최 종
연구보고서

GOVP 12001308

유전공학적 미생물육종기술
Studies on the microbial develope using genetic engineering technique

농업토양 내의 유용미생물군의 생존과 활성에 대한 진단 및 그 개선방법의 개발

Characterization of survival and activities of the microbial populations in the soil ecosystems, and improvement of their useful phenotypes

전남대학교

환경공학과

농 림 부

〔별지 제7호 서식〕

최 종 보 고 서

190㎜×268㎜

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 농업토양 내의 유용미생물군의 생존과 활성에 대한 진단 및 그 개선방법의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 10. 30.

주관연구기관 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 정 선 용 (인)

주관연구기관장 :

직 인

농 림 부 장 관 귀 하

편집순서 2

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전 공학적 미생물육종기술” 과제 (세부과제 “농업토양 내의 유용미생물군의 생존과 활성에 대한 진단 및 그 개선방법의 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 30.

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 정선용
연 구 원 : 최상호
연 구 원 : 이규호
협동연구기관명 : 한국에너지기술연구소
협동연구책임자 : 김미선

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

농업토양 내의 유용미생물군의 생존과 활성에 대한 진단 및 그 개선방법의 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구는 농약오염이 심각한 토양 또는 제한환경(stressed environment)으로부터 농약관련물질을 분해할 수 있는 미생물 및 농업생산성 향상에 도움이 되는 미생물을 개발 또는 이용할 것을 제안한다. 국내농업환경에서 토양의 오염을 방제하고 생산성을 증진시키기 위하여 유용한 토양 내 미생물 생태계를 인위적으로 보존하고 개선할 수 있는 기술의 개발을 목표로 한다. 이를 위하여 우선 국내 농업토양 내 유용미생물 공동체를 분석하고 (제 1세부과제), 손상된 미생물 공동체의 복원을 위한 유해농약 분해 토양세균 (제 2세부과제)과 토양의 생산성 향상을 위한 난분해성 목질계 폐자원의 퇴비화 능력이 뛰어난 백색부후 곰팡이 (제 3세부과제)의 선발 및 육종을 연구하고자 한다. 즉 본 연구자들은 그 동안 미생물생태/생리학 분야와 분자생물학 분야에서 쌓은 경험을 바탕으로 1) 농업토양 내 유용 미생물 군들의 생태학적인 특징의 조사와 아울러 각 균주를 채취한 후; 2) 미생물 균주가 농약분해 역가에 관련된 유전자 그리고 난분해성 목질의 변형 역가에 관련된 유전자들을 얻은 후, 실제토양 내에서 그들의 발현여부를 조사하여 개량된 균주 획득의 가능성을 알아보며; 3) 이렇게 개발된 미생물 또는 그들의 혼합체가 토양 또는 모델토양에 살포되었을 시 각 균주들의 실제 환경요인에 대한 반응을 조사하여 그들의 생존 및 활성도 등을 연구하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

(제 1세부과제)

본 연구에서는 토양 내에 존재하는 beneficial microorganisms 중, 작물의 생산성을 증진시킬 수 있거나 잔류 유해농약의 분해 잠재력을 갖는 세균들의 생태·생리적인 특징을 연구하였다. 1997년 2월부터 1년간 경기도 용인지역의 벼 경작농지

를 대상으로 이 곳에 존재하는 세균을 non-selective agar plates (예를 들면, R2A, AMA) 상에 colony로 성장시킨 후, 이 중에서 방향족화합물질의 분해균 및 질소고정균의 수를 정량 하였다. 이를 위하여 nitrogen-fixing bacteria는 *nifH*, 그리고 aromatic ring cleavage에 관여하는 bacteria는 *todCBA*, *xylL*, 그리고 *tmoABCDE*를 coding하는 gene probes를 사용한 DNA hybridization 방법으로 그들의 양 및 계절적인 분포를 조사하였으며, 방향족화합물질의 분해에 관여하는 유전정보를 갖는 bacteria의 degradation phenotype의 확인을 위하여 benzene (B), toluene (T), 또는 *p*-xylene (X)이 sole carbon source인 agar plates에서 성장하는 colony의 수와 종류도 함께 조사하였다.

각 계절별 (온도, 수분 등의 환경요인의 변화) 그리고 농사활동 (모내기, 농약살포, 추수 등) 중에 채취한 soil samples 내의 총 colony-forming-units (CFU) 수는 대체적으로 큰 변화가 없었다. 그러나 *nif*에 hybridization하는 세균의 수는 모내기 후 그리고 추수 전 동안 그 수가 약간 증가하여, 총 CFU의 약 20% 정도를 유지하였다. 농약 살포 후 2주일이 지난 bacterial community는 그 조성에서 큰 변화를 보였는데, 즉 BTX를 분해하는 균의 괄목할만한 증가가 나타났으며 이러한 분해균 중에는 *tod*, *xyl*, 그리고 *tmo* 등의 알려져 있는 유전자를 갖고있지 않으면서도 농약의 주성분인 방향족화합물의 분해능이 뛰어난 세균이 총 분해세균 중 약 32%를 차지하였다. 이러한 토양세균군락의 역동적인 변화를 이해하고자 다음과 같은 인공토양 및 자연토양 하에서의 주요세균의 생존 및 활성을 조사하였다.

Aromatic ring cleavage 또는 nitrogen fixation 능력을 갖는 균 중, soil bacterial community에서 우점종을 차지하며, 그들의 detection이 용이한 (예를 들면, specific DNA probe에만 hybridization하거나, 특별한 carbon plate에서만 성장하며, 그리고 특이한 colony morphology를 갖춘 균) 3개 및 대조(control)균 1개의 bacterial isolates를 선별하여 여러 환경조건 하의 microcosm에서 함께 접종한 후 각 균의 CFU 변화를 살펴보았다. 이로부터 여러 주요 environmental parameters가 *in situ* bacterial community의 변화에 영향을 끼칠 수 있는 조건들을 조사하였다.

(제 2세부과제)

본 연구에서는 자연계로부터 농약분해능이 우수한 균주를 확보하고, 이를 배양하여 국내 농업 토양 내에 투입함으로서 인위적인 유용토양 미생물 공동체를 구성시켜 토양 활성의 회복을 연구하였다. 무지배지(C-배지)를 제조하고 탄소원으로 2,4-D와 같은 염화방향족 화합물을 함유하고 있는 농약을 사용하여 10균주의 분해미생물을 분리하였으며 분리된 균주의 생장여부 및 분해능력을 조사하였다. 토양이 식물육종에 필요한 수소이온 농도를 벗어나 점점 산성화, 알칼리화 되어감에 따라 분리된 미생물의 산·알칼리 환경에서의 생육특성에 대해 조사한 결과 pH4.0부근에서 생육이 가능한 균도 있었고 pH11.5까지 생육이 가능한 균도 있었다. 폐농약과 같은 유

해화합물을 대량으로 생물학적 처리할 때 유용하게 이용되어질 수 있는 유기용매내성에 관한 조사를 한 결과 3개의 균주가 LogP 3.1인 xylene에서 생육 가능한 것을 나타났다. 분리된 균주들은 다양한 생리화학적인 시험을 거쳐 동정되었다.

염소화된 농약은 치환된 염소의 위치(*ortho*, *para*, *meta*)에 따라 분해정도가 다르다. 같은 종의 미생물이라도 phenyl기에 치환된 side group의 종류에 따라 분해되고 분해되지 않는 경우가 많다. 따라서 이러한 위치에 치환된 농약을 완전 분해를 하기 위해선 기질특이성이 서로 다른 미생물간의 상호작용이 필요하다. 이를 위해 분리된 균주에 대하여 각종 농약 및 방향족화합물에 대한 기질특이성을 조사하였다. 농약분해능이 우수한 균주를 선택하여 최적 온도, 최적pH, 최적기질농도등 최적배양조건을 조사한 결과 35℃가 최적온도였으며, 기질농도 0.3%에서 가장 높은 효소활성을 보임으로서 최적 기질 농도로 결정되었고 최적 pH는 8.5와 9로 나타났다. 농약분해에 관련된 main degradation pathway에 관련되어 있는 효소의 유전자를 cloning하였다. 이 유전자는 농약분해 미생물이 실제로 현장에 뿌려졌을 경우, 우량균주들의 토양 내에서의 생존성을 추적하고 어떠한 변화를 겪게되는지를 보기 위한 monitoring용 probe로서 사용되었다.

농약분해미생물 중 우량 균주를 선별하여 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 이용하여 고정화하고 그 저장효율성을 측정하였다. 실제의 토양 내에서 고정화된 우량 균주의 활성과 시간에 따른 생존을 측정하였으며 외부환경인자와의 관계를 조사하였다.

(제 3세부과제)

본 연구에서는 국내토양환경에 적응력 높은 백색부후곰팡이를 선발하고 동시에 기존의 분해력이 높은 균주를 변이 시켜 리그닌 분해에 관련하는 효소의 역가가 증진된 균주를 확보한다. 확보된 균주의 균사체 성장 및 효소 생산 최적 조건을 실험실 규모에서 검토한 후, 리그닌이 다량 함유된 볏짚에 적용하여 균사체 및 효소가 분해하는 리그닌 및 농약 (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) 분해율을 측정하였다. 또한 볏짚 분해 최대화를 위해서 균사체 및 효소의 고정화 기술을 hollow fiber, 패각, alginate, carrageenan을 이용하여 검토하였고, 배양액 중의 조 효소액을 농축하여 볏짚 분해에 적용하였으며 최종적으로 균사체를 왕겨를 이용하여 pellet을 만들어 모델 토양에 적용하여 토양중의 볏짚 리그닌 및 농약의 분해를 연구하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

(제 1세부과제)

연구개발결과

1. 생태학적 고찰

가. 배지에서 배양시킨 bacteria의 수는 total cell number (1.5 X 1010cells per dry gram of soil)의 0.003-3.5% 정도이며, 농업토양에서의 농사활동과 계절에 따른 (From Feb. 1997 to Feb. 1998) 여러 가지 환경인자들에 의하여 큰 영향을 받지 않고 거의 일정하게 유지하였다.

나. BTX degraders의 수는 aromatic carbon plates에서의 성장여부와 specific probes에 대한 colony hybridization 결과를 토대로 정량화 하였으며, 온도가 상승하면서 그 수가 5배까지 증가하였으며, 특히 병충해를 방지하기 위한 농약을 살포하고 2주 후에는 total CFUs의 70%까지 일시적으로 증가하였다. 그러나 추수 후에는 다시 감소하여 20-40% 정도를 유지하는 현상을 볼 수 있었다.

다. nitrogen-fixer의 양은 AMA 배지에서 성장한 colony의 morphology와 *nifH* hybridization 결과를 토대로 측정하였으며, 농사활동 기간 (모내기 이후 추수까지) 동안 약간 증가하여 total CFUs 의 약 20% 정도를 유지하였다.

2. Microcosm 고찰

가. 농업토양을 대표하는 유용미생물, SJ-N3 (potential nitrogen fixer), SJ-T27 and SJ-X9 (aromatic compound degraders), and SJ-44 (neither hybridizing to genes encoding degradation enzymes nor degrading aromatic compounds)를 선별하여 미생물군의 생존 및 활성에 관여하는 여러 가지 환경인자들에 대한 soil microcosms를 실시하였다.

나. 환경인자들 중에서 농약 (edifenphos or diazinon)과의 접촉에 의하여 방향족 화합물을 분해할 수 있는 미생물군의 수를 크게 증가시키며, 상대적으로 분해할 수 없는 일반적인 균의 수는 감소하는 것으로 나타났다. 이에 반하여 질소고정균은 이러한 독성 화학물질에 대하여 큰 변화를 나타내지 않았다.

다. 계절적인 변화에 따른 온도 하강과 잔류농약 부산물에 의한 농업토양의 pH 변화가 농약 살포 후 급증하였던 방향족화합물 분해균주의 수를 조절하는 것으로 예상된다.

활용에 대한 건의

이러한 분야의 연구에서 선진국들은 자국의 농업환경에 부합한 기술에 초점을 맞추어 그 기술을 개발하고 있기 때문에 외국의 기술을 도입한다는 것은 당분간 불가능하다고 생각되어 진다. 즉 쌀을 생산하지 않거나 또는 생산하더라도 우리와 다른 병해나 곤충을 방제해야 하는 외국이 우리가 사용하는 농약의 처리기술을 개발할 이유가 없다고 생각한다. 아울러 지금 현재의 첨단기술을 도입한 선진국의 일부 처리기술은 위에서 언급한 예와 같이 몇몇 농약과 유해폐기물 분해 미생물의 기초적인 연구에 국한되어 있으며, 이들의 실질적인 오염지역 투입 및 상품화를 위한 연구는 아직 시작 단계에 있다고 본다. 따라서 자연계로부터 유해농약의 분해능을 가지고 있는 많은 미생물을 분리하고 이들의 특성과 상호관계를 파악하여 미생물 library를 구축하고 그들을 이용하여 농약분해 미생물 제제를 상품화시켜 놓으면, 오염된 토양으로부터 잔류농약의 제거는 물론이고 다른 오염지역의 현장처리에도 적용되어 질 수 있다. 그리고 농업토양의 오염정화 기술은 인류가 생존하고 있는 한, 환경오염으로 일부 파괴된 지구의 생명 부양계가 완전히 회복되지 않는 한, 개발이 계속되어져야 할 국가 근간 기술이라고 생각하기 때문에 국내의 기술을 빠른 시일 내에 축적하는 것이 국가간의 경쟁에서 앞서가는 길이고 나아가 후진국에 기술을 이전하는데 기여를 할 수 있다고 생각된다.

이제까지의 손상된 토양의 미생물학적인 회복은 토양 자체의 세균(indigenous population) 활성을 최적화 시키는 방법 등을 통하여 이루어져 왔다. 하지만 토양자체 세균은 활성이 매우 약하여 실질적인 효과를 얻기 위하여서는 실험실에서 개발된 우수한 균주(inoculant)의 오염지역으로의 투입이 필요함을 보여주었다. 그러나 실험실에서 개발된 기존의 균주는 앞에서 언급하였듯이 토양 내에서 낮은 생존율과 낮은 활성을 보여주기 때문에 아직 실질적으로 사용되고 있지는 못한 실정이다. 예를 들면, 국내의 경우, 국내의 건강한 농업토양과 농약 및 비료에 의하여 손상된 토양 내의 미생물공동체에 대한 비교연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 또한 농경지 토양의 유기염소계 및 방향족 화합물에 의한 오염의 실태는 농약의 잔류 수준 조사보고에 의해서 이루어지고 있으나, 이러한 난분해성 물질의 생물학적 분해를 위한 실질적인 기술은 아직 개발되지 않았다. 국내의 농업토양은 외국과 다른 기후 조건에서 외국과 다른 농약과 비료를 사용하여 국내에 특이적인 작물을 재배하므로, 토양 내에 매우 특이적인 미생물 생태계를 유지하고 있을 것이다. 더구나 우리나라 농토는 선진국과는 달리 토양의 산성화가 상당히 진행되어 토양 미생물의 활성이 많이 저해되어 있고, 중금속 등의 활성이 증가되어 있다. 따라서 우리나라 토양의 유용미생물 생태계 복원은 외국기술의 도입보다는 국내기술에 의해 시도되는 것이 타당하다고 판단된다.

(제 2세부과제)

1. 2.4-D를 단일 탄소원으로 하여 농약 분해균을 분리 검색한 결과 10 종의 분해균이 분리되었으며, 모두 Gram 음성균이었다. 생물화학적인 실험을 통해 동정한 결과 *Alcaligenes* sp.(strain PS1, PS2, CW1, CW2)와 *Pseudomonas* sp.(strain YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3)로 분류되었다.

2. 분리된 균주의 각종 방향족 화합물에 대한 기질 특이성은 10일간의 배양의 결과를 보았을 때 CW2와 YC1, YC2가 2.4-D에서의 성장이 가장 좋았고, PS1, CW2, YC1은 phenol에 대한 분해능력이 뛰어 났다. 또한 분리된 균주들은 모두 biphenyl, *p*-chlorobiphenyl에 대하여 분해능력을 가지고 있었다. YC2와 DY2, DY3은 4-chlorobenzoic acid에 대하여 좋은 분해능력을 보인다.

3. *meta*-개열 효소의 기질 특이성에서 *Alcaligenes* sp.쪽이 기질에 대하여 선택의 폭이 좁고, *Pseudomonas* sp.쪽이 각종 기질에 대한 선택의 폭이 넓은 것으로 나타났다.

4. 유기용매 내성실험에서는 xylene(3.1)에서 성장이 왕성한 균주가 선별되었다. 이와 같은 유기용매 내성균주의 이용은 특히 산업적으로 이용성이 큰 것으로 평가받고 있어 앞으로 이들 균주의 이용이 기대되어 진다.

5. 4개의 *meta*-cleavage에 관여하는 효소의 유전자를 클로닝하고 pSY1, pSY2, pSY3, pSY4로 명명하였다.

6. pSY3은 pUC119의 *Pst* I내에서 6.0kb로 cloning되었고 multi-cloning site의 제한효소 중 4종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었으며 pSY4는 pUC119의 *Pst* I내에서 2.5kb로 cloning되었고 multi-cloning site의 제한효소 중 5종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었다.

7. cloning결과 균주 DY3은 두 개의 *bphC*와 1개의 *bphD* 유전자를 보유하고 있었다. *bphC1*은 298개의 아미노산으로 암호화된 897 bases로 구성되었고 *bphC2*는 293개의 아미노산으로 암호화된 879 bases로 구성되어 있었다. *bphD*는 286개의 아미노산으로 암호화된 858bp로 구성되었다.

8. 균주 DY3은 35℃에서 60시간이 지난 후 가장 좋은 성장을 보였으며 기질농도 0.3%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었고 최적 pH는 8.5와 9로 나타났다.

9. 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 사용한 균주 DY3의 혼합저장균의 OD_{600nm}와 CFU는 혼합매체보다 저장온도에 큰 영향을 받았으나, 가장 낮은 온도인 -75℃의 결과와 -2

0℃에서의 결과는 거의 비슷하게 나타났다. 그러나, 경제적인 측면에서 15일 이내의 단기간 저장에는 4℃에서의 저장도 가능하나, 장기간 저장에는 -75℃와 -20℃가 효과적이었다.

10. 균주 DY3의 혼합저장에서 가장 효과적인 저장매체는 쌀겨였다. 이는 쌀겨에 미생물이 쉽게 영양분으로 이용 가능한 녹말성분이 많기 때문이다.

11. 인위적으로 멸균을 실시한 토양은 오랜 기간이 지나도 미생물 생태계의 회복이 잘 일어나지 않았으며, 공기중의 균이 유입되더라도 지속적인 생존은 확인할 수 없었다.

12. 실험토양내에 약 8.7%의 균이 *meta*-ring cleavage 균이었고, 미생물의 증가에 따라 *meta*-ring cleavage 균도 증가함을 알 수 있었다.

13. 토양내에서 미생물의 성장은 대기중의 온도가 낮은 겨울임에도 불구하고 실내의 환경보다 외부의 환경이 더 좋음을 알 수 있었으며, 시간이 지남에 따라 개체수의 차는 점차 증가하였다.

(제 3세부과제)

1.자외선에 의한 백색부후곰팡이, *P. chrysosporium* ATCC 24725 포자 (1× 107) 사멸율은 약 85.5%이었고, 균사체 성장 제한 물질로 사용된 sodium deoxycholate와 sorbose에 의해서는 약 60%의 사멸율을 나타내었다. 자외선 조사에 의한 약 16개의 변이주가 최종적으로 선택되었으며 이중 11개 변이주가 모균주에 비해 lignin peroxidase (LiP) 역가가 높았다. 약 50개의 자연계 백색부후곰팡이가 guaiacol 및 볏짚을 포함하는 배지에서 분리되어 최종적으로 LiP 역가가 *P. chrysosporium*보다 높은 자연계 분리 균주를 분리하였으며, 이중 Wood-A 균주는 약 200배 이상 lignin peroxidase 역가 (1124 U/ℓ)가 높았다.

2. 본 연구팀에 확보된 변이주 3개와 자연계 분리 곰팡이 4개를 포함한 17개의 백색부후곰팡이 볏짚 리그닌 분해율은 *T. versicolor*가 약 90일 동안 약 50%을 분해했고 변이주나 자연계 분리 균주의 경우 LiP 역가는 *P. chrysosporium*보다 높았지만 볏짚 리그닌 분해율은 약 10% 내외로 비슷하였다. 백색부후곰팡이가 배양 중 축적하는 효소 중 본 연구에서는 리그닌 분해효소로 알려진 LiP, Mn Peroxidase (MnP) 및 Laccase를 측정하였다.

3. *P. chrysosporium* ATCC 24725와 변이주는 생육 최적 온도가 37℃인 반면 나머지 모든 균주는 약 25 27℃에서 균사체 최적 생육을 보였다

4. 미량원소 첨가농도를 Modified Kirk 합성배지보다 10배 증가했을 경우 *P. chrysosporium*이 생성하는 Laccase는 약 8.9배 증가하였고, Mn^{++}첨가농도를 0.17 mM에서 0.85 및 1.7 mM으로 증가하였을 때 *P. chrysosporium* 경우 Mn Peroxidase역가가 약 1.35 1.58배 증가한 반면, LiP, Laccase 역가는 증가하지 않았다. 또한 *P. chrysosporium*, *T. versicolor*가 생산하는 LiP, MnP, Laccase 역가는 Mo, Zn, Fe이온을 각각 413mM, 17.4mM, 1,.8mM을 첨가하였을 때 최적화 되었다.

5. *P. chrysosporium* ATCC 24725가 최대 LiP, MnP, Laccase를 생산하기 위한 최적 pH는 4.2이였으며, 첨가된 glucose의 약 70%정도가 액체 배양 5일 동안 분해되었다. *P. chrysosporium* ATCC 24725 및 *T. versicolor* MD-277은 각각 최대 LiP 36 U/ℓ, 130.7 U/ℓ를 축적하였다.

6. Tween 80과 Veratryl alcohol을 *P. chrysosporium* 효소생성을 최대화하기 위해 첨가하였다. Veratryl alcohol의 초기첨가는 배양 4일 후 첨가한 경우 보다 약 4.7배 LiP증가를 보였으며, 0.25% tween 80 첨가는 0.05% 첨가시보다 높은 LiP 생산을 유도하였다.

7. 제초제 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid는 P. chrysosporium 배양 5일 동안 32 33%가 분해되었고, 이후 분해는 계속되었지만 분해율은 낮았다.

8. 토양중의 목질계 자원 중 리그닌, 셀룰로이스 및 농약 등의 분해를 위하여 왕겨, corn, starch, corn steep liquor, lignosulfonate를 80:15:3:2로 섞어서 수분 60%를 유지하는 pellet를 제조하였다. 백색부후곰팡이를 이 왕겨 pellet에 약 2 3주 배양 후, 30 ppm 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid를 포함하는 모델 토양에 적용한 결과 약 63 및 55%가 T. versicolor 및 P. chrysosporium에 의해 각각 1주일 동안 분해되었다.

9. 배양액 중 조효소액은 볏짚 리그닌을 분해하지 못한 반면, 효소를 Miintan II를 이용하여 약 10배 이상 농축한 후, hollow fiber 및 Na-alginate에 고정하여 적용했을 경우 볏짚분해를 고체배양에서 가시적으로 관찰하였으며, 액체 배양에서는 24 시간 동안 약 17-19% 볏짚 리그닌이 T. versicolor 효소 농축 고정화 액에 의해 분해되었다.

10. 농업토양 개선을 위한 백색부후곰팡이의 토양 적용은 균사체를 pellet화하여 첨가하는 것이 효소 자체를 이용하는 것보다 적용기술 용이성과 아울러 분해효과를 높일 수 있는 것으로 사료된다.

편집순서 4

SUMMARY
(영문요약문)

(제 1세부과제)

Analyses of the natural agricultural soil showed that the proportion of the bacteria degrading aromatic compounds and hybridizing to the corresponding gene probes increased rapidly after pesticide treatment. The major environmental factors affecting the dynamics of microorganisms were tested by estimating their effects on four representative bacterial isolates in the paddy field at Yongin; a potential nitrogen-fixer SJ-N3, a *todCBA*-hybridizing SJ-T27, a *xylL*-hybridizing SJ-X9, and one strain SJ-44 neither degrading aromatic compounds nor hybridizing to the above probes. Each bacterial cell in soil microcosms retained its initial cell number for 2-3 months of incubation at 20℃. To look at the effect of pesticides, as we have seen in the natural condition, the pesticides such as edifenphos and diazinon which had been frequently used after rainy season (Jul.-Aug.) were added to the soil microcosm containing four bacterial strains. SJ-44 has not been detected at all by plate-counting, and SJ-N3 and SJ-T27 temporarily decreased in their CFUs followed by rapid increase in their CFUs. SJ-X9 which hybridizes to *xyl* probe and utilizes aromatic compounds as a sole carbon source, however, is negatively affected by the presence of the pesticides. In addition, the low pH which could be derived from the degradation products of S- or P-organic compounds did not support the long-term survival of SJ-X9. In conclusion, it appears that the pesticide-treatment, among the various environmental parameters, to soil greatly effects on the microbial composition through the year.

(제 2세부과제)

10 strains are isolated from soils and wastewaters after the culture in a minimal medium containing 2,4-D or other ring-cleavage compounds as the sole carbon source, and the strains that can effectively degrade 2,4-D under the stress of unfavorable conditions is selected by using the variety of aromatic compounds and organic solvents. The selected isolates are identified as

Alcaligenes sp. and *Pseudomonas* sp. based on their morphological and physiological characteristics. In addition, the enzyme activity is investigated on the substrates of *meta*-ring cleavage dioxygenase in the isolate. The result shows that *Pseudomonas* sp. strains have a wide selectivity in the specificity of *meta*-cleavage dioxygenase for substrates. Also, the isolated strains are tested to examine the organic solvent tolerance. The result shows that three strains can grow in xylene in the organic solvent of the logP value of 3.1.

Strain DY3 has two genes coding for 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and a gene coding 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase. According to the gene mapping, two genes, *bphC1 and bphC2* are quite different. DNA sequence analysis of the genes is performed. The *bphC1* gene consists of 897 bases encoded by 298 amino acids, and *bphC2* is 879 bases encoded by 293 amino acids, and *bphD* is consists of 858 bases encoded by 286 amino acids.

The other goal for this research is to monitor the fate of recalcitrant aromatic compounds-degrading microorganisms in soil ecosystem and to develop its immobilization materials. When the microorganisms immobilized in saw dust, rice bran or activated carbon was stored at -75℃, -20℃, 4℃ or room temperature, all growth and CFU of the immobilized microorganisms in LB decreased as the storage temperature increased. In this study the most efficient immobilization matrix for DY3 is rice bran. The growth of microorganisms in the outdoor soil are higher than that of indoor, even at low temperature. When the soil is sterilized, the microorganisms don't grow well even after 3 months. *Meta*-ring cleavage microorganisms are existed about 8.7% in either the outdoor soil or indoor soil. The number of *meta*-ring cleavage microorganisms is proportion to the total numbers of soil microorganisms.

(제 3세부과제)

The white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *T. versicolor* MD-277, *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 were mainly investigated for the research. 16 mutants of *P. Chrysosporium* derived from UV-irradium were initially selected based on the discolorization of straw and guaiacol media and secondly higher lignin peroxide activity compared to the mother strain. White-rot fungi were also isolated from the rotten leaves. Wood A, showed the lignin peroxidase activity 1124 U/ℓ, which is 200 times higher than that of *P. chrysosporium*.

*Trametes versicolo*r MD-277, *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783, and *P.*

chrysosporium ATCC 24725 degraded the lignin in rice-straw by 50, 32, and 10%, respectively in 3 months at room temperature. Mutants of *P. chrysosporium* and wood A showed the similar degradation rate of lignin in rice-straw to that of original strain, even though the LiP activities of mutant and wood A were higher that of *P. chrysosporium*. The enzyme which were responsible for the lignin degradation were LiP, MnP, laccase. Trace elements were standardized to 1.7mM Mn^{++}, 41.3mM Mo, 17.4mM Zn, 1.8mM Fe for the maximum enzyme production and mycellium growth. The optimum incubation temperature for the white-rot fungi was 25 27℃ except *P. chrysosporium* was 37℃. Incubation pH and period for the optimum growth and Lip production were respectively 4.0 4.2 and 5 days with agitation.

30 ppm of 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid contaminated in model soil was hydrolyzed to 63 and 55% by *T. versicolor* and *P. chrysosporium*, respectively, in one wk at 27 ℃. Crude enzyme solution from the culture broth of *T. versicolor*, *P. chrysosporium* and *P. ostreatus* were concentrated and the applied the rice-straw to degrade the lignin in rice-straw. Approximately 17 to 19% of lignin in rice-straw were hydrolyzed in 24 hrs by the immobilized crude enzyme concentrates of *T. versicolor*.

편집순서 5

CONTENTS

(영 문 목 차)

B. Toluene-4-monooxygenase
C. *cis-p*-toluate-dihydrodiol dehydrogenase
D. Dinitrogenase component II (nitrogenase reductase)

2. Colony hybridization, dot-blot hybridization, and quantitative and qualitative analysis of beneficial microorganism on specific carbon plate through growth curve
A. Optimal conditions for DNA hybridization
B. Selection of media for growth of soil microbial assemblage
C. Treatment of soil microbial assemblage
D. Growth curve on Specific carbon plate
E. Colony hybridization;

section 3. Observation of composition variation among mixing microorganism complex, microorganism interaction, and environmental factors in artificial model soil microcosm

1. Selection of strains for microcosm
A. *nifH* amplification result of SJ-N3
B. Hybridization result of gene probes
C. Characteristics of Selected bacterial isolates

2. Experiment condition establishment of microcosm
A. Inoculation of selective strains
B. Investigation of mixing effectiveness of microorganism when inoculating to microcosm
C. Qualitative of bacterial cells

3. Survival degree test according to the cultural condition of microcosm
A. Temperature
B. Nutrition starving condition
C. Competition
D. Agricultural chemicals-exposed microcosm
1) Effect of hinosan of various soil bacteria
2) Effect of agricultural chemicals

1. Study methods

A. Isolation of microorganism

B. Substrates specificity and organic solvent tolerance

C. Identification of microorganism

2. Content

A. Isolation and identification of microorganism

B. Degradation ability

C. Specificity of *meta*-cleavage enzyme

D. Organic solvent tolerance

section 3. Interaction relationship of isolated strains and selection of superior microorganism

1. Study methods

A. Cloning methods

a. pDNA preparation as a cloning vector

b. Competent cell preparation

c. Transformation method

d. cDNA preparation

e. cDNA partial digestion with restriction enzyme and extraction from agarose gel

f. Plasmid extraction method

g. Extracted pUC119 restriction enzyme treatment

h. CIAP treatment

i. Ligation, gene expression and final verification

B. Substrate specificities of recombinant plasmids in *E. coli* DH5α

C. Subcloning of recombinant plasmids

D. Restriction Mapping

E. Deletion Mutants method와 sequence 분석

F. Optimum temperature, pH and concentration

편집순서 6

목 차

라. Specific carbon plate 상에서의 성장 조사
마. Colony hybridization;

제3절 인공 모델토양 microcosm 내에 혼합 미생물의 조성 및 미생물상호간 및 환경인자에 의한 조성 변화 관찰

1. Microcosm에 사용할 균주의 선택
가. SJ-N3의 *nifH* amplification 결과
나. 각 균의 gene probes에 대한 hybridization 결과
다. Selected bacterial isolates의 특징의 정리

2. microcosm 실험 조건의 확립
가. 선택된 세균의 접종
나. Microcosm에 접종 시 각 균의 mixing 효율의 조사
다. 각 bacterial cells의 정량

3. microcosm의 배양조건에 따른 각 세균의 생존도 측정
가 온도
나. 영양결핍 조건
다. 각 세균간의 경쟁관계 (competition)
라. 농약에 노출시킨 microcosm
1) 다양한 토양세균의 히노산에 대한 영향조사
2) 농약의 영향
가) M9 microcosm에서
나) soil microcosm에서

제4절 보다 많은 종류의 환경인자 및 미생물 상호 간의 관계 연구 후, 실제 논 토양내에 투입한 혼합미생물의 생존 및 혼합미생물 조성의 변화 조사

1. Microcosms를 이용한 비료, 온도, pH에 대한 영향 평가
가. 비료의 영향
나. 동절기의 영향
다. pH의 영향

2. *in situ* soil microcosm에서의 접종 미생물군의 생존도
가. colony 특징에 의한 분석
나. 각 세균의 방향족화합물의 분해능 및 colony hybridization 특징에 의한 분석

1. 서 설
2. 재료 및 방법
   가. 균주
   나. 변이 유도 및 자연계 백색부후 곰팡이의 분리용 배지와 배양조건
   다. 자외선에 의한 변이 유도
   라. 자연계로부터 백색부패곰팡이의 분리 및 선별
   마. 균사체 및 lignin peroxidase 생성 배양 조건
   바. P. chrysosporium의 lignin peroxidase생산의 최적 조건
   사. 효소 분석
      a. Lignin peroxidase
      b. Mn(Ⅱ)-dependent peroxidase
      c. Laccase
   아. glucose 소비량 측정
   자. 균체 건조 중량
   차. 백색부후 곰팡이에 의한 볏짚 리그닌 분해 실험
   카. Klason lignin 정량
3. 결과 및 고찰
   1. 변이에 의한 *P.chrysosporium*의 생존율
   2. 균주의 선별
   3. 변이주 및 자연계 분리 백색 부후 곰팡이가 생산하는 LiP
   4. *P. chrysosporium*의 LiP 생산의 최적 조건
   5. 볏짚 중의 리그닌 분해 효과
4. 참고문헌

제3절 백색부후곰팡이의 최적 리그닌 분해 조건 확립

1. 서 론
2. 재료 및 방법
   a. 사용 균주
   b. 배양
      가. *P. chrysosporium* ATCC 24725 및 Wood A
      나. *T. versicolor* MD 277
   c. 실험 인자
   d. 효소역가 측정 및 각종분석
      가. lignin peroxidase (LiP)
      나. Manganese peroxidase (MnP)
      다. Laccase의 역가 측정
   e. 리그닌 분해 및 리그닌 정량

f. *P. chrysosporium* 균사체에 의한 농약 2, 4, 5-trichlorophenoxy acetic acid
g. HPLC 분석

3. 결과 및 고찰
a. 백색부후곰팡이 (*P. chrysosporium*) 균사체의 토양적용 조건 검토
b. 제초제 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T) 분해
c. 선별 백색부후곰팡이의 고체배양에 의한 볏짚 리그닌 분해
d. 미량원소의 영향
e. pH의 영향
f. 배양기간의 영향

4. 참고문헌

제4절 백색부후곰팡이의 고정화 연구 및 토양적용

1. 서 론
2. 재료 및 방법
a. 균주
b. 균주의 배양
c. 효소분석
d. 계면활성제(tween 80)의 영향
e. 백색부후곰팡이로부터 생산된 효소 정제 및 농축
가. 배양액 농축
나. FPLC 분리
f. 효소의 고정화 및 볏짚, 왕겨 적용
가. 효소의 고정화
나. 고정화 효소의 볏짚 및 왕겨 분해
g. 효소적용기술
h. 백색부후곰팡이에 의한 토양 중 2,4,5-T 분해
i. HPLC 분석
3. 결과 및 고찰
1. *P. ostreatus*를 위한 고체배지 및 액체배지
2. tween 80의 영향
3. 효소의 농축 및 정제
가. 배양액 농축
4. 효소 및 고정화 효소에 의한 볏짚 분해
5. 고체배지에 disk 적용
6. 백색부후곰팡이에 의한 토양 중 2,4,5-T 분해

4. 참고문헌

제5절 국내 토양의 목질계 폐자원 실태조사

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적

1. 필요성

토양생물군락, 그 중에서 특히 토양미생물군집은 농업자원의 생산성 향상을 목적으로 과다하게 사용된 여러 가지 유기합성농약과 화학비료 등에 의하여 그 생태학적 균형이 원래의 그것과 많이 달라져왔다. 이러한 결과는 농업토양의 생산성 저하라는 반대급부를 야기했을 뿐 아니라 토양의 자정능력 상실로 인한 농토의 오염이라는 부수적인 문제를 제기시켰다. 따라서 생산성이 높고 건강한 토양을 유지하기 위하여 인위적으로 채취된 유용미생물들의 첨가를 통한 토양 내 미생물생태계의 복원 및 그 유지와 효과적인 관리에 대한 연구가 시급한 실정이다.

농약 사용에 의한 토양오염을 방지하려면, 농약의 사용을 절제하고 안전하고 무해한 대체농약의 개발 등이 선결되어야 하며, 이미 오염된 토양의 정화 및 이미 생산되어진 유독 농약의 안전한 처리방법 개발과 이용기술의 개발이 이루어져야 한다. 여기에 대응하는 기술로서는 물리적, 화학적, 생물학적 처리방법이 적용되어 질 수 있다. 그러나 물리화학적인 방법에는 이차생성물에 대한 제2의 오염의 염려가 있어 실용화 될 수 없다. 생물학적 처리방법에서는 미생물이 그 중심 역할을 하고 있으며, 이들에 관한 연구는 가까운 일본을 비롯해서 미국, 유럽 등 선진국을 중심으로 연구되어지고 있으며 어느 정도 가능성이 보여지고 있다. 하지만 실험실 수준에서 개발된 미생물 균주들이 실제 자연계에서 다른 미생물들과 경쟁하여 생존할 수 있는가 또는 토양내에서 그들이 우리가 원하는 활성을 나타낼 수 있는가 등에 대한 연구는 매우 미미한 편이며 이와 같은 방법이 실제현장에서 성공적으로 응용됐다는 사례는 매우 적다. 더구나 일부 plant 실험에 들어간 몇몇 처리기술과 공정에 관한 정보는 기업간, 국가간의 know-how로 되어 있기 때문에 정보 교환이 잘 이루어지고 있지 않고 있으며, 이러한 상태가 계속된다면 국내의 유해농약과 같은 유해폐기물 처리 및 오염된 토양의 정화기술은 외국의 기술도입에 의존 할 수밖에 없다는 취약점을 안고 있다.

현재까지 미생물을 이용한 농약의 분해에 관한 연구를 살펴보면, 유기인제와 카바메이트제는 알칼리성 토양에서는 곧바로 분해되어지며 세균의 phosphatase와 *Pseudomonas*의 esterase에 의해 그 활성을 잃어버린다고 알려져 있다. Phenylurea류는 *Bacillus sphaeroides*의 amidase에 의해서, Anilide류는 *Fusarium solani*의 amidase에 의해서 분해되고, Triazine류는 세균의 탄소원과 질소원으로서 이용되어질 수 있다. 따라서 이와 같은 농약들의 경우는 농약살포와 미생물살포를 적당하게 병행하면 환경오염을 극복하는데 있어서 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

그러나 유기염소제는 미생물에 의해서 쉽게 분해되지 않고 자연계에 잔류하기 때문에 문제가 된다. 이 중에서도 염소이온이 치환된 방향족화합물은 물리화학적으로 안정하고 또한 독성도 강하여 살충제, 살균제 그리고 제초제로서 각광을 받아 왔다. 이러한 화합물은 철과 같은 금속의 촉매 하에서 간단히 조제되기 때문에 지금까지 가장 많이 생산되고 사용된 환경오염 물질들이며 이 중에서 농약이 거의 대부분을 차지하고 있다. 인공유래의 난분해성 화학물질에 대한 연구현황을 보면 PCB(polychlorinated biphenyl)에 관해서 분해균주 및 관련효소 그리고 유전자 등에 관해서 연구가 많이 진행되고 있고, 그리고 월남전쟁 시 고엽제로서 대량 살포된 2,4-D와 2,4,5-T를 중심으로 해서, DDT, 파라치온, BHC등 사회적으로 문제가 되었던 농약에 관해서 균학적, 효소학적 및 유전학적인 연구가 진행되고 있다.

이 분야의 선진국들은 자국의 농업환경에 부합한 기술에 초점을 맞추어 그 기술을 개발하고 있기 때문에 외국의 기술을 도입한다는 것은 당분간 불가능하다고 생각되어 진다. 즉 쌀을 생산하지 않거나 또는 생산하더라도 우리와 다른 병해나 곤충을 방제해야 하는 외국이 우리가 사용하는 농약의 처리 기술을 개발 할 이유가 없다고 생각한다. 아울러 지금 현재의 첨단기술을 도입한 선진국의 일부 처리기술은 위에서 언급한 예와 같이 몇몇 농약과 유해폐기물 분해 미생물의 기초적인 연구에 국한되어 있으며, 이들의 실질적인 오염지역 투입 및 상품화를 위한 연구는 아직 시작 단계에 있다고 본다. 따라서 자연계로부터 유해농약의 분해능을 가지고있는 많은 미생물을 분리하고 이들의 특성과 상호관계를 파악하여 미생물 library를 구축하고 그들을 이용하여 농약분해 미생물 제제를 상품화시켜 놓으면, 오염된 토양으로부터 잔류농약의 제거는 물론이고 다른 오염지역의 현장처리(*in situ* bioremediation)에도 적용되어 질 수 있다 .그리고 농업토양의 오염정화 기술은 인류가 생존하고 있는 한, 환경오염으로 일부 파괴된 지구의 생명 부양계(life-support system)가 완전히 회복되지 않는 한, 개발이 계속되어져야 할 국가 근간 기술이라고 생각하기 때문에 국내의 기술을 빠른 시일 내에 축적하는 것이 국가간의 경쟁에서 앞서가는 길이고 나아가 후진국에 기술을 이전하는데 기여를 할 수 있다고 생각된다.

이제까지의 손상된 토양의 미생물학적인 회복은 토양 자체의 세균(indigenous population) 활성을 최적화 시키는 방법 등을 통하여 이루어져 왔다. 하지만 토양자체 세균은 활성이 매우 약하여 실질적인 효과를 얻기 위하여서는 실험실에서 개발된 우수한 균주(inoculant)의 오염지역으로의 투입이 필요함을 보여주었다. 그러나 실험실에서 개발된 기존의 균주는 앞에서 언급하였듯이 토양내에서 낮은 생존율과 낮은 활성을 보여주기 때문에 아직 실질적으로 사용되고 있지는 못한 실정이다. 예를 들면, 국내의 경우, 국내의 건강한 농업토양과 농약 및 비료에 의하여 손상된 토양내 미생물공동체(microbial community)에 대한 비교연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 또한 농경지 토양의 유기염소계 및 방향족 화합물에 의한 오염의 실태는 농약의 잔류 수준 조사보고에 의해서 이루어지고 있으나, 이러한 난분해성 물질의 생물학적 분해를 위한 실질적인 기술(*in situ* bioremediation)은 아

직 개발되지 않았다. 국내의 농업토양은 외국과 다른 기후 조건에서 외국과 다른 농약과 비료를 사용하여 국내에 특이적인 작물을 재배하므로, 토양내에 매우 특이적인 미생물 생태계를 유지하고 있을 것이다. 더구나 우리나라 농토는 선진국과는 달리 토양의 산성화가 상당히 진행되어 토양 미생물의 활성이 많이 저해되어 있고, 중금속 등의 활성이 증가되어 있다. 따라서 우리나라 토양의 유용미생물 생태계 복원은 외국기술의 도입보다는 국내 기술에 의해 시도되는 것이 타당하다고 판단된다.

토양 내 미생물생태계 복원을 이용한 토양의 생산성 증진사업은 아직 실용화의 초기 단계이므로 축적된 사례가 많지 않다는 것이 가장 큰 문제점이며, 수리학, 지질학, 토양미생물학 등의 복합된 기술로서 주변학문의 많은 연구 및 협조가 필요하다. 더구나 일부 plant 실험에 들어간 몇몇 기술과 공정에 관한 정보는 기업간, 국가간의 노하우로 되어있기 때문에 정보 교환이 잘 이루어지고 있지 않고 있으며, 이러한 상태가 계속된다면 국내의 손상된 토양의 생산성 복원 기술은 외국의 기술도입에 의존할 수밖에 없다는 취약점을 안고 있다.

미국 및 독일에 이어 일본도 최근 백색부후곰팡이를 유전자 재조합 미생물로 개량하여 획기적인 효소역가를 높이고, 이 효소에 의한 폐수처리 및 중금속 제거를 National Institute for Resources & Environment의 환경관련 그룹에 의해 개발되고 있다. 이는 직접적인 토양에의 적용은 아니지만 지표수의 처리로 농업 및 주거 토양을 보호하려는 차원으로 해석된다. 또한 미농무성은 에너지 다소비업종인 펄프 산업 중 기계적 파쇄 공정을 백색부후곰팡이를 이용한 biopulping으로 개선하여 현재 실용화 초기단계에 있다. 즉 목질계의 단단한 리그닌 구조 때문에 파쇄에 소요되는 많은 전기에너지를 백색부후곰팡이로 1 2 개월간 전처리하여 푸석한 연질의 구조를 만들면 소요 전기에너지의 약 50% 이상을 절약할 수 있을 뿐만 아니라, 리그닌의 함량 감소 때문에 염소계 표백제의 사용을 90% 이상 절감할 수 있다고 보고되었다. 이와 같은 염소계 표백제 사용의 절감은 환경개선 및 환경처리 비용의 감소에도 큰 역할을 하고있다.

과다한 농약 사용 등에 의해 파괴된 농업토양 내 유용미생물 생태계의 복원은 자연계로부터 유해농약의 분해능을 가지고있는 많은 미생물을 분리하고 이들을 개량하여 다시 토양에 투입하여 토양내에 유용한 미생물 공동체를 유지시키는 방법을 통하여 가능해질 수 있을 것이다. 이러한 생물학적 토양환경 회복기술은 토양의 생산성을 증진시키고 궁극적으로 농업생산성을 향상시킬 것이다. 또한 이 기술에 사용되는 곰팡이가 생산하는 효소 및 균체는 목질계 폐자원 (볏짚, 왕겨, 식물대)의 주성분인 리그닌의 분해효과가 크고, 토양내 잔존률이 높아 실질적인 응용가치가 높일 것이다.

2. 목적

본 연구는 농약오염이 심각한 토양 또는 제한환경(stressed environment)으로부터 농약관련물질을 분해할 수 있는 미생물 및 농업생산성 향상에 도움이 되는 미생물을 개발 또는 이용할 것을 제안한다. 국내농업환경에서 토양의 오염을 방제하고 생산성을 증진시키기 위하여 유용한 토양 내 미생물 생태계를 인위적으로 보존하고 개선할 수 있는 기술의 개발을 목표로 한다. 이를 위하여 우선 국내 농업토양 내 유용미생물 공동체를 분석하고 (제 1세부과제), 손상된 미생물 공동체의 복원을 위한 유해농약 분해 토양세균 (제 2세부과제)과 토양의 생산성 향상을 위한 난분해성 목질계 폐자원의 퇴비화 능력이 뛰어난 백색부후 곰팡이 (제 3세부과제)의 선발 및 육종을 연구하고자 한다.

즉 본 연구자들은 그 동안 미생물생태학 분야와 분자생물학 분야에서 쌓은 경험을 바탕으로 1) 농업토양 내 유용미생물군들의 생태학적인 특징의 조사와 아울러 각 균주를 채취한 후; 2) 미생물 균주가 농약분해 역가에 관련된 유전자 그리고 난분해성 목질의 변형 역가에 관련된 유전자들을 얻은 후, 실제토양 내에서 그들의 발현여부를 조사하여 개량된 균주 획득의 가능성을 알아보며; 3) 이렇게 개발된 미생물 또는 그들의 혼합체가 토양 또는 모델토양에 살포되었을 시 각 균주들의 실제 환경요인에 대한 반응을 조사하여 그들의 생존 및 활성도 등을 연구할 것이다.

제2절 연구개발의 범위

농업 생산성을 증진시키기 위하여 여러 가지 화학비료와 농약이 1980년대 이후 지속적으로 사용되어져 왔으며, 이로 이하여 농산물 경작지가 산성화 및 독성화되고 생태계 파괴가 야기되었다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 토양오염의 주요 원인인 방향족 화합물 분해균주와 생산성 증진을 도모하는 질소고정균등 유용 미생물을 활용하는 방안이 제시되고 있다. 최근 방향족 화합물 분해능 또는 질소고정능이 우수한 균주를 개발하여 토양에 접종하는 연구가 활발하게 수행되어져 왔으나 토양에 인위적으로 개발된 미생물을 접종하였을 때 그 개체군의 수와 활성이 현저하게 떨어진다는 사실이 밝혀지게 되었다. 또한 자연 생태계에 현존하고 있는 유용미생물군의 정량·정성적인 분석자료가 거의 없기 때문에 대표적인 경작물인 벼 농사지역을 대상으로 토양내 미생물군 조성에 관한 연구를 기존의 배양법과 유전자를 이용한 분자생물학적인 방법을 병행하여 수행하고자 한다. 이러한 연구결과는 우점종인 균주를 선별하여 난분해성 물질을 분해하고 농업 생산성을 증대시키고자 하는 연구의 기본자료로서 활용이 가능할 것이다.

1. 농지 유용 미생물공동체의 생태학적인 분석•확보 및 생물공학적인 이용

-농업 토양내 유용 미생물공동체의 정량 및 정성적인 분석
-인공 모델토양 microcosm 내에 혼합미생물의 조성 및 미생물상호간 및 환경인자에 의한 조성 변화 관찰
-보다 많은 종류의 환경인자 및 미생물 상호 간의 관계 연구 후, 실제 논 토양내에 투입한 혼합미생물의 생존 및 혼합미생물 조성의 변화 조사

2. 농약분해 미생물을 이용한 토양오염정화 기술 개발

-극한 환경으로부터 유해농약 분해능을 가진 미생물의 분리 및 동정
-분리된 미생물의 상호관계 및 우량균주군 선발
-우량균주들의 토양내 활성 및 생존성의 증진

3. 농업에 유용한 목질계 곰팡이의 육종기술 개발

-백색부후곰팡이의 탐색과 선별 및 선별된 곰팡이의 개량 및 특성연구
-균사체 생산 최적 배양조건 검토 및 선택곰팡이의 효소 생산 최적조건 검토
-볏짚 분해를 위한 곰팡이 균사체와 효소의 고정화기술 연구 및 제재화기술 개발

제 2 장 농지 유용 미생물공동체의 생태학적인 분석•확보 및 생물공학적인 이용분야

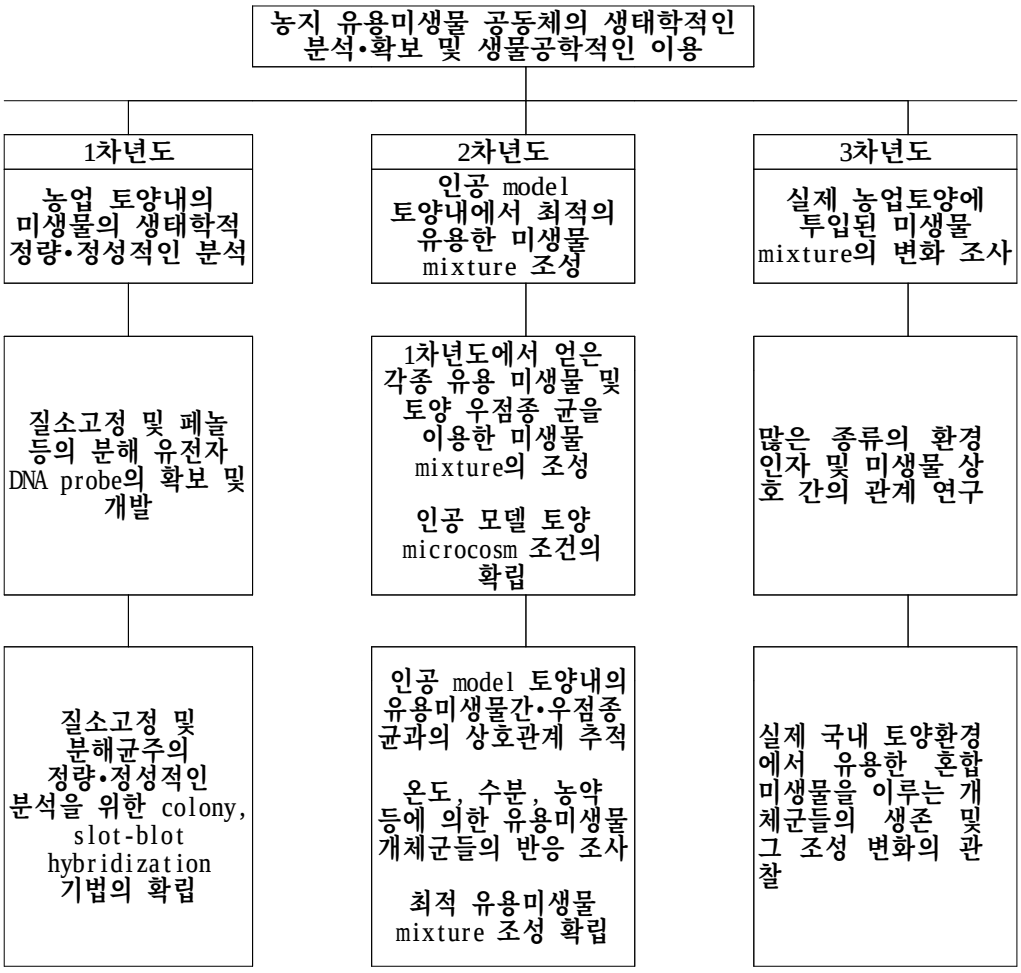
제1절 서 설

본 연구에서는 토양내에 존재하는 beneficial microorganisms 중, 작물의 생산성을 증진시킬 수 있거나 잔류 유해농약의 분해 잠재력을 갖는 세균들의 생태·생리적인 특징을 연구하였다. 1997년 2월부터 1년간 경기도 용인지역의 벼 경작농지를 대상으로 이 곳에 존재하는 세균을 non-selective agar plates (예를 들면, R2A, AMA) 상에 colony로 성장시킨 후, 이 중에서 방향족화합물질의 분해균 및 질소고정균의 수를 정량 하였다. 이를 위하여 nitrogen-fixing bacteria는 *nifH*, 그리고 aromatic ring cleavage에 관여하는 bacteria는 *todCBA*, *xylL*, 그리고 *tmoABCDE*를 coding하는 gene probes를 사용한 DNA hybridization 방법으로 그들의 양 및 계절적인 분포를 조사하였으며, 방향족화합물질의 분해에 관여하는 유전정보를 갖는 bacteria의 degradation phenotype의 확인을 위하여 benzene (B), toluene (T), 또는 *p*-xylene (X)이 sole carbon source인 agar plates에서 성장하는 colony의 수와 종류도 함께 조사하였다.

각 계절별 (온도, 수분 등의 환경요인의 변화) 그리고 농사활동 (모내기, 농약살포, 추수 등) 중에 채취한 soil samples 내의 총 colony-forming-units (CFU) 수는 대체적으로 큰 변화가 없었다. 그러나 *nif*에 hybridization하는 세균의 수는 모내기 후 그리고 추수 전 동안 그 수가 약간 증가하여, 총 CFU의 약 20% 정도를 유지하였다. 농약 살포 후 2주일이 지난 bacterial community는 그 조성에서 큰 변화를 보였는데, 즉 BTX를 분해하는 균의 괄목할만한 증가가 나타났으며 이러한 분해균 중에는 *tod*, *xyl*, 그리고 *tmo* 등의 알려져 있는 유전자를 갖고있지 않으면서도 농약의 주성분인 방향족화합물의 분해능이 뛰어난 세균이 총 분해세균 중 약 32%를 차지하였다. 이러한 토양세균군락의 역동적인 변화를 이해하고자 다음과 같은 인공토양 및 자연토양 하에서의 주요세균의 생존 및 활성을 조사하였다.

Aromatic ring cleavage 또는 nitrogen fixation 능력을 갖는 균 중, soil bacterial community에서 우점종을 차지하며, 그들의 detection이 용이한 (예를 들면, specific DNA probe에만 hybridization하거나, 특별한 carbon plate에서만 성장하며, 그리고 특이한 colony morphology를 갖춘 균) 3개 및 대조(control)균 1개의 bacterial isolates를 선별하여 여러 환경조건 하의 microcosm에서 함께 접종한 후

각 균의 CFU 변화를 살펴보았다. 이로부터 여러 주요 environmental parameters가 *in situ* bacterial community의 변화에 영향을 끼칠 수 있는 조건들을 조사하였다. 이러한 일련의 연구는 아래의 그림에서 연차식으로 도식하여 정리하였다.



제2절 농업 토양내의 유용 미생물공동체의 정량 및 정성적인 분석

1. DNA probe의 확보 및 개발

유해농약의 기본 구성성분인 방향족화합물의 ring cleavage 관여하는 유전자 4가지 그리고 질소고정에 관여하는 유전자를 DNA hybridization에 이용할 수 있는 상태의 probe DNA를 확보한다. 각 probe의 labeling 및 specific hybridization condition을 찾는 실험은 2항에서 설명하였다.

가. Toluene dioxygenase

tod 유전자는 *Pseudomonas putida* F로부터 이미 cloning 되었는 바, *todABC* gene products는 toluene을 *cis*-toluene dihydrodiol로 변환시키는 작용을 하는 효소군 (reductase, ferredoxin, 그리고 iron-sulfur protein으로 구성)이다. *pHG2*라는 plasmid DNA를 *Bam*HI 제한효소로 처리한 후, 약 4 kilo base-pair 크기의 DNA fragment를 agarose gel로부터 순수 정제하여 labeling reaction에 사용하였다.

나. Toluene-4-monooxygenase

Toluene을 *p*-cresol로 전환시키는 system이 *Pseudomonas mendocina* KR1이라는 균주로부터 발견되었는데, 이에 관여하는 유전자가 *tmoABCDEF* operon이다. 여기서부터 발현되는 효소가 toluene-4-monooxygenase (T4MO)system이다. *tmoABCDEF*를 얻기 위하여, toluene을 분해하는 *Pseudomonas spp.*를 template로 이용한 PCR 작업을 하였다. forward primer로는 5'AAGCTTTTAGGGCCCACAGGC AAGGAGGACAAGAATATGGCG3', 그리고 reverse primer로는 5'CCTTAGCGCCGACATTACG CCACTGAGAATTCTACTAAAACC3'을 이용하여 다음의 조건에서 PCR을 수행하였다. 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2mM MgCl2; 0.1% Triton X-100으로 조성된 buffer에서, ① 94℃ / 5min; ② 94℃ / 1min, 38℃ / 1min, 72℃ / 4min으로 구성된 20 cycles의 amplification; 그리고 마지막으로; ③ 72℃ / 10min 동안 final extension을 하여 4639 base-pair 크기의 DNA를 얻은 후, labeling reaction에 사용하였다.

다. *cis-p*-toluate-dihydrodiol dehydrogenase

cis-p-toluate-dihydrodiol dehydrogenase는 dihydrodiol을 catechol 이나 4-methyl catechol로 전환시키는 효소인데, 이를 coding하는 *xylL* 유전자를 pTOL047 로부터 얻었다. pTOL047을 *Eco*RI과 *Pst*I이라는 제한효소로 double-digest한 후, 약 800 base-pair 크기의 DNA fragment를 agarose gel electrophoresis한 다음 QiaexII gel extraction 방법을 이용한 정제방법으로 얻은 *xylL*을 labeling reaction에 사용하였다.

라. Dinitrogenase component II (nitrogenase reductase)

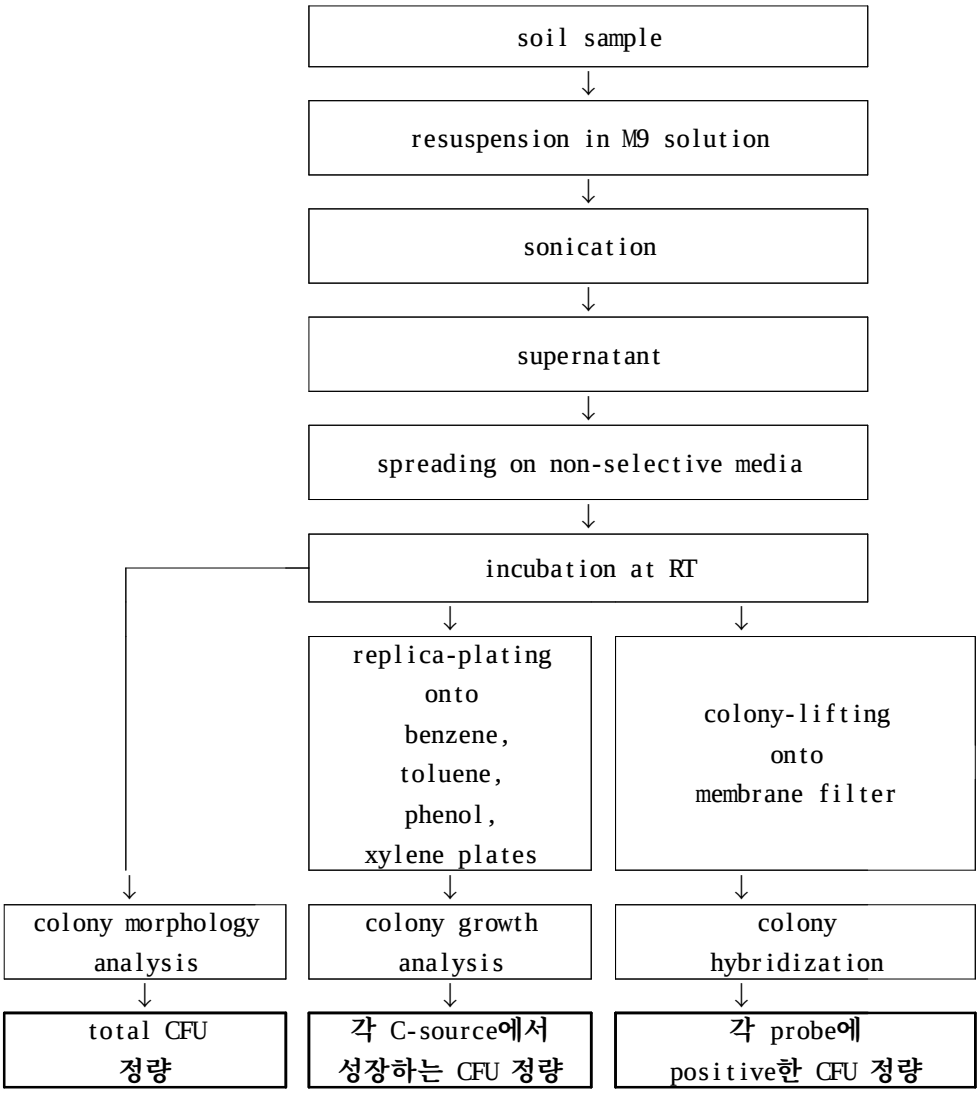
많은 종류의 nitrogen-fixing bacteria에 conserved하게 존재하는 *nifH* 유전자를 PCR을 이용하여 증폭시켰다. *niH*의 19번째, 그리고 407번째 부근의 sequences에 homologus한 primers를 사용하였다; GCIWTYTAYGGIAAR GGIGG, AAICCRCCRCAIACIACRTC [여기서 W= A 또는 T, Y= C 또는 T, R= A 또는 G, I=inosine]. Primer는 Bioneer Co.에서 주문•제작하였다. 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2mM MgCl2로 조성된 buffer 에서, ① 94℃ / 7min; ② 94℃ / 1min, 42℃ / 1min, 72℃ / 1min으로 구성된 25 cycles의 amplification; 그리고 마지막으로; ③ 72℃ / 10min 동안 final extension 으로부터 만들어진 390 base-pair의 DNA fragment를 확보하였다.

2. Colony hybridization, dot-blot hybridization 방법 및 specific carbon plate 상에서의 성장 조사를 통한 유용 미생물의 정량 및 정성적인 분석

농업 토양생태계로부터 질소고정균과 방향족화합물 분해균의 생태를 각 계절별로 알아보기 위한 아래의 기초 실험들을 수행한 후, 다음의 도식표에 나타난 바와 같은 일련의 실험으로 구성된 연구를 수행하였다.

가. Optimal conditions for DNA hybridization

5가지의 DNA probes 중 *tmoABCDE*, *nifH*, *todABC*, 그리고 *xylL*을 이용한 hybridization의 optimal condition을 확보하였다. 우선 probe는 Random Primed DNA Labeling kit (Boehringer Mannheim)으로 Klenow enzyme을 이용 DIG-dUTP를 붙인 다음, 4시간 동안 42℃에서 prehybridization한 후, 16 시간동안 같은 온도에서 hybridization을 하였다. Post-hybridization washing condition으로는 2X, 0.5X, 또는 0.1XSSC 농도의 Wash solution으로 15min 간 두 번씩 65℃ (*tmoABCDE*의 경우에는 52℃)의 온도에서 씻어내었다. NBT와 BCIP의 colorimetric reaction으로 발생한 색의 정도로 그 결과를 고찰하였다.


soil sample
resuspension in M9 solution
sonication
supernatant
spreading on non-selective media
incubation at RT
replica-plating onto benzene, toluene, phenol, xylene plates
colony-lifting onto membrane filter
colony morphology analysis
colony growth analysis
colony hybridization
total CFU 정량
각 C-source에서 성장하는 CFU 정량
각 probe에 positive한 CFU 정량

optimal conditions for DNA hybridization

Gene probe	Size (bp)	Function	Hybridization condition	Washing condition
todCBA	@ 4200	Transformation of toluene to cis-toluene dihydrodiol	at 42℃	0.5X SSC* at 65℃
tmoABCDE 4639	4639	Transformation of toluene to *p*-cresol	〃	0.1X SSC at 65℃
xylL	@ 800	Transformation of dihydrodiol to either catechol or 4-methyl catechol	〃	0.1X SSC at 65℃
nifH	390	A subunit of nitrogenase complex (component Ⅱ)	〃	0.1X SSC at 65℃

*1X SSC solution contains 150mM sodium chloride, 15mM sodium citrate, and pH 7.0.

나. Selection of media for growth of soil microbial assemblage

soil sampling을 용인에 위치한 논이 집결되어 있는 곳의 한 논으로부터 하였다. Soil particle에 붙어있는 attached microbial assemblage를 효율적으로 dissociation시키는 조건을 알아보기 위하여, 각각의 sample에 1min, 3min, 그리고 5min 간의 sonication을 수행하였다. 1 gram의 soil sample을 M9 solution [Na2HPO4 30g, KH2PO4 15g, NaCl 25g, NH4Cl 5g per 500ml] 10ml에 resuspension한 후, 각 sonication 시간 별로 처리한 다음 ice에서 15min동안 정치시킨 후에 supernatant를 M9 solution에 dilution 하여 위에서 기술한 plates 중 R2A와 1/2LB에 spreading하였다.

treatment	CFU/ml after 48 hr R2A	after 48 hr 1/2LB	after 96 hr R2A	after 96 hr 1/2LB
vortex for 1min	1.2 X 106	1.3 X 105	2.4 X 106	1.8X 106
sonicator 강도 5 for 1min	1.3 X 106	4.3 X 105	2.6 X 106	1.8 X 106
sonicator 강도 10 for 1min	1.6 X 106	3.8 X 105	4.0 X 106	1.8 X 106
sonicator 강도 15 for 1min	1.7 X 106	4.0 X 105	4.3 X 106	2.9 X 106

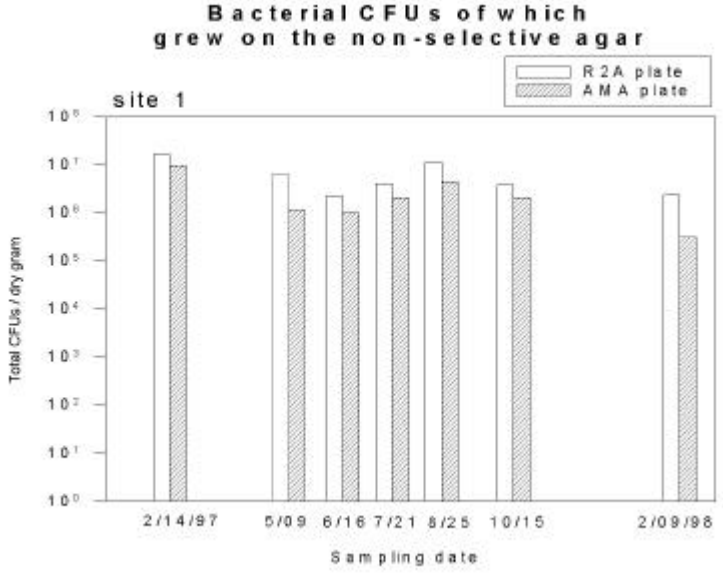
다. Treatment of soil microbial assemblage

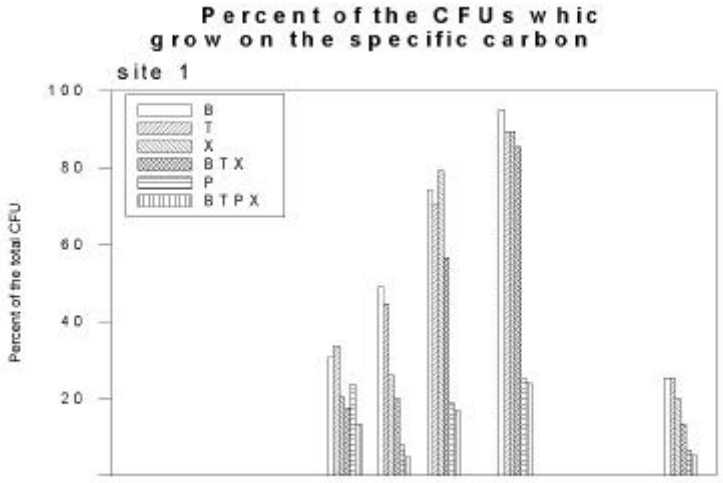
아울러 soil microbial assemblage가 가장 잘 성장할 수 있는 배지를 알아보기 위하여, 4가지의 plate (1/2 LB, R2A, AMA, Pseudomonas Isolation Agar)에서 culture하였다. R2A는 많은 종류의 heterotrophic bacteria 그 중에서도 oligotrophic bacteria의 성장에 유리하며, AMA 는 질소고정균, 즉 *Rhizobium*이나 *Bradyrhizobium* spp를 잘 성장시켜주며, PIA는 여러 종류의 방향족 화합물을 분해시킨다고 믿어지는 *Pseudomonas* spp.의 성장에 유리한 배지라 알려져 있다. 1/2LB는 그 효율성이 떨어져 아래의 Table에 정리하지 않았다. 20-25℃에서 48hr동안 incubation 한 후의 CFU/ml는 아래의 Table에 정리하였다. colony num.는 각 dilution하에서의 CFU 숫자; colony morp.는 48hr와 84hr 후에 각 plate에서 보이는 다른 모양 (morphology)의 colony 종류를 의미한다. 위 Table에서 보는 바와 같이 sonication 시간은 약 3분이 최적이며, R2A plate가 total CFU 및 많은 종류의 bacterial cells 의 성장을 support 함을 알 수 있다.

Sonication treatment	R2A CFU/ml	R2A CFU type	AMA CFU/ml	AMA CFU type	PIA CFU/ml	PIA CFU type
1 min	5.4 X 105	16	4.9 X 105	13	-	-
3 min	7.3 X 105	29	4.2 X 105	18	1.0 X 103	1
5 min	2.8 X 105	22	2.2 X 105	15	2.0 X 104	1

라. Specific carbon plate 상에서의 성장 조사

우선 non-selective media에서 culturable한 CFU를 정량한 후, colony-hybridization에 사용된 균주들을 각 DNA probe의 특성에 부합된 carbon-plate (예를 들면, benzene, toluene, phenol 등이 유일한 탄소원으로 함유된 plate)에서의 성장을 조사하여 그들의 genotype과의 비교를 하였다.





마. Colony hybridization;

각 시료에 존재하는 총 세균 (total culturable bacteria) 수는 위에서 밝혀진 최적의 treatment 후, membrane filtration 방법으로 R2A 나 AMA plate에서 배양한 후, bacterial colony를 담고있는 filter를 위의 DNA probe를 사용하는 colony hybridization에 이용하였다. Bacterial colony가 자란 filter를 10% SDS, Denaturing soln, Neutralizing soln, 2X SSPE으로 filter paper를 충분히 적셔준다. 물기가 마른 다음, 자외선 조사기를 사용하여 bacterial colony로부터 노출된 DNA를 filter에 고정시켰다. 각 각의 labeled probe를 가지고 specific hybridization 조건하에서 colony hybridization 수행한 후 probe-positive colony를 정량하였다.

토양으로부터 추출해낸 미생물을 비선택배지 (영양배지인 R2A와 질소고정균인 *rhizobia*와 같은 mannitol-utilizing bacteria 성장배지인 AMA를 사용)에서 배양시킨 결과 colony-forming-unit (CFU) 수는 여러 가지 환경요인 (온도, 습도, pH, 농약 등)의 변화에 큰 영향을 받지 않고 106 - 107 CFUs per dry gram of soil을 유지하였다. Fluorescent dye로 염색한 후 측정한 total cell numbers의 0.003 - 1.8%에 해당하는 값이다.

농업토양의 주오염원인 잔류농약의 주요 성분인 방향족화합물 분해에 관련된 유전정보를 가지고 있는 미생물의 degradation phenotype을 확인하기 위하여 sole carbon source로서 0.1%의 benzene (B), toluene (T), xylene (X), 또는 phenol (P)을 함유하고 있는 배지에서의 성장여부를 관찰하여, 그 CFUs 수를 total CFUs 수에 대한 percentages로 나타내었다. 장마기간이 끝나고 병충해를 방지하기 위하여 농약을 살포하고 2주 후 (8/25/97)에 BTX degraders 수가 total CFUs의 70% 까지 증가하였다가 추수 후 (10/15/97)에는 다시 감소하여 농약을 살포하기 전의 수준을 유지하는 것을 볼 수 있었다. P degraders는 이러한 경향을 따르지 않는 것으로 나타났다. R2A 또는 AMA 배지에서 성장한 colonies를 membrane filters로 옮겨서 10% SDS solution, a denaturing solution, a neutralizing solution, 그리고 2XSSPE로 처리하고, UV cross-linker로 DNA를 filter에 고정시키고, Digoxygenin-11-dUTP-labeled specific DNA probes로 hybridization 하였다. DNA probes에 hybridization되는 ring cleavers의 수도 specific carbon plate에서 성장한 colonies의 수에서와 동일한 경향을 보였으며, 항상 specific carbon plate에서 성장한 colonies의 수보다는 작았다. The *nifH* probe-positive CFUs의 수는 농사활동 기간 (모내기부터 추수까지) total CFUs 수의 20%를 유지하였다.

제3절 인공 모델토양 microcosm 내에 혼합 미생물의 조성 및 미생물상호간 및 환경인자에 의한 조성 변화 관찰

본 연구과제의 제1차년도 (1996. 11부터 1997. 10)에서는 논농사가 진행 중인 토양내에 존재하는 유용미생물군 (beneficial microorganisms) 중, 작물의 생산성을 증진시킬 수 있거나 잔류 유해농약의 분해 잠재력을 갖는 세균들의 생태·생리적인 특징을 연구하였다. 1997년 2월부터 1년간 경기도 용인지역의 벼 경작농지를 대상으로 이 곳에 존재하는 세균을 non-selective agar plates (R2A, AMA) 상에 colony로 성장시킨 후, 이 중에서 방향족화합물질의 분해균 및 질소고정균의 수를 정량하였다. 이를 위하여 nitrogen-fixing bacteria는 *nifH*, 그리고 aromatic ring cleavage에 관여하는 bacteria는 *todCBA*, *xylL*, 그리고 *tmoABCDE*를 coding하는 gene probes를 사용

한 DNA hybridization 방법으로 그들의 양 및 계절적인 분포를 조사하였으며, 방향족 화합물질의 분해에 관여하는 유전정보를 갖는 bacteria의 degradation phenotype의 확인을 위하여 benzene (B), toluene (T), 또는 *p*-xylene (X)이 sole carbon source인 agar plates에서 성장하는 colony의 수와 종류도 함께 조사하였다.

위의 1차년도 결과 분석에 따라서 어떠한 환경요인이 농지 내의 유용미생물군의 양 및 조성에 영향을 끼치는지를 microcosm study를 통해 알아봄이 2차년도 연구의 주요 관심대상이다. Aromatic ring cleavage 또는 nitrogen fixation 능력을 갖는 균 중, soil bacterial community에서 우점종을 차지하며, 그들의 detection이 용이한, 예를 들면, specific DNA probe에만 hybridization하거나, 특별한 carbon plate에서만 성장하며, 그리고 특이한 colony morphology를 갖춘 3개의 bacterial isolates를 선별하여 여러 환경조건 하의 microcosm에서 함께 접종한 후 각 균의 CFU 변화를 살펴보았다. 이밖에 여러 주요 environmental parameters 하의 microcosm 실험을 통하여 *in situ* bacterial community의 변화에 영향을 끼칠 수 있는 조건들을 조사하였다.

1. Microcosm에 사용할 균주의 선택

제 1차년도 실험 (제2절)으로부터 채취된 많은 종류의 유용미생물을 benzene, toluene, xylene, phenol 등의 agar plate 상에서의 성장 및 specific DNA probes에 hybridization되는 정도를 구분하여 (아래의 table 참조; +의 수는 성장의 정도 또는 hybridization signal의 정도를 나타냄), microcosm 실험에 적당한 질소고정균주 SJ-N3과 두 가지의 분해균주 SJ-T27, SJ-X9를 선택하여 microcosm 연구 전에 다음의 기본적인 조사를 실시하였다.

	growth on carbon plate				DNA hybridization			
strain name	B	T	X	P	*tod*	*xyl*	*nif*	
1	+++	++	+	-	+	+	+	
2	++	-	+	-	-	-	+	
3	-	-	-	+				
4	-	-	-	-				
5	+	++	++	+	-	-	+	
6	+	+	-	-				
7	+++	+++	+++	-	+	+	+	
8	+++	++	++	-	+	+	+	
9	+	++	-	-	+++	+++	+++	[SJ-X9]
10	-	-	-	-				
11	+++	+++	++	+++	+	+	+	
12	+++	+++	++	+++	+	+	+	
13	+	+	+	++				
14	+	+	+	+				
15	-	+	-	-				

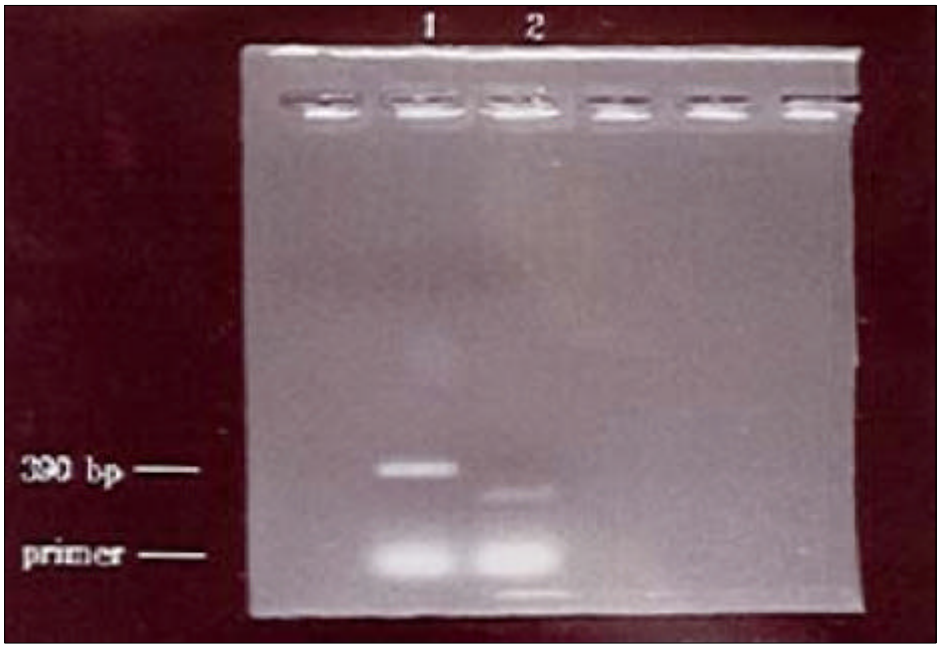
16	-	-	-	-				
17	-	-	-	-				
18	++	+	-	-	+	-	+	
19	+	-	-	-				
20	++	+	+	+	++	+	++	
21	++	+	++	+	+	++	+	
22	+++	+++	+++	+++	+	+	+	
23	+	-	-	-				
24	++	+	+	+++				
25	+	+	+	+++	-	-	-	
26	+	+	+	-				
27	+	-	+	+++	+++	-	++	[SJ-T27]
28	+	+	+	-				
29	++	++	++	-	+	+	+	
30	-	-	+	+				
31	-	-	-	-				
32	-	-	-	-				
33	+++	+++	+++	+++	-	-	-	
34	+	-	-	-				
35	+	-	-	-				
38	-	-	-	-				
39	++	+++	+++	+++	-	-	-	
40	-	-	-	-				
41	-	-	-	-				
42	+	+	+	+				
43	-	-	-	-				
44	-	-	-	-				
45	-	-	-	-				
46	-	-	-	-				
47	-	-	-	-				
48	+++	+++	+++	+++	-	-	-	
49	-	-	-	-				
50	-	-	-	-				
N1	+	+	-	-	+	+	+	
N2	++	+++	+	-	+	+	+	
N3	+++	+++	-	+	+	+	++	[SJ-N3]
N 9706-2 +++	+++	+++	++	-	-	-		
N 9706-5 ++	++	++	-	+	+	++		
N 9706-71	+	+	0	0	+	+++	+++	
N 9706-72	0	0	-	-	+	+	+	
N 9706-10	0	+	0	0	+	+++	+++	
N 9707-6 +	+	+	0	+++	+	+		
N 9707-9 0	+	+	-	++	+	+		
N 9707-15	+++	+++	+++	0	0	0	0	
N 9707-16	+	+	+	-	++	+	+	
N 9707-181	+++	+++	+++	-	+	0	0	
N 9707-182	++	++	++	+	-	-	-	
N 9707-21	+	0	+	-	+	+	+	
N 9707-27	++	+	++	-	+	+	+	
X 9706-2 0	0	0	0	+	+++	+++		
X 9706-101	+	+	+	+	+	+	+	
X 9706-102	+	0	+	+	+	+	+	
X 9707-1 ++	+++	++	+	+	+	+		
X 9707-3 +	+	+	-	+	+	+		
X 9707-51	0	0	-	-	+	0	0	
X 9707-52	+	+	+	-	+	+	+	
X 9707-61	+++	+++	+++	+	0	0	0	
X 9707-62	++	++	++	-	+	+	-	
X 9707-7 +++	+++	+++	++	-	-	-		
X 9707-17	+	0	+	-	+	++	+	
T 9706-11	0	-	0	-	++	+++	+	
T 9706-12	++	++	++	0	+	+	0	

T 9706-14	+	+	0	+	+	+	+
T 9706-25	+++	+++	+++	++	0	0	0
T 9706-45	+	+	+	-	0	-	-
T 9706-47	+	+	+	-	0	-	-
T 9706-50	+	+	+	-	0	-	-
T 9706-52	++	++	++	+	+++	+	+
T 9706-531	+	+	+	-	++	+	+
T 9706-532	+++	+++	+++	-	+	0	0
T 9707-1 +	+	+	-	+	+	+	
T 9707-2 +++	+++	+++	-	0	0	-	
T 9707-3 ++	++	++	+	+	+	+	
T 9707-4 +++	+++	+++	+	0	0	0	
To 9707-6	+	+	+	-	++	+++	++
T 9707-8 +	+	+	-	-	-	-	
T 9706-1 ++	++	++	0	++	+++	+	
T 9706-3 +++	+++	+++	++	-	-	-	
T 9706-41	+	+	++	-	++	++	+
T 9706-42	+	-	+	-	++	+++	++
T 9706-11	+++	+++	+++	++	-	-	-
T 9706-16	+	-	+	-	0	+	++
T 9707-1 ++	++	+++	++	-	-	-	
T 9707-4 +++	+++	+++	-	+	+	+	
T 9707-5 +++	+++	+++	-	+	+	+	
T 9707-15	++	++	++	-	+	+	+
B 8-31	++	+	++	-	0	-	-
B 8-32	++	+	++	-	0	-	-
X 8-6	+	-	+	-	++	+++	+++

가. SJ-N3의 *nifH* amplification 결과

이 중에서 특히 질소고정 능력이 있는 것으로 판단되는 균 (SJ-N3)은 *nifH* gene의 유무를 DNA hybridization 이외에 polymerase chain reaction으로 그 존재를 확인하였다 (연구내용 부분의 agarose gel 사진 참조). 이를 위하여, 많은 종류의 nitrogen-fixing bacteria에 conserved하게 존재하는 nifH 유전자를 PCR을 이용하여 증폭시켰다 (제1차년도 결과 참조). *niH*의 19번째, 그리고 407번째 부근의 sequences에 homologus한 primers를 사용하였다; GCIWTYTAYGGIAARGGIGG, AAICCRCCRCAIACIACRTC [여기서 W= A 또는 T, Y= C 또는 T, R= A 또는 G, I=inosine]. Primer는 Bioneer Co.에서 주문•제작하였다. 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 2mM MgCl2로 조성된 buffer에서, ① 94℃ / 7min; ② 94℃ / 1min, 42℃ / 1min, 72℃ / 1min으로 구성된 25 cycles의 amplification; 그리고 마지막으로; ③ 72℃ / 10min 동안 final extension으로부터 만들어진 390 base-pair의 DNA fragment를 확인하였다.

DNA probe에 강하게 hybridization signal을 보여주는 SJ-N3 균 (아래항의 hybridization 결과 참조)을 가지고 실험방법에 따라 PCR을 수행한 결과, lane 1의 390bp size의 DNA 대신 이보다 약간 작은 size의 DNA가 증폭되었다 (lane 2). 이는 SJ-N3이 *nif* gene을 갖고는 있지만 일반적인 질소고정균 (lane 1의 경우 *Bradyrhizobium* spp.) 것과는 다른 염기서열을 갖음을 의미한다 하겠다.

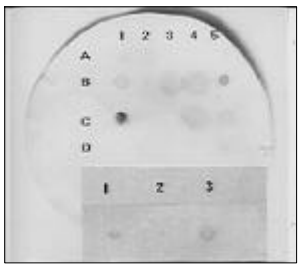


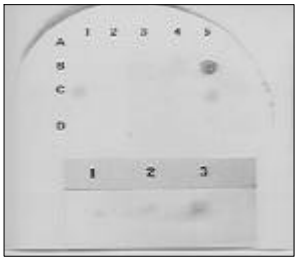
나. 각 균의 gene probes에 대한 hybridization 결과

SJ-N3, SJ-T27, SJ-X9 등을 포함한 토양세균들의 *tod*, *xylL*, 그리고 *nifH* 에 대한 DNA hybridization을 수행하였다. 각 membrane filter에 위치한 균의 위치는 아래 표시한 숫자로 나타내었다. *tod*, *xylL*, 그리고 *nifH*의 순서로 각 세균의 각 probe 대한 DNA hybridization 결과는 *tod*의 경우 SJ-T27에, *xylL*는 SJ-X9에, 그리고 *nifH* 의 경우에는 SJ-N3과 SJ-X9에 가장 강한 signal을 보였다.

	1	2	3	4	5
A	8	7	5	2	1
B	20	18	12	11	SJ-X9
C	SJ-T27	25	24	22	21
D		48	39	33	29

1	2	3
N1	N2	SJ-N3





다. Selected bacterial isolates의 특징의 정리

이 외의 다른 특징, 예를 들면 plasmid DNA의 유무, Gram staining, 항생제에 대한 내성 등 또한 조사하여 microcosm 내에 접종된 균들의 수를 추정하는데 이용하였다.

Soil bacterial isolates		SJ-N3	SJ-T27	SJ-X9	SJ-44 (대조군세균)
Gram-staining/Cell shape		negative rod	negative rod	negative rod	negative rod
Colony morphology on R2A, AMA		white	yellow	green - fluorescent	small yellow
Growth on specific C-plates	B	+	+	+	-
	T	+	-	+	-
	X	-	+	-	-
	P	+	+	-	-
Specificity to DNA probe	*tod*	+	+++	+++	nd
	xyl	+	-	+++	nd
	nif	++	++	+++	nd
Resistance to antibiotics	Rif	+	-	+	nd
	Amp	+	-	+++	nd
	Sm	+	-	+	nd
	Km	+	-	-	nd
	Cm	-	-	+++	nd
	Tet	+	-	+	nd
Utilization of pesticides and herbicide (0.1%)	Edifenphos	+	+	+	-
	Diazinon	+	+	+	-
	Paraquat	+	-	+	-

2. microcosm 실험 조건의 확립

가. 선택된 세균의 접종

Autoclave 방법으로 멸균시킨 soil을 ethanol로 씻고 dry시킨 plastic container (size : 15 X 15 cm)에 담은 후, 흙이 완전하게 잠길 수 있는 정도의 M9 solution으로 water saturation 시킨 다음, bacterial cell을 접종한 후 각 treatment에서 30일 이상 incubation하였다. Microcosm 실험을 시작할 때 함께 autoclave한 후 rm. temp.에서 보관 중이던 soil에 M9 solution만을 넣어준 (no cell) control incubation도 함께 실험하였다.

나. Microcosm에 접종 시 각 균의 mixing 효율의 조사

용인 토양의 특징은 아래의 표와 같다.

Characteristics of Yongin agricultural soil used for microcosm study

Texture		Loam
Particle size distribution (%)	Sand	41.6
	Silt	44.6
	Clay	13.6
pH	1 : 5 in H_2O	5.5
EC (dS/m)		1.40
Organic Material (%)		3.5
P_2O_5 (mg/kg)		117
Total Nitrogen (%)		0.21
Ex. cation (cmol/kg)	K^+	0.16
	Ca^{2+}	5.0
	Mg^{2+}	0.9
	Na^+	0.33
CEC (cmol/kg)		12.0

위와 같은 soil과 선택된 세균이 잘 혼합되었는지 (homogenization of bacterial cells within soil particles)를 알아보기 위하여 plastic box의 center와 각 side로부터 5개의 soil sample을 채취하여 bacterial cell의 분포를 알아본 결과는 다음의 table과 같이 homogeneous하게 각 균들이 분포함을 보여주었다.

sampling site	SJ-N3	SJ-T27	SJ-X9
avg.	15.0 X 107	2.9 X 107	0.6 X 107
std. dev	± 7.6	± 3.5	± 0.43

다. 각 bacterial cells의 정량

접종 후 2, 3, 5, 9, 15, 31 day time point에 시료를 채취하여 아래의 세 가지 방법을 이용한 실험을 실시하였다.

3. microcosm의 배양조건에 따른 각 세균의 생존도 측정

Microcosm에 사용될 여러 가지 조건에 대한 세균들의 반응을 우선 알아보기 위하여, 네 가지의 배양온도, 영양고갈 상태에서의 생존도, 그리고 각 세균들끼리의 상호관계를 알아보았다.

가 온도

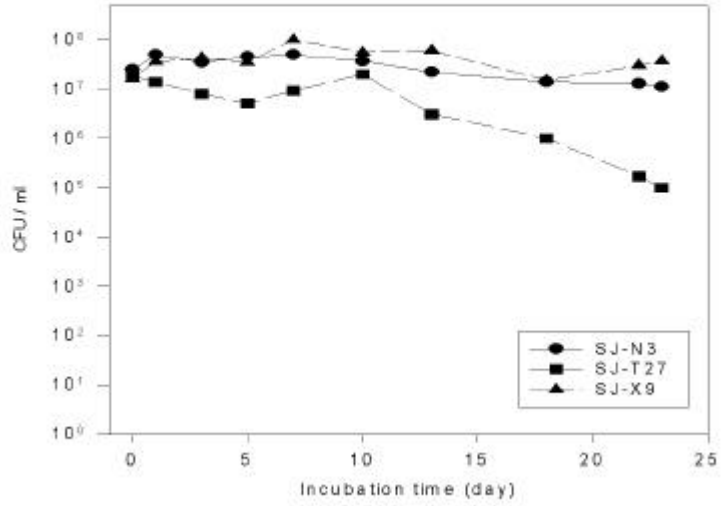
R2A plate에 streaking한 후, 4, 20, 30, 40C의 배양기에서 24시간 그리고 72시간 후에 agar plate 상에서의 성장을 관찰해본 결과, 대부분의 토양세균들은 20-30C에서 optimal growth를 나타내었으며, 특히 선정된 3가지 균 중에서 질소고정균은 보다 broad한 growth temperature range를 나타내었다.

strain	after 24 hr temperature (C)				after 72 hr temperature (C)			
	4	20	30	40	4	20	30	40
SJ-X9	+	+	+	-	+	+	+	-
SJ-T27	-	+	+	-	-	+	+	-
SJ-N3	+	+	+	+	+	+	+	+

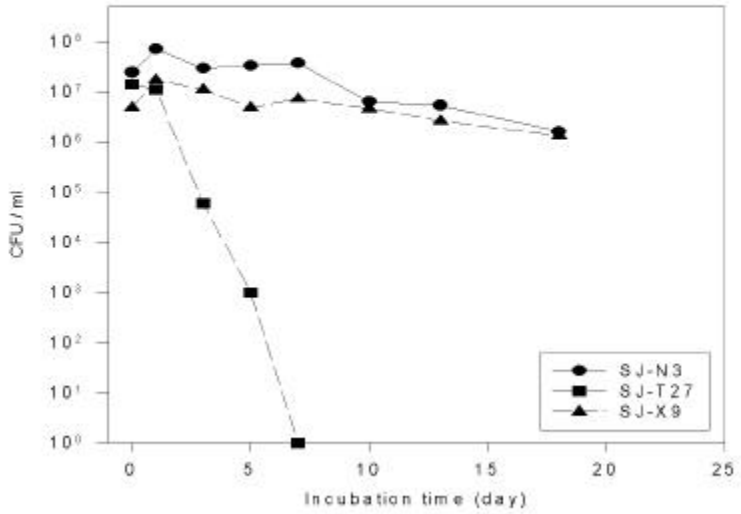
나. 영양결핍 조건

20℃ 배양온도에서 세 가지 균을 혼합하여 minimal starvation medium에 incubation 한 결과 SJ-N3과 SJ-X9는 약 1달간의 기간 동안 초기 수준의 cell density를 나타내었다. SJ-T27의 경우에는 10일 이 후 점진적인 감소추세를 보였는데 이는 starvation의 영향이라기 보다는 다른 균과의 관계로 인한 감소 때문이었다. 그 이유는 SJ-T27을 pure culture 상태로 M9에 incubation 하였을 시는 그 수의 감소를 탐지할 수 없었기 때문이다 (이 부분의 결과는 competition 실험 및 농약 실험 결과 section 참조). 20C 이외에, 35C 하에서의 starvation 결과는 아래의 Figure에 나타내었다.

Changes in numbers of strain SJ-N3, SJ-T27, SJ-X9 in the M9-microcosms at 20°C



Changes in numbers of strain SJ-N3, SJ-T27, SJ-X9 in the M9-microcosms at 35°C



다. 각 세균간의 경쟁관계 (competition)

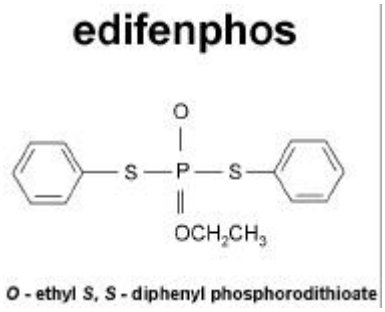
토양세균끼리의 상호관계를 알아보기 위하여 R2A broth에서 24시간 culture 한 세균 suspension을 가지고 R2A plate 상에 spot-on-lawn 실험 후 48hr 후에 관찰된 결과를 아래의 표에 정리하였다. n은 서로간에 아무런 growth inhibition이 없는 경우, s는 spot이 lawn cell을 inhibition 하는 경우, l은 lawn이 spot cell을 inhibition 하는 경우, b는 spot과 lawn cell이 서로 inhibition 하는 경우를 표시하였다. data가 없는 것은 lawn이 running colony인 경우 spot의 성장여부를 판단하기 불가능한 경우이다. 표에서의 결과와 같이, SJ-X9가 SJ-T27에 약간 영향을 끼치는 것 이외에는, R2A plate 상에서 microcosm에 선택된 각 균의 상호 inhibition은 거의 없었다. 따라서 앞으로의 microcosm study 결과는 주어진 environmental parameters에 의하여서만 각 균의 생존이 영향을 받음을 암시한다 하겠다.

spot / lawn	1	2	5	7	8	SJ-9	11	12	18	20	21	22	25	SJ 27	29	33	39	48	N1	N2	SJN 3
1		n	n	n	n	n	n	n	l	n	l	n	n	l	n	l	n	n	n	n	n
2	n		n	n	n	n	n	n	l	l	n	n	l	l	n	n	n	n	n	n	n
5										b											
7	l	n	n		n	n	s	s	l	n	l	n	n	n	n	l	n	n	s	n	n
8	n	n	n	l		n	s	s	l	n	n	n	n	n	n	n	n	n	s	n	n
SJ-9	n	n	n	n	n		n	n	n	n	n	n	n	l	n	l	l	l	l	n	n
11	n	n	n	n	n	n		n	n	b	b	n			n				n	n	
12	n	n	n	n	n	n	n		n	b	b	n	n	n	n				n	n	n
18	n	n	n	n	l	n	n	n		n	n	n	n	n	n	l	l	n	l	n	n
20	n	n	n	n	n	l	n	n	n		l	n	n	l	n	n	n	n	n	n	n
21	n	n	n	n	n	l	n	n	n	l		n	n	l	n	n	n	n	n	n	n
22	n	n	n	n	n	n	n	l	n	b	b		n	l	n	l	l	l	n	n	n
25	n	n	n	n	n	n	s	s	n	b	b	s		l	n	l	l	n	l	n	n
SJ-27	n	n	n	n	n	n	n	n	n	l	l	n	n		n	l	l	l	l	n	n
29	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n		n	n	n	b	n	n
33	n	n	n	n	n	l	n	n	n	n	l	n	n	n	n		l	l	l	n	n
39	n	n	n	n	n	l	n	n	l	n	n	n	n	n	n	l		l	l	n	n
48	n	n	n	n	l	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	l	l		l	n	n
N1	l	n	l	n	n	l	n	n	l	n	n	n	l	n	n	l	l	l		n	n
N2																					
SJ-N3										b	b					b					

이밖에 SJ-N3, -T9, -X27 cells를 R2A plate 상에 cross-culture한 결과, N은 다른 모든 cell과의 cross-culture에서 잘 자랐으며, T와 X는 잘 자라지 못하였다. (nutrient-rich agar plate 상에서의 competition 이외에, liquid broth 내에서의 competition은 위 항의 starvation condition 결과 참조.)

라. 농약에 노출시킨 microcosm

본 연구에서 사용된 농약은 용인 논농사 지역에서 장마기간이 끝난 후에 살포하는 도열병약 (히노산; 오-에칠-에스, 에스-디페닐, 팔-포로 디지오에이트 30%, 유화제 요제 70%; 한농주식회사)을 본 실험에 사용하였다. 적당히 희석 후 분무기를 이용하여 soil sample에 주입하였다.



1) 다양한 토양세균의 히노산에 대한 영향조사

bacteria strain	성장여부 (after 24hrs) 히노산의 concentration (%)								
	0	0.01	0.05	0.1	0.2	1.0	1.5	2.0	3.0
1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SJ-X9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	-	-	-
17	+	+	+	+	+	+	-	-	-

18	+	+	+	+	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	-	-	-
21	+	+	+	+	+	+	-	-	-
22	+	+	+	+	+	+	-	-	-
23	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25	+	+	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SJ-T27	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	-	-	-
29	+	+	-	-	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-
33	+	+	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	+	-	-	-	-
35	+	+	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	-	-	-	-	-	-	-
37	+	+	+	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	-	-	-	-	-	-
39	+	+	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	+	+	-	-	-
41	+	+	+	+	+	+	-	-	-
42	+	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	+	-	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+	+	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-	-	-	-
49	+	+	+	+	+	+	-	-	-
50	+	+	-	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+	+	+	+	-	-	-
N1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
N2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SJ-N3	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2) **농약의 영향**

가) M9 microcosm**에서**

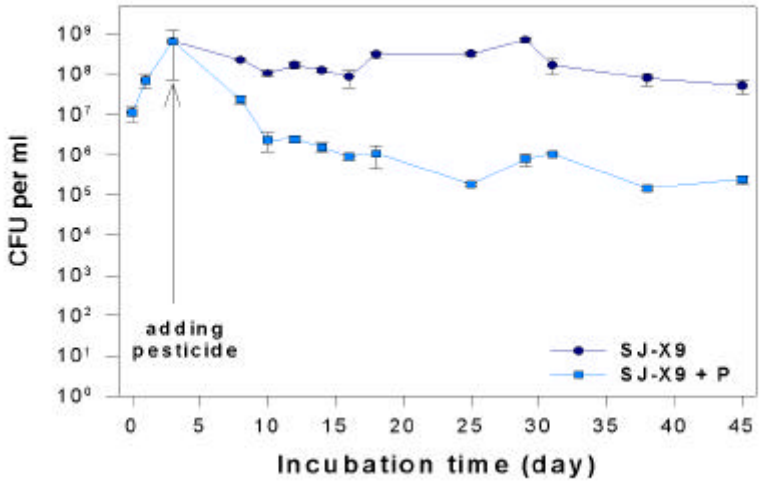
각 균을 minimal M9 solution**에 배양한 후, 약 16일 째에 배양을 두 부분으로 나누어 한 쪽 부분에 히노산 1.0%를 첨가한 후, 각 균의** CFU/ml**을 측정하였다. 세 가지 균 모두 많은** inhibition**을 받았다. 아울러 세 가지 균을 혼합하여** inoculation **한** microcosm**에서도 같은 양상을 보였는 바, 이는 토양이 아닌 용액 내에서 세균들은, 한 종류의 균만이 존재하던 또는 여러 가지 균이 상존하던 간에, 첨가된 농약에 의하여 그들의 생존력이 현저히 감소함을 보여주었다.**

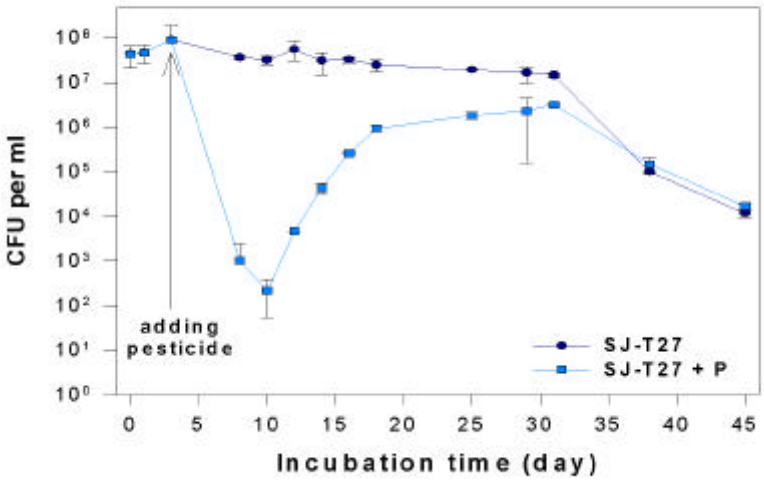
나) soil microcosm에서

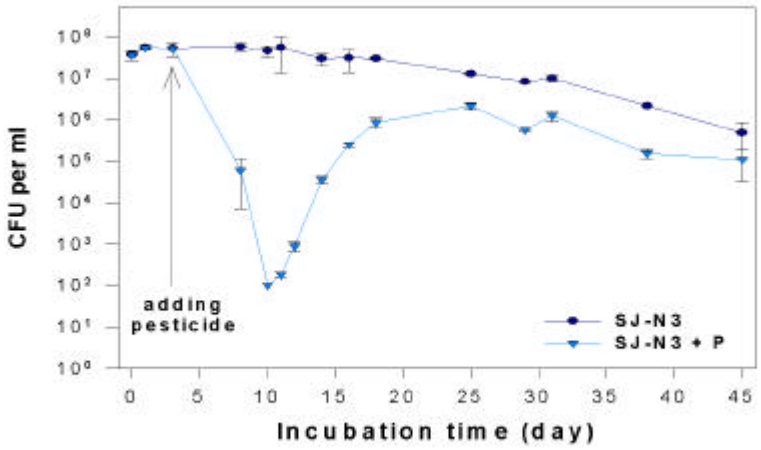
Minimal medium 실험에 이어, 이번에는 soil microcosm에 직접 세 가지 균을 각각 또는 함께 혼합하여 접종시킨 후, 4, 20, 그리고 35℃ 온도에서 배양하면서 각 균수를 측정하였다. M9 solution 결과와 비슷한 유형의 survivalship을 보여주었다. 그러나 세 가지 균의 mixed culture로서 inoculation하여 4, 20, 그리고 35℃에서 incubation 한 실험의 결과, SJ-T27은 soil microcosm에서도 다른 두 가지 균과 함께 존재할 시 그 수가 감소함을 보였다. 또한 이 균은 낮은 온도와 35℃ 이상의 배양온도에서는 그 수의 현격한 감소가 나타났다. 이러한 결과는 추후 3차년도 실험인 실제 환경에 접종할 연구에서 꼭 고려되어야할 사항일 것이다.

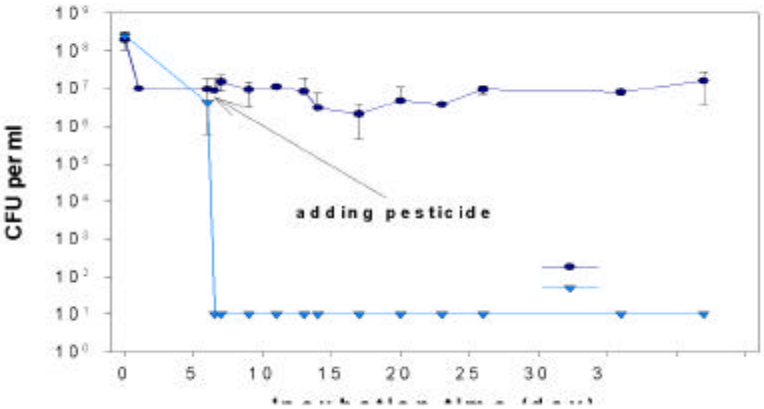
농업토양을 대표할 수 있는 4개의 bacterial isolates, 즉 a potential nitrogen-fixer SJ-N3, a *todCBA*- hybridizing SJ-T27, a *xylL*-hybridizing SJ-X9, and 방향족 화합물을 분해하지 못하며 위의 specific probes에 hybridization 하지 못하는 SJ-44를 선별하여, microcosms에 각각의 cell을 107 CFUs 접종하고 농업생태계에서 흔히 접하게 되는 환경인자들에 대한 평가를 실시하였다. 4가지 균주 모두 autoclaved soil 또는 minimal medium에 접종하였을 때 30일 이상 그 abundance를 유지하였다.

자연환경에서 나타난 것처럼 농약을 살포한 이후의 미생물군 조성의 dynamics를 알아보기 위하여 널리 사용되고 있는 농약인 edifenphos를 soil microcosms에 실제 사용농도로 살포하였다. SJ-N3과 SJ-T27은 살포 직후 abundance가 10^2-10^3 CFUs 까지 급격히 감소하였으나 다시 초기 접종수의 10% 수준까지 회복되었다. 다른 분해균주인 SJ-X9의 경우에는 지속적으로 천천히 감소하였다. 한편 SJ-44의 CFU는 detection limit 이하로 감소하여 회복되지 못하였다. 이러한 양상은 또 다른 종류의 농약인 diazinon을 접하였을 때에도 유사하게 나타났다. 제초제인 paraquat를 살포하였을 때에는 질소고정균 SJ-N3과 분해균주 SJ-T27과 SJ-X9 모두 큰 영향을 나타내지 않았다.


CFU per ml
Incubation time (day)
adding pesticide
SJ-X9
SJ-X9 + P


CFU per ml
Incubation time (day)
adding pesticide
SJ-T27
SJ-T27 + P


CFU per ml
adding pesticide
SJ-N3
SJ-N3 + P
Incubation time (day)


CFU per ml
adding pesticide

제4절 보다 많은 종류의 환경인자 및 미생물 상호 간의 관계 연구 후, 실제 논 토양내에 투입한 혼합미생물의 생존 및 혼합미생물 조성의 변화 조사

1. Microcosms를 이용한 비료, 온도, pH에 대한 영향 평가

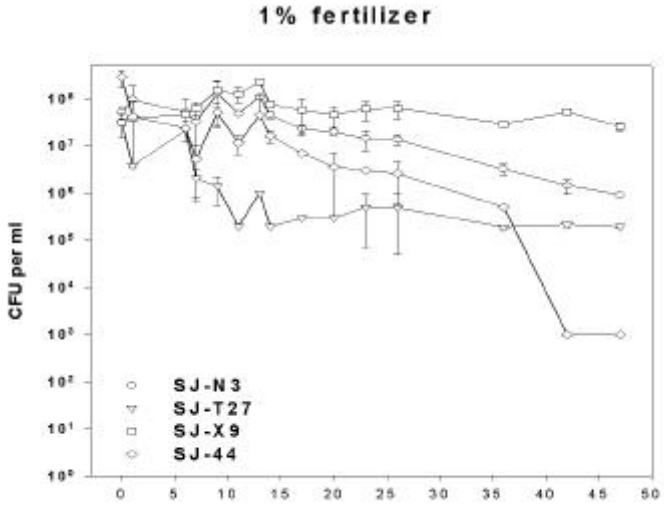
농업토양의 생태학적 특성에 관한 연구를 수행하면서 얻은 bacterial isolates 중에서 R2A plate에서의 cell morphology, 현미경으로 관찰한 gram staining과 cell shape, 항생제에 대한 내성, 온도에 대한 적응, 농약에 대한 utilization, 그리고 각 균간의 competition 등의 실험을 실시하여 농업토양의 미생물군 조성에 영향을 미치는 여러 가지 환경인자들에 대한 microcosm에 적합한 균주 SJ-N3 (potential nitrogen fixer), SJ-T27 and SJ-X9 (aromatic compound degraders), and SJ-44 (neither hybridizing to genes encoding degradation enzymes nor degrading aromatic compounds)를 선별하였다. 선별된 균주를 대수성장기 (exponential phase) 까지 배양한 후 bacterial cell만을 취하여 minimal medium으로 washing 한 다음 초기 미생물 수가 약 10^7 CFU가 되도록 minimal medium 또는 멸균된 토양에 접종하였다.

토양에서 일반적으로 경험하게 되는 nutrient starvation, 온도, pH, 그리고 여러 가지 농약과 비료에 노출되었을 때 각 균의 survival을 조사하였다. nutrient starvation 상태인 minimal medium에서는 접종균주의 CFU가 큰 변화를 나타내지 않고 30일 이상 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 농약 edifenphos와 diazinon을 microcosm에 실제 사용농도인 0.1%로 살포하였을 때, SJ-N3과 SJ-T27은 살포 직후 abundance가 10^2-10^3 CFUs 까지 급격히 감소하였으나 다시 초기 접종수의 10% 수준까지 회복되었다. 다른 분해균주인 SJ-X9의 경우에는 지속적으로 천천히 감소하였다. 한편 SJ-44의 CFU는 detection limit 이하로 감소하여 회복되지 못하였다. 제초제인 paraquat를 살포하였을 때에는 SJ-N3, SJ-T27 그리고 SJ-X9 모두 큰 영향을 나타내지 않았다. 따라서 보다 다양한 환경인자를 접촉시킨 후 세균의 생존 및 양의 변화를 추적하기 위하여 아래의 실험을 보완하였다.

가. 비료의 영향

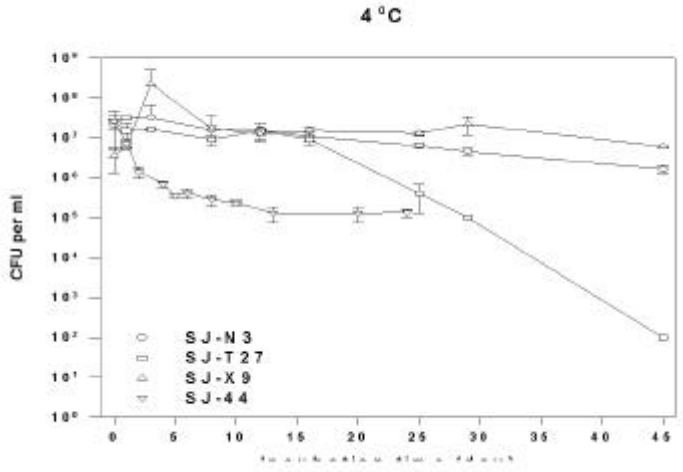
Microcosm에서 농약의 영향평가를 하였을 때와 동일한 조건에서 비료 (N: P: K = 21:17:17, 동부화학 제조)를 처리하였을 때 4가지 균주의 CFU 변화는 control에

서와 유사하였다. 즉 토양에 살포되는 무기비료는 질소고정 또는 분해세균의 양에 별 다른 영향을 끼치지 않음을 보였다.



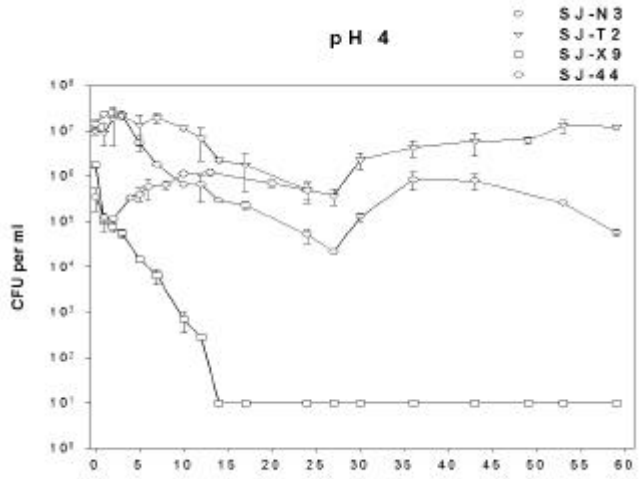
나. 동절기의 영향

지금까지의 microcosm (at 20℃)에서와 다른 온도에서의 실험결과, 동절기로 표현될 수 있는 4℃에서 SJ-N3과 SJ-X9의 CFU는 control인 20℃에서의 실험결과와 큰 차이를 나타내지 않았으나 SJ-T27은 농약 살포후 장기간동안 population abundance를 유지하였던 것과는 상반되게 CFU가 빠르게 감소하였다.



다. pH의 영향

농약과 접촉하였을 때 지속적인 감소를 나타내었던 균주인 SJ-X9는 acidic pH (pH 4)에 민감하게 반응하여 급격한 CFU의 감소를 나타내었다.

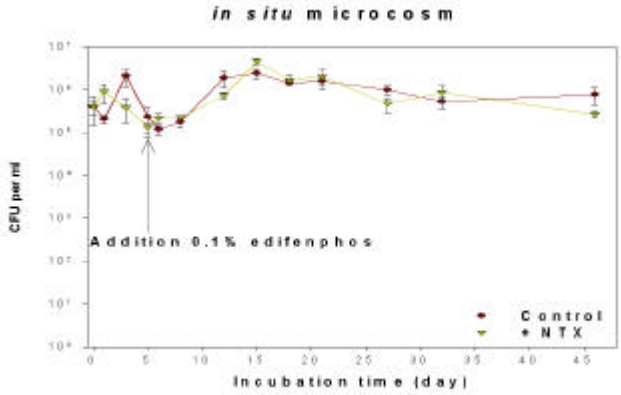


2. *in situ* soil microcosm에서의 접종 미생물군의 생존도

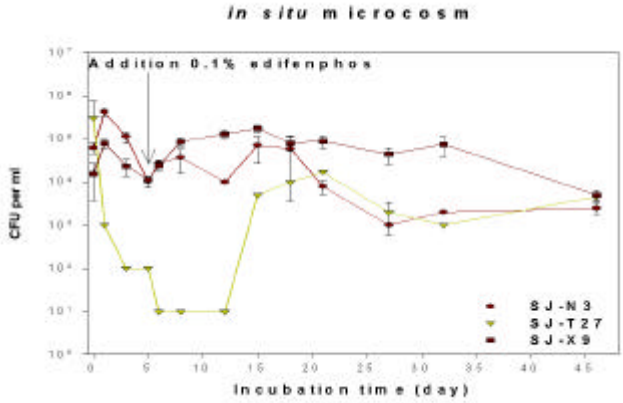
가. colony 특징에 의한 분석

실제 농업토양에 미생물을 접종하였을 때 survival과 activity를 측정하기 위하여 멸균하지 않은 토양을 사용하여 *in situ* microcosm을 수행하였다. soil container (50cm X 50cm X 12cm)에 3cm 두께로 토양을 넣고 접종 미생물 초기값이 약 10^7 CFU가 되도록 접종한 다음 microcosm 토양내의 총 세균 수와 접종한 균의 CFU 변화를 조사하였다. 토양의 총 세균 수는 균을 접종하였을 때나 접종하지 않았을 때나 큰 차이를 나타내지 않고 10^5-10^6 CFU를 유지하였으나, 인위적으로 접종시킨 bacteria의 CFU는 초기값의 약 10% 정도만을 유지하였으며 분해균주의 하나인 SJ-T27은 토양에 접종하였을 때 그 population의 크기가 급격하게 감소하였다.

Total bacterial number of the control and the in situ microcosm added with 0.1% edifenphos



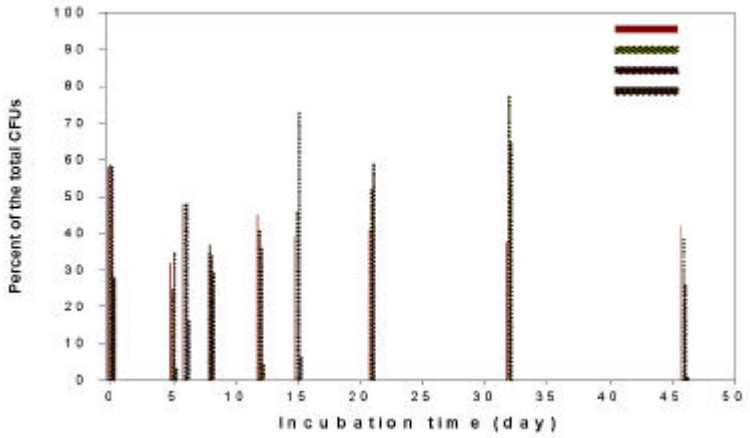
Bacterial numbers of each strain in the control and *in situ* microcosm added with 0.1% edifenphos



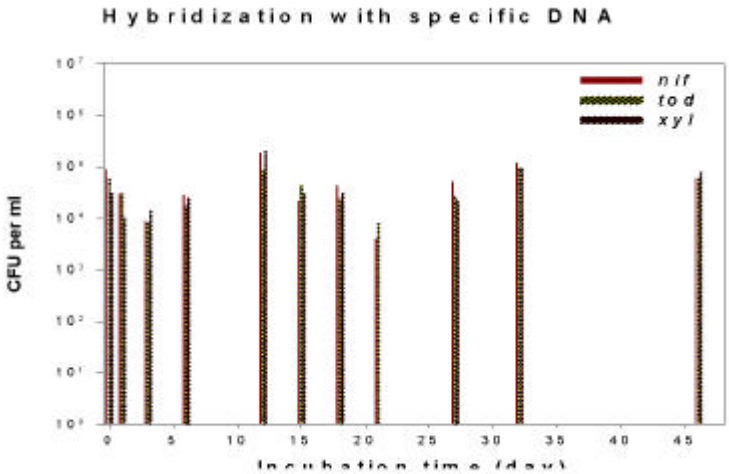
나. 각 세균의 방향족화합물의 분해능 및 colony hybridization 특징에 의한 분석

아울러 같은 in situ microcosm 내에 인위적으로 넣어준 세 가지 균의 동태를 위의 그림에서 보여준 colony morphology에 근거한 data 외에 위 절에서 자세히 설명된 B, T, X, 그리고 P를 함유한 carbon plate 및 세 가지 유전자 probe를 이용한 colony hybridization 결과는 다음의 그림과 같다.

Growth on 0.1% BIXP plate in situ microcosm containing the SJ-NIX cell



Hybridization with specific DNA probe in situ soil microcosm containing SJ-NIX cell



즉, *in situ* soil microcosm에 0.1% edifenphos를 살포하였을 때 각 균의 성장 및 생존을 조사하기 위하여 R2A plate에서의 성장, BIXP plate에서의 성장, colony hybridization을 실시한 결과, total bacterial CFU는 농약을 살포한 이후에도 큰 변화를 나타내지 않았으나, 분해균주인 SJ-X9의 CFU는 농약 살포 직후 일시적으로 증가하였다가 점차적으로 감소하였으며, 다른 하나의 분해균주인 SJ-T27은 농약에 접하였을 때 그 CFU가 detection limit 이하까지 감소하였다가 10일 이내에 다시 초기 CFU의 10% 까지 회복되었다. BIX plate에서 성장한 colony의 수와 specific DNA

probe에 hybridization된 colony의 수는 균을 접종한 토양과 접종하지 않은 토양에서 모두 증가하였으나, 시간이 경과함에 따라 균을 접종한 microcosm에서 약간의 증가를 나타내었다.

토양 미생물 중에서 실험실 배양조건에서 성장할 수 있는 미생물이 총 세균의 10% 에도 미치지 못하므로 실험실에서 배양되지는 않으나 질소고정 또는 방향족 화합물 분해능력을 가지고 있는 미생물을 정량화 하고자 하는 추후 연구의 필요성이 나타난다. 즉, 토양으로부터 초음파 추출로 bacterial cell을 분리하고 chloroform과 phenol로 추출하여 직접 soil total DNA를 추출하고, *xylE*, *todCEA*, *nifH probe*에 hybridization 되는 최소한의 CFU와 DNA를 측정하여 실제 토양의 유용 미생물을 정량화가 있어서 보다 정확한 유용미생물의 역동적인 동태 파악이 가능할 것이다.

제5절 결 론

1. 생태학적 고찰

가. 배지에서 배양시킨 bacteria의 수는 total cell number (1.5 X 10^{10}cells per dry gram of soil)의 0.003-3.5% 정도이며, 농업토양에서의 농사활동과 계절에 따른 (From Feb. 1997 to Feb. 1998) 여러 가지 환경인자들에 의하여 큰 영향을 받지 않고 거의 일정하게 유지하였다.

나. BTX degraders의 수는 aromatic carbon plates에서의 성장여부와 specific probes에 대한 colony hybridization 결과를 토대로 정량화 하였으며, 온도가 상승하면서 그 수가 5배까지 증가하였으며, 특히 병충해를 방지하기 위한 농약을 살포하고 2주 후에는 total CFUs의 70%까지 일시적으로 증가하였다. 그러나 추수 후에는 다시 감소하여 20-40% 정도를 유지하는 현상을 볼 수 있었다.

다. nitrogen-fixer의 양은 AMA 배지에서 성장한 colony의 morphology와 *nifH* hybridization 결과를 토대로 측정하였으며, 농사활동 기간 (모내기 이후 추수까지) 동안 약간 증가하여 total CFUs 의 약 20% 정도를 유지하였다.

2. Microcosm 고찰

가. 농업토양을 대표하는 유용미생물, SJ-N3 (potential nitrogen fixer), SJ-T27 and SJ-X9 (aromatic compound degraders), and SJ-44 (neither hybridizing

to genes encoding degradation enzymes nor degrading aromatic compounds)를 선별하여 미생물군의 생존 및 활성에 관여하는 여러 가지 환경인자들에 대한 soil microcosms를 실시하였다.

나. 환경인자들 중에서 농약 (edifenphos or diazinon)과의 접촉에 의하여 방향족 화합물을 분해할 수 있는 미생물군의 수를 크게 증가시키며, 상대적으로 분해할 수 없는 일반적인 균의 수는 감소하는 것으로 나타났다. 이에 반하여 질소고정균은 이러한 독성 화학물질에 대하여 큰 변화를 나타내지 않았다.

다. 계절적인 변화에 따른 온도 하강과 잔류농약 부산물에 의한 농업토양의 pH 변화가 농약 살포 후 급증하였던 방향족화합물 분해균주의 수를 조절하는 것으로 예상된다.

제6절 참고문헌

1. Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 55:154

2. Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright, and G. D. Aust. 1985. Oxidation of persistant environmental pollutants by a white rot fungus. Science 228:1434

3. Clark, A. N., R. D. Mutch, D. J. Wilson, and K. H. Oma. 1992. Design and implementation of pilot scale surfactant washing/flushing technology. Water Sci. Technol. 26:127

4. Donnelly, P. K., J. A. Entry, and D. L. Crawford. 1993. Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by Mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 59:2642-2647.

5. Dworkin, D., D. J. Messinger, and R. M. Shapot. 1988. In situ flushing and bioremediation technologies at a eveosote-bass wood treatment plant. Proceedings 5th National Conterence on Hazardous Waste and Hazardous Materials. Las Vegas, NV.

6. Eardly, B. D., J. P. W. Young, and R. K. Selander. 1992. Phylogenetic position of Rhizobium sp. strain Cr191, a symbiont of both Medicago sativa and Phaseolus vulgaris, based on partial sequences of the 16S rRNA and nifH genes. Appl. Environ. Microbiol. 58:1809-1815.

7. Furugawa, K., N. Tomizuka, and A. Kamibayashi. 1979. Effect of choline substitution on the polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol., 38:301-310.

8. Goodfellow, M. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bateriology. 9th ed., vol. 2, N. R. Krieg and J. G. Holts, (eds.) Williams and Willkins Co., Baltimore, pages. 1472-1481.

9. Hadman, D. J. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. Critical Rev. Biotechnol. 11:1-40.

10. Hummerli, S. D., M. S. A. Leisola, A. Sangland, and A. Fiechter. 1986. Oxidation of benzopyrene by extracellular ligninase of Phanerochaete chrysosporium. J. Biol. Chem. 261:6900

11. Jarinen, K. T., E. S. Melin, and J. A. Puhakk. 1994. High rate bioremediation of chlorophenol contaminated ground water at low temperature. Environ. Sci. Technol. 28:2387.

12. Jeffrey, W. H., S. M. Cuskey, P. J. Chapman, S. Resnick, and R. H. Olsen. 1992. Characterization of Pseudomonas putida mutants unable to catabolize benzoate: Cloning and characterization of Pseudomonas genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for xylS in activation of the TOL lower-pathway promoter. J. Bacteriol. 174:4986-4996.

13. Larmar, R. T., J. W. Evans, and J. A. Glaser. 1993. Solid-phase treatment of a pentachlorophenol contaminated soil using lignin-degrading fungi. Environ. Sci. Technol. 27:2566

14. Kaal, E. E., J. A. Field, and T. W. Joyce. 1995. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot Basidiomycetes by nitrogen-sufficsent media. Bioresource Technol. 53:133

15. Kelly, M. P., K. B. Hallberg, and O. H. Tuovinen. 1989. Biological degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: chloride mass balance in stirred tank reactors. Appl. Environ. Micribiol. 55:2717-2719.

16. Kim, E., Y. Kim, and C.-K. Kim. 1996. Genetic structures of the genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylxa -2,4-dienoic acid hydrolase from biphenyl and 4-chlorobiphenyl-degrading Pseudomonas sp. strain DJ-12. Appl. Environ. Microbiol. 62:262-265.

17. MaCdounald, J. A., and B. E. Rittman. 1993. Performance standards for in situ bioremediation. Environ. Sci. Technol. 27:1974

18. Marques, S., and J. L. Ramos. 1993. Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TCL plasmid catabolic pathways. Mol. Microbiol. 9:923-929.

19. Miller, J. H., 1991. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

20. Morgan, P. M., S. T. Lewis, and R. J. Watsinson. 1991. Comparison of abilities of white-rot-fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:693

21. Neidle, E. L., M. K. Shapio, and L. N. Ornston. 1987. Cloning and expression in Escherichia coli of Acinetobacter calcoaceticus genes for benzoate degradation. J. bacteriol. 169:5496-5503.

22. Nishino, S. F., J. C. Spain, L. A. Belcher, and C. D. Litchfield. 1992. Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 58:1719-1726.

23. Roszak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. 51:365-379.

24. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

25. Sutherland, J. B., A. L. Selby, J. P. Freeman, F. E. Evans, and C. E. Cerniglia. 1991. Metabolism of phenanthrene by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 57:3350

26. van Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and J. A. B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. 56: 677-694.

27. Yen, K.-M., and M. R. Karl. 1992. Identification of a new gene, tmoF, in the Pseudomonas mendocina KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxigenase. J. Bacteriol. 174:7253-7261.

28. Zylstra, G. J., W. R. McCombie, D. T. Gibson, and B. A. Finette. 1988. Toluene degradation by Pseudomonas putida F1: genetic organization of the tod operon. Appl. Environ. Microbiol. 54:1498-1503.

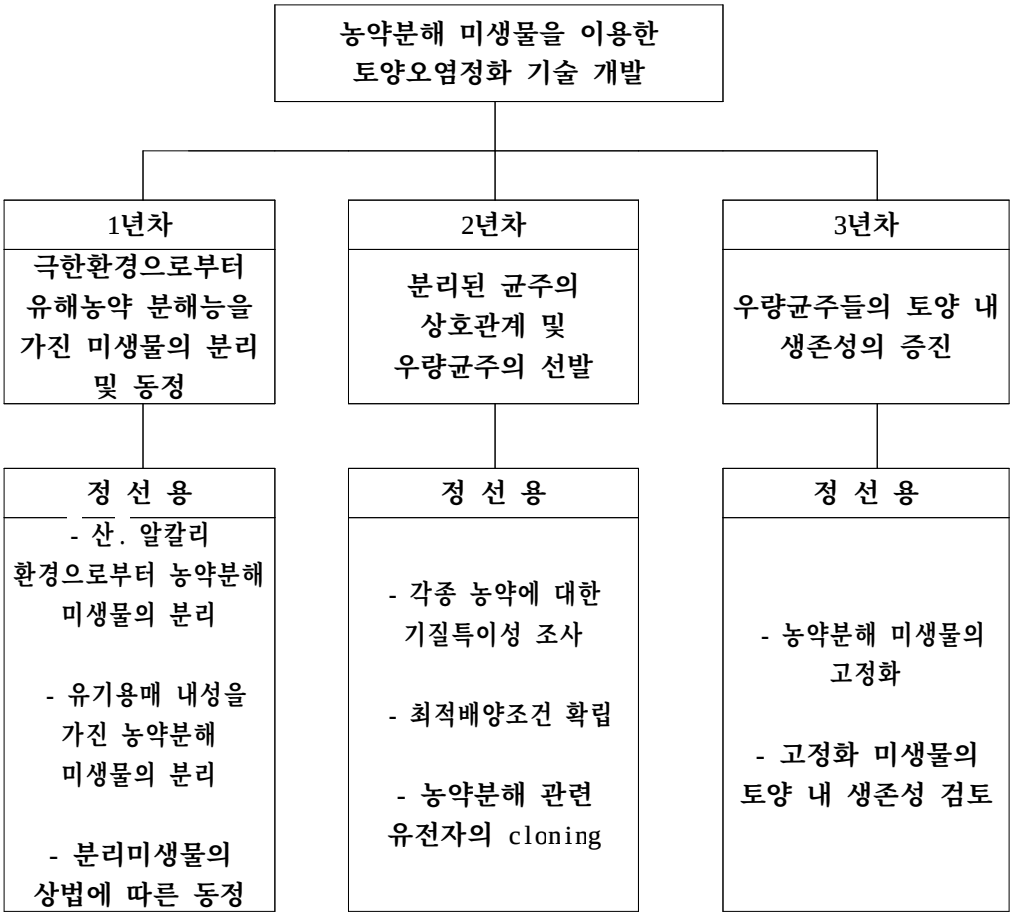
제 3 장 농약분해 미생물을 이용한 토양오염정화 기술 개발분야

제1절 서 설

본 연구에서는 자연계로부터 농약분해능이 우수한 균주를 확보하고, 이를 배양하여 국내 농업 토양 내에 투입함으로서 인위적인 유용토양 미생물 공동체를 구성시켜 토양 활성의 회복을 연구하였다. 무지배지(C-배지)를 제조하고 탄소원으로 2,4-D와 같은 염화방향족 화합물을 함유하고 있는 농약을 사용하여 10 균주의 분해미생물을 분리하였으며 분리된 균주의 생장여부 및 분해능력을 조사하였다. 토양이 식물육종에 필요한 수소이온 농도를 벗어나 점점 산성화, 알칼리화 되어감에 따라 분리된 미생물의 산·알칼리 환경에서의 생육특성에 대해 조사한 결과 pH4.0부근에서 생육이 가능한 균도 있었고 pH11.5까지 생육이 가능한 균도 있었다. 폐농약과 같은 유해화합물을 대량으로 생물학적 처리할 때 유용하게 이용되어질 수 있는 유기용매내성에 관한 조사를 한 결과 3개의 균주가 LogP 3.1인 xylene에서 생육 가능한 것을 나타났다. 분리된 균주들은 다양한 생리화학적인 시험을 거쳐 동정되었다.

염소화된 농약은 치환된 염소의 위치(*ortho, para, meta*)에 따라 분해정도가 다르다. 같은 종의 미생물이라도 phenyl기에 치환된 side group의 종류에 따라 분해되고 분해되지 않는 경우가 많다. 따라서 이러한 위치에 치환된 농약을 완전 분해를 하기 위해선 기질특이성이 서로 다른 미생물간의 상호작용이 필요하다. 이를 위해 분리된 균주에 대하여 각종 농약 및 방향족화합물에 대한 기질특이성을 조사하였다. 농약분해능이 우수한 균주를 선택하여 최적 온도, 최적pH, 최적기질농도등 최적배양조건을 조사한 결과 35℃가 최적온도였으며, 기질농도 0.3%에서 가장 높은 효소활성을 보임으로서 최적 기질 농도로 결정되었고 최적 pH는 8.5와 9로 나타났다. 농약분해에 관련된 main degradation pathway에 관련되어 있는 효소의 유전자를 cloning하였다. 이 유전자는 농약분해 미생물이 실제로 현장에 뿌려졌을 경우, 우량균주들의 토양내에서의 생존성을 추적하고 어떠한 변화를 겪게되는지를 보기 위한 monitoring용 probe로서 사용되었다.

농약분해미생물 중 우량균주를 선별하여 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 이용하여 고정화하고 그 저장효율성을 측정하였다. 실제의 토양 내에서 고정화된 우량 균주의 활성과 시간에 따른 생존을 측정하였으며 외부환경인자와의 관계를 조사하였다. 이러한 일련의 연구는 아래의 그림에서 연차식으로 도식하여 정리하였다.



제2절 극한 환경으로부터 유해농약 분해능을 가진 미생물의 분리 및 동정

1. 연구수행방법

가. 분해미생물의 분리

C-배지 (Carbon-minimal medium)는 미생물 균주를 간별하고 분리하는데 이용하였다. C-배지는 배지 1ℓ에 $(NH_4)_2SO_4$, 5g; KH_2PO_4, 2.93g; K_2HPO_4, 5.87g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g; NaCl, 2g; $CaCl_2$, 0.03g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01g; $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6mg; yeast

extract, 0.2g; trace elements solution (2㎖)로 구성되며, pH는 7.0으로 맞춘다. 여기서 trace elements solution은 4㎎, MoO_3; 28㎎, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$; 2㎎, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 4㎎, H_3BO_3; 4㎎, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$; 4㎎, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$로 이루어진다. 본 연구에 사용한 농약은 전 세계적으로 문제가 되었던 제초제, 일명 고엽제로 알려져 있는 2.4-Dichlorophenoxyacetate(2.4-D)를 사용하였다. C-배지에 대해 최종농도가 0.5% 또는 0.1%가 되도록 하였다. 미생물을 찾기 위한 시료는 부산의 사상공단, 경남 창원의 창원공단, 전남 여천시의 여천공단, 그리고 광주 하수종말처리장에서 채취한 토양 및 폐수를 이용하였다. C-배지 (10㎖)가 들어 있는 시험관에 채취한 토양을 약 0.1g 혹은 폐수의 경우에는 약 100㎕씩 넣어 30℃ 또는 37℃에서 이주일 동안 진탕 배양하였다. 이주일 후 균이 자란 시험관을 선별해서 동일배지가 들어 있는 시험관에 1% 접종하고 다시 이주일간 배양하였다. 이것을 두 번 반복한 후 미생물균주를 분리하기 위하여 배양액 100 ㎕를 petri dish (90㎜, 녹십자, 한국)에 있는 LB plate에 도말하고 3일간 정치배양기 (stationary incubator)에서 배양하였다. 그리고, 방향족화합물의 대사과정의 간별법으로 일반적으로 두 가지가 알려져 있다. 그중 하나는 benzene ring이 파괴될 때에 두 분자의 산소가 소요되는데, 이 필요한 산소의 소모량을 측정하여 간별하는 방법 (산소전극을 사용하여 측정)과 나머지 하나는 적당한 기질을 사용하여 효소반응을 시키고, 이때 반응 생성물이 색깔을 나타내면 이것을 spectrophotometer에서 측정하여 간별하는 방법이 있다. 여기서 전자는 benzene 화합물의 *ortho* 위치에서 ring이 파괴되는 *ortho*-cleavage reaction 혹은 *ortho* pathway라고 말하고, 후자는 benzene 화합물의 *meta* 위치에서 ring이 파괴되기 때문에 *meta*-cleavage reaction 혹은 *meta* pathway라고 말한다. 미생물에 의한 benzene 화합물의 pathway는 이 두 가지 pathway에 의해서 일어나고 있고 미생물에 따라 어느 pathway를 가지고 있느냐는 다르다. 자연계에서는 거의 반반 정도로 일어나고 있는 것 같다.

산소전극을 사용한 *ortho*-pathway를 가지고 있는 분해 미생물을 찾을 경우 효소반응을 위한 시간이 너무 많이 걸리고, 또한 측정치에 대한 오차의 차가 심하기 때문에 연구자들이 선호하지 않는다. 그러나 *meta*-pathway의 경우에는 spectrophotometer에서 손쉽게 측정이 가능하기 때문에 효소반응 실험이나 균주의 검색에 있어서 이상적이라 하겠다. 특이 균주의 검색을 할 때엔 plate 상에서 적당한 기질을 뿌려주기만하면 colony의 색깔이 변하기 때문에 쉽게 분해 균주를 찾을 수 있다. 본 연구에서는 이와 같은 손쉬운 점을 감안하여 *meta*-pathway를 가지고 있는 분해 균주를 검색하였다. 사용된 효소의 기질로는 *p*-catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 그리고 2,3-dihydroxybiphenyl을 사용하였다. 상기의 기질을 포함하는 아세톤용액 (20㎜)을 도말된 LB plate에 생성된 colony 위에 분무하여 노란색을 띠는 colony를 골라내어 같은 과정을 여러 번 반복하여 4가지 기질에 대하여 각기 다른 반응을 보이는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 LB plate에서 single colony isolation 하였다.

나. 기질특이성 및 유기용매내성 조사

분해균의 기질 특이성을 조사하기 위하여 C-배지에 유일한 탄소원으로는 각종 방향족 화합물을 0.1%농도로 하여 3일간, 6일간, 10일간 배양해서 균의 자화능력 여부를 조사하였다. 균주의 성장에 필요한 탄소원으로 2,4-dichlorophenoxyacetate, phenol, biphenyl, *p*-chlorobiphenyl, sodium benzoate, *p*-hydroxybenzoate, protocatechuic acid, 3-chlorobenzoate, 4-chlorobenzoate, n-hexane, propybenzene, *o*-dichlorobenzene, cyclohexane, xylene, stylene, toluene, benzene 을 사용하였다. 이러한 각종 화합물에 대한 미생물의 성장 정도 및 *meta*-개열 효소의 특이성은 중간 산물이 나타내는 노란색 정도차이로 관찰한다. 그리고, 고농도의 염소계 유해화합물이 분해되어 가는 과정을 보면 염소이온이 많이 치환되어 있는 경우에는 먼저 탈염소화가 일어나고 그 후에 여러 가지 관능기의 도입으로 인한 친수화 현상이 일어나고 마지막으로 벤젠 고리의 파괴로 대사가 이루어진다. 이 때 친수화 과정에서 이들 화합물들은 유기용매로서 작용을 하게 된다. 따라서, 이들 환경은 어떤 면에서 극한 환경 (stressed conditions)에 가깝다. 여러 가지 극한 환경, 특히 유기용매 하에서 유해화합물 분해능력을 나타내는 미생물을 분리하기 위하여 분리된 미생물에 대해 유기용매 내성실험을 하였다. 사용된 유기용매에 대해서는 table 1에 나타내었으며, 여기서 log P의 수치는 어떤 용매가 octanol과 water에 용해되는 분배계수를 log 수치로 나타낸 것이다. 일반적으로 log P의 수치가 낮을수록 미생물에 미치는 독성이 강하다. 이 실험에서는 유기영양분으로 이루어진 LB배지에 유기용매 (15%, v/v)를 첨가하고, 뚜껑 달린 시험관에서 배양을 하였다. 각각의 미생물을 접종하여 3일간 배양한 뒤 600㎚에서 흡광도를 측정하여 0.3 이상의 수치를 나타내는 것으로 균의 생육 유무를 판정하였다.

Table. 1 유기용매의 LogP 수치

LogP	organic solvents
6.6	Dodecane
5.6	Decane
4.5	Cctane
4.3	Diphenylether
3.6	Prophylbenzene
3.5	*n*-Hexane
3.2	Cyclohexane
3.1	Xylene
3.0	Styrene
2.5	Toluene
2.0	Benzene

다. 분해균주의 동정

- Single colony isolation되어진 균주는 API20 kits를 사용하여 Bergy's manual of bacteriology에 준하여 동정하였다.
- 분리동정된 균주는 glycerol stock solution(15-20%)을 제조하여 -80℃에 보관하고, 필요시 꺼내어 얼음 위에서 녹여서 사용하였다.

2. 연구수행 내용 및 평가

가. 농약분해 미생물의 분리·동정

2.4-D를 단일 탄소원으로 하여 분해균을 분리 검색한 결과 10 종의 분해균이 분리되었으며, 모두 Gram 음성균이었다. 생물화학적인 실험을 통해 동정한 결과 *Alcaligenes* sp.(strain PS1, PS2, CW1, CW2)와 *Pseudomonas* sp.(strain YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3)로 분류되었다. 이들 균들은 모두 Pseudomonad를 선택적으로 분리하는 Pseudomonas Isolation Agar(PIA) plate에서 성장을 하였다. 이들 분해균들을 여러 가지 방향족화합물을 탄소원으로 하여 배양했을 때, 서로 차이점을 나타내었기 때문에 이와 같이 분류하였다. 생물화학적 실험의 결과는 Table 2에 나타낸다.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strains

Characteristics	Isolated Strains									
	PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CNPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Simmons citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteolysis of gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. to be continued

Characteristics	Isolated Strains									
	PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L(I)-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of nitrites	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of nitrogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
McConkey agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF-O	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
OF-F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

나. 방향족화합물 분해능력 실험

분리된 균주의 각종 방향족 화합물에 대한 기질 특이성을 조사하기 위하여 탄소원으로 각종 방향족 화합물을 0.1%농도로 하여 C-배지에 첨가하고 3, 6, 10일간 배양하여 분리 균주의 자화능력 여부를 조사하였다. 사용한 방향족 화합물과 균주의 성장여부는 Table 3, 4, 5에 나타낸다.

10일간의 배양의 결과를 보면 CW2와 YC1, YC2가 2.4-D에서의 성장이 가장 좋았고, PS1, CW2, YC1은 phenol에 대한 분해능력이 뛰어 났다. 분리된 균주 모두 benzoic acid에 대한 자화능력이 있는 것으로 나타났다. 그리고 benzoic acid 분해대사의 중간 산물인 catechol에 대해서도 모두 분해능력을 나타내었다. 그러나 CW1은 *p*-hydroxybenzoic acid에 대하여 분해능력이 없었다. 분리된 균주들은 또한 모두 biphenyl, *p*-chlorobiphenyl에 대하여 분해능력을 가지고 있었다.

PS1, PS2는 3-chlorobenzoic acid에 대한 분해능력이 없고 KW1은 4-chlorobenzoic acid에 대하여 분해능력이 없었다. 일반적으로 방향족화합물의 농약은 기본골격은 benzene이고 주로 할로겐화합물이 치환된 경우가 많다. 이중에서도 염소이온이 가장 많이 사용되어져 왔다. 예를 들면, PCP(pentachlorophenol)의 경우에는 5개의 염소이온이 탄소와 결합하고 있다. 이와 같은 화합물이 미생물에 의해 분해될 경우에는 먼저 두개의 Cl^-이 dechlorination되어 수소와 결합하여 두분자의 염화수소($2HCl$)가 되어 제거된다. 이렇게 하여 점점 Cl^-이 적어지면 최종적으로 한 개의 염소가 남게되고 이러한 과정 중에 소수성의 화합물이 친수성인 chlorobenzoic acid(2-, 3-, 4-chlorobenzoic acid)로 일반적으로 전환된다. 미생물에 의한 2-, 3-, 4-chlorobenzoic acid의 분해에 관해서 살펴보면, 2-, 3-chlorobenzoic acid의 경우

에는 비교적 분해되기 쉽지만 4-chlorobenzoic acid는 분해되기 어렵다고 알려져 있다. 본 연구의 결과 YC2와 DY2, DY3은 4-chlorobenzoic acid에 대하여 좋은 분해능력을 보이고 있기 때문에 농약분해대사외 다른 난분해성 물질에 관한 연구에서 보다 더 하류의 대사에 관한 연구를 위한 좋은 재료가 되리라 사료된다.

이외에도 hexane, propylbenzene, cyclohexane, xylene, styrene, toluene, benzene에 대한 분해활성을 나타내는 균주도 있었다. 산업체에서 방출되는 폐수에는 이와 같은 방향성의 화합물이 대량으로 함유되어 있는 곳이 많기 때문에 폐수처리에 있어서 문제가 되고 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 상기의 균주들을 이용하면 산업폐수의 처리에도 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

Table 3. 분리균주의 각종 방향족 화합물에 대한 자화능력 시험(3일)

Substrates \ Strains	PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++
Phenol	-	-	+	++	++++	-	-	+	-	+
Benzoic acid	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
p-Hydroxybenzoic acid	-	++++	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Catechol	++++	++++	++++	++	-	+	-	+	+	+
3-Chlorobenzoic acid	-	-	+	++	-	+	++	+	+	+
4-Chlorobenzoic acid	-	+	+	++	++	+++	-	++	+++	+
Biphenyl	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+	+
p-Chlorobiphenyl	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Hexane	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++
Propylbenzene	-	+++	-	+++	+	++	++	-	+	++
o-Dichlorobenzene	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Cyclohexane	++	+++	++	-	++	++	++	-	++	++
Xylene	-	+++	+	-	++++	+	++	-	++	++
Styrene	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	++++	++++	++	++	-	+++	+++	++	+++	++
Benzene	+++	++	++	-	++	++	++	-	++	++

++++: best growth, +++: good growth, ++: growth,
+: a little growth, -: no growth

Table 4. 분리균주의 각종 방향족 화합물에 대한 자화능력 시험(6일)

Substrates \ Strains	PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	++
Phenol	++++	-	+	++++	+	-	-		-	+
Benzoic acid	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
p-Hydroxybenzoic acid	-	++++	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Catechol	++++	++++	++++	++	+	+	++	++	++	+++
3-Chlorobenzoic acid	-	-	+	+	++	+++	++++	+++	+++	+++
4-Chlorobenzoic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
Biphenyl	++++	++++	++++	++++	++	+++	+++	+++	+++	++++
p-Chlorobiphenyl	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Hexane	++	++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
Propylbenzene	++	+++	-	++++	++++	++++	++++	-	++	++++
o-Dichlorobenzene	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+++
Cyclohexane	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Xylene	+	+++	+++	-	++++	++	+++	+++	+++	+++
Styrene	+++	++	-	-	-	++	+++	-	++	++
Toluene	++++	++++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Benzene	+++	++	++	-	+++	++	++	-	++	+++

++++: best growth, +++: good growth, ++: growth,
+: a little growth, -: no growth

Table 5. 분리균주의 각종 방향족 화합물에 대한 자화능력 시험(10일)

Substrates \ Strains	PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
Phenol	++++	-	+	++++	++++	-	-	+	-	+
Benzoic acid	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
p-Hydroxybenzoic acid	++	++++	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Catechol	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++
3-Chlorobenzoic acid	-	-	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	+++
4-Chlorobenzoic acid	+	+	+	++	++	+++	-	++	+++	+++
Biphenyl	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++++
p-Chlorobiphenyl	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Hexane	++	++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
Propylbenzene	++	+++	-	++++	++++	++++	++++	-	++	++++
o-Dichlorobenzene	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+++
Cyclohexane	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Xylene	+	+++	+++	-	++++	++	+++	+++	+++	+++
Styrene	+++	++	-	-	-	++	+++	-	++	++
Toluene	++++	++++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Benzene	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	-	++	+++

++++: best growth, +++: good growth, ++: growth,
+: a little growth, -: no growth

다. *meta*-cleavage enzyme의 기질특이성 조사

meta-개열에 관여하는 효소를 가지고 있는 미생물을 대상으로 하여 이들 효소의 기질에 대한 특이성을 조사하였다. 사용된 기질은 *p*-catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl 이다. 이들의 결과를 Table 6에 나타낸다. 이들의 결과를 보면 YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3 균주들은 사용한 기질에 대하여 모두 효소반응을 나타내었으나, 나머지 균들은 그렇지 않았다. CW1, CW2는 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl에 대하여 효소활성을 나타내었다. PS1, PS2는 3-methylcatechol에 대하여 효소활성을 나타내지 못하였다. 전체로 보아서 *Alcaligenes* sp. (strain PS1, PS2, CW1, CW2) 쪽이 기질에 대하여 선택의 폭이 좁고, *Pseudomonas* sp. (strain YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3) 쪽이 각종 기질에 대한 선택의 폭이 넓은 것으로 나타났다.

Table 6. 분리균주에 대한 *meta*-Cleavage Enzyme의 기질특이성

Strains	Substrates			
	p-Catechol	3-Methyl catechol	4-Methyl catechol	2,3-Dihydroxy biphenyl
PS1	++	-	++	+++
PS2	++	-	++	+
CW1	-	-	++	+
CW2	-	-	++	+
YC1	+++	++	++	++
YC2	+++	++	++	++
KW1	+++	+	++	+++
DY1	+++	+	++	+++
DY2	+++	++	++	++
DY3	+++	+	++	++

+++ : deep yellow, ++ : yellow, + : light yellow, - : colorless

라. 유기용매 내성실험

분리된 미생물 중에는 xylene에서도 성장이 왕성한 균주가 분리되었다. 유기용매로는 dodecane, decane, diphenyl ether, propylbenzene, *n*-hexane, cyclohexane, xylene, stylene, toluene, benzene(LogP가 2.0에서 6.6 사이)을 이용하였으며, 이 실험에서는 유기영양분으로 이루어진 LB배지에 유기용매 (15%, v/v)를 첨가하고, 각각의 미생물을 접종하여 3일간 배양한 뒤 미생물의 성장정도를 관찰하였다. 실험결과를 Table 7에 나타낸다. 지금까지 알려진 유기용매 내성균주로는 toluene(LogP 2.5)에서도 생육이 가능한 균주가 일본의 이화학연구소 미생물학 연구실에서 분리한 것이 최고이다. 본 연구에서는 비록 toluene에 대한 내성을 가지고 있는 균주의 선발에는 실패했지만 그것보다 조금 LogP가 낮은 xylene(3.1)에서는 성장이 왕성한 균주가 선별되었다. 이와 같은 유기용매 내성균주의 이용은 특히 산업적으로 이용성이 큰 것으로 평가받고 있어 앞으로 이들 균주의 이용이 기대되어 진다. 그 한 예로 농약과 같은 난분해성 물질들은 물에는 용해하기 힘들지만 유기용매에는 용해도가 매우 크다. 따라서 용매계와 수계를 이용한 이중배양계를 사용하여 폐농약과 같은 난분해성 물질을 처리하고자 할 때에 이들 균주는 유용하게 이용될 수 있을 것

이다. 또한 이들 유기용매 내성균주가 가지고 있는 혹은 생산하여 분비하는 효소도 유기용매에 대하여 높은 내성을 가지고 있을 것이기 때문에 미생물을 이용할 수 없는 반응조에서는 이들 효소가 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. 분리균주에 대한 유기용매 내성 실험

Solvents	LogP	Strains									
		PS1	PS2	CW1	CW2	YC1	YC2	KW1	DY1	DY2	DY3
Dodecane	6.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Decane	5.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Octane	4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diphenyl ether	4.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propylbenzene	3.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Hexane	3.5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Cyclohexane	3.2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Xylene	3.1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Styrene	3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzene	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

제3절 분리된 미생물의 상호관계 및 우량균주군 선발

1. 연구수행방법

가. Cloning methods

Cloning을 위한 전체적인 실험방법은 Fig.1에 나타내었다. DY3의 cDNA를 추출한 다음 Pst I로 제한효소처리하여 partial digestion시키고 agarose gel로부터 일정부분을 취해 준비한다. pUC119는 SY5의 cDNA를 partial digestion할 때 사용한 Pst I로 똑같이 절단하고 CIAP처리하여 준비한다. 두 DNA를 T4 DNA ligation enzyme으로

ligation하고 *E. coli* DH5α로 조제한 competent cell내에 transformation한다. LB+Ampicillin+IPTG+X-gal solid medium에 도말하고 24시간 배양하여 흰색 colony에 2,3-dihydroxybiphenyl을 뿌려보아 노란색으로 발현하는 것만 따로 순수분리한다. 이 colony를 LB+Ampicillin liquid medium에 배양하고 plasmid 추출방법에 의해 recombinant DNA를 추출한 다음 Pst I로 처리하여 cloning이 되었는지에 대하여 마지막 검증을 한다.

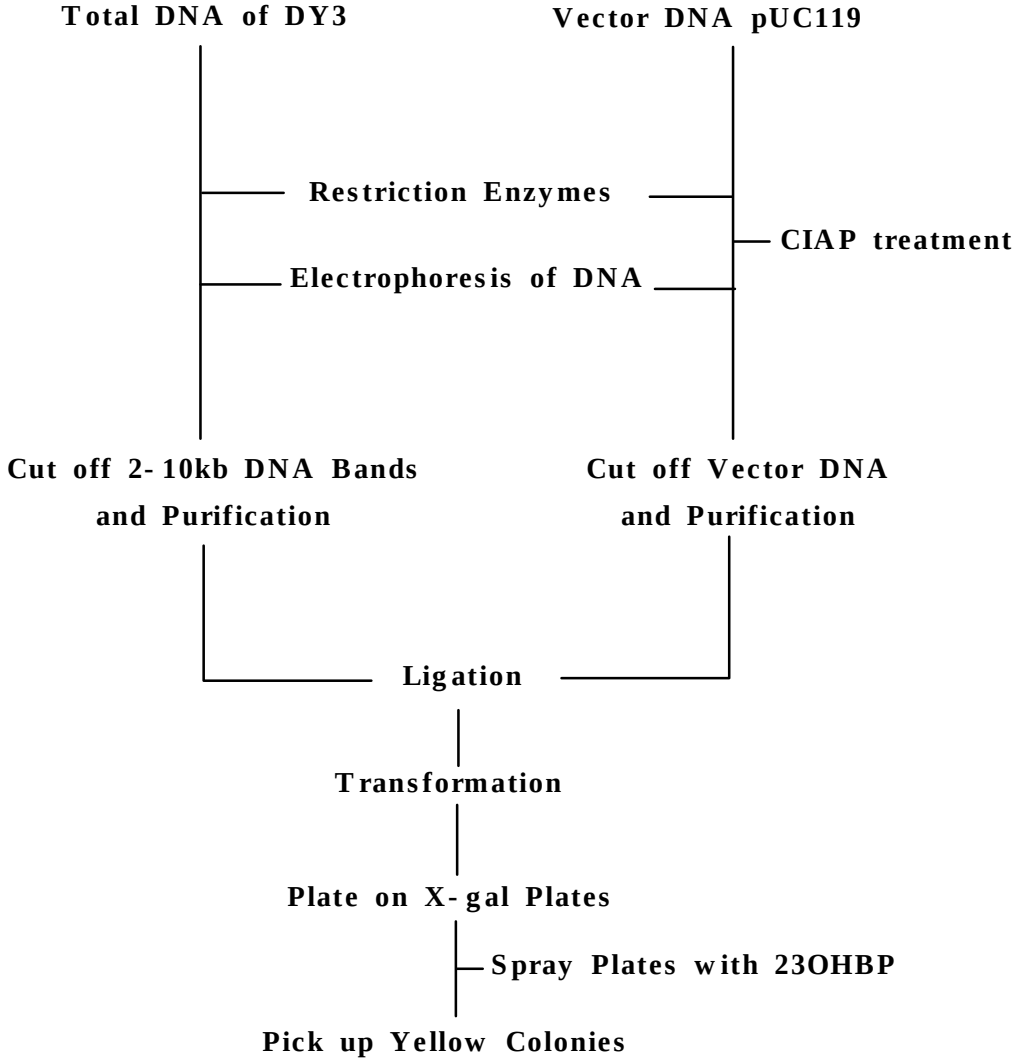


Fig.1 Cloning 방법

ㄱ. pDNA preparation as a cloning vector

Plasmid pUC119용액을 competent cell에 transformation 한 후에 LB+Ampicillin solid medium에 도말한다. 하나의 colony를 취해 LB+Ampicillin liquid medium에 배양하고 plasmid extraction method를 이용하여 추출한다. 3㎕를 취해 multi-cloning site에 있는 restriction enzyme으로 절단하고 전기영동 후 ethidium bromide에서 염색하여 plasmid를 확인한다.

ㄴ. Competent cell preparation

E. coli DH5α를 37℃, overnight조건으로 전배양 후 2㎖를 취해 LB액체 배지에서 2-4시간동안 배양하여 준비한다. 50㎖ centrifugal tube에 25㎖씩 나누어 담은 후 6000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하고 TFB Ⅰ용액과 TFB II 용액으로 처리하여 준비한다.

ㄷ. Transformation method

Competent cell 200㎕에 plasmid DNA를 넣은 후 얼음 위에서 30분간 놓아둔다. 42℃에서 2분간 열처리하고 다시 5분간 얼음 위에서 놓아둔 후 1㎖ LB액체배지를 섞어 37℃에서 1시간동안 배양한다. Ampicillin 최종 농도가 25㎍/㎖가 되게 들어간 LB agar plate or LB+Ampicillin +IPTG+X-gal solid medium에 100㎕씩 분주하여 도말한다.

ㄹ. cDNA preparation

CY3을 LB액체배지, 37℃에서 전배양하고 같은 배지에서 본배양하여 원심분리한다. pellet을 TE buffer에 녹인 후 80㎎ lysozyme power를 첨가하여 37℃에서 10분간 배양하고 proteinase K(20㎎/㎖ 50㎕)와 10% SDS(final conc. 0.5%)로 처리한다. 이후 CTAB/NaCl solution으로 처리하여 DNA를 용출시키고 phenol처리와 에탄올 침전을 거쳐 DNA를 준비한다.

ㅁ. cDNA partial digestion with restriction enzyme and extraction from agarose gel

추출된 CY3을 Pst I로 처리하여 전기영동하고 2 10kb부위를 칼로 도려낸 후 반투막을 이용하여 gel로부터 DNA를 추출한다. phenol처리와 에탄올 침전으로 DNA를 추출한다.

ㅂ. Plasmid extraction method

Plasmid를 LB+Ampicillin 25㎍/㎖ liquid medium에 배양하고 원심분리하여 pellet만 남긴 후 Alkali lysis 방법으로 cell로부터 플라스미드를 추출하고 phenol 처리와 에탄올 침전을 하여 준비한다.

ㅅ. Extracted pUC119 restriction enzyme treatment

추출된 플라스미드를 DY3의 partial digestion시 사용된 효소인 *Pst* I로 절단하고 phenol처리와 에탄올 침전으로 준비한다.

ㅇ. CIAP treatment

Pst I로 절단된 플라스미드를 CIAP효소로 처리하고 phenol처리와 에탄올 침전으로 플라스미드를 준비한다.

ㅈ. Ligation, gene expression and final verification

Pst I로 절단되고 CIAP 처리된 플라스미드와 *Pst* I로 절단되고 gel로부터 회수된 DY3을 1:3의 비율로 섞은 후 같은 양의 T4 DNA ligation enzyme을 넣어 16℃에서 배양한다. 2시간 후 transformation하여 LB+Ampicillin+IPTG+X-gal solid medium에 도말하고 37℃에서 24시간동안 배양한 다음 2,3-dihydroxybiphenyl이 들어간 acetone을 뿌려 노란색 colony가 생성되는지 확인하고 순수분리한다. 순수분리된 colony는 LB+Ampicillin액체배지에 배양하고 추출하여 *Pst* I로 절단한 다음 전기영동으로 확인한다.

나. Substrate specificities of recombinant plasmids in *E. coli* DH5α

Cloning된 recombinant plasmids에 효소기질 특이성을 측정하기 위해서 LB+Ampicillin+ IPTG+X-gal solid medium에 배양하고 각각의 기질을 acetone spray방법을 이용하여 뿌려본다. 기질은 2,3-dihydroxybiphenyl, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol을 사용한다.

다. Subcloning of recombinant plasmids

Cloning된 recombinant plasmid를 보다 더 작게 만들기 위해 제한효소와 함께 37℃에서 배양하여 절단하고 phenol 처리와 에탄올 침전 후 ligation하고 competent cell에 transformation한다. 2YT+Amp+IPTG+XGal solid medium에 도말 후 배양하고 2,3CHBP를 뿌려 노란색 확인된 colony를 취하여 LB+Amp 액체배지에 배양한다. 플라스미드 추출방법에 따라 추출하고 제한효소처리하여 전기영동하고 적당한 band를 골라내어 plate를 만들어 보관한다. plate에 있는 colony는 다시 한번 플라스미드 추출방법에 의해 추출하고 제한효소처리 후 전기영동하여 추출 결과를 최종 확인한다.

라. Restriction Mapping

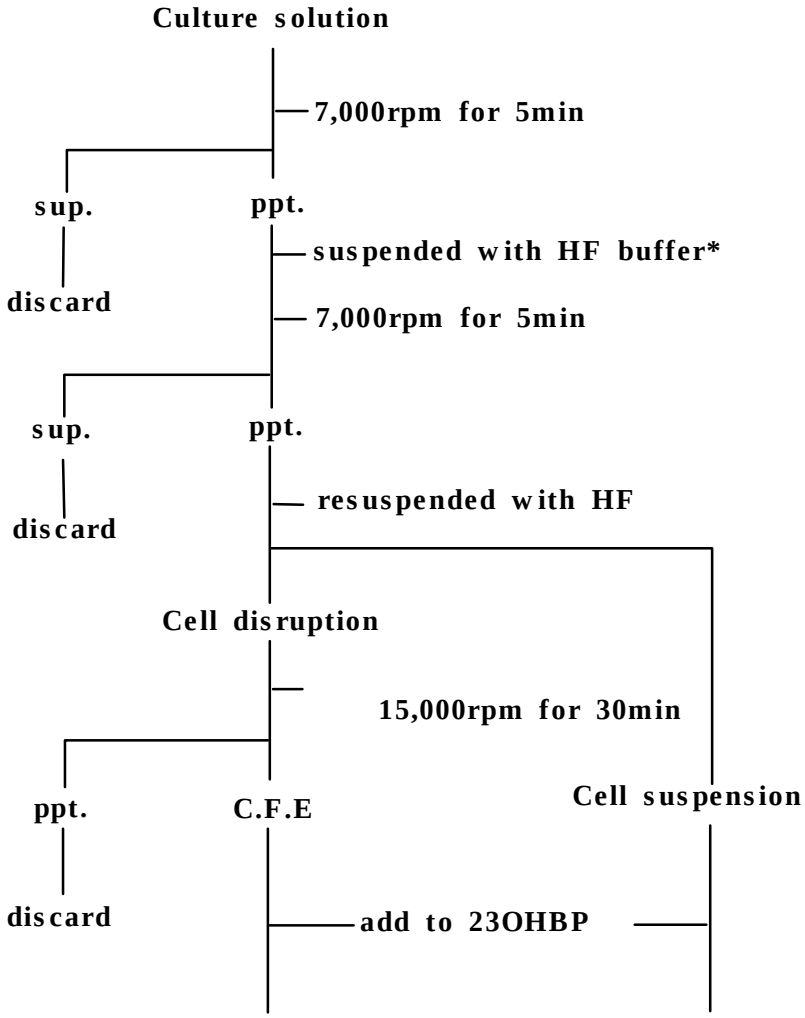
Cloning된 plasmid의 mapping을 위해 각종 제한 효소로 절단하고 전기영동하여 DNA molecular marker와 비교함으로서 크기를 결정하고 단편의 수를 확인하여 plasmid내에 존재하는 제한 효소 site와 수를 결정한다.

마. Deletion Mutants method와 sequence 분석

추출된 recombinant plasmid를 5′protruding end를 만드는 a enzyme과 3′protruding end를 만드는 b enzyme으로 절단한다. Exo nuclease III에 의해서 5′blunt-ended의 윗부분 strand를 시간에 따라 소화시킨 후 mung bean nuclease로 blunt-ended를 형성하고 Klenow fragment에 의해 3’ blunt-ended의 윗부분 strand를 채워 넣어 blunt ended를 형성한다. ligation하고 transformation하여 mutants를 형성하고 형성된 mutants는 플라스미드 추출방법에 따라 추출하고 적당한 제한효소들에 의해 절단되어 전기영동으로 확인한다. 형성된 mutants는 Sanger dideoxy sequencing procedure의 원리에 의해서 373A DNA sequencer로 분석되고 sequence 분석과 다른 유전자와의 동질성조사는 web상의 BCM search launcher와 NCBI's sequence similarity search tool에 의해서 수행된다.

바. Cptimum temperature, pH and concentration

최적온도의 결정을 위하여 C-배지에 균주 1%, 기질 0.1% 넣고 30℃, 35℃, 37℃, 45℃, 50℃의 온도에서 optical density를 조사하였다. 최적 pH와 최적 농도는 enzyme activity 실험을 통하여 결정하였고 그 방법은 Fig.2에 나타내었다.



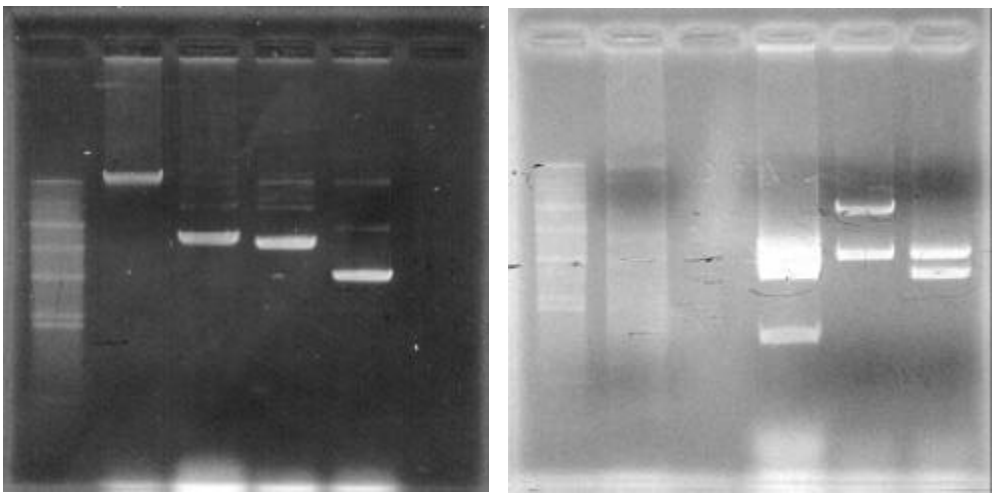
HF buffer* : 50mM HEPES, 0.01mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH8.0

Fig.2 Enzyme Assay 시험방법

2. 연구수행 내용 및 평가

가. Cloning of CY3

상기의 방법에 의해서 유전자를 cloning한 결과 약 2000개의 clone중에서 4개의 positive한 clone이 얻어졌다. 이들 *meta*-cleavage에 관여하는 효소의 유전자를 가지고 있는 플라스미드를 각각 pSY1, pSY2, pSY3, pSY4로 명명하였다. 이들 plasmid DNA의 전기영동사진을 Fig.3에 나타낸다. pSY1의 경우는 제한효소 *Pst* I 으로 절단하였을 때 Fig.3에서 보는 바와 같이 이상현상을 나타냄으로서 plasmid의 크기를 확인하지 못하였고 pSY2의 경우는 vector를 제외한 2개의 단편이 존재하였으며 pSY3과 pSY4는 각각 1개의 단편이 나타났다.



1 2 3 4 5

Non-digested plasmid DNA
Lane 1 : λ-Hind III digest
Lane 2 : pSY1 Lane 3 : pSY2
Lane 4 : pSY3 Lane 5 : pSY4

1 2 3 4 5 6

Digested plasmid DNA with Pst I
Lane 1 : λ-Hind III digest
Lane 2 : pSY1 Lane 4 : pSY2
Lane 5 : pSY3 Lane 6 : pSY4

Fig.3 plasmid DNAs 전기영동

나. Recombinant plasmids의 기질 특이성

cloning methods에 의해 strain CY3은 4개의 recombinant plasmids가 만들어졌다. 이들의 효소에 대한 기질특이성을 조사하기 위해서 LB+ Ampicillin+IPTG+X-gal solid medium에 배양하고 각각의 기질을 acetone spray방법을 이용하여 뿌려보았다. 그 결과는 Table 8.에 나타내었다.

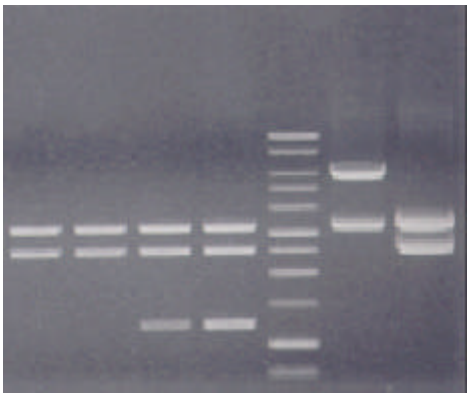
Table 8. Recombinant plasmids의 기질 특이성

substrate	plasmids			
	pSY1	pSY2	pSY3	pSY4
2,3- dihydroxybiphenyl	+++	+++	+++	++
catechol	+++	+++	+++	++
3- methylcatechol	+	+	+	+
4- methylcatechol	+++	+++	+++	++

Colonies turn yellow after spraying with substrates.
+++, ++ and + means deep yellow, yellow and light yellow, respectively.

다. Subcloning of recombinant plasmid pSY2

pSY2는 Fig.3에서와 같이 vector를 제외한 2개의 단편이 존재하였고 이중 보다 큰 단편을 subcloning하기 위해서 *Pst* I 제한효소로 절단하고 cloning하여 전기영동으로 확인하였다(Fig.4). 이중 subcloning된 lane 1과 lane 2의 plasmid는 2.3-dihydroxybiphenyl에서 노란색으로 발현하였다. pSY2-1과 pSY2-2는 pSY4와 Fig.4에서 보는 바와 같이 같은 크기의 plasmid로서 판명되었으며 실제로 pSY4와 똑같은 plasmid인지 확인하기 위해서 pSY4가 가지고 있는 제한효소 site로 처리하여 본 결과 pSY2-1과 pSY2-2는 pUC119의 multiple cloning site의 *Fst* I site에 삽입될 때 pSY4와 비교하여 거꾸로 삽입된 것으로 판명되었다.(Fig.5)



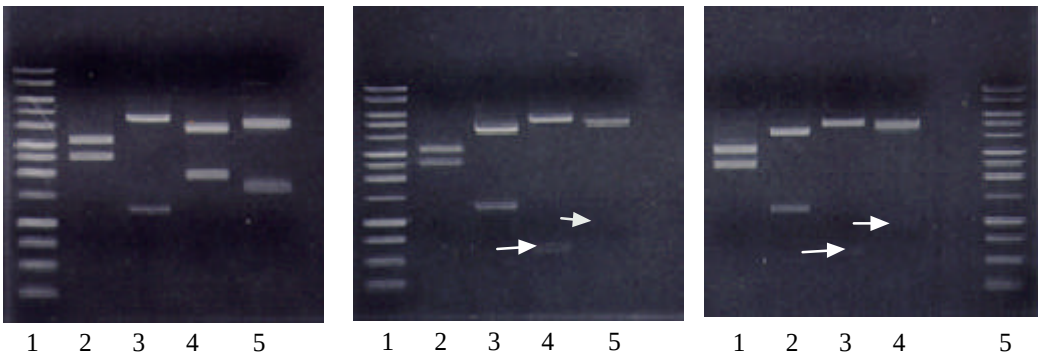
Lane 1 : pSY2-1 Lane 2 : pSY2-2

Lane 3 : pSY2-3 Lane 4 : pSY2-4

Lane 5 : 1kb DNA Ladder(marker)

Lane 6 : pSY3 Lane 7 : pSY4

Fig.4 Subcloning된 recombinant plasmid pSY2의 전기영동



Lane 1: 1kb DNA Ladder
Lane 2: *Pst* I
Lane 3: *Hinc* II
Lane 4: *Xba* I
Lane 5: *Sac* I

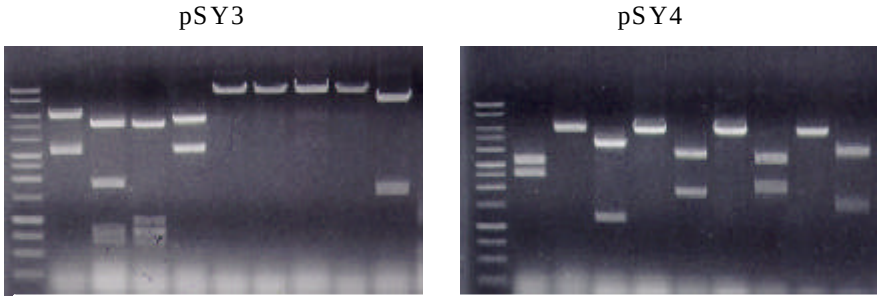
Lane 1: 1kb DNA Ladder
Lane 2: *Pst* I
Lane 3: *Hinc* II
Lane 4: *Xba* I
Lane 5: *Sac* I

Lane 1: *Pst* I
Lane 2: *Hinc* II
Lane 3: *Xba* I
Lane 4: *Sac* I
Lane 5: 1kb DNA Ladder

Fig.5 pSY4, pSY2-1 and pSY2-2 동질성을 위한 전기영동

라. Restriction Mapping

Cloning된 recombinant plasmids인 pSY3과 pSY4의 Mapping을 위해서 pUC119의 multiple cloning site내에 존재하는 각종 제한효소들을 이용하여 절단하고 전기영동하였다.(Fig.6) 그 결과 pSY3은 pUC119의 *Pst* I내에서 6.0kb로 cloning되었고 4종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었으며 pSY4는 pUC119의 *Pst* I내에서 2.5kb로 cloning되었고 5종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었다. pSY3과 pSY4의 Mapping결과는 Fig.7-1과 Fig.7-2에 mutants의 2,3DHBD 활성, open reading frames와 함께 나타냈다.



Lane 1 : 1kb DNA Ladder(marker)
Lane 2 : *Pst* I Lane 3 : *Sal* I Lane 4 : *Hin*c II Lane 5 : *Bam* HI
Lane 6 : *Xba* I Lane 7 : *Hin*d III Lane 8 : *Sma* I Lane 9 : *Eco* RI
Lane 10 : *Sac* I

Fig.6 pSY3 and pSY의 restriction mapping을 위한 전기영동

마. Deletion Mutants와 sequence 분석

Cloning된 plasmids pSY3과 pSY4의 아미노산 염기서열을 결정하기 위한 deletion mutants를 제조하기 위하여 Fig.6에서 pSY3과 pSY4가 갖지 않는 제한 효소 site를 찾아 5′protruding end를 만드는 a enzyme과 3′protruding end를 만드는 b enzyme으로서 선택하였다. a 와 b enzyme으로 플라스미드를 절단한 후 Exo nuclease III에 의해 30분에 걸쳐 시간에 따라 점진적으로 소화시킨 다음 mung bean nuclease

로 blunt ended를 만들고 klenow fragment로 3′protruding end의 윗부분 strand를 채워 blunt ended를 형성한 후 ligation하여 mutants를 제조하였으며 이에 대한 결과는 Fig.7-1과 Fig.7-2에 나타낸다. Fig.7-1, Fig.7-2는 제조된 mutants에 대한 2,3DHBD의 활성을 함께 나타낸 것으로서 이 결과 *meta*-cleavage에 관계된 유전자의 pUC119에 삽입될 때 *lac Z* promoter로의 방향을 알 수 있었다.

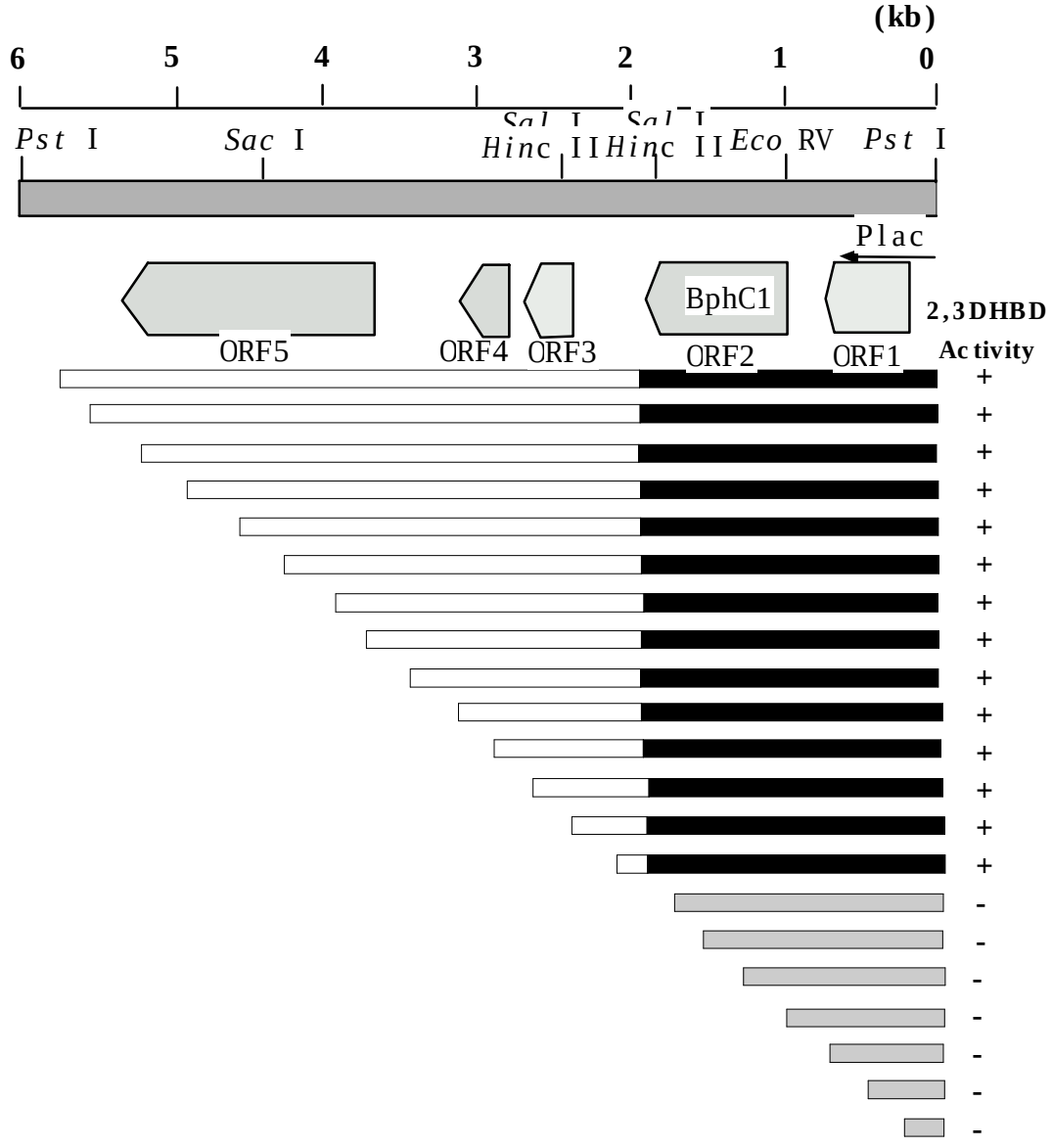


Fig.7-1 pSY3의 제한효소 지도와 2,3DHBD activity와의 관계

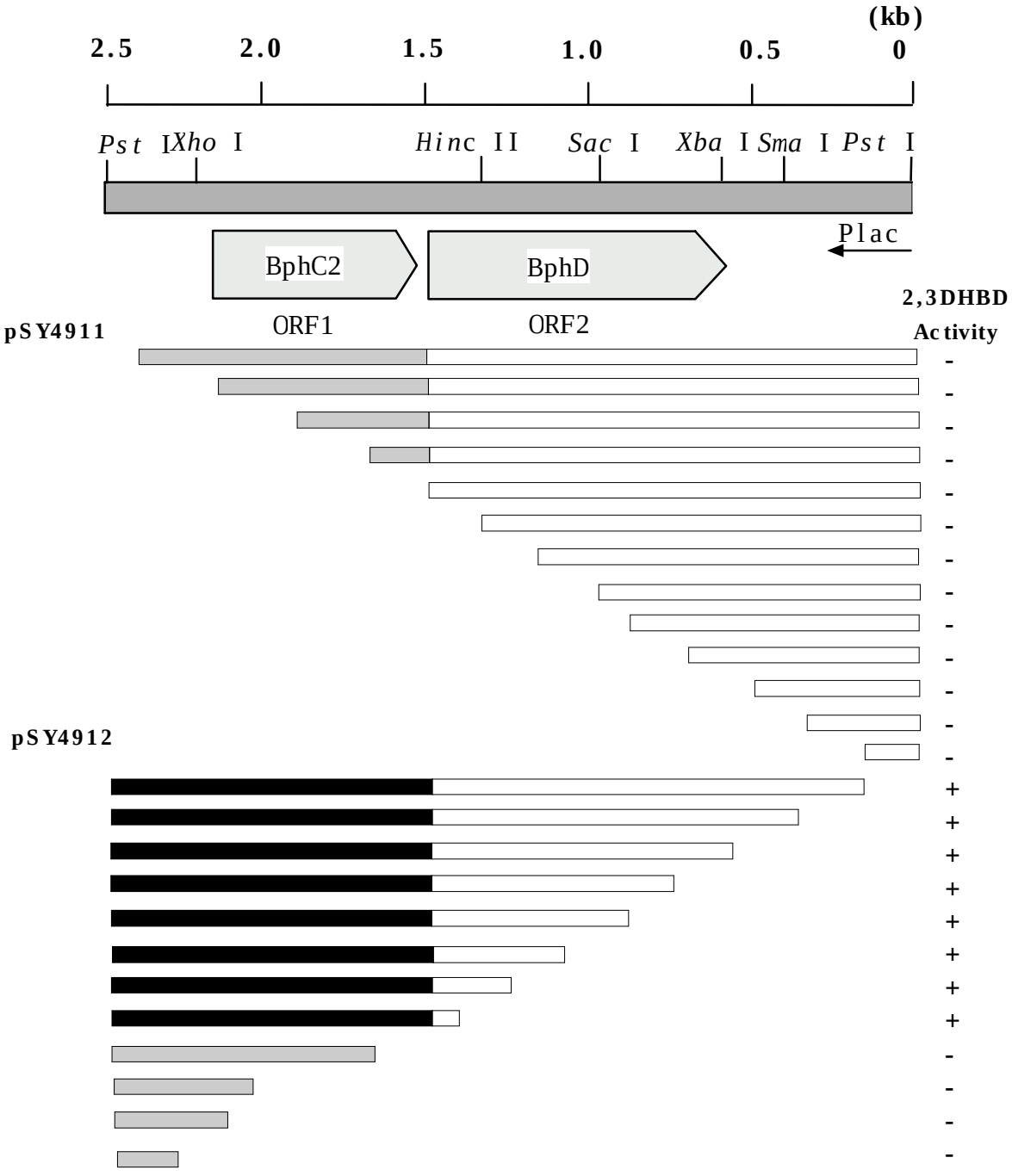
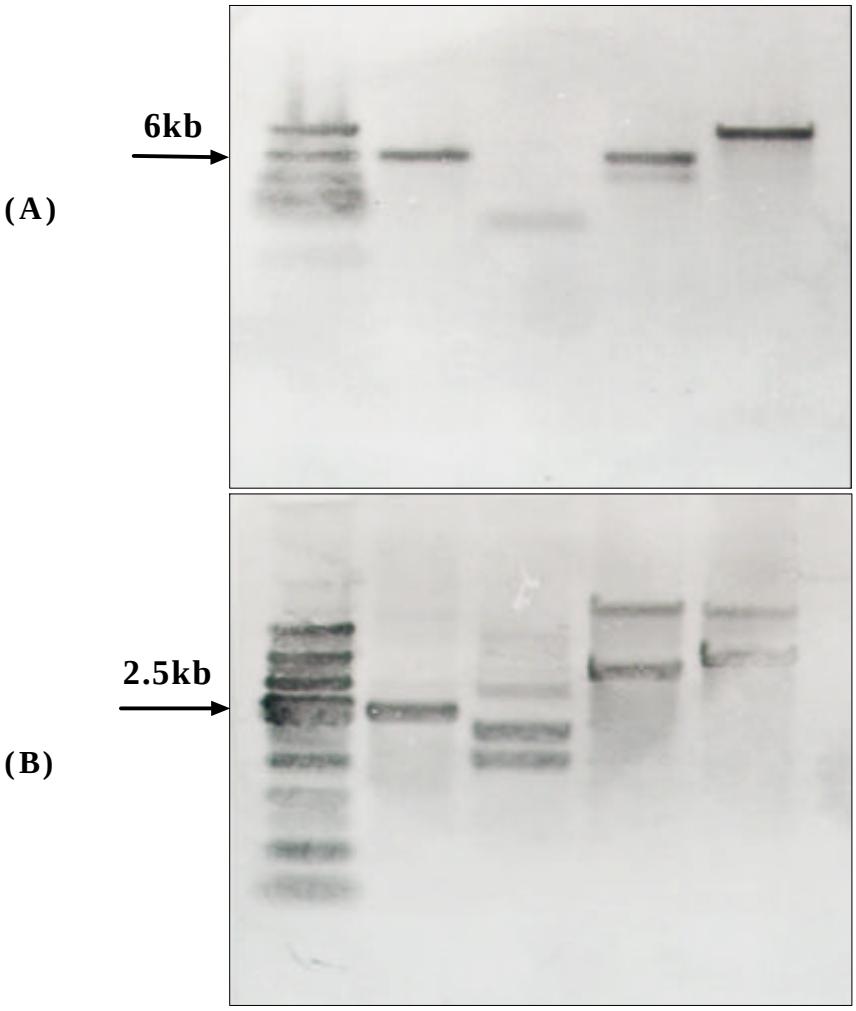


Fig.7-1 pSY4의 제한효소 지도와 2,3DHBD activity와의 관계

균주 DY3으로부터 pSY3과 pSY4의 유래는 Fig.8에서 보여준 hybridization 실험결과에 의해서 두 플라스미드는 확실하게 균주 DY3으로부터 유래되었다는 것을 알 수 있었다.



(A) Lane 1, molecular weight marker(1kb DNA Ladder);
lane 2, 3, 4, 5, chromosomal DNA와 *Pst* I, *Hinc* II, *Sac* I, *Sma* I로 소화된 pSY3. probe : 6kb pSY3.
(B) Lane 1, molecular weight marker(1kb DNA Ladder);
lane 2, 3, 4, 5, Chromosomal DNA와 *Pst* I, *Hinc* II, *Sac* I, *Sma* I로 소화된 pSY4. probe : 2.5kb pSY4.

Fig.8 DY3**으로부터의** total DNA**와** *bphC* genes**와의** hybridization

cloning**결과 균주** DY3**은 두 개의** *bphC***와** 1**개의** *bphD* **유전자를 보유하고 있었다. 유전자지도분석에서** *bphC1***과** *bphC2***는 다르게 나타났으며** DNA **염기서열분석을 한 결과,** *bphC1***은** 298**개의 아미노산으로 암호화된** 897 bases**로 구성되었고** *bphC2***는** 293**개의 아미노산으로 암호화된** 879 bases**로 구성되어 있었다.** *bphD***는** 286**개의 아미노산으로 암호화된** 858bp**로 구성되었다.** *bphC1***은** *Alcaligenes eutrophus* H850**과,** *Rhodococcus rhodochrous***와의 아미노산수준 동질성조사에서 각각** 38%, 45%**의 유사성을 보였다. 그러나,** *bphC2***는 각각** 95%**와** 43%**를 보여주었다.** *bphC1***과** *bphC2***와의 동질성조사에서는 헥산과 아미노산수준에서 각각** 50% and 39%**의 유사성을 나타내었다. 균주** DY3**의** *bphD* **염기배열은** *Alcaligenes eutrophus* H850, *Pseudomonas sp.* KKS102, *Pseudomonas sp.* LB400**과 각각** 92, 92, 79%**의 유사성을 보였다.** *bphC1***과** *bphC2***와의 비교에서는 각각 헥산과 아미노산에서** 50%**와** 39%**의 동질성을 보이고** hybridization**결과 두 유전자는 서로** hybridize**되지 않음으로 인해서 다른 서로 유전자임이 판명되었다.** operon**을 형성하는 그람음성균의** *bph* **유전자는 서로 인접하여 존재한다. 이 연구에서의** *bphC2***와** *bphD***가 서로 인접하여 존재함으로 인해서 이 유전자들의 앞뒤로 완전한** *bph* **유전자군에 존재할 가능성이 높다. 그러나** *bphC1***의 경우는 단독으로 존재하고 다른 유전자와의 동질성조사에서 잘 맞지 않음으로 인해서 외부로부터 유전자가 유입되었을 것이라 추정할 수 있다. 각 유전자의** nucleotide sequences**는** Fig.9, Fig.10**에 나타낸다.**

```
cagctatgaccatgattacgcccagcttgcatgcctgcagccgcagatcgacgaggccat    60
gtacctgatcccgaaaatgttcgtgcaggatgagatcgagcaccacggcgacttcgtcaa   120
gatccccaagcgcccgatccaccccaagccgtaccaggatccgcacccgccgatgtacct   180
ggcttgcaccaacaccgagtcgctgaagaacgccgcggccgtggcatgggcgcgctggtg   240
                                                  ORF1→
ctgggcttcggtgggcctgaggaaatcgccaaggaaggtcgaggtgtaccaccaggccttc   300
gacaatcgtgaagagcgcaaccaggtcggtttccgcccgaaccgccacatcgccgcgctg   360
tgcccggccatcgtgttggatgacaacgaaaccgcgcgccgtatcggtattcgtggccag   420
cgctacttcatggagtcgctgggctactggtacggcggcggcgagcgtccggatccgcag   480
aagtggaaaagatgacacctacgtcgatggcaatggccaggcggtgatcaagtcgcgcttc   540
gcctccgaggaagtgagcgtggacttctccgacccgaccatggcgatgatgaaccccaac   600
catgcctacggcaccgtcgaggactgcatcggctacgtgcaacgcctgatcgatgccggc   660
gccgacgagatcctgttcatctgccagatgggcaccgtgccgcagtgggctcagctggag   720
accttgcgcaacatcggcgagaaagtcatcccgcatttccgcaacaagcagtaagcccat   780
                                                  *
cgggggggctgcaacgcagccccatttccgggatcgcgtgtatgcaccggctttgccggtg   840
tgcgcgggtgaacccgcgaagcattcgccacggagcaaggccgttgctcctggcggtatc   900
acgcggcctcagggccggtagtcctattggacgatgccgccaaccccctgactggcttga   960
atacgccaagtacaaaaacgaggagatcgtgcatggatatccgtggcctgggttacgtca  1020
                    ORF2 bphC1→ M  D  I  R  G  L  G  Y  V  T
ccgtacgttccagcgacctggcgcaatggcgtcactacgccagccaagtgctgggcatga  1080
```

Fig.9 bphC1**의 헥산과 아미노산 염기서열배열**

Stop codons는 *로 표시하고 밝혀지지 않은 sequences는 점으로 표시.

```
  V  R  S  S  D  L  A  Q  W  R  H  Y  A  S  Q  V  L  G  M  M
tggtggtcgaggacgagagcggcgagcgtctgttcctgaagatggacgagcgcccctatc 1140
  V  V  E  D  E  S  G  E  R  L  F  L  K  M  D  E  R  P  Y  R
gcatcctggtgcagcacagcgcccaggatggtttcggcgccctgtggctggaaagtggccg 1200
  I  L  V  Q  H  S  A  Q  D  G  F  G  A  C  G  W  K  V  A  G
gccaggccgccttcgaccaggccgtggccgagctgcacgcccgccggcgtggcggtggagc 1260
  Q  A  A  F  D  Q  A  V  A  E  L  H  A  A  G  V  A  V  E  Q
aggcagcgctgagcaagccgcgctgcgccaggtccaggcgctggcgttgttcgccgacc 1320
  G  S  A  E  Q  A  A  L  R  Q  V  Q  A  L  A  L  F  A  D  P
ccgatggcaatcgccacgagctgtactggggcccgcgccaggacttcgcccgcttcgtct 1380
  D  G  N  R  H  E  L  Y  W  G  P  R  Q  D  F  A  R  F  V  S
ccccggtgggcgtgcgcgcggtttcgtcagcgacgggctgggcatgggccatgtggtcctgc 1440
  P  V  G  V  R  G  F  V  S  D  G  L  G  M  G  H  V  V  L  P
cggcaccgaccttcgatcgctgccgcgatttctatgagcaggtgatgggctttggcctgt 1500
  A  P  T  F  D  R  C  R  D  F  Y  E  Q  V  M  G  F  G  L  S
cggacctgatgaaagtgcgcttcaccccggacctgccgagccggaaaaacgtatccact 1560
  D  L  M  K  V  R  F  T  P  D  P  A  E  P  E  K  R  I  H  F
tcatgcactgcaacaacggccgtcaccactcgctggcgatcttcgaatgcccggtgccca 1620
  M  H  C  N  N  G  R  H  H  S  L  A  I  F  E  C  P  V  P  S
gcggctgcgtgcacatgatggtcgaggtccgcgggcctggaggacgtgggtcgcgccctgg 1680
  G  C  V  H  M  M  V  E  V  A  G  L  E  D  V  G  R  A  L  D
accgtatgcacgccaacggcgtgaagctctccgcgaccctgggccagcacaccaacgacc 1740
  R  M  H  A  N  G  V  K  L  S  A  T  L  G  Q  H  T  N  D  Q
agatgatctccttctacatgaagaccccgtccggtttcgacctggagtacggctgcgacg 1800
  M  I  S  F  Y  M  K  T  P  S  G  F  D  L  E  Y  G  C  D  G
gcctggtggtcgactggagccgccacaccccgttcgaaagcacggtggtcagccagtggg 1860
  L  V  V  D  W  S  R  H  T  P  F  E  S  T  V  V  S  Q  W  G
gccacgacttcagcgtcggccgccaatgaggacaacacccatggataaacagatgaccac 1920
  H  D  F  S  V  G  R  Q  *
ggccgagatggtcgcccagctgcgcgacggcatgaccctcggcatcggcggctgggggccc 1980
gcgccgcaagcccatggcgctggtgcgcgagatcctgcgctcggacctcaaggacctgac 2040
catcgtcgcctacggcggtgccgacgtcggcctgctgtgcgccgccggcaaggtaaagaa 2100
actggtgttcgccttcgtctccctcgacttcatcccgctcgagccgtacttccgcaaggc 2160
gcgtcaggaaggtgccatcgaggtgatggaaatcgacgaaggcatgctgctgctgggggct 2220
gcgcgccgccgccatgaatgtgccgttcatccccaccgcggtgggcctgggcaccgacgt 2280
gctgcgccacaaccccgacatcaagctgatcgcctcgccctacgccgatggccgtgactg 2340
                                                    ORF3→
ggtcgcgatgcccgcgctcaagctcgacgccgccctggtgcacgtggatcgcgccgatgc 2400
gcgcggtgtgtgccagatcgctggccccgaccactatatggatgacctgttcgtgcgggc 2460
cgcggcgcgcacctacgtcacctgtgacgaactggtcgacagtgcgtggttccacgcgga 2520
gccggcgcgtgcgcatcaggtgttctgggagcgcaacctgaccaccgccgtggcccatgt 2580
                                  *                 ORF4→
gcccggtggcgcgcaccctcgtcctgcgcgccgctgtatggcttcgacgtgccgcacttt 2640
caaggcctacgccgcctcggcgcagagcgaagagggctggcaggactatgtcgatcagta 2700
cgtggcctgttcccactcccagtacctggagcgttgcgggggccttgaggccatccgtcg 2760
aagcccgagcta.............ccgccgggtgttcgtcgagggcgagtgcgacgtgg 4020
tcgcctcggtgggttacaacccgagcgcctggcccgtggctggtcgctggatgacatcg 4080
acatccgcctgatcgtcactgacctgtgcgtgctcgacttcctcgggccccagcaccagg 4140
        *
```

Fig.9 - to be continued

tgcgcgtgcgctcgctgcatccgggtgtgagcctggacgaggtgcgcgacaacacaggct 4200
ttgccctgcatgtgcctgagcactgcccggtgaccaccgcgccgaccgaggcgcagttgc 4260
agctgatccagcgactggacccgcacaacctgcgcgccagccagctcaaggacaacccac 4320
cgggccagcgcccagcgcgctgacagcccgttccagccaaccgccttgccggagtgcagt 4380
aatgagcgagcaaaacaataaagaggccgatgaggtggtgctgtacgaagtgcgggacgg 4440
ORF5→
ggtagccctggtcaccatgaaccgccccgagtaccacaacgcccagaactcgcggatgac 4500
ctatgccctggatgcggccttcgcccgtgcgtgcgccgatgacgaggtcaaggtcatcgt 4560
cctgcgcgggggctggcaagcatttctccgccgggcacgacatcggcacgccagggcgtga 4620
cgtaaaccagagtttcgagcgcgtgagcctgtggtacgaccacgtcgacaagcctggggg 4680
cgagttcctctatgcccgcgagcaggaggtgtacctgggcatgtgccggcgctggcgcga 4740
catgcccaagccgaccatcgccatggtccagggcgcctgcatcgccggtggcctgatgct 4800
ggcctgggtgtgcgatttgatcgtggccagcgacgatgcgtacttccgcgacccggtggt 4860
gcgcatggggattccgggggtggagtacttcgcccacgtgcatgagctcaatccgcgtat 4920
cgccaaggagtttctcttcctcggcgcgccgatgccggcggcgcgtgcctaccagatggg 4980
catgctcaaccgcgtggtgccccgcgagcagctggaacaggaaaccttggccatggccgg 5040
gcagatcgcccagatcccgcgcctgggcctgcaactgagcaaacaggcggtgaacaacgc 5100
cgaagacctgatgggcaagcgctcgaccatggacatggtgttcggcctgcaccacttcgg 5160
cccacgctcacaacgagttggtgtccggcgatcgcctgggcggctacgacgccaaggcca 5220
tggccagctcccagcgcgaaccggggagggcgtgagcatggccgtgtcgctcgatacccg 5280
cctgaccgcgttgctcggttgccgttacccgatcatccagaccgccatgggctgggtcgc 5340
cgacccgcgcctggtggccgccacctgcaacgccgggggcttcggcttttggccggggc 5400
gaccatcgagccgcgccagatggaagcggcgatcctcgaaaccaagcgcctgaccgaccg 5460
cccgttcggggtcaacttccacatgtaccaggccaacgccgaagagatcgtcgagctggt 5520
ggtgcgccaccaggtgcgcgcggtcagctacagccgctcgcccggtaaacagatgatcgc 5580
ccggctcaaggacgccggggtggtctgcatgccccccgtgggcgcgctgaagcacgcgca 5640
gaaggccgtggaaatgggcgctgacgtggtgaccgtgcagggcggcgagggcggtggcca 5700
caccggtccggtgcccaccgccatgctgctgggccaggtgctcgacgcggtgcaggtgcc 5760
ggtggtggccgcaggtggcttcaaggatgcccgggtttggtgtcggccctggcccagggc 5820
gcctatggcatgggcgccagccagctcaaggacaacccggtgccccaggccaccctggcg 5880
cgctacctggcggtcctttagattgatttaaaacttccttttaagaagatggacgagcg 5940
*
ccctatcgcatcatggtacagcacagcgcccagaatggtttcggcgcctgtggctggaa 6000
gcg 6003

Fig.9 - to be continued

```
cctgcagctttcataaccaaggagaagacatgagcatcgaacgtttggctaccctcggct   60
                ORF1  bphC2→  M  S  I  E  R  L  G  Y  L  G  F
tcgccgtccaggatgtacccgccttgggaccaatttctgaccaagagcgtggtttgatgg   120
  A  V  Q  D  V  P  A  W  D  Q  F  L  T  K  S  V  G  L  M  A
cttcggttcggctggcgacgcttcgctgtaccgggccgatcagcgtgcttggcgcatcg   180
  S  G  S  A  G  D  A  S  L  Y  R  A  D  Q  R  A  W  R  I  A
ccgtgcagccggcgaactcgacgaccttggcctacgcaggcttggaagtggatggcgccg   240
  V  Q  P  G  E  L  D  D  L  A  Y  A  G  L  E  V  D  G  A  A
ccgcgctcgagcgcatggccgacaagctgcgccaggcaggggtggccttcaccgcggtg   300
  A  L  E  R  M  A  D  K  L  R  Q  A  G  V  A  F  T  R  G  D
acgaagcgctcatgcagcatcgcaaagtcatggcctgttgtgcctgcaagacccgtacg   360
  E  A  L  M  Q  H  R  K  V  M  G  L  L  C  L  Q  D  P  Y  G
gtctgtcgcttgagatttactacggcccggcagaaaccttcgaccagccccttcctgccca   420
  L  S  L  E  I  Y  Y  G  P  A  E  T  F  D  Q  P  F  L  P  S
gcgctcccgtgtcggggcttcgtcacggggcgaccaggggcatcgggcatttcgtgcgctgcg   480
  A  P  V  S  G  F  V  T  G  D  Q  G  I  G  H  F  V  R  C  V
tcccccgacaccgccaaggcgatggagttctacaccgaaggtgctggctttgtgctgtccg   540
  P  D  T  A  K  A  M  E  F  Y  T  E  V  L  G  F  V  L  S  D
acatcatcgacatccagatgggggccggaaatgagcgtgcccgcgcacttcctgcactgca   600
  I  I  D  I  Q  M  G  P  E  M  S  V  P  A  H  F  L  H  C  N
atgggcgccaccacacgatcgcccctggctgccttcccaatcccccaagcgcatcccaccatt   660
  G  R  H  H  T  I  A  L  A  A  F  P  I  P  K  R  I  H  H  F
tcatgctgcaagccaacaccatcgatgacgtgggctatgccttcgatcggctggacgcgg   720
  M  L  Q  A  N  T  I  D  D  V  G  Y  A  F  D  R  L  D  A  A
ccgggcgcatcacttccctgctcgggcgtcacaccaacgaccatacgatctccttctatg   780
  G  R  I  T  S  L  L  G  R  H  T  N  D  H  T  I  S  F  Y  A
ccgacacgccgtcgcccatgatcgaagtcgagttcggctgggagccgcgcacggtggatt   840
  D  T  P  S  P  M  I  E  V  E  F  G  W  G  P  R  T  V  D  S
cctcctggacggtggtgcgccacaaccgcaccgccatgtggggtcacaagtcggtacgcg   900
  S  W  T  V  V  R  H  N  R  T  A  M  W  G  H  K  S  V  R  G
gccagcgctgagccgcgtcattcatctagtttttcaggaaattcccatgtcaggaactca   960
  Q  R  *                        ORF2  bphD→  M  S  E  L  N
acgaaagcacgacgagcaaattcgtcaccatcaacgaaaaaggcctctccaacttcgca   1020
  E  S  T  T  S  K  F  V  T  I  N  E  K  G  L  S  N  F  R  I
ttcacctcaacgatgcaggcgaggcgaaggtaatcatgctgcacggaggcggaccgg   1080
  H  L  N  D  A  G  E  G  E  A  V  I  M  L  H  G  G  G  P  G
gaggcggggggtggagcaactactaccgcaacatcggccccttcgtcaaggccggttacc   1140
  A  G  G  W  S  N  Y  Y  R  N  I  G  P  F  V  K  A  G  Y  R
gcgtgatccttcaggacgccgccgggcttcaacaagtccgacaccgtcgtgatggacgagc   1200
  V  I  L  Q  D  A  P  G  F  N  K  S  D  T  V  V  M  D  E  Q
agcgcggcttagtcaacgcgcgctcggtcaaaggatgatggatgtactggcgcatcgaaa   1260
  R  G  L  V  N  A  R  S  V  K  G  M  M  D  V  L  G  I  E  K
aagcgcacctcgtggaaattccatggtggcgcaggcgcgctgaacttttgctcttgaat   1320
  A  H  L  V  G  N  S  M  G  G  A  G  A  L  N  F  A  L  E  Y
acccggagcgcaccggcaagctcatcctcatggggccggcggattggcaacagcctgt   1380
  P  E  R  T  G  K  L  I  L  M  G  P  G  G  L  G  N  S  L  F
tcactgcgatgcccatggaaggaatcaagctgctgtttaagctctacgccgagcttcgc   1440
  T  A  M  P  M  E  G  I  K  L  L  F  K  L  Y  A  E  P  S  L
tcgacacgctcaagcagatgctcaacgtcttcctgttcgaccagagcctgatcaccgacg   1500
  D  T  L  K  Q  M  L  N  V  F  L  F  D  Q  S  L  I  T  D  E
```

Fig.10 *bphC2*와 *bphD*의 헥산과 아미노산 서열.

Stop codons는 *로 표시.

```
aactggtgcaaggacgctgggccaacatccagcgcaaccccgagcacctgaagaacttcc  1560
  L  V  Q  G  R  W  A  N  I  Q  R  N  P  E  H  L  K  N  F  L
tcttgagctcgcaaaagttgccactttcgtcctgggacgtgtcgccgcgcatgggcgaga  1620
  L  S  S  Q  K  L  P  L  S  S  W  D  V  S  P  R  M  G  E  I
ttaaggccaagacgctcgtcacctgggggcgtgacgaccgcttcgtgccgctggaccacg  1680
  K  A  K  T  L  V  T  W  G  R  D  D  R  F  V  P  L  D  H  G
gcctcaagctggtcgcgaacatgccggatgcgcagttgcacgtcttcccgcgctgtggtc  1740
  L  K  L  V  A  N  M  P  D  A  Q  L  H  V  F  P  R  C  G  H
actgggcgcaatgggagcatgcggacgccttcaatcggctgacgctggacttcctagcca  1800
  W  A  Q  W  E  H  A  D  A  F  N  R  L  T  L  D  F  L  A  N
acggctgagcccccatttccttttttccgcacggaagcaaatctgttggccgctttcccg  1860
  G  *
caagggaaatgggccgctgctttgctctagaaaagttagatagtccatttaacagaacat  1920
aaggagacaacccgtgaaacgcttttccgcaccctgcttccgttggtctgcgccgcagt  1980
ggtcagcaacgcccacgcacaaacagcaccgagcgcaccaacttcgccctggtcactggc  2040
gctgggcgctgtgaactttaacttcaacaccaaggccgacctgtatgccggcgggcccgt  2100
cccgggggctggcgtaaacgccagcgacgacaccgtactaggcctggaaatcgcttattc  2160
ccttaaccccaactggacggccaggctggacatcggcacgcccgtcaagacagacctgtc  2220
cggcactggcaacctcgggacttgggggcgtctcggtggcgtaaaaggtgggccggcaat  2280
tctgacactcagctactcgccgggcatgtgggggccctatccgcccattcttcggcggcgg  2340
tataagctacctcaaggtattcagcaccagcgagggcgcactgcaaaacctcaaggtgga  2400
caacaactttggcggcgccttcatcgtcggtgccgactggcctttggctgacggctacag  2460
cctctccttcacgctgca                                             2478
```

Fig.10 - to be continued.

바. Cptimum temperature, pH and concentration

DY3의 최적 온도 결정은 Fig.11에 나타난바와 같이 ring-cleavage compounds를 0.1% 기질로 하여 30℃, 35℃, 40℃, 50℃에서 배양한 결과 35℃에서 60시간이 지난 후 가장 좋은 성장을 보였으며 stationary phase로 접어들었다. 기질 농도를 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, 5%로 하여 최적 기질농도를 측정하기 위해서 enzyme activity를 측정한 결과 0.3%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었고 그 결과를 Fig.12에 나타냈다. 이로서 최적 기질 농도는 0.3%으로 결정되었다. 또한 최적 pH 결정을 위해 pH3부터 pH12까지 실험을 하였다. 실험 결과는 Fig.13에 나타내었으며, 최적 pH는 8.5와 9로 나타났다. 이는 약알칼리성의 배지에서 효소의 활성이 극대화되고 방향족 화합물을 분해할 때 약알칼리성일 때 분해 효율이 최대가 될 것임을 시사한다.

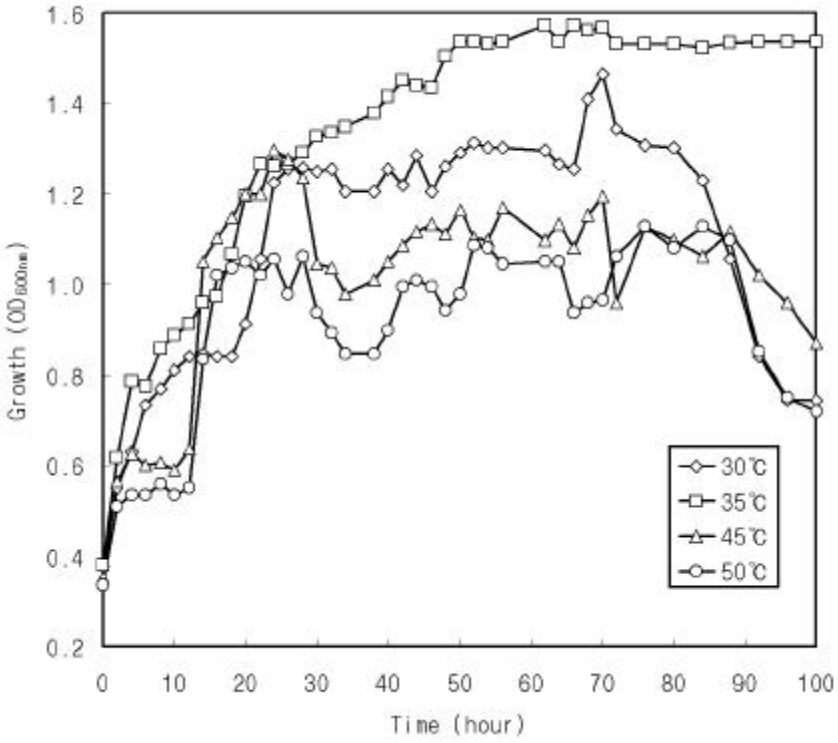


Fig.11 Growth of DY3 in carbon-minimal medium

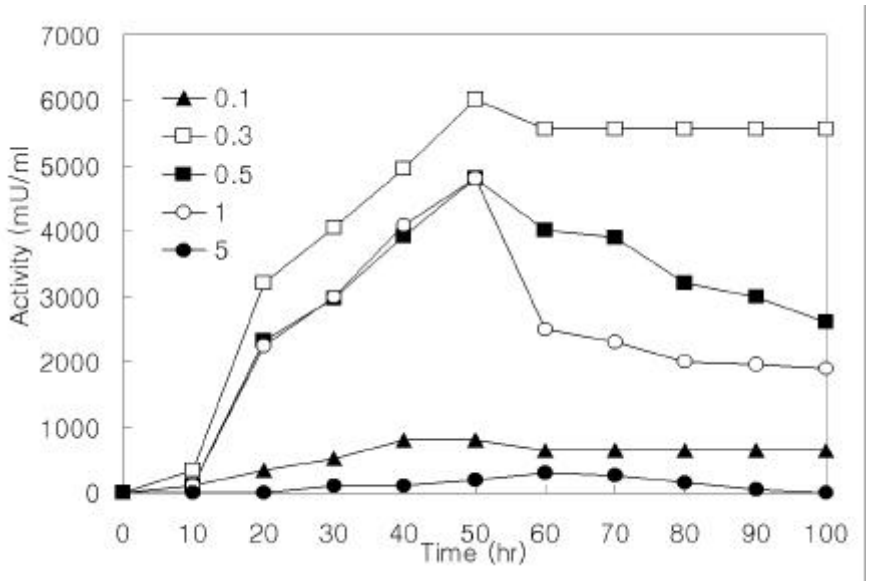


Fig.12 Enzyme Activity of DY3 at 35℃

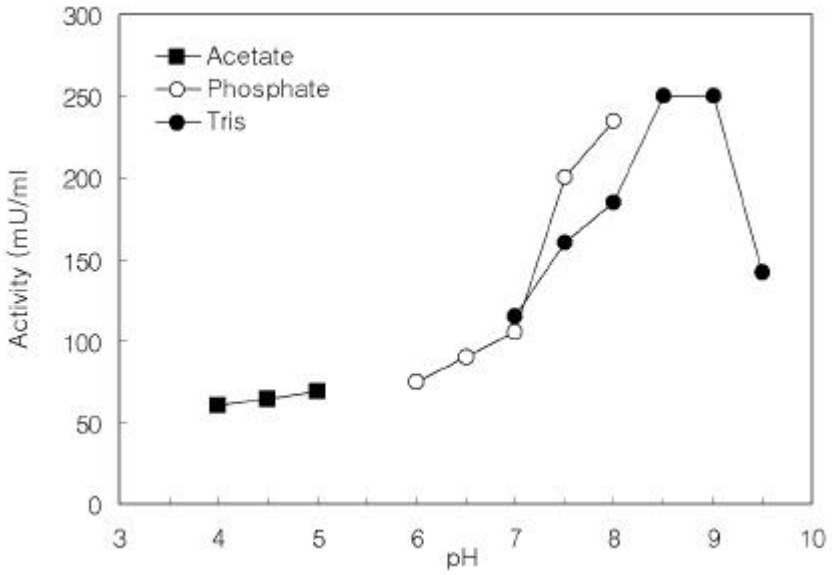


Fig.13 Effect of pH on 23DHBD Activity

제4절 우량균주들의 토양 내 활성 및 생존성의 증진

1. 연구수행방법

가. 각종 media를 이용한 균의 혼합저장

멸균한 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 혼합저장매체로 사용하여 LB액체배지에 24시간 배양한 균주 DY3(CFU 1.83×10ℓ()을 일정한 비율(10㎖ 배양액/g media)로 혼합한다. 또한 냉동저장시 균의 사멸을 최소화하기 위해서 글리세롤(배양액 : 글리세롤 = 650 : 350)을 주입 후 -75℃, -20℃, 4℃, 실온(약 20℃)에서 각각 균을 저장한다. 혼합 저장한 균의 일정기간이 지난 후 생존율 및 성장성은 저장한 균의 양에 따라 LB 액체배지의 양(㎖ 배양균/100 ㎖ 배지)을 조절하여 37℃에서 6시간(이 시간은 DY3의 성장곡선중 대수증식기의 초기에 해당하는 시간임.) 배양 후 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 600㎚에서 OD를 측정하고, LB평판배지에 도말해서 24시간 배양하여 CFU를 조사하는 방법을 사용한다. 또한, OD(((m과 CFU의 상호관계를 도식화하여 OD의 측정만으로 CFU값을 대신할 수 있는지를 알아보았다.

나. 토양중의 균수측정

밭 토양을 채취하여 미생물의 성장에 필요한 충분한 영양분을 공급하기 위해 비료(돈분 51%, 수피 15%, 목분 34%)를 주입 후 12mesh 체(1.32 ㎜ : Newark, New Jersey)로 체분리를 실시하여 토양의 입자분포가 고르게 한다. 체분리를 실시한 토양을 5개의 용기에 약 7.2 ㎏정도씩 주입한 후 대조실험을 위하여 2개 용기내의 토양을 autoclave를 사용하여 120℃에서 15분간 3회 반복 멸균을 실시한다. 탄소원의 주입방법은 ethanol 1ℓ에 ring- cleavage compounds(6.050 g)를 녹인 혼합액 150㎖를 용기의 표면에 분무하는 방법과 5g의 ring-cleavage compounds를 일정량의 토양과 혼합한 후 이 혼합토양을 용기에 주입하는 방법을 사용한다. 탄소원은 5개의 용기 모두에 주입한다. DY3의 주입은 LB액체배지에 16시간 배양한 배양액(3.91×109 CFU/㎖) 150㎖를 대조실험을 위한 용기를 제외한 나머지 3개의 용기에 주입하는 방법을 사용한다. 균과 탄소원을 주입 후 약 20℃의 온도가 유지되는 실내에 4개의 용기를 두고 나머지 1개는 실외에 보관하였다. 실험을 위한 5개 용기의 조건을 Table 9에 종합적으로 나타내었다.

Table 9. 실험토양조건

No.	Sterilization of soil a)	Injection of strain b)	Injection of carbon source	Storage condition of soil
1	Yes	No	Yes	indoor
2	No	No	Yes	indoor
3	Yes	Yes	Yes	indoor
4	No	Yes	Yes	indoor
5	No	Yes	Yes	outdoor

a) : 120℃에서 15분간 3번 멸균한 토양.

b) : 균주 DY3

각각의 용기에서 토양을 원추사분법에 의하여 채취한 후 멸균수를 사용하여 단계희석을 실시한다. 토양중의 미생물 colony수는 단계희석수를 LB평판배지(LB-plate medium : Trypton 10 g/ℓ, Yeast Extract 5 g/ℓ, NaCl 10 g/ℓ, Agar 1.5%(w/v), pH 7.0)상에 도말 접종하여 37℃에서 24시간 배양을 실시한 후 CFU(Colony Forming Units)를 구하는 방법을 사용하여 결정한다. 배지상의 colony중 *meta*-ring cleavage 균의 분리는 *meta*-ring cleavage 균의 colony가 0.1M catechol(catechol 0.55 g, acetone 50 ㎖)과 반응하여 선명한 노란색으로 변한다는 성질을 이용한다.

2. 연구수행 내용 및 평가

가. 각종 media를 이용한 균의 혼합저장 후 균의 성장

저장매체로 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 사용하여 혼합 저장한 균과 혼합저장을 실시하지 않은 균을 -75℃, -20℃, 4℃, 실온(약 20℃)에 저장한 후 일정기간이 경과 후 균을 37℃에서 6시간 배양하여 각각의 OD(((m와 CFU 결과측정 결과를 각각 Fig.14-Fig.17과 Fig.18-Fig.21에 나타내었다. 모든 저장 균에 대하여 균의 성장은 -75℃에서 가장 좋은 값을 나타냈으며, 실온에 저장한 균은 15일 이후부터 성장이 거의 없었으며, 4℃에 저장한 균은 저장기간이 경과할수록 균의 성장이 현저하게 감소하는 추이를 보였다.

CFU의 측정결과에서는 저장매체별로 -75℃와 -20℃에서 거의 같은 결과를 나타냈지만, -75℃의 값이 약간 높은 값을 나타냈었다. 4℃에 저장한 균은 균의 성장 실험 결과와 마찬가지로 시간의 경과에 따라 현저하게 감소하였다. 그러나, 실온에 저장한 균의 CFU는 균의 성장은 15일 이후부터 거의 성장을 보이지 않은 반면 혼합저장을 실시하지 않은 control실험을 제외한 나머지 혼합 저장한 균은 초기에는 균의 성장에 비하여 상대적으로 높은 값을 나타내다 점차적으로 감소하였다.

이 결과에서 일정기간동안 다양한 온도에 저장한 균의 성장과 CFU 값은 저장온도에 큰 영향을 받음을 알 수 있었다.

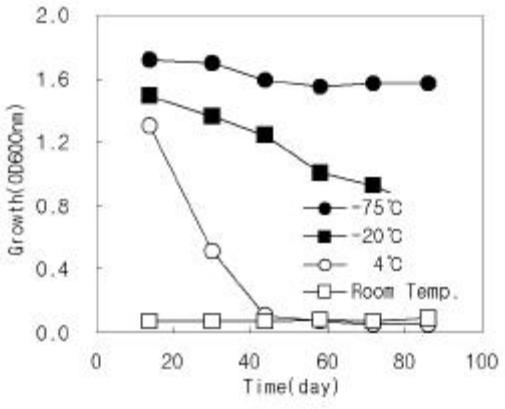


Fig.14 톱밥 고정균주의 성장

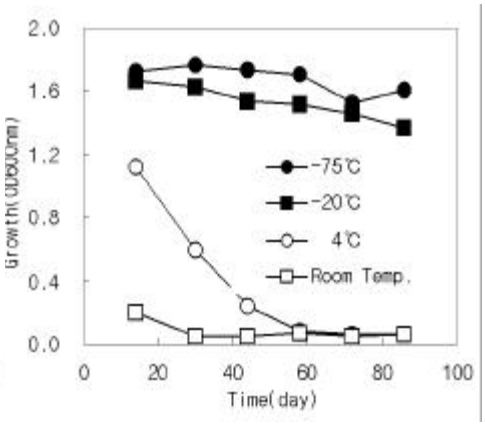


Fig.15 쌀겨 고정균주의 성장

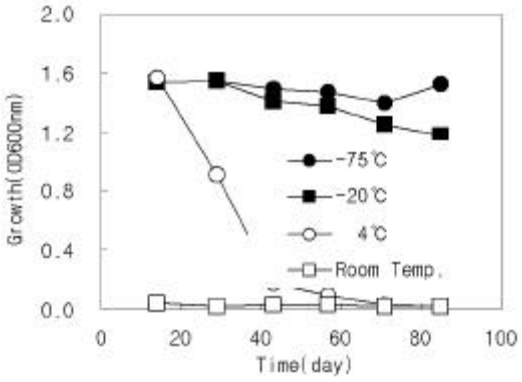


Fig.16 활성탄 고정균주의 성장

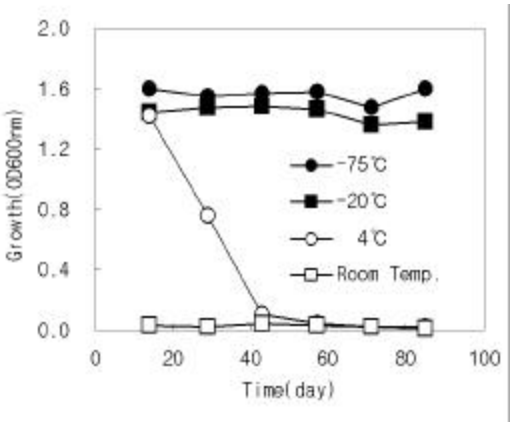


Fig.17 비고정균주의 성장

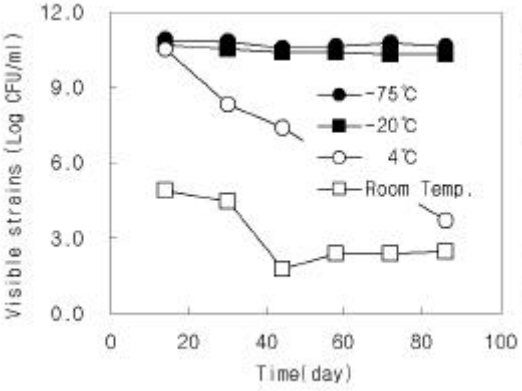


Fig.18 톱밥 고정균주의 CFU변화

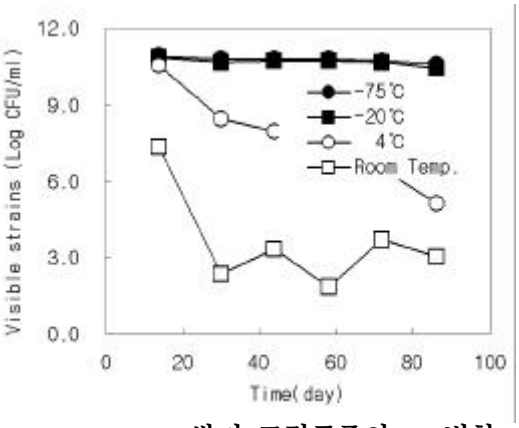


Fig.19 쌀겨 고정균주의 CFU변화

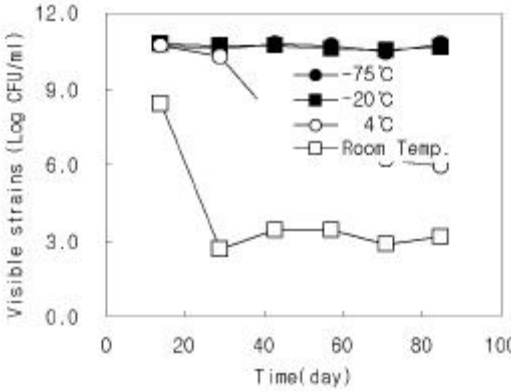


Fig.20 활성탄 고정균주의 CFU변화

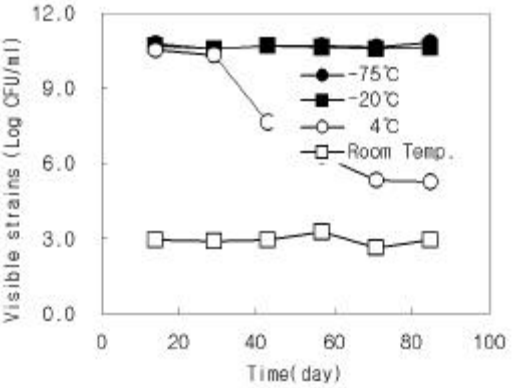


Fig.21 비고정균주의 CFU변화

나. 저장 온도에 따른 균의 성장

각종 매체를 이용한 혼합저장균의 온도에 따른 성장은 가장 낮은 저장온도인 -75℃에서는 저장매체에 관계없이 거의 비슷한 결과를 나타내며, 조금씩 감소한다. 미미한 차이지만 -75℃에서는 가장 효율적인 저장매체는 쌀겨였다(Fig.22). -20℃에서의 결과는 또한 -75℃와 마찬가지로 거의 비슷한 결과를 나타내며, 쌀겨가 가장 좋은 성능을 나타냈었다. 그러나, -20℃에서 톱밥의 경우는 다른 균에 비하여 시간이 경과될수록 급격하게 감소하는 경향을 보였다(Fig.23). 영상의 온도인 4℃에서는 15일정도 소요된 초기에는 만족스러운 결과를 얻을 수 있었으나 시간에 경과함에 따라 현저하게 감소하는 추이를 보였다(Fig.24). 이는 4℃에서 균의 저장은 다량의 균을 저장하여 15일 이전에 사용한다면 경제적인 측면에서 -75℃나 -20℃보다 더 효율적인 저장온도임을 의미한다. 실온에서는 모든 매체에 대하여 초기부터 낮은 성장을 나타내어 균의 저장에 부적합한 온도임을 알 수 있었다(Fig.25).

저장온도에 따른 CFU의 측정결과는 성장과 마찬가지로 -75℃와 -20℃에서는 오랜 기간동안 비슷한 결과를 유지하고, 4℃에서는 계속적인 감소를 실온에서는 현저한 감소 후 60일 정도에서는 거의 평형을 유지하였다(Fig.26 Fig.29).

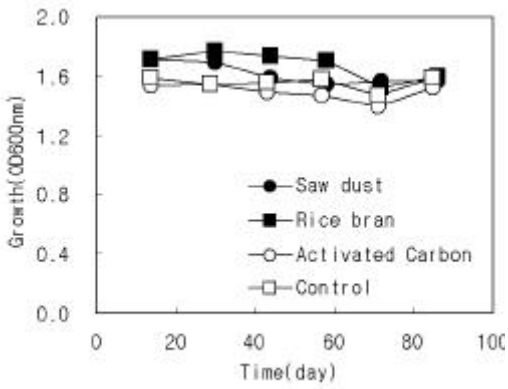


Fig.22 -75℃에서 고정화균 성장

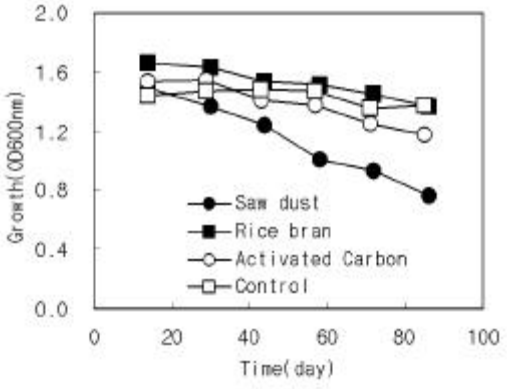


Fig.23 -20℃에서 고정화균 성장

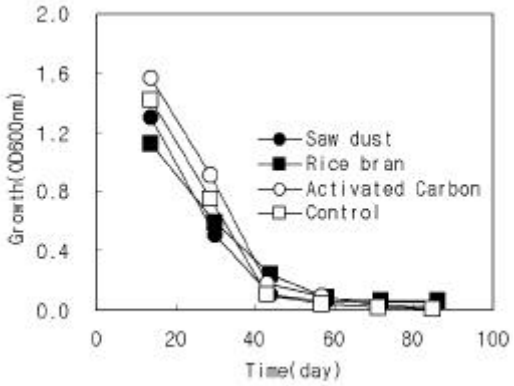


Fig.24 4℃에서 고정화균 성장

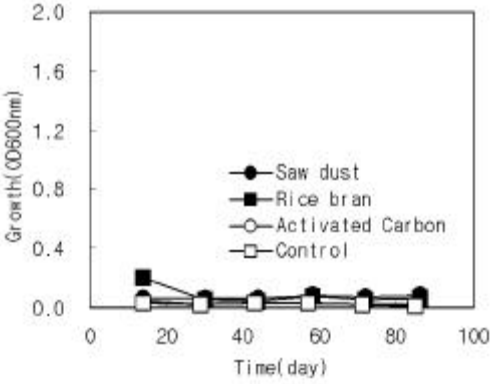


Fig.25 실온에서 고정화균 성장

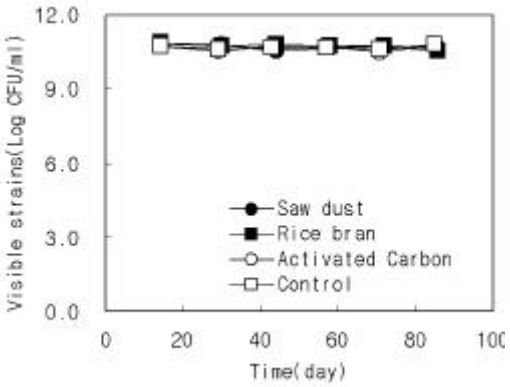


Fig.26 -75℃에서 고정화균 CFU변화

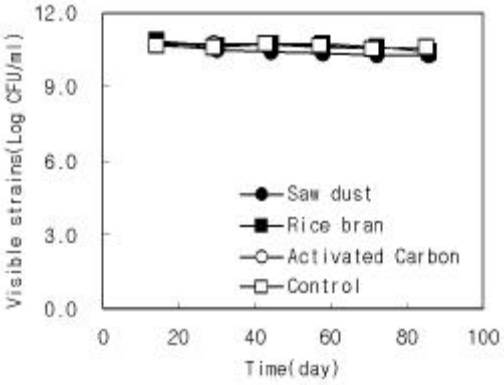


Fig.27 -20℃에서 고정화균 CFU변화

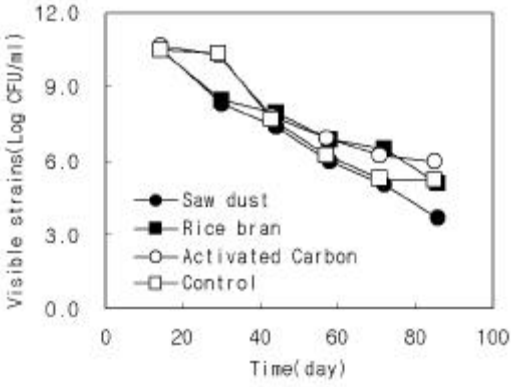


Fig.28 4℃에서 고정화균 CFU변화

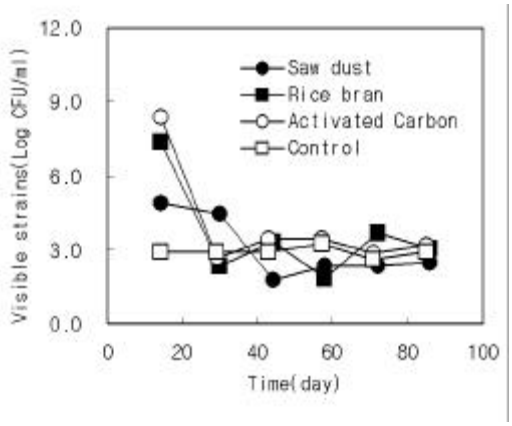


Fig.29 실온에서 고정화균 CFU변화

다. 토양중의 균수측정

멸균을 실시한 토양과 멸균을 실시하지 않은 토양에서의 미생물의 개체수를 비교해보면 상대적으로 멸균을 실시한 토양에서 미생물의 개체수가 적은데, 이는 토양을 멸균함으로 해서 아직까지 명확하게 밝혀지지 않은 토양의 생명체 보존역할을 위한 몇 가지 인자의 특성이 변화되었기 때문으로 사료된다. 따라서, 멸균을 실시한 토양은 오랜 기간이 지나도 미생물의 성장에는 부적합한 환경이었으며, 대기중의 균이 유입되더라도 오랜 기간동안의 지속적인 생존은 확인할 수 없었다. 대기 중에서 유입되는 균은 상대적으로 *meta*-ring cleavage 균이 많이 유입되었으나, 다른 유입균과 마찬가지로 오랜 기간동안은 생존하지 못했다(Fig.30, Fig.32). 유입되는 균 중 *meta*-ring cleavage 균이 상대적으로 우점종을 차지하는 것은 주입한 탄소원의 영향에 의한 것이라 생각된다. 이와 같은 결과를 통해 인위적으로 멸균한 토양에서는 오랜 기간이 지나도 미생물 생태계의 회복이 잘 일어나지 않음을 알 수 있었다.

멸균을 실시한 토양을 제외한 나머지 3개의 토양 중에는 전체균 중 약 8.7%의 균이 *meta*-ring cleavage 균임을 알 수 있었다(Fig.30, Fig.33, Fig.34). 또한, 토양 중 전체균의 증가에 따라 *meta*-ring cleavage 균도 증가하였으며, ring-cleavage 균주 DY3의 주입은 토양 내 미생물의 환경에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 초기 균의 개체수 감소는 ring-cleavage compounds의 용매로 사용한 alcohol의 멸균효과에 기인하는 것으로 생각된다.

실외에 보관된 토양중의 미생물 개체수는 실내에 보관된 토양중의 개체수보다 평균 1.77×10^{7} CFU/g soil 정도 많았으며 *meta*-ring cleavage 균도 평균 2.55×10^{6} CFU/g soil 정도 많이 존재함을 알 수 있었다(Fig.35, Fig.36). 또한, 오랜 기간이 지나면 실내에 보관된 토양중의 미생물 개체수는 감소하는 반면 실외에 보관된 토양에서는 점차적으로 증가하였다. 미생물의 성장은 일반적으로 최적온도에서 온도가 증가하면 단백질로 구성된 효소의 변성에 의해 성장이 둔화되고, 온도가 감소되면 효소의 활성이 낮아져 성장이 감소한다. 토양 내에서 미생물의 성장은 대략적으로 20℃ 25℃에서 활발한 성장을 보이며, 수분의 영향을 많이 받는다. 따라서, 본 실험에서는 실내에 보관한 토양의 온도가 20℃를 유지하도록 하였으며, 수분함량을 유지하기 위해서 주기적으로 수분을 토양에 분무하였다. 그러나, 토양중의 미생물은 대기중의 온도가 영하까지 내려가는 겨울임에도 불구하고 20℃의 온도가 유지되는 실내의 토양보다 실외의 토양에 더 많이 존재하였다. 이는, 토양에서 미생물의 성장은 온도와 수분함량 뿐만 아니라 일조량, 바람 등의 다양한 요인에 위해서 영향을 받으며, 인위적인 실내의 환경보다 실외의 환경의 자연환경이 미생물의 성장에 좋음을 알 수 있었다.

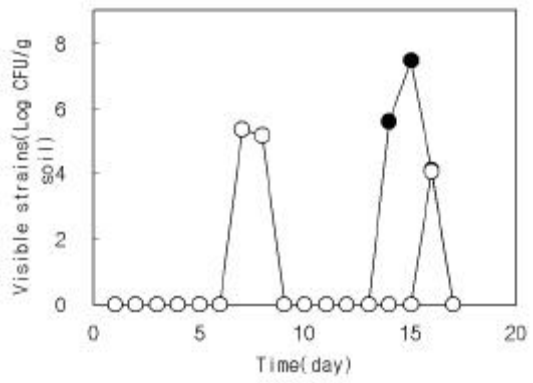


Fig.30 1번 토양에서 토양미생물 변화
실내환경, 멸균, 균주를 넣지 않음

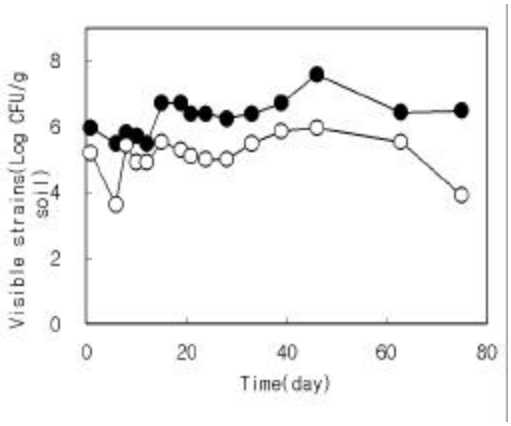


Fig.31 2번 토양에서 토양미생물 변화
실내환경, 비멸균, 균주를 넣지 않음

(●) 모든 토양미생물
(○) *meta*-ring cleavage 미생물

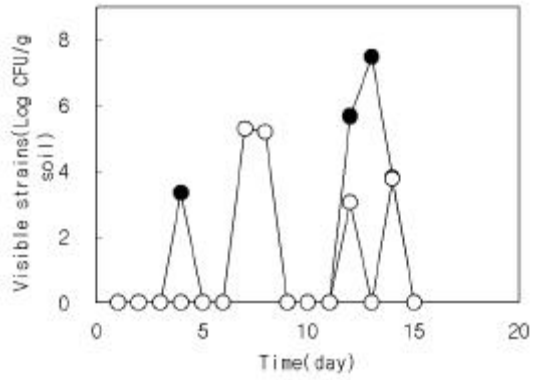


Fig.32 3번 토양에서 토양미생물 변화
실내환경, 멸균, 균주 넣음

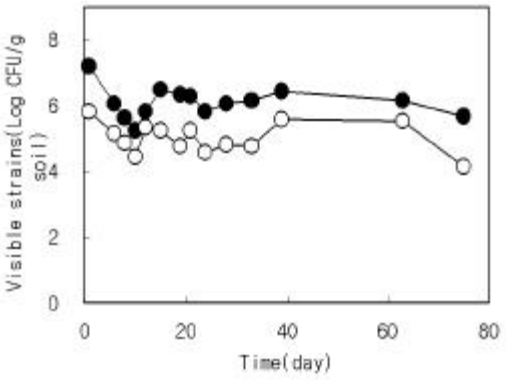


Fig.33 4번 토양에서 토양미생물 변화
실내환경, 비멸균, 균주 넣음

(●) 모든 토양미생물
(○) *meta*-ring cleavage 미생물

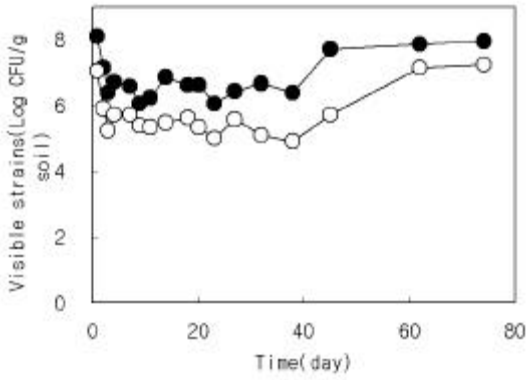


Fig.32 3번 토양에서 토양미생물 변화
외부환경, 비멸균, 균주 넣음
(●) 모든 토양미생물
(○) *meta*-ring cleavage 미생물

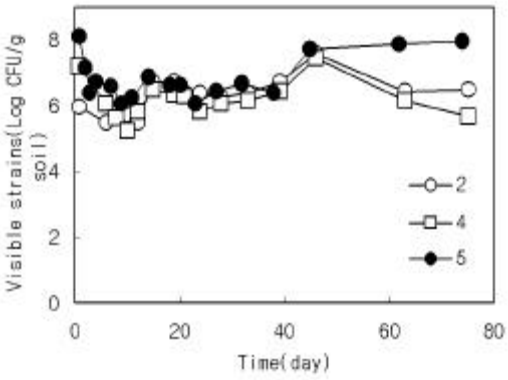


Fig.33 2, 4, 5번 모든 토양미생물변화
2, 4번 : 실내환경, 5번 : 외부환경
모든 토양 비멸균
4, 5번 : 균주 넣음

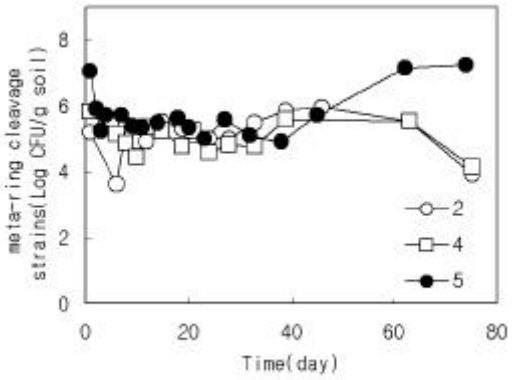


Fig.34 2, 4, 5번 *meta*-cleavage미생물변화
2, 4번 : 실내환경, 5번 : 외부환경
모든 토양 비멸균
4, 5번 : 균주 넣음

제5절 결론

1. 2.4-D를 단일 탄소원으로 하여 농약 분해균을 분리 검색한 결과 10 종의 분해균이 분리되었으며, 모두 Gram 음성균이었다. 생물화학적인 실험을 통해 동정한 결과 *Alcaligenes* sp.(strain PS1, PS2, CW1, CW2)와 *Pseudomonas* sp.(strain YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3)로 분류되었다.

2. 분리된 균주의 각종 방향족 화합물에 대한 기질 특이성은 10일간의 배양의 결과를 보았을 때 CW2와 YC1, YC2가 2.4-D에서의 성장이 가장 좋았고, PS1, CW2, YC1은 phenol에 대한 분해능력이 뛰어 났다. 또한 분리된 균주들은 모두 biphenyl, *p*-chlorobiphenyl에 대하여 분해능력을 가지고 있었다. YC2와 DY2, DY3은 4-chlorobenzoic acid에 대하여 좋은 분해능력을 보인다.

3. *meta*-개열 효소의 기질 특이성에서 *Alcaligenes* sp. (strain PS1, PS2, CW1, CW2) 쪽이 기질에 대하여 선택의 폭이 좁고, *Pseudomonas* sp. (strain YC1, YC2, KW1, DY1, DY2, DY3) 쪽이 각종 기질에 대한 선택의 폭이 넓은 것으로 나타났다.

4. 유기용매 내성실험에서는 xylene(3.1)에서 성장이 왕성한 균주가 선별되었다. 이와 같은 유기용매 내성균주의 이용은 특히 산업적으로 이용성이 큰 것으로 평가받고 있어 앞으로 이들 균주의 이용이 기대되어 진다.

5. 4개의 *meta*-cleavage에 관여하는 효소의 유전자를 클로닝하고 pSY1, pSY2, pSY3, pSY4로 명명하였다.

6. pSY3은 pUC119의 *Pst* I내에서 6.0kb로 cloning되었고 multi-cloning site의 제한효소 중 4종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었으며 pSY4는 pUC119의 *Pst* I내에서 2.5kb로 cloning되었고 multi-cloning site의 제한효소 중 5종류의 확인된 제한효소 site를 가지고 있었다.

7. cloning결과 균주 DY3은 두 개의 *bphC*와 1개의 *bphD* 유전자를 보유하고 있었다. *bphC1*은 298개의 아미노산으로 암호화된 897 bases로 구성되었고 *bphC2*는 293개의 아미노산으로 암호화된 879 bases로 구성되어 있었다. *bphD*는 286개의 아미노산으로 암호화된 858bp로 구성되었다.

8. 균주 DY3은 35℃에서 60시간이 지난 후 가장 좋은 성장을 보였으며 기질 농도 0.3%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었고 최적 pH는 8.5와 9로 나타났다.

9. 톱밥, 쌀겨, 활성탄을 사용한 균주 DY3의 혼합저장균의 CDC(m와 CFU는 혼합매체보다 저장온도에 큰 영향을 받았으나, 가장 낮은 온도인 -75℃의 결과와 -20℃에서의 결과는 거의 비슷하게 나타났다. 그러나, 경제적인 측면에서 15일 이내의 단기간 저장에는 4℃에서의 저장도 가능하나, 장기간 저장에는 -75℃와 -20℃가 효과적이었다.

10. 균주 DY3의 혼합저장에서 가장 효과적인 저장매체는 쌀겨였다. 이는 쌀겨에 미생물이 쉽게 영양분으로 이용 가능한 녹말성분이 많기 때문이다.

11. 인위적으로 멸균을 실시한 토양은 오랜 기간이 지나도 미생물 생태계의 회복이 잘 일어나지 않았으며, 공기중의 균이 유입되더라도 지속적인 생존은 확인할 수 없었다.

12. 실험토양내에 약 8.7%의 균이 *meta*-ring cleavage 균이었고, 미생물의 증가에 따라 *meta*-ring cleavage 균도 증가함을 알 수 있었다.

13. 토양 내에서 미생물의 성장은 대기중의 온도가 낮은 겨울임에도 불구하고 실내의 환경보다 외부의 환경이 더 좋음을 알 수 있었으며, 시간이 지남에 따라 개체수의 차는 점차 증가하였다.

제6절 참고문헌

1. Aono, R., Ito, M., Inoue, A., and Horikoshi, K.: Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 145-146 (1992).

2. Chung, S. Y., Maeda, M., Song, E., Horikoshi, K., and Kudo, T.: A Gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* strain TA421, isolated from a termite ecosystem. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2111-2113 (1994).

3. Engelen, B., Meinken, K., Wintzin, F., Heuer, H., Malkomes, H. P., and Backhaus, H.: Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil

communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures, Appl. Environ. Microbiol., 64(8), (1998).

4. Furukawa, K., Simon, J., and Chakrabarty, A. M.: Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene, and salicylate catabolism in *Pseudomonas* paucimobilis. J. Bacteriol., 154, 1356-1362 (1983).

5. Henikoff, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 28, 351-359 (1984).

6. Horikoshi K.: Microorganisms in Alkaline Environments, Kodansha press, Tokyo, Japan (1991).

7. Horikoshi K., and Akiba, H.: Alkalophilic Microorganisms, Gakukai press, Tokyo, Japan (1993).

8. Huertas, M. J., Luque, E., Maroues, S., and Ramos, J. L.: Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock, Appl. Environ. Microbiol., 64(1), (1998).

9. Hwang, I., and Farrand, S. K.: Detection and enumeration of a tagged Pseudomonas fluorescens strain by using soil with markers associated with an engineered catabolic pathway, Appl. Environ. Microbiol., 63(2), (1997).

10. Inoue, A., and Horikoshi, K.: A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. Reprinted from Nature, 332:6212, 264-266 (1989).

11. Kiyohara, H., Nagao, K., and Yano, K.: Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol., 42, 454-457 (1982).

12. Kitayama, A., achioku, T., Yanagawa, T., Kanou, K., Kikuchi, M., Ueda, H., Suzuki, E., Nishimura, H., Nagamune, T., and Kawakami, Y.: Cloning and characterization of extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas aeruginosa* JI104, J. Ferment. Bioeng., 82(3), (1996).

13. Krieg, N. R., and Holt, J. G.: Gram negative aerobic rods and cocci. In Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore., 140-1945 (1984).

14. Maeda, M., Chung, S. Y., Song, E., and Kudo, T.: Multiple Genes Encoding 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase in the Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, Isolated from a Termite Ecosystem. Appl. Environ. Microbiol., 61, 549-555 (1995).

15. Mitchell, R.: Environmental microbiology, Lewis-Liss Publishers, (1992).

16. Na, K. S., Lee, Y. W., Lee, Jin. S., Lee, Jae. S., Kubo, M., and Chung, S. Y.: Isolation and Characterization of Polychlorinated Biphenyls (PCBs)-Degrading Bacteria from a Municipal Sewage Treatment Plant. Environ. Eng. Res., 3, 67-78 (1998).

17. Rand, G. M., and Petroceli, S. R.: Fundamentals of aquatic toxicology, Hemisphere Publishing Coporation, (1985).

18. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.: Molecular Cloning: a laboratory manual, second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

19. Sanger, F., Nichlen, S., and Coulsen, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. proc. Natl. Acad. Sci., USA 74, 5463-5467 (1997).

20. Sayler, G. S., Layton, A., Lajoie, C., Bowman, J., Tschantz, M., and Fleming, J. T.: Molecular site assessment and process monitoring in bioremediation and natural attenuation, Appl. Biochem. Biotech., 54, (1995).

21. Stotzky G.: Gene transfer among bacteria in soil, in S. B. Levy and R. V. Miller(ed), Gene transfer in the environment, McGraw-hill Eook Co., New York, N.Y., 165-222 (1989).

22. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33, 103-119 (1985).

23. 三宅 淳, バイオエコモニタリング－環境汚染物質の超高感度檢出技術開發, 日本農藝學會 大會講演要旨, (1999).

24. 加藤順子, 大西康之, 野外における微生物の利用の際の安全性評價, 日本農藝學會大會講演要旨, (1999).

제 4 장 농업에 유용한 목질계 곰팡이의 육종기술 개발분야

제1절 서 설

1.연구개발의 목적과 범위

과다한 비료사용에 의한 농업 생산성 유지는 소비자들의 화학비료 기피 실리에 의하여 농산물 소비 감소를 유발시키기도 한다. 더구나 이러한 비료 사용에 의한 미생물 생태계 파괴는 토양의 자정능력을 떨어뜨리고 궁극적으로는 농약 등의 유독물질의 잔류 등의 부가적인 문제를 유발할 것이다.

본 연구에서는 백색부후곰팡이에 의한 토양 내 농산 폐기물의 퇴비화 촉진 기술은 특정화학물질에 오염되어 유용 미생물 생태계가 파괴되고 결국 생산성이 떨어진 토양을 원래 상태로 회복(bioremedeation) 할 수 있을 것이다.

이러한 기술은 몇몇 선진국에서 실용화 초기단계에 와 있으며, 우리나라의 넓은 농토와 경제적인 실정으로 볼 때 바람직하며, 우리나라에서도 우리 토양의 특성 및 오염 물질에 맞는 적절한 연구가 요구되는 바이다. 미농무성 및 환경 보호청 실험실은 자연계의 특정한 백색 부패 곰팡이를 이용한 토양 내 폐농산물의 기초 생물학적 재활용법의 활성화에 지난 5년간 관심을 집중하여 상당한 연구 진척과 유망한 결과를 보여 주고 있으나, 아직 환경 유해 물질의 자연계 백색 곰팡이에 의한 생분해성은 실용화 단계에 이르지 못하고 있다. 이들 오염 물질의 대부분은 환경적 위험과 높은 비용이 수반되는 소각이나 매립 등 이외에는 별다른 방법을 찾지 못하였으나, 곰팡이를 이용한 토양 폐기물 제거 작업은 소각이나 매립에 비해 1/50 정도의 비용으로 청정효과를 얻을 수 있을 뿐 아니라 장기적으로 군사적, 산업적 농업지역 토양의 오염 방지 및 환경보호 효과를 얻을 수 있다.

화학비료와 농약사용으로 인한 토양의 생산성 및 자성 능력 저하를 생물학적으로 회복하는 기술은 국내 농업 실정에 맞게 개발되어야 한다. 이들 기술의 실제 field에서의 성공여부는 투입된 미생물의 토양 생존성 등이 중요 인자가 될 것이다. 일반적으로 곰팡이는 세균에 비하여 산성, 낮은 water activity등, 열악한 환경에서 생존성이 높아, 앞으로 이 분야에서 세균 대신 유용하게 활용될 것이다.

우리나라 농토는 선진 각국과는 재배 작물 및 화학비료의 성분이 다르다. 또한 특히 토양의 산성화가 상당히 진행되어, 토양 생물의 활성화 저해, 유기물 분해의 저해, 중금속 등의 활성증가 등의 특징을 갖는다. 따라서 우리나라 토양에 존재하는 볏짚, 보리짚등 주 농산 폐기물을 대상으로 적당한 미생물의 선별 및 이동 특성이 연구되고, 오염물질의 흡탈착을 고려한 처리 시스템을 확립하여야 하기 때문에 기술도

입보다는 국내 기술에 의해 연구되는 것이 타당하다고 판단된다.

2. 참고문헌

1. Liese, W. 1970. *Annual Review of Phytopathlogy*. 8: 829-833

2. Moreira M.T., G. Feijoo, R. Sierra-Alvarez, J. Lema, and J. A. Field. 1997. Maganese is not required for biobleaching of oxigen-delignified kraft pulp by the white-rot fungus *Ejerkandera* Sp. strain BCS55. *Appl. Environ. Microbiol.* mAY: 1749-1755

3. Tuor, U., K. Winterhalter, and A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Eiotechnology*. 41: 1-17

제 2절 백색부후곰팡이(White-rot fungi)의 자연계 분리, 개선 및 특성

1. 서론

자연계에서 백색부후곰팡이는 주로 죽은 나무에 자라서 하얗게 썩는 자국을 형성하며, 그 결과로 단단한 나무 조직을 푸석푸석한 연질로 변하게 한다. 이는 나무 조직 중의 리그닌이 백색부후곰팡이가 생산하는 효소에 의해서 분해되고 있기 때문이다. 백색부후곰팡이를 비롯한 미생물은 각종 천연 또는 오염성 유기물질을 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있으므로 생태계의 물질 재순환에 있어서 최종분해자로서의 역할이 인정되었고, 그러므로 환경의 보존적인 차원에서의 미생물의 이용에 대한 관심과 이들의 분해능의 증가 및 분해기질 범위의 확장을 목적으로 하는 균주개량에 관한 연구가 증가되는 추세에 있다. 백색부후곰팡이는 자연계에 존재하는 1500 1600 여종의 Basidiomycete에 속하는 버섯류의 곰팡이이다. 그러나 자연계에 존재하는 많은 백색부후곰팡이들은 생산되는 효소의 양이 적어서 산업적인 목적에 모두 이용할 수 있는 상태가 아니므로, 균주의 개발 및 분리는 현재 활발히 진행되고 있다.
본 연구에서는 국내 산림에 존재하는 백색부후곰팡이를 채집하여 guaiacol과 볏짚을 포함하는 배양조건에서 효소를 다량 축적하는 백색부후곰팡이를 선택하고, 선택된 곰

팡이의 효소 생산성과 볏짚 중 리그닌 분해력을 측정하고, 백색부후곰팡이의 특성을 연구하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 균주

본 실험에 사용된 균주는 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 및 *Trametes versicolor* ATCC 42530이며 American Type Culture Collection (ATCC) 으로부터 구입했다. 또한 자연계로부터 분리한 다수의 백색부패 곰팡이와 *P. chrysosporium*의 변이주를 사용하였다.

균주의 배양 조건

균주	배양 최적 온도 (℃)	**배양 최적 기간 (day)
Phanerochaete chrysosporium (*ATCC 24725)	37	3
Pleurotus ostreatus (ATCC 32783)	25	5
Trametes versicolor (ATCC 42530)	25	7
자연계 분리 곰팡이	37	5

* American Type Culture Collection

** Potato dextrose agar 배지 사용

나. 변이 유도 및 자연계 백색부후 곰팡이의 분리용 배지와 배양조건

P. chrysosporium 은 potato dextrose agar (PDA) 사면배지를 이용하여 3 6 일간 37℃에서 배양하였다. 배양 후 균주는 4℃에서 보관하였으며 한 달마다 계대배양하여 보관하였다. 자외선 조사에 의한 *P. chrysosporium* 포자의 변이 후에 균의 생존율을 계산하기 위해 sodium deoxycholate 및 L-sorbose를 첨가한 BDS 배지가 사용되었으며 그 조성은 <표 2-1>1 과 같다. 자연계 분리 곰팡이의 배양을 위해서는 배지 A와 배지 B가 사용되어 그 적합성을 비교하였고, LiP 생산이 우수한 균주를 선별하기 위해서는 배지 A를 사용하였으며 그 조성은 <표 2-2>와 같다.

<표 2-1> *BCS 배지 조성

BCS 배지 (per ℓ)	
KH_2PO_4	1g
$MgSO_4$	0.25g
$CaCl_2$	0.05g
**TES 100×	50mℓ
Ammonium tartarate (2 g /100 mℓ, autoclaved)	10mℓ
Thiamine-HCl (100 mg/ℓ, pH 4.5, autoclaved)	10mℓ
trans-aconitic acid (1.74 g/300 mℓ, pH 4.5, autoclaved)	300mℓ
L-sorbose	30g
Agar	20g
Sodium deoxycholate	0.1g
**TES 100× (per ℓ)	
Nitrilotriacetate	1.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5g
NaCl	1.0g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g
$CoSO_4$	0.1g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.01g
H_3BO_4	0.01g
$NaMoO_4$	0.01g

* BCS는 BIII배지에 sodium deoxycholate와 sorbose가 첨가된 배지

** 먼저 nitrilotriacetate를 800 mℓ의 H_2O에 녹이고 1 N KOH를 이용하여 pH를 6.5로 맞추고 나머지를 넣어 1ℓ로 조절.

<표 2-2> 자연계 백색 부후 곰팡이 분리용 배지

배지 A (per ℓ)		배지 B (per ℓ)	
Guaiacol	0.1㎖	Guaiacol	0.1㎖
rice-strow	2g	rice-strow	2g
Agar	20g	Agar	20g
		Carbendazim (0.375g/100㎖)	2㎖

10 N KOH를 사용해서 pH 5로 조절

다. 자외선에 의한 변이 유도

37℃의 PDA평판배지에서 7일 배양한 균주에 멸균 증류수 10 ㎖을 넣어 배지 표면의 포자를 백금이로 모아 포자 현탁액을 만들었다. Haemacytometer를 사용하여 포자수를 세고 5×10⁵/㎖이 되게 희석하였다. 희석액 20 ㎖을 멸균 petri dish에 넣고 계속 흔들어 주면서 254 ㎚의 자외선 파장을 20 ㎝의 거리에서 각각 5분, 7.5분, 10분 동안 조사하였다. 자외선 조사 후 BDS배지에 접종하여 37℃에서 5 6일 배양 후 나타난 colony의 수를 세어 균의 생존율을 알아보았다. BDS배지에 나타난 변이주를 무작위로 선별하여 배지 A를 사용하여 LiP 생산량에 비례하여 Guaiacol을 적변시키는 정도에 의해 최종 선별하였다.

라. 자연계로부터 백색부패곰팡이의 분리 및 선별

손으로 누르면 부서지는 정도의 썩은 나무로부터 하얀 색 균사를 가진 곰팡이를 채취해서 배지 A와 배지 B에 접종하였다. 37 ℃에서 5 6일간 배양하여 균이 자라는 정도와 잡균의 오염 여부를 비교하여 적합균주를 선정하였다. 수 차례의 계대배양으로 오염균이 제거된 분리균주는 배지 A에 접종하여 37 ℃에서 5 6일 배양하였다. 그 후 *P. chrysosporium*을 대조구로 한 Guaiacol의 적변 정도를 비교하여 최종적으로 자연계 선별 균주를 선택하였다.

마. 균사체 및 lignin peroxidase 생성 배양 조건

균사체 및 LiP 생산을 위한 배지 조성은 <표 2-3>과 같다. PDA 평판배지에 *P. chrysosporium*을 1백금이 접종하여 37 ℃에서 4 6일간 배양한 후 표면에 형성된 포자를 멸균수 10 ㎖을 첨가하여 수집하였으며, 포자를 수집할 때 섞인 균사체는 멸균된 glass wool로 여과하여 제거하였다. Haemacytometer를 사용해 count한 포자를 1 ℓ용 삼각 플라스크에 정치배양용 배지 50 ㎖를 넣어 포자수가 10⁶/㎖이 되도록 접종하였다. 공기의 출입을 막기 위해 실리콘 마개를 한 후, 산소를 20분간 주입하였다. 이 플라스크를 37℃의 암소에서 흔들리지 않게 주의하며 정치 배양하였다. 2 3일 후 표면에 형성된 균사체 (mycellium mat)를 멸균 증류수로 2회 세척 후, 동일한 양의

배지를 넣고 10초 동안 blender를 이용해 분쇄하였다. 1ℓ용 삼각플라스크에 위의 균사체 현탁액과 325 ml의 진탕 배양용 배지를 넣고 실리콘마개로 막은 후 37 ℃ 암소에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 매일 5 mℓ의 배양액을 취하여 LiP역가를 측정하고 20분간 산소를 주입하였다.

<표 2-3> 백색 부패 곰팡이 균사체 및 Lignin Peroxidase 생산용 액체 배지

얕은 정치 배양용 배지의 조성 (per ℓ)	
KH_2PO_4	2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
$CaCl_2$	0.1g
Ammonium tartarate (2 g/100 mℓ, autoclaved)	10mℓ
Thiamine-HCl (100 mg/100 mℓ, autoclaved)	10mℓ
Veratryl alcohol (0.1M stock, filter sterilized)	20mℓ
100X Trace Element Soln (filter sterilization)	10mℓ
5% Glucose (autoclaved)	100mℓ
trans-aconitic acid (1.74 g/100 mℓ, pH 4.2, autoclaved)	100mℓ
진탕 배양용 배지의 조성	
얕은 정치 배양용 배지와 동일한 조성에 Tween 80 0.05%를 멸균 후 첨가한다.	

바. *P. chrysosporium*의 lignin peroxidase생산의 최적 조건 검토

*P. chrysosporium*의 진탕배양용 배지의 조성을 달리하여 LiP의 생산의 최적 조건을 검토하였다.

a. veratryl alcohol의 첨가 시기 효과

veratryl alcohol을 초기 및 4일 후에 첨가하였으며, 그 배양액을 매일 일정량 취하여 LiP 역가, pH, 균체 건조 중량 및 glucose소비의 변화를 측정하였다.

b. trace element solution 10 ml 및 30 ml 첨가 효과

c. Tween 80 0.05% 및 0.25% 첨가 효과

사. 효소 분석

a. Lignin peroxidase1

veratryl alcohol 이 H_2O_2의 존재 하에 LiP에 의해 veratryl aldehyde로 산화되는 비율에 의해서 측정하였다. 매일 0.5 mℓ의 배양액을 취해 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액 0.18 mℓ에 veratryl alcohol 2 mM, Na-tartarate (pH 3) 50 mM이 되도록 잘 섞은 후 H_2O_2를 0.4 mM되게 첨가하여 즉시 UV spectrophotometer를 이용하여 310 nm에서 흡광도를 측정하였다.

b. Mn(Ⅱ)-dependent peroxidase2

Mn(Ⅱ)-dependent peroxydase 의 역가는 Mn(Ⅱ)의 존재 하에 phenol red가 산화되는 비율에 기초한다. 0.25 ㎖의 효소액에 0.1 ㎜의 H2C2 0.25 ㎖ 과 phenol red 0.5 ㎖를 넣어 30℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후 5N NaCH 20 ㎕를 첨가하여 반응을 종료시키고 610 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

c. Laccase3,4

Laccase의 역가는 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)의 산화에 근거하여 측정하였다. 10 ㎕의 효소액에 1 ㎜의 ABTS, 50 ㎜ Sodium tartarate (pH 3)를 넣어 1 ㎖로 맞춘 후 420 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

아. glucose 소비량 측정

Dinitrosalicylic Acid (DNS) 방법에 의해 환원당의 양을 측정하였다.

자. 균체 건조 중량

배양액 5 ㎖을 원심분리하여 상등액을 제거하고 동량의 증류수로 2회 세척 후에 95℃ 건조 오븐에서 17 19시간 건조하여 무게를 측정하였다.

차. 백색 부후 곰팡이에 의한 볏짚 리그닌 분해 실험

125 ㎖용 삼각 플라스크에 볏짚 2 g와 10 ㎜ trans-aconitic acid (pH 4.2) 5 ㎖를 넣고 잘 섞어 121℃에서 40분 멸균하였다. 그 후 잘 식혀서 PDA 평판배지상에서 키운 균사체를 일정량 접종시켰다. 균사체 접종 후, 공기의 출입을 차단하기 위해 실리콘 마개를 하고 37℃ 암소에서 30일 동안 배양하였다. 각 플라스크에 매 5일마다 3분씩 산소를 공급하였다.

카. Klason lignin 정량6

2 g 볏짚에 72% H2SO4를 20 ㎖ 가한 후 4 시간 동안 실온에 방치하였다가 황산 농도가 3%가 되도록 증류수를 가하여 희석하였다. 환류 냉각기를 부착하여 2시간 동안 서서히 끓인 후, 실온으로 식혀서 glass filter로 흡인 여과한다. 100℃ 증류수 500 ㎖을 가하여 다시 흡인 여과하였다. glass filter에 남은 리그닌을 105℃ 오븐에서 항량이 될 때까지 건조 후 무게를 측정하였다. 볏짚과 10 ㎜ trans-aconitic acid 5 ㎖ 만을 넣은 대조구도 같은 방법으로 lignin을 정량하여 그 차이를 비교, 볏짚 분해율을 알아보았다.

3. 결과 및 고찰

1. 변이에 의한 *P. chrysosporium*의 생존율

자외선 조사에 의한 *P. chrysosporium* 포자의 사멸율은 자외선 조사시간의 증가와 비례하여 5분 조사시 71.4%에 비해 10분 조사시에는 85.5%가 사멸하였다. 또

한 자외선이 조사되지 않은 포자도 BDS 배지에 첨가된 0.01% sodium deoxycholate 및 3% sorbose에 의해 59.78%의 사멸율을 나타내었다. <표 2-4> *F. chrysosporium*은 고체 평판 배지 상에서 균사체 및 포자를 형성하는 Basidiomycetes로써 각각의 포자를 형성하기 위해서는 균사체 성장을 제한할 수 있는 물질의 첨가가 불가피하다. 본 실험에서 사용된 sodium deoxycholate와 sorbose의 사용은 Gold와 Cheng 등에 의해서 *F. chrysosporium*의 균사에 성장 제한제로 이미 보고되었으며, 고체 평판 배지 상에서 각각의 곰팡이 포자로부터 생성되는 균체를 관찰할 수 있다는 면에서 변이주를 선택하는 방법을 용이하게 한다. 그러나 이러한 균사체 성장 제한제는 포자 사멸 효과가 관찰되었다. Durand 등은 99% 이상의 극단적인 사멸율을 나타내는 변이 방법보다는 70 90% 정도의 변이를 일으키는 방법을 쓸 것을 제안했다. 또한 본 실험에서는 254 nm 의 자외선 파장을 사용하여 변이를 유도했는데, 260 nm 근처의 자외선은 미생물을 사멸하는 효과가 있다. 이 자외선은 DNA에 작용하는데, 그 중 thymine이 민감하게 반응하여 이웃한 thymine과 dimer를 형성한다. 그 결과 DNA구조에 변화를 일으켜 복제를 할 수 없고, 그에 따라 단백질 합성이 불가능하게 되어 사멸하거나 기능의 손상을 일으킨다.

<표 2-4> Sodium deoxycholate와 L-sorbose가 *F.chrysosporium* 포자 사멸율에 주는 영향 및 자외선의 효과

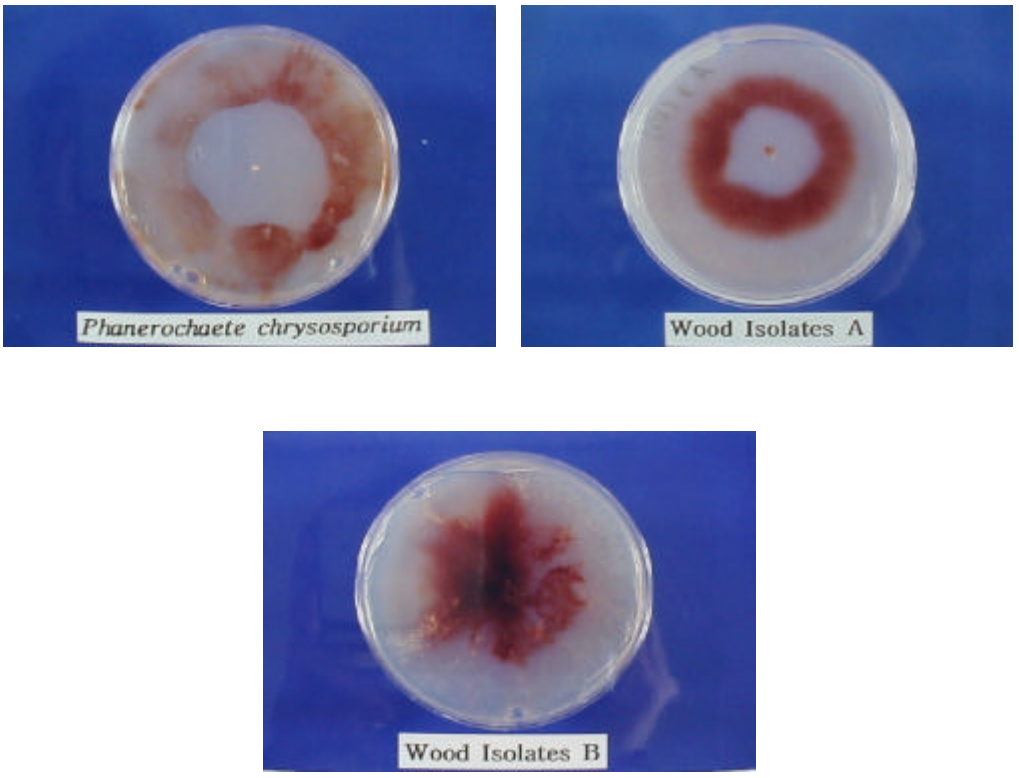
변이원	생존율 (%)	사멸율(%)	UV에 의한 사멸율(%)
*DS	42.22	59.78	
DS+UV 5 min	28.60	71.40	11.62
DS+UV 7.5 min	23.10	76.90	17.12
DS+UV 10 min	14.48	85.52	25.74

* DS는 Sodium deoxycholate (0.01%)와 L-sorbose (3%)가 포함된 고체 배지

2. 균주의 선별

자연계 분리 곰팡이의 순수 배양과 사용균주의 선별 및 변이주의 최종 선별에 사용된 배지는 Guaiacol과 볏짚을 포함한 배지 A와 Carbendazim을 더 첨가한 배지 B이다. 배지 B에 배양한 균주보다 배지 A에 배양한 균주가 더 활발한 성장을 보였는데, 이것은 배지 B에 첨가한 Carbendazim의 균주 성장 제한 효과에 의한 것으로 분석된다. Field 등[4]는 benomyl 15㎎/ℓ를 첨가하여 자연계 Basidiomycetes를 분리하는데 이용하였지만 benomyl의 생산 중단으로 본 실험에서는 세균 및 효모의 오염을 제거하고, 백색부후곰팡이 균사체의 지나치게 빠른 성장을 억제하기 위해 사용하였다. 그러나 배지 A, B의 조성이 볏짚만을 영양 물질로 함유하는 최소 영양 배지여서, 오염균의 증식이 제한되는 것을 관찰하였다. 오히려 본 실험에 사용된 농도에서 Carbendazim이 자연계 분리 곰팡이 및 변이주의 생육을 제한한 것으로 보인다. 실험

결과에 따라서 우수 균주 선별에 배지 A를 사용하였다. 배지 A에 접종한 각 균주가 생산하는 LiP는 Guaiacol을 붉은 색으로 변색시키는데 LiP 생성량이 많을수록 변색의 정도가 짙고 변색의 범위가 넓었다. 따라서 접종한 여러 균주 중에서 배지를 짙은 붉은 색으로 변화시킨 균주를 최종 선별한 후, PDA 배지에서 보관하였으며, LiP의 생성량을 측정하기 위해 액체 배양을 하였다. 자연계 분리 곰팡이가 Guaiacol을 함유한 배지를 붉게 변색시킨 것은 <그림 2-1>에, PDA 평판 배지에서 균사체의 성장은 <그림 2-2>에 나타내었다.



<그림 2-1> 자연계에서 분리된 백색 부후 곰팡이와 *P. chrysosporium* ATCC 24725에 의한 guaiacol 첨가시 LiP 생성 비교

<그림 2-2> 자연계에서 분리한 백색 부후 곰팡이가 potato dextrose agar 배지에서 생육한 균사체

3. 변이주 및 자연계 분리 백색 부후 곰팡이가 생산하는 LiP

대덕 연구 단지 숲 근처의 푸석하게 썩은 나무토막에서 분리한 백색 부후 곰팡이인 I-A는 타 균주들보다 훨씬 높은 LiP를 생산하였다. I-A를 비롯한 대부분의 자연계 분리 균주는 1차적으로 guaiacol의 적변 정도로 선별한 후에, 다시 액체 배지에서 LiP 생성을 측정하였다. *P. chrysosporium*의 변이주에 비해 자연계 분리 균주가 높은 LiP 역가를 나타냈으며, 변이주들 중 M 9 및 M 11은 모균주보다 각각 9.4배, 3.1배 LiP가 증가된 우수한 변이주이다.

4. *P. chrysosporium*의 LiP 생산의 최적 조건

*P. chrysosporium*은 배양 48시간 후에 높은 LiP 역가 (약 26 U/ℓ)를 나타내었으며, 그 후 감소하다가 120시간 후에 가장 높은 역가 (약 35 U/ℓ)를 나타내었다. 이미 발표된 연구 결과에 의하면 *P. chrysosporium*은 액체 배양 4 5일째에 가장 높은 LiP 역가를 보이는 것으로 보고되었으나 본 실험에서는 항상 48시간 및 120시간에 높은 LiP 역가를 나타내었다. 첨가된 glucose는 약 8일간에 100% 모두 소비되었다. glucose는 균체의 성장에 직접적으로 영향을 주는 것으로 분석된다. 즉 glucose의 분해율이 높은 초기 5 6 일 동안 균체의 성장도 활발히 이루어졌으나, 그 후 균체 성장이 지연되었다. 또한 pH는 배양 후 계속 증가하여 최종적으로 5.7까지 상승하였다. *P. chrysosporium*의 LiP 생산 최적 조건을 위해 배지 조건을 달리한 결과는 <그림 2-3> <그림 2-4> <그림 2-5>에 나타내었다. veratryl alcohol을 초기 첨가시에는 5일째 높은 역가를 보였으나 4일 후에 첨가하였을 때는 LiP 상승 현상을 관찰할 수 없었다. Trace element solution의 양 10 ㎖ 및 30 ㎖ 첨가는 LiP 활성에 큰 차이를 나타내지는 않았고 10 ㎖ 첨가시의 역가가 약간 높았다. 0.25% Tween 80의 첨가는 0.05% 첨가시보다 높은 LiP 생산을 유도하였다. 실험 결과를 종합하여 *P. chrysosporium*의 배양에 의한 LiP 생산의 최적 조건은 veratryl alcohol의 초기 첨가, TES의 양 10

㎖, Tween 80의 양 0.25%로 확정할 수 있었으며 그 배양기간은 5일로 하였다.

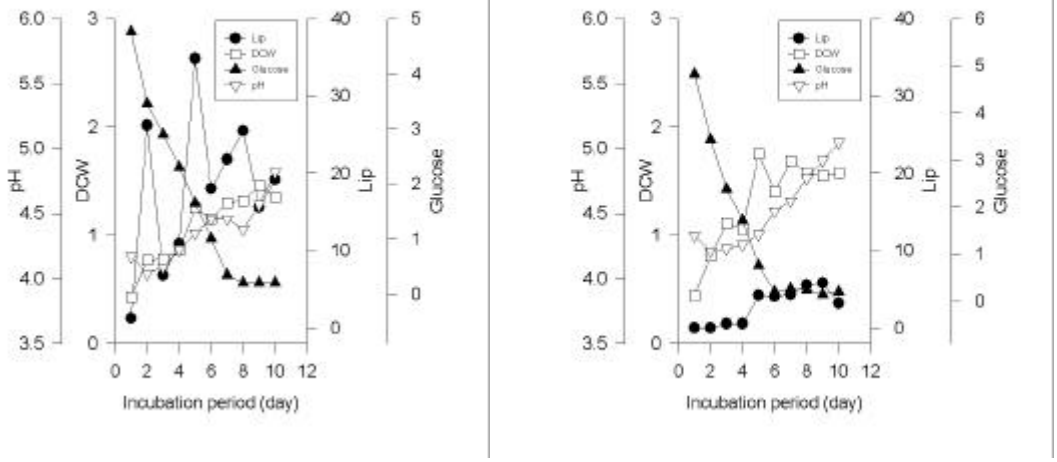
<표 2-5> 자외선 조사에 의한 *P.chrysosporium* 변이주가 생산하는 Lignin Peroxydase (LiP)의 역가 및 자연계 분리 균주의 LiP 역가

변이주	역가(U/ℓ)	분리균주	역가(U/ℓ)
*Pc (모균주)	5.14	***I-A	1124.0
**M1	1.46	I-S6	360.0
2	0	I-S14	911.8
3	0	I-S15-1	312.6
4	0	I-S15-2	752.1
5	0	I-S16-1	674.3
6	7.77	I-S16-2	717.6
7	9.41	I-S17	7.98
8	8.51		
9	48.30		
10	7.36		
11	15.83		
12	8.36		
13	8.06		
14	8.36		
15	11.05		
16	11.95		

* *Phanerochaete chrysosporium* ** 자외선 조사에 의한 변이주

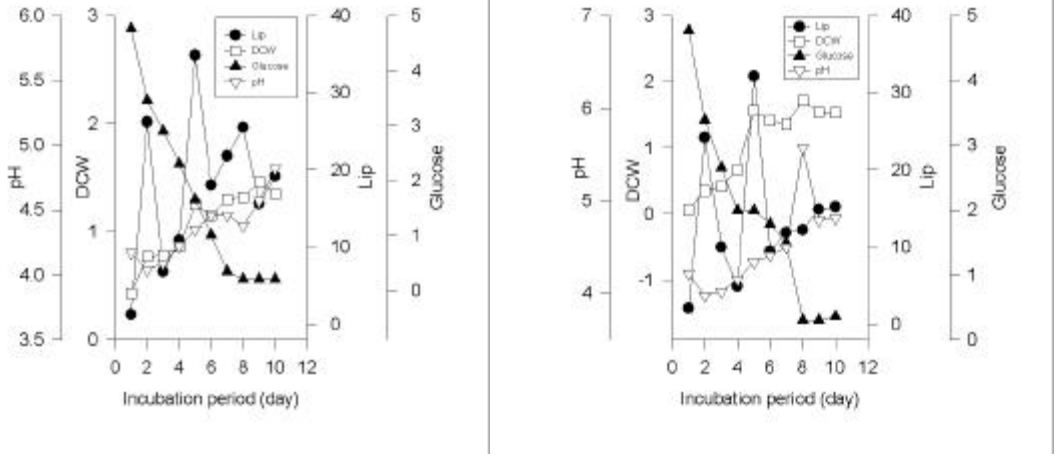
***숲에서 분리된 자연계 백색부후곰팡이

(a) 초기 첨가 (b) 4일 후 첨가



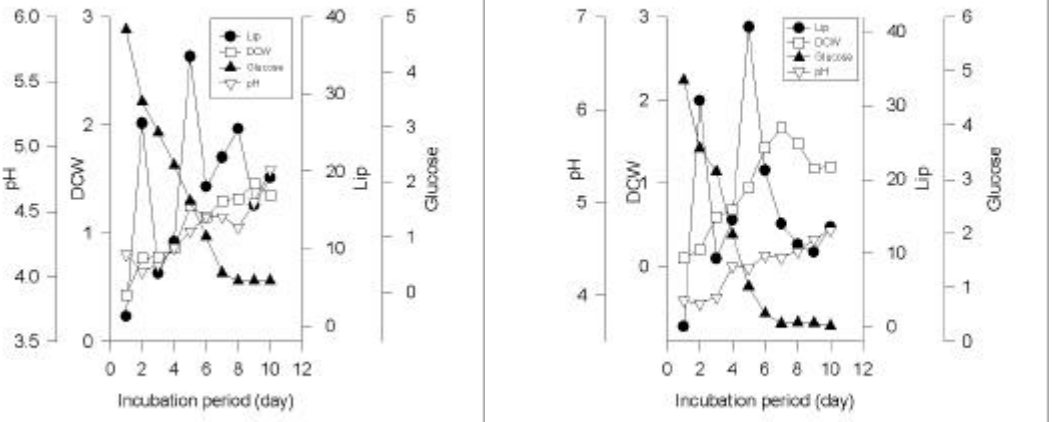
<그림 2-3> *P. chrysosporium*의 진탕 배양에 의한 리그닌 퍼옥시데이스 생성 조건 중 veratryl alcohol의 첨가 시기 효과.

(a) 10 ㎖ 첨가 (b) 30 ㎖ 첨가



<그림 2-4> *P. chrysosporium*의 진탕 배양에 의한 리그닌 퍼옥시데이스 생성 조건 중 Trace element solution의 과량 첨가 (㎖) 효과

(a) 0.05% 첨가 (b) 0.25% 첨가



<그림 2-5> *P. chrysosporium*의 진탕 배양에 의한 리그닌 퍼옥시데이스 생성 조건 중 Tween 80 첨가 효과

5. 볏짚 중의 리그닌 분해 효과

볏짚의 lignin 함량은 약 24%였으며 황산에 용해되는 산 가용성 lignin은 포함하지 않은 함량으로 실질적으로는 이보다 약간 증가될 것으로 추정된다. 그러나 보고된 문헌에 의하면 5% 이내로 추정되며 본 실험에서는 측정하지 않았다. ATCC에서 구입된 각 균주 및 *P. chrysosporium*의 변이주에 의한 볏짚 lignin의 분해율은 *P. ostreatus*가 33.88%로 가장 높은 분해율을 보였고 *P. chrysosporium* 18.25%, *T. versicolor* 28.73%의 분해율을 보였다. Mutant 1, 3, 4는 모균주보다 리그닌 분해율이 약간 향상되었으며, 자연계에서 분리된 곰팡이들은 LiP 역가가 Mutant들보다 높은 반면 리그닌 분해율은 낮았다. 위와 같은 현상으로 미루어 LiP 생성 능력과 리그닌 분해율은 항상 일치하지는 않는 것 같다.

4. 참고문헌

1. Tien M, and T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of unique H_2O_2-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* U.S.A 81: 2280-2284

2. Carmen R.J., S. Loreto. R. Vicuna, and T.K. Kirk. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* June: 1792-1797

3. Jensen JR., K.A., Woli Bao, S. Kawai, E. Srebotrik, and K.E. Hammel. 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* Cct: 3679-3686

4. Nishida T., Y. Kashino, A. Mimura, and Y. Takahara. 1988. Lignin degradation by wood-rotting fungi. I. Screening of lignin-degrating fungi. *Mokuzai Gukkaishi*. 34(6): 530-536

5. Field, J. A., E. De Jong, G.F. Costa, and J.A.M. De Bont. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic gydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* July: 2219-2226

6. 조남석, 이종규, 윤병호, 황병호 공역. 1987. 목재화학. 영남대학교 출판부 158-159

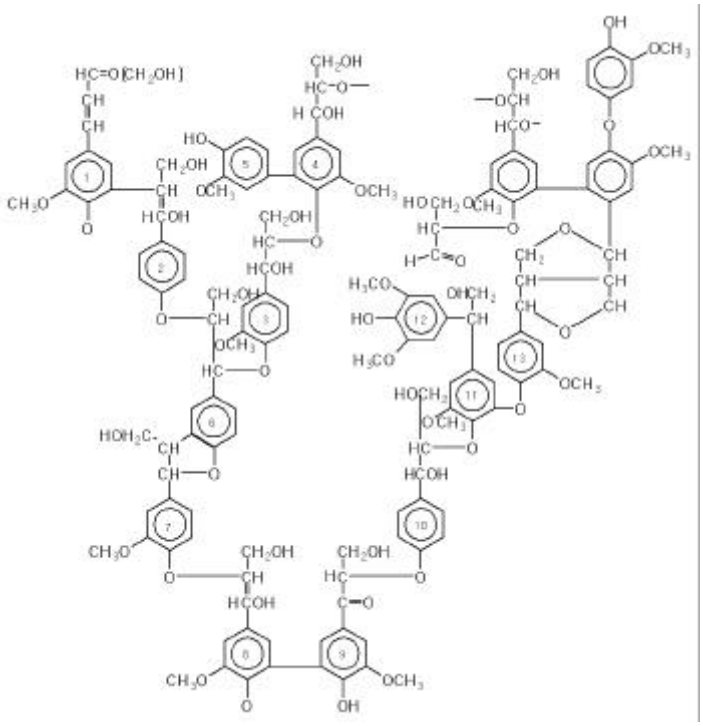
제3절 백색부후곰팡이의 최적 리그닌 분해 조건 확립

1. 서론

자연계에 존재하는 백색부후곰팡이는 약 1,500 1,600종으로 *Basidiomycete*에 속하는 버섯류의 곰팡이이며, 분류 체계가 아직 이루어지지 않아서 백색, 갈색부후곰팡이 등으로 일컬어지고 있다. 알려진 백색부후곰팡이 중 *Lentinus edodes*(표고버섯), *Pleurotus ostreatus*(느타리버섯)는 식용버섯으로 이용되고 있다. 이와 같은 백색부후곰팡이가 최근 산업적 및 난분해성 환경오염처리에 이용될 수 있는 잠재력을 갖고 있다는 사실은 1970년 Liese]이 나무에 하얗게 썩은 자국을 형성하는 것은 백색부후곰팡이가 나무조직 중의 리그닌과 탄수화물을 분해하여 생긴다는 사실을 나무조직의 초미세구조로 밝힌 후 보다 구체화되었다. 나무 조직의 약 30%를 차지하는 리그닌은 식물 자체에서 광합성 및 여려 단계의 생합성 과정을 거쳐 합성되는 물질이며, 주로 phenylpropane 구조의 복잡하고, 불규칙적인 페놀계 고분자 물질로서 나무에 견고성을 주고, 조직세포를 보호해 주는 물질이며, 물에 용해되지 않는다. 이러한 리그닌의 효소적 분해가 어려운 것은 Cβ-Cβ, Cβ-C$, Cβ-O-4, Cα-C-4, C$-C$, C4-O-C$, Cβ-C 등 안정된 구조가 리그닌 분자 자체에 다량 포함되어 있어서 미생물에 의해 분해되기 어렵다.(그림 3-1) 이와 같이 자연계에서 난분해성인 리그닌은 그의 구조가 유류에서 발생하는 환경오염물질인 다환성 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)의 분해에 최근 응용되고 있다. 1985년 Bumpus등이 *Phanerochaete*

*chrysosporium*에 의한 benzo(a)pyrene, DDT 등의 PAH 분해력을 관찰한 이후, 백색부후곰팡이에 의한 환경오염의 연구가 활발하게 진행되고 있다.

자연계에 존재하는 백색부후곰팡이는 세포막에 존재하거나, 세포 외로 분비하는 특이적인 산화효소 : lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, laccase, oxygenase 등에 의해서 리그닌을 CO_2로 완전히 분해한다. 관련 미생물에 의한 리그닌의 분해 기작에 관하여는 아직까지 밝히지 못하는 점이 많지만, 최근 수년간 산업적인 이용 목적으로 이 분야에 관한 연구가 현저히 진보되어왔다. 자연계 특히 산림토양이나 죽은 나무 및 나뭇잎에 기생하여 견고한 리그닌 구조를 분해하는 백색부후곰팡이는 이와 같은 리그닌 분해력 때문에 최근 바이오 펄프공정 중 전기에너지의 절감효과, 펄프 제지산업의 염소계 표백제 사용절감 효과 및 제지의 고품질화를 이루고 있으며, 또한 동물사료에 처리되어 소화율을 촉진시키는 등의 목적으로 최근 이용되고 있다. 그러나 자연계에 존재하는 많은 백색부후곰팡이들은 생산되는 효소의 양이 적어서 산업적인 목적에 모두 이용할 수 있는 상태가 아니므로, 균주의 개발 및 분리와 아울러 효소생산 최적화 조건이 탄소원, 질소원을 중심으로 연구되고 있으며 본 실험에서는 Lip, MnP, 및 laccase 생산을 최대화하기 위하여 각종 미량원소, veratryl alcohol, 초기 pH, 계면활성제의 농도 영향을 선택된 균주에 한하여 연구하였다.



<그림 3-1> Schematic diagram of lignin extracted from spruce wood

2. 재료 및 방법

a. 사용 균주

사용된 균주는 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Trametes versicolor* MD-277, 및 Wood A 이다. *P. chrysosporium* ATCC 24725는 American Type Culture Collection에서 구입한 균주이다. *T. versicolor* MD-277은 US Department of Agriculture, Forest Products Laboratory, Center for Forest Mycology Research로부터 분주받았으며, Wood A는 본 연구팀에 의해서 대덕연구단지 근처의 야산에 하얗게 썩은 나무로부터 분리된 균주이다. 각 균주의 배양조건은 1차년도 보고서에 이미 기술되었으며, Wood A는 *P. chrysosporium*과 동일한 배양온도를 사용하였으나, 최적 배양기간은 약 5-7일이었다.

b. 배양

가. *P. chrysosporium* ATCC 24725 및 Wood A

PDA 배지에 접종하여 37 ℃에서 3-5 일간 배양하였다. 배양된 균주는 4 ℃에서 2-3개월 간격으로 계대배양하여 보관하였다. PDA 평판배지에 접종 후 37 ℃에서 5일간 암소에서 배양하여 균사체 및 포자를 형성시킨다. 평판배지표면에 형성된 포자를 멸균수 10 ㎖를 가하고 백금이를 이용하여 긁어낸 후, 멸균 유리섬유나 여러 겹의 가제로 여과한다. 여과액 중의 포자수를 haemacytometer를 사용하여 측정한 후, *P. chrysosporium*의 경우 배양액 50㎖을 넣은 1ℓ용 삼각 플라스크에 포자수 10⁶/㎖-배양액 이 되도록 접종하고 정치 배양하였다. 이 플라스크를 공기의 출입을 막기 위해 실리콘 마개를 하고, 멸균 필터를 거친 산소를 5-7분간 플라스크에 주입하여 37℃ 암소에서 흔들리지 않게 정치 배양하였다. Wood A의 경우, 약 포자수 10⁸ / ㎖-배양액을 위와 같은 방법으로 첨가하였다.

2-3일 후 표면에 형성된 균사체를 멸균증류수로 2회 세척 후, 동일한 양의 배지를 넣고 10초 동안 blender(Fisher scientific 11-504-204, Biomixer Homogenizer Complete)를 이용하여 분쇄하였다. 250 ㎖ 용 삼각 플라스크에 90 ㎖ 진탕 배양용 배지와 분쇄된 균사체 (50 ㎖ 정치 배양에서 형성된 균사체량의 반정도)를 넣고, 실리콘 마개로 막은 후 플라스크 내를 멸균 필터를 통과한 산소로 약 5분간 치환하였다. 진탕 배양은 150 rpm의 속도로 37 ℃ 암소에서 이루어 졌으며, 매일 또는 예정 sampling 날짜에 2 ㎖ 배양액을 취하여 lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), 및 laccase 역가, glucose, pH를 측정하였다.

<표 3-1> Composition of modified Tien & Kirk liquid culture media for the enzyme production by white-rot fungi1

얕은 정치 배양용 배지의 조성 (ℓ)	
KH_2PO_4	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$CaCl_2$	0.1 g
Ammonium tartarate (2 g/100 mℓ, autoclaved)	10 mℓ
Thiamine-HCl (100 mg/100 mℓ, autoclaved)	10 mℓ
100× Trace Element Solution* (filter sterilization)	10 mℓ
5% Glucose (autoclaved)	100 mℓ
trans-Aconitic acid (1.74 g/100 mℓ, pH 4.2, autoclaved)	100 mℓ
Veratryl alcohol (0.1 M 표준용액, autoclaved)	20 mℓ
*100× TES (ℓ)	
Nitrilotriacetate	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5 g
NaCl	1.0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CoSO_4$	0.1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.01 g
H_3BO_4	0.01 g
$NaMoO_4$	0.01 g

진탕 배양용 배지의 조성 (ℓ)

얕은 정치 배양용 배지와 동일한 조성에 Tween 80 0.05%**를 멸균 후 첨가한다.**

나. *I. versicolor* MD 277

보관용 균주는 PDA 사면 배지에 접종하여 27℃, 암소에서 배양하였다. 배양 후 4℃에 보관하였으며 2-3개월마다 계대배양하였다.

*I. versicolor*와 같이 포자를 형성하지 않는 백색부후곰팡이는 균사체를 직접 이용하여 효소생산을 하였다. 즉 PDA 평판배지에서 배양된 *I. versicoor* 균사체는 직경 0.8 ㎝로 균사체를 잘라내어 균사체 조각을 4-5개 정치배양용 배지 50 ㎖을 포함하는 1ℓ용 삼각 플라스크에 접종하였다. 공기의 출입을 차단하기 위하여 실리콘 마개를 하고 27℃ 암소에서 약 7일간 배양하여 균사체를 형성 시켰다.

균사체 형성 후의 실험 방법은 전술한 *P. chrysosporium*과 동일하였으며, 2 ㎖ 배양액을 취하여 LiP, MnP, laccase 역가와 glucose 소비 및 pH 변화를 측정하였다.

c. 실험 인자

백색 부후곰팡이가 배양액 중에 생산하는 효소 생산의 최적화를 위하여 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 농도는 0.36, 1.8, 3.6 ㎜을 첨가하여 배양하였으며, $MnSO_4 \cdot H_2O$는 0.17, 0.85, 1.7 ㎜, Na_2MoO_4는 0.0413, 0.2065, 0.413 ㎜, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$는 0.0174, 0.087, 0.174 ㎜을 각각 첨가하여 배양하였다.

초기 pH 효과를 관찰하기 위해서 배양액의 pH를 3.2, 4.2, 5.2, 6.2로 조절하여 효소생산의 변화를 관찰하였다. 질소원은 NH_4-tartrate를 1.2 ㎜ 첨가한 질소원 제한배지를 사용하였다.

d. 효소역가 측정 및 각종분석

가. lignin peroxidase (LiP)1

Veratryl alcohol(3,4-dimethoxybenzyl alcohol)이 H_2O_2의 존재 하에 LiP에 의해 veratryl aldehyde로 산화되는 비율에 의해서 측정하였다. 매일 5 ㎖의 진탕 배양액을 취해 원심분리 (6000 rpm, 30분)하여 침전물을 제거한 후, 상등액 0.18 ㎖에 veratryl alcohol 2 ㎜, Na-tartarate (pH 3) 50 ㎜이 되도록 잘 섞은 후 H_2O_2를 0.4 ㎜이 되도록 첨가하여 즉시 UV spectrophotometer(Hewlett Packard 8452A Diode array spectrophotometer)를 이용하여 파장 310 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. LiP 1 unit는 1분 동안에 veratryl alcohol 1㎛ol을 산화시키는 데 필요한 효소의 양으로 정의하였고, 계산에 사용된 veratryl alcohol의 molecular extinction coefficient는 9,300 $M^{-1}cm^{-1}$이다.

나. Manganese peroxidase (MnP) 2,3

MnP는 H_2O_2 존재 하에 Mn^{+2}를 Mn^{+3}으로 산화하고, 동시에 기질로 사용된 2,6-dimethoxy phenol을 산화하여 Mn^{+3}-phenolic 복합체를 이룬다. 배양 상등액 0.6 ㎖에 0.1 ㎜의 2,6-dimethoxy phenol, 50 ㎜의 sodium tartarte (pH 4.5), 1 ㎜ $MnSO_4$를 넣어 잘 섞은 후, 0.4 ㎜ H_2O_2를 첨가하여 즉시 470 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. MnP 1 unit는 1분 동안에 2,6-dimethoxy phenol 1㎛ol을 산화하는 데 필요한

효소의 양으로 정의하였고 계산에 사용된 2,6-dimethoxy phenol의 molecular extinction coefficient는 49,600 $M^{-1}cm^{-1}$이다.

다. Laccase의 역가 측정4

Laccase는 산화효소로써 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 기질로 사용할 때 산화율을 측정하였다. 0.05 ㎖의 효소액에 4.7 mM의 ABTS, 50 mM glycine-HCl (pH 3)를 넣어 1 ㎖로 맞춘 후 436 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Laccase 1 unit 는 1분 동안에 ABTS 1 μmol을 산화시키는 데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 역가 계산에 사용된 기질 ABTS의 molecular extinction coefficient는 36,000 $M^{-1}cm^{-1}$이다.

라. glucose 분석 및 pH 측정은 제 2장에서 실시한 방법과 동일하다.

e. 리그닌 분해 및 리그닌 정량 (modified Klason method) 실험방법제 2장에서 실시한 방법과 동일하다.5

f. *P. chrysosporium* 균사체에 의한 농약 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T)

전술한 방법대로 *P. chrysosporium*의 균사체를 정치배양으로 형성시킨 후, 0.3 g(wet cell weight) 균사를 0.5% glucose를 포함하는 modified Tien & Kirk 배지 10 ㎖을 serum bottle (250 ㎖-용량)에 접종한다. 최종농도가 10 ㎎/ℓ가 되도록 2,4,5-T 수용액을 microsyringe를 이용해 첨가하고, silicone 및 aluminum seal로 마개를 한 후 산소를 치환하였다. 37 ℃ 암소에서 배양하면서 20일 동안 2, 4, 5-T 분해정도를 측정하였다.

g. HPLC 분석

배양액을 원심분리하여 균사체를 제거하고, 상등액을 0.2 μ cellulose nitrate membrane filter를 이용해서 주사기로 여과한 후, Beckman Ultrasphere C18 (reverse-phase) column (㎜rl 25㎝×4.6㎜ 층전물질입자 5㎛)을 장착한 Beckman liquid chromatography-model Gold (Beckman Instrument, USA)로 분석하였다. mobile phase는 methanol : 0.1% Phosphoric acid 이 60:40으로 섞인 용매이며, 유속 1.0 ㎖/min으로 30분간 분석하였다. 이때 Beckman Model 160 UV detector로 파장 230㎚에서 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

a. 백색부후곰팡이 (*P. chrysosporium*) 균사체의 토양적용 조건 검토

토양 중에 그대로 버려지는 농산 폐기물인 볏짚, 왕겨, 식물 지지대등을 비롯하여 토양중의 잔류농약 분해를 시도하기 위해 모델토양에 *P. chrysosporium* 균사체 적용방법이 연구되었다.

*P. chrysosporium*을 포함한 대부분의 백색부후곰팡이를 성공적으로 오염토양 및 처리를 원하는 토양에 적응시키는 것은 토양의 특성 및 곰팡이의 호기성(好氣性) 등 제반인자 때문에 쉽게 해결되는 문제는 아니라고 보고되고 있다. 미국 농무성의 Forest Products Laboratory의 Le₹tan 등 (ER-57)은 영양물질을 첨가한 pellet을 만들어 토양에 적용한 경우가 보고되고 있으나, 본 연구에서는 농산 부산물인 왕겨를 이용하여 *P. chrysosporium* 균사체를 배양하면 하얗게 성장된 균사체가 왕겨를 덮어서 (그림 3-1) 토양 적용에 쉽게 이용할 수 있었다. 왕겨를 그대로 이용하는 경우 균사체의 성장이 지연되었으므로, 왕겨에 corn starch, corn steep liguor 및 lignosulfonate를 (표 3-2 A) 조성과 같이 첨가하였고, 이외에도 corn steep liquor 대신 곰팡이 배양 실험에 사용했던 modified Tien & Kirk 배지를 사용하여 비교하였으며, 각각 왕겨에 접종된 균체의 양은 *P. chysosporium* 경우, 1.25 × 106 개 포자를 g당 처리된 왕겨에 접종하였으며 배양온도 37℃에서 7일간 배양하였다. *T. versicolor* MD-277 및 R105-SR은 포자를 형성하지 않으므로 PDA 평판 배지에서 키운 균사체 조각을 1.5 ㎝ × 1.5 ㎝ (가로×세로)로 오려내어 왕겨 25 g에 접종하고 27 ℃에서 약 2 3주 배양하였다. 배양 중 산소공급을 별도로 하지 않았지만 플라스크를 면전 하여 멸균공기가 유통되게 하였다. 수분의 증발을 방지하기 위해서 배양기 내의 습도를 90 100% 유지하여 시료로부터 최대한 수분증발을 방지하였다.

<표 3-2> 왕겨 전처리에 사용한 배지 조성 (%)

A.

왕겨	80
corn starch	15
corn steep liquor	3
lignosulfonate	2

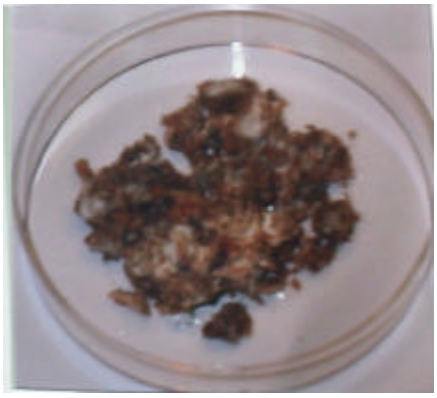
위 성분을 잘 섞은 후 증류수를 첨가해 수분 60% 조절한 후 121℃에서 30분간 멸균한다.

B.

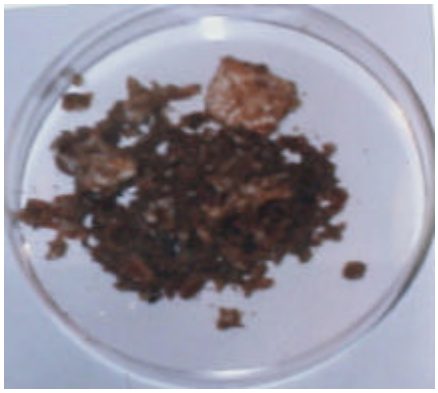
왕겨	80
corn starch	15
증류수	3
lignosulfonate	2

위 성분은 잘 섞은 후 modified Tien & Kirk 배지를 첨가해 수분 60% 조절한 후 121℃에서 30분간 멸균한다.

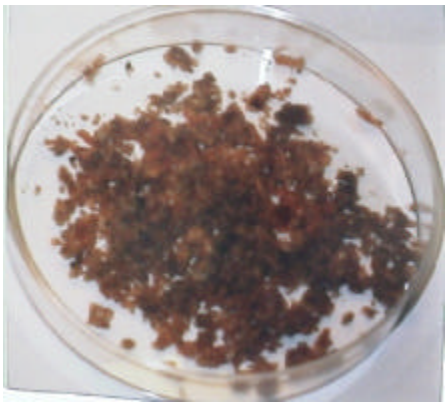
A)



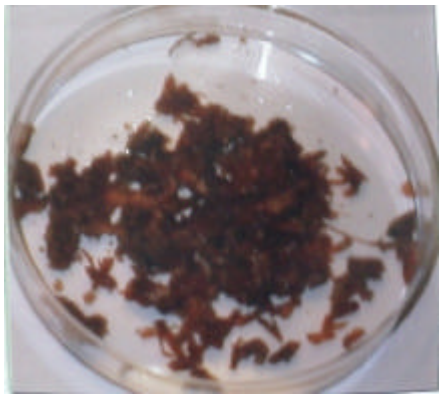
B)



C)



D)



<그림 3-1> 왕겨를 T. versicolor MD-277 균사체를 배양한 후 토양에 적용한 경우

A, A배지 처리 왕겨를 토양에 적용한 경우

B, B배지 처리 왕겨를 토양에 적용한 경우

C, 왕겨 첨가 안하고 직접 토양에 균사체를 적용한 경우

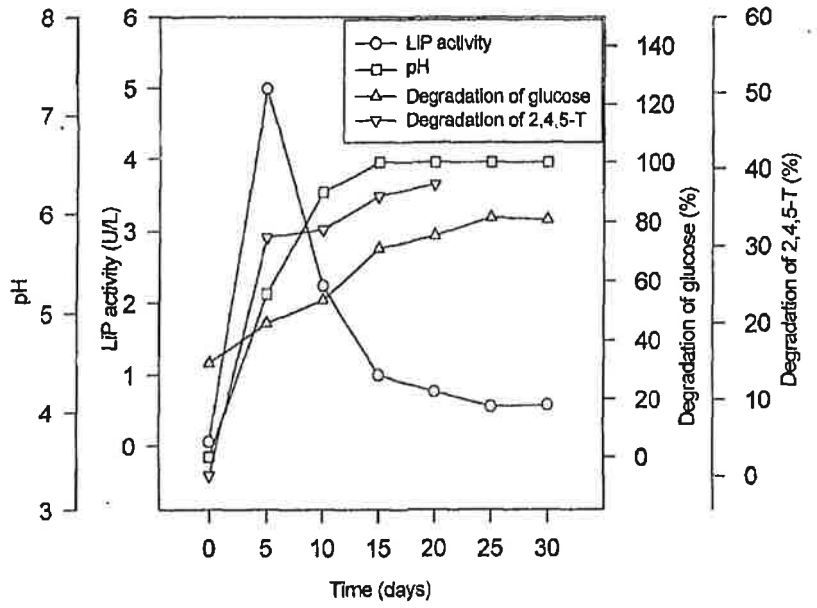
D, 처리 안된 왕겨.

b. 제초제 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T) 분해

2, 4, 5-T는 오랫동안 미국 및 세계각국이 잡초제거 목적으로 제초제 성분에 함유한 성분이며, 1979년 multiple chromosomal aberration을 일으키는 유전자 독성이 있는 것으로 알려졌다. 토양 중에 존재하는 2, 4, 5-T는 분해가 지연되며, 제초제의 살포로 오랜 기간 동안 축적된 2, 4, 5-T는 미국 공군기지에서 처음으로 문제화되었다.

국내에서도 2, 4, 5-T phenoxy계 제초제를 현재 사용되고 있으므로, 본 실험에서는 10 ㎎/ℓ의 농도로 *F. chrysosporium* 균사체에 의한 분해를 관찰한 결과 그

림 3-2와 같이 20일 동안 약 40%가 분해되었다. 이와같은 분해율의 대부분은 배양 5일 동안에 급격히 일어났으며 그후는 분해율이 감소하였다. 본 실험에서 적용한 10 mg/ℓ농도에서는 곰팡이 성장에 영향을 주지 않았지만, 50 mg/ℓ이상을 적용하였을 때는 곰팡이의 생육이 지연되거나 전혀 자라지 않아서 분해력을 측정할 수 없었다. 2, 4, 5-T의 분해력과 LiP 역가 사이에는 직접적인 상관 관계를 관찰할 수는 없었지만, LiP 역가는 배양 초기에 최대 값을 나타내었고, 이 기간의 2, 4, 5-T 분해력이 최대인 것으로 미루어 LiP를 포함한 효소 생성이 2, 4, 5-T 분해에 영향을 준 것으로 사료된다. LiP는 그후 감소하여 배양 15일 이후에는 거의 LiP 역가를 검출할 수 없었다. pH는 배양 초기 4.2 보다 약간 증가하였으나, 15일 이후에는 5 이상으로 상승하였다. 이와같은 pH의 상승도 효소의 최적 범위를 벗어났으므로 효소 및 2, 4, 5-T 분해력에 영향을 주었다고 분석된다.

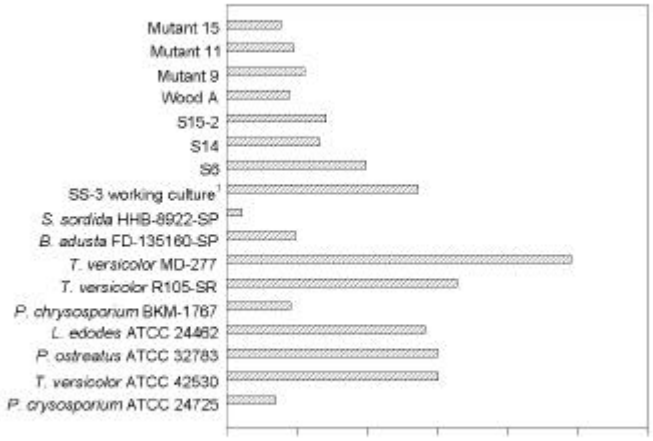


<그림 3-2> *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 균사체에 의한 10 ppm 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid 분해 및 배양 중의 특성

c. 선별 백색부후곰팡이의 고체배양에 의한 볏짚 리그닌 분해

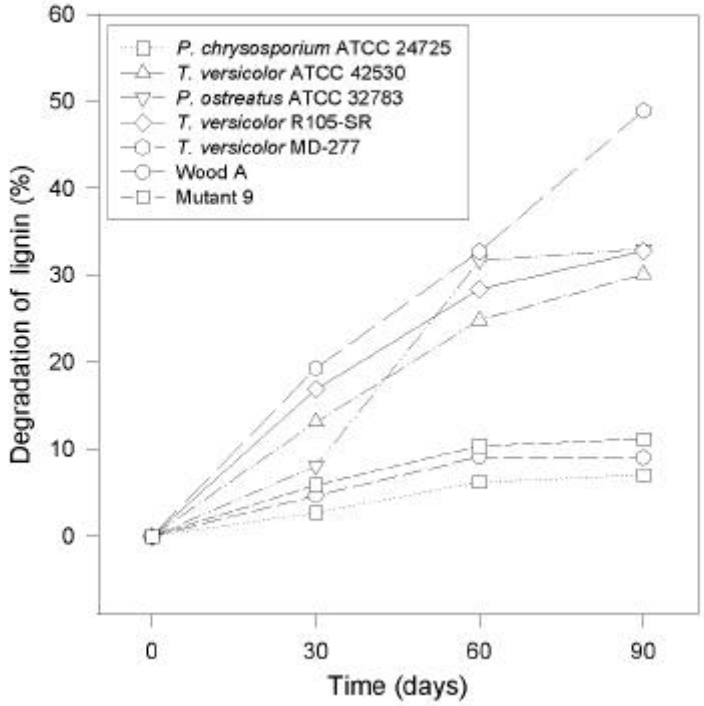
미국 농무성 (USDA) Forest Product Laboratory에서 분주받은 biopulping에 응용되는 백색부후곰팡이를 비롯한 6종의 균주 및 전년도에 확보되었던 자연계 분리 곰팡이와 *P. chrysosporium* 변이주를 비롯한 17개 백색부후곰팡이를 3개월간 고체배양으로 볏짚 리그닌의 분해를 관찰하였다 (그림 3-3). *T. versicolor* MD-277은 본 실험조건에서 약 50% 리그닌을 분해한 반면, *S. sordida* HHB-8922-SP는 약 3%만을 분해하였다. 또한 같은 속의 백색부후곰팡이인 *T. versicolor* MD-277, R105-SR, 및 ATCC 42530은 각각 50, 33, 30% 분해율을 나타내었다. Biopulping에 사용되는 SS-3 working culture는 약 30%의 분해율을 보였다. 이와같은 결과로 미루어 백색부후곰팡이는 일반적으로 리그닌을 분해하는 특성을 가지고 있지만, 특정 곰팡이의 선택이 요구된다.

시간에 따른 리그닌의 분해를 선택된 곰팡이를 중심으로 살펴보면, *T. versicolor* MD-277은 배양 90일 동안 일정한 비율로 리그닌을 분해하였으나, *P. ostreatus*, *T. versicolor* R105-SR 및 ATCC 42530은 배양 60일 이후부터는 리그닌 분해율이 감소하였다. Wood A, Mutant 9 및 *P. chrysosporium* ATCC 24725는 리그닌 분해율이 10% 이하이었으며, 제 2장의 실험결과와 비교하여 낮은 분해율을 나타내었다. 이와같은 결과는 실험간의 오차에 기인된 것으로 분석되며, 특히 *P. chrysosporium*의 경우, 균주 상태의 변화로 여겨진다.



<그림 3-3> 각종 백색부후곰팡이가 90일의 고체 배양 동안 분해한 리그닌 비교

1: USDA (미국 농무성), Forest Product Laboratory에서 biopulping에 사용하는 균주



<그림 3-4> 선택 백색부후곰팡이 고체 배양에 의한 리그닌 분해율

d. 미량원소의 영향

첨가 농도를 10배 증가하였을 때 *P. chrysosporium*이 생산하는 laccase 역가를 약 8.9배 증가시킨 반면, *T. versicolor*가 생산하는 laccase 증가는 관찰할 수 없지만, LiP 역가는 약 1.3배 증가하였다 (표 3-3).

Mn^{++} 첨가 농도의 증가는 (표 3-4) LiP 및 laccase 역가 증가를 보이지는 않았지만, Mn peroxidase의 경우, Mn^{++} 첨가를 control 보다 5배 및 10배 증가하였을 때 *P. chrysosporium*은 각각 1.32배, 1.35배가 증가하였고, *T. versicolor* MD-27은 1.57배, 1.58배 각각 증가하였다. Mo 및 Zn 이온의 5배 및 10배 첨가는 효소 역가 증가 효과 없었으며, 또한 저해를 일으키지도 않았다 (표 3-5,3-6).

<표 3-3> $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가농도 (0.36 mM, 1.8 mM, 3.6 mM)가 *P. chrysosporium* ATCC 24725와 *Trametes versicolor* MD-277의 배양 7일 동안 생산하는 lignin peroxidase, Mn peroxidase, laccase 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향.

균 주	*P. chrysosporium* ATCC 24725			*T. versicolor* MD-277		
농 도 (mM) / 인자(U/L)	0.36	1.8	3.6	0.36	1.8	3.6
lignin peroxidase	7.35	7.9	7.9	30	34.27	40.37
Mn peroxidase	2.47	2.54	1.99	141.87	189.67	159
laccase1	0.59	3.75	5.23	111.05	136.14	107.89
glucose 소비량 (%)	70	41	40	69	76	75

1, 배양 5일째 생성 효소역가

<표 3-4> $MnSO_4 \cdot H_2O$ 첨가농도 (0.17 mM, 0.85 mM, 1.7 mM)가 *P. chrysosporium* ATCC 24725와 *Trametes versicolor* MD-277의 배양 7일 동안 생산하는 lignin peroxidase, Mn peroxidase, laccase 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향.

균 주	*P. chrysosporium* ATCC 24725			*T. versicolor* MD-277		
농도(mM) / 인자(U/L)	0.17	0.85	1.7	0.17	0.85	1.7
lignin peroxidase	7.35	6.62	5.99	30	20.97	24.81
Mn peroxidase	2.47	3.27	3.33	141.87	222.79	224.58
laccase1	0.59	0	0	111.05	106.05	106.03
glucose 소비량 (%)	70	41	61	69	75	80

1, 배양 5일째 생성 효소역가

<표 3-5> Na_2MoO_4 첨가농도 (0.0413 mM, 0.2065 mM, 0.413 mM)가 *P. chrysosporium* ATCC 24725와 *Trametes versicolor* MD-277의 배양 7일 동안 생산하는 lignin peroxidase, Mn peroxidase, laccase 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향.

균 주	*P. chrysosporium* ATCC 24725			*T. versicolor* MD-277		
농도(mM) / 인자(U/L)	0.0413	0.2065	0.413	0.0413	0.2065	0.413
lignin peroxidase	7.35	7.9	6.96	30	30.29	31.87
Mn peroxidase	2.47	2.76	2.86	141.87	147.28	149.5
laccase1	0.59	0.57	0.48	111.05	133.18	118.97
glucose 소비량 (%)	70	42	42	70	71	68

1, 배양 5일째 생성 효소역가

<표 3-6> $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가농도 (0.0174 mM, 0.087 mM, 0.174 mM)가 *P. chrysosporium* ATCC 24725와 *Trametes versicolor* MD-277의 배양 7일 동안 생산하는 lignin peroxidase, Mn peroxidase, laccase 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향.

균 주	*P. chrysosporium* ATCC 24725			*T. versicolor* MD-277		
농도(mM) / 인자(U/L)	0.0174	0.087	0.174	0.0174	0.087	0.174
lignin peroxidase	7.35	7.05	7.44	30	25.87	28.26
Mn peroxidase	2.47	2.70	2.91	141.87	115.93	154.39
laccase1	0.59	1.51	0.96	111.05	124.68	123.68
glucose 소비량 (%)	70	40	40	69	72	72

1, 배양 5일째 생성 효소역가

e. pH의 영향

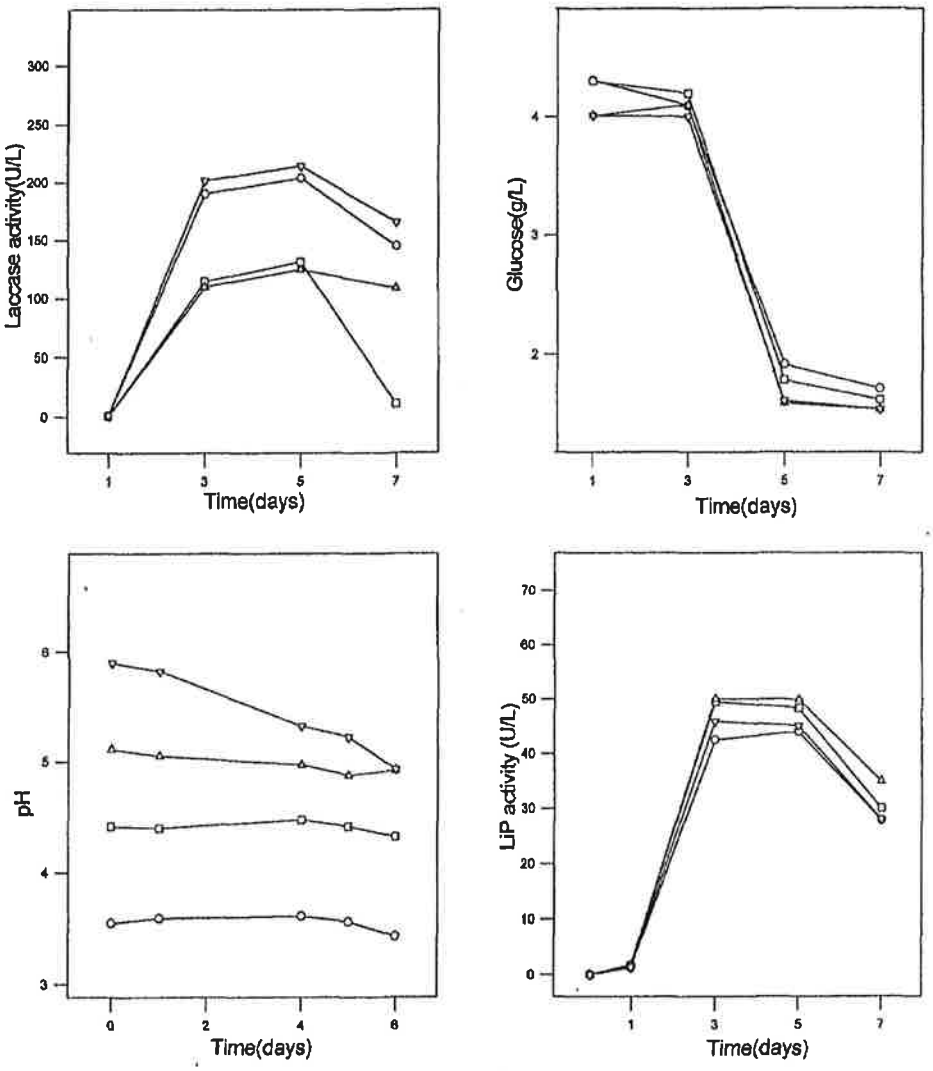
백색부후곰팡이 *P. chrysosporium* ATCC 24725가 생산하는 Lignin peroxidase(LiP), Manganese peroxidase(MnP) 및 Laccase를 생산하기 위한 배양액의 초기 pH는 4.2로 조절하였으며, Modified Tien & Kirk 배지에 0.01M trans-aconitic acid를 buffer로 사용하였다. 배양 중 pH는 약간 증가하여 10일 째에는 약 4.5 5.2로 상승하였다. 반면 0.01 M 2,2-dimethyl-succinate를 buffering agent로 사용할 경우 배양 10일에 배양액의 pH가 6이상으로 상승하였으며, 이는 LiP, MnP, Laccase의 생성에 저해현상을 주었다. Trans-aconitic acid를 buffering agent로 사용한 것이 Na-succinate 보다 훨씬 좋은 pH 완충작용을 하는 것으로 관찰되었다.

T. versicolor MC-277 (그림 3-5)은 초기 조절 pH 보다 배양기간 7일 동안 약간 감소한 반면 *P. chrysosporium* ATCC 24725 (그림 3-6)는 초기 조절 pH 보다 다소 올라가는 경향을 보였다. 두 균주 모두 glucose의 분해율은 초기 pH 6.2의 경우, 최대 90%를 배양 5일에 나타냈으며 배양 초기 pH가 높을수록 glucose 분해율이 높았다. *T. versicolor* MC-277이 생산하는 LiP는 배양 중 초기 pH에 의해 현저한 차이를 보이지는 않았지만 laccase는 초기 pH를 6.2로 조절할 경우 가장 높은 역가를 나타내었다.

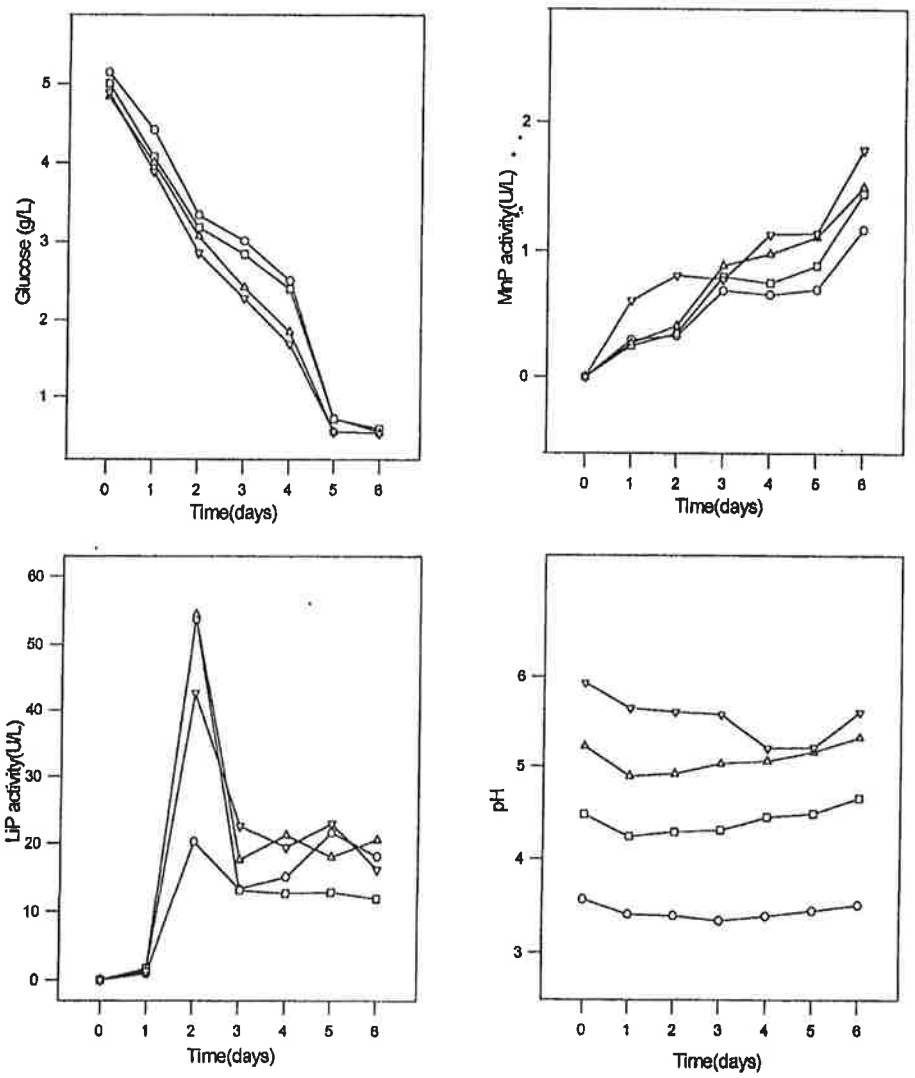
f. 배양기간의 영향

P. chrysosporium ATCC 24725는 액체배양 5일 동안 첨가된 glucose의 약 70% 정도 분해되었다. LiP는 배양 2 3일에 최대 역가를 나타낸 반면, laccase와 MnP 역가는 배양 5일 이후에 약간 증가되었으나 2.5 U/ℓ 이하였다. LiP 역가의 경우 탄소원으로 0.5%와 1% glucose를 첨가한 경우를 비교하여 효소 유도 기간에 상이한 점을 나타내었는데, 1% glucose를 첨가할 경우 배양 2일과 5일에 LiP가 최댓값 즉 28 U/ℓ, 36 U/ℓ을 각각 나타낸 반면, 0.5% glucose의 경우, 배양 2 3일에 최대 45 U/ℓ를 생산하였다. (그림 3-7)

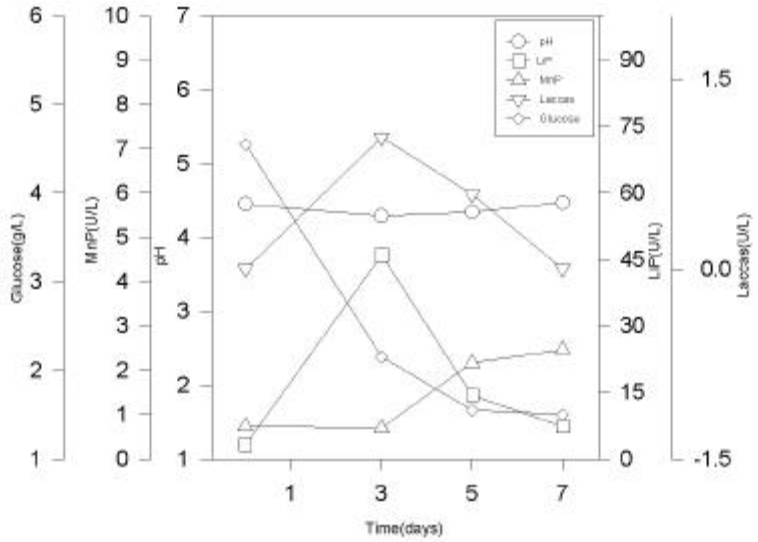
T. versicolor MC-277은 배양 5일 동안 첨가된 glucose의 약 65%를 분해하였으며 5일 이후 glucose의 분해는 아주 천천히 일어났다. 배양액의 초기 pH는 4.31로 조절하였지만 3일 동안 4.16으로 감소하였고 점차 증가하여 배양 5일에는 초기 조절 pH와 비슷한 4.29를 나타내었다. LiP 역가는 약 130.69 U/ℓ로 배양 5일에 최댓값 나타내었으나 이후 감소하였다. (그림 3-8)



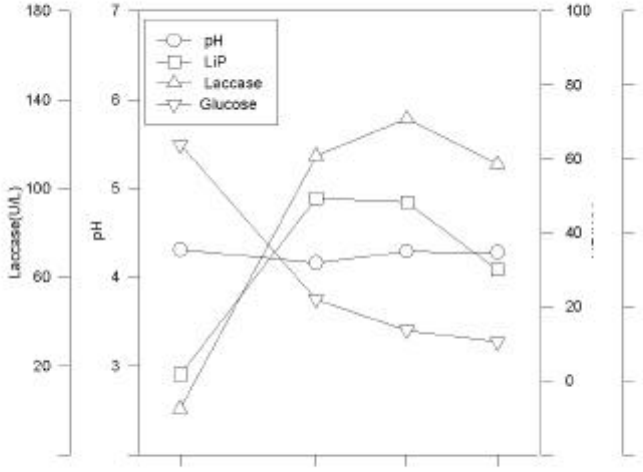
<그림 3-5> 배양 초기 pH의 변화가 *Trametes versicolor* MD-277 균사체에 의한 각종 효소 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향. (-○-:초기 pH 3.2, -□-:초기 pH 4.2, -△-:초기 pH 5.2, -▽-:초기 pH 6.2)



<그림 3-6> 배양 초기 pH가 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725에 의한 각종 효소 역가 및 glucose 소비율에 미치는 영향. (-○-:초기 pH 3.2, -□-:초기 pH 4.2, -△-:초기 pH 5.2, -▽-:초기 pH 6.2)



<그림 3-7> *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 균사체가 배양 중 생산하는 각종 효소 및 배양 인자 변화



<그림 3-8> *Irametes versicolor* MD-277 균사체가 배양 중 생산하는 각종 효소 및 배양 인자 변화

4. 참고문헌

1. Tien M, and T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of unique H_2O_2-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* U.S.A 81: 2280-2284

2. Jensen JR., K.A., Woli Bao, S. Kawai, E. Srebotrik, and K.E. Hammel. 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* Cct: 3679-3686

3. Nishida T., Y. Kashino, A. Mimura, and Y. Takahara. 1988. Lignin degradation by wood-rotting fungi. I. Screening of lignin-degrating fungi. *Mokuzai Gukkaishi*. 34(6): 530-536

4. Carmen R.J., S. Loreto. R. Vicuna, and T.K. Kirk. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* June: 1792-1797

5. 조남석, 이종규, 윤병호, 황병호 공역. 1987. 목재화학. 영남대학교 출판부 158-159

제4절 백색부후곰팡이의 고정화 연구 및 토양적용

1. 서론

자연계에 존재하는 백색부후곰팡이는 세포막에 존재하거나, 세포 외로 분해하는 특이적인 산화효소 : lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, laccase, oxygenase 등에 의해서 리그닌을 CO_2로 완전히 분해한다1. 관련 미생물에 의한 리그닌의 분해 기작에 관하여는 아직까지 밝히지 못하는 점이 많지만, 최근 수년간 산업적인 이용 목적으로 이 분야에 관한 연구가 현저히 진보되어왔다.

자연계 특히 산림토양이나 죽은 나무 및 나뭇잎에 기생하여 견고한 리그닌 구조를 분해하는 백색부후곰팡이는 이와같은 리그닌 분해력 때문에 최근 바이오 펄프 공정 중 전기에너지의 절감효과, 펄프 제지산업의 염소계 표백제 사용절감 효과 및 제지의 고품질화를 이루고 있으며, 또한 동물사료에 처리되어 소화율을 촉진시키는 등의 목적으로 최근 이용되고 있다.

본 연구에서는 백색부후곰팡이 *Phacerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Trametes versicolor* MD-277, *Pleurotus ostreatus* 가 계면활성제(tween 80)의 농도에 따라 lignin peroxidase, Mn peroxidase, laccase등의 효소 생산이 어떠한 영향을 받는지를 알아보고 최적 농도의 tween 80을 배양액 중에 첨가한다. 또한 이미 확립된 효소생산의 최적 조건에서 효소역가가 높은 배양액을 생산하고, 농축하여 고정화 기술을 확립하고 목질계 폐자원인 볏짚 및 왕겨에 효소를 직접 적용하거나 고정화 효소를 적용하여 리그닌을 분해하였다. 또한 관목류에 대한 제초효과가 우수하여 도로, 철도, 목장 등의 잡초 또는 관목구제에 널리 이용되고 있는 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid를 토양에 오염시켜 왕겨배지에서 자란 균사체를 적용하여 분해하고자 한다.

2. 재료 및 방법

a. 균주

본 연구에 사용된 균주는 *Phacerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Trametes versicolor* MD-277, *Pleurotus ostreatus* 이다. *P. chrysosporium*과 *T. versicolor*의 배양조건과 보관방법은 제 2,3장에서 이미 기술하였으며, *P. ostreatus*는 배양배지의 조건을 달리하였고, 배양온도는 *T. versicolor*와 동일하며 최적 배양일은 5 7일이었다.

b. 균주의 배양

*P. chrysosporium*과 *T. versicolor*의 배지성분 및 배양방법은 제 3장에서 이미 기술하였다. *P. ostreatus*는 PDA배지에서의 성장속도가 10일 이상 너무 오래 걸리므로 <표 4-1>과 같은 조성으로 고체감자배지를 만들어 27 ℃ 암소에서 배양하여 4 ℃에서 보관하였으며, 한 달마다 계대배양하여 보관하였다. 이외에 감자대신 감자 거른 액을 첨가하여 배지를 만들어 배양하기도 하였다. 고체감자배지에서 5 7일간 배양된 *P. ostreatus* 균사체는 직경 0.8㎝로 균사체를 잘라내어 균사체 조각 7개를 정치배양용 액체배지 50 ㎖을 포함하는 1ℓ용 삼각플라스크에 접종하였다. 공기의 출입을 막기 위하여 실리콘 마개를 하고 산소를 10분간 치환시킨 후 27 ℃ 암소에서 약 5 6일간 배양하여 균사체를 형성시켰다. 이후 진탕배양 방법은 제 3장에서 이미 기술하였다. 단, tween 80의 농도는 각 균주의 Lignin peroxidase 생산 최적농도를 멸균하여 첨가하였으며, 2.5ℓ배양기를 사용할 경우에는 tween 80을 많이 넣으면 거품이 생겨 균체가 성장할 때 산소와의 접촉면이 작아져 성장이 지연되고 효소 생산율이 떨어지므로 0.2%이상 첨가하지 않았고, 공기는 0.5ℓ/min을 연속적으로 공급했다.

<표 4-1> *P. ostreatus*를 위한 배지의 조성

고체감자배지의 조성 (ℓ)	
KH_2PO_4	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$CaCl_2$	0.1 g
Ammonium tartarate (2 g/100 mℓ, autoclaved)	10 mℓ
Thiamine-HCl (100 mg/100 mℓ, autoclaved)	10 mℓ
100× Trace Element Solution* (filter sterilization)	10 mℓ
5% Glucose (autoclaved)	100 mℓ
trans-Aconitic acid (1.74 g/100 mℓ, pH 4.2, autoclaved)	100 mℓ
Veratryl alcohol (0.1 M 표준용액, autoclaved)	20 mℓ
감자 (300g/500mℓ, autoclaved)	300g
*100× TES (ℓ)	
Nitrilotriacetate	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5 g
NaCl	1.0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CoSO_4$	0.1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.01 g
H_3BO_4	0.01 g
$NaMoO_4$	0.01 g
정치 배양용 액체감자배지의 조성 (ℓ)	
고체감자배지와 동일한 조성에 감자 대신 감자 거른 액 400mℓ을 첨가하고, agar는 첨가하지 않는다.	

c. 효소분석

Lignin peroxidase(LiP)[2], Mn-peroxidase(MnP)[4,5], Laccase(Lac)[3]의 효소분석은 제 3장에서의 방법과 동일하게 실시하였다.

d. 계면활성제(tween 80)의 영향

백색부후곰팡이가 배양액 중에 생산하는 효소 생산의 최적화를 위하여 제 3장에서 기술한 정지배양용 배지(modified kirk 배지)에 tween 80을 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0% 첨가하여 5일 배양하였다. 5일째 배양액(효소액)을 5㎖씩 취해 원심분리(4500rpm, 30분)하여 침전물을 제거한 후, 상등액으로 효소역가를 측정하였다.

e. 백색부후곰팡이로부터 생산된 효소 정제 및 농축

가. 효소액 농축

전술한 바와 같이 *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *P. ostreatus*를 PDA배지 및 고체감자배지에서 5 7일 배양하여 정치배양용 배지 및 액제감자배지에서 정치배양하여 균사체를 형성시킨 후 2.5ℓ 배양기에서 pH 4.5, 27/37 ℃에서 공기 0.5ℓ/min을 공급하면서 최적의 조건에서 효소를 생산하였다. 배양액을 원심분리(4500rpm, 30분)하여 균사체를 제거하고 상등액만 수집하였다. 수확한 배양액 중 1.5ℓ를 10-kDa High Flux Biomax Polysulfone membrane을 사용하여 Ultrafiltration (Millipore Minitan II TM unit)을 하여 10배 농축했다.

나. FPLC 분리

농축한 효소액을 0.2 ㎛ nylon membrane filter를 이용해서 주사기로 여과한 후, Fast desalting column(HR 10/10, Sephadex G-25 Superfine)을 장착한 FPLC(Pharamacia)로 salt를 제거하였다. mobile phase는 pH 6.0의 25 mM sodium citrate 이며, 유속 0.5 ㎖/min으로 30분간 분리하였다. 이때 UV detector로 파장 280 nm에서 분석하였다. desalting column으로 salt를 제거한 분획을 Mono-Q(Anion exchange column, Pharamacia) column을 장착한 FPLC로 LiP를 분리하였다. 이때 단백질량은 0.28 ㎎/㎗(desalting column으로부터 분리한 단백질 용액 2 ㎖)을 inject하였다. mobile phase는 25 mM sodium citrate와 함께 0 1 M NaCl로 gradient를 주었으며, 유속은 0.5 ㎖/min으로 50분 동안 분리했다.

f. 효소의 고정화 및 볏짚, 왕겨 적용

가. 효소의 고정화

고정화에 사용된 담체는 Na-alginate, hydrophillic cuprammonium rayon hollow-fiber(180 ㎛, 직경)이며 제조 방법은 다음과 같다. 10배 농축한 효소액 2U(LiP 기준)와 동일한 양의 4%(w/v) alginate를 잘 혼합하여 주사기에 넣고 needle(14G)을 이용하여 0.05M CaCl2 용액에 떨어뜨려 직경 약 2-3㎜ bead를 만든다. 고정화효소를 안정화하기 위해 CaCl2 용액에 담가두었다가 사용하였다. hydrophillic cuprammonium rayon hollow-fiber(180 ㎛, 직경)를 2-3 ㎝로 절단하여 농축효소

2U(LiP)/1.5g hollow fiber를 흡착시켜 고정화하였다.

나. 고정화 효소의 볏짚 및 왕겨 분해

Na-alginate와 hollow fiber에 적용한 효소를 pore size가 1 ㎜인 직사각형 철망(6×7 ㎝)에 넣는다. 볏짚(1 ㎝씩 자른 것)과 왕겨 1g과 D.W 300 ㎖을 넣은 비커에 고정화 효소가 들어있는 철망을 넣고 27 ℃ 암소에서 24시간 교반 시킨다. 대조구는 효소와 혼합하지 않은 alginate bead와 hollow fiber를 적용하여 같은 조건으로 반응시킨다. 리그닌정량(modified Klason method) 실험방법은 제 2장 실험방법과 동일하게 실시하여 리그닌 분해율을 측정하였다.

g. 효소적용기술

가. 효소액을 이용한 볏짚, 왕겨에 직접 적용

비커에 1 g의 볏짚과 왕겨를 각각 넣은 후 *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *P. ostreatus* 효소액과 10배 농축효소액 2U(LiP기준)를 직접 적용하여 27 ℃ 암소에서 24시간 정치하였다. 대조구는 같은 양의 D.W를 적용하였다. 리그닌정량 실험방법은 전술한 방법과 동일하게 실시하여 리그닌 분해율을 측정하였다.

나. 고체배지에 disk적용

1% 볏짚배지는 modified kirk배지 성분 중 glucose를 빼고 대신 1% 간 볏짚(100mesh)과 2% agar를 첨가하여 autoclave 한 후 petri dish에 15 ㎖씩 부어 사용하였다. 여기에 직경 0.8 ㎝ paper(Watman No 1) disk에 효소액과 10배 농축액을 각각 100 ㎕씩 적셔 배지 중앙에 올려놓아 가시적으로 볏짚의 분해력을 측정하였다.

h. 백색부후곰팡이에 의한 토양 중 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid 분해

토양 중 잔류되어 있는 2,4,5-T를 분해하기 위해 인위적으로 토양에 2,4,5-T를 오염시켜 백색부후곰팡이를 적용하여 분해율을 측정하였다. 제 3장에서 이미 기술했듯이 균사체를 직접 토양에 적용하기는 힘이 들기 때문에 왕겨를 이용하였다. 왕겨(80%)에 corn starch(15%), corn steep liquor(3%) 및 lignosulfonate(2%)를 잘 섞은 후 modified kirk 배지를 첨가해 수분 60%를 조절한 후 121 ℃에서 30분간 멸균한다. *P. chrysosporium*은 1.25×10⁶개 포자를 g당 처리된 왕겨에 접종하였으며, *T. versicolor*, *P. ostreatus*는 1.5×1.5 ㎝로 자른 것을 15개 접종하여 2주일간 배양하였다. 왕겨배지의 습도는 60%를 유지해 주었으며 배양온도는 전술한 바와 같다. 멸균한 토양에 2,4,5-T를 30 ppm 오염시킨 후 <그림 4-1>과 같이 하얗게 균사체가 자란 왕겨를 5 g(wet weight)씩 접종하여 *P. chrysosporium*은 37 ℃ *T. versicolor*, *P. ostreatus*는 27 ℃에서 4주일 동안 적용하였고, 1주일마다 왕겨와 함께 토양 5 g를 sampling하였다.

(A)

(B)

(C)

<그림 4-1> 왕겨배지에 접종하여 2주일간 배양한 균사체 (A) *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (B) *Trametes versicolor* MD-277 (C) *Pleurotus ostreatus*

i. HPLC 분석

sampling한 토양과 10 g의 sodium sulfate anhydrous를 섞어 수분을 제거한다. 23 ㎖의 sodium chloride를 넣어 sonication하여 2,4,5-T를 추출하고 원심분리(300 rpm, 30분)하여 상등액을 모은다. 추출과정을 5회 반복하여 상등액을 모두 모아 감압증류하여 sodium chloride를 모두 날려버린 후 methanol 10 ㎖에 녹인다. 2 ㎛ cellulose nitrate membrane filter를 이용하여 주사기로 여과한 후, Beckman Ultrasphere C18(reverse-phase) column(크기 25 ㎝×4.6 ㎜ 충진물질입자 0.5 ㎛)을 장착한 Beckman liquid chromatography-model Gold(Beckman Instrument, USA)로 분석하였다. mobile phase는 methanol:0.1% phosphoric acid 이 60:40으로 섞인 용매이며, 유속은 1.0 ㎖/min으로 30분간 분석하였다. 이때 Beckman Model 160 UV detector로 파장 230 ㎚에서 분석하였다.

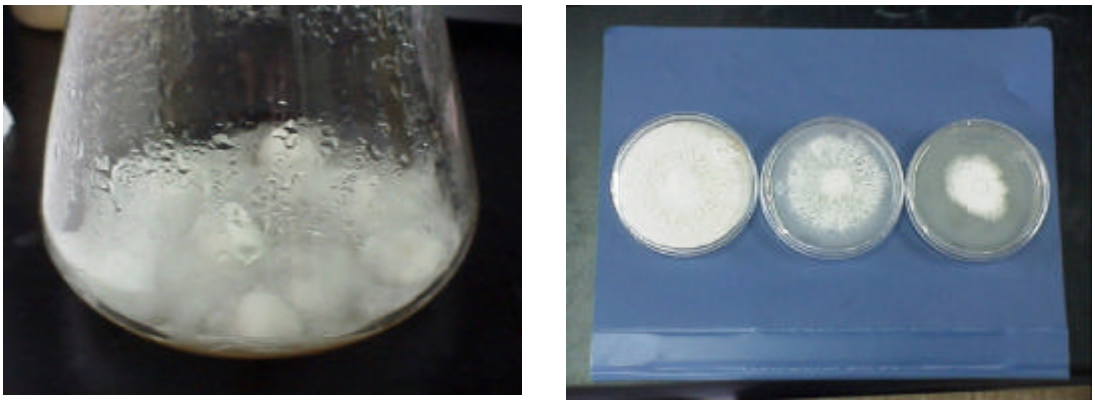
3. 결과

1. *P. ostreatus*를 위한 고체배지 및 액체배지

*P. ostreatus*는 PDA 고체배지에서 자라는 성장속도가 느려 배양하는데 10일 이상 걸리므로 고체감자배지에 27 ℃ 암소에서 배양하였다. *P. ostreatus*는 감자배지에서 가장 단시간에 성장하였는데, PDA배지에서 14일 동안 균사체가 다 자라는데 반해 감자배지에서는 6일이 소비되었으며 감자대신 감자 거른 액을 넣은 배지에서는 9일이 소비되었다. <그림 4-2 (A)>

*P. ostreatus*를 액체감자배지에서 정치 배양한 경우 modified kirk 배지를 사용하여 정치 배양하였을 때보다 균사체가 5일 이상 빨리 형성되었다.<그림 4-2 (B)>

(A) (B)



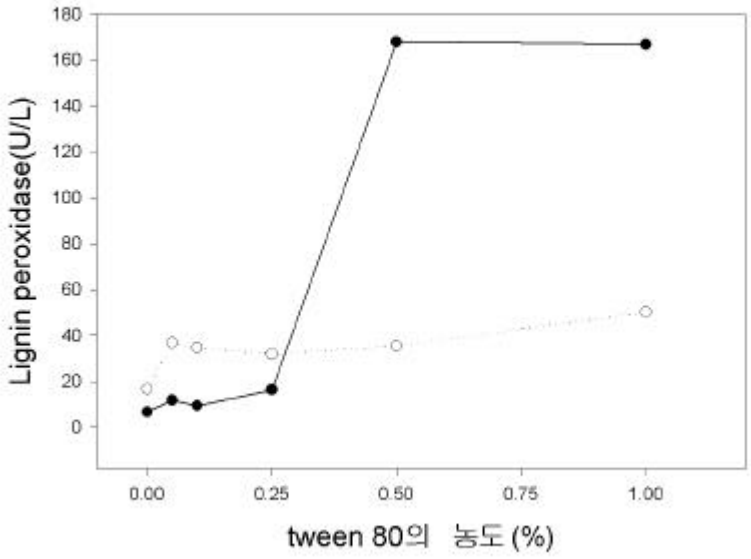
<그림 4-2> 감자배지에서 자라는 *P. ostreatus* (A) 감자배지와 PDA배지에서 자란 *P. ostreatus* 비교. 왼쪽부터 감자배지, 감자거른액 배지, PDA배지(배양 6일째) (B)감자액체배지에서 자란 *P. ostreatus*(배양 6일째)

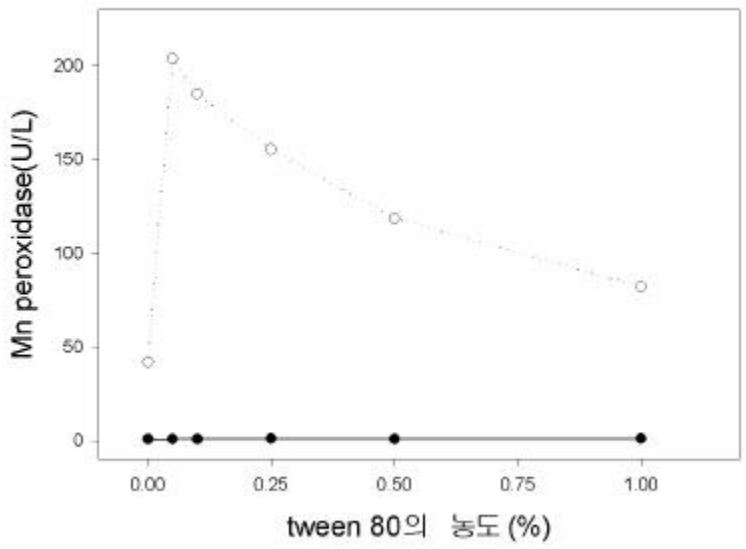
2. tween 80의 영향

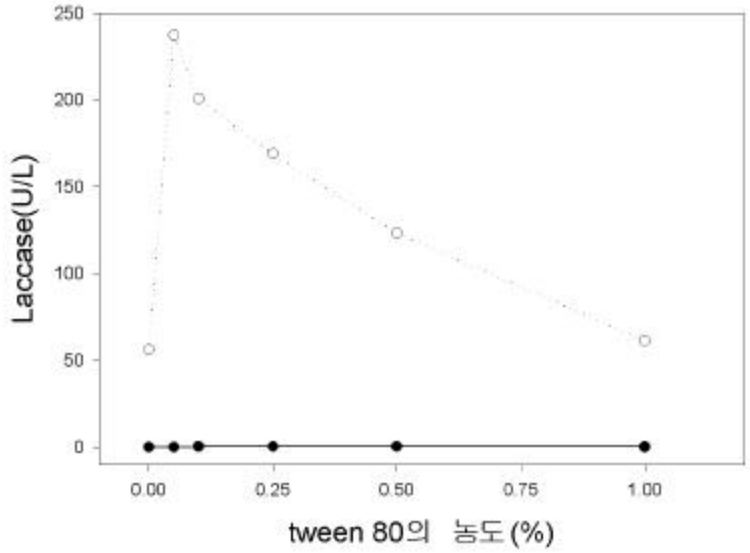
본 실험에서는 *P. chrysosporium*, *T. versicolor* 균주에 대해 250㎖ 삼각플라스크에 온도와 pH 및 산소 공급이 일정한 조건에서 tween 80의 농도가 각 균주로부터 생산되는 효소에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 tween 80의 농도를 달리하였다. *P. chrysosporium*이 생산한 LiP는 tween 80 0 0.25%에서는 큰 차이가 없고, 0.5% 이상에서는 10배 이상 높게 나타났으며, MnP와 Lac는 별다른 영향이 없는 것으로 보였다. *T. versicolor*가 생산한 LiP는 tween 80의 농도가 높을수록 역가가 높게 나타났으며, MnP와 Lac는 0.05%에서 가장 높았으며, 그 이상에서는 농도가 높아질수록 효소역가가 낮게 나타났다. <표 4-2>

<표 4-2> *P. chrysosporium*, *T. versicolor*의 tween 80 농도에 따른 효소역가 비교

tween80의 농도(%)	*P.chrysosporium*			*T.versicolar*		
	LiP	MnP	Laccase	LiP	MnP	Laccase
0	6.6	0.6	0	16.7	41.8	56.2
0.05	11.8	0.7	0	36.7	203.8	237.4
0.1	9.4	0.7	0.4	34.7	184.9	200.7
0.25	16.3	1.0	0.4	31.8	155.2	168.9
0.5	167.9	0.8	0.4	35.4	118.4	123.3
1.0	166.8	0.9	0.2	50.2	82.1	61.2







<그림 4-3> *P. chrysosporium*, *T. versicolor* 가 생산하는 효소역가에 tween 80의 농도가 미치는 영향(-●- :*P. chrysosporium* , -○-: *T. versicolor*)

3. 효소의 농축 및 정제

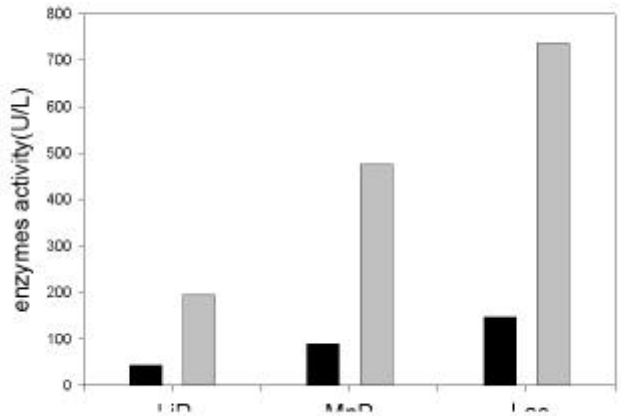
가. 배양액(효소액) 농축

P. chrysosporium, *T. versicolor*, *P. ostreatus*를 Ultrafiltration 하여 배양액 중 salt와 분자량 10,000이하인 분자들이 대부분 제거되었으므로 배양액의 양은 10배 농축되었다. 하지만 배양액의 양이 10배 농축되었다고 해서 효소역가도 10배 농축되지는 않았다.<표 4-3> *T. versicolor*와 *P. ostreatus* 는 배양액이 10배 농축되었을 때 LiP, MnP, Lac 가 약 5배 농축되었다. 반면 *P. chrysosporium*은 약 2배 농축되었다.

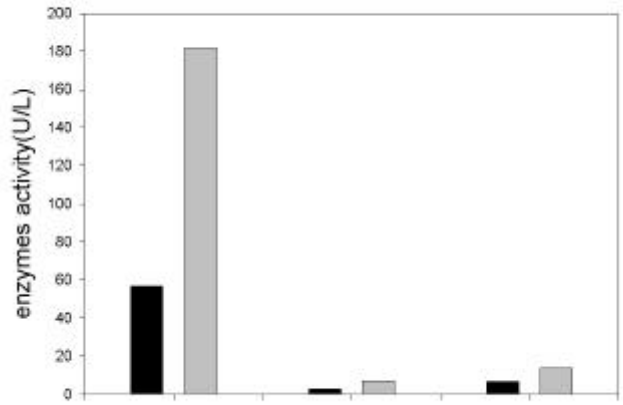
<표 4-3> *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *P. ostreatus*를 ultrafiltration 전후 비교

효소역가 / 균 주	단백질 정량 (mg/dL)		Lignin peroxidase (U/L)		Manganese peroxidase (U/L)		Laccase (U/L)	
	UF전	UF후	UF전	UF후	UF전	UF후	UF전	UF후
T.versicolor	22.4	74.3	35.4	92.0	41.3	475.5	79.3	736.1
P.chrysosporium	5.4	16.8	28.8	66.1	3.0	7.0	6.6	13.6
P.ostreatus	1.2	36.7	580.9	605.8	17.6	126.9	98.7	633.5

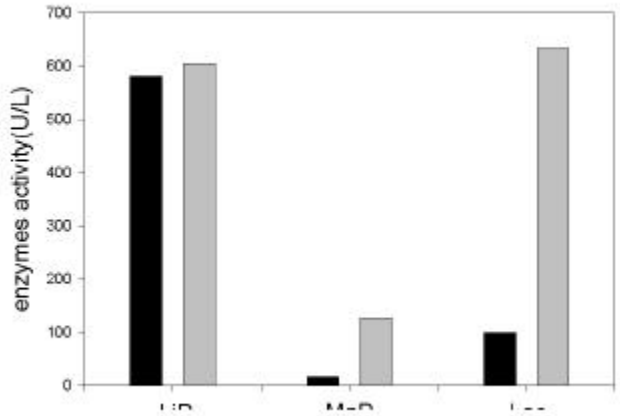
(A)



(b)



(C)



<그림 4-4>배양액 ultrafiltration전후의 효소역가비교. (A) *F. chrysosporium* (B) *T. versicolor* (C) *P. ostreatus* (■: 배양액 원액, □: ultrafiltration 후)

나. Lignin peroxidase 분리

T. versicolor MD-277이 생산한 효소액(LiP-65.7, MnP-147, Lac-204.2)을 fast desalting column이 장착된 FPLC로 분리했을 때 fraction tube number 2,3,4,5에서 단백질이 검출되었다. 이 때 분리된 단백질의 LiP역가를 측정하였더니 전혀 나타나지 않아 FeSO4 48mM을 첨가하였더니 <표 4>와 같이 LiP가 측정되었다. 단백질이 검출된 fraction 만을 모은 후 Mono Q(anion exchange column) column이 장착된 FPLC로 LiP를 분리하였을 때 fraction tube number 10,11,12에서 단백질이 검출되었는데 효소역가가 LiP만 측정되는 것으로 보아 LiP임을 알 수 있다.<표 4-5>

<표 4-4> desalting column으로부터 분리된 단백질의 효소역가

fraction tube No.	LiP	MnP	Lac
2	561.6	21.9	98.3
3	394.2	3.9	41.7
4	418.2	0.5	22.5
5	436.2	0.1	25.0

<표 4-5> Mono-Q로부터 분리된 효소의 역가

fraction tube No.	LiP	MnP	Lac
10	64.5	0.007	1.7
11	86.3	0	0
12	72.6	0	0

4. 효소 및 고정화 효소에 의한 볏짚 분해

P. chrysosporium, *T. versicolor*, *P. ostreatus* 가 생산하는 효소액을 직접 혹은 10배 농축해서 볏짚과 왕겨에 적용하였을 때 분해가 되기는 하였으나 분해율이 매우 적었다.<표 4-6> klacon 리그닌 정량법에 의해 단리된 리그닌의 색은 진한 갈색을 띠게 되는데, 효소액 및 농축효소액에 의해 분해된 리그닌의 색은 엷은 갈색을 띠었다. 따라서 가시적으로 볏짚 및 왕겨의 리그닌이 효소에 의해 분해된 것을 가시적으로 관찰할 수 있었다. 반면에 효소액을 alginate에 고정화해서 적용하였을 때 간 볏짚(100mesh 통과)은 세 균주 모두 10%이상 분해되었고, 1cm 간격으로 자른 볏짚은 24시간 동안 약 20% 분해되었으며, 왕겨는 거의 분해가 되지 않았다. hollow fiber에 고정화하였을 때 간 볏짚의 경우 30%가 분해되었는데 이때는 볏짚의 유실이 있어 분해율이 높게 나타난 것으로 추측된다. 1 cm 간격으로 자른 볏짚은 24시간 동안 17% 이상 분해하였고, 역시 왕겨는 거의 분해되지 않았다.

<표 4-6> *P. chrysosporium, T. versicolor, P. ostreatus* 가 생산하는 효소액에 의한 볏짚 및 왕겨 분해율(%) 비교

백색부후곰팡이 / 효소처리방법		*T. versicolor* MD-277	*P. chrysosporium* ATCC 24725	*P. ostreatus*
배양액 원액	간 볏짚	2.3	2.2	1.9
	왕겨	1	2.4	0.9
배양액 농축액	간 볏짚	1.5	3.8	2.9
	왕겨	1.8	3.4	1.4

<표 4-7> *P. chrysosporium, T. versicolor, P. ostreatus* 고정화효소에 의한 볏짚 및 왕겨 분해율(%) 비교

백색부후곰팡이 / 효소처리방법		*T. versicolor* MD-277	*P. chrysosporium* ATCC 24725	*P. ostreatus*
alginate	간 볏짚	12.3	14.4	14.3
	볏짚	19.3	18.9	18.9
	왕겨	0.15	0.7	0
hollow fiber	간 볏짚	28.8	30.7	29.5
	볏짚	17.3	18.3	19.1
	왕겨	0.8	0	0

5. 고체배지에 disk 적용

백색부후곰팡이가 분비하는 특이적인 산화효소: lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, laccase, oxygenase 등에 의해서 리그닌은 CO_2로 완전히 분해되므로1 리그닌이 함유된 볏짚을 포함하는 1% 볏짚배지에 효소액을 적용하였다. *T. versicolor*는 생산한 효소액과 농축효소액을 disk에 묻혀 볏짚배지에 적용하였을 때 disk주변 볏짚을 분해하여 투명하게 되는 것으로 보아 볏짚 중 리그닌을 분해하는 것을 가시적으로 관찰할 수 있었다. <그림 4-5> *P. chrysosporium*과 *P. ostreatus*는 분해가 되기는 하나 시간이 너무 오래 걸리고, 그사이에 균사체가 자라서 분해되는 것을 볼 수 없었다.

6. 백색부후곰팡이에 의한 토양 중 2,4,5-T 분해

왕겨에 *T. versicolor, P.chrysosporium, P.ostreatus* 균사체를 배양하여 pellet을 만든 후 2,4,5-T 30 ㎎/ℓ를 오염시킨 인공 토양에 적용하여 수분을 60% 유지하면서 배양한 결과, 백색부후곰팡이를 적용하지 않은 토양에서도 약 14%의 2, 4, 5-T 분해를 측정할 수 있었으며, 곰팡이를 적용한 경우, 높은 분해율을 나타내어 *T. versicolor, P.chrysosporium, P.ostreatus* 경우 배양 1주일 동안 각각 63, 55, 46%

(A) (B)

<그림 4-5> Paper disk를 이용한 *T. versicolor* 배양액(효소액)의 1%볏짚고체배지 분해 효과 (A) 100㎕ 배양액(3.5×10-3U) (B) 100㎕ 농축배양액(9.2×10-3U)

가 분해되었다. 배양 2-3주 경과 후, 분해력은 증가하지 않았으며, *T. versicolor*의 경우 2주 후에 최대 약 66%가 분해되었다.

자연계에서 난분해성인 리그닌의 분해력을 가지고 있는 백색부후곰팡이는 리그닌과 구조가 유사한 구조를 가지는 유류에서 발생하는 환경오염물질인 다환성 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)의 분해에 최근 응용되고 있다. 1985년 Bumpus1등이 Phanerochaete chrysosporium에 의한 benzo(a)pyrene, DDT 등의 PAH 분해력을 관찰한 이후, 백색부후곰팡이에 의한 환경오염의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 우리나라에서도 해마다 다양한 오염성 유기화합물의 사용량이 증가되고 있으며. 이들 유기화합물 중에 특히 농약으로 많이 이용되고 있는 염소계 방향족탄화수소는 구조적으로 매우 안정하고 잔류성이 강한 난분해성물질로서 농약의 구제대상이 아닌 생물에 유입되어 돌연변이 유발원 및 발암원으로 작용하게 될 수 있으며 근권의 미생물에도 직, 간접적 영향을 주고 있다.[6,7] 염소계 방향족탄화수소화합물 중 2,4,5,-trichlorophenoxyacetic acid는 관목류에 대한 제초효과가 우수하여 도로, 철도, 목장 등의 잡초 또는 관목구제에 널리 이용되고 있다. 이외에 식물호르몬제로서 과수 낙과 방지제. 감자류의 발아 방지제, 밀감류의 크기 증가 및 착색 지연제로도 널리 이용되고 있다.[8,9] 그러나 2,4,5-T 는 genotoxic effect를 가져 사람에 있어 기형아 출산을 유발시킨 사례가 보고된 바 있다.[6,7]

5. 참고문헌

1. Bumpus, J.A., M. Tein, D. Wright, and S.D. Aust. 1985. Oxidation of environmental pollutants by a white-rot fungus. *Science* 228: 1434-1436

2. Tien M, and T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of unique H_2O_2-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* U.S.A 81: 2280-2284

3. Carmen R.J., S. Loreto. R. Vicuna, and T.K. Kirk. 1993. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* June: 1792-1797

4. Jensen JR., K.A., Woli Bao, S. Kawai, E. Srebotrik, and K.E. Hammel. 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* Cct: 3679-3686

5. Nishida T., Y. Kashino, A. Mimura, and Y. Takahara. 1988. Lignin degradation by wood-rotting fungi. I. Screening of lignin-degrating fungi. *Mokuzai Gukkaishi*. 34(6): 530-536

6. Grant, W.F., 1979. The Genotoxic Effects 2.4.5-T. *Mutat. Res*. 65 83

7. Hanify, J. A., P.Metcalt, C. L.Nobbs, and K. J.Worsley. 1981. Aerial spraying of 2,4,5-T and human birth malformations: on epidermiological investigation. *Science*, 212: 349 351

8. kilbane, J. J., D. K.Chatterjee., J. S.Karans., S.T.Kellogg and A. M.Chakrabarty. 1982. Biodegradation of 2,4,5-T by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. environ. Microbiol*. 44: 72 78

9. Suflita, J. M., J.Stout, and J. M.Tiedje. 1984. Dechlorination of 2,4,5-T by an anaerobic microbic microorganisms. *J.Agric.Food.Chem*.32: 218 221

10. 조남석, 이종규, 윤병호, 황병호 공역. 1987. 목재화학. 영남대학교 출판부 158-159

제5절 국내 토양의 목질계 폐자원 실태조사

우리나라의 농산·임산계 폐자원에 관한 연구는 1970년대부터 농촌진흥청, 임업시험연구소 등을 중심으로 활발히 이루어져 왔다. 1973년도의 에너지쇼크이후 농산·임산계 폐자원은 대체에너지 원료물질로서 국·내외적으로 각광을 받기 시작, 정부출연 연구소·대학 등에서 농산, 임산, 축산, 식품산업 각 분야 유기성 폐자원의 에너지 전환 기술 개발 추진이 활발해졌다. 이와 때를 맞추어 광합성으로 고정되는 탄수화물 사이클 전체가 바이오매스라는 용어로 통칭되면서 정부 주도의 대체에너지 개발 주요 아이템이 되기에 이르렀다.

1980년대에 들어서자 바이오매스는 생물학적 용어로서보다는 에너지 자원 공학적 용어로서 더 보편화되었다. 현재 바이오연료, 바이오알콜, 바이오수소 등 바이오에너지 개발이용은 OECD, EU, IEA 등 선진국의 에너지 수급 정책과 지구환경보존방안 수립 집행에서의 핵심사항이 되고 있다.

세계의 농·임산분야 목질계 폐자원량은 <표 8>에 일부 나타난 바와 같이 약 720억 TOE에 달하는데 실제 부존량은 2 000억톤/년이라는 견해가 대부분이다(2).

<표 5-1> 세계의 농산·임산 분야 목질계 폐자원 부존량

단위: 10억 TOE

지 역	농산계폐자원	임산계폐자원	임 목	합 계
미국/캐나다	0.4	0.9	8.6	9.9
유 럽	0.3	0.5	2.8	3.6
일 본	0.02	0.05	0.2	0.27
호주/뉴질랜드	0.1	0.05	4.4	4.55
구소련	0.2	0.5	11.5	12.2
남 미	0.6	0.3	12.7	13.6
아프리카	0.2	0.3	13.0	13.5
중 국	0.5	0.2	4.0	4.7
아세아	0.8	0.5	8.2	9.5
오세아니아	-	-	0.3	0.3
합 계	3.12	3.3	65.7	72.12

이 자료에는 도시폐자원(폐지류, 주방폐기물, 폐목, 하수슬러지)과 식품가공폐수 등이 제외되어 있는데, 만일 이 모든 유기성 폐자원까지 포함되면 총 폐자원량은 훨씬 증가될 것이다. 유기 자원량 중에서 식량에너지, 유용물질 생산 등으로 세계

가 이용하는 양은 250억 건량톤/년으로 실제 부존량의 1.3%밖에 안 된다. 250억 M/T 중에서 약 40%는 식량·사료용이고 에너지 이용은 20%이다(1,270백만 TOE).

UN과 IEA 예측에 따르면 현재의 목질계 폐자원 이용률 제고 가능성은 거의 무한하다고 한다. 우리나라는 모든 면에서 자원 빈국이라할 수 있는데 특히 에너지 분야는 더욱 심하여 석유류 연료의 해외 의존도는 100%에 달하며 1995년도 말 현재의 에너지 수입액은 186억 달러에 이른 실정이다. 국내 목질계 폐자원의 연간 부존량이 1995년도 에너지 수입액과 동일한 1.5억 TCE(186억달러), 연간 폐자원 발생량이 농·임산계만도 약 400만 TCE(4.8억달러)인 것은 다행한 일이라 하겠는데, 이 자원의 개발 이용은 범국가적으로 추진돼야할 매우 긴요한 사안이라 할 것이다.

이 같은 중요성을 감안하여 1980년대 초부터 한국에너지기술연구소는 목질계 폐자원을 중심으로 한 각종 유기폐자원의 에너지화 기술개발에 대해 연구 노력을 경주하여 왔으며(1982, 1985, 1989, 1995, 1996), 한국과학기술원(1981, 1984)은 바이오매스의 에너지화 연구 외에도 개발전략연구를 진행하였다. 목질계 폐자원 실태 파악을 위한 기초분야 연구는 조재명(1974), 이흥규·유진우(1975), 농촌진흥청(1980), 삼림청(1979, 1981), 이돈구외(1981, 1982), 이경재(1984), 김갑덕외(1985) 등에 의하여 활발히 추진되었고 많은 연구실적도 발표된 바 있다.

본 조사에서는 그 동안 국내외에 발표된 문헌을 통해 농산계·임산계 폐자원 조사방법들을 정립, 최근의 국내 총자원량을 파악한 후 이를 근거로 토양 잔류량을 추정, 제시하였다. 농산 폐자원의 가장 큰 부분인 볏짚은 주로 뿌리부분과 낙수부분이 매년 잔류 분해되고 있고, 과수 경작지에서는 전정지 폐재 일부와 낙엽이 잔류, 분해되고 있다. 임산폐자원중 가장 많은 토양 내 잔류물은 낙엽과 조림·육림관리 부산물이며, 연료림 벌채지역은 뿌리부분과 벌채폐재 등의 잔류량이 많다.

<표 5-2> 농산물 종류별 부산물 구성부위 및 단위 면적당 부산물 발생량단위: kg/10a

농산물	부위	부산물	농산물	부위	부산물
쌀	볏짚	518	감자	줄기	131
	왕겨	113	콩	줄기	168
보리	짚	269		깍지	70
	맥강	62	땅콩	줄기	143
밀	짚	217		깍지	60
호밀	짚	127	팥	줄기	123
옥수수	줄기	566		깍지	42
조	짚	201	녹두	줄기	119
	겨	13		깍지	44
메밀	줄기	138	참깨	줄기	131
	겨	17	유채	줄기	305
고추	줄기	294	들깨	줄기	138
고구마	줄기	646		잎	137

농산부문 목질계 폐자원은 농산 바이오매스와 동일 개념으로 간주하여 그 부존량은 한국에너지기술연구소 연구보고서 '바이오매스 자원조사 및 에너지 평가분석(1989-1991)'에 제시된 방법에 준하여 산출하였다. 즉, 농산물 종류별 경지면적을 조사하고 여기에 단위면적당의 농산물 종류별 부산물량을 곱하는 방법이다. 부산물은 식용 이외의 부위를 주대상으로 하는데 구체적인 부위와 각 부위별 발생량은 농촌진흥청 발행의 '농산물 표준소득분석(1982)'를 참고하였으며 각 농산물별 경지면적은 한국통계연감(1996) 발표치에 따랐다. <표 9>는 농촌 진흥청의 '농산물 표준소득분석'에 나타난 농산물 종류별 부산물 부위 구분 및 단위 면적(10a)당 부산물 발생량이다.

한편 에너지 자원 개념의 바이오매스 종류는 국가별 경제 수준, 식생활 습관, 에너지 정책, 에너지 전환기술 수준 등에 따라 달라진다. 즉, 고구마, 옥수수 등은 일부 선진국에서는 바이오매스로 분류되지만 후진국에서는 식량 자원으로서 가치가 더 큰 실정이다. 이 같은 가치의 차이는 우리나라에서도 곧 있을 수 있다는 전제하에 금번 조사분석에서는 선진국의 사례를 참고하여 보리, 고구마, 유체, 옥수수 등 몇 개 농산물을 바이오매스 자원으로 유념하는 뜻에서 21개종의 농산물별 연간 주곡생산량을 아울러 제시하였다<표 11>.

현재 우리나라에서 재배되고 있는 농산물은 전분식물, 단백질식물, 유지식물, 약용식물, 기호식물, 향료식물 등 100여종에 이르고 있지만, 본 보고서에서는 주곡생산량이 큰 미곡, 맥류, 두류, 서류, 과실류, 특용작물류 중심으로 21종을 선정 조사하였다. 과실류의 목질계 폐자원은 전정지(剪定枝)만으로 한정하였고, 낙엽량은 일반 활엽수 낙엽량 1,267kg/ha(목질계 폐자원으로서의 낙엽)의 50%로 계산, 토양잔류량 산정에만 반영하였다. 낙엽류는 임지나 농지에서 퇴비로 재 순환될 뿐만 아니라, 정확한 발생량 파악이 어렵고, 절대량에서 큰 의미가 없으므로 자원 발생량 산출에서는 제외한 것이다. 단위면적당 농산분야 과수별 목질계 폐자원 발생량은 <표 10>에 나타내었다.

채소류 부산물의 경우도 수확현장에서의 발생량은 낮을 뿐만 아니라 역시 퇴비용으로 토양에 재순환 되어버린다. 그리고, 대부분의 부산물은 공판장, 농산물 시장 등 유통 집산지에서 도시 폐기물 형태로 발생되므로 농산분야 목질계 폐자원량 조사에는 포함시키지 않았다. 그러나, 수확시 미수거 상태로 경작지에 방치 잔류되어진 토양의 목질계 폐자원 발생량 산정대상에는 포함시켰으며 그 비율은 모든 농산물 공히 부산물량의 7%로 임의 추정, 농산물 종류별 경작지별 토양잔류 목질계 폐자원량을 별도 산출 제시하였다. 단, 채소류 부산물의 토양잔류량은 주곡 수확량의 3%(임의 추정치)으로 계산하였다<표 14>. 이하 모든 자원량은 건중량 M/T로 표시하였다.

<표 5-3> 과수 종류별 단위 면적당 농산분야 목질계 폐자원 발생량

단위: kg/10a

수 종	부산물	수 종	부산물
사 과	459	밀 감	265
배	387	감	350
복숭아	427	자 두	427
포 도	369	기 타	300

가. 농산물의 종류별 생산량

21개 주요 농작물별 총 경지면적과 농산물 생산량을 산출하면 <표 11>와 같다. 한국인의 식습성으로 보아 미곡은 장래에도 식량자원으로 경작될 것이 확실하지만 식량으로서 소비될 양은 점차 줄어들 것이다. 그러나, 다른 작물중 일부(옥수수, 고구마 등)는 가까운 장래에 그 재배목적과 주된 역할이 에너지 작물로 바뀔 가능성도 있으므로 이를 대비하여 1995년도 현재의 경지면적과 생산량을 표5-4에 일단 적시하여 본 것이다. 탄수화물량 중심에서 보아 주목되는 작물은 고구마(619kg/10a)인데 수분함량을 고려해야 되므로 쌀(445kg), 밀(444kg), 옥수수(425kg), 보리(323kg) 등이 일단 유리한 바이오에너지자원이라고 볼 수 있다.

노임상승, 식습성의 변화 영향으로 잡곡류의 경지면적은 축소되고 과실류 경작지는 증대되는 경향이 나타나고 있으며 이에 따라 목질계 폐자원량도 변화되고 있다. 1986년부터 1995까지 10년동안 21개 작물의 경지면적과 폐자원 발생량의 차이를 비교하여 <표 12>에 나타내었는 바 보리와 밀의 경작지는 각각 54%, 9.9%씩 감소되었으나 배, 감, 포도, 밀감의 경작지는 각각 74.7%, 131.3%, 52.8% 씩 증가되었다.

<표 5-4> 농작물 종류별 식재면적과 생산량(1995)

농작물	식재면적(ha)	생산량(M/T)	농작물	식재면적(ha)	생산량(M/T)
쌀	1,055,868	4,694,956	사과	50,103	715,982
보리	87,497	281,712	배	15,752	178,321
밀(호밀)	2,317	10,275	감	25,009	194,585
조(수수)	4,236	3,176	포도	26,030	316,443
옥수수	17,541	74,465	복숭아	10,241	129,640
메밀	6,886	6,994	밀감	24,348	614,801
콩	105,035	159,640	참깨	52,263	31,859
팥	18,225	18,973	들깨	36,476	26,232
녹두	2,675	2,821	유채	1,981	3,883
감자	24,941	118,407	땅콩	9,358	17,214
고구마	14,908	94,514	합계	1,589,782	7,694,893

* 자료: 한국통계연감(1996), 농림수산 주요통계(1996)

나. 농산물 종류별 폐자원 발생량

각 작물별 부산물 부위와 단위면적당 발생량은 <표 9>에 나타낸 바와 같거니와 이 단위면적당의 값을 1995년도 경지면적에 곱하여 얻은 농산물 종류별 폐자원 발생량은 표5-5와 같다. 이 표를 고찰할 때 1995년도 농산 폐자원은 총 8,262,032 건중량 M/T으로서 미곡 폐자원(볏짚, 왕겨)이 가장 큰 비중을 차지하고 있는데 전체의 80.64%를 점하고 있다. 그런데 전체 농산분야 목질계 폐자원량은 10년전의 발생량보다는 17.9% 감소되었으며 미곡 폐자원은 약 14.5%가 줄었다. 이같은 변화는 산업화 진전에 따른 이농현상, 농지전용 등이 근본 요인일 것으로 추정되며 이와 함께 채소·과일류 등 고수익 작물로의 경지전환이 이루어진 때문일 것이다. 실제로 1986년도의 미곡·잡곡류 등의 경지면적은 1,773,477 ha이었으나 1995년도에는 1,398,450 ha로서 21.5%가량이 줄었으며<표 12> 농가수도 상당히 감소되었다.

<표 5-5> 1986년과 1995년의 농작물 종류별 발생량 비교

구 분	1986		1995	
	경지면적(ha)	폐자원발생량(M/T)	경지면적(ha)	폐자원 발생량(M/T)
쌀	1,233,000	7,789,000	1,055,868	6,662,527
보리	190,456	630,409	87,497	289,615
밀(호밀)	2,565	5,566	2,317	5,017
조(수수)	4,236	9,065	2,328	4,982
옥수수	23,645	133,837	17,541	99,282
메밀	11,714	18,157	6,886	10,674
콩	133,489	317,704	105,035	249,984
팥	26,872	44,339	18,225	30,072
녹두	7,815	12,738	2,675	4,360
감자	27,734	36,332	24,941	32,673
고구마	27,767	179,375	14,908	96,306
사과	86,446	396,787	50,103	229,973
배	9,017	34,896	15,752	60,960
감	10,812	37,842	25,009	87,532
포도	17,037	62,867	26,030	96,051
복숭아	14,456	61,727	10,241	43,729
밀감	16,773	44,448	24,348	64,522
참깨	88,423	115,834	52,263	68,465
들깨	34,135	93,871	36,476	100,309
유채	3,875	11,819	1,981	6,042
땅콩	13,252	26,902	9,358	18,957
합계	1,983,519	10,063,515	1,589,782	8,262,032

수확후 전답에 방치·잔류된 일부 부산물, 즉, 뿌리, 줄기하부, 낙수 등 형태로 남겨진 토양 잔류 부산물량에 대하여는 <표 13> 및 <표 14>로 정리하였는데 총량은 698,818 M/T이다.

<표 5-6> 작물별 토양 잔류 목질계 폐자원량 추정치(1995) 단위: 건량M/T

농작물	토양잔류량	농작물	토양잔류량
쌀	466,376	고구마	6,741
보리	20,273	사과	47,863
밀	351	배	14,254
조	350	포도	23,227
옥수수	6,950	복숭아	6,496
메밀	747	밀감	19,954
콩	17,499	참깨	4,793
팥	2,105	들깨	7,022
녹두	305	유채	423
감자	2,287	땅콩	1,327
감	21,983	합계	671,326

<표 5-7> 채소류 부산물의 토양 잔류량 추정치(1995) 단위: 건량M/T

채 소	경지면적(ha)	생산량(M/T)	부산물 토양잔류량(M/T)*
무	35,518	1,435,296	8,612
배 추	46,483	2,884,772	17,309
양배추	6,651	261,787	1,571
합 계	88,652	4,581,855	27,492

* 수분함량: 80% 추정, 생산량의 3%로 추정

임산부문 목질계 폐자원 발생원은 줄기, 가지, 껍질, 낙엽 등 태양에너지가 축적되는 모든 부분과 치수(稚樹), 시초(柴草; brush wood)까지도 포함된다. 산출방법은 한국에너지기술연구소의 연구보고서 '농산 및 임산부산물의 에너지 활용연구(1982)', '바이오매스 자원조사 및 에너지 평가분석(1989-1991)' 등에서 사용한 방법을 기본으로 하고 여기에 1982-1988 7개년간의 임산부문 목질계 폐자원 발생량의 평균증감율을 구하여 1989-1995 기간의 연도별 발생량에 적용 추정하였다.

본 조사에서 참고한 임산부문 목질계 폐자원량 산출 기본 방법은 다음과 같다.

가. 줄기부분

삼림청 임업연구소 발행의 '전국 삼림실태 조사보고서(1981)'를 참고하여 임상별(林相別) 줄기, 직경 크기를 소·중·대로 구분, 평균축적비를 정하고 여기에 수종별 총축적량을 곱하였다.

구 분	침 엽 수			활 엽 수		
	소경목	중경목	대경목	소경목	중경목	대경목
직 경	6-16cm	18-28cm	30cm이상	6-16cm	18-28cm	30cm이상
축적비	0.7382	0.2334	0.0284	0.5806	0.3905	0.0289

나. 가지부분

임업시험장 보고서 '주요 수종에 대한 지조수확량에 관한 연구(1975)'에서 제시된 가지부분 비율치를 임상별, 수종별 총 축적량에 곱하였다.

임 상	소경목	중경목	대경목
침엽수	0.327	0.217	0.147
활엽수	0.245	0.217	0.222

다. 껍질부분

임업기술(1981)에 발표된 바 있는 수종별 비율치를 총재적량에 곱하였다. 껍질이 없는 수종에 대하여는 유피목 총재적량에서 껍질재적량을 제한 값으로 하였다.

임 상	소경목	중경목	대경목
침엽수	0.141	0.111	0.098
활엽수	0.160	0.136	0.124

라. 낙엽량

임업연구소에서 조사 보고한 소나무(침엽수 대표수종), 참나무(활엽수 대표수종)의 매년 ha당 낙엽발생량(소나무: 880kg건중량, 참나무: 1267kg건중량)을 임상면적에 곱하였다.

마. 치수량(稚樹量)

이미 조사되어 사용중인 치수재적량(침엽수: 16.39㎥/ha, 활엽수: 5.77㎥/ha)을 임상별 면적에 곱하였다.

바. 연료림 축적량

임야 전체의 평균 축적을 연료림 면적(634,000ha)에 곱하였다.

사. 시초(柴草: Brush wood)

시초는 임야에 생육하는 잡초목류로서 삼림청의 발표치인 2 M/T/ha(건중량)을 전국 삼림지 면적에 곱하였다.

아. 원목 가공 폐재량

임야에 생육중인 목질계 자원 외에도 국내외 원목을 가공할 때 발생하는 가공폐재량이 많은바, 이의 산출은 한국에너지기술연구소(1982)가 개발한 방법을 준용하였다. 원목량의 35%가 통상적인 폐재량이다.

폐재종류	톱밥	단목	대팻밥	죽데기	심목	단판 및 합판설	기타
발 생 률	0.08248	0.0428	0.0109	0.08109	0.02842	0.08295	0.02459

자. 조림·육림관리 부산물

한국에너지기술연구소(1989)의 추정치(3.5 M/T/ha/년)를 적용하였다.

1996년 임업통계에 의하면 1995년도 총 산림면적은 645만2천 ha로서 국토면적의 약 65%를 점하나 목질계자원 축적량은 45.82㎥/ha로서 독일의 266㎥, 일본의 124㎥, 미국의 78㎥에 비하여 매우 낮은 수준에 있다. 이같은 상황은 과거 일본식민치하시의 자원 수탈, 6·25전화 등에 기인함과 동시에 국·공유림 부족(면적률 29%)에 따른 적극적인 치산·치림이 어려운 때문일 것이다. 최근의 원목 수입량 증가도 원유에서와 마찬가지로 자급률의 절대부족으로 인한 것이다. 우리나라의 1995년도말 현재의 목질계 자원 총량은 279,200천 M/T이나 대부분은 생태계 보호, 수해방지, 조경 등의 기능유지상 보존 관리의 대상이며 약 3.3%인 9.215천톤 정도만이 현실적인 목질계 폐자원량이다. 여기서는 이용측면을 고려한 것이므로 낙엽량 6.440천톤은 제외하였으나 토양 내에 잔류하는 목질계 폐자원량 추정에는 합산하였다.

1982년부터 총부존량은 연도별로 평균 3.2%씩 증가되었으며, 10년(1986-1995)간에는 45.2%(87백만M/T)가 증가되었다. 앞서 언급한 대로 총 목질계 자원량 279.20백만 톤의 17%는 국토, 생태계 보호 유지 차원에서 더욱 효율적으로 조성

관리되어야 하겠으나 나머지 부분인 9.2백만톤<표 16>은 매년 발생되는 목질계폐자원으로서 여러 가지 목적으로 이용가치가 크다. 토양내 잔류되는 목질계 폐자원 산출은 농산부문 목질계 폐자원에서와 마찬가지로 목질계 자원 발생량의 7%를 기본량으로 임의 적용하였고 낙엽량은 전량(6.44백만M/T) 토양내 잔류 폐자원으로 간주하였다.

<표 5-8> 목질계 자원의 발생원별 연도별 부존량 변화

단위: 백만M/T

연도	줄기	가지	껍질	낙엽	치수	연료림	시초	가공폐재	합계
1982	75.89	27.24	11.96	6.18	20.57	10.40	13.11	2.040	167.38
1983	79.00	28.35	12.45	6.23	20.57	10.85	13.09	2.310	172.85
1984	82.62	29.65	13.01	6.23	20.57	11.36	13.08	2.070	178.58
1985	86.12	30.90	13.56	6.22	20.57	11.87	13.06	2.030	184.32
1986	92.14	33.02	14.47	6.24	20.57	12.78	13.05	2.110	194.37
1987	95.67	34.26	15.01	6.26	20.57	11.93	13.00	2.350	199.05
1988	103.05	37.08	16.26	6.28	20.57	12.86	12.98	2.570	211.65
1989	108.41	39.05	17.11	6.30	20.57	13.28	12.70	2.679	220.09
1990	114.05	41.12	18.00	6.32	20.57	13.72	12.68	2.793	229.25
1991	120.00	43.30	18.95	6.34	20.57	14.17	12.66	2.911	238.90
1992	126.24	45.60	19.94	6.36	20.57	14.64	12.64	3.034	249.02
1993	132.80	48.02	20.99	6.38	20.57	15.12	12.66	3.163	259.70
1994	139.71	50.57	22.09	6.40	20.57	15.62	12.60	3.297	270.86
1995	146.97	53.26	23.25	6.44	20.57	16.13	12.58	3.437	282.67

이용 가능한 임산부문 목질계 폐자원 발생량은 조림·육림 관리 부산물 부분과 원목 가공 폐재 부분이 각각 37%로 도합 74%를 점하여 비중이 크다. 연료림은 벌채후 화목, 장작, 숯, 버섯목 등으로 이용되고 있다. 한국에너지기술연구소 보고서(1982)에 따르면 국내 원목가공폐재부문의 이용비율은 <표 17>과 같다.

임산부문 목질계 폐자원의 경우는 농산물의 경우와는 달리 매년 수확 이용되는 것이 아닐 뿐더러 임지의 경작 작업도 없으므로 현재로서는 부산물의 토양잔류량

추정이 곤란하다. 조림·육림 관리 부산물(전지·풀베기, 덩굴치기, 잡목속기 등)도 전량 수거되며 성장중인 식물군도 그대로 남아있는 상황이므로 토양 잔류 성분량에는

<표 5-9> 목질계 폐자원의 연도별, 발생원별 이용가능량

단위: 천M/T

연도	벌채 폐잔재	연료림 벌채량	조림·육림 부산물	가공폐재	합계
1982	160	1,740	3,620	2,040	7,573
1983	150	2,160	3,520	2,310	8,140
1984	140	2,160	3,690	2,070	8,060
1985	140	2,160	3,680	2,030	8,010
1986	150	2,160	3,430	2,110	7,850
1987	160	2,160	3,430	2,350	8,100
1988	170	2,160	3,430	2,570	8,330
1989	172	2,160	3,430	2,679	8,441
1990	175	2,160	3,430	2,793	8,558
1991	177	2,160	3,430	2,911	8,678
1992	180	2,160	3,430	3,034	8,804
1993	182	2,160	3,430	3,163	8,935
1994	185	2,160	3,430	3,297	9,072
1995	188	2,160	3,430	3,437	9,215

<표 5-10> 가공폐재 이용비율

구분	연료	착화탄	활성탄	파이올보드	펄프	화이어보드	기타
이용비율	57.1	16.3	11.7	8.0	1.2	0.7	5.0

큰 변화를 줄 수 없다. 그러나 벌채지역은 그루터기 전량과 벌채 폐재가 일부 토양 중에 잔류되며 낙엽도 수거되지 않고 그대로 분해되는데, 이 부분에 대한 연구가 충

분치 않아 기준치 설정이 곤란하다. 따라서 본 조사에서는 부득이 당 연구팀이 임의로 정한 값을 적용하였는 바, 낙엽량은 앞에서 이미 구한 발생량 전부를, 벌채폐재, 조림·육림관리 부산물, 연료림 등에는 발생 폐자원량의 7%를 각각 적용, 토양 잔류 목질계 폐자원량으로 하였다(<표 18> 참조).

<표 5-11> 임산부문 목질계 폐자원의 토양 잔류량 산출

단위: 천M/T

폐자원 종류	폐자원 발생량	토양 잔류량	비 고
벌채폐잔재	188	13	잔류량: 폐자원량의 7%
연료림벌채	2,160	151	"
조림·육림부산물	3,430	240	"
낙 엽	6,440	6,440	잔류량: 발생량 전량
원목가공폐재	3,437	0	제재소에서 발생됨
합 계	15,655	6,844	