폴리염화비페닐류의 생분해 우수 백색부후균 선발 및 분해율 분석*¹

홍 창 영*² · 곽 기 섭*² · 이 수 연*² · 김 선 홍*² · 최 인 규*^{2,3†}

Selection of White Rot Fungi for Biodegradation of Polychlorinated Biphenyl, and Analysis of Its Biodegradation Rate*¹

Chang-Young Hong*² · Ki-Seob Gwak*² · Su-Yeon Lee*² ·
Seon-Hong Kim*² · In-Gyu Choi*^{2,3†}

요 약

본 연구에서는 다양한 목재부후균의 polychlorinated biphenyls (PCBs) 생분해 가능성을 구명하고자 7종의 백색부후균을 이용하여 PCB 혼합물 중 가장 분해가 어렵다고 알려진 Aroclor 1254와 1260을 대상으로 분해력이 우수한 목재부후균을 선발하였다. 그리고 선발된 목재부후균을 이용하여 GC 분석을 통해 Aroclor 1254, 1260의 분해율을 조사하였다. 고체배지 저항성 테스트를 통해 우수분해 균주로 선발된 *Cystidodontia isubellina*는 다른 균주에 비해 균사생장량의 역제가 가장 적었으며 상대적으로 생장속도도 빠른 특징을 나타냈다. 선발된 *C. isubellina*에 의한 Aroclor 1254와 1260의 분해율 분석 결과, Aroclor 1254배양 13일째 57.57%로 가장 높은 분해율을 나타냈다. Aroclor 1260 역시 배양일수가 증가함에 따라 분해율 역시 증가하는 경향을 보였으며, 배양 13일째 49.43%로, 두 혼합물 모두 기존의 다른 연구에서보다 높은 분해율을 나타냈다.

*¹ 접수 2010년 7월 7일, 채택 2010년 8월 12일

*² 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*³ 농업생명과학연구원, Research Institute for Agriculture and Life Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

ABSTRACT

In this study, the possibility of biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by various white rot fungi was evaluated, and outstanding white rot fungi for the degradation of PCBs were selected. Seven white rot fungi were used to degrade Aroclor 1254 and 1260, which are widely considered to be toxic and difficult to degrade. And the degradation rates of Aroclors by selected white rot fungi were performed by GC analysis. Through the resistance test of white rot fungi on different concentrations of PCBs, the inhibition of mycelial growth of *Cystidodontia isubellina* was much less than that of others, and this fungus grew faster than others, relatively. Based on this result, it was considered that *C. isubellina* was selected as degrading fungus for Aroclors. As a result of biodegradation rate of Aroclors by *Cystidodontia isubellina*, the degradation rate of Aroclor 1254 was reached to 57.57% in 13 days, which showed very high degradation rate. Also the degradation rate of Aroclor 1260 by *C. isubellina* had a tendency of increasing along with increasing incubation day. Maximal degradation rate of Aroclor 1260 was 49.43% at 13 days. Based on this results, it indicated that in comparison with a previous study, high degradation rate was obtained by *C. isubellina*.

Keywords: Degradation, Polychlorinated biphenyls, White rot fungi, *Cystidodontia isubellina*

1. 서 론

폴리염화비페닐류(Polychlorinated biphenyls, PCBs)는 난분해성 물질 중 하나로 1970년대까지 산업적으로 널리 사용되어 왔다. 이들은 절연유, 가소제, 난연제, 용제, 회석제 등으로 사용되었으며, 미국과 영국에서 Aroclor라는 상품명으로 상용화 되었다. Aroclor는 염소 원자가 치환된 비율에 따라 Aroclor 1242, 1254, 1260으로 명명되며, 이는 biphenyl 분자당 염소원자가 각각 무게의 42, 54, 60%를 차지하는 물질로 구성된 형태이다(Yadav *et al.*, 1995). 따라서 Aroclor는 PCB 동족체의 혼합물로 이들을 구성하는 PCBs는 biphenyl에 10개 수소 중 2~10개가 염소원자로 치환된 형태이며, 209개의 다른 이성질체를 가진다(Quensen III *et al.*, 1990).

지금까지 PCBs 생분해에 관한 연구는 박테리아를 중심으로 진행되어 왔다(Abramowicz, 1990). 호기성 박테리아는 주로 2,3-dioxygenases를 이용하여 aromatic ring을 dioxygenation함으로써 PCBs를 분해하지만, ortho-위치보다 meta-, para- 위치에 염소

원자가 있을시 분해가 더 잘 되므로 선택적 분해가 일어나기 쉬우며, 이에 따라 분해율이 낮고 biphenyl 분자당 5개 이하로 치환된 염소원자가 적은 PCBs만을 분해하는 단점을 가진다(Bedard *et al.*, 1987; Borja *et al.*, 2005; Boyle *et al.*, 1992). 따라서 PCB 분해 연구에 있어서 호기성 박테리아보다는 혐기성 박테리아를 이용한 연구가 더 많이 진행된 상태이다. PCBs는 혐기성 조건하에 염소원자의 치환수가 많은 PCBs를 환원적 탈염소화시킴으로써 biphenyl ring 구조만을 유지하면서 분해가 이루어진다(Quensen III *et al.*, 1990).

반면 목재부후균을 이용한 PCBs분해 연구는 현재까지 미진한 상황이다. 대부분 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 PCB의 분해율을 분석하였는데, Yadav *et al.* (1995)은 Aroclor 1242, 1254, 1260이 각각 질소제한배지에서 약 56, 21, 10%의 분해율을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Eaton (1985)은 0.25 ppm의 Aroclor 1254가 *P. chrysosporium*에 의해 약 9% 분해된다고 보고하였다. 이렇게 목재부후균을 이용한 PCB 분해 연구는 사용하는 균의 종류가 한정

되어 있으며, Aroclor 1242나 1254에 대한 연구는 많이 진행된 반면, Aroclor 1260의 경우 토양 내에 많이 함유되어 있지만 분해가 어려워 큰 문제로 인식되고 있다.

백색부후균은 리그닌을 분해하는 효소시스템을 가진다. 리그닌은 phenyl propane의 중합체로, phenol 전구체의 자유라디칼 반응을 통해 생성된다(Tien, 1987). 이렇게 폐놀성 구조를 지닌 리그닌은 백색부후균이 생산하는 대표적인 균체외 효소에 의해 분해된다. 균체 외 효소는 주로 lignin peroxidase와 manganese-dependent peroxidase로, 이 두 효소는 리그닌을 분해할 뿐 아니라 aromatic compound를 산화시키기도 하며(Beaudette *et al.*, 1998), 영양분이 제한된 배지에서 잘 생산된다는 특징을 가진다(Huynh and Crawford, 1985). 따라서 이러한 백색부후균의 효소시스템을 이용해 폐놀성구조인 PCB동족체가 분해되며 Aroclor 역시 분해된다는 보고가 있다(Krčmář *et al.*, 1999; Takagi *et al.*, 2007).

백색부후균에 의한 PCB 분해를 측정에는 크게 gas chromatography (GC)를 이용한 방법(Quensen III *et al.*, 1990; Yadav *et al.*, 1995), ^{14}C 로 구성된 PCB 동족체를 이용해 $^{14}\text{CO}_2$ 회수를 통한 방법(Thomas *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1995) 두 가지로 나눌 수 있다. 일반적으로 정량 분석 시에는 GC를 이용하지만, GC분석 시, PCB 분해 실험이 균을 이용한 것이므로 균사에 PCB가 흡착될 가능성이 있다. 이는 곧 결과적 오차를 발생하므로 정확한 정량 분석에 문제를 야기하기도 하므로(Beaudette *et al.*, 1998) 본 연구에서는 이러한 문제점을 고려하여 실험 및 분석을 실시하였다.

본 연구에서는 7개의 백색부후균을 이용하여 PCB 혼합물 중 가장 분해가 어려운 것 중 하나로 알려진 Aroclor 1254와 1260을 대상으로 분해력이 우수한 목재부후균을 선발하였다. 선발된 목재부후균을 이용하여 GC 분석을 통해 Aroclor 1254와 1260의 분해율을 측정하였다. 이러한 결과를 바탕으로 선발된 목재부후균의 분해 능력을 알 수 있었으며, 또한 Aroclor 1254와 1260의 분해 정도를 비교해 볼 수 있었다.

Table 1. White rot fungi

No.	White-rot fungi (species)	Abbreviation
1	<i>Cystidodonta isubellina</i> (KUC 8090)	CYI
2	<i>Fomitopsis insularis</i>	FOI
3	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (KCTC 6728)	PCH 6728
4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (KCTC 6293)	PCH 6293
5	<i>Polyporus brumalis</i> (KFRI 20912)	POB
6	<i>Stereum hirsutum</i> (KFRI 234)	STH
7	<i>Trametes versicolor</i>	TRA

2. 재료 및 방법

2.1. PCBs 분해 목재부후균 선발

2.1.1. 공시재료

본 연구에서 사용한 목재부후균은 백색부후균으로서 PDA배지에서 26°C, 7일 동안 선택배양 시켰으며, 생장 후 4°C에서 보관하였다. 임의로 선택된 백색부후균은 총 7가지로 Table 1과 같다. *Phanerochaete chrysosporium* (KCTC 6728)과 *Phanerochaete chrysosporium* (KCTC 6293)은 한국 생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받았으며, *Cystidodonta isubellina* (KUC 8090)는 고려대학교에서, *Polyporus brumalis* (KFRI 20912)와 *Stereum hirsutum* (KFRI 234)은 국립산림과학원에서 분양받았다. 그리고 나머지 두 개는 실험실에서 보유하고 있는 균주이다.

PCBs로는 Aroclor 1254 (4-8586, SUPELCO, USA)와 Aroclor 1260 (C-260N-50MG, AccuStandard, USA)를 사용하였으며, 백색부후균의 생장에 대한 영향을 최소화하기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시켜 배지에 첨가하였다.

2.1.2. PCBs의 농도에 따른 백색부후균의 저항성

PCBs 분해 백색부후균을 선발하기 위하여 PCBs로 선택된 Aroclor 1254와 1260의 농도에 따른 백색부후균의 저항성을 실험하였다. Malt extract agar

(MEA) 배지를 121°C, 15분간 멸균한 후, Aroclor 1254와 1260을 각각 1, 5, 10, 50 ppm이 되도록 배지와 혼합하여 직경 50 mm petridish에 분주하였다. 선배양시킨 백색부후균을 4 mm borer로 뚫어 접종한 뒤, 26°C에서 배양하여 12시간(0.5일) 간격으로 균사생장량을 측정하였다. 대조구는 두 가지로 Aroclor 1254와 1260, 그리고 DMSO가 모두 첨가되지 않은 대조구와 DMSO만 첨가된 대조구를 사용하였다. 모든 실험은 3반복을 실시하였다. 균사생장량 측정은 균사생장에 따른 직경의 길이를 측정하였으며, DMSO 대조구에서의 균사 생장량과 PCBs (1, 5, 10, 50 ppm)가 첨가된 배지에서의 균사 생장량의 차이를 통해 백색부후균의 저항성 정도를 계산하였다.

농도에 따른 균사생장 저해량을 각각 비교하여 PCBs의 농도에 따른 백색부후균의 생장 저해가 가장 적으면서 생장이 빠른 균주를 선택하였다. 균사생장 저해량은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Inhibition of mycelial growth (mm)} \\ &= \text{Mycelial growth of DMSO control (mm)} \\ &\quad - \text{Mycelial growth of PCBs-treated media (mm)} \end{aligned}$$

2.2. Aroclor 1254, 1260의 분해율 측정

2.2.1. 공시재료

저항성 실험을 통해 선택된 백색부후균을 이용하여 균질화 과정을 통해 균사 현탁액을 제조하였다. 선발된 백색부후균은 Potato dextrose agar (PDA) 배지에서 26°C, 7일 동안 배양 후, 균사 부분만 긁어 내어 멸균수와 함께 혼합한 뒤, 균질기(RH91, SMT, Japan)를 이용하여 5,000 rpm에서 2분 동안 분쇄하여 현탁액으로 제조하였다. 제조된 균사 현탁액은 4°C에서 보관되었다.

2.2.2. GC-ECD를 이용한 Aroclor 1254, 1260의 분해율 측정

Aroclor 1254, 1260의 분해율을 측정하기 위해서 질소제한배지인 Shallow stationary culture (SSC) 배지를 사용하였으며 그 조성은 Tables 2, 3과 같다.

Table 2. Composition of SSC media (per 1 ℓ distilled water)

Component	Concentration	Molecular weight (g/M)
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10%	180.16
Ammonium tartrate (C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆)	1.08 mM	184.15
KH ₂ PO ₄	14.7 mM	136.09
MgSO ₄ · 7H ₂ O	203 mM	246.47
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.68 mM	147.02
Thiamine · HCl	297 mM	337.27
Trace element solution	10 ml/liter	

Table 3. Composition of trace element solution (per 1 ℓ distilled water)

Component	Concentration (mM)	Molecular weight (g/M)
Nitriloacetic acid (C ₆ H ₅ NO ₆)	7.8	171.14
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.12	246.47
MnSO ₄ · H ₂ O	29	169.01
NaCl	17	58.44
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.359	278.01
CoCl ₂	0.775	98.92
CaCl ₂	0.9	110.99
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.348	287.54
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.04	249.68
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	0.021	474.39
H ₃ BO ₃	0.16	61.83
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.041	241.98

50 ml 삼각플라스크에 배지를 10 ml씩 넣고 silistopper로 막은 뒤 121°C에서 15분간 멸균하였다. SSC 배지의 경우, thiamine HCl과 trace element solution을 0.2 µm filter로 멸균 후 첨가하였다.

각각 플라스크에 균사 전건무게가 0.005 g이 되도록 균사 현탁액을 접종한 후, 26°C 배양기에서 5일간 정지 배양시켰다. Aroclors는 10 ppm씩 첨가하였다.

실험구는 균주의 접종과 Aroclors의 첨가 여부에 따라 다음과 같이 세 가지로 나누었다.

1) Sterile control (SC): 배지만 선배양(5일) 시킨

후, Aroclor 첨가

2) Killed control (KC): 배지에 균주를 접종시킨 후 배양(선배양 5일 + 1, 5, 9, 13일) → 각 배양일에 멸균(121°C, 15분) → Aroclor 첨가

3) Live culture (LC): 배지에 균주를 접종시킨 후 배양(5일) → Aroclor 첨가

균으로부터 PCBs를 회수하는 데는 다음과 같은 인자에 영향을 받는다: 1) 균에 의한 분해 정도, 2) 균에 흡착된 정도, 3) 용기에 흡착되거나 실험과정에서 손실(Beaudette *et al.*, 1998). 따라서 다음과 같은 영향인자를 최소화하기 위해 sterile control을 통해 용기에 흡착되거나 실험과정에서의 손실을 확인하였으며, 이를 통해 배양일수에 따른 Aroclor의 회수율을 측정하였다. 또한 killed control을 두 번째 대조구로 설정함으로써 균사에 의한 PCBs의 물리적 흡착량을 고려하였다.

따라서 sterile control과 live culture의 경우, 5일 선배양 후 바로 Aroclor를 첨가하는 반면, killed control은 5일 선배양 후에 추가적으로 추출일(1, 5, 9, 13일)까지 배양하였으며, 추출일에 멸균을 통해 균의 성장을 멈춘 후 Aroclor를 첨가하였다.

추출은 배양 1, 5, 9, 13일에 실시하였다. 각 플라스크에 7% perchloric acid 1 ml씩 첨가하여 배양을 종료하고 Aroclor 1254와 1260의 추출 및 분석을 실시하였다. 우선 7% perchloric acid가 첨가된 샘플을 균질기를 통해 균사를 균질화시킨 후, n-hexane으로 추출하였다. 균질기에 샘플과 n-hexane 25 ml을 함께 넣어 5,000 rpm에서 30초간 분쇄한 후, 이를 분별 깔대기를 이용하여 추출하였다. 추출은 shaker를 이용하여 270 rpm에서 15분간 진행되었으며, 총 추출 과정은 3반복하여 총 75 ml n-hexane 추출액을 획득하였다.

다음으로 배지에 함유된 각종 유기성분을 제거하기 위하여 진한 황산 30 ml을 이용해 270 rpm에서 1분간 추출하였다. 그리고 잔존해 있는 진한 황산을 제거하기 위해서 n-hexane으로 추출한 증류수 60 ml을 통해 같은 조건하에 추출하였으며, 이 모든 과정은 shaker를 이용하여 3반복하였다. 추출액에 anhydrous sodium sulfate를 첨가하여 수분을 제거하였으며, 여과지(No. 2, Advantec, Japan)로 여과하여 완전 농

축한 후, n-hexane에 용해시켜 최종 부피가 10 ml가 되도록 하였다.

Aroclor 1254와 1260을 정량하기 위해 GC-ECD (Electron Capture Detector, 6890N, Agilent Technologies, USA)를 이용하였다. 컬럼은 DB-5 (60 m, 0.32 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, 초기 온도 135°C에서 3분 동안 유지 후, 280°C까지 8°C/분으로 승온시켰으며, 최종 온도 300°C까지 15°C/분으로 승온시킨 후, 13분 동안 유지시켰다. Inlet 온도는 250°C (splitless), detector 온도는 320°C로 유지하였으며, N₂를 1.5 ml/분의 유속으로 흘려주었다. 추출액은 n-hexane으로 10배 희석하여 GC 분석을 실시하였으며 standard curve는 0.1, 0.2, 0.5, 1 ppm 농도의 Aroclor 1254, 1260을 이용하여 작성하였다.

GC-ECD를 통해 측정된 Aroclor 1254, 1260의 정량값은 다음의 식을 이용하여 분해율을 계산하였다.

Biodegradation rate of Aroclor 1254 and 1260 (%)

$$= \frac{\text{Concentration of killed control (ppm)} - \text{Concentration of live culture (ppm)}}{\text{Concentration of killed control (ppm)}} \times 100$$

또한 Aroclor 1254, 1260의 회수율은 다음의 식을 통해 계산하였으며, 배양일수에 따른 sterile control의 평균으로 나타냈다.

Recovery rate of Aroclor 1254 and 1260 (%)

$$= \frac{\text{Concentration of sterile control (ppm)}}{10 (\text{ppm})} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. Aroclor 1254와 1260 분해 목재부후균 선발

MEA배지에서 1, 5, 10, 50 ppm의 Aroclor 1254와 1260에 대한 백색부후균의 저항성을 살펴보았다.

DMSO 대조구에서의 균사 성장량과 Aroclor 1254, 1260 (1, 5, 10, 50 ppm)이 각각 첨가된 배지에서의 균사 성장량의 차이를 비교하였다. 즉 이 차이에 따

Fig. 1. Inhibition of mycelial growth in MEA media against Aroclor 1254 (x-axis : Incubation day (day), y-axis : Inhibition of mycelial growth (mm)).

른 결과값은 Aroclor 1254와 1260의 농도에 따른 균사 성장량의 억제율을 의미한다. 이 균사 성장량의 억제값이 낮을수록 Aroclor 1254와 1260에 대한 백색부후균의 저항성이 높은 것으로 판단하였으며, 최종적으로 Aroclor 1254와 1260의 농도에 따른 백색부후균의 저항성이 가장 높으면서 성장속도도 빠른 균주 한 종을 선발하였다.

3.1.1. Aroclor 1254 분해 목재부후균 선발

Aroclor 1254의 농도가 증가함에 따라 다른 균주에 비해 CYI의 저항성이 가장 높게 나타났다(Fig. 1). CYI는 DMSO 대조구에서의 균사성장량과 Aroclor 1254가 첨가 된 배지의 균사성장량의 차이가 최대 농도인 50 ppm에서 4.87 (mm)을 나타내었으며 이는 다른 균에 비해 낮은 값으로 높은 저항성을 보여주었다. 그리고 농도에 따른 균사의 성장 차이 역시 가장 작게 나타났다. 이와 반대로 POB에서는 가장 높은 균사성장량 억제값을 나타내었다. Aroclor 1254 50 ppm에서 19.74 (mm)로 다른 균주에 비해 높은 값을 나타내었으며 이에 따라 POB는 Aroclors의 농도에 따라 큰 영향을 받으며 분해시키는 정도가 낮다는 사실을 알 수 있다.

균의 생장은 실험에 사용한 직경 50 mm petridish를 대조구에서 균사가 모두 덮을 때까지 완료된 것으로 간주하였다. PCH 6728과 6293을 제외한 나머지

균들은 모두 생장이 완료되는 때까지 4일 이상 소요되었지만 CYI의 경우 생장이 3일 내에 완료되었다. 이 결과에 따르면 생장이 가장 빠른 균은 PCH종으로 Aroclor 1254의 분해를 빠르게 진행한다고 간주할 수도 있었지만 PCH 6728과 6293 모두 균사성장량의 억제 정도가 심하고 Aroclor 1254에 대한 저항성이 CYI보다 낮게 나타났다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 CYI가 Aroclor 1254에 대한 저항성이 가장 높은 것으로 판단되었다.

3.1.2. Aroclor 1260 분해 목재부후균 선발

Aroclor 1260의 경우 역시 농도가 증가할수록 CYI의 저항성이 월등히 높았다(Fig. 2). CYI는 생장이 완료된 3일을 기준으로 1, 5, 10, 50 ppm에서 균사성장량의 차이가 각각 1.58, 2.43, 3.15, 2.91 (mm)로 균사 성장량의 억제가 다른 균주에 비해 가장 적었으며, 50 ppm농도 범위 내에서 농도에 따라 거의 성장 차이를 보이지 않았다. 성장 속도면에서는 Aroclor 1254와 마찬가지로 PCH 6293, 6728가 가장 빠른 생장을 나타내었지만 균사성장량 억제값이 높으므로 우수분해 균주로 적합하지 않다고 사료되었다.

그리고 Aroclor 1260 경우 역시 Aroclor 1254와 마찬가지로 POB에서 가장 높은 균사성장량 억제값을 나타내었다. Aroclor 1260 50 ppm에서 10.66 (mm)로 다른 균주에 비해 높은 값을 나타내었다.

Fig. 2. Inhibition of mycelial growth in MEA media against Aroclor 1260 (x-axis : Incubation day (day), y-axis : Inhibition of mycelial growth (mm)).

따라서 1, 5, 10, 50 ppm의 Aroclor 1254와 1260에 대한 백색부후균의 저항성을 살펴본 결과, Aroclors 농도에 따른 백색부후균의 저항성이 가장 높으면서 생장속도도 빠른 균주로써 CYI를 선택하였다.

3.2. *C. isubellina*에 의한 Aroclor 1254와 1260 분해율

질소제한 배지인 SSC배지에서 우수 분해균주로 선발된 *C. isubellina*를 접종하여 Aroclor 1254와 1260에 대한 분해능을 살펴보았다. 배지에 균사 현탁액을 접종하고 5일 선배양 시킨 후, Aroclor를 첨가하여 배양 1, 5, 9, 13일 후에 추출 및 정량을 통해 분해율을 확인하였다. 정량은 GC/ECD 분석을 통해 이루어졌다. 균으로부터 PCBs를 회수하는 데는 균에 흡착된 정도 및 용기에 흡착되거나 실험과정에서 손실인자 등에 영향을 받는다(Beaudette *et al.*, 1998). 따라서 다음과 같은 영향인자를 최소화하기 위해 sterile control와 killed control, 두 대조구로 설정하였다.

3.2.1. Aroclor 1254의 분해율

*C. isubellina*에 의한 Aroclor 1254의 분해율은 4일간격으로 측정되었다. 우선 sterile control의 경우, 배양 일수에 따른 약간의 손실을 보였다. 특히 13일

Table 4. Concentrations (ppm) of Aroclor 1254 in the media after 5 days pre-incubation

Samples	Incubation day			
	1 day	5 days	9 days	13 days
Sterile control	10.11	8.04	9.14	7.56
Killed control	9.58	9.10	9.63	9.08
Live culture	6.62	4.15	4.32	3.85

째 2.44 ppm의 손실을 보였는데, 이는 배양 일수가 증가함에 따라 용기에 흡착되는 양이 많아지면서 실질적인 회수량이 줄어들었고, 또한 실험과정 상의 손실도 포함된 것으로 생각되었다. 하지만 9일까지는 10 ppm에 가까운 회수율을 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로 비생물적 손실을 고려하였을 때, Aroclor 1254는 13일 동안 평균적으로 약 86%의 회수율을 보였다(Table 4).

Aroclor 1254의 생분해에 있어 균사로 흡착되는 부분을 정확히 조절하기 위해 일정기간 동안 배양시킨 균주를 멸균시켜 killed control을 설정하였는데, killed control에 대한 Aroclor 회수량을 측정한 결과, 배양일수가 증가함에 따라 회수량이 약 5% 정도 감소하였다. Sterile control보다 수치상으로는 높은 회수율을 보였는데, 이는 비생물적 손실은 고려하지 않고 균사에 의한 물리적 흡착만을 고려한 수치이다. 배양일수 증가에 따라 균사에 대한 Aroclor 1254의

Table 5. Concentration (ppm) of Aroclor 1260 in the media after 5 days pre-incubation

Samples	Incubation day			
	1 day	5 days	9 days	13 days
Sterile control	9.09	10.51	10.32	11.09
Killed control	8.75	9.28	9.95	9.38
Live culture	7.33	5.67	5.84	4.74

Fig. 3. Biodegradation rate of Aroclor 1254 by *C. isubellina* in SSC media.

물리적 흡착량은 약간 증가한 것으로 나타났다. 물리적 흡착량은 처음 첨가한 농도 10 ppm과 killed control의 농도 차이를 통해 구할 수 있다.

배양 일수에 따른 killed control (KC)과 live culture (LC)의 농도변이는 Table 4를 통해 알 수 있으며, killed control에 의한 군사 흡착율을 고려하여 *C. isubellina*에 의한 Aroclor 1254의 분해율을 계산해본 결과는 Fig. 3과 같다. 배양일수 증가에 따라 killed control의 회수량이 약간 감소하였지만 live culture 양의 현저한 감소로 인해 높은 분해율을 나타내었다. 배양일수가 증가함에 따라 분해율은 증가하였으며, 배양 후 13일째 57.57%로 가장 높은 분해율을 보였다. 이는 이전의 *P. chrysosporium*을 이용한 연구 결과(Yadav *et al.*, 1995)보다 높은 수치로 *C. isubellina*의 높은 분해능을 나타냈다.

3.2.2. Aroclor 1260의 분해율

Aroclor 1260의 경우, sterile control에서는 배양 일수에 상관없이 초기 농도인 10 ppm에 가까운 회수량을 보여주었다. 약 97%의 높은 회수율을 통해 실

Fig. 4. Biodegradation rate of Aroclor 1260 by *C. isubellina* in SSC media.

험과정에 의한 손실이 거의 이루어지지 않았음을 알 수 있다.

Killed control의 경우, Aroclor 1254와는 달리 배양일수 증가에 따른 군사에 의한 물리적 흡착량은 거의 일정하게 나타났다(Table 5).

Killed control에 의한 군사 흡착율을 고려하여 *C. isubellina*에 의한 Aroclor 1260의 분해율을 계산해본 결과, 배양일수가 증가함에 따라 분해율이 증가하였다. Aroclor 1260 첨가 후, 1일째에는 약간의 분해를 보였지만 1일 이후 급격한 분해가 시작되어 배양 5일째 분해율이 38.90%였으며, 9일 이후 계속 증가하여 13일째 49.43%가 분해되었다(Fig. 4).

Aroclor 1260은 상업적으로 판매되었던 다른 Aroclor보다 독성이 높으며 분해가 어렵다고 알려져 있는데, *P. chrysosporium* 균주를 이용하여 Aroclor 1260을 분해한 이전의 연구 결과를 보면, 질소제한배지에서 30일 동안 10% 정도의 분해율을 보여주었다(Yadav *et al.*, 1995). 그리고 Aroclor 1260의 대부분을 차지하는 PCB 동족체인 tetra- 또는 hexa-chlorinated biphenyl은 *P. chrysosporium* 균주에 의해 거의 분해되지 않았다고 보고된 바 있다. *P. chrysosporium*은 염소 원소의 비율이 적은 dichlorinated biphenyl의 경우 약 12% 분해율을 보였지만, tetra chlorinated biphenyl과 hexa chlorinated biphenyl의 경우, 1% 미만의 낮은 분해율을 나타냈다(Dietrich *et al.*, 1995).

반면, 본 연구에서는 *P. chrysosporium*을 이용한 이전의 연구에 비해 49.43%의 높은 분해율을 나타냈으며, 이는 *C. isubellina*에 의한 Aroclor 1260의 생분해 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

3.2.3. Aroclor 1254, 1260의 분해율 비교 분석

*C. isubellina*에 의한 Aroclor 1254와 1260의 생분해 실험 결과, 다른 연구 결과에 비해 높은 분해율을 보였다(Figs. 3, 4). *Aspergillus niger*에 의한 PCBs의 분해율 분석 결과, biphenyl 분자당 약 42%의 염소원자로 치환된 Clophen A 30의 경우, 염소원자 비율이 상대적으로 낮기 때문에 20~30%의 분해율을 보인 반면, Aroclor 1254, 1260의 염소 치환 비율과 같은 Clophen A 50, 60은 거의 분해되지 않았다(Dmochewitz *et al.*, 1988).

또한 박테리아를 이용한 이전의 연구에서는 *Alcaligenes eutrophus* H850에 의한 Aroclor 1242와 1254의 분해율을 분석하였는데, 상대적으로 염소원자가 덜 치환된 1242는 81%의 높은 분해율을 보인 반면, 1254는 약 35%의 분해율을 보였다. 이는 본 연구의 분해율 결과보다 낮은 수치로, 박테리아의 경우 dioxygenase에 의해 meta-, para- 위치에 염소원자가 치환되지 않은 물질에 대해서만 높은 분해율을 보였기 때문이다(Bedard *et al.*, 1987; Borja *et al.*, 2005). 하지만 백색부후균은 biphenyl의 ortho-, meta-, para- 위치에 상관없이 비선택적으로 분해가 야기되기 때문에 높은 분해율을 보인 것으로 사료된다(Yadav *et al.*, 1995).

Aroclor 1254, 1260 모두 배양 13일째에 가장 높은 분해율을 보였으며, 이는 13일 이후의 배양일수 증가에 따라 분해율이 증가할 수 있다는 가능성을 보여 주었다.

하지만 sterile control 비교 시, Aroclor 1254는 Aroclor 1260에 비해 배양일수 증가에 따라 회수율이 감소하는 경향을 보였다. 이는 비생물적 손실과 실험과정 상의 오차 등으로 해석할 수 있는데 실험과정 상의 손실만이라도 줄일 수 있다면 더 높은 분해율을 보일 수 있을 것이라 사료된다. Aroclor 1254 자체의 회수율을 높이기 위해서는 배지 및 용기에 의한 흡착으로 인해 발생한 손실부터 최소화해야 한다. 이를 위해 n-hexane 외에 다양한 용매를 이용한 추출이 추가적으로 실행되어야 한다. Aroclor는 대부분 증류수로 구성된 배지에 녹아 있는데, 비극성인 Aroclor가 극성인 증류수에 완전히 용해되지 못한 상

태로 존재하게 되므로 배양일수 증가에 따라 배지 및 용기 흡착이 증가하면서 회수율이 낮아지게 된 것이다. 따라서 다양한 용매별 추출법에 대한 연구를 통해 Aroclor의 회수율을 증가시킬 수 있는 방법을 고안해야 할 필요가 있다.

두 번째로 배지조성 성분을 변화시킴으로써 PCBs의 회수율을 높일 수도 있다. Zachar *et al.* (1996)은 질소제한배지에 veratryl alcohol이나 계면활성제 중 하나인 Tween 80을 첨가함으로써 PCBs의 회수율이 증가하였다고 보고한 바 있다. 이들은 특히 배양일수 증가에 따라 veratryl alcohol과 Tween 80을 첨가한 배지의 회수율이 첨가하지 않은 것에 비해 PCBs의 회수율이 높다는 결과를 제시하였다. 따라서 이러한 내용을 참고하여 배지조성 성분의 변화를 통해 PCBs의 회수율을 높일 수 있으므로 이에 대한 연구 또한 필요하다.

Killed control 비교 시, Aroclor 1254에 비해 Aroclor 1260은 배양일수와 상관없이 물리적 흡착율이 일정한 값을 나타내었으며, 이를 통해 Aroclor 1254가 1260보다 물리적 흡착 정도가 큰 것으로 판단되었다. 하지만 live culture에서 Aroclor 1254의 회수율이 배양일수가 증가함에 따라 현저히 감소하는 경향을 보였기 때문에 Aroclor 1254의 분해율이 더 높게 나타났다.

이렇게 Aroclor 1254와 Aroclor 1260의 분해율 차이는 두 Aroclor 혼합물이 각각의 동족체 구성이 다르고 차지하는 양도 다르기 때문이다(Yadav *et al.*, 1995). Aroclor 1254와 1260은 biphenyl 분자당 염소원자가 각각 무게의 54, 60%를 차지하는 물질로 구성된 형태로, 일반적으로 Aroclor 1260은 1254보다 더 많은 염소원자가 치환된 물질로 구성되어 있다. 이러한 차이로 인해 Aroclor 1254의 분해율이 더 높게 나타난 것으로 생각된다. 이전의 연구결과들 역시 Aroclors 간의 분해율 차이를 구성성분 및 비율의 차이로 해석하고 있으며, 이를 조금 더 명확하게 확인하기 위해서는 GC/MS 분석이 실행되어야 한다고 생각한다. 그리고 Aroclors의 분해 과정에서 생성된 분해산물 역시 분해 과정에 영향을 미치는데, 그 정도가 다르므로 다음과 같은 결과를 야기한다고 생각된

다. 즉, 분해 과정 시 생성된 분해산물은 기존 Aroclor 물질에 대한 상대적 반응성에 따라 각각 다른 영향을 미치게 되므로 분해율 차이를 야기할 수 있다(Yadav *et al.*, 1995).

따라서 Aroclors를 구성하는 물질에 따라, 즉 염소 원자가 치환된 비율이나 염소원자의 위치에 따라 분해되는 정도가 다르므로 다른 결과를 야기시킨 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 백색부후균을 이용하여 난분해성 물질 중 하나인 폴리염화비페닐류의 생분해 가능성에 대해 알아보고자 하였다. 폴리염화비페닐류로는 상용화되었던 Aroclor를 사용하였으며, 백색부후균은 고체배지저항성 테스트를 통해 가장 우수한 저항성을 보인 것을 선택하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 백색부후균은 총 7가지로 그 중에서 *C. isubellina*가 가장 높은 저항성을 보였으며 이를 우수 분해 균주로 선발하였다. 선발된 *C. isubellina*를 이용해 Aroclor 1254와 1260에 대한 분해율 분석을 실시하였다. 그 결과 두 PCB 혼합물 모두 배양일수가 증가함에 따라 분해율 역시 증가하였지만 분해율에서는 차이를 나타냈다. Aroclor 1254는 배양 13일째 57.57%로 가장 높은 분해율을 보였으며, Aroclor 1260은 배양 13일째 49.43%의 분해율을 보였다. 이러한 분해율 차이가 발생하는 원인은 배지 및 용기 흡착에 의한 손실 및 균사에 의한 물리적 흡착, 그리고 Aroclor를 구성하는 PCBs 동족체의 구성 물질 및 구성비율의 차이 등으로 생각할 수 있다. 배지 및 용기에 의한 흡착으로 인해 발생한 손실은 다양한 용매 추출법을 이용하여 좀 더 회수율이 높은 추출방법을 고안한다면 발생하는 손실을 줄일 수 있을 것이다. 그리고 또한 분해산물의 GC/MS 분석을 통해 Aroclor 1254와 1260의 구성물질의 차이를 확인함으로써 분해율 차이의 원인을 정확히 설명할 것이라 기대된다. 따라서 다양한 용매추출에 의한 회수율 분석 및 분해산물의 GC/MS 분석 등 추가적인 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 기초연구과제지원사업(KRF-2008-313-F00051)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. Abramowicz, D. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 10(3): 241~251.
2. Beaudette, L., S. Davies, P. Fedorak, O. Ward, and M. Pickard. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6): 2020~2025.
3. Bedard, D., R. Wagner, M. Brennan, M. Haberl, and J. Brown Jr. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 1094~1102.
4. Borja, J., D. Taleon, J. Auresenia, and S. Gallardo. 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry* 40(6): 1999~2013.
5. Boyle, A., C. Silvin, J. Hassett, J. Nakas, and S. Tanenbaum. 1992. Bacterial PCB biodegradation. *Biodegradation* 3(2): 285~298.
6. Dietrich, D., W. Hickey, and R. Lamar. 1995. Degradation of 4, 4'-dichlorobiphenyl, 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl, and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11): 3904~3909.
7. Dmochewitz, S. and K. Ballschmiter. 1988. Microbial transformation of technical mixtures of polychlorinated biphenyls (PCB) by the fungus. *Chemosphere* 17(1): 111~121.
8. Eaton, D. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme and Microbial*

- Technology 7(5): 194~196.
9. Huynh, V. and Crawford, R. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters 28(1): 119~123.
10. Krčmář, P., A. Kubátová, J. Votruba, P. Erbanová, Novotn, and V. Šásek. 1999. Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15(2): 269~276.
11. Quensen III, J., S. Boyd, and J. Tiedje. 1990. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. Applied and Environmental Microbiology 56(8): 2360~2369.
12. Takagi, S., C. Shirota, K. Sakaguchi, J. Suzuki, T. Sue, H. Nagasaka, S. Hisamatsu, and S. Sonoki. 2007. Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. Chemosphere 67(9): 54~57.
13. Thomas, D., K. Carswell, and G. Georgiou. 1992. Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology and bioengineering 40(11): 1395~1402.
14. Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. Critical Reviews in Microbiology 15(2): 141~168.
15. Yadav, J., J. Quensen III, J. Tiedje, and C. Reddy. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. Applied and Environmental Microbiology 61(7): 2560~2565.
16. Zachař, P., Č. Novotn, Z. Vozňáková, M. Matuchac, E. Tesařová, D. Skora, A. Kubátová, M. Popl, and V. Šásek. 1996. Physical factors negatively affecting evaluation of long-term biodegradation experiments of polychlorinated biphenyls. Chemosphere 33(12): 2411~2421.