

*Coriolus versicolor*에 의한 Laccase 生産 및 性質에 관한 研究

洪載植·金明坤·金潤熙·李種培

全北大學校 食品加工學科

Production and Properties of Laccase from *Coriolus versicolor*

Jai-Sik Hong, Myung-Kon Kim, Yun-Hi Kim and
Jong-Bae Lee

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National
University, Chonju 520, Korea

ABSTRACT: The production and properties of laccase(E.C.1.10.3.2) from *Coriolus versicolor* were studied.

The results were as follows; The nutritional optimum conditions for laccase production were 1% indulin At, 0.3% peptone 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% MgSO_4 , 0.1 mg% CuSO_4 , and 0.005 mg% thiamine HCl.

The optimum temperature and pH of laccase production were 25°C and 5.0, and respectively, and the cultural period was 20 days.

The optimum pH and temperature for the activity were 4.6 and 40°C, respectively.

The enzyme was almost stable under the temperature of 40°C and within the pH range of 4.0-5.0.

The enzyme was stable at 40°C for 30 min.

Cu^{++} , Fe^{++} and Ca^{++} activated the enzyme activity, but Mn^{++} and Hg^{++} were inhibited.

The enzyme was totally inhibited by 1 mM sodium azide and 1 mM potassium cyanide, and partly inhibited by EDTA and hydroxyamine.

KEYWORDS: *Coriolus versicolor*, Laccase, Enzyme activity

白色腐朽菌이 生産하는 Phenol oxidase를 대표하고 있는 laccase(O_2 diphenol oxidoreductase E. C. 1. 10. 3. 2)는 Cu^{++} 를 함유하고 있는 glycoprotein으로써 *o*-diphenol과 *p*-diphenol을 酸化하는 酵素이다(Crawford, 1981; Konishi 등, 1974).

이 酵素에 대한 연구는 주로 lignin 分解에 관여하는 것으로 밝혀졌는데 Konishi & Inoue(1971)와 Ishihara & Miyazaki(1972)는 *Polyporus versicolor*의 laccase가 milled wood lignin의 depolymerization을 일으켜 수용성으로 전환한다고 하였고, Kirk 등(1968)은 lignin 결합의 48%를 차지하고 있는 lignin의 주 골격인 syringyl glycol- β -guaiacyl ester 결합을 laccase로 分解시켜 guaiacyl acetaldehyde와 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone의 부산물을 동정하였으며, Ishihara와

Miyazaki(1974)도 정제된 *Polyporus versicolor*의 laccase를 milled wood lignin에 작용시켜 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone을 부산물로 확인한 바 있다.

또한, Ander와 Errikson(1976)은 *Phanerochate chrysosporium*의 Phenol oxidase less mutant 실험에서 Phenol oxidase가 lignin 分解에 필수적이라고 역설하였다. 이밖에도 lignin 分解에 관련된 laccase의 기능으로 demethylation, (Ander 등 1976; Ishihara 등, 1974; Ishihara 등, 1975) detoxification; Bollag 등, 1979)과 lignin 및 다당류 분해효소의 조절작용(Westermark 등, 1974) 등의 연구가 수행되었지만 균주차이에 따라 이와 상반된 결과들도 많이 논의되어 아직도 laccase의 기능은 완전하다고 할 수 없다(Hiroi 등, 1976; Liu

등, 1981). 그러므로 laccase 作用特性和 더불어 laccase를 이용한 각종 phenol 화합물의 biotransformation(Rosazza, 1978)에 대해 다양한 유도체의 개발, 각종 의약품의 제조(Lugaro 등, 1973), 독성 phenol 화합물의 無毒化(Hoff 등, 1985) 및 廢資源의 이용가치증대 방안들이 모색되어야 할 것으로 사료된다.

활엽수의 썩은 나무와 목재중에 기생하며 목재에 백색부후를 일으키며 laccase 活性이 강한 *Coriolus versicolor*를 선별하여 이 균이 生産하는 laccase을 이용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 酵素最適生産 조건과 酵素特性을 검토하여 약간의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

供試菌株

1985年 全北山野에서 채집 분리 보관하고 있는 *Coriolus versicolor*를 供試菌株로 사용하였다.

培地の 調製

1) 保存培地 組成

Malt extract 10g, peptone 2g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 寒天 15g을 distilled water 1000 ml에 pH 5.5로 조정하여 調製하였다.

2) 種培養 培地の 組成

Malt extract 10g, peptone 2g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, thiamine HCl 500 μg CuSO_4 2mg distilled water 1000 ml, pH 5.5로 조정하여 調製하였다.

3) 液體培養 基本培地の 組成

Indulin AT 1g, peptone 0.2g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, thiamine HCl 50 μg , CuSO_4 0.2mg, distilled water 100 ml pH 5.5로 조정하여 調製하였다.

4) 炭素源

基本培地 50 ml에 炭素源으로 여러가지 糖을 1%씩 添加하였으며, 炭素源 濃度실험은 酵素生産이 비교적 양호한 indulin AT를 0~4%되게 加하여 調製한 다음 1.2 kg/cm²에서 15분간 殺菌하였다.

5) 窒素源

基本培地에 indulin AT 1%씩 添加하고, 여러가지 窒素源이 0.026%되게 加하여 調製하였으며, 窒素源 濃度 실험은 peptone의 濃도를 0~0.5%되게

調製하였다.

6) KH_2PO_4

5)의 培地에서 peptone의 濃도를 0.2%되게 添加하고 KH_2PO_4 를 0~0.25% 濃도로 調製하였다.

7) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

6)의 培地에서 KH_2PO_4 를 0.1% 添加한 후 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃도를 0~0.05%로 調製하였다.

8) 기타 無機鹽類

7)의 培地에서 MgSO_4 濃도를 0.02%되게 첨가하고 여러가지 無機鹽類를 加하여 調製하였다.

9) CuSO_4 濃度の 影響

7)의 培地에서 MgSO_4 濃도를 0.02%되게 加하고 CuSO_4 濃도는 0~0.5mg%로 調製하였다.

培養方法

種培養 培地에 保存菌株 일정량을 接種하여 25°C에서 7일간 種培養한 후 waring blender로 1분간 마쇄하여 현탁액을 基本培地에 5ml씩 接種하였으며 溫도와 培養期間 실험을 제외하고는 25°C로 15일간 培養하였다.

酵素液 調製

15일간 培養한 培養液을 여과하여 여액을 粗酵素液으로 사용하였다. 酵素液에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 加하여 30% 포화용액이 되도록 한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그 상등액을 다시 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 加하여 80% 포화용액이 되도록 한 후 10,000 rpm에서 30분간 다시 원심분리하여 그 상등액을 제거하고 침전물을 0.2M sodium phosphate buffer(pH 6.0)에서 24시간 투석 후 0°C에서 보관하면서 사용하였다.

酵素活性度 測定

Mcllvaine buffer(pH 4.6) 2.5 ml에 粗酵素液 0.5 ml를 加하여 30°C water bath에서 3분간 예열하고 4.47 mM syringaldazine (Petroski 등, 1980) (1.6 mg/ml in methanol) 10 μl 를 加하여 1분간 반응시킨 후 525 nm에서 비색정량 하였다. 酵素活性度는 Leonowicz 등(1981)의 방법에 준하여 아래와 같은 식으로 환산하여 arbitrary unit로 하였다.

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

$\epsilon = 6500$ (molar absorption coefficient according to Harkin and Obst)

$\Delta E = \text{increase in absorbance at 525 nm}$

$\Delta t = \text{reaction time in seconds}$

酵素特性

1) 作用最適 pH

pH 3.0에서 pH 8.0까지 Mcllvaine buffer 2.5 ml에 酵素液 0.5 ml를 加하고 40°C water bath에서 5분간 예열한 후 基質을 加하여 酵素活性을 測定하였다.

2) 最適溫度

Mcllvaine buffer (pH 4.6) 2.5 ml에 酵素액 0.5 ml를 加하고 15°C에서부터 65°C까지 溫度別로 5분간 예열한 후 基質을 加하여 酵素活性을 測定하였다.

3) pH 安定性

pH 3.0에서 pH 8.0의 Mcllvaine buffer에 酵素液을 加하여 40°C에서 15분간 보존한 후 酵素殘存活性을 測定하였다.

4) 熱安定性

Mcllvaine buffer (pH 4.6)에 酵素液을 加하고 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 65°C에서 보존하면서 30분 동안 經時的으로 殘存活性을 測定하였다.

5) 금속이온의 영향

여러가지 금속염류를 Mcllvaine buffer (pH 4.6)에 1 mM되게 加하고 이에 酵素液을 加한 다음 酵素活性을 測定하였다.

6) 各種 阻害劑의 影響

各種 阻害劑의 濃度를 달리하여 Mcllvaine buffer (pH 4.6)에 加하고 여기에 다시 酵素液을 加한 다음 酵素活性을 測定하였다.

結果 및 考察

培養溫度의 影響

培養溫度가 酵素生産에 미치는 影響을 검토한 結果는 Table I과 같다.

Table I. Influence of cultural temperature on laccase production by *Coriolus versicolor*

Temperature (°C)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
15	0.13
20	0.30
25	0.49
30	0.34
35	0.12

Table II. Influence of initial pH on laccase production by *Coriolus versicolor*

pH	Enzyme activity (Arbitrary unit)
3	0.22
4	0.42
5	0.50
6	0.38
7	0.07
8	0.02

Table I과 같이 酵素生産은 溫度가 증가함에 따라서 급격히 증가하여 25°C에서 제일 양호하였고 그 이상의 溫度에서는 감소하였다.

Polyporus versicolor (Sandhu 등, 1984) *Botrytis cinerea* (Gigi 등, 1980), *Agaricus bisporus* (Wood, 1979) 등에서의 laccase 最適生産 溫度가 25°C였다는 보고와 본 실험결과와는 일치하였으나, Sandhu와 Arora(1985)의 *Polyporus sanguineus*의 laccase 生産最適溫度가 37°C였다는 보고와는 큰 차이를 보였다.

培養 pH의 影響

酵素生産에 미치는 pH 影響을 검토한 結果는 Table II와 같다.

Table II와 같이 laccase 生産은 pH 5.0에서 가장 양호하였고 pH가 중성측으로 갈수록 酵素生産 감소가 심한 경향을 보였다. Bollag(1979)와 Leonowicz(1984)의 laccase 실험에서 *Botrytis cinerea* pH 4.0, *Fomes annosus* pH 4.3, *Pleurotus ostreatus* pH 4.0, Sandhu(1984) 등의 *Polyporus sanguineus* laccase 最適 pH 3.0이었다는 보고와 차이가 있었다.

培養期間의 影響

培養期間을 달리하여 酵素生産을 검토한 結果는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1과 같이 酵素生産은 20일까지는 급격히 증가하였으며 그 이후부터는 완만하게 감소하는 경향이 있었다.

이는 Sandhu(1984) 등은 *Polyporus versicolor* 실험에서 laccase 生産의 最適培養期間이 20日, Bollag(1984) 등의 *Botrytis cinerea*가 20日이라는 보고와 유사하였지만, *Polyporus anserina* laccase는 30日, *Rhizoctonia praticolor* laccase는 30日, *Pleurotus*

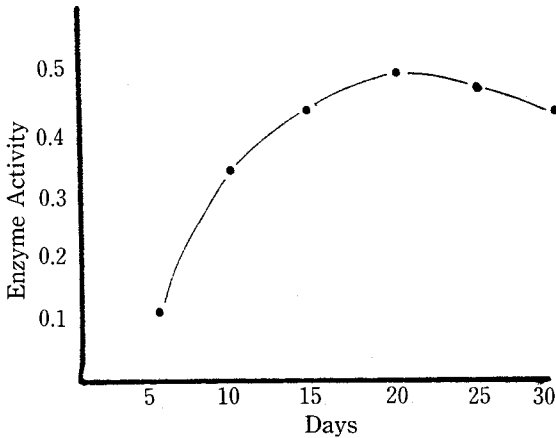


Fig. 1. Influence of cultural period on laccase production by *Coriolus versicolor*.

ostreatus laccase는 40日, *Pholiota mutabilis* laccase는 45日과는 차이를 보였다.

炭素源의 影響

1) 各種 炭素

各種 炭素源이 laccase 生産에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table III과 같다.

Table III에서 보는 바와 같이 laccase는 indulin AT 添加시 가장 효과적이었고 다른 炭素源에 비하여 1.2-3배의 laccase를 生産하였으며 그 다음으로 malt extract, xylose, trehalose 순이었다.

Wood(1979)는 *Agaricus bisporus*의 炭素源 실험에서 malt extract가 다른 당류보다 2배 이상의 laccase를 生産하였다는 보고와 Sandhu(1984) 등의

Table III. Effect of carbon source on laccase production by *Coriolus versicolor*

Carbon sources (1%)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
Glucose	0.12
Rhamnose	0.24
Fructose	0.15
Trehalose	0.29
Malt extract	0.39
Indulin AT	0.48
Cellobiose	0.14
Maltose	0.18
Sucrose	0.22
Xylose	0.32

*Polyporus versicolor*의 실험에서 malt extract보다 indulin AT 添加시에 酵素生産이 29% 증가되었다는 보고는 본 실험결과와 유사한 경향을 보였다.

2) Indulin AT 濃度

Laccase 生産이 양호하였던 indulin AT 濃度を 0~4%로 달리하여 laccase 生産에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 indulin AT 濃도가 증가함에 따라 酵素生産은 급격히 증가하여 1% 이었을 때 제일 양호하였고 그 이상의 濃도에서는 오히려 감소한 경향을 보였다.

Sandhu(1984)의 *Polyporus sanguineus*에서는 indulin AT 濃度 0.2%에서 酵素生産이 가장 좋았다는 보고와 차이가 있었다. 그러므로 다음 실험은 indulin AT의 濃도를 모두 1%로 하였다.

窒素源의 影響

1) 各種 窒素源

酵素生産에 미치는 各種 窒素源의 영향을 검토한 결과는 Table IV와 같다.

Table IV와 같이 酵素生産은 有機態窒素인 peptone과 casamino acid에서 가장 좋았으며, 窒酸態窒素인 KNO₃와 NaNO₃는 비교적 양호한 편이었는데 이는 Kirk(1978) 등의 *Phanerochate chrysosporium*의 lignin 分解실험에서 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, L-asparagine 및 casamino acid 등이 우수하였고 urea, NaNO₃ 등이 비교적 양호하였다는 보고와는 약간의 차이가 있었다. 또한 Adhikary 등(1982)은 *Polyporus hirsutus*의 실험에서

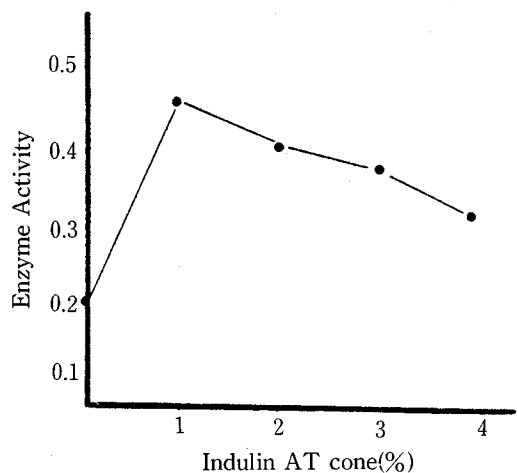


Fig. 2. Effect of indulin AT concentration on laccase production by *Coriolus versicolor*.

Table IV. Effect of nitrogen source on laccase production by *Coriolus versicolor*

Nitrogen sources (N;0.026%)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
None	0.27
Peptone	0.49
Casamino acid	0.43
NH ₄ NO ₃	0.29
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.22
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.19
KNO ₃	0.33
NaNO ₃	0.31
NaNO ₂	0.01

(NH₄)₂SO₄의 添加시 laccase 生産에는 아무런 영향을 미치지 못하였으며 오히려 군사 생육을 저해했다는 보고와 본 실험에서 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄가 별 영향을 미치지 못한 것과는 유사한 경향을 보였다. 또한 아질산태窒素인 NaNO₂는 오히려 군사 생육과 酵素生産을 저해하는 경향이였다.

2) Peptone 濃度

窒素源중에서 酵素生産이 가장 양호한 peptone의 濃度を 0~0.5%로 調製하여 영향을 검토한 결과 Fig.3과 같다.

Fig. 3과 같이 peptone의 濃도가 증가함에 따라 酵素生産은 0.3%까지는 증가하였으나 그 이후부터

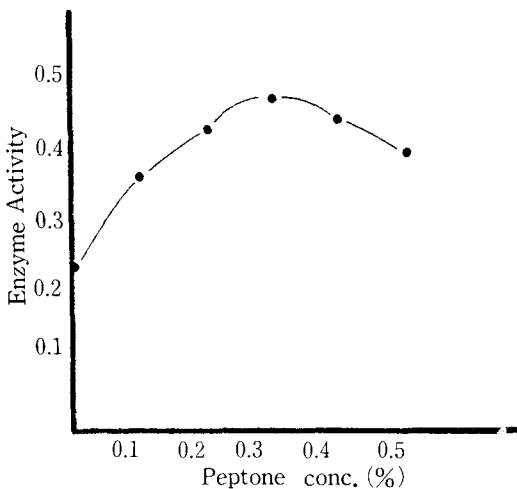


Fig.3. Effect of peptone concentration on laccase production by *Coriolus versicolor*.

Table V. Effect of potassium dihydrogen phosphate concentration on laccase production by *Coriolus versicolor*

KH ₂ PO ₄ conc (%)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
None	0.40
0.05	0.47
0.1	0.53
0.15	0.44
0.2	0.37
0.25	0.31

는 감소하는 경향이였다. Kirk(1978)는 *Phanerochate chrysosporium*의 lignin 分解실험에서 窒素源이 낮은 濃度(2.4 mM)에서는 양호하였으나 높은 濃度에서는 불량하였다는 보고와 유사하였다.

KH₂PO₄ 濃度の 影響

酵素生産에 KH₂PO₄ 濃도가 미치는 영향을 검토한 결과는 Table V와 같다.

Table V와 같이 酵素生産은 KH₂PO₄ 濃度 0.1%까지는 증가하였고 그 이후부터는 감소하여 0.2%에서는 無添加보다 오히려 낮은 경향이였다.

Kirk(1978) *Phanerochate chrysosporium*의 lignin 分解실험은 1.0mM이 0.2mM보다 양호하였다고 보고하였는데 이는 본 실험의 결과와 유사하였다.

MgSO₄ 濃度の 影響

酵素生産에 미치는 MgSO₄ 濃度の 影響을 검토한 결과는 Table VI과 같다.

Table VI과 같이 MgSO₄ 濃도가 0.02%에서 다소 높았지만 無添加에 비해 큰 차이가 없었는데 이는 SO₄²⁻ 濃도가 lignin 分解에 커다란 影響을 미치지 않는다는 Kirk(1978) 등의 보고와 유사한 경향이였다.

기타 無機鹽類

基本培地에 無機鹽類의 영향을 검토하기 위하여 CuSO₄를 添加하지 않고 기타 無機鹽類가 酵素生産에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table VII과 같다.

Table VII과 같이 기타 無機鹽類중 CuSO₄·5H₂O를 添加하였을 때 酵素生産이 제일 양호하였으며 그 밖에 無機鹽類는 뚜렷한 효과를 기대할 수 없는데 이는 laccase가 active site에 Cu⁺⁺을 갖는 metallo enzyme이라고 알려져 있어(Crawford, 1981) Cu⁺⁺

Table VI. Effect of magnesium sulfate concentration on laccase production by *Coriolus versicolor*

MgSO ₄ · 7H ₂ O conc. (%)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
None	0.41
0.01	0.47
0.02	0.53
0.03	0.51
0.04	0.48
0.05	0.45

Table VII. Effect of various minerals on laccase production by *Coriolus versicolor*

Other salts	Conc (mg%)	Enzyme activity (Arbitrary unit)
None	1	0.04
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.14
	1	0.12
MnSO ₄ · H ₂ O	0.16	0.15
	0.32	0.16
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.14	0.15
	0.28	0.12
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2	0.16
	0.4	0.19
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	0.54
	0.2	0.49

에 의하여 laccase 生産이 促進되는 것으로 사료된다.

CuSO₄ 濃度の 影響

無機鹽類中 laccase 生産이 양호한 CuSO₄ 濃度の 영향을 검토한 결과는 Table VIII과 같다.

Table VIII과 같이 CuSO₄를 添加하였을 때 酵素生産은 증가되어 0.1mg%에서는 최고 生産을 보였으며 그 이상의 濃度에서는 감소되는 경향이였다.

Amin 등(1985)의 *Polyporus hirsutus* laccase 실험에서 CuSO₄ 0.2mg%에서 가장 효과적인 보고와 차이가 있으나 Gigi 등(1980)의 *Botrytis cinerea*, Fahraeus 등(1958)의 *Polyporus versicolor* laccase 에서 CuSO₄ 0.1mg%였다는 보고와 유사하였다.

酵素特性

1) 作用最適 pH

作用最適 pH를 알아보기 위하여 pH 3.0에서 pH

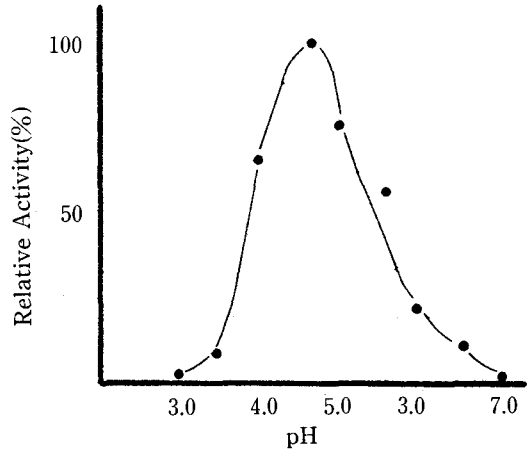


Fig.4. Influence of pH on laccase activity.

7.0까지 McIlvaine buffer를 사용하여 酵素活性을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4와 같이 본 酵素는 pH 4.6에서 最大活性을 나타냈으며 最適 pH 4.6 이상에서는 급격히 감소하여 pH 6.5 이상에서는 酵素活性이 5% 이하로 떨어져 본 菌株의 laccase는 pH에 아주 민감한 酵素임을 알 수 있다.

Hoff 등(1985)의 *Trametes versicolor*의 laccase pH 4.0, Bollag 등(1984)의 *Rhizoctonia praticolor*의 laccase pH 7.0와는 차이가 있었으나 Ishihara (1983)의 *Coriolus versicolor*의 laccase pH 4.5 Marbach 등(1982)의 *Botrytis cinerea*의 laccase pH 4.6이었다는 보고와는 유사한 경향이였다.

2) 作用最適溫度

본 酵素 作用最適溫度를 알아보기 위하여 여러 溫度에서 酵素活性을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

본 酵素는 Fig. 5와 같이 40°C 이상에서는 급격히

Table VIII. Effect of cuperic sulfate concentration on laccase production by *Coriolus versicolor*

CuSO ₄ · 5H ₂ O conc (mg%)	Enzyme activity) (Arbitrary unit)
None	0.04
0.1	0.54
0.2	0.47
0.3	0.38
0.4	0.37
0.5	0.36

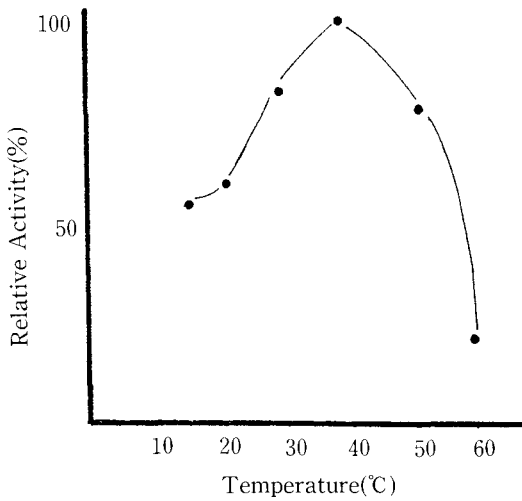


Fig. 5. Influence of temperature on laccase activity.

감소하였다.

Sandhu와 Arora(1984)의 *Polyporus sanguineus*의 laccase 作用 最適 溫度는 37°C로 본 실험과 유사하였으나 Amine 등(1985)의 *Polyporus hirsutus*의 laccase 作用 最適 溫度가 60°C라는 보고와는 큰 차이를 보였다.

3) pH 安定性

본 酵素의 pH 安定性을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5와 같이 酵素를 각 pH別로 15분간 보존한 후 殘存活性은 pH 4.6 부근에서 제일 안정하였고, pH 4.0과 pH 5.0에서는 비교적 안정한 상태이며, pH 4.0 이하에서는 급격히 감소되었다. pH 5.5에서 殘存活性이 50% 이하로 감소되었고, pH 3.0과 pH 7.0에서는 거의 失活되었다. Lee 등(1985)의 *Pleurotus ostreatus*의 laccase pH 안정성 4.7~8.0와 *Flammulina velutipes*의 laccase pH 안정성 4.5-9.5의 넓은 pH 범위에 비해 본 酵素는 pH 범위가 좁았다.

4) 熱安定性

본 酵素의 熱安定性을 알기위해 酵素液을 여러 溫度에서 보존하면서 經時的으로 검토한 결과는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 본 酵素는 熱에 민감하여 50°C에서 30분간 방치했을 때 49.2%, 60°C에서는 시간이 경과함에 따라 급격히 失活하여 30분 후에는 98%가 失活되었으며 65°C에서는 완전 失活되었다.

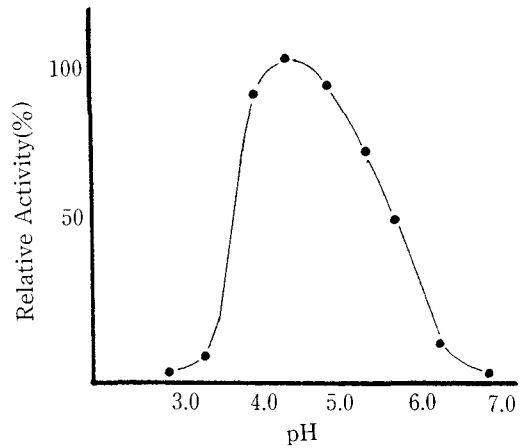


Fig. 6. pH stability of laccase activity.

Marbach 등(1982)의 *Botrytis cinerea*의 laccase 熱安定性을 살펴보면 60°C에서는 4분 경과 후 酵素活性이 50% 감소되었으며 Wood(1979)의 *Agaricus bisporus*의 熱安定性은 40°C에서는 적어도 24시간은 완전하게 안정되었으나 50°C에서는 3시간 60°C에서는 40분 70°C에서는 10분일 때 熱安定性은 50% 정도였다고 보고된 바 있는데 본 酵素와는 상당한 차이를 보였다.

5) 金屬이온의 影響

各種 金屬이온의 濃度를 1mM되게 添加하여 酵素活性을 검토한 결과는 Table IX와 같다.

Table IX와 같이 酵素活性은 CuSO₄, CaSO₄, FeCl₂에서는 증가한 반면 HgCl₂나 MnSO₄에서는

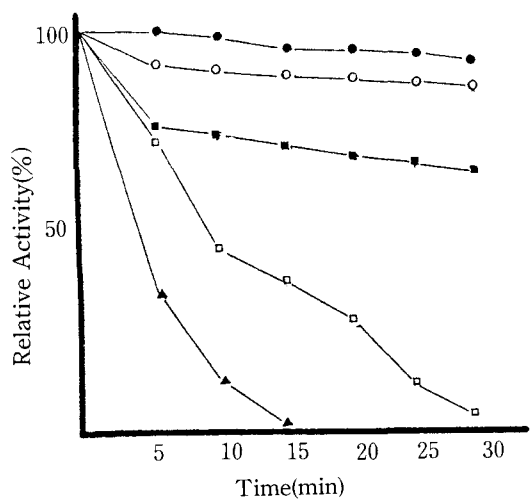


Fig. 7. Heat stability of laccase activity.

Table IX. Effect of metal ion on laccase activity

Salt	Conc. (mM)	Relative activity (%)
None		100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1	110
HgCl ₂	1	73
CaSO ₄ ·2H ₂ O	1	105
FeCl ₂ ·7H ₂ O	1	105
MnSO ₄ ·H ₂ O	1	60

Table X. Effect of inhibitor on laccase activity

Inhibitor	Conc. (mM)	Inhibition (%)
Sodium azide	1	100
	0.1	99
KCN	1	100
	0.1	94.1
EDTA	100	78.7
	10	38.5
	1	12.2
Hydroxylamine	0.5	78.7
	0.3	61.7

감소하는 경향이였다.

Tsuruta와 Kawai(1983)의 *Pleurotus ostreatus* 실험에서 phenol oxidase 활성을 금속이온들이 저해하였다는 보고와 張의 인삼의 phenol oxidase 실험에서 대부분의 금속이온들이 酵素活性을 촉진시켰다는 보고는 본 酵素와 큰 차이를 보였다.

6) 阻害劑의 影響

各種 阻害劑를 添加하여 酵素活性을 검토한 결과는 Table X과 같다.

Table X에서와 같이 sodium azide와 KCN 1 mM에서는 酵素活性을 완전 阻害하였다. Haars와 Huttermann(1980)의 *Fomes annosus* 실험에서 sodium azide 0.2 mM에서 완전 저해한다고 하였고 Bollag 등(1984)의 *Botrytis cinerea*, *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus anserina*, *Rhizoctonia praticola*, *Trametes versicolor*는 laccase를 sodium azide 0.1 mM에서 100% 저해했다고 보고했으며 Wood

(1979)의 *Agaricus bisporus*의 laccase에서 1 mM sodium azide와 KCN에 100% 저해되었다고 하였는데 이들 보고는 본 酵素와 유사한 경향이였다.

摘 要

*Coriolus versicolor*가 生産하는 laccase 生産 條件과 그 特性을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Laccase 生産은 영양적 最適 條件은 indulin AT 1%, peptone 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.02%, CuSO₄ 0.1 mg%, thiamine HCl 0.005 mg%였다. Laccase 生産의 最適 溫度는 25°C 最適 pH는 5.0이었고 培養期間은 20日이었다. Laccase 作用 最適 pH는 4.6이었고 最適溫度는 40°C였으며 pH 안정성은 40°C에서 15분간 保存하였을 때 pH 4.6에서 가장 안정하였다. 熱安定성은 40°C 이하에서는 비교적 안정하였으나 그 이상 올라갈수록 열에 민감한 反應을 보였고 sodium azide 1 mM과 KCN 1 mM에서 완전 阻害되었다.

參考文獻

- Adhikary, D.K., U. George and T.K. Ghose(1982): Growth and enzyme production by *Polyporus hirsutus* in presence of ammonium sulphate. *Biotech Lett.* 4:197-202.
- Amin, B., C. Gupta and U. George(1985): Factors affecting production and activity of *Polyporus hirsutus* laccase. *Indian. J. Exp. Biol.* 23:273-275.
- Ander, P. and K.E. Eriksson(1976): The importance of phenoloxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109:1-8.
- Bollag, J.M., R.D. Sjoblad and S.Y. Liu(1979): Characterization of an enzyme from *Rhizoctonia praticola* which polymerizes phenolic compounds. *Can J. Microbiol.* 25:229-233.
- Bollag, J.M. and A. Leonowicz(1984): Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.
- Crawford, R.L.(ed.) (1981): Lignin biodegradation and transformation, Wiley Interscience, N.Y., 1-154.
- Fahraeus, G., V. Tullander, H. Ljunggren(1958):

- Production of high laccase yields in cultures of fungi. *Physiol. Plant.* **11**:631-643.
- Gigi, O, I. Marbach, and A.M. Mayer(1980): Induction of laccase formation in *Botrytis*. *Phytochem.* **19**:2273-2275.
- Harris, A. and A. Huttermann(1980): Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**:233-237.
- Hiroi, T. and K.E. Eriksson(1976): Microbial degradation of lignins by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Sven. Papperstidn* **5**:157-161.
- Hoff, T, S.Y. Liu and J.M. Bollag(1985): Transformation of halogen-, alkyl- substituted anilines by laccase of *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1040-1045.
- Ishihara, T. and M. Miyazaki(1974): Demethylation of lignin models by fungal laccase. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **20**:39-41.
- Ishihara, T. and M. Miyazaki(1972): Oxidation of milled wood lignin by fungal laccase. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **18**:415-419.
- Ishihara, T. and M. Miyazaki(1975): Estimation of orthoquinone structure and methanol formed from lignin models by fungal laccase. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **21**:323-325.
- Ishihara, T.(1983): Effect of pH in the oxidation of syringic acid by fungal laccase. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **29**:801-805.
- Kirk, T.K., J.M. Harkin and E.B. Cowling(1968): Degradation of the lignin model compound syringyl glycol-m-guaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **165**:145-163.
- Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz and J.G. Zeikus.(1978): Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**:277-285.
- Konishi, K. and Y. Inoue(1971): Decomposition of lignin by *Coriolus versicolor*. III. Mode of action of laccase type enzyme on lignin. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **17**:255-262.
- Konishi, K. and Y. Inoue(1974): Characterization of the laccase of *Coriolus versicolor*. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **20** : 45-47.
- Leonowicz, A. and K. Grzywnowicz(1981): Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Technol.* **3**:55-58.
- Liu, S.Y., R.D. Minard and J.M. Bollag(1985): Oligomerization of syringic acid, a lignin derivative by a phenoloxidase. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45** : 1100-1105.
- Lugaro, G., G. Carrea, P. Cremonesi, M.M. Caselato and E. Antonini(1973): The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**:1-6.
- Marbach, I.E. Harel and A.M. Mayer(1982): Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* **22**:1535-1538.
- Petroski, R.J., and W. Peczyńska-czoch. and J.P. Rosazza(1980): Analysis, production and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:1003-1006.
- Rosazza, J.P.(1978): Microbial transformation of natural antitumor agents. *Lloydia.* **41**:297-311.
- Sandhu, D.K. and D.S. Arora(1984): Laccase production by *Polyporus versicolor* on different substrate. *Acta. Biotechnol.* **4**:49-57.
- Sandhu, D.K. and D.S. Arora(1985): Laccase production by *Polyporus sanguineus* under different nutritional and environmental conditions. *Experientia* **41**:355-356.
- Tsuruta, T. and M. Kawai(1983): Catechol-oxidizing activities of basidiomycetous fungi, *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **24**:65-77.
- Westermarck, U. and K.E. Eriksson(1974): Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta. Chem. Scand.* **28**: 204-208.
- Wood, D.A.(1979): Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**:327-338.
- 李在成, 李恩政, 徐達善(1985) : *Pleurotus ostreatus*가 생산하는 Laccase의 부분정제 및 효소적 특성. 韓國産業微生物學會誌, **13**:65-70.
- 張在哲(1984) : 水參中 Polyphenol oxidase의 정제 및 특성에 관하여, 全北大學校 大學院 博士學位論文.