

옥틸페놀(4-t-Octylphenol)의 *Basidioradulum molare*와 *Schizopora paradoxa*에 의한 분해 및 에스트로젠성 저감효과*1

이수민*2 · 구분옥*2 · 이재원*2 · 최돈하*3 · 정의배*4 · 최인규*2†

Biodegradation of 4-t-Octylphenol by *Basidioradulum molare* and *Schizopora paradoxa* and Estrogenicity Reduction of its Metabolites

Soo-Min Lee*2 · Bon-Wook Ku*2 · Jae-Won Lee*2 · Don-Ha Choi*3 · Eui-Bae Jeung*4 · In-Gyu Choi*2†

요 약

계면활성제로 이용되는 난분해성 4-t-Octylphenol에 대하여 목질분해균인 큰이빨버섯과 좀구멍버섯을 선발하여 농도별 저항성 시험을 한 결과 좀구멍버섯은 200 ppm 이상의 농도에서 14일 내에 완전 균사생장(8.5 cm in petri dish)에 도달하며 큰이빨버섯은 농도의 증가에 따라 서서히 제한적인 성장을 하였다. 분해능 조사에서 좀구멍버섯은 배양 1일째 초기 투입된 4-t-Octylphenol의 95%를 분해하였으며, 큰이빨버섯은 36%의 분해능을 나타내었고 두 균주 모두 3일 이후에는 95% 이상 분해하는 것으로 나타났다. 이러한 분해과정에서 좀구멍버섯은 4-t-Octylphenol 첨가에 의하여 MnP 유도효과가 있었으나 laccase는 두 균주 모두 첨가하기 전에 최고의 역가를 나타냈다. 4-t-Octylphenol 및 분해산물이 MCF-7 세포증식에 미치는 영향을 살펴본 결과 좀구멍버섯 및 큰이빨버섯 처리에 의한 분해산물의 생물학적 반응성이 하루 이후에 완전히 감소하였다. 또한, MCF-7 세포의 pS2 유전자의 발현은 처리 1일 후, 배지만 첨가한 무처리균과 동일한 양으로 감소하였다.

*1 접수 2004년 2월 13일, 채택 2004년 3월 25일

*2 서울대학교 임산공학과, Dept. of Forest Products, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*3 국립산림과학원 Dept. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

*4 충북대학교 수의과대학 College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

† 주저자(corresponding author) : 최인규 (e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

ABSTRACT

Recalcitrant 4-t-Octylphenol used as a surfactant was subjected to the biodegradation with wood rot fungi, *Basidioradulum molare* and *Schizopora paradoxa*. Two fungi were grown in the culture medium containing various concentrations of 4-t-Octylphenol in order to investigate their resistance against 4-t-octylphenol. *Schizopora paradoxa* was reached to the full growth within 14 incubation days in the concentration of more than 200 ppm of 4-t-Octylphenol, while *Basidioradulum molare* showed the inhibitory mycelium growth as the concentration was increased. *Schizopora paradoxa* and *Basidioradulum molare* biodegraded 95% and 36% of initial concentration of 4-t-Octylphenol at first incubation day, respectively. However, the biodegradation capability reached to more than 95% after 3 incubation days. During the biodegradation of 4-t-Octylphenol, the activity of manganese dependent peroxidase was induced by the addition of 4-t-Octylphenol in the culture medium of *Schizopora paradoxa*, but that of laccase was maximal before the addition. The reduction of estrogenicity was assayed by MCF-7 cell proliferation test and measurement of pS2 mRNA expression. The level of pS2 mRNA was decreased down to the level of baseline at first incubation day. Also, estrogenicity of 4-t-Octylphenol completely disappeared after treatment with supernatant by *Schizopora paradoxa* and *Basidioradulum molare* from first incubation day of culture down to the levels of vehicle.

Keywords: 4-t-Octylphenol, biodegradation, *Basidioradulum molare*, *Schizopora paradoxa*, estrogenicity

1. 서 론

환경중에서 체내로 유입되어 여성호르몬인 에스트로겐(estrogen)과 유사한 작용을 하는 물질을 유사호르몬(xenoestrogen)이라고 한다. 일반적으로 내분비계 장애물질 중 대부분이 이러한 물질로 정의되며, 환경오염물질 중에는 대표적으로 알킬페놀류(alkylphenols)가 이에 해당된다. 알킬페놀류는 에스트로겐과 유사한 스테로이드 구조를 지니고 있지는 않으나, 체내에서 에스트로겐 수용체(estrogen receptor)의 ERE (estrogen response element)와 결합함으로써 에스트로겐과 유사하게 여러 생리작용을 유발하는 것으로 알려져 있다(Sato *et al.*, 1991). 이들 알킬페놀류 중 4-pentylphenol, 4-Octylphenol, nonylphenol isomers는 플라스틱 등 합성수지류의 산화방지제나 안정제 및 비이온성 계면활성제의 용도로 주로 사용되고 있으므로 수질오염 및 식습관에서 유발되는 환경적 요인에 의해 체내에 유입되는 경우가 대부분이다.

최근 이러한 환경오염 물질을 생물공학적인 방법을

이용하여 분해하는 연구가 집중적으로 진행되고 있으며 특히, 박테리아를 이용한 bisphenol A, nonylphenol 및 phthalate류 등의 alkylphenol류와 플라스틱 가소제와 관련된 난분해성 물질의 미생물분해 연구가 주된 대상으로 이루어지고 있다(Ronen *et al.*, 2000; Lobos *et al.*, 1992; Furusawa *et al.*, 2000; Chatterjee & Dutta, 2003). 백색부후균인 판막버섯(*Phanerochaete chrysosporium*)을 이용한 phenanthracene의 분해가 확인된 이후(Hammel *et al.*, 1986), 내분비계 장애물질과 관련된 난분해성 물질의 미생물분해 연구에서 백색부후균을 이용한 연구가 지속적으로 수행되고 있다.

박테리아가 특정 난분해성 물질에 대해서 분해능을 지니고 있고 다른 종류의 물질에는 분해능이 감소하는 반면, 백색부후균은 비특이적인 세포의 효소를 이용하여 분해 시스템을 유지시키고 있으므로 지속적인 분해가 가능하다. 이에 관련된 주요 효소로는 목질부의 리그닌을 선택적으로 제거하는 효소로 잘 알려져 있는 lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase 및 Mn-independent peroxidase, laccase 외에도

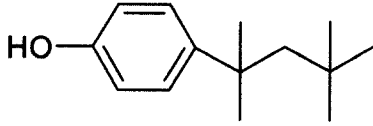


Fig. 1. Chemical structure of 4-t-octylphenol.

(Tien & Kirk, 1984), 셀룰로오스 분해 및 균 성장과 관련된 cellulase, oxidase류 등의 여러 효소들이 성장 환경에 맞추어 운용되고 있는 것이 확인되어 생물복구(bioremediation) 분야에서 백색부후균의 중요성을 확인하는 계기가 되고 있다. 최근의 백색부후균 관련 난분해성 물질의 분해 연구는 *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pleurotus ostearus* 등 다양한 균을 대상으로 연구가 진행되고 있으며(Glen et al., 1986), 국내에서는 국내 자생 백색부후균을 이용하여 난분해성 환경오염물질인 여러 종류의 염소화페놀류를 분해하는 연구가 이루어졌다(최와 안, 1998; 안과 최, 1998; 최 등, 2002).

본 연구에서는 백색부후균을 이용하여 4-t-Octylphenol의 분해가능성을 저항성 및 분해능 측정을 통하여 확인한 후 분해산물의 에스트로젠성 저감 여부를 MCF-7 세포주의 증식성과 pS2 유전자의 발현 양상을 통하여 구명하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시 물질 및 균주

세계생태보전기금 및 일본 후생성 분류 내분비계 장애물질 목록에 있는 계면활성제인 4-t-Octylphenol을 공시물질로 선정하였다. 공시물질의 화학구조식은 Fig. 1과 같다. 공시균주는 국립산림과학원 미생물화학실 기 보유균주 95종과 식용 임산버섯 38종을 대상으로 RBBR (Remazol Brilliant Blue R)법에 의하여 선별한 후 리그닌 분해효소 역가조사 및 농도별 저항성조사를 통하여 큰이빨버섯(*Basidioradulum molare*)과 좁구멍버섯(*Schizopora paradoxa*)을 공시균주로 선별하였다.

2.2. 저항성 측정

4-t-Octylphenol 100, 200, 300, 400, 500 mg/ℓ를 함유한 YMPG 배지(1 ℓ의 증류수당, glucose 10 g, malt extract 10 g, bacto-peptone 2 g, yeast extract 2 g, asparagine 1 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, thiamine 1 mg, bacto-agar 20 g)에 큰이빨버섯과 좁구멍버섯을 접종하여 14일간 30℃에서 정치배양을 하면서 매일 성장하는 균사의 성장길이를 측정하여 각 균주의 해당 4-t-Octylphenol 농도에 대한 저항성을 측정하였다.

2.3. HPLC 분석

균사의 생장이 최고조에 달한 배양 7일째에 20 mM의 4-t-Octylphenol stock solution으로부터 50 μl 씩을 10 ml의 박충고정상 액체배지에 첨가하여 액체배지상의 화합물 농도를 100 μM 로 조정하여 30℃에서 배양하였다. 배양기간별 분해능을 조사하기 위하여 첨가 후 1, 3, 6, 12일이 지나면 각 배양기간별로 n-hexane 20 ml를 넣어 5 min간 격렬하게 흔들고 10 min간 정치시킨 후 n-hexane 층을 피펫을 이용하여 회수하였다. 수층은 다시 ethylacetate 10 ml와 n-hexane 10 ml의 혼합용매를 첨가하여 재추출을 하였으며 1차 추출액과 혼합하여 0.45 μm microfilter로 여과를 하였다. 분해능은 Waters symmetric column을 이용하여 HPLC (Hewlett Packard 1100 series, Germany)로 정량 분석하여 얻었다. 분석조건은 flow rate, 0.6 ml/min, 용매 CH_3CN : water = 80:20 (v/v), detector는 UV 240 및 280 nm에서 isocratic 조건으로 분석하였다.

2.4. 효소역가 및 유도효과 조사

MnP (Manganese dependent peroxidase) 및 laccase의 역가를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. MnP 역가는 ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))(0.08 g/ℓ), H_2O_2 (0.1 mM), MnSO_4 (0.2 mM) 및 0.2 M lactate buffer (pH 4.5) 용액을

이용하여 측정하였으며 조효소액을 제일 나중에 첨가하여 측정을 개시하였다. Laccase 역가의 경우는 ABTS (0.8 g/l) 및 0.1 M sodium lactate buffer만을 이용하였다. MnP와 laccase의 역가는 ABTS를 기준으로 $\epsilon_{414} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 적용하여 계산하였다. 또한, 4-t-Octylphenol 첨가에 의하여 변화되는 MnP, laccase 효소의 역가를 관찰하기 위하여 액체 배지에 균주를 접종한 후 매일 6일간, 그리고 대상물질을 첨가한 후 12일간 역가를 위와 동일한 방법으로 조사하였다.

2.5. 적정 균사 생장 조건

저항성 조사에 의하여 선정된 큰이빨버섯과 좁구멍버섯의 적정 온도 및 배지 선정을 위하여 2% malt extract agar 및 YMPG 배지에 접종하여 17, 25, 30, 34°C에서 각각 배양하여 매일 균사생장환을 측정하여 조사하였다. 또한 탄소원 및 질소원에 따른 효소역가 변화를 측정하기 위하여 액체배지 내에서 glucose 및 asparagine의 배지함량을 조정하여 배양한 후 균사가 최대생장을 이룬 시점에서 조효소액을 여과하여 역가를 측정하였다.

2.6. 4-t-Octylphenol 및 분해산물에 대한 에스트로겐성 평가

2.6.1. 배지 및 트립신 제조

배지는 증류수 1 l에 DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium)와 최종농도가 1 mM이 되도록 sodium pyruvate 및 7.5% NaHCO_3 를 첨가한 후 pH를 7.4로 조정한 후 0.2 μm filter로 여과하였다. 그 후 열불활성화 처리(56°C, 30 min)된 FBS (Fetal Bovine Serum) 50 ml를 첨가하여 최종 5% FBS DMEM 배지를 제조하였다. 제조된 배지의 오염 확인은 37°C 배양기에서 48 h 배양한 후 배지의 현탁유·무로 확인하였다. 배양된 세포를 수득하기 위한 0.25% 트립신용액과 0.2% EDTA를 각각 조제한 후 PBS:0.2% EDTA:2.5% trypsin (8:1:1)을 혼합하여 0.2 μm 로 여과한 후 실험에 사용하였다.

2.6.2. 세포의 계대배양조작

세포가 들어 있는 25 cm^3 플라스크(Corning #430168)의 배지를 흡인·제거한 후, 바닥표면에 남아있는 잔여물을 제거하기 위하여 PBS (Phosphate Buffered Saline) 완충액 5~6 ml로 세정하였다. 그 후 0.25% 트립신용액을 플라스크 당 500 μl 를 첨가하여 1~2 min 정도 배양하였다. MCF-7 세포가 플라스크바닥에서 떨어져 나오면 배지 5 ml를 넣어 피펫팅한 후, 15 ml 원심튜브(Falcon #352097)에 분주하여 원심분리(1,000 rpm, 4°C, 5 min)하였다. 상층액을 흡인 제거하고 새로운 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화한 후 세포수를 계측하였다. 새로운 세포 배양용 25 cm^3 플라스크에 5% FBS를 포함한 DMEM 배지를 5 ml 넣고, $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/flask가 되도록 세포를 분주한 후 플라스크를 천천히 흔들어서 세포가 균일하게 분산되도록 하여 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 배양하였다. 3~4 일에 한번 배지를 흡인·제거하고 새로운 배지로 교환하였다. 세포의 계대는 6~8일 간격으로 계대배양을 하였다.

2.6.3. Charcoal-Dextran 처리

혈청 중에 함유된 세포증식인자를 제거하기 위하여 다음과 같이 처리하였다. 뚜껑이 있는 유리원심튜브에 5% 활성탄(혈청량 \times 1.1 ml)을 첨가하여 표시된 지점까지 증류수를 넣고 상하로 뒤집으면서 잘 흔들어서 활성탄을 분산시킨 후 원심분리하여 (250 rpm, 2 min) 활성탄 부유입자를 제거하였다. 그 후 0.5% dextran (혈청량 \times 1.1 ml)을 넣고 표시지점까지 증류수를 넣은 후 위아래로 뒤집어 활성탄을 분산시켜 원심분리 하였다(600 rpm, 5 min). 상층액을 흡입·제거한 후, 혈청을 넣고 기포발생이 안되도록 서서히 교반하여 활성탄을 분산시켰다. 이를 37°C의 진탕 배양기에서 60 min간 배양한 후 원심분리를 하였다(3,000 rpm, 20 min). 얻어진 상층액을 0.45 μm , 0.2 μm filter로 여과 멸균하여 10 ml용 유리원심튜브에 4~5 ml 정도 분주 후 -20°C에서 보관하고 실험시 상온에서 해동한 후 phenol red free 배지에 활성탄 처리 혈청을 5% 첨가하여 E-screen assay에 이용하였다.

옥틸페놀(4-t-Octylphenol)의 *Basidioidulum molare*와 *Schizopora paradoxa*에 의한 분해 및 에스트로겐성 저감효과

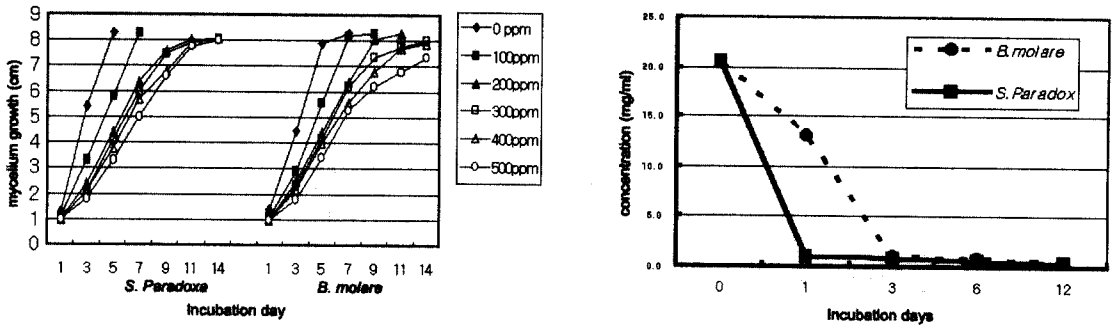


Fig. 2. Resistance (left) and biodegradation (right) of 4-t-Octylphenol by *Basidioidulum molare* and *Schizopora paradoxa* depending on incubation days.

2.6.4. 세포증식성 시험

세포가 들어 있는 플라스크 내의 배지를 제거하여 PBS로 1회 세정한 후 0.25% trypsin을 플라스크당 500 μ l를 첨가하여 1~2 min 정도 배양시켰다. 배지를 15 ml 원심분리 튜브에 포집하여 4°C에서 원심분리(1,000 rpm, 5 min)한 후 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 세포의 밀도에 따라 일정량의 배지를 가한 후 피펫팅하여 세포를 단일화한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포수는 5×10^3 cells/well로 96 well plate (Falcon #353072, Non-pyrogenic)에 일정량(100 μ l)의 세포를 분주하였다. 시험용 배지인 5% Charcoal-dextran activated FBS을 포함하는 DMEM 90 ml씩 각 well에 가하고 시험물질 (4-t-Octylphenol)의 농도를 조제하여 각 농도별로 10 μ l를 well에 첨가하였다. 이때 음성대조물질로는 DMSO (DiMethyl Sulfoxide)를 가하여 5% CO₂, 배양기에서 6일간(144 h) 배양하고 MCF-7 세포의 증식 및 total RNA를 분리하여 pS2 유전자의 발현양을 RT-PCR법을 이용하여 측정하였다.

2.6.5. pS2 mRNA 분석

세포증식시험에서와 같이 세포를 준비하고 계산된 세포를 well당 5×10^4 cell이 되도록 6 well plate에 분주한 다음 5% CO₂, 37°C에서 24 h 배양하였다. 24 h 후 steroid free DMEM (Phenol red free, 5% Charcol-Dextran 처리된 5% FBS가 첨가된 DMEM)을 2 ml씩 분주하여 72 h 후 plate 내의 스테로이드

물질이 제거된 배지를 앞서 언급된 세포증식시험에서와 같은 방법으로 처리하였다. M-MLV reverse transcriptase (Ambion)을 사용하여 cDNA를 합성하여 1 μ l를 주형으로 Tag DNA polymerase를 이용하여 PCR을 시행하는데 pS2 유전자를 증폭하기 위하여 forward primer 5'-GGCCACCATGGAGAACAAGG-3'와 reverse primer 5'-CCA CGAACGGTGTCTGTC GAA-3'를 사용하여 30회 반복 수행하였다. House keeping 유전자는 human 1A를 이용하였으며, forward primer 5'-GATATGG CGTTTCCCCGCATA-3'와 reverse primer 5'-GGATTTTGGCGT AGGTTTGGT-3'를 1A를 증폭하는데 사용하였다. PCR 결과물 중 50%를 agarose gel (pS-2; 2% agarose, 1A: 1% agarose)에 loading 후 100 volts로 약 30 min간 전압을 걸어 전기영동을 수행하였다. EtBr (Ethidium Bromide)을 이용하여 염색하였으며, 나타난 영상은 Gel doc 1,000을 사용하여 분석하였다. 측정된 pS2 mRNA의 값을 1A mRNA로 표준화하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주의 4-t-Octylphenol에 대한 저항성 및 분해능

4-t-Octylphenol 100, 200, 300, 400, 500 ppm을 함유한 배지에서 곰구멍버섯 및 큰이빨버섯의 균사 생장환을 14일간 측정하여 저항성을 측정한 결과는 Fig. 2

Incubation day Incubation day

Fig. 3. Induction effect of manganese dependent peroxidase (left figure) and laccase (right figure) activities in the culture medium of *BasidiRADulum molare* and *Schizophora paradoxa* by the addition of 4-t-Octylphenol (Add : incubation with the addition of 4-t-Octylphenol, Inc : incubation without the addition of 4-t-Octylphenol).

와 같다. 균사가 완전히 페트리 디쉬를 피복하여 생장환의 길이가 8.5 cm에 도달하였을 때를 완전 생장으로 간주하였으며 두 균주 모두 4-t-Octylphenol이 첨가되지 않은 대조구에서는 일일 균사생장율이 1~2 cm 이상으로 빠르게 성장하며 최종 완전 생장까지는 5~7일이 소요되었다. 100 ppm의 농도에서는 두 균주 모두 대조구와 비교하여 2일 정도 늦게 완전 생장에 도달하였으나 200 ppm 농도에서는 *좀구멍버섯*은 14일, *큰이빨버섯*은 11일이 걸려서 4-t-Octylphenol의 첨가에 의하여 균사 생장이 상당히 제한되었다. 300~400 ppm으로 농도가 증가함에 따라 약간의 생장 제한은 있었지만 500 ppm의 고농도에서도 생장이 우수하여 *좀구멍버섯*과 *큰이빨버섯*은 4-t-Octylphenol의 미생물분해 시스템에 이용이 가능한 것으로 판단되었다.

100 μ M의 4-t-Octylphenol을 액체배지에 첨가하여 배양기간별로 살펴본 분해능은 Fig. 2(오른쪽)와 같다. *좀구멍버섯*은 배양 1일째 투입된 4-t-Octylphenol의 95%를 분해시키고 *큰이빨버섯*은 36%의 분해능을 나타내나 두 균주 모두 3일째에는 95% 이상의 높은 분해율을 나타내었다. 이는 매우 빠른 시간에 분해가 이뤄짐을 나타내지만 연속식 생물반응기(bioreactor) 등의 적용 시험을 통하여 장기적인 균주 성능 시험이 필요하리라 사료된다.

3.2. 효소역가 및 유도효과

4-t-Octylphenol 첨가 전후의 *좀구멍버섯* 및 *큰이빨버섯* 배양액의 MnP 및 laccase의 변화는 Fig. 3과 같다. 4-t-Octylphenol 첨가는 *좀구멍버섯*에서 배양 전과 비교하여 배양 후에 계속적으로 MnP 역가가 증가하여 유도효과가 있었음을 나타내나, *큰이빨버섯*의 경우는 첨가 전에 최고의 MnP 역가를 나타내어 4-t-Octylphenol 첨가에 의하여 서서히 역가가 감소하였다. Laccase의 경우에는 두 균주 모두 첨가 전에 최고의 역가를 나타낸 후 서서히 감소하거나 변화가 없어 4-t-Octylphenol 첨가에 의한 유도효과가 없는 것으로 판단되었다.

3.3. 균사 적정 생산 조건

4-t-Octylphenol 첨가 전후의 *좀구멍버섯* 및 *큰이빨버섯* 배지 내의 pH 변화는 Fig. 4와 같다. *좀구멍버섯*은 배양전 pH 4.8에서 4-t-Octylphenol 첨가 전까지 3.8로 감소하고 첨가 후에는 pH 3.8~3.6을 유지하며 *큰이빨버섯*은 약간 낮은 pH 3.8~3.4로 균주 간 차이는 크게 없었다. 균주 생장에 있어서 배양액 내의 pH는 4-t-Octylphenol 첨가에 의한 효소분비 또는 분해산물의 영향보다는 균주가 자체 생산해내는

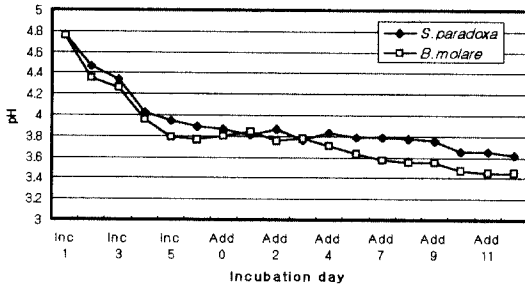


Fig. 4. pH change in the culture medium of *Basidiobolus molare* and *Schizopora paradoxa* due to the addition of 4-t-Octylphenol.

지방산의 농도에 의하여 많은 영향을 받는 것으로 사료된다. 별도의 실험에서 두 균주 모두 초기 pH 5.0, 온도 30~34°C, YMPG 배지에서 최적의 균주 성장 조건이었으며 탄소원 및 질소원을 각각 0, 1, 2배로 변화하면서 균사의 성장변화를 관찰한 결과 glucose 10 g, asparagine 1 g을 이용한 기본배지(1배)에서 역시 최대 성장에 도달하였다.

3.4. 4-t-Octylphenol 및 분해산물에 대한 에스트로겐성 평가

3.4.1. MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향

본 연구에서는 사람 유방암세포인 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. 공시물질인 4-t-Octylphenol을 최초 100 µM로 첨가된 상태에서 쯤구멍버섯과 큰이빨버섯으로 배양한 후 각각 1, 3, 7, 12 일 후의 배양액을 채취하여 MCF-7 세포 배양시 첨가하여 6일간 배양 후 세포증식 및 표적유전자의 발현 양이 음성대조구인 DMSO에 의한 영향을 비교하여 분석하였다. 4-t-Octylphenol의 경우 최초 100 µM의 농도에서 MCF-7 세포 증식에 유의성 있게 영향을 미치고 있음을 확인하였으며, 처리 시간이 경과됨에 따라, 그 효과가 감소하는 것을 확인하였다. 쯤구멍버섯에 의한 처리의 경우 처리 하루 만에 세포 증식 유도 효과가 유의성 있게 감소하여 무처리군과 동일한 반응을 보이는 것으로 나타났으며, 큰이빨버섯도 처리

3일 째 이후에 세포 증식에 미치는 효과가 무처리군 수준으로 그 반응성이 저하된 것으로 나타났다. 위의 HPLC를 이용한 분석 결과에서 4-t-Octylphenol이 현격하게 감소하였으나, 세포 증식성 실험에서는 약간 다른 현상을 보여 주었는데, 쯤구멍버섯에 의한 분해 산물이 오히려 MCF-7 세포의 증식성을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 쯤구멍버섯에 의한 처리 12 일 째 획득된 시료에서는 무처리군에 비하여 세포 증식성이 50% 정도로 감소하였으나, 이와 같은 결과가 세포 독성에 의한 것인지, 여성호르몬 반응 인체 유방암 세포인 MCF-7 세포 특이적 증식억제인지 여부에 관련되어서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이는 큰이빨버섯의 분해 산물과는 다른 현상을 보여 주었다. 또한 분해산물의 생물학적 반응성이 처리 하루 이후에 완전 감소하는 것으로 미루어 4-t-Octylphenol이 쯤구멍버섯과 큰이빨버섯의 균사체에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

3.4.2. 표지유전자 및 자궁 생체에 미치는 영향

MCF-7 세포주에서 이용되는 marker 유전자를 이용하여 그 발현양을 측정하여 세포의 증식과 병행하여 분해산물의 에스트로겐 물질로서의 특성 및 효과를 확인하였다. Fig. 6에서 나타난 것과 같이 양성반응물로 이용된 에스트로젠과 공시물질인 4-t-Octylphenol에 처리하였을 때 pS2 유전자 발현이 유도되는 것으로 나타났으나, 쯤구멍버섯 및 큰이빨버섯으로 처리한 분해산물로 처리하였을 때는 MCF-7 세포의 pS2 유전자 발현이 현저히 감소하여 처리 1일 후, 무처리군과 동일한 양으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 이는 앞서 세포증식성에서 보이는 결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었으며, 세포증식관련 실험의 결과를 뒷받침해 주었다. 큰이빨버섯의 pS2 유전자 발현 양상 변화에서는 쯤구멍버섯에 비해 pS2 유전자의 발현이 상대적으로 증가된 상태임이 확인되어, 실험에 사용된 두 종의 백색부후균이 다른 종류의 분해산물을 생성시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 4-t-Octylphenol을 미성숙 랫드에 투여하여 랫드의 조직에 미치는 영향을 분석한 결과, 특히 자궁에서 자궁비대 현상이 농도에 따라 나타났고, 미성숙자궁

Schizopora paradoxa

Basidioradulum molare

Fig. 5. Reduction effect of estrogenicity of 4-t-Octylphenol by treatments with *Basidioradulum molare* and *Schizopora paradoxa*.

Fig. 6. The effects of 4-t-Octylphenol or supernatants from *Basidioradulum molare* and *Schizopora paradoxa* treated with 4-t-Octylphenol on the pS2 mRNA expression.

은 모든 자궁조직을 구성하는 자궁층의 세포가 미약한 세포로 관찰되었으나, 양성대조군으로 사용된 17β -estradiol이나 4-t-Octylphenol을 투여한 군 농도에

따라서 자궁의 선과 상피세포의 증식이 현저히 증가하여 4-t-Octylphenol이 에스트로겐으로서의 효과가 높은 것으로 판단되었다(Fig. 7).

참 고 문 헌

Fig. 7. Histological changes in the uterus by the treatment of vehicle (1), estradiol (2), and 4-*tert*-Octylphenol (3), and nonylphenol (4). Arrow with head indicates the epithelial cell layer of uterus.

4. 결 론

난분해성인 4-t-Octylphenol의 목질분해균에 의한 미생물분해를 위하여 좁구멍버섯과 큰이빨버섯을 선발하였으며 저항성 시험에서 두 균주는 농도의 증가에 따라 서서히 제한적인 생장을 보였으나 고농도인 500 ppm에서도 균사의 생장이 지속되었고, 분해능 조사에서 두 균주 모두 3일 이후에는 95% 이상을 나타냈다. 두 균주에 의한 4-t-Octylphenol 분해산물에 대한 에스트로겐성 평가에서 MCF-7 세포증식에 미치는 영향을 살펴본 결과 좁구멍버섯 및 큰이빨버섯 처리에 의하여 그 분해산물의 생물학적 반응성이 하루 이후에 완전히 감소하였으며, pS2 유전자의 발현은 처리 1일 후에 배지만 첨가한 무처리군과 동일한 양으로 감소하여 에스트로겐 유사 MCF-7 세포의 증식성이 상당히 감소한 것으로 나타났다.

사 사

이 연구의 일부분은 BK21 (임산공학 연구인력 양성사업팀), 산림청 임업공동연구사업 지원에 의해서 수행되었습니다.

1. 안세희, 최인규. 1998. 목질 분해균에 의한 4,5,6-triguaiacol의 미생물 분해, 한국목재공학회, Vol. 26(3): 63~72.
2. 최인규, 안세희. 1998. 목질 분해균에 의한 pentachlorophenol의 미생물 분해, 한국목재공학회, Vol. 26(3): 53~62.
3. 최인규, 이재원, 최돈하. 2002. Monochlorophenol의 목질 분해균에 의한 분해 특성, 한국 환경농학회, Vol. 21(4): 261~268.
4. Chatterjee, S. and T. K. Dutta, 2003. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia sp.* strain MTCC 4818, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 309: 36~43.
5. Furusawa, S., S. Nakai, and M. Hosomi, 2000. Microbial degradation of 4-Nonylphenol. *J. Jpn Soc. Water Environ.*, Vol. 23: 243~245.
6. Glenn, J. K., L. Akileswaran, and M. H. Gold, 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochemistry Biophysics*, Vol. 251: 688~696.
7. Hammel, K. E., B. Kalyanaraman, and T. K. Kirk, 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzop[*h*]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 261: 16948~16952.
8. Lobos, J. H., Leib, T. K., and T. M. Su, 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 58: 1823~1831.
9. Ronen, Z. and A. Abeliovich, 2000. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromophenol A. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 66: 2372~2377.
10. Sato A., H. Justica, J. W. Wray, and C. Sonnenschein, 1991. p-Nonylphenol and estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environmental Health Perspectives* Vol. 92: 167~173.
11. Tien, M. and T. K. Kirk, 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA*, Vol. 81: 2280~2284.