

## 고정된 laccase의 특성 및 촉매효과

형경희 · 신운섭<sup>†</sup>

서강대학교 화학과

(1998년 10월 29일 접수 : 1998년 11월 3일 채택)

### Characterization of immobilized laccase and its catalytic activities

Kyung Hee Hyung and Woonsup Shin<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

(Received October 29, 1998 : Accepted November 3, 1998)

#### 초 록

구리이온을 함유하는 효소인 laccase(*Rhus vernicifera*)를 self-assembly technique을 이용하여 금전극 표면에 고정시킨 후 표면의 특성을 관찰하고 반응성을 살펴보았다. laccase는 diphenol, diamine 등을 산소에 의해 산화시킬 수 있는 oxidoreductase이다. 이 경우 산소는 peroxide나 superoxide 등의 중간체 생성없이 몰까지 직접 4전자 환원이 일어난다.  $\beta$ -mercaptopropionate를 이용하여 금전극 표면에 음전하를 띤 self-assembled monolayer를 형성시킨 후, 중성용액에서 양전하를 띤 laccase(pI=9)를 정전기적 인력에 의해 고정시킨 후, 순환 전압-전류법에 의한 실험으로 전극표면에 고정되었음을 확인하였다. 또한, 낮은 주사속도에서 흐른 전하량으로부터 surface coverage를 계산하여 전극표면에 효소가 monolayer로 덮여 있음을 확인하였다. laccase가 고정된 전극을 laccase의 기질인 ABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthio-line-6-sulfonic acid) 용액에 담그면 ABTS가 산화되는 것으로부터 고정된 laccase가 활성을 가지고 있음을 확인하였고, 그 효소효과는 4°C에서 2~3일 동안 지속됨을 관찰하였다. 앞서 구한 surface coverage로부터 고정된 효소의 양을 알 수 있어서, 표면에 고정된 laccase가 용액상의 laccase에 비하여 10~15% 정도 만의 효소효과를 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한, laccase의 산소의 전기화학적 환원 촉매로서의 역할에 대하여 용액상에서와 전극표면에 고정시켰을 경우에 비교하여 보았는데, 두 경우 다 전자전달체가 없이는 산소환원의 촉매로 작용하지 않고,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 를 전자전달체로 사용한 경우에 산소환원의 촉매로 작용함을 알 수 있었다. 이러한 산소환원촉매로서의 역할이 laccase로부터 기인한다는 것은 억제제인 azide를 이용한 실험으로 다시 한 번 확인할 수 있었다.

**Abstract** - Copper-containing enzyme, laccase (*Rhus vernicifera*) was immobilized onto gold electrode using self-assembly technique and its surface properties and catalytic activities were examined. Laccase is an oxidoreductase capable to oxidize diphenols or diamines by 4-electron reduction of molecular oxygen without superoxide or peroxide intermediates. The electrode surface were modified by  $\beta$ -mercaptopropionate to have a net negative charge in neutral solution and positively charged laccase (pI=9) was immobilized by electrostatic interaction. The successful immobilization was confirmed by cyclic voltammograms which showed typical surface-confined shapes and behaviors. The amount of charge to reduce the surface was similar to the charge calculated assuming the surface being covered by monolayer. The activity of the immobilized enzyme was tested by the capability of oxidizing a substrate, ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthio-line-6-sulfonic acid) and it was maintained for 2~3 days at 4°C. The immobilized laccase showed about 10~15% activity compared to that in solution. The laccase-modified electrode showed the activity of electrocatalytic reduction of oxygen in the presence of mediator,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . The addition of azide which is an inhibitor of laccase completely eliminated the catalytic current.

**Key words** : Laccase, Catalysis, Oxygen, Immobilization, Self-assembly

#### 1. 서 론

Laccase는 구리이온을 반응의 활성자리로 가지고 있는 multi-copper oxidase의 일종으로서 diphenol, diamine류 등의 산화와 함께 산소를 peroxide나 superoxide 등의 중간체 생성 없이 몰까

지 직접 환원시켜 주는 역할을 하는 효소이다. Laccase는 처음 옷 (lacquer)에서 발견되었는데 옷은 종명이 *Rhus* 또는 *Melanorrhoea* 인 나무의 수액에서 나온다. 그 밖의 여러 가지 종류의 나무에서 laccase가 발견되는데, 이들을 통칭하여 tree laccase라 한다.<sup>1-6)</sup> 또한, laccase는 *polyporus versicolor*, *podospora anserina*, *neurospora crassa*, *aspergillus nidulans* 등의 버섯균류(fungi)에도 널리 분포하고 있는데, 이것들을 통칭하여 fungal laccase라 한다.<sup>1-6)</sup> laccase

<sup>†</sup>E-mail : shinws@ccs.sogang.ac.kr

는 나무의 목질부의 형성과 분해에 촉매로 작용한다는 것이 알려졌다, 최근에는 펄프제조공정에서 염소 대신 산소와 laccase 등을 포함한 효소를 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>7,9)</sup> 본 연구에서는 중국산 *Rhus vernicifera tree laccase*를 사용하였는데, 분자량은 110,000이며, 이 중에서 아미노산이 64,000이고, 탄수화물이 46,000인 glycoprotein이다. *Rhus laccase*의 pI는 대략 9 정도로서 중성용액에서는 전체적으로 양전하를 띠게 된다.

laccase는 일반적으로 네 개의 구리이온( $\text{Cu}^{2+}$ )을 가지고 있고 이 부분이 반응의 활성자리(active site)로 작용하며 이들은 일반적인 구리함유단백질의 분류형태인 type-1, 2, 3의 세 종류의 형태로 구분된다. type-1 site에는 하나의 구리이온이 있고 이것은 600 nm 근처에서 강하게 빛을 흡수한다( $\epsilon_{614} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). 따라서 효소가 푸른색을 띠게 되고, type-1을 blue copper site라 부른다. type-2에도 역시 하나의 구리이온이 있는데, 일반적인 구리 화합물과 유사한 분광학적 성질을 보여서 normal copper site라 불린다. type-3에는 두 개의 구리이온이 반강자성 짝지움(antiferromagnetic coupling)되어 있고 330 nm에서 빛을 흡수한다. type-2와 type-3의 세 개의 구리이온은 3.8-3.9 Å 사이로 모여 있어서 trinuclear copper site라 불리기도 한다.<sup>1,4,10,11)</sup> laccase에 의한 촉매 반응은 type-1 주변에 있는 아미노산들에 의해 형성된 소수성 부분(hydrophobic patch)에 환원기질이 결합하여 1전자 산화가 일어나며 type-1 site의 환원이 일어나고, 이때 생성된 전자는 cystein-histidine으로 이루어진 아미노산 결합을 따라 type-2와 type-3에 결합하는 산소에 전달되어 산소의 물로의 4전자 환원이 일어난다(Fig. 1). trinuclear copper에 의한 산소의 환원은 peroxide 중간 물질을 거치지 않아 효과적인 4전자 환원을 일으키는 주 요인으로 작용한다. 이때 laccase는 산화시키는 기질의 종류에 대하여 큰 선택성(specificity)을 갖지 않는데 그 이유는 type-1 부근의 소수성 부분에 hydrophobic interaction에 의해 결합되기 때문으로 알려져 있다. 기질의 종류에는 mono-, di-, polyphenol류(hydroquinone, 4-methylcatechol)와 amine류(p-phenylenediamine, 2,7-diaminefluorene, ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)))가 있다. 실제로 생체 내의 반응에 사용되는 기질로는 urishiol, coniferyl alcohol, dehydro-N-acetyldopamine, 1,8-dihydroxynaphthalene, parasperone 등이 알려져 있다.<sup>6,12)</sup>

중성용액에서의 산소/물 쌍의 산화-환원 전위는 +810 mV(vs.

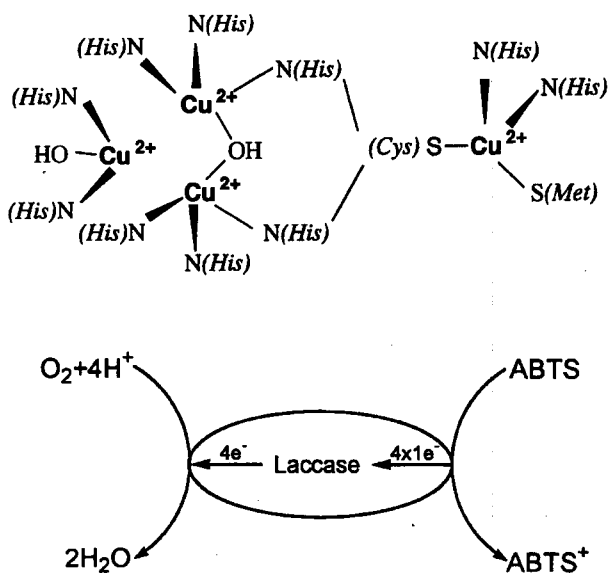


Fig. 1. Proposed active site structure of laccase and schematic diagram of catalytic reactions.

NHE pH=7.0)이고, laccase의 구리 자리(copper site)는 +400~+780 mV(vs. NHE at pH=7.0)의 전위를 갖는다.<sup>4,13-15)</sup> 따라서 laccase는 단지 30~410 mV의 과전압을 가지고 산소를 물로 직접 환원시켜 주는 아주 좋은 촉매가 될 것이다. 어떤 무기화합물이나 효소들도 이 효소보다 낮은 과전압으로 산소를 물로 환원시켜 주는 경우가 알려져 있는 것이 없다. 화학적인 에너지를 전기적인 에너지로 바꾸는 과정(연료 전지 등)에서 큰 어려움 중의 하나는 산소의 환원이 많은 과전압을 필요로 하여 에너지 효율이 많이 떨어진다는 것인데, 본 연구에서 사용한 laccase는 무척 높은 전위(+500~+800 mV vs. NHE at pH=7.0)를 가지고 있어서, 산소 환원에 있어서 유망한 촉매가 될 것이다.

laccase에 의한 산소환원과정에 관한 연구는 분광학적, 생화학적 방법으로 많은 연구가 되었지만<sup>1-5,16,17)</sup> 전기화학적 연구는 그리 많지 않다. laccase의 전극표면에서의 고정화는 fungal laccase에 대하여 흡착 혹은 고분자 막을 이용하여 시도해 본 예가 있고, 산소 환원 및 기질의 산화에 대하여 관찰하였다.<sup>18-23)</sup> 본 연구진은 tree laccase를 이용하여,  $\beta$ -mercaptopropionate를 전극표면에 흡착시켜 SAM(self-assembled monolayer)을 형성시키고, 그 위에 정전기적 인력을 이용하여 효소를 고정시킨 효소 변성전극의 제작과 고정된 laccase가 ABTS 산화효과를 유지하고 있음을 보고한 바 있다.<sup>24)</sup> 본 논문에서는 이와 같이 고정된 laccase 변성전극의 표면을 전기화학적 특성조사와 함께 정량적인 효소효과를 관찰한 결과를 보고하고자 한다.

## 2. 실험

laccase는 *Rhus vernicifera*(chinese)로부터 이미 알려져 있는 방법을 이용하여 aceton powder(Saito Co., Osaka, Japan)로부터 추출하여 정제하였다.<sup>25,26)</sup> 효소의 농도는 614 nm에서의 흡광도( $\epsilon_{614} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )로부터 결정하였고, 효소의 활동도(activity)는 8 mM MES(4-Morpholineethanesulfonic acid) 완충용액(pH 5.3)으로 만든 1 mM ABTS 용액을 기질로 하여 측정하였다.<sup>27)</sup> 산화에 의해 생성되는 ABTS는 405 nm에서 강한 흡수( $\epsilon_{405} = 35,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 보이므로 효소의 활성도 측정에 용이하다. 이 흡광도 변화에 의해 laccase의 specific activity를 계산하였는데, 0.40-0.54  $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ (turnover number = 45-60  $\text{min}^{-1}$ )가 얻어졌다. 참고로 발표된 값은 27  $\pm 1 \text{ min}^{-1}$ 로<sup>27)</sup> 상당히 좋은 효소효과를 가짐을 알 수 있었다.

laccase를 고정시키는데 사용한 전극은 유리 위에 금을 증착시킨 슬라이드 형태의 금전극(1 cm  $\times$  1 cm) 혹은 원판모양의 전극(0.70  $\text{cm}^2$ )을 사용하였다. 금전극의 표면은 piranha 용액( $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 4 : 1$ )에 몇 초간 흔들어서 씻어주고 2차 종류수에 3번 정도 씻은 후 질소기체를 흘려 주어 물기를 없앴다. 금전극표면이 깨끗하게 되었는지는 1 M 황산용액에서의 순환 전류-전압그림으로 확인하였다.<sup>28)</sup> 음전하를 띤 SAM을 형성하게 위하여 깨끗하게 씻은 용기에 에탄올을 용매로 하여 3 mM  $\beta$ -mercaptopropionate 용액을 만들고, 여기에 잘 말린 금전극을 담그어 마개를 막고, 실온에서 약 6-24시간 정도 담그어 두었다. 금전극을  $\beta$ -mercaptopropionate 용액에서 꺼내어 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.0)으로 씻어주고 같은 완충용액을 사용하여 만든 0.15 mM laccase 용액에 4°C에서 하루 정도 담그어 효소가 음전하를 띤 전극표면에 정전기적으로 고정되도록 하였다.

전기화학실험은 BAS 50 W 혹은 EG&G 362를 이용하였고, 기준전극으로는 Ag/AgCl을 사용하였는데, 모든 전위는 NHE에 대하여 변환시켜 보고하였다. 대전극으로는 백금선을 사용하였다. 아르곤이나 산소가스는 99.99%급을 이용했고, 모든 시약은 reagent grade를 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Laccase 용액상에서의 전기화학

금전극과 유리탄소(glassy carbon, GC)전극, 또한  $\beta$ -mercapto-propionate가 형성된 금전극을 이용하여 0.15 mM laccase 용액상에서 순환 전압-전류곡선을 살펴보았다. 순수한 금전극, 혹은 GC 전극을 사용한 경우에는 산화, 환원봉우리가 관찰되지 않는다(Fig. 2). 그러나  $\beta$ -mercapto-propionate가 형성된 금전극을 이용하면 약 +320 mV(vs. NHE)에서 환원봉우리가, 약 +380 mV에서 산화 봉우리가 관찰된다( $E^0 = +350$  mV,  $\Delta E_p = 60$  mV, Fig. 3(a)). 환원 봉우리 전류가 처음에는 크게 나타나다가 시간이 지남에 따라 감소하였고 봉우리 모양이 점차 종모양으로 변하며, 환원 전위( $E^0$ )가 +350 mV에서 +330 mV로 음전위 방향으로 이동함을 관찰하였다(Fig. 3(b)). 이것은 나중에 설명될 laccase가 고정된 전극의 순환 전압-전류곡선(Fig. 4)과 일치한다. 그러므로 순수한 금전극 혹은 유리탄소전극과 laccase 사이에는 전자전달 반응이 이루어지지 않는 반면에 전극표면을  $\beta$ -mercapto-propionate

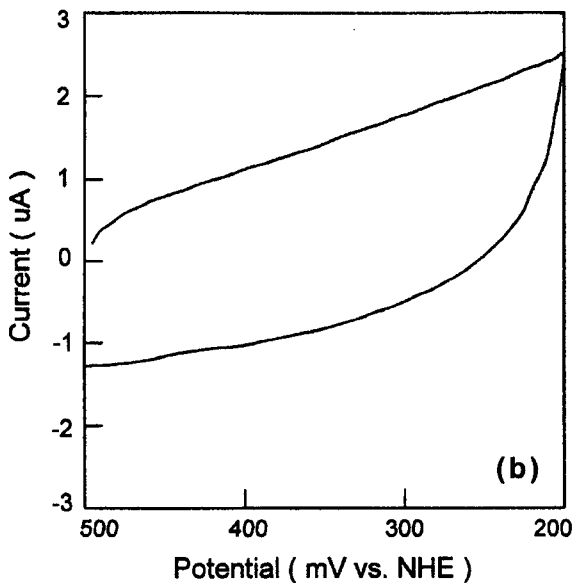
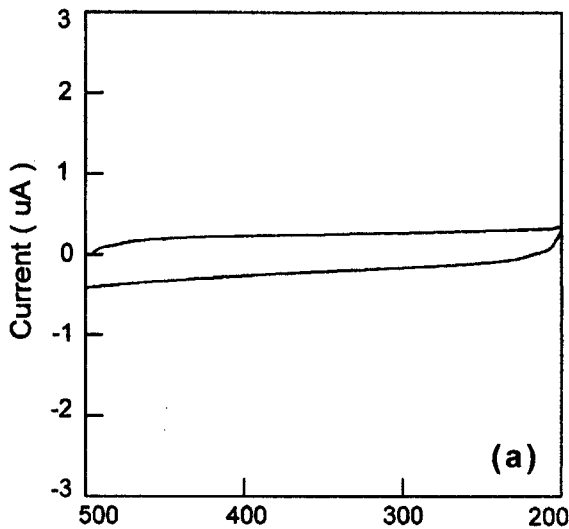


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 0.15 mM laccase in 0.1 M phosphate buffer at (a) Au electrode, (b) glassy carbon (GC) electrode at scan rate of 50 mV/sec.

로 변성시키면 전극과 laccase 사이에는 전자전달이 가능해짐을 알 수 있다. 또한,  $\beta$ -mercapto-propionate가 고정된 전극은 처음에는 용액상의 laccase와 전자전달이 이루어지다가 시간이 지나면서 laccase가 전극에 고정되며, 고정된 laccase에 의한 전자전달이 대부분을 차지함을 알 수 있다.

#### 3.2. 순환 전압-전류법에 의한 laccase 고정의 확인

고정된 laccase의 순환전압-전류그림을 보면(Fig. 4), +300 mV 전위에서 환원 봉우리가, +360 mV 전위에서 산화 봉우리가 나타나고 그 모양이 종모양에 가까움을 알 수 있다. 봉우리 전위차

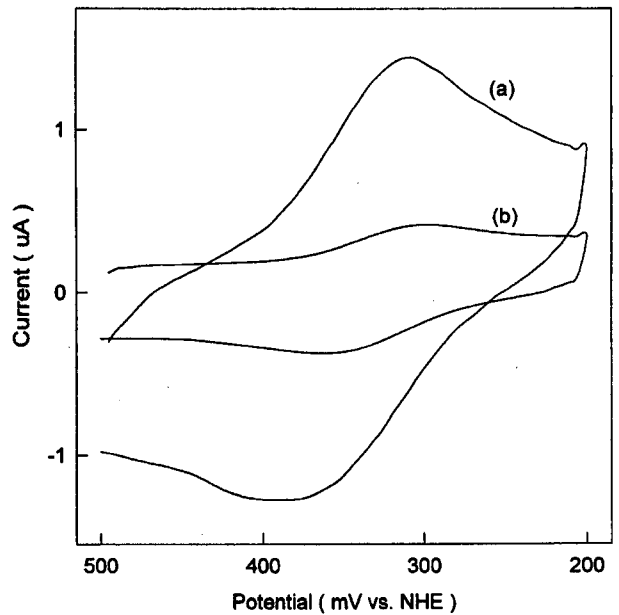


Fig. 3. Cyclic voltammograms of 0.15 mM laccase in 0.1 M phosphate buffer at  $\beta$ -mercapto-propionate-modified electrode at scan rate of 50 mV/sec; (a) initial, (b) final.

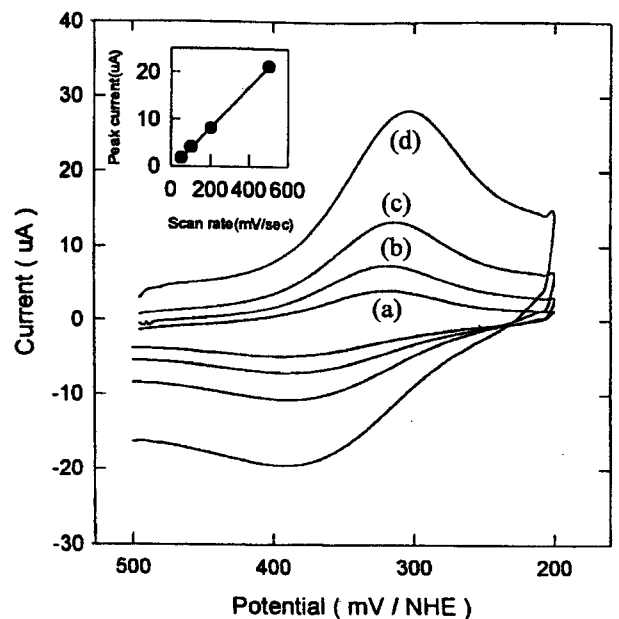


Fig. 4. Cyclic voltammograms of the laccase-immobilized electrode ( $A = 0.70$  cm<sup>2</sup>) in 0.1 M phosphate at pH 7.0 at scan rates; (a) 50 mV/sec, (b) 100 mV/sec, (c) 200 mV/sec, (d) 500 mV/sec.

( $\Delta E_p$ )는 거의 60 mV 정도로 관찰되는데 주사속도가 200 mV/sec으로 증가할 때까지 크게 변하지 않았고 산화 환원 봉우리의 전위로 부터 환원전위( $E^0$ )는 +330 mV가 얻어졌다. 그리고 주사속도가 50 mV/sec에서 500 mV/sec로 증가할수록 환원 봉우리 전류가 선형적으로 증가하였다. 이러한 결과들은 모두 표면에 흡착된 물질에 의한 산화-환원 반응임을 말해 주며, 이것으로부터 laccase가 성공적으로 고정되었음을 확인할 수 있었다. 특히, 봉우리 전위차( $\Delta E_p$ )가 60 mV인 것으로부터 고정된 laccase로의 전자전달이 반가역적으로(quasi-reversible) 이루어짐을 알 수 있었다.

주사속도가 증가하면 산화 봉우리가 넓어짐을 관찰할 수 있는데 이것은 다음으로 생각할 수 있을 것 같다. 일반적인 구리 착물에서 Cu(II)와 Cu(I)의 입체 구조는 매우 다르기 때문에 구리 자리의 환원은 단백질 구조의 변화를 가져올 수 있다. 그리고 금속 단백질에서 산화-환원에 의한 구조적인 변화가 일어나는 것은 일반적인 현상이다.<sup>29)</sup> 따라서 환원된 단백질이 쉽게 산화될 수 있는 구조로 되돌아오는 데는 시간이 걸리게 되고, 그 결과 순환 전압-전류곡선에서 나타나는 것처럼 산화 봉우리가 넓어지게 되는 것으로 생각하였다. 본 실험에서 구조적인 변화속도는 주사속도에 따른 산화봉우리의 모양으로 개략적으로 유추할 수 있는데, 0.1~1초 사이에 일어나는 것으로 설명할 수 있다.

tree laccase의 금속 자리에 대한 환원 전위는 이미 전위차법을 이용하여 측정된 바 있다. 이것은 다른 전달물질을 사용하여 얻어진 것으로 pH 7.5에서 +394 mV, pH 7.0에서 +430 mV이다.<sup>26,30)</sup> 본 연구에서 측정된 표면에 고정된 laccase의 산화-환원 전위는 +330 mV(pH 7.0)인데, 이것은 위에서 용액상에서 측정된 값과는 약간 다르다. 이것은 laccase가 표면에 고정되면서 어떤 구조적인 변화를 일으키고, 그 변화가 금속 자리의 구조를 변형시켜 환원 전위가 이동되는 것으로 설명할 수 있다.

### 3.3. 순환 전압-전류법에 의한 surface coverage 측정

순환 전압-전류법 실험을 통하여 전극표면에 고정된 laccase의 양을 측정하여 보았다. 먼저 금전극의 실제면적을 1 M 황산 용액에서의 산화막이 형성되는 산화봉우리의 면적으로부터 이미 알려진 방법을 이용하여 결정하였다. 전극의 겉보기 면적이 0.70 cm<sup>2</sup>인데 산화봉우리의 면적으로 계산된 전하량은 784 C이고, 금전극산화막 형성에 의한 전하량이 400 °C/cm<sup>2</sup><sup>28)</sup>이므로 실제면적은 2.0 cm<sup>2</sup>이고 roughness factor는 약 2.8이 된다. 이 전극을 이용하여 고정된 laccase의 양을 측정하기 위하여 laccase가 고정된 전극을 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.0)에서 아주 낮은 주사속도인 2 mV/sec으로 순환 전압-전류곡선을 얻었다(Fig. 5). 아주 낮은 주사속도로 실험을 하였기 때문에 전극표면에 고정된 laccase가 전부 환원된 후 산화되어진 것이라 생각할 수 있다. 얻은 순환 전압-전류곡선에서 환원 봉우리를 적분하여 얻은 전하량으로부터 surface coverage를 측정하였다. 5회 실험을 통해 얻은 전하량은 3.8 × 10<sup>-7</sup> C, 3.7 × 10<sup>-7</sup> C, 2.6 × 10<sup>-7</sup> C, 3.4 × 10<sup>-7</sup> C, 3.9 × 10<sup>-7</sup> C으로서 평균 전하량은 3.5 × 10<sup>-7</sup> C이다. laccase 한 분자당 4개의 Cu(II)가 있기 때문에 laccase 환원에는 4전자가 필요하게 되므로 환원된 laccase의 양은  $[3.5 \times 10^{-7}(\text{C}) / (4 \times 96485(\text{C/mol}))] = 9.1 \times 10^{-13}$  moles이다. 전극의 실제면적이 2.0 cm<sup>2</sup>이므로 surface coverage는 0.45 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이다. 이 값을 참고문헌을 토대로 하여 glucose oxidase(GOx)와 비교하여 보면 GOx는 분자량이 15,000인 구형 단백질로 한 분자 당 58 nm<sup>2</sup>의 면적을 갖는다. 이 면적으로부터 GOx가 ordered packing되어 있다고 가정하고 얻은 이론적 계산값이 2.9 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이다.<sup>31)</sup> 그러나 효소가 고정될 때는 random disordered packing되는 것으로 알려져 있는데, 이 값은 일반적으로 ordered packing의 약 60%이기 때문에<sup>32,33)</sup> GOx가 monolayer로 전극표면에 고정될 때 surface coverage는

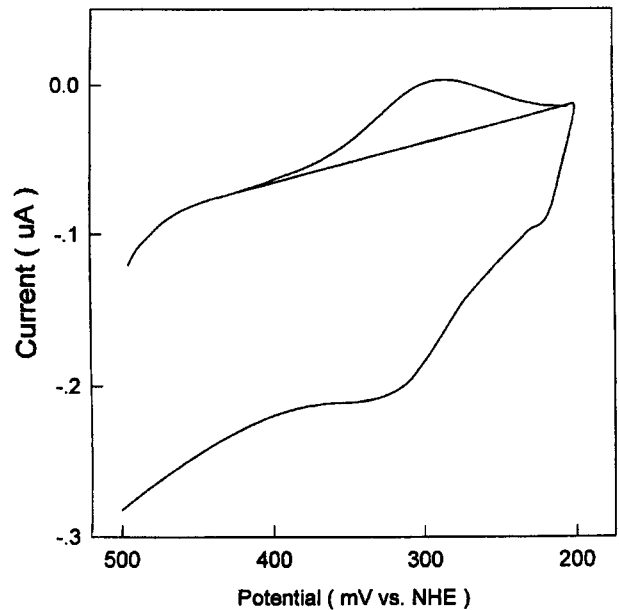


Fig. 5. Cyclic voltammogram of the laccase-immobilized electrode in 0.1 M phosphate at pH 7.0 at scan rate of 2 mV/sec for the determination of surface coverage.

1.7 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이다.<sup>31)</sup> 본 실험에서 사용한 laccase의 dimension은 알려져 있지 않지만, 구형으로 가정하여 GOx의 경우와 비교하여 보았다. 효소의 모양이 구형일 때 지름이 분자량의 세제곱근에 비례하므로, GOx의 지름(8.6 nm) 및 분자량(M.W. = 15,000)과 laccase의 분자량(M.W. = 110,000)으로부터 laccase의 지름을 계산하여 보니 16.7 nm이고, laccase 한 분자가 차지하는 면적은 219 nm<sup>2</sup>이다. 이 값으로부터 laccase가 ordered packing된 경우의 surface coverage를 계산하면 0.77 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이므로, random disordered packing된 경우는 0.46 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이다. 실제로 순환 전압-전류 실험을 통해 얻은 surface coverage 값은 0.45 × 10<sup>-12</sup> moles/cm<sup>2</sup>이므로, 본 실험의 방법으로 laccase를 금전극 표면에 고정시키면 전극표면에 monolayer로 덮여 있는 것으로 생각할 수 있다.

### 3.4. 기질, ABTS의 산화에 대한 촉매효과

laccase가 고정된 전극을 사용하여 laccase의 기질인 ABTS 용액의 산화에 대한 촉매효과를 살펴보았다. 이 실험은 laccase가 고정된 전극에 전기화학적으로 전위를 가해주지 않고, 이 전극을 ABTS 용액에 담그어 단순히 고정된 laccase가 ABTS 산화에 대해 촉매효과를 나타내는지 살펴보았다. 먼저, 문헌에 있는대로 3 mM MES(4-Morpholineethanesulfonic acid) buffer, pH 5.3을 이용하여 1.0 mM ABTS 용액을 준비하였다.<sup>27)</sup> 준비한 1.0 mM ABTS 용액 1.0 mL를 UV용 quartz cuvette 안에 넣고, laccase가 고정된 전극을 담그어 406 nm( $\epsilon_{406} = 35,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )에서 약 8일 동안 지속적으로 흡광도를 측정하여 시간에 따른 흡광도 변화를 관찰하였다(Fig. 6). ABTS 용액에 laccase가 고정된 전극을 담그었을 때 ABTS 용액의 색이 서서히 연두색으로 변함을 관찰할 수 있었다. 약 80시간 정도까지는 선형적으로 흡광도가 증가하다가 그 이후에는 직선관계에서 벗어나는 것으로부터 전극표면에 고정된 laccase의 활성이 약 80시간 정도 지속됨을 알 수 있었다. 이때 전극표면에 고정된 laccase의 활성으로 인해 흡광도의 증가를 나타내는 것인지 아니면 전극표면으로부터 laccase가 떨어져 나가 용액상에 있는 laccase의 활성때문에 ABTS가 산화되는 것인지를 확인하기 위하여 흡광도를 측정할 때마다 laccase가 고정

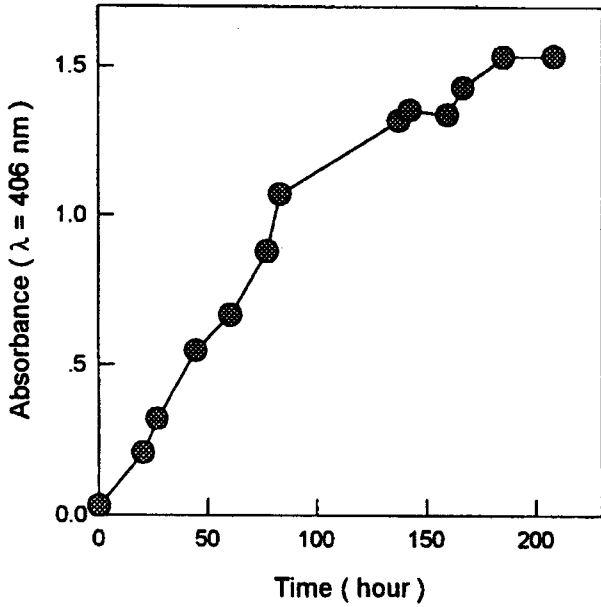


Fig. 6. ABTS oxidation by immobilized laccase: 1.0 mM ABTS in 8 mM MES (4-Morpholineethanesulfonic acid) buffer; pH=5.3, under air, T = 4°C.

된 전극을 새로운 ABTS 용액으로 교체하며 실험도 하여 보았다. 이때 흡광도 변화속도는 ABTS 용액을 교체함에 따라 변하지 않았다. 따라서 laccase가 고정된 전극을 ABTS 용액에 담그었을 때 ABTS가 산화가 되는 것은 전극에 고정된 laccase의 활성으로 인해 일어나는 것임을 확인하였다.

laccase가 ABTS를 산화시키는데 있어서, 전극에 고정된 laccase가 용액 내에 있는 laccase와 같은 활성을 갖는지를 알아보기 위해, 전극표면에 고정된 laccase의 specific activity를 측정하여 용액상 laccase의 specific activity와 비교하여 보았다. 앞서 측정된 surface coverage( $0.45 \times 10^{-12}$  moles/cm<sup>2</sup>)로부터 laccase의 양을 계산하면  $0.45 \times 10^{-12}(\text{moles/cm}^2) \times 2.0(\text{cm}^2) \times 110,000(\text{g/mol}) \times 10^3(\text{mg/g}) = 9.9 \times 10^{-5}$  mg이다. Fig. 6에서 초기의 시간에 따른 흡광도 변화는 0.012 Abs/hr로서, 1분당 산화된 ABTS의 양은  $[0.012(\text{Abs/hr})/60(\text{min/hr})]/[35,000(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1.0(\text{cm}) \times 10^3(\text{mL/L})/1.0(\text{mL})] = 5.7 \times 10^{-12}$  moles이다. 그러므로 고정된 laccase의 ABTS의 산화에 대한 specific activity는  $5.7 \times 10^{-6}(\text{mol})/[1.0(\text{min}) \times 9.9 \times 10^{-5} \text{mg}] = 0.058 \text{ mol/mg} \cdot \text{min}$ 이다. 용액상에서 laccase의 specific activity는 0.40~0.54 mol/mg·min이므로 고정된 laccase는 용액상의 laccase에 비해 단지 10~15% 정도의 activity를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이것은 효소의 일부만 활성도를 나타낸다고 보다는 전극표면에 고정됨에 의해 단백질 형태 변화 등의 원인으로 전체적으로 활성도가 떨어지는 것으로 생각된다.

3.5. 산소 환원에 대한 촉매효과

앞에서 언급한 바와 같이 laccase는 기질을 산화시키고 이때 생겨나는 전자를 이용하여 산소를 환원시키는 촉매역할을 하는 oxido-reductase이다. laccase가 기질을 산화시키는 촉매효과가 있는 것으로부터 반대편 반응인 산소 환원의 촉매효과도 일어나고 있을 것으로 생각된다. 이때 laccase가 산소를 환원시키는데 필요한 전자는 기질을 산화시킴으로써 공급받게 되는데, 본 실험에서는 기질 대신에 전극을 사용하여 전자를 공급하는 산소의 전기화학적 환원반응에 대하여 살펴보았다.

3.5.1. Laccase 용액상에서의 산소 환원

본 실험에서는 먼저, 전자전달체를 사용하지 않고 전극에 고정

된 laccase가 산소의 전기화학적 환원반응에서 촉매로 작용하는지를 살펴보았다. 먼저, 순수한 금전극, β-mercaptopropionate가 고정된 금전극, 그 위에 laccase가 고정된 금전극을 사용하여 산소를 포화시킨 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.0)에서 산소의 전기화학적 환원반응을 비교하여 보았는데, 모두 0.0 V vs. NHE보다 음전위까지 가야 산소의 환원이 일어나는 것으로 관찰되었다(Fig. 7). 더우기 β-mercaptopropionate가 형성된 전극과 laccase가 고정된 전극의 산소 환원 전위가 금전극의 산소 환원 전위보다도 더 음의 전위에서 나타나는 것으로 보아 전자전달체 없이 전극에 고정된 laccase만으로는 산소환원 반응에 있어서 촉매효과를 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>와 laccase가 섞여있는 용액의 순환 전압-전류 실험을 아른곤 또는 산소분위

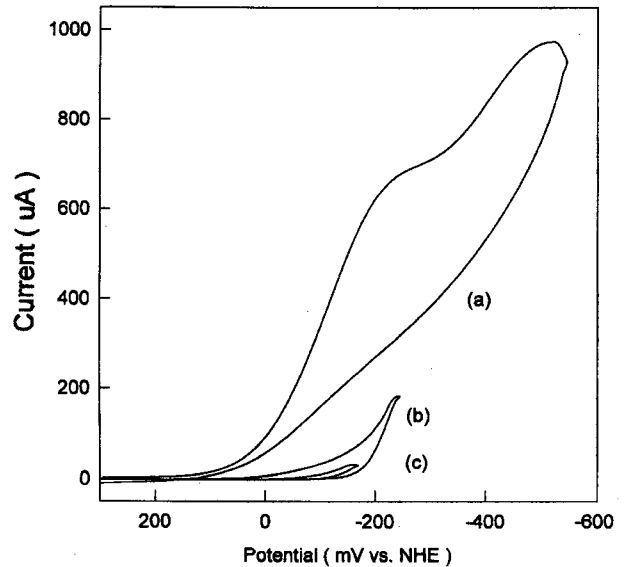


Fig. 7. Electrochemical reduction of O<sub>2</sub> in 0.1 M phosphate at pH 7.0 with (a) bare Au electrode, (b) β-mercaptopropionate-modified electrode, and (c) laccase-immobilized electrode under 1 atm O<sub>2</sub>.

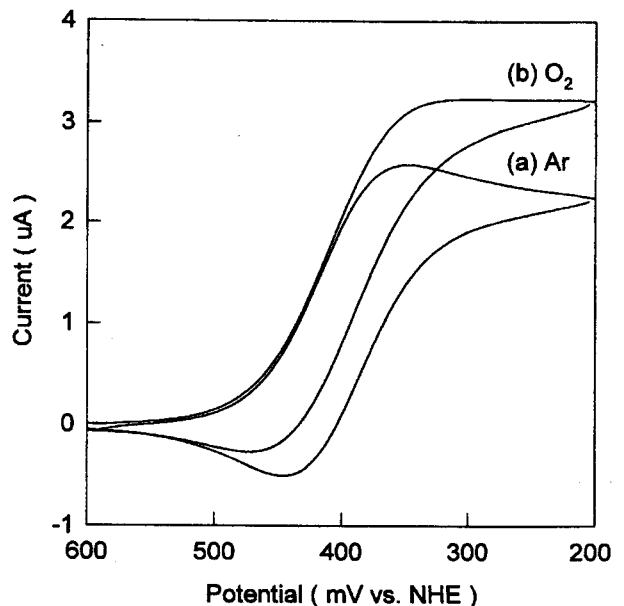


Fig. 8. Electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> by 0.15 mM laccase in the presence of 1.0 mM ferricyanide with GC electrode (A = 0.14 cm<sup>2</sup>) at scan rate of 2 mV/sec under (a) Ar, (b) O<sub>2</sub>.

기 하에서 각각 살펴보았다. GC 전극을 사용하고, 주사속도를 2 mV/sec로 하여 아르곤 하에서 얻은 순환 전압-전류곡선은 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>만 있는 경우와 일치하였는데, 산소로 포화시킨 경우에는 환원 봉우리 전류가 증가하고 산화 봉우리는 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 이것은 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>가 환원되면서 전자를 laccase를 통하여 산소에 전달하기 때문에 생기는 촉매효과에 의한 것으로 설명될 수 있다.

전자전달체를 이용한 laccase의 산소환원 과정은 Fig. 9처럼 나타낼 수 있다. Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>가 전극표면으로부터 전자를 받아 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>로 환원되면, 다시 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>가 laccaseox에 전자를 전달하여 laccasered로 환원되고 환원형의 효소가 다시 산화되면 전자를 산소에 전달하여 산소가 물로 환원되는 형태로 설명할 수 있다. 보통 효소의 활성자리는 효소 내부에 위치하고 있는데 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>가 효소 내로 확산되어 들어가서 활성자리에 전자를 전달해 주는 것으로 생각된다.

laccase가 산소의 전기화학적 환원반응에 촉매로 작용함을 또 다른 방법으로 확인하기 위하여 laccase의 반응억제제인 NaN<sub>3</sub> (sodium azide)를 사용하여 laccase 용액을 산소로 포화시킨 후 N<sub>3</sub><sup>-</sup>를 첨가하게 되면 환원 봉우리 전류가 감소함을 관찰할 수 있는데(Fig. 10), 이것은 아르곤 분위기 하에서의 순환 전압-전류 그림과 일치한다. 이는 laccase의 억제제인 N<sub>3</sub><sup>-</sup>가 산소의 결합자리에 대신 결합하여 laccase 산소환원 촉매반응을 저지하기 때문이다. 이러한 결과들로부터 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>를 전자전달체로 사용하면

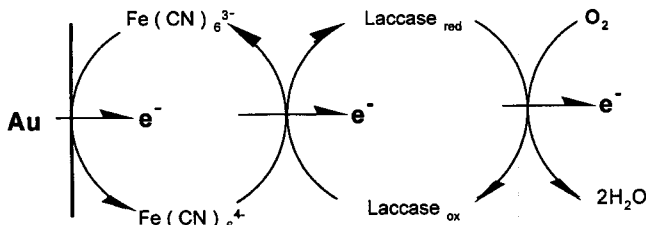


Fig. 9. Schematic diagram of the mediated catalytic reduction of O<sub>2</sub> to water by laccase.

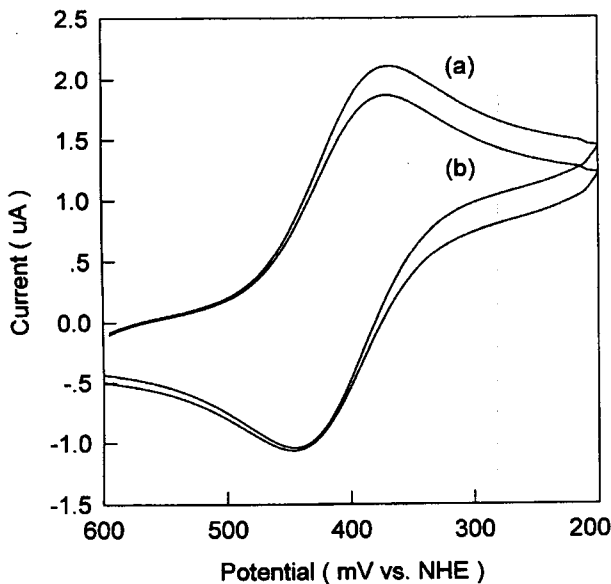


Fig. 10. Effect of azide for the electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> in 0.97 mM ferricyanide and 0.14 mM laccase with GC electrode (A = 0.070 cm<sup>2</sup>) at scan rate of 10 mV/sec; (a) under O<sub>2</sub>, (b) under O<sub>2</sub> with 0.54 mM N<sub>3</sub><sup>-</sup>.

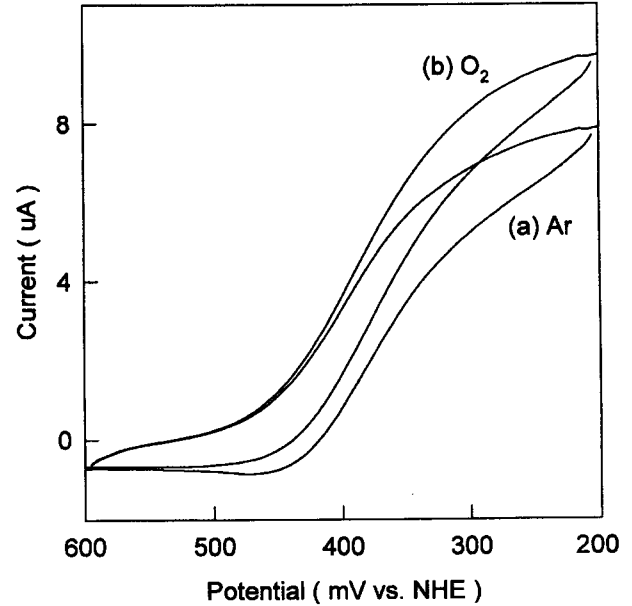


Fig. 11. Electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> by the laccase-immobilized electrode in 1.0 mM ferricyanide at scan rate of 2 mV/sec under (a) Ar, (b) O<sub>2</sub>.

laccase가 산소의 전기화학적 환원반응에 있어서 촉매로 작용함을 알 수 있었다.

### 3.5.2. Laccase 전극을 이용한 산소 환원

전자전달체인 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>가 존재하는 용액에서 laccase가 고정된 전극을 이용하여 산소의 전기화학적 환원반응에 있어서 촉매로 작용하는지를 알아보았다(Fig. 11). laccase가 고정된 전극을 사용하고, 전자전달체인 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>가 존재하는 용액을 아르곤 또는 산소로 포화시켜서 얻은 산소 환원에 대한 순환 전압-전류 곡선이다. 산소로 포화된 경우의 환원 봉우리 전류가 아르곤으로 포화된 경우보다 증가하는 것으로부터, 전극에 고정된 laccase가 산소 환원반응에 촉매로 작용함을 알 수 있었다. 이때 용액 내에 존재하는 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>는 고정된 laccase의 안쪽으로부터 확산되어 들어가 β-mercapto-propionate가 고정된 전극으로부터 전자를 전달받아서 laccase로 전자를 전달해 주는 것 같다. 이로부터 전극 표면에 고정된 laccase만으로는 촉매효과를 볼 수 없었지만, 전자전달체가 존재할 때 전극표면에 고정된 laccase는 산소의 전기화학적 환원반응에 있어서 촉매로 작용함을 확인하였다.

## 4. 결 론

금전극표면에 β-mercapto-propionate를 이용하여 음전하를 띤 self-assembled monolayer를 형성시킨 후 정전기적 인력으로 고정시킨 *Rhus* laccase는 전극표면에 단분자층으로 덮여 있음을 알 수 있었고, 기질에 대한 산화효과가 유지되고 있는데, 용액상에 비하여 10~15% 정도임을 알 수 있었다. 또한, *Rhus* laccase는 용액상에서나 전극에의 고정상에서나 전자전달체가 있는 경우에만 산소의 전기화학적 환원의 촉매로 작용함을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학재단 핵심연구과제 961-0304-036-2 및 교육부 기초과학연구소 학술조성 연구비 BSRI-97-3444의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. B. Reinhammar, in "Copper Proteins and Copper Enzymes", Vol. III, pp. 1-31, R. Lontie, Eds., CRC Press, Boca Raton (1984).
2. B. Reinhammer, *Chemica Scripta*, **25**, 172 (1985).
3. O. Farver, in "Gas Enzymol., Proc. Symp., Meeting Date 1984", pp. 61-78, H. C. Degn, R. P.; Toftlund, H., Eds., Reidel, Dordrecht, Neth (1985).
4. E. I. Solomon, M. J. Baldwin and M. D. Lowery, *Chem. Rev.*, **92**, 521 (1992).
5. E. I. Solomon and M. D. Lowery, *Science*, **259**, 1575 (1993).
6. J. F. D. Dean and K.-E. L. Erikson, *Holzforchung*, **48**, suppl. 1, 21 (1994).
7. F. Xu, *Biochemistry*, **35**, 7608 (1996).
8. C. Eggert, U. Temp and K.-E. L. Eriksson, *FEBS Lett.*, **407**, 89 (1997).
9. F. Xu, *J. Biol. Chem.*, **272**, 924 (1997).
10. A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Guiseppina, A. Marchesini, R. Petruzzelli and A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.* **206**, 513 (1989).
11. A. Messerschmidt, H. Luecke and R. Huber, *J. Mol. Biol.* **230**, 997 (1993).
12. E. Tsuchida and K. Yamamoto, in "Bioinorganic Catalysis", pp. 29-87, J. Reedjik, Eds., Marcel Dekker, Inc., New York (1993).
13. J. A. Fee and B. G. Malmstrom, *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 299 (1968).
14. B. G. Malmstrom, B. Reinhammar and T. Vanngard, *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 48 (1970).
15. B. Reinhammar and T. Vanngard, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 463 (1971).
16. U. M. Sundaram, W. Shin, J. L. Cole and E. I. Solomon, *J. Inorg. Biochem.*, **59**, 699 (1995).
17. W. Shin, U. Sundaram, J. L. Cole, H. H. Zhang, Britt Hedman, K. O. Hodgson and E. I. Solomon, *J. Amer. Chem. Soc.*, **118**, 3202 (1996).
18. C.-W. Lee, H. B. Gray, F. C. Anson and B. G. Malmstrom, *J. Electroanal. Chem.*, **172**, 289 (1984).
19. A. I. Yaropolov and A. L. Gindilis, *Electrokhimiya*, **21**, 982 (1985).
20. V. A. Bogdanovskaya, E. F. Gavrilova and M. R. Tarasevich, *Electrokhimiya*, **22**, 742 (1986).
21. V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, F. Sheller, D. Pfeifer and U. Wollenberger, *Electrokhimiya*, **23**, 666 (1987).
22. V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, F. Sheller, U. Wollenberger and G. S. Strnad, *I. Elektrokhimiya*, **24**, 707 (1988).
23. A. I. Yaropolov, O. V. Skorobogatko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev, *Appl. Biochem. Biotech.*, **49**, 257 (1994).
24. K. H. Hyung, K. Y. Jun, H.-G. Hong, H. S. Kim and W. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **18**, 564 (1997).
25. B. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 35 (1970).
26. B. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 245 (1972).
27. F. Xu, W. Shin, S. H. Brown, J. Wahleithner, U. M. Sundaram and E. I. Solomon, *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 303 (1996).
28. R. Woods, in "Electroanalytical Chemistry", Vol. 9, p.125, A. J. Bard, Eds., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1976).
29. K. D. Karlin and Z. Tyeklar, *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman & Hall, New York and London (1993).
30. R. M. Wynn, D. B. Knaff and R. A. Holwerda, *Biochemistry*, **23**, 241 (1984).
31. I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, A. F. Buckman and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10321 (1996).
32. C. Bourdillon, C. Demaille, J. Gueris, J. Moiroux and J. M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 12264 (1993).
33. M. K. Weibel and H. J. Bright, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2734 (1971).