



환경 독성 유기인 화합물 분해를 위하여 재조합 대장균에서 세포내 간극으로 분비된 Organophosphorus Hydrolase의 생산

최석순[†], 서상환, 강동균*, 차형준*

세명대학교 환경공학과, 포항공과대학교 화학공학과*

(2005년 8월 30일 접수, 2005년 9월 22일 채택)

Production of Periplasmic Space-Secreted Organophosphorus Hydrolase from Recombinant *Escherichia coli* for Degradation of Environmental Toxic Organophosphate Compounds

Suk Soon Choi[†], Sang Hwan Seo, Dong Gyun Kang*, Hyung Joon Cha*

Department of Environmental Engineering, Semyung University, Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology*

ABSTRACT

In the present work, production of organophosphorus hydrolase (OPH) that is secreted in periplasmic space of recombinant *Escherichia coli* was performed for degradation of environmental toxic organophosphate compounds, paraoxon. The optimal conditions for enhancement of OPH production were 1.0 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 0.25 mM Co²⁺, and 0.1 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA). Under these culture conditions, the maximum OPH production was 174 Unit/L · OD. In addition, 1 mM of paraoxon was completely degraded by OPH. These results can be used as a bioremediation tool for removal of environmental toxic organophosphate compounds remaining in soil and aquatic environment.

Keywords : recombinant *Escherichia coli*, organophosphorus hydrolase, periplasmic space-secretion, optimal condition, environmental toxic organophosphate, bioremediation

초 록

본 연구에서는 유기인 화합물인 Paraoxon의 분해를 위하여 재조합 대장균에서 세포내 간극(periplasmic space)으로 분비되는 organophosphorus hydrolase(OPH)의 생산에 대하여 고찰하였다. OPH 생산의 향상을 위하여 성장 배지에 첨가되는 최적의 조건은 1.0 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 0.25 mM Co²⁺ 및 0.1 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 이었다. 이 조건에서 최대

[†]Corresponding author (sschoi@semyung.ac.kr)

OPH 생산은 174 Unit/L · OD를 나타내었다. 또한 1 mM의 Paraoxon은 OPH에 의하여 완전히 분해되었다. 이러한 연구 결과는 토양 및 수계에 잔류하는 환경독성 유기인 화합물을 제거하는 bioremediation의 수단으로 활용될 수 있음을 보여주었다.

핵심용어 : 재조합 대장균, organophosphorus hydrolase, 세포내 간극으로 분비, 최적 조건, 환경 독성 유기인, bioremediation

1. 서론

유기인 화합물은 paraoxon, parathio, coumaphos, diazinon 등의 살충제와 제초제로서 화학 농약에서 널리 사용되고 있다¹⁾. 이러한 화학 농약은 사용자들에게 급성 또는 만성 독성을 유발시키고, 토양, 하천 및 지하수 유입으로 인하여 자연 생태계에 악영향을 미치고 있다^{2, 3)}. 특히 살포된 농약의 작물체 내에 잔류는 인체의 농약 흡수와 직접적인 관계가 깊다는 점에서 매우 중요한 의미를 갖고 있기 때문에, 세계 각국에서는 식품 중 잔류 농약의 피해를 최소화하기 위한 농약의 잔류 허용기준 설정 및 그 대상 농약수도 점차 증가하고 있는 추세이다³⁾. 그리고 유기인 화합물은 sarin, soman 등의 신경 독성제로 쓰이며¹⁾, 이러한 화합물들이 인간의 체내에 유입되면 acetylcholinesterase (AChE)의 활성 저해작용을 일으켜서 근육성 진통을 포함하는 만성적인 합병증 유발 및 생명에 위협을 주는 물질로 밝혀졌다⁴⁾. 본 연구에서 이용한 paraoxon은 유기인 화합물 중 하나로서 parathion의 분해에 의하여 생성되는 물질로 알려졌으며⁵⁾, 또한 paraoxon과 parathion의 LD₅₀ 값은 쥐에 적용시켰을 때 각각 1.8, 3.6-13 mg/kg를 나타냄으로써 paraoxon이 훨씬 독성이 높은 물질로 밝혀졌다⁶⁾.

유기인 화합물의 처리는 크게 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 나누어진다. 물리적 방법으로 소각은 비용이 많이 요구되므로 제한적으로 사용되고 있으며, 여기서 발생하는 유해한 가스를 무해한 물질로 전환시키는 추가 공정이 요구되고 있다¹⁾. 또한, 활성탄을 이용한 흡착공정에서는 흡착된 유기인 화합물을 처리해야하는 2차적인 폐기물 처리의 문제점을 나타내고 있다⁷⁾. 그리고 화학적 방법

으로서 최근 들어 연구가 활발히 이루어지고 있는 광촉매처리하는 유기인 화합물의 분해 능력이 우수하지만 처리수에 포함된 유기인 화합물의 완전 분해를 위하여 미세여과 (microfiltration)와 같은 특별한 처리가 요구되며, 또한, 가시광선을 사용시 370nm 이상의 파장에서는 처리효율이 크게 떨어지는 단점을 가지고 있다⁸⁾. 한편, 생물학적 방법으로 기존의 재조합 대장균을 이용한 유기인 화합물 처리에서 organophosphorus hydrolase (OPH)의 낮은 용해성으로 인하여 생산 수율이 매우 낮기 때문에⁹⁾ 실제적으로 현장에 적용할 경우 문제점으로 대두되고 있다. 이와 같은 단점을 극복하기 위한 새로운 유기인 화합물의 처리 방법이 요구되고 있다.

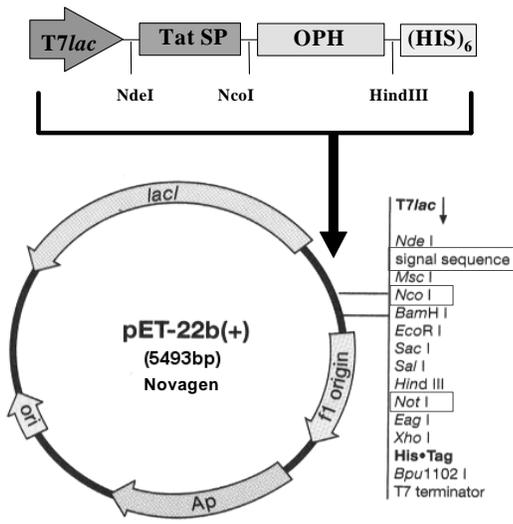
본 연구에서는 환경독성 물질인 paraoxon을 분해하기 위하여 토양미생물인 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacteria* sp으로 부터 유래된 OPH를^{10, 11, 12)} 재조합 대장균의 세포내 간극에서 효과적으로 발현시켰으며, 이를 이용하여 OPH 생산의 향상을 위한 최적의 조건을 도출하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 균주 배양 및 시약

재조합된 OPH의 발현을 위하여 숙주(host)로서 *E. Coli* BL21 (DE3) (Novagen Madison, WI, USA)를 이용하였으며, 본 실험에서 사용된 재조합 플라스미드는 [Fig. 1]에 나타내었다.

재조합 대장균은 M9 배지 (6.78g/L Na₂HPO₄, 3g/L KH₂PO₄, 0.5g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl, 2mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂)를 이용하였으며, 여기에 0.5% Glucose, 50μg/ml Ampicillin을 첨가하여



[Fig.1] Gene map of recombinant plasmid. (T7lac, Promoter; Tat, signal sequence; OPH, organophosphorus hydrolase; (His)₆, hexahistidine affinity tag)

사용하였다. Sub-culture는 shaking incubator (J-S11, Jisico Co. Korea)를 이용하였으며, 이때 37°C와 215rpm 조건에서 12시간 동안 배양하였다. 여기서 얻어진 균주를 50mL의 배지에 접종하였으며, optical density(OD) 값이 1.2에 도달하였을 때, OPH 생산을 위하여 inducer로서 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), cofactor로서 CoCl₂ · 6H₂O 및 chelating agent로서 ethylenediamine tetraacetate (EDTA)를 배지에 첨가하였다.

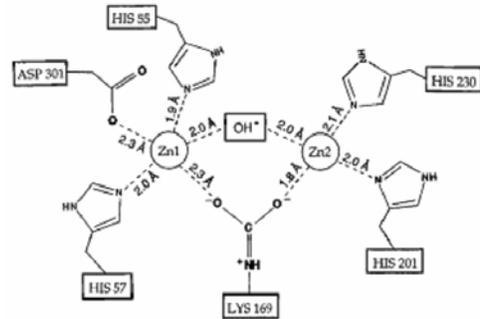
본 실험에서 사용된 paraoxon의 물리적 특성을⁶⁾ [Table 1]에 나타내었다. 그리고, OPH는 다양한 phosphoryl bonds (P-O, P-F, P-CN, P-S)를 가수분해시키는 효소로서¹²⁾ [Fig. 2]에 화학적 구조를 나타내었다.

2.2 분석 방법

재조합된 대장균의 농도는 UV/VIS Spectrophotometer (UV-1601PC Shimadzu, Japan)를 이용하였으며, 이때 600nm의 파장에서 일정한 시간 간격으로 대장균 현탁액을 채취하여 OD

[Table1] Physical Characteristics of Paraoxon

Property	Value
Molecular weight	275.21g
Specific gravity	1.2683
Boiling point	169~170°C
Solubility in water	2400µg/ml



[Fig.2] Structure of OPH enzyme.

를 측정하였다. 그리고 채취한 현탁액 1mL는 원심분리기 (Hanil Micro-12, Korea)를 이용하여 7000rpm에서 5분 동안 분리하였으며, 여기서 얻어진 미생물은 증류수를 이용하여 세척과 재현탁을 시켰다. 또한, 재현탁액 100µL, 100mM CHES [2-(N-cyclohexylamino) ethane-sulfonic acid] buffer 400µL, 10mM Paraoxon 100µL, 증류수 400µL로부터 시료 1mL를 제조하여 OPH, paraoxon 및 p-nitrophenol의 농도 분석에 사용하였다. OPH는 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하였으며, 400nm 파장에서 기질인 paraoxon이 p-nitrophenol로 가수분해되는 속도에 의하여 측정하였다. 여기서 OPH 1Unit는 1 µmol의 paraoxon이 1분 동안 가수분해 하는데 요구되는 효소의 양으로 정의된 것을 이용하였다¹⁾. 또한 상기의 시료 1mL를 14000rpm에서 2분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 0.45µm micro filter (MFS, Japan)를 사용하여 여과하였으며, 이때 얻어진 20µL 여과액은 276과 400nm 파장에서 HPLC(Waters 2487, USA)를 이용하여 paraoxon과 p-nitrophenol을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

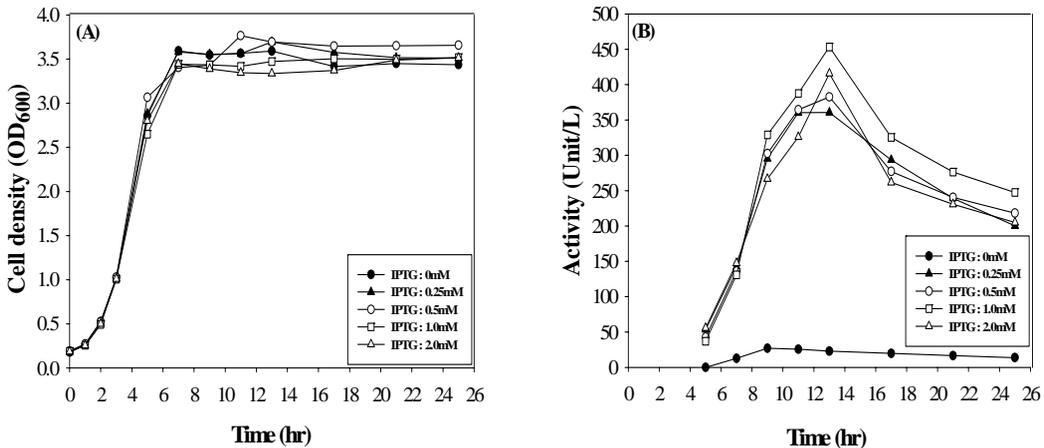
3.1 OPH 생산 향상을 위한 최적 조건

[Fig. 3](A)와(B)는 IPTG 농도 변화에 의한 재조합 대장균의 성장과 OPH의 생산을 나타낸 것이다. 재조합 대장균의 성장은 배지에 IPTG를 첨가하지 않은 경우와 0.25~2.0mM IPTG 를 첨가한 모든 경우에서 거의 유사한 OD 값을 보였다. 따라서 IPTG의 첨가는 본 균주의 성장에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 한편, IPTG를 첨가하지 않은 경우에서 OPH의 생산은 IPTG를 첨가한 모든 경우와 다르게 배양전체 시간 동안 매우 낮게 유지되었다. 이러한 결과로부터 IPTG가 OPH 생산을 위한 inducer임을 알 수 있었다. 그리고, 0.25, 0.5, 2.0mM의 IPTG를 주입한 것보다 1.0mM의 IPTG를 첨가한 경우가 배양 9시간 이후부터 높은 OPH의 생산을 나타내었으며, 배양 13시간에 도달하였을 때 453Unit/L의 최대 OPH 값을 얻었다. 따라서, OPH 생산의 향상을 위한 최적의 IPTG 농도는 1.0 mM임을 구할 수 있었다.

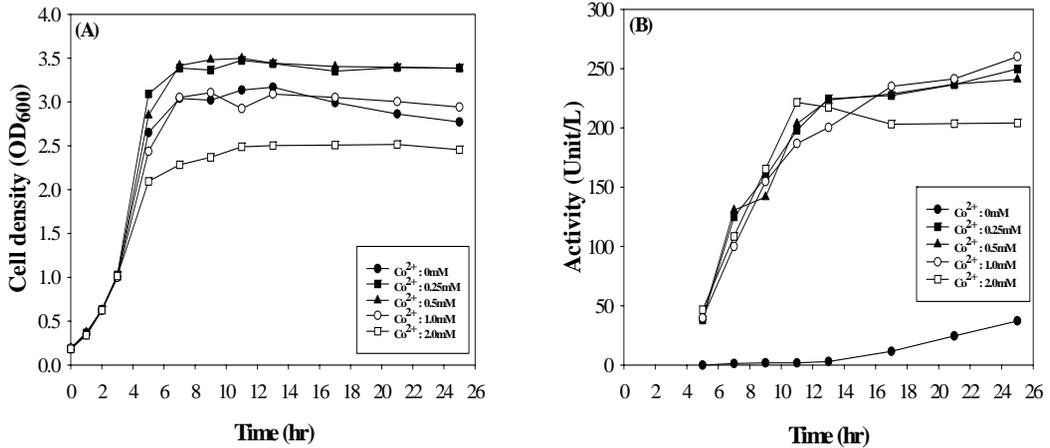
OPH는 Metalloenzyme로서 Co, Zn 등의 2가 금속 이온에 의하여 효소의 활성이 영향을 받는다고 알려졌다^{13, 14}), 중금속 이온과 반응이 이루어지는 OPH의 특성에 대하여 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 OPH 생산의 향상을

위하여 IPTG와 중금속 이온의 결합에 의한 효과를 고찰하기 위하여, 최적의 Co^{2+} 이온의 농도 도출 실험이 수행되어졌다. [Fig. 4] (A)와 (B)에 나타난 것과 같이, Co^{2+} 를 배지에 전혀 첨가하지 않은 경우에는 전체 배양시간 동안 매우 낮은 OPH (0~37Unit/L) 생산을 나타내었으며, 또한 2.0mM Co^{2+} 를 주입하였을 때 재조합 대장균의 성장은 크게 저해를 받았으며, 배양 13 시간 이후에 OPH 생산이 감소하는 현상을 보였다. 그러나, 0.25, 0.5, 1.0mM Co^{2+} 를 첨가한 경우에서 거의 비슷한 수준의 높은 OPH 생산을 보였다. 따라서 OPH 향상을 위하여 0.25mM 이상의 Co^{2+} 이온을 배지에 주입할 필요가 없음을 알 수 있었다.

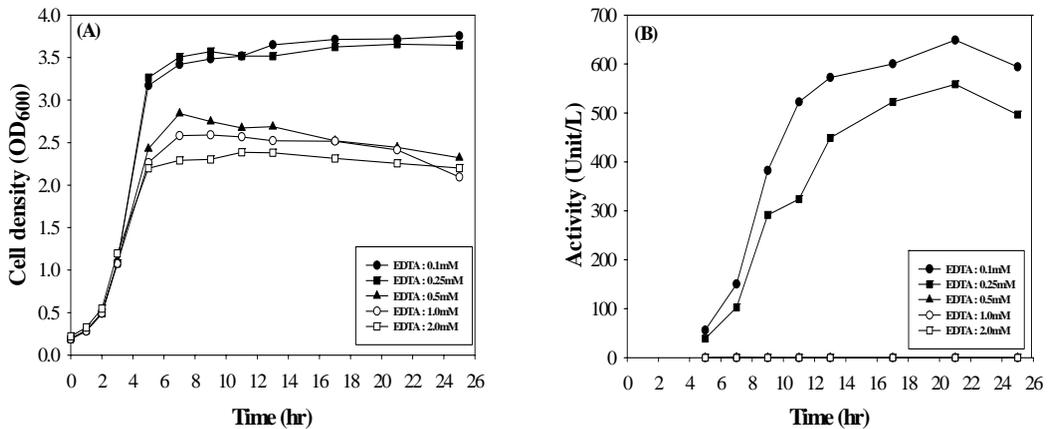
배지에 EDTA와 같은 chelating agent 첨가는 효소의 활성 site에 있는 금속 이온을 치환시켜서 효소의 활성이 증가 또는 감소된다고 발표되었으나^{13, 14}), 아직까지 IPTG, 중금속 이온 및 EDTA의 반응에 의한 OPH의 생성 기작과 OPH 생산을 위한 최적의 EDTA 농도는 밝혀지지 않았다. 본 실험에서는 앞서 구한 최적 농도로 재조합 대장균의 배지에 IPTG 및 Co^{2+} 이온을 주입하였으며, 여기에 EDTA 농도변화 (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0mM)로 부터 OPH 생산의 향상을 위한 최적의 EDTA 농도를 구하고자 하였다. [Fig. 5](A)와 (B)에 보인 것과 같이, 0.5mM 이상의 EDTA 농도 경우



[Fig. 3] Effect of IPTG concentration on cell growth (A) and OPH production (B). Experimental condition: The IPTG was added in the medium at 3 hr of cultivation.



[Fig. 4] Effect of Co²⁺ concentration on cell growth (A) and OPH production (B). Experimental condition: The IPTG and Co²⁺ were added in the medium at 3 hr of cultivation.



[Fig. 5] Effect of EDTA concentration on cell growth (A) and OPH production (B). Experimental condition: The IPTG, Co²⁺, and EDTA were added in the medium at 3 hr of cultivation.

에서는 배양 시간이 증가할수록 균주 성장이 크게 저해를 받았으며, 또한 OPH의 발현이 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 그리고, 가장 낮은 0.1mM로 주입한 경우에 전체 배양시간 동안 매우 높은 OPH를 생산하였으며, 배양 21시간에 도달하였을 때 최대 OPH (174Unit/L · OD)의 발현량을 나타내었다. 따라서 OPH 향상을 위하여 배지에 주입되는 EDTA의 최적 농도는 0.1mM임을 알 수 있었으

며, 또한 성장 배지에 EDTA를 첨가하지 않고 IPTG와 Co²⁺만 주입한 것과 비교할 때 약 2.4배 OPH가 증가되는 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 현상은 0.1mM 저농도 EDTA 첨가는 재조합 균주의 투과제 (permeabilizing agent)로서 작용하여 물질전달 저항을 감소시켜서¹⁵⁾, 그 결과 세포에서 기질 확산의 향상으로 인하여 OPH 생산이 향상된 것으로 판단되어진다.

3.2 OPH에 의한 paraoxon의 분해 및 *p*-nitrophenol의 생성

환경 독성 유기인 화합물인 paraoxon은 OPH 효소에 의한 가수분해에 의하여 *p*-nitrophenol로 분해 된다고 알려져 있다^{1, 13)}. 본 실험에서는 앞서 구한 OPH 생산의 향상을 위한 최적 조건에서 paraoxon의 분해 및 *p*-nitrophenol의 생성에 대하여 고찰하였다. [Fig. 6](A)와 (B)에 나타난 것과 같이, OPH 발현량이 높은 경우 (OPH : 500unit/L)가 낮은 경우 (OPH : 95Unit/L) 보다 1.0mM paraoxon의 가수분해 속도를 증가시켰음을 알 수 있었으며, 그 결과 반응 12분 만에 paraoxon은 100 %의 완전한 분해가 이루어졌다. 또한 OPH 발현량이 낮은 경우에서 반응 20분이 경과하였을 때 paraoxon은 50% 만이 분해 됨을 나타내었다. 따라서 paraoxon의 가수분해 속도를 향상시키기 위해서는 OPH의 발현량을 증가시키는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 OPH의 발현량이 낮은 경우 (OPH : 95Unit/L)에서도 반응 시간을 95분 까지 증가시키면, paraoxon의 완전한 분해가 이루어짐을 확인할 수 있었다. [Fig. 6]에는 나타내지 않음). 그리고 OPH 발현량이 높은 경우 (OPH : 500 Unit/L)가 낮은 경우 (OPH : 95Unit/L) 보다 *p*-nitrophenol의 높은 생성 속도를 나타내었으며,

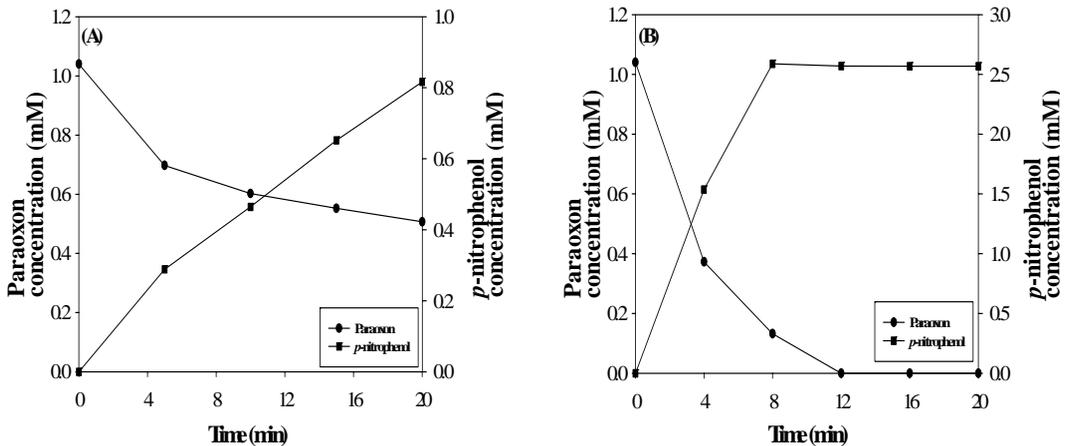
결과적으로 반응 8분에 도달하였을 때 2.6mM의 *p*-nitrophenol이 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한 반응 20분을 기준으로 *p*-nitrophenol의 생성량을 비교 고찰하였을 때, OPH 발현량이 높은 경우가 낮은 경우 보다 약 3.3배 증가된 *p*-nitrophenol를 생성시켰으므로 paraoxon의 가수분해 능력이 우수함을 알 수 있었다.

이러한 실험 결과들은 각종 수계, 토양 및 농작물에 존재하는 paraoxon과 같은 환경 독성 유기인 화합물을 친환경적으로 분해 시키는 bioremediation의 수단으로서 충분히 활용될 수 있음을 보여주고 있다.

4. 결론

본 연구에서는 환경 독성 유기인 화합물인 paraoxon을 분해하기 위하여 재조합 대장균의 세포내 간극(periplasmic space)에서 분비되는 organophosphorus hydrolase(OPH)의 생산 특성을 고찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

재조합 대장균의 회분식 배양과정에서 OPH 생산의 향상을 위하여 배지에 첨가되는 최적의 조건은 1.0mM IPTG, 0.25mM Co²⁺ 및 0.1mM EDTA임을 구할 수 있었으며, 이 조건에서 174



[Fig. 6] Comparison of paraoxon degradation and *p*-nitrophenol production under the optimal conditions. Experimental condition: (A) OPH production was 95 Unit/L, (B) OPH production was 500 Unit/L.

Unit/L · OD의 최대 OPH 생산이 이루어졌다. 또한 1mM의 paraoxon이 OPH에 의하여 완전히 분해 됨을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 토양, 각종 농작물 및 수계에 잔류하는 환경독성 유기인 화합물을 제거하는 bioremediation 기술로 활용될 수 있음을 보여주었다.

참고문헌

1. Caldwell S.R. and Raushel F. M., "Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*", *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 103~109 (1991).
2. 이규승, "농업 생태계에 대한 잔류농약의 영향 평가", *한국환경농학회지* 16(1), pp. 80~93 (1997).
3. 김종향, 민병철, "자외선에너지(UV-C)를 이용한 유기인계 화합물의 분해, *공업화학* 9(1), pp. 28~32 (1998).
4. Singh A. K., Flounders A. W., Volponi J. V., Ashley C. S., Wally K., and Schoeniger J. S., "Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports", *Biosensors and Bioelectronics*, 14, pp. 703~713 (1999).
5. 김탁수, 김정곤, 최경호, 조경덕, "TiO₂ 광촉매를 이용한 methyl parathion 농약의 분해 기전과 독성저감에 관한 연구", *대한환경공학회 춘계학술연구발표회*, pp. 1577~1584 (2005).
6. Winholz M. and Budavari S., "The Merck Index", 3rd Edn., Merck & Co., pp. 1009~1010 (1983).
7. Yu J. J., "Removal of organophosphate pesticides from wastewater by supercritical carbon dioxide extraction", *Water research*, 36, pp. 1095~1101 (2002).
8. Sanjuan A., Aguirre G., Alvaro M., and Garcia H., "2,4,6-triphenylpyrylium ion encapsulated within Y zeolite as photocatalyst for the degradation of methyl parathion", *Water research*, 34(1), pp. 320~326 (2000).
9. Kang D. G., Kim Y. H., and Cha H. J., "Enhanced detoxification of organophosphates using recombinant *Escherichia coli* with co-expression of organophosphorus hydrolase and bacterial hemoglobin", *Biotechnology letters*, 24, pp. 879~883 (2002).
10. Cao X., Mabrouki M., Mello S. V., Leblanc R. M., Rastogi V. K., Cheng T. C., and Defrank J. J., "The interaction between OPH and paraoxon at the air-water interface studied by AFM and epifluorescence microscopies", *Colloids and Surfaces B*, 40, pp. 75~81 (2005).
11. Fu G., Cui Z., Huang T., and Li S., "Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase", *Protein expression and Purification*, 36, pp. 170~176 (2004).
12. Cho M. H., Mulchandani A., and Chen W., "Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents", *Applied and Environmental microbiology*, 68(4), pp. 2026~2030 (2002).
13. Omburo G. A., Kuo J. M., Mullins L. S., and Raushel F. M.,

- “Characterization of the Zinc binding site bacterial phosphotriesterase”. The Journal of Biological Chemistry, 267(19), pp. 13278~13283 (1992).
14. Wu C. F., Valdes J. J., and Bentley W. E., “Effects of situ cobalt ion addition on the activity of a GFP-OPH fusion protein: The fermentation kinetics”, Biotechnology Progress, 17, pp. 606~611 (2001).
 15. Chen W. and Mulchandani A., “The use of live biocatalysts for pesticide detoxification”, Trends in Biotechnology, 16, pp. 71~76 (1998). 