

아교버섯(*Phlebia tremellosa*)의 리그닌 분해효소 형질전환체를 이용한 염료의 탈색

금현우¹ · 이성숙² · 유선화² · 최형태^{1*}

¹강원대학교 생명과학부 생화학과, ²국립산림과학원 바이오에너지연구과

Dye Removal by *Phlebia tremellosa* and Lignin Degrading Enzyme Transformants

Hyunwoo Kum¹, Sunhwa Ryu², Sunguk Lee², and Hyoung T. Choi^{1*}

¹Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea

²Division of Forest Bioenergy, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Republic of Korea

(Received December 7, 2009/Accepted December 17, 2009)

White rot fungi which have lignin degrading enzymes show high degrading activity to diverse recalcitrant compounds such as polycyclic aromatic compounds, dyes, explosives and endocrine disrupting chemicals. We have examined decolorizing activity of dyes by *Phlebia tremellosa* and two transformants which had genetically transformed using laccase or manganese peroxidase (MnP) gene. In case of methyl green, wild type strain showed 50% decolorization while laccase transformant (TF2-1) and MnP transformant (T5) showed more than 90% decolorization on day 3. Remazol brilliant blue R(RBBR) was decolorized up to 85% by two transformants while the wild type showed 67% decolorization on day 3. Transformants TF2-1 and T5 both showed increased laccase and MnP activity respectively during the whole growing phase.

Keywords: dye decolorization, genetic transformant, methyl green, *P. tremellosa*, remazol brilliant blue R

합성염료는 빛, 열, 유기용매 및 미생물 등의 작용에 대하여 안정성을 보이기 때문에 천연 염료에 비하여 널리 사용된다. 이에 따라 많은 합성염료들이 자연에 유출되며, 이들에 의한 다양한 환경오염이 나타나고 있다. 오염된 염료의 색깔 때문에 수계 환경에서 광합성 생물체의 효율이 저하되고, 이에 따라 다양한 유기물을 분해하는 호기성 미생물의 활동도 감소하여 수계의 오염이 더욱 심하게 된다. 또한 많은 종류의 염료가 독성을 나타내기 때문에 미생물에 의한 분해도 상대적으로 느려 전통적인 활성오니 방법에 의한 염료의 분해 효율이 낮다.

리그닌을 분해하는 백색부후균류는 laccase, lignin peroxidase (LiP) 및 manganese peroxidase (MnP)가 포함된 리그닌 분해 효소들의 넓은 기질범위에 힘입어 다양한 난분해성 물질의 분해에 활용된다. 이들을 사용하여 다핵방향족 화합물, 폭약류 및 내분비계 장애물질 등의 분해에 대한 연구가 매우 활발하다. 연구자의 실험실에서는 백색부후균을 이용한 폭약류의 분해(7)와 내분비장애 물질의 분해(1)를 보고하였다. 또한 백색부후균류에서 리그닌 분해효소인 laccase와 MnP 유전자를 분리

하고 이들의 발현백터를 구축하여 형질전환체를 제작하였으며, 이들을 활용하여 내분비장애 물질의 분해능이 향상된 형질전환체를 보고하였다(2, 4).

염료의 탈색에 대한 국내의 연구보고로는 흰구름버섯에 의한 방향족 염료의 탈색(3)과 백색부후균 및 갈색부후균에서 리그닌 분해효소의 활성과 염료의 탈색(5) 등이 있고, 외국의 경우 구름버섯(*Trametes versicolor*)과 laccase에 의한 염료의 탈색(6)이 보고되었다. 이와 같이 백색부후균류는 폭약류와 내분비계 장애물질을 포함하여 염료까지 다양한 물질의 분해능을 가지고 있다. 이 연구에서는 리그닌 분해효소의 활성이 증가된 형질전환체들을 이용하여 염료의 탈색효과를 분석하였으며 야생형에 비하여 월등히 향상된 탈색능을 보이는 형질전환체에 대하여 보고하고자 한다.

아교버섯의 laccase cDNA 발현백터를 도입한 아교버섯 형질전환체(TF2-1)와(4) 구름버섯의 MnP 발현백터를 도입한 아교버섯 형질전환체(T5) 균주들(2) 아교버섯 야생형 균주와 함께 사용하였다. 형질전환체 TF2-1와 T5는 각각 laccase와 MnP의 활성이 야생형에 비하여 증가하였으며 bisphenol A와 phthalate류 및 nonylphenol에 대한 분해능이 크게 증가된 균

* For correspondence. E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr; Tel: +82-33-250-8511; Fax: +82-33-242-0459

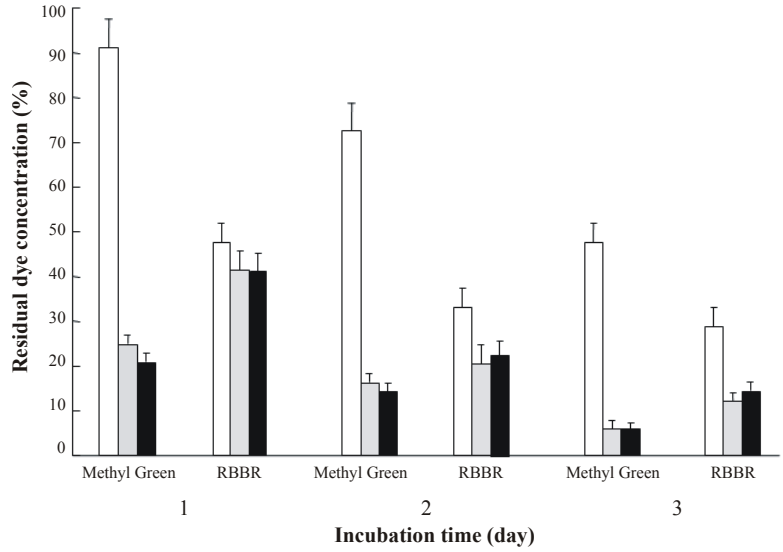


Fig. 1. Decolorization of dyes by *P. tremellosa* and its transformants. (□) wild type; (▨), laccase transformant (TF2-1); (■) MnP transformant (T5).

주들이다. 세 가지 균주들을 완전배지인 potato dextrose broth 에서 진탕배양하고 이를 Waring blender로 갈아 100 ml의 최소배지(9)에 접종할 때 methyl green 0.01% 및 remazol brilliant blue R (RBBR) 0.04%를 각각 더하고 배양하였다. 염료의 탈색을 배양 1일 후부터 3일까지 배양 상등액의 흡광도 변화를 530 nm에서 측정하여 분석한 결과 Fig. 1과 같다. 배양 1일 후에 methyl green은 야생형에서 약 92%가 잔존한 것에 비하여 laccase 형질전환체(TF2-1)에서 27%, MnP 형질전환체(T5)에서는 21%가 잔존하였다. 이러한 탈색정도는 3일 후의 배양 체에서도 유사한 결과를 보여 야생형은 약 50%만 탈색한 것에 비하여 두 가지 형질전환체 모두 90% 이상의 탈색을 보였다. RBBR의 경우에는 배양 3일 후 야생형의 상등액에는 33%가 잔존하였고, 형질전환체에서는 14-18%가 남았다. 염료의 종류는 다르지만 흰구름버섯을 이용한 Congo red의 탈색이 2일째 36%, 5일째 57%의 탈색(즉 64% 및 43% 잔존량)을 보였다

(3). 또한 bromophenol blue는 배양 3일째부터 탈색이 확인되었고, methylene blue의 경우에는 5일 동안 탈색이 거의 일어나지 않았다고 보고하였다. 이에 비하여 비록 염료의 종류는 다르지만 laccase 및 MnP 형질전환체들은 야생형에 비하여 월등하게 향상된 탈색정도를 보였기 때문에 염료폐수의 처리에 활용할 가능성을 높였다고 판단한다.

야생형 및 형질전환체에서 배양 2일의 상등액에 존재하는 laccase와 MnP 활성은 각각 *o*-tolidine (4)과 H₂O₂ 존재 하에서 2,6-dimethoxyphenol의 산화정도(2)로 결정하였다. 두 형질전환체에 사용된 발현벡터의 프로모터는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자에서 유래된 것으로써 항상 발현되기 때문에 배지에 염료의 존재와 관련없이 TF2-1은 야생형에 비하여 2배 전후 증가된 laccase 활성을 보였고, T5는 야생형에 비하여 3-4배 증가된 MnP 활성을 보였다(Fig. 2).

배양 2일의 균사체로부터 RNA를 분리하고(10) laccase와

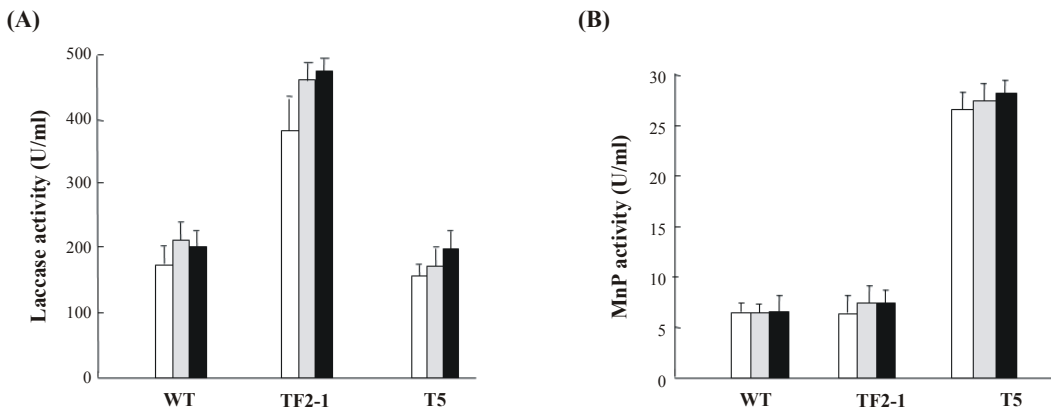


Fig. 2. (A) Laccase activity in the culture supernatant on day 2. (B) Manganese peroxidase activity in the culture supernatant on day 2. (□) control culture; (▨) culture with methyl green; (■) culture with RBBR.

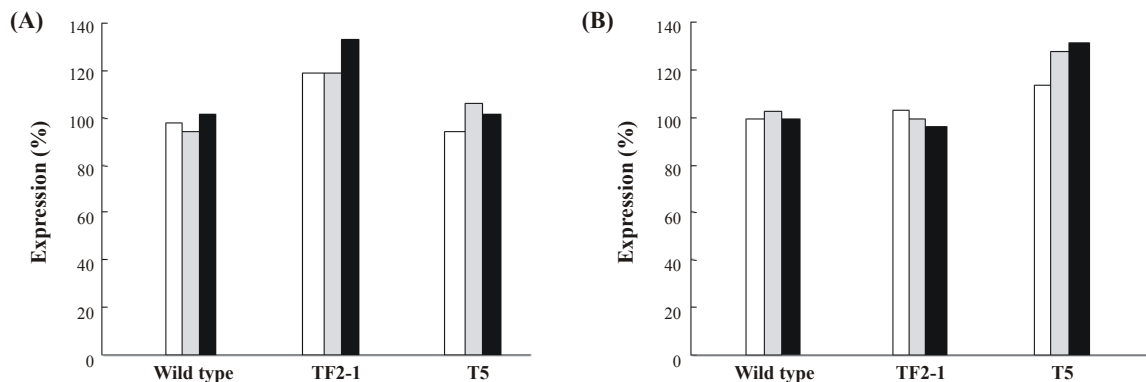


Fig. 3. Determination of laccase and MnP gene expression by RT-PCR using the gene-specific primers. Intensity of the amplified DNA bands were read by Autochemi System and calculated using Lab Work program. RNAs were isolated from the fungal cells on day 2. Relative expressions of laccase or MnP were compared with actin gene expression, and expression level of each gene from the control culture of wild type was set to 100%. Legends are same as in Fig. 2. (A) relative laccase expression. (B) relative MnP expression.

MnP 유전자의 발현을 분석하고자 각 유전자의 특이 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하고 전기영동 방법으로 증폭된 밴드를 분리하였다. 이를 값으로 전환하고자 Autochemi System (UK)을 사용하여 측정된 밴드의 밝기를 Lab Work program으로 계산하였다. Laccase와 MnP 유전자의 발현은 효소활성과 유사하게 각 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 3). 두 가지 염료의 탈색은 배양기간을 1주일 이상 연장하면 100% 가까운 탈색을 보였다. 이 결과를 종합하면 laccase 또는 MnP 유전자를 증폭시킨 형질전환체들은 methyl green과 RBBR의 탈색능이 야생형에 비하여 매우 증가되었음을 확인할 수 있다. 이 결과는 여러 논문(3, 6, 8)에서 제시한 리그닌 분해효소들의 염료탈색 효과를 뒷받침하는 것이다. Polymeric dye R-478 (Poly-R)의 경우 methyl green과 RBBR에 비하여 탈색되는 속도가 느렸는데 이는 Poly-R이 두 가지 염료에 비하여 다핵구조를 가지고 있기 때문이라고 판단된다. Poly-R의 경우 야생형과 두 형질전환체 모두 거의 유사한 속도의 탈색을 보였기 때문에(결과 미제시) 앞으로 더 다양한 염료에 대하여 우수한 탈색을 보이는 균주를 얻기 위하여 다양한 효소균에 대한 실험이 진행되어야 할 것이다.

적요

리그닌 분해효소 균을 가진 백색부후균들은 다핵방향족 화합물을 포함하여 염료와 폭약 및 내분비장애 물질의 분해 등 다양한 난분해성 물질을 분해할 수 있다. 리그닌 분해효소 중 laccase와 manganese peroxidase (MnP)를 각각 발현하는 벡터를 국내에서 분리한 백색부후균류의 하나인 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)에 형질전환 방법으로 도입시킨 형질전환체를 사용하여 염료의 탈색능력을 분석하였다. Methyl green의 경우 3일 후 약 50%의 탈색을 보인 야생형에 비하여 laccase 형질전환체(TF2-1)와 MnP 형질전환체(T5) 모두 90% 이상의 탈색을 보였다. Remazol brilliant blue R (RBBR)에서는 야생형이 약 67%의 탈색을 보인 반면 두 가지 형질전환체들은 약 85%의

탈색을 보였다. 각각의 형질전환체들은 laccase와 MnP의 활성 및 유전자 발현도 활발한 것으로 확인되었다.

감사의 말

이 연구는 국립산림과학원의 연구비로 일부 수행되었음.

참고문헌

1. 강애리, 최형태, 송홍규. 2008. *Trametes versicolor*에 의한 bisphenol A 생분해의 최적조건. *미생물학회지* 44, 37-42.
2. 김현우, 김명길, 최형태. 2009. 구름버섯 망간 과산화효소를 도입한 아교버섯 형질전환체에 의한 내분비장애 물질의 생분해. *미생물학회지* 45, 82-85.
3. 송연홍, 최철민, 김창진, 신광수. 1997. 흰구름버섯(*Coriolus hirsutus*)에 의한 방향족 염료의 탈색. *미생물학회지* 33, 252-256.
4. 여수민, 김명길, 최형태. 2008. 아교버섯 형질전환체를 이용한 내분비장애 물질의 분해. *미생물학회지* 44, 10-13.
5. 장태원, 전상철, 안태석, 김규중. 2006. 목재 부후균의 리그닌 분해 효소 활성과 염료 화합물의 탈색. *미생물학회지* 42, 34-39.
6. Casas, N., T. Parella, T. Vicent, G. Caminal, and M. Sarrà. 2009. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere* 75, 1344-1349.
7. 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.
8. Couto, S.R. 2009. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 227-235.
9. 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.
10. 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.