

Shuffled toluene-o-xylene monooxygenase를 이용한 TCE 측정용 fluorescence biosensor

류두현*, 김용미*, 목지예*, 최상일**, Thomas Wood***

전주대학교 자연과학부 환경과학과*, 광운대학교 환경공학과**,
Dept. of chemical engineering, univ. of Connecticut***

Abstract

A sol-gel fiber-optic biosensor with encapsulated pH-sensitive fluorophore and immobilized genetically modified toluene-o-xylene monooxygenase was developed to detect TCE, which is carcinogenic chlorinate organic compounds prevailing in ground water. The sensitivity was characterized for the composition of sol-gel, and manufacturing procedure.

key word : Biosensor, TCE, Fiber Optics

1. 서 론

본 연구는 염화유기오염물질인 TCE를 측정 할 수 있는 센서의 개발을 목표로하여 TCE를 분해 할 수 있는 미생물을 이용하여 실험하였다. TCE의 분해능을 갖고 있는 미생물 중 분해성이 가장 우수한 균주를 선별하여 각 균주들을 비교실험 하였다. TCE의 분해성의 비교는 gas chromatography를 이용한 방법, chloride assay(Doohyun Ryoo, 2000), pH 측정등 여러 가지 방법을 이용하였으며, 특히 센서 부분의 주축이 되는 sol-gel법을 이용하여 센서의 개발 실험을 하였다. 졸-겔 과정(sol-gel processing)이란 콜로이드(sol) 부유 상태를 만들고 이 졸의 겔화 과정을 통해 액체상의 망상조직(gel) 으로 변화시켜 무기질 망상조직 을 만드는 과정을 말한다. 이 콜로이드를 합성하기 위한 전구체는 금속이나 준 금속 원소들이 다양한 반응성 배위체로 둘러 쌓인 물질로 구성되어 있다. 금속 알콕사이드들이 가장 많이 사용되는데 이는 이들 물질들이 물과 쉽게 반응하기 때문이며, 졸-겔 과정은 일반적으로 가수분해, 알콜 응축, 물 응축의 3가지의 반응으로 구분하여 설명할 수 있다. 졸-겔 무기질 망상조직의 특성과 성질은 다양한 요소들과 연관 되어 있다(Shinji Sakai 2002). 이러한 요소들은 가수분해 및 응축 반응율에 영향을 준다. 이들 반응에 영향을 주는 요소로는 pH(W.M. de Azevedo 2001), 온도와 시간(J. Rajan PremKumar 2002), 시약의 농도(Michelle A. LeRoux 1999), 촉매의 성질과 농도(D.A. Donatti 2001), H₂O/금속원소 몰 비(R), 숙성온도와 시간, 건조 등을 들 수 있다. 이러한 요소들을 제어함으로써 졸-겔 무기질 망상조직의 구조와 성질들을 넓은 범위에 걸쳐 변화시킬 수 있다.

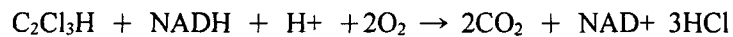
2. 실험방법

TCE, PCE, chloroform, dichloroethylene와 vinyl chlorides의 분해에 대하여 최적화 된 sMMO, TOM, ToMO와 TCE를 분해 할 수 있는 monooxygenase 중 유사한 염기서열을 갖는 것을 선택하여, 단독으로 혹은 혼합하여 shuffling하였다. *M. trichosporium* OB3b와 *M. capsulatus* (Bath), *B. cepacia* G4의 toluene *o*-monooxygenase, *P. mendocina* KR1의 toluene *p*-monooxygenase, *P. pickettii*의 toluene *m*-monooxygenase와 *Pseudomonas* CF600의 phenol hydroxylase등에 site-directed mutation을 실시하여, monooxygenase의 활성부위에 위치한 중요한 아미노산의 종류를 전환하여 활성의 변화를 살펴본 다른 연구자들의 연구결과를 참조하여 볼 때, 지방족 염화유기탄소 분해능이 향상된 monooxygenase도 효소 중 hydroxylase 활성을 갖는 부위에 중요 아미노산이 변화할 것으로 추측된다. 이렇게 볼때 monooxygenase의 gene은 6개 부분으로 구성되어 매우 유사한 구조를 이루고 있다.

지방족 염화유기탄소의 분해능이 개선된 random mutagenesis를 위하여 pBSKan-ToMO(8983 bp, Figure 1)를 vector로 사용하였다. pBSKan-ToMO를 plasmid purification kit (eg. Qiagen MIDI prep kits)로 정제한 후, ToMO 전체를 발현시킨 touABCDEF gene을 PCR을 이용하여 증폭시켰다.

TCE등 여러 유기오염물질을 측정 할 수 있는 산화효소 센서를 개발하기 위해 TCE의 분해성이 가장 우수한 균주를 선별하여야 하므로 각 변이된 균주들을 비교실험 하였다. 실험에 사용된 미생물은 TCE이 분해능을 가지고있는 것으로 판명된 *Burkholderia. cepacia* G4(Leahy,1996) *Pseudomonas. stutzeri* OX1(Ryoo, 2000), *Escherichia. coli* TGI pBSKAN Tom Green(D. Ryoo, 2001)등의 여러 미생물을 GC와 CI test를 이용하여 비교하였다.

수중에 미생물에 의해 TCE가 분해되는데 이때 분해성이 높을수록 H⁺가 많이 생성되게 되고 이는 산성으로 변화하게된다. pH optode에 의한 sensor의 개발 가능성 여부를 살펴보기 위하여, TCE 분해 전후의 수용액의 pH를 측정하였다.



pH indicator는 Bromophenolblue(Faiz Bukhari Mohd Suah 2003), Fluoresceinamine(FLA), Broncresolpurple(BCP)등 여러 종류가 있다. 실험에 사용된 pH 지시약으로는 Fluoresceinamine(FLA)와 Broncresolpurple(BCP)이 사용되었다. 미생물에 의해 분해된 TCE의 영향으로 증가된 H⁺는 pH meter나 indicator를 이용하여 감지 할 수 있다. FLA는 형광물질이며 490nm에서 excitation, 519nm에서 emission 된다(N.K. Chaudhury, 2003). 이 물질은 pH 변화에 따라 520nm에서 형광의 강도(intensity)가 변화하는데 이를 이용하여 pH를 알아 볼 수 있다. BCP는 UV-Vis(Varian cary 100)로 측정하였다. BCP는 490nm에서 가장 좋은 감도를 보였으며 pH 변화에 따라 강도(intensity)가 변화하였다. FLA는 N,N-Dimethylformamide(DMF, Tedia)을 용매로 하며, 이 용매 500 μ l에 1mg을 녹인 것을 제조하여 실험시 최종농도에 맞게 희석하여 사용하였다. BCP는 증류수에 녹여 사용하였다.(N.K. Chaudhury, 2003). FLA, BCP 두 물질을 TCE 실험 후 원심분리된 상등액에 각 최종농도 0.004mg/ml로 하여 형광 분광광도와 흡광도를 측정하였다. 이를 pH meter로 측정한 값과 FLA, BCP로 실험하여 측정한 값을 비교하였다.

센서용 3층의 원형 판을 만들기 위한 유리부분을 유리판(cover galss)을 원형으로 잘라 염산용액으로 세척하고 물과 에탄올로 다시 세척한 후 건조시킨다. 건조된 유리판을 평평한 위치에 놓고 sol-gel/indicator solution을 5 μ l 떨어뜨린다. 2~3분 후 완전건조 되기전, gel이 형성 되었을 때, 유리판의 크기와 같게 만들어진 Durapore membrane(HVLP 2500, Millipore)을 올려놓은 후 가볍게 압착시켰다. 이렇게 제조된 glass/sol-gel/membrane 3층을 4 $^{\circ}$ C에서 40%의 습도를 유지하면서 overnight 건조 시

Table 1. Volume ratio of the Hybrid silica solution

NO. Material	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TEOS	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PTMOS	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
EtOH	10	10	10	7	7	7	13	13	13
DW	0.63	3	7.4	0.63	3	7.4	0.63	3	7.4
Catalyst	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31

켰다. Overnight 건조된 판은 효소 및 미생물을 고정화 시키기전 PPB에 30분동안 담궈 sol-gel solution 제조 중 반응되지 않은 산을 중화시켜 안정화 시킨 후 건조시켜 제조하였다.

Glutaldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma)의 단백질을 결합할 수 있는 능력을 이용해 결합하여 고정화시켰다. 이 작업을 안정하게 하기위해 효소의 활성을 유지할 수 있게 주의해야하며, E. coli bovine serum albumin(BSA, sigma)를 첨가하여 고정화되는 효율을 증가시킬수 있도록 하였다. 효소와 phosphate buffer(5mM, PPB)등을 섞어 working enzyme solution(A)을 제조하고, 굳히는 물질 즉, glutaldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma)가 함유되었있는 용액을 working glutaldehyde solution(B)을 제조하였다. B-용액은 phosphate buffer(5mM, PPB) 100 μ l에 glutaldehyde 40 μ l를 혼합하여 만들어진 것을 stock으로 하며, 냉동보관하여 사용하였다.

3. 결론

본 연구의 주요 목표인 TCE나 여러 유기오염 물질을 측정하기 위하여 미생물의 분해에 관하여 여러 미생물들의 특징을 살펴보았다. 실험에 사용된 여러 균주중 TCE에 대한 활성이 가장 높은 것을 선택하기 위해 분해성을 비교실험 하여본 결과 *E. Coli pBSKAN Tom Green* 70%정도로 가장 높게 나타났다. *E. Coli pBSKAN Tom Green*은 상기 서술한 바와같이 배양시 100 μ g/ml의 Kanamycin 농도를 유지해야하며, 활성이 높아지면 파란색의 염료물질을 내놓는 특징을 갖고 있다.

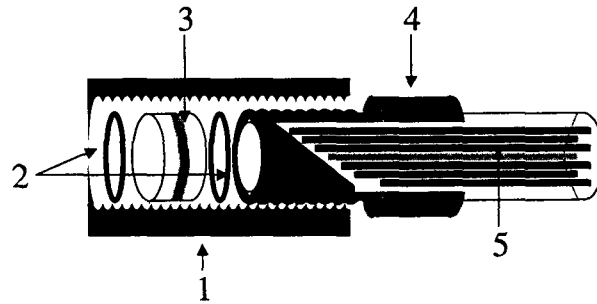
Chloride assay법을 이용하여 무기염소 이온의 정량분석결과 액상에 존재하는 염소 이온은 TCE의 분해성이 여러 균주보다 우수한 *E. coli TGI pBS Tom Green*이 약 71 μ M로 존재 하며 *ToMo mutant 30*, *ToMo mutant MA*, *ToMo mutant MC* 등이 각 1.5 μ M, 2 μ M, 2.2 μ M로 *E. coli TGI pBS Tom Green*을 이용한 것이 다른 균주에 비해 무기염소 이온이 많이 존재하였다. 실험의 결과로 존재하는 Cl⁻ 이온의 양은 TCE 분해량에 해당하는 Cl⁻ 측정치 보다는 낮게 나타났으며, 이는 TCE 분해시 완전한 광물화(mineralization)가 일어나지 않았음을 의미한다. pH의 변화는 TCE를 접촉시킨 sample이 좀더 낮게 나왔다. 이는 TCE 분해의 결과로 H⁺가 발생이 되고 이에따라 pH가 낮아지는 것을 의미한다.

미생물에 의해 분해된 TCE로 인한 H⁺의 증가로 변화된 pH를 indicator를 이용하여 감지하여보았다. 형광물질로 알려져있는 FLA와 BCP를 이용하였다. FLA의 excitation λ m는 490nm이며 emission λ m는 520nm이었다(N.K Chaudhury, 2003). 이 두 물질은 pH 변화에따라 각 특정 파장에서 강도(intensity)가 변화하는데 pH meter를 이용하여 측정한 pH와 두 물질을 이용하여 추정된 pH를 비교하여보았다. BCP는 UV-Vis(Varian Cary 100)로 측정하였으며 FLA에 대해서는 Fluorospectrophotometer(Jisico, Japan)을 이용하였다. FLA, BCP 두 물질을 TCE 실험 후 원심분리된 상등액에 각 최종농도 0.004mg/ml로 하였다. 상등액의 pH 감응을 알아보기 위해 Buffer로 pH에 따라 FLA, BCP에 따른 각각의 기준 만들어 시료와 비교하여보았다. pH meter로 측정한 것과는 오차가 있으나 pH변화의 경향성은 유지하는 것으로 나타났다. 즉, pH 지시약으로 쓰인 물질이 TCE 분해에 따른 pH 변화를 감지할 수 있고 이

물질을 이용해 바이오 센서용 sol-gel을 제조하는데 지시약으로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 이 중 NAD를 첨가한 시료는 다른 시료에 비해 pH가 낮게 측정되는데 이는 NAD 첨가에 따른 것이었다.

Enzyme의 활성을 유지할 수 있는 최적의 과산화수소의 농도를 찾기 위해 과산화수소(hydrogen peroxide)의 여러 농도 조건 하에서 실험하여 보았다. 그 결과 Fig. 6.에 나타낸 바와같이 과산화수소 (Hydrogen peroxide)의 농도가 80mM일 때 TCE의 분해성이 제일 좋게 나타났다. 결과적으로 세포나 효소의 TCE 분해능은 거의 비슷하지만 H₂O₂를 조효소로 이용한 방법이 TCE 분해성이 50%이상으로 가장 우수하였다.

BCP는 수용액의 pH가 산성이면 연노란색을 나타내고 염기성이면 보라색을 나타는 특징이 있다. 이를 이용하여 3층의 판에 세포와 효소의 고정화 후 TCE를 접촉시켜 pH 변화에 따른 sol-gel의 색깔의 변화를 비교하였다. 1.8ml의 샘플병에 끼워넣은 3층의 판을 꺼낼 때 부주의하거나, 3층의 판의 유리를 cover glass를 사용해 간혹 깨지거나 금간 것이 있었다. BCP의 pH에 따른 색변화에 의해 TCE 접촉여부에 따라 pH가 변화되고 이에 따라 sol-gel의 색깔이 연노란색으로 변화해야 하지만, 현재 보기에는 뚜렷히 구분히 되지않았다. 이는 세포나 효소의 고정화 시킬 때의 그 농도에 문제가있거나 pH의 변화가 크지 않기 때문에 생긴 결과로 생각된다.



(b)

Fig. 1. 실험 장치의 개략도

- 1 : Screwable terminal holding ring
- 2 : Sealing 'O' rings
- 3 : Biosensing sandwich (left to right : Durapore membrane with immobilized enzyme, middle sol-gel/indicator layer, supporting glass disk)
- 4 : Probe tip
- 5 : multi-element optical fiber