

김 규 중  
강릉대학교 생물학과

## 1. 서론

리그닌은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 함께 목재의 주요 구성성분으로 목재의 20-30%를 차지하고 있다. 리그닌은 식물세포의 1차 및 2차 세포벽의 중간층에 많이 분포하며 세포와 세포의 접착제 역할을 한다고 볼 수 있으며 식물조직의 형틀을 유지하여 준다.

리그닌은 C-C, C-O-C의 화학결합을 주로 가진 페닐프로판 단위로 이루어져 있으며 methoxyl group이 잔기로 붙어 있는 복잡한 그물구조로 일정한 규칙성이 없고 난 분해성 물질이다. 이러한 난 분해성과 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 견고히 결합되어 있기 때문에 리그닌의 분해기작의 이해는 목질자원의 효율적 이용에 매우 중요하다.

대부분의 리그닌 분해 미생물은 고등균류들인 자낭균 및 담자균에 속하며 특히 담자균류 중 백선부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*을 재료로 많이 연구되어 왔다. 이 균은 분류상으로 Corticiaceae과 Aphyllphorales속에 속하며 다른 목재 부후균과 비교해서 연구재료로 적합한 몇가지 특징을 갖고 있다. 즉, 최적생장온도가 40°C로 다른 균에 비해 높으며 실험실 조건에서 무성포자뿐만 아니라 유성포자도 쉽게 형성할 수 있고, 리그닌 분해율도 다른균에 비해 월등히 높다(1,2). 여기에서는 리그닌 분해에 관여하는 주된 효소들로 알려진 lignin peroxidase(LIP), Manganese peroxidase(MNP) 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성효소들의 특성, 역할 및 최근의 연구결과들과 이들 효소생성과 관련하여 배양상 조건들을 살펴 보고자 한다.

## 2. Lignin peroxidases(LIPs)

Forney등(3)이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 리그닌 분해와의 관련성을 보고한 이래 Tien등(4)과 Glenn등(5)은 리그닌 분해력을 지니고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 요구하는 효소가 *Phanerochaete chrysosporium*에 존재함을 보고 하였다. 이 lignin peroxidase(ligninase)는 분자량이 38-43KDa, PI값의 범위가 3.3-4.7인 많은 동

위효소(multiple isozymes)로 이루어진 heme을 가진 체외효소이다(6). 이 동위효소들은 이온교환수지 등으로 분리할 수 있는데, 그 수는 배양조건, 균주, 분리기술에 따라 2-15개로 이루어져 있다고 보고된 바 있다(6-9). 예를 들면 Dass 등(9)의 보고에 의하면 *P.chrysosporium* BKMf-1767균주로, 배지에 acetate buffer를 사용 하면 H2, H6가 주된 peak로 나타나고 dimethyl succinate(DMS) buffer의 경우에는 H8, H10이 주된 동위효소로 나타난다고 보고하였다. 최근 Farrell등(6)에 의하면 HPLC를 사용하여 *P.chrysosporium* BKMf-1767로 부터 10개의 isozyme을 분리하였고 이중 6개는 (H1, H2, H7, H8, H10) lignin peroxidase (LIP), 4개는 (H3, H4, H5, H9) Mn - peroxidase (MNP)의 동위효소임을 밝혔다. LIP isozyme은 모두 veratryl alcohol을 veratraldehyd로 산화하고 분자량도 평균 38KDa로 유사 하였다. 다만 배양기간에 따라 각 동위효소의 생성량(unit)이 다르게 나타났고 기질에 대한 친화력이 각기 차이가 났다(Table-1). 이로써 각 동위효소들은 리그닌 분해에 있어서 공조효과(synergistic effect)를 발휘하지 않나 추측되지만 아직도 그 역할 및 존재의 의미에 대해서는 더 연구되어야 할 것이다.

LIP의 발견은 곧 이어 이 효소의 분자 생물학적 연구도 활발하게 이루어졌다. 여러 연구자들(7-20)의 연구 결과로 H2, H8, H10에 해당하는 유전자의 base sequence 및 아미노산 서열이 밝혀졌고 이들 유전자 상호간의 base 혹은 아미노산의 유사도(homology)는 다소 차이가 있으나 대략 70-90% 범위를 유지하고 있다(Table-2). 또한 이들은 각기 다른 구조유전자에 의해 발현됨을 시사하고 mRNA level에서 여러 환경요인에 의해 (예, nitrogen, carbon starvation) control됨을 나타내고 있다.

LIP의 촉매반응은 다양한 결합방식을 가진 리그닌 모델 화합물에 작용하지만 대체로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 관여하는 라디칼 반응으로 설명하고 있다(Fig.1 ; 21). 즉, LIP이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응하여 compound I (2e<sup>-</sup> oxidized)을 만들고 이 compound I은 리그닌 화합물과 반응하여 compound II (e<sup>-</sup> oxidized)와 리그닌 화합물에서 유래한 라디칼 화합물(aryl cation radical)을 생성한다. 이 라디칼 화합물은 많은 화학반응(비 효소적반응)을 일으켜 다양한 반응생성물을 만든다. LIP은 라디칼반응으로 광범위한 기질특이성을 나타내지만 반응산물을 기준으로 할 때 그 반응양상은 크게 다섯 카테고리로 나눌수 있다(21). 즉, ① benzylic alcohol oxidation, ② carbon-carbon bond cleavage, ③ hydroxylation, ④ phenol dimerization(or polymerization), ⑤ demethylation등이다.

### 3. Manganese - dependent peroxidases (MnPs)

LIP와 같이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 요구하는 extracellular heme protein들로 되어 있으나 이 효소는 LIP와는 달리 veratryl alcohol을 산화하지 않으며 (pH 5.0에서) 대신 Mn(II)를 Mn(III)로 산화하며 이 Mn(III)이 리그닌 화합물을 라디칼로

산화하는 과정을 갖는다. 또한 LIP와 마찬가지로 4-6개의 동위효소를 갖는 것으로 알려져 있으며(6, 22) PI값은 4.2-4.9이며 분자량은 대략 46KDa정도이다. MNP도 LIP와 거의 유사한 촉매 순환반응을 가지나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응후 생성된 중간산물이 바로 리그닌화합물과 반응하지 않고 먼저 Mn(II)와 반응하여 Mn(III)로 산화하며 이 Mn(III)이 리그닌 화합물을 산화시키는 과정을 갖는다. 따라서 이 효소는 활성을 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 뿐만 아니라 Mn(II)가 요구되는 것이다.

Paszczynski등(23)에 의하면 LIP가 비 페놀성과 페놀성 리그닌 모델 화합물 (non phenolic and phenolic lignin model compounds)에 대해 산화작용을 하는데 비해 MNP는 페놀성 화합물, 특히 경질목재의 주성분인 syringyl 화합물에 대해 높은 친화력을 갖는다는 것으로 이 효소의 중요성을 제시하였다. 또한 MNP는 Mn(II)존재하에서 NADPH, GSH, dithiothreitol 및 dihydroxymaleic acid를 산화하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성한다는 것을 알았다. 이로써 이 효소는 peroxidase뿐 아니라 oxidase의 기능도 한다는 것을 보여 주었다. 따라서 이 효소는 리그닌 분해에서 laccase와 같은 phenol oxidizing enzyme과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 공급하는 역할을 함께하지 않나 암시하였다(1). Bonnarme등(24)의 연구결과에 따라 Perez등(25)은 배지 성분 중 Mn(II)농도를 조절함으로써 LIP와 MNP효소생성을 억제 혹은 촉진하여 LIP, MNP 각 효소의 [<sup>14</sup>C] DHP lignin에 대한 분해율을 조사한 결과, MNP는 [<sup>14</sup>C] DHP lignin 분해와 거의 관계가 없음을 보여 주었다. 그러나 LIP이 결핍된 돌연변이주들을 분석한 결과 (Table 3)에 의하면 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 발생율이 야생균주와 비교 했을 때 40%이상되는 경우도 관찰할 수 있어 Perez등(25)의 결과와는 달리 아직 MNP와 [<sup>14</sup>C] DHP lignin 분해와의 상호 관련성을 배제할 수 없다. 또한 자연계 부후 목재 부위에 Manganese가 축적되어 있는 것을 관찰한 Blanchette(26)의 연구 결과나 MnO<sub>2</sub>가 LIP의 활성을 안정시켜 준다는 Kern(27, 28)의 결과를 볼 때 리그닌 분해에서 Manganese와 함께 MNP의 중요성을 시사하고 있다. MNP와 관련된 분자 생물학적 연구로는 2개의 cDNA가 알려졌고 (MnPI, lambda MP1)(29, 30) 이를 근거로 MnPI과 일치하는 mnp genomic clone의 transcription조절과 염기서열이 밝혀진 상태이다(31).

#### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성효소들

리그닌 분해와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 상호관련성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 요구되는 LIP와 MNP의 발견으로 분명해졌으며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 공급원으로 glucose-1-oxidase가 주된 효소라는 연구결과(32)가 나온 이래 여러효소가 알려졌다. glucose-1-oxidase는 리그닌 분해능과 마찬가지로 질소나 탄소원 고갈시 2차 대사과정에서 생성되는 것으로 알려져 있다. glucose-1-oxidase가 결핍된 mutant(GOX)들은 리그닌 분해를 할 수 없을 뿐만 아니라 LIP, MNP활성도 나타나지 않았지만 GOX<sup>+</sup> revertant들은 리그닌 분해능을 다시 회복하였다. 이로써 GOX<sup>-</sup> mutant의 리그닌 분해능 결핍은 glucose oxidase 뿐만 아니라 LIP, MNP결핍에 의한 것으로 볼 수 있으며 이들

효소들은 어떤 동일한 regulatory gene에 의해 조절되는 것으로 생각했다(33). 그러나 최근 LIP mutant 및 다양한 mutant들의 특성을 분석한 결과 서로 상이한 조절유전자들에 의해 효소활성이 조절되지 않나 추측된다(34, Table 3).

그 외  $H_2O_2$ 를 생성하는 효소로는 glucose-2-oxidase(35), fatty acyl CoA oxidase(36), methanol oxidase(37, 38), glyoxal oxidase(39) 및 aryl alcohol oxidase(40, 41)등이 알려져 있으며 glyoxal oxidase는 extracellular로 배양액내에서의 중요한  $H_2O_2$  공급원으로 Kersten등(39)에 의해 보고된바 있다. 결론적으로 여러 산화효소들이  $H_2O_2$  공급원으로 이 균주에 의해 생성되는 것으로 보이며 리그닌 분해에서 각 효소들의 역할 및 상호관련성이 연구되어야 할 것이다.

## 5. 기타 효소

오래전 부터 리그닌 분해와 관련하여 연구된 효소로 laccase가 있다. 이 효소는 copper를 prosthetic group으로 가지고 있으며 페놀화합물에서 one electron oxidation을 통해 페놀 라디칼 형성을 촉매하며 이 반응을 통해  $\alpha$ -oxidation, aryl- $\alpha$  cleavage 및  $\alpha$ - $\beta$  cleavage반응이 일어나는 경우도 있지만(42), 이 라디칼들은 LIP, MNP와는 달리 대개 비효소적 반응으로 중합화(polymerization)됨으로 리그닌 분해에서의 역할이 의문시 되었다. 그러나 이 라디칼들은 cellobiose와 cellobiose:quinone oxidoreductase(43)의 작용으로 탈 중합화(depolymerization)된다는 것을 밝힌 바 있다. 강력하고 대표적인 리그닌 분해균인 *Phanerochaete chrysosporium*은 이 laccase가 결핍된 균주로, 리그닌 분해에서 이 효소의 역할에 의문을 제기하지만 대부분의 리그닌 분해 균들이 이 효소를 분비한다는 사실에 비추어 볼 때 리그닌 분해에서 배제할수 없는 효소로 생각된다.

## 참고 문헌

1. Kirk, T.K.(1988). In "Biochemistry and genetics of Cellulose degradation" (Ed J.P. Aubert et al.) P.315-332. Academic Press Inc.
2. Tien, M.(1987). CRC Cirtical Rev. 15(2), 141-168.
3. Forney, L.J., C.A. Reddy, M. Tien and S.D. Aust.(1982).  
J.Biol. chem. 257, 11455-11462.
4. Tien, M and T.K. Kirk.(1983). Science 221, 661-663.
5. Glenn, J.K., M.A. Morgan, M.B. Mayfield, M. Kuwahara and M.H. Gold.(1983). Biochem. Biophys.Res.Commun.114, 1077-1083.
6. Farrell, R.L. , K.E. Murtagh , M. Tien, M.D. Mozuch and T.K. Kirk.  
(1989). Enzyme Microb. Technol. 11, 322-328
7. Renganathan, V., K. MiKi and M.H. Gold.(1985).  
Arch. Biochem. Biophys. 342 , 304-314.
8. Leisola, M.S.A., B. Kozulic, F. Meussdorffer and A. Fiechter.(1987). J  
Biol. Chem. 262, 419-424.
9. Dass, S.B. and C.A. Reddy.(1990). FEMS Microbiol. Lett.69,221-224.
10. Zhang, Y.Z. , G.J. Zylstra, R.H. Olsen and C.A. Reddy.(1986). Biochem.  
Biophys. Res. commun. 137, 649-656
11. de Boer, H.A. ,Y.Z. Zhang, C. Collins and C.A.Reddy.(1988). Gene,  
60,93-102.
12. Tien, M. and C-PD. Tu.(1987). Nature, 326, 520-523.
13. Saloheimo, M., V. Barajas, L.N. Niku-Paavola and J.K.C.  
Knowles.(1989). Gene, 85, 343-351.
14. Smith, T.L., J. Schalch, S. Gaskell, S. Covert and D. Cullen.(1988).  
Nucleic Acids Res. 16, 1219.
15. Walther, I., M. Kalin, J. Reiser, F. Suter, B. Fritsche, M. Saloheimo,  
M. Leisola, T. Teeri, J.K.C. Knowles and A. Fiechter.(1988). Gene, 70,  
127-137.
16. Holzbaaur, E.L.F. and M. Tien.(1988).  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 155, 626-633.
17. Brown, A., P.F.G. Sims, U. Raeder and P. Broda.(1988). Gene, 73, 77-85.
18. Asada, Y., Y. Kimura, M. Kuwahara, A. Tsukamoto, K. Koide, A. Oka and  
M. Takanami.(1988). Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 469-473.
19. Schalch, H., G. Gaskell, T.L. Smith and D. Cullen.(1989). Mol. Cell.  
Biol. 9, 2743-2747.
20. Naidu, P.S., Y. Z. Zhang and C.A. Reddy.(1990).  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 173(3), 994-1000.

21. Tien, M. (1987). *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15, 141-168.
22. Leisola, M.S.A., B. Kozulic, F. Meusdoerffer and A. Fiechter. (1985) *J. Biotechnol.* 2, 379-382.
23. Paszczynski, A., V.B. Huynh and R. Crawford. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 244(2), 750-765.
24. Bonnarne, P. and T.W. Jeffries. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1), 210-217.
25. Perez, J. and T.W. Jeffries. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6), 1806-1812.
26. Blanchette, R.A. (1984). *Phytopathology.* 74(6), 725-730.
27. Kern, H.W. (1989). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 223-234.
28. Kern, H.W. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 582-588.
29. Pease, E.A., A. Andrawis and M. Tien. (1989). *J. Biol. Chem.* 264, 13531-13535.
30. Pribnow, D., M.B. Mayfield, V.J. Nipper, J.A. Brown and M.H. Gold. (1989). *J. Biol. Chem.* 264, 5036-5040.
31. Godfrey, B.J., M.B. Mayfield, J.A. Brown and M.H. Gold. (1990). *Gene*, 93, 119-124.
32. Kelley, R.L. and C.A. Reddy. (1986). *Arch. Microbiol.* 144, 248-253.
33. Kelley, R.L., K. Ramasamy and C.A. Reddy. (1986). *Arch. Microbiol.* 114, 254-257.
34. Boominathan, K., S.B. Dass, T.A. Randall, R.L. Kelley and C.A. Reddy. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 260-265.
35. Eriksson, K.E., B. Pettersson, J. Volc and V. Musilek. (1986). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 257-262.
36. Greene, R.V. and J.M. Gould. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 437-443.
37. Nishida, A., K.E. Eriksson. (1987). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 325-338
38. Eriksson, K.E. (1987). *Philos. Trans. R. Soc. Lond A* 321, 455-459.
39. Kersten, P.J. and T.K. Kirk. (1987). *J. Bacteriol.* 169(5), 2195-2201.
40. Guillen, F., A.T. Martinez and M.J. Martinez. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 465-469.
41. Muheim, A., R. Waldner, M.S.A. Leisola and A. Fiechter. (1990). *Enzyme Microb. Technol.* 12, 204-209.
42. Ander, P. (1990). In "Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components" (Ed K.E. Eriksson et al.) P. 255-270. Springer-Verlag.
43. Westermark, U. and K.E. Eriksson. (1974). *Acta Chem. Scand. B* 28, 209-214.

Table 1. Catalytic Properties of lignin peroxidases with three substrates.

| Lips | Veratryl alcohol            |                 | $\beta$ -0-4 Model <sup>2</sup> |     | 1,4-Dimethoxy benzene |     |
|------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|-----|-----------------------|-----|
|      | K <sub>m</sub> <sup>3</sup> | TN <sup>4</sup> | K <sub>m</sub>                  | TN  | K <sub>m</sub>        | TN  |
| H1   | 86                          | 3.2             | 99                              | 1.4 | 42                    | 1.5 |
| H2   | 250                         | 8.3             | 78                              | 3.1 | 132                   | 3.0 |
| H6   | 122                         | 6.6             | 27                              | 1.1 | 78                    | 4.2 |
| H7   | 483                         | 5.5             | 88                              | 0.8 | 20                    | 3.4 |
| H8   | 89                          | 1.3             | 111                             | 0.5 | 73                    | 8.6 |
| H10  | 190                         | 2.8             | 444                             | 0.4 | 192                   | 0.8 |

1. From Ref. 6

2. 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(0-methoxyphenoxy)-propane-1,3-diol

3. K<sub>m</sub>= units are micromolar

4. TN= turn over number

Table 2. Nucleotide and amino acid homology among *P. chrysosporium* lignin peroxidase genes and the proteins encoded by these genes<sup>a</sup> (Naidu and Reddy 1990).

|                                     | Amino acids <sup>c</sup> |      |      |      |     |     |      |       |      |      |
|-------------------------------------|--------------------------|------|------|------|-----|-----|------|-------|------|------|
|                                     | LIP2                     | LIP5 | LIP6 | 0282 | ML4 | ML5 | GLG3 | GLG6* | LIG1 | PLG1 |
| <u>LIP2</u>                         |                          | 72   | 66   | 70   | 71  | 71  | 72   | 72    | 70   | 72   |
| <u>LIP5</u>                         | 73                       |      | 82   | 95   | 99  | 91  | 98   | 88    | 90   | 99   |
| <u>LIP6</u>                         | 72                       | 80   |      | 81   | 81  | 79  | 81   | 82    | 79   | 82   |
| <u>0282</u>                         | 73                       | 87   | 77   |      | 95  | 89  | 95   | 86    | 89   | 95   |
| <u>ML4</u>                          | 73                       | 98   | 80   | 87   |     | 91  | 99   | 88    | 90   | 98   |
| Nucleotides <sup>b</sup> <u>ML5</u> | 73                       | 85   | 79   | 83   | 85  |     | 91   | 86    | 93   | 91   |
| <u>GLG3</u>                         | 73                       | 99   | 80   | 87   | 99  | 86  |      | 88    | 90   | 99   |
| <u>GLG6*</u>                        | 72                       | 82   | 79   | 80   | 81  | 80  | 82   |       | 88   | 88   |
| <u>LIG1</u>                         | 71                       | 82   | 78   | 81   | 83  | 89  | 83   | 81    |      | 90   |
| <u>PLG1</u>                         | 73                       | 99   | 80   | 87   | 98  | 86  | 99   | 82    | 83   |      |

a. The numbers in the lower left triangle of the table give % nucleotide homologies and are separated by a diagonal space from the upper right triangle in which % amino acid homologies are given. The GLG6 gene and the GLG6 protein are highlighted in the first vertical column and horizontal row.

b. Percentage of matched nucleotides within exons as determined by GENEPRO program.

c. Percentage of matched amino acids between various LIPs are given. LIP2, LIP5 and LIP6 genes of *P. chrysosporium* BKMF-1767, respectively, encode lignin peroxidases H2, H8 and H10. Genes 0282, ML4, ML5 and GLG3 are genes isolated from *P. chrysosporium* BKMF-1767 (1, 12, 22). LIP genes LIG1 and PLG1 were isolated from *P. chrysosporium* strain ME-446(9, 10) and are closely related to the LIP6 gene.



Table 3. Characteristics of some mutants of *Phanerochaete chrysosporium*.

| Mutants | LIP | MNP  | GOX  | GlyOX | <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (S) | <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (R) |
|---------|-----|------|------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ME446   | 143 | 1930 | 0.41 | 30.9  | 40.4 (100)                        | 18.0(100)                         |
| GOX6    | —   | —    | —    | 0.04  | 3.02 (7.5)                        | ND                                |
| 931-2   | —   | 642  | 0.15 | 0     | 19.4 ( 48)                        | 5.5 (30.5)                        |
| -M      | —   | 58   | ND   | 0     | 1.04 (2.6)                        | ND                                |
| 71b9    | —   | 888  | 0.04 | 0.06  | 20.7 (51.2)                       | 7.7 (42.6)                        |
| 981-10  | —   | 294  | —    | 0.08  | 9.95 (24.6)                       | 3.9 (21.8)                        |

LIP: lignin peroxidase ( $\mu$ /l)

MNP: Mn peroxidase ( $\mu$ /l)

GOX: glucose oxidase ( $\mu$ /mg protein)

GlyOX: glyoxal oxidase (n mole/min/ml)

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>(S): <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from 2'-<sup>14</sup>C-labelled lignin

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>(R): <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from [<sup>14</sup>C] lignin

ND : not determined

ME446: wild type

-M : mutant(931-2) cultured without Mn(II)

Relative percentages in parentheses

Unpublished data from Dr.C.A.Reddy.