

주걱송편버섯(*Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3)의 Laccase에 의한 Acridine 산화

이현수 · 한만덕 · 윤경하*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학과

Acridine은 fungal laccase의 기질이 아님에도 불구하고 acridine을 *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3 배양액에 첨가했을 때 acridone으로 산화되었다. *P. cinnabarinus* SCH-3 균주는 배양 중에 다량의 laccase와 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)와 cinnabarinic acid (CA)를 생성했다. 정제된 laccase와 acridine을 완충용액에서 직접 반응시켰을 때 acridine은 변화되지 않았다. 그러나 laccase의 기질인 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)나 3-HAA를 laccase와 acridine 혼합액에 첨가했을 경우에는 acridine이 acridone으로 산화되었다. 특히 ABTS 첨가구는 3-HAA 첨가구보다 acridine 산화율이 2배 이상 높았다. 한편 정제된 laccase와 3-HAA를 완충액에서 반응시켰을 때 3-HAA는 CA로 전환되었다. 이와 같은 실험결과들은 *P. cinnabarinus* SCH-3의 laccase가 배양 중에 생산된 3-HAA를 매개체로 사용하여 acridine을 acridone으로 산화하고 CA는 laccase에 의하여 3-HAA로부터 합성됨을 나타낸다.

Key words □ 3-hydroxyanthranilic acid, acridine, acridone, cinnabarinic acid, laccase, *Pycnoporus cinnabarinus*

Acridine (benzo[b]quinoline)은 coal tar에서 최초로 분리된 수용성의 무색고체로 염료와 몇몇 약제 제조에 원료로 사용된다(11). Acridine은 공기, 담수, 해수, 담수퇴적물, 지하수, 폐수 등 다양한 곳에서 발견되고(21, 22) 생물체에 독성, 돌연변이, 기형, 암을 유발시킬 수 있는 유해한 물질로 알려져 있다. Acridine은 *Salmonella typhimurium*과 Chinese hamster 세포의 염색체를 변이시키고(15, 23), 특히 수중에서는 몇몇 어류의 체내에 축적되어 물질대사에 해를 끼칠 뿐만 아니라 열록말홍합의 생식작용과 단세포녹조류의 성장을 억제하고 섬모충류와 물벼룩, 갈따구 등의 유충을 죽이는 등 수중생태계에 심각한 영향을 끼친다(2, 3, 13).

Laccase (EC 1.10.3.2)는 구리(Cu)를 포함하는 polyphenol oxidase로 균류, 식물, 곤충 등에 광범위하게 분포한다(16). 특히 lignin을 합성하는 목재와 lignin을 분해하는 균류 등에 많이 존재한다. Laccase는 lignin의 생합성, 식물의 병원성, 식물세포벽의 분해, 곤충의 경화(sclerotization)등 다양한 기능을 갖는데 laccase의 이러한 기능들은 방향족물질(aromatic substances)의 산화와 관련이 있다(1, 14, 24). 그러나 이러한 산화의 효과는 매우 다를 수 있다. 심지어는 반대방향으로 작용할 수 있다. 예를 들면 식물의 laccase는 monolignols를 산화하여 polymeric lignins를 형성하는데 반하여 백색부후균의 laccase는 lignin을 분해하고 탈중합화한다. 최근에 lignin 생합성과정에서 laccase 생성과 역할에 대하여 재검토 되었는데(7) laccase는 phenolic 기질이나 aromatic amine과 같은 물질들을 산화하고 일반적으로 nonphenolic 화합물을 산화하지 못한다고 하였다. 그러나 최근에 mediator라고 하는

저분자량 화합물의 존재 하에서 laccase가 nonphenolic 화합물을 포함하여 광범위한 aromatic lignin model 화합물을 산화할 수 있다는 것이 보고되었다(4). 이와 같은 laccase-mediator 개념의 근거는 효소에 의하여 유리기(redical)로 산화되는 저분자량의 화합물을 사용하는 것이다. 이렇게 생성된 유리기는 산화환원매개체(redox mediator)로 작용하여 laccase의 기질이 아닌 다른 화합물을 산화한다는 것이다. 최근에는 최초의 laccase의 mediator로 사용된 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)와 1-hydroxybenzotriazole (HBT), violuric acid (VIO), 그리고 N-hydroxyacetanilide (NHA) 등과 같은 인공 mediators와 aceto-syringone, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, 그리고 aniline 등과 같은 천연 mediators를 이용하여 nonphenolic 물질 산화기작 연구가 활발하게 진행되고 있다(5, 12). 특히, Eggert 등(8)은 주걱송편버섯(*Pycnoporus cinnabarinus*)에서 laccase의 mediator인 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)가 생산됨을 밝히고 이러한 mediator 하에서 laccases가 veratryl alcohol과 1,2-diarylpropane-1,3-diol과 같은 nonphenolic lignin model 화합물을 산화할 수 있다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 laccase와 3-HAA를 생산하는 주걱송편버섯(*P. cinnabarinus* SCH-3)을 이용하여 생체에 유해한 acridine을 어떻게 산화하는지를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용된 주걱송편버섯(*Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3)은 1998년 경기도 청평에서 채취하여 동정한 백색부후균류로써

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-530-1250, Fax: 82-41-530-1256
E-mail: kyungha@sch.ac.kr

배양 중에 lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, tyrosinase 등을 배지로 생산하지 않고 다량의 laccase와 극소량의 peroxidase를 생산하는 균주이다(20).

균주를 실험에 사용할 때는 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco) 배지의 중앙에 소량의 균사체를 접종하여 28°C에서 8일간 배양한 후 포자를 채취하여 포자 현탁액(9.6×10^7 spores/ml)을 만들고, 이것을 접종원으로 사용하였다. 균주의 배양은 Eggert 등(10)의 배지(3 g glucose, 1 g KH_2PO_4 , 0.26 g NaH_2PO_4 , 0.317 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g $\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2 g $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, 0.5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 74 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,000 ml DW, pH 4.5)를 기본배지로 사용하여 포자현탁액 10 ml를 접종한 후 진탕배양기(Operon-SI-130C)에서 28°C, 100 rpm으로 배양하였다.

Laccase 정제

Laccase의 정제는 박 등(20)의 방법에 따라 실시하였다. 기본 배지에서 8일간 배양한 배양액을 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 10 min)하고 상등액을 milipore filter (0.45 μm filter)로 여과하였다. 그 후 여과액을 ultrafiltration system (10,000 Da membrane, Amicon 8400)을 사용하여 6 ml로 농축한 후 증류수로 연속 투석하고, 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.0, KPB)으로 재투석 하였다. 투석액을 동일한 완충액으로 평형화된 DEAE-cellulose column (1×15 cm)에 적재하고 50 mM과 100 mM KPB (pH 6.0)를 단계적으로 적용하여 0.3 ml/min로 용출 시켰다. 용출된 분획 가운데 laccase의 활성을 나타내는 용출 분획을 선택하고 ultrafiltration system을 이용하여 3 ml로 농축하였다.

Acridine 산화

용량 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 기본배지를 넣고 1 ml의 포자현탁액을 접종하여 2일간 진탕배양한 후 0.1 mM acridine을 첨가하였다. 그 후 2일 간격으로 1 ml 배양액을 채취하여 4 ml ethyl acetate (EA)로 추출, 여과(PVDF syringe filter, 0.45 μm , Whatman)하여 배양액내에서의 acridine의 산화정도를 HPLC로 분석하였다. 한편 정제된 laccase가 acridine을 산화하는지를 확인하기 위하여 반응액[0.1 mM acridine, 50 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0), 0.4 U/ml laccase]을 제조한 후 1 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)나 1 mM 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)를 각각 첨가한 실험구(experiment)와 ABTS나 3-HAA를 첨가하지 않은 대조구(control)를 사용하여 24시간 반응시킨 후 반응물을 HPLC로 분석하였다.

3-HAA 생성과 CA의 형성

균주의 배양 과정 중에 배지내에 3-HAA와 cinnabarinic acid (CA)의 생성을 조사하기 위하여 균주를 100 ml 기본배지에서 진탕배양하면서 2일 간격으로 배양액을 채취하여 4°C에서 10분간 15,000 rpm으로 원심분리한 후, 상등액을 UV-분광광도계를 이용하여 200에서 600 nm까지의 흡광도를 측정하고, 동시에 상등액을 EA로 처리하여 HPLC로 정량하였다. 한편 상등액을

Freeze dryer ED5508 (ED5508, Ilshin Lab Co.)로 농축한 후 농축물을 methanol로 녹여 TLC용 silica gel plate (GF grade, Uniplat, Analtech) (200×200 mm)에 점적하여 butanol:acetic acid:water (4:2:1)로 전개하여 분석하였다.

배양과정 중에 생산되는 3-HAA가 CA로 전환되는지를 확인하기 위해 1 mM 3-HAA와 정제된 laccase (400 U/ml)를 50 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0)에서 반응시킨 후 HPLC로 분석하였다.

분석

배양중인 배지내의 포도당량은 dinitrosalicylic acid 방법(18)으로 측정하였다. Laccase 활성은 ABTS를 기질로 사용하여 Niku-Paavola 등(19)의 방법으로 측정하였고 효소 활성의 단위는 1분간 1 μM 의 ABTS를 산화하는데 사용된 효소의 양으로 표시하였다. Acridine과 acridone의 정량은 Sigma 사의 acridine과 Aldrich 사의 9(10H)-acridone을 표준품으로 사용하여 HPLC (shimadzu, SPD-10A)로 분석하였다. 정량조건은 다음과 같다. $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$ C₁₈ revers phase column (3.9×300 mm, 5 μm , Waters), 254 nm에서 이동상으로 acetonitrile:water (85:15, v/v)을 이용하여 1 ml/min 유속으로 15분간 분석하였다.

3-HAA양은 Aldrich 사 제품을 표준품으로 사용하여 HPLC로 정량하였고, CA는 Eggert 등(8)의 방법을 사용하여 흡광도와 HPLC로 정량하여 표시하였다. 3-HAA와 CA의 분석을 위한 HPLC 조건은 위와 같은 조건에서 methanol:Water (85:15, v/v) 이동상에 0.086%의 phosphoric acid를 첨가하여 분석하였다.

결 과

배양환경의 변화

P. cinnabarinus SCH-3를 0.3% 포도당을 포함한 기본배지에서 28°C로 진탕배양 하였을 때, 배양 초기에 무색이었던 배지가 2일이 지나면서 연한 노란색을 거쳐 6일경에는 짙은 갈색으로 변화하였다. Laccase 활성은 2일부터 나타나기 시작하여 배양 10일에 최고치를 나타냈다. 포도당은 계속적으로 감소하였고 3-HAA는 배양초기부터 나타나기 시작하여 배양 4일에 최고치를 나타낸 후 급격히 감소하여 배양 8일에는 별 변화가 없었다. 한편 CA는 효소활성과 더불어 계속적으로 증가하였다(Fig. 1).

배지내에서 acridine 산화

균주배양 2일째에 acridine을 배지에 첨가한 후, 2일 간격으로 배양액을 채취하여 acridine과 산화물인 acridone을 HPLC로 측정한 결과, 배양기간 중 acridine은 배양 4일부터 8일까지 크게 감소하였고, acridone은 배양 6일부터 10일까지 크게 증가하였다(Fig. 2). 배양 중에 acridine의 산화율을 보면 laccase 활성이 높을 때 acridine 산화율도 높았다. 즉, 효소활성이 27.14 U/L일 경우에 산화율은 24.72%였고 효소활성이 41.81 U/L일 때 산화율은 42.49%였다(Table 1).

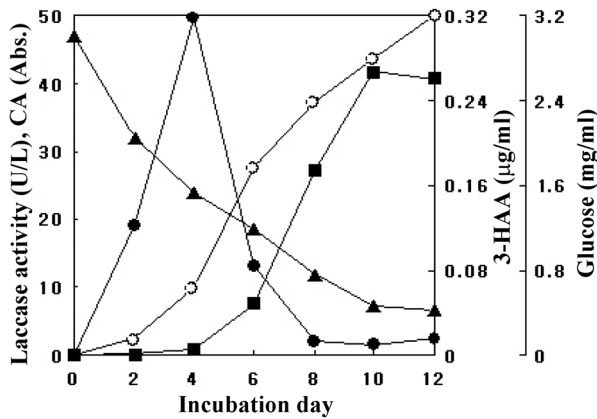


Fig. 1. Time course of the enzyme activities, glucose, 3-HAA and CA in the extracellular fluid of *P. cinnabarinus* SCH-3 grown in the basal medium. (■) laccase activity, (▲) glucose, (●) 3-HAA, (○) CA.

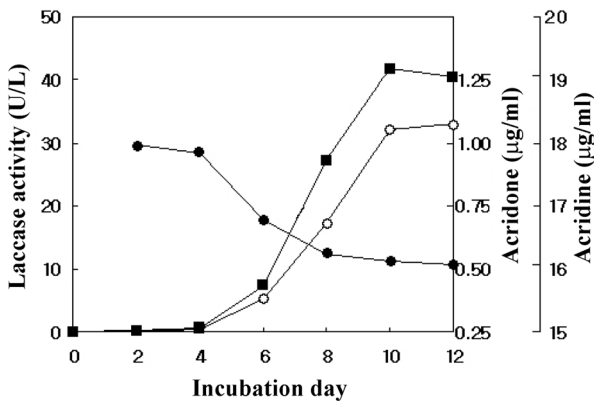


Fig. 2. Oxidation of acridine in the liquid culture of *P. cinnabarinus* SCH-3. (■) laccase activity, (●) acridine, (○) acridone.

Laccase에 의한 acridine 산화

Acridine이 laccase와 직접적으로 반응하는지를 알기 위하여 *P. cinnabarinus* SCH-3로부터 정제된 laccase를 50 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0) 용액에서 acridine과 반응시켰다. 그 결과 acridine은 전혀 acridone으로 전환되지 않았고, 여기에 1 mM의 3-HAA나 ABTS를 각각 첨가했을 때는 acridine이 acridone으로 전환되었다. 특히 ABTS나 3-HAA의 농도를 증가시켰을 때

Table 1. Oxidation of acridine in the liquid culture of *P. cinnabarinus* SCH-3

Culture time (day)	Laccase activity (U/L)	Concentration (µg/ml)		(%)
		AC	AD	
0	0	18	0	0
2	0.13	17.98	0.001	0.06
4	0.64	17.85	0.013	8.85
6	7.48	16.78	0.133	10.85
8	27.14	16.24	0.435	24.72
10	41.81	16.11	0.803	42.49
12	40.51	16.08	0.828	43.13

AC, acridine; AD, acridone; %, oxidation rate

Table 2. Effect of mediator concentration on oxidation of acridine in the incubation with purified laccase and 3-HAA or ABTS

Con. (mM)	3-HAA		%	ABTS		%
	AC	AD		AC	AD	
0	17.98	0	0	17.87	0	0
0.1	16.56	0.56	38.89	16.50	0.93	62.07
0.5	16.45	0.62	40.00	9.41	6.06	70.55
1.0	16.49	0.63	41.72	5.64	9.71	78.56
2.0	16.53	0.65	44.22	0.02	14.84	82.54

acridine 산화율은 증가하였고(Table 2), laccase의 기질로 사용되는 ABTS 첨가구는 3-HAA 첨가구 보다 산화율이 2배 이상 높았다(Table 3).

배지내 3-HAA 생성과 CA 형성

P. cinnabarinus SCH 균주의 배양중에 3-HAA와 CA의 생성 여부를 spectrophotometer와 TLC, HPLC를 이용하여 확인한 결과, 배양 상등액은 450 nm에서 최고 흡광도를 나타냈고(Fig. 3) TLC 상에서 3-HAA는 R_f 0.86이었고, CA는 R_f 0.62였다(Fig. 4). 그리고 HPLC 상에서 3-HAA는 RT (retention time)가 3.57이었고, CA는 RT가 3.88였다(Fig. 5).

Table 3. Oxidation of acridine through reaction of 3-HAA or ABTS with purified laccase from *P. cinnabarinus* SCH-3

Hour	Laccase			Laccase + 3-HAA			Laccase + ABTS		
	AC	AD	%	AC	AD	%	AC	AD	%
0	17.98	0	0	17.98	0	0	17.76	0	0
6	17.84	0	0	17.23	0.09	11.69	16.10	1.26	66.32
12	17.85	0	0	16.55	0.43	29.66	10.48	5.54	73.67
24	17.84	0	0	16.45	0.58	37.42	5.64	9.71	78.56
48	17.86	0	0	16.39	0.63	39.13	2.28	13.24	84.22

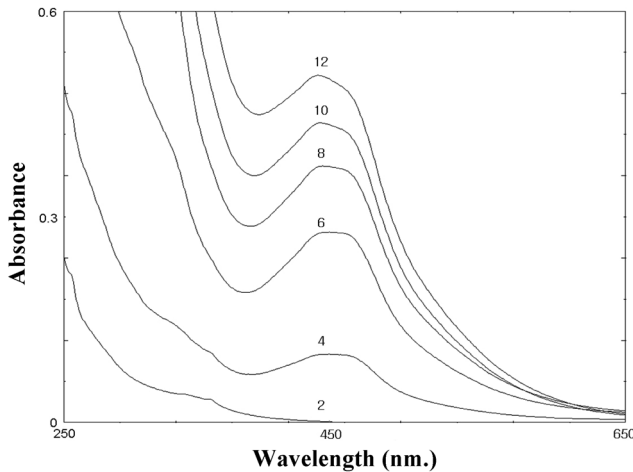


Fig. 3. Absorbance spectra of samples from the cell-free medium of *P. cinnabarinus* SCH-3 grown in shake-flask (3 g/L glucose). Spectra were recorded at 2 day intervals from days 2 to 12.

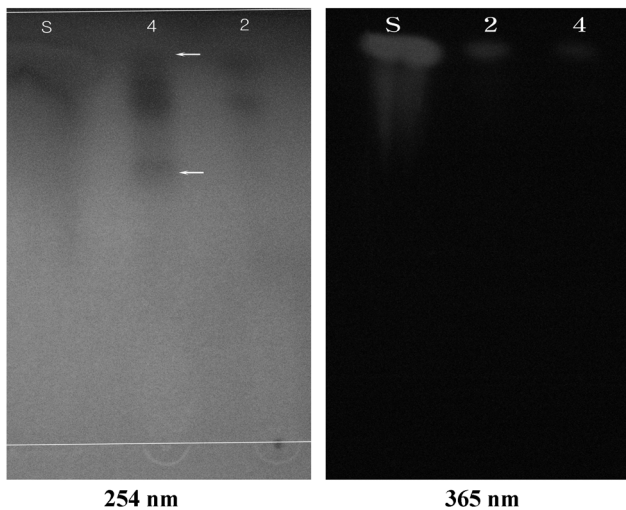


Fig. 4. TLC analysis in the extracellular fluid of *P. cinnabarinus* SCH-3 at 2 and 4 day cultures exhibited a single band with an R_f value of HAA (0.86) and CA (0.62).

Cinnabarinic acid (CA) 형성

3-HAA로부터 CA가 생성되는지를 알기 위하여 3-HAA와 정제된 laccase를 sodium tartrate buffer (pH 3.0)에서 반응 시킨 후 반응물을 채취하여 HPLC로 조사한 결과, 3-HAA로부터 CA로 전환율은 반응시간이 10분일 때 65% (0.666 $\mu\text{g/ml}$), 60분일 때 94% (0.963 $\mu\text{g/ml}$), 120분일 때 100% (1.021 $\mu\text{g/ml}$)로 전환되었다(Fig. 5).

고 찰

P. cinnabarinus SCH-3균주를 포도당이 포함된 액체 배지에서 배양했을 때 배지의 색깔은 무색에서 연한 노란색을 거쳐 짙은

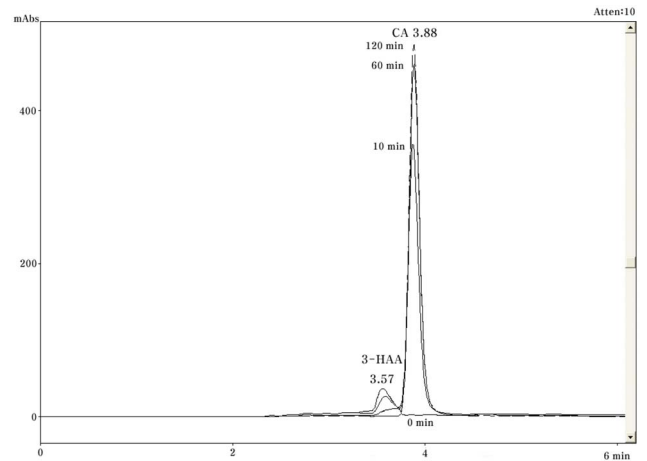


Fig. 5. HPLC-profile of the reaction products separated after 0 min, 60 min and 120 min incubation of 3-HAA with purified laccase. Retention time; 3-HAA (3.57 min), CA (3.88 min).

적색으로 변화였고, laccase와 CA는 지속적으로 증가하였다. 그리고 3-HAA는 배양초기부터 생성되기 시작하여 배양 4일에는 최고치에 도달한 후 급격히 감소하여 배양 8일 이후에는 거의 변화가 없었다(Fig. 1). 이와 같은 균주의 배양환경 변화는 Eggert 등(8)이 호주산(Australia, qucensland) *P. cinnabarinus* PB 균주를 이용하여 3-HAA로부터 CA가 생성된다는 실험을 하기 위하여 균주를 포도당함유배지에서 배양했을 때 투명했던 배양액이 연한 노란색(pale yellow)를 거쳐 짙은 적색(dark red)으로 변화하는 것을 관찰하고 짙은 적색은 phenoxazinone 유도체인 CA의 축적 때문이라고 보고한 실험과 비슷하다.

Acridine은 생물체에 유해한 물질로서 자연환경에 널리 분포하며 생물체에 미치는 영향도 다양하고 대사산물도 다양하다. McMurtrey 등(1984)은 쥐 간에서 추출한 aldehyde oxidase을 acridine에 반응시켰을 때 acridine이 9-acridone으로 전환되고, PCB로 처리한 쥐 간에서 추출한 P-450 효소는 acridine을 2,3- or 3,4-dihydrodiol로 전환함을 관찰하였다(17). 그리고 Sutherland 등(25)은 acridine을 포함하는 Sabouraud 액체배지에서 *Cunninghamella elegans* (ATCC36112) 균주를 배양했을 때 acridine이 acridine trans 1,2-dihydrodiol과 2-hydroxyacridine으로 전환됨을 확인하고 전환 초기단계에 cytochrome P-450 monooxygenase가 acridine을 산화하여 acridine 1,2-oxide로 전환할 것이라고 추정하였다. 이와 같이 acridine의 산화는 acridine에 작용하는 효소에 따라 다양한 물질로 전환된다. 본 연구에서 균주배양 2일째에 배지에 첨가한 acridine은 배양시간의 경과와 더불어 감소하였고 acridone이 laccase와 함께 증가하였다. 배양액 중에서 acridine이 acridone으로 산화되는 과정을 알아보기 위하여 정제된 laccase와 acridine을 완충용액에서 직접 반응시켰을 때는 아무런 반응결과가 없었으나 laccase와 acridine의 혼합 반응액에 3-HAA를 첨가했을 때는 acridine은 acridone으로 산화되었다(Table 2 and 3). 다른 한편으로 배양액에서 CA 형성 과정을 알아보기 위하여 *P. cinnabarinus* SCH-3 배양액으로부터 정제한 laccase와 3-HAA를 sodium

tartrate buffer (pH 3.0)에서 반응시켰을 때 CA가 생성됨을 확인하였다(Fig. 5). 이와 같은 실험결과는 *P. cinnabarinus* SCH-3의 laccase가 균주의 배양 중에 생산된 3-HAA를 매개체로 사용하여 acridine을 acridone으로 산화하고 3-HAA는 CA 전구물질임을 증명한다. 따라서 본 연구에서 *P. cinnabarinus* SCH-3 균주에 의한 acridine 산화기작은 배지내의 laccase가 산소의 존재 하에서 균주가 생산한 4분자의 3-HAA를 산화하여 4개의 3-HAA radical을 형성하고 그중 2개의 3-HAA radical은 짝반응을 통하여 1개의 3-HAA와 1개의 *o*-quinone imine을 형성한다. 그 후 *o*-quinone imine은 3-HAA와 결합하여 CA를 형성한다(6, 8, 26). 한편 3-HAA radical은 물분자로부터 수소 radical과 결합하여 3-HAA로 되고 또 다른 3-HAA radical은 acridine의 9위치에 있는 수소원자를 취하여 3-HAA가 된다. 그리고 물분자의 OH radical은 acridine의 9위치에 수산화(hydration)되어 9-hydroxyacridine이 되고 이는 산화되어 결국 acridone으로 전환된다고 사료된다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 순천향대학교 교수연구년제에 의하여 연구하였음.

참고문헌

- Andersen, S.O. 1985. Sclerotization and tanning in cuticle, p. 59-64. In G.A. Kerkut and L.I. Gillert (ed.), Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 3. Pergamon Press, Oxford, England.
- Bleeker, E.A.J., H.G. Van Der Geest, M.H.S. Kraak, P. De Voogt, and W. Admiraal. 1998. Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 41, 51-62.
- Bleeker, E.A.J., H.G. Van Der Geest, H.J.C. Klammer, P. De Voogt, E. Wind, and M.H.S. Kraak. 1999. Toxic and genotoxic effects of azaarenes: Isomers and metabolites. *Polycycl. Arom. Comp.* 13, 191-203.
- 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.
- Camarero, S., D. Ibarra, M.J. Martinez, and A.T. Martinez. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1775-1784.
- Christen, S., P. Southwell-Keely, and R. Stocker. 1992. Oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid to the phenoxazinone cinnabarinic acid by peroxy radicals and by compound of peroxidases or catalase. *Biochemistry* 31, 8090-8097.
- Dean, J.F.D. and K.E.L. Eriksson. 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48, 21-33.
- Eggert, C., U. Temp, J.F.D. Dean, and K.E.L. Eriksson. 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett.* 376, 202-206.
- Eggert, C., U. Temp, and K.E.L. Eriksson. 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391, 144-148.
- Eggert, C., U. Temp, and K.E.L. Eriksson. 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151-1158.
- Gerard, P.M., P.K. David, and P. Mack. 2001. Synthesis of acridine-based DNA bis-intercalating agents. *Molecules* 6, 230-243.
- Johannes, C. and A. Majcherczyk. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 524-528.
- Kraak, M.H.S., C. Ainscough, A. Fernandez, P.L.A. Van Vlaardingen, P. De Voogt, and W.A. Admiraal. 1997. Short-term and chronic exposure of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. *Aquat. Toxicol.* 37, 9-20.
- Malley, D.M., R. Whetten, W. Bao, C.L. Chen, and R. Sedoe-maker. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J.* 4, 751-757.
- Matsuoka, A., K. Shudo, Y. Saito, T. Sofuni, and M. Ishidate. 1982. Clastogenic potential of heavy oil extracts and some azaarenes in Chinese hamster cells in culture. *Mutation Res.* 102, 275-293.
- Mayer, A.M. 1987. Polyphenol oxidases in plant-recent progress. *Phytochemistry* 26, 11-20.
- McMurtrey, K.O. and T.J. Knight. 1984. Metabolism of acridine by rat-liver enzymes. *Mutat. Res.* 140, 7-11.
- Merkle, R.K. and I. Poppe. 1994. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 230, 1-15.
- Niku-Paavola, M.L., L. Raaska, and M. Itavaara. 1990. Detection of white-rot fungi by non-toxic stain. *Mycol. Res.* 94, 27-30.
- Park, E.H. and K.H. Yoon. 2003. Characterization of laccase purified from Korean *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3. *Korean J. Mycology* 31, 59-66.
- Pereira, W.E., C.E. Rostad, J.R. Garbarino, and M.F. Hult. 1983. Groundwater contamination by organic bases derived from coal tar wastes. *Environ. Toxicol. Chem.* 2, 283-294.
- Santodonato, J. and P.H. Howard. 1981. Azaarenes: sources, distribution, environmental impact and health effects, p. 421-438. In J. Saxana and F. Fisher (ed.), Hazard Assessment of Chemicals, vol. 1. Academic Press, NY, USA.
- Seixas, G.M., N.M. Andon, P.G. Hollingshead, and W.G. Thilly. 1982. The aza-arenes as mutagens for *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 102, 201-212.
- Shaghi, M., P. Jeandet, R. Bessis, and P. Leroux. 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathol.* 45, 139-144.
- Sutherland, J.B., F.E. Evans, J.P. Freeman, A.J. Williams, J. Deck, and C.E. Cerniglia. 1994. Identification of metabolites produced from acridine by *Cunninghamella elegans*. *Mycologia* 86, 117-120.
- Toussaint, O. and K. Lerch. 1987. Catalytic oxidation of 2-aminophenols and ortho hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase. *Biochemistry* 26, 8568-8571.
- Wakeham, S.G. 1979. Azaarenes in recent marine lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1118-1123.

(Received March 21, 2008/Accepted May 13, 2008)

ABSTRACT : Oxidation of Acridine by Laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3

Hyoun-Su Lee, Man-Deuk Han, and Kyung-Ha Yoon* (Department of Life Science, Soon-chunhyang University, Asan 336-745, Republic of Korea)

Acridine was not a substrate for fungal laccase but it was oxidized to acridone in the culture medium of *P. cinnabarinus* SCH-3. During the cultivation of *P. cinnabarinus* SCH-3, Laccase was the predominant extracellular phenoloxidase, and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) was produced in the early culture. Cinnabarinic acid (CA) was observed to accumulate in the culture medium. When *P. cinnabarinus* was grown in the culture medium containing acridine, acridine was oxidized to acridone. But when the laccase purified from the culture medium of *P. cinnabarinus* directly reacted with acridine in sodium tartrate buffer (pH 3.0), The oxidation of acridine did not happen. In contrast, when 3-HAA was added to the buffer that was mixed with laccase and acridine, the acridine was oxidized to acridone. While *in vitro studies*, the CA was formed from 3-HAA in the presence of purified laccase. The results suggest that the acridine should be oxidized to the acridone through the mediation of 3-HAA by the laccase in the culture medium of *P. cinnabarinus* SCH-3.