

최 종
연구보고서

바이오기술을 이용한 화학펄프 표백용
우수 laccase 및 mediator의 개발과
대량 생산

Development of Novel Laccase and Mediators for
Bio-bleaching by Biotechnology

순천대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “바이오기술을 이용한 화학펄프 표백용 우수 laccase 및 mediator의 개발과 대량생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 08 월 09 일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 김 훈

세부연구책임자 : 박 서 기

세부연구책임자 : 정 현 채

연 구 원 : 신 은 선

연 구 원 : T. selvaraj

연 구 원 : 권 은 주

연 구 원 : 정 유 진

연 구 원 : 박 의 선

연 구 원 : 정 창 현

연 구 원 : 윤 철 현

연 구 원 : 송 송

연 구 원 : 이 진 영

연 구 원 : 진 행 나

연 구 원 : 송 진 영

요 약 문

I. 제 목

바이오기술을 이용한 화학펄프 표백용 우수 laccase 및 mediator의 개발과 대량생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

펄프·제지산업에서 발생하는 가장 큰 오염원은 펄프 표백 시 염소에서 유래되는 염소화 리그닌 및 다이옥신 등이다. 오래전부터 이들의 처리와 새로운 펄프 표백법의 개발에 많은 관심이 집중되었지만 아직까지 염소를 대체할 만한 우수한 표백방법을 찾지 못하고 있다.

최근의 생물공학기술은 이의 대체 방법으로 충분한 가능성을 갖고 있는 것으로 평가되어 펄프·제지산업의 여러 분야에서 이의 응용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Xylanase에 의한 표백의 전처리와 재생섬유의 잉크 제거 (deinking)는 이미 산업화되어 xylanase의 상업적 생산 규모는 날로 확대되어 가고 있다. 그러나 xylanase처리로서는 펄프표백시 활성염소의 양을 최대 25%정도 감소시키는데 지나지 않아 만족할만한 대체효과를 달성하지 못하고 있다 (3). 이에 반하여 자연계에서 뛰어난 리그닌 분해능을 갖고 있는 백색부후균을 이용하여 탈리그닌 처리를 행하였을 때 표백에 필요한 약품의 약 72%까지 감소시킬 수 있다는 보고가 발표되고 (6, 7), 특히 laccase/mediator system이 비폐놀성 리그닌구조를 직접 분해하고 펄프의 kappa number를 감소시킨다고 보고됨으로서 laccase를 이용한 생물학적 표백은 장차 염소를 대체할 수 있는 표백공정으로서의 가능성에 많은 관심이 집중되고 있다. 그러나 laccase/mediator system이 확실한 표백공정으로 적용되기 위해서는 펄프 표백에 더 적합하고 우수한 laccase를 분비하는 야생 균주들을 분리하여 이들 균주들로부터 생물공학기술에 의한 laccase의 대량생산 체계를 확립하여야 하고, 또한 특정의 laccase에 적합한 값싸고 효과적인 mediator를 선별하여 이들

laccase와 mediator에 의한 효과적인 표백체계가 확립되어야 할 것이다.

본 연구진은 최근 기존의 백색부후균에 비하여 리그닌분해능이 우수하고 탈리그닌 선택성이 뛰어난 *Trichopyton rubrum* LKY-7을 국내의 chip pile로부터 분리하였다 (37). 또한 이 균주가 생산한 laccase는 지금까지 국내·외에서 보고된 것과는 다른 특성을 나타냈고, 기 개발된 mediator들에 대하여 우수한 기질 특이성을 나타냈다 (38).

본 연구에서는 첫째, 새로 분리한 *Trichopyton rubrum* LKY-7으로부터 laccase유전자를 클로닝하고 이 유전자를 다른 호모나 세균에 도입, 발현시켜 대량생산할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 둘째, N-OH 그룹을 포함하고 있는 특정 화합물의 유사체들로 우수한 mediator를 선발하고자 하였다. 셋째, 미 표백펄프의 탈리그닌 효과를 증대시킬 목적으로 활엽수 및 침엽수 크라프트펄프에 대하여 xylanase와 laccase/mediator system의 병용처리에 의한 시너지효과를 검토하여 laccase/mediator system에 의한 화학펄프의 표백 체계를 확립하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 xylanase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

- 1) *T. rubrum* LKY-7의 리그닌 분해에 관련된 효소 활성화
- 2) *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석
- 3) 펄프의 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

나. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성과 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

- 1) *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase(TrL) 유전자의 클로닝
- 2) *T. rubrum* LKY-7의 redox potential과 리그닌 분해능과의 관계 구명
- 3) TrL 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

다. TrL/mediator system 혹은 xylanase와 TrL/mediator system에 의한 펄프 표백 체계 확립

- 1) *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase를 분리, 정제하여 그 특성을 규명하고 laccase의 대량생산 체계 확립
- 2) N-hydroxypyrazinone 및 N-hydroxy-2-pyridone analogues로부터 우수한 mediator의 선발
- 3) Xylanase 및 TrL/mediator system에 의한 화학펄프의 표백체계 확립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 xylanase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

- 1) *T. rubrum* LKY-7의 리그닌 분해에 관련된 효소 활성화

T. rubrum LKY-7 (TrLKY-7)의 리그닌 분해효소 생산량을 비교한 결과, 효소생산량은 배지의 조성에 민감하였으며, 특히 laccase 생산은 진탕배양에서 높은 수준을 보였다. 목분이 첨가되었을 때, laccase 활성이 20배 높게 나타났으나, MnP, LiP, cellulase, 그리고 xylanase의 활성은 매우 미미하였다. 사용한 배지에 목분을 첨가할 경우 laccase는 최고 20 U/ml, LiP는 laccase의 약 20% 수준, 그리고 MnP는 그 절반 수준을 생성하는 것으로 확인되어 이 균은 실제 환경에서 LiP와 MnP를 소량 생성할 수 있는 것으로 조사되었다. 그러나, LiP와 MnP의 효소단백질 자체의 생산량이 낮아 이들 효소는 정제할 수 없었다. TrLKY-7의 laccase의 경우, native gel에서 활성염색을 수행한 결과 2-4개의 활성 band가 보여 생산되는 laccase 종류가 두 개 이상일 가능성을 확인하였다. SDS-PAGE 활성염색에서 laccase는 열에 대해서 민감하게 반응하였으며, 주요 band의 분자량은 약 65 kDa이었다. 배양액에 목분이 첨가 여부에서 laccase 활성염색 band 수가 다르게 나타났으나, laccase 정제 과정에서 두 경

우 활성은 다르지만 일치된 한 개의 효소활성 peak를 보였다. 항체를 이용한 Western blotting 실험의 결과는 TrLKY-7이 생산하는 laccase는 단일 laccase가 아닌 것을 뒷받침하여, TrLKY-7은 주요 laccase와는 다른 또 하나의 laccase를 생산하는 것으로 조사되었다. 정제된 laccase 효소의 특성을 조사한 결과, 기질친화력은 ABTS가 가장 좋았으나, 활성촉매 속도는 NHA에 대하여 가장 높았다. 또한, 다른 효소원으로 *T. rubrum* LSK-27, *Phanerochate chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Bacillus subtilis* BSE616, *B. subtilis* KD1014, 그리고 *Clostridium thermocellum* 등의 균들을 확보하였다.

2) *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석

TrLKY-7으로부터 분리된 laccase 유전자 (*lacA*)는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역이 확인되었다. 현재까지 보고된 곰팡이 유래 laccase 유전자는 약 20여종과는 다른 서열을 보였다. Block 5개 중에서 4개 부분은 촉매에 직접적인 관련을 하는 것으로 예측되어지고, 일반적으로 뒷 부분에 기질결합 domain이 많이 존재하므로 다섯 번째 domain 부분을 deletion 시키는 실험을 수행하였다. Overlapped DNA를 pGEM-T Easy vector에 cloning하여 plate에 도말 후 자란 콜로니 25개 중 12개를 무작위로 배양하여 활성을 나타내는 클론을 선발하였다. Block 5가 결손된 유전자를 지니는 transformant로부터 생산된 laccase의 효소 활성은 본래 유전자 *lacA*를 지니는 클론과 비교하였을 때 전반적으로 낮아 가장 우수한 clone의 효소 활성도 31%로 현저히 감소되었다.

3) 펄프의 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

Laccase는 TrLKY-7 유전자를 대상으로 벡터는 pWB705, insert cDNA는 pETLAC 플라스미드를 사용하였다. 형질전환은 *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800의 competent cell을 만들어 수행하였다. WB700 (pES88)과 WB800 (pES88)은 kanamycin이 들어있는 평판배지에 도말하였고, 그 중 가장 활성이 높은 transformant를 선택하였다. *B. subtilis* WB800 (pES88)의 상층액에서

최고 32 U/ml의 활성을 확인하였으며, 이를 활성 염색한 결과 두 종류의 형질 전환주 모두 예상된 분자량 부근에서 하나의 활성 띠를 보였다. WB800 (pES88)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 laccase를 정제하여 전기영동과 활성염색을 수행하였다. 또한, xylanase는 *C. thermocellum* 유래 XynX로 하여 vector pJH323을 사용하여 pJX33을 얻었다. *B. subtilis*의 WB700과 WB800을 형질전환숙주로 사용하여 transformant를 선발하였다. *B. subtilis* WB700 (pJX33)와 WB800 (pJX33)의 상층액을 활성염색한 결과 *B. subtilis* WB700 (pJX33)는 예상된 분자량 116 kDa 보다 작은 부근에서 두 개의 활성 띠가 보였고, WB800 (pJX33)는 그 보다 분자량이 큰 위치에서 세 개의 활성 띠가 보였다. 잘려진 여러 종류의 내열성의 XynX 중에서 효소활성이 있는 작은 xylanase를 열처리, ammonium sulfate 침전, High-Q, 그리고 CHT-II chromatography로 정제하였다.

나. *T. rubrum* LKY-7으로 부터 laccase유전자의 클로닝 및 특성과 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

1) *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase(TrL) 유전자의 클로닝

T. rubrum LKY-7으로부터 total RNA를 분리하여 polyA+ RNA를 조제하고, cDNA를 합성, ZAP Expression Vector에 구축하여 phage를 증폭하였고, 정제된 laccase를 쥐에 주사하여 항혈청을 얻었다. Phage를 NZY plate에 도말, plaque를 형성 후, laccase 항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였는데, 약 2,500,000개의 plaque로부터 23개의 plaque가 hybridization되었고, 이들 중에서 2개의 plaque가 laccase를 생산하였다. 이들 plaque를 *E. coli* XL0LR 내로 도입 후, 재조합 *E. coli*의 배양여액, periplasm 및 cytoplasm에 있는 laccase 활성을 측정한 결과 배양여액에서는 검출되지 않고, periplasm과 cytoplasm에서만 검출되었다. 이들 cDNA의 염기서열을 분석한 결과 1,839의 염기와 612의 아미노산으로 이루어져 있고, 예상되는 단백질의 분자량은 66,180 Da, pI는 5.72로 분석되었다. 또한 이 유전자는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 50%이하의 유사성을 나타냈지만, 고도로 conserve한 5개의 지역은 매우 유사한 아미

노산 서열을 나타냈다.

2) *T. rubrum* LKY-7의 redox potential 과 리그닌 분해능과의 관계 구명

다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역 중에서 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산과 conserve하지 않은 아미노산을 site-directed mutagenesis에 의하여 다른 아미노산으로 대체하였다. Laccase 유전자를 지닌 *E. coli*는 laccase를 분비하지 못하였는데, 세포질 속의 laccase 활성은 LB 보다 TB 배양에서 더 우수하였고, 배양 12시간 후에 최고의 활성을 나타냈다. 한편, 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 D38A, D99W, W130D, E278A, H556A 등은 모균주와 단백질 농도에서 큰 차이를 나타내지 않았지만, laccase 활성은 전혀 검출되지 않았다. 그러나 다른 유전자와 conserve하지 않은 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 I35V, N105T, V148I, S259L, T561A 등은 모균주에서 보다 laccase 활성이 감소되었지만 검출은 되었다. 이들 유전자를 pET-36벡터에 구축하여 생산된 laccase를 one-step purification하고, enterokinase로 절단 및 정제 후, 속도론적 특성을 조사한 결과 변이된 유전자들이 생산한 laccase의 기질친화력은 모균주의 laccase와 비슷하였지만 활성 촉매속도가 감소하는 경향이였다.

3) Laccase 유전자를 *Pichia pastoris* 에 도입, 발현

Laccase 유전자를 pGAPZ@에 구축, *E. coli* TOP10F'에 형질전환시킨 후, 재조합 플라스미드를 확인하고 *Pichia pastoris*에 형질전환시켰다. 형질전환 균주로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR에 의해서 laccase 유전자를 지닌 균주를 선별하였고, 이들 균주의 염색체 DNA속에 들어 있는 copy수를 southern blot hybridization에 의하여 분석한 결과, 균주에 따라 1-4개의 유전자가 도입되어 있었다. 이들 균주를 30℃에서 배양 후 배양여액에 대한 효소활성을 조사한 결과 배양 3-4일 후 최고 활성을 나타냈는데, 효소 활성이 낮은 균주는 배양 4일 후, 효소활성이 높은 균주는 배양 3일 후 최고에 이르는 경향이였다. 균주에 따라서 laccase 활성에 차이가 있었는데 T8은 다른 균주에 비

하여 활성이 높았다. 이들 효소 활성과 도입된 copy수와의 관계를 비교해 본 결과 도입된 copy수가 많을수록 효소활성이 높은 경향이었지만 완전 일치하지는 않았다.

다. TrL/mediator system 혹은 xylanase와 TrL/mediator system에 의한 펄프 표백 체계 확립

1) *T. rubrum* LKY-7 laccase (TrL)의 생산과 정제

활엽수 chip pile로부터 새로 분리한 목재부후균 *T. rubrum* LKY-7 균주로부터 laccase의 생산능을 검토하고, laccase를 분리 정제하여 그 특성들을 검토하였다. *T. rubrum* LKY-7 균주는 glucose-peptone liquid medium에서 높은 수준의 laccase (7.2 U/ml)를 분비하였고 참나무 목분 첨가에 대해 강한 유도효과를 나타냈다. ca-alginate beads에 고정화된 균체에 의해 glucose-peptone medium에서 5 주기까지의 반연속 laccase 생산이 가능하였다. TrL은 3단계 chromatography를 거쳐 전체수율 약 40%로 정제되었으며 분자량은 약 65 kDa 이었다. 정제된 TrL은 substrate/mediators에 대하여 강력한 산화력을 갖고 있는 것으로 검토되었다.

2) TrL의 화학펄프 표백을 위한 mediator 선발

TrL에 효과적인 mediator를 선발하고자 기존의 mediators인 NHA, 1-HBT, VA와 N-hydroxypyrazinone analogues 및 N-hydroxy-2-pyridone analogues에 대하여 펄프 표백특성을 조사하였다. 기존의 mediator중에서는 NHA의 표백 특성이 가장 우수하였고 검토된 mediators 중에서 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 NHP.1이 가장 우수한 표백효과를 나타내 TrL에 적합한 mediator로 선발되었다. N-hydroxy-2-pyridone analogues와 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 치환체의 형태가 표백에 미치는 영향은 나타나지 않았다. TrL과 우수한 mediator로 선발된 NHA와 NHP.1의 laccase/mediator에 의한 최적 표백시간은 2시간에서 4시간이 가장 효과적이었으며 그이상의 표백

시간은 표백 효과에 크게 작용하지 않았다.

3) Xylanase 및 TrL/mediator system에 의한 펄프표백

TrL을 이용하여 laccase/mediator system에 의한 우수한 생물학적인 펄프 표백공정을 확립하기 위하여 활엽수 및 침엽수펄프에 대하여 목질분해효소인 xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합 및 연속처리에 의한 펄프 표백성을 검토하였다. Xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합처리는 펄프를 xylanase와 TrL/NHP.1로 동시에 혼합처리 했을 때가 각각을 연속적으로 처리했을 경우 보다 표백효과가 높게 나타나 xylanase와 TrL/NHP.1이 펄프 표백에 강한 시너지 효과를 나타냈다. 활엽수펄프를 xylanase와 TrL/NHP.1으로 혼합처리 했을 때 백색도는 11.3% ISO 증가 하였고 kappa number는 3.2 감소하였으나 침엽수펄프의 경우 백색도는 9% ISO 증가하고 kappa number는 약 2.8 정도 감소하였고 이 결과는 TrL/NHP.1으로 표백처리한 결과와 비슷하게 나타나 xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합처리에 의한 펄프 표백효과는 크게 나타나지 않았다.

2. 활용에 대한 건의

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 laccase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

일반적으로 외래단백질을 발현시킬 때 숙주세포의 단백질분해효소에 의하여 외래단백질의 내부가 절단이 된다. 이 현상은 경우에 따라 외래 단백질의 활성을 완전히 불활성화 시키거나 약화시킨다. 아주 드물게는 크기가 작아짐에 따라 활성이 다소 증가하는 경우를 보이기도 한다. *Bacillus subtilis* WB700 (pJX33)의 경우 원래의 분자량 116 kDa 보다 훨씬 작은 위치에서 강한 활성 띠와 약한 활성 띠 각각 한 개씩이 나타났다. 이로부터 WB700이 7개의 숙주 단백질효소가 불활성화된 발현 숙주임에도 불구하고 XynX 효소단백질의 경우 두 군데 이상이 잘려지고 있음을 알 수 있었다. 단백질분해효소 8개를 불활성화 시킨 WB800 (pJX33)의 경우 원래의 분자량에 해당하는 활성 띠와 함께 바

로 밑에 하나, 그리고 그 밑에 하나가 더 있어 원래 크기의 효소와 절단된 효소 2 종류가 생산됨을 알 수 있었다. 이 경우 원래 크기의 효소와 숙주로 펄프 표백에 각각 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, WB800 (pES88)에서 생산된 laccase는 분해되지 않은 원래 분자량에 해당되는 하나의 단백질을 생산하므로 효소와 숙주로 각각 활용될 수 있음을 확인하였다.

나. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성과 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

1) *T. rubrum* LKY-7으로 부터 클로닝된 laccase 유전자

본 연구에서 클로닝된 laccase 유전자는 지금까지 보고된 laccase 유전자와는 다른 새로운 유전자이었기 때문에 앞으로 여러 분야에서 활용 가능하다. 특히, 이 유전자를 다른 균주에 도입해서 laccase를 대량생산하는데 이용될 수 있고, 이 유전자의 genomic DNA부위를 분리하여 프로모터, signal sequence 등을 분석하는데 활용될 수 있다.

2) Laccase 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

Laccase 유전자가 도입된 *Pichia pastoris*는 laccase를 배양여액으로 분비하였다. 따라서 이 균주는 리그닌 분해에 관련된 다른 효소는 생산하지 못하고 오직 laccase만 분비할 가능성이 많기 때문에 배양여액에 분비된 laccase를 분리, 정제하지 않고도 사용 가능하리라 생각된다. 따라서 여기에서 얻어진 배양여액은 펄프 표백에 직접 활용 가능하리라 생각된다.

다. TrL/mediator system 혹은 xylanase와 TrL/mediator system에 의한 펄프 표백 체계 확립

ca-alginate beads에 고정화시킨 *T. rubrum* LKY-7 균주는 TrL의 연속적인 대량생산이 가능할 뿐만 아니라 phenol성 물질의 연속적인 분해처리에 이용이 가능하다. 또한 정제된 TrL은 강한 laccase-mediator의 산화력을 나타내기 때문에 laccase/mediator system에 활용이 매우 유리하다. TrL의

mediator로 선발된 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 NHP.1은 우수한 탈리그닌 효과를 나타낼 뿐만 아니라 값이 싸고 수용성이어서 기존의 laccase-mediator 보다 laccase/mediator system에의 적용이 훨씬 유리하다. Xylanase와 Trl/mediator의 병용처리로 활엽수 크라프트펄프의 경우 약 3정도의 Kappa number 감소를 가져와 화학펄프의 표백에 있어서 염소화단계와 연계시킨다면 염소투입량을 감소시킬 수 있다.

SUMMARY

I. Investigation of lignin-degrading system of *T. rubrum* LKY-7 and development of laccase- and xylanase-producing *Bacillus* sp.

1. Enzymatic activities of *T. rubrum* LKY-7 related to lignin-degradation

Production of lignin-degrading enzymes in *T. rubrum* LKY-7 was dependent on composition of medium and aeration. When wood powder was added into the medium, laccase activity was 20-times higher than the control, while activities of manganese peroxidase, lignin peroxidase, cellulase, and xylanase were very low. It might be concluded that *T. rubrum* LKY-7 produce a major laccase and a minor laccase based on the results of native-PAGE, SDS-PAGE, purification pattern, and Western blotting. The purified laccase showed the highest affinity toward ABTS and the highest catalytic activity toward NHA.

2. Structural and functional analysis of *T. rubrum* LKY-7 laccase gene

T. rubrum LKY-7 laccase showed 5 conserved regions from its amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence and were different from other 20 fungal laccase sequences published. The 5th domain of the enzyme was deleted by PCR method using the laccase cDNA and the overlapped DNA was cloned into the pGEM-T vector. Among 25 transformants, a clone showing highest laccase activity was selected. The activity was low, only 31% compared to the control.

3. Development of laccase- and xylanase-producing *Bacillus* sp. for bio-bleaching

Laccase gene of *T. rubrum* LKY-7 was cloned using pWB705 and pETLAC into competent cell of *Bacillus subtilis* WB 700 and WB 800, protease-deficient strains. Transformants WB700 (pES88) and WB 800 (pES88) were selected and those produced an active laccase in the culture medium upto 32 U/ml. The plasmid pJX33 was constructed from xylanase gene of *Clostridium thermocellum* and transformed into the strains. *B. subtilis* WB 700 (pJX33) showed three active bands smaller than the intact size due to the internal proteolytic cleavages. *B. subtilis* 800 (pJX33) showed a largest band corresponding its intact size and two bands. It could be concluded that WB800 strain is suitable for production of foreign proteins and the products WB 800 (pES88) and 800 (pJX33) can be used for bio-bleaching.

II. Cloning and characteristics of a laccase gene from *T. rubrum* LKY-7, and its expression in *Pichia pastoris*

1. Cloning of a laccase gene from *T. rubrum* LKY-7

Total RNAs of *T. rubrum* LKY-7 were synthesized into polyA⁺RNA and cDNA, and then constructed in ZAP expression vector. The antisera were obtained from the mouse injected with purified laccase. The amplified phages were plated on NZY medium and hybridized by the laccase-antibody. The 23 plaques were selected from about 2,500,000 plaques by the plaque hybridization. The 2 plaques produced laccase in the amplified culture solution. When the selected phages were transfected into

E. coli XL0LR, laccase activity was detected in periplasmic and cytoplasmic fractions, but not detected in culture supernatants. The nucleotide sequence of the phage was determined. An open reading frame was consist of 1839 base pairs, which coded for a mature protein of 612 amino acids. The mature protein showed a predicted molecular mass of 66,180 Da and a theoretical pI of 5.72. The nucleotide sequence of the gene showed less than 50% identity, but 5 regions were highly conserved with those of other fungal laccase.

2. Relationship between redox potential and ligninolytic activity of a *T. rubrum* LKY-7 laccase

In the 5 regions of laccase gene from *T. rubrum* LKY-7 conserved highly with those of other fungal laccase, the amino acids conserved or non conserved with those of other genes were substituted into another amino acids by site-directed mutagenesis. The *E. coli* harboring laccase gene did not secrete the laccase. The laccase activity of the cytoplasmic fraction was better in TB than in LB and showed the highest activity in the 12 hours culture. When the conserved amino acids were substituted into another amino acids ; D38A, D99W, W130D, E278A and H556A, the laccase activity was not detected although the protein concentration was similar to that of parental gene. When the non conserved amino acids were substituted into another amino acids ; I35V, N105T, V148I, S259L, T561A, the laccase activity was detected but reduced in comparison with that of parental gene. The parental and modified genes were constructed in pET-36 vector and transformed in *E. coli*. Their laccase were purified by one-step and digested with enterokinase. Kinetic properties of the purified laccase showed that laccase from modified genes were similar to those of parental gene in the Km values but decrease in Kcat values.

3. Introduction and expression of a laccase gene into *Pichia pastoris*

The laccase gene was constructed in pGAPZ@ and transformed in *Pichia pastoris*. Some transgenic *Pichia pastoris*, which harbored a laccase gene in the genomic DNA, were selected by PCR. Southern blot analysis showed that transgenic *Pichia pastoris* have one to four laccase genes in the chromosomal DNA according to the strains. When the transgenic *Pichia pastoris* were cultured at 30°C, laccase activity of their culture supernatants reached at the maximum after 3-4 days culture ; 3 days culture in strains showing high laccase activity and after 4 days culture in strains showing low laccase activity. The laccase activity was differed with strains but was specifically high in T8 strain. Their laccase activity showed higher trends in the strains with more copy numbers but their relationship was not completely correspond.

III. Laccase production by *T. rubrum* LKY-7 and development of bio-bleaching process with laccase/mediator system

1. Production and purification of laccase from *T. rubrum* LKY-7

A new wood-degrading fungus *T. rubrum* LKY-7 secretes a high level of laccase in a glucose-peptone liquid medium. The production of laccase was strongly induced by addition of oak-wood meal. The laccase was purified to homogeneity through three chromatography steps in an overall yield of 40%. The molecular mass of the purified laccase was about 65 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The purified laccase had the distinct blue color and the basic spectroscopic features of a typical blue laccase : two absorption maxima at 278 and 610

nm and a shoulder at 338 nm. The enzyme had a low reox potential of ~ 0.5 V, yet it was one of the most active laccases in oxidizing a series of representative substrates/mediators. The laccase had the isoelectric point of 4.0 and had very acidic optimal pH values (3-4), although it was more stable at neutral pH than at acidic pH. The laccase was strongly inhibited by sodium azide and sodium fluoride.

2. Selection of mediator for the TrL-based chemical pulp bleaching

NHA, one of the best laccase-mediators reported so far, 1-HBT, VA, N-hydroxypyrazinone analogues and N-hydroxy-2-pyridone analogues were evaluated as laccase-mediators to select useful mediator for the TrL-based chemical pulp bleaching. TrL for pulp bleaching was used after one step purification with Q-sepharose column.

Of the laccase-mediators reported so far, NHA had the highest brightness and the lowest kappa number : the brightness increased from 35.8 to 45.7% ISO, and the kappa number decreased from 23.5 to 23.7. It was demonstrated that NHP.1 of N-hydroxy-2-pyridone analogues was as effective as NHA in pulp bleaching : the brightness increased from 35.8 to 44.6%ISO, and the kappa number decreased from 23.5 to 20.7. The effect of substitution of N-hydroxypyrazinone analogues and N-hydroxy-2-pyridone analogues on pulp bleaching was not observed. Pulp bleaching with TrL/NHA and TrL/HHP.1 respectively showed that the 2-4 hours was the optimal incubation time for TrL-based pulp bleaching effect.

3. Pulp bleaching with Xylanase and TrL/mediator system

To increase pulp bleaching effect with TrL/mediator system, a combination of xylanase and TrL/NHP.1 were used for hardwood and softwood kraft pulp bleaching. Pulp bleaching were performed in the

presence of xylanase (15 U/g pulp) or TrL (15 U/g pulp). In xylanase treatment of hardwood pulp, xylanase worked at 60°C, increasing the brightness from 47.3 to 52% ISO and decreasing the kappa number from 11.2 to 10. However, the effect of xylanase treatment of softwood pulp was not high, compared with hardwood pulp. When the hardwood and softwood pulp were treated with TrL, the pulp bleaching effect was much lower than xylanase treatment effects. Especially the optimal temperature for TrL treatment was lower than that of xylanase, with the level of 40–50 °C.

To evaluate the synergistic effect of xylanase and TrL/mediator, pulps were treated with xylanase and TrL/mediator simultaneously or sequentially. Pulp bleaching with xylanase and TrL/mediator simultaneously gave significantly higher pulp brightness than that obtained after the treatment of pulp with xylanase and TrL/mediator sequentially. This indicated that xylanase and TrL/mediator exhibit synergistic effect on pulp bleaching. The combination of xylanase and TrL/mediator followed by an alkaline/H₂O₂ treatment increased the hardwood pulp brightness from 47.3 to 58.6% ISO and decreased the kappa number from 11.5 to 8.5. In case of softwood pulp, the brightness increased from 36.6 to 45.6% ISO and kappa number decreased from 17.0 to 14.2. These results were almost identical to those obtained with the treatment of TrL/NHP.1.

CONTENTS

SUMMARY -----	12
CONTENTS -----	18
Chapter I. Introduction -----	22
Section 1. Scope and objective of research -----	22
Section 2. Necessity of research -----	24
Chapter II. Present situation of related techniques -----	28
Chapter III. Results of research -----	33
Section 1. Investigation of lignin-degrading system of <i>T. rubrum</i> LKY-7 and development of laccase- and xylanase-producing <i>Bacillus</i> sp. -----	33
1. Introduction -----	33
2. Materials and methods -----	34
3. Results and discussions -----	38
1) Enzymatic activities of <i>T. rubrum</i> LKY-7 related to lignin-degradation -----	38
2) Structural and functional analysis of <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase gene -----	48
3) Development of laccase- and xylanase-producing <i>Bacillus</i> sp. for bio-bleaching -----	51
4. Summary -----	58

Section 2. Cloning and characteristics of a laccase gene from <i>T. rubrum</i> LKY-7, and its expression in <i>Pichia pastoris</i>	60
1. Introduction	60
2. Materials and methods	61
3. Results and discussions	68
1) Cloning of a laccase gene from <i>T. rubrum</i> LKY-7	68
2) Relationship between redox potential and ligninolytic activity of a <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase	73
3) Introduction and expression of a laccase gene into <i>Pichia pastoris</i>	77
4. Summary	82
Section 3. Laccase production by <i>T. rubrum</i> LKY-7 and development of bio-bleaching process with laccase/mediator system	85
1. Introduction	85
2. Materials and methods	87
3. Results and discussions	94
1) Production and purification of laccase from <i>T. rubrum</i> LKY-7	94
2) Selection of mediator for the TrL-based chemical pulp bleaching	102
3) Pulp bleaching with Xylanase and TrL/mediater system	109
4. Summary	114
Chapter IV. Attainment of research objective and contribution to related fields	117
Chapter V. Plan for application of research results	124
Chapter VI. Information received at abroad	126
Chapter VII. References	128

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	12
CONTENTS	19
제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 1 절 연구개발의 목적 및 범위	22
제 2 절 연구개발의 필요성	24
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	28
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	33
제 1 절. <i>T. rubrum</i> LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 xylanase 생산 <i>Bacillus</i> sp.의 개발	33
1. 서 론	33
2. 재료 및 방법	34
3. 결과 및 고찰	38
가. <i>T. rubrum</i> LKY-7의 리그닌 분해효소 활성 확인	38
나. Laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석	48
다. <i>Bacillus subtilis</i> 로 laccase 및 xylanase 유전자 cloning	51
4. 결과 요약	58

제 2 절. <i>T. rubrum</i> LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성과 <i>Pichia pastoris</i> 에 도입, 발현 -----	60
1. 서 론 -----	60
2. 재료 및 방법 -----	61
3. 결과 및 고찰 -----	68
가. <i>T. rubrum</i> LKY-7으로부터 laccase(TrL) 유전자의 클로닝 -----	68
나. <i>T. rubrum</i> LKY-7의 redox potential 과 리그닌 분해능과의 관계 구명 -----	73
다. TrL유전자를 <i>Pichia pastoris</i> 에 도입, 발현 -----	77
4. 결과 요약 -----	82
제 3 절. <i>T. rubrum</i> LKY-7 균주로부터 laccase 생산과 laccase/mediator system에 의한 생물학적 펄프 표백공정 개발 -----	85
1. 서 론 -----	85
2. 재료 및 방법 -----	87
3. 결과 및 고찰 -----	94
가. <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase의 생산과 정제 -----	94
나. <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase의 화학펄프 표백을 위한 mediator 선발 -----	102
다. Xylanase 및 TrL/mediator system에 의한 펄프표백 -----	109
4. 결과 요약 -----	114
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	117
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	124
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	126
제 7 장 참고문헌 -----	128

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

Trichopyton rubrum LKY-7의 리그닌 분해시스템을 구명하고, laccase (TrL) 유전자를 분리, 다른 균주에 도입, 발현시켜 대량 생산체계를 확립하며, TrL에 적합하고 우수한 펄프 표백성을 갖는 mediator를 선발하여 TrL/mediator system 혹은 xylanase와 TrL/mediator system에 의한 펄프의 표백 체계를 확립하는데 있다.

2. 연구개발의 범위

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 xylanase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

- 1) *T. rubrum* LKY-7의 리그닌 분해에 관련된 효소 활성
 - 배지 및 목분에서의 laccase 종류 및 생산량 변화
 - Lignin peroxidase (LiP)와 Manganese peroxidase (MnP) 생산 여부
 - Xylanase와 cellulase의 생산 여부
- 2) *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석
 - laccase 유전자 domain의 구조
 - laccase 유전자 domain의 deletion
 - domain이 deletion된 플라스미드를 지닌 형질전환주의 선발
 - domain이 deletion된 형질전환주들의 laccase 활성 및 특성
- 3) 펄프의 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

- Laccase cDNA를 *Bacillus* sp. expression vector에 구축
- Xylanase 유전자를 *Bacillus* sp. expression vector에 구축
- 각 재조합 플라스미드를 *Bacillus* sp.에 형질전환
- 형질전환 *Bacillus* sp.가 생산한 xylanase와 laccase의 활성 및 특성

나. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성과 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

- 1) *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase(TrL) 유전자의 클로닝
 - cDNA library의 구축
 - Laccase cDNA clone의 선발
 - Laccase cDNA의 염기서열 결정 및 분석
- 2) *T. rubrum* LKY-7의 redox potential 과 리그닌 분해능과의 관계 구명
 - Laccase 유전자의 아미노산변경
 - 아미노산이 변화된 형질전환주들의 laccase 활성 및 특성
 - 형질전환주들을 pET vector에 도입 및 생산된 laccase의 one step-purification
 - 정제된 laccase의 특성
- 3) TrL 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현
 - Laccase cDNA를 yeast expression vector 에 구축
 - 재조합 플라스미드를 *Pichia pastoris*에 형질전환
 - 형질전환 *Pichia pastoris*가 생산한 laccase 활성 및 특성

다. *T. rubrum* LKY-7 균주로부터 laccase 생산과 laccase/mediator system에 의한 생물학적 펄프 표백공정 개발

- 1) Laccase 생산에 우수한 inducer의 선발
 - 다양한 폐놀성물질로부터 laccase inducer 검색
 - 고정화된 *T. rubrum* LKY-7 균주로부터 laccase의 연속생산

- TrL의 분리와 정제 및 특성 규명
- 2) Laccase에 의한 화학펄프 표백에 더 적합하고 우수한 mediator의 개발
- TrL과 기존의 효과적인 mediator인 NHA, 1-HBT 및 VA에 의한 펄프 표백 특성 검토
 - TrL과 N-hydroxypyrazinone analogues의 치환체에 의한 펄프 표백특성 검토
 - TrL과 N-hydroxy-2-pyridone analogues 치환체에 의한 펄프 표백특성 검토
 - TrL에 적합하고 우수한 펄프 표백성을 지닌 mediator 선발
- 3) Xylanase 및 laccase/mediator의 병용처리에 의한 펄프 표백체계 확립
- Xylanase와 laccase 처리에 의한 펄프 표백성 검토
 - Xylanase와 laccase/mediator system의 혼합처리와 연속처리에 의한 화학펄프 표백효과 검토

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

리그닌의 생물학적분해에 관한 연구는 백색부후균 (white rot fungi) 인 *Phanerochate chrysosporium* 에 의해서 주로 이루어져 왔다(24, 30, 45 47, 75). 이 균주의 리그닌 분해능은 lignin peroxidase (LiP) 와 manganese peroxidase (MnP) 의 분비와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었지만, 분리, 정제된 LiP 혹은 MnP가 리그닌을 직접 분해한다는 보고는 현재까지도 없다. 반면, 최근 많은 백색부후균들이 LiP없이 리그닌을 효과적으로 분해하고(72, 73) 대부분의 백색부후균들에서 LiP와 MnP 조합보다 MnP와 laccase의 조합이 훨씬 일반적이며(7, 14, 16, 22, 29, 37, 57, 63, 66), *Pycnoporus cinnabarinus* 의 경우에는 LiP 나 MnP 없이 오직 laccase만 분비하여 리그닌을 분해하는 것으로 밝혀졌다 (4, 20, 21 23).

더욱이, 특정의 저분자량의 유기화합물 (mediator) 이 존재할 경우에는 분리, 정제된 laccase가 리그닌의 비페놀성구조를 산화시킬 뿐만 아니라 미 표백 펄프를 탈리그닌시키는 것으로 보고됨으로써, laccase를 이용한 생물학적 펄프화 및 표백에 많은 관심이 집중되고 있다 (5, 6, 7). 특히, 독일의 Call 과 Mucke 등(9) 은 효과적인 mediator, 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT) 를 발견하여 laccase/1-HBT system에 의한 펄프표백을 최초로 pilot plant규모로 적용시켰다. 이후, laccase/mediator system이 화학펄프 표백에 있어서 장차 염소를 대체할 수 있는 가장 효과적인 방법으로 받아들여지고 있다.

그러나 laccase/mediator system이 펄프표백의 한 공정으로 적용되고 산업화되기 위해서는 1) laccase의 대량 생산 체계, 2) 펄프표백에 우수한 mediator의 개발, 3) 더 효과적인 펄프 표백의 공정 등이 확립되어야 한다. 현재 laccase를 분비하는 균주는 많이 보고되어 있지만, 그들의 대부분은 laccase 이외의 여러 효소를 분비하고 있다 따라서 배양 여액으로부터 laccase만 얻기 위해서는 laccase유전자를 백색부후균 이외의 다른 균주에 도입, 발현시켜 분비토록 해야 할 것이다. 또한 지금까지 펄프 표백에 우수한 mediator를 개발하려는 연구는 기존의 유기화합물에서 찾으려고 하였다. 따라서 특정 화합물의 유사체를 새로이 합성하여 우수한 mediator를 찾으려는 노력이 필요하다. 한편 펄프에는 xylan이 침적되어 있어 염소표백시 리그닌 제거에 장애가 되는데 이때 표백전처리로서 xylansae처리에 의하여 염소의 소비량을 감소시킬 수가 있다. 따라서 효과적인 생물학적 펄프표백시스템으로서 xylanase와 laccase/mediator를 동시 또는 연속 처리하여 표백효과를 증진시키는 연구도 필요하다. 또한 동시처리에서 표백효과가 좋아진다면 이들 두 효소를 생산할 수 있는 재조합 균주를 만들어서 대량생산할 수 있는 체계를 확립하는 연구도 필요할 것이다.

2. 경제. 산업적 측면

현재, 전 세계적으로 1년에 150 x 106ton이상의 펄프가 생산되고 있고, 이들의 약 80%가 화학펄프인데, 이 때 사용되어진 화학약품은 리그닌과 결합하여 약 50 x 106ton의 부산물로 발생되고 있다 (3). 특히 펄프 표백시 사용되는

염소는 엄청난 환경 오염을 일으키기 때문에 이들의 처리에 많은 노력과 비용이 소요되고 있는 실정이다. 따라서 펄프·제지 산업에서는 점차 무공해적인 산소에 의한 화학펄프화나, 표백시 염소(chlorine)와 염소화합물(chlorine compounds)을 독성이 없는 과산화수소나 오존 등으로 대체하는 표백시스템으로의 전환을 모색하고 있으나 이러한 변환은 기존의 공정을 변화시켜야 할 뿐만 아니라 막대한 자본의 투자가 요구되고 있기 때문에 현실적으로 어려운 실정이다.

이에 반하여 효소는 매우 단순한 공정의 적용과 효과적인 비용으로 염소나 염소화합물 및 표백약품의 사용을 감소시킬 수 있다. 현재, xylanase처리에 의해 활엽수펄프의 경우 약 20-25%, 침엽수펄프의 경우 10-15%의 염소의 양을 감소시킬 수 있다. 따라서 외국의 경우 많은 펄프, 제지공장에서 xylanase 처리를 표백의 한 공정으로 적용하고 있고, 많은 기업들이 펄프 표백을 위한 xylanase를 상업적으로 생산하고 있다 (3). 최근에는 laccase/mediator system이 펄프 잔존 리그닌의 50-70%까지 감소시킬 수 있는 것으로 보고되어 이 시스템이 장차 염소를 대체할 수 있는 가장 확실하고 효과적인 방법으로 인정되어지고 있고, 또한 가장 경제적인 방법으로 받아들여지고 있다. 따라서 이 시스템에 필요한 laccase와 mediator 등은 앞으로 상업적으로 대량 생산될 가능성이 크다.

3. 사회·문화적 측면

최근 급속한 산업화에 따른 환경파괴는 점점 심각해지고 지구는 자체의 자정능력을 상실해 가고 있다. 따라서 환경을 파괴하는 행위를 규제하기 시작했다. 1992년 브라질 리우에서 열린 리우환경개발 국제회의에서도 환경보존과 경제개발을 불가분의 관계로 보고 환경이 견딜 수 있을 만큼만 경제개발을 하여야 한다는 결론을 내렸다. 그 이후, 세계 각 국은 환경을 보호하고 정화한다는 차원에서 수많은 환경조례들을 입법화하기에 이르렀고, 펄프·제지산업에서도 환경적 측면에서 심한 압력과 규제를 받고 있다.

현재, 화학펄프 생산량의 90%가 크라프트 공정에 의하여 생산되고 있는데, 크라프트 펄프중의 잔존리그닌은 염소계 약품에 의한 다단표백이 요구되

며, 염소화 단계 후 알카리 추출에서 발생하는 폐수는 수질오염을 일으키는 주요 원인이 되고 있다. 특히 염소에서 유래되는 염소화 리그닌 및 다이옥신 등이 그대로 자연계에 방출될 경우 엄청난 환경 오염문제가 대두된다. 따라서 펄프표백에서 염소를 대체할 수 있는 가장 확실하고 효과적인 방법이 하루 빨리 나와야 한다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 Laccase에 의한 리그닌 분해 특성

1. 리그닌의 구조 및 분해 특성

리그닌의 화학구조는 페놀성과 비페놀성구조로 구분된다. 페놀성 구조는 방향족환에 페놀성 수산기를 포함하여 쉽게 분해되지만 완전한 분해를 위해서는 리그닌 구조의 약 90%를 차지하는 비페놀성구조의 분해가 필수적이다. *Panus tigrinus*의 “yellow” laccase는 비페놀성구조인 β -1 model compound를 직접 산화시킨다는 보고 (48)가 있지만, 일반적으로 laccase 단독으로는 비페놀성 리그닌구조의 분해가 불가능한 것으로 알려져 있다 (4, 10, 74, 81). laccase에 의한 페놀성 리그닌 모델화합물분해는 Higuchi등에 의하여 중점적으로 수행되었다 (10). laccase는 C_α-C_β결합의 단리를 촉매하고 이어서 β - α -4 에테르결합의 파괴로 새로운 페놀성수산기그룹이 생성되며 그 과정에서 alkyl-phenyl결합의 단리는 minor reaction으로 관찰되어진다. laccase는 alkyl aryl의 단리나 C_α는 산화시키지만 β -5, β - β , 5-5, 4- α -5에 대한 분해는 아직 보고된 바 없다.

2. Laccase의 생화학적 특성

Laccase는 수 많은 균, 다양한 식물, 곤충 및 세균 등이 생산하는 blue multi-copper oxidases 중의 하나이다 (26, 27, 28). 대부분의 laccase는 한 분자당 4개의 copper, 즉, 첫 번째 copper (T1), 두 번째 copper (T2) 및 나머지 두 개의 copper (T3) 로 이루어져 있다. Laccase catalysis는 Figure 1에서와 같이 3 단계로 이루어진다. 즉, T1, T2, T3 copper site의 순서로 환원된다. 보통 laccase의 redox potential은 400-800mV 범위이며 기질로부터 T1 copper로의 전자이동은 기질과 laccase사이의 redox potential 차이에 기인되는 것으로 예측하고 있다 (25, 52, 54, 65, 71). 환원성 기질에 대한 laccase binding pocket은 매우 얇아 약 10Å 깊이인 것으로 보고되었고 (25, 52, 65), T2, T3

copper site의 oxygen-binding pocket은 산소 이외의 산화제의 접근을 제한하는 것으로 보고 되었다.

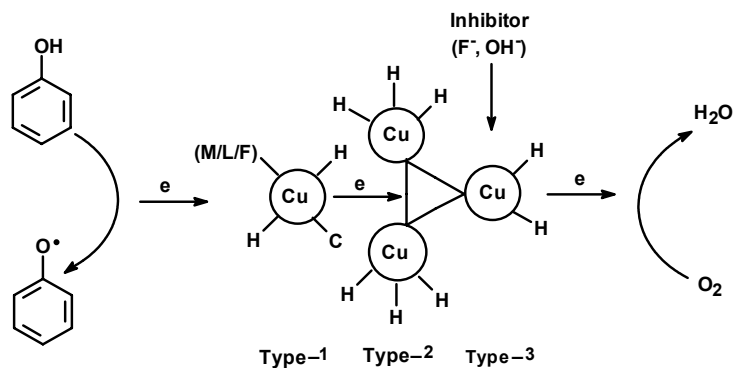


Fig. 1. Laccase catalysis.

제 2 절 Laccase/mediator에 의한 리그닌분해 시스템

1. Laccase/mediator system (LMS)의 개념

Laccase-mediator라는 개념은 1984년 Sariaslani등이 laccase가 chlorpromazine의 존재 하에 비페놀성 방향족화합물인 rotenone을 산화시킨다고 보고하면서 처음으로 제기되었고 후에 Kawai등이 syringaldehyde와 함께 polymethoxylated benzylalcohol을 산화시킨다고 보고하였으나 이는 생화학자나 목재 화학자들의 관심을 끌어내지 못하였다. 그러나, 1990년 Bourbonnais와 Paice 는 laccase/ABTS {2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)}가 veratryl alcohol과 같은 비페놀성 리그닌모델화합물을 분해할 뿐만 아니라 펄프의 kappa number를 감소시킨다고 보고 (7) 한 이래, Call과 Mucke는 mediator로서 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT) 를 발견하여 펄프표백을 위한 laccase/1-HBT system을 처음으로 pilot plant수준으로 적용하였다 (14). 그 이후, Anann (1)은 laccase mediator로서 violuric acid (VA), N-hydroxy-acetanilide (NHA), 3-nitrosochinolin-2,4-diol (NC)와 같은 N-OH를 함유하는 화합물들을 보고하였다.

2. Laccase/mediator에 의한 리그닌의 분해 특성

Laccase에 의한 mediator의 산화와 산화되어진 mediator에 의한 리그닌의 산화, 두 가지 반응이 계속적으로 작용하면서 리그닌을 분해한다 (Fig. 2). 다시 말하면 리그닌 산화를 위한 효과적인 laccase mediator는 직접 laccase의 기질이 되어야 하고 또한 산화되어진 mediator는 리그닌을 효과적으로 산화시킬 수 있어야 한다. 그러나 이들 반응 중 어느 것이 rate-limiting step인지 아직 밝혀지지 않았다.

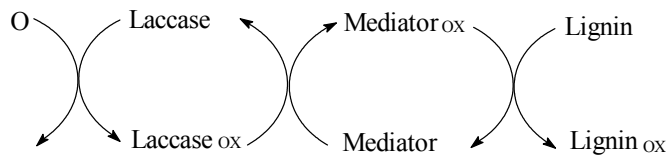


Fig. 2. A proposal mechanism for the oxidation of lignin by a laccase/mediator system

제 3 절 Laccase/mediator에 의한 펄프표백 시스템

1. Laccase-mediator

지금까지 보고된 가장 우수한 mediator들은 구조 내에 N-OH그룹을 함유한 화합물들인데, 그 이유는 laccase에 의해 쉽게 $\cdot\text{O-N}$ radical이 생성되고, 그 radical은 안정하고 용이하게 펄프섬유 속으로 침투하여 반응할 수 있기 때문으로 생각된다. 특히, NHA는 지금까지 보고된 mediator중에서 가장 우수한 효과를 나타내는 것 중의 하나로 인정되고 있다 (49). 최근에는 NHA의 화학적 변형이나 안정한 금속이온에서 유래하는 mediator등에 관한 연구가 보고되어지고 있다 (8, 84).

지금까지 효과적인 laccase-mediator로 밝혀진 N-OH group을 포함하는 화합물들은 natural cyclic hydroxamic acid (1, 그림 3 ; $\text{R}^1 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = -\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$)에서 유래하며 *Aspergillus flavus*로부터 처음으로 분

리되었다 (78). 그 후로 똑같은 고리구조를 갖는 다양한 cyclic hydroxamic acid가 다양한 미생물로부터 분리되었다. N-hydroxypyridone (2, 그림 3)과 같은 기본적인 구조를 갖는 많은 cyclic hydroxamic acid가 미생물로부터 분리된 반면 N-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (3, 그림 3)의 유사체들은 식물 (Gramineae)로 부터 분리되었고, 또한 홍미류계도 지금까지 펄프표백에 가장 효과적인 laccase mediator로 밝혀진 N-hydroxy-acetanilide (NHA) (4, 그림 3 ; $R^1=R^2=H$)는 포유동물의 조직과 식물세포로부터 합성될 수 있다고 보고되었다 (90, 91). 그림 3에 나타낸 natural cyclic hydroxamic acid중에서 N-hydroxypyrazinone(1, 그림 3)과 N-hydroxypyridone (2, 그림 3)은 펄프표백을 위한 laccase-mediator로서 아직 검토가 되지 않았으며 또한 N-hydroxy-1,4-benzoxazine-3-one 유사체 (3, 그림 3) 들도 N-OH group의 N이 방향족고리에 결합되어 있어 NHA와 매우 유사한 구조적 특징을 나타내므로 효과적인 mediator로 작용할 가능성이 있을 것으로 예측할 수 있다.

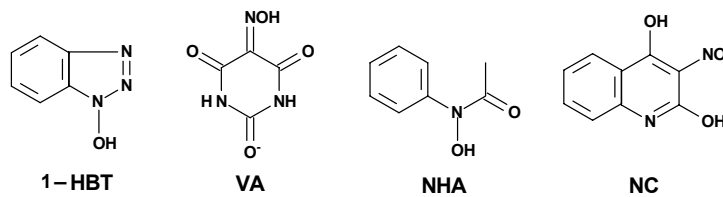


Fig. 3. Chemical structures of laccase-mediators

제 4 절 Laccase 유전자의 클로닝 및 특성

1. 클로닝된 laccase 유전자

Laccase 유전자는 리그닌분해 곰팡이인 *Agaricus bisporus* (63), *Coriolus hirsutus* (46), *Phlebia radiata* (69, 70), *Coriolus versicolor* (33), *Trametes versicolor* (36), *Trametes villosa* (83), *Pycnoporus cinnabarinus* (19, 56) 와 lignin을 분해하지 않는 fungi인 *Neurospora crassa* (28), *Cryphonectria parasitica* (17), *Aspergillus nidulans* (17) 로 부터 클로닝 되었고, 국내에서는 먹물버섯의 분화와 관련된 laccase유전자에 대한 연구가 이

루어졌다 (강원대학교 생명과학부).

2. Laccase 유전자의 특성

Laccase 유전자를 포함한 blue copper oxidase의 모두에서, 3'-말단에 copper-binding domain이 존재하고, cysteine아래쪽 10번째 아미노산이 methionine, leucine, phenylalanine의 3그룹으로 분류되는데, 이들 아미노산은 cupric ion의 redox potential에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (85). 1998년 Eggert등 (19) 은 laccase를 이들 아미노산에 따라서 3그룹, 즉, *Lac1*(Met), *Lac2*(Leu), *Lac3*(Phe), 으로 분류하자고 제안하였는데, *P. cinnabarinus* 의 laccase는 *Lac3*, *T. villosa* 의 laccase 는 *Lac1* 이었다.

3. Laccase 유전자의 변형에 의한 효소 활성 및 특성의 변화

유전자의 변형에 의한 효소활성 및 특성의 변화에 대해서는 blue multi-copper oxidases중의 하나인 ascorbate oxidase에서 많은 연구가 이루어져 왔고, laccase의 경우에는 Xu 등 (83, 85) 에 의해서 수행되었다. 그들은 site-directed mutagenesis에 의해서, T1 copper site의 cysteine아래쪽 10번째 아미노산을 변형하여 그 아미노산이 phenylalanine일 경우에는 redox potential이 매우 높고 methionine일 경우에는 매우 낮다고 보고하였고, 기질 특이성 및 효소 안정성의 변화에 대해서도 보고하였다.

4. Laccase 유전자를 다른 미생물에 도입, 발현

Laccase 유전자를 *Aspergillus oryzae* (12), *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* (69), *Pichia pastoris* (35, 56)등의 곰팡이 및 효모에 도입, 발현시켜 그 특성이 보고되었지만, *Bacillus* spp.에 도입, 발현시킨 보고는 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 laccase와 xylanase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

1. 서론

리그닌의 생물학적 분해능은 생물체에 따라 여러 종류의 기작으로 일어나고 있다. 백색부후균 (white rot fungi) *Phanerochate chrysosporium*의 리그닌 분해능은 lignin peroxidase (LiP)와 manganese peroxidase (MnP)의 분비와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었지만, 분리 정제된 LiP 혹은 MnP가 리그닌을 직접 분해한다는 보고는 현재까지 없다. 반면, 최근 많은 백색부후균들이 LiP 없이 리그닌을 효과적으로 분해하고 (72, 73), 대부분의 백색부후균들에서 LiP와 MnP 조합보다 MnP와 laccase의 조합이 훨씬 일반적이며 (7, 14, 16, 22, 29, 37, 57, 63, 66), *Pycnoporus cinnabarinus*의 경우에는 LiP나 MnP 없이 오직 laccase만 분비하여 리그닌을 분해하는 것으로 밝혀졌다 (4, 20, 21 23).

더욱이, 특정의 저분자량의 유기화합물 (mediator) 이 존재할 경우에는 분리, 정제된 laccase가 리그닌의 비페놀성구조를 산화시킬 뿐만 아니라 미 표백 펄프를 탈리그닌 시키는 것으로 보고되고 있다 (5, 6, 7). 이 laccase/mediator system이 화학펄프 표백에 있어서 장차 염소를 대체할 수 있는 가장 효과적인 방법으로 받아들여지고 있다. 그러나, laccase/mediator system을 이용한 펄프 표백에서 표백 효과를 높이기 위해서는 기존의 것들 보다 더 우수한 laccase 및 mediator를 개발하는 것이 필요하다.

Laccase/mediator system 이 펄프표백의 한 공정으로 적용되고 산업화되기 위해서는 laccase를 대량생산할 수 있어야 하고, 기존의 시스템 보다 더 효과적인 펄프 표백시스템이 확립되어야 한다. 효소의 대량생산은 fungi보다 효모나 세균에서 더 용이하다. 따라서, laccase유전자를 효모나 세균에 도입, 발현시켜 대량생산할 수 있는 체계를 확립하는 연구가 필요하다.

본 연구팀에서는 활엽수 chip pile에서 기존의 백색부후균에 비하여 리그닌분해능이 우수하고 탈리그닌 선택성이 뛰어난 리그닌분해균 *Trichopyton rubrum* LKY-7을 분리하였다 (37). 이 균주는 glucose-peptone medium에서 주로 laccase만 생산하였고, 개발된 mediator들에 대하여 우수한 기질 특이성을 나타냈다 (38).

본 세부과제에서는 효소학적 리그닌 분해 및 펄프표백 시스템을 구명하기 위하여 이 균주로부터 생산되는 리그닌 분해효소 종류를 확인, 유전자변형에 의한 새로운 laccase 개발, 세균에 도입하여 다량생산 체계확립 등을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 리그닌 분해효소원

전남 광양지역의 활엽수 chip pile로부터 분리한 *Trichopyton rubrum* LKY-7 (TrLKY-7)을 리그닌 분해효소 생산 균주로 사용하였다. 이를 potato-dextrose agar (PDA) plate에서 29℃에서 5일 동안 배양하여 plates의 가장자리에서 0.5 cm 직경의 agar block을 떼어내 spore 생산과 접종원으로 사용하였다.

나. Laccase 생산을 위한 배지 조성

Laccase 생산을 위한 배지는 basal medium (Kirk's medium)과 glucose-peptone medium을 이용하였다. basal liquid medium의 구성은 glucose 10 g, 20 mM sodium tartrate (pH 4.5), KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, thiamine HCl 1 mg, Tween 20 0.5 g, trace element solution 70 ml (per liter)이고 trace element solution은 nitriloacetic acid 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, NaCl 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CoSO_4 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g (per liter)이다. Glucose-peptone medium (pH 4.5)은 glucose 20 g, peptone 10 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, thiamine HCl 2 mg (per liter) 로 구성되었다.

50 ml의 배지에 1.0×10^6 /ml로 조정된 spore suspension 1.0 ml씩 접종하여 29°C에서 10일 동안 정지 및 교반 (150 rpm) 배양하였다. 장기배양을 위하여 30일 동안 진탕배양도 병행하였다. 또한 TrLKY-7을 배양한 Potato dextrose agar (PDA) plate로부터 직경 0.5 cm크기의 block 2개를 떼어내 50 ml의 glucose-peptone medium 표면에 띄워 정지배양하였고, block 2개를 50 ml의 glucose-peptone medium과 균일하게 마쇄하여 150 rpm에서 10일간 교반 배양하였다. 배양이 끝난 culture medium은 균사체를 제거한 다음 laccase activity 측정용 조효소액으로 사용하였다. 배양액은 2.0 mM ABTS를 기질로 420 nm에서 laccase activity를 측정하였다.

다. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, cellulase 및 xylanase 탐색

TrLKY-7으로부터 lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), cellulase와 xylanase 탐색을 위하여 basal liquid medium과 glucose-peptone medium을 이용하였다.

라. Activity staining

이 효소를 native gel를 이용하여 활성도 및 종류를 알아보았고, SDS-PAGE에 의한 denaturing gel로 분자량을 측정하였으며, 온도에 대한 안정성을 측정하였다. 필요 시 조효소액을 ultrafiltration을 하여 10배 농축하였다. Native gel은 50 mM sodium acetate (pH 4.5)와 1.0 mM guaiacol을 이용하여 staining을 수행하였다. SDS-PAGE에 의한 denaturing gel은 20% isopropanol로 3번 씻어 SDS를 제거하고, 50 mM sodium citrate (pH 5.5)로 3번 씻어주어 laccase를 재생시킨 후, 최종적으로 50 mM sodium acetate (pH4.5)와 1.0 mM guaiacol을 이용하여 staining을 수행하였다.

마. laccase 유전자 domain의 구조

Laccase 유전자의 염기서열을 Motif의 BLOCKS program에서 search하여 EBI (European Bioinformatics Institution)의 FASTA program에 의해서 homology search 한 다음, 주요 domain의 위치 및 아미노산서열 등을 조사하

였다.

바. laccase 유전자 domain의 deletion

Domain의 deletion은 ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)를 이용하였다.

1) 플라스미드의 추출 : 재조합 *E. coli*로부터 Alkaline-Lysis/PEG Precipitation Procedure (ABI User Bulletin #18) 에 의해서 분리, 정제하였다.

2) Domain의 deletion을 위한 PCR 실시 : 정제된 플라스미드 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 10x mutagenesis buffer 2.5 μl , 25 mM dNTP 1 μl , primer #1 및 #2 (15 pmol) 각각 2 μl , ExSite DNA polymerase blend (5 U/ μl) 1 μl 을 포함한 25 μl 의 PCR 반응물에 첨가되는데, Primer #1 및 #2 는 domain의 구조에 따라 제작되었다. PCR은 94°C 4분, 50°C 2분, 72°C 2분 동안 1 cycle을 거친 후, 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 1분의 10 cycle을 실시하고, 72°C에서 5분 동안 더 실시하는데, 원하는 DNA의 밴드가 나오지 않을 경우에는 cycle수를 늘려가면서 실시하였다.

3) PCR 산물의 ligation 및 형질전환 : PCR 산물에 template DNA를 절단하기 위하여 Dpn I을 첨가하고, 3'-말단의 extended bases를 제거하기 위하여 cloned Pfu DNA polymerase blend 를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 효소를 실효시키기 위하여 72°C에서 30분 더 반응시켰다. 이들 반응물을 ligation시키기 위하여 T4 DNA ligase를 첨가 후 37°C에서 1시간 반응시켜 *E. coli* XL1-Blue supercompetent cells에 형질전환시켰다.

바. Domain이 deletion된 플라스미드를 지닌 형질전환주의 선발

인접 DNA의 염기서열을 primer로 이용한 colony PCR에 의해서 1차 선발하고, 플라스미드를 분리, 정제하여 제한효소로 절단한 다음, 전기영동에 의해서 2차 선발하였다. 그 후, DNA의 염기서열을 결정하여 deletion부위를 확

인하였다.

바. Domain이 deletion된 형질전환주들의 laccase 활성 및 특성

1) laccase의 활성 : pET expression vector의 protocol (Invitrogen) 방법으로 형질전환주들의 조효소액을 추출하여 0.5 mM ABTS와 반응시켜 420 nm에서 laccase 활성을 측정하였다.

2) laccase의 특성 : native 및 SDS-PAGE에 의한 active staining에 의해서 형질전환주들이 생산한 laccase의 분자량을 비교, 분석하였다.

사. Laccase cDNA를 *Bacillus sp.*에 발현

1) *Bacillus subtilis* competent cell 제작 : 발현용 숙주 *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 단백질분해효소 돌연변이주를 TBAB 고체배지에 그어 밤새 30°C에서 배양하였다. 다음 날 아침, 이 균주를 2 ml의 SP1 배지에 접종하여 37°C에서 3시간 45분 배양한 후, 이 배양액 0.5 ml을 미리 데워진 4.5 ml의 SP2 배지에 옮겨 37°C에서 1시간 30분 배양하였다. 이 배양액에 0.1 M EGTA 용액 50 μ l를 첨가한 후 37°C에서 10분을 배양하여 competent cell을 만들었다.

2) Laccase cDNA recombinant 벡터 제조 : 발현벡터로는 pWB705를 사용하였다. EcoRI으로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 laccase cDNA가 연결되도록 하였다. Insert인 laccase cDNA는 제2세부과제에서 제작된 pETLAC 플라스미드를 사용하였다. 벡터와 insert를 end-filling 하여 ligation 후 위에서 만든 *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 competent cell에 형질전환시켰다.

3) Laccase cDNA 형질전환 및 형질전환주 확인 : *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 competent cell을 가진 배양액 0.5 ml에 laccase cDNA를 갖는 플라스미드 DNA를 넣어 90분간을 더 키웠다. 적당한 항생제가 들어있는 TBAB 배지에 0.25 ml의 형질전환주 용액을 도말하여 37°C에서 배양하였다.

아. Xylanase를 *Bacillus* sp.에 발현

1) Xylanase recombinant 벡터 제조 : 대상 xylanase는 비교적 활성이 강한 세균 *Clostridium thermocellum* 유래 xylanase (XynX)로 하였다. 이 유전자를 secretion/expression shuttle vector pJH323에 넣어 pJX33을 얻었다.

2) Xylanase 형질전환 및 형질전환주 확인 : *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 competent cell을 가진 배양액 0.5 ml에 xylanase를 갖는 플라스미드 DNA를 넣어 위 laccase cDNA 형질전환과 같은 방법으로 형질전환주를 얻었다.

3. 결과 및 고찰

가. *T. rubrum*의 리그닌 분해효소 활성 확인

1) LiP와 MnP

가) *T. rubrum* LKY-7을 MnP와 LiP 생산을 위한 medium으로 보통 이용하는 아래의 medium에서 7-30일간 배양해 보았으나 본 균주에서는 MnP는 trace 정도, LiP는 검출되지 않았다.

Culture Medium

- a. Basal medium 100 ml : autoclaved
 - KH₂PO₄ 2.0 g
 - MgSO₄·7H₂O 0.5 g
 - CaCl₂·2H₂O 0.1 g
 - Ammonium tartrate 0.2 g
- b. 10% Glucose 100 ml : autoclaved
- c. 0.1 M 2,2-dimethylsuccinate 100 ml : autoclaved
- d. Thiamine-HCl (100 mg/liter stock) 10 ml : filter sterilized

e. Trace element solution	70 ml	: filter sterilized
g. Veratryl alcohol (0.4 M stock)	100 ml	: filter sterilized
f. distilled water	520 ml	

*** Trace element solution (per Liter, filter sterilized)**

MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5-2.5 g (for MnP production)
NaCl	1.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂	0.1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CuSO ₄	0.1 g
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ MoO ₄	10 mg
Nitrilotriacetate	1.5 g

* Dissolve nitrilotriacetic acid in 800 ml distilled water, adjust pH to - 6.5 with 1 N NaOH, add each component, and then bring the volume to 1 liter.

나) 가장 일반적인 백색부후균의 하나인 *Trametes versicolor*로부터 MnP 생산을 위한 합성배지로 Mycological broth (10 g/L soytone, 10 g/L glucose, 1 ml trace metals, 0.2 mM MnSO₄; pH 5 with acetic acid)를 사용하여 *T. rubrum* LKY-7의 LiP와 MnP의 생성을 확인하였으나 소량 검출되었다.

다) 나무조각을 이용할 경우 실제 감소되는 중량을 측정한 결과, *T. rubrum* LKY-7의 경우 대조군에 비하여 약 50% 정도가 더 감소되는 것을 확인하였다 (표 1).

Table 1. Weight loss of pine wood blocks caused by LSK-27 and LKY-7 after 3-month respective incubation at 30°C

	LSK-27	LKY-7	Control
Weight loss (%)	20.8±1.5	3.1±0.7	2.3±0.5

라) *T. rubrum* LKY-7을 이용한 생분해 후의 리그닌의 구조의 변화를 화학 group 조성의 변화로 분석한 결과, aliphatic -OH는 감소하였으며, -COOH 는 별 변화가 없었다 (표 2). phenolic -OH는 약간 감소하였으나, condensed -OH 는 대조군에 비하여 약 2배 가량 증가하였다.

Table 2. Aliphatic, phenolic, and carboxylic hydroxyl groups (mmol/g) before and after biodegradation

	Aliphatic		Phenolic-OH			- COOH
	- OH	Condensed	Guaiacyl	<i>p</i> -hydroxy - phenyl	Total	
Control	4.07	0.21	1.22	0.04	1.47	0.10
LSK-27	3.78	0.39	0.81	0.06	1.28	0.16
LKY-7	3.43	0.45	0.79	0.05	1.30	0.09

마) *T. rubrum* LKY-7가 실험실 수준의 배지에서는 그 생성량이 미미하여, 목분을 이용하여 리그닌변형 효소의 생성을 추적하였다. 실험 결과 LiP는 300 ml에서 450-1300 U, MnP는 260-270 U를 생성하는 것으로 확인되었다 (표 3). 즉, 이 균은 LiP와 MnP를 소량 생성할 수 있는 것으로 조사되었다. 실험실 내에서 이들 효소를 생성하는 최적의 배지 확립이 가장 중요한 문제이므로 이에 관한 실험을 진행하고 있다. 한편, 이 조건에서 laccase도 약 2200 U로 다량 생성하는 것으로 확인되었다.

또 다른 실험에서 목분을 첨가하지 않을 때의 basal medium에서는 정

치배양과 진탕배양 경우에는 느린 성장을 보여주었고, MnP와 LiP의 activity는 거의 보이지 않았다.

Table 3. Lignin modifying enzymes of LSK-27 and LKY-7 during degradation of pine extracted with 300 ml of malonate buffer (pH 4.5)

	LiP (U)	MnP (U)	Laccase (U)
LSK-27	848.4	77.7	262.5
	358.9	236.1	82.3
LKY-7	1293.5	257.3	2300.0
	452.4	270.8	2183.3

2) Laccase activity

Laccase activity는 정치배양이 진탕배양 보다 매우 낮은 수준이었다. 반면에 glucose-peptone medium 경우에는 basal medium과 같이 MnP와 LiP의 activity는 정치배양과 진탕배양 두 경우 모두 거의 보이지 않았으며, 배양 5일째에는 약간의 laccase activity가 보였다. 목분이 첨가되었을 때, basal medium 보다는 glucose-peptone medium에서 laccase activity가 20배 높게 나타났으며, 또한 정치배양보다 진탕배양에서 더 높은 activity가 보였다 (그림 1). 하지만 MnP와 LiP의 activity는 거의 보이지 않았다.

3) Xylanase와 cellulase

T. rubrum LKY-7를 위의 배지 조성으로 배양하였으나, 이로부터 생산되는 cellulase와 xylanase의 활성이 매우 미미하였다.

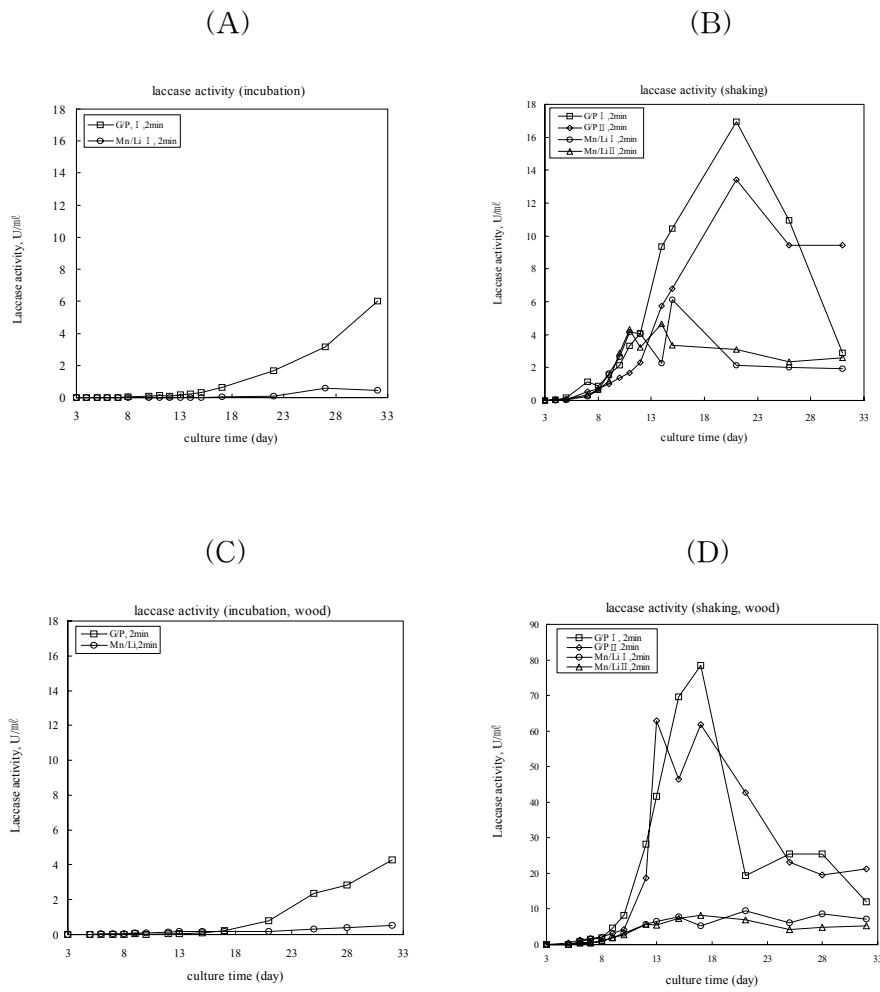


Fig. 1. Laccase production by *T. rubrum* LKY-7 grown in a glucose-peptone medium and basal medium at the following culture conditions. (A) starting with the fungal mycelia at a incubation condition, (B) starting with the fungal mycelia at a shaking condition. (c) starting with the fungal mycelia at a incubation condition in the presence of wood, (D) starting with the fungal mycelia at a shaking condition in the presence of wood.

4) Activity staining

Native gel electrophoresis는 10%의 gel을 사용하여 수행하였다. Sample enzyme 처리 방법은 효소원을 sample buffer (×5)와 혼합한 후 끓이지 않고 처리하였다. Native gel의 경우 activity staining을 수행하였더니, 2-4개의 활성 band가 보였다 (그림 2). 이는 laccase 종류가 두 개 이상일 가능성과 또는 한 종류의 laccase가 oligomer 형태를 이루고 있다는 것을 의미한다.



Fig. 2. Native gel and activity staining of *T. rubrum* LKY-7 laccase

이 native gel만으로는 laccase의 분자량은 확인할 수 없기 때문에 SDS-PAGE로 수행한 gel을 사용하여 activity staining을 하였다. 효소의 열안정성과 재생력을 점검하기 위하여 시료를 45초, 60초, 75초, 90초에 동안 열처리를 하였다. 활성염색 후 열처리가 짧을수록 활성 band가 선명하게 보였다 (그림 3). 또한 활성 염색의 모든 조건을 차갑게 하였더니, band가 더 선명하게 보였다. 이는 laccase가 열에 대해서 민감하게 반응한다는 것을 제시하며, 주요 band의 분자량이 약 65 kDa이었다.

정제한 효소와 목분을 첨가한 경우도 위와 비슷한 결과를 나타냈다 (그림 4). 그림 4의 lane 1, 4, 5는 정제된 laccase이고, lane 2는 목분이 첨가하지 않을 때 부분 정제된 농축 laccase, lane 5과 8은 각각 5배, 10배 희석한 laccase이며, lane 3은 목분이 첨가할 때 부분 정제된 농축 laccase, lane 6과 9는 각각 5배, 10배 희석한 laccase이다. 정제된 laccase은 band가 뚜렷하게 2개의 band로 보였으나, 정제되지 않은 laccase는 band가 뚜렷하게 보이지는 않았지

만, 목분이 첨가하지 않을 때 laccase는 5개 정도 band가 보였고, 목분이 첨가했을 때는 3-4개 정도 band가 보였다. 이로써 목분이 첨가할 때와 목분이 첨가하지 않을 때의 두 경우가 정제된 것보다 다른 종류 band가 보이는 것으로 미루어 다른 laccase가 존재할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

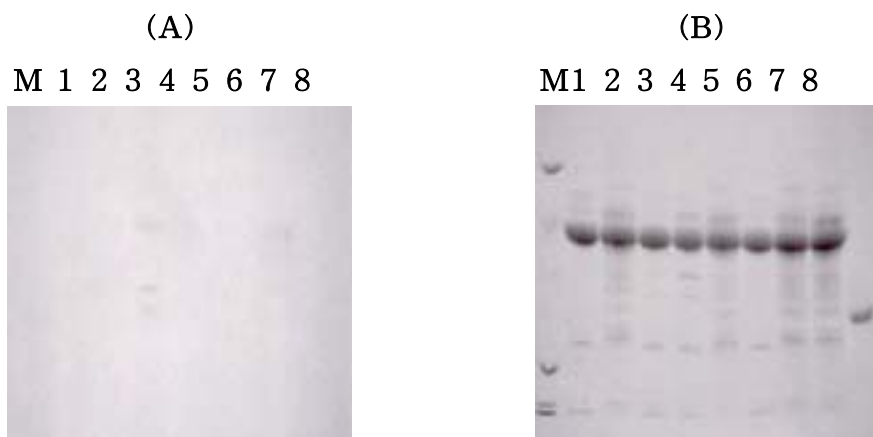


Fig. 3. Activity staining after SDS- PAGE of *T. rubrum* LKY-7 laccase. (A) activity stained gel, (B) Coomassie Blue stained gel.

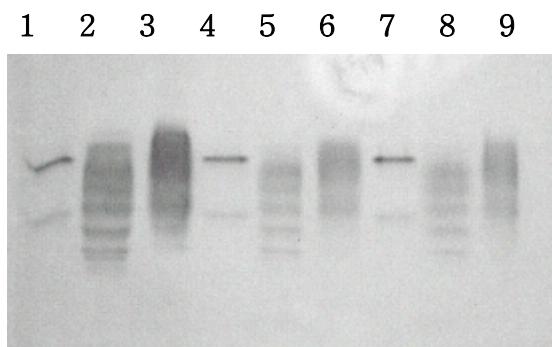


Fig 4. Activity staining of purified TrL after native gel electrophoresis. Lanes 1, 4 and 7, the purified laccase; 2, concentrated laccase of preparation I; 3, concentrated laccase of preparation II. Samples in lanes 5 and 8 contained a 5 times- and 10 times-diluted concentrate, respectively, of preparation I, and samples in lanes 6 and 9 contained the same as 5 and 8 except of preparation II.

5) Purification of the laccase

Glucose-peptone 배지에서 배양한 배양액 1ℓ를 12,000 x g에서 10분간 원심 분리하여 상층액 1ℓ를 ultrafiltration하여 50 ml로 20배 농축한 후 투석하였다. 투석한 후 SP-Sephadex C-50 column (3.0 × 26 cm, buffer; 25 mM Tris/HCl, 25 mM Tris/HCl + 1 M NaCl pH 6.5)을 이용하였다. 분획의 효소 활성이 낮아서, 다시 동결 건조를 하였다. 다시 투석한 후 High-Q column을 장착하여 low salt buffer (25 mM Tris/HCl, pH 6.5)와 high salt buffer (25 mM Tris/HCl + 1 M NaCl, pH 6.5)을 이용하였다.

그 결과 목분이 첨가할 때와 목분이 첨가하지 않을 때 모두 한 개의 효소 활성 peak을 얻었다 (그림 5). 이들 결과로 목분 첨가는 새로운 효소를 생성하는 것이 아니라 주효소의 생산을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

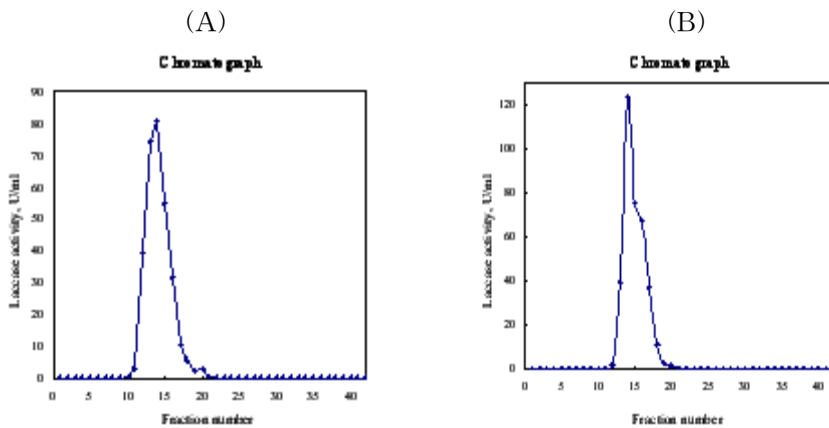


Fig 5. Chromatogram of the laccase from High-Q column. Bed volume, 5 ml. (A) in the absence of wood powder, (B) in the presence of wood powder.

6) *T. rubrum* 효소 정제 및 특성

정제된 laccase 효소의 특성을 조사한 결과, 속도론적 특성은 기질친화력은 ABTS가 가장 좋았으나, 활성촉매 속도는 NHA에 대하여 가장 높았다 (표

4). LiP, MnP는 생산 배지 조성을 달리하여 배양시간에 따른 활성을 조사하였으나 두 효소 모두 생산량이 미미하여 정제를 할 수 없었다.

Table 4. Kinetic properties of TrL with selected substrates^a

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)	pH _{opt}
ABTS	0.045±0.008	620±30	1.410 ⁷	3.0
MS	0.380±0.07	330±20	8.610 ⁵	3.0
HBT	24±1	160±10	6.910 ³	-
VA	58±3.1	600±18	1.010 ⁴	-
NHA	2.3±0.2	1100±20	4.710 ⁵	4.0

^a The K_m/k_{cat} values are the results of nonlinear regression fitting of Michaelis-Menten equation on 6 to 10 experimental reading that covered the whole rate-[substrate] profile (from the initial, linear phase to the saturated phase).

7) Western blot

SDS-PAGE 후 gel에 NC (nitrocellulose) membrane을 붙여 Western blotting kit (Hoefer 사)을 사용하여 20 V, 90 mA에서 overnight하여 NC membrane에 단백질을 전이시켰다. NC membrane을 blocking solution (1% BSA)로 30분 동안 incubation하여 비특이적 결합부위를 포화시키고, 1,000배 희석한 primary antibody를 plastic chamber에 넣고 30분 동안 천천히 흔들면서 incubation 시켰다. 이 때 희석 정도는 strip test를 한 후 사용하였다. 비결합 antibody를 제거하기 위하여 PBST (Tween 20 in phosphate-buffered saline)로 충분히 씻어주고, 5,000배 희석한 secondary antibody (AP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, Stratagene)에 넣고 천천히 흔들면서 30분 동안 incubation시킨 후 비결합 antibody를 제거하기 위하여 PBST를 membrane을 충분히 씻어주고, Tween 20을 제거하기 위하여 PBS로 씻어주었다. Membrane을 Alkaline phosphatase에 1~15분 정도 발색 반응시키

고 색깔이 보이면 증류수로 몇 분 동안 씻어서 반응을 정지시켰다. 이 결과 Membrane에 단백질이 전이가 되었지만, 다른 size marker도 밴드가 보여서 primary anti-IgG가 비특이적 결합이 있는 것으로 관찰되었다. (그림 6). 그러나, 그 경향은 TrLKY-7이 생산하는 laccase는 단일 laccase가 아닌 것을 뒷받침하였다.

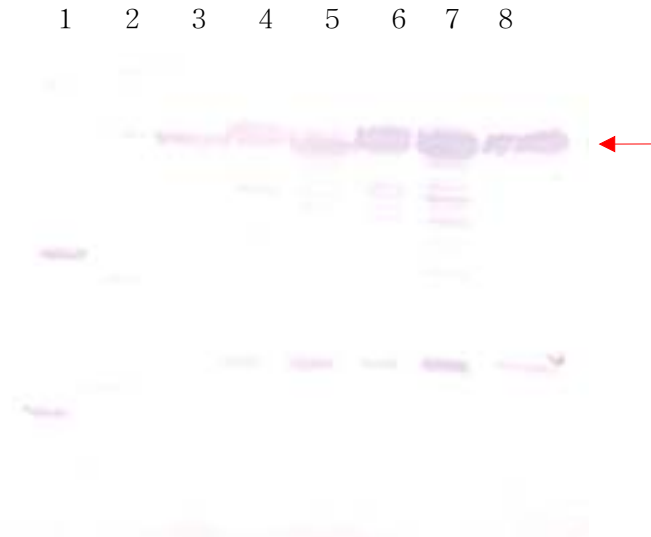


그림 6. Western blotting of the laccase produced from TrLKY-7. Lanes 1 and 2, Size marker proteins; 3, Supernatant; 4, Concentrate; 5, High-Q pools; 6, CHT-II pools; 7, HIC fraction; 8, HIC fraction.

8) *T. rubrum* LKY-7과 *T. rubrum* LSK-27의 laccase activity

또 다른 대상 균을 확보하기 위하여 *T. rubrum* LSK-27을 분리하여 사용하였다. 이 균을 대상으로 glucose-peptone medium을 사용하여 목분을 첨가할 때와 첨가하지 않을 때의 activity를 측정한 결과, *T. rubrum* LKY-7이 *T. rubrum* LSK-27보다 높은 activity가 보였다. *T. rubrum* LSK-27은 laccase activity가 거의 보이지 않았다.

9) 기존 리그닌분해 효소원 확보

대표적 백색부후균 *Phanerochate chrysosporium* 과 *Pycnoporus cinnabarinus*의 laccase를 확보하였다. 호기성세균 *Bacillus subtilis* BSE616와 *Bacillus subtilis* KD1014의 cellulase와 혐기성세균 *Clostridium thermocellum*의 xylanase를 확보하였다.

나. Laccase 유전자 domain 구조 및 기능 분석

1) Laccase 유전자 domain 분석

T. rubrum LKY-7부터 분리된 laccase유전자(*lacA*)는 다른 곰팡이의 laccase유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역이 선발되었다 (그림 7).

SWISS -PROT	BLOCK A	BLOCK B	BLOCK C
LAC1 TRIRU:Query	35 IQPDG	86 HWHGLEFVAGTNWADG&AFVNQCP	127 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVV
LAC2_AGABI Q12542	33 L&PDG	82 HWHGFFQ&ARTSGQDGF&FVNQCP	122 GTFWYHSHLSTQYCDGLRG&FI V
LAC1_CORHI Q02497	36 VSPDG	85 HWHGFFQKGTWADG&AFVNQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVV
LAC1_PHLRA Q01679	36 USPDG	85 HWHGFFQHG&TNWADG&AFINQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVV
LAC1_PLEOS Q12729	38 USPDG	96 HWHGFFQSG&STWADG&AFVNQCP	136 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIV
LAC1_THACU P56193	33 I&PDG	98 HWHGFFQ&GSSWADG&AFVTQCP	122 GTFWYHSHLSSQYVDGLRGPLV I
LAC2_TRAVE Q12718	35 VSPDG	84 HWHGFFQ&AGTNWADG&AFVNQCP	124 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVV
LAC1_TRAVI Q99044	36 USPDG	85 HWHGFFQKGTWADG&AFINQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRG P FVV
	BLOCK D	BLOCK E	
LAC1 TRIRU:Query	249 GKRYRFRFVLSLSCDPNFTFSIDGHNFTIIEAG	553 HPEFLHGHTF	
LAC2_AGABI Q12542	214 GKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHDLT IIEVD	417 HPFHLHGHTF	
LAC1_CORHI Q02497	214 GKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHDLT IIEVD	416 HPFHLHGHTF	
LAC1_PHLRA Q01679	215 GKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHSLSVIEVD	418 HPFHLHGHTF	
LAC1_PLEOS Q12729	224 MKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHSLSVIEVD	425 HPFHLHGHTF	
LAC2_TRAVE Q12718	213 GKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHSLSVIEVD	415 HPFHLHGHTF	
LAC1_TRAVI Q99044	214 GKRYRFRFVLSLSCDPNHTFSIDGHNFT I IETD	416 HPFHLHGHTF	

그림 7. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자와 다른 곰팡이 laccase 유전자의 주요 아미노산 서열 비교

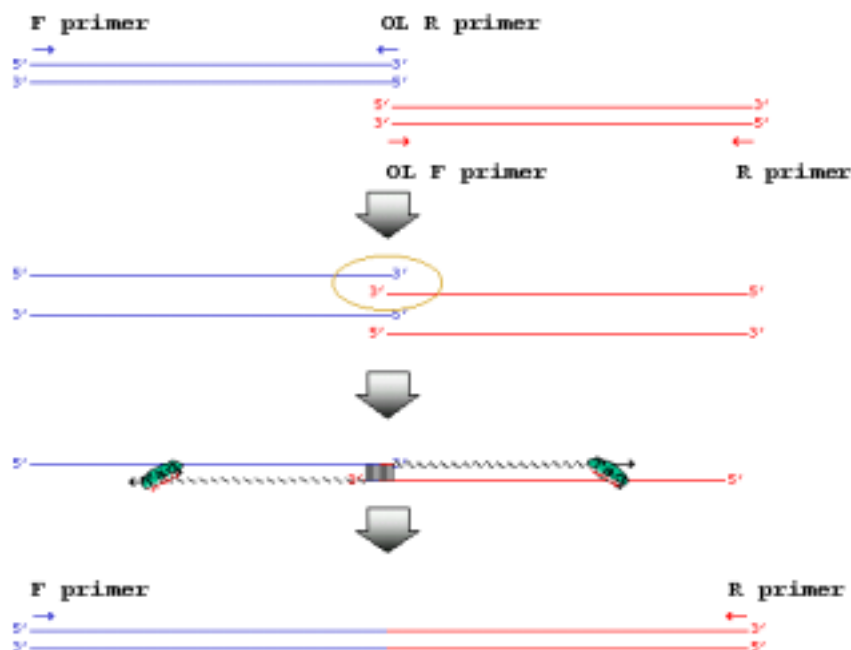
또한, 현재까지 보고된 곰팡이 유래 laccase 유전자는 약 20여종이다 (표 5).

Table 5. Fungal laccase genes from database

SOURCE	SIZE	ACCESSION NUMBER	YEAR	JOURNAL
<i>Pleurotus ostreatus</i> (oyster mushroom)	2929 bp	AB089612	2003	Mycoscience 44, 11-17 (2003)
<i>Trametes hirsuta</i>	2904 bp	M60560	1993	J. Biol. Chem. 265 (25), 15224-15230 (1990)
<i>Trametes hirsuta</i>	2907 bp	M60561	1993	J. Biol. Chem. 265 (25), 15224-15230 (1990)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	2119 bp	AY147188	2002	Unpublished
<i>Trametes hirsuta</i>	1845 bp	AY081775	2002	Unpublished
<i>Trametes villosa</i>	2812 bp	L78078	2001	Gene 181 (1-2), 95-102 (1996)
<i>Cyathus bulleri</i>	150 bp	AF437509	2002	Unpublished
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	1397 bp	AF297528	2002	Microbiology 147 (Pt 7), 1755-1783 (2001)
<i>Coriolopsis gallica</i>	3000 bp	AY017340	2001	Unpublished
<i>Pycnoporus coccineus</i>	2124 bp	AB072704	2001	Journal of Bioscience and Bioengineering (2001)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	1557 bp	AB072703	2001	Journal of Bioscience and Bioengineering (2001)
<i>Polyporus ciliatus</i>	1694 bp	AF176232	2000	Unpublished
<i>Polyporus ciliatus</i>	2020 bp	AF176231	2000	Unpublished
<i>Polyporus ciliatus</i>	1829 bp	AF176230	2000	Unpublished
<i>Coriolus versicolor</i>	3099 bp	D84235	2000	Unpublished
<i>Trametes villosa</i>	2906 bp	L78077	1997	Gene 181 (1-2), 95-102 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	3016 bp	L78076	1997	Gene 181 (1-2), 95-102 (1996)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	2629 bp	AF025481	1998	Appl. Environ. Microbiol. 62 (94), 1151-1158 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	2417 bp	L49376	1996	Appl. Environ. Microbiol. 62 (3), 834-841 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	2800 bp	X84683	1995	Biochim. Biophys. Acta 1251 (2), 210-215 (1995)
<i>Trametes villosa</i>	2689 bp	L49377	1996	Appl. Environ. Microbiol. 62 (3), 834-841 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	2417 bp	L49376	1996	App. Environ. Microbiol. 62 (3), 834-841 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	2906 bp	L78077	1997	Gene 181 (1-2), 95-102 (1996)
<i>Trametes villosa</i>	3016 bp	L78076	1997	Gene 181 (1-2), 95-102 (1996)
<i>Trametes versicolor</i>	2800 bp	X84683	1995	Biochim. Biophys. Acta 1251 (2), 210-215 (1994)

2) Laccase 유전자 domain의 deletion

Block 5개 중에서 뒷 부분에 기질결합 domain이 많이 존재하므로 다섯 번째 부분을 deletion 시키는 실험을 수행하였다.



사용할 주형 DNA는 pGEM-T Easy vector에 클로닝된 유전자를 이용하였다. 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다 (94°C - 30 sec, 50°C - 30 sec, 72°C - 90 sec, 35 cycles). Overlap PCR을 수행하기 위하여 먼저 TrL 뒷 부분의 block 5번 바로 앞부분에 5번 끝나는 부위의 서열을 부착시켰다. 두 번째 조각은 5번 끝나는 부위 앞에 5번 시작 부위와 반대서열을 부착하였다.

Overlapped DNA를 pGEM-T Easy vector에 cloning하여 plate에 도말 후 자란 콜로니를 12개를 무작위로 배양하여 활성을 나타내는 클론을 선발하였다 (그림 8).

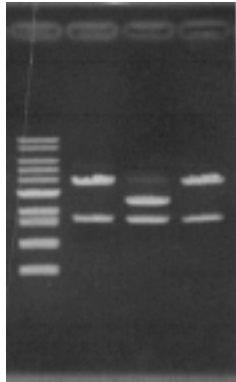


Fig 8. Plasmid DNA of domain-deleted transformant of laccase.

Block 5가 결손된 유전자를 지니는 transformant로부터 생산된 laccase의 효소 활성은 본래 유전자 lacA를 지니는 클론과 비교하였을 때 31%로 현저히 감소되었다 (표 6).

Table 6. Enzyme activity of intact and mutant laccase-harboring transformants

	Enzyme activity (U/ml)
<i>E. coli</i> XL1-blue lacA	1.35
<i>E. coli</i> XL1-blue lacA/Δ5	0.42

다. *Bacillus subtilis*로 laccase 및 xylanase 유전자 cloning

1) *Bacillus subtilis*로 laccase cloning

Laccase의 *Bacillus* cloning에 pWB705 벡터 (그림 9)를 사용하였다. 이 벡

터를 EcoRI으로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 laccase cDNA가 연결되도록 하였다. Insert인 laccase cDNA는 제2세부과제에서 제작된 pETLAC 플라스미드를 사용하였다. 먼저 *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800의 형질전환주를 competent cell을 만들어 vector만을 사용하여 plasmid의 *Bacillus subtilis* 형질전환 조건을 수립하였다. *Bacillus subtilis* competent cell은 SPI 배지에 밤새 키운 균을 접종하여 37°C에서 약 4시간 키워 OD600이 약 0.6되게 한 후, 이 배양액 0.5 ml을 4.5 ml의 SPII 배지에 넣어 37°C에서 90분간 키운 다음 EGTA 용액 0.05 ml을 넣고 5분간을 더 키웠다. DNA 시료를 0.5 ml의 competent cell과 섞어 90분간 배양하였다. 이 때, WB700 (pES88)과 WB800 (pES88)은 kanamycin이 들어있는 평판배지에 도말하였고, 37°C에서 15시간 키웠다. 자라난 transformant 각각 8마리씩을 무작위로 선발하여 이들을 액체배양하여 enzyme activity와 단백질을 정량분석 하였고, 그 중 가장 활성이 높은 transformant를 선택하여 이후 실험에 사용하였다. *B. subtilis* WB700 (pES88)과 WB800 (pES88)의 상층액을 회수하여 효소활성을 조사한 결과, WB800 (pES88)에서 32.1 U/ml을 나타냈다 (표 7). 활성 염색한 결과 두 종류의 형질전환주 모두 예상된 분자량 부근에서 하나의 활성 띠를 보였다 (그림 10). 이 후 실험은 *B. subtilis* WB800 (pES88)을 사용하였다.

Table 7. Laccase activity and protein concentration of WB700 (pES88) and WB800 (pES88)

	Enzyme activity (U/ml)	Protein (mg/ml)
<i>B. subtilis</i> WB700 (pES88)	24.9	8.70
<i>B. subtilis</i> WB800 (pES88)	32.1	9.21

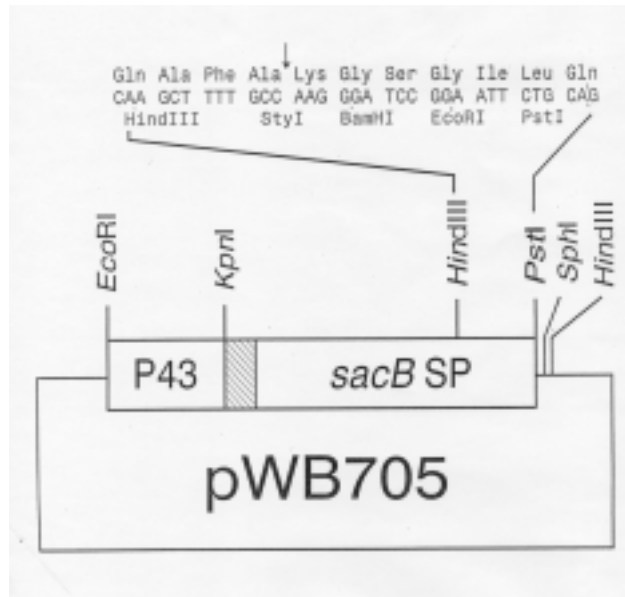


Fig 9. Expression vector pWB705 for *Bacillus subtilis* transformation



Figure 10. Activity staining of the culture supernatant from *Bacillus subtilis* WB800 (pES88) harboring the laccase cDNA.

2) *Bacillus subtilis* 형질전환주에서 생산된 laccase의 정제

WB800 (pES88)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 앞에서 기술한 TrLKY-7의 laccase를 정제하는 방법과 동일한 방법으로 laccase를 정제하여 전기영동과 활성염색을 수행하였다 (그림 11).



Figure 11. SDS-PAGE of purified laccase from *Bacillus subtilis* WB800 (pES88) supernatnat.

3) *Bacillus subtilis*로 xylanase cloning

대상 xylanase는 비교적 내열성이 있는 XynX로 하였다. 이 유전자를 shuttle vector pJH323의 Sma I 부위에 pCX33을 blunt ligation하여 pJX33을 얻었다. 앞서 기술된 laccase 유전자의 형질전환과 같이 *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800을 형질전환숙주로 사용하였다. 이들 competent cell을 0.5 ml에 DNA를 섞어 90분간 배양하였다. 이 때, WB700 (pJX33)는 kanamycin이 들어있는 평판배지에 도말하였고, WB800 (pJX33)는 hygromycin이 들어있는 평판배지에 도말하여, 37°C에서 15시간 키웠다. Halo를 보이는 transformant를 선발하여 이들을 액체배양하여 enzyme activity와 단백질을 정량분석 하였다 (표 8). *B. subtilis* WB700 (pJX33)와 WB800 (pJX33)의 상층액을 활성염색한 결과 *B. subtilis* WB700 (pJX33)는 예상된 분자량 보다 작은 부근에서 두 개의 활성 띠가 보였고, WB800 (pJX33)는 그 보다 분자량이 큰 위치에서 세 개의 활성 띠가 보였다 (그림 12).

일반적으로 외래단백질을 발현시킬 때 숙주세포의 단백질분해효소에 의하여 외래단백질의 내부가 절단이 된다. 이 현상은 경우에 따라 외래 단백질의 활성을 완전히 불활성화 시키거나 약화시킨다. 아주 드물게는 크기가 작아짐에 따라 활성이 다소 증가하는 경우를 보이기도 한다. *Bacillus subtilis* WB700 (pJX33)의 경우 원래의 분자량 116 kDa 보다 훨씬 작은 위치에서 강한 활성 띠와 약한 활성 띠 각각 한 개 씩이 나타났다. 이로부터 WB700이 7개의 숙주

단백질효소가 불활성화된 좋은 발현 숙주임에도 불구하고 XynX 효소단백질의 경우 두 군데 이상이 잘려지고 있음을 알 수 있었다. 그러나, 다행히 잘려진 부분이 촉매반응에 결정적이지 않아 효소활성은 유지되고 있었다. 단백질분해 효소 8개를 불활성화 시킨 WB800 (pJX33)의 경우 원래의 분자량에 해당하는 활성 띠와 함께 바로 밑에 하나, 그리고 그 밑에 하나가 더 있어 원래 크기의 효소와 절단된 효소 2 종류가 생산됨을 알 수 있었다. 이 경우 완벽하지는 않지만 원래 크기의 효소를 얻을 수 있는 숙주로 사용할 수 있음을 확인하였다.

Table 7. Enzyme activity and protein concentration of WB700 (pJX33) and WB800 (pJX33)

	Enzyme activity (U/ml)	Protein Concentration (mg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> WB700 (pJX33)	4.89	8.47
<i>Bacillus subtilis</i> WB800 (pJX33)	1.97	9.03



Fig 12. Activity staining of *Bacillus subtilis* WB700 (pJX33) and WB800 (pJX33). Lane 1, WB700 (pJX33); 2, WB800 (pJX33).

4) *Bacillus subtilis*에 cloning된 xylanase의 정제

잘려진 여러 종류의 내열성의 XynX 중에서 효소활성이 있는 작은 xylanase를 분리하기 위하여 이 유전자가 들어있는 *E. coli* 세포를 키웠다. 얻은 세포를 파쇄한 후 원심 분리하여 모은 상층액에서 효소의 활성이 있음을 확인하였고, 이 효소원을 열처리와 ammonium sulfate로 침전 분리 하였다 (표 9). 내열성을 지닌 xylanase이었기 때문에 열처리하였지만 효소 활성의 변화가 거의 없이 불순 단백질을 제거할 수 있었다. 위 침전 농축액을 High-Q과 CHT-II chromatography 로 정제하였다. 이 효소를 CHT-II chromatography 로 정제하였을 때, fraction 4~7에서 xylanase activity가 높게 나왔다 (그림 13). 높게 나온 fraction의 activity staining과 SDS-PAGE를 수행한 결과 이 fraction들은 예상된 분자량에서 하나의 활성 띠를 보였다 (그림 14).

Table 9. Purification procedure of the xylanase

Sample	Activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Sonication	22.5	1.88	12.0
Heat-treatment	23.0	0.84	27.5
Ammonium down	301	4.67	64.0
	15	27.0	0.37
	16	38.0	0.80
High-Q chromatography (Fractions)	17	112	1.00
	18	96.0	1.07
	19	40.0	1.05
	3	16.0	0.08
	4	43.0	0.26
CHT-II chromatography (Fractions)	5	59.0	0.43
	6	60.0	0.45
	7	39.0	0.29
	8	15.0	1.00

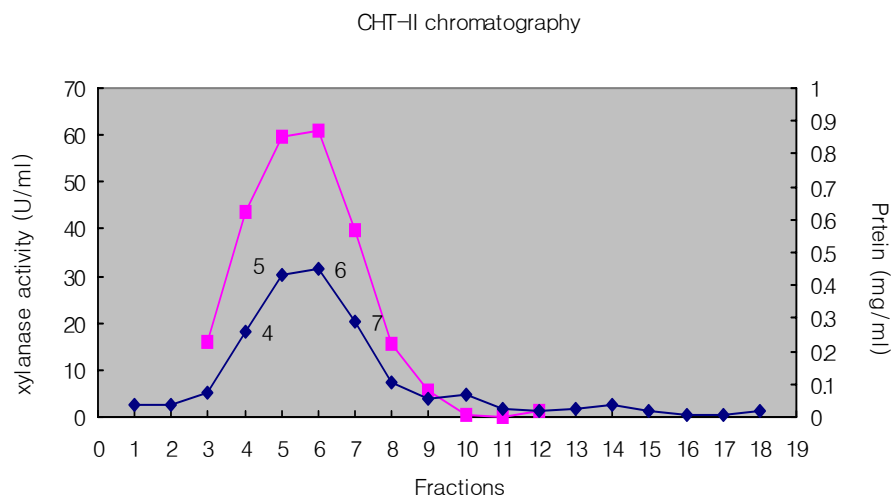


Fig 13. CHT-II chromatography for isolating the xylanase

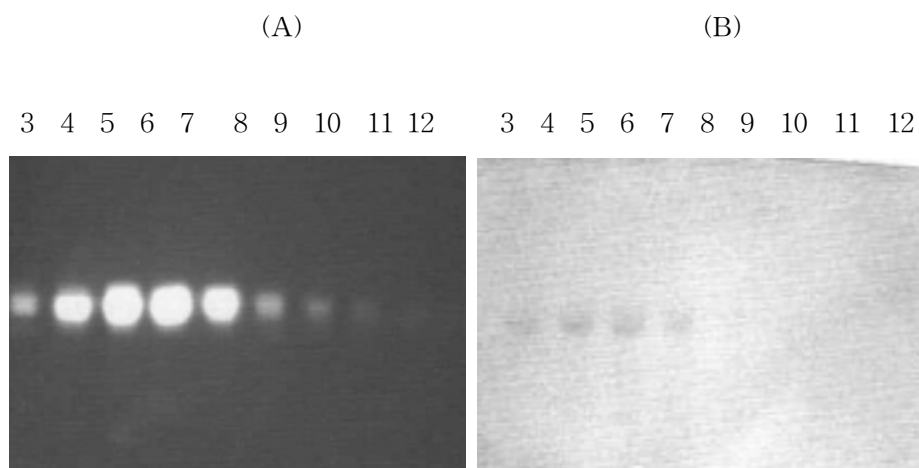


Fig 14. Activity staining (A) and protein staining (B) of the CHT-II chromatography fractions after SDS-PAGE.

4. 결과 요약

가. *T. rubrum*의 리그닌 분해효소 활성 확인

T. rubrum LKY-7 (TrLKY-7)의 리그닌 분해효소 생산량을 비교한 결과, 효소생산량은 배지의 조성에 민감하였으며, 특히 laccase 생산은 진탕배양에서 높은 수준을 보였다. 목분이 첨가되었을 때, laccase 활성이 20배 높게 나타났으나, MnP, LiP, cellulase, 그리고 xylanase의 활성은 매우 미미하였다. 사용한 배지에 목분을 첨가할 경우 laccase는 최고 20 U/ml, LiP는 laccase의 약 20% 수준, 그리고 MnP는 그 절반 수준을 생성하는 것으로 확인되어 이 균은 실제 환경에서 LiP와 MnP를 소량 생성할 수 있는 것으로 조사되었다. 그러나, LiP와 MnP의 효소단백질 자체의 생산량이 낮아 이들 효소는 정제할 수 없었다. TrLKY-7의 laccase의 경우, native gel에서 활성염색을 수행한 결과 2-4개의 활성 band가 보여 생산되는 laccase 종류가 두 개 이상일 가능성을 확인하였다. SDS-PAGE 활성염색에서 laccase는 열에 대해서 민감하게 반응하였으며, 주요 band의 분자량은 약 65 kDa이었다. 배양액에 목분이 첨가 여부에서 laccase 활성염색 band 수가 다르게 나타났으나, laccase 정제 과정에서 두 경우 활성은 다르지만 일치된 한 개의 효소활성 peak를 보였다. 항체를 이용한 Western blotting 실험의 결과는 TrLKY-7이 생산하는 laccase는 단일 laccase가 아닌 것을 뒷받침하여, TrLKY-7은 주요 laccase와는 다른 또 하나의 laccase를 생산하는 것으로 조사되었다. 정제된 laccase 효소의 특성을 조사한 결과, 기질친화력은 ABTS가 가장 좋았으나, 활성촉매 속도는 NHA에 대하여 가장 높았다. 또한, 다른 효소원으로 *T. rubrum* LSK-27, *Phanerochate chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Bacillus subtilis* BSE616, *B. subtilis* KD1014, 그리고 *Clostridium thermocellum* 등의 균들을 확보하였다.

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석

TrLKY-7으로부터 분리된 laccase 유전자 (*lacA*)는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역이 확인되었다. 현재까지 보고된 곰팡이 유래 laccase 유전자는 약 20여종과는 다른 서열을 보였다. Block 5개 중에

서 4개 부분은 촉매에 직접적인 관련을 하는 것으로 예측되어지고, 일반적으로 뒷 부분에 기질결합 domain이 많이 존재하므로 다섯 번째 domain 부분을 deletion 시키는 실험을 수행하였다. Overlapped DNA를 pGEM-T Easy vector에 cloning하여 plate에 도말 후 자란 콜로니 25개 중 12개를 무작위로 배양하여 활성을 나타내는 클론을 선발하였다. Block 5가 결손된 유전자를 지니는 transformant로부터 생산된 laccase의 효소 활성은 본래 유전자 lacA를 지니는 클론과 비교하였을 때 전반적으로 낮아 가장 우수한 clone의 효소 활성도 31%로 현저히 감소되었다.

다. 펄프의 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

Laccase는 TrLKY-7 유전자를 대상으로 벡터는 pWB705, insert cDNA는 pETLAC 플라스미드를 사용하였다. 형질전환은 *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800의 competent cell을 만들어 수행하였다. WB700 (pES88)과 WB800 (pES88)은 kanamycin이 들어있는 평판배지에 도말하였고, 그 중 가장 활성이 높은 transformant를 선택하였다. *B. subtilis* WB800 (pES88)의 상층액에서 최고 32 U/ml의 활성을 확인하였으며, 이를 활성 염색한 결과 두 종류의 형질 전환주 모두 예상된 분자량 부근에서 하나의 활성 띠를 보였다. WB800 (pES88)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 laccase를 정제하여 전기영동과 활성염색을 수행하였다. 또한, xylanase는 *C. thermocellum* 유래 XynX로 하여 vector pJH323을 사용하여 pJX33을 얻었다. *B. subtilis*의 WB700과 WB800을 형질전환숙주로 사용하여 transformant를 선발하였다. *B. subtilis* WB700 (pJX33)와 WB800 (pJX33)의 상층액을 활성염색한 결과 *B. subtilis* WB700 (pJX33)는 예상된 분자량 116 kDa 보다 작은 부근에서 두 개의 활성 띠가 보였고, WB800 (pJX33)는 그 보다 분자량이 큰 위치에서 세 개의 활성 띠가 보였다. 잘려진 여러 종류의 내열성의 XynX 중에서 효소활성이 있는 작은 xylanase를 열처리, ammonium sulfate 침전, High-Q, 그리고 CHT-II chromatography로 정제하였다.

제 2 절 *Trichopyton rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

1. 서론

백색부후균 (white rot fungi)을 이용한 리그닌의 생물학적 분해에 관한 연구가 많이 이루어져 왔고, 최근에는 목재의 펄프화 및 표백에 laccase를 이용하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 laccase를 펄프표백의 한 공정으로 이용하기 위해서는 그 효소를 대량 생산할 수 있는 균주가 개발되어야 할 것이다.

Laccase를 분비하는 균주는 백색부후균에서 많이 보고되어 있다. 그러나 그들의 대부분은 laccase이외의 여러 효소를 분비하고 있다. 따라서 알려진 백색부후균으로부터 laccase를 얻기 위해서는 배양 여액으로부터 laccase를 따로 분리, 정제해야 하는 어려움이 있다. 분리, 정제하지 않고 이용하기 위해서는 그 효소만 생산할 수 있는 균주를 선발하거나 개발해야 할 것이다. 그러나 자연에서 특정의 효소만을 생산하는 균주를 선발하기란 어렵고, 유전공학기법을 이용하여 개발해야 한다. 결국, laccase 생산균주로부터 유전자를 클로닝하여 백색부후균이외의 다른 균주에 도입, 발현은 물론 그 효소가 배양 여액으로 분비할 수 있도록 해야 한다는 것을 의미한다.

laccase 유전자는 리그닌분해 곰팡이로서 *Agaricus bisporus* (63), *Coriolus hirsutus* (46), *Phlebia radiata* (69, 70), *Coriolus versicolor* (33), *Trametes versicolor* (36), *Trametes villosa* (83), *Pycnoporus cinnabarinus* (19, 56) 와 lignin을 분해하지 않는 곰팡이로서 *Neurospora crassa* (28), *Cryphonectria parasitica* (17), *Aspergillus nidulans* (17) 등에서 클로닝 되었다. 또한 *Aspergillus oryzae* (12), *Saccharomycetes cerevisiae*, *Trichoderma reesei* (69), *Pichia pastoris* (35, 56) 등에서 외래 유전자를 발현 및 분비했다는 보고가 있다. 그러나 이미 보고된 유전자를 다른 균주에 도입, 발현시켜 이용할 경우에는 유전자에 대한 로얄티를 지불해야 할 것이다. 따라서 지금까지 보고되지 않은 새로운 laccase유전자를 클로닝하는 것이 필요하다.

본 연구팀에서는 기존의 백색부후균에 비하여 리그닌 분해능이 우수하고

탈리그닌 선택성이 뛰어난 *Trichopyton rubrum* LKY-7을 활엽수 chip pile로부터 분리하였다 (37). 또한 그 균주가 생산한 laccase는 지금까지 국내·외에서 보고된 것과는 다른 특성을 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 *T. rubrum* LKY-7으로부터 cDNA library를 만들어서 laccase유전자를 클로닝하고, 이 유전자를 *E. coli*에 도입, 발현시켜서 생산된 laccase의 분리, 정제 및 특성을 조사하였다. 또한 클로닝된 laccase 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현시켜 분비된 효소의 특성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성

1) cDNA library의 구축

가) RNA 조제 : laccase의 발현을 위하여 1.34 mM의 2,5-xylydine이 첨가된 성장배지에서 균주를 5일 동안 배양 후, Messenger RNA isolation kit (Stratagene, USA) 을 이용하여 total RNA를 분리하였고, Oligotex-dT30 (Super) mRNA Purification kit (Takara, Japan) 을 이용하여 polyA⁺ RNA를 조제하였다.

나) cDNA의 합성 : cDNA Synthesis Kit (Stragene)을 이용하여 Gubler-Hoffman법으로 cDNA를 합성하였다. 1st strand 합성시 5-methyl dCTP를 사용하여 Directional Cloning 과정에서 cDNA의 절단을 방지하였다.

(1) mRNA start volume : 1.48 ug

(2) Reverse Transcriptase : MMLV Reverse Transcriptase와 BRL Superscript II의 혼합사용.

* Ologo(dY)₁₈ Linker primer (GA)₁₀ACTAGTCTCGAG(t)₁₈

(3) Directional Cloning : 5 말단측 *EcoRI* Adaptor Ligation

3 말단측 *XhoI* 절단

* *EcoRI* Adaptor 5'-OH-AATTCGGCACGAGG-3'

3'-GCCGTGCTCCp-5'

다) cDNA를 ZAP Expression Vector에 구축 : cDNA를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단된 ZAP Expression Vector (Stratagene)에 ligation하여 Gigapack III gold packaging kit (Stratagene)을 이용하여 packaging하였다. 여기에 500 μ l의 SM buffer를 첨가하고, 25 μ l의 Chloroform을 첨가하여 상층을 회수한 후, 최종 농도 7%가 되도록 DMSO를 첨가하여 primary library로 하였다.

2) laccase cDNA clone의 선발

가) 항체의 조제 : 정제된 laccase를 Takara에 의뢰하여 조제하였다.

나) hybridization 실시 : cDNA library의 plaque (50,000 pfu/plate) 위에 IPTG 함유 nitrocellulose membrane 올려 놓고 laccase가 발현하도록 한 다음, *picoBlue*TM immunoscreening kit (Stratagene, USA)을 이용하여 상기의 항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였다.

다) laccase의 발현여부 확인 : 항체 교잡에 의해서 선발된 plaque들을 순수 분리 후, *E. coli*와 액체 배양하고, 이 배양 여액을 laccase기질에 첨가하여 효소 생산여부를 확인하였다.

3) laccase cDNA를 *E. coli*에 도입 및 발현

가) *E. coli*에 도입 : ZAP express vector는 *in vivo*상태에서 lambda vector를 phagmid로 전환하여 *E. coli*내에서 삽입 DNA가 복제할 수 있도록 design되었다. 따라서, 회사에서 제공한 protocol (Stratagene, USA)에 의해서, laccase를 생산한 plaque들을 *E. coli* XL0LR내로 도입하였다.

나) *E. coli*에서의 발현 : 재조합 *E. coli*의 배양여액, periplasm 및 cytoplasm으로부터 조효소액을 추출(pET expression vector의 protocol, Invitrogen), 0.5 mM ABTS와 반응시켜 420 nm에서 laccase 활성을 측정하였다.

4) laccase cDNA의 염기서열 결정 및 분석

가) 염기서열 결정 : 재조합 *E. coli*로부터 phagmid를 분리, 정제하여 MacroGen에 의뢰하여 결정하였다.

나) 염기서열 및 아미노산 서열 분석 : 염기서열의 homology search는 NCBI (National Center for Biotrchnology Information) 의 BLAST program, laccase의 이론적 분자량 및 pI 값은 ExPASy Proteomics tools 의 Compute pI/Mw program, 제한효소 절단 site는 Web Cutter program 에 의해서 분석하였다.

나. 유전자의 변형에 의한 laccase 활성의 변화 및 특성

1) Site-directed mutagenesis에 의한 laccase 유전자의 아미노산 변경

가) 플라스미드의 추출

T. rubrum LKY-7으로부터 분리된 laccase 유전자 (*lacA*) 를 pBK-CMV 벡터 (Stratagene, La Jolla, CA) 에 구축하여 pBKLACA로 명명하고, *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA) 에 형질전환시켰다. 형질전환 *E. coli*는 kanamycin (50 $\mu\text{l/ml}$) 을 함유한 Luria Broth (LB)에 접종하여 37°C에서 배양 후, 알칼리-lysis법에 의하여 플라스미드를 추출하였다.

나) 아미노산변경을 위한 PCR 실시

*lacA*의 target 아미노산들은 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) 을 이용하여 돌연변이 되었다. PCR은 Template DNA 2 μl , dNTP (25 mM) 0.5 μl , 10X buffer 2.5 μl , S.D.W 18.5 μl , pfu DNA polymerase 0.5 μl , primer F·R (20 pmole) 각각 1 μl 를 PCR tube에 넣고, 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 68°C에서 12분을 16 cycle을 거쳤고, 원하는 DNA의 밴드가 나오지 않았을 경우에는 cycle수를 늘려가면서 실시하였다.

다) PCR 산물의 ligation 및 형질전환

PCR산물 속에 들어 있는 template DNA는 *Dpn* I 처리에 의해서 절단시킨 후, *E. coli* competent cell에 첨가하고, 얼음에서 30분, 42°C에서 45초, 얼음

에서 2분 담근 후, 42°C에 보존된 NZY broth 500 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 (200~250 rpm) 배양하였다. 배양액 100 μ l씩을 LB (km 50) plate에 도말한 후 37°C 항온기에서 16시간 이상 배양하여 single colony를 선발하였다.

라) 형질전환주의 선발 및 확인

선발된 형질전환주를 LB (km 50) plate에 다시 streaking 하여 plasmid를 추출한 다음 DNA 염기서열을 결정하여 아미노산의 변화를 확인하였다.

마) 형질전환 *E. coli*의 laccase 생산 능력

laccase 생산의 최적 조건을 찾기 위하여 LB와 TB에서 3시간 배양 후, IPTG 첨가를 첨가하여 24시간까지 더 배양 후, 세포질 및 배양여액에 있는 laccase 활성을 조사하였다.

(1) 조효소액의 조제 : 형질전환주들을 배양 후, 원심분리에 의해서 배양액과 pellet (세포)를 얻었다. 세포질로부터의 효소 추출은 pET manual에 준하였다. 즉, 원심분리에 의해서 배양액 40 ml의 pellet에 30 mM Tris-HCl (pH8.0 + 20% sucrose) 30 ml와 0.5 M EDTA 60 μ l 첨가한 후 상온에서 10분간 100 rpm으로 shaking하여 원심분리하였다. pellet을 ice cold 5 mM MgSO₄ 10 ml에 녹여 얼음에서 10분 동안 100 rpm으로 shaking하고, 원심분리한 후, pellet에 ice cold 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 4 ml를 첨가하여 녹였다. 완전히 녹인 pellet에 Lysozyme (10 mg/ml) 40 μ l를 첨가하여 30°C 항온기에서 15분 동안 침지한 후 4°C에서 overnight시켜 13000 rpm, 20분 원심하여 나온 상등액을 조효소액으로 하였다.

(2) laccase의 활성 및 특성 : 추출된 조효소액을 0.5 mM ABTS와 반응시켜 420 nm에서 laccase 활성을 측정하였고, SDS-PAGE에 의하여 laccase의 분자량을 비교, 분석하였다.

바) 변이된 laccase의 one step-purification

laccase 유전자와 변이된 laccase 유전자를 pET-36(+) 벡터 (Novagen, USA)에 구축하여 one step-purification하였다.

(1) pET-36(+) 벡터에 구축

laccase 유전자를 pET-36 EK/LIC vector에 구축하기 위하여 template DNA 2 μ l, dNTP (2.5 mM) 4 μ l, 10X buffer 5 μ l, SDW 36.75 μ l, Taq

polymerase 0.26 μl , forward 와 reverse Primer 1 μl 씩을 PCR용 tube에 넣고, 94°C에서 30초, 55°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건에서 35 cycle 거친 후 마지막 72°C에서 7분 동안 PCR 하였다.

Forward 와 Reverse Primer 구성은 다음과 같다.

Forward	5'-GAC-GAC-GAC-AAG-ATG-GGC-AAG-GCA-TTC-GTT-TTT-C-3'
Reverse	5'-GAG-GAG-AAG-CCC-GGT-TCA-GCT-TTC-AAT-GGC-GCA-3'

이렇게 나온 PCR 산물 14.5 μl , 10x T₄DNA poly buffer 2 μl , 25 mM dATP 2 μl , 100 mM DTT 1 μl , T₄DNA polymerase 0.26 μl , SDW 10.6 μl 를 effendorf tube 에 넣은 후 22°C 에서 30분, 75°C 에서 20분 반응을 시킨 후 pET-36 EK/LIC vector 1 μl , 상기 산물 2 μl 를 섞고 22°C 에서 5분, 23 mM EDTA 1 μl 를 첨가하여 22°C에서 5분 Annealing 시켰다.

(2) *E. coli*에 형질전환

Annealed DNA 1 μl 를 Novablue singles 25 μl 에 첨가한 후 얼음에서 5분, 42°C 에서 30초, 얼음에서 2분 담근 후 SOC medium 250 μl 를 첨가하여 37°C 에서 30분(200~250 rpm) shaking 하였다. 배양액 100 μl 씩을 LB Km plate 에 도말한 후 37°C 항온기에서 배양하였다. 형질전환된 colony로부터 plasmid 를 추출, 염기서열을 결정, 확인 후, DE3 competent cell에 형질전환하였다.

(3) laccase의 one step-purification

형질전환된 colony를 Km 100 ppm 이 첨가된 TB 액체배지에 접종, 37°C shaking incubater 에서 200 rpm으로 12시간 배양 후, 상기의 방법에 의해서 세포질로부터 조효소를 추출하였다. 추출된 조효소에 Ammonium sulfate을 첨가하여 4°C에서 Overnight 후, 원심에 의하여 단백질을 농축하고, 투석하였다. 투석된 단백질을 CBind 900 Catridge (Novagen)를 통과하여 정제하였다.

(4) 정제된 laccase의 특성 조사

정제된 laccase로부터 Enterokinase Cleavage Capture Kit (Novagen)을 이용하여 순수 laccase를 얻은 후, laccase의 여러 특성을 조사하였다.

다. laccase 유전자를 *Pichia pastoris* 에 도입, 발현

laccase 유전자를 발현 벡터인 pGAPZ@ (Invitrogen, USA)에 구축, *Pichia pastoris* 에 형질전환시켰다.

1) laccase 유전자를 발현 벡터에 구축

laccase 유전자 내에는 *XbaI*에 의한 절단 부위가 없었기 때문에 벡터와 삽입 DNA를 *XbaI*으로 절단하여 ligation시켰다

가) vector DNA의 조제 : pGAPZ@B를 *XbaI*으로 절단하였다

나) insert DNA의 조제 : laccase 유전자를 지니고 있는 플라스미드 벡터 (pETLAC)는 alkaline-lysis/PEG treatment법에 의해서 분리, 정제 후, PCR을 실시하여 *XbaI* site을 만들어 절단하였다.

(1) 프라이머 합성 : 이용된 프라이머는 다음과 같다

lacF1	5'-ATG GGC AAG GCA TTC GTT TTT C-3'
lacR1	5'-GCT TTC AAT GGC GCA GGC AGA C-3'

(2) PCR 실시 : laccase 유전자의 증폭은 94°C에서 5분 동안 변성시킨 다음, 94°C에서 40초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 35 cycle을 거친 후 72°C에서 7분 동안 실시하였다

(3) PCR산물의 정제 : PCR 산물은 UltraClean PCR Clean-Up DNA Purification Kit (Mo-Bio, USA)을 이용하여 정제하였다.

(4) 정제된 PCR산물은 *XbaI*으로 절단하여 calf intestine phosphatase를 처리, 전기영동 후 gel로부터 추출하였다.

다) ligation 및 형질전환 : 조제된 Insert와 vector DNA를 ligation시켜 *E. coli* TOP10F'에 형질전환시켰다.

라) 형질전환주의 선발 : 형질전환주들은 Zeocin (25 ug/ml)을 함유한 Low Salt LB 배지에서 37°C 하룻밤 배양 후 선발되었다

마) 재조합 플라스미드의 확인 : Zeocin를 함유한 LB 배지에서 자란 균주로부터 colony PCR에 의해서 laccase 유전자를 지닌 균주를 선발하고, 선발된 균주로부터 플라스미드를 분리, 정제 후 물리적 제한효소 지도, PCR을 실시하여 재조합 플라스미드를 확인하고 염기서열을 결정하여 옳게 구축되었는가를 확인하였다.

PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다.

lacF	5'-GGA ATC GAG GCG TCT AGA AAT GGG CAA GGC -3'
lacR	5'-GCA GCC GTG CCG TCT AGA AGC TTT CAA TGG-3'

2) 재조합 플라스미드를 *P. pastoris*에 형질전환

가) 재조합 플라스미드의 조제 : 재조합 플라스미드를 대량 (10 ug 이상) 분리, 정제후 *AvrII*로 절단, 전기영동에 의해서 확인하고, EDTA의 첨가에 의해서 반응을 중지시킨 후, phenol/chloroform처리, ethanol 처리에 의해서 정제하였다

나) Electroporation을 위한 *Pchia*의 조제 : *P. pastoris*를 30°C, YPD배지에서 배양(OD600=1.3-1.5) 하여 빙냉 멸균수로 2번, 빙냉 1M sorbitol로 1번 세척 후 저장하지 않고 바로 이용하였다.

다) Electroporation에 의한 형질전환 : 빙냉 0.2 cm electroporation cuvette에 조제된 *Pchia* 80 ul와 재조합 플라스미드 10 ul (ug/ul)를 넣고 얼음에서 5분 incubation 후, 전기충격을 가하고 즉시 빙냉 1 M sorbitol를 첨가, 30°C에 2시간 incubation하였다. 이들 액을 Zeocin(100 ug/ml)를 함유한 YPDS배지에 도말하고 30°C에서 2-3일간 배양하여 형성된 colony를 선발하였다.

라) 형질전환균주의 확인 : Zeocin(100 ug/ml)를 함유한 YPDS배지에 자란 균주를 선발하여 PCR에 의해서 도입된 DNA의 존재를 확인하였다.

마) 도입된 copy 수의 확인 : southern blot hybridization에 의해서 조사되었는데, 도입된 copy수는 Dig DNA Labeling and Detection kit (Roche

applied science)을 이용한 Southern Blot Hybridization에 의해서 조사되었다. probe로 이용될 DNA는 PCR에 의해 증폭되어진 *lacA*를 이용하였고, 모균주 및 형질전환 *P. pastoris*의 DNA는 *XbaI*에 의해 절단, 전기영동 사진촬영 후 southern의 방법에 의해서 membrane filter에 transfer 시켰다. 전이된 membrane은 80°C에서 건조시켜 DNA를 membrane에 완전 부착시키고, pre-hybridization과정과 hybridization과정을 거쳐 발색 후 DNA밴드를 검출하였다.

3) *Pichia pastoris*에서 laccase의 생산

가) 배양기간 및 형질전환균주에 따른 laccase 활성 : 형질전환균주를 10 ml의 YPD배지에 접종, 30°C에서 하룻밤 shaking incubation (250 rpm) 하였다. 이 배양액 100 ul를 50 ml (250 ml 삼각 플라스크)의 YPD 배지에 접종, 30°C에서 shaking incubation (250 rpm) 후, 매일 1 ml를 채취하여 laccase 활성을 조사하였다.

나) Laccase 활성 조사 : 배양액을 10,000 g에서 15분 동안 원심분리 후, 상등액을 0.5 mM ABTS와 반응시켜 420 nm에서 측정하였다..

다) Laccase의 특성 : SDS-PAGE에 의한 active staining과 항체에 의한 immunoblotting에 의해서 형질전환주가 생산한 laccase의 분자량을 wild type 및 재조합 *E. coli*의 그것과 비교, 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase유전자의 클로닝 및 특성

1) cDNA library의 구축

가) RNA 조제 : *T. rubrum* LKY-7으로부터 분리된 total RNA는 그림 1에서 보는바와 같고, total RNA 95.1 ug로부터 polyA+ RNA 1.48 ug을 조제하였다.

나) cDNA library의 구축 : mRNA로부터 합성된 cDNA를 ZAP

Expression Vector에 구축하여 primary library로 하였다. primary library 1 ul를 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 transfection하여 IPTG와 X-Gal을 포함하고 있는 LB plate위에 형성되는 plaque수와 발색여부를 조사한 결과 500 ul에 1.12×10^6 pfu, Blue가 6.59% 로서, 1,000,000개 이상의 clone을 얻었고, 그 중, 약 93.4%가 insert DNA를 포함하고 있을 것으로 생각되었다.



그림 1. *T. rubrum* LKY-7으로부터 분리된 total RNA

8개의 white plaque를 random하게 선택하여 M13 Reverse와 M13 Forward Primer로 PCR한 결과 8 plaque 모두 다양한 길이의 Insert DNA를 포함하고 있는 것으로 확인되었고 (그림 2), primary library를 15 cm LB plate 당 5×10^4 plaque 가 되도록 도말하여, 37°C에서 overnight 배양한 다음, plate당 10 ml의 SM buffer를 처리하여 회수하고 원심분리 및 chloroform 처리에 의해서 phage solution 얻어서 DMSO 최종농도 7%를 첨가하여 -70°C에 보존하였다.

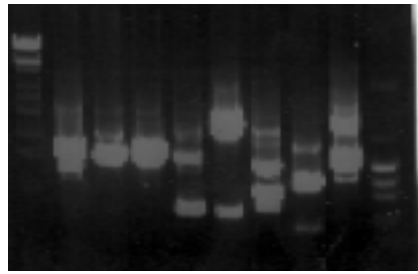


그림 2. cDNA library 의 삽입 DNA

2) laccase 항체의 조제 : 정제된 laccase를 쥐에 주사하여 1 ml 당 1.32 mg의 단백질 농도를 지닌 항혈청을 얻었다.

3) laccase 항체에 교잡된 cDNA plaque의 선발

가) 증폭된 cDNA library의 Titer : 15cm LB plate 당 5×10^4 plaque 정도 되도록 도말하기 위하여 library의 titer를 조사한 결과 증폭된 cDNA

library는 1ml당 6.20×10^8 pfu 정도이었다.

나) 1, 2차 항체의 역가를 평가하기 위한 예비 실험 : nitrocellulose membrane에 결합된 단백질 (laccase)의 검출에 우수한 1차 항체의 농도, 1차 항체의 반응에 우수한 2차 항체의 농도를 결정하기 위하여 dot blot test를 한 결과, 1차 항체는 250배, 2차 항체는 5000배 희석한 것이 우수하였다.

다) 항체에 교잡된 plaque의 선발 : 15 cm NZY plate 당 5×10^4 plaque가 되도록 도말, plaque를 형성후, IPTG를 함유한 nitrocellulose membrane을 올려놓고 37°C 에서 3.5시간 배양 후, laccase가 발현하도록 한 다음, *picoBlue*TM immunoscreening kit (Stratagene, USA) 을 이용하여 항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였다. 1차 선발된 plaque들로부터 단 plaque를 분리하였는데, 2,500,000개의 plaque로부터 항체에 hybridization 된 23개의 plaque를 얻었다 (그림 3).



4) Laccase를 생산하는 cDNA 그림 3. laccase 항체에 교잡된 plaque plaque의 선발 : 항체에 hybridization 된 23개의 plaque중에서 laccase를 생산하는 2개의 plaque를 선발하였다. 이들 plaque를 *E. coli* XL0LR내로 도입 후, 재조합 *E. coli* 의 배양여액, periplasm 및 cytoplasm에 있는 laccase 활성을 측정 한 결과 배양여액에서는 검출되지 않고, periplasm 과 cytoplasm에서만 검출되었다.

5) Laccase cDNA의 염기서열 : laccase cDNA의 ORF는 1,839의 염기와 612의 아미노산으로 이루어져 있고 (그림 4), 예상되는 단백질의 분자량은 66,180 Da, pI는 5.72로 분석되었다.

1 atgggcaagcattogtttttctgtgtctogcattagctctctctogcagcagcgttagcattggggcccgcggaaccctgacccat
 M G K A F V F L V V L A L A L S R S E R S I G A R G P L T H
 91 gogactaaatctatccaaccagatggactctatogctcaaccogtgcctgocgtogggcogtaccogggctctttgatcaagcctaagacc
 A T K S I O P D G P Y R S T R A A V G A Y P G F L I K P K T
 181 ggcaacaagttocaaatfaatcaggtgaaacaagctogaogaactggagaccaactogatgocgaaggacaaccagatccactggcoggt
 G N K F Q I N Q V N K L D D L E T N S M P K D T S I H W H G
 271 ctcttctgocgggcaaccaactgggcaagcogcogccttctggaaccagtgcccaatcactcogggcactogtttttgtacgaactc
L F V A G T N W A D G A A F V N O C P I T P G H S F L Y D F
 361 gaagtccctgatcaagctggacattttggatcactctcatctttcacacaatactgtgatggactgoggggccaattggtggtctac
 E V P D Q A G T F W Y H S H L S T O Y C D G L R G P L V V Y
 451 tctaagaatgaccocagatgccaacogctctcttaogaogtogatgaogaactgaccctgggtgattggtaccatgocogtccattg
 S K N D P D D A N A S L Y D V D D E L T L G D W Y H A A S L
 541 togtcactgccttcccocatccogactogacaactatcaatggccttggcogtctctcogcoggtccaggatogcogacatacogtcatg
 S L T A F P H P D S T L F N G L G R S L G G P G S P T Y V M
 631 aaogtggcaccogtcaogcaaaaaggcaagcogctatogtatcoggaactcctcoggaoccccaacttccaattctctatogaoggg
 N V V T V T Q K G K R Y R I R I N T S C D P N F O F S I D G
 721 cataactcactatcatogaagctggogagagaatcaocagcctctggcogtogatcaaatcaaatttttgocggccaogcttattog
H N F T I I E A G G E N H Q P L D V D Q I Q I F A G Q R Y S
 811 ctgtcctcaacoggaatcagtcogtogaacaactcggattcogcgaatcccacaacogcoggaocccoggttcaocggcogcogtgaac
 L V L N A N Q S V D N Y W I R A I P N T G D P G F T G G V N
 901 tctgcaatcctcogctacogaogcogaogagatogaoccccaogaogaocgcaaacogctaccaacccocctccaogaatacagattt
 S A I L R Y D G G A R E I D P T T N A Q T A T N P L H E Y R F
 991 gtccogcttatcaacaagcogtgcocaggogaccccttctgtggogcogtggatcaogctatcagtcctaaactcogctttogatgggtcc
 V P L I N K P A P G D P F V G G V D H A I S L N F A F D G A
 1081 aaogcogtctcaacogcaacaaccatacogtctgocccocctacogtccagtgctgtgocagatctgtogggcogcogcogtgggg
 N A L F N A N N H T F V P P T V P V L L Q I L S G A R D A E
 1171 actgttcaogtgcogctatcatctgtacogtoggagttaatcacccatogtcttaaccocgtacctgaagcctggaaacaatcttggc
 L P N G S I Y D L K L N D V V E I S M P A L T F A G A H P A
 1261 cctttactocogcatacctccatgtagttggtagtgocacagcogtgaogtacaacogcaagcogtctcagggatgtcaactcc
 P L L P H T F H V V G S A D S V T Y N A E S S V F R D V N S
 1351 gtogtcatgaccatogaacaactcaccogtccogattatagccactgaccogtccactgcttctcogtccattgcccactcogactggc
 V G H D P S D N I T V R F I A T D R V T C F V H C H F D W H
 1441 actgttcaogtgcogctatcatctgtacogtoggagttaatcacccatogtcttaaccocgtacctgaagcctggaaacaatcttggc
 T V H V C A I I C T V G V N H P S S L T P Y L K P G T I F A
 1531 cccogtctcaogcogtogaacccatogaacccatcctaatgggcaocctgocacoggaagcogtgaogcogtgccttogaogcogaccatc
 P R S Y E L E P I E T P N G H L P S G S V Y A L P S N A T I
 1621 gagctgagctcogcogcogcogcactggggcogcogcogcactcacttgcogcogcacaactcagcogtgcogtccogcogtggctcc
 E L S L P A G A L G G P H P F H L H G H T F S V V R P A G S
 1711 acgaogtacaactatgtcaaccocgtccagcogtgaogtgcagcattggaaacaocggcogaacaogtcaacaatccogctogatactaac
 T T Y N Y V N P V Q R D V V S I G N T G D N V T I R F D T N
 1801 attggactcogtccogtctgocctgoccatgaaagctga
 I G L V P S A C A I E S *

그림 4. Laccase cDNA 유전자의 염기 및 아미노산 서열 (밑줄친 부분은 다른 laccase 유전자와 고도로 conserve 한 아미노산)

6) 다른 fungal laccase 유전자와의 유사성 : *T. rubrum* LKY-7으로부터 클론된 laccase 유전자는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 50%이하의 유사성을 나타냈지만, 고도로 conserve한 5개의 지역은 매우 유사한 아미노산 서열을

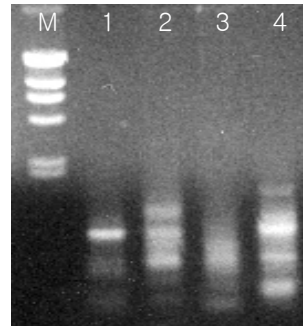
나타냈다

7) laccase유전자에 homologous한 염색체 DNA 부위의 선발

가) Primer 합성 : 현재까지 알려진 laccase유전자로부터 고도로 conserve한 아미노산 서열을 기초로 하여 다음과 같이 primer를 합성하였다.

HW-F 5'-CAY TGG CAY GGN TTY- 3'
IN-F 5'-ATH AAY GGN AAR GGN- 3'
IN-R 5'-NCC YTT NCC RTT DAT- 3'
DN-F 5'-GAY AAY TAY TGG ATH- 3'
DN-R 5'-DAT CCA RTA RTT RTC- 3'
PH-F 5'-SCN CAY CCN TTY CAY- 3'
PH-R 5'-RTG RAA NGG RTG NGC- 3'
HC-R 5'-RTC DAT RTG RCA RTG- 3'

나) PCR 실시 : *T. rubrum* LKY-7로부터 분리된 염색체 DNA 2 μ l에 10 x Reaction buffer 5 μ l, dNTP (10 mM) 4 μ l, Taq polymerase(1 U/ μ l) 1 μ l와 상기의 primer (100 pM)를 여러 조합으로 처리하고 total 50 μ l의 반응액을 94°C 30초, 50°C 30초, 72°C 40초의 조건으로 35 Cycle을 실행한 결과, HW-F 와 IN-R 의 primer 조합에서 예상되는 길이의 PCR 산물이 검출되었다 (그림 4 lane 1).



다) PCR산물을 pGEM vector에 cloning : PCR산물을 전기영동후 예상되는 DNA 절편을 gel로부터 추출하여 pGEM vector에 cloning 하였다

그림 5. PCR 산물 : 1, HW-F+IN-R, 2, In-F+DN-R, 3, DN-F+PH-R, 4, PH-F+HC-R

나. *T. rubrum* LKY-7의 redox potential과 리그닌 분해능과의 관계 구명

1) Site-directed mutagenesis에 의한 유전자의 변형

T. rubrum LKY-7부터 분리된 laccase 유전자(*lacA*)는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역이 선발되었다 (그림 6).

SMSS -PROT	BLOCK A	BLOCK B	BLOCK C
LAC1_TRIRU:Query	35 IQPDG	86 HWHGLFVAGTNWADGPAFVNQCP	127 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGLV
LAC2_AGABI Q12542	33 LAPDG	82 HWHGFFQARTSGQDGPAPVNQCP	122 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFI V
LAC1_CORHI Q02497	36 VSPDG	85 HWHGFFQKGINWADGPAFVNQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV V
LAC1_PHLRA Q01679	36 VSPDG	85 HWHGFFQKGINWADGPAFVNQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV V
LAC1_PLEOS Q12729	38 VSPDG	96 HWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCP	136 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV I V
LAC1_THACU P56193	33 IAPDG	98 HWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP	122 GTYWYHSHLSSQYVDGLRGLV I
LAC2_TRAVE Q12718	35 VSPDG	84 HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCP	124 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV V
LAC1_TRAVI Q99044	36 VSPDG	85 HWHGFFQKGINWADGPAFVNQCP	125 GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV V
	BLOCK D	BLOCK E	
LAC1_TRIRU:Query	249 GKRYRIRINTSCDPNFQFSIDGHNFTIIEAG	553 HPFHLHGHTF	
LAC2_AGABI Q12542	214 GKRYRFRLVLSLSCDPNHTFSIDGHDLTIIEVD	417 HPFHLHGHN	
LAC1_CORHI Q02497	214 GKRYRFRLVLSLSCDPNHTFSIDGHDLTIIEVD	416 HPFHLHGHA	
LAC1_PHLRA Q01679	215 GKRYRFRLVLSLSCDSFFTFSDGHSNLVIEVD	418 HPFHLHGHTF	
LAC1_PLEOS Q12729	224 NKRYRFRLISMCDPNFTFSIDGHSLOVIEAD	425 HPFHLHGHTF	
LAC2_TRAVE Q12718	213 GKRYRFRLVLSLSCDPNYTFSIDGHNLTVIEVD	415 HPFHLHGHA	
LAC1_TRAVI Q99044	214 GKRYRFRLVLSLSCDPNYTFSIDGHNMIIETD	416 HPFHLHGHA	

그림 6. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자와 다른 곰팡이 laccase 유전자의 주요 아미노산서열 비교

본 연구에서는 5개의 지역 중에서 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산과 conserve하지 않은 아미노산 1개씩을 선정하여 다른 아미노산으로 대체하기 위한 PCR을 실시하였다. 즉 Block A의 35번째 있는 I를 V로 (I35V), 38번째 있는 D를 A (D38A) 로 대체하고, Block B에서 D99W와 N105T, Block C에서 W130D와 V148I, Block D에서 S259L와 E278A, Block E에서 H556A와 T561A로 대체하기 위한 PCR을 실시하였다.

PCR 산물은 *Dpn* I 처리 후, 전기영동에 의하여 확인하였다(그림 7A). 이들 DNA는 *E. coli* 에 형질전환시킨 후, plasmid를 추출(그림 7B)하여 염기서열을 결정하고, 돌연변이된 부위를 확인하였다.

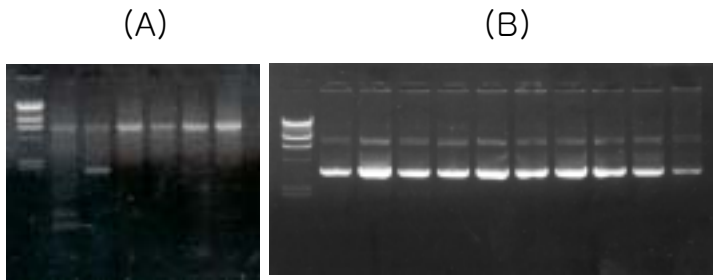


그림 7. *Dpn*I 처리된 PCR 산물(A)과 형질전환 *E. coli*로부터 추출된 plasmid(B)

2) Site-directed mutagenesis에 의한 laccase 활성의 변화

*lacA*를 지닌 *E. coli*에서 laccase는 분비되지 못하고 세포질 속에 존재하였다. 따라서 최적 배양 조건을 찾기 위하여 LB와 TB에서 3시간 배양 후, IPTG를 첨가하여 배양시간에 따른 laccase 활성을 조사하였다. 그 결과 LB에서는 배양 6시간 후, TB에서는 배양 12시간 후에 최고의 활성을 나타냈고, LB보다 TB에서 더 높은 laccase 활성을 나타냈다 (그림 8).

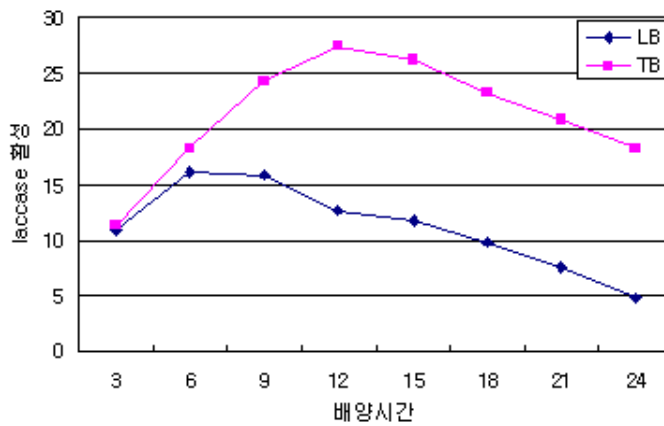


그림 8. 배지의 종류 및 배양시간에 따른 laccase 활성.

*lacA*를 지닌 *E. coli*를 LB와 TB에서 3시간 배양하고 IPTG를 첨가 후, 3~24시간 배양하여 세포질로부터 추출된 조효소의 laccase 활성

모균주와 돌연변이균주를 TB에서 12시간 배양 후, 세포질로부터 추출된 조효소의 단백질 농도와 laccase 활성을 비교해 보았다. 그 결과, 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 D38A, D99W, W130D, E278A, H556A 등은 단백질 농도에서 큰 차이를 나타내지 않았지만, laccase 활성은 전혀 나타내지 않았다. 한편, 다른 유전자와 conserve하지 않은 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 I35V, N105T, V148I, S259L, T561A 등은 모균주에서 보다 laccase 활성이 감소되었지만 검출은 되었다 (표 1).

표 1. 모균주와 돌연변이균주의 세포질로부터 추출된 조효소의 단백질농도와 laccase활성의 비교

변이지역	균주	단백질 (mg/ml)	Laccase (U/ml)
	모균주	0.612	1.253
Block A	I35V	0.598	0.342
	D38A	0.640	-
Block B	D99W	0.585	-
	N105T	0.498	0.273
Block C	W130D	0.626	-
	V148I	0.581	0.524
Block D	S259L	0.568	0.472
	E278A	0.591	-
Block E	H556A	0.562	-
	T561A	0.603	0.363

3) 변형된 laccase의 분리, 정제 및 특성

가) Laccase 유전자를 pET-36백터에 구축

변이된 유전자의 laccase를 one-step purification하기 위한 백터는 pET-36 (Novagen)이다. 이 백터는 그림 9에서 보는 바와 같이 생산된 laccase를 cellulose에 binding하여 정제할 수 있는 cellulose binding domain(CBDcenA)이 들어 있고, 제한 효소의 절단 없이 ligation할 수 있는 Lic site가 들어 있다. 따라서 변이된 유전자 중에서 laccase 활성이 검출된 I35V, N105T, V148I, S259L, T561A 와 원래의 laccase 유전자를 PCR에 의해

서 얻고(그림 10), 벡터 DNA에 anneal시킨 후 *E. coli*에 형질전환시켰다.



그림 9. Laccase를 one-step purification하기 위한 pET-36 벡터의 특징

나) 형질전환균주로부터 laccase의 분리 및 정제

형질전환균주를 TB에서 12시간 배양 후, 세포질로부터 조효소를 추출하여 CBind 900 Catridge를 통과하여 정제하였다. 그 결과, 그림 11에서 보는 바와 같이 완전 정제는 이루어지지 않았지만 상당히 깨끗한 laccase를 얻을 수 있었다.

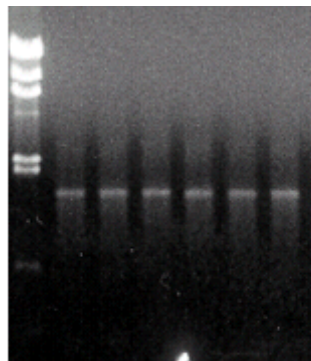


그림 10. pET-36 벡터에 구축하기 위한 PCR산물

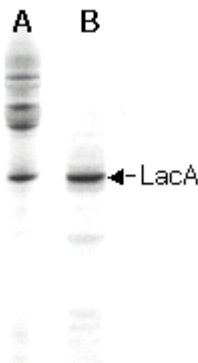


그림 11. 세포질로부터 추출된 조효소(A)와 정제된 laccase (B)

다) 정제된 laccase의 특성

부분 정제된 laccase를 enterokinase로 절단 및 정제 후, 속도론적 특성을 조사한 결과 모균주가 생산한 laccase는 *T. rubrum* LKY-7로부터 분리, 정제

된 laccase의 특성과 비슷하였다. 또한 변이된 균주들이 생산한 laccase의 기질 친화력은 모균주의 laccase와 비슷하였지만 활성 촉매속도가 감소하는 경향이 있었다 (표 2).

표 2. 모균주와 돌연변이균주가 생산한 laccase의 Kinetic parameters와 상대활성

효소 종류	Kinetic parameters			상대 활성(%)
	K_m (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)	
LacA	0.042	635	1.63	100.0
I 35V	0.038	327	1.12	45.5
N105T	0.045	278	0.88	32.7
V148I	0.041	345	1.24	63.2
S259L	0.046	342	0.85	53.6
T561A	0.037	295	0.95	47.2

다. laccase 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

1) Laccase 유전자를 형질전환용 벡터에 구축

가) 벡터의 특성 : 이용된 벡터(pGAPZ@)는 3147 bp로 이루어져 있고, *Pichia pastoris*에서 외래 유전자를 발현할 수 있는 GAP 프로모터와 발현 산물을 분비할 수 있는 @-factor signal sequence, Zeocin 저항성유전자, 그리고 c-myc epitope와 polyhistidine(6xHis)을 지니고 있다 (그림 12)

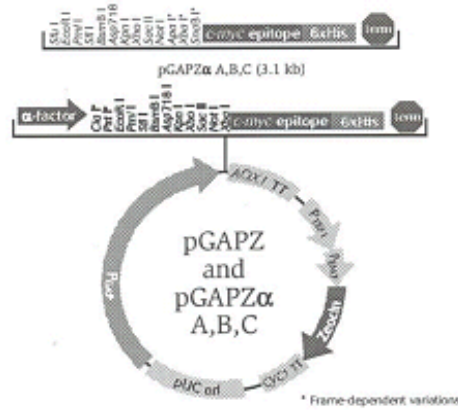


그림 12 Pichia에서 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터

나) laccase 유전자를 pGAPZ@에 구축

laccase 유전자의 제한효소 site을 분석한 결과 *Xba*I site이 존재하지 않았다. 따라서 유전자의 양쪽 끝에 *Xba*I site을 만들기 위한 프라이머를 합성하여 PCR을 실시하고 얻어진 산물을 정제 후, *Xba*I으로 절단하고 calf intestine phosphatase를 처리 후 전기영동한 결과 약 1.9 kb 정도의 크기를 나타냈다 (그림 13A). 또한 pGAPZ@를 *Xba*I으로 절단, 정제 후 전기영동에 의해서 확인 후 (그림 13B), ligation하여 *E. coli* TOP10F'에 형질전환 시켰다.

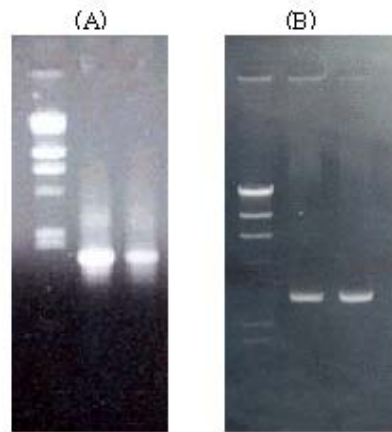


그림 13. 제한효소(*Xba*I)처리된 laccase유전자(A)와 pGAPZ@ (B)

다) 재조합 플라스미드의 확인

Zeocin (25 ug/ml)을 함유한 Low Salt LB 배지에서 성장한 형질전환균주 10개를 선발, laccase 유전자의 양쪽 끝 부분을 프라이머로 하여 PCR을 실시한 결과 그림 3A에서 보는 바와 같이 6개의 균주에서 laccase 유전자와 비슷한 크기의 밴드가 검출되었다.

laccase 유전자의 제한효소 site을 분석한 결과 *AfaI*과 *XbaI*으로 절단하였을 경우에는 laccase 유전자 부분(약 1.9 kb)이 나오게 되어 있었다. 따라서 laccase 유전자 밴드를 지닌 균주 3개로부터 플라스미드를 분리, 정제하여 *AfaI*과 *XbaI*으로 절단 후 전기영동을 한 결과 그림 14B에서 보는 바와 같이 예상되는 크기의 밴드가 검출되었다. 이들 중 2 플라스미드의 염기서열을 분석한 결과 벡터의 @ factor 뒤에 laccase 유전자의 ORF가 옳은 방향으로 구축되어 있었다.

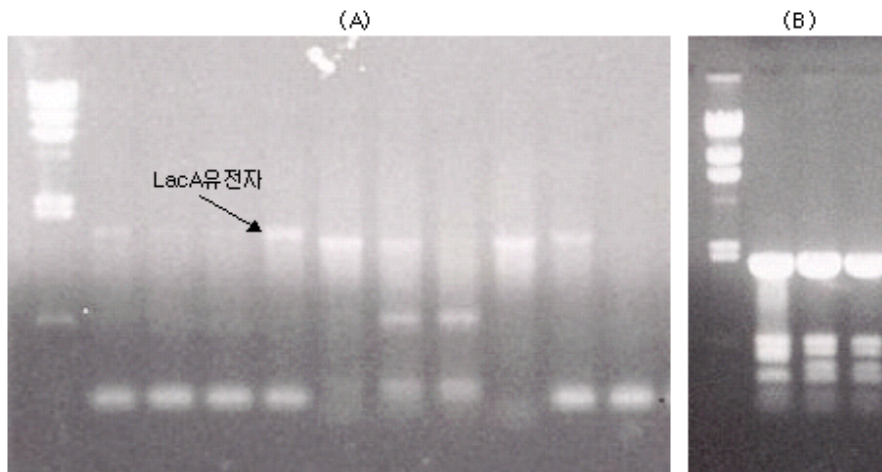


그림 14. colony PCR에 의해서 laccase 유전자를 지닌 형질전환균주의 선발(A) 및 분리된 재조합 플라스미드(B)

2) 재조합 플라스미드를 *Pichia pastoris*에 형질전환

가) 형질전환 균주의 선발 : 재조합 플라스미드를 조제된 *Pichia pastoris*와 혼합하여 electroporation을 실시 후 Zeocin(100 ug/ml)를 함유한 YPDS배지에 도말하고 30 °C에서 배양한 결과 수백 개의 colony가 형성되었다.

나) PCR에 의한 laccase 유전자의 도입 확인 : 형질전환 균주로부터 genomic DNA를 분리하여 laccase 유전자의 양쪽 끝 부분을 프라이머로 하여 PCR을 실시한 결과 그림 4에서 보는 바와 같이 모두 laccase 유전자와 비슷한 크기의 밴드가 검출되었다.

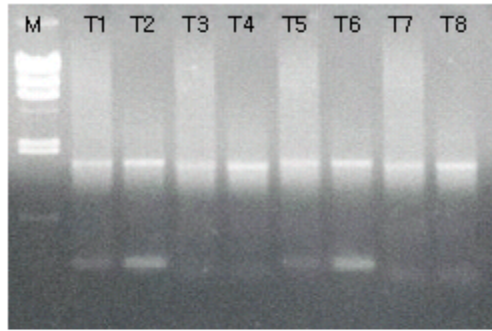


그림 15. PCR에 의해서 형질전환 *P. pastrois*로부터 검출된 laccase 유전자

다) southern blot hybridization에 의한 도입된 copy수의 확인 : 형질전환주들의 염색체 DNA를 분리하여 *Xba*I으로 절단 후, *lacA*를 probe로 하여 southern blot hybridization을 실시한 결과 그림 15에서 보는 바와 같이 모균주인 *P. pastrois*에서는 *lacA*가 전혀 검출되지 않고, 형질전환균주에서는 1개 이상의 밴드가 검출되었다. 특히 T2와 T4에서는 1개, T3와 T5에서는 2개, T1과 T7에서는 3개, T6와 T8에서는 4개의 밴드가 검출되었다. *lacA*에는 *Xba*I site이 없기 때문에 여기에서 검출된 밴드 수는 도입된 copy수로 생각된다.

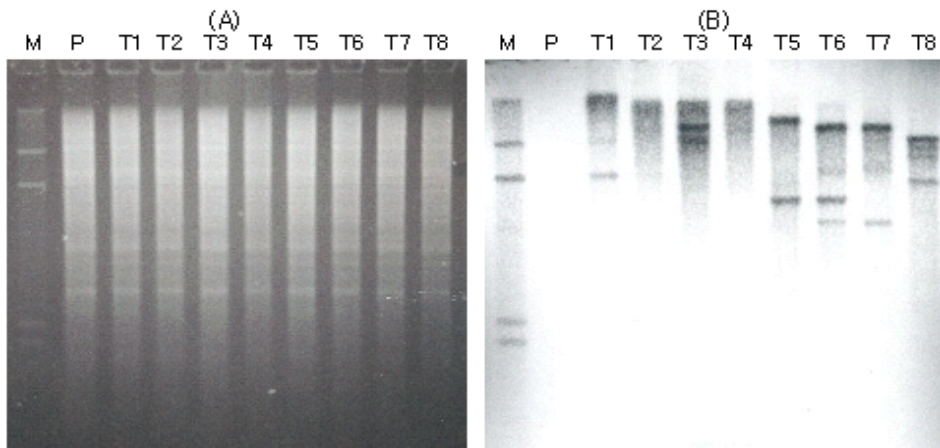


그림 16. 모균주(P)와 형질전환 *P. pastrois*(T1-T8)의 *Xba*I 절단 genomic DNA(A)와 southern blot hybridization(B)

3) 형질전환 *Pichia pastoris*에서의 laccase 생산

laccase유전자가 도입된 8개의 형질전환균주를 30℃에서 배양 후, 배양액에 대한 효소활성을 매일 조사한 결과 (표3, 그림 17, 18), T2, T4, T5는 배양 4일 후, T1, T3, T6, T7, T8은 배양 3일 후 최고 활성을 나타내고 그 이후 감소하였다. 따라서 효소 활성이 낮은 균주는 배양 4일 후, 효소활성이 높은 균주는 배양 3일 후 최고에 이르는 경향이였다. 균주에 따른 laccase 활성도 차이가 있었는데 T2와 T4에서 낮고 T3와 T8에서 높은 경향이였다. 특히 T8은 다른 균주에 비하여 높았다. 이들 효소 활성과 도입된 copy수와의 관계 (그림 16B)를 비교해 본 결과 도입된 copy 수가 많을수록 효소활성이 높은 경향이였지만 완전 일치하지는 않았다.

표 3. 배양기간에 따른 형질전환 *P. pastrois*들의 laccase 생산 능력

배양기간 (일)	Laccase 활성(U/ml)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	1.4	1.2	2.1	1.5	1.8	1.9	1.4	1.8
2	8.5	4.7	14.1	6.2	7.9	9.2	7.5	16.4
3	26.2	19.5	29.8	20.8	23.6	25.9	24.2	35.2
4	25.8	24.1	27.6	23.4	24.6	23.2	22.8	29.2
5	18.2	17.5	16.5	16.8	14.8	15.9	13.8	20.2

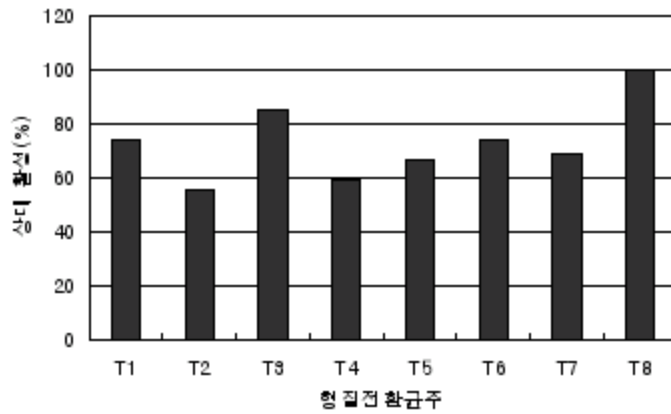


그림 17. 형질전환균주에 따른 laccase 생산(배양 3일 후)

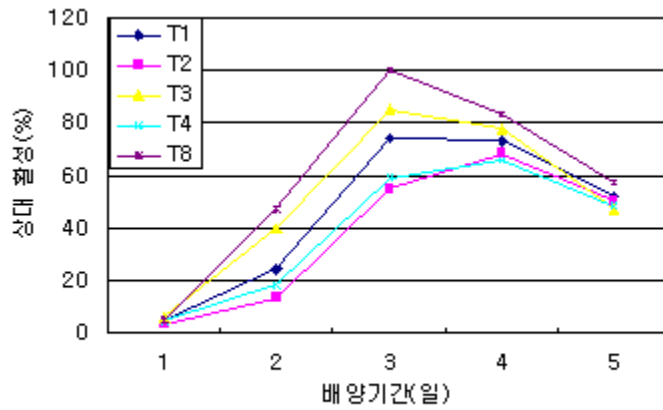


그림 18. 배양기간에 따른 형질전환균주의 laccase 생산

4. 결과 요약

가. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase(TrL) 유전자의 클로닝

T. rubrum LKY-7으로부터 total RNA를 분리하여 polyA⁺ RNA를 조제하고, cDNA를 합성, ZAP Expression Vector에 구축하여 phage를 증폭하였고, 정제된 laccase를 쥐에 주사하여 항혈청을 얻었다. phage를 NZY plate에 도말, plaque를 형성 후, laccase항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였는데, 약

2,500,000개의 plaque로부터 23개의 plaque가 hybridization되었고, 이들 중에서 2개의 plaque가 laccase를 생산하였다. 이들 plaque를 *E. coli* XL0LR내로 도입 후, 재조합 *E. coli*의 배양여액, periplasm 및 cytoplasm에 있는 laccase 활성을 측정 한 결과 배양여액에서는 검출되지 않고, periplasm 과 cytoplasm에 서만 검출되었다. 이들 cDNA의 염기서열을 분석한 결과 1,839의 염기와 612의 아미노산으로 이루어져 있고, 예상되는 단백질의 분자량은 66,180 Da, pI는 5.72로 분석되었다. 또한 이 유전자는 다른 곰팡이의 laccase유전자와 50%이하의 유사성을 나타냈지만, 고도로 conserve한 5개의 지역은 매우 유사한 아미노산 서열을 나타냈다

나. *T. rubrum* LKY-7의 redox potential과 리그닌 분해능과의 관계 구명

다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역 중에서 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산과 conserve하지 않은 아미노산을 site-directed mutagenesis에 의하여 다른 아미노산으로 대체되었다. laccase 유전자를 지닌 *E. coli*는 laccase를 분비하지 못하였는데, 세포질 속의 laccase 활성은 LB보다 TB배양에서 더 우수하였고, 배양 12시간 후에 최고의 활성을 나타냈다. 한편, 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 D38A, D99W, W130D, E278A, H556A 등은 모균주와 단백질 농도에서 큰 차이를 나타내지 않았지만, laccase 활성은 전혀 검출되지 않았다. 그러나 다른 유전자와 conserve하지 않은 아미노산이 다른 아미노산으로 대체된 I35V, N105T, V148I, S259L, T561A 등은 모균주에서 보다 laccase 활성이 감소되었지만 검출은 되었다. 이들 유전자를 pET-36벡터에 구축하여 생산된 laccase를 one-step purification하고, enterokinase로 절단 및 정제 후, 속도론적 특성을 조사한 결과 변이된 유전자들이 생산한 laccase의 기질친화력은 모균주의 laccase와 비슷하였지만 활성 촉매속도가 감소하는 경향이였다.

다. laccase 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

laccase유전자를 pGAPZ@에 구축, *E. coli* TOP10F'에 형질전환시킨 후,

재조합 플라스미드를 확인하고 *Pichia pastoris*에 형질전환시켰다. 형질전환 균주로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR에 의해서 laccase 유전자를 지닌 균주를 선별하였고, 이들 균주의 염색체 DNA속에 들어 있는 copy 수를 southern blot hybridization에 의하여 분석한 결과, 균주에 따라 1-4개의 유전자가 도입되어 있었다. 이들 균주를 30℃에서 배양 후 배양여액에 대한 효소 활성을 조사한 결과 배양 3-4일 후 최고 활성을 나타냈는데, 효소 활성이 낮은 균주는 배양 4일 후, 효소활성이 높은 균주는 배양 3일 후 최고에 이르는 경향이였다. 균주에 따라서 laccase 활성에 차이가 있었는데 T8은 다른 균주에 비하여 활성이 높았다. 이들 효소 활성과 도입된 copy 수와의 관계를 비교해 본 결과 도입된 copy 수가 많을수록 효소활성이 높은 경향이였지만 완전 일치하지는 않았다.

제 3 절 *T. rubrum* LKY-7 균주로부터 laccase 생산 과 laccase/mediator system에 의한 생물학적 펄프표백 공정 개발

1. 서론

지구상에서 두번째로 풍부한 천연의 유기물질인 리그닌의 생물학적인 분해는 주로 목재부후균의 작용에 의해서 이루어지며 그중에서도 백색부후균이 자연계에서 리그닌을 가장 효과적으로 분해하고 있다. 백색부후균은 ligninolytic system에서 주로 lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) 및 laccase 등 3가지 타입의 리그닌 분해효소를 분비하는 것으로 알려져 있다. 그러나 일반적으로 백색부후균은 이들 리그닌 분해효소중에서 한가지 혹은 두가지 효소의 작용으로 리그닌을 분해하여 리그닌의 생물학적인 분해에는 한가지 이상의 분해기구가 존재하는 것으로 생각할 수 있고 아직까지도 식물체로부터 리그닌을 제거하는데 있어서 어떤 enzyme mechanism이 가장 중요하게 작용하며, 장차 생물학적인 펄프화와 표백의 적용에 어떤 enzyme mechanism이 가장 효과적인지는 밝혀지지 않고 있다.

지금까지 규명되어진 리그닌의 생물학적인 분해에 관한 생리, 효소적인 mechanism은 대부분 *Phanerochate chrysosporium*에 대한 연구에서 비롯되었다(30, 45, 47, 75). 이균에 의한 리그닌의 분해는 LiP와 MnP의 분비와 밀접한 관계가 있으며 특히 LiP가 리그닌의 화학구조중에서 약 90%를 차지하는 비페놀성 구조의 분해에 결정적으로 작용하는 균체의 phenoloxidase로 받아들여 졌다. 그러나 *P. chrysosporium*이 전체 백색부후균을 대표할 수 없을 뿐만 아니라 기 검토된 백색부후균의 약 40%만이 ligninolytic system에서 LiP를 분비하였고, laccase/MnP의 조합이 *P. chrysosporium*에서 발견된 LiP/MnP 조합보다 더 일반적인 것으로 나타났다(72, 73). 즉 백색부후균인 *Dichomitus squalens*와 *Ceriporiopsis subvermispora*는 LiP 분비없이 리그닌을 효과적으로 분해하였고 *Coriorus versicolor*의 경우에도 ligninolytic system에서 MnP/LiP 보다 laccase/MnP의 enzyme조합으로 리그닌을 분해하

는 것으로 알려져 있다 (7, 14, 16, 22, 29, 37, 57, 63, 66). 뿐만아니라 최근에 *Pycnoporus cinnabarinus*가 LiP와 MnP 없이 laccase 만으로 리그닌을 거의 완전하게 분해하는 것으로 밝혀진 이래 (4, 20, 21 23). 리그닌 분해에 laccase 가 결정적인 역할을 하는 많은 증거들이 보고 되고 있다.

리그닌의 화학구조는 페놀성과 비페놀성구조로 구분되며 페놀성 구조는 방향족 환에 페놀성 수산기를 포함하여 생물학적으로 쉽게 분해되지만 리그닌의 완전한 분해를 위해서는 리그닌 구조의 약 90%를 차지하는 비페놀성구조의 분해가 필수적이다. laccase의 경우 *Panus tigrinus*의 “yellow” laccase가 비페놀성구조인 β -1 model compound를 직접 산화시킨다는 보고 (48)가 있지만, 일반적으로 laccase 단독으로는 비페놀성 구조의 분해가 불가능한 것으로 알려져 있다 (4, 10, 74, 81). 그러나 *P. cinnabarinus*가 laccase 단독으로 리그닌을 완전히 분해할 수 있고 또한 laccase가 어떤 저분자량의 유기화합물과 함께 리그닌의 비페놀성 모델화합물을 산화시킨다고 보고되면서 펄프표백에 laccase를 적용하는 연구가 급속히 진행되었다. 1984년 Sariaslani등이 laccase가 chlorpromazine의 존재하에 비페놀성 방향족화합물인 rotenone을 산화시킨다고 보고하면서 처음으로 laccase-mediator라는 개념이 제기되었고 후에 Kawai등이 syringaldehyde와 함께 polymethoxylated benzylalcohol을 산화시킨다고 보고하였으나, 이는 생화학자나 목재 화학자들의 관심을 끌어내지 못하였다. 그러나, 1990년 Bourbonnais와 Paice는 laccase/ABTS {2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)}가 veratryl alcohol과 같은 비페놀성 리그닌모델화합물을 분해할 뿐만 아니라 펄프의 kappa number를 감소시킨다고 보고 (7) 한 이래, Call과 Mucke는 mediator로서 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT) 를 발견하여 펄프표백을 위한 laccase/1-HBT system을 처음으로 pilot plant 수준으로 적용하였다 (14). 그 이후, Anann (1)은 laccase mediator로서 violuric acid (VA), N-hydroxy-acetanilide (NHA), 3-nitrosochinolin-2,4-diol (NC)와 같은 N-OH를 함유하는 화합물들을 보고하였다 (그림 1).

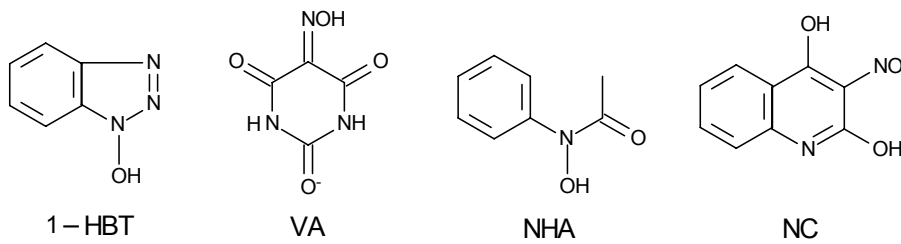


그림 1. laccase-mediators의 화학구조

지금까지 펄프표백에 가장 우수한 mediator들은 그림 1에서와 같이 구조 내에 N-OH그룹을 함유한 화합물들인데, 그 이유는 laccase에 의해 쉽게 ·O-N radical이 생성되고, 그 radical은 안정하고 용이하게 펄프섬유 속으로 침투하여 반응할 수 있기 때문으로 생각된다. 특히, NHA는 지금까지 보고된 mediator중에서 가장 우수한 효과를 나타내는 것 중의 하나로 인정되고 있다 (49). 최근에는 NHA의 화학적 변형이나 안정한 금속이온에서 유래하는 mediator등에 관한 연구가 보고되어지고 있다 (8, 84). 그러나 laccase/mediator system이 현실적으로 펄프표백의 한 공정으로 적용되고 산업화되기 위해서는 laccase를 대량생산할 수 있어야 하고, 기존의 시스템 보다 더 효과적인 펄프표백시스템이 확립되어야 한다. 본 연구팀에서 활엽수 chip pile로부터 분리한 *Trichopyton rubrum* LKY-7 (*T. rubrum* LKY-7)은 기존의 백색부후균에 비하여 리그닌분해능이 우수하고 탈리그닌 선택성이 뛰어났으며 (37), 예비실험에서 분리된 laccase는 지금까지 국내·외에서 보고된 것과는 다른 특성을 나타냈고, 개발된 mediator들에 대하여 우수한 기질 특이성을 나타냈다. 따라서, 본 과제에서는 바이오 기술을 이용하여 1) TrL의 분리, 정제 및 특성 규명과 대량생산체계 확립, 2) 펄프표백에 우수한 laccase 및 mediator의 개발, 3) xylanase와 TrL/mediator system의 병용처리에 의한 효과적인 생물학적 펄프표백체계를 확립하고자 하였다..

2. 재료 및 방법

가. *T. rubrum* LKY-7 laccase의 생산과 정제

1). Microorganism

전남 광양지역의 활엽수 chip pile로부터 분리한 본 균주는 GC-FAME (gas chromatography-fatty acid methyl ester) technique (Microbe Inotech Labs, Inc., St. Louis, MO)에 의하여 *Trichopyton rubrum*과 매우 유사성이 있는 것으로 검토되어 잠정적으로 *Trichopyton rubrum* LKY-7 (*T. rubrum* LKY-7)으로 명명하였다. 본균주를 potato-dextrose agar (PDA) plate에서 29 °C, 5일동안 배양하여 plates의 가장자리에서 0.5cm 직경의 agar block을 떼어내 spore 생산과 접종원으로 사용하였다. spore 생산은 long-grain rice에 agar block을 접종하여 29°C에서 7일간 배양한 후 무균적으로 spore를 채취하여 spore 농도를 1.0×10^6 /ml로 조정하여 사용하였다.

2) laccase생산을 위한 배지조성

laccase 생산을 위한 배지는 basal medium (Kirk's medium)과 glucose-peptone medium을 이용하였다. basal liquid medium의 구성은 glucose 10 g, 20mM sodium tartrate (pH 4.5), KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, thiamine HCl 1 mg, Tween 200.5 g, trace element solution 70 ml (per liter)이고 trace element solution은 nitriloacetic acid 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, NaCl 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CoSO_4 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g (per liter)이다. glucose-peptone medium (pH 4.5)은 glucose 20 g, peptone 10g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, thiamine HCl 2 mg (per liter)로 구성된다.

50 ml의 배지에 1.0×10^6 /ml로 조정한 spore suspension 1.0 ml씩 접종하여 29°C에서 10일 동안 정지 및 교반 (150 rpm) 배양하였다. 또한 *T. rubrum* LKY-7를 배양한 potato dextrose agar (PDA) plate로부터 직경 0.5 cm크기의 myblock 2개를 떼어내 50 ml의 glucose-peptone medium 표면에 띄워 정지 배양하였고, block 2개를 50ml의 glucose-peptone medium과 균일하게 마쇄하여 150 rpm에서 10일간 교반 배양하였다. 배양이 끝난 culture medium은 균사체를 제거한 다음 laccase activity 측정용 조효소액으로 사용하였다.

3) laccase inducer 탐색

laccase inducer로서 gallic acid, guaiacol, ferulic acid, vanilic acid, lignosulfonate, syringaldehyde 등의 phenol성 물질과 굴참나무 (*Quercus variabilis*) 목분(60-80 mesh)을 glucose-peptone medium에 첨가하여 *T. rubrum* LKY-7에 대한 laccase 유도효과를 검토하였다. 각 phenol성 물질은 *T. rubrum* LKY-7을 glucose-peptone medium에 접종하여 48시간 배양 후 첨가하였고 굴참나무 목분은 glucose-peptone medium 배지에 0.5-2% (W/W) 첨가하여 멸균 후 접종하였다. 배양이 끝난 후 균사체를 여과하여 제거하고 배양여액은 2.0 mM ABTS ($\epsilon_{\max} = 3.6 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 기질로 420 nm에서 laccase activity를 측정하여 효과적인 laccase inducer를 선발하였다.

4) laccase의 대량 생산을 위한 *T. rubrum* LKY-7의 고정화

0.5x0.5x0.5 cm 크기의 nylon sponge에 glucose-peptone medium과 함께 마쇄한 균사체를 접종하여 29°C에서 7일간 배양하여 고정시켰다. 또한 마쇄된 균사체를 ca-alginate beads에 고정하여 laccase 생산을 위한 접종원으로 사용하였다. *T. rubrum* LKY-7 균사체가 고정된 nylon sponge에 glucose-peptone medium을 첨가하여 9일 동안 배양하면서 laccase 생산능을 검토하였고, *T. rubrum* LKY-7 균사체가 고정된 ca-alginate beads 약 3 g에 50ml의 medium을 첨가하여 9일 동안 배양하면서 주기적으로 laccase activity를 측정하였다. 또한 7일간 배양을 주기로 하여 연속적으로 medium을 첨가하면서 ca-alginate beads에 고정된 *T. rubrum* LKY-7에 의한 laccase 대량생산을 위한 연속적인 배양을 실시하였다.

5) *T. rubrum* LKY-7 Laccase의 정제 및 특성

Ca-alginate beads에 고정된 *T. rubrum* LKY-7 균주를 이용하여 laccase inducer로서 참나무 목분 1% (W/W)을 첨가한 glucose-peptone medium에서 7일 간격으로 연속적으로 생산한 조효소액을 stirred cell (Amicon Corp.)을 이용하여 농축한 다음 (10-kDa cut off) -20°C에서 freezing 하고 다시 thawing하여 0.4 μm cellulose membrane filter로 polysaccharide fraction을 제거하였다. 농축 효소액을 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 대하여

dialysis한 후 다음과 같은 3가지 단계를 통하여 효소를 순수 분리 정제하였다.

- Q-sepharose (Pharmacia)에 의한 ion chromatography
- hydrophobic phenyl-sepharose (Pharmacia)
- Superdex-75 (Pharmacia)에 의한 gel-filtration

Laccase의 정제도와 molecular weights는 SDS-PAGE에 의하여 확인하였다. laccase의 Redox potential은 Xu 등의 방법으로 20℃, 10 mM MES (pH 5.5) 에서 $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 로 측정하였다.

정제 laccase의 온도 안정성은 25-80℃의 온도범위에서 5-60분 배양하여 검토하였다. 최적 pH는 ABTS와 guaiacol을 기질로 하여 pH 2.0에서 7.0 범위 까지 결정하였고 buffer는 50 mM glycine-HCl buffers(pH 2.0-3.0), 50 mM sodium citrate buffers (pH 3.5-4.5), 50 mM sodium acetate buffers (pH 5.0-6.0) 및 sodium phosphate buffers (pH 6.5-7.0)를 사용하였다. inhibitors 영향은 inhibitor 존재하에 50 mM sodium citrate (pH 3.5)에서 guaiacol을 기질로 사용하여 측정하였다.

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase의 화학펄프 표백을 위한 mediator 선발

1) 표백용 laccase 생산과 정제

T. rubrum LKY-7 균사체 일정량을 glucose-peptone medium에서 homogenize한 다음, 2%의 Na-alginate 용액과 혼합하여 2% $CaCl_2$ 용액에 무균적으로 떨어뜨려 encapsulation 시켰다. ca-alginate에 고정된 *T. rubrum* LKY-7을 참나무 목분을 1% (W/W) 첨가한 glucose-peptone medium에서 7일간 배양 후 glucose-peptone medium만 교체하는 방법으로 5 cycle 반연속 배양을 실시하였다. 회수한 배지를 조효소액으로 하여 stirred cell (Amicon Corp.)을 이용하여 10배 농축하였다 (10-kDa cut off). 농축액은 90% 포화도의 ammonium sulfate로 단백질을 침전시킨 후 소량의 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해하고 다시 동 buffer에 대하여 dialysis한 다음

Q-sepharose column(Pharmacia)에서 one step 정제하였다.

2) laccase mediator

본 연구에 사용하는 laccase mediators는 미국 Oregon State University의 Kaichang Li 교수가 합성하여 제공한 것을 이용하였다.

3) laccase/mediator에 의한 펄프표백

가) laccase와 NHA, 1-HBT 및 VA에 의한 펄프 표백

500 ml flask에 50 mM sodium acetate buffer (pH = 4.5)로 pH를 조절 한 2%농도의 침엽수 미표백 크라프트펄프 5.0 g (o.d)을 넣고 그림 2의 mediator (10 mg per gram o.d pulp)와 one step 정제한 *T. rubrum* LKY-7 laccase (TrL) (15 units per gram o.d pulp)를 투입하여 60℃에서 4시간 처리 한 후 filtering하여 세척하였다. 세척된 펄프의 1/2 (약 2.5 g)은 5%의 농도로 ziploc bag에서 70℃, 90분간 알카리 추출 (2% NaOH on pulp, 10% consistency)하고 다른 1/2 (약 2.5 g)은 ziploc bag에서 80℃, 4시간동안 알카리-과산화수소표백 (2% NaOH and 0.05% MgSO₄ on pulp, 2% H₂O₂ on o.d pulp)을 실시하였다. 알카리추출 및 알카리-과산화수소 표백된 펄프는 micro kappa number method에 의하여 kappa number를 측정하고 TAPPI test method T218 om-83에 의하여 handsheet를 제조한 다음 TAPPI test method T525 om-86에 의하여 handsheet의 백색도(Brightness)를 측정하였다. 비교를 위하여 enzyme처리하지 않은 펄프에 대하여 알카리 추출과 알카리-과산화수소 처리한 펄프의 백색도와 Kappa number를 control로 하였다.

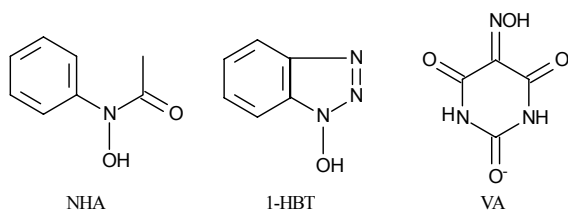


그림 2. laccase mediators의 화학구조.

나) TrL과 N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프 표백

그림 3과 같은 3종의 N-hydroxypyrazinone 치환체를 laccase mediator로 하여 1)항에서와 같은 방법으로 펄프 표백을 실시하고 pyrazinone 링의 3, 5, 6번 위치에 따른 치환체의 결합형태가 펄프표백에 미치는 영향을 조사하였다.

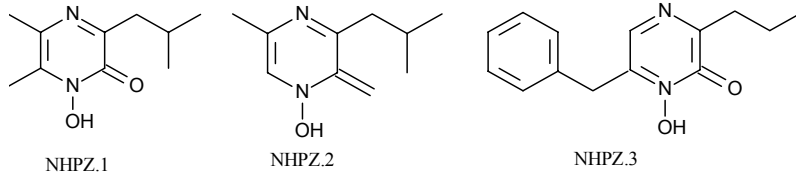


그림 3. N-hydroxypyrazinone analogues의 화학구조.

다) TrL과 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백

N-hydroxy-2-pyridone 유사체들은 다양한 종의 fungi에서 발견되고 있으며 그림 4와 같은 화합물들을 laccase mediator로 하여 전항에서와 같은 방법으로 펄프 표백을 실시하여 N-hydroxy-2-pyridone의 치환체가 펄프표백에 미치는 영향을 조사하였다.

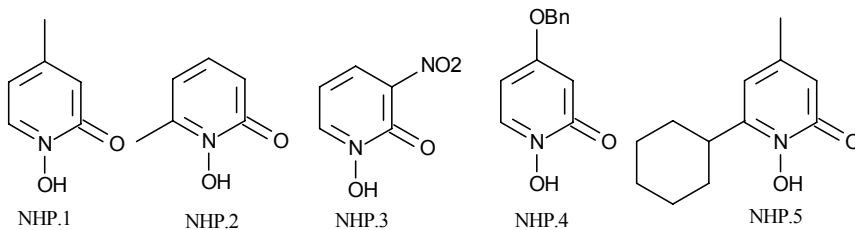


그림 4. N-hydroxy-2-pyridone analogues의 화학구조.

다. Xylanase 및 TrL/mediater system에 의한 펄프표백

1) 표백용 펄프제조

순천대학교 연습림에서 벌채한 15년생 굴참나무 (*Quercus variabilis*)와 20년생 소나무 (*Pinus densiflora*)를 chip화 하여 실험실용 digester(capacity, 4

Liter)를 이용하여 표 1의 조건으로 표백용 크라프트펄프를 제조하였다.

표 1 크라프트 펄프화 조건

Pulping condition	Quercus variabilis	Pinus densiflora
Active alkali (%)	18	20
Sulfidity (%)	20	25
Wood to liquor ratio	4 : 1	4 : 1
Max. temp.(°C)	180	180
Time to max. temp.(min.)	60	60
Time at max. temp.(min.)	150	150

2) Xylanase 및 TrL에 의한 펄프의 표백

Xylanase는 *Bacillus subtilis*로 부터 분리한 xylanase를 이용하였다. 500 ml flask에 50 mM sodium acetate buffer (pH = 4.5)로 pH를 조절한 2%농도의 전건기준 침엽수 및 활엽수 미표백 크라프트펄프 5.0 g을 넣고 펄프 gram 당 15 U의 xylanase와 TrL을 각각 투입하여 반응온도 30, 40, 50, 60°C에서 4시간 처리하였다. 처리가 끝난 펄프는 세척한 후 펄프농도 5%, 전건기준 펄프 gram 당 0.05% MgSO₄, 2% NaOH, 2% H₂O₂를 투입하고 ziploc bag에서 80°C, 4시간 알카리-과산화수소 처리를 실시하여 백색도와 micro kappa number를 측정하였다.

3) xylanase 및 TrL/mediator system에 의한 펄프표백

가) 미표백 크라프트펄프의 xylanase와 TrL/mediator에 의한 혼합처리

혼합처리는 X+L+AH와 X+L+L/M+AH (X = xylanase, L = TrL, L/M = TrL/mediator, AH = 알카리-과산화수소) 처리를 기준으로 하였다. 50 mM

sodium acetate buffer (pH=4.5) 로 pH를 조절한 2%농도의 침엽수 및 활엽수 미표백 크라프트펄프를 500 ml flask에 넣고 전건기준으로 펄프 gram당 15 U의 xylanase와 TrL 및 10 mg의 mediator를 투입하고 반응 온도 50℃에서 4시간동안 표백처리하였다. 반응이 끝난 펄프는 세척한 다음, ziploc bag에서 80℃, 4시간 알카리-과산화수소 처리(2% NaOH, 0.05% MgSO₄ and 2% H₂O₂ on o.d pulp)를 실시한 다음, 위항에서와 같은 방법으로 백색도와 micro kappa number를 측정하였다.

나) 미표백 크라프트펄프의 xylanase와 TrL/mediator에 의한 연속처리

연속처리는 X · L/M · AP를 기준으로 처리하였다. 500 ml flask에 50mM sodium acetate buffer (pH = 4.5)로 pH를 조절한 2%농도의 전건기준 침엽수 및 활엽수 미표백 크라프트 펄프 5.0 g을 넣고 펄프 gram 당 15 U의 xylanase를 투입하여 50℃에서 4시간 동안 xylanase 처리한 다음, 다시 전건기준 펄프 gram당 15 U의 TrL 및 10 mg의 mediator를 투입하고 반응온도 50℃에서 4시간 TrL/mediator 처리하였다. 처리가 끝난 펄프는 위항에서와 같은 방법으로 80℃에서 4시간동안 알카리-과산화수소처리 (2% NaOH, 0.05% MgSO₄ and 2% H₂O₂ on o.d pulp)를 실시한 다음, 백색도와 micro kappa number를 측정하였다.

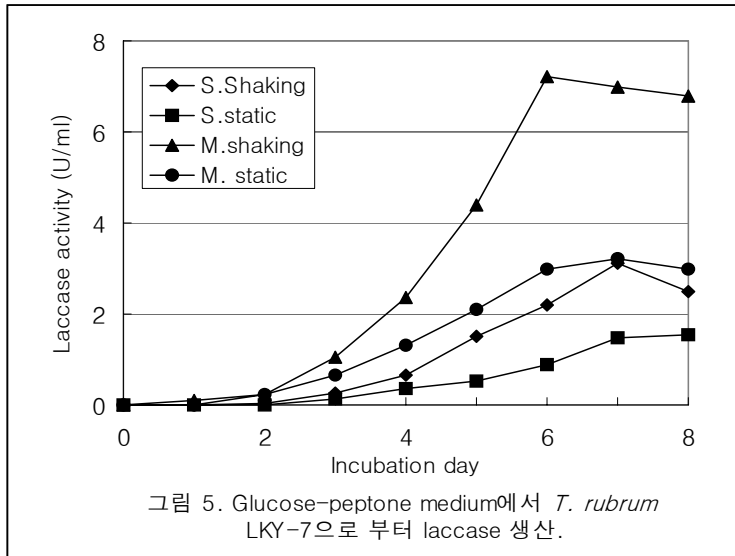
3. 결과 및 고찰

가. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase의 생산과 정제

1) *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 생산

T. rubrum LKY-7은 basal medium (Kirk's medium) 에서는 spore 및 균 사체 접종 시 매우 느린 생장을 보여주었고 laccase activity도 매우 낮은 수준으로 나타났다 (data not shown). *T. rubrum* LKY-7의 마쇄된 mycelium을 glucose-peptone medium에 접종하여 교반 배양하였을 때 그림 5에서와 같이 배양 2일째부터 laccase가 검출되어 배양 6일째에는 약 7.2 U/ml의 높은

laccase activity를 보여주었고 그 이후부터는 다소 감소하는 경향을 나타냈다. mycelium block을 배지 표면에 접종하여 정지배양한 경우 laccase activity는 교반했을 때보다 전반적으로 낮았으며 배양 7일째 약 3.0 U/ml의 최대치를 나타냈다. 반면에 spore를 정지배양이나 교반 배양했을 경우에는 균사체 배양에 비하여 전체적으로 laccase activity는 낮게 나타났으며 교반배양시 약 3.0 U/ml의 최대치를 나타냈다.



2) Laccase inducer 탐색

Laccase 유도효과는 표 2에서와 같이 phenol성 물질의 경우 ferulic acid와 gallic acid의 경우에서 120-140%정도 나타났으나 그 외의 화합물에서는 크게 나타나지 않았다. 특히 백색부후균에 대해 효과적인 laccase inducer로 알려진 2,6-xylydine의 경우에도 그 유도효과는 크게 나타나지 않았다. 반면에 굴참나무 목분의 경우에는 260-330%정도의 laccase 유도효과가 나타나 본 균주의 laccase 유도에는 굴참나무 목분이 매우 효과적인 것으로 검토되었다. 굴참나무 목분을 배지량에 대해 0.5% 첨가하였을 경우 laccase activity는 약 19 U/ml에서 1.0%의 경우 23 U/ml 그리고 2.0% 첨가하였을 때 24 U/ml로 증가

하여 TrL의 inducer로서 최적 굴참나무 목분 첨가량은 1.0%로 검토되었다.

표 2. laccase생산을 위한 inducer 효과

Inducer	Laccase activity (U/ml)	Relative activity (%)
Control	7.2	100
gallic acid	8.8	122
guaiacol	7.5	104
ferulic acid (1mM)	10.2	142
lignosulfonic acid (1mg/ml)	8.2	114
syringaldehyde (1mM)	8.5	118
vanilic acid (1mM)	6.8	94
2,6-xylydine (25uM)	7.6	105
Oak woodmwal 0.5%	19.3	268
1.0%	23.4	325
2.0%	24.2	336

3) 고정화된 *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 생산

Laccase의 대량생산 및 연속생산을 위하여 *T. rubrum* LKY-7 균사체를 nylon sponge 및 ca-alginate beads에 고정화시킨 다음 glucose-peptone medium에 접종하여 laccase의 생산능을 검토하였다. 고정화된 균으로부터 생산된 laccase activity는 그림 6에서와 같이 고정화 되지 않은 균주에 비하여 다소 높았으며 ca-alginate beads에 고정 시켰을 때가 nylon sponge보다 다소 높게 나타났다. ca-alginate beads에 고정시킨 *T. rubrum* LKY-7균주를 laccase inducer로서 굴참나무 목분을 1.0% 첨가한 glucose-peptone medium에 접종하여 7일동안 배양한 다음 배양여액을 회수하고 다시 glucose-peptone medium을 보충하면서 7일 간격으로 5주 연속 배양하면서 laccase 연속생산을 시도하였다. 그 결과 표 3과 그림 7에서와 같이 five cycle의 연속배양에서 20 U/ml이상 거의 일정한 laccase 생산능을 나타내어 고정화시킨 균주에 의한 laccase의 대량생산이 가능할 것으로 검토되었다.

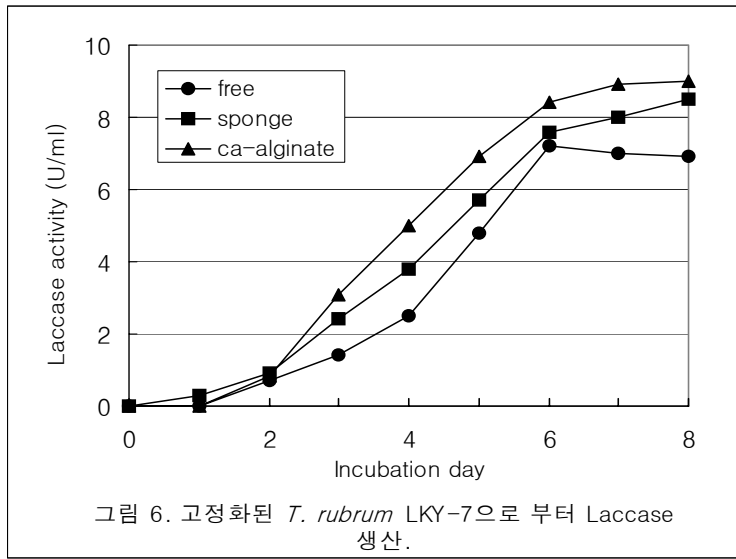
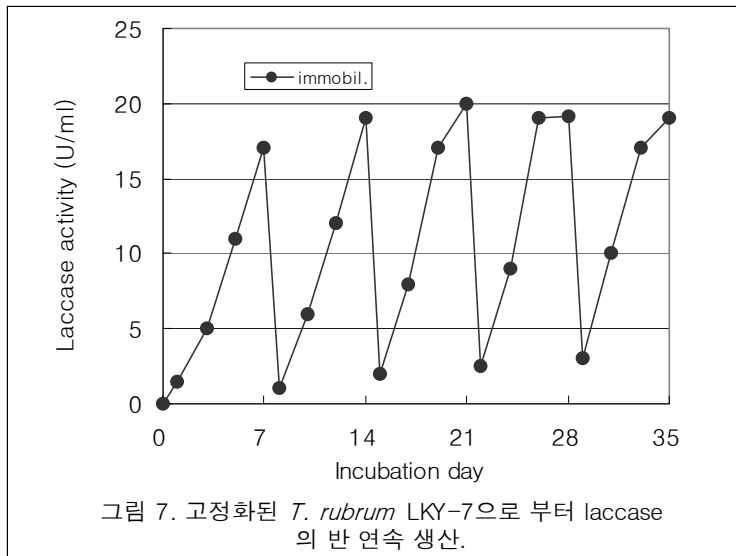


표 3. ca-alginate beads에 고정된 *T. rubrum* LKY-7로부터 laccase의 연속 생산

No. of cultivation cycle	Laccase activity (U/ml)
1 cycle	10.4
2 cycle	22.9
3 cycle	23.3
4 cycle	22.7
5 cycle	24.0



4) *T. rubrum* LKY-7 laccase의 분리, 정제 및 특징

Ca-alginate beads에 고정된 *T. rubrum* LKY-7균주를 이용하여 7일 간격으로 연속적으로 생산한 culture medium을 농축하고 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 대하여 dialysis하여 표 4에서와 같이 정제하였다. laccase정제는 3 chromatographic step으로 행하여 졌으며 Q-sepharose chromatography step에서는 농축 culture medium의 갈색부분이 거의 제거되고 하나의 laccase fraction이 얻어졌으나 phenyl sepharose chromatography step에서 높은 laccase activity와 아주 낮은 activity를 갖는 두 개의 laccase fraction으로 나누어져 그중에서 청색을 띠며 높은 activity를 갖는 fraction에 대해 gel-filtration chromatography를 실시하여 수율 약 40%의 정제된 laccase를 얻었다. 정제된 laccase는 그림 8에서와 같이 SDS-PAGE에서 단일밴드로서 분자량 약 65 kDa의 정제된 laccase로 확인 되었다.

표 4. *T. LKY-7* laccase의 정제

Purification step	Volume (ml)	Activity (unit)	Protein (mg/ml)	SP act (U/mg)	Yield (%)	Purification factor(fold)
Culture filtrate	5,400	13,500	0.25	10	100	-
Concentration (10-kDa filter)	52	10,900	2.70	78	81	8
Q-sepharose	25	8,600	2.50	173	64	17
Phenyl sepharose	20	6,400	1.50	210	48	21
Superdex-75	10	5,400	1.80	300	40	30

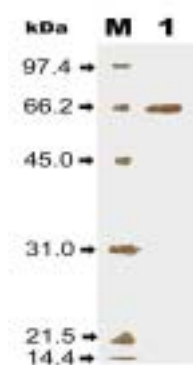


그림 8. 정제된 *T. rubrum* LKY-7 laccase의 SDS-PAGE profile.

Protein was visualized by silver stain.

Lane M: protein marker and lane 1: the purified TrL.

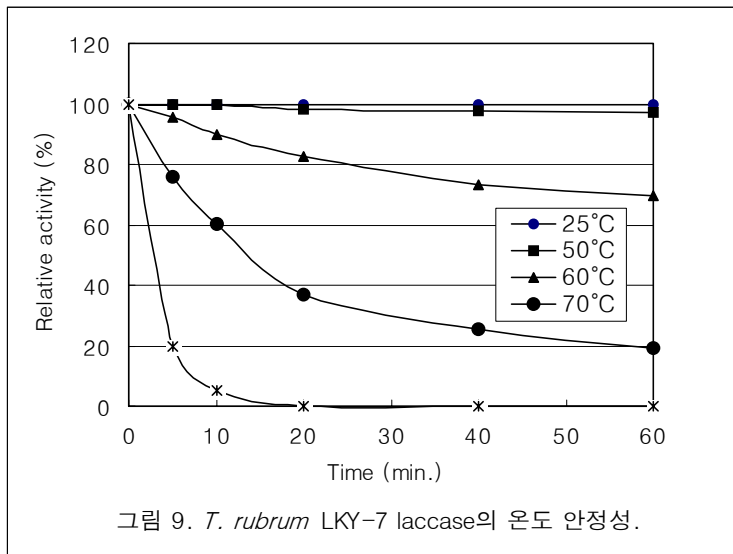
Multiphor apparatus (Pharmacia)에서 pH gradient 2.5-7.5로 5.0% polyacrylamide slab gel로 측정된 정제된 *T. rubrum* LKY-7 laccase (TrL)의 isoelectric point는 4.0이었으며 UV-visible spectrum에서 278 nm와 610 nm에서 각각 0.22 및 0.009의 absorption maxima와 338 nm에서 0.005의

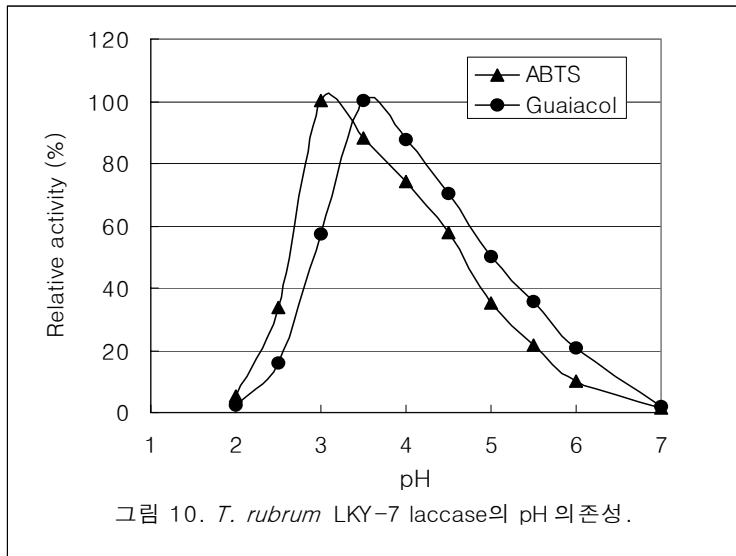
shoulder가 관찰되었고 또한 biquinoline titration에 의하여 protein subunit 당 2.5 ± 0.7 의 copper atoms를 갖고 있는 것으로 나타나 전형적인 fungal laccase와 유사한 것으로 검토되었다. pH 5.5에서 TrL의 redox potential E. 는 NHE (Normal Hydrogen Electrode)에 대하여 0.54 ± 0.02 수준으로 나타났다.

5) TrL의 온도안정과 최적 pH

50 mM sodium tartrate buffer (pH 4.5)에서 TrL의 온도에 대한 안정성은 그림 3-9에서와 같이 50°C이하에서는 매우 안정하였으나 70°C이상의 온도에서는 급격하게 불활성화하여 80°C에서는 10분 이내에 완전히 불활성화되었다.

TrL의 최적 pH는 그림 3-10에서와 같이 ABTS를 기질로 했을 때 3.0이었고 guaiacol의 경우 3.5 정도로 상당히 산성으로 나타났으며 pH에서의 TrL의 안정성은 pH 3-4보다 pH 5-7에서 더 높았고 온도 안정성도 pH 3보다 pH 6에서 더 높게 나타났다.





6) *T. LKY-7* laccase에 대한 inhibitors의 효과

50 mM sodium citrate buffer (pH 3.5)에서 guaiacol을 기질로 하여 일반적인 laccase inhibitor에 대하여 TrL에 대한 inhibition효과를 검토하였다. inhibitors 작용은 표 5에서와 같이 sodium azide의 경우 0.1 mM의 낮은 농도에서 100% 완전한 inhibition이 검토되었으며 그 외에는 sodium azide 농도에 비하여 10배 이상의 농도에서 100% inhibition이 관찰되었다. L-cysteine이나 dithiothreitol 은 1-5.0 mM의 농도에서 효과적으로 TrL이 inhibition되었으며 tropolone 10 mM의 농도에서 100% inhibition이 검토되었다. 반면에 p-coumaric acid의 경우 5.0 mM의 농도에서도 약 36% inhibition을 나타냈다.

표 5. TrL에 대한 inhibitor 효과

Compounds	Conc.(mM)	Inhibition (%)
Sodium azide	0.1	100
Sodium fluoride	1.0	100
L-Cysteine	1.0	50
	5.0	95
Dithiothreitol	1.0	82
	2.0	100
Tropolone	5.0	65
	10.0	100
	5.0	100
p-Coumaric acid	1.0	15
	5.0	36

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase의 화학펄프 표백을 위한 mediator 선발

1) 표백용 TrL 생산과 정제

표 6에서와 같이 ca-alginate beads에 encapsulation 시킨 *T. rubrum* LKY-7을 참나무 목분 1% (W/W)가 첨가된 glucose-peptone medium에서 5회 반연속 배양하여 약 4,800 ml의 조효소액을 회수하였고 laccase activity는 총 72,000 unit정도였다. 농축, ammonium sulfate 침전, dialysis 단계를 거쳐 total volume 15 ml (laccase activity 약 51,000 unit)의 조효소액을 Q-sepharose column (Pharmacia)에서 one step 정제하여 수율 약 60% laccase activity 43,000 unit의 효소액을 얻어 펄프 표백용 laccase로 이용하였다.

표 6. *T. rubrum* LKY-7 laccase의 1단계 정제

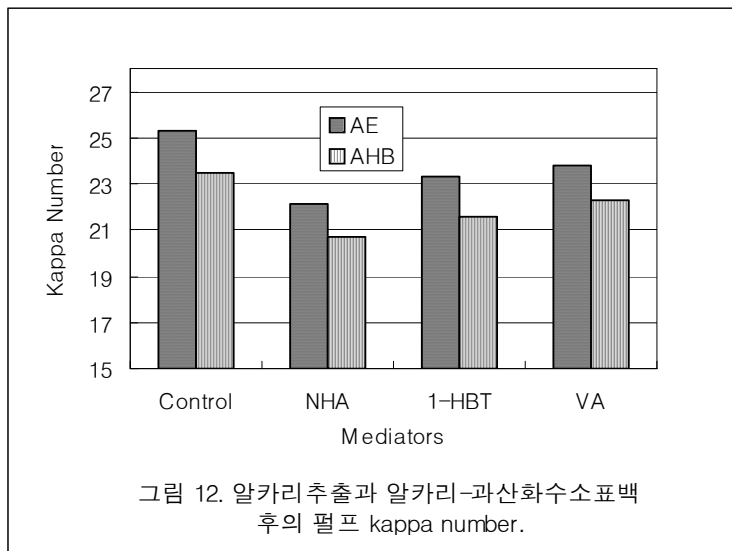
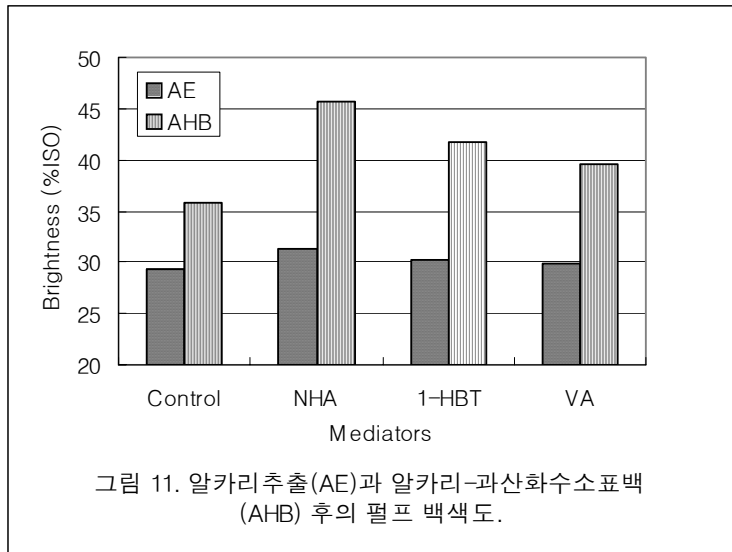
Fungi	Purification step	Volume (ml)	Activity (unit)	Yield (%)
T. LKY-7	Culture filtrate	4,800	72,000	100
	Concentration(>10 kDa)	450	62,000	86
	Ammonium sulfate precipitation	15	51,000	78
	Q-sepharose	20	43,000	60

2) TrL/mediator에 의한 펄프표백

가) TrL과 NHA, 1-HBT 및 VA에 의한 펄프 표백

TrL과 지금까지 우수한 laccase mediator로 알려진 NHA와 1-HBT를 비롯하여 VA를 mediator로 하여 침엽수 크라프트펄프를 처리한 다음 알칼리 추출 및 알칼리-과산화수소 표백을 실시하여 백색도와 Kappa number를 측정하여 표백성을 검토하였다. 비교를 위한 control은 mediator를 투입하지 않고 펄프를 알칼리 추출과 알칼리-과산화수소 처리만 행하였다. 그림 11과 12에서와 같이 TrL/mediator 표백 후 알칼리 추출에서 백색도는 거의 변화가 없으나 kappa number는 감소하였고 알칼리-과산화수소 표백에서는 백색도의 증가와 kappa number 감소를 나타냈다. 알칼리 추출에서보다 알칼리추출과 과산화수소 표백을 동시에 실시하였을 때 백색도 증가와 kappa number 감소에 더 효과적이었다.

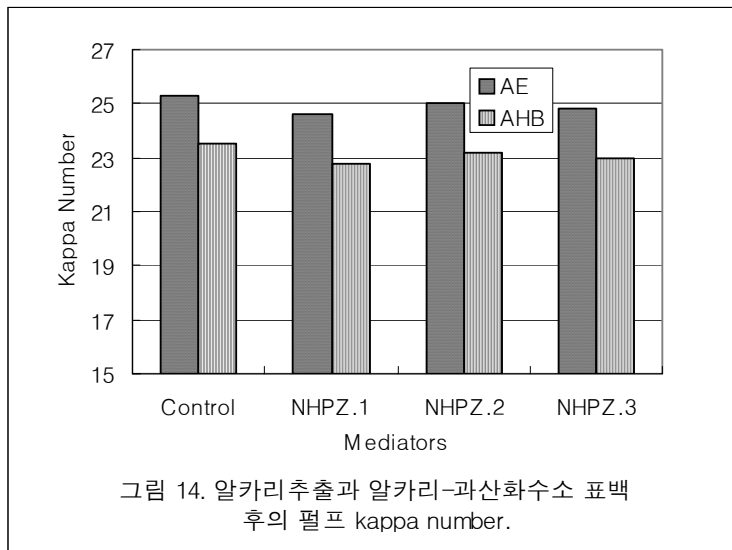
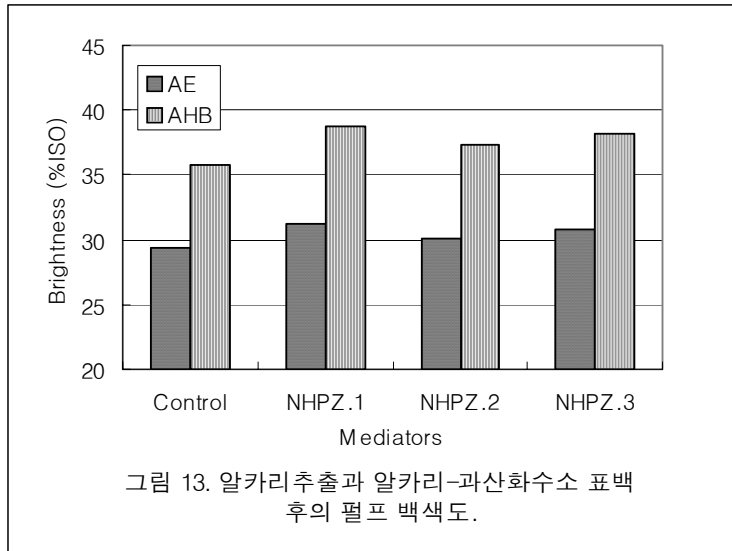
TrL/NHA의 경우 알칼리 추출에서 2.5, 알칼리-과산화수소 표백에서는 2.8 정도의 Kappa number 감소와 약 10% ISO 백색도 증가로 가장 효과적인 표백성을 나타냈다. 반면 1-HBT와 VA의 경우 각각 1.8과 1.2 정도의 Kappa number 감소와 약 6% ISO 정도의 백색도 증가를 나타내 TrL에 대하여 기존의 mediator중에서는 NHA가 효과적인 mediator로 작용함을 보여주었다.



나) TrL과 N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프 표백

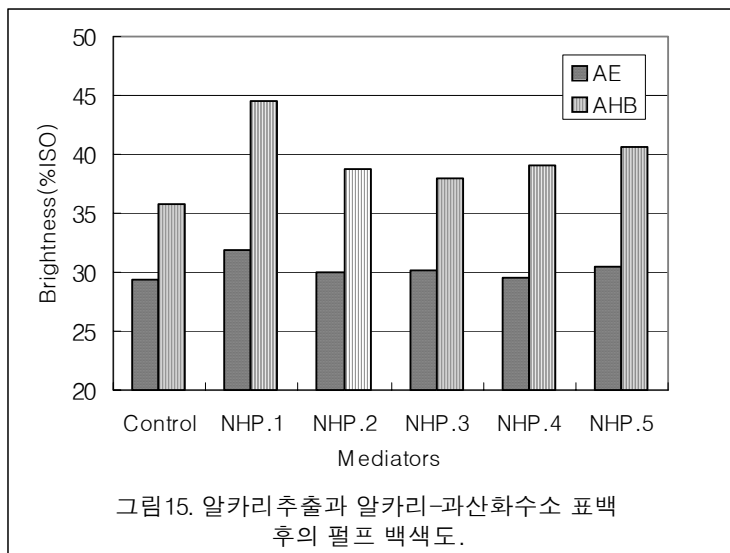
N-OH 그룹을 갖고 있는 화합물 중에서 2종의 N-hydroxypyrazinone 치환체를 이용하여 pyrazinone링 치환체의 결합형태가 펄프표백에 미치는 영향

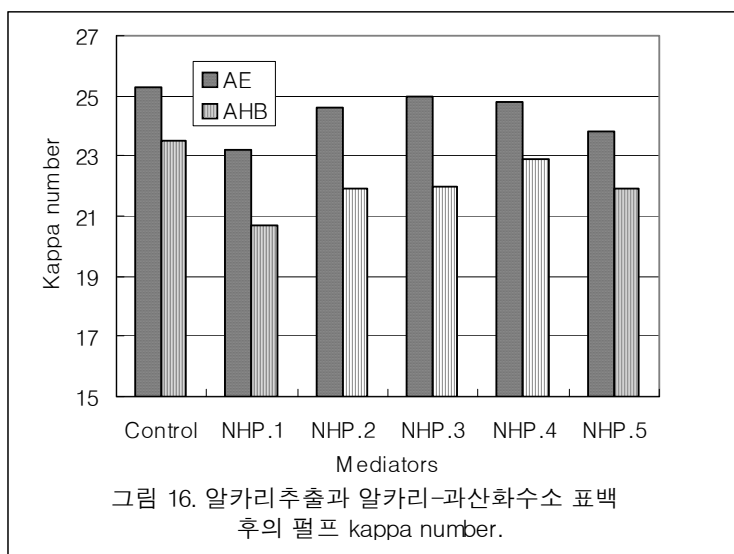
을 조사였다. 그림 13과 14에서와 같이 TrL/N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프표백은 전체적으로 3% ISO 정도의 백색도 증가와 0.7 정도의 kappa number 감소를 나타내 표백효과가 크지 않았고 또한 pyrazinone링의 치환체 결합형태가 펄프 표백에 미치는 영향도 크게 나타나지 않았다.



다) TrL과 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백

TrL과 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백 결과, 그림 15과 16에서와 같이 NHP.1의 표백성이 가장 우수하였으며 그다음은 NHP.5로 나타났다. 즉 NHP.1의 경우 알카리 추출이나 알카리-과산화수소 표백에 의하여 Kappa number는 약 2.8 정도 감소하고 백색도는 약 8.8% ISO정도 증가하여 NHA와 유사한 펄프 표백효과를 나타냈다. NHP.5의 경우, 알카리 추출이나 알카리-과산화수소 표백에 의하여 Kappa number는 1.6정도 감소하였고 백색도는 약 5.8% 정도 증가하였으나 다른 치환체에 있어서는 그 표백효과가 미미하였고 NHP.1과 NHP.5의 경우를 제외하고 그 차이가 크지 않아 N-hydroxy-2-pyridone 치환체의 형태에 의한 펄프표백 효과에서는 일정한 경향을 발견할 수 없었다.





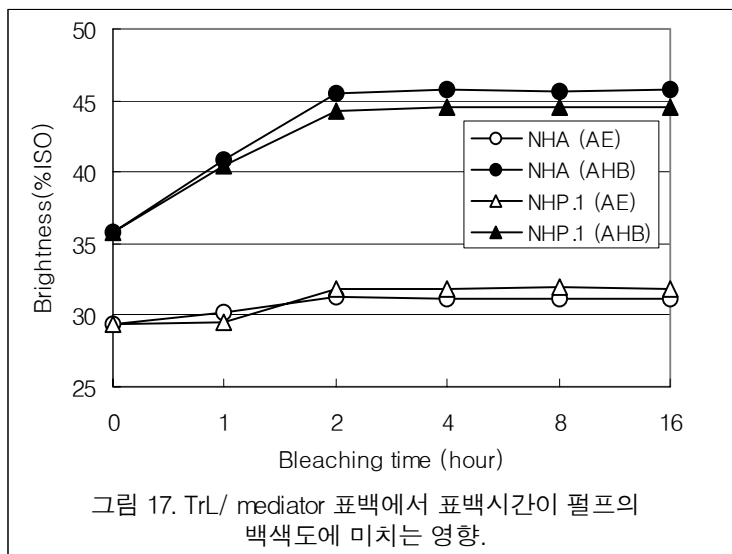
이상의 결과에서 natural cyclic hydroxamic acid에서 유래한 N-OH group을 함유한 N-hydroxypyrazinone과 N-hydroxy-2-pyridone derivatives의 표백성은 치환체의 형태에서 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었고 차라리 electron-withdrawing group과 electron-donating group에 의한 영향이 클 것으로 예측되어 추후 이에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

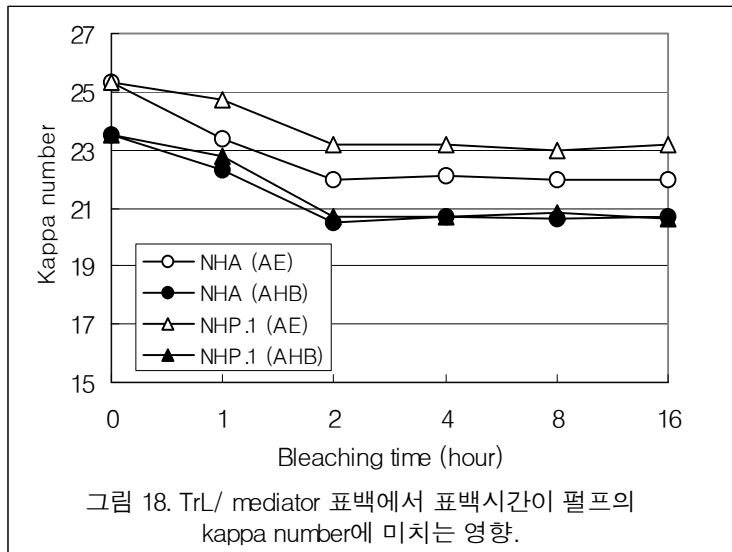
라) 표백시간에 따른 표백효과

natural cyclic hydroxamic acid에서 유래한 N-OH group을 포함한 화합물 중에서 지금까지 우수한 laccase mediator로 알려진 화합물과 N-hydroxypyrazinone 및 N-hydroxy-2-pyridone 치환체의 표백특성을 검토한 결과 TrL의 mediator로서는 기존의 NHA와 N-hydroxy-2-pyridone의 NHP1이 가장 우수한 표백효과를 나타냈다. 따라서 TrL과 NHA와 NHP.1을 mediator로 하여 표백시간에 따른 표백성을 조사하였다.

그림 17, 18에서와 같이 NHA의 경우 투입된 TrL은 4시간 반응에서 대부분 활성을 잃었으며 Kappa number 감소와 백색도 증가는 반응시간 2시간에서 4시간째에 가장 크게 나타났고 그 이후 16시간까지 처리에는 표백효과가 크지 않았다. NHP.1의 경우에는 2시간의 반응에서 이미 laccase의 활성은 거

의 나타나지 않았고 표백효과는 마찬가지로 2시간에서 4시간째 반응에서 가장 크게 나타났고 그이상의 표백시간은 표백효과에 크게 영향하지 않는 것으로 검토되었다. NHA와 NHP.1 공히 laccase활성이 거의 없는 4시간 이후의 반응에서도 알카리 추출과 알카리-과산화수소 표백에서 어느정도 백색도 증가와 kappa number 감소가 관찰되는 것은 반응초기에 laccase에 의해 쉽게 mediator에 $\cdot O-N$ radical이 생성되고 생성된 radical은 laccase활성이 없어진 뒤에도 안정하고 용이하게 펄프섬유 속으로 침투하여 계속 반응이 일어나는 것으로 생각된다.





다. Xylanase 및 TrL/mediater system에 의한 펄프표백

1) Xylanase 및 TrL에 의한 펄프의 표백

목재펄프를 xylanase로 전 처리함으로써 연이은 화학 표백단계에서 펄프의 표백성이 증가하여 요구되어지는 펄프의 백색도에 도달하는데 최대 25%의 표백약품을 절약할 수 있는 것으로 보고되어 최근에는 몇몇 펄프공장에서 xylanase를 표백공정에 이용하고 있다. 그러나 실제 xylanase의 탈리그닌 효과는 제한적이고 간접적이며 laccase나 MnP와 같은 ligninolytic enzymes와 병용하는 것이 탈리그닌이나 펄프 표백에 더 효과적일 것이다. 보통 laccase나 MnP가 다양한 정도로 리그닌을 분해하고 펄프를 표백하지만 그들의 제한적인 리그닌 분해능과 고비용때문에 단독으로 상업적 표백공정에 이용하는 것은 어렵다. 그래서 ligninolytic enzymes의 펄프 표백효과를 증가시키기 위하여 두가지 혹은 그이상의 효소를 조합하여 펄프 표백에 적용하는 연구가 많이 진행되었으며 실제 이는 상당한 가시적 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 TrL과 xylanase와의 병용 처리로 새로 분리 정제한 TrL의 표백성을 개선하여 TrL/mediator system에

의한 우수한 펄프 표백공정을 확립하고자 하였다.

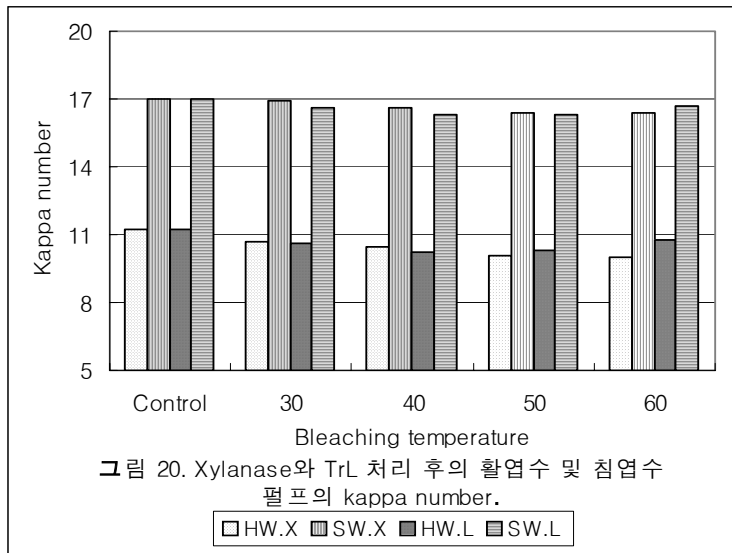
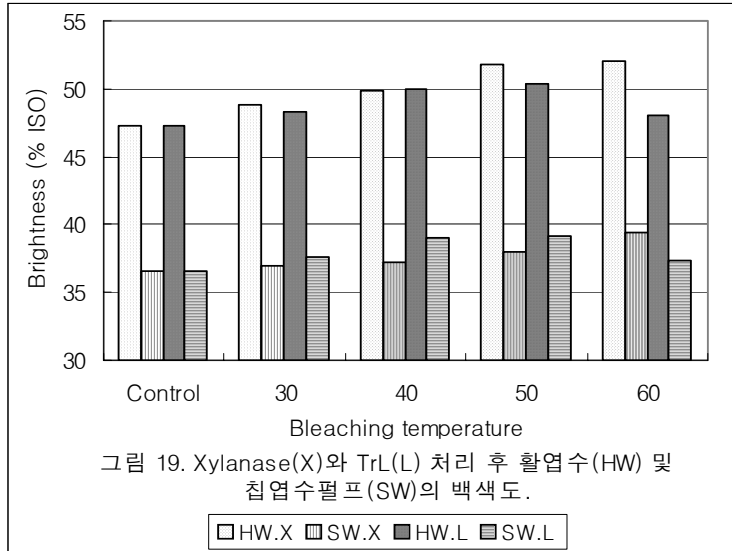
수중에 따른 xylanase와 TrL의 펄프 표백성을 검토하기 위하여 표 7과 같은 조건으로 굴참나무 (활엽수)와 소나무 (침엽수)를 자체 크라프트 증해하였다. 제조한 크라프트 펄프는 표 3-7에서와 같이 굴참나무의 경우 백색도 33.2% (ISO), Kappa number 15.5, 소나무는 백색도 29.8% (ISO) Kappa number 22.4로서 이를 표백용 펄프로 이용 하였다. 비교를 위한 control은 enzyme 처리를 하지 않고 알카리-과산화수소 처리한 펄프로서 활엽수는 백색도 47.3% (ISO) Kappa number 15.5였고 침엽수는 백색도 36.6% (ISO) Kappa number 17.0이었다.

표 7. 굴참나무와 소나무의 크라프트 펄프화 및 알카리-과산화수소처리의 백색도 및 Kappa number

Control pulps (no enzymatic treatment)		Brightness (% ISO)	Kappa number
Hardwood	Before alkline/H ₂ O ₂	33.2	15.5
	After alkaline/H ₂ O ₂	47.3	11.5
Softwood	Before alkline/H ₂ O ₂	29.8	22.4
	After alkaline/H ₂ O ₂	36.6	17.0

Xylanase와 TrL의 수중에 따른 펄프 표백성을 검토하기 위하여 활엽수 크라프트펄프와 침엽수 크라프트펄프에 대하여 전건기준으로 펄프 gram당 15U의 xylanase와 TrL을 투입하여 반응온도 30, 40, 50, 60℃에서 4시간 반응처리 하였다. 처리가 끝난 펄프는 알카리-과산화수소 처리하여 백색도와 kappa number를 측정 한 결과, 그림 19과 20에서 보는 바와 같이 xylanase 처리 시 활엽수펄프의 경우 60℃에서 가장 효과적으로 작용하였으며 백색도는 47.3% ISO에서 52.0% ISO로 약 4.7% 증가하였고 Kappa number 값은 11.2에서 10으로 1.2 정도 감소하였다. 반면에 침엽수펄프의 경우 활엽수에 비하여 xylanase 처리 효과가 크게 나타나지 않았으며 60℃에서 백색도는 2.8% ISO 증가하였고 Kappa number는 약 0.6정도 감소하였다. 이는 활

엽수 헤미셀룰로오스의 주체는 xylan류이며 펄프에 잔존하는 xylan이 xylanase 처리에 의하여 어느 정도 제거되면서 알카리-과산화수소처리에 의한 리그닌 분해가 용이하기 때문일 것으로 생각된다.



펄프를 TrL로 처리하였을 때 활엽수펄프에서는 50℃에서 가장 효과적이었으며 백색도 증가 3% ISO, Kappa number 감소 1.0 정도였다. 침엽수펄프의 경우에는 40-50℃가 가장 효과적으로 작용하여 백색도는 약 2.4% ISO 증가하였고 Kappa number는 약 0.7정도 감소하였다. xylanase와는 달리 TrL은 60℃이상의 온도에서는 표백효과가 30℃에서 보다는 낮게 나타나 TrL의 온도 의존성은 xylanase보다 낮고 최적 온도는 40-50℃인 것으로 검토되었다.

2) Xylanase와 TrL/mediator system의 혼합 및 연속처리에 의한 펄프표백

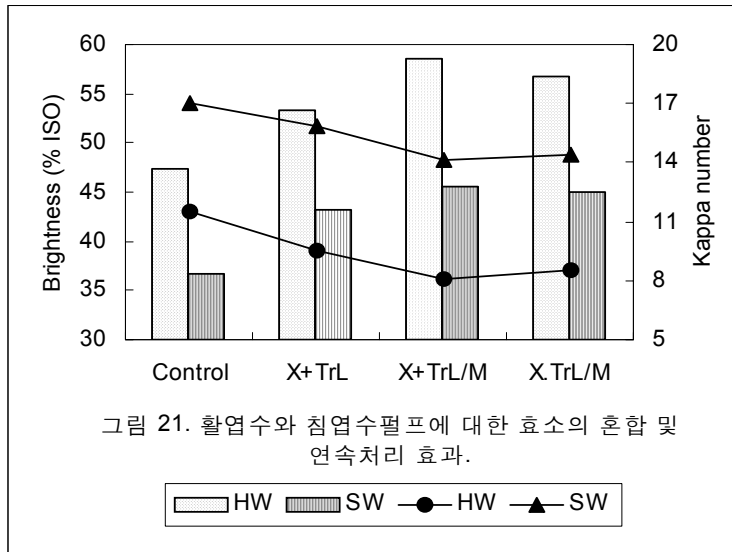
일반적으로 xylanase와 ligninolytic enzymes와의 병용처리는 각각의 enzyme 처리에 비하여 펄프 표백에 더 효과적이다. Xylanase와 TrL/mediator로 병용처리 한 펄프 표백효과가 이들 enzyme의 시너지(synergy) 작용인지 아니면 각 enzyme의 펄프 표백효과가 부가 되어진 것인지를 검토하기 위하여 Xylanase, TrL 및 TrL/mediator의 혼합처리와 연속처리를 실시하였다.

혼합처리는 $X+L+AH$ 와 $X+L+L/M+AH$ ($X=xylanase$, $L=TrL$, $L/M=TrL/mediator$, $AH=$ 알카리-과산화수소) 처리를 기준으로 하였고 연속처리는 $X \cdot L/M \cdot AP$ 를 기준으로 처리하였고 laccase mediator로는 새로 선발된 NHP.1을 이용하였다. 표 8과 그림 21에서와 같이 활엽수펄프의 경우에 xylanase와 TrL의 혼합처리 했을 때 백색도는 약 6% ISO 증가하였고 kappa number는 약 2 정도 감소하였으나 xylanase와 TrL/NHP.1으로 혼합처리 했을 때는 훨씬 효과적으로 나타나 백색도는 11.3% ISO 증가하였고 kappa number는 3.2 감소하였다.

표 8. 미표백 크라프트펄프의 xylanase와 Trl/mediator 혼합처리 및 연속처리 효과

Control pulps (no enzymatic treatment)		Brightness (% ISO)	Kappa number
Hardwood	After alkaline/H ₂ O ₂	47.3	11.5
Softwood	After alkaline/H ₂ O ₂	36.6	17.0
Pulps treated with enzymes			
	Xylanase+TrL	53.3	9.5
Hardwood pulp	Xylanase+Trl/Mediator	58.6	8.1
	Sequential treatment with Xylanase and Trl/mediator	56.8	8.5
	Xylanase+TrL	40.2	15.8
Softwood pulp	Xylanase+Trl/Mediator	45.6	14.1
	Sequential treatment with Xylanase and Trl/mediator	45.0	14.4

침엽수펄프에서는 전반적으로 활엽수 펄프에 비하여 표백효과가 낮게 나타났지만 xylanase 와 TrL 혼합처리 시, 백색도는 5.6% ISO 증가하였고 kappa number는 1.2 정도 감소한 반면 xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합처리에 의하여 백색도는 10% ISO 증가하고 kappa number는 약 3정도 감소하여 활엽수 펄프의 경우와 비슷한 경향을 나타냈다. 또한 펄프를 xylanase와 TrL/NHP.1로 동시에 혼합처리 했을 때가 연속적으로 처리했을 경우 보다 표백효과가 높게 나타난 것은 xylanase와 TrL/NHP.1의 펄프 표백에 강한 시너지 효과를 나타낸 것으로 생각되었다. 이러한 시너지 효과가 활엽수펄프에서 보다 크게 나타난 것은 xylanase가 연속적인 처리에서 보다 동시에 혼합 처리했을 경우에 TrL/HHP.1의 리그닌 접근성을 더욱 증가시킬 수 있다는 것을 보여 주었다.



4. 결과 요약

가. *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase의 생산과 정제

활엽수 chip pile로부터 새로 분리한 복재부후균 *T. rubrum* LKY-7균주로부터 laccase의 생산능을 검토하고, laccase를 분리 정제하여 그 특성들을 검토하였다.

T-LKY-7균주는 glucose-peptone liquid medium에서 높은 수준의 laccase를 분비하였고 참나무 목분 첨가에 대해 강한 유도효과를 나타냈다. laccase의 연속생산을 위해서 ca-alginate에 균체를 고정시키고 glucose-peptone medium에서 배양한 결과 5 주기까지의 반연속 laccase 생산을 유지할 수 있었다. *T. rubrum* LKY-7 laccase (TrL)는 3단계 chromatography를 거쳐 전체 수율 약 40%로 정제되었으며 분자량은 약 65 kDa 이었다. 정제된 TrL은 전형적인 laccase의 특성을 나타냈으나 0.5 V의 매우 낮은 redox potential을 갖고 있으면서 substrate/mediators에 대하여 강력한 산화력을 갖고 있는 것으로 검토되었다. TrL 50°C까지는 매우 안정적이었으나 70°C 이상의 온도에서는 급격하게 불활성화되었고 최적 pH는 3-4범위였다. 또한 TrL은 sodium azide와 sodium fluoride에 강한 inhibition을 나타냈다.

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase의 화학펄프 표백을 위한 mediator 선발

TrL에 효과적인 mediator를 선발하고자 기존의 mediators인 NHA, 1-HBT, VA와 N-hydroxypyrazinone analogues 및 N-hydroxy-2-pyridone analogues에 대하여 펄프 표백특성을 조사하였다. 기존의 mediator중에서는 NHA의 표백 특성이 가장 우수하여 TrL/NHA의 경우 알카리 추출에서 2.5, 알카리-과산화수소 표백에서는 2.8 정도의 Kappa number 감소와 약 10% ISO 백색도 증가하였다. N-hydroxy-2-pyridone analogues 중에서 NHP.1이 NHA와 비슷한 표백효과를 나타내었으며 약 8.8% ISO의 백색도 증가와 약 2.8 정도의 Kappa number 감소를 가져왔다. N-hydroxy-2-pyridone analogues와 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 치환체가 표백에 미치는 영향은 나타나지 않았다. TrL과 우수한 mediator로 선발된 NHA와 NHP.1의 laccase/mediator system에 의한 최적 표백시간은 2시간에서 4시간이 가장 효과적이었으며 그 이상의 표백시간은 표백 효과에 크게 작용하지 않았다.

다. Xylanase 및 TrL/mediator system에 의한 펄프표백

TrL을 이용하여 laccase/mediator system에 의한 우수한 생물학적인 펄프 표백공정을 확립하기 위하여 활엽수 및 침엽수펄프에 대하여 목질분해효소인 xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합 및 연속처리에 의한 펄프 표백성을 검토하였다. 펄프 gram당 15 U의 xylanase와 TrL을 각각 투입하여 처리한 결과 xylanase 처리 시 활엽수펄프의 경우 60°C에서 가장 효과적으로 작용하였으며 백색도는 47.3% ISO에서 52.0% ISO로 약 4.7% 증가하였고 Kappa number 값은 11.2에서 10으로 1.2 정도 감소하였으나 침엽수펄프의 경우 활엽수에 비하여 xylanase 처리 효과가 크게 나타나지 않았다. 펄프를 TrL로 처리하였을 때는 xylanase에 비하여 표백 효과가 침엽수와 활엽수 모두 낮게 나타났다. 특히 TrL의 적정 표백온도는 40-50°C 범위로 xylanase에 비하여 낮았다. xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합처리는 펄프를 xylanase와 TrL/NHP.1로 동시에 혼합처리했을 때가 각각을 연속적으로 처리했을 경우 보다 표백효과가 높게 나타나 xylanase와 TrL/NHP.1이 펄프 표백에 강한 시너지 효과를 나타냈다. 활엽수

펄프를 xylanase와 TrL/NHP.1으로 혼합처리 했을 때 백색도는 11.3% ISO 증가하였고 kappa number는 3.2 감소하였으나 침엽수펄프의 경우 백색도는 9% ISO 증가하고 kappa number는 약 2.9 정도 감소하였고 이 결과는 TrL/NHP.1으로 표백처리한 결과와 비슷하게 나타나 xylanase와 TrL/NHP.1의 혼합처리에 의한 침엽수펄프의 표백효과는 크게 나타나지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 1년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표
1차년도 (2001)	<i>T. rubrum</i> LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 <i>T. rubrum</i> LKY-7의 laccase 유전자 (TrL) 분리 및 특성 구명 <i>T. rubrum</i> LKY-7의 laccase inducer 탐색, laccase 분리 및 정제, 특성규명

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도(점수)
1차년도 (2001)	○ <i>T. rubrum</i> LKY-7의 리그닌분해에 관련된 효소의 분리, 정제 및 특성	30
	○ <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase유전자의 클로닝 및 특성	50
	○ <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase inducer의 탐색과 laccase의 분리 및 정제, 특성 규명	20

2. 연구개발 목표의 달성도

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해 효소 활성화

리그닌 분해효소 생성량을 비교한 결과, 효소 생산량은 배지의 조성에 민감하였으며, 특히 laccase 생산은 진탕배양과 목분 첨가에 따라 크게 증대되었다. MnP, LiP, cellulase, 그리고 xylanase 생산량은 미미하였다. 또한 활성 염색, 열의 민감성 및 항체를 이용한 Western blotting에 의해 생산되는 laccase는 한 종류의 laccase가 아닌 것이 조사되었다.

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자의 클로닝 및 특성

T. rubrum LKY-7의 mRNA로부터 cDNA를 합성, ZAP Expression Vector에 구축, laccase 항체로 선발 및 *E. coli* XL0LR로 도입하여 laccase 생산 클론을 선발하였고 염기서열을 결정하여 laccase 유전자의 특성을 분석하였다.

다. *T. rubrum* LKY-7 laccase inducer의 탐색, laccase의 생산 및 정제, 특성 규명

T. rubrum LKY-7의 laccase 생산에는 참나무 목분 첨가가 효과적이었으며 ca-alginate beads에 고정화시킨 균주로부터 laccase 반 연속생산이 가능하였다. laccase를 분리하여 3 step chromatography로 정제하여 그 특성을 규명하였다.

3. 기술발전에의 기여도

가. *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해에 활성 확인

T. rubrum LKY-7가 생산한 laccase는 지금까지 국내·외에서 보고된 것과는 다른 특성을 가지며, 소량의 MnP와 LiP를 생산하고 있다는 점 등이 분야의 기술발전에 크게 기여할 것이다.

나. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자의 클로닝 및 특성

T. rubrum LKY-7로부터 클로닝된 laccase 유전자는 아직 보고되지 않은 새로운 유전자이기 때문에 앞으로의 활용가치는 물론 기술발전에 기여도가 크리라 생각된다.

다. *T. rubrum* LKY-7 laccase inducer의 탐색과 laccase의 대량 분리 및 정제

T. rubrum LKY-7 균주는 참나무 목분 첨가에 의하여 강한 laccase 유도효과를 나타내므로 고정화된 균주를 이용하여 laccase의 연속적인 대량생산이 가능하다. 또한 TrL은 강한 mediator 산화능을 보여주므로 laccase/mediator system에 활용이 유리할 것으로 생각된다.

제 2 절 2년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표
2차년도 (2002)	TrL 유전자 domain의 구조 및 기능 분석
	TrL redox potential 과 리그닌 분해능과의 관계 구명
	TrL에 의한 화학펄프 표백에 우수한 새로운 mediator의 개발

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도(점수)
2차년도 (2002)	○ <i>T. rubrum</i> LKY-7 laccase유전자 domain의 구조 및 기능 구명	30
	○유전자 변형에 의하여 펄프표백에 우수한 laccase의 개발	40
	○펄프 표백에 우수한 mediator의 개발	30

2. 연구개발 목표의 달성도

가. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 분석

TrLKY-7으로부터 분리된 laccase (lacA)는 다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역이 확인되었으며, 현재까지 보고된 곰팡이 유래 laccase 유전자는 약 20여종과는 다른 서열을 보였다. 활성이 증대되지는 않았지만, 다섯 번째 부분의 domain이 결손된 laccase 유전자를 만들었다.

나. 유전자 변형에 의하여 펄프표백에 우수한 laccase의 개발

다른 곰팡이의 laccase 유전자와 고도로 conserve한 5개의 지역 중에서 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산과 conserve하지 않은 아미노산을 선정하여 site-directed mutagenesis에 의하여 다른 아미노산으로 대체하고 pET-36벡터에 구축, 생산된 laccase를 one-step purification하였다. 본 연구에서 다른 유전자와 고도로 conserve한 아미노산이 변화되었을 경우에는 laccase 활성이 전혀 없고, 다른 유전자와 conserve하지 않은 아미노산이 변화되었을 경우에는 laccase 활성이 검출은 되지만 감소된다는 것을 발견하였다. 그러나 laccase 활성이 증대된 클론은 얻지 못하였다.

다. 펄프 표백에 우수한 mediator의 개발

N-OH 그룹을 함유하고 있는 N-hydroxy-2-pyridone analogues로부터 TrL-based laccase/mediator system에 적합하고 우수한 펄프 표백성을 갖는 NHP.1을 선발하였다.

3. 기술발전에의 기여도

가. *T. rubrum* LKY-7 laccase 유전자 domain의 구조 및 기능 구명

이 laccase 유전자가 5개의 중요 지역이 있다는 것과 특정 domain을 제거한 변이체 laccase를 얻은 점 등은 새로운 효소를 인위적으로 만드는 단백질 공학분야에 실질적인 정보를 제공할 것이다.

나. 유전자 변형에 의하여 펄프표백에 우수한 laccase의 개발

이번 연구에서 펄프표백에 우수한 laccase유전자는 얻지 못하였지만 site-directed mutagenesis에 의해서 얻어진 10개의 변이 유전자는 앞으로 laccase catalysis domain의 기능 분석, laccase 단백질 구조와 활성과의 관계 등을 분석하는데 중요한 기초 자료가 되리라 생각된다.

다. 펄프 표백에 우수한 mediator의 개발

새로 선발된 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 NHP.1은 값이 싸고 수용성이기 때문에 laccase/mediator system에 적용이 기존의 mediator에 비하여 훨씬 용이하다.

제 3 절 3년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표
3차년도 (2003)	화학펄프의 표백에 더 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 <i>Bacillus</i> sp.의 개발 유전적 재조합 효모에서의 laccase 대량생산 체계 확립 Xylanase, laccase/mediator의 혼합 혹은 연속처리에 의한 화학 펄프 표백체계 확립

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도(점수)
3차년도 (2003)	○Xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 <i>Bacillus</i> sp.의 개발	40
	○유전적 재조합 효모를 이용한 laccase의 대량 생산 체계 확립	30
	○Xylanase, laccase/mediator의 혼합 혹은 연속 처리에 의한 화학펄프 표백체계 확립	30

2. 연구개발 목표의 달성도

가. 펄프 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

펄프표백에 사용되는 laccase와 xylanase를 세포배양액으로 직접 분비하는 재조합 세균을 만들었고, 이들이 생산 후 원래효소의 크기를 유지하고 있음을 확인하였다.

나. 유전적 재조합 효모를 이용한 laccase의 대량생산 체계 확립

Laccase 유전자를 pGAPZ@에 구축하고 *Pichia pastoris*에 형질전환시켜서 PCR, southern blot hybridization에 의하여 도입 유전자를 확인하고 laccase를 배양여액으로 분비한 형질전환균주를 선발하였으며 배양기간에 따른 laccase 생산능을 조사하였다.

다. Xylanase, laccase/mediator의 혼합 혹은 연속처리에 의한 화학펄프 표백효과 증진

활엽수 및 침엽수펄프를 xylanase와 TrL/mediator로 동시에 혼합처리하였을 때가 연속처리 시보다 표백효과가 컸으며 특히 활엽수펄프의 경우 우수한 백색도 증가와 kappa number 감소효과를 가져왔다.

3. 기술발전예의 기여도

가. 펄프의 표백에 효과적인 xylanase와 laccase를 분비하는 재조합 *Bacillus* sp.의 개발

T. rubrum LKY-7 laccase 유전자와 내열성 xylanase 유전자를 세균 *Bacillus subtilis* 단백질분해효소돌연변이주에 도입하여 발현한 기술은 생산된 효소 자체 뿐 만 아니라, 다른 외래단백질의 숙주로서의 활용기술에 크게 기여할 것이다.

나. 유전적 재조합 효모를 이용한 laccase의 대량생산 체계 확립

*Pichia pastoris*에 laccase유전자의 도입, 발현은 다른 분야의 기술 발전에 대한 기여도가 크지 않지만 앞으로 펄프표백에 이용할 laccase의 상업적 생산에 대한 기여도가 크리라 생각된다.

다. Xylanase, laccase/mediator의 혼합 혹은 연속처리에 의한 화학펄프 표백효과 증진

활엽수펄프의 표백에서 xylanase와 TrL/mediator로 혼합처리를 염소화 단계에 적용시킴으로서 염소사용량을 감소시킬 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 *T. rubrum* LKY-7의 리그닌분해시스템 구명 및 xylanase와 laccase 생산 *Bacillus* sp.의 개발

가. 추가 연구의 필요성

- 1) Laccase 생산을 증대시키기 프로모터 개발
- 2) Xylanase 생산을 증대시키기 위한 프로모터 개발
- 3) 배양액 농축 기술 개발

나. 타 연구에의 응용

- 1) 효율적 펄프 표백을 위한 효소재료 생산 및 공급
- 2) Laccase의 기능 개선
- 3) 다른 종류의 외래 단백질 발현시스템 적용

제 2 절 *T. rubrum* LKY-7으로부터 laccase 유전자의 클로닝 및 특성과 *Pichia pastoris*에 도입, 발현

가. 추가 연구의 필요성

- 1) Laccase의 프로모터, signal sequence 등을 구명
- 2) Laccase를 더 저렴한 가격으로 대량생산할 수 있는 배지 및 배양 조건 확립
- 3) 형질전환 *Pichia pastoris*에서 리그닌 분해에 관련된 다른 효소의 생산여부 확인
- 4) 생산된 laccase를 펄프표백에 이용할 경우의 경제성 분석

나. 타 연구에의 응용

- 1) 리그닌 분해기작 구명

- 2) laccase의 단백질 구조 및 특성 구명
- 3) 유전자 변형에 의한 펄프 표백에 더 효과적인 laccase의 생산

제 3 절 TrL/mediator system 혹은 xylanase와 TrL/mediator system에 의한 펄프 표백 체계 확립

가. 추가 연구의 필요성

- 1) TrL의 고정화 방법을 검토하여 laccase의 연속생산체계 확립
- 2) TrL/NHP.1 system에 의한 침엽수 펄프표백 시 백색도 향상과 kappa number감소를 보다 증진할 수 있는 방법 모색
- 3) 비목질계 펄프에 대한 TrL/NHP.1 system의 표백효과 검토

나. 타 연구에의 응용

- 1) 다른 백색부후균으로부터 리그닌 분해효소의 생산, 분리, 정제
- 2) ECF 표백에 적용
- 3) 환경친화적인 biopulping 및 biobleaching
- 4) 저급 인쇄용지의 백색도 향상

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생물학적 펄프표백에 이용되는 ligninolytic enzymes 중에서 laccase는 다른 효소에 비하여 생산이나 취급, 적용이 매우 용이하여 효과적으로 이용할 수 있기 때문에 laccase/mediator system에 의한 생물학적 펄프표백에 많은 관심이 집중되고 있다. 현재 laccase/mediator system은 소규모 pilot plant에 적용되기도 하지만 백색도 증가나 kappa number 감소면에서 보면 기존의 화학 펄프 표백단계에 직접 적용할 수 있는 수준은 아니다. 그래서 최근까지도 우수한 laccase와 효과적인 mediator 선발 및 이들의 ligninolytic system에서의 분해기작에 관한 연구가 계속 진행되고 있다.

전통적인 펄프표백에 있어서 일반적으로 kappa number의 감소는 백색도 증가를 수반하게 되는데 laccase-based 펄프표백에 있어서는 kappa number 감소가 꼭 백색도 증가를 가져오지 않는다. 이는 표백과정중에 펄프에 부착된 laccase-mediator 혹은 분해산물의 absorbance와 관련이 있는 것으로 보고되었다. 이는 laccase-mediator가 분해되면서 발색단을 형성할 수 있고 이들 발색단이 펄프의 백색도를 감소시키는 것으로 최초의 laccase-mediator로 보고된 ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenziazolone-6-sulfonanic acid)]의 예에서 확인할 수 있다. 즉 laccase/ABTS로 펄프를 처리했을 때 lignin은 현저히 분해되는데도 펄프의 백색도는 감소하게 된다. 더구나 표백처리 후 추출단계에서 과산화수소가 주로 mediator나 분해산물에 의해서 소비되게 되면 이는 백색도를 감소시키고 다시 kappa number를 증가시키는 결과를 가져올 수 있다고 보고되었다. 본 연구에서 TrL의 mediator로 선발된 NHP.1은 표백결과에서 보는 바와 같이 kappa number 감소와 함께 백색도의 증가를 가져와 mediator의 분해산물이 백색도에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 생각되었다.

Laccase-mediator의 수용성은 laccase-mediator system을 펄프 표백에 적용시킬 때 가장 중요한 인자중의 하나다. 지금까지 보고된 대부분의 laccase-mediator는 dimethylformamide와 같은 유기용매에 용해시켜 펄프에 적용시켰다. NHA derivatives 중에서 NNPH는 수용성이면서 표백 후처리에

상관없이 펄프표백에 있어서 NHA만큼 표백효과를 나타낸다고 보고되었으며, 이는 처음으로 수용성 laccase-mediator가 laccase-based 펄프표백에 효과적으로 작용할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Amann, M. 1997. The lignozym process-coming closer to the mill, p. F(4-1). 9th International symposium on Wood and Pulping Chemistry, Montreal, Canada.
2. Ahn, D.H, H. Kim and M.Y. Pack. 1997. Immobilization of glucosidase using the cellulose-binding domain of *Bacillus subtilis* endo-1,4-glucanase. *Biotechnol. Lett.* 19:483-486.
3. Bajpai P. 1999. Application of enzymatic in the pulp and paper industry. *Biotech. Prog.* 15, 147-157.
4. Bermek, H., K. Li, and K.-E. L. Eriksson 1998. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *J. Biotechnol.* 66:117-124.
5. Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates:An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
6. Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1996. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J.* 79(6): 199-204.
7. Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 61:1876-1880.
8. Bourbonnais R, Rochefort, D, Paice, MG, S. Renaud & D. Leech. 2000. Development of stable redox complexes to mediate delignification of kraft pulp by laccase. in 219th ACS national meeting. San Francisco, USA.
9. Call, H. P., and I. Muke. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym process). *J. Biotechnol.*53:163-202.
10. Chen, C.-L., and H.-M. Chang. 1985. Chemistry of lignin biodegradaton,

- p. 535-555. In T. Higuchi(ed.), Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press, Inc.
11. Choi, G. H., T. G. Larson, and D. L. Nuss. 1992. Molecular analysis of the laccase from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain Mol. Plant-Microbe Interact. 5:119-128.
 12. Chrostensen, T., H. Woldike, E., Boel, S. B. Moritensen, K. Hjortshøj, L. Thim, and M. T. Hansen. 1988. High level expression of recombinant genes in *aspergillus oryzae*. Biotechnology 6 : 1419-1422.
 13. Coll, P. M., C. Taberner, R. Santamaria, and P. Perez. 1993. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated lignolytic basidiomycete PM1 (CECT2971). Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4129-4135.
 14. Coll, P. M., J. M. Fernandez-Abalos, J. R. Villanueva, R. Santamaria, and P. Perez 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1(CECT 2971). Appl. Environ. Microbiol. 59:2607-2613.
 15. Cramer A, S.A. Raillard, E. Bermudez and W.P. Stemmer. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature. 391(6664): 288-91.
 16. Cui, F., and D. Dolphin 1990. The role of manganese in model systems related to lignin biodegradation. Holzforschung. 44:279-283.
 17. Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. Journal of Biotechnology 53 : 273-289.
 18. Doolittle, R. F. 1995. The multiplicity of domains in proteins. Annu Rev Biochem. 64: 287-314.
 19. Eggert, P. R., Lafayette, U. Temp, K. L. Eriksson, and Jeffrey F. D. Dean. 1998. Molecular Analysis of a Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl. Environ Microbiol. 64(5) : 1766-1772
 20. Eggert, C., U. Temp, J. F. Dean, and K.-E. L. Eriksson. 1996. A fungal

- metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Lett 391:144-148.
21. Eggert, C., U. Temp, and K.-E. L. Eriksson. 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Lett. 407:89-92.
 22. Eggert, C., U. Temp, and K.-E. L. Eriksson. 1996. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase., p. 130-150. In ACS Symposium Series 655, Enzymes for pulp and paper processing. American Chemical Society, Washington, D. C.
 23. Eggert, C., U. Temp, and K.-E. L. Eriksson. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Appl Environ Microbiol 62:1151-1158.
 24. Eriksson, K.-E., R. A. Blanchette, and P. Ander 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, New York.
 25. Farver, O., M. Goldberg, S. Wherland, and I. Pecht 1978. Reductant-dependent electron distribution among redox sites of laccase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:5245-5249.
 26. Felsenfeld, G. 1960. The determination of cuprous ion in copper proteins. Arch Biochem Biophys. 87:247-251.
 27. Fukushima, Y., and T. K. Kirk 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Appl Environ Microbiol. 61:872-876.
 28. Germann, U. A., G. Muller, P. E. Hunziker, and K. Lerch 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. J Biol Chem 263:885-896.
 29. Giardina, P., R. Cannio, L. Martirani, L. Marzullo, G. Palmieri, and G. Sannia. 1995. Cloning and Sequencing a Laccase Gene from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ.

- Microbiol. 61(6) : 2408-2413.
30. Glenn, J. K., M. A. Morgan, M. B. Mayfield, M. Kuwahara, and M. H. Gold 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:1077-1083.
 31. Harayama S. (1998) "Artificial evolution by DNA shuffling", Trends Biotechnol. 16(2): 76-82.
 32. Hofer, C., and D. Schlosser 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. FEBS Lett. 451:186-190.
 33. Iimura, Y., K. Takenouchi, M. Nakamura, S. Kawai, Y. Katayama, and N. Morohoshi. 1992. Cloning and sequence analysis of laccase genes and its use for an expression vector in *Coriolus versicolor*, p. 427-431. In M. Kuwahara and M. Shimada (ed.), biotechnology in pulp and paper industry. Uni Publisher Co., Ltd., Tokyo.
 34. Jung, J. S., Park, S. K., Kim, H. 1999. *Chromobacterium violaceum* chitinase의 chitin 결합 domain의 특성과 섬유소 결합 domain으로의 치환. 한국분자생물학회 추계학술대회.
 35. Jonsson, L. J., M. Saloheimo & M. Penttila. 1997. Laccase from the the white-rot fungus *Trametes versicolor*. cDNA cloning of *lccI* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* 32, 425-430.
 36. Jossen, L., K. Sjostrom, I. Haggstrom, and P. O. Nyman. 1995. Character-ization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim. Biophys. Acta* 1251 : 210-215.
 37. Jung, H. C., S. K. Park, B. S. Kim and C. Y. Park. 1995. Screening and evaluation of wood-rotting fungi for lignin degradation and ligninolytic enzyme production. *J. Kor. W. Sci. Tech.* 24(4):74-80.
 38. Jung, H. C., F. Xu and K. Li. 2001. Purification and characterization of *Trichopyton rubrum* LKY-7 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
 39. Kikuchi M., K. Ohnishi and S. Harayama. 2000 An effective family

- shuffling method using single-stranded DNA. *Gene*. 243(1-2): 133-137.
40. Kim H., D.H Ahn, K.H Jung and M.Y. Pack. 1997. Adsorption of *Bacillus subtilis* endo-1,4-glucanase to cellulosic materials. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41: 665-677.
 41. Kim H., K. H. Jung and M.Y. Pack. 2000. Molecular characterization of *xynX*, a gene encoding a multidomain xylanase with a thermostablizing domain from *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 521-527.
 42. Kim G.J., Y.H. Cheon and H.S. Kim. 2000. Directed evolution of a novel N-carbamylase/D-hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability. *Biotechnol Bioeng.* 68(2): 211-7.
 43. Kim H., M. Goto, H. J. Jeong, K. H. Jung, I. Kwon and K. Furukawa. 1998. Functional analysis of a hybrid endoglucanase of bacterial origin having a cellulose binding domain from a fungal exoglucanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75: 193-204.
 44. Kim Y. S., H. C. Jung and J. G. Pan. 2000. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):788-93.
 45. Kirk, T. K., E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, and J. G. Zeikus 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism on *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117:277-285.
 46. Kojima, Y., Y. Tsukuda, Y. Kawai, A. Tsukamoto, J. Sugiura, M. Sakaino, and Y. Kita 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Bacteriol.* 265:15224-15230.
 47. Kuwahara, M., J. K. Glenn, M. A. Morgan, and M. H. Gold 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169:247-250.
 48. Leontievsky, A., N. Myasoedova, N. Pozdnyakova, and L. Golovleva.

1997. Yellow laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. FEBS Lett. 413:446-448.
49. Li, K., P. Horanyi, R. Collins, R. S. Phillips, and K.-E. L. Eriksson 2000. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Enzyme Microb. Technol.:In press.
50. Li, K., F. Xu, and K. E. Eriksson 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Appl Environ Microbiol. 65:2654-2660.
51. Matsumura I. and A.D. Ellington. 1999. In vitro evolution of thermostable p53 variants. Protein Sci. 8(4): 731-40.
52. Messerschmidt 1993. Blue copper oxidase. Adv. Inorg. Chem. 40:121-185.
53. Messerschmidt, A. (ed.) 1997 Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore.
54. Morpurgo, L. 1987. The copper sites of laccases. Life Chem Reports. 5:277-288.
55. Oksanen T., M. Amann, A. Candussio, A. Buchert and L. Viikarir. 1997. Role of xylanase in laccase-mediator delignification of kraft pulps. in 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Montreal, Canada, G3-1.
56. Otterbein, L., E. Record, S. Longhi, M. Asther and S. Moukha. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. Eur. J. Biochem. 267 : 1619-1625
57. Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso, and G. Sannia 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. J. Biol. Chem. 272:31301-31307.
58. Park S. K. and G. E. Harmann. 1998. Cloning, sequencing and expression of a *Chromobacterium violaceum* endochitinase gene in *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).

59. Park, S. K. and G. E. Harmann. 1998. Production of a *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
60. Park, S. K., Jung, J. S., Kim, H. 1999. Structure of a *Chromobacterium* sp. Strain C-61 Chitinase Gene and Function of Its Domains. Molecules and cells(ABSTRACT)
61. Park, S. K., K. B. Park, Y. J. Kim. 1999. Role of Domains of a Chitinase from *Chromobacterium* sp. Strain C-61 in Chitin Degradation. Korean J. Plant Pathol(ABSTRACT).
62. Park, S. K., Y. C. Lee, J. S. Jung. 1999. Strategy for Maximal Production and Single-Step Purification of a *Chromobacterium* sp. Strain C-61 Chitinase in *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol(ABSTRACT).
63. Perry, C. R., M. Smith, C. H. Britnell, D. A. Wood, and C. F. Thurston. 1993. Identification of two laccase gene in the Cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. J. Gen. Microbiol. 139 : 1209-1218
64. Perry, C. R., S. E. Matcham, D. A. Wood, and C. F. Thurston 1993. The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. J Gen Microbiol. 139:171-178.
65. Reinhammar, B. 1984. Laccase, p. 1-35. In R. Lonties (ed.), Copper proteins and copper enzymes, vol. III. CRC Press, Boca Raton, Florida.
66. Ruttimann-Johnson, C., E. Schwember, L. Salas, D. Cullen, and R. Vicuna 1992. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnol. Appl. Biochem. 16:64-76.
67. Ryu, DD, Nam, DH. (2000) "Recent progress in biomolecular engineering", Biotechnol Prog. 16(1): 2-16.
68. Safir, S., J. M. Beale, Jr., and J. P. Rosazza. 1984 Oxidation of rotenone by *Polyporus anceps* laccase. J. Nat. Prod. 47(4):692-697.
69. Saloheimo, M., M. Leena, and N. Paavola. 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebid radiata*

- laccase gene in *Trichoderma reesei*. Bio/Technology 9 : 987-990.
70. Saloheimo, M., M. L. Niku-Paavola, and J. K. Knowles 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin- degrading fungus *Phlebia radiata*. J Gen Microbiol. 137:1537-1544.
 71. Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev. 96:2563-2605.
 72. Srebotnik, E., J. Kenneth A. Jensen, and K. E. Hemmel. 1994. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12794-12797.
 73. Srebotnik, E., K. A. Jensen Jr., S. Kawai, and K. E. Hammel 1997. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structures by a one-electron-oxidation mechanism. Appl. Environ. Microbiol. 63:4435-4440.
 74. Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140:19-26.
 75. Tien, M., and T. K. Kirk 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science. 221:661-663.
 76. Wackett L. P. 1998. Directed evolution of new enzymes and pathways for environmental biocatalysis. Ann N Y Acad Sci. 864:141-152.
 77. Wessels, J.G.H., Mulder, G.H. & Springer, J.(1987) Expression of dikaryon-specific and non specific mRNAs of *Schizophyllum commune* in relation to environmental conditions and fruiting. J. Gen. Microbiol. 133, 2557-2561.
 78. White, E.C., and J.H. Hill. 1943. Studies on antibacterial products formed by molds. I. Aspergillic acid, a product of a strain of *Aspergillus glavus*. J. Bacteriol. 176(3):656-664.
 79. Williamson, P. R. 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. J Bacteriol. 176:656-664.

80. Xirodimas D.P. and D.P. Lane. 1999. Molecular evolution of the thermosensitive PAb1620 epitope of human p53 by DNA shuffling. *J Biol Chem.* 274(39): 28042-9.
81. Xu, F. 1999. Laccase, p. 1545-1554. In M. C. Flickinger, and S. W. Drew (eds), *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.* John Wiley & Sons, Inc.
82. Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials, as well as halide inhibition. *Biochemistry.* 35:7608-7614.
83. Xu, F., A.E. Palmer, D.S. Yaver, R.M. Berka, G.A.Gambetta, S.H. Brown & Solomon. E.I.(1999) Targeted mutations in a *Trametes villosa laccase.* *J. Biol. Chem.* 274, 12372-12375.
84. Xu, F., J. J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H. J. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte, and P. Schneider. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056.
85. Xu, F., R.M. Berka, J.A. Wahleithner and B.A. Nelson. 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profil. *Biochem. J.* 334. 63-70.
86. Xu, F., W. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, and E.I. Solomon 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity and stability. *Biochim Biophys Acta.* 1292:303-311.
87. Yano T, S. Oue and H. Kagamiyama.. 1998. Directed evolution of an asparatate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(10): 5511-5515.
88. Yaropolov, A. I., O. V. Skorobogat'ko, S. S. Vartanov, and S. D. Varfolomeyev 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism, and application. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49:257-280.

89. Yaver, D. S., F. Xu, E. J. Golightly, K. M. Brown, S. H. Brown, M. W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf, and H. Dalboge 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:834-841.
90. Yoshioka, T., H. Ohno, and T. Uematsu. 1996. Pyruvate dehydrogenase complex-catalyzed formation of M-arylaceto hydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in rat isolated cells and perfused organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(3):1282-1289.
91. Yoshioka, and T. Uematsu. 1998. Formation of N-acylhydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in isolated spinach leaf cells. *J. Agric. Food Chem.* 46(2):606-610.
92. Zhao H., and F.H. Arnold. 1997 Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(15):7997-8000.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.