

흰구름버섯에 의한 방향족 염료와 비스페놀 A의 분해

임경환 · 백승아 · 최재혁 · 이태수*

인천대학교 생명과학부

Biodegradation of aromatic dyes and bisphenol A by *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilat

Kyung-Hoan Im, Seung-A Baek, Jae-hyuk Choi, and Tae-Soo Lee*

Division of Life Sciences, Incheon National University, (Songdo-dong) 119 Academy-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea

ABSTRACT: *Trametes hirsuta*, a white rot fungus, exhibits the ability to degrade synthetic aromatic dyes such as congo red (CR), methylene blue (MB), crystal violet (CV), and remazol brilliant blue R (RBBR). The mycelia of *T. hirsuta* degraded RBBR and CR more efficiently than CV and MB in the PDB liquid medium (supplemented with 0.01% 4 aromatic dyes). In these mycelia the activities of three ligninolytic enzymes—laccase, manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP)—were observed. Among these, laccase was identified to be the major enzyme responsible for the degradation of the four aromatic dyes. The degradation of bisphenol A was also investigated by culturing the mycelia of *T. hirsuta* in YMG medium supplemented with 100 ppm bisphenol A. The mycelia of *T. hirsuta* were found to degrade bisphenol A by 71.3, 95.3, and 100 % within incubation periods of 12, 24, and 36 hr, respectively. These mycelia also showed ligninolytic enzyme-like activities including those similar to laccase, MnP, and LiP. Therefore, these results indicate that *T. hirsuta* could emerge as a potential tool for the remediation of environmental contamination by aromatic dyes and bisphenol A.

KEYWORDS: Aromatic dyes, Bisphenol-A, Ligninolytic enzymes, *Trametes hirsuta*, White rot fungi

서 론

염료의 생산과 염색과정에서 배출되는 대부분의 염색폐수는 화학적으로 안정된 난분해성 방향족 화합물로 전 세계에서 다양한 종류가 생산되고 있다 (Singh, 2006). 염색 산업체에서 배출하는 염색폐수 발생량은 연간 2.8×10^5 톤으로 추정되고 있다 (Jin *et al.*, 2007). 하천이나 강으로 유출되는 염색폐수는 물속의 용존 산소를 낮추어 수생태

계에 나쁜 영향을 미치고, 심미적으로도 불쾌감을 일으키며, 발암의 위험성을 높이고 있다 (Fu and Viraraghavan, 2001). 염색폐수를 처리하기 위해 응집법, 막 여과법, 전기 분해법, 흡착법, 오존산화법, 이온교환법, 침전법 등 다양한 방법이 사용되고 있으나, 경제성이 낮고 이 과정에서 2차의 오염 발생 등 문제점이 발견되고 있다 (Banat *et al.*, 1996). 따라서 이러한 폐수처리 방법의 문제점을 보완하기 위해 곰팡이, 조류, 세균 등 생물체를 이용해 염색폐수를 안전하게 생분해하는 생물학적 처리기술의 연구가 진행되고 있다 (Rai *et al.*, 2005).

현재 지구의 환경을 위협하는 요소 중 하나에 내분비계 교란물질 (endocrine disruptor) 또는 일명 환경호르몬 (environmental hormone)에 의한 오염이 있다. 호르몬은 생물체의 특정한 세포에서 생산되어 혈액을 통해 다른 곳에 있는 표적세포 (target cell)에 운반되어 생리화학적 효과를 나타내 체내의 물질대사를 조절하는 역할을 하는 물질을 지칭하는 용어이다. 그러나 내분비계 교란물질은 생물의 체내에서 정상적으로 만들어진 물질이 아니라 산업 활동에 의해 생산된 것이어서 이들 물질이 자연계에 방출되어 생물의 체내로 흡수되면 호르몬과 매우 유사한

J. Mushrooms 2019 December, 17(4):247-254
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.4.247>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : tslee@inu.ac.kr
 Tel : +82-32-835-4617, Fax : +82-32-835-0763

Received December 2, 2019
 Revised December 12, 2019
 Accepted December 12, 2019

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

역할을 수행하기 때문에 정상적인 호르몬의 작용을 교란하여 체내의 물질대사에 여러 문제점을 발생시킨다 (Danzo, 1998). 환경호르몬이 생물체에 미치는 효과를 보면 매우 다양해서 극소량으로도 정상적인 호르몬의 작용을 억제하기도 하고 촉진하기도 하여 생물체의 발육과 성장에 큰 영향을 미치고 있다. 따라서 우리의 주변에 잔류하고 있는 내분비계 교란물질을 안정적으로 제거하여 환경을 정상적으로 복구해야 할 필요성이 대두되고 있다.

비스페놀 A는 러시아의 화학자 Dianin이 1891년에 처음으로 합성한 물질로 폴리카보네이트나 에폭시수지 같은 플라스틱 제조의 원료로 사용되는 데 이를 토대로 전 세계에서는 자동차 용품, 음식 용기, 젓병, 또는 음료수 캔의 코팅 등 널리 사용되고 있다. 비스페놀 A의 화학적 구조는 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사하여 이를 섭취하면 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 작용을 일으키기 때문에 내분비계 교란물질로 등록되어 있다. 특히 비스페놀 A는 남성의 정자 수를 감소시키거나 여성화를 초래하는 등의 문제를 야기할 수 있어 미생물을 이용해 제거하는 기술의 개발이 주목을 받고 있다 (Vijayalakshmi *et al.*, 2018).

리그닌은 셀룰로오스 헤미셀룰로오스와 함께 식물체를 구성하는 성분 중 가장 많은 비중을 차지하고 있는 난분해성 물질이다. 리그닌은 식물의 세포벽에 많이 존재하고 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 간의 접착제 역할을 하여 식물 조직의 강도와 견고성을 유지하는데 큰 도움을 주고 대부분의 미생물에 의한 분해에도 저항성을 갖고 있어서 식물이 생존하는데 중요한 성분이다 (Monties and Fukushima, 2001).

리그닌은 일반적인 효소에 의해서는 분해가 어려운 난분해성 화합물이나 일부의 진균류 중 리그닌 분해 효소를 생산하는 백색부후균에 의해 분해가 용이한 것으로 보고되어 있다 (Kirk and Farrell, 1987). 백색부후균 (white rot fungi)이 생산하는 리그닌 분해 효소에는 크게 laccase, lignin-peroxidase (LiP), manganese-peroxidase (MnP) 등이 있으며 균에 따라 생산하는 효소의 종류와 활성에 큰 차이를 보이고 있다. 백색부후균이 목재를 부후시키는 양상은 백색부후균이 이들 효소를 일부를 가지고 있거나 또는 모두 갖고 있거나에 따라 부후능력에 차이가 생기기 때문에 백색부후균을 이용해 염색폐수나 환경호르몬을 효율적으로 분해하기 위해서는 이들 백색부후균이 생산하는 리그닌 분해 효소의 종류와 활성을 정확하게 파악해야 할 필요성이 있다 (Bumpus *et al.*, 1985).

방향족 염료와 비스페놀 A가 백색부후균에 의해 분해가 가능한 것은 이들 균이 생산하는 리그닌 분해 효소의 기질특이성이 리그닌은 물론 리그닌과 화학구조가 유사한 방향족 염료와 비스페놀 A를 분해할 수 있기 때문이다 (Field *et al.*, 1993). 비스페놀 A는 최대 300 ppm까지 증류수에 용해되나 냄새와 색깔이 거의 없기 때문에 육안으로는 존재여부를 확인하는 것이 어려워 이를 확인하기 위해서는 HPLC, GC-Mass 또는 발색시약을 이용해 분광광

도계로 측정하는 방법 등이 있다 (Peng *et al.*, 2015).

따라서 본 연구에서는 인천대학교 버섯균주은행에 보존 중인 여러 백색부후균 균주 중에서 이제까지 방향족 염료와 비스페놀 A의 분해실험에 이용되지 않았던 흰구름버섯 (*T. hirsuta*) 균주를 선발하여 4종류의 염료와 비스페놀 A의 분해 가능성에 대해 조사하고 또한 이 균주가 생산하는 리그닌 분해 효소의 종류와 활성도가 방향족 염료와 비스페놀 A의 분해에 어떤 차이와 효과를 나타내는지 에 대해서도 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 백색부후균인 흰구름버섯 (*Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilat, IUM 5925)의 균사체는 인천대학교의 버섯균주은행에서 분양받았다. 분양받은 균주는 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 7일간 25°C에서 암 배양한 후, 실험 사용 전 까지 4°C의 냉장고에 보관하였다.

사용 염료와 비스페놀 A

본 실험에는 azo계 염료인 congo red (CR), heterocyclic계 염료인 methylene blue (MB), triphenylmethane계 염료인 crystal violet (CV), anthraquinone계 염료인 remazol brilliant blue R (RBBR) 등 4종의 탄화수소계 방향족 염료와 비스페놀 A를 사용하였다. 이들 염료와 비스페놀 A는 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

고체 배지에서의 염료의 탈색

고체 배지에서 흰구름버섯에 의한 염료의 탈색은 Jayasinghe *et al.* (2008)의 방법에 따라 수행하였다. 흰구름버섯 균사체를 PDA 배지에서 7일간 25°C로 배양한 뒤 직경 5 mm의 cork borer를 사용하여 절단하고 각각 0.01%의 염료가 첨가된 PDA 배지의 정 중앙에 접종하고 25°C에서 10일간 배양하면서 매 2일 간격으로 균사체가 성장한 직경 (mycelia diameter, MD)과 염료가 탈색된 직경 (decolorizing diameter, DD)을 mm 단위로 측정하였다. 염료의 탈색 능력은 decolorization index (DI)로 나타내었고 DI는 DD를 DM으로 나눈 값 ($DI = DD/DM$)으로 표시하였다. 각각의 실험은 4반복하였다.

액체 배지에서의 염료의 분해

각각 4종의 염료가 함유된 액체배지에서 흰구름버섯 균사체에 의한 염료의 분해는 Jayasinghe *et al.* (2008)의 방법을 수정하여 수행하였다. 50 mL 용량의 conical tube에 PDB 20 mL를 넣은 뒤 PDA에서 7일간 배양한 각각의 균사체를 cork borer로 절단한 뒤 4개의 균사체 disc를 PDB 액체배지에서 10일간 선 배양한 후 각각 20 mL의 0.02% 염료가 함

유된 20 mL의 PDB 배지를 첨가하여 농도를 0.01%로 조정 한 후 10일간 배양하였다. 매 2일 간격으로 conical tube내의 배양액을 멸균된 피펫을 이용해 2 mL씩 꺼낸 뒤 원심분리 기를 이용해 4,000 rpm으로 4°C에서 3분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 각 염료의 최대흡수파장(ϵ_{\max} A)에서 흡광도를 4반복하여 측정하였다. CR, MB, CV, RBBR 등 염료의 흡광도 측정은 각각 이들 염료의 최대흡수파장인 497 nm, 586 nm, 589 nm, 597 nm 등을 이용하였다. 각각의 염료 분해율은 다음의 식을 이용해 구하였다.

$$\text{염료 분해율 (\%)} = (A_0 - A)/A_0 \times 100$$

A_0 : 염료의 최대흡수파장에서의 흡광도

A : 샘플의 최대흡수파장에서의 흡광도

리그닌 분해효소의 활성 측정

4종의 염료와 비스페놀 A가 각각 함유된 액체배지에서 흰구름버섯의 균사체가 생산한 리그닌 분해효소의 활성을 측정하기 위해 50 mL 용량의 conical tube에 각각 20 mL의 PDB와 YMG 배지를 넣은 후 5 mm 직경의 흰구름버섯 균사체 disc 4개를 접종한 뒤 10일간 25°C에서 암 배양한 후 각각 0.02%의 4종류 염료가 함유된 20 mL의 PDB 배지와 200 ppm의 비스페놀 A가 함유된 YMG 배지 20 mL를 추가로 첨가하여 배양하였다. 4종의 염료를 접종한 PDB 배지는 배양 0일, 0.5일, 1일, 3일, 4일, 6일, 8일, 10일 후 배양액 2 mL를 멸균된 피펫으로 취하고 원심 분리하여 상등액의 효소 활성도를 측정하였다 (Jayasinghe *et al.*, 2008).

리그닌 분해효소의 활성도 기준을 마련하기 위한 standard curve를 그리기 위해 Bradford 방법을 이용한 단백질 정량을 수행하였다 (Bradford, 1976). 1 mg/mL의 bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 샘플에 함유된 단백질량을 mg 단위로 측정하여 이를 효소 활성의 측정에 사용하였다.

각각의 리그닌 분해효소의 측정에는 균사체 배양액 2 mL를 취하고 원심 분리하여 균사를 가라앉힌 후 상등액 100 μ L를 취하여 Bradford reagent 900 μ L와 섞은 다음 5분간 상온에 정치시키고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Laccase의 활성의 측정은 Hong (2010)의 방법을 따라 수행하였다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}$)를 기질로 사용하였다. 0.2 M lactate buffer (pH 4.5) 850 μ L에 ABTS를 50 μ L 섞고 배양액을 100 μ L 첨가한 후 상온에서 3분간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 산화된 ABTS의 양 (μmol)으로 정의하였다.

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

Manganese peroxidase (MnP)의 활성측정은 Hong (2010)의 방법을 따라 기질로 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}$)를 사용하였다 [23]. 0.2 M lactate buffer (pH 4.5) 800 μ L에 ABTS 50 μ L와 6 mM MnSO₄ 33 μ L, 배양액 100 μ L를 넣고 0.1 mM의 H₂O₂를 17 μ L 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 산화된 ABTS의 양 (μmol)으로 정의하였다.

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

Lignin peroxidase (LiP)의 활성 측정은 DeSouza-Ticlo (2008)의 방법에 따라 수행하였다. 기질인 veratryl alcohol이 H₂O₂에 의해 산화되어 veratrylaldehyde ($\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}$)가 되는 정도를 측정하였다. 125 mM d-tartaric acid buffer (pH 2.5) 400 μ L와 40 mM veratryl alcohol 50 μ L, H₂O₂ 50 μ L를 섞은 다음 배양액 500 μ L를 넣은 직후와 상온에서 10분 반응시킨 후의 310 nm에서의 흡광도 차이를 비교하였다. 1 unit은 1분간 생성된 산화물 (μmol)의 양으로 정의하였다.

$$\text{LiP activity (unit/mg)} = \frac{[\Delta\text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume (L)}]}{[\Delta\text{Time (Min)} \times \epsilon_{310} \times \text{Sample weight (mg)}]}$$

비스페놀 A 함유 고체 배지에서의 균사체 성장

비스페놀 A를 PDA 배지에 각각 0, 25, 50, 100, 200 ppm의 농도로 첨가하고 멸균한 뒤 PDA에서 7일 성장한 5 mm 직경의 균사체 disc를 서로 다른 농도의 비스페놀 A가 함유된 plate의 정 중앙에 접종하고 25°C에서 10일간 배양하면서 성장한 균사체의 직경을 매 2일 간격으로 mm 단위로 측정하여 비스페놀 A의 농도 차이에 따른 각각의 균사체 성장을 조사하였으며 실험은 4반복하였다.

액체 배지에서의 비스페놀 A의 분해

비스페놀 A가 함유된 액체배지에서 흰구름버섯의 균사체가 비스페놀 A를 분해하는 실험은 yeast extract-malt extract-glucose (YMG) 배지를 이용해 수행하였다. 50 mL 용량의 conical tube에 YMG를 20 mL를 넣고 7일간 YMG agar 배지에서 배양한 5 mm 직경의 흰구름버섯 균사체 4개를 접종하여 10일간 선 배양한 후 비스페놀 A가 200 ppm 함유된 20 mL의 YMG 배지를 첨가하여 배양액의 농도를 100 ppm으로 조절한 뒤 4일간 배양하였다. 비스페놀 A를 첨가한 0 hr, 12 hr, 24 hr, 36 hr 48 hr 후 2 mL의 배양액을 취하여 원심분리기로 4°C에서 4,000 rpm으로 3분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 분석시료로 사용하였다. 시료에 함유되어있는 비스페놀 A의 정량은 상등액

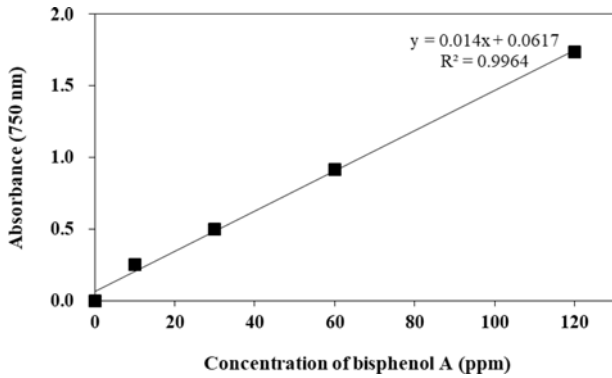


Fig. 1. Standard curve of bisphenol A based on the spectrophotometric determination.

160 μL에 발색제인 1% FeCl₃·6H₂O와 1% K₃Fe(CN)₆ 동량 혼합액을 40 μL (4:1) 넣고 30°C에서 5분간 반응시킨 후 50 mM의 HCl을 10 μL 가해 반응을 정지시킨 후 분광광도계 (Optizen 2120 UV, Daejeon, Korea)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각각의 실험은 4반복 하였다 (Kum *et al.*, 2007). 시료에 함유된 비스페놀 A의 정량은 분광광도계로 750 nm 흡광도에서 측정하여 작성한 비스페놀 A의 표준곡선을 이용해 구하였다 (Fig. 1).

결과 및 고찰

고체 배지에서 염료의 탈색

염료가 함유된 PDA 고체배지에서 흰구름버섯 균사체의 성장과 염료의 탈색 결과를 Table 1에 표시하였다. 염료를 함유하지 않은 PDA 배지에서의 균사체 직경은 접종

8일 후 petri dish 내의 배지를 모두 채운 89 mm로 나타났으나 CR 첨가 배지에서는 접종 2일부터 성장을 시작하여 접종 10일 후에는 88.3 mm 까지 성장하여 염료를 함유하지 않은 배지에 비해 균사체의 생장이 저해되었다. CR 첨가 배지의 탈색은 접종 4일 이후부터 관찰되어 접종 10일 후에는 배지에 함유된 CR이 탈색된 직경 (DD)이 81.5 mm로 DI 값이 0.92로 나타나 균사체가 성장한 직경 만큼 염료가 탈색되지는 못하는 것으로 나타났다. MB 첨가 배지에서 균사체는 접종 4일 후 직경이 16.8 mm를 보여 생장이 느렸으며 배양 10일 후에도 균사체의 직경이 68.3 mm로 나타나 배지에 함유된 MB의 독성이 균사체의 성장을 저해한 것으로 보인다. 특히 배양 10일 후 MB의 탈색은 균사체의 성장 (68.3 mm)에 비해 저해 효과가 더 크게 나타나 탈색된 직경이 37.3 mm로 측정되어 DI가 0.54로 공시한 4종류의 염료 중 탈색율이 가장 낮았다. CV가 함유된 배지에서 흰구름버섯의 균사체는 접종 10일 후 직경이 65.5 mm로 측정되었고 탈색된 직경도 65.5 mm로 균사체의 성장한 직경과 탈색된 직경이 일치해 DI 값이 1.0으로 나타났다. 따라서 CV가 첨가된 배지에서 흰구름버섯의 균사체 생장은 MB를 함유한 배지에 비해 조금 저조하였지만 탈색율은 1.0을 나타내 MB에 비해 CV를 효율적으로 탈색시키는 것으로 나타났다. RBBR 염료가 첨가된 PDA 배지에서 배양 2일 후부터 균사체의 생장이 시작되어 배양 6, 8, 10일 후 균사체의 직경이 각각 71.5 mm, 88.3 mm, 89 mm에 도달해 실험에 사용한 4종류의 염료 배지 중에서 성장 속도가 가장 빠르게 나타났으며, 염료가 탈색된 직경도 각각 74.5 mm, 89 mm, 89 mm로 탈색율이 각각 1.04, 1.01, 1.0으로 가장 높아서 공시한 4종류의 염료 중 탈색율이 가장 높았다.

Table 1. Decolorization of aromatic dyes on the solid medium by *Trametes hirsuta*

Dye		Days of culture on solid medium					
		0	2	4	6	8	10
CR	MD	5	6.9	34.5	68	78.5	88.3
	DD	0	0	28.8	59.5	70.5	81.5
	DI	0	0	0.84	0.88	0.9	0.92
MB	MD	5	5.5	16.8	40.5	53.5	68.3
	DD	0	0	6.8	17.5	28.5	37.3
	DI	0	0	0.41	0.43	0.45	0.54
CV	MD	5	5.8	14.8	37.3	50.8	65.5
	DD	0	0	12.8	36.8	50.5	65.5
	DI	0	0	0.86	0.99	0.99	1
RBBR	MD	5	7	37.5	71.5	88.3	89.0
	DD	0	0	36.3	74.5	89.0	89.0
	DI	0	0	0.97	1.04	1.01	1

MD; Mycelial diameter, DD; Decolorization diameter, DI; Decolorization index = DD/MD. The mycelial diameter and decolorization diameter were measured for 10 days (mm, n=4)

따라서 본 실험에서 흰구름버섯의 균사체는 공시된 4종류의 염료 중 RBBR 염료를 가장 효율적으로 탈색시켰고 다음으로 CR, CV, MB 등의 순으로 염료를 탈색시키는 것으로 나타났다. 특히 MB 배지에서 균사체의 생장은 CV 배지에 비해 조금 빨랐으나 탈색율 (DI)은 CV의 1에 비해 0.54로 낮은 것은 흰구름버섯 균사체가 MB 첨가 배지에서 배지 내에 녹아있는 MB 독성을 피해 주로 배지 표면에서 성장하면서 배지 속으로 균사체와 리그닌 분해효소의 침투가 지연되어 MB의 탈색이 저해된 것으로 사료된다.

액체배지에서 염료의 분해

염료가 함유된 PDB 액체 배지에서 흰구름버섯의 균사체가 10일간 4종류의 염료를 분해한 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 염료가 함유된 PDB 배지에서 흰구름버섯의 균사체는 접종 2일 전에는 염료의 분해를 거의 하지 않았으나 접종 2일 후에는 CR이 41.5%, MB가 15.5%, CV가 35.5%, RBBR이 46% 분해되었고 접종 4일 후에는 CR이 63.3%, MB가 21.3%, CV가 45.3%, RBBR이 96.3%까지 분해되어 흰구름버섯 균사체의 염료 분해능이 짧은 배양기간에도 매우 빠른 것으로 나타났다. 그러나 접종 4일 후부터는 모든 염료의 분해속도가 점차 감소하기 시작하여 접종 10일 후에는 CR이 81.3%, MB가 35.3%, CV가 69.5%, RBBR이 100% 분해되어 CR과 RBBR을 제외하고는 염료의 분해율이 상대적으로 낮았다. 액체배지에서 흰구름버섯의 염료 분해율은 고체배지에서의 염료 분해율과 마찬가지로 RBBR의 분해율이 가장 빨랐고 효율적이었으며 다음으로 CR, CV, MB 등의 염

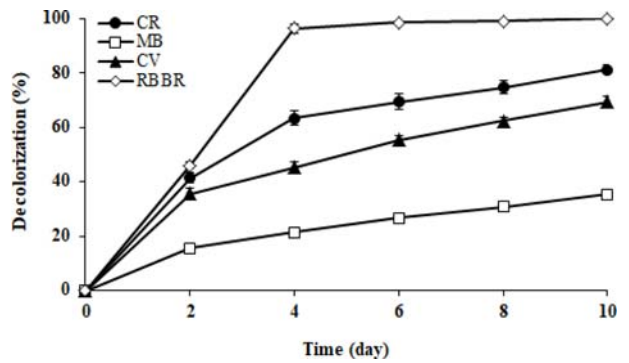


Fig. 2. Decolorization of aromatic dyes in PDB medium containing 0.01% aromatic dyes by *Trametes hirsuta*. CR (congo red), MB (methylene blue), CV (crystal violet), RBBR (remazol brilliant blue R). Results are means ±SD (n=4).

료 순으로 낮았다. 이와 같이 RBBR과 CR 등의 분해율이 CV나 MB에 비해 높은 것은 이들 염료는 공통적으로 모두 벤젠 고리를 갖고 있는 화학물질이지만 화학적인 구조와 벤젠고리의 숫자 등에 차이가 있어 생물체에 대한 독성 특히 미생물에 대한 독성에 큰 차이를 나타낸다는 보고와 유사한 결과를 나타냈다 (Gu *et al.*, 2012). 따라서 미생물에 대한 독성이 강한 MB 배지에서 흰구름버섯 균사체의 생장이 저해되고 분해율도 낮아지는 결과가 나타난 것으로 사료된다.

염료 함유 액체배지에서 리그닌 분해효소 활성

흰구름버섯의 균사체를 4종류의 염료가 각각 첨가된

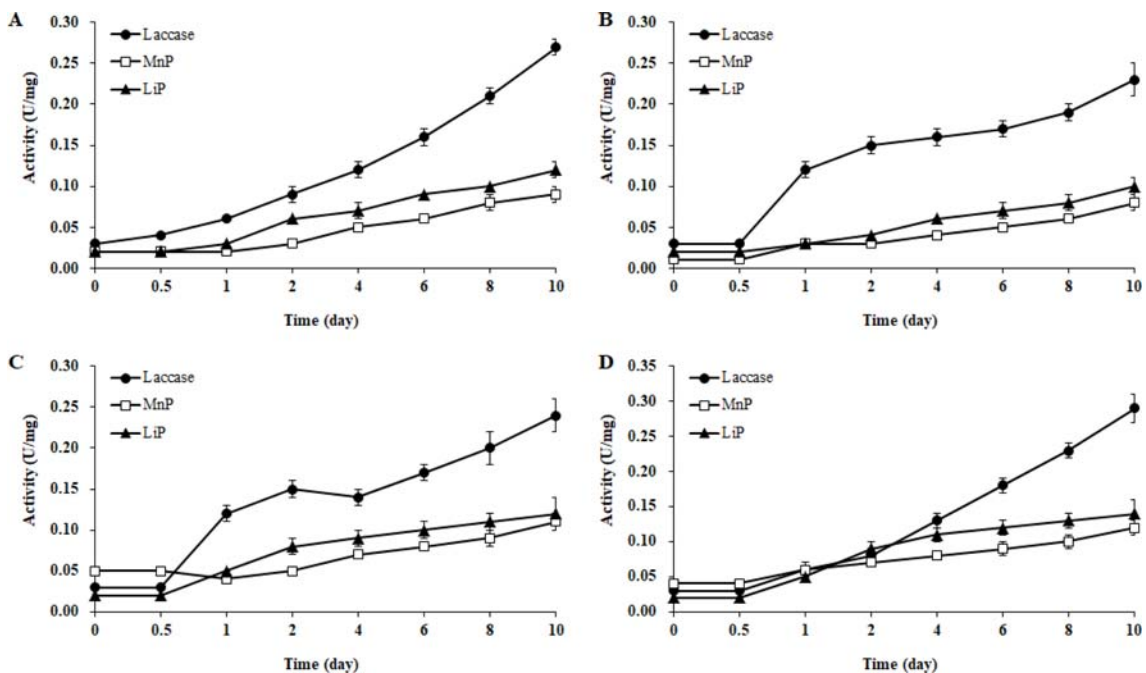


Fig. 3. Ligninolytic enzyme activities of *Trametes hirsuta* in PDB medium containing 0.01% aromatic dyes. MnP; manganese peroxidase, LiP; lignin peroxidase. A; CR (congo red), B; MB (methylene blue), C; CV (crystal violet), D; RBBR (remazol brilliant blue R). Results are means ± SD (n=4).

PDB 액체 배지에서 배양하여 배지에 생성된 리그닌 분해 효소의 활성을 Fig. 3에 표시하였다. CR이 첨가된 배지에서 균사체가 생산한 laccase의 활성도는 배양 당일에는 0.03 U/mg으로 낮았으나 배양 2일 후부터 지속적으로 증가하여 배양 10일에는 0.27 U/mg으로 증가하였다. LiP는 접종 당일에는 활성도가 0.02 U/mg으로 낮았으나 배양 1일 째는 0.03 U/mg이었고 배양 10일 째에는 0.12 U/mg으로 증가하였다. 그러나 MnP의 활성도는 배양 10일 째에도 0.09 U/mg을 나타내 laccase의 활성도에 비해 각각 33.3%에 그쳐 매우 낮았다. MB가 첨가된 배지에서 laccase의 활성도는 접종 초기에 0.03 U/mg으로 낮았지만 배양 기간에 비례해 증가하여 10일 째에는 활성도가 0.23 U/mg으로 높아졌다. LiP와 MnP도 배양 초기에는 각각 0.01 U/mg과 0.02 U/mg으로 활성도가 매우 낮았지만 배양 10일 째에는 0.08 U/mg과 0.12 U/mg으로 측정되어 배양 기간이 증가함에 따라 이들 효소의 활성도도 증가하는 추세를 보였다. CV가 첨가된 배지에서 laccase의 활성도는 10일 째에 0.24 U/mg으로 측정되었다. LiP와 MnP 효소의 활성도는 배양 10일 째 0.11 U/mg과 0.12 U/mg을 나타내 배양 초기에 비해 활성도가 각각 2.2배와 6배 증가하였다. RBBR이 첨가된 배지에서 laccase의 활성도는 접종 초기에 다른 염료와 유사한 0.03 U/mg으로 측정되었지만 배양 기간에 계속되면서 10일 째의 활성도는 0.29 U/mg으로 높아졌다. LiP와 MnP도 배양 초기의 활성도는 각각 0.02 U/mg과 0.04 U/mg으로 낮았으나 배양 10일 째에는 0.14 U/mg과 0.12 U/mg으로 나타나 배양 기간이 길어짐에 따라 활성도가 증가하는 경향을 보였다.

본 실험에서 흰구름버섯의 균사체가 CR, CV, MB, RBBR 등의 염료 탈색과정에서 생산한 laccase, LiP, MnP 등 3종류의 리그닌 분해효소의 활성도는 laccase가 가장 높게 측정되었으며 배양기간의 증가함에 따라 효소의 활성도도 지속적으로 증가하는 추세를 나타내었다. 배양기간 중 측정된 LiP의 활성도는 laccase에 비해 상대적으로 낮았지만 MnP의 활성도에 비해서는 상대적으로 높았다. Baek *et al.* (2015) 에 의하면 흰구름버섯과 같은 속에 속하는 구름버섯 (*Trametes versicolor*) 균사체를 anthracene을 첨가한 PDB 배지에서 배양하였을 때 LiP의 활성이 확인되지 않아서 구름버섯의 경우 laccase와 MnP만을 이용해 염료의 분해가 가능했다고 보고하였는데 본 실험에서는 흰구름버섯이 3종류의 리그닌 분해효소를 모두 생산하는 것으로 보아 구름버섯 보다는 염료 분해능이 우수한 것으로 사료된다.

특히 흰구름버섯 균사체에 의해 본격적으로 4종류의 염료가 탈색되기 시작한 시점이 배양 2일 째이고 (Fig. 2) 또한 3종류의 리그닌 분해 효소가 본격적으로 생산을 시작한 시점 (Fig. 3)도 배양 2일 후인 것은 감안해 보면 염료의 분해에는 최소한 어느 정도 이상의 리그닌 분해효소의 생산량과 시간이 필요한 것으로 사료된다.

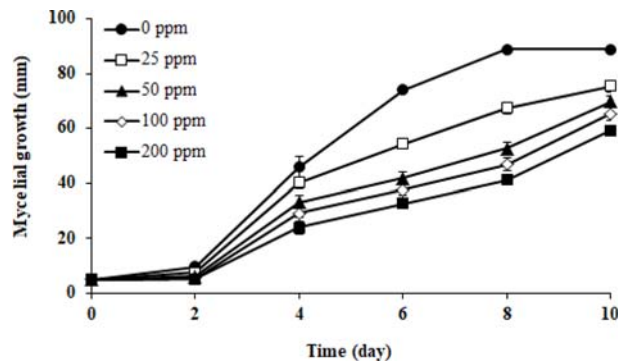


Fig. 4. Mycelial growth of *Trametes hirsuta* on PDA medium containing different concentrations of bisphenol A. Results are means \pm SD (n=4).

비스페놀 A 함유 고체배지에서 균사체 생장

비스페놀 A 농도가 0, 25, 50, 100, 200 ppm 함유된 PDA petri dish에서 흰구름버섯의 균사체를 접종하여 10일 간 배양하면서 매 2일 간격으로 성장한 균사체의 직경을 측정하여 그 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 비스페놀 A가 0 ppm 함유된 PDA 배지에서 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 배양한 petri dish 내의 균사체 직경은 각각 9.8 mm, 46 mm, 74 mm, 89 mm, 8.9 mm로 8일 배양 이후에는 petri dish에서 모두 성장하였고, 25, 50, 100, 200 ppm 함유된 PDA 배지에서 균사체를 배양하여 측정된 균사체의 직경은 배양 10일 후 각각, 75.5 mm, 69.8 mm, 65.3 mm, 59.3 mm로 측정되어 비스페놀 A가 첨가되지 않은 배지에 비해 균사체의 생장이 각각 11.6%, 21.6%, 26.6%, 33.4% 저해되었다. 이렇게 비스페놀 A의 농도가 높아짐에 따라 균사체의 생장이 농도 의존적으로 지체된 것은 비스페놀 A의 농도가 증가함에 따라 비스페놀 A의 독성이 균사체 성장을 저해한 것으로 사료된다. 따라서 흰구름버섯 균사체의 성장을 26.6% 저해한 100 ppm의 비스페놀 농도를 YMG 액체배지에서 비스페놀 A의 분해 실험에 사용하였다.

액체배지에서 비스페놀 A의 분해

비스페놀 A를 100 ppm 함유한 YMG 액체배지에 흰구름버섯의 균사체를 접종하고 48시간 배양하여 매 12시간 마다 분해된 비스페놀 A의 양을 측정하여 그 결과를 Fig. 5에 표시하였다. 흰구름버섯의 균사체는 비스페놀 A를 배양 12시간 후 71.26%, 배양 24시간 후에는 95.25% 분해하고 배양 36시간 후에는 100% 분해하였다. 이와 같이 흰구름버섯의 균사체가 100 ppm의 비스페놀 A를 36시간 배양에 모두 분해할 수 있었던 것은 흰구름버섯의 균사체가 100 ppm의 비스페놀 A가 첨가된 YMG 배지에서 laccase, MnP, LiP 등 3종류의 효소를 생산하는 능력을 갖고 있었기 때문으로 사료된다. (Shin *et al.* (2007)은 기계충버섯, 새송이의 균사체를 비스페놀 A가 50 ppm 첨가

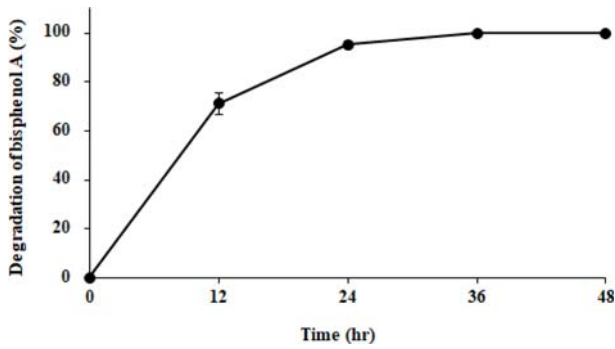


Fig. 5. Degradation of 100 ppm bisphenol A by *Trametes hirsuta* in YMG medium. Results are means \pm SD (n=4).

된 YMG 액체 배지에 접종하여 24시간 배양 후 분해율을 조사한 결과, 각각 100%, 11.8% 분해되는 것을 확인하였으며 기계충버섯은 laccase, MnP, LiP 등 3종의 효소를 모두 생산하였으나 새송이는 laccase와 MnP 효소를 생산하였으나 LiP의 활성은 거의 나타나지 않아 이들 버섯의 laccase와 MnP가 비스페놀 A의 분해에 중요한 역할을 하는 효소인 것으로 보고하였다. 따라서 비스페놀 A의 분해에는 laccase의 양과 활성이 중요한 역할을 하고 이외에 MnP가 보조적인 역할을 하는 것으로 보고하였다. Kang *et al.* (2008)은 구름버섯 균사체를 50 ppm의 비스페놀 A가 함유된 YMG 액체 배지에서 배양하여 비스페놀 A의 분해율을 조사한 결과, 배양 12시간 후 100% 분해하였으며 laccase와 MnP의 활성은 높게 나타났으나 LiP의 활성은 측정되지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서도 흰구름버섯이 빠른 시간 내에 비스페놀 A를 효과적으로 분해할 수 있었던 것은 이 버섯이 laccase, MnP, LiP 등 3종류의 효소를 생산함으로써 리그닌이나 이와 유사한 비스페놀 A를 분해하는 데 상승효과를 낼 수 있었을 것으로 사료된다 (Hatakka, 1994).

비스페놀 A 함유 액체배지에서 리그닌 분해효소 활성

흰구름버섯의 균사체를 비스페놀 A가 100 ppm 함유된 YMG 액체 배지에서 배양하여 배지에 생성된 리그닌 분해효소의 활성을 Fig. 6에 표시하였다. 균사체가 생산한 laccase의 활성도는 배양 당일에는 0.03 U/mg이었으나 배양 2일 후 (0.15 U/mg) 부터는 지속적으로 증가하여 배양 10일에는 0.23 U/mg으로 증가하였다. LiP는 접종 초에는 활성도가 0.02 U/mg이었으나 배양 1일째 0.03 U/mg, 배양 10일째는 0.13 U/mg으로 증가하였다. 그러나 MnP의 활성도는 배양 10일째에도 0.09 U/mg을 나타내 laccase의 활성도에 비해 크게 낮았고 LiP에 비해서는 조금 낮았다.

따라서 laccase, MnP, LiP 효소의 활성은 배양기간이 경과함에 따라 점차 증가하는 추세를 나타냈으며 측정된 리그닌 분해 효소의 양은 laccase가 가장 높았고 다음으로 LiP와 MnP 순으로 나타났다.

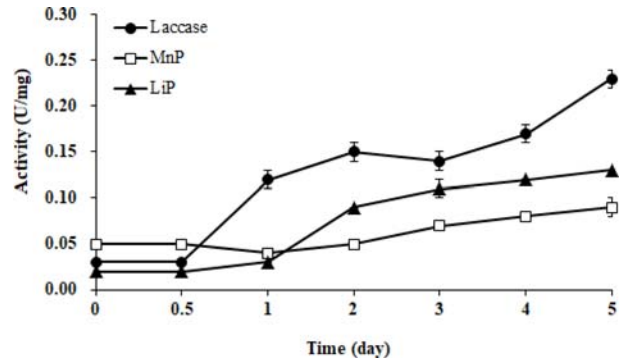


Fig. 6. Ligninolytic enzyme activities of *Trametes hirsuta* in YMG medium containing 100 ppm bisphenol A. Results are means \pm SD (n=4).

적 요

흰구름버섯 (*Trametes hirsuta*)의 균사체는 CR, CV, RBBR 등 방향족 염료가 함유된 고체와 액체 배지에서 이들 염료를 효과적으로 탈색하였으나 MB의 탈색은 저조하였다. 각각 CR, MB, CV 및 RBBR 등 4종류의 염료가 함유된 액체배지에서 흰구름버섯의 균사체를 10일 간 배양했을 때 laccase, LiP, MnP 등 세 종류의 효소를 모두 생산하였으며 이들 효소 중 laccase의 활성도가 가장 높았으며 LiP와 MnP의 활성도 laccase에 비해 낮았다. 따라서 흰구름버섯 균사체에 의한 방향족 염료의 탈색에는 laccase가 주로 사용되고 LiP나 MnP는 보조적인 역할을 하는 것으로 사료된다. 또한 비스페놀 A가 0, 25, 50, 100, 200 ppm의 농도로 함유된 PDA 배지에 균사체를 접종하여 배양한 결과 비스페놀 A의 농도가 증가함에 따라 균사체의 생장은 농도 의존적으로 저해되는 것으로 나타났다. 또한 비스페놀 A가 100 ppm 함유된 YMG 액체배지에 균사체를 접종하고 비스페놀 A의 분해율을 측정한 결과 배양 12시간 후 72.3%, 배양 24시간 후 95.3%, 그리고 배양 36시간 후에는 100% 분해된 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과는 우리나라의 산업 활동 과정에서 생산되고 자연계로 배출되어 생물체에 큰 피해를 주는 합성염료와 내분비계 장애물질인 비스페놀 A를 친환경적으로 제거할 수 있는 기술의 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 인천대학교 교내 연구비 지원에 의해 수행한 연구 결과입니다.

REFERENCES

Baek SA, Choi JH, Lee TS, Im KH. 2015. Biodegradation of

- triphenyl methane dyes by white rot fungus, *Trametes versicolor*. *J Mushrooms* 13(1): 63-67.
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: A review. *Bioresour Technol* 58: 217-227.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-250.
- Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
- Danzo BJ. 1998. The effects of environmental hormones on reproduction. *Cell Mol Life Sci* 11: 1249-1264.
- DeSouza-Ticlo D. 2008. The lignin-degrading enzyme, laccase from marine fungi: biochemical and molecular approaches. Ph. D. Thesis. Goa University. pp. 335. Goa, India.
- Field J, de Jong E, Feijoo G, de Bont J. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11: 44-49.
- Fu Y, Viraraghavan T. 2001. Fungal decolorization of dye waste waters: A review. *Bioresour Technol* 79: 251-262.
- Gu BJ, Kim MS, Kim YM, Kim SW, Choi WH, Lee MW, Cho HJ, Lee TS. 2012. Decolorization of synthetic dyes and ligninolytic enzymes production by white rot fungi. *Korean J Mycol* 40(2): 98-103.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13: 125-135.
- Hong CY. 2010. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by white rot fungus, *Ceriporia* sp. ZLP-2010. M.S. Thesis. Seoul National University. Seoul, Korea.
- Jayasinghe C, Imtiaj A, Lee GW, Im KH, Hur H, Lee MW, Yang HS, Lee TS. 2008. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiol* 36: 114-120.
- Jin XC, Liu GQ, Xu ZH, Tao WY. 2007. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 239-243.
- Kang AR, Choi HT, Song HG. 2008. Optimization of bisphenol A biodegradation by *Trametes versicolor*. *Korean J Microbiol* 44(1): 37-42.
- Kirk TK, Farrell RL. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41: 465-501.
- Kum EJ, Ryu HY, Kwon GS, Shon YH. 2007. Spectrophotometric determination of bisphenol A by complexation with ferricyanide and ferric chloride solution. *J Life Sci* 17(2): 266-271.
- Monties B, Fukushima K. 2001. Occurrence, function and biosynthesis of lignins. In M. Hofrichter & A. Steinbüchel. (ed.), *Biopolymers Part 1: Lignin, Humic Substances and Coal*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Peng SY, Liu LP, Zhang XQ, Heinrich J, Zhang J, Schramm KW. 2015. A nested case-control study indicating heavy metal residues in meconium associate with maternal gestational diabetes mellitus risk. *Environ Health* 14: 19.
- Rai HS, Bhattacharyya MS, Singh J, Bansal TK, Vats P, Banerjee UC. 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dye stuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 35: 219-238.
- Shin EH, Choi HT, Song HG. 2007. Biodegradation of endocrine disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*. *J Microbiol Biotechnol* 17(7): 1147-1151.
- Singh H. 2006. *Mycoremediation: Fungal bioremediation*. John Wiley & Sons. Inc. New Jersey, USA. pp. 592.
- Vijayalakshmi V, Senthilkumar P, Mophin-Kani K, Sivamani S, Sivarajasekar N, Vasantharaj S. 2018. Bio-degradation of bisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* PAb1 isolated from effluent of thermal paper industry: Kinetic modeling and process optimization. *J Rad Res Appl Sci* 11: 56-65.