

*Tyromyces palustris*의 수산생성효소인 Oxaloacetase와 목질 분해와의 관계 구명^{*1}

손 동 원^{*2} · 이 동 흡^{*3} · 오 정 수^{*2}

Evaluation on Relations between the Oxalic Acid Producing Enzyme, Oxaloacetase from *Tyromyces palustris*, and Wood Decaying Activity^{*1}

Dong-Weon Son^{*2} · Dong-Heub Lee^{*3} · Jung-Soo Oh^{*2}

ABSTRACT

Brown rot fungus, *Tyromyces palustris*, has been reported to cause the loss of strength accelerated by oxalate, a non-enzymatic low molecular weight acid, with minute weight loss of decaying wood in early stage. The production of oxalate in relation to wood decaying and the presence of oxaloacetase, an oxalate producing enzyme, were identified during the process.

Tyromyces palustris produced the largest amount of oxalate among brown rot fungi. In order to find out the cleavage of pulp fiber, we submerged pulp fiber in oxalate solution and the results showed that the number of short pulp fiber was highly increased, compared with control solution. The pH of decaying wood was decreased to 1.77, which was close to that of saturated oxalate solution, pH 1.2. Thus, the oxalate was thought to be accumulated in the decaying wood. The oxaloacetase which accelerates production of oxalate was derived from fungus, and the production of oxalate by the enzyme was determined by using on UV/Vis spectrophotometer.

Therefore, the oxalate was found to be produced by oxaloacetase during decay. The oxalate may cause the acid-hydrolysis of cellulose and hemicellulose. The oxalate was thought to reduce the degree of polymerization and increase the enzyme activity, which resulted in rapid loss of strength in early stage-an identical feature of brown rot fungus.

Keywords : *Tyromyces palustris*, oxalate, oxaloacetase, cleavage of fiber, non-enzymatic activity

*1 접수 1995년 10월 20일 Received October 20, 1995

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

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

1. 서 론

갈색부후균은 목재성분 중 리그닌의 제거가 없는 낮은 중량감소율인 초기부후단계에서 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스의 중합도를 빠르게 감소시키는 특이한 방법으로 목재를 분해하며, 중량감소율 4% 정도에서 50% 정도의 강도감소가 일어난다. 이러한 초기 부후단계에서 급격한 강도저하의 원인은 분해물질이 분명히 목재의 미세공극으로 마음대로 침투하여야 하며 목재의 세포벽에 고르게 분산되어야 한다. 따라서 저분자량 물질에 의한 부후의 시작, 즉 비효소적 균대사는 최근 효소이용과 목재보존 분야에서 크게 관심이 집중되고 있다.

Highley와 Murmanis(1985)는 갈색부후균에 의한 초기 부후단계에서 강도의 감소는 셀룰로오스의 급작한 산 가수분해와 관계가 있다고 보고 이를 입증하기 위하여 실험실에서 셀룰로오스의 산 가수분해를 실시한 바 있으며, 목재성분의 산 가수분해가 강도감소에 크게 영향함을 시사한 바 있다. 한편 Green 등(1991)은 수산이 갈색부후균의 초기 부후단계에서 산 가수분해를 일으킨다고 제안하였으며, Shimada 등(1991)은 수산은 셀룰로오스 점도를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 이들은 갈색부후균이 백색부후균과는 달리 목재 셀룰로오스를 분해할 때 생리적 조건이 수산을 균체 외에 집적시키고, 이로 인해 목재성분이 탈중합화되어짐을 가정한 것이다.

본 논문에서는 갈색부후균 *T. palustris*가 생성하는 수산의 환경적 요인과 수산에 의한 헤미셀룰로오스 성분의 분해에 대한 연구(손 등, 1995)를 발표한데 이어 이번에는 여러가지 갈색부후균의 수산생성 능력을 검토하고, 수산에 의한 섬유질의 개열을 확인하였다. 그리고 갈색부후균에 의해 공격받은 목재내부의 pH변화를 검토하여 균에 의해 분비된 수산의 목재내 확산을 검토하였으며, *T. palustris*로부터 oxalate의 생성촉매효소인 oxaloacetase 분리를 시도하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

2.1.1 공시균주

공시균주로는 갈색부후균 *Tyromyces palustris* (FRI 21055 : 부후개떡버섯), *Laetiporus sulphureus* (FRI 20631 : 덕다리버섯), *Gloeophyllum trabeum* (FRI 20652), *Daedalea dickinsii* (FRI 20323 : 등갈색송편버섯), *Fomitopsis pinicola* (FRI 20414 : 소나무잔나

비버섯), *Serpula lacrymans* (FRI 20965 : 버즘버섯), *Lentinus lepideus* (FRI 20641 : 잣버섯)을 입엽연구원에서 분양받아 사용하였다.

2.1.2 공시배양기

배양기 조성은 glucose 25g, malt extract 10g, peptone 5g, KH₂PO₄ 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g을 증류수에 녹여 전량이 1,000ml가 되게 조정하였으며, 고형배양기는 위의 배양액 1,000ml에 한천 20g을 첨가하여 사용하였다.

2.1.3 공시필프

조일제지에서 미표백필프를 시트상으로 분양받아 해리기로 해리한 다음 기건하여 사용하였다.

2.1.4 공시목재

동국대학교 운길산 연습림에서 채취한 서어나무(*Carpinus laxiflora* Blume)를 사용하였으며 생재상태에서 곧은질 재채하고, 건조시킨 후 4cm×4cm×4cm로 조정하였다.

2.2 방법

2.2.1 배양액 중의 oxalate 측정

평판배지에서 미리 배양한 공시균을 코르크볼러(6mm)로 찍어낸 것을 공시배양액 100ml를 넣은 500ml용 진탕 플라스크에 5조각씩 넣어 26℃ 120rpm으로 왕복 진탕 배양하였다. 진탕배양액에서 생성된 수산의 양의 측정은 배지여과액을 NH₄OH로 알칼리성으로 만들고, 여과액 중의 수산은 CaCl₂용액의 첨가로 침전시켰다. 이를 원심분리하고 모아진 침전물을 묽은 H₂SO₄로 용해시키고 수산량을 1/10N-KMnO₄로 적정하여 결정하였다. 공시균의 수산 생성량을 5일 간격으로 측정 비교하였다.

2.2.2 수산에 의한 섬유 분해 측정

필프를 ethylen oxide로 가스멸균한 후 무균상태에서 증류수, 1% 수산, 5% 수산을 200ml씩 500ml용 삼각플라스크에 붓고 7g의 필프를 28℃에서 15일 동안 침지하였다. 이후 필프를 여과, 수집하고, 섬유장 측정은 Kajaani FS-100 Fiber analyzer로 하였다

2.2.3 목재 시편 내의 pH변화

자동기록 장치가 달린 pH미터(Hanna Hi-8418)의 probe(직경 0.3cm)를 섬유방향과 수직이 되게 드릴로 구멍을 뚫은 서어나무 시편의 가운데에 깊이 3cm로 꽂은 후 *T. palustris* 균사가 만연한 모래 배지위에 무균적으로 설치하고 24시간 마다 pH변화를 측정하였다. 방법의 예는 Photo. 1과 같다.

2.2.4 효소의 준비

공시배양기에 *T. palustris*를 진탕배양하고, 배양 7일

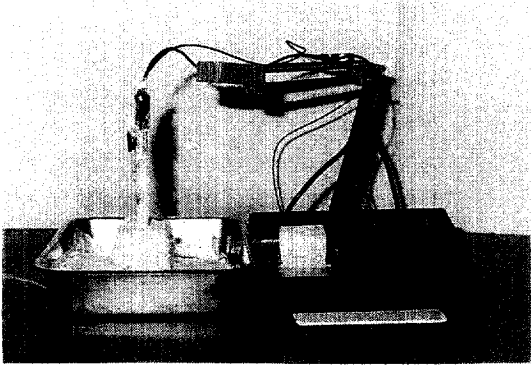


Photo 1. pH test of block degraded by *T. palustris*.

후에 $\text{Na}_2\text{CO}_3(2\text{M})$ 용액을 배지의 pH가 약 9가 될 때까지 첨가하였으며, 17시간 정도 oxaloacetase를 유도하였다. 균사를 여과하고 0.01M potassium phosphate buffer(pH 7.6)를 사용하여 세척하였다. 세척한 균사는 50mM의 mercaptoethanol, 0.2mM sodium ethylen diamin eteracetate(EDTA), 0.5mM MnCl_2 을 포함하는 중량 2배의 buffer(pH 7.6)에 섞어 냉각 상태에서 homogenize하였다. Homogenize는 $15,000 \times g$ 에서 30분 동안 4°C 에서 하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 oxaloacetase의 분광분석 시료로 사용하였다.

2.2.5 Oxaloacetase의 활성

Oxaloacetase의 분석은 Lenze 등(1976)에 의한 Spectrophotometric method를 적용하였다. 0.2M imidazole buffer(pH 7.6), 1.0mM oxalacetic acid 그리고 효소용액을 포함하는 혼합물(3ml)을 30°C 에서 배양하였다. 배양 3분 후에 반응은 효소의 첨가에 의해 시작되었다. 활성은 oxalacetic acid의 분해에 의한 255nm에서의 흡수대의 감소로 측정하였다.

2.2.6 Oxaloacetate로 부터 분리된 수산의 동정

Oxaloacetate(1M), oxaloacetase(5ml), 0.2M imidazole buffer(pH 7.6: 25ml)를 포함하는 반응 혼합물(31ml)을 실온에서 15시간 반응시켰다. 1N HCl로 산화시키고, 원심분리한 후, 상등액은 1N- NH_4OH 로 중화하였고, 10% CaCl_2 를 떨어뜨려 형성된 수산을 침전시켰다. 침전물은 원심분리하여 얻었으며, 묽은 H_2SO_4 로 용해시켰다. 용액은 여과지로 여과하였으며, 수산을 원심분리하여 침전시키고, 0.1N HCl에 용해시켰다. 이 용액을 UV(Hewlett packard 8452A Diode Array Spectro-photometer)상에서 검광선에 근거하여 수산

의 양을 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 여러 가지 갈색부후균에 의한 수산의 생성

진탕배양 5일 간격으로 측정한 배양액 중의 수산의 생성량은 Fig. 1과 같다. *T. palustris*는 다른 갈색부후균과 달리 배양 초기 수산생성이 매우 빨랐으며, 배양 5일 이후 생성량은 다른 공시균보다 20배 이상인 0.4g/100ml를 나타냈다. 그러나 초기 생성량이 우수한 *T. palustris*도 배양 5일 이후에는 생성량이 완만해졌으며, 배양 10일 이후에는 그 생성량이 거의 정지되었다. 한편 *L. sulphureus*는 초기 수산생성까지의 기간이 10일 정도 소요되었고, 이후 급작한 생산이 있었으며, 배양 20일 경과시는 *T. palustris*와 거의 동일량의 수산이 생성되었다. 배양 20일 경과 이후 수산생성량의 크기는 *T. palustris* > *L. sulphureus* > *D. dickinsii* > *L. lepideus* > *G. trabeum* > *F. pinicola* > *S. lacrymans* 순이었다.

이상의 결과에서 *T. palustris*는 다른 공시균보다 많은 수산생성을 보였으며, 수산생성과 관련된 이후의 실험에 *T. palustris*를 공시균으로 사용하였다.

3.2 수산에 의한 섬유유의 개열

수산의 농도에 따른 섬유유의 길이 분포를 0.2mm 단위로 구분하여, 그 범위내의 섬유분포의 백분율을 Fig. 2에 나타냈다. 각 처리별 총 섬유유의 수는 무처리가 7,542개, 1% 수산이 7,037개, 5% 수산이 7,130개였으며, 무

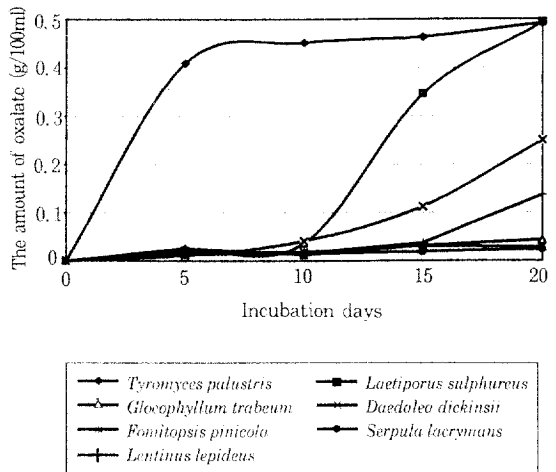


Fig. 1. The amount of oxalate filterates from various fungi.

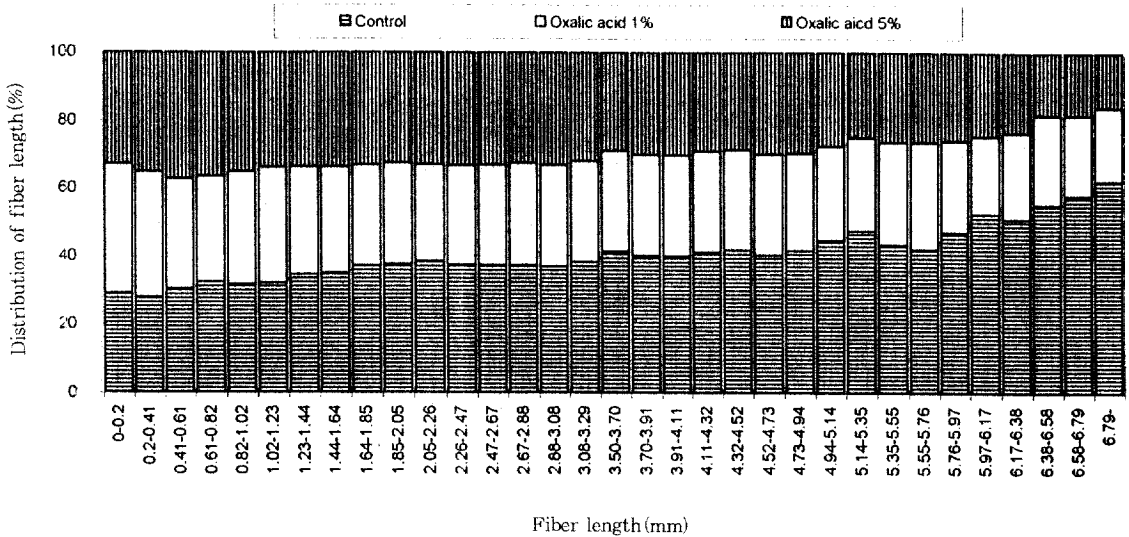


Fig. 2. Distribution of fiber length of pulp treated with oxalic acid.

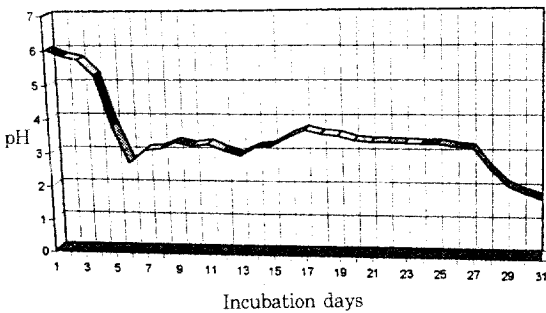


Fig. 3 Changes in pH of wood block by *T. palustris* depending on incubation day for 31days.

처리의 경우 섬유장이 긴 섬유가 많이 분포하고 있었다. 한편 수산처리에 의해 3mm 이상의 섬유 분포가 무처리보다 많이 감소하였으며, 최장의 섬유분포를 나타낸 6.79 mm 이상에서는 무처리보다 그 분포가 3배 이상 감소된 것을 알 수 있는 등, 결과적으로 1%, 5% 수산용액에서 짧은 섬유가 많이 형성됨을 볼 수 있었다. 섬유장이 무처리에 비해 짧아졌음은 수산에 의한 섬유의 개열과 관련이 있으며 Green 등(1993)은 짧아진 섬유형성으로 면셀룰로오스의 개열을 확인하였고, 이것은 중합도 감소의 유관적 표시일 수 있다고 보고한 바 있다.

따라서, 갈색부후균에 의한 수산의 생성이 목질 셀룰

로오스 비결정부분의 산 가수분해를 도와 주므로 셀룰로오스 중합도는 감소되며, 중합도가 감소하게 되면, 미세결정의 용액화가 일어난다. 이로 인해 분해효소의 활동이 활발하게 되며, 목재 초기 부후의 급격한 진전을 가져오는 것으로 유추할 수 있다.

3.3 *T. palustris*에 의해 부후가 진행 중인 목재내부의 pH변화

목재내 수산의 축적과 부후의 진행과의 관계를 알아보기 위해 목재내부의 pH의 변화를 측정하고 이를 Fig. 3에 나타냈다. *T. palustris*가 목재를 공격하면서부터 pH는 감소하기 시작하였으며, 공시목재를 *T. palustris* 위에 설치한 5일 이후 균사는 pH미터의 probe(1cm)까지 확산되었으며, 이때는 pH가 2.7 정도까지 감소하였다. 다시 균사의 생장이 목재 전반으로 덮어갈 때 pH는 높아졌으나 그 후 서서히 산성 쪽으로 감소하였다. 설치 31일에는 수산의 포화용액 pH 1.2에 육박하는 pH 1.77로 감소하여 목재내에 수산이 크게 집적되었음을 추정할 수 있었다. 이때 시편의 중량감소율은 21%를 나타냈다. Green 등(1991)이 *Postia placenta*의 목재내 pH변화 실험에서 pH는 2.5~1.6으로 감소하였다고 보고한 바 있으며, 이는 균종을 달리한 본 실험의 결과와도 일치하였다. 수산의 생성은 일반적으로 pH의 감소와 밀접한 관계가 있으며, 이때 수산의 목재내 확산은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스성분의 산 가수분해로 인한 중합도가 감소를

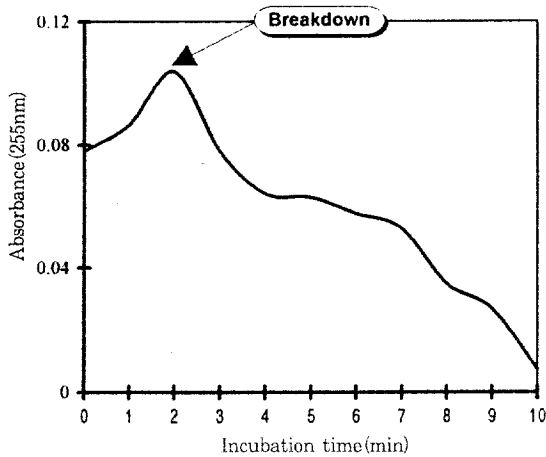


Fig. 4. Enzymatic breakdown of oxaloacetate by oxaloacetase extracted from mycelia of *T. palustris*.

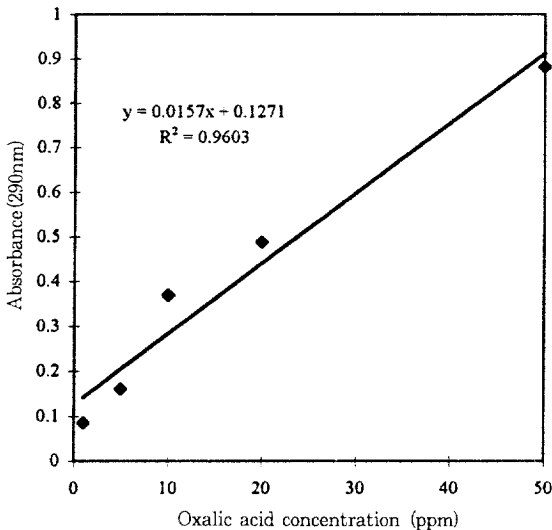


Fig. 5. Calibration curve for oxalic acid.

가져오며, 이들 성분의 초기분해가 강도감소에 영향을 크게 미치는 것을 추정할 수 있었다.

3.4 수산 생성 효소 oxaloacetase의 활성

Lenz 등(1976)은 *Aspergillus niger*에서 분리한 oxaloacetase가 oxaloacetic acid의 분해에 촉매역할을 한다고 보고하였고, 효소활성은 Lenz(1976)에 따라 oxalacetic acid의 255nm에서의 흡수대의 감소로 측정하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. 본 실험에서 유도

한 oxaloacetase의 활성은 0.3nKat이었다.

3.5 Oxaloacetase에 의해 분리된 수산의 동정

Fig. 5는 290nm에서의 농도별로 나타낸 oxalic acid의 검량선이다. 수산생성은 검량선에 근거하여 확인하였으며, 반응후 생성된 수산의 양은 검량선에서 얻은 식 $Y=0.0157X+0.1271$ 에 의거 5.12ppm이었다. *T. palustris*는 수산생성을 촉진하는 효소를 균체 내에 지니고 있으며, 부후과정에서 균세포외액에 축적되는 수산은 oxaloacetase에 의해 그 반응이 촉진되어짐을 알 수 있었다.

4. 결 론

갈색부후균의 수산생성과 초기 목재부후와의 관계를 밝히기 위해 갈색부후균의 수산생성과 수산에 의한 섬유소의 개열을 확인하여 보았으며, *T. palustris*의 부후진행과 더불어 목재내 pH변화를 통해 수산의 집적을 추정하였고, 수산생성효소의 유도와 oxaloacetase에 의한 수산생성을 확인하였다.

갈색부후균 중 *T. palustris*는 다른 공시 갈색부후균보다 수산의 생성량이 많았으며, 특히 부후초기 상태인 배양 5일 이내에 그 생성량의 95% 이상이 집적되었다. 수산은 목질섬유를 짧게 개열하였고, 이로 인한 셀룰로오스 중합도의 감소를 가져올 수 있으며, 이것이 급격한 초기 부후의 원인이 됨을 추정할 수 있다.

*T. palustris*가 목재의 공격을 시작하면서 부터 pH는 감소하였으며, 이후 지속적인 수산의 집적이 목재 내에 집적 확산되어짐을 확인할 수 있었다. 수산의 생성은 수산생성을 촉진하는 효소 oxaloacetase에 의해 진행되며, *T. palustris*에 있어서도 oxaloacetase에 의해 수산이 생성되어짐을 확인했다.

갈색부후균 *T. palustris*에 의한 수산의 생성은 oxaloacetase에 의한 것이며, 생성된 수산은 목재내 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 성분의 산 가수분해를 진행시키고, 효소의 활동을 원활하게 할 수 있는 기초를 마련하여 목재의 초기 부후가 왕성하게 일어나게 하며, 적은 중량감소에도 큰 강도손실을 가져올 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Fredick, G., M.J. Larsen, J.E. Winandy, T.L. Highley. 1991. Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Material unt*

Organismen 26 : 190~213

2. Griffin, H., J.M. Hackney, C.A. Dausen, M.T. Larsen, T.L. Highley. 1993. The role of oxalic acid in short fiber formation by the brown-rot fungus *Postia placenta*. Internat. Res. Group on wood preservation. Doc. No. IRG/WP/93-10028
3. Highley, T.L., L. Murmanis. 1985. Micro-morphology of degradation in western hemlock and sweetgum by brown-rot fungus *Poria placenta*. *Holzforschung* 39(2) : 73~78
4. Kirk, T.K., R.E. Ibach, M.D. Mozuch, A.H. Conner, T.L. Highley. 1991. Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. *Holzforschung* 45 : 239~244
5. Lenz, H., W. Peter, E. Hermann. 1976. Partial purification and some properties of oxaloacetase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* 65 : 225~236
6. Shimada, M., Y. Akamatsu, A. Ohta, M. Takahashi. 1991. Biochemical relationships between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot wood decay. Internat. Res. Group on wood preservation. Doc. No. 1472
7. 손동원, 이동흡, 오정수. 1995. 갈색부후균 *Tyromyces palustris*의 수산대사와 목질 분해특성. 목재공학 23(4) : 54~59