

# *Abortiporus biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환과 환원제 첨가에 따른 구조 변화<sup>1</sup>

홍 창 영<sup>2</sup> · 박 세 영<sup>2</sup> · 김 선 홍<sup>2</sup> · 이 수 연<sup>3</sup> · 유 선 화<sup>3</sup> · 최 인 규<sup>2,4,†</sup>

## Biomodification of Ethanol Organosolv Lignin by *Abortiporus biennis* and Its Structural Change by Addition of Reducing Agent<sup>1</sup>

Chang-Young Hong<sup>2</sup> · Se-Yeong Park<sup>2</sup> · Seon-Hong Kim<sup>2</sup> · Su-Yeon Lee<sup>3</sup> · Sun-Hwa Ryu<sup>3</sup>, In-Gyu Choi<sup>2,4,†</sup>

### 요 약

본 연구에서는 백색부후균 *Abortiporus biennis*를 이용하여 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 시도함으로써, 생물학적 변환 기작을 이해하고, 상업적 활용을 위해 유기용매 리그닌의 저분자화를 유도하고자 하였다. 질소제한 배지에서 *A. biennis*는 주로 유기용매 리그닌의 중합반응을 유도하면서, 분자량을 급격히 증가시켰으며, 배양일에 따라 구조적 차이를 야기하였다. 배양 초기, ether 결합의 분해를 통해 phenolic OH 함량이 증가한 반면, 배양 후기에는 ether 결합이 증가함에 따라 phenolic OH 함량이 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 유기용매 리그닌의 탈중합을 유도하기 위해 환원제인 ascorbic acid를 첨가하여 유기용매 리그닌의 구조 변화 및 변환 산물을 분석하였다. 결과적으로, 환원제의 첨가에 의해 유기용매 리그닌의 분자량은 소폭 증가하였지만, 환원제 무첨가 실험에 비해 그 증가 폭이 현저히 감소하였다. 또한 배양액 내 리그닌 올리고머의 경우, 배양 10일째 환원제를 첨가한 실험구에서 중량 평균 분자량 381 Da, phenolic OH 함량 38.63%를 나타냈으며, 이는 저분자화된 형태로 상업적 활용 가치가 높다고 사료된다. 결론적으로, *A. biennis*의 효소 시스템은 유기용매 리그닌의 분해보다 중합을 야기하였으며, 환원제의 첨가를 통해 배양액 내 리그닌 올리고머의 저분자화 및 phenolic OH 함량 증가를 유도할 수 있었다.

### ABSTRACT

The main goal of this study was to investigate biomodification mechanism of lignin by white rot fungus, *Abortiporus biennis*, and to depolymerize ethanol organosolv lignin for industrial application. In nitrogen-limited culture, *A. biennis*

<sup>1</sup> Date Received September 14, 2015, Date Accepted October 23, 2015

<sup>2</sup> 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Department of Forest Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, 08826, Republic of Korea

<sup>3</sup> 국립산림과학원 임산공학부. Department of Forest Products Engineering, Korea Forest Research Institute, Seoul 02455, Republic of Korea

<sup>4</sup> 농업생명과학연구원. Research Institute of Agriculture and Life Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul, 08826, Republic of Korea

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

polymerized mainly lignin showing a rapid increase of molecular weight and structural changes depending on incubation days. At the initial incubation days, cleavage of ether bonds increased phenolic OH content, while the results were contrary in of the later part of the culture. Based on these results, ascorbic acid as a reducing agent was used to induce depolymerization of lignin during cultivation with white rot fungus. As a result, the degree of increase of average molecular weight of lignin was significantly declined when compared with those of the ascorbic acid free-experiment, although the molecular weight of fungus treated sample slightly increased than that of control. Furthermore, lignin derived oligomers in culture medium were depolymerized with the addition of ascorbic acid, showing that the average molecular weight was 381 Da, and phenolic OH content was 38.63%. These depolymerized lignin oligomers were considered to be applicable for industrial utilization of lignin. In conclusion, *A. biennis* led to the polymerization of lignin during biomodification period. The addition of ascorbic acid had a positive effect on the depolymerization and increase of phenolic OH content of lignin oligomers in medium.

**Keywords :** biomodification, depolymerization, lignin oligomers, white rot fungus, *Abortiporus biennis*

## 1. 서 론

담자균류에 속하는 백색부후균은 목재부후균 중 하나로, 목재 성분 중 리그닌을 선택적으로 분해하며, 이는 주로 산화 효소 시스템을 바탕으로 진행된다(Martínez *et al.*, 2010). 백색부후균의 효소 시스템을 이용한 리그닌 생분해는 화학적 처리에 비해 에너지 소모가 적은 친환경 공정으로, 특히 백색부후균이 분비하는 효소는 비특이적이며, 기질과 광범위하게 반응하므로 다양한 기질에 적용이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 산림 기반 산업 분야에서 백색부후균의 효소 시스템은 펄프 표백 및 목질계 바이오매스의 전처리 등 주로 탈리그닌 공정에 이용되고 있다(Gouveia *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2011). 백색부후균이 분비하는 리그닌 분해 효소에는 대표적으로 lignin peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14), manganese dependent peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13), versatile peroxidase (E.C. 1.11.1.16), 및 laccase (Lac; EC 1.10.3.2)가 있으며, 효소분류학적으로 산화·환원 효소에 속한다(Schmidt, 2006). 하지만 백색부후균 내에는 리그닌 분해 효소 외에 탈리그닌에 영향을 미치는 다양한 효소들이 존재한다. 대표적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 산화 효소로 glyoxal oxidase (E.C. 1.2.3.5)와 aryl alcohol oxidase (E.C. 1.1.3.7)가 있으며, 리그닌 내 biphenyl 결합 분해에 영향을 미치는 demethylase와 dioxygenase가 존재한다고 알려져 있다. 이러한

다양한 효소들은 상호 작용을 통해 리그닌의 생물학적 변환을 야기 한다(Pointing, 2001; Pollegioni, 2015).

목질계 바이오매스의 구성 성분인 리그닌은 자연계에 존재하는 가장 풍부한 고분자 중 하나로, phenyl propanoid 단량체의 중합을 통해 다양한 결합으로 이루어져 있다. 이러한 특성은 목질계 바이오매스의 난분해성을 부여하기 때문에 지금까지 펄프제지 산업에서 뿐 아니라, 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하는데 있어서도 저해인자 또는 부산물로 간주되었다(Himmel, 2009; Sahoo *et al.*, 2011). 하지만 바이오리파이너리 공정 도입과 함께 리그닌에 대한 고부가가치화에 대한 관심이 증대되면서 몇몇 연구에서는 리그닌을 고분자 충전제로 이용하거나 접착제, 화학약품 및 비료를 생산하기 위한 첨가제로 이용될 수 있다고 보고하였다(Sahoo *et al.*, 2011; Stewart, 2008). 특히, 다양한 리그닌 중 유기용매 리그닌은 크라프트 리그닌이나 lignosulfonate와 달리 황을 포함하지 않으므로 유도체 생성 가능성이 높고, 높은 순도 및 낮은 분자량을 가지고 있어 변환공정을 통해 유용 화합물로 이용 가능성이 있다(Lora & Glasser, 2002).

하지만 복잡한 구조를 가진 리그닌의 산업적 이용을 위해서는 변환 공정이 필요하며, 현재 열화학적 및 생물학적 처리를 통한 리그닌 변환에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

백색부후균을 이용한 리그닌의 생물학적 변환은 대부분 백색부후균으로부터 정제된 리그닌 분해 효소를 바탕으로 연구가 진행되었다(Higuchi, 1986; Kawai *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 1985). 백색부후균으로부터 분리 정제된 LiP 및 laccase는  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -1 및  $\beta$ -5 모델 화합물을 분해하며, 이를 통해 리그닌 모델 화합물의 생분해 메커니즘 및 리그닌 분해 효소의 역할을 파악할 수 있었다. 하지만 선행 연구 결과만으로는 백색부후균 whole cell의 전반적인 효소 시스템을 이해하고, 목재 내 리그닌 및 상업용 리그닌의 생물학적 변환 공정에 적용하기 쉽지 않다.

따라서 본 연구에서 이전 연구를 통해 높은 리그닌 분해 효소 활성을 가진 백색부후균 *Abortiporus biennis*의 whole cell을 이용하여, 목질계 바이오매스의 유기용매 전처리 공정에서 잔여물로 생산되는 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 시도함으로써 생물학적 변환 기작을 이해하고, 리그닌의 상업적 활용 가치를 높이기 위해 저분자화를 유도하고자 하였다. 우선 백색부후균을 처리한 유기용매 리그닌의 화학적 구조 변화를 분석하였으며, 유기용매 리그닌의 탈중합 반응을 유도하기 위해 환원제의 일종인 ascorbic acid를 첨가했을 때 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 구조 변화를 비교 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

본 연구에서 사용한 백색부후균 *Abortiporus biennis*<sup>1)</sup>는 Potato dextrose agar배지에서 28℃, 7일 동안 선배양 시켰으며, 성장 후 4℃에서 보관하였다. *A. biennis*는 이전 연구 결과에서 가장 높은 리그닌 분해 효소 활성을 나타냈으며, 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 이용에 적합하다고 판단하였다(Hong *et al.*, 2013).

본 연구에서 사용한 유기용매 리그닌은 백합나무

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

Component	Concentration
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1%
Ammonium tartrate (C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )	1.08 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.7 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.03 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.68 mM
Thiamine · HCl	2.97 mM
Trace element solution (Hong <i>et al.</i> , 2013)	10 ml/liter

*Liriodendron tulipifera*를 이용한 유기용매 전처리 공정에서 리그닌 생산 최대 수율을 나타낸 조건인 50% 에탄올, 1.6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 촉매로 사용하여 151℃에서 16분 동안 반응시켜 획득한 리그닌이다.

### 2.2. *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 구조 변화

백색부후균을 shallow stationary culture (SSC) 배지에 접종시켰으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 250 ml 삼각플라스크에 배지를 98.8 ml씩 넣고 sili-stopper로 막은 뒤 121℃에서 15분간 멸균하였다. SSC 배지의 경우, thiamine HCl 0.2 ml와 trace element solution 1 ml를 0.2 μm filter로 여과 후 멸균된 배지에 첨가하였다.

각각 플라스크에 균사 전건무게가 0.01 g이 되도록 균사 현탁액을 접종한 후, 유기용매 리그닌 0.1 g을 첨가하여, 28℃ 배양기에서 정치 배양시켰다. 유기용매 리그닌 첨가 후, 각 배양일에 원심분리기 (12000 rpm, 15분, 4℃)를 이용하여 리그닌 고형분 및 배양액을 분리하였다. 리그닌과 균사가 포함된 고형분은 0.5 M NaOH로, 배양액은 dichloromethane으로 추출하였다. NaOH를 이용하여 리그닌 잔사와 균사가 포함된 고형분으로부터 리그닌을 획득하였으며, 획득한 리그닌은 분자량, phenolic OH 함량 및 ether 결합 특성이 분석되었다.

- Gel permeation chromatography (GPC)를 이용한

1) (Hong *et al.*, 2013) 논문에서는 *Fomitopsis insularis*로 언급되었으며, internal transcribed sequence (ITS)동정을 통해 최종적으로 *Abortiporus biennis*라 명명되었다.

#### 분자량 분석

: GPC 분석은 Shodex KF-801, KF-802, KF-802.5, KF-803 columns (Showa Denko, Tokyo, Japan) 을 사용하였고, UV detector는 280 nm에서 tetrahydrofuran을 이용하여 분석하였다. 아세틸화된 시료 2 mg을 tetrahydrofuran에 용해 시킨 후, 0.5  $\mu$ m hydrophobic filter로 여과 후 측정하였다.

- Aminolysis 방법을 이용한 phenolic OH 함량 측정 : Phenolic OH 함량을 분석하기 위한 방법으로, 아세틸화된 시료 20 mg에 0.5 ml pyrrolidine과 0.5 ml dioxane을 반응시켜, 생성된 1-acetylpyrrolidine의 GC (Agilent 7890B) / MS (Agilent5975) 분석을 통해 시료의 phenolic OH 함량을 분석하였다. 컬럼은 DB-5 (30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Agilent)를 사용하였으며, 초기 온도 100 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지 후, 173 $^{\circ}$ C까지 30 $^{\circ}$ C/분으로 승온시킨 후, 5분간 유지시켰으며, 최종 온도 200 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/분으로 승온시킨 후, 5분 동안 유지시켰다. Inlet 온도는 220 $^{\circ}$ C, detector 온도는 300 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

- Nitrobenzene oxidation (NBO)을 이용한 ether 결합 경향 분석

: 리그닌의 ether 결합 경향성을 파악하기 위해 NBO방법이 실시되었다. 리그닌 40 mg에 4 ml의 2 M NaOH와 250  $\mu$ l의 nitrobenzene을 첨가하고 170 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 4 M HCl을 첨가하여 pH를 1~2로 조절한 후, dichloromethane으로 추출 해 얻어진 용매를 농축하여 diethyl ether로 녹인 후, 100  $\mu$ l pyridine과 100  $\mu$ l N,O bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide를 첨가하여 TMS (trimethylsilane) 반응을 유도하였다. 최종적으로 GC (Agilent 7890B) / MS (Agilent 5975) 분석을 통하여 coniferyl (G)과 sinapyl (S) unit이 정량적으로 분석되었다. 컬럼은 DB-5 (30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Agilent)를 사용하였으며, 초기 온도 120 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지 후, 최종 온도 280 $^{\circ}$ C까지 10 $^{\circ}$ C/분으로 승온시킨 후, 20분 동안 유지시켰다. Inlet 온도

는 200 $^{\circ}$ C, detector 온도는 250 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

### 2.3. 환원제 ascorbic acid 첨가에 따른 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 구조 변화

본 연구에서는 리그닌의 중합 반응을 억제하기 위해 환원제의 일종인 5 mM ascorbic acid를 첨가하여 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 구조적 변화도 함께 분석되었다. Ascorbic acid는 유기용매 리그닌과 함께 첨가되었으며, 각각 배양일에 2.1항의 방법과 동일하게 유기용매 리그닌의 변환 산물 분석이 이루어졌다.

### 2.4. *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌으로부터 생성된 리그닌 올리고머의 특성 분석

원심분리를 통해 얻어진 균 배양액은 dichloromethane을 이용하여 추출하였다. 획득한 리그닌 올리고머를 함유한 추출액의 화학적 특성을 파악하기 위해 Gas chromatography / Mass spectroscopy 및 Gel permeation chromatography를 이용하여 분해산물 분석 및 phenolic OH 함량을 측정하였다. 리그닌 올리고머의 phenolic OH 함량 분석은 2.2항의 방법과 동일하게 진행되었다.

## 3. 결과 및 고찰

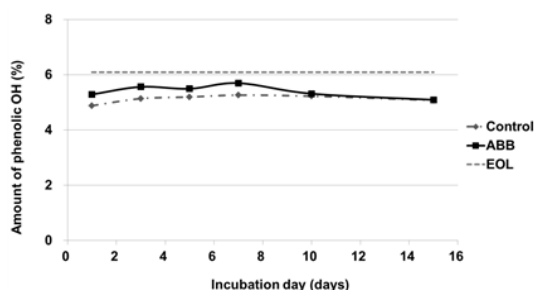
### 3.1. *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 산물 분석 및 환원제 첨가의 영향

#### 3.1.1. *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 분자량 및 구조 변화 분석

백색부후균 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환 산물의 특성을 알아보기 위해 분자량, phenolic OH 함량 및 ether 결합의 경향성이 분석되었다.

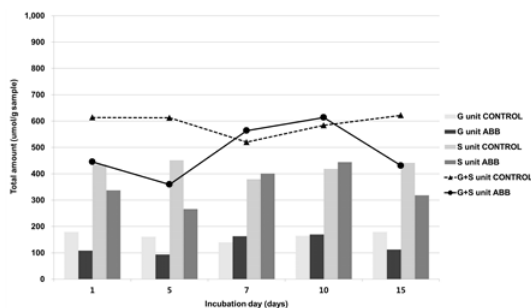
**Table 2.** Average molecular weights and polydispersity of ethanol organosolv lignin (EOL) after fungal treatments (Con: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*)

Parameter	EOL	3 days		5 days		10 days		15 days	
		Con	ABB	Con	ABB	Con	ABB	Con	ABB
Mn	1140	1332	1567	1489	1884	1933	1948	1447	2478
Mw	2408	2975	3879	3274	6208	4980	9801	3376	15232
Mw/Mn	2.11	2.23	2.48	2.20	3.37	2.58	5.03	2.33	6.15



**Fig. 1.** Amount of phenolic OH group after the fungal treatment (Control: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*).

우선 분자량의 경우, *A. biennis* 처리를 한 실험구에서 배양일이 증가함에 따라 증가하는 경향이 나타났다. 특히 배양 15일째, *A. biennis*에 의해 유기용매 리그닌의 중량 평균 분자량(Mw)은 15,232 Da까지 증가하였으며, 다분산성 역시 매우 급격히 증가하였다(Table 2). 변환된 리그닌의 구조적 변화를 분석한 결과, 배양 7일까지 phenolic OH 함량은 소폭 증가하였으며(Fig. 1), NBO 산물은 배양 5일까지 대조구에 비해 감소했다가 배양 7일과 10일에는 소폭 증가하였다(Fig. 2). 결과적으로 *A. biennis*는 배양 기간 동안 중합 반응을 통해 유기용매 리그닌의 분자량을 증가시켰으나, 배양일에 따라 리그닌 내 구조적 차이를 보였다. 배양 5일까지는 NBO 산물의 감소, 즉 ether 결합의 분해를 통해 phenolic OH 함량 증가에 영향을 미친 것으로 사료되지만, 배양 7일부터는 NBO산물이 증가했음에도 불구하고 phenolic OH 함량이 대조구보다 높게 유지되었다. 이는 배양 초기에는 *A. biennis*가 ether 결합의 분해 반응을 야기하였지만, 라디칼 작용에 의해 ether 결합 외 다른 결합으



**Fig. 2.** Amount of guaiacyl unit (G unit) and syringyl unit (S unit) of EOL after fungal treatments (Control: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*).

로의 중합 반응이 일어난 것으로 보이며, 배양 7일 이후에는 리그닌의 분자량 증가에 ether 결합의 증가가 영향을 미친 것으로 사료된다. 따라서 배양 7일째 변환된 유기용매 리그닌은 phenolic OH 함량이 대조구에 비해 높게 유지되면서, ether 결합을 많이 함유하고 있는 형태로, 다른 배양일의 유기용매 리그닌보다 덜 중합된 구조로 예상된다(Bauchier *et al.*, 1998).

본 연구 결과는 백색부후균을 이용한 리그닌 생분해 관련 선행 연구와 상이한 결과로, 지금까지 대부분 백색부후균의 리그닌 분해 효소는 리그닌 모델 화합물의 결합을 분해한다고 보고되었다. Tien & Kirk 그룹과 Higuchi 그룹은 주로 *Phanerochaete chrysosporium*로부터 정제된 LiP와 MnP을 이용하여  $\beta$ -O-4 모델 화합물의 생분해 기작을 밝혔으며 (Higuchi, 1986; Tien, 1987; Tien & Kirk, 1983), *Coriolus versicolor*로부터 정제된 laccase는  $\beta$ -O-4와  $\beta$ -1 모델 화합물의 alkyl-phenyl 결합의 분해 및  $C_{\alpha}$

**Table 3.** Average molecular weights and polydispersity of ethanol organosolv lignin (EOL) after fungal treatments and the addition of ascorbic acid (Con: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*)

Parameter	EOL	3 days		5 days		10 days		15 days	
		Con	ABB	Con	ABB	Con	ABB	Con	ABB
Mn	1140	1429	1597	1471	1676	1359	1665	1457	1663
Mw	2408	3367	3659	3396	3898	2946	4067	3343	4134
Mw/Mn	2.11	2.36	2.29	2.31	2.33	2.17	2.44	2.29	2.49

산화에 영향을 미친다고 보고되었다(Higuchi, 1990; Kawai *et al.*, 1988; Morohoshi *et al.*, 1987). 하지만 몇몇 선행 연구는 백색부후균의 리그닌 분해 효소시스템이 리그닌 분해 뿐 아니라 중합에도 영향을 미친다고 보고하였다(Iwahara *et al.*, 2000; Kudanga *et al.*, 2011; Nugroho Prasetyo *et al.*, 2010). 특히 laccase는 리그닌의 생합성에도 관여를 하는 효소로, 리그닌의 phenolic OH로부터 전자를 빼서 축매작용을 유도하기 때문에 생분해 반응과 동시에 중합반응을 야기한다(Youn *et al.*, 1995). 뿐만 아니라 LiP와 MnP 역시 라디칼 반응을 유도함에 따라 중합반응을 유도하여 리그닌의 분자량 증가에 영향을 미친다(Eriksson *et al.*, 1990; Haemmerli *et al.*, 1986). 리그닌 분해 효소는 산화·환원 효소로, 전자 이동을 통한 산화 작용을 일으켜 라디칼을 형성한다. 이때 생성된 라디칼은 불안정하며, 반응성이 좋기 때문에 C-C, C-O, C-N 결합과 같은 다양한 공유결합을 형성하여 중합반응을 유도한다. 특히 MnP의 경우, 망간이온의 전자 이동을 통해 산화 반응을 유도하기 때문에, 망간이온의 산화 전위가 중합 반응을 유도할 수 있다(Kudanga *et al.*, 2011, Önnnerud *et al.*, 2002).

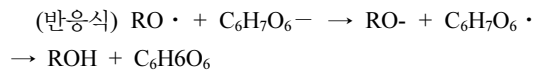
본 연구는 백색부후균 *A. biennis*의 whole cell을 이용한 연구로, 선행연구를 통해 *A. biennis*의 리그닌 분해 효소 활성은 리그닌 첨가에 의해 대조구에 비해 증가하였지만, 배양일에 따라 다른 경향을 보였다. 배양 초기에는 MnP와 laccase 활성이 증가한 반면, 중합이 급격히 일어난 배양 후기에는 활성이 감소함을 알 수 있었다(data unshown). 따라서 배양 초기 *A. biennis*의 리그닌 분해 효소는 ether 결합 분해를 통한 phenolic OH 함량 증가 및 분자량 증가에도 영향을 미쳤을 것이라 사료된다. 하지만 배양 후기에

는 리그닌 분해 효소 외 다른 효소 시스템이 작용하여 유기용매 리그닌의 구조적 변화 및 급격한 중합 반응을 유도한 것으로 사료된다.

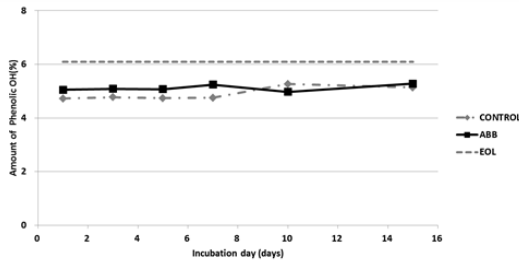
### 3.1.2. 환원제 첨가에 따른 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 구조 변화 분석

3.1.1항의 결과를 바탕으로 유기용매 리그닌의 탈중합 반응을 유도하기 위해 환원제의 일종인 ascorbic acid를 첨가하여 *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 시도하였다.

분자량의 경우, 대조구에 비해 *A. biennis*를 처리한 실험구에서 소폭 증가하긴 했지만, ascorbic acid를 첨가하지 않은 실험 결과와 비교했을 때, 분자량의 증가 정도가 매우 크게 감소하였다. 배양 15일째 유기용매 리그닌의 중량평균 분자량은 4,134 Da이며, 다분산성은 2.49로 나타났다(Table 3). 이는 ascorbic acid의 첨가가 *A. biennis*에 의한 유기용매 용매 리그닌의 중합을 저지하는데 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단된다. 환원제의 일종인 ascorbic acid는 효소 반응에서 페놀성 화합물간의 중합 반응을 억제하기 위해 사용된다. 아래의 반응식에서 보여주듯이, ascorbic acid의 산소에서 전자 손실을 통해 산화반응이 일어나면서 기질을 환원시키는 작용을 한다(Kinne *et al.*, 2009; Kinne *et al.*, 2011).



또한 분자량의 증가 정도는 대조구 대비 배양 3일째 292 Da에서 배양 10일째 최대 1,121 Da으로 나타났다는데, 이는 분해된 리그닌 유래 화합물이 중합된

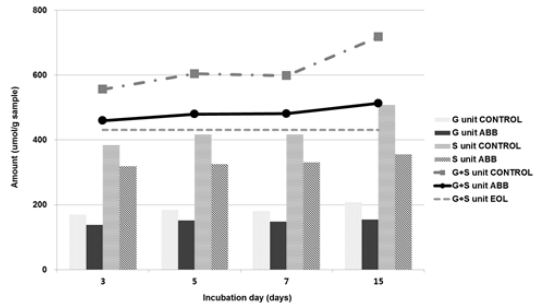


**Fig. 3.** Amount of phenolic OH group after fungal treatments and the addition of ascorbic acid (Control: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*).

것으로 판단된다. 결과적으로, *A. biennis*에 의해 유기용매 리그닌의 분해와 중합이 동시에 발생하고 있으며, 환원제 무처리구에 비해 환원제의 첨가를 통해 중합 반응 저지와 함께 저분자화 현상이 활발히 발생함에 따라 나타난 결과로 사료된다.

Phenolic OH 함량의 경우, 배양 7일까지 대조구에 비해 약간 증가하였으나 그 양이 미미하다. NBO 산물을 분석을 통해 유기용매 리그닌 내 ether 결합으로 연결된 G unit과 S unit의 함량은 ascorbic acid를 첨가함에 따라 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 배양일에 따라 거의 차이를 보이지 않았다 (Figs. 3 & 4). 따라서 ascorbic acid의 첨가는 분자량의 증가율을 감소시키는데 긍정적인 영향을 미치는 반면, 이전 결과에 비해 유기용매 리그닌 내 구조적 변화에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 배양 기간 내 NBO 산물 함량 감소를 통해, 유기용매 리그닌 내 ether 결합이 분해되었음을 확인할 수 있었으나, 중합 반응이 ether 결합이 아닌 다른 결합의 형태로 이루어진 것으로 판단된다.

결과적으로, 리그닌의 탈중합 반응을 유도하기 위해 환원제 ascorbic acid를 첨가한 결과, 분자량의 증가는 억제할 수 있었지만, 리그닌 자체의 구조적 변화는 크지 않은 것으로 분석되었다. 위에서 언급했듯이, 환원제의 첨가는 리그닌 분해 효소에 의해 생성된 라디칼의 환원 작용을 유도함에 따라 중합 반응 저지에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료되나, 생성된 모든 라디칼에 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다. 따라서 환원제의 영향을 덜 받은 라디칼에 의



**Fig. 4.** Amount of guaiacyl unit (G unit) and syringyl unit (S unit) of EOL after fungal treatments and the addition of ascorbic acid (Control: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*).

해 분자량이 소폭 증가하였으며, 배양 초기 첨가한 환원제의 영향이 배양일 증가와 함께 감소하면서 분자량 증가에 영향을 미친 것으로 예상된다.

따라서 바이오리파이너리 개념을 바탕으로 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 통해 산업적 이용을 하기 위해서는 환원제의 투입 시점 변화나 백색부후균의 효소 시스템 조절을 통해 phenolic OH 함량 증가 및 분자량의 다분산성 감소를 유도시키는 방향으로 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

### 3.2. *A. biennis*에 의한 유기용매 리그닌으로부터 생성된 리그닌 올리고머의 특성 분석

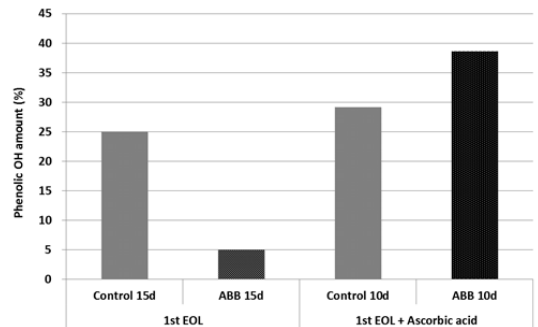
백색부후균에 의한 유기용매 리그닌의 분해 산물을 dichloromethane으로 추출한 결과, ascorbic acid 첨가 유무에 따라 상이한 결과를 보였다. Ascorbic acid를 첨가하지 않은 유기용매 리그닌의 분해 산물의 경우, 리그닌 고형분의 결과와 비슷하게 분자량이 증가한 반면, ascorbic acid를 첨가한 실험구에서는 배양액 내 리그닌 올리고머의 분자량이 감소하였다 (Table 4). Ascorbic acid를 첨가하지 않은 실험의 경우, 배양일에 따라 중량평균 분자량 225~264 Da만큼 증가하였으며, 이는 리그닌 올리고머로부터 분해된 산물의 재중합 현상에 의한 결과라 사료된다. 이에 반해 ascorbic acid를 첨가한 실험의 경우, 이러한

**Table 4.** Average molecular weights and polydispersity of lignin oligomers derived from ethanol organosolv lignin after fungal treatments ((A): 1<sup>st</sup> EOL treated by *A. biennis*, (B): 1<sup>st</sup> EOL treated by *A. biennis* and ascorbic acid, (Con: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*)

(A)							(B)						
Parameter	1 days		5 days		15 days		Parameter	1 days		5 days		10 days	
	Con.	ABB	Con.	ABB	Con.	ABB		Con.	ABB	Con.	ABB	Con.	ABB
Mn	298	312	369	512	311	525	Mn	312	280	265	250	298	220
Mw	888	1128	1152	1416	865	1090	Mw	848	742	528	552	586	381
Mw/Mn	2.98	3.62	3.12	2.77	2.78	2.08	Mw/Mn	2.64	2.65	1.99	2.21	1.97	1.73

재중합 현상이 발생하지 않고, 배양 10일째 중량평균 분자량 381 Da을 나타냈다. Ascorbic acid를 첨가한 실험에서는 리그닌 올리고머의 저분자화와 더불어 phenolic OH 함량이 배양 10일째 38.63%를 나타냈다(Fig. 5). Phenolic OH 함량 증가를 통해, 리그닌 올리고머의 ether 결합의 분해가 일어났을 것이라 예상되며, 변환된 리그닌 올리고머는 상업적 활용에 있어 매우 가치가 높다고 판단된다. 높은 페놀 함량을 지닌 저분자화 된 리그닌 유래 화합물은 합성고분자와 중합 반응을 통해 공중합체(copolymers)로 적용 가능하며, 이는 페놀성 레진이나 에폭시 레진과 같은 유용 고분자 대체 물질로 이용가능하며(Liu *et al.*, 1999; Meister, 2002), 이들은 친환경 고분자로 잠재적 이용 가치가 높다(Hüttermann *et al.*, 2001; Sena-Martins *et al.*, 2008).

본 연구 결과를 통해, 환원제의 첨가와 함께 백색부후균에 의한 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 시도한 결과, 주로 배양액 내 용해된 리그닌 올리고머로부터 저분자화 현상이 발생함을 확인할 수 있었다. 이는 백색부후균의 균체 외 효소 작용이 배양액 내에서 발생하고, ascorbic acid가 수용성 환원제이므로, 배양액 내 리그닌 유래 화합물에 영향을 미친 것으로 사료된다. 결과적으로, 환원제로 첨가된 ascorbic acid는 배양액 내에서 분해된 리그닌 유래 화합물 간의 재중합을 저지함에 따라 분자량 감소를 야기하였지만, 유기용매 리그닌 자체의 탈중합 유도에는 한계가 있었다고 사료된다. 따라서 백색부후균을 이용한 생물학적 변환 공정은 고분자 리그닌의 변환보다 배양액 내에 용해될 수 있는 저분자화된 리그닌의 분해에 좀 더 긍정적인 영향을 미친다. 본 연구



**Fig. 5.** Amount of phenolic OH group of degradation products of 1<sup>st</sup> EOL after fungal treatments and the addition of ascorbic acid (Control: EOL in medium, ABB: EOL treated by *A. biennis*).

에서 시도한 백색부후균을 이용한 생물학적 변환 공정은 고분자 리그닌의 생물학적 변환에 있어 한계를 나타냈지만, 다양한 변환 공정 중에서 친환경 대체 공정으로 그린 케미칼 생산을 위한 잠재력이 크다고 보고된 바 있다(Martínez *et al.*, 2010; Sena-Martins *et al.*, 2008). 특히 백색부후균은 유일하게 리그닌을 분해할 수 있는 미생물로, 이들이 분비하는 LiP 및 탈리그닌 관련 산화 효소들은 리그닌의 링 개열을 유도할 수 있다고 알려져 있으므로(Pollegioni *et al.*, 2015), 리그닌으로부터 다양한 산 화합물로의 변환을 유도할 수 있다(Johnson & Beckham, 2015; Linger *et al.*, 2014). 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로, 저분자화 된 리그닌 올리고머를 이용하여 유용 페놀성 화합물 및 산 화합물로의 변환에 관한 추가적인 연구가 이루어진다면, 리그닌 고부가가치화에 기여할 수 있을 것이라 사료된다.



## 4. 결 론

본 연구에서는 리그닌 분해 효소 활성이 높은 백색부후균 *Abortiporus biennis*를 이용하여 유기용매 리그닌의 생물학적 변환을 유도하였으며, 다양한 방법을 통해 유기용매 리그닌의 구조적 변화를 분석하였다. *A. biennis*는 배양 기간 동안 유기용매 리그닌의 중합 반응을 유도하면서, 배양일에 따라 유기용매 리그닌 내 구조적 차이를 야기하였다. 백색부후균에 의한 유기용매 리그닌의 탈중합을 유도하기 위해 환원제의 일종인 ascorbic acid를 첨가한 결과, 배양액 내 리그닌 올리고머의 분자량 감소 및 phenolic OH 함량이 증가하였다. 이는 백색부후균이 분비하는 균체의 효소시스템과 환원제 모두 수용성 반응을 기반으로 일어나기 때문에 나타난 결과로 사료된다. 그러므로 백색부후균은 환원제 ascorbic acid의 첨가에 의해 리그닌 올리고머의 저분자화 및 phenolic OH 함량의 증가를 유도하였으며, 앞으로 리그닌의 다양한 상업적 활용 및 백색부후균의 산림미생물로서 활용 가능성을 증대하기 위해 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 사 사

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

## REFERENCES

- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., Boerjan, W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical reviews in plant sciences* 17(2): 125-197.
- Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A., Ander, P. 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag.
- Gouveia, S., Fernández-Costas, C., Sanromán, M., Moldes, D. 2013. Polymerisation of Kraft lignin from black liquors by laccase from *Myceliophthora thermophila*: Effect of operational conditions and black liquor origin. *Bioresource technology* 131: 288-294.
- Hüttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied microbiology and biotechnology* 55(4): 387-394.
- Haemmerli, S.D., Leisola, M.S., Fiechter, A. 1986. Polymerisation of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS microbiology letters* 35(1): 33-36.
- Higuchi, T. 1986. <Review Article> Catabolic Pathways and Role of Ligninases for the Degradation of Lignin Substructure Models by White-Rot Fungi. *Wood research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University* 73: 58-81.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology* 24(1): 23-63.
- Himmel, M.E. 2009. Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy. Wiley-Blackwell.
- Hong, C.Y., Kim, H.Y., Jang, S.K., Choi, I.G. 2013. Screening of outstanding white rot fungi for biodegradation of organosolv lignin by decolorization of Remazol Brilliant Blue R and ligninolytic enzymes systems. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 41(1): 19-32.
- Iwahara, K., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M. 2000. Polymerization of guaiacol by lignin-degrading manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* in aqueous organic solvents. *Applied microbiology and biotechnology* 54(1): 104-111.
- Johnson, C.W., Beckham, G.T. 2015. Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metabolic*

- engineering 28: 240-247.
- Kawai, S., Asukai, M., Ohya, N., Okita, K., Ito, T., Ohashi, H. 1999. Degradation of a non-phenolic  $\beta$ -O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. FEMS microbiology letters 170(1): 51-57.
- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. 1988. Degradation mechanisms of phenolic  $\beta$ -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Archives of biochemistry and biophysics 262(1): 99-110.
- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. Journal of Biological Chemistry 260(5): 2609-2612.
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ralph, S.A., Ullrich, R., Hofrichter, M., Hammel, K.E. 2009. Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. Journal of Biological Chemistry 284(43): 29343-29349.
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ullrich, R., Nousiainen, P., Sipilä, J., Scheibner, K., Hammel, K.E., Hofrichter, M. 2011. Oxidative cleavage of non-phenolic  $\beta$ -O-4 lignin model dimers by an extracellular aromatic peroxygenase. Holzforschung 65(5): 673-679.
- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. Enzyme and microbial technology 48(3): 195-208.
- Linger, J.G., Vardon, D.R., Guarnieri, M.T., Karp, E.M., Hunsinger, G.B., Franden, M.A., Johnson, C.W., Chupka, G., Strathmann, T.J., Pienkos, P.T. 2014. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences 111(33): 12013-12018.
- Liu, J., Ye, L., Weiping, Y. 1999. Copolymerization of lignin with cresol catalysed by peroxidase in reversed micellar systems. Electronic Journal of Biotechnology 2(2): 7-8.
- Lora, J.H., Glasser, W.G. 2002. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. Journal of Polymers and the Environment 10(1-2): 39-48.
- Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C. 2010. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology 8(3): 195-204.
- Meister, J.J. 2002. Modification of Lignin. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 42(2): 235-289.
- Morohoshi, N., Haraguchi, T., Wariishi, H., Muraiso, C., Nagai, T. 1987. Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor*, 4: Properties of three laccase fractions fractionated from the extracellular enzymes. Journal of the Japan Wood Research Society (Japan).
- Nugroho Prasetyo, E., Kudanga, T., Østergaard, L., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Ignacio Santos, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Martínez, A.T. 2010. Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. Bioresource technology 101(14): 5054-5062.
- Önnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G., Henriksson, G. 2002. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic Oxidation A New Model in Lignin Biosynthesis I. The Plant Cell 14(8): 1953-1962.
- Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by

- white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(1-2): 20-33.
- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E. 2015. Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal* 282(7): 1190-1213.
- Sahoo, S., Seydibeyoğlu, M., Mohanty, A., Misra, M. 2011. Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass and bioenergy* 35(10): 4230-4237.
- Schmidt, O. 2006. *Wood and tree fungi*. Springer.
- Sena-Martins, G., Almeida-Vara, E., Duarte, J. 2008. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Industrial crops and products* 27(2): 189-195.
- Singh, D., Zeng, J., Laskar, D.D., Deobald, L., Hiscox, W.C., Chen, S. 2011. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass and Bioenergy* 35(3): 1030-1040.
- Stewart, D. 2008. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products* 27(2): 202-207.
- Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Critical reviews in microbiology* 15(2): 141-168.
- Tien, M., Kirk, T.K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science (Washington)* 221(4611): 661-662.
- Youn, H.D., Hah, Y.C., Kang, S.O. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 132(3): 183-188.