

***Ceriporiopsis subvermispora* 및 *Irpex lacteus*를 이용한
벼짚의 리그닌분해에 관한 연구**

姜安錫 · 車東烈 · 金光布 · 劉勝憲

**A Study on Biodelignification of Rice Straw with White-rot and
Brown-rot Fungi "*Ceriporiopsis subvermispora* and *Irpex lacteus*"**

An-Seok Kang, Dong-Yeol Cha, Gwang-Po Kim and Seung-Hun Yoo

Reprinted from
RDA Journal of Agro-Environment Science
Vol. 40, No. 2, 1998
Suwon, Rep. of Korea

Ceriporiopsis subvermispota 및 *Irpex lacteus*를 이용한 벼짚의 리그닌분해에 관한 연구

姜安錫* · 車東烈** · 金光布** · 劉勝憲***

A Study on Bidelignification of Rice Straw with White-rot and Brown-rot Fungi "*Ceriporiopsis subvermispota* and *Irpex lacteus*"

An-Seok Kang*, Dong-Yeol Cha**, Gwang-Po Kim** and Seung-Hun Yoo***

ABSTRACT : This study was executed to improve techniques for digestibility of rice straw for animal feed. Better agents for delignification of crop residues rice straw with *Ceriporiopsis subvermispota* and NaOH was used for economical pretreatment. Mixed/Sequential culture of white rot fungi and brown rot fungi which were *C. subvermispota*, *Irpex lacteus*, respectively. It was shown that corn steep liquor, urea and other inexpensive nutrients can be used for growing *C. subvermispota*. A similiar medium optimal for delignification can be easily developed.

Key words : Rice staw, Delignification, White-rot fungi, Brown-rot fungi.

緒 言

균류는 유기물을 분해하는데 가장 중요한 역할을 담당하고 있으며 그중에서 담자균류에 속하는 대부분의 목재 부후균은 cellulose 또는 lignin을 분해하는 것으로 잘 알려져 있다(Leisola 등 1985, Yitzhak 등 1993, Giovanni 등 1994). 더욱이 백색부후균은 세포외적 ligninase 등을 생성하면서 리그닌이 분해되면서 H₂O₂를 발생하는 체제를 갖추는 능력이 있다(Arora와 Kahlon 1992). 유기물중의 리그닌은 그 化學構造가 복잡하기 때문에 분해가 늦고 일부는 부식화되나 利用率이 낮아 不用化되기 쉽다. 그러나 백색부후균을 이용하

여 농산부산물에서 대부분을 차지하는 리그노 셀룰로스 물질에서 리그닌만을 分解할 수 있으면 高級飼料로 개발이 가능할뿐 아니라 폐자원의 再利用率을 증대시킬 수 있다(Akin 등 1993).

김 등(1993), 강 등(1994)은 *Phanerochaete chrysosporium* 및 *Ceriporiopsis subvermispota* 등의 lignin peroxidase, laccase 생성에 관한 최적조건을 보고한 바 있다. 여기서는 목초류와 농작물 부산물 등 초분류내의 리그노셀룰로스를 분해하는데 있어 *P. chrysosporium* 보다 우수한 *C. subvermispota*를 재료로 하여(Kadan 1995) 벼짚내의 리그닌 분해 최적조건을 찾아내어 부산물 재활용 효과를 제고시키기 위하

* 江原道農業技術院(Kangwon-do Agricultural Research and Extension Services Chunchon, 200-150, Korea)

** 農業科學技術院(Nat'l Insti. of Agri. Sci. & Tech., RDA, Suwon 441-707, Korea)

*** 忠南大學校 農生物學科(Chungnam Nat'l Univ., Taejon 305-764, Korea)

여 본 연구를 실시한 결과 몇가지 결론을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

본 시험에 使用된 供試菌株는 農業科學技術院 응용미생물과에 보존중인 백색부후균 *Ceriporiopsis subvermispota* (Fp. 90031~5p) 및 갈색부후균 *Irpex lacteus* 이었다(Chandrasekaran과 Shanthamma 1969).

2. 액체배양을 위한 염가배지 선발

Biodelignification에 필요한 균주의 배양에 필요한 값이 싼 배지를 선발하기 위하여 corn steep liquor(C.S.L)이나 요소, 황산마그네슘을 이용하여 배지를 조제하였다. 그 농도는 요소를 0.13, 0.5, 1.3(W/V, %), C.S.L을 1.5, 10, 15(W/V, %), 황산마그네슘을 0.5mM로 각각 조절하여 125ml Erlenmeyer 삼각플라스크에 먼저 서술된 3가지 균주의 blended mycelia(최종 20% 농도)와 기본배지를 합하여 50ml로 하였으며, 39℃ 왕복 shaking incubator에서 6일간 배양한 후 균체량 및 Pellet size를 조사하였다.

3. 화학 및 생물적 조합처리 시험

벚짚의 리그닌 분해에 간편하게 비교할 수 있고 구둑이 용이한 NaOH를 사용하여 전처리에 의한 상승효과를 보기위하여 NaOH의 최종농도를 1.5%로 조절한(벚짚함량 20% : dry base w/w) 것과 농도를 각각 0.3%로 조절(벚짚함량 20% : dry base w/w)하여 실온에서 overnight한 처리와 농도를 0.3%(벚짚함량 20% : dry base w/w)로 조절하여 121℃ 1.1기압에서 10분간 멸균처리를 하여 각 처리모두 최종 pH를 4.2로 조절한 후 이를 배지재료로 하여 *C. subvermispota*를 공시하여 고체배양과 액체배양을 동시에 실시하였다.

고체배양은 전처리한 벚짚배지를 65% 수분으로 조절한 뒤 균층을 사방 1cm로 떼어 4일간 배양 뒤 벚짚

의 탈색정도를 육안으로 관찰하였고, 액체배양은 벚짚을 1% 함량으로 각각 조절하여 250ml 삼각플라스크에 넣고 *C. subvermispota*균주를 접종한 다음 28℃에서 14일간 배양한 후 리그닌 함량 및 레마졸블루 탈색도를 각각 조사하였다.

4. 리그닌 및 섬유소 분해균의 조합배양 실험

I. lacteus(*I. l.*)와 *C. subvermispota*(*C. s.*)의 공동배양 또는 연쇄배양이 벚짚의 리그닌분해에 미치는 영향을 검토하고자 실험을 실시하였다. 공시배지는 강등(1994)이 이용한 BⅢ배지를 이용하였다.

각 처리는 *C. s.*와 *I. l.*의 동시배양, *I. l.* 접종 7일 경과 뒤 *C. s.*의 단독배양 등 5종류이다.

각 처리의 내용은 BⅢ배지를 26ml, 각 균주의 blended mycelia를 10%, 벚짚을 1%로 조절하였고 나머지는 증류수를 넣어 최종부피를 50ml로 하여 125ml 삼각플라스크에 넣어 28℃ 회전진탕배양기(100rpm)에서 15일간 배양하면서 2일마다 ligninase 활성을 강 등(1994)의 방법으로 측정한 다음 배양종료 후 리그닌 함량 및 레마졸블루 탈색도를 조사하였다.

5. 리그닌 함량조사

벚짚의 리그닌 함량을 조사하기 위하여 건조된 벚짚 분말 200mg 에 72%의 H₂SO₄ 2.0ml를 첨가한 후 30℃에서 1차 가수분해한 뒤 이를 다시 H₂SO₄ 4%(w/w)에 희석하여 121℃에서 1시간동안 2차 가수분해 하였다. 이 시료는 glass fiber 여지를 칸 항량 crucible에 통과시킨 후 여지를 5ml 증류수로 3회, 온수 증류수로 6회 세척한 다음 건조중량을 측정하였다.

리그닌 분해효소의 작용 여부를 검정하기 위하여 Remazol Blue R염색약 (Sigma : C₂₂H₁₆N₂O₁₁S₂Na₂)를 이용하여 590nm에서 흡광도를 (Beckman Du® 650, U.S.A.)를 측정하였다.

結果 및 考察

1. 액체배양을 위한 염가배지 선발

생물적 리그닌 분해 처리가 경제적으로 유익하려면

배지생산비를 최소화시키는 방법이 신중하게 검토되어야 할 것이다. 따라서 corn steep liquor(C.S.L.)이나 농업용 비료인 요소, 농산부산물 등 산업적 영양원에 대한 이용성 검토가 이루어져야 한다. Newman과 Kadan(1995)은 알콜생산에 산업적으로 적합한 배지를 개발하였으나 본 시험에 사용된 Brown rot fungi나

white rot fungi에 대한 배지의 연구는 미흡하다. 표 1은 Brown rot fungi인 *Irpex lacteus*(기계충버섯)에 대한 염가배지 선발 결과이다.

*I. lacteus*균의 배지조성별 균체 건물중은 0.5% 요소와 15% 및 1.5% CSL의 조합처리가 가장 높은 것으로 나타났다(표 1). 이는 배지첨가 재료의 양이 적으면서

Table 1. Selection of cost effective media using *Irpex lacteus*

Nutrients			Mycelial growth (6days)	
Urea (% w/v)	C S L (% w/v)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (mM)	Pellet size range (mm)	Mycelial dry weight (mg)
1.3	15.0	5	1.30~3.25	60.7
1.3	15.0	0	1.43~3.63	39.5
1.3	10.0	5	1.58~3.69	66.5
1.3	10.0	0	1.76~4.02	55.0
1.3	1.5	5	1.65~3.20	73.1
1.3	1.5	0	1.70~3.30	65.6
0.5	15.0	5	1.76~3.26	81.0
0.5	15.0	0	2.05~3.40	63.9
0.5	10.0	5	1.58~3.25	63.1
0.5	10.0	0	1.60~3.50	36.9
0.5	1.5	5	1.76~3.26	81.0
0.5	1.5	0	1.80~3.45	63.9
0.13	15.0	5	1.55~2.66	56.1
0.13	15.0	0	2.10~3.00	66.3
0.13	10.0	5	0.53~2.31	77.0
0.13	10.0	0	2.08~4.44	55.2
0.13	1.5	5	0.48~1.65	68.2
0.13	1.5	0	0.56~1.73	54.2

Table 2. Selection of cost effective media using *Ceriporiopsis subvermispora*

Nutrients			Mycelial growth (6days)	
Urea (% w/v)	C S L (% w/v)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (mM)	Pellet size range (mm)	Mycelial dry weight (mg)
1.3	15.0	5	0.65~1.45	59.2
1.3	15.0	0	1.20~2.25	46.5
1.3	10.0	5	0.77~1.28	43.6
1.3	10.0	0	1.47~2.20	26.6
1.3	1.5	5	1.27~2.19	65.0
1.3	1.5	0	1.30~2.45	51.9
0.5	15.0	5	1.36~1.83	80.2
0.5	15.0	0	1.27~2.77	116.4
0.5	10.0	5	0.40~1.20	22.1
0.5	10.0	0	0.58~2.30	37.9
0.5	1.5	5	1.23~1.29	95.4
0.5	1.5	0	1.06~2.07	44.8
0.13	15.0	5	1.15~1.36	93.9
0.13	15.0	0	1.52~3.61	67.7
0.13	10.0	5	0.55~1.50	25.7
0.13	10.0	0	1.74~4.28	45.1
0.13	1.5	5	1.58~3.04	97.7
0.13	1.5	0	1.50~3.19	62.4

효과는 크게 나타나는 것으로 보아서 경제성이 높을 것으로 본다. 이의 결과로 보아 벚짚 발효의 측면에서 다른 균주와의 비교검토가 더욱 필요할 것으로 사료된다. 또한 이 결과에서 나타난 중요한 사실은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용할 경우 균체크기가 작아지기 때문에 효과적이며 균체량은 증가하는 경향으로 나타났다. 이와같은 원인은 Mg^{2+} 에서 2가의 양이온에 의한 것으로 생각된다.

White rot fungi의 일종인 *C. subvermispota*균의 열가매지를 선별하고자 실험한 결과를 나타내면 표 2와 같다. 여기에서 나타난 결과를 검토하여 보면 생산비와 균체의 수량면에서 0.13%의 요소와 1.5% CSL의 조합처리가 가장 적합한 것으로 나타났다. *C. subvermispota*균의 경우도 *I. lacteus*와 같이 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가하면 균체 크기가 작아지는 결과를 얻었다.

이는 Leatham과 Stahman(1981)이 표고버섯 균사 배양시 Mg^{2+} 가 균사생장 촉진효과를 나타낸다고 한 결과와 일치하였다.

2. 화학 및 생물적 조합처리 시험

벚짚에 대한 화학 및 생물적 조합처리로서 NaOH나 요소 등을 전처리한 후 리그닌 분해균을 이용하면 리그닌 분해처리 비용이 절감되는 효과를 기대할 수 있다.

표 3에서 나타난 바와 같이 *C. subvermispota*균은

벚짚을 탈색시키는데 있어 우수한 결과를 나타내고 있다. 본 시험에서는 공시균주를 벚짚에 처리하여 리그닌 분해에 미치는 영향을 측정하기 위하여 레마졸 블루탈색도 반응에 의한 방법을 적용하였다. 이를 위하여 Remazol blue표준곡선을 만든 후에 이를 상수치로 하여 탈색비율을 환산한 값에 의하여 리그닌 분해력을 구명하였다.

공시균주의 균사 및 벚짚배지과 혼재된 시료를 각각 취하여 Remazol Blue R.의 농도가 0.02%되게 조절하여 125ml Erlenmeyer 삼각플라스크에 물과, 염색약, 배지의 총부피를 50ml로 하여 2.5일간 진탕배양하여 590nm에서 OD를 측정 한 뒤 그림 1에서 얻은 측정치를 이용하여 탈색도 = 0.02-측정치/0.02로 하였다.

표4는 화학제인 NaOH의 전처리 방법을 달리한 후 *C. subvermispota*를 벚짚 액체배지에 배양하여

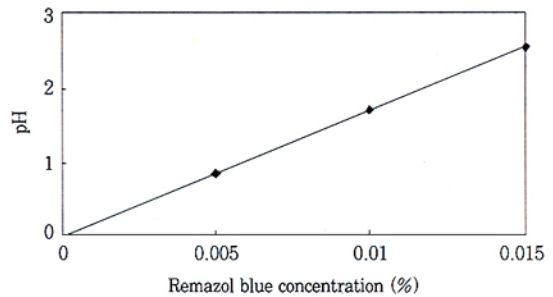


Fig. 1. Remazol blue standard curve.

Table 3. Combination treatment : Subjective decolorization degree in solid culture

Chemical pretreatment conditions	Biological treatment with <i>C. subvermispota</i>
1.5% NaOH ¹ at room temperature/overnight	+++ ²
0.3% NaOH at room temperature/overnight	+++
0.3% NaOH at 121°C/10min autoclaved	+++

¹ NaOH concentration based on dry wt NaOH/dry wt straw, e.g., 1.5%

NaOH = 1.5g dry NaOH+98.5g dry biomass

² +++ : Excellent

Table 4. Combination treatment : Remazol blue decolorization degree of *C. subvermispota* in liquid culture

Chemical pretreatment conditions	Remazolblue decolorization(%)
1.5% NaOH ¹ at room temperature/overnight	94
0.3% NaOH at room temperature/overnight	91
0.3% NaOH at 121°C/10min autoclaved	90

¹ NaOH concentration based on dry wt NaOH/dry wt straw, e.g., 1.5% NaOH = (1.5g dry NaOH+98.5g dry biomass)

Table 6. Lignin contents and decolorization degree of Remazol blue in mixed and sequential cultures

Culture types	Lignin contents(%)	Remazol blue decolorization(%)
Mixed culture (C.s+I. l)	28.3	58.5
Sequential culture after 7 days (I. l +C.s)	14.7	96.5
Sequential culture after 7 days (C.s+I. l)	14.2	71.0
I. l	33.5	57.5
C.s	24.3	70.0

Table 5. Maximum activity of ligninase with mixed and sequential culture of rot fungi

Culture types	Maximum activity (Unit/L)
Mixed culture (C.s+I. l)	218.6
Sequential culture after 7 days (I. l +C.s)	293.4
Sequential culture after 7 days (C.s+I. l)	275.3
I. l	236.8
C.s	207.9

Remazol blue의 탈색정도를 나타낸 결과이다. 각 처리 별 큰 차이없이 양호하였으나, 1.5% NaOH 농도에 1 일간 실내에 방치하여 두었을 때 탈색정도가 가장 높았다. 그러나 가장 경제적인 방법은 0.3% NaOH를 벚짳에 전처리하는 것이라고 할 수 있을 것으로 생각된다.

3. 리그닌 및 섬유소 분해균의 조합 배양실험

벚짳에 섬유소 분해균과 리그닌 분해균의 혼합배양, 연속배양 및 각균의 단독배양시 리그니네이저 활성 및 활성최대치 소요일수를 표 5에서 나타내었다.

갈색부후균과 백색부후균의 동시 배양과 단독 배양에 비하여 양자의 균을 연속 배양하는 경우가 효소 활성이 높은 경향을 보였다. 백색부후균인 리그닌 분해균과 갈색부후균인 섬유소 분해균을 조합배양하면 synergy 효과를 주고 리그닌 분해력을 증진시킨다(Kiran 1995).

또 이들균의 배양후 벚짳의 리그닌 함량 및 레마졸블루 탈색 정도를 조사한 결과 역시 양자의 균을 연속 배양하는 경우에서 리그닌 함량이 가장 적고 탈색정도도 높아서(표 6) 위의 결과를 입증하는 양상을 보였다.

摘 要

백색부후균인 *C. subvermispora*와 갈색부후균인 *Irpex lacteus*를 이용하여 벚짳의 리그닌 분해력을 제

고 시키기 위한 몇가지 실험을 실시하여 벚짳 등 농산부 산물의 이용도 증가를 위한 기초자료를 활용하기 위하여 본 시험을 실시한 결과 얻어진 몇가지 결론을 요약하면 다음과 같다.

1. *I. lacteus*의 염가배지는 생산비와 균체 수량면에서 0.5% 요소와 15% 및 1.5% C.S.L의 농도가 적합하였고 *C. subvermispora*의 경우는 0.13% 요소와 1.5% C.S.L의 조합처리가 양호하였다.

2. 벚짳의 리그닌 분해를 위한 화학 및 생물적 조합을 할 경우 0.3% NaOH농도로 실온에서 1일간 방치한 뒤에 *C. subvermispora*를 배양할 때 Renazol blue 탈색정도가 높은 것으로 보아서 이같은 처리는 리그닌 분해를 효율적으로 제고시킬 수 있었다.

3. 벚짳에 갈색부후균과 백색부후균 등의 두 균을 연속배양 하는 것이 동시배양 또는 단독배양에 비하여 리그니네이저 효소활성도도 높을뿐만 아니라 레마졸블루 탈색도가 높아서 리그닌 분해에 효과적으로 나타났다.

引用文獻

- Akin D E, A Sethuraman, W H Morrison, S A Martin and K E L Eriksson. 1993. Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. Appl. Environ. Microbiol. 59(12):4274~4282.
- Arora M and S S Kahlon. 1992. Bioconversion of rice straw with white rot fungi. Indian J. Microbiol. 32(4):469~472.
- Chandrasekaran A and M S Shanthamma 1969. A new Technique for the Economic Production of Cellulase. J. Food Sci. Technol. 6:12~19.
- Giovanni G, Sermanni Alessandro D' Annibale, Gabriella Di Lena, Nicoletta Silvia Vitale, Elena Di Mattia, Vincenzo Minelli. 1994. The production of exoenzyme by *L. edodes* and *P. ostreatus* and their use for upgrading corn straw. Bioresource Technology 48 : 173~178.

- 홍인표. 1992. 동국대 박사학위청구논문 pp. 19~20.
- 하덕모, 박계인. 1982. 응용미생물학 개론사(서울). p171~184.
- 강안석, 차동열, 김경수, 홍인표, S C Croan, 유승현. 1994. *Phanerochaete chrysosporium*과 *Ceriporiopsis subvermispota* 균주의 Ligninase 및 Laccase 생산 최적조건에 관한 연구. 한국균학회지 22(3):254~259.
- 김경수, 김영호, 강안석, 유창연, 차동열, S C Croan. 1993. 진탕배양에 의한 *Phanerochaete chrysosporium* Diffuse 균사의 Ligninase생성에 관한 연구. 한국균학회지 21(4):310~315.
- Kadan K L. 1995. Final report on biodelignification of rice straw. I.A.E.A. report note.
- Leatham G F and M A Stahmann, 1981. Studies on the laccase of *L. edodes* : specificity, localization and association with development of fruiting bodies. J. Gen. Microbiol. 125:147-157.
- Leisola S A, U M T Wyss and F Armin. 1985. Strategies for production of high ligninase activities by *P. chrysosporium*. J. Biotech. 3:97~107.
- Newman M M and Kadan K L. 1995. Development of a cost effective medium for ethanol production from biomass. 17th symposium on Biotech for Fuels and Chemicals note.
- Yitzhak H, Z Kerem and B Gorodecki. 1993. Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *P. ostreatus*. J. of Biotech. 30:133~139.