

백색부후균에 의한 크라프트 리그닌의 분해(I)¹

-리기다소나무 리그닌-

김명길² · 안원영²

Biodegradation of Kraft Lignins by White-Rot Fungi(I)¹

- Lignin from Pitch Pine -

Kim, Myong-Gil² and Won-Yung Ahn²

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the structural characteristics of kraft lignin and the wood degrading characteristics, the productivity of ligninolytic enzymes and the enzymatic degradation of kraft lignin by white-rot fungi. To purify kraft lignin, precipitation of kraft pulping black liquors of pitch pine meal was done by titration with 1N H₂SO₄ reaching to pH 2, and isolation of the precipitates done by centrifugation. The isolated precipitates from pitch pine were redissolved in 1N NaOH, reprecipitated by titration with 1N H₂SO₄, washed with deionized water, and kept for analysis after freeze drying. Fractionation of the precipitates in solution by successive extraction with CH₂Cl₂ and MeOH, and the fractionates were named SwKL, SwKL I, SwKL II, and SwKL III for pitch pine kraft lignin. The more molecular weights of kraft lignin increased, the less phenolic hydroxyl groups and the more aliphatic hydroxyl groups. Because as the molecular weights increased, the ratio of etherified guaiacyl/syringyl(G/S ratio) and the percentage were increased. The spectra obtained by ¹³C NMR and FTIR assigned by comparing the chemical shifts of various signals with shifts of signals from authorized ones reported. The optimal growth temperature and pH of white-rot fungi in medium were 28°C and 4.5-5.0, respectively. Especially, in temperature and pH range, and mycelial growth, the best white-rot fungus selected was *Phanerochaete chrysosporium* for biodegradation. For the degradation pathways, the ligninolytic fungus cultivated with stationary culture using medium of 1% kraft lignin as a substrate for 3 weeks at 28°C. The weight loss of pitch pine kraft lignin was 15.8%. The degraded products extracted successively methanol, 90% dioxane and diethyl ether. The ether solubles were analyzed by HPLC. Kraft lignin degradation was initiated in β-O-4 bonds of lignin by the laccase from *Phanerochaete chrysosporium* and the degraded compounds were produced from the cleavage of

¹ 접수 1998년 10월 17일 Received on October 17, 1998.

² Department of Forest Products, College of Agriculture and Life Science, Seoul Natl. Univ., Suwon, Korea. 441-744.

Ca-Cβ linkages at the side chains by oxidation process. After Ca-Cβ cleavage, Ca-Carbon was oxidized and changed into aldehyde and acidic compounds such as syringic acid, syringic aldehyde and vanilline. And the other compound as quinonemethide, coumarin, was analyzed. The structural characteristics of kraft lignin were composed of guaiacyl group substituted functional OHs, methoxyl, and carbonyl at C-3, -4, and -5 and these groups were combined with α aryl ether, β aryl ether and biphenyl. Kraft lignin degradation pathways by *Phanerochaete chrysosporium* were initially accomplished cleavage of Ca-Cβ linkages and Ca oxidation at the propyl side chains and finally cleavage of aromatic ring and oxidation of OHs.

Key words : ¹³C NMR, FTIR, Hardwood kraft lignin, Softwood kraft lignin, HPLC, White-rot fungi, Laccase *Phanerochaete chrysosporium*

서 론

유관속 식물의 세포벽에서 1차 전구물질(前驅物質)인 coniferyl, sinapyl 및 p-coumaryl alcohol이 효소적으로 탈수소중합되어 생성된 리그닌은 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 유기 고분자 물질로서, 활엽수에는 20~25%, 침엽수에는 20~30% 함유되어 있으며, 펄프산업에서 생산되는 리그닌은 연간 약 5×10⁷t에 이른다.^{4,10)}

고분자 리그닌을 저분자화하고 용출시키는 방법 중의 하나인 크라프트 펄프화법은 목재의 칩을 NaOH와 Na₂S의 혼합액으로 증해하는 것으로 이 크라프트 증해 약품의 하나인 NaOH에 의해 목재 세포벽 내 리그닌의 페놀성 수산기와 나트륨염의 형성, phenyl ether의 개열, 방향족 중의 methoxyl기의 가수분해에 의한 저분자화, 그리고 carboxyl기, phenol성 수산기, 또는 enol형 수산기 생성 등의 변화가 일어나게 되지만, 한편 이들 분해 리그닌 간의 축합반응도 일어난다. 또 Na₂S는 리그닌의 benzyl alcohol형 수산기 또는 alkyl ether와 반응하여 주로 monosulfide나 disulfide결합을 생성시켜 리그닌의 이차적 결합을 억제시키는 역할을 함으로써 알칼리에 의한 리그닌의 저분자화를 촉진시키는 것이 특징이다.

또 펄프 내 잔류 리그닌을 분리·제거하기 위하여 표백제로 염소와 염소 유도체를 사용하는 표백 과정에서 발생하는 폐기 리그닌의 미생물학적 분해·처리 기술은 상당히 진보를 이루었다. 그러나 크라프트 펄핑 과정에서 용출

되어 나오는 리그닌은 지금까지 단순한 흑액의 회수 과정을 통하여 재생되거나 에너지원으로 이용되어 왔을 뿐이며 펄프화 과정에서 발생된 리그닌의 생물학적 활용 방법에 관한 연구는 미비한 실정이다.

국내에서도 강화되고 있는 수질오염규제와 환경보존에 부응하기 위하여 펄프 제지 산업 폐수의 독성유발물질 및 발색물질들을 점차적으로 감소시킬 필요가 있으며, 이러한 목적을 달성하기 위한 방법도 환경친화적인 것이 절실히 요청된다. 그리하여 이 리그닌을 분해하는 미생물, 특히 백색부후균에 대한 연구가 활발하여 리그닌을 분해하는 효소 중의 하나로 과산화효소는 1983년 최초로 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)의 배양액으로부터 분리되었으며, 그 이후 변형효소로 저분자량의 리그닌 모델화합물을 중심으로 연구해 왔다.⁷⁾

이 연구에서는 리기다소나무를 크라프트 펄프화한 후, 모은 흑액을 공시시료로 하여 산침전법과 재용해, 그리고 동결건조 등을 거쳐 분리하여 ¹³C NMR과 FTIR 분석으로 크라프트 리그닌의 구조적인 특성을 구명하고, 또 5종의 백색 부후균 중 성장량과 효소 역가로 선발한 판막버섯을 공시균주로 하여 균사 크라프트 리그닌을 분해하여 중량 감소율을 검정하였으며 한편 분해 후의 ¹³C NMR과 FTIR 분석을 하여 분해 전과 비교하였으며, HPLC 분석으로 리그닌 분해 산물을 동정한 후, 크라프트 리그닌의 백색 부후균에 의한 분해 특성을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

3.1 공시 시료

공시목은 서울대학교 칠보산 연습림에서 식생하는 흉고직경 10cm, 수고 8m인 리기다소나무(*Pinus rigida* Miller)를 선정·벌채하여 박피한 후 칩(함수율 13%)으로 만들어 크라프트 펄프화 과정에서 나온 pH:12-13의 흑액을 모아 공시시료로 사용하였다. 황화도 25%, 유효알칼리 16%, 액비 5:1, 온도구배 상온에서 3.75℃/분으로 증해온도 170-180℃ 까지 가열하여 1시간 동안 증해하였다.

3.2 공시 균주

판막버섯 (*Phanerochaete chrysosporium*, PCH)과 구름버섯(*Coriolus versicolor*, COV) 및 영지버섯(*Ganoderma lucidum*, GAL), 그리고 느타리(*Pleurotus ostreatus*, PLO)와 흰구름버섯(*Coriolus hirsutus*, COH)의 5가지 백색부후균을 28±1℃의 항온배양실에 보관하여 이를 공시균주로 사용하였다. 배양시 사용한 배지 조성은 MgSO₄·7H₂O이 2g/L, KH₂PO₄이 3g/L, Glucose 25g/L, Malt extract 5g/L, Peptone 10g/L 그리고 Agar가 20g/L이다.

3.3 실험방법

3.3.1 공시목의 화학적 조성분 분석

공시목으로 사용한 리기다소나무의 화학적 특성은 TAPPI Standard Method의 각항에 의거 분석하였다. 크라프트 리그닌이 추출물 제거 전건중량 기준으로 27.2%, 전섬유소(holo-cellulose)가 63.5%, 회분이 0.4% Alcohol-benzene extractives이 미추출전건중량의 3.0%이었다.

3.3.2 크라프트 리그닌의 분리 및 용매추출

리기다소나무의 크라프트 리그닌의 분리는 펄프 흑액을 글래스필터 G4로 여과시킨 후, 그 여액에 1N 황산을 1분당 1mL씩 가하면서 강하게 저어주어 pH를 2까지 떨어뜨렸다. 이것을 4,500rpm으로 20분동안 원심분리하여 침전된 리그닌을 180mL 증류수에 분산시켜 불순물을 씻어 내고, 다시 원심분리하였다.

원심분리하여 생긴 침전물을 다시 증류수로

세척한 후, 리그닌의 순수함을 개선하기 위해 1N 수산화나트륨 수용액에 녹이고, 이를 다시 황산을 가하면서 산침전을 시켜 원심분리하였다. 침전물은 잔류불순물 제거를 위해 0.001N 황산으로 5번 씻고, 2차 증류수로 2번 씻어 동결 건조하였다. 동결 건조된 리그닌에 잔존하는 추출물과 다른 저분자량의 물질을 제거하기 위하여 *n*-pentane으로 8시간 동안 추출한 후, 다시 동결 건조하여 순수한 리그닌을 얻었다.

Mörck 등¹²⁾의 방법에 의거하여 얻은 리기다소나무 크라프트 리그닌 1g에 dichloromethane 50mL를 가하여 30분 동안 저어 준 다음, 글래스 필터 G4로 여과시켜 여과액은 감압 건조하고, 위에 남은 물질은 메탄올 50mL를 가하여 저어 준 다음, 여과하여 여과액을 감압 건조하였다.

침엽수 크라프트 리그닌(SwKL)에서 CH₂Cl₂ Extraction로 얻는 침엽수 크라프트 리그닌(SwKL(I)), 잔사를 메타노올로 추출한 리그닌을 SwKL(II), 또 그 잔사로부터 얻는 리그닌을 SwKL(III)로 분류하였다.

3.3.3 크라프트 리그닌의 기본 분석

위에서 얻은 SwKL, SwKL(I), SwKL(II), SwKL(III)의 탄소(C)함량, 수소(H)함량, 황(S)함량을 분석하였다. 그리고 산소(O)함량은 다음 식 (1)에 의하여 구하였다.

$$O(\%) = 100.00 - [C(\%) + H(\%) + S(\%)] \quad \text{-- 식 (1)}$$

페놀성 수산기 정량은 SwKL, SwKL(I), SwKL(II), SwKL(III) 10-50mg을 2-methoxy ethanol:ethanol:water(2:2:1) 혼합 용액에 녹인 다음, UV visible spectrometer로 250nm와 300nm에서 흡광도를 측정하여 페놀성 수산기를 식 (2)로 구하였다.⁵⁾

Phenolic OH(%)

$$= \text{absorbance}(g-ll-1) \times \text{Factor} \quad \text{-- 식 (2)}$$

$$\text{Factor}_{250nm} = 0.2005, \text{Factor}_{300nm} = 0.4140$$

또 전체 수산기 정량은 아세틸화된 리그닌 10mg에 1M의 dioxane 수용액 0.5 mL를 가하여 녹인 후, 1M의 sodium methoxide 메탄올용액

0.5mL를 가해 5시간동안 방치하였다. 그리고 내부 표준 물질로 benzyl butyrate 수용액을 넣고 5시간 동안 방치한 후, 1g의 이온교환수지(DOWEX 50, WX2 mesh 50~100)로 여과시켰다. 여과된 여액을 메탄올로 여러 번 세척한 후, 0.03M의 tetra-n-butyl ammonium hydroxide용액으로 pH 8이상으로 맞추어 감압증류하였다. 여기에 아세톤 5mL와 benzyl-bromide 30μL를 가하여 2시간 동안 방치한 후, 충전물을 2.6% BDS on Chromosorb G로 하고 크기가 30×0.25mm이며, 온도는 130℃ 조건인 capillary columne으로 분석하였다.¹¹⁾

리기다소나무 크라프트 리그닌의 분액채취 건조시료인 SwKL, SwKL(I), SwKL(II), SwKL(III)의 0.5mg에 THF 1mL를 가하고 온도는 30℃ 조건으로 투명한 갈색이 될 때까지 녹인 후, GPC를 이용하여 분자량을 구하였다. 분자량의 검량선은 polystyrene으로 구하였는데, 그 분자량은 94, 580, 980, 1680, 2450, 3250, 5050, 7000, 11600, 22000, 및 28500으로 하였다.⁶⁾

3.3.4 크라프트 리그닌의 기기 분석

리기다소나무 크라프트 리그닌의 분액채취 건조시료인 SwKL, SwKL(I), SwKL(II), SwKL(III) 300-500mg을 1.0 mL DMSO-d₆에 녹인 후, ¹³C NMR 분석 시료로 사용하였으며,⁹⁾ KBr 350mg에 SwKL(II), SwKL(III) 1.5-2.0mg을 섞어 pellet을 만들어 FT-IR 분석 시료로 사용하였다.³⁾

3.4 백색 부후균에 의한 크라프트 리그닌의 분해

3.4.1 균주의 생육조건

공시 균주를 앞의 배지 조건에서 10일간 전배양한 후, 균사의 선단 부위에서 직경 5mm 원판을 취하고, 1N HCl로 배지의 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 및 6.0으로 조절된 배지에 접종한 후, 7일간 배양하여 균사의 반경을 측정하여 최적 pH를 구하였다. 또 온도 조건은 18, 23, 28, 33, 및 38℃로 조절된 배양기에서 7일간 배양하여 균사의 반경을 측정하여 최적배양온도를 구하였다.²⁾

위에서 구한 최적배양 pH로 한 액체배지 (Table 1 참고) 100mL를 500mL 삼각 플라스크에 넣고 면전을 한 후 121℃의 autoclave에서 30분간 살균하였다. 또 Table 2의 배지 조건하에서 10일간 전배양한 후, 균사 선단 부위에서 직경 5mm의 원판을 취하여 배양일을 3일, 6일, 9일 및 12일로 하고, 배양 방법은 정치배양과 진탕배양으로 나누어 앞에서 구한 최적배양 온도에서 배양하였다. 배양일별로 pH 변화를 측정하며, 배양액을 여과하고 전건시킨 균사의 무게를 측정하여 균사생장량으로 하였다.²⁾

리그닌 분해효소의 역가 측정을 위하여 배양액의 단백질 함량은 배양일별로 정치배양과 진탕배양을 한 후, 여과한 배양액 1mL와 bovine serum albumin을 10, 20, 30, 40 및 50μg/L의 농도로 조절된 표준용액에 deoxycholate용액 0.1mL를 넣어 잘 섞은 후, 실온에서 10분동안 방치하였다. 또 72% trichloroacetic acid용액 0.1mL를 넣고 10분간 원심분리한 후, 침전물은 1.0mL Lowry시약에 녹여 시험관으로 옮긴 뒤, 2차 증류수 1.0mL로 씻어 시험관에 붓고 실온에서 20분간 방치시켰다. 여기에 Folin reagent 0.5 mL를 가하여 30분동안 정색반응을 시킨 후, UV로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁾

배양액의 laccase역가 측정은 여과한 배양액 2.8mL에 25℃의 항온 수조에서 10분간 예열한 syringaldazine 메탄올용액(0.182mg/1mL) 0.2mL

Table 1. Composition of the liquid medium for white-rot fungi cultivation

| Component | Concentration(mg/L) |
|---------------------------------------|---------------------|
| Urea | 1,320 |
| KH ₂ PO ₄ | 600 |
| K ₂ HPO ₄ | 400 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 500 |
| MnSO ₄ | 200 |
| Glucose | 10,000 |
| CaCl ₂ | 74 |
| Ferric citrate | 12 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 6.6 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 1.0 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 1.0 |
| Thiamine - HCl | 0.1 |
| pH | 5.0 |

를 가하였다. 그리고 525nm에서 5초 간격으로 흡광도를 측정하고, 흡광도가 직선적으로 증가하는 구간에서의 흡광도차와 반응시간을 이용하여 laccase역가를 식 (3)에 의거하여 구하였다.²¹

$$\text{Laccase activity (unit/mL)} = \frac{106 \times \Delta E}{\epsilon \times \Delta t \times 2.8} \quad (3)$$

여기에서 ϵ : 6,500(molar absorbance coefficient of tetramethyl-azo-bis-methyl-enequinone, $M^{-1}cm^{-1}$)
 ΔE : Absorbance at 525nm
 Δt : Reaction time in minute.

위 시험의 결과를 종합하여 5종의 공시균주 중 1종의 우량균주를 선발하였다.

3.4.2 크라프트 리그닌의 중량 감소율

3.4.1에서 선발된 백색 부후균은 2차 배양한 후, 균사의 선단부에서 직경 1.0cm의 원판을 취하여 배지(Table 1)에 집종하였다. 이 때, 리기다소나무와 상수리나무 크라프트 리그닌(SwKL, HwKL)의 농도는 1%로 조절하였다. 온도는 28℃로 배양하여 분해 전과 분해 후의 전건 중량을 구해 중량 감소율을 구하였다. 중량 감소율은 식 (4)에 의거하여 구하였다.²¹

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W_b - W_a}{W_b} \times 100 \quad \text{---} \quad (4)$$

여기에서 W_a : oven dry weight of decayed kraft lignin after 3 weeks cultivation by the fungus on the kraft lignin

W_b : calculated oven dry weight of sound kraft lignin

3.4.3 분해된 크라프트 리그닌의 분석

DSwKL 300-500mg을 1.0mL DMSO- d_6 에 녹여 ^{13}C NMR 분석을 하였다. 여기에서의 결과를 3.3.4의 결과와 비교 분석하였으며, KBr 350 mg에 DSwKL 1.5-2.0mg을 섞은 후, pellet을 만들어 분석한 결과를 3.3.4의 결과와 비교 분석하였다.

3.4.4 크라프트 리그닌의 분해 산물

액체배지(Table 1)에서 3주간 배양하여 여과시킨 배양액을 14,000rpm으로 원심분리한 후, 상등액은 취하고 침전물은 메탄올 100mL를 가하고 초음파로 15분간 마쇄시켰다. 이것을 원심분리하여 메탄올 가용 부분을 취한 후, 이들의 혼합물을 농축시켰다. 농축된 시료는 90% dioxane에 녹인 후, ethyl ether 150mL에 녹여 저분자량의 리그닌 분해산물을 분리하였다.²¹

추출된 에테르 가용분을 메탄올에 녹인 후, 0.45 μ m의 membrane filter로 거르고 흡착력이 큰 불순물을 제거하기 위해 Sepek C₁₈로 재여과하였다.

3주간 배양한 배양액을 원심분리하여 침전물을 얻어 이를 메탄올에 넣어 15분동안 초음파로 처리하고 침전물을 제거하고 여액을 농축한 후 90% 다이옥신에 녹는 부분을 HPLC 분석시료로 하였다.

분석용 column은 C₁₈ prepack column을 사용하였고, 용매는 메탄올과 0.001M phosphate를 사용하였는데, 이 때 사용한 용매의 경사는 5분간 메탄올의 농도를 25%로 유지한 다음, 메탄올의 농도를 80%까지 3%/min으로 증가시킨 후, 다시 메탄올 농도 100%까지는 4%/min으로 증가시키고 그 후에 메탄올의 농도를 15%/min으로 감소시켜 메탄올 농도를 25%에서 column을 안정화시켰다. 사용한 유속은 0.8 mL/min이었고, 시료 주입량은 10 μ L였으며, UV detector로 280nm에서 행하였다

결과 및 고찰

4.1 크라프트 리그닌의 기본 분석

4.1.1 크라프트 리그닌의 원소 분석

리기다소나무 크라프트 리그닌의 추출되지 않은 분획과 추출된 분획의 원소분석 결과(Table 2)를 얻었다.

Table 2. Elemental analysis of unfractionated and fractionated soft-wood kraft lignin

| Fraction | C (%) | H (%) | O (%) | S (%) | Empirical formula |
|-----------|-------|-------|-------|-------|---|
| SwKL | 66.8 | 6.5 | 24.3 | 2.4 | C ₇₀ H ₈₂ O ₁₉ S |
| SwKL(I) | 67.6 | 6.7 | 24.3 | 1.4 | C ₁₂₄ H ₁₄₉ O ₃₄ S |
| SwKL(II) | 67.1 | 5.8 | 20.3 | 6.8 | C ₂₆ H ₂₇ O ₆ S |
| SwKL(III) | 66.0 | 6.7 | 25.8 | 1.5 | C ₁₁₇ H ₁₄₃ O ₃₂ S |

4.1.2 크라프트 리그닌의 전체 수산기와 페놀성 수산기의 정량

리기다소나무와 상수리나무 크라프트 리그닌의 추출되지 않은 분획과 추출된 분획의 수산기를 정량(Table 3)하였다.

Table 3. Contents of hydroxyl groups in unfractionated and fractionated soft-wood kraft lignin

| Fraction | Total hydroxyls (mmol/g) | Phenolic hydroxyls (mmol/g) | Aliphatic hydroxyls (mmol/g) |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| SwKL | 6.7 | 3.5 | 3.2 |
| SwKL(I) | 6.2 | 3.8 | 2.4 |
| SwKL(II) | 6.5 | 3.2 | 3.3 |
| SwKL(III) | 6.4 | 2.8 | 3.4 |

위의 결과에서 보면, 리기다소나무 크라프트 리그닌의 전체 수산기의 양은 별 차이가 나지 않으나, 페놀성 수산기는 dichloromethane 추출물이 가장 높고 지방족 수산기는 그 반대로 나타났다.

4.1.3 크라프트 리그닌의 분자량 분포

리기다소나무와 상수리나무 크라프트 리그닌의 추출되지 않은 분획과 추출된 분획의 분자량을 polystyrene으로 검량선을 구한 후, 수평균 분자량(Mn)과 중량평균 분자량(Mw)를 계산하고 분산도(Table 4)를 구하였다.

Table 4. Molecular weight averages and polydispersity of unfractionated and fractionated soft-wood kraft lignin

| Fraction | Mn | Mw | Mw/Mn |
|-----------|------|------|-------|
| SwKL | 1010 | 2990 | 3.96 |
| SwKL(I) | 510 | 714 | 1.40 |
| SwKL(II) | 1320 | 2110 | 1.60 |
| SwKL(III) | - | - | - |

분자량과 수산기간의 관계를 보면, 분자량이 증가할수록 페놀성 수산기는 감소하는 반면, 지방족 수산기는 증가하였다. 그 이유는 분자량이 증가함에 따라 에테르화 된 guaiacyl과 syringyl이 증가하고 이에 따라 산소의 양이 많아진 때문이다.

4.2 크라프트 리그닌의 기기 분석

4.2.1 ¹³C NMR 분석

DMSO-d₆를 용매로 하여 리기다소나무 크라프트 리그닌의 추출되지 않은 분획과 추출된 분획의 ¹³C NMR 스펙트럼은 Fig. 1에 나타내었다. 그리고 Kringstad와 Morck⁹⁾가 보고한 chemical shift를 참고하여 Table 8과 9에 이들 각 peak의 assignments를 나타내었다.

Fig. 1과 Table 5에서 보는 바와 같이 리기다소나무 크라프트 리그닌은 115.0-116.1ppm 근처에서 C-5 guaiacyl 결합양식이 돌보였으나, 메탄올추출분획은 144.0-149.8ppm에서의 C-3, 4 guaiacyl의 signal도 나타났다. 또 상수리나무와 마찬가지로 115.6ppm 근처에서 β-aryl ether결합과 55.0-56.2ppm에서 methoxyl의 signal도 보였다. 그리고 리기다소나무 크라프트 리그닌 분리시에도 역시 탄수화물의 분해산물인 xylan group들이 75.0-102ppm 근처에 나타났다.

그러나 활엽수 크라프트 리그닌과는 다르게 13.8-26.2ppm에 걸쳐 methyl이나 methylene group의 피크가 보였다.

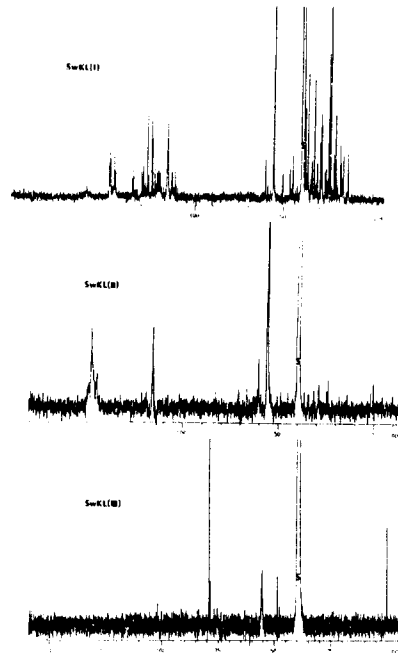


Fig. 1. ¹³C NMR Spectra of unfractionated and fractionated softwood kraft lignin (S=solvent, DMSO-d₆)

Table 5. Assignments of ^{13}C NMR spectra of unfractionated and fractionated softwood kraft lignin(chemical shifts in δ , ppm)⁹⁾

| SwKL | SwKL(I) | SwKL(II) | SwKL(III) | Assignments | |
|-------|---------|----------|-----------|--|-------------------------|
| | | 149.8 | | C-4 Guaiacyl, etherified | |
| | | 149.5 | | | |
| | | 149.1 | | | |
| | | 149.0 | | | |
| | | 148.8 | | | |
| | | 148.7 | | | |
| | | 148.5 | | | |
| | | 148.4 | | | |
| | | 148.2 | | | |
| | | 147.9 | | | C-3 Guaiacyl |
| | 147.8 | 147.7 | | C-4G-CH=CH- | |
| | 147.4 | 147.4 | | | |
| | 147.3 | 147.2 | | | |
| | | 147.0 | | | |
| | 146.9 | 146.8 | | | |
| | | 146.3 | | | |
| | | 146.1 | | | |
| | | 145.6 | | | C-4G-CH=CH- and G-CHOH- |
| | | 145.3 | | | |
| | 145.0 | 145.0 | | | |
| | | 144.8 | | C-5G-CH=CH, G-CH-, G-CH ₂ C-5G-CHOH-, G-CH-O, G-CH ₂ - G-CH- C-5 β -aryl ethers | |
| | | 144.6 | | | |
| | | 144.4 | | | |
| | 134.3 | | | | |
| | 128.7 | | | | |
| | 126.5 | | | | |
| | 124.5 | | | | |
| | 124.0 | | | | |
| | 123.6 | | | | |
| | | 116.1 | | | |
| 116.0 | | 116.0 | | C-1 xylan | |
| 115.8 | | 115.8 | | | |
| 115.6 | 115.5 | 115.7 | | | |
| 115.4 | 115.3 | 115.4 | | | |
| 115.2 | 115.1 | 115.3 | | | |
| 115.0 | 115.0 | 115.1 | 102.1 | | |
| 114.9 | | | 102.0 | | |
| 114.7 | | | 101.9 | | |
| 114.6 | | | 101.8 | | |
| 114.4 | | | 100.2 | | |
| 114.3 | | | 99.1 | not resolved | |
| | | | 99.0 | | |
| | | | 79.3 | | |
| | | | 79.2 | not resolved | |
| | | | 79.0 | | |
| | | | 76.9 | | |

(Continued Table 5)

| SwKL | SwKL(I) | SwKL(II) | SwKL(III) | Assignments |
|------|---------|----------|-----------|---|
| | | | 75.8 | |
| | | | 75.7 | |
| | | | 75.6 | C-4 xylan |
| | | | 75.4 | |
| | | | 75.3 | |
| | | 71.0 | | not resolved |
| | | 66.5 | | not resolved |
| | | 61.2 | | not resolved |
| 56.2 | 60.2 | 60.3 | | ν -CH ₂ OH(G-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH ; β -aryl ethers) |
| | 56.0 | | 56.2 | |
| | 55.7 | | 56.0 | |
| | 55.6 | 55.6 | 55.9 | |
| 55.7 | 55.5 | | 55.8 | |
| 55.6 | 55.2 | | 55.7 | |
| | | | 55.6 | -OCH ₃ |
| | | | 55.5 | |
| | | | 55.4 | |
| | | | 55.3 | |
| 55.1 | | | 55.2 | |
| 54.8 | | | 55.1 | |
| 54.7 | | | | |
| | | | 48.7 | not resolved |
| | | | 48.6 | |
| | | | 47.8 | not resolved |
| | 46.4 | | | not resolved |
| | 44.8 | | | |
| | | 36.5 | | not resolved |
| | 34.0 | | | -CH ₂ -(G-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH) |
| | 32.9 | | | not resolved |
| | | 31.5 | | |
| | 31.2 | 31.3 | | -CH ₂ -(G-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH) |
| | 29.6 | 29.1 | | |
| | 29.0 | 29.0 | | -CH ₂ -(C ₅ -CH ₂ -C ₅) |
| | 28.8 | 28.8 | | |
| | 28.7 | | | |
| | 26.2 | 25.0 | | -CH ₂ and CH ₃ |
| | 24.8 | 24.9 | | |
| | 24.0 | 24.0 | | |
| | 22.1 | | | not resolved |
| | 22.0 | | | |
| | 21.3 | | | not resolved |
| | 21.1 | | | |
| | 20.7 | | | |
| | 18.3 | | | not resolved |
| | 17.8 | | | |
| | 16.6 | | | -CH ₃ |
| | 14.0 | | | not resolved |
| | 13.8 | | | not resolved |

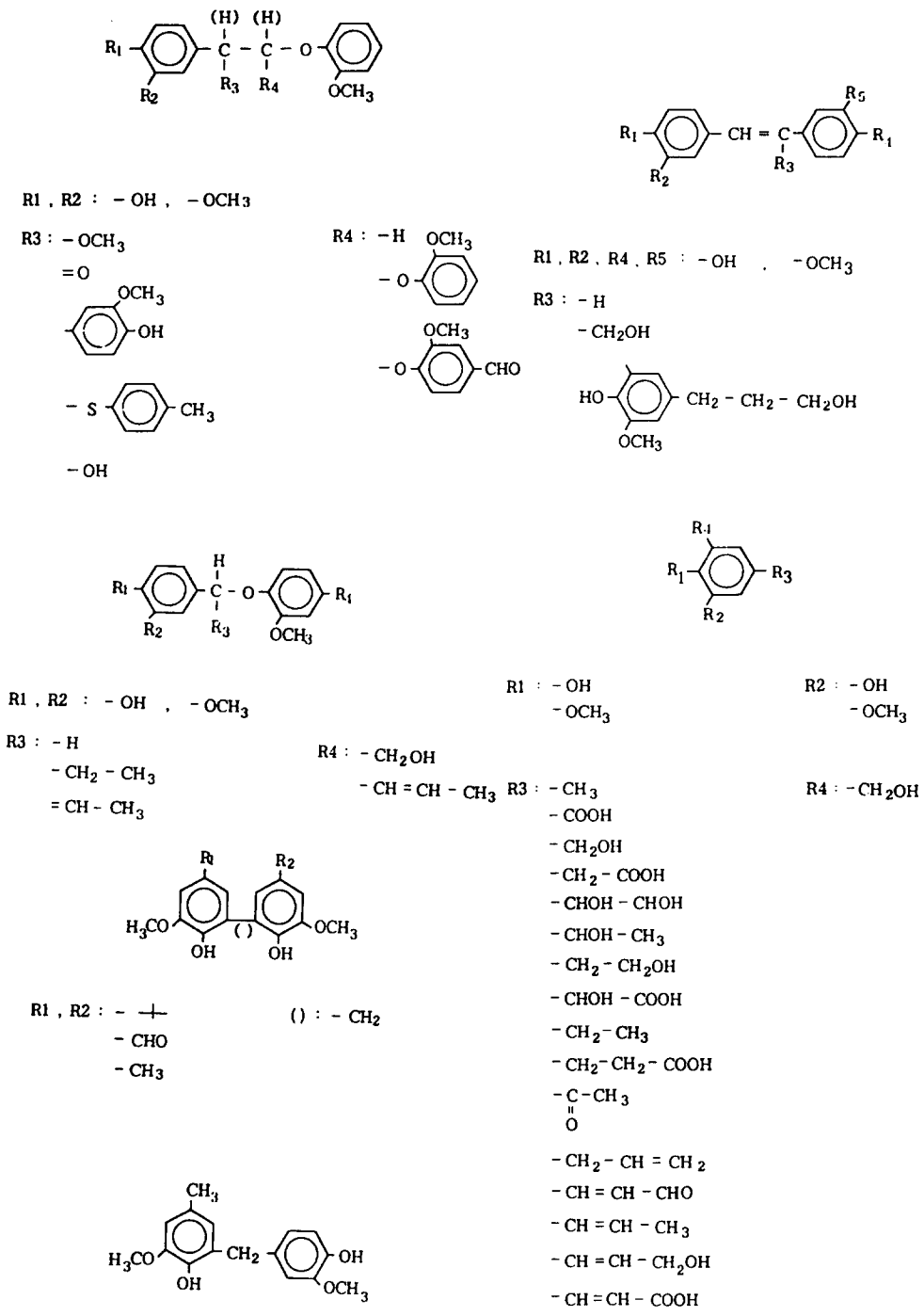


Figure 2. Proposed compounds of hardwood and softwood kraft lignin

이상으로 위의 결과로부터 추정되는 리기다 소나무 크라프트 리그닌을 구성하는 화합물은 Fig. 2에 나타내었다.

4.2.2 FTIR Spectroscopy 분석

리기다소나무 크라프트 리그닌의 FTIR 분석 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

Guaiacyl형의 신축진동(stretching vibration)과 휨진동(bending vibration)의 피크로 보이는 1000-1500cm⁻¹부근에서 흡수가 있으며, 그 외에 1700cm⁻¹부근에서의 피크는 carbonyl group의 결과이며, 2900cm⁻¹부근에서의 피크는 methyl이나 methylene group으로 보였다. 그리고 3400cm⁻¹부근에서의 강한 피크는 -OH group의 결과이고, 800 cm⁻¹ 근처에서의 피크는 방향족환의 약한 진동으로 인한 피크였다.

4.3 백색 부후균에 의한 크라프트 리그닌의 분해

4.3.1 균주의 생육조건

5가지 공시균주의 pH별과 온도별 생장 특성은 Table 6과 Table 7에 나타냈다.

온도를 28℃로 고정하였을 때, 배양적정 pH는 4.5-5.0로 나타났다. 통계분석결과, 균주간에는 1% 수준에서 고도의 유의차가 인정되었

으나, pH간에는 유의차가 없었다. pH를 5.0으로 고정하였을 때 5가지 균주 모두 배양적정은

Table 6. Mycelial growth of white-rot fungi by pH at temperature of 28℃ (Unit: cm)

| Fungi \ pH | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 5.5 | 6.0 | L.S.D (5%) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| PCH* | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | |
| COH* | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | |
| PLO* | 3.8 | 4.0 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | • |
| COV* | 3.5 | 4.0 | 4.0 | 3.3 | 3.5 | • |
| GAL* | 2.3 | 2.7 | 3.3 | 3.1 | 3.3 | • |
| L.S.D(5%) | | | | | | |

* : PCH(*Phanerochaete chrysosporium*), COH(*Coriolus hirsutus*), PLO(*Pleurotus ostreatus*), COV(*Coriolus versicolor*), GAL(*Ganoderma lucidum*)

Table 7. Mycelial growth of white-rot fungi by temperture at pH of 5.0 (Unit: cm)

| Fungi \ °C | 18 | 23 | 28 | 33 | 38 | L.S.D (5%) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| PCH* | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | •** |
| COH | 2.1 | 4.3 | 4.5 | 4.5 | 0 | • |
| PLO | 3.3 | 4.0 | 4.5 | 2.7 | 0 | • |
| COV | 2.8 | 3.2 | 4.0 | 2.7 | 0 | • |
| GAL | 2.4 | 3.6 | 3.3 | 1.8 | 0 | • |
| L.S.D(5%) | •** | • | • | • | • | |

* & ** : See footnote below at Table 10.

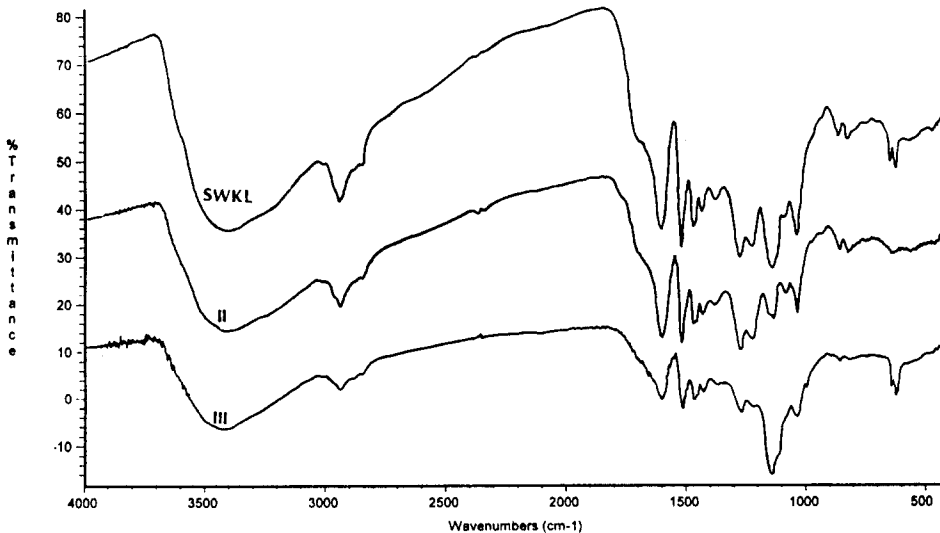


Figure 3. FT-IR Spectra of unfractionated and fractionated softwood kraft lignin

도가 28℃이었고, 균주간과 처리온도별로 1% 수준에서 유의차가 인정되었다.

이상과 같이 5가지의 균주가 pH에 의한 영향보다는 온도에 대한 영향이 큰 것은 배양기간이 경과함에 따라 배지 내의 pH가 저하되어 균 자체가 pH에 대해 내성을 가진 때문이라 생각된다.

또 균주별로 비교해보면, 5가지 균주 중에서 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)이 모든 pH영역과 온도영역에서의 균사 생장이 높은 것으로 밝혀졌다.

이는 Nishida 등^{13,14)}이 판막버섯(*P. chrysosporium*)과 IZU-154의 성장 온도가 각각 25-44℃와 25-38℃라고 보고한 점과 흰구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 성장 온도가 28℃라고 보고한 결과에도 일치하였다. 또 배양온도를 28℃로 고정하고 pH에 따른 균사성장 조사한 것으로 적정배양 pH가 4-6이라고 한 보고와도 거의 유사한 결과를 얻었다.

4.3.1.2 균사 성장량

균사의 성장량을 보기 위하여 배양일을 3일, 6일, 9일 및 12일로 하고 정치 및 진탕배양하여 배양액을 여과하여 전건시킨 후, 균사성장량을 측정된 결과를 Table 8에 나타내었다.

균사 성장량의 통계분석 결과, 정치배양법과 진탕배양법간에는 유의차가 없었고, 균주간에는 1% 수준에서 매우 높은 유의차가 인정되었으며, 배양일간에도 1% 수준에서 유의차가 인정되었다.

배양일별로 살펴보면, 배양 초기에는 정치배양한 균사가 진탕배양한 균사보다 더 높은 수치를 나타냈고, 배양 12일에는 그와는 반대로 진탕배양의 경우가 더 높았다. 그리고 균주별로 살펴보면, 정치배양과 진탕배양 모두 구름버섯과 흰구름버섯인 경우가 높은 균사성장량을 보였고, 느타리버섯인 경우가 가장 낮은 균사성장량을 보였다.

이는 최²⁾가 organosolve lignin을 노랑느타리로 분해했을 때, 배양 초기에는 정치배양이 그리고 후기에는 진탕배양이 균사성장량이 좋았다는 결과와 같음을 보였다.

이와 같이 배양 후기로 갈수록 진탕배양했을 때의 균사성장량이 좋음을 보인 이유는 정치배양에 비해 배양기간동안 산소의 공급이 원활하고 균사들이 펠릿을 만들어 뭉치기 때문이라고 생각되어진다.

4.3.2 크라프트 리그닌의 중량 감소율

크라프트 리그닌의 농도를 1%로 하여 우수 균주로 선발된 판막버섯으로 분해한 전과 후의 전건 중량을 구하여 식 (4)에 의거하여 중량 감소율을 구한 결과, 침엽수 크라프트 리그닌의 중량감소율은 15.8%였다.

위의 결과는 이 등¹⁰⁾이 주요 백색 부후균에 대한 부후 생리 및 물리·화학적 특성을 조사한 결과, 대부분의 백색 부후균이 활엽수 리그닌의 중량감소율이 높았던 반면, 판막버섯인 경우에는 침엽수 리그닌의 감소율은 약 8.6%이다.

Table 8. Mycelial growth of the culture filtrate during the cultivation of white-rot fungi in stationary and shaking culture

| Fungi | Days** | | 0 | | 3 | | 6 | | 9 | | 12 | | L.S.D (5%) |
|-------------------------|--------|----|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|----|---|------------|
| | A* | B* | A | B | A | B | A | B | A | B | | | |
| PCH | 0 | 0 | 5.53 | 3.48 | 6.72 | 6.45 | 9.51 | 4.98 | 9.20 | 8.72 | | • | |
| COV | 0 | 0 | 5.93 | 4.39 | 6.11 | 7.85 | 8.42 | 7.54 | 18.33 | 24.45 | | • | |
| COH | 0 | 0 | 5.52 | 2.20 | 6.78 | 6.73 | 17.37 | 9.06 | 20.61 | 25.17 | | • | |
| GAL | 0 | 0 | 5.35 | 3.10 | 5.65 | 6.21 | 6.21 | 6.61 | 6.71 | 14.16 | | • | |
| PLO | 0 | 0 | 6.15 | 3.78 | 6.59 | 5.85 | 7.10 | 3.45 | 9.95 | 4.06 | | • | |
| A×B L.S.D(5%) | | | | | | | | | | | | | • |
| Cult. days L.S.D(5%) | | | | • | | • | | • | | • | | | |

* : A(Stationary culture), B(Shaking culture) ** : Unit(1" 2g)

4.3.3 분해된 크라프트 리그닌의 분석

분해된 리기다소나무 크라프트 리그닌의 ¹³C NMR spectra는 Fig. 4에 나타내었고, assignment의 결과는 Table 9에 나타내었다. 분해 결과를 4.2.1과 비교해 보면, 분해 전에 보이지 않았던 카르복실기의 피크가 170ppm 근처에서 보임을 알 수 있었다. 이는 백색 부후균에 의해 크라프트 리그닌이 분해되어 방향족환의 개열과 산화에 의한 결과라고 생각된다. 또 stilbene형태의 화합물의 피크가 120-132 ppm 근처에서 나타나 분해과정에서의 중간 산물로 생성되었음을 알 수 있었다.

한편 수종간의 비교를 해 보면, 활엽수가 침엽수 크라프트 리그닌에 비해 더 분해산물이 많이 생성되었음을 알 수 있는데, 이것은 산침전법에 의해 크라프트 리그닌을 분리시 침엽수가 축합반응이 더 많이 일어나 부후균이 침투할 수 있는 위치가 적어진 결과라고 본다.

분해된 리기다소나무 크라프트 리그닌의 FT-IR spectra(Fig.4)에서 분해 전과 비교하여 살펴보면, 3400cm⁻¹ 부근에서의 피크의 세기가 약간씩 줄어들었음을 알 수 있었다. 이는 리그닌에 붙어 있는 -OH기가 산화되었거나 떨어져 나갔음을 보여준다. 또한 1000-1500cm⁻¹ 부

근에서의 피크가 조금 변함을 알 수 있는데, 이것은 백색부후균의 효소에 의해 방향족환의 개열과 alkyl-aryl간의 붕괴로 인한 결과라고 생각된다.

4.3.4 크라프트 리그닌의 분해 산물

리기다소나무 크라프트 리그닌의 분해산물에 대한 HPLC결과는 Fig.6에 나타내었는데, 분리된 피크의 검색은 최²⁾의 논문에 따랐다.

12분대와 37-39분대에 큰 피크가 나오는 이유는 판막버섯의 효소에 의해 저분자량의 화합물이 산화되어 생긴 라디칼이 축합 반응을 일으킨 결과라고 생각되어지며, 14분대의 피크는 syringic acid이고, 15분대의 피크는 vanillin이며, 17분대의 피크는 syringic aldehyde이고, 22분대의 피크는 coumarin으로 판명되었다.

위의 결과를 바탕으로 하여 크라프트 리그닌의 분해 특징을 살펴보면, Chen 등^{1,2)}이 가문비나무를 분해하여 생성된 화합물을 분석한 결과, propyl side chine의 C_α-C_β 결합이 효소에 의해 절단된 후 C_α산화가 이루어진다고 하였는데, 본 연구에서도 마찬가지로 syringic acid와 syringic aldehyde는 활엽수 리그닌에 많이 분포된 synapyl 단위로부터 온 것이고, vanillin

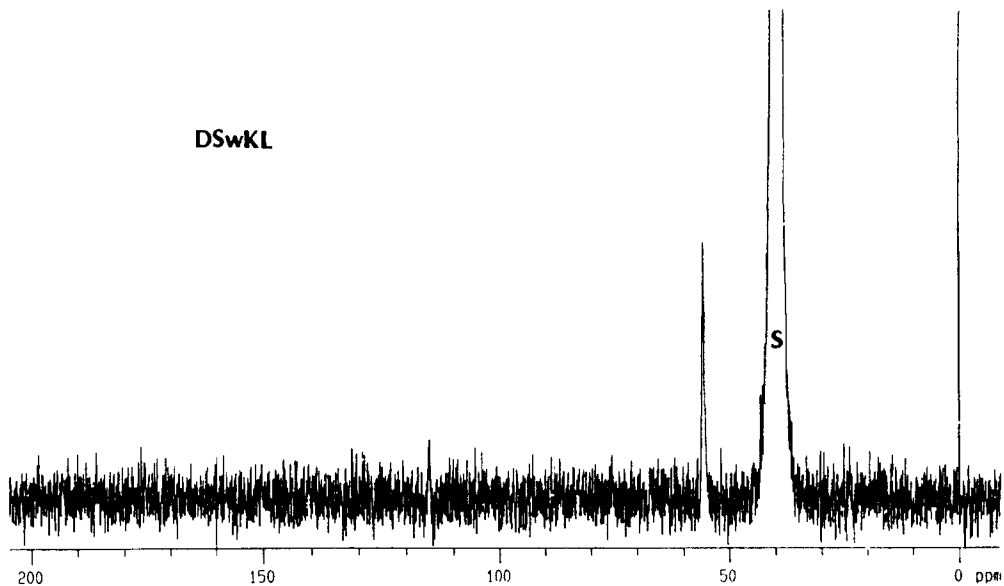


Figure 4. ¹³C NMR Spectra of degraded softwood kraft lignin (S=Solvent, DMSO-d₆)

Table 9. Assignments of ^{13}C NMR spectra of DS_wKL (chemical shifts in δ ppm)

| DHWKL | DSWKL | Assignments |
|-------|-------|---|
| 172.0 | | -COOH, Aliphatic(G-CHOH-COOH, G-CH ₂ -CH ₂ -COOH) |
| 171.3 | | |
| 171.0 | | |
| 148.1 | | |
| 147.9 | | |
| 147.8 | | |
| 147.7 | | |
| 147.5 | | |
| 147.4 | | C-3 Guaiacyl |
| 147.2 | | |
| 147.0 | | |
| 146.8 | | C-4G-CH=CH- |
| 146.7 | | |
| 134.2 | | C-1 β -aryl ethers and phenylcoumaran |
| 132.4 | | C-1 Guaiacyl and / or olefinic carbons |
| 130.6 | | |
| 121.3 | | C-6G-CH ₂ -, G-CH:olefinic carbons(C- β _p , o'-stilbenes) |
| | 115.6 | C-5G-CHOH-, G-CH-O, G-CH ₂ -, G-CH- |
| | 115.5 | |
| | 115.4 | |
| | 115.2 | |
| | 115.0 | C-5 β ary ethers |
| | 114.9 | |
| 101.7 | | C-1 Xylan |
| 97.7 | | |
| 97.6 | | not resolved |
| 97.5 | | |
| 79.2 | | not resolved |
| 76.4 | | |
| 76.3 | | not resolved |
| 75.5 | | C-4 Xylan |
| 75.4 | | |
| 75.2 | | |
| 74.1 | | C-3 Xylan |
| 72.7 | | C-2 Xylan |
| 70.2 | | |
| 70.0 | | not resolved |
| 69.4 | | not resolved |
| 65.1 | | not resolved |
| 56.6 | 56.3 | |
| 56.4 | 56.2 | |
| 56.3 | 56.0 | |
| 56.0 | 55.8 | OCH ₃ |
| 55.9 | 55.7 | |
| 55.7 | 55.5 | |
| 55.6 | 55.4 | |
| 55.1 | 55.2 | |
| 55.0 | 55.1 | |
| | 55.0 | |
| | 54.9 | |
| 51.6 | 51.7 | not resolved |

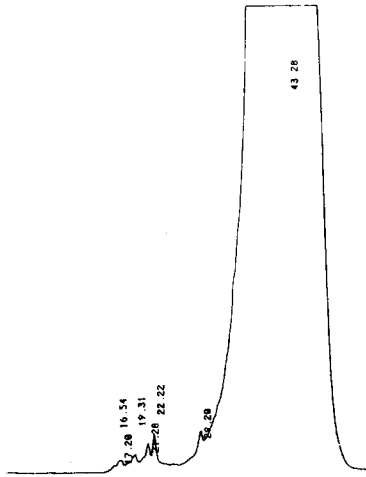


Figure 5. High performance liquid chromatogram of degraded softwood kraft lignin by *Phanerochaete chrysosporium*

은 coniferyl단위로부터 온 것이라고 생각된다.

또 Katayama 등⁸⁾은 phenylcoumaran을 백색 부후균으로 처리하였을 때, 알데히드기는 산화나 환원 과정을 통해 분해됨과 동시에 이 분해된 물질이 다시 부가적으로 불균등화와 β-proton 위치에서의 탈수소반응 및 ν 위치로부터 포름알데히드기가 떨어져나가 quinone-methide 유도체를 생성한다고 하였는데, 이와 비슷한 결과로 본 실험에서는 coumarin이 생성됨이 보였다.

결 론

1. 리기다소나무 크라프트 리그닌은 분자량이 증가할 수록 페놀성 수산기가 감소하는 반면, 지방족 수산기는 증가하였다.

2. 리기다소나무 크라프트 리그닌의 C-3, -4, 및 -5 group, C-β aryether 형태 및 methoxyl group의 특징적인 ¹³C NMR signal로 판단되는 것이 있다.

3. 리기다소나무 크라프트 리그닌의 FTIR 분석 양상은 1000-1500cm⁻¹부근의 강한 피크는 guaiacyl type의 신축과 휨진동으로 판단되고,

1700cm⁻¹부근의 피크는 carbonyl group으로 확인되었으며, 2900cm⁻¹부근의 피크는 methyl 또는 methylene group으로 나타났다. 3400cm⁻¹부근의 강한 피크는 -OH group이고, 800cm⁻¹ 근처의 피크는 방향족환의 약한 진동으로 인한 피크로 규명되었다. 균사 성장량에 있어서 정치배양법과 진탕배양법간에는 유의차가 없었고, 균주간 및 배양일간에는 유의차가 인정되었다. 배양일별은 배양 초기에 정치배양한 균사가 진탕배양한 균사보다 더 높은 성장량을 나타냈고, 배양 12일에는 그와는 반대로 진탕 배양의 경우가 더 높았다. 배양일에 따른 배양액의 pH변화는 정치배양과 진탕배양간에는 유의차가 없었고, 균주간과 배양일간에는 유의차가 인정되었다. 배양초기에는 정치배양과 진탕 배양 모두 pH가 5에서 6으로 증가했다가, 배양 9일 이후에는 5이하로 떨어졌다.

4. 배양액의 단백질 함량 측정치는 배양방법 간과 균주간에는 유의차가 없었으나 배양일에 따라 유의차는 매우 컸다. 정치배양인 경우는 단백질 함량이 배양 9일까지는 증가하다가 그 이후에는 떨어졌고, 진탕배양인 경우는 배양 6일까지는 증가하다 배양 9일에는 떨어졌다가 그 이후에는 다시 증가하였다.

5. 크라프트 리그닌의 농도를 1%로 하여 우량 균주로 선발된 판막버섯으로 분해한 전과 후의 전건 중량을 구하여 중량 감소율을 구한 결과 리기다소나무 크라프트 리그닌의 중량감소율은 15.8%였다.

6. 분해된 리기다소나무 크라프트 리그닌 리그닌의 ¹³C NMR과 FTIR spectra를 분해 전과 비교분석한 결과, 방향족환의 개열과 산화 및 alkyl-aryl group간의 붕괴로 stilbene형태의 중간산물이 생성됨을 알 수 있었다.

7. 크라프트 리그닌의 분해산물을 HPLC로 동정한 결과, C_α-C_β 결합이 효소에 의해 절단된 후 C_α산화에 의해 syringic acid 및 syringic aldehyde와 vanillin이 생성되었고, quinone-methide 유도체인 coumarin이 생성되었다.

인용문헌

1. Chen, C.-L. and H.-M. Chang. 1982b. Aromatic acids produced during degra-

- ation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzfor-schung*. 36:3-9.
2. Choi, D. H. 1993. The degradation of lignin by laccase from *Pleurotus cornu-copia*(Pers.) rolland. Ph. D. Dissertation. Seoul National University.
 3. Collier, W. E., T. P. Schultz and F. Kalasinsky. 1992. Infrared study of lignin: reexamination of aryl-alkyl ether C-O stretching peak assignments. *Holzfor-schung*. 46:523-528.
 4. Dean, J. F. D. and K.-E. L. Eriksson. 1992. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzfor-schung*. 46:135-147.
 5. Faix, O., C. Grünwald and O. Beinhoff. 1992. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignins (MWL's) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, ¹H-NMR and UV spectroscopy. *Holzfor-schung*. 46:425-432.
 6. Glasser, W. G. and S. Sarkanen. 1989. Lignin Properties and Materials. American Chemical Society. Washington. DC. ACS Symposium Series. 397:100-108.
 7. Kantelinen, A., B. Hotling, K. Ranua and L. Viikarli. 1993. Effects of fungal and enzymatic treatments on isolated lignins and on pulp bleachability. *Holzfor-schung*. 47:29-35.
 8. Katayama, T., F. Nakatsubo and T. Higuchi. 1986. Degradation of a phenyl-coumaran, a lignin substructure model, by *Fusarium Solani* M-13-1. *Mokuzai Gakkaishi*. 32(7):535-544.
 9. Kringstad, K. P. and R. Mörck. 1983. ¹³C NMR spectra of kraft lignins. *Holzfor-schung*. 37:237-244.
 10. Lee, D.-H., D.-H. Choi, S.-L. Yoon and S.-H. Sohn. 1992. Fundamentals studies on the wood decay(II)-physiological and physicochemical characteristics of the white rot fungi in korea-. *Mokchae Konghak* 20(4):49-56.
 11. Mansson, P. 1983. Quantitative determi-nation of phenolic and total hydroxyl groups in lignins. *Holzfor-schung*. 37: 143-146.
 12. Mörck, R., A. Reimann and K.P. Kringstad. 1988. Fractionation of kraft lignin by successive extraction with organic solvents. 3. Fractionation of kraft lignin from birch. *Holzfor-schung*. 42:11-116.
 13. Nishida, T., Y. Kashino, A. Mimura and Y. Takahara. 1988a. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I.-Screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkai-shi*. 34(6):530-536.
 14. Nishida, T., Y. Kashino, A. Mimura and Y. Takahara. 1988b. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi II. -Degradation of phenolic and nonphenolic β -O-4 lignin substructure compounds by fungus IZU-154. *Mokuzai Gakkaishi*. 35(2):144-151.
 15. Yokota, S. 1990. Degradation of phenolic β -1 lignin substructure model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* and its lignin peroxidase. *Holzfor-schung*. 44:271-276