

## 數種 木材腐朽菌에 의한 리그닌의 重合化와 脫重合化 現象

金圭衆\* · 孟鎮秀 · 申光洙 · 姜思旭 · 河永七 · 洪淳佑

江陵大學 生物學科\* · 서울大學校 自然科學大學 微生物學科

### Polymerization and Depolymerization of Lignin by Some White-rot Fungi

Kyu-Jung Kim,\* Jin-Soo Maeng, Kwang-Soo Shin, Sa-Ouk Kang,  
Young-Chil Hah and Soon-Woo Hong

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

**Abstract:** So as to clarify the biodegradation mechanism of lignin, lignin biodegradability among four white-rot fungi, *Pleurotus ostreatus* 1, 2, 3, and *Polyporus versicolor* were compared each other by simple plate test method, so that *P. ostreatus* 2 and *P. versicolor* exhibited the most wide clear zone. And to investigate the degree of lignin depolymerization, they were grown in lignin-media where various carbohydrates were added, then that was analyzed through column chromatography. In consequence, *P. ostreatus* 2 and 3 showed more excellent effect of lignin depolymerization among those 4 white-rot fungi, and also in culture media in which glucose, cellobiose and xylose were added. When culture filtrates of the same media were scanned at UV range, there were no peak at 280 nm in the culture filtrate of *P. ostreatus* 2 and 3 where glucose, cellobiose and xylose were added. At the same time, culture filtrate, in which lignin was only contained as a carbon source, showed browning in color, whereas culture media with glucose, cellobiose and xylose in addition to lignin became yellowish (that is, decolorization). From above results, it might be assumed that polymerization and browning of lignin were decreased and lignin biodegradability was increased, when grown in lignin media where various carbohydrates were added.

**Keywords:** Polymerization, Depolymerization, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus versicolor*, White-rot fungi.

리그닌을 효과적으로 분해하는 미생물로는 담자균류의 백색부후균이 잘 알려져 있으나 이 균류도 리그닌만을 탄소원으로 배양했을 때는 그 생장이 미미하며 오랜 배양기간이 요구되는 난분해성물질로 물질순환의 한정요인이 될 수 있지만 생리적 기능이 다른 미생물과 혼합배양을 하거나, 다른 탄소원(주로 다당류)을 함께 넣고 배양했을 때 그 분해능 및 분해속도가 촉진되는 것으로 알려져 있다(Kirk 등, 1976; Selin 등, 1975)

젤 컬럼크로마토그래피에 의하면 대부분의 목재부후균에 의해 리그닌이 분해될 때에는 큰 분자량쪽으로의 중합화가 일어나며 동시에 리그닌의 갈변현상이 일어

난다(Westermark 등, 1974; Selin 등, 1975; Haars 등, 1980; Hüttermann 등, 1980). 이것은 리그닌분해에 관여하는 효소로 polyphenoloxidase에 의해 형성된 phenol의 free radical의 화학반응에 의한 현상으로 알려져 있으나 구체적인 반응 기작은 아직 잘 알려져 있지 못하며 더구나 보조기질로서 탄수화물과의 상호관계는 더 많은 연구가 요구된다. 현재까지 보조기질로 주로 조사연구된 것은 cellulose계 탄수화물에 국한하여 연구되었으며 목재성분에서 또 다른 주요 구성분이 되는 hemicellulose계 탄수화물이 리그닌분해에 어떠한 영향을 미치는가를 연구한 바가 적으며 특히 중합화 및 갈

변현상과 관련하여 전반적으로 조사된 바가 없다.

본 실험에서는 리그닌 분해기작을 연구하기 위한 일환으로 시중 느타리버섯균(*Pleurotus ostreatus*)과 대표적인 목재 부후균인 구름버섯(*Polyporus versicolor*) 균간의 리그닌 분해능력의 비교와 컬럼크로마토그래피에 의해서 리그닌 중합화 및 갈변현상에 cellulose계 탄수화물 외에 hemicellulose계 탄수화물인 xylan 및 xylose가 어떠한 영향을 주는지 조사하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

사용균주 중 느타리 버섯균(*Pleurotus ostreatus*)은 한국 산림조합 연합회에서, 구름버섯균(*Polyporus vers-*

*icolor*)은 미국 오레곤대학의 현윤우 박사로부터 분양 받았으며 보관은 PDA (Potato Dextrose Agar) slant에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 실험시 배양은 주로 Czapek 기본배지에 탄소원으로 0.5% 리그닌과 다른 탄수화물을 필요에 따라 1% 첨가하여 사용하였다. 사용한 리그닌은 calcium-lignosulfonate이며 보조기질로 사용한 탄소원은 cellulose계 탄수화물로 phosphoric acid swollen cellulose 및 cellobiose와 glucose이며 hemicellulose계 탄수화물로는 xylan과 xylose를 사용하였다.

#### 리그닌 분해능력 측정

리그닌분해 여부는 Sundman 등(1971)이 사용한 simple plate test로 조사하였고 젤 컬럼크로마토그래피에서는 spectrophotometer로 파장 280 nm에서 흡광도의 변화를 조사하였다. 이때 단백질에 의한 오차는

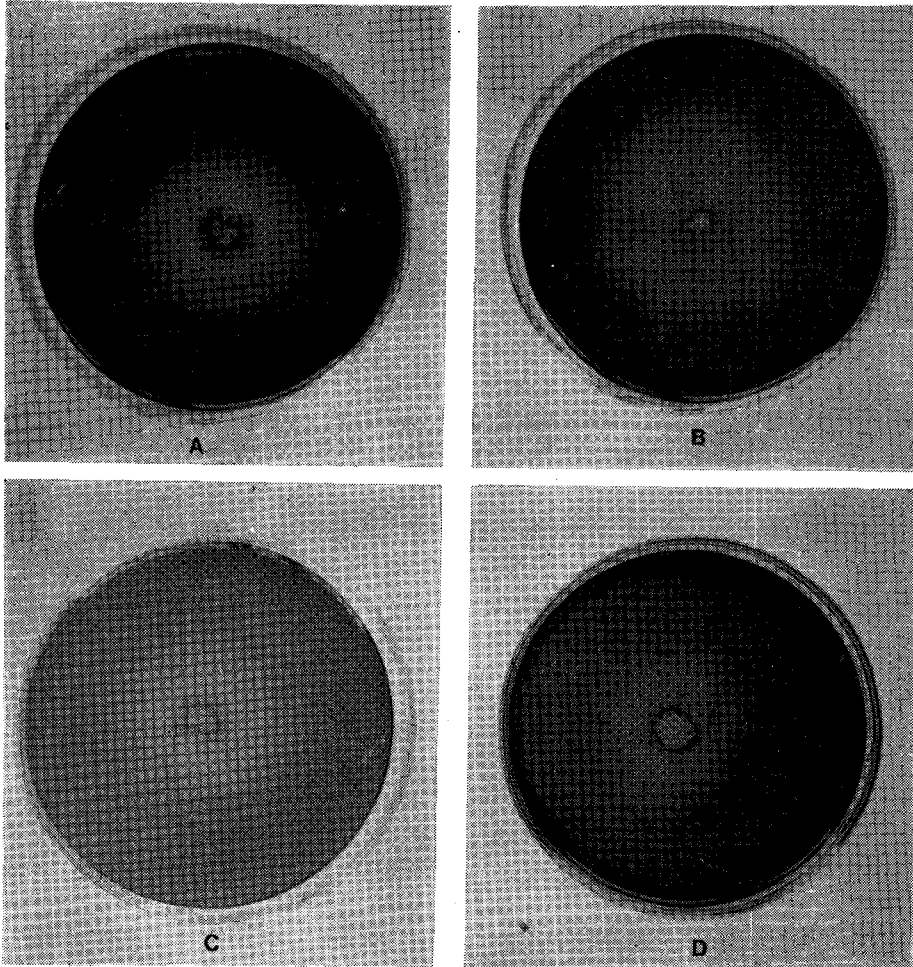
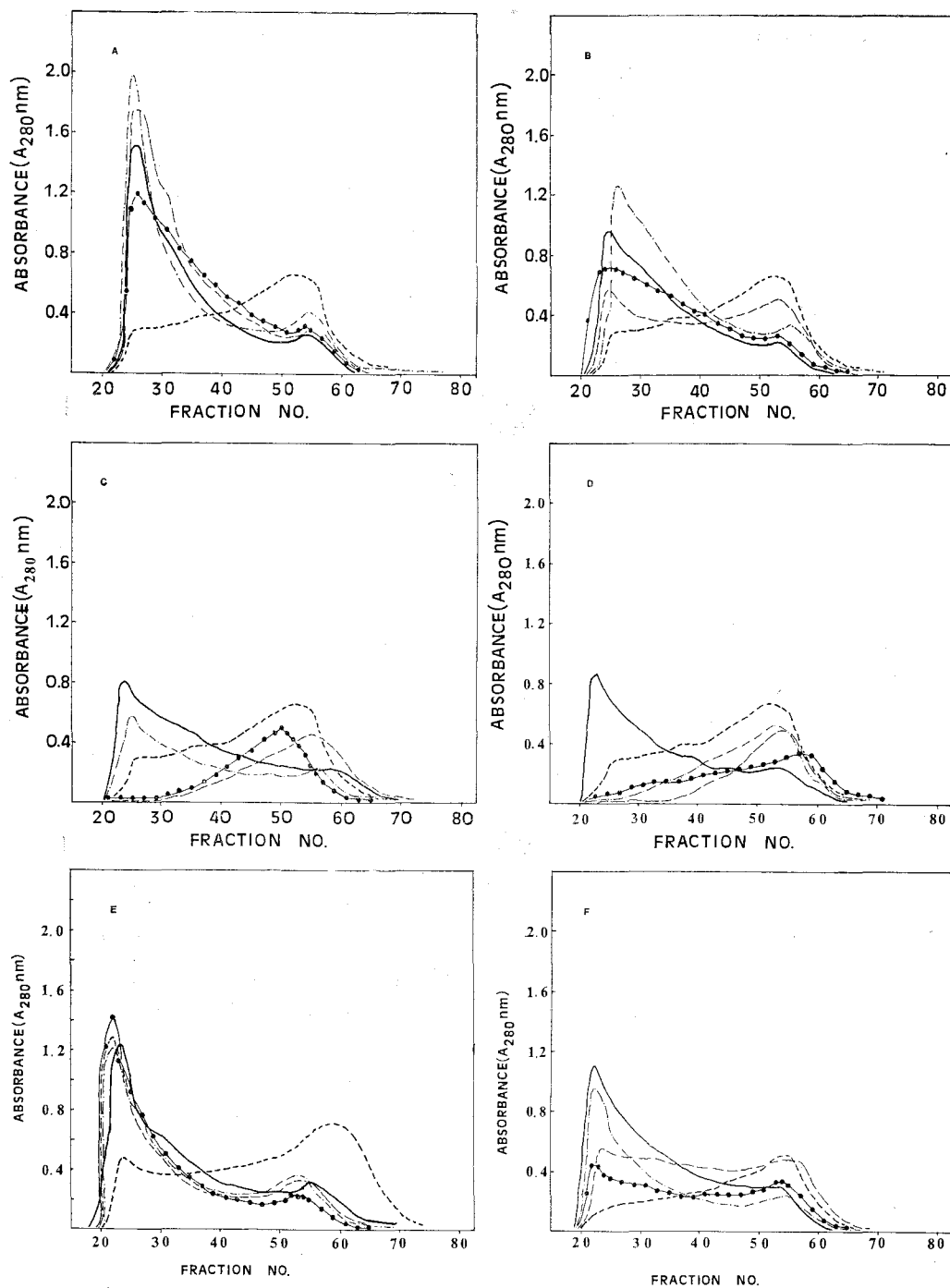


Fig. 1. Simple plate test for lignin degradation activity. A-C, *Pleurotus ostreatus* strain No.1-3; D, *Polyporus versicolor*.



**Fig. 2.** Comparison of depolymerization effects on lignosulfonate medium supplemented with various carbohydrates. A: control(lignosulfonate only), B: PSC(Phosphoric acid swollen cellulose), C: cellobiose, D: glucose, E: xylan, F: xylose.

—•—•—: *Pleurotus ostreatus* strain No. 1; —●—: *Pleurotus ostreatus* strain No.2; - - - : *Pleurotus ostreatus* strain No.3; —: *Polyporus versicolor*; .....; control (no culture).

ninhydrin이나 Bradford(1976) 방법에 의해 단백질을 정량해 봄으로써 보정하였다.

**젤 컬럼크로마토그래피**

Sephadex G-75로 충전된 25×70 cm의 컬럼을 사용하였으며 0.25 M CaCl<sub>2</sub>를 용매로, 작동조건은 유속 16 ml/hr에 분획당 4 ml씩 모아서 측정하였다.

**사용시약 및 기기**

lignosulfonate(Ca-salt)는 독일 Carl Roth사로부터 xylan은 larch wood로부터 추출한 것을 미국 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 리그닌 정량을 위한 파장 280 nm에서의 흡광도와 UV scanning spectra를 위해서는 Gilford spectrophotometer(Model No. 250)를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**균주간 리그닌 분해력 비교**

Jayme 등(1957)의 방법에 의해서 리그닌의 분해능력을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 구름버섯이 가장 큰 clear zone을 나타냈고 느타리균주 No. 2 그리고 느타리균주 No. 1과 3의 순서로 clear zone의 크기가 다르게 나타났다. 이상에서 볼 때 구름버섯이 리그닌을 가장 잘 분해하는 것으로 볼 수 있으나 clear zone의 선명도도 어느 정도 고려해야 할 것 같다. 이 방법은 ferric chloride-potassium ferricyanide와 phenol기가 반응하여 녹색화합물을 형성하는 원리를 이용한 것으로 리그닌에서 phenol기의 분해정도만을 측정할 수 있는 단점이 있지만 다른 리그닌 분석법과 비교할 때 빠르고 쉽게 육안으로 그 활성을 확인할 수 있는 장점이 있다.

**컬럼 크로마토그래피 양상**

0.5% 리그닌에 1% 탄수화물을 첨가하여 배양하

거나 리그닌만 넣어 준 상태에서 배양하여 (36일간) 그 배양여액을 첨가해 준 탄수화물에 따라 젤 컬럼크로마토그래피하여 그 분자량의 분포가 어떤 양상으로 변화하는가를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 것처럼 리그닌만 넣어 준 경우에는 4균주 모두 고분자량으로의 전환이 일어났다. 다시말해 중합화 현상이 일어났고 Selin 등(1975)이 언급한 바에 의하면 본 실험에 사용된 균주들은 polyphenol oxidase를 분비하는 전형적인 백색부후균임을 알 수 있다. 리그닌에다 탄수화물을 첨가한 경우에는 탄수화물에 따라 차이가 있으나 대체로 탈중합화 현상을 나타냈으며 glucose와 cellobiose 및 hemicellulose계 탄수화물인 xylose에 의한 탈중합화 효과가 큰 것으로 나타났으나 cellulose와 xylan의 경우는 효과가 적었으며 이것은 이 균주들이 cellulose나 xylan 같은 다당류들을 단당류로 전환시키는 정도가 낮은 결과인 것 같다(예비실험결과 일치함). 균주별로는 느타리균주 2와 3이 탄수화물에 의한 탈중합화 효과가 큰 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 볼 때 탄수화물들은 리그닌 분해를 저해하는 중합화작용을 완화 혹은 제거해 줌으로써 리그닌 분해를 촉진하는 것으로 사료되며 여러탄수화물에 의한 효과와 균주간에 탈중합화 정도가 다른 것을 볼 때 탄수화물과 리그닌분해미생물 그리고 리그닌간에는 여러 반응단계를 거쳐 탈중합화가 일어나는 것으로 생각된다.

**리그닌 분해능과 갈변현상**

Table I. 과 Fig. 3은 크로마토그래피한 것과 같은 조건에서 배양한 배양여액의 색깔과 UV scanning spectra에 의해 파장 280 nm에서 상대적 농도(100 ppm)의 peak 높이를 나타낸 것으로 Fig. 1에서 탈중합화 효과가 컸던 탄수화물인 glucose, cellobiose 그리고 xylose를 첨가하여 배양한 경우에 peak 높이가 낮은 것으로 미루어 리그닌 분해를 촉진함을 알 수 있다.

**Table I.** Relative peak heights of the culture filtrates by UV scanning spectra at 280 nm.

	Blank	POS-1	POS-2	POS-3	PV
Control(LS only)	1.820	2.390	2.182	2.376	2.216
Glucose	1.170	N.P.	N.P.	N.P.	1.014
Cellobiose	0.899	0.809	N.P.	N.P.	1.135
PSC	0.874	1.389	1.571	1.230	1.275
Xylose	1.147	0.957	N.P.	N.P.	1.165
Xylan	1.403	1.380	1.642	1.576	1.734

LS: lignosulfonate

PSC: phosphoric acid swollen cellulose

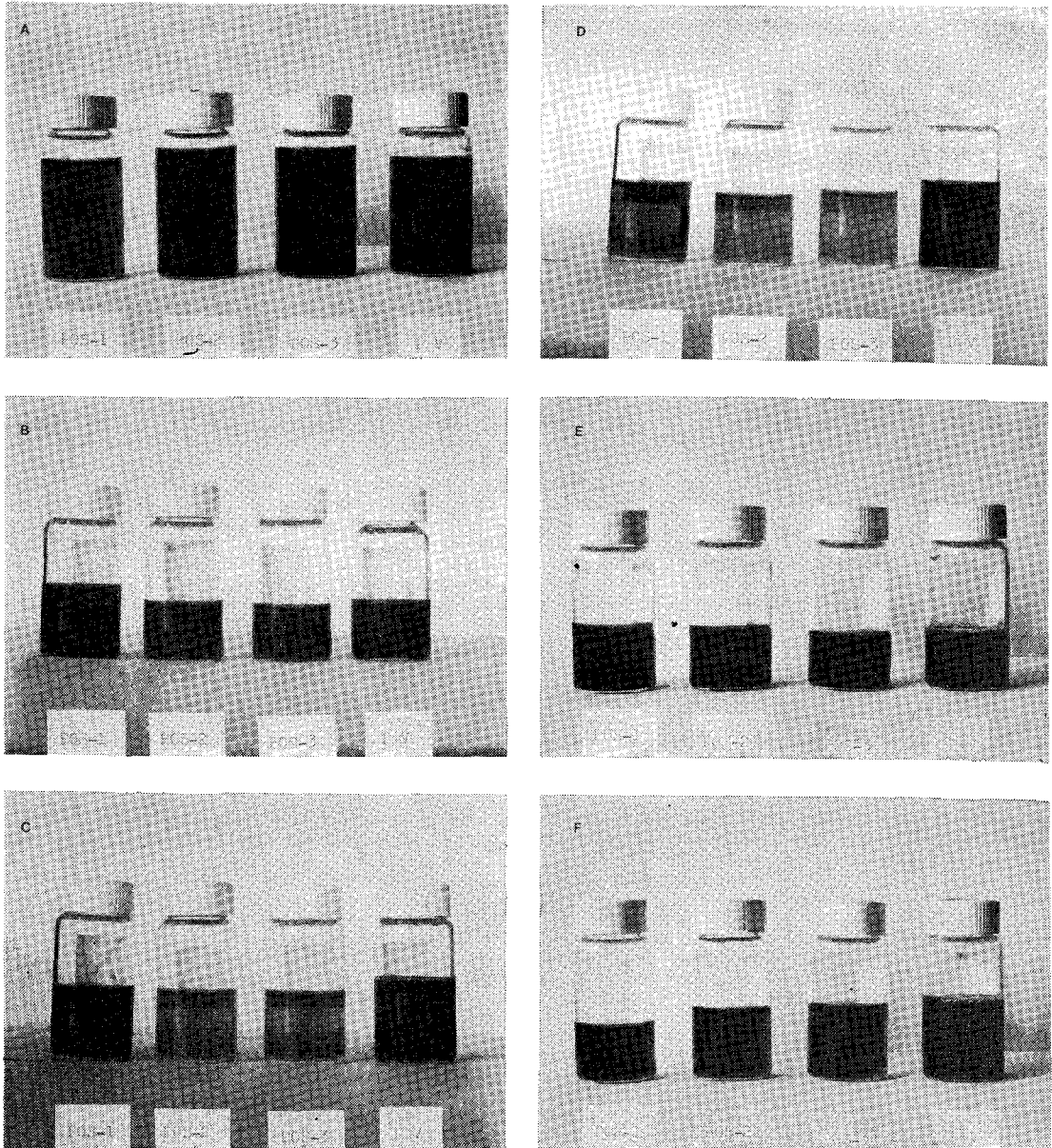
N.P.: no peak

POS: *Pleurotus ostreatus* strain

PV: *Polyporus versicolor*

이 현상은 젤 컬럼크로마토그래피한 결과와 비교할 때 유연관계를 가지고 있다. 즉, 탈중합화 효과가 큰 탄수화물은 리그닌 분해도 더욱 촉진한다는 것을 보여주고 있다. 균주별로 볼 때는 느타리균주 2와 3이 보조기질탄수화물에 대한 리그닌 분해효과가 다른 균주에

비해 크게 나타났다. Fig. 3은 배양여액의 색깔변화를 나타낸 것으로 리그닌만 넣고 배양했을 때는 현저한 갈변현상을 보였는데 반해 여러 탄수화물이 첨가된 배양여액은 탈색 현상을 나타냈다. 따라서 첨가된 보조기질들은 리그닌 분해시 색깔변화에도 관여한다는 것



**Fig. 3.** Culture filtrates of *P. ostreatus* strain No. 1-3 and *Polyporus versicolor* showing the colorization, which were grown on lignosulfonate media supplemented with various carbohydrates.

A: control (lignosulfonate only), B: PSC(phosphoric acid swollen cellulose), C: cellobiose, D: glucose, E. xylan, F. xylose.

POS 1-3: *Pleurotus ostreatus* strain No. 1-3. PV: *Polyporus versicolor*.

을 알 수 있으며 느타리 2와 3에서 glucose, cellobiose 및 xylose를 첨가한 경우 Fig. 1에서 탈중합화 정도가 컸으며 동시에 Fig. 3에서 탈색정도가 가장 심하게 나타났다. Westermark 등(1974)의 결과에 의하면 리그닌에 cellulose나 cellobiose를 함께 넣고 배양한 경우는 탈색정도가 컸지만 glucose의 경우 별 효과가 없다고 보고했지만 본 실험에 의하면 glucose와 hemicellulose계 탄수화물인 xylose의 경우도 탈색효과가 컸으며 이것은 리그닌 분해에는 이미 알려진 cellobiose: quinone oxidoreductase 효소계 외에도 다른 종류의 반응효소계가 존재할 수 있는 가능성을 보여주고 있으며 이에 대한 자세한 연구가 요구된다.

### 적 요

리그닌 분해기작을 연구하기 위한 일환으로 느타리 버섯균(*Pleurotus ostreatus*) 3종류와 구름버섯균(*Polyporus versicolor*)의 리그닌 분해능을 simple plate test 방법으로 비교한 결과 느타리버섯균주 3과 구름버섯균이 가장 큰 clear zone을 나타냈다. 리그닌의 탈중합화 정도를 조사하기 위해서 리그닌배지에 여러가지 탄수화물들을 첨가하여 배양한 후 켈립크로마토그래피를 해본 결과 4균주 중 느타리균주 2와 3이 첨가된 탄수화물에 대한 탈중합화 효과가 컸고 탄수화물 별로는 glucose, cellobiose 및 xylose를 첨가한 경우가 탈중합화 정도가 컸다. 같은 배양액을 UV scanning시 나타나는 파장 280 nm에서의 peak 높이를 비교해 보면 느타리균주 2가 glucose, cellobiose 그리고 hemicellulose계 탄수화물인 xylose를 첨가한 배지에서 peak가 나타나지 않았고 배양액의 색깔을 보면 리그닌만 넣고 배양한 경우는 갈변현상을 나타냈는데 반해 탄수화물을 첨가한 경우 특히 glucose, cellobiose 및 xylose는 탈색이 심하게 일어났다. 이상의 결과에서 볼 때 리그닌 분해시에 보조기질로 다른 탄수화물을 첨가하면 리그닌의 탈중합화와 갈변현상이 감소되며 리그닌분해정도가 향상된다는 것을 알 수 있다.

### 문 헌

Amer, G.I. and Drew, S.W. (1980): Microbiology of lignin degradation. *Ann. Rep. Ferment. Pro.* 4:67~103.  
 Ander, P. and Eriksson, K.E. (1976): The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by

the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109:1~8.  
 Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248~254.  
 Kern, H.H. (1981): Microbial degradation of lignosulfonates. In: *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds* (T. Leisinger, R. Hütter, A.M. Cook and J. Nüesch, Eds.), pp 299~324. Academic Press.  
 Kern, H.W. (1983): Transformation of lignosulfonates by *Trichoderma harzianum*. *Holzforschung* 37:109~115.  
 Ferm, R. (1972): Molecular-weight changes in lignin and lignosulfonates caused by phenol-oxidizing enzymes. *Svensk Papperstidn.* 75:863~865.  
 Haars, A. and Hüttermann, A. (1980): Macromolecular mechanism of lignin degradation by *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* 125:233~237.  
 Haars, A. and Hüttermann, A. (1980): Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Naturwissenschaften* 67:39~40.  
 Hüttermann, A., Gebauer, M., Volger, C. and Rösger, C. (1977): Polymerisation und abbau von natriumligninsulfonat durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. *Holzforschung* 31:83~89.  
 Hüttermann, A., Herche, C. and Haars, A. (1980): Polymerization of waterinsoluble lignins by *Fomes annosus*. *Holzforschung* 34:64~66.  
 Kirk, T.K. and Kelman, A. (1965): Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying basidiomycetes. *Phytopathology* 55: 739~745.  
 Moore, S. and Stein, W.H. (1954): A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211:907~913.  
 Selin, J.F., Sundman, V. and Rähkä, M. (1975): Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch. Microbiol.* 103:63~70.  
 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.
- 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.
- Stenlund, B. (1970): Polyelectrolyte effects in gel chromatography of lignosulfonates. III. The fractionation mechanism. *Paper and Timber* 52:197~206.
- 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.
- Sundman, V. and Näse, L. (1971): A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Paper och Trä* 2:67~71.

<Received October 18, 1986;

Accepted November 10, 1986>