

*Pleurotus ostreatus*가 생산하는 Laccase의 부분정제 및 효소적 특성

李在成 · 李恩政 · 徐達善

嶺南大學校 食品加工學科
(1985년 2월 11일 수리)

Production, Partial Purification and Physico-Chemical Characteristics of Laccase from *Pleurotus ostreatus*

Jae Sung Lee, Un Jung Lee and Dal Sun Suh

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Taegu, Korea
(Received February 11, 1985)

The production media, partial purification and the enzymatic characteristics of laccase from *Pleurotus ostreatus* were investigated. Among various media tried the double strength onion media showed much higher production of laccase compared to glucose and/or CMC added media. The laccase from *Pleurotus ostreatus* has the optimum pH of 5.94 for the activity and appears to be stable at relatively broad pH spectrum (4.7-8.7). The experiments on the temperature stability shows that above 90% activity could be preserved after holding at 30°C for 40 min., 60% activity was remained after 40 min. at 50°C. The Km value of the laccase from *Pleurotus ostreatus* was estimated to be 3.209mM and the molecular weight of laccase was estimated to be 55,000 by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis.

자원의 재활용에 대한 연구는 오랜 동안의 과제였으며 자연계에 널리 분포되어 있는 섬유성 폐자원의 활용에 관한 연구는 지금도 많은 학자들에 의해 꾸준히 진행되어 오고 있다.

Cellulose는 β -1, 4 결합된 포도당의 고분자로 반응성이 낮고, 결정성이며 천연 물질중에서 가장 반응성이 낮은 lignin과 같이 존재하는데 이 lignin은 polyphenol의 중합체로 생물에 의해서 거의 분해를 받지 않거나 분해 속도가 대단히 늦다. Lignin과 결합된 섬유소는 ligno-cellulose로 존재하며 이 경우 미생물이나 cellulase의 접촉을 방해하므로 천연 상태의 식물체로는 생물학적 분해가 어렵게 된다.

근래에는 ligno-cellulose의 전처리로서 종래의 물리적, 화학적 전처리가 아닌 효소적으로 lignin을 제거하는 방법이 시도되고 있다.

일반적으로 lignase로 총칭되는 lignin분해 효소의

대표적인 효소의 하나인 laccase는 1883년 Yoshida가 일본 lac 나무의 수액에서 발견한 것으로 1894년 Bertrand가 Indo-chinese lacquer 나무의 유액으로부터 같은 효소를 얻어 내어 이 효소의 이름을 laccase로 붙였다. 이 효소는 polyphenoloxidase의 일종으로 여러 식물체와 버섯등에 널리 분포하며 산소의 존재하에서 ortho와 para dihydricphenol을 산화한다.

본 연구에서는 *Pleurotus ostreatus*로부터 생산되는 이 효소를 부분 정제하고 그 특성을 조사하여 효소적 lignin 제거의 기초 자료로 발표한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

Pleurotus ostreatus 농기연 201을 PDA사면배지

에 순수 배양 한 다음 양과 기본배지(Hiroki)⁽¹⁾ 를 비롯한 8 종류의 액체 배지에 접종하여 26°C 에서 간헐적인 진탕배양으로 배양하였다.

배양중의 laccase 활성의 변화

각 배지는 소정의 배양 기간 경과별로 무균적으로 시료를 취한 다음 여과지로 신속히 여과하여 활성을 측정하였다.

조효소액의 조제

각 배지는 소정 기간 배양 후 가장 활성이 강한 시기를 택하여 배양액을 실온에서 Buchner funnel 로 신속히 여과하여 동결 보관해 두고 각종 시료로 사용하였다(이 효소는 extra-cellular enzyme이므로 여과만으로 추출이 가능함).

효소활성의 측정

Laccase 활성 측정은 분광 광도법으로 실시하였다. 조효소액 1.9ml를 citrate-phosphate buffer (pH 6.45, 0.02M) 1.7ml와 섞어 5 mM의 *p*-phenyldiamine 0.3ml를 첨가한 즉시 525nm에서 흡광도를 매 분마다 측정하였으며 아래 식⁽²⁾에 의하여 arbitrary activity (A)로 환산하였다.

$$A = \frac{10^5 \Delta E}{E \Delta t} \quad (1)$$

E=65000
 ΔE =O.D의 변화
 Δt = 반응시간(sec)

효소활성을 저해하는 물질

침전에 사용되는 유기 용매 및 부패 방지를 위하여 사용되는 Na-azide에 의한 효소의 불활성화를 측정하였다. 유기 용매의 저해 작용은 다음 절차에 의하여 측정하였다. 우선 조효소액 30ml에 각각의 유기 용매를 30ml씩을 가하여 침전시킨 다음 원심 분리(3500rpm, 25분간 4°C)하여 그 침전물을 회수한다. 회수된 침전물을 증류수 30ml에 분산 용해시킨 다음 1.9ml를 취하여 효소 활성을 측정 하였다. 이 활성을 침전하기 전의 조효소액의 활성과 비교하여 그 불활성화 정도를 표시하였다. Na-azide 경우는 2 mM 이 되게 첨가하여 활성을 비교하였으며 TCA(Trichloroacetic acid)는 10M 용액 0.1 ml를 조효소액 30ml에 첨가하여 활성을 측정, 불활성화 정도를 표시하였다.

최적 pH

조효소액 1.9ml+완충용액 1.7ml (citrate phosphate buffer (pH 3-7), clark lubs buffer (pH 7-12) +기질 (5 mM의 *p*-phenyldiamine) 0.3ml를 섞은

즉시 525nm에서 O.D를 매 분마다 측정, 초기 속도를 구하고 이로 부터 최적 pH를 구한다.

pH 안정성

조효소액 1.9ml+완충용액 1.7ml를 섞어 각 pH에서 60분간 방치한 후 다시 최적 pH로 조절한 다음 초기 속도를 측정하였으며 이로부터 각 pH에서의 안정성을 구한다.

온도 안정성

조효소액 1.9ml+citrate phosphate buffer (pH 6.45) 1.7ml를 섞어 40분간 각 온도에서 방치 한 후 급냉 한 다음 초기속도를 측정하여 온도 안정성을 구한다.

km 값

기질의 농도를 5, 10, 20, 60, 100mM로 변화시키면서 각 농도 별 초기속도를 측정하여 이것으로부터 Lineweaver Burk plot를 그린 다음 km value를 구한다.

효소액의 정제

정제 과정은 다음과 같다(Fig. 1)

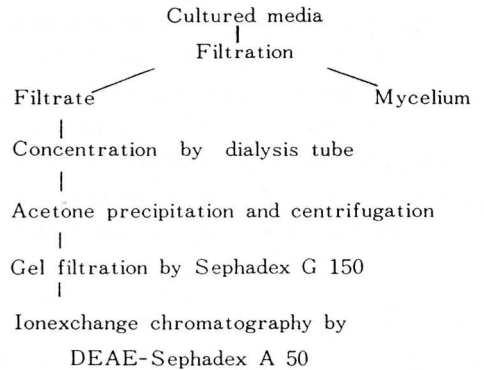


Fig. 1. Purification scheme of laccase from *Pleurostus ostreatus*

분자량 측정

SDS-PAGE에 의하여⁽³⁾ 표준 단백질은 Pharmacia Fine Chemicals의 저분자 단백질 분자량 측정을 위한 Electrophoresis Calibration Kit를 사용하였다.

Energy of activation

20°C 및 35°C에서 효소활성을 측정한 후 다음 식에 의하여 energy of activation을 계산하였다.⁽⁴⁾

$$E_a = \frac{2.3RT_2T_1 \log \frac{k_2}{k_1}}{T_2 - T_1} \quad (2)$$

결과 및 고찰

기질

효소 활성 측정의 기질로서는 β -phenylenediamine 이 syringaldazine에 비하여 재현성이 높고 안정된 측정치를 나타내었다. Kellin과 Mann^(5,6)이 보고한 바와 같이 polyphenol oxidase는 p -phenylenediamine 을 산화하지 못하므로 laccase의 활성 측정에는 p -phenylenediamine이 적합하다고 사료된다. 즉 polyphenol oxidase의 활성을 laccase의 활성으로 오인할 위험이 없는 것이다.

각 배지별 배양중 효소활성의 변화

각 배지에서 균사를 접종, 배양하면서 임의의 시간별로 시료를 채취하여 효소활성을 측정하였다. 먼저 Fig. 2에서 보면 균사 접종 후 5일후에서 부터 활성이 나타나서 급격히 증가하여 11일째 최대 활성치를 보이고 서서히 감소하여 어느 일정 수준을 오랜시간 유지한다. 양파 기본배지, 양파 200g 배지, 포도당이나 CMC첨가 배지를 비교하면 양파

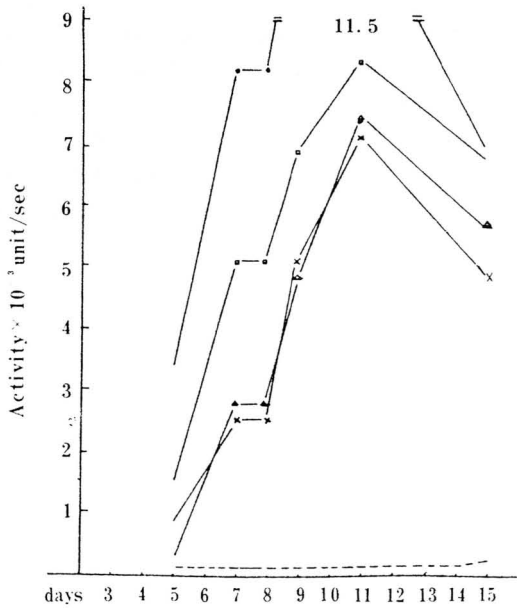


Fig. 2. Change in laccase activity from various liquid medium during incubation.

- : Onion medium
- : Onion double strength medium
- △— : Onion medium plus glucose
- 0.5% and CMC 0.5%
- ×— : Onion medium plus glucose 2.5%
- : Onion medium plus CMC 2.5%

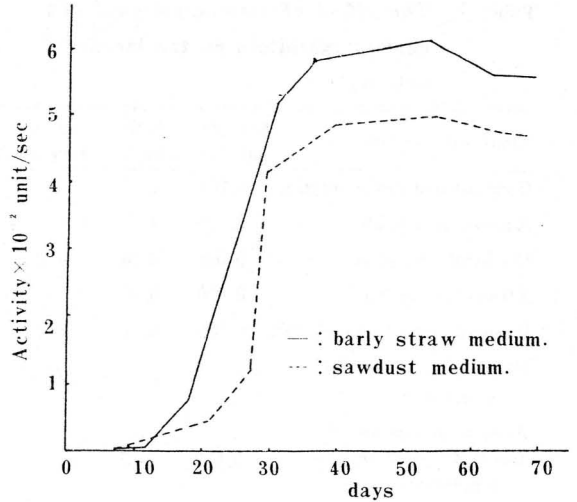


Fig. 3. Change in laccase activity from saw dust medium and barley straw medium.

200g 배지에서 효소활성이 월등하였고 포도당이나 CMC는 효소활성의 촉진제 역할을 하지 못하며 오히려 억제 작용이 있는 듯 하다. CMC 2.5% 배지는 거의 활성을 볼 수 없었다. CMC를 2.5%나 첨가함으로써 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 충분하여 구태여 lignin 분해효소를 생산하지 않아도 되었기 때문이라고 추측된다. 그러나 이 결과는 고체 배지에서 포도당이나 CMC첨가가 laccase 활성을 촉진시킨다는 Hiroki⁽¹⁾ 등의 보고와는 상이하며 배지 성상의 차이에서 오는 결과인지는 앞으로 검토되어야 할 과제이다. Fig. 3에서 보면 보리짚 배지와 톱밥배지의 활성은 대단히 좋은 것으로 나타나고 있다. 보리짚 배지의 최대 활성치는 양파 기본 배지의 최대 활성치의 약 7 배이며 양파 200g 배지의 최대 활성치 보다는 약 5 배 이상의 강한 활성을 보였다. 톱밥 배지는 보리짚 배지 보다는 약하지만 양파 기본 배지의 최대 활성치의 6 배 정도이며 양파 200g 배지 보다는 약 4 배의 활성을 나타내었다. 그러나 Fig. 1 처럼 배양초기에 최대 활성이 나타나는 것이 아니고 거의 30일 후에 높은 활성치를 나타내어 오랫동안 유지하는 점이 특이하였다. 최대 활성시기를 *Flamulina velutips* 균주와 비교하여 보면⁽⁷⁾ *Pleurotus ostreatus* 균의 최대 활성은 배양 초기(10-20일 경과)에 있는 반면에 *Flamulina velutips* 균주는 *Pleurotus ostreatus* 균의 활성이 감소하고 있는 시기인 배양 30-40일 경과 후에 최대 활성을 가지며 성장되는 동안의 균사 형성 모양도 *Flamulina velutips* 균은 한 곳에 뭉쳐서 지라는

Table 1. The effect of various solvents and enzyme inhibitors on the laccase activity.

Kinds of solvent	Activity (unit/sec)	Activity Index	Percent Inhibition(%)
Concentrated crude enzyme	0.031	1	.
Acetone precipitate	0.039	1.28	.
Methanol precipitate	0.031	0.99	1.2
Ethanol precipitate	0.030	0.96	3.7
Iso-propyl alcohol precipitate	0.023	0.75	15.1
Na-azide added enzyme concentrate	0	0	100.0
Acetone precipitate of Na-azide added enzyme concentrate	0.039	1.25	.
T. C. A. precipitate	0	0	100.0

* T. C. A. :Trichloroacetic Acid

반면에 *Pleurotus ostreatus* 균은 배양기 전체에 흩어져 자람으로서 두 균주간의 현격한 차이를 이루었다.

효소의 특성

Table 1 에와 같이 laccase는 메틸알콜과 에틸알콜에는 거의 저해를 받지 않으며 iso-propyl alcohol에 의하여는 약간의 저해가 일어난다. Na-azide와 TCA는 효소활성을 완전히 억제한다. 즉 Na-azide를 첨가한 조효소 농축액은 전혀 활성을 나타내지 않았다. 그러나 이 액을 acetone으로 침전시켜 그 침전을 원심분리하여 증류수에 원래의 용적으로 용해시킨 다음 효소활성을 측정하면 조효소 농축액 자체의 활성보다 더 높은 활성치를 나타낸다. 즉 acetone 침전물이 농축액 자체보다 더 높은 활성치를 가지는데 그것은 배양액자체에 효소 활성을 억제하는 어떤 저해 물질이 포함되어 있다가 초기정제 단계라고 볼 수 있는 acetone 침전에 의해 제거됨으로써 더 큰 활성치를 갖는 것으로 추측된다.

(Table 1) 또한 이 결과에서 Na-azide에 의한 효소활성의 억제는 가역적인 것으로서 일단 Na-azide를 제거하면 그 활성이 완전히 회복되며, 정제 과정에서 정제과정에서 Na-azide가 제거되면 활성에는 영향이 없음을 알 수 있다. 단 시료를 유기 용매에 오랜 시간 노출시켰을 경우에는 유기용매에서도 거의 완전히 활성을 잃었다. 유기용매와 TCA 첨가에 대해 비교하여 보면 TCA첨가에서 가장 많은 침전물이 생겼고 유기용매 중에서는 acetone 첨가에서

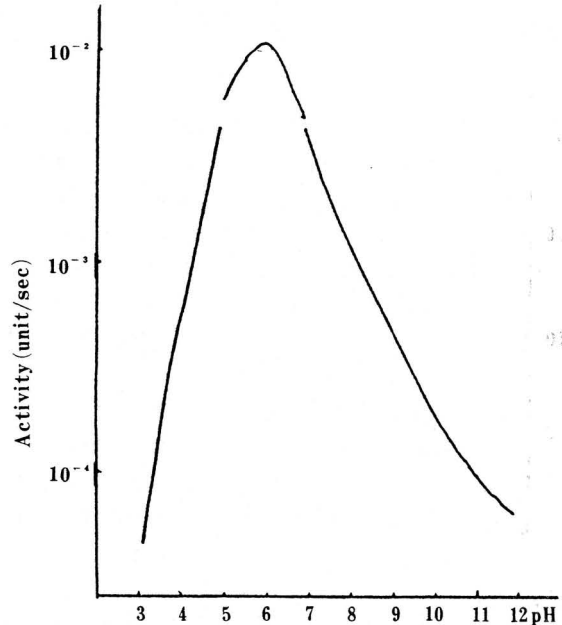


Fig. 4. Optimum pH of laccase from *Pleurotus ostreatus*.

가장 많은 침전물이 생겼다. Leonowicz와 Grayn-owicz⁽⁹⁾에 의하면 acetone에 의해 효소 활성이 20% 감소하는 것으로 발표하였는데 본 실험 결과와는 차이가 있는 것이다. 위에서 지적하였듯이 이점은 배양액 자체에 함유되어 있던 자연적 효소 억제제와 관련시켜 생각하여야 하므로 순수 정제된 효소에 대한 acetone의 저해 효과와는 차이가 있는 것 같다.

최적 pH

최적 pH (Fig. 4)는 5.94로 *Flamulinn velutips*⁽⁹⁾

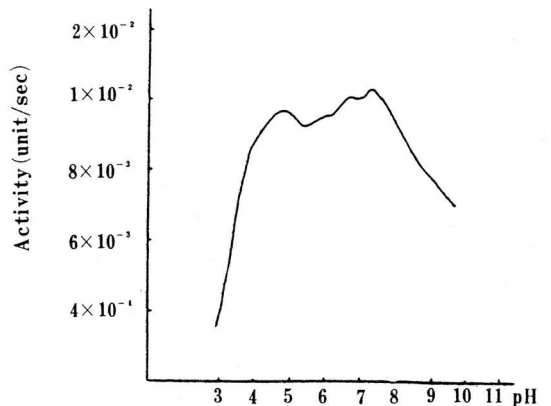


Fig. 5. pH stability of laccase at the 60 min. holding time.

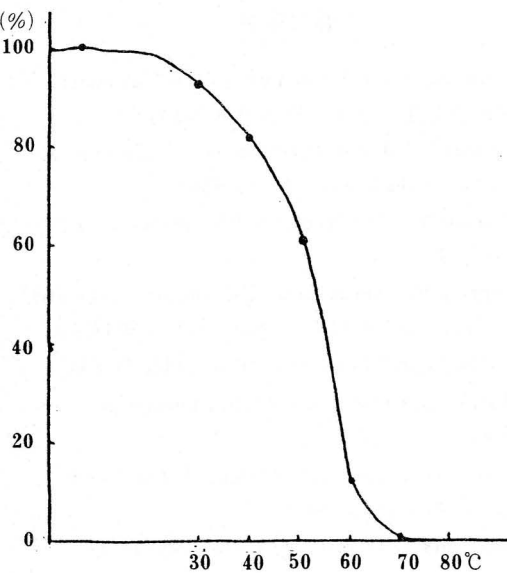


Fig. 6. Temperature stability of laccase at the 40 min. holding time.

6.62보다 조금 낮은 편이다.

Leonowicz et al⁽⁹⁾에 의하면 *Trametes versicolor* 부터 추출한 laccase의 최적 pH는 5.3으로 *Pleurotus ostreatus*의 최적 pH와는 차이가 있으나 laccase의 최대 활성이 pH 6.0-6.5라고 보고한 Regg⁽¹⁰⁾ 및 Bertrand⁽⁹⁾의 결과와는 일치한다고 볼 수 있다. pH안정성은 pH 4.7-8.7로 비교적 넓은 영역에서 안정하였다(Fig. 5)

온도 안정성에 있어서는 40°C에서 40분 방치하였 때 약 80% 활성을 보존하므로 열에는 비교적 강한 효소로 볼 수 있다. 단 60°C 이상에는 급격 활성이 감소하여 강한 실활현상을 일으켰다(Fig. 6).

Km 값은 3.209mM이며 *Flamulina velutipes* 균의 Km에 비하면 많이 낮은 값이다(Fig. 7). 이것은

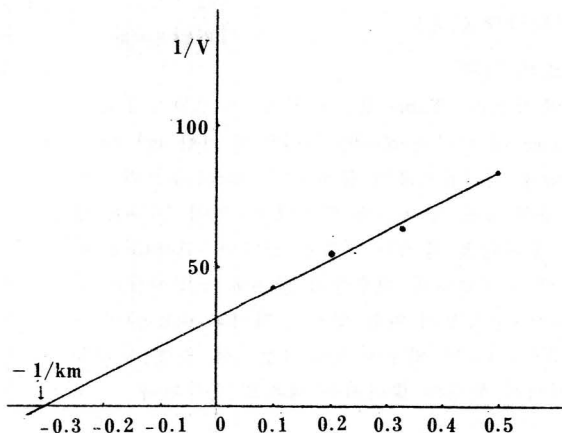


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of laccase from *Pleurotus ostreatus*.

효소반응의 최대 속도 1/2까지 도달하는데 필요한 기질의 농도가 그리 높지 않아도 된다는 것을 의미하여 효소의 이용면에서 볼 때는 보다 유리한 조건이 된다.

Laccase에 의한 *p*-phenylenediamine의 산화반응에서 활성화에너지는 식 (2)에 의하여 2892cal/mole로 계산되었다. SDS-PAGE에서의 이동성에 의한 방법으로 추정된 laccase의 분자량은 55,000으로

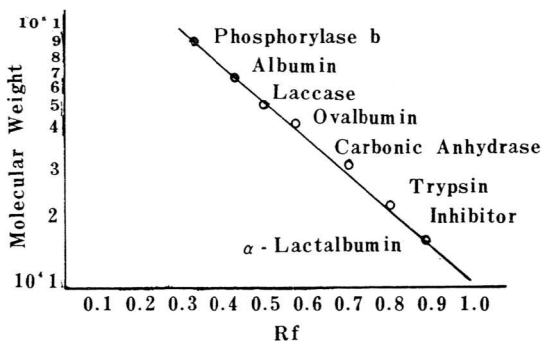


Fig. 8. Estimation of molecular weight of laccase.

Table 2. Purification table of laccase from *Pleurotus ostreatus*

Fraction	Total volume (ml)	protein (mg)	Activity (A)*	Total activity(A/ml)	Activity recovery (%)	Specific activity(A/mg)
Culture filtrate	3,600	1,400	0.015	54.00	100	0.040
Acetone precipitation	5 × 50**	65	0.114	28.56	52.9	0.440
Sephadex G-150	46 × 10**	27	0.055	25.13	46.5	0.93
DEAE-Sephadex A 50	56	1.5	0.099	5.53	10.2	0.69

* Arbitrary unit calculated by equation (1)

** In enzyme assay, the actual volume of enzyme solutions (5 ml and 46ml respectively) were diluted 50 and 10 times.

나타났다 (Fig. 8).

효소의 정제

정제과정은 (Table 2)에 정리되어 있다. Ion exchange에 앞서 Sephadex G-150에 의한 gel filtration을 실시함으로써 분자량이 laccase보다 큰 상당량의 불순 단백질을 제거할 수 있어 DEAE 칼럼의 부하량을 줄이는 효과가 있었다. Acetone 침전에서 효소활성의 회수율이 52.9%로 떨어지는 것은 acetone 침전에 의한 실활이 아니고 polyethylene glycol을 이용한 반투막 농축과정에서 오랜 시간동안 서서히 활성이 줄어지는 결과로 생각된다.

사 사

본 연구는 1983년도 한국과학재단 연구비 지원으로 실시되었음.

참고문헌

1. Iwahara, H., T. Yoshimoto and T. Fukuzumi : 木材化学会誌, 27 (4), 331-336 (1981)
2. Leonowicz, A. and K. Graynowicz : Enzyme Microb. Technol., 3 (1) 55-58 (1981)
3. Cooper, T.: The Tools of Biochemistry, 206-208 (1977)
4. Segel, I. H.: Biochemical Calculations 204 (1968)
5. Kellin, D. and T. Mann : Nature, 145, 304 (1940)
6. Kellin, D. and T. Mann : Nature, 143, 23 (1939)
7. Suh, D. S.: Thesis for M. S., Yeungnam Univ., 1984
8. Gregg, D. C. and W. H. Miller : J. Am. Chem. Soc., 62, 1374 (1940)
9. Bertrand, D.: Comp. rend. 224, 605 (1947)