

# 아세틸화 처리 목재에 배양시킨 *Trametes versicolor*의 Laccase활성과 $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 분석\*<sup>1</sup>

손 동 원\*<sup>2</sup> · 이 동 흡\*<sup>2</sup>

## The Laccase Activity of *Trametes versicolor* during Cultivation on Acetylated Wood and $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR Study\*<sup>1</sup>

Dong-Won Son\*<sup>2</sup> · Dong-Heub Lee\*<sup>2</sup>

### 요 약

아세틸화 목재를 부후균에 노출시켜 laccase의 생성을 액체배양기와 고체배양기상에서 검토하고,  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 분석을 통하여 목재 내 화학성분의 변화와 치환 도입된 아세틸기의 변화를 검토하여 보았다. 액체배양기상에서 laccase의 활성은 glucose를 탄소원으로 할 때 보다 높게 나타났으며, 고체배양기상에서는 laccase의 활성이 원활히 이루어지지 않았다.  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR의 분석 결과 리그닌 뿐만 아니라 셀룰로오스 부분에서도 아세틸화가 이루어졌음을 알 수 있었다. 부후된 아세틸화 목재의 분석 결과, 아세틸기의 목재내 결합이 목재 부후균 *T. versicolor*에 대해서 안정적이었다.

### ABSTRACT

For examine anti-degradation factors of acetylated wood, acetylated wood was incubated on *Trametes versicolor*. The laccase activity was examined in broth culture and solid fermentation that contain acetylated chips. The change of acetyl groups and chemical composition in the acetylated wood having massloss analysed by  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR.

The laccase activity was detected in broth culture. When the *T. versicolor* contact to acetylated wood directly, the laccase activity was very low and couldn't maintain during test periods. Through the analysing of  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR, the acetylation took place carbohydrates as well as lignin and hydroxyl group of

\* 1 접수 2001년 4월 30일, 채택 2001년 9월 3일

\* 2 임업연구원 임산공학부 Forest Research Institute, Forest Products Technology Div. 207 Cheongnyangri Dong Dongdaemoon Gu, Seoul 130-712, Korea.

amorphous region was more easily substituted than that of crystalline region. The spectral analyses of <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR were shown that introduced acetyl bond was stable against fungal attack.

**Keywords:** Acetylated wood, *Trametes versicolor*, Laccase, <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR

## 1. 서 론

목재의 물리적 열화나 생물 열화에 대한 안전한 처리 방법 중의 하나가 아세틸화 처리이다. 지금까지 보고된 아세틸화 목재의 장점을 열거하면, 치수안정성과 방부·방충능력이 크게 향상된다는 점이다. 한과조(1996)는 침엽수재를 아세틸화 하였을 때 아세틸화도가 증가함에 따라 치수안정성이 증가하였다고 보고하였으며, Rowell 등(1987)은 아세틸화 플레이크보드(중량증가율 15% 이상)는 6개월 동안 균 공격을 받지 않았다고 보고하였다. Becker와 Militz(1994)는 아세틸화된 너도밤나무, 소나무, 그리고 포플러(중량증가 10%)는 연부후균 피해도 없었다고 보고하였으며, 20% 이상의 중량증가에서는 갈색부후균의 공격을 피할 수 있었다고 보고하고 있다.

또한 아세틸화 목재는 흰개미(Irving 등, 1961)나 해양 천공충(Johnson & Rowell, 1988)과 같은 생물 열화에도 높은 저항성을 갖고 있음을 보고한 바 있다. 그러나 아세틸화 목재의 야외 노출 시험에서 아세틸화 처리에 따른 중량 증가율과 부후균에 따른 부후의 정도가 차이가 있었으며(Becker 등, 1994), Makoto 등(1999)의 연구에서도 백색부후균과 갈색부후균의 아세틸화 목재에 대한 부후양상에 차이가 있었다는 보고도 있다. 그의 연구에서 갈색부후균은 아세틸화 목재의 리그닌을 선호 가해한다고 보고하고 있다.

아세틸화 목재의 부후균에 따른 방부성능 차이는 목재 부후균의 효소 작용과 아세틸화 목재의 목재 내 화학성분 변화와 관계가 있을 것으로 생각하여 본 연구에서는 너도밤나무를 여러 단계의 아세틸 함량으로 아세틸화시킨 후, 아세틸화 목재와 접촉하는 *Trametes versicolor*의 laccase분비의 변화를 측정하고, 10주 후 중량감소율을 비교하였다. 그리고 <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR을 이용하여 치환된 아세틸기의 목재 내 화학성분 변화를 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 아세틸화

너도밤나무(*Fagus sylvatica*)를 칩(< 3 cm)의 상태로 아세틸화 하였다. 칩은 24시간 100℃에서 건조한 후 촉매는 사용하지 않고 초산을 사용하여 스테인레스 스틸 실린더에서 처리하였다. Table 1에 아세틸화 조건과 처리 후 아세틸 함량을 나타내었다. 실험에는 무처리 목재를 포함하여 다섯 가지 조건으로 아세틸화하였다. 본 시험에서는 아세틸 함량 17.1%까지는 온도와 시간을 고정시키고 초산과 무수초산의 비율을 다르게 하면서 처리하여 아세틸 함량을 조정하였다. 28.9%의 아세틸 함량 처리에서는 100% 무수초산을 사용하였으며 처리시간은 3시간으로 고정시켰고 온도는 120℃로 하였다.

**Table 1.** The condition of acetylation and acetyl group content.

Specimen	Solution		Temperature (°C)	Time (min)	Acetyl group contents (%)
	Acetic anhydride	Acetic acid			
Control					53
I	25	75	80	180	96
II	50	50	80	180	113
III	75	25	80	180	17.1
IV	100	0	120	180	28.9

## 2.2 목재내 아세틸 함량 측정

목재내부의 아세틸 함량을 측정하기 위하여 다음 방법을 사용하였다. 1 g의 목분을 100 mL의 비이커에 넣고 뚜껑을 덮고 4시간 동안 103°C에서 건조하였다. 건조된 시편을 데시케이터에서 식힌 다음 4 M sodium butylate 3 mL와 sodium hydroxide 0.2 M 80 mL를 첨가하였다. 18시간 경과 후 70°C에서 1시간 반응시켰다. Formic acid로 희석(1:1 v/v)한 후 가스 크로마토그래피(Helwett Packerd 5890, 6890 autosampler)를 이용하여 목재 내 아세틸 함량을 구하였다.

## 2.3 아세틸화 칩을 탄소원으로 한 액체 배지에서의 Laccase 활성 측정

100 mL의 배양액이 들어 있는 500 mL의 플라스크에 멸균샬레에서 미리 배양하여둔 균사 8조각(각각 1 cm<sup>3</sup>)을 접종시켰다. 탄소원으로는 글루코스, 너도밤나무 칩, 아세틸함량 29%의 칩을 사용하였다. 농도는 리터 당 10 g으로 하였다. 각각의 경우, 변형된 Tien, 그리고 Kirk(1988)의 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 리터당 ammonium tartrate {0.2 g, pH 4.5 40 mM(2,2-dimethylsuccinate 5.84 g/l)}, B-III medium 100 mL{리터당 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 g, MgSO<sub>4</sub> 5 g, CaCl<sub>2</sub> 1 g, trace element solution 100 mL(리터당 MgSO<sub>4</sub> 3 g, MnSO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 1 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CoCl<sub>2</sub> 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CuSO<sub>4</sub> 0.1 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01 g, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O, nitrotriacetate 1.5 g)} Thiamine (200 ppm) 10 mL를 사용하였다. 배양조건 26°C, 70% 조건에서 정지 배양하였다. 균사를 제거한 배양액을 laccase 활성 측정에 사용하였다.

## 2.4 고체배양기상에서 Laccase 활성 측정과 중량감소를 측정

균주는 *T. versicolor*를 사용하였다. 20 g의 칩(길

이 0.5 cm 이하)을 200 mL의 마개가 있는 병에 넣고 증류수 20 mL를 함께 넣은 후 멸균처리하였다. 멸균처리 후 미리 진탕배양하여 두었던 균사 3 mL를 칩이 들어 있는 병에 접종한 후 26°C, 70% 조건에서 배양하였다. 일정 기간 후 5 g의 칩을 꺼낸 다음 50 mL의 증류수에 넣어 3시간 동안 교반하여 효소를 추출하였다. 원심분리(10,000×)후 상등액을 laccase의 활성 측정에 사용하였다. Laccase활성은 200 μL malonate 용액에 2,6-dimethoxyphenol을 50 μL, 배양액을 600 μL 넣어 30°C에서 2분간 반응시켜 468 nm에서 흡광도를 측정하였다(kazuhito, 2000).

일정 기간마다 배양병내의 칩을 균사와 함께 꺼낸 후 건조하여 중량감소율을 측정하였다.

## 2.5 <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 분석

무처리 시편과 처리 시편의 <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 분석은 Bruker AMX 300 spectrometer를 사용하여 75.48 MHz에서 측정하였다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3.1 아세틸화 목재의 <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 분석

Fig. 1에 아세틸화 처리 전과 처리 후의 <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR의 차트를 나타냈다. 여기에서 A는 너도밤나무의 무처리 목재의 차트를 나타내며, B는 9.6%, C는 28.9%의 아세틸 함량을 나타낸 것이다. 목재내 아세틸 함량이 증가되면서 C2 밴드는 줄어들다가 사라졌다. 무처리 목재의 차트에서는 C6의 두 부분, 즉 셀룰로오스의 결정영역과 비결정영역이 있었다. 목재내 아세틸 함량이 증가 할수록 C6밴드의 한 부분, 즉 셀룰로오스의 비결정 영역의 밴드가 사라졌다. 특히 비결정영역 부분 C6밴드가 아세틸화로 인해 사라짐은 비결정영역의 수산기가 결정영역보다 더 쉽게 아세틸기로 치환되어 짐을 유추할 수 있었다.

Rowell 등(1994)은 소나무로부터 목재내 성분, 즉

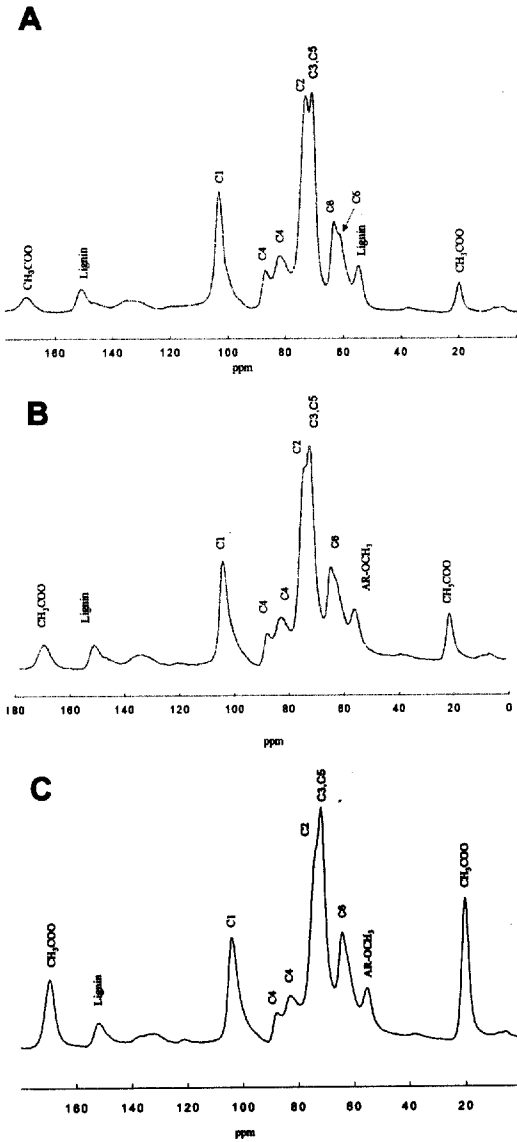


Fig. 1.  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR spectra of untreated wood and acetylated wood; A: Untreated beechwood, B: Acetylated wood(Acetyl content: 9.6%), C: Acetylated wood(Acetyl content: 28.9%).

셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 그리고 리그닌을 분리하여 무수초산과 반응시켜 본 결과 반응이 가장 잘 일어나는 것은 리그닌이었으며 헤미셀룰로오스, 전셀룰

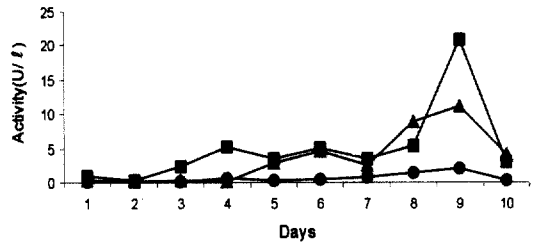


Fig. 2. Extracellular laccase activity during broth cultivation on glucose(●), beech wood(■) and acetylated wood(▲) (acetyl content: 28.9%).

로오스 순으로 반응됨을 보고하였다. 특히 셀룰로오스 자체는 촉매없이 무수초산과 반응 할 때 반응이 일어나지 않음을 보고한 바 있다.

본 실험에서 무처리 및 처리 시료인  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 분석결과 셀룰로오스가 리그닌 존재 하에서 아세틸화 반응이 일어남을 알 수 있었다.

### 3.2 글루코스, 너도밤나무 칩, 아세틸화 칩을 탄소원으로 한 액체 배지에서의 Laccase 활성 비교

Fig. 2에 백색부후균 *T. versicolor*에 의해 생성된 균체의 laccase 효소의 활성을 탄소원을 구분하여 본 결과를 나타냈다. 글루코스를 탄소원으로 하였을 때 10일 간의 배양기간 중 최대 활성은 2.0 U/l에 달하였다. 탄소원을 비교하였을 때 최대 활성은 너도밤나무 칩을 탄소원으로 할 때로, 20.9 U/l로 나타났다. 아세틸화 칩(아세틸 함량: 28.9%)을 탄소원으로 처리하였을 경우에는 최대 활성 11.1 U/l에 도달하였다. 이것은 탄소원을 글루코스로 하였을 때 보다 높은 활성이었다. 최대 활성은 모두 배양 9일 이후에 얻어졌다.

백색부후균 *T. versicolor*는 특별한 배양조건에서 laccase, Mn peroxidase, 그리고 lignin peroxidase를 생성한다고 보고하였다(Dodson, 1987; Rogalski, 1991). *T. versicolor*가 리그닌 분해 효소를 생성하기 위해서는 고유한 C:N율과 유도물질이 필요하다. 그

중에서 리그닌 분해 효소 유도물질들은 페놀, lignosulphonic acid, 그리고 페놀의 methoxylated derivatives로 알려져 있다(Leonowiz, 1978; Bollag and Leonowicz, 1984; Bollag, 1988).

본 실험에서 주어진 탄소원, 즉 너도밤나무 칩과 아세틸화 처리 칩에서 배양시킨 균 배양액에서 laccase의 생성이 확인된 것은 리그닌 혹은 리그노셀룰로오스 부분에서의 페놀과 저분자 화합물 혹은 페놀을 포함하는 고분자 화합물에 의해 유도되어진 것으로 사료된다. Rowell(1994)은 아세틸화로 인한 중량증가를 8.5%를 보인 시편인 경우, 약 80%의 리그닌 수산기가 치환되어졌으나 전셀룰로오스의 수산기는 12% 치환되어졌다고 보고하였다.

### 3.3 중량감소율과 Laccase활성

아세틸화 목재칩 20 g을 500 mL 배양병에 넣고 미리 배양시킨 균사를 직접 접종하여 2주마다 칩에 분비된 균체의 효소 활성을 측정하고 10주 후 중량 감소율을 측정하였다. Fig. 3에 시간의 경과에 따른 아세틸화 칩에서의 laccase 활성을 비교하여 보았다. 무처리 칩에서의 laccase의 활성은 4주 이후 증가하기 시작하여 10주 후에 23.9 U/l에 이르렀다. 반면 아세틸화 칩의 경우, 균 접종 후 육안으로 균사의 생육이 확인되었으며, laccase활성이 2주 이후부터 확인되었다. 그러나 4주 이후 활성은 감소하기 시작하였으며 아세틸 함량 17.1%의 칩에서는 활성이 0.3 U/l로 저하되었다. 아세틸 함량 28.9%의 칩에서는 균사의 생육이 없었으며, 효소의 활성은 측정되지 않았다. Fig. 4와 같이 배양 10주 후 무처리 시편의 중량감소율은 18%이었으며, 아세틸 함량 9.6%의 칩은 5.5%, 그리고 아세틸 함량 11.3%와 17.1%의 칩에서는 각각 중량감소율이 2.6%와 2.3%를 나타내었다.

화학수식 목재의 내후성 발취 요인은 처리된 목재의 세포벽 성분의 변화로 인하여 아세틸화된 목재 기질을 효소들이 대사과정에서 이용하지 못하는 것 보다 효소 가수분해가 발생할 수 없는 세포벽 내 수분 감소 때문이라고 Stamm 등(1960)은 가정하였다.

Rowell 등(1987)은 아세틸화 처리된 목재의 부후

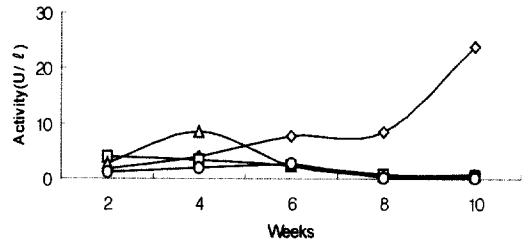


Fig. 3. Extracellular laccase activity during cultivation on acetylated wood (Solid state fermentation) \*Acetyl content (%): ◇, 5.3 □, 9.6 △, 11.3 ○, 7.1.

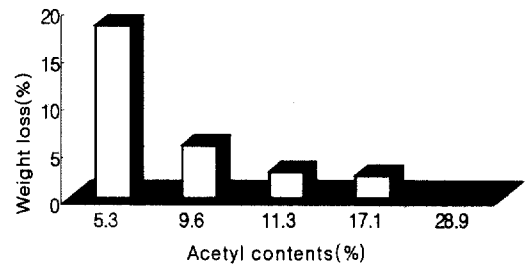


Fig. 4. Weight loss of acetylated wood on 10 weeks incubation with *T. versicolor*.

저항 요인을 처리된 세포벽에서의 수분의 부족함과 기질 억제라고 생각하였으며, Kalnins(1982)는 목재 부후균이 목재내 탄수화물을 공격할 때 이를 보호하고 있는 리그닌을 변화시킨 이후에 목재를 분해하기 시작하므로 리그닌의 화학적 수식은 중요하다고 보고하였다. 또한 리그닌의 화학수식은 균에 대하여 목재를 적절한 기질로서 인지하는 것을 방해할 수 있다고 보고하였다.

본 실험의 결과 아세틸화 목재와 접촉하는 균은 낮은 아세틸 함량의 목재에서는 laccase를 분비할 수 있었으나 점차 그 활성이 저하되는 추세를 보였다. 중량 감소율은 매우 적었으며, 리그닌의 아세틸화로 인하여 laccase효소의 유도가 원활히 이루어지지 못하였음을 알 수 있었다.

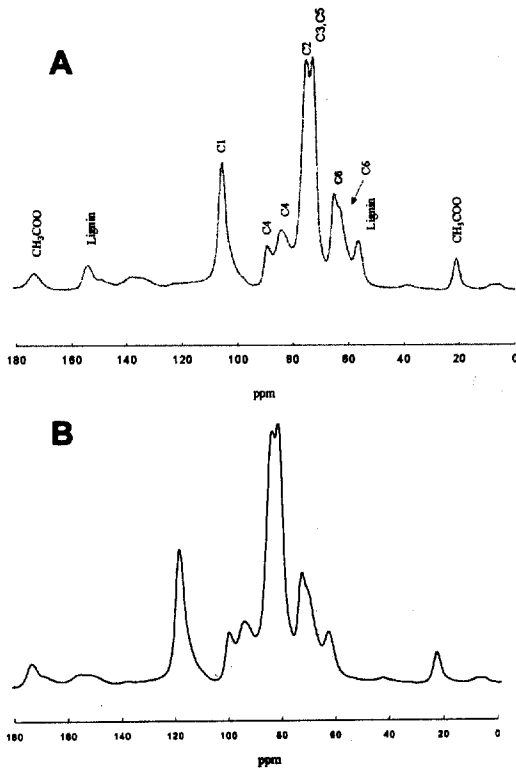


Fig. 5.  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR spectra of untreated wood; A: untreated wood. B: after fungal treatment(massloss 18%).

### 3.4 중량 감소된 아세틸화 처리 목재의 $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 분석

Laccase 활성측정과 10주간 부후시험이 끝난 칩의 화학성분의 변화를 알아보기 위하여  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR분석을 하였다. Fig. 5에 무처리 목재의 균처리 전과 후를 비교하여 나타내었으며, Fig. 6에는 아세틸 함량 9.6% 칩의 균처리 전과 후를 비교하여 나타내었다. 무처리 목재에서는 리그닌 부분(aromatic region 110~160 ppm)이 미약하나마 감소되어 짐을 확인할 수 있었다. 또한 63 ppm과 840 ppm부분의 감소는 셀룰로오스 비결정 부분의 감소가 있었음을 확인할 수 있었다. 아세틸 함량 9.6% 칩의 균처리 전과 후에서는 아세틸화로 증가된 피크, 즉 20 ppm과 172 ppm에서의 피크의 변화는 확인되지 않았다.

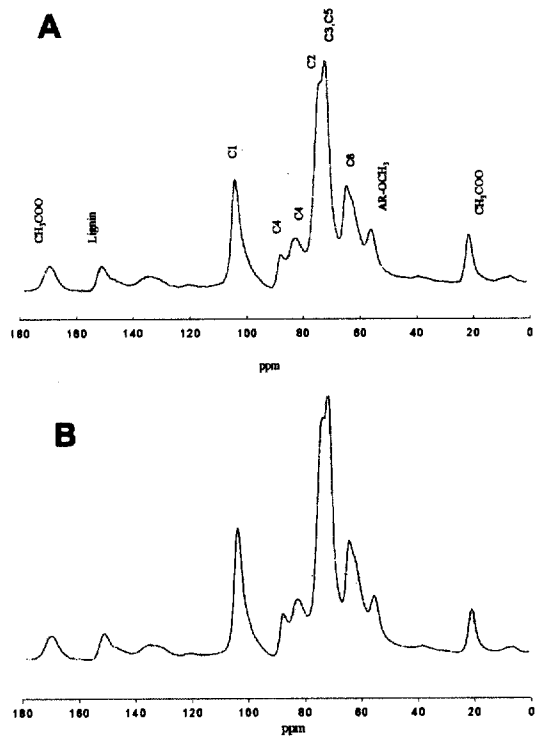


Fig. 6.  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR spectra of acetylated wood (Acetyl content: 9.6%); A: Untreated wood, B: After fungal treatment(massloss: 5.5%).

$^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR의 분석결과 유도된 아세틸 결합은 *T. versicolor*에 대하여 안정적임을 알 수 있었다.

## 4. 결론

아세틸화 처리 목재의 내후 요인을 탐색하기 위하여 아세틸화 처리 목재를 부후균에 노출시키고 리그닌 분해 효소인 laccase의 생성을 액체배양과 고체 배양기상에서 검토하였다. 그리고  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 분석을 통하여 치환된 아세틸기의 목재내 결합과 중량감소율을 보인 아세틸 칩에서의 아세틸기의 변화를 검토하여 보았다.

아세틸화 칩을 탄소원으로 한 액체 배양기상에서의 laccase의 활성이 측정되었으며, 이는 laccase를 유도할 수 있는 폐놀성 화합물이 배양기내에 존재함을 추

정할 수 있었다.

고체 배양기에서의 laccase활성 측정 결과 아세틸화 목재와 접촉하는 균은 낮은 아세틸 함량의 목재에서 laccase를 분비할 수는 있었으나 점차 감소하는 추세를 보였으며, 중량감소를 또한 매우 적어 리그닌의 아세틸화로 인하여 laccase효소의 유도가 원활히 이루어지지 못하였음을 알 수 있었다.

<sup>13</sup>C-CP/MAS NMR의 분석결과 리그닌 뿐만 아니라 목재내 탄수화물에서도 아세틸화가 일어났음을 알 수 있었으며, 비결정영역의 수산기가 셀룰로오스의 결정영역보다 쉽게 아세틸기로 치환됨을 알 수 있었다. 부후된 아세틸화 목재의 분석에서 목재 내 아세틸 결합은 부후가 진행되어도 목재 부후균 *T. versicolor*에 대하여 안정적인임을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Beckers, E. P. J. and H. Militz. 1994. Acetylation of solid wood. International Research Group on Wood Preservation. Proceedings: Second Pacific Rim Bio-Based Composites Symposium, Vancouver, Canada. p. 125~134.
2. Beckers, E. P. J., H. Militz M. Stevens. 1994. Resistance of Acetylated wood to Basidiomycetes, Soft Rot and Blue Stain. International Research Group on Wood Preservation. WP-94-40021.
3. Bollag, J. M. and D. H. Anderson. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl Environ Microbiol* 54: 3086~3091.
4. Bollag, J. M. and A. Leonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl Environ Microbiol* 48: 849~854.
5. Dodson, P., C. Evans, P. Harvey, and J. Palmer. 1987. Production and properties of extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyzes C  $\alpha$ -C  $\beta$  cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol Lett* 42: 17~23.
6. Hadi, Y. S., I. G. K. T. Darma, F. Febrianto and E. N. Herlyyana, 1995. Acetylated rubberwood flake-board resistance to bio-deterioration. *Forest prod J* 45(10): 64~66.
7. Irving, S. G., E. B. Jeroski. A. E. lund and J. W. Weaver. 1961. Acetylation of wood in lumber thickness. *Forest Products Journal* 363~370.
8. Johnson, B. R., and R. M. Rowell. 1988. Resistance of chemically-modified wood to marine borers. *Material und Organismen*. 23(2), 147~152.
9. Kajuhito, I., M. Fujita. K. Kumano. K. Suyama. H. Hamamoto. 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology & Biochemistry*. 32: 85~91.
10. Kalnins, M. A. 1982. Chemical modification for improved decay resistance. *Wood Sci* 15: 81~89.
11. Leonowicz, A., and J. Trojanowski. 1978. Induction of laccase in basidiomycetes, the laccase-coding messenger. *Acta Biochim Polon* 25: 147~157.
12. Makoto, O., A. Kato, K. Suzuki, N. Hayashi, and M. Ishihara. 1999. Characterization of acetylated wood decayed by brown-rot and white-rot fungi. *J. wood Sci* 45: 69~75.
13. Rogalski, J., T. Lundell, A. Leonowicz, and A. hatakka. 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiol Polon* 40: 221~234.
14. Rowell, R. M., G. R. Esenther, J. A. Youngquist, D. D. Nicholas, T. Nilsson, Y. Imamura, W. Kerner-Gang, L. Trong, and G. Deon. 1987. Wood modification in the protection of wood composites. 239~266. Proc IUFRO division 5 forest products subject group: wood protection, Canada.
15. Rowell, R. M., D. V. Plackett, D. Cronshaw, and E. Dunningham. 1994. Acetyl distribution in acetylated whole wood and reactivity of isolated wood cell-wall components to acetic anhydride. *Wood and Fiber Science* 26(1): 11~18.
16. Stamm, A. J. and B. H. Baechler. 1960. Decay resistance and dimensional stability of five modified woods. *Forest products Journal*. 10: 22~26.
17. Tien, M., and T. K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymol* 161: 238~249.
18. 한규성 · 조남석. 1996. 아세틸화 침엽수재의 치수변화 특성. 목재공학 24(4): 40~46.