

헌구두솔버섯균의 균학적 특성 및 목질계 섬유소의 분해 특성 분석

박인철* · 석순자 · 김정선 · 유재홍 · 안재형

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Analysis of Mycological Characteristics and Lignocellulose Degradation of *Gyrodontium sacchari*

In-Cheol Park*, Soon-Ja Seok, Jeong-Seon Kim, Jae-Hong Yoo and Jae-Hyung Ahn

Agricultural Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT : Two fungal strains were isolated from rods of *Quercus* sp. (NAAS02335) and *Pinus densiflora* (NAAS05299) in Korea. These strains were identified as *Gyrodontium sacchari* by their morphological and mycological characteristics. The optimal growth temperature of NAAS02335 and NAAS05299 are 25°C and 30°C, respectively. Production of cellulase, xylanase, and ligninase was tested on agar media supplemented dyes or substrates. Production of cellulase and xylanase of NAAS05299 was higher than those of NAAS02335, however ligninase activity of NAAS02335 was higher than that of NAAS05299. The activities of cellulase, xylanase, and amylase of strain NAAS05299 were estimated at 6.7~10.2 times higher than that of NAAS02335. Laccase activity was only estimated by strain NAAS02335. The lignocellulytic enzymes are induced by substrates such as rice straw, wooden chips of pine, oak, and poplar. The NAAS05299 was able to degrade filter paper completely after 4 weeks of culturing in liquid media containing a piece of filter paper at 28°C with continuous shaking. NAAS05299 was able to degrade rice straw, pine chips, and oak chips after 4 months in solid culture, however NAAS02335 decomposed only rice straw among tested 4 kinds of biomass.

KEYWORDS : Cellulase, *Gyrodontium sacchari*, Ligninase, Lignocellulose, Xylanase

서 론

우리나라의 농작물 유래 부산물의 발생량은 연간 약 920 만 여 톤으로 추정되며 일부는 퇴비, 사료, 열 에너지원 등으로 이용되고 있으나 대부분 폐기되고 있어 폐기에 따른 환경오염이 문제가 되고 있다. 이들의 많은 부분을 차지하

는 목질계 섬유소는 식물체를 지지하는 기본적인 구성 성분으로서 리그닌, 섬유소, 헤미셀룰로스로 구성된 복합체이다. 이 중 리그닌은 섬유소 다음으로 중요한 식물의 구성 성분으로서 광합성 작용에 의해서 만들어지는 탄소원의 약 20%가 리그닌으로 합성된다. 또한 리그닌은 생물계에서 두번째로 많은 난분해성 성분이므로 이들의 생분해는 지구의 탄소 순환 및 환경오염 정화 측면에 있어서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다[1, 2]. 리그닌을 분해하는 미생물로는 백색부후균 등의 곰팡이를 비롯한 방선균과 세균 등이 알려져 있다. 방선균은 lignin peroxidase-type의 리그닌 분해 효소를 생성하여 리그닌을 분해하며 세균은 리그닌의 저분자 성분을 분해하므로 리그닌의 최종 무기화 과정에만 관여한다[3]. 리그닌 분해 곰팡이는 담자균에 속하는 백색부후균이 대표적이다. 갈색부후균은 주로 목재의 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 분해하는 곰팡이로 백색부후균 보다 리그닌 분해와 관련된 연구가 미흡하다. 갈색부후균은 리그닌 분해와 관련되어 *Polyporus ostreiformis*, *속눈머짐버섯균* (*Serpula lacrymans*), *Coniophora puteana*,

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 239-246
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.239
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: pinc@korea.kr

Received November 18, 2015
Revised November 23, 2015
Accepted November 24, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

작은조개버섯균(*Gloeophyllum trabeum*) 등에 대한 연구가 주로 이루어져 왔다. 백색부후균은 리그닌을 거의 완전히 분해하여 무기화하는 균이다. 백색부후균에는 구름송편버섯균(*Trametes versicolor*), 큰밀구멍버섯균(*Ceriporiopsis subvermispora*), 주걱간버섯균(*Pycnoporus cinnabarinus*), 느타리버섯균(*Pleurotus ostreatus*), 아교버섯(*Phlebia tremellosa*) 등 많은 균 종이 있으며 이 균들은 여러 가지 리그닌 산화효소 생성능력이 우수하여 리그닌을 효과적으로 분해하는 것으로 알려져 있다[4].

리그닌은 방향족 화합물이므로 리그닌 분해 효소나 백색부후균이나 갈색부후균을 비롯한 리그닌 분해 효소 생성능이 우수한 미생물을 이용하여 농약과 같은 난분해성 방향족 화합물이나 섬유, 종이류, 가죽제품 등에 사용되는 각종 염색제에 의한 오염원을 제거하고자 하는 연구도 국내외에서 활발하게 이루어지고 있다[5-9].

본 연구에서는 목질계 섬유소로 구성된 농업 부산물 및 폐기물을 환경친화적으로 처리하거나 재활용하기 위한 소재로서의 가능성을 확인하고자 우리나라 참나무와 소나무 목재에서 분리한 흰구두솔버섯균의 균학적 특성과 목질계 섬유소 분해 효소 활성 및 바이오매스 분해력을 구명하였다.

재료 및 방법

흰구두솔버섯 균주의 수집과 균 분리

흰구두솔버섯의 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원 한국농업미생물보존센터에 보관되어 있던 NAAS02335와 NAAS05299를 potato dextrose agar (PDA)에 계대배양하여 본 연구에 사용하였다. NAAS02335는 1998년 6월 26일 강원도 홍천군 연엽산 참나무 썩은 부위에서 수집(HCCN 06946)하였고, NAAS05299는 2009년 7월 23일 경기도 과천시 서울대공원 열대식물원의 테크로 사용된 적송에 발생한 버섯을 수집(HCCN18337, Fig. 1)하여 자실체의 포자로부터 균주를 순수 분리하였다.

흰구두솔버섯의 생장 특성 조사

흰구두솔버섯균의 생장 특성을 알기 위해 고체 배지의 종류, 배양 온도 등을 달리하여 균사 생장속도를 조사하였



Fig. 1. Morphological features of *Gyrodontium sacchari*. Fruit bodies (HCCN18337).

다. 고체배지는 PDA, malt extract agar (MEA), yeast extract peptone soluble starch (YPSS) 등 배지 3종을 선택하여 제조하였다. 고압증기멸균(121°C, 20 min)한 배지를 petri dish (bottom 90 mm × height 15 mm)에 20 mL씩 분주하여 굳힌 후, 각 배지의 중앙에 접종원(직경 5 mm)을 1개씩 접종하고, 배양 온도에 따른 흰구두솔버섯의 균사 생장 특성을 8 종류(10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C, 40°C)의 각기 다른 온도에서 20일간 암배양한 후, 균총의 형태적 특성과 길이(접종원의 직경 제외)를 측정하여 최적배지와 온도를 구명하였다. 배양 20일 후에 균총의 형태, 색, 배지 착색력, 균사 밀도, 질감, 균총 표면의 형태적 특성 등을 조사한 후, 사진으로 기록하였다.

목질계 섬유소 분해 효소 활성 검정

목질계 섬유소 분해 효소는 배지상에서 cellulase, xylanase와 ligninase의 분비 여부를 고체배지에서 검정하였다. 검정 배지는 기본 배지로 yeast nitrogen base를 사용하였으며, 탄소원으로는 cellulase 활성 검정을 위하여 0.4%의 carboxymethyl cellulose (CMC)를 첨가하였고, xylanase 검정 배지에는 birchwood xylan을 0.4% 되도록 첨가하였다. 각 기질이 함유된 평판배지에 미리 PDA에서 배양한 균사체를 지름 5 mm의 cork borer로 취한 agar plug를 치상하여 28°C 항온기에서 5일간 배양하였다. 효소의 분비 여부를 확인하기 위하여 배양한 배지를 0.1% Congo red 용액으로 15분간 염색한 후 1 M NaCl 용액으로 수회 탈색하여 기질의 분해환을 확인하였다. Ligninase 활성 검정에 사용한 배지는 기본 배지에 0.05% remazol brilliant blue R, 0.1% gallic acid, 0.01% guaiacol을 첨가한 3종류의 배지를 조제하였다. 조제한 각 배지에서 실험 균주를 7일간 배양한 후 균체 주변에 형성되는 갈색 산화대의 크기와 색깔로 ligninase 활성을 조사하였다.

효소 활성의 정량 분석

효소 활성을 정량 분석하기 위한 조효소액은 실험 균주를 yeast nitrogen base 액체배지에 1주일간 배양 후 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 배양액만 회수하여 준비하였다. 바이오매스에 따른 효소 활성의 차이를 확인하기 위한 실험에서는 벗짚 분말이나 미송, 참나무, 포플러 톱밥을 2 mm 크기의 체로 걸러 배지에 0.1% (w/v) 농도로 첨가하여 배양하였다.

Amylase, cellulase, xylanase 활성의 정량 분석은 Dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 수행하였다[10, 11]. Amylase의 정량분석은 균주 배양액으로 조제한 조효소액 4 µL를 증류수 96 µL와 혼합하고 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 10 mg/mL의 농도로 녹인 soluble starch 용액 100 µL를 기질로 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS 시약을 첨가하여 발색시켜 540 nm의 파장에서 측정하였다. 측정값은 10 mg/mL 농도의 maltose

용액으로 작성한 표준곡선을 참고로 환산하였다.

Cellulase 활성은 조효소액 100 μ L를 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 10 mg/mL의 농도로 녹인 CMC 용액 100 μ L를 기질로 첨가하여 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS 시약을 첨가하여 발색시켜 540 nm의 파장에서 측정하였다. 측정값은 10 mg/mL 농도의 glucose 용액으로 작성한 표준곡선을 참고로 환산하였다.

Xylanase 정량을 위하여는 조효소액 100 μ L를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 10 mg/mL의 농도로 녹인 birchwood xylan 용액 100 μ L를 기질로 첨가하여 혼합하고 37°C에서 20분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS 시약을 첨가하여 발색시켜 540 nm의 파장에서 측정하였다. 측정값은 10 mg/mL 농도의 xylose 용액으로 작성한 표준곡선을 참고로 환산하였다. 측정된 효소의 활성은 분당 1 μ M을 분해하는 양을 1 unit로 하고 unit/mL로 표시하였다.

Laccase는 조효소액 100 μ L를 sodium acetate buffer (pH 4.0)에 ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]를 0.5 M 농도로 녹인 기질을 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 420 nm에서 ABTS의 산화에 의한 흡광도의 증가량을 측정하였으며, 분당 OD값의 변화량을 unit로 정의하였다.

Lignin peroxidase (Li-P)의 활성은 조효소에 의하여 veratryl alcohol이 산화되어 생성된 veratraldehyde 정량하였다[12]. 반응은 증류수로 10배 희석한 조효소액 720 μ L에 50 mM의 veratryl alcohol 40 μ L와 0.5 M의 sodium tartrate buffer (pH 3.0) 200 μ L를 첨가하여 혼합한 후 10 mM의 H_2O_2 40 μ L를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 생성된 veratraldehyde 양은 310 nm에서 측정하였고, 분당 분해된 기질의 농도(μ M)를 unit로 정의하여 unit/mL로 표시하였다.

Filter paper 분해력 검정

현구두솔버섯의 섬유소 분해능을 확인하기 위하여 filter paper 분해력을 검정하였다. Yeast nitrogen base 액체배지 5 mL에 filter paper (Whatman No.2; Whatman, Piscataway, NJ, USA) 조각을 넣고 PDA 배지에 배양한 실험 균주의 균사체를 접종한 후 28°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하면서 filter paper의 분해 정도를 관찰하였다.

목질계 바이오매스 분해력 검정

목질계 바이오매스 분해력은 벼짚(*Oryza sativa*)과 미송(*Tsuga heterophylla*), 참나무(*Quercus* sp.), 포플러(*Populus euramericana*)의 톱밥을 대상으로 수행하였다. 벼짚은 약 3 cm의 길이로 절단하였고, 목재의 톱밥은 2 mm의 체로 걸러 나무조각을 제거하고 증류수에 하룻밤 침지하여 수분을 흡수시킨 후 50 g씩 식물 조직배양용 용기(72 × 72 × 100 mm)에 넣고 15분간 autoclave한 후 PDA에서 배양한

균사체를 지름 5 mm의 cork borer로 취한 agar plug 3개씩 접종하여 28°C에서 배양하면서 바이오매스의 분해 상태와 탈색 여부 등을 육안으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

현구두솔버섯균의 배양 특성

목재에서 자생하는 현구두솔버섯 균주의 생장과 증식에 세 가지 배지를 활용하여 실험한 결과 PDA에서 균사생장이 가장 양호하여 최적배지로 선발하여 균의 특성을 조사하였다. NAAS02335 균주는 25°C PDA에서 19일 만에 85 mm로 균사 생장이 가장 우수하였다(Fig. 2). PDA 배지에서 NAAS02335 균주의 온도별 균 성장력을 비교한 결과, 10°C 저온에서는 균 생장이 저조한 반면 15°C 이상에서는 균 성장속도가 빨라지기 시작했으며 35°C 이상에서는 균 성장속도가 저조하였다.

NAS05299 균주는 30°C PDA에서 19일 만에 83 mm로 균사생장이 우수하였다(Fig. 3). 온도별 균 성장력을 비교한 결과, 10°C 또는 15°C의 저온에서는 균 생장이 저조한 반면, 20°C 이상에서는 균 성장속도가 빨라졌다. 균총의 크기는 25°C에서보다 30°C에서 배양했을 때에 더 큰 것으로 조사되어 고온의 배양 조건을 선호하거나 고온에 잘 적응하며 살아가는 균주임을 알 수 있었다. 이와 같이 같은 종 이면서 발생시기와 수집지역이 다른 차이로 최적 성장 온도가 다른 것은 자실체의 발생 환경이 어느 정도 반영된 것으로 보인다. 현구두솔버섯의 자실체 발생 시기가 여름이었으며, 야생(NAAS02335), 열대식물원(NAAS05299)에서 발생한 점 등으로 미루어 보면, 그 균이 살아가기 위해 온도에 잘 적응하며 성장할 수 있는 형질을 획득하여 나타난 결과로 해석된다.

현구두솔버섯 균사체의 생장 형태를 살펴본 결과, NAAS02335는 20°C, 25°C, 30°C, 배양 온도 범위에서 배지 착색 현상이 나타나고 균총의 선단부 경계가 불분명한 사상형으로 성장하였다. 균총의 주된 색상은 배양 초기에는 흰색이었으며, 배양기간 6일 이후부터 흰색에서 옅은 노란색 범위의 균총을 형성하였다. 35°C 이상에서는 헝기성 곰팡이처럼 배지 속으로 균사체가 자라거나 성장을 하지 못하는 경향이 있었다.

균총 표면의 특성을 조사한 결과, 25°C 이하에서는 비교적 고른 표면의 균총이 형성된 반면, 28°C와 30°C에서는 균총의 표면이 고르지 못한 것을 관찰할 수 있었다. NAAS05299는 배양 온도가 25°C, 28°C, 30°C로 높아질수록 진한 노란색과 황갈색을 띠며, 균사 밀도가 증가하여 최대를 이루었다. 균총 표면의 특성을 조사한 결과, 25°C 이상에서 35°C까지 균사의 불규칙한 분포로 인해 균총의 표면이 고르지 못한 것을 관찰할 수 있었다. 30°C에서 분생자를 형성하는 이 균의 독특한 특성은 균사 생장에 가장 적합한 배양 조건이 아니라고 단순히 해석할 수 있다. 기주 식물

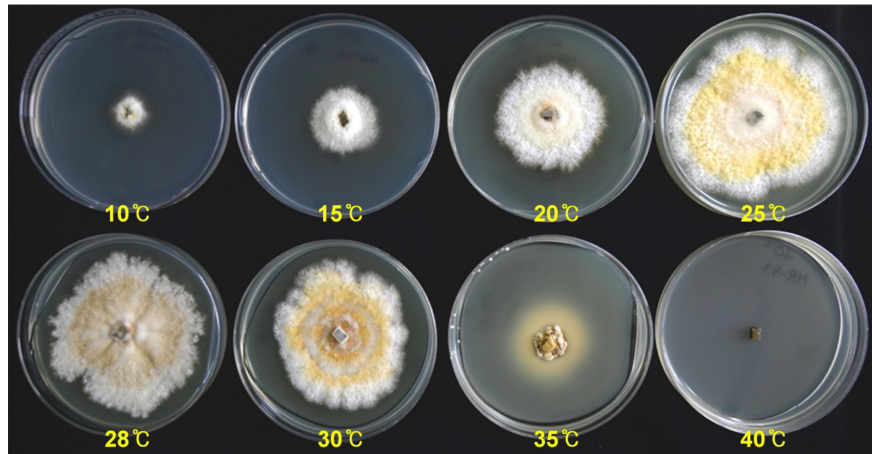


Fig. 2. Photographs of *Gyrodontium sacchari* NAAS02335 grown on potato dextrose agar (PDA) plate at different temperatures.

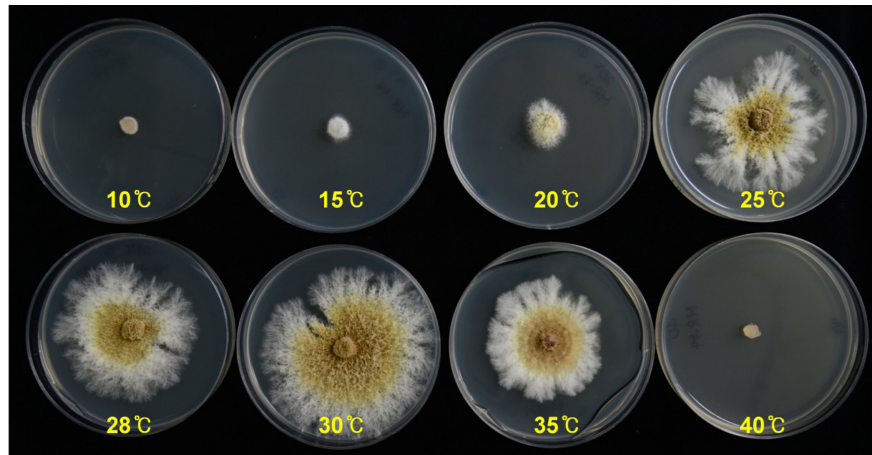


Fig. 3. Photographs of *Gyrodontium sacchari* NAAS052990 grown on potato dextrose agar (PDA) plate at different temperatures.

의 장기적인 부재와 같은 열악한 환경에 직면했을 때 만들어지는 무성포자로 보인다.

현구두솔버섯의 자실체 특성

현구두솔버섯[*Gyrodontium sacchari* (Spreng.) Hjortstam]은 담자균문(Basidiomycota) 분칠버섯과(Coniophoraceae) 구두솔버섯속(*Gyrodontium*)에 속한다[13]. 국내에는 1991년에 임업연구원보고서에 처음으로 기록되었다[14]. 표본과 종 특징 기술 등이 없이 한국명만 신칭되어 보고되었으므로 본 연구에서 표본기재와 종 특징 기술을 하고자 한다.

자실체는 반원형, 때로는 배착성에서 반배착성이다. 갓은 편평하고 폭은 50~80 mm, 표면은 백색에서 황백색, 대부분이 무색이다. 표피는 없고 광택도 없다. 육질은 백색 또는 탁한 황백색이고 부드러우나 육질은 건조하면 절단되기가 쉬운 해면질 또는 펄트질, 두께는 5~10 mm, 갓 아랫면의 자실층은 바늘버섯형이다. 생육시에는 초기에 난황색

이다가 노랑 진흙 또는 연록황색 건조하면 암갈색, 약간 밀납질을 띤다. 포자를 형성하는 침의 길이는 5~10 mm로 크고, 기부는 0.5 mm이며 침상이 있는 선단은 절단상으로 뽕족하지 않다. 균사는 제1 균사형이고 균사에 클램프는 없다. 포자는 타원형으로 담황갈색이며 표면은 평활하다. $4.5 \sim 5 \times 2 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 로 비아밀로이드이고 불임성세포인 시스티디아는 없다.

발생 시기 및 장소는 여름 지상의 오래된 소나무 목재 등에 주로 발생하며 셀룰로스를 주로 분해하면서 살아가는 갈색부후균이다. 주로 한국을 포함한 동아시아에 분포한다[15].

현구두솔버섯균의 목질계 섬유소 분해 효소 생성 활성

현구두솔버섯 균주에 대한 cellulase와 xylanase 효소 생성 여부를 평판 배지를 이용하여 확인한 결과 NAAS 05299 균주는 CMC와 xylan 분해환이 확인되어 cellulase

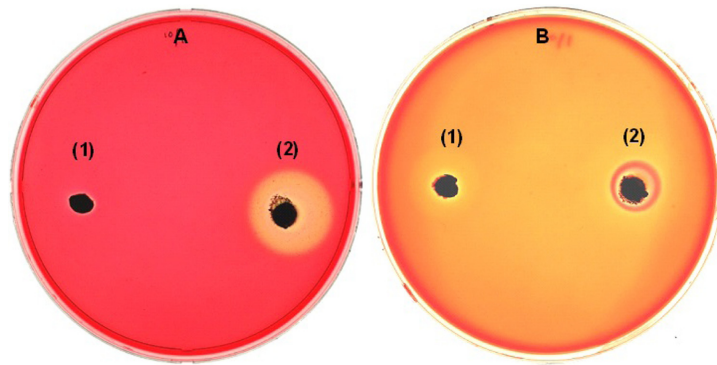


Fig. 4. Activities of cellulase (A) and xylanase (B) by *Gyrodontium sacchari* NAAS02335 (1) and NAAS05299 (2) on agar medium. The medium was made by yeast nitrogen base containing 0.4% carboxymethyl cellulose (cellulase) and 0.1% birchwood xylan (xylanase) as substrates.

와 xylanase를 생성하는 것이 확인되었으나 NAAS02335 균주는 평판배지에서 분해환이 나타나지 않았다(Fig. 4). 염료를 이용한 lignin 분해 효소 검정에서는 NAAS05299 균주는 균체 주변에 갈색 환원대를 형성하지 않았으며 NAAS02335 균주는 3종의 염료에서 갈색 환원대를 형성하였으며 이 중 gallic acid와 guaiacol을 첨가하였을 때 선명한 환원대를 형성하였다(Fig. 5). 실험에 사용한 2 균주 간 섬유소 분해 효소와 lignin 분해 효소의 생성능에는 차이가 많았다. NAAS02335 균주는 lignin 분해 효소의 활성을 나타낸 반면 NAAS05299 균주는 섬유소 분해 효소인 cellulase와 xylanase 활성이 높았다. Yeast nitrogen base 액체배지에서 배양한 배양액을 조효소액으로 한 정량 분석에서도 NAAS05299 균주가 cellulase 8.3배, xylanase 6.7배, amylase 12.8배 더 많이 생성되었으며, lignin 분해 효

소인 laccase는 NAAS05299 균주의 배양액에서는 거의 검출되지 않았으나 NAAS02335 균주는 120.47 unit/mL이 생성되었으며 Li-peroxidase도 NAAS05299 균주보다 3.7배 더 많이 생성되었다(Fig. 6). 일반적으로 갈색부후균은 리그닌 분해 효소를 거의 생성하지 않는 것으로 알려져 있으나 NAAS02335 균주는 리그닌 분해 효소 활성을 나타내었다. 본 실험에서는 2 균주의 현구두솔버섯균에 대해서만 효소의 활성을 조사하였으므로 이 균 종에 속하는 다수의 균주를 확보하여 추가적인 비교, 확인이 필요할 것으로 보인다.

목질계 바이오매스 첨가에 따른 현구두솔버섯 균주의 효소 활성

현구두솔버섯 균주의 기질에 따른 효소 활성을 조사하기

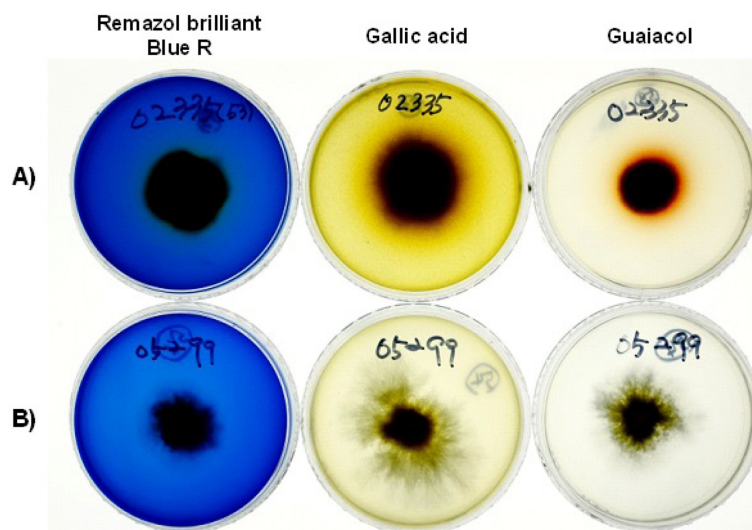


Fig. 5. The formation of brown-zone by ligninase on yeast nitrogen base agar medium containing 0.05% remazol brilliant blue R, 0.1% gallic acid, and 0.01% guaiacol. The fungal strain *Gyrodontium sacchari* NAAS 02335 (A) and NAAS05299 (B) were inoculated on center of plate by agar plug and incubated at 28°C, for 7 days.

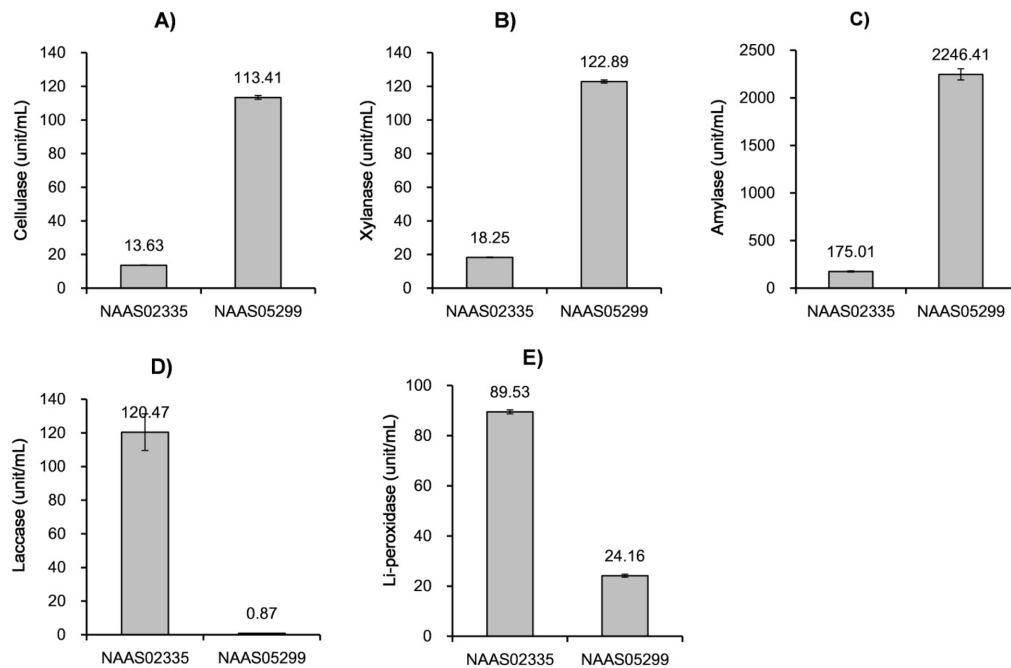


Fig. 6. Production of lignocellulytic enzymes by *Gyrodontium sacchari* NAAS02335 and NAAS05299. The enzyme activities were determined by cultures which were shaking cultured in yeast nitrogen base medium at 28°C for 7 days. The results are means of three replicate samples. A, Cellulase; B, Xylanase; C, Amylase; D, Laccase; E, Lignin peroxidase.

위하여 버섯재배 배지의 재료로 많이 사용되는 볏짚 분말과 미송, 참나무, 포플러 톱밥을 0.1% 첨가한 배지에서 7일간 배양하여 배양액의 효소 활성을 분석하였다. 기질에 따른 효소의 활성은 Table 1과 같다. Cellulase는 볏짚을 첨가하였을 때 NAAS05299 균주가 NAAS02335 균주보다 약 2배 가량 활성이 높았으나 참나무 톱밥을 첨가하였을 경우에는 NAAS02335 균주가 2배 이상 높은 활성을 나타내었다. 미송과 포플러를 첨가하였을 때는 균주간 효소 활성 차이가 거의 나타나지 않았다. Xylanase의 활성은 포플러를 첨가한 경우 NAAS05299 균주의 활성이 1.18배 높았을 뿐 균주간 큰 차이는 없었다. 리그닌 분해 효소 중 하나인 laccase는 NAAS02335 균주에서만 활성을 나타내었는데 참나무 톱밥을 기질로 하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었으며 볏짚도 우수한 활성을 보였다. Lignin peroxidase의 경우는 NAAS05299 균주가 모든 기질에서 더 활성이 높았

으며 참나무와 볏짚을 기질로 하였을 경우가 우수하였다. 기질을 첨가하지 않고 배양한 경우보다 목질계 섬유소가 포함된 바이오매스를 첨가하였을 때 섬유소 분해 효소와 lignin 분해에 관련된 효소의 활성이 증가되었다. 갈색부후 곰팡이 *Fomitopsis palustris*의 경우에도 볏짚이나 혼합 목분을 탄소원으로 첨가하였을 때 섬유소 분해에 관련된 효소의 생성이 현저하게 높아지는 것으로 보고하였는데 [16] 본 연구에서도 바이오매스 첨가에 의하여 섬유소와 리그닌 분해 효소의 활성이 증가하였다.

현구두솔버섯 균주의 filter paper 분해

현구두솔버섯 NAAS02335와 NAAS05299 균주를 액체 배지에서 cellulose로 구성된 filter paper 분해활성을 조사한 결과 배양 약 4주 후 NAAS05299 균주는 filter paper의 형체가 보이지 않을 정도로 완전히 분해하였으며, NAAS

Table 1. Lignocellulytic enzyme activities of *Gyrodontium sacchari* NAAS02335 and NAAS05299 by different substrates

Substrate	Cellulase (unit/mL)		Xylanase (unit/mL)		Laccase (unit/mL)		Li-peroxidase (unit/mL)	
	NAAS02335	NAAS05299	NAAS02335	NAAS05299	NAAS02335	NAAS05299	NAAS02335	NAAS05299
Rice straw	257.63 ± 7.08	553.32 ± 7.68	259.90 ± 5.79	273.31 ± 6.13	408.60 ± 11.38	0.6 ± 0.02	97.37 ± 4.19	123.73 ± 10.1
Pine chip	231.28 ± 2.04	251.04 ± 6.09	255.85 ± 6.48	253.01 ± 6.13	176.00 ± 11.02	4.0 ± 0.17	43.01 ± 3.20	53.76 ± 1.96
Oak chip	833.27 ± 11.98	370.70 ± 6.42	259.51 ± 9.36	266.82 ± 6.48	585.57 ± 11.94	0.0 ± 0.00	70.49 ± 2.74	93.79 ± 2.93
Poplar chip	242.99 ± 5.82	238.60 ± 6.09	273.72 ± 6.97	324.48 ± 8.10	166.20 ± 7.75	2.4 ± 0.15	83.63 ± 3.84	128.43 ± 4.53

Values are means ± standard errors, calculated from three replications.

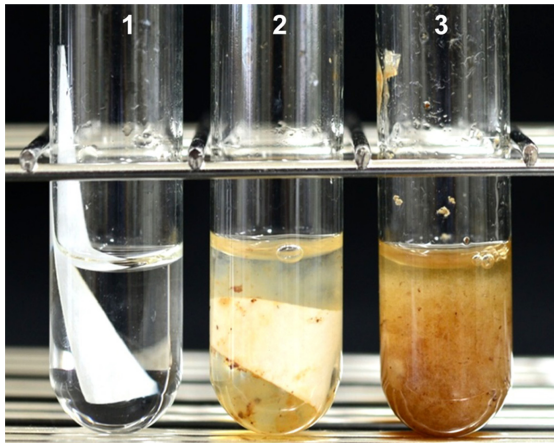


Fig. 7. Degradation of filter paper by *Gyrodontium sacchari*. The fungal strains were cultured in yeast nitrogen base broth containing a fragment of filter paper at 28°C, for 4 weeks. 1, Uninoculated control; 2, Inoculated *G. sacchari* NAAS02335; 3, Inoculated *G. sacchari* NAAS05299.

02335 균주는 일부 분해 효과가 있었으나 filter paper 조각의 형태를 유지하고 있었다. 따라서 NAAS05299 균주의 분해력이 훨씬 높은 것으로 나타났다(Fig. 7). 큰느타리버섯 수확 후 배지 추출물로 filter paper를 분해한 결과 10시간 후에 완전히 분해되어 Novozyme (Bagsværd, Denmark)에서 개발하여 상용화된 Celluclast와 대등한 분해력이 있음을 보고한 바 있으나[11], 균을 접종한 본 실험에서는 filter paper의 완전 분해에 약 4주일의 기간이 소요되었다.

현구두솔버섯 균주의 목질계 바이오매스 분해

바이오매스 분해 효과는 벚짚과 미송, 참나무, 포플러의 톱밥을 대상으로 검정하였다. 벚짚은 약 3 cm의 길이로 잘랐으며 목재 톱밥은 2 mm의 체로 걸러 하룻밤 증류수에 침지시켜 멸균하고 현구두솔버섯균을 접종하여 28°C에서 고상 배양하였다. 배양 중 2~3일 간격으로 배지를 고르게 섞어주어 접종 균이 고르게 분산되도록 하였다. 배양 4개월 경과 후 벚짚은 NAAS02335 균주와 NAAS05299 균주 처리로 분해되는 것이 관찰되었고, 미송과 참나무는 NAAS05299 균주 접종에서만 분해되었으나 포플러는 전혀 분해되지 않아 무처리구와 형태적인 차이가 거의 없었다. 분해력을 보이는 바이오매스에서는 접종균의 균사체의 생장이 관찰되었으며 참나무 톱밥에서는 NAAS05299 균주의 포자가 다량 생성되었고, 톱밥의 색소가 탈색되는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 참나무를 기질로 하였을 때 NAAS02335 균주에서 cellulose, laccase, Li-peroxidase의 활성이 더 높았으나 참나무 톱밥의 분해력은 NAAS05299 균주가 더 우수하였다. 이는 균주의 활력 및 성장 조건 등과 같은 생물적 요인이나 균주가 생산하는 각종 분해 효소들의 복합적인 작용으로 추측된다. 담자균류가 생산하는 리그닌 분해 효소는 몇 가지 조합으로 분류되는데 lignin peroxidase (LiP)-Mn peroxidase (MnP), MnP-laccase, LiP-laccase 군 중에서 MnP-laccase 군이 리그닌 분해 효율이 높은 것으로 보고하여[17], 바이오매스의 분해에는 여러 가지 효소가 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

바이오매스로부터 cellulosic 에탄올의 생산 과정에서 바이오매스 분해 효소 생성능이 우수한 부후균과 같은 미생



Fig. 8. Degradation of lignocellulosic biomass by *Gyrodontium sacchari* NAAS02335 and NAAS05299. The fungal strains were inoculated to autoclaved biomasses and incubated at 28°C, for 4 months. The black lined boxes are shown degradation of biomass by *G. sacchari*. Column 1, Rice straws; 2, Pine wood chips; 3, Oak wood chips; 4, Poplar wood chips; Row A, Uninoculated control; B, Inoculated *G. sacchari* NAAS02335; C, Inoculated *G. sacchari* NAAS05299.

물을 이용하는 생물학적 방법은 저비용, 환경친화적인 장점이 있으나 처리 기간이 상당히 길다는 단점을 지니고 있어 실용화 측면에서 문제점으로 지적되고 있다[18, 19]. 따라서 바이오매스 분해의 효율을 높이고 산업적 적용을 위해서는 관련 효소들의 종합적인 분석과 분해기간의 단축에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

적 요

참나무와 소나무 목재에서 분리한 *Gyrodontium sacchari* 균주에 대한 균학적 특성과 목질계 섬유소 분해력을 검정하였다. 균주는 참나무와 소나무 목재에서 분리하였으며 배지는 potato dextrose agar (PDA)에서 가장 생장이 좋았고 생장온도는 참나무에서 분리한 NAAS02335 균주는 25°C에서, 소나무 목재에서 분리한 NAAS05299 균주는 30°C에서 가장 우수한 생장을 보였다. 섬유소 분해 효소인 cellulase와 xylanase, amylase의 활성은 *G. sacchari* NAAS05299 균주가 6.7~12.8배 더 높았으며 리그닌 분해 효소는 *G. sacchari* NAAS02335 균주가 3.7~138.5배 활성이 더 높았으며 목질계 섬유소를 탄소원으로 첨가하였을 때 효소의 활성은 월등히 증가하였다. 목질계 바이오매스 분해력을 검정한 결과 *G. sacchari* NAAS05299 균주는 filter paper를 4주만에 완전히 분해하였고 벚짚과 미송, 참나무를 분해하였으나 *G. sacchari* NAAS02335 균주는 벚짚에서만 분해력을 나타내어 *G. sacchari* NAAS05299 균주가 더 우수한 바이오매스 분해 효과를 나타내었다.

Acknowledgements

This study was carried out with the support of “Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ01094901)”, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Eggert C, Temp U, Eriksson KE. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1151-8.
2. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez ÁT. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol* 2009;2:164-77.
3. Vicuña R, González B, Seelenfreund D, Rüttimann C, Salas L. Ability of natural bacterial isolates to metabolize high and low molecular weight lignin-derived molecules. *J Biotechnol* 1993;30:9-13.
4. Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin: Springer-Verlag; 1990.
5. Kamei I, Takagi K, Kondo R. Degradation of endosulfan and endosulfan sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsuta*. *J Wood Sci* 2011;57:317-22.
6. Ulcnik A, Kralj Cigaj I, Pohleven F. Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;29:2239-47.
7. Maciel GM, Inacio FD, de Sa-Nakanishi AB, Haminiuk CW, Castoldi R, Comar JF, Bracht A, Peralta RM. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. *Pestic Biochem Physiol* 2013;105:84-92.
8. Hirai H, Nakanishi S, Nishida T. Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere* 2004;55:641-5.
9. Fragoeiro S, Magan N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environ Microbiol* 2005;7:348-55.
10. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-8.
11. Lim SH, Kim JK, Lee YH, Kang HW. Production of lignocellulolytic enzymes from spent mushroom compost of *Pleurotus eryngii*. *Kor J Mycol* 2012;40:152-8.
12. Magalhães DB, de Carvalho ME, Bon E, Araujo Neto JS, Kling SH. Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate. *Biotechnol Tech* 1996;10:273-6.
13. Seok SJ, Lim YW, Kim CM, Ka KH, Lee JS, Han SK, Kim SO, Hur JS, Hyun IH, Hong SG, et al. List of mushrooms in Korea. Seoul: The Korean Society of Mycology; 2013.
14. Royal Botanic Gardens Kew. Index Fungorum [Internet]. London: Royal Botanic Gardens Kew; 2008 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.indexfungorum.org>.
15. Hembrom ME, Parihar A, Das K. *Gyrodontium sacchari* (Spreng.) Hjortstam: a new record of wood-inhabiting hydroid fungus from India. *J New Biol Rep* 2014;3:71-4.
16. Kim YH, Cho MJ, Shin K, Kim TJ, Kim NH, Kim YS. Enzymatic hydrolysis of rice straw, a lignocellulosic biomass, by extracellular enzymes from *Fomitopsis palustris*. *J Kor Wood Sci Technol* 2010;38:262-73.
17. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 1994;13:125-35.
18. Chung CH. Cellulosic ethanol production. *Kor J Biotechnol Bioeng* 2008;23:1-7.
19. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 2002;83:1-11.