

## 2,5-Xylidine을 이용한 목재부후균으로부터 Laccase 효소의 유도\*1

조 남 석\*2 · 김영신\*2 · 방명혁\*2 · 최윤정\*2 · 남장현\*2 · 안드레 레오노비취\*3

# Induction of Laccase from Wood-Rotting Fungi with 2,5-Xylidine\*1

Nam-Seok Cho · Y.S. Kim · M.H. Pang · Y.J. Choi · J.H. Nam · A. Leonowicz\*2

### ABSTRACT

Some white-rot fungi, screened at the Laboratory of Forest Products Microbiological Chemistry, Chungbuk National University were cultured and added the inducer of laccase enzyme, 2,5-xylidine. The fungi named by CB-13, CB-20, CB-99, CB-100 and CB-123 strains showed positive results in the decolorization of aromatic compounds, carminic acid and Rhemazol brilliant blue R.

Concerned to the inducing effect of 2,5-xylidine on laccase activity, CB-20, CB-100 and CB-123 strains showed very high activity by addition of 2,5-xylidine, whilst CB-13, CB-99 and CB-124 strains produced relatively high laccase enzymes, regardless of inducer addition. There were no any laccase activities on CB-25, CB-64 and CB-139, even in addition of inducer. It is confirmed that some screened fungi have decolorizing ability on aromatic compounds, carminic acid and Rhemazol brilliant blue R. Also, the addition of inducer, 2,5-xylidine, has increased the activity of laccase enzyme which is secreted from some white-rot fungi.

**Keywords** : laccase, carminic acid, Rhemazol brilliant blue R, inducer, white-rotting fungi, 2,5-xylidine, decolorization

## 1. 서 론

급속한 산업화로 야기된 환경오염문제 중 폐수처리나 폐수의 회수 문제와 같이 수질오염에 대한 관심이 한층 더해가고 있다. 이러한 폐수중에 포함된

유해물질가운데는 목재 리그닌유도체와 유사한 구조를 가지는 화합물이 있으며, 일부 목재부후균이 리그닌을 분해하는 점에 착안하여 이 특성을 이용, 이를 제거할 목적으로 많은 연구 (Magdoff *et al.*, 1984; Rappe, 1980)가 이루어지고 있다. 리그닌을 분해하

\*1 Received on March 26, 1998.

본 연구는 95 농림수산 기술개발사업(첨단기술개발과제) 및 한국과학재단 국제공동연구과제(985-0600-011-2)의 연구비지원으로 수행되었음.

\*2 충북대학교 농과대학 College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

\*3 폴란드 마리아-큐리대학교 Department of Biochemistry, Maria Curie-Skłodowska University Place 3, PL 20031, Lublin, Poland

는 효소로서 몇몇의 백색부후균이 분비하는 lignin peroxidase, Mn peroxidase와 laccase의 세 효소가 관여하는 것으로 알려지고 있는데 펄프와 제지 산업에 있어 이러한 리그닌 분해효소를 이용한 생명공학 적 접근이 펄프화, 펄프표백, 표면특성개량 뿐만 아니라 나아가서 이런 공정 상에서 발생하는 폐수의 정화에까지 사용될 것으로 전망되고 있다.

Laccase [Benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2]는 옻나무의 수액에서 발견(Yoshida, 1883)한 것으로, Bertrand(1894)가 Indo-chinese lacquer 나무의 유액으로부터 같은 효소를 얻어내어 이 효소의 이름을 laccase라 하였다. Laccase는 다양한 균들에서 발견되었는데, 자낭균인 *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*와 *Podospora anserina* 및, 포도상 불완전균인 *Botrytis cinerea*와 담자균의 몇몇 속(屬)에서 생산되어진다. Laccase 활성이 높은 담자균으로서는 *Collybia velutipes*, *Fomes annosus*, *F. fomentarius*, *Lentinula edodes*, *Pholoiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*, *Poria subacida*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Trametes sanguinea*와 *T. versicolor* 등인데, 이와 같은 균들은 리그닌을 효과적으로 분해시키는 것으로 알려져 있으며, 토양균인 *Rhizoctonia praticula*도 laccase를 생산하는 능력이 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 laccase의 활성은 백색부후균뿐만 아니라 갈색부후균의 일부에서도 찾아볼 수 있었다(Keither and Telliard, 1979). 이러한 laccase가 리그닌 분해에 관여하는 효소이지만 생물학적 분해에 어떤 역할을 하는지가 거의 구명되고 있으며, 최근 이러한 laccase 효소가 산화기질이 있는 상태에서 비폐놀성 리그닌 구조를 분해시킬 수 있음을 밝혀냈다 (Magdoff et al., 1984).

일반적으로 백색부후균에서 발견되는 laccase는 리그닌 모델화합물을 중합하거나 해중합하기 위하여 폐놀성 수산기로부터 하나의 전자를 분리시키는 촉매작용을 한다. Laccase는  $\beta$ -1과  $\beta$ -O-4 이량체를  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ 의 분리와  $C_{\alpha}$ 산화와 alkyl-aryl 분리를 통해 분해한다. 또한 방향핵 (aromatic ring) 분리가 laccase의 작용에 따라 감지 될 수 있다. Laccase는 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)와 같은 물질이 1차 매개물 (primary mediator)로 공존할 때에 폐놀성 화합물을 산화시킬 수 있고, 목재부후효소로 하여금 목재세포벽에 침투할 수 있게 하는 Mn(III) chelate를 만든다. Laccase는 Li-P와 Mn-P와 함께 하여 리그닌을 분해할 수 있는 능력이 있는

것으로 밝혀졌다 (Keither and Telliard, 1979). Bollag와 Leonowicz(1984)는 여러 종류의 담자균 (basidiomycetes), 자낭균(ascomycetes)과, 땅이 풍부한 액체 배지에서 성장한 불완전균(deuteromycetes)의 laccase 생산 능력과 laccase 생산에 대한 2,5-xylydine 유도효과(inducing effect)를 연구한 결과, *Fomes annosus*, *Pholia mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*와 *Trametes versicolor*의 배양에서 2,5-xylydine이 균체외 효소(extracellular enzyme)형성을 촉진시킨다는 결과를 얻었다(Gray and Rock, 1987).

리그닌 분해효소를 이용한 것은 폐수 처리뿐만 아니라 생물학적 펄프화, 생물학적 표백 등으로 그 이용분야가 다양하다. 그러므로 이 리그닌 분해효소를 분비하며 이용하기에 보다 경제적이고 작업이 용이한 균의 선발과, 기존 리그닌 분해균의 생리, 배양상태의 조건 개선 등에 관하여 보다 많은 연구가 요구되고 있다.

본 연구는 백색부후균으로 밝혀진 몇 종의 균주들에 대하여 방향족 화합물에 대한 분해능력을 통한 스크리닝 및 이들이 생산하는 laccase 효소활성에 미치는 2,5-xylydine inducer의 첨가효과를 알기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시균주의 배양

속리산 및 월악산 지역에서 채집한 균주를 25°C, PDA배지에 배양하고, 방향족화합물 guaiacol 과의 강한 정색반응을 나타내는 균주 CB-13, CB-20, CB-25, CB-64, CB-99, CB-100, CB-123, CB-124, CB-139 등 9종을 공시균주로 선발, 사용하였다.

### 2.2 방향족 화합물 탈색특성

방향족화합물의 탈색특성을 조사하기 위하여 고형 배지를 사용하였다. Malt extract 10g, sucrose 10g, peptone 2g, yeast extract 4g, agar 20g을 1 liter에 녹이고, pH를 5.5로 조정하여 조제한 배지에 carminic acid 0.2g/l 및 Rhemazol brilliant blue R 0.2g/l을 첨가하고, 멸균후 9cm 직경의 페트리접시에 분주하고, 냉각시킨후 공시균을 접종하고, 25°C에서 10일간 균의 성장 및 탈색능을 페트리접시에서 각균주의 성장과 변색부위의 길이로서 측정하였다.

### 2.3 효소활성 및 최적 pH 측정

공시균주들이 분비하는 리그닌 분해효소가운데 laccase활성을 측정하기 위하여 glucose 10g, L-asparagine 2.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.47g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.48g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50mg, Mn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 8.5mg, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 3.2mg, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 3.91mg, thiamine 0.5mg 등을 1 l의 증류수에 용해시켜 만든 질소원이 낮은 액체배양액(pH 5.5)에 접종하여 25°C에서 소정기간(60일) 동안 정치배양하였다. 효소배양액을 정기적으로 그리고 무균적으로 채취하여 0.5mM syringaldazine을 기질로 525nm 에서 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1601) 을 사용하여 laccase 활성을 측정(Leonowicz and Grzywnowicz, 1981; Leonowicz *et al.*, 1997) 하였으며, 최적 활성 pH를 알기 위하여 0.1 M citrate-phosphate buffer를 이용, 가장 높은 laccase 활성을 나타내는 균의 최적 pH를 측정(Hellvaine, 1921)하였다. 전실험에서의 pH는 McIlvaine buffer(pH 2.2-8.0)을 사용하여 조정하였다.

### 2.4 Inducer 첨가가 laccase 효소활성에 미치는 영향

Inducer를 사용한 laccase 효소의 유도효과를 알기 위하여 2.3항의 배양조건에서 액체배지에 균을 접종 후, 균사가 반정도 피복하였을때 (통상 8-12일) Fahraeus와 Reinhammar의 방법(1967)에 따라 0.01 M의 2,5-xylidine 를 무균적으로 첨가하여 배양기간에 따른 laccase활성을 전항의 방법으로 조사한 최적 pH 조건에서 경시적으로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 공시균주의 성장 및 방향족 화합물의 탈색효과

Carminic acid를 첨가한 고체배지에서의 각종 균주들의 균사생장은 CB-124, CB-123의 생장이 가장 활발하였고, CB-20도 상기 2종의 균주들에게 거의 버금가는 성장상황을 나타냈으며, 3종 모두 5일만에 성장최대치에 달하였다. CB-13, CB-100, CB-99는 7일만에, CB-139는 9일만에 성장 최대치를 나타냈고, CB-25 및 CB-64는 거의 성장하지 않았다.

Fig. 1은 carminic acid에 의한 착색대의 탈색에 미치는 균주들의 특성을 나타낸것이다. CB-124 및

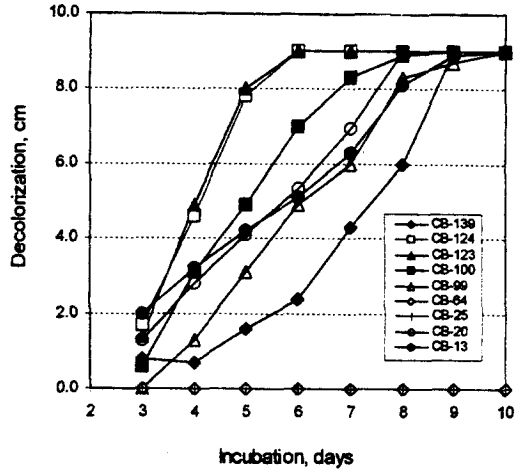


Fig. 1. Decolorization of the carminic acid by fungi.

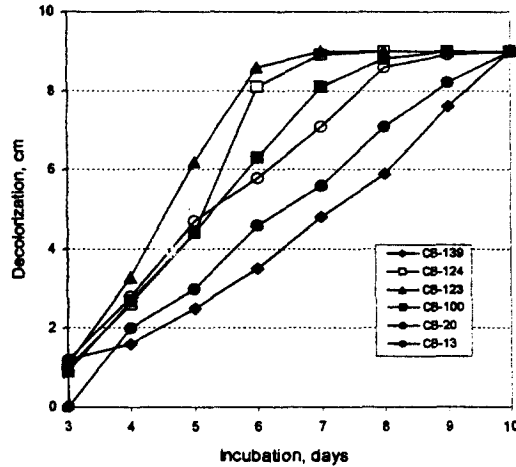


Fig. 2. Decolorization of the Rhemazol brilliant blue R by fungi.

CB-123의 탈색효과가 가장 높아 6일만에 최대의 탈색효과를 나타냈으며, 탈색최대가 성장보다 하루 늦게 나타났다. 그리고 CB-100은 8일만에, CB-20, CB-13, CB-99, CB-139 등은 8-9일만에 최대의 탈색을 보였으며, 생장이 저조하였던 CB-25 및 CB-64는 탈색이 전혀 이루어지지 않았다.

Rhemazol brilliant blue R의 배양기에서의 각종 균주들의 균사성장상태를 살펴보면 carminic acid 배양기에서의 마찬가지로 CB-124, CB-123의 생장이 가장 활발하였고, CB-20도 상기 2종의 균주들에게 거의 유사한 성장상황을 나타냈으며, 3종 모두 6일만에 성장최대치에 달하였다. CB-13, CB-100, CB-99

는 8일만에, CB-139는 9일만에 성장 최대치를 나타냈고, CB-25 및 CB-64는 거의 성장하지 않았다. Fig. 2는 Rhemazol brilliant blue R 첨가에 의한 착색대의 탈색에 미치는 균주들의 특성을 나타낸 것이다. CB-124 및 CB-123의 탈색효과가 가장 높았는데 7일만에 최대의 탈색효과를 나타냈으며, 생장이 최대에 달한 날짜보다 하루 늦게 나타났다. 그리고 CB-100 및 CB-20은 8일만에, CB-13, CB-99, CB-139 등은 8-9일만에 최대의 탈색을 보였으며, 생장이 불량하였던 CB-25 및 CB-64는 탈색이 전혀 이루어지지 않았다.

### 3.2 Laccase 효소활성의 최적 pH

공시균주 가운데서 선발된 균주들이 최대 laccase 활성을 나타내는 최적 pH를 조사한 결과, 대부분의 균주들이 pH 4.5-6.0의 범위에서 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. CB-13, CB-123 및 CB-124 균주에서는 inducer로서 첨가한 xyloidine의 유무에 관계없이 최적 pH가 5.3-5.5으로 큰 변화가 없었는데 대하여, Fig. 3에서와 같이 적정 pH를 경시적으로 조사한 결과, CB-20, CB-99 및 CB-100 균주와 같이 inducer의 첨가로 적정 pH가 다소 상승하는 경우도 있었다. *Trametes versicolor* 및 *Cerrena unicolor*의 최적 pH가 5.5, *Rhizoctonia praticolor*는 6.8 정도 (Leonowicz *et al.*, 1984)로서 균주에 따라 상이한바, 본 연구에서 선발된 균주들도 대개 이런 정도의 범위에 있었으며, 경우에 따라서는 3.5 - 4.5의 pH를 최적으로 하는 백색부후균(Cho *et al.*, 1997)도 보고되고 있다.

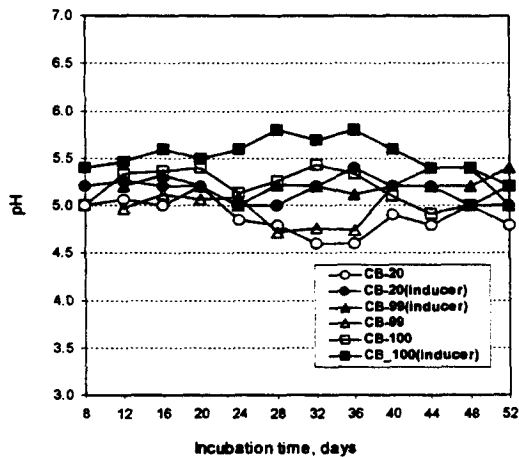


Fig. 3. Change in pH optimum by addition of inducer.

### 3.3 주요 부후균의 laccase 효소 활성변화에 미치는 inducer의 영향

Laccase는 담자균류, 자낭균류 및 불완전균류들로부터 생산되어 지는데, 이들이 분비하는 효소의 활성을 높이기 위하여 탄소원 및 질소원을 제한한 배양액에 효소의 유도물질로서 2,5-xyloidine이 도입 (Fahraeus *et al.*, 1949)된 이래 오늘날까지 널리 이용 (Agematu *et al.*, 1993; Rogalski and Leonowicz, 1992)되고 있다. CB-20 균주의 laccase 활성에 미치는 2,5-xyloidine의 첨가효과를 경시적으로 Fig. 4에 나타냈는데, 2,5-xyloidine 첨가로 인하여 급격한 활성의 증가를 나타냈다. laccase 활성은 계속 증가하여 24일에는 44,000 nkat/l로서 공시한 균주 가운데는 가장 높은 값을 보였으며, 그 이후에는 점

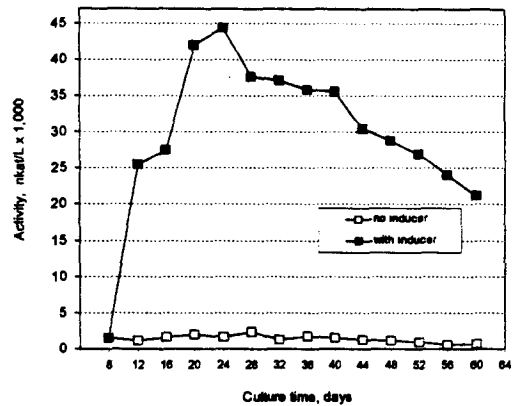


Fig. 4. Change in Laccase activity of CB-20 by inducer addition.

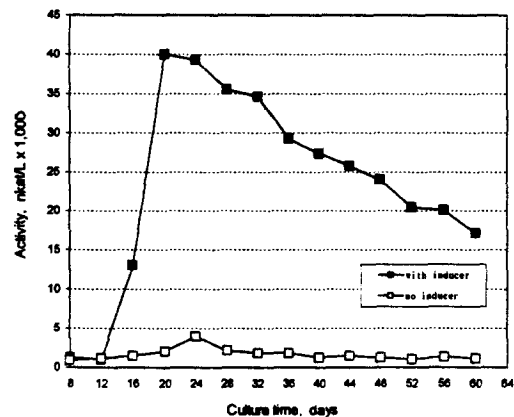


Fig. 5. Change in Laccase activity CB-123 by inducer addition.

차 감소하는 것으로 나타났다.

Fig. 5는 2,5-xylydine 첨가에 의한 CB-123의 활성의 경시적 변화를 나타낸 것으로서 2,5-xylydine 첨가후 12일후 급격한 활성증가를 결과하여 20일만에 최고의 활성값인 42,500 nkat/l 정도의 높은 활성을 기록하고, 그 이후 점차 감소하였다. 2,5-xylydine 미첨가시에는 매우 낮은 활성을 나타내는데 그쳤다.

Fig. 6은 CB-100의 활성에 미치는 2,5-xylydine의 첨가효과를 나타낸것으로서 앞에서의 균주들보다는 2,5-xylydine 첨가후 즉시 활성이 증가되지 아니하고, 24일 지난 후부터 급격한 활성증가를 일으키기 시작하여 32일 배양후 약 18,000 nkat/l의 높은 활성을 나타냈다. 그 이후에는 활성이 급격히 감소하여 36일째에는 미첨가한 균주와 마찬가지로의 매우 낮은 활성을 나타내, 활성의 유지기간이 매우 짧은 특징을 나타냈다.

Fig. 7은 CB-124 균주의 활성의 경시적 변화로서 배양 초기 16일까지는 2,5-xylydine의 첨가유무에 관계없이 15,000-20,000 nkat/l 의 매우 높은 laccase 활성을 나타냈으며, 16일이 지나면서 inducer 의 첨가로 급격한 활성의 증가가 나타나 24일째 약 32,700 nkat/l 의 가장 높은 활성을 나타냈고, 그 이후는 다시 감소하였다. 이에 대하여 inducer 첨가하지 않은 균주에서는 약 20일 이상 동일한 활성이 유지 되었으며 그 이후 44일까지는 소폭으로 유지되다가, 44일이 되면서 급격한 감소를 나타냈다.

Fig. 8 및 9는 inducer의 첨가효과가 없는 CB-13 및 CB-99 의 활성변화를 각각 나타낸 것이다. 이들 2종의 균주들은 2,5-xylydine 첨가 유무에 관계없이 활성이 유사한 경향을 보여주었으며, CB-13 의 경우는 7일에서 10일정도 까지 활성이 유지되었으며, 11일이 지나면서 급격한 활성저하를 결과하였다. CB-99는 30일 전후에 16,000 nkat/l 의 최대의 활성을 나타냈으며, 48일 되면서 급격한 활성의 저하를 나타냈다. 이와 유사한 결과는 *Pluerotus sajor-caju* 에서도 보고(Vasdev and Kuhad, 1994; Tuor *et al.*, 1995; Leonowicz *et al.*, 1997)되고 있다. 공시된 균주 가운데 CB-13 이 가장 짧은 기간중에 활성변화를 나타냈다.

이상을 요약하면 리그닌 분해효소인 laccase 활성 및 이들 효소활성에 미치는 2,5-xylydine의 첨가효과에 있어서 CB-20, CB-100 및 CB-123균주는 inducer의 첨가 없이는 단지 소량의 laccase만을 생산할 뿐이며, inducer의 첨가로 laccase 효소의 유도

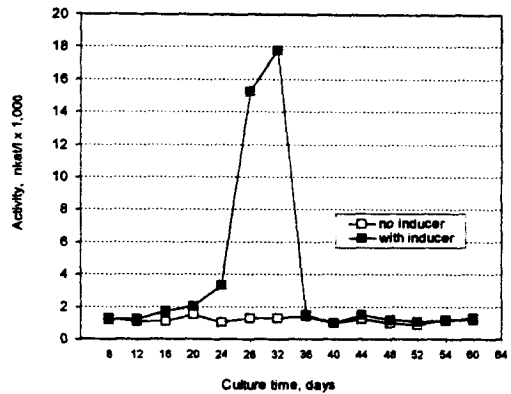


Fig. 6. Change in Laccase activity of CB-100 by inducer addition.

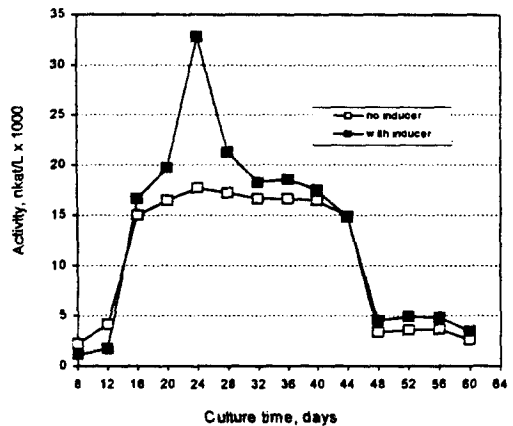


Fig. 7. Change in Laccase activity of CB-124 by inducer addition.

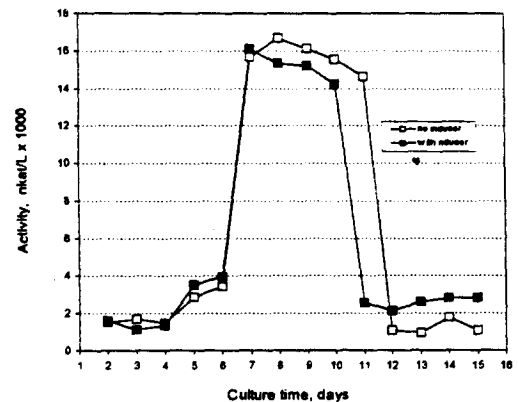


Fig. 8. Change in Laccase activity of CB-13 by inducer addition.

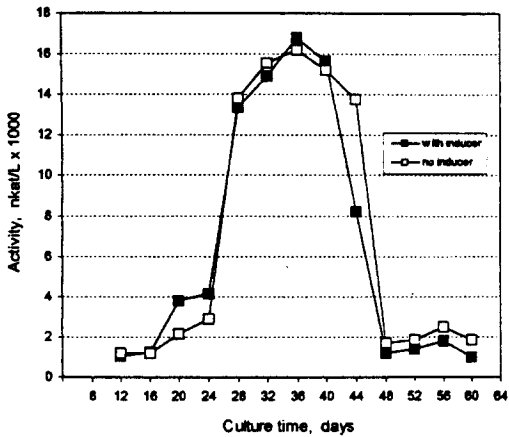


Fig. 9. Change in Laccase activity of CB-99 by inducer addition.

효과가 매우 큼을 알 수 있었다. 한편 CB-13, CB-99 및 CB-124 균주는 inducer의 첨가 없이도 어느 정도의 laccase를 분비하였으며, CB-25, CB-64 및 CB-139는 inducer 첨가 유·무에 관계없이 laccase 활성이 거의 확인되지 않았다. 그러므로 laccase 활성에 있어 2,5-xylydine 과 같은 유도물질이 모든 균주에 대하여 유도효과를 가지는 것이 아님을 알 수 있었다. 금후 많은 균주를 대상으로 하여 고활성의 laccase 효소의 대량생산을 위한 유도물질의 첨가효과 및 생산된 유도효소의 특성에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

#### 4. 결 론

백색부후균으로부터 carminic acid 및 Rhemazol brilliant blue R의 탈색에 높은 활성을 보이는 9종의 균주를 선발하였으며, 그 가운데 CB-124 및 CB-123 균주의 탈색능이 매우 높아 배양 6일만에 최대의 탈색효과를 나타냈다. CB-100은 배양 8일만에, CB-20, CB-13, CB-99, CB-139 등은 8-9일만에 최대의 탈색을 보였으며, 생장이 저조하였던 CB-25 및 CB-64는 탈색이 전혀 이루어지지 않았다. Rhemazol brilliant blue R에 대해서도 carminic acid 에서와 유사한 결과를 얻었다.

상기 균주들에 대하여 리그닌 분해효소인 laccase 활성 및 이들 효소활성에 미치는 2,5-xylydine의 유도효과를 조사한 결과, CB-20, CB-100 및 CB-123 균주는 inducer의 첨가 없이는 낮은 laccase 활성을

보였을 뿐이며, inducer의 첨가에 의해 비교적 높은 laccase 활성이 유도됨을 확인하였다. 한편 CB-13, CB-99 및 CB-124 균주는 inducer의 첨가없이도 어느 정도의 laccase를 분비하였으며, CB-25, CB-64 및 CB-139는 inducer 첨가 유·무에 관계없이 laccase 활성이 거의 확인되지 않았다. 그러므로 laccase 활성에 있어 2,5-xylydine 과 같은 유도물질이 모든 균주에 대하여 유도효과를 가지는 것이 아님을 알 수 있었다.

#### 참 고 문 헌

1. Agematu, H., N. Shibamoto, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin, and S. Murao. 1993. Oxidative decarboxylation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) glycine by laccases from *Coriolus versicolor* and *Coriolus bilirubin* oxidases from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1877-1881
2. Bertrand, G., 1894. Sur le latex de l'arbre a laque. C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris) 118: 1215
3. Bollag, J.M. & A. Leonowicz. 1994. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl. Environ. Microbiol. 48: 849-854
4. Cho, Nam-Seok, J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek. M.W. Wasilewska, E. Malarczyk, M. Fink-Boots and A. Leonowicz. 1997. Removal of chlorophenols by fungal laccase in the presence of fungal laccase. Proc. Intern'l Sem. For. Sci., Chungbuk National Univ., Cheongju, Korea. pp.71-80
5. Hellvaine, T.C., 1921. A buffer solution for calorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49, 183-186.
6. Leonowicz A. and Grzywnowicz K., 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme Microb. Technol., 3, 55-58.
7. Magdoff, R. et al., 1984. Wood ash research project Final report, Dept. Plant & Soil Sci., Unive. of Vermont, Burlington, U.S.A.
8. Leonowicz, A., L. Gianfreda, J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek. M.W. Wasilewska, E. Malarczyk, A. Dawidowicz, M. Fink-Boots. G. Ginalska,

- M. Staszczak and Nam-Seok Cho. 1997. Appearance of Laccase in wood-rotting fungi and its inducibility. *Mokchaekonghak* 25(3): 29-36.
9. Leonowicz, A., R.U. Edgehill, and J.M. Bollag. 1984. The effect of pH on the transformation and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticolor* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137: 89-96.
  10. Rappe, C., 1980. Chloroaromatic compounds containing oxygen : phenols, diphenylethers, dibenzo- p-dioxins and dibenzofurans, pp.157-179. In O. Hutzinger (ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag KG, Berlin.
  11. Rogalski, J. and A. Leonowicz. 1992. *Phlebia radiata* laccase forms induced by veratric acid and 2,5-xylidine in relation to lignin peroxidase and Mn-dependent peroxidase. *Acta Biotechnol.* 12: 213-221.
  12. Tuor, U., K. Winterhalter and A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17.
  13. Vasdev, K. and R.C. Kuhad. 1994. Induction of laccase production in *Cyathus* under shaking and static culture conditions. *Folia Microbiol.* 39: 326-330.
  14. Yoshida, H., 1883. Zur Chemie des Urushi firmiss. *J. Chem. Soc. (Tokyo)* 43: 472.