

유독성 4-Chlorobiphenyl의 생분해를 위한 탈염소화 유전자의 클로닝

김치경* · 채종찬 · 한재진

충북대학교 자연대 미생물학과

4-Chlorobiphenyl (4CB)를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12가 가지고 있는 *pcbABCD* 유전자를 *Escherichia coli*에 클로닝한 결과, 재조합 균주인 *E. coli* CU1과 CU101은 모두 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서와 같이 4CB를 분해하여 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP)을 생성하는 탈염소화 기능을 보여주었다. 특히 *pcbAB*를 포함하는 재조합 플라스미드인 pCU101을 가지고 있는 *E. coli* CU101은 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서와 같이 4CB로부터 4-chlorobenzoic acid를 생성하지 않고 2,3-DHBP만을 생성하는 탈염소화 기능을 보여주었다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 염색체 DNA로부터 클로닝한 약 2.2 kb의 *pcbAB* 유전자는 4CB로부터 2,3-DHBP을 생성하는 탈염소화 기능을 가지고 있음이 밝혀졌다.

KEY WORDS □ dechlorination, cloning of *pcbAB*, 4-chlorobiphenyl, *Pseudomonas* sp. DJ-12

Polychlorinated biphenyls (PCBs)는 biphenyl에 하나 또는 여러개의 염소가 여러가지 위치에 치환되어 있는 isomer들의 혼합체이다. 치환되어 있는 염소의 수가 많을수록, 그리고 같은 수의 염소라도 양쪽의 벤젠 고리에 붙어있는 경우나 염소가 biphenyl의 *ortho* 위치에 붙어있는 경우에는 더 높은 난분해성 특징을 나타낸다고 알려져 있다(3). 따라서 미생물에 의한 PCBs의 완전 분해에 있어서는 벤젠 고리의 개환 과정과 함께, 염소가 유리되는 탈염소화 과정(dechlorination)이 관심의 대상이 되고 있다.

여러가지 PCBs 중 4-chlorobiphenyl (4CB)에 대한 탈염소화 과정에 관한 연구는 *pcbABCD* 유전자에 의해 생성되는 효소 작용으로 benzene 고리의 *meta*-cleavage에 의해 4-chlorobenzoate (4CBA)로 분해된 후, 탈염소화 작용에 의해 4-hydroxybenzoate (4HBA)로 분해되는 과정이 보고되어 있다(4). 그 반면 4CBA에서 ring-cleavage가 먼저 일어나 4-chlorocatechol로 된 후 탈염소화 작용이 일어나는 과정도 알려져 있다(14). 또 Morris 등(13)은 PCBs 제품인 Aroclor의 실험에서 주로 biphenyl 고리의 *meta* 위치에 붙어있는 염소가 떨어짐으로서 분해된다고 보고하였다.

4CBA로부터 4HBA로 탈염소화되는 과정에는 3개의 open reading frame에 의해 암호화되어 있는 효소들, 즉 4CBA:CoA ligase, 4CBA:CoA dehalogenase, 4HBA:CoA thioesterase 등이 관여한다는 보고가 있었다(4). 그리고 탈염소화 과정이 일어나기 위해서는 cofactor로서 coenzyme A(CoA), ATP, Mg^{2+} 가 요구된다고 Löffler와 Muller(11)는 보고하

였다. 이처럼 탈염소화 작용에 의해 4CBA를 분해하는 균주로는 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Corynebacterium* 등이 보고되어 있으며(6), 최근에는 *Pseudomonas* sp. CBS3(16), *Arthrobacter globiformis* KZT1(18), *Arthrobacter* sp. strain SU(17)로부터 4CBA의 초기 탈염소화 과정에 관여하는 유전자가 cloning된 바 있다.

본 실험실에서는 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 벤젠 고리의 개환을 통하여 4CB를 분해하는 *pcbABCD* 유전자에 관해 연구해왔으며(7), 그 과정에서 *pcbAB*의 산물에 의하여 4CB의 탈염소화가 일어나는 것을 확인하였다. 따라서 본 논문에서는 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 4CB의 탈염소화 작용에 관여하는 *pcbAB* 유전자의 클로닝과 *E. coli*에서의 발현에 관한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 균주의 분해 특성과 플라스미드의 구조적 특성은 Table 1에 기술된 바와 같다. 탈염소화 작용에 의하여 4CB를 분해하는 균주로 Kim 등(9)에 의해 분리된 *Pseudomonas* sp. DJ-12를 사용하였으며, 이 균주의 분해 특성을 청주 및 그 인근의 공단지역 하폐수로부터 분리한 P08, P09, P19, P20, P27, P1242 균주들과 비교 실험하였다. 그리고 cloning vector로서 pBluescript SK(+) phagemid (Stratagene Co.)를 사용하였으며, 숙주세포로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmids	Relevant markers	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Kim <i>et al.</i> (9)
Isolate No. P08	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P09	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P19	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P20	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁻ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P27	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P1242	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁻ , Ap ^r	Yun <i>et al.</i> (19)
<i>E. coli</i> CU1	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU1, Ap ^r , Tc ^r	This study
<i>E. coli</i> CU101	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU101, Ap ^r , Tc ^r	This study
Plasmids		
pCU1	containing <i>pcbABCD</i> , 6.4 kb <i>EcoRI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	This study
pCU101	containing <i>pcbAB</i> , 2.2 kb <i>EcoRI-SalI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	This study

4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; Ap, ampicillin.

배지 및 배양조건

4CB 분해균주의 배양에는 MM2 최소배지 (10)를 사용하였다. 그 조성은 10 mM KH₂PO₄-Na₂HPO₄ (K-Na) phosphate buffer (pH 7.0)에 (NH₄)₂SO₄ 18 mM, FeSO₄·7H₂O 1 μM, CaCl₂·2H₂O 100 μM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, NaCl 8.5 mM을 포함하고 있으며 단일 탄소원으로 4CB를 농도가 1 mM 되도록 배지에 첨가하였다. 완전배지로는 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하였다.

Total DNA 및 플라스미드 DNA의 분리

각 균주의 염색체 DNA와 플라스미드 DNA를 포함하는 total DNA는 Ausubel 등 (2)의 방법에 따라 분리하였다. 각 분해균주의 배양액을 원심분리 (4000 ×g)하여 균체를 수집한 후 TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer에 현탁하고 10% SDS와 proteinase K를 처리하여 37°C에서 일정시간 동안 반응시켰다. 그리고 5 M NaCl과 CTAB/NaCl solution을 처리하여 65°C에서 20분 동안 반응시킨 후 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 용액으로 DNA를 추출 정제하고 원심분리한 후 상등액에 0.6 volume의 isopropanol을 처리하여 DNA를 침전시켰다. DNA pellet은 TE (pH 8.0) buffer에 녹여 사용하였다. 플라스미드 DNA는 Sambrook 등 (15)의 방법으로 분리하였다.

4CB 분해 유전자의 클로닝

Pseudomonas sp. DJ-12의 total DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 pBluescript SK(+) vector와 3:1의 비율로 섞어 T4 DNA ligase를 첨가하여 16°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 *E. coli* XL1-Blue에 Sambrook 등 (15)의 방법에 따라 형질전환시켰다. 형질전환 후 ampicillin 100 μg/ml과 tetracycline 15 μg/ml이 포함되어 X-gal (20 mg/ml) 40 μl와 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG; 200 mg/

ml) 4 μl가 첨가된 LB 한천배지에 성장한 흰색 균집락을 1차 선발하였고, 그 위에 0.1% 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP) 용액을 분무하여 노란색의 meta-cleavage product (MCPs)를 생성하는 균집락을 2차 선발하였다.

탈염소화 산물의 검정

Pseudomonas sp. DJ-12 및 재조합균주의 resting cells를 사용하여 Khan과 Walia (8)의 방법을 일부 변형한 gas chromatography (Varian Model 3700)로 탈염소화에 의한 대사산물을 검정하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12와 재조합균주를 LB 액체 배지에서 10⁹/ml의 세포수가 될 때까지 배양한 다음 원심분리하여 균체를 phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하고 MM2배지에 4CB를 0.1 mM이 되게 첨가하여 37°C에서 60시간 진탕배양하였다. 일정시간에 따라 배양액을 채취하여 diethyl ether로 유기물을 추출한 다음 진공 건조시킨 후 알콜에 녹여 시료로 사용하였다. 이 때 사용한 column은 silicon OV17이었고 injection 온도는 230°C, column 온도는 250°C, 검출기 온도는 250°C로 하였고, 질소가스는 45 ml/min으로 주입하였다. 검출기는 flame ionization detector (FID)를 사용하였다.

4CB의 탈염소화 작용으로 유리되는 chloride ion은 4CB가 포함된 MM2에서 각 균주를 배양한 후 Gerritse 등 (5)의 보고에서와 같이 Fe(SCN)₂의 생성방법으로 측정하였다. 배양액 1 ml에 Hg(SCN)₂와 ferric ammonium sulfate를 각각 400 μl씩 첨가하여 생성되는 Fe(SCN)₂의 흡광도를 454 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

4CB 분해 균주들의 특성

Table 2. Degradation and dechlorination of the chlorinated aromatic hydrocarbons by several bacterial strains.

Bacterial strains	Degradation			Dechlorination			Group ^a
	4CB	4CBA	BP	4CB	4CBA	2,4-DCB	
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	+	+	+	+	+	-	I
Isolate No. P08	+	+	+	+	+	-	
Isolate No. P09	+	+	+	+	+	-	
Isolate No. P27	+	+	+	NT	+	-	
Isolate No. P19	+	-	+	-	-	-	II
Isolate No. P20	+	-	+	-	-	-	
Isolate No. P1242	+	-	+	NT	-	+/-	

^aGroup of bacterial strains referred by the reference #19.

4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; 2,4-DCB, 2,4-dichlorobiphenyl; NT, not tested; +/-, poorly detected.

자연계로부터 분리한 4CB 분해 균주들을 4CB 뿐 아니라 그 중간 대사산물인 4CBA를 분해시키는 group I과 4CB는 분해하지만 4CBA를 축적하는 group II로 분리한 Yun 등 (19)의 연구보고에 따라 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 P08, P09, P27과 함께 Table 2에서와 같이 group I에 소속되었다. 이 균주들에 대하여 resting cell assay 방법으로 몇가지 염소화 방향족 탄화수소에 대한 탈염소화 활성을 Fe (SCN)₂ 생성 방법으로 조사한 결과, *Pseudomonas* sp. DJ-12의 경우 4CB와 4CBA를 기질로 하였을 때 모두 탈염소화 활성을 보였다. 일반적으로 4CB의 중간 대사산물인 4CBA에서 탈염소화 작용이 일어난다는

점 (4, 16, 17, 20)에 비하여, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4CB에 대해 탈염소화 활성이 있다는 사실은 주목할 만하다. 그리고 Ahmad 등 (1)이 *Pseudomonas testosteroni* B-356에서 4CB를 기질로 하였을 때 4CB로부터 4CBA까지의 분해과정 중 MCP-derivatives가 생성된다고 보고하였다. 따라서 4CB의 분해과정은 균주에 따라 다르지만, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4CB로부터 ring-cleavage를 통하여 4CBA가 생성되고 탈염소화 과정이 나중에 일어나는 분해경로 (7)와 함께 4CB를 탈염소화 과정을 통해 2,3-DHBP이 생성된 후 benzoate로 분해하는 두가지 경로를 모두 가지고 있는 것이 확인되었다.

4CB의 탈염소화 유전자의 클로닝

Pseudomonas sp. DJ-12의 total genomic DNA와 pBluescript SK(+) DNA를 *EcoRI*으로 처리한 후 ligation시켜 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 얻은 재조합 균주들 중 1%의 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-

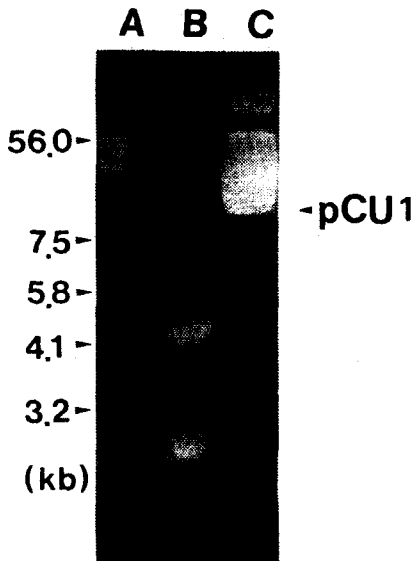


Fig. 1. Gel electrophoresis of the hybrid plasmid, pCU1. Lane A. *E. coli* V517; B. pBluescript SK(+); C. pCU1.

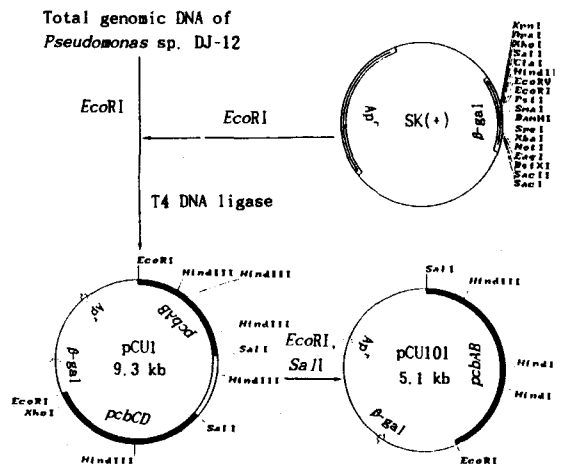


Fig. 2. Cloning scheme of the *pcbAB* genes coding for dechlorination of 4-chlorobiphenyl.

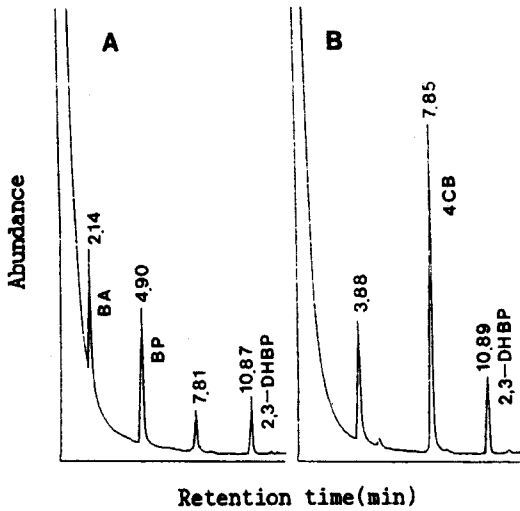


Fig. 3. GC spectra of the metabolites produced from BP(A) and 4CB(B) by *Pseudomonas* sp. DJ-12. The metabolites were extracted from the 60-hour cultures by diethyl ether extraction method.

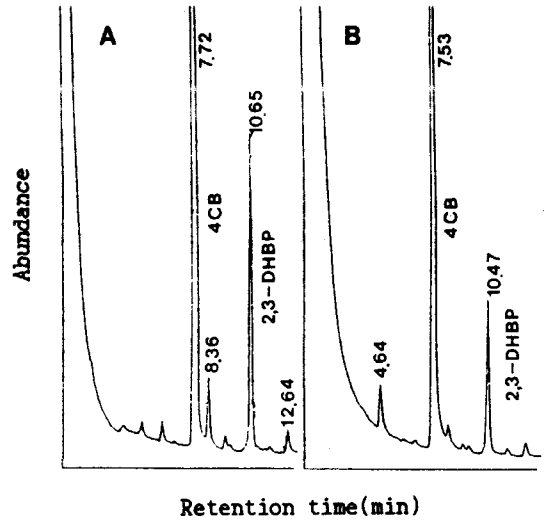


Fig. 4. GC spectra of the metabolites produced from 4CB by *E. coli* CU1(A) and CU101(B). The metabolites were extracted from the 60-hour cultures by diethyl ether extraction method.

DHBP를 분무하여 MCPs를 생성하는 집락체를 얻어 *E. coli* CU1이라고 명명하였다. 이 재조합균주가 가지고 있는 재조합 플라스미드인 pCU1에는 탈염소화 유전자를 포함하는 약 6.4 kb의 *EcoRI* 절편이 vector에 삽입된 약 9.3 kb의 재조합 플라스미드 pCU1임이 Fig. 1에서와 같이 확인되었다. 이 pCU1을 Fig. 2에서와 같이 *EcoRI*과 *SalI*으로 double digestion 하여 pBluescript SK(+)에 ligation시켜 pCU101을 제조하였다. 약 5.1 kb의 pCU101은 약 2.2 kb 정도의 *EcoRI*과 *SalI* 절편이 vector에 삽입되었으며, 이 insert DNA에 탈염소화 유전자를 포함하고 있었다.

탈염소화 유전자의 발현

자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 *E. coli* CU1 및 CU101의 재조합 균주들로부터 탈염소화 유전자의 발현을 확인하기 위해 각 균체의 배양액에서 4CB가 탈염소화작용에 의하여 2,3-DHBP가 생성되는 것을 GC를 이용하여 조사하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 경우 biphenyl(BP)과 4-chlorobiphenyl(4CB)를 기질로 하여 resting cell assay 방법으로 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 4CB를 기질로 하였을 때에도 BP를 기질로 한 실험결과와 똑같이 2,3-DHBP의 peak가 10.87~10.89의 retention time에서 나왔다는 것은 *pcbC* 유전자에 의한 meta-cleavage 이전에 4CB로부터 탈염소화 과정이 일어났다는 것을 의미한다. 이것은 *pcbAB* 유전자가 탈염소화 과정에 관여하고 있다는 것을 말한다. 그리고 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 Table 2에서와 같이 4CB 및 4CBA를 모두 분해하고 4CBA에 대해서도 탈염소화 활성이 있다는 것이 확인되었다. 그러므로

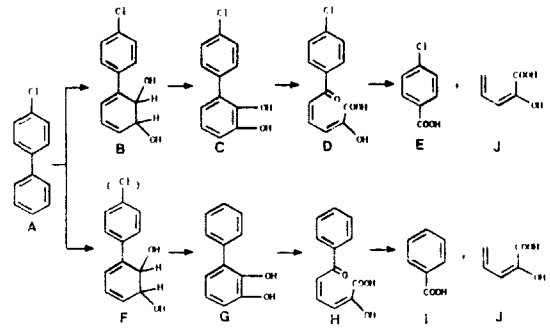


Fig. 5. Proposed two pathways for microbial degradation of 4-chlorobiphenyl.

A. 4-chlorobiphenyl; B. 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; C. 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; D. 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid; E. 4-chlorobenzoate; F. dihydrodiol; G. 2,3-dihydroxybiphenyl; H. 2-hydroxy-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA); I. benzoate; J. 2-hydroxy-pent-2,4-dienoic acid.

4CB가 분해될 때 벤젠 고리의 개환보다 먼저 탈염소화 작용이 일어났다는 것은 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbAB* 유전자가 탈염소화 작용에 관여하는 것이 입증된 것이다.

E. coli CU1과 CU101의 재조합균주에 대해 4CB를 기질로 하여 resting cell assay에 의한 대사산물을

GC로 검사해본 결과는 Fig. 4와 같다. *E. coli* CU1과 CU101은 *pcbAB* 유전자가 형질전환된 재조합균주로서 4CB로부터 탈염소화 작용에 의하여 생성된 2,3-DHBP가 10.47~10.65의 retention time에서 검정되었다. 이는 이미 기술한 *pcbAB* 유전자와 탈염소화 유전자의 연관성을 증명해 주는 것이다. 이 결과는 Morris 등 (13)의 보고와 함께 Khan과 Walia (8)가 보고한 *cbpABCD* 유전자를 포함하는 *P. putida* AC 812가 나타내는 탈염소화 활성과 비교해 볼 때 탈염소화 작용에 의한 분해과정이 벤젠 고리의 개환에 의한 분해와 함께 일어날 수 있다는 점에서 주목할 만한 것이다.

따라서 본 실험의 결과를 토대로 미생물에 의한 4CB의 생분해 경로를 Fig. 5에서와 같이 두가지로 제시해 볼 수 있다. 첫번째는 *pcbAB* 유전자에 의해 염소가 떨어지지 않은채 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl이 생성된 후 *pcbCD* 유전자에 의해 벤젠 고리가 개환되어 4CBA로 분해되는 과정이다. 그리고 두번째는 *pcbAB* 유전자의 탈염소화 작용에 의해 2,3-dihydroxybiphenyl로 된 후 *pcbCD* 유전자에 의해 벤젠 고리가 개환되어 benzoate로 분해되는 과정이다. 따라서 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 *pcbAB* 유전자의 탈염소화 기능에 의하여 상기의 두번째 과정으로 4CB를 분해한다는 것이 입증되었다. 그러므로 PCBs의 난분해성 특성이 여러가지 양상으로 치환되어 있는 염소에 의해 높아진다는 점을 고려할 때, 4CB의 탈염소화 유전자의 클로닝과 분자생물학적 특성 그리고 탈염소화 효소 및 중간 대사산물에 대한 연구는 매우 중요하다고 하겠다.

감사의 글

본 연구는 교육부의 학술연구조성비(1993년도 유전공학연구)로 수행되었으며, 연구 결과의 일부는 서울대 분자미생물학 연구센터의 지원으로 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse, 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1375-1385.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmen, J.A. Smith, and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bedard, D.L., R.E. Wagner, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and J.F. Brown, Jr., 1987. Extensive degradation of aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1094-1102.
- Chang, K.H., P.H. Liang, W. Beck, J.D. Scholten, and D. Dunaway-Mariano, 1992. Isolation and characterization of the three polypeptide components of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3. *Biochemistry* **31**, 5605-5610.
- Gerritse, J., B.J. van der Woode, and J.C. Gottschal, 1992. Specific removal of chloride from the *ortho*-position of halogenated benzoic acids by reductive dechlorination in anaerobic environment cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 273-280.
- Hagblom, M.M., 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 29-72.
- Han, J.J., T.K. Sung, and C.K. Kim, 1993. Cloning and expression of *pcbAB* gene of *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **31**, 129-135.
- Khan, A. and S. Walia, 1989. Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 798-805.
- Kim, C.K., J.W. Kim, and Y.C. Kim, 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 122-128.
- Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
- Löffler, F. and R. Müller, 1991. Identification of 4-chlorobenzoyl-coenzyme A as intermediate in the dehalogenation catalyzed by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3. *FEBS Lett.* **290**, 224-226.
- Löffler, F., R. Müller, and F. Lingens, 1991. Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: An ATP/coenzyme A dependent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 1106-1111.
- Morris, P.J., W.W. Mohn, J.F. Quensen III, J.M. Tije, and S.A. Boyd, 1992. Establishment of a polychlorinated biphenyl-degrading enrichment culture with predominantly *meta* dechlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3088-3094.
- Reineke, W. and H.J. Knackmuss, 1984. Microbial metabolism of haloaromatics: Isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 395-402.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Savard, D., L. Peloquin, and M. Sylvestre, 1986. Cloning of *Pseudomonas* sp. strain CBS3 genes specifying dehalogenation of 4-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **168**, 81-85.
- Schmitz, A., K.H. Gartemann, J. Fiedler, E. Grund,

- and R. Eichenlaub, 1992. Cloning and sequence of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4068-4071.
18. Tsoi, T.V., G.M. Zaitsev, E.G. Plotnikova, I.A. Kosheleva, and A.M. Boronin, 1991. Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* *fcbA* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 165-170.
19. Yun, D.J., J.J. Han, C.K. Kim, and Y.S. Kim, 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4CB catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 53-59.
20. Zaitsev, G.M., T.V. Tsoi, V.G. Grishenkov, E.G. Plotnikova, and A.M. Boronin, 1991. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 171-176.

(Received March 18, 1994)

(Accepted April 2, 1994)

ABSTRACT: Cloning of Dechlorination Genes Specifying Biodegradation of Toxic 4-Chlorobiphenyl

Kim, Chi-Kyung*, Jong-Chan Chae, and Jae-Jin Han (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

The *pcbABCD* genes in *Pseudomonas* sp. DJ-12 specifying degradation of 4-chlorobiphenyl (4CB) were cloned in *Escherichia coli*. The cloned cells of *E. coli* CU1 and CU101 showed to produce 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP) from 4-chlorobiphenyl by dechlorination, as *Pseudomonas* sp. DJ-12 produced 2,3-DHBP from both biphenyl and 4CB. In particular, *E. coli* CU101 transformed with the recombinant plasmid of pCU101 revealed dechlorination activity to produce 2,3-DHBP from 4CB without production of 4-chlorobenzoic acid. Therefore, the *pcbAB* genes (2.2 kb in size) cloned from the chromosome of *Pseudomonas* sp. DJ-12 were found to have dechlorination activity on 4CB to produce 2,3-DHBP.