

S. setonii 유래 고온성 catechol-1,2-dioxygenase 특성연구

박현주, 이복남, 안혜련, 김용수

한국의국어대학교 환경학과 생물공학 실험실

전화 (0335) 330-4532

Abstract

Streptomyces setonii(ATCC 39116) is a thermophilic gram-positive soil bacteria which undergoes an *ortho*-cleavage pathway in the presence of phenol or benzoate as a sole carbon and energy source. The specific activities of catechol-1,2-dioxygenase in *S. setonii*, a key enzyme in *ortho*-cleavage pathway, were induced by various aromatic compounds such as benzoate, phenol, m-hy-benzoate, p-hy-benzoate, catechol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, benzene, toluene, ethyl-benzene, 2-chloro-phenol, and 4-chloro-phenol, among which the phenol showed the highest inducibility in the presence of 0.01% glucose. More than 0.1% glucose dramatically reduced the specific activities of catechol-1,2-dioxygenase induced by most of the single aromatic compounds tested.

서론

호기성 미생물에 의해 분해되는 대부분의 방향족 화합물들은 일반적으로 catechol 혹은 protocatechuate 등의 중간체로 전환되고 catechol-1,2-dioxygenase에 의한 *ortho*-cleavage pathway 와 catechol-2,3-dioxygenase에 의한 *meta*-cleavage pathway에 의해 광물화된다.¹⁾ *cis,cis*-muconic acid는 catechol-1,2-dioxygenase에 의해 방향족 화합물이 *ortho*-cleavage pathway로 분해되어 생성되는 첫번째 중간산물으로써, 유해방향족 화합물의 생분해 기작을 규명하는데 매우 중요한 지표 화합물이다. 또한 adipic acid로의 전환이 쉬워 산업적으로도 유용한데, 특히 유기합성에 의한 생산공정은 경제단가가 높고 환경오염 유발이라는 단점이 있어서 최근 미생물에 의한 *cis,cis*-muconic acid 생합성 공정을 개발하여 운전의 용이성 및 경제적인 측면을 향상시키려는 연구가 진행되고 있다.²⁾

*Streptomyces setonii*는 그람양성 세균으로 phenol 및 benzoate를 유일한 탄소원으로 하여 정상적인 균체성장 및 우수한 생분해능을 보이는 고온성 균주로서 고온성 catechol-1,2-dioxygenase를 생성하여 방향족 화합물을 *ortho*-cleavage 기작으로 분해한다.

본 논문에서는 *Streptomyces setonii* (ATCC 39116)로부터 생성되는 고온성 catechol-1,2-dioxygenase 활성을 측정하여 중온성 catechol-1,2-dioxygenase와의 특성을 비교하고, 배지 성분에 포함되는 glucose의 농도 및 유도인자인 방향족 화합물의 종류에 따른 catechol-1,2-dioxygenase 생산유도 정도를 비교함으로써, 환경학적으로나 산업적으로 유용한 *S. setonii* 유래 고온성 catechol-1,2-dioxygenase의 생화학적 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법**사용균주 및 배양조건**

본 실험에서는 방향족 화합물 생분해능이 우수한 *Streptomyces setonii* (ATCC 39116)를 R5

평판배지에 접종하여 45°C에서 3~4일간 배양한 다음, spore-용액 (20% glycerol)을 제조하여 -20°C에 보존하면서 사용하였다.

Catechol-1,2-dioxygenase 활성도 측정

25ml의 CM배지(Na₂HPO₄ · 12H₂O 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 3g/L, KH₂PO₄ 1g/L, Yeast extract 0.5g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.05g/L, Agar 20g/L)에 *S. setonii*를 접종하여 45°C, 200rpm으로 36시간 동안 진탕 배양하고, harvest (1000rpm, 5분) 하여 resuspending buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM MnSO₄)로 세척한 후, resuspending buffer에 1/100 volume으로 현탁하였다. Sonication은 9 second-pulse, 35 % amplitude 조건으로 3번 파쇄 후, 원심상등액(10,000rpm, 30분)을 취하여 사용하였다. *S. setonii* crude lysate 100ul를 5× reaction buffer (30mM Tris-HCl pH 8.0, 1.2mM EDTA pH 8.0) 200ul에 첨가한 후, 기질로써 catechol을 최종농도 0.3mM로 첨가한 후, *cis,cis*-muconic acid로의 전환을 UV spectrophotometer를 사용하여 260nm에서 분당 측정하였다.³⁾

온도에 따른 Catechol-1,2-dioxygenase 활성도의 안정성 비교

활성도 측정시 온도를 25, 37, 45, 50, 55, 60, 65°C로 하여 catechol-1,2-dioxygenase 활성도를 측정하였다. 또한 활성도 측정 전에 45, 50, 55, 60°C에서 5, 10, 15, 20min incubation 한 후 catechol-1,2-dioxygenase 활성도를 측정하였다.

Catechol-1,2-dioxygenase 생산유도능 비교

0.1%, 0.01% glucose를 함유한 최소액체배지인 CM 배지와 복합영양배지인 YEME 액체배지 (Difco yeast extract 0.075g/25ml, Difco Bacto-pepton 0.125g/25ml, Oxoid malt extract 0.075g/25ml, glucose 0.25g/25ml, sucrose 8.5g/25ml, pH 7.0~7.2) 에 *S. setonii*를 접종한 후, 45°C, 180 rpm에서 36시간 배양하여 사용하였다.

0.1% glucose를 함유한 CM배지에 다양한 방향족 화합물 (benzoate, phenol, m-hy-benzoate, p-hy-benzoate, catechol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, benzene, toluene, ethyl-benzene, 2-chloro-phenol, 4-chloro-phenol: pH7.5)을 각각 1, 3, 5mM 농도로 첨가한 후, *S. setonii*를 접종하여 45°C, 180 rpm으로 36시간 진탕 배양하여 사용하였다.

S. setonii 생육도 측정

배지성분 및 방향족 화합물 첨가에 따른 *S. setonii*의 균체성장을 관찰하기 위해 다양한 방향족 화합물을 함유하고 탄소원의 농도가 다른 CM배지에 균주를 접종하여 45°C, 180 rpm에서 36시간 배양한 후 1ml을 취하여 UV spectrophotometer, 600nm에서의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

온도에 따른 *S. setonii* catechol-1,2-dioxygenase 활성도 측정

고온성 균주인 *S. setonii* 유래 catechol-1,2-dioxygenase의 생화학적 특성을 규명하기 위해서 반응 온도에 따른 효소 활성도 실험을 수행하였으며, 대조구로는 중온성 균주인 *Acinetobacter* 와 *Rhodococcus* 유래의 효소액을 사용하였다. 같은 양의 단백질을 사용하여 catechol-1,2-dioxygenase 활성도를 측정된 결과, 각 균주의 성장 최적 온도에서의 활성도를 100%로 환산하였을 경우, 중온성 균주인 *Acinetobacter*와 *Rhodococcus* 유래의 catechol-1,2-

dioxygenase는 55℃ 에서 각각 90% 이상, 50% 이상의 활성도가 상실되는 반면, 고온성 균주인 *S. setonii*의 경우 catechol-1,2-dioxygenase 활성도가 65℃까지 67%이상 유지되었다 (Fig.1).

비교적 고온인 65℃에서 높은 활성도를 보이는 *S. setonii* 유래 catechol-1,2-dioxygenase의 온도에 따른 활성도의 억제정도를 측정한 결과 효소를 60℃에서 5분간 처리한 경우, 효소 활성도가 완전히 억제되었으며, *Rhodococcus*는 55℃에서 억제되었다. 또한 *S. setonii*는 성장최적온도인 45℃에서의 효소 안정도는 비교적 높아서 20min간 처리하였을 때도 활성도를 유지하였으나 *Rhodococcus*는 15min만에 활성도가 완전히 억제되었다.

배지 조성에 따른 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도

catechol 1,2-dioxygenase의 활성도가 가장 최적인 배지 조성을 찾기 위해 최소영양배지인 CM 배지와 복합영양배지인 YEME 배지, 그리고 CM배지에 보조탄소원으로 0.01% glucose와 0.1% glucose를 첨가한 배지에 5mM benzoate를 넣어 45℃, 36시간 진탕 배양한 결과 최소 영양배지인 CM배지에 0.01% glucose를 첨가한 배지에서 *S. setonii* 유래의 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도가 가장 뛰어남을 알 수 있었다(fig.2). 반면 복합 영양 배지인 YEME배지에서는 전혀 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도가 관찰되지 않았다(fig.2).

다양한 방향족 화합물에 의한 catechol 1,2-dioxygenase 활성도 비교

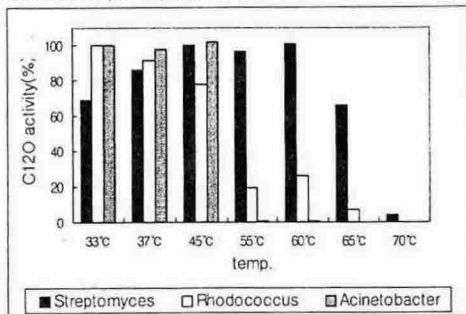
CM+0.01% glucose 배지에서 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도가 가장 뛰어남을 바탕으로 다양한 방향족 화합물(benzoate, phenol, m-hy-benzoate, p-hy-benzoate, catechol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, benzene)을 1, 5mM 농도로 첨가하여 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도를 측정하였다. 그 결과, 농도에 상관없이 phenol에 의해 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 가장 잘 유도됨을 알 수 있다(fig.3, fig.4). 또한 다양한 방향족 화합물의 종류에 따라서 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 유도되는 정도가 다르게 나타났다(fig.3, fig.4).

glucose농도 변화에 따른 catechol 1,2-dioxygenase 활성도 비교

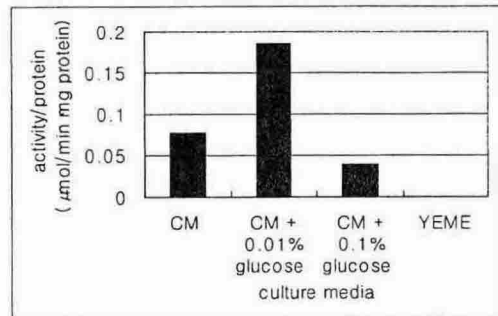
glucose의 농도에 따른 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도를 1mM의 다양한 방향족 화합물을 이용하여 실험하였다. 0.01% glucose를 함유한 배지에서는 phenol, p-hy-benzoate, catechol은 오히려 의 활성이 낮아짐에 비해 나머지 benzoate, m-hy-benzoate, o-cresol, m-cresol, p-cresol, benzene은 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도가 높아짐을 볼 수 있다(fig.5). 이러한 결과로 볼 때 다양한 방향족 화합물에서 catechol 1,2-dioxygenase의 활성도는 이용하기 쉬운 탄소원인 glucose가 일정 농도 이상일 때 catabolic repression을 받음을 알 수 있고, 또한 catechol 1,2-dioxygenase 활성도는 유도 방향족 화합물의 종류 및 glucose의 농도 변화에 따라 다른 경향을 보임을 알 수 있다.

참고문헌

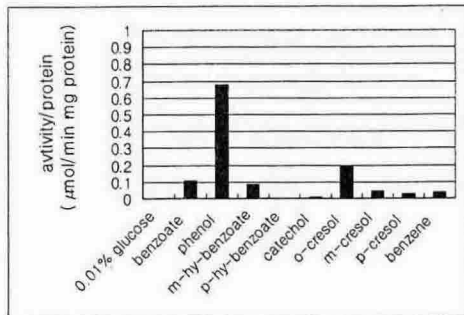
1. Hegeman, G. D., "Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*"(1966), *J. Bacteriol.*, 91(3), 1140-1154.
2. Won-Jae, C., L. Eun-Yeol, C. Moo-Hwan and C. Cha-Yong , "Enhanced production of cis, cis-muconate in a cell-recycle bioreactor"(1997), *J. Fermentation and Bioengineering.*, 84, 70-76
3. Hamzah, R. Y., and B. S. Al-Baharna , "Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of ortho and meta pathway"(1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 250-256.



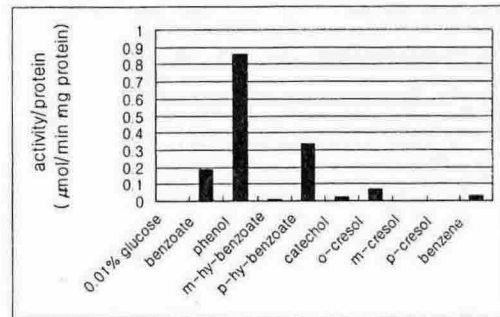
<fig.1> temperature effect of catechol 1,2-dioxygenase



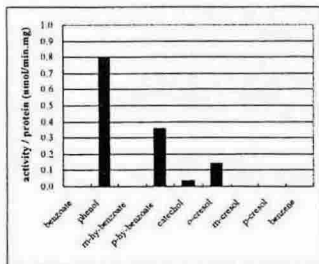
<fig.2> *S. setonii* catechol 1,2-dioxygenase from different media including 5mM benzoate



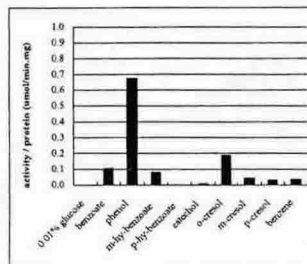
<fig.3> *S. setonii* catechol 1,2-dioxygenase induced by 1mM of various aromatic compounds



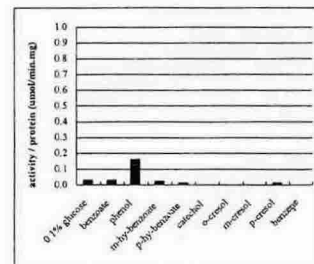
<fig.4> *S. setonii* catechol 1,2-dioxygenase induced by 5mM of various aromatic compounds



(a)



(b)



(c)

<fig.5> *S. setonii* catechol 1,2-dioxygenase induced by 1mM of aromatic compounds in the presence of (a) none, (b) 0.01%, (c) 0.1% of glucose