

백색부후균 *Polyporus brumalis*에 의한 프탈산의 분해*¹

이수민*² · 박기령*² · 이성숙*³ · 김명길*³ · 최인규*^{2†}

Biodegradation of Phthalic acid by White rot Fungus, *Polyporus brumalis**¹

Soo-Min Lee*² · Ki-Ryung Park*² · Sung-Suk Lee*³ · Myung-Kil Kim*³ · In-Gyu Choi*^{2†}

요 약

플라스틱 가소제로 사용되고 있는 프탈레이트류(phthalate esters)의 백색부후균에 의한 분해 특성을 확인하기 위해 본 연구에서는 프탈레이트 제조에 사용되고 있는 전구체로서 프탈산(phthalic acid)의 분해를 *Polyporus brumalis*를 이용하여 확인하였다. 프탈산(phthalic acid) 50 ppm을 액상 배지에 처리하고 균체에 의한 프탈산의 감소율을 확인한 결과, 배양 4일 후부터 감소하기 시작하여 배양 24일에는 배지 내에서 검출되지 않아 완전히 분해되었음을 확인하였고, 배양 기간 동안 리그닌 분해 효소 활성 변화는 배양 10일 후부터 대조구에 비해 프탈산 처리구의 효소 활성이 저조하게 나타남을 확인하였다. Esterase의 경우에는 대조구에서 보여지는 효소 활성 변화와는 달리 배양 10일 이후에 지속적으로 증가하는 것을 확인하였다. 영양원으로 사용된 glucose는 배양 6일째까지는 대조구와 프탈산 처리구간에 감소율이 유사하였으나, 이후 배양 시간이 연장됨에 따라 배지 내에서 급격하게 감소하는 것을 확인하여 대조구에 비해 프탈산 처리구가 glucose 소모율이 낮았다. 이는 프탈산이 균체에 흡수된 후에 대사작용에 이용되기 때문이라 사료된다. 또한, 균체의 효소에 의한 프탈산의 화학적 구조변화를 GC/MS를 이용하여 분석한 결과 반응 12시간 이내에 무수프탈산으로 탈수 반응이 급격히 진행되는 것을 확인하였다.

ABSTRACT

Phthalate esters are known as plasticizers and some of them suspected as endocrine disrupting chemicals. In this study, in order to identify the mechanism of phthalate esters degradation by white rot

*¹ 접수 2004년 11월 22일, 채택 2004년 12월 15일

*² 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. of Forest science, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*³ 국립산림과학원 Dept. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea
† 주저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

fungus, phthalic acid, which is major metabolite in the biodegradation of phthalate esters, was used. Phthalic acid 50 ppm was treated in culture medium with *Polyporus brumalis*. The availability of ABTS oxidation was different from control and phthalic acid treated group after 4 days of incubation. The activity was gradually increased in control group, but not in phthalic acid treated group. Especially, esterase activity of control group was maximized at 10 days of incubation, and then decreased while the activity of phthalic acid treated group was increased. Glucose was used as a carbon source, and the difference of glucose consumption by control and phthalic acid treated group was not significant. However, after 6 days of incubation the residual glucose in culture medium was rapidly decreased. The consumption rate of phthalic acid treated group was lower than control. These results might indicate that the absorption of phthalic acid in culture medium was occurred by mycelium and metabolized through some pathways as that of glucose was. To clarify the chemical modification of phthalic acid in culture medium, phthalic acid was reacted under *in vitro* condition which mycelium was excluded. The metabolites were analyzed by GC/MS. The results showed that phthalic acid was converted to phthalic acid anhydride by the extracellular enzymes of *P. brumalis*.

Keywords: phthalic acid, biodegradation, white rot fungus, *Polyporus brumalis*, lignin degrading enzymes

1. 서 론

내분비계 장애물질은 환경 중에서 체내로 유입되어 여성호르몬인 에스트로겐(estrogen)과 유사한 작용을 하는 물질로 정의된다. 이들은 에스트로겐과 유사한 스테로이드 구조를 지니고 있지는 않으나, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor)의 estrogen response element (ERE)와 결합함으로써 체내 호르몬 수준에 영향을 미치면서, 여러 부정적인 생리작용을 유발하는 것으로 알려져 있다(Sato *et al.*, 1991). 내분비계 장애물질의 대부분은 석유화학제품에서 생산되는 물질들로 이루어져 있고, 생활 전반 및 산업 각 분야에서 대량으로 사용되고 있다. 이미 1990년대 후반 세계야생동물보호기금(WWF)에서는 67종의 내분비계 장애물질을 선정하였으며, 그 이후 미국, 일본 등에서도 자국의 실정에 맞는 기준을 설정하여 이러한 화학물질을 규제·관리하고 있다.

프탈레이트류(phthalate esters)는 프탈산(phthalic acid)에 alkyl chain이 에스터 결합을 이루고 있는 물질로 대량 생산되고 있다(Fig. 1). 프탈산 구조에서 에스터 결합을 하고 있는 축쇄의 종류에 따라 프탈레이트류는 약 18종이 상업적인 용도로 사용되고 있

며, polyvinyl chloride (PVC) 수지에서 제품에 유연성을 부여하기 위한 플라스틱 가소제로 가장 많이 사용되고 있다(Staple *et al.*, 1997). 그 밖에 이들의 사용용도는 매우 광범위하여, 잉크, 페인트, 바닥재 등의 첨가제로 다량 사용되고 있으며, 생활과 매우 밀접한 관계가 있는 포장지, 화장품, 향수, 샴푸 및 린스 등의 제품에도 첨가된다.

프탈레이트류들은 플라스틱 내부에서 수지와 결합을 하지 않기 때문에 쉽게 유출될 수 있는 가능성이 있으며, 자연 생태계에서 쉽게 분해되지 않기 때문에 환경에 축적되어 먹이사슬을 통해 인간과 동물의 체내에 농축된다. 최근 미국 환경부(EPA)에서 선정한 위험 화학물질 275종 가운데 총 4종의 프탈레이트류가 포함되어 있는데, dibutyl phthalate가 가장 높은 위험도를 지니고 있는 것으로 발표하였다(<http://www.atsdr.cdc.gov/clist-supportdoc.html>).

최근 이러한 내분비계 장애물질을 포함한 환경오염 물질을 미생물을 이용한 생물공학적인 방법을 이용하여 처리하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며 특히, 박테리아를 이용하여 내분비계 장애물질 및 난분해성 물질의 미생물분해 연구가 주된 대상으로 이루어지고 있다(Ronen & Abeliovich, 2000; Lobos *et al.*, 1992;

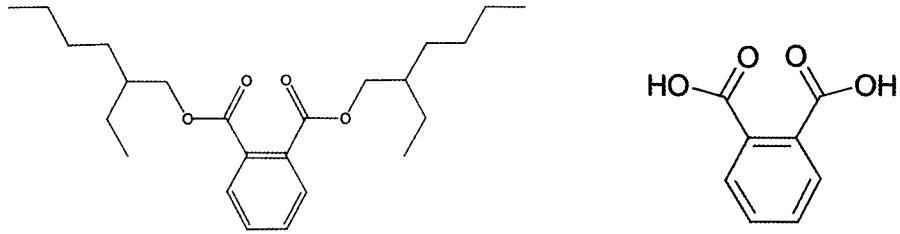


Fig. 1. Chemical structures of di-(ethylhexyl) phthalate and phthalic acid.

Furusawa *et al.*, 2000; Chatterjee & Dutta, 2003). 백색부후균인 관막버섯(*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(Lee *et al.*, 2004).

백색부후균의 비특이적인 균체의 효소를 이용한 분해 시스템은 박테리아의 선택적 분해 작용과는 달리 광범위한 분해능을 지닌다. 이러한 분해에 관련된 주요 균체의 효소로는 목질부의 리그닌을 선택적으로 분해하는 효소로 잘 알려져 있는 lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, Mn-independent peroxidase 및 laccase 외에도(Tien & Kirk, 1984), 셀룰로오스 분해 및 균 성장과 관련된 cellulase, oxidase 류 등의 여러 효소들이 성장 환경에 맞추어 운용되고 있어 생물 복구(bioremediation) 분야에서 백색부후균의 중요성을 확인하는 계기가 되고 있다. 백색부후균 관련 난분해성 물질의 분해 연구는 *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pleurotus ostreatus* 등 다양한 균을 대상으로 진행되고 있으며(Glen *et al.*, 1986), 국내에서는 국내 자생 백색부후균을 이용하여 난분해성 환경오염물질인 여러 종류의 페놀류를 분해하는 연구가 이루어졌다(최와 안, 1998; 안과 최, 1998; 최 등, 2002, 이 등, 2004).

본 연구에서는 백색부후균인 *Polyporus brumalis*를 이용하여 프탈레이트류의 분해과정을 확인하기 위한 방법의 일환으로 프탈레이트류 생산에 사용되는 전구체인 프탈산의 백색부후균에 의한 분해, 균체외 효소의 역할 및 화학적 구조 변화 가능성을 확인해보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균

국립산림과학원으로부터 분양받은 겨울우산버섯(*Polyporus brumalis*)을 공시균으로 사용하였다. 분양받은 균은 potato dextrose agar (PDA)에 매 1 개월 마다 계대 배양을 수행하였으며, 실험에 사용되기 전까지 4°C에서 보관하였다.

2.2. 배양

리그닌 분해 효소 활성을 증가시키기 위해 Tien과 Kirk (1984)가 사용하였던 박충고정상(SSC) 배지를 약간 변화시켜 사용하였다. 본 실험에서 사용된 액체 배지 1ℓ에는 glucose 10 g, (NH₄)₂C₄H₄O₆ 0.5 g, Thiamine-HCl 0.5 mg, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, Ca(H₂PO₄)₂ 0.5 g, 그리고 소량의 무기질 혼합물(MgSO₄ 3 g, NaCl 1 g, MnSO₄ 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CoCl₂ 0.1 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CuSO₄ 0.1 g, AlK(SO₄)₂ · 12H₂O 10 mg, nitriloacetic acid 1.5 g을 1ℓ의 증류수에 첨가하여 0.2 μm 여과지를 이용하여 여과 후 배지에 첨가)이 첨가되었으며, pH는 4.5로 조정하였다. 접종은 PDA 배지에서 7일간 전배양된 균을 대상으로 8 mm 직경의 plug을 제조한 후 배지 20 ml 당 1 개의 plug을 접종하였으며 25°C에서 정치배양을 수행하면서 균생장을 관찰하였다.

2.3. 프탈산 첨가

시약용 프탈산(*ortho*-phthalic acid)을 Junsei chemicals Ltd.에서 구입하여 사용하였다. 프탈산은 프탈레이트류를 만드는 전구체로 대량 사용되어지며 물에 대한 용해도는 약 5.9 g/ℓ 인 것으로 알려져 있다. 따라서, stock solution을 5,000 ppm의 농도로 증류수에 용해시켜 제조하였으며, *P. brumalis*에 투입하기 전에 0.2 μm polyvinylidene fluoride (PVDF) 필터로 여과하여 최종 농도가 50 ppm이 되도록 처리하였다. 균주 접종과 동시에 프탈산을 처리하여 배양 기간 동안 주기적으로 프탈산 처리구와 미처리 대조구에서 균의 생리적 변화를 관찰하였다.

2.4. 조효소액 제조 및 프탈산 첨가

균체가 배제된 상태에서 프탈산의 화학적 구조에 변화가 있는지 여부를 확인하기 위해 조효소액을 제조하였다. 먼저, 접종 후 14일 동안 액체배지에서 배양된 *P. brumalis*를 대상으로 Whatmann No. 2 여과지를 이용하여 균체를 제거한 후 0.2 μm PVDF 필터를 이용하여 배지 내의 포자 및 균사 잔유물을 제거한 다음 이를 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 제조 후에 프탈산을 50 ppm의 농도로 첨가한 후, 조효소액 내에서의 시간의 경과에 따른 효소활성 변화와 프탈산의 농도 변화를 관찰하였다.

2.5. 단백질 정량 및 효소 역가 측정

배지 내 효소 활성 변화를 확인하기 위해, 1일부터 24일 동안 배양시킨 각각의 시료에 대해 Whatmann No. 2 여과지를 사용하여 감압 상태에서 여과를 수행하였으며, 이를 조추출액으로 이용하였다. 배지 내 단백질량은 bradford assay 방법(Bradford, 1976)을 이용하였으며, 리그닌 분해효소로 MnP (manganese-dependent peroxidase)와 laccase의 역가 및 esterase의 활성을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 먼저, MnP 역가는 ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))(0.08 g/ℓ)를 기질로 사

용하여 H₂O₂ (0.1 mM), MnSO₄ (0.2 mM) 및 0.2 M citrate 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 buffer를 이용하였다. MnP와 laccase의 역가는 ABTS를 기준으로 $\epsilon_{414} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 적용하여 계산하였다. Esterase의 역가는 Fett 등(1992)이 제시한 p-nitrophenyl butyrate를 기질로 사용하여 50 mM sodium acetate (pH 5.5)에서 p-nitrophenyl butyrate가 esterase에 의해 1시간 동안 반응 후 0.1 M sodium borate를 이용하여 발색시켜 생성되는 p-nitrophenyl의 양을 400 nm에서 관찰하였다. 균체 외 배지에서 esterase의 역가는 1 시간 동안 반응에서 생성되는 1 nmol의 p-nitrophenol을 1 unit으로 정의하였다.

2.6. 배지 내 Glucose 함량 변화

배지 내에 잔류되어 있는 glucose의 양을 확인하기 위해 Miller 등(1958)이 제시한 방법을 사용하였다. Dinitrosalicylic acid 10 g, phenol 2 g, sodium sulfite 0.5 g, rochelle salt 200 g을 500 ml의 2% NaOH 용액에 용해시킨 후 최종 1ℓ 부피로 희석하여 일정 비율로 배지와 혼합하고 100°C에서 5분간 반응시켜 발색을 유도하였다. 상온으로 냉각 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 제작한 glucose 표준 곡선과 비교하여 정량 분석을 수행하였다.

2.7. HPLC 분석

프탈산은 에스터 구조를 지니고 있는 프탈레이트류에 비해 용해도가 상당히 높아 배지 내에서 안정성을 지니므로, 2.5 항에서의 실험을 수행하기 위해 제조된 조추출액을 대상으로 0.45 μm PVDF 필터로 여과를 수행한 후에 직접 추출액을 HPLC에 주입하였다. 분석에 사용된 HPLC는 Spectrasystem P2000이었으며, Microsolv C18 (particle 5 μm, length 25 cm) 컬럼을 사용하였다. 용매 조건은 프탈산이 지니고 있는 카르복실기의 특성에 의해 역상 HPLC에서 매우

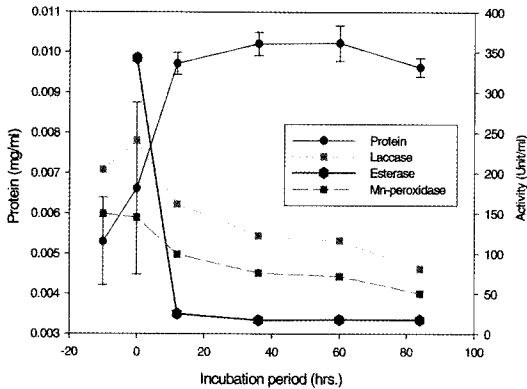


Fig. 2. Enzyme activities in crude extracellular enzyme solution of *P. brumalis*.

앞부분에 용출되는 성질을 지니므로 보류 시간을 조정하기 위해 50 mM phosphate buffer (pH 3)와 CH₃CN(87:13, v/v)에서 isocratic 조건을 유지하였다. 0.7 ml/min 속도로 20분 동안 용출하여, 280 nm에서 프탈산의 감소율을 정량적으로 분석하였다.

2.8. GC/MS 분석

균체 및 배지 내 잔존하는 여러 효소들이 프탈산의 화학적 구조 변화 유도를 확인하기 위해 2.4의 방법을 이용하여 조추출액을 제조한 후 동일량의 ethylacetate를 이용하여 분별할때기에서 10분간 격렬하게 흔든 다음, 층 분리가 일어나도록 상온에서 방치하였다. ethylacetate 추출물을 감압농축하여 최종 3 ml가 되도록 하였다. 여기에서 1 ml를 N₂ 가스를 이용하여 용매를 증발시킨 후에 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 이용하여 65°C에서 1시간 동안 반응시켜 유도체를 제조하였으며, 동일 부피의 pyridine을 촉매로 사용하였다. 대사산물 분석은 gas chromatography (HP 4890)-mass spectrometry (HP 5792)를 사용하였다. Carrier gas는 He, 유속은 1.0 ml/min이었으며 컬럼은 HP-5 MS (0.25 μm × 30 m)를 이용하였다. 주입부 온도는 250°C로 splitless 모드로 사용하였고, 검출부의 온도는 300°C였으며 오븐 온도는 80°C에서 10분간 유지한 후, 6°C/min의 속도로 300°C까지 승온시킨 다음 300°C에서 5분간 유지

하면서 분석을 수행하였다. GC의 컬럼은 mass selective detector에 직접 연결되었으며 물질 분석은 EI 모드에서 70 eV, 50-400 amu로 2초간 scanning하여 내장된 library (Wiley Registry of Mass Spectra Data, 7th ed.)와 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균체의 효소에 의한 프탈산의 화학적 구조 변화

먼저, 균체의 효소가 프탈산의 화학 구조 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 *P. brumalis*를 14일 간 배양한 액체 배지를 사용하여 조효소액을 제조하였다. Fig. 2는 조효소액에서의 리그닌 분해 효소 및 프탈레이트류의 에스터 결합을 개열시키는 esterase의 효소활성 변화를 보여 준다. 조효소액 내 단백질량은 반응시간이 증가됨에 따라 약 10시간 경과 후에 1.5 배 가량 증가 후 그 이후로는 비슷한 수준을 유지하였다. 이는 조효소액 내에 존재하는 단백질 분해 효소에 의한 영향으로 판단된다.

조효소액에서 균체의 리그닌 분해효소인 laccase와 MnP의 활성은 반응 시간에 비례하여 지속적으로 감소하였다. 특히, 조효소액 제조 후 초기 12시간 정도에 큰 폭으로 감소하였으나, 반응 80시간 이상이 지속된 후에도 laccase와 MnP의 활성이 관찰되어 외부 조건에서도 안정적으로 활성을 유지하는 효소였다.

조효소액 내의 esterase 경우에는 리그닌 분해효소와 비교하여 급격한 활성의 저하가 관찰되었는데 12시간 경과 후에는 효소 활성을 관찰할 수 없었다. 이는 균체의 환경에서 존재하는 esterase의 단백질 분해효소에 대한 안정성이 리그닌 분해에 관련된 효소들이 지니고 있는 안정성에 비해 낮다는 것을 보여준다.

Fig. 2에서 제시된 균체 외 효소에 의한 프탈산의 화학적 구조 변화를 관찰하기 위해 프탈산을 50 ppm 농도로 처리한 후 HPLC를 이용하여 정량 분석을 수행하였다. 역상 HPLC 분석 조건에서 카복실기를 효율적으로 분석하기 위해 pH 3의 버퍼를 사용하였는데, 프탈산의 보류시간은 8.33분이었다. 조효소액

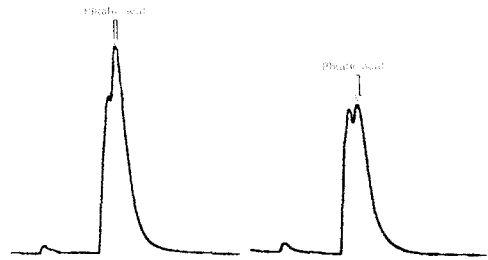
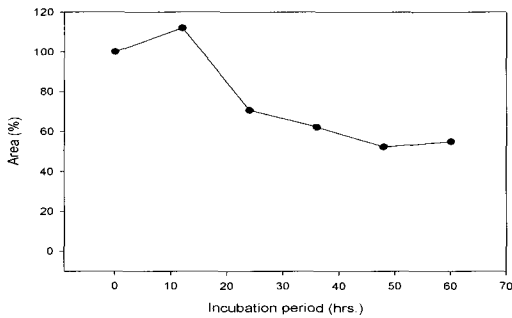


Fig. 3. Reduction of phthalic acid concentration in extracellular medium (Left), and change in the peak height and shape of phthalic acid in HPLC chromatogram (Right).

내에서 프탈산의 정량적 변화는 초기 기계적 오류에 의한 약간의 증가가 있었다(Fig. 3). Fig. 3의 우측 크로마토그램에서는 최초에 프탈산의 양을 나타내는 피크가 점차적으로 두 개의 피크로 분리되는 것을 확인할 수 있으며, 이는 조효소액 내에 존재하는 효소의 반응에 의해 프탈산의 화학적 구조변화가 발생하는 것을 의미한다.

분리된 피크는 첨가된 프탈산의 앞부분에서 생성되어 조효소액 내 프탈산의 화학적 구조가 중심의 방향환에서의 구조 변화가 아닌 측쇄 부분에 형성되어 있는 두 개의 카르복실기를 변화시키는 것으로 판단된다. 두 피크의 완전한 분리는 시간이 지나도 관찰되지 않았다. 조효소액 내에서 활성을 지닌 효소에 의해 분해된 프탈산 분해 산물의 양은 투입된 프탈산의 40%였다. 프탈산 첨가에 의한 반응 유도가 50시간 경과한 다음부터는 분해가 진행되지 않았으며, 오히려 프탈산의 양이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 Fig. 2에서 나타난 조효소액 내에 있는 효소의 활성 변화와 비교하면, 효소 활성 저항에 의한 분해반응의 종결로 사료된다.

3.2. *P. brumalis* 생장에 대한 프탈산 영향

이러한 프탈산의 균체에 의한 분해와 균 생장에 미치는 영향을 확인하기 위해 *P. brumalis* 접종과 동시에 배지에 50 ppm의 농도로 프탈산을 처리하였다. 최초 배양 배지의 pH는 *P. brumalis* 최적 생장 pH인

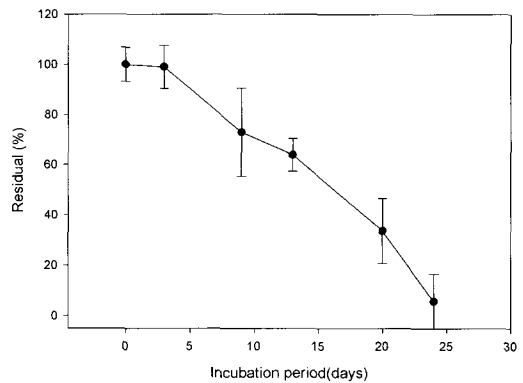


Fig. 4. Reduction of phthalic acid concentration in culture medium.

4.5 정도로 조정되었으나, 배지 내에 첨가된 프탈산의 농도가 50 ppm 이상으로 증가하면 전체 배지의 pH가 4 이하로 내려가면서 적절한 균 생장 조건을 유지하기 어려웠다. 프탈산의 첨가 농도를 조정하여 pH 4~4.5를 유지하기 위해서는 프탈산을 50 ppm의 농도로 투입하는 것이 최적임을 확인하였다. Fig. 4에서는 HPLC를 이용한 프탈산의 정량적 분석 결과를 보여준다. 프탈산 처리 후 생장 초기에는 감소율이 크지 않았으나, 배양 5일 후부터 빠른 속도로 감소되기 시작하여 배양 24일 후 완전히 분해되어 사라졌다. 이는 조효소액에 의한 결과로부터 프탈산의 완전한 분해는 균체와 균체의 효소의 복합적 작용에 의해 이루어지는 것으로 판단된다.

위의 프탈산 감소 경향을 laccase와 esterase의 활

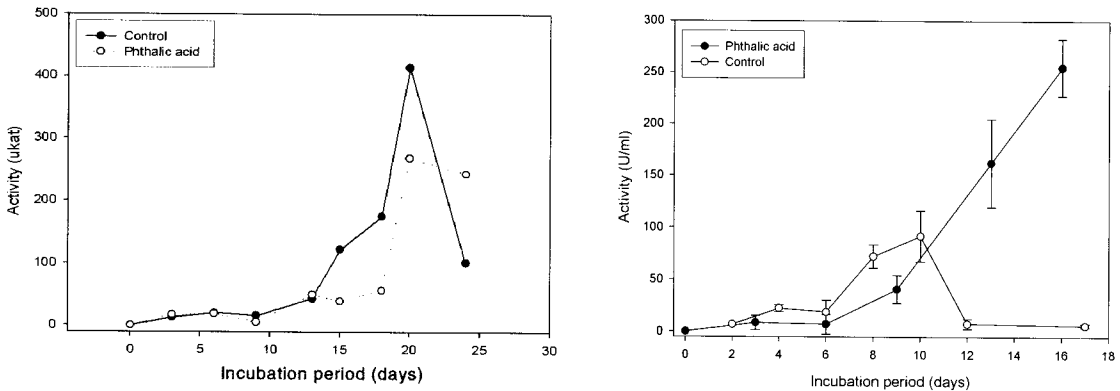


Fig. 5. Effect of phthalic acid on enzyme activities of *P. brumalis* in culture medium. (Left: laccase, Right: esterase)

성 변화와 비교하고자 하였다. Fig. 5에서 확인되는 바와 같이, 프탈산 첨가 후 배양 10일까지도 처리구와 대조구에서 차이를 보이지 않았으나, 배양 12일 후부터 활성에 차이를 보이기 시작하였다. 프탈산 처리구에 비해 대조구의 laccase 활성이 더 빠른 속도로 증가하기 시작하였으며, 배양 20일 후에 최대 활성을 나타내었다.

그러나, 최대 활성을 보인 시기에서도 대조구에 비해 프탈산 처리구의 활성은 75% 수준에 머물렀으며 이후에 감소하였다. Esterase 활성은 대조구에서는 배양 초기에 증가하였으나, 배양 10일 이후에는 감소하여 측정되지 않았으나, 배양 9일 이후에 급격히 증가하기 시작하여, 측정기간 동안 효소 활성이 지속적으로 증가하는 것을 확인하였다. 프탈산 처리구에서 활성이 증가하는 것은 프탈산의 첨가가 esterase 활성을 유도하기 위한 선택적 요인으로 작용한다고 판단되며, 프탈레이트류의 분해에 있어서 esterase가 프탈레이트류 초기 분해 단계에 중요한 요인으로 작용한다는 보고와 일치하는 결과를 확인하였다(Chatterjee *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2003).

프탈산의 감소량과 효소활성 변화에 따른 영양원의 변화를 Fig. 4에서 보여주고 있다. 배양 초기에 glucose 변화율은 대조구와 프탈산 처리구에 있어서 거의 차이를 보이지 않았다. 그러나, 배양 10일 이후에 대조구의 glucose 소모율이 프탈산 처리구에 비해 빠른 속도로 증가하여 배양 24일 후 배지 내 glucose의

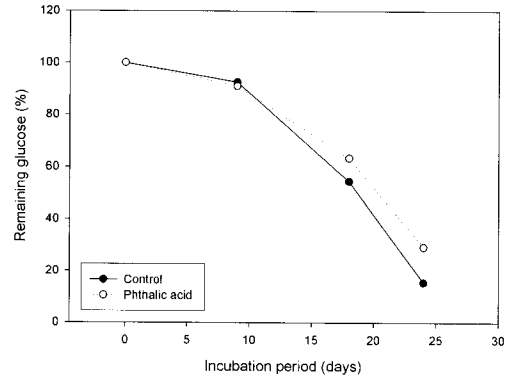


Fig. 6. Reduction of glucose concentration in culture medium containing phthalic acid.

잔량은 20%의 차이를 보였다. 이러한 결과는 Fig. 3에서 제시된 결과와 매우 유사한 것으로 *P. brumalis*가 지수 성장기(exponential phase)에 들어서면서 영양원인 glucose 외에 프탈산과의 접촉율이 증가하고 균체에서는 이를 이용하기 위한 생리적 변화를 보여주며 이러한 변화가 세포의 효소의 활성 변화에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한, 배양 10일 후에 측정된 효소의 활성 증가가 배지 내 영양원의 소모율과 관계가 있으며 프탈산이 glucose와 비슷한 경로를 통해 대사과정에 참여할 수 있음을 보여주는 것으로 사료된다. 그러나, 프탈산에 의해 배지 내 존재하는 전체 효소 및 단백질의 변화 양상을 파악하기 위해서 앞으로 보다 구체적인 실험이 진행되어야 할 것이다.

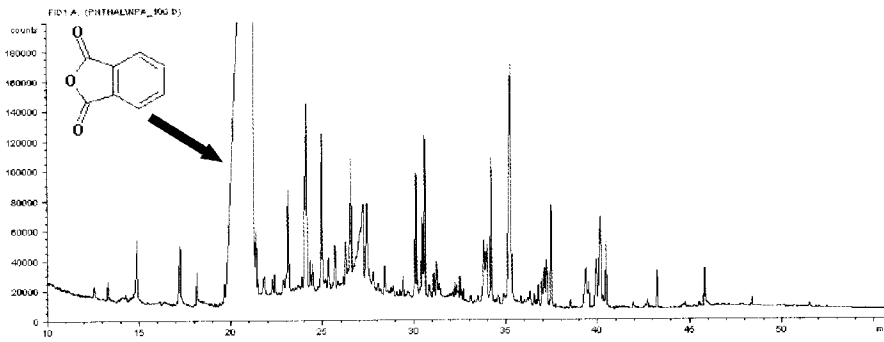


Fig. 7. Gas chromatogram of dehydration products of phthalic acid in culture medium.

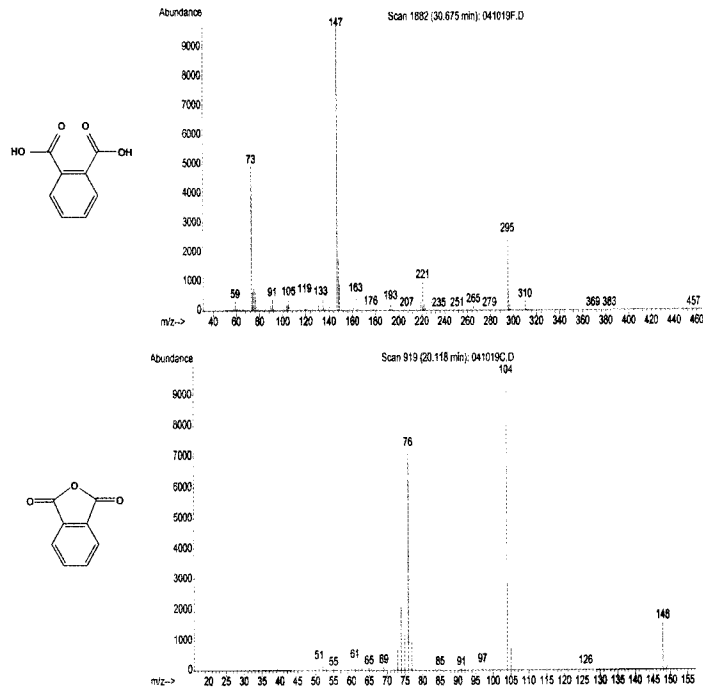


Fig. 8. Comparison of mass spectra between phthalic acid and phthalic acid anhydride.

3.3. 프탈산 분해 산물의 GC/MS 분석

배지 내 프탈산의 분해 산물을 확인하기 위해 14일 배양된 프탈산 처리구를 대상으로 ethylacetate로 추출한 후 TMS 유도체를 제조하여 GC 분석을 수행하였는데(Fig. 7), 보류시간 20분에서 상당량의 물질을 검출하였으며 검출된 물질을 GC/MS를 이용하여 확

인한 결과 프탈산에서 탈수 반응이 진행된 무수프탈산으로 확인되었다(Fig. 8). 화학 반응에서 프탈산의 탈수 반응을 유도하기 위해서는 약 200°C의 온도가 있어야 하며, 일반적으로 쉽게 반응이 이루어지지 않는다. 이러한 결과는 Fig. 4에서 확인되는 조효소액 내에 프탈산의 HPLC 분석 피크 변화와 유사한 반응인 것으로 판단되며, 또한 균체의 효소 반응에 의한

것으로 판단된다. 투입된 프탈산의 양에 비하여 그 유도체를 정량적으로 검출하는 것은 쉽지 않았다. 이는 프탈산이 균체 내에서 대사 작용을 거치는데 대사 작용으로 소모되지 못한 소량의 프탈산 유도체가 다시 균체 밖으로 배출되기 때문이라 판단된다. 이러한 결과는 butyl benzyl phthalate를 박테리아로부터 생산된 esterase와 병원성 진균류로부터 얻어진 cutinase를 이용하여 분해한 실험에서 주요 분해 산물로 무수프탈산이 생산된 것과 유사한 결과를 보여주었다 (Kim *et al.*, 2002). 그러나, 프탈레이트류의 분해에 있어서 에스터 결합이 파괴되면서 형성되는 카르복실산은 그 양이 증가하면 앞서 설명한 바와 같이 배지의 pH를 낮추는 결과를 가져와 배지 내에서 성장하고 있는 균의 입장에서는 생장에 불편한 환경이 조성된다. 균의 정상적인 성장을 위해서는 이러한 카르복실산의 생성은 균으로서 매우 정밀하게 조정해야 하는 요소가 될 것이다. 이러한 측면에서 프탈레이트 투입 이후에 esterase 활성 변화와 배지의 pH를 조정시켜 최적의 프탈레이트 분해 조건을 확인하는 것이 필요하다. 반면, 불포화 지방산의 경우 이미 리그닌 분해효소가 진행하는 one electron transfer 기작에서 mediator와 유사한 작용을 진행하고 있음이 밝혀지고 있어 (Gutierrez *et al.*, 2002) 프탈산이 지니고 있는 카르복실기에 대한 리그닌 분해효소의 역할에 대해 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 결 론

산업에서 플라스틱 가소제로 대량 사용되고 있는 프탈레이트류의 백색부후균에 의한 분해과정을 확실히 하기 위해 본 연구에서는 프탈레이트 제조에 사용되는 전구체인 프탈산을 이용하여 배지 내에서 분해율과 균 생장에 미치는 영향, 그리고 균체의 효소에 의한 화학적 구조 변화 등을 확인하였다. 50 ppm 농도로 배지에 투입된 프탈산은 배양 24일 후에 완전히 분해되었다. 프탈산 처리구의 경우 대조구에 비해 기질로 사용된 ABTS 산화능은 배양 시간이 경과함에 따라 감소하였으며, esterase의 활성은 지속적으로 증가하였다. Glucose 소모율은 프탈산 처리구에 비하여 대조구에서 높았다. 이를 명확하게 구명하기 위해 균

체의 조효소액을 이용한 프탈산 분해의 경우 반응 12시간 경과 후에 프탈산이 제거되지 않고 무수프탈산 형태로 구조가 변형되었음을 확인하였다. 이는 프탈산이 제거되기 위해서는 프탈산에서 무수프탈산 형태로 탈수 반응이 진행되어야 하며 이러한 탈수 반응이 균체 외 효소에 의해 빠른 속도로 진행된다는 것을 확인하였다. 따라서, 백색부후균인 *P. brumalis*에 의한 프탈레이트류 분해에 있어서, 최초 양쪽의 측쇄에서 에스터 결합이 파괴된 후에 무수프탈산 형태로 탈수 반응이 진행된 후 균체 내부로 유입되어 glucose와 유사한 대사작용을 진행하는 것으로 판단된다.

사 사

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

참 고 문 헌

1. 안세희, 최인규. 1998. 목질 분해균에 의한 4,5,6-triguaiacol의 미생물 분해. 목재공학 26(3): 63~72.
2. 이수민, 구본욱, 이재원, 최돈하, 정의배, 최인규. 2004. 옥틸페놀(4-t-octylphenol)의 *Basidioidium molare*와 *Schizopora paradoxa*에 의한 분해 및 에스트로겐성 저감 효과. 목재공학 32: 27~35.
3. 최인규, 안세희. 1998. 목질 분해균에 의한 pentachlorophenol의 미생물 분해. 목재공학 26(3): 53~62.
4. 최인규, 이재원, 최돈하. 2002. Monochlorophenol의 목질 분해균에 의한 분해 특성. 한국환경농학회지 21(4): 261~268.
5. <http://www.atsdr.cdc.gov/clist-supportdoc.html>
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248~254.
7. Chatterjee, S. and T. K. Dutta. 2003. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia sp.* strain MTCC 4818. Biochem. Biophysics. Res. Comm. 309: 36~43.
8. Fett, W. F., H. C. Gerad, R. A. Moreau, S. F. Osman, and L. E. Jones. 1992. Cutinase production by

- Streptomyces* spp. Curr. Microbiol. 25: 165~171.
9. Furusawa, S., S. Nakai, and M. Hosomi. 2000. Microbial degradation of 4-Nonylphenol. J. Jpn Soc. Water Environ. 23: 243~245.
 10. Glenn, J. K., L. Akileswaran, and M. H. Gold. 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Pbanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 251: 688~696.
 11. Gutierrez A., J. C. del Rio, M. J. Martinez-Inigo, M. J. Martinez, and A. T. Martinez. 2002. Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1344~1350.
 12. Hammel, K. E., B. Kalyanaraman, and T. K. Kirk. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]dioxins by *Pbanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 261: 16948~16952.
 13. Kim, Y. H., J. W. Lee, J. Y. Ahn, M. B. Gu, and S. H. Moon. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *psii* cutinase. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4684~4688.
 14. Lee, S. M., B. K. Koo, M. K. Kim, D. H. Choi, E. J. Hong, E. B. Jeung, and I. G. Choi. 2004. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. Enzym. Microbial Technol. 35: 417~423.
 15. Lobos, J. H., T. K. Leib, and T. M. Su. 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium, Appl. Environ. Microbiol. 58: 1823~1831.
 16. Miller G. L. 1958. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Biochem. 1: 426~506.
 17. Ronen, Z. and A. Abeliovich. 2000. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromophenol A. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2372~2377.
 18. Sato A., H. Justica, J. W. Wray, and C. Sonnenschein. 1991. p-Nonylphenol and estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, Environ. Health Perspect. 92: 167~173.
 18. Staples, C. A., D. R. Peterson, T. F. Parkerton, and W. J. Adams. 1997. The Environmental Fate of Phthalate Esters: a literature review. Chemosphere 35: 667~749.
 19. Tien, M. and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Pbanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 81: 2280~2284.