목재공학 35(6): 91~99, 2007
Mokchae Konghak 35(6): 91~99, 2007

국내산 침엽수 목분의 진탕배양에서 나타난 *Fomitopsis palustris*의 효소 활성 및 셀룰로오스 분해*1

최 두 열*2 · 이 영 민*2 · 김 영 균*2 · 윤 정 준*3 · 김 영 숙*2†

Enzyme Activities and Cellulose Degradation of Domestic Softwoods in Shaking Culture of *Fomitopsis palustris*[*1]

Doo-Yeol Choi[*2] · Young-Min Lee[*2] · Young-kyoon Kim[*2] ·
Jeong-Jun Yoon[*3] · Yeong-Suk Kim[*2†]

요 약

소나무, 낙엽송, 리기다소나무, 잣나무 등 국내산 침엽수 목분을 기질로 진탕배양했을 때 갈색부후균인 *Fomitopsis palustris*로부터 분비된 당 분해성 균체 외 효소는 *Endoglucanase* (EG), *β-glucosidase* (BGL) 및 *β-1,4-xylosidase* (BXL)와 함께 결정형 셀룰로오스를 분해하는 *Cellobiohydrolase* (CBH)도 활성을 갖는 것으로 나타났다. 4주간 배양에서 변재는 심재에 비해 큰 효소활성을 나타냈으나, 배양기간을 증가시킴으로써 효소활성이 커지는 것으로 밝혀져 효소에 의한 목질바이오매스 분해의 경우 심변재 혼합처리도 가능할 수 있음이 시사되었다. 그리고, 균체 외 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 대부분의 수종에서 나타나는 효소의 단백질 패턴은 거의 유사한 것으로 나타나 효소를 이용한 목질계 바이오매스 분해의 경우 수종별 혼합처리도 가능함이 시사되었다. *F. palustris*에 의해 분해된 목분(60 mesh 통과) 셀룰로오스의 결정화도 감소율은 4주 배양에서 약 4.2~20.4%, 8주 배양에서 약 12.9~28.9% 수준으로 나타났다.

* 1 접수 2007년 10월 10일, 채택 2007년 10월 24일
본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 20050401034819)의 지원으로 수행되었음.
* 2 국민대학교 임산공학과. Dept. of Forest Products, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea
* 3 건국대학교 생명공학과. Dept. of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
† 주저자(corresponding author) : 김영숙(e-mail: yskim@kookmin.ac.kr)

ABSTRACT

Activities of the extracellular enzyme from *Fomitopsis palustris*, a brown-rot fungi, and by which crystallinity changes of cellulose in the various softwoods, such as *Larix leptolepsis*, *Pinus rigida*, *Pinus koraiensis* and *Pinus densiflora* by liquid culture, were investigated. Activity of *Cellobiohydrolase* (CBH) from *F. palustris* was detected in the every test softwoods culture, showing activities of the *Endoglucanase* (EG), *β-glucosidase* (BGL) and *β-1,4-xylosidase* (BXL). It was shown high enzyme activities in the sapwood culture than heartwood of the same wood species, However, the enzyme activities in most of test wood cultures increased with longer incubation time, indicating a possibility of intermix sapwood and heartwood for degradation process by enzyme. Also it was shown that protein patterns of the extracellular enzyme from *F. palustris* in wood particle substrate of the several domestic softwoods were similar with each other wood species, which suggested the possibility of mixing all softwoods in saccharification by enzyme from *F. palustris*. Crystallinity reduction value of cellulose by *F. palustris* was 4.2~20.4% in 4 weeks cultivation, 12.9~28.9% in 8 weeks.

Keywords: *Fomitopsis palustris*, cellulase, crystallinity, EG, CBH, BGL, BXL, wood biomass

1. 서 론

근래 생명공학기술의 발달과 함께 미생물 유래 효소 이용이 식품, 의약품, 섬유산업 및 바이오에너지 분야 등 다양한 분야에 응용되고 있다(전 등, 2003). 특히 목재가해균류인 진균류 중 *Trichoderma, Aspergillus, Mucor, Rhizopus*와 같은 균류의 효소는 섬유, 제지산업, 바이오매스의 당화 등에 상용화되고 있기도 하다(Arja, 2004; Reczey, 1996). 뿐만 아니라 목질계 원료를 바이오에탄올과 같은 에너지형태로 전환하기 위해서는 목재 주요성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌과 같은 성분을 적절하게 제거 또는 분리하는 전처리기술이 요구되는데 여기에도 목재부후균의 균체 외 효소 응용을 시도하는 예가 많다(McMillan, 2003; Keller *et al.*, 2003). 더구나 대부분의 목재부후균은 기질의 종류와 반응조건에 따라 효소생산과 기질의 분해정도가 달라지므로 이들 미생물의 기질에 따른 분해력이나 효소활성은 이들의 산업적 응용에 매우 중요한 정보가 될 수 있다. 특히 목질계 원료의 다당류분해에 유용하게 이용할 수 있는 갈색부후균은 일반적으로 선택적인 다당류분해력이 크고 리그닌에 대해 한정적 분해성을 갖는 것으로 알려져(金, 2007; Highly *et al.*, 1988; Zabel, 1992), 이들의 균체외 효소의 당화효소로서의 이용가능성은 크다고 할 수 있다.

김은 최근 갈색부후균의 특성 및 분해 기구를 다룬 총설에서 갈색부후균이 목재 중의 다당류 중 결정형 셀룰로오스를 분해하는데 효소 단독의 분해보다는 공조역할을 하는 물질이나 전구물질 등 효소보다 저분자인 물질의 관여 등의 학설을 소개하고 있다(김 등, 2004; 金, 2007). 구체적으로 효소분해 이외에 Fenton시약, 수산, glycopeptide 또는 금속킬레이트화제와 같은 저분자 물질 등의 역할을 설명하고 있는데 여기에도 확실히 이해되지 않는 부분이 있다는 것을 지적하고 있다. 또한 Yoon *et al.* (2007)은 Avicel을 기질로 했을 때 분비되는 효소 정제와 동정을 통하여 결정형 셀룰로오스 분해에 endoglucanase의 역할이 있었음을 보고하였다. 또한 *Fomitopsis palustris*가 2% Avicel 기질에서 14일간 진탕배양했을 때 셀룰로오스 결정화도가 83%에서 78.5%로 감소함을 보고(Yoon & Kim, 2005)하였으나, 최 등(1992)은 갈색부후균 중 *Tyromyces palustris* (현재의 *F. palustris*)와 *Gloeophyllum trabeum*로 해사

배양기상에서 목재 시험편을 부후했을 때 부후균에 의한 중량감소가 30% 이상 되어야 결정화도에 미미한 변화가 있음을 보고한 바 있다. 갈색부후균의 목재분해기구나 특성은 金(2007)에 의해 지적된 바와 같이 아직 통일된 개념이 정립되어 있지 않은 상황이므로 이에 대한 보다 깊은 연구가 요구되는 상황으로 해석되고 있다. 특히 목질계 바이오매스 에너지화 등에 이들 균체 외 효소를 직접 이용하거나 효소 탐색에 활용하고자 하는 경우, 목재기질 형태나 배양조건에 따른 효소 패턴과 활성, 그리고 그들 효소군의 기질 분해성 등의 구명은 그 필요성이 매우 큰 것으로 시사되었다.

따라서 본 연구에서는 국내산림에서 가장 공급 가능성이 많은 주요 침엽수를 대상으로 전처리 또는 당화과정에 갈색부후균 중의 하나인 *F. palustris*를 이용하는 경우, 특히 이 수종들을 목분화하여 진탕배양으로 효소분해를 시도할 때 *F. palustris*가 배출하는 당 분해효소 패턴 및 효소활성, 그리고 목재의 셀룰로오스 분해특성을 구명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

공시수종은 국내산 낙엽송(*Larix leptolepsis*), 리기다소나무(*Pinus rigida*), 잣나무(*Pinus koraiensis*) 및 소나무(*Pinus densiflora*)를 대상으로 각 수종별로 심재와 변재로 구분하여 willy mill로 분쇄한 목분(60 mesh 이하)을 사용하였다. 공시균으로는 국립산림과학원에서 분양받은 갈색부후균 *F. palustris* (FFPRI 0507)을 사용하였다.

2.2. 공시균 배양

공시균은 PDA (Potato Dextrose Agar)배지에서 배양된 균사체를 PDB (Potato Dextrose Broth)배지 100 mℓ에 접종한 후, 28°C에서 5일간 진탕배양(115 rpm)하는 방법으로 전배양을 실시하고, 이들을 본배양에 이용하였다.

본배양에는 glucose 0.5%, peptone 0.8%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3%, Thiamin HCl 5 ppm을 포함한 액체배지(pH 5.0)를 사용하였다. 조제된 액체배지에 전배양액 5 mℓ를 첨가하고, 목분 혼입률을 2% (w/v)가 되도록 조정하여 본배양을 실시하였다. 배양기간별 효소활성의 차이를 보기 위해 4, 8주로 나누어 28°C에서 진탕배양(150 rpm)하였다.

2.3. 효소활성 및 단백질 정량

〈*β-glucosidase* 측정〉

1.5 mℓ 튜브에 100 μℓ 1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 100 μℓ 10 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG, Sigma), 증류수 700 μℓ와 100 μℓ 효소를 넣고 50°C에서 15분간 반응을 시켰다. 그 후에 100 μℓ 2 M Na_2CO_2를 첨가시킨 후에 405 nm에서 *β-glucosidase*의 활성을 측정하였다. 효소활성단위는 일정 조건하에서 1분간 반응용액 1 mℓ당 p-nitrophenol 1 μmol을 방출하는 데 필요한 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

〈*Endo-β-1,4-glucanase* 측정〉

Somogyi-Nelson법(NN. elson, 1944; M. Somogy, 1952)에 따라서 5 μℓ 1 M sodium-acetate, 5 μℓ 1%의 carboxymethyl cellulose (CMC)나 1% xylan, 35 μℓ 증류수에 5 μℓ 효소를 첨가시킨 후, 50°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응이 끝난 샘플에 구리 시약 50 μℓ를 넣고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 효소반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 샘플을 실온까지 냉각하였다. 50 μℓ Nelson 발색 시약을 첨가하여 청색으로 변색하는 것을 확인하고 1 mℓ 증류수를 넣고 충분히 혼합하였다. 샘플을 실온에서 15분간 반응시킨 후에 660 nm 흡광도를 측정한 다음, 검량선에 의거 효소활성을 구하였다.

〈*Cellobiohydrolase* 측정〉

1 M CH_3COONa (pH = 5) 100 ㎕, 10 mM p-NPL (p-Nitrophenyl-β-lactopyranoside) 100 ㎕, 효소 100 ㎕, 증류수 700 ㎕를 혼합한 후 40°C에 30분간 반응 후 효소활성 저해제인 2 M Na_2CO_3 100 ㎕ 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405 nm에서 흡광도를 측정한 다음 cellobiohydrolase 활성을 구했다.

〈β-1,4-*xylosidase* 측정〉

1 M CH_3COONa (pH = 5) 100 ㎕, 10 mM p-NPX (p-Nitrophenyl-β-xylopyranoside) 100 ㎕, 효소 100 ㎕, 증류수 700 ㎕를 혼합한 후 40°C에 30분간 반응 후 효소활성 저해제인 2 M Na_2CO_3 100 ㎕ 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405 nm에서 흡광도를 측정한 다음 효소활성을 구하였다.

〈단백질의 정량〉

배양액을 filter paper (Adventec No. 2)로 여과시킨 후, Amicon Membrane 농축기를 사용하여 농축액을 얻었다. 여기서 얻은 농축액을 분석용 추출물로 사용하였다.

단백질 정량은 Bradford 방법(M. Bradford, 1967)에 따라 정량하였고, 다음 식에 의거하여 단백질 농도를 구하였다.

$$\text{Protein Concentration (mg/mℓ)} = A_{595} \times 0.811 + 0.009$$

2.4. SDS-PAGE에 의한 효소패턴 및 분자량 분석

각 수종별로 목분 배양에서 추출한 균체 외 효소군의 패턴 분석을 위해 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 12.5% 겔을 사용하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 실시하였다.

분자량 표준 단백질로 Mycoin (220 kDa), β-galactosidase (115 kDa), bovine serum albumin (96 kDa), ovalbumin (51 kDa), carbonic anhydrase (37 kDa), soybean trypsin inhibitor (30 kDa)과 lysosme (20 kDa)을 포함하고 있는 SDS Molecular Weight Standard Markers (Bio-Rad)를 사용하였다. 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)으로 염색하였다. 염색된 겔을 탈색용액을 이용하여 탈색하였다.

2.5. 결정화도 측정

배양이 종료된 생분해 목분의 결정화도를 Power X-ray Diffractometry (XRD, Philips)를 이용하여 측정하였다. 무처리 목분과 진탕배양된 목분의 결정화도를 측정하여 기질별로 효소에 의한 결정형 셀룰로오스의 분해 정도를 관찰하였다. X-ray 회절기의 분석조건은 관전압 35 kv, chart speed 4° (2θ)/min, 관전류 15 mA, full scale 10^3cps이었고, 결정화도는 Segal법(Segal *et al.*, 1959)에 의해 다음과 같이 구했다.

$$\text{결정화도}(\%) = [I_{002} - I_{am}/I_{002}] \times 100$$

여기서, I_{002}는 22°와 23° 사이의 최대 Intensity, I_{am}는 18°과 19° 사이의 최소 Intensity를 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수종별 액상기질에서의 균체 외 효소활성

각각의 배양기간에 따라 4종의 국산침엽수 변재 및 심재기질에서 *F. palustris*가 분비하는 균체 외 효소군에서 주로 당 분해효소로 알려진 EG, CBH, BGL 및 BXL 활성에 대해 측정한 결과를 Table 1에 제시하였다. 저자 등(Kim *et al.*, 2006)이 구두 발표했던 바와 같이 공시수종인 주요 국내산 침엽수의 Cellulose 및 Hemicellulose 분해에는 측정된 4종의

Table 1. Enzyme activities of *Formitopsis palustris* in each substrates by wood species

Wood species	Wood portion	Incubation time (weeks)	Activity(U/L)				Protein concentration (mg/L)
			EG[1]	CBH[2]	BGL[3]	BXL[4]	
Larix leptolepsis	sapwood	4	102.0	24.3	425.0	43.6	58
		8	149.0	26.8	845.0	70.6	78
	heartwood	4	81.3	9.4	189.0	18.6	36
		8	169.0	21.0	253.0	30.2	45
Pinus rigida	sapwood	4	155.0	63.3	644.0	38.9	71
		8	154.0	86.7	584.0	36.0	68
Pinus koraiensis	sapwood	4	75.5	48.7	374.9	27.3	104
		8	70.5	72.3	2145.4	52.8	126
	heartwood	4	155.6	14.1	93.9	10.8	28
		8	110.2	17.0	144.3	23.7	39
Pinus densiflora	sapwood	4	98.5	57.8	712.1	88.0	82
		8	191.6	45.7	484.2	78.3	56
	heartwood	4	48.6	37.0	483.9	27.4	52
		8	33.5	41.7	616.9	30.9	41

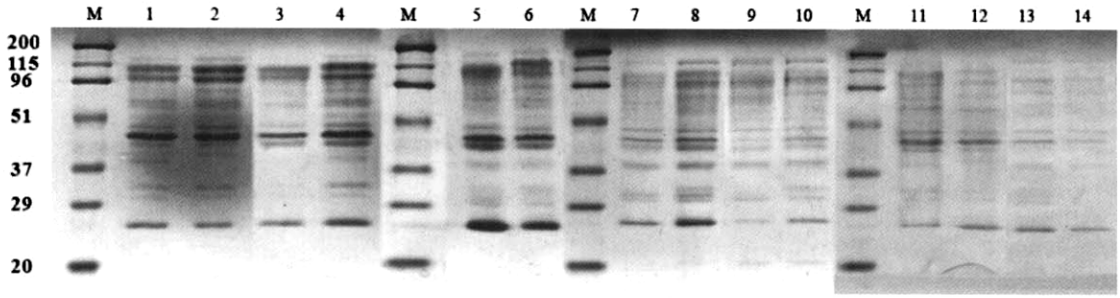
1: *Endoglucanase* (EG), 2: *Cellobiohydrolase* (CBH), 3: *β-glucosidase* (BGL), 4: *β*-1,4-*xylosidase* (BXL)

효소가 모두 활성을 띄는 것으로 나타났다. EG 및 BGL 활성이 비교적 높게 나타났고, 결정형 셀룰로오스의 분해효소로 알려져 있는 CBH 활성이 EG 활성보다는 작지만 사용된 대부분의 침엽수 목분 기질에서 생성되는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 갈색부후균에 의한 결정형 셀룰로오스 분해 기구는 Fenton시약, 수산, Glycopeptide 또는 금속킬레이트화제와 같은 저분자물질 등에 의한 분해기구 등의 가능성 등 확실히 단정지을 수 없는 상황이 보고되고 있는데(金, 2007) 본 연구결과에서 얻어진 CBH 활성은 효소에 의한 결정형 셀룰로오스 분해 가능성을 시사하는 결과로 활용될 수 있는 것으로 판단된다. 그리고 Ishihara와 Shimizu (1984a, 1984b)는 CMC (Carboxymethylcellulose)와 각종의 *β-glucosidic* 결합을 갖는 기질을 분해한 *F. palustris*의 균체 외 효소가 결정형 셀룰로오스 분해력을 갖지 않는 것을 보고한 바 있고, Yoon과 Kim (2005)은 동일균이 Avicel과 Cotton 등을 기질로 했을 때 CBH 활성과 결정형 셀룰로오스 분해를 보고하였는데, 본 연구에서는 목분을 기질로 했을 때 CBH 활성을 보임으로써 이 효소에 의한 결정형 셀룰로오스 분해 가능성이 시사되었다.

그리고, 배양조건에 따라 효소활성의 수준이 다르나 배양기간 8주의 경우 4주에 비해 높은 활성을 나타내었고, 수종별로 심재의 경우 변재에 비해 대체적으로 효소활성과 배양액 중 단백질 농도가 낮은 경향을 보여 심재에 함유된 추출물 등의 저해가 있는 것으로 나타났다. 그러나 수종 간 다소간의 차이가 있기는 하나 배양기간이 4주에서 8주로 길어질 때에는 효소 활성의 현저한 증가를 보여 대부분의 효소가 심재물질에 의해 완전히 억제되지는 않는 것으로 밝혀졌다. 수종별로 크고 작은 효소활성의 차가 나타났는데 특히 리기다소나무 변재의 경우 타 수종에 비해 CBH 활성이, 잣나무 변재에서는 BGL 활성과 단백질 농도가 비교적 높게 나타나 효소종류에 따라 수종의 영향을 받는 결과를 보여주었다.

3.2. 균체 외 효소군의 효소 단백질 패턴

각 공시재료로부터 추출한 균체 외 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이, Yoon *et al.* (2007)이 Avicel 기질에서 *F. palustris* 균체 외 단백질 중 EG로 동정했던 47 kDa 부근에 선명한 밴드가 목분



(1) *Larix leptolepsis* sapwood for 4 weeks, (2) *Larix leptolepsis* sapwood for 8 weeks,
(3) *Larix leptolepsis* heartwood for 4 weeks, (4) *Larix leptolepsis* heartwood for 8 weeks,
(5) *Pinus rigida* sapwood for 4 weeks, (6) *Pinus rigida* sapwood for 8 weeks,
(7) *Pinus koraiensis* sapwood for 4 weeks, (8) *Pinus koraiensis* sapwood for 8 weeks,
(9) *Pinus koraiensis* heartwood for 4 weeks, (10) *Pinus koraiensis* heartwood for 8 weeks,
(11) *Pinus densiflora* sapwood for 4 weeks, (12) *Pinus densiflora* sapwood for 8 weeks,
(13) *Pinus densiflora* heartwood for 4 weeks, (14) *Pinus densiflora* heartwood for 8 weeks

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of extracellular proteins from *F. palustris*.

기질에서도 대부분의 수종에 나타났다. 그러나 동일 균종에 의한 Aivcel 기질에서 EG로 동정된 35 kDa의 단백질 밴드는 본 연구에서 사용한 목분 기질에서는 아주 흐리거나 거의 나타나지 않았으며, 목분의 경우 Avicel에는 매우 흐리게 나타난 26 kDa에 확실한 효소단백질이 보였다. 그 밖에 96~115 kDa 부근의 선명한 밴드가 2개, 70 kDa 부근에 1개 단백질이 거의 공통적으로 나타났다. 특히 115 kDa 부근의 단백질은 cellobiose를 선택적으로 분해하는 BGL임이 확인되었다(미발표자료). 이와 같이, 다양한 수종의 기질에서 배출된 *F. palustris*의 균체 외 단백질 패턴은 Avicel과는 다소 달랐으나 수종 상호간에는 매우 비슷한 결과를 보여 서로 다른 수종에서도 거의 유사한 종류의 효소단백질이 생산되는 것으로 확인되어 효소를 이용한 목질계 바이오매스 분해의 경우 수종별 혼합처리도 가능함이 시사되었다.

3.3. XRD분석에 의한 결정화도 변화

최 등(1992), Ishihara *et al.* (1984a) 및 Highly *et al.* (1988)에 의하면 갈색부후균에 의해 부후된 목재 또는 목면(cotton)의 경우 중량감소율 20~30%에 달할 때까지는 셀룰로오스의 결정화도에 변화가 없고, 그 이상이 되었을 때 결정화도의 변화가 보이기 시작한다고 보고했다. 특히 최 등(1992)은 국내산 소나무재의 목편을 갈색 부후균인 *F. palustris*로 부후시켰을 때 중량감소율 50%에서 결정화도 감소율은 불과 13%로 매우 적은 감소율을 나타냄으로써 이 균이 주로 비결정형 셀룰로오스를 분해하는 것으로 해석한 바 있다. 본 연구에서는 국내산 주요 침엽수를 기질로 한 진탕배양에서 목분(60 mesh 통과) 중 셀룰로오스의 결정화도 변화를 측정한 결과, Table 2 및 Fig. 2~5에 나타낸 바와 같이 4주 및 8주 배양의 경우 약 5~28.9%의 결정화도 감소율을 나타내 Soil-block시험에 의한 목재편의 부후에서보다는 다소 높은 결정화도의 변화율을 보였다. 실제로 목재편의 경우, 갈색부후균에서 단리된 6 kDa 이상(Fluornoy, 1991)의 효소는 벽공을 통과하지 못하여 세포벽 전체에 확산하기 어려운 것으로 해석되는데 본 연구에서는 목분 상으로 액상 배양기에서 분해가 일어나므로 효소에 노출되는 결정형 셀룰로오스가 많아 결정화도의 분해가 보다 많이 일어나는 것으로 추론하였다. 그러나 실제 공시부후균에 의해 목분의 분해 정도를 균사체와 분리하여 정량적으로 확인하지 못하였으므로 갈색부후균인 *F. palustris*에 의한 결정화도 분해에 관여하는 CBH의 역할 등을 보다 확실하게 밝히기 위해서는 진탕배양에서 목분의 분해 정도와 결정화도 변화에 대한 관계 구명

Table 2. Crystallinity of degraded wood substrates by *F. palustris* (unit: %)

Wood spec. date (weeks)	*Larix leptolepsis (sapwood)*	*Larix leptolepsis (heartwood)*	*Pinus rigida (sapwood)*	*Pinus koraiensis (sapwood)*	*Pinus koraiensis (heartwood)*	*Pinus densiflora (sapwood)*	*Pinus densiflora (heartwood)*
Control	62.2	55	54.9	62.4	55.5	58.5	50.5
4	49.5 (20.4)	48.3 (12.2)	52.6 (4.2)	51.4 (17.6)	52.7 (5.0)	52.8 (9.7)	41.7 (17.4)
8	47.6 (23.5)	39.1 (28.9)	47.8 (12.9)	-	-	-	-

*( ) show the reduction rate (%)

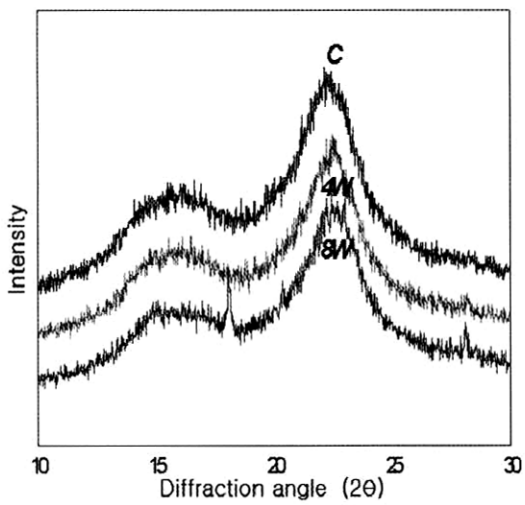


Fig. 2. X-ray diffractograms of *Larix leptolepsis* sapwood (passed 60 mesh) degraded by *F. palustris* (Numbers on diffractograms represent the shaking cultivated time: 4W – 4 weeks, 8W – 8 weeks, C-Control).

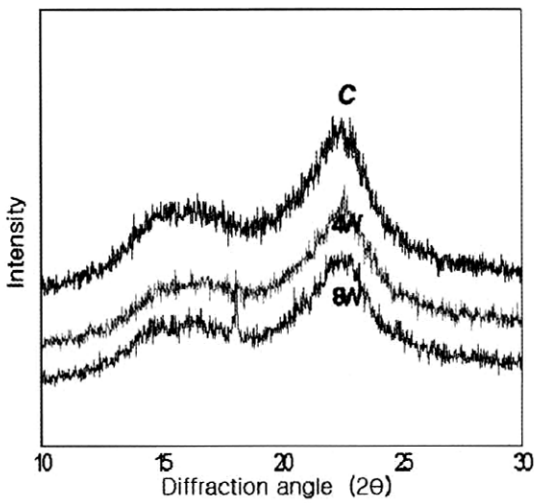


Fig. 3. X-ray diffractograms of *Larix leptolepsis* heartwood (passed 60 mesh) degraded by *F. palustris* (Numbers on diffractograms represent the shaking cultivated time: 4W – 4 weeks, 8W – 8 weeks, C-Control).

이 필요한 것으로 고찰하였다.

4. 결 론

국내산 주요 침엽수를 대상으로 전처리 또는 당화 과정에 갈색부후균 중의 하나인 *F. palustris*를 이용하는 경우, 특히 이 수종들을 목분화하여 진탕배양으로 효소분해를 시도할 때 *F. palustris*가 배출하는 당 분해효소 패턴 및 효소활성, 그리고 목재의 셀룰로오스 분해특성을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 소나무, 낙엽송, 리기다소나무, 잣나무 등 국내산 침엽수를 기질로 했을 때 갈색부후균인 *F. palustris*로부터 분비된 당 분해성 균체 외 효소는 EG, BGL 및 BXL와 함께 결정형 셀룰로오스를 분해하는 CBH도 활성을 갖는 것으로 나타났다. 4주간 배양에서 변재는 심재에 비해 큰 효소활성을 나타냈

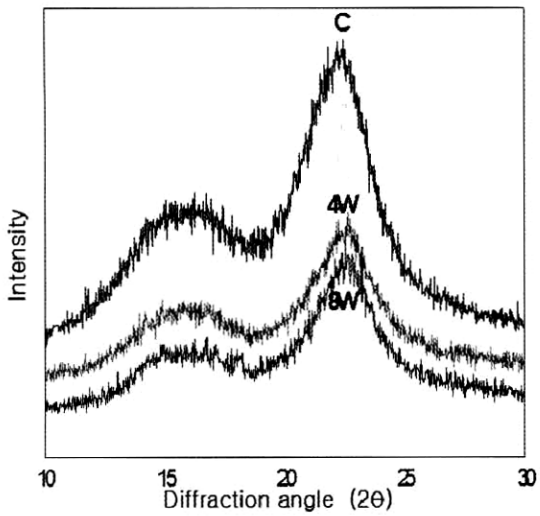


Fig. 4. X-ray diffractograms of *Pinus densiflora* sapwood (passed 60 mesh) degraded by *F. palustris* (Numbers on diffractograms represent the shaking cultivated time: 4W − 4 weeks, 8W − 8 weeks, C-Control)

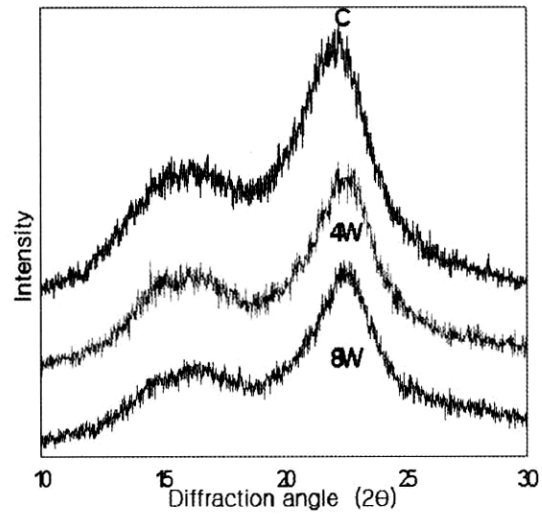


Fig. 5. X-ray diffractograms of *Pinus rigida* sapwood (passed 60 mesh) degraded by *F. palustris* (Numbers on diffractograms represent the shaking cultivated time: 4W − 4 weeks, 8W − 8 weeks, C-Control)

으나, 배양기간을 증가시킴으로써 효소활성이 커지는 것으로 밝혀져 목질바이오매스효소분해의 경우 심변재 혼합처리도 가능할 수 있음이 시사되었다.

둘째, 균체 외 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 대부분의 수종에서 나타나는 효소의 단백질 패턴은 거의 유사한 것으로 나타나 효소를 이용한 목질계 바이오매스 분해의 경우 수종별 혼합처리도 가능함이 시사되었다.

셋째, 국내산 주요 침엽수를 기질로 한 진탕배양에서 *F. palustris*에 의한 목분(60 mesh 통과) 중 셀룰로오스의 결정화도 감소율은 4주 배양에서 약 4.2~20.4%, 8주 배양에서, 약 12.9~28.9%로 Soil-block 시험에 의한 목재편의 부후에서보다는 다소 높은 결정화도 변화율을 보였다.

사 사

바이오그린21사업(과제번호 20050401034819)의 일환으로 본 연구가 수행될 수 있도록 지원한 농촌진흥청에 감사드린다.

참 고 문 헌

1. 김영숙, 김이경, 최두열, 윤정준, 김영균. 2006. 침엽수 목질계 기질에서 나타난 *Fomitopsis palustris*의 효소 특성. 한국목재공학회 요지집. 50~51.
2. 金潤受. 2007. 褐色腐朽への再訪 －褐色腐朽の統一された概念は得まだられていない－. 木材保存. vol. 33-2.
3. 金潤受, 金圭赫, 金榮淑. 2004. 木材保存科學. 71-72. 全南大學校出版部.
4. 전문진, 권석태, 이철호, 임번삼. 2003. 현대의 생물공학과 생물산업. 아카데미서적.
5. 최지호, 한옥수, 김윤수. 1992. 갈색부후목재의 X선 회절 및 IR 분석. 목재공학. 20(3): 55~60.
6. Miiettinen-Oinonen, A. 2004. Trichoderma reesei strains for production of cellulases for the textile industry. p22. VTT publications. 550.
7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive meth-

od for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of pro tein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 248~254.
8. Flournoy, D. S., T. K. Kirk, and T. L. Highley. 1991. Wood decay by brown-rot fungi: Changes in pore structure and cell wall volume. Holzforschung. 45: 383~388.
9. Highly, T. L., R. Ibach, and T. K. Kirk. 1988. Properties of cellulose degraded by the brown rot fungus Postia placenta. IRG/WP/Document No. 1350.
10. Ishihara, M. and K. Shimizu. 1984a. Chemical characteristics of brown rot *Tyromyces palustris*. Bull. Jap. For. & For. Prod. Res. Inst. No. 330: 141~152.
11. Ishihara, M. and K. Shimizu. 1984b. Purification and properties of two extracellular endo-cellulases from the brown rotting fungus *Tyromyces palustris*. Mokkuzai Gakkaishi. 30: 79~87.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680~685.
13. Reczey, K. 1996. Cellulase production by T.reesei.
14. Keller, F. A., J. E. Hamilton, and Q. A. Nguyen. 2003. Microbial pretreatment of biomass, Applied Biochemistry and Biotechnology. vol. 105-108: 27~85.
15. McMillan, J. D. 2003. Enzyme sugar-ethanol platform and advanced pretreatment interim project reviews. http://www.nrel.gov/bioenergy.
16. Segal, L., J. J. Creely, A. E. Jr. Martin, and C. M. Conrad. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. Text. Res. J. 786~794.
17. Somogyi, M. 1959. Exacerbation of diabetes by excess of insulin action. Am. J. Med. 26: 169.
18. Kim, Y.-S., J.-J. Yoon, N. Khan, Y.-K. Kim, C.-J. Cha, and Y.-K. Kim. 2006. Hydrolysis of crystalline cellulose by cellulase system from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. 2006 Proceedings of the Korean Society of Wood Science and Technology Annual meeting. 48~49.
19. Yoon, J.-J. and Y.-K. Kim. 2005. Degradation of Crystalline Cellulose by the Brown-rot Basidiomycete *F. palustris*. Journal of Microbiology. December 2005. pp. 487~492.
20. Yoon, J.-J., C.-J. Cha, Y.-S. Kim, and D.-W. Son. 2007. The brown-rot basidiomycete *F. palustris* has the *Endo-glucanases* capable of degrading microcrystalline cellulose. J. Microbial Biotechnol. 17(5): 800~805.
21. Zabel, R. A. 1992. Wood microbiology. pp. 204~208. Academic press.