

좀구멍버섯균의 배양조건에 따른 *Mn-Peroxidase*와 *Glucose Oxidase*의 생성조건

이상윤 · 신현동 · 김규중*
강릉대학교 생물학과, 원예학과

Correlative Production of Mn-Peroxidase and Glucose Oxidase Depending on the Culture Condition of *Schizopora paradoxa*

Sang-Yoon Lee, Hyeon-Dong Shin and Kyu-Joong Kim*

Department of Biology and Department of Horticulture
Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

ABSTRACT: White-rot fungus, *Schizopora paradoxa* did not produce Mn-peroxidase and glucose oxidase without manganese. But, in high concentration of manganese (40 ppm), the activities of both enzymes were higher than those in basal concentration of manganese (11.15 ppm). Unlike the activities of the enzymes, mycelial mass was the same level as the control culture (11.15 ppm manganese) through out the culture period, depending on the concentration of manganese. The same experiments were carried out for the effect of copper and veratryl alcohol added to the culture. The results were not consistent dependent on the concentration of copper and veratryl alcohol, respectively. The involvement of cAMP in the correlative production of MNP and GOX was investigated. In this study, addition of atropine to the culture resulted in a concomitant inhibition of production of MNP and GOX, depending on the concentration of inhibitor added.

KEYWORDS: Mn-peroxidase, glucose oxidase, cAMP, manganese

서 론

리그닌분해와 관련된 주된 효소로는 lignin peroxidase (LIP), Mn-dependent peroxidase (MNP), glucose oxidase (GOX) 및 glyoxal oxidase (GlyOX)가 있으며 그외 laccase 등이 알려져 있다(Tien *et al.*, 1983; Glenn *et al.*, 1983; Paszczynski *et al.*, 1986; Kelley *et al.*, 1986; Kersten *et al.*, 1987, 1990). LIP 및 MNP는 리그닌을 분해하는 주효소로 효소 활성을 위해 H₂O₂를 요구하는 것이 특성이다. 또한 이들 효소들은 많은 동위효소로 이루어진 heme을 가진 체외효소이다. Farrell 등(1989)에 의하면 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 10개의 동위효소를 HPLC로 분리 하였으며 분석결과 그중

6개(H1, H2, H6, H7, H8, H10)는 lignin peroxidase, 4개(H3, H4, H5, H9)는 Mn-peroxidase의 동위효소임이 밝혀졌으며, 기질에 대한 친화력에 각기 차이를 보임으로서 각 동위효소들은 리그닌 분해에서 공조효과(synergistic effect)를 발휘하지 않나 추측되지만, 아직도 그 역할 및 존재 의의에 대해서는 더 연구되어야 할 것이다.

MNP는 LIP과 달리 veratryl alcohol에 대한 산화작용이 없으며 대신 망간(II)를 망간(III)로 산화하며 이 망간(III)이 리그닌 화합물을 라디칼로 산화하는 과정을 가지는 것으로 보고되었다(Paszczynski *et al.*, 1986). GOX 및 GlyOX는 리그닌 분해에 직접적으로 관계 한다기 보다는 LIP 및 MNP의 활성을 위해 요구되어지는 H₂O₂의 주된 공급원으로 작용하는 효소들로 GOX가 체내 효소인데 반해 GlyOX는 체외분비 효소이다. GOX 결핍 돌연변이

*Corresponding author

주들의 분석에 의하면(Kelley *et al.*, 1986) GOX결핍 돌연변이주들은 리그닌 분해력이 상실될 뿐 아니라 GOX⁺ revertant들의 리그닌 분해력 회복으로 리그닌 분해에서 GOX의 중요성을 나타냈을 뿐만 아니라 LIP, MNP의 관련성을 암시한 바 있다. 또한 최근 Dey 등(1991)의 보고에 의하면 갈색부후균인 *Polyporus ostreiformis*에서 LIP이 소량 검출되었으며 Datta 등(1991) 의해서도 *P. chrysosporium*을 직접 목재에 접종한 후 효소활성을 조사한 바에 의하면 MNP, LIP 및 GlyOX활성이 검출되었으며 이중 MNP가 주된 효소 활성을 보였다고 보고한 바 있다. 이로써 리그닌 분해에서 MNP의 중요성을 암시하고 있다. Bonnarne 등(1990)과 Perez 등(1990)은 배지 성분중 망간(II) 농도를 조절함으로써 LIP, MNP의 생성을 억제 혹은 촉진한다는 것을 보고 하였으며, Brown 등(1990)은 이 조절은 전사수준(transcription level)에서 이루어진다고 하였다.

본 연구에서는 배지내의 망간(II)처럼 LIP, MNP의 생성을 조절하는 인자들에 의해 MNP와 GOX의 생성에 상호 연관성이 있는지를 파악하고자 한 것이며 일부 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

사용한 균주는 본 실험실에서 분리한 백색부후균인 좁구멍버섯균(*Schizopora paradoxa*)으로 PDA (Potato Dextrose Agar)slant에 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였으며 4주 간격으로 한천평판배지에 계대배양하였다. Seed culture를 위해서는 25°C에서 7일간 배양한 malt배지상의 균사 조각(직경 0.7 cm)을 8개 따서 20 ml의 배지가 들어있는 500 ml 삼각플라스크에 접종하여 25°C에서 7일 배양하였으며 균사체는 마쇄하여 그 현탁액을 1%되게 접종하였다.

효소활성을 위한 배지로는 Tien(1987)의 배지를 사용하였으며 실험조건에 따라 망간(II)과 구리(II) 농도는 Bonnarne 등(1990)의 기준에 따라 0 ppm, 11.15 ppm, 40 ppm으로 조절하였으며 veratryl alcohol은 Kirk 등(1986)과 Leisola 등(1985)의 결과를 참고로 하여 0 mM, 0.4 mM, 1 mM로 조정하여 사용하였다. cAMP의 저해제인 atropine의 농도는

Boominathan 등(1992)의 문헌을 참고로 하여 0 mM, 10 mM, 20 mM 및 30 mM로 하여 배지에 첨가하였다.

조효소준비

체외효소인 Mn-peroxidase를 위해서는 배양액을 여과지(whatman No. 2)로 여과한후 그 배양액을 ultrafiltration에 의해 5배 농축한 다음 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 것을 조효소로 사용하였다. Glucose oxidase를 위해서는 1리터 플라스크에 조성이 다른 액체배지 80 ml에 균주를 접종하여 25°C에서 정지배양하여 균체를 얻었으며 0.01 M 시트르산 완충용액(pH 4.5)으로 여러번 세척하고 동량의 모래와 0.1 M 시트르산 완충용액(pH 4.5)을 넣고 균체를 마쇄하였다. 마쇄된 균체는 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리한 다음 그 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

효소활성측정

MN-PEROXIDASE(MNP) Paszczynski 등(1988)의 방법을 변형하여 사용하였다. 반응혼합물 1.0 ml당 조성은 0.5 M sodium tartrate buffer(pH 5.0) 870 μ l, MnSO₄(10 mM) 10 μ l 그리고 효소용액 100 μ l로 하였으며 최종적으로 8 mM H₂O₂ 용액 12.5 μ l를 첨가하여 흡광도의 변화를 238 nm에서 측정하였다. 효소의 활성단위는 분당 1 μ mole의 Mn(II)를 산화시키는 정도를 1 unit로 정의하였다.

GLUCOSE OXIDASE(GOX) Pick 등(1980)의 방법을 변형하여 사용하였으며 0.1 M 시트르산(pH 4.5) 1.1 ml에 o-dianisidine(0.31 mM) 1.0 ml, 1.0 M β -D-glucose 0.3 ml, horseradish peroxidase(60 μ g/ml) 100 μ l를 넣고 37°C에서 산소로 5분간 충전시킨 후 효소용액 0.5 ml를 첨가하여 분광광도계의 파장 460 nm에서 흡광도 변화로 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성단위는 반응조건에서 분당 1 μ mole의 o-dianisidine을 산화할 수 있는 효소의 양으로 정의하였으며 단백질 mg당 효소의 활성단위로 표시하였다.

단백질정량

Lowry 방법(1951)을 변형하여 사용하였으며 표준단백질로 bovine serum albumin(Sigma)을 사용

하였다.

균사체측정

생장곡선 측정을 위한 균사체측정은 여과된 균사체를 100°C 에서 2시간 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1에서 보는 바와 같이 망간(II) 농도에 따른 균사체의 건조중량을 측정한 바에 의하면 균사체의

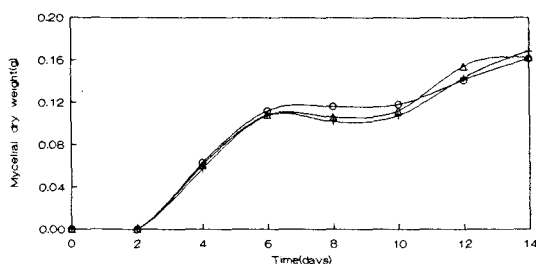


Fig. 1. Mycelial dry weight according to the concentration of Mn (II). Symbols; 0 ppm (+), 11.15 ppm (Δ) and 40 ppm (○) of Mn (II).

중량은 배양 6일째까지는 계속 증가하였다. 그 이후 배양 10일까지는 균체 증가가 나타나지 않다가 10일 이후 완만한 증가를 보였다, 이로써 균사체 생장은 일주일 이내에 완료되는 것으로 보이며, 망간(II) 농도에 따른 균사체의 건조중량은 망간(II)이 없을 때와 기본적인 망간(II) 농도(11.15 ppm), 그리고 높은 농도의 망간(II)(40 ppm)에서 차이가 없음을 보여주었다. 또한 Fig. 2에서 보면 좁구멍버섯균은 망간(II)이 없을 때 MNP와 GOX가 생성되지 않았으나 고농도의 망간(II)(40 ppm)을 배지에 첨가하여 주면 기본농도(11.15 ppm)때 보다 MNP와 GOX의 생성이 모두 증가하였다. 다만 GOX의 활성이 배양 기간에 따라 비례적으로 증가하고 있는데 비해 MNP의 활성은 고농도의 망간(II)이 첨가된 배지에서 배양한 경우 배양 8일에서 최고 활성도를 나타냈으며 기본농도(11.15 ppm)의 경우, 이보다 늦은 배양 10일에서 최고 활성도를 보였다. 이상의 결과로 볼 때 좁구멍 버섯균에서 MNP나 GOX생성에 망간(II)가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고 망간(II)에 의해 MNP와 GOX의 생성이 연관되어 있는 것으로 해석된다. Fig. 3은 Fig. 2에서 망간 농도에 따라 단백질을 정량하여 MNP효소의 활성을 단백질

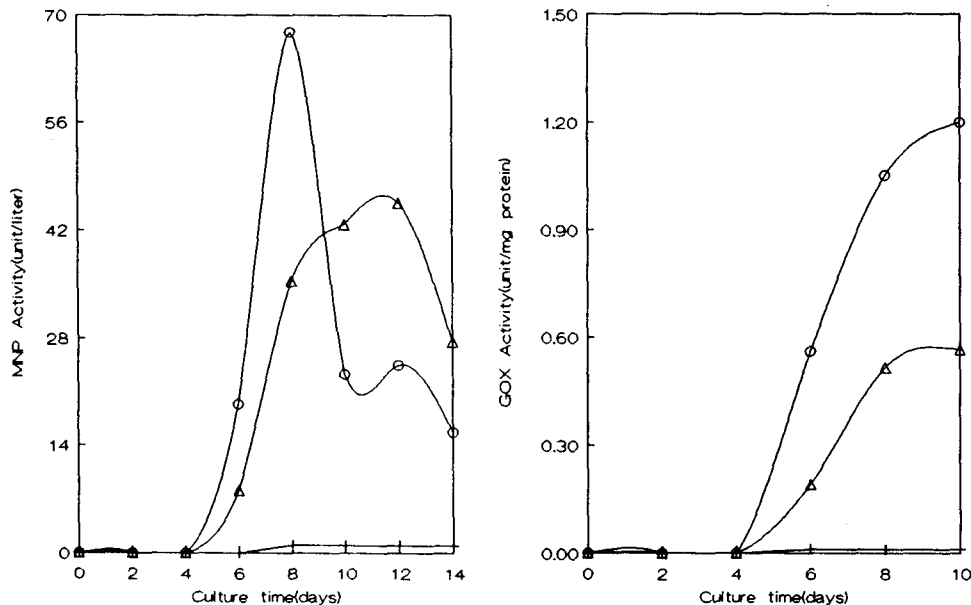


Fig. 2. Production of MNP (left) and GOX (right) according to the concentration of Mn (II). Symbols; 0 ppm (+), 11.15 ppm (Δ) and 40 ppm (○) of Mn (II).

mg당 농도로 환산하여 나타낸 그래프로 흥미롭게도 고농도 망간(II)(40 ppm)의 경우에 기본농도(11.15 ppm)에 비해 MNP활성이 배양 10일까지는 비슷한

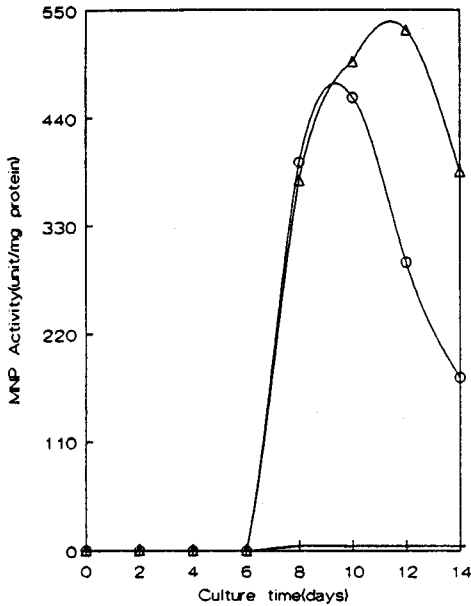


Fig. 3. Production of manganese peroxidase per unit protein according to the concentration of Mn (II). Symbols; 0 ppm (+), 11.15 ppm (Δ) and 40 ppm (○) of Mn (II).

양상을 나타내나 배양 10일 이후는 오히려 감소하는 양상을 나타냈다. 이상에서 볼 때 망간(II)는 MNP 생성을 선택적으로 촉진할 뿐만 아니라 일반적인 단백질의 체외분비를 촉진하는 것이 아닌가 생각되나 이 부분은 추가연구가 요구되는 부분이다.

Fig. 4는 망간대신 구리(II)이온 농도에 의한 MNP, GOX 활성도 변화를 배양기간에 따라 측정된 결과로 망간(II)의 경우에서의 달리 구리(II) 이온을 첨가하지 않았을 때 오히려 기본농도(11.15 ppm)에 비해 MNP활성이 전반적으로 증가한 반면에 GOX의 활성은 고농도의 구리(II) 이온 (40 ppm)을 처리한 경우와 기본농도(11.15 ppm)의 경우 별 차이가 없었으며 고농도의 구리(II) 이온 처리시는 GOX활성이 감소 하였다. 이상에서 본 바와 같이 MNP와 GOX의 생성에 있어서 구리(II) 이온에 의한 연관 관계는 없는 것으로 판단된다. 이것은 최근 Brown 등(1991)이 MNP유전자 발현이나 MNP활성을 위한 유도물질로 철(II), 구리, 코발트, 니켈 등 어느 금속이온도 망간(II)과 대치될 수 없다고 보고한 바와 일맥상통한 점이 있다.

최근까지의 연구 결과에 의하면 veratryl alcohol은 리그닌 분해에서 분해효소의 생성을 위한 유도제로 쓰이거나(Faison *et al.*, 1986) 안정제(stabilizer)로서 작용한다고 보고(Tonon *et al.*, 1988)한 바

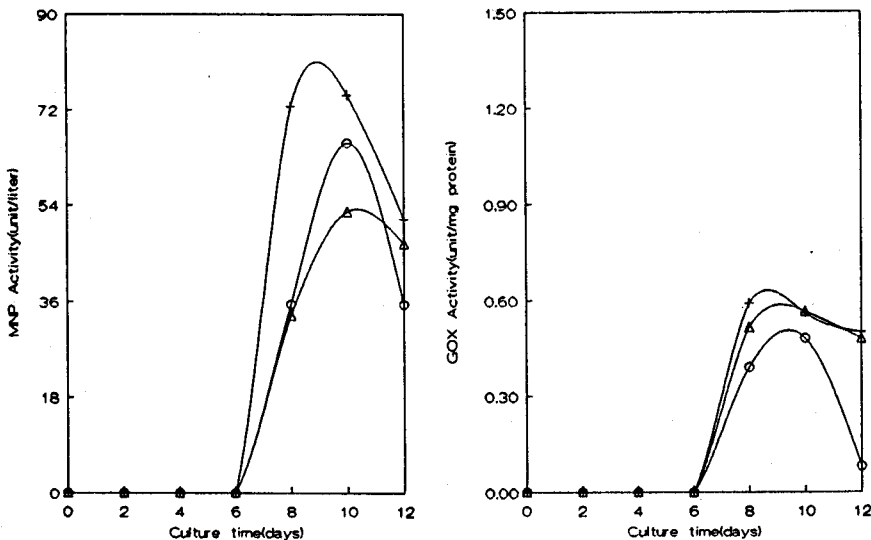


Fig. 4. Production of MNP (left) and GOX (right) according to the concentration of copper (II). Symbols; 0 ppm (+), 11.15 ppm (Δ) and 40 ppm (○) of Mn (II).

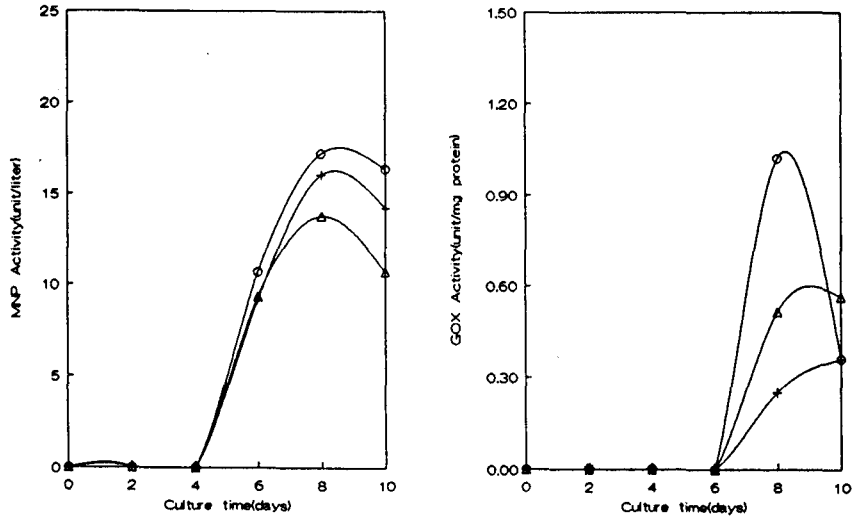


Fig. 5. Production MNP (left) and GOX (right) according to the concentration of veratryl alcohol. Symbols; 0 mM (+), 0.4 mM (Δ) and 1 mM (○) of veratryl alcohol.

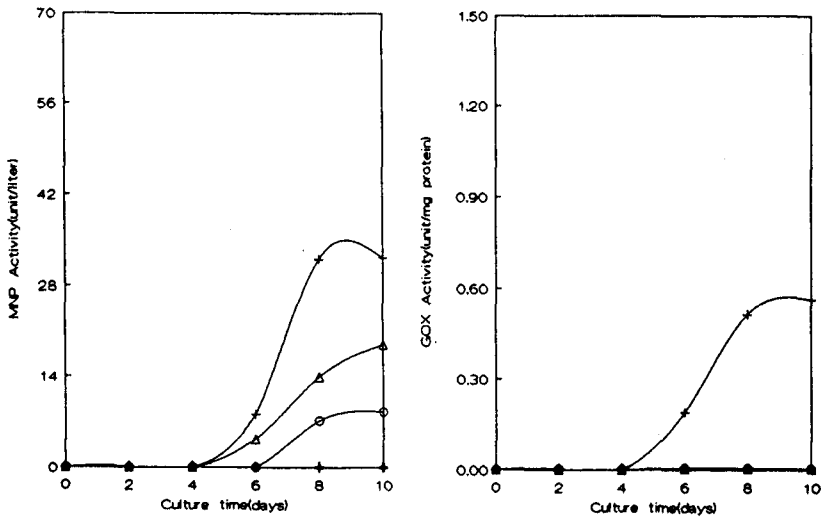


Fig. 6. Production MNP (left) and GOX (right) according to the concentration of atropine. Symbols; 0 mM (+), 10 mM (Δ), 20 mM (○) and 30 mM (+) of atropine.

있는 중요한 대사 물질로서 본 실험 결과에 의하면 (Fig. 5), GOX 생성에 다소 영향을 주는 듯하나 MNP 생성에는 별 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 veratryl alcohol이 MNP 활성에는 영향을 주지 않고 다만 LIP의 안정제 내지 보호제(protector)로 작용한다는 최근 Cancel 등 (1993)의 연구 결과와 일치하는 점이 있다.

Boominathan 등(1992)은 atropine, theophylline

혹은 histamine를 추가하여 배양한 결과 세포내 cAMP가 떨어짐을 나타내었고 억제물질의 농도에 의존하여 단지 LIP만 혹은 LIP과 MNP 모두의 생성이 억제되며 LIP의 생성억제는 일반적으로 MNP보다 더 민감하다고 하였다. 또한 northern blot 분석에서 억제물질들은 전사단계에서 LIP과 MNP 생성에 영향을 주어 *P. chrysosporium*에서는 LIP과 MNP의 생성이 cAMP에 의해 조절된다고

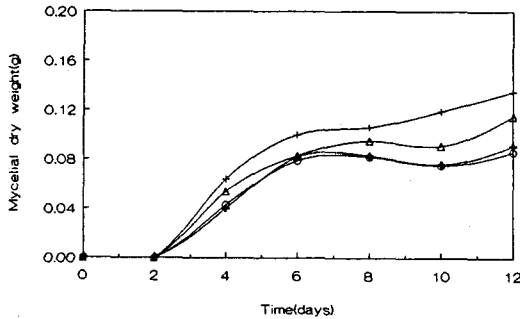


Fig. 7. Mycelial dry weight according to the concentration of atropine. Symbols; 0 mM (+), 10 mM (Δ), 10 mM (\circ) and 30 mM (+).

하였다. 이에 좀구멍버섯균에서는(Fig. 6) adenylate cyclase 활성 억제에 의해서 cAMP 합성을 직접적으로 억제하는 atropine을 사용하여 MNP와 GOX의 활성을 조사한 결과 대조구(0 mM atropine)에 비해 MNP 활성이 10 mM atropine 처리한 경우 10%, 20 mM에서는 대조구의 4%로 감소하였으며 30 mM atropine에서는 MNP 활성이 완전히 억제 되었다. 이에 비해 GOX 활성은 10 mM atropine 이상 농도에서 효소 활성이 전혀 검출되지 않음으로써 cAMP 생성 억제제인 atropine은 MNP에 비해 GOX 효소 생성에 더욱 민감하게 작용하는 것으로 판단된다. 이와같이 cAMP 생성 억제제에 대한 영향에 차이가 있으나 cAMP에 의해 MNP와 GOX 생성이 다소 연관되어 조절되는 것이 아닌가 생각된다. 그러나 atropine은 10 mM 이상에서 균사 생장에 다소 영향을 주는 것으로 보이며(Fig. 7) GOX 활성은 10 mM 이하 농도의 atropine에 의해 점진적으로 억제 되는 것으로 예측된다. 일반적으로 cAMP는 2차 대사 과정의 조절자로서 전사단계에서 조절한다는 사실과, 망간(II)가 MNP 발현을 전사 단계에서 조절 한다는 Brown(1990)의 연구결과로 미루어 볼 때 cAMP와 망간(II)은 동시에 transcription level에서 조절자로 작용하는 것으로 생각되나 이들 두 인자간의 상호관계는 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

좀구멍버섯균(*Schizopora paradoxa*)은 백색 부후균으로 망간이 배지에 첨가되지 않으면 MNP와

GOX는 동시에 생성되지 않았으며 고농도의 망간 첨가시 (40 ppm)에는 기본적 농도(11.15 ppm)에 비해 MNP와 GOX가 모두 높은 활성을 보였다. 그러나 망간농도에 따른 균사생장량에는 별 차이가 없었다. 구리와 veratryl alcohol에 대해서도 같은 실험을 실시하였으나 농도에 따른 MNP와 GOX의 변화가 상관관계를 갖지 않는 것으로 나타났다. MNP와 GOX의 생성조절과 관련하여 cAMP의 영향을 조사한 결과 cAMP 생성효소 억제제인 atropine을 농도별로 배양액에 첨가시 정도의 차이는 있었으나 MNP와 GOX 생성이 동시에 억제되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제 연구비(과제번호 931-0500-005-2)지원에 의한 결과의 일부입니다.

参考文献

- Bonnarme, P. and Jeffries, T. W. 1990. Mn (II) regulation of Lignin Peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(1): 210-217.
- Brown, J. A., Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1990. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **172**(6): 3125-3130.
- Brown, J. A., Alic, M. and Gold, M. H. 1991. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J. Bacteriol.* **173**(13): 4101-4106.
- Boominathan, K. and Reddy, C. A. 1992. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5586-5590.
- Cancel, A. M., Orth, A. B. and Tien, M. 1993. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(9): 2909-2913.
- Datta, A., Bettermann, A. and Kirk, T. K. 1991. Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(5): 1453-1460.

- Dey, S., Maiti, T. K. and Bhattacharyya, B. C. 1991. Lignin peroxidase production by a brown-rot fungus *Polyporus ostreiformis*. *J. Ferment. Bioeng.* **72** (5): 402-404.
- Fasion, B. D., Kirk, T. K. and Farrell, R. L. 1986. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 251-254.
- Farrell, R. L., Murtagh, K. E., Tien, M., Mozuch, M. D. and Kirk, T. K. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 322-328.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. and Gold, M. H. 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**: 1077-1083.
- Kelley, R. L. and Reddy, C. A. 1986. Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **144**: 248-253.
- Kelley, R. L., Ramasamy, K. and Reddy, C. A. 1986. Characterization of glucose oxidase-negative mutants of a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **144**: 254-257.
- Kersten, P. J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. sci.* **87**: 2936-2940.
- Kersten, P. J. and Kirk, T. K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **169**: 2195-2202.
- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, M. D. and Kalyanaraman, B. 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*: mechanism of its degradation of non-phenolic arylglycerolaryl ether substructure of lignin. *J. biochem.* **236**: 279-287.
- Leisola, M., Schmidt, B., Thanei-Wyss, U. and Fiechter, A. 1985. Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, **189**: 267-270.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L. and Huynh, B. V. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*; Purification, *Methods in Enzymol.* **161**: 264-270.
- Paszczynski, A., Huynh, V. B. and Crawford, R. 1986. Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**(2): 750-765.
- Perez, J. and Jeffries, T. W. 1992. Mineralization of ¹⁴C-ring labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (6): 1806-1812.
- Pick, E. and Keuisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* **38**: 161-170.
- Tien, M. and Kirk, T. K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*, **221**: 661-633.
- Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Crit. Rev. J. Microbiol.* **15**: 141-168.
- Tonon, F. and Odier, E. 1988. Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 466-472.