

## 한국산 주걱송편버섯(*Pycnoporus cinnabarinus*) SCH-3로부터 정제 된 Laccase의 특성

박은혜 · 윤경하\*

순천향대학교 생명과학부

### Characterization of Laccase Purified from Korean *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3

Eun Hye Park and Kyung-Ha Yoon\*

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

(Received July 23, 2003)

**ABSTRACT:** Laccase produced by *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3 isolated from Korea was partially purified using ultrafiltration, anion exchange chromatography and affinity chromatography. The laccase was produced as the predominant extracellular phenoloxidase during primary metabolism. Neither lignin peroxidase nor manganese-dependent peroxidase were detected in the culture fluid. In order to examine the effect of inducers in laccase production, 2,5-xylydine was added in the culture of *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3. Addition of 2,5-xylydine enhanced 25-fold laccase production. Purified laccase was a single polypeptide having a molecular mass of approximately 66 kDa, as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and carbohydrate content of 9%.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for laccase with ABTS [2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)] as a substrate (Lineweaver-Burk plot) was determined to be 44.4  $\mu$ M and 56.0  $\mu$ mole, respectively. The optimal pH for laccase activity was found to be 3.0. The enzyme was very stable for 1 hour at 60°C. Half-life ( $t_{1/2}$ ) of the enzyme was about 10 min at 80°C. Spectroscopic analysis of purified enzyme indicated that the enzyme was typical of copper-containing protein. Substrate specificity and inhibitor studies for laccase also indicated to be a typical fungal laccase. The N-terminal amino acid sequence of the *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase showed 94% of homology to the N-terminal sequences of laccases from *P. cinnabarinus* PB and *P. coccineus*.

**KEYWORDS:** Laccase, Lignin peroxidase, Manganese-dependent peroxidase, *Pycnoporus cinnabarinus*

리그닌(lignin)은 phenylpropanoid 단위로 구성된 방향족 이형중합체(aromatic heteropolymer)로써 목재조직을 견고하게 하고 미생물의 공격으로부터 목재를 보호한다(Higuchi, 1990). 이와 같은 리그닌을 탈중합화하고 무기물질화 하는 데는 주로 목재 백색부후균류(white rot fungi)가 생산하는 몇몇 세포의 산화환원효소와 저분자량의 대사산물 그리고 활성화된 산소종이 포함된 비특이적 산화계(nonspecific oxidation system)가 관여한다(Schoemaker, 1990). 리그닌을 분해하는 목재 백색부후균류가 다양한 방향족 오염물질을 분해하는 능력도 이러한 비특이적 산화계가 부분적으로 작용하기 때문이다(Barr and Aust, 1994; Paszczynski and Crawford, 1995). 리그닌과 인공 화합물(xenobiotics)의 분해에 관여하는 목재 백색부후균류의 세포외 효소로는 laccase(Thurston, 1994; Leontievsky *et al.*, 1997), peroxidase(Tien and Kirk, 1983; Kirk and Farrell, 1987; Camarero *et al.*, 1999) 그리고  $H_2O_2$ 을 생산하는 산화효소(Kersten and Kirk, 1987; Guillen *et al.*, 1990; Volc *et al.*, 1996) 등으로 알려져 있으나, 많은 균

류들이 laccase를 생산하고 리그닌 분해 모델 균주로 사용되는 *Phanerochaete chrysosporium* 균주도 laccase를 생산한다는 것이 최근에 밝혀짐에 따라(Srinivasan *et al.*, 1995) 리그닌의 분해와 난분해성 방향족 화합물의 분해 연구는 주로 laccase에 집중되고 있다.

Laccase(benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1, 10, 3, 2)는 분자상의 산소를 전자수용체로 이용하는 phenoloxidase로써 페놀성 리그닌 단위(phenolic lignin units)와 광범위한 페놀성화합물과 방향족 아민(aromatic amine)을 직접적으로 산화하나(Field *et al.*, 1993; Thurston, 1994) 비페놀성 리그닌 단위(nonphenolic lignin units)는 산화하지 못한다(Eggert *et al.*, 1996a). 그러나 laccase는 산화 환원 매개체로서 작용하는 인공기질이나 어떤 대사산물이 존재할 경우에 laccase는 비페놀성 리그닌 단위 뿐만 아니라 몇몇 방향족 인공화합물과 지방족 인공화합물을 분해한다(Bourbonnais and Paice, 1990; Eggert *et al.*, 1996b; Johannes and Majcherczyk, 2000; Niku-Paavola, and Viikari, 2000). 따라서 이러한 laccase-mediator system의 연구는 리그닌 분해기작의 규명과 laccase의 생물공학 적 응용에 활기를 불어넣고 있다(Bourbonnais and Paice,

\*Corresponding author <E-mail: kyungha@sch.ac.kr>

1992).

본 연구에서는 우리나라에서 자생하는 목재 백색부후균류인 *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3을 분리한 후 균체를 액체배양하여 배양액으로부터 laccase를 분리, 정제하고 그의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용된 *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3는 1998년 8월에 경기도 청평에서 채집되어 동정된 균주이다. 균주의 보존은 potato dextrose agar(PDA, Difco. Lab.) 배지에 균주를 접종하여 30°C에서 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 약 1개월마다 계대배양 하였다. 균주의 접종은 PDA 배지 중앙에 소량의 균사체를 접종하여 30°C에서 7일간 배양한 후 생장 가장자리로부터 1 cm 떨어진 부위에서 직경 6 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 사용하였다.

### 배지 및 유도원 첨가

Laccase의 생산과 유도원의 영향을 조사하기 위하여 Collins(1996)의 배지(glucose 10 g; ammonium tartrate 4 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.026 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0066 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0005 g; thiamine-HCl 0.00001 g; distilled water 1000 ml, pH 5.0)를 기본배지로 사용하였고, 유도원의 첨가는 용량 250 ml flask에 50 ml의 기본배지를 넣고 균주를 접종하여 1일간 배양한 후 2,5-xylydine은 0.2 mM, 그리고 ferulic acid, gallic acid, hydroxyquinone, protocatechuic acid, syringaldehyde, vanillic acid, veratryl alcohol 등은 1 mM 이 되도록 각각 첨가하였다. 배양은 30°C에서 130 rpm(Operon-SI-130C)으로 진탕 배양하였다.

### 효소 활성 측정

Laccase 활성은 0.5 mM의 ABTS[2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)] 기질을 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)으로 완충시키고 효소를 첨가하여 생성한 양이온 래디칼을 420 nm( $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )에서 측정하였다(Niku-Paavola *et al.*, 1988). Peroxidase의 활성은 laccase 활성측정용액에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 을 0.1 mM이 되도록 가하여 측정하였다(Eggert *et al.*, 1996b). Lignin peroxidase(LiP)의 활성은 2 mM veratryl alcohol을 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)으로 완충시키고 0.4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 가했을 때 효소에 의해 전환된 veratraldehyde( $\epsilon = 9,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )을 310 nm에서 측정하였다(Tien and Kirk, 1984). Manganese-dependent peroxidase(MnP)의 활성은 0.1 mM  $\text{MnSO}_4$ 를 100 mM sodium tartrate 완충액(pH

5.0)로 완충시킨 후 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  존재 하에서 효소에 의하여 생성된  $\text{Mn}^{+3}$ -tartrate 복합체( $\epsilon = 6,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )를 238 nm에서 측정하였다(Paszczynski *et al.*, 1988). Aryl alcohol oxidase(AAO)의 활성은 5 mM veratryl alcohol을 100 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)으로 완충시키고 효소가 생성한 veratraldehyde( $\epsilon = 9,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )의 양을 310 nm에서 측정하였다(Saparrat *et al.*, 2002).

효소 활성의 단위는 기질로부터 1분간 생성된 1  $\mu\text{mole}$ 의 생성물을 1 unit(U)로 표시하였다.

### Laccase 정제

Laccase를 정제하기 위하여 용량 2000 ml flask에 기본배지 500 ml을 넣고 균주를 접종하여 1일간 전 배양한 후 laccase 생산 유도원으로 알려진 2,5-xylydine을 첨가하여 30°C에서 130 rpm으로 진탕배양하였다. 진탕배양 된 배양액을 4°C에서 8,000 rpm로 20분간 원심분리하고 상등액을 ultrafiltration(10,000 Da membrane, Amicon 8400)하여 10 ml로 농축하였다. 그 후 농축액을 증류수로 연속 투석하고, 50 mM potassium phosphate 완충액(KPB, pH 6.0)으로 2시간 동안 투석하였다. 그 후 투석액을 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(1×15 cm)에 적재하고 50 mM과 100 mM KPB(pH 6.0)를 단계적으로 적용하여 0.3 ml/min로 용출 시킨 후 laccase의 활성을 나타내는 분획을 선택하여 5 ml로 농축하였다. 농축액은 0.02 mM KPB(pH 7.2)로 투석하여 같은 완충액으로 평형 시킨 hydroxyapatite column(2×10 cm)에 적재하고 0.02 mM KPB(pH 7.2)에 포함된 0.5 M( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 구배를 적용하여 효소를 용출 시킨 후, 활성을 나타내는 분획을 모아 농축하여 정제된 효소로 사용하였다. 단백질량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 물질로 사용하여 Lowry(1951) 법으로 측정하였다.

### 효소활성의 특성

효소의 kinetics는 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)과 0.05~10 mM의 ABTS를 기질로 사용하여 효소활성을 측정한 후 이중역수도시(Lineweaver-Burk plots)하여 결정하였다. 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 정제된 효소를 100 mM sodium tartrate(pH 3.0) 완충액으로 완충시키고 30°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C에서 일정 시간 동안 전처리하고 10분마다 효소의 활성을 측정하여 열에 대한 효소의 안정성을 조사하였다. 효소활성의 최적 pH를 조사하기 위하여 100 mM glycine-HCl (pH 1.5~3.5), 100 mM sodium tartrate(pH 2.5~4.5), 100 mM sodium acetate(pH 4.5~6.0), 그리고 100 mM sodium phosphate(pH 6.0~7.0) 완충액을 사용하였다. Laccase의 기질특이성을 조사하기 위하여 laccase의 기질로 추정되는 몇몇 기질을 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)에 각각 5 mM씩을 넣고 일정량의 효소를 첨가하여 반응

시킨 후 상온에서 효소의 활성을 측정하였다. 효소활성에 미치는 화학물질의 영향은 0.5 mM ABTS 기질과 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)을 사용하여 조사하였다.

**전기영동**

정제된 효소의 분자량과 동질성(homogeneity)을 조사하기 위하여 SDS-PAGE를 Laemmli(1970) 법에 따라 수행하였다. 즉, sodium dodesylsulfate polyacrylamide gel(10%)에 분자량 markers(phosphorylase b 97,000; albumin 66,000; ovalbumin 45,000; carbonic anhydrase 30,000, Amershm pharmacia)와 정제된 laccase를 적재하고 80 V로 2시간 동안 전개한 후 coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색했다.

**Copper characterization**

정제된 laccase의 촉매 중심의 성질을 조사하기 위하여 0.3 mg의 정제된 laccase를 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해하고 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1601)을 이용하여 200 nm에서 700 nm까지 흡광도를 조사하였고 copper의 양은 flame technique를 이용하여 atomic absorption spectrometry(Shimadzu AAS-6800)로 측정하였다.

**N-말단의 아미노산 서열분석**

정제된 laccase의 N-말단 아미노산의 서열분석은 한국 기초과학연구원 연구원의 단백질 자동서열 분석기(Perkin Elmer model 491A)를 사용하여 분석하였고 얻어진 N-말단의 아미노산의 서열은 NCBI의 BLAST Search 프로그램을 이용하여 동정과 유사성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

***P. cinnabarinus* SCH-3의 효소 생산**

*P. cinnabarinus* SCH-3를 기본배지에서 10일간 진탕배양 했을 때 세포외로 분비되는 몇몇 효소와 단백질 양을 조사한 결과(Fig. 1) 균주의 생장은 배양 9일에 최대였고 단백질 양은 배양 8일에 최대값을 나타내었다. Laccase의 활성은 배양 3일부터 나타나기 시작하여 배양 7일에 최대값을 나타냈고 그 이후에는 활성이 급격히 감소하였다. peroxidase는 배양 5일에 나타나기 시작하여 배양 7일에 최대값을 나타내었으나 LiP, MnP와 AAO의 활성은 배양 기간동안 나타나지 않았다. 이와 같은 효소 생산의 결과는 Eggert(1996b) 등이 호주의 시드니(Sydney) 근교에서 분리 동정한 *P. cinnabarinus* PB 균주가 일차대사 때 다량의 laccase와 소량의 peroxidase를 생산하고 LiP, MnP 그리고 AAO를 세포 외로 생산하지 않는다는 보고와 일치한다.

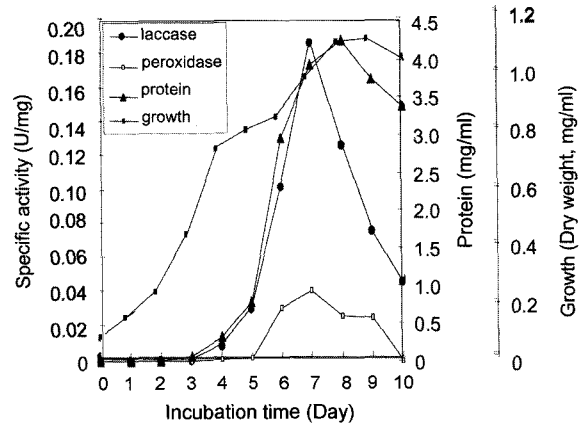


Fig. 1. Time course of enzyme activities and protein in the extracellular fluid of *P. cinnabarinus* SCH-3 culture grown in the basal medium.

**유도원의 영향**

*P. cinnabarinus* SCH-3를 기본배지에서 1일간 배양한 후 laccase 생산 유도원으로 추정되는 몇몇 유도원을 배지에 각각 첨가하여 laccase 활성을 측정한 결과(Fig. 2), 균주배양 12일에 laccase생산 유도원의 효과는 2,5-xylidine > hydroquinone > syringaldehyde > vanillic acid > protocatechuic acid > gallic acid > veratryl alcohol > ferulic acid 순으로 나타났다. 특히 2,5-xylidine을 첨가한 실험구의 효소활성은 2.0 U/ml로 가장 높았고, 대조구(control)에 비해 25배 높은 활성을 나타내었다. Eggert (1996b) 등이 분리 동정한 *P. cinnabarinus* PB 균주는 2,5-xylidine에 의하여 laccase 생산이 유도되었다. 이와

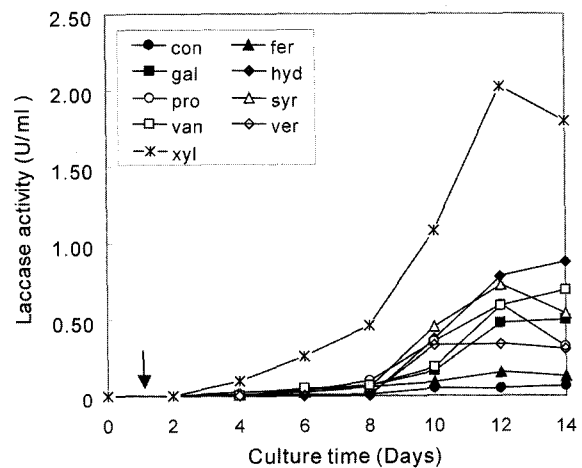


Fig. 2. Stimulation of laccase production in cultures of *P. cinnabarinus* SCH-3 by addition of inducers. The arrow indicates the time of inducer addition. con: control, fer: ferulic acid, gal: gallic acid, hyd: hydroquinone, pro: protocatechuic acid, syr: syringaldehyde, van: vanillic acid, ver: veratryl alcohol, xyl: 2,5-xylidine.

같은 결과는 본 실험의 결과와 일치한다. Haars(1981) 등은 *Fomes annosus* 균주의 세포 외 laccase(extracellular laccase)는 dihydroxybenzoic acid, gallic acid, hydroquinone, 그리고 protocatechuic acid 등으로 유도됨을 관찰하였고, Bollag와 Leonowicz(1984)는 여러 종류의 담자균류와 불완전균류, 그리고 자낭균류에 대하여 2,5-xylydine의 laccase 생산 유도 효과를 조사했는데 2,5-xylydine은 일반적으로 담자균류에 대하여 유도효과가 있고 몇몇의 담자균류에 있어서는 laccase 동위효소를 생산한다고 보고하였다. 그리고 Coll 등(1993)은 제지공장의 폐수에서 분리한 *Basidiomycete* PM1(CECT 2971) 균주는 laccase 생산 유도원으로 알려진 2,5-xylydine, gallic acid, toluidine, guaiacol 그리고 veratryl alcohol과 같은 화합물에 대하여 laccase가 전혀 유도 되지 않음을 보고하였다. 이와 같은 실험결과들은 담자균류들이 laccase 생산 유도원에 대하여 다양하게 반응함을 나타내 주고 있다.

#### Laccase의 kinetic constants

Laccase의 정제는 Table 1에 표시된 과정에 따라 수행하였다. 정제된 효소의 kinetic constants는 100 mM sodium tartrate 완충액(pH 3.0)으로 완충시킨 ABTS를 기질로 사용하여 laccase의 활성을 측정 후 이중역수도식(Lineweaver-Burk plot)한 결과,  $K_m$ 값은  $44.4 \mu\text{M}$ ,  $V_{max}$ 값은  $56 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 이었다.

#### Laccase의 분자량 및 탄수화물량

정제된 laccase의 분자량과 동질성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과(Fig. 3), 정제된 laccase는 단일의 polypeptide로 분자량은 약 66 KDa이었다. 그리고 laccase에 포함된 탄수화물의 양을 포도당을 표준물질로 사용하여 anthron법(Yemm and Wills, 1954)으로 측정된 결과, 약 9%의 탄수화물을 포함하였다. Thurston(1994)은 대부분의 균류의 laccase는 당단백질로 된 단량체로서 분자량이 50 KDa와 80 KDa 사이에 있음을 보고하였다. 본 균주의 laccase는 전형적인 균류의 laccase임을 보여주고 있다.

#### Copper characterization

*P. cinnabarinus* SCH-3 배양액으로부터 정제된 laccase

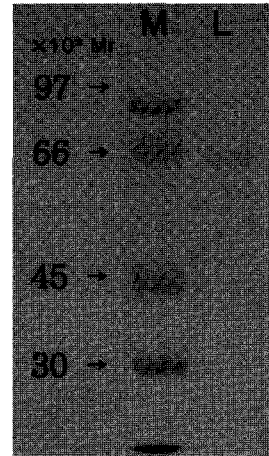


Fig. 3. SDS-PAGE of *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase purified by affinity chromatography (lane L). Molecular size markers are shown in lane M.

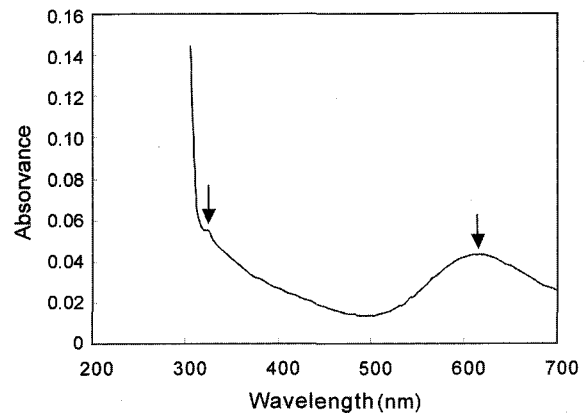


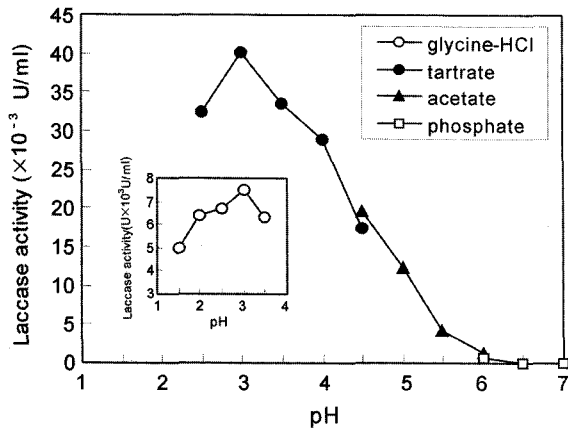
Fig. 4. Absorbance spectrum of laccase from *P. cinnabarinus* SCH-3 (0.3 mg in 100 mM sodium acetate, pH 5.0) at 25°C. The arrows indicate the characteristic absorbance peak corresponding to type I (ca. 614 nm) and III (ca. 325 nm).

의 촉매중심의 성질을 조사하기 위하여 laccase의 UV-visible의 spectrum을 조사한 결과(Fig. 4), 흡수 peak가 614 nm 부근(type I blue copper atom)에서 나타났고 어깨(shoulder)가 325 nm(type III binuclear copper)에서 나타났다. 그리고 copper의 양은 단백질 1 mol당 3.4 mol의 copper를 포함하고 있었다. 이와 같은 분광학적인 자료는 본 균주의 laccase에는 전형적인 균류의 laccase와 같이

Table 1. Purification of laccase from the culture liquid of *P. cinnabarinus* SCH-3

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg) <sup>a</sup>	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (folds)
Filtrate	470	54	826.4	15.3	100	1
Ultra-filtrate	10	35	793.7	22.7	96.0	6.9
DEAE-cellulose	5	1.5	604.3	402.9	73.1	26.3
Hydroxyapatite	5	0.6	390.4	623.6	47.2	63.2

<sup>a</sup>Protein was measured by Lowry's method (1951).



**Fig. 5.** pH profile of purified *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase. Using 0.5 mM ABTS (100 mM sodium tartrate buffer, pH 3.0) as the substrate.

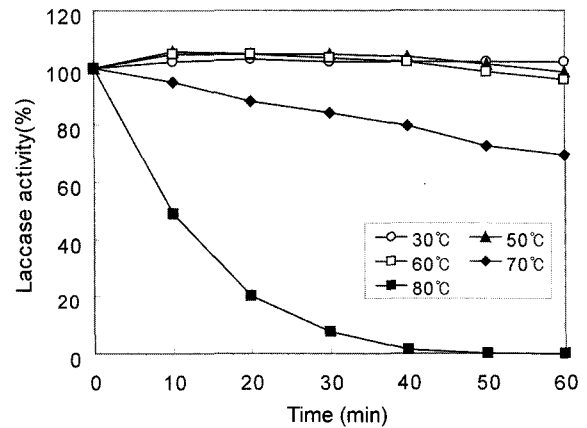
Cu(II) 이온이 존재함을 강력히 제시하고 있다(Thurston, 1994). 그러나 균류 가운데 *Phlebia radiata*(Karhunen *et al.*, 1990)와 *Phellinus ribis*(Min *et al.*, 2001)의 laccase는 type III와 type I의 copper를 각각 결여하고 있다는 보고도 있다.

#### 최적 pH

*P. cinnabarinus* SCH-3의 laccase는 pH 3.0에서 가장 높은 활성을 나타냈고, pH 6.5 이상에서는 효소의 활성이 나타나지 않았다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 리그닌을 분해하는 균류의 배양액으로부터 분리한 대부분의 laccase가 갖는 최적 pH 범위 내에 속한다(Thurston, 1994). 그러나 담자균류 가운데 *Agaricus bisporus*의 laccase는 두 개의 뚜렷한 최적의 pH(3.6과 5.6)를 갖는 경우도 있다(Wood, 1980).

#### 온도의 영향

*P. cinnabarinus* SCH-3 균주로부터 정제된 laccase를 60°C에서 60분 동안 처리하였을 때 효소는 매우 안정적이었으며, 80°C에서 약 10분간 처리하였을 때 효소의 활성



**Fig. 6.** Activity of purified *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase after preincubation at different temperatures. One hundred percent activity refers to 40 U/ml. Using 0.5 mM ABTS (100 mM sodium tartrate buffer, pH 3.0) as the substrate.

이 약 절반으로 감소하였다(Fig. 6). 대부분의 목재 백색 부후균류의 laccase는 50°C 미만에서 안정된 활성을 나타내는데(Wood, 1980; De Vries *et al.*, 1986; Sugiura *et al.*, 1987) 반하여 본 실험 균주의 laccase는 60°C에서 매우 안정된 활성을 나타냈다. 따라서 본 실험에 사용된 균주가 생산하는 laccase는 열에 대하여 대단히 안정된 효소라고 생각된다.

#### 기질 특이성

Laccase의 기질로 생각되는 몇몇 페놀 화합물을 시험한 결과(Table 2), ABTS와 hydroquinone이 우수한 기질로 밝혀졌고, tyrosine에 대해서는 전혀 활성을 나타내지 않았다.

#### Inhibitor의 영향

Laccase 활성에 영향을 미칠 것으로 추정되는 몇몇 효소저해제의 저해효과를 조사한 결과(Table 3), copper를 포함하고 있는 산화효소들의 활성을 저해하는 물질로 알려져 있는 sodium azide(0.1 mM), thioglycolic acid(0.1

**Table 2.** Activity of laccase from *P. cinnabarinus* SCH-3 assessed against various substrates<sup>a</sup>

Substrate	Conc. (mM)	Wavelength (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	Activity (U/ml)	Relative activity (%)
ABTS	5	420	36,000	40.1	100.0
Hydroquinone	5	248	17,252	38.1	95.0
Guaiacol	5	436	6,400	15.0	37.5
2,6-Dimethoxyphenol	5	470	35,645	13.9	34.7
4-Methylcatechol	5	420	2,091	4.8	11.9
Catechol	5	450	2,211	2.4	5.8
Syringaldehyzine	5	525	65,000	1.3	3.2
Tyrosine	3	280	ND <sup>b</sup>	—	—

<sup>a</sup>Assays were done in 100 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0).

<sup>b</sup>ND, not determined.

**Table 3.** Effect of putative laccase inhibitors on oxidation of ABTS by purified *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase<sup>a</sup>

Compound	Concentration (mM)	Inhibition (%)
NaN <sub>3</sub>	0.01	90
	0.02	95
	0.05	98
	0.10	100
TGA <sup>b</sup>	0.01	75
	0.10	100
	1.00	100
	2.00	100
DDC <sup>c</sup>	1.00	77
	2.00	100
L-Cysteine	0.50	3
	1.00	86
<i>p</i> -Coumaric acid	1.00	0
	2.00	0
	3.00	0
EDTA <sup>d</sup>	1.00	0
	2.00	0
	3.00	0

<sup>a</sup>ABTS was used at 0.5 mM in 100 mM sodium tartrate buffer, pH 3.0. Zero inhibition refers to 40 U/ml of laccase activity per ml. Using 0.5 mM ABTS in a control assay.

<sup>b</sup>TGA, thioglycolic acid.

<sup>c</sup>DDC, Diethyldithiocarbamic acid.

<sup>d</sup>EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

**Table 4.** Comparison of N-terminal amino acid sequences of *P. cinnabarinus* SCH-3 laccase and other fungal laccase

Microorganism	N-terminal amino acid sequence
<i>P. cinnabarinus</i> SCH-3	AIGPVADLTLTNAAVVPD.
<i>P. cinnabarinus</i> PB	AIGPVADLTLTNAAVSPD.
<i>P. coccineus</i>	AIGPVADLTLTNAAVSPD.
<i>C. hirsutus</i>	AIGPTADLTISNAEVSPD.

mM), diethyldithiocarbamic acid(2 mM)는 효소의 활성을 완전히 저해했으나 metal chelator인 *p*-coumaric acid와 EDTA는 효소활성을 저해하지 않았다.

#### N-말단 아미노산 서열

분리 정제된 laccase의 N-말단 아미노산 서열을 측정하여 다른 균주의 laccase와 비교한 결과(Table 4), *P. cinnabarinus* SCH-3의 laccase는 *P. coccineus*의 laccase(Hoshida *et al.*, 2001)와 Eggert(1996b) 등이 호주에서 분리 동정한 *P. cinnabarinus* PB와는 94%의 상동성을 각각 나타냈고, *C. hirsutus*의 laccase(Kojima *et al.*, 1990)와는 83% 상동성을 나타냈다.

## 적 요

한국산 주걱송편버섯(*Pycnoporus cinnabarinus*) SCH-

3로부터 배지 내로 분리된 laccase를 ultrafiltration과 anion exchange chromatography, adsorption chromatography를 이용하여 분리·정제하고 정제된 효소의 특성을 조사하였다.

Laccase는 균주의 일차 대사 과정에서 주로 생산되는 세포의 폐놀 산화효소였다. 주걱송편버섯을 기본 배지에서 배양하였을 때 생장은 배양 9일에 최대였고, laccase의 활성은 배양 7일에 최대활성을 나타냈으며 배양액에서 LiP, MnP 그리고 AAO의 활성은 측정되지 않았다.

Laccase의 생산에 미치는 유도원의 영향을 조사하기 위하여 배양 중인 주걱 송편버섯에 몇몇 유도원을 첨가한 결과, 2,5-xylydine은 대조구에 비하여 laccase의 생산을 25배 증가 시켰다. 정제된 laccase는 SDS 젤 전기영동에서 대략 66 kDa의 분자량을 가지는 단일 폴리펩타이드(single polypeptide)였고, 탄수화물 함량은 9%였다. ABTS[2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]를 기질로 사용하며 정제된 laccase의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 를 조사한 결과 각각 44.4  $\mu$ M과 56.0  $\mu$ mol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>로 측정되었다. Laccase 활성의 최적 pH는 3.0이며, 이 효소는 60°C에서 1시간 동안 처리하였을 때 매우 안정적이었고 80°C에서 10분간 처리하였을 때 효소의 활성이 반감되었다. Laccase의 분광학적 특성을 조사한 결과 구리를 포함하는 단백질로 나타났다. 일반적으로 알려진 laccase의 기질들에 대한 특이성을 조사한 결과 5 mM ABTS와 5 mM hydroquinone에서 높은 활성을 나타내었으며 tyrosine에서는 laccase의 활성이 나타나지 않았다. 저해제의 영향을 조사한 결과, 일반적으로 구리를 포함하는 단백질의 저해제인 NaN<sub>3</sub>, TGA, DDC를 일정농도로 처리한 실험구에서는 효소의 활성이 완전하게 억제되었으며, *p*-coumaric acid와 EDTA 처리구에서는 효소의 활성이 억제되지 않았다. 한국산 주걱송편버섯 SCH-3 균주로부터 생산되는 laccase의 N-말단의 아미노산의 서열은 *P. coccineus*의 laccase와 호주에서 분리·동정한 *P. cinnabarinus* PB의 laccase와 94%가 같았다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 순천향대학교 대학자체 학술연구 조성비지원(과제번호: 20030027)에 의해 수행되었다. 본 연구에 사용된 균주를 동정 해주신 서울대학교 미생물학과의 정확성 교수님과 임영운 박사님께 감사를 드리는 한편 laccase의 N-말단의 아미노산 서열을 밝혀주신 한국기초과학 지원연구원의 김승일 박사님께도 감사를 드립니다.

## 참고문헌

Barr, D. P. and Aust, S. D. 1994. Pollutant degradation by white-rot fungi. *Rev. Environ. Contam. T.* 138: 49-72.

- Bollag, J. M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 849-854.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **167**: 99-102.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1992. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in lignin biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 823-827.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J. and Martinez, A. T. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**: 10324-10330.
- Cleland, W. W. 1967. Enzyme kinetic. *Ann. Rev. Biochem.* **36**: 77-122.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R., Santamaria, R. and Perez, P. 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2607-2613.
- Collins, P. J., Kotterman, M. J. J., Field, J. A. and Dobson, A. D. W. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4563-4567.
- De Vries, O. M. H., Kooistra, W. H. C. F. and Wessels, J. G. H. 1986. Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dicaryon. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2817-2826.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. and Eriksson, K. E. L. 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of nonphenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letter.* **391**: 144-148.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and Eriksson, K. E. L. 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1151-1158.
- Field, J. A., De Jong, E., Feijoo-Costa, G. and De Bont, J. A. M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* **11**: 44-49.
- Guillen, F., Martinez, A. T. and Martinez, M. J. 1990. Production of hydrogen peroxide arylalcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol.* **32**: 465-469.
- Haars, A., Chet, I. and Huttermann, A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. J. Forest Pathol.* **11**: 67-76.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**: 23-63.
- Hoshida, H., Nakao, M., Kubo, K., Hakukawa, T., Morimasa, K., Akada, R. and Nishizawa, Y. 2001. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *trametes sanguinea* by cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering. In press.*
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 524-528.
- Karhunen, E., Niku-Paavola, M.-E., Viikari, L., Haltia, T., Van Der Meer, R. A. and Duine, J. A. 1990. A novel combination of prosthetic group in a fungal laccase, PQQ and two copper atoms. *FEBS Lett.* **267**: 6-8.
- Kersten, P. J. and Kirk, T. K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidases in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **169**: 2195-2201.
- Kirk, T. K. and Farrell, R. L. 1987. Enzymic "Combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Biochem.* **41**: 465-505.
- Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaino, M. and Kita, Y. 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of lignolytic phenoloxidase gene of the white-rot basidiomycete *Corioclus hirsutus*. *J. Bacteriol.* **265**: 15224-15230.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N. N., Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovelva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F. and Hatakka, A. 1997. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 9-14.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-267.
- Min, K.-L., Kim, Y.-H., Kim, Y. W., Jung, H. S. and Hah, Y. C. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting group *Phellinus ribis*. *Arch. Biophem. Biophys.* **392**: 279-286.
- Niku-Paavola, Karhunen, M.-L., Salola, E. P. and Raunio, V. 1988. Lignolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* **254**: 877-884.
- \_\_\_\_\_ and Viikari, L. 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. *J. Mol. Cat. B Enzymol.* **10**: 435-444.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L. and Huynh, V. B. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol.* **161**: 264-270.
- \_\_\_\_\_ and Crawford, R. L. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *P. chrysosporium*. *Biotechnol. Prog.* **111**: 368-379.
- Saparrat, M. C. N., Guillen, F., Arambarri, A. M., Martinez, A. T. and Martinez, M. J. 2002. Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1534-1540.
- Schoemaker, H. E. 1990. On the chemistry of lignin degradation. *Rec. Travaux chim. Pays-bas.* **109**: 255-272.
- Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. and Reddy, C. A. 1995. Demonstration of laccase in white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4274-4277.
- Sugiura, J., Sakaino, M., Kojima, Y., Tsujioka, K., Mutoh, Y., Shinohara, Y. and Koide, K. 1987. Purification and properties of phenol oxidase produced by white-rot fungi and molecular cloning of phenol oxidase gene, Pp 317-320. *In International Seminar on Lignin Enzymic and Microbiol Degradation. International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Paris. INRA Publication, Versailles, France.*
- Tien, M. and Kirk, T. K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* **326**: 520-523.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 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.

- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Volc, J., Kubatova, E., Daniel, G. and Prikrylova, V. 1996. Only C-2 specific glucose oxidase activity is expressed in ligninolytic cultures of the white rot fungus *Phanerocheate chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **165**: 421-424.
- Wood, D. A. 1980. Production purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus hirporus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**: 327-338.
- Yemm, E. W. and Willis, A. J. 1954. The Estimation of carbohydrates in plant extracts by Anthron. *Biochem.* **57**: 508-514.