



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009年 8月

碩士學位論文

*Chromohalobacter* sp. HS-2 유래  
수산화효소 유전자 내포 재조합 대장균을  
이용한 hydroxybenzoate의 전환

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

林 聖 勳

*Chromohalobacter* sp. HS-2 유래  
수산화효소 유전자 내포 재조합 대장균을  
이용한 hydroxybenzoate의 전환

Bioconversion of hydroxybenzoate using recombinant *E. coli*  
harboring hydroxylase genes from *Chromohalobacter* sp. HS-2

2009年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

林 聖 勳

*Chromohalobacter* sp. HS-2 유래  
수산화효소 유전자 내포 재조합 대장균을  
이용한 hydroxybenzoate의 전환

指導教授 金時郁

이 論文을 工學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2009年 4月 日

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

林 聖 勳

## 林聖勳의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 이 인 화 印

委 員 朝鮮大學校 教授 김 시 욱 印

委 員 朝鮮大學校 教授 신 현 재 印

2009年 5月 日

## TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS .....	I
LIST OF TABLE .....	IV
LIST OF FIGURES .....	V
Abstract .....	VII
<b>제 1 장 서 론</b> .....	1
1. 연구 배경 .....	1
2. 연구 동향 .....	3
3. 연구 목표 .....	4
<b>제 2 장 실험 재료 및 방법</b> .....	10
제 1 절 실험 재료 .....	10
1. 효소 및 시약 .....	10
2. 사용 균주 및 플라스미드 .....	10
3. 배지 조성 .....	10
제 2 절 실험 방법 .....	12
1. Chromosomal DNA extraction .....	12
2. Competent cell 제조 .....	12
3. 플라스미드 DNA 분리 .....	13
4. Aromatic oxygenase 유전자의 클로닝 .....	14
1) Benzoate dioxygenase 유전자의 클로닝 .....	14
가. <i>benABC</i> 유전자의 증폭 .....	14
나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리 .....	14
다. Ligation .....	15
라. <i>benABC</i> 유전자의 형질전환 .....	15
마. 형질전환된 균체로부터 플라스미드 확인 .....	15
2) <i>p</i> -hydroxybenzoate hydroxylase 유전자의 클로닝 .....	15
가. <i>pobA</i> 유전자의 증폭 .....	15
나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리 .....	16
3) <i>m</i> -hydroxybenzoate hydroxylase 유전자 클로닝 .....	16
가. <i>mobA</i> 유전자 증폭 .....	16
나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리 .....	16

5. 단백질 과발현 .....	17
1) 단백질 과발현 유도 .....	17
2) SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인 .....	17
6. 재조합 대장균을 이용한 생물전환 .....	18
7. HPLC에 의한 대사산물 분석 .....	18
8. 재조합 대장균에서의 chaperone plasmid의 동시발현 .....	18
1) 재조합 대장균에서의 chaperone plasmid의 동시발현 시스템 구축 .....	18
2) L-arabinose의 농도에 따른 최적 과발현 조사 .....	19
3) 단백질 과발현 유도 .....	19
9. 효소 특성조사 .....	20
1) PobA 단백질 정제 .....	20
가. 초음파 파쇄기를 이용한 cell free extract의 제조 .....	20
나. Ni-NTA column을 이용한 PobA 정제 .....	20
다. PobA 단백질의 활성측정 .....	20
<b>제 3 장 결과 및 고찰 .....</b>	<b>21</b>
1. Aromatic oxygenase 유전자의 클로닝 .....	21
2. <i>benABC</i> 유전자의 발현 및 생물전환 .....	24
1) <i>benABC</i> 유전자의 발현 .....	24
2) <i>benABC</i> 유전자를 이용한 생물전환 .....	26
3. <i>pobA</i> 유전자의 발현 및 생물전환 .....	28
1) <i>pobA</i> 유전자의 발현 .....	28
3) <i>pobA</i> 유전자를 이용한 생물전환 .....	30
4. <i>mobA</i> 유전자의 발현 및 생물전환 .....	32
1) <i>mobA</i> 유전자의 발현 .....	32
2) <i>mobA</i> 유전자를 이용한 생물전환 .....	34
5. 재조합 대장균에서 chaperone plasmid의 동시발현 시스템 구축 .....	36
6. <i>pobA</i> 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 및 생물전환 .....	38
1) <i>pobA</i> 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 .....	38
2) L-arabinose 농도가 동시발현에 미치는 영향 .....	40
3) <i>pobA</i> 와 pKJE7이 동시발현된 재조합 대장균을 이용한 생물전환 .....	42
7. <i>mobA</i> 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 및 생물전환 .....	44
1) <i>mobA</i> 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 .....	44

2) L-arabinose 농도가 동시발현에 미치는 영향 .....	46
3) <i>mobA</i> 와 Chaperone plasmid가 동시발현된 재조합 대장균을 이용한 생물전환 .....	48
8. Ni-NTA spin column을 이용한 <i>pobA</i> 유전자 정제 .....	51
<b>제 4 장 결 론</b> .....	53
<b>참고문헌</b> .....	54



## LIST OF TABLE

Table 1. Identification of mono-substituted benzoate cluster genes from <i>Chromohalobacter</i> sp. strain HS-2 based on the comparison with functionally characterized homologs .....	8
Table 2. Prices of substrates and product reagents used in this study .....	9
Table 3. Composition of mineral salts basal (MSB) media .....	11

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Possible model for chaperone - assisted protein folding in <i>E. coli</i> .....	5
Fig. 2. Degradative pathway of <i>p</i> -hydroxybenzoate and benzoate in <i>Acinetobacter</i> . ..	6
Fig. 3. Supraoperonic clustering of mono-substituted benzoate-degradative genes in <i>Chromohalobacter</i> sp. strain HS-2 .....	7
Fig. 4. PCR product .....	22
Fig. 5. Construction of expression vector of pEXP5CT/TOPO aromatic oxygenases	23
Fig. 6. SDS-PAGE analysis of BenABC in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	25
Fig. 7. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant BenABC protein .....	27
Fig. 8. SDS-PAGE analysis of PobA insoluble protein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	29
Fig. 9. SDS-PAGE analysis of PobA soluble protein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	29
Fig. 10. Bioconversion of <i>p</i> -hydroxybenzoate to protocatechuate using PobA protein .....	31
Fig. 11. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant PobA enzyme .....	31
Fig. 12. SDS-PAGE analysis of MobA insoluble protein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	33
Fig. 13. Bioconversion of <i>m</i> -hydroxybenzoate to protocatechuate using MobA protein .....	35
Fig. 14. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant MobA enzyme .....	35
Fig. 15. Construction of co-expression system of <i>mobA</i> and <i>pobA</i> genes with different chaperone plasmids .....	37
Fig. 16. SDS-PAGE analysis of coexpressed PobA in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) with chaperone plasmids .....	39
Fig. 17. Effect of L-arabinose concentration on the co-expression of PobA .....	41
Fig. 18. Bioconversion of high concentrations of <i>p</i> -hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of <i>pobA</i> with pKJE7 .....	43
Fig. 19. Co-expression of <i>mobA</i> with different chaperone plasmids during different IPTG induction times .....	45
Fig. 20. Effect of L-arabinose on the co-expression of <i>mobA</i> with pKJE7 .....	47
Fig. 21. Bioconversion of 1 mM <i>m</i> -hydroxybenzoate to protocatechuate by coexpre	

-ssion of <i>mobA</i> with different chaperone plasmids .....	49
Fig. 22. HPLC profile showing the bioconversion of 5 mM <i>m</i> -hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of <i>mobA</i> with pKJE7 .....	50
Fig. 23. Purification of PobA protein through Ni-NTA coulumn. lane 1, cell free extract; lane 2, purified PobA protein .....	52

## Abstract

Bioconversion of hydroxybenzoate using recombinant *E. coli* harboring hydroxylase genes from *Chromohalobacter* sp. HS-2

Im, seong hun

Advisor : Prof. Kim, Si Wouk, Ph.D.

Department of Environmental Engineering,

Graduate School of Chosun University

*Chromohalobacter* sp. strain HS-2 was isolated from salted fermented clams and analyzed for the ability to grow on (hydroxy)benzoate as the sole carbon and energy source. HS-2 was characterized to be moderately halophilic, with an optimal NaCl concentration of 10%. The genes encoding the benzoate metabolism of HS-2 were cloned into a cosmid vector, sequenced, and then analyzed to reveal the benzoate dioxygenase (*benABC*), *p*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*pobA*) and *m*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*mobA*). The HS-2 genes involved in (hydroxy)benzoate degradation were clustered within approximately 39 kb region, and showed quite a different genetic organization from those of other benzoate catabolic genes. The *benABC*, *pobA*, *mobA* genes were cloned into the expression vector pEXP5-CT/TOPO. The expressed BenABC, PobA, MobA were analyzed by SDS-PAGE and the specific bands were confirmed. The HPLC and LC-MS/MS analysis revealed that resting cells of *E. coli* BL21 (DE3) harboring *benABC*, *pobA*, *mobA* oxidized 3-chlorobenzoate to 4-chlorocatechol, *p*-hydroxybenzoate to protocatechuate and *m*-hydroxybenzoate to protocatechuate, respectively. To enhance the conversion rate, pKJE7 chaperone (*dnaK-dnaJ-grpE*) were co-expressed with *E. coli* harboring *pobA* and *mobA* genes, respectively. The *pobA* and *mobA* genes expressed higher level of protein than without pKJE7. And bioconversion of high concentration of *m*, *p*-hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of *pobA* with pKJE7.

# 제 1 장 서 론

## 1. 연구배경

20세기에 들어 화학공업의 급속한 발전은 전자, 기계, 금속산업을 포함한 모든 산업발전에 획기적인 기여를 했지만, 심각한 환경문제를 야기하였다. 산업이 발전해 가면서, 인류생활을 보다 풍요롭고 윤택하게 하기 위해 더욱 많은 인위적인 화학 합성 물질을 생산하게 되었다. 예를 들어, 의복의 재료가 되는 합성 섬유(polyester, polyamid), 일회용 용기의 재료가 되는 합성수지(polyethylene, polystyrene) 그리고 자동차 타이어와 같은 탄성체의 재료가 되는 합성고무(styrene) 등이 그 예이다<sup>1)</sup>. 이 뿐만 아니라 인간의 질병 치료와 수명 연장을 목적으로 만들어진 여러 가지 의약품과 식량 자원의 생산성 증대를 목적으로 만들어진 농약은 인간의 생활을 풍요롭게 해주었지만, 독성과 잔류성 때문에 환경과 인간의 생명에 심각한 부작용을 야기해왔다. 이에 따라 화학합성 물질을 분해하기 위해 탈기(stripping), 활성탄 흡착 및 화학적 산화방법과 같은 물리·화학적 방법이 시도 되었다. 하지만 이런 방법들은 특히 방향족 화합물을 제거하는 데는 효율적이지 못하다. 따라서 고온, 고압과 고독성의 시약을 이용하는 극렬한 반응조건이 요구되는 화학공정을 상온과 상압 그리고 안전한 용매계를 사용하는 온화한 조건의 생물반응공정으로 대체하려는 연구가 일찍부터 시작되었고, 그 결과 많은 화학공정이 생물반응계로 대체되고 있다<sup>2)</sup>.

생물전환 기술(biotransformation)이란 생물전환(bioconversion), 생합성(biosynthesis), 생촉매(bio-catalysis) 등의 용어와 의미상 중복성을 가지며, 미생물이 갖고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술을 말한다. 따라서 생체 기능을 세포 또는 효소단계에서 이용하는 생물전환 기술은 고부가 가치의 유용물질 생산을 주요 목적으로 하며, 현재의 생물산업을 구성하는 주요한 공정이라 할 수 있다. 생물전환 공정은 기존의 발효공정과 비교해 볼 때, 두 공정이 생물반응계를 이용한다는 점에서 공통점을 갖지만, 발효공정은 주로 균체생장에 필요한 영양성분에서 출발하여 균체 내의 생명 현상을 이용하여 생산물을 얻어내는 반면 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용하여 전구물질을 도입하여 목적으로 하는 화합물을 생산한다는 점에서 차이가 있다<sup>3)</sup>. 지금까지의 대부분의 화학제품 생산기술은 전적으로 화학반응을 이용한 공정기술에 의존하여 왔으나, 이러한 공해 유발형·고에너지 소비형의 기존 화학합성 공정을 발효공정 또는 생물전환 공정으로 대체하여 탈공해·저공해의 청정생물산업 기술을 개발하려는 노력이 최근 생명공학 기술의 주요 흐름이 되고 있다. 미생물을 이용한 생물전환 기술은 여러 분야에서 폭넓게 이용되고 있는데, 유해한 물질

을 비독성물질로 바꾸는 생물학적 분해(biodegradation), 정밀화학품 제조, 식품가공, 그리고 의약품 생산 등이 주요 응용분야이다. 특히 의약품 개발에 있어서 생물전환은 여러 가지 방법으로 이용되어 의약품의 유용성 및 효과성을 향상시키는데 기여할 수 있다<sup>3)</sup>. 미생물이 다양한 구조의 천연화합물을 생산한다는 것은 잘 알려진 사실이며, 7000개 이상의 천연 항생물질의 구조를 보더라도 미생물이 갖고 있는 무한한 생물 화학적 기능을 알 수 있다. 이 같은 미생물의 기능을 적극적으로 이용하기 위하여 증식하는 미생물이나 휴지기의 미생물로부터 얻어낸 효소를 이용하여 유기화합물로부터 목적으로 하는 새로운 화합물을 얻는 방법을 생물전환이라 한다. 미생물이나 효소를 이용한 물질전환의 특징을 화학적 전환과 비교하면, 다음과 같은 특징이 있다. 첫째, 화학적인 전환방식은 chiral 화합물 등의 정밀 화학제품 생산에서 절대적으로 요구되는 구조선택성(regioselectivity)과 입체선택성(stereoselectivity)을 충족시킬 수 없다. 둘째, 산화적 생물전환 방식은 독성이 강한 화학 촉매보다 환경 친화적이며 자연계에 존재하는 공기 중 산소를 이용한다. 셋째, 기질 특이적인 산소화효소를 이용하여 고가의 생리활성물질 합성에 필요한 광학합성물질 전구체(chiral precursor)인 single dihydrodiols을 합성할 수 있다는 장점이 있다. 반면에 기질의 농도를 높게 사용할 수 없는 경우가 많아 수율이 낮고, 부반응을 수반하는 경우가 많다는 단점도 있다<sup>4)</sup>. 이러한 단점들을 제조합 단백질을 이용하여 극복할 수 있는데 이 또한 목적 단백질이 불용성의 단백질 형태로 나타나거나, proteolysis 과정을 통해 발현이 되지 않는 단점을 가지고 있어 일부 단백질의 경우 생물전환기술에 적용하기에는 아직도 문제점을 가지고 있다. 하지만 최근 단백질의 folding에 관여하는 chaperone 분자가 알려짐에 따라 *in-vivo*에서 단백질의 folding 기작을 규명하기 위한 다양한 연구가 진행되었다. Chaperone 단백질을 목적 단백질과 함께 발현시켜 inclusion body의 형성과 protease에 의한 단백질의 분해를 방지하여 발현 단백질의 회수율을 높이고 목적 단백질의 안정적인 발현을 유도함으로써 수율이 낮은 단점을 보완할 수 있게 되었다. Chaperone은 단백질의 접힘을 도와주는 단백질이다. 불안정한 3차구조를 나타내는 단백질을 완벽한 3차구조로 만드는 역할을 한다. DnaJ와 DnaK는 chaperone 단백질을 지정하는 유전자인데, 대부분의 chaperone은 열 충격 단백질로 높은 온도나 반응성 산소로 인해 손상당한 다른 단백질에 결합하여 그 기능을 보호하고 회복시키는 기능을 한다. GrpE, GrpES와 GroEL은 이미 접혀진 단백질을 부분적으로 반응하여 접힘을 보다 완벽하게 할 수 있도록 도와주는 역할을 한다. Tig는 단백질의 잘못 접힘과 엉킴을 방지하는 기능을 한다<sup>5)</sup> (Fig. 1).

## 2. 연구동향

산업의 급속한 발달로 인해 benzoate, *m*-hydroxybenzoate, *p*-hydroxybenzoate, aniline 등의 방향족 화합물은 제약, 제초제, 살충제, 염료, 플라스틱, 유제품 등의 새로운 화학약품을 생산하기 위하여 사용량이 증가하고 있다. 방향족 화합물은 구조적으로 안정하며, 자연생태계에서 쉽게 분해가 이루어지지 않는 난분해성 물질로 토양이나 수질환경의 오염원이 되고 있다<sup>6)</sup>. 또한 이들 화합물은 높은 지질 친화성과 낮은 수용성을 갖고 있어 생물체 내에 축적될 가능성이 높아 현재 이들 화합물의 효율적인 제거를 위하여 미생물을 이용한 생분해, 대사, 유전적 연구, 분해능이 뛰어난 균의 연구 및 유전 공학적 기법을 이용한 대사 분해능 향상 등의 연구가 광범위하게 진행되고 있다<sup>7-9)</sup>. 호기성 미생물에 의한 방향족 화합물의 탄화수소 분해과정은 산소화반응(oxygenation), 수산화반응(hydroxylation), 탈수소화반응(dehydrogenation)을 거치며, 방향족 화합물의 주요 중간 대사산물인 catechol과 protocatechuate 등으로 전환된다. 전환된 catechol과 protocatechuate는 고리 계열 화합물 대사에서 중요한 역할을 하는 효소인 이산소화효소(dioxygenases)에 의해 촉매반응이 계속 진행된다<sup>10,11)</sup>.

Catechol과 protocatechuate류는 반응성이 매우 커서 의약품의 전구체로 사용되는 유용한 물질이다. 산업적으로 볼 때 산소화효소는 의약품 합성 시 중간유도체의 산화 반응에 이용되거나(Merck, Schering) 제약, 화학 산업에서 building block이나 commodity를 만들 때 사용된다(Lonza, Pfizer, BASF). 또한 식품산업에서 terpene류를 비롯한 방향성 유기 화합물을 만드는데도 사용될 수 있다.

방향족 화합물에 대한 분해와 대사경로, 효소에 관련된 연구들은 대부분 그람음성 세균에서 이루어지고 있다. *Acinetobacter calcoaceticus*와 *Pseudomonas putida*는 대표적인 benzoate 분해 세균으로 알려져 있다. 호기적 조건에서 미생물에 의한 benzoate 분해는  $\beta$ -keto adipate 경로를 통해서 진행된다<sup>12-14)</sup>(Fig. 2). 또한 호기적 조건에서 *Acinetobacter*가 *p*-hydroxybenzoate를 분해하는 것으로 보고되어 있는데 *p*-hydroxybenzoate의 분해 경로와 분해에 관련된 효소는 Fig. 2에 나타나있다<sup>14)</sup>.

### 3. 연구 목표

지난 20년 동안 *Halomonas*<sup>23-25)</sup>, *Pseudomonas*<sup>26)</sup>, *Kordiimonas*<sup>27)</sup>, *Thalassobacillus*<sup>28)</sup>, *Novosphingobium*<sup>29)</sup>, *Marinobacter*<sup>30)</sup>, 그리고 *Microbacterium*<sup>31)</sup>을 포함한 상급호염성 세균(Moderately Halophilic Bacteria)에 대한 분리, 동정에 대한 많은 연구가 진행되었다. 한편 방향족 화합물의 분해와 대사경로<sup>31)</sup> 그리고 효소<sup>32)</sup>에 관련된 연구는 생화학적 수준의 연구가 진행되었을 뿐, 해수보다 염분의 농도가 높은 환경으로부터 분리한 *Pseudomonas mendocina*의 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자에 대한 부분적인 염기서열에 대한 연구<sup>33)</sup>를 제외한 방향족 화합물의 분해와 관련된 유전자에 대한 연구에 대해서는 보고된 사례가 없다. 현재까지 상급호염성 세균인 *Chromohalobacter* sp.에 대한 연구는 9종이 진행되었으나, 방향족화합물을 분해할 수 있는 있는 종에 대해서는 보고된 사례가 없다<sup>15-22)</sup>. 이전의 연구에서 해양 극한 환경에서 유래한 상급호염성세균인 *Chromohalobacter* sp. HS-2 균주로부터 genomic cosmid library (2,000 colonies)를 제작하였다. 제작한 cosmid library (2,000 clones)를 대상으로 benzoate dioxygenase 유전자를 포함하는 cosmid clone를 선별하였다. 선별한 cosmid clone내 삽입된 DNA 조각의 전체 염기서열(38,945 bp)를 결정하고 분석용 프로그램을 이용하여 염기서열을 분석한 결과, 이 cosmid clone 내에는 총 31개의 Open Reading Frame (ORF)이 존재하며 이 중 18개의 ORF가 benzoate를 포함하는 aromatic compound의 초기 산화와 분해에 관련되어 있음을 확인하였다 (Fig. 3). 확인된 ORF로부터 기존에 알려진 aromatic oxygenase와 높은 상동성을 가진 새로운 aromatic oxygenase 유전자인 benzoate dioxygenase (*benABC*), *m*-hydroxybenzoate hydroxylase (*mobA*), 그리고 *p*-hydroxybenzoate (*pobA*)를 확보하였다 (Table 1).

본 연구에서는 *Chromohalobacter* sp. 에서 확보한 *benABC*, *mobA*, *pobA* 유전자의 활용을 위해 재조합 대장균에서 관련 유전자의 과발현을 통해 생물전환을 유도하고자 하였다. 또한 상대적으로 저가의 benzoate 화합물로부터 고가의 생물신소재 물질인 4-chlorocatechol과 protocatechuate를 생산하고자 하였다 (Table 2).



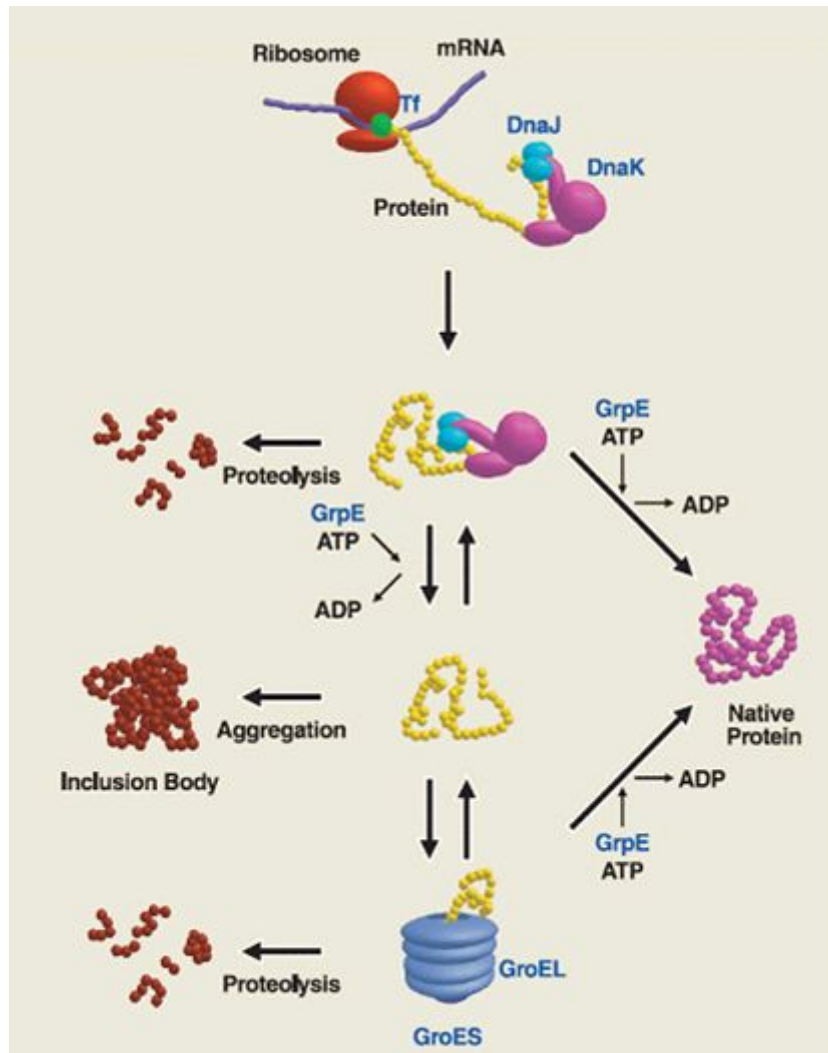


Fig. 1. Possible model for chaperone - assisted protein folding in *E. coli*.

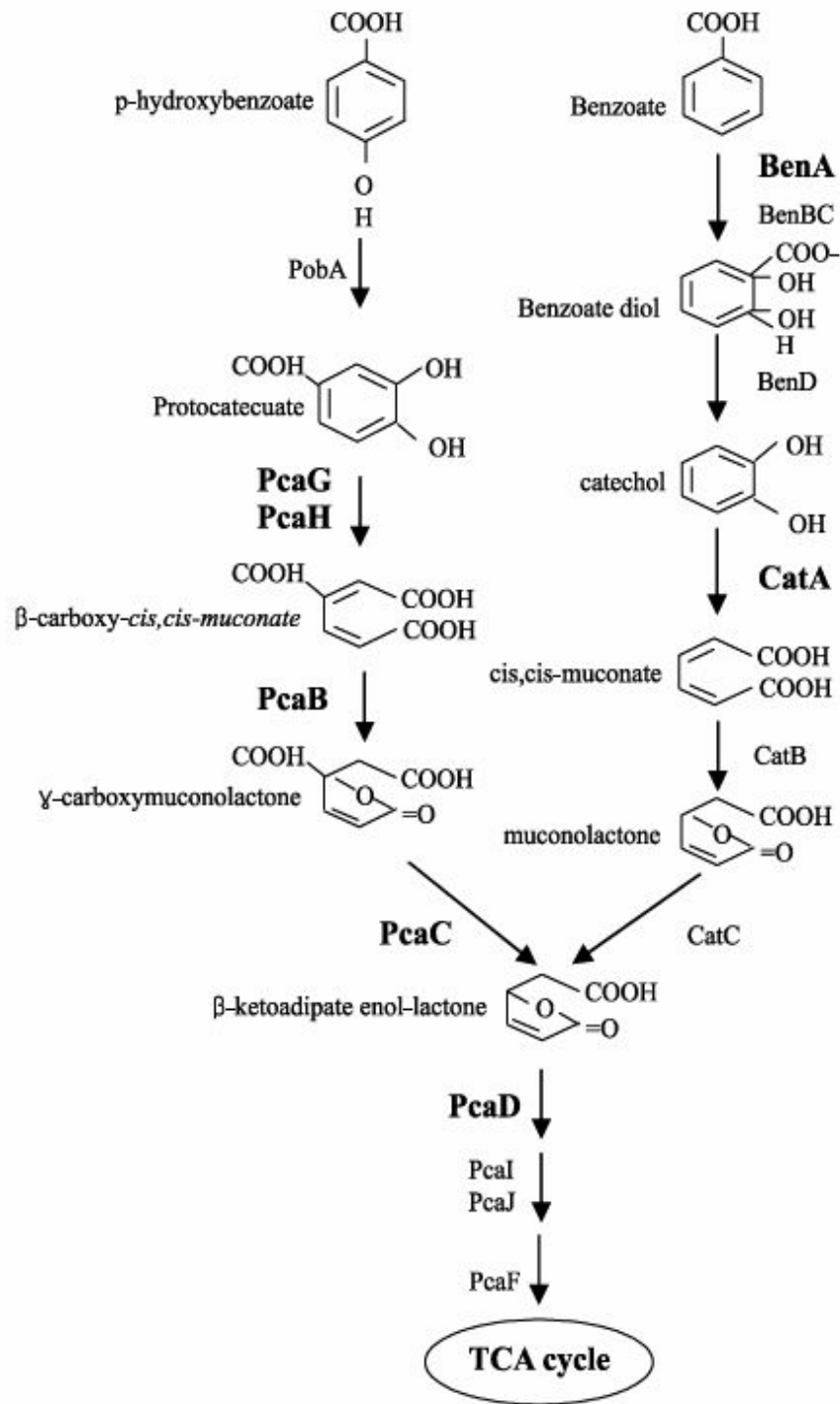


Fig. 2 Degradative pathway of *p*-hydroxybenzoate and benzoate in *Acinetobacter*.

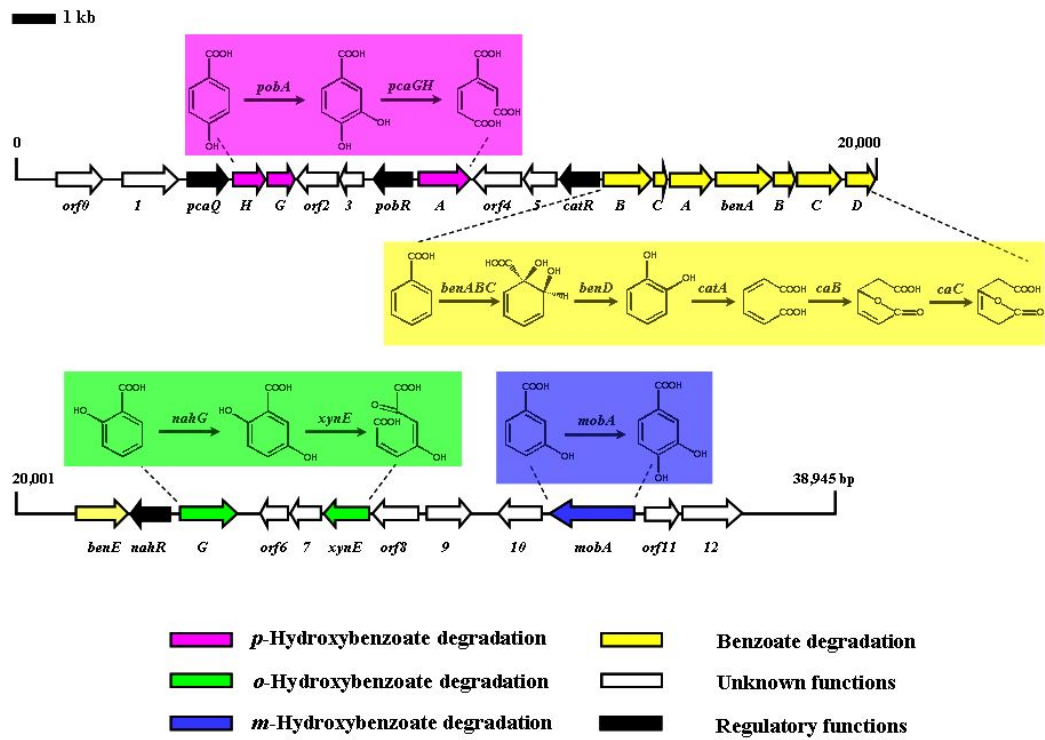


Fig. 3. Supraoperonic clustering of mono-substituted benzoate-degradative genes in *Chromohalobacter* sp. strain HS-2.

Table 1. Identification of mono-substituted benzoate cluster genes from *Chromohalobacter* sp. strain HS-2 based on the comparison with functionally characterized homologs

Gene	Representative homolog (gene)	Identity (%) <sup>a</sup>	Organism
<i>orf0</i>	Conserved protein	92	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043
<i>orf1</i>	Conserved protein	95	<i>C. salexigens</i> DSM 3043
<i>pcaQ</i>	LysR-type transcriptional regulator ( <i>pcaQ</i> )	50	<i>Pseudomona</i> sp. HR199
<i>pcaH</i>	Beta subunit of protocatechuate 3,4-dioxygenase ( <i>pcaH</i> )	68	<i>P. putida</i> ATCC 23975
<i>pcaG</i>	Alpha subunit of protocatechuate 3,4-dioxygenase ( <i>pcaG</i> )	67	<i>P. putida</i> NCIMB 9869
<i>orf2</i>	Conserved protein	87	<i>C. salexigens</i> DSM 3043
<i>orf3</i>	Conserved protein	93	<i>C. salexigens</i> DSM 3043
<i>pobR</i>	AraC family of transcriptional regulator ( <i>pobR</i> )	41	<i>P. putida</i> WCS358
<i>pobA</i>	p-Hydroxybenzoate hydroxylase ( <i>pobA</i> )	72	<i>P. putida</i> WCS358
<i>orf4</i>	Conserved protein	63	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134
<i>orf5</i>	Conserved protein	93	<i>C. salexigens</i> DSM 3043
<i>catR</i>	LysR-type transcriptional regulator ( <i>catR</i> )	51	<i>P. putida</i>
<i>catB</i>	Muconate cycloisomerase ( <i>catB</i> )	60	<i>Burkholderia</i> sp. NK8
<i>catC</i>	Muconolactone Delta-isomerase ( <i>catC</i> )	62	<i>Acinetobacter lwoffii</i> K24
<i>catA</i>	Catechol 1,2-dioxygenase ( <i>pheB</i> )	74	<i>Pseudomonas</i> sp. EST1001
<i>benA</i>	Large subunit of benzoate 1,2-dioxygenase ( <i>benA</i> )	66	<i>Burkholderia gladioli</i> MAFF301588
<i>benB</i>	Small subunit of benzoate 1,2-dioxygenase ( <i>benB</i> )	61	<i>B. gladioli</i> MAFF301588
<i>benC</i>	Electron transfer component of benzoate 1,2-dioxygenase ( <i>benC</i> )	58	<i>B. gladioli</i> MAFF301588
<i>benD</i>	Benzoate diol dehydrogenase ( <i>benD</i> )	60	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>benE</i>	Benzoate membrane transport protein ( <i>benE</i> )	58	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>nahR</i>	LysR-type transcriptional regulator ( <i>nahR</i> )	47	<i>P. putida</i> NCIB 9816-4
<i>nahG</i>	Salicylate hydroxylase ( <i>nahG</i> )	58	<i>P. putida</i> G7
<i>orf6</i>	Conserved protein	62	<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1
<i>orf7</i>	Conserved protein	65	<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1
<i>xlnE</i>	Gentisate 1,2-dioxygenase ( <i>xlnE</i> )	70	<i>P. alcaligenes</i> NCIB 9867
<i>orf8</i>	Conserved protein	51	<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM
<i>orf9</i>	Putative transposase ( <i>ORFUIK23L</i> )	58	<i>Pseudomonas</i> sp. K23
<i>orf10</i>	Conserved protein	33	<i>R. nubinhibens</i> ISM
<i>mobA</i>	m-Hydroxybenzoate 4-hydroxylase ( <i>mobA</i> )	66	<i>Comamonas testosteroni</i> KH122-3S
<i>orf11</i>	Conserved protein	94	<i>C. salexigens</i> DSM 3043
<i>orf12</i>	Conserved protein	94	<i>C. salexigens</i> DSM 3043

<sup>a</sup>Percentage of identity was obtained by aligning the deduced amino acid sequences using BlastP.

Table 2. Prices of substrates and product reagents used in this study

시 약 명	제 조 회 사	양 (g)	가격 (원)
2-Chlorobenzoic acid, 98%	Aldrich	100	22,000
3-Chlorobenzoic acid, 99+%	Aldrich	100	98,000
4-Chlorobenzoic acid, 99%	Aldrich	50	32,000
3-Chlorocatechol, >98.0%	Tokyo Chemical Industry	1	861,900
4-Chlorocatechol, 97%	Aldrich	1	117,000
2-Fluorobenzoic acid, 97%	Aldrich	100	129,000
4-Fluorobenzoic acid, >=98.0%	Fluka	100	26,000
3-Fluorocatechol, 99%	Aldrich	1	62,000
3-Fluorobenzoic acid, 97%	Aldrich	100	237,000
4-Fluorocatechol, >98.0%	Tokyo Chemical Industry	1	239,200
3-Hydroxybenzoic acid, 99%	Aldrich	100	72,000
4-Hydroxybenzoic acid, 99%	Aldrich	100	26,000
3,4-Dihydroxybenzoic acid	Fluka	100	379,400
Sodium benzoate, 99%	Aldrich	1000	43,000
Catechol, 99+%	Aldrich	100	34,000

## 제 2 장 실험 재료 및 방법

### 제 1 절 실험 재료

#### 1. 효소 및 시약

유전자 조작에 사용한 제한효소와 T4 DNA ligase 그리고 alkaline phosphatase는 Takara로부터 구입하였다. PCR을 위한 primer는 Bionics에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 생물전환 실험에 사용한 시약인 Benzoate, 3-chlorobenzoate, *m*-hydroxybenzoate, *p*-hydroxybenzoate, catechol, 4-chlorocatechol (Sigma-Aldrich), protocatechuate (Fluka), 3-chlorocatechol (Tokyo Chemical Industry)를 이용하였다..

#### 2. 사용 균주 및 플라스미드

유전자 클로닝을 위한 *Chromohalobacter* sp. HS-2 균주는 연세대학교 김응빈 교수 연구팀에서 분양받아 사용하였다. DNA 조작은 *E. coli* Top 10' 을 이용하였고, 단백질 발현은 *E. coli* BL21 (DE3)를 숙주로 이용하였다. 단백질의 과발현을 위하여 cloning 및 단백질 발현을 동시에 할 수 있는 pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen)과 단백질의 안정적인 발현을 위해 사용된 chaperone plasmid는 Takara로 부터 구입하여 사용하였다. 유전자 재조합 *E. coli*는 ampicillin(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 Luria bertani (LB) medium에서 37°C로 12 시간 동안 배양하였다.

#### 3. 배지 조성

*Chromohalobacter* sp. HS-2 균주는 10% NaCl이 포함된 mineral salts basal (MSB) medium에서 배양하였고 그 구성성분은 Table 3에 나타내었다. 플라스미드의 분리와 *E. coli* 형질전환을 위해서는 LB medium를 사용하였다. *E. coli* 형질전환체 선별배지로써 ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 1.5% LB agar plate를 사용하였다.

Table 3. Composition of mineral salts basal (MSB) medium<sup>a</sup>

Components	Amount
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.16 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.72 g
Nitrilotriacetic acid	0.2 g
KOH	0.146 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.591 g
$\text{CaCl}_2$	0.067 g
$(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.185 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.98 mg
Trace metal solution <sup>b</sup>	1 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
NaCl	100 g

<sup>a</sup> The above chemicals were mixed in distilled water to make a final volume of 1 liter.

<sup>b</sup> Trace metal solution is made of 2.5 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.54 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mg  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 0.18 mg  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  in 1 ml of distilled water.

## 제 2 절 실험 방법

### 1. Chromosomal DNA extraction

분리균주의 chromosomal DNA는 Goldberg와 Ohman (1984)이 제시한 방법을 이용하여 분리하였다<sup>34)</sup>. 20 mM glucose가 첨가된 50ml의 MSB 배양액에서 *Chromohalobacter* sp. HS-2 균주를 지수성장기까지 배양한 후 12,000 × g에서 15분 동안 원심분리 하였다. 회수된 균체에 10ml의 Solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0)과 1ml lysozyme (50mg/ml), 0.5ml RNase (2mg/ml), 0.1ml proteinase K (50mg/ml)를 섞어 현탁시켰다. 현탁액을 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 10% SDS 용액 0.1ml를 넣고 혼합한 후 다시 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 반응액에 1ml의 mercaptoethanol과 3M sodium acetate solution (pH 5.2) 6.5ml을 혼합하고 20ml의 chloroform을 넣은 다음 조심스럽게 흔들어 섞었다. 이후 12,000 × g에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 새로운 tube에 옮겨 담고 상등액의 0.6 배에 해당하는 isopropanol을 첨가하여 섞었다. 실처럼 엉킨 형태의 DNA는 파스퇴르피펫을 이용하여 조심스럽게 eppendorf tube에 옮겨 담고 70% ethanol 1ml를 첨가하여 DNA를 세척한 다음 60°C에서 건조하였다. 잘 건조된 DNA는 3ml의 TE buffer (10 mM Tris-HCl와 1 mM EDTA 혼합액, pH 8.0)를 첨가하여 녹인 후 1.5% agarose gel 전기영동을 통하여 확인하였다.

### 2. Competent cell 제조

Competent cell은 Inoue법에 따라 제조하였다.<sup>35)</sup> LB medium 5ml에 *E. coli* BL21 (DE3) 단일 콜로니를 접종하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 200ml의 SOB medium에 배양액 0.1%를 접종하였고, OD<sub>600</sub>가 0.4~0.7로 될 때까지 배양하였다. 이 후 배양액을 얼음물에서 10분간 방치한 후 12,000 × g에서 15분 동안 원심분리 하였다. 회수된 균체에 67ml의 TB buffer를 첨가하여 재현탁한 후 같은 조건으로 원심분리 하였다. 최종적으로 16ml의 TB buffer와 1.2ml의 DMSO를 첨가하여 혼합한 후 100μl씩 멸균된 eppendorf tube에 넣고 -70°C에 보관하였다.



### 3. 플라스미드 DNA 분리

플라스미드의 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하여 분리하였다.<sup>36)</sup> 지수성장기 말기에 들어선 배양액 1ml를 eppendorf tube에 넣고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물을 2mg/ml lysozyme이 녹아있는 100 $\mu$ l의 용액 I에 현탁하였다. 용액 I은 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)로 제조하였다. 현탁액을 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 후 여기에 200 $\mu$ l의 용액 II (0.2N NaOH와 1% SDS 혼합액)를 첨가하여 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 다음 얼음에 10분간 방치시켰다. 150 $\mu$ l의 용액 III를 첨가하여 서너번 조심스럽게 흔들어 혼합시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리 12,000  $\times$  g 하였다. 용액 III은 5M potassium acetate 60ml와 glacial acetic acid 11.5ml와 증류수 28.5 ml를 혼합한 후 멸균된 증류수를 첨가하여 전체 용량을 100ml로 제조하였다. 원심분리가 끝난 상등액은 새로운 tube에 옮겨서 phenol과 chloroform을 1:1로 섞은 혼합액을 처리하여 두 번 추출한 후 원심분리 (12,000  $\times$  g)하여 상등액을 얻었다. 이것을 다시 chloroform으로 한 번 더 추출하여 상등액을 새로운 tube에 옮긴 후 -20 $^{\circ}$ C에서 충분히 냉각시킨 95% ethanol 900 $\mu$ l를 넣고 잘 흔든 다음 -70 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하였다. 이후 sample을 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 제거하였고, 침전된 플라스미드는 95% ethanol 1ml을 넣어 잘 흔든 다음 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 다시 원심분리 (12,000  $\times$  g)하였다. 상등액을 제거하고 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 침전물을 건조시켰다. DNase를 포함하고 있지 않은 RNase (20  $\mu$ g/ml) 1 $\mu$ l를 포함한 TE buffer 20 $\mu$ l에 침전물을 녹인 후 1.5% agarose gel 전기영동을 통하여 확인하였다.

#### 4. Aromatic oxygenase 유전자의 클로닝

##### 1) Benzoate dioxygenase 유전자의 클로닝

###### 가. *benABC* 유전자의 증폭

*benABC* 유전자 primer를 5' -ATGACCTCACAACTTGATCGT-3' (forward)와 5' -TGCGGCCTCCTCAGAGGT-3' (reverse)로 제작하였다. *benABC* 유전자의 증폭은 *Chromohalobacter* sp. HS-2로부터 분리한 38,945bp의 chromosomal DNA 단편을 template DNA로 하였으며, 총 반응액은 50 $\mu$ l이었다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 1분 반응시켜 pre-annealing하고, 증폭단계를 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 45 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 3분 cycle을 30회 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 반응을 수행하였다. 반응혼합액의 조성은 Taq<sup>TM</sup> reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>], 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10~50ng의 template DNA, 100ng의 3'과 5' primer, 2.5 unit의 Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase를 사용하였다. 그리고 PCR의 최종 반응 생성물은 Gel extraction kit (Nucleogen)을 이용하여 정제하였다.

###### 나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

PCR을 통해 증폭된 DNA와 vector에 10 units의 제한효소 *Xba* I 과 *Nco* I 을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. Vector와 insert DNA를 제한효소로 각각 처리한 후에 1% (w/v) agarose gel로 전기영동 하였다. Gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내어 용해시키고, Gel extraction kit (Nucleogen)를 사용하여 gel로부터 원하는 DNA 단편을 분리 정제하였다.

#### 다. Ligation

Vector와 insert DNA를 1 : 3의 몰수비로 넣어주었고, 10 × ligation buffer (300 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP)와 3 unit의 T4 DNA ligase를 첨가하여 총 반응액을 15μl로 한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다.

#### 라. *benABC* 유전자의 형질전환

Inoue방법에 따라 제조한 competent cell<sup>35)</sup>에 ligation한 DNA 15μl를 첨가한 뒤 heat shock 방법을 이용하여 형질전환시켰다. 형질전환된 cell 100μl을 ampicillin (100μg/ml)이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37°C에서 배양한 후 생성된 콜로니를 형질전환된 *E. coli* 균주로 선별하였다.

#### 마. 형질전환된 균체로부터 플라스미드 확인

위의 방법으로 분리한 plasmid DNA를 10 units의 제한효소 *Xba* I 과 *Nco* I 으로 처리하여 혼합한 뒤 약 30초간 원심분리 한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 전기영동으로 확인하였다. 형질전환된 plasmid DNA를 선별하여, pEXP5-CT/TOPO-*benABC*로 명명하였다.

## 2) *p*-hydroxybenzoate hydroxylase 유전자의 클로닝

### 가. *pobA* 유전자의 증폭

*pobA* 유전자 primer를 5' -ATGAAAACCCAAGTCGCGATC-3' (forward)와 5' -GCCCTCCAACGGTTCGTAAGG-3' (reverse)로 제작하였다. *pobA* 유전자의 증폭은 *Chromohalobacter* sp. HS-2로부터 분리한 38,945bp의 chromosomal DNA 단편을 template DNA로 하였으며, 총 반응액은 50μl이었다. 반응조건은 94°C에서 1분 반응시켜 pre-annealing하고, 증폭단계로 94°C에서 30초, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 cycle을 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 2분 동안 반응을 수행하였다. 반응혼합액의 조성은 Taq<sup>TM</sup> reaction buffer [50mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>], 0.2mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10~50ng의 template DNA, 100ng의 3'과 5' primer, 2.5 unit의 Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase를 사용하였다. 그리고 PCR의 최종 반응생성물은 Gel extraction kit (Nucleogen)을 이용하여 정제하였다.

## 나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

PCR을 통해 증폭된 DNA와 vector에 10 units의 제한효소 *Xba* I 과 *Sal* I 을 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. Vector와 insert DNA를 제한효소로 각각 처리한 후에 1% (w/v) agarose gel로 전기영동 하였다. Gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내고, Gel extraction kit (Nucleogen)를 사용하여 gel로부터 DNA 단편을 분리 정제하였다. 이후 ligation과 형질전환 및 플라스미드 DNA의 확인은 앞서 설명한 방법과 동일하게 수행하였고, pEXP5-CT/TOPO-*pobA*로 명명하였다.

## 3) *m*-hydroxybenzoate hydroxylase 유전자 클로닝

### 가. *mobA* 유전자 증폭

*mobA* 유전자 primer를 5' -ATGCAATTCCATCGTGATGGC-3' (forward)와 5' -ACGGGTTGATTGATCGAGCAT-3' (reverse)로 제작하였다. *mobA* 유전자의 증폭은 *Chromohalobacter* sp. HS-2로부터 분리한 38,945bp의 chromosomal DNA 단편을 template DNA로 하였으며, 총 반응액은 50 $\mu$ l이었다. 반응조건은 94°C에서 1분 반응시켜 pre-annealing하고, 증폭단계로 94°C에서 30초, 45°C에서 1분, 72°C에서 2분 cycle을 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 2분 동안 반응을 수행하였다. 반응혼합액의 조성은 Taq<sup>TM</sup> reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>], 0.2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10~50ng의 template DNA, 100ng의 3'과 5' primer, 2.5 unit의 Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase를 사용하였다. 그리고 PCR의 최종 반응 생성물은 Gel extraction kit (Nucleogen)을 이용하여 정제하였다.

### 나. 제한효소 처리와 DNA 단편 분리

PCR을 통해 증폭된 DNA와 vector에 10 units의 제한효소 *Bgl*II 과 *Hind*III을 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. Vector와 insert DNA를 제한효소로 각각 처리한 후에 1% (w/v) agarose gel로 전기영동 하였다. Gel로부터 vector와 insert DNA 부분을 잘라내고, Gel extraction kit (Nucleogen)를 사용하여 gel로부터 DNA 단편을 분리 정제하였다. 이후 ligation과 형질전환 및 플라스미드 DNA의 확인은 앞서 설명한 방법과 동일하게 수행하였고, pEXP5-CT/TOPO-*mobA*로 명명하였다.

## 5. 단백질 과발현

### 1) 단백질 과발현 유도

선별된 pEXP5-CT/TOPO-*benABC*, pEXP5-CT/TOPO-*pobA*, pEXP5-CT/TOPO-*mobA* 재조합 플라스미드를 포함한 대장균을 ampicillin ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 포함된 LB배지에서 전 배양 하였다. Ampicillin ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 포함된 50ml LB 배지에 배양액 4%를 접종하였고, OD<sub>600</sub>가 0.4~0.7로 될 때까지 배양한 다음 0.75 mM의 isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 발현을 유도하였다.

### 2) SDS-PAGE를 이용한 단백질 발현 확인

재조합 단백질의 발현 여부를 확인하기 위해 0.75 mM의 IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 후 일정한 시간 간격으로 배양액을 취하였다. 발현이 유도된 배양액 1ml를 eppendorf tube에 넣고 원심분리하여 상등액을 제거하였고, TE buffer (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)로 2번 세척하였다. 세척된 세포는 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄용액은 원심분리 ( $12,000 \times g$ , 30 min, 4°C)하여 상등액을 분리하였고, 분리된 cell free extract는 Bradford 방법을 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다. 단백질의 정량을 위하여 BSA (bovine serum albumin)으로 표준 곡선을 작성하였고, 측정하고자 하는 단백질 시료는 표준곡선 흡광도의 범주를 벗어나지 않도록 희석한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Bradford 방법으로 정량한 cell free extract의 농도는 각각  $10\mu\text{g}$ 으로 맞추어 5분간 끓인 후 200V에서 1시간 20분 동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)로 염색하였고, destaining solution (30% methanol, 10% glacial acetic acid, 60% distilled water)으로 탈색한 후 단백질의 발현여부를 확인하였다.

## 6. 재조합 대장균을 이용한 생물전환

앞서 제작한 각각의 재조합 플라스미드를 포함하고 있는 대장균을 200ml LB 배지에서 단백질 발현을 유도하였다. 발현이 유도된 대장균을 원심분리 (12,000 × *g*, 30 min, 4°C)한 후 상등액을 제거하고 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 2번 세척하였다. 이 후 50ml의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 재현탁한 후 glucose의 농도가 최종적으로 20 mM이 되게 첨가하였다. 이때 *benABC*, *pobA*, *mobA* 유전자가 포함된 재조합 대장균 현탁액에 각각 1 mM의 3-chlorobenzoate, *p*-hydroxy benzoate, *m*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하고 30°C에서 생물전환 하였다.

## 7. HPLC에 의한 대사산물 분석

분석에 사용된 기기는 Agilent 1200 series HPLC 분석기이었다. Agilent Eclipse XDB C-18, 5 $\mu$ l column을 사용하였으며 Acetonitrile과 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 1:1로 혼합한 액을 이동상으로 이용하였다. 분석시 column 온도는 30°C, 유량은 1.0 ml/min, UV 검출과장은 203 nm의 조건에서 분석하였으며, 시료의 주입은 0.2 $\mu$ m membrane filter를 통과한 여과액 20 $\mu$ l를 주입하여 분석하였다.

## 8. 재조합 대장균에서의 chaperone plasmid의 동시발현

### 1) 재조합 대장균에서의 chaperone plasmid의 동시발현 시스템 구축

단백질의 안정적인 발현 및 생물전환 효율을 높이기 위하여 단백질 folding에 관여하는 chaperone이 포함되어 있는 5종의 plasmid (pG-KJE8, pKJE7, pGro7, pTf16, pG-Tf2)를 co-expression하였다. 먼저 Inoue법에 따라 pEXP5-CT/TOPO-*pobA*와 pEXP5-CT/ TOPO-*mobA*를 포함하고 있는 *E. coli* BL21을 이용하여 competent cell을 제조하였다. 제조된 competent cell에 각각의 chaperone plasmid를 heat shock 방법을 이용하여 형질전환시켰다. 형질전환된 cell을 ampicillin (100 $\mu$ g/ml)과 chloramphenicol (25 $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37°C에서 12시간 동안 배양하여 생성된 콜로니를 선별하였다. 각각을 pKJE7/TOPO/*pobA*, pG-KJE8/TOPO/*pobA*, pGro7/TOPO/*pobA*, pTf16/TOPO/*pobA*와 pG-KJE8/TOPO/*mobA*, pKJE7/TOPO/*mobA*, pGro7/TOPO/*mobA*, pTf16/TOPO/*mobA*, pG-Tf2/TOPO/*mobA*로 명명하였다.

## 2) L-arabinose의 농도에 따른 최적 과발현 조사

Chaperone plasmid의 유도물질로 작용하는 L-arabinose의 최적 발현 농도를 확인하기 위해 L-arabinose의 농도를 각각 0.0002%, 0.002%, 0.02%, 0.2%로 접종하였다. 단백질의 과발현 여부는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였고, 생물전환 반응 및 HPLC 분석은 기존 연구 수행방법과 동일하게 하였다.

## 3) 단백질 과발현 유도

선별된 pKJE7/TOPO/*pobA*, pG-KJE8/TOPO/*pobA*, pGro7/TOPO/*pobA*, pTf16/TOPO/*pobA*와 pG-KJE8/TOPO/*mobA*, pKJE7/TOPO/*mobA*, pGro7/TOPO/*mobA*, pTf16/TOPO/*mobA*, pG-Tf2/TOPO/*mobA* 재조합 플라스미드를 포함하고 있는 대장균을 ampicillin (100 $\mu$ g/ml), chloramphenicol (25 $\mu$ g/ml), 그리고 L-arabinose가 포함된 50ml LB 배지에 접종 하였고, OD<sub>600</sub>가 0.4~0.7로 될 때까지 배양한 다음 0.75 mM의 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다.

## 9. 효소 특성조사

### 1) PobA 단백질 정제

#### 가. 초음파 파쇄기를 이용한 cell free extract의 제조

효소 정제를 위해 균체를 OD값이 0.4일때 0.75 mM의 IPTG를 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 원심분리 하였으며 모든 정제과정은 4°C에서 수행하였다. 회수된 균체 10g의 3배 용량의 TE buffer (pH 8.0)로 1회 씻은 후 원심분리하여 다시 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 50ml의 TE buffer (pH 8.0)를 넣어 재현탁 시킨 후, sonicator (SONIFIER 250, Branson)로 파쇄하였다. 파쇄액을 원심분리하여 (15,000 × g, 30분) 상등액을 cell free extract로 사용하였다. 이 상등액을 다시 100,000 × g에서 2시간 동안 초원심분리한 후 이때의 상등액을 soluble fraction으로 간주하였다.

#### 나. Ni-NTA column을 이용한 PobA 정제

PobA 단백질의 정제는 Ni-NTA column (QIAGEN)을 이용하여 정제하였다. Ni-NTA column에 600 $\mu$ l의 binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0)를 옮긴 후 700 × g에서 2분 동안 원심분리하여 column을 평형화 하였다. 이후 column에 600 $\mu$ l의 soluble fraction을 주입하고 700 × g에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 600 $\mu$ l의 washing buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0)로 3회 세척한 후 최종적으로 300 $\mu$ l의 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole pH 8.0)로 녹여 His-tag PobA 단백질을 분리 정제하였다.

#### 다. PobA 단백질의 활성측정

PobA 단백질의 활성측정은 NADH가 산화되어 340 nm에서 흡광도 값이 감소되는 속도를 측정하였다. 활성측정액은 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM NADH를 혼합하여 제작하여 실험에 이용하였다. 먼저 반응에 참여하는 NADH의 농도와 단백질의 양을 각각 0.1 mM과 0.02 mg으로 고정한 후 기질의 농도를 각각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 그리고 2 mM로 조절하여 최적 기질의 농도를 결정하였다.



## 제 3 장 결과 및 고찰

### 1. Aromatic oxygenase 유전자의 클로닝

*Chromohalobacter* sp. HS-2의 chromosomal DNA로부터 각각 benzoate oxygenase, *p*-hydroxybenzoate hydroxylase, *m*-hydroxybenzoate hydroxylase 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 각각 PCR 기법을 통해 증폭하였고 (Fig. 4), 재료 및 방법에 서술한 내용에 따라 cloning 하였다. *benABC*의 경우 2933bp, *pobA*의 경우 1188bp, *mobA*의 경우 1956bp의 유전자를 pEXP5-CT/TOPO vector에 cloning하였다 (Fig. 5).

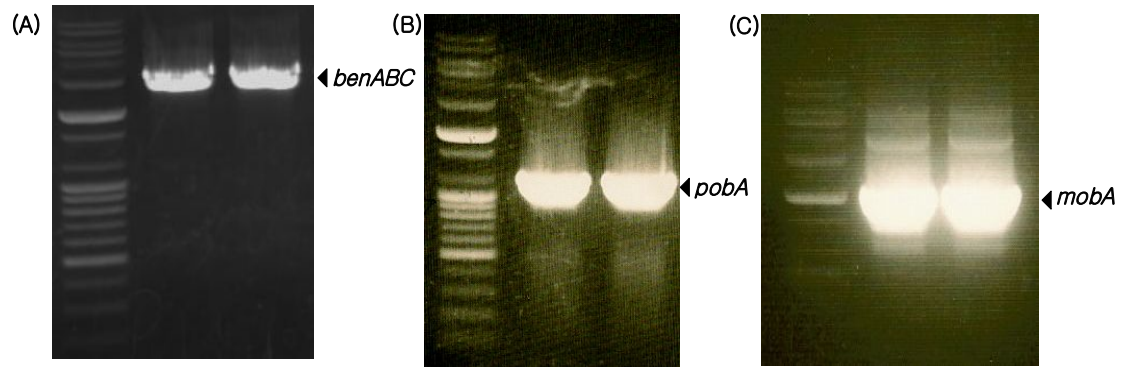


Fig. 4. PCR product of (A) *benABC*, (B) *pobA*, and (C) *mobA*.

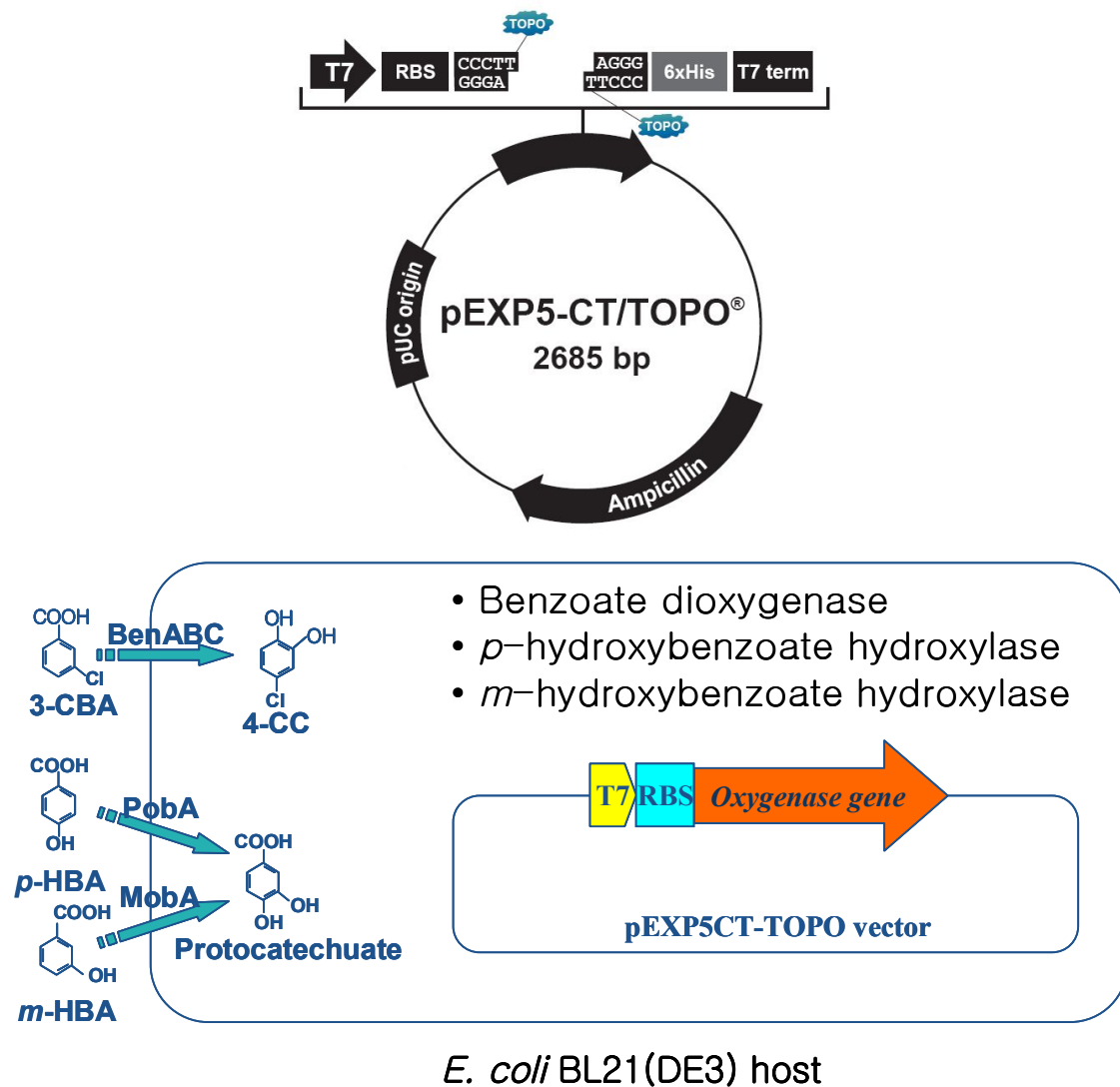


Fig. 5. Construction of expression vector of pEXP5-CT/TOPO aromatic oxygenases.

## 2. *benABC* 유전자의 발현 및 생물전환

### 1) *benABC* 유전자의 발현

BenABC 단백질의 발현양상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. IPTG 첨가 후, 시간이 지남에 따라 각각 BenA (51 kDa), BenB (19 kDa) 그리고 BenC (38 kDa)의 발현양상을 확인할 수 있었으며, 특히 4시간 후 발현이 가장 잘 나타났다 (Fig. 6).

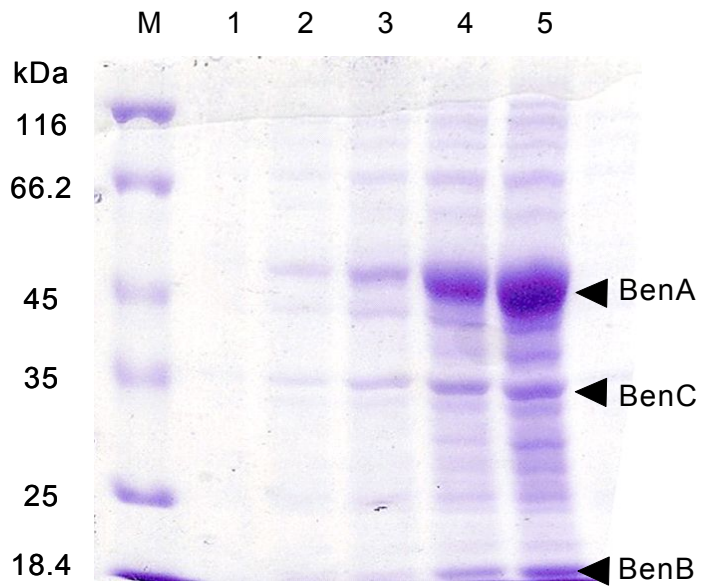


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of BenABC in *E.coli* BL21 (DE3). The cells were harvested after different IPTG induction times of 0, 0.5, 1, 2 and 4 hr (lane 1 to 5), respectively. Symbol; M, molecular weight marker.

## 2) *benABC* 유전자를 이용한 생물전환

발현이 유도된 *benABC* 유전자를 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 내용에 따라 생물전환 실험을 하였다. 1 mM의 3-chlorobenzoate를 기질로 제공하고 16시간 동안 배양하였다. 전환량을 측정하기 위해 LC-MS/MS로 분석한 결과 0.25 mM의 4-chlorocatechol로 생물전환 되는 것을 확인하였다 (Fig. 7).

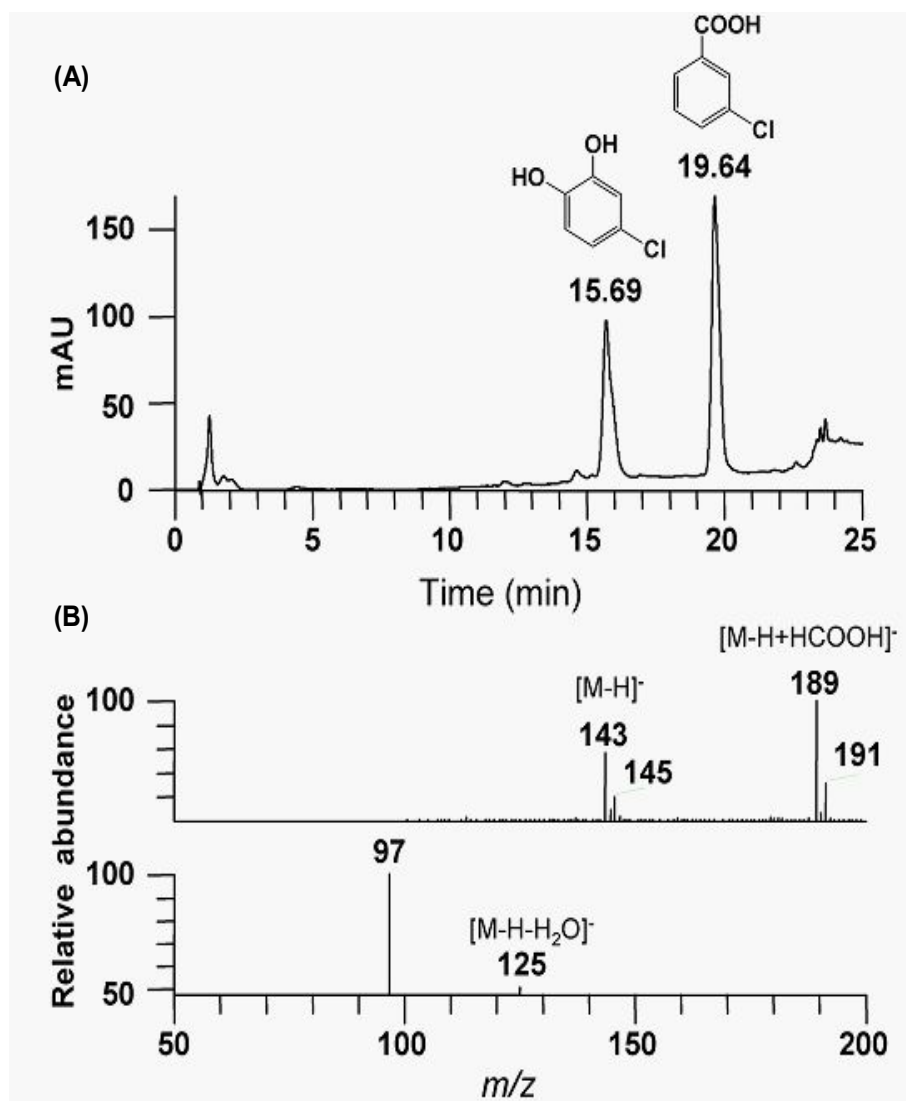


Fig. 7. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant BenABC protein. (A) HPLC-PDA chromatogram and (B) MS/MS fragmentation patterns of a 3-chlorobenzoate conversion product, 4-chlorocatechol eluted at 15.69 min.

### 3. *pobA* 유전자의 발현 및 생물전환

#### 1) *pobA* 유전자의 발현

PobA 단백질의 발현양상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. IPTG 첨가 후 시간이 지남에 따라 낮은 수준의 불용성과 수용성 PobA (44 kDa) 단백질의 발현이 유도되었다 (Fig. 8 and 9). PobA 단백질의 발현양이 적은 것은 PobA 단백질의 활성이 낮은 것으로 사료된다.



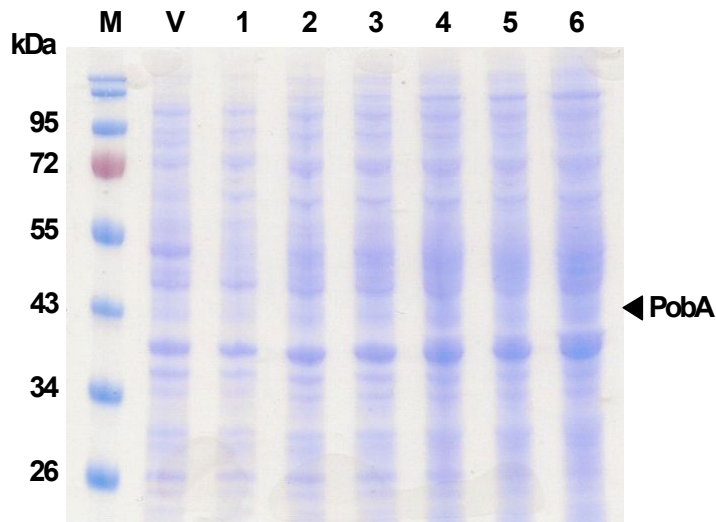


Fig. 8. SDS-PAGE analysis of Poba insoluble protein in *E. coli* BL21 (DE3). The cells were harvested after different IPTG induction times of 0, 0.5, 1, 2, 4 and 6 hr (lane 1 to 6), respectively. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

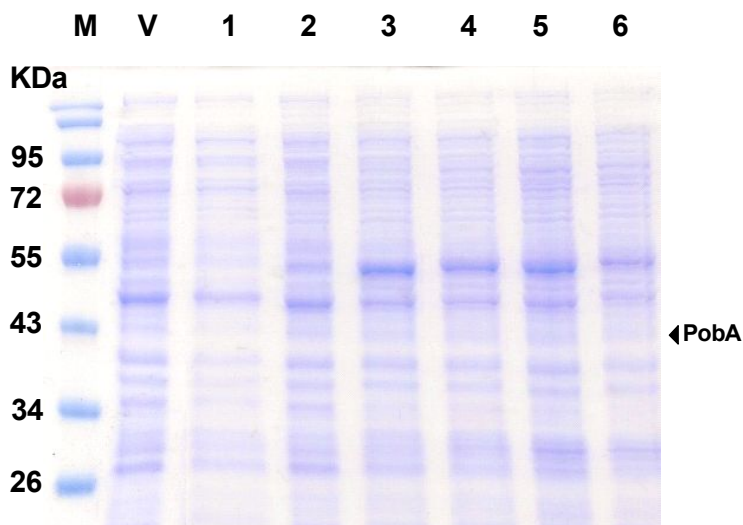


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of Poba soluble protein in *E. coli* BL21 (DE3). The cells were harvested after different IPTG induction times of 0, 0.5, 1, 2, 4 and 6 hr (lane 1 to 6), respectively. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

### 3) *pobA* 유전자를 이용한 생물전환

발현이 유도된 *benABC* 유전자를 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 생물전환 실험을 하였다. 1 mM의 *p*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하고 16시간 동안 배양하였다. 전환량을 측정하기 위해 HPLC와 LC-MS/MS로 분석한 결과 기질을 100% 이용하여 1 mM의 protocatechuate로 생물전환 되는 것을 확인하였다 (Fig. 10 and 11). 또한 2 mM의 *p*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하였을 때에는 1.2 mM의 protocatechuate로 전환되는 것을 확인하였다.

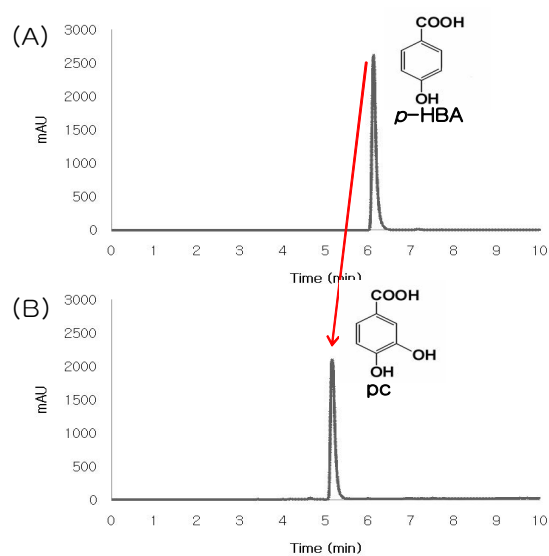


Fig. 10. Bioconversion of *p*-hydroxybenzoate to protocatechuate using PcbA protein. (A) HPLC chromatogram of 1 mM *p*-hydroxybenzoate eluted 6.01 min and (B) that of protocatechuate eluted 5.01 min. Abbreviations: *p*-HBA, *p*-hydroxybenzoate; pc, protocatechuate.

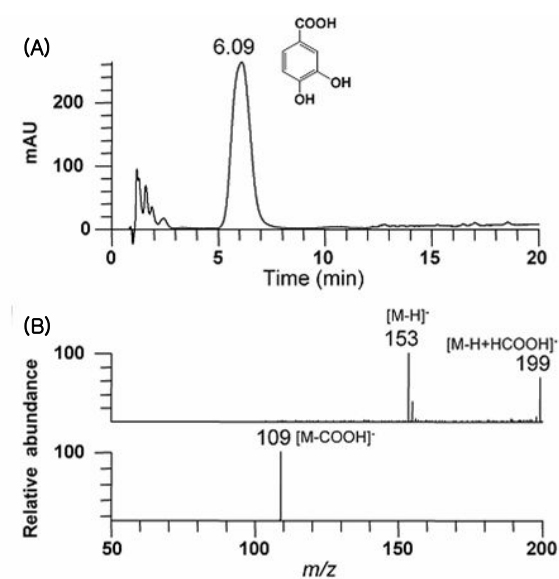


Fig. 11. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant PcbA enzyme. (A) HPLC-PDA chromatogram and (B) MS/MS fragmentation patterns of a *p*-hydroxybenzoate conversion product, protocatechuate eluted at 6.09 min.

#### 4. *mobA* 유전자의 발현 및 생물전환

##### 1) *mobA* 유전자의 발현

MobA 단백질의 발현양상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. IPTG 첨가 후 시간이 지남에 따라 불용성 상태의 MobA (72 kDa) 단백질의 발현양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 12).

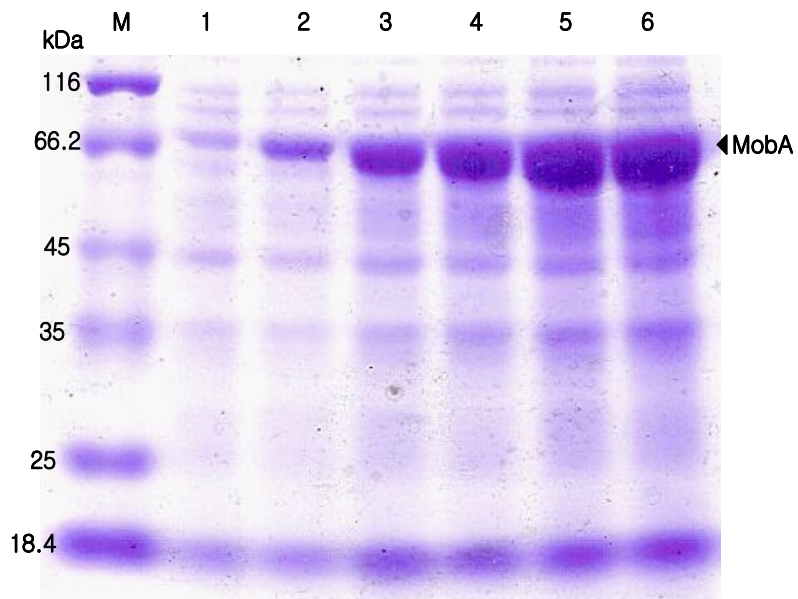


Fig. 12. SDS-PAGE analysis of MobA insoluble protein in *E. coli* BL21 (DE3). The cells were harvested after different IPTG induction times of 0, 0.5, 1, 2, 4 and 6 hr (lane 1 to 6), respectively. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

## 2) *mobA* 유전자를 이용한 생물전환

발현이 유도된 *mobA* 유전자를 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 생물전환 실험을 하였다. 1 mM의 *m*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하고 16시간 동안 배양하였다. 전환량을 측정하기 위해 HPLC와 LC-MS/MS 분석결과 아주 소량의 기질만이 이용되어 0.05 mM의 protocatechuate로 생물전환 되는 것을 확인하였다 (Fig. 13 and 14). 대부분의 단백질 발현이 불용성 상태의 단백질로 이루어져있어 활성이 낮기 때문에 0.05 mM의 protocatechuate만 전환된 것으로 사료되어진다.

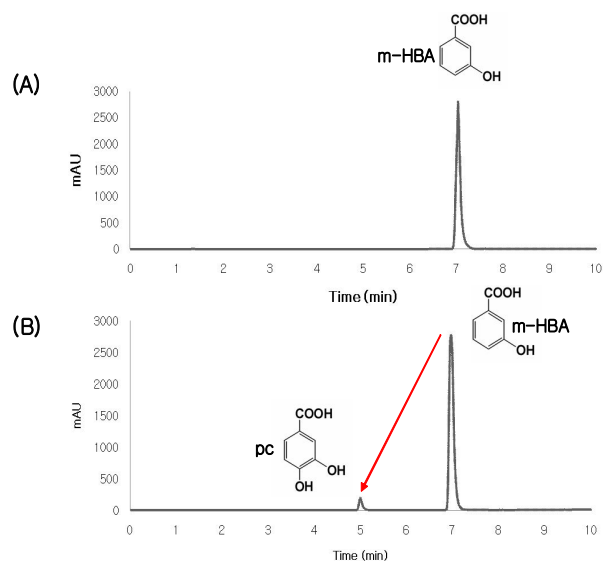


Fig. 13. Bioconversion of *m*-hydroxybenzoate to protocatechuate using MobA protein. (A) HPLC chromatogram of 1 mM *m*-hydroxybenzoate eluted 6.01 min and (B) that of protocatechuate eluted 5.01 min. Abbreviations: m-HBA, *m*-hydroxybenzoate; pc, protocatechuate.

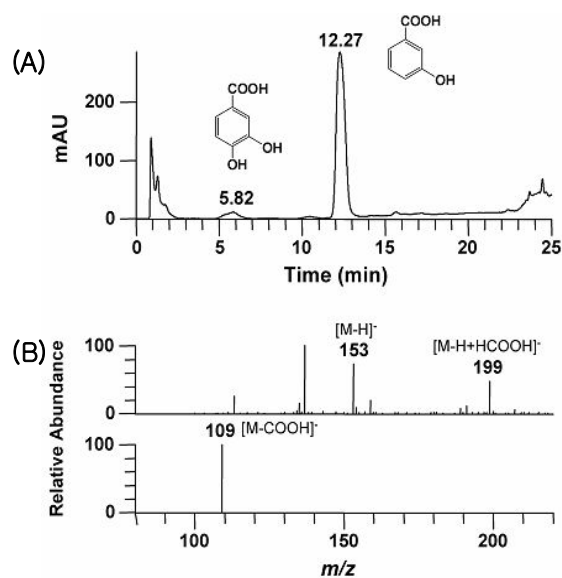


Fig. 14. LC-MS/MS tandem mass spectral analysis of the bioconversion products derived with recombinant MobA enzyme. (A) HPLC-PDA chromatogram and (B) MS/MS fragmentation patterns of a *m*-hydroxybenzoate conversion product, protocatechuate eluted at 5.82 min.

## 5. 재조합 대장균에서 chaperone plasmid의 동시발현 시스템 구축

단백질이 inclusion body를 형성하여 활성이 없는 불용성 단백질 형태로 존재하는 것을 방지하고 수용성 단백질형태로 발현을 유도함으로써 생물전환 효율을 높이기 위해 단백질 folding에 관여하는 chaperone 분자가 포함되어 있는 5종의 plasmid (pG-KJE8, pKJE7, pGro7, pTf16, pG-Tf2)를 재조합 대장균에서 동시발현 할 수 있는 시스템을 구축하였다 (Fig. 15).





## 6. *pobA* 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 및 생물전환

### 1) *pobA* 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현

Chaperone plasmid가 포함된 *pobA* 유전자에서 수용성 PobA 단백질의 발현양상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. Chaperone plasmid의 유도물질로 사용되는 L-arabinose를 0.02% 접종하여 발현을 유도하였다. 재조합 대장균에 단독발현된 *pobA* 유전자와 비교해 볼 때 안정적으로 수용성 PobA (44 kDa) 단백질의 발현양상을 확인할 수 있었고, *pobA* 유전자와 pKJE7가 동시발현 되었을 때 가장 안정적으로 많은 양의 수용성 PobA (44 kDa) 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 16).

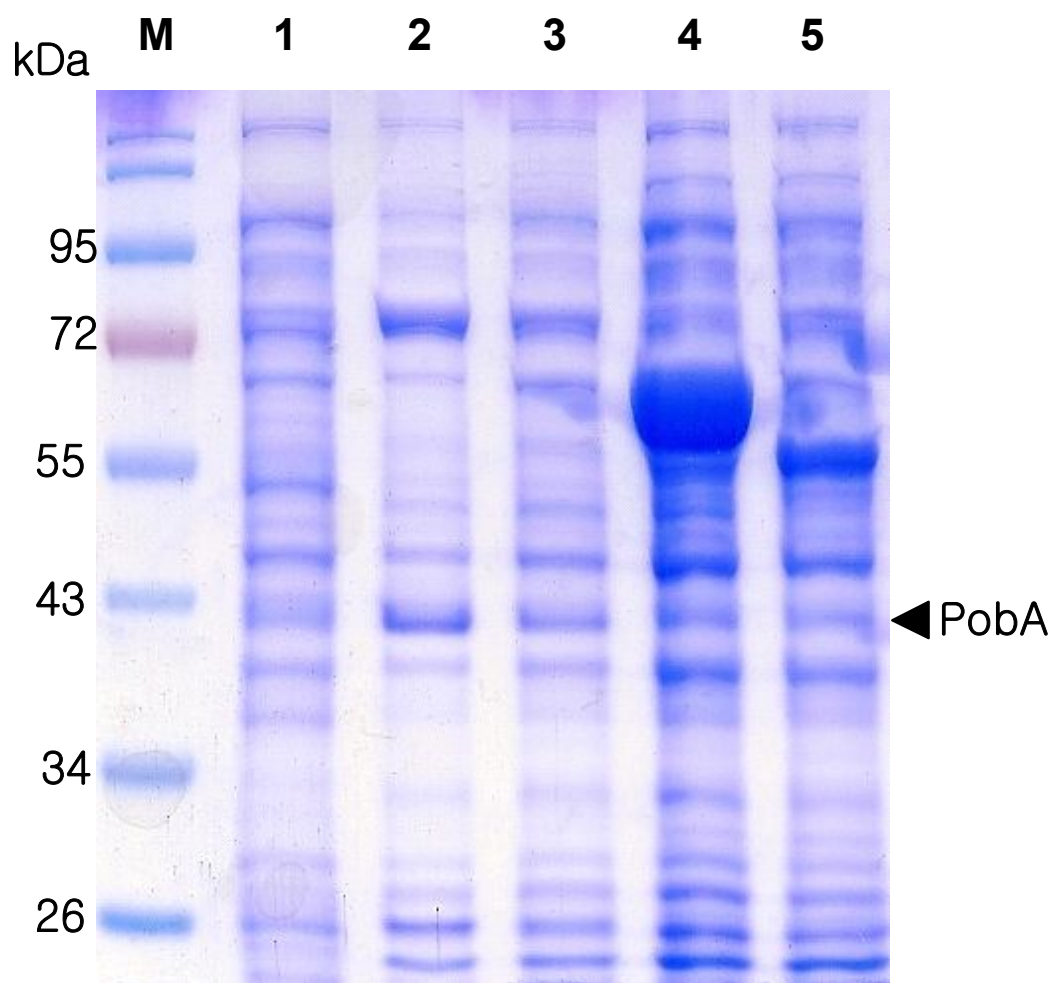


Fig. 16. SDS-PAGE analysis of coexpressed PobA in *E. coli* BL21 (DE3) with chaperone plasmids of pKJE7 , pG-KJE8, pTf16 and pG-Tf2 (lane 1 to 4), respectively. The cells were harvested after 0.75 mM IPTG induction for 2 hr. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

## 2) L-arabinose 농도가 동시발현에 미치는 영향

L-arabinose의 최적 발현 농도를 확인하기 위해 L-arabinose의 농도를 각각 0.0002%, 0.002%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%로 접종하여 농도에 따른 발현정도를 SDS-PAGE를 통해 비교하였다. 비교 결과 0.05%에서 가장 안정적으로 수용성 상태의 PobA (44 kDa) 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 17).

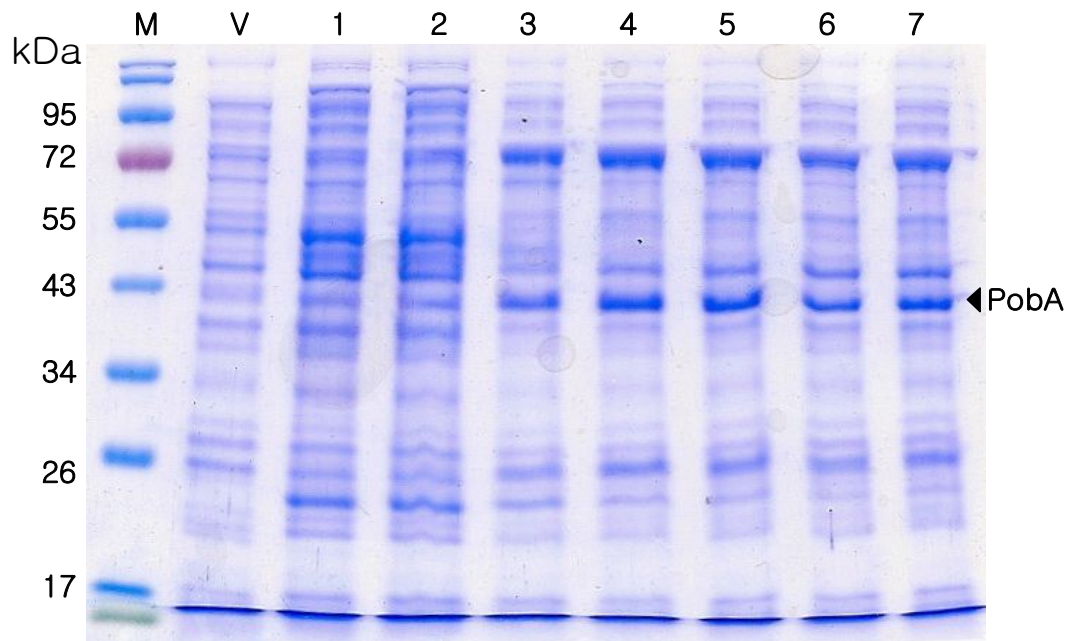


Fig. 17. Effect of L-arabinose concentration on the co-expression of PobA. L-arabinose concentrations were 0.0002, 0.002, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2% (lane 1 to 7), respectively. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

### 3) *pobA*와 pKJE7이 동시발현된 재조합 대장균을 이용한 생물전환

pKJE7와 *pobA*가 동시발현된 재조합 대장균을 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 내용에 따라 생물전환 실험을 하였다. 재조합 대장균에서 단독발현된 *pobA* 유전자에 비해 수용성 상태의 단백질이 안정적으로 발현되었기 때문에 기질의 농도를 30 mM과 50 mM로 높여서 생물전환 실험을 하였다. 30 mM의 *p*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하고 16시간 동안 배양하였다. 전환량을 측정하기 위해 HPLC용 증류수로 20배 희석하여 HPLC로 분석하였다. 분석 결과 기질을 100% 이용하여 30 mM의 protocatechuate로 생물전환 되었다. 또한 50 mM의 *p*-hydroxybenzoate를 기질로 제공했을 때는 33.2 mM의 protocatechuate로 생물전환 되었다 (Fig. 18). 단독 발현되었을 때와 비교해 볼 때 약 27배의 protocatechuate로의 생물전환 효율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

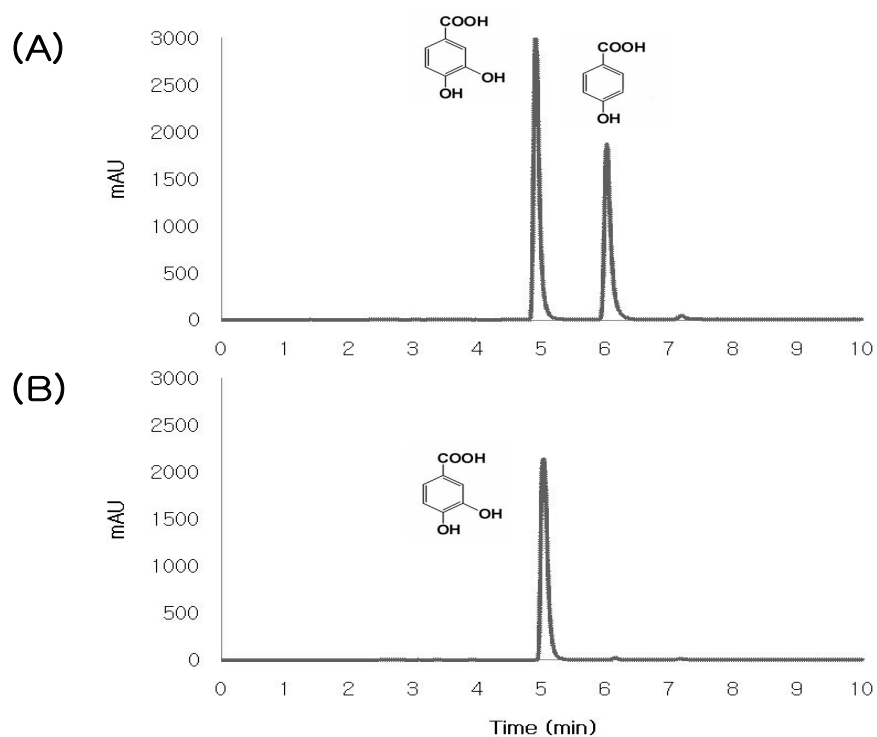


Fig. 18. Bioconversion of high concentrations of *p*-hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of *pobA* with pKJE7. (A) 50 mM and (B) 30 mM *p*-hydroxybenzoate. Abbreviations: p-HBA, *p*-hydroxybenzoate; pc, protocatechuate.

## 7. *mobA* 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현 및 생물전환

### 1) *mobA* 유전자와 chaperone plasmid의 동시발현

Chaperone plasmid가 포함된 *mobA* 유전자에서 수용성 MobA 단백질의 발현양상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. Chaperone plasmid의 유도물질로 사용되는 L-arabinose를 0.02% 접종하여 발현을 유도하였다. 제조합 대장균에서 단독발현된 *mobA* 유전자와 비교해 볼 때 pKJE7와 *mobA* 유전자가 동시발현 되었을 때 가장 안정적으로 많은 양의 수용성 MobA (72 kDa) 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 19).



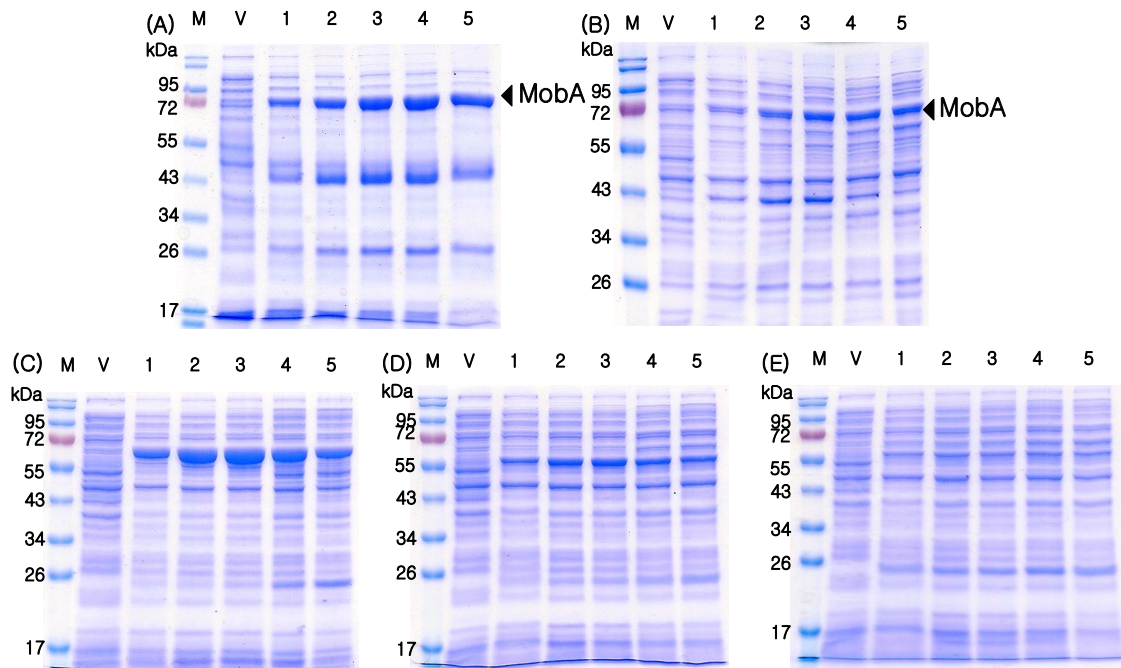


Fig. 19. Co-expression of *mobA* with different chaperone plasmids during different IPTG induction times. The chaperone plasmids used were as follows (A) pKJE7, (B) pG-KJE8, (C) pGro7, (D) pTf16, and (E) pG-Tf2, respectively. The cells were harvested after different IPTG induction times of 0, 0.5, 1, 2 and 4 hr (lane 1 to 5), respectively. Symbol: M, molecular weight marker; V, pEXP5CT/TOPO vector.

## 2) L-arabinose 농도가 동시발현에 미치는 영향

L-arabinose의 최적 발현 농도를 확인하기 위해 L-Arabinose의 농도를 각각 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2% 점중하여 농도에 따른 발현정도를 SDS-PAGE를 통해 비교하였다. 비교 결과 0.15%의 L-arabinose에서 가장 안정적으로 수용성 상태의 MobA (72 kDa) 단백질이 발현되었다 (Fig. 20).

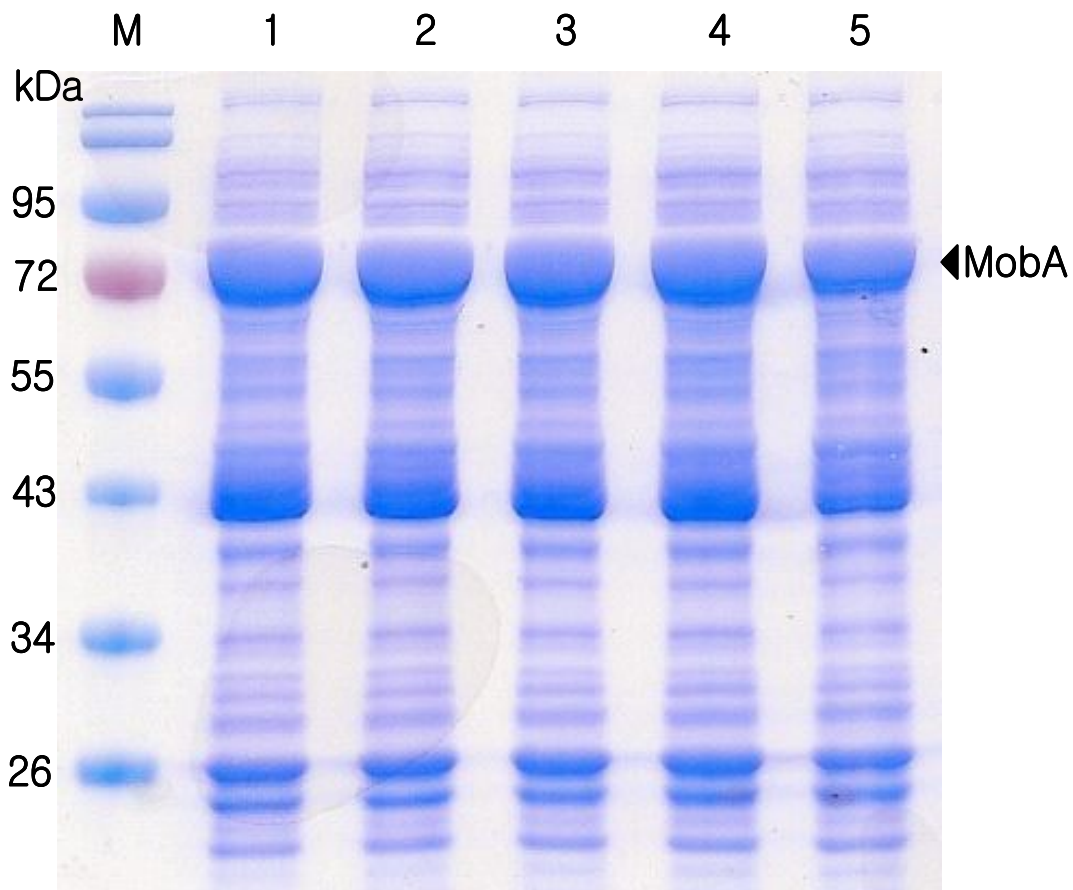


Fig. 20. Effect of L-arabinose on the co-expression of *mobA* with pKJE7. L-arabinose concentrations were 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2% (lane 1 to 5), respectively. Symbol: M, molecular weight marker.

### 3) *mobA*와 Chaperone plasmid가 동시발현된 재조합 대장균을 이용한 생물전환

각각의 Chaperone plasmids와 *mobA*가 동시발현된 재조합 대장균을 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 내용에 따라 생물전환 실험을 하였다. 1 mM의 *m*-hydroxybenzoate를 기질로 제공하고 16시간 동안 배양하였으며 전환량을 HPLC로 분석하였다. 분석결과 각각 1 mM, 0.41 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.1 mM의 protocatechuate로 생물전환 되었다 (Fig. 21). 생물전환 효율이 가장 좋은 pKJE7와 *mobA* 유전자가 동시발현된 재조합 대장균을 이용하여 5 mM의 *m*-hydroxybenzoate를 기질로 제공했을 때 2.7 mM의 protocatechuate로 생물전환 되었다 (Fig. 22). 단독 발현 되었을 때와 비교했을 때 약 50배의 생물전환 효율이 증가하였다.

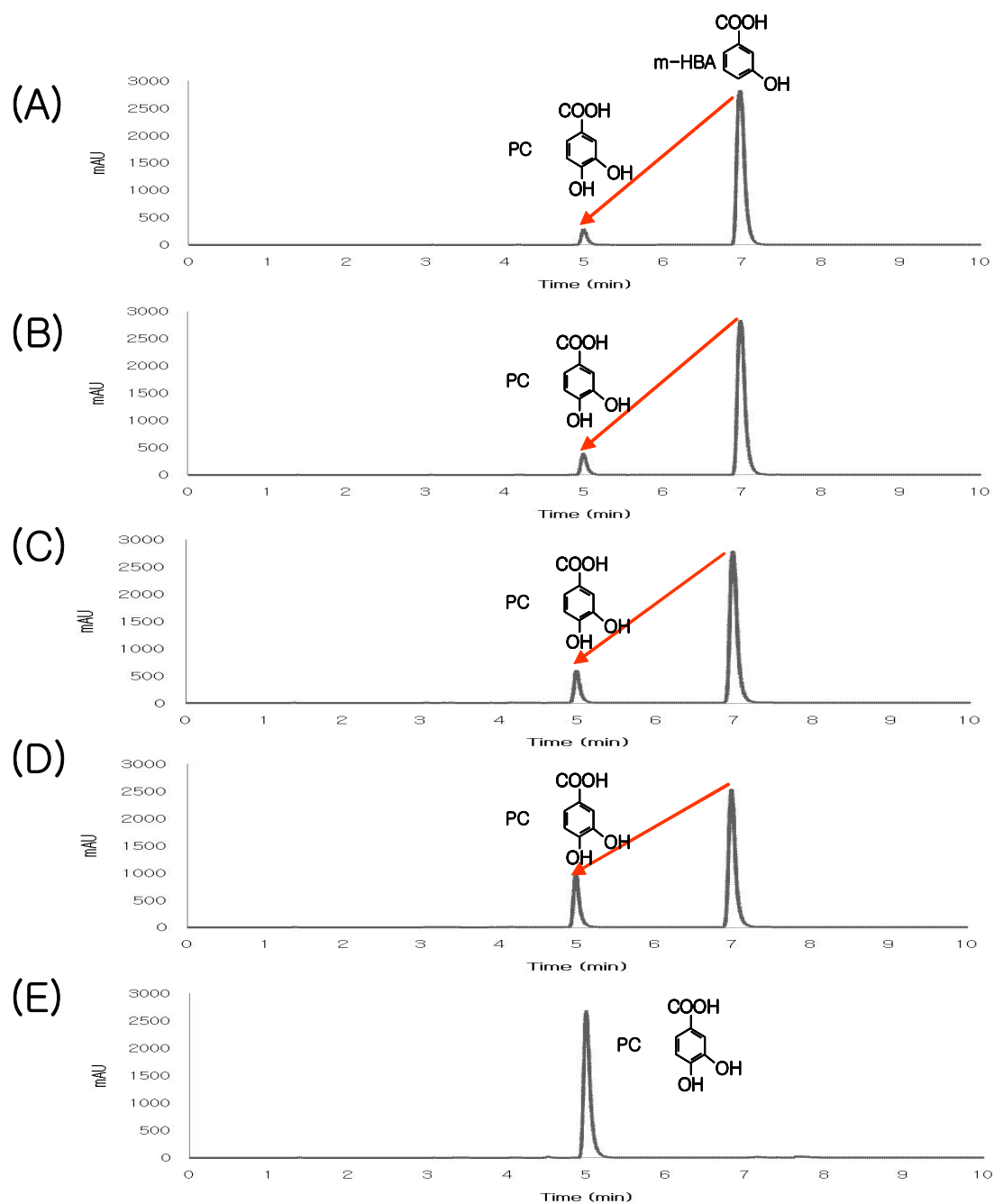


Fig. 21. Bioconversion of 1 mM *m*-hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of *mobA* with different chaperone plasmids. The chaperone plasmids used were as follows: (A) pG-Tf2, (B) pTf16 (C) pGro7, (D) pG-KJE8, and (E) pKJE7, respectively.

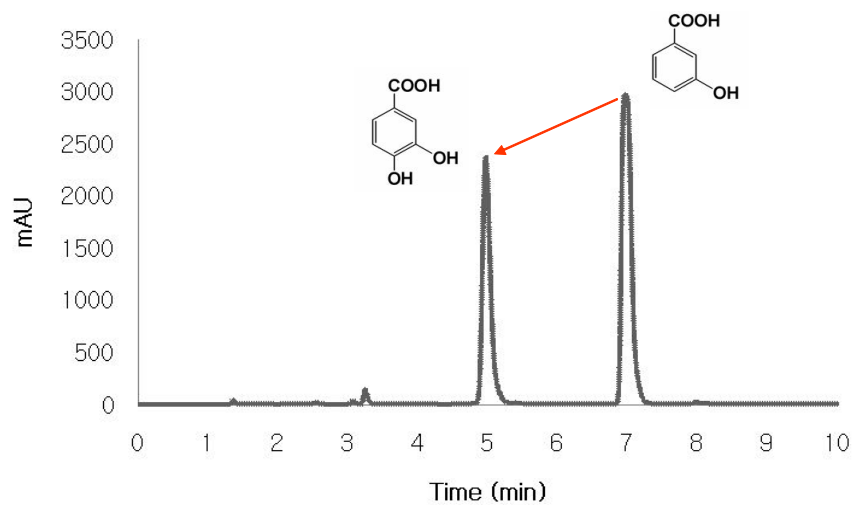


Fig. 22. HPLC profile showing the bioconversion of 5 mM *m*-hydroxybenzoate to protocatechuate by co-expression of *mobA* with pKJE7.

## 8. Ni-NTA spin column을 이용한 *pobA* 유전자 정제

Ni-NTA spin column을 이용하여 43.2mg의 total protein으로부터 2.4mg의 PobA 단백질을 분리 정제하였다. Ni-NTA spin column으로부터 5.56%의 정제된 PobA 단백질을 회수하였다. 정제된 PobA 단백질을 SDS-PAGE를 통해 전기영동한 결과 수용성 PobA (44kDa) 단백질을 확인 할 수 있었다 (Fig. 23).

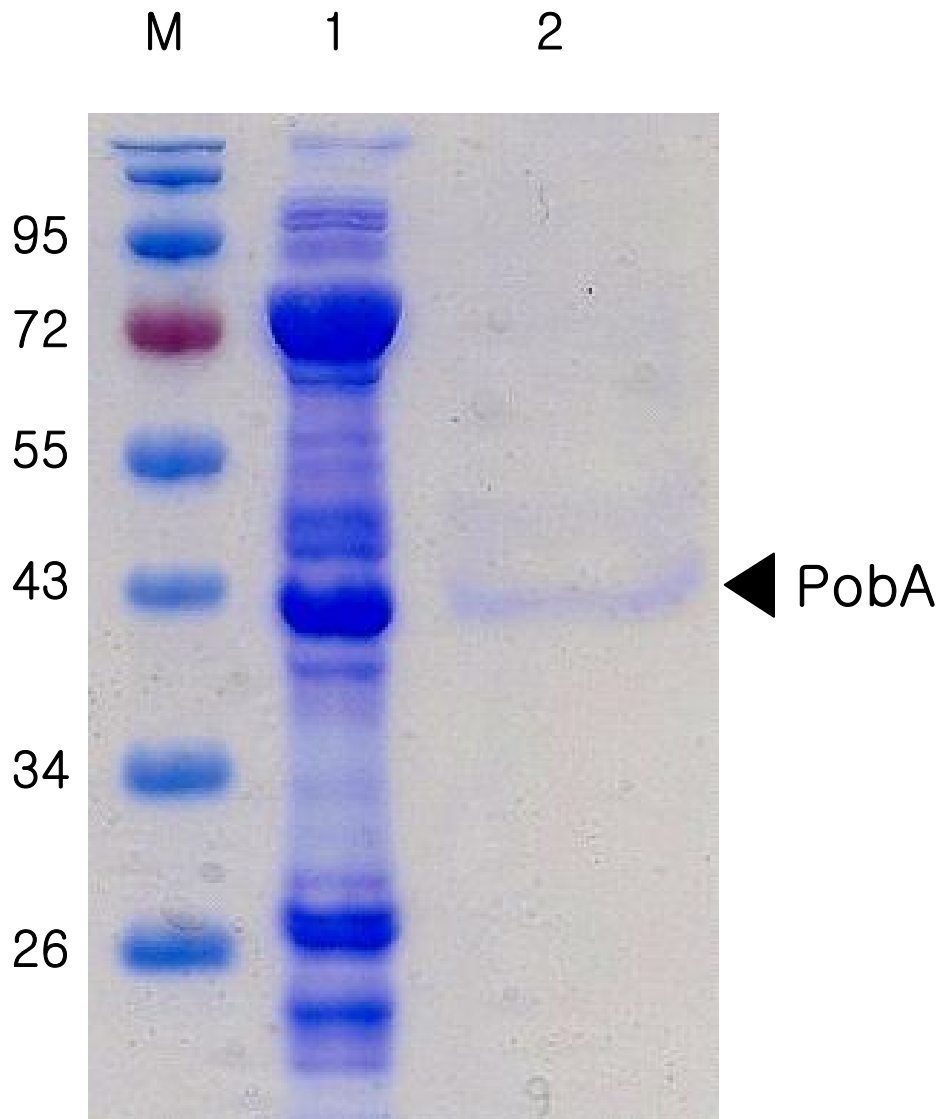


Fig. 23. Purification of PobA protein through Ni-NTA column. lane 1, cell free extract; lane 2, purified PobA protein.



## 제 4 장 결 론

1. 상급호염성세균인 *Chromohalobacter* sp. HS-2로부터 benzoate dioxygenase (*benABC*), *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (*pobA*), *m*-hydroxybenzoate hydroxylase (*mobA*)를 확보하였고 각각의 유전자를 과발현 vector인 pEXP5-CT/TOPO vector에 클로닝 하였다.

2. BenABC 단백질의 과발현을 SDS-PAGE를 통해 확인하였고 생물전환 결과 1 mM의 3-chlorobenzoate로부터 0.25 mM의 4-chlorocatechol로 생물전환 되었다.

3. *pobA* 유전자는 chaperone plasmid와 동시발현을 통해 안정적으로 발현됨을 확인하였다. 그 중 pKJE7과 동시발현 되었을 때 가장 안정적이고 많은 양의 수용성 PobA 단백질의 발현을 확인할 수 있었다. 생물전환 결과 30 mM의 *p*-hydroxybenzoate는 100% 이용하여 30 mM의 protocatechuate로 전환되었으며, 50 mM의 *p*-hydroxybenzoate로부터는 33.2 mM의 protocatechuate로 전환되었다. 재조합 대장균에서 단독발현 되었을 때와 비교해보면 동시발현 되었을 때 생물전환 효율이 약 27배 증가하였다.

4. *mobA* 유전자는 chaperone plasmid와 동시발현을 통해 안정적으로 발현됨을 확인하였다. 그 중 pKJE7과 동시발현 되었을 때 가장 안정적이고 많은 양의 수용성 MobA 단백질의 발현을 확인할 수 있었다. 생물전환 결과 5 mM의 *m*-hydroxybenzoate로부터 2.7 mM의 protocatechuate로 전환되었다. 재조합 대장균에서 단독발현 되었을 때와 비교해보면 동시발현 되었을 때 생물전환 효율이 약 50배 증가하였다.

## 참고문헌

1. K. J. Sanders. Oligonic Polymer chemistry, Champmann. 1977
2. Trends in Biotechnol. 1995, 13, 200-205.
3. Proceedings of International Conference of Biotechnology BIO-JAPAN '94. 1994, 193-200.
4. Bioconversion, Medical Publication Center, Tokyo. 1993.
5. Thomas, J. G., et al. Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. Appl. Biochem. Biotech. 1997, 66:197-238
6. Alexander, M. Biodegradation of chemical enviromental concern. Science. 1981, 211:132-138
7. Haggblom, M. Microbial Breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbil. Reviews. 1992, 103:29-72
8. Chaudhry, G.R and S. Chapalamadugu. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiology. Reviews. 1991, 55:59-79
9. Van der Meer, and J. Roelof. Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. FEMS Microbial Reviews. 1994, 15:239-249

10. Provident, M.A., J. Mampel, S. Macsween, A.M. Cook. *Comamonas testosteroni* BR 6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology*. 2001, 147:2157-2167.
11. Bugg, T.D.H. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5:550-555.
12. Patel, R.N., C.T. Hou, A. Felix, and M.O. Lillard. Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 1976, 127:536-544.
13. Herayama, S., M. Kok, and E.L. Neidle. Function and evolutionary relationships among diverse oxygenase. *Microbiology. Reviews.* 1992, 45:565-601.
14. Soon-Ho Park, Jae-Woo Kim, Seung Il Kim. Characterization of  $\beta$ -Ketoacid pathway from Multi-Drug Resistance Bacterium, *Acinetobacter baumannii* DU202 by Proteomic Approach. *Microbiology*. 2006 Vol. 44, No. 6, 632-640.
15. Aguilera, M., Cabrera, A., Incerti, C., Fuentes, S., Russell, N. J., Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M. *Chromohalobacter salarius* sp. a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almeria, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007, 57, 1238-1242.
16. Garcia-Esteva, R., Argandona, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J. & Vargas, C. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Microbiology*. 2006, 188, 3774-3784.
17. Garcia, M. T., Ventosa, A. & Mellado, E. Catabolic versatility of aromatic

compound-degrading halophilic bacteria. FEMS Microbiol. 2005b, 54, 97-109.

18. Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol. 2002, 28, 56-63.

19. Peconek, J., Gruber, C., Gallego, V., Ventosa, A., Busse, H. J., Kampf, P., Radax, C. & Stan-Lotter, H. Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* emended description of the species. Int J Syst Evol Microbiol. 2006, 56, 1953-1957.

20. Prado, B., Lizama, C., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Campos, V. & Monteoliva-Sanchez, M. *Chromohalobacter nigrandesensis* sp. a moderately halophilic, Gram-negative bacterium isolated from Lake Tebenquiche on the Atacama Saltern, Chile. Int J Syst Evol Microbiol. 2006, 56, 647-651.

21. Vargas, C. & Nieto, J. J. Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae*. Methods Mol Biol. 2004, 267, 183-208.

22. Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. Microbiol Mol Biol. Reviews. 1998, 62, 504-544.

23. Alva, V. A. & Peyton, B. M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. Environ Sci Technol. 2003, 37, 4397-4402.

24. Garcia, M. T., Mellado, E., Ostos, J. C. & Ventosa, A. *Halomonas organivorans* sp. a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. Int J Syst Evol Microbiol. 2004, 54, 1723-1728.

25. Fang-Bo, Y., Biao, S. & Shun-Peng, L. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain ONBA-17 degrading *o*-nitriobenzaldehyde. *Curr Microbiol.* 2006, 53, 457-461.
  
26. Kwon, K. K., Lee, H. S., Yang, S. H. & Kim, S. J. *Kordiimonas gwangyangensis* sp. a marine bacterium isolated from marine sediments that forms a distinct phyletic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the '*Alphaproteobacteria*'. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005, 55, 2033-2037.
  
27. Garcia, M. T., Gallego, V., Ventosa, A. & Mellado, E. *Thalassobacillus devorans* sp. a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005a, 55, 1789-1795.
  
28. Sohn, J. H., Kwon, K. K., Kang, J. H., Jung, H. B. & Kim, S. J. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004, 54, 1483-1487.
  
29. Al-Awadhi, H., Sulaiman, R. H., Mahmoud, H. M. & Radwan, S. S. Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007.
  
30. Abdelkafi, S., Labat, M., Casalot, L., Chamkha, M. & Sayadi, S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain IMPC, a *p*-coumaric acid-metabolizing bacterium that decarboxylates other cinnamic acids under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 255, 108-114.
  
31. Oie, C. S., Albaugh, C. E. & Peyton, B. M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. *Water Res.* 2007, 41, 1235-1242.

32. La Cara, F., Alves, L., Girio, F., Di Salle, A., Capasso, A. & Rossi, M. A new dehydrogenase specific towards aromatic aldehydes from a halophilic bacterium. *Protein Pept Lett.* 2003, 10, 449-457.
  
33. Brusa, T., Borin, S., Ferrari, F., Sorlini, C., Corselli, C. & Daffonchio, D. Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea. *Microbiology. Reviews.* 2001, 156, 49-58.
  
34. Goldberg, J. B., and D. E. Ohman. Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J. Bacteriol.* 1984, 158:1115-1121.
  
35. *Molecular Cloning*. Chapter 1, Protocol 24.
  
36. C.I. Kado, S.T. Liu. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* 1981, 1365-1373.

## 저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20087119	과 정	석 사
성 명	한글 임성훈                      한문 林聖勳		영문 Im Seong Hun		
주 소	광주광역시 동구 계림동 571-14 태광베스트빌 A동 403호				
연락처	E-mail : lsh1573@nate.com				
논문제목	한글 <i>Chromohalobacter</i> sp. HS-2 유래 수산화효소 유전자 내포 재조합 대장균을 이용한 hydroxybenzoate의 전환				
	영문 Bioconversion of hydroxybenzoate using recombinant <i>E. coli</i> harboring hydroxylase genes from <i>Chromohalobacter</i> sp. HS-2				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다                      음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.</li> <li>2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.</li> <li>3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.</li> <li>4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.</li> <li>5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.</li> <li>6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.</li> <li>7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.</li> </ol> <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의( ○ )    반대(    )</p> <p style="text-align: center;">2009년 8월</p> <p style="text-align: right;">저작자:    임성훈                      (인)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">조선대학교 총장 귀하</p>					