

## 산화구리에 의한 독성 고분자화가 균류의 페놀 생분해에 미치는 영향

박재연\*

화학생물공학부 서울대학교

(albert7eng@snu.ac.kr\*)

## Fungal Phenolic Degradation Affected by Toxic Catalytic Polymerization Mediated by Copper Oxide

Park, Jae Yeon\*

School of Chemical and Biochemical Engineering, Seoul National University

(albert7eng@snu.ac.kr\*)

## 서론

페놀은 산업폐수로부터 발생하여 토양 및 수계를 오염시키는 물질로써 aromatic compound 중 대표적인 물질의 하나이다. 페놀로 오염되어 있는 수계 및 토양을 처리하는 방법으로 생물학적 처리법(Bioremediation)이 각광받고 있다.<sup>1)</sup> 생물학적 처리는 처리 비용이 저렴하며 현장처리(in-situ)나 현장외 처리(ex-situ)에 모두 적용할 수 있다는 점에서 장점을 보이고 있으나 오염물의 농도가 높을 경우에는 적용이 제한적이며 처리 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 또한 미생물은 토양 내 환경에 의해 영향을 받으며 오염물은 토양 내 여러 물리 화학 반응에 의해 수계에 있거나 혹은 표면에 흡착된 상태로 존재하는 등 거동이 달라지며 이에 따라 미생물의 처리율이 변하게 된다. 페놀류는 산화망간이나 산화철 등에 의해 자연산화(autoxidation)된다는 연구가 있었으며 이를 이용하여 페놀류를 처리하려는 연구도 있었다.<sup>2)</sup> 그러나 아직 이러한 자연산화에 의한 고분자 생성이 생물학적 처리에 미치는 영향에 대해서는 보고가 없었다. 미생물의 페놀 제거는 호기상태일 때는 카테콜(catechol)이나 그 유사체를 거치는 대사과정을 거친다. 이 카테콜은 두 개의 하이드록실 기능기로 인하여 강한 반응성을 갖고 있으며 전술한 산화망간이나 산화철 등에 의하여 자연산화가 쉽게 된다. 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 환경에 의한 영향 중 토양 성분인 산화금속에 의하여 페놀류 오염물 즉 기질의 존재 상태 변화와 이에 의한 생물학적 처리에 미치는 영향에 대하여 밝혔으며 새로운 저해 메커니즘을 밝혔다. 또한 이러한 영향을 줄이기 위한 방안으로 외부 탄소원의 공급에 대하여 연구하였다.

## 결과 및 토론

카테콜과 여러 금속 산화물 및 인산염들을 고상 및 액상에서 반응을 시켰다. 그 중 몇 가지의 금속 산화물들이 카테콜 산화 반응을 촉진하여 검푸른 색의 고분자 물질을 만드는 것을 확인하였다. 이중 가장 반응성이 높았던 산화구리를 대상 화합물로 하여 실험을 진행하였다. 페놀 분해 균류인 *F. oxysporum* GJ4를 아가 플레이트에서 글루코스 혹은 페놀을 단독 기질로 하여 반응을 시킬 경우 균류에 의해 발생한 proton 혹은 유기산에 의하여 산화구리가 녹아서 발생하는 solubilized zone이 관찰되었다. 이때 페놀을 단독 기질로 사용할 경우는 글루코스에서는 관찰하지 못했던, 아가와 균류의 색이 검게 변화하는 것을 관찰하여 중간산물인 카테콜이 고분자로 반응한다는 것을 확인하였다. 균이 없는 경우 혹은 산화구리를 첨가 하지 않은 경우는 이와 같은 색변화가 관찰되지 않았다. 산화구리는 균류에 의하여 용해될 때 구리 이온이 발생하여 균에 독성을 미치기 때문에 균의 성장도 저해 되는 것을 관찰할 수 있었으며 또한 글루코스를 기질로 사용할 때는 대량으로 발생한 구리이온을 균이 흡착(Biosorption)하여 일시적으로 성장이 정지하였다. 단위 셀당의 구

리 흡착량은 기질에 상관없이 비슷하였다.

수계에서 산화구리가 존재할 경우 페놀 생분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10mM의 산화구리 존재 하에서 페놀의 농도를 바꿔가며 균의 성장 및 페놀 분해를 살펴보았다. Fig. 1과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 2mM이하의 페놀농도에서는 분해가 약간의 저해는 받지만 잘 제거함을 알 수 있었다. 그러나 페놀농도가 2mM 이상이 될 경우는 페놀 제거가 일어나지 않았으며, 균류의 관찰에서도 초기 약간의 성장 후에는 균의 성장이 멈췄으며 균의 색도 흰색에서 점차 검붉은 색으로 변해갔다. 배지색의 변환을 UV로 확인하였을 때 색의 변화가 구리이온에 의한 고분자화 효과나 pH에 의한 효과보다 더 크게 일어남을 관찰하였다. 또한 HPLC를 이용하여 반응 중 카테콜 농도를 확인 한 결과 산화구리가 존재할 경우에는 카테콜의 농도를 검출 할 수 없었다.

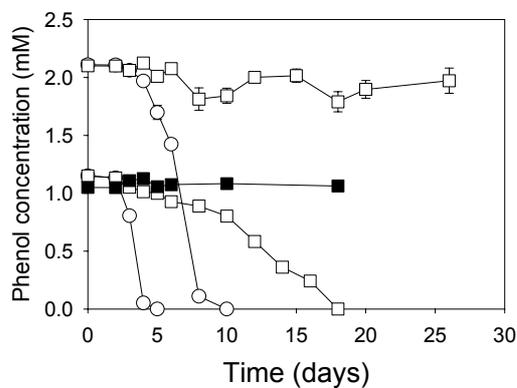


Fig. 1. Phenol degradation by *Fusarium oxysporum* GJ4 with 10mM  $\text{Cu}_2\text{O}$ . ○: without  $\text{Cu}_2\text{O}$  □: with  $\text{Cu}_2\text{O}$  ■: abiotic control

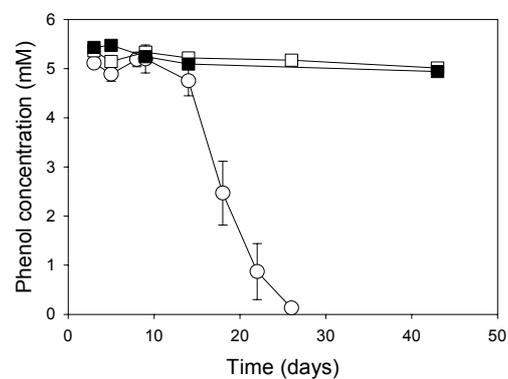


Fig. 2. Phenol degradation by *Fusarium oxysporum* GJ4 with 10mM  $\text{Cu}_2\text{O}$  at high phenol concentration. ○: without  $\text{Cu}_2\text{O}$  □: with  $\text{Cu}_2\text{O}$  ■: abiotic control

균류에 의한 페놀 분해에 영향을 미칠 수 있는 인자는 구리 이온 농도, 산화구리의 자체 독성, pH등이 있을 수 있다. 구리이온은 전술한 바와 같이 균류의 성장 시 발생하는 proton에 의한 용해 혹은 유기산등에 의한 킬레이팅 반응 등으로 인하여 발생할 수 있다. 배지내의 구리 이온을 측정 한 결과 abiotic과 biotic 모두에서 0.05mM 까지 증가하였다. 그러나 Fig. 3에서 알 수 있듯이 *F. oxysporum* GJ4의 경우 0.2mM 구리 농도까지도 페놀을 분해하고 있음을 알 수 있었으며 이로부터 구리 농도는 분해 지연을 일으킬 수는 있지만 분해를 멈추게 할 수는 없다는 것을 확인하였다.

또 다른 인자는  $\text{Cu}_2\text{O}$ 가 갖을 수 있는 자체 독성으로써 본 연구자들은 *F. oxysporum* GJ4를 글루코스를 이용하여 동일한 농도의 산화구리 존재 하에서 키워 보았다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 초기 lag time이 있었으나 이후에는 비슷한 cell mass를 보이며 균이 자랐음을 알 수 있었으며 이로써 산화구리 자체는 균류에 독성을 미치지 않음을 알 수 있었다.

세번째는 카테콜의 자연 산화 혹은 고분자화를 일으킬 수 있는 인자인 pH에 대하여 살펴보았다. 카테콜은 pH 7이상에서 자연산화 속도가 빨라지는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> Fig. 5는 pH에 따른 페놀 제거 경향을 보인 것으로써 pH가 높아짐에 따라 점점 제거 속도는 느려지고 있으나 여전히 페놀을 제거하고 있다는 것을 알 수 있다. 이외 산화-환원 효소가 있을 경우 이와 같은 고분자화가 있을 수 있으나 본 실험에 사용한 균류의 경우는 페놀만 존재 할 경우에는 배지의 색변화를 보이지 않았기 때문에 이와 같은 산화 환원 효소를 분비 하지 않는 것으로 사료된다. 또한 구리 이온이 존재할 경우 이와 비슷한 반응을 촉진 시킬 수 있으나 Fig. 3에서 알 수 있듯이 구리 이온 독성 효과에서 이것이 배제되었

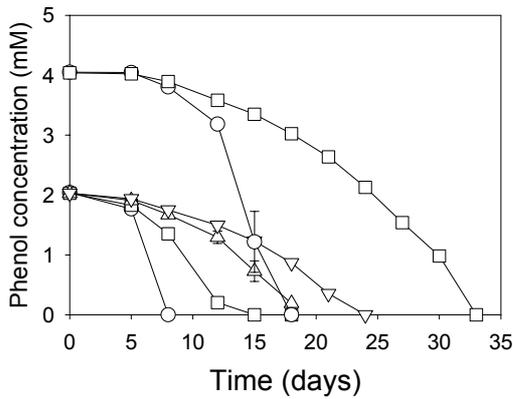


Fig. 3 Copper effects on phenol degradation.  
 ○ : no Cu □: 0.05mM Cu △: 0.1mM ▽: 0.2mM

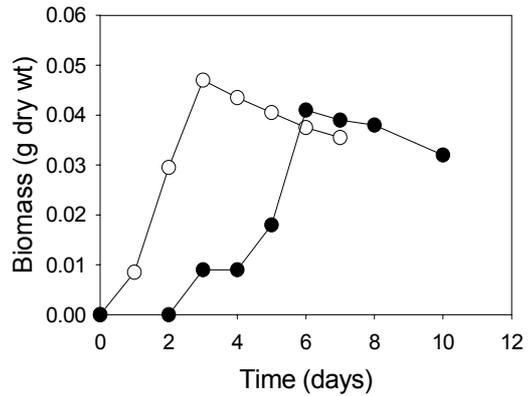


Fig. 4 Copper oxide effects on *Fusarium oxysporum* GJ4 when glucose was used as a carbon source. ○: glucose without Cu<sub>2</sub>O ●: glucose with Cu<sub>2</sub>O

으며 또한 구리이온 존재시의 배지의 색을 UV로 측정 한 결과 control과 거의 비슷한 수준에서 색변화가 일어나는 것을 알 수 있어서 이온에 의한 고분자 정도는 미약한 것으로 생각되었다.

이상으로부터 페놀 분해과정에서 발생한 카테콜이 산화구리에 의해서 자동산화가 촉진되면서 고분자화 되어 배지 및 세포의 색변화 시키며 세포에 독성을 미쳐서 페놀의 분해를 중단시킨다는 것을 밝혀냈다. 저해 작용의 이유로는 카테콜의 고분자가 세포 표면에 생성되어 세포의 정상적인 막 기능을 저해하는 것으로 생각하였으며 이를 확인하기 위하여 TEM 분석을 행하였다. 카테콜 폴리머의 경우 중금속에 대해 높은 흡착능을 보인다는 것이 알려져 있으므로 uranyl acetate 와 lead citrate를 이용하여 staining하였다. Fig. 6에서 보는 것처럼 산화구리 존재 하에서는 세포 표면에 얇은 고분자 막이 생긴 것을 알 수 있

으며 균등하게 분포되어 있는 막이 세포의 정상적 역할을 방해할 것으로 생각되어 진다.

이처럼 자연산화를 촉진하는 촉매역할을 할 수 있는 금속 화합물이 토양 내에 존재할 경우 페놀 혹은 페놀류들의 생물분해가 저해 받을 수 있으며 심한 경우 생물 분해 공정이 실패 할 수도 있다. 이러한 반응은 호기성 조건 뿐만이 아니라 혐기성 조건에서도 전자 전달을 통하여 일어날 수 있으며 토양 내 포집되어 있는 작은 양의 물로 만들어지는 수계에서도 일어날 가능성이 높다.

산화구리 혹은 동일한 효과를 갖는 금속 산화물에 의한 저해 현상을 줄일 수 있는 방법으로 외부에서 다른 탄소원을 넣어줌으로써 세포의 성장을 촉진하여 세포단위당 형성되는 막의 두께를 줄이고 자연산화에 의하여 소모되는 대사산물을 보충해 줌으로써 독성을 줄이려 하였다. Fig. 7에서 보듯이 글루코스의 투입에 의하여 산화구리가 없는 경우는 페놀의 분해를 촉진할 수 있었으며 산화구리가 있는 경우에도 분해 지연은 있었으나 페놀의 분해가 진행됨을 알 수 있었다. 이것은 두 개의 탄소원이 존재할 경우 글루코스가 먼저 섭취되어 세포양을 늘려주기 때문에 전체 세포

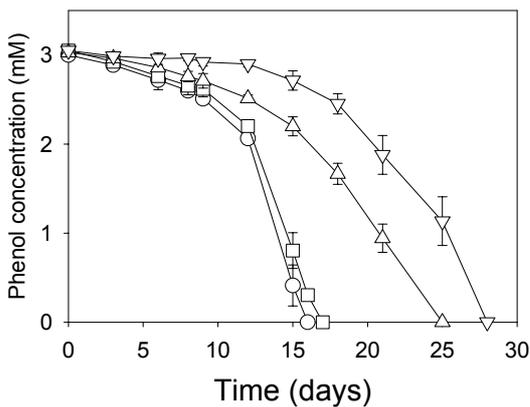


Fig. 5. pH effects on phenol degradation.  
 ○: pH 5 □: pH 6 △: pH 7 ▽: pH 9

되는 대사산물을 보충해 줌으로써 독성을 줄이려 하였다. Fig. 7에서 보듯이 글루코스의 투입에 의하여 산화구리가 없는 경우는 페놀의 분해를 촉진할 수 있었으며 산화구리가 있는 경우에도 분해 지연은 있었으나 페놀의 분해가 진행됨을 알 수 있었다. 이것은 두 개의 탄소원이 존재할 경우 글루코스가 먼저 섭취되어 세포양을 늘려주기 때문에 전체 세포

양의 증가에 의하여 단위 세포당 형성되는 막의 두께가 적어지는 효과와 외부 탄소원으로 인한 효소 생성촉진 등이 이유로 생각되어 진다. 따라서 생물 분해에 있어서 외부 탄소원의 투입에 의해 이러한 독성 메커니즘은 완화 될 수 있으며 특히 초기투입에 의한 세포양 증가가 중요할 것으로 생각되어 진다.

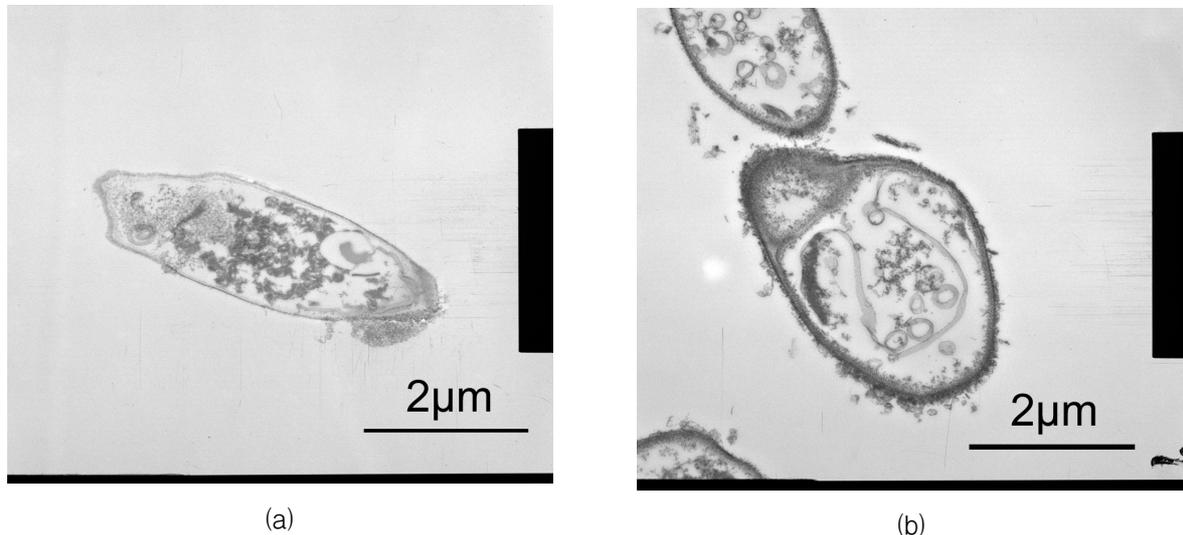


Fig. 6 TEM images of *Fusarium oxysporum* GJ4. (a) without  $\text{Cu}_2\text{O}$  (b) with  $\text{Cu}_2\text{O}$

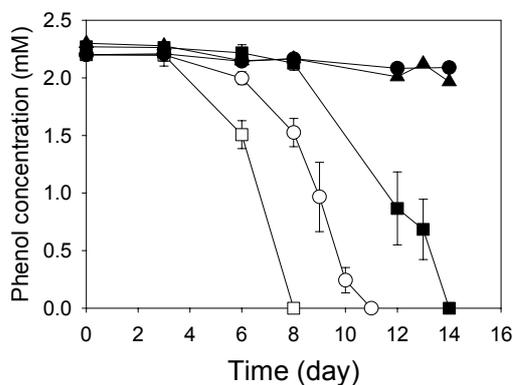


Fig. 7 Effects of glucose on phenol degradation in the presence of  $\text{Cu}_2\text{O}$ . ○: without glucose ■: with glucose ●: with  $\text{Cu}_2\text{O}$  without glucose ■: with  $\text{Cu}_2\text{O}$  with glucose ▲: abiotic control

### 결론

본 연구에 의해 밝혀진 바처럼 미생물에 의한 오염물의 제거에는 미생물의 오염물에 대한 반응 이외에도 대사과정 산물 혹은 오염물에 대한 환경 인자와 그에 따르는 물리-화학적 반응들에 의한 영향이 매우 중요하며 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다. 본 연구에서 밝혀진 산화 금속에 의한 대사산물의 고분자 반응과 미생물에 미치는 새로운 저해 메커니즘은 토양에서의 페놀류의 생물학적 분해에서 반드시 고려해야할 영향이다. 또한 본 연구결과는 토양 내 미생물, 오염물 및 환경인자들의 상호작용에 대한 중요 인자 중 하나로써 흡착 효과 이외에 반드시 고려해야 할 인자이다.

### 참고문헌

- 1) Müller, R. Bacterial degradation of xenobiotics. In *Microbial control of pollution* Fry, J.C., Gadd, G.M., Herbert, R.A., Jones, C.W., Watson-Craik, I.A., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 1992; pp 35-57.
- 2) Park, J.-W.; Dec, J.; Kim, J.-E.; Bollag, J.-M. Effect of humic constituents on the transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of oxidoreductive enzymes or birnessite. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 2028-2034.
- 3) Alva, V.A.; Peyton, B. M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 4397-4402.