

## *Ganoderma lucidum* 균주에 의한 Laccase의 정제 및 효소적 특성

이재성 · 박경숙 · 박영도

영남대학교 식품가공학과  
(1986년 1월 30일 수리)

## Purification and enzyme characteristics of laccase from *Ganoderma lucidum*

Jae Sung Lee, Gyung Sook Park and Young Do Park

Department of Food Science and Technology Yeungnam University, Taegu, Korea  
(Received January 30, 1986)

The production media and enzymatic characteristics of laccase from *Ganoderma lucidum* was investigated. Potato dextrose yeast extract media was proved to be the best for laccase production. The enzyme has optimum pH of 6.45, Km value of 6.71mM and appeared to be stable at wide pH range. The enzyme was inactivated partially by methanol and ethanol and totally by sodium azide but not at all by acetone. Also the enzyme purification was performed and the data is given.

소화율이 낮은 섬유성 폐자원의 소화율을 높이는 데 우선적으로 해결해야 할 문제중의 하나는 cellulose 분해를 저해하는 lignin을 제거하는 것이다.

Lignin과 결합한 섬유소가 ligno-cellulose로 존재하는 경우 효소가 cellulose의 접촉을 방해하므로 천연상태의 식물체로는 생물에 의하여 거의 분해를 받지 않거나 분해속도가 대단히 늦다.

Lignin 분해법으로 탄수화물과 결합된 망상구조를 절단할 수 있는 용해성의 증가 또는 다른 수용기를 도입하는 방법 등이 모색되고 있다<sup>(1-4)</sup>.

Laccase는 lignin 분해효소로 총칭되는 lignase의 대표적인 효소로서 Yoshida(1883년)에 의하여 발견되었으며<sup>(5)</sup>, Bertrand(1894년)에 의하여 명명되었다<sup>(6)</sup>. Bertrand(1895년)는 수많은 식물과 fungi에 laccase가 들어있다고 보고했으며<sup>(6)</sup>, Fukuzumi(1960년) 등은 어떤 종의 white-rot fungi가 접종된 나무는 lignin 함량이 감소된다고 발표했다<sup>(7)</sup>.

본 연구에서는 구멍장이 버섯科, 영지屬에 속하는 *Ganoderma lucidum*을 배양하며 laccase의 특성을 조사하고 그 효소를 정제한 결과를 보고하고자

한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양

본 실험실에서 보관중인 *Ganoderma lucidum* IFO 8346 균주를 사용하였으며, PDY배지<sup>(8)</sup>와 양파 기본배지<sup>(9)</sup> 등 5 종류의 배지에 접종하여 26~28°C에서 간헐적인 진탕배양으로 배양하면서 일정한 시기에 시료를 취하여 buchner funnel로 신속히 여과하여 여과액을 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소 활성 측정

조효소액 1.9 ml와 citrate-phosphate buffer (pH 6.48, 0.02M) 1.7 ml를 섞은 다음, 5 mM의 p-phenylenediamine 0.3 ml를 첨가한 즉시, 525 nm에서 흡광도를 측정하고 이후 매분마다 흡광도를 측정하였다.

활성은 다음식에 의하여 임의의 활성(A)으로 계산하였다<sup>(10)</sup>.

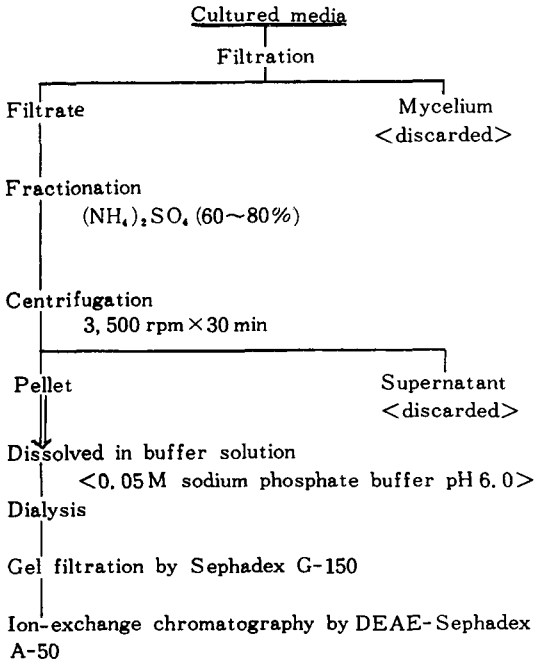


Fig. 1. Isolation and purification scheme of laccase from *Ganoderma lucidum*.

$$A = \frac{10^6 \Delta E}{E \Delta t} \text{ (unit/sec)}$$

E

 : 65,000  

ΔE

 : O. D의 변화  

Δt

 : 반응시간 (Sec.)

**효소의 정제**

효소의 정제과정은 4°C 저온실에서 행하여졌다.

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획**: 조효소액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 10% 포화도 간격으로 침전, 원심분리시켜 분획하였다 (Fig. 1).

효소 활성을 나타낸 분획은 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 20배를 사용하여 세번 교환하면서 하룻밤 동안 투석하였다.

**Gel filtration**: 투석한 효소액을 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0)로 미리 평형시켜 둔 Sephadex G-150 column (2.6×60 cm LKB)에 주입하여 phosphate buffer 0.05 M (pH 6.0)으로 flow rate 30 ml/h로 용출시켰다.

**Ion-exchange chromatography**: Sephadex G-150 column에서 용출된 분획중 laccase 활성이 있는 분획을 Amicon model 8050 ultrafiltration (PM 10 membrane)을 이용하여 농축하고 이를 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0)으로 미리 평형시켜 둔 DEAE-Sephadex A-50 column (1×20 cm phamacia)에 주입한 다음 phosphate buffer (pH 6.0) linear gradient (0.05~0.1 M)로 용출하였다 (20 ml/h). 각 분획

의 laccase 활성을 측정한 다음 활성이 있는 분획을 합하였다.

**단백질의 정량**: Acetone 침전, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획, Gel filtration 분획, Ion-exchange chromatography 분획의 단백질 함량은 Lowry<sup>(11)</sup> 등의 방법에 따라 bovine serumalbumin을 표준품으로 하여 정량하였다.

**SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis**: 각 정제 단계에서 얻어진 laccase 활성이 있는 분획을 검정하기 위해서 Davis<sup>(12)</sup> 등의 방법에 따라 전기영동을 실시하였다. Gel의 농도는 5%로 하였고 전류는 3 mA/tube로 하였으며 tray buffer로 SDS-sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 사용하였다.

**효소활성의 저해물질**: 침전에 사용되는 유기용매 및 부패방지를 위하여 사용되는 Na-azide에 의한 효소의 불활성화를 검정하였다. 조효소액 20 ml에 냉각시킨 유기용매 20 ml를 가하여 원심분리 (4°C 20분간 3,500 rpm)하여 그 침전물을 회수한다. 회수한 침전물을 증류수 20 ml로 분산용해한 후 침전시키기 전의 활성과 비교하여 각 용매의 저해율을 표시하였다. Na-azide는 0.1 M이 되게 첨가하여 활성을 측정 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**각 배지별 laccase 생성**

Fig. 2에 나타난 것을 보면 양파 기본배지에서는 8일경 활성이 나타나서 20일경 최대 활성치를 나타

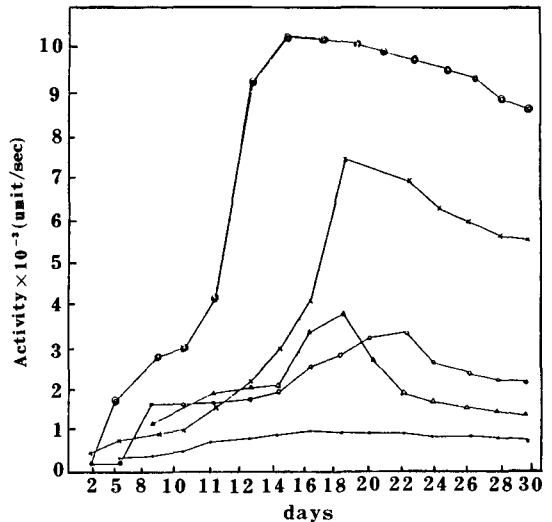
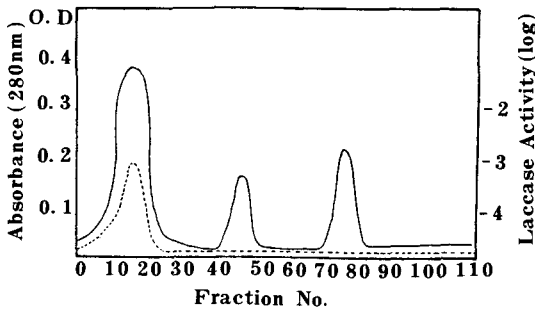


Fig. 2. Change in laccase activity from various liquid medium during incubation.

○—Onion medium, ×—Onion double strength medium, ●—Salt medium, △—Potato medium, ◐—PDY medium



**Fig. 3. Elution profiles of crude laccase on Sephadex G-150 column**

Column (2.6×60cm), Flow rate 30ml/h Absorbance at 280nm —, Laccase activity ----

냈다. 양파 200 g배지에서 양파 기본배지보다 훨씬 높은 활성을 나타낸 것은 양파의 어떤 성분이 활성에 많은 영향을 미치는 것으로 추측된다. 염류배지는 inducer로 작용하는 탄소원이 전혀 없기 때문에 lignin 분해 효소가 많이 생산되지 않는 것 같다. 감자배지는 18일경 활성이 최대에 도달하였고, PDY 배지에서도 14~16일경 최대 활성을 나타냈으며, 여러 배지중에서 laccase의 생산 능력이 가장 높았다 (Fig. 2).

**효소의 정제**

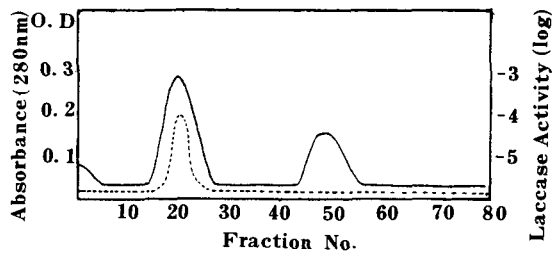
배양액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 60~80% 포화도로 분획한 후 침전물을 회수하여 투석하였다.

투석한 침전물을 Gel-filtration한 결과는 Fig. 3와 같았다.

나타난 3 개의 peak 중에서 앞부분의 Peak에서 laccase 활성이 나타났으므로 이 부분을 합하여 Ion-exchange chromatography를 실시 하였다. DEAE-Sephadex A-50 column을 이용한 결과는 Fig. 4와 같았다.

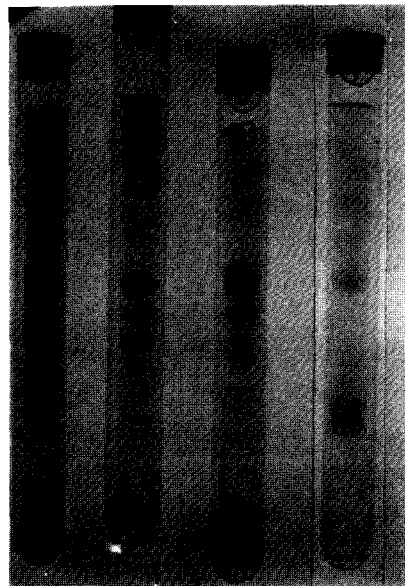
두개의 peak가 얻어졌으나 앞부분에서 활성이 나타나서 이 부분의 분획을 합하였다.

각 정제 단계별 laccase의 정제도는 Table 1과 같



**Fig. 4. Elution profiles of the laccase on DEAE-sephadex A-50 column**

Column (1×20cm), Flow rate 20ml/h Absorbance at 280nm —, Laccase activity ----



**Fig. 5. Polyacrylamide(5%) gel electrophoresis patterns of samples at various purification steps**

- 1) Acetone precipitation
- 2) Ammonium sulfate fractionation
- 3) Gel filtration
- 4) Ion-exchange chromatography

**Table 1. Purification of laccase from Ganoderma lucidum.**

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total Activity (A)	Specific Activity (A/mg)	Purification fold	Yield (%)
Filtrate of culture medium	1000	5.210	112.5	0.021	1	100
Ammonium Sulfate fractionation	100	1.219	82.1	0.673	32.07	72.98
Gel filtration (Sephadex G-150)	60	0.391	38.3	1.632	77.71	34.04
Ion-exchange chromatography (DEAE-sephadex A-50)	50	0.370	31.6	1.708	81.33	28.09

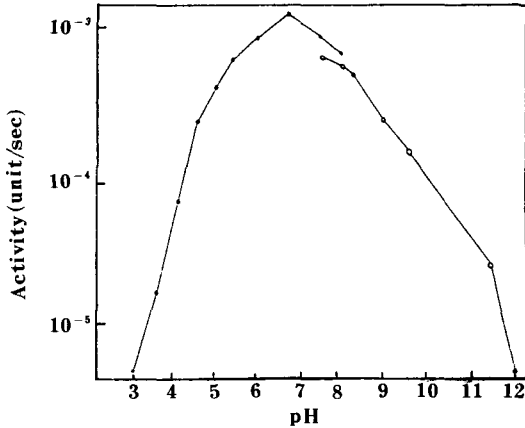


Fig. 6. Optimum pH of laccase from *Ganoderma lucidum*

—●—Citrate phosphate buffer.  
—○—Clark lub's buffer.

Enzyme (1.9ml) was mixed with 1.7ml (pH 3-12) and the activity was measured. Citrate phosphate buffer was used for pH 3-7 and Clark lub's buffer was used for pH 7-12.

았다.

정제되는 laccase를 각 단계별로 시료를 취하여 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 5에서 볼 수 있다.

Acetone 침전물은 하나의 주된 band와 여러개의 band로 나타나 배양액 중에는 여러종류의 단백질이 혼합되어 있음을 알 수 있고 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전을 거친 후에는 몇개의 불순 단백질이 제거되었고 Gel-filtration, Ion-exchange chromatography를 통하여 laccase가 정제되어 가는 과정을 볼 수 있었다.

효소의 특성

Laccase의 최적 pH는 6.45 (Fig. 6)로 *Pleurotus*

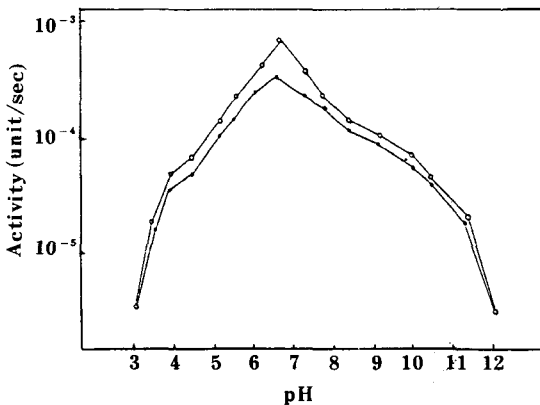


Fig. 7. pH stability of laccase from *Ganoderma lucidum*

—○—Activity based on initial velocity  
—●—Activity based on average for 60min.

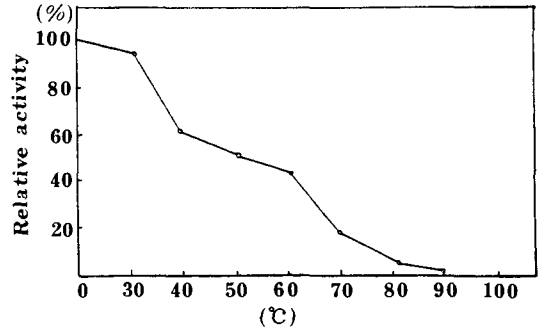


Fig. 8. Temperature stability of laccase at the 40min holding time.

Enzyme (1.9ml) was mixed with 1.7ml of citrate phosphate buffer (pH 6.45) and kept for 40 min at the specific temp. The mixture was then cooled rapidly and the activity was determined.

*ostreatus* 균주<sup>(13)</sup>의 5.94보다는 약간 높았고 *Flammulina velutipes* 균주<sup>(14)</sup>의 6.62보다는 조금 낮은 결과를 나타냈다. 같은 효소일지라도 Strain에 따라 특성의 차이가 있음을 알 수 있다.

Laccase의 pH 안정성은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 pH 5.0~9.0 사이에서 효소활성이 안정되어 넓은 pH 영역에서 안정됨을 볼 수 있다.(Fig. 7).

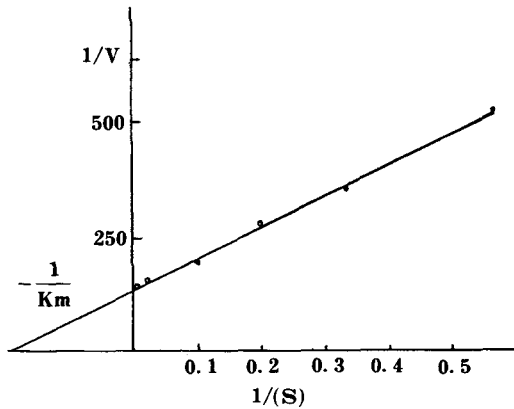
Laccase의 열 안정성은 Fig. 8에서 보는 바와 같이 50°C에서 40분간 방치하였을 때 58%의 잔유활성을 갖는 것으로 보아 비교적 열에 안정한 편이다(Fig. 8).

효소 활성에 영향을 미치는 여러가지 유기용매를 실험한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 Methanol (42%) Ethanol (25%)에서 저해가 있었으며 *Pleurotus ostreatus* 균주<sup>(13)</sup>와 *Flammulina velutipes* 균주<sup>(14)</sup>가 거의 저해를 받지 않는 것과는 차이가 있

Table 2. The effect of various solvents and enzyme inhibitors on the laccase activity

Kinds of solvent	ΔE	Activity (unit/sec)	Activity Index	Percent Inhibition (%)
Crude	0.12	6.15 × 10 <sup>-3</sup>	1	0
Acetone 침전물	0.16	8.20 × 10 <sup>-3</sup>	1.33	0
Methanol 침전물	0.07	3.58 × 10 <sup>-3</sup>	0.58	42
Ethanol 침전물	0.09	4.61 × 10 <sup>-3</sup>	0.75	25
Iso-propyl alcohol 침전물	0.05	2.56 × 10 <sup>-3</sup>	0.42	58
Na-Azide 첨가액	0	0	0	100
Na-Azide 첨가액의 Acetone 침전 회수물	0.11	5.64 × 10 <sup>-3</sup>	0.92	0.08

\*The activity was determined for 300 sec.



**Fig. 9. Km value of purified laccase**

The enzyme activity was determined with varying substrate concentration from 2mM to 60mM. The data was converted and then plotted.

었다. Acetone 침전시켰을 때는 침전 전보다 약간 높은 활성을 보인다. 이것은 초기 정제단계라고 볼 수 있는 Acetone 침전에 의해서 활성을 억제하는 어떤 물질이 제거되는 것으로 추정할 수 있다.

Na-azide를 첨가한 조효소액은 전혀 활성을 나타내지 않지만 이 액을 다시 Acetone 침전시켜서 침전물을 증류수로 용해시킨 후 활성을 측정하면 완전히 활성을 회복한다. 이 결과 Na-azide에 의한 활성의 억제가 가역적이며 따라서 column의 부패방지를 위해 Na-azide를 사용하였다더라도 Na-azide가 제거되면 활성에는 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다 (Table 2).

정제된 laccase의 Km 값은 6.71 mM 이다 (Fig. 9). 이것은 *Pleurotus ostreatus*의 laccase (3.29mM) 과 거의 비슷하였으며 *Flammulina velutipes*의 laccase (28 mM) 보다는 상당히 낮았다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 연구비 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Peal I. A.: *Tappi*, **52**, 575 (1969).
2. Sarkanen K.V.: *Tappi*, **50**, 363 (1967).
3. Borton G.M.: *J. Chromatog.*, **26**, 320 (1967).
4. Kleinert T.N.: *Tappi*, **50**, 120 (1967).
5. Yoshida H.: *J. Chem. Soc.*, **43**, 472 (1883).
6. Bertrand G.: *Compt. rend.* **118**, 1215 (1894), **120**, 266 (1895).
7. Fukuzumi T.: *Sacc. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 728 (1960).
8. Sjerma F., G.R. Fink, J.B. Hicks: *Methods in Yeast Genetics. Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor, New York (1982).
9. Iwaharax H., T. Yoshimoto and T. Fukuzumi: *木材化学会誌* **27** (4) 331 (1981).
10. Leonowica A. and K. Graynowicz: *Enzyme Microb. Technol.* **3** (1) 155 (1981).
11. Lowry D.H.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
12. Davis B.J.: *Disc. electrophoresis Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 (1964).
13. Lee J.S., U.J.Lee., D.S. Suh: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13** (1), 65 (1985).
14. Lee J.S., D.S. Suh: *Korean J. Mycol.* **13** (2) 111 (1985).
15. Cooper T.: *The Tools of Biochemistry*, **206** (1977).
16. Kellin D. and T. Mann; *Nature*, **145**, 304 (1940).
17. Bertrand D.: *Comp. rend.* **224**, 605 (1947).