

다양한 버섯 수확 후 배지로부터 목질섬유소 분해효소의 최적 추출 및 특성

임선화¹ · 이윤혜³ · 강희완^{1,2,4*}

¹한경대학교 미래융합기술대학원, ²JK 바이오테크, ³경기도농업기술원 버섯연구소, ⁴한경대학교 유전공학연구소

Optimal Extraction and Characteristics of Lignocellulytic Enzymes from Various Spent Mushroom Composts

Sun Hwa Lim¹, Yun Hae Lee³ and Hee Wan Kang^{1,2,4*}

¹Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

²JK BioTech Co. Ltd. Gyonggi, Ansung 456-749, Korea

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

⁴Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

ABSTRACT : Recovery of 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) from spent mushroom composts (SMCs) of *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Hericium erinaceum*, *Lyophyllum ulmarium*, *Agrocybe cylindracea*, *Lentinus lepideus*, and *Flammulina velvipes* were investigated using different extraction buffers. The maximum recovery of the enzymes was mostly detected in SMC extracts with tap water and 0.25% Triton X-100 by shaking incubation (200 rpm) for 2 h at 4°C. The xylanase (152 U/g) and laccase (8.1 U/g) activities were the highest in SMC extracts from *F. velvipes* and *P. eryngii*. In addition, high enzymatic activities of α -amylase (3.6 U/g) and cellulase (3.4 U/g) was detected in SMC extract of *A. cylindracea*. Furthermore, cellulase and laccase activities of SMCE from *P. eryngii* were compared to commercial enzymes.

KEYWORDS : Lignocellulytic enzymes, Recovery, Spent mushroom composts

서 론

담자균류는 수목에 기생하며 xylanase, cellulase, lignin 분해효소 등 목질분해효소를 다량 분비하여 고분자의 목질 섬유소를 수용성 저분자의 당으로 분해하여 균사의 영양 흡수과정을 거쳐 영양원으로 이용한다(Scarse, 1995). 버섯

의 인공재배는 발전을 거듭하여 아시아, 유럽, 미주 등 전 세계 각 지역에서 다양한 버섯이 식용으로 재배되고 있다. 특히, 버섯은 친환경 기능성 농산물로서 항암, 항산화 효과 등 약리기능 및 건강보호 효과가 커서 건강식품으로도 수요가 증가하고 있다. 버섯인공 재배 시에 사용되는 배지재료는 면실박, 비트펄프, 콘코브, 톱밥 등 농업 잔여 폐자원이 주로 이용되고 있으며 이들은 cellulose, hemicellulose, lignin 등 목질섬유소로 구성되어 있다. 느타리버섯의 인공 재배는 봉지 또는 병 재배형태로 종균을 접종한 후 30~40일의 균사 성장 과정과 10여일의 자실체 유도 과정을 거쳐 자실체를 수확하는데, 자실체를 수확하고 남은 배지를 수확 후 배지(spent mushroom compost, 이하 SMC로 약칭)라고 한다. SMC는 배지를 구성하는 기질의 입자표면에 균사가 생장하는데 목질섬유소를 분해하기 위하여 cellulase, xylanase 및 lignin 분해효소 등의 목질분해효소를 세포외로 분비하여 기질을 분해하고 영양원을 흡수한다. 따라서 SMC 내에는 균사체가 생산하는 목질분해효소가 다량 잔존해 있을 것으로 추정된다. 국내에서는 SMC를 동물사료, 퇴

Kor. J. Mycol. 2013 September, 41(3): 160-166
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.3.160>
 pISSN 0253-651X
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: kanghw2@hknu.ac.kr

Received August 18, 2013

Revised September 25, 2013

Accepted September 25, 2013

©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.

비 등으로 활용하고 있으며 일부 농가에서는 배지로 가공하여 재사용하기도 한다. 버섯 SMC로부터 효소추출연구는 표고버섯, 여름느타리, 양송이, 표고버섯, 느타리버섯, 팽이버섯 등에서 수행되었다(Ayala *et al.*, 2011; Ball and Jacson, 1995; Ko *et al.*, 2005; Matcham and Wood, 1992; Singh *et al.*, 2003). 국내에서 병 또는 봉지 재배 후 생산되는 SMC는 오염이 거의 없고 균사 활성화와 효소활성이 그대로 남아있어 효소생산을 위한 매우 좋은 재료로 판단된다. 큰느타리버섯의 SMC는 laccase가 다른 버섯에 비하여 10배 이상 높은 생산량을 보여 remazol brilliant blue R (RBBR)과 congo red와 같은 인공색소의 탈색에 유용하게 이용될 수 있어 SMC 효소의 산업적 적용 가능성을 보여 주었다(Lim *et al.*, 2012). Laccase 분해효소 대량생산을 위해서 세균, 곰팡이 등 미생물을 이용한 유전자 재조합에 의한 과발현 방법이 사용되고 있으나, lignin 분해 시 발생하는 폐놀성분은 미생물 성장을 억제하여 산업적 효소생산에 걸림돌이 되고 있다(Couto and Toca, 2006; Guo *et al.*, 2005).

국내의 농산버섯 총생산량은 연간 173,354톤이 생산되고 있으며 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*), 큰느타리버섯 (*P. eryngii*), 팽이버섯 (*Flammulina velvipes*)은 국내 농산버섯의 총 버섯 생산량의 87%를 차지하고 있다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2013). 자동화 시설재배 확대에 따라 이들 버섯의 재배 시 생산되는 버섯 수확 후 배지의 양은 연간 200만 톤 이상이 될 것으로 추정되고 있다(Lim *et al.*, 2012). 최근 버섯 소비자의 수요 확충을 위하여 새로운 버섯 품목의 인공재배방법이 개발 보급되면서 노루궁뎅이버섯 (*Hericium erinaceum*), 느티만가닥버섯 (*Lycophyllum ulmarium*), 노랑느타리버섯 (*Pleurotus cornucopiae*), 잣버섯 (*Lentinus lepideus*), 버들송이버섯 (*Agrocybe*) 등 다양한 버섯이 병 또는 봉지재배로 재배면적이 증가하고 있다.

본 연구에서는 노루궁뎅이버섯 (*H. erinaceum*), 느티만가닥버섯 (*L. ulmarium*), 노랑느타리버섯 (*P. cornucopiae*), 잣버섯 (*L. lepideus*), 버들송이버섯 (*A. cylindracea*) 버섯 등의 SMC로부터 다양한 추출 buffer를 이용하여 목질분해효소의 회수율을 조사하였으며 이의 산업적 이용성을 검토하였다.

재료 및 방법

SMC 수집 및 목질분해효소 추출

느타리버섯, 큰느타리버섯, 팽이버섯 SMC는 병 재배 버섯농가에서 분양 받았으며, 느티만가닥버섯, 잣버섯, 백일송이버섯, 노루궁뎅이버섯 SMC는 경기도 버섯연구소로부터 분양 받아 사용하였다. 추출 buffer별 효소회수율을 조사는 느타리버섯과 팽이버섯의 SMC 5 g을 fulcon 튜브에 넣고 추출 buffer 25 ml 첨가 후 2시간 동안 실온에서 200 rpm에서 진탕하였다. 추출 buffer는 tap water, 1% NaCl, 0.05 M sodium citrate, 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-100로 하였다. 추출 buffer SMC 혼합액을 미라크로스(miracloth, pore size: 22~25 μ m)로 거르고 10,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 SMC 잔여물을 침전제거하고 상등액을 SMC extract (이하 SMCE로 약칭)로 하여 실험에 이용하였다.

효소활성검정

α -Amylase 효소활성은 SMCE 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 측정하였으며 maltose를 표준으로 분당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit로 하고 U/g로 표시하였다. Cellulase는 상기 효소추출액 50 μ l에 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 녹인 1% carboxymethyl cellulose를 기질로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 생성된 환원당을 540 nm 파장에서 DNS 방법에 따라 측정하였으며 glucose를 표준으로 1분 당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit로 하고 U/g로 표시하였다. Laccase활성은 SMCE 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 OD값의 변화량을 unit로 정의하였다. Xylanase활성은 SMCE 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 측정하였으며 D-xylose를 표준으로 1분 당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit로 하고 U/g로 표시하였다. β -glucosidase활성 측정을 위하여 0.5 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)를 0.5 mM sodium citrate buffer에 녹여 기질로 하였으며 p-nitrophenol을 표준으로 사용하여 1분 당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit로 하고 U/g으로 표시하였다. β -xylosidase 활성은 0.5 mM sodium citrate buffer에 녹인 0.5 mM p-nitrophenyl- β -D-xyloside를 기질로 하여, p-nitrophenol을 표준으로 1분 당 1 μ M을 분해하는 것을 1 unit로 하고 U/g으로 표시하였다. 단백질함량은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Bradford(1976) 방법에 의하여 결정하였다.

SMC 추출물의 탈색효과

느타리버섯, 큰느타리버섯, 팽이버섯, 노루궁뎅이버섯, 느티만가닥버섯, 노랑느타리버섯, 잣버섯, 버들송이버섯 등의 SMCE 25 μ l을 3 ml의 0.5% remazol brilliant blue R (RBBR)을 포함한 3 ml의 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)에 첨가하고 0~24시간 동안 시간을 달리하여 반

응하였으며 Spectrophotometer (Tecan SUNRISE, Austria)의 595 nm 파장에서 측정하였다. 탈색백분율(%)은 $(A_0 - A) / A_0 \times 100$ 으로 산출하였으며 A₀는 RBBR의 흡수파장, A는 반응샘플의 흡수파장을 나타낸다.

결과 및 고찰

추출 buffer별 느타리버섯 및 팽이버섯 SMC로부터 효소 회수율

느타리버섯, 큰느타리버섯(새송이), 팽이버섯이 우리나라 농산버섯 생산량의 88% 차지하며 대부분 자동화시스템에 의한 병 재배로 버섯을 생산하기 때문에 보통은 버섯균의 배양과 자실체 생육 후에는 2, 3주기 재배를 하지 않는다. 따라서 수확 후 배지는 완전히 분해되지 않고 기질이 일부 남아 있으며 버섯균사체는 배지 표면에 밀착하여 있으면서 균사와 효소활성이 남아 있는 것으로 추정된다. 이는 큰느타리버섯의 SMC로부터 효소추출 조건에 관하여 조사 한 결과 밝혀진 바 있다(Lim *et al.*, 2012). 본 연구에서는 느

타리버섯과 팽이버섯 SMC에서 추출 buffer별 효소회수율을 조사하였으며, SMC로부터 목질분해효소를 추출하기 위하여 tap 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-100 등을 추출 buffer로 하여 각각의 buffer에서 α -Amylase, cellulase, β -D-glucosidase, xylanase, β -xylosidase, laccase 등의 활성을 조사하였다. 느타리버섯 SMCE의 추출 buffer별 단백질량은 0.47 mg/SMC g-0.89 mg/g이었으나 팽이버섯 SMCE에서는 1.2~1.57 mg/g으로 2배 이상의 단백질량이 검출되었다(Table 1, Table 2). 큰느타리버섯 SMCE의 경우에는 평균적으로 단백질이 0.55 mg/g 추출된 것으로 보고되어 느타리버섯과 팽이버섯에 비하여 낮은 단백질 함량을 보였다(Lim *et al.*, 2012). 특히 느타리버섯과 팽이버섯의 SMCE에 포함된 단백질량의 확인결과 0.25% Triton X-100이 포함된 buffer에서 증가하는 경향치가 있었고, 나머지 추출 buffer 간에는 유의적인 차이가 없었다.

Table 1. Productivity of lignocellulytic enzymes from SMC of *P. ostreatus* by different extraction buffers

Enzyme	Enzymic activity (Unit/g)						
	Extraction buffer						
	A	B	C	D	E	F	G
Protin (mg/g)	0.545±0.012	0.488±0.013	0.504±0.011	0.639±0.015	0.720±0.015	1.206±0.014	0.896±0.018
Amylase	1.040±0.025	1.137±0.022	0.970±0.024	0.847±0.021	0.803±0.019	0.891±0.019	10471±0.025
Cellulase	1.181±0.045	1.567±0.033	2.165±0.052	.611±0.049	1.216±0.050	1.682±0.056	1.418±0.039
β -D-glucosidase	0.324±0.020	0.230±0.021	0.283±0.025	0.537±0.024	0.643±0.027	1.087±0.032	0.520±0.043
Xylanase	11.157±2.463	17.524±2.996	17.391±3.510	12.616±3.122	12.185±3.227	19.115±3.592	26.941±4.015
β -xylosidase	0.011±0.005	0.011±0.005	0.010±0.005	0.324±0.026	0.226±0.036	0.449±0.039	0.014±0.008
Laccase	2.784±2.261	1.531±0.199	1.969±2.208	1.859±0.222	0.471±0.041	0.614±0.098	2.141±0.258

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 (\pm S.D.) of four replicate samples.

Table 2. Productivity of lignocellulytic enzymes from *Flammulina velvtipes* SMC by different extraction buffers

Enzyme	Enzymic activity (Unit/g)						
	Extraction buffer						
	A	B	C	D	E	F	G
Protin (mg/g)	1.233±0.273	1.342±0.321	1.274±0.335	1.335±0.332	1.152±0.256	1.260±0.240	1.571±0.296
Amylase	2.130±0.713	2.429±0.801	2.271±0.775	2.314±0.759	1.866±0.700	1.796±0.726	2.385±0.749
Cellulase	3.044±0.556	3.299±0.540	3.439±0.499	2.815±0.506	1.682±0.423	2.824±0.586	3.404±0.467
β -D-glucosidase	4.779±0.596	4.201±0.583	4.562±0.599	4.362±0.603	5.203±0.594	4.507±0.558	4.339±0.644
Xylanase	62.305±11.023	65.422±11.895	63.631±11.124	62.238±12.012	60.713±11.905	60.448±11.854	64.427±12.008
β -xylosidase	1.152±0.092	1.065±0.082	0.340±0.063	1.049±0.067	0.946±0.069	0.987±0.060	1.082±0.085
Laccase	0.358±0.033	0.376±0.034	0.555±0.029	0.873±0.037	0.354±0.035	0.449±0.026	0.939±0.031

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 (\pm S.D.) of four replicate samples.

추출 buffer에 따른 느타리버섯과 팽이버섯 SMCE의 α -amylase, cellulase, β -glucosidase, xylanase, β -xylosidase, laccase의 효소활성을 조사한 결과 느타리버섯 SMCE에서 amylase활성은 추출 buffer별로 0.8 U/g에서 1.4 U/g로 특이 할만한 유의차는 없었으며 cellulase는 0.05 M sodium citrate (pH 4.8)에서 가장 높은 2.16 U/g의 활성을 보였고 xylanase는 0.25% Triton X-100에서 26.94 U/g으로 물 추출(11.1 U/g)보다 2배 이상의 활성을 보였다. laccase는 물 추출에서 2.78 U/g으로 가장 높은 활성을 보였다(Table 1). 팽이버섯 SMCE는 느타리버섯 SMCE에 비하여 laccase활성을 제외하고 모든 효소활성이 높게 나타났으며 이는 단백질생산량이 많은 것으로 추정되는 원인이 되었을 것으로 사료되었다. 특히 팽이버섯의 SMCE의 xylanase는 추출 buffer별 60 U/g에서 65 U/g으로 느타리버섯 SMCE보다 4배에서 5배 높은 효소활성을 보였다. 큰느타리버섯 SMCE의 xylanase 활성은 5 U/g으로 보고되었기 때문에 (Lim *et al.*, 2012) 팽이버섯 SMCE는 xylanase가 특징적으로 많이 생산 되는 것으로 나타났다.

결론적으로 추출 buffer별 SMC추출물의 효소회수율을 조사한 결과 최적의 추출 buffer는 cellulase는 0.05 M sodium citrate (pH 4.8)에서, 또 xylanase는 Tap water 또는 0.25% Triton-X buffer가 양호한 것으로 나타났으며 다른 효소의 경우는 큰 유의차가 없었다.

Singh 등(2003)이 여름느타리버섯(*P. sajor-caju*) SMC로부터 대량효소생산을 위한 추출조건을 조사한 결과 추출 buffer별 효소 회수량은 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5)에서 가장 높게 나타났으며 특히 β -D-glucosidase가 27.4 U/g로 물 추출에 비하여 2배의 효소회수율을 보였다. 본 연구에서는 β -D-glucosidase활성이 느타리 SMCE와 팽이버섯 SMCE에서 각각 약 0.5 U/g와 약 4.5 U/g으로 여름느타리 SMCE보다 현저히 낮은 효소활성을 보였으나 cellulase와 xylanase는 비교적 높은 활성을 보였다. 특히 큰느타리 SMCE의 laccase 활성은 여름느타리버섯 SMCE 보다 약 60배 이상의 효소활성이 높은 것으로 나타났다. Ball과 Jacson(1995)은 양송이 SMC의 추출 buffer별 효소회수율을 조사한 결과 0.5 M phosphate buffer (pH 7.5)보다 물 추출한 SMCE에서 10배 이상의 xylanase 활성을 보였다고 보고한 바 있다. 여름느타리의 경우 추출 buffer에 SMCE를 넣고 고속으로 호모제나이저로 처리한 후 효소회수율을 조사한 결과 일반적인 진탕추출방법에 비하여 큰 유의차가 없는 것으로 나타나 상반된 결과를 보였다(Singh *et al.*, 2003). SMCE 효소활성 안정성은 60°C 이상의 고온에서도 SMC 효소가 안정한 것으로 보고된 바 있다(Ball and Jacson, 1995). 본 연구에서는 큰느타리 SMCE의 보존기간별 laccase활성을 조사하고 있으며 4개월까지는 효소활성에 차이를 보이지 않아 안정한 효소활성이 유지되는 것으로 잠정 확인되었다(data는 제시하지 않음).

다양한 버섯 종 유래 SMC의 효소활성 특성

다양한 버섯 종에서 생산된 SMC의 효소활성 특성을 조사하기 위하여 국내 주요생산버섯인 느타리버섯, 큰느타리버섯, 팽이버섯과 노루궁뎅이버섯, 느티만가다버섯, 노랑느타리버섯, 잣버섯, 버들송이버섯 등의 SMC 10 g을 물 30 ml에 혼합하여 2시간 동안 200 rpm에서 진탕하고 원심분리하여 상등액을 SMCE용액으로 하여 α -amylase, cellulase, xylanase, β -xylosidase, laccase 등 효소활성을 조사하였다. 느타리버섯 SMCE는 α -amylase (2.37 U/g), cellulase (1.67 U/g), xylanase (91.5 U/g), laccase (2.97 U/g) 등이 활성을 보여 다른 버섯 종의 SMCE에 비하여 고른 효소활성을 보였다(Fig. 1). 큰느타리버섯은 laccase (8.1 U/g) 이외에 α -amylase (1.5 U/g), cellulase (1.25 U/g), xylanase (10.5 U/g) 등의 활성이 인정되었으나 다른 버섯 종의 SMCE에 비하여 낮은 효소활성을 보였다. 팽이버섯 SMCE는 가장 높은 xylanase (153 U/g) 활성을 보였으며 α -amylase와 cellulase도 비교적 높은 활성이 나타났으나 laccase (0.4 U/g)는 낮은 활성을 보였다. 버들송이 SMCE는 laccase를 제외한 α -amylase (3.6 U/g)와 cellulase (3.2 U/g) 활성이 공시한 SMC 중에서 가장 높게 나타났다. 느티만가다버섯은 cellulase 활성이 극히 미약하며 그 밖의 효소활성도 공시된 SMCE에 비하여 평균 이하로 나타났다. 느티만가다의 종균접종 후 자실체형성까지의 기간이 약 100일 정도 소요되는데 이마도 전체적으로 낮은 목질분해효소의 활성이 균사생장과 자실체형성을 더디게 하는 원인이 될 수 있을 것으로 사료되었다. 잣버섯 SMCE는 cellulase 활성(2.73 U/g)이 비교적 높게 나타났으나 다른 효소활성은 약하였다. 노루궁뎅이버섯 SMCE는 α -amylase (1.28 U/g)와 cellulase (1.76 U/g)가 약간 높게 나타났지만 xylanase와 laccase 활성은 26.7 U/g과 0.4 U/g으로 미약하여 특이할만한 효소 활성을 보이지 않았다. Fig. 2는 8종류의 버섯 SMCE를 이용하여 RBBR의 탈색효과를 시간별로 조사한 것이다. 큰느타리 SMCE는 탈색반응 4시간 후부터 반응이 시작되어 6시간대에 50% 이상의 탈색율이 보이다가 9시간대에는 완전한 100%의 탈색효과를 보였다. 그러나 잣버섯과 팽이버섯 SMCE는 시간이 경과하여도 거의 탈색효과를 보이지 않아 laccase 함량이 적은 결과로 분석되었다. 느티만가다 SMCE에서는 반응 5시간 이후에 14%의 탈색율을 보이다가 12시간대에 큰느타리 SMCE와 필적하는 탈색율을 보였다. 그러나 느타리 SMCE의 탈색율은 노랑느타리버섯보다 떨어지며 6시간 이후에 탈색율 증가가 시작되어 24시간 경과하여도 65%의 낮은 탈색율을 보였다. 각 버섯종별 탈색율에 있어서 가장 많은 laccase 생산량을 보인 큰느타리버섯 SMCE에서 가장 높은 탈색율을 보여 laccase가 탈색에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

다양한 곰팡이에서 탈색제로 laccase의 이용 연구가 보고된 바 있다(Claus *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2012). 또한 느타리버섯의 배양여액에서 추출한 lignin peroxidase도 RBBR

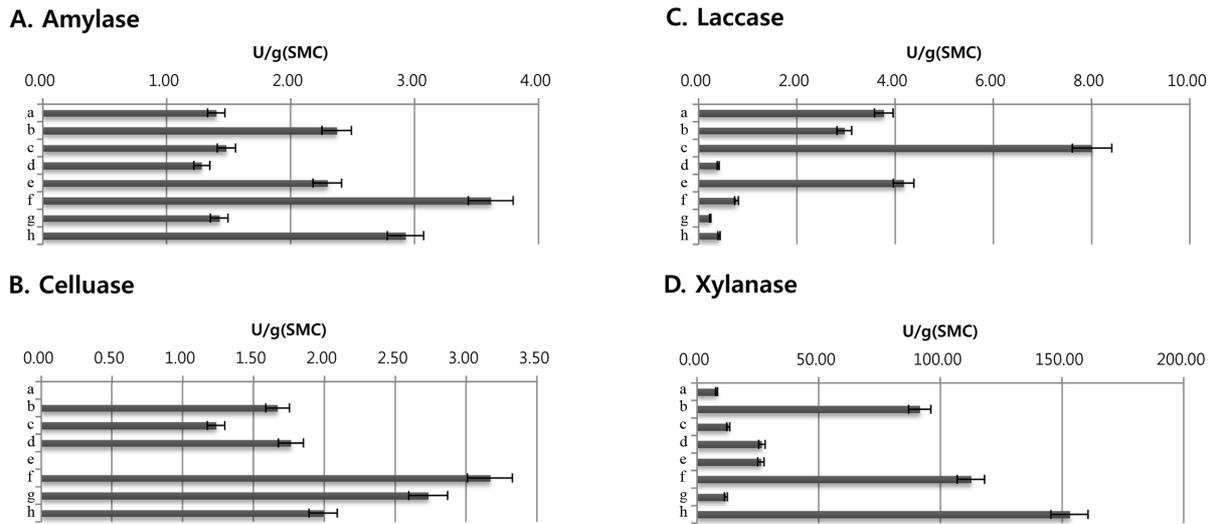


Fig. 1. Productivity of enzymes in spent mushroom composts (SMCs) of different mushroom species. a, *Pleurotus cornucopiae*; b, *Pleurotus ostreatus*; c, *Pleurotus eryngii*; d, *Hericiium erinaceum*; e, *Lyophyllum ulmarium*; f, *Agrocybe cylindracea*; g, *Lentinus lepideus*; h, *Flammulina velvtipes*. The results are mean (\pm S.D.) of three replicate samples.

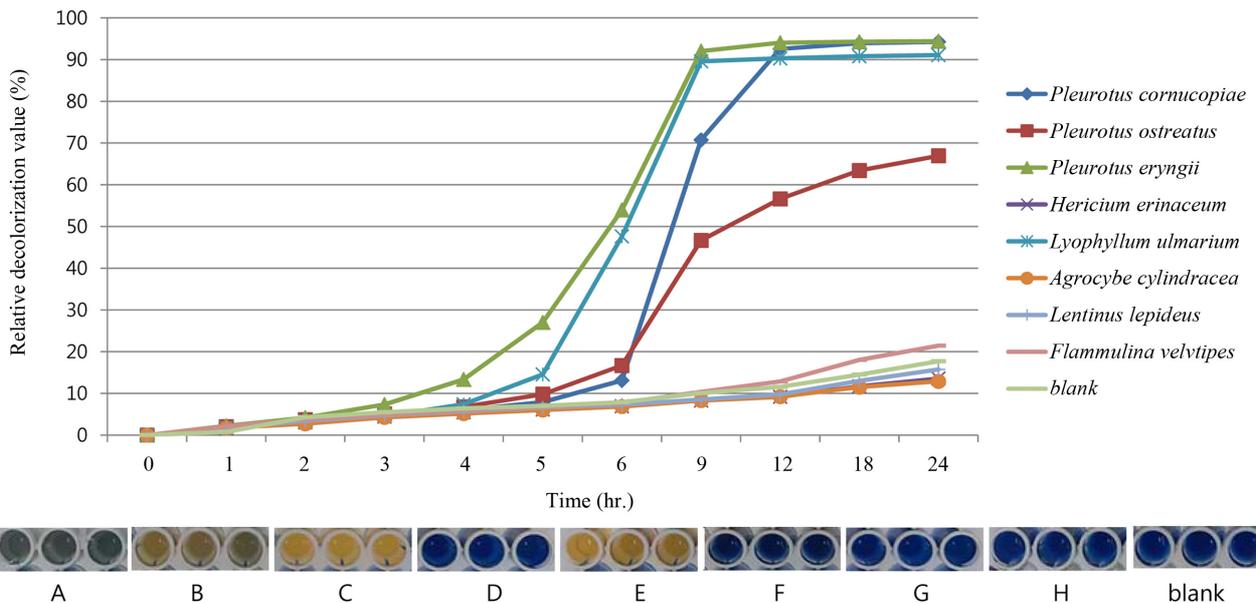


Fig. 2. Decolorization of Remazol Brilliant Blue (RBBR) by extracts from spent mushroom composts (SMCs) of eight mushroom species. The RBBR decolorization in SMCE was monitored at 595 nm absorbance using a spectrophotometer. A, *Pleurotus cornucopiae*; B, *Pleurotus ostreatus*; C, *Pleurotus eryngii*; D, *Hericiium erinaceum*; E, *Lyophyllum ulmarium*; F, *Agrocybe cylindracea*; G, *Lentinus lepideus*; H, *Flammulina velvtipes*; Blank, Distilled water.

의 탈색에 유효하다고 보고된 바 있다(Shin *et al.*, 1997). SMC를 이용한 탈색연구는 *Lentinus polychrous* 버섯 SMC에서 분리된 laccase에 의한 RBBR 탈색효과가 보고된 바 있으며(Saranyu and Rakrudee, 2007) 느타리버섯의 SMC 추출물의 탈색이용도 보고된 바 있다(Papinutti and Forchiassin, 2010). 본 연구에서 제시한 노랑느타리, 느티만가닥버섯 SMCE의 탈색효과에 관해서는 아직 보고되지 않았다.

일반적으로 laccase는 분자상의 산소를 전자수용체로 이용하는 phenoloxidase로 작용하여 mono- 및 폴리페놀성 기질의 ortho- 및 para-hydroxyl group이나 방향족 아민을 직접적으로 산화하며(Field *et al.*, 1993), 산화 환원 매개체로서 작용하는 인공기질이나 대사산물이 존재할 경우 비페놀성 리그닌 단위뿐 만 아니라 몇몇 방향족 인공화합물과 지방족 인공화합물을 분해하는 것으로 보고되어 있다(Eggert *et al.*, 1996). 다양한 기질에 대하여 촉매반응을 나

타내는 특성으로 인해 laccase는 광범위한 산업분야에서 사용되며, 특히 오염된 수질 및 토양환경을 재 생, 복원하는 bioremediation 산업과 리그닌 제거, 섬유소 표백 등의 펄프산업 등에서 연구가치가 매우 높다(Couto *et al.*, 2006; Kunamneni *et al.*, 2007)

SMC의 산업적 유용성

큰느타리버섯 SMCE의 효소활성을 다른 상용화된 효소 활성과 비교하기 위하여 *Trichoderma reesei*로부터 분리된 cellulase (Sigma, 1000 Unit/ml)와 *P. ostreatus*부터 분리된 laccase (Sigma, 11 Unit/ml)를 사용하였다. Fig. 3(a)에서와 같이 물 추출 큰느타리버섯 SMCE 20 µl, 10 µl, 5 µl와 상용 cellulase (Sigma, 1000 Unit) 1 unit, 10 unit를 1%의 carboxymethyl cellulose (CMC)가 첨가된 agar plate에 떨어트리고 37°C에서 2시간 반응시키고 0.1% congo-red 5 ml를 CMC 배지에 첨가하여 염색시킨 후 1 M의 NaCl buffer로 congo-red를 제거하여 노란색 halo zone 형성 정도로 효소 활성을 관찰 평가한 결과 큰느타리 SMCE의 cellulase 활성은 상용 cellulase의 10 U와 필적하는 halo zone을 형성하였다. Fig. 3(b)는 laccase 활성을 비교한 것으로 0.5 M 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)를 첨가한 agar plate에 상용 laccase (Sigma, 11 Unit/ml)와 상용 laccase를 10배 희석한 효소액과 큰느타리 SMCE를 각각 25 µl를 떨어트리고 실온에서 1시간 반응 후 효소 활성을 비교 하였다. 큰느타리 SMCE는 상용 laccase 0.055 Unit와 필적하는 초록색 존을 형성할 정도의 활성을 보였다. 일반적으로 큰느타리 병재배는 800 g 배지에 균을 접종하여 배양을 시작하며 배양 및 자실체유도기간 약 40일 경과 후 버섯 수확 후 배지는 30%의 수분이 감소하여 약 600 g이 된다. SMC 600 g을 기준으로 하여 5 volume의 buffer를 이용하여 생산되는 SMCE는 3000 ml가 되며 0.11 Unit/ml로 볼 때 laccase의 총량은 약 300 Unit의 높은 효소 회수율을 예측할 수 있어 효소생산을 위한 정제 기술과 효소활성 안정화가 확립된다면 산업적 접근이 가능

할 것으로 사료된다.

목질섬유소 분해효소는 펄프, 제지 산업이외에도 세제공업, 농산물 가공, 섬유 등 다양한 산업 분야에 잠재적인 시장을 갖고 있다. SMC를 이용연구에서 독성성분인 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)를 제거하는데 유용하게 이용되어 bioremediation에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Gasecka *et al.*, 2012). 최근 바이오에너지 생산과정에 사용되는 당화 효소는 세계 산업용 효소 시장의 약 11%를 점하고 있어 목질섬유소분해효소의 가치가 새롭게 대두되고 있으며 대부분 관련 유전자의 재조합과 미생물배양으로 효소생산을 하고 있다(Gianluca *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2005).

일반적으로 미생물의 효소생산을 위해서는 bioreactor와 배지를 비롯한 관련 막대한 시설비용을 필요로 한다. 그러나 SMC의 이용은 저렴한 원재료의 이용과 부가적인 배양이 필요하지 않아 저비용에 의한 생산 공정 절감이 가능하다. 잎새버섯의 SMC추출물을 이용한 동시 당화발효에 의한 에탄올생산에 관한 연구가 수행되어 SMC의 바이오에너지 생산 효소이용 가능성을 제시한 바 있다(Hideno *et al.*, 2007). SMC의 효소생산은 버섯 농가에서 문제시되고 있는 농업 폐기물인 SMC를 유용효소생산에 이용함으로써 환경오염을 감소시키고 고부가가치의 유용자원으로 전환시킬 수 있는 발판이 될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*), 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*), 팽이버섯(*Flammulina velvtipes*)과 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*), 느티만가닥버섯(*Lyophyllum ulmarium*), 노랑느타리버섯(*Pleurotus cornucopiae*), 잣버섯(*Lentinus lepideus*), 버들송이버섯(*Agrocybe cylindracea*)의 수확 후 배지 (spent mushroom compost, SMC)로부터 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) 및 cellulase (EC 3.2.1.4)의 활성을 추출 buffer별로 조사하였다. 물과 0.25% Triton X-100가 효소 회수율이 높았으며 xylanase는 팽이버섯 SMC에서 153 U/g으로 가장 많이 생산되었으며 laccase는 큰느타리버섯 SMC에서 8.0 U/g로 가장 높았다. α-amylase (3.6 U/g)와 cellulase (3.2 U/g)는 버들송이 SMC에서 가장 많이 생산되었다. 큰느타리버섯 SMC 추출물의 laccase와 cellulase 활성은 상용 효소와 필적하는 효소활성을 보여 산업적 이용 가능성을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물기술기획평가원(IPET) 생명산업 기술개발사업(111163031SB010)에 의하여 이루어진 결과의

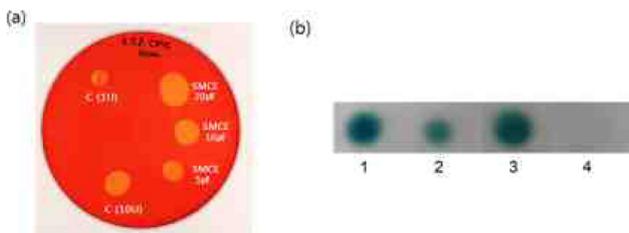


Fig. 3. Comparisons of enzymatic activity of spent mushroom compost (SMC) extracts from *Pleurotus eryngii*. (a) cellulase activity on CMC medium represents with halo zone size; C, commercial cellulase (Sigma, 1000 unit/ml). (b) Laccase activity on ABTS medium represents with green zone size; 1: commercial laccase (Sigma, 11 unit/ml) 25 µl, 2: commercial laccase (Sigma, 1.1 unit/ml) 25 µl, 3: *P. eryngii* SMCE, 4: Distilled water.

일부분이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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 *Agaicus birsorus* to degrade forages for ruminants. *African J. 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.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic. Biochem.* 72: 248-254.
- 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. *Biotechnol. Adv.* 24: 500-513.
- Devi, V. M., Inbathamizh, L., Ponnu, T. M., Premalatha, S and Divya, M. 2012. Dye decolorization using fungal laccase. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* 1:67-71.
- Eggert, C, U., Temp, J. F., Dean and Eriksson, K. E. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of nonphenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391:144-148.
- Field, J. A., E. De Jong, G. Feijoo-Costa, and DeBont, J. A. M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:44-49.
- Gasecka, M., Drzewiecka, K., Stachowiak, J., Siwulski, M., Golin'ski, P., Sobieralski, K. and Golak, I. 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by spent mushroom substrates of *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes*. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 11:39-46.
- 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 DNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:178-183.
- Hideno, A., Aoyagi, H., Isobe, S. and Tanaka, H. 2007. Utilization of spent sawdust matrix after cultivation of *Grifola frondosa* as substrate for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Food Sci. Technol. Res.* 13:111-117.
- 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.
- Kunamneni, A., Ballesteros A., Plou, F. J. and Alcade, M. 2007. "Fungal laccases. a versatile enzyme for biotechnological applications," in Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, A. Mendez- Vilas, Ed., pp. 233-245, Formatex, Badajoz, Spain,
- Lim., S. H., Kim, J. K., Lee, Y. H. and Kang, H. W. 2012. Production of lignocellulytic enzymes from spent mushroom compost of *Pleurotus eryngii*. *Kor. J. Mycol.* 40: 152-158. (in Korean).
- Matcham, S. E. and Wood, D. A. 1992. Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compost. *Biotechnol. Lett.* 14: 297-300.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2011. [cited 2013 sep] Available from: <http://library.mafra.go.kr/skyblueimage/17767.pdf>
- Papinutti, L and Forchiassin, F. 2010. Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15:1102-1109.
- 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.
- Shin, K, S, Oh, I. K. and Kim, C. J. 1997. Production and purification of remazol brilliant blue R. decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1744-1748.