

## 목재부후균에 의한 trans,trans-farnesol의 생물변환

김영훈<sup>1</sup> · 이수연<sup>2</sup> · 박미진<sup>3</sup> · 최인규<sup>2</sup> · 이재원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학부

<sup>2</sup>서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부

<sup>3</sup>국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과

### Biotransformation of trans,trans-farnesol by Wood Rot Fungi

Young-Hun Kim<sup>1</sup>, Su-Yeon Lee<sup>2</sup>, Mi-Jin Park<sup>3</sup>, In-Gyu Choi<sup>2</sup>, and Jae-Won Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Products and Technology (BK21 Program), Chonnam National University,  
Gwangju 500-757, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University,  
Seoul 151-921, Republic of Korea

<sup>3</sup>Division of Wood Chemistry and Microbiology, Department of Forest Products, Korea Forest Research Institute,  
Seoul 130-712, Republic of Korea

(Received August 24, 2011 / Accepted October 5, 2011)

In this study, we screened and evaluated possibility of wood rot fungi as biocatalyst for biotransformation of sesquiterpenes. Screening were performed to select the most promising microorganisms with ability to biotransformation the substrate trans,trans-farnesol. Trans,trans-farnesol which is synthesized precursor of sesquiterpenes was used for resistance test on 19 of wood rot fungi. From the 19 tested wood rot fungi, 5 were selected by resistance test on different concentration of trans,trans-farnesol. Biotransformation was performed with selected wood rot fungi on liquid culture. The metabolites detected by GC-MS analysis were nerolidol for *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (jungh) Imaz and eicosane for *Coriolus versicolor* (L.Fr) Prlar and isoborneol for *Fomitopsis pinicola* and isocyclocitral for *Lampteromyces japonicus*. As the results, wood rot fungi could be potential biocatalyst for biotransformation of sesquiterpenes.

**Keywords:** biotransformation, sesquiterpene, trans,trans-farnesol, wood rot fungi

생물변환(biotransformation)은 생체가 가지고 있는 촉매의 기능을 이용하여 생체 내에 침입한 이물질을 다른 물질로 변환시키는 과정을 말한다(Abraham *et al.*, 1985). 지금까지 생물변환은 균, 박테리아, 곤충, 식물, 효소 등 다양한 생촉매를 적용해 왔으며 주로 박테리아나 균을 이용한 연구가 대부분을 차지하고 있다(Banthorpe *et al.*, 1973; Busmann and Berger, 1994). 이러한 생물변환의 목적은 값싼 기질을 이용하여 천연물의 고부가가치 산물을 생산하는 것이다. 따라서 terpene류와 같은 구조가 간단하고 쉽게 고부가가치 산물로 전환되는 기질이 주로 사용되었다. Terpene의 생물변환에는 *Aspergillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp. 등이 사용되어 왔으며 기질로는 geraniol, nerol, citral과 같은 monoterpene류가 주로 이용되었다. 이들은 생촉매의 생물변환을 통해 linalool,  $\alpha$ -terpineol과 같은 고부가가치 산

물을 생산하였다(Cadwallader *et al.*, 1989; Tan *et al.*, 1998; Onken and Berger, 1999; Arruda *et al.*, 2005; Toniazzo *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008).

지금까지 생촉매로 목재부후균에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 목재부후균은 생장에 있어 앞에서 언급한 생촉매보다 생장속도가 느리기 때문에 제한적으로 이용되었다. 하지만 목재부후균은 넓은 pH 범위에서 생장이 가능하고 목재의 난분해성 성분을 분해하기 위해 다양한 산화효소, 가수분해효소 등을 분비한다(Tuor *et al.*, 1995; Marostica *et al.*, 2009). 특히 Gamero 등(2011)의 연구결과에 의하면  $\beta$ -glucosidase가 monoterpene류의 생물변환에 영향을 미치는 인자로 확인되었다.  $\beta$ -Glucosidase는 대부분의 목재부후균이 분비하는 가수분해효소로 알려져 있으며 이러한 특징을 고려하였을 때 목재부후균은 생물변환의 생촉매로서 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

목재부후균을 생촉매로서 monoterpene의 생물변환에 대한 연구는 일부 연구자들에 의해 이루어져 왔다. Busmann과 Berger

\*For correspondence. E-mail: Ljw43376@chonnam.ac.kr; Tel.: +82-62-530-2098; Fax: +82-62-530-2099

**Table 1.** Wood rot fungi used for resistance test (in this study)

Fungus	Korean Name	Provided by
<i>Hericeum erinacium</i>	노루궁뎅이	Korea Forest Research Institute
<i>Ganoderma aplanatum</i> (pers.:Wallr.) Pat	잔나비불로초	
<i>Lentinus lepideus</i> (Fr.: Fr.) Fr.	갓버섯	
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Singer	팽이버섯	
<i>Lampteromyces japonicus</i>	화경버섯	
<i>Hericium americanum</i>	노루궁뎅이	
<i>Coprinus atramentarius</i>	두엄먹물버섯	
<i>Lepista nuda</i>	민자주방망이	
<i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i> (Jungh.) Imaz.	붉은 덕다리버섯	
<i>Fomitopsis pinicola</i>	잔나비버섯	
<i>Schizophyllum commune</i>	치마버섯	
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	표고버섯	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. Fr.) kummer	느타리 버섯	
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Singer	팽이 버섯	
<i>Lentinus lepideus</i> (Fr.: Fr.) Fr.	갓버섯	
<i>Coriolus versicolor</i> (L. Fr.): Prlar	구름버섯	Bioenergy center, Chonnam National University
<i>Wolfiporia cocos</i>	복령	
<i>Schizdhyllum commune</i>	치마버섯	
<i>Postia placenta</i>	구멍버섯	

**Table 2.** Composition of SSC liquid culture

Components	Concentration (%)
Glucose	1
Ammonium tartrate	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
Thiamine·HCl	0.0001
Trace element	10 ml/L

(1994)는 *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus sajorajua*와 같은 목재부후균이 myrcene로부터 휘발성 대사산물을 생산하는데 적합하다고 하였다. 하지만 아직까지 목재부후균을 이용한 sesquiterpene의 생물변환에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. Sesquiterpene류는 monoterpene류 보다 항진균, 진통에 효과가 있어 sesquiterpene류를 이용한 생물변환은 보다 고부가가치의 산물을 생산할 수 있는 높은 가능성을 가지고 있다 (Sode et al., 1989).

따라서 본 연구에서는 sesquiterpene의 합성전구체로 알려진 trans,trans-farnesol을 기질로 사용하여 목재부후균에 의한 생물변환을 시도하여 그 가능성을 제시하고자 한다.

공시균주로는 국립산림과학원 녹색자원이용부 바이오에너지 연구과와 전남대학교 바이오에너지센터로부터 분양 받은 19종의 목재부후균을 이용하였다(Table 1). 공시균주는 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에서 선배양하여 4℃에 보관하였다. 생물변환의 기질은 sesquiterpene류의 합성 전구체인 trans,trans-farnesol (95% pure)을 Sigma-Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다.

Trans,trans-farnesol의 생물변환을 위한 생축매로서 가능한

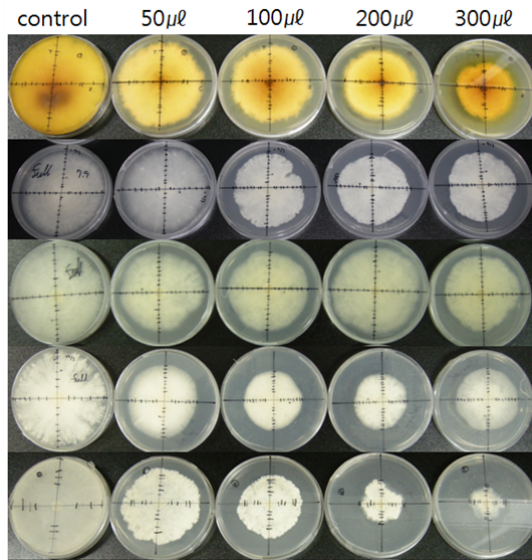
균주를 선정하기 위하여 총 19종의 목재부후균을 이용하여 기질에 대한 저항성 테스트를 실시하였다. 저항성 테스트는 기질이 첨가되지 않은 배지와 기질을 각 50, 100, 200, 300 µl/100 ml 첨가한 PDA 배지에서 실시되었으며, 균을 접종한 후 28℃에서 배양하여 균사 생장량 차이를 비교·분석하였다.

생물변환을 위해서 저항성 테스트에서 선발된 균주는 Shallow Stationary Culture (SSC) 배지에서 선배양하였다(Table 2). 250 ml 삼각플라스크에 100 ml의 SSC 배지를 첨가한 후 직경 9.5 mm cork borer를 이용하여 각 균주를 20개씩 접종한 후 shaking incubator (28℃, 150 rpm)에서 7일간 선배양을 실시하였다. 이후 trans,trans-farnesol 200 µl를 첨가한 뒤 동일한 조건에서 배양하였다. 생물변환의 유무를 확인하기 위해 대조균으로 균만 접종한 것과 기질만 첨가한 것을 설정하여 비교·분석하였다.

대사산물 분석을 위해 기질 첨가 후 일정 시간(0, 3, 5, 7, 10일 경과 후) 배양한 후 배지와 균을 분액칼때기로 옮겨 hexane을 200 ml 첨가한 뒤 3분간 추출하는 과정을 2반복 실시하였다. 이 과정에서 얻어진 추출물은 감압농축기를 이용하여 완전히 농축하고 hexane 2 ml에 녹여 최종 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 GC/MS 분석에 의해 대사산물을 확인하였다. 분석 조건은 GC (model-Agilent 6890), column (DB-5MS), carrier gas (He gas)를 사용하였다. 온도 조건은 injector 250℃, detector 300℃이었으며, oven 온도는 초기온도 70℃에서 10분간 유지시킨 후 5℃/min씩 상승시켜 최종 280℃까지 상승시킨 후 10분간 유지하였다. Split ratio는 20:1로 하였고, mass range는 50-800 m/z 이고, EI mode로 분석하였다. 얻어진 시료 peak의 mass data와 표준 library data와 비교하여 peak의 화합물 구조를 확인하였다.

생물학적 변환의 기질로 사용된 trans,trans-farnesol은 항균성

을 가지고 있는 것이 보고 된 바 있다(Kromidas *et al.*, 2006). 따라서 목재부후균이 생물학적 변환에 있어서 생촉매로서 이용되기 위해서는 기질에 대한 저항성이 필요하다고 생각되어 기질의 농도를 달리하여 저항성 테스트를 실시하였다. 저항성 테스트에서 기질을 첨가하지 않은 배지와 비교하여 성장량이 우수한 균주를 선발하였다. 대부분의 균주에서 기질 농도 200  $\mu$ l까지 생장이 가능하였으며 그 이상의 농도에서는 지속적인 성장을 보이지 않았다. *Lampteromyces japonicas*, *Fomitopsis pinicola*, *Coriolus versicolor* (L. Fr.) Prlar, *Schizophillum commune*, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (Jungh.) Imaz은 대조구와 비교하여 높은 성장량을 나타냈다(Fig. 1). 대부분의 균주는 기질의 농도 증가에 따라 성장에 저해를 받았으나 *C. versicolor* (L. Fr.) Prlar은 100-300  $\mu$ l의 높은 기질 농도에서도 빠른 성장을 나타냈다

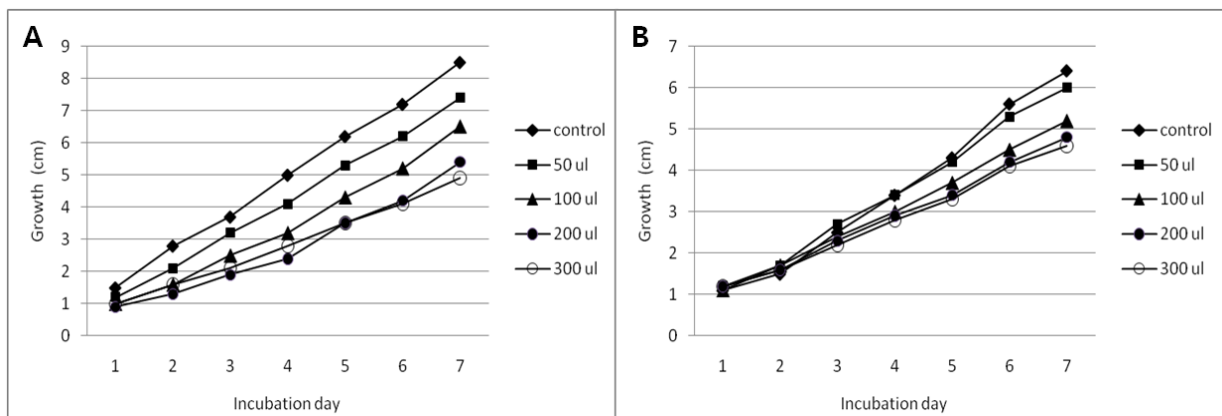


**Fig. 1.** Resistance of wood rot fungi to trans,trans-farnesol after 7 days incubation [A, *Lampteromyces japonicas*; B, *Fomitopsis pinicola*; C, *Coriolus versicolor* (L. Fr.) Prlar; D, *Schizophillum commune*; E, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (Jungh.) Imaz].

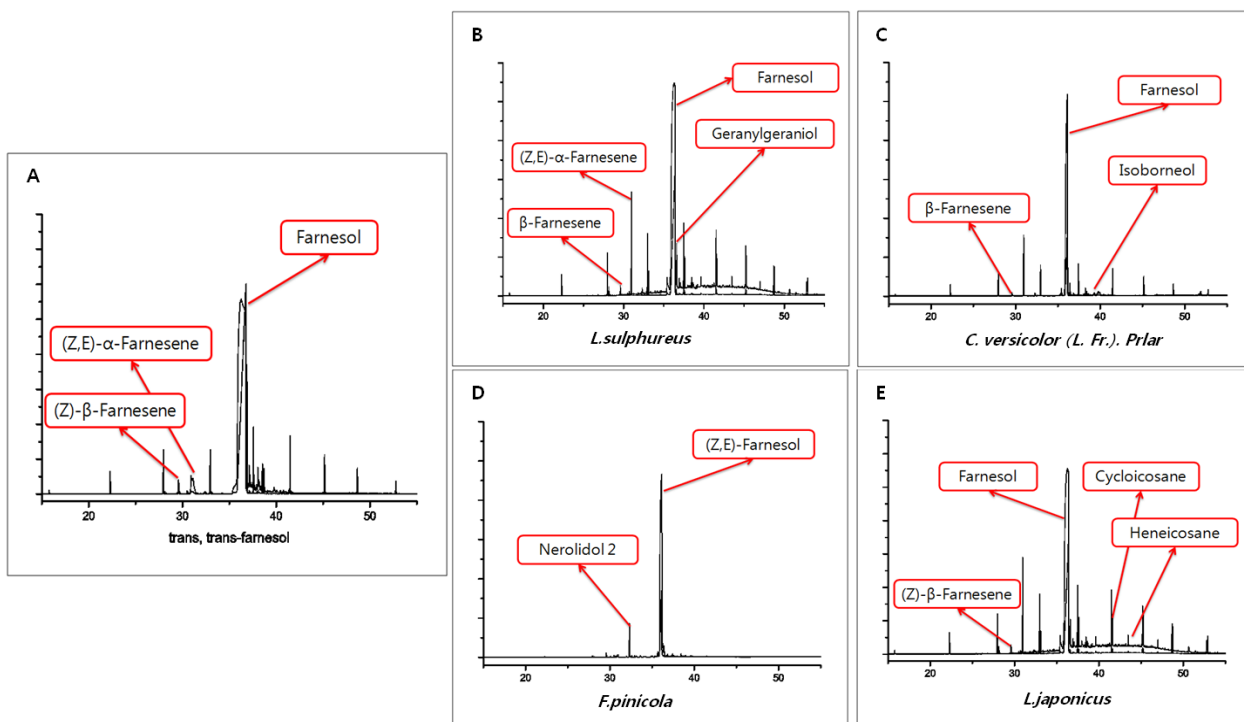
(Fig. 2B). *F. pinicola*는 저농도의 기질에서 기질 농도에 따라 성장량의 차이를 나타냈지만 300  $\mu$ l의 고농도에서는 200  $\mu$ l에서와 유사한 성장속도를 나타냈다(Fig. 2A). 이와 같이 저항성 테스트에서 선발된 균주는 기질에 대한 높은 저항성을 나타내고 있어 생물변환 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

저항성 테스트에서 선발된 5종의 균주를 이용하여 trans,trans-farnesol의 생물 변환을 시도한 결과 *L. sulphureus* var. *miniatus* (Jungh.) Imaz, *C. versicolor* (L. Fr.) Prlar, *F. pinicola*, *L. japonicas* 등 4개의 균주에서 새로운 대사산물이 생성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). *L. sulphureus* var. *miniatus* (Jungh.) Imaz를 생촉매로 사용하였을 경우 RT 36.93에서 geranylgeraniol을 확인하였고 *C. versicolor* (L. Fr.) Prlar를 생촉매로 하였을 경우 RT 39.29에서 isoborneol을 확인하였다. *F. pinicola*의 경우 RT 32.33에서 nerolidol을 확인하였으며 *L. japonicas*에서는 cycloicosane (RT 41.50), heneicosane (RT 43.47), eicosane (RT 52.89) 등이 검출되었다. 이와 같은 대사산물은 동일한 배양조건에서 기질을 제외하고 균만 배양하였을 때는 나타나지 않았던 대사산물로 생물변화에 의해 기질부터 유도된 것으로 판단된다.

Nerolidol은 sesquiterpene의 일종으로 farnesol과 하나의 수산기 위치만 다른 선형구조를 가지고 있으며 terpenoid 합성 전구체로 이용되는 물질이다(Kirk *et al.*, 1986). 이것을 단독으로 사용하였을 경우 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*에 대하여 항박테리아 활성을 가지고, *Leishmania parasites*에 대해서도 저해 활성을 가지고 있다(Lee, 2010; Spindola *et al.*, 2010). Geranylgeraniol은 diterpene류의 일종으로 생물체에서 다양한 terpenoids 합성에 관여하는 물질이며 식물체 내에서 carotenoids, gibberellins, tocopherols, chlorophylls의 합성을 위한 전구 물질이다. 이 외에도 geranylgeraniol의 진통작용에 대한 연구가 보고된 바 있다(Sode *et al.*, 1989). Isoborneol은 2개의 고리환을 가지고 있는 terpenoid로 다양한 정유의 구성성분이며, Jacobson에 의해 천연 살충제로 알려져 있다(Jacobson, 1990). 이러한 대사산물들의 구조적 특징은 기질로 사용된 trans,trans-farnesol이 생물학적 변환의 촉매인 목재부후균에 의해 일부의 수산기에 자리 바꿈이 일어나거나, 고리 형성 반응 등이 일어나



**Fig. 2.** Resistance of *Fomitopsis pinicola* (A) and *Coriolus versicolor* (L. Fr.) Prlar (B) to trans,trans-farnesol depending on incubation days.



**Fig. 3.** Metabolites of selected fungi on trans,trans-farnesol after 7 days incubation as determined by GC/MS (A, trans,trans-farnesol as control; B, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (Jungh.) Imaz.; C, *Coriolus versicolor* (L. Fr.) Prlar; D, *Fomitopsis pinicola*; E, *Lampteromyces japonicus*).

생성된 것으로 생각된다.

본 연구에서는 새로운 대사산물의 검출로 목재부후균을 생촉매로 한 sesquiterpene의 생물변환 가능성을 확인할 수 있었다. 하지만 각 대사산물의 수율이 낮은 문제점을 가지고 있어 수율 향상을 위한 생물변환에 적합한 배지 조성, 대사산물 생성에 관여하는 효소 탐색 및 유도 등에 대한 후속 연구가 필요하다.

### 적요

본 연구에서는 sesquiterpene류의 생물학적 변환을 위한 생촉매로서 목재부후균을 선발하고 생물변환 가능성을 확인하였다. Sesquiterpene류 합성 전구체로 알려진 trans,trans-farnesol을 기질로 하여 총 19종의 목재부후균에 대하여 저항성 실험을 실시하였다. 기질의 농도를 달리하여 저항성 테스트를 실시하여 생물변환 가능성을 갖는 5종의 균주를 선발하였으며 선정된 균주를 이용하여 액체배지 조건에서 trans,trans-farnesol의 생물변환을 시도하였다. GC/MS를 이용하여 분석한 결과 *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (jungh) Imaz, *Coriolus versicolor* (L. Fr.) Prlar, *Fomitopsis pinicola*, *Lampteromyces japonicus* 등 4개의 균주에서 각각 nerolidol, eicosane, isoborneol, isocyclocitral 등의 대사산물을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 sesquiterpene류의 생물학적 변환을 위한 생촉매로서 목재부후균의 가능성을 확인하였다.

### 감사의 말

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원인 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(2011-0018393).

### 참고문헌

Abraham, W.R., Hoffmann, H.M., Kieslich, K., Reng, G., and Stumpf, B. 1985. Microbial transformation of some monoterpenoids and sesquiterpenoids. *Ciba Found Symp.* **111**, 146–160.

Arruda, D.C., Alexandri, F.L., Katzin, A.M., and Uliana, S.R.B. 2005. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Amer. Soc. Microbiol.* **49**, 1679–1687.

Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., and Young, M.R. 1973. Mono and Sesquiterpenoids, pp. 1–185. In Hanson, J.R. (ed.). *Terpenoids and steroids*, vol. 12, Royal Soc. Chem. UK.

Busmann, D. and Berger, R.G. 1994. Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **37**, 39–43.

Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., and Higgins, D.P. 1989. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *J. Food Sci.* **54**, 1241–1245.

Gamero, A., Manzanares, P., Querol, A., and Belloch, C. 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hydrids. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 92–97.

Jacobson, M. 1990. Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents, p. 213. CRC Press Inc., USA.

Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E., and Farrell, R.L.

1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth condition and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 27–32.
- Kromidas, L., Perrier, E., Flanagan, J., Rivero, R., and Bonnet, I.** 2006. Release of antimicrobial actives from microcapsules by the action of axillary bacteria. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**, 103–108.
- Lee, S.Y.** 2010. Analysis of terpenoids released during the drying process of *Cryptomeria japonica* and microbial biotransformation of terpenoids. The Graduate School Seoul National University, Seoul.
- Lee, J.W., Kim, H.Y., Koo, B.W., Choi, D.H., Kwon, M., and Choi, I.G.** 2008. Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 162–167.
- Marostica, M.R.Jr., Silva, T.A.A.R.e, Franchi, G.C., Nowill, A., Pastore, G.M., and Hyslop, S.** 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chem.* **116**, 8–12.
- Onken, J. and Berger, R.G.** 1999. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated- membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 158–163.
- Sode, K., Karube, I., Araki, R., and Mikami, Y.** 1989. Microbial conversion of  $\beta$ -ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1191–1195.
- Spindola, H.M., Servat, L., Denny, C., Rodrigues, R.A., Eberlin, M.N., Cabral, E., Sousa, I.M., Tamashiro, J.Y., Carvalho, J.E., and Foglio, M.A.** 2010. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol.* **10**, 1.
- Tan, Q., Day, D.F., and Cadwallader, K.R.** 1998. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochem.* **33**, 29–37.
- Toniazzo, G., De Oliveira, D., Dariva, C., Oestreicher, E.G., and Antunes, O.A.C.** 2005. Biotransformation of (-) $\beta$ -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121**, 837–844.
- Tuor, U., Winterhalter, K., and Fiechter, A.** 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* **41**, 1–17.