

*Pleurotus ostreatus*의 Laccase 작용특성

김규중* · 신광수 · 맹진수 · 강사옥 · 하영철 · 홍순우

*강릉대학 생물학과, 서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of Laccase from *Pleurotus ostreatus*

Kim, K.J.* , K.S. Shin, J.S. Maeng, S.O. Kang, Y.C. Hah and S.W. Hong

*Department of Biology, Kang-Reung National University, Kang-Reung 210

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University Seoul 151, Korea

ABSTRACT: Extracellular laccase (E.C. 1.10.3.2) from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus* was purified by ammonium sulfate precipitation, protamine sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel permeation chromatography. The molecular weight of the enzyme was estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to be 58,000 and the isoelectric point was 3.75. The optimum temperature for the enzyme was about 45°C and the optimum pH was 6.5. The enzyme was found to be stable at temperature below 35°C and rapidly inactivated at higher temperatures. Km values for ferulic acid, vanillic acid, dihydroxyphenylalanine (DOPA) were 48.6 μM, 0.52 mM, and 2.73 mM, respectively, which indicates that the enzyme has much higher affinity towards ferulic acid. The reaction products of the enzyme were separated by TLC and HPLC.

KEY WORDS □ *Pleurotus ostreatus*, laccase.

Laccase(O₂: *p*-diphenol oxidoreductase; E.C. 1.10.3.2)는 식물체와 곰팡이에서 발견되는 효소로서, 식물에서는 옻나무 (*Rhus* species)의 latex에서, 곰팡이에서는 자실체 형성에 관여하거나 (Betrand 등, 1895; Leonard, 1971, 1973), 목재부후균이 리그닌 성분을 분해할 때 세포밖으로 분비하는 것으로 알려져 있다 (Fåhræus, 1952).

Laccase를 생성하는 대부분의 균주에서 보면, phenol oxidase의 다른 두 효소에 비해, 세포밖으로 분비되는 양이 비교적 많고, 리그닌을 분해하는 균주의 대부분이 laccase를 생산하며 (Bollag 등, 1984), 이러한 균주중에서 laccase-less mutant는 그 분해능을 상실하였다는 보고 (Ander 등, 1976) 등을 종합해 볼 때, laccase가 리그닌 생분해에서 그 역할이 중요할 것이라 여겨져 왔고, 실제로 이런 관점에서 이 효소의 기질에 대한

기작이 리그닌 분해에 미치는 역할에 대한 여러가지 가설이 제시된 바 있다 (Gadd, 1957; Law, 1959; Rosch, 1966; Grabbe 등, 1968; Shimada 등, 1971; Gierer 등, 1973; Ander 등, 1976).

일반적으로 알려진 laccase의 기작으로는, diphenol에서 *meta* 위치보다 주로 *para*와 *ortho* 위치에서 전자와 수소양이온을 동시에 산소에 이 전시키는 산화환원반응을 수행한다. 이 과정에서 전자의 이동은 구리이온이 관여하는 copper-containing enzyme의 반응이며, free radical인 aryloxy radical이 반응산물로 생성된다 (Ander 등, 1978; Leonowicz 등, 1980). 따라서 이 radical들은 상호반응하여 중합체를 만들 수 있다 (Bollag 등, 1979, 1982).

리그닌을 진균이 분해할 때, 배양액의 갈변현상이 일어나는 것을 볼 수 있었고 (Selin 등, 1975;

Kern, 1983; Kim 등, 1986), 리그닌과 함께 당류가 존재하면 그 결과 탈중합화가 될 수 있음이 보고되고 있는 것으로 보아(Hiroi 등, 1976; Kim 등, 1986), 리그닌 생분해는 당류에 작용하는 다른 효소의 역할이 수반되는 일련의 효소들로 구성된 oxidoreductase 계에 의해 이루어 진다는 것을 시사해 주고 있다(Westermark 등, 1974; Green, 1977).

리그닌 분자 자체에 대한 laccase의 작용양상은 자세히 알려져 있지 않으나 진균에 의한 그 분해기작 중 볼 수 있는 중합화 현상이 이 효소의 작용에 의한 것이라는 사실이 추정되고 있고, 리그닌에 대한 효소계의 전체 분해기작을 구성하는 일련의 반응들이 존재한다고 하면, laccase의 작용기작에 대한 연구가 그것을 밝히는 데 필요하다고 보고, 본 논문에서는 중합화 현상이 다른 진균에 비해 뚜렷하게 나타나는 *Pleurotus ostreatus*에서 얻은 laccase의 순수분리 및 작용양상을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주는 한국 산림 조합 연합회에서 분양받은 *Pleurotus ostreatus* (strain No. 2)로서 potato dextrose agar slant에 접종, 25°C에서 배양하여 보관하였다.

액체완전배지의 조성은 다음과 같다; liter 당, malt extract (Difco) 20g, yeast extract (Difco) 5g, dextrose (Junsei) 10g, peptone (Difco) 5g, 액체최소배지는 Czapek 배지를 변형한 것으로, liter 당, NaNO₃ (Junsei) 3g, K₂HPO₄ (Junsei) 1g, MgSO₄·7H₂O (Shinyo) 0.5g, KCl (Wako) 0.5g, FeSO₄·7H₂O (Shinyo) 10mg의 조성으로 멸균 후 각각 pH 5.5로 조절하여 chloramphenicol (Sigma)을 34 μg ml⁻¹ 되게 첨가하였다.

배양 및 수확

균을 7 일 이상 액체배양한 후 omnimixer (Du Pont Instrument)로 갈아 그 현탁액을 610 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 5×10⁻³l⁻¹되게 접종하였다. 이렇게 접종된 액체완전배지 10l를 25°C에

서 진탕배양하였고, 2 일 후 효소의 유도물질인 ferulic acid (Sigma)를 1mM되게 첨가하였다.

7 일 후 여과지(Whatman No.1)로 균체를 제거하고 여과액을 40-80% 고체황산암모늄으로 염석시켜 12,000×g에서 30분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 얻은 침전물을 0.02M의 인산완충용액으로 녹인 후 동일한 완충용액으로 4°C에서 48시간 투석시킨 뒤 남은 고형물을 원심분리로 제거하고 동결건조시켰다.

색소제거

동결건조된 효소시료 (2.895g) 1g에 대해 protamine sulfate (Sigma) 2.5g을 각각 0.02M 인산완충용액 (pH 7.0) 250 ml에 녹인 다음 두 용액을 천천히 섞어 주어 protamine과 결합된 저분자성 단백질 색소를 9,000×g로 20분 원심분리하여 침전시켜 제거하였다. 여기서 얻은 500 ml의 효소용액을 Pellicon ultrafiltration cassette system으로 완충용액을 교환해 주면서 50 ml로 농축시켰다.

DEAE - Sephadex A - 50 이온교환 chromatography

위 시료를 DEAE - Sephadex A - 50 (Pharmacia Fine Chemicals)으로 이온교환 chromatography하였다. 0.02M의 인산완충용액 (pH 7.0)으로 세척한 4.0×40 cm의 column에서, 시료를 얻고 500 ml의 완충용액으로 용출한 뒤 다시 같은 완충용액에서 NaCl을 0 - 0.8M의 일정농도 기울기로 용출시켰다.

용출속도는 50 ml hr⁻¹이었고 10 ml씩 분획하였다. 각 fraction의 효소활성도와 단백질 농도를 측정하여 원하는 부분의 용액을 완충용액과 교환하고 NaCl을 제거해 주면서 30 ml로 농축하였다.

Sephadex G - 100 gel permeation chromatography

농축된 시료를 Sephadex G - 100 (Pharmacia Fine Chemicals)으로 gel permeation chromatography 하였다. 2.8×90 cm의 column에서 동일한 완충용액으로 세척하고 시료를 얻어 용출시켰다. 용출속도는 12 ml hr⁻¹로 하였고 5 ml씩 분획하였다.

효소 활성 측정

Leonard (1971)의 방법에 따라 기질로 DL-β-

3, 4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)(Sigma)을 0.03 M 인산완충용액 (pH 6.5)에 10 mM 녹인 기질용액 2 ml과 효소용액 1 ml을 30°C에서 5 분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소용액은 균사체가 존재할 경우, microcentrifuge에서 8,000×g로 4 분간 원심분리해서 제거하여 준비하였다.

효소의 활성단위는, 위의 반응에서 나타나는 흡광도를 반응용액의 양 (ml), 기질의 농도 (mM), 반응시간 (min.)으로 나눈 값에 10⁴배 한 값이 1 인 경우를 1 unit라 정하였다. 즉 위의 반응에서 나타난 흡광도에 100을 곱하여 얻은 값이다.

단백질 정량

단백질 정량은 주로 Lowry 등 (1951)의 방법으로 하였고, column 용출액에서는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 결정하거나 단백질이 미량일 경우 coomassie brilliant blue G-250을 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하는 Bradford (1976)의 방법을 사용하였으며 표준 단백질로 bovine serum albumin (Sigma)을 사용하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

Davis (1964)의 방법을 변형하여, slab gel (폭 150 mm×길이 170 mm×두께 2 mm)에 discontinuous로 resolving gel의 acrylamide 농도가 12.5% 되게 하였으며 tris-glycine (pH 8.3) 완충용액계를 사용하였다.

효소시료를 10 μl에 10 μg의 농도로, 여기에 bromphenol blue를 0.02%, ficoll type 400을 6.7%되게 섞어 시료를 만들어 엷은 후 stacking gel에서 60 V, resolving gel에서 200 V의 전압을 걸어 4°C에서 전개시켰다.

단백질 band 염색은 coomassie brilliant blue R-250 (0.1%) 용액으로 하였고, 효소의 활성을 보기 위해서는, catechol (Sigma) 15 mg과 sulf-anilic acid (Sigma) 50 mg을 0.1 M의 인산완충용액 (pH 6.8) 100 ml에 녹인 용액에 gel을 담근 후 30°C에서 30분간 반응시키는 Sato 등 (1976)의 방법을 사용하였다.

SDS - Polyacrylamide gel 전기영동

Laemmli (1970)의 방법에 따랐고 polyacrylamide gel 전기영동과 같은 조건에서 SDS

(sodium dodecyl sulfate)를 0.1% 되게 첨가하였고, 시료는 0.01 M의 tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma), 1% SDS (Sigma), 5% β-mercaptoethanol (Merck)을 녹인 시료 완충용액 10 μl에 효소시료 10 μg을 녹여 5분간 100°C에서 증탕해서 준비하여 같은 방법으로 전기영동하였다.

Isoelectrofocusing

T=50%, C=3%인 slab gel (폭 130 mm×길이 150 mm×두께 1.5 mm)에서 pH 범위가 2.5-5인 6.25% pharmalyte (Pharmacia)를 사용하였다. Focusing은 0.1 M H₃PO₄ (Fisher)와 0.1 M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) (Sigma) 수용액을 각각 음극과 양극의 용액으로 하여 10°C에서 일정전력 4 W로 1030 V에 도달하면 일정전압으로 3 시간 행했다. Focusing이 끝난 후 12 cm의 gel strip을 1 cm 간격으로 잘라 0.025 M KCl 수용액으로 용출시켜 각각의 pH를 측정하여 pH 기울기를 구하였다.

효소의 활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소의 활성도에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 20°C에서 70°C 사이의 온도에서 앞에서 설명한 효소활성도 측정방법에 따라 활성도를 측정하였다. 효소 반응의 활성화에너지 (Ea)는 Arrhenius equation으로 구하였고 다음과 같다.

$$E_a = 2.3R \log \frac{k_2}{k_1} \left(\frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \right)$$

여기서 k₁과 k₂는 각각 T₁과 T₂의 온도에서의 specific reaction rate constant 이고, R은 gas constant (1.98 cal×mole×degree)이다 (Segel, 1975).

효소의 열안정성은 기질이 없는 0.03 M의 인산완충용액 (pH 6.5)에 효소를 넣고 20°C에서 60°C 사이의 온도에서 30분 처리한 후 기존의 측정방법에 따라 효소의 활성도를 측정하였다.

효소의 활성도에 대한 pH의 영향은 반응혼합물을 pH 4.0에서 pH 7.0까지는 시트르산-인산완충용액, pH 6.0에서 pH 8.0까지는 인산완충용액을 써서 기존의 측정방법에 의해 효소의 활성도를 측정하였다.

Thin-layer chromatography에 의한 반응산물 분석

Ferulic acid와 vanillic acid를 각각 10 mM되게 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0)에 녹인 후에 분리된 효소용액을 각각 7 unit, 14 unit 넣어 30°C에서 반응시키고 시간별로 일부를 적하 하였다. 이때 ferulic acid와 vanillic acid는 재결정한 것을 사용하였고, 완충용액을 산소로 미리 포화시켜 사용하였다.

전개용매로는 benzene (Merck) : dioxane (Wako): acetic acid (Junsei)=90 : 25 : 4 (v/v)를 사용하였고, 흡착제로는 silica gel layer로 TLC plastic sheet (silica gel 60 E. Merck)를, plate 상에 분리된 물질들을 분석할 목적으로는 두께 0.25 mm의 TLC plate (silica gel 60 F₂₅₄. Merck)와 두께 2mm의 preparative용 PLC plate (silica gel 60 F₂₅₄. Merck)를 사용하였으며 분리된 양상을 UV transilluminator (Model C-62 Ultra-Violet Products INC.)로 확인하였다.

Plate 상에 분리된 물질을 따로 모으기 위해 Leonowicz 등 (1984)의 방법에 따라 silica gel을 끊어 methanol (Merck)에 녹인 후 여과하여 Büchi rotavapor (Brinkmann Instruments)로 용매를 증발시키고 질소가스를 충전하여 보관하였다.

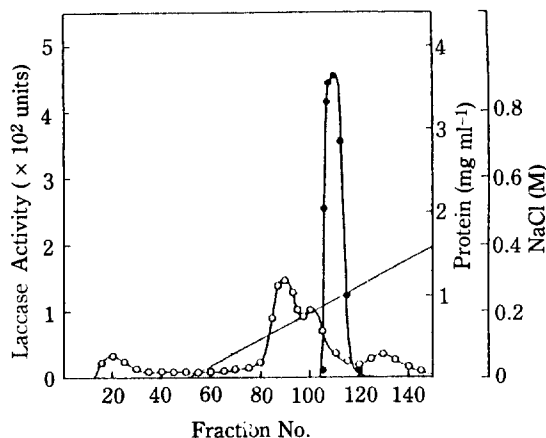


Fig. 1. Ion exchange chromatography of laccase on DEAE-Sephadex A-50 column (4.0x40 cm diameter). Fractions of 10 ml were collected at a rate of 50 ml/hour.
○, protein content; ●, laccase activity

High performance liquid chromatography에 의한 반응산물 분석

TLC에 사용하였던 같은 시료를 효소와 반응시킨 후 그 반응산물과 TLC에 의해 분리된 물질들을 각각 HPLC (Model 510 Waters Associates Co.)로 분석하였다. 이때 column은 Nova-PAK C₁₈, 용출속도는 1 ml/ min⁻¹이었으며, 용매는 반응혼합물을 그대로 분석한 경우, water : acetonitrile (Merck) : acetic acid=80 : 20 : 1 (v/v), TLC에서 분리된 물질인 경우에는 그 조성을 76 : 24 : 1 (v/v)로 하였다. 반응산물을 254 nm에서 Waters Model 441 detector로 검출하여 Waters Model 730 integrator로 정량분석하였다.

결과 및 고찰

효소의 순수분리

1) DEAE-Sephadex A-50 이온교환 chromatography.

Fig.1에서와 같이, NaCl을 흘려주기 전의 fraction에서는 효소의 활성이 나타나지 않았고,

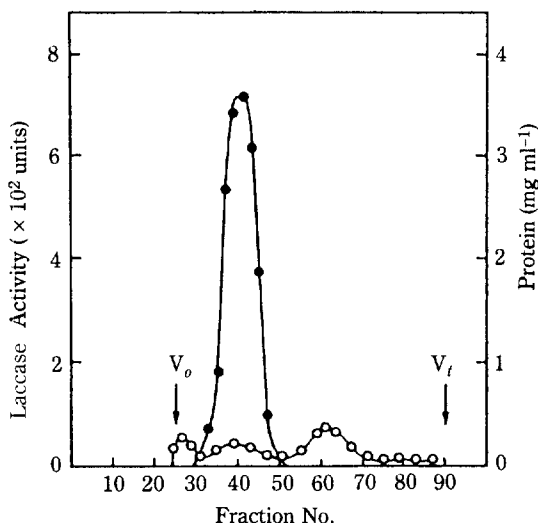


Fig. 2. Gel permeation chromatography of laccase on Sephadex G-100 column (2.8x90 cm diameter). Fractions of 5 ml were collected at a rate of 12 ml/hour.
V₀, void volume; V_t, total volume;
○, protein content; ●, laccase activity.

Table 1. Purification of laccase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units mg ⁻¹)	Yield (%)
Culture filtrate	13,000	540,000	41.5	100
Ammonium sulfate precipitation	2,980	373,000	125.2	69
Protamine sulfate precipitation	1,870	201,600	107.6	37
DEAE-Sephadex A-50 chromatography	180	120,000	666.7	22
Sephadex G-100 chromatography	75	66,000	880.0	12

NaCl 0.2 근방에 해당하는 fraction No.90-120 에 걸쳐 효소의 활성을 나타내는 peak가 분리되었으며 이 부분을 분리 (110 ml)하여 동일한 완충용액을 교환하면서 NaCl을 제거하여 농축하였다.

2) Sephadex G-100 gel permeation chromatography.

Fig.2에서와 같이, 효소의 fraction이 다른 단백질의 peak와 분리되어 순수한 효소부분 (70 ml)을 모을 수 있었다.

이상과 같은 과정을 세 번 거듭하여 전체시료에서 laccase를 순수분리한 결과를 Table 1에 나타내었다. 배양여액을 고체 황산암모늄염색, protamine sulfate에 의한 색소제거, DEAE-Sephadex A-50 이온교환 chromatography, Sephadex G-100 gel permeation chromatography, 그리고 각 단계마다 ultrafiltration하고 이렇게 4 단계를 거친 결과, 12%의 수율에 효소의 specific activity가 20배 증가하였다.

효소의 순수도

Polyacrylamide gel 전기영동과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(Fig. 3), isoelectrofocusing의 결과로 보아 단일종류의 단백질임을 확인할 수 있었다.

분자량과 등전점

SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의해 정제된 효소의 분자량을 추정해보았다. 표준시료로는 lysozyme (14,000), β -lactoglobulin (18,400), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200) 등의 SDS molecular weight markers MW-SDS-70 kits를 사용하였는데 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig.4에서 표준시료 단백질의 상대적 이동거리

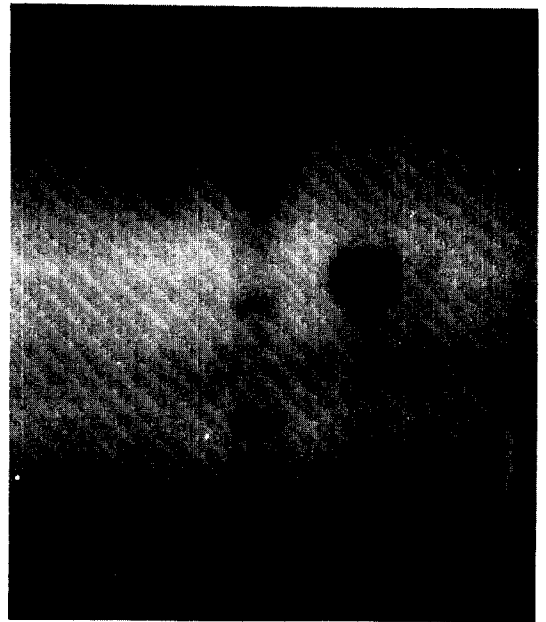


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of laccase. Gel composition: T = 12.5%, C = 2.7%.

Molecular weight markers:

- 1, bovine serum albumin (66,200);
- 2, β -lactoglobulin (18,400);
- 3, ovalbumin (45,000)
- 4, lysozyme (14,300);
- S, laccase.

를 분자량의 상용대수 값에 대하여 회귀곡선을 그려 분자량이 58,000 정도 되는 것으로 추정된다.

그리고 isoelectrofocusing 결과 이 효소는 등전점이 3.75 인 것으로 나타났다.

효소활성도에 미치는 온도와 영향

반응혼합물은 온도조건만 변화시키고 효소의 활성을 측정한 결과 45°C가 최적 반응온도임을 알 수 있었다. 온도에 따른 효소의 활성도로 부터 활

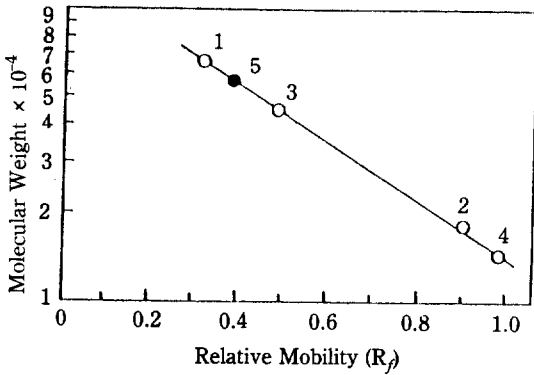


Fig. 4. Molecular weight estimation of laccase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
Molecular weight markers:
1, bovine serum albumin (66,200);
2, β -lactoglobulin (18,400);
3, ovalbumin (45,000)
4, lysozyme (14,300);
5, laccase.

성에너지 E_a 를 구하여 Arrhenius plot을 한 것이 Fig.5이며, E_a 는 40-45°C에서 3.3 kcal mol⁻¹, 30-40°C에서 7.8 kcal mol⁻¹, 20-30°C에서 9.7 kcal mol⁻¹의 값으로 증가하였고 55°C 이상에서는 급격히 곡선이 기울어져 효소의 inactivation 양상을 보이고 있다. 효소의 열안정성은 최적반응온도인 45°C가 포함된 40°C 이상에서 활성이 빨리 떨어지는 것으로 보아 30°C 이하에서 비교적 안정하다는 결론을 얻었다.

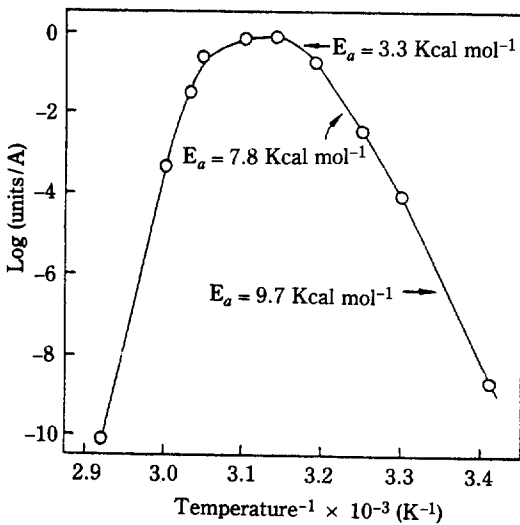


Fig. 5. Temperature optimum of laccase.

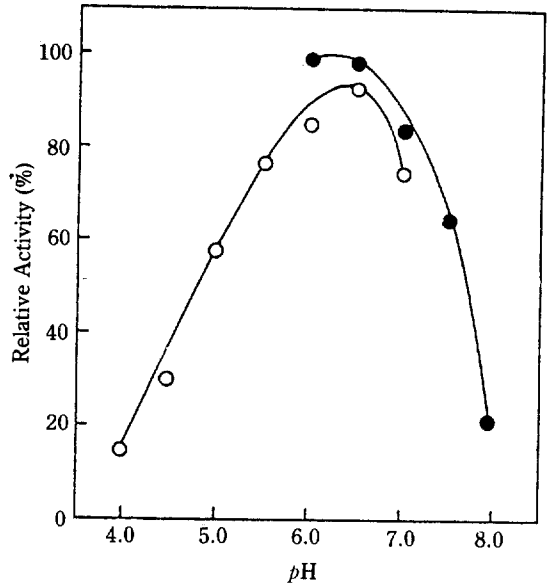


Fig. 6. pH optimum of laccase.
○, citrate-phosphate buffer; ●, phosphate buffer.

효소활성도에 미치는 pH 영향

반응혼합물을 pH 조건만 변화시키고 효소의 활성을 측정하였더니 Fig.6에서와 같이 pH 6.5 부근이 최적 pH 조건이라는 것을 알 수 있었고, 시트르산-인산완충용액에서보다 인산완충용액에서 효소의 활성도가 큰 값을 나타내었다.

기질친화도

각 기질에 대해 농도에 따른 반응속도를 구하고 Km 값과 Vmax를 계산하였다. 그 중 DOPA, ferulic acid 그리고 vanillic acid의 경우를 Fig.7에 Lineweaver-Burk plot을 작성하였다. DOPA, ferulic acid, vanillic acid에 대한 laccase의 Km 값은 각각 2.73 mM, 48.6 μ M, 0.52 mM로 나타났고 ferulic acid가 가장 큰 친화력을 갖고 있었다.

Thin-layer chromatography에 의한 효소의 작용양상 분석

적하여 전개시킨 plate를 UV transilluminator로 확인하였다(Fig.8). 그 결과 ferulic acid의 경우, R_f 값이 각각 0.08, 0.17, 0.39 되는 3개의 물질이 비교적 뚜렷이 드러났다. 효소가 들어가지 않는 대조구와 비교하여 R_f 0.39는 기질과 동일한 R_f 값을 가지는 것으로 보아 기질 자체인 것으로 여겨지며 R_f 0.17과 R_f 0.08은 효소의 작

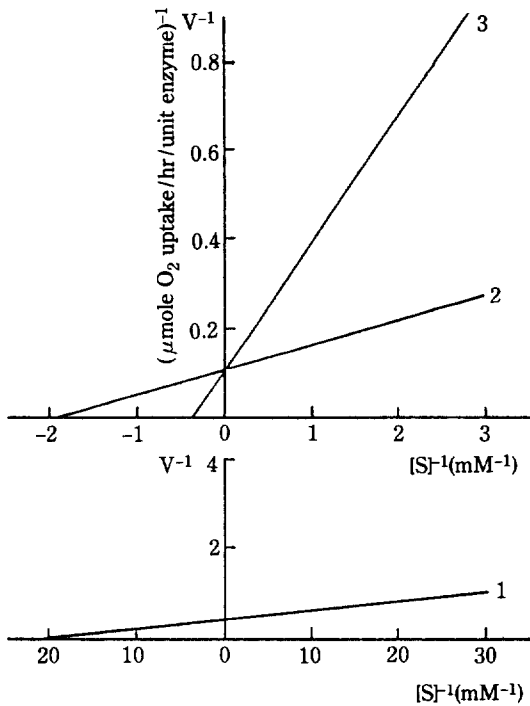


Fig. 7. Lineweaver-Burk plots for substrates by lac-case.

Substrate: 1, ferulic acid;
 2, vanillic acid;
 3, DOPA.

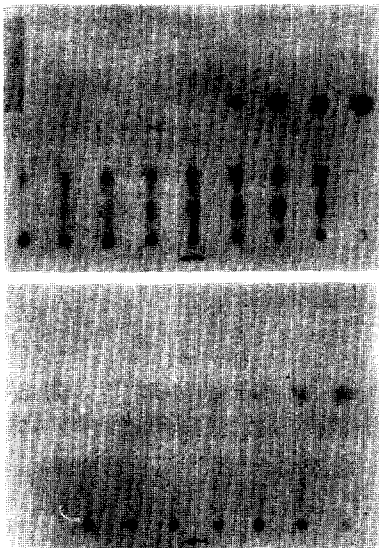


Fig. 8. Separation of reaction products according to the reaction time by thin-layer chromatography.

Above: in case of ferulic acid (20 min. interval)
 Below: in case of vanillic acid (30 min. interval)

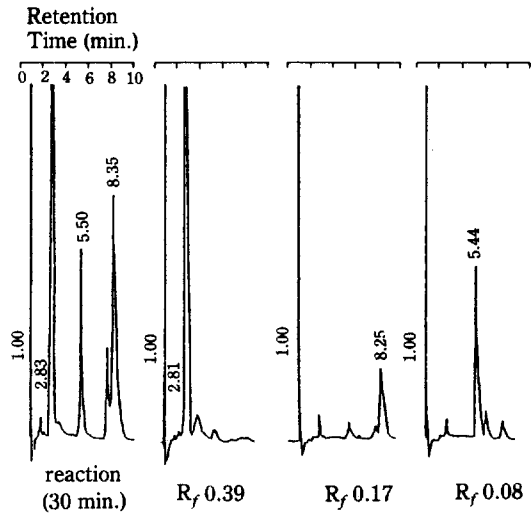


Fig. 9. High performance liquid chromatography analysis of reaction products which were separated by TLC.

용기작에 근거하여 기질이 분자량이 큰 화합물로 변한 것으로 추정된다. R_f 0.39는 반응시작후 90분이 경과하자 보이지 않았고, R_f 0.08은 160분이 경과하자 나타나지 않았다. 즉 기질이 소모되면서 생성된 반응산물은 R_f 0.08, R_f 0.17의 순으로 소모되는 것을 볼 수 있으나, 이 기작은 직접 효소

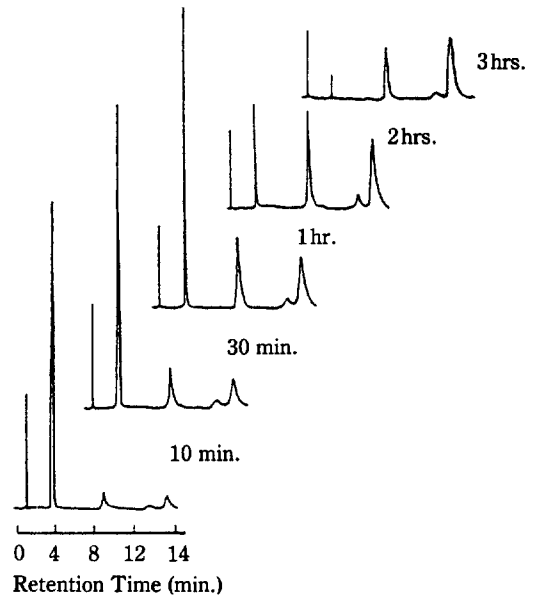


Fig. 10. Separation of reaction products according to the reaction time by high performance liquid chromatography.

의 기질로 작용한 결과인지, 또는 자발적인 것인지 확인되지 않았다.

Vanillic acid의 경우, R_f 값이 0.06, 0.16, 0.37의 물질을 자외선으로 확인할 수 있었고 ferulic acid와 비슷한 양상을 보였다.

High performance liquid chromatography 에 의한 효소의 작용양상 분석

Fig.9에서 ferulic acid를 기질로 하여 TLC에서의 조건에 따라 반응시킨 후 plate에 전개된 3가지 물질을 분리하고 각각 HPLC로 분석하여

retention time (Rt) 2.8이 R_f 0.39, Rt 5.5가 R 0.08, Rt 8.3이 R_f 0.17에 해당되는 peak라는 것을 밝혔다.

그리고 Fig.10에서는 용매의 조성을 water: acetonitrile:acetic acid=80:20:1로 바꾸고 ferulic acid와 효소의 반응 혼합물을 시간별로 일정량 취하여 분석하였다. 그 결과 TLC에서와 같이 반응산물에 기질보다 분자량이 큰 물질이 존재하며, 반응시간이 경과함에 따라 소멸되어 사라지는 것을 확인하였다.

적 요

*Pleurotus ostreatus*의 배양액에서 laccase (E. C. 1, 10, 3, 2)를 황산암모늄에 의한 염석, protamine sulfate에 의한 색소제거, DEAE-Sephadex A-50에 의한 이온교환 chromatography, Sephadex G-100에 의한 gel permeation chromatography의 단계를 거쳐 순수 분리하였다. 이 효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의해 58,000 정도로 추정되며, isoelectrofocusing에 의해 3.75의 등전점을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이 효소의 최적반응온도는 45°C, 최적 반응 pH는 6.5 정도인 것으로 나타났으며 35°C 이하에서 활성이 안정하게 유지되었다. 기질에 대해서는 ferulic acid가 가장 친화력이 좋은 것으로 나타났다. 반응산물을 TLC와 HPLC에 의해 분석한 결과 기질보다 분자량이 크고 반응시간이 경과함에 따라 소멸되어 사라지는 산물을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Ander, P. and K.-E. Eriksson. 1976. The importance of phenoxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **109**: 1-8.
2. Ander, P. and K.-E. Eriksson. 1978. Lignin degradation and utilization by microorganisms. In *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 14. M.J. Bull, ed. Elsevier Scientific, New York, pp. 1-58.
3. Bertrand, G. and E. Bourquelot. 1895. La laccase dans les champignons. *C. R. Soc. Biol.* **47**: 579.
4. Bradfore, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
5. Bollag, J.-M. and A. Leonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 849-854.
6. 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.
7. Bollag, J.-M., S.Y. Liu and R.D. Minard. 1982. Enzymatic oligomerization of vanillic acid. *Soil Biol. Biochem.* **14**: 157-163.
8. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-407.
9. Fåhræus, G. 1952. Formation of laccase by *Polyporus versicolor* in different media. *Physiol. Plant.* **5**: 284-291.
10. Gadd, O. 1957. Wood decay resulting from rot fungi. *Paper and Timber* **8**: 363-374.
11. Gierer, J. and A.E. Opara. 1973. Studies on the enzymatic degradation of lignin. The action of peroxidase and laccase on monomeric and dimeric model compounds. *Acta Chem. Scand.* **27**: 2909-2922.
12. Green, T.R. 1977. Significance of glucose oxidase in lignin degradation. *Nature* **268**: 78-80.

13. Grabbe, K., R. Koenig and K. Haider. 1968. Die Bildung der Phenol-oxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. *Arch. Microbiol.* **73**: 133-153.
14. Hiroi, T. and K.-E. Eriksson. 1976. Influence of cellulose on the degradation of lignins by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Sven. Papperstidn.* **79**: 157-161.
15. Kern, H.W. 1983. Transformation of lignosulfonates by *Trichoderma harzianum*. *Holzforschung* **37**: 109-115.
16. Kim, K.J., J.S. Maeng, S.O. Kang, Y.C. Hah and S.W. Hong. 1986. Effect of several carbohydrates on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Microbiol.* **24**(3): 323-328.
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
18. Law, K. 1959. A role of the laccase of wood-rotting fungi. *Physiol. Plant.* **12**: 854-861.
19. Leonard, T.J. 1971. Phenoloxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* **106**: 162-167.
20. Leonard, T.J. and L.B. Phillips. 1973. Study of phenoloxidase activity during the reproductive cycle in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* **114**: 7-10.
21. Leonowicz, A. and K. Grzywnowicz. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* **137**: 89-96.
22. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
23. Rösch, R. 1965. Über die Funktion der Phenoloxidasen holzabbauender Pilze. In *Holz und Organismen*, Int. Symp. Berlin-Dahlem, G. Becker and W. Liese, eds. Duncker und Humblot, Berlin; 1966, pp.173-185.
24. Sato, M. and M. Hasegawa. 1976. The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochemistry* **15**: 61-65.
25. Segel, I.R. 1975. In *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley-Interscience, New York, pp. 931-934.
26. Selin, J.F., V. Sundman and M. Raiha. 1975. Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch. Microbiol.* **103**: 63-70.
27. Shimada, M. 1979. Stereobiochemical approach to lignin biodegradation: possible significance of nonstereospecific oxidation catalyzed by laccase for lignin decomposed by white-rot fungi. In *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Applications*. T.K. Kirk and T. Higuchi, eds. CRC Press, West Palm Beach, Fla., 1980.

(Received May 12, 1987)