

겨울우산버섯에 의한 목재칩의 리그닌 분해 효소 활성 및 리그닌 함량 변화*1

조명길*2 · 유선화*2 · 김명길*2

Changes in Activities of Lignin Degrading Enzymes and Lignin Content During Degradation of Wood Chips by *Polyporus brumalis**1

Myung-Kil Cho*2 · Sun-Hwa Ryu*2 · Myungkil Kim*2†

요 약

본 연구에서는 국내에서 자생하는 백색부후균인 겨울우산버섯(*Polyporus brumalis*)을 소나무 시편에 배양하여 목재 처리에 의한 리그닌 분해효소의 활성변화를 조사하고 목재의 분해가 일어나는 동안 중량감소율 및 리그닌 감소율을 통해 분해능을 확인하고 여기에 관여하는 유전자의 발현을 조사하였다. SSC (Shallow Stationary Culture) 액체배지에 목재 시편을 넣고 겨울우산버섯을 배양하였을 때 무처리구에서는 laccase의 활성이 20일 이후 감소하는 반면, 시편 처리구에서는 활성이 계속 증가되었다. 특히, 60일 전후의 처리구에서 무처리구에 비해 10배 이상 높은 활성을 나타내었다. 또한, 겨울우산버섯에 의한 소나무칩의 중량 감소율과 리그닌 감소율은 80일 후 각각 23.4%와 6.3%로 나타났다. 40일 배양한 목질칩에서 분리한 겨울우산버섯의 *pblac1*의 유전자 발현은 무처리구에 비해 소나무 칩 처리구에서 약 3배 정도 높게 나타났다. 이상의 결과로 백색부후균에 의한 목재칩 처리에 의해 리그닌 분해효소의 활성이 증가되며 *pblac1*이 리그닌 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다. 따라서 백색부후균의 리그닌분해효소 유전자 발현을 조절함으로써 리그닌 분해능이 우수한 균주 개발이 가능하고 목질에탄올 생산 전처리에 효율적으로 이용할 것으로 기대된다.

ABSTRACT

In this study, laccase activity, rate of weight loss and degree of lignin degradation of pine wood chips were determined during the liquid and solid state incubation with *Polyporus brumalis*. The

*1 접수 2012년 8월 20일, 채택 2012년 11월 20일

*2 국립산림과학원 화학미생물과, Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 김명길(e-mail: mkkim@forest.go.kr)

results showed that laccase enzyme activity at untreated wood chip was gradually decreased after 20 days, but enzyme activity with wood chip treatment showed 10 times higher than untreated ones at 60 incubation days. Rate of weight losses of pine chip and rate of lignin loss were 23.4% and 63% by *P. brumalis* during 80 incubation days. Gene expression of *pblac1* from *P. brumalis* was 3 times increased under pine chip treatment at 40 incubation days. Consequently, laccase activity of white rot fungi, *P. brumalis*, was increased at incubation with wood chip and *pblac1* gene was important factor of lignin degradation. Therefore, to regulate lignin degrading enzyme gene expression by using the tools of biotechnology will be able to develop superior strains and it will be useful for pretreatment of lignocellulosic biomass at bioethanol production.

Keywords: polyporus brumalis, white rot fungi, pretreatment

1. 서 론

최근 화석자원의 고갈과 빠르게 증가하는 온실가스(Smeets *et al.* 2007)로 인한 지구온난화 문제를 해결하기 위한 국제적 다양한 협약이 실행됨으로써 친환경적이며 안정적인 에너지 확보가 국가 안보 및 국가 경쟁력 향상과 밀접한 관계를 형성하고 있다. 따라서 에너지 주권확립을 위해 국가차원의 새로운 에너지 생산이 필요한 시점이며 바이오에탄올 생산 기술이 대안이 될 수 있다.

미국 등 다양한 국가에서 바이오에탄올 보급율을 높이기 위한 방안을 마련하고 실행에 들어가 있는 실정이다(Ana, 2008). 그러나 기존의 상업화된 바이오에탄올 생산 공정은 곡물(옥수수, 사탕수수, 감자)을 원료로 사용하므로 식량부족, 국제곡물가격 상승 등의 새로운 문제를 유발하고 있다(Gopalakrishnan *et al.*, 2012). 이런 문제를 해결하기 위해 옥수수대를 비롯한 목질계 바이오매스 자원(Lignocellulosic biomass)을 원료로 하는 바이오에탄올을 생산하고자 하는 연구가 국제적으로 활발히 진행되고 있다(Mosier *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

목질계 바이오매스 자원으로부터 바이오에탄올을 생산하는 과정에서 셀룰로오스와 결합한 리그닌 분자의 물리화학적 1차 분해와 분해효소 투입비용이 전체 생산단가에서 비교적 높은 비중을 차지하고 있다. 이 리그닌을 분해하기 위한 다른 방법으로 저비용이며 친환경적인 방법으로 대두되고 있는 것으로

생물학적 방법을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그중에서 백색부후균은 자연계에서 존재하는 리그닌 분해자로서 목질계 바이오에탄올을 생산하는 과정에서 장애가 되는 리그닌의 난분해적 특성(Chatterjee *et al.*, 2010)을 생물학적으로 분해하는 친환경 소재가 될 수 있다. 몇몇 연구자들에 의해 이러한 시도가 진행되고 있는데, 그중 대표적 백색부후균인 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)을 30일 동안 볏짚(rice straw)에 처리하여 분해함으로써 리그닌을 32.6% 감소시켰고, 당화 및 에탄올 수율을 증가시킨 연구 결과가 보고된 바 있으며(Bak *et al.*, 2009), *Ceriporiopsis subvermispora*를 옥수수대에 처리하여 57.8%의 에탄올의 수율을 얻은 결과가 보고되었다(Wan *et al.*, 2010).

겨울우산버섯은 국내에서 자생하는 백색부후균으로 리그닌 분해효소인 laccase와 MnP를 가지고 있다. 선행 연구에서 겨울우산버섯으로부터 2개의 laccase 유전자를 분리하였다(Ryu *et al.*, 2008). 또한, 겨울우산버섯이 리그닌과 유사한 구조를 가진 DBP(Dibutylphthalate)를 효율적으로 분해할 수 있는 것으로 보고되었다(Lee *et al.*, 2007).

본 연구에서는 리그닌분해효소 과발현과 목질계 바이오매스의 생물학적 전처리에 활용하기 위한 기초 실험으로서 난분해성 물질 및 리그닌의 분해력이 좋은 겨울우산버섯을 이용하여 소나무칩을 분해할 때 리그닌 분해효소인 laccase의 활성변화와 여기에 관여하는 laccase 유전자의 발현 및 소나무칩의 중량

감소율과 리그닌 감소율을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 배양

목재칩 시료는 소나무(*Pinus densiflora*)로 하고 공시균주는 겨울우산버섯(*Polyporus brumalis*)을 사용하였다. 공시균주의 효소 활성측정을 목적으로 박층 고정상(SSC, shallow stationary culture) 액체배지를 사용하였으며, 목재칩의 중량 감소율, 리그닌 함량변화 및 유전자 발현을 보기 위해서 PDA (potato dextrose agar) 고체배지를 사용하였다. SSC 배지는 glucose 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0.5 g, Thiamine-HCl 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0.5 g, 그리고 소량의 무기질 혼합물(MgSO_4 3 g, NaCl 1 g, MnSO_4 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CoCl_2 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CuSO_4 0.1 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, nitriloacetic acid 1.5 g)을 1 ℓ의 증류수에 첨가하여 0.2 μm 여과지를 이용하여 여과 후 배지에 첨가되었으며, pH는 4.5로 조정하였다.

2.2. 리그닌 분해효소 활성 측정

가스멸균된 20 g의 소나무칩이 첨가된 180 ml의 SSC 액체배지에 PDA에서 배양한 공시균주를 블렌더로 마쇄 후 20 ml를 접종하여 70일 이상 배양하며 10일 간격으로 활성을 조사하였다. 효소 활성 측정은 상등액 7.5 μl를 취하여 *o*-tolidine 용액을 넣고 590 nm에서 효소에 의해 산화된 양을 흡광도로 측정하여 laccase 활성을 나타내었다(Guo *et al.*, 2009).

$$\begin{aligned} & \text{Laccase activity (O.D./mg)} \\ & = \text{산화된 } o\text{-tolidine의 흡광도 측정값} / \\ & \quad \text{배양액 내 단백질 양} \end{aligned}$$

2.3. 중량 감소율 분석

7일간 PDA에서 배양된 겨울우산버섯 위에 소나무

칩(70 mm × 30 mm × 5 mm)을 3개씩 올려놓고 계속 배양한 후 20일 간격으로 균과 소나무칩을 각각 회수하였다. 20일 간격으로 회수한 소나무칩을 50 μM sodium acetate buffer 50 ml에 침지하여 4°C에서 24시간 처리하였다. 상등액을 제거한 소나무칩에 50 ml 증류수를 넣고 8시간 이상 2회 침지하여 buffer를 제거하였다(Liew *et al.*, 2011; Jessica *et al.*, 2009). Buffer가 제거된 소나무를 100°C 건조기에 24시간 이상 처리하여 항량이 도달한 후 중량 감소율을 측정하였다.

2.4. 리그닌 분해효소 유전자 발현 조사

중량감소율 분석 실험에서 배양 기간별 회수한 균 중에서 40일차 균을 액체질소로 급게 마쇄한 후 RNA를 분리(RNA extraction kit, NucleoSpin[®] RNA Plant kit)하였다. 분리한 RNA는 Experion[™] RNA StdSens Chips를 이용하여 정량하였다. cDNA를 합성하여 RT-PCR (BIO-RAD, iQ[™]5)을 실시하였다. 95°C 3분간 변성과정을 거쳐 annealing 온도에 맞추어 95°C 10초, 60°C 30초로 40회 반복하여 증폭하고 95°C 1분, 55°C 10초간 처리하였다. Primer는 *pblac1* 5'-CTCGGG TATTTCAAAGGGTTAAG-3', 5'-AATGAGAGGAG GACAAGTAGTC-3'과 *pblac2* 5'-CAACTGAGCGG AGG-3', 5'-GAATGGTGTGATTGTGTAAAGGC3'를 이용하였다.

2.5. 리그닌 감소율 분석

중량 감소율을 측정된 소나무칩을 분쇄기(FRITSCH, pulverisette 14, Germany)를 이용하여 목분으로 만들어 유리병에 넣고 아세톤으로 24시간 담근 후 아세톤과 분쇄된 칩과 분리하여 목분 0.2 g을 klason lignin 정량에 사용하였다. 105°C 오븐에 1일간 완전히 건조시킨 후 무게를 재어 함수율을 계산하였다. 0.2 g의 목분에 72% 황산용액 3 ml를 넣고 10분간 유리막대로 저어 황산용액이 목분에 잘 섞이도록 하여 2시간 동안 목분을 가수분해한 후 110 ml의 증류수를 넣어 황산용액 농도 3%로 희석하였다. Serum bottle의

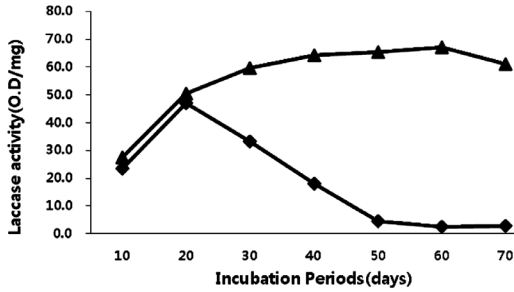


Fig.1. Laccase activities of *P. brumalis* in SSC liquid media. Incubation of *P. brumalis* with pine chips(▲) and Incubation of *P. brumalis* without pine chips(◆). Values shown are the averages from triplicate experiments with each condition.

구멍을 고무 Sleeve cover로 막은 후 Aluminum seal로 덮어 E-Z Crimper로 집어 Serum bottle을 밀폐하고 121°C, 1 Hr 가수분해하였다. 식힌 용액은 1G4 Glass filter에 걸러 가수분해된 목분은 105°C 오븐에서 건조 후 무게를 측정하여 acid insoluble lignin을 구하였다. 여과된 3% 황산용액 UV 205 nm에서 순수한 3% 황산용액으로 Blank를 설정하여 acid soluble lignin을 구하였다. Acid insoluble lignin과 Acid soluble lignin을 더하여 총 Klason lignin의 양을 구하였다. 얻어진 Klason lignin을 바탕으로 control과 비교하여 얼마나 리그닌이 감소되었는지 알아보기 위하여 다음과 같이 리그닌 감소율을 구하였다.

리그닌 감소율 (%) :

$$\frac{\text{처리 전 klason lignin} - \text{처리 후 klason lignin}}{\text{처리 전 klason lignin}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 리그닌 분해효소 활성

목재 내 리그닌을 분해하는 리그닌 분해효소 라카아제의 활성 변화를 조사하기 위해 20 g의 소나무칩이 첨가된 SSC 배지와 칩이 첨가되지 않은 SSC 배지

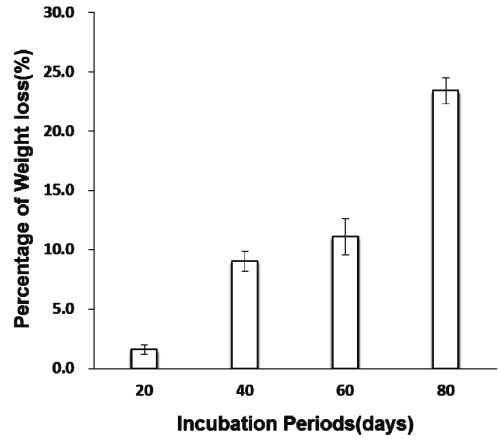


Fig.2. Weight losses of Pine wood chips biodegraded by *P. brumalis* during 20 to 80 incubation days.

에 겨울우산버섯의 균사를 각각 배양하였다. 칩을 처리하지 않은 겨울우산버섯의 laccase 활성은 20일 이후로 감소하는 것을 확인할 수 있는 반면 칩이 있는 배지에서는 활성이 60일까지 완만하게 증가되어 무처리구에 비해 약 10배 이상 높았다(Fig. 1). 이 결과는 판막버섯(*P. chrysosporium*)을 이용한 볏짚(rice straw) 분해 과정에서 리그닌 분해효소 활성 변화와 매우 유사한 양상(Bak et al., 2009)을 보여주는 것으로 리그닌을 포함하고 있는 볏짚과 목재칩에 의해 리그닌 분해효소 활성이 증가되어 리그닌을 분해할 수 있는 것으로 추정된다.

3.2. 목재 중량감소율, 유전자 및 리그닌분해율 분석

PDA 고체배지에서 겨울우산버섯을 선배양한 후 소나무칩(70 mm × 30 mm × 5 mm)을 올려놓고 80일 동안 배양시키면서 20일 간격으로 목재칩의 중량 감소율, 유전자 발현 및 리그닌 함량을 조사하였다. 20일, 40일, 60일 및 80일 배양에서 각각 1.6%, 9.0%, 11.1%, 및 23.4% 중량 감소율을 보였으며, 배양 기간에 따라 중량 감소율이 증가하였다(Fig. 2).

백색부후균의 리그닌 분해효소 활성이 증가하기

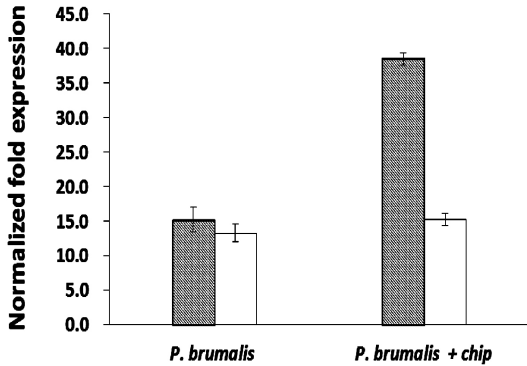


Fig.3. Gene expression of *pblac1* (▨) and *pblac2* (□) in *P. brumalis* during incubation with pine chips. RNA was extracted from mycelium at 40th day after inoculation.

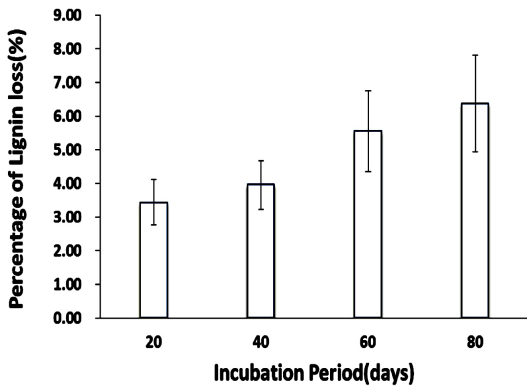


Fig. 4. Lignin content losses of Pine chips bio-degraded by *P. brumalis* during 20 to 80 incubation days.

위해서는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가되어야 하므로 목재칩을 처리한 균사와 처리하지 않은 균사로부터 RNA를 분리하여 선행연구(Ryu *et al.*, 2008)에서 분리한 2개의 laccase (*pblac1*과 *pblac2*) 유전자의 발현을 조사하였다. 소나무칩이 있는 배지에서 *pblac1*의 유전자 발현은 소나무 칩이 없는 배지에 비해 약 3배 증가되었으며 *pblac2*는 큰 차이가 없었다(Fig. 3). 이는 선행연구(Ryu *et al.*, 2008)에서 난분해성 위해물질 존재 유무에 따른 laccase 유전자의

발현 양상 분석 결과 *pblac1* 유전자 발현이 증가함에 따라 라카아제 효소 활성 증가에 주된 역할을 하였다. 이와 유사한 결과로 목재칩에 의해서도 *pblac1* 유전자 발현이 유도되어 다량의 효소가 생산됨으로써 효소 활성이 증가된 것으로 판단된다.

기간별로 배양된 목재를 건조한 후 리그닌 함량을 조사하여 균을 처리하지 않은 목재를 대조구로 하여 리그닌 감소율을 계산하여 리그닌 분해율을 나타내었다. 리그닌 감소율은 20일, 40일, 60일 및 80일에서 각각 3.4%, 4.1%, 5.5% 및 6.3%으로 증량 감소율과 유사한 패턴으로 배양기간에 따라 증가되었다(Fig. 4).

배양 기간과 목재의 시료의 상태는 다르지만 목분을 이용한 분해 연구(Lee *et al.*, 2007)에서의 결과와 비교하면 45일 후 겨울우산버섯에 의한 소나무 목분의 증량 감소율과 리그닌 감소율은 9.9%와 11.6%로 증량 감소율은 본 실험에서 40일 결과와 유사하지만 리그닌 감소율은 다소 높았다. 소나무 목분의 경우, 표면적이 목재칩 형태보다 넓기 때문에 겨울우산버섯 리그닌 분해효소의 접근성이 용이하여 셀룰로오스를 둘러싸고 있는 리그닌을 보다 쉽게 분해할 수 있었던 것으로 추정된다.

리그닌 함량이 낮은 벧짚(rice straw)의 경우 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)의 배양 30일 후 리그닌이 32.6% 분해되어(Bak *et al.*, 2009) 이는 본 연구에서 사용한 소나무 목질칩보다 훨씬 높은 리그닌 분해율을 보였다. 같은 방법으로 옥수수 대를 *Ceriporiopsis subvermispora*으로 18일 동안 분해하였을 때 목재 파티클의 크기와 함수율에 따라 리그닌 함량이 0.08%에서 31.59%까지 분해율의 차이를 보였다(Wan *et al.*, 2010). 이런 결과로 리그닌 분해율은 백색부후균의 종류에 따른 리그닌 분해효소 활성의 영향도 있으며, 분해 대상 시료의 종류나 크기 그리고 함수율 및 온도 같은 배양 조건 등 다양한 요인에 의해 리그닌 분해율 차이가 있으므로 목질계 바이오 에탄올 수율을 높이기 위해서는 리그닌을 분해하는 전처리 과정에서 적절한 조건을 찾는 것이 필요하다고 판단된다.

4. 결 론

목재 내 리그닌을 분해하는 리그닌 분해효소 라카아제의 활성 변화를 조사하였는데 소나무칩이 첨가된 SSC 배지에서 리그닌 분해효소의 활성이 60일까지 완만하게 증가되어 무처리구에 비해 약 10배 이상 높았다. 이는 배지 외 리그닌을 포함하고 있는 목재칩에 의해 리그닌 분해효소 활성이 증가된 것으로 판단된다.

PDA 고체배지에서 소나무칩에 겨울우산버섯을 목재칩의 중량 감소율, 유전자 발현 및 리그닌 함량을 조사한 결과, 배양 기간에 따라 중량 감소율이 증가하였고, 소나무칩이 있는 배지에서의 *pblacI*의 유전자 발현은 소나무 칩이 없는 배지에 비해 약 3배 증가되었으며, 리그닌 감소율은 중량감소율과 유사한 패턴으로 배양기간에 따라 증가되었다. 이는 목재칩에 의해 *pblacI* 유전자 발현이 유도되어 다량의 효소가 생산됨으로써 효소 활성이 증가되었고, 그에 따라 중량 감소율과 리그닌 분해율이 높아진 것으로 판단된다.

따라서, 위의 결과를 바탕으로 wild type인 백색부후균 외에 라카아제 유전자가 과발현된 형질전환체를 이용하여 목재 내 성분인 리그닌을 분해하는 전처리 효율을 높혀 목질계 바이오에탄올 수율 증가 등의 효과를 볼 수 있으리라 기대하고 있다.

참 고 문 헌

1. Ana, S. 2008. Development and Utilization of Sorghum as a Bioenergy Crop. Genetic Improvement of Bioenergy Crops. 2: 211~248.
2. Bak, J. S., Ja K. K., and I-G. Choi. 2009. Fungal Pretreatment of Lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to Produce Ethanol from Rice Straw. Biotechnology and Bioengineering 104(3): 471~482.
3. Chatterjee, S., and P. Karlovsky. 2010. Removal of the Endocrine Disrupter Butyl Benzyl Phthalate from the Environment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 61~73.
4. Gopalakrishnan, K., J. Van Leeuwen, and R. C.

- Brown. 2012. Assessing the Environmental Risks and Opportunities of Bioenergy Cropping Sustainable. Bioenergy and Bioproducts Green Energy and Technology. 189~212.
5. Guo, L.-Q., S.-X. Lin, X.-B. Zheng, Z.-R. Huang, and J.-F. Lin. 2010. Production, Purification and Characterization of a Thermostable Laccase from a Tropical White-rot Fungus. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 731~735.
6. Jessica M. A., J. A. Gallagher, and I. S. Donnison. 2009. Fermentation Study on *Saccharina latissima* for Bioethanol Production Considering Variable Pre-treatments. Journal of Applied Phycology 21: 569~574.
7. Kumar, P., DM. Barrett, MJ. Delwiche, and P. Stroeve. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Industrial & Engineering Chemistry Research 48: 3713~3719.
8. Lee, J.-W., K.-S. Gwak, J.-Y. Park, M.-J. Park, D.-H. Choi, M. Kwon, and I.-G. Choi. 2007. Biological Pretreatment of Softwood *Pinus densiflora* by Three White Rot Fungi. The Journal of Microbiology 45(6): 485~491.
9. Liew, C. Y., A. Husaini, H. Hussain, S. Muid, K. C. Liew, and H. A. Roslan. 2011. Lignin Biodegradation and Lignolytic Enzyme Studies during Biopulping of *Acacia mangium* Wood Chips by Tropical White Rot Fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 1457~1468.
10. Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, and M. Holtzapple. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology 96(6): 673~676.
11. Ryu, S.-H., A.-Y. Lee, and M. k. Kim. 2008. Molecular Characteristics of Two Laccase from the Basidiomycete Fungus, *Polyporus brumalis*. The Journal of Microbiology 46(1): 62~69.
12. Edward M. W. S. and P. C. F. André. 2007. Bioenergy Potentials from Forestry in 2050. An Assessment of the Drivers that Determine the Potentials. Climatic Change. 81: 353~390.
13. Wan, C. and Y. Li. 2010. Microbial Pretreatment

- of Corn Stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Production. *Bioresource Technology* 101: 6398~6403.
14. Yang, X., F. Ma, Y. Zeng, H. Yu, C. Xu, and X. Zhang. 2010. Structure Alteration of Lignin in Cornstover Degraded by White-rot Fungus, *Irpex lacteus* CD2. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64: 119~123.