

## 페놀분해세균인 *Pseudomonas* sp. EL-04J로부터 Trichloroethylene 분해효소의 확인

박근태 · 김호성 · 손홍주<sup>1</sup> · 이 건 · 박성훈<sup>2</sup> · 이상준\*

부산대학교 미생물학과, <sup>1</sup>밀양대학교 생물공학과, <sup>2</sup>부산대학교 응용화학공학부 및 환경기술산업개발연구소

### Confirmation of Trichloroethylene-Degrading Enzyme from a Phenol-Degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. EL-04J

Geun-Tae Park, Ho-Sung Kim, Hong-Joo Son<sup>1</sup> Geon Lee, Sung-Hoon Park<sup>2</sup>  
and Sang-Joon Lee\*

*Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea,*

<sup>1</sup>*Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea,*

<sup>2</sup>*Division of Chemical Engineering, and Institute for Environmental Technology,  
Pusan National University, Busan, 609-735, Korea*

#### Abstract

*Pseudomonas* sp. EL-04J was previously isolated from phenol-acclimated activated sludge. This bacterium was capable of degrading phenol and cometabolizing trichloroethylene (TCE). In this study, we report the identification of trichloroethylene-degrading enzyme in *Pseudomonas* sp. EL-04J by the investigation of enzyme activity and DNA sequencing of specific phenol oxygenase gene. As the results of experiment, trichloroethylene-degrading enzyme in *Pseudomonas* sp. EL-04J was monooxygenase and suspected to phenol hydroxylase.

**Key words** – Phenol, trichloroethylene, *Pseudomonas* sp., TCE degrading enzyme

#### 서 론

휘발성 염소화 지방족 탄화수소(volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons; CAHs)는 음용수에 오염되어 인간의 건강을 위협하는 주된 물질이다[5]. 그중 가장 광범위하게 오염되어 있는 물질중의 하나가 바로 trichloroethylene (TCE)이다. TCE는 다양한 산업체에서 decreasing agent로 널리 사용되는 화합물로서, 발암성 물질로 추정되고 있다

[2,4,8]. 또한 TCE는 강력한 난분해성으로 인하여 지하수에서 가장 일반적으로 검출되는 물질이기도 하다[10,13]. 따라서 미생물에 의하여 TCE를 생분해시키기 위한 많은 연구들이 보고되고 있다.

최근, 본 저자들은 페놀오염 지역으로부터 페놀을 분해할 수 있는 *Pseudomonas* sp. EL-04J를 분리하여 페놀분해 특성 및 페놀이 TCE 공동대사를 위한 우수한 생육기질로 작용한다는 것을 확인[6]하였으며, 또한 페놀을 생육기질로 사용했을 때, *Pseudomonas* sp. EL-04J에 의한 TCE 공동대사 특성 및 kinetics에 대하여 보고하였는데, 페놀을 유도기질로 하여 TCE를 분해하는 다른 세균과는 달리 초기 TCE

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-510-2268, Fax : 051-518-1688  
E-mail : sangjoon@pusan.ac.kr

농도가 TCE 분해에 제한요인으로 작용하지 않는 특성을 가지고 있었으며, 페놀과 TCE를 추가적으로 반응조에 공급함으로써 균체생육 및 지속적 TCE 분해가 가능하였다 [7]. 페놀과 같은 방향족 화합물이 분해되기 위해서는 벤젠 고리의 절단이 필수적이며, 이 벤젠고리에 dihydroxylation 이 일어나서 catechol로 전환되어야 한다[9]. 이러한 작용을 ring activation이라 하고, catechol에서 벤젠고리를 절단하는 작용을 ring fission이라 한다. 그리고 이러한 두 과정에 작용하는 효소가 TCE 분해와 관련이 있다고 알려져 있다 [1]. 따라서 본 연구에서는 앞에서 언급한 바와 같이 독특한 TCE 공동대사 특성을 가지고 있는 *Pseudomonas* sp. EL-04의 페놀분해와 관련된 TCE 공동대사 기작을 이해하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

유도기질인 페놀로부터 유도되는 효소계 (페놀을 catechol로 변환시켜주는 ring activation 효소인 dioxygenase, mono-oxygenase와 catechol에서 벤젠고리를 끊어주는 ring fission 효소인 catechol dioxygenase)중에서 어떤 효소가 TCE 분해와 관련이 있는지 다음과 같이 조사하였다. 즉, 5 mM catechol에서 배양된 washed cell을 23  $\mu$ g protein/ml의 농도로 현탁한 무기염 배지[1] 10 ml를 50-ml serum vial에 첨가한 후, TCE stock solution을 25  $\mu$ M (액상 = 18.1  $\mu$ M) 첨가하였다. Vial을 teflon-faced butyl rubber로 밀봉하여 200 rpm, 30 $^{\circ}$ C, 20시간동안 반응시킨 후, 대조구인 페놀에서 배양한 washed cell에 의한 TCE 분해와 비교하였다. Dioxygenase 활성은 Gibson 등[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 페놀에서 배양한 균체를 원심분리하여 회수한 뒤에 2 mM indole이 첨가된 무기염 배지에 현탁하였다. 현탁액을 30 $^{\circ}$ C, 160 rpm에서 4시간동안 진탕한 후, 반응액과 동일한 부피의 ethyl acetate로 2회 추출하여 indigo 생성량을 660 nm에서 조사하였다. 효소활성은 흡광도가 0.1 증가할 때를 1 unit로 하였다. Phenol-degrading mono-oxygenase 활성은 Lee 등[8]의 방법을 변형하여 측정하였다. Sonicator로 균체를 파쇄하여 원심분리 (18,000 rpm, 50분)한 배양상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 100  $\mu$ l (23  $\mu$ g protein/ml)와 reaction mixture (100  $\mu$ M 페놀,

1 mM NADH, 100 mM Na-phosphate buffer) 1 ml와 혼합한 후, 30 $^{\circ}$ C, 180 rpm에서 15분간 진탕하였다. 반응을 중지시키기 위해 2N NH<sub>4</sub>OH 12 $\mu$ l를 첨가하고, 2% 4-amin-oantipyrine 40  $\mu$ l와 2% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 40  $\mu$ l를 넣은 후, 잘 흔들어 주었다. 그리고 최종 반응액에 증류수 2 ml를 첨가한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 미리 작성된 검량선과 비교하여 페놀 분해량을 계산하였고, 효소활성은 1  $\mu$ M/min의 페놀이 분해될 때를 1 unit로 하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 TCE 분해 효소를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. PCR에 이용된 DNA template는 Bio-Rad사의 instagene<sup>TM</sup> matrix 시약을 이용하여 분리하였다. LB 한천평판배지에서 생육시킨 균체를 instagene<sup>TM</sup> matrix시약 100  $\mu$ l에 현탁하여 58 $^{\circ}$ C에서 30분간 유지한 후, 100 $^{\circ}$ C에서 8분간 유지하였다. 반응이 끝난 뒤, 실온에서 원심분리 (12,000 rpm, 10분)한 반응액을 4 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 DNA template로 사용하였다. 2개의 primer는 Selvaratnam 등[11]이 phenol-mono-oxygenase 유전자의 염기서열에 기초로 하여 작성한 DMPN1 (5'-ATC ACC GAC TGG GAC AAG TGG GAA GAC C-3')과 DMPN2 (5'-TGG TAT TCC AGC GGT GAA ACG GCG G-3')를 한국생공(주)에서 주문하여 사용하였다. PCR amplification은 0.5  $\mu$ l의 Takara Taq polymerase (5 unit/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l 10  $\times$  PCR buffer, 8  $\mu$ l dNTP mixture, 2  $\mu$ l template DNA (450  $\mu$ g/ml), 각 0.25 mM의 primer를 첨가하고 GeneAmp PCR system (9600, Perkin Elmer)를 사용하여 initial denaturation 95 $^{\circ}$ C, 2분; denaturation 95 $^{\circ}$ C, 1분; primer annealing 50 $^{\circ}$ C, 30초; primer extension 72 $^{\circ}$ C, 1분의 조건으로 40 cycle을 실행한 후, final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하여 증폭을 종결하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시하여 확인하였다. PCR product의 정제는 QIAGEN gel extraction kit를 사용하여 실시하였고, 정제된 PCR product는 ABI 377기종의 auto-sequencer를 사용하여 dye terminator sequencing법으로 실시하였다. PCR product의 염기서열 분석은 Blast search program을 이용, internet상의 database인 gene-bank, EMBL, DDBJ, PDB을 통하여 실시하였다.

### 결과 및 고찰

페놀 분해효소계에서 TCE 분해효소를 확인한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉, catechol에서 배양된 washed cell의 경우, TCE 분해가 일어나지 않았다. 이러한 결과는 페놀 대사과정의 첫 단계인 페놀이 catechol로 전환되는 과정에 작용하는 효소가 TCE 분해에 관여한다는 것을 의미하며, 이전에 보고된 TCE 분해효소와 일치하였다 [3,5].

방향족 화합물의 분해에 있어서 ring activation dioxygenase와 monooxygenase의 활성을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. Ring activation dioxygenase의 경우, 페놀에서 자란 균체의 흡광도(660 nm)가 증류수로 실시한 대조구의 흡광도와 동일하여 dioxygenase활성을 가지지 않는 것으로 나타났고, phenol-degrading monooxygenase의 경우에는 약 80%의 페놀이 분해되어 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 페놀 분해효소 및 TCE 분해효소는 phenol-degrading monooxygenase임을 알 수 있었다. Phenol-degrading monooxygenase를 대상으로 PCR을 실시한 결과는 Fig. 1과 같았다. 반응시킨 3개의 sample 모두에서 203 base pair의 DNA fragment가 증폭됨을 확인할 수 있었고, 대조군로 이용한 *E. coli*에서는 증폭된 band가 없었다. 증폭된 PCR product를 정제하여 sequencing한 결과를 Fig. 2에, DNA 염기서열을 분석한 결과를 Fig. 3에 나

Table 1. Rate of TCE degradation by an induced cell from phenol and catechol

Substrates	Utilization	Rate of residual TCE (%)
Blank		100
Phenol	+	<1.5
Catechol	+	>99.5

\*Heat-inactivated control.

Table 2. Activity of ring activation enzyme

Dioxygenase activity	Phenol-degrading monooxygenase activity
-	80 unit

\*One unit of phenol-degrading monooxygenase activity is defined as 1  $\mu$ M of phenol degradation per min.

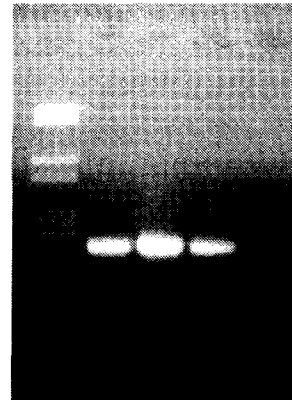


Fig. 1. Gel electrophoresis of PCR product.

Lane 1; size marker, lane 2, 3, 4; *Pseudomonas* sp. EL-04, lane 5; *E. coli*.

```

001 TATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTG
    I T D W D K W E D P F R L
041 ACCATGGACAGCTACTGGAATACCAGGCGGAGAAAGAG
    T M D S Y W K Y Q A E K E
080 AAGAAGTGTACGGATCTTCGACGCCCTTGCCAGAACA
    K K L Y A I F D A F A Q N
120 ATGGTCATCAGAACATTTCGATGCGCGCTACGTCAACG
    N G H Q N I S D A R Y V N
160 CCCTGAAGCTGTTCCCTACCGCGCTTTCACCGCTGGAAT
    A L K L F L T A
200 ACCAA
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the 203 base pair PCR product.

타내었다. PCR product의 DNA 염기서열을 분석한 결과, *Pseudomonas putida* CF600의 phenol hydroxylase gene (*dmpN* component), *Pseudomonas putida* BH의 phenol hydroxylase gene (*pheA4* component), *Pseudomonas putida* P35X의 phenol hydroxylase and ferredoxin like protein gene (*phhN* component)와 99%의 상동성을 나타내었고, *Pseudomonas putida* H의 phenol hydroxylase gene (*phlD* subunit)과 97%의 상동성을 나타내었다. 비록 203 base pair의 짧은 길이의 fragment로만 분석하였지만 *Pseudomonas*속의 phenol hydroxylase와 97%이상의 상동성을 보임에 따라 본 공시균의 페놀분해효소가 phenol hydroxylase임을 추정할 수 있었다. 그리고 상기의 균주중 *Pseudomonas*

```

This study 003 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 042
dmpN      2492 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 2531
pheA      2492 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 2531
phhN      2398 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 2437
phlD      1990 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 2039
tmbD      2190 ATCACCGACTGGGACAAGTGGGAAGACCCCTTCCGCCTGA 2239
ORF4      1939 ATTACCGACTGGTTCGAAATGGGAAGATCCTTTCCGTTTAA 1978

043 CCATGGACAGCTACTGGAAATACCAGGCGGAGAAAGAGAA 082
2532 CCATGGACACCTACTGGAAATACCAGGCGGAGAAAGAGAA 2571
2532 CCATGGACACCTACTGGAAATACCAGGCGGAGAAAGAGAA 2571
2438 CCATGGACAGCTACTGGAAATACCAGGCGGAGAAAGAGAA 2476
2040 CCATGGACAGCTACTGGAAAACCAGGCGGAGAAAGAGAA 2079
2240 CCATGGATGCGTACTGGAAGTACCAGGCGGAGAAAGAGAA 2279
1979 CCATGGATAACTATTGGAAATACCAAGCAGAAAAAGAAAA 2018

083 GAAGCTGTACGCGATCTTCGACGCCTTTGCCCAGAACAAT 122
2572 GAAGCTCTACGCGATCTTCGACGCCTTTGCCCAGAACAAT 2611
2572 GAAGCTCTACGCGATCTTCGACGCCTTTGCCCAGAACAAT 2611
2477 GAAGCTCTACGCGATCTTCGACGCCTTTGCCCAGAACAAT 2516
2080 GAAGCTCTACGCGATCTTCGACGCCTTTGCCCAGAACAAT 2119
2280 GAAGCTCTACGCGTGATCGAGGCTTTGCGCGAGAACAAC 2319
2019 GAAGCTATATGCCATTTTGTATGCTTTTGCACAAAACAAT 2058

123 GGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 162
2612 GGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 2651
2612 GGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 2651
2517 GGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 2556
2120 GGTCATCAGAACATTTCCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 2159
2320 GGCCAGCTCGGCATCAGCGATGCGCGCTACGTCAACGCC 2359
2059 GGGCAAATGAATGTTTCAAATGAACGTTATGTCAACGCCA 2098

163 TGAAGCTGTTCTCACC GCCGTTTACC GCTGGAATACCA 203
2652 TGAAGCTGTTCTCACC GCCGTTTACC GCTGGAATACCA 2691
2652 TGAAGCTGTTCTCACC GCCGTTTACC GCTGGAATACCA 2691
2557 TGAAGCTGTTCTCACC GCCGTTTACC GCTGGAATACCA 2597
2160 TGAAGCTGTTCTCACC GCCGTTTACC AATGGAATACCA 2189
2360 TCAAGCTGTTTATCCAGGGCGTACGCGCTGGAATACAA 2389
2099 TTAAATTGTTTTTAAACCGCGGTAACCCCGCTTGAGTATCAA2139
    
```

Fig. 3. An alignment of the nucleotide sequences deduced from nucleotide sequence of the 203 base pair phenolhydroxy fragment of *Pseudomonas* sp.

EL-4J(this study) with *Pseudomonas putida* CF600(dmpN), *Pseudomonas putida* BH(pheA), *Pseudomonas putida* P35X(phhN), *Pseudomonas putida* H(phlD), *Pseudomonas* sp. strain JS150(tmbD), *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250(ORF4). \* indicated different sequence.

*putida* BH의 phenol hydroxylase는 TCE 분해능이 있는 것으로 보고되어 있으며, 이외에도 TCE 분해능이 보고된

*Pseudomonas* sp. strain JS150의 toluene/benzene-2-monooy- genase gene (*tmbD* componet), *Acinetobacter calcoaceticus*

NCIB8250의 phenol hydroxylase gene (ORF4 component) 과도 73% 이상의 상동성을 보여 본 공시균주의 페놀 분해 효소인 phenol hydroxylase가 TCE 분해효소임을 확인할 수 있었다.

## 요 약

*Pseudomonas* sp. EL-04J는 페놀로 적응된 활성오니로부터 분리되었으며, 페놀을 분해할 수 있는 동시에 trichloroethylene(TCE)을 공동대사할 수 있는 세균이다. 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. EL-04J에서 발견되는 trichloroethylene 분해효소의 종류를 효소활성 측정 및 specific phenol oxygenase gene의 DNA sequencing을 통하여 조사하였으며, 그 결과 본 균주의 trichloroethylene 분해효소는 monooxygenase였으며, phenol hydroxylase로 추정되었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 '96 목적기초연구 특정연구과제 지원금(과제번호 95-0502-10-01-3)에 의하여 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Fetzner, S. and F. Lingens. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**, 641-685.
2. Folsom, B. R., P. J. Chapman and P. H. Pritchard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1279-1285.
3. Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka and M. Takeo. 1995. Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 100-106.
4. Furukawa, K. J. Hirose, S. Hayashida and K. Nakamura. 1994. Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *J. Bacteriol.* **176**, 2121-2123.
5. Haker, A. R. and Y. Kim. 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic degrading pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1179-1181.
6. Kim, H. S., G. T. Park, H. J. Son, S. H. Park and S. J. Lee. 2001. Isolation and characterization of aerobic trichloroethylene cometabolizing bacterium. *J. Kor. Environ. Sci. Soc.* **10**, 99-103.
7. Kim, H. S., G. T. Park, H. J. Son, S. H. Park and S. J. Lee. 2001. Cometabolism of trichloroethylene by a phenol-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. EL-04J. *J. Kor. Environ. Sci. Soc.* **10**, 359-364.
8. Lee, S. H., S. Y. Kang and J. H. Ha. 1994. Biodegradation of trichloroethylene by a phenol-utilizing bacterium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 203-209.
9. Lorriss, G. C. and B. S. Shane. 1994. *Basic Environmental Toxicology*. CRC Press, Inc.
10. Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, P. H. Pritchard. 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 604-606.
11. Selvaratnam, S., B. A. Schoedel, B. L. McFarland and C. F. Kulpa. 1997. Application of the polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcriptase/PCR for determining the fate of phenol-degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bioaugmented sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 236-240.
12. Wackett, L. P. and D. T. Gibson. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1703-1708.
13. Zylstra, G. J., L. P. Wackett and D. T. Gibson. 1989. Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3162-3166.

(Received July 10, 2002; Accepted September 25, 2002)