

폐광지역에서 분리한 Benzoate 분해세균 *Pseudomonas* sp. NFQ-1에서 정제된 Catechol 1,2-Dioxygenase의 특성

주정수 · 윤경하*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Quinoline (2,3-benzopyridine)을 유일한 탄소원과 질소원, 그리고 에너지원으로 이용하는 *Pseudomonas* sp. NFQ-1을 실험 균주로 사용하였으며, 균주로부터 catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)를 유도하기 위하여 탄소원으로 benzoate를 사용하였다. C1,2O의 효소학적 특징을 조사하기 위하여 benzoate에서 배양한 *Pseudomonas* sp. NFQ-1을 초음파 분쇄기로 파쇄하고, ammonium sulfate 침전과 gel permeation chromatography 및 Source 15Q의 과정을 실시하여 C1,2O를 분리 및 정제하였다. 정제된 C1,2O의 특이활성(specific activity)은 14.21 unit/mg으로 나타났으며, SDS-PAGE에 의해 조사된 C1,2O의 분자량은 약 33 kDa이었다. C1,2O는 catechol과 4-methylcatechol 및 3-methylcatechol에 대해서 효소활성을 나타내는 것으로 확인되었다. C1,2O의 Km은 38.54 μ M로 측정되었고, Vmax는 25.10 μ mol·min⁻¹·mg⁻¹으로 나타났다. C1,2O는 30°C와 pH 8.5에서 최적활성을 나타내는 것으로 조사되었으며, Ag⁺, Hg⁺, Ca²⁺, 그리고 Cu²⁺는 C1,2O의 활성을 억제하였다. 분석되어진 N-말단 아미노산 서열은 ¹TKISQSASIQKFFEEA¹⁷이었으며, *Pseudomonas aeruginosa* PA01과 82%로 가장 높은 유사성을 보였고 *Pseudomonas arvilla* C-1와는 71%, *Pseudomonas putida* KT2440과는 59%, 그리고 *Pseudomonas* sp. CA10과는 53%의 상동성이 각각 존재하는 것으로 확인하였다.

Key words □ benzoate, catechol 1,2-dioxygenase, *Pseudomonas* sp. NFQ-1, N-terminal amino acid sequence

산업혁명 이후 인류는 화석연료를 무분별하게 사용하였으며 그로 인한 환경오염 문제가 심각하게 대두되고 있다. 그 중 대표적인 환경오염 물질은 방향족 고리 화합물로서, benzene 고리의 구조가 비교적 안정하여 자연계에서 난분해성물질로 구분되어 있다. 현재 화학공업 등 산업분야에서 발생하는 xylene, salicylate, benzene, toluene, phenol 등은 자연계에서 분해가 어려울 뿐만 아니라 독성을 나타내는 환경오염 물질로 알려져 있다(2, 10, 21). 이러한 방향족 화합물들의 분해 및 제거는 백금촉매와 활성탄을 이용하거나, 2차 오염물질의 발생 방지 및 경제적 처리를 위하여 생물학적 처리에 대한 연구가 수행되고 있다(13). 자연생태계의 미생물, 특히 토양 미생물은 상당히 다양한 천연 또는 합성 유기 화합물을 변화시키거나 분해하여 성장할 능력이 있는 것으로 알려져 있으며 그 가운데 *Pseudomonas* 속(genus) 세균은 유일 탄소원과 에너지원으로 인공적이나 자연적으로 발생하는 방향족화합물 등을 포함한 많은 종류의 화합물을 매개하여 성장할 수 있는 것으로 알려져 있다(8). 미생물에 의한 방향족 화합물의 분해과정에서는 공통 중간산물인 catechol과 protocatechuate를 형성하며, benzene 고리가 미생물이 생성하는 효소의 작용으로 개환되면서 지방족 화합물로 변형된 후 효소반응에 의해 완전 분해된다. 이처럼 방향족 화합물의 산화는 어떠

한 경우이나 benzene 고리에 hydroxyl 기(group)를 도입하는 oxygenase의 작용으로 시작되어 catechol이나 protocatechate를 거쳐 benzene 고리가 열리게 된다(12). Catechol은 다른 두 종류의 dioxygenase가 작용하여 두 가지 다른 과정으로 분해가 일어난다. 방향족 고리의 -OH기 사이를 절단하는 catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)는 catechol에 작용하여 2개의 산소 원자가 붙게 되면서 방향족 고리가 열리게 되며, 이 반응에 의해서 cis,cis-muconate가 생성된다. 방향족 고리의 분해와 β -ketoacid 경로로 거치면서 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 succinate와 acetyl-CoA가 만들어진다(ortho 경로)(20). 다른 생분해 기작으로 meta 경로가 있는데, 이 반응은 고리(ring)의 hydroxyl 기 외부를 절단하는 catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O)가 catechol에 작용하여 최종적으로 미생물이 이용할 수 있는 형태인 pyruvate와 acetaldehyde로 분해되어 대사에 이용된다(22). Catechol의 고리를 열리게 하는 중요한 역할을 하는 catechol dioxygenase는 효소의 활성을 위해서는 반드시 철의 함유를 필요로 하는데, hydroxyl 기 내절단 효소는 Fe(III), hydroxyl 기 외절단 효소는 Fe(II)를 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다(21). 방향족 화합물의 분해 능이 우수한 균주에서의 C1,2O의 특성 조사와 유사성 연구가 활발히 진행중이다. Patel 등(21)은 배양한 *Acinetobacter calcoaceticus*에서 돌연변이체를 유도하여 연속적인 C1,2O를 생산하는 *A. calcoaceticus* P-96을 획득하였다. Briganti 등(5, 6)은 사용되는 기질에 따른 C1,2O의 발현 양상을 알아보기 위하여, 탄소원으로 phenol과 benzoate를 이용하여 배양한 *A. redioresistens*

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-1250, Fax: 041-530-1256
E-mail: Kyungha@sch.ac.kr

에서 다른 종류의 C1,2O를 분리하였고 benzoate에서 배양한 균주에서 높은 비율로 발견되는 것을 발견하였다. C1,2O의 연구는 그람양성 세균에서도 폭 넓게 연구되고 있다. Aoki 등(2)은 aniline을 분해하는 *Rhodococcus erythropolis* AN-13에서 넓은 범위의 pH와 높은 온도에서도 활성과 안정성을 유지하는 효소를 분리하여 특성을 조사한 결과, 이 효소가 황산화기를 가지고 있으며, 3-methylcatechol에서 높은 기질 특이성을 갖는 것으로 확인하였다. 또한 프로테오미 연구도 많은 진척을 보이면서 C1,2O에 대한 보고가 증가하고 있다. Nakai 등(16)은 *Pseudomonas putida* mt-2로부터 C1,2O를 분리하여 이 효소가 두 개의 subunits으로 이루어진 dimer임을 밝혔고, N-말단 아미노산 서열의 상동성 및 그 특성을 연구하였다.

본 연구에서는 quinoline의 분해능이 탁월한 *Pseudomonas* sp. NFQ-1을 benzoate가 포함된 배지에 배양한 후, 분해에 관여하는 효소인 C1,2O를 분리 및 정제하고, 분자량과 효소 활성에 영향을 미치는 요인에 대하여 조사하였으며, 그 효소학적 특성 및 N-말단의 아미노산 서열을 분석하였다.

재료 및 방법

세균의 배양 조건

충남 보령에 위치하는 석탄 폐광지역으로부터 채취한 토양으로부터 quinoline을 분해하는 세균 *Pseudomonas* sp. NFQ-1을 분리하였다(25). 분리된 *Pseudomonas* sp. NFQ-1을 Nakazawa (18)의 배지를 변형한 방법을 이용하여 기질로서 quinoline 대신에 benzoate에 배양하여 분해에 관여하는 catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)를 유도하였다. 사용된 배지는 증류수 1L당 1g benzoate, 0.5g yeast extract, 3g (NH₄)₂SO₄, 1.8g KH₂PO₄, 1.67g NaCl, 0.1g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g MgSO₄ · 7H₂O를 포함하고 최종 pH가 8.0이며, 균주 NFQ-1을 접종한 후, 14시간동안 30°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다.

C1,2O의 분리

효소를 분리하기 위하여 배양된 *Pseudomonas* sp. NFQ-1 균주를 변형된 Nakazawa 배지에서 14시간 동안 배양하고 11,000 × g에서 20분 동안 원심 분리하여 균체를 모은 뒤 50 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 3회 세척하였다. 세척된 균체를 50 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 0.25g (wet weight)/mg의 농도가 되도록 재현탁하여 ultrasonicator (XL2010 Heat Systems Inc.)로 파쇄하였다. Sonication 파장은 16 KHz (80% outpower)로 30초 간격으로 45분간 90회 실시하였으며, 이후 4°C에서 25,000 × g로 20분간 원심분리(MICRO 17TR Hanil Science Industrial Co., Ltd.)하여 상등액을 취하였다. 상등액을 30% 포화 (NH₄)₂SO₄로 만들기 위하여 천천히 교반하면서 배양액에 1L당 176g의 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 후 1시간 동안 반응하였다. 그 후 반응액을 11,000 × g에서 20분간 원심 분리하여 침전물은 제거하고, 상등액을 취하였다. 다시 상등액에 55%의 (NH₄)₂SO₄를 만들기 위해 (NH₄)₂SO₄를 L당 160g씩 위와 같은 방법으로 첨가하여

11,000 × g에서 20분간 원심분리하고 침전물을 취하였다. 침전된 단백질에 10 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 dialysis tubing (Sigma, St. Louis, USA)을 이용하여 1L의 동일 buffer에서 1시간동안 투석 후, 다시 동일 buffer 3 L로 12시간동안 투석을 실시하였다. 투석을 실시한 시료 용액을 50 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형 시킨 Sephadex G-100 column (2 × 70 cm)에 주입하여 6 ml/hr의 유속으로 2 ml씩 분획하여 동일 buffer로 용출하였다. 용출액은 C1,2O의 활성이 높은 부분을 모아서 단백질 정량을 실시하고 다시 HPLC의 50 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 미리 평형화시킨 Source 15Q column (1 × 10 cm)에 주입하였다. 단백질은 유속 1 ml/min, NaCl의 농도를 0-0.5 M로 증가시키면서 1 ml 씩 1시간동안 용출하였다. 분리한 용액은 Bradford 방법(4)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다.

C1,2O의 분자량 측정

겔럼을 통해 분리된 균주 NFQ-1의 C1,2O는 효소의 분자량과 분리 단계별 순수 정제를 확인하기 위하여 Laemmli법(14)에 따라 전기영동을 실시하였다. Separating gel은 15%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. 전기영동은 분자량 marker와 정제 단계별 sample을 5 × bromophenol blue와 혼합한 후 끓는 물에서 3분간 변성시키고 well에 첨가한 후 25 mA에서 1시간 20분간 전개하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 염색 한 후 탈염색은 40%의 methanol과 10%의 acetic acid가 포함된 용액에서 하룻밤 동안 실시하였다.

C1,2O의 활성 측정과 활성에 미치는 요인

C1,2O의 활성 측정은 catechol 20 μl, 50 mM의 Tris-HCl (pH 8.5) 975 μl, 그리고 5 μl의 분리된 효소 용액을 첨가하여 최종 1 ml로 맞춘 후 30°C에서 3분간 반응시키고 반응액은 UV/vis spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다. 반응 산물인 cis,cis-muconic acid의 몰 흡광계수 (molar extinction coefficient)는 16,000 M⁻¹cm⁻¹이며, 1 unit을 30°C에서 1분간 1 μmole의 cis,cis - muconic acid를 생산하는 효소량으로 정하고, 특이 활성(specific activity)은 units/mg으로 나타내었다. 기질 특이성을 알아보기 위해서 기질로 사용되는 여러 catechol 유사 기질인 4-methylcatechol, 3-methylcatechol, 4-chlorocatechol, pyrogallol, protocatechuate를 같은 농도로 첨가하여 실시하였다 C1,2O의 활성에 영향을 미치는 요인으로 pH, 온도, 그리고 금속이온의 첨가에 따른 효소 활성을 측정하여 비교하였다. 효소 활성의 최적 pH를 조사하기 위하여 pH 5.0-7.5에서는 50 mM potassium phosphate buffer를, pH 8.0-11.0에서는 50 mM Tris-HCl buffer를 이용하여 활성측정을 실시하였다. 각각의 pH에 해당하는 반응용액을 사용하여 5분간 반응 후에 260 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 최대 흡광도 값을 100% 기준으로 상대적 활성을 측정하였다. 온도에 의한 효소 활성의 영향을 조사하기 위하여 반응용액의 온도를 25-50°C로 변화를 시키면서 효소

활성을 측정하였다. 여러 금속 이온에 의한 효소의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 0.1 mM의 농도로 금속 이온을 각각 첨가하고 10분간 방치한 후에 효소와 반응 후 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

C1,2O의 kinetic constants

정제된 효소의 catechol에 대한 Km 값을 측정하기 위하여 여러 기질농도에서 효소활성을 측정하였다. 기질의 농도 범위는 50-200 μ M로 25 μ M간격으로 각 농도에서 C1,2O활성을 조사한 후 Lineweaver-Burk plot에서 산출하였다.

C1,2O의 N-말단 아미노산 서열분석과 상동성조사

정제된 C1,2O를 SDS-PAGE 상에서 전개한 gel을 semidry electroblotter (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 18V, 20분간 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막(Applied Biosystems, Foster City, USA)에 옮긴 후 PVDF 막을 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka Chemika) 용액으로 염색하였으며, 탈염색을 실시하여 염색된 단백질 부분을 잘라내었다. 잘라낸 PVDF 막을 한국기초과학연구원 연구원의 단백질 자동 서열 분석기(Model 491A, Perkin Elmer, Foster City, USA)를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다. 얻어진 N-말단 아미노산 서열은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 상동성을 조사하였다.

결과 및 고찰

C1,2O의 정제

Benzoate에 의해 유도된 C1,2O의 정제를 위하여 배양액에서 얻은 세포를 초음파로 파쇄하여 얻어진 세포추출물의 총 C1,2O의 활성은 324.9 unit으로 나타났고, 특이 활성은 1.13 units/mg으로 측정되었다. 30-50%의 포화 ammonium sulfate 침전을 통하여 얻어진 단백질은 효소 활성 측정 결과, 1.43배가 농축된 것을 확인하였다. 효소를 보다 농축, 정제하기 위하여 ammonium sulfate 침전으로 얻어진 시료를 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column에서 분획하였으며(Fig. 1), 그 중 효소 활성이 높은 5개의 분획 시료를 모아 효소활성을 측정한 결과, 총 C1,2O의 활성은 136.35 unit으로 나타났고, 특이 활성은 2.65 units/mg으로 세포추출물에 비해 2.35배 농축되었다. 이후 gel permeation chromatography를 통해 얻어진 시료를 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형화된 Source 15Q column에 주입하여 통과시킨 결과, NaCl의 농도가 0.27-0.29 M 부근의 분획된 시료에서 높은 효소활성을 확인하였다(Fig. 2). 이 분획 시

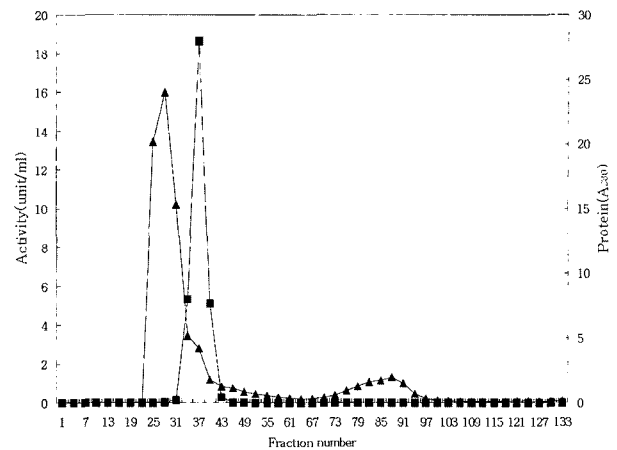


Fig. 1. Purification of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NFQ-1 with preparative gel permeation chromatography. Sephadex G-100 column dimension : 2 × 70 cm. Fraction of 2 ml were collected at a rate of 6 ml/hr. Symbols : catechol 1,2-dioxygenase activity (■), and protein concentration (▲).

료를 모아 효소활성을 측정한 결과 총 효소의 활성은 74.46 units로 나타났으며, C1,2O의 특이 활성은 14.21 units/mg으로 확인되었으며, 세포추출물에 비해 12.57배 농축되었다. *Acinetobacter radioresistens*의 C1,2O는 DE52 cellulose와 Q-sepharose의 과정을 거쳐 7배 농축된 효소를 얻었으며, 회수율은 60.2%인 것으로 보고되었고(5), *Alcaligenes eutrophus* CH34에서는 C1,2O를 일반적인 방법으로 정제가 어려워 소수성의 성질을 이용한 phenyl sepharose column을 통하여 정제를 실시한 것으로 보고된 바 있다(9). 각 단계에서 분리해낸 효소 용액의 단백질과 효소의 활성을 측정하여 표로 작성하였다(Table 1).

C1,2O의 분자량 확인

각 단계에서 얻어진 단백질 시료를 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하여 정제 여부를 확인하였고, 순수 정제 여부는 gel상에서 단일 band의 생성으로 확인되었다. SDS-PAGE를 통해 분석한 C1,2O의 분자량은 약 33 kDa임이 관찰되었다(Fig. 3). 본 연구에서 정제된 C1,2O의 분자량은 33 kDa 인데 반해 *A. eutrophus* CH34와 *Acinetobacter* sp. KS-1에서는 동일한 크기인 36 kDa의 C1,2O가 확인되었고, phenol에 노출된 *A. radioresistens*에서는 분자량이 38.7 kDa인 C1,2O가 보고되었다(11, 23).

pH 및 온도에 대한 영향

Table 1. Purification scheme of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

Purification step	Vol. (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	38	286.5	324.9	1.13	100	1
Ammonium sulfate	9	118.8	192.6	1.62	59.3	1.43
Sephadex G-100	11.5	51.6	136.3	2.65	41.9	2.35
Source Q15	10	5.24	74.46	14.2	22.9	12.5

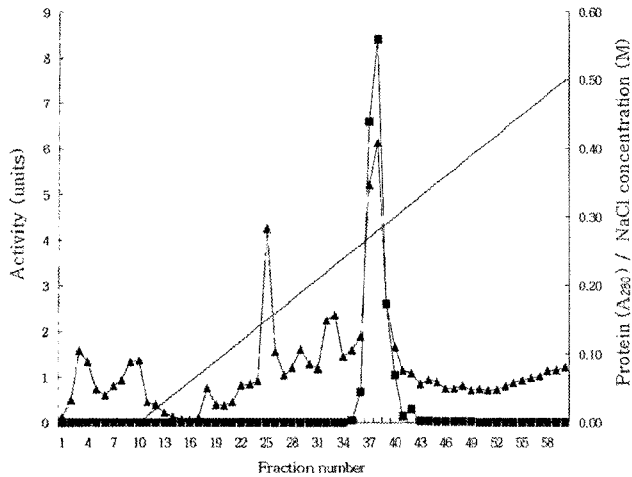


Fig. 2. Purification of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NFQ-1 with source 15Q ion exchange chromatography. Column dimension : 1.0 × 10 cm. Fraction of 1 ml were collected at a rate of 1 ml/min. Symbols : catechol 1,2-dioxygenase activity (■), and protein concentration (▲).

Sodium benzoate에 노출된 균주 NFQ-1로부터 분리한 C1,2O의 최적 활성 온도는 25-35°C로 나타났으며 최대 활성 온도는 30°C인 것으로 조사되었다. 그러나 온도가 40°C이상 되면 그 활성은 급격히 감소하였다(Fig. 4). *Acinetobacter* sp. KS-1의 C1,2O는 27-37°C에서 최적 활성을 나타냈으며 35°C에서 최고 활성을 나타내었다. Briganti 등(5)은 *A. radioresistens*에서 분리된 C1,2O의 최적 활성온도를 조사한 결과 30-45°C이었으며, 최대 활성 온도는 40°C인 것으로 보고하여 본 연구에서 분리한 C1,2O보다

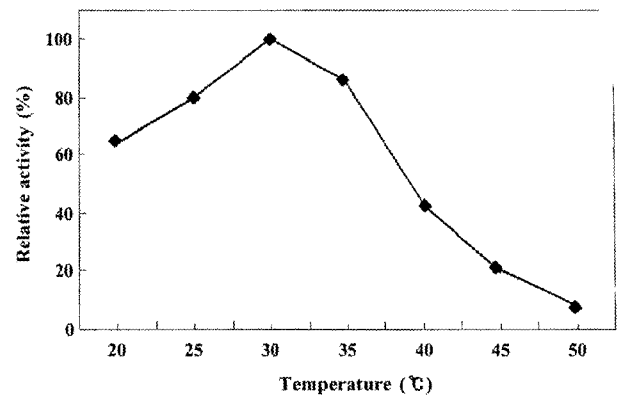


Fig. 4. Effect of temperature on catechol 1,2-dioxygenase activity of *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

다소 높은 온도에서 활성을 나타내었다. 또한 An 등(1)은 benzoate에 노출된 *Streptomyces setonii*에서 분리한 C1,2O를 cloning 방법으로 *E. coli*에서 과발현 시켜 분리한 C1,2O가 65°C 까지도 효소의 활성이 안정적으로 유지되며, 70°C에서도 효소 활성을 잃지 않는 thermostable C1,2O임을 발견하였다. NFQ-1에서 분리된 C1,2O의 활성의 최적 pH를 조사한 결과 pH 6.5에서 최대 활성의 60%정도로 나타나기 시작하여 pH 8.5에서 최대 활성을 나타냈으며 pH 10.5이상에서 활성이 급격히 감소되었다. C1,2O는 pH 7.0-10.5의 넓은 범위에서 그 활성을 유지하였으며, pH 7.5-9.0의 범위에서 최적 활성을 나타내는 것으로 조사되었다(Fig. 5). *P. putida*에서 분리된 C1,2O는 본 연구의 결과와 유사하게 pH 7.5-9.0에서 최적 활성을 나타냈으나 최대 활성 pH는 7.5로 보고되었고, *Acinetobacter* sp. KS-1의 C1,2O도 역시 pH 7.0-9.0에서 최적 활성을 나타냈으며 최고 활성은 pH 8.0으로 보고되었다(16, 23). 상기의 결과들로부터 C1,2O의 활성은 산성 보다 약 알칼리성에서 효소의 활성이 높게 나타나는 것으로 확인되었다.

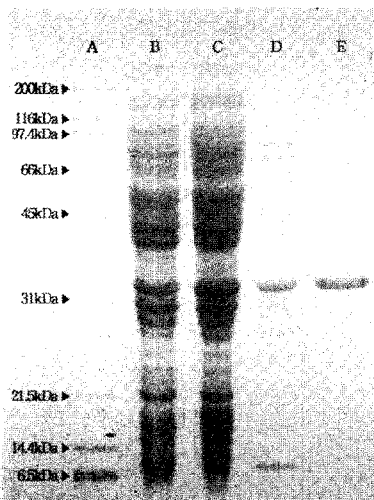


Fig. 3. SDS-PAGE of purification procedure catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NFQ-1. A: molecular size marker, B: crude extract, C: 30-50% saturated crude cell extract with ammonium sulfate, D: eluted protein from sephadex G-100, E: eluted catechol 1,2-dioxygenase from Source 15Q column. The purified catechol 1,2-dioxygenase was showed single band of approximately 33 kDa.

C1,2O의 금속 이온의 효과

금속에 의한 C1,2O의 효소 활성 억제에 대한 조사에서

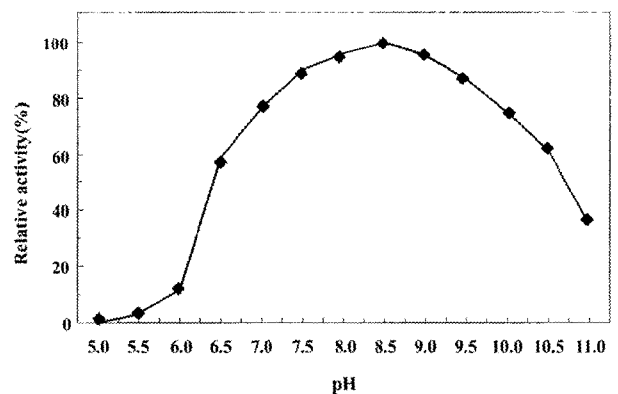


Fig. 5. Effect of pH on catechol 1,2-dioxygenase activity of *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

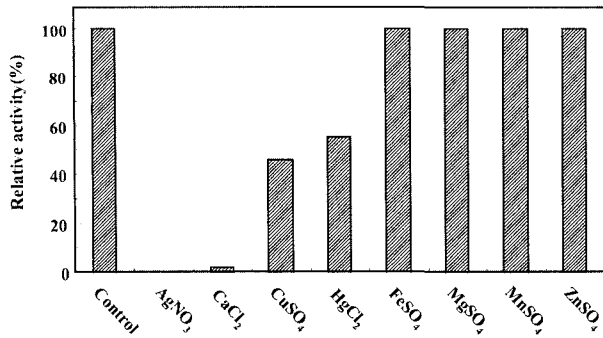


Fig. 6. Effects of several metal ions on the activity of catechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

AgNO₃, CaCl₂에 의해서는 거의 100% 저해되었으며, CuSO₄, HgCl₂가 첨가된 경우 효소활성은 각각 55%, 45% 정도 저해되었으나 FeSO₄, MnSO₄, MgSO₄, ZnSO₄에는 저해 받지 않는 것으로 조사되었다(Fig. 6). 특히 C1,2O는 구조 내에 철(II)을 포함하고 있기 때문에 기질과의 반응 시에 철이 조효소의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(21), 본 연구에서도 철 이온은 효소의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. AgNO₃에 의한 억제 효과는 *Frateruria*의 C1,2O에서 나타난 성질과 유사하게 효소 내에 존재하는 황산화기와 반응하여 C1,2O의 활성이 억제되는 것으로 확인되었다(15).

기질특이성

분리된 C1,2O로 catechol과 그의 유사체인 다양한 기질에 대한 C1,2O의 기질 특이성을 조사하였다. NFQ-1에서 분리된 C1,2O의 경우는 catechol과 4-methylcatechol에 대해서는 각각 100%와 42.06%의 활성이 나타났고, 3-methylcatechol에서는 8.31%의 미약한 활성이 관찰되었으며, 4-chlorocatechol, protocatechuate, pyrogallol에서는 C1,2O의 활성이 나타나지 않았다(Table 2). *Pseudomonas arvilla* C-1로부터 분리된 C1,2O에 대한 기질 특이성은 본 연구와 유사하게 catechol과 4-methylcatechol에서는 활성을 나타냈으나, 4-chlorocatechol과 pyrogallol에서는 활성을 나타내지 않았다(16). *A. radioresistens*의 C1,2O도 catechol과 4-methylcatechol에서만 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(6).

Kinetic constants

Table 2. Substrate specificity of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

Substrates	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Catechol	0.33	100
4-Methylcatechol	0.33	42.0
3-Methylcatechol	0.33	8.31
4-Chlorocatechol	0.33	0
Protocatechuate	0.33	0
Pyrogallol	0.33	0

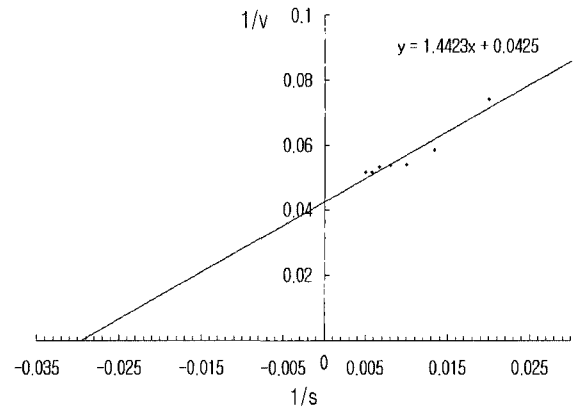


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of catechol 1,2-dioxygenase purified from *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

균주 NFQ-1에서 분리된 C1,2O의 kinetic constants를 조사하기 위하여 Lineweaver-Burk plot 한 결과 C1,2O의 Km과 Vmax는 각각 33.94 μM와 23.53 μmol · min⁻¹ · mg⁻¹으로 측정되었다(Fig. 7). *P. putida* SM 25에서 분리된 C1,2O의 Km은 7.83 μM로 보고되었으며, *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259에서 분리된 C1,2O의 Km값은 1.1 μM이며 Vmax값은 19 μmol · min⁻¹ · mg⁻¹로 보고되었다(24).

C1,2O의 N-말단 아미노산 서열분석과 상동성

Pseudomonas 속에 속하는 다른 세균들에서 보고된 C1,2O와 NFQ-1에서 분리된 C1,2O의 유사성을 알아보기 위하여 NFQ-1에서 정제된 C1,2O의 N-말단 아미노산 서열을 아미노산 자동 서열분석기로 분석하였다. N-말단으로부터 조사된 17개의 아미노산 서열은 ¹TVKISQSADIQKFFEEA¹⁷으로 확인되었다. 확인된 아미노산 서열은 NCBI BLAST search 프로그램을 이용하여 서열의 유사성을 검색한 결과 *P. aeruginosa* PA01, *Pseudomonas arvilla* C-1과 *P. putida* KT2440의 C1,2O와는 70% 이상으로 비교적 높은 유사성을 나타냈으나, *Pseudomonas* sp. CA10의 C1,2O와는 52%의 유사성이 있는 것으로 조사되었다(Fig. 8). 상기의 5개 종류의 균주에서 분리된 C1,2O의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 17개의 아미노산 서열 중에서 6개의 아미노산(thr¹, ser², gln¹¹, phe¹³, phe¹⁴, ala¹⁷)이 공통적으로 보전되고 있는 것을 확인하였다.

현재까지 많은 연구자들에 의해 *ortho* cleavage에서 나타나는

<i>Pseudomonas</i> sp. NFQ-1	T V K I S Q S A D I Q K F F E E A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	T V K I S Q T A D V Q R F F E E A
<i>Pseudomonas arvilla</i> C-1	T V N I S H T A E I Q Q F F E E A
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	T V N I S H T A E V Q Q F F E Q A
<i>Pseudomonas</i> sp. CA10	T I K L S S T E S V Q K F F Q E A

Fig. 8. Sequence alignment of N-terminal sequence of catechol 1,2-dioxygenase with *Pseudomonas* sp. NFQ-1, *P. aeruginosa* PA01, *Pseudomonas arvilla* C-1, *P. putida* KT2440, *Pseudomonas* sp. CA10.

C1,2O의 분리 및 그 특성 연구는 많이 진행되어 왔다. 그러나 *ortho* cleavage에 관여하는 C1,2O이외에 다른 효소들이나 *meta* cleavage의 효소들에 대해서는 그 연구가 보고되고 있으나(7, 17, 19) 아직 미비한 실정이다. 또한 대부분의 C1,2O는 물리적인 외부 환경에 큰 영향을 받으므로 발현유전자인 *catA* gene의 돌연변이 연구 및 극한 세균에서의 C1,2O의 분리에 의한 물리적 환경에 안정한 효소 생산도 요구되는 바이다. 향후 본 연구에서는 상기의 연구 내용을 토대로 하여 C1,2O의 관련 유전자의 분자생물학적 특성 규명 실험이 진행될 것이다.

참고문헌

- An, H.R., H.J. Park, and E.S. Kim. 2000. Characterization of benzoate degradation via *ortho*-cleavage by *Streptomyces setonii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 111-114.
- Aoki, K.K. Tsukasa, S. Ryu, and N. Hiroshi. 1984. Two catechol 1,2-dioxygenase from an aniline-assimilating bacterium, *Fracteuria* species ANA-18. *Agric. Bio. Chem.* 48, 2097-2104.
- Barbara, M.K., and B. Smreczak. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. Inter.* 28, 719-728.
- 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.
- Briganti, F., E. Pessione, C. Giunta, and A. Scozzafava. 1997. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Lett.* 416, 61-64.
- Briganti, F., E. Pessione, C. Giunta, R. Mazzoli, and A. Sczzafava. 2000. Purification and catalytic properties of two catechol 1,2-dioxygenase isozymes from benzoate-grown cells of *Acinetobacter radioresistens*. *J. Protein Chem.* 19, 709-716.
- Bull, C., and D.P. Ballou. 1981. Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 256, 12673-12680.
- Gieg, L.M., A. Otter, and P.M. Fedorak. 1996. Carbazol degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: metabolic characteristics and the identification of some metabolites. *Environ. Sci. Technol.* 30, 575-585.
- Ginette, S.I., J. Gagnon, and C. Béguin. Characterization of a chromosomally encoded catechol 1,2-dioxygenase (E.C. 1.13.11.1) from *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Microbiol.* 166, 42-50.
- Guidotti, M., D. Stella, M. Owczarek, A. De Marco, and C. De Simone. 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *J. Chromatography* 985, 185-190.
- Haroune, N., B. Combourieu, P. Besse, M. Sancelme, T. Reemtsma, A. Kioepfer, A. Dian, J.S. Knapp, S. Baumberg, and A.M. Delort. 2002. Benzothiazole degradation by *Rhodococcus pyridimovorans* strain PA: evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6114-6120.
- Harwood, C.S., and R.E. Parales. 1996. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 553-590.
- John, B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.* 9, 53-62.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Murakami, S., A. Takashima, J. Takemoto, S. Takenaka, R. Shinke, and K. Aoki. 1998. Cloning and sequence analysis of two catechol-degrading gene clusters from the aniline-assimilating bacterium *Fracteuria* species ANA-18. *Gene* 226, 189-198.
- Nakai, C., T. Nakazawa, and M. Nozaki. 1988. Purification and Properties of catechol 1,2-dioxygenase (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 in comparison with that from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 701-713.
- Nakajima, H., T. Ishida, H. Tanaka, and K. Horiike. Accurate measurement of near micromolar oxygen concentrations in aqueous solutions based on enzymatic extradiol cleavage of 4-chlorocatechol: Applications to improved low-oxygen experimental systems and quantitative assessment of back diffusion of oxygen from the atmosphere. *J. Biochem.* 131, 523-531.
- Nakazawa, T., and A. Nakazawa. 1970. Pyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymol.* 17A, 518-522.
- Nancy, A., and J.B. Howard. 1979. The primary structure of the α -subunit of protocatechuate 3,4-dioxygenase: I. Isolation and sequence of the tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 254, 7302-7308.
- Ornston, L.N. 1996. The conversion of catechol and protocatechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3776-3786.
- Patel, R.N., C.T. Hou, A. Felix, and M.O. Lillard. 1976. Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 127, 536-544.
- Reineke, W., and H.J. Knackmuss. 1988. Microbiol degradation of haloaromatics. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 263-287.
- Song, S.Y., S.I. Kim., K.H. Yoon. and K.H. Oh. 2002. characterization and N-terminal amino acid sequence analysis of catechol 1,2-dioxygenase from benzoate degrading *Acinetobacter* sp. KS-1. *Kor. J. Microbiol.* 38, 74-80.
- Strachan, P.D., A.A. Freer, and C.A. Fewson. 1998. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene. *J. Biochem.* 333, 741-747.
- Yoon, K.H., S.Y. Hwang, O.S. Kwon and K.H. Oh. 2003. Characterization of the quinoline-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. NFQ-1 isolated from dead coal pit areas. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 18, 174-179.

(Received August 16, 2004/Accepted December 14, 2004)

ABSTRACT : Characterization of Catechol 1,2-Dioxygenase Purified from the Benzoate Degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. NFQ-1 Isolated from Dead Coal Pit Areas**Jung-Soo Joo and Kyung-Ha Yoon*** (Department of Life Science, Soochunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea)

Our previous research has demonstrated that the bacterium, *Pseudomonas* sp. NFQ-1 capable of utilizing quinoline (2,3-benzopyridine) as the sole source of carbon, nitrogen, and energy was isolated and characterized [Yoon *et al.* (2003) *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 18(3):174-179]. In this study, we have found that *Pseudomonas* sp. NFQ-1 could degrade quinoline as well as benzoate, and extended this work to characterize the catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O) purified from the bacterium cultured in benzoate media. Initially, C1,2O has been purified by ammonium sulfate precipitation, gel permeation chromatography, and Source 15Q. After Source 15Q, purification fold was increased to approximately 14.21 unit/mg. Molecular weight of C1,2O was about 33 kDa. Physicochemical characteristics (*e.g.*, substrate specificity, K_m , V_{max} , pH, temperature and effect of inhibitors) of purified C1,2O were examined. C1,2O demonstrated the activity for catechol, 4-methylcatechol and 3-methylcatechol as a substrate, respectively. The K_m and V_{max} value of C1,2O for catechol was 38.54 μM and 25.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. The optimal temperature of C1,2O was 30°C and the optimal pH was approximately 8.5. Metal ions such as Ag^+ , Hg^+ , Ca^{2+} , and Cu^{2+} show the inhibitory effect on the activity of C1,2O. N-terminal amino sequence of C1,2O was analyzed as TVKISQSASIQKFFEEA¹⁷. In this work, we found that the amino acid sequence of NFQ-1 showed the sequence homology of 82, 71, 59 and 53% compared with C1,2O from *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas arvilla* C-1., *P. putida* KT2440 and *Pseudomonas* sp. CA10, respectively.