

## *Coprinus congregatus*에서 산성액체배지에서의 Laccase의 역할

김순자 · 임영은 · 최형태\*

강원대학교 생명과학부 미생물학전공, 서울대학교 분자미생물학연구소

*Coprinus congregatus*를 pH 4.2로 낮춘 YpSs 액체배지에 접종할 경우 세포막연관효소인 laccase가 배양 1일만에 상등액으로 대량 생성분리된다. 분리된 효소는 매우 빠르게 효소력의 감소를 보이며 전기영동상의 이동변화가 있다. 이와같이 변화된 전기영동상을 보이는 효소단백질을 분광광도계로 분석할 경우 정제된 효소단백질과는 다른 분광 스펙트럼을 보인다.

KEY WORDS □ *Coprinus congregatus*, laccase, acid neutralization

*Coprinus congregatus* Fries는 분화단계별로 2종류의 laccase isozyme을 생성한다. 균이 YpSs 한천배지에서 자랄 때 균사 끝부분에서 나타나는 hyphal tip laccase와 버섯원기를 생성하는 단계에서 나타나는 primordial laccase 등이다(5). 이들을 non-denaturing native PAGE로 분석할 경우 서로 다른 전기영동상을 보인다(5). 한편 이 균을 YpSs 액체배지에서 진탕배양할 경우 1주일 이상된 균사체에서 sclerotium을 형성할 때 나타나는 sclerotial laccase는 primordial laccase와 전기영동상이 동일하며(5) 이들은 모두 세포막과 연관된 cell membrane associated enzyme이고(4,6) hyphal tip laccase는 이 균의 분화와 밀접한 관계가 있어 일정한 수준 이상의 효소력이 있어야 버섯의 생성을 유도할 수 있다(13, 14).

본 연구실에서는 이 균을 pH 4.2로 조절된 YpSs 액체배지에 접종할 경우 세포막연관 hyphal tip laccase가 배양 초기에 대량 생성분리됨을 확인하였고(1) 이때 배지의 산도는 배양 1일 후에 pH 5.0 이상으로 중화됨을 확인하였다(3). 이와 동시에 상등액에서의 효소력이 급격히 감소되며 색소체의 생성이 빠르게 진행됨을 확인하였고 균의 생장이 시작됨을 보고하였다(3). 본 논문에서는 산성액체배지에서 laccase 단백질의 생화학적 변화를 분석하여 laccase의 역할을 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주와 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 *Coprinus congregatus* dikaryon (cc13×cc16)이다. 이 균을 YpSs 사면배지(2)에 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였다. 세포막 연관 laccase를 분리시키기 위하여 YpSs 액체배지(pH 7.1)에서 5일간 진탕배양한 균체를 Waring blender로 1초씩 5회 갈아서

pH 4.2로 조절된 YpSs 액체배지에 접종하고(접종량: 10%, v/v) 25°C에서 배양하였다(1).

#### Anti-laccase antibody의 생성

Laccase의 정제는 최 등의 방법에 따라 수행하였다(2). 정제된 효소(500 µg/500 µl in Tris-HCl, pH 7.0)와 동일 부피의 complete Freund's adjuvant를 혼합하여 쥐의 복강에 주사하였고 2주 후에 동일량의 효소단백질을 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 복강내에 주사하였다. 다시 2주 후에 2번째와 같은 방법으로 효소단백질을 주사하고 쥐의 혈청을 분리하여 polyclonal 항체로 사용하였다.

#### Western blot에 의한 효소단백질의 분석

액체산성배지의 배양상등액을 배양일별로 채취하여 단백질량을 분석하고(12) 각 lane에 70 µg의 총단백질을 8% native PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮기고 anti-laccase antibody와 alkaline phosphatase가 연결된 2차항체를 사용한 Western blot 방법으로 laccase 및 변형된 단백질을 분석하였다.

#### 자외선-가시광선 분광광도계에 의한 효소단백질의 분석

정제된 효소의 흡광 spectrum은 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 350 µg의 정제된 효소를 용해하고 UVIKON 930(Kontron)을 사용하여 측정하였다. 정제된 효소 30 µg을 액체산성배지 50 µl와 혼합하여 25°C에서 0.5~3일간 반응 후 8% native PAGE로 단백질을 분리하고 위와 동일한 Western blot 방법으로 효소단백질의 변화를 분석하였다. 또 동일한 방법으로 효소단백질을 산성액체배지와 3일 동안 반응시키고 전기영동한 후 1개 lane에서 Western blot 방법으로 단백질의 위치를 확인하였다. 나머지 lane으로부터 확인된 각 단백질의 위치를 도려내고 단백질을 용출시킨 후 amide bond의 흡광인 210 nm에서의 흡광도를 모두 동일값으로 일치시켰다. 각 단백질은 위와 같은 방법으로 흡광 spec-

\*To whom correspondence should be addressed

trum을 분석하였다.

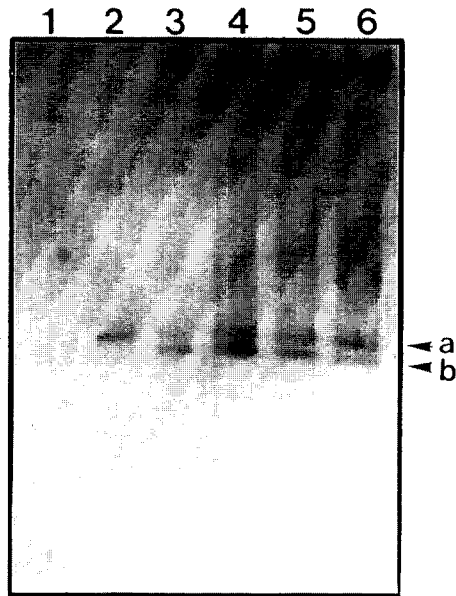
### 결과 및 고찰

액체 산성배지에 *C. congregatus*를 배양하고 그 배양상등액을 5일 동안 채취하여 laccase 항체를 이용한 Western blot 방법으로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 배양 3일 후부터 효소력이 없는 것(3)과는 대조적으로 배양 5일 후까지 효소단백질이 남아 있었고(Fig. 1a) 효소단백질과는 다른 mobility를 보이는 변형된 효소단백질(Fig. 1b)이 laccase 항체에 의하여 검출되었다. 정제된 laccase 단백질과 액체산성배지를 혼합하여 반응시킨 후 위와 동일한 Western blot 방법으로 효소단백질을 추적하였다(Fig. 2). 배양상등액의 경우와 같이 효소력이 없어진 변형된 효소단백질(Fig. 2b), 배양상등액에서 검출된 변형된 효소단백질(Fig. 2c), 그리고 앞의 경우와는 다르게 변형된 효소단백질(Fig. 2a) 등이 확인되었다. 이와 같이 효소력은 전혀 가지고 있지 않으나 laccase 항체에 의하여 검출되는 단백질의 변화정도를 분석하기 위하여 자외선 및 가시광선에서의 단백질 흡광도를 측정하였다.

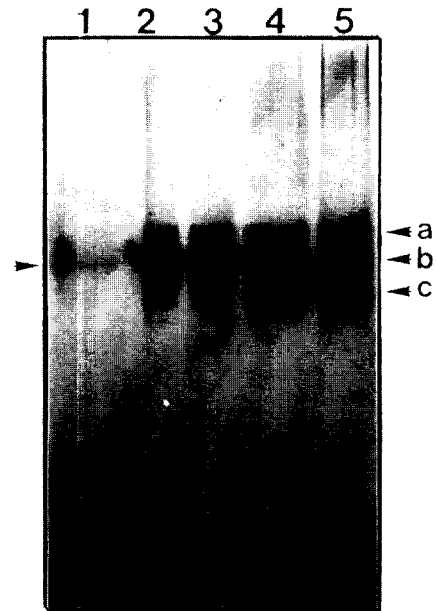
정제된 laccase 단백질의 흡광곡선은 Fig. 3과 같이 210 nm에서 최대치를 보였다. 효소단백질이 배지와 반응하여 생성된 3가지 변형 단백질(Fig. 2a, b, c)의 흡광곡선을 분석한 결과 Fig. 4와 같이 나타났다. 효소력을 잃었으나 정제된 효소와 동일한 전기영동상을 보이는 단백질은 흡광곡선이 효소단백질과 거의 동일하였다(Fig. 4B). 이와는 달리 전기영동상이 효소단백질과는 다른 단백질의 경우 흡광곡선의 모양도 변화되어 동일량의 단백질을 분석하였음에도 270-280

nm에서의 흡광이 크게 증가하거나(Fig. 4a, Fig. 2a의 단백질) 약간의 흡광증가(Fig. 4c, Fig. 2c의 단백질)가 있었다.

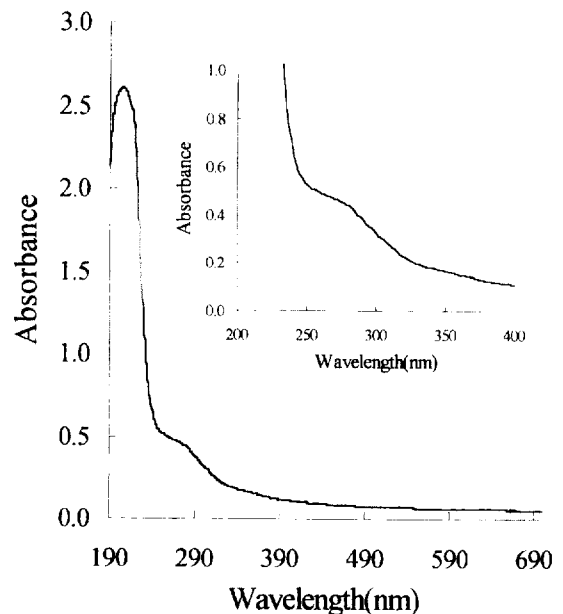
균류에서 laccase는 *Aspergillus nidulans*의 경우 균사에서 conidiophore로의 분화단계(10) 및 conidia의 색소형성(7)에,



**Fig. 1.** Western analysis of modified laccase proteins in the low pH Ypss liquid culture. Lanes: 1, purified laccase; 2, culture supernatant(day 1); 3, culture supernatant(day 2); 4, culture supernatant(day 3); 5, culture supernatant(day 4); 6, culture supernatant(day 5). Arrowhead, purified laccase detected by anti-laccase antibody.



**Fig. 2.** Western analysis of modified laccase proteins generated by mixing the purified laccase protein with the low pH Ypss liquid medium. Lanes: 1, purified laccase; 2, enzyme mixture for 12 h; 3, enzyme mixture for 1 day; 4, enzyme mixture for 2 days; 5, enzyme mixture for 3 days. a, modified laccase protein showing slower mobility with no activity. b, modified laccase protein showing same mobility with no activity. c, modified laccase protein showing faster mobility with no activity. Arrowhead, purified laccase detected by anti-laccase antibody.



**Fig. 3.** U.V.-visible spectrum of purified laccase protein.

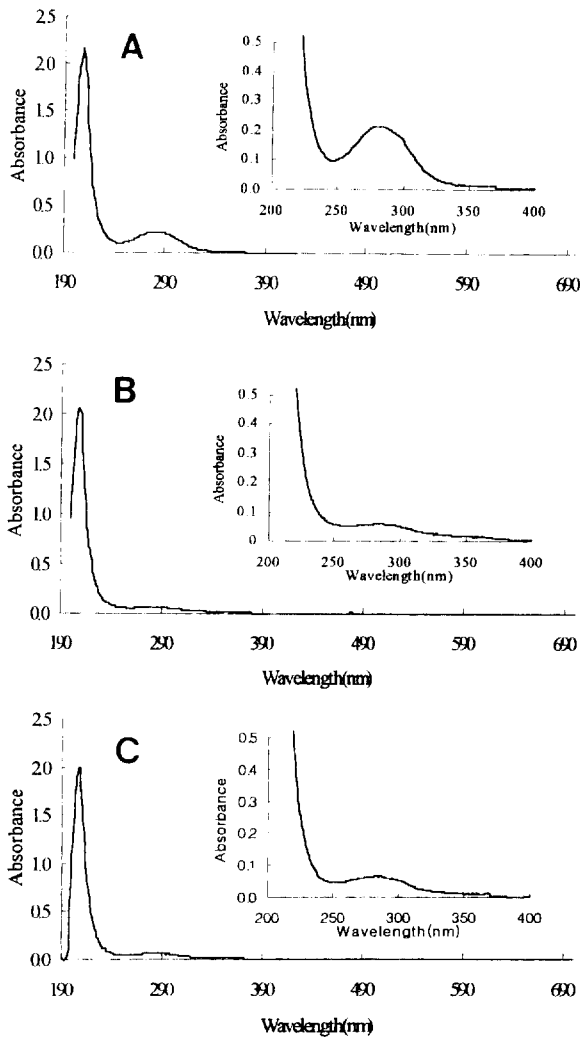


Fig. 4. U.V.-visible spectra of modified laccase proteins. A, spectrum of modified protein in Fig. 2a. B, spectrum of modified protein in Fig. 2b. C, spectrum of modified protein in Fig. 2c.

표고버섯의 경우 버섯원기의 분화단계에 관련된 것으로 보고되었다(11). 한편 *Cryptococcus neoformans*의 경우 laccase가 없는 변이주는 그 병원성이 없어짐은 물론(9) 활성산소에 대한 저항성이 laccase의 산물에 의하여 이루어짐이 보고되었고(8) 이는 laccase가 균체를 보호하는 기능을 가졌음을 시사한다. *C. congregatus*를 YpSs 한천배지에서 3-5일간 배양하고 면도칼로 균사체에 상처를 주면 laccase가 대량 생성된다(Fig. 5). 이 경우 균사끝 부분이 아니므로 이미 laccase의 효소력은 현저히 떨어진 상태(13)이며 균이 자신을 보호하기 위하여 laccase를 생성하였다고 판단된다. 높은 수소이온농도에서 자신을 보호하기 위한 방법으로 laccase를 생성분비하고(1) 분비된 효소는 수소이온을 소비하면서 색소체를 생성하며(3) 효소단백질은 변화되고(Fig. 1, 2, 4) 결과적으로 균은 중화된 배지에서 생장이 가능하게 된다(3). 중화된 배지에서는 더 이상의 효소유도가 없으며(1), 또한 이미 분비된 효소단백질도 색소생성과정에서 변화되므로 배양상등액에서 효소력이 빠르게 감소되었다(3). 즉 *C. con-*

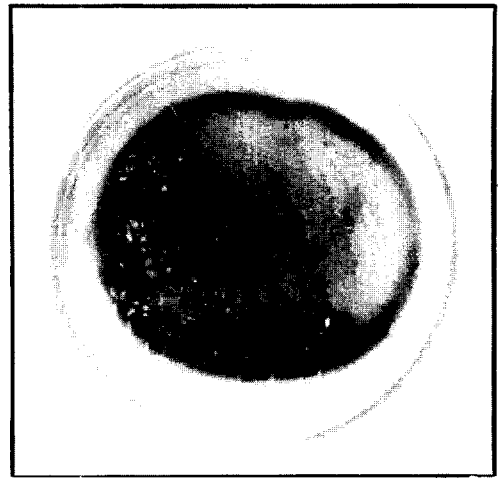


Fig. 5. Rapid production of laccase in the trauma region. Laccase reaction(arrowheads) while no reaction in old mycelial zone.

*gregatus*는 높은 수소이온의 충격으로부터 자신을 보호하기 위하여 laccase를 빠르게 생성분비하였고 분비된 효소는 수소이온을 소비하면서 색소체를 생성함과 동시에 배지를 중화시켜 균 자신을 보호하였다.

### 감사의 말

이 논문은 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 지원 연구비로 수행하였습니다.

### 참고문헌

1. 김순자, 최형태, 강사옥, 하영칠. 1991. *Coprinus congregatus*의 세포막 연관 laccase의 세포외 분비. 미생물학회지 **29**, 267-269.
2. 최영옥, 김순자, 최형태. 1995. *Coprinus congregatus*가 분비하는 laccase의 분리 정제 및 특성. 미생물과 산업 **21**, 351-358.
3. 최영옥, 하은수, 김순자, 최형태, 윤권상. 1994. 액체배양한 *Coprinus congregatus*에서 세포막연관 laccase의 생성조절. 한국균학회지 **22**, 46-49.
4. 최형태, I.K. Ross. 1990. 저온액화성 응고제를 사용한 고체배지에서 자란 *Coprinus congregatus*의 phenoloxidase들의 localization. 미생물학회지 **28**, 274-277.
5. Choi, H.T. 1987. Phenoloxidases and photomorphogenesis in *Coprinus congregatus*. PH.D. Thesis, Univ. California Santa Barbara.
6. Choi, H.T., R.L. Wilks and I.K. Ross. 1987. Formation of sclerotia in liquid culture of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycol.* **79**, 166-172.
7. Clutterbuck, A.J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **70**, 423-435.
8. Emery, H.L., C.P. Shelburne, J.P. Bowman, P.G. Fallon, C.A. Schulz and E.A. Jacobson. 1994. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Infection & Immun.* **62**, 5694-5697.

9. **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.
10. **Law, D.J. and W.E. Timberlake.** 1980. Developmental regulation of laccase level in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**, 509-517.
11. **Leatham, G.F. and M.A. Stahmann.** 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 147-157.
12. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Parr and R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
13. **Ross, I.K.** 1982. The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2763-2770.
14. **Ross, I.K.** 1985. Determination of the initial steps in differentiation in *Coprinus congregatus*. In: *Developmental Biology of Higher Fungi*(Moore, D., L.A. Casselton, D. Wood and J.C. Frankland Ed.), pp. 353-373.

(Received December 21, 1996/Accepted February 19, 1997)

---

**ABSTRACT: Role of Laccase in a Low pH Liquid Medium in *Coprinus congregatus***

**Soon-Ja Kim, Young-Eun Leem and Hyoung-Tae Choi\***(Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

When *Coprinus congregatus* is transferred to a low pH YpSs liquid medium(pH 4.2), it secretes lots of laccase into the medium. The secreted laccase loses its enzyme activity very rapidly, and its electrophoretic mobility is also changed. When the protein which shows different electrophoretic mobility is analyzed by spectroscopy, it also shows different absorption spectrum.