

# *Ceriporiopsis subvermispota* 처리에 의한 아스펜 목재 리그닌의 구조 변화\*<sup>1</sup>

최준원\*<sup>2</sup> · 문성희\*<sup>3</sup> · 안세희\*<sup>4</sup> · 최돈하\*<sup>2+</sup> · 백기현\*<sup>3</sup>

## Structural Analysis of Milled Wood Lignins Isolated From Aspen Wood (*Populus tremuloides* L.) Biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*\*<sup>1</sup>

Joon-Weon Choi\*<sup>2</sup> · Sung-Hee Moon\*<sup>3</sup> · Sye-Hee Ahn\*<sup>4</sup> · Don-Ha Choi\*<sup>2+</sup> · Ki-Hyun Paik\*<sup>3</sup>

### 요 약

아스펜 목재(*Populus tremuloides*, L.)를 *Ceriporiopsis subvermispota*로 1, 2, 4, 6주 동안 부후 처리한 후, 목재의 화학적 성상변화를 관찰하였으며, 부후목재로부터 리그닌(MWL)을 단리하여 Gel permeation chromatography (GPC) 분석과 nitrobenzene oxidation (NBO)을 실시하였다. 부후가 진행되면서 목재내 리그닌의 함량은 계속 감소하여 6주 후에는 미처리재와 비교하여 20%까지 감소하였다. 리그닌은 균주처리에 의하여 저분자화되어 알칼리에 쉽게 용출되는 것으로 예측된다. 부후목재의 전섬유소(Holocellulose) 함량은 미처리재와 비교하여 5~6% 정도 감소하였다. 부후 과정 동안  $\alpha$ -셀룰로스의 함량은 커다란 변화가 관찰되지 않았으나, xylose의 함량은 대조구의 23.4%에서 6주후에는 18%까지 감소하였다. 아스펜 목재의 리그닌 분자량은 균주처리에 의해서 점차 감소되었다가 부후 6주 이후에는 안정화 단계에 접어드는 경향을 보였다. 단리한 리그닌의 NBO 분석 결과, NBO 분해산물의 수율은 대조구와 비교하여 6주처리 후에는 20% 가량 감소되었다. 특히, 부후 목재 리그닌에서 S-타입 유도체(syringaldehyde+syringic acid)의 감소량이 두드러졌다. G-타입 유도체(vanillin+vanillic acid)의 수율은 부후가 진행되면서 약 20% 가량 증가되었는데, 이는 부후과정에서 리그닌 분해 효소에 의한 S-리그닌의 탈메톡실화 반응이 진행되었음을 암시한다. 결론적으로, *C. subvermispota*는 부후 과정동안 G-리그닌보다 S-리그닌을 더욱 선택적으로 분해하는 경향을 나타내었다.

\*<sup>1</sup> 접수 2005년 7월 18일, 채택 2005년 9월 8일

\*<sup>2</sup> 국립산림과학원 화학미생물과, Division Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

\*<sup>3</sup> 고려대학교 생명환경과학대학, College of Life & Environmental Science, Korea University, Seoul, 136-701, Korea.

\*<sup>4</sup> 대구대학교 생명환경학부, Division Life & Environmental Resources, Daegu University, Daegu 712-714, Korea.

† 주저자(corresponding author) : 최돈하(e-mail: edonha@foa.go.kr)

## ABSTRACT

Aspen wood (*Populus tremuloides*, L.) was biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora* for 1, 2, 4, and 6 weeks to observe the physical/chemical modification of wood components. Milled wood lignins (MWLs) isolated from each decayed wood were analyzed by gel permeation chromatography (GPC) and nitrobenzene oxidation (NBO). As fungal treatment was progressed, lignin contents continuously decreased up to 20% after 6-week treatment. The lignin polymer could be fragmented to low-molecular phenolics, which make an enhancement of alkali solubility. Holocellulose contents were not affected severely during the period of fungal treatment, only reduction of 5~6% compared to the control. Xylose contents were decreased gradually from 23.4% to 18% after 6 weeks, whereas alpha-cellulose remained almost unchanged. Gel permeation chromatography (GPC) indicates that molecular weight of lignin undergoes a slight decrement for 4 weeks of fungal treatment. Nitrobenzene oxidation revealed that total yield of NBO products of lignins were lowered ca 20% after fungal treatment. Sum of syringaldehyde and syringic acid are remarkably decreased. However, increment of sum of vanillin and vanillic acid was surprisingly observed. These results work as indirect evidence that a specific lignolytic reaction, maybe selective demethoxylation of S-lignin, can occur during fungal treatment of aspen wood by *C. subvermispora*.

**Keywords:** *Ceriporiopsis subvermispora*, *Populus tremuloides*, L., biodegradation, nitrobenzene oxidation, MWL, GPC, alkali solubility

## 1. 서 론

리그닌은 셀룰로스와 함께 식물 세포벽을 구성하는 주요 성분으로서 3차원구조로 이루어진 폐놀성 2차 대사산물이다. 세포분열에 따른 세포벽의 성장 과정에서 여러 효소 작용에 의해 형성된 C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>형의 모노머(p-coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohols)들은 다양한 형태의 탄소-탄소와 에테르 결합을 이루면서 리그닌 고분자를 세포벽에 축적시킨다(Boudet, 1998). 이러한 리그닌은 화학적으로나 생물학적으로 매우 안정된 성질을 띠지만, 리그닌의 주요 결합 양식인 에테르 결합은 알칼리에 쉽게 분해되므로 펄핑 공정에서는 알칼리를 이용하여 이들 결합을 분해함으로써 탈리그닌화를 유도한다. 그러나 최근 환경에 대한 관심이 점차 높아지면서 이러한 펄핑·표백 공정은 공해물질을 유발한다는 치명적인 취약점에 노출되었으며 이에 대한 대책이 매우 시급한 실정이다.

미생물학적 방법을 이용한 탈리그닌화 공정은 환경 친화적이라는 장점에도 불구하고 처리 시간이 길다는

단점과 경제적 효율성 때문에 산업화하는 데에 아직 미흡한 점이 많다. 그러나 Branchette *et al.* (1997)은 크라프트 펄프와 아황산 펄핑 공정에 백색부후균을 이용하여 전처리하면 처리시간의 단축과 펄프의 생산 수율이 증가된다고 보고하였으며, loblolly pine을 2주간 백색부후균으로 부후 처리하였을 경우 에너지 소비량을 감소시킬 수 있으며, 펄프의 질이 크게 향상된다는 긍정적인 연구 결과를 보고한 바 있다.

1980년대부터 *Phanerochaete chrysosporium*을 비롯하여 유망한 백색부후균에 의한 리그닌의 분해 메커니즘을 규명하는 연구는 활발하게 진행되어 왔다(Hammel *et al.*, 1985; Kirk *et al.*, 1986; Srebotnik *et al.*, 1994, 1997; Daine *et al.*, 2002). 그러나 이러한 연구는 대부분 저분자량의 리그닌 합성 모델물질을 대상으로 수행되었기 때문에 백색부후균에 대한 천연 고분자 리그닌의 분해 양상에 관한 연구는 아직 미흡한 상태이다.

백색부후균의 일종인 *Ceriporiopsis subvermispora*는 목재내의 리그닌만을 선택적으로 분해하는 특성을

나타내며, 섬유소의 분해에는 관여하지 않아 펄프의 강도에는 크게 영향을 주지 않으며, 또한 이 균주는 침엽수 뿐 아니라 활엽수 리그닌의 분해에도 적합하다고 보고된 바 있다. 목재의 부후과정에서는 lignin peroxidase의 역가가 전혀 측정되지 않았고, manganese peroxidase (MnP)와 laccase만이 리그닌의 분해에 관여할 것으로 예측하고 있다(Jensen *et al.*, 1996; Breen *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2003). 이러한 *C. subvermispota*의 분해 특성의 바이오펄핑에 대한 적용가능성을 제시하고자 리그닌 분해 및 세포벽 구조 변화 메커니즘에 관한 연구가 진행되고 있다(Blanchette *et al.*, 1997; Guerra *et al.*, 2002).

본 연구에서는 아스펜 목재(*Populus tremuloides* L.)를 선택하여 *C. subvermispota*로 기간별(1, 2, 4, 6주) 처리하여 부후 과정 동안 아스펜목재의 물리적/화학적 성상변화를 관찰하였고, 균주처리 아스펜 목재로부터 milled wood lignins (MWLs)을 단리하여 부후 처리기간에 따른 리그닌의 분자량 변화와 니트로벤젠 산화법으로 리그닌의 화학적 구조 변화에 대한 특성을 논의하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료의 균주처리

본 실험에서는 아스펜 목재(*Populus tremuloides* L.)를 공시 수종으로 사용하였으며, 공시 균주인 *Ceriporiopsis subvermispota* strain SS-3은 미국 임산물 연구소에서 분양받아 사용하였다. 아스펜 목재 칩은 수분함량 55%를 유지하면서 공시 균주 균사체 혼합액으로 27°C에서 소형 반응기를 이용하여 1, 2, 4, 6주 동안 부후처리를 하였다. 이렇게 획득한 부후 목재 시편은 -40°C에서 보관하였다. 본 실험에서 미처리 아스펜 목재는 대조구로 사용하였다.

### 2.2. 부후 목재의 화학적 분석

화학적 분석을 위한 시료의 제조를 위하여 부후목재 시편을 동결건조한 후 ball miller로 미세하게 분

쇄하였으며 메탄올로 추출하여 탈지하였다. 탈지한 각 부후시료의 리그닌 함량은 Klason 리그닌 정량법으로 산불용성 리그닌과 산가용성 리그닌을 각각 측정하였고(Dence, 1992) 이들 함량의 합을 총 리그닌 양으로 계산하였다. 부후목재의 전섬유소 함량과  $\alpha$ -cellulose의 함량은 각각 아염소산나트륨법과 Browning법(Browning, 1967)으로 정량분석을 실시하였으며, 부후목재의 알칼리에 대한 용해도의 변화를 측정하기 위하여 각 시료를 1 M NaOH 수용액으로 37°C에서 24시간 동안 처리하였다.

### 2.3. Milled Wood Lignins (MWLs) 단리 및 화학적 구조 분석

순수 리그닌의 단리를 위해서 탈지 목분은 planetary mono mill로 48시간 동안 분쇄하였다. 미세하게 분쇄된 부후 아스펜 목분은 Björkman법(1956)에 의하여 95% dioxane으로 milled wood lignins (MWLs)을 단리하였다.

#### 2.3.1. Gel Permeation Chromatography

리그닌(100 mg)을 무수초산(1 mL)과 피리딘(1 mL)으로 50°C에서 4시간 동안 아세틸화 하였다. 아세틸화된 리그닌은 THF 용액에 용해시킨 후, 셀룰로오스 재질의 membrane 필터로 거른 후, 2개의 Styragel 칼럼(HR4E와 HR5E, Waters)이 장착된 Waters 1515 기종의 Gel Permeation Chromatography (GPC)분석을 실시하였으며, Refractive Index (RI) 검출기로 40°C에서 분자량을 측정하였다. 용출용매는 THF를 사용하였으며 분자량 계산을 위하여 10개의 분자량 분포가 다른 polystyrene 표준물질로 검량선을 만든 후, Waters Breeze GPC software를 이용하여 분자량을 계산하였다.

#### 2.3.2. 니트로벤젠 산화법

테플론 마개가 장착된 glass tube에 탈지시료 약 30 mg과 NaOH (2 M) 4 mL와 nitrobenzene 250  $\mu$ L를 넣고 170°C에서 2시간 동안 가온하면서 반응시켰다

Table 1. Determination of lignin, holocellulose and  $\alpha$ -cellulose contents in fungal treated aspen woods

Biodegradation time (wks)	Determination of lignin by Klason method			Determination of polysaccharides	
	Insoluble lignin	Soluble lignin	Total	Holocellulose	$\alpha$ -Cellulose
0	19.6±0.04	0.7±0.01	20.3±0.04	80.8±0.14	429±0.17
1	17.9±0.08	0.8±0.01	18.8±0.08	74.2±0.44	48.6±15.1
2	17.0±0.40	0.8±0.01	17.8±0.39	76.8±0.04	43.3±18.5
4	16.8±0.03	0.8±0.01	17.6±0.03	75.6±0.03	41.3±0.26
6	15.2±0.40	0.8±0.01	15.9±0.41	75.4±0.36	40.6±0.18

(Iiyama *et al.*, 1990). 반응 후 내부 표준물질로 3, 5-dimethoxyphenol (1.0 mg)을 첨가한 뒤 반응물을 디클로로메탄(20 ml)으로 3회 추출한 후, 수용성층을 분획하여 4 M HCl로 pH를 1~2로 조정 한 후, 다시 디클로로메탄(20 ml)으로 3회 추출하였다. 이렇게 획득한 페놀성 리그닌 분해 생성물은 피리딘(50  $\mu$ l)과 N, O bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, 50  $\mu$ l)로 유도체화 하였으며, DB-5 capillary column (60 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m)을 장착한 Gas chromatography (HP 6890 series)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 다음과 같다 - Injection 온도: 220°C; 오븐 온도: 160°C에서 250°C까지 분당 2°C씩 상승, 최고온도에서 5분간 유지; 검출기: FID (온도: 250°C). 정량분석을 위하여 Sigma사에서 구입한 *p*-hydroxyl-benzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillin, vanillic acid, syringaldehyde, syringic acid와 내부표준물질로 각 성분의 RF (response factor)를 계산하였다. 모든 실험 결과는 2회 반복한 결과의 평균치를 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 균주처리 기간에 따른 아스펜 목재 주성분의 정량적 변화

*C. subvermispora*에 의한 부후과정 동안 리그닌의

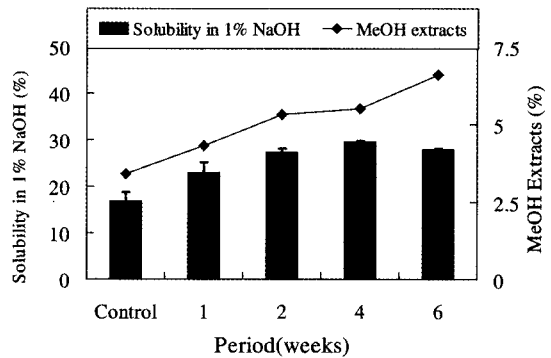


Fig. 1. Determination of methanol extracts contents and alkali solubility in fungal decayed aspen woods.

정량적인 변화와 전섬유소와  $\alpha$ -셀룰로스의 함량을 Table 1에 나타내었다. UV 측정법에 의한 산가용성 리그닌 함량에는 거의 변화가 없었지만, 산 불용성 리그닌의 함량에는 커다란 변화가 나타났다. 미처리 아스펜 목재의 리그닌 함량은 약 20%로 나타났지만 부후가 진행되면서 산불용성 리그닌의 양이 점차 감소되어 6주간의 부후처리 후에는 대조구와 비교하여 약 22%의 리그닌이 감소되는 것으로 나타났다. 전섬유소의 경우에는 부후처리 1주 동안 어느 정도 감소하는 경향을 보였지만 그 이후에는 안정된 상태를 유지하였으며,  $\alpha$ -셀룰로스의 함량은 부후가 진행될수록 약간의 감소량을 보였다. 그러나 *C. subvermispora*에 의한 부후과정 동안 아스펜 목재 칩에 나타난 가장 특

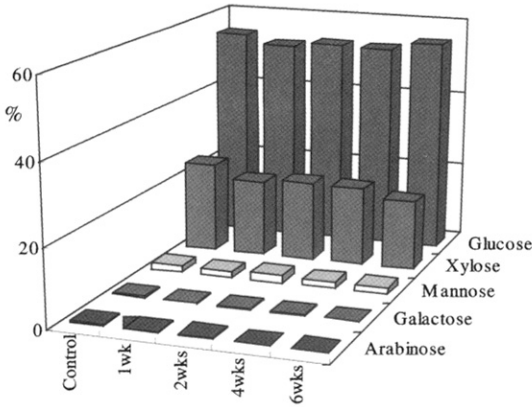


Fig. 2. Neutral sugar composition of holocellulose isolated from decayed aspen woods determined by gas-chromatographic analysis after derivatization to alditol acetates.

징적인 것은 칩의 색상이 갈색으로 변한다는 사실이었다. 이러한 변색은 Fig. 1과 연관지어 생각해 볼 수 있다. 부후가 진행되면서 리그닌은 부후균에서 분비되는 리그닌 분해효소, 즉 manganese peroxidase (MnP)나 laccase에 의해서 저분자량의 페놀성 물질로 분해되고, 이러한 분해산물은 아스펜 목재의 변색을 유도하였으리라 예측된다. 이들은 메탄올에 의해서 어느 정도 추출되어 Fig. 1에서 보는 바와 같이 추출물의 함량이 부후 기간에 비례하여 증가하는 추세를 나타내었다. 또한 Fig. 1에 나타난 알칼리에 대한 용해도는 부후 기간에 비례하여 증가하다가 4주 이후부터는 약간 감소되는 것으로 나타났다. 즉, 부후균에 의해서 세포벽내의 리그닌의 구조와 세포벽의 형태가 크게 변형되어 알칼리에 쉽게 용출되는 것으로 보인다.

균주 처리에 의한 전섬유소의 감소량에 대해 살펴보기 위하여 아스펜 부후목재에서 단리한 전섬유소의 중성당의 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 산가수 분해와 유도체화(alditol acetate)를 실시한 후 GC 분석을 통하여 주요 5가지의 당류에 대한 정량적 분석을 실시하였다. 전체적으로 분석 결과는 활엽수의 특징적인 당류 조성을 나타내었으며, 부후가 진행되면서 글루코스의 함량은 큰 변화가 없었지만, 자일로스의 함량은 미처리재의 23.4%에서 6주후 18.1% 까지 지속

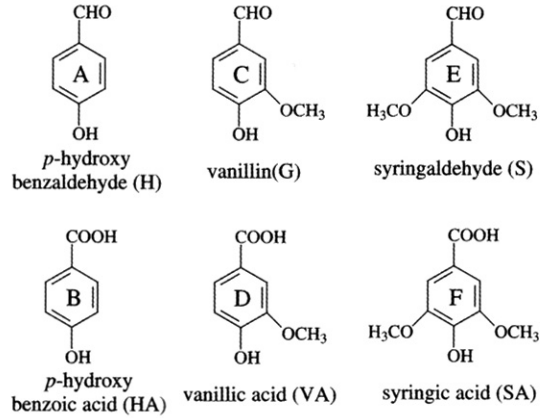


Fig. 3. Essential nitrobenzene oxidation products from lignin.

적으로 감소되는 것으로 보아, *C. subvermispora*는 리그닌 부후과정에서 자일로스를 분해하는 효소가 분비됨을 알 수 있다(Guerra *et al.*, 2003).

### 3.2. 부후처리에 의한 리그닌의 구조적 변화 관찰

*C. subvermispora* 부후에 의해서 나타나는 리그닌의 구조적 변화를 관찰하기 위하여 우선 부후목재로부터 milled wood lignins (MWLs)을 Björkman 법에 의하여 단리하였으며, 이를 리그닌 분석법 중 하나인 니트로벤젠 산화법과 Gel Permeation Chromatography 분석법으로 분석하였다. 각 부후 목재로부터 단리한 리그닌의 수율은 Klason 리그닌 함량을 기준으로 미처리재는 약 27.8%이고 부후처리 아스펜 목재에서는 약 23~25.6%로 *C. subvermispora*의 부후처리에 의해 리그닌 수율은 약간 낮게 나타났다 (Table 2).

단리한 아스펜 부후목재의 MWL을 아세틸화 시킨 후, GPC 분석에 의하여 측정된 리그닌의 평균분자량과 다분산도(polydiversity)를 Table 3에 제시하였다. 미처리재 리그닌의 평균분자량은 11,600 g/mol이었으며, *C. subvermispora*에 의한 부후가 진행되면서 리그닌의 평균분자량은 감소되어 4주 후에는 9,770 g/mol이었으며, 6주 후에는 약간 증가하는 경향을 보

Table 2. Yields of milled wood lignins isolated from decayed aspen woods and their analytical data by nitrobenzene oxidation

Biodegradation time (weeks)	Yield of MWL	Nitrobenzene oxidation (mg/g in MWL)					
		Guaiacyl type*		Syringyl type**		Total	S/G***
		V	VA	S	SA		
0	27.8	108.2±132	4.78±3.53	236.8±14.67	14.7±9.68	364.5±2.78	2.23
1	23.2	101.6±1.01	7.86±0.11	193.2±8.86	21.5±0.39	324.1±9.25	1.96
2	23.3	130.8±3.08	8.84±0.08	156.9±3.86	15.4±0.60	311.9±3.26	1.24
4	23.5	133.0±6.38	10.0±0.50	163.0±13.74	18.5±1.20	324.6±14.95	1.27
6	25.6	129.7±6.60	9.65±0.61	148.5±4.79	16.5±1.31	304.3±6.10	1.19

\* V: vanillin, VA: vanillic acid,

\*\* S: syringaldehyde, SA: syringic acid

\*\*\* S/G: (S+SA)/(V+VA)

Table 3. Weight-average molecular weight (Mw), number-average molecular weight (Mn) and polydispersity (D) of milled wood lignins purified from aspen wood determined by gel permeation chromatography

Biodegradation time (weeks)	Refractive Index detector		
	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	D (Mw/Mn)
0	11603	4677	2.48
1	10783	5189	2.08
2	11865	4913	2.19
4	9772	4647	2.10
6	10230	4456	2.30

였다. 이러한 아스펜 리그닌의 분자량 변화 추세는 Guerra *et al.* (2003)의 실험에 의해서 설명할 수 있는데, 이들은 *Pinus taeda*를 *C. subvermispora*로 90일간 처리하였을 경우, 리그닌의 중량 평균분자량이 약 25% 가량 감소하였으며, 이러한 리그닌의 분자량 감소는 부후 전반기 2~4주 동안에 β-O-4 결합의 분해에 의한 것이었으며, 이 기간에 laccase의 역할은 전혀 나타나지 않았지만 MnP의 역할이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 중반기에 접어들면서 MnP의 역할은 감소되었으며, 리그닌의 분자량도 안정세에 접어들었다고 보고하였다.

니트로벤젠 산화법은 리그닌의 주요 결합양식인 β-O-4 결합을 분해하여 6종류의 페놀 단량체들을 생성한다. Fig. 3의 A와 B는 *p*-coumaryl (H), C와 D는

guaiacyl (G) 그리고 E와 F는 syringyl (S) 단위체로부터 형성되며, 이러한 정량적 결과로부터 리그닌 내의 β-O-4 결합 빈도와 리그닌의 H/G/S 조성비율을 계산할 수 있다. Table 2는 니트로벤젠 산화법에 의한 부후 목재 리그닌(MWLs)의 분석결과이다. 페놀 단량체 A와 B는 모든 리그닌에서 전혀 검출되지 않았고, G와 S 단위체로부터 생성된 4종의 NBO 생성물들만이 확인되었다. 대조구(365 mg/g MWL)와 비교하여 부후목재의 NBO 생성물 수율은 균주 처리기간에 비례하여 감소하였으며, 6주 처리 후에는 대조구보다 약 20% 정도 감소되었다(304 mg/g MWL). S-타입 유도체(S+SA)의 생성량은 부후가 진행되면서 감소하는 경향을 나타내어 6주 후에는 34%까지 감소되었다. 그러나 G-타입 유도체(V+VA)의 생성

량은 처음 1주 동안은 다소 감소하는 경향을 띠다가 2주부터는 다시 증가하여 6주 후에는 20% 가량 증가하였다. 아스펜 목재 리그닌의 S/G 비율은 부후가 진행되면서 2.23에서 1.19까지 감소하였다. 이와 같은 리그닌 분석 결과로 미루어 *C. subvermispora*는 아스펜 목재의 부후과정에서 G-리그닌보다 S-리그닌을 선택적으로 분해하는 것으로 보이며, 부후가 진행되면서 G-타입 유도체의 수율이 증가하는 현상은 리그닌 분해효소에 의한 S-리그닌의 분해대사과정중의 탈메톡실화 반응(demethoxylation)에 의한 것으로 예측된다.

#### 4. 결 론

*C. subvermispora*로 아스펜 목재(*Populus tremuloides* L.)를 기간별로(1, 2, 4, 6주) 부후하는 동안 아스펜 목재 칩의 색상변화가 관찰되었으며, 6주 후에는 리그닌 함량이 20% 가량 감소되었으며, 부후목재의 리그닌은 알칼리에 쉽게 용출되는 경향을 보였다. 부후목재의 메탄올 추출물 함량은 부후처리 기간에 비례하여 증가하였으며, 6주간 처리 후에는 대조구와 비교하여 최고 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 전섬유소와  $\alpha$ -cellulose의 함량은 균주처리기간에 크게 영향을 받지 않았지만, xylose의 함량은 균주 처리에 의해서 크게 감소하였다. 리그닌의 평균분자량은 균주처리 4주까지는 어느 정도 감소하는 경향을 보이지만, 6주 이후에는 리그닌의 분자량이 안정화되는 것으로 나타났다. 부후목재로부터 단리한 리그닌의 NBO 분석을 통하여 리그닌의 Guaiacyl (G)과 Syringyl (S) 모노머 조성비율의 변화를 관찰한 결과, 균주처리가 길어질수록 니트로벤젠 산화 분해물의 수율이 급격하게 감소하는 경향을 보였는데, 특히 S-타입 리그닌 분해물(syringaldehyde와 syringic acid)의 감소가 특징적이었다. *C. subvermispora*가 목재 부후과정에서 분비하는 리그닌 분해효소는 S-타입 리그닌을 보다 선택적으로 분해하는 특성을 지니는 것으로 예측되었다.

#### 참 고 문 헌

1. Björkman, A. 1956. Studies on finely divided wood. I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Sven. Papperstidn.* 59: 477~485.
2. Blanchette, R. A., E. W. Krueger, J. E. Haight, M. Akhtar, and D. E. Akin. 1997. Cell wall alteration in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of biotechnology* 53: 203~213.
3. Boudet, A. M. 1998. A new view of lignification. *Trends in plant sciences.* 3:67~71.
4. Breen, A. and F. L. Singleton. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 252~258.
5. Browning, B. 1967. *Methods of wood chemistry.* New York. Wiley.
6. Daine, S., M. Orlandi, G. Bestetti, C. Wiik, and G. Elegir. 2002. Degradation of  $\beta$ -5 lignin model dimers by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 499~505.
7. Dence, C. W. 1992. The determination of lignin, In S. Y. Lin and C. W. Dence (ed.), *Methods of lignin chemistry.* Springer-Verlag, Heidelberg. 33~61.
8. Ferraz, A., A. M. Cordova, and A. Machuca. 2003. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technol.* 32: 59~65.
9. Guerra, A., R. Mendonca, and A. Ferraz. 2002. Characterization of the Residual Lignins in Biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* by Using *in situ* CuO Oxidation and DFRC Methods. *Holzforchung* 56: 157~160.
10. Guerra, A., R. Mendonca, and A. Ferraz. 2003. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technol.* 33: 12~18.
11. Hammel, K. E., M. Tien, B. Kalyanaraman, and T. K. Kirk. 1985. Mechanism of oxidative C-C cleavage of a lignin model dimmers by ligninase.

- J. Biol. Chem.* 260: 8348~8353.
12. Iiyama, K. and T. B. T. Lam. 1990. Lignin in wheat nodes. Part I: The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation. *Journal of Sci. Food Agric.* 51: 481~491.
  13. Jensen, K. A., W. Bao, S. Kawai, E. Srebotnik, and K. E. Hammel. 1996. Manganese dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3679~3686.
  14. 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  $\beta$ -aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* 236: 279~287.
  15. Srebotnik, E., K. A. Jensen, Jr., and K. E. Hammel. 1994. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12794~12797.
  16. Srebotnik, E., K. A. Jensen, Jr., S. Kawai, and K. E. Hammel. 1997. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structures by a one electron oxidation mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4435~4440.
  17. Umezawa, T. and T. Higuchi. 1987. Mechanism of aromatic ring cleavage of  $\beta$ -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase. *FEBS Lett.* 218: 255~260.