

## 갈색부후균 *Tyromyces palustris*의 수산대사와 목질분해 특성<sup>\*1</sup>

손동원<sup>\*2</sup> · 이동흡<sup>\*3</sup> · 오정수<sup>\*2</sup>

## Oxalic Acid Metabolism and Decay Characteristics of *Tyromyces palustris*<sup>\*1</sup>

Dong-Weon Son<sup>\*2</sup> · Dong-Heub Lee<sup>\*3</sup> · Jung-Soo Oh<sup>\*2</sup>

### ABSTRACT

This experiment was carried out to evaluate the role of oxalic acid metabolism in the incipient decay of brown rotting, and to investigate the effects of various compositions of culture medium.

Until 5days incubation, the amount of oxalic acid produced by *Tyromyces palustris* was increased, while pH was gradually decreased.

The difference in oxalic acid production depending on carbon sources was not significant and the pH adjustment of media did not stimulate the production of oxalic acid.

In this experiment, hemicellulose was hydrolyzed with 1% oxalic acid, so it is suggested that nonenzymatic acid hydrolysis of hemicelluloses might be involved in the process of incipient decay of brown-rot fungi.

**Keywords :** *Tyromyces palustris*, oxalic acid, mycelial weight, nonenzyme, incipient decay

### 1. 서 론

최근 목재부후균의 수산대사가 많은 연구자들의 관심을 끈다. 그 이유는 목재부후에 대한 정확한 기작이 밝혀지지 않고 있는 상태에서 갈색부후균의 부후 양상이 백색부후의 그것과 차이를 지니고 있으며(高橋, 1986), 갈색부후균이 초기 부후단계의 적은 중량손실에서도 큰 강도 손실을 가져오기 때문이다(高橋, 1986 : 島田, 1993). 이것은 초기부후단계에서 비효소, 저분자량의 물질, 즉 수산이 초기 부후에 관여하기 때문이다(島田, 1993 : Akamatsu *et al.*, 1992 : Shimada *et al.*, 1991). 많

은 연구자들이 여러가지 가설중에서 수산에 그 촉점을 집중시키는 것은 수산이 셀룰로오스의 중합도를 저하시킬 수 있다는 것이며(Shimada *et al.*, 1991 : Espejo *et al.*, 1991) 대부분의 갈색부후균이 수산을 그 배양액 속에 집적한다는 데 있다(島園, 1952). 즉 부후의 초기 단계에서 수산이 목재세포 속으로 자유롭게 이동하면서 셀룰로오스의 성분을 분해하여 효소의 이동을 용이하게 한다는 가정이다(Highley, 1981).

수산은 오랜 기간 동안 식물과 목재부후균을 포함하여 많은 유기체에서 발생되는 대사물질로서 그 생화학적 역할은 관심을 끌어 왔다. 목재보존에 있어서 수산대사의

\*1 접수 1995년 7월 29일 Received July 29, 1995

\*2 동국대학교 생명자원과학대학 College of Biological Resources Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

\*3 임업연구원 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

생화학적 의미를 종합적으로 고찰하는 것은 매우 중요한 일이라 하겠다.

갈색부후에 의한 셀룰로오스의 해중합에 관계하는 생화학적 요인이 밝혀지고 그 요인을 제거할 수 있다면 목재의 부후를 방제할 수 있는 새로운 분명한 목표가 세워지고, 환경보전에 영향을 주지 않는 목재보존 방법으로 시작될 수 있을 것이다.

이러한 의도에서 본 고에서는 갈색부후균인 *Tyromyces palustris*에 의한 수산생성과 배지 구성성분의 영향등의 기초대사를 파악하고, 수산에 의한 목질재료의 분해정도를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

#### 2.1.1 공시균

공시균은 갈색부후균인 *Tyromyces palustris* (FRI 21055)를 임업연구원에서 분양받아 사용하였다.

#### 2.1.2 공시배양기

배양기 조성은 glucose 25g, malt extract 10g, peptone 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g을 증류수에 녹여 전량이 1,000ml이 되게 조정하였으며, 고형배양기는 위의 배양액 1,000ml에 한천 20g을 첨가하여 사용하였다.

#### 2.1.3 공시펄프

본 실험에 사용된 펄프는 조밀제지에서 분양받은 미표백 크라프트 펄프로서 시트상으로 분양받아 해리기로 해리하고 풍건한 후 ethylene oxide 가스 멸균기로 멸균한 후 실험에 사용하였다.

### 2.2 실험방법

#### 2.2.1 *T. palustirs*의 pH, 산도, 수산량, 균체량

공시균 *T. palustirs*의 수산생성량을 2일 간격으로 측정하였다. 500ml 진탕플라스크에 배양액 100ml를 넣고 미리 평판배지에서 배양한 균을 코르크볼리(6mm)로 찍어 낸 것을 5조각씩 넣어 26°C에서 왕복 진탕(120rpm) 배양하였다. 이를 간격으로 배양액의 pH, 산도, 수산량, 균체량을 조사하였으며, 산도는 각 배양액 10ml를 1/10N NaOH로 적정하여 측정하였고, 배양액에서 생성된 수산의 양은 배양액을 NH<sub>4</sub>OH로 알카리성으로 만들고, 수산은 CaCl<sub>2</sub>용액의 첨가로 침전시켰다. 원심분리하여 모든 침전물을 끓은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 용해시키고 수산량은 1/10N KMnO<sub>4</sub>로 적정하여 결정하였다. 균체량은 배양기중의 균체를 여과 분리하고 건조중량으로 결정

하였다.

#### 2.2.2 탄소원을 달리한 배지에서의 수산생성량

기본배양액 구성성분중 glucose를 다른 탄소원(2%)으로 대체하여 배양액을 조성한 후 수산의 양을 비교하여 탄소원에 의한 수산생성의 변화를 검토하였다. 사용된 탄소원은 D-galactose, D-xylose, starch, D-mannose, D-cellobiose, D-maltose, D-inositol, D-mannitol, sacharose이다.

탄소원에 의한 수산생성의 직접적인 관계를 검토하기 위하여 탄소원만으로 배양액을 조성하여 수산축적량을 검토하였다.

#### 2.2.3 산의 첨가, pH 조정배지에서의 수산생성량

pH 조정에 따른 수산축적의 양은 0.1N HCl과 NaOH를 사용하여 배양액의 초기 pH를 조정한 후 균체량과 함께 수산의 축적량을 검토하고 이로 인한 pH변화를 측정하였다. 또한 배양액에 산을 첨가하여 수산의 생성자극 유무를 균체량과 더불어 수산의 양을 검토하였으며 pH 변화도 검토하였다. 실험에 사용된 산은 citric acid, tartaric acid, L-aspartic acid, sulfanilic acid, oxalic acid이다.

#### 2.2.4 수산에 노출된 펄프의 당분석

미표백 크라프트 펄프 3g을 40일 동안 26°C에서 1% tartaric acid, tannic acid, oxalic acid, 그리고 H<sub>2</sub>O로 처리하였다. 40일 이후에 알카리수와 증류수로 세척하였다. 처리된 펄프의 분해정도를 alditol-acetate 방법에 따라 가스크로마토그래피(GC)로서 분석하였다. GC분석은 Shimadzu Co., GC-14A로 190cm × 0.4cm 칼럼, 3% ECNSS-M on Gaschrom Q, 100-200 mesh 총진체를 사용하였다.

#### 2.2.5 균여과액과 수산용액에서의 크라프트 펄프 당분석

미표백 크라프트 펄프 3g을 1% oxalic acid용액 100ml와 *Tyromyces palustris* 균을 9일 동안 액체 진탕배양한 후 그 여과액을 마이크로 실린지를 통하여 무균상태에서 여과한 후 그 여과액과 효소생성을 억제시킨 가압멸균한 여과액 100ml에 각각 침지시켜 26°C로 조절된 배양실에서 20일 동안 처리한 후 분해정도를 2.2.4의 alditol-acetate 방법으로 GC분석을 행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 *T. palustris*의 pH, 산도, 수산량, 균체량

갈색부후균 *T. palustris*의 수산생성량을 2일 간격으로 균체량과 pH, 산도의 변화와 함께 측정하여 Fig. 1

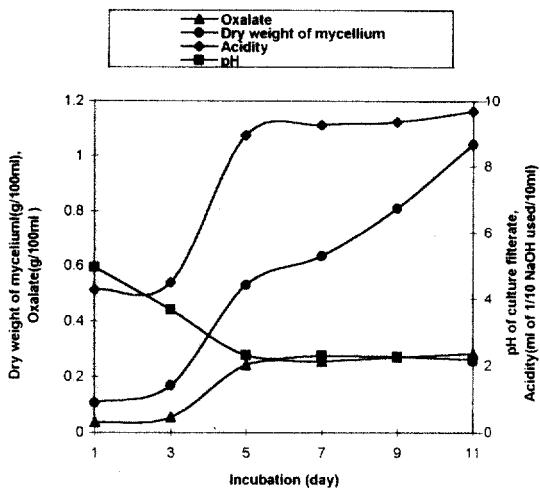


Fig. 1. The amount of oxalate, dry weight of mycelium, acidity and pH in the shaking incubation of *Tyromyces palustris* for 11 days.

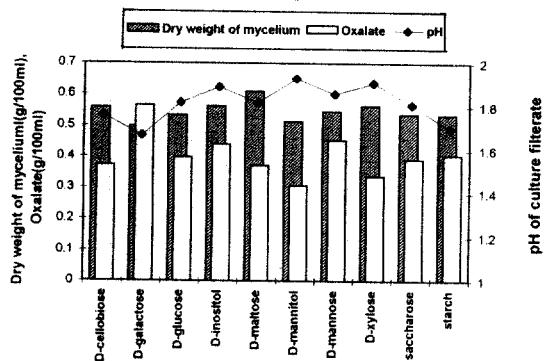


Fig. 2. The effect of the different carbon sources on the amount oxalate, dry weight of mycelium, and pH of *Tyromyces palustris* in 9 day incubation time.

에 나타내었다. 배양 5일 이후에 균체량은 계속하여 증가하였으나, 수산량은 0.23부근에서 거의 고정되었으며 이에 따라 pH도 고정되고 산도도 9 정도로 고정되었다. 이는 *T. palustris*의 경우 배양기중의 수산의 접적이 일정량 이상이 되면 더이상 수산을 생성하지 않음을 의미한다. 한편 Shimada(1991)는 배양기내의 수산의 생성은 배양 14일까지 계속하여 증가함을 시사한 바 있으나, 이는 균생육에 있어 배양조건에 따른 생장유도기와 관련이 있다고 추정된다.

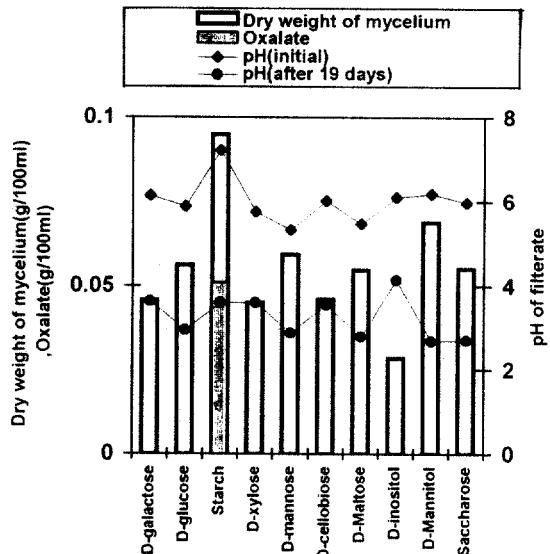


Fig. 3. The effect of single carbon sources on oxalate, pH and mycelial weight of *Tyromyces palustris*.

### 3.2 탄소원을 달리한 배지에서 수산생성량

탄소원에 따른 수산생성의 자극, 억제 요인을 검토하기 위하여 공시배양기 성분 중 글루코스를 함유율 2%의 여러가지 탄소원으로 대치하여 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 9일 생장이후에 pH의 가장 큰 감소 폭을 보인 것은 D-galactose였으며 수산생성량도 많았다. 그러나 다른 탄소원과의 큰 차이는 확인되지 않았으며 균체량도 D-glucose의 경우와 비슷하게 나타났다. 한편 D-maltose 2% 첨가구에서는 균체량은 많았으나 수산생성량이 적었고, 이와 유사한 결과가 D-xylose와 D-mannitol 첨가구에서도 나타났다.

배양기 함유율 2% 탄소원 만으로 배양액을 조성하여 균체량과 수산량을 Fig. 3에 나타냈다. 19일간의 배양기간에서 공시배양기보다 필수영양원의 부족으로 인해 균체량은 공시배양기보다 적었으며 특히 탄소원은 수산생성과 관련된 생리활성물질로 작용하지 못하였다. 또한 이를 배양액 중에는 대부분의 경우 수산을 형성하지 못하였으며, starch 첨가구에서만 수산생성을 확인할 수 있었다.

한편 Maxwell(1968)의 식물병원균 *Sclerotium rolfsii*로 행한 실험에서 starch, D-glucose, D-galactose의 수산생성양은 1mg보다 작았으며 수산축적은 생산된 균체량과는 관계가 없었다고 보고하였으므로 수산

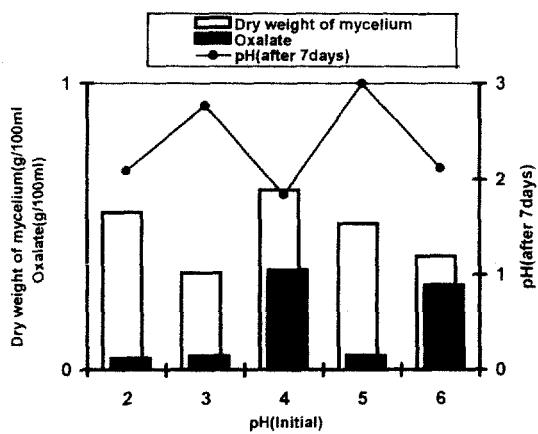


Fig. 4. The differences of dry weights of mycelia, oxalate and pH by the control of medium pH of *Tyromyces palustris*.

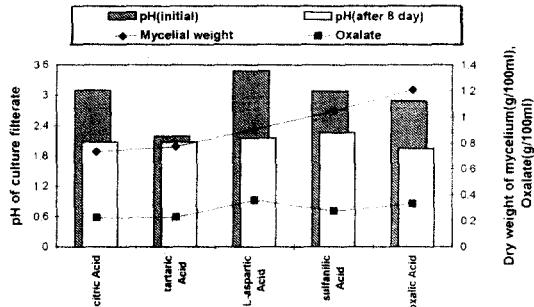


Fig. 5. The amount of oxalate, dry weight of mycelia, and pH of culture filtrates on shaking culutre of media added various acids.

생성은 특별히 탄소원에 의지하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

### 3.3 pH 조정배지, 산첨가 배지에서의 수산생성량

배양액의 pH를 0.1N HCl과 NaOH를 사용하여 조정한 후 7일 배양이후의 수산생성량을 균체량, pH의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 초기 pH 4로 조정한 배지에서 균체량도 많았으며 수산생성량도 많았고 pH 감소폭도 커다. 그러나 pH 5로 조정한 배지에서는 pH 6으로 조정한 배지에서 보다 균체량은 증가하였으나 수산생성량은 적은 것으로 나타났다. 한편 초기 pH와 배양 7일 이후의 pH의 변화율을 비교하면, 초기 pH가 높을수록 pH감소율이 크게 나타났으며, pH 6으로 조정된 배지에

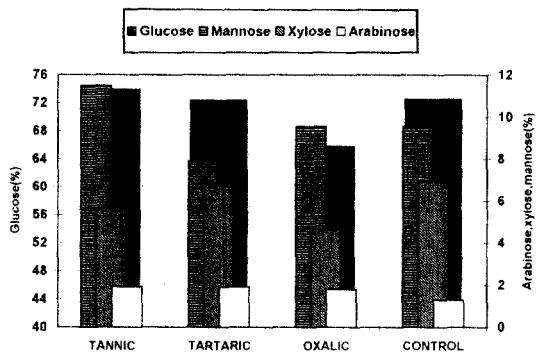


Fig. 6. Sugar composition of acid treated UKP.

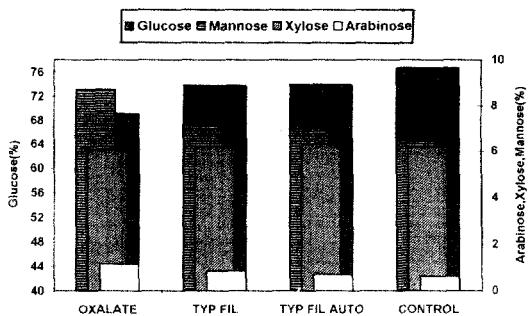


Fig. 7. The sugar composition for acid treated UKP and percolated UKP in filtered culture medium.

서는 7일 이후가 2.1정도로 pH가 3.9정도 낮아졌음을 알 수 있었다.

인위적으로 배양액에 산을 첨가하여 산에 의한 수산생성 자극 유무를 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. 인위적인 산첨가가 특별히 수산생성을 자극하거나 억제하지는 못하였으며, 수산의 첨가가 균생장을 다소 촉진하는 경향이 있었다. 초기 pH로부터 pH 감소율이 가장 크게 나타난 것은 L-aspartic acid였으며, citric acid, sulfanilic acid 및 oxalic acid의 첨가구에서는 비슷한 정도의 pH 감소율을 나타냈다. 한편 tartaric acid의 경우는 소량의 수산대사가 있었음에도 불구하고 pH변화율은 거의 없는 것으로 나타 났다. 전술한 바와 같이 균생장에 따라 배양액의 pH가 2.0 이하로 떨어짐을 보였으나(Fig. 1), 인위적인 배지의 환경이 초기에 강산성을 떨 경우에는 균생장이나 수산생성이 오히려 억제됨을 볼 수 있었다. 한편 L-aspartic acid 첨가구와 oxalic acid 첨가구가 다른산의 첨가구보다 약간 수산생성량이 높게

나타났으나, 산 무첨가구의 수산량(Fig. 1)과 별다른 차이가 없는 것으로 추정하여 갈색부후균 *T. palustris*는 균생장에 oxalic acid를 사용하지 않는 것으로 사료된다.

### 3.4 수산에 노출된 펄프의 당분석

수산용액에 의한 목질 성분의 분해정도를 알아보기 위한 실험으로 각각 1%의 tartaric acid, tannic acid, oxalic acid와 증류수에 침지한 크라프트 펄프의 당분석을 통하여 분해정도를 비교하였다(Fig. 6). 수산에 의한 당성분의 가수분해 정도는 대조구 보다 큰것으로 나타났다.

여과액과 수산용액을 비교하여 본 경우를 Fig. 7에 나타내었다. 수산용액의 glucose 가수분해가 여과액에서 보다 큰것으로 나타났는데, 이것은 수산용액의 농도가 여과액중의 수산농도 보다 높았기 때문으로 당연한 것이다. Shimada 등(1991)은 수산용액에 여러가지 셀룰로오스 시편을 처리하였을때, 농도와 시간의 증가에 따라 유리된 환원당의 양이 증가함을 보고한바 있다. 이는 본 연구의 결과와도 일치하는 것이라 사료된다. 한편 1% 수산용액 중에서 당 가수분해율이 여과액보다 높게 나타난 것은 일반적으로 여과액 중의 수산농도는 0.23g/100ml로 1% 수산보다는 그 농도가 낮기 때문으로 추정된다.

Green 등(1991)은 헤미셀룰로오스가 화학물질, 열 혹은 생물적 분해에 대한 목재의 첫번째 방어선임을 주장하였고 또 중요한 강도 손실이 셀룰로오스와 연관된 글루코오스의 분명한 분해 이전에 일어남을 제시하였다. 제한된 글루코스의 분해는 글루코오스가 침엽수 헤미셀룰로오스의 glucomannan에서 1:3의 비율로서 글루코오스가 분해 되기 때문에 헤미셀룰로오스와 관계있는 글루코오스로 보았으며 남아있는 글루코오스는 셀룰로오스와 관계가 있으며 영향을 받지 않는다고 보았다.

Highley(1981)는 가수분해를 통한 헤미셀룰로오스의 제거는 목재의 전반적인 다공성을 증가시킬 수 있다고 하였으며 세포벽의 다공성의 증가는 효소의 목재 세포벽으로의 확산을 허용할 수 있다고 하였다. 본 연구의 당분석의 결과는 부후균에 의한 수산생성이 헤미셀룰로오스의 잠재적인 가수분해의 열쇠를 쥐고 있으며 산에 의해 저분자의 당이 용해되고 셀룰로오스의 가수분해 가능성을 증가시킨다는 이론을 지지하게 한다. 본 연구에서의 1% 수산에 의한 헤미셀룰로오스의 분해의 검토는 갈색부후균의 수산생성과 초기 강도손실의 관계를 연결시켜 줄 수 있을 것이라 생각한다.

수산이 부후목재 중에 생성되면 pH저하와 함께 먼저 헤미셀룰로오스가 이어서 셀룰로오스가 공격을 받고 또

효소계도 활발히 작용함으로써 부후는 가속적으로 촉진되리라 예상된다. 그러므로 초기부후에서 수산생성을 저지할 수 있는 방법이 검토되어야 한다고 본다.

수산대사의 정확한 이해가 목재 보존의 새로운 방향을 제시하리라 믿는다.

## 4. 결 론

갈색부후균 *T. palustris*는 균체량의 증가에 따라 수산을 그 배양액 속에 집적하며 이와 더불어 배지의 산성도는 높아졌다. 배지의 환경여건에 따른 수산의 생성정도는 탄소원에 따라 영향을 받지 않았으며, pH는 4.0근처에서 특별히 수산의 생성이 많았다. 인위적인 강산성의 pH조정(pH 3이하)은 균생장과 수산생성을 자극하지는 못하였으며, 인위적인 산 첨가 역시 수산생성을 자극하지는 못하였다. 미표백펄프로 행한 인위적인 수산환경에서의 분해정도의 검토에서는 수산이 헤미셀룰로오스를 분해할 수 있었으며, 헤미셀룰로오스의 분해의 검토는 갈색부후균의 수산생성과 초기 강도손실의 관계를 연결시켜 줄 수 있을것이라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Akamatsu, Y., M. Takahashi and M. Shimada. 1992. Cell-free extraction and assay of oxaloacetate from the brown-rot fungus *Tyromyces palustris*. *Mokuzai Gakkaishi* 38(5): 495~500.
2. Espejo, E. and E. Agosin. 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Applied & Environmental Microbiology* 57(7) : 1980~1986
3. Green, F. M. J. Larsen. 1991. Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Material und Organismen* 26(3) : 191~213
4. Highley, T. L., K. E. Wolter and F. J. Evan. 1981. Polysaccharide-degrading complex produced in wood and liquid media by the brown-rot fungus *Poria placenta*. *Wood & Fiber* 13(4) : 265~274
5. Maxwell, D.P., D.F. Bateman. 1968. Influence of carbon source and pH on Oxalate Accumulation in culture filtrates of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 58 : 1351~1355

6. Shimada, M., Y. Akamatsu, A. Ohta, and M. Takahashi. 1991. Biochemical relationships between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot wood-decay. *Internat. Res. Group Wood Pres.* Doc. No. IRG/WP/1472. 1-12
7. 島田幹夫. 1993. 腐朽菌キノコの シュウ酸 代謝. 木材研究・資料 29 : 1~41
8. 島園平雄. 木材腐朽菌の生化學. 林業試験場研究報告 53 : 117~125
9. 高橋旨象. 1986. 木材の腐朽型、その木材保存處理への活用. 木材研究・資料 22 : 19~36