

Recombinant Cyanide Hydratases에 의한 시안화물 분해

권성현¹, 조대철^{2*}

¹경상대학교 해양환경공학과(해양산업연구소), ²순천향대학교 에너지환경공학과

Cyanide Degradation by Two Recombinant Cyanide Hydratases

Sung-Hyun Kwon¹ and Dae-chul Cho^{2*}

¹Department of Marine Environmental Engineering/Institute of Marine Industry
Gyeongsang National University

²Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University

요 약 시안화물을 포름아미드로 변환시키는 nitrilase의 일종인 시안 수화효소 (cyanide hydratase, CHT) 를 진균류인 *Neurospora crassa* 와 *Aspergillus nidulans*로부터 유전자 조작을 통하여 His에 태그 또는 언태그된 형태로 대장균에 형질변환시켜 발현하였다. 발현된 효소를 고정 metal affinity chromatography로 정제하였다. 정제된 효소들의 pH 안정성, 동력학적 매개변수의 값을 검토하였다. 실험 결과 *N. crassa* 의 CHT가 50%정도 더 넓은 pH 안정 범위를 가졌고 3배 가량 turnover rate도 높았다. 반면 *A. nidulans* CHT의 Km 값 (효소포화 용량)이 *N. crassa* CHT보다 더 크게 나타났다. 두 진균류에서 CHT의 유도발현은 질소성분과 상관없이 KCN에 의해 가능하였으며, 생분해 실험결과 *N. crassa* CHT에 의해 최대 82%/h의 시안분해가 가능하였다.

Abstract The genes of cyanide hydratase(CHT), a kind of nitrilases which hydrolyze cyanide to formamide were extracted from *N. crassa* and *A. nidulans*, the two fungal strains. The recombinant forms of the CHT originated from *N. crassa* and *A. nidulans* were prepared with N-terminal hexahistidine purification tags or no tags, and expressed in *E. coli*. The enzymes were purified using immobilized metal affinity chromatography. They were compared according to their pH activity profiles, and kinetic parameters. The *N. crassa* CHT has the wider pH range of activity above 50% and three-fold higher turnover rate ($6.6 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$) than the *A. nidulans*, meanwhile the CHT of *A. nidulans* has the higher K_m value. Expression of CHT in both *N. crassa* and *A. nidulans* were induced by the presence of KCN, regardless of any presence of nitrogen sources. Max. 82% of KCN was degraded in 60 min for biological degradation tests.

Key Words: Cyanide hydratase, Recombinant enzyme, Enzyme kinetics, Biodegradation

1. 서론

시안 폐기물은 미국을 비롯하여 전세계적인 주요 환경 유독성 물질로 주목받고 있으며 약 1800만 톤 규모로 발생하고 있다[1]. 광산, 전기도금, 제강, 고분자 합성, 약품 제조, 염료 제고 및 농업재배 등에서 다양하게 사용되고 있으며 쉽게 대체물질을 찾기 어려운 특성을 갖고 있다. 본질적으로 생물의 호흡시스템에 독성으로 작용하는 시안화합물을 분해하려면 시토크롬 c에서 산소로 전달되는

전자의 최종경로를 차단함으로써 가능하다. 현재 가장 널리 쓰이는 제독방법은 시안을 호화적으로 산화시켜 안정된 비독성 물질로 전환시키거나 불투수성 토양에 차단시키는 것이다.

이러한 시안화합물을 생물학적으로 처리하기 위한 다양한 방법들이 지난 수 십년간 제시되어 왔다[2]. 이 가운데 미생물로부터 얻어지는 nitrilase를 사용하는 것이 가장 실현성 높은 접근법으로 인식되고 있다. 많은 효소들은 시안화합물을 특정한 환경조건에서 비독성 화합물로

본 연구는 순천향대학교의 연구년제(2007.9 ~ 2008.8)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

*교신저자 : 조대철(daechul@sch.ac.kr)

접수일 09년 05월 13일

수정일 09년 06월 05일

게재확정일 09년 06월 17일

전환시킨다: 질소고정 박테리아에서 발견되는 nitrogenase는 절대 혐기성 상태를 조성해 주어야 하며 [3], 대부분의 동물 및 일부 식물, 균사체와 미생물이 보유하고 있는 rhodanase는 티오황산염이 필요하다[4]. 반면 nitrilase는 이러한 제한성을 갖고 있지 않다. 이들은 시스틴의 친핵반응[5]을 포함한 단순한 가수분해 경로를 사용하여 시안을 전환시킬 수 있다. Nitrilase 보유 계열균 주들에서 시스틴은 라이신, 글루탐산과 함께 전환되어 시안분해에 필요한 촉매 triad를 형성한다고 알려져 있다 [5-7]. *Pseudomonas chlororaphis* B23[8]과 같은 미생물은 이미 시안화물 (nitrile)을 대사하는 효소로서 대량생산의 가능성이 높은 예의 하나이다.

미생물에서 생산되는 nitrilase는 수화반응을[9] 통해서 시안과 같은 nitril을 무독물질로 변환시키는 효소군의 하나이다. Nitrilase중 시안수화효소(cyanide hydratase; CHT)는 수많은 식물병원체인 *Fusarium solani*, *Gaeocercospora sorghi* 등에서 발견되며 시안화물을 포름아미드로 전환시킨다[10]. 또 다른 nitrilase는 시안이수화효소(cyanide dihydratase; CynD)로서 시안화물을 포름산염과 암모니아로 전환시키며[11] *Alcaligenes xylooxidans*나 *Pseudomonas stutzeri* AK61, *Bacillus pumilis* 등에서 발견된다[12].

CHT나 CynD는 시안의 분해에 유망한 특성을 갖추고 있는데 장기간 유지되는 안정성, 조효소가 불필요하다는 점이며 추출, 정제, 세포자체의 형태로 촉매활성이 높은 수준으로 쉽게 발현되는 것이 또 다른 잇점이다[13].

본 연구를 통해 *Aspergillus fumigatus*와 같은 병원성 균사체가 상기에 언급한 효소의 관련 유전자를 보유하고 있음을 확인하고 *A. nidulans*, *N. crassa* 균주로부터 관련 유전자를 복제하였다. 대장균에서 복제된 두 종류의 CHT의 안정성 및 효소동력학 (enzyme kinetics)을 조사하고 KCN을 모델물질로 하여 생분해 실험을 수행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 균주, 플라스미드 및 배지

【표 1】 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain	Plasmid Description	Reference
<i>E. coli</i> B1	BL21(DE3)pLysS F <i>ompT hsdS_B gal dcm</i>	Novagen, Inc.
<i>E. coli</i> B2N	B1, pET28a <i>Ndel</i> <i>EcoRI</i> of <i>N. crassa</i> CHT	Here
<i>E. coli</i> B2A	B1, pET28a <i>Ndel</i> <i>EcoRI</i> of <i>A. nidulans</i> CHT	Here

표 1에 사용된 균주 및 플라스미드 제원이 나타나 있다. 대장균을 Studier 등[14]이 단백질 발현을 위해 조성한 LB배지 (0.05% 포도당, 0.5% 글리세롤, 0.2% 락토스)에서 배양하였다. 대장균 선별을 위해 암피실린 100 µg/ml, 클로람페니콜 25 µg/ml, 카나마이신 25 µg/ml를 첨가하였다. *N. Crassa*는 Vogel 배지[15]에서 그 외 균주는 complete 배지[16]에서 배양하였다.

2.2 DNA 조작

CHT 유전자는 *A. nidulans*의 게놈 DNA에서, *N. crassa*의 경우 cDNA를 사용하여 증폭 사용하였다. 프라이머는 ATG코돈의 *Nde I*에 도입되어 p1260에 클로닝되고 서열분석된 후에 다시 PET26b과 PET28a에 재클로닝되어 각각 언태그된 단백질을 발현하고 N 말단의 His에 태그된 단백질을 발현하도록 하였다.

*A. nidulans*의 클론에서 인트론을 제거하기 위하여 Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA)를 사용하여 그림 1과 같은 아미노산 서열을 얻었다. 대장균에 형질전환되고 유전자 발현은 BL21(DE3)pLysS에서 이루어졌다.

2.3 대장균의 CHT 발현과 정제

Recombinant 대장균에서 단백질의 생산은 30°C에서 Studier 등[14]의 자동유도 배지에서 이루어졌다. 세포 수확 후 펠렛을 0.1M NaCl, 0.0125M imidazole, 1mg/ml 라이소자임을 포함하는 0.02M 인산나트륨 완충액에 재분산시킨 후 ‘동결 해빙법’으로 DNA가 없는 원천 lysate를 얻었다. His 태그된 CHT효소는 고정 metal affinity 크로마토그래피(1 ml HisTrap Ni Sepharose HP column)로 정제하였다: imidazole 완충액을 elution에 사용하였고 peak fraction을 채취하여 냉장보관하며 사용하였다.

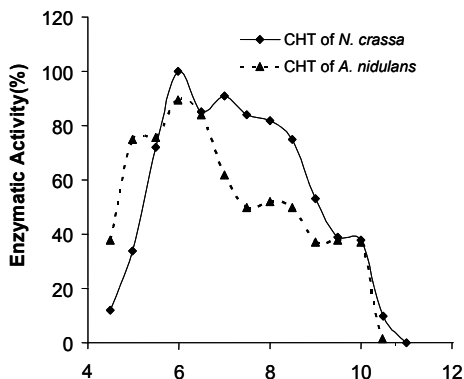
2.4 최적 pH 및 효소동력학 분석

정제된 CHT의 pH에 따른 활성을 그림 2에 나타내었다.

pH 4~11의 범위로 인산나트륨 완충액에서 효소활성을 측정하였다. 우선 KCN 1M stock 용액을 100 ml의 pH 7.6 MOPS 용액에 희석시켜 최종 100 mM의 KCN을 준비하였다. 상온에서 300 µl의 효소와 10mM KCN을 60분간 반응시켰다. 효소의 농도는 *N. crassa*, *A. nidulans*에 대하여 각각 1.8, 2.2 µg/mL였다. 시안 농도의 측정에는 피크릭산법[17]을 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<i>N. crassa</i>	--MVLTKYKAAAVTSEPCWFDLEGGVVRKTIDFINEAGQAGCKLVAFPEVWIPGYPYWMWK	58
<i>A. nidulans</i>	MSPVLKKYKAAAVNAEPGWFDLEESVRRTIHWINEAGRNRCKLIAPELVWIPGYPYWMWK	60
<i>N. crassa</i>	VTYQOSLPLMKKYRENAMA VDSDEFRRIRRAARDNQIYVSLGF AEIDHATLYLAQALIDP	118
<i>A. nidulans</i>	VNYQESLPLMKKYRENSLLSDSEEMRRIREAARANKIYVSLGYSEVDLASLYTTQVLISP	120
<i>N. crassa</i>	TGEVINHRRKIKPTHVEKLVYGDGAGDTFMSVTPTELGRLGQLNCWENMNPFLKSLNVSM	178
<i>A. nidulans</i>	AGNILNHRRIKIRATHVERLVFGDGTGDTTESVQTEIGRVGHLNCWENMNPFMKSYAASL	180
<i>N. crassa</i>	GEQIHIAAWPIYPGKETLKYDPDPATNVADP ASDLVTPAYAIETGTWTLAPFORLSVEGLK	238
<i>A. nidulans</i>	GEQVHIAAWPLYPGKETLKYDPYTNVAEANC DLVTPAYAIETGTYTLAPWQTITEEGIK	240
<i>N. crassa</i>	KNIPGEVPEPSTYNGHARIYRPDG-SLVVRPDKDFDGLLFVDIDLNECHLTKALADF	297
<i>A. nidulans</i>	LNTPPG-KPLEDPNIYNGHGRIFAPDGRNLVPHPAKDFQGLLYVDIDLDEIHLTKSLADF	299
<i>N. crassa</i>	AGHYMRPDLIRLLVDTSRKELVTEVD--RNGGIVQYSTRERLGLNTPLEND--KEGKK--	351
<i>A. nidulans</i>	GGHYMRPDLIRLLVDGNRKDLVSEDR-INGGIKYTSMDRVGLTKPLEAP--KPTDQK	355
<i>N. crassa</i>	-----	
<i>A. nidulans</i>	E-----	356

[그림 1] 시안화물을 분해하는 두가지 nitrilases의 아미노산 서열(밑줄은 catalytic triads와 같은 잔류물)



[그림 2] *N. crassa*와 *A. nidulans*의 pH조건에 따른 CHT의 활성도

동력학 실험을 위한 효소의 농도는 0.1M MOPS 용액을 사용하여 *N. crassa*, *A. nidulans*에 대하여 각각 1.8, 0.44 µg/mL 로 정하였고 KCN의 최종농도는 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM 로 하여 준비하였다. 효소반응은 상온에서 10분간 진행되도록 하고 1분, 10분마다 샘플링하였다.

다음 식 (1)과 같이 Lineweaver Burk plot 을 이용하여 V_{max} 및 K_m 을 결정하였다.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad (1)$$

2.5 시간에 따른 생분해 실험

A. nidulans 와 *N. Crassa* 유래의 recombinant 대장균 균주를 각각 준비하였다. 30°C에서 오버나잇으로 2ml complete 배지에서 배양 후, 1ml 은 whole cell 로 보관하고 다른 1ml 은 세포해체 완충액에서 초음파로 파쇄하였다: 원심분리로 수확한 cell pellet을 1ml 해체완충액 (40 mM NaCl; 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄; 1.8mM KH₂PO₄; pH=7.3)에 재분산시킨 후 0°C에서 10초간 3회 초음파를 적용하고 4°C에서 5분간 13000 rpm 으로 원심 분리한 후 상등액을 cell extract로 사용하였다(활성을 가진 CHT는 대개 수용액상에 존재함). Whole cell 및 cell extract 를 10mM KCN과 반응시켜 10분 마다 피크릭산 법으로 잔류 시안량을 측정하였다.

3. 결과 및 토론

3.1 대장균 클로닝 및 CHT 정제

*N. crassa*와 *A. nidulans*의 CHT유전자는 *N. crassa*의 경우 cDNA library로부터, *A. nidulans*는 게놈 DNA에서 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 p1260에 부분 클로닝 되어 대장균으로 형질변환 되었다. 포함된 인트론은 표적돌연변이법으로 제거하였다. His 태그된 플라스미드는 pET28a의 *Nde I* site를 사용하여, 이와 유사하게 언태그된 단백질을 얻기 위해서는 pET26b가 사용되었다. 최종 플라스미드 복합체는 전기천공법을 통하여

BL21(DE3)pLysS 에 형질전환 되었다. 그림 1의 아미노산 서열은 시안화물에 활성을 나타내었다. 각 클론의 DNA는 SDS PAGE를 사용한 파다 발현을 통하여 확인되었다. 그 발현 수준 및 효소활성은 태그, 언태그와 상관없이 차이가 없었다. CHT효소들은 고정 metal affinity chromatography로 정제되고 4°C에서 수개월간 안정하였다.

3.2 pH 활성

정제된 CHT효소의 pH에 따른 활성변화를 그림 2에 나타내었다. pH범위 4~11 가운데 중성에 해당하는 6~7에서 최대활성을 보였다. *N. crassa*의 CHT가 *A. nidulans*에 비해 25% 더 높은 활성을 보였으며, pH 5~9에 걸쳐 광역적 안정성을 나타내었다.

3.3 Kinetic 분석 및 시안생분해

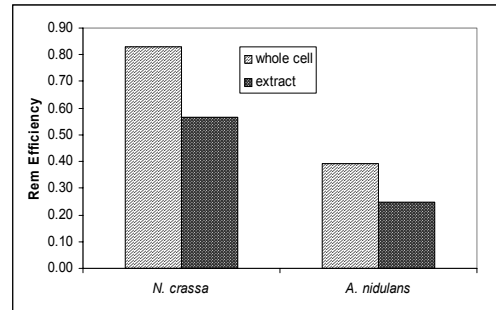
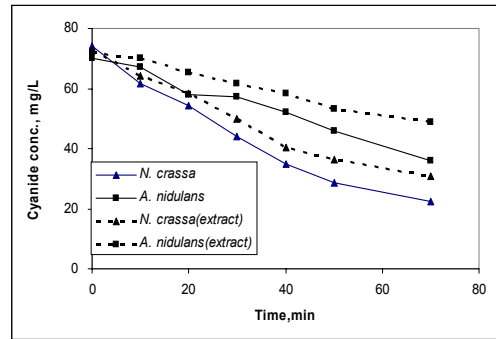
[표 2] 실험에서 결정된 CHT효소의 kinetic parameter

Enzyme Source	K_m (mM)	V_{max} (mMmin ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ min ⁻¹)
<i>N. crassa</i>	16.2	2.7	6.6×10^8	4.07×10^7
<i>A. nidulans</i>	32.2	1.35	3.4×10^8	1.06×10^7

정제된 recombinant CHT효소의 kinetic parameter 값은 표2와 같다. *N. crassa*의 V_{max} 및 k_{cat} 값이 상대적으로 높았고, 반포화계수인 K_m 값은 *A. nidulans*의 약 1/2 정도였다. 기질친화성과 효소활성을 동시에 고려한 k_{cat}/K_m 값에서는 *N. crassa*가 높아 *A. nidulans*보다 더 효율적인 촉매시스템을 가진 것으로 평가되었다.

N. crassa 자연균주와 knockout 변이주를 최소배지에서 배양 후, CHT유도효과를 조사하였다. 각 배양액에 2mM의 KCN을 주입하고 시안의 분해에 따른 암모니아 발생여부를 확인하였다. 배양 중 시안이 존재하면 CHT 유전자의 발현이 유도되었고 반면 knockout 균주에서는 어떤 활성도 발견되지 않았다.

F. lateritium, *F. solani*, *F. oxysporum*, *L. maculans*에서 작용하는 nitrilase와 같이[18-20] 이 두 균주는 시안화물에 의해 효소발현이 유도되고 있었으며 그 CHT효소들은 활성이나 대사조절 측면에서 서로 유사하였다. 이 효소들은 아미노산 서열 분석에 의하면 *N. crassa*의 경우, *G. sorgi*와 *F. Lateritium* 의 서열과 72%~82% 유사하였으며 *A. nidulans*경우에는 60% 유사성을 보였다.



[그림 3] *N. crassa* 와 *A. nidulans*에 의한 KCN의 시간에 따른 분해(위) 및 두 균주의 whole cell과 추출한 경우의 분해효율(아래)

그림 3은 두 변이균주 자체에 의한 시안화물의 시간에 따른 분해를 도기한 것으로 *N. crassa*의 CHT가 *A. nidulans*에 비해 분해속도가 크고 반응속도론적으로 0차 반응에 가까움을 보여준다. 한편 효소를 초음파법으로 추출하여 시험한 경우에는 whole cell에 비해 분해효율이 30%~35% 가량 저하되었으며 이는 추출과정에서 세포의 파괴와 아울러 효소변성이나 효소활성의 소실이 수반되었기 때문으로 사료된다. 즉 초음파로 인한 물리적 효소 감소와 과다발생한 열, 또한 세포의 유출 성분과 효소와의 상호작용 등이 안정한 세포내에서 작용하는 효소보다 통합적으로 효소활성을 감소시키는 것으로 이해할 수 있다.

본 연구결과로 적정한 pH 범위가 넓고 turnover rate와 최대반응속도가 큰 *N. crassa*유래의 CHT가 시안화물의 분해에 유망한 촉매로 사용될 수 있다고 사료된다.

참고문헌

[1] Baxter J., and Cummings S.P., The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination, Ant. Van Leeuwen., Vol.90,

- 1-17, 2006.
- [2] Akcil A., and Mudder T., Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review, *Biotechnol. Lett.*, Vol.25, 445-450, 2003.
- [3] Hardy R.W. and Knight E., ATP dependent reduction of azide and HCN by N₂ fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.139, 69-90, 1967.
- [4] Westley J., Thiosulfate:cyanide sulfurtransferase(rhodanese), *Met. Enzymol.*, Vol.77, 285-291, 1987.
- [5] Kobayashi M., Goda M. and Shimizu S., Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis, *Biochim Biophys. Res. Comm.*, Vol.253, 662-666, 1998.
- [6] Brenner C., Catalysis in the nitrilase superfamily, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol.12, 775-782, 2002.
- [7] Pace H.C. and Brenner, C., The nitrilase superfamily: classification, structure ad function, *Gen. Biol.*, Vol.2, REVIEWS0001, 2001.
- [8] Banerjee A., Sharma R. and Banerjee U.C., The nitrileenzymes current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.60, 33-44, 2002.
- [9] Kobayashi M. and Shimizu S., Versatile nitrilase: Nitrileenzymes, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol.120, 217-224, 1994.
- [11] Watanabe A., Yano K., Ikebukuro K. and Karube I., Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.50, 93-97, 1998.
- [12] Sewell B.T., Meyers P., Berman M, Jandhyala D.M., and Benedik M.J., The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a twofold symmetric, 14spiral, *Structure*, Vol.11, 1413-1422, 2003.
- [13] Jandhyala D.M., Willson R.C., Sewell B.T. and Benedik M.J., Comparison of cyanide degrading nitrilases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.68, 327-335, 2005.
- [14] Studier F.W., Protein production by auto induction in high density shaking cultures, *Prot. Expr. Purif.*, Vol.41,207-214, 2005.
- [15] Vogel H.J., A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N), *Microbiol. Genet. Bull.*, Vol.13, 42-43. 1956.
- [16] Kaminsky S.G.W., Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*, *Fung. Genet. Newslett.*, 25-31, 2001.
- [17] Fisher F.B., and Brown J.S., Colorimetric determination of cyanide in stack gas and waste water, *Anal. Chem.*, Vol.24, 1440-1444, 1952.
- [18] Cluness M.J., Turner P.D., Clements E., Brown D.T. and O'Reilly C., Purification and properties of cyanide hydratase from *Fusarium lateritium* and analysis of the corresponding chl1 gene," *J. Gen. Microbiol.*, Vol.139, 1807-1815, 1993.
- [19] Sexton A.C., and Howlett B.J., Characterisation of a cyanide hydratase gene in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*, *Mol. Gen. Genet.*, Vol.263, 463-470, 2000.
- [20] Barclay M., Tett V.A. and Knowles C.J., Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions, *Enz. Microb. Technol.*, Vol.23, 321-330, 1998.

조 대 철(Daechul Cho)

[정회원]



- 1985년 2월 : 서울대학교 화학공학과(공학사)
- 1996년 2월 : Purdue Univ. (공학박사)
- 2003년 3월 ~ 현재 : 순천대학교 에너지환경공학과 부교수

<관심분야>

바이오계면현상, 생물학적 수질대기환경처리, 토양정화

권 성 현(Sung-Hyun Kwon)

[정회원]



- 1988년 2월 : 부경대학교 환경공학과(공학사)
- 1997년 2월 : Univ. Southern California 환경공학과 (공학박사)
- 2000년 9월 ~ 현재 : 경상대학교 해양환경공학과 부교수

<관심분야>

생물환경공학, 생물학적 토양정화, 생물학적 폐기물 처리