

## *Trimorphomyces papilionaceus*에서 Laccase의 Catabolite Repression에 의한 조절

정해숙 · 최형태 · 윤권상

강원대학교 자연과학대학 미생물학과  
서울대학교 분자미생물학 연구센터

담자성 효모인 *Trimorphomyces papilionaceus*는 생장에 thiamine을 요구하고 최적배양온도는 25°C이며 넓은 범위의 pH (4.0-7.0)에서 잘 자랐고 최소배지에 여러가지 탄소원을 가하고(1%) 배양하여 균의 성장과 laccase의 역가를 조사하였다. Glucose, fructose, mannose, sucrose와 xylose 배지에서 OD 0.8이상으로 자랐고(A group), galactose와 gluconate의 경우 OD 0.3-0.6 (B group), 그리고 arabinose, lactose와 pyruvate 배지에서 OD 0.1-0.2를 보였다 (C group). Ribose, acetate, citrate, lactate와 oxaloactate는 이용하지 못 하였다. Laccase는 C group 배지에서 가장 높은 역가를 보였고(8 u 이상), B group 배지에서 4-6 unit, A group 배지의 경우 가장 낮은 1.5 unit 이하를 보였다. 이 균을 glucose와 arabinose가 혼합된 배지에 배양할 경우 laccase는 catabolite repression에 의하여 조절되었다.

KEY WORDS □ Laccase, Catabolite Repression, *Trimorphomyces papilionaceus*.

생물체가 유성생식에 의하여 번식할 경우 서로 다른 성인자를 가진 반수체가 접합하여 일시적인 이핵체상(dikaryon)을 거쳐 핵융합에 의한 이배체 형성으로 진행된다. 최근 원형질체 융합에 의하여 유용한 품종을 개발하는 시도가 진행되고 있으며 이와같은 경우 한 세포안에 두개의 서로 다른 핵이 일정기간 존재하며 융합체가 안정화 되거나 곧바로 퇴화된다고 알려져 있다. 버섯을 생성하는 담자균류는 서로 다른 성인자를 가진 반수체의 균사가 접합하여 이핵체의 균사를 이루고 이들이 외부의 자극을 받아 버섯을 생성하게 된다. 이와같은 이핵체상은 다른 생물체에서는 극히 짧은 순간동안 유지되지만 담자균류에서 체세포상태로 지속될 수있다 (2). 또한 phenoloxidase는 고등균류의 분화와 깊은 관련이 있으며 (3, 8, 9, 14) membrane의 permeability를 변화시키거나 (10) 병원성 미생물의 pathogenicity와 관련이 있는등 (13) 특히 균류의 대사작용및 분화에 영향을 미친다. *Coprinus congregatus*의 경우 교배가능한 균체(monokaryon; haploid)를 한천배지에서 교배시켰을 때 정상균주의 경우 균사의 접합후 핵이동이 상대방 균사로 동시에 진행되어 이핵체상 균사를 생성하는 것과는 달리 phenoloxidase mutant 경우 핵이동에도 이상이 생겨 이핵체상의 균사를 만들지 못한다고 보고된 바 있다 (6). 이와같이 여러가지 현상과 관련이 있는 phenoloxidase와 이핵체상의 유지및 조절의 관련여부를 연구하기 위하여 단세포 담자균인 *Trimorphomyces papilionaceus*를 대상으로 phenoloxidase의 한 종류인 laccase에 대한 연구를 시작하

였다.

*T. papilionaceus*는 *Tremellaceae*에 속하는 담자성 효모이고 이름이 시사하듯이 분화단계별로 3가지 모양을 가지고 있다 (18). Monokaryon은 자낭균류의 효모와 모양이 동일하나 서로 다른 성인자를 가진 균주를 교배하여 얻은 이핵체세포(dikaryon)는 출아법에 의하여 번식하되 나비모양을 유지하고 두개의 핵이 유지된다. 실험실에서 monokaryon과 dikaryon이 용이하게 배양되며 일반적인 담자균류와는 달리 단세포성 생물체이므로 변이처리, 균락형성은 물론 동조배양등이 가능하여 이핵체상의 조절기작에 관한 세포 생리학적 연구에 좋은 재료이다. 본 연구에서는 *T. papilionaceus*의 배양특성을 실험하고 최소배지를 결정하였으며 여러가지 탄소원에 따른 laccase activity의 조절정도를 실험하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양특성 실험

본 실험에 사용한 균주는 Dr. R.Bandoni (Univ. British Columbia)로 부터 분양 받은 *T. papilionaceus* dikaryon이고 YEPD slant에 접종, 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였다. 최적온도의 결정은 YEPD 액체배지 (50 ml)에 균을 접종하고 25°C에서 1일간 진탕배양후 이를 새로운 액체배지에 접종 (1%) 하고 20-35°C에서 진탕배양 하였다. 최적 pH의 결정은 25°C에서 각 pH 별로(4.0-7.0) 배양하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

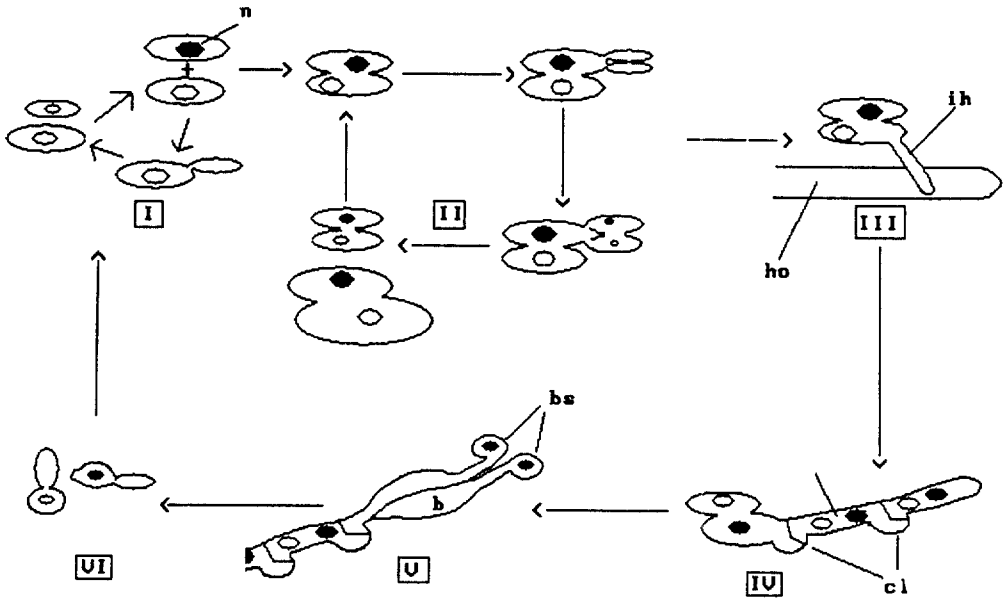


Fig. 1. Life cycle of *Trimorphomyces papilionaceus*.

I, monokaryotic yeast stage (conidial). II, dikaryotic yeast stage. III, dikaryotic hypha infecting an ascumycete *Arthrinium*. IV, dikaryotic hypha with clamp. V, basidium formation. VI, germinating basidiospore. b: basidium, bs: basidiospore, cl: clamp, h: hypha, ho: host (*Arthrinium*), ih: infecting hypha, n: nucleus.

최소배지는 Mandels와 Reese(16)의 최소배지를 다음과 같이 변형하여 사용하였다. 즉  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $(NH_4)_2SO_4$  3.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g,  $CaCl_2$  0.1 g을 1 L에 가했고 미량원소는 동일하였으며 탄소원을 1%로 가하고 pH 6.0으로 조절하여 사용하였다.

**Laccase 역가의 측정**

일정시간 배양한 균을 모아서 인산염 완충액으로 세척한 후 인산염 완충액 (0.01 M, pH 6.5)에 glycerol 5%, 1%의 Triton X-100을 더한 세포용해 완충액 600  $\mu$ l에 균을 현탁하고 glass bead 0.5 g을 넣고 Mini Bead Beater에서 6분간 세포를 용해 시켰다. 이를 4°C에서 1시간동안 혼합하고 소형원심분리기로 15분간 원심분리한 후 상등액을 효소역가 측정 및 단백질정량에 사용하였다. Laccase역가는 Ross (20)의 방법에 따라 o-tolidine을 기질로 사용하여 측정하였고 단백질정량은 Lowry 등 (15)의 방법을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**일반적인 배양특성**

최적배양온도의 실험결과는 Table 1과 같이 25°C에서 최고치를 보였고 세포의 모양도 25°C에서 달걀형 (oval form), 20°C에서 긴 타원형, 30°C이상에서 구형으로 자랐다. 이는 많은 종류의 담자균이 25°C가 성장 최적온도인 것과 (1.7) 동일하나 같은 담자성 효모인 *Cryptococcus neoformans*가 37°C

Table 1. Growth of *T. papilionaceus* during 36 h culture at different temperatures in YEPD medium.

Temperature (°C)	20	25	30	35
Growth (OD <sub>600</sub> )	0.70	0.92	0.27	0.030

에서도 잘 자라는 것과는 (19) 다르다. 그러나 *T. papilionaceus*가 자낭균에 기생 (18)하는 것과는 달리 *Cr. neoformans*는 사람에게 질병을 유발하는 종(13)이므로 최적성장온도가 다른것으로 판단된다. *Lentinus edodes* (12) *Cop. congregastus* (Choi, unpublished)와 같이 이 균은 생장에 thiamine을 요구하였고, 많은 종류의 효모에서와 같이 넓은 범위의 pH (4.0-7.0)에서 잘 자랐다 (Fig. 2).

**탄소원의 종류에 따른 성장 및 laccase 역가**

최소배지에 여러가지 탄소원을 가하고 25°C에서 진탕배양하면서 일정시간별로 성장정도를 측정하였고 (Table 2), 36시간 배양한 후에 균체에 있는 laccase의 역가를 측정하였다 (Fig. 3). Glucose, fructose, mannose등의 6탄당과 xylose, sucrose등의 배지에서 좋은 성장을 보였고 (OD 0.8이상/ 48 hr: A group), galactose와 gluconate배지에서 OD 0.3-0.6사이 (B group), 그리고 arabinose, pyruvate와 lactose의 경우 (C group) 최소의 성장을 보였다. 또한 ribose,

acetate, citrate, lactate, oxaloacetate 등의 배지에서는 생장이 없었다. 대부분의 효모균이 ribose와 acetate를 이용하는 것과는 달리 이들을 이용하지 못하였다. 균류의 분화와 깊이 관련된 laccase의 역가는 탄소

원의 이용정도와 반대의 경향을 보였다. 즉 A group의 당류를 탄소원으로 사용한 경우 가장 낮은 laccase역가 (1.5 u 이하/단백질 mg당)를 보였고, B group의 당류에서는 4-6 unit, 생장이 가장 느렸던 C group의 탄소원에서 가장 높은 역가 (8 u 이상)를 보였다 (Fig. 3). 이런 현상은 *Mucor racemosus*의  $\beta$ -glucosidase(4), *Penicillium italicum*의  $\beta$ -glucanase (21) 경우와 같이 탄소원의 종류에 따라 각 효소의 역가가 다르며, 잘 이용될 수 있는 탄소원의 경우 각 효소의 역가가 낮게 나타났다고 생각된다.

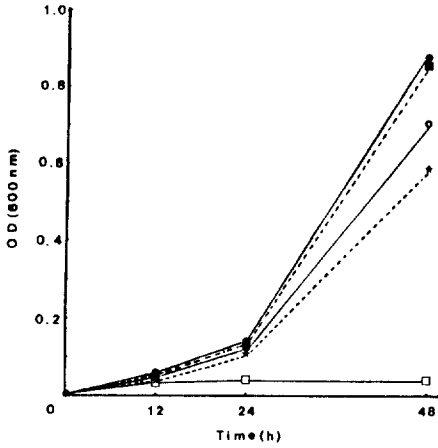


Fig. 2. Effects of pH and thiamine on growth in glucose minimal medium.

□—□; pH 6.0 without thiamine, ★—★; pH 4.0 with thiamine, ○—○; pH 5.0 with thiamine, ■—■; pH 6.0 with thiamine, ●—●; pH 7.0 with thiamine.

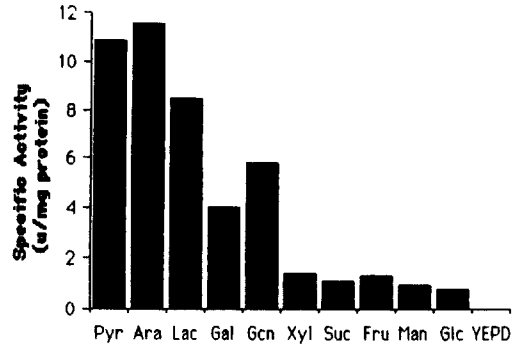


Fig. 3. Laccase production on minimal media with different carbon sources.

(Abbreviations are same as Table 2).

Table 2. Growth of *T. papilionaceus* during 36 h culture on various carbon sources. (OD at 600 nm)

Carbon source	Pyr	Ara	Lac	Gal	Gcn	Xyl	Suc	Fru	Man	Glc	YEPD
Culture time (h)											
6	0.051	0.065	0.062	0.070	0.060	0.070	0.086	0.088	0.090	0.078	0.072
12	0.070	0.075	0.078	0.095	0.100	0.105	0.130	0.103	0.120	0.120	0.111
24	0.088	0.120	0.115	0.175	0.202	0.225	0.308	0.205	0.302	0.032	0.355
36	0.136	0.148	0.145	0.252	0.371	0.450	0.520	0.580	0.620	0.683	0.870
48	0.165	0.200	0.195	0.360	0.590	0.805	0.880	1.10	1.15	1.35	1.40

(Ribose, acetate, citrate, lactate, and oxalacetic acid gave no growth).

The components of minimal medium were as follows.  $K_2HPO_4$  1.0g,  $(NH_4)_2SO_4$  3.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g,  $CaCl_2$  0.1g. Carbon source 1%. Trace elements solution 1 ml ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  500 mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  187 mg,  $ZnCl_2$  170 mg,  $CoCl_2$  200 mg, HCl 1 ml in 100 ml). pH was adjusted to 6.0.

Pyr: pyruvate Ara: arabinose Lac: lactose Gal: galactose Gcn: gluconate Xyl: xylose Suc: sucrose Fru: fructose Man: mannose Glc: glucose

Table 3. Growth of *T. papilionaceus* and its laccase activity on two-carbon source medium.

Substrate conc. (%)	Growth (OD at 600 nm)				Laccase activity at 36 h (u/mg protein)
	12	24	36	48	
Arabinose 0.5%	0.15	0.17	0.19	0.20	4.67
Arabinose 1.0%	0.16	0.18	0.20	0.21	5.15
Arabinose 0.5% + Glucose 0.5%	0.25	0.50	0.82	1.45	1.59
Glucose 0.5%	0.28	0.58	0.94	1.56	1.10

## Catabolite repression에 의한 laccase 조절

탄소원의 종류에 따른 laccase 역가의 차이가 glucose effect, 즉 catabolite repression에 의한 것 인가를 확인하기 위하여 glucose, arabinose, 그리고 glucose와 arabinose 혼합물을 탄소원으로 사용하여 균을 배양하고 성장과 효소역가를 측정하였다 (Table 3). Glucose 또는 arabinose를 탄소원으로 사용한 경우를 비교구로 하였을 때 glucose와 arabinose 혼합물을 탄소원으로 사용한 경우 성장정도와 효소의 역가가 glucose의 경우와 매우 유사하였다. 즉 glucose에 의하여 arabinose의 사용이 억제되어 arabinose에 의한 효소유도가 이루어지지 않았고 *Sporotrichum thermophile*의 cellulase (5), *Aspergillus terreus*의 glucoamylase (11), *Polyporus* sp.의  $\beta$ -glucosidase (17)에서도 쉽게 이용되는 탄소원, 특히 glucose가 효소유도배지에 존재하면 각각의 효소유도가 억제되는 것과 동일하였다. 이러한 현상은 fructose를 C group의 당류와 함께 주었을 때에도 동일하게 나타났으며 이 균의 laccase는 catabolite repression에 의하여 조절된다고 생각되었다. 이 효소의 분화와의 관련을 연구하기 위하여 현재 여러가지 분화관련 변이주를 유도하고 있다.

## 사 사

이 논문은 과학재단 우수과학센터 (분자미생물학 연구센터) 지원 연구비 (1991)에 의해 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- 배성호, 신광수, 감사옥, 하영철, 최선진, 김규중, 최형태, 1989. *Pleurotus ostreatus*에서 분비되는 peroxidase의 특성. 미생물학회지 27, 348-356.
- Alexopoulos, C.J., 1962. Introductory Mycology. John Wiley & Sons.
- Birse, C.E., and A.J. Clutterbuck, 1991. Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase-encoding gene. *ivoB. Gene* 98, 69-76.
- Borgia, P., and P.S. Sypherd. 1977. Control of  $\beta$ -glucosidase synthesis in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 130, 812-817.
- Canevascini, G., M.R. Coudray, J.P. Rey, R.J.G. Southgate, and H. Meier, 1979. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *J. Gen. Microbiol.* 110, 291-303.
- Choi, H.T., 1986. Phenoloxidase and photomorphogenesis in *Coprinus congregatus*. Ph.D. thesis. University of California Santa Barbara.
- Choi, H.T., and I.K. Ross, 1990. Localization of phenoloxidases in *Coprinus congregatus* grown on a low-temperature-liquifying medium. *Kor. J. Microbiol.* 28, 274-277.
- Choi, H.T., R.L. Wilks, and I.K. Ross, 1987. Formation of sclerotia in liquid cultures of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycologia* 79, 166-172.
- Clutterbuck, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 70, 423-435.
- Cory, J.G., 1967. Evidence for a role for tyrosyl residues in cell membrane permeability. *J. Biol. Chem.* 242, 218-221.
- Ghosh, A., B. Chatterjee, and A. Das, 1990. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1307-1311.
- Kawasumi, T., T. Baba, and S.O. Yanagi, 1988. Protoplast fusion of incompatible mating type combinations of *Lentinus edodes* (Shiitake) auxotrophs. *Agric. Biol. Chem.* 52, 3197-3199.
- Kwon-Chung, K.J., I. Polacheck, and T.J. Popkin, 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150, 1414-1421.
- Leonard, T.J., 1971. Phenoxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* 106, 162-167.
- Lowry, R.J., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mandels, M., and E.T. Reese, 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* 73, 269-278.
- Nigam, P., and K.A. Prabhu, 1991. Influence of sugars on the activity of cellulase system from two basidiomycetes cultures. *J. Basic. Microbiol.* 4, 279-283.
- Oberwinkler, F., and R.J. Bandoni, 1983. *Tremorphomyces*: a new genus in the Tremellaceae. *System. Appl. Microbiol.* 4, 105-113.
- Polacheck, I., and G.A. Lebens, 1989. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 67-71.
- Ross, I.K., 1982. The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2763-2770.
- Santos, T., J.R. Villanueva, and C. Nombela, 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum*  $\beta$ -glucosidase. *J. Bacteriol.* 129, 52-58.

(Received January 7, 1992)

(Accepted March 21, 1992)

---

**ABSTRACT: Regulation of Laccase by Catabolite Repression in *Trimorphomyces papilionaceus***

**Chung, Hae Sook, Hyung Tae Choi and Kwon Sang Yoon** (Department of Microbiology, Kangwon National University, Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

The dikaryon of *Trimorphomyces papilionaceus*, one of basidiomycetous yeast needed thiamine as a growth factor and required relatively simple nutrient components. This organism grew best at 25°C, and showed broad pH range (pH 4.0-7.0). It was grown in liquid minimal media with various carbon sources and they could be classified into 3 groups as follows. Glucose, fructose, mannose, sucrose and xylose (A group) supported good growth (>OD 0.8), and showed poor laccase activity (less than 1.5 u/mg protein). Galactose and gluconate (B group) showed moderate growth (OD 0.3-0.6), and had moderate enzyme activity (4-6 u). Arabinose, lactose, maltose and pyruvate (C group) showed poor growth (OD 0.1-0.2), and showed high enzyme activity (higher than 8 u). Ribose, acetate, citrate, lactate and oxaloacetate showed no growth. When the yeast was grown in a medium which had two carbon sources (glucose and arabinose), laccase was regulated by the catabolite repression.