



Bioremediation을 위하여 재조합 대장균 촉매를 이용한 Paraoxon의 생분해 속도 향상

최석순[†], 서상환, 강동균*, 차형준*, 염승호**

세명대학교 바이오환경공학과[†], 포항공과대학교 화학공학과*, 강릉대학교 환경응용화학공학과**

(2006년 8월 28일 접수, 2006년 9월 11일 채택)

Enhancement of Paraoxon Biodegradation Rate from Recombinant *Escherichia coli* Catalyst for Bioremediation

Suk Soon Choi[†], Sang Hwan Seo, Dong Gyun Kang*, Hyung Joon Cha*, Sung Ho Yeom**

Department of Biological and Environmental Engineering, Semyung University, Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology*

Department of Environmental and Applied Chemical Engineering, Kangnung National University**

ABSTRACT

In this study, the biodegradation rate of paraoxon, that is an organophosphate pesticide, was enhanced by recombinant *Escherichia coli* harboring organophosphorus hydrolase (OPH). The optimum conditions were 8.5 of initial pH and 5.0% of acetone for the enhancement of specific whole cell OPH activity. When the OPH was produced to 498 Unit/L, 98% of 275mg/L paraoxon was degraded within 10 minutes, and thus the biodegradation rate was enhanced to 29.2 mg/g · min. The results implied that practical bioremediation technology developed in this study was an effective method to degrade residual organophosphate pesticide in ground water or soils in a short time.

Keywords : organophosphorus hydrolase, specific whole cell OPH activity, paraoxon biodegradation rate, organophosphate pesticide

초 록

본 연구에서는 재조합 대장균으로부터 Organophosphorus Hydrolase (OPH)를 이용하여 유기인 살충제 화합물인 paraoxon의 생분해 속도를 향상시켰다. OPH의 비 활성도 (Specific whole cell OPH Activity)를 증가시키기 위한 배지의 최적 조건은 초기 pH 8.5의 조절과 5.0 % acetone 첨가가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 또한, 이 최적의 조건에서 498 Unit/L의 OPH가 생산될 때, 275 mg/L paraoxon은 반응 10분 동안 98% 생분해 효율을 나타내었고, 그 결과 생분해 속도를 29.2 mg/g · min까지 향상시킬 수

[†]Corresponding author (sschoi@semyung.ac.kr)

있었다. 이러한 실험 결과들은 지하수 또는 토양에 잔류하는 유기인 살충제를 빠른 시간 안에 효과적으로 생분해시키는 실질적인 생물 복원 기술로 사용될 수 있을 것이다.

핵심용어 : Organophosphorus Hydrolase, Specific whole cell OPH Activity, paraoxon의 생분해 속도, 유기인 살충제

1. 서론

환경 독성 유기인 화합물은 살충제로서 100가지 종류 이상의 성분들로 구성되었으며, 1500개 이상의 서로 다른 유기인 화합물이 합성되었다고 알려졌다¹⁾. 이러한 유기인 화합물들이 고농도 노출되면 acetylcholine의 축적으로 인하여 근육 반응에 저해를 주며, 생체 조직에 심각한 손상을 일으켜서 최종적으로 사망에 이른다고 보고 되었다²⁾. 또한, 살충제의 과다 사용으로 인하여 지하수와 토양에서 심각한 환경오염을 유발시키고 있다. 그리고, Sarin, Soman, VX, tabun 등과 같은 유기인 화합물들은 신경 작용제로서 화학 무기에 널리 사용되고 있으며, 이러한 화학 무기를 기존의 물리적, 화학적 방법에 의하여 처리 할 때 상당한 비용이 소요되므로 새로운 처리기술의 개발이 요구되고 있다³⁾.

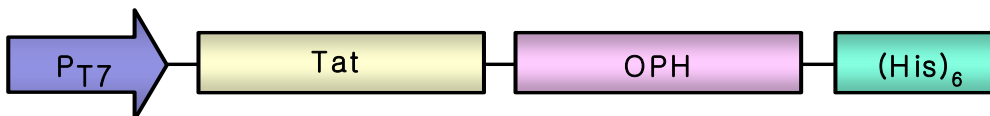
최근 유기인 화합물을 생물학적 처리로서 효소를 이용한 방법들이 관심을 받고 있다. 이러한 방법 중에서 Organophosphorus Hydrolase (OPH) 효소는 토양미생물인 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacterium* sp.에서 분리되었으며, 유기인 화합물을 효과적으로 제거한다고 알려졌다^{4, 5, 6)}. 또한, 이 효소는 bioremediation agent로서 그 사용에 대하여 상당한 관심을 받고 있으나 생물

복원을 위한 실제적 현장 적용에서는 효소의 구조적 안정성과 높은 촉매 효율이 요구되고 있다⁷⁾. 한편, 기존의 OPH 연구에서는 주로 미생물로부터 효소를 분리 및 정제한 것을 이용하였거나⁸⁾ 또는 고정화 시스템에서 효소를 사용하였기 때문에^{9, 10, 11)}, 이를 환경 분야에 응용시킬 때 상당한 경제적 부담의 요인이 될 수 있다. 따라서 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 생물학적 처리 방법이 요구되고 있다.

본 연구에서는 기존의 특정 미생물에서 발견되는 OPH를 분리 및 정제하여 사용하는 방법과는 달리, 재조합 대장균의 세포 간극에서 발견되는 전세포 촉매 (Whole Cell Biocatalyst)인 OPH를 이용하였다. OPH 촉매를 Bioremediation 분야에 적용하고자, 본 연구에서는 OPH의 비활성도 (Specific whole cell OPH activity)를 증가시키기 위한 배지에서의 초기 pH 및 첨가되는 유기용매의 최적 조건을 도출하였다. 이 최적조건을 이용하여 paraoxon의 생분해 속도를 향상시키고자 하였다.

2. 실험재료 및 분석방법

본 실험에 사용된 균주는 재조합 플라스미드를 *Esherichia coli* BL21 (DE3)에 형질 전환시켜서 제조하였으며, 이를 [Fig. 1]에 나타내었다. 재조



[Fig. 1] Structure of recombinant plasmid. Abbreviations: P_{T7}, T7 promoter; Tat, signal sequence; OPH, organophosphorus hydrolase; (His)₆, hexahistidine affinity tag.

합 대장균은 LB 배지 (5g/L Yeast extract, 10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl)에 50 μ g/mL ampicillin를 첨가한 후, Sub-culture하였다. 이때 37°C, 216 rpm의 조건에서 shaking incubator (J-S11, Jisico, Korea)를 이용하였으며 12시간 동안 균주를 배양하였다. 그리고 M9 배지 (6.78 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 0.5g/L NaCl, 1g/L, NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂)에 0.5% glucose와 50 μ g/mL ampicillin을 첨가한 배지를 제조하였으며, 배지의 초기 pH를 조절하기 위하여 1 N HCl과 1 N NaOH를 사용하였다. 이 배지를 사용하여 성장된 균주를 재접종한 후 배양하였다. 또한, 배양 3시간에 도달하였을 때 IPTG, CoCl₂ · 6H₂O, EDTA 및 3가지 유기용매(methanol, ethanol, acetone)를 첨가하였으며, 재조합 균주의 농도와 OPH를 측정하였다.

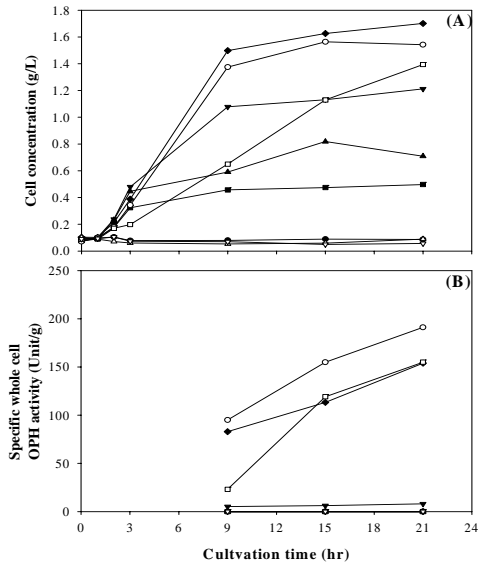
재조합 균주의 Optical Density (OD)는 UV/VIS Spectro-photometer (UV-1601PC Shimadzu, Japan)를 이용하였으며, 이때 600nm의 파장에서 채취된 대장균 현탁액으로부터 OD를 분석하였다. 분석된 OD를 미생물 건조 질량으로 환산하여 균주의 농도를 구하였다. 또한, 채취한 현탁액 1 mL는 원심분리기 (Hanil Micro-12, Korea)를 사용하여 분리하였으며, 여기서 얻어진 미생물은 증류수를 이용하여 재현탁시켰다. 그리고, 재현탁액 100 μ l, 100 mM CHES [2-(N-cyclohexylamino) ethane-sulfonic acid] buffer 400 μ l, 10mM Paraoxon 100 μ l, 증류수 400 μ l로부터 시료 1 mL를 제조하여 OPH, paraoxon, *p*-nitrophenol의 농도를 분석하였다. OPH 분석은 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하였으며, 400 nm 파장에서 paraoxon이 *p*-nitrophenol로 가수분해되는 속도에 의하여 구하였다⁹⁾. 또한, 상기 시료 1 mL를 원심 분리한 후 상등액을 취하였으며, 이를 0.45 μ m micro filter (MFS, Japan)를 사용하여 여과하였다. 여기서 얻어진 여과액은 HPLC(Waters 2487, USA)를 이용하여 276, 400 nm 파장에서 각각 paraoxon과 *p*-nitrophenol의 농도를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

효소는 활성을 나타내는 접힌 (folded) 형태 또는 활성을 나타내지 않는 풀린 (unfolded) 형태로 존재한다. 이러한 효소의 접힘 (folding)의 평형은 pH에 의존한다¹²⁾. 따라서, pH는 효소의 활성도에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나이다.

본 연구에서는 재조합 대장균의 전세포 촉매인 OPH의 활성에 영향을 미치는 pH 영향을 파악하기 위하여, 배지에서 초기 pH 변화에 의한 균주의 성장과 OPH의 비 활성도 (Specific whole cell OPH activity)를 고찰하였다. [Fig. 2]에 나타난 것과 같이, 초기 pH를 7.5 또는 8.5로 조정할 경우가 배양 9시간 이후 다른 초기 pH 조건 보다 높은 세포 성장을 나타내었다. 그러나 초기 pH를 강산성 영역인 3.5와 강염기성 영역인 10.5 및 11.5로 조절한 후, 21시간 동안 균주를 배양하였지만 세포 성장은 거의 이루어지지 않았다. 그리고 초기 pH를 8.5로 조절하고 균주를 성장시킨 결과, 배양 9, 15, 21 시간에 각각 95, 155, 191 Unit/g의 높은 OPH 비 활성도를 나타내었다. 한편, 초기 pH를 3.5~5.5 및 10.5~11.5로 조정할 경우, OPH 효소는 거의 발현이 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 위의 실험 결과로부터, 전세포 촉매인 OPH의 비 활성도를 향상시키기 위한 배지에서 최적의 초기 pH가 8.5임을 구할 수 있었다.

재조합 대장균을 이용하여 OPH를 생산할 때, 이 효소의 낮은 용해성으로 인하여 생산 수율이 떨어진다고 알려졌다¹³⁾. 따라서 OPH를 실제적인 공정에 적용하기 위하여 생산성을 증가시켜야 한다. 본 연구에서는 OPH 효소의 용해성을 향상시키고자 앞서 구한 배지에서의 최적의 초기 pH를 8.5로 조절한 후, 성장 배지에 유기 용매 첨가에 의한 균주의 성장과 OPH의 비 활성도를 비교하였다. [Fig. 3]에 보인 것과 같이, 2.5 %의 동일한 농도로 3가지 유기 용매 (methanol, ethanol, acetone)를 배지에 주입한 후 51시간 동안 배양시킨 결과, 모든 경우에서 세포 성장의 저해 (inhibition) 현상을 나타내었다. 특히, 세포 성장에서 가장 큰 저해를 나타내는 유기 용매가 acetone임을 알 수 있었다.

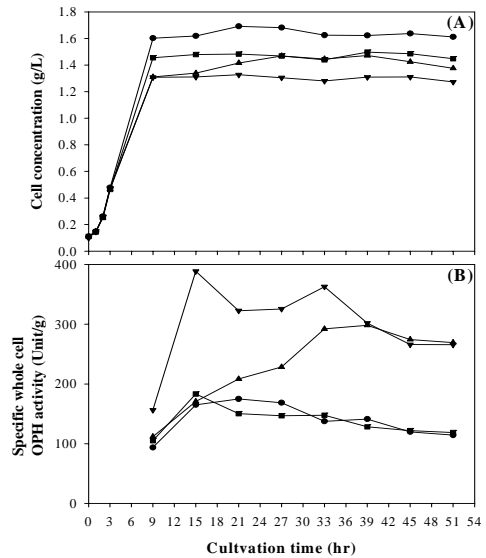


[Fig. 2] Effect of initial pH on cell growth (A) and specific whole cell OPH activity (B).

Experimental conditions: Cells were grown in the media at 35°C. 0.2mM IPTG, 0.25mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and 0.2mM EDTA were added in the M9 media after 3 hour cultivation. Symbols: ●, initial pH 3.5; ■, initial pH 4.5; ▲, initial pH 5.5; ▼, initial pH 6.5; ◆, initial pH 7.5; ○, initial pH 8.5; □, initial pH 9.5; △, initial pH 10.5; ▽, initial pH 11.5.

그러나 배지에 acetone를 첨가한 경우가 배양 전체 시간에서 높은 OPH를 생산하였으며, 배양 51시간을 기준으로 유기 용매를 첨가하지 않은 경우와 비교하였을 때, OPH 비 활성도가 2.3배 증가되었다. 따라서 OPH 비 활성도를 향상시키기 위하여 배지에 acetone의 첨가가 필요함을 알 수 있었다.

[Fig. 4]에서는 배지에 첨가되는 acetone 농도 변화 (0.05, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 %)에 의하여 균주의 성장과 OPH의 비 활성도를 비교 및 고찰하였다. Acetone 농도가 0.05에서 7.5 %로 높을수록 미생물의 성장에서는 저해가 많이 이루어짐을 알 수 있었으며, 0.05 % acetone을 배지에 주입한 경우가 배양 전체 기간 동안에서 가장 높은 미생물의 농도를 유지하였다. 그리고, 5.0 % acetone를 배지에 첨가한 경우가 다른 농도와 비교하여 전체 배



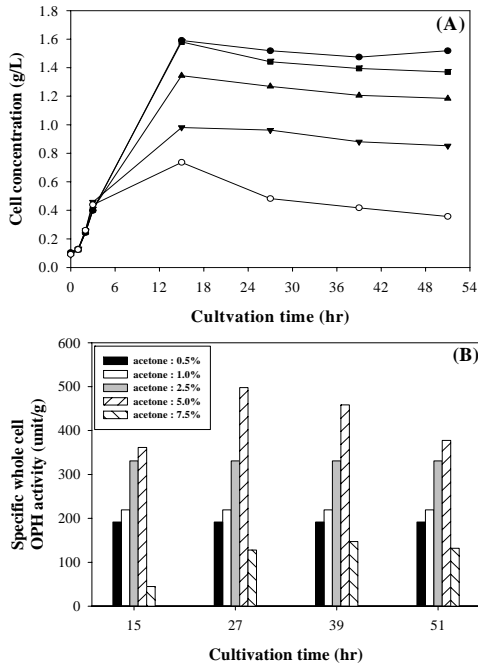
[Fig. 3] Effect of organic solvent on cell growth (A) and specific whole cell OPH activity (B).

Experimental conditions: Cells were grown in the M9 media at 35°C. 0.2mM IPTG, 0.25 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and 0.2mM EDTA were added in the media after 3 hour cultivation. Symbols: ●, control; ■, 2.5 % methanol; ▲, 2.5 % ethanol; ▼, 2.5 % acetone.

양 시간에서 가장 높은 OPH 비 활성도를 나타내었으며, 배양 27시간에 도달하였을 때 497 Unit/g의 최대 값을 얻을 수 있었다. 그러나 7.5% acetone를 주입한 경우는 배양 전체 기간 동안 33~62 Unit/L의 매우 낮은 OPH 생산이 이루어졌으며, 또한 미생물 성장에서도 가장 저해를 크게 받았기 때문에 다른 농도와 비교하여 배양 전체 기간 동안 매우 낮은 OPH 비 활성도를 나타내었다. 위의 실험 결과로부터, OPH의 비 활성도를 향상시키기 위하여 배지에 첨가되는 최적의 acetone 농도가 5.0 % 임을 도출할 수 있었다.

OPH 효소에 의하여 유기인 살충제 화합물인 paraoxon은 생분해가 이루어져서 *p*-nitrophenol가 생성된다고 밝혀졌다^{9, 14)}. 그러나, 실제적으로 유기인 화합물이 오염된 지하수 또는 토양에 OPH

효소를 적용할 때, 필요한 paraoxon의 생분해 속도에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 실험



[Fig. 4] Effect of acetone concentration on cell growth (A) and specific whole cell OPH activity (B).

Experimental conditions: Cells were grown in the M9 media at 35°C. 0.2 mM IPTG, 0.25 mM CoCl₂ · 6H₂O, 0.2 mM EDTA, and were added in the media after 3 hour cultivation. Symbols: ●, 0.5 % acetone; ■, 1.0 % acetone; ▲, 2.5 % acetone; ▼, 5.0 % acetone; ○, 7.5 % acetone.

에서는 재조합 대장균의 세포안의 간극에서 발현되는 전세포 생물촉매 OPH의 비활성도를 증가시키기 위하여 앞서 구한 배지에서의 최적 조건을 이용하여 paraoxon의 생분해 속도를 향상시키고자 하였다. [Table 1]에 나타낸 것과 같이, 109 Unit/L의 OPH가 생산될 때 275 mg/L paraoxon 기질은 10분 동안 45%의 낮은 생분해 효율을 나타내었으며, 그 결과 13.0 mg/g · min의 paraoxon 생분해 속도를 구할 수 있었다. 그러나, 498 Unit/L의 OPH가 생산되는 경우 기질은 매우 빠른 가수분해가 이루어져서, 결과적으로 98 % 생분해 효율과 29.2 mg/g · min의 생분해 속도를 얻을 수 있었다. 따라서, OPH 생산이 109에서 498 unit/L로 증가할수록, paraoxon의 생분해 효율과 생분해 속도가 향상됨을 알 수 있었다.

그리고, OPH 생산량 변화에 의한 *p*-nitrophenol의 생산 속도를 비교 고찰하였다. OPH를 498Unit/L까지 증가시켰을 때, paraoxon 기질은 10분 경과 후 22.3 mg/g · min의 최대 *p*-nitrophenol 생산 속도를 나타내었다. 그러나, 109, 255 unit/L의 상대적으로 낮은 OPH 생산이 이루어졌을 때, 각각 8.4, 11.9 mg/g · min의 *p*-nitrophenol 생산 속도를 구할 수 있었다. 이러한 현상은 고농도 유기인 분해효소의 생산이 이루어질 때, 재조합 대장균의 기질로서 작용하는 유기인 살충제 화합물인 paraoxon의 생분해 속도를 29.2 mg/g · min까지 향상시킨 결과에 의하여 *p*-nitrophenol 생산속도가 증가됨을 나타낸 것이다.

[Table1] Biodegradation of Paraoxon using the OPH-Expressing Whole Cells

OPH (unit/L)	biodegradation efficiency of paraoxon (%)	biodegradation rate of paraoxon (mg/g · min)	production rate of <i>p</i> -nitrophenol (mg/g · min)	cell concentration (g/L)
109	40	13.0	8.4	0.84
255	52	14.8	11.9	0.97
498	98	29.2	22.3	0.93

275 mg/L paraoxon was used for substrate.

Cells were grown in the M9 media at 35°C. 0.2 mM IPTG, 0.25 mM CoCl₂ · 6H₂O, 0.2 mM EDTA, and 5 % acetone were added in the media after 3 hour cultivation.

4. 결론

본 연구에서는 기존의 특정 미생물에서 발견되는 OPH를 분리 및 정제하여 사용하는 방법과는 달리, 재조합 대장균 전세포 촉매 (Whole Cell Biocatalyst)인 Organophosphorus Hydrolase (OPH)를 이용하여 유기인 살충제로 쓰이는 paraoxon을 효과적으로 생분해하였다. OPH 촉매를 Bioremediation 분야에 적용하고자, OPH의 비활성도 (Specific whole cell activity)를 향상시키기 위한 배지에서 최적 조건으로서 초기 pH 8.5의 조절과 5.0 % acetone 첨가가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 이 조건에서 498 Unit/L의 OPH가 생산될 때, 275 mg/L paraoxon은 반응 10분 동안 98 %의 생분해 효율을 나타내었으며, 생분해 속도를 29.2 mg/g · min까지 향상시킬 수 있었다. 또한, 고농도 유기인 분해효소의 생산이 이루어질 때 paraoxon의 생분해 속도가 향상되어서, *p*-nitrophenol 생산속도가 증가됨을 알 수 있었다.

사사

본 연구는 2006년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kang D. G., Choi S. S., and Cha H. J., "Enhanced Biodegradation of Toxic Organophosphate Compounds Using Recombinant Escherichia coli with Sec Pathway-Driven Periplasmic Secretion of Organophosphorus Hydrolase", *Biotechnology Progress*, 22(2), pp. 406~410 (2006).
2. Wang A. A. Mulchandani A., and Chen W., "Specific Adhesion to Cellulose and Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agent by a Genetically

- Engineered Escherichia coli Strain with a Surface-Expressed Cellulose-Binding Domain and Organophosphorus Hydrolase", *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp. 1684~1689 (2002).
3. Mulbry W. and Rainina E., "Biodegradation of Chemical Warfare Agents", *ASM News-American Society for Microbiology*, 64(6), pp. 325~331 (1998).
4. Serdar C. M. and Gibson D. T., "Enzymatic hydrolase of organophosphates: cloning and expression of a parathion hydrolase gene from Pseudomonas diminuta", *Bio/Technology*, 3, pp. 567~571 (1985).
5. Mulbry W. W. and Kams J. S., "Parathion hydrolase specified by the Flavobacterium opd gene: relationship between the gene and protein". *Journal of Bacteriology*, 171, pp. 6740~6746 (1989).
6. Fu G., Cui Z., Huang T., and Li S., "Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase", *Protein expression and Purification*, 36, pp. 170~176 (2004).
7. Grimsley J. K., Scholtz J. M., Pace C. N., and Wild J. R., "Organophosphorus Hydrolase Is a Remarkably Stable Enzyme That unfolds through a Homodimeric Intermediate", *Biochemistry*, 36, pp. 14366~14374 (1997).
8. Dumas D. P., Caldwell S. R., Wild J. R., and Raushel F. M., "Purification and Properties of the Phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta", *The Journal of Biological Chemistry*, 264(3), pp. 19659~19665 (1989).
9. Caldwell S. R. and Raushel F. M., "Detoxification of organophosphate

- pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*”, *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 103~109 (1991).
10. Mansee A. H., Chen W., and Mulchandani, “Bioremediation of Comaphos Insecticide Using Immobilized *Escherichia coli* Expressing Organophosphorus Hydrolase Enzyme on Cell Surface”, *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 5(6), pp. 436~440.
 11. Lejeune K. E. and Russell, “Covalent Binding of a Nerve Agent Hydrolyzing Enzyme within Polyurethane Foams”, *Biotechnology and Bioengineering*, 51(4), pp. 450~ 457, (1996).
 12. 서울대학교 생물산업인력양성 사업단, “생물 산업 기술인력 양성프로그램 (단백질 생산공학)”, pp. 273~323 (2004).
 13. Kang D. G., Kim Y. H., and Cha H. J., “Enhanced detoxification of organophosphates using recombinant *Escherichia coli* with co-expression of organophosphorus hydrolase and bacterial hemoglobin”, *Biotechnology letters*, 24, pp. 879 ~883 (2002).
 14. Omburo G. A., Kuo J. M., Mullins L. S., and Raushel F. M., “Characterization of the Zinc binding site bacterial phosphotriesterase”. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), pp. 13278~13283 (1992). 