

## 기계충버섯 형질전환체를 이용한 비스페놀 A의 분해와 에스트로겐 활성 제거

김윤정 · 송홍규 · 최형태\*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

리그닌을 분해하는 백색부후균의 하나인 기계충버섯(*Irpex lacteus*)은 다양한 난분해성물질에 대한 분해능이 매우 높다. 그러나 이 균은 다양한 배양조건에서도 리그닌 분해효소의 하나인 laccase 활성이 매우 낮다. 난분해성 물질들에 대한 분해능을 향상시키기 위하여 laccase 활성을 증가시키고자 아교버섯의 laccase cDNA를 발현벡터로 구축하여 기계충버섯에 형질전환 방법으로 도입하였다. 항시 발현되는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자의 프로모터와 재조합된 laccase 유전자는 생성된 형질전환체에서 배양초기인 생장기에서 강하게 발현되었으며, 생성된 형질전환체가 내분비장애물질의 하나인 비스페놀 A (BPA) 분해능은 물론 에스트로겐 활성 제거에 있어서도 더 우수하였다.

**Key words** □ bisphenol A, endocrine disrupting chemicals, estrogenic activity, genetic transformation, *Irpex lacteus*

수많은 합성화학 물질들이 우리의 환경을 오염시킬 뿐만 아니라 1회용 플라스틱류의 소각과정에서도 심각한 환경오염이 발생한다. 이러한 오염물질들 중에서 사람의 생식 기관에 영향을 줌으로써 내분비 생식호르몬의 활성화와 유사한 반응을 보이거나 활성을 방해하는 물질들이 있으며, 이를 내분비장애물질(endocrine disrupting chemicals: EDCs)이라고 부른다(6). 이들은 매우 낮은 농도에서도 동물의 생식기관계를 방해하기 때문에(15) 이들의 분해가 매우 중요한 문제로 인식되었다. EDC에 대한 물리화학적 인 처리 방법은 다양한 화학물질의 투입 때문에 2차 오염이 발생하므로 비록 속도는 느리지만 유독한 물질을 사용하지 않는 생물학적 처리방법이 EDC의 안전한 해결책이 될 수 있다. 특히 비스페놀 A는 에폭시와 페놀수지 생산에 사용될 뿐만 아니라 다양한 식품저장 깡통의 제조 시 내부 코팅제로 사용되기 때문에 자연으로 노출될 가능성이 매우 높다.

백색부후균은 리그닌을 분해하는 효소군, 즉 laccase, lignin peroxidase (LiP) 및 manganese peroxidase (MnP)를 가지고 있으며, 이 효소들에 의한 염료의 탈색(4), EDC의 분해(3, 21), 폭약류의 생분해(5) 및 살충제의 분해(12, 14) 등 다양한 난분해성 물질의 분해에 대한 보고가 있다. 백색부후균의 하나인 기계충버섯(*Irpex lacteus*)도 염료의 탈색(17), 폭약류의 분해(7) 그리고 비스페놀 A의 분해(16)에 대한 연구가 수행되었다. 한편 기계충버섯의 MnP (2, 18)와 균사 연관 laccase (19)가 보고된 바 있으나 laccase 활성은 다양한 배양조건에서 매우 낮다(김 등, 미발표 자료).

아교버섯(*Phlebia tremellosa*)을 프탈레이트류가 있는 배지에서 배양할 경우 laccase의 활성이 크게 증가되는 것을 확인하였고, 이 때 발현되는 laccase cDNA를 분리하였다(22). 그러나 아교버섯은 이 실험에서 분석한 비스페놀 A의 분해가 거의 확인되지 않았다(22). 본 연구실에서는 기계충버섯의 형질전환 방법을 확립하였으므로(1) 아교버섯의 laccase cDNA를 형질전환 방법으로 기계충버섯에 도입함으로써 분해능이 향상된 형질전환체를 확보하고자 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 아교버섯의 Laccase cDNA를 도입한 기계충버섯의 형질전환체 생성

대관령 지역에서 분리한 기계충버섯을 이 실험에 사용하였다(7). 완전배지는 PDA (Potato Dextrose Agar)를 사용하였으며 최소배지는 Leem 등(11)의 배지를 사용하였고 기타 배양은 Yeo 등(22)의 방법을 따랐다. 아교버섯의 laccase cDNA (accession no.: AM282562)를 pBARGPE1의 *Bam*HI 위치에 삽입함으로써 laccase 발현벡터 pBARLAC1을 구축하였다. Laccase 발현벡터를 기계충버섯에 도입하기 위하여 전통적인 원형질체-CaCl<sub>2</sub> 방법을 사용하였고(1), 형질전환체는 선택표지인 phosphinothricin 저항성으로 선발하였다. 선발된 형질전환체로부터 총 DNA를 분리하고 발현벡터에 존재하는 *trpC* 프로모터-phosphinothricin 저항성 유전자(*bar*) 특이 프라이머(forward primer; 5'-GTCGACAGAAGA TGATATTG-3' 및 reverse primer; 5'-AGTTAGACAACCTGAAG TCT-3')를 사용하는 PCR을 수행하여 발현벡터의 안정적 유지를 확인하였다.

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

### 내분비장애물질, 비스페놀 A의 분해 및 에스트로겐 활성 저해 분석

선발된 형질전환체 2개와 야생형 균주를 PDA에서 5일간 배양하여 균체를 얻었고 이를 최소배지 50 ml에 작게 자른 약 20조각의 균체를 접종하여 30°C에서 5일간 진탕배양 하였다. 진탕배양한 균체 전체를 Waring blender로 갈아 새로운 최소배지 100 ml에 20% (v/v) 되도록 접종하고 비스페놀 A (BPA) 무첨가 배지에 비하여 약 70%의 길이생장을 보이는 농도인 BPA (50 mg/L)를 더하고 30°C에서 진탕배양 하였다. BPA의 잔류농도는 다음과 같이 분석하였다. 형질전환체들의 배양액 전체를 n-hexane으로 추출하고 이를 다시 ethylacetate로 추출한 후 24,900×g에서 원심분리 하였다. 잔류 BPA를 포함하는 유기용매 층을 회수하고 HPLC (HP 1,525 series, Gemini 5 μm C6-phenyl 110A 150×4.6 mm column)를 사용하여 분석하였다. 용출 용매는 acetonitrile과 H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) 혼합용액을 사용하였고, 용출속도는 1.0 ml/min이었으며 BPA 표준 시약을 동일한 조건으로 분석하여 BPA의 농도를 결정하였다.

배양상등액에 잔존하는 에스트로겐 활성은 Shizuoka 대학의 Nishida 교수로부터 분양받은 yeast two hybrid system (Y190)을 이용하여 분석하였다(8).

### BPA 분해과정에서 Laccase 발현 분석

Laccase의 활성은 *o*-tolidine을 발색기질로 사용하여 분석하였고(9) 효소활성은 이 조건에서 1분당 OD<sub>590</sub> 0.1의 상승을 보이는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다. Trizol 추출완충액(Invitrogen)을 사용하여 각 형질전환체의 균체로부터 총 RNA를 분리하고, 각 RNA를 대상으로 laccase 유전자 서열에 근거한 PCR 프라이머(5)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였으며 증폭된 DNA는 전기영동 방법으로 분리하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

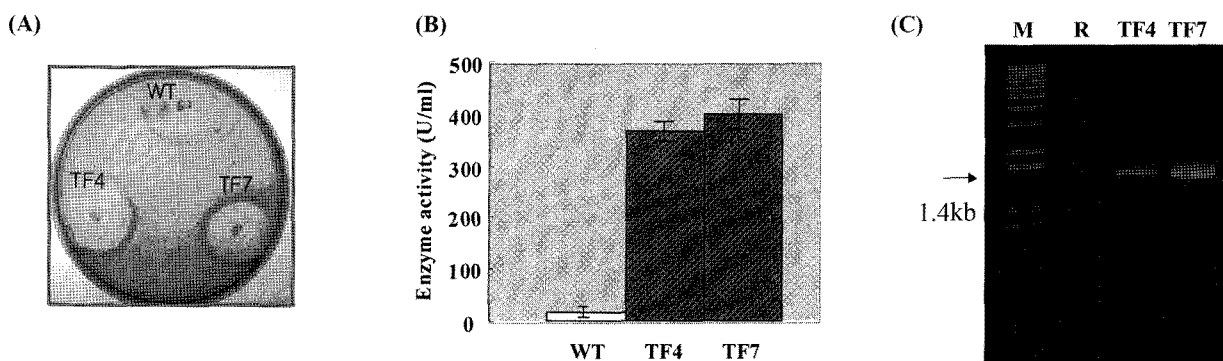
기계충머섯에 laccase 발현벡터 pBARLAC1을 형질전환 방법

으로 도입한 결과 약 80개의 형질전환체가 선발되었으며 이 중에서 laccase 활성이 가장 높은 두 개의 균주를 선발하였다. 이들은 PDA에서 야생형에 비하여 발색기질인 *o*-tolidine과 더 강한 발색을 보였고(Fig. 1A), 액체배지에서도 배양 2일째에 상등액에 높은 활성이 확인되었다(Fig. 1B). 이렇게 배양 초기에 laccase 활성이 높은 균주는 질소성분이 낮은 배지에서 배양 7일째 리그닌 분해효소의 활성이 나타나는 것(19)과 비교할 때 난분해성 물질분해를 배양 초기부터 시작할 수 있기 때문에 긍정적인 효과라고 판단된다. 형질전환체에 pBARLAC1의 안정적인 유지를 확인하기 위하여 *trpC/bar* 유전자 특이 프라이머를 사용한 PCR을 수행한 결과 예상되는 DNA 조각(1.4 kb)이 오직 형질전환체(TF4와 TF7)의 염색체로부터 증폭되었다(Fig. 1C). 이 형질전환체들은 유전적으로 매우 안정되어 비선택배지에서 10회 이상 세대배양한 후에도 선택표지 및 laccase 유전자가 유지되었다.

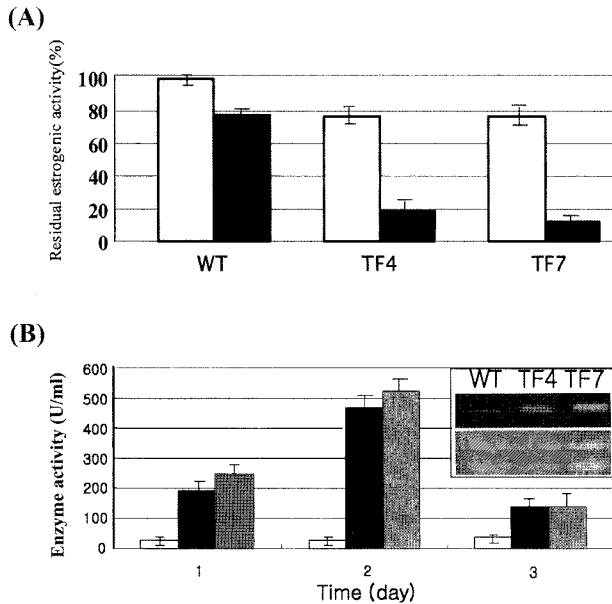
세 가지 균주(야생형, TF4와 TF7)들에 의한 BPA의 분해를 HPLC로 분석한 결과 모두 배양 24시간에 BPA (50 mg/L)를 95% 이상 분해하였다(Table 1). 형질전환체들에 의한 BPA 분해율이 야생형에 비하여 비록 3% point 정도 우세하지만 상등액에 잔존하는 에스트로겐 활성은 큰 차이를 보였다. TF4와 TF7의 배양상등액에 잔존하는 에스트로겐 활성은 배양 1일째 야생형보다 더 낮으며, 배양 2일째에는 야생형에 비하여 5배 이상 에스트로겐 활성의 제거율을 보였다(Fig. 2A). 백색부후균의 하나인 *Corioliopsis polyzona*가 분비하는 laccase는 4시간 동안의 반응에서 BPA (5 mg/L)를 완전히 제거하였다(3). 한편 백색부후균 *Stereum hirsutum*과 *Heterobasidium insulare*는 BPA (100 mg/L)

**Table 1.** Comparison of removal rate of bisphenol A by *Irpex lacteus* and two laccase transformants in 24 hr incubation

Strains	Removal of bisphenol A (%)
Wild type	95.3±0.6
Transformant 1 (TF4)	97.9±0.6
Transformant 2 (TF7)	97.0±0.8



**Fig. 1.** (A) Comparison of laccase activities of two transformants with the recipient strain on agar plate on day 4. (B) Comparison of extracellular laccase activities of the recipient and two transformant strains on day 2. (C) Confirmation of integration of the expression vector (pBARLAC1) in two transformants by PCR using vector-specific primers. The arrow represents the expected amplified PCR product.



**Fig. 2.** (A) Determination of the residual estrogenic activity from the culture supernatants of three strains on day 1 (white bar) and on day 2 (black bar). (B) Determination of laccase activity on the culture supernatant of the wild type (white bar), TF4 (black bar), and TF7 (gray bar). (Inset: Determination of laccase expression from three different strains at 24 hr by RT-PCR using the laccase-specific primers. Upper panel for the amplified RT-PCR product; lower panel for the total RNA).

를 99%까지 제거하는 데에 7~14일이 소요되었다(10). 이러한 결과는 TF4와 TF7이 BPA를 제거하는 것에는 야생형과 비슷하지만 형질전환체들은 BPA 및 이의 분해 중간산물에 대한 분해능이 야생형에 비하여 더 우수하고, 따라서 이들 중간산물이 보이는 에스트로겐 활성의 제거에 더 효율적이었다고 판단된다.

BPA를 분해하는 과정에서 laccase의 활성과 발현은 야생형에 비하여 TF4와 TF7에서 모두 높았다(Fig. 2B). 그러나 BPA의 첨가가 없는 경우에도 laccase의 발현이 증가하기 때문에 BPA 첨가시 나타나는 laccase의 활성 및 발현상승은 BPA에 의하여 유도되는 것이 아니다(Fig. 1B and 2B). pBARLAC1은 항시발현 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자의 프로모터를 사용하기 때문에 재조합된 laccase도 성장기에서 발현됨은 물론 특별한 유도물질 없이 발현되었기 때문이다. 다양한 난분해성 물질의 분해에 laccase가 관련되었다는 연구보고는 매우 많다. 프탈레이트류는 아교버섯의 laccase를 유도하며(22), 구름버섯에서 폭약류의 분해과정에서 laccase의 발현이 증가되고(5) nonylphenol 및 aniline에 의하여 laccase 활성이 크게 증가된다(13). 또한 느타리버섯 배양시 제초제(Scepter)를 더하면 laccase 생성이 유도되었다(14). Laccase에 매개제인 1-hydroxybenzotriazole (HBT) 또는 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)를 더하고 17 $\beta$ -estradiol 및 ethinylestradiol과 반응시키면 1시간 후에 80% 이상의 에스트로겐 활성이 감소되며 8시간 후에는 에

스트로겐 활성이 완전히 제거된다(20). 본 실험에서 BPA에 의한 에스트로겐 활성의 감소가 laccase 활성증가와 평행하게 진행된 결과에 의하여 laccase 활성이 증가된 형질전환체들이 야생형보다 더 효율적으로 BPA 및 그 중간산물이 보이는 에스트로겐 활성을 제거했음을 알 수 있다. 한편 아교버섯은 프탈레이트류에 대한 우수한 분해능에 비하여 BPA의 분해 및 에스트로겐 활성 제거 효율이 매우 저조하지만, 상대적으로 BPA의 분해가 우수하나 laccase 활성이 거의 없는 기계충버섯에 타 버섯균의 laccase를 도입하고 발현시킨으로써 BPA의 분해능이 더 향상된 형질전환체를 얻을 수 있었다. 결론적으로 laccase 형질전환체들은 생장기에 laccase의 발현 및 활성이 증가되었고, 이는 배양 초기에 BPA의 분해는 물론 그 결과 에스트로겐 활성 제거에도 긍정적인 효과를 가져왔다.

## 감사의 말

이 연구는 환경부 “The Eco-Technopia 21 Project (과제번호 031-061-030)”에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 김윤정, 김명길, 송홍규, 최형태. 2007. 아교버섯과 기계충버섯의 형질전환. *미생물학회지* 43, 147-149.
2. Baborova, P., M. Moder, P. Baldrian, K. 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.
3. 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 preparation from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770-778.
4. Champagne, P. and J.A. Ramsay. 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 276-285.
5. 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.
6. Colborn, T., D. Dumanoski, and J. Meyers. 1996. Our stolen future. Dutton, New York, USA.
7. Kim, H. and H.G. Song. 2003. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 150-156.
8. Kim, Y., S. Yeo, M.K. Kim, and H.T. Choi. 2008. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 172-175.
9. Ko, E., Y. Leem, and H.T. Choi. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 98-102.
10. Lee, S.M., B.W. Koo, J.W. Choi, D.H. Choi, B.S. An, E.B. Jeung, and I.G. Choi. 2005. Degradation of bisphenol A by white rot

- fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 201-207.
11. 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.
  12. Maruyama, T., C. Komatsu, J. Michizoe, H. Ichinose, and M. Goto. 2006. Laccase-mediated oxidative degradation of the herbicide dymron. *Biotechnol. Prog.* 22, 426-430.
  13. Mougin, C., A. Kollmann, and C. Jolival. 2002. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol. Lett.* 24, 139-142.
  14. Rezende, M.L., A.M. Barbosa, A.F. Vasconcelos, R. Haddad, and R.F. Decker. 2005. Growth and production of laccase by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter (imazaquin). *J. Basic Microbiol.* 45, 460-469.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Shin, K.S. 2004. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J. Microbiol.* 42, 37-41.
  18. Shin, K.S., Y.H. Kim, and J.S. Lim. 2005. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Microbiol.* 43, 503-509.
  19. Svobodová, K., A. Majcherczyk, Č. Novotný, and U. Kües. 2008. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresour. Technol.* 99, 463-471.
  20. 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.
  21. Tamagawa, Y., H. Hirai, S. Kawai, and T. Nishida. 2007. Removal of estrogenic activity of 4-*tert*-octylphenol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Environ. Toxicol.* 22, 281-286.
  22. Yeo, S., M. Kim, and H.T. Choi. 2008. Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 72-77.

(Received August 20, 2008/Accepted September 16, 2008)

---

**ABSTRACT : Degradation of Bisphenol A and Removal of Its Estrogenic Activity by Two Laccase Transformants of *Irpex lacteus***

**Yunjung Kim, Hong-Gyu Song, and Hyoung T. Choi\*** (Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea)

A white rot fungus *Irpex lacteus* produced lignin degrading enzymes, which showed degrading activity against various recalcitrant compounds. However, laccase, one of the lignin degrading enzymes, was too low to be assayed by spectrophotometry using *o*-tolidine as the chromogenic substrate in this fungus under various culture conditions. A laccase expression vector was constructed using a cDNA from *Phlebia tremellosa* with the constitutively expressed promoter of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene, and introduced into *I. lacteus* by the restriction enzyme mediated integration transformation through the protoplast-CaCl<sub>2</sub> procedure. Two transformants showed highly increased laccase activities at the early growth phase in the minimal liquid medium, and they not only degraded bisphenol A, a notorious endocrine disrupting chemical, but also removed the estrogenic activity effectively.