

Remazol Brilliant Blue R 탈색능과 리그닌 분해 효소시스템을 이용한 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주 선별*1

홍창영*2 · 김호용*2 · 장수경*2 · 최인규*2,3†

Screening of Outstanding White Rot Fungi for Biodegradation of Organosolv Lignin by Decolorization of Remazol Brilliant Blue R and Ligninolytic Enzymes Systems*1

Chang-Young Hong*2 · Ho-Yong Kim*2 · Soo-kyeong Jang*2 · In-Gyu Choi*2,3†

요 약

본 연구에서는 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템을 이용하여, 다양한 균주 중에서 목질계 바이오매스 유기용매 전처리 과정에서 발생한 리그닌(유기용매 리그닌)의 생분해에 적합한 우수 균주를 선별하고자 하였다. 우선 분양받은 15개의 백색부후균을 대상으로 shallow stationary cultur (SSC)배지와 malt extract broth (MEB)배지에 유기용매 리그닌의 첨가에 따른 Remazol Brilliant Blue R (RBBR)의 흡광도 변화를 측정하였다. RBBR 탈색능 결과, SSC 배지에서 *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Ceriporia lacerate*, *Fomitopsis insularis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum* 등 6종의 백색부후균에서 급격한 흡광도 변화를 나타냈다. 배양 초기에 급격한 흡광도 변화를 나타낸 6개의 백색부후균을 대상으로 균체 외 단백질 농도 및 리그닌 분해 효소 활성을 측정하였다. 선발된 6개의 균 중에서 *S. hirsutum*과 *P. chrysosporium*은 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 높은 단백질 농도가 측정되었다. 반면, 리그닌 분해 효소 활성은 *F. insularis*에서 배양 6일째에 manganese peroxidase (MnP) 활성이 1,545 U/mg, laccase 활성은 1,259 U/mg으로 최고 활성을 나타냈다. 결론적으로, 균체 외 단백질 농도 및 리그닌 분해 효소 활성이 전반적으로 높았던 STH*와 MnP 및 laccase의 활성이 가장 높은 FOI가 유기용매 리그닌 생분해에 유리하게 작용할 것으로 판단된다.

*1 접수 2012년 11월 12일, 채택 2013년 1월 9일

*2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Department of Forest Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*3 농업생명과학연구원. Research Institute for Agriculture and Life Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

ABSTRACT

In this study, outstanding white rot fungi for biodegradation of organosolv lignin were selected on the basis of their ligninolytic enzyme system. Fifteen white rot fungi were evaluated for their ability to decolorize Remazol Brilliant Blue R (RBBR) in SSC and MEB medium, respectively. Six white rot fungi (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Ceriporia lacerate*, *Fomitopsis insularis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus brumalis*, and *Stereum hirsutum*) decolorized RBBR rapidly in SSC medium within 3 days. The protein contents as well as the activities of manganese peroxidase (MnP) and laccase for 6 selected fungi were determined on the SSC medium with and without organosolv lignin. Interestingly, extracellular protein concentrations were determined to relative higher for *S. hirsutum* and *P. chrysosporium* in the presence of organosolv lignin than others. On the other hands, each fungus showed a different ligninolytic enzyme pattern. Among them, *F. insularis* resulted the highest ligninolytic enzyme activities on incubation day 6, indicating of 1,545 U/mg of MnP activity and 1,259 U/mg of laccase activity. In conclusion, STH* and FOI were considered as outstanding fungi for biodegradation of organosolv lignin, because STH* showed high extracellular protein contents and ligninolytic enzyme activities over all, and ligninolytic enzyme activities of FOI were the highest among white rot fungi used in this study.

Keywords: white rot fungi, ligninolytic enzyme systems, MnP, laccase, organosolv lignin

1. 서 론

최근 인구 증가 및 에너지 소비의 증가에 따른 환경 문제로 인해 기존의 화석 에너지를 대신할 새로운 대체 에너지의 개발에 대한 요구가 지속적으로 증가함에 따라 목질계 바이오매스를 이용한 대체 에너지 연구가 현재 각광받고 있다(Hamelinck *et al.*, 2005; Mason, 2007). 이에 따라 목질계 바이오매스의 변환 공정상에서 생성되는 리그닌을 포함한 다양한 부산물을 활용하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다(Stewart, 2008).

목질계 바이오매스의 구성 성분 중 하나인 리그닌은 지금까지 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하는데 있어 저해 인자 또는 저부가가치의 부산물로 간주되었다. 하지만 목질계 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산 증가와 함께 생성된 리그닌에 대한 고부가가치화에 대한 관심이 증대되면서 리그닌을 천연 고분자로 직접 이용하거나 바이오리파이너리 공정 도입을 통하여 리그닌 유래 유용 화합물을 생산하고자 하는 연구가 현재 진행 중에 있다(Sahoo *et al.*,

2011; Stewart, 2008).

이러한 리그닌 변환 공정 중 하나인 미생물을 이용한 리그닌 변환 공정은 낮은 에너지 소모와 함께 친환경 공정으로 그 파급효과가 클 것으로 예상된다.

리그닌을 변환시킬 수 있는 대표적인 미생물인 목재부후균은 박테리아와는 달리 복합적인 효소시스템을 바탕으로 비특이적으로 빠르고 광범위하게 기질과 반응하므로 리그닌으로부터 다양한 산물을 생성할 수 있다(Martínez *et al.*, 2005).

담자균류에 속하는 목재부후균은 목재를 부후시키는 형태에 따라 백색부후균과 갈색부후균으로 나뉘며, 백색부후균은 목재 내 리그닌을 분해시켜 부후가 진행되면서 백색으로 변하는 형태학적 특징을 가지고 있다. 반면 갈색부후균은 목재 내 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 먼저 분해시켜 리그닌이 잔류하게 되어 부후가 진행되면서 목재는 갈색을 띠게 된다(Schmidt, 2006).

이 중 백색부후균은 특징적인 리그닌 분해효소 시스템을 가지고 리그닌을 선택적으로 생분해한다. 대표적인 리그닌 분해 효소로는 lignin peroxidase

Table 1. White rot fungi

No.	White rot fungi (species)	Abbreviation
1	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (KUC 8904)	CES
2	<i>Crustoderma flavescens</i> (KUC 8001)	CRF
3	<i>Ceriporia</i> sp. ZLY-2010	CER
4	<i>Ceriporia lacerate</i> (KUC 8090)	CEL
5	<i>Coriolus consors</i> (#20271)	COC
6	<i>Fomitopsis insularis</i> (#48)	FOI
7	<i>Heterobasidium</i>	HEI
8	<i>Lentinus edodes</i> (600)	LEN
9	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PCH
10	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (KCTC 6728)	PCH6728
11	<i>Polyporus brumalis</i> (KFRI 20912)	POB
12	<i>Pleurotus ostreatus</i> (JPN)	PLO
13	<i>Stereum hirsutum</i> (KFRI 234)	STH
14	<i>Trametes versicolor</i> (JPN)	TRA
15	<i>Stereum hirsutum</i> *	STH*

(LiP: EC 1.11.1.14), manganese dependent peroxidase (MnP: EC 1.11.1.13), laccase (Lac: EC 1.10.3.2) 가 있으며 효소분류학적으로 산화·환원 효소에 속한다(Schmidt, 2006). LiP와 MnP는 과산화수소 존재 하에 phenoxy radical과 cation radical을 형성함으로써 리그닌 분해를 유도한다. LiP는 주로 lignin의 C-C 결합의 분해를 야기하며, benzyl alcohol을 aldehydes 및 ketones으로 산화시키기도 한다. MnP는 Mn²⁺를 Mn³⁺로 산화시키며 Mn³⁺가 지니고 있는 에너지가 비특이적으로 단일 전자 전달을 유도함으로써 폐놀성 물질의 수산화기에서 phenoxy radical을 형성하여 리그닌 분해를 유도한다. Lac의 경우에는 phenol oxidase로 과산화수소 없이 산소 하에서 리그닌 분해반응을 유도한다(Schmidt, 2006; Tien, 1987). 이러한 백색부후균의 복합적인 리그닌 분해 효소 시스템은 비특이적인 반응을 유도함에 따라 동시 다발적으로 리그닌을 분해한다고 알려져 있다(Hammel *et al.*, 1993; Wariishi *et al.*, 1991).

대부분의 리그닌 분해 효소 시스템에 대한 연구는 지금까지 주로 *Phanerochaete chrysosporium*을 중심으로 진행되어 왔으며, 따라서 많은 연구자들은 다른 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템에 대한 연

구가 필요하다고 강조하고 있다(De Jong *et al.*, 1992; Nerud *et al.*, 1991; Vyas, 1995 & Molitoris, 1995). 다양한 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템에 대한 연구를 진행하기 위해 Poly B-411, Poly R-478, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) 등과 같은 염료를 이용한 균주 선별 방법이 많이 이용되었다(Glenn & Gold, 1983; Machado *et al.*, 2005). 특히 RBBR은 산업용 염료중 하나로, 화학적으로 안정하며, 수용성, 저렴한 가격, 낮은 독성 등의 특징을 바탕으로 담자균류의 리그닌 분해 효소 활성 지표로 이용되어 왔다(Machado *et al.*, 2005).

이러한 내용을 바탕으로, 본 연구에서는 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템을 이용하여 리그닌으로부터 고부가가치 화합물을 생성하기 위해, 우선 리그닌 생분해 우수 균주를 선별하고자 하였다. 백색부후균에 의한 RBBR의 탈색능을 비교하고, 대표적인 리그닌 분해 효소 활성을 측정함으로써 백색부후균의 종류에 따른 리그닌 분해 효소 시스템을 평가하였다. RBBR의 탈색능과 리그닌 분해 효소 활성의 결과를 종합하여 최종적으로 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주를 선별하고자 하였다.

Table 2. Composition of SSC media (per 1 l distilled water)

Component	Concentration
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1%
Ammonium tartrate (C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆)	108 mM
KH ₂ PO ₄	14.7 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	203 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.68 mM
Thiamine · HCl	297 mM
Trace element solution (홍창영, 2010)	10 ml/liter

Table 3. Composition of MEB media (per 1 l distilled water)

Component	Concentration
Malt extract base	0.6%
Maltose	0.18%
Dextrose	0.6%
Yeast extract	0.12%

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 연구에서 사용한 목재부후균은 백색부후균으로서 PDA배지에서 28°C, 7일 동안 선배양 시켰으며, 생장 후 4°C에서 보관하였다. 임의로 선택된 백색부후균은 총 15가지로 Table 1과 같다. *Ceriporiopsis subvermispora* (KUC 8904)와 *Crustoderma flavesescens* (KUC 8001), *Ceriporia lacerate* (KUC 8090)은 고려대학교에서 분양받았으며, *P. chrysosporium* (KCTC 6728)은 한국생명공학연구원 생물자원센터에서, *Polyporus brumalis* (KFRI 20912)와 *Stereum hirsutum* (KFRI 234)는 국립산림과학원에서 분양받았다. 그리고 나머지는 본 실험실에서 보유하고 있는 균주이다.

본 연구에서 사용한 유기용매 리그닌은 백합나무 *Liriodendron tulipifera*를 이용한 유기용매 전처리 공정에서 리그닌 생산 최대 수율을 나타낸 조건인 50% 에탄올, 1.6% H₂SO₄을 촉매로 사용하여 151°C에서 16분 동안 반응시켜 획득한 리그닌이다.

2.2. RBBR을 이용한 백색부후균의 탈색능

15개의 백색부후균은 shallow stationary culture (SSC) 배지와 malt extract broth (MEB) 배지에 접종시켰으며, 그 조성은 Table 2와 Table 3과 같다. 50 ml 삼각플라스크에 배지를 9.88 ml씩 넣고 sili stopper로 막은 뒤 121°C에서 15분간 멸균하였다.

SSC 배지의 경우, thiamine HCl과 trace element solution을 0.2 µm filter로 여과 후 0.12 ml을 첨가하였다.

각각 플라스크에 100 µM RBBR과 유기용매 리그닌 100 ppm이 되도록 첨가하였다. 그리고 균사 전건 무게가 0.005 g이 되도록 균사 현탁액을 접종한 후, 0.1 mM H₂O₂의 첨가와 함께 반응을 시작하여, 28°C 배양기에서 정지 배양시켰다. 유기용매 리그닌 첨가 후, 각 1, 2, 3, 5일에 원심분리기(12,000 rpm, 15분, 4°C)와 0.2 µm cellulose acetate filter를 이용하여 얻어진 상층액을 UV 분광광도계(Shimadzu 1601P, Japan)를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Chemical Co., USA)을 표준시약으로 이용하여 Bradford 방법을 통해 측정하였다(Bradford, 1976). 반응 혼합물은 Bradford 용액 1 ml에 샘플 용액 0.1 ml을 첨가하여 반응시켰으며, 1시간 내에 UV를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 균체 외 효소 활성

균체 외 효소 활성 측정 방법은 RBBR 탈색능 실험과 같은 방법으로 진행되었으며, 배지는 SSC배지를 사용하였다. 배지에 0.005 g 균사 현탁액을 첨가한 후, 2일 동안 선배양하여 100 ppm 유기용매 리그닌을 첨가하였다. 유기용매 리그닌의 첨가 여부에 따라 대조구와 실험구, 두 가지로 구분하였다.

유기용매 리그닌 첨가 후, 각각의 배양 일에 원심분리기(12,000 rpm, 15분, 4°C)를 이용하여 얻어진 상층액을 통해 15일 동안 2일 간격으로 효소 활성을

Remazol Brilliant Blue R 탈색능과 리그닌 분해 효소시스템을 이용한 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주 선별

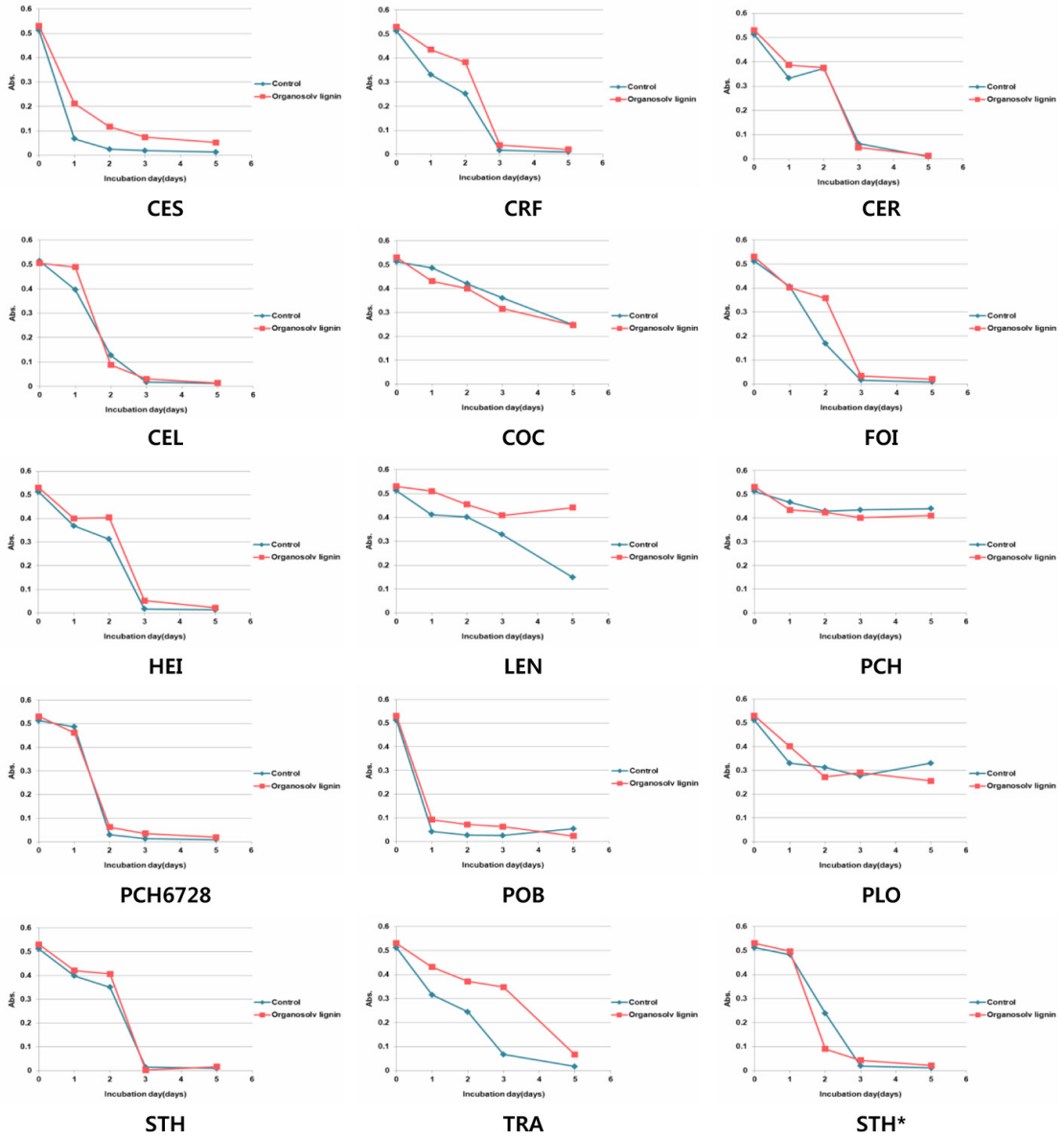


Fig. 1. RBBR decolorization by white rot fungi in SSC medium as determined by UV spectrophotometer at absorbance 593 nm.

측정하였다.

Manganese peroxidase (MnP) 활성은 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)을 기질로 사용하였다. 0.2

M lactate buffer (pH 4.5) 0.8 ml에 50 μl ABTS (0.8 g/l), 33 μl 6 mM MnSO_4 그리고 100 μl 상층액을 첨가한 후, 17 μl 0.1 mM H_2O_2 를 첨가하여 반응을 시작하였다. 30분 동안 반응시킨 후 420 nm에서

흡광도를 측정하였으며, 효소 활성은 아래의 식을 통해 계산하였다(Krčmář, 1999; Lee, 2005).

$$\text{MnP activity (unit/mg)} = \frac{\Delta \text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume}}{\Delta \text{time} \times \epsilon_{420} \times \text{Sample weight}}$$

Laccase 역시 ABTS를 기질로 사용하였으며, 0.85 ml 0.2 M lactate buffer (pH 4.5)에 50 μl ABTS 그리고 100 μl 의 상층액을 3분간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 활성은 아래의 식을 통해 계산하였다(Krčmář, 1999; Lee, 2005; Lee *et al.*, 2007).

$$\text{Laccase activity (unit/mg)} = \frac{\Delta \text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume}}{\Delta \text{time} \times \epsilon_{420} \times \text{Sample weight}}$$

3. 결과 및 고찰

3.1. RBBR을 이용한 백색부후균의 탈색능

백색부후균에 의한 RBBR의 탈색능을 이용하여 15개의 백색부후균에 대한 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주를 선별하고자 하였다. 이전까지 우수 균주 선별 방법으로 이용했던 기질에 대한 성장속도 및 저항성 테스트는 기질의 생분해와 관련된 백색부후균의 효소 시스템을 이해하기에는 부족하므로, 본 연구에서는 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템을 바탕으로 쉽게 이용 가능하며, 리그닌 분해 효소 활성에 따라 색 변화를 나타내는 염료 중 하나인 RBBR을 이용하여 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주를 선별하고자 하였다(Glenn & Gold, 1983).

Remazol Brilliant Blue R (RBBR)을 이용하여 15개의 백색부후균에 의한 탈색능을 살펴본 결과, SSC 배지에서는 몇몇의 백색부후균을 제외하고 일반적으로 배양 2일에서 3일 사이에 흡광도가 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 특히 POB의 경우, RBBR의 첨가와 함께 배양 1일째부터 급격한 흡광도의 변

화를 나타냈으며, CES, CEL, PCH6728 그리고 STH* 역시, 배양 2일째에 0에 가까운 흡광도를 나타냈다. 하지만 이들 대부분은 대조구에서 더 많은 흡광도의 감소를 나타낸 반면, STH*의 경우 이들과 달리 대조구에 비해 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구의 흡광도 변화가 더 급격한 것으로 나타났다.

MEB 배지의 경우, SSC배지의 결과와 비슷한 경향을 나타냈으며 CES, CRF, CEL, STH 등에서 급격한 흡광도의 변화를 나타냈다(Fig. 2). 하지만 SSC 배지에서 2~3일 사이에 급격한 변화를 나타낸 것에 비해 MEB 배지에서는 4일 이후에 흡광도가 감소하는 것으로 나타났으며, 그 변화 정도가 덜하다.

RBBR은 반응성이 좋은 anthraquinone을 기본으로 한 염료로, 이들은 안정적이며, 순도가 높고, 분광광도계를 이용해 쉽게 측정이 가능하다는 특징을 가지고 있다. 또한 리그닌 구조와 비슷한 구조를 가짐에 따라 리그닌 분해 효소 활성 측정에 이용된다(Novotný *et al.*, 2001). Vyas and Molitoris (1995)는 백색부후균 *Pleurotus ostreatus*에서 분비되는 MnP 및 laccase 등에 의해 RBBR의 탈색 현상이 나타난다고 보고하였으며, Machado *et al.* (2005)은 RBBR을 이용하여 담자균류의 리그닌 분해효소 시스템을 연구하였다. 물론 리그닌과 상용화 염료 사이에는 물리적 성질의 차이가 있지만, 백색부후균에 의한 리그닌 분해 시스템과 염료의 탈색 시스템 둘 다 공통적으로 백색부후균의 이차 대사과정을 통해 일어난다. 다시 말해서, 백색부후균은 리그닌 분해 효소에 의한 촉매시스템을 바탕으로, 두 기질에 대해 수산화기 라디칼을 형성함으로써 생분해를 야기하는 것이다(Glenn & Gold, 1983).

이렇게 상용화 염료인 RBBR을 이용한 균주 선별 방법을 통해 본 연구에서는 균에 따른 다른 효소 시스템을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 *P. chrysosporium*을 이용한 이전의 연구 결과와 달리, 두 *P. chrysosporium* 균주 중 PCH 6728에서만 급격한 흡광도 감소를 나타냈으며, *P. chrysosporium* 외에 다른 백색부후균에서 더 빠른 RBBR 탈색능을 나타냈다. 이전까지는 *P. chrysosporium*이 생분해 연구에 있어 우수한 균주로 평가받았지만, 백색부후균은 종류

Remazol Brilliant Blue R 탈색능과 리그닌 분해 효소시스템을 이용한 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주 선별

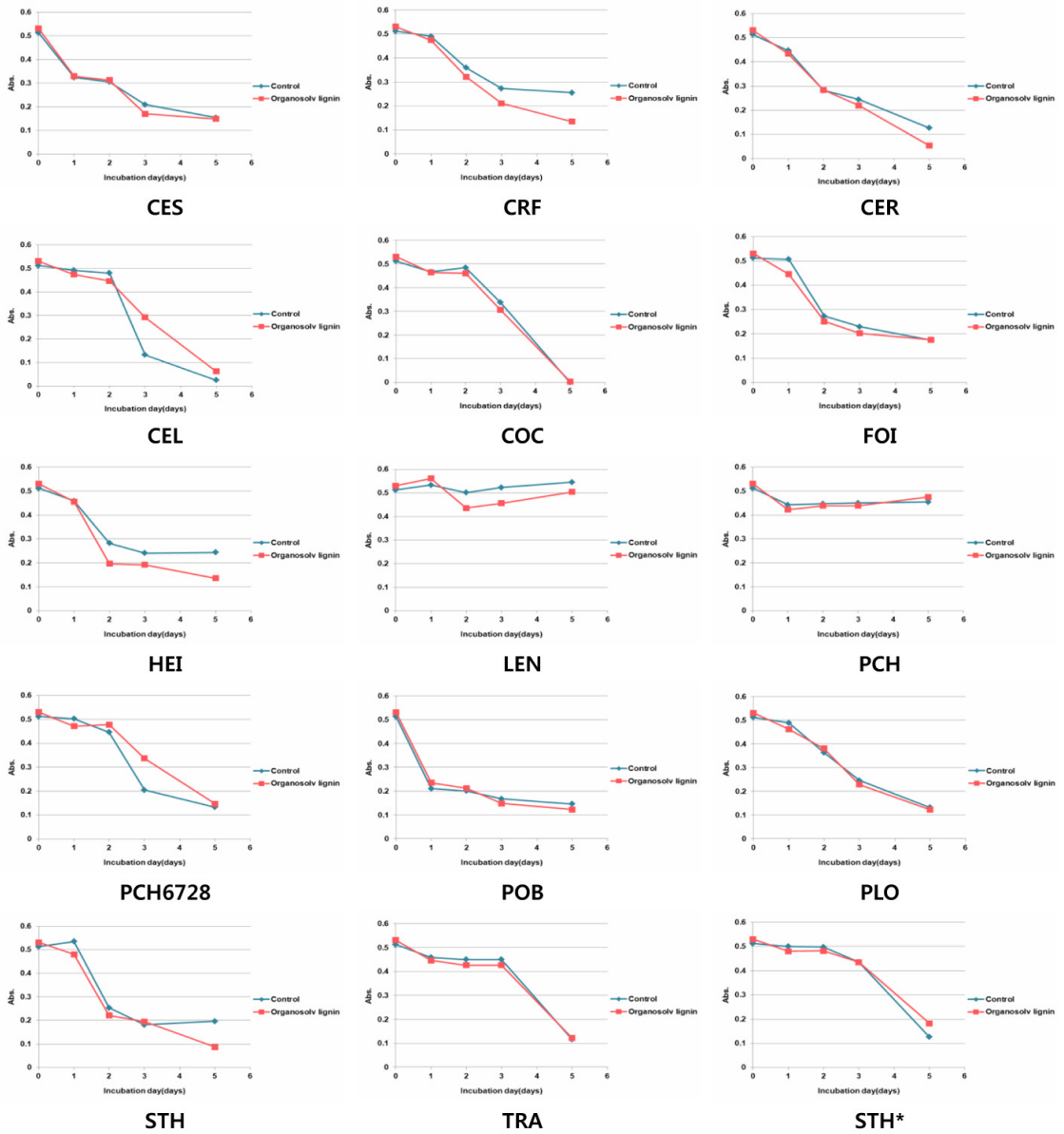


Fig. 2. RBBR decolorization by white rot fungi in MEB medium as determined by UV spectrophotometer at absorbance 593 nm.

에 따라 다른 효소 시스템을 가지며, 환경에 따라서 기질 분해능이 다르게 나타난다고 보고된 바 있기 때문에 이러한 결과가 나타난 것으로 판단된다(Beaudette

et al., 1998; Pointing, 2001; Tekere *et al.*, 2001). 그리고 본 연구 결과에서는 배지의 조성성분에 따라 백색부후균의 효소 활성이 다르게 나타났음을 확

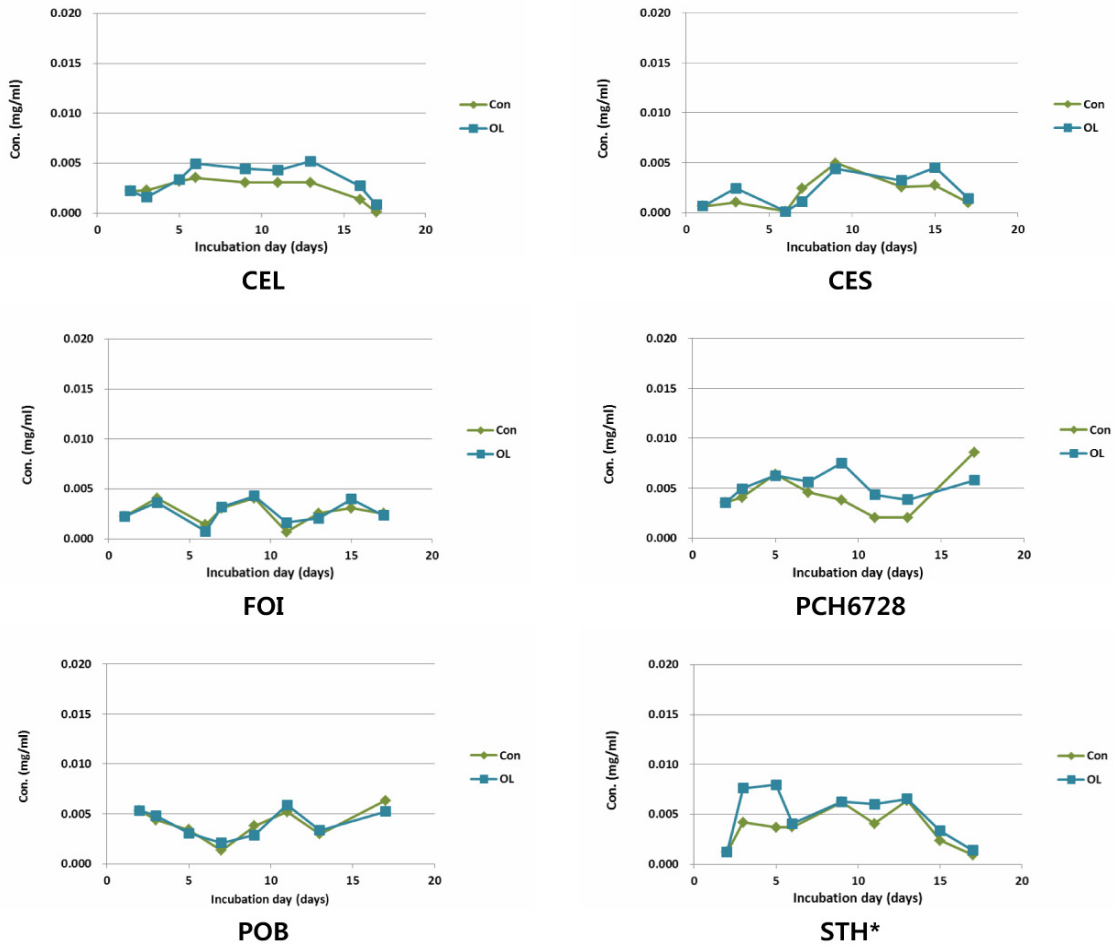
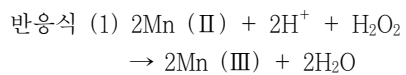


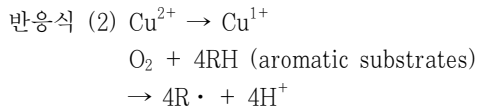
Fig. 3. Extracellular protein contents of selected white rot fungi in culture medium.

인할 수 있었다. SSC배지에서는 MEB배지와 달리 더 급격한 RBBR 탈색능을 보였는데, 이는 두 배지 구성성분의 차이에 따른 백색부후균의 효소시스템에 미치는 영향이 달랐기 때문이다. 일반적으로 SSC배지는 질소제한배지 중 하나로, 백색부후균의 리그닌 분해 효소 분비를 증가시킨다고 알려져 왔다. SSC배지의 구성성분을 살펴보면(Table 2), glucose 외에 다양한 무기원소들이 포함되어 있는 것을 확인할 수 있다. 특히 trace element solution에는 Mg, Mn, F, Co, Ca, Cu, Zn, Mo, Al까지 다양한 원소가 함유되어 있으며, 이러한 성분들은 리그닌 분해 효소 활성

을 증가시킨다고 보고된 바 있다(Tien, 1987). 특히 SSC배지에서의 Cu와 Mn은 MnP와 laccase 활성에 영향을 미친다. MnP의 경우, Mn^{2+} 를 Mn^{3+} 로 산화시키는데, Mn^{2+} 가 *mnp* 유전자 전사를 조절하여 MnP의 발현을 야기시킨다. 따라서 아래의 반응식과 같이 Mn에 영향을 받아 산화 반응을 유도하게 되는 것이다(Bonnarme & Jeffries, 1990; Wong, 2009).



Laccase는 multi copper (Cu) 효소 그룹에 속하는 효소로, 효소 내 보조인자인 Cu에 의해 기질의 라디칼 형성을 유도하면서 산화반응을 일으킨다(반응식 (2)) (Wong, 2009). 이러한 시스템을 가진 laccase는 배지 성분에 따라 laccase 유전자 발현이 다르게 나타나며, 특히 Cu를 함유한 배지에서 기존보다 높은 활성 및 효소 안정성을 나타낸다고 보고되었다 (Baldrian & Gabriel, 2006; Faraco *et al.*, 2003).



이러한 내용을 바탕으로, SSC 배지에서 RBBR의 빠른 탈색은 trace element solution에 함유되어 있는 무기원소의 작용에 따른 효소 활성의 증가에 의한 것으로 판단된다.

그리고 위에서 언급했듯이, SSC배지는 MEB배지에 비해 질소가 덜 함유된 배지로, 질소는 백색부후균의 리그닌 분해 효소 생산에 매우 중요한 요소라고 널리 알려져 있다(Bonnarme & Jeffries, 1990; Buswell *et al.*, 1995). 이전 연구에서는 배지 내 질소 성분이 다른 성분으로 전환됨에 따라 균체 외 리그닌 분해 효소의 농도가 증가하며, 배지 내 질소가 많이 함유된 상태에서 균체 외 효소의 생산을 증가시키는 것이 어렵다고 보고하였다(Bonnarme & Jeffries, 1990; Fenn & Kent Kirk, 1981). 또한 암모늄 이온(NH_4^+)의 첨가는 리그닌 분해 효소 활성을 일시적으로 저해한다(Fenn *et al.*, 1981; Keyser *et al.*, 1978). 암모늄 이온(NH_4^+)은 *P. chrysosporium*을 포함한 다양한 균에서 NADP-glutamate dehydrogenase의 활성을 증가시키며, 이는 균의 이차 대사와 관련된 효소 분비에 영향을 미친다고 보고되었다(Hynes, 1974; Keyser *et al.*, 1978). 뿐만 아니라 배지 내 질소화합물의 첨가는 미생물의 경쟁적 질소 대사를 야기함에 따라, 리그닌 생분해와 관련된 주요 효소의 보조인자를 생화학적으로 억제하므로 이러한 결과를 나타낸 것으로 사료된다(Keyser *et al.*, 1978).

따라서 SSC 배지의 경우, trace element solution

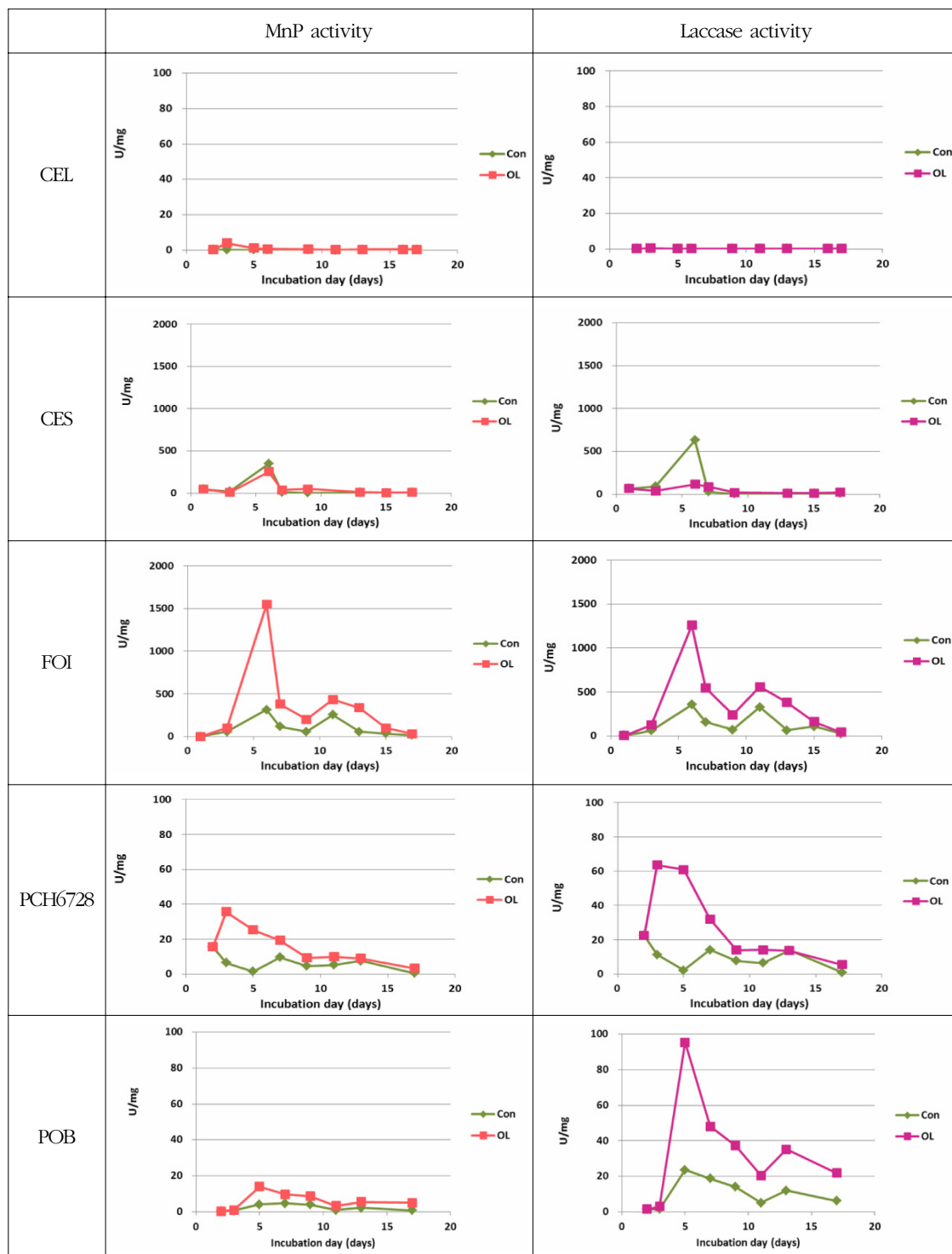
에 함유되어 있는 무기원소의 작용 및 질소의 빠른 전환과 함께 리그닌 분해 효소의 활성이 증가됨에 따라 RBBR의 탈색능이 빨리 나타난 것으로 판단된다.

3.2. 유기용매 리그닌 첨가에 따른 단백질 정량 및 효소 활성

RBBR의 탈색능 연구 결과를 바탕으로, 급격한 탈색능을 보이면서 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 더 높은 탈색능을 보인 균주를 선발하여 리그닌 분해 효소 활성 및 단백질 정량을 실시하였다. SSC 배지에서 단시간에 급격한 탈색능을 보인 6개의 균주를 선택하여, SSC배지에서 실험을 진행하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이, 균체 외 단백질 농도는 선발된 6개의 균주에서 비슷한 경향을 보였다. 단백질 농도의 경우, 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 더 높은 농도를 나타냈으며, 특히 STH*와 PCH6728은 유기용매 리그닌 첨가 시 변화가 크게 나타났다. STH*의 경우, 유기용매 리그닌의 첨가와 함께 단백질 농도가 급격히 증가하였으며, PCH6728은 첨가 후 2일 후부터 높은 농도를 유지하였다. 그리고 CEL은 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 미세하지만 더 높은 농도를 유지하는 경향을 보였다. 이외에 다른 균주들은 대조구와 실험구 사이에 큰 차이를 보이지 않았다.

하지만 균체 외 효소 활성을 측정해본 결과, 선발된 6개의 균주에 따라 매우 다른 MnP 및 laccase 활성을 나타냈다. 우선 균체 외 단백질 농도 결과에서 대조구와 실험구 사이에 큰 차이를 보이지 않았던 FOI는 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 배양 6일째 MnP 활성이 1.545 U/mg, laccase 활성은 1.259 U/mg으로 최고 활성을 나타냈다(Fig. 4). 그러나 CEL의 경우, 균체 외 단백질 농도에서는 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 높은 농도를 유지했던 반면, MnP와 laccase활성은 배양 3일째에 3.85 U/mg, 0.41 U/mg으로 매우 낮은 활성을 나타냈다. PCH6728과 STH*은 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구의 균체 외 단백질 농도가 다른 백색부후균에 비해 높았지만, MnP 및 laccase 활성은 FOI에 비해 낮게



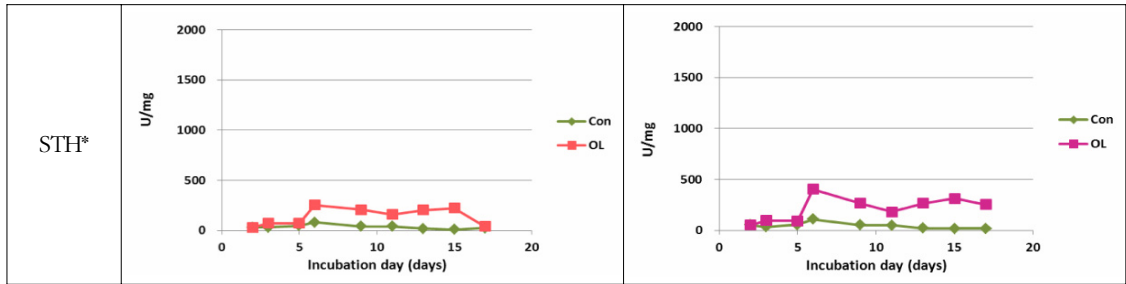


Fig. 4. Extracellular enzymes activities of selected white rot fungi in culture medium.

나타났다(Fig. 4).

본 연구 결과를 통해, 선발된 백색부후균의 균체 외 효소시스템에 대한 전반적인 이해를 할 수 있었다.

우선 첫 번째로, 균의 종류에 따라 서로 다른 효소 시스템을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 균체 외 단백질 농도의 경우, 대체적으로 6개 균에서 큰 차이를 보이지 않았지만 MnP와 laccase 활성 측정 결과, 그 활성의 차이가 크게는 3,000배 이상으로 나타났다. 이렇게 균체 외 단백질 농도는 비슷한 경향을 보였지만, 리그닌 분해 효소 활성에서 매우 다른 결과가 나타난 것은 MnP 및 laccase 외에 다른 효소의 작용이 있었기 때문이라고 사료된다. 균이 분비하는 균체 외 효소에는 MnP, laccase뿐 아니라, 대표적으로 glyoxal oxidase (E.C. 1.2.3.5), aryl alcohol oxidase (E.C. 1.1.3.7), 그리고 glucose oxidase (E.C. 1.1.3.4) 등이 있다(Pointing, 2001). 그리고 아직 연구가 활발히 진행되지 않은 백색부후균의 경우 리그닌 분해 효소 외에 다른 다양한 효소를 분비했을 가능성이 있기 때문에 기존과 다른 효소 시스템이 작용했을 것이라 사료된다. 결론적으로 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 연구를 계속적으로 진행하는데 있어 MnP, laccase뿐 아니라 다른 효소 시스템의 관여 가능성도 항상 염두해 두어야 한다고 생각한다.

그리고 다음으로, 리그닌 분해 효소 활성과 RBBR 탈색능 결과를 종합해보면, 선발된 백색부후균의 리그닌 분해 효소 활성은 유기용매 리그닌의 첨가와 함께 배양 초기인 2~3일 내에 높은 활성을 나타냈는데, 이는 RBBR 탈색능 결과와 부합하는 결과이다. 선발된 6개의 균 모두 2~3일 내에 RBBR이 거의 탈색됨에 따라 낮은 흡광도를 보였기 때문이다. 결국

선발된 백색부후균 모두 배양 초기에 효소를 분비하여 기질에 작용했을 것으로 판단되며, 이러한 결과는 앞으로 진행될 유기용매 리그닌의 생분해 연구에 기초자료로서 활용될 수 있다.

마지막으로, Figs. 3과 4를 살펴보면, 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구의 단백질 농도 및 효소 활성이 모두 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 첨가한 유기용매 리그닌이 기질과 비슷한 구조를 갖는 기질 유사체(substrate analogue) 역할을 수행함으로써 활성형 효소 단백질의 생성을 유도했기 때문인 것으로 사료된다(장관식, 2010; Tien, 1987). 하지만 아직까지 리그닌 분해 효소의 mRNA 전사(transcription)와 리그닌 분해 효소 단백질의 번역(translation) 증가 등에 의한 유전자 발현 때문인지에 대해서는 밝혀지지 않았다(Tien, 1987). 따라서 이러한 원인에 대한 분자생화학적 접근을 통한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

위의 결과를 바탕으로, 유기용매 리그닌의 첨가에 따라 균체 외 단백질 농도가 증가하는 경향을 보인 균은 CEL, PCH6728, STH*이었으며, 리그닌 분해 효소 활성이 높았던 균은 FOI, STH*이었다. 따라서 균체 외 단백질 농도 및 리그닌 분해 효소 활성이 전반적으로 높았던 STH*가 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주로 이용될 수 있다고 판단된다. 하지만 균체 외 단백질 농도의 경우, 서로 다른 균들간에 차이가 크지 않았기 때문에 MnP 및 laccase의 활성이 가장 높은 FOI가 유기용매 리그닌 생분해에 유리하게 작용할 수도 있다. 그리고 지금까지 MnP 및 laccase에 의해 리그닌이 분해된다고 알려져 왔지만 아직까지 밝혀지지 않은 다양한 백색부후균의 효소 작용으

로 인해 리그닌 생분해가 유도될 가능성도 있으므로 CEL에 대한 연구도 필요하다.

결론적으로 이러한 모든 가능성을 고려하여 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주를 선발할 필요가 있으며, 현시점에서 더 나아가 분해산물 분석 및 유기용매 리그닌의 감소 정도를 측정하는 추가적인 연구가 더 필요하다. 따라서 본 연구 결과는 앞으로 진행될 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 연구의 기초 자료로 이용할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 백색부후균의 리그닌 분해 효소 시스템을 이용한 리그닌 유래 고부가가치 화합물 생산 연구를 위해 리그닌 생분해 우수 균주를 선별하고자 백색부후균에 의한 RBBR의 탈색능과 리그닌 분해 효소 활성을 측정하였다.

백색부후균의 RBBR 탈색능 결과, SSC 배지에서 2~3일 내에 변화를 나타냈으며, CES, CEL, FOI, PCH6728, POB 그리고 STH*가 급격한 흡광도 변화를 나타냈다. SSC 배지는 질소제한 배지 중 하나로, trace element solution에 다양한 무기원소를 포함함에 따라 리그닌 분해 효소 활성을 높이는 결과를 야기한 것으로 판단된다. 그리고 RBBR의 색 변화는 대표적인 리그닌 분해 효소의 산화 반응을 통하여 RBBR의 발색단을 제거함으로써 나타난 것으로 보인다.

균체 외 단백질 농도 및 리그닌 분해 효소 활성을 측정한 결과, STH*과 PCH 6728의 경우, 유기용매 리그닌을 첨가한 실험구에서 높은 단백질 농도가 측정되었다. 하지만 리그닌 분해 효소 활성은 FOI에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 각각의 균에 따라 리그닌 분해 효소 외에 다른 효소 시스템을 가짐을 알 수 있었으며, 유기용매 리그닌 생분해 우수 균주 선발에 있어 리그닌 분해 효소뿐 아니라 다양한 효소 시스템에 대한 전반적인 이해가 필요하다고 사료된다.

따라서 본 연구의 결과는 백색부후균에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 및 유용화합물 생산 연

구에 기초 자료로서 효과적으로 이용될 수 있다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 기본연구지원사업(2012 R1A1A2008592)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. 장관식, 노봉수, 유상호, 김묘정, 김영환. 2010. 제6장 효소의 생산, 추출 및 정제. in: *이해하기 쉬운 식품효소공학*, 수학사. 서울, 208~212.
2. 홍창영, 광기섭, 이수연, 김선홍, 최인규. 2010. 폴리염화비페닐류의 생분해 우수 백색부후균 선별 및 분해율 분석. *목재공학*, 38(6): 586~578.
3. Baldrian, P. and J. Gabriel. 2006. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* FEMS microbiology letters, 206(1): 69~74.
4. Beaudette, L. A., S. Davies, P. M. Fedorak, O. P. Ward, and M. A. Pickard. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, 64(6): 2020~2025.
5. Bonnarne, P. and T. W. Jeffries. 1990. Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, 56(1): 210~217.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1): 248~254.
7. Buswell, J. A., Y. Cai, and S. Chang. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS microbiology letters, 128(1): 81~87.
8. De Jong, E., F. P. De Vries, J. A. Field, R. P. van der Zwan, and J. A. M. de Bont. 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycological Research*, 96(12):

- 1098~1104.
9. Faraco, V., P. Giardina, and G. Sannia. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* lac-case gene promoters. *Microbiology*, 149(8): 2155~2162.
 10. Fenn, P., S. Choi, and T. K. Kirk. 1981. Ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium* Physiology of suppression by NH₄⁺ and l-glutamate. *Archives of Microbiology*, 130(1): 66~71.
 11. Fenn, P., and T. Kent Kirk. 1981. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 130(1): 59~65.
 12. Glenn, J. K., and M. H. Gold. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 45(6): 1741~1747.
 13. Hamelinck, C. N., G. Hooijdonk, and A. P. C. Faaij. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4): 384~410.
 14. Hammel, K. E., K. A. Jensen Jr., M. D. Mozuch, L. L. Landucci, M. Tien, and E. A. Pease. 1993. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17): 12274~12281.
 15. Hynes, M. 1974. Effects of ammonium, L-glutamate, and L-glutamine on nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology*, 120(3): 1116~1123.
 16. Keyser, P., T. Kirk, and J. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium* synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of bacteriology*, 135(3): 790~797.
 17. Krěmář, P., A. Kubátová, J. Votruba, P. Erbanová, Novotn, and V. Šašek. 1999. Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2): 269~276.
 18. Lee, S. 2005. Biodegradation of Dibutyl and Di (2-ethylhexyl) Phthalates by White Rot Fungus, *Polyporus brumalis*. in: Department of forest sciences, Vol. Ph. D. Thesis, Seoul National University. Seoul.
 19. Lee, S. M., J. W. Lee, B. W. Koo, M. K. Kim, D. H. Choi, and I. G. Choi. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6): 1516~1522.
 20. Machado, K. M. G., D. R. Matheus, V. L. R. Bononi, 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of microbiology*, 36(3): 246~252.
 21. Martínez, Á. T., M. Speranza, F. J. Ruiz Dueñas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillén, M. J. Martínez, A. Gutiérrez, and J. C. Río, 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology*, 8(3): 195~204.
 22. Mason, J. E. 2007. World energy analysis: H₂ now or later? *Energy Policy*, 35(2): 1315~1329.
 23. Nerud, F., Z. Zouchova, and Z. Mišurcová, 1991. Ligninolytic properties of different white rot fungi. *Biotechnology letters*, 13(9): 657~660.
 24. Novotný, Č., B. Rawal, M. Bhatt, M. Patel, V. Šašek, and H. P. Molitoris. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of biotechnology*, 89(2): 113~122.
 25. Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1): 20~33.
 26. Sahoo, S., M. Ö. Seydibeyoglu, A. Mohanty, M. Misra. 2011. Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass and bioenergy*, 35(10): 4230~4237.
 27. Schmidt, O. 2006. Wood cell wall degradation. in: *Wood and Tree fungi* (Ed.) D. Czeschlik, Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 99~107.
 28. Stewart, D. 2008. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial crops and products*, 27(2): 202~207.
 29. Tekere, M., A. Mswaka, R. Zvauya, J. Read. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activ-

- ity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial technology*, 28(4): 420~426.
30. Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Critical reviews in microbiology*, 15(2): 141~168.
31. Vyas, B, H. P. Molitoris. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. *Applied and environmental microbiology*, 61(11): 3919~3927.
32. Wariishi, H, K. Valli, and M. H. Gold. 1991. depolymerization of lignin by manganese peroxidase of. *Biochemical and biophysical research communications*, 176(1): 269~275.
33. Wong, D. W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(2): 174~209.