

구름버섯의 형질전환체 *Trametes versicolor* MrP10에 의한 Phenanthrene의 생분해

최윤성 · 최형태 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, 강원대학교 생명과학연구소

난분해성과 독성을 나타내고 인간에게 돌연변이와 암을 유발한다고 알려진 다핵방향족 탄화수소를 대상으로 분자적 방법을 이용하여 개발한 백색부후균 형질전환체와 야생형균주의 최적 생분해조건에서의 생분해능을 비교하였다. 구름버섯 *Trametes versicolor*와 그것의 형질전환체 *T. versicolor* MrP1의 phenanthrene 생분해는 veratryl alcohol과 tryptophan을 첨가한 pH 6.0의 약산성 배지에서 30°C로 진탕배양할 때 최적의 생분해능을 나타내었으며 형질전환체와 야생형균주 대조군의 최적조건은 유사하였다. 조사된 최적조건의 최소배지에서 20일간 배양하였을 때 *T. versicolor* MrP1이 대조군에 비해 31% 더 높은 phenanthrene 분해능을 나타냈다. 실제 토양 환경을 대상으로 한 생분해 실험에서도 형질전환체가 우수한 phenanthrene 분해능을 나타냈으며 이러한 결과는 형질전환체를 이용한 새로운 균주의 개발이 환경에 존재하는 난분해성 물질의 분해에 큰 기여를 할 수 있음을 보여준다.

Key words □ biodegradation, phenanthrene, *Trametes versicolor*, transformant

구조적으로 안정적이며 환경에 노출 시 분해가 잘 되지 않아 난분해성 물질로 분류되는 다핵방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 2~7개의 벤젠고리 화합물로 이루어진 소수성 유기화합물로서 용해도가 매우 낮아 토양 내에 쉽게 흡착되며(4) 산불, 화산활동 및 석유의 자연적인 유출 등의 자연적 요인에 의해 배출되거나, 석탄이나 석유 등 화석연료의 생산, 사용, 운반이나 폐기물의 처리와 처분 과정 중에 우발적 또는 의도적으로 환경에 유출될 수 있다. 또한 화석연료의 사용은 인간 생활과 밀접한 관련을 맺고 있기 때문에 PAHs는 인간 활동이 있는 곳에서는 어디서든 발견될 수 있고, 대기 중으로 방출될 경우에는 대기의 흐름에 따른 확산으로 장거리 이동 또한 가능하다(18). 환경에 노출된 PAHs는 자연적인 분해가 잘 이루어지지 않는 난분해성 물질로 장기간 환경에 잔류하며 인체에 독성을 나타내거나 암을 유발하고 유전적인 돌연변이를 일으킨다고 보고된 바 있기 때문에 이들 중 16개 물질은 미국 EPA에서 우선오염물질(priority pollutant)로 정해 규제하고 있다(19).

오래 전부터 미생물을 이용한 난분해성 물질의 분해는 지속적으로 연구되어 왔으며 물질의 처리 시 비용이 저렴하고 다루기가 쉬우며 사람들에게 긍정적인 인식을 준다는 장점 때문에 근래에도 활발한 연구가 진행되고 있다(2, 16). 난분해성 물질 분해에 관여하는 다양한 미생물들 중 특히 백색부후균(white rot fungi)이 난분해성 물질을 분해하고 광물화할 수 있는 능력이 우

수하다고 보고되었는데 대표적인 예로 이 실험에서 사용된 구름버섯 *Trametes versicolor*는 PAHs, 염료, TNT 등 여러 가지 난분해성 방향족 화합물을 분해할 수 있다(11, 14). 백색부후균에 의한 난분해성물질들의 분해에는 lignin peroxidase, manganese dependent peroxidase, laccase 등의 리그닌 분해효소가 관여하는데(15), 이들의 기질 특이성이 낮아 다양한 방향족 화합물들을 분해할 수 있으며 특히 여러 가지 물질들을 동시에 분해할 수 있다. 또한 백색부후균은 PAHs와 같은 난분해성 물질의 생분해에 있어 높은 분해율을 보이고 있으며, 본 연구에서는 분해율을 높이기 위해 분자적 접근방법으로 난분해성 물질의 분해에 관여하는 효소의 활성을 증가시키기 위해 효소유전자를 클로닝하여 만든 형질전환체를 확보하고 야생형 균주와 생분해능을 비교함으로써 백색부후균의 생분해능 증대의 가능성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

백색부후균의 분해효소 중의 하나인 manganese dependent peroxidase (MnP)와 manganese repressed peroxidase (MrP)의 효소유전자인 *mnp*와 *mrp*를 제한효소-매개 삽입법(restriction enzyme-mediated integration)을 이용하여 구름버섯 *Trametes versicolor*의 유전체 내로 각각 다시 삽입시켜서 MnP를 과발현시킨 MnP2-6과 MrP를 과발현시킨 MrP1과 MrP13 균주(12, 20)를 강원대학교 미생물생리학 실험실로부터 분양받았다.

분양받은 균주를 potato dextrose agar (PDA: Difco Lab.,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8545, Fax: 82-33-251-3990
E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr

USA)에 1×1 cm² 크기로 접종하여 균사체가 평판배지 끝까지 다 성장할 때까지 30°C에서 배양하였다. PDA 평판배지에서 자란 균사체를 마쇄기(model PH91, SMT Co., Japan)로 마쇄한 후 YMG (4 g/L yeast extract, 10 g/L malt extract, 4 g/L glucose) 액체배지 500 ml에 접종하고 30°C에서 130 rpm으로 5일간 진탕배양하였다. 배양된 균주는 상등액과 균사체를 원심분리(4°C, 6,140×g, 30 min)하여 따로 분리하고 10% (wet w/v)의 균질화된 균사체 접종물을 준비하였다.

준비한 접종물을 20 ml의 YMG배지와 Kirk's basal salts medium의 변형배지(17) [10 g/L glucose, 0.22 g/L ammonium tartrate, 2 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂, 0.001 g/L thiamin-HCl, 160 ml/L trace elements (0.08 g/L CuSO₄·7H₂O, 0.05 g/L H₂MoO₄, 0.07 g/L MnSO₄, 0.043 ZnSO₄·7H₂O, 0.05 g/L Fe₂(SO₄)₃, veratryl alcohol 0.06 ml/L, 1.3 ml/L 2,2-dimethylsuccinate, pH 4.2 and 0.5 ml/L Tween 20]에 0.5 ml 접종하여 일정 기간 배양하였다.

추출과 분석방법

배양된 시료를 마쇄기로 1분간 균질하게 마쇄하고 15 ml의 methylene chloride를 첨가한 후 extraction shaker (Recipro shaker RS-1, JEIO TECH, Korea)에서 300 rpm으로 30분간 진탕하여 6,140×g에서 30분간 원심분리 후 유기용매층만을 분리하였다. 분리된 methylene chloride 10 ml을 잔류 phenanthrene의 측정을 위해 회전진공증발기를 이용하여 0.5 ml로 농축하고 HPLC (Waters, Breeze Model, USA)를 이용하여 분석하였으며 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼은 Gemini 5μ C18 150×4.6 mm의 역상컬럼(Phenomenex, USA)을 사용하였고 이동상은 gradient 조건으로 15분까지는 50% acetonitrile을 15분에서 25분까지는 100% acetonitrile을 흘려주었으며 25분부터 30분까지는 50% aceto-nitrile을 사용하였다. 농축한 시료는 pore 크기 0.45 μm의 syringe filter로 여과한 후 20 μl를 autosampler (Waters 717 plus)를 이용하여 주입하고 flow rate은 1 ml/min로 하여 254 nm 파장에서 UV detector를 사용하여 분석하였다.

Phenanthrene 분해의 최적화

50 mg/L phenanthrene이 첨가된 20 ml YMG 액체배지에 *T. versicolor*와 형질전환체 *T. versicolor* MrP1의 접종물을 0.5 ml 접종하고 온도(15~40°C), pH(3.0~8.0), 교반(130 rpm 진탕, 정치)을 달리하고 또한 5 mM veratryl alcohol과 5 mM tryptophan을 각각 또는 함께 첨가하여 백색부후균의 phenanthrene 생분해에 미치는 영향을 조사하였다.

토양에서 phenanthrene의 생분해

강원대학교 내에서 토양(loam soil)을 채취하여 직경 2 mm의 채로 토양을 걸러 토양 100 g을 250 ml 비이커에 담고 채토건 조법으로 토양의 함수량을 측정 후 토양 수분보유능의 50~60%의 토양수분을 유지시키고 30°C에서 20일간 배양한 후 Kayali-Sayadi 등(10)의 방법에 따라 잔류 phenanthrene을 정량하

였다. 토양에서 phenanthrene의 추출은 100 g의 토양에 100 ml의 n-hexane을 첨가한 후 1시간동안 sonication을 시킨 뒤 유기용매를 따로 분리하여 10배 농축한 후 HPLC로 분석하였다.

결 과

백색부후균에 의한 phenanthrene의 생분해

다핵방향족 탄화수소인 phenanthrene을 50 mg/L의 농도로 YMG 액체 배지에 첨가하고 대조균인 야생형 *T. versicolor*와 *T. versicolor*의 형질전환체들을 접종하여 3일 동안 배양한 결과 대조균, *T. versicolor* MrP1, MrP13과 MnP2-6은 각각 40, 80, 75와 19%의 phenanthrene 생분해를 나타냈고 *T. versicolor* MrP1은 대조균보다 40% 정도 phenanthrene 제거능이 더 우수하였다(Fig. 1). 배양 6일째에는 *T. versicolor*의 야생형과 MrP1 및 MrP13과의 분해능 차이가 줄어들었지만 *T. versicolor* MrP1의 분해능이 야생형보다 높았다.

Phenanthrene 생분해의 최적조건

YMG 액체배지에서 phenanthrene을 기질로 하여 배양조건을 달리하여 2일간의 생분해 실험을 수행한 결과 정치배양에서는 형질전환체 *T. versicolor* MrP1이 3.7%, 대조균은 7.8%의 생분해능을 보였으나 진탕배양에서 *T. versicolor* MrP1은 39.4%, 대조균은 28.1%의 생분해능을 나타냈다. 온도가 phenanthrene 생분해에 미치는 영향에 대해서는 대조균은 15, 20, 25, 30, 35와 40°C 조건에서 phenanthrene을 각각 10, 20, 25, 29, 14와 4% 생분해하였으며 *T. versicolor* MrP1은 3, 18, 24, 38, 32와 21% 생분해하였다(Fig. 2). Phenanthrene은 pH 3, 4, 5, 6과 7 조건에서 대조균에 의해 각각 12.6, 25, 4, 24.6과 7.8% 제거되었으며 *T. versicolor* MrP1에 의해 13.1, 27.9, 28.7, 31.4와 5.6% 제거되었다. 중성(pH 7.0) 조건을 제외한 모든 조건에서 *T. versicolor* MrP1의 생분해능이 대조균보다 높았으며, pH 6.0에서 최고 생분해능(31.4%)을 나타내었다. Veratryl alcohol과 tryptophan을 5 mM 첨가하면 모든 실험조건에서 phenanthrene의 생분해능이

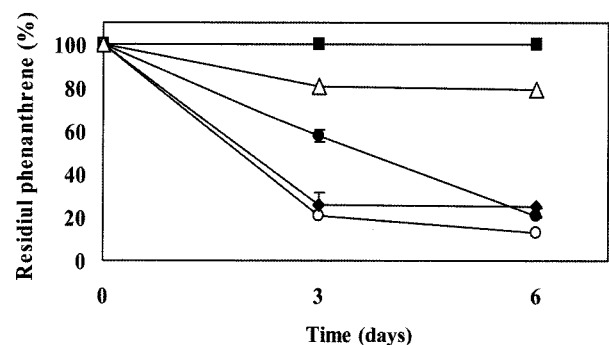


Fig. 1. Biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* and its transformants in YMG medium. Symbols; uninoculated control (■), *T. versicolor* (●), *T. versicolor* MrP1 (○), MrP13 (◆), MnP2-6 (△).

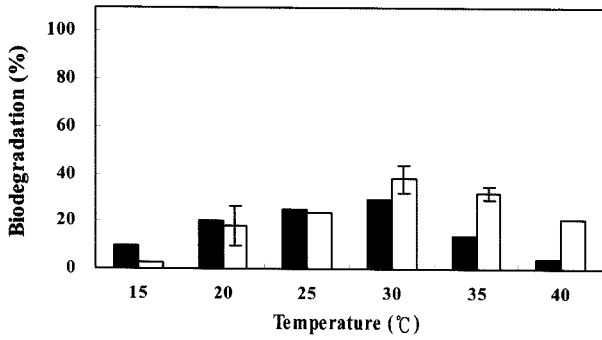


Fig. 2. Biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* (closed bar) and its transformant *T. versicolor* MrP1 (open bar) at different temperatures in YMG medium during 2 days.

11~20.9% 증가되었고 *T. versicolor* MrP1의 생분해능은 대조군보다 11~24% 더 높았다. 특히 veratryl alcohol과 tryptophan을 동시에 처리한 경우 대조군은 12.4%, 형질전환체 *T. versicolor* MrP1은 20.9%의 phenanthrene 생분해능이 증가되었다. 두 균주에 의한 phenanthrene 생분해에 tryptophan이 veratryl alcohol보다 3~5% 정도 생분해능을 더 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3).

Phenanthrene의 생분해 양상과 균체량의 변화

조사된 phenanthrene의 생분해 최적조건을 바탕으로 Kirk's basal salts medium의 변형배지에 phenanthrene을 50 mg/L 첨가한 후 20일간 배양하면서 phenanthrene의 분해량과 균체량의 변화를 측정하였다. 대조군과 *T. versicolor* MrP1 모두 10일째까지 각각 59.4와 91.2%의 phenanthrene 제거를 나타내었고 그 이후부터 배양 종료까지의 생분해는 크게 증가하지 않았다(Fig. 4). 동일한 배양조건에서 측정된 균체량도 *T. versicolor* MrP1이 더 높게 측정되었다(Fig. 5).

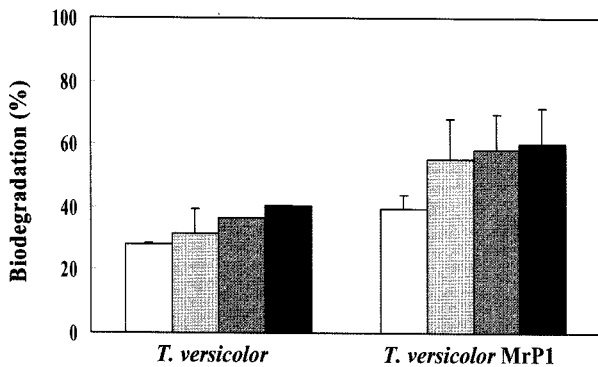


Fig. 3. Effect of veratryl alcohol and tryptophan addition on the biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* and its transformant *T. versicolor* MrP1 in YMG medium during 2 days. Symbols: control (□), 5 mM veratryl alcohol (▤), 5 mM tryptophan (▥), 5 mM veratryl alcohol and 5 mM tryptophan (■).

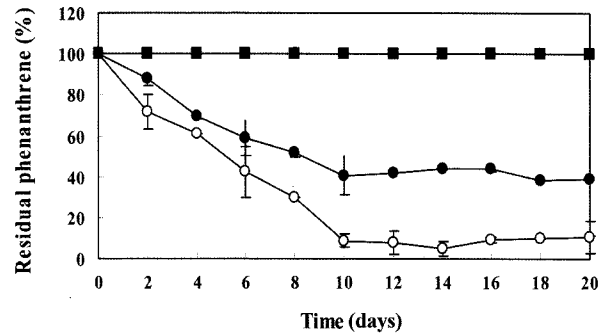


Fig. 4. Biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* (●) and its transformant *T. versicolor* MrP1 (○) in the minimal medium. (■) uninoculated control.

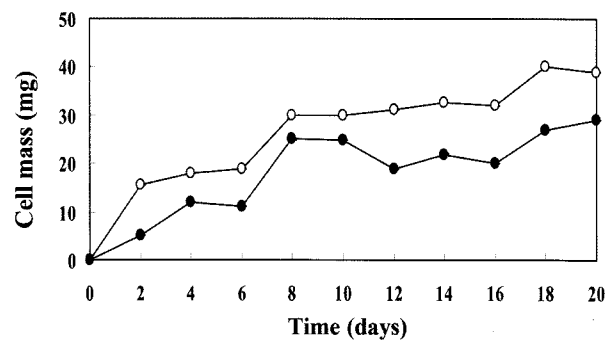


Fig. 5. Change of cell mass (dry weight) during biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* (●) and its transformant *T. versicolor* MrP1 (○) in the minimal medium.

토양에서 phenanthrene의 생분해

형질전환체 *T. versicolor* MrP1의 우수한 생분해능이 실제 토양에서도 유지되는지 알아보기 위해 토양환경에서의 생분해능을 조사하였다. 별균 토양에서는 *T. versicolor* MrP1과 대조군은 5일부터 10일 사이부터 분해가 시작되어 각각 95.7과 94.3% 분해하였으며(Fig. 6), 비별균 토양에서는 *T. versicolor* MrP1은 별균

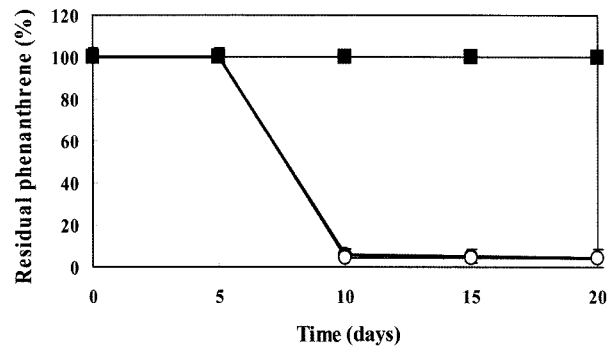


Fig. 6. Biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* (●) and its transformant *T. versicolor* MrP1 (○) in a sterilized soil. (■) uninoculated control.

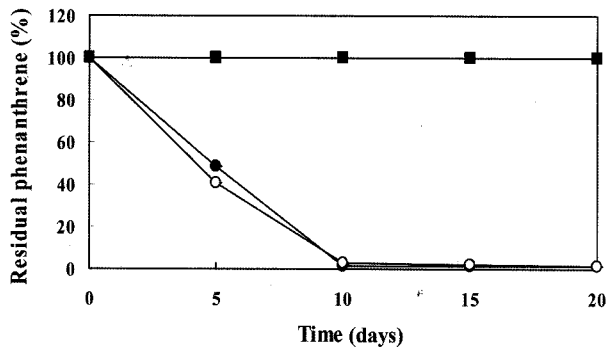


Fig. 7. Biodegradation of 50 mg/L phenanthrene by *Trametes versicolor* (●) and its transformant *T. versicolor* MrP1 (○) in a non-sterilized soil. (■) uninoculated control.

토양보다 일찍 phenanthrene 분해가 일어났으며, 5일째에 *T. versicolor* MrP1과 대조군은 각각 60과 52% 분해하였으며 형질 전환체의 분해율이 8% 정도 높았다. 하지만 10일 동안의 배양결과 96.3과 95.7%로 비슷한 분해율을 보였다(Fig. 7).

고 찰

다핵방향족 화합물은 환경에 잔존하는 경향이 있으며 이러한 종류의 화합물뿐만 아니라 그 분해 대사산물들 역시 환경에서 독성을 나타내며 암을 유발하고 유전적 돌연변이를 일으킨다고 보고된 바 있다(13). 오래 전부터 이러한 난분해성 물질의 분해에 있어 백색부후균을 이용한 사례들이 보고되기 시작하였고 분해세균과 비교할 때 생분해에 다양한 장점을 갖기 때문에 최근까지 백색부후균을 이용한 난분해성물질의 생분해 연구는 활발히 진행되고 있다(2). 본 연구에서는 백색부후균의 난분해성 물질의 분해에 관여하는 효소를 과발현시킨 형질전환체와 야생형 균주의 분해능 비교를 통해 형질전환을 통한 난분해성 물질의 보다 효율적인 분해 가능성을 증명하고자 연구를 진행하였다.

PAHs의 한 종류로서 환경에 많이 존재하며 PAHs 오염의 지표로 사용되는 phenanthrene (4)을 대상으로 강원대학교 미생물생리학 실험실로부터 분양받은 *Trametes versicolor* (구름버섯)의 형질전환체들인 *T. versicolor* MrP1과 MrP13 (manganese repressed peroxidase 과발현 균주) 및 *T. versicolor* MnP2-6 (manganese dependent peroxidase 과발현 균주)과 야생형 균주와 비교해 phenanthrene 생분해 우수균주를 선별하였다. YMG배지에서 6일간의 배양기간 동안 phenanthrene에 대한 분해능이 우수한 균주는 *T. versicolor* MrP1이었으며 대조군인 야생형 균주에 비해 특히 배양 초기에 높은 분해율을 보였다(Fig. 1). 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*은 배양 27일 만에 첨가된 phenanthrene을 70~100% 분해한다고 보고되었고(15), *Pleurotus ostreatus*는 배양 11일째에 첨가한 phenanthrene의 94%를 제거한다고 알려졌다(3). 이에 비하여 *T. versicolor* MrP1과 *T. versicolor* MrP13은 3일의 짧은 기간 동안 75~80% 이상의 높은 phenanthrene

생분해능을 보였으며 이 형질전환체들은 다른 분해균주들보다 우수한 phenanthrene 생분해 능력을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있다. *T. versicolor* 야생형 균주는 배양 6일째에 형질전환체들과 유사한 분해율을 나타내었지만 집종미생물은 특히 초기 분해에 중요한 역할을 하므로(1) 형질전환체의 초기 생분해능은 실제 난분해성 오염물질의 제거에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

생분해능을 증대시키기 위하여 생분해 조건을 최적화하는 실험을 진행하였다. 먼저 YMG배지에서 배양방법(정치, 130 rpm 진탕)을 달리하여 2일간 생분해 실험을 수행한 결과 형질전환체 *T. versicolor* MrP1과 대조군 모두 진탕배양 시에 25~30% 분해율이 증가하였다. 이러한 결과는 PAHs의 호기적 대사 과정에서 monooxygenase와 dioxygenase를 이용한 초기 벤젠고리의 산화를 위해 산소가 절대적으로 필요하다는 것을 보여준다(8). 하지만 YMG 액체배지에서 5일 선배양한 *T. versicolor*가 정치배양에서 100 mg/L phenanthrene에 대한 생분해능이 진탕배양보다 더 우수하다는 결과(9)와는 반대의 결과인데 그 이유는 본 실험은 균주의 선배양 없이 phenanthrene과 균주를 함께 접종하였기 때문에 접종된 균사체가 2일 동안 충분한 균체량을 확보하지 못한 반면 진탕배양에서는 정치배양에 비해 충분한 균체량을 얻을 수 있었기 때문인 것으로 사료된다.

배양온도를 최적화하기 위해 위와 동일한 조건으로 실험을 수행한 결과 대조군은 Han 등(9)의 결과와 동일하게 25와 30°C에서 phenanthrene 생분해가 모두 잘 일어났으며 *T. versicolor* MrP1은 35와 40°C 조건에서도 대조군의 25와 30°C에서의 생분해능과 비슷한 높은 분해능을 나타내어 전체적으로 야생형에 비해 높은 온도에서 생분해가 잘 일어나는 것으로 변화되었다(Fig. 2). 따라서 높은 온도에서의 생분해에 이런 형질전환체의 이용이 보다 유리할 것으로 생각된다. 배지의 초기 pH가 생분해에 미치는 영향을 조사한 결과 중성(pH 7.0) 조건을 제외한 모든 조건에서 *T. versicolor* MrP1의 생분해능이 대조군보다 높았지만 오차범위를 크게 벗어나지 못하는 정도였으며, pH 6.0에서 최고 생분해능(31.4%)을 나타내었는데 이 경향은 Han 등(9)의 보고와 일치하였다.

Collins 등(6)에 따르면 veratryl alcohol과 tryptophan은 lignin 분해 효소들을 활성 과산화수소로부터 보호하여 효소의 안정성을 증가시킬 수 있다고 하였으며, 이러한 효소의 안정화가 백색부후균에 의한 난분해성 물질의 생분해능을 증가시킬 수 있다고 사료되어 veratryl alcohol과 tryptophan을 대조군 *T. versicolor*와 형질전환체 *T. versicolor* MrP1의 phenanthrene 생분해 시료에 첨가하여 그 효과를 조사하였다. 두 첨가물에 의해 *T. versicolor* MrP1의 생분해능은 대조군보다 8.5% 더 증가하였다. 뿐만 아니라 두 균류에 의한 phenanthrene 생분해에 tryptophan이 veratryl alcohol보다 3~5% 정도 생분해능을 더 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3) 이러한 결과는 Collins 등(6)과 Faison 등(7)의 연구에서 tryptophan이 리그닌 분해 효소의 안정화와 효소유도에 있어 veratryl alcohol보다 뛰어난 능력을 보인 것의 간접적인 증명이 된다.

각각의 균주별로 생분해능의 증가를 위해 최적화된 환경조건

을 바탕으로 장기간의 배양기간 동안 생분해 양상과 균사체량의 변화를 알아보기 위해 Kirk's basal salts medium의 변형배지에서 20일간 배양하며 분해양상과 균체량을 측정하였다. 20일간의 배양기간 동안 균사체량의 증가는 형질전환체인 *T. versicolor* MrP1이 야생형 대조군 균주에 비해 높았으며(Fig. 5), 그에 따라 phenanthrene의 생분해능 또한 우수하였는데 *T. versicolor* MrP1과 대조군은 각각 91.2과 59.4%까지 분해하였으며 *T. versicolor* MrP1은 대조군에 비해 30.8% 더 우수한 생분해능을 나타내었다(Fig. 4). Phenanthrene의 생분해는 MrP1과 대조군 모두 배양 10일까지 증가한 후 더 이상 증가하지 않는 양상을 나타내었는데 생분해에 따른 유기산 등의 독성 대사산물의 축적 때문인 것으로 추정된다. 그러나 이런 대사산물은 균체량이 충분하거나 secondary population이 존재할 경우 마저 분해될 수 있을 것이다(1).

배지 환경에서 형질전환체 *T. versicolor* MrP1은 야생형 대조군 균주에 비해 우수한 phenanthrene 초기 분해능을 나타냈다. 실제 토양에서도 대조군에 비해 *T. versicolor* MrP1의 우수한 분해능이 유지되는지 알아보기 위해 실험한 결과 멸균 토양과 비멸균 토양에서 각각 95.7과 96.3%의 높은 phenanthrene 제거를 보였으며(Figs. 6 and 7) 멸균 토양에 비해 비멸균 토양에서의 생분해가 더 빨리 진행되었다. 이러한 결과는 비멸균 토양에 존재하는 다양한 미생물과의 상호작용으로 인해 phenanthrene의 생분해가 촉진된 것으로 사료된다. 구름버섯 형질전환체에 의한 토양에서의 생분해는 혐기적 조건하에서 phenanthrene의 생분해 시 20일간 90% 정도 분해한 결과(5)보다 우수하였으며 배양배지에서의 결과와 유사하게 phenanthrene의 초기 생분해가 야생형 대조군보다 높았다. 배양 후반부에 형질전환체와 대조군 토양의 생분해가 유사해진 것 또한 다른 분해미생물들의 생분해 및 secondary population에 의한 분해산물의 제거로 인한 결과로 추정된다(1).

*T. versicolor*와 형질전환체 *T. versicolor* MrP1에 대한 phenanthrene 생분해 연구 결과 형질전환체 *T. versicolor* MrP1은 여러 조건에서 우수한 생분해능을 나타내었다. 이러한 결과는 난분해성 물질의 생분해에 있어 분자적 방법을 이용한 형질전환체의 사용이 실험실내 뿐만 아니라 실제 환경에서까지 특히 초기 생분해능을 증가시킬 수 있다는 근거를 제시하였으며 이와 같은 연구를 바탕으로 생분해능의 증대를 위한 다양한 형질전환체의 개발과 생분해능의 증대를 위한 다양한 조건들을 확립해 나가야 할 것이다.

감사의 말

본 연구는 환경부 '차세대 핵심환경기술개발사업'으로 지원받은 과제임(과제번호 031-071-030).

참고문헌

- Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation, 2nd

- (ed.), pp. 282-287, 299-301. Academic Press, New York, USA.
- Baborova, P., M. Moder, P. Baldrian, K. Cajthamlova, and T. Cajthaml. 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157, 248-253.
- Bezalel, L., Y. Hadar, P.P. Fu, J.P. Freeman, and C.E. Cerniglia. 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2547-2553.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.
- Chang, B.V., L.C. Shiung, and S.Y. Yuan. 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48, 717-724.
- Collins, P.J., J.A. Field, P. Teunissen, and A.D. Dobson. 1997. Stabilization of lignin peroxidases in white-rot fungi by tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2543-2548.
- Faison, B.D., T.K. Kirk, and R.L. Farrell. 1986. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 251-254.
- Gibson, D.T., J.R. Koch, and R.E. Kallio. 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* 7, 2653-2661.
- Han, M.-J., H.T. Choi, and H.-G. Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 42, 94-98.
- Kayali-Sayadi, M.N., S. Rubio-Barroso, C.A. Diaz-Diaz, and L.M. Polo-Diez. 2000. Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 697-701.
- Kim, H.-Y. and H.-G. Song. 2000. Comparison of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Curr. Microbiol.* 41, 317-320.
- Kim, Y., S. Yeo, J. Kum, H.-G. Song, and H.T. Choi. 2005. Cloning of a manganese peroxidase cDNA gene repressed by manganese in *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* 43, 569-571.
- Levin, L., A. Viale, and A. Forchiasini. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Int. Biodet. Biodeg.* 52, 1-5.
- Pazarlioglu, N.K., M. Sariisik, and A. Telefoncu. 2004. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochem.* 40, 1673-1678.
- Reddy, C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 320-328.
- Rodgers, J.D. and N.J. Bunce. 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Res.* 35, 2101-2111.
- Tien, K. and T. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161, 813-817.
- Wilson, S.C. and K.C. Jones. 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environ. Poll.* 88, 229-249.
- Won, W.D., L.H. Disalvo, and J. Ng. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 576-580.
- Yeo, S., N. Park, H.-G. Song, and H.T. Choi. 2007. Generation of a transformant showing higher manganese peroxidase (Mnp) activity by overexpression of mnp gene in *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* 45, 213-218.

(Received November 29, 2007/Accepted December 14, 2007)

ABSTRACT: Biodegradation of Phenanthrene by Transformant *Trametes versicolor* MrP1

Yun-Seong Choi, Hyoung Tae Choi, and Hong-Gyu Song* (Division of Life Sciences, and Research Institute of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

As a model compound of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) phenanthrene has been regarded as a toxic material, mutagen and carcinogen in various animals. Biodegradation conditions of phenanthrene such as pH, temperature, shaking speed, stabilizer and cofactor of degrading enzymes were investigated with *Trametes versicolor* and its transformant *T. versicolor* MrP1 in YMG medium, minimal medium and soil microcosm. *T. versicolor* MrP1 can overexpress *mrp* gene encoding Mn-repressed peroxidase that is involved in fungal degradation. Biodegradations of phenanthrene by *T. versicolor* and *T. versicolor* MrP1 were optimally performed in conditions of weak-acid (pH 6.0), 30°C, shaken culture and medium containing 5 mM veratryl alcohol or tryptophan. In these optimal conditions, biodegradation of phenanthrene by *T. versicolor* MrP1 is 31% higher than that of wild type strain in a minimal medium for 20 days. Biodegradation of phenanthrene by *T. versicolor* MrP1 was also higher than that of wild type in soil microcosm. *T. versicolor* MrP1 can be a excellent candidate for the bioremediation of PAHs contaminated environments.