

표고 교잡균주들의 세포외 laccase 활성 검출에 미치는 배지성상과 발색반응 시약의 영향 분석

김준영¹ · 권혁우¹ · 당룡장¹ · 고한규³ · 김성환^{1,2*}

¹단국대학교 미생물학과, ²단국대학교 기초과학연구소, ³산림조합중앙회 산림버섯연구소

Analysis of the Effect of Media Types and Chromagenic Chemicals on the Detection of Extracellular Laccase Activity among *Lentinula edodes* Strains

Jun Young Kim¹, Hyuk Woo Kwon¹, Longqing Tang¹, Han Kyu Ko³ and Seong Hwan Kim^{1,2*}

¹Department of Microbiology and ²Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
³Forest Mushroom Research Center, National Forestry Cooperative Federation, Yeosu 469-803, Korea

(Received 17, March 2011., Accepted 21, March 2011)

ABSTRACT : Breeding of *Lentinula edodes* generates a number of hybrid strains that are subject to evaluation for good traits for the mushroom production. As an effort to understand biochemical properties of the hybrid strains, this study tried to develop a fast and easy method for comparison of the ability of producing extracellular laccase among hybrid strains of *Lentinula edodes*. For this aim, we estimated the effect of media types and chromagenic chemicals on the detection of extracellular laccase in seven hybrid strains of *L. edodes*. When Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye was used for chromagenic reaction, the detection of the enzyme activity was feasible both in the solid and liquid media containing not potato dextrose but malt extract as a nutrient component. When guaiacol was used for chromagenic reaction, the detection of the enzyme activity was feasible both in the solid and liquid media containing either potato dextrose or malt extract as a nutrient component. Malt extract-based liquid culture with RBBR or guaiacol in 2 ml microfuge tube allowed us to economically and quantitatively detect and compare the enzyme activity within 3 days among the tested hybrid strains of *L. edodes*.

KEYWORDS : Dye effect, Guaiacol, Laccase, *Lentinula edodes*, Remazol Brilliant Blue R.

서 론

표고는 한국, 중국, 일본 등 동아시아 지역에서 주로 재배가 이루어지고 있는 주요한 식용 및 약용 버섯이다. 표고 버섯균은 또한 우수한 목재 분해력과 복합물질 분해 능력이 있는 백색 목재부후균류이다. 우수한 식용 버섯 생산용 균주의 육성이나 물질분해 효율이 좋은 표고 균주를 얻기 위해서는 야생균주 자원의 수집과 더불어 교잡을 통한 유전학적 연구가 요구된다. 비록 최근 유전공학적 기술을 이용하여 변이체 선발을 통한 우수균주를 선발하는 방식이 균류를 대상으로 시도되고 있지만 아직까지도 대부분의 표고 균주의 개발은 주로 서로 다른 특성을 지닌 표고 균주를 선택하여 교배를 시도하고 교잡이 이루어진 균주들을 대상으로 달라진 특성을 지닌 균주를 선발하는 재래식 방법이 주도적으로 수행되고 있다. 이러한 교잡작업 과정 중 교배 조합으로 생겨나는 수많은 교잡균주에 대하여 지금까지는 주로 생육특성과 재배기질에서의 자실체 발생 특성을 조사하는 쪽으로

연구가 이루어져왔다. 이는 버섯의 발생과 신품종 육종의 측면에서의 접근에만 초점을 둔 결과에서 비롯된 것이라 할 수 있다. 따라서 교잡이 이루어져 만들어진 교잡균주들에 있어서 실제 서로 어느 정도 특성 변화가 오는지에 대한 기초적인 정보는 거의 없는 실정이다. 또한 교잡 과정 중 만들어지는 교잡균주의 수가 많으므로 이들을 효율적으로 짧은 시간 안에 간편하게 평가할 수 있는 방법이 부재하기 때문에 많은 경우 기초적인 정보를 얻으려는 시도가 이루어지지 않았다. 그 결과 좋은 특성이 있음에도 불구하고 발굴되지 못하고 버려지는 교잡균주가 있음을 배제할 수 없는 실정이다.

Laccase(EC 1.10.3.2)는 활성부위 중심에 구리 원자를 지니고 있는 polyphenol oxidase의 일종으로 흔히 Multi-copper oxidase라고도 불린다. 이 효소는 리그닌과 연계된 페놀계 및 비페놀계 화학물질을 비롯하여 내분비 체계에 장애를 주는 화학물질, 살충제, 제초제, 염료에 이르는 환경오염물질의 정화와 관련된 연구가 이루어지고 있는 중요한 효소이다 (Couto and Toca-Herrea, 2006; Leonowicz *et al.*, 2001). 표고에서는 지금까지 2가지 laccase가 알려졌으며(Nagai *et al.*, 2002), lignin 분해와 버섯의 분화에 관련이 되어 있다는

*Corresponding author <E-mail : piceae@naver.com>

보고가 많이 있다(Garyf and Marka, 1981; Leatham and Stahmann, 1981; Ohga and Rosey, 2001; Zhao and Kwan, 1999).

본 연구에서는 표고 교잡균주들의 생화학적 특성을 이해하기 위한 하나의 시도로서 교잡균주간의 laccase 효소의 활성을 비교하는 간편한 방법을 모색하고자 균사체 배양 배지의 성장과 염색물질이 laccase 활성 검출에 미치는 영향을 조사 비교하였다.

재료 및 방법

표고버섯 시험균주

본 연구에 사용한 표고버섯 시험균주는 경기도 여주에 소재한 산림조합중앙회 산림버섯연구소에서 육종연구 수행 중에 만들어진 계통이 서로 다른 2가지 단핵균주를 교배시켜 만든 이핵체의 교잡균주로서 6개 균주를 이용하여 진행하였다(Table 1).

Laccase 효소 측정배지 선정

Laccase 효소 측정법으로는 고체 배지에 기질을 넣어 색이 변하는 것을 확인 하는 방법과 laccase 효소를 정제하여 측정하는 방법이 주로 사용되어 왔다(Christian and Andrzej, 2000; Kiiskinen *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 1995; Ryu *et al.*, 2003). 표고에 있어서 laccase는 여러 연구자들에 의해 그 특성이 보고되었는데 고체배지에서 활성 효소를 분리하거나 액체배지에서 분리 한 경우가 있어 배양 조건에 따라 그 특성이 다를 수 있다고 Nagai 등(2003)은 지적하였다. 이에 따라 본 연구에서는 비교 대상 표고균주를 고체배지와 액체배지로 나누어 laccase 검출을 비교하고 색이 변하는 것을 쉽게 관찰하는 방법에 사용되는 염색기질인 Remazol Brilliant Blue R(RBBR)과 guaiacol을 선정하여 비교하였다. 고체배지의 비교로서는 제일 흔하게 쓰이는 potato dextrose agar (PDA)와 malt extract agar(MEA) 배지를 영양배지로 하여 비교하였다. 액체배지로는 potato dextrose(PD) broth와 malt extract(ME) broth를 영양배지로 하여 비교하였다. 발색반응 검출을 위한 화학염료로는 발색 반응 시약인 RBBR(Remazol Brilliant Blue R, Sigma Co.)와 Guaiacol(Sigma Co.)를 사용하였다. RBBR의 경우 2%의 용액을 만들어 여과한다음 각각의 멸균된 고체배지와 액체 배지에 최종농도가 0.04%가 되도록 첨가하였다. Guaiacol은 각각의 배지를 만들 때 최종 농도가 0.01%가 되도록 첨가하고 멸균 후 사용하였다.

배지에서의 정성적 효소 활성 검출

배지에서의 활성 검출 비교를 위하여서는 시험균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C 배양기에서 4일간 배양하여 키운 다음 접종용 균주로 사용하였다. 고체배지에 시험균주를 접종하기 위해서는 지름 0.5 cm의 살균된 cork borer를 사용하여 동일한 성장선상에 있는 균총의 균사 끝 부분에서 agar plug를 떼어내어 RBBR 또는 guaiacol이 첨가된 PDA와 MEA배지

중양에 각각 하나씩 접종하였다. 접종된 고체 배지는 25°C 배양기에서 7일간 배양 후 발색을 조사하였다. Laccase 효소 활성 검출을 위해서는 RBBR이 첨가된 배지의 경우는 청색에서 clear zone의 형성을 조사하였고, guaiacol이 첨가된 배지의 경우는 무색에서 갈색 또는 붉은 갈색이 나타나는 것을 조사하였다. 액체 배지에 시험균주를 접종하기 위해서는 고체 배지에서와 동일한 방법으로 접종용 균주를 키우고 agar plug를 떼어내어 RBBR 또는 guaiacol이 첨가된 30 ml의 PD broth 와 ME broth가 담긴 50 ml plastic tube에 하나씩 접종하였다. 접종된 액체 배지는 25°C 회전식 배양기에서 150 /rpm 속도로 7일간 배양 후 배지의 색 변화를 조사하였다. Laccase 효소 활성 검출을 위해서는 RBBR이 첨가된 배지의 경우는 청색이 열리는 것을 조사하였고, guaiacol이 첨가된 배지의 경우는 무색에서 갈색 또는 붉은 갈색이 나타나는 것을 조사하였다.

정량적인 효소 활성 검출

준비된 시험균주의 agar plug를 떼어내어 RBBR 또는 guaiacol이 첨가된 1.5 ml의 PD broth 와 ME broth가 담긴 무균 처리된 2 ml microfuge tube에 하나씩 접종하였다. 접종된 액체 배지는 25°C 배양기에서 3일간 배양 후 정제 배양 후 8,000 rpm 으로 3분간 microcentrifuge한 다음 상층액 1 ml 을 취하여 spectrophotometer로 RBBR 함유 배지의 경우는 560 nm에서 guaiacol 함유배지는 495 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정에 사용된 파장은 RBBR 또는 guaiacol 이 함유된 PD broth와 ME broth를 사전에 scanning 하여 가장 큰 흡광도 값을 보인 파장을 선택하였다. 흡광도 측정은 시료당 3반복으로 측정을 수행하였다.

결과 및 고찰

고체배지에서의 laccase 활성 검출 비교

고체배지에서의 laccase 활성을 측정된 결과를 보면 RBBR 를 함유하는 PDA의 경우 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 청색을 띄고 있었고 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때 균사는 자랐으나 clear zone은 보이지 않았다(Fig. 1A, B). 이에 반하여 RBBR를 함유하는 MEA의 경우는 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 청색을 띄고 있었으나 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때 clear zone을 형성하였다(Fig. 1C, D). 이는 표고버섯균의 균사에서 분비한 세포외 laccase에 의해 MEA의 경우는 발색 반응이 일어났음을 시사한다. 한편 guaiacol을 함유하는 PDA의 경우는 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 무색을 띄고 있었고 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때는 갈색으로 발색이 일어났다(Fig. 1E, F). 이러한 결과는 guaiacol을 함유하는 MEA의 경우에도 유사하게 나타났다. 이는 표고버섯균의 균사에서 분비한 세포외 laccase에 의해 guaiacol을 함유하는 경우는 PDA와 MEA 모두 발색 반응이 일어났음을 시사한다. 이러한 발색반응의

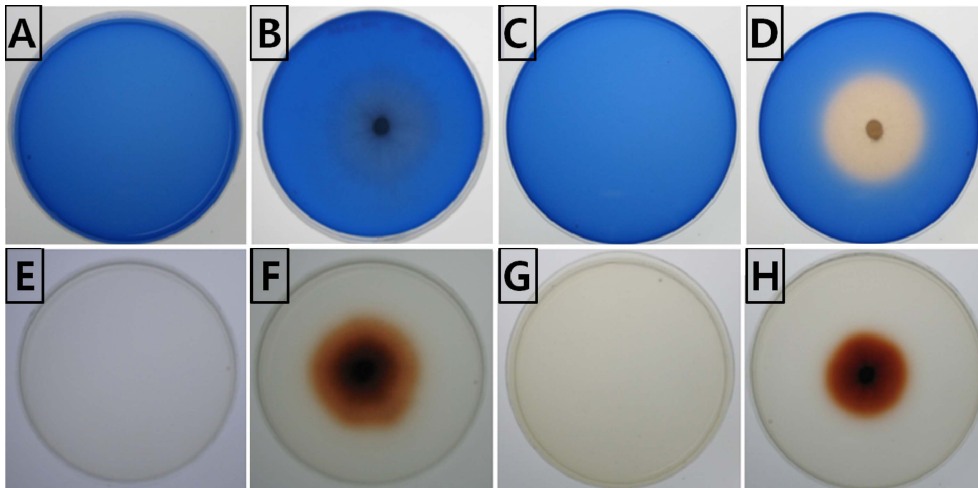


Fig. 1. Examples of the detection of extracellular laccase activity produced by *Lentinula edodes* on solid media plates containing different dyes and nutrients. A, PDA containing RBBR without inoculation; B, PDA containing RBBR with inoculation; C, MEA containing RBBR without inoculation; D, MEA containing RBBR with inoculation; E, PDA containing guaiacol without inoculation; F, PDA containing guaiacol with inoculation; G, MEA containing guaiacol without inoculation; H, MEA containing guaiacol with inoculation.

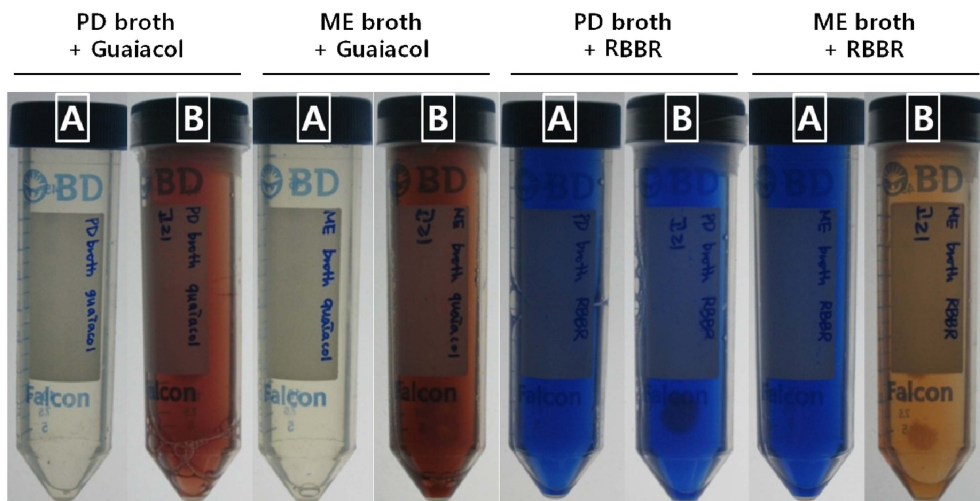


Fig. 2. Examples of the detection of extracellular laccase activity produced by mycelia of *Lentinula edodes* in 30 ml of liquid media containing different dyes and nutrients in 50 ml plastic tube. A, control without inoculation; B, with inoculation.

성상은 사용된 7개 시험관주 모두에서 동일한 성향으로 나타났다(Table 1). 이것으로 볼 때 고체배지를 이용하여 표고버섯균의 세포의 laccase 활성을 질적을 검출하려면 사용하는 발색시약이 RBBR 일 경우 PDA배지 보다도 MEA배지를 사용하는 것이 바람직하였다. Guaiacol을 염료시약으로 사용하는 경우는 PDA와 MEA 모두 사용이 가능하였다. 이처럼 고체배지를 이용하여 균주간의 활성 차이를 비교하는 경우는 생성된 clear zone의 직경 크기나 갈색으로 변화된 부분의 직경 크기를 측정함으로써 수치적 비교가 가능하리라고 사료된다.

액체배지에서의 laccase 활성 검출 비교

액체배지에서의 laccase 활성 조사 결과를 보면 50 ml의

plastic tube에서 배양 한 RBBR를 함유하는 PD broth의 경우 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 청색을 띄었으나 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때는 균사는 자랐으나 색의 변색은 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그 결과 접종하지 않은 배지와 거의 색의 차이를 육안으로 구분하기 어려웠다 (Fig. 2). 그러나 RBBR를 함유하는 ME broth의 경우는 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 청색이었다가 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때는 청색이 옅어지며 옅은 갈색으로 변하였다. 이러한 색의 변화는 표고버섯균의 균사에서 분비한 세포의 laccase에 의해 ME broth의 경우는 발색 반응이 일어났음을 시사한다. 한편 guaiacol을 함유하는 PD broth와 ME broth 모두 표고버섯균이 접종되지 않았을 때 무색을 띄었으나 표고버섯균을 접종하여 배양 하였을 때는 갈색으로 발색

이 일어났다(Fig. 2). 이상의 결과로 볼 때 액체배지를 이용하여 표고버섯균 균사가 분비하는 세포의 laccase 활성을 질적 검출 할 때도 사용하는 염료시약이 RBBR 일 경우는 PD broth를 피하고 ME broth를 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있다. 액체배지에서 guaiacol을 발색시약으로 사용하는 경우는 PD broth와 ME broth 모두 사용이 가능함을 알 수 있다.

이상의 Fig. 1과 Fig. 2의 결과를 종합 해 볼 때, 고체배지와 액체배지 모두 발색 시약인 RBBR과 guaiacol를 사용하여 표고 교배균주들의 laccase 효소분비 능력 여부의 평가가 가능하였다. 이는 고체배지든 액체배지든 배지 성상이 사용된 2종의 발색 시약과 함께 사용하더라도 laccase의 검출에 영향을 미치지 않음을 보여준다. 이에 반해서 영양배지는 어느 배지를 선택하느냐에 따라서 laccase 활성 검출이 될 수도 있고 안 될 수도 있기 때문에 영양배지의 선택이 표고 균주의 laccase 활성 검출에 중요한 영향을 미침을 알 수 있었다.

Microfuge tube 배양을 이용한 laccase 측정 비교

영양 배지의 선택이 어느 정도로 크게 laccase 활성에 영향을 미치는지는 알 수 없으므로 정량 평가를 수행하였다. 분석시간 단축과 배지의 최소화를 위해 액체배지를 1.5 ml 씩 2 ml tube에 분주하고 표고 교배균주를 접종하여 3일간 배양 후 색이 변화된 배양액의 흡광도를 측정하였다(Table 1). 사용된 guaiacol과 RBBR 시약 보다 영양 배지의 종류가 laccase 검출에 영향을 미치느냐 2가지 염색시약이 함유된 PD broth와 ME broth 중 어느 액체배지에서 6개 표고 교배균주가 높은 활성을 나타내는지 흡광도 측정값을 비교하였다. PD broth와 ME broth에서 자란 6개 균주의 흡광도 측정값을 대상으로 흡광도 값에 유의한 차이가 있는지 *t* 검정을 실시한 결과 95% 신뢰도 수준에서 2가지 염색시약이 함유된 액체 배지 모두에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. ME broth에서 자란 균주들이 PD broth에서 자란 균주들 보다 흡광도 측정값이 높았다. 이는 표고균주들이 PD

broth에서 자랄 때 보다 ME broth에서 자랄 때 세포의 laccase 분비가 활발함을 나타낸다.

직경 5 mm의 agar plug 1개만을 접종하여 3일간 배양하였을 때 흡광도 측정값은 교배균주에 따라서 0.1 이하에서부터 1.6 사이에 분포하는 서로 다른 값을 나타내었다(Table 1). 이는 spectrophotometer의 흡광도 신뢰 범위가 0.2에서부터 2사이 임을 고려할 때 균주간 비교 평가를 할 수 있는 고무적인 수치라고 할 수 있다. 일반적으로 표고는 생육이 빠르지 않기 때문에 표고균주의 laccase 분석을 위해서는 보통 2주 내지 4주 정도 배양을 한 후 평가가 이루어져 왔다. 따라서 3일 만에 교배균주간 차이를 비교 평가를 할 수 있다는 것은 단기간 내에 많은 교배균주들의 extracellular laccase 분비 능력을 평가 할 수 있다는 의미를 지닌다. 이러한 간편한 방법에 의한 비교 평가가 가능한 이유는 아마도 사용된 발색기질 시약인 guaiacol과 RBBR에 대해 표고버섯균이 분비하는 세포의 laccase가 민감하기 때문인 것으로 사료된다.

표고에서 분리된 laccase는 lcc1과 lcc2 등 2가지 종류가 알려져 있는데 lcc1은 세포의 효소이고 lcc2는 표고버섯 자체의 균첩이 갈변시 발현되는 세포내 효소로 보고되었다(Nagai *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2003). 이중 lcc1은 RBBR과 Poly R-480을 기질로 이용할 수 있다고 보고되었다. 이는 RBBR에서 발색 반응을 보인 본 연구 결과와도 일치한다. Poly R-480은 국내의 경우 몇 년 전부터 유독한 시약으로 분류되어 수입이 어려워 상업적으로 이용하기 힘든바 앞으로 RBBR을 사용하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. 본 연구는 좀 더 경제적이며 시간이 적게 걸리는 방법으로 한번에 많은 표고 교배균주로부터 간편하게 laccase 효소 활성을 검출하고 수치화 하고 정량화하여 표고 교배균주들의 생화학적 특성을 조기에 평가할 수 있는 한가지 가능성을 제시하였다. 이 같은 방법을 사용할 경우 3일 정도면 최소 수백 개의 교배균주의 균사체로부터 laccase 활성비교가 가능할 것으로 사료된다.

Table 1. Detection of extracellular laccase enzyme activity produced by the mycelia of hybrid strains of *Lentinula edodes* grown on solid media plates (PDA and MEA) and in 2ml microfuge tube containing 1.5 ml liquid media (PD broth and ME broth) with guaiacol or RBBR chemical dye using either visual inspection or absorbance values measured by a spectrophotometer

Strains	Guaiacol		RBBR		Guaiacol		RBBR	
	PDA	MEA	PDA	MEA	PD broth	ME broth	PD broth	ME broth
P033	D ¹⁾	D	N ²⁾	N	1.07±0.28 ³⁾	1.69±0.07	0.24±0.06	1.37±0.33
P041	D	D	N	N	0.57±0.14	0.91±0.09	0.08±0.02	1.01±0.29
P048	D	D	N	N	1.17±0.27	1.59±0.27	0.14±0.10	1.15±0.33
P064	D	D	N	N	1.11±0.21	1.61±0.11	0.11±0.02	1.23±0.18
P082	D	D	N	N	0.04±0.03	0.03±0.04	0.08±0.01	0.16±0.07
P136	D	D	N	N	0.55±0.14	1.51±0.03	0.11±0.07	0.88±0.35

¹⁾D: Colored or clear zone is visible.

²⁾N: Clear zone is not visible.

³⁾Mean of absorbance values ±standard error.

적요

본 연구에서는 표고 교잡균주들의 생화학적 특성을 이해하기 위한 하나의 시도로서 교잡균주간의 laccase 효소의 활성을 비교하는 빠르고 간편한 방법을 모색하고자 균사체 배양 배지의 성장과 염색물질이 laccase 활성 검출에 미치는 영향을 조사 비교하였다. 고체배지와 액체배지 모두에서 발색시약인 Remazol Brilliant Blue R(RBBR)일 경우는 potato dextrose 성분 보다 malt extract 성분 배지를 사용하는 것이 표고버섯 균 균사가 분비하는 세포외 laccase 활성 검출이 용이하였다. Guaiacol을 발색시약으로 사용하는 경우는 potato dextrose 성분과 malt extract 성분 배지 모두 세포외 laccase 활성 검출이 용이하였다. 2 ml microfuge tube를 이용한 액체 배양 방법은 RBBR와 Guaiacol 모두 malt extract 성분배지에서 3일 만에 표고 교잡균주간의 세포외 laccase 활성 검출과 정량적 비교를 가능케 하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업에 의해 이루어진 것임

참고문헌

- Christian, J. and Andrzej, M. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* 78:193-199.
- Couto, S. R. and Herrera, J. L. T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Advan.* 24:500-513.
- Garyf, L. and Marka, S. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125:47-157.
- Kiiskinen, L.-L., Ratto, M. and Kruus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *J. Appl. Microbiol.* 97:640-646.
- Leatham, G. and Stahmann, M. A. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125:147-157.
- Leonowicz, A. Cho, H. -S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszeska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. and Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41:185-227.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K. and Sato, T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiol.* 149:2455-2462.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. and Enei, H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 327-335.
- Ohga, S and Royse, D. J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiol. Lett.* 201:111-115.
- Ryu, W. Y., Jang, M. Y., and Cho, M. H. 2003. The Selective Visualization of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase, produced by white rot fungi on solid media. *Biotechnol. Bioengineering* 8:130-134.
- Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. and Reddy, C. A. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12): 4274-4277.
- Zhao, J. and Kwan, H. S. 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11):4908-4913.