

## *Ceriporia* sp. ZLY-2010에 의한 폴리염화비페닐류의 생분해 : 균체 외 효소활성 및 cytochrome P450 monooxygenase 영향\*<sup>1</sup>

홍 창 영\*<sup>2</sup> · 곽 기 섭\*<sup>2</sup> · 이수 연\*<sup>2</sup> · 김 선 홍\*<sup>2</sup> · 정 한 섭\*<sup>2</sup> · 최 인 규\*<sup>2,3†</sup>

## *Ceriporia* sp. ZLY-2010 in Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls\*<sup>1</sup> : Extracellular Enzymes Production and Effects of Cytochrome P450 Monooxygenase

Chang-Young Hong\*<sup>2</sup> · Ki-Seob Gwak\*<sup>2</sup> · Su-Yeon Lee\*<sup>2</sup> · Seon-Hong Kim\*<sup>2</sup> ·  
Han-Seob Jeong\*<sup>2</sup> · In-Gyu Choi\*<sup>2,3†</sup>

### 요 약

본 연구에서는 *Ceriporia* sp. ZLY-2010을 이용하여 폴리염화비페닐류의 생분해와 효소 시스템간의 상관관계에 대해 알아보고자 하였다. 폴리염화비페닐 동족체 첨가에 따라 단백질 정량 및 manganese peroxidase (MnP)와 laccase의 활성을 비교하였으며, cytochrome P450 monooxygenase의 저해 정도를 평가함으로써 균체 내 효소가 폴리염화비페닐의 생분해에 끼치는 영향을 구명하였다. 단백질 정량 및 균체 외 효소 활성을 측정해 본 결과, 대조구에 비해 폴리염화비페닐 동족체를 첨가한 실험구에서 단백질 농도 및 효소활성이 더 높게 측정되었다. 단백질 농도의 경우, 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 첨가했을 때, 가장 높은 단백질 농도가 측정되었다. 하지만 MnP와 laccase 활성에서는 상대적으로 염소원자가 적게 치환된 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구에서 높게 나타나는 경향을 보였다. Cytochrome P450 monooxygenase의 저해 정도를 평가한 결과, 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구의 경우, 배양 1일째, 저해제 1-aminobenzotriazole 0.1 mM에서 2.73%의 분해율을 나타냈으며, 저해제 첨가 시 생분해율이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl 역시, 저해제의 존재 하에 20% 내외의 분해율을 보였으며, 이는 대조구에 비해 약 40% 감소한 비율이다.

\*<sup>1</sup> 접수 2011년 7월 29일, 채택 2011년 8월 25일

\*<sup>2</sup> 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Department of Forest Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

\*<sup>3</sup> 서울대학교 농업생명과학연구원, Research Institute for Agriculture and Life Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

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

## ABSTRACT

In this study, to determine the ligninase activity related to the PCBs degradation of *Ceriporia* sp. ZLY-2010, the protein contents and manganese peroxidase (MnP) and laccase activities during cultivation on shallow stationary culture (SSC) medium were observed. 4 PCB congeners were selected depending on the number of chlorine substituted on biphenyl. Furthermore, to examine the effects of cytochrome P450 monooxygenase, the inhibition of cytochrome P450 monooxygenase was evaluated by measuring the biodegradation rate when inhibitor such as 1-aminobenzotriazole was added. The extracellular protein contents were affected by PCB congeners in culture media. The total protein in the culture medium showed the biggest differences between the samples containing 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and the control. On the other hand, MnP and laccase activity showed dominant increases within samples containing 4,4'-dichlorobiphenyl and 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl. Cytochrome P450 monooxygenase was inhibited by adding inhibitor, 1-aminobenzotriazole in low concentration. Only 2.73% of 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl was degraded on day 1, and biodegradation of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl was inhibited as well, showing about 20% of biodegradation rate.

**Keywords:** biodegradation, manganese peroxidase, laccase, cytochrome P450 monooxygenase, polychlorinated biphenyls, *Ceriporia* sp. ZLY-2010

## 1. 서 론

백색부후균은 담자균류에 속하는 목재부후균 중 하나로, 목재 내 리그닌을 선택적으로 분해시켜 부후가 진행되면서 백색으로 변하는 형태학적 특징을 가지고 있다. 목재의 구성성분 중 리그닌은 phenyl propanoid 단량체로 이루어져 있으며, 화학적으로는 매우 다양한 결합으로 이루어졌기 때문에 분해하기 어렵다고 알려져 있다(Sjöström, 1992). 목재부후균 중 백색부후균은 리그닌을 효과적으로 분해할 수 있는 능력을 가지는 유일한 미생물로 리그닌의 생물학적 분해를 위해 특징적인 리그닌 분해효소 시스템을 가지고 있다(Schmidt, 2006). 아직까지 백색부후균의 효소시스템은 완벽하게 밝혀지지는 않았지만, 주로 *Phanerochaete chrysosporium*을 중심으로 연구가 진행되었으며, 그들은 질소제한 조건에서 효소분비 증진을 통해 다양한 이차 대사산물을 형성한다고 보고된바 있다(Huynh & Crawford, 1985; Keyser et al., 1978).

백색부후균의 대표적인 효소로는 lignin perox-

idases (LiP, E.C. 1.11.1.14), manganese-dependent peroxidases (MnP, E.C. 1.11.1.13), 그리고 laccases (Lac, E.C. 1.10.3.2)가 있다. LiP는 heme을 포함한 산화·환원효소로써, 과산화수소 존재 하에 리그닌을 포함한 다양한 aromatic 화합물의 C-C 결합을 분해하며 산화과정을 야기한다(Tien, 1987; Tien & Kirk, 1984). MnP는 과산화수소 존재 하에  $Mn^{2+}$ 를  $Mn^{3+}$ 로 산화시키며,  $Mn^{3+}$ 가 지니고 있는 에너지가 비특이적으로 단일 전자 전달을 유도함으로써 자유 라디칼 반응을 통해 폐놀성 물질의 수산화기에서 phenoxy radical을 형성하여 리그닌 분해를 유도한다(Eriksson & Ander, 1990; Hofrichter, 2002). Laccase는 copper분자를 함유한 phenol oxidase로, 과산화수소 없이 산소 존재하에서 *p*-diphenols의 산화 반응을 야기함으로써 리그닌 분해반응을 유도한다(Schmidt, 2006). 이러한 리그닌 분해효소들은 백색부후균이 생산하는 다양한 종류의 효소들과 유기적으로 반응하여 리그닌 고분자를 저분자화시키는 역할을 수행함으로써 리그닌의 생물학적 분해를 유도한다.

따라서 이러한 효소시스템을 바탕으로 백색부후균은 리그닌 유사구조물질인 다이옥신, 프탈레이트 및 폴리염화비페닐 등의 다양한 내분비계 장애물질을 분해한다고 보고된바 있다(Kamei *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002; Valli *et al.*, 1992; Yadav *et al.*, 1995). 대표적인 내분비계 장애물질 중 하나인 폴리염화비페닐류(Polychlorinated biphenyls, PCBs)는 1970년대까지 절연유, 가소제, 난연제, 용제 희석제 등으로 사용되었으며, PCBs는 biphenyl에 10개 수소 중 2~10개가 염소원자로 치환된 형태로, 209개의 다른 이성질체를 가진다(Quensen III *et al.*, 1990). 치환된 염소의 수에 따라 다양한 성질을 가지는데, 염소치환 비율이 높을수록 점도가 증가하여 수지상으로 변하고 독성이 강해진다. 일반적으로 산과 알칼리에 매우 안정하고 열에 안정하여 쉽게 분해되기 어려운 물질이다(Borja *et al.*, 2005).

PCBs의 독성과 잔류성 및 생체 축적성이 알려진 이후, 대부분의 국가에서는 상업적 사용을 전면 금지하였으며 이를 처리하기 위해 다양한 방법이 시도되어 왔다. 폐PCBs를 처리하는 기술은 크게 세 가지로, 소각에 의한 분해처리 기술, 대체처리 기술, 그리고 재활용 기술로 구분할 수 있으며 대부분 소각처리에 의한 방법이 선호되었다. 하지만 소각처리는 1,200°C 이상의 온도를 요구하며, 연소조건이 불량할 때 다이옥신 등의 유독성 기체가 발생할 가능성이 높기 때문에 이 문제를 해결하기 위한 다양한 기술이 연구되었다(이와 서, 2005). 그 방법 중 하나가 미생물을 이용한 방법이며, 미생물로는 주로 박테리아 및 백색부후균을 이용한 연구가 진행되고 있다.

일반적으로 백색부후균을 이용한 PCBs의 생분해 연구는 주로 균체 외 효소활성을 측정함으로써 그 연관성을 살펴보았지만, 균체 외 효소만으로는 PCBs 생분해와의 연관성을 명확히 밝힐 수 없었으며, 그에 따라 cytochrome P450 monooxygenase와 같은 균체 내 효소에 대한 연구가 보고된 바 있다(Krčmář *et al.*, 1999; Mori & Kondo, 2002; Novotný *et al.*, 2004).

목재부후균과 같은 진핵 생물의 cytochrome P450

monooxygenase는 효소 내 구조적 특징인 N-terminal transmembrane-spanning  $\alpha$ -helix에 의해 미토콘드리아나 소포체에 결합되어 있다. 형태상으로는 heme과 porphyrin구조를 가지며, 산소원자를 활성화 시켜 기질과의 반응을 유도한다(Claes von Wachenfeldt, 1995).

Cytochrome P450 monooxygenase는 미생물의 대사 반응에서 매우 중요한 역할을 하는데, NADPH cytochrome P450 reductase를 통해 NADPH로부터 전자를 받아 heme catalytic center로 이동시키며, 산소분자(O<sub>2</sub>)를 활성화시켜 산화효소로서 작용을 한다(Kotze, 1997). 활성화된 산소분자는 효소의 ferrous heme와 반응하여 Fe(III)-hydroperoxy complex를 형성한 후, O-O 결합이 끊어지고, OH기가 기질로 이동함으로써 수산화 과정을 야기하게 된다(Groves, 2005). 이러한 과정을 통해 미생물 내에서 다이옥신이나 폴리염화비페닐과 같은 다양한 내분비계 장애물질들이 저독성화 물질로 변하게 된다(Kamei & Kondo, 2005; Kamei *et al.*, 2006; Mori & Kondo, 2002). 또한 Bezalel *et al.* (1996)은 백색부후균 *Pleurotus ostreatus*에 의한 phenanthrene의 생분해에 cytochrome P450 monooxygenase가 관여한다고 보고하였으며, Masaphy *et al.* (1995, 1996) 역시, 난분해성 물질 중 하나인 benzopyrene이 *P. chrysosporium*과 *Pleurotus pulmonarius*에서 분비되는 cytochrome P450 monooxygenase의 수산화 과정에 의해 생분해 된다고 보고하였다.

이러한 특징을 가진 cytochrome P450 monooxygenase는 다양한 기작에 의해 저해될 수 있는데, 특히 효소내의 heme과 lipophilic group에 결합하는 저해제에 의해 효과적으로 저해될 수 있다고 보고된 바 있으며(Claes von Wachenfeldt, 1995), cytochrome P450 monooxygenase 저해제로서는 1-aminobenzotriazole이 잘 알려져 있다(Cabanne *et al.*, 1987; Ortiz de Montellano *et al.*, 1984).

따라서 본 연구에서는 저항성 테스트를 통해 우수 분해 균주로 선발된(홍 등, 2010) 백색부후균인 *Ceriporia* sp. ZLY-2010을 이용하여 치환된 염소원자의 수에 따라 선택된 PCB 동족체에 따른 대표적인

Table 1. Composition of SSC media (per 1 L distilled water)

Component	Concentration	Molecular weight (g/M)
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10%	180.16
Ammonium tartrate (C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )	1.08 mM	184.15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.7 mM	136.09
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.03 mM	246.47
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.68 mM	147.02
Thiamine · HCl	2.97 mM	337.27
Trace element solution (홍 등, 2010)	10 ml/L	

균체 외 효소인 MnP 및 laccase의 활성을 비교하였으며, PCB 동족체의 종류에 따른 효소 활성 결과를 바탕으로 균체 내 효소로 알려진 cytochrome P450 monooxygenase의 저해 정도를 평가함으로써 균체 내 효소의 영향 정도를 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

본 연구에서 사용한 백색부후균 *Ceriporia* sp. ZLY-2010은 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 26°C, 7일 동안 배양 후, 균사 부분만 긁어 내어 멸균수와 함께 혼합한 뒤, 균질기(RH91, SMT, Japan)를 이용하여 5,000 rpm에서 2분 동안 분쇄하여 현탁액으로 제조하여 4°C에서 보관하였다.

폴리염화비페닐 동족체로는 4,4'-dichlorobiphenyl, 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl, 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl, 그리고 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (C-015 N, 031 N, 070 N, 101 N, 153 N, Accustandard, USA)을 사용하였으며, 백색부후균의 생장에 대한 영향을 최소화하기 위해 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 배지에 첨가하였다.

### 2.2. 폴리염화비페닐 동족체에 따른 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford 방법을 통해 bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Chemical Co.,

USA)를 표준시약으로 사용하였다(Bradford, 1976). 반응 혼합물은 Bradford 용액 1 ml에 샘플 용액 0.1 ml를 첨가하여 반응시켰으며, 1시간 내에 UV visible spectrophotometer (UV- 1501 PC, Shimadzu)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.3. 폴리염화비페닐 동족체에 따른 균체 외 효소 활성

*Ceriporia* sp. ZLY-2010에 의한 폴리염화비페닐 동족체의 생분해와 균체 외 효소활성간의 연관성을 알아보기 위해 *Ceriporia* sp. ZLY-2010는 shallow stationary culture (SSC) 배지에 접종시켰으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 50 ml 삼각플라스크에 배지를 10 ml씩 넣고 silistopper로 막은 뒤 121°C에서 15분간 멸균하였다. SSC 배지의 경우, thiamine HCl과 trace element solution을 0.2 µm filter로 여과 후 첨가하였다.

각각 플라스크에 균사 전건무게가 0.005 g이 되도록 균사 현탁액을 접종한 후, 26°C 배양기에서 5일간 정지 배양시킨 후, PCB 동족체를 10 ppm씩 첨가하였다.

실험구는 PCB 동족체의 첨가 여부에 따라 다음과 같이 두 가지로 나누었다.

- 1) 대조구 : SSC 배지에 균사 접종 후, 배양
- 2) 실험구 : SSC 배지에 균사 접종 → 선배양 5일 후, PCB 동족체 첨가

PCB 동족체의 첨가 후, 17일 동안 2일 간격으로 효소 활성을 측정하였으며, 각각의 배양 일에 원심분

리기(12,000 rpm, 15분, 4°C)를 이용하여 얻어진 상층액을 통해 효소 활성을 측정하였다.

Manganese peroxidase (MnP) 활성은 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS;  $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}$ )를 기질로 사용하여 측정하였다.

0.2 M lactate buffer (pH 4.5) 0.8 ml에 50  $\mu\text{l}$  ABTS (0.8 g/L), 33  $\mu\text{l}$  6 mM  $\text{MnSO}_4$  그리고 100  $\mu\text{l}$  상층액을 첨가 한 후, 17  $\mu\text{l}$  0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 첨가하여 반응을 시작하였다. 30분 동안 반응시킨 후, UV visible spectrophotometer (UV-1501 PC, Shimadzu)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소활성은 아래의 식을 통해 계산하였다(Krčmář *et al.*, 1999; Lee, 2005).

$$\text{MnP activity (unit/mg)} = \frac{\Delta \text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume}}{\Delta \text{Time} \times \epsilon_{420} \times \text{Sample weight}}$$

Laccase 역시 ABTS를 기질로 사용하였으며, 0.2 M lactate buffer (pH 4.5) 0.85 ml에 50  $\mu\text{l}$  ABTS 그리고 100  $\mu\text{l}$ 의 상층액을 3분간 반응시킨 후, UV visible spectrophotometer (UV-1501 PC, Shimadzu)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소활성은 아래의 식을 통해 계산하였다(Krčmář *et al.*, 1999; Lee, 2005; Lee *et al.*, 2007).

$$\text{Laccase activity (unit/mg)} = \frac{\Delta \text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume}}{\Delta \text{Time} \times \epsilon_{420} \times \text{Sample weight}}$$

## 2.4. Cytochrome P450 Monooxygenase 저해 정도 평가

균사의 접종 및 배양은 2.3항에 제시된 방법과 동일하게 이루어졌다. Cytochrome P450 monooxygenase 저해제로서 1-aminobenzotriazole (1-ABT)이 사용되었으며, 배지에 0, 0.1, 1.0 mM씩 첨가되었다(Mori & Kondo, 2002). 저해제 첨가 후, 20분 동안 배양한 다음, PCB 동족체가 첨가되었다. PCB 동족체로는

균체 외 효소활성 결과에서 차이를 보인 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl이 선정되어 10 ppm씩 첨가되었다. PCB 동족체 첨가 후, 배양 1, 5일에 각각 PCB 동족체를 추출하여, 분해율을 계산하였다(Mori & Kondo, 2002).

실험구는 균사에 의한 흡착정도를 고려하기 위해 다음과 같이 두 가지로 나누었다(홍 등, 2010).

1) Killed control (KC): 배지에 균주를 접종시킨 후 배양(5일) → 1-ABT 첨가 → 각 배양일(1, 5일)에 멸균(121°C, 15분) → PCB동족체 첨가

2) Live culture (LC): 배지에 균주를 접종시킨 후 배양(5일) → 1-ABT 첨가 → PCB동족체 첨가

균질기에 샘플과 n-hexane 25 ml, acetone 10 ml을 함께 넣어 5,000 rpm에서 30초간 분쇄한 후, 이를 분별깔대기를 이용하여 추출하였다. n-hexane만을 회수하기 위해 acetone을 제거하였으며, 이를 위해 증류수 90 ml을 이용하여 추출이 이루어졌다. 추출은 shaker를 이용하여 270 rpm에서 15분간 진행되었으며, 총 추출과정은 25 ml씩 3반복하여 총 75 ml n-hexane 추출액을 획득하였다.

배지에 함유된 각종 유기성분을 제거하기 위하여 concentrated sulfuric acid 20 ml을 이용해 270 rpm에서 1분간 추출하였다. 그리고 남아있을 concentrated sulfuric acid를 제거하기 위해서 n-hexane으로 추출한 증류수 60 ml을 이용하여 같은 조건하에 추출하였으며, 이 모든 과정은 shaker를 이용하여 3반복하였다. 추출액에 anhydrous sodium sulfate를 첨가하여 수분을 제거하였으며, 여과지(No. 2, Advantec, Japan)로 여과하여 완전 농축한 후, n-hexane에 용해시켜 최종 부피가 10 ml가 되도록 하였다.

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl과 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl를 정량하기 위해 GC-ECD (Electron Capture Detector, 6890 N, Agilent Technologies, USA)를 이용하였다. 컬럼은 DB-5 (60 m, 0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, 초기 온도 135°C에서 3분 동안 유지 후, 280°C까지 8°C/분으로 승온시켰으며, 최종 온도 300°C까지 15°C/분으로 승온시킨 후, 13분 동안 유지시켰다. Inlet 온도는 250°C (splitless), detector 온도는

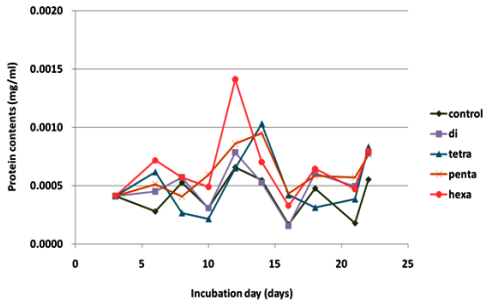


Fig. 1. Effect of PCB congeners on protein contents in culture medium.

320°C로 유지하였으며, N<sub>2</sub>를 1.5 ml/분의 유속으로 흘려주었다. 추출액은 n-hexane으로 10배 희석하여 GC분석을 실시하였으며 standard curve는 1, 2, 5, 10 ppm 농도의 PCB 동족체를 이용하여 작성하였다.

GC-ECD를 통해 측정된 PCB 동족체의 정량값은 다음의 식을 이용하여 분해율을 계산하였다.

$$\text{Biodegradation rate of PCBs (\%)} = \frac{\text{Concentration of Killed Control (ppm)} - \text{Concentration of Live Culture (ppm)}}{\text{Concentration of Killed Control (ppm)}} \times 100$$

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 폴리염화비페닐 동족체에 따른 단백질 정량 및 효소 활성

단백질 정량을 실시한 결과, 대체적으로 배양 10일에서 15일 사이에 가장 높은 농도가 측정되었으며, 대조구에 비해 PCB 동족체를 첨가한 실험구에서 단백질 농도가 높게 나타났다(Fig. 1). 특히 염소원자가 많이 치환된 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl이 첨가된 실험구의 단백질 농도는 염소원자가 상대적으로 적게 치환된 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl이 포함된 실험구의 단백질 농도보다 높았다(Fig. 1). 일반적으로 PCBs는 물에 대한 용해성이 떨어지고 독성이 강하기 때문에(Borja *et al.*, 2005),

*Ceriporia* sp. ZLY-2010의 성장 및 대사활동에 부정적인 영향을 끼칠 것으로 예상하였지만 배양 10일에서 15일 사이에 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 포함한 실험구에서 가장 높은 단백질 양을 나타냈다. 이는 내분비계 장애물질인 폴리염화비페닐이 미생물의 호르몬에 영향을 미쳐 성장을 자극한 것으로 판단되며(Lee, 2005), PCB 동족체 혼합물인 Aroclors를 포함한 실험구의 균사 전건문제가 대조구의 균사 전건무게보다 더 높게 나타난 결과로도 설명될 수 있다(Hong, 2011a).

다른 동족체에 비해 일관적으로 높은 단백질 양을 나타낸 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 결과로부터 생분해 과정에 다양한 효소 작용이 관여함을 추측할 수 있다. 여기서 단백질 양은 즉 효소의 양을 의미하는 것으로 다른 동족체에 비해 많은 단백질의 생산은 다양한 효소의 복합적 작용의 가능성을 의미한다. PCBs 생분해에는 균체 내외로 다양한 효소가 작용했을 것이라 예상하지만, 본 연구에서 실시한 단백질 정량은 균체 외로 분비된 효소에 해당하는 것이므로 균체 내 효소에 대한 가능성은 본 연구 결과를 통해 예측하기 어렵다. 따라서 LiP, MnP, laccase 외에 리그닌 분해효소와 관련 있는 균체 외 효소에는 대표적으로 glyoxal oxidase (E.C. 1.2.3.5), aryl alcohol oxidase (E.C. 1.1.3.7), 그리고 glucose oxidase (E.C. 1.1.3.4) 등을 들 수 있다. glyoxal oxidase는 LiP나 MnP가 작용을 하기위해 필요한 과산화 수소를 생성하는 역할을 하며, aryl alcohol oxidase는 벤젠환에 붙은 수산화기를 알데히드기로 산화시키는 역할을 하며, 마지막으로 glucose oxidase는 glucose를 산화시켜 과산화 수소를 생성하는 역할을 한다(Pointing, 2001). 이러한 다양한 효소들의 보조적 생산은 MnP 및 laccase가 PCBs를 생분해시키는 데 큰 역할을 했을 것이라 생각되며, 이러한 효소의 생산은 본 연구의 단백질 양의 증가 결과를 뒷받침해 준다.

MnP와 laccase의 활성은 단백질 정량 결과와 비슷하게 대조구에 비해 PCB 동족체를 포함한 실험구에서 더 높은 활성을 보였다. 두 효소 활성 모두 PCB 동족체를 첨가하는 배양 5일째를 기점으로 하여 배

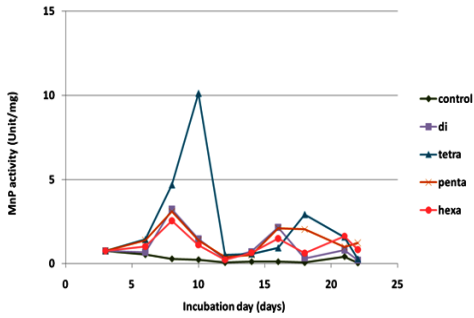


Fig. 2. Effect of PCB congeners on MnP activity in culture medium.

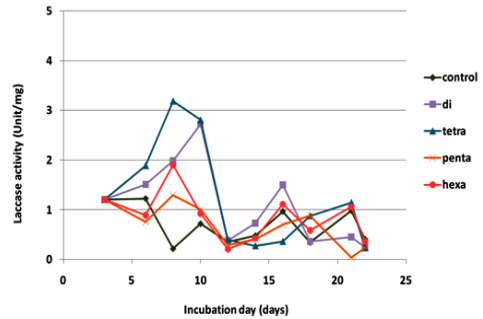


Fig. 3. Effect of PCB congeners on laccase activity in culture medium.

양 10일까지 크게 증가하는 경향을 보였다.

이렇게 PCB 동족체를 포함한 실험구의 단백질 농도 및 효소활성이 대조구에 비해 높게 나타난 것은 *Ceriporia* sp. ZLY-2010이 PCB 자체를 기질 유도체나 효소 저해제로 인식했기 때문이다(장 등, 2010). 미생물이 PCB를 기질 유도물질로 인식했을 경우, 다수의 동위효소를 생산함에 따라 효소의 총 생산증가를 야기시킬 수 있다. 또한 효소저해제로 인식했을 경우 역시 자기방어기작을 통해 리그닌 분해 효소 뿐 아니라 동위효소의 생산을 증가시켜 총 단백질 양 및 효소활성을 높일 수 있다. 백색부후균은 분비하는 효소의 종류의 따라 LiP-MnP 그룹, MnP-laccase 그룹, LiP-laccase 그룹으로 나눌 수 있는데, 이들은 각각의 미생물 내에서 다양한 동위효소를 가진다고 보고된 바 있다(Hatakka, 1994). 따라서 각 리그닌 분해효소의 동위효소 생산 증가를 통해 PCB 동족체를 포함한 실험구의 단백질 발현량 및 효소활성이 높아졌을 것이라 판단된다.

하지만 PCB 동족체의 종류에 따라 다른 효소 활성을 나타냈는데, MnP와 laccase의 활성이 단백질 정량 결과와는 달리, 염소원자가 적게 치환된 동족체에서 높은 활성을 나타냈다(Figs. 2, 3). MnP의 경우, 대조구에 비해서 특히 배양 10일째에 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 포함한 실험구에서 10.10 Unit/mg으로 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2). Laccase 또한, 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 포함한 실험구의 효소 활성보다

4,4'-dichlorobiphenyl과 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 포함한 실험구의 효소 활성이 더 높게 나타났으며, 배양 8일째에 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 포함한 실험구의 laccase 활성은 3.19 unit/mg으로 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 3).

이렇게 동족체 종류에 따라 효소의 활성이 다르게 나타난 것은 PCB 동족체 종류에 따른 특이적 성질 때문이라고 판단된다. 염소원자가 증가함에 따라 hydrophobicity가 증가하여 생분해가 어려울 것이라는 예상과 달리, Hong (2011b)은 염소원자가 가장 많이 치환된 PCB 동족체의 생분해율이 가장 높다고 보고하였다. 또한 PCB 동족체의 종류에 따른 선택적 생분해가 일어난다는 결과를 고려하면(Bedard *et al.*, 1987), 생분해와 관련된 다양한 효소 작용 역시 PCB 동족체의 종류에 따라 다르게 작용할 수 있다고 사료된다. 그리고 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 포함한 실험구는 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 포함한 실험구에 비해 측정된 단백질 농도가 상대적으로 적었기 때문에 본 연구에서 사용한 specific enzyme 계산법에 의해 MnP나 laccase 활성이 높게 나타난 것으로 판단된다. 네 개의 동족체를 첨가한 실험구의 흡광도만을 비교했을 경우, 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 포함한 실험구에서 약간 더 높은 흡광도를 보였다. 하지만 이들은 단백질 농도 역시 높았기 때문에 상대적으로 낮은 specific enzyme 활성

Table 2. Recovery rate (%) of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl in cultures of *Ceriporia* sp. ZLY-2010 after 5 days pre-incubation

Samples	Incubation day	
	1 day	5 days
Killed control (0.1 mM)	94.76	94.24
Live culture (0.1 mM)	92.17	93.46
Killed control (1 mM)	100.00	95.42
Live culture (1 mM)	99.77	93.95

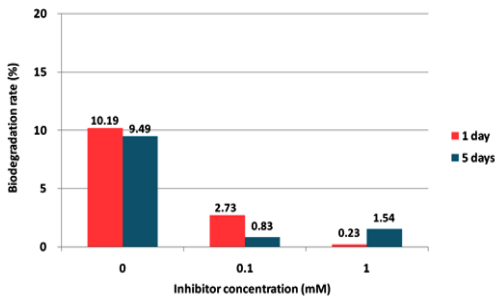


Fig. 4. Effect of 1-aminobenzotriazole (1-ABT) on the biodegradation rate of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl in cultures of *Ceriporia* sp. ZLY-2010.

을 나타낸 것이다. 즉 MnP나 laccase는 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl을 포함한 실험구에서 단위질량 당 기질에 작용하는 활성이 큰 것으로 판단된다. 이는 염소원자가 많이 치환된 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 생분해는 MnP와 laccase 뿐 아니라 다른 다양한 효소의 복합적 작용에 의해 일어날 수 있다는 것을 의미한다.

### 3.2. Cytochrome P450 monooxygenase 저해 정도 평가

각 동족체의 종류에 따른 단백질 정량을 분석해 본 결과, 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl을 첨가한 실험구의 단백질 양이 가장 높게 나타났으며, MnP와 laccase의 활성은 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과를

바탕으로 PCB 생분해에는 동족체의 종류에 따라 다른 효소시스템이 작용하여 나타났을 것이라 생각되었다. 또한 위의 결과와 각 동족체의 생분해율 측정 결과(Hong, 2011b)를 복합적으로 고려했을 때, 균체 내 효소에 대한 가능성을 생각할 필요가 있다고 판단하여 P450 저해제인 1-ABT에 따른 생분해율을 조사함으로써 cytochrome P450 monooxygenase의 역할에 대해 알아보하고자 하였다.

2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구의 경우, P450 저해제 농도가 증가함에 따라 생분해율이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 4). 배양 1일째에 저해제를 첨가한 실험구의 경우 현저하게 생분해율이 감소하는 경향을 보였다. 0.1 mM의 저해제를 첨가한 실험구는 대조구에 비해 생분해율이 70% 이상 감소하였으며, 1 mM의 저해제를 첨가한 실험구는 90%에 가까운 저해율을 보였다. 배양 5일째 역시 배양 1일째와 비슷한 경향을 나타냈다. 이러한 결과를 통해 cytochrome P450 monooxygenase가 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl의 생분해에 큰 영향을 미쳤음을 유추할 수 있었다.

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 경우, 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl과 마찬가지로 저해제를 첨가한 실험구의 생분해율이 첨가하지 않은 대조구에 비해 현저히 감소하는 경향을 나타냈다(Table 3, Fig. 5). 특히 배양 1일째, 0.1 mM의 저해제를 첨가한 실험구의 경우 2.64%의 생분해율로, 생분해가 거의 일어나지 않았다. 하지만 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 경우, 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl에 비해 저해제를 첨가한 실험구에서도 20% 내외의 분해율을 보였다. 이를 통해 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 생분해는 cytochrome P450 monooxygenase



Table 3. Recovery rate (%) of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in cultures of *Ceriporia* sp. ZLY-2010 after 5 days pre-incubation

Samples	Incubation day	
	1 day	5 days
Killed control (0.1 mM)	95.91	99.05
Live culture (0.1 mM)	93.38	81.52
Killed control (1 mM)	100.00	99.48
Live culture (1 mM)	82.30	78.60

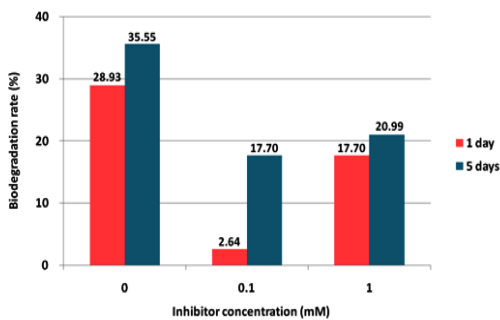


Fig. 5. Effect of 1-aminobenzotriazole (1-ABT) on the biodegradation rate of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in cultures of *Ceriporia* sp. ZLY-2010.

뿐만 아니라, 다양한 균체 내 효소들이 복합적으로 작용한 것으로 판단된다.

본 연구의 결과는 저해제로 작용한 1-ABT가 PCB 생분해율에 크게 영향을 미치며, cytochrome P450 monooxygenase를 크게 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 cytochrome P450 monooxygenase는 heme-protein을 포함한 효소로, heme의 N-alkylation과정을 통해 활성이 저해된다고 알려져 있다. 1-ABT 분자 내 amino 그룹은 P450의 porphyrin 구조와 반응함에 따라 구조적 변형을 일으키며, 결국 이러한 반응을 통해 효소를 촉매적으로 turnover 시킴으로써 효소활성을 억제하는 것으로 보고되었다(Ortiz de Montellano *et al.*, 1984).

이러한 내용을 바탕으로 본 연구의 결과를 통해 저해제 0.1 mM의 농도만으로도 충분히 P450의 heme과 porphyrin구조를 변형시킬 수 있었음을 유추할

수 있었다. 즉 저해제의 농도의 영향보다는 저해제 자체의 첨가가 PCB 생분해에 큰 영향을 주었다고 판단된다.

본 연구를 통해 cytochrome P450 monooxygenase가 PCB 생분해 과정에 큰 영향을 미친다는 사실을 간접적으로 확인할 수 있었다. 하지만 cytochrome P450 monooxygenase의 정확한 역할을 구명하기 위해 효소 정제에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 그리고 cytochrome P450 monooxygenase 뿐만 아니라, 다양한 균체 효소가 작용했을 것이라 예상되므로 이에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 *Ceriporia* sp. ZLY-2010의 효소 시스템과 PCB 생분해 간의 상관관계에 대해 정확히 구명할 수 있을 것이라 기대된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 *Ceriporia* sp. ZLY-2010을 이용하여 폴리염화비페닐의 생분해와 균체 외 효소와의 상관관계에 대해 알아보기 위해 4개의 폴리염화비페닐 동족체 첨가에 따라 단백질 및 대표적인 균체 외 효소 활성을 비교하였으며, PCB 동족체의 종류에 따른 활성 차이를 통해 균체 내 효소로 알려진 cytochrome P450 monooxygenase의 저해 정도를 평가함으로써 균체 내 효소의 영향 정도를 평가하였다.

단백질 정량 및 균체 외 효소 활성을 측정해 본 결과, 대조구에 비해 PCB 동족체를 첨가한 실험구에서 더 높은 단백질 농도 및 효소활성이 측정되었다. 단백질 농도의 경우, 염소원자가 가장 많이 치환된 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl를 첨가 했을 때, 가

장 높은 단백질 농도가 측정되었다. 하지만 MnP 활성에서는 염소원자가 적게 치환된 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구에서 높게 나타나는 경향을 보였으며, laccase 활성 역시 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl을 첨가한 실험구에서 가장 높은 활성을 보였다. 이러한 결과를 통해, 동족체 종류에 따라 효소의 활성이 다르게 나타난 것은 PCB 동족체 종류에 따른 특이적 성질 때문이라고 판단되며, 특히 염소원자가 많이 치환된 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl과 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl의 생분해 과정은 MnP와 laccase 뿐 아니라 다른 다양한 효소의 복합적 작용 가능성에 대해 고려할 필요가 있다고 사료된다.

Cytochrome P450 monooxygenase의 저해 정도를 평가한 결과, 저해제 0.1 mM의 농도에서부터 생분해율이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 저해제 0.1 mM의 농도만으로도 충분히 P450의 heme과 porphyrin구조를 변형시킬 수 있으며, 이는 PCB 생분해에 큰 영향을 주었다고 판단된다.

하지만 MnP와 laccase, 그리고 cytochrome P450 monooxygenase만으로는 PCB 생분해와 *Ceriporia* sp. ZLY-2010의 효소시스템과의 상관관계에 대해 정확히 설명할 수 없기 때문에 생분해에 관련된 다양한 효소에 대한 연구가 필요하다.

## 사 사

본 연구는 한국연구재단의 기초연구과제지원사업(NRF-2008-313-F00051)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 참 고 문 헌

1. 이상훈, 서봉국. 2005. 잔류성 유기오염물질 Polychlorinated Biphenyls(PCBs) 분해 처리 기술 현황. *청정 기술* 11(1): 29~39.
2. 장관식, 노봉수, 유상호, 김묘정, 김영완. 2010. 제6장 효소의 생산, 추출 및 정제. in: 이해하기 쉬운 식품효소공학, 수학사. 서울. pp. 208~212
3. 홍창영, 광기섭, 이수연, 김선홍, 최인규. 2010. 폴리염화

- 비페닐류의 생분해 우수 백색부후균 선발 및 분해율 분석. *목재공학* 38(6): 586~578.
4. Bedard, D., R. Wagner, M. Brennan, M. Haberl, and J. Brown Jr. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 1094~1102.
5. Bezalel, L., Y. Hadar, P. P. Fu, J. P. Freeman, and C. E. Cerniglia. 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2547~2553.
6. Borja, J., D. Taleon, J. Auresenia, and S. Gallardo. 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry* 40(6): 1999~2013.
7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248~254.
8. Claes von Wachenfeldt and E. F. Johnson. 1995. Structures of eudaryotic Cytochrome P450 enzymes. in: *Cytochrome P450-structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ed.) Ortiz de Montellano, P.R, 1986 Plenum Press. New York, pp. 183~213.
9. Cabanne, F., D. Huby, P. Gaillardon, R. Scalla, and F. Durst. 1987. Effect of the cytochrome P-450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat\* 1. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 28(3): 371-380.
10. Eriksson K. E. and B. R. Ander P. 1990. Chapter 4. Biodegradation of lignin. in: *Microbial and Enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag Berlin, pp. 225-397.
11. Groves, J. T. 2005. Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action. in: *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, (Ed.) P.R.O.d. Montellano, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, pp. 1~15.
12. Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13(2-3): 125~135.

13. Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology* 30(4): 454~466.
14. Hong, C. Y. 2011a. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by white rot fungus, *Ceriporia* sp. ZLY-2010. in: Department of forest sciences, Vol. Master Science Thesis, Seoul National University. Seoul, pp. 56~61.
15. Hong, C. Y. 2011b. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by white rot fungus, *Ceriporia* sp. ZLY-2010. in: Department of forest sciences, Vol. Master Science, Seoul National University. Seoul, pp. 44~55.
16. Huynh, V. B. and R. L. Crawford. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS microbiology letters* 28(1): 119~123.
17. Kamei, I. and R. Kondo. 2005. Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-p dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied microbiology and biotechnology* 68(4): 560~566.
18. Kamei, I., S. Sonoki, K. Haraguchi, and R. Kondo. 2006. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Applied microbiology and biotechnology* 73(4): 932~940.
19. Keyser, P., T. Kirk, and J. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium* synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of bacteriology* 135(3): 790~797.
20. Kotze, A. 1997. Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *International journal for parasitology* 27(1): 33~40.
21. Krěmář, P., A. Kubátová, J. Votruba, P. Erbanová, Novotn, and V. Šašek. 1999. Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(2): 269~276.
22. Lee, S. M. 2005. Biodegradation of Dibutyl and Di (2-ethylhexyl) Phthalates by White Rot Fungus, *Polyporus brumalis* in: Department of forest sciences, Vol. Ph.D. Thesis, Seoul National University. Seoul.
23. Lee, S. M., J. W. Lee, B. W. Koo, M. K. Kim, D. H. Choi, and I. G. Choi. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnology and bioengineering* 97(6): 1516~1522.
24. Masaphy, S., D. Levanon, Y. Henis, K. Venkateswarlu, and S. Kelly. 1995. Microsomal and cytosolic cytochrome P450 mediated benzo (a) pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnology letters* 17(9): 969~974.
25. Masaphy, S., D. Levanon, Y. Henis, K. Venkateswarlu, and S. L. Kelly. 1996. Evidence for cytochrome P 450 and P 450 mediated benzo (a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS microbiology letters* 135(1): 51~55.
26. Mori, T. and R. Kondo. 2002. Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied microbiology and biotechnology* 60(1): 200~205.
27. Novotný, C., K. Svobodová, P. Erbanová, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang, and V. Šašek. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry* 36(10): 1545~1551.
28. Ortiz de Montellano, P. R., J. M. Mathews, and K. C. Langry. 1984. Autocatalytic inactivation of cytochrome P-450 and chloroperoxidase by 1-aminobenzotriazole and other aryne precursors. *Tetrahedron* 40(3): 511~519.
29. Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(1): 20~33.
30. Quensen III, J. F., S. A. Boyd, and J. M. Tiedje. 1990. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 56(8): 2360~2369.
31. Ruiz-Aguilar, G. M. L., J. M. Fernandez-Sanchez, R. Rodriguez-Vazquez, and H. Poggi-Varaldo. 2002. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated

- soil. *Advances in Environmental Research* 6(4): 559~568.
32. Schmidt, O. 2006. Wood cell wall degradation. in: *Wood and Tree fungi*, (Ed.) D. Czeschlik, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 99~107.
33. Sjöström, E. 1992. ch 4. Lignin. in: *Wood chemistry : fundamentals and applications*. Harcourt Brace Jovanovich. London, pp. 71~89.
34. Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Critical reviews in microbiology* 15(2): 141~168.
35. Tien, M. and T. K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(8): 2280~2284.
36. Valli, K., H. Wariishi, and M. H. Gold. 1992. Degradation of 2, 7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of bacteriology* 174(7): 2131~2137.
37. Yadav, J., J. Quensen 3rd, J. M. Tiedje, and C. Reddy. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7): 2560~2565.