

T. versicolor와 P. chrysosporium의 효소발현 특성에 따른 Azo계 염료(Orange II) 제거 특성 비교

김학윤 · 오제일[†]

중앙대학교 건설환경공학과

(2004년 12월 17일 접수, 2005년 7월 5일 채택)

Comparison of Azo-dye Removal Based on the Enzymatic Differences in T. versicolor and P. chrysosporium

Hak-Yoon Kim · Jeill Oh[†]

Department of Civil & Environmental Engineering, Chung-Ang University

ABSTRACT : Stepwise reductions of glucose and Orange II concentration were observed from the experiment of both white-rot fungi such as *T. versicolor* and *P. chrysosporium*. As a result, typical removal patterns in those dual substrate system were categorized through several distinctive steps: initial lag period, primary and secondary carbon consumption periods. Also, based on the total removal amounts of Orange II, COD and Color during the experimental period, similar removal extent were observed from both species experiments, within the maximal error range of 5%. However, it was refereed that the internal steps of Orange II removal on enzymatic level should be different between two species: Enzyme Lac showed good affinity for Orange II removal in *T. versicolor*, however in *P. chrysosporium* enzyme LiP represented more close affinity to the similar experimental condition. Thus, even though the superficial removal amount of calcitrant Orange II at different fungal species was merely similar, removal pathway of enzymatic levels and intermediates produced during the fungal decomposition would be different.

Key Words : Azo Dye, Enzyme, Lac, LiP, Orange II

요약 : 생물처리에 생분해 지표로 이용되는 Glucose를 주 탄소원으로 하고 난분해물질로 알려져 있는 아조계 염료를 부탄소원으로 하여 이들의 저감패턴을 백색 부후균인 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*을 통해 관찰하였으며, 그 결과 두 기질(dual substrate)의 저감 패턴을 정형화된 단계별로 관찰할 수 있었다(새로운 환경 적응기, 주탄소원 소모기, 합성 효소에 의한 부탄소원 소모기). 또한 두 균주의 결보기 최종 Orange II, 색도, COD 제거량을 비교한 결과 최대 5%범위 내에서 유사한 결과를 보여주었으나, 이러한 결과가 반드시 Orange II 분해 과정의 동일성을 의미하는 것은 아니었다. 즉, *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 효소 발현 특성을 분석한 결과, 선행 연구 결과와 함께 다단계로 진행되는 Orange II 분해 과정(Pathway)을 고려할 때, 결보기 Orange II 저감과 직접적으로 연계된 참여 효소로서 *T. versicolor*가 Lac를 이용하였고, *P. chrysosporium*은 LiP를 이용하는 것으로 판단되며, 그에 따라 발현 효소 차이로 인한 분해 과정 및 중간물질 생성이 상이할 것으로 예상된다.

주제어 : Azo계 염료, 효소, Lac, LiP, Orange II, LiP

1. 서론

진균류(Fungi) 중 담자균(Basidiomycete)에 속하는 백색부후균(White rot fungus)은 현재까지 난분해성 오염물질 제거능력이 있다고 알려진 균주(strain)만 65종에 이르고 있으며,¹⁾ 각각의 균주에 따라 성장 특성(최적 성장 조건, 성장 속도, 생성 Biomass 양, 균주/균사 비율 등) 및 난분해성 물질 제거를 위한 효소 특성(효소 발현 조건, 발현 효소 종류, 발현 효소량 등)이 상이한 것으로 보고되고 있다.^{2,3)}

한편, 백색부후균을 이용하여 다양한 난분해성 물질 분해와 직접 연계된 효소 특성 규명에 초점을 둔 많은 연구들이 활발하게 진행되었으며,^{4,5)} 그 결과 초기에는 백색부후균 발현 효소는 분해물질과 비선택적 특성을 지니는 것으로 알려져 왔으나 최근의 추가 연구에 의하면 발현 효소 종류에 따라 제거 대상물질과의 친화도에 차이가 있는 것으로 확인되었다.⁶⁾ 즉, 백색부후균의 주요한 세포외 효소(Extracellular enzyme)인 MnP(Manganese peroxidase), LiP(Lignin peroxidase), Lac(Laccases)는 탄소원, 질소원, 황성분 등이 고갈되었을 때 이차대사산물(Secondary metabolite)로써 생성되어 제거 대상 물질과의 친화도 차이에 따라 난분해성 물질 제거 메커니즘에 연계되는 것으로 밝혀졌다.^{6,7)} 예를 들어, MnP는 Heme 구조를 갖는 당단백질

[†] Corresponding author
E-mail: ohjeill@cau.ac.kr
Tel: 02-820-5339

Fax: 02-812-1834

(Glycoprotein)으로써 Hydrogen peroxide(H₂O₂)의 존재 하에서 Mn(II)를 Mn(III)로 산화시킨 후 산화된 Mn(III)의 추가 산화 반응을 통해 Phenolic compound, Polymetric dyes, Amines 등의 분해가 진행되는 것으로 보고 되고 있으며,⁸⁾ MnP와 같은 Heme 구조의 당단백질인 LiP는 전자 교환을 통해 생성된 양이온 라디칼의 산화반응을 통해 Nonphenolic compound, PAHs(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 분해가 진행되며, Multicopper blue oxidase인 Lac도 양이온 라디칼의 산화반응을 통해 Nonphenolic compound, Aromatic compound 분해가 가능한 것으로 보고되었다.⁹⁾ 그러나 최근 연구에서 앞서 언급한 효소별 분해 가능 물질 외에 MnP의 Nonphenolic compound 분해능이 추가 보고 되고 있으며, LiP와 Lac의 Phenolic compound 분해능이 추가로 제기되는 등 아직까지 효소와 난분해성 오염물질 저감 사이의 명확한 연계 메커니즘이 규명되지 못한 상황이라 할 수 있다.⁶⁾

특히 본 연구의 관심대상인 Azo계 염료(Orange II)의 경우 *Phanerochaete chrysosporium*(이하 *P. chrysosporium*)을 이용한 초기 연구 결과에 따르면 LiP가 주 제거 효소로 반응을 주도하며 Lac는 뚜렷한 제거능이 없는 것으로 보고되었으나,^{10,11)} 최근 *Trametes versicolor*(이하 *T. versicolor*)의 Lac 효소를 이용한 연구에서 Lac 효소도 LiP와는 다른 반응 과정(Pathway)에 따라 Azo계 염료 생분해가 가능한 것으로 보고되는 등 상반된 연구 결과가 양존하고 있는 상황이다.^{12~14)} 이에 본 연구에서는 발현 효소에 의한 Azo계 염료 제거 특성 규명을 위해 Azo계 염료 제거에 효과적인 것으로 알려진 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*을 이용 균주로 선정하여 쉽게 분해가 가능한 탄소원인 Glucose와 난분해성 탄소원인 Orange II (Azo계 염료)를 공급하는 Dual substrate 조건하에서 성장 패턴 및 Orange II 제거 특성을 균주에 따라 상대적으로 비교/평가하였으며, 특히 균주별 발현 효소 종류, 효소 발현 순서, 효소 발현량에 따른 Orange II 제거능 차이를 집중적으로 고찰하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 미생물 배양

본 연구에서는 백색 부후균의 대표종 가운데 *T. versicolor*(ATCC 20869, 건조형태)와 *P. chrysosporium*(KCTC 6147, 건조 형태)을 이용하여 균주별 효소발현 특성에 따른 Orange II 제거 특성 평가를 수행하였다. 선정된 균주는 실험을 위해 생리 식염수(0.8% NaCl)에 희석시킨 후, PDB (potato dextrose broth; 24 g/L)배지에 개별적으로 식중, 배양하였다. 또한 균주의 장기 보존을 위해 초대 배양한 PDB에서 채집한 균주를 PDA(potato dextrose agar; 14 g/L) 배지에 계대 배양하여 단기적으로 보존하였다. 이때 식중된 PDB, PDA배지의 보관은 20℃로 유지된 Incubator에서 이루어졌으며, 본 회분식 실험에 이용된 균주는 4일간 배양된 PDB 배지에서 채취하여 이용하였다.

Table 1. Medium composition for batch test in both species

Species	Orange II (mg/L)	Glucose (mg/L)	Ammonium tartrate (mg/L)	Other Nutrient (1L)
<i>T. versicolor</i>	100	2000	120	- Dimethyl succinate: 146.14 mg
<i>P. chrysosporium</i>				- Thiamin Hydrochloride: 1 mg
				- Basal III medium: 100 mL*
				- Veratryl alcohol : 0.25 g
				- D.I. water

* Basal III medium formulated based on Kirk and Tien⁹⁾

2.2. 실험 방법

부착 성장하는 백색부후균주(*T. versicolor* 및 *P. chrysosporium*)를 이용하는 회분식 실험 조건은 Table 1과 같으며, 분해가 쉬운 탄소원으로 Glucose(C₆H₁₂O₆), 질소원으로는 Ammonium tartrate([−CH(OH)CO₂NH₄]₂)를 이용하였고, Azo계 염료인 Orange II(C₁₆H₁₁N₂O₄SNa; C.I. 15510)를 난분해성 탄소원(오염원)으로 가정하였다. 또한 다른 무기 염류성분(Dimethyl succinate: HOOCCH₂C(CH₃)₂COOH, Thiamin Hydrochloride: C₁₂H₁₇ClN₄OS · HCl, Veratryl alcohol: (CH₃O)₂C₆H₃CH₂OH)은 Kirk's media와 동일하게 조성하였다.⁹⁾ 특히 초기 탄소원 대비 질소원 조건인 C:N ratio는 12:1이 되도록 실험 조건을 조성하여 질소가 부족하지 않는 상태를 조성하였다.

회분식 실험은 선행 연구¹⁵⁾에서 이용한 방법을 참조하여 Open-top cap에 셉타를 적용할 수 있는 500 mL 병을 이용하여 수행하였다. 실험 조건에 따라 고압 증기 멸균기를 이용하여 살균한 기질(탄소원, 질소원, 미량영양분)과 0.45 μm 유리섬유필터를 통해 여과한 Orange II를 혼합하여 총 495 mL의 기질을 준비한 뒤(Orange II를 정량적으로 준비하기 위해서는 사전에 3~4회 정도 흡착시킨 유리섬유필터를 이용하여 멸균조건의 Orange II 용액을 준비하였음), 균주를 식중하였다. 이 때, 균주 식중은 부착 성장 할 수 있는 Polyurethane foam(size = 1 cm × 1 cm × 1 cm, porosity = 40%, density = 0.9) 담체 15개를 선 주입하여 담체에 의한 Orange II의 흡착이 완료되는 24시간 후에 4일간 배양된 PDB배지를 유리솥에 통과시켜 균사가 배제된 액상의 균주 5 mL을 확보, 접종하였다.¹⁶⁾ 이상과 같은 방법으로 진행된 실험은 각각 균주에 대해 3쌍씩(Triplicate) 수행함을 원칙으로 구성하였다.

실험을 위해 준비된 기질의 초기 pH는 4.5~4.7, 초기 DO는 산소 주입을 통해 약 10 mg/L로 맞추었다. 교반기에 탑재한 실험병들은 실험 초기에는 충분한 성장을 위해 180~200 rpm으로 회전시켰고, 효소 발현기에는 Lac 발현을 저해하지 않는 수준인 50~70 rpm으로 교반하였다. 산소는 1일 1회 주입하였으며, 실험 온도는 18~20℃로 유지하였다.

2.3. 분석

Open-top cap에 셉타를 적용한 실험병은 외부와의 차단과 분석을 위한 시료 채취(바늘이 장착된 주사기 이용)가

매우 용이하게 구성되어 있다. 분석을 위해 매 3.5 mL의 시료를 채취한 후, 0.45 μm Syringe filter로 전처리 하였다. Glucose 농도는 시료 0.5 mL를 증류수 0.5 mL, 1% Dinitrosalicylic acid 1 mL와 혼합한 후 90°C에서 10분간 발색(적갈색)시킨 다음에 40% Potassium sodium tartrate 1 mL를 주입하여 색을 안정화한 후 실내 온도에서 방열한 후 UV-spectrophotometer(U-1201, Shimadzu, JAPAN) 575 nm에서 흡광도를 측정하는 DNS method를 이용하여 분석 하였다. NH_4^+ -N과 COD는 각각 시료 0.1 mL, 0.2 mL를 AmVer Reagen Hach kit과 UV-spectrophotometer(DR/2010, Hach, USA)를 이용하여 측정 하였으며, Orange II의 농도는 시료 1 mL를 증류수 2 mL로 희석한 후 483 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석 하였다. 또한 색도는 Adams-Nickerson의 색도 공식을 적용하는 Standard Methods 2120E를 이용하여 분석하였다. 부유 성장 Biomass 농도는 Standard Method 2540b를 이용하여 분석하였고, 부착 성장 Biomass 양은 주입된 15개의 담체(PUF) 각각을 약포지로 포장하여 Biomass의 손실을 막은 후 105°C에서 48시간 건조 후 건조 무게를 측정하여 결정하였다.

한편 효소 활성도(activity of enzyme)는 효소 종류별로 개별 측정하며 LiP는 시료 0.5 mL에 0.33 mol/L Sodium tartrate 0.375 mL, 4 mmol/L Veratrylic alcohol 0.125 mL, D.I. water 0.45 mL를 UV cell에 넣고 마지막으로 10 mmol/L H_2O_2 0.05 mL를 주입한 후 310 nm에서 흡광도를 측정하여 1분간의 1 μmol 의 Veratrylic alcohol을 산화시키는 효소량을 1 Unit(U)로 산정하였다(molar extinction coefficient = 9,300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁶⁾ 또한 Lac는 시료 0.5 mL와 50 mmol/L citrate-phosphate buffer 0.3 mL를 UV cell에 넣고 마지막으로 1.0 mmol/L syringaldazine 0.1 mL를 주입한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 1분간의 1 μmol 의 syringaldazine을 산화시키는 효소량을 1 Unit(U)로 산정하였다(molar extinction coefficient = 65,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁷⁾ 또한 MnP는 시료 0.5 mL와 0.25 mol/L sodium lactate 0.1 mL, 5% bovine albumin 0.2 mL, 2.0 mmol/L MnSO_4 0.05 mL, 0.1% phenol red 0.1 mL를 UV cell에 넣고 마지막으로 2.0 mmol/L H_2O_2 0.05 mL를 주입한 후 610 nm에서 1 μmol 의 H_2O_2 를 산화시키는 효소량을 1 Unit(U)로 산정하였다(molar extinction coefficient = 2,200 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁸⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 곰팡이 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 성장 특성 비교

대표적 백색부후균주인 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*을 앞서 언급한 Table 1과 같은 배치 실험 조건에 따라 배양한 결과 아래 Fig. 1과 같은 Glucose 및 Orange II 저감 패턴을 확인할 수 있었다.

*T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 단계별 Glucose 및 Orange II 소비 패턴은 두 기질, 즉 1차로 쉽게 분해되는

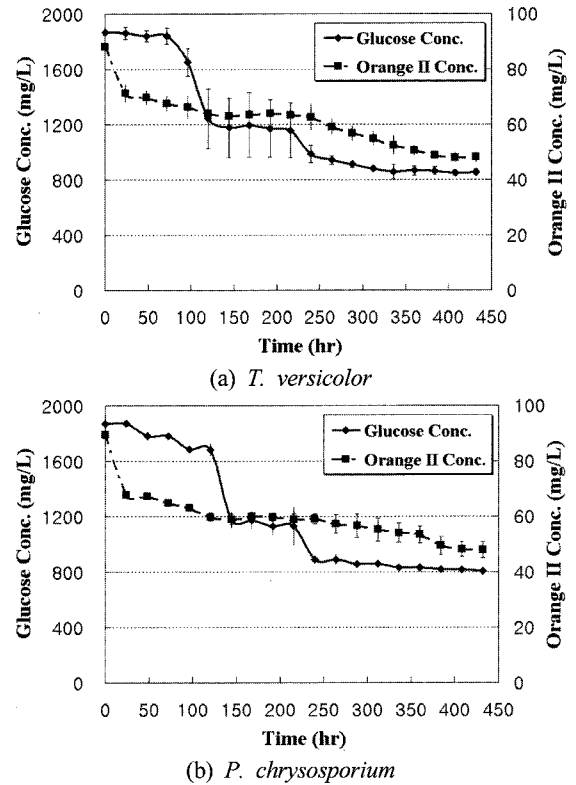


Fig. 1. Profiles of glucose and orange II removal during the experimental period

탄소원인 Glucose와 추후 Co-metabolism(효소 발현)에 의한 난분해성 Orange II 저감 사이에는 밀접한 연계가 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 이번 연구에서 확인된 실험 결과 및 본 연구진의 선행 연구¹⁵⁾를 종합한 결과, 쉽게 분해 가능한 기질(주탄소원)과 난분해성 기질(부탄소원)이 동시에 존재할 경우(dual substrate 조건) 백색 부후균의 단계별 주탄소원-부탄소원 소비 패턴을 Glucose-Orange II 사례를 통해 아래 Fig. 2와 같이 일반화할 수 있다.

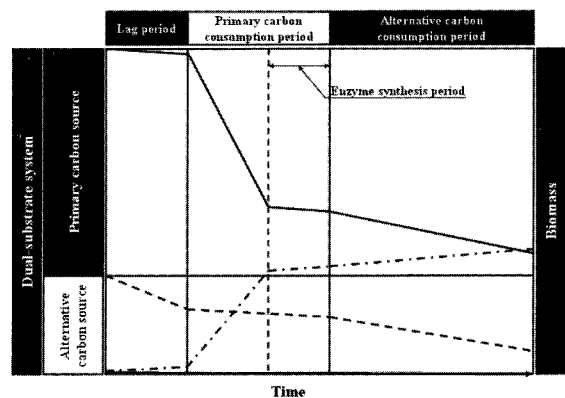


Fig. 2. Conceptual profiles of typical stepwise reduction of dual substrate (e.g., glucose-orange II) and typical biomass growth with White rot fungi such as *T. versicolor* and *P. chrysosporium*: Primary carbon source (—), Alternative carbon source (---), and Biomass (· · ·).

Fig. 2는 시간에 따른 상대적인 주탄소원-부탄소원(섭취가 쉬운 주탄소원과 추가적인 효소 대사를 요하는 난분해성 탄소원)의 저감 경향을 각각 탄소원의 상대적 저감 정도에 따라 비교 도시화한 후, 각각의 탄소 감소량에 따른 총 Biomass 생성량을 선행 연구¹⁹⁾에서 도출한 Yield 값(0.24)을 참조하여 개략적인 Biomass 생성량 경향을 표시한 것이다. 종합해보면 백색부후균이 본 연구와 같은 Dual substrate 조건 하에서 성장하게 되면 다음과 같은 단계별로 성장하게 된다. 먼저 최초 적응기(혹은 지체기)에서는 새로운 환경에 적응하면서 섭취가 쉬운 주탄소원 소비가 시작되고 그에 따라 미량의 Biomass가 생성되는 단계로써, 성장 Biomass(부유 성장 균사)에 의한 난분해성 부탄소원 흡착이 초기 이 부분에서 어느 정도 발생한다. 두 번째 단계인 주탄소원 소모기(Primary carbon consumption period)에서는 두 기질 가운데 상대적으로 섭취가 쉬운 주탄소원의 왕성한 소비와 함께 본격적인 Biomass 생성이 이루어지며, 난분해성의 부탄소원은 효소 발현이 아직 이루어지지 않은 상황에서 성장 Biomass 흡착에 의한 미미한 추가 저감 추세를 보여준다. 한편 이러한 주탄소원 소모기 말기에는 명확한 구간 분리는 어려우나, Biomass 생성을 위한 왕성한 주탄소원 소모가 거의 감소하는 시기이며, 부가적인 효소 작용을 통한 부탄소원 소모도 일어나지 않는 효소 합성기(효소 발현 지체기)가 포함된다. 마지막 발현 효소에 의한 부(대체)탄소원 소모기(Alternative carbon consumption period)에서는 주탄소원 소모기에 비해 소비율은 낮으나 세포의 효소 합성 및 발현을 위한 에너지원으로 주탄소원 소비가 발생하고(Biomass 생성은 상대적으로 적음), 발현 효소 작용에 의한 본격적인 부탄소원 소비가 시작되는 최종 단계에 이르게 된다. 한편 이러한 부탄소원(본 연구에서는 Orange II) 저감 과정이 완료되는 시기(본 연구에서는 약 Glucose 340 mg-C/L 농도 조건)가 관찰되는데, 이는 효소 활동성에 필요한 부가적인 촉매(H₂O₂, V.A 등) 발현이 둔화되었기 때문이다.^{13,14)}

이상과 같은 백색부후균의 단계별 주탄소원-부탄소원 소비 과정에서 발생한 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 Glucose/Orange II 소비량과 생성 Biomass의 정량적인 상대적 비는 아래 Table 2와 같이 정리할 수 있다.

Table 2. Relative Glucose/Orange II consumption ratio according to the biomass growth at each experiment of *T. versicolor* and *P. chrysosporium*

Species	Initial glucose Conc. (mg/L)	Total biomass ΔX* (mg/L)	Glucose		Orange II	
			ΔS _G ** (mg/L)	ΔS _G /ΔX (mg/mg)	ΔS _O *** (mg/L)	ΔS _O /ΔX (mg/mg)
<i>T. versicolor</i>	2,000	623.3±10.3	1,013±8.8	1.63±0.11	39.89±2.69	0.06±0.002
<i>P. chrysosporium</i>		644.0±7.0	1,070±21.7	1.67±0.25	41.22±3.93	0.06±0.004
Relative ratio [†]		0.97	0.95	0.98	0.97	1.00

* Total biomass growth during the experimental period, ** Glucose consumption during the experimental period, *** Orange II removal during the experimental period, [†] Relative ratio = *T. versicolor* / *P. chrysosporium*

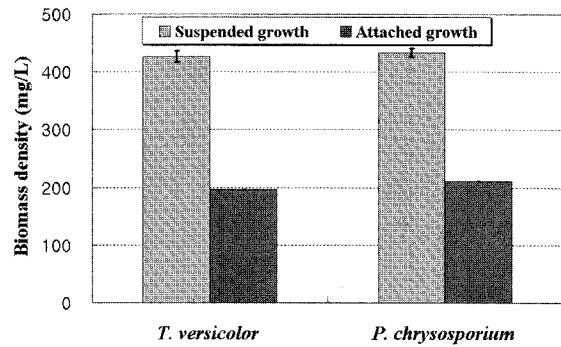


Fig. 3. Comparison of final biomass densities at each growth pattern of *T. versicolor* and *P. chrysosporium*, suspended and attached.

Table 2를 통해 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 Glucose/Orange II 소비량 및 생성 Biomass를 비교한 결과 5% 범위 하에서 매우 유사한 경향을 보여주었다. 즉 이러한 결과 총 기질 소비와 총 Biomass 성장 패턴은 차이점이 확인되지 않았으며, 아래 Fig. 3에서 보여준 부유/부착 성장 유형별 Biomass 측정 결과를 분석해보면 성장 유형별 특이성도 없는 것으로 관찰되었다.

3.2. *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 Orange II 저감 특성 비교

본 절에서는 곰팡이 균주별 Orange II 제거 특성을 보다 자세히 살펴보기 위해 비교 항목을 Orange II, 색도, COD로 세분화 한 후 아래 Table 3과 같이 상대적 비교를 수행해 보았다.

Table 3. Relative ratios of Orange II, Color, and COD removal during the experimental period of *T. versicolor* and *P. chrysosporium*

Species	Total biomass (mg/L)	Orange II removal (mg/L)	Color removal (NTU)	COD removal (mg/L)
<i>T. versicolor</i>	623.3±10.3	39.89±2.69	2593.44±248.93	43.3±4.16
<i>P. chrysosporium</i>	644.0±7.0	41.22±3.93	2453.26±363.91	40.0±6.07
Relative ratio	0.97	0.97	1.06	1.1

* Relative ratio = *T. versicolor* / *P. chrysosporium*

난분해성 물질인 Orange II 저감에 따라 비례적인 저감이 예상되는 색도 및 COD 관점에서 보다 자세히 살펴보면, *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 걸보기 Orange II, 색도, COD의 총량적인 최종 저감 정도 비율은 편차가 크지 않았다. 그러나 이상과 같이 측정된 최종 Orange II-색도-COD 제거량 비율의 유사성이 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 Orange II 분해과정(Pathway)의 동일성을 의미하는 것은 아니다.²⁰⁾ 발현 효소 종류에 따라 상이하게 전개되는 다양한 분해과정과 그에 따른 상이한 중간물질 생성 개연성은 최종적인 Orange II 농도-색도-COD 저감정도가 같더라도 많은 선행 연구^{12,13)} 결과로 추론해 볼 때, 보다 세밀한 Orange II 제거 특성 평가는 균주별 효소 특성(발현 효소 종류, 효소 발현 순서, 발현량) 분석을 통해 이루어져야 할 것으로 판단되어진다.

3.3. *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 효소 발현 특성

Orange II 저감과 관련된 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 효소 발현 특성을 비교, 검토하고자 아래 Fig. 4와 같이 균주별 주요 발현 효소(LiP, MnP, Lac) 활성도를 실험 기간동안 측정하였다.

Fig. 4를 통해 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium* 두 균주 모두 백색 부후균의 대표적 발현 효소인 LiP, MnP, Lac를 발현하는 것으로 확인되었으며, 효소 발현 순서에 있어서도 MnP→Lac→LiP 순으로 동일하게 관찰되었다. 그러나 LiP 효소 발현 시기에 있어서 *P. chrysosporium*이 *T. versicolor*에 비해 약 168 hrs 빠르게 발현하는 등 효소별 발현 시점은 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 Orange II 저감 시점(*T. versicolor* = 264 hrs; *P. chrysosporium* = 240 hrs)과 효소발현 시점을 분석하여, Orange II 1차 저감과 가장 밀접한 관계를 갖는 참여 효소로써 *T. versicolor*는 Lac(168 hrs 이후 발현)이, *P. chrysosporium*는 LiP(148 hrs 이후 발현)인 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Azo계 염료 제거 효소로 *T. versicolor*의 Lac와 *P. chrysosporium*의 LiP를 지목한 기존의 선행 연구 결과와도 일치하는 것이다.^{10,14)} 이와 같은 균주 간 참여 효소 차이로 보아 앞서 언급한 바와 같이 두 균주는 효소에 따라 상이하게 전개되는 다양한 분해과정과 그에 따른 상이한 중간물질 생성 개연성이 높을 것으로 예상할 수 있었다.¹³⁾ 또한 다단계로 진행되는 Orange II 분해 과정(Pathway)을 고려할 때, 걸보기

Orange II 저감과 직접적으로 연계된 참여 효소 외에도 다른 발현 효소가 Orange II 분해 과정에 부분적으로 참여할 수 있는 가능성을 배제할 수는 없었으나,¹²⁾ 본 연구 결과만으로 다른 발현 효소의 역할을 규명하기는 어려웠다.

한편 Fig. 4와 같이 효소 발현 초기부터 등간격(식 (1)에서 h)으로 측정된 효소 활성도(식 (1)의 X_0, X_1, X_2, X_3)를 Simpson 3/8 수치공식(식 (1) 참조)에 적용하여 균주별 참여 효소의 발현량(enzyme amount, 식 (1)의 Area)을 산정할 수 있었다.²¹⁾

$$Area = \frac{3}{8}h \times (X_0 + 3X_1 + 3X_2 + X_3) \quad (1)$$

또한 Simpson 3/8 수치공식으로 산정한 발현 효소량과 그에 따른 Orange II, 색도, COD 제거량 관계는 아래 Table 4와 같이 정리할 수 있다.

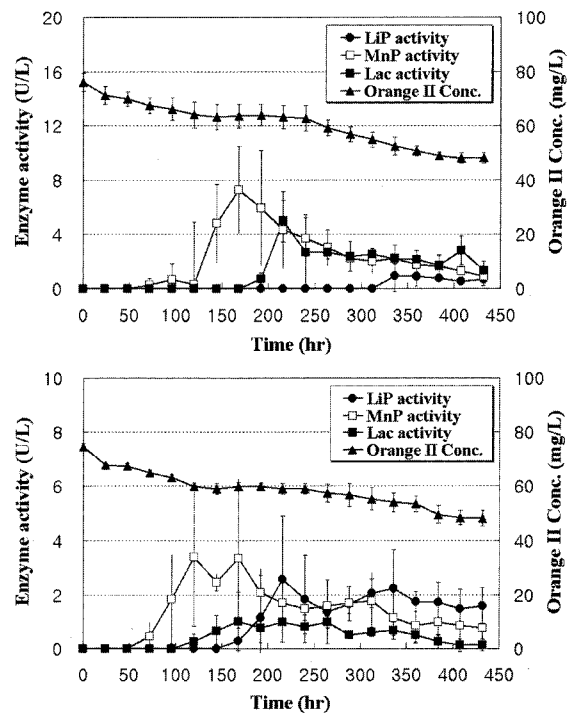


Fig. 4. Various enzyme-activity profiles coupled with Orange II removal during the experimental period. (a) *T. versicolor* and (b) *P. chrysosporium*.

Table 4. Removal ratios of Orange II, Color and COD normalized by the amount of primary fungal enzyme expressed during the *T. versicolor* and *P. chrysosporium* growth

Species	Enzyme amount, ΔE (U · hr/L)	Orange II		Color		COD	
		Removed amount, ΔS_o (mg/L)	$\Delta S_o / \Delta E$ (mg/U · hr)	Removed amount, ΔS_c (NTU)	$\Delta S_c / \Delta E$ (NTU/U · hr)	Removed amount, ΔS_{COD} (mg/L)	$\Delta S_{COD} / \Delta E$ (mg/U · hr)
<i>T. versicolor</i>	562.10±31.27 (Lac)	39.89 ±2.69	0.07 ±0.003	2593.45 ±248.93	4.61 ±0.44	43.3 ±4.16	0.08 ±0.007
<i>P. chrysosporium</i>	455.40±43.64 (LiP)	41.22 ±3.93	0.09 ±0.006	2453.26 ±363.91	5.39 ±0.80	40.0 ±6.07	0.09 ±0.010

Table 4를 통해 균주별 Orange II 제거 효소 발현량은 *T. versicolor*의 Lac가 562.10±31.27 U·hr/L이고, *P. chrysosporium*의 LiP가 455.40±43.64 U·hr/L인 것으로 확인되었다. 또한 효소 발현량(ΔE) 대비 저감된 Orange II(ΔS₀) 저감 정도를 비교한 결과 *T. versicolor*의 경우 0.07±0.003 mg/U·hr 이고, *P. chrysosporium*의 경우 0.09±0.006 mg/U·hr으로 효소 간 Orange II 저감 정도는 비교적 유사하였으며, 이러한 경향은 색도(ΔS_C)와 COD(ΔS_{COD}) 저감에서도 공통적으로 확인할 수 있었다. 이는 결론적으로 발현 주효소량 대비 Orange II 제거량(ΔS₀/ΔE)에 있어서 두 효소 간 차이가 크지 않음을 의미하는 것으로서 이러한 결과를 통해 백색 부후균 연구⁹⁾ 초기 제기된 Lac 효소와 Azo계 염료의 비 반응성과 달리 Lac 효소의 Azo계 염료 제거 가능성을 제시할 수 있었다.²²⁾

4. 결론

본 연구에서는 대표적인 백색 부후균주인 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 Orange II 제거 특성에 대한 비교/평가를 실시하였으며, 그 결과 아래와 같은 결론을 획득할 수 있었다.

1) 백색부후균인 *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*은 매우 유사한 Glucose(주탄소원), Orange II(부탄소원) 저감 패턴을 보였으며, 이를 통해 분해가 쉬운 주탄소원과 난분해성의 부탄소원으로 조성된 Dual substrate 조건에서 백색 부후균은 초기 지체 성장기, 대부분의 Biomass 성장을 위한 주탄소원 소모기, 효소 작용에 의한 부탄소원 소모기와 같은 탄소원 소비 단계를 갖는 것으로 확인할 수 있었다.

2) 또한 균주별 관찰된 Orange II, 색도, COD의 총량적인 저감 비율은 각각 3%, 6%, 1%로 그 차이가 크지 않았으며, 이러한 것이 균주 별 상이하게 전개되는 다양한 분해과정과 그에 따른 상이한 중간물질 생성 개연성이 낮은 것을 의미하지는 않는다.

3) *T. versicolor*와 *P. chrysosporium*의 효소 발현 종류 및 발현 순서가 일치하였다. 두 균주 모두 백색 부후균의 대표적 효소인 LiP, MnP, Lac를 MnP→Lac→LiP 순으로 발현하는 것으로 확인되었다. 한편, Orange II 저감 시점과 효소발현 시점을 분석한 결과, Orange II 1차 저감과 가장 밀접한 관계를 갖는 참여 효소로써 *T. versicolor*는 Lac이, *P. chrysosporium*은 LiP인 것으로 판단되었다.

4) 균주별 Orange II 제거 발현 주효소량 대비 Orange II 제거량(ΔS₀/ΔE)을 살펴본 결과 *T. versicolor*(주효소 Lac)의 경우 0.07±0.003 mg/U·hr이고, *P. chrysosporium*(주효소 LiP)의 경우 0.09±0.006 mg/U·hr으로 두 효소 간 Orange II 저감 정도는 비교적 유사하였다.

사 사

이 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Ibrahim, M. B., Poonam, N., Dattel, S., and Roger, M., "Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review," *Bioresour. Technol.*, **58**, 217~227(1996).
2. Tuor, U., Winterhalter, K., and Fiechter, A., "Enzyme of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay," *J. Biotechnol.*, **41**, 1~17(1995).
3. Yuzhu, F. and Viraraghavan, T., "Fungal decolorization of dye wastewaters: a review," *Bioresour. Technol.*, **79**, 251~262(2001).
4. Conneely, A., Smyth, W. F., and McMullan, G., "Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*," *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 333~337(1999).
5. Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziengenhagen, D., Wasilewska, W. M., Cho, N. S., and Hofrichter, M., "Biodegradation of lignin by white rot fungi," *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 175~185(1999).
6. Mester, T. and Tien, M., "Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants," *Int. Biodegr. Biodeter.*, **46**, 51~59(2000).
7. 김기은, "백색부후균에 의한 공업폐수의 탈색 효과 I," 산업기술연구소 논문집, **4**, pp. 105~112(1998).
8. Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., and Zeikus, J. G., "Influence of culture parameters of lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*," *Arch. Microbiol.*, **85**, 117~177(1978).
9. Kirk, T. K. and Tien, M., "Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*," *Methods Enzymol.*, **161B**, 238~248(1988).
10. Helena, P., Irena, G., and Anton, P., "Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*," *Chemosphere*, **38**(6), 1353~1359(1999).
11. Adosinda, M. M., Queiroz, M. J., Silverstre, A. J. D., and Lima, N., "Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation," *Res. Microbio.*, **153**, 361~368(2002).
12. Stolz, A., "Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes," *Appl. Microbial Biotechnol.*, **56**, 69~80(2001).
13. Ana, C., Peter, J. P., Cees A. M., and Van den hondel, J. J., "Fungal peroxidases: molecular aspects and applications," *J. Biotechnol.*, **93**, 143~158(2002).
14. Tim, R., Bennett, C., and Poonam, N., "Studies on the production of enzyme by white-rot fungi for the de-

- colourisation of textile dyes," *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 575~579(2001).
15. 김학윤, 오재일, 최영화, "백색 부후균(*Phanerochaete chrysosporium*)을 이용한 Azo계 염료 제거-보충 탄소원 및 질소원 조건의 영향," *대한환경공학회지*, **25**(12), 1481~1490(2003).
 16. Fan-Chiang, Y. and Jih-Tzong, Y., "Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization," *Bioprocess Eng.*, **15**, 307~310(1996).
 17. Kirby, N., "Bioremediation of textile industry waste water by white-rot fungi. Ph D Thesis," Coleraine, Northern Ireland: University of Ulster(1999).
 18. Tien M. and Kirk T. K., "Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*," *Method Enzyme*, **49**, 161~238(1988).
 19. Paszczynski, A., Crawford, R. K., and Huynh V. B., "Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*," *Method Enzyme*, **161**, 264~270(1988).
 20. Wesenberg, D., Kyriakides, I., and Agathos, S. N., "White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents," *Biorechnol. Adv.*, **22**, 161~187(2003).
 21. Howard, R. L., Masoko, P., and Abotsi, E., "Enzyme activity a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase expresses as a heterologous protein from *Escherichia coli*," *African J. Biotechnol.*, **2**(9), 296~300(2003).
 22. Swamy, J. and Ramsay, J. A., "Effects of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*," *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 278~284(1999).