

## 구름버섯 (*Coriolus versicolor* IFO 30388)에 의한 Poly R-478 염료의 탈색

윤 경 하

순천향대학교 자연과학대학 생물학과

구름버섯에 의한 Poly R-478 염료의 탈색에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였다. 2.0% glucose, 0.04% ammonium tartrate, 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.002% thiamine-HCl, 10 mM 2,2-dimethylsuccinate(sodium)와 0.02% Poly R-478 염료 등으로 조성된 질소제한배지에서 균주를 28°C에서 10일간 정치배양 했을때 염료의 탈색율은 87.2%로 나타났다. 염료의 탈색은 배지내에 질소원이 존재할 때에 일어났으며 탈색율은 배지내에 질소원이 고갈된 직후에 급격히 증가하였다.

**KEY WORDS** □ decolorization, Poly R-478, *Coriolus versicolor*

리그닌(lignin)은 생물권에서 가장 풍부한 방향족의 중합체로서 화학적으로나 생물학적으로 분해되기 어려운 난분해성 물질로 알려져 왔으나 리그닌을 분해하는 몇몇의 미생물들이 발견됨에 따라 리그닌의 분해효소와 분해기작이 밝혀지게 되었다(15). 리그닌 분해효소 기구는 세포외 효소기구(extracellular machinery)로서 lignin peroxidases (LiPs), manganese-dependant peroxidases (MnPs) 그리고  $\text{H}_2\text{O}_2$ 을 생성하는 산화효소로 구성되어 있다(4). LiPs는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 존재하에서 리그닌 분자의 비페놀부위(non-phenol moiety)로부터 하나의 전자를 방출하여 양이온의 래디칼(radical)을 만들고 이러한 래디칼은 산화반응을 통하여 리그닌을 산화(oxygenation)시키고 탈중합화 시킨다. MnPs는 LiPs와 마찬가지로 heme구조를 갖는 당단백질로  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 존재하에서 Mn(II)를 Mn(III)로 산화하고 산화된 Mn(III)은 리그닌의 페놀 부위를 산화한다. 이와 같은 리그닌 분해효소 기구는 리그닌의 단체(monomeric unit)들이 무질서하게 배열되어 3차원의 구조를 형성하고 있는 리그닌을 비특이적인 방법으로 분해한다. 리그닌 분해효소 기구는 리그닌 뿐만 아니라 polychlorinated biphenyls (PCBs) (3), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (7), azo염료(14), heterocyclic 염료(1) 그리고 중합체 염료(polymeric dyes) (5) 등과 같은 방향족 화합물들도 분해한다. 특히 중합체 염료의 탈색은 리그닌 분해효소 활성과 밀접한 상관관계가 있다(2). 즉 질소원이 배지에 풍부하면 리그닌 분해효소 활성은 물론 염료의 탈색도 억제되고, 산소공급은 리그닌 분해와 염료의 탈색을 증가시킨다. 그리고 리그닌 분해를 저해하는 저해제는 염료의 탈색을 저해한다. 따라서 중합체의 염료를 리그닌 분해효소의 기질로 사용하여 리그닌 분

해효소 활성 측정에 이용할 뿐만 아니라 리그닌 분해효소가 결여된 돌연변이체의 분리와 리그닌 분해 균주를 검색하는데 유용하게 쓰이고 있다(2, 5, 6, 17).

본 연구에서는 리그닌 분해효소 기구를 갖는 구름버섯(*Coriolus versicolor*)을 이용하여 중합체 염료 중의 하나인 poly(vinylamine) sulfonate-anthrapyridone 염료(Poly R-478)의 탈색에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주

본 연구에 사용된 균주는 서울대학교 미생물학과에서 분양받은 구름버섯(*Coriolus versicolor* IFO 30388)으로서 potato dextrose agar (PDA)배지에서 28°C로 일정기간 배양한후 4°C에 보존하였다. 균주를 실험에 사용할 때는 PDA를 포함하고 있는 petri-dish의 중앙에 균주를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한후 petri-dish 가장자리로부터 약 1 cm 정도 떨어진 부위에서 직경 6 mm의 cork borer로 agar plug를 취하여 접종용 균주로 사용하였다.

#### 배지

본 실험에 사용한 배지는 Tien과 Kirk(16)배지에서 veratryl alcohol과 미량원소를 생략한 배지(1% glucose, 0.04% ammonium tartrate, 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.002% thiamine-HCl, 10 mM sodium 2,2-dimethylsuccinate (DMS, pH 4.5)를 기본배지로 사용하였다.

#### Poly R-478 염료의 탈색측정

용량 100 ml 삼각후라스크에 10 ml의 배지를 넣은 후 0.02% (최종농도)의 R-478염료를 가하고 균주를 접종하여 28°C에서 7일간 정치배양하였다. 탈색의

측정은 일정량의 배양액을 취하여 Poly R-478 염료 용액의 최대 흡수파장인 520 nm과 350 nm에서 흡광도를 측정하고 탈색의 정도를  $A_{520}/A_{350}$ 의 비율로 산출하여 백분율 (%)로 나타냈다. Poly R-478 염료의 붉은색 (red)은 완전히 탈색되면 오렌지색 (orange)으로 변한다 (5).

#### 분 석

배지내에 남아 있는 glucose는 Nelson (12)방법에 따라 정량하였고 ammonium tartrate는 Weatherburn (18)의 방법에 따라 ammonium sulfate를 표준용액으로하여 정량하였다. 균체의 생장량은 균사체를 포함하는 배양액을 여과지 (TOYO No. 2)로 여과하여 여과지를 150°C에서 1시간 건조시킨 후 건량을 측정하여 표시하였다.

### 결과 및 고찰

#### Poly R-478 염료의 가시 스펙트럼 (visible spectrum)

본 연구에 사용한 Poly R-478 염료용액의 가시 스펙트럼은 Fig. 1과 같이 520 nm 파장에서 최대 흡수치를 나타내었다. 균사체를 포함하고 있는 배양액에 염료를 첨가 했을때 염료는 균사체에 흡착될 뿐만 아니라 균사체에 의하여 염료가 전환되기 때문에 용액내에서 염료의 강도는 감소된다. 이때에 두 파장에서 측정한 각각의 흡수치는 현저하게 감소되나 두 파장에서 측정한 흡수치의 흡수비율은 거의 일정하다. 따라서 Glenn과 Gold (5) 그리고 Gold (6) 등의 방법에 따라 염료의 탈색율은 520 nm와 350 nm의 두 개의 파장에서 측정한 흡수치의 흡수비율로 산출하였다.

#### 탄소의 영향

Poly R-478 염료의 탈색에 가장 효과적인 탄소원을 선정하기 위하여 기본배지의 glucose를 여러가지 탄소원 (최종농도 1%)으로 대체하여 실험하였다 (Table 1). 탄소원 가운데 CMC와 xylose는 탈색효

과가 낮고 glucose와 mannose는 탈색효과가 높았다. 특히 glucose는 다른 탄소원에 비해 생장도 우수하고 69.9 %의 탈색율을 나타냈기 때문에 탈색에 가장 효과 있는 탄소원으로 선정되었다.

Glucose농도가 탈색에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지의 glucose농도를 0.5에서부터 4%까지 조제하여 균주를 배양한 결과 (Table 2), 2.0%의 glucose배지에서 71.9%의 가장 높은 탈색율을 나타내었고 4.0%의 glucose배지를 제외한 나머지 실험구에서는 비슷한 탈색율을 나타내었다. 김 등 (10)은 calcium-lignosulfonate 배지에 여러가지 탄수화물을 첨가하여 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*)을 배양한 결과, 리그닌의 탈중합화 (depolymerization)와 탈색 (decolorization)에는 glucose, cellobiose 그리고 xylose가 효과적임을 보고하였고 Kirk (11) 등은 구름버섯을 이용하여 질소제한배지에서  $^{14}C$ 로 표시된 리그닌 모델화합물의 분해에 미치는 여러가지 탄수화물의 영향을 조사한 결과, cellulose powder는

Table 1. Effect of carbon sources on decolorization of poly R-478 dye by *C. versicolor* IFO 30388.

Carbon sources	Absorbance ratio ( $A_{520}/A_{350}$ )	Decolorization (%)	Dry weight (mg)
CMC*	1.14	7.3	12.5
Cellobiose	0.61	50.4	30.4
Cellulose powder	0.47	61.8	26.0
Glycerol	0.54	56.1	33.5
Glucose	0.37	69.9	51.8
Mannose	0.40	67.5	42.5
Sucrose	0.55	55.3	40.8
Xylose	0.76	38.2	34.9

Initial absorbance ratio ( $A_{520}/A_{350}$ ) of the dye solution was 1.23.

\*Carboxymethylcellulose.

Table 2. Effect of glucose concentration on decolorization of Poly R-478 dye by *C. versicolor* IFO 30388.

Glucose conc. (%)	Absorbance ratio ( $A_{520}/A_{350}$ )	Decolorization (%)
0.5	0.44	65.6
1.0	0.44	65.6
1.5	0.41	68.0
2.0	0.36	71.9
2.5	0.42	67.2
3.0	0.43	66.4
3.5	0.45	64.8
4.0	0.68	46.9

Initial absorbance ratio ( $A_{520}/A_{350}$ ) of the dye solution was 1.28.

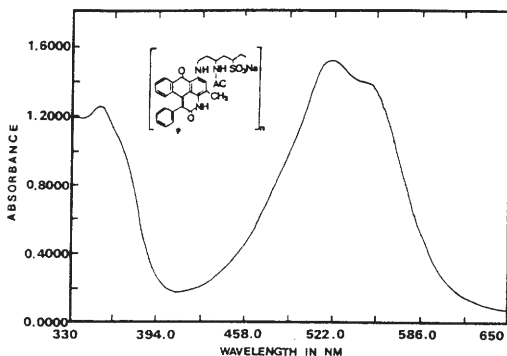


Fig. 1. Visible spectrum of the polymeric dye poly R-478.

**Table 3.** Effect of nitrogen sources on decolorization of poly R-478 dye by *C. versicolor* IFO 30388.

Nitrogen sources	Absorbance ratio ( $A_{520}/A_{540}$ )	Decolorization (%)	Dry weight (mg)
Ammonium chloride	0.59	52.0	40.7
Ammonium nitrate	0.44	64.2	100.2
Ammonium sulfate	0.54	56.1	38.6
Ammonium tartrate	0.42	65.9	44.2
Sodium nitrate	0.54	56.1	15.8

Initial absorbance ratio ( $A_{520}/A_{540}$ ) of the dye solution was 1.23.

**Table 4.** Effect of ammonium tartrate concentration on decolorization of Poly R-478 dye by *C. versicolor* IFO 30388.

Ammonium tartrate (%)	Absorbance ratio ( $A_{520}/A_{540}$ )	Decolorization (%)
0.01	0.46	64.1
0.02	0.32	75.0
0.04	0.29	77.3
0.06	0.31	75.8
0.08	0.40	68.7
0.10	0.48	62.5
0.20	0.49	61.7
0.40	0.63	50.8

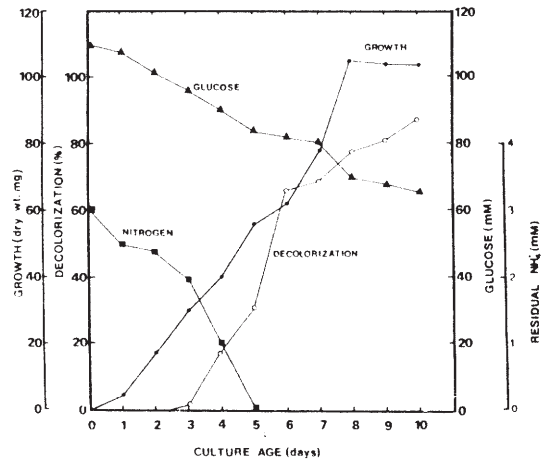
Initial absorbance ( $A_{520}/A_{540}$ ) of the dye solution was 1.28.

glucose보다 높은 분해효과를 나타냈고 cellobiose는 glucose와 비슷한 분해효과를 나타냈다. 그러나 본 실험에서 poly R-478 염료의 탈색에는 cellulose powder가 glucose보다 약간 낮은 탈색율을 나타냈고 cellobiose와 xylose는 아주 낮은 탈색율을 나타냈다. 이와 같은 상이한 결과는 사용한 균주, 기질 그리고 배양조건 등이 서로 다르기 때문이라고 생각된다.

#### 질소원의 영향

탈색에 가장 효과가 좋은 질소원을 선정하기 위하여 기본배지의 질소원소인 ammonium tartrate를 여러가지 무기질소원 (0.04%)으로 대체하여 균주를 배양하였다 (Table 3.) Ammonium tartrate와 ammonium nitrate가 각각 65.9%와 64.2%의 탈색율을 나타냈으나 생장은 ammonium nitrate가 ammonium tartrate에 비하여 2배 이상의 좋은 생장을 나타냈다.

염료 탈색에 가장 효과적인 ammonium tartrate의 농도가 염료탈색에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 4) ammonium tartrate의 농도가 0.04% 일

**Fig. 2.** Relationship between culture parameters and decolorization of poly R-478 dye during 10 days of growth.

때 77.3%의 탈색율을 나타내어 가장 효과적이었고 0.04% 이상의 농도에서는 농도가 증가 할수록 탈색율은 감소하였다.

*Aspergillus sojae* B-10 균주에 의한 amaranth, sudan III 그리고 Congored 등과 같은 azo 염료의 탈색에는 sodium nitrate가 가장 좋은 질소원으로서 그의 농도가 0.04%일때 94.0%, 93.7% 그리고 90.5%의 탈색율을 각각 나타냈다 (13). 본 실험에서는 sodium nitrate의 농도가 0.04%일때 56.1%의 탈색율을 나타냈다.

#### 염료의 탈색과 배양환경

Glucose를 2.0%, ammonium tartrate를 0.04%로 조성한 기본배지에서 구름버섯을 28°C에서 10일간 정치배양 했을때 염료의 탈색과정과 배양환경과의 관계를 보면 (Fig. 2) glucose의 양은 균주의 배양시간과 더불어 감소하였고 균주의 생장은 배양초기에서부터 서서히 증가하고 배양 8일 이후부터는 중지되었다.

염료의 탈색은 배지내에 질소원이 존재할때에 일어났으며 질소원이 고갈 되었을때는 탈색율이 급격히 증가하고 배양 10일에는 87.2%의 탈색율을 나타내었다. Keyser (9) 등은 질소제한배지에서 *P. chrysosporium*을 정치배양 했을때 배지내의 질소가 고갈된 후 리그닌 분해효소계의 활성이 나타나는 것을 관찰하고 배지내의 질소원의 농도가 리그닌 분해효소계의 출현을 조절한다고 보고하였고, Jeffries (8) 등은 *P. chrysosporium*을 질소제한배지에서 배양 했을때 질소원이 고갈되면 생장은 중단되고 2차 물질대사가 일어나는데 이때에 리그닌을 분해한다고 하였다. 뿐만 아니라 Glenn과 Gold (5)는 중합체염료의 탈색은 리그닌 분해효소계와 마찬가지로 배지내의 질소원에 의하여 조절되고 배지내의 질소원이 고갈된 후에 염

료의 탈색이 일어난다고 하였다. 본 연구에서는 질소원이 배지내에 존재함에도 불구하고 탈색효과가 있었고 질소원이 고갈된 직후에는 탈색율이 급격히 증가하였다. 이와 같은 결과는 구름버섯의 1차 물질대사와 2차 물질대사가 뚜렷이 구분되어 있지 않거나 리그닌 분해효소기구가 *P. chrysosporium*과 다르게 조절되기 때문이라고 생각된다.

## 사 사

본 연구를 수행함에 있어서 구름버섯 (*Coriolus versicolor* IFO 30388)을 분양해 주신 서울대학교 미생물학과의 강사옥 교수께 감사드리고 실험을 도와준 한만덕군과 권오성군에게 또한 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- Cripps, C., J.A. Bumpus, and S.D. Aust, 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1114-1118.
- de Jong, E., F.P. de Vries, J.A. Field, R.P. van der Zwan, and J.A.M. de Bont, 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol. Res.* **96**, 1098-1104.
- Eaton, D.C., 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **7**, 194-196.
- Field, J.A., E. de Jong, G. Feijoo-Costa, and J.A.M. de Bont, 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotech.* **11**, 44-49.
- Glenn, J.K. and M.H. Gold, 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1741-1747.
- Gold, M.H., J.K. Glenn, and M. Alic, 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assay. *Methods Enzymol.* **161**, 74-78.
- Hammel, K.E., B. Kalyanaman, and T.K. Kirk, 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* **261**, 16948-16952.
- Jeffries, T.W., S. Choi, and T.K. Kirk, 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 290-296.
- Keyser, P., T.K. Kirk, and J.G. Zeikus, 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **135**, 790-797.
- Kim, K.J., J.S. Maeng, K.S. Shin, S.O. Kang, Y.C. Hah, and S.W. Hong, 1986. Polymerization and depolymerization of lignin by some white-rot fungi. *Kor. J. Mycol.* **14**, 257-263.
- Kirk, T.K., W.J. Connors, and J.G. Zeikus, 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 192-194.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
- Ryu, B.H. and Y.D. Weon, 1992. Decolorization of azo dyes by *Aspergillus sojae* B-10. *J. Microbiol. Biotech.* **2**, 215-219.
- Spadaro, J.T., M.H. Gold, and V. Renganathan, 1992. Degradation of azo by lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2397-2401.
- Tien, M. and T.K. Kirk, 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycetes *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221**, 661-663.
- Tien, M. and T.K. Kirk, 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**, 238-248.
- Ulmer, D.C., M.S.A. Leisola, and A. Fiechter, 1984. Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **1**, 13-24.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**, 971-974.

(Received March 18, 1994)

(Accepted April 16, 1994)

## ABSTRACT: Decolorization of Poly R-478 Dye by *Coriolus versicolor* IFO 30388

Yoon, Kyung-Ha (Department of Biology, Soonchunhyang University, Asan-gun 337-745, Korea)

Effects of nitrogen and carbon sources on the decolorization rate of poly R-478 dye by a white rot basidiomycete *Coriolus versicolor* IFO 30388 were examined. The fungus exhibited 87.2% of decolorization rate when it was cultured in the state of stationary in a nitrogen-limited medium (pH 4.5) which contained 2.0% glucose, 0.04% ammonium tartrate, 0.02% poly R-478 dye, 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.002% thiamine-HCl and 10 mM 2,2 dimethylsuccinate (sodium) at 28°C for 10 days. Decolorization of the dye occurred in the presence of nitrogen source in the medium and decolorization rate increased rapidly after depletion of  $\text{NH}_4^+$  from the medium.