

재조합균주 *E. coli* CNU312가 생산하는 Catechol 2,3-Dioxygenase의 정제 및 특성

임재윤 · 최경호 * · 최병돈¹

충북대학교 미생물학과, ¹단국대학교 미생물학과

Toluene, phenyl 등의 분해균주인 *Burkholderia cepacia* G4로부터 *tomB* 유전자를 클로닝하여 얻은 재조합 균주 *E. coli* CNU312로부터 catechol 2,3-dioxygenase를 정제하여 효소학적 특성을 조사하였다. Catechol 2,3-dioxygenase는 native 분자량이 약 140.4 kDa이었으며 4개의 동일한 35 kDa subunit로 구성된 homotetramer로 생각된다. Catechol의 K_m 값과 V_{max} 값은 372.6 μ M과 39.27 U/mg이었으며, 1.56 mM 이상의 기질 농도에서는 활성이 감소되었다. 효소 활성의 최적 pH는 8.0이었으며, pH 7.0-8.0 범위에서 안정하였다. 최적 활성온도는 40°C였으며, 60°C 이상에서 완전히 활성을 상실하였다. 또한 Fe^{2+} , Fe^{3+} 를 비롯한 대부분의 금속 이온에 의해 활성이 감소되었으며, Mg^{2+} , K^+ 에는 영향을 받지 않았다. 효소 활성부위를 알아보기 위해 화학변형제를 처리한 결과, tryptophan과 histidine이 효소 활성부위에 존재하는 것으로 추정된다. 그리고 10%의 유기용매에 안정성을 보이지 않았으며, H_2O_2 , EDTA, o-phenanthroline에도 활성이 감소되었다. 또한 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, 그리고 ascorbic acid와 같은 환원제에 대해서도 안정성을 보이지 않았다. 이 효소는 catechol에 대해 높은 기질 특이성을 보였으며, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 그리고 4-chlorocatechol에 대해 약간의 활성을 보였다. 그러나 2,3-dihydroxybiphenyl에 대해서는 거의 활성을 보이지 않았다.

Key words □ *Burkholderia cepacia* G4, catechol 2,3-dioxygenase, *tomB* gene

서 론

산업화로 인한 화학 공업의 발달은 많은 분야에서 인류의 복지향상과 생활수준의 향상을 이루었다. 그러나 많은 종류의 난분해성 물질을 자연계에 방출시킴으로서 심각한 환경오염을 야기시켰다. 특히, 농약, 윤활제 등 각종 유기화학 공업에서 주된 용매로 쓰이고 있는 polychlorinated biphenyl (PCBs)은 심각한 환경오염의 주범으로 등장하게 되었다(16). 이와 같은 특성은 PCBs 자체가 구조적으로 매우 안정하며, 산이나 염기, 그리고 열에 대한 내성이 강하여 자연계에서 잘 분해되지 않고, 자연계와 생명체에 축적되어 악영향을 끼치고 있기 때문인 것으로 보고되고 있다(10). 미생물에 의한 PCBs의 분해정도는 벤젠링에 치환되어 있는 염소의 수와 위치 등에 따라 다양하며, 치환된 염소의 수가 많을수록 분해가 어려운 것으로 알려져 있다(7). PCBs는 공통적으로 aromatic compounds 구조를 지니고 있으며, 이것이 미생물에 의해 분해될 때 중간 매개물질인 catechol로 전환된다(11). Catechol은 dioxygenase에 의해 분해되는데, dioxygenase는 aromatic ring의 분해 위치에 따라 intradiol과 extradiol dioxygenase로 구분된다(4). 이 두 type의 효소들은 서로 상이한 특징을 지니고 있는데, intradiol type이 prosthetic group으로 ferric

ion(Fe^{3+})을 가지고 있고 하나 또는 두 종류의 subunit로 구성되어 있는 반면, extradiol type은 prosthetic group으로 ferrous ion(Fe^{2+})을 가지며 한 종류의 subunit로 구성되어 있다는 점이 가장 큰 차이이다(4). 중간 대사물질인 catechol의 분해과정에 intradiol type enzyme인 catechol 1,2-dioxygenase가 관여할 경우, 인접하여 붙어 있는 두 개의 수산기 사이에 위치한 1,2-position의 C-C 결합에 작용하여 ring을 개환시키며(ortho-cleavage pathway) cis, cis-muconic acid를 생성한다. 반면 extradiol type enzyme인 catechol 2,3-dioxygenase는 수산기와 비수산기 사이에 위치한 2,3-position의 C-C 결합에 작용하여 ring을 개환시키며(meta-cleavage pathway), 노란색을 띠는 2-hydroxymuconic semialdehyde(MCP)를 생성한다(4). 한편, *Pseudomonas* sp. S-47(11), *Pseudomonas putida* GJ31(6), *Terrabacter* sp. DPO360(14)으로 부터 각각 catechol 2,3-dioxygenase가 분리, 정제되었으며, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(3), *Pseudomonas* sp. DJ-12(15), *Pseudomonas* sp. LB400(2), *Rhodococcus globerulus* P6(1), 그리고 *E. coli* CK1092(13)로부터 각각 2,3-DHBP dioxygenase가 분리, 정제되어 효소학적 특성이 보고되었다. Oh 등(1997)이 *Burkholderia cepacia* G4에서 순수분리한 *tomB* gene에서 생성되는 catechol 2,3-dioxygenase는 extradiol type enzyme으로, 이 균의 *tomA* gene에서 만들어진 monooxygenase에 의해 형성된 catechol을 개환시켜준다(12). 이상의 많은 종류의 보고에도 불구하고, Oh등이 cloning한 toluene, phenyl 등을 이용하는 *Burkholderia cepacia* G4균주의 catechol 2,3-dioxygenase의 특성

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 019-499-0725
E-mail: yonadan@hanmail.net

에 대해서는 자세히 보고된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 catechol 2,3-dioxygenase의 발현 효율을 높이며, catechol의 분해 산물이 다음 단계로 분해되지 않고 축적되도록 하기 위하여 *Burkholderia cepacia* G4의 catechol 2,3-dioxygenase를 암호화하는 *tomB* 유전자가 cloning된 재조합 균주 *E. coli* CNU312균주를 사용하여 catechol 2,3-dioxygenase를 정제하고 효소학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 *E. coli* CNU312는 *Burkholderia cepacia* G4로부터 클로닝된 균주로서 *tomB* 유전자를 암호화하는 *SacI*-*HindIII* DNA fragment(2.2 kb)를 가지고 있는 재조합균주이다 (12).

Catechol 2,3-dioxygenase의 생산

재조합 균주 *E. coli* CNU312는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone 10 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.0)에 sucrose 2%를 첨가한 배지를 사용하여 37°C에서 14시간 배양하였다. 균주의 대량배양은 5 l jar fermentor를 이용하여 3 l 배양하였으며, 10% 소포제(Silicon oil) 5 ml, 통기량 3 vvm, 교반속도 200xg의 조건으로 37°C에서 통기 교반하며 배양하였다.

Catechol 2,3-dioxygenase의 정제

세포 배양액을 4°C, 5,000xg으로 15분간 원심분리하여 균체를 모은 후, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 3회 세척하고 동일 buffer로 현탁하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기(Fisher M-300, Pittsburg, USA)로 파쇄하여 4°C에서 12,000xg으로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후, -20°C로 냉각한 cold acetone을 최종 농도 30-60%가 되도록 첨가한 후 4°C, 12,000xg으로 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전시킨 단백질을 buffer로 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 변성된 단백질을 제거하였다. Acetone 침전으로 얻은 시료는 buffer로 평형화시킨 Sephadex G-75(Sigma Chemical Co., USA) column(2.5x50 cm)에 gel filtration하였다. buffer로 충분히 씻어낸 후 tube당 5 ml씩 분획하였다. 단백질의 농도는 280 nm의 흡광도로 측정하였으며 효소 활성을 갖는 분획을 모아 ultrafiltration(Amicon YM 10)으로 농축하였다. 이 모든 과정은 Econo system(Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 위 과정으로 얻어진 효소를 가지고 polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. gel은 두께 1.5 mm로 하여 길이 8 cm, 8% separating gel(pH 8.8)과 1.5 cm 길이의 5% stacking gel(pH 6.8)을 만들어 사용하였다. Running buffer로 Tris-glycine buffer(100 mM, pH 8.8)를 사용하여 4°C에서 45V로 24시간동안 전기영동을 실시하였다(SE 600 Series standard Dual cooled units, Hoefer, USA). 전기영동이 끝난 후 기질을 분무하여 노란색을 띠는 band 위치와 일치하는 나머지 band를 자른 후 gel slice들을 모았다. 이와 같이 얻은 gel slice를 가지고 Electro Eluter(Model 422, Bio-Rad, USA)를 사용하였는데 gel slice를 유리관

에 채운 후 protein elution buffer(25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 5% glycerol)를 사용하여 4°C에서 유리관 당 8 mA로 5 시간 동안 용출하였다.

활성 측정 및 단백질 정량

Catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 100 μ M의 catechol을 25°C에서 반응시킨 후 생성되는 생성물(2-hydroxymuconic semialdehyde)을 UV-visible spectrophotometer(Ultrospec 1000E, Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 375 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질인 catechol은 ethanol에 녹여 10 mM catechol stock을 만들어 사용하였다. catechol 2,3-dioxygenase의 1 unit는 1분당 1 μ mol의 2-hydroxymuconic semialdehyde를 생성하는 효소의 양으로 정의하였으며, 2-hydroxymuconic semialdehyde의 몰 흡광계수 값은 33,000으로 하여 계산하였다(9). 단백질 양의 측정은 표준 단백질로 bovine serum albumin 정량 Kit(No. 95656, Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였고 Lowry 방법으로 수행하였다(13).

분자량 측정

효소의 분자량 측정은 native-PAGE와 SDS-PAGE를 실시하여 측정하였다. Native-PAGE는 8% separating gel(두께 1.5 mm)과 5% stacking gel을 사용하였으며, 4°C에서 45V로 일정하게 하여 약 24시간 정도 전기영동하였다(SE250 Mighty small II system, Hoefer, USA). Active staining은 10 mM의 catechol을 분무하여 노란색으로 나타나는 band를 확인하였으며, staining solution(coomassie brilliant blue R-250 1.0g, methanol 450 ml, glacial acetic acid 100 ml, H₂O 450 ml)에서 1시간 동안 염색한 후 destaining solution I(methanol 500 ml, glacial acetic acid 100 ml, H₂O 400 ml)으로 2시간 동안 탈색한 다음 destaining solution II(methanol 50 ml, glacial acetic acid 70 ml, H₂O 880 ml)로 12시간 동안 2차 탈색하여 단백질 band를 확인하였다. 단백질의 분자량은 표준 단백질로 thyroglobulin(669 kDa), ferritin(440 kDa), catalase(232 kDa), aldolase(158 kDa), albumin bovine(66 kDa), albumin egg(45 kDa) (Pharmacia Biotech., Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 측정하였다. SDS-PAGE는 12% separating gel(두께 1.5 mm)과 5% stacking gel을 사용하여 4°C에서 200 V로 일정하게 하여 약 30분 동안 전기영동한 후 native-PAGE와 같은 조건으로 염색과 탈색을 하였다. 표준 단백질로는 phosphorylase B(97.4), bovine serum albumin(66.2), glutamate dehydrogenase(55), ovalbumin(42.7), aldolase(40), carbonic anhydrase(31), soybean trypsin inhibitor(21.5), lysozyme(14.4) (Mid-range protein MW markers, Promega Co., USA)를 이용하여 측정하였다.

pH 및 온도의 영향

Potassium phosphate buffer(50 mM, pH 6~8), Tris-HCl buffer(50 mM, pH 8~9), glycine-NaOH buffer(50 mM, pH 9~10)를 사용하여 효소 반응액을 각각의 pH로 맞추어 준 후, pH에 대한 영향을 조사하였다. pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의

pH에서 4°C에서 48시간 동안 방치한 후, 잔존하는 효소활성을 조사하였다. 온도에 대한 영향은 10~80°C의 구간에서 효소 반응을 수행하여 최적 반응 온도를 조사하였고, 온도에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 잔존하는 효소 활성을 조사하였다.

금속이온의 영향

효소 활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온들을 효소에 최종농도 0.05 mM, 0.1 mM 그리고 0.5 mM로 첨가한 후 효소활성을 측정하였다. Buffer로는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

화학 변형제의 영향

효소의 활성 부위에 존재하는 아미노산 잔기를 알아보기 위해 아미노산 수신 시약인 iodine, N-bromosuccinimide(NBS), β -naph-thoquinone-4-sulfonic acid(NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), glyoxal, N-ethylmaleimide, *p*-diazobenzene sulfonic acid, *p*-chloromercuri benzoic acid를 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. 각각의 반응시약을 효소에 최종농도 0.1 mM과 1 mM로 첨가하여 25°C에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

유기용매의 영향

효소 활성의 안정화에 영향을 줄 수 있는 다양한 유기용매에 의한 catechol 2,3-dioxygenase의 활성 정도를 알아보았다. 유기용매로는 ethanol, isopropyl alcohol, acetone, ethyl acetate, acetic acid를 효소 반응액에 10%가 되도록 첨가하고 150시간까지 잔존하는 효소 활성을 측정하였다.

Chelators의 영향

효소의 활성에 영향을 줄 수 있는 킬레이트로 EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), tiron(4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt), *o*-phenanthroline을 사용하여 0.1 mM과 1 mM의 농도로 처리한 후 효소 활성의 억제정도를 측정하였다.

산화제와 환원제의 영향

산화제와 환원제에 의한 효소활성의 영향을 알아보기 위해 산화제로 H₂O₂를 사용하였고, 환원제로는 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, ascorbic acid를 각각의 농도별로 처리하여 효소활성

억제 정도를 측정하였다.

기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 여러 가지 기질에 대한 효소 활성을 조사하였다. 기질로는 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol 그리고 2,3-dihydroxybiphenyl을 효소 반응액에 100 μ M이 되도록 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 각 기질의 반응산물에 대한 최적 흡광도와 몰 흡광계수는 다음과 같다; catechol(λ_{max} =375 nm, ϵ =33,000 cm⁻¹M⁻¹), 3-methylcatechol (λ_{max} =388 nm, ϵ =13,400 cm⁻¹M⁻¹), 4-methylcatechol(λ_{max} =382 nm, ϵ =28,100 cm⁻¹M⁻¹), 4-chlorocatechol (λ_{max} =379 nm, ϵ =39,600 cm⁻¹M⁻¹), 2,3-dihydroxybiphenyl (λ_{max} =434 nm, ϵ =22,000 cm⁻¹M⁻¹) (9).

결과 및 고찰

Catechol 2,3-dioxygenase의 정제

Jar fermentor를 이용하여 *E. coli* CNU312를 대량 배양했을 때 균체 성장은 15시간만에 정지기에 도달하였다. 효소의 활성은 대수기 말기인 14시간에 가장 높았으며 정지기 이후 급격한 감소를 보였다. 반응 초기 산성 환경에 있던 pH는 대수기로 접어들면서 높아지기 시작하여 알칼리성 환경을 나타냈다. 배양균 상등액의 침전물을 Sephadex G-75로 6시간 동안 gel filtration하였을 때 18~30 fraction에서 활성을 보였다. 활성 분획을 농축시킨 후, 전기영동과 Electro-elution을 행하여 native-PAGE로 효소의 단일 밴드를 확인하였다. 정제 결과 Table 1과 같이 최종 수율은 20.6%였고, 정제 배수는 29.0이었다.

분자량 측정

Catechol 2,3-dioxygenase는 native-PAGE를 통해 active staining을 실시한 결과 노란색의 band를 확인할 수 있었으며, 분자량은 약 140.4 kDa이었다. SDS-PAGE를 통해 분자량을 측정했을 때는 약 35 kDa으로서, 4개의 동일한 subunit로 구성된 homotetramer인 것으로 추정되었다. 이 subunit의 크기는 Oh등 (1997)에 의한 *Burkholderia cepacia* G4가 생산하는 효소와 같은 효소임을 의미한다. 이 subunit의 크기는 *Pseudomonas* sp. P20이 생산하는 2,3-DHBP dioxygenase(13)와 *Pseudomonas* sp. S-47이 생산하는 catechol 2,3-dioxygenase(8), 그리고 *Bacillus macerans* JJ1b가 생산하는 protocatechuate 2,3-dioxygenase(17)의 subunit 크기와 유사하였다.

Table 1. Purification of the catechol 2,3-dioxygenase from *E. coli* CNU312.

	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Recovery yield (%)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold
Crude extract	23354.1	182.8	100.0	127.8	1.0
Acetone precipitation ¹⁾	15438.4	71.0	66.1	217.4	1.7
Gel filtration ²⁾	12208.5	18.9	52.3	646.0	5.1
Electro-elution	4818.1	1.3	20.6	3706.2	29.0

¹⁾30~60%, ²⁾Sephadex G75

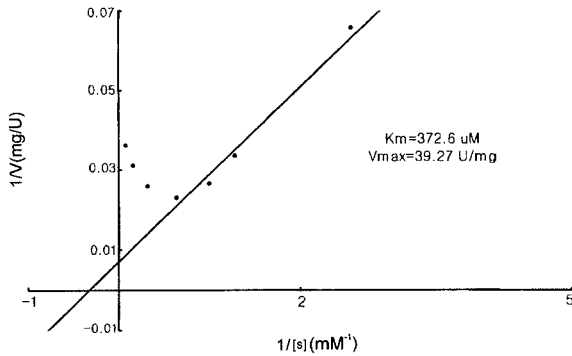


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot of catechol 2,3-dioxygenase. Concentration of substrate[S]; 390 μ M, 780 μ M, 1 mM, 1.56 mM, 3.12 mM, 6.25 mM, 12.5 mM.

K_m값과 V_{max}값의 결정

Lineweaver-Burk plot에 의해서 catechol에 대한 K_m값, V_{max}값을 계산한 결과 Fig. 1에서와 같이 372.6 μ M, 39.27 U/mg이었으며 1.56 mM 이상의 기질농도에서 효소 활성이 감소되는 substrate inhibition이 나타났는데, 이런 현상은 일부의 다른 extradiol dioxygenase에서도 나타나는 공통적인 현상으로(5), *Pseudomonas* sp. LB400(2), *Rhodococcus globerulus* P6(1), 그리고 *Pseudomonas* sp. P20(13)에서 생산되는 2,3-DHBP dioxygenase에도 나타났다.

pH 및 온도의 영향

pH에 대한 효소 활성의 정도를 조사한 결과, Fig. 2A에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서 최대의 효소 활성을 보였으며, pH 7.0-8.0 범위에서 비교적 안정하였다. 반면 pH 9.0에서는 낮은 효소 활성을 보였는데, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707의 2,3-DHBP dioxygenase(3)와 *Pseudomonas putida* GJ31의 chlorocatechol 2,3-dioxygenase(6)가 pH 9.0에서 최적 pH를 갖는 것과 차이를 보이고 있다. 그러나 다른 extradiol dioxygenase들은 대개 pH 7-8에서 최적 pH를 보이고 있어 대체로 비슷한 특성을 보이고 있는 것으로 생각된다. 온도에 대한 효소 활성은 10°C에서 40°C까지 꾸준히 증가하였으나, 50°C이후 급격히 감소되었으며, 효소 활성의 최적 온도는 40°C였다. 효소의 안정성은 60°C 이후 효소 활성이 완전히 상실되었으며, 50°C까지는 비교적 안정하였다(Fig. 2B).

금속이온의 영향

금속이온에 대한 활성을 조사한 결과, Table 2에서와 같이 Mg²⁺와 K⁺를 제외한 다른 금속이온에 의하여 활성이 감소되었으며, 특히 Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, 그리고 Cu²⁺에서 활성이 완전히 억제되었다. 일반적으로 보고된 대부분의 extradiol dioxygenase들은 Fe²⁺를 prosthetic group으로 가지고 있으며 Fe²⁺에 의해 효소 활성이 증가되는 반면, Fe³⁺에 의해서 효소 활성이 감소된다고 보고되었다(4). 그러나 본 효소에서는 Fe²⁺, Fe³⁺ 모두에 의해 효소 활성이 감소되는 특성을 보였다. *Pseudomonas* sp. P20(13)과 *Pseudomonas* sp. DJ12(15)의 2,3-DHBP dioxygenase에서도 효소

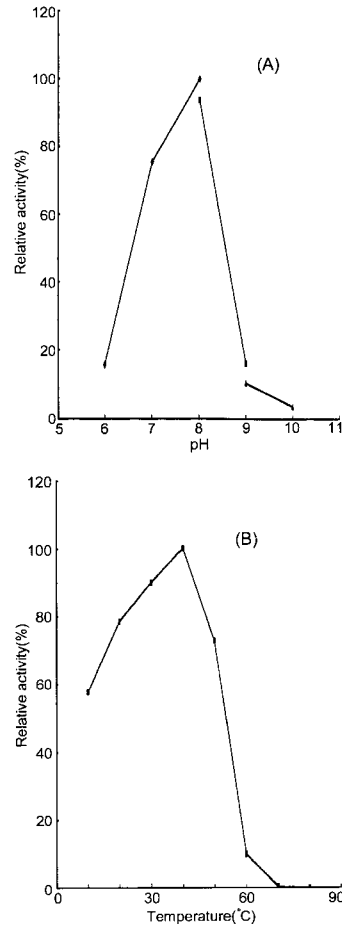


Fig. 2. Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity of catechol 2,3-dioxygenase. pH 6-8, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8-9, 50 mM Tris-HCl buffer; pH 9-10, 50 mM glycine-NaOH buffer.

활성이 감소되는 비슷한 특성을 보이고 있다.

화학 변형제의 영향

여러 가지 화학 변형시약에 대한 효소 활성은 Table 3에서와

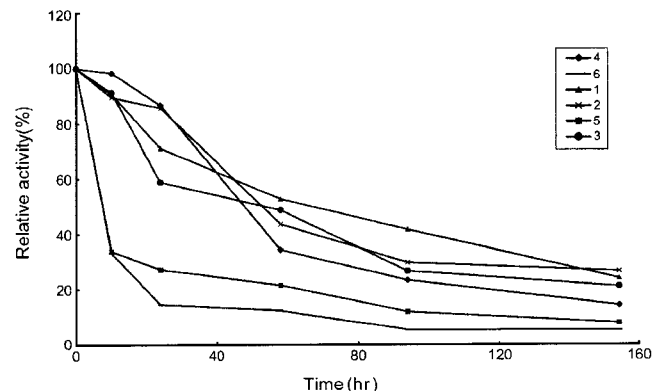


Fig. 3. Effects of various organic solvents on the stability of catechol 2,3-dioxygenase. 1, ethanol; 2, isopropyl alcohol; 3, acetone; 4, none; 5, ethyl acetate; 6, acetic acid.

같이 tryptophan 변형시약인 N-bromosuccinimide와 histidine 변형시약인 p-diazobenzene sulfonic acid에 의해 효소활성이 억제되었다. 따라서 tryptophan과 histidine 잔기가 효소의 활성부위에 존재하는 것으로 생각된다.

유기 용매의 영향

유기용매에 대한 안정성은 Fig. 3에서와 같이 안정화되지 않았다. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(3)과 *Pseudomonas* sp. LB400(2)의 2,3-DHBP dioxygenase가 acetone, ethanol 등에 의해 안정화된 것과는 상이한 특성을 보이고 있다. 반면 ethyl acetate, acetic acid에 의해서는 활성이 크게 감소되었는데, 이것은 ethyl acetate와 acetic acid가 산성 환경의 pH를 지니고 있어, pH에 의해 효소가 실활된 것으로 생각된다.

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

Metal ions	Relative activity(%)		
	0.05 mM	0.1 mM	0.5 mM
None	100.0	100.0	100.0
Co ²⁺	1.7	2.4	4.6
Mn ²⁺	8.5	3.1	4.0
Zn ²⁺	2.2	0.7	0.7
Mg ²⁺	98.3	115.2	92.7
Fe ⁺	33.8	38.1	36.5
Fe ⁺³	44.2	44.6	36.0
Cu ²⁺	14.0	4.8	1.2
K ⁺	82.7	84.2	77.9

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

Reagents	Relative activity (%)	
	0.1 mM	1 mM
None	100.0	100.0
Iodine	75.6	47.6
N-bromosuccinimide	5.9	5.4
B-naphthoquinone -4-sulfonic acid	72.5	31.8
2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid	81.1	61.0
Glyoxal	77.4	61.2
N-ethylmaleimide	93.3	81.1
p-diazobenzene sulfonic acid	1.9	0.0
p-chloromercuri benzoic acid	86.6	56.7

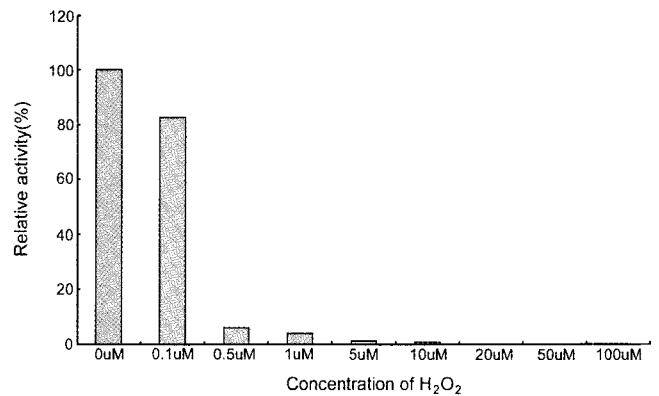


Fig. 4. Effect of H₂O₂ on the activity of catechol 2,3-dioxygenase.

Table 4. Effects of chelators on the activity of catechol 2,3-dioxygenase

Compounds	Concentration	Relative activity (%)
None		100.0
EDTA	5 mM	69.0
	10 mM	54.6
Tiron	5 mM	90.0
	10 mM	118.3
o-phenanthroline	5 mM	14.5
	10 mM	4.1

4.1

Chelator의 영향

각각의 chelators들에 대한 영향은 Table 4에서와 같이, 모든 금속이온을 킬레이트하는 EDTA를 처리했을 때 5 mM에서 69.0%, 10 mM에서는 54.6%로 효소 활성이 감소되었으며, Fe²⁺를 킬레이트하는 o-phenanthroline을 처리했을 때 5 mM에서 14.5%, 10 mM에서는 4.1%로 효소 활성이 감소되었다. 그러나 Fe³⁺를 킬레이트하는 Tiron의 경우 큰 영향을 받지 않았다. 따라서 본 실험에서 정제된 catechol 2,3-dioxygenase는 Fe²⁺에 의해 활성이 억제되었으나, prosthetic group으로 Fe²⁺를 가지고 있는 전형적인 extradiol dioxygenase의 특성을 지니고 있는 것으로 생각된다.

산화제와 환원제의 영향

산화제인 H₂O₂에 대해서는 Fig. 4에서와 같이 0.5 μM 이후 효소 활성이 급격히 감소되었다. 본 효소 뿐 아니라 *Pseudomonas* sp. P20(13)과 *Rhodococcus globerulus* P6(1)이 생산하는 2,3-DHBP dioxygenase, *Pseudomonas putida* GJ31(6)이 생산하는 chlorocatechol 2,3-dioxygenase, 그리고 *Bacillus macerans* JJ1b(17)가 생산하는 protocatechuate 2,3-dioxygenase도 H₂O₂에 의해 효소 활성이 저해되었다. 환원제가 효소 활성에 미치는 영향은 Table 5에서와 같이 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, 그리고 ascorbic acid에 대해 큰 안정성을 보이지 않았다



Fig. 5. Substrate specificity of the catechol 2,3-dioxygenase. Cat: catechol, 4-Clcat: 4-chlorocatechol, 4-Mecat: 4-methylcatechol, 3-Mecat: 3-methylcatechol, 2,3-DHBP: 2,3-dihydroxybiphenyl.

기질 특이성

Catechol을 비롯한 여러 가지 기질들을 이용하여 각 기질의 분해 능력을 조사하였다. Fig. 5에서와 같이 catechol에 대해 가장 높은 기질특이성을 보였으며, 3-methylcatechol에 대해서도 42.49%의 기질특이성을 보였다. 그리고 4-methylcatechol과 4-chlorocatechol에 대해서는 9.01%와 5.84%의 기질특이성을 보였고, 2,3-DHBP에 대해서는 0.41%의 매우 낮은 기질특이성을 보였다. *Pseudomonas* sp. S-47(8), *Pseudomonas putida* GJ31(6), 그리고 *Achromobacter xylosoxidans* KF701(11)에 의해 생산되어지는 catechol 2,3-dioxygenase들도 catechol에 매우 높은 특이성을 보였으며, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol과 같은 기질에 대해서도 어느 정도의 분해능을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 2,3-DHBP에 대해서는 매우 낮은 특이성을 보였다. 반면 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(3), *Pseudomonas* sp. DJ12(15), 그리고 *Pseudomonas* sp. P20(13)에서 생산되어지는 2,3-DHBP dioxygenase는 2,3-DHBP에만 매우 높은 기질특이성을 보였으며 다른 기질에는 매우 낮은 분해능을 보이고 있는 것으로 밝혀져, 본 실험에서 정제된 효소와 매우 상이한 기질특이성을 보였다. 이상과 같이 *Burkholderia cepacia* G4의 catechol 2,3-dioxygenase는 이미 보고된 다른 균주로부터

Table 5. Effects of various reducing agents on the activity of catechol 2,3-dioxygenase.

Compounds	Concentration	Relative activity (%)
None		100.0
2-mercaptoethanol	0.1 mM	67.7
	1 mM	57.3
Dithiothreitol	0.1 mM	92.7
	1 mM	51.2
Ascorbic acid	0.1 mM	55.5
	1 mM	0.9

터 생산되는 extradiol enzyme들과 유사한 특성 뿐 아니라 상이한 특성도 지니고 있어, 앞으로 보다 많은 연구가 필요하며 미생물을 이용한 xenobiotics의 분해연구에 보탬이 될 것으로 기대된다.

참고문헌

- Asturias, J. A., L. D. Eltis, M. Prucha, and K. N. Timmis. 1994. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Biol. Chem.* 269, 7807-7815.
- Eltis, L. D., B. Hofmann, H. J. Hecht, H. Lünsdorf, and K. N. Timmis. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268, 2727-2732.
- 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 *bph* C gene. *J. Bacteriol.* 169, 924-927.
- Harayama, S. and M. Reikik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzyme are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264, 15328-15333.
- Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayash, 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.
- Kaschabek, S., T. Kasberg, D. Muller, A. E. Mars, D. B. Janssen, and W. Reineke. 1998. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* 180, 296-302.
- 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, 122-128.
- Kim, K. P., D. I. Seo, K. H. Min, J. O. Ka, Y. K. Park, and C. K. Kim. 1997. Characteristics of catechol 2,3-dioxygenase produced by 4-chlorobenzoate-degrading *Pseudomonas* sp. S-47. *Kor. J. Microbiol.* 35, 295-299.
- Lee, J. R., Y. C. Kim, J. Y. Lim, and Y. S. Kim. 1996. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in chromosomal DNA of *Pseudomonas putida* KF715. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 831-836.
- Masse, R., F. Messier, L. Peloquin, C. Ayotte, and M. Sylvestre. 1984. Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 947-951.
- Moon, J. H., E. J. Kang, K. R. Min, C. K. Kim, K. H. Min, K. S. Lee, and Y. S. Kim. 1997. Characterization of the gene encoding catechol 2,3-dioxygenase from *Achromobacter xylosoxidans* KF701. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 430-435.
- Oh, J. M., K. R. Min, C. K. Kim, Y. C. Kim, J. Y. Lim, K. S. Lee, K. H. Min, and Y. S. Kim. 1997. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in TOM plasmid of *Pseudomonas cepacia* G4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234(3), 578-581.
- Park, H. N., Y. S. Kim, Y. C. Kim, C. K. Kim, and J. Y. Lim. 1996. Purification and characterization of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from recombinant *E. coli* CK1092. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 282-289.
- Schmid, A., B. Rothe, J. Altenbuchner, W. Ludwig, and K. H.

- Engesser. 1997. Characterization of three distinct extradiol dioxygenases involved in mineralization of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DPO360. *J. Bacteriol.* 179, 53-62.
15. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 150-156.
16. Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1223-1224.
17. Wolgel, S. A., J. E. Dega, P. E. Perkins-Olson, C. H. Juarez-Garcia, R. L. Crawford, E. Münck, and J. D. Lipscomb. 1993. Purification and characterization of protocatechol 2,3-dioxygenase from *Bacillus maceransia* new extradiol catecholic dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175, 4414-4426.

(Received February 18, 2000/Accepted June 3, 2000)

ABSTRACT : Purification and Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenase from Recombinant Strain *E. coli* CNU312.

Jai-Yun Lim, Kyung-Ho Choi,* and Byung-Don Choi¹(Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea, ¹Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea)

Catechol 2,3-dioxygenase was purified from recombinant strain *E. coli* CNU312 carrying the *tomB* gene which was cloned from toluene-degrading *Burkholderia cepacia* G4. The purification of this enzyme was performed by acetone precipitation, Sephadex G-75 chromatography, electrophoresis and electro-elution. The molecular weight of native enzyme was about 140.4 kDa and its subunit was estimated to be 35 kDa by SDS-PAGE. It means that this enzyme consists of four identical subunits. This enzyme was specifically active to catechol, and K_m value and V_{max} value of this enzyme were 372.6 μ M and 39.27 U/mg. This enzyme was weakly active to 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, and 4-chlorocatechol, but rarely active to 2,3-DHBP. The optimal pH and temperature of the enzyme were pH 8.0 and 40°C. The enzyme was inhibited by Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} ions, and was inactivated by adding the reagents such as N-bromosuccinimide, and *p*-diazobenzene sulfonic acid. The activity of catechol 2,3-dioxygenase was not stabilized by 10% concentration of organic solvents such as acetone, ethanol, isopropyl alcohol, ethyl acetate, and acetic acid, and by reducing agents such as 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, and ascorbic acid. The enzyme was inactivated by the oxidizing agent H_2O_2 , and by chelators such as EDTA, and *o*-phenanthroline.