

Monochlorophenol의 목질분해균에 의한 분해 특성

최인규* · 이재원 · 최돈하

임업연구원 임산공학부

(2002년 8월 12일 접수, 2002년 11월 5일 수리)

Biodegradation Characteristics of Monochlorophenols by Wood Rot Fungi

In-Gyu Choi, Jae-Won Lee, and Don-Ha Choi (Dept. of Forest Products, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea)

ABSTRACT : Biodegradation of monochlorophenols by wood rot fungi such as *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* was evaluated by determining their resistance or toxic test and biodegradability. The metabolites of monochlorophenols were also analyzed. Among the three fungi, *T. versicolor* was the most resistant to 200 ppm of 2-, 3- and 4-chlorophenols, and did not show any inhibitory mycellium growth. But *D. concentrica* had a little inhibition effect at more than 100 ppm of 3- or 4-chlorophenol. Control cultures of *P. ostreatus* took even 14 days for the completion of mycellium growth, but the hyphal growth was improved when 2- or 3-chlorophenol were added to the culture. In biodegradation analysis, *P. ostreatus* showed the highest degradation of 2- or 3-chlorophenol, while *T. versicolor* was the most effective in 4-chlorophenol. *D. concentrica* and *P. ostreatus* slowly degraded 4-chlorophenol. However, *T. versicolor* had similar degradation capability in the three monochlorophenols, suggesting that the biodegradation mode is dependent on the fungi as well as the type of monochlorophenol. Several metabolites such as 1,3,5-trihydroxyl benzene, 1-ethyl-1-hydroxyl pentane, 2-propenoic acid, methylmalonic acid and 2-methyl-4-keto-pentan-2-ol were found as products of primary oxidation of 2-, 3- and 4-chlorophenols by intact fungal cultures. Fatty acids including tetradecanoic, heptadecanoic and octadecanoic acids were also detected. The order of increase of mycellium weight during incubation were *P. ostreatus* > *T. versicolor* > *D. concentrica*. The pH in the culture was not constantly changed depending on incubation days, but the mycellium weight was slightly increased, indicating that the biodegradation of monochlorophenol might have low relationship with the mycellium growth. Laccase activities of *T. versicolor* and *P. ostreatus* were continuously increased depending on the incubation days, suggesting that the ligninolytic enzyme activity play an important role in the biodegradation of monochlorophenol.

Key words: monochlorophenol, *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, biodegradation.

서 론

Monochlorophenol은 산업 현장에서 목재, 페인트, 가죽의 방부제로 이용되거나, 펄프화 과정 중 표백공정에서 발생하는 폐액의 주성분이며, 또한 chlorophenoxy를 주성분으로 하는 제초제의 일반적인 분해산물로 알려져 있다. 그리고 폐수 또는 표면수의 염소화 과정에서 생성될 수도 있으며 오염된 토양으로부터 유출되어 슬러지, 침전물 및 지하수에서 검출되기도 한다¹⁾. Monochlorophenol은 혐기성 조건에서 분해가 매우 안정적이라고 하지만 그들의 독성 때문에 펄프 제지 산업의 폐수처리에서는 심각한 문제를 일으키고 있다²⁾. 염화페놀 중에서도 독성이 강한 것으로 알려진 2,3,6-trichlorophenol은 페놀로

오염된 물을 염소로 소독하였을 때 생성되는 것으로 알려져 있는데, 이러한 페놀성 유기염소 화합물은 자연적으로는 광분해, 혐기성 또는 호기성 균에 의한 미생물분해에 의존한다³⁾. 이런 페놀성 유기염소 화합물의 분해기작은 혐기성 상태에서는 주로 환원성 탈염소화(reductive dechlorination) 과정에 의하여 염소가 수소에 의하여 치환되며, 호기성 조건에서는 측쇄(side chain)가 있을 경우 측쇄를 먼저 공격하고 산화시킨 후 방향환을 산화시키는 기작을 가지며 중간 산물인 catechol에 mono- 또는 di-oxygenase의 작용에 의해 방향환이 개열되면서 분해되고 치환기에 따라 ortho와 meta개열이 일어나 분해되는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 하지만 페놀성 유기염소화합물은 미생물에 의한 분해가 이루어져도, 사람의 건강이나 동식물에 피해를 줄 가능성이 큰 것으로 여겨져 수질환경보전법에서 특정수질 유해물질로 구분하고 있다.

유기할로젠 화합물의 특징처럼 유기염소화합물도 염소의 치환된 수, 형태, 위치에 따라 독성의 정도가 다르며, 일반적으로 trichlorophenol, pentachlorophenol이 dichlorophenol이

*연락처:

Tel: +82-2-961-2584 Fax: +82-2-961-2570

E-mail: CINGYU@foa.go.kr

나 monochlorophenol보다 균에 대한 저항성이 큰 것으로 나타나 치환된 염소 숫자가 많을수록 독성이 강한 것으로 알려져 있다^{5,7)}.

Fungi에 의한 chlorophenol 분해 연구로는 백색부후균인 *Panus tigrinus*와 *Coriolus versicolor*에 의해 2,4,6-trichlorophenol의 변형이 일어나며, 2,4,6-trichlorophenol을 공격함에 있어서는 *P. tigrinus*는 manganese peroxidase에 의해 *C. versicolor*는 laccase에 의해 변형이 주도적으로 일어난다고 보고한 바 있다⁸⁾. 또, 식용담자균인 *Pleurotus ostreatus*에 의한 monochlorophenol의 분해능을 조사한 결과 *ortho*나 *meta* 위치에 있는 염소화합물에 비해 *para* 위치에 있는 염소화합물이 분해능이 뛰어난 것으로 보고되었다⁹⁾.

그 밖에도 bacteria를 이용한 monochlorophenol 분해에 대한 연구로는 *Rhodotorula glutinis*에 의해 phenol과 monochlorophenol의 분해로 muconolactone에 의해 *ortho* 부분에 방향환 개열이 일어나 phenol의 분해를 설명하였고, 3-chlorophenol, 4-chlorophenol 또한 많은 양의 chloride ion이 검출되어 분해되었다는 것을 밝혔다. 반면 2-chlorophenol의 분해는 매우 느리게 일어나는 것으로 보고되었다¹⁰⁾. 또 *Pseudomonas sp.*에 의한 chlorophenol의 분해에 대한 연구도 많이 수행되어 왔다¹¹⁾. 하지만 bacteria는 목재를 기질로 하여 chlorophenol을 처리하는 소재에 이용하기에는 적당하지 않다고 생각된다. 즉 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol은 목재 방부제로 널리 사용하고 있고, 또 monochlorophenol은 펄프 폐액에 주로 잔존하므로 bacteria 보다는 fungi에 의한 연구가 많이 이루어지고 있다.

지금까지 fungi를 이용하여 폐놀성 유기화합물 분해에 대한 연구는 여러 방향으로 이루어지고 있다. 대표적으로 균 배양액에 접촉하는 방법¹²⁻¹⁵⁾, 균사와 배양액을 분리하여 이용하는 방법¹⁶⁾, free 또는 immobilized 효소를 사용하는 방법^{7,17-19)} 등이 이용되고 있다.

본 연구에서는 균 배양액에 접촉하는 방법을 사용하여 염소가 한 개 치환된 monochlorophenol인 2-, 3-, 4-chlorophenol에 대해서 *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* 3균주를 이용하여 방향환에서의 염소 위치에 따른 균주의 monochlorophenol 분해능 및 분해산물의 차이를 확인 하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 균주 배양

2-, 3-, 4-chlorophenol은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee WI, USA) 순도가 99% 이상인 것을 구입하였으며, 균주 배양 시약 및 추출용매는 특급을 사용하였다.

균주 *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*는 임업연구원 미생물화학실 보존 중인 것을 사용하였다. 균의 배양은 효소의 생산을 증가시키기 위하여 PDA배지에서 배양한 후 다시 YMPG 배지(1 L의 증류수당, glucose

10 g, malt extract 10 g, bacto-peptone 2 g, yeast extract 2 g, asparagine 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 g, thiamine 1 mg, Bacto-agar 20 g)로 옮겨져 재배양시킨 것을 저항성 시험에 이용하였고, 분해능 조사에서는 Tien Kirk의 방법²⁰⁾으로 제조한 박충고정상(shallow stationary phase) 액체배지(pH 5.4)를 이용하여 28℃에서 배양을 했다.

선발균주의 Monochlorophenol 농도별 저항성 시험

YMPG 배지로부터 얻은 8 mm 정도의 plug을 2% malt extract agar 배지(20 g/L)에 다시 접종하여 균사가 완전히 사레를 덮을 정도로 성장한 후에 접종용으로 사용했다. Monochlorophenol에 대한 각각 균주의 저항성을 시험하기 위하여 2 g/L의 stock solution을 dimethyl formamide (DMF)에 용해하여 제조하여 2% malt extract agar에 첨가하여 50, 100, 200 mg/L를 만들었다. 14일간 30℃에서 정지배양을 하면서 매일 성장하는 균사의 생장길이를 측정하여 각 균주의 해당 monochlorophenol 농도에 대한 저항성을 측정하였다.

pH, 균사량 변이 및 분해산물 분석

균사의 생장이 최고조에 달한 배양 7일째에 20 mM의 monochlorophenol stock solution으로부터 50 µL씩을 10 mL의 박충고정상 액체배지에 첨가하여 농도를 100 µM로 조정하였다. 1, 3, 6, 12, 20일이 경과한 후에 pH와 균사량을 측정하고 각각의 배양후라스크에 n-hexane 20 mL를 넣은 후 충분히 흔들어 추출한 후 유기용매층은 피펫을 이용하여 회수하였다. 수층은 다시 ethylacetate 10 mL와 n-hexane 10 mL의 혼합용매를 첨가한 후 재추출을 한 후 위에서와 같이 유기용매층을 얻어 전회의 것과 혼합하였다.

분해능은 HPLC(Hewlett Packard 1100 series, Germany)를 이용하여 정량분석하였으며, column은 Waters symmetric column을 사용하였다. 분석 조건은 flow rate 0.6 mL/min, 70% CH₃CN과 30% H₂O(V/V), detection은 280 nm에서 15분간 검출하였다. 2-, 3-, 4-Chlorophenol의 retention time은 각각 5.95, 6.22, 6.10 min이었다. 정량분석 전에 1, 5, 10, 20, 30 mg/L standard 용액을 이용하여 calibration curve를 작성하였다.

또한 여과액은 질소가스로 bubbling을 시키면서 완전히 농축시킨 후 N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide로 유도체화 시킨 후 60℃에서 1시간 반응시킨 다음 Gas chromatography(HP6890)-Mass Spectrometer(JMS-600W, JEOL)를 이용하였으며 GC column은 Shimadzu HiCap-CBP1-M25-025 (25 m, 0.25 µm, 0.25 mm)를 사용하였다. GC 분석조건은 He를 carrier gas로 flow rate 1.0 mL/min, injector 270℃, detection 285℃, oven 온도는 80℃에서 5분간 유지, 8℃/min으로 160℃까지 상승 후 5분간 유지, 다시 5℃/min으로 280℃까지 상승 후 5분간 유지되는 program을 이용하여 분석하였다. GC column으로부터 effluent는 직접 MS로 연결되었으며 EI mode, 70 eV ionization energy, 2초간 50~800

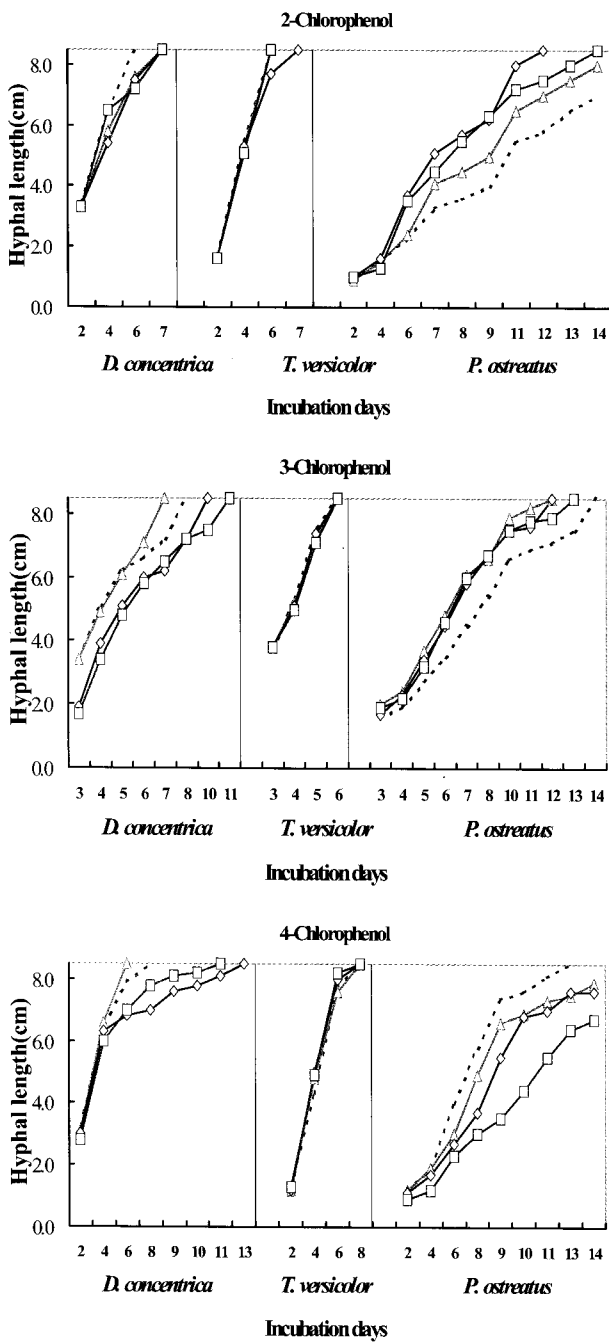


Fig. 1. Comparison of hyphal growth of *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor*, and *Pleurotus ostreatus* in 2% malt extract agar medium containing various concentrations of 2-, 3-, or 4-chlorophenol. —, control; △, 50 mg/L; ◇, 100 mg/L; □, 200 mg/L.

amu scan을 하여 스펙트라를 얻었다. 얻어진 스펙트라의 분해산물 분석은 MS 시스템에 내장된 mass spectra library (Wiley Registry of Mass Spectra Data, 6th ed.)와 비교하여 확인하였다.

효소활성 및 induction 역가 측정

액체배양한 균사의 표면 아래에서 소량의 균체외액을 채취하여 0.45 μm microfilter를 이용하여 여과한 후 효소 활성 역가의 측정에 이용했다. Induction(유도) 효과를 측정하기 위해서는 균사가 성장한 7일 후에 20 mM의 4-chlorophenol 50 μL를 10 mL의 배지에 첨가한 후 분해력 측정시 이용한 배양 일수 및 시간별로 시료를 채취하여 활성역가를 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. Lignin peroxidase(LiP)의 활성역가는 0.1 M tartrate buffer(pH 3.5)에서 veratryl alcohol (100 mM)을 이용하여 310 nm에서 10 mM H₂O₂ 50 μL를 첨가하면서 측정하였으며, manganese peroxidase(MnP)와 laccase의 활성역가는 0.1 M lactate buffer상에서 ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 0.8 g/L), MnSO₄(100 mM)를 이용하여 414 nm에서 측정하였다. 활성역가의 계산은 LiP는 $\mu\text{kat} = (\text{Absorbance}/9,300) \times (3/1,000) \times 10^6$, MnP와 laccase는 $\mu\text{kat} = (\text{Absorbance}/36,000) \times (3/1,000) \times 10^6$ 를 적용하였다(veratryl aldehyde는 $\epsilon_{310}=9300/\text{M}/\text{cm}$, ABTS는 $\epsilon_{414}=36000/\text{M}/\text{cm}$).

결과 및 고찰

균주의 monochlorophenol에 대한 저항성

Phenol의 방향환에 1개의 염소가 탄소 2, 3, 4 위치에 각각 치환하는 2-, 3- 또는 4-chlorophenol에 대한 3균주의 저항성 시험을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Monochlorophenol을 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 3균주의 특성을 살펴보면 *T. versicolor*는 2-, 3-, 4-chlorophenol의 종류 및 농도의 증가에 따라 전혀 영향을 받지 않고 균사 생장이 이뤄지며, 50, 100, 200 mg/L에서 최대 균사생장 속도는 약 2 cm/day로 일정하였으며, 7일 또는 8일 이내에 사레 전면에 균사가 자라서 monochlorophenol의 농도나 종류에 관계없이 생장이 이루어졌다.

*D. concentrica*는 50 mg/L 처리구를 제외하고는 2-, 3-, 4-chlorophenol의 농도가 증가할수록 약간의 성장 저해를 받아서 2-chlorophenol에서는 7일만에 농도에 관계없이 균사의 생장이 최대에 이르렀으나, 3-chlorophenol과 4-chlorophenol에서는 100 mg/L 이상으로 농도가 증가하면 사레 전면을 회복하기까지 11일 또는 13일까지 균사 생장이 느려져 제한을 받고 있는 것으로 나타났다.

*P. ostreatus*는 2-, 3-chlorophenol에서 위의 두 균주와 달리 대조구 자체의 생장이 14일 정도로 상당히 느렸으며 오히려 monochlorophenol을 첨가했을 때 1~2일 정도로 생장이 촉진되는 결과를 나타내서 100 ppm을 첨가했을 때 제일 양호한 균사 성장을 보였다. 그러나 4-chlorophenol에서는 농도가 높아질수록 성장 제한의 양상이 나타났으며 14일이 지나도 50, 100, 200 mg/L에서 각각 7.9, 7.6, 6.7 cm의 성장만 이루어졌다.

결론적으로 저항성 시험에 이용된 3균주 중 *T. versicolor*는 염소가 1개 치환된 2-, 3-, 4-chlorophenol의 분해에 있어서 균사

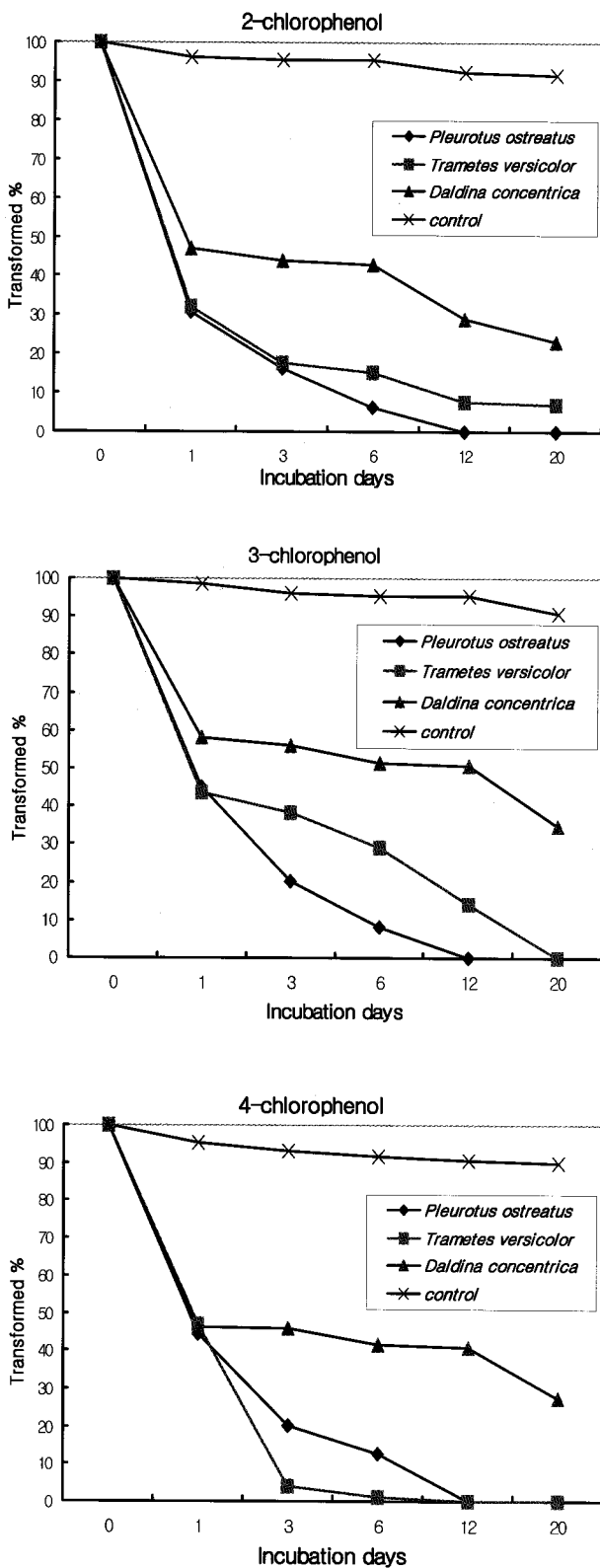


Fig. 2. Transformation of 2-, 3-, and 4-chlorophenol during the culture of *Daldinia concentrica*, *Trametes versicolor*, and *Pleurotus ostreatus* in a liquid media.

생장에 제한을 받지 않고 우수한 성장력을 갖고 있는 것으로

나타났다. 또한, 다른 두 균주에서처럼 목질분해균은 염소화합물이 고농도화 될수록 저항성이 제한되는 경우가 다른 유기염소화합물의 경우에도 관찰되었다^{21,22}. 1개의 염소가 치환된 같은 monochlorophenol이라도 염소의 치환 위치에 따라 균의 저항성이 달라져 *ortho*나 *meta*보다는 *para* 위치에 염소가 치환된 4-chlorophenol은 *D. concentrica*나 *P. ostreatus*의 경우 분해가 느린 것으로 나타났다. 그러나 *P. ostreatus*를 이용하여 12일째에 5 mM의 각종 monochlorophenol을 첨가하여 염소의 위치별 분해능을 조사한 결과 *ortho*나 *meta* 위치 보다 *para* 위치에 있는 염소화합물의 분해능이 빠르다고 보고한 연구⁹와는 대조적인 결과였다.

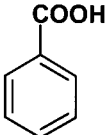
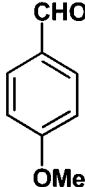
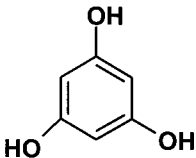
Monochlorophenol의 분해능

2-, 3-, 4-Chlorophenol에 대한 *D. concentrica*, *T. versicolor*, *P. ostreatus* 3균주의 분해능 시험을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.

2-Chlorophenol 분해에 있어서 균주별 분해능을 살펴보면 *P. ostreatus*의 분해능이 우수하여 1일째 70%의 분해율을 보이며 12일째 완전히 분해시켰다. *T. versicolor*는 초기 분해능(1일째, 68~81%)이 *P. ostreatus*과 비슷하나 최종일 20일이 지나도 완전 분해는 도달하지 못하고 96%에 머물렀다. 또한 *D. concentrica*는 전반적으로 위의 두 균주 보다 분해능이 현저히 떨어져서 20일째 최종적으로 79%의 분해율을 보였다. 3-chlorophenol의 경우에도 *P. ostreatus*의 분해능이 우수하여 12일째 완전분해에 이르며 *T. versicolor*는 20일째 *D. concentrica*는 최종적으로 65%의 분해율에 그쳤다. *P. ostreatus*는 저항성 시험에 있어서 2-, 3-chlorophenol을 첨가했을 때 생장이 촉진되는 결과를 바탕으로 물질을 탄소원으로 잘 이용하여 분해능이 빠른 것으로 생각된다. 4-chlorophenol에서는 *T. versicolor*의 분해율이 월등하여 3일째 96%의 분해율을 나타냈으며 *P. ostreatus*와 함께 12일째 완전히 분해되었다. *D. concentrica*는 최종적으로 73%의 분해율을 나타냈다.

결론적으로 2-chlorophenol 이나 3-chlorophenol은 *P. ostreatus*가 제일 우수한 분해능을 보였으며 4-chlorophenol의 경우는 *T. versicolor*가 2균주에 비하여 월등하게 우수하게 나타나 균주에 따른 monochlorophenol의 분해능에 있어서 차이가 있음을 보여주었다. 이는 앞에서 설명된 저항성의 결과와 일치하는 것으로 monochlorophenol이라도 염소의 치환 위치에 따라 *ortho*나 *meta* 보다 *para* 위치에 염소가 치환된 4-chlorophenol은 *D. concentrica*나 *P. ostreatus*의 경우 분해가 느린 것으로 나타났다. 그러나 *T. versicolor*는 2-, 3-, 4-chlorophenol의 저항성 시험에서 균사 생장이 제한을 받지 않고 우수한 성장력을 갖고 있는 것처럼 분해능 시험에 있어서도 우수하였다. 특히 *T. versicolor*는 염소페놀 중 제일 독성이 강한 것으로 알려진 pentachlorophenol(PCP)에 대해서도 저항성이 상당히 높은 것으로 보고되었다²³. 다른 보고에 의하면 chlorophenol의 경우에 *ortho* 또는 *para* 위치에 염소가 치환된 것보다 *meta* 위치에 염소가 치환된 3-chlorophenol, 3,5-dichlorophenol, 2,3,4-

Table 1. TMS silylated metabolites during the biodegradation of 2-, 3-, and 4-chlorophenols by white rot fungi, *Tranetes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*.(bp = base peak; mp = molecular peak)

Metabolites	Structural formula	MW (TMS-MW)	Major mass peaks
lactic acid	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	90 (234)	73, 117, 147(bp), 190, 219, 234(mp)
2-propenoic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	72 (144)	73, 75, 99, 129(bp), 144(mp)
methyl malonic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	118 (334)	73, 113, 147, 207, 281(bp), 319, 334(mp)
benzoic acid		122 (194)	105, 135, 179(bp), 194(mp)
4-methoxy benzaldehyde		136 (-)	77, 92, 107, 136(bp, mp)
1,3,5-trihydroxy benzene		126 (342)	73(bp), 147, 268, 281,327, 342(mp)

trichlorophenol이 균에 더 독성이 강하다고 보고되었다¹⁰⁾. 그러나 균주에 따라서는 chlorophenol의 종류에는 관계없이 단지 농도에 따라서 독성의 여부가 달라지는 경우도 있다.

Monochlorophenol 분해산물

분해능이 우수한 *T. versicolor*나 *P. ostreatus*에 의한 2-, 3-, 및 4-chlorophenol 분해산물을 GC/MS에 의하여 분석한 결과는 Table 1과 같다.

Monochlorophenol의 호기적 조건에서 미생물에 의한 분해과정은 산소가 전자수용체로 또는 분해초기에는 reactant 역할을 하면서 탈염소화 반응과 함께 최종적으로 이산화탄소로 완전분해된다고 알려져 있다^{7,8,21,22)}. 본 연구에서는 benzoic acid, 4-methoxy benzaldehyde, 1,3,5-trihydroxyl benzene이 초기단계에서 탈염소화 반응의 산물로 분석되었다. 그러나 이

러한 산물이 배지로부터 유도되었는지 또는 방향환으로부터 직접 탈염소화 및 산화 과정으로부터 발생되었는지의 여부는 확인할 수가 없었다. 또한 탈염소화 후에 방향환의 개열에 의하여 발생될 수 있는 산물인 1-ethyl-1-hydroxyl pentane, 2,3-dihydroxyl butane, 2-propenoic acid, lactic acid, methylmalonic acid, 2-methyl-4-keto-pentan-2-ol, dicarboxylic ethane 등이 확인되었다. 그리고 2-chloro-4-acetyl phenol, dichloro 화합물(unidentified)도 발견되었는데 이것은 탈염소화가 진행되지 않았거나 혹은 탈염소화 후 산화된 방향환에 염소가 치환된 것으로 추측된다. 그러나 방향환에서 탈염소화가 되고 산화된 형태인 catechol은 분석되지 않았다. 또한 목질분해균에 의한 분해산물 분석시 많이 발생하는 지방산 종류인 tetradecanoic acid, heptadecanoic acid, octadecanoic acid 등이 확인되었으며, 이러한 지방산은 난분해성물질의 미생물 분

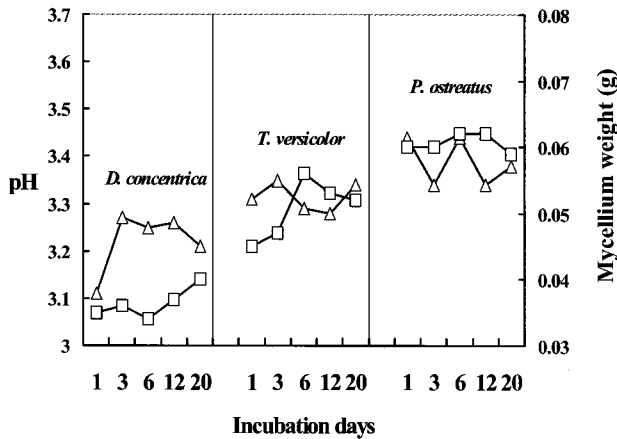


Fig. 3. Comparison of the mycelium weight of *D. concentrica*, *T. versicolor*, and *P. ostreatus* and the change of pH in culture medium containing 4-chlorophenol. Δ , pH; \square , mycelium weight

해시 주요한 역할을 할 것으로 추측된다.

pH와 균사량 변이

4-Chlorophenol을 첨가한 액체배지 배양일수별 각 균주의 pH나 균사량의 변이는 Fig. 3과 같다. 균주별로는 pH와 균사량은 *P. ostreatus* > *T. versicolor* > *D. concentrica* 순으로 높았으며, 균주내에서 배양일수별로 pH의 변이는 유동적이었고 균사량은 조금씩 증가하였으나 뚜렷한 차이는 없었다. 3균주 모두 2-, 3- 또는 4-chlorophenol에서 pH 3.1~3.4, 균사량도 0.03~0.07 g으로 일정하여 배양일수별 또는 monochlorophenol 종류에 따라서 차이가 없었으며, *P. ostreatus*만 4-chlorophenol에서 균사량이 0.06 g으로 높게 나타났다. 즉, 2-, 3- 또는 4-chlorophenol의 목질분해균을 이용한 분해에 있어서 pH 및 균사량은 monochlorophenol의 분해능과는 상관관계가 낮은 것으로 나타났다.

효소역가 유도 효과

4-Chlorophenol을 첨가하여 배양일수별로 변화하는 3균주의 ligninase의 유도 효과는 Fig. 4와 같다. *T. versicolor*와 *P. ostreatus*의 경우는 높은 laccase의 유도 효과를 나타내면서 monochlorophenol의 분해에 영향을 주는 것으로 생각된다. 그러나 *D. concentrica*는 다른 균주와 비교하여 laccase의 유도 효과는 없지만 LiP의 효과가 미미하나 뚜렷함을 보였다. 3균주의 저항성 시험과 관련지어 monochlorophenol의 분해에는 LiP나 laccase의 활성이 관련됨을 나타냈다. 많은 연구에서 나타났듯이 난분해성 염소화합물의 변환 또는 분해에는 리그닌 분해 효소의 시스템이 작용하는데 주로 LiP, MnP 그리고 laccase의 역할을 보고하였다. 伊藤 등⁹⁾은 *P. ostreatus*를 이용한 각종 monochlorophenol의 분해시에 MnP의 역할을 강조하였으나 본 연구에서는 미미한 역가를 나타내었고 뚜렷한 유도 효과는 볼 수 없었다.

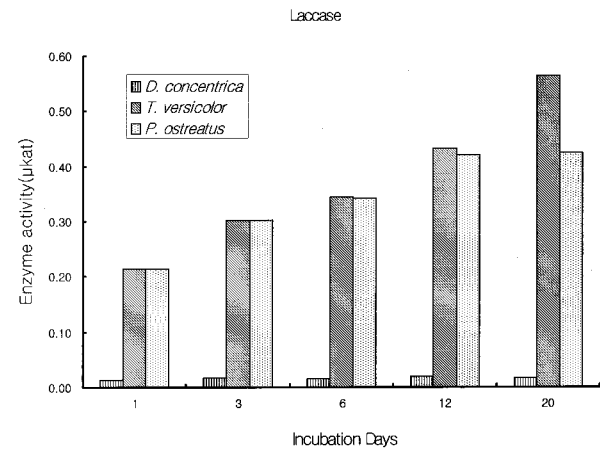
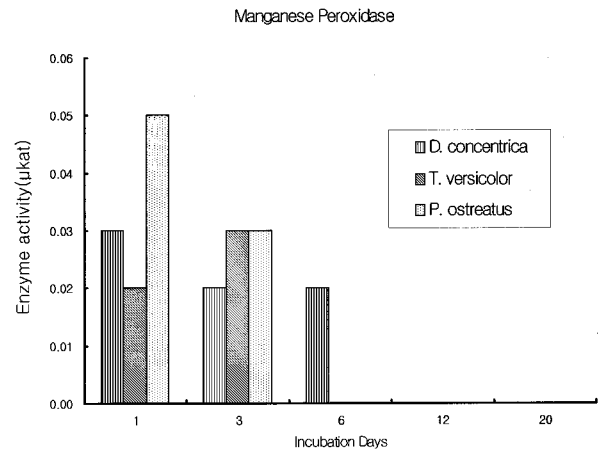


Fig. 4. Induction of ligninases by *D. concentrica*, *T. versicolor*, and *P. ostreatus* in the nitrogen limited media containing 4-chlorophenol.

요 약

Monochlorophenol인 2-, 3- 및 4-chlorophenol에 대해서 *D. concentrica*, *T. versicolor*, *P. ostreatus* 3균주를 이용하여 저항성, 분해능, 분해산물 등을 비교 분석하였다.

*T. versicolor*는 monochlorophenol의 종류 및 농도의 증가에 따라 전혀 영향을 받지 않고 균사 생장이 이뤄지며, *D. concentrica*는 3-, 4-chlorophenol에서 100 mg/L 이상으로 농도가 증가하면 균사 생장이 느려져 제한을 받고 있는 것으로 나타났다. *P. ostreatus*는 두 균주와 달리 대조구 자체의 생장이 14일 정도로 상당히 느렸으나 2-, 3-chlorophenol을 첨가했을 때 오히려 1~2일 정도씩 생장이 촉진되는 결과를 나타냈다. 2-Chlorophenol 이나 3-chlorophenol에서는 *P. ostreatus*가 제일 우수한 분해능을 보였으며 4-chlorophenol의 경우는 *T. versicolor*가 2균주에 비하여 월등하게 우수하게 나타나 균주에 따른 monochlorophenol의 분해능에 있어서 차이가 있고, 염소의 치환 위치에 따라 ortho나 meta 보다는 para 위치

에 염소가 치환된 4-chlorophenol이 *D. concentrica*나 *P. ostreatus*의 경우 분해가 느린 것으로 나타났다. 그러나 *T. versicolor*는 2-, 3- 및 4-chlorophenol의 저항성 시험에서 균사 생장이 제한을 받지 않고 우수한 성장력을 갖고 있는 것처럼 분해능 시험에 있어서도 우수하였다. 균주별로 pH와 균사량은 *P. ostreatus* > *T. versicolor* > *D. concentrica* 순으로 높았으며, 균주내에서 배양일수별로 pH의 변이는 유동적이었고 균사량은 조금씩 증가하였으나 뚜렷한 차이는 없었다. 즉, 2-, 3- 또는 4-chlorophenol의 목질분해균을 이용한 분해에 있어서 pH 및 균사량은 monochlorophenol의 분해능과는 상관관계가 낮은 것으로 나타났다. *T. versicolor*와 *P. ostreatus*의 경우는 높은 laccase의 유도 효과를 나타내면서 monochlorophenol의 분해에 영향을 주는 것으로 생각된다.

Monochlorophenol의 분해산물로는 1,3,5-trihydroxyl benzene, 1-ethyl-1-hydroxyl pentane, 2-pro-penoic acid, methylmalonic acid, 2-methyl-4-keto-pentan-2-ol 등과 지방산의 일종인 tetradecanoic acid, hexadecane, heptadecanoic acid, octadecanoic acid 등이 확인되었다.

참고문헌

- Rochkind-Dubinsky, M. L., Saylor, G. S. and Blackburn, J. W. (1987) *Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds*, Marcel Dekker Inc., NY and Basel, p.73-107.
- Sierra-Alvarez, R., Field, J. A., Kortekaas, S. and Lettinga, G. (1994) Overview of the anaerobic toxicity caused by organic forest industry wastewater pollutants, *Wat. Sci. Technol.* 29, 353-363.
- Huynh, V., Chang, H., and Joyce, T. (1985) Dechlorination of chloro-organics by a white-rot fungi, *Tappi Journal* 68(7), 98-102.
- Krumm, M. L. and Boyd, S. A. (1988) Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors, *Wat. Res.* 22, 171-177.
- Roy-Arcand, L. and Archibald, F. S. (1991) Direct dechlorination of chlorphenolic compounds by laccase from *Trametes(Coriolus) versicolor*, *Enzyme Microb. Technol.* 13, 194-203.
- Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F. and Sasek, V.(2000) PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil, *Chemosphere.* 43, 207-215.
- Ruttimann, J. C. and Lamar, R. T. (1996) Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3890-3893.
- Leonitevsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Evans, C. S. and Golovleva, L. A. (2000) Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*, *Biodegradation.* 11, 331-340.
- 伊藤弘道, 本田与一, 渡辺隆司, 桑原正章 (1998) 食用擔子菌を用いたバイオレメディエーションに関する研究 -ヒラタケによる鹽素化フェノールの分解, 日本木材學會大會研究發表要旨集, 501
- Katayama, H. (1994) Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*, *Wat. Sci. Tech.* 30, 59-66.
- Chang, B. V., Wu, W. B. and Yuan, S. Y. (1997) Biodegradation of benzene, toluene, and other aromatic compounds by *Pseudomonas sp.* D8, *Chemosphere.* 35, 2807-2815.
- Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A and Aust, S. D. (1988) Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1779-1785.
- Valli, K. and Gold, M. (1991) Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.* 173, 345-352.
- Alleman, B. C., Logan, B. and Gibertson, R. L. (1992) Toxicity of pentachlorophenol to six species of white rot fungi as a function of chemical dose, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4048-4050.
- Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S. and Gold, M. H. (1998) Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium* : involvement of reductive dechlorination, *J. Bacteriol.* 180, 5159-5164.
- Armenante, P. M., Pal, N. and Lewandowski, G. (1994) Role of mycelium and extracellular protein in the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1711-1718.
- Shuttleworth, K. L. and Bollag, J. M. (1986) Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols, *Enzyme Microb. Technol.* 8, 171-177.
- Ruggiero, P., Sarkar, J. M. and Bollag, J. M. (1989) Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay, *Soil Science.* 147, 361-370.
- Iimura, Y., Hartikainen, P. and Tatsumi, K. (1996) Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white rot basidiomycete *Coriolus versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 434-439.
- Tien, M., and Kirk T. K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of an unique

-
- H_2O_2 -requiring oxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2280-2284
21. 최인규, 안세희 (1998) 목질분해균에 의한 Pentachlorophenol의 미생물분해, *한국목재공학회* 26(3), 53-62
22. 최인규 (1999) Biodegradation of Chlorinated Phenols, Pentachlorophenol and 4,5,6-Trichloroguaiacol, by Lignin-Degrading Basidiomycetes, *Grammothele fuligo*, and *Phanerochaete crassa*, *산림과학논문집* 62, 53-66
-