

## 구름버섯 망간 과산화효소를 도입한 아교버섯 형질전환체에 의한 내분비장애 물질의 생분해

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

<sup>1</sup>강원대학교 생명과학부 생화학과, <sup>2</sup>국립 산림과학원 화학미생물과

내분비장애물질은 분해가 매우 어려워 자연계에서 먹이그물을 통하여 사람에게 농축·전달된다. 이들은 정상적인 내분비계에 혼란을 일으키며, 특히 성호르몬의 작용에 많은 피해를 준다. 이를 효율적으로 분해하고 이들의 에스트로겐 활성을 제거하고자 백색부후균의 하나인 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)을 활용하여 4가지 내분비계 장애물질의 분해에 대한 실험을 수행하였다. 아교버섯의 manganese peroxidase (MnP) 활성을 높이기 위하여 구름버섯의 MnP 유전자를 아교버섯에 도입하여 형질전환체를 확보하였으며 이들은 유전적으로 MnP 활성을 안정되게 나타냈다. 내분비 장애물질을 분해하는 조건에서 내분비장애 물질에 따라 30~45%의 분해율을 보인 야생형에 비하여 이 형질전환체들 중 T5는 70~88%의 분해율을 보였으며 에스트로겐 활성의 제거에도 약 2배 향상된 능력을 보였다.

**Key words** □ endocrine disrupting chemicals, estrogenic activity, manganese peroxidase, *Phlebia tremellosa*

우리의 생활에 편리함을 더하기 위한 다양한 제품의 개발과 이들의 사용과정에서 우리가 원하지 않는 환경오염 뿐만 아니라 가축을 포함한 인간에게까지 여러 가지 피해를 끼치는 경우가 매우 많다. 각종 페인트, 강통의 내부 코팅, 플라스틱과 비닐류의 제조과정에 사용되는 계면활성제와 플라스틱 가소제 등, 특히 bisphenol A, nonylphenol, 그리고 다양한 phthalate류가 환경부에서 지정된 내분비계 장애물질에 포함되며, 쓰레기 소각장에서 발생하는 dioxin도 이에 포함된다. 이러한 내분비장애물질(endocrine disrupting chemicals, 이하 EDC)은 자연계에서 분해가 매우 느리기 때문에 먹이그물을 통하여 가축을 포함한 사람에게까지 피해를 주고 있다. 일명 환경호르몬이라고 불리는 이들은 우리의 정상적인 내분비계를 교란시키는데 특히 성 호르몬계를 혼란시키는 것으로 보고되었고(8), 이들은 매우 낮은 농도에서도 동물의 생식기관에 심각한 영향을 주고 있다(13). 농업에서 널리 사용되는 다양한 살충제와 제초제들이 내분비장애물질로 변형되기 때문에 공기와 지하수가 이들에 의하여 오염되고 있다. 이러한 내분비장애물질을 분해하는 다양한 시도가 있었고, 특히 미생물을 사용하는 분해는 비록 느리게 진행되는 단점에도 불구하고 다른 화학물질의 투입 없이 완전한 분해를 이룰 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 연구보고가 있다. 이러한 미생물 중에서 특히 백색부후균을 사용하는 보고가 많은데 이는 백색부후균들이 대표적 난분해성 물질인 리그닌을 분해하기 때문이다.

리그닌 분해에는 laccase, lignin peroxidase (LiP), manganese

peroxidase (MnP) 및 peroxidase에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 공급하는 glucose oxidase 등이 관련된다. 백색부후균 및 리그닌 분해효소들은 리그닌과 유사한 구조를 가진 다양한 난분해성물질에 대한 분해능을 보여, 다양한 염료의 탈색(5, 7), 폭약류의 분해(6) 및 내분비계 장애물질의 분해(10, 14) 등 많은 연구보고가 있다.

국내에서 분리한 백색부후균의 하나인 아교버섯은 다양한 내분비장애물질에 대한 저항성을 보이며, 이들이 포함된 배지에서 생장할 때 laccase 유전자의 발현과 효소활성이 크게 증가되었고(16), 프탈레이트 류, bisphenol A 및 nonylphenol의 에스트로겐 활성 감소에 laccase가 관련되었다(3). 아교버섯은 다양한 배양조건에서 laccase와 LiP의 활성은 강하게 확인되지만 상대적으로 MnP의 활성이 매우 낮다. MnP는 bisphenol A의 분해(9)와 다핵방향족화합물의 분해(4)에 직접적으로 관련되었으므로 아교버섯의 MnP 활성을 증가시켜 난분해성물질의 분해능을 향상시키고자 실험을 진행하였다. 구름버섯을 사용하여 bisphenol A의 분해(1) 외에 많은 논문이 보고되었고, 부분 정제된 MnP를 사용하여 bisphenol A와 nonylphenol의 효율적 분해가 보고되었다(15). 우리 유전자원의 활용을 높이고자 국내에서 분리한 구름버섯의 MnP 유전자를 동일 균주에 재도입하여 효소활성 및 염료 탈색 능력이 증가된 형질전환체를 보고하였다(17). 이와 같이 다양한 난분해성 물질의 분해에 깊게 관련된 구름버섯의 MnP cDNA를 아교버섯에 도입한 형질전환체를 만들고 이들에 의한 EDC의 분해능을 분석하였다. 실험에 사용한 benzylbutylphthalate (BBP), bisphenol A (BPA), diethylphthalate (DEP) 및 nonylphenol (NP)은 Aldrich (USA)로부터 구입하였다.

아교버섯(*Phlebia tremellosa*) 일핵체 균주(Pt05-2)를 완전배지인 PDA (potato dextrose agar)에 배양하여 균체를 확보하였고,

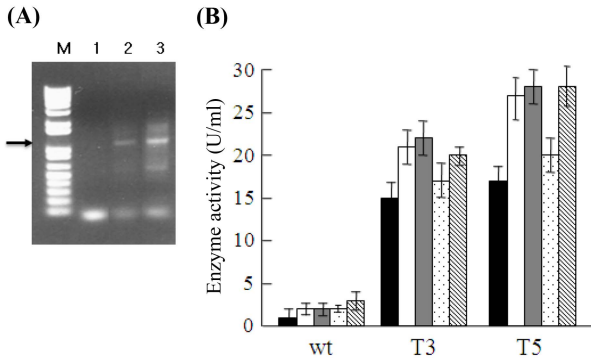
\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-33-250-8511, Fax: 82-33-241-4627  
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

액체배지는 최소배지(11)를 사용하였다. MnP 발현벡터는 구름버섯의 MnP cDNA에 *Bam*HI linker를 연결하고 이를 pBARGPE1의 *Bam*HI 위치에 재조합한 벡터(17)를 사용하였으며 형질전환은 여 등(3)의 방법을 따랐다. 생성된 50여 개의 형질전환체 중 선발된 T3와 T5를 대상으로 벡터에만 존재하는 *gpd* promoter 및 *bar* 유전자의 일부서열을 primer로 제작하여 PCR을 수행함으로써(3) 벡터의 삽입을 확인한 결과 Fig. 1A와 같이 형질전환체의 염색체 DNA로부터 예상되는 길이(1.4 kb)의 유전자 조각이 증폭되었다.

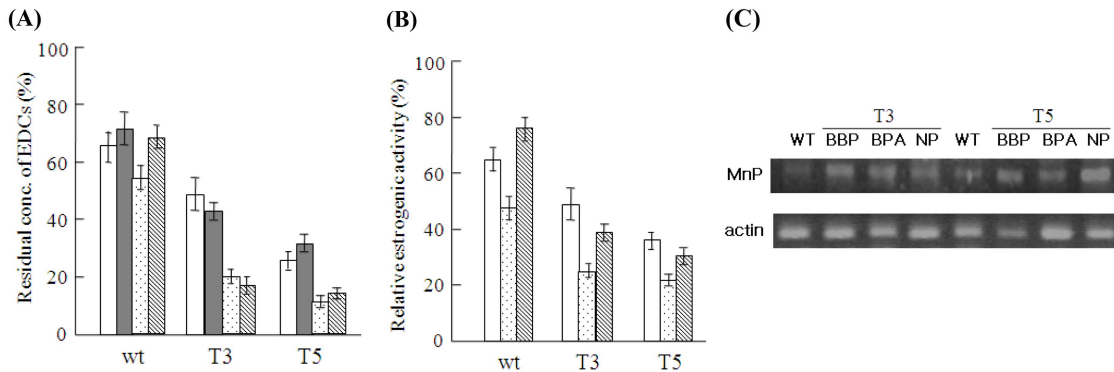
PDA에 배양한 Pt05-2 및 형질전환체 T3와 T5 균체를 PDB에 접종하여 5일 동안 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양된 균체를 Waring blender로 1초씩 5회 분쇄하고 균체를 최소배지(100 ml)에 부피 비율로 10% 되도록 접종하였다. 이를 3일 동안 동일한 조건으로 진탕배양하고 전체 균체를 다시 갈아서 최소배지(200 ml)에 접종하였으며, 동시에 BBP (300 µg/ml), BPA (100 µg/ml), DEP (400 µg/ml) 및 NP (20 µg/ml)를 각각 배지에 더하여

함께 배양하였다. MnP 활성은 Mn<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재 하에서 2,6-dimethoxyphenol의 산화정도로 결정하였다(12). 각각의 EDC가 포함된 배지에서 배양 6일째의 상등액에 존재하는 MnP 활성을 분석한 결과는 Fig. 1B와 같다. 항시발현 promoter에 의하여 발현되는 MnP에 의하여 형질전환체들은 최소배지에서 wild type에 비하여 효소활성이 약 15배 상승하였으며, 다양한 EDC가 첨가된 조건에서 또 다시 15~60% 상승된 활성을 보였다. 리그닌 분해효소들은 질소원이 고갈된 휴지기에서 생성되는 경우가 많지만, 이 형질전환체들은 배양 2일 후부터 wild type에 비하여 높은 효소활성을 보였다(결과 미제시).

배양액에 잔존하는 EDC들의 농도 분석방법은 다음과 같다. 접종 6일 후 균체를 포함하는 배양액을 n-hexane과 ethylacetate로 차례로 추출하고 24,900×g에서 20분간 원심분리하여 유기용매 층에 있는 EDC의 농도를 HPLC (Waters, USA)의 Gemini 5 µm C6-phenyl 150×4.6 mm column (Phenomenex, USA)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. T3 형질전환체보다 T5보다 EDC들에 대한 전체적인 분해능이 우수하였으며, 특히 상등액에 남아있는 BPA와 NP의 농도가 wild type에 비하여 30% 이하로 더 적어 그 분해능이 우수하였다(Fig. 2A). 각 균주의 배양상등액에 잔존하는 에스트로겐 활성은 Shizuoka 대학의 Nishida 교수로부터 분양받은 yeast two hybrid system (15)을 이용하여 분석한 결과 분해능이 우수한 T5의 경우 BPA에 의한 잔존하는 에스트로겐 활성이 22%로서 wild type의 48%에 비하여 에스트로겐 활성의 감소 효과도 우수하였으며, NP에 의한 잔존 에스트로겐 활성도 wild type의 약 77%에 비하여 약 37% 이하로 적었다(Fig. 2B). 형질전환체들이 EDC를 분해하는 조건에서 도입된 MnP의 발현을 분석하고자 균체를 회수하여 total RNA를 분리하였고, 각 배양균체의 RNA를 대상으로 MnP 유전자 서열에 근거한 PCR primer (17)를 사용하여 RT-PCR을 수행하고 증폭된 DNA는 전기영동 방법으로 분리하여 분석하였다. Figure 2C에 제시된 것과 같이 BBP 분해배지에서 wild type



**Fig. 1.** (A) Confirmation of integration of the MnP expression vector in the chromosomal DNAs of transformants by PCR using the MnP-specific primers. M, molecular weight marker; 1, wild type; 2, transformant 3 (T3); 3, transformant 5 (T5). Arrow represents the expected amplified PCR product. (B) Comparison of MnP activities from wild type, T3 and T5 with 4 different EDCs. Black bar, no addition; white bar, BBP; gray bar, DEP; dotted bar, BPA; hatched bar, NP.



**Fig. 2.** (A) Determination of EDC concentrations by HPLC from the 6 day cultures from 3 different strains with 4 EDCs. Legends are same as in Fig. 1B for 4 EDCs. (B) Determination of residual estrogenic activities from the culture supernatant of 3 fungal strains with BBP, BPA or NP. White bar, BBP; dotted bar, BPA; hatched bar, NP. (C) Determination of MnP gene expression by PCR using MnP gene-specific primers. WT, wild type with BBP; rest of the lanes were for T3 and T5 with BBP, BPA or NP.

균주가 발현한 MnP 전사체의 양에 비하여 T3 및 T5가 각각의 EDC를 분해하는 조건에서 MnP의 발현량이 증가되었다. EDC의 분해 및 에스트로겐 활성 제거에 대한 결과는 아교버섯에 자신의 laccase 유전자를 도입한 형질전환체에서 4가지 EDC에 대한 분해와 에스트로겐 활성 제거율이 증가한 것(3)과 기계충버섯에 아교버섯의 laccase를 도입한 형질전환체에서 BPA의 분해 및 에스트로겐 활성 제거율이 증가한 것(2)과 동일한 양상을 보였다. 아교버섯에 자신의 laccase를 추가 도입한 형질전환체가 배양 5 일 후에 BBP 90%, DEP 22%, BPA 90%, NP 25%의 제거율을 보인 것(3)에 비하여 이 실험에서 얻은 형질전환체 T5는 BBP 75%, DEP 65%, BPA 88%, NP 85%의 제거율을 보여 BBP와 BPA의 제거에는 거의 유사한 수준을 보인 반면 DEP와 NP의 분해에 월등히 향상된 제거율을 보였다. 형질전환체의 유전적 변화를 모두 분석하지 않았으나 다양한 내분비장애 물질의 분해에는 리그닌 분해효소군의 활성을 모두 가지는 것이 더 유리하다는 것을 시사한다. 이 실험에서 리그닌 분해효소군이 다양한 난분해성 물질의 분해와 직접적으로 관련되었음을 확인하였을 뿐만 아니라, 분해능이 우수한 균주를 확보하는 다양한 가능성을 제시하였다.

### 감사의 말

이 연구는 국립산림과학원의 연구비로 일부 수행되었음.

### 참고문헌

- 강애리, 최형태, 송홍규. 2008. *Trametes versicolor*에 의한 bisphenol A 생분해의 최적조건. 미생물학회지 44, 37-42.
- 김윤정, 송홍규, 최형태. 2008. 기계충버섯 형질전환체를 이용한 비스페놀 A의 분해와 에스트로겐 활성 제거. 미생물학회지 44, 199-202.
- 여수민, 김명길, 최형태. 2008. 아교버섯 형질전환체를 이용한 내분비장애 물질의 분해. 미생물학회지 44, 10-13.
- 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.
- Bhatti, H.N., N. Akram, and M. Asgher. 2008. Optimization of culture conditions for enhanced decolorization of cibacron red FN-2BL by *Schizophyllum commune* IBL-6. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149, 255-264.
- 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.
- Chhabra, M., S. Mishra, and T.R. Sreekrishnan. 2008. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 587-598.
- Colborn, T., D. Dumanoski, and J. Meyers. 1996. Our stolen future. Dutton, New York, USA.
- Hirano, T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1958-1962.
- Hwang, S.S., H.T. Choi, and H.G. Song. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 767-772.
- 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.
- Palma, C., M.T. Moreira, G. Feijoo, and J.M. Lema. 1997. Enhanced catalytic properties of MnP by exogenous addition of manganese and hydrogen peroxide. *Biotechnol. Lett.* 19, 263-267.
- 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.
- Shin, E.H., H.T. Choi, and H.G. Song. 2007. Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1147-1151.
- Tsutsumi, Y., T. Haneda, and T. Nishida. 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42, 271-276.
- 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.
- 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 December 26, 2008/Accepted February 4, 2009)

---

**ABSTRACT : Biodegradation of Endocrine Disrupting Chemicals by Genetic Transformants of *Phlebia tremellosa* Using Manganese Peroxidase Gene from *Trametes versicolor***

**Hyunwoo Kum<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, Kangwon National University, Chunchon 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) disturb animal hormonal system even at very low concentrations, and finally give harmful effects to human through the food web. A white rot fungus *Phlebia tremellosa* isolated in Korea, was reported to have good degrading activity against the endocrine disrupting phthalates. However, this fungus has very low manganese peroxidase (MnP) activity under various culture conditions while laccase and lignin peroxidase activities were high. We have isolated an MnP cDNA from *Trametes versicolor* which was involved in the degradation of EDCs, and constructed an MnP expression vector to use in the genetic transformation of *P. tremellosa* in order to get higher MnP producing strains. Many transformants had integrated expression vector in their chromosomal DNAs, and showed increased MnP activity. One of two transformants showed increased degradation of 4 EDCs (70~88%) than the wild type (30~45% degradation rates), and showed twice better removal of estrogenic activities generated by the EDCs than the wild type.