

Trametes versicolor 배양액으로부터 단리 정제된 Laccase의 효소적 특성^{*1}

김 현 주^{*2} · 배 현 종^{*2†}

Purification and Characterization of Extracellular Laccase from *Trametes versicolor*^{*1}

Hyun Joo Kim^{*2} · Hyeun Jong Bae^{*2†}

요 약

본 연구에서는 *Trametes versicolor*에서 분비하는 laccase를 분리 정제하고, 그 효소특성을 조사하였다. 공시균의 배지로는 PDB배지를 사용하였으며, 이 효소를 유도하기 위하여 공시균 접종 5일 후 inducer로 2,5-xylidine (0.2 mM)을 첨가하였다. Inducer 첨가 2일 후 laccase를 수확하여 Glass filter (GF/C)를 이용하여 균사체를 제거한 후 laccase 여과액의 정제시간을 단축시키고, 쉽게 단백질을 농축시키기 위하여 ultramicrofilter (Viva flow 50, GE Healthcare Bioscience, USA)를 사용하여 농축하였다. 이렇게 농축된 laccase 여과액은 Hitrap Q FF column으로 부분 정제하여 활성이 검출된 peak를 확인할 수 있었다. 효소의 특성을 조사한 결과 효소의 활성이 가장 높은 pH는 5.0이었으며 최적 온도는 60°C였고, specific activity는 syringaldazine을 substrate로 사용하여 확인한 결과 crude한 상태에서는 약 32 U/mg였고, 농축한 후에는 약 409 U/mg였으며 Hitrap Q FF column으로 분리한 후에는 약 1.243 U/mg였다. 그리고 SDS-PAGE gel 사진으로 확인한 결과 단백질의 크기는 약 53 kDa이었다.

ABSTRACT

The study was performed to purify and characterize laccase in culture of *Trametes versicolor*. The fungus was grown in liquid culture media of PDB and added 2,5-xylidine (0.2 mM) after 5

*¹ 접수 2007년 6월 20일, 채택 2007년 7월 5일

*² 전남대학교 농업생명과학대학 임산공학과, Dept. of Forest Products & Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

† 주자자(corresponding author) : 배현종(e-mail: baehj@chonnam.ac.kr)

days to enhance the production of laccase. The fungal culture was incubated at 25°C on a rotary shaker (120 rpm) for 7 days, and the culture broth was clarified through Glass filter (GF/C). The aqueous solution was concentrated by ultramicrofiltration (Viva flow 50, GE Healthcare Bioscience, USA) and loaded onto a Hitrap Q FF column. Laccase activity could be detected at one peak, and this enzyme has a molecular mass of approximately 53kDa as determined by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for syringaldazine were 5.0 and 60°C, respectively. The specific activity of crude, concentrated and purified laccase were 32, 409, and 1,243 U/mg, respectively.

Keywords: *Trametes versicolor*, 2,5-xylidine, laccase

1. 서 론

지난 수십 년 동안 백색부후균(white-rot fungi)은 목재종이, 펠프 등의 산업적인 활용 가능성에 대해 많은 관심을 받아 왔다. 그 이유는 대부분이 목재 부후균인 백색부후균은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스뿐만 아니라 리그닌도 분해하여 CO₂로 전환시킬 수 있기 때문이다. 특히 리그닌을 분해하는 효소는 리그닌뿐만 아니라 다양한 범주의 난분해성 유해화합물을 분해하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다. 대표적 리그닌 분해 효소로는 laccase, lignin peroxidases (LiPs), manganese peroxidases (MnPs) 등이 알려져 있고 이들 세 가지 리그닌 분해효소는 백색부후균에 의한 분해 기작에 중요한 역할을 한다고 이미 보고되었다(Xiao *et al.*, 2003). 이 효소들 중 laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase: EC. 1.10.3.2)는 물에 녹아 있는 산소 분자를 사용하여 폐활성 화합물의 산화를 촉진하는 효소이며 산소는 산화반응에서 물로 환원된다. 그러므로 laccase는 2,6-dimethoxyphenol 또는 guaiacol과 같은 monophenols을 쉽게 분해할 수 있으며, syringaldazine과 같은 diphenol은 laccase만이 유일하게 분해할 수 있는 능력이 있으므로 diphenol oxidase라고 불리기도 한다(Harkin *et al.*, 1974). Laccase의 생물학적 기능은 매우 다양하다. 그 중 가장 잘 알려진 기능은 Lip, MnP와 함께 리그닌 분해에 관여하는 것이다. 그 외에도 여러 가지 외부 자극에 대한 방어 기작을 보여줌으로써 미생물이 병원성을 갖게 하는 것이다. 이러한 다양한 기능과 낮은 기질특이성 때문에 bio-

bleaching, textile dye bleaching, phenolics removal, 폐수탈색 등의 산업효소로써 사용되어 질 수 있는 높은 잠재력을 지니고 있다(Nyanhongo *et al.*, 2002; Shin, 2004; Cho *et al.*, 2004).

이에 본 연구에서는 활성이 높은 여러 종류의 laccase 동위효소(isozyme)를 생산하는 것으로 알려진 *Trametes versicolor*로부터 한 종류의 laccase를 생산, 분리, 정제하여 그 효소 특성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

2.1.1. 공시균주

본 실험에서는 Canada, Forintek에서 분양받은 *Trametes. versicolor* 균주를 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 다음 4°C 냉장고에 보관 후 사용하였다.

2.1.2. 사용배지

T. versicolor 균사체로부터 laccase를 생산하기 위하여 액체배지인 potato dextrose broth (PDB) 합성배지를 사용하였으며, inducer로써 2,5-xylidine 을 사용하였다.

2.2. 방법

2.2.1. 균사배양

*T. versicolor*를 PDA 평판 배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 배지 상의 균사를 1 mm cork bore로 punching하여 얻은 균사 disk를 각각의 200 μl 액체배지에 균일하게 접종한 다음 25°C에서 120 rpm으로 5일간 진탕배양 후 laccase의 inducer로 2,5-xylidine을 첨가하여 2일간 더 배양하였다(최 등, 2006). 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다.

2.2.2. Laccase 분리 정제

배양이 끝난 균사배양액은 filter paper (Whatman No.2)를 이용하여 균사를 제거하고, glass filter (GF/C)로 다시 한 번 걸러낸 후 Viva flow 50 (cut-off 30,000)으로 12시간 동안 농축하였다. 농축된 laccase의 단백질 분리를 위하여 ion-exchange column (Hitrap Q FF, GE Healthcare)을 이용하였다.

2.2.3. 단백질량 측정

단백질 함량은 Bradford법(Bradford, 1976)을 이용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량 분석하였으며 BSA를 표준단백질로 사용하였다.

2.2.4. Laccase 활성 측정

정제된 laccase의 활성을 측정하기 위하여 0.5 mM syringaldazine (in methanol)을 25°C의 항온수조에 넣고 10분간 예열한 뒤 100 mM phosphate 완충액(pH 6.0) 1.99 ml와 예열시킨 syringaldazine 10 μl, 조효소액 1 ml를 잘 혼합하여 526 nm에서 흡광도를 측정하였다(Galliano *et al.*, 1991). 효소의 활성 단위는 분당 1 μ mole syringaldazine의 산화량을 1 unit로 정하였다.

2.2.5. 최적 pH와 온도 조건 측정

최적 pH는 조효소액 1 ml, 완충액 1.990 ml, substrate 10 μl를 혼합 후 10분 방치한 후 급냉한 다음

흡광도를 측정하여 초기 속도를 기준으로 최적 pH를 구하였다. 최적 온도는 조효소액과 완충액을 위와 동량 혼합 후 각 온도에서 10분 방치한 후 급냉한 다음 초기 속도를 측정하여 조사하였다.

2.2.6. 분자량 측정

Laemmli (1970) 방법에 따라 Polyacrylamide gel 전기 영동과 같은 조건에서 2% SDS를 포함하고 있는 12%의 Acrylamide stacking gel로 0.75 mm의 slab gel을 만들었으며 시료 완충 용액 20 μl에 효소 시료 10 μg씩을 녹여 2분간 100°C에서 중탕하였다. 이 시료를 slab gel에 가하여 120 V 직류전기로 전기 영동 후 Coomassie Brilliant Blue-R250 (0.1%) 용액으로 염색하여 단백질을 검증하였다. 또한 표준은 SDS low molecular weight marker (Sigma)를 사용하여 분자량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Inducer에 의한 Laccase 효소 유도

본 연구에서 이용된 공시균의 배지로는 PDB배지를 사용하였으며, 이 효소를 유도하기 위하여 공시균 접종 5일 후 laccase의 활성도를 증가시키기 위하여 2,5-xylidine (0.2 mM)을 첨가하여 2일간 더 배양하였다. 그 결과 inducer를 첨가한 날부터 laccase가 유도되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 균주의 Inducer로 2,5-xylidine을 첨가했을 때 *T. versicolor* 배양액으로부터 다양한 laccase 효소가 유도 분비되었음을 최 등(2006)을 포함한 여러 연구보고에서도 잘 나타나 있으며 inducer를 첨가하지 않은 배양액에서는 laccase 효소활성의 증가가 미미하였다(Leonowicz *et al.*, 1984).

3.2. 배양액 농축

이렇게 수확한 액체배지의 배양액을 filter로 걸러내어 균사체와 배양액을 분리해내고 배양액은 Viva

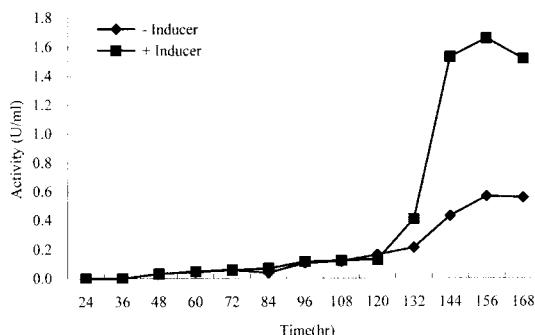


Fig. 1. Laccase production in culture of *T. versicolor*.

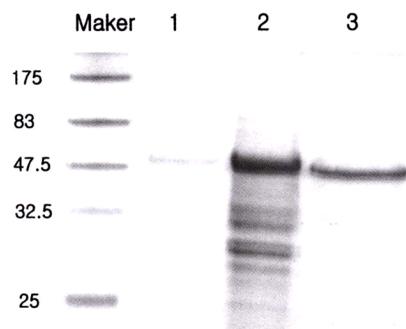


Fig. 2. SDS-PAGE of concentrated laccase I. Lines; 1: crude laccase, 2: concentrated laccase, 3: purified laccase. Standard molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. Protein was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

flow 장치를 이용하여 분자량 30,000 이상의 단백질만을 농축하였다. 그 결과 배양액은 1,000 mL에서 75 mL로 약 13배 농축되었으며, 농도는 0.041 mg/mL에서 0.454 mg/mL로 약 11배 증가함을 볼 수 있었

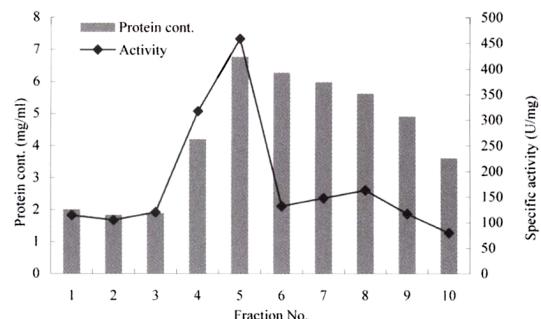


Fig. 3. Purification of laccase secreted from *T. versicolor* on Hitrap Q FF column.

다. 배양이 종료된 후 수확된 *T. versicolor*의 배양액에서 laccase의 specific activity는 농축 전 32.078 U/mg였으며 농축 후에는 409.262 U/mg였다(Table 1).

3.3. 이온교환 크로마토그라피에 의한 Laccase 정제

농축된 균체와 효소를 이온교환 크로마토그라피로 부분 정제하여 효소활성을 확인하여 본 결과, 분획 4 이후부터 protein 양은 지속적으로 빠져 나왔으나 분획 4와 5에서만 laccase의 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이렇게 활성이 확인된 분획들만을 모아 농축하였으며 specific activity를 측정한 결과 1243.458 U/mL을 나타내었다(Table 1). 이렇게 정제 농축된 laccase의 정제도와 분자량을 알아보기 위하여 SDS-PAGE 전기영동(10% polyacrylamid gel)을 실시하여 53 kDa 크기의 분자량을 갖는 단일한 band를 확인할 수 있었다(Fig. 2). Laccase의 활성이 높은 분획들은 함께 농축하여 다음 효소특성 실험을

Table 1. Purification of laccase from the culture of *T. versicolor*

	Volume (mL)	Protein content (mg/mL)	Activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)
Crude	1000	0.041	1326	32078
Concentration (Viva flow 50)	75	0.454	185.641	409.262
Ion-exchange chromatography	3	0.097	120.615	1243.458

Trametes versicolor 배양액으로부터 단리 정제된 Laccase의 효소적 특성

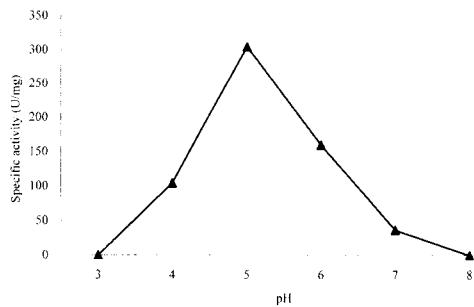


Fig. 4. Optimum pH of laccase from *T. versicolor*.

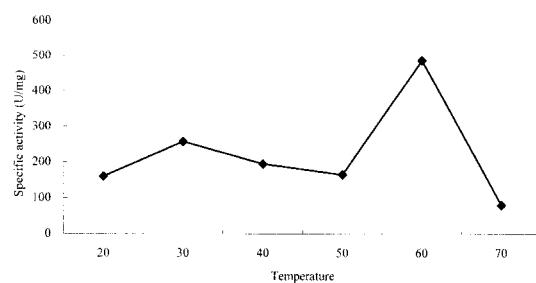


Fig. 5. Optimum Temperature of laccase from *T. versicolor*.

Table 2. The characterization of laccases from *T. versicolor*

	Lac I	Lac II	Lac III	Lac IV	Lac V
DNA (bp)	1580	1563	1563	1580	
Mw (kDa)	53~55	53	47~52	53.7	97
pH	5.0	3.0~4.0	3.6	*	3.0
Temperature	60	*	*	*	50
PI	6.5~6.7	4.7	4.06	4.2	*

위한 laccase원으로 사용하였다.

3.4. pH와 온도에 따른 Laccase 활성 측정

정제된 laccase의 효소 특성분석을 하기 위하여 pH와 온도 변화에 따른 효소활성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 이 실험에서 정제된 laccase 효소는 최적 pH는 5.0에서 높은 효소 활성을 나타내었다. 최적 온도는 60°C에서 높은 효소 활성을 나타내어 열에 안정된 효소의 특성을 보여주었다 (Fig. 5). 지금까지 *T. versicolor*에서 유래한 laccase는 복수의 효소 단백질들로서 등전점의 상위에 따라 Lac A나 Lac B로 나누어지거나 효소의 특성에 따라 Lac I, II, III, IV, V 등으로 분리되어지기도 한다. 대부분의 *T. versicolor*에서 유래한 laccase 효소들은 최적 pH가 3~4의 범위에 속하였으나 본 실험에서 생산된 laccase는 최적 pH가 5.0으로 중성에 가까운 약산성을 나타내었다(Table 2). 또한 효소의 활성과 온도에 대한 실험을 실시한 결과 60°C에서

가장 높은 활성을 보이다가 이후 급격히 활성이 감소하였다.

4. 결 론

*T. versicolor*를 배양할 때 inducer로 2,5-xylidine (0.2 M)을 첨가하여 laccase의 발현을 다양으로 유도하였다(Kollmann et al., 2005).

농축된 배양액의 laccase를 ion-exchange column (Hitrap Q FF)으로 정제하여 peak를 확인할 수 있었으며 SDS-PAGE에 의하여 단백질 band를 확인하여 본 결과 분자량이 약 50 kDa 정도 됨을 확인할 수 있었다. 이렇게 정제된 laccase의 특성을 조사하여 본 결과 최적 pH는 5.0이었고, 최적 온도는 60°C로 확인되었다.

다량으로 발현된 laccase는 extracellular enzyme이기 때문에 배양액의 농축이 필요하므로 본 연구에서는 ultrafilter (Viva flow 50, cutoff: 30,000)를 사용하여 12시간 농축하였을 때 약 13배 정도를 농축 할 수 있었다.

본 연구에서 정제된 laccas의 효소적 특성을 비교한 결과 laccase I type으로 사료되며 비교적 고온에 안정성을 지닌 효소로 확인되었다.

사 사

본 연구는 2006년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochim.* 72: 248~254.
- Cassland, P. and L. J. Jonsson. 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 392~400.
- Cho, N. S., J. M. Park, T. H. Choi, A. matuszewska, M. Jaszek, and A. Leonowicz. 1999. The effect of wood rotting fungi and laccase on destaining of dyes and KP bleaching effluent. *Mokchae Konghak*, 27(4): 72~79.
- Galliano, H., G. Gas, J. L. Seris, and A. M. Boudet. 1991. Lignin degradation by regidorporus lignosus involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzym. Micro. Technol.* 13: 478~482.
- Harkin, J. M., M. J. Larsen, and J. R. Obst. 1974. Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia*. 66: 469~476.
- Kollmann, A., F. D. Boyer, P. H. Ducrot, L. Kerhoas, C. Jolivalt, I. Touton, J. Einhorn, and C. Mouqin. 2005. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(2): 251~258.
- Leonowicz, A., R. V. Edgehill, and J. M. Bollag. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic vanillic acids by the laccase of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*, *Arch. Microb.* 137: 89~96.
- Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T₄*. *Nature* 227: 680~685.
- Nyanhongo, G. S., J. Gomes, G. M. Gubitz, R. Zvauya, J. Read, and W. Steiner. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly Isolate strain of *Trametes modesta*. *Water res.* 36(6): 1449~1456.
- Shin, K. S. 2004. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J. Microbiol.* 42(1): 37~41.
- Xiao, Y., X. Tu, J. Wang, M. Zhang, Q. Cheng, W. Zeng, and Y. Shi. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 700~707.
- 최유정, 신유수, 조남석. 2006. RBBR 탈색능을 이용한 목재 부후균의 선발 및 이들균의 laccase 효소 활성. *목재공학* 34(4): 46~53.