

*Lentinus edodes*에서 분비되는 Laccase의 특성

정인범 · 윤홍덕 · 맹진수 · 강사옥 · 하영철 · 정가진 · 최형태¹ · 김재현²

서울대학교 자연과학대학 미생물학과
¹강원대학교 자연과학대학 미생물학과
²단국대학교 자연과학대학 미생물학과

*Lentinus edodes*에서 분비된 laccase를 DEAE Sephadex A-50, Con A-Sepharose, Sephadex G-150 크로마토그래피를 통해서 순수분리하였다. 순수분리된 효소는 분자량이 87 KDa 정도인 하나의 소단위체로 되어 있고, 12.0%의 당을 함유하고 있었다. 그리고 N-말단 아미노산 서열은 *Pleurotus ostreatus*와 *Coriolus hirsutus*의 laccase와 유사하였다. 효소의 최적 pH는 4.8이고 최적 온도는 40°C이었다. 그리고 본 효소는 pH 7~9와 30°C 이하에서 비교적 안정하였다. Syringaldazine에 대한 K_M 은 0.4 μ M이었고 k_{cat} 은 77 sec⁻¹이었다. Thin layer chromatography에 의한 본 효소의 반응산물들의 분리양상이 *Pleurotus ostreatus*의 laccase의 경우와 유사하였다.

KEY WORDS □ *Lentinus edodes*, laccase, molecular mass, N-terminal amino acid sequence

Laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 주로 고등식물이나 균류에서 발견되는 multi-copper, blue oxidase의 일종으로 케놀계열 물질에서 1개의 전자를 이탈시켜 케놀 라디칼을 형성하며, 궁극적으로 4개의 전자를 O₂에 전달하는 작용 메커니즘을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (25). Laccase는 리그닌을 잘 분해하는 백색부후균에서 널리 존재하는데 (13) 지금까지 laccase가 분리된 대표적인 균류들은 *Coriolus versicolor* (23), *Neurospora crassa* (6), *Podospira anserina* (22), *Agaricus bisporus* (30), *Aspergillus nidulans* (18), *Rigidosporus lignosus* (7), *Pleurotus ostreatus* (10, 26), *Phlebia radiata* (24) 등이다. *Lentinus edodes*에서는, *L. edodes* RA-3-2E와 *L. edodes* JA01에서 laccase의 활성이 확인된 바 있다 (19, 27).

균류의 laccase는 lignin의 중합화와 탈중합화 현상에 모두 관여하고 있으며(2, 14), *in vitro* 상태에서는 lignosulfonates의 분자량의 크기에 따라 중합화와 탈중합화가 결정된다 (20). 하지만 생리적 측면에서 균류가 lignin을 합성할 필요가 없기 때문에 중합화 현상은 *in vivo* 상태에서는 중요한 반응이 아니며(14) 생체내에서는 라디칼이 아주 빨리 산화되거나 (15), cellobiose:quinone oxidoreductase (CBQase)나 glucose oxidase에 의해 라디칼의 농도가 감소된다고 추정하고 있다 (28, 29). 최근에 *Coriolus versicolor*의 laccase가 lignin model compound의 C_α-C_β bond와 alkyl-aryl bond를 끊으며 C_α oxidation을 하는 것이 확인되었다 (9). 또한 lignin의 phenolic moiety뿐만 아니라 non-phenolic moiety도 laccase의 primary substrate가 같이 존재할 때는

산화시킬 수 있다는 것이 제안되었다 (3).

본 연구실에서는 *Pleurotus ostreatus*로부터 분비되는 laccase를 순수분리하여 ferulic acid와 저분자량의 lignosulfonates에 반응시켜서 중합화현상을 관찰하였고 (11, 12) glucose oxidizing enzyme들과의 상호작용을 연구한 바 있다(10). 본 연구에서는 *Lentinus edodes* ATCC 48085의 세포외 laccase를 순수분리하고 그 기본적인 특성, N-terminal amino acid sequence, 반응양상 등을 연구하여 lignin의 분해기작을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 *Lentinus edodes* ATCC 48085 로서 potato dextrose agar slant에 접종, 22°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였으며, 4주간격으로 한천배지에서 계대배양하였다. 효소정제를 위한 배지는 항생제인 chloramphenicol (Sigma)를 34 mg/되게 첨가하고, antifoaming agent (Sigma)를 0.05% (v/v)되게 처리한 malt배지 (liter당, malt extract; 20 g, dextrose; 10 g, yeast extract; 5 g, bacto peptone; 5 g, pH 4.5)를 사용하였다.

액체배지용 집중 균주는 직경 0.8 cm 콜크 천공기로 한천 평판배지에서 10개의 원형시료를 따서 100 ml의 배지가 들어 있는 250 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 25°C에서 진탕배양한 후, omni-mixer (Dupont)로 마쇄하여 그 현탁액을 5%되게 접종하여 25°C에서 진탕배양하였다. Laccase의 생성 촉진을 위해 gallic acid(Kanto)를 1 mM 되게 처리하였다.

2. 효소활성도 측정 및 단백질 정량

Syringaldazine (Sigma)을 기질로 사용하여 효소의 활성을 측정하였다 (31). 0.04 M 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid (MES)-NaOH 완충용액 (pH 5.5) 2.5 ml, 에탄올에 녹인 0.5 mM syringaldazine 0.3 ml과 효소용액 0.2 ml을 섞어 30°C에서 5 분간 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응은 반응용액에 syringaldazine을 넣어줌으로써 시작하였다. 효소의 활성단위는 이 조건에서 분당 1 nmol의 반응산물 생성을 촉매할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

단백질 정량은 280 nm에서 흡광도를 측정하거나, Lowry (21) 또는 Bradford (4)의 방법을 사용하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다.

3. 효소의 정제

(1) 조효소의 제제

15일동안 균을 배양하여 malt배지에서 거어조로 균사체를 제거하고 여과액에 황산암모늄을 80%되게 처리한 후, 12,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 이 때 얻은 침전물을 0.02 M 인산완충용액 (pH 7.0)에 녹여 24시간동안 동일한 완충용액에서 투석시킨 후 freeze dryer (Labconco 4451F)로 건조시켜 -60°C에서 보관하였다.

(2) DEAE-Sephadex A-50 이온 교환 크로마토그래피.

0.02 M 인산완충용액 (pH 7.0)에 녹인 시료 50 ml을 DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia) 이온 교환 크로마토그래피로 분리하였다. 동일 완충용액으로 세척한 컬럼 (3.8×20 cm)에 시료를 얹고 1,000 ml의 동일 완충용액으로 세척한 뒤 NaCl 0~0.7 M의 일정 농도 기울기로 용출시켰다. 용출속도는 40 ml/h 이었고 5 ml/씩 분획하였다.

(3) Con A-Sepharose 친화 크로마토그래피

Con A-Sepharose (Pharmacia)를 컬럼 (1.4×15 cm)에 충전하여 0.02 M Tris-HCl (pH 7.0)완충용액으로 세척하고 농축된 시료를 얹은 후 200 ml의 동일 완충용액으로 용출된 뒤 α -methylmannose 0~0.2 M의 일정 농도기울기로 용출시켰다. 용출속도는 10 ml/h 이었고 5 ml/씩 분획하였다.

(4) Sephadex G-150 젤 여과 크로마토그래피

Sephadex G-150 (Pharmacia)을 컬럼 (2.2×120 cm)에 충전하여 0.02 M 인산완충용액 (pH 7.0)으로 세척하고 농축된 시료를 얹은 후 동일완충용액으로 용출시켰다. 용출속도는 8 ml/h 이었고 5 ml/씩 분획하였다.

4. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동

Lambin (17)의 방법을 변형하여 SDS discontinuous buffer system 으로 acrylamide의 총 농도는 5~10%, bisacrylamide의 농도는 2.7%인 linear gradient slab gel을 사용하였다. 시료는 10% sucrose,

2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol과 0.002% bromophenol blue가 들어 있는 62.5 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 6.8)에 넣고 100°C에서 5 분간 증탕한 후 사용하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 α_2 -macroglobulin(170 KDa; reduced form), phosphorylase b(97.5 KDa), glutamate dehydrogenase (55.4 KDa), lactate dehydrogenase (36.5 KDa), 그리고 trypsin inhibitor (20.1 KDa) (이상 Boehringer Mannheim)을 사용하였다.

5. 젤 여과 크로마토그래피에 의한 효소의 분자량 측정

Sephadex G-150(Pharmacia)을 컬럼 (2.2×120 cm)에 충전하여 0.02 M 인산완충용액 (pH 7.0)으로 세척하고 순수분리한 효소와 표준단백질로는 blue dextran (2,000 KDa, Sigma), catalase (240 KDa), aldolase(158 KDa), albumin(45 KDa, aus Hühnere), 그리고 chymotrypsinogen(25 KDa) (이상 Boehringer Mannheim)을 얹고 동일 완충용액으로 용출시켰다. 용출속도는 5.0 ml/h이었고 5.0 ml/씩 분획하였다. 이 때 단백질들의 K_{av} 값을 산정하여 이것을 분자량의 상용대수 값에 대하여 회귀곡선을 그려 효소의 분자량을 추정하였다.

6. N-terminal amino acid sequence 결정

순수분리한 laccase가 담겨있는 완충용액을 ultrafiltration (PM10 membrane, Amicon)을 통해 증류수로 치환하여 농축한 것 (170 pmol)을 MilliGen/Biosearch 6600 ProSequencer Protein Sequencing System (Millipore)으로 결정하였다.

7. 효소의 당 함량 측정

Dubois 등 (5)의 방법에 따라 순수분리된 효소에 5% phenol 수용액과 황산을 처리한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 당 함량을 측정하였다. 표준당으로는 포도당 (Fluka)을 0.02 M 인산완충용액 (pH 7.0)에 녹여 사용하였다.

8. 효소활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 20~50°C 사이의 온도에서 앞에서 언급한 방법으로 효소의 활성을 측정하였다. 효소의 활성화에너지는 Arrhenius공식으로 계산하였다. 효소의 열안정성은 기질이 없는 0.02 M의 인산완충용액 (pH 7.0)에 효소를 넣고 5~55°C에서 30분간 처리한 후 앞에서 언급한 방법에 따라 효소의 활성도를 측정하였다.

효소의 활성에 대한 pH의 영향은 pH 3.6~6.6 사이의 시트르산-인산완충용액을 0.2 pH 단위별로 만들어 각각의 pH에서 활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성은 기질이 없는 0.2 M boric acid, 0.05 M citric acid, 0.1 M trisodium orthophosphate 완충용액 pH 2~12에 각각 넣고 4°C에서 20시간 처리한 후 앞에서 언급한 방법에 따라 효소의 활성도를 측정하였다.

9. K_M 및 V_{max} 값 측정

순수분리된 laccase의 syringaldazine에 대한 K_M

및 V_{max} 를 측정하기 위해 여러 기질농도에서 효소활성도를 측정하였다. 기질의 농도 범위는 1~20 μ M로 하였고 K_M 및 V_{max} 값은 Lineweaver-Burk plot에서 산출하였다.

10. 효소의 기질특이성 조사

기질에 대한 반응여부를 알기 위해 각각의 기질을 0.02 M 초산완충용액 (pH 4.8) 3 ml에 1 mM이 되도록 녹인 다음 효소 20 units를 처리하여 30 °C에서 UV/visible spectrophotometer (Shimadzu UV 265)로 스펙트럼 변화를 관찰하였다. 효소의 기질로서, anthranillic acid, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid, 2,6-dichlorophenol indophenol, 2,2'-dihydroxybiphenol, *o*-dianisidine, L- β -3,4-dihydroxyphenylalanine, ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, pyrogallol, protocatechuic acid, syringic acid, sulfanilamide, syringaldazine, N,N,N',N'-tetramethylbenzidine, N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, vanillic acid (이상 Sigma), 2,4-dichlorophenol, 3,4-dimethoxybenzyl alcohol, hydroquinone, *o*-phenylenediamine (이상 Aldrich), gallic acid, α -naphthyl amine, 1-naphthol, *p*-nitrophenol, L-phenylalanine (이상 Kanto), catechol, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitrophenylhydrazine, tyrosine (이상 Wako), *p*-aminobenzoic acid, diphenylamine, orcinol (이상 Katayama), 4-dimethyl aminobenzaldehyde (Fluka), vanillin (Fisher), sinapic acid (Carl Roth), sulfanilic acid (Junsei), 8-hydroxyquinoline (Hayashi)를 사용하였다.

11. Thin layer chromatography (TLC)에 의한 반응산물 분석

0.02 M 초산 완충용액 (pH 4.8)에 기질을 10 mM 되게 녹인 후 이 용액 10 ml에 순수분리된 laccase 200 units를 넣고 30°C에서 반응시키면서 일정시간별로 효소반응액을 TLC plate에 적하하여 반응생성물의 변화를 관찰하였다. 반응생성물의 분리양상은 UV-transilluminator (Ultra-Violet Product INC.

Model C-62)로 확인하였다. 전개용매로는 benzene (Merck):dioxane (Wako):acetic acid (Junsei)=90 : 25 : 4 (v/v/v)를 사용하였고 (20), TLC plate는 aluminium sheet (silica gel 60 F₂₅₄, Merck)를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Laccase의 분리

배양 여액을 황산암모늄 처리, DEAE Sephadex A-50, Con A-Sepharose 및 Sephadex G-150 겔 크로마토그래피를 수행한 결과, Table 1 과 같이 18 %의 수율에 specific activity가 1,100배 증가 하였다. 이상에서 분리한 효소를 SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 하였을 때 단일 밴드로 나타났다 (Fig. 1).

2. 분자량

5~10% SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동의 결과로 계산하여 본 효소의 분자량을 87 KDa으로 추정하였다 (Fig. 1). 그리고 본 효소가 polymeric protein인지를 알아보기 위하여 Sephadex G-150 겔 여과 크로마토그래피를 하여 분자량을 측정하였는데 앞의 경우와 유사한 값인 85 KDa으로 측정되어 하나의 단위체로 이루어진 단백질이라고 추정되며 여기서 분자량의 차이가 생긴 것은 이 효소가 당 단백질이기 때문에 전기영동상에서 전개가 지연되었기 때문이라고 생각된다. 대부분의 균류의 laccase는 60~100 KDa정도인데 (25) 본 효소도 이 범위에 해당된다. 그리고 *Pleurotus ostreatus*의 laccase(31)보다 24 KDa정도 큰 단백질이다.

3. N-말단 아미노산 서열과 당 함량

본 laccase의 N-말단 아미노산 서열은 다음과 같다.

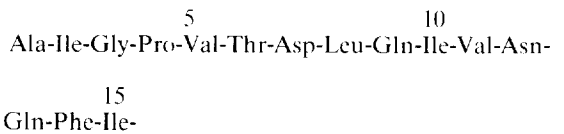


Table 1. Purification step of laccase from *Lentinus edodes* ATCC 48085

Purification Step	Total Protein (mg)	Enzyme Activity (unit)	Specific Activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification Fold
Culture Filtrate	1,110.00	112,000	100	100	1.0
Ammonium Sulfate Precipitation	189.00	103,000	545	92	5.5
DEAE-Sephadex A-50 Chromatography	12.00	46,000	3,800	41	17.0
Con A-Sepharose Chromatography	1.90	35,000	18,000	31	180.0
Sephadex G-150 Chromatography	0.18	20,000	110,000	18	1,100.0

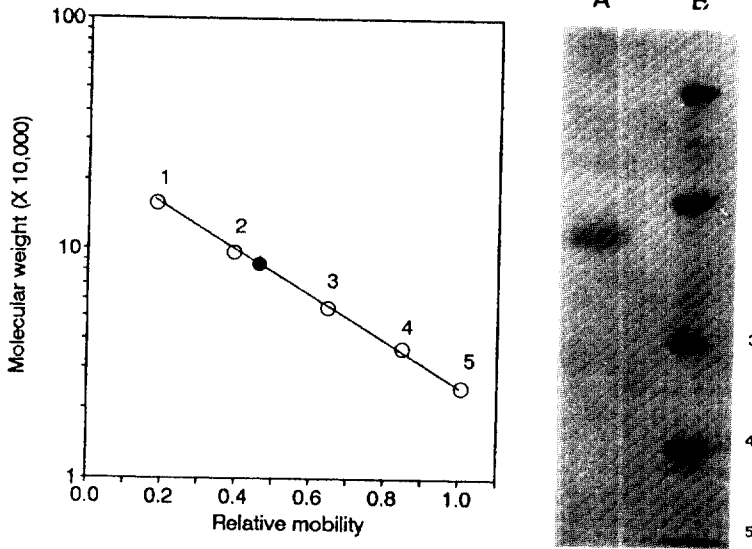


Fig. 1. SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis of laccase. 5-10% linear gradient gel(2.7% bis-acrylamide) was used. Lane A:Laccase, Lane B:Molecular Weight Markers. 1. α_2 -Macroglobulin (170 KDa:reduced); 2. Phosphorylase b(97.4 KDa); 3. Glutamate Dehydroge nase(55.4 KDa); 4. Lactate Dehydrogenase(36.5 KDa); 5. Trypsin Inhibitor (20.1 KDa). The insert shows a calibration standard curve. Symbols, ●: Laccase, ○: Molecular Weight Markers.

Fungi	Sequence and Sequence homology
<i>Lentinus edodes</i> ATCC 48085	A I G P V T D L Q I V N Q F I
<i>Pleurotus ostreatus</i> strain 3004	A I G S A G N T Y I V N Q D V
<i>Pleurotus ostreatus</i> NFFA 4501	A I G P T G N M Y I V
<i>Coriolus hirsutus</i> IFO 4917	A I G P T A D L T I S N A E V
<i>Neurospora crassa</i>	G G G G G C N S P T N R D C W

Fig. 2. N-Terminal sequence for the first 15 amino acids of laccase isolated from *L. edodes* cultures grown on a malt extract media and homology with amino acid sequences for the laccase from other fungi. Boxed areas show regions of sequence identity.

이것을 이미 밝혀진 다른 균류들의 laccase의 N-말단 아미노산 서열과 비교하면 자낭균인 *Neurospora crassa*의 laccase (8)보다 담자균인 *Pleurotus ostreatus* (26)와 *Coriolus hirsutus* (16)와 더 유사하다 (Fig.2).

Dubois 등 (5)의 방법에 따라 당 함량을 측정할 결과, 본 효소 20 μ g을 처리했을 때 2.4 μ g의 당이

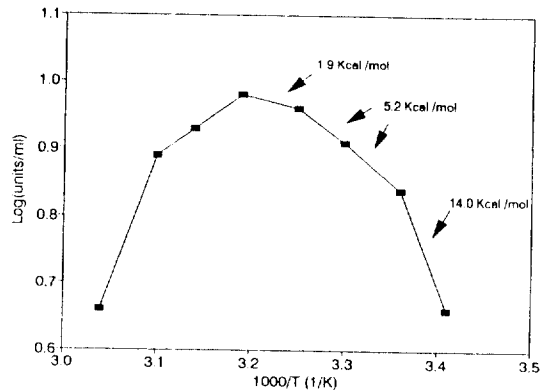


Fig. 3. Arrhenius plot of laccase from *Lentinus edodes* ATCC 48085.

검출되어 본 효소에 내재하는 당 함량은 12.0%로 추정되었다. 이는 *Pleurotus ostreatus*의 laccase (31)와 유사한 값이다.

4. 효소활성에 대한 온도와 pH의 영향

20~50°C 사이의 온도에서 효소의 활성을 측정하였더니 40°C에서 활성이 가장 높았다. 온도에 따른 활성화에너지는 20~25°C에서 14 kcal/mol, 25~35°C에서 5.2 kcal/mol, 35~40°C에서 1.9 kcal/mol이었고 40°C 이상에서는 효소가 급격히 불활성화되는

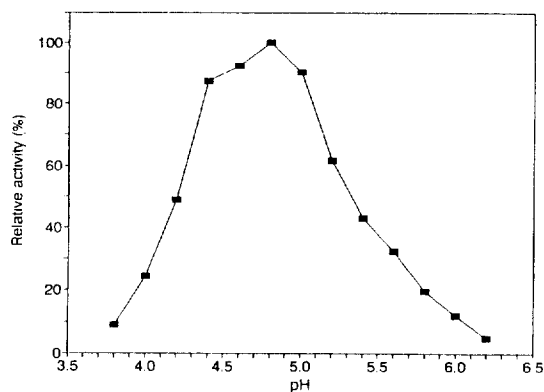


Fig. 4. Optimal pH of laccase. Citrate-phosphate buffer was used as reaction buffer and syringaldazine was used as substrate.

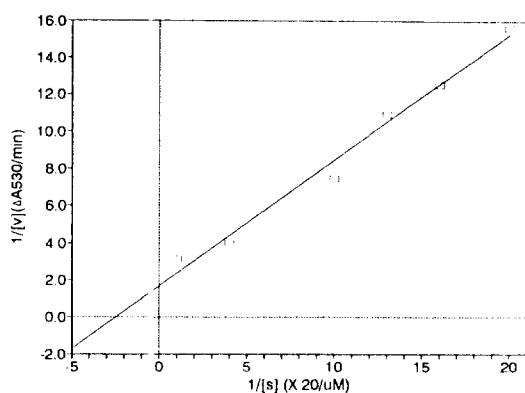


Fig. 5. Lineweaver-Burk Plot of laccase for syringaldazine. Citrate-phosphate buffer (pH 4.8) was used as reaction buffer.

Table 2. Oxidation of various substrates by *Lentinus edodes* laccase.

A. Phenol compounds

Functional group on <i>para</i> position	Substrates	Oxidation
Acrylic group	<i>p</i> -Coumaric acid	+
	Ferulic acid	+
	Sinapic acid	+
Carboxylic group	Vanillic acid	+
	Syringic acid	+
	Gallic acid	+
	Protocatechuic acid	+
	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	-
Hydroxyl group	Hydroxyquinone	+
Aldehyde group	Vanillin	-
Nitro group	2,4-Dinitrophenol	-
	<i>p</i> -Nitrophenol	-
Methoxyl group	3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	-
Other group	Pyrogallol	+
	L-DOPA	+
	2,6-Dihydrophenol indophenol	+
	1-Naphthol	+
	2,2'-Dihydroxybiphenol	+
	8-Hydroxyquinoline	+
	2,4-Dichlorophenol	-
	Orcinol	-
	Catechol	-
	Tyrosine	-
	Phenol red	-
	Phenolphthalein	-
	Hydrindantin	-

B. Aminobenzene compounds

<i>o</i> -Dianisidine	+
N,N,N',N'-Tetramethyl benzidine	-
N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylene diamine	+
α -Naphthylamine	+
Diphenylamine	+
<i>o</i> -Phenylene diamine	+
Syringaldazine	+
4-Dimethyl amino-benzaldehyde	-
2,4-Dinitrophenyl hydrazine	-
Anthranillic acid	-
Sulfanilic acid	-
Sulfanilamide	-

C. Other benzene compounds

L-Phenylalanine	+
3,4-Dimethoxybenzaldehyde	-
3,4-Dimethoxy cinnamic acid	-
Chloramphenicol	-
<i>trans</i> -Cinnamic acid	-
3-Phenoxy-1,2-propandiol	-
3-(4-methoxyphenoxy)-1,2-propandiol	-
<i>p</i> -Toluic acid	-
<i>p</i> -Cl-Cinnamic acid	-
Guaiacol glyceryl ether	-
<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside	-

a+: UV-visible spectral change was observed

-: UV-visible spectral change was not observed

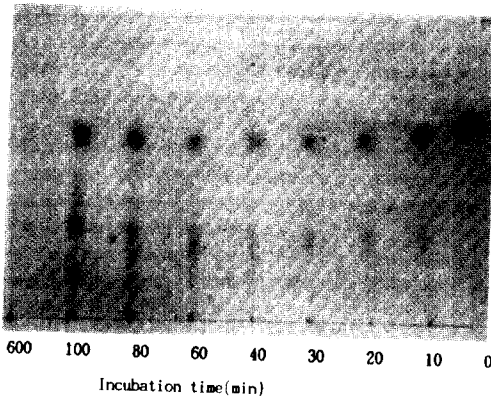


Fig. 6. Separation of reaction products of laccase according to the reaction time by thin-layer chromatography. Ferulic acid was used as substrate.

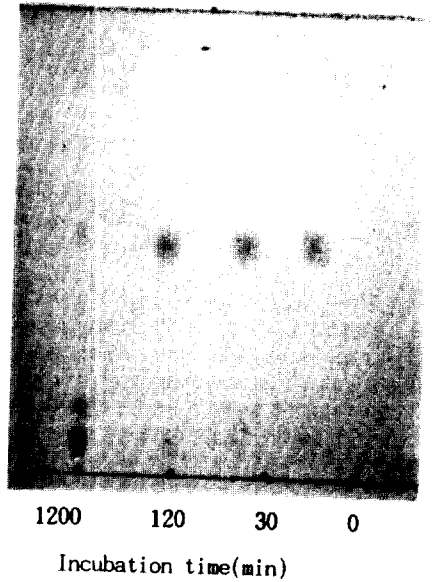


Fig. 7. Separation of reaction products of laccase according to the reaction time by thin-layer chromatography. Sinapic acid was used as substrate.

현상을 보였다 (Fig. 3). 그리고 본 효소의 열안정성은 30°C 이하에서 비교적 안정하였다.

pH 조건만 달리하고 각 pH에서 syringaldazine을 기질로 하여 효소의 활성을 측정한 결과 최적 pH는 4.8이었다 (Fig. 4). 몇가지 목재부후균에서 보고된 laccase의 최적 pH는 3.4~5.4 정도였는데 (1) 본 효소도 이 범위에 해당되고 *Pleurotus ostreatus*의 laccase (31)의 최적 pH보다 더 산성 조건이다. 그리고 본 효소는 pH 7.0~9.0 범위에서 대체로 안정하였다.

5. Syringaldazine에 대한 steady-state kinetic parameter의 결정

본 효소의 활성측정에 사용한 기질인 syringaldazine에 대한 steady-state kinetic parameter를 결정하였다. 기질농도 1~20 μM 사이에서 반응시키면서 반응산물의 생성속도를 UV/visible spectrophotometer로 측정하여, 그 결과를 Lineweaver-Burk plot으로 그렸다 (Fig. 5). 본 효소의 syringaldazine에 대한 K_M 은 0.4 μM 이었고 k_{cat} 은 77 sec^{-1} 이었다.

6. 기질 특이성

본 효소의 기질 특이성을 살펴보기 위해 여러가지 방향족 화합물과 반응시키면서 spectrophotometer로 흡광스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 이때 스펙트럼의 변화 유무로써 반응여부를 판정하였는데 (Table 2), 그 결과를 살펴보면 본 효소와 반응하는 화합물들은 몇가지 특징을 보인다. 첫째, 벤젠고리에 수산기나 아미노기가 붙어 있다. 본 실험에서 사용한 50여가지의 화합물중에 효소와 반응한 화합물들은 phenylalanine을 제외하고 모두 벤젠고리에 수산기나 아미노기가 붙어 있다. 둘째, 페놀 화합물의 경우 *para* 위치에 acrylic acid나 carboxyl기 또는 수산기가 붙어 있거나, 다른 벤젠고리가 추가로 연결된 화합물들이다. *Para* 위치에 aldehyde기나 nitro기 또는 methoxyl기가 붙은 경우는 효소와의 반응을 관찰할

수 없었다. 셋째, 페놀 화합물의 경우 추가로 *ortho* 위치에 methoxyl기가 붙거나 수산기가 붙어 있으면 효소와의 반응을 촉진한다. 예를 들면 vanillic acid, syringic acid, gallic acid 등은 효소와 반응을 하였지만 *p*-hydroxybenzoic acid는 효소와 반응을 확인할 수 없었다.

7. TLC로 분석한 반응산물의 양상

Lignin의 구성성분으로 알려진 ferulic acid와 sinapic acid를 각각 효소와 반응시키면서 일정한 시간 간격을 두고 TLC plate에 적하하여 전개시킨 결과 반응산물을 확인할 수 있었다. 자외선을 쬐어 주면서 관찰하였을 때 ferulic acid의 경우는 R_f 값이 0.61, 0.31, 0.16인 점이 나타났는데 (Fig. 6), R_f 0.61의 점은 대조구와 비교하였을 때 기질 자체인 것으로 여겨지며 R_f 0.31과 0.16의 점은 반응산물로 추정된다. 그러나 반응을 계속 시켰더니 R_f 0.31과 0.16의 점은 없어지고 적하 지점이 짙어졌다. 이는 효소의 반응산물이 생겼다가 효소의 작용과는 무관하게 다른 물질로 변화되기 때문이라고 생각한다. Ferulic acid의 반응 양상은 *Pleurotus ostreatus*의 laccase의 경우와 유사하다 (10). Sinapic acid의 경우는 R_f 0.5, 0.15, 0.07의 점이 나타났는데 (Fig. 7), R_f 0.5의 점은 기질이고 R_f 0.15, 0.07의 점은 본 효소의 반응산물로 추정된다. 이 경우에도 반응을 계속하였을 때는 효소의 반응산물로 추정되는 점은 없어지고 적하지점이 짙어졌다.

사 사

본 논문은 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비 (1990~1991)에 의해 수행되었다.

참 고 문 헌

- Bollag, J.M. and A. Leonowicz, 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 849-854.
- Bollag, J.M., S-Y. Liu and R.D. Minard, 1982. Enzymatic oligomerization of vanillic acids. *Soil. Biol. Biochem.*, **14**, 157-163.
- Bourbonnais, R. and M.G. Paice, 1990. Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS*, **267**, 99-102.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-250.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Robers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- Froehner, S.C. and K.-E. Eriksson, 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *J. Bacteriol.*, **120**, 458-465.
- Geiger, J.P., B. Huguenin, M. Nicol and D. Nandris, 1986. Laccase of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* 2. Effect of *R. lignosus* laccase L1 on thioglycolic lignin of hevea. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **13**, 97-110.
- Germann, U.A., G. Muller, P.E. Hunziker and K. Lerch, 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 885-896.
- Kawai, S., T. Umezawa and T. Higuchi, 1988. Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 99-110.
- Kim, K.J., 1987. The role of polyphenoloxidase and glucose oxidizing enzymes in the lignin metabolism of *Pleurotus ostreatus*. Ph.D.Thesis, Seoul National University.
- Kim, K.J., J.-S. Maeng, K.S. Shin, S.-O. Kang, Y.-C. Hah and S.-W. Hong, 1986. Polymerization and depolymerization of lignin by some white-rot fungi. *Kor. J. Mycol.*, **14**, 257-263.
- Kim, K.J., K.S. Shin, J.-S. Maeng, S.-O. Kang, Y.-C. Hah and S.-W. Hong, 1987. Characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Microbiol.*, **25**, 148-156.
- Kirk, T.K., 1971. Effects of microorganisms on lignin. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **9**, 185.
- Kirk, T.K. and M. Shimada, 1985. Lignin biodegradation : The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi, chap.21. In T. Higuchi(ed.). *Biosynthesis and Biodegradation of Wood components*. Calif:Academic press, San Diego.
- Kirk, T.K. and R.L. Farrell, 1987. Enzymatic combustion : The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 465-505.
- Kojima, Y., Y. Tsukuda, Y. Kawai, A. Tsukamoto, J. Sugijura, M. Sakaino and Y. Kita, 1990. Cloning, sequence analysis and expression of ligninolytic phenoloxidase gene of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15224-15230.
- Lambin, P.C., 1978. Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.*, **85**, 114-123.
- Law, D.J. and W.E. Timberlake, 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, **144**, 509- 513.
- Leatham, G.F. and M.A. Stahmann, 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 147-157.
- Leonowicz, A., G. Szklarz and M. Wojtas-Wasilewska, 1986. The effect of fungal laccase on fractionated liginosulfonates(Peritan Na). *Phytochemistry*, **24**, 393-396.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Parr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Molitoris, H.P., 1976. Die laccasen des ascomyceten *Podospora anserina*. In J. Cramer(ed.), *Bibliotheca Mycologica*, Vol. 52. Gantner Verlag, Vaduz.
- Mosbach, R., 1963. Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**, 204-212.
- Niku-Paavola, M.L., 1987. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*, pp. 119-123. In E. Odier(ed.), *Lignin enzymic and microbial degradation. Paris Symp. Intern. INRA*.
- Reinhammar, B., 1984. Laccase, pp. 1-35. In R. Lontie(ed.), *Copper protein and Copper enzymes*, Vol. 3. Fla:CRC Press, Boca Raton.
- Sannia, G., P. Giadina, M. Luna, M. Rossi and V. buonocore, 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.*, **8**, 797-800.
- Shin, K.S., K.J. Kim, S.-W. Hong and Y.-C. Hah, 1986. Properties of extracellular polyphenol oxidase isolated from *Lentinus edodes* JA01. *Kor. J. Microbiol.*, **24**, 141-146.
- Szklarz, G. and A. Leonowicz, 1986. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase, in the degradation of lignin derivatives. *Phyto-*

- chemistry. **25**, 2537-2539.
29. **Westermark, U. and K.E. Eriksson**, 1974. Cellobiose : quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scand. Sci.*, **B28**, 209-214.
30. **Wood, D.A.**, 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, **117**, 327-338.
31. **Youn, H.-D.**, 1989. Characterization of laccase excreted from *Pleurotus ostreatus* and analysis of enzymatic reaction. M.S. Thesis, Seoul National University.

(Received August 4, 1992)

(Accepted August 17, 1992)

ABSTRACT: Characterization of Laccase Excreted from *Lentinus edodes*

Jeong, In-Beom, Hong-Duk Youn, Jin-Soo Maeng, Sa-Ouk Kang, Yung-Chil Hah, Gajin Jeong, Hyoung Tae Choi¹ and Jae-Heon Kim² (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, ¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ²Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea)

Extracellular laccase excreted from *Lentinus edodes* ATCC 48085 was purified through a series of DEAE Sephadex A-50, Con A-Sepharose and Sephadex G-150 chromatography. Extracellular enzyme, which consists of a single polypeptide, has a molecular mass of 87,000 daltons and contains 12.0% carbohydrate. The N-terminal amino acid sequence (15 residues) of the purified enzyme was similar to that of laccases of *Pleurotus ostreatus* and *Coriolus hirsutus*. The enzyme showed optimal activity at near pH 4.8 and 40 °C. The enzyme was stable at pH 7~9 and below 30 °C. K_M and k_{cat} values for syringaldazine were estimated to be 0.4 μ M and 77 sec⁻¹, respectively. The developed patterns of reaction products of the enzyme on thin layer chromatography were similar to those of laccase of *Pleurotus ostreatus*.