

## *Pleurotus ostreatus*에서 분비된 Laccase의 보결단 추정

윤홍덕 · 신광수\*\* · 강사옥 · 하영철 · 정가진 · 김규중\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

\*강릉대학교 생물학과

## Estimation of the Prosthetic Group of Laccase Secreted from *Pleurotus ostreatus*

Youn, Hong-Duk, Kwang-Soo Shin\*\*, Sa-Ouk Kang, Yung Chil Hah Gajin Jeong and Kyu-Jung Kim\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Seoul National University

\*Department of Biology, Kangreung National University

**ABSTRACT:** Extracellular laccase secreted from *Pleurotus ostreatus* was activated by  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu}^+$ . The enzyme was strongly inactivated by 8-hydroxyquinoline, potassium cyanide, sodium azide, sodium bisulfite and 2-mercaptoethanol. The two ionogenic groups, which have pKa values of 5.60-5.70 and 6.70-6.85 respectively, were found to relate with the active site of this enzyme. The oxidation reactions were brought about by initial single electron transfer process on the active site. The enzyme was found to be a metalloprotein which had about 3.9 cupric ions per molecule of protein as a prosthetic group. The enzyme showed a strong peak at 605 nm and a weak shoulder at 330 nm in UV-Visible absorption spectrum. Both signals disappeared upon treatment of the enzyme with 4 electron equivalent ascorbate. These results indicate that type I Cu peak and type III Cu shoulder are present in laccase.

**KEY WORDS** □ *Pleurotus ostreatus*, laccase, prosthetic group.

Laccase(benzenediol : oxygen oxidoreductase, E.C.1.10.3.2)는 고등식물체와 곰팡이에서 주로 발견되는 blue oxidase의 일종으로 페놀계열물질에서 1개의 전자를 빼내어 페놀라디칼을 형성하며 궁극적으로 4개의 전자를  $\text{O}_2$ 에 전달하는 작용기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Reinhammer, 1984). Laccase의 생리적 기능에 관해서는 아직 명확하지는 않으나 곰팡이에서는 자실체 형성에 관여하거나 (Betrand 등, 1895; Leonard, 1971; Leonard와 Phillips, 1973), 목재부후균이 리그닌 성분을 분해할 때 세포밖으로 분비하는 것으로 알려져 있다 (Fahraeus, 1952). Laccase의 보결단에 관한 연구는 옫나무(*Rhus* species)에서 순수분리된 laccase를 중심

으로 이루어져 왔다. *Rhus* laccase는 4개의 Cu이온을 가지고 있으며 이는 분광학적 특성에 따라 세 가지 형태로 나뉘어진다. Type I Cu는 610 nm에서 흡광을 가지고 전자스핀공명(Electron Paramagnetic Resonance, EPR) 스펙트럼에서는  $g_{11}$  지역에서 협소한 hyperfine splitting이 생기는 특성을 가지며, type II Cu는 tetragonal Cu(II) 복합체와 유사한 흡광을 보이며, type III Cu는 EPR-silent하므로 두 개의 Cu 이온이 antiferromagnetic coupling을 하고 있으리라 추정되고 있다(Reinhammer, 1981). 곰팡이에서 분리된 laccase의 EPR 스펙트럼은 *Neurospora crassa*에서 보고된 바가 있고(Froehner와 Eriksson, 1974), *Coriolus versicolor*에서는  $^{63}\text{Cu}$ 로 치환된 laccase를 이용하여 Cu와 ligand간의 상호관계를 보고한 바가 있다(Wrigley와 Gibson, 1987). 그러나 곰팡이 laccase의 보결단에 관한 연구는 다소 미진한 상태에 놓여 있다. 본 연구는 백색부후균의

\*\*현주소: 대전대학교 이과대학 미생물학과(Department of Microbiology, College of Sciences, Taejon University)

일종인 *Pleurotus ostreatus*에서 분리된 laccase의 보결단을 UV-Visible absorption spectroscopy를 이용하여 추정해 보았다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 한국 산림조합 연합회에서 분양받은 *P. ostreatus* (strain No. 4501)로서 potato agar dextrose slant에 접종, 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였으며 4주 간격으로 한천평판배지에서 계대배양하였다. 효소 정제를 위한 배지는 chloramphenicol (Sigma)을 34 mg·l<sup>-1</sup> 되게 첨가하고 antiform A (Sigma)를 0.05% (v/v) 되게 처리한 malt 배지 (malt extract (Difco) 10g·l<sup>-1</sup>, dextrose (Duksan chemical) 10g·l<sup>-1</sup>, yeast extract (Difco) 5g·l<sup>-1</sup>, Bacto-peptone (Difco) 5g·l<sup>-1</sup>)를 사용하였다. 액체배지용 접종균주는 직경 0.8 cm 콜크 천공기로 한천평판배지에서 10개의 원형시료를 따서 100 ml의 배지가 들어 있는 250 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 28°C에서 48시간 진탕배양한 후, omni-mixer (Du Pont Instrument)로 마쇄하여 그 현탁액을 1% (v/v) 되게 접종하여 28°C에서 진탕배양하였다. 효소 유도를 위해서는 배양 2일 후 유도물질로 ferulic acid (Sigma)를 1 mM 되게 첨가하였다 (Kim 등, 1987).

### 효소의 정제

Kim 등 (1987)의 방법을 다소 변형하여 효소를 정제하였다. 6일 동안 배양된 배지에서 균사체를 제거하고 여과액을 80% (w/v) ammonium sulfate 침전, protamine sulfate (Sigma)를 이용한 색소제거, DEAE Sephadex A-50 ion exchange (Pharmacia) chromatography, Sephadex G-100 (Pharmacia) chromatography, DEAE Sepharose CL-4B ion exchange (Pharmacia) chromatography, Concanavalin-A affinity (Pharmacia) chromatography 등의 과정을 통해 효소를 순수분리하였다.

### 효소활성 측정과 단백질 정량

Syringaldazine (4-hydroxy-3, 5-dimethoxybenzaldehydeazine, Sigma)을 기질로 사용한 방법을 변형하여 효소활성을 측정하였다 (Leonowicz와 Grzywnowics, 1981). 40 mM 2(N-morpholine)ethane sulfonic acid (MES)-NaOH 완충용액 (pH 5.5) 2.5 ml, 에탄올에 녹인 0.5 mM syringaldazine 0.3 ml/과 효소용액 0.2 ml/을 섞어 최종부피가 3 ml/이 되도록 한 다음, 30°C에서 5분간 반응시킨 후 1 cm 큐벳으로 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성단위는 위의 조건에서 분당 1 nmol의 반응산물 생성을 촉매할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 정하였다. 단백질 정량을 위해서는 Lowry 등 (1951)의 방법을 사용하였고 표준단백질로는 bovine serum albumin (Sigma)을 사용하였다.

### Single-electron transfer 확인

20 mM 인산완충용액 (pH 6.5)에 정제한 10 mM

ferulic acid를 녹여 순수한 산소를 충분히 흘려준 후 반응용액 1 ml/에 효소용액 (150 units)과 1 mM ceric ammonium nitrate (CAN)을 각각 처리하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 HPLC로 분석하였다. 사용한 컬럼은 Hibar Lichrosorb RP-18 (10 μm, Merck), 용출속도는 1 ml·min<sup>-1</sup>, 용매는 water : acetonitrile : acetate = 76 : 24 : 1 (v/v/v)이었고 반응산물은 254 nm에서 Waters Model 441 Detector로 검출하여 Waters Model 741 Integrator로 정량분석하였다.

### 구리이온 함량 측정

Brumby와 Massey (1967)의 방법에 따라 구리이온 함량을 측정하였다. 효소시료 0.3 mg를 20 mM 인산 완충용액 (pH 7.0) 1 ml/에 녹여 시험관에 넣고 빙초산에 녹인 0.1% (w/v) 2,2'-biquinoline (Sigma) 용액 1 ml/과 동일 완충용액에 녹인 10% (w/v) hydroxylamine hydrochloride (Fisher) 0.5 ml/을 섞어 적당하게 흔들어서 5분 동안 세워 둔 후 0.95 ml/의 에탄올을 섞어 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기에 사용한 모든 유리조차는 왕수에 하룻동안 담겨둔 후 Millipore-Q grade 탈이온수로 여러번 세척한 후 사용하였다. 완충용액은 chelating resin (Sigma)이 충전된 컬럼 (1×8 cm)에서 용출시켜 사용하였다.

### 효소의 분광학적 분석

자외-가시 흡광 스펙트럼 (UV-Visible absorption spectrum)은 Shimadzu UV-265 spectrophotometer를 사용하여 30°C에서 행하였다. 100 mM 아세트산 완충용액 (pH 5.0) 1 ml/에 순수분리된 효소 2.9 mg을 녹여 흡광 스펙트럼을 관찰하였다. 효소의 환원을 위해서는 4 전자당량에 해당하는 ascorbate (Merck)를 처리하여 위와 동일한 조건으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소활성에 대한 저해제와 금속염의 영향

여러 가지 저해제가 효소활성에 끼치는 영향을 조사하였다 (Table 1). Potassium cyanide, 2-mercaptoethanol, sodium azide, sodium bisulfite 등이 억제 효과가 컸으며 금속 칼레이트 물질 중에서는 8-hydroxyquinoline이 억제 효과가 컸으나, 2,2'-dipyridyl, o-phenanthroline, EDTA는 상대적으로 억제 효과가 크지 않았다. 라디칼 제거제로 알려진 thiourea는 다소의 억제 효과를 보였다. 여러 가지 금속이온이 효소활성에 끼치는 영향을 조사하였다 (Table 2). 금속이온 중에는 Cu<sup>2+</sup>와 Cu<sup>+</sup>가 효소활성을 거의 두배 정도로 증가시켰는데 이는 순수분리된 효소 중 일부는 apoenzyme의 형태로 존재하였기 때문이 아닌가 생각한다. 그러나, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>는 억제 효과를 나타내었으며, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>는 효소활성에 별 영향을 주지 않았다. *Alternaria tenuis*에서 분리된 polyphenol oxidase (Motoda, 1979)의 경우도 본

**Table 1.** Effects of various reagents on the *P. ostreatus* laccase activity<sup>a</sup>

Reagent	Relativity activity(%)
None	100.0
Thiourea	88.4
2,2'-Dipyridyl	88.1
EDTA	86.2
Sodium dodecyl sulfate	83.9
<i>o</i> -Phenanthroline	76.0
8-Hydroxyquinoline	2.9
Potassium cyanide	0.0
Sodium azide	0.0
Sodium bisulfite	0.0
2-Mercaptoethanol	0.0

<sup>a</sup>The enzyme activity was determined using the standard assay system in the presence of reagent in final concentration of 1 mM. The enzyme solution(9.5 units) was incubated with each reagent for 10 minutes at 30°C prior to the addition of substrate.

**Table 2.** Effects of metal salts on the *P. ostreatus* laccase activity<sup>a</sup>

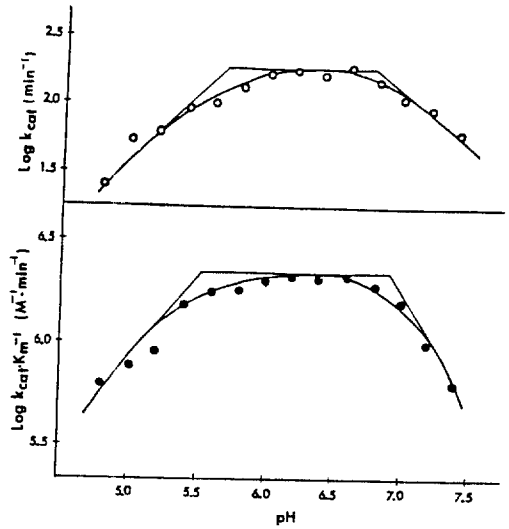
Metal salts	Relativity activity(%)
None	100.0
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	204.2
CuCl	184.3
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	121.2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	105.4
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	102.2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	101.8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	92.8
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	57.2
AgNO <sub>3</sub>	19.7
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9.6
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.3
HgCl <sub>2</sub>	0.0

<sup>a</sup>The enzyme activity was determined using the standard assay system in the presence of metal salt in a final concentration of 1 mM. The enzyme solution(9.5 units) was incubated with each metal salt for 10 minutes at 30°C prior to the addition of substrate.

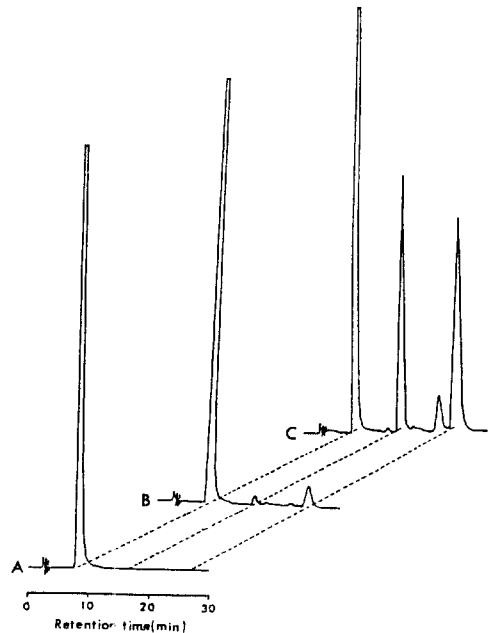
효소와 비슷한 양상을 보였다.

**효소활성에 대한 pH의 영향**

효소활성에 대한 pH 영향을 조사하기 위해 pH 4.8-7.4 사이를 0.2 pH 단위로 나누어 각 pH에서 syringaldazine을 기질로 하여 steady-state kinetic parameter인  $k_{cat}$ 과  $k_{cat}/K_m$ 을 구하여 그 상용대수값을 pH에 대해 plot하였다(Fig. 1). 그 결과, 본 효소에는 pKa 값이 5.60-5.70 정도인 ionogenic group과 6.70-



**Fig. 1.** pH profiles of steady-state kinetic parameters  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_m$  for the oxidation of syringaldazine catalyzed by *P. ostreatus* laccase.



**Fig. 2.** HPLC analysis of single-electron transfer. The products of the reaction between (B) 10 mM ferulic acid and 1 mM CAN, and (C) 10 mM ferulic acid and *P. ostreatus* laccase. (A) 10 mM ferulic acid prior to the reaction.

6.86 정도의 ionogenic group이 활성부위에 관련되어 있으며 이들이 효소활성을 조절하는 것으로 보인다. Single-electron transfer **확인**

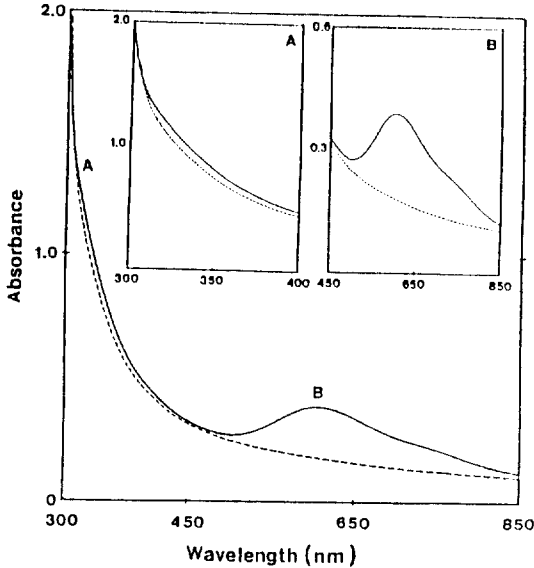


Fig. 3. UV-Visible absorption spectra of *P. ostreatus* laccase.

Spectra of the enzyme ( $2.9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) dissolved in 100 mM acetate buffer were scanned at  $30^\circ\text{C}$ . Type III Cu signal (A) appeared as a shoulder at 330 nm and type I Cu signal (B) appeared as a peak at 605 nm. Both signals disappeared when the enzyme was treated with 4 e<sup>-</sup> equivalent ascorbate. Solid line: native enzyme, dashed line: enzyme treated with ascorbate.

본 효소의 기질과의 전자전달 체계를 확인하기 위해 ferulic acid를 기질로 하여 HPLC로 분석하였다. Fig. 2에서 (A)는 대조구로서 효소를 처리하지 않은 상태의 ferulic acid이며 (B)는 single-electron transfer process를 하는 화학 촉매로 알려진 CAN을 1 mM되게 처리하여 1시간 동안 반응시킨 양상이며

(C)는 본 효소(100 units)를 처리하여 같은 조건에서 반응시킨 양상이다. (B)와 (C)를 비교하여 보았을 때 반응산물의 양은 다르지만 그 양상은 동일하였다. 따라서 본 효소는 single-electron transfer를 하는 것으로 추정된다.

**효소의 구리이온 함량과 분광학적 분석**

Brumby와 Massey(1967)의 방법에 따라 신뢰도 (r)가 0.980인 표준직선을 얻었고 이를 기준으로 효소 0.3 mg에 대해 구리이온은 1.1  $\mu\text{g}$ 이 존재하였다 따라서 본 효소에 존재하는 구리이온은 0.36%(w/w) [ $3.9 \text{ Cu}^{2+}/\text{monomer}$ ]이었다. 대조구로서 단백질 분자당 8개의  $\text{Cu}^{2+}$ 가 존재한다고 알려진 ascorbate oxidase (Boehringer Mannheim Biochemica)는 7.7개의  $\text{Cu}^{2+}$ 가 검출되었다(Reinhammar, 1984). *Agaricus bisporus*는 구리이온을 2개 가지고 있고 효소용액은 옅은 노란색을 나타내다는 보고(Wood, 1980)를 제외하면 대부분의 laccase는 단백질 분자당 4개의 구리이온을 내포하고 있는 것으로 알려져 있다. 순수 분리된 효소의 흡광 스펙트럼에서 330 nm의 weak shoulder(Fig. 3A)와 605 nm의 strong peak(Fig. 3 B)가 관찰되었다. 330 nm의 shoulder는 주변 파장에서 강한 흡광을 갖는 단백질 자체의 흡광물질 즉, 방향족 아미노산 등의 간섭으로 강한 peak를 이루지 못하는 특성을 갖게 된다. 본 효소의 흡광 스펙트럼을 *Corioliolus versicolor*와 *Rhus vernicifera* laccase (Malmström 등, 1968; Reinhammar, 1981)의 흡광 스펙트럼과 상호비교하면 거의 유사함을 알 수 있으며, 따라서 본 효소도 일단 type I Cu peak와 type III Cu shoulder가 존재하리라고 추정할 수 있다. 그리고 4 전자당량의 ascorbate를 처리하였을 때 두 시그날이 모두 사라졌다. 이는 어떤 형태로든 두 종류의 구리이온은 전자전달에 관련되어 있다고 추정할 수 있다. 그러나 자외-가시 흡광 스펙트럼으로는 type II Cu의 존재를 확인할 수 없고 type III Cu의 존재를 명확히 설명할 수 없다. 따라서 이들의 존재여부는 앞으로 EPR을 이용하여 보다 명확히 확인하여야할 것이다.

**적 요**

*Pleurotus ostreatus*에서 분리된 laccase의 활성은  $\text{Cu}^{2+}$ 와  $\text{Cu}^+$ 에 의해 증대되고 8-hydroxyquinoline, potassium cyanide, sodium azide, sodium bisulfite와 2-mercaptoethanol에 의해서는 억제되었다. pKa 값이 5.60-5.70과 6.70-6.85인 두 ionogenic group이 효소 활성부위에 존재하며 이들이 효소 활성 조절에 관여하는 것으로 추정된다. 효소의 산화반응은 single-electron transfer 과정에 의해 이루어지며 본 효소에는 보결단으로 단백질 분자당 약 3.8개의 구리이온이 존재하였다. 자외-가시 흡광 스펙트럼에서는 605 nm의 strong peak와 330 nm의 weak shoulder가 관찰되었고 이는 각각 type I Cu peak와 type III Cu shoulder에 해당된다.

**사 사**

본 논문은 교육부 기초과학연구소 학술조성연구비 (1989~1990)에 의해 수행되었다.

**REFERENCES**

1. Bertrand, G. and E. Bourquelot, 1895. La laccase

- dans les champignons. *C. R. Soc. Biol.* **47**, 579.
2. **Brumby, P.E. and V. Massey**, 1967. Copper determination. *Methods in Enzymol.* Vol. **10**, 471-474.
  3. **Fahraeus, G.** 1952. Formation of laccase by *Polyporus versicolor* in different media. *Physiol. Plant.* **5**, 284-291.
  4. **Forehner, S.C. and K.E. Eriksson.** 1974. Purification and properties on *Neurospora crassa* laccase. *J. Bacteriol.* **120**, 458-465.
  5. **Kim, K.J., K.S. Shin, J.S. Maeng, S.O. Kang, Y.C. Han and S.W. Hong**, 1987. Characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**, 148-156.
  6. **Leonard, T.J.**, 1971. Phenoloxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* **106**, 162-167.
  7. **Leonard, T.J. and L.B. Phillips**, 1973. Study of phenoloxidase activity during the reproductive cycle in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* **114**, 7-10.
  8. **Lenowicz, A. and K. Grzywniowicz**, 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme. Microb. Technol.* **3**, 55-58.
  9. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall**, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  10. **Malmstrom, B.G., B. Reinhammar and T. Vanngard**, 1968. Two forms of copper(II) in fungal laccase. *Biochem. Biophys. Acta* **156**, 67-76.
  11. **Motoda, S.** 1979. Properties of polyphenol oxidase from *Alternaria tenuis*. *J. Ferment. Technol.* **57**, 79-85.
  12. **Reinhammar, B.** 1981. An epr signal from the half-reduced type III copper pair in *Rhus vernicifera* laccase. *J. Inorg. Biochem.* **15**, 27-39.
  13. **Reinhammar, B.** 1984. Laccase, in Copper proteins and copper enzymes. Vol. III, ed. R. Lontie. Chap. 1. Boca Raton: CRC press.
  14. **Wood, D.A.**, 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**, 327-338.
  15. **Wrigley, S.K. and J.F. Gibson**, 1987. Electron paramagnetic resonance studies of type I copper in type 2 depleted fungal laccase A. *Biochim. Biophys. Acta* **915**, 259-264.

(Received June 5, 1991)

(Accepted August 27, 1991)