 유럽남부, 중앙아시아, 북아프리카, 지중해연안 및 러시아 남부 등의 아열대지방의 건조성 초원지대에 자생하고 있으며, 산형과(*Eryngium campestre*), 분과(*Laserpitium latifolium*), 부처꽃과(Ammiaceae)와 같은 초본식물의 뿌리에 기생하는 것으로 알려져 있다(Zevakis *et al.*, 2001).

담자균류는 자연상태에서 대부분 수목에 기생하여 생활하는 균으로서 xylanase, cellulase, lignin 분해효소(lignin peroxidase, Lip, Mn peroxidase, laccase)를 다량 분비하여 고 분자량의 목질섬유소를 수용성 저분자량의 당으로 분해하여 균사의 영양 흡수과정을 거쳐 영양원으로 이용한다(Scarse, 1995). 버섯인공 재배시에 사용되는 원재료

는 먼실박, 비트펄프, 콘코브, 톱밥 등 목질계 바이오매스가 주로 이용 되고 있으며 주로 cellulose, hemicellulose, lignin 등 목질섬유소로 구성 되어 있다. 큰느타리버섯 인공재배는 봉지 또는 병재배형태로 종균을 접종한 후 30-40일의 균사생장과정과 10여일의 버섯 자실체 유도 과정을 거쳐 버섯을 수확하는데 수확 후 폐기하는 배지를 수확 후 배지(spent mushroom compost, SMC)라고 정의한다. 국내 버섯 수확 후 배지 생산량은 160만톤/년으로 추정 되고 있으며 일부가 동물사료, 퇴비 등으로 활용되고 있으나 대부분 버려지고 있다. 일반적으로 담자균류는 자실체 생성시기에 다량의 목질섬유소분해 효소를 생산하므로(Singh *et al.*, 2003) 큰느타리SMC에는 다량의 목질섬유소분해효소가 잔존 할 것으로 예상 된다. 버섯 SMC로 부터 효소추출연구는 표고버섯, 여름느타리, 양송이, 표고버섯, 느타리버섯, 팽이버섯에서 수행되었다(Ayala *et al.*, 2011; Ball and Jacson, 1995; Ko *et al.*, 2005; Matcham and Wood, 1992; Singh *et al.*, 2003). 그러나 큰느타리버섯 SMC로 부터의 효소 생산에 관한보고는 없다. 수확 후 배지를 이용한 목질섬유소분해효소의 추출과 산업적 이용은 폐자원을 이용한 고 부가가치의 산업효

*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

소생산이라는 측면에서 중요한 의미가 있다. 목질섬유소 분해효소 시장은 펄프, 제지 산업이외에도 세제공업, 농산물 가공, 섬유 등 다양한 산업 분야에 잠재적인 시장을 갖고 있다. 최근 바이오에너지 생산과정에 사용되는 당화 효소는 세계 산업용 효소 시장의 11%를 형성하고 있어 목질 섬유소분해효소의 가치가 새롭게 대두 되고 있다.

본 연구는 큰느타리버섯의 수확 후 배지내의 cellulase, xylanase, lignin 분해효소 등의 목질섬유소분해효소 추출조건을 확립하고 산업효소로서의 유용성을 제공하는데 있다.

재료 및 방법

큰느타리버섯 SMC 로부터의 추출 buffer별 목질분해효소 회수 효율

안성 인근의 큰느타리 병재배농가에서 생산되는 수확 후 배지(SMC)를 이용하였다. 큰느타리 SMC 5g을 Fulcon 튜브에 넣고 추출 buffer 25 ml 첨가 후 4°C에서 2시간 동안 실온에서 200 rpm에서 진탕하였다. 추출 buffer는 tap water, 1% NaCl, 0.05 M sodium citrate (pH 4.8), 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)로 달리하여 사용하였다. 진탕배양 후 SMC혼합액을 10,000 rpm에서 원심 분리하여 SMC 잔여물을 침전시켜 하고 상등액을 효소추출액으로 하여 실험에 이용 하였다.

큰느타리버섯 SMC 종류별 효소생산성

안성인근의 큰느타리 재배농가 3곳을 선택하여 SMC를 수집하고 목질분해효소들의 활성을 조사하였다. 각 버섯 농장별 배지내 수분함량이 다르게 나타나 균일한 SMC함량을 주어 주기위하여 각각의 SMC를 동결건조하고 5g의 건물량을 측정하고 증류수 25 ml를 첨가해 2시간 동안 효소추출을 시행하였다.

추출 시간별 효소활성

큰느타리버섯 SMC 5g에 각각의 증류수와 0.05 M sodium citrate (pH 4.8)로된 추출 buffer 25 mL을 첨가하여 4°C에서 2, 4, 6시간 동안 200 rpm진탕한 후 6,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 cellulase 활성을 측정 하였다.

효소활성검정

(1) α -amylase: 효소추출액 20 μ l와 증류수 4,480 μ L를 혼합하고, 20 mM 인산 완충용액(phosphate buffer; pH 7.0)에 녹인 500 μ l 녹말용액(10 mg/ml)을 기질로 첨가하여 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 생성된 환원당을 540 nm 파장에서 Dinitrosalicylic acid; DNS) 방법에 따라 측정했다. 이때, maltose를 표준으로 분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

(2) Cellulase: 상기 효소추출액 50 μ l에 0.2 M sodium

acetate buffer; pH 5.0에 녹인 1% carboxymethyl cellulose를 기질로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 생성된 환원당을 540 nm 파장에서 DNS 방법에 따라 측정했다. 이때, glucose를 표준으로 1분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

(3) Laccase: 효소추출액 100 μ l에 sodium acetate buffer (pH 4.0)에 녹인 0.5 M 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)를 기질로 첨가하여 실온에서 5분 동안 반응시킨 후, 420 nm 파장에서 ABTS의 산화를 측정하였으며 분당 OD 값의 변화량을 unit으로 정의하였다.

(4) Xylanase: 효소추출액 100 μ l와 400 μ l의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 혼합하고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 500 μ l의 1% oat spelt xylan을 기질로 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 생성된 환원당을 540 nm 파장에서 DNS 방법에 따라 측정했다. 이때, D-xylose를 표준으로 1분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

(5) β -glucosidase: 기질로서 0.5 mM sodium citrate buffer에 녹인 0.5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside (PNPG)를 사용하여 확인하고, *p*-nitrophenol을 표준으로 사용하여 1분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

(6) β -Xylosidase: 기질로서 0.5 mM sodium citrate buffer에 녹인 0.5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-xyloside를 기질로 사용하고 사용하여 확인하고, *p*-nitrophenol을 표준으로 사용하여 1분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

(7) Lignin peroxidase: 기질로서 veratryl alcohol을 사용하고 효소반응에 의해 생산되는 산화산물인 veratraldehyde를 310 nm의 흡광도에서 측정하여 효소활성을 조사하였다. 반응혼합액은 100 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0), 2 mM veratryl alcohol로 하였다. 이 반응은 0.5 mM의 H₂O₂를 첨가함으로써 반응을 시작하고 실온에서 5분간 반응 하였다. veratraldehyde 3,4-dimethoxybenzaldehyde를 표준으로 하여 1분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit으로하고 U/g로 표시하였다.

결과 및 고찰

큰느타리버섯 SMC부터 목질섬유소분해효소 추출조건 확립

추출시간에 따른 효소회수율을 조사하기 위하여 20g의 큰느타리 SMC를 100 ml 증류수와 0.05 M sodium citrate (pH 4.8) 추출 buffer를 첨가하고 2, 4, 6시간별로 200 rpm에서 진탕하면서 추출시간에 따른 효소활성을 조사하였다. 큰느타리버섯 SMC로부터 당화효소를 대량 추출할 수 있는 조건을 확인하기 위해 방법에 따라 각각 tap

Table 1. Productivity of lignocellulytic enzymes from SMC of *Pleurotus eryngii* by different extraction buffers

Enzymes	Enzymic activity (Unit/g)						
	Extraction buffers						
	A	B	C	D	E	F	G
Protein (mg/g)	0.572	0.356	0.396	0.653	0.531	1.328	0.693
α -Amylase	1.559	1.506	1.462	1.409	1.216	1.524	1.647
Cellulase	2.645	2.855	1.975	1.567	2.856	2.125	2.725
β -D-glucosidase	0.141	0.183	0.090	0.517	0.709	0.560	0.158
Xylanase	4.857	4.592	4.028	4.028	5.056	5.255	5.089
β -xylosidase	-	0.020	-	0.080	0.102	0.108	-
Laccase	8.924	2.702	6.283	1.684	0.939	2.360	8.073
Lignin peroxidase	5430.9	5234.2	4234.3	5560.3	3765.8	4879.7	5673.5

Extraction buffers: A, tap water; B, 1% NaCl; C, 0.05 M Sodium citrate (pH 4.8); D, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0); E, 0.05 M phosphate buffer + 10% glycerol; F, 0.05 M phosphate buffer + 0.25% Triton X-100; G, 0.25% Triton X-100. The results are mean of four replicate samples.

water, 1% NaCl, 0.05 M Sodium citrate (pH 4.8), 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), 0.05 M phosphate buffer + 10% glycerol, 0.05 M phosphate buffer + 0.25% Triton X-100, 0.25% Triton X-100를 각각 달리하여 사용하였다. Table 1에서 나타난 것과 같이 추출 buffer별 단백질량은 0.025% Triton-X buffer에서 다른 buffer에 비하여 3배에서 2배까지 많은 양이 검출되었다.

각 추출 buffer별 큰느타리버섯 SMC로부터의 α -amylase, cellulase, β -glucosidase, xylanase, β -xylosidase, lignin peroxidase 및 laccase의 효소회수 효율을 효소 활성으로 조사 하였다. Amylase활성은 추출 buffer별로 1.2 U/g에서 1.6 U/g로 특이할만한 차이가 나타나지 않았으며 cellulase도 유사한 결과로 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)에서 1.567 U/g로 낮게 나타났지만 다른 추출 buffer에서는 유사한 경향치를 보였다. β -D-glucosidase는 다른 효소활성보다 0.5 U/g로 매우 낮게 나타났으며 β -xylosidase는 buffer에 따라 검출되지 않았고 0.1 U/g이하의 매우 미약한 활성을 보였다. Xylanase활성은 0.025% Triton-X buffer에서 5.3 U/g으로 높은 효소활성을 보였으며 다른 추출 buffer에서도 4 U/g이상의 효소활성을 보였다. Laccase효소활성의 경우는 다른 효소보다 월등히 높은 것으로 나타났으며 특히 tap water와 0.25% Triton X-100추출용액에서 8 U/g이상의 높은 효소활성을 보였다. lignin peroxidase의 경우는 큰느타리버섯 SMC 효소 중에서 가장 많이 분포하는 것으로 나타났다. Buffer에 따라 약간씩 차이가 있으나 3,765에서 5,673 U/g의 높은 효소생산성을 보였다.

SMC추출시간별 효소 활성량을 조사하기위하여 증류수와 0.05 M sodium acetate추출 buffer에서 2, 4, 6 간 동안 200 rpm의 진탕 후 효소활성을 조사한 결과 2시간 추출시간이면 충분히 높은 효소회수를 할 수 있을 것으로 나타났다으며 오히려 4시간 이후에는 효소활성이 감소하였다. 이는 전에 *Pleurotus sajor-caju*(여름느타리) SMC로부터의 추출시간별 효소회수율이 2-3시간 때에 최적이었다는

(Singh *et al.*, 2003) 결과와 일치 한다.

전에 *P. sajor-caju*(여름느타리) SMC로부터의 대량효소 생산을 위한 추출조건이 보고된 바 있다(Singh *et al.*, 2003). 그 보고서에서 추출 buffer별 효소 회수량은 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5)에서 가장 높게 나타났으며 특히 β -D-glucosidase가 27.4 U/g 의 높은 활성을 보였으나 laccase와 lignin peroxidase는 본 연구의 큰느타리 SMC보다 10배 이상의 낮은 효소회수율을 보였다. 목질의 경우는 lignin 함량이 20-25%정도 함유하며 cellulose, hemicellulose, pectin과 견고한 화학적 결합을 이루고 있어 cellulose, hemicellulose 등의 섬유소생산을 위해서 lignin분해가 필수적이다. 담자균류는 lignin 분해효소인 lignin peroxidase, Lip, Mn peroxidase, laccase로 lignin을 분해하고 노출된 섬유소를 분해 당을 영양원으로 흡수 한다(Couto and Toca Herrera 2006; Zhao *et al.*, 1996). Laccase는 구리이온을 포함하는 산화효소로서 목질에 있는 lignin을 구성하는 phenol 성분을 분해하며 곰팡이류, 세균류, 식물체에 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며, 펄프의 탈색, 식품이나 폐수에 존재하는 유해 폐물성분을 제거하는 Bioremediation에 응용 될 수 있다(Abadulla *et al.*, 2000; Couto and Toca; 2006; Devi *et al.*, 2012). 바이오에너지 생산을 위하여 lignin함량이 적은 옥수수, 사탕수수 등의 식량자원이 biomass로 이용되고 있으나 식량 애그플레이션 현상 우려로 최근에는 수목, 폐목을 이용한 바이오에너지 생산에 박차를 가하고 있다(Angenent, 2007; Na and Kim, 2008). 그러나 목질의 주성분인 lignin분해에 의한 섬유소생산 효율을 증가시키는 것이 주된 과제로 화학적, 물리적 방법이 적용 되고 있으나 환경적인문제로 생물학적 방법인 lignin 분해효소이용에 관한 관심이 높아지고 있다. 유전자조환에 의한 lignin 분해효소의 대량발현이 세균, 효모, 곰팡이 숙주를 이용하여 시도되고 있으나(Gianluca *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2005; Hoshida *et al.*, 2005) 매우 낮은 발현율과 phenol 분해산물에 의한 숙주미생물의 성장저해가 문제점이다. 본 연구

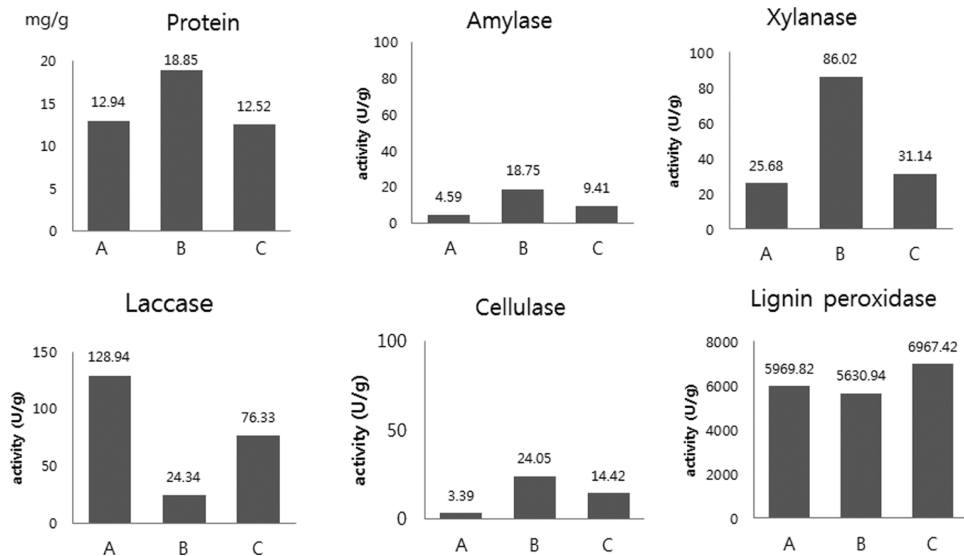


Fig. 1. Productivity of enzymes in *Pleurotus eryngii* SMCs collected from different mushroom farms (A, B and C). The results are mean of four replicate samples.

에서 폐자원인 큰느타리버섯 SMC로부터 lignin 분해효소가 다량생산할 수 있는 것으로 나타남에 따라 후속 연구에 따른 정제시스템개발과 산업적 적용연구가 뒤따른다면 저비용 고효율의 산업적 적용이 가능할 수 있을 것으로 기대된다.

Fig. 1은 큰느타리버섯 재배농가로부터 SMC를 수거하여 농가별 SMC내의 효소활성을 조사하였다. A농가 SMC는 g당 12.92 mg의 단백질량이 검출되었으며 laccase 생산이 가장 높게 나타났으며, B농가 SMC는 g당 18.85 mg의 단백질이 회수 되었으며 α -amylase, cellulase, xylanase 활성이 가장 높게 나타났으며 특히 xylanase의 경우는 3배 이상의 효소활성을 보였다. C농가의 경우 대부분의 효소가 고루 높은 활성을 나타냈으며 lignin peroxidase가 가장 높은 활성으로 검출되었다. 큰느타리 재배 배지의 표준재료는 미송톱밥, 콘코브, 면실박을 구성하며 목질톱밥이 50-80%의 높은 비율을 차지한다. 그러나 본 연구에 사용된 배지조성이 농가마다 달랐으며 효소활성의 차이는 효소기질이 되는 배지 원재료 조성에 기인된 것으로 생각되었다.

위의 cellulase와 xylanase활성이 가장 높게 나타난 A농가의 큰느타리버섯 SMC추출용액의 필터 페이퍼 (filter paper) 분해능을 celluclast 1.5 L (Nobozye사)와 비교하였다. 큰느타리버섯 SMC 5 g을 25 ml 증류수로 추출하고 40%의 ammonium sulfate로 단백질을 침전하여 5 ml의 물에 녹여 1 ml를 4 mL 0.05 M 구연산나트륨 완충용액(pH 4.8)에 혼합하여 최종 5 ml로 하였다. 비교군으로서 celluclast 1.5 L 원액(1,800 cellulase unit/mL)을 10배, 100배 희석한 효소용액 1 ml를 4 ml 0.05 M 구연산나트륨 완충용액(pH 4.8)에 혼합하여 사용하였다. SMC효소 혼합액과 celluclast 1.5 L의 효소 혼합액 5 ml씩을 Watman

No. 2의 필터 페이퍼 조각이 들어 있는 유리시험관에 첨가하고 50°C에서 1시간 반응한 후 filter paper의 분해정도를 확인하였다. Filter paper의 분해는 celluclast 1.5 L 10배 희석액에서 반응 2시간 후부터 시작하여 3시간에 완전히 분해되었다. 그러나 100배 희석한 celluclast 1.5 L와 큰느타리 SMC 추출 효소는 유사하게 5시간 정도 지난 후에 분해하기 시작하여 10시간 후에는 완전히 분해하였다(Fig. 2). celluclast 1.5 L 100배 희석한 반응액 18 cellulase unit/mL와 필적하는 필터 페이퍼 분해력을 가진 것으로 나타났다. Celluclast 1.5 L는 Nobozye사가 개발한 cellulase 효소로서 바이오에너지 생산을 위한 biomass

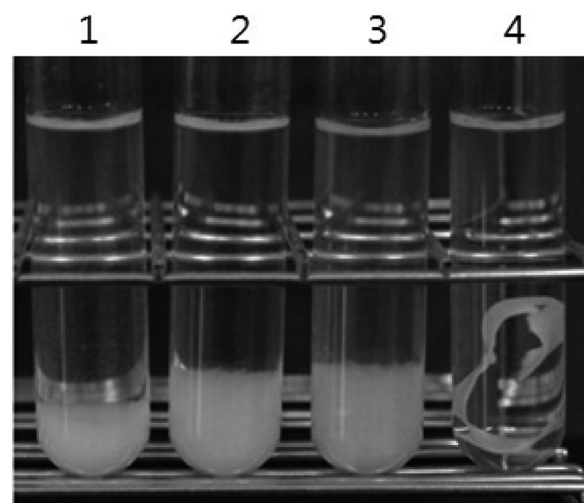


Fig. 2. Degradation of filter paper by water extracted *P. eryngii* SMC. 1. Celluclast 1.5 L (180 U), 2. Celluclast 1.5 L (18 U), 3. Water extracted solution from 5 g of *P. eryngii* SMC (Farm B), 4. Water Extracted solution from mushroom compost without *P. eryngii*.

Table 2. Effect of time on cellulase recovery with different extraction buffers

Extraction buffers	cellulase activity(U/g of SMC) at different time intervals (in h)		
	2	4	6
Distiled water	4.89	4.96	4.89
0.05 M sodium citrate (pH4.5)	7.61	7.15	7.08

The results are mean of four replicate samples.

의 cellulose 당화에 가장 보편적으로 이용 되는 효소이다 (Na and Kim, 2008). 큰느타리버섯 SMC는 g당 cellulase 18 cu를 함유 하는 것으로 나타나 다른 버섯 SMC의 cellulase 함량을 조사하고 보다 우수한 SMC를 선발하여 활성저해물질 등을 해결 한다면 cellulase로서의 산업적 적용이 가능 할 것으로 생각 되었다.

큰느타리버섯 SMC Laccase 생산성과 특성

큰느타리버섯 SMC에서 laccase활성이 특징적으로 가장 높게 나타남으로서 국내주요 생산버섯인 *P. ostreatus* (느타리버섯), *Flammulina velvtipes* (팽이버섯), *Lentinula edodes* (표고버섯)과 잎새버섯, 만가닥버섯, 노랑느타리버섯, 버들송이버섯, 잣버섯, 노루궁뎅이버섯 SMC와 laccase 효소활성을 비교 하였다. Fig. 3은 다양한 버섯 SMC 추출물을 ABTS와 반응하여 laccase 활성정도를 초록색발색 강도로 나타낸 것이다. 큰느타리버섯 SMC 추출물에서 진 초록색으로 발색되었으며 다음으로 느타리버섯은 옅은 초록색을 보였으며 팽이버섯, 잎새버섯, 만가닥버섯, 노랑느타리버섯, 버들송이버섯, 잣버섯, 노루궁뎅이버섯 SMC의 경우는 초록색 변색반응이 매우 미약하게 나타났다. 효소 활성 단위로 환산하여 볼때 큰느타리 SMC는 8.0 U/g의 높은 활성을 보였으며 느타리버섯 SMC 2.80 U/g보다 3배 이상의 laccase활성이 높게 나타났으며 표고버섯 SMC는 1.3 U/g로 팽이버섯은 0.35 U/g으로 laccase 활성이 매우 미약하였다. 따라서 큰느타리 SMC는 다른 버섯 SMC와 비교해서 월등히 높은 laccase 활성이 있는 것으로 나타남에 따라 큰느타리 SMC로 부터의 laccase 분리와 산업적 이용에 매우 유용할 것으로 사료 되었다.

다양한 곰팡이 종 내에서의 Laccase의 탈색제로의 이용

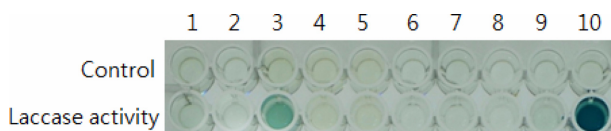


Fig. 3. Productivity of laccase in SMCs of different mushroom species 1. *P. cornucopiae*; 2. *Herichium erinacium*; 3. *P. ostreatus* (cultivar, Chunchu); 4. *Hypsizygus marmoreus*; 5. *Agrocybe cylindracea*; 6. *Lentinus lepideus*; 7. *Flammulina velvtipes* (brown cultivar); 8. *F. velvtipes* (white cultivar); 9. *Lentinula edodes*; 10. *P. eryngii* (Farm C). The green color was detected after 5 min of enzymic reaction. Control indicates addition of the boiled SMC samples in enzymic reaction.

연구가 수행되고 있다(Claus *et al.*, Devi *et al.*, 2012). 큰느타리 SMC 내에 특이적으로 다량의 laccase의 회수됨에 따라 큰느타리 SMC의 탈색효과를 bromophenol blue (BPB)로 실시하였다. 큰느타리버섯 SMC를 물로 추출하여 사용 하였으며 대조구로는 *P. ostreatus*로부터 분리한 Laccase (11 Unit/mg)를 Sigma 사로 부터 구입 하여 사용 하였다. Sigma사 laccase를 물에(165 unit/ml)로 녹이고 그 중 100 μ l와 SMC 100 μ l를 100 mM sodium acetate (pH 4.0) 100 μ l와 혼합하고 BPB의 최종농도는 0.01%와 0.05% 하여 12시간 동안 실온에 방치하여 탈색효과를 조사하였다. Fig. 4는 0.01%의 BPB파랑색으로 나타나다가 Sigma사 laccase 16.5 U를 처리 하였을 경우 파랑색이 옅은 노랑색으로 탈색되었으며 10배로 희석 하였을 때는 탈색효과가 현저히 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 큰느타리버섯 SMC의 경우는 Sigma laccase 4.5 U 정도의 효소활성을 보이면서 0.01%와 0.05% BPB에서 탈색효과를 보였다. 그러나 열처리 한 laccase 와 SMC는 활성을 잃어 BPB원색이 변화되지 않았다. 큰느타리버섯 SMC에는 다양한 효소가 복합적으로 존재하고 있으며 특히 lignin peroxidase가 다량함유하고 있어 탈색에 관여 할 수 있을 을 배제 할 수 없다. 실제적으로 느타리버섯의 배양여액

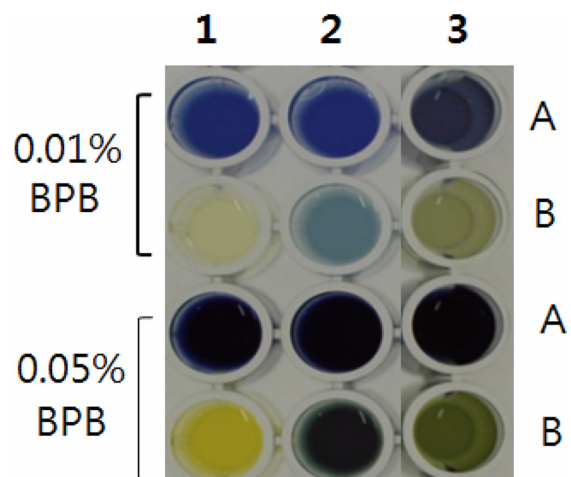


Fig. 4. Decolorization of bromophenol blue by water extracted *P. eryngii* SMC. Commercial laccase solution(1, 2) and SMC extract was boiled (A) and not boiled(B). 1. Sigma laccase(16.5 U), 2. Sigma laccase(1.65 U); 3. water extracted *P. eryngii* SMC; A: boiled laccase and water extracted SMC, B: laccase and water extracted SMC.

에서 추출한 lignin peroxidase가 remazol brilliant blue R의 탈색에 유효하다고 보고 된 바 있다(Vyas and Molitoris, 1995). *Lentinus polychrous* 버섯 SMC로 부터의 laccase 정제와 Remazol Brilliant Blue R 탈색효과가 보고 된 바 있으나(Saranyu and Rakrudee, 2007) 본 연구의 큰느타리버섯 SMC내에 *L. polychrous* SMC와 비교하여 약 3배 이상의 laccase가 많이 잔존 하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 큰느타리SMC의 laccase를 정제하고 laccase에 의한 활성효과로 한다면 보다 산업적 이용가능성이 있을 것으로 사료 되었다.

결론적으로 본 연구에서는 큰느타리버섯 SMC로부터 다량의 목질분해효소를 추출할 수 있는 방법을 정립 하였다. 특징적으로 큰느타리버섯 SMC는 팽이버섯, 느타리버섯SMC 보다 3배에서 15배까지 lignin 분해효소인 laccase가 많이 생산 되는 것으로 나타났다. 큰느타리버섯은 국내 주요 농산버섯 중에서 29%를 차지함으로서 다량의 SMC 확보에 문제가 없으며 SMC를 활용한 효소분리 시스템이 개발된다면 큰느타리 SMC 목질섭유소 분해효소의 산업적 생산과 활용이 가능 할 것으로 기대 된다.

적 요

큰느타리 수확 후 배지(spent mushroom compost, SMC)로부터 목질분해효소인 α -amylase (EC 3.2.1.1), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14), laccase (EC 1.10.3.2), xylanase (EC 3.2.1.8), β -xylosidase (EC 3.2.1.37), β -glucosidase (EC 3.2.1.21) cellulase (EC 3.2.1.4)가 다양한 buffer로 추출 되었으며 1 g SMC당 5 volume으로 첨가하고 2시간 동안 4°C에서 200 rpm속도로 진탕배양 시에 최적 효소회수율을 보였다. α -Amylase는 2.10에서 2.80 U/g (SMC)의 효소활성을 보였으며 β -glucosidase와 β -xylosidase는 0.1 U/g 이하의 가장 낮은 효소활성이 나타났다. Cellulase는 2.80 U/g와 xylanase는 5.0 U/g이상의 비교적 높은 효소회수율을 보였다. 큰느타리버섯 SMC 추출물은 상업용 laccase와 탈색효과 cellulase와는 filter paper분해활성을 비교하여 산업적 적용을 평가하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물식품기술기획평가원(IPET) 생명산업기술개발사업(111163031SB010)에 의하여 이루어진 결과의 일부분이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. and Gubitz, G. M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes*

- hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3357-3362.
- Angenent, L. T. 2007. Energy biotechnology: beyond the general lignocellulose-to-ethanol pathway. *Current Opinion in Biotechnology* 18:191-192.
- Ayala, M., Gonzalez-Munoz, S. S., Pinos-Rodriguez, J. M., Vazquez, C., Meneses, M., Loera, O. and Mendoza, G. D. 2011. Fibrolytic potential of spent compost of *Agaricus bisporus* to degrade forages for ruminants. *African J. of Microbiol. Res.* 5:643-650.
- Ball, A. S. and Jacson, A. M. 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Biores. Technol.* 54:311-314.
- Claus, H., Faber, G. and Konig, H. 2002. Redox mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microb. Biotech.* 59:672-678.
- Couto, S. R. and Toca Herrera, J. L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 500-513.
- Devi, V. M., Inbathamizh, L., Ponnu, T. M., Premalatha, S. and Divya, M. 2012. Dye Decolorization using fungal laccase. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 1:67-71
- Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K. and Akada, R. 2005. Copper dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1090-1097.
- Gianluca, B., Chiara L., Giovanni, M., Patrizia, R., Carla, P., Luciano, V. and Francesco, G. 2008. Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 79:731-741.
- Guo, M., Lu, F., Pu, J., Bai, D. and Du, L. 2005. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolic.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:178-183
- Ko, H. K., Park, S. H., Kim, S. H., Park, H. G. and Park, W. M. 2005. Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia Microbiol.* 50:103-106.
- Jang, H. W. 2011. Mushroom. *The Korean society of mushroom.* 15:19-30
- Matcham, S. E. and Wood, D. A. 1992. Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compost. *Biotechnol. Lett.* 14:297-300.
- Na, J. N. and Kim, J. S. 2008. The optimum condition of SSF to ethanol production from starch biomass. *Korean Chem. Eng. Res.* 46:858-862
- Saranyu, K. and Rakrudee, S. 2007. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for Remazol Brilliant Blue R decolourisation. *Biotechnology* 6:408-413
- Scarse, R. 1995. Cultivating mushrooms-the potential. *Mycologist* 9:18-19.
- Singh, A. D., Abdullah N. and Vikineswary, S. 2003. Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78:743-752.
- Vyas, B. R. M and Molitoris, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3919-3927.
- Zervakis, G., Venturella, G. and Papadopoulou, K. 2001. Genetic

polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Mycobiology* 147:3183-3194.

Zhao, J., De Koker, T. H. and Janse, B. J. H. 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:393-399.