

방향족 유해물질 생분해에 관여하는 토양 방선균의 분리 및 특성 연구

안혜련* · 김용수*

한국외국어대학교 자연과학대학 환경학과

요약문

본 연구의 목적은 방향족 화합물의 생분해능이 우수한 토양 방선균을 분리하여 방선균에 의한 방향족 화합물의 생분해 기작 및 생분해 특성을 연구하는 것이다. 본 연구실에서는 phenol을 model compound로 실험한 결과, 일반 토양에서 분리한 많은 방선균들이 비록 농도의 차이를 보이기는 하지만 phenol의 생분해능을 갖고 있었다. 그러나 이들 대다수의 방선균들을 낮은 농도의 phenol에서만 일정 기간 성장을 하며, morphological differentiation 및 포자의 형성과 같은 일반적인 방선균의 성장 특성은 전혀 관찰되지 않았다. 이들 중 몇 종류의 분리된 방선균들은 낮은 농도에서의 우수한 성장은 물론이고 상당히 높은 농도 (7mM)에서도 phenol을 유일한 탄소 및 에너지원으로 사용하여 성장하며 정상적인 morphological differentiation을 진행시킴이 관찰되었다. 특히 PD001로 명명된 phenol 분해능이 우수한 방선균에서는 일반적인 방선균 성장 온도 (30°C) 보다 높은 45°C의 고온에서 더 빠른 성장을 보이는 고온성 방선균의 특징도 관찰되었다.

I 서론

PCP (phentachlorophenol)를 비롯한 방향족 유해 독성 물질은 토양 내에서 매우 안정적인 방향족 고리 화합물로 존재하며, 이런 화합물들은 살균제, 방부제, 산업용 접착제 (wood preservation and textile treatment), 산업용 원료, 곰팡이 제거제, 멸균제 등 다양한 용도와 여러 장소에서 이용되고 있다. 반면 인간에게 장시간 노출되었을 경우 만성적인 독성을 띄어 구토, 설사, 식욕 감퇴, 두통, 기절, 현기증, 정신착란, 피부 발진 등의 증세를 보이고 간장 장애나 피부 변색 등의 문제를 일으키는 등의 그 위해성이 커서 2,4,6-Trichlorophenol 의 경우는 1986년부터 미국에서의 생산이 전면 금지되었다 (1, 2). 또한 생물학적 폐수처리시에 방해가 되고, 상수원에 유입시 여러 가지 공중 보건 상의 문제 등을 야기시킨다 (3, 4). 따라서 현행 수질 환경보전법에서는 Phenol을 특정 유해 물질로 규정하여 엄격히 관리하고 있다. 오염된 환경으로부터 방향족 화합물을 제거하기 위해 물리, 화학적인 방법이 이용되기도 하지만 상대적으로 높은 처리비용과 2차 오염의 문제가 있으므로 특정 미생물을 이용한 생물학적 처리 방법이 많이 개발되고 있다 (5).

방향족 화합물의 생분해 기작은 일반적으로 catechol 혹은 protocatechuate와 같은 중간 체를 거쳐 ortho 나 meta cleavage 기작에 의해 분해되며, 여러 다양한 자연 환경에 존재하는 토양 세균인 *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* 등이 뛰어난 분해능을 갖고 있음은 이미 잘 알려진 사실이다 (6, 7, 8, 9). 토양 미생물을 이용한 방향족 유해 독성 물질의 bioremediation에 관한 연구는 현재 국내외에서 꾸준히 진행되고 있으나, 대부분이 *Pseudomonas*와 이와 생리학적으로 유사한 미생물에 국한되어 있다. 그러나 보다 효과적으로 다양한 화학적 구조의 방향족 유해물질을 생복원하기 위해서는 방향족 화합물의 생분해능이 우수한 새로운 자연 미생물의 개발과 그 특성 연구가 필요하다. 따라서 방향족 화합물의 생분해에 관여하는 유용한 방선균의 분리 및 특성 연구는, 방선균을 이용한 유해 물질 복원의 가능성을 타진함과 동시에 여러 자연환경에 존재하는 다양한 방선균의 생태학적 특성을 이해하는데도 중요하리라 확신한다.

II 연구배경

방선균은 다양한 자연 환경에 존재하는 그람 양성 박테리아로서 필라멘트 형태를 띤 대표적인 토양 미생물이다 (10). 방선균은 일반적인 토양에서 분리 할 수 있는 미생물의 약 20%까지를 차지하며, 토양에서 나는 독특한 흙 냄새는 바로 방선균이 생성하는 geosmin 이라는 것은 주지의 사실이다 (11). 방선균은 우선 포자를 형성하고 이것이 발아하면 substrate mycelia 라는 독특한 형태의 hyphae를 형성한다. 마치 식물이 뿌리를 내리듯이 밑으로/옆으로 mycelia가 자라게 되다가 일정 시간이 지나고 외부로 자극이 주어지면 방선균은 substrate mycelia를 바탕으로 위로 자라는 aerial mycelia 라는 형태를 띠게 된다. 이런 직선 형태의 mycelia는 결국 코일처럼 꼬이면서 다시 포자를 형성하면서 성장 주기를 마감한다 (12). 오래 전부터 방선균이 미생물을 연구하는 많은 학자들에게 중요한 연구 대상이 되었던 가장 큰 이유는 다른 일반 미생물에서는 볼 수 없는 독특한 발생학적 성장 주기 (developmental life-cycle)를 갖고 이에 따른 형태적 변이 (morphological differentiation)을 하며, 이와 더불어 산업적으로나 의학적으로 유용한 항생제, 효소 반응 억제제, 염료, 향료 등의 상당수가 방선균에 의해 만들어지는 2차 부산물 (secondary metabolite)에 의한 것이기 때문이다 (13). 또한 이러한 형태적 변이를 보이는 방선균은 자연에 존재하는 난 분해성 화합물을 포함한 다양한 구조의 방향족 화합물들을 분해하는 능력이 탁월하여, 생태학적인 관점에서 볼 때도 매우 유용한 환경 미생물로 인식되어 왔다.

III 연구방법

토양 방선균이 여러 다양한 구조의 난분해성 방향족 화합물의 우수한 분해능을 갖는다는 특성을 이용하여, 본 연구실에서는 대표적인 방향족 화합물인 phenol을 model compound로 사용하여 phenol이 유일한 탄소원으로 포함된 최소 영양 배지에서 방선균의 정상적인 형태적 변이가 관찰되는 토양 방선균들을 선별하였다. 이들 중 고 농도 (7mM) Phenol이 함유된 배지에서도 성장이 가장 우수하고 빠른 방선균을 분리하여 PD001이라 명명 하였다.

IV 결과 및 고찰

자연 환경에 존재하는 대부분의 방선균이 방향족 화합물의 분해 능력을 갖고 있음은 이미 잘 알려진 사실이며, 이미 1982년에 Phenol 분해능이 우수한 *Streptomyces setonii*가 분리되어 방선균에 의한 방향족 화합물의 생분해 기작이 ortho pathway로 진행됨을 여러 중간 체들의 구조를 밝힘으로써 증명되었다 (14). 본 연구실에서 phenol을 model compound로 실험한 결과, 일반 토양에 분리한 많은 방선균들은 비록 농도의 차이를 보이지만 Phenol의 생분해능을 갖고 있었다. 그러나 이들 대다수의 방선균들을 낮은 농도의 Phenol에서만 일정 기간 성장을 하며, morphological differentiation 및 포자의 형성과 같은 일반적인 방선균의 성장 특성은 전혀 관찰되지 않았다. 흥미롭게도 이들 중 몇 종류의 분리된 방선균들은 낮은 농도에서의 우수한 성장은 물론이고 상당히 높은 (Phenol 7mM) 농도에서도 Phenol을 유일한 탄소 및 에너지원으로 사용하여 성장하며 정상적인 morphological differentiation을 진행시키는 것이 관찰되었다. 이들 중 Phenol 생분해능이 가장 우수한 방선균을 선별하여 (PD001이라 명명함) 다양한 환경에서의 성장 특성을 파악하고 Phenol 이외의 몇 가지 다른 방향족 화합물에서의 생분해 정도를 관찰하였다.

PD001의 온도에 따른 성장 및 형태적 변형을 관찰하기 위해 일반적으로 방선균의 성장에 적합한 30°C부터 45°C까지 온도를 설정하여, 토양에서 방선균을 분리할 때 유용하게 쓰이는 영양분이 풍부한 배지 (R2YE)에서 성장시킨 결과 일반적인 방선균과는 달리 45°C에서 빠른 성장이 관찰되었다. 이는 앞서 언급한바 있는 Crawford 교수가 분리한 thermophilic *Streptomyces setonii*의 성장 온도 특성과의 유사성을 보인다. Phenol 이외의 방향족 화합물인 Benzene, Toluene, Xylene을 모델 화합물로 하여 1mM의 낮은 농도에서부터 10mM의 높은 농도까지 포함하는 배지에서 PD001을 포함한 여러 방선균을 성장시킨 결과 고농도까지 (7mM) 방향족 화합물을 유일한 탄소원으로 이용하여 형태적 변이를 일으키는 것을 관찰하였다. 비록 이들 방향족 화합물의 높은 휘발성을 고려한다면 배지에 실제로 포함된 방향족 화합물의 농도가 설정한 값보다 낮을 수 있으나, 방향족 화합물 이외의 탄소원이 없는 배지에서 방선균이 성장을 한다는 사실은 선별한 방선균들이 Benzene, Toluene, Xylene등을 유일한 탄소원으로 사용한다는 것을 알 수 있으며 이는 방향족 화합물에 대한 방선균의 우수한 생분해능을 뒷받침하는 것이다.

미국 영국을 비롯한 국내외의 많은 학자들이 방향족 화합물의 생분해에 관련하는 특정 미생물을 선별하여 그 특성을 파악하는 연구를 꾸준히 진행하고 있으나, 안타깝게도 이러한 연구는 대부분 그램 음성 미생물에 국한되어 있다. 이는 대부분의 방선균에 대한 연구는 유용한 항생제를 포함한 2차 부산물의 생합성에 집중되었기 때문에 이러한 방선균의 연구 결과가 환경 정화적인 측면에서 응용되지 못했기 때문이다. 따라서 방향족 화합물의 생분해에 관여하는 토양 방선균을 분리하여 그 특성을 파악하는 연구의 성공적인 결과는 방향족 유해 물질의 생분해에 관여하는 이제까지 밝혀지지 않았던 새로운 유용한 토양 미생물의

개발이라는 점에서 생태학적 뿐만 아니라 환경정화적인 측면에서 그 의의가 매우 높으리라 확신한다.

V 참고문헌

1. R. Bellandi, "Innovative Engineering Technologies for Hazardous Waste Remediation", O'Brien & Gere Engineers, Inc. 1995. p. 209-250
2. 유해 화학 물질 편람 (1991) 유해화학물질연구회편 동화 기술. 1 : 486
3. Crawford, R.L., Pignatello, J.J., Martinson, M.M., Steiert, J.G., and Carlson, R.E. (1983) Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial freshwater streams. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 1204-1031
4. Crawford, R.L., Saber, D.L., (1985) Isolation and characterization of Flavobacterium strain that derade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 1512-1518
5. 朴鍾基, "Bacillus sp.에 의한 Phenol 의 생분해", 慶北 大學敎대학원 . 1995.
6. Gurujeyalakshmi, G. and Oriel, P. 1988. "Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 505-502
7. Ornston, L. N. and E. L. Neidle. 1991. Evolution of genes for the β -ketoakipate pathway in *Acinebacter calcoaceticus*, In the Biology of *Acinebacter*. Ekited by K. Towner, E. Begogne-Berezin and C. A. Fewson, pp.201-238. FEMS Symposia Series. Plenum press.
8. Yeh, W.K., D.J Gibson and T.N. Liu. 1977. Toluene dioxygenase : A multicomponent enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 401-410
9. Zylstra, G. J. and D. T. Gibson. 1992. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* 264 : 14940-14946
10. Stainer, R. Y., Ingraham, J.I., Wheelis, M.L. and Painter, P.R. 1986. In the microbial world. Ch24. pp 506-519.
11. Dowrkin, M. 1985. In Developmental biology of the bacteria. Ch3. pp 22-49.
12. Chater, K. F. and Merrick, M. J. 1979. In Development biology of prokaryotes. Parish, J. H. (Ed.). Univ. of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp. 93-114
13. Lancini, G. and Lorenzetti R. 1993. In Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Plenum Press, New York.