

## 아교버섯 형질전환체를 이용한 내분비장애 물질의 분해

여수민<sup>1</sup> · 김명길<sup>2</sup> · 최형태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생명과학부 생화학과 · 생명과학연구소, <sup>2</sup>국립산림과학원 화학미생물과

내분비장애 물질은 분해가 어렵고, 생물체에 축적되기 때문에 먹이그물을 통하여 결국 인간에게 피해를 준다. 리그닌 분해효소 군을 가진 백색부후균들은 다양한 난분해성 물질의 분해능이 우수하며, 국내에서 분리한 아교버섯은 내분비장애 물질에 속하는 프탈레이트의 분해능이 우수하다. 내분비장애 물질분해와 관련된 laccase cDNA를 발현벡터로 재조합하고 이를 형질전환 방법에 의하여 아교버섯으로 도입하였으며 도입된 발현벡터는 형질전환체의 염색체에 안정하게 존재하였다. 형질전환체들 중 가장 효소활성이 좋은 균주를 대상으로 분석한 결과 laccase 활성이 증가되었을 뿐만 아니라 내분비장애 물질의 분해능도 향상되었고, 동시에 다양한 내분비장애물질에 의한 에스트로젠 활성도 야생형 균주에 비하여 빠르게 감소시켰다.

**Key words** □ endocrine disrupting chemicals, estrogenic activity, laccase expression, *Phlebia tremellosa*

사람들이 일상생활에서의 편리함을 추구하면서 다양한 비닐 및 플라스틱 1회용품 사용량이 증가하였고, 생활의 다양화로 인하여 자연계로 방출되는 난분해성 물질의 종류와 양이 증가하는 추세다. 이러한 난분해성 물질들의 공통적인 특징은 지용성이기 때문에 생태계의 먹이그물을 통하여 결국 우리 몸으로 농축되어 유입된다는 점이다. 이러한 난분해성 물질 중 최근 가장 큰 위협이 되는 것으로서 내분비장애물질(endocrine disrupting chemicals, 이하 EDC), 일명 환경호르몬이라고 불리는 물질들이다. 이들은 우리의 정상적인 내분비계를 교란시키는데 특히 성 호르몬계를 혼란시키는 것으로 보고되었다(4). 이러한 내분비장애물질 중에는 화장품과 플라스틱 제조 시 사용되는 프탈레이트 류(phthalates)와 페인트 및 플라스틱 산업에 사용되는 bisphenol A 등이 포함된다. 이들은 매우 낮은 농도에서도 동물의 생식기관에 심각한 영향을 주고 있다(10). 프탈레이트 류는 햇볕에 노출된 후 에스트로젠 활성이 강하게 되며(9), 다양한 살충제와 제초제들이 내분비장애물질로 변형되기 때문에 공기와 지하수가 이들에 의하여 오염되고 있다. 이를 해결하기 위하여 내분비장애물질을 분해하기 위한 다양한 방법이 제시되었는데, 다양한 화학물질을 투입하는 화학적 방법에 비하여 비록 처리속도는 느리지만 생물학적인 분해방법이 2차 오염이 없으므로 새로운 대안으로 보고되고 있다. 세균(11) 또는 미세조류(6)를 사용하여 다양한 내분비장애물질의 분해가 가능함이 보고되었다.

리그닌은 식물의 세포벽에 섬유질 및 hemicellulose와 함께 주성분을 이루고 있는 고분자화합물로서 리그닌을 분해하는 백색부후균들이 관련 효소군을 가지고 유기탄소의 순환에 기여하고 있다. 리그닌분해효소인 laccase, lignin peroxidase (LiP) 그리고

manganese peroxidase (MnP)들은 리그닌의 분해는 물론 다양한 방향족 화합물의 분해에도 탁월한 활성을 보여, 이 균류를 이용한 난분해성물질의 분해에 대한 연구는 다핵방향족 탄화수소(5), 할로겐화 탄화수소(8), 폭약류(3) 그리고 내분비장애물질(2) 등 매우 다양하다. 백색부후균의 하나인 아교버섯은 국내의 삼림에 흔히 자생하는 균류로서 프탈레이트 류에 대한 분해능이 우수하였고, 프탈레이트가 포함된 배지에서 laccase의 활성이 크게 증가되었다(13). 저자들은 아교버섯의 laccase cDNA를 확보하였고, 이를 발현벡터로 구축하여 다시 아교버섯에 도입함으로써 분해능이 향상된 형질전환체를 확보하였으므로 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 배양조건 및 시약

아교버섯 이핵체 균사로부터 원형질체 분리방법(14)을 사용하여 분리한 일핵체 Pt05-2를 완전배지인 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco)에 배양하여 균체를 확보하였고 액체배지는 PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) 또는 최소배지(7)를 사용하였으며, 기타 배양조건은 Yeo 등(13)의 방법을 따랐다. 실험에 사용한 benzylbutylphthalate (BBP), bisphenol A (BPA), diethylphthalate (DEP) 및 nonylphenol (NP)은 Aldrich로부터 구입하였다.

#### Laccase 발현벡터의 구축 및 형질전환체 확보

아교버섯 laccase cDNA에 *Bam*HI linker를 연결하고 이를 발현벡터인 pBARGPE1의 *Bam*HI 위치에 삽입함으로써 laccase 발현벡터(pBARLAC1)를 구축하였다. 아교버섯 일핵체를 최소배지에서 진탕배양 후 김 등(1)의 방법에 따라 형질전환 실험을 수행하였다. 형질전환체는 선택표지인 항생물질 phosphinothricin 저항성 유전자(*bar*)를 사용하고자 phosphinothricin (50 µg/ml)이 포

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-33-250-8511, Fax: 82-33-242-0459  
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

함된 최소배지에서 선발하였으며, 선발된 형질전환체들은 phosphinotricin (100 µg/ml)이 포함된 배지에서 생장을 재차 확인하였다. 형질전환체에 laccase가 발현벡터가 안정되게 삽입되었음을 증명하기 위하여 형질전환체의 염색체를 분리하고 발현벡터에 존재하는 *tpcC* promoter의 일부와 *bar* 유전자의 일부를 각각 forward primer 및 reverse primer로 사용하는 PCR을 수행하였다(14).

### 형질전환체를 이용한 내분비장애물질의 분해, 에스트로겐 활성 감소 및 laccase 발현분석

PDA에 배양한 Pt05-2 균체를 PDB에 접종하여 5일 동안 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양된 균체를 Waring blender로 1초씩 5회 분쇄하고 균체를 최소배지(100 ml)에 부피 비율로 10% 되도록 접종하였다. 이때 BBP (300 µg/ml), BPA (100 µg/ml), DEP (400 µg/ml) 및 NP (20 µg/ml)를 각각 더하여 균체와 함께 배양하였다.

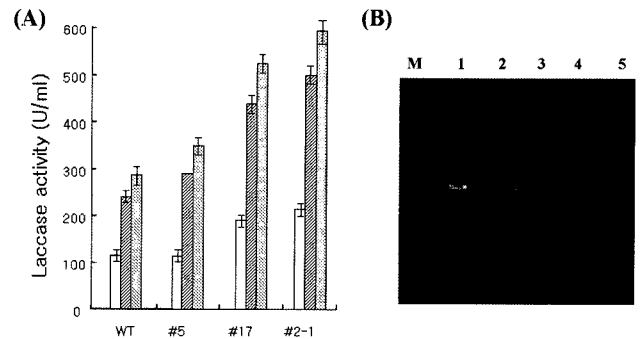
배양액 및 균체에 잔존하는 EDC들의 농도를 다음과 같이 분석하였다. 접종 5일 후 균체를 포함하는 배양액을 n-hexane과 ethylacetate로 차례로 추출하고 24,900×g에서 20분간 원심분리하여 유기용매층에 있는 EDC의 농도를 HPLC (Waters, 미국)를 사용하고 Gemini 5 µm C6-phenyl 150×4.6 mm column (Phenomenex, 미국)을 이용하여 분석하였다. 용출용매는 acetonitrile과 H<sub>2</sub>O (9:1)의 혼합용액을 사용하였고, 용출속도는 1.0 ml/min이었다. 각 EDC의 농도는 표준시약을 동일한 조건으로 분석하여 결정하였다. 배양상등액에 잔존하는 에스트로겐 활성은 Shizuoka 대학의 Nishida 교수로부터 분양받은 yeast two hybrid system을 이용하여 분석하였다(12).

EDC들이 포함된 배지에서 laccase의 활성 및 발현을 분석하고자 배양 5일 후 상등액의 효소활성을 *o*-tolidine을 발색기질로 사용하여 분석하였다(13). 효소활성은 이 조건에서 1분당 OD<sub>590</sub> 0.1의 상승을 보이는 효소 양을 1 unit로 정하였다. 유전자의 발현을 분석하고자 균체를 회수하고 Yeo 등(13)의 방법에 따라 total RNA를 분리하였고, 각 배양균체의 RNA를 대상으로 laccase 유전자 서열에 근거한 PCR primer (3)를 사용하여 RT-PCR을 수행하고 증폭된 DNA는 전기영동 방법으로 분리하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### Laccase 발현벡터를 사용한 형질전환체 확보

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자의 promoter (*gpd*)를 가진 pBARGPE1에 야교버섯 laccase cDNA를 연결하여 발현벡터를 구축하고 이를 야교버섯 일핵체에 도입하여 형질전환체를 확보하였다. 형질전환체 70여 개 중 PDA 배지에서 laccase 활성이 증가된 균주들을 액체배양하여 상등액에 존재하는 효소활성을 분석한 결과 야생형 균주(recipient strain)에 비하여 높은 효소활성을 보이는 형질전환체를 확보하게 되었다(Fig. 1). 이와 같이 효소활성이 증가된 균주들의 염색체에 laccase 발현벡터가 존재함을 증명하기 위하여 *tpcC/bar*-specific PCR을 수



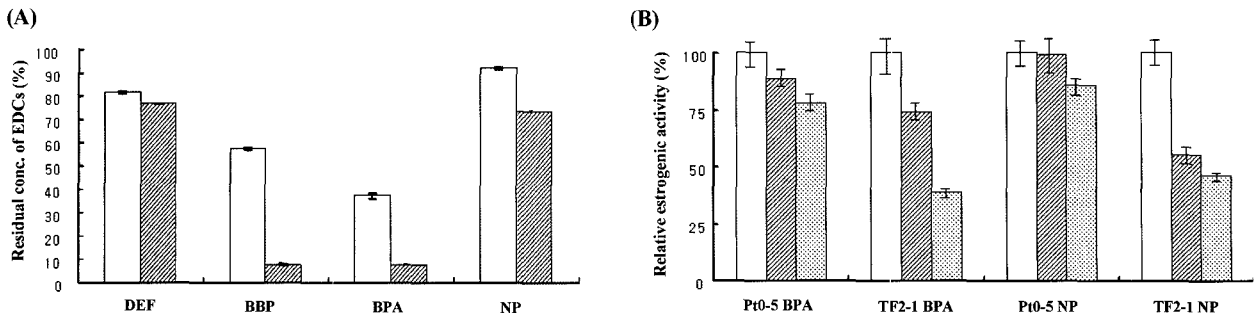
**Fig. 1.** (A) Extracellular laccase activity of several transformants in minimal liquid medium. White bar represents 1-day-old culture and hatched bar and dotted bar represent 3- and 5-day-old cultures respectively. WT represents the recipient strain (Pt0-5) and the number represents three different transformants. (B) Confirmation of the integration of the pBARLAC1 by PCR using vector-specific primers. Arrow, amplified band with 1.4 kb. Lane M; molecular weight marker (1 kb ladder), lane 1; positive control with pBARLAC1, lane 2; Pt0-5, lane 3; transformant 5, lane 4; transformant 17, lane 5; transformant 2-1 (TF2-1).

행한 결과 형질전환체의 염색체에서 예상되는 길이의 유전자가 증폭되어 확인되었다(Fig. 1). 구름버섯의 *MnP* 유전자를 pBARGPE1 벡터와 재조합하고 이를 구름버섯에 도입한 결과 *MnP* 활성이 증가된 형질전환체가 보고되었으며(14), 이 실험에서도 laccase 활성이 증가된 형질전환체를 다수 확보할 수 있었다.

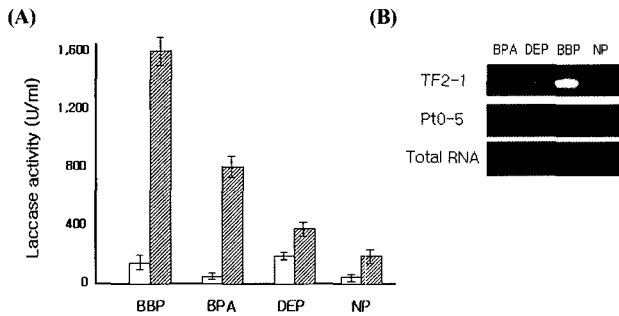
### Laccase 형질전환체를 이용한 내분비장애물질의 분해 및 에스트로겐 활성 감소

형질전환체 중 laccase 활성이 가장 높은 TF2-1을 대상으로 내분비장애물질의 분해 및 에스트로겐활성의 감소, 그리고 이때 laccase의 활성 및 발현량을 분석하였다. 내분비장애물질 4가지를 각각 최소배지에 더하고 배양 5일 후 HPLC를 사용하여 잔존량을 분석한 결과 DEP와 NP의 경우 분해가 느리게 진행되었으나 BBP와 BPA의 경우 빠르게 분해되었으며, 이들 4가지 물질 모두 야생형 균주보다 형질전환체 TF2-1에서 빠른 분해를 보였다(Fig. 2). 내분비장애물질이 보이는 가장 큰 피해인 에스트로겐 활성은 BBP와 NP가 강하기 때문에 이들의 에스트로겐 활성감소를 분석한 결과 TF2-1에서 빠른 활성감소를 보였다(Fig. 2). 내분비장애물질의 분해에 대한 분석을 배양 5일 후 분석한 것과 달리 에스트로겐 활성의 감소를 배양 24시간까지 분석한 것은 original compound의 감소/분해에 비하여 에스트로겐 활성의 감소가 더 빠르게 진행되기 때문에 야생형 균주와 형질전환체의 정확한 활성비교를 위하여 빠른 시간대의 시료를 대상으로 분석하였다. 이 과정에서 laccase는 BBP 및 BPA의 첨가에 의하여 더 많은 활성 증가를 보였으며, laccase-specific RT-PCR에 의한 발현량의 분석에서도 BBP 첨가 시 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 3).

백색부후균의 하나인 *Corioliopsis polyzona*의 세포외 효소를 이용한 내분비장애물질의 분해가 보고되었으며, 이때 laccase mediator인 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)



**Fig. 2.** (A) Determination of residual concentrations of EDCs by HPLC from 5-day-old cultures of Pt0-5 (white bar) and TF2-1 (hatched bar). (B) Determination of estrogenic activity from cultures at time zero (white bar), 12 hr (hatched bar), and 24 hr (dotted bar) after inoculation.



**Fig. 3.** (A) Extracellular laccase activity from 5-day-old cultures of Pt0-5 (white bar) and TF2-1 (hatched bar). (B) Determination of laccase gene expression by RT-PCR using laccase-specific primers from the 5-day-old cultures.

(ABTS)에 의하여 분해가 증가되었고 이를 근거로 laccase의 관련성이 보고되었다(2). 아교버섯의 경우 BBP와 DEP를 첨가한 배지에서 laccase 활성과 발현량이 증가되었기 때문에(13) 항시발현 *gpd* promoter를 사용하여 laccase가 균 생장기에도 발현되는 형질전환체를 확보하여 이들의 분해능을 분석하였다. Laccase 활성이 증가된 형질전환체가 사용된 4가지 내분비장애물질에 대하여 모두 우수한 분해결과를 보이지는 않았으나 야생형 균주에 비하여 더 빠른 분해 및 에스트로젠 활성의 감소를 보였으므로, 이 결과는 내분비장애물질의 분해능을 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 제시한 것이라고 판단된다.

**감사의 말**

이 연구는 산림과학원 연구비로 수행되었음.

**참고문헌**

1. 김윤정, 김명길, 송홍규, 최형태. 2007. 아교버섯과 기계충버섯의 형질전환. *미생물학회지* 43, 147-149.
2. Cabana, H., J.-L. Jiwan, R. Rosenberg, V. Elisashvili, M. Peninckx, S.N. Agathos, and J.P. Jones. 2007. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme prepara-

tion from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770-778.

3. Cheong, S., S. Yeo, H.-G Song, and H.T. Choi. 2006. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiol. Res.* 161, 316-320.
4. Colborn, T., D. Dumanoski, and J. Meyers. 1996. Our stolen future. Dutton, New York, USA.
5. 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.
6. Hirooka, T., M. Ozawa, H. Sakamoto, T. Sako, H. Inoue, R. Kurihara, S. Hashimoto, and H. Yokota. 2003. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 200-203.
7. Leem, Y., S. Kim, I.K. Ross, and H.T. Choi. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 35-40.
8. Mori, T., S. Kitano, and R. Kondo. 2003. Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 380-383.
9. Okamoto, Y., T. Hayashi, C. Toda, K. Ueda, K. Hashizume, K. Itoh, J. Nishikawa, T. Nishihara, and N. Kojima. 2006. Formation of estrogenic products from environmental phthalate esters under light exposure. *Chemosphere* 64, 1785-1792.
10. Schonfelder, G., B. Flick, E. Mayr, C. Talsness, M. Paul, and I. Chahoud. 2002. *In utero* exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 4, 98-102.
11. Soares, A., B. Guieysse, and B. Mattiasson. 2003. Biodegradation of nonylphenol in a continuous packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 25, 927-933.
12. Suzuki, K., H. Hirai, H. Murata, and T. Nishida. 2003. Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* 37, 1972-1975.
13. Yeo, S., M.K. Kim, and H.T. Choi. 2008. Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 72-77.
14. 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 January 3, 2008/Accepted February 21, 2008)

---

**ABSTRACT : Degradation of Endocrine Disrupting Chemicals by Laccase Transformant of *Phlebia tremellosa***

**Sumin Yeo<sup>1</sup>, Myungkil Kim<sup>2</sup>, and Hyoung T. Choi<sup>1\*</sup>** (<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Division of Life Sciences and Research Institute of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea, <sup>2</sup>Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Republic of Korea)

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are hard to be degraded in nature, and are also accumulated in diverse organisms. They finally give negative effects to human through the food web. White rot fungi which have lignin-degrading enzymes have high potentials for degradation of recalcitrant compounds, and a white rot fungus, *Phlebia tremellosa*, isolated in Korea show good degrading activity against the endocrine disrupting phthalates. We have isolated a laccase cDNA which was involved in the degradation of EDCs, and constructed a laccase expression vector to use in the genetic transformation of *P. tremellosa*. The expression vector was stably integrated into the chromosomal DNAs and showed increased laccase activity in transformants. One of transformants showed not only increased degradation of several EDCs but also faster estrogenic decreasing activities generated by the EDCs.