

Article

정제된 먹물버섯(*Coprinus comatus*) laccase에 의한 염료 탈색

김수연^{1,2} · 최지영^{1,3} · 최형태^{1*}

¹강원대학교 자연과학대학 생화학과, ²과학기술연합대학원대학교 시스템생명공학, ³두웰바이오

Decolorization of dyes by a purified laccase from *Coprinus comatus*

Su Yeon Kim^{1,2}, Ji Young Choi^{1,3}, and Hyoung T. Choi^{1*}

¹Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon 24341, Republic of Korea

²Biosystems and Bioengineering, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

³Dowellbio, Suwon 16229, Republic of Korea

(Received April 4, 2017; Revised May 4, 2017; Accepted May 17, 2017)

An inky cap, *Coprinus comatus* synthesizes and secretes a laccase in the liquid yeast extract peptone dextrose medium. We have successfully purified the enzyme through the ion-exchange chromatography and the preparative gel electrophoresis. The estimated molecular weight was 67 kDa by the SDS-PAGE analysis. Optimum pH was pH 4.3 and optimum temperature was 25°C. The K_m value was 0.45 mM and the V_{max} was 0.0132 OD/min/unit for *o*-tolidine. Purified laccase showed 49.3% decolorizing activity against remazol brilliant blue R (RBBR) and 41.6% decolorizing activity against Poly R-478 after 12 h incubation.

Keywords: *Coprinus comatus*, dye decolorization, laccase

백색부후균들은 리그닌을 분해하는 효소균을 가지고 있어 다양한 난분해성 물질을 분해할 수 있다. 리그닌 분해 효소균에는 laccase, lignin peroxidase 그리고 manganese peroxidase 등이 포함되는데 laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 multicopper oxidases (MCOs)의 하나로 백색부후균을 포함하여 매우 많은 균류들이 이 효소를 다양한 목적으로 생성한다. 본 실험실에서는 구름버섯(*Trametes versicolor*)에 의한 bisphenol A의 생분해(Kang *et al.*, 2008)를 보고하였고, 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)에 자신의 laccase 또는

manganese peroxidase 유전자를 추가로 도입한 형질전환체에 의한 remazol brilliant blue R (RBBR) 염료의 탈색(Kum *et al.*, 2010)을 보고하였다. 아교버섯의 laccase에 의한 내분비계 장애물질의 분해(Kim *et al.*, 2008)와 겨울우산버섯(*Polyporus brumalis*)의 laccase에 의한 RBBR 탈색(Kim *et al.*, 2012) 등 정제된 laccase에 의한 난분해성 물질의 분해에 대하여 보고하였다. 한편 *C. comatus*가 생성하는 laccase가 종양세포의 증식을 억제하고 human immunodeficiency virus의 역전사효소 활성을 억제한다는 보고도 있다(Zhao *et al.*, 2014).

주름버섯에 속하는 먹물버섯류는 유성생식 자실체인 버섯이 성숙되는 과정에서 갓의 가장자리부터 자가분해되어 먹물을 생성한다. 이 먹물에는 다량의 담자포자가 존재하여 이들이 빗물에 섞여 흘러가거나 곤충 등의 동물에 묻어서 포자가 이동된다. 먹물버섯류는 *Coprinus* 하나의 속으로 분류되었으나 ribosomal RNA의 염기서열에 따라 *Coprinus*, *Coprinellus*, *Coprinopsis* 세 개의 속으로 나뉘어졌다. 그러나 이 세 속에 속하는 모든 종들은 버섯 갓이 자가분해되어 먹물을 생성하는 동일한 현상을 보인다. 먹물버섯류의 대표인 먹물버섯(*Coprinus comatus*)은 말의 분변, 두엄 그리고 낙엽에서 잘 자라며 리그닌 분해 효소균을 생성한다. 2013년 9월에 강원도 춘천 근교에서 *C. comatus* 균주 하나를 분리하였고 이 균주가 생성하는 laccase의 생화학적 특성과 정제된 효소에 의한 두 가지 염료의 탈색에 대하여 보고한다.

*For correspondence. E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8511; Fax: +82-33-259-5664

재료 및 방법

C. comatus 배양

실험에 사용된 균주인 *C. comatus*는 2013년 9월 춘천 근교에서 분리하여 potato dextrose agar (Difco)에서 배양하고 보관하였다. 이 균으로부터 laccase를 정제하기 위하여 potato dextrose broth (Difco), yeast extract malt extract glucose 배지 (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, 1 L d-H₂O), yeast extract peptone dextrose (YEPD) 배지(yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g, 1 L d-H₂O) 등의 액체배지에 접종하고 25°C에서 진탕배양 하면서 효소의 활성을 비교하였다.

C. comatus laccase 정제 및 생화학적 특성 분석

가장 높은 효소활성을 보인 YEPD 배지(300 ml, 1 L baffled flask)에서 3일 동안 진탕배양하고 원심분리(7,500 × g)와 여과과정을 거쳐 배양액(900 ml)을 수확하였다. 냉각된 배양액에 ammonium sulfate를 85% 포화가 되도록 더하여 단백질을 침전시키고 단백질을 10 mM phosphate buffer를 사용하여 3회 투석하였다. Laccase 정제는 10 mM phosphate buffer에 현탁한 이온교환수지 DEAE-Sepharose CL-6B (3.5 × 40 cm)에 효소액 15 ml을 엮고 500 ml 동일한 완충용액으로 세척 후에 0~0.5 M NaCl gradient 용액으로 단백질을 용출하였다. 활성을 보인 분획을 ultrafiltration (pore size 10 kDa) 방법으로 농축하여 10% native gel로 만든 preparative gel electrophoresis (Prep Cell, Bio-Rad)에서 10 ml/h 속도로 단백질을 분리·정제하였다(Kim et al., 2008). Laccase 효소활성은 *o*-tolidine을 발색기질로 사용하여 측정하였고(Ko et al., 2001) 효소단백질의 분자량은 10% SDS-PAGE를 사용하여 측정하였다(Laemmli, 1970). 효소활성의 최적 pH는 25°C에서 pH 3~6 (0.1 M citrate-phosphate buffer)와 pH 6~8 (0.1 M phosphate buffer)에서 분석하였고, 최적온도는 pH 4.3 에서 10~40°C 범위에서 분석하였다. 기질 *o*-tolidine에 대한 Km 값과 Vmax 값은 0.2~1.0 mM 범위에서 초기반응속도를 측정하여 분석하였다. 모든 생화학적 특성분석 실험은 3개씩 동시에 진행하여 평균값을 구하였다.

정제된 laccase에 의한 두 가지 염료의 탈색

리그닌 분해효소의 존재유무를 빠르게 확인할 때 자주 사용하는 RBBR (300 μM)과 polymeric 염료인 Poly-R 478 (0.01%) 190 μl에 효소 10 μl (10 u)을 더하고 25°C에서 배양하고 색깔의 변화를 600 nm와 400 nm에서 분석하였다.

결과 및 고찰

C. comatus laccase의 생화학적 특성

여러 가지 액체배지에서 *C. comatus*를 진탕배양하고 laccase 활성을 비교한 결과 YEPD 배지에서 가장 높은 활성을 보였다 (결과 미제시).

정제된 laccase 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에서 약 67 kDa으로 추정(Fig. 1)되며, 동일 종에서 낮은 질소원+ 높은 탄소원(low nitrogen-high carbon: LNHC) 배양조건에서 생성되는 분자량 70 kDa의 laccase (Jiang et al., 2013)와 아교버섯 laccase의 분자량(75 kDa: Kim et al., 2008) 및 겨울우산버섯 laccase의 분자량(70 kDa: Kim et al., 2012) 보다 작은 것으로 확인되었다. 그러나 먹물버섯 류의 한 종인 두엄먹물버섯 *Coprinellus congregatus*가 생성·분비하는 산성 laccase의 분자량(60.5 kDa: Choi et al., 1995) 보다는 크다. 최적 산도는 pH 4.3이었으며(Fig. 2A), 최적 온도는 25°C로 확인되었다(Fig. 2B). 기질 *o*-tolidine에 대한 Km 값은 0.45 mM이었고, Vmax 값은 0.0132 OD/min/unit이었다. 두엄먹물버섯(Choi et al., 1995), 아교버섯(Kim et al., 2008) 그리고 겨울우산버섯(Kim et al., 2012)의 laccase들이 pH 4.0~4.5, 20°C에서 최대활성을 보인 것과 유사하며, Km 값과 Vmax 값도 동일한 범위에 속하였다. *C. comatus* laccase cDNA를 *Pichia pastoris*에서 발현한 효소는 기질 2,6-dimethylphenol에서 pH 5.5, 70°C에서 최적 활성을 보였고, 기질 syringaldazine에서 pH 6.0, 50°C에서 최적 활성을 보인 것과 크게 다르다(Bao et al., 2013).

구멍장이버섯에 속하는 영지(*Ganoderma lucidum*)는 65~68 kDa의 laccase 동위효소 3개를 생성하였으며, 최적산도 pH

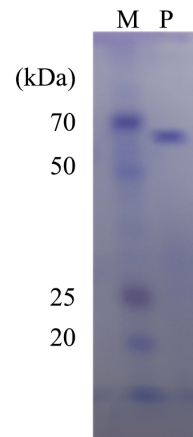


Fig. 1. Determination of molecular weight of the purified laccase protein by 10% SDS-PAGE. M, molecular weight marker; P, purified laccase. Laccase was purified through ion-exchange chromatography and preparative gel electrophoresis.

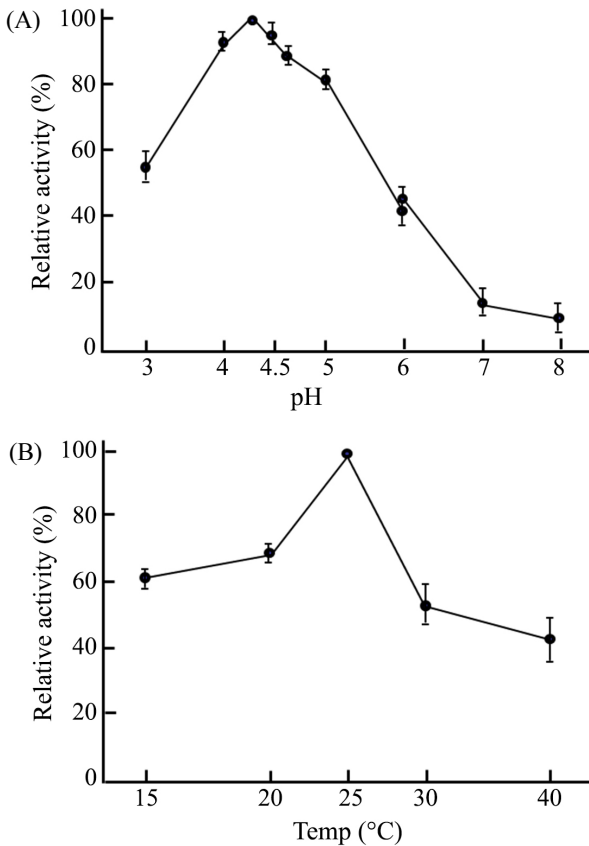


Fig. 2. Determination of optimum pH (A) and optimum temperature (B). Laccase assay was performed using *o*-toluidine as the chromogenic substrate.

3.5와 최적온도 20°C를 보였다(Ko *et al.*, 2001). 이 실험에서 사용한 기질 *o*-toluidine에 대하여 Km 값은 0.402 mM이었고, Vmax 값은 0.0198 OD/min/unit로 매우 유사하였고 또 다른 기질 2,2'-azino-bis-(3-ethylthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)에 대한 Km 값은 0.0037 mM이었고, Vmax 값은 0.0142 OD/min/unit로 *o*-toluidine에 비하여 100 이상의 친화도를 보였다(Ko *et al.*, 2001). 네팔에서 분리한 영지는 43 kDa의 분자량과 pH 5.0 및 30°C의 생화학적 특성을 보였으며, 기질 ABTS에 대하여 Km 값 0.11 mM과 Vmax 값 0.036 OD/min/unit을 보였다(Shrestha *et al.*, 2016).

C. comatus laccase에 의한 두 가지 염료의 탈색

Laccase를 포함하여 리그닌 분해효소 활성을 빠르게 비교하는 목적으로 RBBR과 Poly-R 478의 탈색능을 분석하였다. 정제된 laccase 10 U을 RBBR (300 µM)과 Poly-R 478 (0.01%) 190 µl에 각각 더하고 25°C에서 12시간 동안 탈색을 확인하였다. RBBR은 49.3% 수준의 탈색을 보였고, Poly-R 478은 약 41.6% 수준의 탈색을 보였다(Fig. 3). *C. comatus* laccase에 의

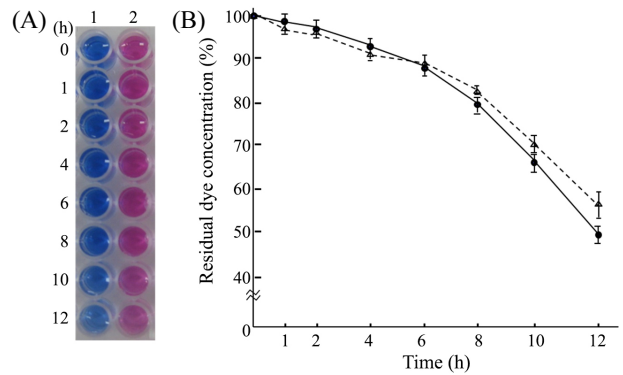


Fig. 3. Confirmation of decolorization of RBBR and Poly R-478 by the purified laccase. (A) Photograph of decolorization of two dyes. Lanes: 1, RBBR; 2, Poly R-478. (B) Residual concentrations of two dyes after incubation with laccase. ●—●, RBBR; ▲—▲, Poly R-478. Decolorization was measured by spectrophotometry at 600 nm (RBBR) and 400 nm (poly R-478).

한 염료의 탈색에 대해서는 다음에 보고된 세가지 경우와 비교하면 탈색능이 저조한 것으로 보인다: (1) Laccase cDNA를 *Pichia pastoris*에서 발현하여 얻은 효소를 이용하여 40°C에서 12시간 후에 RBBR이 86.99% 탈색되었다는 보고(Bao *et al.*, 2013), (2) *C. comatus*를 LNHC 배양조건에서 배양하여 확보한 laccase가 40°C에서 RBBR을 약 75% 수준까지 탈색한 것(Jiang *et al.*, 2013), (3) 그리고 겨울우산 버섯의 laccase가 5시간 후에 RBBR을 70%까지 탈색한 것(Kim *et al.*, 2012). 구멍장이버섯의 한 종인 *Cerrena unicolor*에서 보고된 laccase는 분자량 63.2 kDa, 최적산도 pH 2.6, 최적온도 45°C, 그리고 ABTS에 대하여 Km 값 0.303 mM과 Vmax 값 0.0136 OD/min/unit의 생화학적 특성을 보였으며 pH 3.0, 25°C 조건에서 수행한 malachite green과 bromothymol blue에 대하여 12시간에 62.4%와 84.9%의 탈색을 보인 반면 RBBR에 대하여 8.1%의 탈색을 보였다(Wang *et al.*, 2017). 이처럼 염료의 종류에 따라 탈색정도가 크게 차이를 보일 뿐만 아니라 몇 가지 기질에 대한 Km 값과 Vmax 값이 염료 탈색에 대한 기준이 되지 않으므로 각 버섯균에서 해당 laccase가 실제로 어떤 기능과 역할을 보이는가에 따라 다를 것이다. 즉 이 실험에서 보고한 균주는 액체 YEPD 배지에서 5~6일 후에 최대 효소 활성을 보이지만 배양액이 짙은 검은 갈색으로 변하여 멜라닌 색소 생성이 매우 활발하다. 따라서 이 균에서의 해당 laccase가 실제로 어떤 기능을 보이는지 확인할 필요가 있다.

적 요

떡물버섯 *Coprinus comatus*를 yeast extract peptone dextrose 액체배지에서 배양하고 laccase의 생성·분비를 확인하였다. 이 때 분비된 laccase를 이온교환수지 방법과 전기영동 분획 수집방법으로 순수하게 정제하였다. 정제된 효소단백질의 분자량은 SDS-PAGE로 분석하였을 때 약 67 kDa으로 나타났고 최적산도는 pH 4.3, 최적온도는 25°C로 확인되었다. 기질 *o*-tolidine에 대한 K_m 값은 0.45 mM, V_{max} 값은 0.0132 OD/min/unit로 나타났다. 정제된 laccase를 사용하여 염료 RBBR과 Poly R-478의 탈색을 분석한 결과 배양 12시간 후에 RBBR은 49.3% 탈색되었고 poly R-478은 41.6% 탈색되었다.

감사의 말

이 논문은 2015년 강원대학교 학술연구조성비의 연구비로 수행되었음.

References

- Bao, S., Teng, Z., and Ding, S. 2013. Heterologous expression and characterization of a novel lacase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 1927-1936.
- Choi, Y.O., Kim, S.J., and Choi, H.T. 1995. Purification and characterization of laccase from *Coprinu congregates*. *Microorganisms Industry* **21**, 351-358.
- Jiang, M., Ten, Z., and Ding, S. 2013. Decolorization of synthetic dyes by crude and purified laccases from *Coprinus comatus* grown under different cultures: the role of major isoenzyme in dyes decolorization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 660-672.
- Kang, A.R., Choi, H.T., and Song, H.G. 2008. Optimization of bisphenol A biodegradation by *Trametes versicolor*. *Korean J. Microbiol.* **44**, 37-42.
- Kim, H., Lee, S., Ryu, S., and Choi, H.T. 2012. Decolorization of remazol brilliant blue R by a purified laccase of *Polyporus brumalis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 159-164.
- Kim, Y., Yeo, S., Kim, M.K., and Choi, H.T. 2008. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**, 172-175.
- Ko, E.M., Leem, Y.E., and Choi, H.T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 98-102.
- Kum, H., Lee, S., Ryu, S., and Choi, H.T. 2010. Dye removal by *Phlebia tremellosa* transformants with lignin degrading enzymes. *Korean J. Microbiol.* **46**, 93-95.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Shrestha, P., Joshi, B., Joshi, J., Malla, R., and Sreerama, L. 2016. Isolation and physicochemical characterization of laccase from *Ganoderma lucidum*-CDBT1 isolated from its native habitat in Nepal. *Biomed Res. Int.* DOI: 10.1155/2016/3238909.
- Wang, S.S., Ning, Y.J., Wang, S.N., Zhang, J., and Zhang, G.Q. 2017. Purification, characterization, and cloning of an extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Cerrena unicolor* GSM-01. *Int. J. Biol. Macromol.* **95**, 920-927.
- Zhao, S., Rong, C.B., Kong, C., Liu, Y., Xu, F., Miao, Q.J., Wang, S.X., Wang, H.X., and Zhang, G.Q. 2014. A novel laccase with potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus*. *Biomed. Res. Int.* DOI: 10.1155/2014/417461.