

폭약 TNT 분해세균 *Stenotrophomonas* sp. OK-5에서 분리된 NAD(P)H-nitroreductase의 정제 및 특성 연구

호은미 · 천재우 · 강형일¹ · 오계현*

순천대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹순천대학교 사범대학 환경교육과

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)을 분해할 수 있는 *Stenotrophomonas* sp. OK-5에서 분리한 NAD(P)H-nitroreductase의 특성을 조사하였다. 먼저 ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose, 그리고 Q-sepharose 등의 일련의 정제 과정을 통하여 NAD(P)H-nitroreductase을 분리정제하였다. 분취기로부터 얻어진 시료로부터 NAD(P)H-nitroreductase의 효소활성을 가지는 3개의 다른 fractions (I, II 및 III)이 탐침되었다. NAD(P)H-nitroreductase의 fractions I, II, 그리고 III의 비활성(specific activity)은 각각 5.06 unit/mg, 4.95 unit/mg, and 4.86 unit/mg이었으며, crude extract와 비교하여 각각 10.5배, 9.8배, 8.9배 이상 농축되었다. 이 실험에서 이들 3개의 fractions 가운데, fraction I이 가장 높은 비활성을 나타내었다. NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II 및 III)의 효소활성에 영향을 미치는 몇 가지 요인을 조사하였다. 모든 NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II 및 III)의 최적 온도는 30°C이었으며, 최적 pH는 약 7.5이었다. Ag⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ 등의 금속이온은 약 80%의 효소활성을 저해하였으나, Mn²⁺ 이나 Ca²⁺의 첨가 시에는 약 30~40% 정도의 활성이 감소되었다. 그러나 Fe³⁺은 이들 효소의 활성을 증진시켰다. SDS-PAGE에 의해 측정된 NAD(P)H-nitroreductase의 fractions I, II 및 III의 분자량은 모두 약 27 kDa임이 확인되었다.

Key words □ TNT, *Stenotrophomonas* sp. OK-5, NAD(P)H-nitroreductase, enzyme activity

군사적 목적으로 널리 사용되는 TNT (2,4,6-trinitrotoluene)는 자연계에서 잔류성이 강한 난분해성 니트로 방향족 유기화합물로서, 자연 생태계에 노출되었을 때 생분해가 매우 느리거나 어려워 커다란 문제를 일으키는 것으로 알려져 있다(8, 23). 이러한 TNT는 화학적 구조가 방향족 화합물 고리에서 세 개의 질소 그룹이 대칭적으로 위치하기 때문에 구조적으로 매우 안정한 특징이 있다(6). TNT는 자연에서 서서히 광분해(photolysis)되는 것으로 알려져 있으며, 많은 과학자들이 미생물에 의한 효율적인 TNT 제거에 대하여 많은 관심을 가져왔다. 미생물에 의한 TNT의 분해과정은 전자친화성(electrophilic)인 니트로 기(nitro group)들이 제거되어 hydroxylamino와 amino 유도체들로 생물학적 전환(biotransformation)이 가능하다는 연구가 보고되고 있으며(10,17), 이들 TNT의 분해 경로는 일정하게 이루어지지 않고 균주와 중간 대사산물의 생성에 따라 다양한 경로를 거치는 것으로 알려져 있다(14)(Fig. 1). TNT의 생분해 경로에 중요한 효소로 작용하는 nitroreductase는 TNT의 첫 번째 대사산물인 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene과 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene 생성뿐만 아니라 계속 이어지는 중간대사산물인 2,4-diamino-6-nitrotoluene으로의 전환을 촉매하는 것으로 보고되었다(11). 일반적으로 nitroreductase는 환원되는 전자의 개수와 산소에 의한 영향에 따라서 type I과 type II로 알려져 있다. Type I은 NAD(P)H-

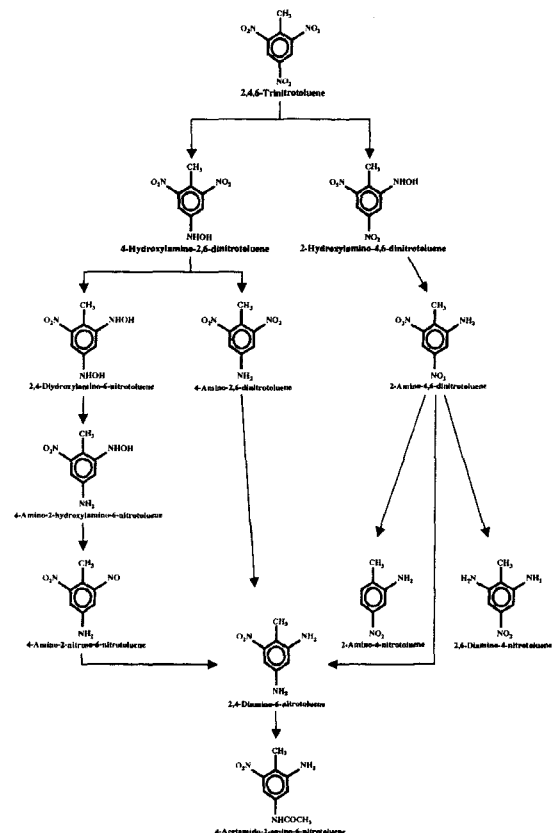


Fig. 1. Proposed mechanisms for TNT metabolism in several bacteria.

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel: 041-530-1353, Fax: 041-530-1350
 E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

quinone oxidoreductase (DT-diaphorase, EC 1.6.99.2)와 같은 산소에 민감하지 않은(oxygen-insensitive) 것으로 니트로 방향족 화합물에서 두 개의 전자를 환원시킴으로써 nitroso 화합물이나 hydroxylamine과 같은 중간대사산물을 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 amino 화합물로 전환되는 것을 촉매한다(3,4,22). Type II는 NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase (EC 1.6.2.4), NADPH-b₅ oxidoreductase(EC 1.6.2.2)와 같은 산소에 민감한(oxygen-sensitive) 것으로서 니트로 방향족 화합물에서 한 개의 전자를 환원시켜 음이온 자유 라디칼(radicals)을 형성하게 되는데, 이들은 산소에 의해서 쉽게 재산화되어 세포내의 단백질, 핵산, 그리고 지질에 치명적인 영향을 줄 수 있는 superoxide, hydrogen peroxide 등을 생성한다(16, 21). 따라서, type II에 속하는 nitroreductase는 혐기적 조건에서만 니트로 방향족 화합물을 환원시킬 수 있다. TNT를 기질로 사용하여 분리된 NAD(P)H-nitroreductase는 type I에 속하는 것으로 보고되었다(4, 11). 이러한 nitroreductase는 TNT를 포함하는 니트로 방향족 화합물을 hydroxylamine 등으로 환원시키면서 flavin mononucleotide cofactor (FMN)에 의해 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH)나 다른 nicotinamides의 환원이 동시에 이루어지는 것으로 알려져 있다(9, 12). 최근 nitrofurazone, nitrobenzene, p-nitrophenol, RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)와 같은 다양한 니트로 방향족 화합물을 기질로 사용하는 여러 종의 미생물로부터 nitroreductase를 분리, 정제하고 그 특성 규명에 대한 연구가 보고되고 있고(11, 15), 특히, *Enterobacter cloacae*에서는 TNT를 기질로 사용하여 산소에 민감하지 않은(oxygen-insensitive) type II에 속하는 nitroreductase를 분리, 정제하고 그 특성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(4, 15). 또한, nitroreductase와 다양한 기질 사이의 반응 속도에 관한 효소학적인 연구(16, 18, 19)가 보고되고 있으며, nitroreductase를 암호화하는 유전자에 대한 분자유전학적인 연구(5, 20)도 많이 보고되고 있다. 본 연구에서는 세균의 성장에서 TNT를 기질로 이용하는 *Stenotrophomonas* sp. OK-5를 TNT가 포함된 최소배지에 배양한 후, 분해에 관여하는 효소인 NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II, 및 III)를 분리 및 정제하고 SDS-PAGE를 통하여 각각의 분자량을 확인하였으며, 온도와 pH, 그리고 여러 가지 금속의 첨가가 이들 효소에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

TNT에 오염된 토양으로부터 농화 배양을 통하여 TNT 분해세균 OK-5를 분리하였다. 균주 OK-5는 Biolog 시험과 생리생화학 시험을 통하여 *Stenotrophomonas* 종으로 동정되었으며, *Stenotrophomonas* sp. OK-5로 명명되었다. 이 균주의 특성과 배양조건, 그리고 TNT 분해능은 이미 보고된 바 있다(13). 균주 OK-5는 TNT를 포함하는 배지에 접종하여 30°C 에서 분당 160 회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였으며, nitroreductase 연구를 위하여 지수생장기에 도달할 때까지 세균을 생장시켰다.

Nitroreductase의 분리 및 정제

배양한 OK-5를 분광광도계(V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 이용하여 660 nm에서 O.D.가 0.8일 때 250 ml의 원심분리튜브에 넣고 4,100×g에서 20분 동안 원심분리를 실시하였으며, 균체는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 3회 세척하였다. 침전된 균체를 4 ml의 50 mM Tris-HCl로 재현탁한 후, sonicator (Fisher M-300, Pittsburgh, USA)를 이용하여 파쇄하였다. Sonication은 30초 간격으로 25회 실시하였다. 파쇄한 용액은 8,700×g로 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 40% 포화 ammonium sulfate로 만들기 위해 천천히 교반하면서 L 당 242 g의 ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, USA)를 첨가한 후, 4°C에서 1 시간 동안 반응하였다. 약 6,300×g에서 20분간 원심분리하여 침전물은 제거하고, 상등액을 취하였다. 다시 상등액에 L 당 130 g의 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 첨가하여 60% 포화 ammonium sulfate를 만들었고, 6,300×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 침전물은 0.01 mM FMN (Sigma)이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 7 ml에 30분간 완전히 녹여 dialysis membrane (Sigma)을 이용하여 1 L의 동일한 buffer (pH 7.5)에서 10시간 이상 투석 후 동일한 buffer에서 다시 투석을 실시하였다. 투석된 용액을 DEAE-sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column (2.5×20 cm)에 주입하고, 1 M의 NaCl을 이용하여 농도구배에 의해 0.01 mM FMN이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 2 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 nitroreductase의 활성이 높은 부분을 확인하여 단백질 정량을 실시하였고, 다시 Q-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column (2.5×20 cm)에 주입하였다. 단백질은 1 M의 NaCl 농도로 약 40분 동안 분취기로 2.5 ml 씩 모아서 효소 활성측정을 통하여 nitroreductase가 포함된 용출액을 분리하였고, 분리한 용액은 Bradford 방법(2)을 응용하여 단백질 정량을 실시하였으며, bovine serum albumin (BSA)으로 표준곡선을 작성하였다. 1 ml의 Bradford 용액에 각각 10, 20, 30 µg의 BSA를 첨가하여 5분간 반응 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였고, 측정하고자 하는 단백질 시료는 표준곡선의 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 첨가한 후, 흡광도를 측정하여 정량을 실시하였다.

Nitroreductase의 분자량 측정

Nitroreductase의 정제 여부와 분자량을 확인하기 위하여 Bollag 등의 방법(1)을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하여 동일량의 단백질을 준비하였고, 1× sample buffer로 총량을 맞추었다. 준비된 시료를 100°C에서 5분간 열처리하여, 얼음에 냉각 후 주입하였다. 표지 단백질은 prestained SDS-PAGE standard (Bio-rad, Hercules, USA)를 사용하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 60 V에서 30분간 실시하였고, separating gel에서는 100 V에서 1시간 30분 동안 실시하였다.

전기 영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 염색을 실시하였고. gel destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)로 1시간 동안 처리한 후, gel destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)로 8시간 처리하였다.

Nitroreductase의 활성 측정

정제된 nitroreductase는 염의 제거와 농축을 위하여 Centriprep 10 concentrator (Amicon, Beverly, USA)를 사용하여 10배로 농축한 후, 전자 공여체인 NADH의 산화에 의해 측정되는 French 방법(7)에 의해서 활성 측정을 실시하였다. Nitroreductase 활성 측정은 Tris-HCl buffer(50 mM, pH 7.5)에 기질로 TNT (0.1 mM), NADH(0.2 mM)와 정제한 nitroreductase를 최종 1 ml로 맞추어 첨가한 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 NADH (Sigma)가 산화되면서 1분 동안 감소되는 값을 측정하였다. 반응 산물인 NADH의 몰 흡광계수 (molar extinction coefficient)는 $6,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이며, 1 unit은 25°C에서 분당 1 mole의 NADH가 산화되는 양으로 정하고, 비활성(specific activity)은 unit/mg으로 정하였다.

Nitroreductase의 활성에 영향을 미치는 요인

Nitroreductase의 활성에 영향을 미치는 요인으로 pH, 온도, 그리고 금속의 첨가에 따른 효소 활성을 측정하여 비교하였다. 효소 활성의 최적 온도를 알아보기 위하여, 반응온도를 10~50°C로 변화를 시키면서 효소활성을 측정하였다. 효소 반응은 순환온도장치를 이용하여 해당되는 온도를 맞추었다. 각각의 온도에 해당하는 반응용액을 사용하여 1분간 반응 후에 340 nm에서 흡광도 측정을 하였으며, 최대 흡광도 값을 100% 기준으로 상대적 활성을 측정하였다. 효소활성의 최적 pH를 조사하기 위하여, pH 5.0 ~7.0에서의 효소 활성은 50 mM potassium phosphate buffer에서 측정하였고, pH 7.5~12.0에서의 활성측정은 50 mM Tris-HCl buffer를 이용하여 활성 측정을 실시하였다. Hg^{2+} , Ag^{+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 등의 금속에 의한 nitroreductase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 각각 10 mM의 금속을 첨가하고, 실온에서 5분간 방치 후에 200 μl 의 0.1 mM TNT와 10 μl 의 0.2 mM NADH 용액 및 분리된 효소용액을 첨가하였으며, 반응은 실온에서 1분간 실시한 후에 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Nitroreductase의 분리 및 정제

Crude extract 상태의 효소 용액을 40~60% ammonium sulfate 침전을 통하여 단백질의 양을 절반으로 줄였고, DEAE-sepharose, Q-sepharose column을 실시하여 nitroreductase를 분리 및 정제하였으며, 이 후 세 개의 다른 fractions이 나타남을 확인하였다(Fig. 2). Nitroreductase를 정제하는 일반적인 방법은 acetone이나

ammonium sulfate로 포화시킨 용액에서 단백질을 침전시킨 후 음이온의 성질을 가진 nitroreductase를 정제하기 위하여, DEAE나 DE52, Mono Q 등의 음이온 교환 chromatography를 이용하는 것이었으나(4, 5), 본 연구에서는 분리세균 OK-5로부터 nitroreductase를 정제하는 과정에서 acetone 침전을 실시하지 않고, ammonium sulfate 침전을 이용한 일련의 과정을 통하여 순수한 nitroreductase를 분리하였다. 또한, nitroreductase의 등전점이 낮은 pH에서 나타나는 것으로 알려져 있어 다양한 음이온 교환체 chromatography를 이용한 분석 결과 여러 개의 peak들이 나타난다고 보고된 바 있다(4, 7). *Enterobacter cloacae*에서는 nitroreductase를 일반적인 방법으로 정제가 어려워 소수성의 성질을 이용한 phenyl sepharose column을 통하여 정제를 실시한 것으로 보고되었다(4). DEAE-sepharose column을 이용한 nitroreductase의 분리에서 약 10분 이후부터 1 M의 NaCl 농도구배가 형성되어 용출되었는데 fraction I이 가장 높은 활성을 나타냈으며, 약 25분 후에 용출된 fraction II가 가장 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 2A). 반면에 Q-sepharose column을 통하여 분리된 nitroreductase에서는 fraction III가 가장 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 2B).

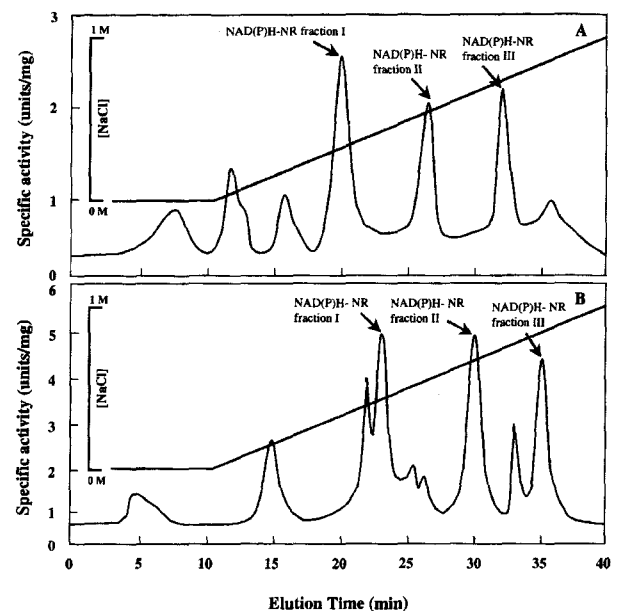


Fig. 2. Analyses of NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II, and III) by anion exchange chromatography. (A) DEAE-sepharose chromatography. 7 ml of the resuspended 40-60% ammonium sulfate pellet was recovered by centrifugation and applied to a DEAE-sepharose column (2.5×20 cm) which had been preequilibrated in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5 add to 0.01 mM FMN. Protein was eluted with a 0-1 M gradient of NaCl. Arrows indicate the position of distinct peaks of activity. (B) Q-sepharose chromatography. The pooled fractions from DEAE-sepharose column were applied to a Q-sepharose column (2.5×20 cm) equilibrated in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5 add to a 0.01 mM FMN. Protein was eluted with a 0-1 M gradient of NaCl. Arrows indicate the position of distinct peaks of activity.

Column을 통한 정제단계에서 손실될 수 있는 효소의 활성은 0.01 mM의 FMN을 첨가함으로써 극복되었다. FMN은 nitroreductase간의 수소결합에 영향을 주어 안정화시킨다고 알려져 있으며(9), *Salmonella typhimurium*과 *E. cloacae* 등에서 분리된 nitroreductase를 이용한 연구에서 FMN에 의해 효소 활성이 증가됨을 보고하였다(4, 22). 따라서, 본 실험에서도 FMN이 효소 활성을 증가시킬 수 있는 조효소 역할을 하는 것으로 확인되었다. 각 정제단계에서 분리된 효소 용액의 단백질 정량과 NADH를 이용한 효소 활성 측정을 실시하여 효소의 단계별 분리표를 작성하였다(Table 1). 정제된 nitroreductase (fractions I, II, III)의 specific activity는 각각 5.24 unit/mg, 4.91 unit/mg, 그리고 4.46 unit/mg으로 나타났으며, crude extract에 비해 10.5배, 9.8배, 8.9배 농축되었다. 본 연구에서 분리된 nitroreductase (fractions I, II, III)는 실온에서 불안정한 것으로 나타났으며, -70°C에서도 장시간 보관 시에 활성이 크게 감소되는 것으로 확인되었다.

Nitroreductase의 분자량 측정

정제된 nitroreductase의 분자량 측정을 위해 각 정제단계별 시료를 12%의 SDS-PAGE gel에 전개하여 nitroreductase (fractions I, II, 및 III)의 분리 여부를 단일 band로 확인하였고, 분자량은 약 27 kDa임을 확인하였다(Fig. 3). Watanabe 등(21)은 *Salmonella typhimurium*에서 분리된 nitroreductase의 분자량이 약 24.5 kDa인 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서 분리된 이 효소의 분자량은 약 27 kDa로, *Enterobacter*

*cloacae*에서 분리, 정제된 NAD(P)H-nitroreductase와 동일한 크기로 밝혀졌다(4). 또한, *E. cloacae*를 이용한 NAD(P)H-nitroreductase 연구에서는 단백질을 변성시킨 조건과 변성시키지 않은 조건에서 크기를 조사했을 때, 각각 27 kDa으로 나타남을 확인하여 단량체로서 효소 활성

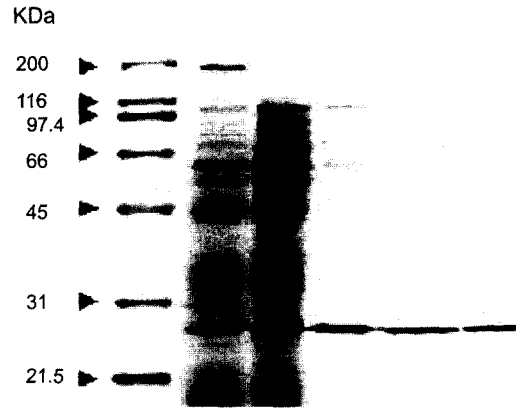


Fig. 3. SDS-PAGE of purification procedure NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II, and III) from *Stenotrophomonas* sp. OK-5. A: molecular size marker, B: crude cell extract, C: 40-60% saturated crude cell extract with ammonium sulfate, D: eluted NAD(P)H-nitroreductase (fraction I) from Q-sepharose, E: eluted NAD(P)H-nitroreductase (fraction II) from Q-sepharose, F: eluted NAD(P)H-nitroreductase (fraction III) from Q-sepharose chromatography.

Table. 1. Purification of NAD(P)-nitroreductase (fractions I, II, and III) purified from *Stenotrophomonas* sp. OK-5 [(A) fraction I, (B) fraction II, and (C) fraction III]

(A)

Purification step	vol(ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (units/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	22.95	11.48	0.5	100	1
Ammonium sulfate	23	15.1	11.02	0.73	95.9	1.5
DEAE-sepharose	7	2.18	6.26	2.87	54.53	5.7
Q-sepharose	3	0.59	3.1	5.24	27	10.5

(B)

Purification step	vol(ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (units/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	22.95	11.48	0.5	100	1
Ammonium sulfate	23	15.1	11.02	0.73	95.9	1.5
DEAE-sepharose	7	2.67	5.48	2.05	47.73	4.1
Q-sepharose	3	0.59	2.46	4.91	22.65	9.8

(C)

Purification step	vol(ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (units/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	22.95	11.48	0.5	100	1
Ammonium sulfate	23	15.1	11.02	0.73	95.9	1.5
DEAE-sepharose	7	2.59	5.72	2.21	49.82	4.4
Q-sepharose	3	0.76	3.38	4.46	29.4	8.9

을 가지는 것으로 보고하였다(4), 따라서 본 연구에서 확인된 OK-5의 NAD(P)H-nitroreductase는 *E. cloacae*의 NAD(P)H-nitroreductase와 유사성이 있는 것으로 확인되었다.

온도와 pH에 대한 효소 활성

온도가 nitroreductase (fractions I, II, 및 III)의 활성에 미치는 영향에 대한 조사에서는 10°C에서 최대 활성 온도의 20~30%로 나타나기 시작하여 25°C에서 활성이 증가하고, 최적 활성 온도는 30°C로 나타났다(Fig. 4). 온도가 35°C 이상으로 증가하면 활성은 급격히 감소하였고 40°C 이상에서는 활성이 20% 이하로 낮아졌다. pH에 의한 nitroreductase(fractions I, II, 및 III)의 활성 조사에서는 pH 5.0에서는 활성이 거의 나타나지 않았고 pH 6.0 이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 효소의 적정 pH는 7.0~8.0으로 나타났으며, 최적 pH는 7.5로 확인되었다(Fig. 5). 이

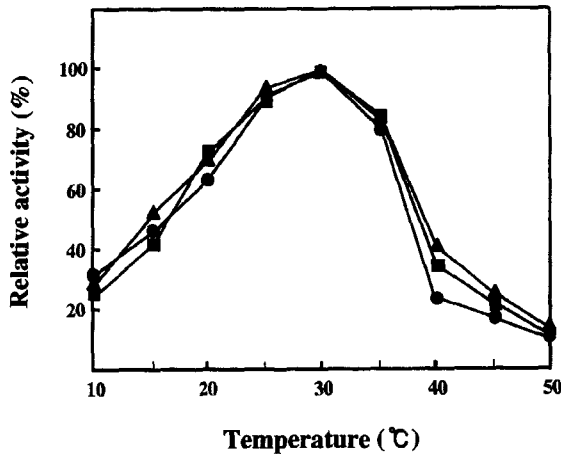


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of NAD(P)H-nitroreductase [fraction I (●), fraction II (▲), and fraction III (■)]. The relative activity was based on the activity of 100% at 30°C.

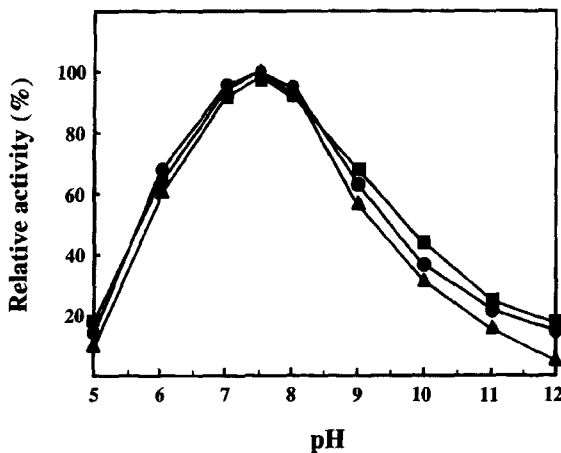


Fig. 5. Effect of pH on the activity of NAD(P)H-nitroreductase [fraction I (●), fraction II (▲), and fraction III (■)]. pH 5.0~7.0: 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5~12.0: 50 mM Tris base buffer. The relative activity was based on the activity of 100% at pH 7.5.

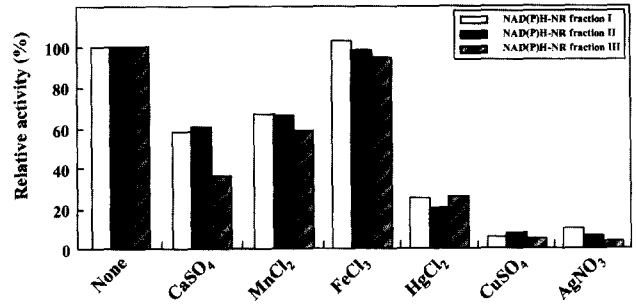


Fig. 6. Effect of several metal ions on the activity of NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II, and III). The final concentration of each metal ion was 0.1 mM. Each bar represents the average of three independent experiments.

범위를 벗어난 pH에서는 효소 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

금속에 의한 효소활성 저해

금속에 의한 nitroreductase (fractions I, II, 및 III)의 효소 활성 저해효과를 알아보기 위해서 다양한 금속 이온들을 첨가하여 활성을 조사하였다. 먼저 nitroreductase fraction I은 HgCl₂, AgNO₃ 와 CuSO₄에 의해서 각각 26.8%, 12.31%, 10.3%로 활성이 감소하였다. CaSO₄, MnCl₂에 의해서는 활성이 소폭 감소하였고, FeCl₃의 첨가 시에는 효소의 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. Nitroreductase fraction II도 AgNO₃에 의해서 활성이 감소하였고, FeCl₃에 의해서 효소 활성이 증가하였다. 반면에 nitroreductase fraction III는 AgNO₃에 의해서 활성이 억제되었고, FeCl₃의 첨가 시 효소 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 6). Cu²⁺나 Hg²⁺ 등은 NADH의 산화에 영향을 주어 효소 활성을 감소시키고, Ag⁺는 단백질 내의 sulphydryl group에 결합하여 억제되는 것으로 보고되었다(9). 본 연구에서 실시한 금속이 효소 활성에 미치는 영향에 대한 조사에서도 Cu²⁺, Hg²⁺ 그리고 Ag⁺에 의하여 효소 활성이 억제됨을 확인하였다. 향후 본 연구에서는 얻어진 결과를 바탕으로 TNT 분해세균 OK-5로부터 분리, 정제된 NAD(P)H-nitroreductase의 아미노산 서열을 분석하여 다른 세균에서 분리된 NAD(P)H-nitroreductase와의 유사성을 규명하고, 관련 유전자의 분자 생물학적 특성 규명 실험이 진행될 것이다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 순천향대학교 대학자체 학술연구조성비 지원(과제번호: 20030042)에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Gel electrophoresis under denaturing condition. 2nd ed. 107-172, New York, NY, USA.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quanti-

- fication of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Brunmark, A., E. Cadenas, A.J. Segura, C. Lind, and L. Ernster. 1988. DT-diaphorase-catalyzed two-electron reduction of various *p*-benzoquinone- and 1,4-naphthoquinone epoxides. *Free Radic. Biol. Med.* 5, 133-143.
 4. Bryant, C., and M. DeLuca. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266, 4119-4125.
 5. Bryant, C., L. Hubbard, and W.D. McElroy. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266, 4126-4130.
 6. Esteve-Nunez, A., A. Caballero, and J.L. Ramos. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 335-352.
 7. French, C.E., S. Niklin, and N.C. Bruce. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2864-2868.
 8. Hartter, D.R. 1985. The use and importance of nitroaromatic compounds in the chemical industry, p. 1-14. In D.E. Rickert (ed.), Chemical Institute of Toxicology Series. Toxicity of nitroaromatic compounds. Hemisphere Publishing, Washington, D.C.
 9. Haynes, C.A., R.L. Koder, A.-F. Miller, and D.W. Rodgers. 2002. Structure of nitroreductase in three states. *J. Biol. Chem.* 277, 11513-11520.
 10. Kalafut, T., M.E. Wales, V.K. Rastogi, R.P. Naumova, S.K. Zari-pova, and J.R. Wild. 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Curr. Microbiol.* 36, 45-54.
 11. Kitts, C.L., C.E. Green, R.A. Otle, M.A. Alvarez, and P.J., Unkefer. 1999. Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can. J. Microbiol.* 46, 278-282.
 12. Koder, R.L., and A.-F. Miller. 1998. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1387, 395-405.
 13. Lee, M.S., H.W. Chang, H.Y. Kahng, J.S. So, and K.H. Oh. 2002. Biological removal of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *Stenotrophomonas* sp. OK-5 in bench-scale bioreactors. *Biotechnol. Bio-process Eng.* 7:105-111.
 14. McFarlan, S.: 2,4,6-Trinitrotoluene pathway map. 1999. University of Minnesota biocatalysis/biodegradation database.
 15. Nivinskas, H., R.L. Koder, Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, A.-F. Miller, and N. Cenas. 2000. Two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: Description of quantitative structure-activity relationships. *Biochim. Pol. Acta.* 47, 941-949.
 16. Nivinskas, H., R.L. Koder, Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, A.-F. Miller, and N. Cenas. 2000. Quantitative structure-activity relationships in two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:nitroreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 170-178.
 17. Oh, K.H., and Y.J. Kim. 1998. Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *s*-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 702-708.
 18. Riefler, R.G., and B.F. Smets. 2000. Enzymatic reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroarenes: Kinetics linked to one-electron redox potentials. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3900-3906.
 19. Wang, C.-J., S. Thiele, and J.-M. Bollag. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 1-8.
 20. Watanabe, M., M. Ishidate, Jr., and T. Nohmi. 1990. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 1059.
 21. Watanabe, M., T. Nishino, and T. Nohmi. 1998. Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductase of *Salmonella typhimurium*. L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 273, 23922-23928.
 22. Watanabe, M., T. Sofuni, and T. Nohmi. 1992. Involvement of Cys⁶⁹ residue in the catalytic mechanism of N-hydroxyarylamine *o*-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*: Sequence similarity at the amino acid level suggests a common catalytic mechanism of acetyltransferase for *S. typhimurium* and higher organisms. *J. Biol. Chem.* 267, 8429-8436.
 23. Won, W.D., L.H. DiSalvo, and J. Ng. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 576-580.

(Received November 3, 2003/Accepted December 8, 2003)

ABSTRACT: Characterization of NAD(P)H-nitroreductase Purified from the TNT-degrading Bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5.

Eun-Mi Ho, Jae-Woo Chun, Hyung-Yeol Kahng¹, and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea, ¹Department of Environmental Education, Sunchon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea)

The purpose of this work was to perform the characterization of NAD(P)H-nitroreductase isolated from *Stenotrophomonas* sp. OK-5 capable of degrading 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Initially, NADP(H)-nitroreductase by a series of purification processes including ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose, and Q-sepharose was prepared. From samples harvested from fraction collector, three different fractions (I, II & III)

having the enzyme activity of NAD(P)H-nitroreductase were detected. Specific activities of three fractions I, II, and III of NAD(P)H-nitroreductase were determined to approximately 5.06 unit/mg, 4.95 unit/mg and 4.86 unit/mg, and concentrated to 10.5, 9.8, and 8.9-fold compared to crude extract, respectively. Among these three fractions, the fraction I of NAD(P)H-nitroreductase demonstrated the highest specific activity in this experiment. Several factors affecting on the enzyme activity of NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II & III) were investigated. The optimum temperature of all NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II & III) was 30°C, and the optimal pH was approximately 7.5. Metal ions such as Ag⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ inhibited approximately 80% enzyme activity of all NAD(P)H-nitroreductase, and the enzyme activities were decreased about 30-40% inhibition in the presence of Mn²⁺ or Ca²⁺. However, Fe³⁺ showed stimulatory effect on the enzyme activity. The molecular weights of NAD(P)H-nitroreductase (fractions I, II & III) were measured about 27 kDa on the SDS-PAGE.