

## 버섯균류에서 산충격에 의한 Laccase의 유도

식물의 섬유질과 리그닌을 모두 분해하는 백색부후균들은 다양한 난분해성 물질을 분해하며(2,7), 할로겐화 방향족 및 기타 난분해성 물질의 분해에는 laccase, lignin peroxidase 및 manganese peroxidase 등이 요구된다(4). 이외에도 균류의 laccase는 병원성 균류의 병독성과 관련이 있거나(11), 식물병원성 균류인 *Cryphonectria parasitica* (12), *Botrytis cinerea* (3)에서도 병원성과 깊게 연관되었다. 또한 양송이(14)와 먹물버섯(*Coprinus congregatus*) (5)에서는 분화와 관련되었음이 보고되었으며, 먹물버섯에서 산충격에 의하여 발현되는 산성 laccase도 보고되었다(8).

매우 다양한 백색부후균 중 특히 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 운지버섯(구름버섯; *Trametes versicolor*)은 오랫동안 약용으로 사용되었으며 따라서 이들 균에 대한 연구보고는 세 포 · 생리학적인 기초연구가 상대적으로 부족하고 주로 약리효과에 대한 것이다(6,13). 본 연구실에서는 국내에서 분리한 영지버섯의 laccase 동위효소의 정제 및 생화학적 특징을 보고하였으며(9) 영지버섯균의 배양과정에서 산충격을 주면 먹물버섯의 경우와 같이 laccase의 생성 · 분비가 3-5배 증가됨을 확인하였다. 이러한 배경을 바탕으로 국내에서 분리된 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus* cc#2), 영지버섯(*G. lucidum* ASI 7071)과 구름버섯(*T. versicolor* 9522), 그리고 태국갯버섯(*L. squarrosulus* BUB-9) 등을 대상으로 산충격에 의하여 생성되는 laccase 기능을 연구하고자 이들의 생성조건 및 전기영동방법에 의한 분석을 통하여 정상적인 pH에서 생성되는 laccase와 비교하였다.

산충격에 의한 laccase 유도실험에서 모든 균주는 SGCM 배지(pH 6.6)(9)에서 배양하였으며 느타리버섯, 영지버섯 및 구름버섯은 30°C, 태국갯버섯은 37°C에서 배양하였다. SGCM 한천배지에서 자란 균사체를 cork borer (#1)로 자르고 동일한 액체배지에 12개씩 접종하여 각 온도에서 5일간 진탕배양(120 rpm)하였다. Waring blender를 사용하여 액체배양된 균체를 1초 동안 5차례 갈아서 새로운 액체배지에 10% (v/v) 접종하고 3일간 배양하였다. Waring blender로 처리된 배양균체를 pH 3부터 pH 7까지 조절된 액체배지에 접종하고 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 24시간, 48시간에 *o*-tolidine을 기질로 사용하여 laccase 효소력을 측정하였다(9).

Native, non-denaturing PAGE 방법에 의한 시료의 laccase 동위효소를 분리하기 위하여 위와 같이 분석하였을 때 중성배지의

배양상등액과 비교하여 laccase 효소력이 높은 pH 4.0 시료들을 선택하였으며, 전기영동을 마친 후 *o*-tolidine을 사용하여 활성 염색하였다(10).

중성배양액에서 자란 버섯균들을 산성배양액에 접종하였을 때 유도되는 laccase 동위효소들의 결과는 Table 1과 같다. 이 실험에 사용된 모든 버섯균들은 중성배양 조건에서도 상당량의 laccase를 분비하며, 산충격 효과가 거의 없는 느타리버섯 및 태국갯버섯과 달리 구름버섯과 영지버섯에서는 산충격에 의한 laccase 동위효소의 유도가 각각 48 시간에 63% 및 400% 상승효과를 나타냈다. 이러한 결과는 먹물버섯에서 중성배양 조건에서는 laccase가 전혀 생성 · 분비되지 않으나 산충격에 의하여 acidic laccase가 합성되어 배지로 분비되는 것(8)과는 다른 현상이다.

산충격에 반응하여 버섯균들이 생성한 laccase 동위효소를 native PAGE로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 영지버섯, 느타리버섯 및 구름버섯은 중성배양조건에서와 동일한 전기영동상을 보이는 동위효소를 생성한 것과 달리 태국갯버섯은 중성배양조건에서 생성되는 laccase와 전기영동상이 다른 산성 laccase를 생성 · 분비하였다. 영지버섯균에 대한 반복실험에서 산성조건에서 전기영동상이 다른 laccase 동위효소가 발현되는 경우가 몇 차례 있었는데 이에 대한 분석이 필요하다.

산충격에 의하여 생성되는 laccase는 먹물버섯균에서 처음 보고되었으며 이 효소의 기능은 산성환경을 중화시켜 균체를 보호하고 성장을 가능하게 해주는 것으로 보고되었다(1). 이 실험에서 사용된 버섯균들의 경우 산충격에 의하여 laccase가 유도된 경우가 있는데 이러한 균들에서의 기능을 확인하기 위하여 유전자 클로닝할 필요가 있으며 해당 유전자를 제거한 변이주를 얻어 정확한 기능을 분석하고자 한다.

김근숙 · 금잔디 · 최형태\*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부 미생물생리학 실험실

### 참고문헌

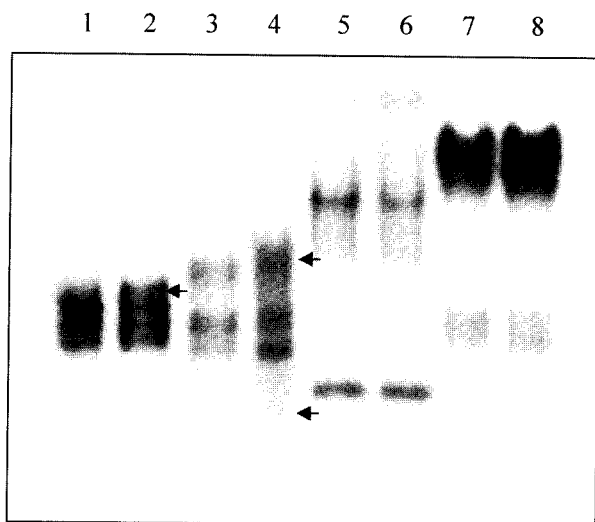
1. 김순자, 임영은, 최형태. 1997. *Coprinus congregatus*에서 산성액체배지에서의 laccase 역할. 미생물학회지 33, 27-30.
2. Baciocchi, E., M.F. Gerini, P.J. Harvey, O. Lanzalunga, and S. Mancinelli. 2000. Oxidation of aromatic sulfides by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 269, 2705-2710.
3. Bar-Nun, N. and A.M. Mayer. 1990. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 29, 787-791.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 033-250-8543, Fax: 033-241-4627  
E-mail: htchoi@cc.kangwon.ac.kr

**Table 1.** Induction of laccase isozymes under acidic conditions in several basidiomycetes

	pH	3	4	5	6	7	C
<i>Ganoderma lucidum</i>	24 hr	7	22	10	11	8	10
	48 hr	75	110	27	28	26	26
<i>Lentinus squarrosulus</i>	24 hr	5	12	9	10	10	11
	48 hr	6	18	15	15	19	25
<i>Pleurotus ostreatus</i>	24 hr	52	52	69	70	90	80
	48 hr	100	125	125	130	150	150
<i>Trametes versicolor</i>	24 hr	30	30	22	21	22	22
	48 hr	130	130	120	80	80	82

Culture supernatant (10  $\mu$ l) was incubated with o-tolidine (3 ml) for 30 min at 25°C, and  $A_{590}$  was read. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme which generated 0.01 OD under the above conditions. Every number represents the mean value of triple experiments.



**Fig. 1.** Comparison of laccase isozymes from neutral cultures with the acidic cultures of each basidiomycetous fungus by the native PAGE (10%). Samples of the neutral cultures are loaded in lanes 1, 3, 5 and 7. Samples of the acidic cultures are loaded in lanes 2, 4, 6 and 8. Lanes 1, 2, *G. lucidum*; 3, 4, *L. squarrosulus*; 5, 6, *P. ostreatus*; 7, 8, *T. versicolor*. In acidic cultures of *G. lucidum* and *L. squarrosulus* (lanes 2 and 4), new bands with different mobilities (black arrow) were detected.

4. Cameron, M.D., S. Timofeevsky, and S.D. Aust. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 751-758.

5. Choi, H.T., R.L. Wilks, and I.K. Ross. 1987. Formation of sclerotia

in liquid cultures of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycol.* 79, 166-172.

6. el-Mekkawy, S., M.R. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezyka, M. Hattori, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, T. Kawahata, and T. Otake. 1998. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochem.* 49, 1651-1657.
7. Grey, R., C. Höfer, and D. Schlosser. 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Basic Microbiol.* 38, 371-382.
8. Kim, S., Y. Leem, K. Kim, and H.T. Choi. 2001. Cloning of an acidic laccase gene (*clac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 151-156.
9. Ko, E.M., Y.E. Leem, and H.T. Choi. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 98-102.
10. Leem, Y., S. Kim, I.K. Ross, and H.T. Choi. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 35-40.
11. Liu, L., R.P. Tewari, and P.R. Williamson. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 67, 6034-6039.
12. Rigling, D. and N.K. Van Alfen. 1991. Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* 173, 8000-8003.
13. Wasser, S.P. and A.L. Weis. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* 19, 65-96.
14. Wood, D.A. 1985. Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117, 339-345.

(Received November 12, 2001/Accepted December 7, 2001)

---

**ABSTRACTS : Induction of laccases under acidic stresses in several mushroom-forming fungi.**

**Keun-Sook Kim, Jan-Dee Keum, and Hyoung-Tae Choi** (Microbial Physiology Lab, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Induction of laccase isozymes under acidic stresses were determined in *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* isolated in Korea, and in *Lentinus squarrosulus* isolated in Thai. When cultures of these fungi were transferred to acidic liquid media (pH 3.0-4.0), the activities of secreted extracellular laccases were increased 60% and 400% in *T. versicolor* and *G. lucidum* respectively. However, there was no such induction in *L. squarrosulus* or *P. ostreatus*. In *L. squarrosulus*, different laccase isozymes in the electrophoretic mobilities were induced under acidic conditions.

**Key words** □ acidic induction, laccases, medicinal mushroom