

Phanerochaete chrysosporium 변이주에서의 Cellobiose Dehydrogenase(CDH)와 β -Glucosidase 활성 향상

김은지* · 강성우* · 송광호* · 한성옥** · 김재진** · 김승욱*[†]

*고려대학교 화공생명공학과
136-701 서울특별시 성북구 안암동 5가
**고려대학교 생명과학대학
136-701 서울특별시 성북구 안암동 5가
(2010년 6월 24일 접수, 2010년 7월 30일 채택)

Improvement of Cellobiose Dehydrogenase(CDH) and β -Glucosidase Activity by *Phanerochaete chrysosporium* Mutant

Eunji Kim*, Seong Woo Kang*, Kwang Ho Song*, Sung Ok Han**, Jae-Jin Kim** and Seung Wook Kim*[†]

*Department of Chemical and Biological Engineering, 5, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

**School of Life Science and Biotechnology, Korea University, 5, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

(Received 24 June 2010; accepted 30 July 2010)

요 약

Hemoflavoenzyme으로서 cellobiose dehydrogenase(CDH)는 셀룰로오스를 분해하는 과정에서 세포 외부로 분비되는 효소로서 amorphous cellulose와 강하게 결합하여 셀룰라아제(cellulase)에 의해 microcrystalline cellulose의 가수분해를 증가시킨다. 따라서 CDH는 바이오 에탄올 생산의 당화공정에서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 여러 백색부후균으로부터 CDH 생산이 높은 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 균주를 선정하였으며, 균주로부터 생산된 CDH 효소활성의 최적 온도와 pH는 각각 55 °C와 4이었다. CDH 활성을 증가시키기 위하여 *P. chrysosporium* ATCC 32629 균주를 돌연변이시켰다. 돌연변이는 새로운 시도로서 국부적으로 큰 에너지를 줄 수 있는 특징을 가진 양성자 빔을 이용하였다. 양성자 빔 조사 후 사멸율이 약 99.9%인 1.2 kGy에서 CDH 활성이 증가된 변이주를 얻었다. 선별된 변이주와 모균주를 액체배양했을 때 변이주가 모균주보다 CDH와 β -glucosidase 활성이 각각 약 1.4배와 20배 증가하였다. 따라서, CDH 뿐만 아니라 β -glucosidase 활성이 높은 *P. chrysosporium* 변이주를 확보하였다.

Abstract – Cellobiose dehydrogenase(CDH) as a hemoflavoenzyme is secreted out of cell in the cellulose degradation. As CDH strongly bound to amorphous cellulose, it helps cellulose hydrolysis by cellulase. CDH may have an important role of saccharification process for bioethanol production. In this study, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 was selected for the production of CDH among other strains tested. The optimal temperature and pH of CDH produced by *P. chrysosporium* ATCC 32629 were 55 °C and 4, respectively. To improve the activity of CDH, the mutation of *P. chrysosporium* was performed using proton beam that has high energy level partially. As a result, *P. chrysosporium* mutant with the high activity was selected at 1.2 kGy in a range of 99.9% lethal rate. The CDH and β -glucosidase activities of mutant were 1.4 fold and 20 fold higher than those of wild strain. Therefore, *P. chrysosporium* mutant with the high activities of CDH and β -glucosidase was obtained from mutation by proton beam irradiation.

Key words: Cellobiose Dehydrogenase, β -Glucosidase, *Phanerochaete chrysosporium*, Proton Beam Irradiation, White-rot Fungi

1. 서 론

목질계 식물의 세포벽은 40~60%가 셀룰로오스로 구성되어 있고 셀룰로오스는 연료나 화학약품의 생산에 이용되고 있다. 미생물에 의한 셀룰로오스 가수분해는 가수분해 효소들의 상호작용을 통해서

이루어지고, 종종 셀룰로오스 분해에 있어 가수분해 효소가 아닌 효소들이 보고되고 있다.

Hemoflavoenzyme인 cellobiose dehydrogenase(CDH)는 셀룰로오스를 분해하는 반응에서 세포외부로 분비되는 효소로서 Westermarck와 Eriksson에 의해 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*로부터 처음으로 동정되었다[1-3]. 이후 여러 균주들이 CDH를 분비한다고 보고되었지만, 아직까지 생산배지를 이용한 액체배양으로 CDH

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimsuw@korea.ac.kr

를 생산하는 보고는 없었다. CDH는 amorphous cellulose와 강하게 결합하여 셀룰라아제(cellulase)에 의해 microcrystalline cellulose가 수분해를 증가시킨다. Crystalline cellulose의 가수분해는 셀룰로오스 당화에 있어 제한적인 속도를 가지고 있다고 알려져 있었지만 CDH는 이 제한된 속도를 증가시키는 것으로 나타났다. 최근 알려진 가설로는 CDH가 Fenton-type reaction으로 수산화기(-OH) 라디칼을 생성하여 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스(hemicellulose), 그리고 리그닌(lignin)을 분해하거나 변형시킨다. 또한 CDH는 셀로바이오스(cellobiose) 산화를 통하여 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 또는 Cu^{2+} 를 Cu^{+} 로 환원시킨다[4,5]. 환원된 종들과 H_2O_2 간의 연속적인 반응은 식물세포벽 중합체를 변형시키거나 탈중합(Depolymerization)시키는 수산화기 라디칼을 발생한다. 반응에 관여하는 철은 식물에 존재하고 과산화수소는 CDH 그 자체 또는 세포외부로 분비되는 다른 곰팡이 산화환원 효소에 의해 쉽게 생성된다[6]. CDH, 셀로바이오스, Fe^{3+} 와 H_2O_2 를 이용한 탈중합반응은 carboxymethyl cellulose(CMC), 수용성 xylan, 동위원소소를 이용하여 합성된 리그닌, 그리고 kraft pulp 제조에서 나오는 불용성 cellulose를 이용하여 증명되었다[7]. 몇몇 탈중합반응은 H_2O_2 가 효소 자체로부터 생성되기 때문에 부가적인 첨가 없이도 발생된다[8].

*P. chrysosporium*은 3 종류의 β -glucosidase(a soluble intracellular enzyme, a particulate cell-wall-bound enzyme, extracellular enzyme)를 생산한다. Intracellular와 cell-wall-bound β -glucosidase는 셀로바이오스에 의해서, 그리고 extracellular β -glucosidase는 셀룰로오스에 의해서 유도된다[9].

한편 효소 생산용 곰팡이를 개량하기 위한 돌연변이 유발원으로 α , β , γ , X선과 같은 이온화 방사선이나 자외선 등의 물리적 돌연변이 유도물과 알킬화 화합물, 과산화, 플린유도체, 발암물질, 콜히친(colchicine) 등의 화학적 돌연변이 유도물이 사용된다[10]. 최근 새로운 방사선으로 등장한 이온 빔은 기존의 방사선보다 국부적으로 큰 에너지를 줄 수 있는 특징이 있어, 생물산업에서 주로 작물과 화훼, 당화 그리고 미생물 육종 산업에 접목이 시도되고 있다[11-13].

본 연구는 다양한 백색부후균으로부터 CDH 활성이 높은 *P. chrysosporium* ATCC 32629 균주를 선별한 후, CDH 생산성 향상을 위해 양성자 빔을 이용하여 *P. chrysosporium*의 돌연변이를 시도하여 우수한 변이주를 확보하는 것이다.

2. 재료 및 실험방법

2-1. 균주

Phanerochaete chrysosporium ATCC 32629는 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 분양 받아 사용하였고, 백색부후균 10 종인 *P. calotricha* KUC8003, *P. sordida*(대나무) KUC8710, *P. sordida*(낙엽송) KUC8801, *P. sordid-like*(잣나무) KUC8370, *Phanerochaete sp.*(리기다) KUC8323, *Trametes versicolor*(대나무) KUC8714, *Trametes versicolor*(신갈) KUC8837, *Phlebia radiata* KUC8004, 그리고 *Phlebia radiata* KUC8932 등의 균주들은 KUC(Korea University Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco) 고체배지를 이용하여 27 °C에서 계대배양하였다.

2-2. 배지 및 배양조건

Petri dish에서 자란 백색 부후균을 10 mm cork borer를 이용하여

agar plug를 10개 취한 후 YMB(Yeast Malt broth, Difco) 또는 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco) 액체배지에 접종하여 27 °C 배양기에서 150 rpm으로 3 일간 배양하여 CDH 생산배지의 접종액으로 사용하였다. CDH 생산을 위한 생산배지 조성은 다음과 같다: 10 g/L Microcrystalline cellulose, 2.28 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.74 g/L $CaCl_2$, 0.01 g/L $FeCl_3$, 0.0158 g/L $NaNO_3$, 6.6 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.8 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 mg/L Thiamine-HCl, 그리고 6.75 g/L succinic acid(pH 4.5)[14]. 생산배지 100 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 종균배양액을 10%(v/v)로 접종하여 27 °C 배양기에서 150 rpm으로 2 주간 배양하였다.

2-3. CDH 및 β -glucosidase 활성도 측정

CDH 활성도는 전자 수용체의 흡광도 감소로 분석하였다. 100 μ L 2,6-dichlorophenol-indophenol(DCIP, 3 mM in water containing 10% (v/v) ethanol), 100 μ L lactose(300 mM), 100 μ L sodium acetate buffer(100 mM, pH 4.0), 그리고 700 μ L 배양상등액이 포함된 총 1.0 mL의 효소반응액을 55 °C에서 5분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 분당 1 μ mol의 DCIP가 환원된 양으로 규정하였다[15].

β -Glucosidase 활성도는 0.05 M citrate buffer(pH 4.8)에 1 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)를 용해시킨 후 기질용액 0.9 mL와 0.1 mL 배양상등액을 섞은 후 50 °C 항온조에서 150 rpm으로 20 분간 반응시켰다. 반응 후 1 M Na_2CO_3 용액 1.0 mL를 반응액에 첨가하여 반응을 종결시킨 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 분당 1 μ mol의 p-nitrophenol이 생산된 양으로 규정하였다.

2-4. 양성자 빔을 이용한 균주 돌연변이

Phanerochaete chrysosporium ATCC 32629 균주를 사면배지에 접종한 후 30 °C에서 7일간 배양하여 포자를 형성시킨다. 0.2% Tween 80(20 mL) 용액을 사면배지에 주입하여 포자를 회수한 후, 멸균된 PCR 튜브에 담아 원자력의학원에 설치된 45 MeV 저선량 양성자 빔을 조사하였다. 양성자 빔 조사가 완료된 후 포자용액을 멸균된 증류수로 희석하여, 0.01% Triton X-100, lactose 그리고 전자 수용체 DCIP가 첨가된 생산배지에 도말하였다. 5~7일 후 colony 주위에 형성된 투명환이 큰 변이주를 선별하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. CDH의 활성도에 따른 균주 선별

CDH는 *P. chrysosporium*를 포함한 다양한 백색부후균에서 발견된다고 보고되고 있다[5]. 그러나 이들 균주를 이용한 액체배양에서 CDH를 생산하는 논문은 보고되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 액체배양을 통하여 CDH를 생산하기 위하여 일차적으로 다양한 백색부후균 중에서 높은 CDH 활성을 가지고 있는 균주를 선별하고자 하였다. 이들 균주는 고체배지에서 일주일 배양 후 종균 배양하였다. CDH 생산은 생산배지에 종균을 접종하여 27 °C 배양기에서 150 rpm으로 2주간 배양하였다. CDH 활성도는 생산 배지에서 2 주간 배양하는 동안 흡광도 감소 변화를 통하여 확인하였다(Fig. 1).

12일 동안 배양한 결과 *P. chrysosporium* ATCC 32629에서 흡광도 감소(Decrease degree of O.D)가 1.46으로 가장 큰 폭으로 변하였

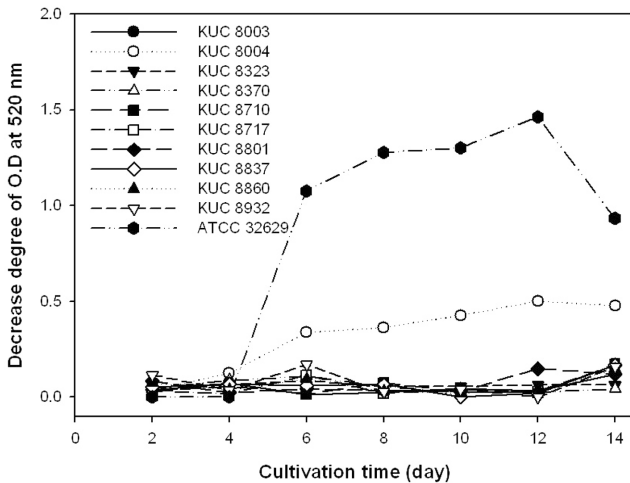


Fig. 1. Comparison of CDH activity between various white-rot fungi.

고, *Phlebia radiata* KUC8004에서는 흡광도 감소가 0.4로 나타났다. 그러나 나머지 백색부후균에서는 흡광도 감소가 거의 없어 CDH 활성도가 나타나지 않았다. 이러한 결과로부터 향후 연구를 위한 CDH 생산균주로 *P. chrysosporium* ATCC 32629를 최종 선별하였다.

3-2. CDH 활성에 대한 온도와 pH의 영향

CDH는 효소활성 분석 시 반응액의 온도와 pH에 따라서 다른 활성도가 나타내므로, CDH 활성의 최적 온도와 pH를 찾기 위해 *P. chrysosporium* 배양상등액(crude enzyme)을 다양한 온도와 pH에서 CDH 활성을 측정하였다.

Fig. 2에서와 같이 반응온도를 25~75 °C까지 10 °C 간격으로 변화시켜 CDH 활성을 측정하였을 때, 반응온도 55 °C와 65 °C에서 높은 CDH 활성을 보였다. 55 °C에서 CDH 활성이 65 °C보다는 95%로 약간 낮았으나 재현성이 좋았다. 이러한 결과로부터 재현성을 고려하여 CDH 활성 측정시 최적 온도는 55 °C로 결정하였다.

pH 영향에서는 다양한 완충용액을 이용하여 pH를 3~8까지 변화시켜 효소활성을 측정하였다. pH 3~4는 sodium acetate buffer를 이용하였으며 pH 5~8는 phosphate buffer를 이용하였다. 반응온도의 변화에 따라 효소활성이 급격하게 변화하는 것과는 다르게 조사된 pH의 범위에서는 효소 활성이 약 80% 이상 유지되었다. 그 중에서도 pH 4에서 가장 높은 CDH 활성이 나타났다(Fig. 2).

3-3. 고활성 CDH 생산 균주 선별과 액체배양

양성자 빔 조사량을 결정하기 위하여 사면고체배지에서 일주일간 배양한 *P. chrysosporium*의 포자를 0.2% Tween 80 용액으로 회수하였다. 회수된 포자액을 0.2~2 kGy로 조사하여 고체배지에 도말한 후 배양하여 성장한 colony 수를 측정하여 포자 생존율을 결정하였다. Dose에 따른 생존율을 측정한 결과 0.4 kGy에 31%, 0.8 kGy에 19%, 1.2 kGy에 0.09%, 1.6 kGy에 0.05%, 그리고 2.0 kGy에 0.004%로 나타났으며, 이러한 결과로부터 사멸율이 약 99.9%인 1.2 kGy에서 CDH 활성이 향상된 변이주를 선별하기 위한 양성자 빔 dose로 선정하였다(Fig. 3).

곰팡이 균주인 경우 한가지 유전형질을 지닌 변이주를 개발하기 위해서는 균사보다 포자의 변이를 유도하는 것이 효과적이므로 휴지 세포인 포자의 변이에 방사선을 이용한 돌연변이가 화학적 돌연변이

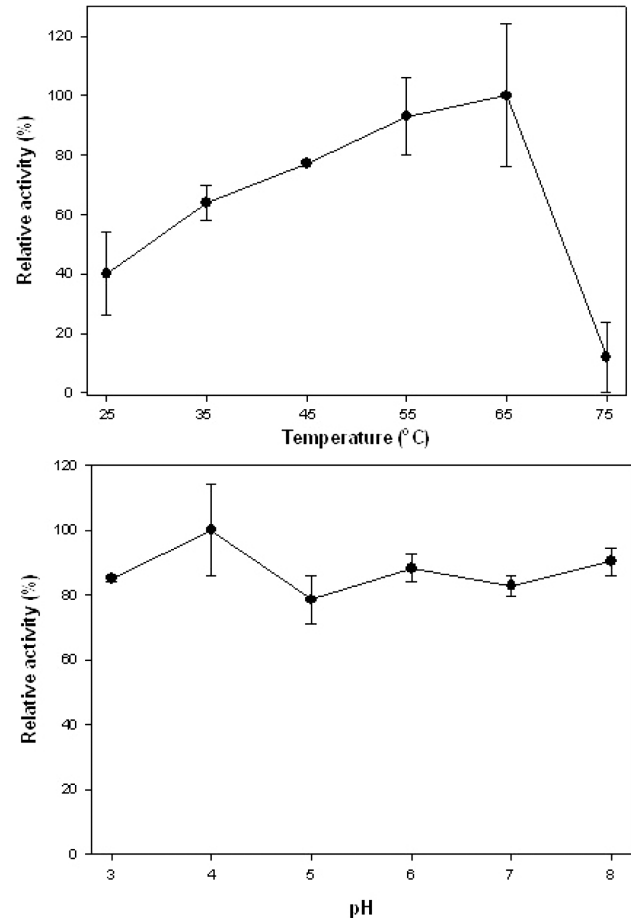


Fig. 2. Effect of temperature and pH on CDH activity of *P. chrysosporium* ATCC 32629.

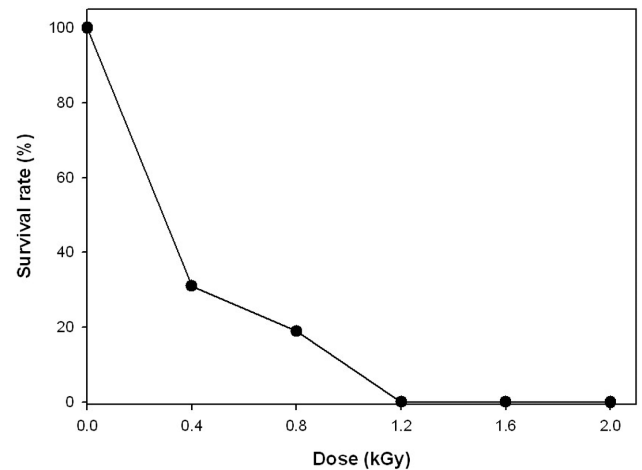


Fig. 3. Effect of proton beam irradiation on survival rate of *P. chrysosporium* ATCC 32629.

보다 효율적이다. 그리고 우수변이주 선별과정에서 곰팡이 포자액을 평판배지에 직접 도말할 경우 포자가 발아하여 성장했을 때 균사체가 넓게 퍼져 성장하게 되어 선별배지에서 포자간의 오염이 발생할 뿐만 아니라 효소활성을 나타내는 halo size의 관찰도 어렵기 때문에 선별배지에 0.01% Triton X-100을 첨가하여 균사체 성장을 억제하였다. 또한 선별배지에서 색 변화에 의한 halo size를 관찰하여 CDH 활성 정도를 측정하기 위하여 효소활성 측정에 사용된 기질(lactose)

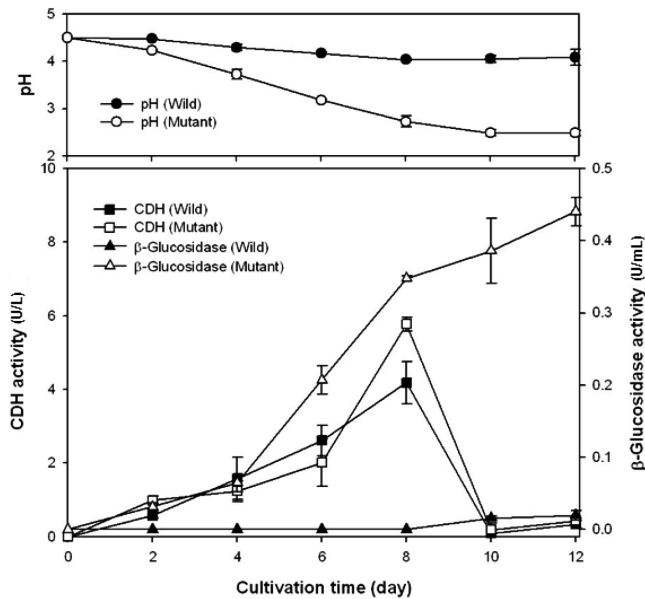


Fig. 4. Comparison of CDH and β -glucosidase activity between *P. chrysosporium* ATCC 32629 and mutant.

과 전자 수용체 DCIP를 첨가하였다. 결과적으로 1.2 kGy로 조사된 포자액을 적절히 희석하여 선별배지에 도말하여 배양한 후 큰 halo size를 갖는 변이주를 선별하였다.

선별된 변이주와 모균주의 액체배양을 통해 CDH와 β -glucosidase 활성을 확인하였다(Fig. 4). *P. chrysosporium* ATCC 32629는 β -glucosidase의 경우 약 0.02 U/ml로 거의 활성이 나타나지 않았는데 비해 변이주는 약 0.44 U/ml로 크게 증가하였다. CDH 활성의 경우 변이주가 모균주보다 약 1.4배 증가했으며, β -glucosidase 활성의 경우는 모균주보다 변이주의 활성이 약 20배 증가되었다. 효소생산을 위한 최적 생산배지가 아님에도 불구하고 이런 결과가 나왔다는 것은 최적 생산배지에서 배양 시 더 높은 생산성을 나타낼 것이라 판단된다.

4. 결 론

본 연구는 다양한 백색부후균으로부터 cellobiose dehydrogenase (CDH) 생산량이 좋은 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629를 선별하였으며, *P. chrysosporium*의 CDH 생산량을 증가시키기 위한 새로운 돌연변이원으로 양성자 빔을 이용하였다. CDH 활성을 증가시키기 위해 양성자 빔 기초 실험을 수행하여 1.2 kGy일 때 99.9%의 사멸율을 확인할 수 있었다. 양성자 빔을 이용하여 돌연변이를 유도한 후 선별배지를 통해 CDH 활성도가 높은 변이주를 선별하였다. 선정된 변이주를 액체배양했을 때 CDH 활성뿐만 아니라 β -glucosidase 활성도 향상된 것을 알 수 있었다. 위 연구를 통해 새로운 방사선원인 양성자 빔은 γ -ray나 X선에 비해 국부적으로 큰 에너지를 주는 특징으로 DNA 이중결합절단, 결실, 전좌, 역위 등 큰 구조변화를 유발할 가능성이 높다고 보고되어, 다른 방사선이나 화학변이원 처리로 얻을 수 없었던 새로운 돌연변이체 유발 가능성을 확인하였다.

감 사

본 연구는 교육과학기술부(MEST)가 지원하는 한국연구재단

(NRF) 중견연구자지원사업(No. 2009-0083923)의 연구비 지원으로 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Westermark, U. and Eriksson, K. E., "Carbohydrate-dependent Enzymatic Quinone Reduction During Lignin Degradation," *Acta Chem. Scand. B*, **28**, 204-208(1974a).
2. Westermark, U. and Eriksson, K. E., "Cellobiose: Quinine Oxidoreductase, a New Wood-degrading Enzyme from White-rot Fungi," *Acta Chem. Scand. B*, **28**, 209-214(1974b).
3. Westermark, U. and Eriksson, K. E., "Purification and Properties of Cellobiose: Quinone Oxidoreductase from *Sporotrichum pulerulentum*," *Acta Chem. Scand. B*, **29**, 419-424(1975).
4. Henriksson, G., Polk, V. and Eriksson, K. E. L., "Assay for Cellobiose Dehydrogenase in the Presence of Laccase," *Biotechnol. Techn.*, **11**(10), 743-745(1997).
5. Henriksson, G., Johansson, G. and Pettersson, G., "A Critical Review of Cellobiose Dehydrogenases," *J. Biotechnol.*, **78**, 93-113 (2000).
6. Ander, P. and Marzullo, L., "Sugar Oxidoreductases and Veratryl Alcohol Oxidase as Related to Lignin Degradation," *J. Biotechnol.*, **53**, 115-131(1997).
7. Henriksson, G., Ander, P., Pettersson, B. and Pettersson, G., "Cellobiose Dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a Wood Degrading Enzyme - Studies on Cellulose, Xylan and Synthetic Lignin," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 790-796(1995).
8. Mansfield, S. D., Saddler, J. N. and G"ubitz, G. M., "Characterization of Endoglucanases from the Brown Rot Fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*," *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 133-140(1998).
9. Smith, M. H. and Gold, M. H., "Phanerochaete chrysosporium β -Glucosidases: Induction, Cellular Localization, and Physical Characterization," *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 938-942(1979).
10. Wang, A. S., Chang, D. S. K., Milicic, J. B. and Yang, T. C., "Effect of X-ray Irradiation on Maize Inbred Lime B73 Tissue Cultures and Regenerated Plants," *Crop Sci.*, **28**, 358-368(1988).
11. Kwon, H. J., Park, Y. J., Yoo, Y. B., Park, S. Y. and Kong, W. S., "Genetic Variability and Phylogenetic Relationship Among Proton-beam Irradiated Strains of *Pleurotus ostreatus*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1041-1044(2007).
12. Kwon, H. J. and Kong, W. S., "Proton Beam Sensitivity of Basidiospore and Mycelium in *Pleurotus ostreatus*," *Kor. J. Mycol.*, **34**, 34-38(2006).
13. Eun, J. S., Kim, J. S., Lim, H. S., Han, S. K., Choi, S. R. and Jang, Y. S., "Effect of Proton Ion and Gamma-ray Irradiation on Radiosensitivity of M1 Seedlings in *Brassica napus*," *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, **25**, 17-23(2007).
14. Mansfield, S. D., deJong, E. and Saddler, J. N., "Cellobiose Dehydrogenase, an Active Agent in Cellulose Depolymerization," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(10), 3804-3809(1997).
15. Baminger, U., Nidetzky, B., Kulbe, K. D. and Haltrich, D. A., "Simple Assay for Measuring Cellobiose Dehydrogenase in the Presence of Laccase," *J. Microbiol. Meth.*, **35**, 253-259(1999).