

수환경-P7 Characterization and refinement of enzyme of the gene encoding catechol 1,2-dioxygenase from Phenol-degrading, *Rhodococcus* sp.

이희정¹, 박근태, 박재림², 이상준

부산대학교 미생물학과

¹부산대학교 환경시스템협동과정, ²신라대학교 환경학과,

The heavy use of petroleum products in modern livings has brought ubiquitous environmental contaminants of aromatic compounds, which persist in aquatic and geo-environment without the substantial degradation. The persistence and accumulation of the aromatic compounds, which include xylene, phenol, toluene, phthalate, and so on are known to cause serious problems in our environments. Some of soil and aquatic microorganisms facilitate their growth by degrading aromatic compounds and utilizing degrading products as growth substrates, the biodegradation helps the reentry of carbons of aromatic compounds, preventing their accumulation in our environments. The metabolic studies on the degradation of aromatic compounds by microorganisms were extensively carried out along with their genetic studies. A *Rhodococcus* sp. isolated in activated sludges has shown the excellent ability to grow on phenol as a sole carbon source. In the present study investigated a gene encoding phenol-degrading enzymes from a *Rhodococcus* sp.

1. 서론

화학공업의 발달과 방향족 화합물의 사용량의 증가로 인한 자연계에 과다 유출은 이들 방향족 화합물이 가지는 강한 독성 및 구조적으로 안정한 난분해성의 특성으로 심각한 환경오염 문제를 유발하고 있다. 이러한 방향족 화합물의 처리는 화학적 산화, 용매추출, 활성탄에 의한 흡착 등의 물리·화학적 방법이 이용되어 왔으나, 최근에는 완전한 mineralization을 위한 생물학적 처리 즉 미생물을 이용한 방법이 각광을 받고 있다.

이들 거의 모든 화합물들은 자연계 미생물에 의해 생산되는 효소들에 의해 생분해되며, 미생물에 의한 각종 방향족 화합물의 분해에 관여하는 효소 유전자는 분해 플라스미드 또는 chromosomal DNA에 operon형태로 존재한다.

따라서 이들 분해 미생물의 분해 효소의 특징 및 유전자의 특성확인과 이들의 발현 증대를 위한 각종 연구는 난분해성 화합물의 효과적인 처리를 위하여 필수적이다.

본 연구에서는 하수처리장 활성슬러지에서 분리·동정한 우수한 페놀분해능 및 다양

한 화합물의 분해능을 가지는 세균 *Rhodococcus* sp. 를 이용하여, 페놀분해시 *Rhodococcus* sp. 의 분해에 관한 대사효소의 특성 및 유전자의 구조를 밝히고자 하였다. 미생물에 의한 방향족 화합물의 분해과정에서는 common intermediate인 catechol을 형성하며, catechol의 벤젠고리가 미생물이 분비하는 효소의 작용으로 개환되면서 지방족 화합물로 변형된 후 효소반응에 의해 완전 분해된다. 이러한 catechol 개환은 *ortho-pathway*와 *meta-pathway*의 두 경로로 보고되고 있다. 본 연구의 페놀분해에 이용하는 *Rhodococcus* sp.는 *ortho-pathway*의 분해 경로를 가지는 것으로 확인되었으며, 이때 작용하는 catechol 1,2-dioxygenase 효소를 분리·정제하고 순수하게 정제된 protein의 nucleotide sequence를 밝히고 다른 균주에서 분리된 catechol 1,2-dioxygenase의 nucleotide sequence와의 상동성을 파악하고자 한다.

2. 재료 및 방법

페놀분해 균주는 하수처리장의 활성슬러지에서 분리한 *Rhodococcus* sp.를 사용하였다. 배양은 5.3 mM KH_2PO_4 , 32 mM Na_2HPO_4 , 18 mM NH_4NO_3 , 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM FeCl_3 의 최소배지에 단일 탄소원으로 1000mM의 페놀을 가하였다. 균주의 대량 배양은 5 l jar fermenter를 이용하였다.

효소의 정제는 DEAE- Sepharose column chromatography(20 cm×1.8 cm)와 phenyl-sepharose colum chromatography(10 cm× 1.0 cm)을 이용하여 추출하였고, catechol 1,2-dioxygenase 효소 활성 측정은 Hegeman²⁾와 Aoki의 방법을 이용하였다. catechol 1,2-dioxygenase 활성측정방법은 0.1M 인산완충액 2.5ml에 10mM catechol 0.1ml을 첨가하고 5-50 μl 의 효소용액을 첨가하여 반응시킨 다음 2-5분후에 1N HCl 0.5ml을 첨가하여 반응을 중단시킨 후, 효소를 첨가하지 않은 반응용액을 표준용액으로 하여 spectrophotometer로 260nm에서 흡광도를 측정하였다.

페놀분해는 standard method의 coloric metric assay를 변형하여 측정하였으며, 단백질 정량은 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였으며 Bradford³⁾ 와 Lowry방법을 사용하였다.

정제효소의 분자량 측정은 Laemmli방법에 따라 SDS-polyacrylamide electrophoresis 하였다. 이렇게 정제한 효소는 기질특성조사 및 가스크로마토그래피-질량분석, 방해물질의 영향, 최적pH와 최적온도 안정성 조사 등을 통하여 효소 특성을 파악한다. 또한 순수 분리 정제한 효소를 통해 nucleotide sequence 분석을 통해 타 균주에 비해 우수한 페놀 분해능을 가지는 *Rhodococcus* sp.의 효소학적 특성을 규명하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. enzyme activity assay

1,2-dioxygenase activity는 페놀농도 1000 mg/l를 유지하며 생육도(600 nm)에서 0.8 정도로 균체를 배양하여 cell disruption하여 측정하였다. catechol 1,2-dioxygenase activity의 specific activity은 0.38 unit로 나타났고, 이는 균체의 증식과 유사한 대수기에

높게 나타났다. 반응산물인 *cis,cis*-muconic acid 의 몰흡광계수는 $19,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이며, 1unit는 25°C에서 1분당 $1 \mu\text{mole}$ 의 *cis,cis*-muconic acid을 생산하는 효소량으로 정하고, specific activity는 unit/mg로 정하였다.

3.2. 생육조건에 따른 Catechol 1,2-dioxygenase 생성능 검토

Rhodococcus sp.의 페놀분해

페놀농도별, 온도별, pH별로 측정하여 본 결과 본 균주에 의한 페놀분해능은 30°C, pH 7.0이상에서 페놀농도 1000 mg/l 이하는 24시간만에 모두 분해되었고, 48시간 이후에는 2500 mg/l농도까지도 분해가능성을 확인할 수 있었다.

또한 *Rhodococcus* sp. EL-GT의 페놀분해는 pH 7~10 의 범위에서 효율적으로 이루어졌으며, 최대 pH 5에서 pH 11정도로 광범위하게 분해가 안정적으로 이루어졌다. catechol 1,2-dioxygenase activity는 pH 7.5-8.0사이에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 페놀분해와 catechol 1,2-dioxygenase의 생성은 비례적인 상관관계를 나타내었다.

3.3 fractionation and chromatography

정제를 위해 cell disruption은 homogenizer을 이용하여, 4°C 이하에서 추출하였고 초발 pH의 영향을 조사하여 본결과 pH 8.0에서 가장 안정한 활성을 나타내었다. fractionation결과 catechol 1,2-dioxygenase는 황산암모늄 50-70% 범위에서 추출되었다. 다음단계로 chromatography를 통해 효소의 특성을 파악하였다.

3.4 molecular biological techniques

다른 유사한 세균에서 밝혀진 catechol 1,2-dioxygenase encoding gene을 probe 제작하여 primer(F) 5'-GGAATTCCATATGACCACCACCGAAAACCCCAC-3',

primer(R) 5'-GAAGATCTCAGGCCTCGGGGTCGAGCGCGAA-3' 이용하여 *Rhodococcus* sp.의 Catechol 1,2-dioxygenase gene을 규명하고자 PCR을 수행한 결과 PCR product는 830bp를 나타내었다. 정제하여 순수분리한 enzyme를 nucleotide sequence analysis하여 상동성을 파악하였다.

4. 요약

본 연구는 방향족 화합물질 중 페놀페수에 대한 생물학적 처리를 위해 본 실험실에서 분리한 페놀분해능이 우수한 *Rhodococcus* sp. EL-GT를 이용하여 catechol 분해 catechol 1,2-dioxygenase 분해활성을 측정하였고, 이것이 *ortho-pathway*임을 확인할 수 있었다. 또한 다른 연구에서 보고된 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 균주의 catechol 1,2 dioxygenase를 기초로한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였으며 이 분해 유전자의 cloning실험을 수행 중이다. 이들 실험을 통하여 *Rhodococcus* sp.의 페놀분해 균의 유전적 구조 및 특성을 검토하고 밝혀지는 단백질 정보를 이용하여 방향족 화합물의 분해능이 보다 우수한 균주의 개발을 시도하고자 한다.

참 고 문 헌

- Philip D. STRACHAN, "Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene"(1998), *Biochem. J.* vol(333), page 741-747
- Hegeman. G.D, "Synthesis of the enzyme of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of the enzymes by the wild type"(1966), *J. Bacteriol.* vol(91), page 1140-1154
- Bradford. M. M, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding"(1976), *Anal. Biochem.* vol(72), page 248-254