

木質分解菌에 의한 Pentachlorophenol의 微生物分解^{*1}

崔仁圭^{*2}·安世喜^{*2}

Biodegradation of Pentachlorophenol by Various White Rot Fungi^{*1}

In-Gyu Choi^{*2} · Sye-Hee Ahn^{*3}

ABSTRACT

In this research, 7 species of white rot fungi were used for determining the resistance against pentachlorophenol (PCP). Three fungi with good PCP resistance were selected for evaluating the biodegradability, and biodegradation mechanism by HPLC and GC/MS spectrometry.

Among 7 fungi, there were significant differences on PCP resistance on 4 different PCP concentrations. In the concentrations of 50 and 100ppm (μg of PCP per g of 2% malt extract agar), most fungi were easily able to grow, and well suited to newly PCP-added condition, but in that of more than 250ppm, the mycelia growths of *Ganoderma lucidum* 20435, *G. lucidum* 20432, *Pleurotus ostreatus*, and *Daldinia concentrica* were significantly inhibited or even stopped by the addition of PCP to the culture. However, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, and *Inonotus cuticularis* still kept growing at 250ppm, indicating the potential utilization of wood rot fungi to high concentrated PCP biodegradation. Particularly, *P. chrysosporium* even showed very rapid growth rate at more than 500ppm of PCP concentration.

Three selected fungi based on the above results showed an excellent biodegradability against PCP. *P. chrysosporium* degraded PCP up to 84% on the first day of incubation, and during 7 days, most of added PCP were degraded. *T. versicolor* also showed more than 90% of biodegradability at 7th day, and even though the initial stage of degradation was very slow, *I. cuticularis* has been approached to 90% at 21st day after incubation with dense growing pattern of mycelia. Therefore, the PCP biodegradability was definitely dependent on the rapid suitability of fungi to newly PCP-added condition. In addition, the PCP biodegradation by filtrates of *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, and *I. cuticularis* was very minimal or limited, suggesting that the extracellular enzyme system may be not so significantly related to the PCP biodegradation.

*1 접수 1998년 6월 20일 Received June 20, 1998

*2 임업연구원 임산공학부 Forestry Research Institute, Forest Products Technology Div. 207 Cheongnyangri Dong, Dongdaemoon Gu, Seoul 130-012, Korea

*3 대구대학교 산림자원학과 Dept. of Forest Resources, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea

Among the biodegradation metabolites of PCP, the most abundant one was pentachloroanisole which resulted in a little weaker toxicity than PCP, and others were tetrachlorophenol, tetrachloro-hydroquinone, benzoic acid, and salicylic acid, suggesting that PCP may be biodegraded by several sequential reactions such as methylation, radical-induced oxidation, dechlorination, and hydroxylation.

Keywords : pentachlorophenol, biodegradation, white rot fungi, *Inonotus cuticularis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*

1. 서 론

유기염소화합물은 발암성 (carcinogenic), 돌연변이성 (mutagenic) 등의 유해성이 보고되고 있으며 이러한 PCP는 유기염소화합물의 독성의 정도가 방향환에 치환되는 염소의 치환도가 증가할수록 증가하는 것으로 알려져 5개의 염소가 aromatic ring에 치환된 pentachlorophenol (이후 PCP라 명함)은 독성이 아주 강한 것으로 보고되었다 (Rochkind-Dubinsky 등, 1987). 지금까지 여러 산업에서 다량으로 이용된 후 방출되고 있는 유기염소화합물의 처리에는 일부 화학·물리적 방법, 소각 등의 방법이 이용되었으나, 이는 오히려 근본적인 분해나 제거의 방법이 아니고 자연 생태계에서 난분해되는 특성으로 인하여 과거 및 현재에 이용되어진 것은 환경에 그대로 축적되어지고 있는 실정이다. 처리후의 폐기물 및 재생에 상당한 비용 및 노력이 필요하며, 실제 이러한 유기물질에 의하여 피해를 입은 지역은 종래의 화학·물리적 방법으로는 넓은 범위의 오염원을 제거할 수도 없고, 막대한 경비가 들어 근래는 환경수복의 방법으로 미생물을 이용한 bioremediation (生物環境修復) 기술이 미국 및 유럽에서 이용되고 있다.

현재까지 PCP의 분해미생물로서는 세균으로 *Rhodococcus* (Apajalahti & Salkinoja-Salomen, 1987), *Arthrobacter* (Schenk 등, 1989), *Pseudomonas*속 (Kiyohara 등, 1992) 등을 이용하여 광범위하게 연구되어 왔으나 실제 적용에 있어서는 효율성에 문제가 제기되고 있다. 근래에는 lignin peroxidase (Tien & Kirk, 1984; Chung & Aust, 1995), manganese peroxidase (Glenn & Gold, 1985; Bogan 등, 1996), laccase (De long 등, 1992)의 균체효소 시스템을 가지고 있는 리그닌분해균인 백색부후균에 의한 난분해성 물질 분해에 대한 관심과 기대가 증폭되어 이용에 관한 연구가 활발하게 진행

되고 있다. 그러나 지금 까지 주로 연구되어온 균주는 리그닌 부후력이 뛰어난 것으로 알려진 *P. chrysosporium*과 *P. sordida* (Mileski 등, 1988; Lamar & Dietrich, 1990; Lamar 등, 1990a, 1990b; Lin 등, 1990; Glaser & Lamar, 1995) 정도이다. *P. chrysosporium*은 PCP이외에 여러 종류의 trichlorophenol (Joshi & Gold, 1993), chlorobiphenyl (Dietrich 등, 1995), dichlorodibenzodioxin (Takada 등, 1996) 등의 유기염소화합물에 대한 분해능이 뛰어난 것으로 보고 되었다. 분해메카니즘으로는 peroxidase가 촉매하는 산화탈염소화 반응, quinone 환원반응, 메틸화 등이 알려져 있다 (Bogan 등, 1996). 그러나 nonligninolytic 조건에서도 반응이 진행되므로 기타 다른 반응의 관여도 제안되어지고 있으며 (Chung & Aust, 1995), 아직까지 PCP 분해시에 생성되는 중간대사산물, 분해특성에 대해서는 많은 연구가 필요하다.

본 연구에서는 리그닌 분해력이 우수한 목질분해균 7종을 이용하여 난분해성물질인 PCP에 대한 저항성을 살펴보고, 저항성이 우수한 균주 3종을 선발하여 PCP에 대한 분해력 및 분해속도를 HPLC를 이용하여 규명하였다. 또한 분해대사산물로 발생되는 화합물을 GC/MS로 분석하여 PCP의 분해 mechanism을 추론하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시약

PCP (C_6HOCl_5 ; purity, 99%)는 Wako Chemical Co.에서 구입하여 사용하였으며 Bacto-peptone 등의 균주배양용 시약은 Difco 등에서 구입하여 사용하였다. 기타 약품 및 용매는 특급 및 HPLC용을 이용하였으며, HPLC용 용매는 microfilter를 이용하여 여과한 후 24시간 He가스로 degassing 시켜서 사용하

었다.

2.2 공시균주 및 배양

사용된 균주의 종류 (괄호안의 알파벳 대문자는 본 논문에서 이용된 라벨)는 임업연구원 미생물화학실 보존 균주를 이용하였으며 아래와 같다. 질소제한 배지에서 균사생장력이 우수한 *G. lucidum* 20435 (G5), *G. lucidum* 20432 (G2), *P. chrysosporium* (PH), *T. versicolor* (CO), *P. ostreatus* (PL), *I. cuticularis* (IN), *D. concentrica* (DA) 7종류를 선발하여 이용하였다. 먼저 7종의 균주는 PDA(potato dextrose agar)배지에서 7일간 배양된 후 다시 complex medium (YMPG)로 옮겨져 30°C에서 7일간 배양을 한 후 4°C에서 사용전까지 보관했다 (*P. chrysosporium*은 37°C에서 배양). YMPG 배지의 조성은 1ℓ의 증류수당 아래와 같다. glucose 10g, malt extract 10g, Bacto-peptone(Difco) 2g, yeast extract 2g, asparagine 1g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 1g, thiamine 1mg, Bacto-agar(Difco) 20g이었고 pH는 5.4로 조절하였다 (*P. chrysosporium*은 4.5).

2.3 PCP에 대한 저항성 및 분해력 조사

YMPG 배지로부터 얻은 4mm 정도의 plug을 2% malt extract agar 배지 (20g/1ℓ) 상에 다시 접종하여 일주일 정도가 지나서 균사가 완전히 살래를 덮을 정도로 성장한 후에 사용했다. PCP에 대한 7종의 균주의 저항성 및 분해력을 시험하기 위하여 사용된 PCP는 DMF (N,N-dimethylformamide)에 용해시켜 4, 8, 20, 40mM의 stock solution을 제조했다. 실제로 각각의 stock solution으로부터 50μℓ씩을 살래에 첨가하였을 때 PCP농도는 배지농도당 (w/w) 100, 250, 500μg으로 조정되어 각각 50, 100, 250, 500ppm에 해당된다. 이때 사용한 DMF는 균주에 대한 성장저해효과에 대한 보고가 있어 (Mileski 등, 1988) 적정 양에 대한 실험을 실시한 결과 1mℓ의 DMF에서 성장저해 효과가 없어서 선택하여 계속 사용하였다. DMF에 용해된 각 농도의 PCP 1mℓ를 마이크로필터를 이용하여 멸균시킨 후 상온에서 냉각시킨 2% malt extract agar 배지에 직접 첨가하여 냉각시킨 후 위의 2% malt extract agar 배지에서 자란 4mm의 plug을 접종했다. 14일간 30°C의 (*P. chrysosporium*은 37°C) incubator에서 배양을 하면서 매일 매일 성장하는 균사의 성장길이를 측정

하여 각 균주의 PCP에 대한 저항성을 측정하였다.

또한, PCP에 대한 분해력을 조사하기 위하여 YMPG 배지로 옮겨져 재배양시킨 균주를 shallow stationary phase 액체배지 (Tien & Kirk, 1984) 10mℓ를 함유한 100mℓ의 배양후라스크에 접종하여 30°C에서 배양을 했다. 7일간 배양되는 동안 배양후라스크는 99% 순도의 산소로 매일 flushing시켰다. 균사의 생장이 최고조에 달한 배양 5~6일째에 20mM의 PCP stock solution으로부터 50μℓ씩을 후라스크에 첨가하여 각각 배지내의 유기염소화합물 농도를 100μM로 조정하였다. 1, 3, 7, 13, 21일이 경과한 후에 각각의 배양후라스크에 n-Hexane 20mℓ를 넣은 후 5분간 100회 정도를 흔든 다음, separator funnel을 이용하여 추출한 후 유기용매층은 피펫을 이용하여 회수하였다. water층은 다시 ethylacetate 10mℓ와 n-Hexane 10mℓ의 혼합용매를 첨가한 후 재추출을 한 후 위에서와 같이 유기용매층을 얻어 전회의 것과 섞은 다음 Beckman GS-15R원심분리기에서 5000rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 0.22μm microfilter로 여과했다. 여과액은 그대로 HPLC를 이용하여 분석하였고, 다시 분해산물을 GC/MS를 이용하여 분석하기 위하여 추출된 액을 배양일별로 농축을 시켜 -20°C에서 보관하였다.

2.4 Chromatography

여과액은 직접 Shim-pack CLC-ODS (0.15m x 6.0f)를 장착한 Shimadzu SPD-10A HPLC에서 분석했다. HPLC eluant는 0.05% phosphoric acid : acetonitrile (25:75)을 이용하였으며 210nm와 218nm dual lamp에서 PCP를 검출하였다. 또한, Rotary evaporator를 이용하여 10mℓ로 농축된 여과액은 최종적으로 질소가스로 서서히 bubbling을 시키면서 100μℓ로 농축시켰다. 농축액은 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide로 유도체화 시킨후 60°C에서 1시간 반응시킨 다음 JEOL JMS-DX303 HF GC-MS (Shimadzu HiCap-CBP1-M25-025 column, 길이 25m, 두께 0.25μm, 내경 0.25mm)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

PCP에 대한 균주의 저항성 및 분해력을 측정하기 위하여 각 균주별, 또는 PCP 농도별로 2% malt

extract agar 상에서 14일간 배양한 결과는 그림 1, 2, 3, 4와 같다. 먼저 물에 잘 녹지 않는 PCP를 용해시키는 DMF에 대하여 성장저해효과를 조사한 결과, 10mℓ의 배지에 1mℓ의 DMF를 첨가했을 때 7종의 균주 중에 1일 정도의 느린 성장저해를 보이는 균주도 있었으나 전체적으로 실험에 영향을 미칠 정도의 저해효과는 없다고 판단되어 PCP와 함께 첨가해서 실험을 실시하였다. 또한 사용하는 2% malt extract agar 상에서의 최적 성장온도를 찾기 위하여 25, 28, 30, 34℃ 등에서 관찰한 결과 대부분의 균주가 30℃에서 생장이 양호한 것으로 확인되어 배양온도는 30℃에서 (*P. chrysosporium*은 37℃) 실시하였다.

3.1 PCP 농도별 균주의 저항성

아래의 그림 1, 2, 3, 4는 14일간 한천배지에서 측정된 각각의 PCP 농도별 7종 균주의 균사생장을 나타냈다. PCP를 함유하지 않은 무처리구와 비교하여 균사의 성장여부, 성장속도 및 최대생장도달점까지의 배양일을 기준으로 각 균주의 저항성을 검토하였다.

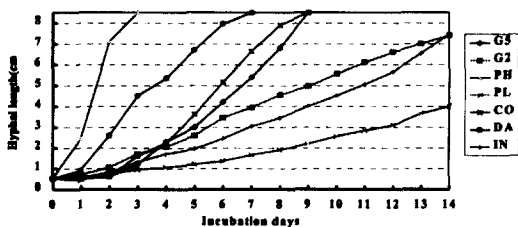


Fig. 1. Comparison of fungal growth of various fungi on 2% malt extract agar medium containing 50 ppm of PCP(μg of PCP per g of malt extract agar)

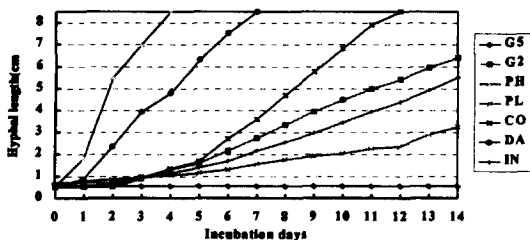


Fig. 2. Comparison of fungal growth of various fungi on 2% malt extract agar medium containing 100 ppm of PCP(μg of PCP per g of malt extract agar)

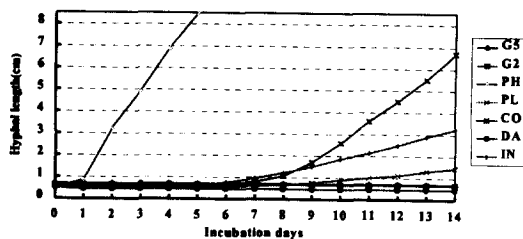


Fig. 3. Comparison of fungal growth of various fungi on 2% malt extract agar medium containing 250 ppm of PCP(μg of PCP per g of malt extract agar)

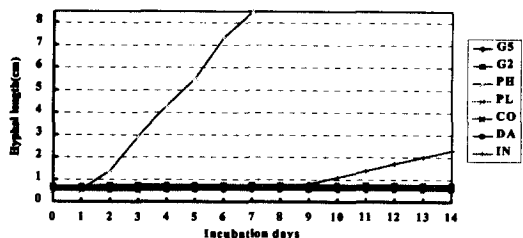


Fig. 4. Comparison of fungal growth of various fungi on 2% malt extract agar medium containing 500 ppm of PCP(μg of PCP per g of malt extract agar)

첨가한 PCP의 농도중 최저농도인 50ppm에서 7종의 균주중 *P. chrysosporium*이 제일 빠른 균사생장을 보였으며, *G. lucidum* 20432, *I. cuticularis*, *P. ostreatus*는 14일이 지나도 완전하게 살레의 전면을 덮는 정점에 도달하지 못하였다. 최고의 생장을 보이는 *P. chrysosporium*은 배양 2일째에 최대 4.3cm의 생장율로 빠른 생장을 보이며 3일의 짧은 배양기간에 최대생장점에 도달하여 PCP를 첨가하지 않은 무처리구와 비교하여 거의 유사한 생장을 보여서 첨가된 50ppm 농도의 PCP는 *P. chrysosporium* 균사의 생장에 전혀 저해를 주지 않음을 보였다. *D. concentrica*, *T. versicolor*, *G. lucidum* 20435는 최대생장점에 도달하기까지 7일에서 9일 정도를 소비하여 약간의 저해를 받고 있으며, *G. lucidum* 20432, *I. cuticularis*, *P. ostreatus* 등은 상당히 생장이 저해됨을 보였다. 50ppm 정도의 PCP농도에서는 공시된 목질분해균에 따라 성장속도에서 약간의 차이가 있지만 잘 적응하여 생장함을 보여 PCP의 처리에 있어서 목질분해균의 이용 가능성을 보였다.

Scholze 등 (1995)은 *T. hirusta*를 이용하였을 때 최대저항농도가 15ppm 이라고 보고했으나, 본 실험에서 이용된 균주들은 최저 50ppm으로써 본 연구에서 공시된 균들 모두가 PCP에 대한 저항성이 상당히 뛰어난 것으로 나타났다. 또한, 리그닌분해균은 균체 외효소를 분비하며, 기질에 대하여 저 특이성을 가지므로 세균이 100ppm 이상의 오염원에는 적용 불가능한 것에 비한다면 (Saber & Crawford, 1985) 목질분해균은 고농도에서도 생장이 가능함을 보여줬다.

100ppm의 농도에서도 *P. chrysosporium*은 50ppm 처럼 단기간에 최대생장을 이루었으나, *G. lucidum* 20435는 전혀 자라지 않았다. 특이한 점은 *D. concentrica*가 100ppm에서도 50ppm과 마찬가지로 7일만에 최대성장점에 도달하여 빨리 PCP의 새로운 환경에 적응하는 것처럼 보였으나 250ppm과 500ppm에서는 전혀 자라지 않아서 250ppm 이상의 고농도에서는 생장이 저해되는 것으로 밝혀졌다. 250ppm에서 생장을 계속하는 균주는 4종류밖에 되지 않았으며, *G. lucidum* 20432, *G. lucidum* 20435와 *D. concentrica*는 전혀 생장을 보이지 않았다. 그러므로 250ppm은 *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *I. cuticularis*, *P. ostreatus*를 제외한 다른 균주에 대해서는 PCP에 대한 최대저항농도로 여겨졌으며, 500ppm에서는 *P. chrysosporium*과 *I. cuticularis*를 제외한 타균주는 전혀 생장의 기미를 보이지 않았다. 여전히 *P. chrysosporium*은 고농도에서도 가장 빠르게 성장최대점에 5~7일만에 도달하여 PCP에 대한 저항력이 뛰어난 것으로 밝혀졌다. Lamar 등 (1990a)도 50ppm의 PCP가 실제 오염된 토양에 *P. chrysosporium*을 접종하였을 때 약 98% 정도가 제거되며, 250~400ppm의 고농도에도 *P. chrysosporium*의 적응이 가능하다고 Lamar 및 Dietrich (1990)가 보고했다.

사용한 7종 균주별로 각각의 PCP농도에 대한 저항성을 살펴보면 상당한 차이를 보였다. *P. chrysosporium*을 제외한 전 균주는 500ppm의 고농도에서 PCP의 첨가에 의하여 상당한 성장저해효과를 받고 있거나 생장이 이뤄지지 않았으며, 이보다 낮은 농도에서도 균주의 특성에 따라 적응하는 정도에 차이를 보였다.

G. lucidum 20432와 *G. lucidum* 20435는 50에서 100ppm까지는完만한 생장을 보이나 250ppm 이상에서는 전혀 생장을 보이지 않았으며, *P. ostreatus*는 처음부터 PCP를 함유한 배지에서의 성장자체가

느렸으며, 서서히 PCP의 환경에 적응하였으나 500ppm이 한계점으로 나타났다. *D. concentrica*는 50, 100ppm에서는 전혀 성장저해효과를 받지 않는 것처럼 여겨졌으나 250ppm에서는 전혀 생장을 하지 못했다.

제일 관심을 끄는 균주는 *P. chrysosporium*과 *I. cuticularis*으로서 이미 PCP 분해력이 뛰어난 것으로 알려진 대로 *P. chrysosporium*은 모든 농도에서 성장저해효과를 거의 받지 않고 잘 자랐으며 *I. cuticularis*는 100ppm에서 2일, 250ppm 6일, 500ppm 9일의 초기성장저해효과 (lag time)를 받았으나 서서히 PCP첨가에 대한 적응력이 살아나면서 생장이 시작되어 완만한 생장을 보였다. 특히 *I. cuticularis*의 500ppm 농도에서의 균사 생장을 관찰하면 1차 성장단계와 2차 성장단계를 거치는 모습이 성장 모양에서도 나무의 나이테를 연상시키는 모습으로 치밀하게 자라서 점차 적응하는 형태를 띄었다. *P. chrysosporium*을 제외한 6종의 균주는 PCP농도가 올라갈수록 초기단계에서 새로운 환경의 적응에 필요한 시간이 요구되었으며, 특히 250ppm에서 3종의 균주가 6일에서 9일정도의 초기성장저해효과를 받는 모습이 나타났다. PCP의 첨가에 영향을 받지 않고 성장하는 모습을 보이는 *P. chrysosporium*이 첨가된 PCP를 실제적으로 성장속도만큼 빠르게 분해하는 지에 대한 실험이 요구되어 *T. versicolor*, *I. cuticularis*와 함께 분해력에 대한 실험을 행하였다.

3.2 PCP에 대한 분해력

질소제한 액체배지에서 자란 3종류의 균주에 대하여 배양일별 PCP에 대한 분해력은 그림 5의 HPLC 처럼 peak 면적을 standard 농도와 비교하면서 측정하였다. 3균주에 의한 PCP의 분해되는 정도는 *T. versicolor*를 이용하여 얻은 그림 5와 같이 배양일수가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며 배양일수별 PCP의 농도변이는 그림 6과 같다.

PCP를 첨가시킨 다음 배양일수별로 PCP 농도의 감소량을 측정하여 분석한 분해력은 우선, PCP가 첨가된 한천배지 상에서 최고의 균사생장을 보였던 *P. chrysosporium*은 액체배지에서도 최고의 분해력을 보였다. 잔존하는 PCP의 비율은 배양1일째에 벌써 14%정도로 감소되었으며, 7일째에는 1%정도의 아주 미미한 양만이 검출되었다. 즉 *P. chrysosporium*은 PCP의 첨가가 이뤄진 직후 1일째부터 분해반응이 진행되어 80%이상이 초기에 분해되고 있음을 보였

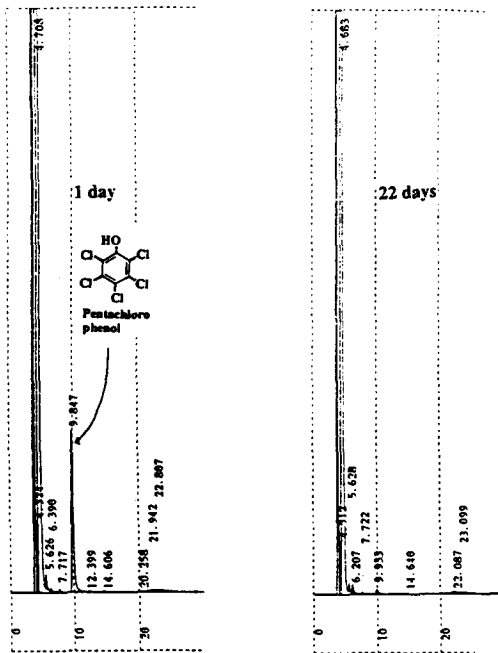


Fig. 5. Change in the concentration of PCP analyzed by HPLC during biodegradation by *T. versicolor*

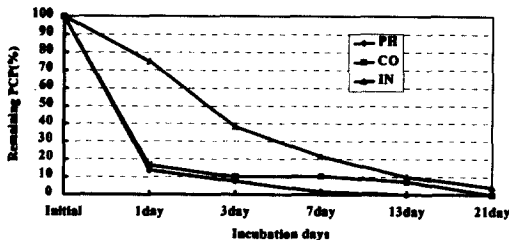


Fig. 6. PCP biodegradation by *P. chrysosporium* (PH), *T. versicolor* (CO), and *I. cuticularis* (IN) depending on incubation days (PCP concentration in the culture was $100 \mu\text{M}$)

다. 그러나 별도의 실험에서 균사가 자란 후에 이를 100°C 에서 끓여 사멸시킨 후에 PCP를 투입하여 즉시 분석을 해본 결과 역시 6~10% 정도의 제거율을 보여 초기의 분해량 중에 10% 정도는 균사에 의한 물리적 흡착에 의한 것으로 밝혀졌다. 그러나 나머지 70%는 실제 분해율로 여겨져 초기분해가 상당히 빨리 일어남을 알 수 있었다. Scholze 등(1995)도 첨가된 PCP는 배지, 균사 등에 물리적으로 흡착된다는 것을 ^{14}C 를 이용하여 밝혔으며, 흡착된 PCP를 유효

하게 추출할 수 있는 용매의 선택에 유의하여야 한다고 보고했다.

*T. versicolor*도 *P. chrysosporium*과 마찬가지로 분해력이 상당히 우수하여 배양1일째에 80% 이상의 분해력을 보였고, 7일째에는 투입량의 10%정도를 남기고 분해되었다. 초기분해력이 전체의 분해력에 상당한 영향력을 미치며 그 후는 한천배지에서와 같이 서서히 분해가 이뤄짐을 나타냈다. 그러나 *I. cuticularis*는 초기의 분해속도가 느려서 3일째까지 40%의 높은 잔존량을 보였으나 서서히 완만한 분해율을 보이면서 21일째에는 분해율이 90%이상에 접근하였다. 이 결과는 저항성 실험의 결과와 일치하는 결과로써 균주의 PCP에 대한 분해는 PCP의 첨가가 이뤄졌을 때 균사의 빠른 적응성 및 성장성 여부가 중요한 요건임을 의미했다. 별도의 실험 결과, *I. cuticularis*와 *T. versicolor*는 보다 높은 농도($\geq 100 \mu\text{M}$)의 PCP를 포함하는 액체배지에서는 균사생장의 저해를 많이 받아 분해의 시작이 전혀 이뤄지지 않았다. 또한 균사의 성장과 PCP 분해와의 관계를 알아보기 위하여 균주를 접종함과 동시에 $100 \mu\text{M}$ 의 PCP를 첨가했을 때 균사의 생장은 전혀 일어나지 않았으며 분해도 이뤄지지 않았다. 이는 초기의 균사 성장여부가 PCP의 분해에 상당한 영향력이 있음을 나타냈다.

한편, 균사를 제외한 여과액(균체외액)에 의하여도 분해가 일어날 수 있는가를 알아보기 위하여 균사생장이 최고조에 달한 5일 내지 6일 후에 glass wool을 이용하여 균사를 완전히 제거한 다음 여과액 자체만 가지고 PCP에 대한 분해력을 검정한 결과(그림 7), 초기분해가 빠른 *P. chrysosporium*, *T.*

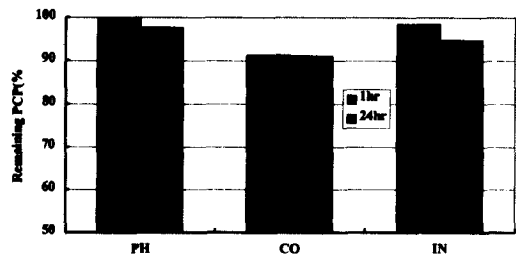


Fig. 7. PCP biodegradation by the filtrates of *P. chrysosporium* (PH), *T. versicolor* (CO), and *I. cuticularis* (IN) depending on incubation days (PCP concentration in the culture was $100 \mu\text{M}$)

*versicolor*도 배양 후 1일이 경과하였지만 분해력은 10% 미만을 보여서 균사를 포함한 상태에서의 분해력과 비교해 볼 때 상당한 차이를 보였다. 또한 효소 역가를 측정된 결과와 종합해 볼 때 여과액이 함유한 균체의효소 (LiP, MnP, laccase)에 의한 PCP의 분해는 미미함을 의미하였으며, Glaser 및 Lamar (1995)도 corrin과 porphyrin반응과 cytochrome P-450 반응의 가능성을 제기하였다, 그러나 Bumpus 등(1985)은 DDT, dioxin을 비롯한 유기염소화합물의 *P. chrysosporium*에 의한 분해는 균체의 리그닌 분해효소 시스템에 의존한다고 보고했고, 또한 많은 연구자들의 보고에서도 유기염소화합물의 목질분해균에 의한 분해에 있어서는 laccase나 MnP의 역할을 강조했다. 차후에 각각의 ligninase정제액과 균체내액에 의한 PCP의 분해력검정에 대한 실험이 요구된다.

3.3 PCP 미생물분해 mechanism

세균을 이용한 PCP의 분해는 저농도에서만 가능하다고 보고되었지만 (Saber & Crawford, 1985; Kiyohara 등, 1992) 목질분해균에 의해서는 고농도

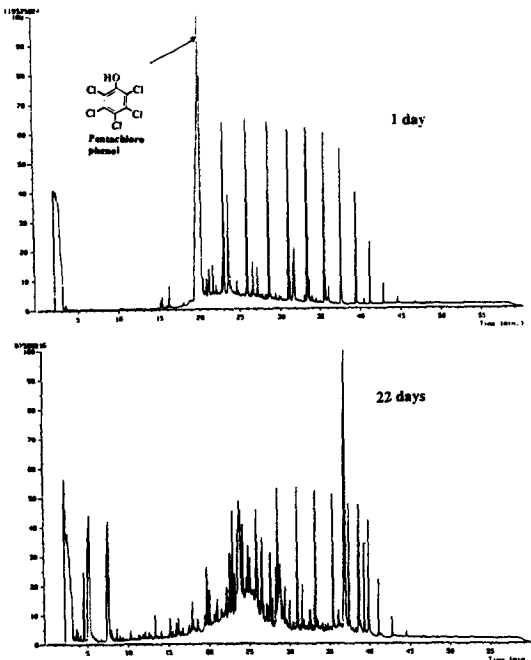


Fig. 8. Change in the concentration of pentachlorophenol analyzed by GC/MS during biodegradation by *P. chrysosporium*

에서도 PCP의 분해처리가 가능하여 실제 적용에 있어서 유리한 면을 갖고 있는 것으로 나타났다. 이는 목질분해균에 의하여 분비되는 LiP, MnP, 그리고 laccase 균체의효소의 초기 산화적 전환 (oxidative conversion)에 의한 것으로 보고됐으나 (Lamar 등, 1990b) 본 연구결과로부터는 이러한 균체의효소 이외의 다른 반응에 의해서도 분해가 이뤄짐을 배제할 수 없었다.

PCP를 첨가한 배지를 배양일수별로 추출, 농축하여 GC/MS를 (그림 8) 이용하여 분석한 결과, 아래 표1과 같은 PCP로부터의 대사화합물을 얻을 수 있었으며, 주요 대사화합물에 대한 MS 스펙트럼은 그림 9와 같다. 배양일수별로 대사화합물의 발생종류에는 큰 차이가 없으므로 분해반응이 동시에 빠르게 진행되는 것으로 생각되나 일정 화합물의 양적인 변화로 mechanism을 추론해 볼 수 있다. 보다 정확한 mechanism의 pathway는 각각의 대사중간화합물에 대한 균의 분해과정을 살펴보는 실험이 요구된다.

먼저 PCP를 첨가한지 1일째에 제일 많이 발생하는 PCP 대사산물은 pentachloroanisole(PCA)이었다. 이는 PCP의 C1의 OH가 간단하게 메틸화된 형태의 화합물로서 이용된 3균주에서 제일 많이 발생되었다. PCA는 PCP보다 독성이 상당히 약하므로 이러한 메틸화에 의한 반응으로 PCP의 무독화 효과를 얻을 수 있다. 이러한 결과는 Scholze 등 (1995), Lamar 등 (1990b)도 PCP의 주요한 대사산물로서 초기에 methylation에 의한 PCA가 축적되면서 PCP를 저독화 시키며, 축적된 PCA는 다시 *P. chrysosporium*에 의하여 mineralization된다고 보고했다 (Lamar & Dietrich, 1990).

PCP 대사산물 중 두 번째로 많이 검출되는 화합물은 PCP의 탈염소화와 산화, 환원, 수산화에 의한 tetrachlorophenol과 tetrachlorohydroquinone이었다. Joshi 및 Gold (1993)는 2,4,5-trichlorophenol의 분해시에 제일 먼저 산화에 의하여 metabolites 중에 benzoquinone이 형성되면서 다음 단계에 환원에 의한 2,5-dichloro-1,4-quinone이 형성되고, 차후에 메틸화와 수산화가 일어나면서 서서히 mineralization이 이뤄진다고 보고했다. 그러므로 본 연구에서 분석된 위의 두 화합물로부터 추론해 볼 수 있는 PCP의 분해 mechanism은 radical에 의한 산화로 전자의 이동에 의한 para 위치에 있는 3번 또는 4번 탄소의 염소에 탈염소화가 먼저 발생되면서 quinone을 형성한 후 환원에 의한 tetrachlorohydroquinone에 수산

Table 1. TMS-silylated metabolites during pentachlorophenol biodegradation by wood rot fungi, *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, and *I. cuticularis* (bp = base peak; mp = molecular peak).

Metabolites	Formula	Major mass peaks
Pentachloroanisole	C ₇ H ₃ OCl ₅	75, 130, 165, 167, 214, 237(bp), 263, 265, 267, 278(mp), 280, 282
Tetrachloroquinone	C ₆ H ₂ O ₂ Cl ₄	83, 119, 175, 212, 239, 260, 299(bp), 375, 377, 379, 390(mp), 392, 394
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	C ₆ HOCl ₄	83, 93, 125(bp), 165, 195, 239, 254, 287, 289(bp), 291, 302(mp), 304, 306
2,4,5,6-Tetrachlorophenol	C ₆ HOCl ₄	73, 93, 129(bp), 185, 252, 287, 289, 291, 302(mp), 304, 306
Tetrachloroanisole	C ₆ H ₄ OCl ₄	75, 131, 168, 201, 203, 229, 231, 244(mp), 246(bp), 248
1-Chloro-2-methyl-3,4,5-methoxyphenol	C ₁₀ H ₁₃ O ₄ Cl	71(bp), 97, 111, 125, 215, 269, 289, 304(mp), 306
2-methyl benzoic acid	C ₈ H ₈ O ₂	85, 91, 119(bp), 149, 193, 208(mp)

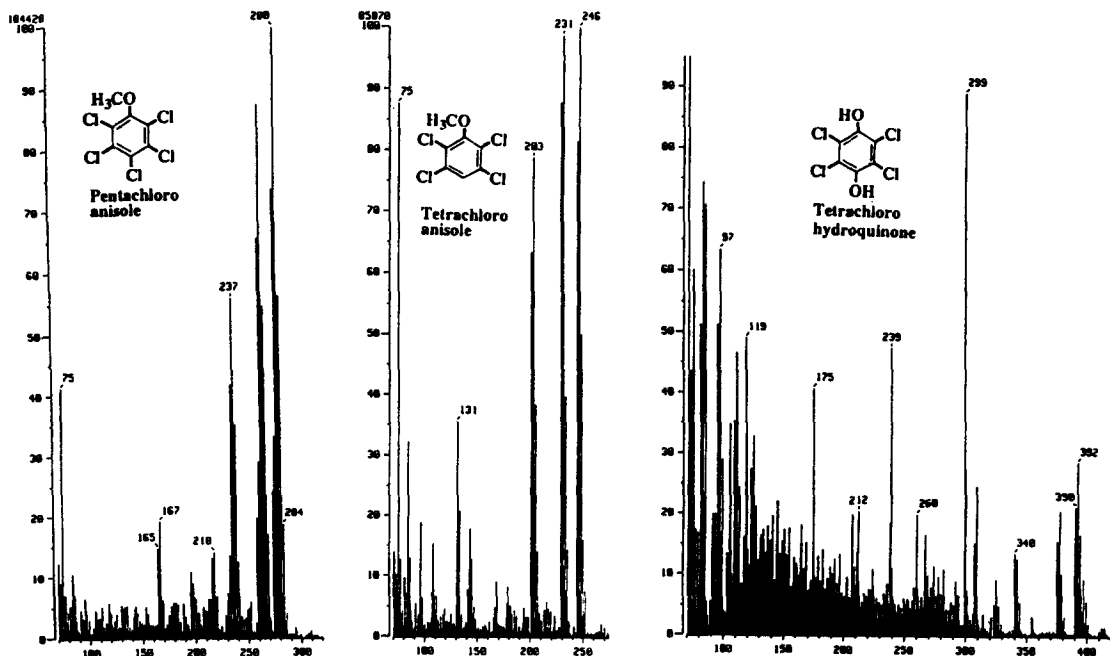


Fig. 9. Mass spectra of major pentachlorophenol metabolites analyzed by GC/MS during biodegradation by *P. chrysosporium*

기의 첨가반응이 이뤄지는 것으로 생각된다 (Apajalahti & Salkinoja-Salonen, 1987). Rasmussen 등 (1995)과 Kiyohara 등 (1992)도 유기염소화합물의 분해반응에 있어서 2,3,4,6-tetrachloro-p-hydroquinone은 quinone에 환원 반응이 관여된 것으로 보

고하였다. 본 연구에서도 GC/MS 상에서 tetrachlorophenol은 2,3,5,6과 2,4,5,6 두가지 형태로 분석이 되었다. 또한, tetrachlorophenol도 PCP와 마찬가지로 쉽게 메틸화에 의하여 tetrachloroanisole로 변환되었으나, 예상되었던 trichlorophenol이나 dichloro-

rophenol의 화합물은 발견되지 않았다. 이는 tetra-chlorophenol로부터 dichlorophenol까지의 반응은 매우 빠른 속도로 탈염소화가 진행되어 intermediates로서는 발견되지 않는가 생각된다. 그러나, 방향족 유기염소화합물의 중간분해산물인 benzoic acid, salicylic acid 등의 화합물도 GC/MS TIC상의 초기 retention time에서 발견됐다.

한편, 목질분해균에 의한 PCP의 분해에 있어서 대사화합물 이외에 다량의 지방산을 발생시키는데 이의 종류는 C₈에서 C₁₈까지로 다양하며 주로 tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, 그리고 octadecen-1-enoic 등의 화합물이 발견됐다. 이는 균의 대사시 분비되는 것으로 사료되며 PCP의 분해시에 어떤 역할을 하는지에 대해서는 아직 명확하게 알려지지 않았으며, 지방산과 PCP의 직접적인 반응도 고려될 수 있다.

4. 결 론

리그닌 분해력이 우수한 목질분해균 7종을 이용한 PCP에 대한 저항성은 상당한 차이를 보였다. 사용한 PCP농도중 저농도인 50 ppm과 100ppm에서는 모든 목질분해균이 잘 성장, 적응함을 보였으나, 250ppm 이상의 고농도에서는 균사의 생장이 저해되는 것으로 밝혀졌다. *G. lucidum* 20435, *G. lucidum* 20432, *P. ostreatus*와 *D. concentrica*의 PCP 저항성에 대한 최대농도는 250ppm, *T. versicolor*는 500ppm, *P. chrysosporium*와 *I. cuticularis*는 500ppm 이상인 것으로 나타나 목질분해균에 의해서 고농도의 PCP처리가 가능함을 보여줬다. 특히, *P. chrysosporium*은 고농도에서도 가장 빠르게 5~7일만에 최대성장점에 도달하여 PCP에 대한 저항력이 뛰어난 것으로 밝혀졌으며, *I. cuticularis*는 각각의 농도에서 초기 2일까지는 성장을 보이지 않다가 서서히 PCP첨가에 대한 적응력이 살아나면서 생장이 시작되어 치밀하고 완전한 성장을 보였다.

저항성 실험으로부터 선발된 *T. versicolor*, *P. chrysosporium*, *I. cuticularis* 균주를 배양일수별로 분해력을 측정한 결과, *P. chrysosporium*은 배양1일째에 84%의 분해력을 시작으로 7일째에는 투입된 양의 분해가 완료되었다. *T. versicolor*도 7일째에는 투입량이 10%정도로 감소하였고, *I. cuticularis*는 초기의 분해속도는 느리지만 21일째에는 분해율이

90%이상에 접근하였다. 위의 결과로부터, PCP의 분해는 초기분해력이 전체의 분해력에 상당한 영향력을 미치며 PCP 첨가에 따른 균사의 빠른 적응성 및 성장성 여부가 중요한 요건임을 의미했다. 여과액 자체만 가지고 PCP에 대한 분해력을 검증한 결과 분해력은 10% 미만을 보여, 균체의효소에 의한 PCP의 분해는 미미함을 보였다. 제일 많이 발생하는 PCP 대사산물은 PCP보다 독성이 약한 pentachloroanisole이었고, tetrahalorphenol과 tetrachlorohydroquinone도 발견되어, PCP의 분해 mechanism은 메틸화, radical 반응에 의한 산화, 탈염소화, 환원, 수산화로 추론해 볼 수 있고, 또한, 방향족유기염소화합물의 중간대사산물인 benzoic acid, salicylic acid 등의 화합물도 규명되었다.

참 고 문 헌

1. 農林水産技術情報協會. 1995. 生物機能を利用した農林水産環境修復技術に關する調査: 1-279
2. Apajalahti, J. H. A., and M. S. Salkinoja-Salonen. 1987. Complete dechlorination of tetrachlorohydroquinone by cell extracts of pentachlorophenol-induced *Rhodococcus chlorophenicus*. *J. Bacteriol.*, 169(11): 5125-5130
3. Bogan, W. B., B. Schoenike, R. T. Lamar, and D. Cullen. 1996. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2381-2386
4. Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright, and S. D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228: 1434-1436
5. Chung, N., and S. D. Aust. 1995. Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 322(1): 143-148
6. De long, E., J. A. Field, and J. A. M. de Bont. 1992. Evidence for a new extracellular peroxidase: manganese inhibited peroxidase from the white rot fungus *Bjerkandera* sp BOS 55. *FEBS Lett.*, 299: 107-110

7. Dietrich, D., W. J. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3904-3909
8. Glaser, J. A., and R. T. Lamar. 1995. Lignin-degrading fungi as degraders of pentachlorophenol and creosote in soil. *Soil Sci. Soc. America*, Special Pub. 43: 117-133
9. Glenn, J. K., and M. H. Gold. 1985. Purification and properties of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycetes, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 242(2): 329-341
10. Joshi, D. K., and M. H. Gold. 1993. Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycetes, *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1779-1785
11. Kiyohara, H., T. Hatta, Y. Ogawa, T. Kakuda, H. Yokoyama, and N. Takizawa. 1992. Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4): 1276-1283
12. Lamar, R. T., and D. M. Dietrich. 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3093-3100
13. Lamar, R. T., J. A. Glaser, and T. K. Kirk. 1990a. Fate of pentachlorophenol(PCP) in sterile soils inoculated with the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: mineralization, volatilization and depletion of PCP. *Soil Biol. Biochem.*, 22(4): 433-440
14. Lamar, R. T., M. J. Larsen, and T. K. Kirk. 1990b. Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3519-3526
15. Lin, J-E., H. Y. Wang, and R. F. Hickey. 1990. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotech. Bioeng.*, 35: 1125-1134
16. Mileski, G. J., J. A. Bumpus, M. A. Jurek, and S. D. Aust. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2885-2889
17. Rasmussen, S. J., N. Chung, A. Khindaria, T. A. Grover, and S. D. Aust. 1995. Reductions catalyzed by a quinone and peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 320(2): 243-249
18. Rochkind-Dubinsky, M. L., G. S. Sayler, and J. W. Blackburn. 1987. In Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds. Marcel Dekker Inc.
19. Saber, D. L., and R. L. Crawford. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1512-1518
20. Schenk, T., R. Muller, F. Morsberger, M. K. Otto, and F. Lingens. 1989. Enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by extracts from *Arthrobacter* sp. Strain ATCC 33790. *J. Bacteriol.*, 171(10): 5487-5491
21. Scholze, R. J., R. T. Lamar, J. Bolduc, and D. Dietrich. 1995. Feasibility of white rot fungi for biodegradation of PCP-treated ammunition box. *USACERL Technical Report.*, EP-95/03: 1-63
22. Takada S., M. Nakamura, T. Matsueda, R. Kondo, and K. Sakai. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(12): 4323-4328
23. Tien, M., and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of an unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2280-2284