

Pseudomonas rhodesiae H5가 생산하는 Parathion Hydrolase의 특성

윤남경 · 박경량*

한남대학교 이과대학 미생물학과

Pseudomonas rhodesiae H5가 생성하는 parathion hydrolase를 (NH₄)₂SO₄ 침전, DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography, Sephadex gel filtration의 단계로 정제한 결과, 이 균주가 생성하는 parathion hydrolase는 두 종류의 효소였으며, 이를 각각 OPH I₁과 OPH I₂라 명명하였다. OPH I₁과 OPH I₂의 최적 pH와 온도는 각각 pH7.2, 30°C와 pH7.6, 37°C이었다. OPH I₁의 parathion을 가수분해하는 활성화 에너지는 4°C~30°C에서 3.01 kcal/mol이었으며 Km값은 69.2 μM이었다. 반면, OPH I₂의 활성화 에너지는 4°C~37°C에서 4.07 kcal/mol이었으며 Km값은 150.9 μM이었다. OPH I₁은 1 mM의 Mg²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺에 의해서 효소활성이 완전 저해되었으나 OPH I₂는 저해를 덜 받는 것으로 확인되었다.

Key words □ enzyme purification, parathion hydrolase (OPH), *Pseudomonas rhodesiae* H5

서 론

유기인제(organophosphates) 살충제인 parathion (*O,O*-diethyl-*O-p*-nitrophenyl phosphorothioate), malathion (*O,O*-dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxyethyl)dithiophosphate), fenitrothion (*O,O*-dimethyl-*O-p*-nitro-*m*-tolyl phosphorothioate) paraoxon (*O,O*-diethyl *O-p*-nitrophenyl phosphate)과 화학 무기 용제(chemical warfare agents)인 soman (*O-1,2,2*-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate), sarin(*O*-isopropyl methylphosphonofluoridate), tabun (ethyl *N,N*-dimethylphosphor amidocyanidate) 그리고 diisopropylfluorophosphate (DFP) 등은 인간에게 매우 유독하여 choline esterase뿐만 아니라 phosphatase, lipase, trypsin 등 다양한 효소들을 억제한다(4, 19). 또 인체에 흡수된 유기인제는 직접 cholinesterase를 억제하기도 하지만 cholinergic activity를 나타내기도 한다.

일반적으로 유기인제 화합물들은 신경세포의 시냅스 간극(synaptic cleft) 안으로 침투하여 acetylcholinesterase (AChE)의 활성부위에 있는 serine 잔기와 비가역적으로 결합하므로서 AChE의 아세틸콜린(acetylcholine) 가수분해 기능을 억제시킨다(4, 9, 19). 이 결과 중추신경 및 말초신경계의 시냅스 간극에 아세틸콜린이 과도하게 축적되어 지속적인 choline effect를 나타낸다. 그러나 이들 유기인제 화합물들은 여러 효소에 의해서 가수분해 된다(11, 13, 15).

유기인제 화합물(organophosphate compound)을 분해시키는 대표적인 효소에는 organophosphorus acid hydrolase (OPH; EC 3.1.8.1)와 organophosphorus acid (OPA) anhydrolase (OPA; EC 3.1.8.2)가 있다. OPH는 phosphotriesterase라 불리는데, 이 효소는

paraoxon, DFP, soman, sarin, tabun 등 다양한 유기인제 화합물들을 분해시킬 수 있다(1, 5, 6). 이 효소는 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacterium* sp. strain (ATCC 27551)으로부터 분리된 효소로(7, 14, 16), OPH를 암호화하는 *opd* 유전자 또한 밝혀져 있다(16). 두 번째 효소인 organophosphorus acid (OPA) anhydrolase, 일명 OPAA-2는 *Alteromonas* sp. strain JD6.5로부터 최초로 발견되었고(5), 이 효소도 OPH와 마찬가지로 다양한 종류의 유기인제를 분해시킬 수 있으나, OPH보다 soman 분해 능력이 더 큰 반면, paraoxon 분해능력은 떨어진다고 밝혀져 있다(1, 5, 6). *Alteromonas undida*(3)와 *Alteromonas haloplanktis* C (ATCC 23821)(12)로부터 발견된 세 번째 효소인 OPAA는 서로 유사한 성질을 가지고 있으며, 원래 proline 잔기가 carboxyl 말단쪽에 위치한 dipeptide, 즉 X-Pro의 펩티드 결합을 가수분해하는 활성을 가진 prolidase로 알려져 왔다. 그런데 최근 prolidase가 X-Pro의 펩티드 결합을 가수분해할 뿐만 아니라 DFP를 비롯한 G-계열 신경작용제의 P-F 결합도 가수분해하는 기능을 가지고 있다고 보고되어 prolidase를 OPAA라 부르고 있으며, 일반적으로 G-계열의 작용제의 P-F결합이 가수분해되면 작용제의 독성 효과가 사라지기 때문에 prolidase를 G-계열작용제의 효소 제독제로 사용하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

parathion본 연구는 본 실험실에서 분리한 *Pseudomonas rhodesiae* H5가 독성과 휘발성이 낮고 용해성이 우수한 parathion을 기질로 이용 했을때 생성하는 parathion hydrolase를 정제하여 그 특성조사를 실시하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험실에서 분리한 parathion 분해균주인 *P. rhodesiae* H5

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-7626, Fax: 042-629-8355
E-mail: krpark@hannam.ac.kr

를 실험에 사용하였다(21).

단백질 정량

전체 단백질 농도 측정은 Bradford(2)방법을 사용하였다. Bio-rad protein assay kit (BIO-RAD, Canada) 내의 dye 용액을 D.W.로 1:4로 희석한 용액 5 ml에 시료 100 μ l를 첨가하여 강하게 교반한 후 Spectronic Genesys 5 (Milton Roy, USA) 분광광도계를 이용하여 protein assay kit의 사용설명서에 표기된 것처럼 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였으며 단백질 농도는 BSA (bovin serum albumin)를 이용한 표준곡선을 작성하여 산출하였다.

효소 활성 측정

Parathion hydrolase 활성은 Walter와 Kams(22)의 방법으로 측정하였다. parathion 10 mg을 1 ml의 methanol에 녹이고, 0.1% Triton X-100이 첨가된 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 완충액에 첨가하여 parathion의 최종 농도를 172 μ M이 되도록 조정하여 기질 용액으로 사용하였다. 효소의 활성은 시료 0.2 ml에 위의 기질 용액 2.8 ml를 첨가하여 30°C에서 1분간 반응시킨 후, Spectronic Genesys 5 (Milton Roy, USA) 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였다.

효소활성은 parathion을 1분동안 1 μ mol의 *p*-nitrophenol (*p*NP)를 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1 unit으로 환산하였으며, 405 nm에서 *p*NP (pH 8.5)의 molar extinction coefficient는 16,500 $M^{-1}cm^{-1}$ 이다.

효소 정제

P. rhodesiae H5이 생성하는 hydrolase의 분리를 위해 LB 배지 3 L에 균을 배양한 후, 배양액을 4°C에서 6,000 \times g로 10분 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 수확하였다. 이 균체를 20 mM potassium phosphate buffer로 3번 세척하고 동일 완충액 100 ml로 현탁시킨 후, 얼음에서 30초 파쇄 후 40초 쉬는 방법으로 7분간 파쇄를 5번 반복 (output watts 14W; Vibra-Cell, Sonics and Material Inc., USA)하는 초음파 분쇄 후 4°C에서 10,000 \times g로 20분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 조효소액은 20%-35%의 ammonium sulfate로 침전시키고 4°C에서 10,000 \times g로 20분간 원심분리한 후 20 mM potassium phosphate (pH 7.2) 완충액 8 ml에 녹여 4°C에서 24시간 Spectrum Medical Industries, Inc., MWCO: 12-14,000 (VWR Scientific, USA) 투석막을 이용하여 투석하였다. 이렇게 얻어진 효소액은 20 mM potassium phosphate (pH 7.2) 완충용액으로 평형화된 DEAE-toyopearl 650M으로 충전된 column (2.5 \times 20 cm)에 유속을 0.5 ml/min로 하여 1,200분 동안 600 ml의 완충액을 흘려주면서 단백질을 용출한 후, 다시 0.4 M-0.7 M NaCl-potassium phosphate (pH 7.2) 완충액을 흘려주며 단백질을 용출하였다. 용출된 시료는 280 nm에서 흡광도로 측정하여 hydrolase 활성을 띠는 분획을 모두 모아서 동결 건조시킨 후 2 ml의 20 mM

potassium phosphate (pH 7.2) 완충액에 다시 녹인 후 1 ml을 20 mM potassium phosphate (pH 7.2) 완충용액으로 평형화 한 Sephadex G-200 (Pharmacia, USA)으로 충전된 column (1 \times 90 cm)에 주입하였다. 이때 유속은 0.25 ml/min로 800분간 총 200 ml의 완충액을 흘려주었고, 각 분획마다 hydrolase 활성을 측정하였다.

F⁻이온의 측정

DFP으로 부터의 F⁻이온의 방출은 DeFrank(4)과 Hoskin(8)방법을 이용하여 측정하였다. 50 mM NaCl, 50 mM Bis-Tris propane (pH 7.2), 3 mM DFP, 1 mM MnCl₂ · 4H₂O의 반응용액 2.5 ml에 25 μ l의 효소를 첨가하여 25°C에서 천천히 혼합하면서 F⁻이온농도 측정전극을 이용하여 10초 단위로 10분간 측정하였다. 이때 효소를 반응액에 먼저 1분간 첨가하여 반응시키고 1분후에 DFP를 첨가하였고, 효소를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였다. F⁻이온 방출량의 표준곡선은 NaF₃를 200 ml magnesium acetate (pH 4.5) 완충액에서 10⁻² - 10⁻⁷으로 희석하여 F⁻이온농도 측정전극으로 측정하여 사용하였다.

효소 특성 조사

정제된 효소의 최적 온도는 20 mM potassium phosphate (pH 7.2) 완충액에 효소를 첨가한 후 반응액의 온도를 10°C~70°C로 변화시키며 효소 활성을 측정하였다. 효소의 최적 pH는 pH에 따라 각각의 완충액 즉, glycine-HCl (pH 2.2~3.5), sodium acetate (pH 3.5~5.5), Tris-malate (pH 5.5~6.5), potassium phosphate (pH 7.0~9.0), glycine-NaOH (pH 9.5~12.0)에서 효소를 4°C, 24시간 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 pH에 따른 효소활성을 조사 하였다. 또 효소를 20 mM potassium phosphate (pH 7.2) 완충액에서 0.4 mM과 1 mM의 CaCl₂ · 2H₂O, CoCl₂ · 6H₂O, CsCl₂, CuCl₂ · 2H₂O, FeCl₃ · 6H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, MnCl₂ · 4H₂O, NiCl₂ · 6H₂O, ZnCl₂ · 7H₂O의 금속이온과 함께 37°C에서 1시간 동안 배양 후, 172 μ M의 parathion을 첨가하고 남아있는 효소 활성을 측정하여 금속이온에 대한 효과를 조사하였고, Km값은 parathion 농도를 10 μ M에서 172 μ M까지 변화시켜 가면서 parathion hydrolase 활성도를 측정한 후, Lineweaver-Burk plot을 그려 결정하였다.

결과 및 고찰

Parathion hydrolase의 정제

P. rhodesiae H5 균주가 분비하는 parathion hydrolase를 정제하기 위하여 LB 배지 3 L에서 24시간 배양한 후 세포를 수확하고, 초음파로 파쇄하여 얻은 조효소액을 20~35%의 ammonium sulfate로 침전시켜 얻은 추출물을 가지고 단백질 농도 및 효소활성을 측정된 결과, parathion hydrolase 효소활성은 총 4454.5 unit으로서 조효소액에 비해 1.98배 농축 되었으며 회수율은 21%임을 확인하였다(Table 1).

또 ammonium sulfate로 침전 후 투석한 조효소액을 DEAE-

Table 1. Purification of parathion hydrolase from *P. rhodesiae* H5

Fraction	Total protein (mg) OPH I ₁ /OPH I ₂	Total activity(U ^a) OPH I ₁ /OPH I ₂	Specific activity (U/mg) OPH I ₁ /OPH I ₂	Yield (%) OPH I ₁ /OPH I ₂	Fold OPH I ₁ /OPH I ₂
Crude extract	818 ^b	21212	25.9	100.0	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	86.9	4454	51.2	21	1.98
DEAE-Toyopearl 650M	8.82/5.66	575/333	65.3/58.9	2.7/1.57	2.52/2.28
Sephadex G-200	0.249/0.0535	197/30.3	789/566	0.93/0.14	30.46/21.86

^aOne unit of enzyme activity was defined as the amount which produced 1 μM *p*-nitrophenol per min at 30°C.

^bSingle values represent a mixture of OPH I₁ and OPH I₂.

toyopearl 650M column에서 0-1 M NaCl gradient 과정으로 용출하여 parathion hydrolase 활성과 단백질량을 조사한 결과 (Fig. 1), 2개의 parathion hydrolase 분획이 검출되어, 각각 OPH I₁과 OPH I₂로 명명하고 각 분획을 모아 단백질양과 활성을 측정한다. 결과, OPH I₁의 효소활성은 575.8 unit로 조효소액에 비해 2.52 배 농축되고 2.71%의 회수율을 나타냈으며, OPH I₂의 효소활성은 333.3 unit로 조효소액에 비해 2.28배 농축되었고 1.57%의 회수율을 나타냈다.

또한 Sephadex G-200에서 gel filtration을 수행한 결과, OPH I₁과 OPH I₂는 각각 효소활성이 30.46배와 21.86배로 농축되었고, 회수율은 각각 0.93%와 0.14%으로 나타났다. 이는 Mullbry[17]가 보고한 *Flavobacterium* sp.의 parathion hydrolase 정제시의 478 배 농축과, Strain B-1의 311배 농축 보다는 낮게 나왔으나 Strain SC의 2.2배의 농축보다는 높게 나타난 결과이다.

그러나 각 단계에서 정제된 단백질을 12% SDS-polyacrylamide

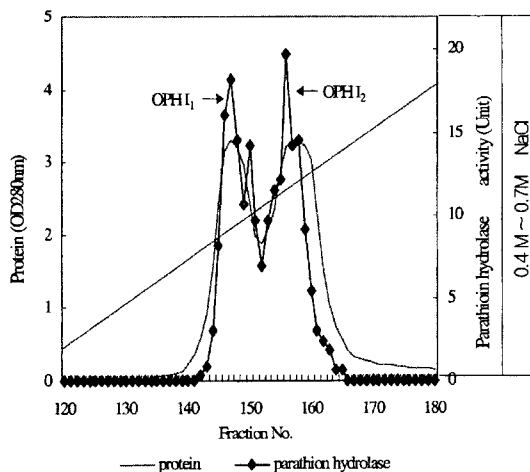


Fig. 1. Purification of parathion hydrolase from *P. rhodesiae* H5. Harvested cells were suspended in 100 ml of buffer A (20 mM Potassium phosphate, pH 7.2) and disrupted with sonicator (output watts 14-W; Vibra-Cell, Sonics and Material Inc.). The supernatant was subjected to 20-35% ammonium sulfate precipitation and dialyzed against buffer A. The enzyme solution was applied to a DEAE-Toyopearl 650M column(2.5 by 20 cm) and eluted with a (dotted line) 0.4 M to 0.7 M NaCl gradient at a flow rate of 2 ml/min for 1,200 min. Twenty ml fractions were collected, and the enzyme activity (closed rhombus) and A 280 (solid line) of each reaction were determined. Active peaks were eluted from a DEAE-Toyopearl column at 0.45 and 0.5 M NaCl.

gel로 전기영동한 결과 gel filtration으로 정제한 단백질도 몇 개의 단백질 밴드가 남아있어 이 두개의 효소분획은 완전 정제된 parathion hydrolase가 아닌 부분 정제된 효소임을 알 수 있었다.

Parathion hydrolase의 특성

부분 정제된 두 효소, OPH I₁와 OPH I₂의 최적 pH (Fig. 2)를 조사한 결과 OPH I₁의 최적 pH는 pH 7.2 였고 산성보다는 약 알칼리성에서 효소 활성이 비교적 우수한 것으로 나타났다. 그러나 OPH I₂의 최적 pH는 pH 7.6으로 OPH I₁과 유사한 약 알칼리성이 최적이지만, OPH I₁은 pH 6.0부터 pH 9.0까지 효소 활성을 유지 하는데 비해 OPH I₂는 pH 4.0부터 pH 9.0까지의 비교적 넓은 범위에서 효소활성이 유지되어 OPH I₁보다 활성pH 범위가 넓은 것을 확인할 수 있었다.

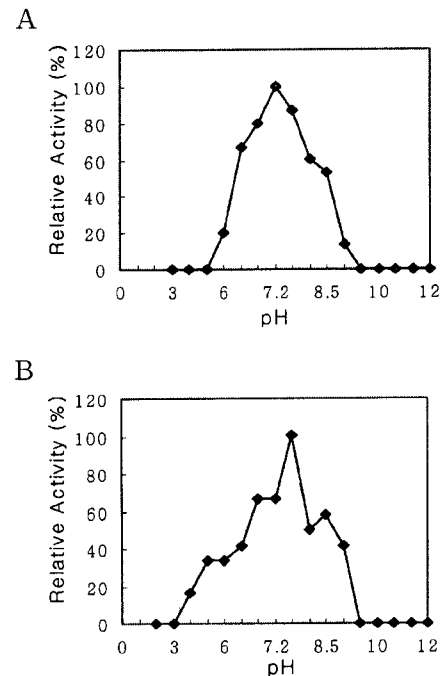


Fig. 2. Effect of pH on the activity of parathion hydrolase. The activity was measured at various pH values, and presented as a percentage of the maximum activity, taken as 100%. Used buffers (final concentration, 20 mM) were sodium acetate (pH 4.0 to 5.0); Tris-malate (pH 6.0); potassium phosphate (pH 7.0 to 7.6); Tris-HCl (pH 8.0 to 8.5); and glycine-NaOH (pH 9.0 to 12). A. OPH I₁ B. OPH I₂

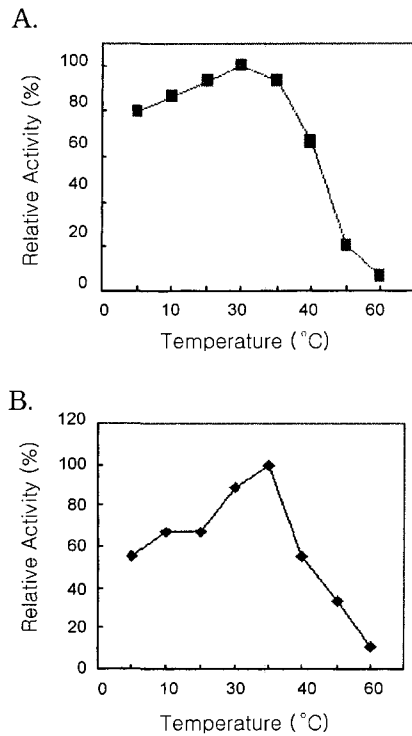


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of parathion hydrolase. The enzyme was incubated with a mixture containing 20 mM potassium phosphate (pH 7.2), and 172 μM parathion at various temperatures for 1 hr, and *p*-nitrophenol formed was measured. The obtained at 30°C was taken as 100% (OPH I₁). The obtained at 37°C was taken as 100% (OPH I₂). A. OPH I₁ B. OPH I₂

또 두 효소의 최적 온도를 조사한 결과(Fig. 3), OPH I₁는 5°C의 낮은 온도에서도 80%정도의 활성을 유지하다가 30°C에서 최적 활성을 나타내고 40°C이후에 효소활성이 급격히 감소하여 비교적 넓은 범위에서 효소활성을 유지한데 비해, OPH I₂는 37°C에서 최대 효소 활성을 나타내지만 효소활성은 거의 30°C-40°C 사이에서만 유지되어 좁은 온도범위를 갖고 있음을 확인하였다. 이같은 결과는 *Flavobacterium* sp.(17)에서 정제된 최적 활성 온도가 40°C인 parathion hydrolase와는 다른 결과이다.

화학반응이 일어나는 데 필요한 최소한의 에너지인 활성화 에너지는 이 값이 크면 반응 속도가 느리기 때문에 반응하기가 어렵다. 본 실험에서 정제된 효소의 활성화 에너지를 조사해본 결과, parathion hydrolase가 parathion을 가수분해할 때의 OPH I₁ 효소의 활성화 에너지는 4-30°C 범위에서 3.01 kcal/mol이었으며, 37°C이상의 온도에서는 14.7 kcal/mol의 활성화 에너지값을 나타내 점진적으로 효소활성이 사라짐을 확인하였다. 반면, OPH I₂의 활성화 에너지는 4-37°C 범위에서 4.07 kcal/mol이었으며, 40°C이상의 온도에서는 9.76 kcal/mol의 활성화 에너지값을 나타내 이 온도 이상에서는 반응하기 어려운 것으로 확인되었다(Fig. 4).

부분 정제된 두 효소에 각각 CaCl₂ · 2H₂O, CoCl₂ · 6H₂O, CsCl₂, CuCl₂ · 2H₂O, FeCl₃ · 6H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, MnCl₂ · 4H₂O,

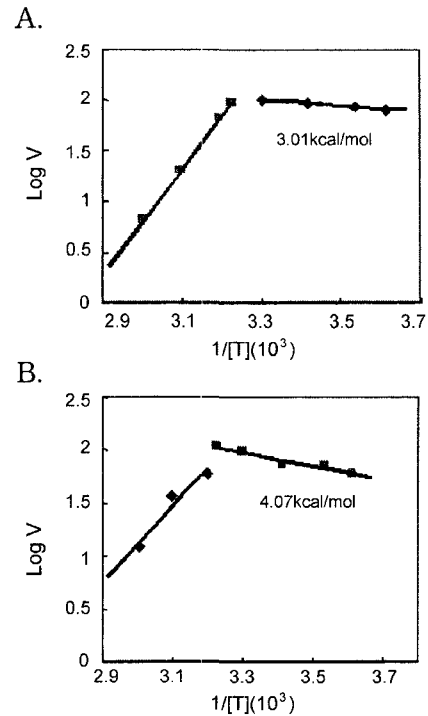


Fig. 4. Arrhenius plot of temperature dependence. The logarithm of the specific activity (V) (in micromoles per milligram per minute) was plotted against the reciprocal of absolute temperature (T). The values shown are activation energy calculated from the linear part of the plot. A. OPH I₁ B. OPH I₂

NiCl₂ · 6H₂O, ZnCl₂ · 7H₂O 등의 다양한 금속이온들과 반응 시켜 이들 효소에 대한 중금속들의 저해 효과를 조사해 본 결과(Table 2), 0.4 mM의 농도로 Mg²⁺, Cu²⁺와 Fe³⁺을 처리한 경우 OPH I₁은 각각 약 62%, 39%, 69%의 효소활성을 유지하고 OPH I₂는 46%, 36%, 64%의 효소활성을 유지해 OPH I₁이 OPH I₂보다 약간 저해를 덜 받는 것으로 나타났다. 그러나 0.4 mM의 농도로 처리한 나머지 금속이온은 OPH I₁ 보다 OPH I₂ 이 모두 저해를 덜 받는 것으로 확인되었다. 또 각 금속을 1 mM로 첨가한

Table 2. Effects of metal ions on parathion hydrolase (OPH I₁ and OPH I₂)

Metals	Remaining activity(%)			
	OPH I ₁		OPH I ₂	
	0.4 mM	1 mM	0.4 mM	1 mM
No addition	100	100	100	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	61.5	0	63.6	45.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	53.9	15.4	72.7	18.2
CsCl ₂	38.5	7.7	45.5	45.5
CuCl ₂ ·2H ₂ O	38.5	0	36.4	27.3
FeCl ₃ ·6H ₂ O	69.2	53.8	63.6	9.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	61.5	0	45.5	36.4
MnCl ₂ ·4H ₂ O	23.1	23.1	45.5	27.3
NiCl ₂ ·6H ₂ O	46.2	0	54.5	27.3
ZnCl ₂ ·7H ₂ O	46.2	15.4	63.6	27.3

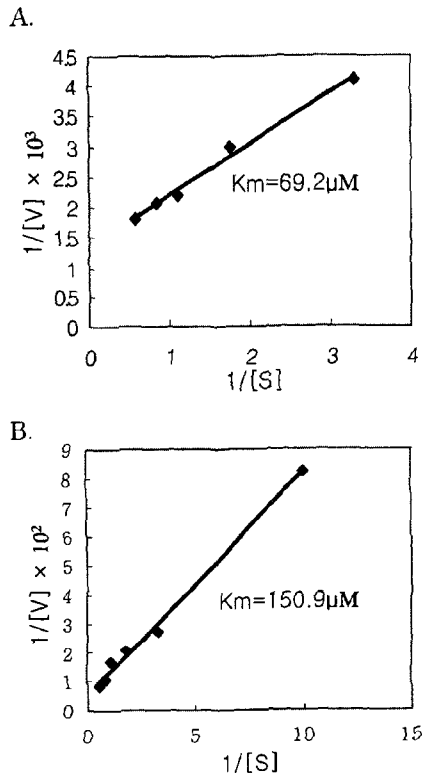


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of partial purified parathion hydrolase. A. OPH I₁, B. OPH I₂

농도에서는 Fe³⁺만 OPH I₁이 56%의 저해를 받아 OPH I₂의 91% 저해보다 효소활성을 높게 유지했을 뿐 나머지 모든 금속은 OPH I₂이 저해를 덜 받는 것으로 나타났다. 특히 1 mM의 Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺을 처리할 경우에는 OPH I₁의 효소활성은 완전히 소실되었으나 OPH I₂는 각각 46%, 27%, 36%, 27%의 효소활성이 남아 있는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 금속이온에 대한 효소활성의 저해는 Serdar(19)의 논문에서 확인된 0.2 mM과 1 mM의 Co²⁺에서 parathion hydrolase의 활성이 6배와 20배 증가하는 결과와는 다르지만 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해 활성이 저해되는 양상은 비슷하였다.

Lineweaver-Burk 식을 이용하여 parathion hydrolase의 K_m 값을 알아본 결과 OPH I₁은 69.2 μM을 나타냈으며, OPH I₂는 150.9 μM을 나타내 OPH I₁의 기질 친화도가 OPH I₂보다 높음을 알 수 있었다(Fig 5). 그러나 본 실험에서 조사된 OPH I₁의 K_m 값은 Mulbry[17]에 의해서 밝혀진 *Flavobacterium* sp., strain SC의 K_m 값인 91 μM과 106 μM보다 친화성이 좋지만 Strain B-1의 25 μM 보다는 친화성이 낮은 것으로 그리고 OPH I₂는 기질친화성이 이들 균주가 생성하는 효소보다 모두 낮은 효소임이 확인되었다.

F⁻ 이온의 방출

DFP로부터 F⁻ 이온의 방출을 측정할 결과 DFP의 F⁻ 이온의 자연 방출은 100초 후에 15.98 mg/L이었고, 초음파로 분쇄하여 얻는 조효소액과 (NH₄)₂SO₄로 침전시킨 시료의 F⁻ 방출은 각

각 16.17 mg/L이었다. 그리고 DEAE-Toyopearl 650M과 sephadex G-200을 거친 OPH I₁의 시료의 F⁻ 이온의 방출은 각각 25.65 mg/L과 38.76 mg/L이었다. 반면 DEAE-Toyopearl 650M과 sephadex G-200을 거친 OPH I₂의 시료는 24.51 mg/L과 40.62 mg/L의 F⁻ 이온이 방출되었다. 이는 parathion 분해능이 있는 *Flavobacterium* sp. ATCC 27551와 *Pseudomonas diminuta* MG가 DFP를 분해하는 것과 비슷한 결과이다(16). 그러나 *Alteromonas haloolanktis* C가 분해하는 58.7 mg/L에 비해서는 DFP 분해 활성이 낮은 결과이다(10), 따라서 DFP 분해 활성을 비교한 결과에서도 OPH I₁과 OPH I₂는 다른 효소임을 확인 수 있었다.

이상과 같이 추후 유기인제 화합물을 분해시키는 효소를 대량 생산하기 위한 기초연구로 활용하고자 하기 위해 시도된 본 연구에서, *P. rhodesiae* H5의 parathion hydrolase의 활성이 Serdar(20)나 Douglas(18)등의 논문에서 보고된 것 보다 뛰어나지는 않지만 2종류의 parathion hydrolase 효소를 동일한 세균이 갖는 것에 대해서는 지금까지 밝혀진 것이 없어, 이들에 대해 추가적인 연구가 진행된다면 parathion hydrolase 효소의 또 다른 기작을 파악할 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- Attaway, H., J.O. Nilson, A.M. Baya, M.J. Voll, W.E. White, D.J. Grimes, and R.R. Colwell. 1987. Bacterial detoxification of diisopropyl fluorophosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1685-1689.
- 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.
- Cheng, T.C., S.P. Harvey, and A.N. Stroup. 1993. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas undina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3138-3150.
- DeFrank, J.J., and T.C. Cheng. 1991. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrolase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 173, 1938-1943.
- DeFrank, J.J., W.T. Beudry, T.C. Cheng, S.P. Harvey, A.N. Stroup, and I. Szafrancic. 1993. Screening of halophilic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem. Biol. Interact.* 87, 141-148.
- Dumas, D.P., H.D. Drust, W.G. Landis, F.M. Raushel, and J.R. Wild. 1990. Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 155-159.
- Harper, L.L., C.S. McDaniel, C.E. Miller, and J.R. Wild. 1988. Dissimilar plasmid isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) contain identical *opd* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 246-249.
- Hoskin, F.C.G., and R.D. Prusch. 1983. Characterization of a DFP-hydrolyzing enzyme on squid posterior salivary gland by use of Soman, DFP and manganous ion. *Comp. Biochem. Physiol.* 75, 17-20.
- Koelle, G.B. 1975. Anticholinesterase agents. The Pharmacological basis of therapeutics, 5th ed., p. 445. Macmillan, New York.
- Kim, S.C., and N.T. Lee. 1999. Test of degradation of soman and sarin gas by organophosphorus acid anhydrolases and applicability of the enzyme to the development of nerve agent decontaminant.

한국군사 과학기술학회지 2, 140-147.

11. Landis, W.G., and J.J. DeFrank. 1990. Enzymatic hydrolysis of toxic organofluorophosphate compounds. *Adv. Appl. Biotechnol. Ser.* 4, 183-201.
12. Liu, L., J. Wu, B. Wang, and D.M. Anderson. 1995. Purification and characterization of an organophosphorus acid hydrolase from *Alteromonas haloplanktis* C and *Alteromonas* sp. M. P. 12, In international workshop on biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. U. S. Army, ERDEC, Aberdeen Proving Ground, MD.
13. Mazur, A. 1946. An enzyme in animal tissue capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J. Biol. Chem.* 164, 271-289.
14. McDaniel, C.S., L.L. Harper, and J.R. Wild. 1989. Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene(*opd*) encoding phosphotriesterase. *J. Bacteriol.* 170, 2306-2311.
15. Mounter, L.A. 1963. Metabolism of organophosphorus anticholinesterase agents, p. 486-504. In G.B. Kolle (ed.), *Hanbuch de experimentellen pharmakologie: Cholinesterases and anticholinesterase agents*. Springer-Verlag, Berlin.
16. Mulbry, W., J.S. Karns, P.C. Kearney, J.O. Nelson, C.S. McDaniel, and J. R. Wild. 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 926-930.
17. Mulbry, W., and J.S. Karns. 1989. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *J. Bacteriol.* 171, 6740-6746.
18. Munnecke, D.M., and D.P.H. Hsieh. 1976. Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 63-69.
19. Serdar, C.M., D.T. Murdock, and M.F. Rohde. 1989. Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: subcloning, complete nucleotide sequence, and expression of the mature portion of the enzyme in *Escherichia coli*. *BioTechnology* 7, 1151-1155.
20. Serdar, C.M., and D.T. Gibson. 1985. Enzymatic hydrolysis of organophosphates: cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*. *BioTechnology* 3, 567-571.
21. Yun, N.K., and K.R. Park. 2004. Characteristics of the parathion degrading *Pseudomonas rhodesiae* H5. *J. Life Sci.* 14, 582-588.
22. Walter, W.M., and J.S. Karns. 1989. Purification and characterization of three parathion hydrolases from Gram-negative bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 289-293.

(Received June 9, 2004/Accepted August 19, 2004)

ABSTRACT : Characteristics of Parathion Hydrolase by *Pseudomonas rhodesiae* H5

Nam Kyung Yun and Kyeong Ryang Park* (Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

The parathion hydrolase (OPH) produced by *Pseudomonas rhodesiae* H5 was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography and Sephadex gel filtration chromatography. Parathion hydrolase from crude extracts of *P. rhodesiae* H5 has two components designated as OPH I₁ and OPH I₂. Optimum pH and temperature of OPH I₁ and OPH I₂ were pH 7.2 and 30°C, and pH 7.6 and 37°C, respectively. The activation energy of OPH I₁ for the hydrolysis of parathion was 3.01 kcal/mol in the temperature range of 4°C to 30°C, and Michaelis constant (K_m) for parathion was 69.2 μM. The activation energy of OPH I₂ for the hydrolysis of parathion was 4.07 kcal/mol in the temperature range of 4°C to 37°C, and Michaelis constant for parathion was 150.9 μM. Furthermore OPH I₁ was completely inhibited by 1 mM Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, but OPH I₂ was less inhibited than OPH I₁ by the metals used in this study.