

방향족 화합물인 Aniline, Benzoate, *p*-Hydroxybenzoate를 분해하는 *Delftia* sp. JK-2에서 분리된 Dioxygenases의 특성연구

황선영 · 천재우 · ¹강형일 · †오계현
순천향대학교 생명과학부, ¹순천대학교 환경교육과
(접수 : 2003. 11. 15., 게재승인 : 2004. 2. 25.)

Characterization of different Dioxygenases isolated from *Delftia* sp. JK-2 capable of degrading Aromatic Compounds, Aniline, Benzoate, and *p*-Hydroxybenzoate

Seon-Young Hwang, Jae-Woo Chun, Hyung-Yeel Kahng¹, and Kye-Heon Oh†

Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan, Chungnam 336-600, Korea

¹Department of Environmental Education, Suncheon University, Jeonnam 540-742, Korea

(Received : 2003. 11. 15., Accepted : 2004. 2. 25.)

The aim of this work was to investigate the purification and characterization dioxygenases isolated from *Delftia* sp. JK-2, which could utilize aniline, benzoate, and *p*-hydroxybenzoate as sole carbon and energy source. Catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O), catechol 2,3-dioxygenase(C2,3O), and protocatechuate 4,5-dioxygenase(4,5-PCD) were isolated by benzoate, aniline, and *p*-hydroxybenzoate. In initial experiments, several characteristics of C1,2O, C2,3O, and 4,5-PCD separated with ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose, and Q-sepharose were investigated. Specific activity of C1,2O, C2,3O, and 4,5-PCD were approximately 3.3 unit/mg, 4.7 unit/mg, and 2.0 unit/mg. C1,2O and C2,3O demonstrated their enzyme activities to other substrates, catechol and 4-methylcatechol. 4,5-PCD showed the specific activity to the only substrate, protocatechuate, but the substrates(e.g., catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol) did not show any specific activities in this work. The optimum temperature of C1,2O, C2,3O, and 4,5-PCD were 30°C, and the optimal pHs were approximately 8, 8, and 7, respectively. Ag⁺, Hg⁺, Cu²⁺ showed inhibitory effect on the activity of C1,2O and C2,3O, but Ag⁺, Hg⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ showed inhibitory effect on the activity of 4,5-PCD. Molecular weight of the C1,2O, C2,3O, and 4,5-PCD were determined to approximately 60 kDa, 35 kDa, and 62 kDa by SDS-PAGE.

Key Words : *Delftia* sp. JK-2, aniline, benzoate, *p*-hydroxybenzoate, dioxygenases

서론

다양한 형태의 방향족 화합물이 자연계에서 식물을 구성하는 성분으로 존재하고 있으나, 현대사회에 들어서면서 많은 산업 공정을 통하여 대량으로 생산되어 소비되고 있다. 이렇게 생성되어진 이들 화합물이 환경에 유입되면 토양 및 수생태계에 잔류하여 독성을 나타내기 때문에 환경 오염물질로

인식되고 있다(1, 2). 환경에 노출된 방향족 화합물들은 주로 호기성 세균의 산화적 분해 경로를 이용하여 효과적으로 분해되는데, 미생물의 방향족 화합물 분해는 초기 단계에서 산화 반응 (oxidation), 하이드록시화 반응 (hydroxylation), 탈수소화 반응 (dehydrogenation)을 거치면서 주요 중간 대사산물인 catechol과 protocatechuate 등으로 전환된다. 이들 전환된 catechol과 protocatechuate은 고리 계열에서 중요한 역할을 하는 효소인 dioxygenases에 의해 촉매반응이 진행된다(3, 4).

Catechol의 경우 dioxygenases에 따라 두 가지 분해경로를 가질 수 있는데, catechol 1,2-dioxygenase(C1,2O)에 의한 *ortho*-cleavage와 catechol 2,3-dioxygenase(C2,3O)에 의한 *meta*-cleavage가 있다(2, 3, 5). C1,2O는 catechol 작용하여 2개의 산소가 붙게 되면서 *cis*, *cis*-muconate를 생성한다. 이

† Corresponding Author : Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan 336-600, Chungnam, Korea

Tel : +82-41-530-1353, Fax : +82-41-530-1350

E-mail : kyeheon@sch.ac.kr

작용에 의해서 방향족 고리가 열리게 되고 β -ketoacid 경로로 통해 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 succinate와 acetyl CoA로 분해된다. C₂,3O도 마찬가지로 catechol에 두 개의 산소가 붙게 되면 2-hydroxymuconic semialdehyde를 형성한다. 이 작용으로 고리가 열리고 최종적으로 pyruvate와 acetaldehyde로 분해되는 것으로 보고되고 있다(3). Protocatechuate는 일반적으로 3가지의 dioxygenases가 방향족 고리를 여는 것으로 보고 되고 있는데, 그 3가지는 protocatechuate 3,4-dioxygenase (3,4-PCD), protocatechuate 4,5-dioxygenase (4,5-PCD), 그리고 protocatechuate 2,3-dioxygenase (2,3-PCD)이다. 일반적으로 대부분 *ortho*-cleavage인 protocatechuate 3,4-cleavage 분해 경로와 *meta*-cleavage인 protocatechuate 4,5-cleavage 분해 경로를 이용한다(4). 방향족 화합물을 분해하는 세균에서 dioxygenases에 대한 효소학적 실험과 분자 유전학적 실험들은 지금까지 많이 이루어져 있다(6-14). 또한 하나의 균주로 다양한 기질을 이용하여 기질에 따라 다른 dioxygenases를 조사하는 실험도 이루어지고 있다. Ground등(11)은 quinate와 *p*-hydroxybenzoate를 이용하는 *actinomycetes*를 이용하여 C₁,2O, 3,4-PCD, 그리고 4,5-PCD 이외에 2가지의 효소의 활성 실험을 하였고, *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586에서 *trans*-ferulic acid와 *p*-coumaric acid의 분해 연구에서는 C₁,2O, 3,4-PCD, 그리고 gentisate 1,2-dioxygenase의 활성이 있는 것을 확인하였다(15).

본 연구에서는 도시 폐수처리장의 활성 슬러지에서 분리한 *Delftia* sp. JK-2에서 기질을 benzoate, aniline, *p*-hydroxybenzoate로 배양함에 따라 분리 정제된 C₁,2O, C₂,3O, 그리고 4,5-PCD에 대하여 다양한 환경 조건에서 활성도 측정을 실시하였고, 이 효소의 특성과 저해 요인에 대한 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

균주의 확보 및 배양 조건

천안 소재 폐수처리장으로부터 수거된 활성 슬러지로부터 aniline을 분해하는 *Delftia* sp. JK-2를 분리·동정하였다. C₁,2O의 분리에 사용된 배지는 증류수 1 L당 1 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 0.41 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.02 g CaCO₃에 단일 탄소원으로 5 mM의 benzoate와 질소원으로 10 g의 NH₄Cl이 포함된 액체 무기 배지를 사용하였다. C₂,3O의 분리에 사용된 배지는 증류수 1 L당 1 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 0.41 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.02 g CaCO₃에 단일 탄소원 및 질소원으로 1 g의 aniline을 포함하는 액체 무기배지를 사용하였으며, 4,5-PCD의 분리에 이용된 배지는 증류수 1 L에 1 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 0.41 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.02 g CaCO₃와 단일 탄소원으로 5 mM의 *p*-hydroxybenzoate와 질소원으로 10 g의 NH₄Cl이 포함된 액체 무기배지를 사용하였다. 이 배지에 접종된 *Delftia* sp. JK-2는 30°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. *Delftia* sp. JK-2에 대한 생리·생화학 특성, 그리고 16s rDNA 염기서열의 계통수 분석 (phylogenetic tree) 결과는 이미 보고된 바 있다(16).

Dioxygenases의 분리

배양한 *Delftia* sp. JK-2는 효소 분리를 위해 분광광도계 (V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Co., Japan)를 이용하여 660 nm에서 O.D.값이 0.8일 때 250 ml의 원심분리 튜브에 넣고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리를 실시하였고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 3회 세척하였다. 준비된 세 또는 초음파 파쇄기 (Fisher M-300, Pittsburgh, PA, USA)로 30초간 30회 반복하여 파쇄하였다. 파쇄한 용액은 원심분리 (13,000 rpm, 30 min, 4°C)하여 상등액을 취하였다. 상등액을 30% 포화 ammonium sulfate를 만들기 위해 천천히 교반하면서, L 당 176 g의 ammonium sulfate (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 한 시간 동안 반응하였다. 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 취하였다. 다시 상등액에 L 당 160 g의 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 첨가하여 55% 포화 ammonium sulfate를 만들어 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 획득하였다. 침전물을 7 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 30°C분간 완전히 재현탁 하였다. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 침전물을 투석막 (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)에 넣고 1 L의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에서 10 시간 이상 투석 후 새로운 buffer에서 다시 투석을 실시하였다. 투석을 실시한 용액을 DEAE-Sepharose 컬럼 (2.5 × 20 cm)에 주입하여 NaCl의 농도를 0.1에서 0.5 M로 증가시키면서 1.25 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 위의 과정까지는 C₁,2O와 C₂,3O, 그리고 4,5-PCD 모두 같은 과정으로 이루어졌다. 용출액은 C₁,2O의 활성이 있는 부분을 모아서 단백질 정량을 실시하고, Q-Sepharose 컬럼에 주입하여 위의 컬럼 용출 방법과 동일하게 실시하고 유속은 1.0 ml/min으로 용액을 용출하였다. 4,5-PCD도 동일한 방법으로 실시하였다. C₂,3O의 경우 용출액에 C₂,3O의 활성이 있는 부분을 모아서 단백질 정량을 실시하고, 다시 DEAE-Sepharose 컬럼에 주입하여 같은 방법에 1.0 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 분취기로 모아서 효소 활성 측정을 통해 효소를 분리하였고 분리한 용액은 Bradford 방법(17)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다.

SDS-PAGE

컬럼을 통해 분리된 C₁,2O, C₂,3O, 그리고 4,5-PCD는 Bollag등의 방법(18)을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. 시료는 Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하여 동일량의 단백질을 주입하였고, 1 × sample buffer로 양을 맞추었다. 시료를 5분간 끓이고, 얼음에 식힌 후 주입하였다. 표지 단백질은 prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 전기영동은 100 V에서 2시간 30분간 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 염색하였고, gel destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1시간동안 처리한 후, gel destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)으로 8시간 처리하였다.

Dioxygenases의 활성 측정

C1,2O의 활성 측정은 Aoki 방법(6)에 의해서 실시하였다. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1.98 ml에 100 mM catechol이 10 μ l와 효소 용액을 10 μ l 첨가하여, 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 산물인 *cis,cis*-muconate의 몰 흡광계수 (molar extinction coefficient)는 19,000 $M^{-1}cm^{-1}$ 이며, 1 unit를 24°C에서 분당 1 μ mole의 *cis,cis*-muconate를 생산하는 효소량으로 정하고 특이 활성도 (specific activity)는 unit/mg으로 정하였다.

C2,3O의 활성 측정은 2-hydroxy-muconic semialdehyde의 생성에 의해 측정되는 Aoki방법(7)에 의해서 실시되었다. 1.98 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 10 μ l의 100 mM catechol, 그리고 효소의 정제과정을 통하여 분리된 시료를 첨가하여 375 nm에서 측정하였다. 반응 산물인 2-hydroxy-muconic semialdehyde의 몰 흡광계수는 33,000 $M^{-1}cm^{-1}$ 이며, 1 unit를 24°C에서 분당 1 μ mole의 2-hydroxy-muconic semialdehyde를 생산하는 효소량으로 정하고 특이 활성도는 unit/mg으로 정하였다.

4,5-PCD의 활성 측정은 4-carboxy-2-hydroxy-muconate-6-semialdehyde (CHMS)의 생성에 의해 측정되는 방법(11)으로 실시하였다. 1.98 ml의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 10 μ l의 50 mM protocatechuate, 그리고 효소의 정제과정을 통하여 분리된 시료를 첨가하여 410 nm에서 측정하였다. 반응 산물 4-carboxy-2-hydroxy-muconate-6-semialdehyde의 몰 흡광계수는 29,000 $M^{-1}cm^{-1}$ 이었으며, 1 unit를 24°C에서 분당 1 μ mole의 4-carboxy-2-hydroxy-muconate-6-semialdehyde를 생산하는 효소량으로 정하고 특이 활성도는 unit/mg으로 정하였다.

Dioxygenases의 특성 조사

C1,2O와 C2,3O, 그리고 4,5-PCD의 기질 특이성을 알아보기 위해서 catechol과 유사한 기질인 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 그리고 4-nitrocatechol을 0.33 mM의 동일한 농도로 첨가하였고, protocatechuate는 0.165 mM의 농도로 첨가하여 실시하였다. 온도에 따른 효소 활성 변화의 실험은 25°C-45°C에서 효소를 catechol과 10분간 반응시키고 0.4 N HCl로 반응을 멈추게 한 후 375 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 최적 pH를 조사하기 위하여 50 mM potassium phosphate buffer를 pH 5.0-7.0으로 변화시켜 활성 측정을 하였고, 50 mM Tris base buffer를 이용하여 pH 8.0-12.0에서의 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성의 억제제에 대한 실험에서는 억제제의 최종농도가 0.1 mM이 되게 첨가한 후에 2분간 효소반응을 실시하였다.

결과 및 고찰

Dioxygenases의 분리 및 정제

(1) Catechol 1,2-dioxygenase

Crude extract 상태인 효소용액의 단백질을 30-55%의 ammonium sulfate 침전을 통하여 절반이상으로 줄였으며, 음이온 교환체인 DEAE-sepharose 컬럼과 Q-sepharose 컬럼을 통과하여하여 최종적으로 얻어진 효소는 crude extract 비하여 10배 이상 농축된 것으로 나타났다. 최종적으로 분리된 효소는 회수율이 9.1%로 조사되었고, 특이활성 (specific activity)은 3.3 unit/mg을 나타냈다. Table 1(A)은 각 정제 단계에서 분리해 낸 효소 용액의 단백질 정량과 효소 활성을 보여주고 있다. 각 단계에서 얻은 시료를 SDS-PAGE 상에 전개하여

Table 1. Purification of dioxygenases, (A) C1,2O, (B) C2,3O, and (C) 4,5-PCD isolated from *Delftia* sp. JK-2

(A) C1,2O

Purification step	Vol. (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	21.0	120.7	38.2	0.3	100.0	1.0
Ammonium sulfate	7.0	42.3	30.3	0.7	79.4	2.3
DEAE-sepharose FF	5.0	8.8	16.9	1.9	44.2	6.1
Q-sepharose	2.0	1.1	3.5	3.3	9.1	10.6

(B) C2,3O

Purification step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	21.0	100.8	44.0	0.4	100.0	1.0
Ammonium sulfate	7.0	35.0	40.1	1.2	91.2	2.6
DEAE-sepharose FF	5.0	10.0	29.9	3.0	68.0	6.8
DEAE-sepharose FF	2.0	0.8	3.8	4.7	8.6	10.8

(C) 4,5-PCD

Purification step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	21.0	132.7	24.0	0.2	100.0	1.0
Ammonium sulfate	7.0	38.2	15.5	0.4	64.5	2.3
DEAE-sepharose FF	5.0	7.5	9.5	1.3	39.3	7.1
Q-sepharose	2.0	0.8	1.7	2.0	7.1	11.4

C2,3O의 정제여부를 확인하였고, 최종적으로 정제된 C2,3O의 분자량이 약 60 kDa임이 관찰되었다(Fig. 1). 본 연구에서 정제된 C1,2O의 분자량은 60 kDa인데 반해 *Frateuria* sp. ANA-18에서 38 kDa과 36 kDa인 CD I과 CD II를 분리하였고(6), *Acinetobacter calcoacticus* ADP-96에서는 분자량이 40 kDa인 C1,2O가 확인되었다(19).

(2) Catechol 2,3-dioxygenase

Crude extract 상태인 효소용액의 단백질 양을 30-55%의 ammonium sulfate 침전을 통하여 절반 이상으로 줄였으며, 음이온 교환체인 DEAE-Sepharose 컬럼에서 두차례 용출하여 최종적으로 얻어진 효소는 crude extract 비하여 10배 이상 농축된 것으로 나타났다. 최종적으로 분리된 효소는 회수율이 8.6%로 조사되었고, 특이활성은 4.7 unit/mg이었다. Table 1(B)은 각 정제 단계에서 분리해 낸 효소 용액의 단백질 정량과 효소 활성을 보여주고 있다. 각 단계에서 얻은 시료를 SDS-PAGE 상에 전개하여 C2,3O의 정제여부를 확인하였고, 최종적으로 정제된 C2,3O의 분자량이 약 35 kDa임을 관찰하였다(Fig. 1B). Gibson 등(20)이 보고한 *Comamonas* sp. JS765에서 분리된 C2,3O는 35 kDa으로 알려졌고, *Alcaligenes* sp. KF711로부터 분리된 C2,3O의 분자량이 35 kDa임을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(21).

(3) Protocatechuate 4,5-dioxygenase

Crude extract 상태인 효소용액의 단백질 양은 30-55%의 ammonium sulfate 침전을 통하여 절반 이상으로 줄였으며, 음이온 교환체인 DEAE-Sepharose 컬럼과 Q-Sepharose 컬럼을 통과하여 최종적으로 얻어진 효소는 crude extract 비하여 11배 이상 농축된 것으로 나타났다. 최종적으로 분리된 효소의 회수율은 7.1%로 조사되었으며, 고유활성은 2.0 unit/mg을 나타내었다. Table 1C는 각 정제 단계에서 분리해 낸 효소 용액의 단백질 정량과 효소 활성을 보여주고 있다. 각 단계에서 얻은 시료를 SDS-PAGE 상에 전개하여 C2,3O의 정제여부를 확인하였고, 최종적으로 정제된 4,5-PCD의 분자량이 약 62 kDa임을 관찰하였다(Fig. 1C). Arciero 등(22)이 분리한 4,5-PCD는 2개의 α -subunit과 2개의 β -subunit이 $\alpha_2\beta_2$ 로서 분

자량은 약 103 kDa이며, α -subunit과 β -subunit의 분자량은 각각 17.7 kDa과 33.8 kDa으로 보고되었다. *p*-Hydroxybenzoate에서 배양된 *Rhizobium leguminosarum*에서 분리된 4,5-PCD는 homodimer로 분자량이 120 kDa의 크기로 하나의 subunit의 분자량이 62 kDa인 것이 연구된 바 있다(23). 본 연구에서 분리된 4,5-PCD는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 나타났으며 분자량도 62 kDa으로 상기 연구에서 보고된 subunit의 크기와 동일하였으나, 실제로 아미노산이나 염기서열의 비교를 통하여 상동성을 확인하여야 할 것으로 판단된다.

기질 특이성

(1) Catechol 1,2-dioxygenase

분리된 C1,2O로 catechol과 그의 유사체인 다양한 기질에 대한 C1,2O의 기질 특이성을 조사하였다. JK-2에서 분리된 C1,2O의 경우는 catechol과 4-methylcatechol에 대해서는 각각 100%와 31.4%의 활성이 나타났고, 3-methylcatechol과 protocatechuate는 7.8%와 2.3%의 미약한 활성이 관찰되었고, 4-chlorocatechol과 4-nitrocatechol은 전혀 활성을 나타내지 않았다(Table 2). *Acinetobacter calcoacticus* ADP-96에서 분리된 C1,2O는 catechol을 비롯하여 4-methylcatechol, 3-methylcatechol, 그리고 2-isopropylcatechol에서 활성을 나타내었으며 이를 통하여 볼 때 이 균주는 넓은 범위의 기질특이성을 갖는 것으로 보고되었다(19).

Table 2. Substrate specificity of dioxygenases, C1,2O, C2,3O, and 4,5-PCD

Substrates	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		C1,2O	C2,3O	4,5-PCD
Catechol	0.33	100.0	100.0	0.0
3-Methylcatechol	0.33	7.8	0.0	0.0
4-Methylcatechol	0.33	31.4	13.8	0.0
4-Chlorocatechol	0.33	0.0	0.0	0.0
4-Nitrocatechol	0.33	0.0	0.0	0.0
Protocatechuate	0.17	2.3	3.5	100.0

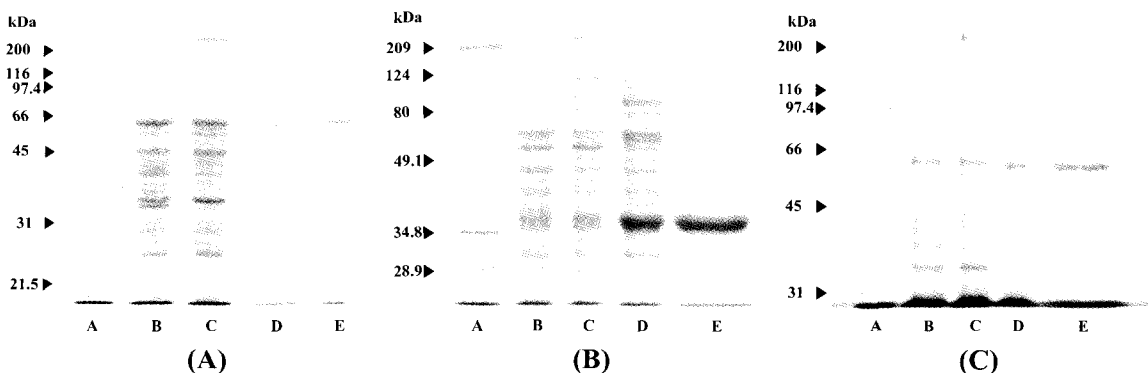


Figure 1. SDS-PAGE of purified dioxygenases, (A) C1,2O, (B) C2,3O, and (C) 4,5-PCD. A: marker (myosin-209 (200), β -galactosidase-124 (116), bovine serum albumin-80 (97.4), ovalbumin-49.1 (66), carbonic anhydrase-34.8 (45), soybean trypsin inhibitor-28.9(31)), B: crude cell extract, C: 30-55% saturated ammonium sulfate D: DEAE-Sepharose E: Q-Sepharose.

(2) Catechol 2,3-dioxygenase

분리된 C2,3O의 경우 기질로 catechol (100%)을 이용하였으며, 4-methylcatechol도 일부 (13.8%) 이용하는 것으로 관찰되었다. 그러나 catechol의 유사 기질인 3-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol 등은 기질로 이용하지 못하는 것으로 조사되었다. Aniline을 포함하는 액체배지에 배양하여 얻은 C2,3O는 특정 기질에 대해서만 활성을 갖는 것으로 나타났다(Table 2). Cerdan 등(9)은 *Pseudomonas putida*에 존재하는 TOL plasmid와 NAH plasmid 에서 각각 발현되는 C2,3O 사이에 나타나는 기질 특이성에 대해 연구하였는데, TOL plasmid에서 발현되는 C2,3O의 경우 catechol, 3-methylcatechol과 4-methylcatechol를 이용하였고, NAH plasmid에서 발현된 C2,3O의 경우는 3-methylcatechol을 이용하지 못하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 분리된 C2,3O는 *Pseudomonas putida*의 NAH plasmid에서 발현된 C2,3O와 유사한 기질능을 나타내었다.

(3) Protocatechuate 4,5-dioxygenase

분리된 4,5-PCD의 경우 기질로 protocatechuate (100%)를 이용하였으나, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol 등의 다른 기질들은 모두 이용하지 못하는 것으로 조사되었다(Table 2). *p*-Hydroxy-

benzoate 상에서 배양하여 얻은 4,5-PCD는 특정 기질에 대해서만 활성을 갖는 것으로 나타났다.

Dioxygenases의 온도에 대한 영향

Dioxygenases 활성에 온도가 미치는 영향 조사에서 C1,2O와 C2,3O의 적정 온도는 30-35℃로 30℃에서 최고의 활성을 나타내었고, 온도가 25℃ 이하로 떨어지거나 40℃ 이상으로 오를 때 활성이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2 A&B). *Acinetobacter radioresistens*에서 분리한 IsoA와 IsoB는 최적 온도가 30-45℃, 40℃로 JK-2에 비해 높은 온도에서도 활성을 지닌 것으로 보고되었다(8). 또한, C2,3O가 암호화된 *xylE* 유전자를 *Escherichia coli* W3110에 클로닝하여 대량 발현한 실험에서는 C2,3O 활성의 적정온도가 25℃, Phenol 분해 세균인 *Bacillus thermoleovorans* strain A2에서 분리된 C2,3O의 경우 적정온도는 70℃로 JK-2에서 분리된 C2,3O와는 최적온도에서 많은 차이를 보였다(12, 24). 4,5-PCD의 경우 적정온도는 27.5-32.5℃이며, 30℃에서 최고의 활성을 보였다(Fig. 2C).

Dioxygenases의 pH에 대한 영향

pH가 분리·정제된 dioxygenases의 활성에 미치는 영향에 대한 조사에서는 C1,2O의 경우 pH 5와 pH 12에서는 효소

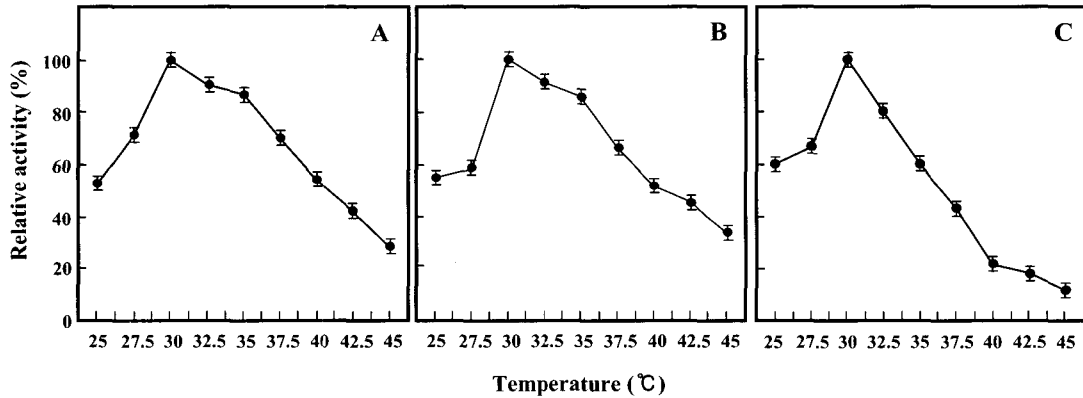


Figure 2. Effects of temperature on the activity of dioxygenases, (A) C1,2O, (B) C2,3O, and (C) 4,5-PCD. The relative activity was calculated as the activity at 30℃ was 100%.

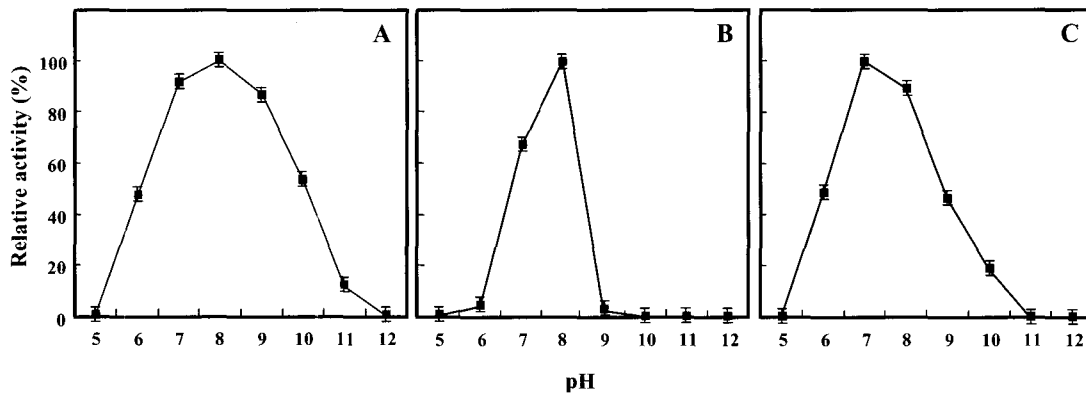


Figure 3. Effects of pH on the activity of dioxygenases, (A) C1,2O, (B) C2,3O, and (C) 4,5-PCD at pH 5-7 in 50 mM potassium phosphate buffer and at pH 8-12 in 50 mM Tris base buffer.

활성이 전혀 나타나지 않았으며, pH 6.0 이상에서 효소 활성이 나타나기 시작하여 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타내었다 (Fig. 3A). *A. radioresistens*에서 분리한 IsoA와 IsoB는 최적 pH가 6.6-8.5로 나타났는데, 본 연구에서 분리한 C1,2O와 비슷한 것으로 조사되었다(8). C2,3O는 pH 5와 pH 10-12사이에서는 활성이 전혀 나타나지 않았으며, pH 6.0이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타내는 것으로 조사되었다(Fig. 3B). *Escherichia coli* W3110에 분리된 C2,3O는 최적 pH가 7.5로 보고되었고, *Bacillus thermoleovorans* strain A2에서 분리된 C2,3O의 경우는 적정 pH는 7.2가 7.0으로 알려져 있다. 이것으로 보아 JK-2에서 분리된 C2,3O는 적정 pH가 보고된 연구들과 유사한 것으로 사료된다(12, 24). 4,5-PCD는 pH 5와 pH 10-12사이에서는 활성이 전혀 나타나지 않았으며, pH 6.0 이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 pH 7.0에서 최고의 활성을 나타내었다(Fig. 3C). Chen등(23)이 연구한 4,5-PCD의 경우 최적의 활성을 나타내는 pH가 9.5로 나타나 본 연구와는 다르게 약 염기에 안정한 것이 보고된 바 있다.

Dioxygenases에 미치는 중금속에 의한 영향

(1) Catechol 1,2-dioxygenase

중금속에 의한 C1,2O의 효소 활성 억제에 대한 조사에서 Hg^+ , Cu^{2+} 는 C1,2O에 대하여 각각 13.4%, 38.7%로 효소 활성이 저해되는 것으로 나타났으며, Ag^+ 같은 경우는 효소 활성을 완전히 저해하는 것으로 조사되었다(Fig. 4A). 그러나 Fe^{3+} 의 존재 하에서는 C1,2O의 효소활성이 약간 증가하는 것이 조사된 것으로 보아 이러한 현상은 C1,2O의 구조 내에 철을 포함하고 있기 때문에 Fe^{3+} 이온이 효소의 활성에 영향을 주지 않거나 효소의 활성을 증가되는 것으로 사료된다(25).

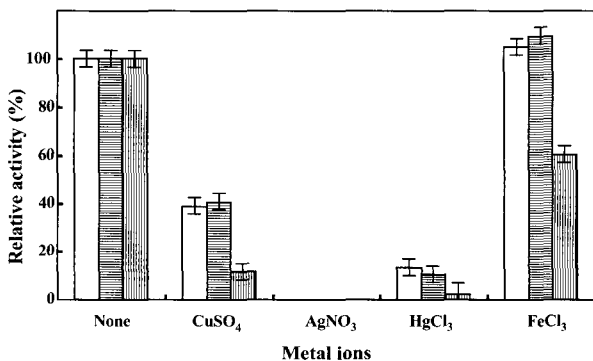


Figure 4. Effects of various metal ions on the activity of dioxygenases, C1,2O (□), C2,3O (▨), and 4,5-PCD (▩). The final concentration of inhibitor was 0.1 mM. Each bar represents the average of three independent experiments.

(2) Catechol 2,3-dioxygenase

중금속에 의한 C2,3O의 효소 활성 억제에 대한 조사에서 Hg^+ , Cu^{2+} 는 C2,3O에 대하여 각각 10.5%, 40.63%로 효소 활성이 저해되는 것으로 나타났으며, Ag^+ 같은 경우는 효소 활성을 완전히 저해하는 것으로 조사되었다(Fig. 4B). 그러나 Fe^{3+} 의 존재 하에서는 C2,3O의 효소 활성이 증가되었다. 이

러한 현상은 C2,3O의 구조 내에 철을 포함하고 있기 때문에 Fe^{2+} 이온이 효소의 활성에 영향을 주지 않거나 효소의 활성을 증가시키는 것으로 보고되고 있는데, 여기서 실험에 사용한 Fe^{3+} 또한 같은 철이온이기 때문에 영향을 미치지 않은 것으로 생각되어진다(25).

(3) Protocatechuate 4,5-dioxygenase

중금속에 의한 4,5-PCD의 효소 활성 억제에 대한 조사에서 Hg^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} 는 4,5-PCD에 대하여 각각 11.6%, 0%, 2.3%, 60.5% 정도로 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). Sugimoto등(26)이 연구한 벤젠 고리를 여는 dioxygenase와 Arciero등(22)이 분리한 4,5-PCD는 효소에 조효소로 철 이온을 포함하고 있어 철 이온에 안정한 것을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 정제된 4,5-PCD는 이전 연구와는 다르게 철 이온에도 불안정한 것으로 나타났다.

본 실험에서는 폐수 처리장에서 분리·동정한 *Delftia* sp. JK-2에서 생산된 C1,2O와 C2,3O, 그리고 4,5-PCD를 분리 정제하였다. 분리 정제된 C1,2O와 C2,3O, 그리고 4,5-PCD는 기질 특이성 및 pH, 온도, 중금속에 대한 영향도의 실험으로 물리 화학적 특성을 규명하였고, SDS-PAGE를 통한 정제 여부 조사에서는 분리된 C1,2O의 크기가 60 kDa, C2,3O는 35 kDa, 4,5-PCD는 62 kDa이 확인되었다. 본 연구에서 분리한 C1,2O 분자량의 경우 분자량이 60 kDa으로 이전에 분리된 것이 33-40 kDa인 것에 비해 상당한 차이가 있는 것으로 나타났으며(6, 19), 분자량이 35 kDa인 C2,3O는 이전에 연구된 것과 유사한 것으로 조사되었다(20, 21). Dioxygenases의 특성 실험에서는 C1,2O와 C2,3O가 catechol 이외에도 4-methylcatechol에 기질 특이성이 있는 것으로 조사되었고, C1,2O의 최적 활성이 나타나는 pH와 온도는 pH 8과 30°C로 *A. radioresistens*의 Iso A와 유사한 것으로 나타났다(7). 그리고 C2,3O는 이전 연구들에 나타난 C2,3O와 효소 활성 pH는 유사하나 최고 활성을 나타내는 온도에서는 차이가 있는 것으로 조사되었다(12, 24). 4,5-PCD의 경우 이전 연구에서는 구조상 여러 개의 subunit으로 구성되어 있는 4,5-PCD가 연구가 이루어졌는데, 본 연구에서 분리된 4,5-PCD가 하나의 subunit 크기와 비슷한 것으로 보아 분리된 효소의 구조 실험이 필요한 것으로 사료된다(23). 향후 본 연구는 얻어진 결과를 바탕으로 정제된 C1,2O와 C2,3O, 그리고 4,5-PCD의 N-terminal sequencing을 통해 primer를 제작하여 PCR 기법을 통한 DNA sequencing을 실시하여 위의 세 효소들의 유전자 서열을 조사하고, 이들을 probe로 이용한 southern blotting을 하여 C1,2O와 C2,3O, 그리고 4,5-PCD의 유전자를 cloning 실험하는데 이용할 것이다.

요 약

본 연구의 목적은 방향족 화합물인 aniline, benzoate, *p*-hydroxybenzoate를 분해할 수 있는 *Delftia* sp. JK-2에서 이들 각 기질에서 배양시 다른 종류의 dioxygenases를 분리 정제하고, 정제된 dioxygenases의 특성을 조사하기 위하여 실시하기 위한 것이다. 기질로서 benzoate, aniline, 또는 *p*-hydroxybenzoate에 따라 분리된 dioxygenases는 각각

catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O), catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O), 그리고 protocatechuate 4,5-dioxygenase (4,5-PCD)였다. 각 dioxygenases의 특성을 조사하기 위하여 먼저 benzoate, aniline 또는 *p*-hydroxybenzoate에서 배양한 *Delftia* sp. JK-2 세포를 초음파 분쇄기로 파쇄하여, ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose, 그리고 Q-sepharose의 순서로 정제하여 농축하였다. 정제·농축된 dioxygenases의 특이 활성도를 보면 C1,2O는 3.3 unit/mg, C2,3O는 4.7 unit/mg이고, 4,5-PCD는 2.0 unit/mg이다. C1,2O와 C2,3O의 기질 특이성 조사에서는 catechol과 4-methylcatechol에서 두 효소 모두 효소 활성이 나타났으며, C1,2O에서는 3-methylcatechol에서 약간의 활성이 확인되었고, 4,5-PCD는 protocatechuate에서만 효소 활성을 보여주었다. C1,2O와 C2,3O는 30°C와 pH 8.0에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 조사되었으며, 4,5-PCD는 30°C와 pH 7.0에서 최적의 활성이 조사되었다. *Delftia* sp. JK-2에서 정제된 C1,2O와 C2,3O의 효소활성은 Ag^+ , Hg^+ , 그리고 Cu^{2+} 에 의해 억제되는 것으로 나타났으며, 4,5-PCD의 경우에는 Ag^+ , Hg^+ , 그리고 Cu^{2+} 뿐만 아니라 Fe^{3+} 에 의해서도 효소 활성이 억제되는 것이 확인되었다. C1,2O, C2,3O, 4,5-PCD의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 각각 60 kDa, 35 kDa, 62 kDa로 측정되었다.

REFERENCES

- Lyons, C. D., S. Katz, and R. Bartha (1984), Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 491-496.
- Provident, M. A., J. Mampel, S. Macsween, A. M. Cook, and R. C. Wyndham (2001), *Comamonas testosteroni* BR 6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate, *Microbiology* **147**, 2157-2167.
- Liu, Z., H. Yang, Z. Huang, P. Zhou, and S. J. Liu (2002), Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 679-682.
- Masai, E., K. Momose, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, and M. Fukuda (2000), Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxy-6-semialdehyde dehydrogenases and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *J. Bacteriol.* **182**, 6651-6658.
- Kim, S. I., S. H. Kim, and Y. N. Lee (1993), Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from aniline degrading *Achromobacter* gr. D.V.K-24, *Kor. J. Microbiol.* **31**, 579-585.
- Aoki, K., K. Ohtsuka, and R. Shinke (1984), Rapid biodegradation of aniline by *Frateria* species ANA-18 and its aniline metabolism, *Agric. Biol. Chem.* **48**, 865-872.
- Aoki, K., Y. Nakanishi, S. Murakami, and R. Shinke (1990), Microbial metabolism of aniline through a meta-cleavage pathway: Isolation of strains and production of catechol 2,3-dioxygenase, *Agric. Biol. Chem.* **54**, 205-206.
- Briganti, F., E. Pessione, C. giunta, and A. Scozzafava (2000), Purification and catalytic properties of two catechol 1,2-dioxygenase isozyme from benzoate-grown cells of *Acinetobacter radioresistens*, *J. Prot. Chem.* **19**, 709-716.
- Cerdan, P., M. Rekik, and S. Harayama (1995), Substrate specificity differences between two catechol 2,3-dioxygenases encoded by the TOL and NAH plasmids from *Pseudomonas putida*, *Eur. J. Biochem.* **229**, 113-118.
- Fukumori, F. and C. P. Saint (1997), Nucleotide sequence and regulational analysis genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1), *J. Bacteriol.* **170**, 399-408.
- Ground, E. and H. J. Kutzner (1998), Utilization of quinate and *p*-hydroxybenzoate by *actinomycetes*; key enzymes and taxonomic relevance, *J. Basic. Microbiol.* **38**, 241-255.
- Kobayashi, T., T. Ishida, K. Horiike, Y. Takahara, N. Numao, A. Nakazawa, T. Nakazawa, and M. Nozaki (1995), Overexpression of *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase with high specific activity by genetically engineered *Escherichia coli*, *J. Biochem.* **117**, 614-22.
- Schreiner, A., K. Fuchs, F. Lottspeich, H. Poth, and F. Lingens (1991), Degradation of 2-methylaniline in *Rhodococcus rhodochrous*: cloning and expression of two clustered catechol 2,3-dioxygenase genes from strain CTM, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2041-2048.
- Yoko, N., S. Murakami, R. Shinke, and K. Aoki (1991), Induction, purification, and characterization of catechol 2,3-dioxygenase from aniline-assimilating *Pseudomonas* sp.FK-8-2, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1281-1289.
- Delneri, E., G. Degrassi, R. Rizzo, and C. V. Brushi (1995), Degradation of *trans*-ferulic and *p*-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586, *Biochim. Biophys. Acta.* **9**, 363-367.
- Cho, Y. S., H. Y. Kahng, H. W. Chang, and K. H. Oh (2000), Characterization of aniline-degrading bacterium, *Delftia* sp. JK-2 isolated from activated sludge of municipal sewage treatment plant, *Kor. J. Microbiol.* **36**, 79-83.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein (1996), Gel Electrophoresis under Denaturing Condition, 2nd ed., pp107-172, New York, NY, USA.
- Patel, R. N., C. T. Hou, A. Felix, and M. O. Lillard (1976), Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties, *J. Bacteriol.* **127**, 536-544.
- Parales, R. E., T. A. Ontl, and D. T. Gibson (1997), Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp. JS765, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 385-391.
- Moon, J., K. R. Min, C. K. Kim, K. H. Min, and Y. Kim (1996), Characterization of the gene encoding catechol 2,3-dioxygenase of *Alcaligenes* sp. KF711: overexpression, enzyme purification, and nucleotide sequencing, *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 248-254.
- Arciero, D. A., J. D. Lipscomb, B. H. Huynh, T. A. Kent, and E. Munck (1983), EPR and mossbauer studies of protocatechuate 4,5-dioxygenase, *J. Biol. Chem.* **258**, 14981-14991.
- Chen, Y. P. and C. R. Lovell (1994), Purification and properties of a homodimeric protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Rhizobium leguminosarum*, *Arch. Microbiol.* **161**, 191-195.
- Milo, R. E., F. M. Duffner, and R. Muller (1999), Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability, *Extremophiles* **3**, 185-190.
- Broderick, J. B. (1999), Catechol Dioxygenases, pp173-189, Academic Press, London, UK.
- Sugimoto, K., T. Senda, H. Aoshima, E. Masai, M. Fukuda, and Y. Mitsui (1999), Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions, *Structure* **7**, 953-965.