

*Pleurotus ostreatus*에 의한 리그닌 분해에 미치는 수종 탄수화물의 영향

김규중* · 맹진수 · 강사육 · 하영철 · 홍순우
 강릉대학 생물학과 서울대학교 자연과학대학 미생물학과

**Effect of Several Carbohydrates on Lignin Degradation
 by *Pleurotus ostreatus***

Kim, K.J*., J.S. Maeng, S.O. Kang, Y.C. Hah and S.W. Hong

*Department of Biology, Kang-Keung National University, Kang-Keung 210
 Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University,
 Seoul 151, Korea

Abstract: To clarify the effects of several carbohydrates on the biodegradation of lignin by *Pleurotus ostreatus*. The strain was cultured on the media formulated with lignin and carbohydrates such as cellulose, xylan, collobiose, glucose and xylose, which was added individually. The culture mixtures grown 36 days were filtered and then estimated the degree of lignin biodegradation. It was found that the growth of *P. ostreatus* was stimulated and the depolymerization was also increased by the addition of carbohydrates.

When the carbohydrates were not added, polymerization was apparent in stead of depolymerization. In the case of glucose as an added carbohydrate, the content of lignin by the nitrosolignin method was greatly (about 7.4 times) decreased than control which contains lignin as a carbon source. The peak of lignin at 280nm in UV spectra was decreased about 27% after 27 days of culture. As results, it was assumed that lignin biodegradation was correlated to the carbohydrates and especially glucose was very significant role in lignin degradation.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, liginosulfonate, polymerization, depolymerization.

미생물에 의한 리그닌 분해기작을 연구하는데 있어서의 난점은 일정한 규칙적 화학구조를 하고있지 않아 구조가 복잡하다는 것과 구조의 골격이 벤젠과 같은 방향족 화합물로 이루어져 있어 쉽게 분해되지 않고 배양기간이 오래걸린다는 것이다(Hiroi 등, 1976; Jayme 등, 1967; Sundman 등, 1971; Haider 등, 1975).

리그닌을 분해할 수 있는 미생물로는 다양한 세균과 균류들이 있지만 특히 담자균류의 백색부후균(White-rot fungi)에 의해 잘 분해된다.

그러나 이 균류들도 리그닌을 효과적으로 분해하기 위해서는 다른 탄소원을 필요로 하는 것으로 알려져 있다(Horvath 등, 1972; Selin 등, 1975; Hiroi 등, 1976; Kirk 등, 1976; Hüttermann 등, 1977).

균류들에 의해 리그닌이 분해될 때는 두 상반된 리그닌 분자량의 변천이 함께 일어난다. 즉, 중합화와 탈중합화 현상이 그것이다(Selin 등, 1975; Kern, 1983). 배양액의 갈변현상이 수반되는 중합화 현상은 phenol oxidase 효소와 관

련이 있는 것으로 나타났다. 리그닌 분해에서 이 효소의 정확한 작용기작은 더 연구가 요구되는 것이지만 현재 알려진 바로는 phenol 을 quinone이나 phenoxy radical로 산화하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. Hiroi 등 (1976)에 의하면 느타리 버섯균을 배양시 lignosulfonate 배지에 cellulose를 첨가했을 때와 안했을 때 리그닌 분해에 상반된 결과가 나왔다. 즉, cellulose를 첨가시에는 탈중합화가, cellulose를 첨가하지 않았을 때는 중합화 현상이 우세하게 일어났다. 이것은 cellulose를 넣어주면 cellulose 효소에 의해 cellobiose가 생기며 이것은 또 다른 효소인 cellobiose-quinone oxidoreductase (Westermarck 등, 1974)의 보조기질로 작용하여 cellobiose는 산화시키고 동시에 quinone 이나 phenoxy radical을 환원시키는 반응이 일어나 중합화 현상이 방지되는 것으로 설명할 수 있다(Amer 등, 1980). 이것은 미생물에 따라 리그닌을 분해하는 양상이 다른 것은 리그닌 분해효소계와 그 효소반응 양식이 다를 가능성이 있다는 Crawford 등 (1980)의 견해와 결부시켜 본다면 또 다른 oxidoreductase 효소계의 존재가능성을 시사해주고 있다(Green, 1977; Haars 등, 1980).

본 실험에서는 목질의 구성성분이 될 수 있는 수종의 탄수화물들이 리그닌 분해에 어떠한 영향을 주는가를 리그닌 분자량의 변화는 컬럼 크로마토그래피를 통해. 리그닌 정량은 Nitrosolignin 법과 분광계의 $A_{280\text{nm}}$ 에 의해 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

사용균주는 한국 산림조합 연합회에서 분양 받은 느타리 버섯균 (strain No. 2)으로 PDA (Potato Dextrose Agar) slant에 접종, 25°C에서 배양하여 보관하였다. 실험시에는 Czapek 기본배지에 0.5% 리그닌과 1% 탄수화물을 첨가하여 배양하였다. 사용한 리그닌은 Calcium-lignosulfonate로 독일 Carl Roth사로 부터 구입하였다.

리그닌 정량

5 ml의 시료에 10% 초산과 10% Na-nitrite 용액 0.1 ml씩 넣고 15분간 반응시킨후 0.2 ml의 2N NH_4OH 용액을 첨가하여 색깔변화를 440 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Jayme 등, 1967).

280 nm에서의 흡광도 측정

컬럼 크로마토그래피시의 리그닌 정량은 분광계의 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

컬럼 크로마토그래피

배양액속의 리그닌 분자의 변환을 관찰하기 위해 Sephadex G 75로 충전된 2.5×70 cm의 컬럼을 사용하였으며 0.25 M CaCl_2 를 용매로 작동조건은 유속 16 ml/hr에 분획당 4 ml/tube씩 모아서 측정하였다.

결과 및 고찰

느타리 버섯균을 리그닌 0.5%에 탄수화물 1%를 첨가한 액체배지에서 배양한후 그 여액을 $0.45 \mu\text{m}$ 의 막여과지로 여과하여 컬럼 크로마토그래피를 하였을 때 리그닌만 넣고 배양한 경우 대조구(배양 안한것)에 비해 고분자량으로의 중합화가 일어난 반면에 탄수화물들이 첨가된 경우는 xylan을 제외하고는 탈중합화 현상을 보였다. 특히 glucose와 cellobiose의 경우는 고분자량 분획부근에 peak가 거의 나타나지 않았다. Cellulose와 xylose도 동일농도(1,000ppm)에서의 상대적 peak 높이가 0.72 및 0.42로 중합화 경우의 peak 높이에 비해 약 35% 및 63%의 감소현상을 나타냈다. Fig. 1과 Fig. 2에서 보듯이 이 균주는 cellulose와 xylan과 같이 중합도 (degree of polymerization)가 큰 다당류에 의해서는 탈중합화 효과가 거의 나타나지 않고 단당류나 이당류 정도에서 탈중합화 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. 이것은 이 균주에 의한 cellulose와 xylan 분해능이 약한 결과로 생각되며 이것은 궁극적으로 동일농도에서 존재할 수 있는 탄수화물들의 환원부위(reducing end)의 수와 관계되는 것으로 리그닌 분해시에 생성되는 자유라디칼의 페놀화합물이나 퀴논화합물들은 첨가된 탄수화물들의 환원

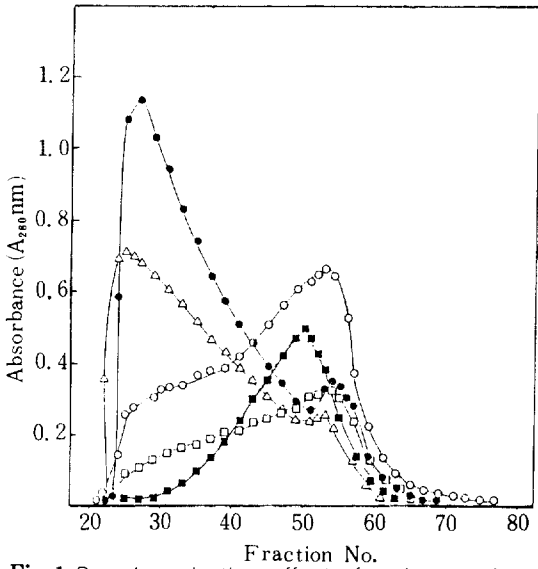


Fig. 1. Depolymerization effect of various carbohydrates on liginosulfonate containing medium in *Pleurotus ostreatus*. Observed symbols: ○, blank; ●, control (lignosulfonate only); □, glucose; ■, cellobiose; △, PSC(phosphoric acid swollen cellulose)

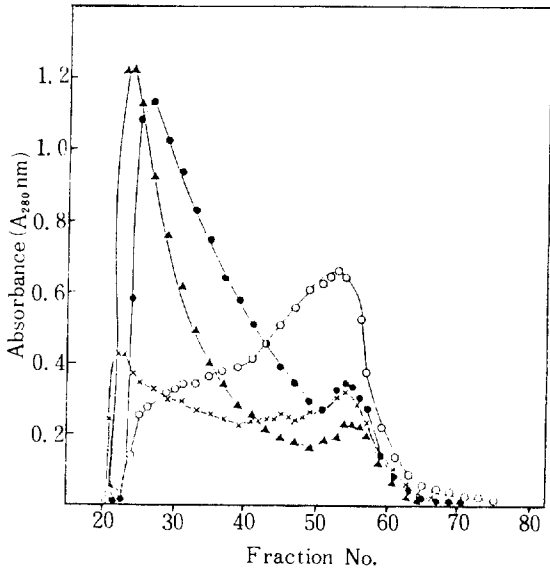


Fig. 2. Depolymerization effect of various carbohydrates on liginosulfonate containing medium in *Pleurotus ostreatus*. Observed symbols: ▲, xylan; ×, xylose

부위에서 효소의 작용에 의해 중합화가 되지 않고 탈중합화가 되는 것으로 사료된다. 배양기간과 중합화관계를 알아보기 위하여 리그닌만

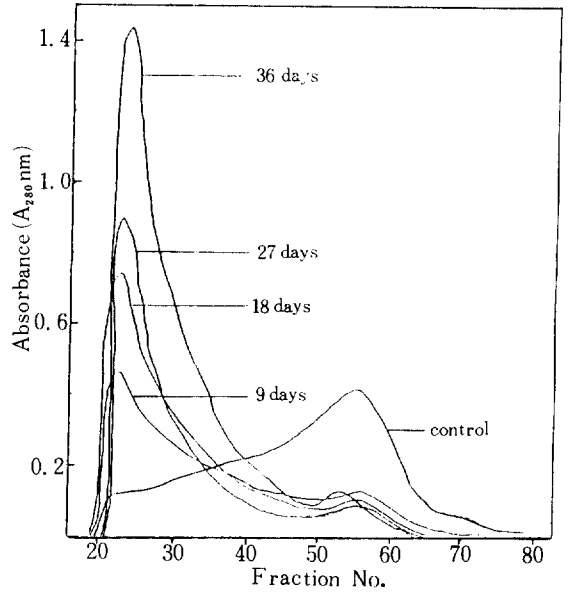


Fig. 3. Increase of polymerization after incubation with *Pleurotus ostreatus* for 9, 18, 27 and 36 days, respectively.

넣고 배양하면서 일정간격으로 배양액을 컬럼 크로마토그래피를 하였다더니 Fig. 3에서처럼 성장상태와는 관계없이 (Fig. 4) 배양기간이 경과함에 따라 중합화 정도가 증가하는 것을 알았다. 이것은 리그닌 분해가 이루어지면서 한편으로 생성되는 화합물들의 연속적인 oxidative coupling이 함께 일어나는 것으로 여겨지며 이것은 생리적 기능면에서 볼 때 생성화합물들이 대개 독성을 가진 phenol 화합물로 해독 (detoxification) 기능을 한다고 생각된다 (Selin 등, 1975). 또한 리그닌의 분해에는 다른 탄수화물 대사경로와 함께 연결되어 이루어져야 효과적이라 사료된다. 일정한 배양간격으로 시료를 채취하여 건조중량에 의한 성장정도와 Nitroso-lignin 법에 의해 리그닌을 정량하여 감소정도를, 처리한 탄수화물 별로 비교하여 보면 Fig. 4와 5에서 보는 바와같이 대체로 성장상태를 향상시킬 수 있는 탄수화물은 리그닌 분해도 촉진시킬 수 있었다. 그리고 이 균주는 목재의 hemicellulose계 탄수화물보다는 cellulose계 탄수화물에 의해 생장이 더욱 촉진되는 것을 보여 주었고 리그닌 분해 정도에 있어서도 탄수화물 종류에 따라 glucose, cellobiose, xylose, xylan 및 cellulose 순서별로 대조구(리그닌만 넣

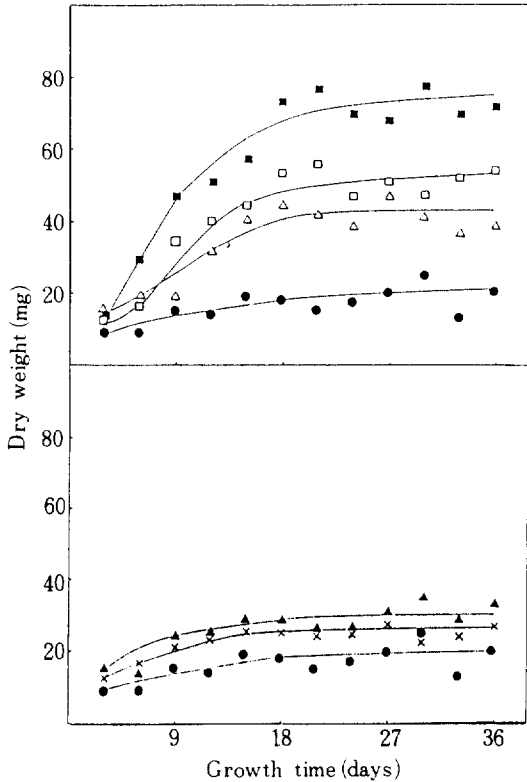


Fig. 4. The growth of *P. ostreatus* for 36 days' culture on the media containing lignosulfonate and various carbohydrates. Observed symbols are the same as figure 1 and figure 2

고 배양한 것)를 1.0로 하여 상대적 기울기로 표시하면 7.4, 6.6, 6.3, 4.8 및 3.7으로 cellulose 계 탄수화물이 앞서고 있다. 그러나 생장상태에 비해서는 리그닌 분해를 상당히 촉진시키고 있음을 알 수 있었다. 같은 배양여액을 280 nm에서 (리그닌은 벤젠계 방향족화합물로 280 nm에서 최대 흡광도를 나타냄) UV scanning한 결과도 이상에서의 결과를 뒷받침해 주었다. 배양기간에 따라 다소 불규칙한 값을 보이지만 대조구에 비해 탄수화물이 첨가된 경우에 배양기간이 경과함에 따라 빠른 속도로 peak 높이가 감소하고 있음을 보여주었다. 이는 리그닌 분해정도가 빠름을 말해주는 것이라 할 수 있다. Glucose의 경우 배양 27일만에 상대적 peak가 소실되었고 배양 36일에는 glucose외에 cellobiose와 xylose도 peak가 나타나지 않았다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 리그닌 분해

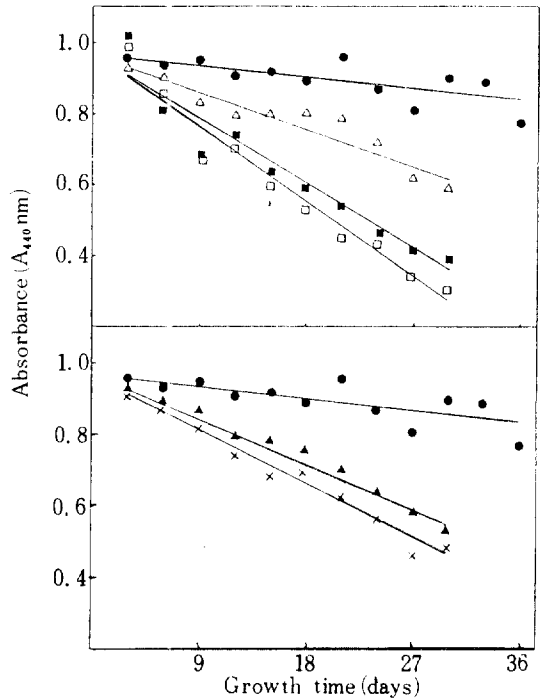


Fig. 5. The decrease of lignosulfonate according to the nitroso-method for 36 days of incubation by *P. ostreatus* on the media containing lignosulfonate and various carbohydrates. Observed symbols are the same as figure 1 and figure 2.

시에 탄수화물을 첨가하여 주면 리그닌 분해를 촉진시켜 줄 뿐만 아니라 리그닌 분해에서 저해 현상인 중합화 과정을 탈중합화 방향으로 유도

Table 1. UV scanned peak heights at 280 nm along to the culture development of *P. ostreatus* for 36 days on the media containing lignosulfonate (5,000 ppm) and various carbohydrates.

Carbohydrates	culture days				
	Blank	9 days	18 days	27 days	36 days
Control	0.855	0.735	0.793	0.751	0.622
PSC	0.774	0.901	0.734	1.123	0.620
Cellb	0.776	0.613	0.709	0.503	N. P.
Glucose	0.791	0.688	0.720	N. P.	N. P.
Xylan	0.631	0.799	0.751	0.986	1.021
Xylose	0.597	0.761	0.779	0.503	N. P.

PSC; phosphoric acid swollen cellulose, cellb; cellobiose, N. P.; no peak, blank; no culture filtrate, control; lignosulfonate only.

한다는 것을 알았고 여러 분석법에 의한 실험 결과들이 대체로 일관된 현상을 보인 것으로 봐서 리그닌의 자동산화(auto-oxidation)에 의한 것과는 다른 결과임을 확인할 수 있었다. 또한 탄수화물 종류에 따라 리그닌 분해정도가 다른

것은 사용균주의 탄수화물 분해효소계와 리그닌 분해효소계의 상관관계에 의한 것으로 생각되며 탄수화물의 종류에 따라 다양한 리그닌 분해효소계가 작용할 것으로 사료된다 (Green, 1977; Eriksson, 1978; Crawford 등, 1980).

적 요

리그닌 분해에 있어서 수종 탄수화물이 느타리 버섯균의 리그닌 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 느타리 버섯균을 리그닌과 탄수화물로 cellulose, xylan, cellobiose, glucose와 xylose가 각각 포함된 배지에서 배양하여 그 배양여액을 분석한 결과, 탄소원으로 리그닌만 넣은 배지보다 리그닌과 탄수화물을 함께 넣고 배양한 경우에 배양균의 생장이 촉진되었고 젤 컬럼 크로마토그래피에 의해 중합화보다는 탈중합화 현상이 우세하게 나타났다. 아울러 Nitrosolignin법과 280 nm에서의 흡광도 측정에 의해 리그닌을 분석한 바에 의하면 탄수화물이 첨가된 배지에서 배양한 경우에 리그닌 분해정도가 증가하였다. Glucose의 경우 리그닌만 넣은 경우에 비해 7.4배이상 분해정도가 증가하였다. 이상의 결과로 봐서 리그닌 분해에는 다른 탄수화물이 함께 작용한다고 볼 수 있으며 자연계에서의 목재분해의 일면을 이해할 수 있어 생태학적 의미가 크다고 할 수 있다.

REFERENCES

1. Amer, G.I. and S.W. Drew. 1980. Microbiology of lignin degradation. *Ann. Rep. Ferment. Pro.* **4**, 67-103.
2. Ander, P. and K.E. Eriksson. 1975. Influence of carbohydrates on lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *svensk Papperstidn.* **8**, 643-652.
3. Ander, P. and K.E. Eriksson. 1976. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **109**, 1-8.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities or protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
5. Eriksson, K.E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.* **22**, 317-332.
6. Ferm, R. and R. Nilsson. 1970. Analysis of microbially degraded lignosulfonate by thin-layer chromatography and ultrafiltration. *Svensk Papperstidn.* **15**, 283-286.
7. Green, T.R. 1977. Significance of glucose oxidase in lignin degradation. *Nature* **268**, 78-80.
8. Haars, A. and A. Hüttermann. 1980. Macromolecular mechanism of lignin degradation by *Fomes annosus*. *Naturwissenschaften* **67**, 39-40.
9. Harrs, A. and A. Hüttermann. 1980. Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**, 233-237.
10. Hiroi, T. and K.E. Eriksson. 1976. Influence of cellulose on the degradation of lignins by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *svensk Papperstidn.* **79**, 157-161.
11. Horvath, R.S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* **36**(2), 146-155.
12. Hüttermann, A., M. Gebauer. C. Volger and C. Rosger. 1977. Polymerisation und abbau von natrium-ligninsulfonat durch *Fomes annosus*(Fr.) Cooke. *Holzforschung*

- 31, 83-89.
13. Hüttermann, A., C. Herche and A. Haars. 1980. Polymerization of water insoluble lignins by *Fomes annosus*. *Holzforschung* 34, 64-66.
 14. Kern, H.W. 1981. Microbial degradation of lignosulfonates. In: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds (T. Leisinger, R. Hutter, A.M. Cook and Nuesch, Eds.), pp 299-324. Academic Press.
 15. Kern, H.W. 1983. Transformation of lignosulfonates by *Trichoderma harzianum*. *Holzforschung* 37, 109-115.
 16. Ferm, R. 1972. Molecular-weight changes in lignin and lignosulfonates caused by phenol-oxidizing enzymes. *Svensk Papperstidn.* 75, 863-865.
 17. Kirk, T.K. and A. Kelman. 1965. Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying basidiomycetes. *Phytopathology* 55, 739-745.
 18. Kirk, T.K., W.J. Connors and J.G. Zeikus. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 32(1), 192-194.
 19. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L. F. Lerenz and J.G. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117, 277-285.
 20. Leisola, M.S.A., D.C. Ulmer and A. Fiechter, 1984. Factors affecting lignin degradation in lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 137, 171-175.
 21. Moore, S. and W.H. Stein. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211, 907-913.
 22. Selin, J. F., V. Sundman and M. Rähä. 1975. Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch. Microbiol.* 103, 63-70.
 23. Stenlund, B. 1970. Polyelectrolyte effects in gel chromatography of lignosulfonates. I. The influence of sample concentration and volume and the use of reference substances. *Paper and Timber* 52, 55-62.
 24. Stenlund, B. 1970. Polyelectrolyte effects in gel chromatography of lignosulfonates. II. The influence of the electrolyte content of the eluent and the cation of the lignosulfonates on the fractionation. *Paper and Timber* 52, 121-130.
 25. Stenlund, B. 1970. Polyelectrolyte effects in gel chromatography of lignosulfonates. III. The fractionation mechanism. *Paper and Timber* 52, 197-206.
 26. Stenlund, B. 1970. Polyelectrolyte effects in gel chromatography of lignosulfonates. IV. The relationship between molecular weight and elution volume. *Paper and Timber* 52, 333-339.
 27. Westermark, U. and K.E. Eriksson. 1974. Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chem. Scand.* 28, 204-208.
 28. Westermark, U. and K.E. Eriksson. 1974. Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scand.* 28, 209-214.

(Received Aug. 1, 1986)