

Pleurotus ostreatus에 의한 lignin 모델 화합물 분해

신 광 수

서울대학교 미생물학과

서 론

Lignin은 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 방향족 화합물로서, 주로 식물 세포벽의 중엽층(second lamella)에 함유되어 있다. Lignin의 전구물질로는 coumaryl alcohol(p-hydroxycinnamyl alcohol), coniferyl alcohol(4-hydroxy-3-methoxycinnamyl alcohol) 및 sinapyl alcohol(3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamyl alcohol)이 있으며, 이들이 효소 작용에 의해 중합되어 고분자 물질인 lignin으로 생성성 된다. 또한 lignin을 구성하고 있는 각 탄소 결합은 미생물에 의한 분해가 용이하지 않은 β -O-4 linkage, β -l' linkage 등으로 연결되어 있다(1). 현재까지 미생물에 의한 lignin 분해는 주로 목재부후균(wood rot fungus)을 재료로 이루어져 왔다. 목재 부후균에는 cellulose만을 분해 이용하는 갈색부후균(brown rot fungus)과 lignin과 cellulose를 모두 분해하는 백색부후균(white rot fungus)이 있는 바, 이 중 백색부후균은 lignin 분해능이 탁월한 종이다. 특히 *Phanerochaete chrysosporium*은 생리학적, 효소학적인 측면에서 가장 연구가 많이된 균주이다. 이 균주는 lignin 및 lignin 모델화합물의 분해능이 우수한 균주로 lignin을 CO_2 로 완전히 산화시킨다. Lignin 분해에 관한 효소학적 연구로는 laccase(2), lignin peroxidase(3, 4), manganese peroxidase(5, 6) 및 과산화수소 공급 효소균, 예컨대, glucose oxidase(7-10), glyoxal oxidase(11), methanol oxidase(12), fatty acyl-CoA oxidase(13) 등이 연구되어 있다. Kawai 등(2)에 의하면 *Coriolus versicolor*에서 분비되는 laccase는 phenolic β -1 lignin 모델 화합물인 1-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propane-1,3-diol을 분해하여 두 개의 monomer를 생성한다. 이는 laccase의 작용에 의해 형성된 phenoxy radical의 작

용으로 alkyl-aryl cleavage, C_α - C_β cleavage, C_α oxidation 등이 일어났음을 시사해 준다. 한편, *P. chrysosporium*에서 분리한 lignin peroxidase는 heme을 prosthetic group으로 지니고 있는 metalloprotein으로 lignin과 반응시 lignin의 주요결합 예컨대, β -O-4 결합 등을 분해하는 cation free radical을 생성한다. *Streptomyces viridosporus*에서 분리한 또 다른 lignin peroxidase는 fungi의 효소와는 달리 C_α 의 환원이 선행한 후에 C_α - C_β 분해가 일어난다. 또한, lignin과 본 효소, H_2O_2 를 함께 처리하였을 때, H_2O_2 의 소비가 급격히 증가하였으며, 이는 *S. viridosporus*의 peroxidase도 lignin 분해에 관여한다는 것을 의미한다. Ramasamy 등(7)은 *P. chrysosporium*의 glucose oxidase negative 돌연변이주는 glucose oxidase의 생성이 억제될 뿐만 아니라 lignin의 분해능도 상실되는 것을 관찰하였다. 이는 lignin 분해시 glucose oxidase가 H_2O_2 공급원으로 작용하기 때문이라 추정하였다.

따라서 본 연구에서는 lignin 분해시 lignin peroxidase와 glucose oxidase의 역할을 규명하기 위하여 백색부후균의 일종인 *Pleurotus ostreatus*를 실험 재료로 하여 glucose oxidase와 세포외 peroxidase를 분리하여 그 특성을 규명하여 이미 분리된 타 균주의 효소와 비교 분석하고, β -O-4 linkage를 지닌 이합체 모델화합물에 작용시켜 그 산물을 분석함으로써 간접적이거나 두 효소의 역할 및 분해 기작을 추정하여 보았다.

P. ostreatus에서 분리한 효소들의 특성

*P. ostreatus*에 분리한 세포외 peroxidase는 *P. chrysosporium*의 lignin peroxidase와 유사한 효소학적 특성을 지니고 있다. Absorption spectrum을 보면 (Fig. 1), *P. ostreatus*의 peroxidase는 iron을 pros-

thetic group으로 지니고 있으며, pyridine hemochrome complex를 만들어 본 결과, iron의 구조는 fe-

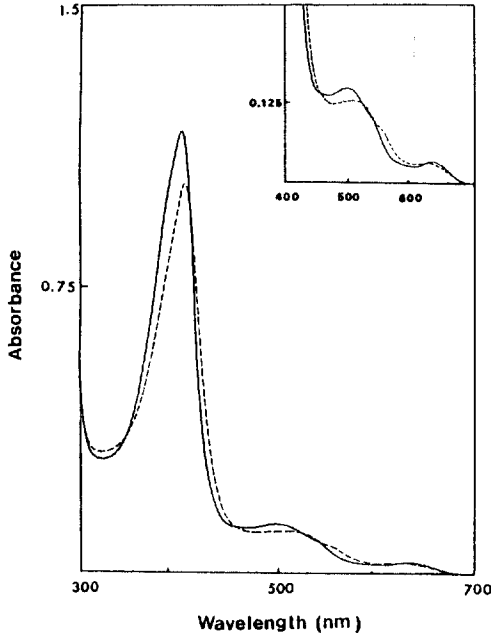


Fig. 1. Absorption spectra of purified peroxidase. Purified enzyme(591 μg) was dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0). The insert shows the enlarged spectrum in the wavelength region indicated. The oxidized from(\cdots) was obtained by adding 0.1 mM of hydrogen peroxide to the reduced from($-$).

rro photohaem IX이었다. 상기 효소는 para 위치에 hydroxyl group을 지닌 화합물에 특이적으로 작용하였으며, 특히 3', 5' 위치에 methoxyl기가 결합되어 있는 sinapyl unit에 대한 기질 친화도가 가장 높았다 (Table 1). 또한 이 효소는 두 개의 동일한 polypeptide로 구성된 dimeric protein으로 분자량이 타 peroxidase에 비해 매우 컸다. Steady-state kinetics 결과, ping-pong by mechanism에 의해 pyrogall이 산화되었으며(Fig. 2A), H_2O_2 에 의한 저해는 competitive한 양상이었다(Fig. 2B).

한편, 순수분리된 glucose oxidase는 당이 함유되지 않은 단백질로 periplasmic site에 존재하는 대부분의 단백질의 glycosylation 되어있지 않다는 점을 고려하여 볼 때, 본 효소도 periplasmic space에

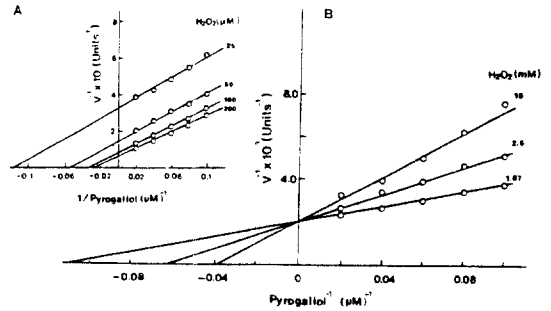


Fig. 2. Determination of the steady-state kinetic parameters for peroxidase(A) and the evidence for inhibition of peroxidase by H_2O_2 (B).

Table 1. Substrate specificity of *Pleurotus peroxidase* and horserdaish peroxidase(HRP).

	<i>Pleurotus peroxidase</i>			HRP		
	Km	kcat	kcat/Km	Km	kcat	kcat/Km
	μM	$10^6(\text{min}^{-1})$	$10^5(\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1})$	μM	$10^6(\text{min}^{-1})$	$10^5(\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1})$
Ferulic acid	10.62	13.61	12.81	34.34	27.94	8.14
p-hydroxy-benzoic acid	39.79	0.95	0.24			
Vanillic acid	133.85	6.43	0.48	178.41	4.60	0.26
Gallic acid	9.77	3.82	3.91	94.07	3.07	0.33
Protochatechuate	5.04	19.23	19.23	45.72	10.26	2.24
p-coumaric acid	5.59	7.72	13.81	8.21	10.45	12.73
Sinapic acid	9.30	21.35	22.96	143.79	2.50	0.17
Phenol red	5.43	4.31	7.95	38.96	0.81	0.21
Syringic acid	11.75	2.76	2.35			
o-dianisidine	14.96	16.80	11.23	23.83	48.53	20.37

Table 2. Kinetic parameters for the interaction of glucose oxidase with various sugars.

Substrate	kcat	Km	kcat/Km	Relative activity
	$10^5(\text{min}^{-1})$	mM	$10^8(\text{min}^{-1}\text{M}^{-1})$	%
D-glucose	11.32	1.34	7.71	100
D-xylose	7.56	40.46	0.19	2.5
L-sorbose	15.43	127.46	0.12	1.6
D-fructose	6.86	300.00	0.03	0.3
D-maltose	17.94	483.46	0.03	0.5
L-arabinose	—	—	—	0.2
D-galactose	—	—	—	0.1
D-cellobiose	—	—	—	0.1

Enzyme activity was determined by the consumption rate of molecular oxygen.

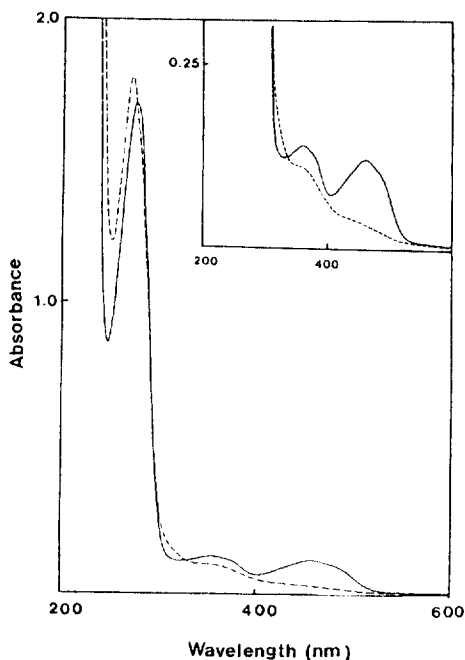


Fig. 3 Absorption spectra of purified glucose oxidase. Purified enzyme (1.6 mg of proteins) was dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0). The insert shows the enlarged spectrum in the wavelength region indicated. The reduced form (---) was obtained by adding 1 mM glucose to the oxidized form (—).

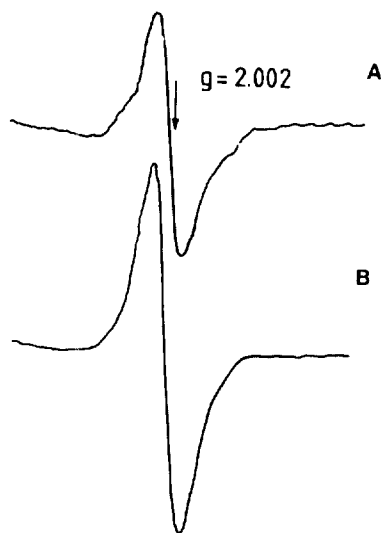


Fig. 4. X-band ESR spectra of glucose oxidase. Spectrum of native enzyme (A) and obtained spectrum after adding of 10 mg of sodium dithionite to the native enzyme (B).

의 subunit로 구성된 tetramer였다. Glucose에 대한 기질 친화도가 월등히 높았으며, cellulose, hemicellulose에서 유래된 cellobiose, D-xylose에 대한 기질 친화도도 관찰되었다 (Table 2). 이는 자연계에서 lignin 분해가 일어날 때, cellulose, hemicellulose의 monomer인 cellobiose, xylose 등을 이용하여 H_2O_2 를 공급할 수 있다는 가능성을 제시해 주는 결과이다. UV-Visible spectrometer (Fig. 3), ESR (Electron Spin Resonance) spectrometer (Fig. 4)의 방법을 이용하여 관찰한 결과, *P. ostreatus*에서 분리한 glucose oxidase는 *Aspergillus*, *Phanerochaete*의 glucose oxidase와 동일하게 FAD (Flavin Adenine Dinucleotide)를 prosthetic group으로 지니고 있었다. 효소에 함유되어 있는 FAD의 양은 molar extinction coefficient 값으로 환산하였는 바, 효소 1분자당 4분자의 FAD 즉, subunit 1분자당 1분자의 FAD가 함유되어 있었다.

Lignin dimer의 분해 기작

상기 두 효소를 lignin dimer에 작용시켜 생성된 산물을 HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), silica gel column chromatography의 방법으로 분리하여 NMR (Nuclear Magnetic Resonance),

위치할 것으로 생각된다. 이 효소의 분자량은 약 290,000 dalton이었으며, 동일한 분자량을 지닌 4개

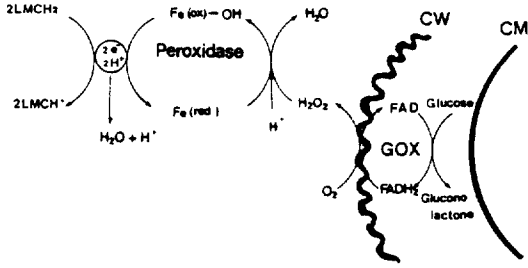


Fig. 5. Proposed scheme of electrons transfer in the degradation of lignin model compounds by glucose oxidase(GOX) and peroxidase of *Pleurotus ostreatus*. LMCH₂ represent reduced lignin model compounds and LMCH· represent radical forms of lignin model compounds.

mass spectrometry를 사용하여 각 물질의 분자량 및 구조를 결정하였다. 생성된 산물의 하나는 3, 5-dimethoxy-p-benzoquinone이었다. 이는 peroxidase에 의해 생성된 cation free radical의 작용으로 dimer의 β-O-4 linkage가 끊어졌음을 추정케 한다. 위 결과를 바탕으로 하여 제안된 electron flow의 모식도는 Fig. 5와 같다. 즉, Glucose oxidase가 glucose를 gluconolactone으로 산화시키고 그 부산물로 H₂O₂를 생성한다. 세포의 peroxidase는 생성된 H₂O₂를 기질로 사용하여 H₂O로 환원시키며, 동시에 lignin 모델 화합물을 산화시켜 cation free radical을 형성한다. 이 radical은 nonspecific한 산화작용을 지속해 lignin의 주요결합을 끊을 것으로 추정된다.

결 론

위에서 서술한 바와 같이 lignin은 구조가 복잡한 물질이므로 그 분해에 관여하는 효소군도 매우 다양하리라 쉽게 짐작된다. 본 연구에서는 lignin 결합의 가장 대표적인 형태인 β-O-4 결합에 초점을 맞추어 이를 분해하는 peroxidase 및 H₂O₂ 공급원으로서의 glucose oxidase를 분리하여 특성을 살펴보고, 이들에 의한 lignin 분해기작을 모델 화합물을 사용하여 간접적으로 추정하여 보았다. 그 결과, 두 효소는 상호 협동적으로 작용함을 관찰하였고, 따라서 이 두 효소는 자연계에서도 협동적으로 작용하여 lignin을 분해할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

고 찰

Lignin 분해에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 lignin peroxidase에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 현재까지 lignin 분해와 관련되어 보고된 세포의 peroxidase는 *P. chrysosporium*에서 분리한 lignin peroxidase와 manganese peroxidase, *Streptomyces viridosporus*(14)에서 분리한 lignin peroxidase가 전부이다. 따라서, 본 연구는 이들과는 생리적 특성이 전혀 다른 백색부후균인 *P. ostreatus*에서 분리한 효소에 대한 연구라는 점에서 의의가 크다고 생각된다. 한편, 자연계에서 lignin은 cellulose, hemicellulose와 complex를 형성하여 존재하므로 cellulose, hemicellulose를 분해하는 효소군과 연관성 및 또 다른 형태의 radical reaction을 일으키는 phenol oxidase와의 연관성 여부도 계속 연구되어야 할 과제이다. 산업적인 측면으로, lignin은 그의 생분해를 통해 순수한 cellulose의 획득, 수질 오염 색소원의 제거 및 장래의 에너지원으로서의 가능성 등이 산재한 물질이므로 더욱 많은 연구가 이루어져야 하겠다.

참고문헌

1. Crawford, R.L.(1981) Lignin biodegradation and transformation, New York, John Wiley & Sons, Inc.
2. Kawai, S., T., Umezawa, and T., Higuchi(1988) Degradation mechanisms of phenolic β-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 99-110.
3. Kirk, T.K., M. Tien, P.J. Kersten, M.D. Mozuch, and B. Kalyanaraman(1986) Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*-Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β-aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.*, **236**, 279-287.
4. Renganathan, V., K. Miki, and M.H. Gold(1985) Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H₂O₂-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 304-314.
5. Glenn, J.K. and M.H. Gold(1985) Purification

- and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 329-341.
6. Mino, Y., H. Wariishi, N.J. Blackburn, T.M. Loehr, and M.H. Gold(1988) Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7029-7036.
 7. Ramasamy, K., R.L. Kelley, and C.A. Reddy (1985) Lack of lignin degradation by glucose oxidase-negative mutants of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 436-441.
 8. Kelley, R.L. and C.A. Reddy(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.
 9. Kelley, R.L., K. Ramasamy, and C.A. Reddy (1986) Characterization of glucose oxidase-negative mutants of a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, **144**, 254-257.
 10. Kelley, R.L. and C.A. Reddy(1986) Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, **166**, 269-274.
 11. Kersten, P.J. and T.K. Kirk(1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, **169**, 2195-2201.
 12. Nishida, A. and K.E. Eriksson(1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotech. Appl. Biochem.*, **9**, 325-338.
 13. Greene, R.V. and J.M. Gould(1984) Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 437-443.
 14. Ramachandra, M., D.L. Crawford, and G. Hertel(1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycetes *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 3057-3063.