

탄수화물과 황산암모늄이 *Pseudomonas diminuta*의 리그닌 분해에 미치는 영향

김규중·신광수*·맹진수*·성치남**

강릉대학 생물학과

*서울대학교 자연과학대학 미생물학과

**순천대학 생물학과

Effects of Some Carbohydrates and Ammonium Sulfate on Lignin Degradation by *Pseudomonas diminuta*

Kim, Kyu-Jung, Kwang-Soo Shin*, Jin-Soo Maeng* and Chi-Nam Seong**

Department of Biology, Kangreung National University, Kangreung 210-702

* Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Seoul National University, Seoul 151-742

** Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-070, Korea

ABSTRACT: To investigate the influence of cosubstrate supplement and ammonium sulfate on lignin degradation by *Pseudomonas diminuta* KM4-2, isolated in the laboratory, the strain was cultured on the lignin media which contained lignin as a source of carbon and the culture filtrate was analyzed by Sephadex G-75 column chromatography. It was found that polymerization was not appeared unlike wood-rot fungi. When the carbohydrates were added, the peak of lignin at 280nm by UV scanning spectra of the filtrate, was significantly increased. In order to determine the effect of ammonium sulfate on the ligninolytic activity, the isolated strain was incubated in the media containing 0.1%, 0.25% and 0.5% of nitrogen concentration in the Warburg flask and the rate of oxygen uptake was estimated by Warburg Respirometer. As a result, the activity was maximum at 0.1% of nitrogen concentration and thereafter decreased in parallel with nitrogen concentration.

KEY WORDS *Pseudomonas diminuta*, cosubstrate, oxygen uptake, ammonium sulfate.

리그닌은 그 종류에 관계없이 기본골격이 벤젠 고리를 가진 단위화합물들이 여러개 연결되어 있는 방향족화합물로 미생물에 의해 쉽게 분해되지 않는 난분해성물질이다. 그러나 리그닌외에 셀룰로오스, 포도당과 같은 보조기질을 함께 넣고 배양하면 그 분해능 및 분해속도가 촉진되는 것으로 알려져 있다(Selin 등, 1975; Kirk 등, 1976). 겔 컬럼크로마토그래피 분석에 의하면 대부분의 목재부후성 균주들에 의해 리그닌이 분해될 때, 중합화 현상이 일어나며 리그닌과 함께 보조기질을 첨가하여 배양하면 중합화와 달리 탈중합화 현

상이 일어난다고 보고된 바 있다(Westermark 등, 1974; Selin 등, 1975; Haars 등, 1980; Hüttermann 등, 1980). 미생물의 리그닌 분해에 영향을 미치는 변수로는 보조기질 외에도 산소농도, 배지조성 특히 질소원의 종류 및 농도 그리고 pH 등이 관계하는 것으로 알려져 있으며 배지의 질소원과 리그닌분해 활성과의 관계는 많이 연구되어 있다(Keyser 등, 1978; Kirk 등, 1978; Reid, 1983; Commodity 등, 1985). 보고된 문헌에 의하면 배지의 질소원 농도가 일정이상 존재하면 리그닌 분해가 억제되며 질소원이 고

갈상태에 들어갈 때 리그닌 분해 활성이 나타난다고 하였으며 (Keyser 등, 1978), 그 기작은 연구자에 따라 각각 주장이 다르다 (Kirk 등, 1978; Amer 등, 1980).

세균의 리그닌 분해에 대한 연구는 *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* 등을 재료로 많이 되어 있으나 (Haider 등, 1978; Odier 등, 1978), 분해정도가 미약하고 탄소원으로 리그닌 외에 yeast extract, glucose 등을 소량 첨가하여 배양하는 경우가 많기 때문에 세균의 리그닌 분해능 유무를 판단하는데 어려움이 많다. 그러나 리그닌 모델화합물이나 합성리그닌인 DHP에 대해 작용한다는 보고가 있을 뿐만 아니라 (Crawford 등, 1973; Haider 등, 1978) 균류와는 달리 혐기성 조건에서도 리그닌을 분해할 수 있다는 보고로 볼 때 (Odier 등, 1978) 세균도 리그닌 분해능을 지니고 있음을 알 수 있다.

미생물의 리그닌 분해에 대한 연구는 대부분 목재부후성 균주들에 의해 이루어졌고 특히 리그닌 분해에 중요한 변수로 작용하는 보조기질, 질소원 등이 세균의 리그닌 분해에는 어떻게 작용하는지 연구된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 자연계에서 리그닌 분해능을 지닌 세균을 분리하여 이러한 성질을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

균주분리

리그닌 분해능이 있는 균주를 분리하기 위해 목재부후식토, 퇴비, 늪지대 토양 등으로부터 시료를 채취하여 탄소원으로 리그닌 (lignosulfonate) 만을 함유한 액체최소배지에서 농화배양하였다 (최소배지 조성: KH_2PO_4 , 0.5g; K_2HPO_4 , 0.5g; NaCl, 6.0g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; lignosulfonate, 1g; 증류수 1l). 농화배양은 채취한 시료를 0.02% yeast extract를 함유한 리그닌 배지에 첨가하여 일주일간 배양한 후 이것을 다시 새로운 배지에 옮겨 배양하는 방식으로 5회 정도 적응을 시킨 뒤 한천평판배지에 접종하여 나타나는 콜로니를 리그닌 분해 세균으로 분리하였다.

배양조건

균주의 분리동정을 위한 경우를 제외하고는 본 실험의 대부분은 0.1% 리그닌을 함유한 액체최소배지에서 배양했으며 탄수화물의 영향을 조사하기 위한 경우에는 리그닌 배지에 0.4%의 탄수화물을 첨가하여 배양하였다. 성장곡선 측정을 위한 배지는 최소배지에 0.3% 포도당과 효과적인 생장을 위해 0.02%의 yeast extract를 첨가하여 배양하였다.

리그닌정량

5ml의 시료에 10% 초산과 10% Na-nitrite 용액 0.1ml씩 넣고 15분간 반응시킨 후 0.2ml의 2N NH_4OH 용액을 첨가하여 색깔변화를 440nm에서 흡광도를 측정하였다 (Jayme 등, 1967). 컬럼크로마토그래피시의 리그닌량은 분광광도계를 이용하여 파장 280nm에서 흡광도로 평가하였다.

생체량측정

분리한 균주를 리그닌 배지에서 배양할 때의 생리조건을 조사하기 위한 생체량 측정은 분광광도계의 파장 540nm에서, 그리고 포도당이 포함된 최소배지에서의 성장정도 측정은 610nm에서의 흡광도를 각각 측정하여 평가하였다.

컬럼크로마토그래피

배양액에서 리그닌 성분의 분자량 변환을 관찰하기 위해 Sephadex G-75로 충전된 2.5×70 cm의 컬럼을 사용하였으며 0.25M CaCl_2 를 eluent로 작동조건은 유속 16ml/hr에 분획당 4ml씩 모아서 측정하였다.

대사활성측정

질소원의 농도에 따른 리그닌 분해 정도를 조사하기 위해 Yanaco Respirometer (Yanaco, Japan)를 이용하여 Umbreit 등(1951)의 방법에 따라 산소소모율을 측정하였다. 기질로는 최소배지에 0.1% 리그닌을 사용하였으며 균체현탁액은 리그닌 액체최소배지에서 배양한 대수기의 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고 인산염 완충용액 (0.2M, pH 7.0)으로 2회 세척한 후 5배 농축하였다. Warburg flask내의 각실의 조성은 다음과 같다. 주실; 기질 2ml, 부실; 20% KOH 용액 0.4ml, 측실; 균체현탁액 0.5ml. 30°C 항온수조에서 10분간 진탕한 후 측실의 균체현탁액을 주실

에 섞어넣고 일정시간 간격으로 산소소모량을 측정하였다. 산소소모량은 Brodie액 높이의 변화를 측정하여 평가하였으며 thermobarometer는 균체 현탁액과 기질 대신 완충용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 특성

리그닌 배지상에서 생장상태나 리그닌 분해능이 우수한 2종의 *Klebsiella*속과 1종의 *Pseudomonas*속을 분리하였다. 그 중 우점종인 *Pseudomonas*속을 가지고 실험을 진행하였으며 이 균주의 분류학적 특징은 Table 1과 같다. Bergy's Manual (1984)이나 관련 책자(S. T. Cowan, 1971; M. D. Starr, 1981)들을 참고로하여 동정한 결과 *Pseudomonas diminuta* KM4-2로 밝혀졌다. 일반적으로 *Ps. diminuta*는 포도당을 비롯하여 이용할 수 있는 당류가 적는데 반해 본 균주는 포도당에 대해 양성반응을 나타내는 것으로 봐서 *Ps. versicularis*로 볼 수도 있으나 본 균주는 nutrient agar 배지상에서 콜로니 색깔이 우유빛깔을 띠는 점에서 *Ps. diminuta*로 동정함이 타당하리라 생각된다. 리그닌 분해에 대해서 *Pseudomonas*속의 균주로 연구한 경우가 많으나 (R. L. Crawford, 1981) 대부분 완전히 동정된 균주를 사용한 것이 아니어서 계통적인 관계를 파악할 수는 없다. 본 균주는 Bergy's Manual에 의하면 DNA homology로 봐서 탄수화물(유기물)이 용성이 다양한 group 1에 속한 균주가 아닌 점에서 특이하나 동일 속은 아니더라도 계통적으로 유사한 *Xanthomonas*속에서 리그닌 분해능이 우수한 균주가 분리되어 보고된 바 (Odier 등, 1978), 본 균주를 *Pseudomonas diminuta*로 동정함에 무리가 없는 것으로 생각된다. 리그닌 배지에서 본 균주의 최적배양조건들을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 배양온도는 30°C, 배지의 리그닌 농도는 4,000 ppm인 때의 생장속도가 가장 빨랐다. 최적 pH는 6.0으로 리그닌 배지의 pH와 일치하였다.

탄수화물의 영향

리그닌 배지에 탄수화물을 첨가함으로써 분해되

Table 1. Characterization of the isolated organism (KM4-2)

| Test | KM 4-2 |
|-----------------------------|-----------|
| Morphology | rod |
| Gram reaction | - |
| Motility | + |
| Oxidase | + |
| Catalase | + |
| Oxidation/Fermentation | oxidative |
| Acid from glucose | ± |
| Fluorescence | - |
| H ₂ S production | - |
| Arginine dihydrogenase | - |
| Urease | - |
| Starch hydrolysis | - |
| Gelatin liquefaction | ± |
| Casein hydrolysis | + |
| Nitrate reduction | - |
| ONPG reaction | + |
| Aesculin hydrolysis | + |
| Citrate utilization | - |
| MacConkey medium, growth | - |
| Tween 80 hydrolysis | - |
| Lysine decarboxylase | - |
| Ornithine decarboxylase | - |
| Utilization of | |
| Glucose | ± |
| Rhamnose | - |
| Melibiose | - |
| Saccharose | - |
| Lactose | - |
| Maltose | - |
| Mannitol | + |
| Salicin | + |
| Sorbitol | - |
| Trehalose | + |
| Xylose | ± |
| Glycerol | + |
| Inositol | - |
| Raffinose | - |
| Fructose | - |
| Adonitol | - |
| Arabinose | - |
| Dulcitol | - |

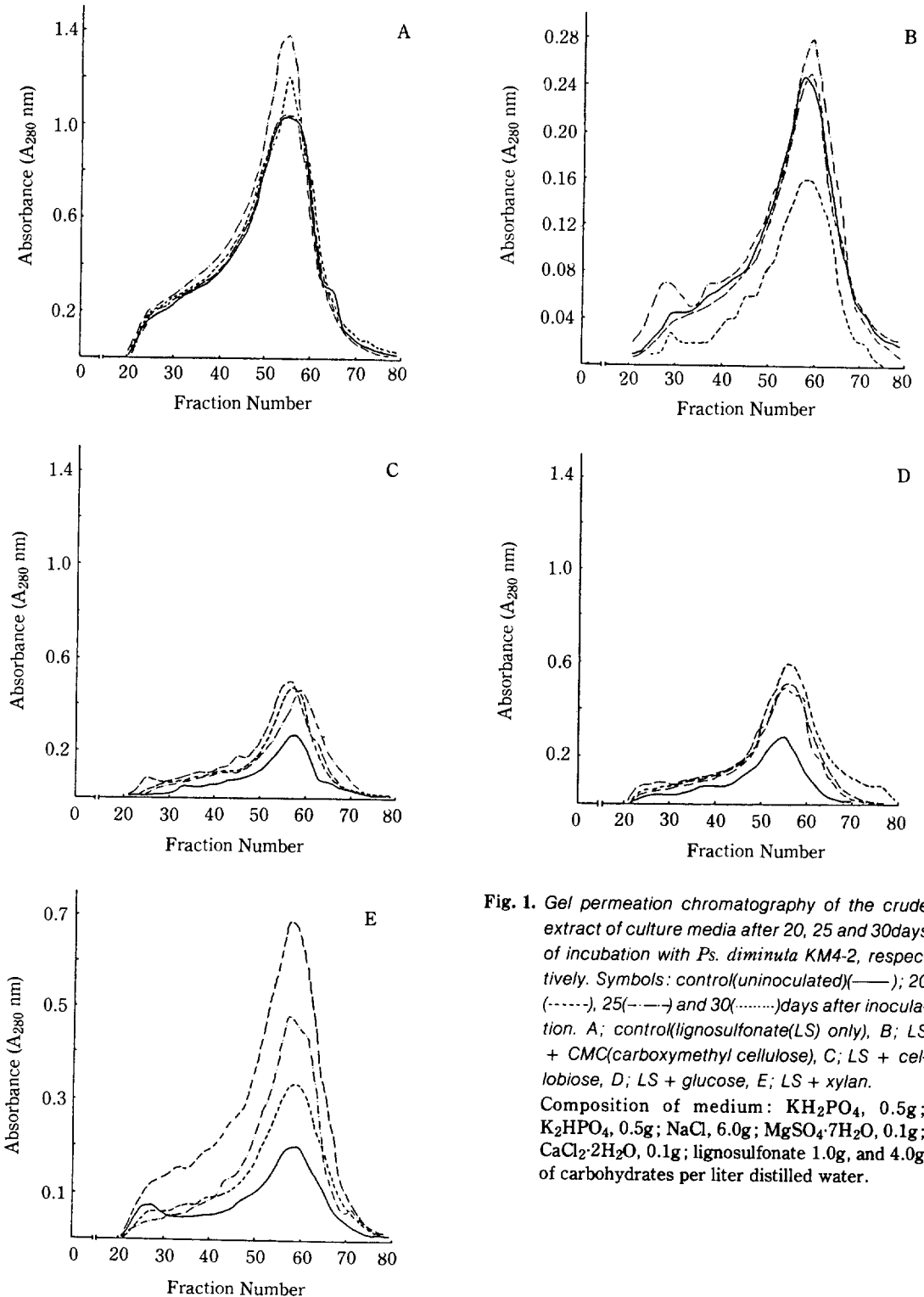


Fig. 1. Gel permeation chromatography of the crude extract of culture media after 20, 25 and 30 days of incubation with *Ps. diminuta* KM4-2, respectively. Symbols: control (uninoculated) (—); 20 (·····), 25 (---) and 30 (-----) days after inoculation. A; control (lignosulfonate (LS) only), B; LS + CMC (carboxymethyl cellulose), C; LS + cellobiose, D; LS + glucose, E; LS + xylan. Composition of medium: KH_2PO_4 , 0.5g; K_2HPO_4 , 0.5g; NaCl, 6.0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; lignosulfonate 1.0g, and 4.0g of carbohydrates per liter distilled water.

Table 2. Optimal condition for culture of the isolate (KM4-2)

| Parameter | Condition |
|--------------|-----------|
| Temperature | 30°C |
| pH | 6.0 |
| Lignin conc. | 4,000ppm |

는 리그닌 분자량의 변화양상을 조사하기 위해서 분리한 *Pseudomonas diminuta* KM4-2을 리그닌 0.1%에 탄수화물 0.4%를 첨가한 액체배지에서 20일, 25일 및 30일씩 각각 배양한 후 그 여액을 0.45 μ m의 막 여과지로 여과한 다음 컬럼크로마토

그래피를 행한 결과 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서처럼 리그닌만 넣고 배양한 경우를 제외하고는 대조구 (배양안한 것)에 비해 모든 분획에 대한 리그닌 농도의 증가를 보여 주었다. 리그닌만 넣고 배양한 경우 흔히 목재부후성 균류에서 볼 수 있는 중합화 현상이 관찰되지 않았으며 또한 리그닌을 근본적으로 분해하지는 못하였다. 따라서 본 균주는 중합화 현상과 관계있는 polyphenol oxidase가 분비되지 않거나 분비되더라도 미량일 것으로 생각되며 리그닌의 벤젠환에 결합되어 있는 잔기(예, methoxyl기)들을 분해하는데 관여하지 않나 생각된다(Ander 등, 1978; Haider 등, 1978). 그러

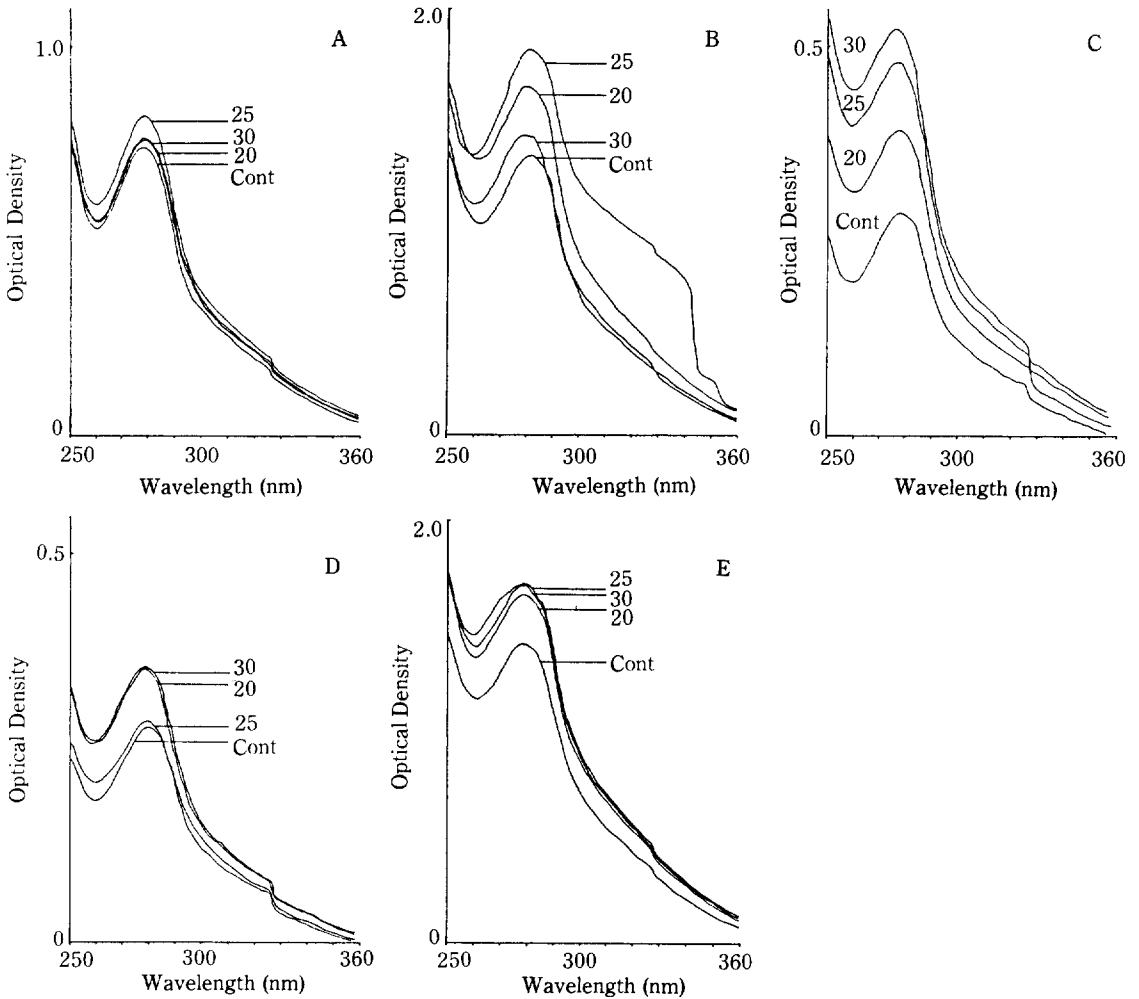


Fig. 2. UV scanning spectra of the culture media after 20, 25 and 30days of incubation with *Ps. diminuta* KM4-2, respectively. Culture media contained liginosulfonate(0.1%) and various carbohydrates(0.4%). Composition of medium and culture condition were the same as in Fig. 1.

나 glucose에서처럼 약하나마 저분자물질로 변환되는 것으로 봐서 리그닌 분해에 탄수화물이 다소나마 영향을 준다고 생각된다. 각종 탄수화물을 첨가하여 배양한 후 그 여액을 UV scanning한 결과, Fig. 2에서처럼 리그닌만 넣고 배양한 경우에는 다소 불규칙하지만 배양기간에 따라 파장 280 nm 근방에서 흡광도 변화의 폭이 현저히 증가하였다. 셀룰로오즈의 경우는 흡광도가 증가하다가 30 일 배양시 급격히 흡광도가 감소하는 양상을 나타냈다. 리그닌이 미생물에 의해 분해될 때 일어나는 화학반응들을 모두 예상하기는 어렵지만 단위 화합물로 존재하는 방향족화합물들이 그것의 중합체에 비해 UV상에서의 흡광도가 일반적으로 크다는 사실을 염두에 둘 때 탄수화물을 첨가하여 줌으로써 리그닌의 분해가 촉진된다는 것을 알 수 있고 또한 분해된 단위화합물들의 재결합도 활발하게 일어난다고 추정되기 때문에 Fig. 2에서와 같은 결과가 나타났다고 생각된다. 그러나 Fig. 1의 결과와 함께 고려해 볼 때 polyphenol oxidase가 결핍되어 있을 것으로 생각되는 본 균주에서는 polyphenol oxidase와 quinone oxidoreductase가

coupling되어 있는 효소계가 아닌 다른 효소계가 존재하리라 생각된다 (Westermarck, 1974; Green, 1977; Kelley 등, 1986).

질소원농도의 영향

Warburg flask에 기질로 0.1% 리그닌과 최소 배지 성분중 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 0.1%, 0.25% 및 0.5%씩 넣고 30°C의 항온조에서 반응하면서 20분간격으로 산소소모율을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 질소원 농도를 0.1%로 사용하였을 때 리그닌 대사활성이 최대를 나타냈고 질소원 농도가 높을수록 산소소모율이 감소하였으며 0.5% 농도에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 이러한 현상은 균류에서와 같은 결과를 나타냈으며 (Keyser 등, 1978; Reid, 1983; Commonday 등, 1985) 세균에서도 균류에서처럼 고농도의 질소원을 첨가하여 주면 리그닌 분해활성이 억제된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 균주에서도 질소원 농도에 따라 리그닌 분해가 조절되는 체계를 갖고 있다고 생각된다. 그러나 본 실험에서 질소원 농도를 0.01% (100 ppm) 수준으로 배지에 첨가하였을 때는 리그닌 대사활성이 나타나지 않았다. 한편 이러한 결과가 순수하게 질소원 농도에 의한 것인지 조사하기 위해 탄소원으로 리그닌 대신에 포도당을 첨가하고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 리그닌 배지에서와 같이 0.1%, 0.25% 및 0.5%

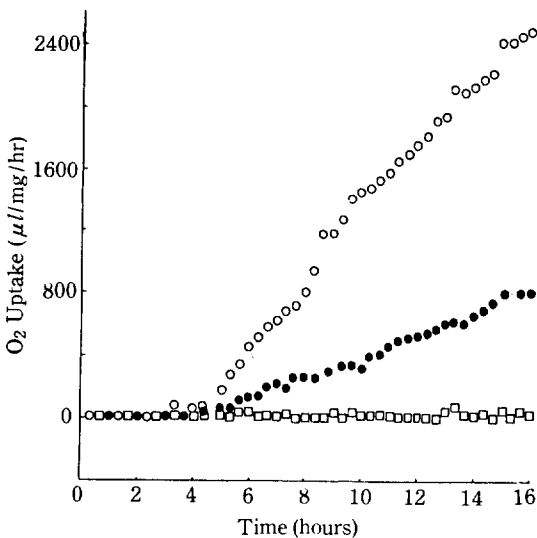


Fig. 3. Changes of degradability of *Ps. diminuta* KM4-2 against lignin at various concentration of ammonium sulfate. Symbols: 1.0g (○), 2.5g (●) and 5.0g (□) of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per liter of media. Composition of medium: KH_2PO_4 , 0.5g; K_2HPO_4 , 0.5g; NaCl, 6.0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; glucose 3.0g per liter distilled water.

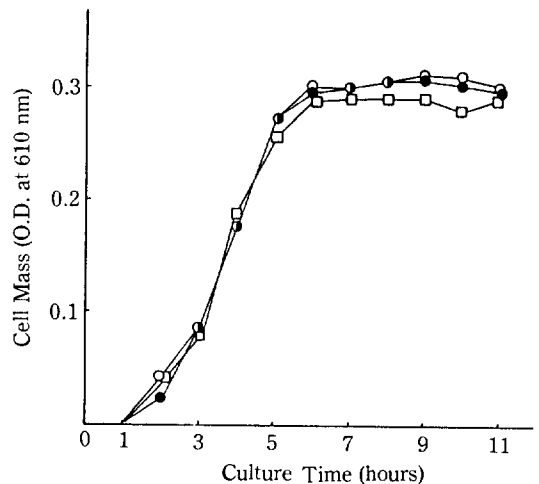


Fig. 4. Effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the growth of *Ps. diminuta* K KM4-2. Symbols are the same as in Fig. 3.

씩 첨가하여 배양하면서 성장정도를 측정한 결과 0.5% 농도에서 약간의 감소현상을 보이나 질소원 농도와는 무관하게 동일한 성장곡선을 나타냈다 (Fig. 4).

사 사

본 연구는 87년도 문교부 학술연구 조성비에 의해 수행되었음.

적 요

미생물에 의해 리그닌이 분해될 때 중요한 변수로 작용하는 보조기질과 배지의 질소원의 농도가 리그닌 분해능을 지닌 세균인 *Pseudomonas diminuta* KM4-2에 있어서 어떤 영향이 있는지 조사하였다. 그 결과, 리그닌 배지에 배양시 균류에서와는 달리 중합화 현상이 관찰되지 않았고 리그닌 분해정도도 미약하였다. 탄수화물을 첨가하고 배양한 경우에는 그 여액을 UV scanning한 결과 배양기간에 따라 파장 280 nm에서의 흡광도 변화폭이 현저히 증가하였다. 또한 리그닌 배지에 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 0.1%, 0.25% 및 0.5%씩 첨가한 후 Warburg Respirometer로 산소 소모율을 측정된 결과 0.1% 첨가한 경우에 리그닌 대사활성이 최대를 나타냈고 질소원 농도를 증가시키에 따라 활성이 감소하였다.

REFERENCES

1. Amer, G.I., and S.W. Drew, 1980. Microbiology of lignin degradation. In: Annual Reports on Fermentation Processes. Vol. 4 (Tsao, T.G., M.L. Flickinger and R.K. Finn, ed.), Academic Press, New York, pp. 67-103.
2. Ander, P., and K.E. Eriksson, 1978. Lignin degradation and utilization by microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.* **14**, 1-58.
3. Commanday, F., and J.M. Macy, 1985. Effect of substrate nitrogen on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Arch. Microbiol.* **142**, 61-65.
4. Crawford, D.L., and R.L. Crawford, 1980. Microbial degradation of lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 11-22.
5. Haars, A., and A. Hüttermann, 1980. Macromolecular mechanism of lignin degradation by *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**, 233-237.
6. Haider, K., J. Trojanowski, and V. Sundman, 1978. Screening for lignin degrading bacteria by means of ^{14}C -labelled lignins. *Arch. Microbiol.* **119**, 361-377.
7. Hüttermann, A., and A. Haars, 1980. Polymerization of water insoluble lignins by *Fomes annosus*. *Holzforschung* **34**, 64-66.
8. Jayme, G., and E. Pohl, 1967. Nachweis der ligninsulfonsäure in groper Verdünung. *Das Papier* (Darmstadt) **21**, 645-651.
9. Kelley, R.L., and C.A. Reddy, 1986. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **166**(1), 269-274.
10. Keyser, P., T.K. Kirk, and J.G. Zeikus, 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **135**(3), 790-797.
11. 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.
12. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz, and J.G. Zeikus, 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**, 277-285.
13. Odier, E., and B. Monties, 1978. Biodegradation of wheat lignin by *Xanthomonas* 23. *Ann. Microbiol.* **129A**, 361-377.
14. Reid, I.D., 1983. Effects of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3), 830-837.

15. Selin, J.F., V. Sundman, and M. Rähä, 1975. Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch. Microbiol.* **103**, 63-70.
16. Westermark, U., and K.E. Eriksson, 1974.

Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chem. Scand.* **28**, 204-208.

(Received May 20, 1988)