

## 액체배양한 *Coprinus congregatus*에서 세포막 연관 laccase의 생성 조절

최영옥 · 하은수 · 김순자 · 최형태\* · 윤권상  
강원대학교 미생물학과

### Regulation of membrane-associated laccase synthesis in liquid culture of *Coprinus congregatus*

Yong-Ok Choi, Eun-Soo Ha, Soon-Ja Kim,  
Hyoung-Tae Choi\* and Kwon-Sang Yoon

Department of Microbiology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701

**ABSTRACT:** When *Coprinus congregatus* was cultivated in low pH YpSs medium(pH 4.2), the culture supernatant turned brown earlier than that of normal(pH 7.1) medium resulted from the melanization synthesized by the secreted laccase reaction. The pH of medium became 5.2 after 24 h incubation. Laccase which was deeply related to the fungal development might also be implicated in the neutralization of excess hydrogen ions to protect from acidification of cytoplasm.

**KEYWORDS:** *Coprinus congregatus*, laccase, enzyme regulation.

*Coprinus congregatus*는 균사로부터 버섯을 형성하는 분화과정 단계별로 laccase의 동위효소를 생성한다. Emerson's yeast protein-soluble starch (YpSs) 한천배지상(Difco)의 균사끝(mycelial mat)에서 최근 1일간 자란 가장 바깥 부분)에서 나타나는 laccase와 버섯생성과정의 시원체(primordium)에 나타나는 효소등 두 가지인데 이들은 native polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)로 분석할 때 서로 다른 전기영동상을 보인다(Choi, 1987). 또한 *C. congregatus*를 YpSs 액체배지에 접종하고 진탕 배양할 경우 5일 이상된 균체에 sclerotium의 형성과 함께 laccase가 생성되며 이 효소는 시원체의 효소와 전기영동상이 동일하다(Choi, 1987; Choi등, 1987). 이들은 모두 세포막에 연관되어 있어 laccase가 균체 밖으로 분비되지 않는다(Ross, 1982; Choi and Ross, 1990; Choi등, 1987). 한천배지상의 균사끝 laccase는 빛의 자극을 전달하는 과정에(Ross, 1982), 시원체와

진탕배양 균체의 효소는 균사의 분화와 관련되어 있을 것으로 판단되며(Choi, 1987; Choi등, 1987) 이들은 모두 균색소인 melanin을 합성한다.

온도, pH, 배지성분의 변화등이 균의 생리대사 작용에 변화를 가져 온다는 것은 잘 알려진 사실이다. YpSs 액체배지의 pH 7.1를 pH 4.0-4.5로 낮춰서 *C. congregatus*를 접종하였을 경우 진탕배양 균체의 효소는 전혀 생성되지 않은 대신 한천배지의 균사끝 효소가 짧은 시간에 생성되어 배지로 분비되었다(Kim등, 1991). 이 효소가 한천배지에서 생성되는 세포막 연관 laccase임을 전기영동방법으로 확인하였으나(Kim등, 1991) 분비된 효소의 역할에 대하여는 보고가 없었다. Laccase의 가장 잘 알려진 기능이 melanin을 생합성하는 것이므로 *C. congregatus*를 산성액체배지(pH 4.2)에서 진탕배양할 경우 분비된 laccase에 의하여 melanin 색소의 생합성 속도를 측정하였고 이 효소의 생성조절을 단백질 합성저해제(5-fluorouracil, cycloheximide)를 사용하여 실험하였다.

\*Corresponding author

## 材料 및 方法

### 균주 및 배양

*Coprinus congregatus* Fries dikaryon(cc13×16) (Ross, 1982)을 YpSs 한천사면배지에 접종, 25°C 에서 배양하고 냉장고에 보관하였다. 균을 YpSs 액체 배지(pH 7.1) 300 ml에 접종하고 25°C 에서 4일간 진탕배양하고 waring blender로 균을 마쇄한 후 산성(pH 4.2) 액체배지 3 L(5 L fermentor)에 접종 하였다. 배양온도는 25°C, 공기주입량은 1.5 L/min, impeller의 회전속도는 200 rpm으로 조절하였다.

### Laccase에 의한 색소의 생성

배양상등액을 일정시간대에 채취하여 laccase 역가와 산도변화를 측정함과 동시에 적갈색 색소의 생성속도를 측정하기 위하여 ELISA Reader를 사용하여 적갈색의 보색파장인 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소의 생성·분비 조절

산성배지에서 *C. congregatus*에 의한 laccase의 분비가 수소이온의 자극에 의하여 유전자가 발현되어 생성분비된 것인가를 확인하기 위하여 transcription, translation inhibitor를 사용하였다. Transcription inhibitor인 5-fluorouracil(5-FU)은 dimethylsulfoxide에, translation inhibitor인 cycloheximide (CHX)는 70% ethanol에 각각 녹여 산성 액체배지 200 ml(1 L flask)에 5-FU는 0.5 mM, 1.0 mM의 농도로, CHX는 0.5 mg/L, 1.0 mg/L의 농도로 더하고 마쇄한 균을 20 ml 접종하였다. 효소의 역가는 일정시간대에 배양상등액을 채취하여 o-tolidine을 기질로 하여 25°C 에서 1시간 동안 발색반응을 시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정함으로써 조사하였고 (Ross, 1982) 단백질 정량은 Lowry등(1951)의 방법을 사용하였다.

## 結果 및 考察

### Laccase에 의한 색소의 생성

*Coprinus congregatus*를 산성 액체배지 fermentor에 배양하였을 경우 laccase의 분비는 24시간만에 최대치를 보였다(Fig. 1). 이는 삼각 flask에서 배양할

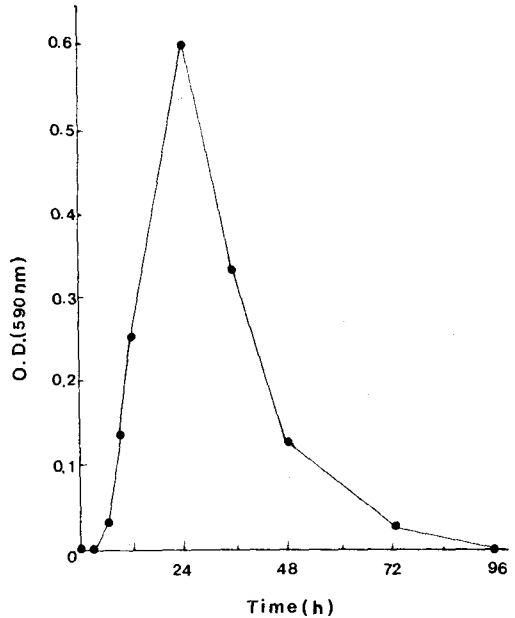


Fig. 1. Secretion of laccase at the time indicated in low pH YpSs medium(pH 4.2).

때 48시간에 최대치를 보였던 것(Kim등, 1991)보다 효소의 분비가 빠르다. 즉 공기의 주입과 impeller에 의한 효과적인 군사체의 뒤섞임에 의하여 수소이온(즉 proton)에 의한 효소의 분비가 빨라졌다고 판단된다. 산성 액체배지의 배양상등액에서 적갈색 색소가 생성되는 속도를 측정하기 위하여 중성배지의 배양상등액과 함께 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다(Fig. 2). 배양 24시간에서 72시간까지는 산성 배지에서 빠른 색소생성을 보였고 120시간 이후에는 중성배지에서 흑갈색의 색소가 생성되었다. 산성배지의 경우 72시간까지 효소력이 존재하는 기간과 색소의 생성이 일치하며 중성배지의 경우 4일 이후에 sclerotia를 형성하면서 laccase가 합성되는 시간도 일치한다(Choi등, 1987). 산성배지 배양상등액의 산도변화를 측정할 결과 배양 24시간만에 pH 4.2에서 pH 5.3으로 빠른 변화를 보였고 48시간 이후에는 중성화의 속도가 느리게 나타났다(Fig. 3). *C. congregatus*는 pH 5.0 이상의 배지에서는 laccase를 생성분비하지 않으며(Kim등, 1991) 이는 24시간 이후부터 효소력의 급격한 감소와 일치한다. 또한 laccase 효소력이 높을 때 배지의 산성이 빠르게 중화되었는데 이는 laccase에 의하여 배양액내의 방

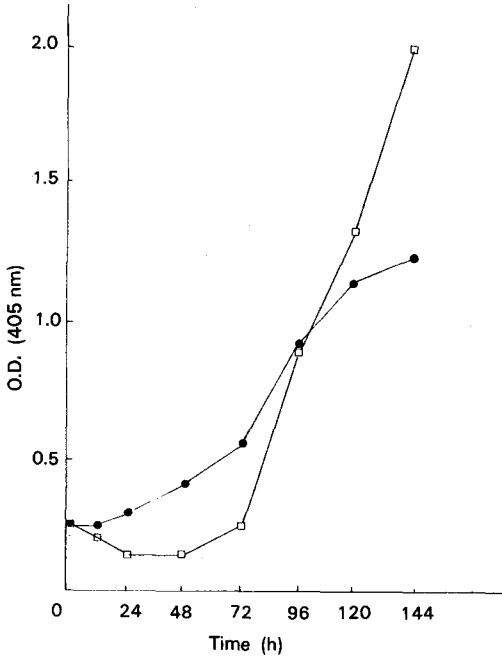


Fig. 2. Pigmentation by melanin synthesis of the culture supernatants(absorbancy at 405 nm). Circle, pH 4.2 medium; square, pH 7.1 medium.

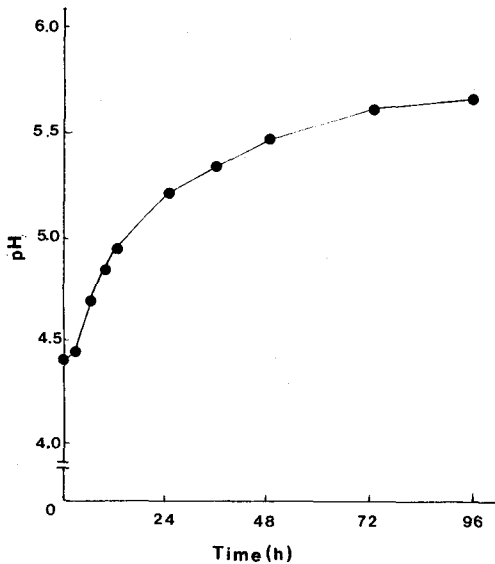


Fig. 3. Change of pH of the low pH medium.

항죽 화합물들이 oxidative polymerization 과정을 거쳐 균색소인 melanin으로 합성되었으며(Molitoris, 1978) 이때 배지의 proton을 소모하여 배지의 중성

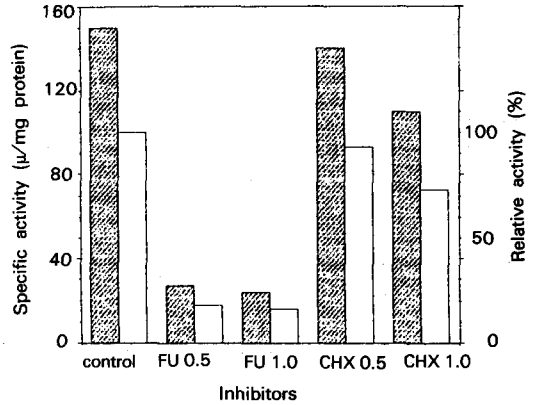


Fig. 4. Effect of 5-fluorouracil and cycloheximide on the secretion of laccase in a low pH medium. Control, no inhibitor; FU 0.5, 5-fluorouracil 0.5 mM; FU 1.0, 5-fluorouracil 1.0 mM; CHX 0.5, cycloheximide 0.5 mg/L; CHX 1.0, cycloheximide 1.0 mg/L. Closed bar, specific activity(μ/mg protein); open bar, relative activity (%).

화가 빠르게 진행되었기 때문이다. 산성배지에서 세포질의 산성화를 막기 위하여 배지의 proton이 lysine과 함께 세포질 내로 운반되어 carboxyl 기를 제거하고 proton을 붙여 CO<sub>2</sub>로 날려 보내는 복잡하고도 많은 에너지를 요구하는 *E. coli*의 *cad* operon(Meng and Bennett, 1992)과 달리 세포 밖에서 수소이온을 소모시켜 배지의 산도를 중화시키는 안전한 방식이라고 하겠다.

수소이온에 의한 laccase의 생성조절

유전자의 발현에 의한 단백질 합성을 저해하는 물질을 멸균된 배지에 더하고 균을 접종하여 24시간 후에 배양상등액의 효소력을 측정하였다(Fig. 4). 대조구에서 배양상등액의 laccase activity가 150 unit 인데 비하여 0.5 mM과 1 mM의 5-fluorouracil에서는 각각 18%, 16% 수준인 27 μ와 24 μ이었고 0.5 mg/L, 1.0 mg/L의 cycloheximide에서는 각각 93%, 73% 수준인 140 μ, 110 μ이었다. *Neurospora crassa*에서 cycloheximide 10 μM(2.8 mg/L에 해당)에 의하여 laccase 생성이 억제되었으나 2.8 μM(0.79 mg/L에 해당)의 cycloheximide에 의하여 laccase의 합성이 유도되며(Linden등, 1991: 저자들은 stress에 의한 laccase의 생성분비로 논의하였음) 본 실험에

서도 비슷한 농도의 cycloheximide에 의하여 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 5 mg/L로 농도를 올렸을 경우 laccase의 분비가 완전히 억제되었다(결과 미제시). *Aspergillus nidulans*에서는 conidia가 발아하는 동안 100 mg/L의 cycloheximide에 의하여 chitin synthetase의 합성은 물론 발아도 진행되지 않았고 2 mM의 5-fluorouracil에 의하여 발아는 억제되었으나 chitin synthetase의 합성과 세포벽의 chitin 함량은 증가되었다. 이는 conidia에 이미 chitin synthetase의 mRNA가 존재하며 발아하는 동안 translation에 의하여 효소의 합성이 진행되었음을 말한다(Ryder and Peberdy, 1979). 본 실험에서는 *Asp. nidulans* conidia의 경우와는 달리 0.5 mM의 5-fluorouracil에 의하여 laccase의 합성이 크게 저하되었으며 이는 laccase 유전자가 proton 자극에 의하여 transcription, translation 과정을 거쳐 발현되었고 합성된 효소가 세포밖으로 분비되었음을 뜻한다. 결론적으로 *C. congregatus*를 산성 액체배지(pH 4.2)에서 배양하면 균 자신을 proton으로부터 보호하기 위하여 laccase를 빠른 시간대에 합성분비하며 이 효소는 melanin을 만드는 과정에서 proton을 소모하고 배지의 산성을 중화시킨다.

### 摘 要

*C. congregatus*를 산성 액체배지(pH 4.2)에 배양할 경우 세포막연관 laccase가 배양 초기에 대량 합성 분비되었으며 분비된 효소의 작용에 의하여 melanin 색소가 중성배지에 비하여 빨리 생성되었고 배양 24 시간 후에 배지의 산도는 pH 5.2로 증가되었다. 이 효소의 합성은 transcription inhibitor인 5-fluorouracil에 의하여 크게 억제되었다.

### 謝 辭

이 논문은 과학재단 우수센터(서울대학교 분자미

생물학 연구센터) 지원연구비(1993)에 의하여 수행되었음.

### 參考文獻

- Choi, H. T. 1987. Phenoloxidases and photomorphogenesis in *Coprinus congergatus*. Ph. D. Thesis. Univ. California Santa Barbara.
- Choi, H. T. and Ross, I. K. 1990. Localization of phenoloxidases in *Coprinus congregatus* grown on a low-temperature-liquifying medium. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 274-277.
- Choi, H. T., Wilks, R. L. and Ross, I. K. 1987. Formation of sclerotia in liquid culture of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycol.* **79**: 166-172.
- Kim, S. J., Choi, H. T., Kang, S. O. and Hah, Y. C. 1991. Secretion of membrane-associated laccase in liquid culture of *Coprinus congregatus*. *Kor. J. Microbiol.* **29**: 267-269.
- Linden, R. M., Schilling, B. C., Germann, U. A. and Lerch, K. 1991. Regulation of laccase synthesis in induced *Neurospora crassa* cultures. *Curr. Genet.* **19**: 375-381.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Parr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Meng, S-Y. and Bennett, G. N. 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* **174**: 2659-2669.
- Molitoris, H. P. 1978. Wood degradation, phenoloxidases and chemotaxonomy of higher fungi. *Mushroom Sci.* **10**: 243-263.
- Ross, I. K. 1982. The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2763-2770.
- Ryder, N. S. and Peberdy, J. F. 1979. Chitin synthetase activity and chitin formation in conidia of *Aspergillus nidulans* during germination and the effect of cycloheximide and 5-fluorouracil. *Exp. Mycol.* **3**: 259-269.