

## 염료의 색도 제거능력이 우수한 백색부후균 분리 및 특성연구

오광근\* · 김현수 · 조무환<sup>1</sup> · 채영규<sup>2</sup> · 전영중

제일제당주식회사 종합기술원, <sup>1</sup>영남대학교 화공 및 공업화학부, <sup>2</sup>한양대학교 생화학과

**Isolation and Characterization of White Rot Fungi for Decolorization of Several Synthetic Dyes.** Oh, Kwang-Keun\*, Hyun-Soo Kim, Moo-Hwan Cho<sup>1</sup>, Young-Gyu Chai<sup>2</sup>, and Yeong-Joong Jeon. Institute of Science and Technology, CHEILJEDANG Corporation, Ichon 467-810, Korea, <sup>1</sup>School of Chemical Engineering and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea, <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea - Several white-rot fungi collected from the mountains of Korea were evaluated for their ability to decolorize azo, polymeric, and reactive dyes. Strains CJ-105, CJ-212 and CJ-315, identified as *Trametes* sp., *Pleurotus* sp. and *Fomes* sp., respectively, showed higher potential for decolorization of those dyes in either solid or liquid media. For *Trametes* sp. CJ-105, 100 ppm of Remazol Brilliant Blue R and 500 ppm of Acid Red 264 were completely decolorized after 2 days under liquid culture. The dominating ligninolytic enzyme existing in the culture broth was laccase (E.C. 1.10.3.2). Also, *Pleurotus* sp. CJ-212 and *Fomes* sp. CJ-315 showed similar patterns in decolorization of Remazol Brilliant Blue R and Acid Red 264. The extent of decolorization of the dyes in liquid culture was found to be proportional to the activities of the ligninolytic enzymes produced by each strain. In addition to that *Trametes* sp. CJ-105 was highly effective in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol by the activity of the ligninolytic enzymes produced. In this study, we found that white-rot fungi, *Trametes* sp. CJ-105(KFCC 10941), *Pleurotus* sp. CJ-212(KFCC 10943) and *Fomes* sp. CJ-315(KFCC 10942), were effective in decolorizing a wide range of structurally different synthetic dyes, as well as some chemical compounds which are known to be hardly degradable.

**Key words :** white rot fungi, *Trametes* sp., *Pleurotus* sp., *Fomes* sp., ligninolytic enzyme, dye decolorization

오늘날 버섯류는 10,000종 이상이 밝혀져 있으며 기호성 식품으로서 영양학적 가치와 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 즉 *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* 등은 식료품으로서 이용되었으며, 약리 성분으로는 *Grifola frondosa*의 균사체로부터 다당류인  $\beta$ -glucan을 얻어 항암 작용과 면역조절 기능에 대하여 보고하였다[26]. 또 *Ganoderma lucidum*의 균사체로부터는  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan에 의한 항암 능력을 보고하였으며[10] *Trametes versicolor*의 균사체에서는 단백 다당류인 크레스틴을 추출하여 항암 능력을 증명하고 실용화하였다[6,12,20,30,31]. 이와 같이 담자균류는 각종 다당류, steroid, terpenoid, nucleic acid 유도체등의 생리활성 물질을 생산하고 있으며 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

그러나, 균류를 이용한 산업폐수 및 유해 환경오염물질의 처리 등 환경적인 측면에서는 활용이 미미한 실정이었으며 최근에 폐수의 생물학적 처리 방법에 균류를 이용하

는 연구가 진행되고 있는데 특히, 담자균류(Basidiomycetes)에 속하는 백색부후균(white rot fungi; WRF)은 각종 난분해성 물질을 비특이적으로 분해할 수 있는 효소와 산을 생성하는 것으로 보고되고 있다[2,21,25,29]. 그 중에서 *Phanerochaete chrysosporium*에 대한 연구가 주로 이루어지고 있으며 리그닌 분해 효소군(ligninolytic enzymes)의 작용에 의하여 다염소성 탄화수소(polychlorinated hydrocarbon), 사염화탄소, 클로로포름, 염화메틸렌, DDT, 2,4,6-TNT, Dye류등을 포함한 다양한 난분해성 물질을 분해할 수 있는 것으로 보고되고 있다[3, 4,9,14,15,24]. 한편, 염색공장이나 염료 제조공장 등에서 배출되는 염료는 10,000여종 이상이며 전세계적으로 연간  $7 \times 10^5$ 톤 정도 생산된다. 합성염료들은 아조기, 니트로기 및 설폰기등 분해가 잘 되지 않는 작용기를 포함하고 있는 난분해성 독성물질로서 아직까지 유용한 분해방법이 확립되어 있지 않아 물리, 화학적인 방법을 사용하여 처리하고 있는데, 비용이 많이 들기 때문에 기존방법 보다는 경제적이고 2차오염의 우려가 없는 미생물을 이용한 생물학적 처리방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

\*Corresponding author

Tel. 82-336-639-4317, Fax. 82-336-632-2784

E-mail:wapaloh@www.cheiljedang.com

본 연구에서는 국내에서 자생하는 버섯들을 채취하여 각종 염료에 대한 성장성과 분해성을 지닌 균주들을 분리, 선별하여 그 특성을 검토하고 향후 난분해성 물질의 생물학적 처리에 대해서도 응용가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리 및 선별

경기도 광릉, 강원도 설악산, 오대산 지역에서 채취하여 분리한 버섯류로부터 무균적으로 균사체를 취하여 YM 배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, glucose 10 g/l, peptonc 5 g/l, agar 17 g/l)의 사면배지에 이식하고 25~28°C에서 5~7일간 배양하여 균사체가 표면을 덮을 정도로 성장한 후 배양을 종료하고 4°C에서 보관하였다. 이후 필요시에 꺼내어 균사체를 사용하였다.

상기 균사체의 선단을 코크보러(직경 6 mm)로 취하여 본 연구에 사용한 각각의 염료를 100 ppm 농도로 함유한 YM 평판배지에 이식한 후 25~28°C의 항온기(Precision, GCA, USA)에서 배양하면서 균사체의 성장을 관찰하고 염료의 색도 제거영역을 측정하여 여러 종류의 염료에서 성장 및 색도 제거능력이 우수한 균주를 선별하였다.

### 시약

본 연구에 사용한 염료는 일반적으로 많이 사용되는 염료로서 아조계인 congo red, methyl orange, 중합계인 poly R-478, 반응성 염료인 안트라퀴논계 remazol brilliant blue R, crystal violet이며 각각은 Sigma사에서 구입하였고 기타 시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다. 또 Acid Red 264는 T시의 방직회사인 K사에서 실제로 사용되는 반응성 아조계 염료이다. 한편, PAH(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) 2종(벤젠링이 3개인 anthracene, 4개인 pyrene) 및 PCP(Pentachlorophenol)는 Sigma사에서 구입한 것을 사용하였고, PAH는 dimethyl formamide에 PCP는 0.25 N NaOH용액에 Acid Red 264는 증류수에 각각 4,000 ppm씩 녹여 stock solution을 만들어 접종하기 전에 필요한 농도로 투입하여 사용하였다.

### 균체의 성장측정

균체의 성장은 고체배지와 액체배지에서의 측정방법이 있으며, 고체배지를 사용할 경우는 평판배지 상에서의 균사체 성장을 기준으로 측정하였는데, 접종된 균사체편의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지의 밑면에 유성펜으로 그려 배양이 완료되었을 때 종축 및 횡축의 직경을 측정 후 두 값을 평균하여 균체의 신장직경으로 나타내었다[8]. 액체배지를 사용할 경우는 배양액 일정량을 취하여 미리 무게를 측정한 filter paper(Whatman No. 2)를 사용하여 여과한 후 균사체를 증류수로 2회 세척하고 90°C dry

oven에서 12시간 건조하여 건조 균사체량을 측정하였다.

### 색도 제거능력 측정

고체배지를 사용하여 색도 제거능력을 측정할 경우는 평판배지 상에서의 탈색된 영역의 지름을 기준으로 측정하였는데, 탈색된 영역의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지의 밑면에 유성펜으로 그려 5일 경과되었을 때 종축 및 횡축의 직경을 측정 후 두 값을 평균하여 탈색영역의 직경으로 정하고 탈색영역의 면적을 구하여 전체 평판의 면적에 대한 비율로 나타내었다. 염료를 함유한 평판배지에서의 균사체 성장 및 염료 색도 제거능력이 우수한 것으로 선별된 균주를 YM 액체배지 50 ml을 함유하는 250 ml 플라스크에 접종하여 25±1°C의 항온기에서 5일간 정치 배양하였다. 이후 액체배양액을 5,000 rpm으로 10분간 원심분리(Vision, VS15000CFN, Korca) 하여 얻어진 균사체를 멸균 증류수로 2회 세척하여 배지성분을 제거한 후에 증류수 50ml을 첨가하여 블렌더로 1분간 균질화 하고, remazol brilliant blue R을 100 ppm 또는 Acid Red 264를 500 ppm 되도록 첨가한 nitrogen-limited medium (NLM) 액체배양배지(glucose 15 g/l, malt extract 400 mg/l, MnCl<sub>2</sub> 0.3 mg/l, FeSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 4 mg/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 40 mg/l, 2,2-dimethylsuccinic acid 2.9 g/l, pH 5.0) 100 ml을 함유한 500 ml 플라스크에 5%(v/v)씩 접종한 후 25±1°C의 진탕회전 배양기(Vision, VS-8480SR, Korea)에서 150 rpm으로 배양하였다[29].

상기의 액체배양배지(NLM배지)에서 1 ml의 표본을 무균적으로 채취하여 원심분리기에서 15,000 rpm으로 5분간 처리한 후 균사체와 입자를 제거하였다. 처리된 상등액을 적당량 희석한 후 분광광도계(Miltonroy, Genesys2, USA)를 이용하여 scanning을 통한 흡광도를 측정하였으며 최대 흡광 파장에서의 흡광도 감소 또는 두 파장에서의 흡광비율(ratio)의 감소를 비교하여 색도 제거능력을 판정하였다[29].

### 균주의 미생물학적 특성조사

채취한 버섯의 자실체를 육안으로 확인하여 균종의 형태, 크기, 색깔등을 조사하였고 광학 현미경(ZEISS, M-35, UK)과 주사전자현미경(HITACHI, S-2460N, Japan)으로 균사체의 성장 및 포자, 포자낭의 모양, 색깔, 크기 등의 특징을 관찰하여 동정하였다[17].

### 백색부후균 배양에 의한 PAH 및 PCP의 분해실험 및 리그닌 분해효소균의 영향

상기 염료의 색도 제거능력이 우수한 것으로 선별된 균주를 YM 액체배지 50 ml을 함유하는 250 ml 플라스크에 접종하여 25±1°C의 항온기에서 5일간 정치 배양하였다. 이후 액체배양액을 5,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 얻어진 균사체를 멸균증류수로 2~3회 세척하는 과정을 2회



Table 1. Comparison of the mycelial growth and the decolorization in the agar plate medium containing dyes

Strains	Mycelial growth <sup>a)</sup>					Decolorization (%) <sup>b)</sup>				
	CR	CV	PR	RB	MO <sup>c)</sup>	CR	CV	PR	RB	MO
CJ-105	+++	+++	+++	+++	+++	69.1	60.4	59.8	89.9	29.6
CJ-108	++	+	++	+	+	34.9	2.8	26.2	7.5	7.9
CJ-113	+	+	+	++	++	2.9	6.2	7.3	43.5	18.9
CJ-117	++	+	+	++	+	22.5	7.3	4.0	47.9	2.9
CJ-120	+	+	+	+	+	11.0	6.6	3.1	16.6	1.7
CJ-212	+++	+++	+++	+++	+++	23.9	16.0	18.5	39.0	15.9
CJ-215	++	+	++	+++	++	18.9	6.1	13.4	43.7	12.3
CJ-226	+	++	+	++	++	4.2	22.5	6.3	22.4	13.0
CJ-236	+	++	++	+++	+++	5.5	11.5	15.0	38.4	16.6
CJ-245	++	+	+	+	++	33.6	2.8	1.5	7.8	18.3
CJ-315	+++	+++	+++	+++	+++	21.9	39.2	30.3	45.5	13.4
CJ-321	+	+	+	+	+	2.0	7.3	2.9	14.1	11.0
CJ-333	+	++	++	++	+	6.1	32.1	16.8	32.1	1.5
CJ-337	++	+	+	+	+	18.3	4.2	1.7	18.5	5.0
CJ-340	++	+	+	++	++	16.9	5.2	5.4	16.6	23.0

a) +++, very good growth; ++, good; +, slight. b) Decolorization indicated the ratio of decolorized zone in YM agar plate after 5 days culture. c) CR, congo red; CV, crystal violet; PR, poly R-478; RB, remazol brilliant blue R; MO, methyl orange.

환반응에서의 지표로서 중요하다고 보고하였다. 이것들을 바탕으로 본 연구에서는 중합체 염료를 포함한 이조계 및 반응성 염료의 색도 제거능력이 우수한 균주를 선별하였으며, 선별된 3가지 균주 CJ-105, CJ-212, CJ-315는 congo red, methyl orange, poly R-478, remazol brilliant blue R, crystal violet을 각각 100 ppm씩 포함한 평판배지 상에서 균사체의 성장이 양호하였으며, 또한 균사체가 성장함에 따라 균사체 주위에서 각 염료의 색도가 제거되는 것을 확인하였다. 특히 CJ-105는 균사체의 성장은 물론이고 각 염료의 색도 제거능력도 우수한 것으로 확인되었다.

#### 선별된 균주의 특성

선별된 균주의 특성을 조사하기 위해 채취한 버섯의 자실체를 육안으로 확인하여 균종의 형태, 크기, 색깔 등을 조사하였고 광학 현미경과 주사전자현미경으로 균사체의 성장 및 포자, 포자낭의 모양, 색깔, 크기 등의 특징을 관찰하여 동정하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 결과적으로 균주 CJ-105는 한국산 담자균 아문(Basidiomycotina), 구멍장이 버섯과(Polyporaceae), 구름버섯속(*Trametes*)에 속하는 균류로 동정[17]되어 *Trametes* sp. CJ-105로 명명하였으며, CJ-212는 한국산 담자균 아문, 느타리과(Pleurotaceae), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 균류로 동정[17]되어 *Pleurotus* sp. CJ-212로 명명하였고, CJ-315는 한국산 담자균 아문, 구멍장이 버섯과, 말굽버섯속(*Fomes*)에 속하는 균류로 동정[17]되어 *Fomes* sp. CJ-315로 명명하였다. 각각의 균주는 한국종균협회에 기탁, 보관하였다(*Trametes* sp. CJ-105 KFCC 10941, *Pleurotus* sp. CJ-212 KF

CC 10943, *Fomes* sp. CJ-315 KFCC 10942).

#### 선별된 균주의 염료 색도 제거능력과 리그닌 분해효소의 활성

상기 선별된 3종의 균주에 대하여 remazol brilliant blue R을 100 ppm 농도가 되도록 첨가한 NLM 액체배양 배지에서 배양한 결과 Fig. 1A에서와 같이 *Trametes* sp. CJ-105의 경우는 배양 2일째에 거의 색도가 제거되었고, *Fomes* sp. CJ-315의 경우에는 배양 2일째에 약 70%가 제거되고 8일째에 거의 색도가 제거되었으며, *Pleurotus* sp. CJ-212의 경우는 배양 2일째에 약 60%, 8일째에는 거의 색도가 제거되었다. 균주별로 다소 차이는 있지만 색도 제거능력이 좋은 것을 알 수 있으며 *Trametes* sp. CJ-105는 아주 우수한 능력을 보여주었다.

한편, 리그닌 분해효소균은 리그닌을 비롯한 각종 난분해성 화합물을 분해하는 것으로 보고되고 있다[2-4, 9, 14]. 따라서, 색도 제거에 있어서 리그닌 분해효소의 영향을 살펴보기 위하여 laccase, LiP 및 MnP의 활성도를 측정하였다. 상기 remazol brilliant blue R이 함유된 배지에서 색도가 제거될 때 배양액의 리그닌 분해효소 각각의 활성도를 측정된 결과 세가지 균주 모두에서 LiP와 MnP의 효소 활성은 미미하게 존재하였고, laccase의 효소활성만이 높게 검출되었으며(Fig. 1B, Fig. 1C), *Trametes* sp. CJ-105, *Fomes* sp. CJ-315, *Pleurotus* sp. CJ-212의 순으로 각 효소의 활성도가 높게 나타났다. 이 결과는 remazol brilliant blue R에 대한 *Trametes* sp. CJ-105, *Fomes* sp. CJ-315, *Pleurotus* sp. CJ-212의 색도 제거능력이 리그닌 분해효소의

Table 2. Characteristics of *Trametes* sp. CJ-105, *Pleurotus* sp. CJ-212 and *Fomes* sp. CJ-315 isolated from the mountains of Korea

Characteristics	WRF Strains			
	<i>Trametes</i> sp. CJ-105 KFCC 10941	<i>Pleurotus</i> sp. CJ-212 KFCC 10943	<i>Fomes</i> sp. CJ-315 KFCC 10942	
Fruiting body	Size	· diameter: 1~5 cm · thickness: 1~2 mm	· diameter: 5~15 cm	· diameter: 3.5~15 cm · thickness: 2~9 cm
	Shape	· bracket to shelf-like or fan-shaped	· fan-shaped, broadly convex to sometimes nearly plane at maturity	· fan-shaped, slightly convex, thin bracket
	Surface	· tomentose with multicolored zones	· smooth, white to greyish-brown	· matted-hairy → smooth, bumpy or warted · dark-brown
	Cuticle	· not forming		· forming
	Flesh	· thin, white, and fibrous	· white, odor of anise	· thin and pliant, dingy pink
	Pore or Gills	· 3~5 pores per mm · white to pale yellow layer of very small tubes	· decurrent gills with white or yellowish	· 3~4 pores per mm, pale to dark pink · tube: multi-series, 2~3 mm long, dingy pink
	Stipe	· non-stipitate	· short and thick (often absent)	· non-stipitate
Spores	Size	· 5~6.5 × 1.5~2.0 μm	· 7.5~11 × 34 μm	· 16~18 × 5~6 μm
	Shape	· curved-cylindrical, smooth, hyaline	· smooth, elliptical, nonamyloid	· curved-cylindrical, smooth, allantoid
	Color	· white to pale yellow	· print white	· print off-white
Fruiting mycelium	Size	· 2~5 μm diameter	· 4~6 μm diameter	· 3~7 μm diameter
	Clamp connection	present	present	present
Habitat	· in rows or overlapping shelves on stumps and logs of hardwoods	· overlapping shelves or clusters on stumps and logs of hardwoods	· scattered or forming overlapping shelves on downed conifer wood	

활성과 상대적으로 관계가 있음을 의미하며, 특히 laccase의 활성도와 관계가 있는 것을 나타내는 것으로 생각된다. 이는 de Jong등[13]이 Poly R-478의 색도 제거와 리그닌 분해효소와 상관관계가 있다는 보고와 일치하는 결과이며, 특히 Chivukula등[5]이 염료의 색도 제거에 있어서 laccase가 작용한다고 보고한 것과 같은 결과로써 본 연구에 사용된 아조계, 중합계 및 반응성 염료의 색도 제거에 있어서도 리그닌 분해효소가 작용하는 것으로 판단할 수 있다.

이를 확인하기 위하여 반응성 염료인 remazol brilliant blue R과는 다른 아조계 염료 Acid Red 264를 500 ppm 첨가된 배지에서 상기 선별된 3종의 균주를 배양하여 염료의 색도 제거 및 효소의 생산을 확인하였다. 그 결과 *Trametes* sp. CJ-105의 경우는 배양 2일째에 거의 색도가 제거되었고, *Pleurotus* sp. CJ-212의 경우는 배양 2일째에 약 80%, 4일째에 거의 제거되었으나 *Fomes* sp. CJ-315의 경우에는 색도가 거의 제거되지 않았다(Fig. 2A). Martins [18]등이 yeast인 *Candida zeylanoides*를 사용하여 몇 가지 아조계 염료에 대한 색도 제거를 시험한 결과 7일 후에 44

~90%의 색도 제거능력을 보인 것으로 보고한 것과 비교하면 본 연구의 *Trametes* sp. CJ-105와 *Pleurotus* sp. CJ-212는 아주 우수한 색도 제거능력을 가졌다고 할 수 있다.

한편 색도가 제거될 때 각 균주별로 리그닌 분해효소의 활성도를 조사해 본 결과 LiP는 모든 균주에서 생산되지 않았고, laccase는 *Trametes* sp. CJ-105와 *Pleurotus* sp. CJ-212에서 각각 생산되었으며 MnP는 *Trametes* sp. CJ-105에서만 생산되었다(Fig. 2B). 이로써 분해하는 물질이나 균주의 종류에 따라서 생산되는 리그닌 분해효소의 종류와 양이 많은 차이가 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 리그닌 분해효소의 활성도와 비교하여 살펴 볼 경우 laccase와 MnP를 동시에 생산하는 *Trametes* sp. CJ-105가 Acid Red 264에 대해 가장 우수한 색도 제거능력을 보였으며, 비교적 laccase를 많이 생산할 수 있는 균주인 *Trametes* sp. CJ-105와 *Pleurotus* sp. CJ-212가 Acid Red 264를 빠른 시간에 생분해할 수 있는 것으로 밝혀졌다. Hatakka[11]는 백색부후균이 리그닌 분해효소의 생산 패턴에 따라 laccase와 MnP만을 생산하는 그룹과 LiP를 추가

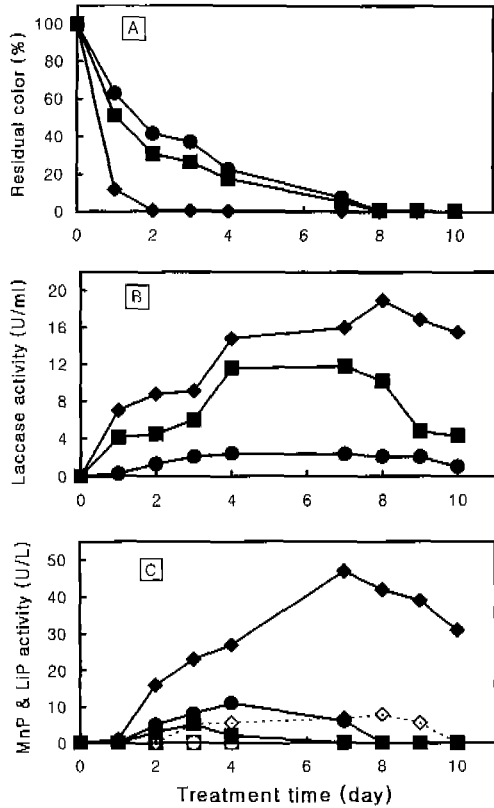


Fig. 1. Decolorization of remazol brilliant blue R by white-rot fungi.

White-rot fungi are *Trametes* sp. CJ-105 (◆), *Fomes* sp. CJ-315 (■) and *Pleurotus* sp. CJ-212 (●). A: residual color of remazol brilliant blue R; B: laccase activity during the decolorization of remazol brilliant blue R; C: LiP (open symbols) and MnP (closed symbols) activity during the decolorization of remazol brilliant blue R.

적으로 생산하는 그룹으로 크게 나눌 수 있으며, 이 두 그룹은 리그닌을 분해하거나 난분해 물질을 분해하는 능력에 상대적인 관련이 있다고 보고하였다. 본 연구에서 특히 *Trametes* sp. CJ-105는 염료를 비롯한 여러 유해물질이 각각 첨가되었을 때에도 모두 리그닌 분해효소의 활성이 나타나며 Acid Red 264를 첨가하였을 때는 500 ppm의 고농도에서 laccase와 MnP의 효소활성이 더 높게 나타나기 때문에 우수하게 난분해 물질을 분해하는데 사용할 수 있을 것으로 판단되며, 또한 효소생산에 있어 적당하게 농도를 조정하여 inducer로도 사용할 수 있는 가능성을 보였다.

선별된 균주에 의한 난분해 물질의 분해

상기 염료의 색도 제거능력이 우수한 것으로 선별된 균주가 자연계에서 분해가 잘 되지 않고 독성이 있는 난분해성 유해 오염물질에 대해서도 분해성이 있는지를 보기 위하여 3종의 균주중 remazol brilliant blue R 및 Acid Red 264에 대해 가장 뛰어난 색도 제거능력을 가진 *Trametes* sp. CJ-105를 배양하여 난분해성 물질에 대한 분해

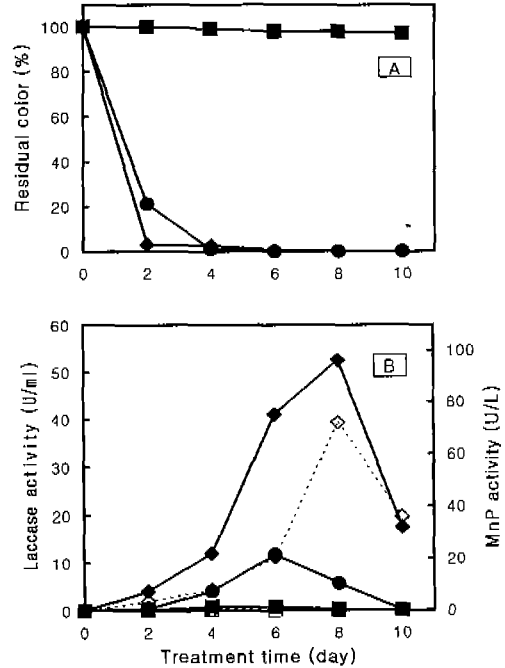


Fig. 2. Decolorization of Acid Red 264 by white-rot fungi. White-rot fungi are *Trametes* sp. CJ-105 (◆), *Fomes* sp. CJ-315 (■) and *Pleurotus* sp. CJ-212 (●). A: residual color of Acid Red 264; B: laccase(closed symbols) and MnP(open symbols) activity during the decolorization of Acid Red 264.

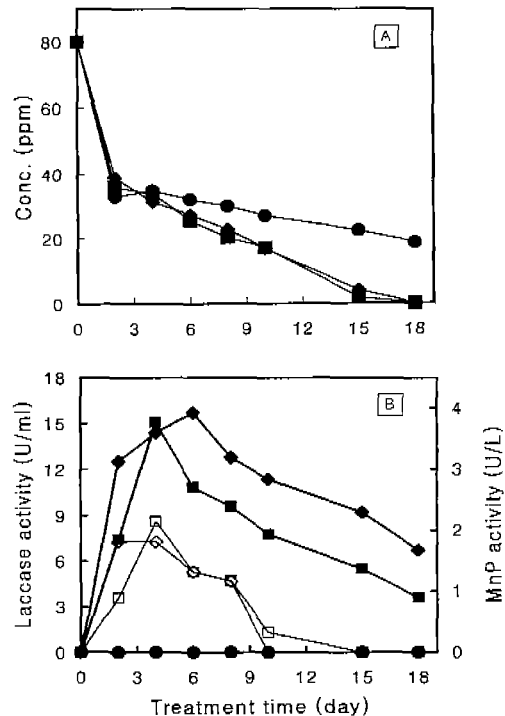


Fig. 3. Degradation of PAH and PCP by *Trametes* sp. CJ-105. The initial concentration of PAH (◆, Anthracene; ■, Pyrene) and PCP (●) is 80 ppm. A: residual concentration of the compounds; B: laccase(closed symbols) and MnP(open symbols) activity during the degradation.

특성을 조사하였다. 난분해 오염물질로서는 PAH 2종(벤젠링이 3개인 anthracene, 4개인 pyrene) 및 PCP를 사용하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 PAH 및 PCP는 배양 초기 균체표면에 잘 흡착되며 시간이 경과함에 따라 탈리되어서 분해된다고 보고되어 있기 때문에 본 연구에서도 초기 PAH 및 PCP가 급격히 감소한 것은 균체표면에 흡착되었기 때문인 것으로 생각되지만, 배지에서 PAH 및 PCP가 제거되고 난 뒤 균사체를 균질화하여 균사표면에 흡착된 PAH 및 PCP를 추출하여 분석한 결과 거의 검출되지 않는 것으로 보아 PAH 및 PCP가 리그닌 분해효소에 의해 단계적으로 분해되고 있음을 알 수 있었다. 한편 PAH 및 PCP가 분해될 때에 배지내의 리그닌 분해효소군의 활성도를 측정된 결과 PAH인 anthracene과 pyrene을 분해할 때는 laccase와 MnP의 활성이 나타났으나, PCP를 분해할 때는 어느 효소의 활성도 나타나지 않았다.

Sack와 Gunther[23]는 여러 백색부후균의 PAH에 대한 분해능력을 조사하는 실험에서 리그닌 분해효소의 활성을 지표로서 활용하였으며, 대부분의 경우에 있어서 세포외 효소의 활성이 PAH를 분해하는 능력을 나타낸다고 하였다. 또한 Tayal등[27]은 중합계 염료와 염소화 페놀류등 중합화합물을 분해하는 백색부후균을 선별하는 연구를 진행하면서 중합계 염료의 분해능력이 우수한 백색부후균이 중합화합물의 분해도 우수함을 보고하였다. 한편, Bogan과 Lamar[1]는 *Phanerochaete laevis* HHB-1625를 액체 배양하여 PAH를 분해하였을 때, MnP의 활성이 많이 존재하였고 laccase의 활성은 적었으며 LiP는 존재하지 않았다고 보고하였다. Kotterman등[16]의 보고에 따르면 PAH의 산화에 *Bjerkandera* sp. strain BOS55가 생산하는 리그닌 분해효소를 이용하는데 있어서 계면활성제 Tween 80을 혼합하여 사용함으로써 anthracene, pyrene 및 benzo[a]pyrcne의 산화속도를 2~5배 증진시킬 수 있었다. 또한 Mileski등[19]은 *Phanerochaete chrysosporium*에 의하여 PCP를 분해하는 연구에서 질소제한 조건(ligninolytic condition)에서가 질소충분 조건(nonligninolytic condition)에서보다 *Phanerochaete chrysosporium* 자체에 의한 PCP의 분해는 우수하였으나 실제 전체적인 PCP의 분해가 작았으며, 이는 리그닌 분해시스템 이외에 다른 분해시스템이 동시에 작용하였기 때문인 것으로 설명했다. 따라서 이러한 결과들을 볼 때 본 연구 결과에서 PCP는 리그닌 분해효소가 생산되지 않은 nonligninolytic condition에서도 분해가 가능한 것으로 생각할 수 있으며, 이러한 결과로써 백색부후균에 의한 난분해 물질의 분해시에 균주별, 물질별에 따라서 laccase, LiP 및 MnP 등 리그닌 분해효소의 활성이 다르게 나타나고 리그닌 분해 효소군이 관여되거나(ligninolytic degradation) 그렇지 않을 수도 있는 것으로(non-ligninolytic degradation) 확인되었다.

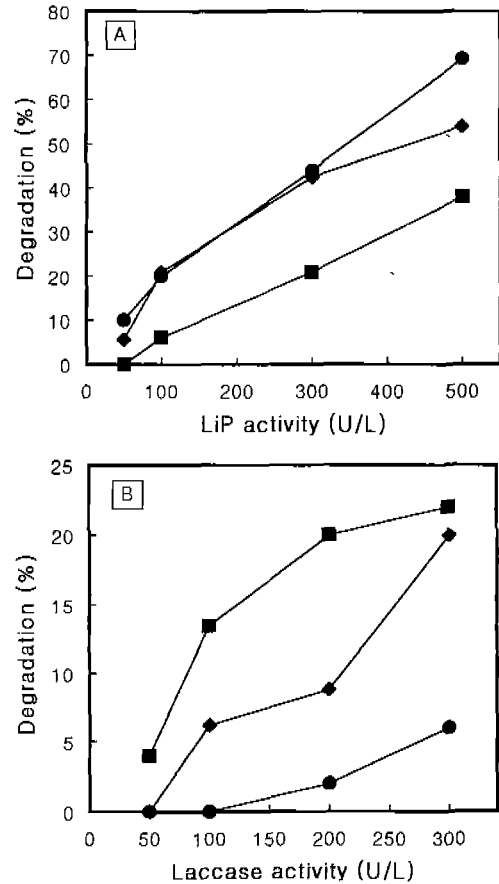


Fig. 4. Degradability and enzyme activity in the degradation of PAH and PCP.

Laccase and LiP was prepared by concentration from culture supernatant of *Trametes* sp. CJ-105, *Fomes* sp. CJ-315 and *Pleurotus* sp. CJ-212. ◆, Anthracene; ■, Pyrene; ●, Pentachlorophenol.

난분해 물질 분해와 리그닌 분해효소와의 상관성

백색부후균이 난분해 물질의 분해에 관여할 때에 리그닌 분해효소와의 상관성을 확인해 보기 위하여, 상기 염료의 색도 제거능력이 우수한 것으로 선별된 3종의 균주 각각을 배양하여 배양액으로부터 얻은 laccase와 LiP의 조효소액을 사용하여 PAH 및 PCP의 분해실험을 진행하였다. 그 결과 효소의 활성도에 따른 난분해 물질별 분해율의 관계를 Fig. 4에 나타내었으며 그림에서 보듯이 각 물질의 분해율과 리그닌 분해효소의 활성도는 거의 선형적으로 비례함을 알 수 있다. 이 결과는 Sack와 Gunther[23]등이 난분해물질의 분해가 리그닌 분해효소와 관계된다는 보고와 일치하며, 이로써 PAH 및 PCP의 분해에 리그닌 분해효소가 중요하게 작용함을 알 수 있었고, PCP의 경우는 위의 선별 균주의 난분해물질의 분해에서도 언급했듯이 리그닌 분해효소에 의하지 않고도 분해될 수 있다고 판단된다. 따라서 난분해성 물질의 분해에서도 염료의 색도 제거의 경우와 마찬가지로 리그닌 분해효소가 작용하는 것을 확인할 수 있었다.

이상과 같이 본 연구에서 최종 선별한 균주인 염료의 색도 제거능력이 우수한 백색부후균 *Trametes* sp. CJ-105, *Pleurotus* sp. CJ-212, *Fomes* sp. CJ-315는 리그닌 분해 효소균에 의하여 방향족 화합물의 구조를 지닌 각종 난분해성 물질을 분해할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 염료의 색도 제거능력을 측정함으로써 난분해성 화합물의 분해능력이 우수한 백색부후균을 선별하는 방법에 이용할 수 있음을 확인하였고, 향후 배양 최적조건의 확립, 효소생산의 최적화, 염료 분해기작과 난분해성 물질의 분해성 연구등을 진행하여 그 결과를 활용하면 염색폐수 및 매립지의 침출수 처리 등 생물학적 환경정화기술(Bioremediation)에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

한국에서 자생하는 버섯으로부터 염료의 색도 제거능력이 우수한 균주를 분리하기 위하여 각종 염료를 함유한 평판배지 상에서 성장성과 색도 변화를 관찰한 결과 우수한 균체 성장과 색도 제거능력을 지닌 3가지 균주를 최종 선별하였으며, 선별된 균주의 특성을 조사하여 *Trametes* sp. CJ-105, *Pleurotus* sp. CJ-212, *Fomes* sp. CJ-315로 동정하였다. 이 균주들을 각각 remazol brilliant blue R 및 Acid red 264를 함유한 액체배지에서 배양한 결과, 배양 2~8일째에 거의 색도가 제거되었고 리그닌 분해효소인 laccase의 활성이 다량 존재하였다. 선별된 균주의 색도 제거능력과 laccase, LiP, MnP의 활성은 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 염료의 색도 제거는 리그닌 분해효소에 의한 것으로 판단되었다. 한편 선별된 균주는 PAH 및 PCP의 분해에도 좋은 활성을 가지며 난분해 물질의 분해에도 리그닌 분해효소의 활성이 상관관계가 있음을 확인하였다. 따라서, 선별된 균주가 향후 염색폐수의 색도 제거, 난분해 물질의 분해 또는 매립지 침출수의 처리등에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 말

본 연구는 1998년도 산업자원부 공업기반기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Bogan, B. W. and R. T. Lamar. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(5): 1597-1603.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(5): 1876-1880.
- Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(1): 154-158.
- Bumpus, J. A. and S. T. Dust. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9): 2001-2008.
- Chivukula, M. and V. Renganathan. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4374-4377.
- Cho, H. J., M. J. Shim, E.C. Choi, and B. K. Kim. 1988. Studies on constituents of higher fungi of Korea(LVII): Comparison of various antitumor constituents of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **16**(3): 162-174.
- Field, J. A., E. de Jong, G. Feijoo-Costa, and J. A.M. de Bont. 1993. *Trends Biotech.* **11**: 44-49.
- Go, S.J., C.H. You, and Y.H. Park. 1984. Effects of temperature, pH, carbon and nitrogen nutrition on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju*(Fr.) Sing. and *P. ostreatus*(Fr.) Quel. *Kor. J. Mycol.* **12**(1): 15-19.
- Hammel, K. E., W. Z. Gai, B. Green, and M.A. Moen. 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(6): 1832-1838.
- Han, M. D., H. Jeong, J. W. Lee, S. J. Back, S. U. Kim, and K. H. Yoon. 1995. The composition and bioactivities of ganoderan by mycelial fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* **23**(4): 285-297.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 125-135.
- Hotta, T., S. Enomoto, C. Yoshikumi, M. Ohara, and S. Ueno. 1980. Protein-bound polysaccharides. *U.S. Patent* 4, 271,151.
- de Jong, E., F. P. de Vries, J. A. Field, R.P. van der Zwan, and J.A.M. de Bont. 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. *Mycol. Res.* **96**(12): 1098-1104.
- Joshi, D. K. and M. H. Gold. 1993. Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(6): 1779-1785.
- Knapp, J. S., P. S. Newby, and L. P. Recce. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 664-668.
- Kotterman, M. J., H. J. Rietberg, A. Hage, and J. A. Field. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **57**(2): 220-227.
- Lee, J. Y. 1985. *A Pictorial Book of the Korean Flora*, Vol. 28. The Ministry of Education.
- Martins M. A., M. H. Cardoso, M. J. Queiroz, M. T.



- Ramalho, and A.M. Campos. 1999. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. *Chemosphere* **38**(11): 2455–2460.
19. 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**(12): 2885–2889.
20. Park, K. S., J. Y. Lee, S. J. Lee, S. H. Kim, and J. S. Lee. 1992. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor*(Fr.) *Quel. Kor. J. Mycol.* **20**(1): 72–76.
21. Pease, E. A., A. Andrawis, and M. Tien. 1989. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13531–13535.
22. Roy-Arcand, L. and F. S. Archibald. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes*(*Coriolus*) *versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 194–203.
23. Sack, U. and T. Gunther. 1993. Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *J. Basic Microbiol.* **33**(4): 269–277.
24. Sayadi, S. and R. Ellouz. 1992. Decolorization of olive mill waste-waters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin-degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 813–817.
25. Sayadi, S. and R. Ellouz. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3): 1098–1103.
26. Suzuiki, I., K. Hashimoto, S. Oikawa, K. Sato, M. Osawa, and T. Yadomae. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a  $\beta$ -glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(2): 410–413.
27. Tayal, A. K., L. Das, and I. Kaur. 1999. Biodegradation of pentachlorophenol (PCP) by white rot fungal strains screened from local sources and its estimation by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **13**(3): 220–224.
28. Tien, M. and T.K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**: 238–249.
29. Vares, T., M. Kalsi, and A. Hatakka. 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10): 3515–3520.
30. Yoshikumi, C., T. Wada, H. Makita, and T. Audo. 1977. Method of producing a stable monokaryotic mycelium of *Coriolus versicolor* and its use in polysaccharide production. *U.S. Patent 4,159,225*.
31. Yoshikumi, C., Y. Omura, and T. Hotta. 1979. Pharmaceutical composition comprising a nitrogen-containing polysaccharide and an antibiotic agent and a method of treating an infectious disease therewith. *U.S. Patent 4,268,505*.

(Received May 27, 1999)