

木質分解菌에 의한 4,5,6-Trichloroguaiacol의 微生物分解*¹

安世喜*² · 崔仁圭*²

Biodegradation of 4,5,6-Trichloroguaiacol by White Rot Fungi, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Inonotus cuticularis**¹

Sye-Hee Ahn*² · In-Gyu Choi*³

ABSTRACT

In order to evaluate the biodegradability and mechanism of 4,5,6-trichloroguaiacol (TCG) produced from bleaching process in pulp mill by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Inonotus cuticularis*, changes in TCG and its metabolites during biodegradation were analyzed by HPLC, and GC/MS spectrometry.

By three fungi, the maximum biodegradability against TCG were very quickly reached, compared with other chlorinated aromatic compounds such as PCP. Within 24 hrs, *T. versicolor* indicated up to 95% of TCG removal rate, and *P. chrysosporium* and *I. cuticularis* also showed more than 80%, and 90%, respectively. Particularly, in case of *T. versicolor*, the removal rate of TCG after 1 hr. incubation was reached to approximately 90%, implying very rapid metabolization of TCG. However, by analyzing the filtrates extracted from TCG containing culture by GC/MS, the major metabolites at initial stage of biodegradation were dimers, indicating that the added TCG monomers were quickly polymerized. The others were trichloroveratrole, dichloroguaiacol, and trichlorobenzoic acid, suggesting that TCG may be biodegraded by several sequential reactions such as polymerization, oxidation, methylation, dechlorination, and hydroxylation.

In other experiments, the extracellular fluid which did not contain any fungal mycelia was used to evaluate the effect of mycelia on TCG biodegradation. The extracellular fluid of *T. versicolor* also biodegraded TCG up to 90% within 24hrs, but those of *P. chrysosporium* and *I. cuticularis* did not show any good biodegradability. *T. versicolor* showed the highest value of laccase, and other two fungi indicated a little activity of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP). In addition, the laccase activity of *T. versicolor* was very linearly proportional to the removal rate of

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

*² 대구대학교 산림자원학과 Dept. of Forest Resources, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea

*³ 임업연구원 임산공학부 Forestry Research Institute, Forest Products Technology Div. 207 Cheongnyangri Dong, Dongdaemoon Gu, Seoul 130-012, Korea

TCG during incubation, in other words, showing the induction effect against TCG. Consequently, the biodegradation of TCG was very dependent upon the activity of laccase.

Keywords : 4,5,6-trichloroguaiacol, biodegradation, wood rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Inonotus cuticularis*

1. 서 론

1960년대 이후 세계, 농약, 절연유, 방부제 등의 급격한 사용 증가로 인하여 대량으로 이용되었던 유기염소화합물 (Kiyohara 등, 1992)은 독성이 알려지면서 안전한 재처리가 현재는 중요한 환경현안으로 대두되고 있다. 그 중에서도 페놀성 유기염소화합물은 독성이 강하고 발암성이며 미생물에 의한 분해가 어려운 난분해성 물질로 보고되었고(Rochkind-Dubinsky 등, 1987), 과거부터 지금까지 자연상태에서 그대로 축적되어져 중요한 오염물질로 분류되고 있다.

현재 펄프공장은 표백공정에 상당한 양의 염소를 이용하고 있으며, 이렇게 이용된 염소는 펄프 및 표백공정에서 분해된 저분자 리그닌과 반응하여 유독한 염소화합물 형태로 다량 발생되고 있는 실정이다. 이 같은 과정에서 발생되고 있는 염소화합물을 살펴보면 주로 페놀성 염소화합물로서 dichlorophenol, dichloroguaiacol, trichlorophenol, TCG, tetrachloroguaiacol (Huynh 등, 1985)과 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (Hansen, 1991; Takada 등, 1996) 등이고 chlorinated dehydroabiatic acid 등의 resin acid도 발견됐다 (Mohn & Stewart, 1997). 이러한 화합물은 활성슬러지법, lagoon법, biofilm법 등에 의하여 처리를 시도하고 있으나 저분자화로 인하여 처리가 미흡할 때는 방류되어 수중생태계의 어패류에 흡수되어 인간에게 해를 주게 된다 (Walden & Howard, 1981). 또한 위에 열거한 처리 방법의 적용은 2차오염을 발생시키고 있어 현재는 미생물을 직접 이용하는 방법이 제안되고 있다 (Huynh 등, 1985). 비생체화합물 (xenobiotics)인 유기염소화합물은 미생물에 의하여 완벽하게 분해가 될 수 없다고 생각되었지만 최근들어 효소들의 cometabolism에 의하여 분해가 가능하다고 여겨지고 있다 (Glenn & Gold, 1985; Bumpus 등, 1985). 이러한 분해균으로서 *Pseudomonas*속 등의 세균이 많이 이용되었고

(Arensdorf & Focht, 1994; Kiyohara 등, 1992), 균으로부터 효소계의 plasmid상의 코드를 변환시켜 염소치환에 특이한 분해를 보이는 신규효소계를 생성함을 이용하는 분자육종법도 대두되고 있다. 유기염소화합물의 생분해 처리시 가장 중요한 단계는 탈염소화반응으로 염소가 본체 화합물로부터 제거되면 기존의 미생물 효소계의 작용에 의하여 쉽게 분해가 이뤄진다 (Valli 등, 1992). 이 과정에서 방향족염소화화합물은 우선 방향환이 산화적으로 개열한 후 lactone화 및 catechol을 거쳐서 분해가 전개되는 경우가 많으며 (Arensdorf & Focht, 1994), 일반적으로 관여하는 반응은 환원, 산화, 메틸화, 탈염소화 반응이다 (Valli 등, 1992; Rasmussen 등, 1995). 그러나, 지금까지 주요한 펄프 표백과정중의 부산물인 TCG에 대한 미생물분해의 가능성 여부, 분해기작과 대사산물에 대한 명확한 연구가 없었다.

본 연구에서는 *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Inonotus cuticularis*의 3균주에 대하여 액체배지상에서 4,5,6-trichloroguaiacol에 대하여 분해력을 검정하고, 중간대사물질이나 대사물질을 GC/MS로 분석하여 TCG의 분해기작을 추론하고 효소역가의 측정 및 유도 (induction)효과를 추적하여 균체외효소의 관여여부를 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시약

4,5,6-Trichloroguaiacol (TCG; purity, 99%)은 Cambridge Isotope Laboratories에서 구입하여 사용하였으며, 균주배양시약 및 추출용매는 각각 Difco 및 Wako의 특급시약을 사용하였다.

2.2 균주 및 배양

한국 임업연구원 미생물화학실 보존 균주인 *P. chrysosporium* (PH), *T. versicolor* (CO), *I. cuticularis* (IN) 3종의 균주를 이용하였다. 효소의

생산을 증가시키기 위하여 PDA배지에서 배양한 후 다시 YMPG 배지 (1 l의 증류수당, glucose 10g, malt extract 10g, bacto-peptone 2g, yeast extract 2g, asparagine 1g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 1g, thiamine 1mg, bacto-agar 20g)로 옮겨져 재배양시킨 것을 shallow stationary phase 액체배지 (Tien & Kirk, 1984) 10ml를 (pH 5.4) 함유한 100 ml의 배양플라스크에 접종하여 30°C에서 배양을 했다. 그러나, *P. chrysosporium*은 pH 4.5, 37°C에서 따로 배양했다. 7일간 배양되는 동안 배양플라스크는 99% 순도의 산소로 3일 후부터 매일 flushing시켰다.

2.3 TCG 분해력 및 분해산물

균사의 생장이 최고조에 달한 배양 7일째에 20mM의 TCG stock solution으로부터 50 μ l의 TCG를 10ml의 shallow stationary phase 액체배지를 포함한 플라스크에 첨가하여 액체배지상의 TCG 농도를 100 μ M로 조정하였다. 1, 3, 7, 24시간, 또는 1, 7, 21일이 경과한 후에 각각의 배양플라스크에 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-15R 원심분리기에서 5000rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 0.22 μ m microfilter를 이용하여 여과를 했다.

2.4 분석

여과액은 직접 Shim-pack CLC-ODS (0.15m x 6.0 ϕ)를 장착한 Shimadzu SPD-10A HPLC에서 분석했다. HPLC eluant는 0.05% phosphoric acid-acetonitrile (25:75)을 이용하였으며 210nm와 218nm dual lamp에서 검출하였다. 균에 의한 TCG 분해시의 분해산물을 조사하기 위하여 추출된 액을 배양일별로 농축을 시켜 -20°C에서 보관하였다. 추출액은 최종적으로 질소가스로 bubbling을 시키면서 100 μ l로 농축된 후 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide로 유도체화 시킨 후 60°C에서 1시간 반응시킨 다음 JEOL JMS-DX303 HF GC/MS (Shimadzu HiCap-CBP1-M25-025 column, 25m, 0.25 μ m, 0.25mm)를 이용하여 분석하였다.

2.5 효소활성 및 역가 측정

TCG 분해시 균주의 효소적 특성에 대하여 알아보 고자 효소활성역가의 유도 효과를 조사하였다. 간단하게 실험방법을 적으면 아래와 같다.

YMPG 배지에서 자란 4mm 크기의 plug을 질소제한 배지인 shallow stationary culture에 4내지 5개를 넣고 액체배양을 했다. 5, 6일 후 균사의 표면 아래에서 소량의 균체의액을 채취하여 활성역가의 측정에 이용했다. induction 효과를 측정하기 위하여는 균사가 생장한 5, 6일후에 TCG를 첨가한 후 분해력 측정시 이용한 배양일수 및 시간별로 시료를 채취하여 활성역가를 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. lignin peroxidase (LiP)의 활성역가는 0.1M tartrate buffer (pH 3.5)에서 veratryl alcohol (100mM)을 이용하여 310nm에서 측정하였으며, manganese peroxidase (MnP)와 laccase의 활성역가는 0.1M lactate buffer상에서 ABTS (0.8g/L), MnSO₄ (100 mM)를 이용하여 414nm에서 측정하였다. 활성역가의 계산은 veratryl aldehyde는 $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ABTS는 $\epsilon_{414} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 적용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 TCG에 대한 분해력

공시된 3균주의 배양후 추출된 TCG의 HPLC상에서 농도의 변이는 그림 1의 *T. versicolor*에 의한 것과 같으며, 표준 TCG의 농도별 검량선을 작성한 후 실제 측정된 peak의 면적을 대비하여 실제 농도를 얻었으며, 배양기간 중에 계속적으로 표준농도를 이용하여 검량선을 검증하였다. 목질분해균에 의한 리그닌 (Kirk 등, 1978) 및 유기염소화합물 (Joshi & Gold, 1993) 분해력은 배지의 조성시 질소 영양분에 의하여 영향을 받으므로 질소가 제한된 배지에서 실험하였다. 질소제한배지인 shallow stationary 배지에서 자란 3종류의 균주에 대하여 배양시간별 TCG에 대한 분해력은 그림 2와 같다.

그림 2는 균사가 완전하게 생장한 후 첨가된 TCG에 대한 시간별 분해율을 나타냈다. TCG의 분해는 단시간에 이뤄져서 24시간 이내에 3균주 모두 80% 이상의 분해율을 나타냈다. 각각 균주의 시간별 분해율을 살펴보면, *T. versicolor*는 1시간 내에 85% 이상의 분해를 보이면서 24시간 이후에는 95% 정도에

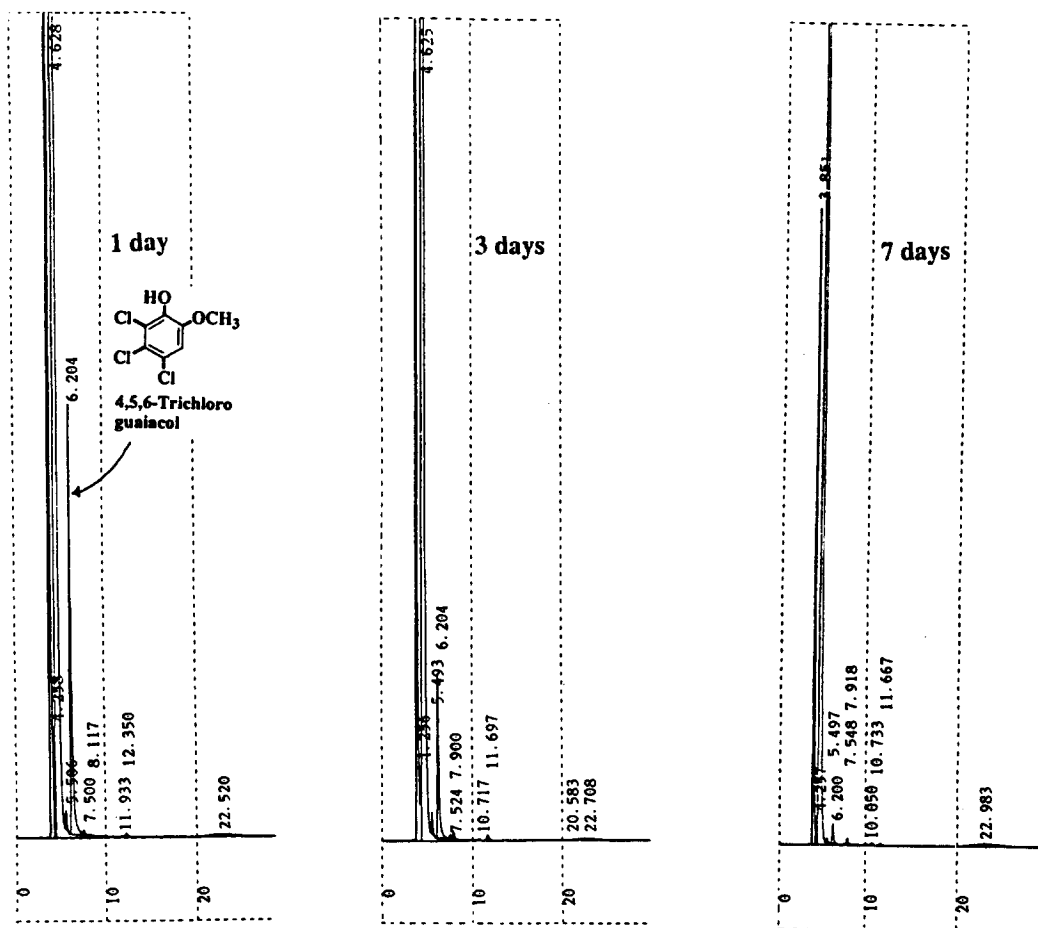


Fig. 1. Changes in the concentration of TCG analyzed by HPLC during biodegradation by *T. versicolor*

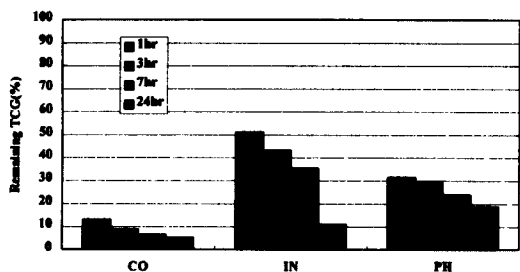


Fig. 2. TCG biodegradation by *T. versicolor* (CO), *I. cuticularis* (IN) and *P. chrysosporium* (PH) in the nitrogen-limited culture medium depending on incubation hours

도달하였다. *I. cuticularis*는 서서히 분해가 진행되어 초기에는 약 50% 정도의 분해율을 보였으나 24시간이 지나면서 약 90% 정도의 TCG분해율을 나타냈으며, *P. chrysosporium*은 3균주중 제일 낮은 분해율인 약 82% 정도를 보였다. 일반적으로 3균주 모두 1시간 이후의 분해속도는 초기와 비교하여 상대적으로 느렸으나, 실제 분해된 또는 변형되고 남은 TCG의 절대적인 양에 있어서는 첨가된 양에 비하여 0.5ppm 이내로 극소량이었다. 초기의 빠른 TCG 분해는 다른 화합물 또는 중간화합물로 변환(transformation)된 것으로 여겨져서 초기의 변환화합물을 GC/MS를 이용하여 확인하여 차항의 분해메카니즘에서 설명하였다. 또한 단시간이 아닌 21일까지 배양을 시켰을 때 3균주 모두 7일 후에는 TCG를 검출할 수 없었으며, HPLC 스펙트럼 상에서도 여러 개의

peak가 나타나 다른 분해산물로 변형된 것으로 나타났다. 7일 이후의 HPLC 상에서의 peak의 수나 양이 작고 적게 나타나 분해대사의 최종산물인 CO₂나 H₂O로의 완전대사가 이뤄진 것으로 짐작할 수 있었다. Joshi & Gold (1993)도 2,4,5-trichlorophenol가 2일 이내에 40% 정도가 CO₂로 mineralization되었다고 보고하였고, Bumpus 등(1985)은 ¹⁴C labeled 유기염소화합물의 분해시 ¹⁴CO₂의 발생이 3일에서 6일 사이에 시작된다고 보고하였다.

미생물분해에 의한 TCG의 분해가 특이하게도 단 시간내에 분해되는 것을 좀 더 자세히 알아보기 위하여 균사를 제거한 여과액 (균체외액) 상태에 직접 TCG (20mM의 50 μ l)를 첨가하여 배양시킨 결과는 그림 3과 같다. *T. versicolor*의 경우는 그림 2에서처럼 균사의 존재 유무에 관계없이 거의 유사한 분해양상을 보여서 균체외액에 함유되어 있는 균체의 효소의 영향에 의하여 분해가 이뤄짐을 알 수 있었다. 반면 *I. cuticularis*와 *P. chrysosporium*은 여과액 상태에서의 TCG 분해는 정상적인 균사함유 상태보다 분해력이 상당히 떨어짐을 보였다. 특히 *P. chrysosporium*의 경우는 균사가 존재하는 상태에서는 배양 24시간 이내에 80% 이상의 분해율을 보였으나 여과액 자체만으로는 20% 정도밖에 분해력을 보이지 않았다. 이러한 결과로부터 3균주 중에 *T. versicolor*와 *I. cuticularis*에 의한 TCG 분해양상은 균사생장과 함께 발생하는 균체외효소의 역할이 상당히 중요한 것으로 나타났다.

균체외효소의 역할을 조사하기 위하여 TCG를 첨가하지 않은 상태에서 각 균주의 ligninases 활성역가를 측정하고, TCG를 첨가한 후 배양시간별로 변

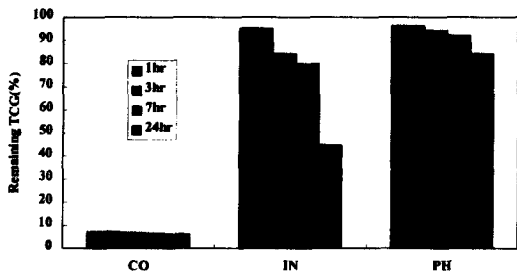


Fig. 3. TCG biodegradation by the extracellular filtrates of *T. versicolor* (CO), *I. cuticularis* (IN) and *P. chrysosporium* (PH) in the nitrogen-limited culture medium depending on incubation hours

화하는 역가의 변이를 측정하여 TCG에 의한 유도 효과를 측정된 결과는 그림 4, 5, 6과 같다. *T. versicolor*는 TCG를 첨가하지 않은 초기에 상당한 laccase 활성역가를 가지며, 최고의 TCG분해력을 보이는 1시간째에는 아주 적은 양으로 감소했다가 이후 점차 증가 추세를 보여 24시간 후에는 원래의 활성역가에 도달하였다 (그림 4). 이는 초기에 생성된 laccase의 대부분이 TCG의 분해에 사용된 후에

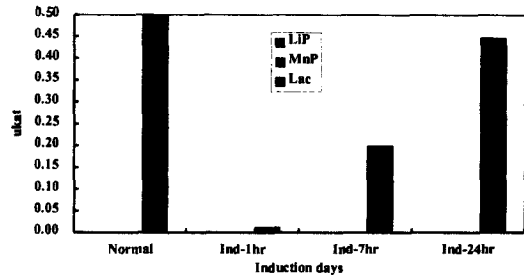


Fig. 4. Change in ligninase activity by the addition of TCG (50 μ l of 20mM) to the culture medium of *T. versicolor*

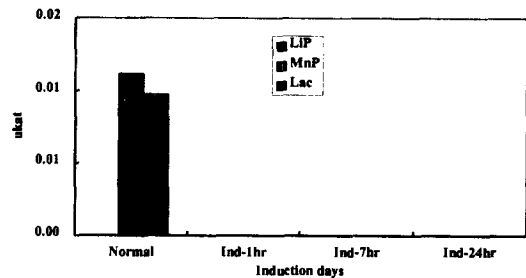


Fig. 5. Change in ligninase activity by the addition of TCG (50 μ l of 20mM) to the culture medium of *I. cuticularis*

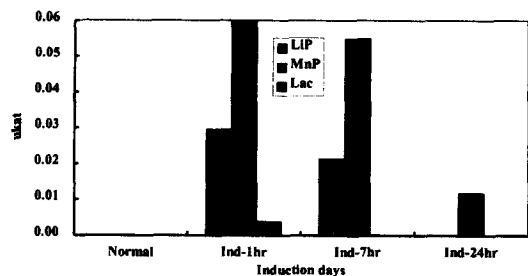


Fig. 6. Change in ligninase activity by the addition of TCG (50 μ l of 20mM) to the culture medium of *P. chrysosporium*

남아있는 TCG의 영향에 의하여 다시 균체의효소의 생성이 이뤄짐을 추론할 수 있다. 그러나 특이한 점은 다른 역가인 LiP나 MnP는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 또한 *I. cuticularis*의 경우는 원래 소량의 laccase의 활성역가를 보였으나 TCG를 첨가하면서 전혀 나타나지 않았으며(그림 5), 여과액을 사용한 TCG분해에 있어서 아주 낮은 분해율을 보인 *P. chrysosporium*은 laccase에 대한 활성역가는 전혀 없었으며, 대신 LiP나 MnP가 TCG를 첨가한 1시간 후부터 나타났다가 점차 감소하는 경향을 보였다(그림 6). 이러한 결과로부터 TCG의 분해는 laccase의 유무 및 양과 긴밀한 상관관계를 갖고 있는 것으로 추측할 수 있으며, 다른 LiP나 MnP는 TCG의 분해에 있어서 역할이 미미한 것으로 추론할 수 있으나 Valli & Gold(1991)와 Valli 등(1992)은 각각 2,4-dichlorophenol과 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin의 분해시에 LiP나 MnP의 산화 환원에 의한 분해 및 균체내효소(intracellular enzyme)의 역할을 강조하여 전혀 배제할 수는 없다.

또한, 초기의 빠른 분해능은 laccase의 효소적 특성상 TCG의 polymerization에 의한 것이 아닌가 추측되었으며 HPLC상에서 broad한 peak (retention

time = 25min./30min. run)의 존재와 침전물이 소량 형성되는 것은 이를 증명할 수 있겠다. 그러나 trichlorophenol이나 dichlorophenol은 반응성이 뛰어나 (Joshi & Gold, 1993) 약간의 균체의효소의 존재에서도 빠르게 분해반응이 진행될 수 있으므로 GC/MS를 이용하여 분해산물을 배양시간별로 추적하여 규명하였다.

3.2 TCG의 분해메카니즘

목질분해균에 의한 TCG 분해시 GC/MS 상에서 농도의 변이는 그림 7과 같으며, 분해에 의한 주요 대사산물 각각의 MS 스펙트럼은 그림 8과 같다.

초기에 (1시간 이내에) 빠른 분해 양상을 보여주는 것처럼 보였던 *T. versicolor*에 의한 TCG 분해는 GC/MS의 분석 결과 분해가 아닌 중합이 일어나는 것으로 판명되었다. GC/MS의 TIC 상에서 retention time 35.6분에서 발견되는 큰 peak는 주로 2개의 trichloroguaiacol이 ester화되어 중합되어진 것으로 여겨지는 분자량 546의 4,5,6-trichloro-3-(2,3-dichloro-4,5-dimethoxybenzoic)guaiacol이 많은 양으로 초기에 형성되었다. 이 형태의 dimer로부터 메틸화와 탈염소화가 일어나면서 dichloro 화합물이

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

Metabolites	Formula	Major mass peaks
3,4,5-trichloroveratrole	C ₈ H ₇ O ₂ Cl ₃	84, 133, 147, 162, 199, 225, 227, 229, 240(bp, mp), 242, 244
3,4,5-trichlorocatechol	C ₆ H ₃ O ₂ Cl ₃	93, 115, 147, 207, 238, 253, 268, 270, 307, 356(mp), 358(bp), 360
5,6-dichloroguaiacol	C ₇ H ₆ O ₂ Cl ₂	73, 105, 149, 151, 219, 234(bp), 236, 264(mp), 266
4-hydroxy-5,6-dichloro-guaiacol	C ₇ H ₆ O ₃ Cl ₂	93, 95, 117, 186, 207, 229, 271, 272, 274, 302, 304, 322(bp), 324, 352(mp), 354
1,2-dichloro-4-(1,2-dichloro veratrole)veratrole	C ₁₆ H ₁₄ O ₄ Cl ₄	73(bp), 95, 133, 193, 207, 252, 272, 307, 309, 355, 410(mp), 412, 414
4,5,6-trichloro-3-(2,3-dichloro-4,5-dimethoxybenzoic)guaiacol	C ₁₆ H ₁₀ O ₆ Cl ₅	73(bp), 133, 207, 249, 281, 309, 355, 388, 390, 410, 458, 460, 462, 475, 530, 532, 534, 546(mp), 548, 550
3,4-dihydroxy-5,6-dichloro guaiacol	C ₇ H ₆ O ₄ Cl ₂	75(bp), 117, 132, 207, 281, 309, 354, 395, 425, 427, 440(mp), 442
dimer(unknown)	Cl ₅	73, 133, 177, 191, 207, 249, 281, 309, 355, 388, 390, 392, 410, 458, 460, 462, 474(mp), 476(bp), 478
dimer(unknown)	Cl ₅	81, 133, 137, 191, 207(bp), 281, 341, 385, 429, 469, 504, 578, 600(mp), 602, 604
dimer(unknown)	Cl ₄	73, 133, 193, 207(bp), 267, 281, 354, 355, 429, 453, 497, 534, 561, 596(mp), 598, 600

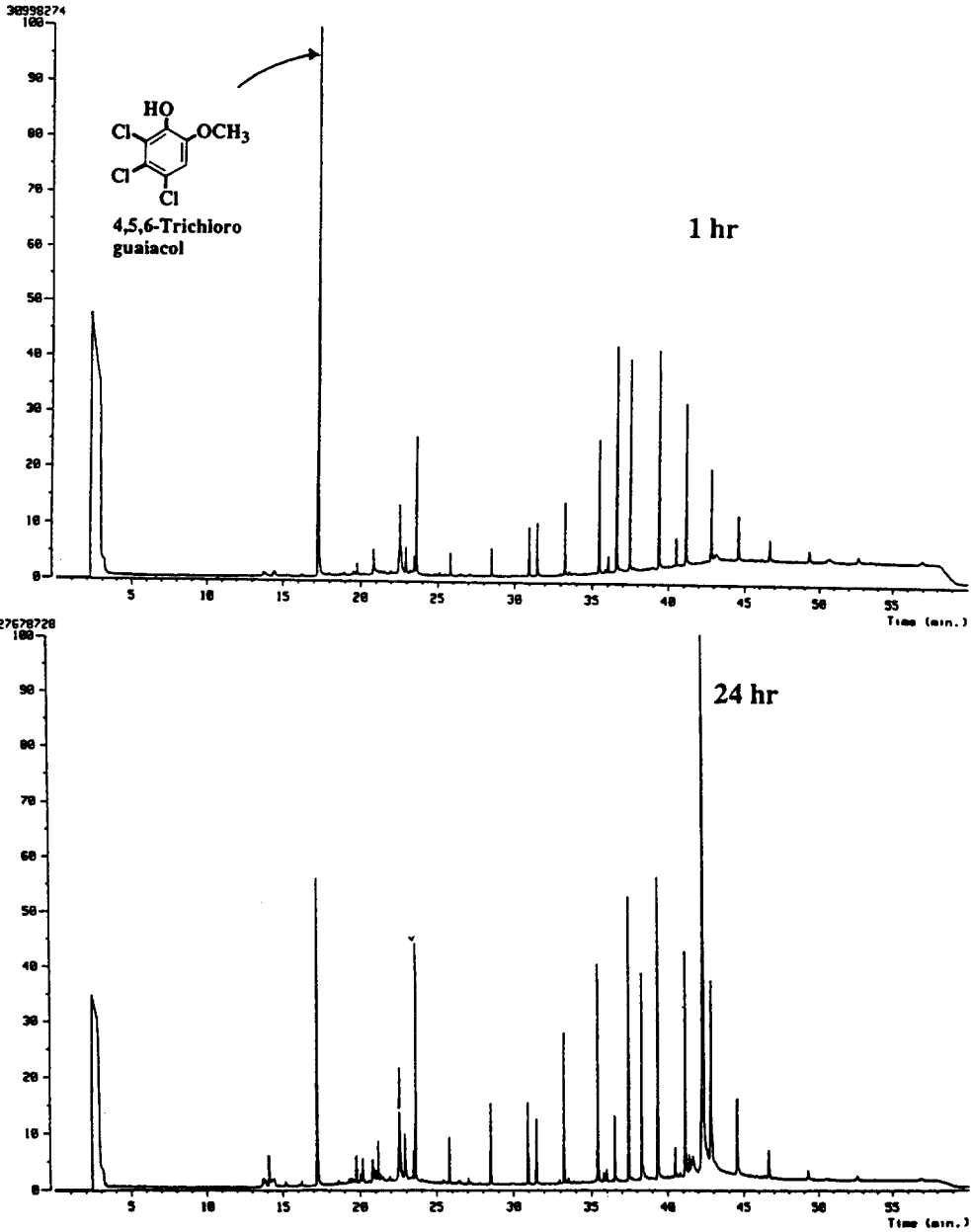


Fig. 7. Change in the concentration of TCG analyzed by GC/MS during biodegradation by *T. versicolor*

된 후에 빠르게 카르복실기에 의하여 TCG의 3번 탄소에서 ester화 반응이 일어남을 알 수 있다. Joshi 및 Gold (1993)도 2,4,5-trichlorophenol의 분해시에 초기 산화에 의한 quinone의 형성시에 중합된 hexachlorobiphenyl이 형성된다고 보고했다.

여기에 이용된 카르복실기는 목질분해미생물의 TCG 분해시 특이하게 많이 생성되는 지방산으로부터 유리된 것으로 여겨지며, 실제 GC/MS 분석에서도 hexadecanoic, tetradecanoic, octadecanoic 등의 C₁₄, C₁₆, C₁₈ 지방산이 배양과 함께 다량 생산됨이 확

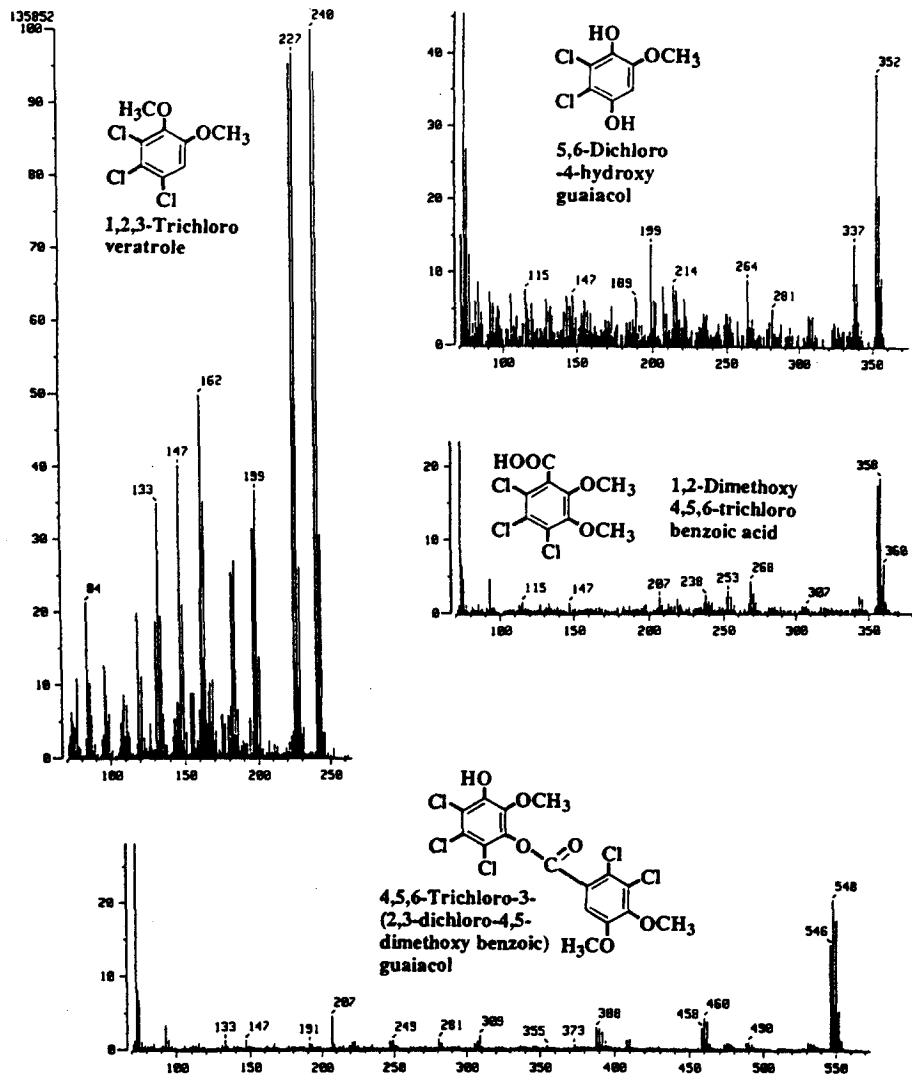


Fig. 8. Mass spectra of major TCG metabolites during biodegradation by *T. versicolor*

확인되었다. 또한 다른 형태의 dimer로서는 표1에서와 같이 분자량 410, 474, 596, 600을 가지고 염소의 수가 4에서 최대 5개가 붙은 dimer로 여겨지는 화합물들이 분석되었다. 특이한 점은 분해가 진행됨에 따라 monomer의 새로운 변형된 형태의 화합물이 생성되면서 dimer의 양은 줄어들음을 보였으며, 중합된 dimer가 단리되는 것으로 여겨졌다. 이의 분해 양상은 모델중합리그닌 화합물의 분해시에 laccase에 의한 alkyl-phenyl cleavage, C_α oxidation에 의한 점차적인 polymer의 분해양상과 비슷하다 (Higuchi,

1986). 그러나, 이렇게 두 개의 benzene이 결합된 PCB (polychlorinated biphenyl)의 분해에서는 치환된 염소의 수에 따라 분해도에서 차이를 보여 4개 또는 6개의 염소가 치환된 경우는 *P. chrysosporium*에 의한 분해가 어렵다고 보고했다 (Dietrich 등, 1995). 그러나 본 실험에서 분석된 변형된 형태의 화합물 중에서 제일 빨리 그리고 많이 형성되는 화합물은 TCG의 메틸화에 의한 3,4,5-trichloroveratrole이었으며, dimethoxy를 가지는 benzoic acid, 또한 trichlorocatechol, dichloroguaiacol과 4-hydroxy-

5,6-dichloroguaiacol도 분석되었다. veratrole 형태의 화합물의 존재는 환원과 메틸화에 의한 것으로 Huynh 등 (1985)에 의하여 펄프 표백 과정중 E1 stage에서 발생한 폐액의 *P. chrysosporium*을 이용한 탈색화 과정에서도 분석된다고 보고됐다. 이러한 dichloro 형태의 화합물은 양이 아주 미미하여 trichloroguaiacol로부터 탈염소화, 수산화 또는 메틸화된 후에 빠르게 분해되는 것으로 여겨졌으며, 주로 방향환의 4번 탄소에서 탈염소화와 수산화가 빨리 진행되어 4-hydroxy-5,6-dichloroguaiacol이 형성되었다. Kiyohara 등 (1992)과 Joshi & Gold (1993)도 2,4,6-trichlorophenol을 이용하여 실험시 2,6-dichlorohydroxy phenol의 형성을 보여 4번 탄소에서의 탈염소화와 수산화 반응이 진행되었고, Valli 등 (1992)도 *P. chrysosporium*에 의한 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin의 분해시 산화, 환원, 메틸화에 의하여 주요 중간대사산물인 1,2,4-trihydroxybenzene이 형성된 후에 방향환이 개열하면서 mineralization이 된다고 보고했다. 또한, 세균인 *Pseudomonads*속의 경우도 monochlorobiphenyl이 2 또는 3-chlorocatechol로 dihydroxylation이 된 후에 방향환이 meta 개열된다고 보고했다 (Arensdorf & Focht, 1994). 본 연구에서도 대사산물을 GC/MS의 분석을 통하여 살펴보면 4,5,6-trichloroguaiacol은 산화에 의한 탈염소화가 진행되고, 형성된 quinone의 환원에 의한 수산화 후에 메틸화가 발생하는 것으로 추론할 수 있다. 그러나, 초기에는 laccase에 의한 산화로 radical의 형성이 많이 이뤄져서 polymerization이 주요한 반응으로 작용했다. 그러므로, 목질분해균에 의한 TCG 분해시의 주요 반응은 중합, 메틸화, 탈염소화, 산화, 환원 등의 반응이 연속적으로 또는 개별적으로 일어남을 알 수 있다.

4. 결 론

목질분해균에 의한 TCG 분해는 다른 염소화합물의 미생물분해와 달리 단시간에 이뤄져, 특히 *T. versicolor*의 경우는 1시간 배양 후에 90%이상의 분해를 보이며 24시간 이내에 잔존하는 TCG의 양은 5%미만이 되었다. 다른 두 종류의 균에 의해서도 24시간 이내에 80% 이상의 분해가 이뤄져 이를 뒷받침했으나, 이러한 초기의 분해는 laccase에 의한 TCG의 radical 형성에 의하여 초기중합에 의한

dimer의 다량 형성임이 GC/MS의 분석으로 확인되었다. laccase에 의한 중합반응으로 TCG의 monomer의 양이 줄어든 후에 서서히 monomer로의 단리가 이뤄지고 탈염소화, 메틸화, 산화, 수산화에 의한 TCG 자체의 분해가 시작되어 trichloroveratrole, trichlorocatechol, dichloroguaiacol 등의 분해대사산물이 생성되는 것으로 추론할 수 있다.

또한 TCG 분해에 대한 균사의 영향을 조사하기 위한 균체외액만의 분해력 실험에서도 *T. versicolor*는 균사의 유무와 관계없이 유사한 분해율을 보였으나 다른 두 종류의 *P. chrysosporium*과 *I. cuticularis*는 분해율이 상당히 저하됐다. 이는 균체외액의 효소적 특성이 TCG 분해에 영향을 미치고 균주 간에도 분해력에 대해서 상당한 차이가 있음을 보였다. 또한, 우수한 TCG 분해력을 보인 *T. versicolor*는 균체외액에 상당한 양의 laccase를 가지고 있었으며 laccase는 TCG를 첨가하면서 유도에 의하여 재생산되는 것으로 밝혀졌다. 즉, laccase의 유무 및 활성도가 TCG의 분해와 밀접한 관계가 있음을 보여 주었다.

참 고 문 헌

1. Arens Dorf, J. J., and D. D. Focht. 1994. Formation of chlorocatechol meta cleavage products by a *Pseudomonad* during metabolism of monochlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(8): 2884~2889
2. 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
3. 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
4. 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

5. Hansen, D.J. 1991. Dioxin toxicity: new studies prompt debate, regulatory action. *Chem. Eng. News* 69(32): 7~14
6. Higuchi, T. 1986. Catabolic pathways and role of ligninases for the degradation of lignin sub-structure models by white rot fungi. *Wood Research*, 73: 58~81
7. Huynh, V-B., H. M. Chang, T. W. Joyce, and T. K. Kirk. 1985. Dechlorination of chloro-organics by a white rot fungus. *Tappi*, 68(7): 98~102
8. 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
9. Kirk, T. K., E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, and J. G. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 117: 277~285
10. 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
11. Mohn W. W., and G. R. Stewart. 1997. Bacterial metabolism of chlorinated dehydroabietic acids occurring in pulp and paper mill effluents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3014~3020
12. 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
13. Rochkind-Dubinsky, M. L., G. S. Sayler, and J. W. Blackburn. 1987. In Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds. Marcel Dekker Inc.
14. 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
15. 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
16. Valli, K. V., and M. H. Gold. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, 173(1): 345~352
17. Valli, K. V., H. Wariishi, and M. H. Gold. 1992. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, 174: 2131~2137
18. Walden, C. C., and T. E. Howard. 1981. Toxicity of pulp and paper mill effluent-a review. *Pulp Pap. Can.* 82 : T143