Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 3, 282-289 (1996)

재조합균주 *E. coli* CK1092가 생산하는 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase의 정제 및 특성

박효남 · 김영수[1] · 김영창 · 김치경 · 임재윤*
충북대학교 미생물학과, [1]약학과

Purification and Characterization of 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase from Recombinant *E. coli* CK1092. **Hyo-Nam Park, Young-Soo Kim[1], Young-Chang Kim, Chi-Kyung Kim and Jai-Yun Lim*.** *Department of Microbiology, [1]Department of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea* — 2,3-DHBP dioxygenase was purified from *E. coli* CK1092 carrying the *pcbC* gene, which was cloned from 4-chlorobiphenyl-degrading *Pseudomonas* sp. P20. Purification of this enzyme was done by acetone precipitation, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, and preparative gel electrophoresis. The molecular weight of subunit was 34 kDa determined by SDS-PAGE, and that of native enzyme was about 270 kDa. It suggests that this enzyme consist of eight identical subunits. This enzyme was specifically active against only 2,3-DHBP as a substrate with 18 μM of Km value, but not catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol and 4-chlorocatechol. The optimal pH and temperature of 2,3-DHBP dioxygenase were pH 8.0 and 40~60℃. The enzyme was inhibited by Cu^{2+}, Fe^{2+} and Fe^{3+} ions, and was inactivated by H_2O_2 and EDTA. The lower concentrations of some organic solvents such as acetone and ethanol don't stabilize the activity of 2,3-DHBP dioxygenase. The enzyme was completely inactivated by adding the reagents such as N-bromosuccinimide, iodine and p-diazobenzene sulfonic acid.

현대 사회가 발달되어 감에 따라 유기합성 물질들의 사용이 증가되어 가고 있다. 이런 유기합성 물질들은 독성이 높고, 화학적으로 안정하여 잘 분해가 되지 않아 심각한 환경오염 문제를 일으키고 있다. 이러한 xenobiotic 물질 중의 하나인 Polychlorinated biphenyls (PCBs)는 물리적, 화학적으로 안정하고 전기적 성질이 우수하여 열전달액으로서 축전지나, 변전기, 내연기관 등에 널리 사용되며, 농약, 제지과정등에서 각종 용제로 사용된다(1). 4-Chlorobiphenyl(4-CB)은 PCBs의 일종으로 미생물에 의해 분해 과정은 Fig. 1(top)과 같은 경로로 서서히 분해될 수 있다(2-5).

난분해성물질들이 공통적으로 벤젠고리를 가지고 있으므로 벤젠고리를 개환시키는 aromatic ring-cleavage enzyme들은 난분해성 방향족 탄화수소물질들의 분해에 매우 중요한 효소이다. 벤젠고리를 절단하는 위치에 따라 extradiol type과 intradiol type으로 나뉘며, intradiol-type enzyme과 extradiol-type enzyme은 여러 상이한 효소적 특성을 나타낸다(6). 2,3-Dihydroxybiphenyl dioxygenase는 extradiol-type enzyme으로 4-CB의 벤젠고리를 개환하는 중요한 효소이다. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pseudomonas* sp. LB400, *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 각각 2,3-DHBP dioxygenase가 분리 정제되어 효소적 특성이 밝혀졌다(7-9). 또한 *Rhodococcus globerulus* P6로부터 3개의 다른 2,3-DHBP dioxygenase(I,II,III)가 분리되었으며, 2,3-DHBP dioxygenase II는 이제까지 밝혀진 2,3-DHBP dioxygenase와 효소적 성질이 다른 새로운 종류의 효소임이 보고되었다(10, 11). 또한 *Rhodococcus erythropolis* TA 421로부터 4개의 다른 2,3-DHBP dioxygenase(I,II,III, IV)이 존재한다고 보고되었다(12).

4-CB 분해균주로 *Pseudomonas* sp. DJ-12를 비롯하여 P20, P08, P27, P1242등이 청주 및 인근 지역의 공단 지역으로부터 분리되었으며(13), 4-CB 분해 양상에 따라 4-CB 분해균주들을 두 개의 군으로 구분하였다. 즉 4-CB에서 4-CBA를 거쳐 protocatechuate로 계속 분해하는 균주군(*Pseudomonas* sp. DJ-12, P08, P27)과 4-CB에서 4-CBA까지만 분해하는 균주군(*Pseudomonas* sp. P20, P1242)으로 분류하였다(14). 각 균주군을 대표하는 균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 *Pseudomonas* sp. P20은 클로닝을 통해 그 유전자 구조가 밝혀졌으며(15-18), Fig. 1(bottom)은 *Pseudomonas* sp. P20으로부터 클로닝된 pCK1과 pCK1092의 유전자 구조를 보여주고 있다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 유전자군을 probe로 하여 southern hybridization 방법으로 분석하여 *Pseudomonas* sp. P20의 *pcbC* 유전자와 상동성이 없음을 보고하였다(19). 4-CB를 완전 분해하는 균주군인 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 2,3-DHBP dioxygenase 특성은 보고된 바 있으나(9), 4-CB에서 4-CBA까지 분해하는 균주군의 2,3-DHBP dioxygenase의 특성에 대하여는 아직 자세히 보고된 바가 없다. 또한 *Pseudomonas* sp. P20으로부터 *pcbC* 유전자가 클로닝된 *E. coli* CK1092 균주의 2,3-

*Corresponding author.
Key words: 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase, *pcbC* gene, *Pseudomonas* sp.

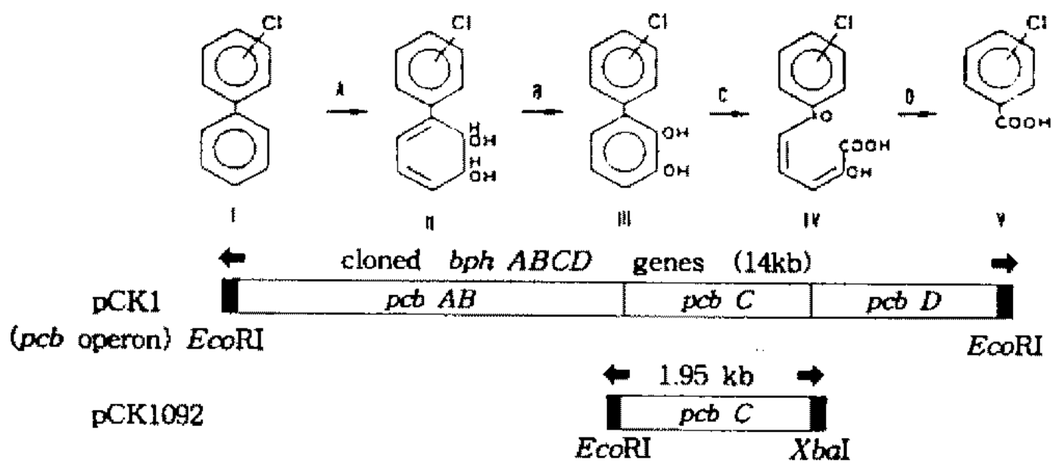

Fig. 1. Catabolic pathway for the degradation of 4-chlorobiphenyl and proposed gene organization of the *pcb* ABCD operon in *Pseudomonas* sp. P20(17).
(top)-Compounds: I, 4-chlorobiphenyl; II, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4′-chlorobiphenyl; III, 2,3-dihydroxy-4′-chlorobiphenyl; IV, 2-hydroxy-6-oxo-6-(4′-chlorophenyl)hexa-2,3-dienoate(meta-cleavage compound); V, 4-chlorobenzoate.
Enzymes: A, 4-chlorobiphenyldioxygenase; B, dihydrodiol-dehydrogenase; C, 2,3-dihydroxybipenyldioxygenase; D, MCP hydrolase.
(bottom)-Genetic structure of pCK1, pCK1092 cloned from *Pseudomonas* sp. P20.

DHBP dioxygenase 활성이 모균주보다 뛰어나므로(18), 본 실험에서는 *Pseudomonas* sp. P20의 2,3-DHBP dioxygenase를 암호하는 *pcbC* 유전자가 클로닝된 *E. coli* CK1092 균주(17, 18)가 생산하는 2,3-DHBP dioxygenase의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 *E. coli* CK1092는 *Pseudomonas* sp. P20으로부터 클로닝된 균주로서 *pcbC* 유전자를 암호하는 *Eco*RI-*Hind*III DNA fragment(1.95 kb)를 가지고 있는 재조합균주이다(17, 18).

효소의 생산

재조합균주 *E. coli* CK1092는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/*l* ; Bacto yeast extract, 5 g/*l* ; NaCl, 5 g/*l*, pH 7.0)에 2% sucrose를 첨가한 배지를 이용하여, 37℃, 15시간 배양하였다. 균주의 대량 배양은 5 liter jar fermenter(한국 발효기)를 이용하여 3 liter 배양하였다. 같은 조건으로 배양한 종균배양액 30 m*l*와 10% 소포제 5 m*l*를 함께 접종하였고, 200 rpm, 3 vvm의 조건으로 37℃에서 통기교반하며 배양하였다.

효소의 정제

세포 배양액을 4℃, 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 모은 후 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 2회 세척하고 동일 buffer로 현탁하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기(Fisher M-300, USA)로 파쇄하고 4℃, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 −20℃로 냉각한 cold acetone을 최종 농도가 60%가 되도록 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 침전시킨 단백질은 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 변성된 단백질을 제거하고 ultrafiltration(Amicon PM 10)법으로 농축하였다. 농축한 시료는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-25 column에 흡착시켰다. 동일 buffer로 충분히 씻어낸 후, 0～1.5M NaCl로 linear gradient elution을 행하여 6 m*l*씩 분획하였다. 단백질의 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, 효소 활성을 갖고 있는 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축하였다. 이 모든 chromatography 과정은 Econo System (Bio-Rad Co., USA)을 이용하였다. 위 과정으로 얻어진 효소는 Prep Cell, Model 491(Bio-Rad Co., USA)를 사용하여 discontinuous buffer system을 이용한 preparative native-PAGE를 실시하였다. Gel은 Prep Cell의 28 mm ID gel tube에다 높이 8 cm, 6% acrylamide separation gel(pH 8.8)과 1.5 cm 높이의 4% acrylamide stacking gel(pH 6.8)을 만들어 이용하였다. Running buffer로는 Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하고, elution buffer로는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였다. 전기영동은 12W에서 10시간 실시하였으며, cooling water bath를 이용하여 15℃ 이하로 유지시켰다. 분획은 tracking dye(0.01% bromophenol blue)가 elution 된 후부터 Econo system에 연결하여 1 m*l*/min의 유속으로 3 m*l*씩 분획하였다. 단백질의 농도는 280 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성을 나타내는 분획을 모아 Centriprep(10,000 M.W. cut)으로 농축하였다.

효소 활성 측정

2,3-DHBP dioxygenase의 활성은 100 μM의 2,3-dihydroxybiphenyl을 25℃에서 반응시킨 후 생성되는 meta-cleavage product(MCP)를 spectrophotometer을 이용하여 434 nm에서 흡광도로 측정하였다. 기질인 2,3-dihydroxybiphenyl은 acetone에 녹여 stock을 만들어 사용하였다. 2,3-DHBP dioxygenase의 1 unit는 1분당 1 μmole의 MCP를 생성하는 효소의 양으로 정하였다. MCP의 Molar extinction coefficient 값(*E*434nm)은 17,900으로 하여 unit를 계산하였다(8). 단백질 양의 측정은 단백질 정량 kit(No. P 5656, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다.

분자량 측정

효소의 분자량 측정은 Native-PAGE와 SDS-PAGE를 실시하여 측정하였다. Native-PAGE는 7.5% separating gel(두께 0.75 mm)과 4% stacking gel를 사용하였으며, 4℃에서 200V를 일정하게 하여 약 30분 정도 전기영동하였다(Mini-protean II, Bio-Rad, USA). Active stai-

ning은 2,3-dihyroxybiphenyl를 분무하여 노란색으로 나타나는 band로 확인하였으며, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 destaining solution(50% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색하여 단백질의 band를 확인하였다. 단백질의 분자량은 표준 단백질로 MW-ND-500 kit를 Sigma Chemical Co.(USA)로 부터 구입하여 측정하였다.

SDS-PAGE는 12% separating gel(두께 0.75 mm)과 4% stacking gel를 사용하였으며, native-PAGE와 같은 조건으로 전기영동시켰다. 표준 단백질로는 Mid-range protein MW markers를 Promega Co.(USA)로 부터 구입하여 분자량을 측정하였다.

효소의 특성

pH 및 온도 pH 6~8의 구간은 potassium phosphate buffer(50 mM), pH 8~9의 구간은 Tris-HCl buffer(50 mM), pH 9~10의 구간은 Glycine-NaOH buffer (50 mM)를 사용하여 효소반응액을 각각의 pH로 맞추어 준 후 pH에 의한 영향을 조사하였다. pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 48시간 동안 4℃에 방치한 후 잔존하는 효소활성을 조사하였다. 온도에 대한 영향은 30~80℃의 구간에서 효소반응을 수행하여 최적 반응온도를 조사하였고, 온도에 대한 안정성의 검사는 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 잔존하는 효소 활성을 조사하였다.

금속이온 효소활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온들을 효소반응액에 최종농도 0.1 mM과 1 mM로 첨가한 후에 효소활성을 측정하였다. Buffer로는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

화학 변형제의 영향 효소의 활성부위에 존재하는 아미노산 잔기를 알아보기 위해 아미노산 수식시약인 iodine, N-bromosuccinimide(NBS), β-naphthoquinone-4-sulfonic acid(NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS), monoiodoacetic acid, glyoxal, N-ethylmaleimide를 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 화학 변형제 처리는 각각 반응시약을 효소반응액에 최종 농도 0.1 mM과 1 mM로 첨가하여 30℃에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

유기용매에 대한 효소 안정화 Extradiol dioxygenase의 활성은 낮은 농도의 다양한 유기용매에 의해 안정화된다는 보고(20)에 근거하여 유기용매에 의한 2,3-DHBP dioxygenase의 활성정도를 알아보았다. 유기용매로는 ethanol, isopropyl alcohol, glycerol, acetone을 효소반응액에 10%가 되도록 첨가하고 50시간까지 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다.

Oxidant와 chelators에 의한 영향 Oxidant와 chelators에 의한 효소활성의 영향을 알아보기 위해 oxidant로는 H_2O_2를 사용하였고, chelator로는 EDTA, tiron, *o*-phenanthroline을 각각 농도별로 처리하여 효소활성 억제정도를 측정하였다.

기질 특이성

효소의 기질특이성을 알아보기 위해 여러기질에 대한 효소활성을 조사하였다. 기질로는 2,3-dihydroxybiphenyl, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol을 효소반응액의 최종농도가 100 μM이 되도록 사용하여 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 생산

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *E. coli* CK 1092는 Jar fermentor를 이용한 대량배양에서 균체성장은 15시간만에 정지기에 도달하였다. 효소의 활성은 대수기 말기에 가장 활성이 높았으며, 정지기에 들어가면서 효소활성은 급격히 감소함을 알 수 있었다.

효소의 정제

E. coli CK1092가 생산하는 2,3-DHBP dioxygenase는 0~60%까지 cold acetone으로 침전하였다. Acetone 침전한 것을 DEAE-Sephadex A-25에 흡착시킨 후 0~1.5M의 NaCl로 용출시킨 결과 Fig. 3에서처럼 0.4~0.7 M의 범위에서 2,3-DHBP dioxygenase가 용출되었다. 효소활성이 있는 분획을 모아 농축한 후 Model 491 prep cell를 이용하여 preparative disc gel electrophoresis를 실행하였다. 효소의 활성이 있는 분획을 모아 centriprep(>10,000 MW)으로 농축한 후에 native-

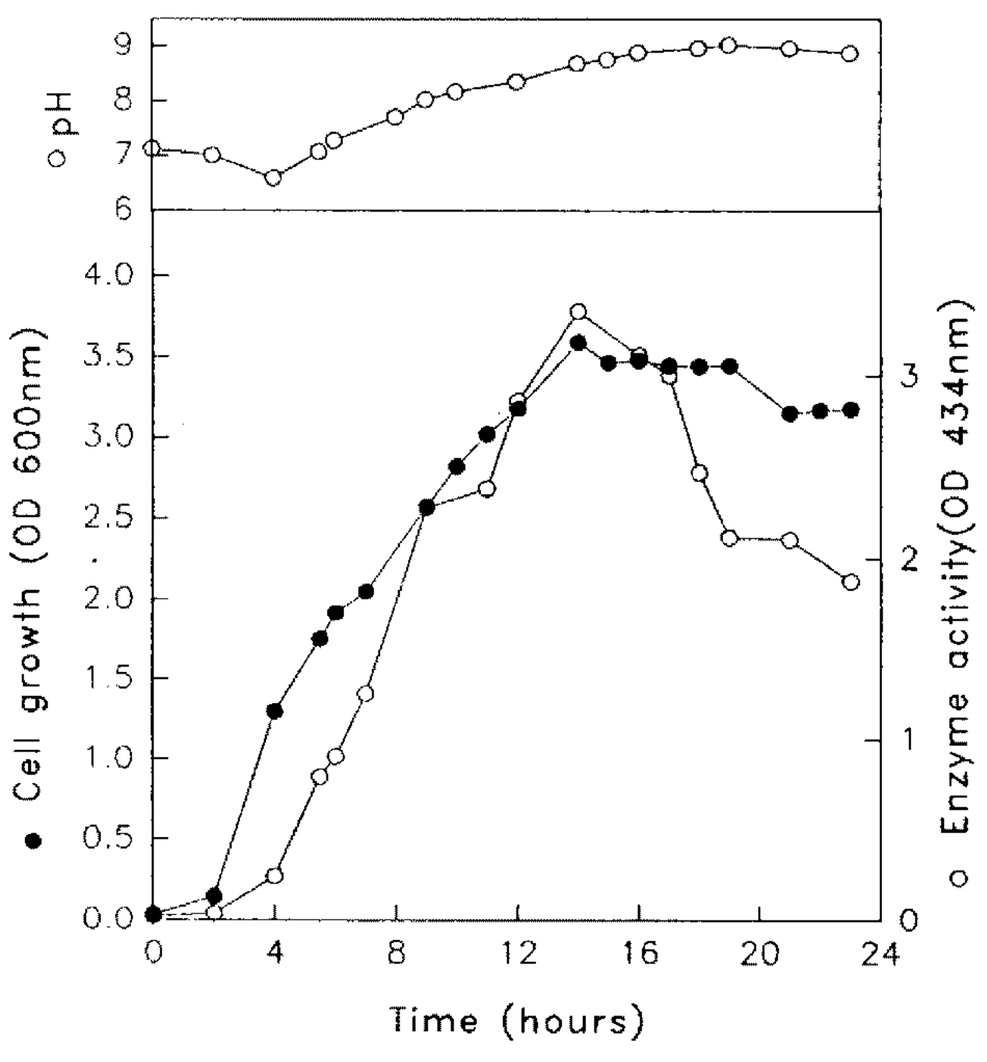

Fig. 2. Time course of *E. coli* CK1092 cell growth and 2,3-DHBP dioxygenase activity.

PAGE를 실행하여 효소의 단일 band를 확인하였다. 최종 수율은 3.1%이였으며, 정제배수는 4.9이였다(Table 1).

분자량 측정

2,3-DHBP dioxygenase는 native-PAGE를 통해 active staining을 실시한 결과 Fig. 4(A)에서와 같이 노란색의 band를 확인할 수 있었으며, 분자량은 약 270 kDa인 것으로 나타났다(Fig. 4(B)). 또한 SDS-PAGE를 통해 분자량을 측정한 결과 약 34 kDa으로 8개의 동일한 subuint으로 구성된 octamer인 것으로 추정되었다(Fig. 5). *Pseudomonas* sp. DJ-12를 비롯하여 여러 보고된 2,3-DHBP dioxygenase의 분자량과 유사하였다(7-9).

효소의 특성

Km 값의 결정 Lineweaver-Burk plot에 의하여 2,3-dihydroxybiphenyl에 대한 Km 값을 계산해 본 결과 18 μM로 나타났다(Fig. 6). 보고된 2,3-DHBP dioxygenase의 Km 값으로는 *Pseudomonas psedoalcaligenes* KF 707의 경우 87 μM이였으며, *Pseudomonas* sp. LB400은 7± 1 μM, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 61 μM이였다. Extradiol dioxygenase들 중에는 기질농도가 높으면, 효소활성이 감소하는 substrate inhibition이 보고된 바 있다(8, 22, 23). 본 효소의 경우에도 Fig. 6에서와 같이 30 μM까지는 활성이 증가하다 30 μM 이상의 기질농도에 의해서는 효소활성이 점차 감소되었다.

pH 및 온도에 대한 영향 pH에 대한 효소활성정도를 조사한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서 효소활성이 최대를 보였으며, pH 7.0～10.0 범위에서 비교적 안정하였다. 온도에 대한 효소활성은 25℃부터 60℃까지 증가하다 60℃ 이상에서는 급격히 감소하였다. 온도에 대한 효소안정성은 30℃ 이후 서서히 감소하나 60℃까지는 비교적 안정하였다(Fig. 8). *Pseudomonas* sp. DJ-12의 경우 10～70℃에서 높은 효소활성을 보인 반면, 온도에 대한 안정성에 있어서는 50℃ 이상의 온도에서 실활되는 것으로 보고되었다(9). 따라서 *Pseudomonas* sp. DJ-12보다는 *Pseudomonas* sp. P20의 2,3-DHBP dioxygenase가 더 열에 안정한 것으로 나타났다.

금속이온의 영향 금속이온을 0.1 mM과 1 mM로 처리하여 효소활성을 조사한 결과 비교적 모든 금속이온에 의해 활성이 감소하였으며, 특히 Cu^{2+}에 의해서

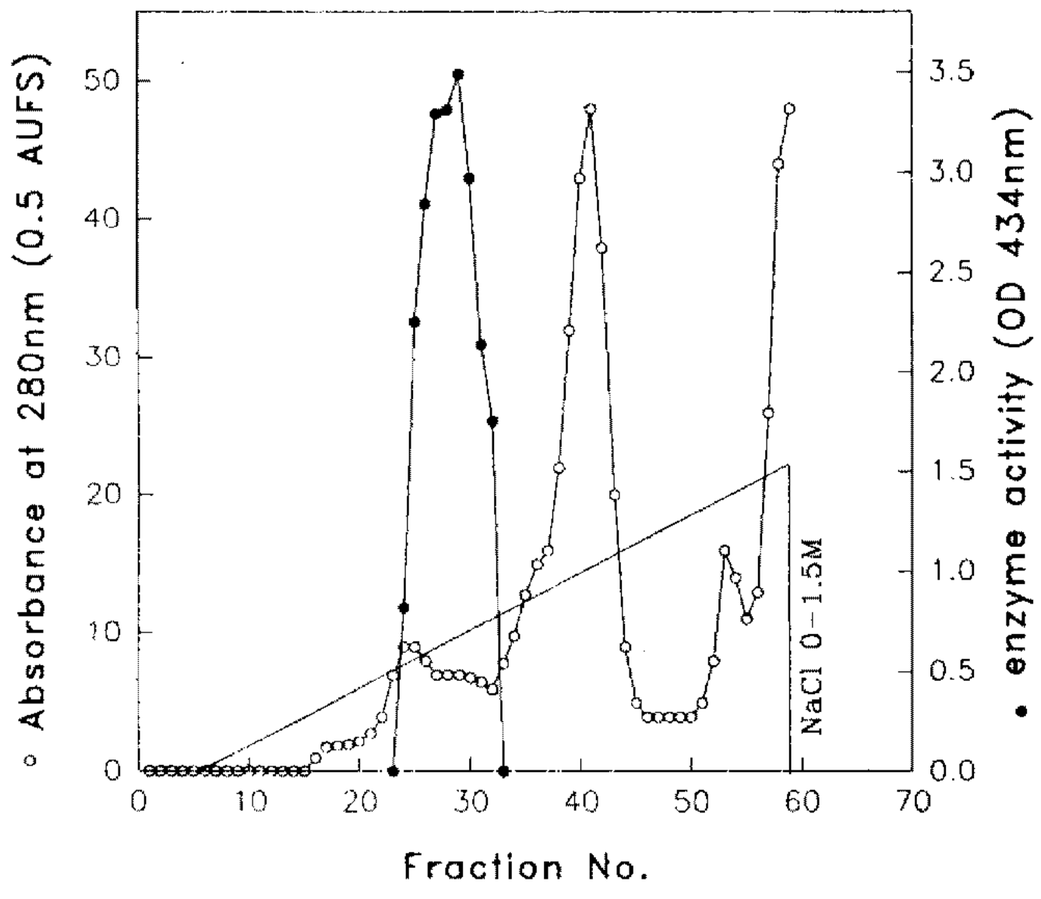

Fig. 3. DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange chromatogram of 2,3-DHBP dioxygenase from *E. coli* CK1092.

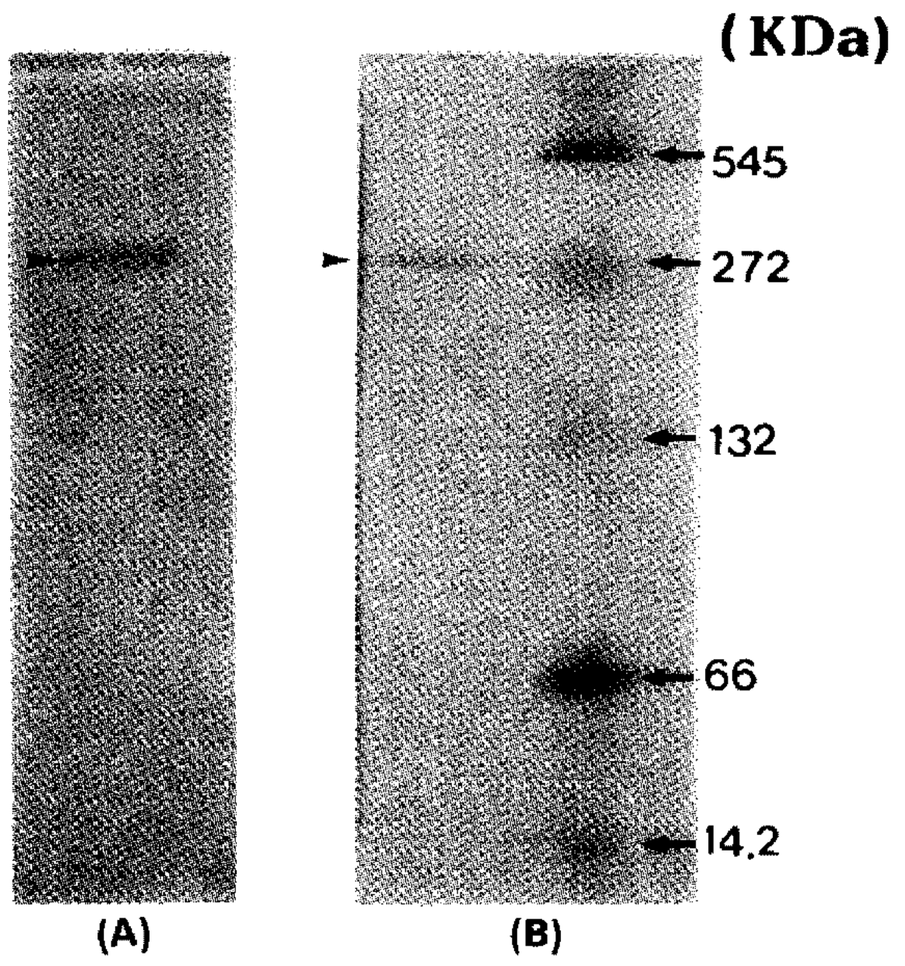

Fig. 4. Native-PAGE of 2,3-DHBP dioxygenase.
(A) active staining (B) Coomassie brilliant blue R-250 staining. Molecular weight markers; 1. α-lactalbumin (14,200), 2. bovine serum albumine (66,000 & 132,000), 3. urease (272,000 & 545,000).

Table 1. Purification of 2,3-DHBP dioxygenase from *E. coli* CK1092.

Purification step	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity	Recovery yield (%)	Purification Fold
Crude extract	109,006	825	132	100	1
Acetone precipitation	78,737	415	190	72	1.4
DEAE-sephadex A-25	55,972	116	483	51	3.7
Preparative electrophoresis	3,352	5.2	645	3.1	4.9

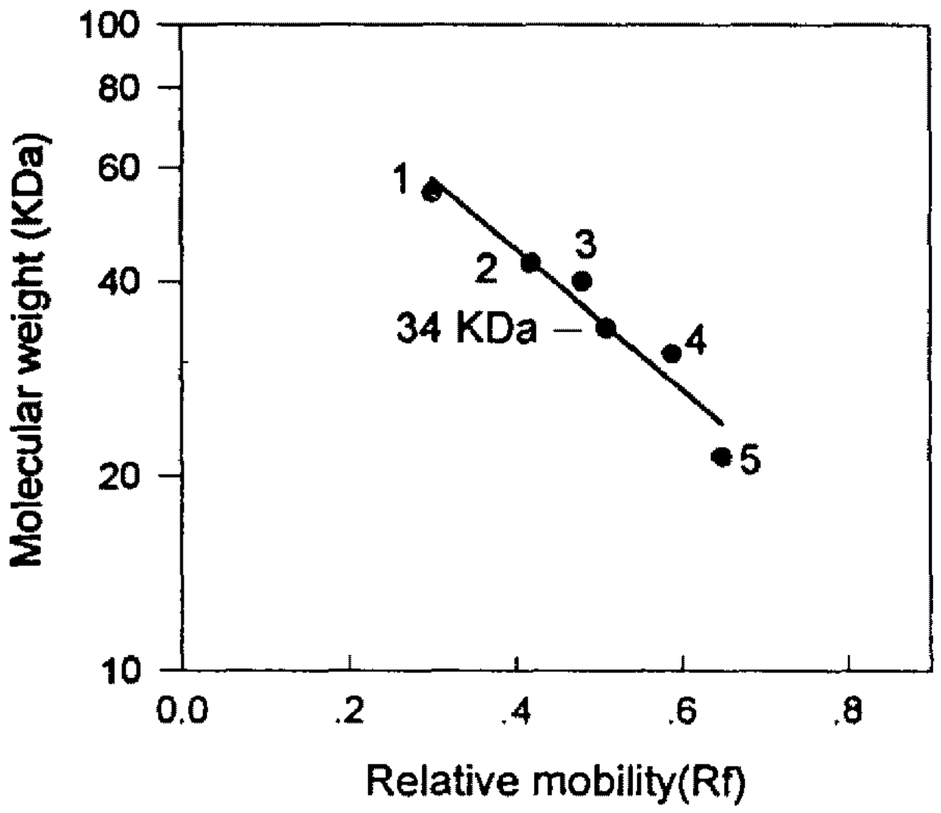

Fig. 5. Molecular weight determination of 2,3-DHBP dioxygenase by SDS-PAGE.
Molecular weight markers; 1. glutamate dehydrogenase (55,000), 2. ovalbumine (42,700), 3. aldolase (40,000), 4. carbonic anhydrase (31,000), 5. soybean trypsin inhibitor (21,500)

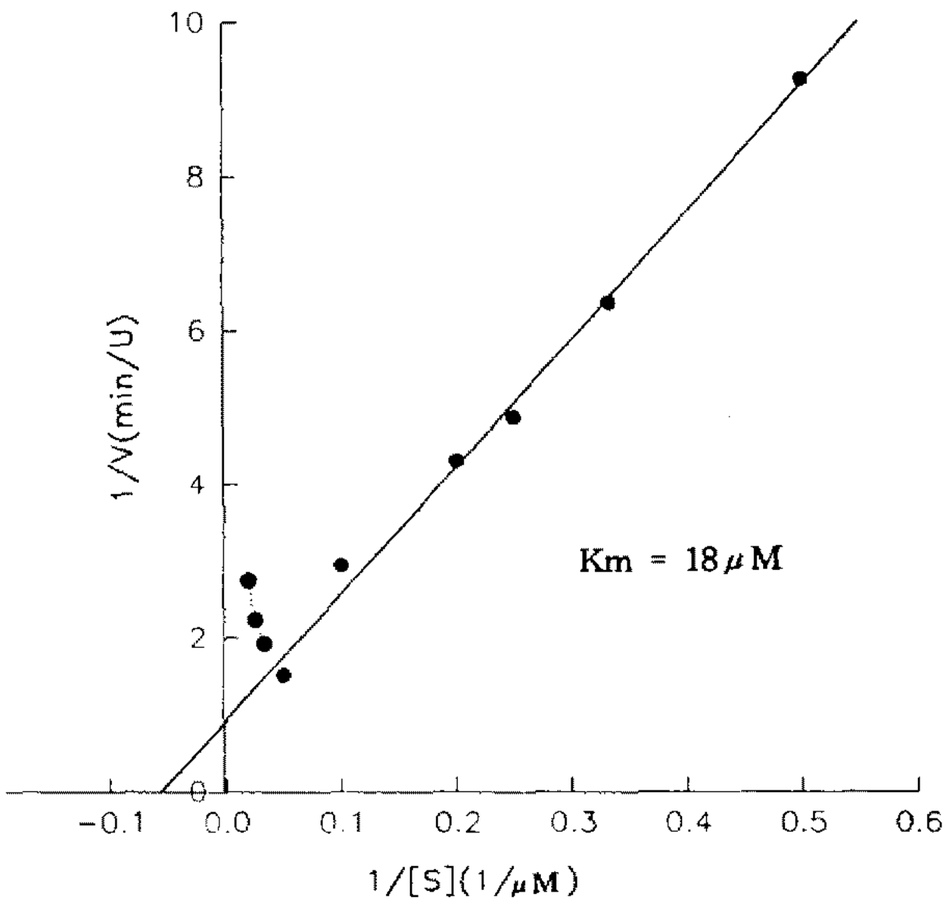

Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of 2,3-DHBP dioxygenase.

효소활성이 완전히 억제되었다. Fe^{2+}와 Fe^{3+}에 의해서도 효소활성이 억제되었으며, Fe^{3+}보다 Fe^{2+}에 의해 활성이 크게 억제되었다(Table 2). 일반적으로 보고된 Extradiol dioxygenase는 Fe^{2+}에 의해 활성이 증가하며 Fe^{3+}나 Cu^{2+}에 의해서는 활성이 감소된다고 알려져 왔으나, 본 효소에서는 Fe^{2+}에 의해 오히려 활성이 감소되는 다른 특성을 보였다.

화학변형시약의 영향 여러 가지의 화학변형시약을 0.1 mM과 1 mM로 처리하여 효소활성의 저해정도를 알아보았다. Table 3에서와 같이 본 효소인 2,3-DHBP dioxygenase는 tyrosine 변형시약인 iodine과 tryptophan 변형시약인 N-bromosuccinimide, histidine 변형

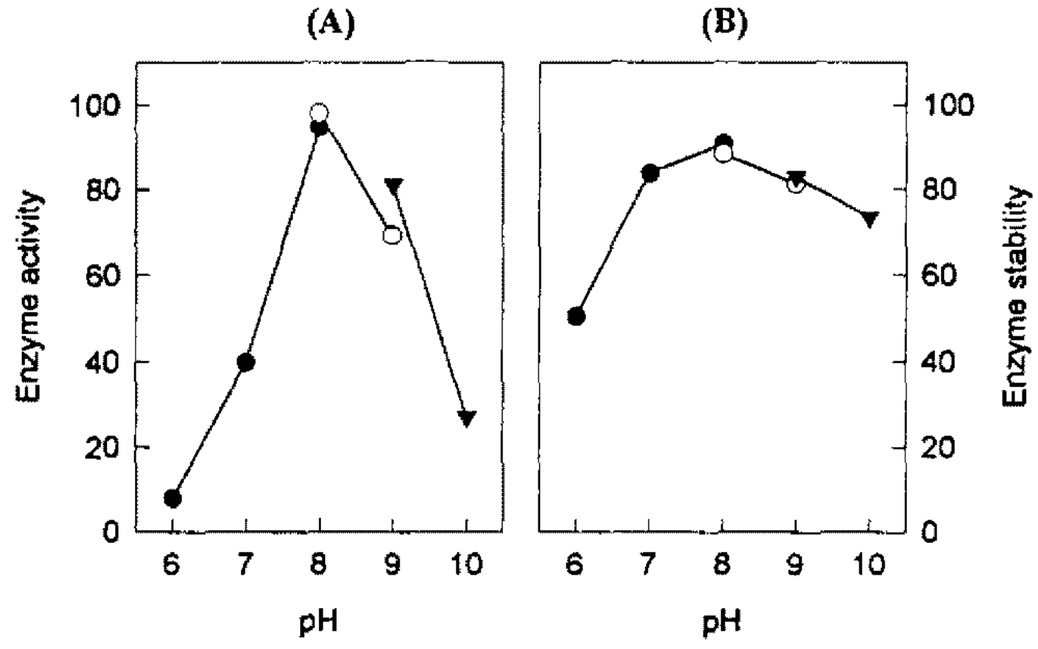

Fig. 7. Effect of pH on activity (A) and stability (B) of the 2,3-DHBP dioxygenase.
Following buffer systems were used −50 mM Potassium phosphate (pH 6~8, ●−●), 50 mM Tris-HCl (pH 8~9, ○−○), and 50 mM Glycine-NaOH (pH 9~10, ▼−▼) buffer.

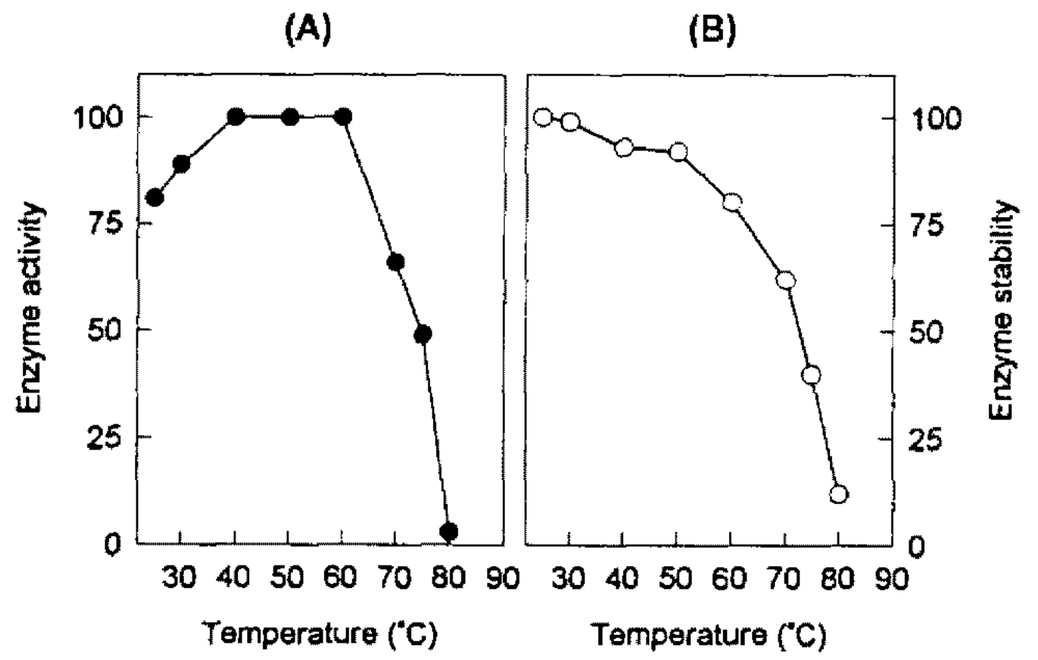

Fig. 8. Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of the 2,3-DHBP dioxygenase.

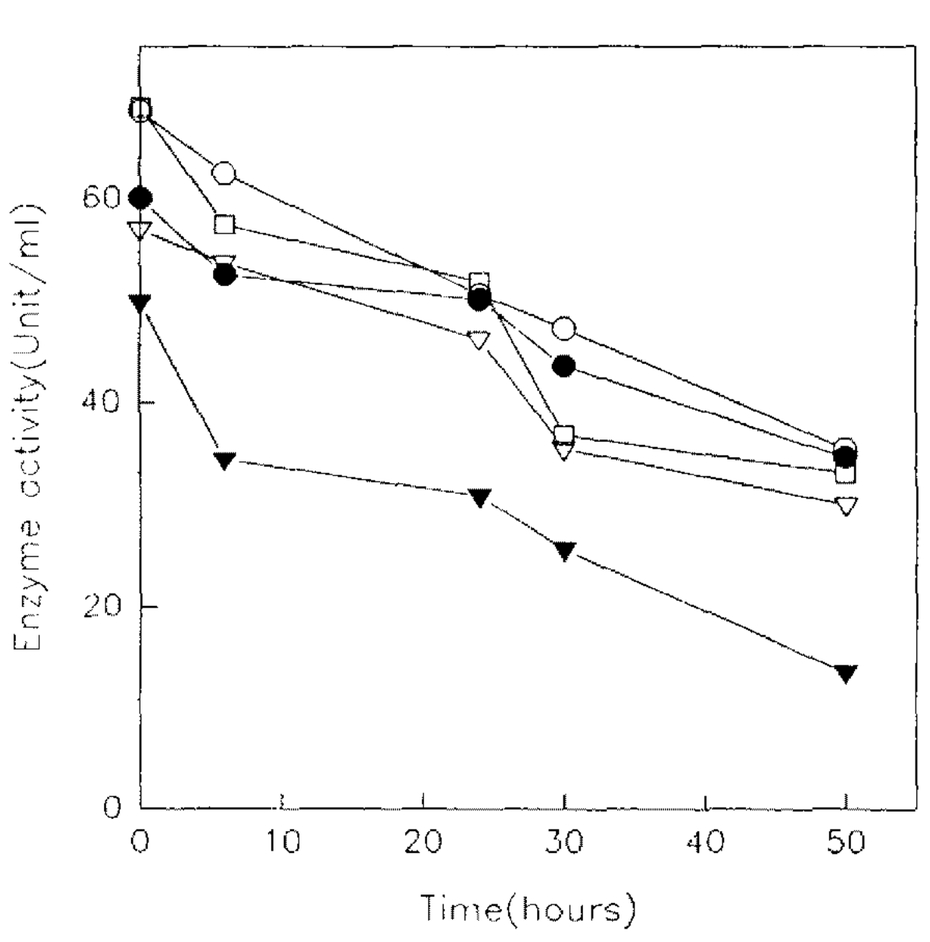

Fig. 9. Effect of various organic solvents on stability of the 2,3-DHBP dioxygenase.
○: none, ●: ethanol, ▽: acetone, ▼: glycerol, □: isopropyl alcohol

Table 2. Effect of metal ions on the 2,3-DHBP dioxygenase activity.

Metal ions*	Relative activity (%)	
	0.1 mM	1 mM
None	100	100
Co^{2+}	74	43
Mn^{2+}	68	88
Ni^{2+}	89	0
Zn^{2+}	95	81
Mg^{2+}	94	109
Fe^{2+}	30	0
Cu^{2+}	0	0
Fe^{3+}	68	38

*Metal ions were used as chloride salts except for Fe^{2+} (sulfate) and Cu^{2+} (sulfate).

Table 3. Effect of group-specific reagents on the 2,3-DHBP dioxygenase activity.

Reagents	Relative activity (%)	
	0.1 mM	1 mM
None	100	100
Iodine	0	0
N-Bromosuccinimide	0	0
p-Diazobenzene sulfonic acid	0	0
β-Naphthoquinone-4-sulfonic acid	80	18
2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid	88	56
Glyoxal	102	97
Monoiodoacetic acid	105	65
N-Ethlymaleimide	88	89

Modification reactions were carried out at 30℃ in 10 mM Tris-HCl (pH 8). Modification reactions were initiated by adding reagents to the enzyme solution. Aliquots of reaction mixture were taken after 30 min incubation and subjected to activity assay.

시약인 *p*-diazobenzene sulfonic acid에 의해 완전히 불활성화되었다. 따라서, tyrosine, tryptophan, histidine 잔기가 효소활성 중심 구조 형성에 관여할 것으로 추정된다.

유기용매에 대한 효소안정성 Extradiol dioxygenase들은 일반적으로 낮은 농도의 유기용매에 의해 안정화된다고 보고되었다(20). 따라서, 10%의 여러 가지 유기용매에 의한 효소의 안정성을 조사한 결과, 2,3-DHBP dioxygenase는 유기용매에 의해 안정화되지 않았으며, 오히려 glycerol에 의해서는 활성이 크게 감소하였다(Fig. 9). 최근에 밝혀진 *Rhodococcus globerulus* P6의 2,3-DHBP dioxygenase II 또한 유기용매에 의해 안정화되지 않는다고 보고되었다(11).

H_2O_2와 chelators에 대한 영향 산화제인 H_2O_2와 여러가지 킬레이트들을 농도별로 처리하여 효소활성에 미치는 영향을 알아 본 결과 Table 4에서와 같이 1 μM의 H_2O_2에 의해서 45% 정도 활성이 감소되었으며, 50 μM에 의해서는 완전히 불활성화되었다. 이제까지 보고된 대부분의 extradiol-type dioxygenase들은 cofacter로 Fe^{2+}를 가지고 있어 Fe^{2+}에 의해 활성이 증가한다고 보고되었다(11). 따라서, Fe^{2+}를 제거시키는 킬레이트를 처리할 경우 활성이 감소하리라 추정되었으나, 본 효소에서는 Fe^{2+}을 킬레이트하는 *o*-phenanthroline에 의해서는 활성이 억제되지 않았고, Fe^{3+}을 선택적으로 킬레이트하는 tiron에는 10 mM의 농도에서 85%로 활성이 감소하였다. 또한 5 mM EDTA에 의해 58%, 10 mM에 의해서는 16%로 활성이 감소하였다. 따라서, 금속이온에 대한 효소활성를 알아본 결과(Table 2)와 연관하여 볼 때, 본 효소는 Fe^{2+}이나 Fe^{3+}에 의해 활성이 증가되지 않고, 오히려 활성을 억제시킴을 알 수 있었다.

Table 4. Effects of oxidant and chelators on the 2,3-DHBP dioxygenase activity.

Compunds	Concentration	Relative activity (%)
None		100
Oxidant		
H_2O_2	1 μM	45
	50 μM	0
Chelators		
EDTA	5 mM	58
	10 mM	16
Tiron	5 mM	106
	10 mM	85
o-Phenanthrolin	5 mM	121
	10 mM	94

기질 특이성

여러 다른 기질에 대한 효소활성을 알아본 결과 Table 5에서와 같이 2,3-DHBP dioxygenase는 2,3-DHBP에만 특이적으로 반응하였다. Catechol이나 3-methylcatechol에는 각각 1.2%와 2.2%로 아주 미미한 반응을 보였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 경우에는 2,3-DHBP뿐만 아니라 catechol(45%), 3-methylcatechol(7%)도 분해한다고 보고하였다(9). 이것은 DJ-12 균주가 4-CB를 protocatechuate까지 완전분해하는 균주이고, P20이 4-CB에서 4-CBA까지만 분해하는 균주이기 때문에 DJ-12균주의 2,3-DHBP dioxygenase가 본 효소보다 기질작용범위가 넓은 것으로 생각된다. 또한, Hirose등(1994)은 여러 extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenase(EDO)들의 특성을 비교하였는데 *Pseudomonas* sp. KKS102와 *Pseudomonas paucimobilis* Q1의 EDO는

Table 5. Substrate specificity of the 2.3-DHBP dioxygenase.

Substrate*	Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
2,3-Dihydroxybiphenyl	289.94	100.00
Catechol	3.45	1.18
3-Methylcatechol	6.38	2.20
4-Methylcatechol	ND[a]	ND
4-Chlorocatechol	ND	ND

*The substrate specificity of 2,3-DHBP dioxygenase was determined by adding various substrate to the standard assay condition.
ND[a]: No detectable activity.

비교적 넓은 범위의 기질을 분해할 수 있었으며, 이에 반해 *Pseudomonas* sp. KF707의 EDO와 *Pseudomonas* sp. LB400는 2,3-DHBP에 높은 기질특이성을 보였다고 보고하였다(21). 따라서, 본 효소는 기질특이성이나 기질에 대한 저해, 분자량등을 비교해 볼 때 *Pseudomonas* sp. LB400이나 *Pseudomonas* sp. KF707과 유사하며, Fe^{2+} 이온에 의해 효소활성이 증가되지 않는다는 점이 상이하다.

요 약

4-CB 분해균주인 *Pseudomonas* sp. P20으로부터 *pcbC* 유전자를 클로닝하여 얻은 *E. coli* CK1092로부터 2,3-DHBP dioxygenase을 분리, 정제하여 효소적 특성을 조사하였다. 효소의 정제는 acetone 침전, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, preparative electrophoresis 방법으로 정제하였다. 2,3-DHBP dioxygenase의 분자량은 약 270 kDa으로 추정되며, SDS-PAGE에 의한 분자량은 34 kDa이였다. 따라서, 동일한 subunit 8개가 존재하는 octamer로 추정된다. 이 효소는 2,3-DHBP에 대해 높은 기질특이성을 보였으며, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol에 대해서는 활성을 보이지 않았다. 2,3-DHBP에 대한 Km 값은 18 μM이였으며, 30 μM 이상의 기질농도에서 활성이 감소하였다. 효소활성의 최적 pH는 8.0이였으며, pH 7.0~10.0 범위에서는 안정하였고, 최적 활성 온도는 40~60℃이며, 60℃까지는 비교적 안정하였다. 또한, 이 효소는 Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} 이온들에 의하여 효소활성이 저해되었고, H_2O_2와 EDTA에 의해서도 활성이 저해되었으며, 10%의 유기용매에 의해서 안정화되지 않았다. 효소활성부위를 알아보기 위해 화학변형제를 처리해 본 결과 tyrosine, tryptophan과 histidine이 효소활성에 관여할 것으로 추정된다.

감사의 말

본 연구는 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-95-4432)의 지원에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chaudhry, G.R. and S. Chapalamadugu. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**(1): 59-79.
2. Masse, R.F., Messier, L., Peloquin, C. Ayotte, and M. Sylvestre. 1984. Microbiol biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(5): 947-951.
3. Furukawa, K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation on *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**(2): 392-398.
4. Mondello, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**(3): 1725-1732.
5. Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse. 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4′-chlorophenyl) hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1375-1385.
6. Harayama, S. and M. Rekik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are clssified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* **264**(26): 15328-15333.
7. Furukawa, K. and N. Arimura. 1987. Purification and properties of 2.3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. *J. Bacteriol.* **169**(2): 924-927.
9. Eltis, L.D., B. Hofmann, H.J. Hecht, H. Lunsdorf, and K.N. Timmis. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**(4): 2727-2732.
9. Sung, T.K., J.H. Nam, and C.K. Kim. 1993. Enzymatic properties of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase purified from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol.* **21**(2): 150-156.
10. Asturias, J.A. and K.N. Timmis. 1993. Three differnt 2,3-Dihydroxybipheny-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* **175**(15): 4631-4640.
11. Asturias, J.A., L.D. Eltis, M. Prucha, and K.N. Timmis. 1994. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase found in *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Biol. Chem.* **269**(10): 7807-7815.
12. Maeda, M., S.Y. Chung, E. Song, and T. Kudo. 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybipheny-1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(2): 549-555.

13. Kim, J.W., C.K. Kim, Y.C. Kim, J.H. Yeoum and J.G. Lee. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**(2): 122-128.
14. Yun, D.J., J.J. Han, and C.K. Kim. 1992. Divergence of the *cbp* gene in 4-chlorobiphenyl catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 53-59.
15. Han, J.J., T.K. Sung, and C.K. Kim. 1993. Cloning and expression of *pcbAB* genes from *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **31**(2): 129-135.
16. Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam, Y.C. Kim, and J.K. Lee. 1994. Cloning and expression of *pcbCD* genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol.* **32**(1): 40-46.
17. Nam, J.H. and C.K. Kim. 1994. Cloning of *pcb* genes in *Pseudomonas* sp. P20 specifying degradation of 4-chlorobiphenyl. *Kor. J. Microbiol.* **22**(4): 353-359.
18. Nam, J.H., H.M. OH, and C.K. Kim. 1995. Cloning and expression of *pcbC* and *pcbD* genes responsible for 2,3-dihydroxybiphenyl degradation from *Pseudomonas* sp. P20. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 68-73.
19. Nam, J.H., C.K. Kim, J.K. Lee, and K.J. Lee. 1994. Homology analysis among the biphenyl degrading genes by southern hybridization. *Kor. J. Microbiol.* **22** (1): 37-44.
20. Nozaki, M., H. Kagamiyama, and O. Hayaishi. 1963. Metapyrocatechase. *Biochem. Z.* **338**: 582-590.
21. Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayashi, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 273-278.
22. Klecka, G.M. and D.T. Gibson. 1981. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(5): 1159-1165.
23. Hirose, J., A. Suyama, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1994. Construction of hybrid biphenyl (*bph*) and toluene (*tod*) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases. *Gene* **138**: 27-33.

(Received 18 December 1995)