

## 폭약 TNT를 분해하는 세균인 *Pseudomonas* sp. HK-6에서 분리정제된 Nitroreductase의 특성연구

호은미 · 강형일<sup>1</sup> · 오계현\*  
순천향대학교 생명과학부, <sup>1</sup>순천대학교 환경교육과

**Characterization of Nitroreductase Purified from TNT-degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. HK-6. Ho, Eun-Mi, Hyung-Yeol Kahng<sup>1</sup>, and Kye-Heon Oh\*.** Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600 Korea, <sup>1</sup>Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea – In this study nitroreductase from *Pseudomonas* sp. HK-6 capable of degrading 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) was characterized. Through a series of purification process including ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose, and Q-sepharose, three different fractions I, II, and III having the enzyme activity of NTRs whose molecular weights were approximately 27 kDa were detected in fractions from HK-6 cells. Specific activity of the three fractions were approximately 4.85 unit/mg, 5.47 unit/mg, and 5.01 unit/mg, and concentrated to 9.0-, 10.1-, and 9.3-fold compared to crude extract, respectively. The optimal pH and temperature for the three NTR fractions were approximately 7.5 and 30°C, respectively. Metal ions, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> inhibited approximately 70% of enzymes activities of all NTR, while Fe<sup>2+</sup> did not stimulate or inhibit the activities. Monitoring the effect of chemicals on the enzyme activity revealed that those NTR fractions lost enzyme activity in presence of β-mercaptoethanol, but were a little influenced by dithiothreitol, EDTA and NaCl. The three NTR fractions demonstrated enzyme activities for nitrobenzene and RDX as well as TNT.

**Key words:** TNT, *Pseudomonas* sp. HK-6, nitroreductase, specific activity

TNT를 포함하는 다양한 니트로 화합물의 분해에 관여하는 대표적인 효소는 nitroreductase (NTR)이다. 일반적으로 알려진 NTR은 type I과 type II로 구분되어진다[4]. Type I에 속하는 NTR은 산소에 민감하지 않은(oxygen-insensitive) 것으로 NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase, EC 1.6.99.2)가 있다. 이들은 니트로 방향족에서 두 개의 전자를 환원시킴으로써 nitroso 화합물이나 hydroxylamine과 같은 중간 대사산물을 생성하고, 최종적으로 미생물이 이용할 수 있는 형태로 전환되는 것을 촉매하는 것으로 보고되었다[3]. 많은 연구자들에 의해 type I의 NTR에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 *Enterobacter cloacae*에서는 TNT를 기질로 사용하여 산소에 민감하지 않은(oxygen-insensitive) type I에 속하는 NTR이 분리되었다[4]. 또한 nitrofurazone, nitrobenzene, *p*-nitrophenol, 그리고 hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)와 같은 니트로 방향족 물질을 각각의 기질로 이용하는 여러 미생물로부터 type I의 NTR을 분리하고 이들에 대한 특성을 규명한 연구가 보고된 바 있다[3, 8, 15]. 이와 달리 type II에 속하는 NTR은 NADPH: cytochrome P-450 oxidoreductase (EC 1.6.2.4), NADPH: *b*<sub>5</sub> oxidoreductase (EC 1.6.2.2), NADH: ubqui-

none reductase (EC 1.6.99.3), 그리고 ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase (EC 1.18.1.2)와 같은 산소에 민감한(oxygen-sensitive) 집단으로서, 이들에 대한 연구는 약 7% 정도에 불과하여 정확한 특성이 알려져 있지 않다. NTR의 type II의 특징은 니트로 방향족으로부터 한 개의 전자를 환원시켜 음이온 라디칼(anion-radicals)을 형성하게 되고, 산소에 의해서 쉽게 재산화(reoxidation)가 되어 세포내의 단백질, 핵산, 그리고 지질에 치명적인 영향을 줄 수 있는 superoxide, hydrogen peroxide, 그리고 hydroxyl radical 등을 생성하는 것으로 알려져 있다[10, 15]. *Escherichia coli*로부터 NTR의 type II를 분리한 Zenno 등[17]은 이들이 상기의 다른 type의 NTR I과 II를 모두 가지는 것을 발견하였으며, 같은 장내세균인 *Vibrio* 속의 미생물로부터 분리된 NTR과의 유사성을 상호 비교하였다.

Somerville 등[14]은 nitrobenzene을 분해하는 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45에서 NTR을 분리하여 효소 활성에 영향을 미치는 온도와 pH, 억제제에 대하여 조사하였으며, TNT로부터 유도되는 NTR을 *E. cloacae*에서 분리한 Bryant 등[4]은 ion-exchange chromatography를 실시한 결과 NTR의 활성을 지니는 세 개의 다른 fractions가 나타남을 보고한 바 있다. NTR에 조효소로 작용하는 FMN과 다른 flavin 유사체인 FAD와 riboflavin을 각각 이용하여 NTR의 활성에 대한 안정성을 서로 비교한 Liochev 등[9]은 FMN의 첨가

\*Corresponding author  
Tel: 82-41-530-1353, Fax: 82-41-530-1350  
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

시에 가장 높은 활성을 나타내며 넓은 범위의 온도와 pH에서도 장시간 동안 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 본 연구에서 사용된 세균인 *Pseudomonas* sp. HK-6는 TNT 뿐만 아니라 RDX에 대하여서도 분해능이 확인되었으며, 특히 RDX 분해능과 고농도에 노출되었을 경우에 일어나는 세포 반응과 형태변화에 관한 연구는 이미 보고된 바 있다[5].

본 연구에서는 TNT 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. HK-6로부터 TNT 분해에 작용하는 NTR을 분리 및 정제하여 분자량을 확인하고, 효소의 활성에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 온도, pH, 금속이온, 그리고 억제제를 첨가하여 각각에 대한 특성을 확인하였으며, TNT이외의 다양한 기질을 이용하여 효소에 대한 기질특이성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 배양 시간에 따른 NTR의 활성 측정

분해 세균 HK-6를 0.45 mM TNT가 포함된 무기 액체배지(10 mM  $K_2HPO_4$ , 5 mM  $NaH_2PO_4$ , 1 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.07 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.04 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.0005 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0.00035 mM  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 mM fructose)에 각각 접종하여 2시간 동안 배양하면서, 6시간 간격으로 배양액을 150 ml씩 취하였다. 시간에 따라 얻어진 배양액을  $4,100 \times g$ 에서  $4^\circ C$ 의 조건으로 20분간 원심분리를 실시하여 균체를 모은 후, sonicator (Fisher M-300, Pittsburgh, USA)를 이용하여 파쇄하고 상기의 동일한 조건으로 원심분리를 실시하여 상등액을 취하였다. NTR의 비활성 (specific activity)을 알아보기 위해 활성측정과 단백질 정량을 실시하였다.

### NTR의 정제와 단백질 정량

효소 분리를 위해 배양된 분해 세균 HK-6를 분광광도계 (V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 이용하여 660 nm에서 O.D가 0.6일 때 250 ml의 원심분리 튜브에 넣고  $4,100 \times g$ 에서 20분 동안 원심분리를 실시하였으며, 균체는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 3회 세척하였다. 침전된 균체 무게의 약 3배가 되도록 50 mM Tris-HCl buffer를 첨가하여 재현탁 한 후, sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하고  $8,700 \times g$ 로  $4^\circ C$ 에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 1 당 242 g의 ammonium sulfate (Sigma Co., St. Louis, USA)를 첨가하여 40% 포화 ammonium sulfate로 만들었다. 이후  $6,300 \times g$ 에서 20분간 원심 분리를 실시하여 침전물은 제거하고 상등액을 취하여 1 당 130 g의 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 첨가하여 60% 포화 ammonium sulfate를 만들었고,  $6,300 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 취하였다. 얻어진 침전물에 0.01 mM FMN (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 7 ml을 첨가하고, 얼음에서

약 30분 동안 방치하여 완전히 녹인 후 dialysis membrane (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 1 l의 동일한 buffer (pH 7.5)에서 6시간 이상 투석하였으며, 동일한 buffer에서 다시 투석을 실시하였다. 투석된 용액을 DEAE-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column ( $2.5 \times 20$  cm)에 주입하고, 1 M NaCl을 이용하여 농도구배에 의해 0.01 mM FMN이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 2 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 0.2 mM NADH를 이용하여 nitroreductase의 활성이 높은 부분을 확인하고 단백질 정량을 실시하였으며, 다시 Q-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column ( $2.5 \times 20$  cm)에 주입하였다. 단백질은 1 M NaCl 농도로 약 40분 동안 분취기로 2.5 ml 씩 모아서 0.2 mM NADH를 이용한 효소 활성 측정을 통하여 nitroreductase가 포함된 용출액을 분리하였고, 분리한 용액은 Bradford 방법[2]을 응용하여 단백질 정량을 실시하였으며, bovine serum albumin (BSA)으로 표준 곡선을 작성하였다. 1 ml의 Bradford 용액에 각각 10, 20, 30  $\mu g$ 의 BSA를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성하였고, 측정하고자 하는 단백질 시료는 표준 곡선의 흡광도 범주 내에서 흡광도를 측정하여 정량을 실시하였다.

### NTR의 분자량 측정

NTR의 정제 여부와 분자량을 확인하기 위하여 Bollag 등 [1]의 방법을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. 상기에 소개된 Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하여 동일량의 단백질을 준비하였고, 1  $\times$  sample buffer로 총량을 맞추었다. 준비된 시료를  $100^\circ C$ 에서 5분간 열 처리하고, 얼음에 냉각 후 주입하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 60 V에서 30분간 실시하였고, separating gel에서는 100 V에서 1시간 30분 동안 실시하였다. 전기 영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 60분 동안 염색을 실시하였고, 탈염색은 40% methanol과 10% acetic acid가 포함된 gel destaining solution으로 3회 실시하였다.

### NTR의 활성 측정

정제된 NTR은 전자 공여체인 NADH의 산화에 의해 측정되는 French 방법[6]에 의해서 활성 측정을 실시하였다. NTR의 활성측정은 Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5)에 기질로 TNT (0.1 mM), NADH (0.2 mM)와 정제한 NTR을 최종 1 ml로 맞추어 첨가한 후 분광광도계를 이용하여 반응 산물인 NADH의 몰 흡광계수가  $6,300 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ 이므로 340 nm에서 1분 동안 NADH가 산화되면서 감소되는 값을 측정

하였다. 1 unit은 25°C에서 분당 1 mole의 NADH가 산화되는 양으로 정하고, 비활성은 unit/mg으로 정하였다.

**NTR의 활성에 영향을 미치는 요인 조사**

NTR의 활성에 영향을 미치는 요인으로 온도, pH, 금속이온, 그리고 억제물질에 따른 효소 활성을 측정하여 비교하였다. 효소의 최적 온도를 알아보기 위하여 반응 온도를 10~50°C로 변화시키면서 효소 활성을 측정하였다. 효소 반응액의 온도는 순환 온도 장치를 이용하여 해당되는 온도를 맞추고, 0.4 N HCl로 반응을 멈추게 하였다. 각각의 온도에 해당하는 반응 용액을 사용하여 1분간 반응 후에 340 nm에서 흡광도 측정을 하였으며, 최대 흡광도 값을 100% 기준으로 상대적 활성을 측정하였다. 효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 5.0~7.0에서의 효소 활성은 50 mM potassium phosphate buffer에서 측정하였고, pH 7.5~12.0에서의 활성 측정은 50 mM Tris-HCl buffer를 이용하여 활성 측정을 실시하였다. 각각의 pH에 해당되는 반응 용액을 사용하여 5분간 반응시킨 후에 흡광도를 측정하였다. 금속 이온의 첨가에 따른 효소의 활성을 조사하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 각각 10 mM의 농도로 금속 이온을 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후, 200 µl의 0.1 mM TNT와 10 µl의 0.2 mM NADH 용액 및 분리된 효소 용액을 최종 1 ml로 맞추어 첨가하였으며, 실온에서 1분간 반응시킨 후에 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 억제물질을 조사하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 각각 1 mM의 농도로 억제 물질을 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후, 0.1 mM TNT를 200 µl, 0.2 mM NADH 용액 및 분리된 효소 용액을 각각 10 µl씩 첨가하여 최종 1 ml로 맞추어 실온에서 1분간 반응시킨 후에 측정하였다. 억제물질을 첨가하지 않았을 때 나타나는 효소활성을 100% 기준으로 하여 상대적 활성을 측정하였다.

**NTR의 기질 특이성 조사**

TNT와 그 유사체를 기질로 하여 NTR의 기질 특이성을 조사하였다. 유사 기질에 대한 NTR의 효소 활성 측정은 TNT에 대한 효소 활성 측정과 동일한 방법으로 실시하였다. RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), nitrobenzene, 2,6-DNT (2,6-dinitrotoluene), 2,4-DNT (2,4-dinitrotoluene)를 각각 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 반응 용액에 첨가하고 0.2 mM NADH와 효소 용액을 첨가하여 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNT를 기질로 사용한 효소 활성 측정값을 100%로 하여 상대적 활성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**배양 시간에 따른 NTR의 활성**

0.45 mM의 TNT를 포함하는 액체 배지에서 배양시간에

따른 HK-6의 성장 및 NTR의 활성, 그리고 배양기간 중의 pH 변화를 관찰하였다. 균주 HK-6는 54시간 동안 빠르게 성장하였고, 60시간 이후에는 성장율이 감소하는 것을 확인하였으며, 시간의 경과에 따라 NTR의 활성이 다르게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1). 세균의 성장에 따른 효소의 비 활성(specific activity)을 조사한 결과 배양 후 48시간 동안은 급속하게 증가하였으나, 배양 시간이 늘어남에 따라 효소의 비활성이 감소하는 것으로 나타났다. 배양 초기의 pH는 7.13으로 나타났으며 세균이 성장함에 따라 pH가 7.27로 증가하는 것으로 확인되었는데, 이것은 TNT의 분해가 진행되면서 중간대사산물들이 생성되는 것에 대한 간접적인 증거로 제시될 수 있다.

**NTR의 분리 및 정제**

TNT에 노출된 HK-6에서 유도되는 NTR의 특성과 N-말단 단백질 서열 분석을 위하여 단백질 정제를 실시하였다. 1 l 배양액으로부터 얻은 세포를 파쇄하여 얻은 세포추출물의 총 NTR 활성은 11.50 unit이었으며, 비활성은 0.54 units/mg으로 나타났다. 40~60%의 포화 ammonium sulfate 침전을 통하여 얻어진 단백질은 효소활성 측정 결과, 세포추출물에 비해 1.5배가 농축되었다. NTR을 분리하기 위하여 anion exchange chromatography를 통과시킨 결과 NTR의 활성을 가지는 세 개의 다른 fractions가 나타남을 확인하였다. DEAE-sepharose column을 통과한 시료는 10분 이후부터 1 M의 NaCl 농도구배가 형성되어 NaCl의 농도가 0.3~0.6 M에 해당하는 fractions에서 NTR의 활성이 나타났

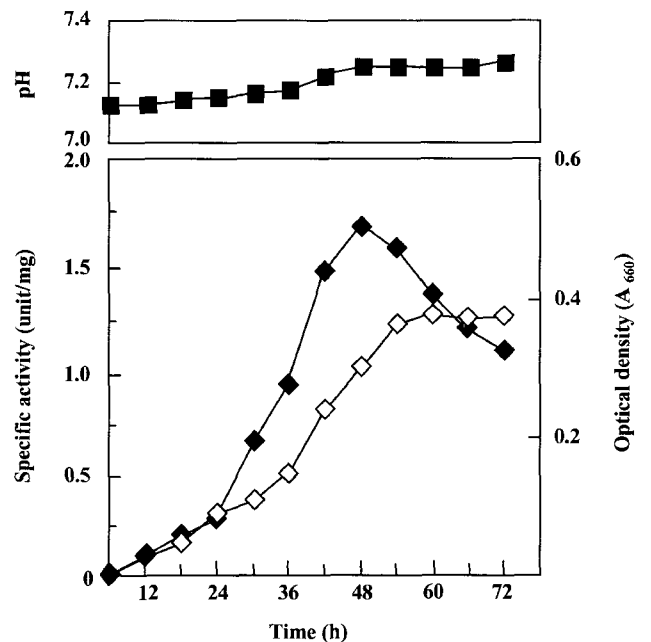


Fig. 1. Cell growth of *Pseudomonas* sp. HK-6 in TNT. ◆, assayed specific activity of nitroreductase; ◇, optical density at 660 nm; ■, pH.

으며, 0.6 M에서의 fraction II에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2A). 이후 NTR fractions I, II, 그리고 III에서 각각 활성이 높은 부분의 fraction에 얻어진 효소 용액을 모아 Q-sepharose column에 주입하였다. 그 결과 역시 약 10분 이후부터 1 M의 NaCl 농도구배가 형성되어 용출 되었는데 NaCl 농도가 0.5 M이 되는 부근의 fraction II 용액에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었다(Fig. 2B). 각 정제 단계에서 분리된 효소 용액의 단백질 정량과 NADH를 이용한 효소 활성 측정을 실시하여 단계별 분리표를 작성하였다(Table

1). NTR fraction I은 column을 이용한 정제 결과 효소의 비활성은 4.85 unit/mg으로 나타났으며, 세포추출물에 비해서 9.0배로 농축되었고, 정제 과정을 거친 회수율은 24%로 나타났다. 정제된 NTR fraction II의 비활성은 5.47 unit/mg으로 나타났고 세포추출물에 비해 10.1배 농축된 것으로 확인되었다. NTR fraction III는 세포추출물에 비해 9.3배 농축되었으며, 비활성은 5.01 unit/mg으로 나타났고, 효소의 최종 회수율은 20%로 나타났다. Bryant 등[4]은 *E. cloacae*로부터 NTR을 분리하기 위하여 Q300-sepharose column을 통

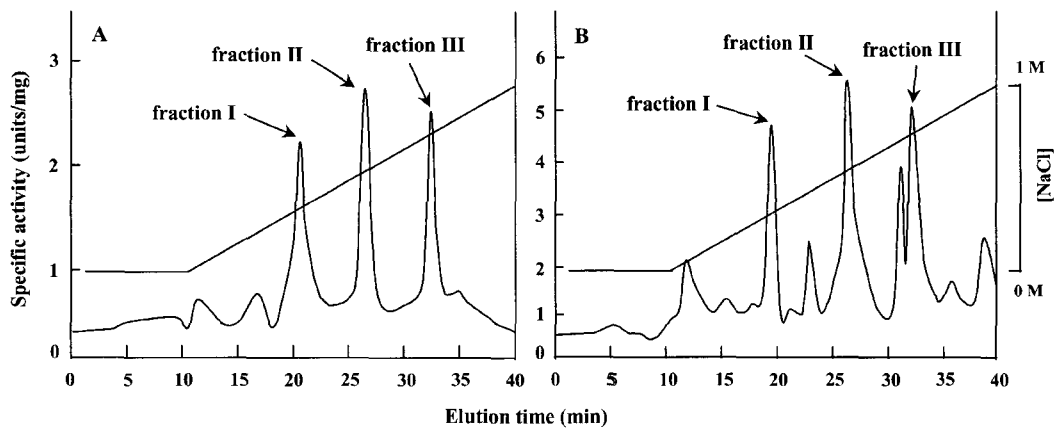


Fig. 2. A; DEAE-sepharose chromatography. Protein was eluted with a 0~1 M gradient of NaCl. Arrows indicate the position of distinct fractions of activity. B; Q-sepharose chromatography. Protein was eluted with a 0~1 M gradient of NaCl. Arrows indicate the position of distinct fractions of activity.

Table 1. Purification of nitroreductase fractions I, II, and purified from *Pseudomonas* sp. HK-6 [(A) fraction I, (B) fraction II, and (C) fraction III].

(A) fraction I

Purification step	vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Ua)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	21.3	11.5	0.54	100	1
Ammonium	23	13.34	10.53	0.79	91.6	1.5
DEAE-sepharose	7	2.66	6.3	2.26	54.8	4.2
Q-sepharose	3	0.57	2.76	4.85	24	9.0

(B) fraction II

Purification step	vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Ua)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	21.3	11.5	0.54	100	1
Ammonium sulfate	23	13.34	10.53	0.79	91.6	1.5
DEAE-sepharose	7	2.78	8.0	2.86	69.57	5.6
Q-sepharose	3	0.63	3.44	5.47	30	10.1

(C) fraction III

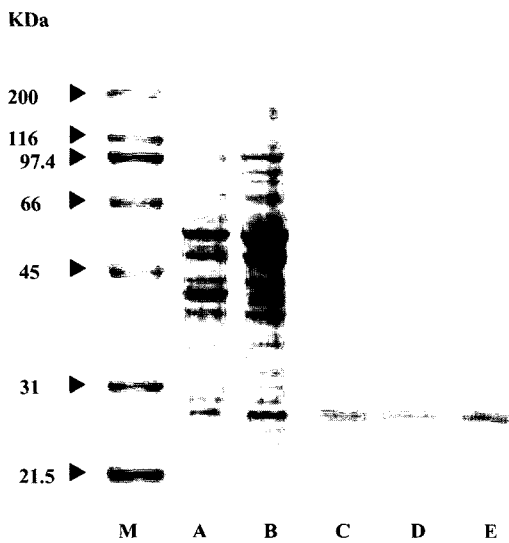
Purification step	vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Ua)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	30	21.3	11.5	0.54	100	1
Ammonium sulfate	23	13.34	10.53	0.79	91.6	1.5
DEAE-sepharose	7	2.45	7.02	2.55	61.4	5.3
Q-sepharose	3	0.45	2.25	5.01	20	9.3

한 정제를 실시하였는데, 그 결과 본 연구의 결과와 동일하게 세 개의 다른 fractions가 나타난 것으로 보고하였으며, NTR의 등전점이 낮은 pH에서 나타나기 때문에 여러 개의 fractions가 나타난다고 설명하였다.

**NTR의 분자량 결정**

균주 HK-6의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 정제 여부와 분자량을 확인하기 위하여 각각의 단백질 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. 효소의 분리 여부는 gel에 나타난 band로 확인하였고, 각 단계를 거친 효소의 순수 정제 여부는 단일 band의 생성으로 확인하

였다. SDS-PAGE를 통해 분석한 NTR fractions I, II, III의 분자량은 모두 약 27 kDa으로 확인되었다(Fig. 3). *S. typhimurium*에서 분리된 NTR의 크기는 약 24 kDa인 것으로 Watanabe 등[16]에 의해 보고되었다. 특히 Bryant 등[4]은 TNT를 기질로 이용하여 *E. cloacae*에서 분리된 NTR의 subunit을 조사하기 위하여 단백질을 변성시킨 조건과 변성시키지 않은 조건에서 크기를 조사했을 때, 모두 27 kDa으로 나타남을 확인하여 NTR이 monomer로써 효소 활성을 가지는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 분리된 HK-6의 NTR은 *E. cloacae*에서 분리된 NTR과 동일한 크기로 조사되어 유사성이 존재할 것으로 추측된다.



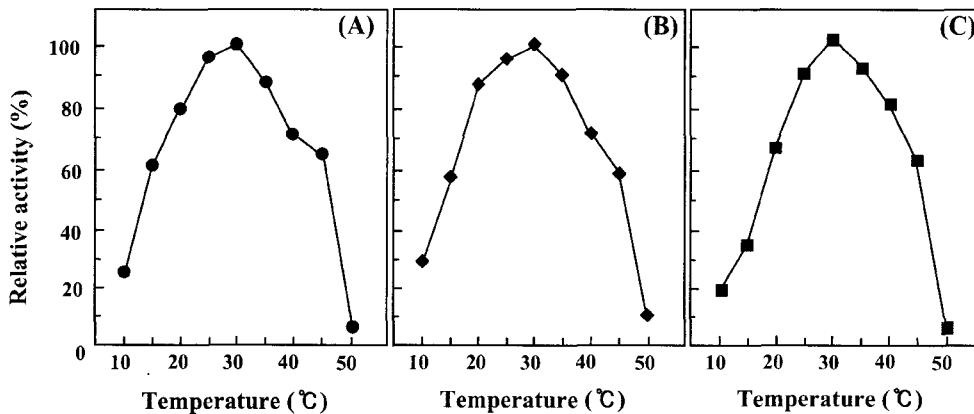
**Fig. 3. SDS-PAGE of purification procedure nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6.** M: molecular size marker, A: crude cell extract, B: 40~60% saturated crude cell extract with ammonium sulfate, C: eluted nitroreductase fraction I from Q-sepharose, D: eluted nitroreductase fraction II from Q-sepharose, E: eluted nitroreductase fraction III from Q-sepharose chromatography.

**NTR 활성의 최적 온도**

균주 HK-6의 NTR 활성에 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 10~50°C의 온도 범위에서 활성을 측정하였다(Fig. 4). NTR fraction I의 활성 조사결과 10°C에서 최대 활성 온도의 25%로 나타나기 시작하여 적정 온도는 20~35°C 사이로 조사되었고 최적 활성 온도는 30°C인 것으로 확인되었다. NTR fraction II의 활성 역시 10°C에서 최대 활성 온도의 30%로 나타나기 시작하여 적정 온도는 25~35°C 사이로 조사되었으며, 효소의 최적 활성 온도는 30°C로 나타났다. NTR fraction III의 활성은 10°C에서 최대 활성 온도의 20%로 활성을 나타내기 시작하여 적정 온도는 25~35°C 사이로 조사되었으며, 효소의 최적 활성 온도는 30°C로 확인되었다. *E. cloacae*에서 TNT를 기질로 이용하여 분리된 NTR은 활성은 30°C에서 최대의 활성을 나타내는 것으로[4], HK-6의 경우와 동일하게 나타났다.

**NTR 활성의 최적 pH**

NTR의 활성이 최적으로 나타나는 pH를 알아보기 위하여 pH 5.0~12.0의 범위에서 활성을 측정하였다. 균주 HK-6의 NTR fraction I은 pH 5.0에서는 활성이 거의 나타나지 않았



**Fig. 4. Effect of temperature on the activity of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6.** The relative activity was calculated as the activity at 30°C was 100%. [(A) fraction I, (B) fraction II, (C) fraction III]

고 pH 6.0이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 효소의 적정 pH는 7.0~8.0으로 나타났으며, 최적 pH는 7.5로 확인되었다. 그러나 pH가 9.0이상으로 변화하면서 활성은 급격하게 감소하였고, pH 12.0에서는 효소의 활성이 상실되는 것으로 확인되었다(Fig. 5). NTR fraction II의 pH에 대한 조사에서도 pH 5.0에서는 활성이 나타나지 않았고 pH 6.0 이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 적정 pH가 7.0~8.0으로 나타났으며, 효소 활성의 최적 pH는 7.5로 나타났다. pH 9.0이상에서는 효소의 활성이 급격하게 감소하여 상실되는 것을 확인하였다. pH에 대한 효소 활성의 조사에서 NTR fraction III는 pH 5.0에서 활성이 나타나지 않았고 pH 6.0 이상에서 효소의 활성이 나타나 증가하기 시작하여 효소의 적정 pH는 7.0~8.0으로 나타났으며, 효소 활성의 최적 pH는 7.5로 나타났다. pH 9.0이상에서는 효소의 활성이 급격하게 감소하여 pH 12.0에서는 활성이 상실되는 것을 확인하였다. Nokhbeh 등[11]에 의해 *S. enterica*에서 분리된 NTR은 pH 7.0에서 최고 활성을 나타내었다. 효소는 비교적 넓은 범위의 온도와 pH에서 활성을 나타내었는데, 이러한 결과는 군주 HK-6가 다양한 환경에 서식하는 세균이므로 이들로부터 분리된 NTR의 활성에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

**NTR 활성에 미치는 금속 이온의 효과**

금속 이온의 첨가에 따른 NTR fractions I, II, 그리고 III의 활성의 저해 효과를 알아보기 위해서 다양한 금속 이온들을 첨가하여 활성을 조사하였다. 군주 HK-6의 NTR fraction I은 CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>와 HgCl<sub>3</sub>에 의해서 각각 6.4%, 5.9% 그리고 29.8%로 활성이 감소하였고, CaSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>에 의해서는 활성이 소폭 감소하는 것으로 나타났다. NTR fraction II의 활성은 CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>와 HgCl<sub>3</sub>에 의해서 14.7%, 9.2% 그리고 20.5%로 각각 활성이 감소하였고, CaSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>에 의해서는 각각 45.1%, 70.0%로 감소하였다. 그러나 FeCl<sub>3</sub>의 첨가 시에는 효소의 활성이 소폭 증가

하는 것으로 확인되었다. NTR fraction III의 활성에 대한 조사에서는 CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>와 HgCl<sub>3</sub>에 의해서 활성이 각각 5.3%, 4.9% 그리고 34.6%로 감소하였으며, CaSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>에 의해서는 각각 54.4%, 68.8%로 활성이 감소하는 것으로 확인되었으나 FeCl<sub>3</sub>를 첨가 시에는 효소의 활성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6). Oh 등[12]은 TNT에 노출된 *P. aeruginosa*에서 분리한 NTR에 Cu<sup>2+</sup>의 첨가 시 활성이 가장 크게 저해되고 Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>에 의해서는 50~70%로 감소하는 것을 확인하였으며, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 그리고 Ni<sup>2+</sup>에 의해서도 효소의 활성이 줄어드는 것으로 보고하였다. 금속 이온은 효소의 활성부위에 작용하여 그 활성을 증가시키거나 감소시키는데, 특히 Ag<sup>+</sup>는 단백질의 황산화기에 결합하여 효소의 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 효소 활성 부위에 황을 포함하는 cysteine이 중요한 역할을 하는 것으로 조사되었고, 또한 효소의 활성부위에 철을 포함하는 효소는 금속 이온 Fe<sup>+</sup>의 첨가 시 효소의 활성이 증가하는 것

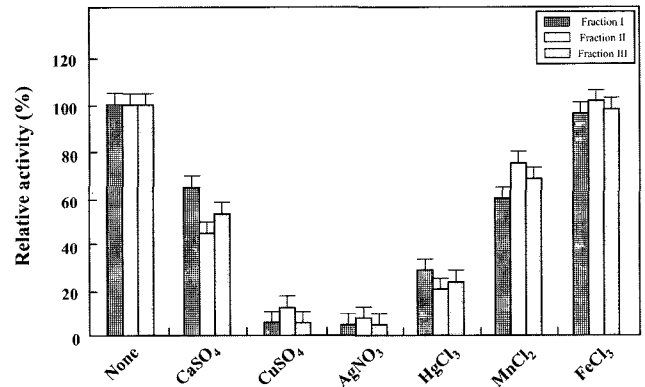


Fig. 6. Effect of several metal ions on the activity of nitroreductase fraction I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6. The final concentration of each metal ion was 0.1 mM. The height of each bar represents the mean value of three independent experiments.

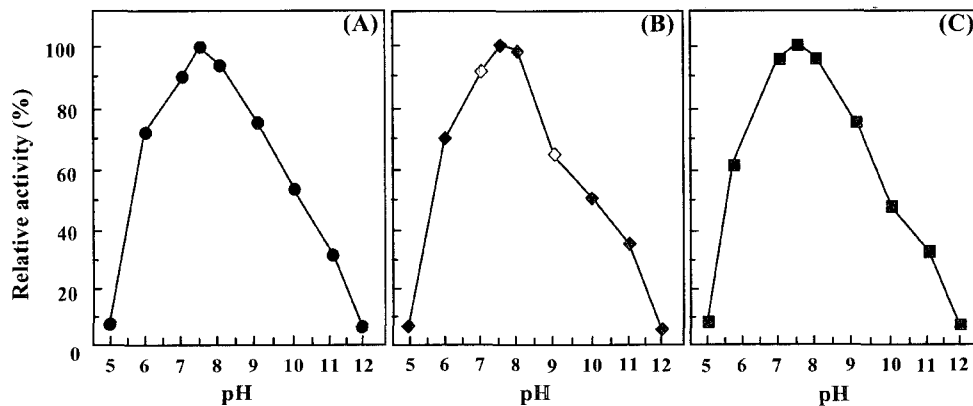


Fig. 5. Effect of pH on the activity of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6. The relative activity was calculated as the activity at pH 7.5 was 100%. [(A) fraction I, (B) fraction II, (C) fraction III]

으로 확인되었다[7]. 본 연구에서도  $Ag^+$ 가 HK-6의 NTR의 활성을 저해시키는 것으로 보아 효소 활성 부위에 황을 포함하는 아미노산이 존재하는 것으로 예상된다.

#### NTR 활성에 미치는 억제물질의 효과

균주 HK-6의 NTR 효소 활성에 대한 억제물질을 조사하기 위하여 실시한 결과, NTR fraction I은 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 60.2%, 44.0%, 35.2%로 저해되는 것으로 나타났으나,  $\beta$ -mercaptoethanol의 첨가 시에는 효소의 활성이 모두 억제되는 것으로 나타났다. NTR fraction II에 대한 조사에서는 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 68.2%, 39.8%, 36.7%로 저해되는 것으로 나타났으나, 역시  $\beta$ -mercaptoethanol의 첨가 시에는 효소의 활성이 모두 억제되는 것을 확인하였다. NTR fraction III는 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 53.1%, 42.6%, 37.8%로 저해되었으나,  $\beta$ -mercaptoethanol을 첨가 시에는 효소의 활성이 억제되는 것으로 나타났다(Table 2). 일반적으로  $\beta$ -mercaptoethanol과 EDTA는 환원제로 사용되어 NTR과 같은 효소의 활성을 안정화시키는 목적으로 첨가되는데, Somerville 등[14]은 이들이 효소 내에 5 mM 이하의 저 농도로 존재하게 되면 오히려 활성을 감소시키는 것으로 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 효소 반응 용액의 최종 부피에 1 mM의 농도가 되도록  $\beta$ -mercaptoethanol과 EDTA를 첨가하였기 때문에 NTR의 활성을 저해시킨 것으로 판단된다.

#### NTR의 기질 특이성

TNT와 그 유사체를 기질로 하여 NTR fractions I, II, 그리고 III의 기질 특이성을 조사하였다. 균주 HK-6에서 분리한 NTR fraction I은 TNT, nitrobenzene, 그리고 hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)에 대해서는 각각 100%, 82.5%, 그리고 74.2%로 활성이 비교적 높게 나타났으나 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)과 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT)에서는 42.4%와 15.6%로 낮은 활성을 나타내었다. NTR fraction II의 기질 특이성에 대하여 조사한 결과, TNT,

**Table 3. Substrate specificities of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6.**

Substrates	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		Fraction I	Fraction II	Fraction III
TNT	0.1	100	100	100
Nitrobenzene	0.1	82.5	89.1	77.7
RDX	0.1	74.2	81.2	76.8
2,6-DNT	0.1	42.4	40.4	41.2
2,4-DNT	0.1	15.6	17.3	14.4

nitrobenzene, RDX에서는 각각 100%, 89.1%, 81.2%로 활성을 나타냈으며, 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 40.4%와 17.3%의 활성을 나타내었다. NTR fraction III는 TNT, nitrobenzene, RDX에서는 각각 100%, 77.7%, 76.8%의 활성을 나타냈으며, 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 41.2%와 14.4%의 낮은 활성을 보여주었다(Table 3). Riefler 등[13]은 니트로기(nitro group)가 대칭적으로 결합되어 있는 TNT의 대사에서는 환원반응이 요구되어지나, 2,6-DNT나 2,4-DNT 등은 산소화 반응에 참여하는 oxygenase에 의한 작용을 받아 분해될 수 있기 때문에 환원되는 과정을 거치지 않으므로 reductase에 의해 큰 영향을 받지 않는다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 HK-6의 NTR에 대한 2,6-DNT나 2,4-DNT의 기질 특이성의 결과에서도 유사하게 나타난 것으로 판단된다.

향후 본 연구에서는 상기의 얻어진 결과를 바탕으로 TNT 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. HK-6에서 분리된 NTR의 아미노산 및 염기서열을 분석하여 다른 세균에서 분리된 NTR과의 유사성을 비교하고, 분자생물학적 특성 규명을 위한 실험이 진행될 것이다.

#### 요 약

균주 *Pseudomonas* sp. HK-6로부터 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)의 대사 과정에서 유도되는 nitroreductase (NTR)를 분리 및 정제하여 다양한 특성조사를 실시하였다. NTR은 균주 HK-6의 세포추출물로부터 ammonium sulfate 침전, DEAE-sepharose, 그리고 Q-sepharose chromatography의 일련의 과정을 통하여 분리되었고, NTR의 활성을 가지는 세 개의 다른 fractions를 확인하였다. 균주 HK-6의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 비활성은 각각 4.85 unit/mg, 5.47 unit/mg, 5.01 unit/mg으로 측정되었으며, 세포추출물에 비해 각각 9.0배, 10.1배, 9.3배 농축된 것으로 나타났다. SDS-PAGE에서 측정된 균주 HK-6의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 분자량은 모두 약 27 kDa으로 확인되었다. 정제된 NTR의 활성에 온도, pH, 금속 이온, 억제 물질의 효과와 기질 특이성 등에 대한 물리화학적 특성 조사를 실시하였다. 균주 HK-6의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 적

**Table 2. Effect of specific inhibitors on the activity of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Pseudomonas* sp. HK-6.**

Inhibitors	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		Fraction I	Fraction II	Fraction III
None	0	100	100	100
Dithiothreitol	1	60.2	68.2	53.1
EDTA	1	44.0	39.8	42.6
NaCl	1	35.2	36.7	37.8
$\beta$ -mercaptoethanol	1	0	2.8	0

정온도는 25~35°C로 확인되었고, 모두 30°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 이들 효소 활성의 적정 pH는 7.0~8.0이었고, 최적 pH는 7.5로 확인되었다. TNT에 대한 HK-6의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 활성은 금속 이온 Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, 그리고 Hg<sup>2+</sup>에 의해서 약 70%이상 저해되었으며, Mn<sup>2+</sup> 또는 Ca<sup>2+</sup>에 의해서 약 20~50%로 활성이 억제되었다. 그러나 Fe<sup>2+</sup> 첨가 시에는 효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. NTR의 활성에 대한 억제물질의 영향은 β-mercaptoethanol의 첨가 시에 효소의 활성이 모두 억제되었고, dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl의 첨가 시에도 활성이 감소하는 것으로 확인되었다. TNT와 그 유사기질을 이용하여 HK-6에서 분리된 NTR의 기질 특이성을 조사한 결과, TNT, nitrobenzene, 그리고 RDX에 대해서는 비교적 활성이 높게 나타났으나 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 낮은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

## REFERENCES

- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. 1996. *Protein method*. 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY, USA.
- 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.
- Brunmark, A., E. Cadenas, A.J. Segura, C. Lind, and L. Ernster. 1988. DT-diaphorase-catalyzed two-electron reduction of various *p*-benzoquinone- and 1,4-naphthoquinone epoxides. *Free Radic. Biol. Med.* **5**: 133-143.
- Bryant, C. and M. DeLuca. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H-nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 4123-4130.
- Chang, H. W., H. Y. Kahng, S. I. Kim, J.W. Chun, and K. H. Oh. 2004. Characterization of *Pseudomonas* sp. HK-6 cells responding to explosive RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 323-329.
- French, C. E., S. Nicklin, and N. C. Bruce. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2864-2868.
- Haynes, C. A., R. L. Koder, A.-F. Miller, and D. W. Rodgers. 2002. Structure of nitroreductase in three states. *J. Biol. Chem.* **277**: 11513-11520.
- Kitts, C. L., C. E. Green, R. A. Otley, M. A. Alvarez, and P. J. Unkefer. 1999. Type I nitroreductase in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can. J. Microbiol.* **46**: 278-282.
- Liochev, S. I., A. Hausland, and J. Fridocich. 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **96**: 3537-3539.
- Nivinskas, H., R. L. Koder, Z. Anusevičius, J. Šarlauskas, A.-F. Miller, and N. Čenas. 2001. Quantitative structure-activity relationships in two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:nitroreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 170-178.
- Nokhbeh, M. R., S. Boroumandi, N. Pokorny, P. Koziarz, E. S. Paterson, and I. B. Lambert. 2002. Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* TA1535. *Mutat. Res.* **508**: 59-70.
- Oh, K. H. and Y. J. Kim. 1998. Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *s*-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**: 702-708.
- Riefler, R. G. and B. F. Smets. 2000. Enzymatic reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroarenes: Kinetics linked to one-electron redox potentials. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 3900-3906.
- Somerville, C. C., S. F. Nishino, and J. C. Spain. 1995. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **177**: 3837-3842.
- Wang, C. -J., S. Thiele, and J. -M. Bollag. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**: 1-8.
- Watanabe, M., T. Nishino, and T. Nohmi. 1998. Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductase of *Salmonella typhimurium* L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **273**: 23922-23928.
- Zeno, S., H. Koike, A. N. Kumar, R. Jayaraman, M. Tanokura, and K. Saigo. 1996. Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **178**: 4508-4514.

(Received Aug. 5, 2004/Accepted Sep. 9, 2004)