

새로운 벡터 pRP7을 이용한 난분해성 방향족 화합물 분해세균의 분자육종

강형일 · 황세현 · 이진규 · 박용근 · 이영록*

고려대학교 이과대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

난분해성 방향족화합물을 강력하게 분해할 수 있는 균주를 개발코자 broad host range vector인 RSF1010에 pTS1137으로부터 강력한 promoter를 가진 부위를 도입, 새로운 고발현 벡터 pRP7을 조립하였다. 새로운 재조합 플라스미드인 pRP7을 벡터로 이용하여, *EcoRI*으로 소화하고 여기에 *Pseudomonas putida* PpG7으로부터 salicylate 및 catechol 분해능을 갖는 유전자 부위를 같은 효소로 소화하여 재조합하고 아닐린, salicylate 및 catechol 분해능이 있는 *Pseudomonas acidovorans* K82, *Achromobacter* gr. *D.V.* K24, *Flavimonas oryzihabitans* K22 등에 형질전환하여 salicylate 분해능이 크게 향상된 *P. acidovorans* K82-1, *A. gr. D.V.* K24-1, *F. oryzihabitans* K22-1 균주들을 육종하였다. 이들은 salicylate 분해능이 크게 향상되었을 뿐만 아니라 보다 고농도의 기질도 분해하는 특성을 나타내었다. 육종균주들의 아닐린 분해능은 모균주들과 큰 차이가 없었으나 salicylate 최소배지에서 배양후 24시간대에서의 salicylate 분해능은 모균주들에 비해 *P. acidovorans* K82-1과 *F. oryzihabitans* K22-1은 9배나 증가하였고, *A. gr. D.V.* K24-1은 2배 가량 증가하였다. M9 최소배지에 2.5 mM 농도의 salicylate를 첨가한 액체배지에서 48시간 동안 배양한 *P. acidovorans* K82-1의 salicylate hydroxylase 활성은 모균주에 비해 약 2배 높았고, 새로이 강력한 catechol 2,3-dioxygenase 활성을 나타냈지만, 아닐린을 기질로 사용하였을 때는 모균주와 같이 catechol 1,2-dioxygenase 활성만을 나타내어 기질에 따라 대사경로가 달라짐을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ molecular breeding, recombinant plasmid, salicylate hydroxylase, catechol 2,3-dioxygenase, catechol 1,2-dioxygenase

지난 수십년간 농업에서 광범위하게 사용되어온 살충제, 제초제 등과 공장에서 방출되고 있는 다양한 유기물질들은 자연계에서 잘 분해되지 않는 난분해성 유독물질들로서 토양과 하천에 축적되어 자연계의 오염을 심화시키고 있다. 특히 수자원의 오염은 날로 그 심각성을 더해가고 있다. 도시하수나 산업폐수는 일반적으로 침전후 활성슬러지로 처리하여 방출시키고 있는데, 미처리된 난분해성 유독물질들은 그대로 방출되고 있다. 방출된 난분해성 미처리 물질들은 해양을 오염시키고, 먹이사슬을 통하여 급기야는 인체에 해를 끼친다(15). 자연계를 오염시키는 주요 물질은 살충제, 페놀류, 플라스틱 제조업 폐수, 석탄 액화 폐액, 벤지딘, 세척제, 염료등인데, 이들은 모두 유독성 난분해성 물질들로서, 인체에 독성을 나타내거나, 암 또는 돌연변이를 유발할 수 있는 물질들을 많이 포함하고 있어서 관심의 대상이 되고 있다(1). 현재 널리 사용되고 있는 제초제로는 benzoate계, phenoxyacetate계, 그리고 아닐린 계열 등의 물질들로서 주로 방향족화합물인데, 이들은 자연계에 존재하는 미생물에 의해 서서히 분해되고 있다. 자연생태계의 미생물, 특히 토양미생물은 다양한 천연 또는 합성유기물을 변화, 분해시켜 성장할 수 있는 능력이 있기때문에 자연계에서 물질의 재순환에 매우 중요한

역할을 하고 있다. 따라서 자연과 환경의 보존적인 차원에서 토양미생물의 이러한 생분해능을 최대한 높이기 위한 연구가 관심의 초점이 되고 있다(8). 난분해성 물질을 분해할 수 있는 능력이 강력한 미생물 균주들을 개발하는 것은 오염된 자연환경의 정화에 크게 기여하게 될 것이며, 이러한 새로운 균주 개발을 위해서는 우선 분해대사 경로에 대한 생화학적이고 효소학적 이해는 물론 그에 상응하는 분해계 유전자의 물리학적 구조에 대한 자세한 연구가 이루어져야 한다(19). 특히 *Pseudomonas*속 세균들은 여러가지 난분해성 화합물을 분해시켜 자화할 수 있는 능력(18) 때문에 관심의 대상이 되고 있는데, 근래에는 *Pseudomonas*속 세균을 이용하여 케놀 분해능을 높일 수 있는 가능성을 보여주었고(17), 이러한 케놀 및 그 유도체들의 산화과정은 toluene dioxygenase에 의해 영향을 받는다는 것이 밝혀졌다(16).

이러한 박테리아의 물질전환 기능을 더욱 개발하여 보다 유용한 미생물을 육종하기 위해서는 유전자 조작을 통한 분해계 유전자의 클로닝이 필요한데, 본 연구에서는 난분해성 방향족화합물의 분해능이 강화된 고활성 처리균주를 개발코자 광역숙주범위 벡터인 RSF1010(11)을 이용하여 강력한 promoter가 도입된 새로운 벡터를 개발하였고, 이를 활용하여 분해계

유전자를 클로닝하여, 난분해성 방향족화합물의 분해 능이 강화된 새로운 세균들을 육종하고, 분해능 및 효소활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 배양조건

본 연구에서 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 표기하였다. 숙주세포로는 Kahng 등 (9)에 의해 보고한 바 있는 *Pseudomonas acidovorans* K82, *P. sp.* K92, *Flavimonas oryzihabitans* K22와 *Achromobacter. gr. D.V.* K24 균주를 사용하였고, 벡터 개발을 위해서는 광역숙주범위 벡터인 RSF1010과 pTS1137 (12)을 사용하였다. Salicylate 및 catechol 분해능을 갖는 *P. sp.* LK5와 *Escherichia coli* JM109는 재조합된 고발현 벡터 pRP7이 포함되어 있는 형질전환 주이다.

영양배지로는 Luria broth를 사용하였고, 세균의 형질전환시에는 각 항생제 및 유전적 지표가 포함되어 있는 선택배지를, 항생제 배지는 LB 한천 평판배지에 ampicillin은 400 µg/ml, tetracycline은 12.5 µg/ml, chloramphenicol은 400 µg/ml의 농도로 첨가하여 사용하였으며, 유전자 증폭시에는 chloramphenicol을 170 µg/ml 농도로 첨가하여 사용하였다. 분해계 유전자가 클로닝된 균주들의 배양시에는 아닐린 배지의 경우 1,000 ppm 농도를, salicylate의 경우 10 mM 농도를 사용하였고, 분해능 조사시에는 각 기질 농도를 다양하게 처리하여 사용하였다. 아닐린 최소 배지로는 Barth's 배지 (4), salicylate 최소배지로는 M9 배지 (10)를 각각 사용하였다.

고발현 벡터의 조립

난분해계 유전자를 보다 다양하게 클로닝 할 수 있도록 하기 위하여 *E. coli* HB101 균주에 내재되어 있는 고발현 벡터 pTS1137으로부터 강력한 promoter

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

| Strains/Plasmids | Characteristics | Source or reference |
|---------------------------------|---|-------------------------------|
| Strains | | |
| <i>Achromobacter gr. D.V.</i> | | |
| K24 | Ani ⁺ Sal Ap Km | Kahng <i>et al.</i> (1992) |
| K24 (pRP7) | Ani ⁺ Sal Ap Km Sm xyl | This study |
| K24 (pRP7-nahG) | Ani ⁺ Ap Km Sm xyl sal | This study |
| LK9 (pRP7) | Km Sm | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| JM109 | recA1 supE44 endA1 hsdR17 relA1 gyrA96 thi (lac-proAB) F'[traD36proAB ⁺ lacI ^q lacZ M15] F'[traD36proAB ⁺ lacI ^q lacZ M15] | Sambrook <i>et al.</i> (1989) |
| JM109 (pRP7) | Ap Sm xylE recA1 supE44 endA1 hsdR17relA1 gyrA96 thi (lac-proAB) F'[traD36proAB ⁺ lacI ^q lacZ M15] | This study |
| <i>Flavimonas oryzihabitans</i> | | |
| K22 | Ani ⁺ Aminobenzoate ⁺ | Kahng <i>et al.</i> (1992) |
| K22 (pRP7) | Ap Sm Ani ⁺ Aminobenzoate ⁺ Sal xyl | This study |
| K22-1 (pRP7-nahG) | Ap Sm xyl sal Ani ⁺ Aminobenzoate ⁺ | This study |
| <i>Pseudomonas putida</i> | | |
| TN1307 | trp leu benl str recA | Nakazawa and Yokoda (1977) |
| TN1307 (pRP7) | Ap xylE trp leu benl str recA | This study |
| TN1307 (pRP7-nahG) | Ap xyl sal trp leu benl str recA | This study |
| PpG7 | Wild/NAH | Yen and Gunsalus (1985) |
| <i>Pseudomonas acidovorans</i> | | |
| K82 | Ani ⁺ Ap Sm | Kahng <i>et al.</i> (1992) |
| K82-1 (pRP7-nahG) | Ani ⁺ Ap Sm xyl sal | This study |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | | |
| K92 | Ani ⁺ Ap Tc Sm Km | Kahng <i>et al.</i> (1992) |
| LK5 (pRP7) | Ani ⁺ Ap Tc Sm Km xyl ade | This study |
| Plasmids | | |
| RSF1010 | Sm Su | Nagahari and Sakaguchi (1983) |
| pTS1137 | Ap Sm xylE | Nakazawa (1980) |

Ani, aniline; Ap, ampicillin; Km, kanamycin; NAH, naphthalene; Sal, salicylate; Sm, streptomycin; Su, sulphonamide; Tc, tetracycline; xyl, xylene.

부위가 포함되어 있는 유전자 부위를 Maniatis 등 (10)의 방법에 따라 제한효소 *Pst*I으로 소화하여 다양한 숙주범위를 갖고 있는 플라스미드 RSF1010에 도입하여 강력한 promoter가 포함된 새로운 고발현 벡터인 재조합 플라스미드를 조립하였다. 이때 형질 전환체는 streptomycin이 포함된 선택배지에서 catechol 용액을 분무하여 노란색을 띠는 clone을 선별하였고, agarose gel 전기영동상에서 그 크기 및 제한효소패턴을 분석하였다.

고발현 벡터의 전달능, 안정성, 및 숙주범위 조사

재조합된 플라스미드를 *P. sp.* LK5와 *E. coli* JM109 등으로 전달되었을 때의 안정성은 Prierer 등 (14)의 방법에 따라 조사하였다. 형질전환에 의해 얻어진 전이체를 각각 항생제가 없는 LB에 접종하고 즉시 LB 한천 평판배지에 도말하여 균체수를 측정하였다. 한편으로는 이를 계속 키워서 접종액이 대수기 말기에 도달하면 적당히 희석하여 새로운 배지에 옮겨주어 nonselective 성장을 계속함과 동시에 희석한 것을 LB 한천 평판배지에 도말하여 자란 집락수를 계산하여 배양 기간 동안의 세대수를 산출하였다. 각 경우에 형성된 집락 100개에 대해 플라스미드가 가지는 항생제 내성과 catechol 분해능의 보유율을 측정하였다. 숙주범위는 조립된 고발현 벡터를 *E. coli*, *Achromobacter gr. D.V.* LK9, *Pseudomonas sp.* LK5 등에 형질전환 (12)하여 조사하였다.

Salicylate hydroxylase 및 catechol 2,3-dioxygenase 유전자의 클로닝

개발한 벡터의 유용성을 확인함과 동시에 난분해성 방향족화합물 분해세균을 육종하고자 salicylate를 inducer로 하여 naphthalene 분해능을 갖는 *P. putida* PpG7 (21)으로부터 DNA를 분리하여 Maniatis 등 (10)의 방법에 따라 *Eco*RI으로 처리하고, 이것을 같은 제한효소로 소화한 재조합된 고발현 벡터에 도입하여 개발된 숙주세포, *E. coli* JM109, 그리고 방향족 화합물 분해능이 있는 *Pseudomonas sp.* LK5 등에 형질전환하여 방향족 탄화수소 분해능이 강력해진 새로운 균주를 육종하였고, 이들의 여러 방향족화합물의 분해능을 Zeyer 등 (22)의 방법에 따라 조사하였다.

Enzyme assay

Catechol 2,3-dioxygenase 활성은 Nozaki (13) 방법에 의해서 측정하였고, catechol 1,2-dioxygenase 활성은 Aoki 등 (2, 3)의 방법에 의하여 측정하였으며, salicylate hydroxylase 활성은 Yamamoto 등 (20)의 방법에 의하여 측정하였다. 아닐린 배지와 salicylate 최소배지에 균을 접종하여 48시간 배양한 세균을 각각 회수하여 sonication 시킨 후 cell-free extract를 얻어서 효소용액으로 사용하였다. 효소활성은 cell-extract를 만든 후 즉시 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 분당 1 μ mol의 기질을 변화시키거나 1 μ mol의 생산물을 만드는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 단백질 농도는 Bradford (5) 방법으로 측정하였다.

산소소비량 측정

아닐린 및 salicylate를 탄소원으로 하는 500 ml 배지에서 48시간 동안 진탕배양시킨 후 6,000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 cell pellet를 1/10 volume의 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)로 현탁시킨 후 사용할 때 까지 얼음에 방치하였다가 Clark oxygen electrode에서 산소소비량을 측정하였다. 산소소비량은 기질을 첨가하지 않았을 때의 산소소비량을 2분 동안 측정하고 나서 1 mM 아닐린과 3 mM catechol을 각각 구분하여 더한 후 산소소비량을 측정하여 실질 산소소비량으로 계산하고 QO_2 로 표시하였다.

Spectrophotometric analysis에 의한 분해능 측정

아닐린 분해능은 시험균주를 아닐린 최소배지 (0.7 mg/ml)에 접종하여 30°C에서 48시간 이상 진탕배양하면서 6시간 마다 시료를 취하여 600 nm에서 세포 밀도를 측정하고, 그 시료를 6000 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 취하여 UV Spectrophotometer (Hewlett Packard 8452A)를 이용하여 280 nm의 파장에서 잔존량을 측정하였다. Salicylate 분해능은 시험균주를 salicylate 최소배지 (2 mM)에 접종하여 30°C에서 60시간 이상 진탕배양하면서 6시간 마다 시료를 취하여 위와 같은 방법으로 340 nm의 파장에서 salicylate 잔존량을 측정하였다.

결 과

고발현 벡터 pRP7의 조립

제한효소지도 및 유전자지도에 근거하여 pKU10, RSF1010 등을 제한효소 *Pst*I으로 소화한 후 같은 효소로 소화한 고발현 벡터인 pTS117의 강력한 promoter를 도입하여, 이를 *P. sp.* LK5와 *E. coli* JM109 등에 형질전환하여, 새로운 재조합 플라스미드 pRP7을 조립하였다 (Fig. 1). pRP7은 catechol 2,3-dioxygenase 유전자가 있어서 이들 유전자를 포함한 세포는 LB 배지나 선택배지에서 배양한 후 catechol 용액을 분무하면 강한 황색변이를 나타내기 때문에 streptomycin이 포함된 배지에서 재조합 플라스미드, pRP7이 포함된 세포를 선별하였고, 알칼리 분해 방법으로 재조합 플라스미드를 분리한 후 *Eco*RI과 *Pst*I으로 소화하여 pRP7 유래 플라스미드임을 확인하였다.

pRP7의 전달능, 안정성 및 숙주범위

새로이 조립된 벡터를 이용하여 catechol 2,3-dioxygenase 및 streptomycin 유전자의 발현과 안정성을 조사하였을 때, RSF1010에 도입된 유전자는 높은 발현과 함께 안정성을 나타내었다. 숙주세포로 사용한 모든 균주에서 97% 이상의 높은 안정성을 나타냈고, *E. coli*, *Pseudomonas sp.* LK5, *Achromobacter gr. D.V.* LK9 등에 형질전환되어 넓은 숙주범위를 갖는 것으로 확인하였다 (Table 2).

방향족 화합물 분해세균의 육종 및 육종균주들의 기질 분해능

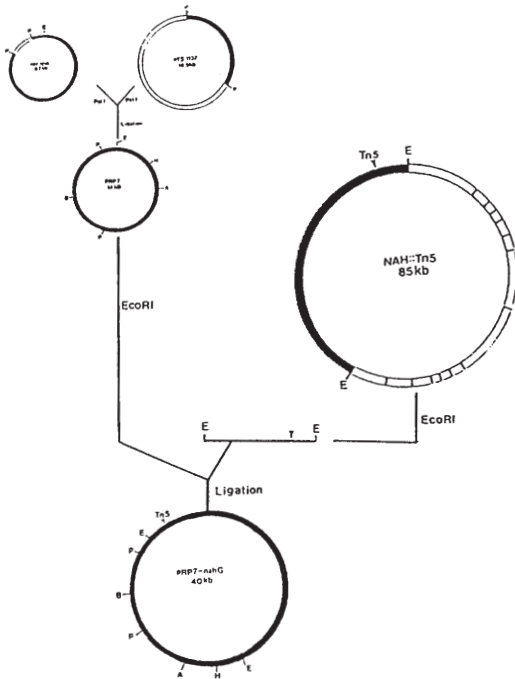


Fig. 1. Schematic diagram for construction of recombinant plasmids pRP7 and pRP7-nahG. E, *EcoRI*; P, *PstI*; A, *AvaI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*.

Table 2. Stability of a recombinant plasmid vector pRP7 and its host range.

| Plasmid | Recipient | Selection ^a | Stability ^b |
|---------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| pRP7 | <i>Escherichia coli</i> JM109 | Sm | 99% |
| | <i>Achromobacter gr. D.V.</i> LK9 | Km Sm | 97.2% |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> LK5 | Sm Su | 98% |

^a The concentration of streptomycin (Sm), kanamycin (Km), and sulphonamide (Su) used in this experiment were 50, 25 $\mu\text{g/ml}$, and 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

^b Stability was indicated as the percentage of cells resistant to Sm, Km, and Su after one generation in an antibiotic-free L-broth.

Naphthalene 분해능을 갖는 *P. putida* PpG7로부터 DNA를 분리하여 *EcoRI*으로 처리하고, 이것을 같은 제한효소로 소화한 재조합 고발현 벡터에 도입하여 pRP7-nahG를 조립하였다. 이를 salicylate 등 방향족 화합물 분해능이 있는 *P. acidovorans* K82, *A. gr. D.V.* K24, 및 *F. oryzihabitans* K22 등에 형질전환하여 분해능이 강화된 *P. acidovorans* K82-1,

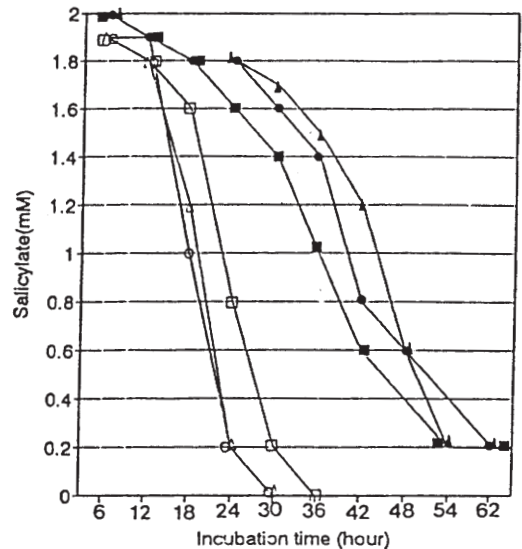


Fig. 2. Degradation of salicylate (2.0 mM) by *Flavimonas oryzihabitans* (mother ●, transformant ○), *Achromobacter gr. D.V.* (mother ■, transformant □), and *Pseudomonas acidovorans* (mother ▲, transformant △).

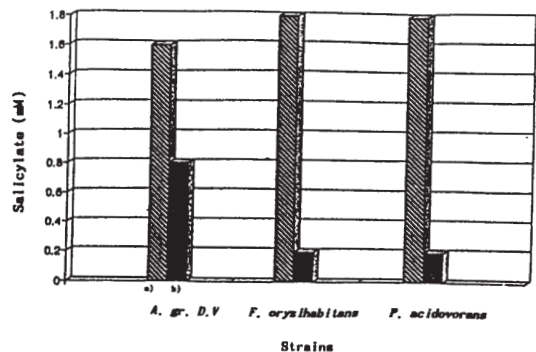


Fig. 3. Comparison of the amount of salicylate remained after 24 hrs culture on M9 minimal media containing 2 mM salicylate

^a ▨, mother strain; ^b ▤, transformant.

A. gr. D.V. K24-1, 및 *F. oryzihabitans* K22-1 등을 선별하였다. 선별은 salicylate가 포함된 최소배지에서 kanamycin, streptomycin, 및 catechol 2,3-dioxygenase 유전자의 발현 등을 지표로 하여 선별하였고, 형질전환체에서 CsCl-초원심 분리로 pRP7-nahG 유래 플라스미드를 분리하였다. 2 mM 농도의 salicylate 최소배지에서 68시간 동안 배양한 *P. acidovorans* K82-1과 *F. oryzihabitans* K22-1은 30시간내에, *A. gr. D.V.* K24-1은 36시간내에서 salicylate를 완전분해하여 분해능이 크게 향상되었음을 알 수 있었다 (Fig. 2). Salicylate 최소배지에서 배양한

Table 3. Degradation of salicylate by breeding bacteria after 52 hrs culture in various concentration of salicylate.

| Strains | Salicylate conc. (mM) | | | |
|--|-----------------------|-----|----|----|
| | 2.5 | 5.0 | 10 | 15 |
| <i>Achromobacter</i> gr. <i>D.V.</i> K24 | + | — | — | — |
| <i>A. gr. D.V.</i> K24-1 | + | + | + | — |
| <i>Flavimonas oryzae</i> K22 | + | + | — | — |
| <i>F. oryzae</i> K22-1 | + | + | + | — |
| <i>Pseudomonas acidovorans</i> K82 | + | + | — | — |
| <i>P. acidovorans</i> K82-1 | + | + | + | + |

The value of maximal degradation of salicylate was measured by UV spectrophotometer at the wavelength of 340 nm.

+, degradation; —, no degradation.

후 24시간이 경과하였을 때 salicylate의 분해능은 모균주에 비하여 *P. acidovorans* K82-1과 *F. oryzae* K22-1에 있어서는 각각 9배 가량이나 증가하였고, *A. gr. D.V.* K24-1은 2배 가량 증가하였다 (Fig. 3). Table 3은 다양한 농도의 salicylate 배지에서 52시간 동안 배양하였을 때의 분해능을 나타낸 것인데, 그중 *P. acidovorans* K82-1은 모균주의 5 mM에 비하여 3배나 되는 15 mM 농도에서도 salicylate를 분해할 수 있었다. *P. acidovorans* K82-1의 산소소비량은 catechol을 기질로 사용하였을 때에는 모균주의 1.5배나 되는 87.6 (QO₂)으로 증가하였고, 아닐린을 기질로 사용하였을 때에는 모균주와 비슷한 값을 나타내었다 (Table 4).

육종균주들의 효소활성

Salicylate를 기질로 사용하였을 때, *P. acidovorans* K82-1, *A. gr. D.V.* K24-1, 및 *F. oryzae* K22-1 등은 meta pathway에 관여하는 catechol 2,3-dioxygenase 활성이 새로이 크게 나타났으나, 아닐린을 기질로 사용하였을 때 catechol 2,3-dioxygenase

Table 5. Catechol oxygenase activities of *Flavimonas oryzae* K22-1, *Achromobacter* gr. *D.V.* K24-1, and *Pseudomonas acidovorans* K82-1.

| Strains | Growth substrate | Enzyme activity (U/mg protein) ^a | |
|--|---------------------|---|-------|
| | | C12O | C23O |
| <i>Flavimonas oryzae</i> K22 | Aniline (1.0 mM) | 0.368 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.284 | 0.00 |
| <i>F. oryzae</i> K22-1 | Aniline (1.0 mM) | 0.358 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.060 | 10.47 |
| <i>Achromobacter</i> gr. <i>D.V.</i> K24 | Aniline (1.0 mM) | 0.375 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.275 | 0.00 |
| <i>A. gr. D.V.</i> K24-1 | Aniline (1.0 mM) | 0.325 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.034 | 8.45 |
| <i>Pseudomonas acidovorans</i> K82 | Aniline (1.0 mM) | 0.437 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.428 | 0.00 |
| <i>P. acidovorans</i> K82-1 | Aniline (1.0 mM) | 0.430 | 0.00 |
| | Salicylate (2.5 mM) | 0.020 | 9.47 |

^a Specific activities were given in units per milligram of protein. 1 U represents the conversion of 1 μmol substrate per minute.

활성은 모균주와 비슷한 값을 나타내었다. 특히 *F. oryzae* K22-1은 catechol 2,3-dioxygenase 활성은 10.47 (U/mg protein)로 매우 높은 값을 나타내었다 (Table 5). *P. acidovorans* K82-1의 salicylate hydroxylase 활성은 모균주에 비하여 약 2.5배 가량 증가하였고, *F. oryzae* K22-1과 *A. gr. D.V.* K24-1은 약 1.5배 가량 증가하였다 (Fig. 4).

고찰

새로운 고발현 벡터 pRP7은 강력한 promoter 부위를 갖고 있는 pTS1137을 *Pst*I으로 소화하여 같은 제한효소로 처리한 broad host range vector인 RSF 1010과 ligation하여 재조합하였다. 새로이 조립된

Table 4. Oxygen consumption rates of *Pseudomonas acidovorans* K82-1 on aniline and catechol.

| Strains | Oxygen consumption (QO ₂ , nmol min ⁻¹ , mg dry weight ⁻¹) | | | | Characteristics |
|---|--|-------------------|----------|-------|------------------------------------|
| | Aniline | | Catechol | | |
| | 1.0 mM | % wt ^a | 3.0 mM | % wt | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. K92 | 118.4 | — | 17.2 | — | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>Pseudomonas acidovorans</i> K82 | 124.2 | — | 58.4 | — | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>P. acidovorans</i> K82-1 (pRP7-nahG) | 124.2 | — | 87.6 | — | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LK5 | 1.3 | 1.1 | 1.4 | 12.8 | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>P. sp.</i> LK5 (pRP7) | 1.3 | 1.1 | 56.3 | 332.0 | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>E. coli</i> JM109 (pRP7) | 1.3 | 1.2 | 58.2 | 358.0 | AOD ⁺ C23O ⁺ |
| <i>E. coli</i> JM109 (pRP7-nahG) | — | — | 25.8 | 156.0 | AOD ⁺ C23O ⁺ |

^a % wt represents QO₂ ratio of each strain to wild type.

^b AOD and C23O represent aniline oxidase and catechol 2,3-dioxygenase, respectively.

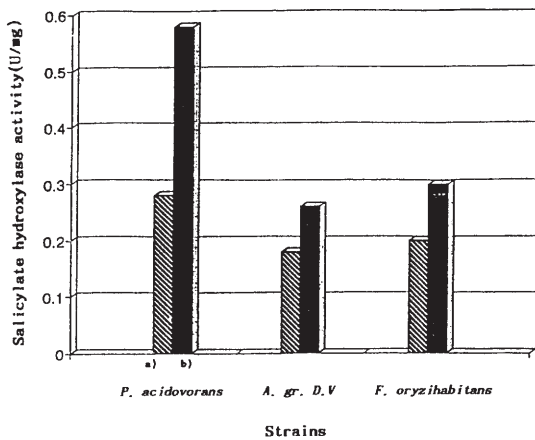


Fig. 4. Comparison of salicylate hydroxylase activities of *Pseudomonas acidovorans* K82-1, *Achromobacter gr. D.V.* K24-1, and *Flavimonas oryzae* K22-1 and their mother strains.

^{a)} ▨, mother strain; ^{b)} ■, transformant.

pRP7의 promoter 바로 근처에는 *EcoRI* site가 위치하고 있어서 제한효소 *EcoRI*은 유용하게 쓰일 수 있을 것이다. 또한 pRP7은 *E. coli*, *Pseudomonas* sp. LK5, *Achromobacter gr. D.V.* LK9 등 넓은 숙주범위를 갖고 있어 매우 다양한 균주유래 유전자의 발현을 높일 수 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 이 pRP7을 벡터로 이용하여 naphthalene 분해능을 갖는 *Pseudomonas putida* PpG7으로부터 salicylate hydroxylase 및 catechol 2,3-dioxygenase를 encoding하는 DNA 부위를 *EcoRI*으로 처리하여 아널린 등 다양한 분해능이 있는 균주에 형질전환하여 salicylate 분해능이 크게 증가된 균주를 육종하였고, 이들 육종균주들에 대한 효소분석을 통하여 아널린을 기질로 사용하였을 때에는 *ortho* pathway를 통하여 대사과정이 진행되었고, salicylate를 기질로 사용하였을 때에는 *meta* pathway를 통하여 대사과정이 진행되어 본 실험에 사용된 균주들은 기질에 따라 lower pathway의 향방이 달라지는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 Feist와 Hegman (7)이 *Pseudomonas putida* R1에 의해 phenol과 benzoate 대사과정에서 전구물질의 성질에 따라 두가지 다른 경로에 의해 중간대사산물인 catechol이 산화될 수 있다는 보고와, benzoate와 salicylate에서 배양한 *Pseudomonas* 균주가 각각 *ortho*와 *meta* pathway를 경유한다는 보고 (6)와 유사한 결과라 할 수 있다. 이는 두 종류의 대사경로를 진행시킬 수 있는 균주들에서도 두 경로가 동시에 작동하지 않는다는 것을 나타내는 것으로서, 같은 균주에 있어도 기질에 따른 upper pathway에 관여하는 효소계의 상대적 농도가 대사회로의 전환에 영향을 미치게 되는 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 1992년도 과학재단의 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구결과의 일부는 교육부의 지원을 받아 수행한 것이다. 두 기관의 연구비 지원에 사의를 표한다.

참 고 문 헌

- Alexander, M., 1981. Biodegradation of chemical environmental concern. *Science* **211**, 132-138.
- Aoki, K., R. Shinke, and H. Nishira, 1983. Metabolism of aniline by *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1611-1616.
- Aoki, K., K. Ohtsuka, R. Shinke, and H. Nishira, 1983. Isolation of aniline assimilating bacteria and physiological characterization of aniline biodegradation in *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2569-2575.
- Bartha, R., 1968. Biochemical transformation of anilide herbicides in soil. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 602-604.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 284-254.
- Chakrabarty, A.M., 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **112**, 815-823.
- Feist, C.F. and G.D. Hegeman, 1969. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* **100**, 1093-1097.
- Franklin, F.C.H., M. Bagdasarian, M.M. Bagdasarian, and K.N. Timmis, 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7458-7462.
- Kahng, H.Y., S.I. Kim, M.J. Woo, Y.K. Park, and Y.N. Lee, 1992. Isolation and characterization of aniline-degrading bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 199-206.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and T. Sambrook, 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Nagahari, K. and K. Sakaguchi, 1978. RSF1010 plasmid as potentially useful vector in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **133**, 1527-1529.
- Nakazawa, T., 1983. *Pseudomonas*. Practical techniques of genetic recombination. Vol. **4**, 73-84.
- Nozaki, M., 1970. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymol.* **17A**, 522-525.
- Priefer, U.B., R. Simon, and A. Puhler, 1985. Extension of the host range of *Escherichia coli*

- vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.* **163**, 324-330.
15. Ramel, C., 1978. Ecological Bulletins. 27. Swedish Natural Science Research Council.
 16. Spain, J.C. and D.T. Gibson, 1988. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain J56. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1399-1404.
 17. Spooner, R.A., M. Bagdasarian, and F.C.H. Franklin, 1987. Activation of the *xyl*/DLEGF promoter of the TOL toluene-xylene degradation pathway by overproduction of the *xyl*S regulatory gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 3581-3586.
 18. Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff, 1966. Aerobic *Pseudomonas*: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271.
 19. Williams, P.A., 1981. Genetics of biodegradation, p. 97-107. In R. Hutter and T. Leisinger (ed.), Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic Press.
 20. Yamamoto, S., H. Katagiri, H. Maeno, and O. Hayashi, 1965. Salicylate hydroxylase, a mono-oxygenase requiring flavin adenine dinucleotide: I. Purification and general properties. *J. Biol. Chem.* **240**, 3408-3413.
 21. Yen, K.M. and I.C. Gunsalus, 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* **162**, 1008-1013.
 22. Zeyer, J., P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis, 1985. Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to *cis*-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1409-1413.

(Received November 7, 1994)

(Accepted November 21, 1994)

ABSTRACT: Molecular Breeding of Bacteria Degrading Persistent Aromatic Compounds by Using a New Vector pRP7

Kahng, Hyung-Yeol, Se-Hyun Hwang, Jin-Kyu Lee, Yong-Keun Park, and Yung-Nok Lee* (Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

For the purpose of molecular breeding of bacterial strains which have powerful capabilities to degrade aromatic hydrocarbons, pRP7, a recombinant plasmid which has a powerful promoter was constructed by introducing the strong promoter of pTS1137 into RSF1010. The gene fragment encoding salicylate hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* PpG7 which was digested with *Eco*RI was ligated with pRP7 digested with the same restriction enzyme and transformed into *Pseudomonas acidovorans* K82, *Achromobacter* gr. *D.V.* K24, and *Flavimonas oryzae* K22 having degradative ability for various aromatic compounds including salicylate, aniline, and catechol. The transformed bacteria *P. acidovorans* K82-1, *A. gr. D.V.* K24-1, and *F. oryzae* K22-1 have more powerful degradative ability for salicylate than the mother strains. The degradative ability of salicylate by both *P. acidovorans* K82-1 and *F. oryzae* K22-1 increased 9-fold higher, and *A. gr. D.V.* K24-1 was 2-fold higher than the mother strains at the point of 24 hrs culture on the minimal media containing salicylate, but the degradative ability of aniline by these transformed bacteria did not increase. The activity of salicylate hydroxylase of *P. acidovorans* K82-1, after 48 hrs' culture on M9 minimal medium containing salicylate of 2.5 mM, was approximately 2-fold higher than the mother strain, and the strong activity of catechol 2,3-dioxygenase was newly formed. In *P. acidovorans* K82-1 grown on the minimal medium containing aniline, however, only catechol 1,2-dioxygenase was induced similarly to the mother strain.