

표고 및 구름버섯으로부터 Mn-peroxidase와 Laccase의 生産*1

裴炫鍾*2 · 韓玉洙*2 · 高弘范*3 · 金潤受*2

Production of Mn-peroxidase and Laccase from *Lentinus edodes* and *Coriolus versicolor* *1

Hyeun-Jong Bae *2 · Ok-Soo Han *2 · Hong-Bum Koh *3 · Yoon-Soo Kim *2

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the characteristics and the productivities of ligninolytic enzymes: laccase (Lac) and Mn-dependent peroxidase (MnP) from *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* respectively. Enzymes were isolated from cultural filterates and purified according to the standard methods. These enzymes showed one band in SDS-PAGE and their molecular weights were found 62,000 and 45,000 dalton respectively. Polyclonal antibodies against Lac and MnP were raised against mouse. In the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Lac and MnP-antiserum produced a strong positive reaction with Lac and MnP antigen ($A_{495} = 2.50$ and 3.53 respectively). The sera to negative (S/N) ratio was determined by the dividing the mean absorbance of antibodies by the corresponding diluted samples from normal mouse serum. The sera produced showed 2 times more positive reaction in S/N ratio than negative sera.

Keywords: ligninolytic enzyme, *Coriolus versicolor*, *Lentinus edodes*, polyclonal antibody, ELISA, S/N ratio, serum

1. 緒 論

미생물에 의한 리그닌 분해 기작의 규명은 지구상의 탄소사이클을 해결하는데 큰 의의가 있을 뿐만 아니라 유효한 펄프화법의 개발을 비롯, 펄프 표백 폐액의 생화학적 처리등에 應用될 수 있다. 리그닌을 분해하는 미생물의 대부분은 담자균에 속하는 백색부후균이 주도적 역할을 한다. 백색부후균이 분비하는 리그닌 분해 효소로는 현재까지 3가지가 알려져 있다. 즉 Lignin peroxidase (이하 LiP), Mn-dependent peroxidase (이하 MnP) (E. C. 1. 11. 1. 7) 및 laccase (이하 Lac) (E. C. 1. 10.

3. 2)가 그것이다.^{1,2)} 이들 리그닌 분해효소에 의한 리그닌 분해 반응은

1. phenyl propane 축체의 C α -C β 결합의 開裂
2. β -0-4 결합의 開裂 및
3. 芳香環 開裂로 요약된다.^{1,5)}

1983년 Tien과 Kirk⁶⁾에 의해 LiP의 單離가 보고된 이래 모든 백색균에는 LiP가 존재하며, 리그닌의 생분해에는 LiP가 가장 중요한 역할을 할 것이라는 가정은 80년대 말 일련의 실험을 통해 기각되고 있다. 최근에는 LiP 보다는 오히려 MnP가 리그닌의 분해에 더 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 서서히 자리를 잡아가고 있다. 리그닌 분해효

* 1 接受 1993年 9月 12日 Received September 12, 1993

본 연구는 한국과학재단 91 일반 목적기초연구 (과제번호 911-1507-046-2)의 일환으로 수행된 것임.

* 2 전남대학교 농과대학 College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

* 3 전남대학교 수의과대학 College of Veterinary, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

소의 생산은 이들 효소에 의한 리그닌 분해 기작을 이해하는데 필수적인 조건이라 하겠다. 따라서 본 연구는 *Coriolus versicolor* (운지버섯)과 *Lentinus edodes* (표고버섯)로부터 각각 Lac와 MnP를 생산하고자 착수하였으며 얻어진 효소의 순도와 특이성은 SDS-PAGE와 면역학적 방법으로 검정하였다.

2. 材料 및 方法

2. 1 사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 *C. versicolor*와 *L. edodes*로서 각각 Canada의 FORINTEK과 일본 京都 大木質科學研究所에서 분양받아 맥아 한천 배지에 접종하여 27°C에서 培養한 후 4°C에서 보관하였다.

2. 2 액체 배지 조성

MnP는 Lobarzewski와 Trojanowski⁷⁾의 배지에 Mn^{++} 를 첨가시켜⁸⁾ *L. edodes*를 培養시켜 抽出하였다. Lac는 Tien과 Kirk⁹⁾의 액체배지에 *C. versicolor*를 培養시켜 抽出하였다. MnP용 배지는 처음 이틀동안 100%산소를 주입하여 주었으며 Lac용 배지에는 Lac 생산을 촉진하기 위하여 수확 2주전 0.5mM xylinin을 添加¹⁰⁾시켜 8~10주간 정지배양시켰다.

2. 3 균체의 효소分離 및 回收

액체 배지는 glass wool로 균사체를 제거한 후 여과지(Whatman No.40)를 사용하여 여과한 후 培養 여과액을 10,000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심분리한 후 상등액을 동결건조기(ISE FD 5505-01)을 사용하여 농축시켰다. 농축된 여과액에 75~85% ammonium sulfate로 처리하여 침전시킨 뒤 침전물을 0.01M phosphate buffer로 녹인 후 4°C에서 24시간 cellulose ester membrane tubing 2,000(Spectra/Por)을 사용하여 투석시켰다. 그 후 다시 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 Amicon PM 10(molecular cut off 10,000 dalton)을 사용하여 상온에서 한외여과시켜, 이어 분자량 10KD 이상의 균체외 효소를 동결시켜 농축시킨 후 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

2. 4 효소의 정제

DEAE-Sephadex A-25(Pharmacia)로 충전된

column(Bio Rad 1.5 × 60cm)을 사용, 100mM phosphate 완충 용액(ph 6.0)으로 용출시켰다. 용출 속도는 분당 2ml로 조정하였다. 분획중에서 효소활성이 가장 높은 fraction만을 gel permeation chromatography(GPC)에 사용하였다. 활성도의 측정은 분획물 0.1ml에 증류수를 가하여 1ml가 되게 한 후 Poly B(Sigma)를 첨가시켜 시간별로 593nm와 483nm에서 흡광도를 측정하여 가장 활성이 높은 분획을¹¹⁾ 조효소액으로 사용하여 GPC를 실시하였다. GPC는 Sephadex G-75(Pharmacia)로 충전된 컬럼(1.5 × 120cm Biorad)을 동일한 완충 용액을 사용분당 0.5ml의 속도로 2ml씩 분획한 후 효소 활성도가 높은 분획만을 모아 농축하였다.

2. 5 蛋白質 定量 및 酵素 및 活性 測定

2. 5. 1 蛋白質 定量

단백질 정량은 Lowry법¹²⁾을 사용하여 정량하였고 이때 표준으로는 Bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다.

2. 5. 2 Laccase의 효소 활성도

0.5mM syringaldazine(in methanol)을 기질로 하여 Gailiano등의 방법¹³⁾에 따라 Lac의 활성도를 526nm에서 測定하였다. 효소의 활성 단위는 분당 1μ mole syringaldazine의 산화량을 1 unit로 정하였다.

2. 5. 3 lignin peroxidase의 효소 활성도

Barclay등 방법¹⁴⁾에 따라 166mM sodium tartrate(pH 3.0) 완충액에 veratryl alcohol 용액과 조효소액을 잘 혼합한 뒤 hydrogen peroxide를 添加하여 60초 이후 310nm에서 흡광도를 측정하였으며 100초 이내에 측정을 마쳤다($\epsilon=9256$). 효소의 활성 단위는 분당 1μ mole의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 양을 1 unit로 하였다.

2. 5. 4 Mn-peroxidase의 효소 활성도

5mM 2, 2-dimethylsuccinate 완충액(pH 4.05)에 0.0025% phenol red, 6.25mM lactate, 0.3mM $MnSO_4$, 0.025% bovine serum albumin의 혼합물 800μl에 조효소액 200μl와 잘 섞은 후 2mM H_2O_2 9μl를 添加하여 60초가 지난 뒤 431nm에서 흡광도를 측정했다($\epsilon=6500$)¹⁴⁾. 효소 활성 단위는 분당 Mn(II)의 변화량을 431nm에서 측정하여 1 unit로 정하였다.

2. 6. SDS-polyacrylamide gel(PAGE) 전기 영동

3. 結果 및 考察

Laemmli 방법¹⁵⁾에 따라 2% SDS를 포함하고 있는 12.5%의 acrylamide stacking gel을 사용시료 완충 용액 20 μ l에 효소 시료 10 μ g을 2분간 100°C에서 중탕한 다음 slab gel상에 40mA의 직류 전기로 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R 250 (0.1%) 용액으로 염색하여 단백질을 檢證하였으며 SDS low molecular weight marker (Sigma)를 사용하여 분자량을 측정하였다.

2. 7 리그닌 분해효소에 대한 抗體의 생산

*C. versicolor*와 *L. edodes*에서 얻어진 Lac와 MnP 효소를 Freund complete adjuvant (Bacto, USA)로 혼합하여 家畜 衛生 研究所로부터 분양받은 ICR mouse에 200 μ l씩 경부피하 주사하였다. 이어 동량의 항원을 Freund incomplete adjuvant를 사용 2주 간격으로 booster 면역시킨 후 8주가 지난 후 안와 정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액을 실온에서 2시간 방치한 후 1000rpm에서 10분간 원심하여 상청액인 혈청을 분리한 다음 사용시까지 -20°C에서 보관하였다. 음성대조 혈청은 항원을 접종하지 않은 mouse로부터 채취하여 동일한 방법으로 보관하였다.

2. 8 ELISA(enzyme-linked immuno sorbent assay)

생산된 항체의 민감도(sensitivity)와 특이성(specifity)은 Tsukamoto¹⁶⁾방법에 따라 ELISA법으로 검사하였다. 즉 Lac와 MnP 효소를 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)를 사용하여 microplate (Nunc, Denmark) well당 10 μ g/ml되게 넣어 4°C에서 overnight 시킨 다음 Tween 20 (0.05%) - PBS로 3회 세척한 후 blocking buffer (1% bovine serum albumin + 0.05% Tween20 + PBS pH7.4)로 30분간 반응시킨 다음 3회 세척 후 blocking buffer로 혈청을 1 : 20에서 1 : 1024까지 계단 희석하여 1시간동안 반응시켰다. 표식 항체 (Goat antimouse IgG peroxidase, Sigma)는 PBS-Tween 20으로 1 : 3000으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 o-phenylene diamine을 30%의 H₂O₂와 함께 30분간 발색시켜 1N H₂SO₄로 발색을 정지시킨 후 ELISA판독기 (Titertek, Multiskan MCC/340 MKII, Flow Lab)를 이용 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 항원을 접종하지 않은 mouse에서 채혈한 음성대조혈청 역시 동일하게 ELISA법을 실시하였다.

3. 1 리그닌 분해효소의 정제

3. 1. 1 Lac와 MnP의 정제

정제 배양한 *C. versicolor*는 배양 기간인 경과함에 따라 단백질은 계속 증가하였으나 Lac 활성도는 8주 정도에서 최고의 활성도를 보였다. 따라서 7주가 지난 직후 xylindin을 첨가하여 Lac의 활성도를 증가시킨 후 수확하였다.

반면 MnP의 경우 효소활성도는 4주째부터 급격히 증가하기 시작하여 6주가 지나면 그 활성도가 감소하였다. 액체배양의 결과 Lac과 MnP 모두 배지상의 단백질이 최고치에 이르기 전에 효소의 활성도가 최고치에 이르렀으며 최고치에 이르는 기간도 효소에 따라 달리하였다. 이같은 결과로부터 리그닌 분해효소의 수확을 위해서는 액체배지 내의 단백질 변화보다는 각각의 리그닌 분해효소를 직접 체크하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

액체배지의 배양여액을 한외여과시켜 얻어진 단백질은 *C. versicolor*의 경우 4.21 mg/ml이었으며 *L. edodes*의 경우는 12 mg/ml이었다. 이러한 단백질량의 차이는 균자체의 성장 속도에 따라 달라진 것으로 생각된다. *C. versicolor*와 *L. edodes*의 균체외 대사물질내에 존재하는 리그닌 분해 효소는 균의 종류에 따라 큰 차이를 보였다(Table 1). *C. versicolor*의 경우 Lac의 활성도는 0.103인 반면 LiP와 MnP의 활성은 0.015, 0.016으로 매우 낮았다. 반면 *L. edodes*의 경우 MnP의 효소 활성도는 0.320로 가장 높게 나타난 반면 LiP나 Lac의 활성은 0.032, 0.015로 매우 낮았다. 본 실험에서 사용된 배지를 사용할 경우 *C. versicolor*는 Lac을, *L. edodes*은 MnP만을 주로 생산할 수 있음을 보여주었다. 특히 *L. edodes*의 경우 초기정제 과정에서도 다량의 MnP를 수확할 수 있었다. 대부분의 리그닌 분해균은 Lac, MnP 및 LiP중 1개 또는 2개만을 갖고 있을 뿐 세가지 효소를 모두 다 갖고 있는 균을 드문 것으로 추측되고 있다 (Shimada, personal communication).

농축된 균체의 효소의 ion exchange chromatography 결과 Lac의 경우 활성도가 높은 3개의 분획을 얻을 수 있었다(Figure 1). 이들 분획의 Lac활성을 Poly B를 사용하여 측정¹⁷⁾한 결과 세개의 분획에서 모두 Poly B의 분해가 나타났으나(Figure 2) 본 실험에서는 Poly B의 분해율이 가장 높은 Fraction 3을 Sephadex G-75로 충전된 column을 통해 GPC를 실시하였다. Gold¹¹⁾은 비

교적 고분자량의 phenolic 화합물인 Poly B의 분해를 Lignin 생분해의 지표로 삼았다. 본 실험 결과 *C. versicolor*에서 수확한 Lac는 Poly B를 분해함으로서 리그닌분해에 관여함을 보여주었다.

이온교환 chromatography에서 얻어진 분획물의 GPC결과 Lac의 활성도가 가장높은 분획은 분획 초기단계에서 나타났다(Figure 3).

Table 1. Purification of extracellular metabolites from *C. versicolor* and *L. edodes*

	Purification step	Total vol (ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/ml)		
				Lignin peroxidase (unit)	Laccase (unit)	Mn-P (unit)
<i>C. versicolor</i>	Cultural filtrate	2,000	0.16	0.015	0.103	0.016
	Freeze dry	300	0.45	0.043	0.215	0.059
	Dialysis	20	2.09	0.078	0.414	0.065
	Ultra filtration (10KD))	10	4.21	0.086	0.51	0.069
	Ion exchange chromatography	4	3.3	0.004	0.35	0.001
	GPC	1	3.8	0.0	0.49	0.001
<i>L. edodes</i>	Cultural filtrate	2,000	0.042	0.032	0.015	0.320
	Freeze dry	250	1.21	0.033	0.43	0.335
	Dyalysis	18	1.38	0.041	0.078	0.352
	Ultra filtration (10KD))	5	12	0.046	0.059	0.386
	Ion exchange chromatography	3	0.8	0.004	0.002	0.38
	GPC	1.5	1.2	0.001	0.0	1.21

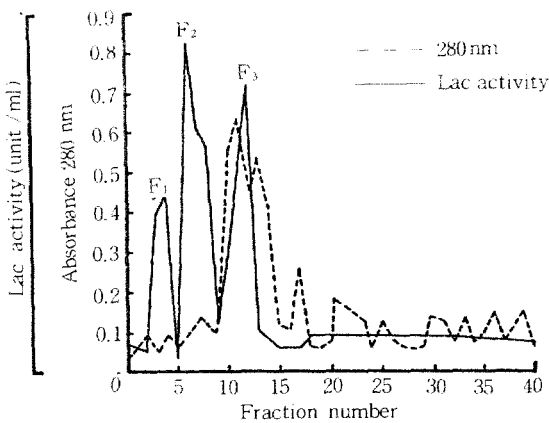


Fig. 1. Elution profile of Laccase from *C. versicolor* on DEAE-Sephadex-A-25.

* Elution condition : flow rate, 2ml per min : fraction volume, 3ml ; elution buffer, 100mM phosphate buffer at pH 6.

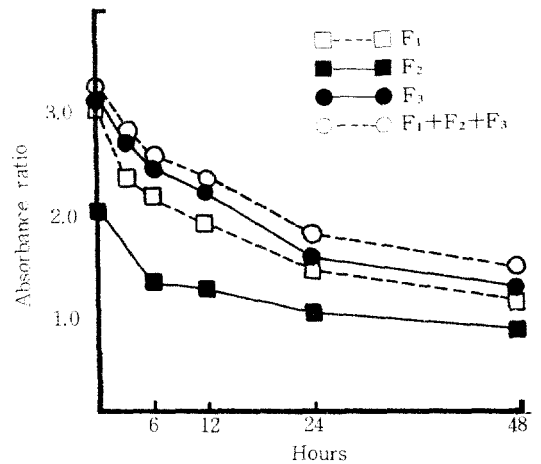


Fig. 2. Degradation of Poly B by laccase fractions from ion exchange chromatography

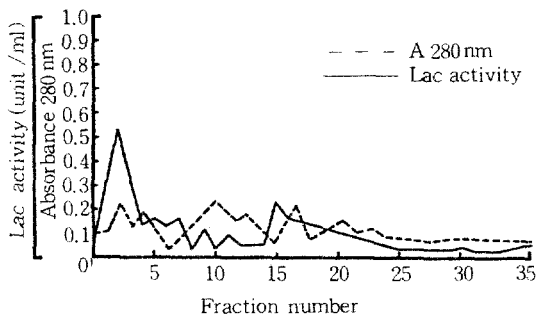


Fig. 3. Elution profile of Lac from *C. versicolor* in gel filtration chromatography on Sephadex G-75 (Pharmacia) column (1.5 × 120cm).

*Elution condition: flow rate, 30ml hr⁻¹; fraction volume, 2ml; elution buffer, 100mM phosphate buffer at pH6.0

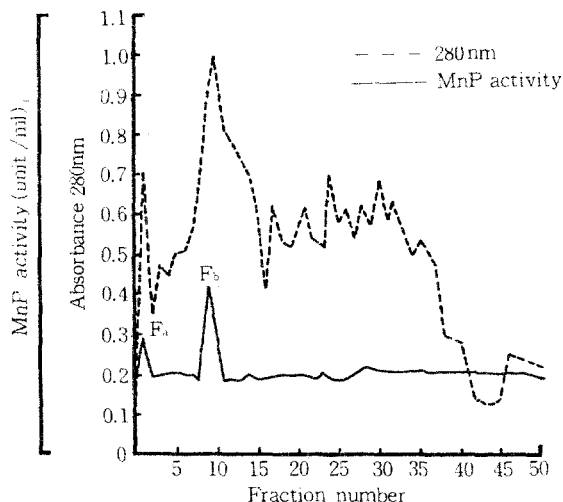


Fig. 4. Elution curves of MnP from *L. edodes* on DEAE-Sephadex-A-25.

Elution condition: flow rate, 2ml permin; fraction volume, 3ml; elution buffer, 100mM phosphate buffer at pH6.0

반면 MnP는 이온교환 chromatography 결과 두개의 분획에서 MnP활성도를 나타냈다(Figure 4). 이중 MnP의 활성이 가장 높은 분획 F₅를 농축한 후 GPC를 실시한 결과 560 fraction에서 MnP 활성이 가장 높은 분획이 나타났다.

얻어진 효소의 정제도와 분자량을 알아보기 위해 SDS-PAGE 전기영동을 실시한 결과 *C. versicolor*의 경우 ion exchange chromatography를

행한 후 gel상에서 18,000, 36,000, 38,000, 62,000의 분자량을 갖는 band를 나타냈으나 GPC를 실시한 후에는 단일한 band를 나타냈다(Figure 5).

반면 *L. edodes*의 균체의 효소로부터 정제된 MnP는 Ionexchange Chromatography후 29,000, 45,000, 54,000, 61,000에서 band를 보였으나 GPC를 통과시킨 후 역시 단일한 Band를 얻을 수 있었다.(Figure 6). Lac와 MnP의 분자량을 calibration curves를 사용하여 판정한 결과 62KD와

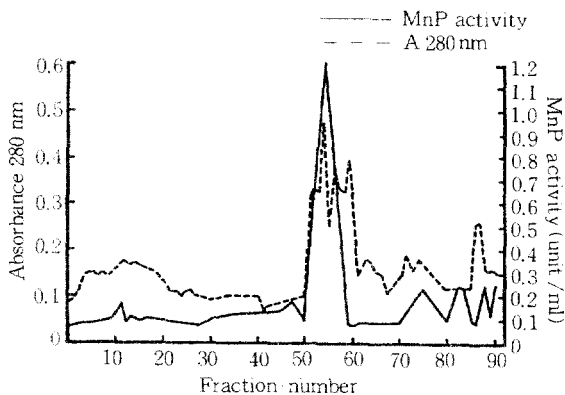


Fig. 5. Elution profile of MnP from *L. edodes* in gel filtration chromatography on Sephadex G-75 (Pharmacia) column (1.5×120cm).

*Elution condition: flow rate, 30ml hr⁻¹; fraction volume, 2ml; elution buffer, 100mM phosphate buffer at pH6.0

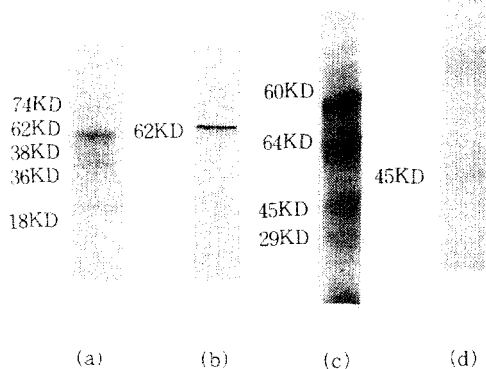


Fig 6. SDS-PAGE of laccase and Mn-peroxidase secreted by *C. versicolor* (a, b) and *L. edodes* (c, d) respectively

a, c: after ion exchange chromatography
b, d: after gel filtration chromatography

45KD로 각각 나타났다. SDS-PAGE결과 얻어진 Lac와 MnP 분자량은 백색부후균으로부터 지금까지 얻어진 Lac와 MnP의 분자량과 일치한다.^{3,11,18,19)}

3. 1. 2 ELISA

생산된 Lac와 MnP의 효소의 정도를 파악하기 위해 이들 효소를 mouse에 면역시킨 후 ELISA 방법을 통해 항체를 판정하였다. 음성 대조혈청에 대한 면역혈청의 비율(S/N ratio)은 면역혈청의 평균 흡광도치를 정상 mouse로부터 평균흡광도치로 나누어 결정하였으며 그 비율이 1.5 또는 그 이상일 때 양성으로 평가하였다.

본 실험에서 anti-Lac serum의 optical (OD)치는 2.492였으며 anti-MnP serum의 OD치는 3.528이었다. 이들 항혈청은 음성대조 혈청의 OD치 1.086과 1.533에 대해 2배 이상의 S/N 비율을 나타냄으로서 높은 특이성을 보여주었다.

4. 結 論

리그닌 분해효소에 의한 리그닌 분해 특성을 파악하고자 백색부후균인 *Coriolus versicolor*와 *Lentinus deodes*의 균체외 효소로부터 laccase (Lac)와 Mn-dependent peroxidase (MnP)를 각각 정제하였다. 정제된 균체외 효소는 SDS-PAGE결과 단일 밴드를 나타내었으며 Lac의 경우 분자량은 62,000, MnP는 45,000 dalton을 나타냈다. 생산된 효소는 mouse에 접종하여 polyclonal 항체를 생산, ELISA를 실시한 결과 Lac과 MnP의 항체의 optical density (A_{492})는 각각 2.492와 3.528를 나타냈다. 이 OD값은 음성혈청보다 두배나 높았다.

參 考 文 獻

1. Kirk, T. K. 1987. Lignin-degrading enzymes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 321 (A) : 461~474
2. Kuwahara, M., J. K. Glenn, M. A. Morgan, M. H. Gold, 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *F. E. B. S. Lett.* 169 : 247~250
3. Morohoshi, N. 1991. Laccase of the ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. in : Enzymes in Biomass Conversion, Leatham, G. F. and M. E. Himmel, (eds.) Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 460 : 407~223
4. Higuchi, T. 1986. Catabolic pathways and role of ligninases for the degradation of lignin substructure models by white rot fungi. *Wood Res.* 73 : 58~81
5. Kirk, T. K. 1984. Degradation of lignin. In : Microbial Degradation of Organic Compounds, Gibson, D. T. (eds.), Marcel Dekker, New York : 399~437
6. Tien, M. and T. K. Kirk. 1983. Lignin-degradation enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science.* 221 : 661~663
7. Lobarzewski, J. and J. Trojanowski. 1979. Induction by ferulic acid of multiple forms of peroxidase in the fungus *Trametes versicolor*. *A. Biochem. Polon.* 25 : 309~317
8. Perez, J. and T. W. Jeffrise. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2402~2409
9. Tien, M. and T. K. Kirk. 1992. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. in: Methods in Enzymology. Wood, W. A. and S. T. Kellogg (eds.) vol. 161. Part B. Academic Press, San Diego. : 238~261
10. Hunolstein, C. V., P. Valenti, P. Visca, G. Antonini, L. Nicolini and N. Orsi. 1986. Production of Laccase A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32 : 185~191
11. Evans, C. S., J. Y. Farmer and J. M. Palmer. 1984. An extracellular hem protein from *Coriolus versicolor*. *Phytochem.* 23 : 1247~1250
12. Galliano, H., G. Gas, J. L. Seris and A. M. Boudet. 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzym. Micro. Technol.* 13 : 478~482
13. Barclay, C. D., D. M. Moore, S. R. Lande and R. L. Legge. 1990. Heat-denaturation

- kinetics of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzym. Microbiol. Technol.* 12 : 778~782
14. Jönsson, L. and P. O. Nyman. 1987. A Manganese (II)-dependent extracellular from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Acta. Chem. Scand.* 41 : 762~765
 15. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T1*. *Nature.* 227 : 680~685
 16. Tsukamoto, K., H. Obata, H. Hihara. 1990. Improved preparation of ELISA antigen of infectious bursal disease Virus. *Avian Dis.* 34 : 209~213
 17. Gold, M. H., J. K. Glenn, and M. Alic. 1992. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. in: *Methods in Enzymology*. Wood, W. A. and S. T. Kellogg (eds.) vol. 161. Part B. Academic Press. San Diego. : 74~78
 18. Kofjuita, H., T. Ohta, Y. Asada and M. Kuwahara. 1991. Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. *Mokuzai Gakkaishi.* 37 (6) : 562~569
 19. Leatham, G. F. 1985. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 859~867
 20. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193 : 265~275