

4-Chlorophenol 분해박테리아 *Arthrobacter chlorophenolicus* A6로부터의 monooxygenase의 복제 및 대량발현과 정제 그리고 기질분해활성도 분석

류송정 · 이소라 · 김한승*

건국대학교 환경공학과

Overexpression and Purification of Monooxygenases Cloned from *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 for Enzymatic Decomposition of 4-Chlorophenol

Song-Jung Ryu · Christina S. Kang · Han S. Kim*

Department of Environmental Engineering, Konkuk University

ABSTRACT

Arthrobacter chlorophenolicus A6 possesses several monooxygenases (CphC-I, CphC-II, and CphB) that can catalyze the transformation of 4-chlorophenol (4-CP) to hydroxylated intermediates in the initial steps of substrate metabolism. The corresponding genes of the monooxygenases were cloned, and the competent cells were transformed with these recombinant plasmids. Although CphC-II and CphB were expressed as insoluble forms, CphC-I was successfully expressed as a soluble form and isolated by purification. The specific activity of the purified CphC-I was analyzed by using 4-CP, 4-chlorocatechol (4-CC), and catechol (CAT) as substrates. The specific activities for 4-CP, 4-CC, and CAT were determined to be 0.312 U/mg, 0.462 U/mg, 0.246 U/mg, respectively. The results of this study indicated that CphC-I is able to catalyze the degradation of 4-CC and CAT in addition to 4-CP, which is a primary substrate. This research is expected to provide the fundamental information for the development of an eco-friendly biochemical degradation of aromatic hydrocarbons.

Key words : 4-Chlorophenol, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, Monooxygenase, Enzyme cloning and expression

1. 서 론

방향족 탄화수소 물질 중에서 페놀류 화합물은 제초제, 살충제, 의약품, 염료, 목재의 부패를 방지하는 방부제 등 다양한 산업분야에서 널리 사용되고 있다(Hernandez et al., 2013; Tobajas et al., 2012; Wang et al., 2012). 그러나 이러한 페놀류 화합물은 강한 독성을 갖고 있음에도 불구하고 페놀을 함유한 제품의 제조공정에서 유출되거나 사용 후 적절히 처리되지 못하고 토양, 지하수, 지표수 등에 유입됨으로써 심각한 환경오염을 야기하고 있다. 이러한 페놀류 화합물을 제거하기 위해 일반적으로 활성탄을 이용하여 페놀을 흡착시켜 처리하는 물리적 기술, 광화학 반응 또는 산화제를 이용하여 분해제거하는 화학적 방법, 그 밖에 미생물을 이용하여 페놀류 화합물을 기질

로써 제거하는 생물학적 분해기술들이 오랫동안 적용되어 왔으며 처리기법의 공정개발도 발전단계에 있다(Czaplicka, 2004; Shah and Chen, 2012; Tobajas et al., 2012). 그러나 산업 및 생산제품의 다양화에 따라 산업단지 주변의 배출오염물질이 다양해지고 이로 인해 수많은 오염물질들이 페놀과 결합하여 보다 복잡한 구조와 화학적 안정성이 높아진 페놀계 화합물들이 생성됨으로써 기존 처리 공정만으로는 광범위한 페놀계 화합물들의 처리에 한계를 보이고 있다.

특히 할로젠 물질 중 염소와 페놀이 결합하게 되면 chlorophenol이 생성되는데 기존의 페놀 화합물보다 독성이 강하고 구조적으로 안정하며 반응성이 낮은 특성이 있고 인체에 노출될 경우 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Ferraroni et al., 2006). 이러한 할로젠 원소와 결합된

*Corresponding author : hankim@konkuk.ac.kr

Received : 2014. 3. 13 Reviewed : 2014. 3. 27 Accepted : 2014. 3. 30

Discussion until : 2014. 8. 31

폐놀계 화합물들을 처리하기 위해서는 물리, 화학, 생물학적 방법으로 처리할 수도 있으나 분해 시 2차적 부산물이 발생할 가능성이 높아 추가비용과 노력이 발생하는 단점이 있다(Tobajas et al., 2012).

최근에는 기존의 처리방법을 보완하기 위해 특정 오염 물질을 기질로 하는 분해효소를 사용하여 오염물질을 선택적으로 분해시키는 생화학적 처리기술이 연구되고 있다(Chen et al., 1999; Pieper and Reineke, 2000). 효소는 특정 기질에 대하여 빠른 분해속도를 나타내며 식물 또는 미생물 등으로부터 생산되는 친환경적인 재료로써 기존의 처리기술에 비해 안전성, 신속성, 친환경성 측면에서 유리한 장점을 가지고 있다(Chen et al., 1999). 이러한 특성을 바탕으로 효소는 식품, 제약, 화장품, 바이오 연료생산 등의 다양한 산업에 광범위하게 사용되고 있다(Jegannathan and Nielsen, 2013). 그리고 환경정화 분야에서도 효소를 이용한 생화학적 처리기술을 기반으로 하여 기존의 정화기술과의 융합적용이 시도되고 있으며 현재 오염물질에 따른 많은 효소들의 기능과 구조가 분석, 연구되고 있다.

Chlorophenol을 분해하는 효소들은 주로 호기성 박테리아로부터 추출하여 연구되어 왔으며 대표적으로 *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Fusarium*, *Azobacter*, *Arthrobacter*가 있다(Hollender et al., 1997; Li et al., 2011; Nordin et al., 2005; Olaniran and Igbinsola, 2011; Sahoo et al., 2010). 이러한 호기성 박테리아 중에서 *Arthrobacter chlorophenolicus* A6는 4-chlorophenol (4-CP)을 완전히 분해하는 것으로 알려졌으며 monooxygenase인 CphC-I, CphC-II, CphB와 dioxygenase인 CphA-I의 4가지 산화분해효소들에 의해 4-CP가 분해되는 것으로 제안된 바 있다(Nordin et al.,

2005). 이들 연구에 따르면, monooxygenase가 4-CP를 초기분해 대사과정의 중간산물로 추측한 benzoquinone 또는 4-chlorocatechol(4-CC)로 변환시키고 다시 monooxygenase가 2~3개의 분해단계에 순차적으로 작용하여 기질을 분해하는 것으로 보고한 바 있다(Fig. 1). 그리고 monooxygenase에 의해 생성된 hydroxyquinol은 dioxygenase인 CphA-I을 통해 ring fission되어 maleylacetate로 분해하는 것으로 추정하고 있다(Fig. 1). 여기서 monooxygenase인 CphC-I과 CphC-II는 산소를 첨가해주는 역할을 하여 초기분해과정에서 기질들을 변환하는 것으로 추정하였으나 CphB와 함께 각 효소의 기능이 확실히 규명되지는 못하였다. 한편, Lee et al.(2013)에 따르면 dioxygenase인 CphA-I은 hydroxyquinol을 분해할 뿐만 아니라 이와 유사한 구조를 가진 catechol(CAT), 4-CC, 3-methylcatechol도 분해시킬 수 있는 것으로 밝혀진 바 있다.

본 연구에서는 4-CP의 대사분해과정 초기단계에서 기질의 분해를 담당하는 것으로 추정된 *cphC-I*, *cphC-II*, *cphB* 유전자를 *A. chlorophenolicus* A6로부터 추출하여 복제하고 이들로 competent cell 형질전환 시켰다. 이를 기질과 반응할 수 있는 단백질, 즉 4차 구조를 보유한 용해된 형태(soluble form)로 제작하기 위하여 최적의 대량 발현조건을 도출하고 발현된 효소의 순도를 높이고자 하였다. 그리고 획득한 효소를 바탕으로 4-CP 및 4-CP와 유사한 구조를 가진 4-CC, 4-CC와 유사한 CAT에 대한 효소의 기질특이성을 분석하여 효소의 기능 및 활성도를 밝히고자 하였다. 이러한 결과를 바탕으로 4-CP 분해 효소에 대한 최적의 단백질 발현조건과 대상 기질과의 활성도에 대하여 분석함으로써 궁극적으로 다양한 오염물질의 분해를 위한 고효율의 생화학적 정화공정 개발의 기초를 제공하는 것이 본 연구의 목표이다.

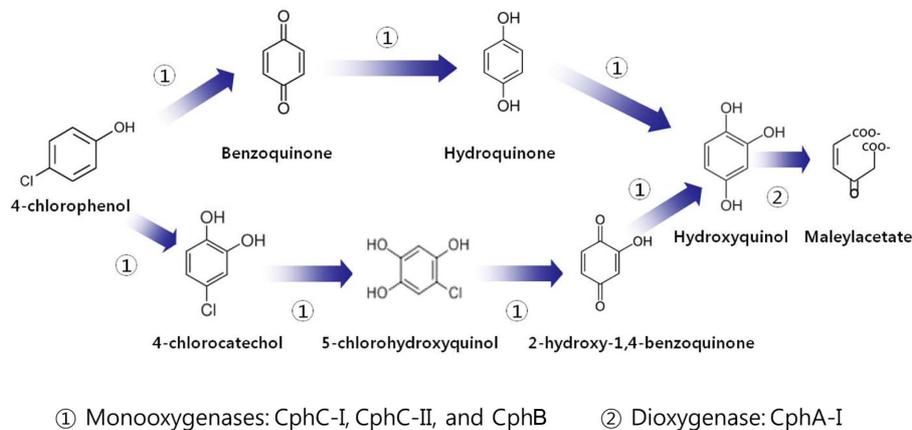


Fig. 1. Proposed degradation pathway of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

A. chlorophenolicus A6는 American Type Culture Collection(ATCC No. 700700)에서, 유전자를 재조합 시키기 위한 pET-24a(+) vector는 Novagen(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 형질전환 시키기 위한 *E. coli* BL21(DE3)는 Yeastern Biotech(Taipei, Taiwan)에서, *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL은 Agilent Technologies (Colorado, USA)에서, *E. coli* Tuner(DE3)는 Novagen (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 단백질 크기를 분석하기 위한 protein standard marker인 GangNam-Pink™ Prestained Protein ladder는 Intron(Seoul, Korea)에서, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel을 염색하기 위한 PageBlue Protein Staining Solution은 Thermo Scientific(Rockford, USA)에서 구입하였다. 순수효소로 정제하기 위한 시약 Ni²⁺-NTA His·Bind® Resin은 Novagen(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 그 밖의 각종 시약은 모두 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

2.2. 복제

3가지 효소의 유전자는 모두 pET-24a(+) vector에 재조합 하였으며 *cphC-I*과 *cphB*의 forward primer와 reverse primer는 *Nde* I과 *Hind* III, *cphC-II*는 *Nde* I과 *Xho* I로 처리하였다. PCR mixture는 10x reaction buffer 5 µL, 2.5 mM의 dNTP 4 µL, 10 µM의 forward primer와 reverse primer를 1 µL씩 Pfu pol 1 µL, 100 ng/µL의 template 1 µL, 5x tuning buffer 10 µL, distilled water 27 µL로 제조하였다. 제조한 PCR mixture를 PCR program을 사용하여 94°C에서 5분 동안 1 cycle, 94°C에서 30초, 5°C에서 30초, 72°C에서 1분, 모두 20-40 cycle, 72°C에서 7분 동안 1 cycle 하고 4°C에서 증폭하였다. PCR product는 Labopass gel purification(Cat No. CMG0115)을 사용하여 정제하였으며 *Nde* I과 *Hind* III, *Xho* I을 이용하여 insert와 vector 모두 효소 처리하고 LaboPass PCR purification kit(Cat No. CMR0115)와 LaboPass gel purification kit(Cat No. CMG0115)로 정제하였다. Vector와 insert의 몰 비는 1:3으로 하였으며 10x ligation buffer 1 µL, 10 U/µL의 T4 DNA ligase 1 µL, distilled water 10 µL를 혼합하여 복제하였다.

2.3. 형질전환

pET-24a(+) vector에 재조합시킨 *cphC-I*, *cphC-II*, *cphB* plasmid 0.5 µL를 각각 3가지의 *E. coli*: BL21 (DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner(DE3) 20 µL에 혼합하여 BL21(DE3)와 Tuner(DE3)는 5분간, BL21 CodonPlus(DE3)-RIL은 30분간 ice box에 넣고 기다린 뒤 약 42°C에서 BL21(DE3)와 BL21 CodonPlus (DE3)-RIL은 20초, Tuner(DE3)는 30초 동안 heat shock 하였다. 다시 BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner (DE3)은 ice box에서 2분 동안 둔 뒤에 각각 SOC medium을 채워 함이 1 mL가 되도록 하고 37°C에서 1시간 동안 210 rpm으로 배양하였다. 배양시킨 용액을 다시 항생제 kanamycin(50 mg/mL)을 주입한 LB agar plate에 spread 한 뒤 37°C에서 약 16시간 배양하였다. Heat shock 시킨 BL21(DE3)는 바로 LB agar plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다.

2.4. 대량발현

Kanamycin(50 mg/mL) 3 µL를 LB 배지 3 mL에 주입하고 *E. coli* colony 0.1~0.2 µg을 넣은 뒤 37°C에서 14~16시간 210 rpm으로 배양하였다. 멸균한 LB 배지 50 mL에 kanamycin(50 mg/mL) 50 µL를 주입하고 16시간 동안 배양한 용액에서 500 µL를 넣고 약 3시간 동안 교반하였다. 교반한 용액을 cuvette에 넣고 UV-Spectrophotometer(Optizen, Mecasys, Korea)로 600 nm에서 측정하여 OD 0.5~0.6 나왔을 때 발현유도제 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 다양한 농도로 주입하고 온도 및 배양시간도 다르게 조절하여 교반시킨 뒤 시간마다 1 mL의 sample을 채취하였다. 1 mL의 sample을 4°C에서 6,000 × g로 20분간 원심분리 한 뒤 상등액은 버리고 세포벽을 녹이기 위해 lysis buffer(1 M Tris(pH 7.5) 25 mL, 4 M NaCl 75 mL, 100% glycerol 200 mL, distilled water 700 mL, 2-mercaptoethanol 480 µL) 90 µL, lysozyme(100 mg/mL) 10 µL를 넣어 ice box에서 30분간 반응시킨 뒤 on: 40초, off: 20초로 4분간 sonication을 실시하였다. 이를 다시 4°C에서 13,000 × g로 30분간 원심분리하고 상등액과 pellet을 각각 따로 분리 회수하였다. 획득한 단백질의 크기와 발현 유무는 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다. SDS-PAGE는 separating gel과 stacking gel로 구성되어 있으며 12%의 separating gel은 H₂O 2.306 mL, 40% acrylamide 1.516 mL, 1.5 M Tris(pH 8.8) 1.3 mL, 10% SDS 50 µL, 10% APS 50 µL, TEMED 2 µL로 제작하였다. 3 mL의 stacking

gel은 H₂O 2.185 mL, 40% acrylamide 0.375 mL, 1.0 M Tris(pH 6.8) 0.38 mL, 10% SDS 30 μ L, 10% APS 30 μ L, TEMED 3 μ L의 조성으로 제작하였다. 획득한 sample 효소의 상등액과 pellet 10 μ L를 loading buffer 3 μ L와 피펫으로 섞어주고 각각을 stacking gel 부분에 주입하여 1x SDS running buffer(Tris base 30.3 g, glycine 144 g, SDS 10 g, distilled water 1 L)를 넣어 120 V로 3시간 전기영동 하였다. 이후 SDS-PAGE를 꺼내어 증류수 100 mL에 넣고 microwave로 1분 간 조사하여 이 과정을 3번 수행하였다. 증류수를 버린 뒤 PageBlue™ Protein Staining Solution 20 mL를 넣고 microwave로 30초 동안 조사하여 shaking incubator에 넣고 28°C에서 1시간 동안 80 rpm으로 교반하였다. 마지막으로 증류수와 함께 12시간 교반하여 단백질 크기 및 발현 유·무를 분석하였다. Pre-test를 통해 발현조건을 확인한 용액은 다시 LB배지 1 L로 대량발현시켜 다음 정제 과정을 위해 사용하였다.

2.5. 정제

대량발현시킨 효소를 4°C에서 6,000 \times g로 20분간 원심분리하고 상등액을 제거한 뒤 세포벽을 녹이기 위해 lysis buffer(1 M Tris(pH 7.5) 25 mL, 4 M NaCl 75 mL, 100% glycerol 200 mL, distilled water 700 mL, 2-mercaptoethanol 480 μ L) 10 mL, lysozyme(100 mg/mL) 10 mL를 주입하였으며 ice box에서 30분간 반응시킨 뒤 on: 40초, off: 20초로 12분간 sonication하였다. Sonication한 용액을 다시 4°C에서 16,000 \times g로, 30분간 원심분리하였으며 상등액을 회수하여 공극 0.45 μ m 막으로 여과하였다. 먼저 column에 Ni²⁺-NTA resin 4 mL를 천천히 통과 시킨 뒤 여과한 상등액을 주입하고 30분간 기다린 뒤 1.5 mL/min 유량으로 통과시켰다. 그리고 순차적으로 wash I buffer(1 M Tris (pH 7.5) 25 mL, 4 M NaCl 125 mL, 2 M imidazol 7.5 mL, 100% glycerol 200 mL, distilled water 642.5 mL)와 wash II buffer(1 M Tris

(pH 7.5) 25 mL, 4 M NaCl 125 mL, 2 M imidazol 20 mL, 100% glycerol 200 mL, distilled water 630 mL)로 column을 세척하여 불필요한 단백질을 제거하였다. 그리고 elution buffer(1 M Tris(pH 7.5) 25 mL, 4 M NaCl 75 mL, 2 M imidazol 150 mL, 100% glycerol 200 mL, distilled water 550 mL)를 2 mL씩 순차적으로 5번 통과시켜 순수한 효소를 획득하였다. 획득한 효소는 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다.

2.6. 활성도 분석

효소 상등액 0.5 mL, pH 7.0의 phosphate buffer에 녹인 6 mM의 H₂O₂ 0.5 mL, 각각 3 mM의 4-CP, 4-CC, CAT 0.5 mL를 주입하여 1.5 mL centrifuge tube에 넣고 1분간 반응시켰다. 반응시킨 용액을 4°C에서 16,000 \times g로 1분간 원심분리하고 상등액 1 mL를 high-performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하였다. HPLC(Agilent 1200 series, Palo Alto, USA)분석은 ZORBAX Eclipse Plus C-18 column(Agilent)을 사용하여 mobile phase를 acetonitrile : H₂O = 30 : 70(%)로 하고 유량을 1 mL/min으로 설정하여 흡광도 278 nm에서 분석하였다. 효소활성도 단위 1 U는 단위 시간당 1 μ mol의 기질을 변환시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였고 비활성도는 효소 활성도를 효소질량(mg-protein)으로 나눈 값으로 정의하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 복제

cphC-I, *cphC-II*, *cphB*를 재조합 시킨 pET-24a(+) vector는 bacteriophage의 T7 RNA 중합효소를 보유하고 있어 IPTG에 의한 발현율의 증가를 쉽게 유도하기 때문에 해당 vector를 선택하였다(Dumon-Seignovert et al., 2004; Khan et al., 2010; Sørensen and Mortensen, 2005). *cphC-I*과 *cphB*는 pET-24a(+) vector내의 제한효소 *Nde I*과 *Hind III*에서 잘라 각각의 해당 DNA

Table 1. Primer design of genes

Gene	Primer	Primer design	Vector
<i>cphC-I</i>	<i>Nde I</i> -F	CATATGAGGACAGGAAAAGAATACCTGGAGTC	
	<i>Hind III</i> -R	AAGCTTGGCCGGCGTGGTTACCGCAGGGTCACTGA	
<i>cphC-II</i>	<i>Nde I</i> -F	CATATGGTGCTTTCAATGACG	pET-24a(+)
	<i>Xho I</i> -R	CTCGAGTTGCTCCCGGTTTCAGGATTG	
<i>cphB</i>	<i>Nde I</i> -F	CATATGCTGATTCATGAAGTGCATCACATTTAT	
	<i>Hind III</i> -R	AAGCTTGCCTCGCCTTGCCTTGCA	

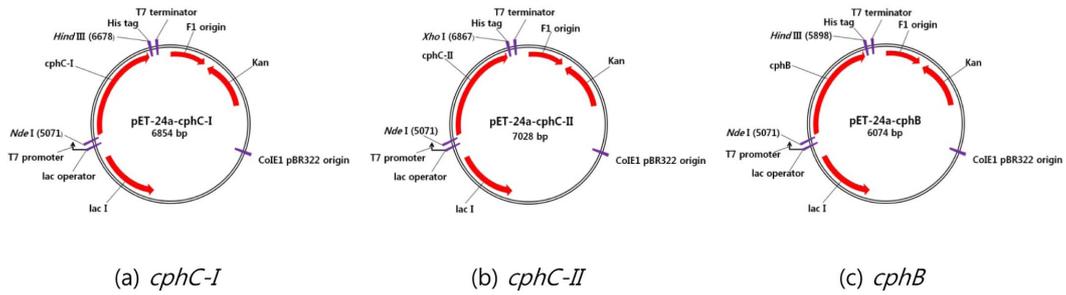


Fig. 2. Recombinant pET-24a(+) vector with *cphC-I*, *cphC-II* and *cphB*.

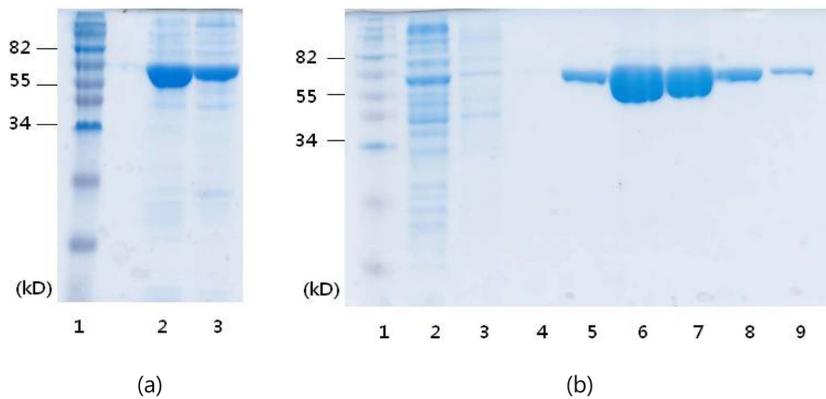


Fig. 3. (a) Overexpressed CphC-I enzyme; 1: Protein standard marker, 2: Supernatant, and 3: Pellet, and (b) Purified CphC-I enzyme; 1: Protein standard marker, 2: Passed through the Ni²⁺-NTA resins 3: Wash I buffer, 4: Wash II buffer, and 5~9: Passed five times by elution buffer (1st~5th).

fragment를 삽입하였으며 *cphC-II*는 *Nde I* 과 *Xho I* 로 처리하여 재조합 하였다. PCR로 해당 유전자의 염기서열을 분석한 결과 *cphC-I*은 72~1617 bp, *cphC-II*는 56~1810 bp, *cphB*는 80~857 bp에 위치함을 확인하였다. 재조합 시킨 유전자의 primer design과 plasmid map은 Table 1과 Fig. 2에 제시하였다.

3.2. 효소대량발현과 정제

효소와 기질의 반응은 4차 구조로 구성되어 있는 단백질의 활성부위를 통해 결합되며 이러한 4차 구조를 갖기 위해서는 용해된 형태(soluble form)로 발현된 효소를 생성해야 한다. 대부분의 효소는 불용성의 inclusion body로 발현되는 경우가 많으며 단백질의 4차 구조도 불균형을 이루고 있어 기질과의 활성이 일어나기 어렵다(Papaneophytou et al., 2013; Sørensen and Mortensen., 2005). 따라서 soluble form으로 발현시키기 위해서는 기본적으로 vector, 발현숙주들을 다양하게 조합시켜야 하며 형질전환된 *E. coli*로부터 soluble form의 효소를 획득하기 위해서는 배양온도, 발현유도제인 IPTG 농도, 배양시

간을 달리하여 최적의 발현조건을 도출해야 한다. 본 연구에서는 각각 배양온도 15°C, 25°C, 37°C, IPTG 농도 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 배양시간은 2, 4, 6, 24시간으로 다르게 설정하여 최적의 발현조건을 분석하였다.

CphC-I의 경우, 단백질 발현용 실험에 널리 사용되어 왔으며 IPTG의 농도를 쉽게 조절할 수 있는 *E. coli* BL21(DE3)을 선택하여(Dumon-Seignovert et al., 2004) 발현 pre-test를 하였다. CphC-I의 pre-test결과 단백질의 크기는 59 kDa이었으며 15°C에서 0.5 mM IPTG, 24시간 동안 배양하였을 때 soluble form으로 대량발현 되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 일반적으로 이중 유전자를 보유한 미생물의 발현은 상온보다 낮은 온도에서 soluble form으로 유도되는 것으로 알려져 있다(Khan et al., 2010). 이는 *E. coli*가 *A. chlorophenolicus* A6의 이중 유전자(*cphC-I*)를 상온보다 낮은 15°C에서 발현을 더 잘하는 것을 설명해주며, 또한 *E. coli*가 *Saccharomyces cerevisiae*의 이중 유전자를 18°C에서 soluble form으로 발현시킨 Khan et al.(2010)의 실험과 같이 상온보다 낮은 온도로

써 발현온도 조건이 유사함을 확인하였다. 또한 Sørensen and Mortensen(2005)에 따르면 낮은 온도에서 발현될 경우 높은 온도보다 더 많은 양의 soluble form 단백질을 획득할 수 있는 것으로 알려졌으며 본 연구에서도 25°C 보다 15°C에서 soluble form으로 발현된 단백질 양이 더 많은 것을 확인하였다. Soluble form으로 대량발현된 CphC-I 효소에서 순수 단백질을 획득하기 위해 Ni²⁺-NTA resin을 사용하여 정제하였다. CphC-I에 포함된 His-tag와 Ni²⁺와의 친화도를 이용하여 불필요한 단백질을 제거한 후 많은 양의 정제된 순수효소를 획득하였으며 정제된 효소의 양은 39.1 mg인 것을 확인하였다(Table 2). 이는 Wojcieszynska et al.(2011)가 4-CP를 분해하는 데 사용한 monooxygenase의 crude extract cell보다 효소의 양이 약 9배 이상 많은 것을 의미한다.

*cphC-II*와 *cphB*는 형질전환에는 *E. coli* BL21(DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner(DE3)의 형질전환에

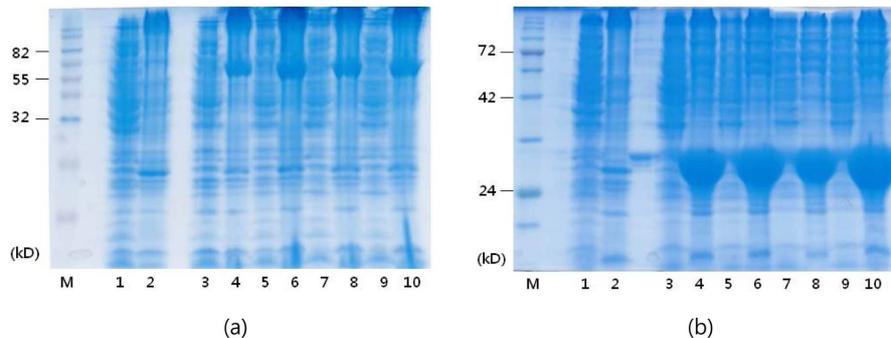
Table 2. Concentration of CphC-I (cell extract, supernatant, pellet, and Ni²⁺-NTA purification)

	Total volume (ml)	Total protein (mg)
Cell extract	25	293.8
Supernatant	25	112.2
Pellet	25	264.9
Ni ²⁺ -NTA purification	10	39.1

사용하였다. Tuner(DE3)는 다른 *E. coli*보다 독성 단백질의 발현실험에 주로 쓰이며 IPTG의 농도범위를 세밀하게 조절할 수 있고 발현조건을 찾는 데 유리한 *E. coli*로 잘 알려져 있다(Khan et al., 2010). BL21 CodonPlus(DE3)-RIL은 이중 유전자의 전사를 제한하는 몇 가지 tRNA를 보유하고 있어 발현실험에 유용하게 사용되고 있는 숙주이다(Khan et al., 2010). 이러한 특성을 바탕으로 3가지 *E. coli*를 사용하였으며 각각 발현조건을 다양하게 설정하여 최적의 발현조건을 도출하였다.

CphC-II의 단백질의 크기는 65 kDa이었으며 *E. coli* BL21(DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner(DE3)에서 모두 insoluble form으로 발현되었고 3가지 cell 모두 유사한 발현율을 나타내었으며 모든 온도, IPTG, 배양시간에 대하여 CphC-I보다 매우 낮은 발현율을 가지는 것을 확인하였다(Fig. 4). BL21(DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RIL은 25°C에서 24시간일 때 모든 IPTG의 농도에서 유사한 발현율을 나타내었고, Tuner(DE3)는 25°C, 6시간의 조건에서 IPTG의 농도에 관계없이 모두 일정하게 발현하였으며 24시간 배양하였을 때는 발현이 거의 되지 않는 것을 확인하였다.

CphB의 단백질의 크기는 30 kDa이었으며 3가지 *E. coli*에서 모두 insoluble form으로 발현되었으며 CphC-I, CphC-II 효소보다 발현율이 높은 것을 확인하였다. 특히



(a) M: Protein standard marker

- 1: Supernatant of pET-24a(+) vector transformed by *E. coli* BL21(DE3)
- 2: Pellet of pET-24a(+) vector transformed by *E. coli* BL21(DE3)
- 3, 5, 7, 9: Supernatant expressed with 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM IPTG, respectively
- 4, 6, 8, 10: Pellet expressed with 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM IPTG, respectively

(b) M: Protein standard marker

- 1: Supernatant of pET-24a(+) vector transformed by *E. coli* Tuner(DE3)
- 2: Pellet of pET-24a(+) vector transformed by *E. coli* Tuner(DE3)
- 3, 5, 7, 9: Supernatant expressed with 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM IPTG, respectively
- 4, 6, 8, 10: Pellet expressed with 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mM IPTG, respectively

Fig. 4. Overexpressed (a) CphC-II enzyme and (b) CphB enzyme.

Table 3. Specific substrate activity of CphC-I enzyme

4-Chlorophenol			
	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Pellet	0.278	5.298	0.052
Purification	0.610	1.953	0.312
4-Chlorocatechol			
	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Pellet	0.291	5.298	0.055
Purification	0.903	1.9533	0.462
Catechol			
	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Purification	0.481	1.953	0.246

Tuner(DE3)에서 발현율이 가장 높았으며 25°C에서 1.0 mM IPTG, 24시간 교반하였을 때 매우 높게 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4). BL21 CodonPlus(DE3)-RIL도 Tuner(DE3)와 유사한 발현율을 보였으나 SDS-PAGE 분석 시 주입량을 3 μ L로 줄여 동시에 비교해 본 결과 Tuner(DE3)가 발현율이 조금 더 높은 것을 확인하였다. 그리고 Khan et al.(2010)의 실험과 동일하게 Tuner(DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, BL21(DE3) 순으로 발현율이 높은 것을 확인하였다.

Pre-test 결과 3가지의 효소 중 CphC-I만 soluble form으로 발현되는 것을 확인하였으며 정제과정을 통해 순도 높은 효소를 성공적으로 획득하였다. CphC-II와 CphB는 Khan et al.(2010)의 실험과 달리 상온보다 낮은 15°C의 온도에서는 발현이 되지 않았으며, 또한 Cph계열 효소와 유사한 sequence를 가진 chlorophenol 4-monooxygenase인 *tfiD*와 *tfiC*로 *E.coli* BL21(DE3)를 형질전환하고 IPTG 1.0 mM를 주입하여 37°C에서 soluble form으로 발현시킨 Gisi and Xun(2003)과는 매우 유사한 조건에서 발현시켰음에도 불구하고 본 연구에서는 발현이 전혀 되지 않아 상반되는 결과가 나타났다. 따라서 CphC-II와 CphB는 모두 insoluble form으로 발현되어 pET-24a(+) vector와 *E. coli*, 온도, IPTG의 농도, 배양시간의 조합이 soluble form으로 발현시키는 데 적합하지 않은 것으로 판단된다.

3.3. 기질분해활성도 분석

효소의 기질 특이성을 분석하기 위해 3가지 효소를 모두 사용하고자 하였으나 CphC-I만 soluble form으로 발현이 되었기 때문에 insoluble form으로 발현된 CphC-II, CphB를 제외하고 CphC-I만을 기질과의 반응에 사용하였다. 기질은 4-CP를 기반으로 4-CP의 초기분해단계의 중

간산물로 추정하고 있는 4-CC, 4-CC와 유사한 구조를 가진 CAT을 선정하여 반응시켰다. 정제된 효소와 함께 추가 실험으로 동일한 대량발현조건에서 회수한 cell lysate, 상등액, pellet의 효소의 양을 측정한 뒤 3가지 기질과 반응시켜 효소 활성도와 비활성도를 분석하였다. 효소의 cell lysate, 상등액, pellet, 정제된 효소의 양은 Table 2에 제시하였다.

기질분해 실험결과 4-CP의 효소 활성도는 각각 정제된 효소와 pellet에서 0.610 U, 0.278 U를 나타냈으며(Table 3) *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase를 사용하여 4-CP를 전혀 분해시키지 못한 van de Pas et al.(1999)와 달리 염소가 *para* 자리에 위치한 4-CP를 CphC-I 효소는 분해할 수 있는 것을 확인하였다. 그리고 정제된 효소와 pellet에서 비활성도는 0.312 U/mg, 0.052 U/mg을 나타냈으며 lysate와 상등액에서는 반응이 일어나지 않아 비활성도가 없는 것을 확인하였다. 정제된 효소의 4-CP 비활성도는 4-CP를 탄소원으로 가지는 *Comamonas testosteroni* JH5의 phenol hydroxylase의 crude extract cell을 사용한 Hollender et al.(1997)에 비하여 비활성도가 2배 높은 것으로 나타났다. *Ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase를 보유한 혐기성 박테리아 *Desulfitobacterium dehalogenans*의 cell extract를 fast protein liquid chromatography(FPLC)로 정제시켜 2-chlorophenol을 분해한 van de Pas et al.(1999)의 선행 연구와 비교하여도 약 1.5배 높은 비활성도를 나타내는 것을 확인하였다. 정제된 CphC-I 효소는 선행연구들보다 높은 비활성도를 나타내었으며 pellet에서는 낮은 비활성도를 가지는 것을 확인하였다. Pellet은 기질과의 반응이 일어날 수 있는 단백질 3차원 구조의 형성이 제대로 이루어져 있지 않을 뿐만 아니라 효소 외의 불필요한 단백질도 포함되어 있어 soluble form의 정제된 효소보다 기질

과의 반응성이 상당히 낮은 것으로 판단된다.

정제된 CphC-I 효소와 pellet의 4-CC와의 효소 활성도는 0.903 U, 0.291 U, 비활성도는 0.462 U/mg, 0.055 U/mg으로 나타났다. 4-CP를 탄소원으로 가진 catechol 2,3-dioxygenase를 FPLC를 사용하여 정제하였음에도 불구하고 4-CC를 분해시키지 못한 Shumkova et al.(2009)과 달리 CphC-I은 4-CC에 대하여 효소 활성도를 가지는 것을 확인하였다. 또한 CphC-I과 CphB와 유사한 DNA sequence를 가진 NpdA2와 NpdA1의 lysate를 사용하여 4-CC를 분해시킨 Perry and Zylstra(2007)보다 33배나 높은 비활성도를 나타내었으며 이를 통해 CphC-I이 4-CP의 초기분해단계 대사산물로 추정하고 있는 4-CC도 함께 분해할 수 있는 것으로 판단된다. 이는 4-CP를 분해하는 박테리아를 이용하여 4-CC를 분해한 선행연구들(El-Sayed et al., 1991, Konoalova et al., 2009, Nordin et al., 2005)과 동일한 결과이다. 따라서 4-CP를 분해하는 박테리아는 4-CC도 함께 분해할 수 있는 것으로 판단된다.

CAT은 정제된 효소에 의해서만 분해되었고 효소 활성도는 0.481 U, 비활성도는 0.246 U/mg이며 4-CP 또는 4-CC에 비하여 정제된 효소 활성도와 비활성도의 값이 매우 낮은 것을 확인하였다. Phenol을 분해하는 *Rhodococcus opacus* 1G의 catechol 2,3-dioxygenase를 정제시켜 CAT을 분해한 Shumkova et al.(2009)에 비해 효소 활성도는 본 연구의 효소 질량이 3배 이상 더 많음에도 불구하고 효소 활성도는 300배, 비활성도는 100배 이상 낮은 차이를 나타냈다. 그리고 *Pseudomonas putida* DSM로부터 catechol 1,2-dioxygenase의 crude extract cell을 사용하여 CAT과 반응시켜 분해한 Sanakis et al.(2003)의 비활성도보다 28% 낮은 것을 확인하였다. CphC-I은 정제를 하였음에도 불구하고 catechol dioxygenase들과 비교하여 전반적으로 매우 낮은 비활성도를 나타냈기 때문에 CAT에 대한 분해 기능이 떨어지는 것으로 볼 수 있다.

결론적으로, 기질분해활성도 실험결과 CphC-I은 4-CP 및 4-CP와 유사한 구조를 가진 4-CC의 분해에 높은 비활성도를 나타내지만 4-CP와 구조상 차이를 보이는 CAT의 경우에는 분해는 가능하나 매우 낮은 반응효율을 갖는 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 4-CP의 초기분해단계의 과정을 담당하는 monooxygenases(CphC-I, CphC-II, CphB)의 DNA를 호기성 박테리아 *A. chlorophenolicus* A6로부터 추출하여

pET-24a(+) vector에 복제하였다. 복제된 plasmid를 다양한 *E. coli*에 형질전환 시켜 soluble form의 효소를 획득하기 위한 최적의 대량발현 조건을 도출하였다. 발현결과 CphC-I은 15°C에서 0.5 mM IPTG, 24시간 동안 배양하였을 때 soluble form으로 대량발현 되었으며 Ni²⁺-NTA resin을 사용하여 정제한 결과 높은 순도의 순수 효소가 획득되었다. CphC-II는 모든 *E. coli*에서 insoluble form으로 가장 낮게 발현되었고 반면에 CphB는 insoluble form으로 발현되었으나 다른 효소보다 발현율은 가장 높은 것을 확인하였다. 그리고 정제한 CphC-I을 4-CP, 4-CC, CAT과 반응시켰을 때 각각의 비활성도는 0.312 U/mg, 0.462 U/mg, 0.246 U/mg로 4-CC, 4-CP, CAT 순으로 높은 것을 확인하였다. 따라서 CphC-I은 4-CP를 분해시킬 뿐만 아니라 4-CC, CAT의 분해가 가능한 것으로 보아 효소가 특정 기질에만 작용하지 않으며 유사한 구조를 가진 기질에도 분해활성도를 나타내는 것으로 판단된다. 본 연구결과는 4-CP를 분해하는 monooxygenase를 토대로 4-CP의 분해단계에 대한 정보를 제공하며 효소의 생물학적 처리 분해과정 설계에 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 국토해양부의 U-City 석·박사과정 지원사업과 환경부 “폐자원에너지화·재활용 전문인력양성사업(YL-WE-12-001)”으로 지원되었습니다.

References

- Chen, W., Brühlmann, F., Richins, R.D., and Mulchandani, A., 1999, Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 137-141.
- Czaplicka, M., 2004, Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment, *Sci. Total Environ.*, **322**, 21-39.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L., 2004, The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3), *Protein Expr. Purif.*, **37**, 203-206.
- El-Sayed, W.S., Ismaeil, M., and El-Beih, F., 2009, Isolation of 4-chlorophenol-degrading bacteria, *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenes* sp. OS2 from petroleum oil-contamination soil and characterization of its catabolic pathway, *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **3**(2), 776-783.
- Ferraroni, M., Kolomytseva, M.P., Solyanikova, I.P., Scozzafava, A., Golovleva, L.A., and Briganti, F., 2006, Crystal

- structure of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase key enzyme of a new modified *ortho*-pathway from the gram-positive *Rhodococcus opacus* ICP grown on 2-chlorophenol, *J. Mol. Biol.*, **360**, 788-799.
- Gisi, M.R. and Xun, L., 2003, Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase (TfD) and NADH:Flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TfC) of *Burkholderia cepacia* AC1100, *J. Bacteriol.*, **185**, 2786-2792.
- Hernandez, S.R., Kergaravat, S.V., and Pividori, M.I., 2013, Enzymatic electrochemical detection coupled to multivariate calibration for the determination of phenolic compounds in environmental samples, *Talanta*, **106**, 399-407.
- Hollender, J., Hopp, J., and Dott, W., 1997, Degradation of 4-chlorophenol via the *meta* cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4567-4572.
- Jegannathan, K.R. and Nielsen, P.H., 2013, Environmental assessment of enzyme use in industrial production- a literature review, *J. Clean. Prod.*, **42**, 228-240.
- Khan, K., Madhavan, T.P.V., and Muniyappa, K., 2010, Cloning, overexpression and purification of functionally active *Saccharomyces cerevisiae* Hop1 protein from *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, **72**, 42-47.
- Konovalova, E.I., Solyanikova, I.P., and Golovleva, L.A., 2009, Degradation of 4-chlorophenol by the strain *Rhodococcus opacus* 6a, *Microbiology*, **78**, 805-807.
- Lee, S.H., Lee, S.H., Ryu, S.J., Kang, C.S., Suma, Y., and Kim, H.S., 2013, Effective biochemical decomposition of chlorinated aromatic hydrocarbons with a biocatalyst immobilized on natural enzyme support, *Bioresour. Technol.*, **141**, 89-96.
- Li, J., Cai, W., and Zhu, L., 2011, The characteristics and enzyme activities of 4-chlorophenol biodegradation by *Fusarium* sp., *Bioresour. Technol.*, **102**, 2985-2989.
- Nordin, K., Unell, M., and Jansson, J.K., 2005, Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6538-6544.
- Olaniran, A.O. and Igbinsosa, E.O., 2011, Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: properties, distribution and microbial degradation processes, *Chemosphere*, **83**, 1297-1306.
- Papaneophytou, C.P., Rinotas, V., Douni, E., and Kontopidis, G., 2013, A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in *Escherichia coli*: purification and characterization of the protein, *Protein Expr. Purif.*, **90**, 9-19.
- Perry, L.L. and Zylstra, G.J., 2007, Cloning of a gene cluster involved in the catabolism of *p*-nitrophenol by *Arthrobacter* sp. strain JS443 and characterization of the *p*-nitrophenol monooxygenase, *J. Bacteriol.*, **189**, 7563-7572.
- Pieper, D.H. and Reineke, W., 2000, Engineering bacteria for bioremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 262-270.
- Sahoo, N.K., Pakshirajan, K., and Ghosh, P.K., 2010, Enhancing the biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 via medium development, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **64**, 474-480.
- Sanakis, Y., Mamma, D., Christakopoulos, P., and Stamatidis, H., 2003, Catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* in organic media-an electron paramagnetic resonance study, *Int. J. Biol. Macromol.*, **33**, 101-106.
- Shah, B. and Chen, A., 2012, Novel electrochemical approach for the monitoring of biodegradation of phenolic pollutants and determination of enzyme activity, *Electrochem. Commun.*, **25**, 79-82.
- Shumkova, E.S., Solyanikova, I.P., Plotnikova, E.G., and Golovleva, L.A., 2009, Phenol degradation by *Rhodococcus opacus* strain 1G, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **45**, 51-57.
- Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K., 2005, Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microb. Cell. Fact.*, **4**, 1-8.
- Tobajas, M., Monsalvo, V.M., Mohedano, A.F., and Rodriguez, J.J., 2012, Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*, *J. Environ. Manage.*, **95**, S116-S121.
- van de Pas, B.A., Smidt, H., Hagen, W.R., van der Oost, J., Schraa, G., Stams, A.J.M., and de Vos, W.M., 1999, Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfotobacterium dehalogenans*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 20287-20292.
- Wang, J., Ma, X., Liu, S., Sun, P., Fan, P., and Xia, C., 2012, Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W1, *Procedia Environ. Sci.*, **16**, 299-303.
- Wojcieszynska, D., Greń, I., Hupert-Kocurek, K., and Guzik, U., 2011, Modulation of FAD-dependent monooxygenase activity from aromatic compounds-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2, *Acta. Biochim. Pol.*, **58**, 421-426.