

## Urushiol에 의해 유도된 장수버섯 laccase isoenzyme의 정제 및 특성

최한석<sup>1\*</sup> · 박효숙<sup>2</sup> · 여수환<sup>1</sup> · 정석태<sup>1</sup> · 최지호<sup>1</sup> · 김명곤<sup>3</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 발효이용과, <sup>2</sup>원광대학교 농화학과, <sup>3</sup>전북대학교 바이오식품공학과

### Purification and Characterization of Urushiol Induced Laccase Isoenzyme from *Fomitella fraxinea*

Han-Seok Choi<sup>1\*</sup>, Hyo-Suk Park<sup>2</sup>, Soo-Hwan Yeo<sup>1</sup>, Seok-Tae Jeong<sup>1</sup>, Ji-Ho Choi<sup>1</sup> and Myung-Kon Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fermentation and Food Processing Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853

<sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749

<sup>3</sup>Department of Bio Food Technology, Chonbuk National University, Iksan 570-752

(Received November 4, 2010. Accepted December 13, 2010)

**ABSTRACT:** The influence of urushiol, as an allergen on laccase property of *Fomitella fraxinea* was investigated. The enzyme production was reached to the highest level after 10 days, cultivation and the activity and mycelial biomass were increased by 2.5 and 1.5 folds, respectively, by adding urushiol in the culture medium. In liquid cultures using a Cu-Mn-free medium, laccase activity was decreased by 3.8-9.2 folds, with similar dry cell weight. Two isoenzymes, were purified using anion exchange, hydrophobic interaction and size-exclusion chromatographies. Both isoenzymes are monomeric proteins, with  $M_w$  around 67 kDa(Lac1) and 66 kDa(Lac2), and isoelectric points of 3.67 and 3.81. The optimal conditions for purified isoenzymes were found to be pH 4.5-5.0 and 30-35°C. Activity decreased by the addition of  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ , and strongly inhibited by EDTA and sodium azide.

**KEYWORDS :** Basidiomycetes, *Fomitella fraxinea*, Laccase, Purification, Urushiol

## 서 론

Laccase(benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 polyphenol oxidase로서  $Cu^{2+}$ 를 함유하고 있어 blue copper protein으로 불리우고 있으며, 1983년 옷나무(*Rhus vernicifera*)의 수액(Yoshida, 1983)으로부터 처음 분리하였다. 옷나무는 상처가 나면 수액을 분비하는데, laccase가 수액중의 urushiol에 작용해 중합체를 형성시킴으로써 상처를 보호하게 된다(Fig. 1). Laccase는 곤충, 식물, 곰팡이에 이르기까지 자연계에 널리 분포되어 있으며(Cambria *et al.*, 2000), 식물체에서 생산되는 laccase는 상처부위의 보호와 lignin의 생성(Bao *et al.*, 1993)에 관여하는 반면 균류에서 생산되는 laccase는 lignin의 분해, 균체의 color 형성, 균근(rhizomorphs)의 형성과

자실체 및 포자의 형성(Thurston, 1994)에 관여하는 것으로 알려져 있어 그 기능은 다소 차이가 있다.

Laccase는 substrate에 대한 특이성이 낮아 polyphenol, methoxy-substituted phenol, diamine 등 자연계에 광범위하게 분포된 phenol성 물질을 산화시킬 수 있기 때문에 i) 제지 - MDF(medium density fiberboard)의 결합제, ii) 식품 - 음료의 색감 향상, iii) 방직 - 염료의 변색방지, iv) 환경 - 독성물질의 저감화 등 다양한 산업에 이용되고 있다(Couto and Herrera, 2006; Xu, 2005; Minussi *et al.*, 2002). 특히, 미생물 기원의 laccase는 독성이 없으며, 미생물 생육과 유사한 조건에서 작용하기 때문에 반응기의 운전조건이 가혹하지 않아 산업적으로 많은 고려의 대상이 되나(Widsten and Kandelbauer, 2008; Xu, 2005) 경제적으로 높은 수율을 생산해야 되는 과제를 가지고 있다(Elisashvili and Kachlishvili, 2009).

장수버섯(*F. fraxinea*)은 민주름버섯목 구멍장이버섯과에 속하는 버섯으로 오래전부터 민간약재로 사용되어왔다. 장수버섯에 대해서는 배양특성(장 등, 1995), 다당류의 분리 및 특성(Cho *et al.*, 1998; 조 등, 1995a, 1995b) 및 혈전분해 효소의 특성(Lee *et al.*, 2006) 등에 대해서 일부 연구가 보고되어 있다. 우리는 이전의 연구에서 장수버섯을 옷나무에 배양시키는 것만으로도 옷의 allergy유발성분인 urushiol을

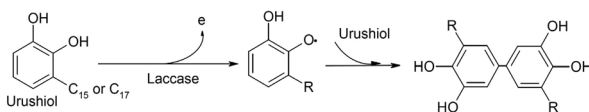


Fig. 1. Laccase-catalyzed oxidative coupling of urushiol.

\*Corresponding author <E-mail : coldstone@korea.kr>

효과적으로 제거시킬 수 있으며, 이러한 무독화 과정은 버섯 균이 생산하는 laccase와 많은 관련성이 있다는 사실을 밝혔다(Choi *et al.*, 2007). Park and Park(2008)은 장수버섯이 생산하는 laccase 1종을 정제하여 그 특성을 보고한바 있으나, 일부 담자균류는 다양한 lignolytic isoenzyme을 생산하는 것으로 알려지고 있다. *Ceriporiopsis subvermispora*는 최소 11개 이상의 manganese peroxidase(MnP)와 4개 이상의 laccase isoenzyme이 존재(Nakatani *et al.*, 2010)하고 있으며, *Trametes trogii* 또한 2개의 laccase isoenzyme을 생산(Zouari-Mechichi *et al.*, 2006)하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 장수버섯의 이용가능성을 증대시키고자 urushiol을 이용하여 laccase를 유도하였으며, 2종류의 laccase isoenzyme을 정제하고 그 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용된 장수버섯은(*Fomitella fraxinea* IK1) 전북대학교 바이오식품공학과에서 분리 보관중인 균으로 2002년 7월 속리산에서 채집한 것을 사용하였다. 균주의 보존은 potato dextrose agar(PDA, Difco™)배지에 균주를 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 3개월 마다 계대 배양하였다.

### 배양

냉장보관된 균주를 PDA에 접종한 후 25°C에서 7일 동안 증식시켜 활성화하고 3 × 3 mm되게 잘라 200 mL 기본 배지(Table 1)가 들어 있는 플라스크에 접종하여 25°C, 100 rpm 속도로 8일 동안 진탕하여 전배양을 완료하였다.

### Urushiol 첨가에 따른 균체생산량 및 laccase활성 변화

멸균된 기본배지에 옻나무 수액으로부터 분리한 urushiol

(3-pentadecatrienly catechol, Choi *et al.*, 2007)을 배지용량의 13 ppm이 되도록 첨가한 후 전배양균을 배지의 2%(v/v)되게 접종하여 본배양하였다. 배양조건은 25°C, 100 rpm으로 하였으며 2일 단위로 배양물을 수거하여 원심분리(4°C, 7,000 rpm, 30 min)한 후 여과(Filter paper No. 2)하여 배양액과 균체를 분리하였다. 균체는 회수하여 105°C 건조법으로 균체량을 측정하였으며, 배양액은 효소활성 측정에 사용하였다.

### 금속이온에 의한 균체량 및 laccase활성 변화

기본 배지에서 금속이온(CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O)을 제거시켜 가면서 균체량 및 효소활성을 측정하였다. 이때 배양조건은 전배양균을 배지의 2%(v/v), 배양온도는 25°C, 교반속도는 100 rpm으로 하였다.

### 조효소액의 조제

Laccase 생산을 위해서 기본 배지 5 L를 10 L jar에 담아 살균한 다음 urushiol(3-pentadecatrienly catechol)을 배지 용량의 13 ppm되게 첨가한 후 전배양균을 배지의 2%(v/v) 되게 접종하였다. 배양 기간은 0.2 μm membrane filter를 통과시켜 제공된 공기를 공급하면서 25°C에서 15일간 배양하였다. 배양물을 원심분리(4°C, 3,000 rpm, 30 min)하여 균체와 배양액으로 분리하였으며, 배양액(상정액)을 여과(Filter paper No. 2)한 후 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 순차적으로(40-80%) 가하여 염석하고 염분을 제거하여 조효소액으로 사용하였다.

### Laccase의 정제

#### Anion-exchange column chromatography

Sodium phosphate buffer(20 mM, pH 7.0)로 평형화시킨 Q-sepharose XL resin(Amersham Co. Denmark)을 column(2.6 × 34 cm)에 충전하고 column volume의 5배 정도의 동일 완충용액으로 씻어내었다. 동결건조된 조효소액을 동일 완충용액에 녹여 column(8.0 mL)에 주입하였다. 동일 완충용액으로 50분 동안 elution시킨 후 0.2 M NaCl이 함유된 동일 완충용액으로 100분 동안, 1 M NaCl이 함유된 동일 완충용액으로 50분 동안 용출하였다. 이때 flow rate는 2.0 mL/min이었으며 5 mL씩 fraction collector로 분획하였다.

Column을 통과하여 나오는 물질은 UV detector(S3210, Sycam Co., Germany)를 이용하여 280 nm에서 모니터링 하였으며, 모든 분획물은 ultrafiltration(UF) membrane(NMWL : 3000, YM3, Millipore Co.)을 통과시켜 염분을 제거한 후 효소활성을 측정하였다.

#### Hydrophobic interaction chromatography(HIC)

부분정제된 시료 20 μL를 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 함유한 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0, A)로 평형화시킨 column(TSK Phenyl-5PW, 7.5 I.d. × 75 mm, 10 μm, LKB Co. Sweden)에 주입하였다. 이때 eluent는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 함유하고 있지 않은 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0, B)를 사용

**Table 1.** Composition of the basal medium

Compounds	Concentration
Glucose	10 g
Peptone	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
FeSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.001 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.002 g
Thiamine·HCl	50 μg
Distilled water	1,000 mL

하여 구간 농도구배를 만들었다. 농도구배 조건은 20분 A(isocratic), 20분 A:B=8:2(stepwise), 6분 7:3(gradient)후 10분 유지, 6분 6:4 10분 유지, 6분 5:5 10분 유지, 30분 B(isocratic)로 하였다.

Flow rate는 0.6 mL/min, 검출파장은 280 nm로 하였으며, 1분 30초 단위로 분획하였다.

#### Gel-filtration chromatography

시료 20  $\mu$ L를 130 mM NaCl을 함유한 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 column(Zorbax GF-250, 9.4 I.d.  $\times$  250 mm, 4-4.5  $\mu$ m, Agilent Co.)에 주입하였다. 이때 eluent는 동일 buffer를 사용하였으며 flow rate는 0.8 mL/min, 검출파장은 210 nm이었다. 시료는 1분 단위로 분획하여 효소활성을 측정 후 활성부위를 모았다. 표준 단백질로 ferritin(440 kDa),  $\beta$ -amylase(200 kDa), aldolase (158 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa)를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정제된 효소의 분자량을 환산하였다.

#### SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)

정제된 효소는 Laemmli(1970)의 방법을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 즉, 8% separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 활성분획 10  $\mu$ g protein/20  $\mu$ L와 5  $\mu$ L sample 완충용액(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)과 혼합하였다. 혼합물을 100°C에서 10분간 증탕하고 전기영동하였다. 이때 단백질 size marker는 Fermentas(PageRuler™ Prestained Protein Ladder, UK)사의 제품을 사용하였으며, Coomassie blue R-250로 염색한 후 확인하였다.

#### IEF(Isoelectric focusing)

Gel의 조성은 acrylamide와 bisacrylamide의 농도를 T 5%, C 3.3%로 조절하고 시료 8  $\mu$ g/20  $\mu$ L를 동일량의 buffer(2.4 g urea, 20  $\mu$ L ampholyte solution pH 3.5-10.0, 100  $\mu$ L ampholyte solution pH 3.5-6.0, 500  $\mu$ L 20% triton X-100, 50  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoethanol, 1.7 mL distilled water, 200  $\mu$ L 1% bromophenol blue)와 잘 섞어 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 gel은 10% trichloroacetic acid 용액에서 10분, 1% trichloroacetic acid 용액에서 하룻밤 동안 반응하여 ampholyte를 제거한 후 Coomassie blue R-250로 염색하여 확인하였다. 이때 pI 표준 marker로는 Amersham사(Sweden)의 IEF calibration kit을 사용하였다.

#### 효소활성 및 단백질 농도측정

효소활성은 Petroski *et al.*(1980)의 방법에 준하여 측정하였으며, 효소의 활성은 syringaldazine이 tetra methoxy azo-*p*-methylene quinone으로 산화하는 초기 1분간의 반

응속도를 525 nm에서 흡광도의 변화로 측정하였으며, 분당 1.0의 흡광도를 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

조단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 의해 단백질 정량하였으며, bovine serum albumin(BSA)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

#### 효소의 특성

##### pH

정제된 효소를 각 pH 완충용액에 가하여 40°C에서 1분간 반응시켜 효소활성을 비교하였다. 이때 사용한 완충용액은 0.1 M citrate-0.2 M NaHPO<sub>4</sub>(pH 3.0-6.5), 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0-8.0)를 사용하였다.

##### 온도

분리된 효소의 반응 최적온도를 알아보기 위하여 25-70°C까지 5°C 단위로 승온시키면서 효소활성을 비교하였다. 효소반응은 각 온도에서 5분 동안 예열한 뒤 기질 10  $\mu$ L를 가하여 반응을 시작하였다.

##### 금속이온

0.1 M citrate-0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.6)완충용액에 CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>를 각각 1 mM이 되도록 제조하였고 NaCl은 10, 50, 100 mM이 되도록 제조한 후 효소액을 가하여 효소활성을 비교하였다.

##### 저해제

Sodium azide, EDTA를 0.1 M citrate-0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.6) 완충용액에 농도별로 첨가하고 효소액을 가한 다음 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Urushiol이 laccase의 유도과 균체생산에 미치는 영향

Urushiol이 장수버섯의 laccase유도 및 균체량의 변화에 미치는 영향을 살펴본 결과(Fig. 2), urushiol첨가구는 배양 6일째부터 대조구(무첨가구)는 배양 8일째부터 laccase활성이 검출되기 시작하여 배양 10일째 최대활성을 나타내고 이후 감소하는 경향이였다. Urushiol첨가구의 laccase활성은 배양 10일째 3.11 U/mL로 무첨가구(1.27 U/mL)에 비하여 2.45배 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 또한, urushiol은 장수버섯의 균체성장에도 다소 영향을 미쳤는데, 대조구의 경우 배양 2일부터 균체량이 증가하기 시작하였던 반면 첨가구는 배양 4일째가 되어서야 균체성장이 이루어지기 시작하였다. 그러나 배양 6일 이후부터는 오히려 첨가구의 균체량이 급격하게 증가하여 배양 10일째 무첨가구에 비하여 1.5배 높은 균체생산을 나타내었다.

담자균이 생산하는 laccase는 증식환경에 따라서 많은 영향을 받는데 xyloidine, veratryl alcohol, ferulic acid, pyrogallol

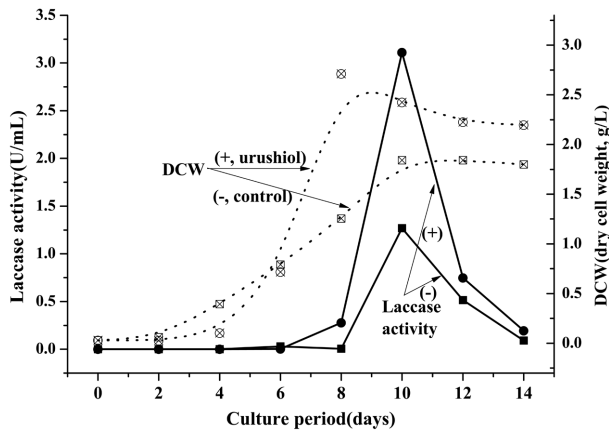


Fig. 2. Stimulation of laccase and mycelial production in cultures of *F. fraxinea* by addition of urushiol(C15 : 3).

(Minussi *et al.*, 2007) 및 indulin AT(김, 1988) 등에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다. Phenolic 화합물은 균체의 세포막 단백질 및 지질과 반응하여 단백질 또는 DNA를 변형시키거나 지질을 산화시키기 때문에 균체증식에 있어 저해적인 요소로 작용한다. Catechol화합물인 urushiol은 lignin base의 phenolic compound보다 균체성장에 더욱 저해적(Rivero-Curz *et al.*, 1997)이라는 보고도 있다. 균체는 lignolytic system을 통해 phenolic compound를 산화시켜 균체에 무해한 형태로 변환시킴으로써 생존할 수 있는데 (Thurston, 1994; Buswell *et al.*, 1993), 장수버섯은 배양초기 urushiol에 의해서 균체성장이 다소 지연되었으나 laccase의 유도를 통해 urushiol을 무독화 시키면서 정상적인 생육이 가능했던 것으로 추측된다.

#### 금속이온(Cu, Mn)이 laccase활성 및 균체생산에 미치는 영향

금속이온이 장수버섯의 laccase활성과 균체생산에 미치는 영향을 살펴보고자 기본 배지성분 중  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 를 결핍시켜 보았다(Fig. 3). 최대 활성을 보이는 배양 10일째의 laccase활성(Fig. 3A)은 Cu와 Mn이 모두 제거된 배지에서는 0.35 U/mL, Cu가 제거된 배지에서는 0.47 U/mL, Mn이 제거된 배지에서는 0.85 U/mL이었던 반면, Cu와 Mn이 모두 함유된 배지(대조구)에서는 3.21 U/mL로 확인되었다. 즉, Cu와 Mn 두 금속 중 1개만 결여되어도 장수버섯의 laccase의 활성은 현저(3.8-9.2배)하게 낮아졌으며, 그 중 Cu이온이 장수버섯의 laccase활성에 더욱더 많이 영향을 미치는 것으로 나타났다.

또한, 이들 금속은 균체생산(Fig. 3B)에도 영향을 미쳤는데, 배양 10일째 건조균체량은 대조구(2.7 g/L) > -Mn(2.4) > -Cu(2.3) > -CuMn(1.8) 순으로 Cu 또는 Mn이온의 결핍에 의해서 균체량도 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 처리구별 균체량의 차이는 비교적 적은 것으로 드러났다. 윤 등(2003)은 Cu이온이 장수버섯의 laccase생산에 주요한 요인이었으나

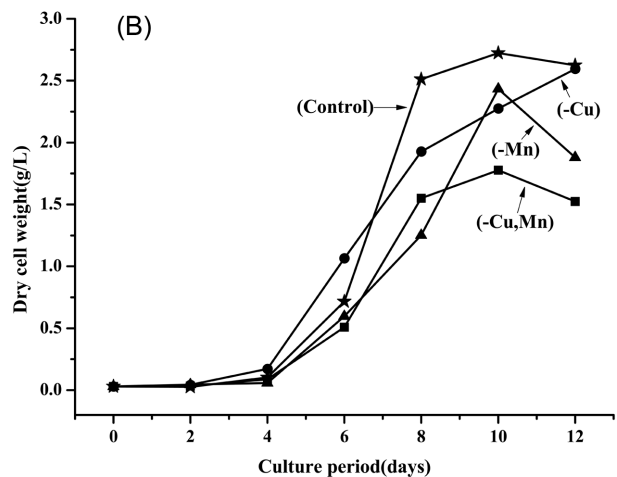
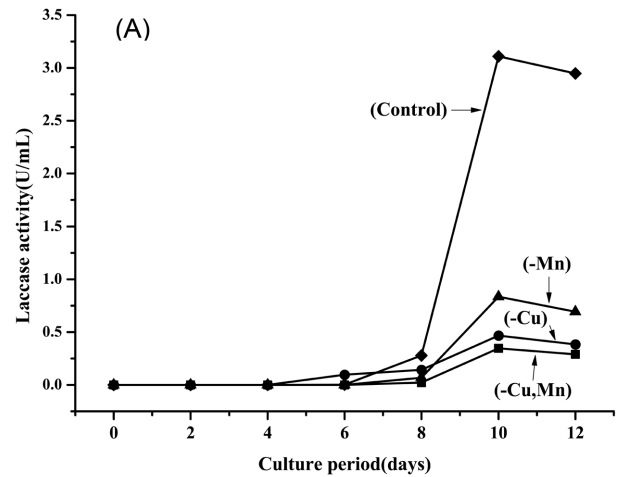


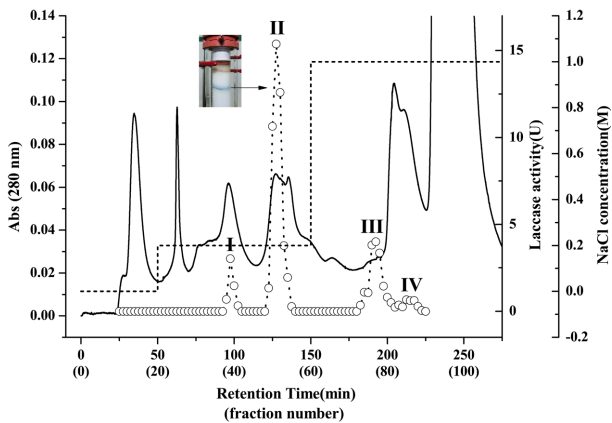
Fig. 3. Effect of iron(Cu, Mn) on the laccase activity(A) and mycelial production(B) of *F. fraxinea*.

균체성장과 관련이 적었으며 배양 6일째부터 효소를 생산하기 시작해 12-16일 사이 효소생산량이 급격히 증가한다고 보고하여 본 연구와 유사하였다.

#### 장수버섯이 생산하는 laccase의 분리 및 정제

장수버섯이 생산하는 laccase정제를 위해 첫 번째 단계로 anion exchange chromatography(Q-sepharose XL, Fig. 4)를 수행하였으며, 4개 부위(I-IV)에서 효소활성이 관찰되었다. I과 II는 0.2 M NaCl로 elution시키는 과정 동안 용출되었고, III과 IV는 그 이상의 농도에서 용출되었다. 활성을 나타내는 각 부위 중(I:37-42; II:48-56; III:72-82; IV:83-90 fraction) II의 부위가 laccase활성이 가장 높았으며, 파란색(blue protein)을 띠고 있어  $\text{Cu}^{2+}$ 를 함유하고 있는 laccase로 판단되었다.

그러나 II의 부위의 분획물은 laccase 이외의 불순물이 다량 존재(data not shown)하였기 때문에 두 번째 단계로 HIC(TSK-phenyl-5PW, Fig. 5)를 수행하였으며, 활성이 다른 두 가지 종류의 laccase(Lac1, Lac2)를 분리하였다. 각각의



**Fig. 4.** Anion-exchange column chromatogram of laccase from *F. fraxinea* on Q-Sepharose XL. The arrow indicate blue protein.

—: Optical density at 280 nm, - ○ - : laccase activity, ... : NaCl concentration.

The protein sample(8 mL) was applied to the column (26 × 340 mm) equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The protein was eluted with same buffer(pH 7.0) for 50 min, 0.2 M NaCl/same buffer for 100 min and 1.0 M NaCl/same buffer for 50 min, at the flow rate of 2.0 mL/min in every elutions.

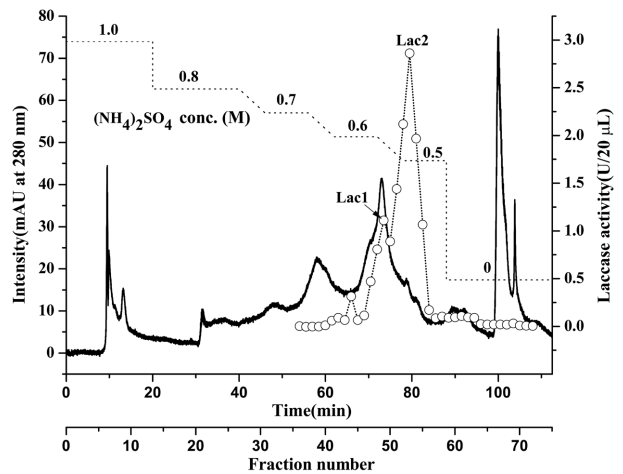
효소활성은 115.97 U/mL(Lac1)과 196.39 U/mL(Lac2)로 Lac2의 효소활성이 Lac1에 비하여 1.7배 높았다.

세 번째 단계로 두 종류의 laccase isoenzyme을 gel filtration (Zorbax GF-250, data not shown)을 통해 정제를 완료하였으며, 정제단계별 특성을 Table 2에 나타내었다. 정제된 laccase의 활성은 각각 366.27 U/mg protein(Lac1), 680.34 U/mg protein(Lac2)으로 조효소에 대하여 각각 241.0배(Lac1)와 447.6배(Lac2)의 정제배수를 가지고 있었다.

**분자량 및 등전점**

HPLC를 이용한 gel filtration상에서 두 효소의 분자량은 (Fig. 6A) 각각 60 kDa(Lac1), 59 kDa(Lac2)인 것으로 확인되었다. 이는 SDS-PAGE상의 결과(Fig. 4B)와 서로 유사한 것으로 나타나 본 연구에서 분리, 정제된 laccase isoenzyme은 단량체로 각각 67 kDa(Lac1)과 66 kDa(Lac2)의 분자량을 가지는 것으로 판단되었다. 두 종류 laccase isoenzyme의 등전점(Fig. 6C)은 Lac1 3.67, Lac2 3.81로 두 효소가 서로 유사하였다. Park and Park(2008)은 장수버섯으로부터 분리한 laccase의 분자량은 47 kDa이며, 등전점은 3.8이라고 보고하였으나 이는 본 연구에서 분리한 효소와 서로 다른 laccase isoenzyme으로 생각되며 장수버섯은 2종 이상의 laccase isoenzyme을 생산하는 것으로 판단된다.

Zouari-Mechichi *et al.*(2006)은 *Trametes trogii*를 대상으로 연구한 연구에서 2종류의 laccase를 분리하였으며, 각각 58 kDa과 62 kDa의 분자량과 4.5와 4.3의 등전점을 가지는 것으로 보고하였다. 또한, 담자균이 생산하는 laccase



**Fig. 5.** Hydrophobic interaction chromatogram of laccase from *F. fraxinea* on TSK Phenyl-5PW.

The protein sample(20 μL) was applied to the column (7.5 × 75 mm, 10 μm) equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The protein was eluted with 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at the rate of 0.6 mL/min.

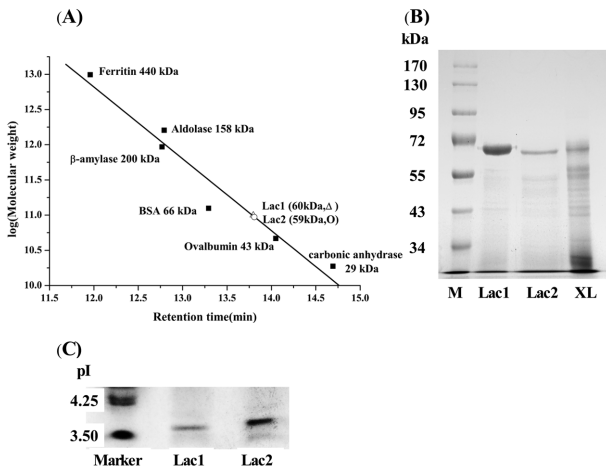
**Table 2.** Purification table of the laccase isoenzymes from *F. fraxinea*

Step	Volume Protein (mL)	Protein (mg/mL)	Laccase activity		Purification fold
			Unit/mL	Specific activity (U/mg protein)	
Culture filtrate	3,650	0.98	0.75	1.52	0.0
Ammonium sulfated (40-80%)	132	10.28	34.40	6.69	4.4
Q-Sepharose XL	60	1.35	69.93	103.94	68.4
TSK Phenyl-5PW	20	0.81	115.97	286.34	216.2
	20	0.67	196.39	586.24	324.4
GF-250	10	0.38	13.91	366.27	241.0
	10	0.30	20.67	680.34	447.6

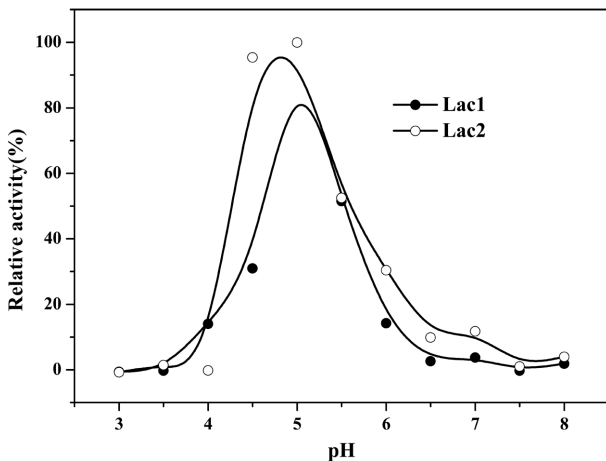
의 대부분이 분자량 60-70 kDa(Lettera *et al.*, 2010) 사이의 단량체(Bollag and Leonowicz, 1984)로 보고되어 있어 본 연구와 유사하였다.

**최적 pH**

장수버섯 laccase isoenzyme의 pH별 효소활성(Fig. 7)은 Lac1, Lac2가 서로 유사하였다. Laccase활성은 pH 4.0부터 급격하게 상승하기 시작하여 pH 4.5-5.0 사이에서 최대활성을 보이고 이후 pH 5.0 이상에서는 급격하게 감소하였으며, pH 6.5 이상에서는 거의 활성이 나타나지 않았다. 이러한 경향은 구름버섯(홍 등, 1987)과 토끼털 송편버섯(김, 1988)에서도 관찰되었다.



**Fig. 6.** Estimation of molecular mass and isoelectric point of the *F. fraxinea* laccase. (A) gel filtration(GF-250) with HPLC, (B) SDS-PAGE(8% polyacrylamide gel), and (C) IEF on 5% PAGE of purified laccase. Lane M : protein marker, lane XL : anion exchange eluate(Q-Sepharose XL).



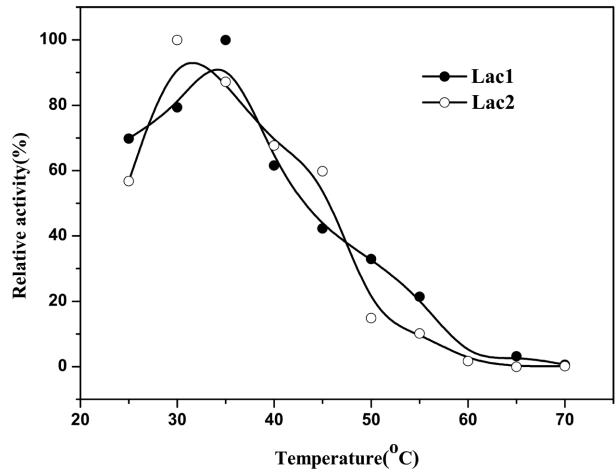
**Fig. 7.** Effect of pH on activity of purified laccase. The reaction was carried out at 40 for 1 min. Buffer solutions used were 0.1 M citrate-0.2 M NaHPO<sub>4</sub>(pH 3.0-6.5), 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0-8.0) and Clark and Lubs buffer(above pH 8.0).

**온도의 영향**

장수버섯으로부터 정제된 laccase의 온도에 대한 영향 (Fig. 8)은 Lac1, Lac2 모두 30-35°C 사이에서 최대활성을 보였으며, 이후 온도가 상승함에 따라 점진적으로 감소하였고 60°C 이상에서는 효소활성이 거의 관찰되지 않았다.

**금속이온의 영향**

금속이온에 대한 영향을 살펴본 결과(Table 3), 두 효소 모두 Fe<sup>2+</sup>에 의해서는 96% 이상 강하게 저해되었으며, Mg<sup>2+</sup> 이온에 대해서도 상당히 저해되는 것으로 드러났다. Lac1의 Cu<sup>2+</sup>이온에 의한 효소활성 저해는 1% 미만으로 거의 저해를



**Fig. 8.** Effect of temperature on activity of purified laccase. The reaction was carried out in 0.1 M citrate-0.2 M NaHPO<sub>4</sub>(pH 4.6) at various temperatures for 1 min.

받지 않았으나 Lac2는 34% 이상으로 비교적 높게 저해를 받는 것으로 나타났다. 특히, 두 효소 모두 50 mM NaCl 에서 84% 이상의 높은 저해를 받았다. Na<sup>+</sup>은 정제과정 중 chromatography를 수행할 경우 이온의 세기를 조절하기 위해 100-1,000 mM 범위로 많이 사용하게 되는데, 정제과정 중 각 분획에 대하여 탈염과정을 거치지 않을 경우 활성부위를 찾지 못하는 문제를 일으킬 수 있다.

**저해제가 효소 활성에 미치는 영향**

저해제가 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 inhibitor로 알려진 EDTA와 sodium azide의 농도를 변환시켜 가면서 활성을 비교하여 보았다(Table 4). 두 효소 모두 Cu를 함유한 효소의 전형적인 저해제로 알려진 sodium azide에 의해서 높은 저해활성을 나타내었는데, 0.01 mM sodium azide에 의해서 각각 72.2%(Lac1)와 92.6%(Lac2)의 저해를 받았다. 또한, EDTA의 존재에 의해서도 비교적 높은 저해를 받는 것으로 나타났다.

**Table 3.** Effect of various metal ions on activity of laccase

Salts	Concentration (mM)	Relative activity(%)	
		Lac1	Lac2
None	-	100	100
CuSO <sub>4</sub>	1	99.3	65.3
CaCl <sub>2</sub>	1	100.0	95.0
ZnSO <sub>4</sub>	1	90.5	90.9
FeCl <sub>2</sub>	1	1.1	3.1
MgCl <sub>2</sub>	1	74.6	46.5
	10	47.8	103.2
NaCl	50	25.7	10.9
	100	10.0	5.3

**Table 4.** Effect of various inhibitors on oxidation of syringaldazine by laccase

Inhibitors	Concentration (mM)	Inhibition(%)	
		Lac1	Lac2
EDTA	0.1	0.0	6.4
	0.5	28.3	21.6
	1	30.3	22.6
	5	30.5	24.0
	10	43.4	47.4
Sodium azide	0.01	72.2	92.6
	0.05	84.5	93.0
	0.1	89.1	94.0

장수버섯이 생산하는 laccase는 urushiol에 의해서 유도될 수 있다는 것이 확인된 바 최대효소 활성을 나타낼 수 있는 조건으로 옷의 처리공정을 개선한다면 옷의 allergy유발 성분인 urushiol을 더욱 효과적으로 제거시킬 수 있을 것으로 기대한다.

**적요**

본 연구는 옷나무의 allergy유발성분으로 알려진 urushiol이 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 laccase유도에 미치는 영향을 살펴보고 laccase isoenzyme을 분리·정제하여 그 특성을 살펴보았다. 장수버섯의 laccase활성과 균체생산량은 배양 10일째 최대치를 나타내었으며 urushiol첨가에 의해서 효소활성은 2.45배, 균체량은 1.5배 높아졌다. Laccase생산용 배지에서 Cu와 Mn이온을 결핍시켰을 경우 효소활성은 3.8-9.2배 낮아졌으나 균체생산에는 영향이 비교적 적었다. Anion exchange, hydrophobic interaction 및 gel filtration chromatography를 통하여 2종의 laccase isoenzyme(Lac1, Lac2)을 정제하였다. 이 효소는 단량체로 각각 67 kDa(Lac1)과 66 kDa(Lac2)의 분자량을 가지고 있었으며, 등전점은 3.67과 3.81이었다. 두 효소 모두 pH 4.5-5.0, 30-35°C에서 최대 활성을 보였으며, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>에 의해서 저해를 받았다. 또한, EDTA와 sodium azide에 의해서도 효소활성이 강하게 저해 받았다.

**감사의 글**

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: PJ007090)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

김명곤. 1988. *Trametes trogii*에 의한 laccase의 생산 및 특성에 관한 연구. 전북대학교 박사학위 논문.

윤재돈, 이종숙, 이경아, 정남옥, 하효철, 이재성. 2003. *Fomitella fraxinea*에 의한 laccase의 대량생산. 한국균학회지 31:181-186.

장현유, 차동열, 강안석, 홍인표, 김광포, 석순자, 류영진, 성재모. 1995. 장수버섯의 배양적 특성. 한국균학회지 23:238-245.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류 (1) - 중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 23:332-339.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995b. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류 (2) - 열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국균학회지 23:340-347.

홍재식, 김명곤, 김윤희, 이종배. 1987. *Coriolus versicolor*에 의한 laccase 생산 및 성질에 관한 연구. 한국균학회지 15:99-107.

Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R. and Sederoff, R. R. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260:672-674.

Bollag, J. M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.

Buswell, J. A., Cai, Y. J. and Chang, S. T. 1993. Fungal and substrate associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates. In: *Mushroom biology and mushroom products*, pp. 141-150. Eds. S. T. Chang, A. B. John and S. W. Chiu. The Chinese University Press, Hong Kong.

Cambria, M. T., Cambria, A., Raguda, S. and Rizzarelli, E. 2000. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expr. Purif.* 18:141-147.

Cho, S. M., Koshino, H., Yu, S. H. and Yoo, I. D. 1998. A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz). *Carbohydr. Polym.* 37:13-18.

Choi, H. S., Kim, M. K., Park, H. S., Yun, S. E., Mun, S. P., Kim, J. S., Sapkota, K., Kim, S., Kim, T. Y. and Kim, S. J. 2007. Biological Detoxification of Lacquer Tree (*Rhus verniciflua* Stokes) Stem Bark by Mushroom Species. *Food Sci. Biotech.* 16:935-942.

Couto, S. R. and Herrera, J. L. T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccase: A review. *Biotechnol. Adv.* 24:500-513.

Elisashvili, V. and Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *J. Biotech.* 144:37-42.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lee, J. S., Baik, H. S. and Park, S. S. 2006. Purification and Characterization of Two Novel Fibrinolytic Proteases from Mushroom, *Fomitella fraxinea*. *J. Microbiol. Biotech.* 16:264-271.

Lettera, V., Piscitelli, A., Leo, G., Birolo, L., Pezzella, C. and Sanna, G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biol.* 114:724-730.

Lowry, W. G., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.

Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13:205-216.

Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Durán, N. 2007. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresour. Technol.* 98:158-164.

Nakatani, M., Hibi, M., Minoda, M., Ogawa, J., Yokozeki, K. and Shimizu, S. 2010. Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a commercial laccase-producing basidiomycete, *Trametes* sp. Ha1. *New Biotech.* 27:317-323.

Park, K. M. and Park, S. S. 2008. Purification and Characterization of

- Laccase from Basidiomycete *Fomitella fraxinea*. *J. Microbiol. Biotech.* 18:670-675.
- Petroski, R. J., Peczynska-Czoch, W. and Rosazza, J. P. 1980. Analysis, production and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps*, *Appl. Environ. Microbiol.* 40:1003.
- Rivero-Cruz, J. F., Chavez, D., Bautista, B. H., Anaya, A. L. and Mata, R. 1997. Separation and characterization of *Metopium brownie* urushiol components. *Phytochem.* 45:1003-1008.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140:19-26.
- Widsten, P. and Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microbial Technol.* 42:293-307.
- Xu, F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotech.* 1:38-50.
- Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urushi). Part 1. *J. Chem. Soc.* 43:472-486.
- Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martinez, A. T. and Martinez, M. J. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 39:141-148.