

## *Pleurotus ostreatus* 에서 분비되는 Peroxidase 의 특성

배성호·신광수·강사옥·하영철·최선진\*·김규중\*\*·최형태\*\*\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

\*서울대학교 치과대학 미생물학교실

\*\*강릉대학교 생물학과

\*\*\*강원대학교 자연과학대학 미생물학과

### Characterization of Extracellular Peroxidase from *Pleurotus ostreatus*

Bae, Seong Ho, Kwang-Soo Shin, Sa-Ouk Kang, Yung-Chil Hah,  
Son-Jin Choe\*, Kyu-Jung Kim\*\*, and Hyoung Tae Choi\*\*\*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Department of Microbiology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*\*Department of Biology, Kang-Reung National University, Kangreung 210-320, Korea

\*\*\*Department of Microbiology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT:** An extracellular peroxidase found in culture broth of *Pleurotus ostreatus* was induced by syringic acid. This enzyme was fractionated by DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography and gel filtration chromatography on Sephadex G-150. The enzyme is a glycoprotein containing 35.7 % carbohydrate. The results of SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis and gel filtration indicate that the enzyme is a dimer consisted of identical subunits ( $M_r = 72,400$ ). The absorption spectrum of the enzyme indicates the presence of one mole of iron protoporphyrin IX per one mole of subunit. Isoelectric point of the enzyme is 4.26 and  $K_m$  value for  $H_2O_2$  is  $7.2 \mu M$ . The enzyme showed its optimal activity at pH 3.5-4.0 and at 40 °C. The  $K_m$  values of this enzyme for ferulic acid and sinapic acid are 2.4 and 12.3 times higher than those of horseradish peroxidase, respectively.

**KEY WORDS** □ *Pleurotus ostreatus*, extracellular peroxidase, iron protoporphyrin IX

Ligninase 와 manganese peroxidase 라는 일련의 새로운 peroxidase 들이 *Phanerochaete chrysosporium* 의 배양액으로부터 순수분리되어 그 특성이 보고된 바 있다(Glenn 과 Gold, 1985; Gold 등, 1984; Tien 과 Kirk, 1984). Manganese peroxidase 는 리그닌 분해와의 관련성이 분명하지 않으나, ligninase 의 경우, 여러 가지  $\beta$ -linked 리그닌모델 화합물에서  $C_\alpha$ - $C_\beta$  cleavage 를 촉매하였다(Gold 등, 1984; Tien 과 Kirk, 1984). 이 반응은 백색 부후균에 의해 리그닌이 분해될 때 관찰되는 반응이다(Chen 과 Chang, 1985). Ligninase 는  $C_\alpha$ - $C_\beta$  cleavage

뿐만 아니라, phenylglycol 의 intradiol cleavage 를 촉매하며, benzyl alcohol 을 aldehyde 와 ketone 으로 산화시키고 phenol 을 산화시키며, benzylic methylene group 과 styryl 구조물에서 olefinic 결합을 hydroxylation 시키는 등, 여러 가지 산화반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다(Kirk 와 Shimada, 1985). Ligninase 는 nonligninolytic culture 에는 존재하지 않으며(Faison 과 Kirk, 1985), 배지내의 질소 영양원이 제한될 때 효소의 생성량이 증가하고, veratryl alcohol 이 유도물질로 작용하여 리그닌 분해능과 함께 유도되는 것으로 알려져 있다(Faison 과 Kirk,

1985; Faison 등, 1986; Kirk 등, 1986a).

리그닌을 이용하는 미생물들 중 *P. chrysosporium* 을 제외한 다른 균들에서 peroxidase 가 구체적으로 연구된 바는 없으나, 최근에 Garcia 등 (1987)이 ligninase 에 대한 항체를 이용해서 여러 가지 목재 부후균에 적어도 ligninase 와 유사한 효소들이 존재한다고 보고한 바 있고, *Pleurotus ostreatus* 에서 extracellular lignin peroxidase 활성이 있다는 것을 보고했으나 ligninase 에 대한 항체로는 검출되지 않았다고 보고하였다. 이외에 *Streptomyces* spp. 가 lignocellulose 를 분해할 때 peroxidase 가 유도된다는 보고가 있고 (Ramachandra 등, 1987), 리그닌과의 연관성에 대해서는 언급된 바 없지만 *Coprinus cinereus* 의 배양액에서 peroxidase 가 순수분리되었다 (Morita 등, 1988). 비록 단편적이지만 이러한 최근의 연구 결과들은 peroxidase 와 리그닌 분해의 관계가 *P. chrysosporium* 에만 국한된 것이 아니라 일반적인 원리로 적용될 수 있을 것이라는 가능성을 시사하는 것이다.

본 실험의 목적은 리그닌 분해와 peroxidase 와의 관계를 좀 더 일반적인 것으로 확장해 보기 위해 Garcia 등 (1987)이 ligninase 와는 다른 peroxidase 가 존재한다고 보고한 *P. ostreatus* 에서 peroxidase 를 분리하여 그 특성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 한국 산림조합 연합회에서 분양받은 *Pleurotus ostreatus* (strain No. 2)로서, potato dextrose agar slant 에 접종하여 25°C에서 보관하였으며, 4주 간격으로 계대배양하였다.

균체를 얻기 위한 배지로는 malt 배지 (1 l 수용액에 dextrose 10g, malt extract 10g, yeast extract 5g, peptone 5g의 조성을 가진 배지)를 사용하였다. 직경 0.8cm cork borer 로 agar plate 에서 4개의 plug 를 따서 50 ml 의 배지가 들어있는 250 ml Erlenmeyer flask 에 접종하여 28°C에서 48시간 진탕배양한 후, Omni-mixer (Du Pont Instrument)로 마쇄하고 그 현탁액을 1% (v/v)되게 접종하여 28°C에서 진탕배양하였다. 효소 유도를 위한 배지로는 Commanday 와 Macy (1985)가 사용한 최소배지를 변형하여 사용

하였다. 그 조성은 1 l 수용액에 dextrose 10.0g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0g,  $\text{CaCl}_2$  0.2g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g, thiamine 2.0mg, trace mineral solution 20 ml (trace mineral solution의 조성은 1 l 당  $\text{CuSO}_4$  0.2g,  $\text{ZnSO}_4$  0.1g,  $\text{MnCl}_2$  0.1g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.05g,  $\text{FeSO}_4$  1.0g, Na-EDTA 0.6g이었다.)을 넣은 다음 1.0N NaOH 로 배지의 pH 를 5.0으로 맞추었다. 본 균주는 생장을 위해 thiamine 이외의 다른 비타민은 요구하지 않았다. Malt 배지에서 배양하여 얻은 균체를 malt 배지의 2배되는 유도배지에 옮긴 후 Omni-mixer 로 마쇄하고 250 ml Erlenmeyer flask 에 50 ml 씩 분주하여 28°C에서 정치배양하였다. Peroxidase 의 유도를 위해서는 균체를 malt 배지에서 유도배지로 옮길 때, 유도배지에 유도물질로서 syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid)를 0.5 mM 의 농도로 첨가하였다.

### 효소활성도 측정

Pick 과 Keisari (1980)의 방법을 변형하여 사용하였다. 반응혼합물 1.0 ml 의 조성은 20 mM 초산완충용액 (pH 4.0), 0.5 mM phenol red (phenolsulfonphthalein)과 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  그리고 효소용액이며 30°C에서 5분간 반응시킨 후 4 N NaOH 20  $\mu\text{l}$  를 넣어 반응을 중지시키고 610 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 반응은  $\text{H}_2\text{O}_2$  를 넣어 줄으로써 시작하였다. 효소의 활성단위는 1분당 1.0의 흡광도 변화를 나타낼 수 있는 효소의 양을 1 unit 로 정의하였다. 효소의 기질특이성을 알아보는 실험에서는 20 mM 시트르산-인산완충용액 (pH 4.0)을 사용하였으며, 각 기질이 특징을 나타내는 파장에서 흡광도 변화정도를 측정하였다. Horseradish peroxidase 의 활성을 측정할 때에는 20 mM 시트르산-인산완충용액 (pH 6.0)을 사용하였다.

### Acetone 침전

효소의 유도물질인 syringic acid 를 0.5 mM 되게 첨가하여 10일 동안 배양한 배양액 2.0 l (50 ml  $\times$  40)에서 gauze 와 유리섬유로 균사체를 제거하고 여과액에 아세톤을 65%되게 처리한 후, 0°C에서 8,000 $\times$ g 로 10분간 원심분리하였다. 이 때 얻어진 침전물에서 질소가스로 아세톤을 제거한 후 20 mM 인산완충용액 (pH 6.5)에 녹여 원심분리한 상등액을 조효소로 사용하였다.

DEAE Sephadex A-50 이온교환크로마토그래피 조효소를 DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia

Fine Chemicals)으로 이온교환크로마토그래피를 수행하였다. 20 mM 인산완충용액 (pH 6.5)으로 세척한 컬럼(2.8×18.5 cm)에 시료를 얹고, 500 ml의 완충용액으로 용출한 뒤, 다시 같은 인산완충용액에서 NaCl 0~0.5 M의 일정농도 기울기로 용출시켰다. 두번째 이온교환크로마토그래피에서는 20 mM 인산완충용액 (pH 6.0)을 사용하였으며, NaCl 0~0.4 M의 일정농도 기울기로 용출시켰다.

#### Gel 여과크로마토그래피

Sephadex G-150(Pharmacia Fine Chemicals)을 컬럼(2.8×101 cm)에 충전하여 20 mM 인산완충용액 (pH 6.0)으로 세척하고 농축된 시료를 얹은 후 같은 완충용액으로 용출시켰다.

#### SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동

Lambin(1978)의 방법을 변형하여 SDS-discontinuous buffer system으로 acrylamide 5~20%, bis-acrylamide 2.6%인 linear gradient slab gel을 사용하였다. 시료는 Tris-HCl 완충용액 (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol에 녹여 5분간 중탕한 후 사용하였다. 전기영동 후 겔은 Neuhoff 등(1988)의 방법에 따라 염색하였다. 겔을 12% trichloroacetic acid 용액에서 1시간 동안 고정시킨 후, 10% coomassie brilliant blue G-250, 2% phosphoric acid, 10% ammonium sulfate, 20% methanol의 염색용액으로 약 24시간 염색하고 25% methanol로 세척하였다. 표준단백질로는  $\alpha_2$ -macroglobulin(170,000; reduced form), phosphorylase b(97,000), glutamate dehydrogenase(55,400), 그리고 lactate dehydrogenase(36,500)(이상은 Boehringer Mannheim Biochemica에서 구입)를 사용하였다.

#### 분자량의 결정

Sephadex S-300 superfine(Pharmacia Fine Chemicals)을 컬럼(2.1×105 cm)에 충전하여 20 mM 인산완충용액 (pH 6.0)으로 세척하고, 효소와 표준단백질: bule dextran(2,000,000), apoferritin(443,000),  $\beta$ -amylase(200,000), alcohol dehydrogenase(150,000), bovine serum albumin(66,000), 그리고 carbonic anhydrase(29,000)(이상 Sigma Chemical Co.)을 얹은 후 동일한 완충용액으로 용출시켰다.

#### 효소의 분광학적 분석

흡광 스펙트럼(UV-visible absorption spec-

trum)은 Shimadzu UV-265 spectrophotometer를 사용하여 실온에서 행하였다. 20mM 인산완충용액 (pH 6.0) 10 ml에 정제된 효소 540  $\mu$ g을 녹여 사용하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-효소 복합체는 실온에서 효소용액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.2 mM 되게 넣어 얻었다.

#### 단백질 정량

Bradford의 방법(1976)과 Lowry의 방법(1951)을 병행하여 사용하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 사용하였다.

#### 효소의 당함량 정량

Dubois 등(1956)의 방법에 따라 정제된 효소에 5% phenol 수용액과 황산을 처리한 후 490 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 효소의 당함량을 결정하였다. 표준당으로는 포도당(Fluka)을 20 mM 인산완충용액 (pH 6.0)에 녹여 사용하였다.

#### 균체의 건조중량 측정

*P. ostreatus*의 생장곡선을 알기 위해 건조중량을 측정하였다. 무게를 알고 있는 건조된 여과지(Whatman No. 2)로 균사체를 걸러서 100°C에서 2시간 동안 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다.

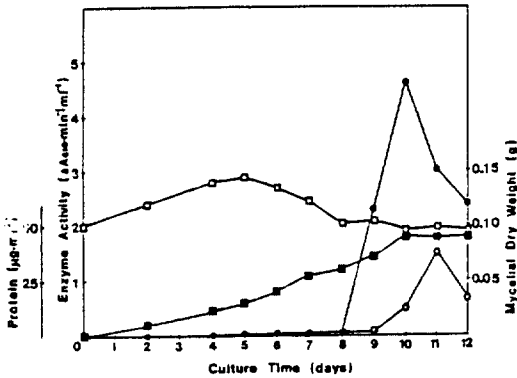
#### 시약

배지성분 중, dextrose는 Junsei Chemical Co.에서, malt extract, yeast extract, 그리고 peptone은 Difco에서 구입하였다. 효소의 기질로서 *o*-dianisidine,  $\beta$ -(3,4-dihydroxyphenyl)- $\alpha$ -alanine, ferulic acid는 Sigma Chemical Co.에서, sinapic acid는 Roth에서, phenol은 Merck에서, salicylic acid는 Fisher Scientific Co.에서, catechol은 Wako Pure Chemical Industries에서, gallic acid는 米山藥品工業株式會社에서, 그리고 guaiacol은 キッタ化學株式會社에서 구입하였다.

## 결과 및 고찰

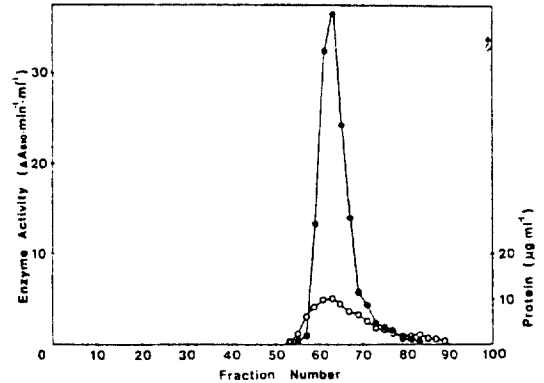
### 효소의 유도

유도배지에서 균을 정치배양하면서 배양액으로부터 peroxidase의 활성과 단백질의 함량을 측정 한 결과, peroxidase의 활성은 배양 11일째, 단백질 함량은 10일째에 최대치를 나타내었다(Fig. 1). 이 때 반응혼합물에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣어주지 않으면 반응이 일어나지 않는 것으로 보아 효소의 활성이 peroxidase에 의한 것으로 추정된다. 균사체의



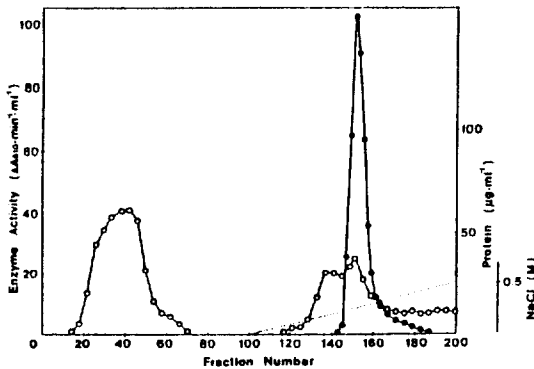
**Fig. 1.** Effect of syringic acid on the production of *Pleurotus peroxidase*.

Syringic acid was added to a final concentration of 0.5mM. Symbols; enzyme activity in the presence of syringic acid (●), enzyme activity in the absence of syringic acid (○), protein concentration (■) and mycelial dry weight (□).



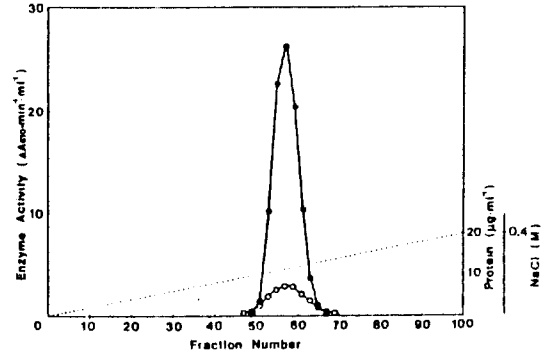
**Fig. 3.** Gel filtration chromatography of *Pleurotus peroxidase* on sephadex G-150.

Column dimension; 2.8×101cm. Fractions of 6ml were collected at a rate of 13.2ml/hr. Symbols; enzyme activity (●), and protein concentration (○).



**Fig. 2.** Ion exchange chromatography of *Pleurotus peroxidase* on DEAE Sephadex A-50.

Column dimension; 2.8×18.5cm. Fractions of 5ml were collected at a rate of 15ml/hr. Symbols; enzyme activity (●), protein concentration (○), and NaCl gradient (---).



**Fig. 4.** Ion exchange chromatography of *Pleurotus peroxidase* on DEAE sephadex A-50.

Column dimension; 1.8×18.5cm. Fractions of 5ml were collected at a rate of 15ml/hr. Symbols; enzyme activity (●), protein concentration (○), and NaCl gradient (---).

건조중량은 5일째까지는 계속 증가하였고, 그 후 8일째까지 감소하다가 8일 이후에는 거의 변하지 않았다. 효소의 유도물질로써 syringic acid를 0.5 mM 되게 넣어주었을 때, 효소의 활성이 10일째에 최대치를 나타냈으며, 이 때 효소활성은 대조구와 비교하여 약 3배 정도 증가하였다. 단백질 함량과 균사체의 건조중량은 대조구와 차이가 없었다.

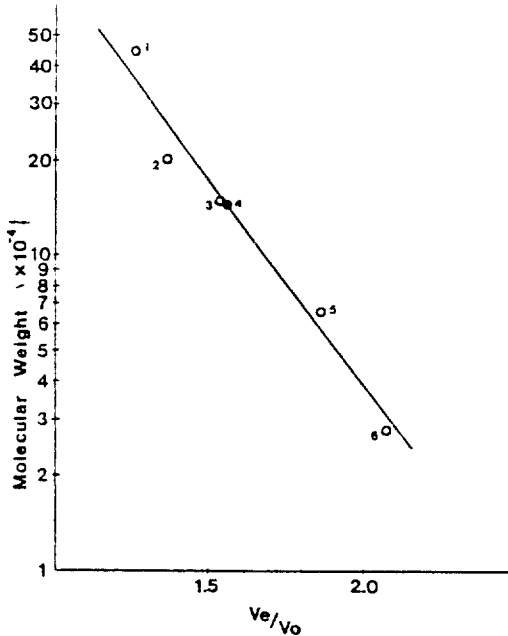
**효소의 분리 및 정제**

유도배지의 여과액에 아세톤을 65%로 처리하여 단백질을 농축한 후 DEAE Sephadex A-50 이온

교환수지에 부착시켜 0~0.5 M NaCl 농도 기울기로 흘러주었다니 NaCl 0.25 M 농도에 해당하는 분획에서 효소의 활성을 나타내는 peak가 분리되었다(Fig. 2). 이 부분을 수확하여 Sephadex G-150과 DEAE Sephadex A-50으로 계속 분획하였다(Fig. 3과 4). 조효소를 세번의 크로마토그래피로 분획한 결과, 11.4%의 수율에 specific activity가 40배 정도 증가하였다(Table 1). 이상에서 분리한 효소의 순도를 SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동(Fig. 6)으로 확인한 결과, 단일 종류의 단백질을 확인할 수

**Table 1.** Purification step of *Pleurotus peroxidase* from the culture filtrate of *P. ostreatus*.

Purification step	Total enzyme activity ( $\Delta A_{610} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Total protein (mg)	Specific activity ( $\Delta A_{610} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	Recovery (%)	Purification fold
Culture filtrate	9062	86.3	105.0	100	1.0
Acetone precipitation	8858	31.8	278.6	97.7	2.7
DEAE Sephadex A-50 chromatography	5520	2.2	2421.1	60.9	23.1
Sephadex G-150 chromatography	1776	0.6	2921.1	19.6	27.8
DEAE Sephadex A-50 chromatography	1032	0.2	4303.5	11.4	40.1

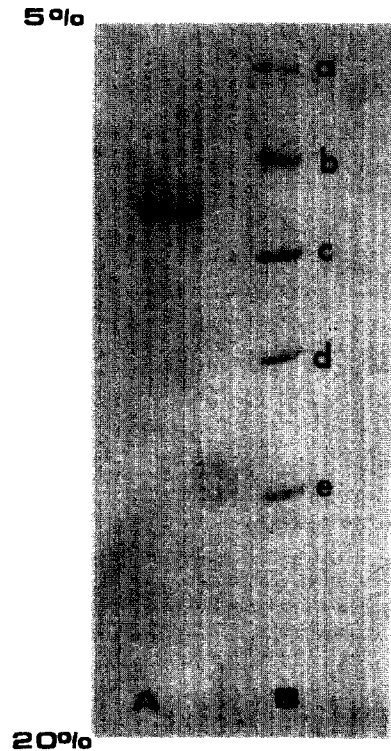
**Fig. 5.** Molecular weight estimation of *Pleurotus peroxidase* by gel permeation chromatography on Sephacryl S-300.

Molecular weight markers: 1, apoferritin (443,000); 2,  $\beta$ -amylase (200,000); 3, alcohol dehydrogenase (150,000); 5, bovine serum albumin (66,000); and 6, carbonic anhydrase (29,000). 4 indicates *Pleurotus peroxidase*.

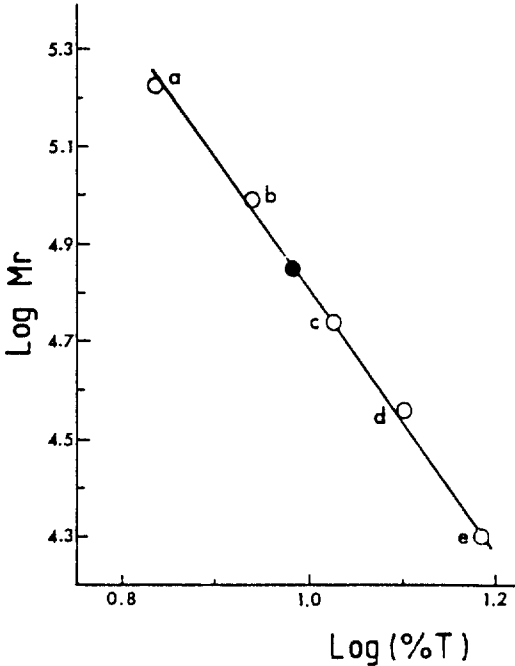
있었다.

#### 효소의 일반적 특성

젤 여과 크로마토그래프상에서 효소의 분자량을 측정하였다. 표준 단백질의  $v_e/v_o$  ( $v_e$ : 용출부피,  $v_o$ : void 부피) 값을 분자량의 상용대수값에 대하

**Fig. 6.** SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis of *Pleurotus peroxidase*.

5—20 % linear gradient gel (2.6 % bis-acrylamide) was used. Slot A indicates *Pleurotus peroxidase*. Slots B, molecular weight markers: a,  $\alpha_2$ -macroglobulin (170,000); b, phosphorylase b (97,400); c, glutamate dehydrogenase (55,400); d, lactate dehydrogenase (36,500); e, trypsin inhibitor (20,100).

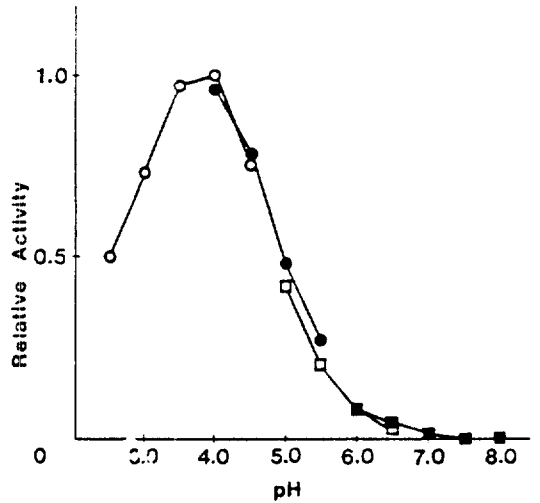


**Fig. 7.** Molecular weight estimation of *Pleurotus peroxidase* by SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Relative mobility was plotted against molecular weight. The enzyme was indicated by the closed circle. Other symbols are the same as those of Fig. 6.

여 회귀곡선을 그려 직선을 얻었고 (Fig. 5), 그 결과 효소의 분자량은 약 150,000으로 추정되었다. 정제된 효소의 분자량을 표준 단백질로 분자량의 지표로 하여 SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동으로 구하였을 때 (Fig. 6), 표준 단백질이 위치한 acrylamide 농도 (% T)의 상용대수값을 분자량의 상용대수값에 대하여 회귀곡선을 그려 직선을 얻었다 (Fig. 7). 그 결과 효소의 분자량은 약 72,400으로 추정되었다. 이상의 결과로부터 본 효소는 2개의 동일한 소단위체 (subunit)로 이루어진 이합체 (dimer)로 추정된다.

포도당을 표준당으로 하여 신뢰도 (r) 0.998의 표준곡선을 얻었으며, 이를 기준으로 하여 정제된 효소 2.67  $\mu\text{g}$ 을 반응시켰을 때 1.48  $\mu\text{g}$ 의 당이 검출되었다. 따라서 본 효소에 내재하는 당의 비율은 35.7% 정도로 높은 값을 나타내었다.

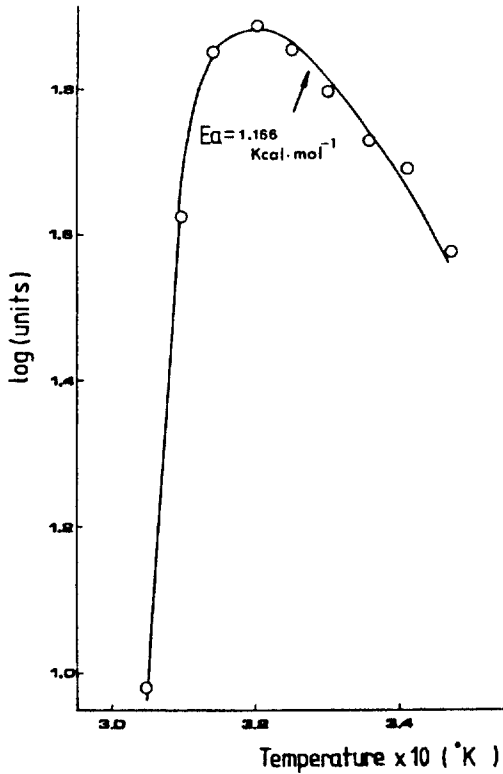
여러 pH 조건에서 phenol red를 기질로 사용하여 효소의 활성을 조사하였다 (Fig. 8). 이 때



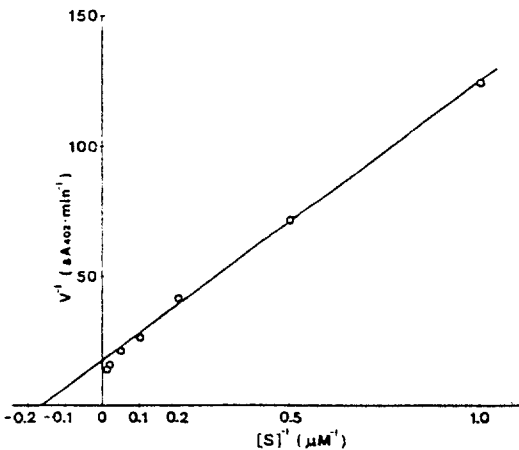
**Fig. 8.** Effect of pH on the activity of *Pleurotus peroxidase*. The optimal pH of *Pleurotus peroxidase* was measured over the following buffer systems: pH 2.5-4.5, 20mM sodium tartrate buffer (○); pH 4.0-5.5, 20mM sodium acetate buffer (●); pH 5.0-6.5, 20mM citrate phosphate buffer (□); pH 6.0-8.0, 20mM sodium phosphate buffer (■).

pH 3.5~4.0 사이에서 최적의 활성을 나타내었다. pH 2.5~5.0 사이에서는 최적활성에 대하여 50% 이상의 활성이 나타났으며, 그 이상의 pH에서는 활성이 급격히 감소하였다. 온도에 따른 효소활성의 변화는 40°C까지는 활성이 점점 증가하였으며, 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 한편 30~35°C에서 활성화에너지는 1.166 kcal·mole<sup>-1</sup>이었으며 35~40°C에서 활성화에너지는 0.6893 kcal·mole<sup>-1</sup>이었다 (Fig. 9).

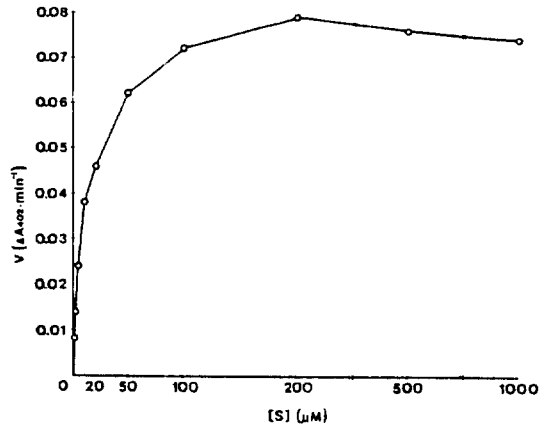
1.0 mM의 *o*-dianisidine을 electron donor로 사용하여, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도를 변화시키면서 효소활성을 측정하였고 Lineweaver-Burk plot으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 효소의 K<sub>m</sub>값을 구하였다 (Fig. 10). 이 때 K<sub>m</sub>값은 약 7.2  $\mu\text{M}$ 이었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도가 200  $\mu\text{M}$ 이었을 때 최대의 효소활성이 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 활성이 약간 억제되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 11). 또한 같은 기질을 사용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도를 변화시키면서 효소활성을 측정할 결과, ferulic acid와 sinapic acid의 K<sub>m</sub>값은 각각 34.3과 12.4  $\mu\text{M}$ 이었고, horseradish peroxidase에 비해 2.35, 12.27배 정도 높은 친화도를 보였다 (Table 2).



**Fig. 9.** Arrhenius plot of *Pleurotus peroxidase*. The optimal temperature of *Pleurotus peroxidase* was measured by incubating the enzyme at the defined temperature range (20°C~55°C).



**Fig. 10.** Lineweaver-Burk plot of *Pleurotus peroxidase* for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The enzyme activity was determined at 30°C by monitoring the change in 402 nm due to oxidation of o-dianisidine.



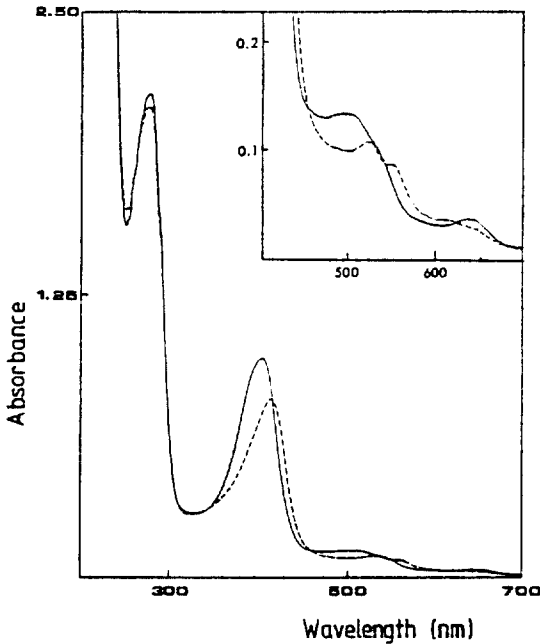
**Fig. 11.** Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on enzyme activity. The enzyme activity was determined by the change in 402 nm with o-dianisidine as a substrate.

**Table 2.** Km value for ferulic acid and sinapic acid. Enzyme activity were expressed by nanomole of substrate oxidation per min

Substrate	<i>Pleurotus peroxidase</i>	Horseradish peroxidase
Ferulic acid	34.3	80.8
Sinapic acid	12.4	152.1

**효소의 분광학적 분석**

정제된 효소의 흡광스펙트럼은 280과 400 nm 에서 상대적으로 높은 흡광도를 나타냈으며 500과 635 nm 에서 약한 peak 가 나타났고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.1 mM 되게 넣어주었을 때 400 nm 의 Soret band 가 415 nm 로 이동하였다(Fig. 8). 이러한 스펙트럼의 양상을 다른 peroxidase 들과 비교하여 보았을 때 (Gleen 과 Gold, 1985; Saunders 등, 1964; Tien 등, 1986), 본 효소는 조효소(prosthetic group)로써 heme 을 가지고 있으며, 그 구조는 protoporphyrin IX 이라고 생각된다. 400 nm 에서 본 효소의 extinction coefficient 는 223 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>로 계산되었으며, 이 값은 다른 peroxidase 들의 extinction coefficient (Glenn 과 Gold, 1985; Saunders 등, 1964; Tien 등, 1986) 값의 약 2배에 해당하는 값이다. 따라서 본 효소는 각 소단위체에 각각 하나의 heme 을 가지고 있는 이합체로 생각된다.



**Fig. 13.** Absorption spectra of purified *Pleurotus peroxidase*.

Purified enzyme (540  $\mu$ g of protein) was dissolved in 0.1 M sodium phosphat buffer (pH 6.0). The insert shows the enlarged spectra in the wavelength region indicated. The oxidized form (---) was obtained by adding 200  $\mu$ M of  $H_2O_2$  to the reduced form (—).

**세포내 효소의 측정**

유도배지에 유도물질로서 syringic acid 를 넣고 10일간 배양한 후 배양액과 균사체내의 peroxidase 활성을 비교하여 보았다 (Table 3). 유리섬

**Table 3.** Localization of peroxidase activity in *P. ostreatus*. Volume of culture filtrate was 3.6l

	Culture filtrate	NaCl extract	Cell free extract
Peroxidase activity ( $\Delta A_{610} \text{min}^{-1}$ )	13,600	0	66.2

유로 균사체를 제거하고 그 여과액에서 효소의 활성을 측정하였으며, 얻어진 균사체를 증류수로 세척한 다음, 0.5 M NaCl 수용액으로 세포벽에 부착되어 있는 단백질을 추출하여 효소의 활성을 측정하였다. 다음으로 균사체를 Omni mixer 로 파괴하여 원심분리한 후, 상등액을 취하여 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, 세포내에 존재하는 peroxidase 의 양은 세포 밖에 존재하는 양의 약 0.5%에 지나지 않았으며, NaCl 에 의해 추출되는 peroxidase 는 없었다. 이러한 결과로 본 효소는 세포외 효소라고 추정할 수 있었다. 또한 균의 생장곡선의 관점에서 볼 때, 건조중량의 감소가 거의 정지되는 지점에서 효소가 생성된다는 점도 본 효소가 세포용해 등과 같은 기작에 의해 세포내에서 배양액으로 나오는 것이 아님을 뒷받침하는 것이다 (Fig. 1). *P. chrysosporium* 의 세포내에는 peroxidase 활성이 없다는 보고가 있으며 (Faison 과 Kirk, 1983), NaCl 이나 tween 80 을 사용하였을 때, 균사체로부터 ligninase 는 추출이 되지 않는 반면, manganese peroxidase 는 추출할 수 있다는 보고가 있다 (Paszczynski 등, 1986).

**적 요**

*Pleurotus ostreatus* 의 배양액에서 syringic acid 에 의해 유도되는 peroxidase 의 활성이 측정되었다. 본 효소는 DEAE Sephadex A-50 이온교환크로마토그래피와 Sephadex G-150 겔 여과크로마토그래피를 통하여 순수분리되었다. 순수분리된 효소는 당함량이 35.7%인 당단백질이었으며, SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동과 겔여과크로마토그래피에 의해 분자량 ( $M_r$ ) 72,400인 2개의 동일한 소단위체로 이루어진 이합체로 판명되었다. 본 효소는 흡광스펙트럼의 분석결과, iron protoporphyrin IX 의 구조를 갖는 2개의 heme 을 조효소로 가지고 있는 것으로 추정되었다. 본 효소의 등전점은 4.26 이었고  $H_2O_2$  에 대한  $K_m$  값은 7.2  $\mu$ M 이었다. 본 효소의 반응 최적온도는 40°C, 최적 pH 는 3.5에서 4.0 사이였다. Ferulic acid and sinapic acid 에 대한 본 효소의 친화도 ( $K_m$ ) 는 horseradish peroxidase 에 비해 각각 2, 4, 12.3배 더 높은 것으로 계산되었다.

**사 사**

본 논문은 문교부 기초과학연구소 학술조성연구비 (1988-1989) 에 의해 수행되었다.

**REFERENCES**

1. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of pro-



- tein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
2. **Chen, C.-L. and H.-M. Chang**, 1985. In: Biosynthesis and biodegradation of wood components (Higuchi, T., ed.), pp.535-556. Academic Press, New York.
  3. **Commanday, F. and J.M. Macy**, 1985. Effect of substrate nitrogen on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Arch. Microbiol.* **142**, 61-65.
  4. **Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith**, 1956. Colorimetric method for determination of sugars & related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
  5. **Faison, B.D. and T.K. Kirk**, 1983. Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1140-1145.
  6. **Faison, B.D. and T.K. Kirk**, 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 299-304.
  7. **Faison, B.D., T.K. Kirk and R.L. Farrell**, 1986. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 251-254.
  8. **Garcia, S., J.P. Latge, M.C. Prevost and M. Leisola**, 1987. Wood degradation by white-rot fungi: Cytochemical studies using lignin peroxidase-immunoglobulin-gold complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2384-2387.
  9. **Glenn, J.K. and M.H. Gold**, 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 329-341.
  10. **Gold, M.H., M. Kuwahara, A.A. Chiu and J.K. Glenn**, 1984. Purification and characterization of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring diarylpropane oxygenase from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 353-362.
  11. **Kirk, T.K. and M. Shimada**, 1985. In: Biosynthesis and biodegradation of wood components (Higuchi, T. ed.) pp.579-605. Academic Press, New York.
  12. **Kirk, T.K., S. Croan and M. Tien**, 1986a. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 27-32.
  13. **Lambin, P.C.**, 1978. Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **85**, 114-123.
  14. **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.
  15. **Morita, Y., H. Yamashita, B. Mikami, H. Iwamoto, S. Aibara, M. Terada and J. Minami**, 1988. Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. *J. Biochem.* **103**, 693-699.
  16. **Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt**, 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
  17. **Paszczynski, A., B.-V. Huynh and R. Crawford**, 1986. Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 750-765.
  18. **Pick, E. and Y. Keisari**, 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* **38**, 161-170.
  19. **Ramachandra, M., D.L. Crawford and A.L. Pometto III**, 1987. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: A comparative study of wild-type and genetically manipulated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2754-2760.
  20. **Saunders, B.C., A.G. Holmes-Siedle and B.P. Stark**, 1964. In: Peroxidase, Butter Worths, London.
  21. **Tien, M. and T.K. Kirk**, 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 2280-2284.
  22. **Tien, M., T.K. Kirk, C. Bull and J.A. Fee**, 1986. Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* burds. *J. Biol. Chem.* **261**, 1687-1693.

(Received November 1, 1989)