

## Flammulina velutipes에 의한 Laccase의 생산과 효소적 특성

李 在 成 · 徐 達 善

嶺南大學校 食品加工學科

# Production and Enzymatic Properties of Laccase from *Flammulina velutipes*

Jae-Sung Lee and Dal-Sun Suh

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 632, Korea

**Abstract:** The production of laccase by the fungus on various media was studied. The characteristics of the enzyme were also studied regarding to the optimum pH, stability, Km value, and inactivation. The maximum activity of laccase reached the 40 days of incubation and the barley straw extract appeared to be a strong inducer for laccase. The enzyme showed stability at wide range of pH with optimum pH of 6.6. Temperature stability of the enzyme was high. Laccase was not inactivated by the organic solvents used for the precipitation. The enzyme, however, was completely inactivated by trichloroacetic acid and sodium azide.

**Keywords:** Laccase, *Flammulina velutipes*, Lignin degrading enzyme.

섬유체 자원의 활용에 관한 연구의 일환으로 ligno-cellulose의 lignin 부분(Barton, 1967; Kleinert, 1967; Nimz, 1965)을 효소적 분해에 의하여 제거 하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 그렇게 함으로써 cellulose의 분해율을 높여 발효원료 혹은 사료로서의 이용 가치를 높이고자 하는 것이다.

Lignin 분해효소로 총칭되는 lignase의 대표적인 효소인 laccase(Yoshida, 1883; Bertrand 1895)의 생산 균주, 배지, 배양 조건을 연구하고 각 균주에 의한 laccase의 효소적 특성을 규명하는 것은 그 일차적 단계라 할

수 있다.

저자(1985) 등은 *P. ostreatus*가 생산하는 laccase의 부분정제 및 효소적 특성에 관한 연구에 이어 *F. velutipes*가 생산하는 laccase의 효소적 특성을 조사하여 발표한다.

### 材料 및 方法

균주 및 배양

농촌진흥청 보관 *Flammulina velutipes*를 양파 기본

Table I. Media and their preparations.

Kinds of media	Compositions and preparations
Onion medium	One hundred gram of onion was boiled for 30 min. and strained. $K_2HPO_4$ 0.2 g, $KH_2PO_4$ 1.5 g, pepton 2 g and $MgSO_4$ 0.5 g were added and made up to 100 ml
Sawdust medium	One hundred gram of oak sawdust was added to onion medium
Barley straw medium	One hundred gram of barley straw was cut to the length of 3 cm and boiled for 30 min. with one liter of water. $K_2HPO_4$ 0.2 g, $KH_2PO_4$ 1.5 g, pepton 2 g and $MgSO_4$ 0.5 g were added and made up to 1,000 ml

배지(Iwahara, 1981) 등 3종류의 배지에 접종하여 26~28°C에서 간헐적인 진탕으로 배양하면서 일정 시간에 시료를 취하고 Büchner funnel로 신속히 여과하여 조효소액을 얻었다.

**기질 및 활성 측정**

p-Phenylendiamine 5 mM을 기질로 하였으며 조효소액 1.9 ml, citrate phosphate buffer(pH 6.45, 0.02 M) 1.7 ml 및 기질 용액 0.3 ml를 혼합한 후 525 nm에서 초기 속도를 측정한다. 활성도는 다음식(Leonowicz, 1981)에 의하여 임의의 활성도 A로 표시하였다.

$$A = \frac{10^6 \cdot \Delta E}{E \cdot \Delta t}$$

$$E = 65000$$

$$\Delta E = \text{O.D.의 변화량}$$

$$\Delta t = \text{반응 시간(sec)}$$

**최적 pH 및 pH 안정성**

조효소액 1.9 ml, buffer 1.7 ml, substrate 0.3 ml를 섞은 즉시부터 매분 O.D.를 측정하여 초기 속도를 기준으로 최적 pH를 구한다. pH 안정성은 조효소액과 buffer를 위의 동량 혼합 후 60분간 방치하였다가 다시 최적 pH로 조절한 다음 기질을 넣고 초기 속도를 측정하여 pH 안정성을 구한다.

**열 안정성**

Buffer(pH 6.6) 1.7 ml, 기질(5 mM) 0.3 ml, 조효소액 1.9 ml를 각 온도에서 40분 방치 한 후 급냉 한 다음 초기 속도를 측정하여 열 안정성을 조사한다.

**K<sub>m</sub> 값**

기질의 농도를 5, 10, 20, 60, 100 mM로 변화시키면서 각 농도별 초기 속도를 측정하여 이것으로 부터 Lineweaver-Burk plot를 그린 다음 K<sub>m</sub> 값을 구한다.

**효소 활성 저해물질**

조효소액 5ml에 acetone 등 4종의 유기용매 5 ml를 첨가하여 침전시킨 후 20분 간 3,500rpm으로 원심분리하고 회수 한 침전물을 증류수 5 ml로 용해하고 1.9 ml를 취하여 활성을 측정한다. 이 활성을 침전시키기 전의 활성과 비교하여 각 용매의 저해율을 계산한다. Na-azide의 저해율은 0.1 M 용액 0.1 ml를 조효소액 5 ml에 첨가한 후의 활성을 원래의 조효소액과 비교 함으로써 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**배지에 따르는 효소활성의 변화**

각 배지에서 균사를 배양하면서 임의의 경과 기간별

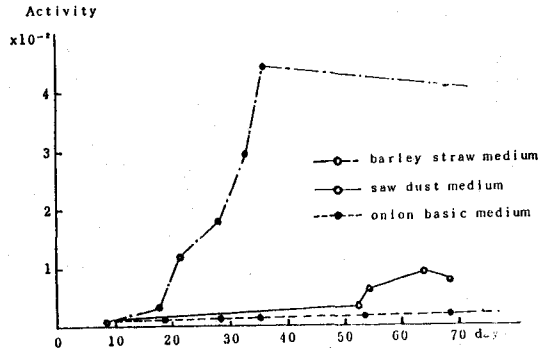


Fig. 1. Change in laccase activity from saw dust medium and barley straw medium.

로 시료를 채취하여 효소 활성의 변화를 관찰하였다. 균사 접종 후 보리짚 배지에서는 20일후 부터 활성이 나타나서 36일 째에 최대 활성치를 나타내고 서서히 감소하나 계속하여 높은 활성치를 유지한다. 이에 비하여 양파 기본배지나 톱밥 첨가 배지에서는 효소 활성이 보리짚 배지에 비하여 대단히 낮고 활성이 나타나는 시기도 늦었다. 또한 *P. ostreatus* 균의 laccase 활성에 비하여 절대 활성치도 낮을 뿐 아니라 활성이 나타나는 시기도 대단히 늦다. 이같은 현상은 *P. ostreatus*에 비하여 *F. velutipes*는 laccase 생산 능력에 있어 대단히 불리함을 보여준다. 보리짚이 laccase 생산의 좋은 inducer임을 두 가지 균주에서 공히 입증되었다고 볼 수 있다.

**최적 pH**

*Flammulina velutipes*의 최적 pH는 6.6으로서 *P.*

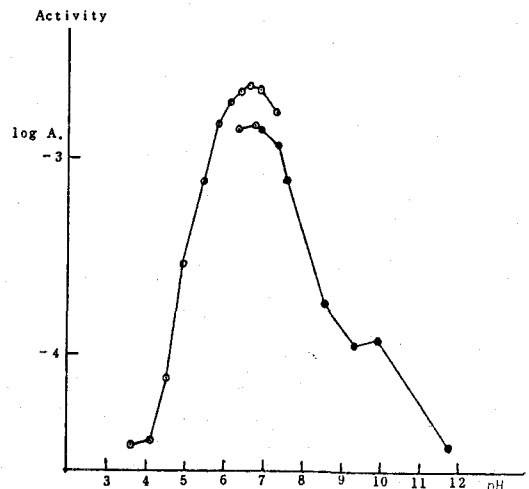


Fig. 2. Optimum pH of laccase from *Flammulina velutipes*.

- citrate phosphate buffer
- Clark Lub's buffer

*ostreatus*의 6.0 보다 다소 높으며 기질이나 효소원, 효소 농도에 따라 최대활성이 pH 6.0~6.5란 D.C. Gregg (1940), D. Bertrand(1947)의 보고와 거의 동일하며 Leonowicz(1981) 등이 발표한 *Trametes versicolor*의 pH 5.3과는 차이가 있다.

Citrate phosphate buffer와 Clark Lub's buffer는 효소 활성에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

**pH 안정성**

pH 4.5~9.5 사이에서 60분간 방치한 효소의 활성은 별로 감소하지 않았으며 pH 4.7~8.0에서 안정한 *P. ostreatus*의 laccase에 비하여 넓은 pH 영역에서 안정성을 보인다.

초기 반응 속도를 기준으로 한 활성과 40분간의 평균 속도를 기준으로 한 활성을 비교하였을 때 임의의 활성치 A값은 초기 속도를 기준으로 하였을 때 높게 나타나지만 안정 pH 영역에는 차이가 없었다.

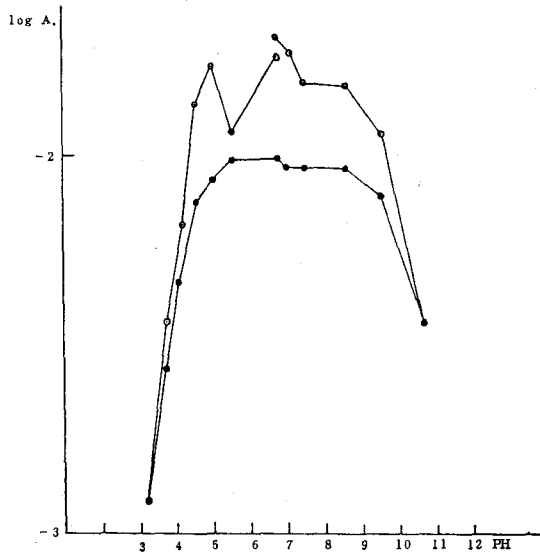


Fig. 3. pH stability of laccase from *F. velutipes* based on initial velocity and based on the average activity for 40 min.

- Activity based on initial velocity
- Activity based on average velocity for 40min.

**열 안정성**

각 온도에서 40분 간 효소액을 방치한 후 활성을 측정 한 결과 40°C 까지 95 % 이상의 활성을 유지하였으며 50°C에서도 78 %나 활성을 유지하는 것으로 보아 열에 비교적 안정한 효소임을 알 수 있다. 이 효소의 열 안정성은 *P. ostreatus*의 laccase에 비하여 높다.

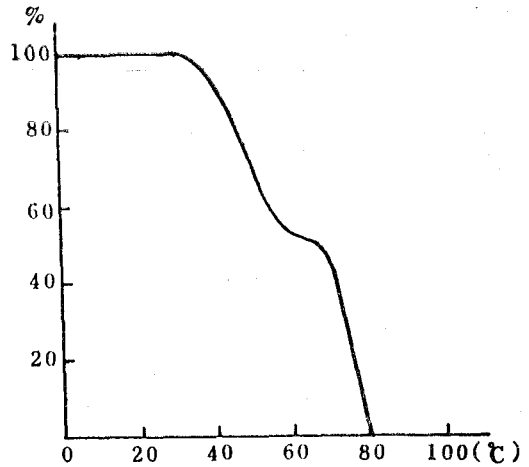


Fig. 4. Temperature stability of laccase from *Flammulina velutipes*.

**$K_m$  값**

*F. velutipes*의  $K_m$  값은 28 mM로서 *P. ostreatus*의 3.2 mM 보다 약 9배 정도 높으며 이것은 기질의 이용 면에서 볼 때 불리한 조건이라고 볼 수 있다.

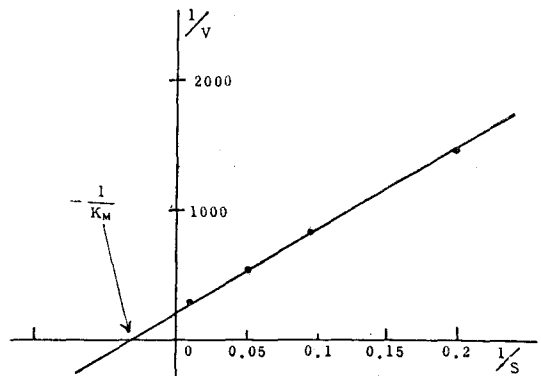


Fig. 5.  $K_m$  value of laccase from *Flammulina velutipes*.

**활성 저해물질**

Laccase의 활성은 대부분의 유기용매에 의하여 큰 저해를 받지 않았으며 Na-azide에 의하여는 100 % 저해를 받으나 다시 acetone 침전을 시킬경우, 활성이 원래의 조효소액보다 높아지는 것으로 보아 조효소액 자체에 약간의 저해물질이 포함되어 있다가 acetone 침전으로 제거되는 것으로 추정된다. 이 같은 현상은 *P. ostreatus*의 laccase에서도 관찰된바 있다.

Table II. The effect of various solvents and inhibitors on the laccase activity.

Treatment	Activity(unit/sec)	Activity factor	Inhibition(%)
Crude enzyme solution	$1.2820 \times 10^{-3}$	1	0
Acetone precipitate	$1.4641 \times 10^{-3}$	1.28	0
Methanol precipitate	$1.1794 \times 10^{-3}$	0.92	8
Ethanol precipitate	$1.2307 \times 10^{-3}$	0.96	4
Iso-propyl alcohol precipitate	$1.0769 \times 10^{-3}$	0.84	16
Crude enzyme solution added sodium azide	0	0	100
Acetone precipitate of crude enzyme solution added sodium azide	$1.4871 \times 10^{-3}$	1.16	0

문헌

Barton, G.M. (1967): *J. Chromatog.* 26, 320.  
 Bertrand, D. (1947): *Comp. rend.* 224, 605.  
 Iwahara, H., Yoshimoto, T. and Fukuzumi, T. (1981):  
 木材化學會誌 27, 331-336.  
 Gregg, D.C. and Miller, W.H., (1940): *J. Am. Chem.*  
*Soc.* 62, 1374.

Kleinert, T.N. (1967): *Tappi* 50, 120.  
 Leonowicz, A and Graynowicz, K. (1981): *Enzyme*  
*Microb. Technol.* 3, 55.  
 Nimz, H. (1965): *Chem. Ber.* 98, 533. Yoshida, H.  
 (1883): *J. Chem. Soc.* 43, 472.  
 李在成, 李恩政, 徐達善: (1985) 한국산업미생물학회지  
 13, 65-70.  
 <Received May 1, 1985; Accepted May 20, 1985>