creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

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

dCollection

공학석사 학위논문

PET분해효소의 활성분석방법 개발에 관한 연구

Development of Activity Analysis Method for PET Degradation Enzyme

2022년 8월

서울대학교 대학원

화학생물공학부

박 태 서

PET분해효소의 활성분석방법 개발에 관한 연구

지도교수 김 병 기

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2022년 8월

서울대학교 대학원
화학생물공학부
박 태 서

박태서의 석사 학위논문을 인준함
2022년 8월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

석유화학산업을 기반으로 1950년대부터 다양한 폴리머 물질들이 합성되었다. 그리고 오늘날, 플라스틱 폐기물 처리문제가 전 세계적으로 대두되고 있다. 이 중, 에스터 결합을 기반으로 한 polyethylene terephthalate(PET)는 플라스틱 폐기물에서 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 최근 *Is*PETase를 시작으로 leaf-branch compost cutinase(LCC)와 같은 PET분해효소들이 자연에서 발견되고 있으며, 이를 통해 폐 PET를 처리하는 방법이 주목을 받고 있다. 더 나아가 해당 효소들을 효소공학 측면에서, PET를 terephthalic acid(TPA)까지 분해하는 PET분해-activity를 향상하려는 연구들 또한 각광 받고 있다. 하지만 현재까지 PET분해효소 돌연변이들의 PET분해-activity 비교를 위한, High throughput screening(HTS)은 제대로 보고되지 않은 상태이다.

본 연구에서는 추후 PET분해-activity 비교를 위한 HTS 개발의 기초가 될, *Escherichia coli* 기반의 2가지 활성분석방법 및 스크리닝 시스템을 시도하였다.

첫째, TPA를 형광물질인 2-hydroxyterephthalate(HOTP)로 합성해 in vitro 상에서 검출하고자 하였다. hydroxyl radical이 TPA와 결합하여, HOTP가 되는 원리를 이용한다. Fe(II)-EDTA 펜톤 반응을 이용해, 생물학적 pH조건에서 hydroxyl radical을 생성하였다. LB 배지의 autofluorescence 반응을 제거하기 위해, ethyl acetate(EA)를 사용한 액액 추출법을 적용하였다. TPA 농도와 HOTP 형광세기에 대한 양의 상관관계를 갖는 검량선을 얻을 수 있었다. LOD값은 316.85 uM로 확인되었다. HOTP screening assay의 유효성 확인을 위해, HOTP의 형광값과 HPLC를 통한

TPA 정량을 통해 교차검증 하고자 하였다. 실제 반응조건(70℃)에서, His-tag 정제한 LCC_야생형 및 돌연변이형 효소로 PET 필름을 분해하였다. 비교군 사이에서, HOTP 형광값 세기가 커짐에 따라 HPLC를 통한 TPA 정량값 또한 높게 나옴을 확인하였다. 해당 screening assay를 HOTPEA 스크리닝이라고 명명하였다.

둘째, TPA를 *E.coli* 상에서 활성인자와 green fluorescent protein(GFP)를 이용한 바이오센서를 통해 in vivo로 확인하고자 하였다. 활성인자로는 *E.coli* K12 genome 유래의 hca operon transcriptional activator(HcaR) 단백질을 선정하였다. 깁슨 어셈블리를 통해, 4-hydroxybenzoic acid(4HBA)를 리간드로 사용하는 HcaR_4HBA 바이오센서를 구축하였다. 4HBA에 대한 기질특이성을 TPA로 변화시키고자 HcaR_4HBA의 단백질 3차 결정구조를 homology modeling을 이용해 예측하였고, ligand binding site에 대한 돌연변이 위치는 docking 시뮬레이션을 통해 선정하였다. 반응조건 및 균주 최적화를 통하여, 1 mM 4HBA에 대해서, 대조군 대비 6배 정도의 GFP 형광값의 fold change를 얻었다. 구축한 HcaR_4HBA 바이오센서를 FACS를 통해 분석해보았지만, GFP와 HcaR 발현에 문제가 있음을 확인하였다. 유전공학 측면에서, hcaR 발현을 담당하는 프로모터를 조정해야할 필요성이 요구되었다. 그렇기에 T7 프로모터를 이용하여, HcaR을 다양한 IPTG 농도에서 과발현해보았다. 이 경우 IPTG를 넣어주지 않았을 때, HcaR의 soluble expression이 잘 일어남을 확인하였다. 이를 통해 프로모터의 세기가 약해짐에 따라 그리고 HcaR의 soluble expression의 증가함에 따라 바이오센서의 형광반응에 유리함을 확인하였다. 그렇기에 T7 프로모터보다 약한 세기의 *E.coli* constitutive 프로모터를 이용하여 새롭게 바이오센서를 구축하였다. *E.coli* K12 genome 유래의 프로모터를 사용한 기존의 바이오

센서보다 더 좋은 형광반응을 얻진 못하였지만, constitutive 프로모터 중에선 J23100 프로모터를 사용한 경우에 가장 나은 결과를 얻었다. 또한 프로모터 엔지니어링에 대한 용이성 때문에, 후속연구로는 J23100 프로모터 cassette를 기반으로 다양한 세기의 RBS와의 조합을 통해, 바이오센서의 형광반응을 증가시킬 필요성이 확인되었다.

TPA 검출을 위한 2가지 활성분석방법 및 스크리닝 시스템 개발시도는, 앞으로 PET분해효소의 돌연변이 연구에 도움이 되어 친환경적 PET 처리에 기여할 것으로 사료된다.

주요어 : PET분해효소, terephthalic acid(TPA), ethyl acetate(EA), 2-hydroxyterephthalate(HOTP), hca operon transcriptional activator(HcaR), 바이오센서

학 번 : 2020-27773

목 차

초록 ····· i

목차 ····· iv

표 목차 ····· vi

그림 목차 ····· vii

1. 서론 ····· 1

2. 재료 및 실험방법 ····· 4

2. 1. 시약 및 재료 ····· 4

2. 2. HOTPEA 스크리닝 시스템 ····· 5

2. 2. 1. LCC 유전자 클로닝 및 LCC_돌연변이형 제작 · 5

2. 2. 2. LCC 효소 발현 및 정제조건 ····· 9

2. 2. 3. HOTPEA 스크리닝 진행방법 ····· 9

2. 2. 4. HPLC를 통한 TPA의 정량적 분석 ····· 10

2. 3. HcaR 바이오센서 시스템 ····· 11

2. 3. 1. HcaR 발현방법 ····· 11

3. 결과 및 토의 ····· 13

3. 1. HOTPEA 스크리닝 ····· 13

3. 1. 1. Fe(II)-EDTA 펜톤반응 ····· 13

3. 1. 2. Ethyl acetate 추출의 도입 ····· 16

3. 1. 3. HOTP 형광값과 HPLC 분석을 통한 교차검증 ·· 17

3. 2. HcaR 바이오센서 ····· 22

3. 2. 1. HcaR 단백질 구조분석 ····· 22
3. 2. 2. HcaR_4HBA 바이오센서 구축 ····· 24
3. 2. 3. 바이오센서 반응조건 및 균주 최적화 ····· 28
3. 2. 4. HcaR 발현 문제 조사 ····· 31
3. 2. 5. HcaR-T7 프로모터 시스템 ····· 31
3. 2. 6. HcaR-Constitutive 프로모터 시스템 ····· 36

4. 결론 ····· 40

참고문헌 ····· 43
Abstract ····· 46

표 목 차

[표 2-1] 합성을 의뢰한 LCC codon optimization 시퀀스 7
[표 2-2] LCC_돌연변이형-재조합플라스미드 제작에 사용한 프라이머 8
[표 3-1] Homology modeling에 사용한 PDB 데이터 목록 25

그 림 목 차

[그림 3-1] HOTPEA 스크리닝 시스템의 기본원리 ····· 14
[그림 3-2] 펜톤반응별 화학반응식 ····· 15
[그림 3-3] HOTP를 이용한 스크리닝 시스템 scheme ····· 18
[그림 3-4] HOTP 형광파장대에서의 LB 배지와 DMSO의 형광특성 조사 ····· 19
[그림 3-5] HOTPEA 스크리닝 시스템의 성능평가 ····· 20
[그림 3-6] HOTPEA 스크리닝 시스템의 교차검증 ····· 21
[그림 3-7] HcaR 바이오센서를 이용한 스크리닝 시스템 scheme ····· 23
[그림 3-8] 리간드별 HcaR_4HBA와의 docking 시뮬레이션 ····· 26
[그림 3-9] HcaR_TPA 돌연변이 제작을 위한, HcaR_4HBA ligand binding site 내의 핵심잔기 조사 ····· 27
[그림 3-10] #0212 cassette의 구성 ····· 29
[그림 3-11] #0212 cassette 기반의 기질별 용량-반응곡선 ····· 30
[그림 3-12] #0212 cassette의 최적 반응조건 및 균주 조사 ····· 32
[그림 3-13] #0212 cassette의 기질별 FACS를 통한 형광분석 ····· 33
[그림 3-14] HcaR 발현문제 해결을 위한 벡터 시스템 scheme ····· 34
[그림 3-15] #0251 cassette의 형광반응 및 HcaR 발현

조사 ····· 37
[그림 3-16] HcaR 발현벡터_#0253 ····· 38
[그림 3-17] constitutive 프로모터 종류별 4HBA에 대한
GFP 형광값 fold change ····· 39

1. 서론

석유화학산업은 인류에게 플라스틱이라는 신소재를 안겨주었다. 그리고 현재, 플라스틱은 인류 문명을 구성하는 핵심 물질로 거듭났다. 특히 전체 플라스틱 생산량 중 가장 많은 26.6%을 차지하는 polyethylene terephthalate(PET)는 전 세계에서 2018년 기준 7930 만톤이 생산되고 있다. 엄청난 PET 생산량에 상응하여 이에 대한 폐 PET 처리문제 또한 지구환경에 심각한 위협으로 다가오게 되었다. [1.2.6]

일반적으로, PET 폐기물을 처리하는 방법은 매립, 소각이나 화학적 방식을 통한 재활용이 대표적이다. 매립, 소각을 하는 방법은, 매립지나 소각지 주변의 환경오염과 풍화과정에 의한 미세플라스틱 문제가 발생하게 된다. 이러한 미세플라스틱은 물의 순환과정을 따라, 그리고 생태계의 먹이사슬을 따라, 다시 인간에게 되돌아온다. [1.6] 화학적 방식의 재활용은 현재 가장 대표적인 PET 재활용 방식으로, 고온고압의 반응조건에서 메탄올이나 황산 같은 유독한 유기용매를 대량으로 이용하게 된다. 이는 플라스틱의 재활용이라는 명목 아래, 추가적인 자원의 낭비와 각종 폐유기용매로 인한 환경피해를 야기한다. [5]

그러던 와중, 2016년, *Ideonella sakaiensis*의 *Is*PETase가 발견되었다. [11] 플라스틱이 본격적으로 대량생산된 1950년대로부터 70년이 지난 후, synthetic polymer를 탄소원으로 이용하여 살아가는 균주의 첫 발견임과 동시에, PET의 에스터 결합을 상온에서도 효율적으로 가수분해하는 *Is*PETase라는 효소의 발견이었다. 지구상에 플라스틱을 분해하는 미생물과 효소가 출현한 것을 계기로, 자연에서 아직 발견하지 못한 PET분해효소를 찾고자 하는 연구들이 시작되었다. metagenomic study를 통해 찾아낸 leaf-branch compost cutinase(LCC)는 여러 PET분해효소들 중에서 가장 우수한 열적 안정성과 고온에서의 PET분해능력을 보유하고 있다. [13] 그렇기에 상온에서 PET을 분해하기 적합한 *Is*PETase와 고온

에서 PET을 분해하기 적합한 LCC 효소에 대하여, 각종 특성향상을 위한 효소공학적 측면의 연구들이 이어졌다. [13.14] 또한 미생물과 효소를 이용한 친환경적 PET분해는, 최종분해산물인 terephthalic acid(TPA)를 다시 PET 제조에 사용하는 closed-loop biorecycling과, gallic acid 또는 muconic acid 등으로 전환하는 open-loop upcycling이라는 PET 재활용까지 이어질 수 있는 공정상의 장점 또한 존재한다. [1.3.4] 하지만 비교적 최신의 연구들이기에, 아직 PET분해효소_돌연변이형들간의 PET분해-activity를 비교하는 screening assay 또한 연구가 미비했다. 주로 분해반응 전후의 PET필름의 무게를 비교하는 방법과, PET이 분해되어서 생긴 TPA를 NaOH를 통한 적정을 통해서 PET분해능력을 평가하였다. 상기한 방법들은 Low throughput이기에, High throughput screening(HTS) 시스템 개발에 대한 필요성이 커져갔다. 이에 발 맞춰, fluorescein dibenzoate을 이용한 Fluorescence-activated droplet sorting 스크리닝, *Acinetobacter baylyi* 에서 구축한 TphR 바이오센서, *E.coli* 에서 구축한 XylS 바이오센서 등이 개발되었다. [19.20.22]

하지만 fluorescein dibenzoate 방식은 실제 기질인 PET에 비해 분해가 쉬운 surrogate substrate이었다. 그렇기에 이를 통해 찾은 PET분해효소들의 PET분해-activity 또한 낮았다. TphR 바이오센서의 경우, 일반적으로 사용하는 *E.coli* 에서 구축되지 않았다는 점의 낮은 범용성과 바이오센서 구축을 위해 TphR 활성인자를 포함해 *Comamonas* sp. E6 유래의 많은 heterologous gene들이 사용되어야 한다는 단점이 있다. 마지막으로 XylS 바이오센서의 경우는 TPA에 대한 낮은 GFP 형광 fold change와 낮은 sensitivity를 가졌기에, 실제 적용에 어려움이 많다고 판단하였다.

그렇기에 본 연구에서는 추후 PET분해-activity 비교를 위한 HTS 개발의 기초가 될, *Escherichia coli* 기반의 2가지 활성분석방법 및 스크리닝 시스템을 개발하고자 하였다. PET의 최종분해산물인 TPA의 검출을 주요 목적으로 하였다. 또한 실험에 사용할 LCC 효소가 signal peptide 없이도 세포막 밖으로 분비가 되는 특성에 착안한 방법을 개발하고자 하

였다. [12] 스크리닝 시스템 개발의 첫 번째 전략은, in vitro 상에서 TPA의 양을 검출하고자 하였다. TPA와 hydroxyl radical이 결합하여 생성된 2-hydroxyterephthalate(HOTP)가 특정 파장대에서 형광특성을 나타낸다는 것을 주요 원리로 이용하였다. [7.8.9.10] 해당 스크리닝 시스템 또는 활성분석방법은 화학적인 원리와 96-well plate를 기반으로 하였기에, 범용성을 장점으로 가진다. 두 번째 전략은, in vivo 상의 검출을 위해 *E.coli* 기반의 바이오센서를 구축하고자 하였다. *E.coli* genome 유래의 hca operon transcriptional activator(HcaR)_야생형은 cinnamic acid에 반응하여 특정 프로모터의 세기를 늘리는 것으로 보고되어있었다. [18.21] 그러나 cinnamic acid뿐만이 아니라 다른 ligand에 대해서도 반응할 수 있게 기질특이성을 변화시킨 논문이 발표된 것을 확인하였다. [17] 비록 TPA를 위한 HcaR_돌연변이형은 없었지만, 이러한 선행연구를 기반으로 TPA에도 반응하는 HcaR 바이오센서를 ligand binding site에 대한 protein 엔지니어링을 통해 구축하고자 하였다. 특히 전사인자 중 활성인자는 억제인자와 달리, 발현되는 균주의 RNA 중합효소와의 interaction 가능여부 및 정도 또한 중요하다. 이러한 측면에서 HcaR은 *E.coli* genome 유래의 활성인자이므로 heterologous 활성인자들보다 유리한 점을 가지고 있다. 그렇기에 이전에 개발된 바이오센서들보다 더 높은 형광반응을 나타낼 것이라 판단하였고, HcaR 활성인자를 이용하여 본 연구를 수행하게 되었다.

2. 재료 및 실험방법

2. 1. 시약 및 재료

유전자 조작 및 클로닝에 PCR tube(Axygen, USA), dNTP(Agilent, USA), Herculase II fusion DNA polymerase(Agilent, USA), 5x Herculase II reaction buffer(Agilent, USA), EB buffer(Geneall, Korea), 2x GC buffer 1(Takara, Japan), 10x FastDigest buffer(Thermo fisher, USA), FD DpnI(Thermo fisher, USA), FD NcoI(Thermo fisher, USA), FD XhoI(Thermo fisher, USA), T4 DNA ligase(Thermo fisher, USA), T4 polynucleotide kinase(Takara, Japan), 2x Rapid ligation buffer(Promega, USA), In-fusion kit(Takara, Japan)를 사용하였다. PCR 산물 및 플라스미드 정제에 Prep column(Geneall, Korea)를 사용하였다. 세포 배양 및 발현을 위해 LB broth(BD Difco, USA), LB agar broth(BD Difco, USA), Kanamycin (Duchefa biochemie, Netherlands), Chloramphenicol(Sigma, USA), Glycerol(Duksan, Korea), IPTG(Biosesang, Korea), Petri dish(SPL, Korea)를 사용하였다. 효소 정제를 위해 Imidazole (Sigma, USA), 15mL tube(Falcon, USA), 50mL tube(Falcon, USA), Ni-NTA agarose beads(Qiagen, Germany), 10K centrifugal filters(Millipore, USA), 96-well flat bottom (Falcon, USA)를 사용하였다. HOTP 스크리닝을 위해 Terephthalic acid (Acros organics, USA), Bis(2-Hydroxyethyl) terephthalate (Aldrich, USA), PET(Goodfellow,UK), Ethyl acetate (Junsei, Japan), EDTA(Sigma, USA), $FeSO_4$(Junsei, Japan), HCl(Duksan, Korea), NaOH(Junsei, Japan), 2mL microtube(Axygen, USA), 고속진공 원심농축기(Ecospin314, Biotron, Australia), 형광분광광도계(LS-55, Perkin elmer, USA), Na_2HPO_4 (Duksan, Korea), NaH_2PO_4 (Duksan, Korea)를 사용하

였다. HPLC 분석을 위해 Vial inserts(Restek, USA), HPLC acetonitrile(Duksan, Korea), HPLC water(Duksan, Korea), HPLC MeOH(Duksan, Korea), Benzoic acid(Sigma, USA), HPLC(Autochro-3000, Young Lin, Korea), C18 column(150x4.6mm, 5um particle size, Phenomenex, USA)을 사용하였다. HcaR 바이오센서를 위해 4-hydroxybenzoic acid(Wako, Japan), DMSO(Emsure, USA), 다기능 마이크로 플레이트 리더기(Spark10M, Tecan, Swiss), Corning Black 96-well plate with clear bottom(Sigma, USA)를 사용하였다. FACS 분석을 위해 FACS(S3e cell sorter, Bio-rad, USA)를 사용하였으며, 단백질 구조분석을 위해 Homology modeling은 Modeller 9.24 프로그램을, Docking 시뮬레이션은 Autodock vina 프로그램을 사용하였다.

2. 2. HOTPEA 스크리닝 시스템

2. 2. 1. LCC 유전자 클로닝 및 LCC_돌연변이형 제작

pET28a+ 벡터를 이용하여, leaf-branch compost cutinase(LCC) 효소 유전자를 발현하고자 하였다. LCC_야생형 유전자는 LCC 관련논문에 보고된 시퀀스를 참고하여 L&C BIO 사에 합성을 의뢰하였다 (표 2-1). [13] 합성의뢰 시에 codon optimization과 LCC 유전자 N-터미널에 NcoI, C-터미널에 XhoI 제한효소 절단부위를 포함하였다. pET28a+ 벡터는 600 ng, LCC 유전자는 300 ng을 준비하고, 각각 NcoI, XhoI 제한효소를 0.5 uL씩, 그리고 최종 반응용액 부피에 비례하는 10x FastDigest buffer를 넣어서 1시간 동안 37℃에서 반응을 진행하였다. 1시간 뒤에, PCR prep을 통해 정제하였다. 제한효소 처리된 pET28a+벡터와 LCC 유전자의 비율이 1:5가 되게 용액을 섞어주었고, T4 DNA ligase 0.5 uL와 최종 반응부피를 고려하여 2x Rapid ligation buffer를 넣어주고 1시간 동안 ligation을 진행하였다. *E.coli* DH5α에 형질전환을

하여, 50 ug/mL kanamycin을 포함한 고체 LB에서 37℃, 16시간 동안 배양한 후 콜로니를 얻었다. pET28a+벡터에 LCC 유전자의 삽입 유무를 판별하기 위해 콜로니 PCR을 수행한 후, DNA전기영동을 진행하였다 DNA전기영동 상에서 유전자삽입이 확인된 콜로니는 50 ug/mL kanamycin을 포함한 3 mL LB broth 배지에서 37℃에 접종하였다. 다음 날 플라스미드 prep을 통해 각각 콜로니에 대한 플라스미드를 얻었으며, DNA 시퀀싱을 통해 구축한 재조합 플라스미드의 시퀀스 이상 여부를 확인하였다. 추후 LCC 유전자의 과발현을 위해서, 정상적으로 ligation된 재조합플라스미드는 *E.coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다.

LCC_야생형-재조합플라스미드를 기반으로, LCC_돌연변이형-재조합 플라스미드를 제작하였다. 사용한 프라이머는 (표 2-2)에 나타내었다. LCC_야생형부터 LCC_ICCM(F243I, D238C, S283C, N246M)까지 제작하기 위하여, 다음의 순서대로 LCC_돌연변이형을 제작하였다. [13] 첫 번째로 LCC_D238C 제작, 두 번째로 LCC_CC(D238C, S283C) 제작, 세 번째로 LCC_ICC(F243I, D238C, S283C) 제작, 마지막으로 LCC_ICCM(F243I, D238C, S283C, N246M)을 제작하였다. PCR 반응용액은 30 uL의 부피 기준으로, 5x HercII buffer 6 uL, 프라이머-Forward 0.5 uL, 프라이머-Reverse 0.5 uL, template 벡터 100 ng, [dNTP]=250 uM, Herculase II fusion DNA polymerase 0.5 uL를 넣은 후, EB buffer로 나머지를 채워주었다. PCR 조건은 preheat - 95℃, 5분; denaturation - 95℃, 30초; annealing - 62 or 64 or 66℃, 30초; extension - 72℃, 3분 30초; post cycling extension - 72℃, 6분이며 denaturation부터 extension까지의 단계를 25회 반복 수행하였다. PCR 산물의 일부는 DNA전기영동을 실시하여, 재조합플라스미드의 크기를 확인하였다. 확인이 완료된 PCR 산물은 template 벡터를 제거하기 위하여, DpnI 효소로 37℃, 1시간동안 처리하였다. 그 후 PCR prep을 통해 정제하였으며, *E.coli* DH5α에 형질전환하였다.

AAACCATGGGCAGCAACCCGTACCAGCGTGGCCCGAATCCGACCCGCAGC
GCACTGACCGCAGATGGCCCGTTTAGCGTGGCAACCTACACCGTCTCACGC
CTGTCAGTCTCGGGTTTTGGCGGTGGCGTGATTTATTACCCGACCGGCACGT
CTCTGACGTTCGGTGGCATCGCGATGAGTCCGGGTTATACCGCAGATGCTA
GCTCTCTGGCATGGCTGGGTCGTCGCCTGGCTTCTCATGGCTTTGTGGTTCT
GGTGATTAACACGAATTCACGTTTCGATTATCCGGACAGCCGCGCCTCTCA
GCTGAGTGCCGCCCTGAACTACCTGCGTACCAGTTCCCCGAGCGCCGTTCG
CGCACGTCTGGATGCAAATCGTCTGGCGGTTGCCGGTCATTCTATGGGTGG
CGGTGGCACCCTGCGTATTGCAGAACAAAACCCGAGCCTGAAAGCGGCTG
TCCCGCTGACCCCGTGGCACACCGATAAAACGTTTAATACCAGTGTCCCGG
TGCTGATTGTTGGCGCAGAAGCTGACACCGTGGCGCCGGTTTCGCAGCATG
CCATCCCGTTTTATCAAAACCTGCCGAGCACCACGCCGAAAGTTTACGTCG
AACTGGATAACGCATCGCACTTCGCTCCGAATAGCAACAATGCGGCCATTT
CCGTTTATACGATCTCATGGATGAAACTGTGGGTCGATAATGACACCCGTTA
CCGCCAGTTCCTGTGTAATGTGAACGACCCGGCTCTGTCCGACTTCCGCAC
CAATAATCGCCACTGCCAACTCGAGAA

표 2-1. 합성을 의뢰한 LCC codon optimization 시퀀스(밑줄은 제한효소 인식서열)

Primer name	Primer sequence (5′→3′)
D238C-Forward	5′-GTTTACGTCGAACTGTGCAACGCATCGCACTTCGC-3′
D238C-Reverse	5′-CAGTTCGACGTAAACTTTCGGCG-3′
S283C-Forward	5′-AACGACCCGGCTCTGTGTGACTTCCGCACCAATAATC-3′
S283C-Reverse	5′-GAGCCGGGTCGTTCACATTACAC-3′
F243I-Forward	5′-TGTGCAACGCATCGCACATCGCTCCGAATAGCAAC-3′
F243I-Reverse	5′-CGATGCGTTGCACAGTTCGACGTAAAC-3′
N246M-Forward	5′-GCAACAATGCGGCCATTTCCGTTTATAC-3′
N246M-Reverse	5′-TGGCCGCATTGTTGCTCATCGGAGCGATGTGCGATG-3′

표 2-2. LCC_돌연변이형-재조합플라스미드 제작에 사용한 프라이머

2. 2. 2. LCC 효소 발현 및 정제조건

LCC 유전자가 삽입된 pET28a+ 벡터를 가지고 있는 *E.coli* BL21(DE3)를, 50 ug/mL kanamycin을 포함한 3 mL LB broth 배지에서 37℃, 18시간 배양하였다. 스케일업을 위해서 500 uL 전단계 배양액을, 50 ug/mL kanamycin을 포함한 새로운 50 mL LB broth 배지에 접종한다. 37℃에서 배양을 시키며, 600 nm에서 OD값이 0.6이 되는 시점에, IPTG 100 uM이 되도록 넣어주었다. 그러고 나서 37℃에서 18시간 동안 과발현을 진행하였다. 그 후에, 배양된 세포를 원심분리과정(4000 rpm, 4℃, 10분)을 거치고, 20mM sodium phosphate 완충용액(pH 8, 300 mM NaCl)으로 세포 세척과정을 진행하였다. 세척과정 후, 상기한 20 mM sodium phosphate 완충용액을 5 mL가 되게 넣어준 상태에서, 초음파 파쇄기(Vibra&cell, USA)를 이용해 세포 파쇄를 하였다. 세포 파쇄액을 원심분리(16000 rpm, 4℃, 30분)하여, 세포추출물이 들어있는 상등액을 얻었다. 해당 상등액을 Ni-NTA agarose beads를 이용해 100 mM imidazole 상에서 단백질을 용출시켰다. 용출액에 대해 ultra-filtration과 buffer exchange를 하였다. 최종적으로 얻은 LCC 효소는 bradford protein assay를 이용하여 단백질농도를 측정하였다.

2. 2. 3. HOTPEA 스크리닝 진행방법

100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8.5)에 정제된 LCC 효소를 원하는 농도만큼이 되게 첨가하여 2 mL tube에 최종부피가 1.8 mL 부피가 되게 만든 후, PET필름(반지름 0.35 cm 원) 조각 1개를 넣어준다.

만약 정제된 효소가 아니라 LB broth 배지에 분비된 LCC 효소를 바로 이용하는 방법의 경우는 아래의 방식을 따른다. LCC 유전자를 가진 *E.coli* BL21(DE3)를 50 ug/mL kanamycin을 포함한 3 mL LB broth 배지에서 37℃, 18시간 접종하여 배양한다. 그 후, 30 uL 전단계 배양액을

50 ug/mL kanamycin을 포함한 새로운 3 mL LB broth 배지에 접종함과 동시에 IPTG 100 uM이 되도록 넣어준다. 37℃에서 18시간 동안 과발현을 진행한 후, 원심분리과정(4000 rpm, 37℃, 10분)을 거친다. 해당 용액의 상등액 1.8 mL에 PET필름 조각 1개를 2 mL tube에 넣어준다.

PET필름(반지름 0.35 cm 원)을 넣어준 후, 70℃ 항온수조에서 24~48시간 동안 LCC 효소에 의한 PET분해반응을 진행하였다. 반응을 진행시키고 나서, 10~40배정도 반응용액을 희석한다. 희석시킨 반응용액 500 uL를 새로운 2 mL tube에 넣어주고, 1 M HCl를 50 uL 첨가하여, TPA의 석출을 유도한다. 해당 tube에 ethyl acetate를 1 mL 넣어준 후, vortexing을 30초간 진행한다. 기존에 있던 TPA 가루들이 ethyl acetate 쪽으로 완전히 녹아 이동한 것을 확인한다. 5분 후 다시 반응용액과 ethyl acetate의 상분리가 일어난 것을 확인하면, ethyl acetate를 10 %만큼 추출하고 고속진공 원심농축기를 이용하여 진공상태에서 5분 동안 용매를 제거한다. ethyl acetate를 통해 추출된 TPA 가루들을, 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8.5) 800 uL에 vortexing 하여 녹여준다. 5 mM EDTA와 5 mM $FeSO_4$를 순서대로 100 uL씩 첨가한다. 10분 후, 형광분광광도계를 통해 exicitation wavelegth(λex) 328 nm, emission wavelegth(λem) 421 nm, slit width 5 nm, integration time 1초 조건에서 HOTP의 형광값을 측정한다.

2. 2. 4. HPLC를 통한 TPA의 정량적 분석

MeOH에 benzoic acid 농도가 1mM이 되게 하여 internal standard로 이용한다. 1 mM benzoic acid 용액과 TPA 시약을 이용하여 검량선 제작을 위한 검량샘플을 만들어준다.

LCC 효소와 PET필름을 반응을 진행하고, ethyl acetate를 통해 추출한 TPA가루를 1 mM benzoic acid 용액에 녹여 테스트 샘플을 만들어준다. 검량 및 테스트 샘플을 HPLC을 통하여 배수량 30 uL, 주입량 10 uL, 흡광도 파장 260 nm 으로, 용액조성 및 펌프는 아래에 기술한 조건

에 따라 설정하여 진행하였다. 용리액 A - HPLC acetonitrile; 용리액 B - HPLC water with 0.1 % TFA; 0.500 ml/min; 0 min, A 12%; 2 min A 16%; 8-20 min A 20%; 21-30 min A 12%; TPA의 retention time은 11.59 분, benzoic acid는 26.5 분 근처이다.

2. 3. HcaR 바이오센서 시스템

2. 3. 1. HcaR 발현방법

HcaR 유전자가 pACYCDuet-1(pACYC) 벡터에 삽입되어있는 경우 20 ug/mL chloramphenicol를, pET28a+ 벡터에 삽입된 경우에는 50 ug/mL kanamycin을 포함한 3 mL LB broth 배지에서, *E.coli* DH5α 또는 BL21(DE3)를 37℃, 18시간 배양한다. 이곳을 분기점으로 SDS-PAGE 분석을 위한 발현인지, HcaR 바이오센서 스크리닝을 위한 발현인지에 따라 아래의 방법을 선택하여 진행한다.

SDS-PAGE 분석을 위한 HcaR의 발현일 경우, 다음의 방법을 따른다. 스케일업을 위해서 500 uL 전단계 배양액을, 이전과 동일하게 20 ug/mL chloramphenicol 또는 50 ug/mL kanamycin을 포함한 새로운 50 mL LB broth 배지에 접종한다. 벡터의 종류와 상관없이 constitutive 프로모터를 이용한 HcaR의 발현일 경우, 37℃, 18시간 배양을 한다. 그러나 T7 프로모터를 이용한 HcaR의 발현일 경우, 600 nm에서 OD값이 0.6이 되는 시점에, IPTG 100 uM이 되도록 넣어주었다. 그리고 나서 37℃에서 18시간 동안 과발현을 진행하였다. 그 후에, 배양된 세포를 원심분리과정(4000 rpm, 4℃, 10분)을 거치고, 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8, 300 mM NaCl)으로 세포 세척과정을 진행하였다. [16] 세척과정 후, 상기한 20 mM sodium phosphate 완충용액을 5 mL가 되게 넣어준 상태에서, 초음파 파쇄기(Vibra&cell, USA)를 이용해 세포 파쇄

를 하였다. 세포 파쇄액을 원심분리(16000 rpm, 4℃, 30분)하여, 세포추출물이 들어있는 상등액을 얻었다. 세포파쇄액과 원심분리 후의 상등액 각각을 추후 HcaR 발현량 확인을 위한 SDS-PAGE 분석에 이용하였다.

HcaR 바이오센서 스크리닝을 위한 HcaR의 발현일 경우 다음의 과정을 따른다. 전단계 배양액을 1/100 비율로, 1 %(v/v) glycerol을 포함한 새로운 3 mL LB broth 배지에 접종한다. 1시간이 지난 후, constitutive 프로모터를 이용한 HcaR의 발현일 경우, DMSO에 고농도로 녹아있는 TPA 또는 4HBA를 원하는 농도만큼 첨가해준다. T7 프로모터를 이용한 HcaR의 발현일 경우, 위의 경우처럼 TPA 또는 4HBA를 원하는 농도만큼 첨가해줌과 동시에 IPTG 또한 100 uM가 되게 넣어준다. 37℃에서 5시간 30분 동안 배양을 진행한다. 이곳을 분기점으로 다기능 마이크로 플레이트 리더기를 통한 분석인지, FACS를 통한 분석인지에 따라 아래의 방법을 선택하여 진행한다.

다기능 마이크로 플레이트 리더기를 통한 분석일 경우, 반응을 진행한 배양액 500 uL를 채취하여 원심분리과정(4000 rpm, 4℃, 10분)을 거친다. pH 7.4의 PBS 완충용액으로 세포 세척을 한다. 세척과정 후에 최종용액 부피가 500 uL이 되게 pH 7.4의 PBS 완충용액을 넣어서 세포를 풀어준다. 세포세척과정이 끝난 용액을 200 uL 채취하여 corning black 96-well plate에 옮겨준다. blank는 pH 7.4의 PBS 완충용액 200 uL로 한다. 준비가 끝난 플레이트는 다기능 마이크로 플레이트 리더기를 통해 bandwidth 20 nm으로 exicitation wavelegth(λex) 485 nm, emission wavelegth(λem) 535 nm에서 GFP 형광값을, 600 nm에서 OD값을 측정하였다.

FACS를 통한 분석일 경우, 반응을 진행한 배양액 1 mL를 채취하여 원심분리과정(12000 rpm, 4℃, 5분)을 거친다. pH 7.4의 PBS 완충용액으로 세포 세척을 한다. 세포세척 과정을 3번 진행한다. 세척과정 후에 최종용액 부피는 1 mL이 되게 pH 7.4의 PBS 완충용액을 넣어서 세포를 풀어준다. 최종 cell concentration이 10^7 cells/mL이하가 되게 serial dilution을 진행한다. 해당 샘플을 FACS를 통해 분석을 진행한다.

3. 결과 및 토의

3. 1. HOTPEA 스크리닝

TPA는 UV 파장대에서 특별한 형광특성을 나타내지 않는다. 그러나 2-hydroxyterephthalate(HOTP)는 TPA와 hydroxyl radical이 결합하여 합성된 물질로, exicitation wavelegth(λex) 328 nm, emission wavelegth(λem) 421 nm에서 형광특성을 감지할 수 있다. 또한 분자구조의 대칭성 덕분에, 언제나 한가지 구조의 합성물만이 생성된다. TPA의 경우와 달리, 나머지 PET분해산물인 bis(2-hydroxyethyl) terephthalate(BHET)와 mono(2-hydroxyethyl) terephthalate(MHET)는 hydroxyl radical을 반응시켜도 형광특성을 나타내는 물질이 생성되지 않는다 (그림 3-1). [7.8.9.10] 이러한 원리를 이용하여, PET분해효소가 PET을 분해하여 생성한 TPA만을 감지하는 in vitro 스크리닝 assay를 구축하고자 하였다. 하지만 현재까지 HOTP를 이용한 high throughput screening(HTS) assay에 대한 연구가 미비하기에, 96-well plate에 적용 가능한 방법을 고안하고자 하였다.

3. 1. 1. Fe(II)-EDTA 펜톤반응

HOTP를 합성하는데 필수적인 hydroxyl radical을 공급하는 방식에 대한 선정이 필요하였고 이를 생성하는 대표적인 반응인 펜톤반응에 집중하였다. 일반적인 펜톤반응은 산성조건 및 과산화수소의 첨가를 한 상태에서 hydroxyl radical을 생성해낼 수 있다. 하지만 Fe(II)-EDTA 펜톤반응은 산성 조건이 아닌, 중성 및 염기성 조건에서 이를 생성해낼 수 있다. 또한 과산화수소의 첨가 또한 필요하지 않다 (그림 3-2). 이처럼

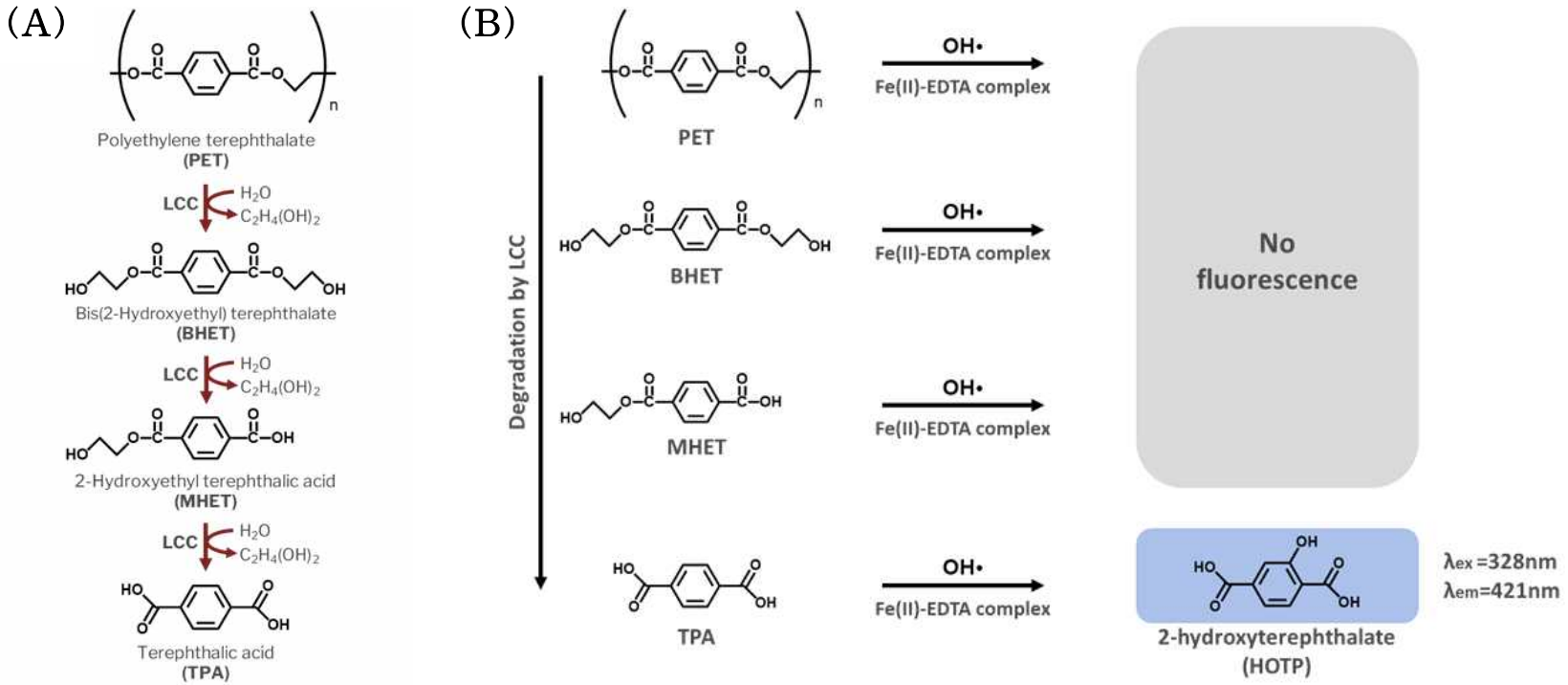


그림 3-1. HOTPEA 스크리닝 시스템의 기본원리. (A) LCC 및 PET분해효소의 PET분해과정, (B) PET 분해산물별 hydroxyl radical과의 반응결과

(A)

$$Fe(II) + H_2O_2 \leftrightarrow Fe(III) + OH^- + OH\cdot$$

$$Fe(III) + H_2O_2 \leftrightarrow Fe(II) + OOH\cdot + H^+$$

(B)

$$Fe(II)\text{-}EDTA + O_2 \leftrightarrow Fe(III)\text{-}EDTA + O_2\cdot^-$$

$$2O_2\cdot^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$Fe(II)\text{-}EDTA + H_2O_2 \rightarrow Fe(III)\text{-}EDTA + OH^- + OH\cdot$$

그림 3-2. 펜톤반응별 화학반응식. (A) 일반적인 펜톤반응, (B) Fe(II)-EDTA 펜톤반응

생물학적 pH조건 및 과산화수소의 첨가가 필요하지 않다는 점은, 배지 및 반응용액 조건 설정에 유리함이 있기에 Fe(II)-EDTA 펜톤반응을 적용하기로 하였다.

3. 1. 2. Ethyl acetate 추출의 도입

(그림 3-3A)와 같은 스크리닝 방법을 고안하였다. *E.coli*에서 분비된 PET분해효소가 LB 배지 상에서 직접 PET을 분해한다. 다른 정제과정 없이, Fe(II)-EDTA 펜톤반응을 통해 LB 배지 상에서 바로 HOTP를 합성하고자 하였다. 그 후, HOTP를 포함한 LB 배지를 λex=328 nm, λem=421 nm 파장에서 HOTP의 형광을 확인하고자 하였다. 그렇기에 형광측정 시에 존재하는 다양한 물질들에 대해 해당 파장에서 형광반응 유무를 확인하는 과정이 필요하였다 (그림 3-4). LB 배지는 해당 파장에서 HOTP 없이도 강한 형광반응을 나타내는 것으로 나타내었다. 또한 DMSO는 강력한 hydroxyl radical scavenger로서, HOTP 합성에 필요한 hydroxyl radical을 제거해서 HOTP 형광값을 없애는 것으로 확인되었다. 특히 세포배양에 필수적인 LB 배지의, autofluorescence 반응은 HOTP 형광측정에 큰 문제였기에 LB 배지를 최종 반응용액에서 제거할 필요성을 확인하였다.

그렇기에 ethyl acetate(EA)를 이용한 액액추출 원리를 이용한 새로운 스크리닝 방법을 고안하였고 HOTPEA 스크리닝이라고 명명하였다 (그림 3-3BC). 하지만 LB 배지가 가진 중성 pH 조건에서는 대부분의 TPA가 deprotonation 되어있는 상태로 존재한다. 이러한 점이 LB 배지와 ethyl acetate 사이의 TPA에 대한 낮은 분배계수를 만들어, TPA 추출효율이 낮은 문제점을 확인하였다. 이를 해결하기 위해 ethyl acetate의 액액추출 과정 중에, HCl을 첨가하여 LB 배지를 산성화시킴으로써 TPA의 protonation 유도하고, 분배계수를 증가시켜 추출효율을 증가시켰다. ethyl acetate를 이용한 TPA의 추출과정 이후, 고속진공 원심농축기에서 용매인 ethyl acetate를 제거하여 TPA 분말을 얻는다. 이러한

TPA 분말에 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 8.5)과 $FeSO_4$, EDTA를 첨가해 HOTP 합성을 유도한다.

ethyl acetate 추출 방식을 도입한 HOTPEA 스크리닝 시스템을 시험해보기 위해, LB 배지에 여러 농도의 TPA를 첨가하여, HOTP 형광값을 측정해보았다. 반응용액 속 TPA 농도와 HOTP 형광값 사이의 양의 상관관계가 형성됨을 확인하였다 (그림 3-5A). 또한 HOTPEA 스크리닝 시스템의 limit of detection(LOD) 값은 316.85 uM로 계산되었다 (그림 3-5BC).

3. 1. 3. HOTP 형광값과 HPLC 분석을 통한 교차검증

동일한 샘플에 대해 HOTP 형광측정과 HPLC 분석을 진행하여, HOTPEA 스크리닝 시스템에 대한 유효성을 검증하고자 하였다. LCC_야생형과 문헌에 보고된 LCC_돌연변이형 효소 중, LCC_CC(D238C, S283C), LCC_ICCM(F243I, D238C, S283C, N246M)까지 총 3종류의 His-tag 정제를 진행한 LCC 효소를 사용하였다. 정제된 효소 600 nM를 sodium phosphate 완충용액 상에서 PET 필름과 각각 70℃, 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 ethyl acetate를 통해 TPA를 추출한다. 그리고 동일한 부피의 ethyl acetate가 담기게 2개의 샘플로 나누고, 각각의 샘플에 대해

1. hydroxyl radical과 반응시켜 HOTP를 합성한 후, 형광을 측정
2. MeOH에 녹인 후 TPA의 양을 HPLC를 통해 측정

하는 2가지 방식을 진행하였다.

HOTP 형광세기의 순서와 HPLC 데이터를 통한 TPA의 검출량 순서가 일치함을 확인하였다 (그림 3-6).

이를 통해, HOTP 형광을 측정하는 방식으로 다양한 LCC 효소들간의 PET분해-activity를 비교할 수 있음을 확인하였다.

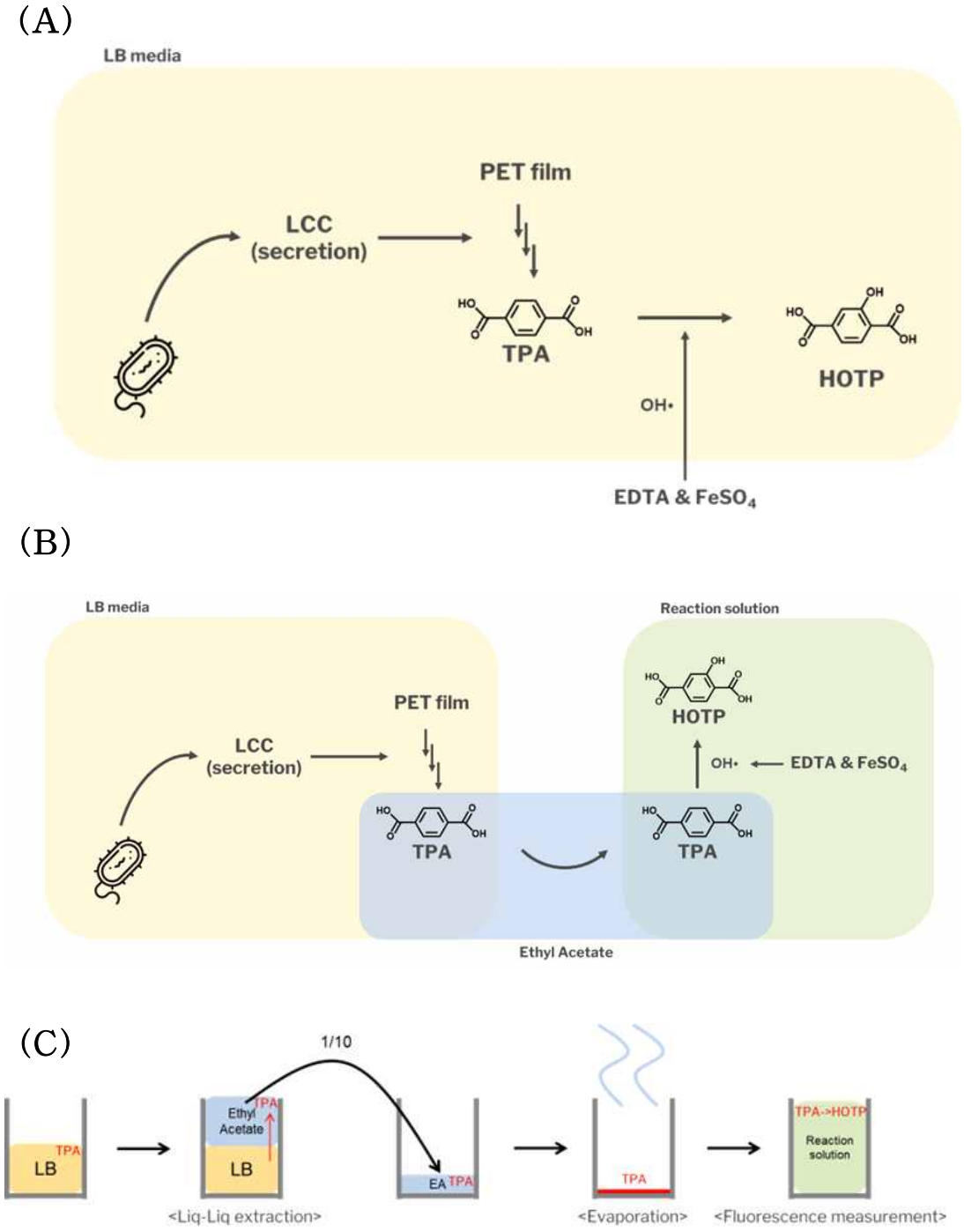


그림 3-3. HOTP를 이용한 스크리닝 시스템 scheme. (A) 초기 디자인, (B) HOTPEA 스크리닝 시스템, (C) HOTPEA 스크리닝 process

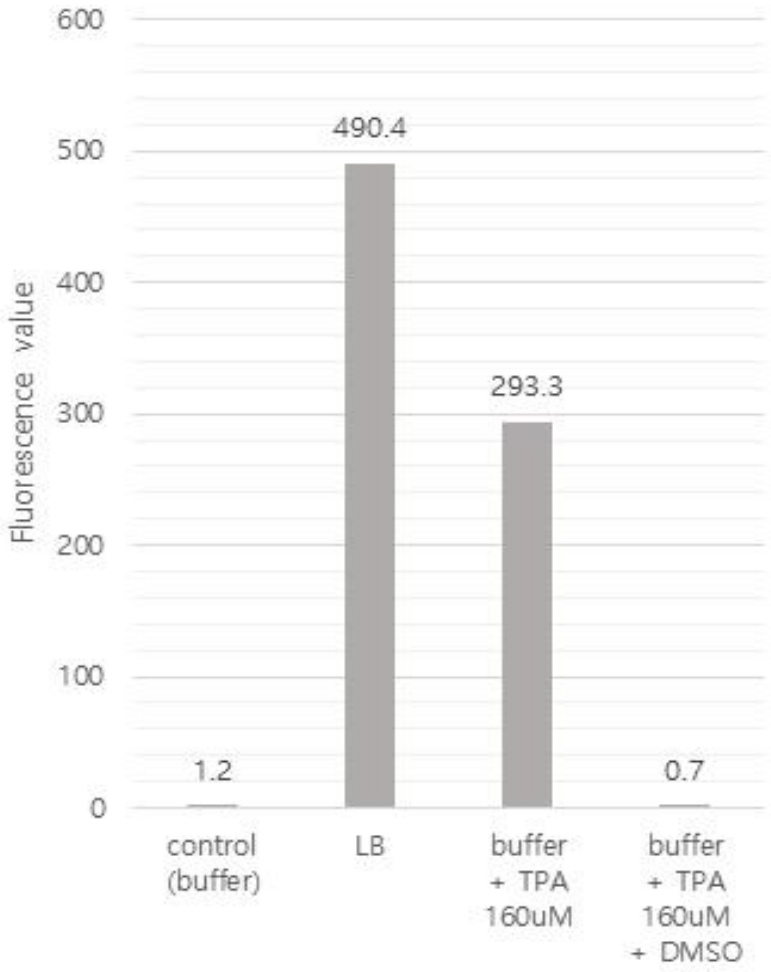
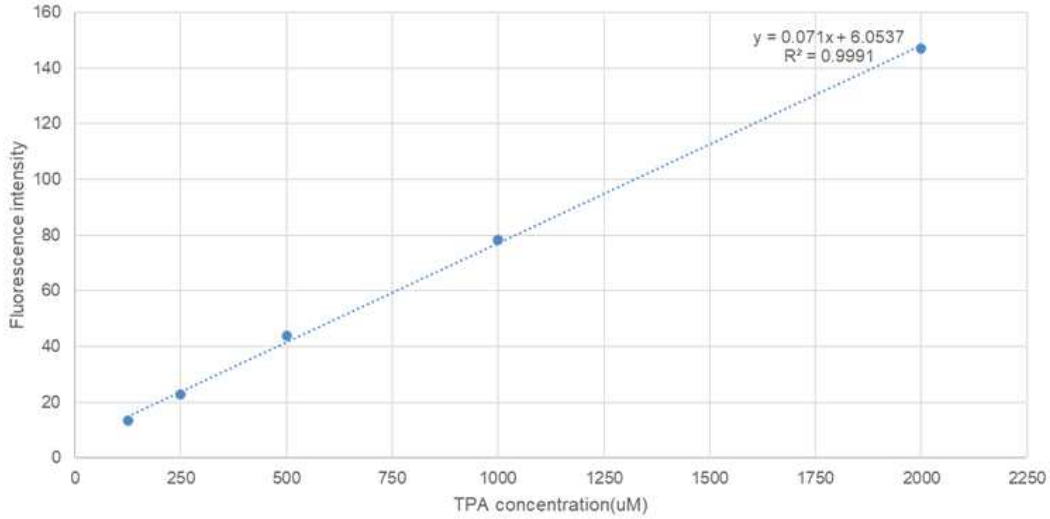


그림 3-4. HOTP 형광파장대에서의 LB 배지와 DMSO의 형광특성 조사

(A)



(B)

$$\text{LOD} = 3.3 \times \frac{\text{standard deviation}}{\text{slope of calibration curve}}$$

(C)

Name	Value
slope of calibration curve	0.071
standard deviation	6.817

그림 3-5. HOTPEA 스크리닝 시스템의 성능평가. (A) TPA 농도와 HOTP 형광값에 대한 검량선, (B) limit of detection(LOD) 계산공식, (C) HOTPEA 스크리닝 검량선의 기울기와 표준편차

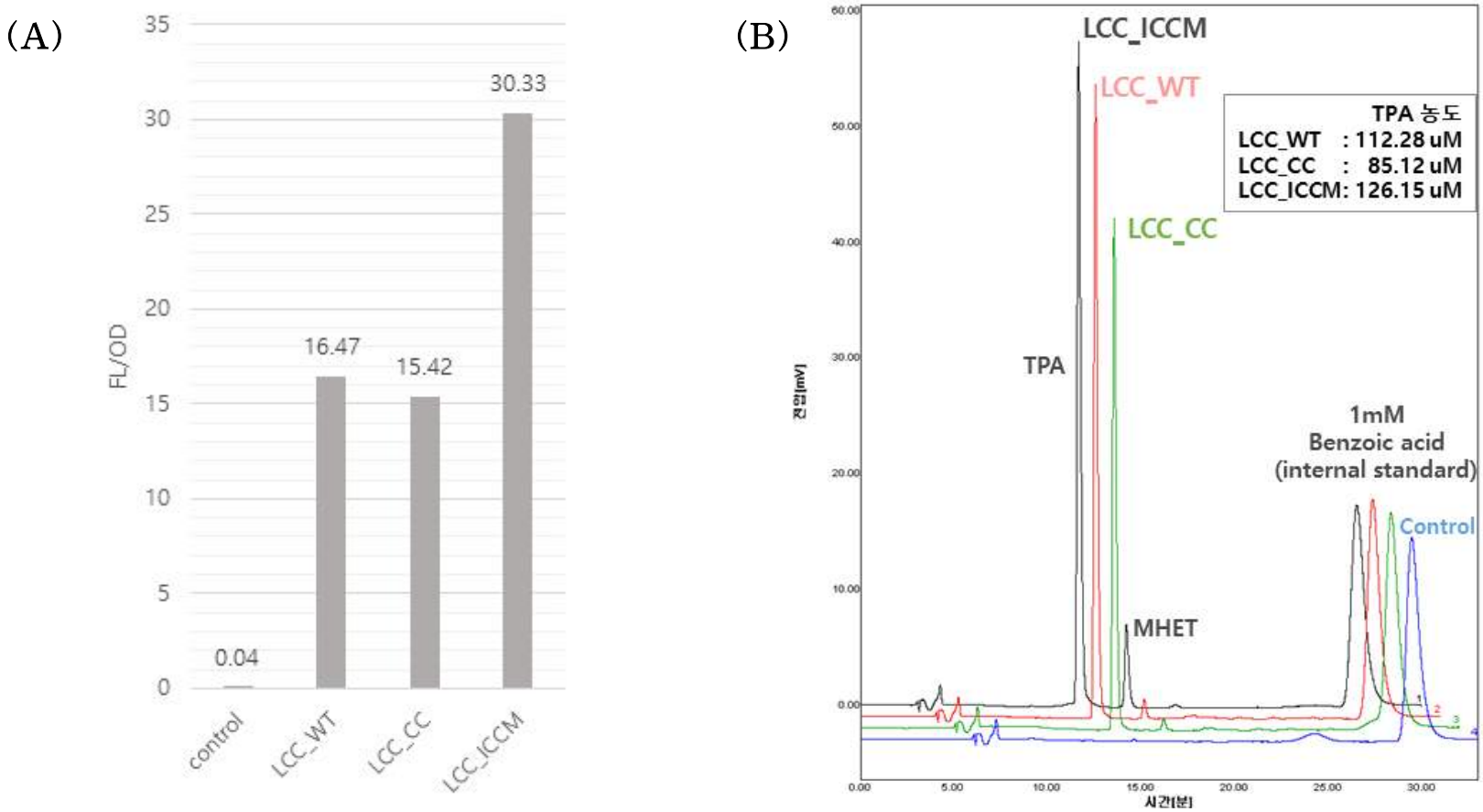


그림 3-6. HOTPEA 스크리닝 시스템의 교차검증. (A) LCC_야생형과 돌연변이형별 반응 후 HOTP 형광값 측정데이터, (B) HPLC를 통한 TPA 정량분석데이터

3. 2. HcaR 바이오센서

앞서 구축한, HOTPEA 스크리닝 시스템보다 TPA에 대한 sensitivity를 증가시키고 전반적인 편의성을 증가시키고자, *E.coli*를 이용해 in vivo 상에서 TPA를 검출하고자 하였다. TPA의 농도에 따라, 이에 반응하는 전사인자에 의해 GFP 발현량이 증가하는 원리를 이용한다.

문헌조사를 통해 여러 전사인자 후보군을 선별하였고, *E.coli* K12 genome에 존재하는 hca operon transcriptional activator(HcaR)을 선정하였다. HcaR은 활성인자로서 ligand binding pocket에 맞는 리간드가 존재할시, HcaR-리간드 복합체를 형성하여 HcaE 프로모터에 존재하는 유전자들의 전사량을 증가시킨다. 그리고 HcaR_야생형은 cinnamic acid에 반응하지만, HcaR_WT의 잔기 4개를 돌연변이시켜 4-hydroxybenzoic acid(4HBA)에도 반응하게 만든 논문을 확인하였다 (E101H, V102Y, V227S, T228E). [17.18] 4HBA와 TPA의 화학구조 상의 유사성 때문에, HcaR_4HBA 돌연변이형 또한 TPA에 반응하여 HcaE 프로모터를 활성화시킬 수 있을지에 대한 확인이 필요하였다. 가능성에 대한 판단 이후, HcaR_4HBA를 기반으로 TPA에 반응하는 바이오센서를 구축하고자 하였다 (그림 3-7).

3. 2. 1. HcaR 단백질 구조분석

HcaR_WT과 HcaR_4HBA는 PDB 사이트에 단백질 결정구조가 없기에 Homology modeling을 통해 단백질 구조를 얻고자 하였다. HcaR 단백질의 DNA 결합부위인 1~89번 잔기를 제외한, 리간드 결합부위인 90~296번 잔기와의 identity 및 query cover 퍼센트가 높은 PDB 단백질 데이터를 선택하고자 하였다. multi-template으로 사용할 데이터는 RCSB PDB 사이트에서 3GLB, 2HXR, 2QL3의 PDB ID를 가진 단백질

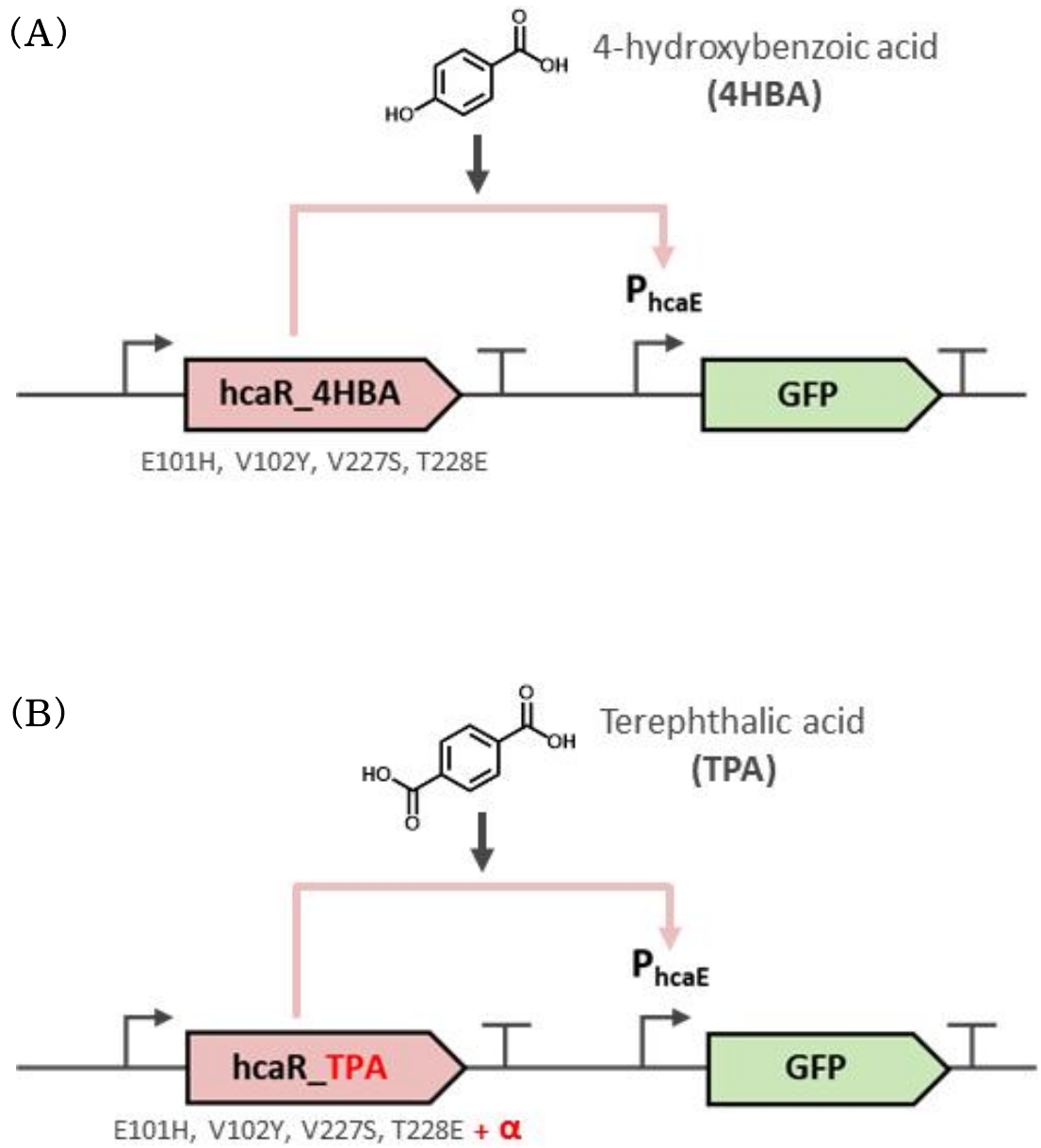


그림 3-7. HcaR 바이오센서를 이용한 스크리닝 시스템 scheme. (A) HcaR_4HBA 바이오센서 scheme, (B) HcaR_TPA 바이오센서 scheme

결정구조를 사용했다 (표 3-1). 추가로 Alphafold를 통해 예측된 HcaR_WT 단백질 결정구조 또한 template로 사용하였다.

그 후, Autodock vina 프로그램을 이용하여, 4HBA와 결합하는 HcaR_4HBA의 ligand binding site을 찾았다. 그리고 TPA에 대해서도 docking 시뮬레이션을 진행한 결과, 핵심 잔기인 R146에 대해 4HBA처럼 TPA 또한 수소결합을 생성할 수 있음을 확인하였다. [17] 또한 ligand binding site에 4HBA가 배열된 위치와 같이, TPA도 사실상 같은 위치에 배열되어 있음을 알 수 있었다. 이를 통해, ligand binding site의 여러 잔기들이 4HBA와 interaction하여 inducer로 작용할 수 있었던 것처럼, TPA도 유사한 interaction을 형성할 가능성이 높다 판단하였고, 정상적으로 HcaR-리간드 복합체를 형성할 수 있다고 예측하였다 (그림 3-8).

homology modeling을 통해 만든 HcaR_4HBA의 단백질 구조를 바탕으로, 추후 HcaR_TPA 제작을 위해 돌연변이를 가할 잔기를 선정하고자 하였다. 4HBA의 OH기의 산소원자를 기준으로, 5 Å 이내에 있는 HcaR_4HBA의 잔기들을 찾아보았다 (그림 3-9). 이를 통해, T193, S198, L201, T223, N224, I225, E228 총 7개의 잔기가 확인되었다. 이 중, L201은 4HBA와 TPA가 공통적으로 가지는 벤젠링 구조와도 많은 interaction을 형성하기에, 추후 돌연변이를 가할 잔기에서는 제외하게 되었다. 최종적으로 HcaR_TPA를 위해 T193, S198, T223, N224, I225, E228 총 6개의 잔기가 기질특이성 변화를 위한 핵심 잔기로 예측되었다. 6개의 잔기들에 대하여 위치포화 돌연변이를 가함으로써, 4HBA의 OH기가 아닌 TPA의 COOH기를 위한 ligand biding pocket의 구조 변화를 유도하여 HcaR_4HBA의 기질특이성 변화를 일으키고자 하였다.

3. 2. 2. HcaR_4HBA 바이오센서 구축

문헌에 따른 HcaR_4HBA 돌연변이 위치를 참고하여, 바이오센서를 구축하고자 하였다. [17] 깁슨어셈블리 원리를 적용한 Takara사의

PDB ID	Name	Organism	Classfication
3GLB	Crystal structure of the effector binding domain of a CATM variant (R156H)	*Acinetobacter baylyi* ADP1	Transcription
2HXR	Structure of the ligand binding domain of E. coli CynR, a transcriptional regulator controlling cyanate metabolism	*Escherichia coli* K-12	Transcription
2QL3	Crystal structure of the C-terminal domain of a probable LysR family transcriptional regulator from Rhodococcus sp. RHA1	*Rhodococcus jostii* RHA1	Transcription

표 3-1. Homology modeling에 사용한 PDB 데이터 목록

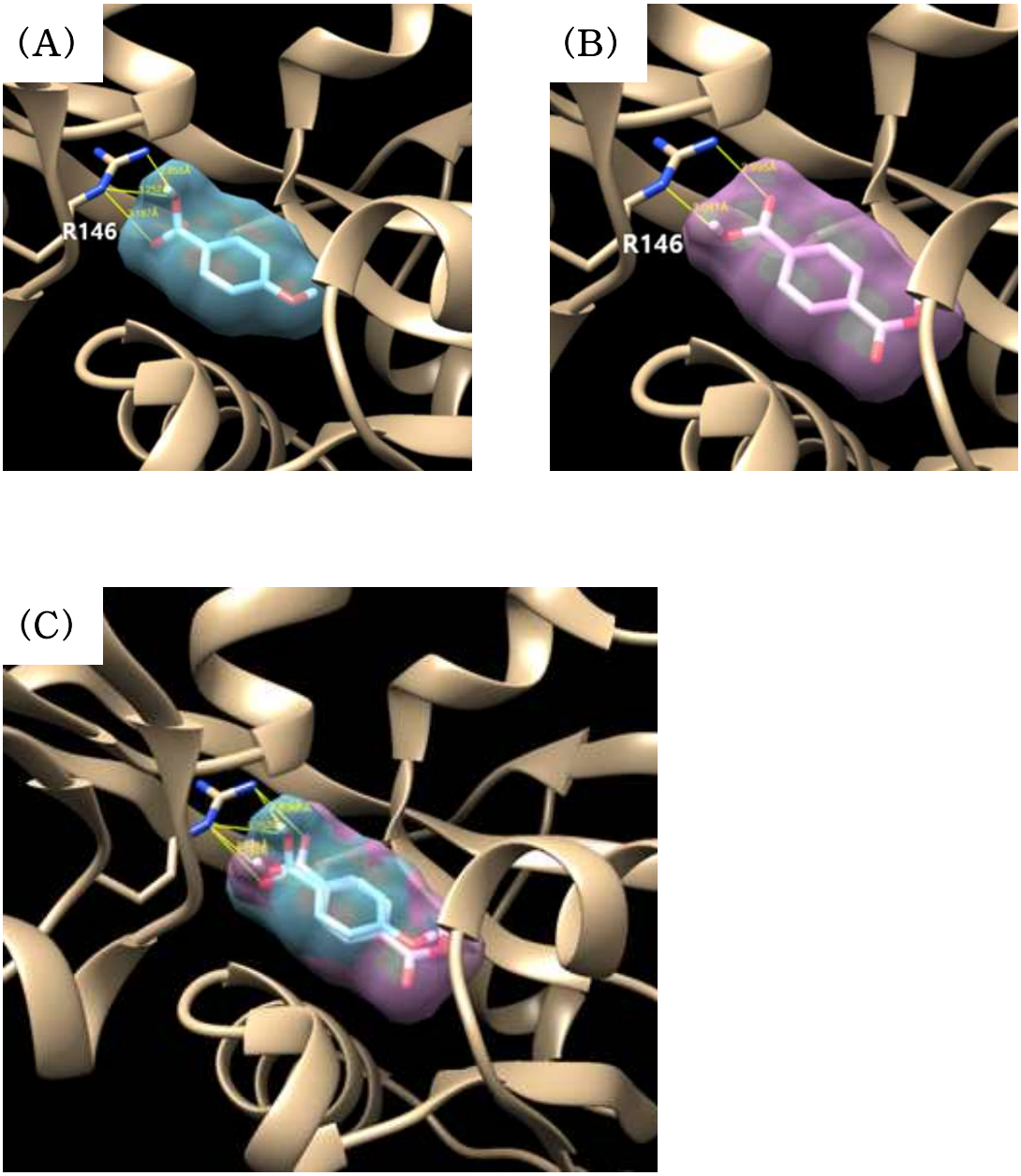


그림 3-8. 리간드별 HcaR_4HBA와의 docking 시뮬레이션. (A) 4HBA, (B) TPA, (C) ligand binding pocket 상에서의 4HBA와 TPA의 배열 유사성

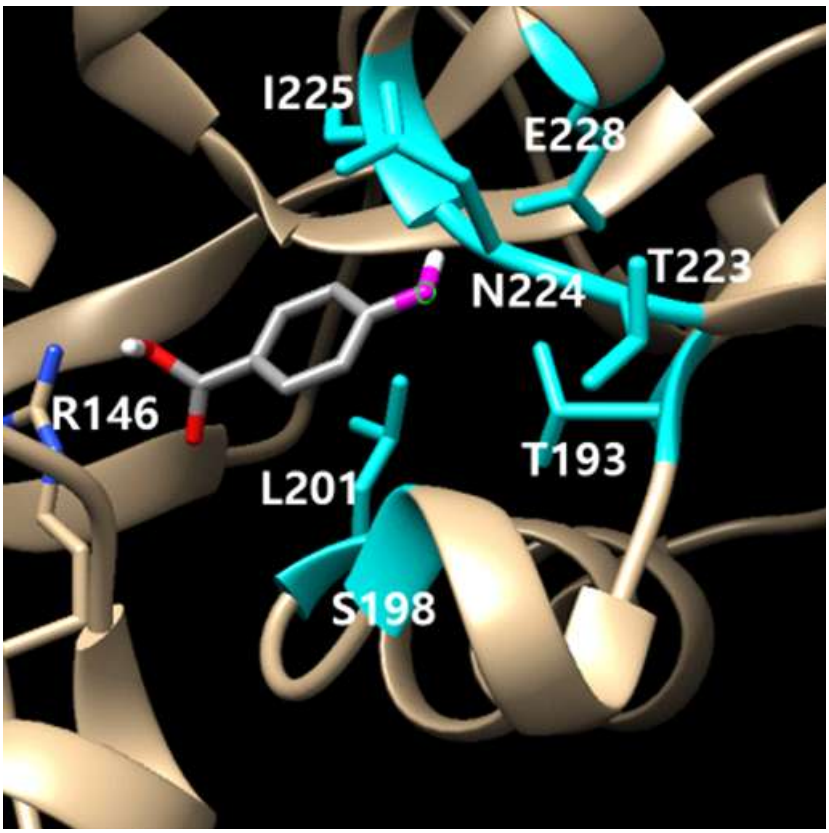


그림 3-9. HcaR_TPA 돌연변이 제작을 위한, HcaR_4HBA ligand binding site 내의 핵심잔기 조사

In-fusion kit를 이용해서 바이오센서를 구축하였다. HcaR 시퀀스 및 hcaR-hcaE intergenic region 그리고 HcaE 프로모터는 *E.coli* K12 genome에서 PCR을 통해 추출하였다. 벡터로는 pACYC_Duet-1(pACYC)을 이용하였다. 해당 벡터는 low copy number를 가지기에 constitutive하게 발현될 GFP 형광값의 백그라운드를 낮추기 위함이다.

구축한 HcaR_4HBA의 cassette를 #0212라고 명명하였다 (그림 3-10). 4HBA와 TPA에 대한 용량-반응곡선을 그려보았다 (그림 3-11). fluorescence/OD600(FL/OD)값을 보면, TPA에 대하여 HcaR_4HBA는 예상과 달리 반응하지 않는 것으로 나타났다. 4HBA의 경우, 기질의 농도에 대한 FL/OD값의 증가를 확인할 수 있었다. 하지만, TPA에 반응하는 HcaR_TPA 돌연변이를 FACS 통해 찾기에는 바이오센서 자체의 GFP 형광값 및 fold change(FC) 증가가 필요함이 확인되었다.

3. 2. 3. 바이오센서 반응조건 및 균주 최적화

반응조건 최적화를 진행하고자 하였다. 배지조성은 논문을 참고해 LB+1 % glycerol로 설정하였고, HcaR 단백질이 post-exponential phase에서 잘 생성된다는 논문을 참고하여 진행한 스케일업시 dilution ratio에 대한 실험은, 1/100 비율이 적합함을 확인하였다 (그림 3-12A). [15] 그 후, *E.coli* 균주에 따른 GFP 형광값 차이를 확인해보았다 (그림 3-12B). 이 경우, BL21(DE3)보다 DH5a가 FC에 대해 유리함을 갖는 것을 확인하였다.

반응조건 및 균주 최적화를 통해 용량-반응곡선을 다시 그려보았다 (그림 3-11). 그 결과, 1 mM 4HBA에 대해서, 대조군 대비 6배 정도의 FC를 얻을 수 있었다. 해당 반응조건을 토대로 #0212 cassette의 4HBA에 대한 형광을 FACS 상에서도 분석 가능한지 확인해보았다. 하지만 FACS 데이터에서는 FC와 별개로, 대다수의 *E.coli*들의 GFP 형광발현이 제대로 되지않는 문제가 있음이 확인되었다.(그림 3-13)

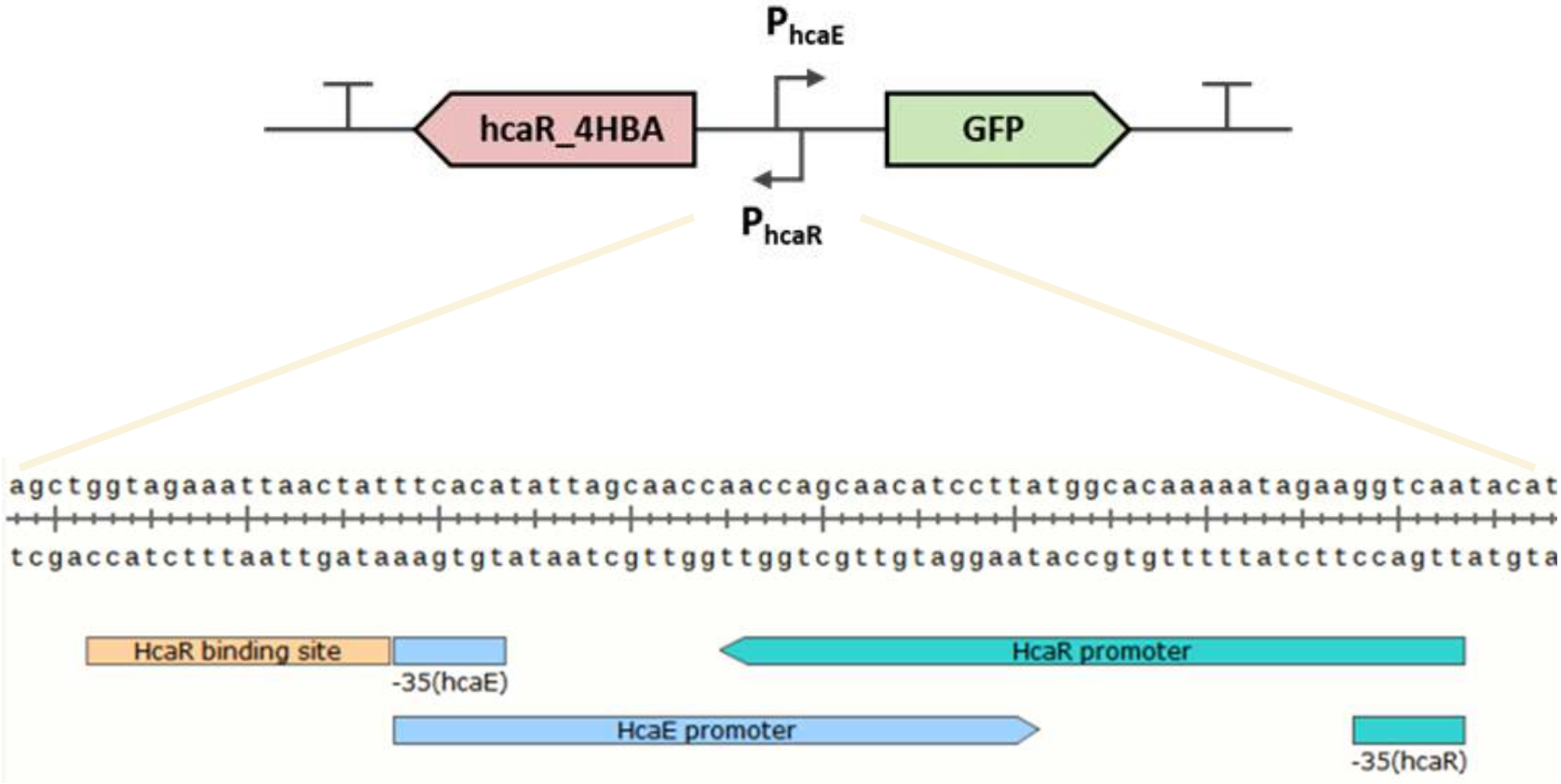


그림 3-10. #0212 cassette의 구성

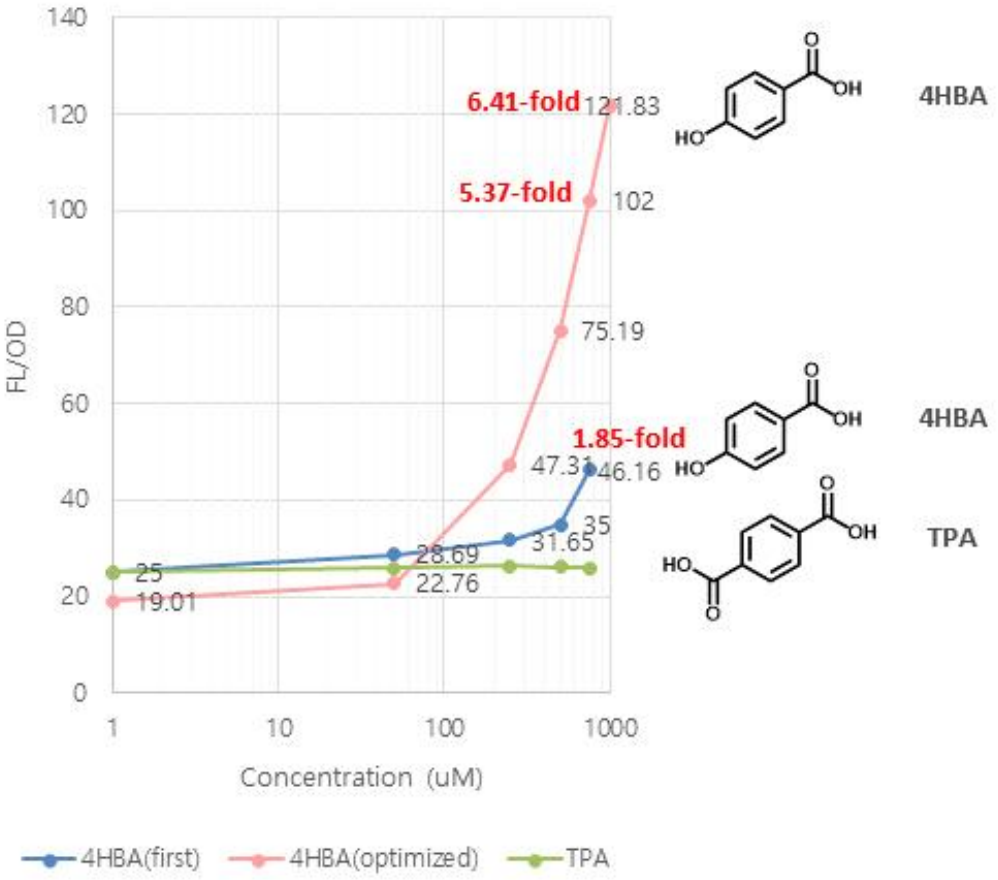


그림 3-11. #0212 cassette 기반의 기질별 용량-반응곡선.

- 4HBA(first) : 반응조건 및 균주 최적화 전의 4HBA에 대한 #0212의 용량반응곡선
- 4HBA(optimized) : 반응조건 및 균주 최적화 후의 4HBA에 대한 #0212의 용량반응곡선
- TPA : 반응조건 및 균주 최적화 전의 TPA에 대한 #0212의 용량반응곡선

그러므로 반응조건 외에도, 단백질공학, 유전공학적인 접근을 통해서 현재 #0212 cassette 구성에 대한 엔지니어링이 필요함을 알게 되었고 이 과정을 통해 전반적인 GFP 형광 발현의 문제를 해결하고자 하였다.

3. 2. 4. HcaR 발현 문제 조사

#0212 cassette의 프로모터에 대한 엔지니어링을 시도하고자 하였다. *E.coli* K12 genome에서 그대로 추출한 프로모터 구조는, hcaR-hcaE intergenic region에 HcaR 프로모터와 HcaE 프로모터가 겹쳐있는 형태로 존재해있다 (그림 3-10). 이러한 구조는 두 개의 프로모터가 DNA 상에 서로 물리적으로 연관되어있어, 개별적인 프로모터 엔지니어링을 시도하기 어렵다고 판단하였다. 또한 SDS-PAGE를 통하여, #0212의 HcaR 발현을 확인해보았을 때, HcaR에 해당하는 band가 거의 확인되지 않았다. 이는 Native promoter인 HcaR 프로모터가 매우 약한 세기이기 때문이라 해석하였다. HcaR의 확실한 발현을 통한 문제점 진단을 위해, hcaR_4HBA 유전자 시퀀스를 pET28a+ 벡터로 옮겨, 새로운 프로모터에서 발현시켜보기로 하였다. 기존의 pACYC 벡터에 있던 hcaR_4HBA 유전자는 N터미널의 15개의 아미노산을 제외하고 전부 truncation 하여서 정상적인 HcaR_4HBA 단백질이 생성될 수 없게 하였다 (그림 3-14A).

3. 2. 5. HcaR-T7 프로모터 시스템

이전 실험에서 확인된 HcaR의 발현문제를 해결하기 위해, hcaR 유전자만을 pET28a+ 벡터로 옮긴 후 T7 프로모터를 이용해 과발현시키기로 하였다. hcaR_4HBA 유전자를 pET28a+ 벡터의 T7 프로모터에 클로닝한 cassette를 #0251이라고 명명하였다 (그림 3-14B). 또한 (그림 3-14A)처럼 truncated hcaR_4HBA와 GFP가 삽입되어있는 cassette를 #0250이라고 명명하였다. 그리고 IPTG 농도에 따른 HcaR 발현량의

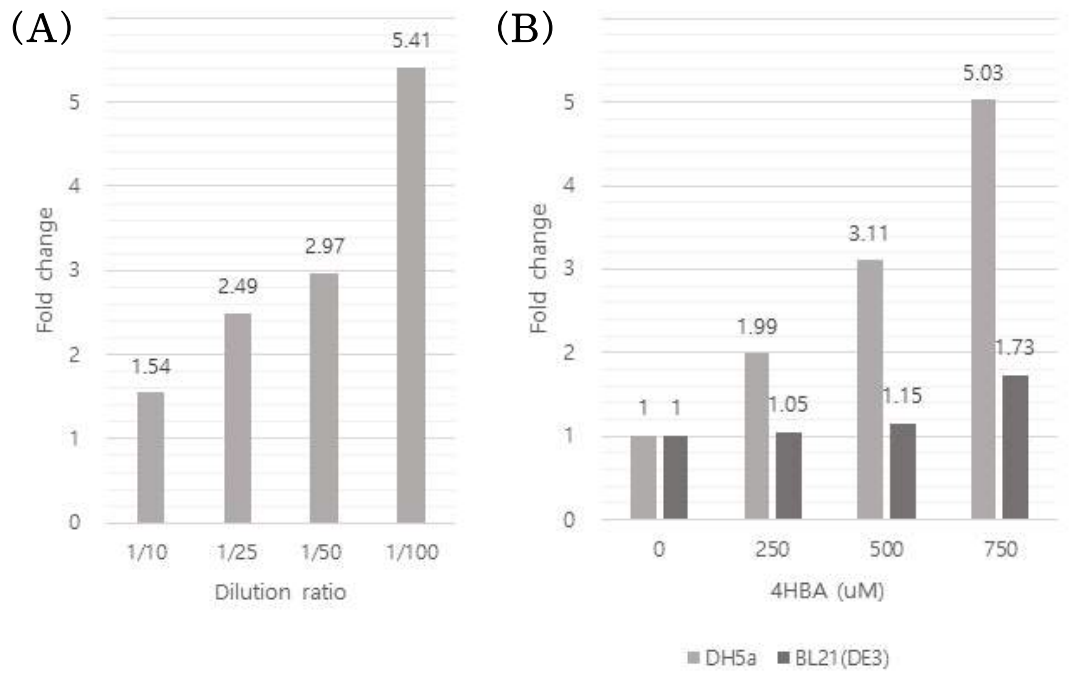
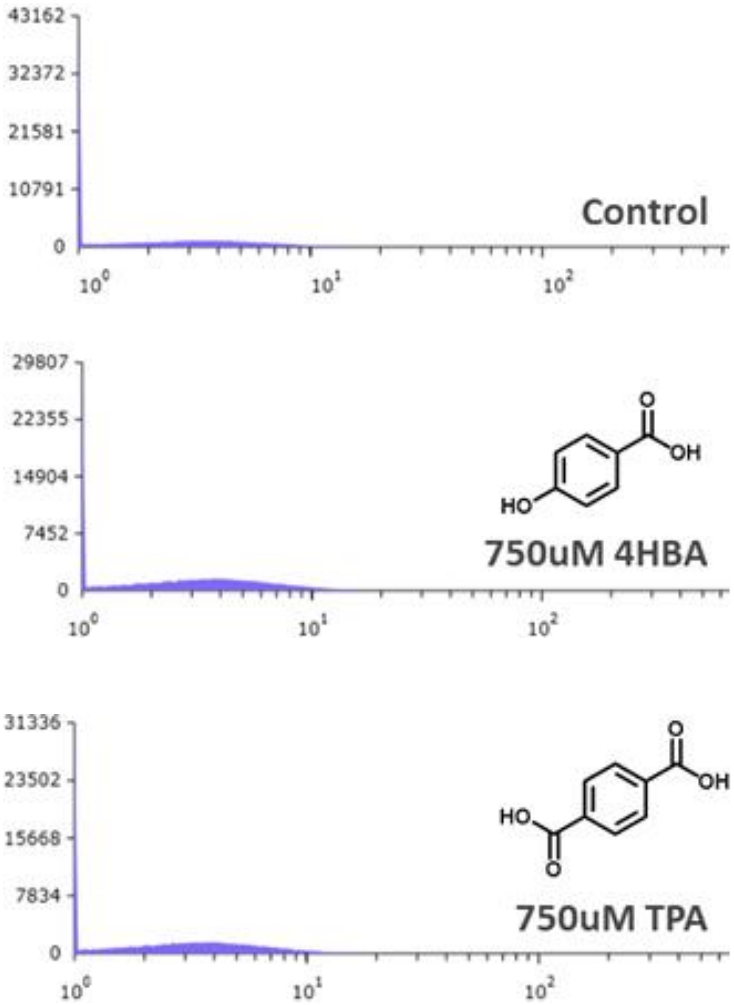


그림 3-12. #0212 cassette의 최적 반응조건 및 균주 조사. (A) 스케일업시 접종비율, (B) DH5α와 BL21(DE3) 간의 FC값 비교



#0212	Mean (FL1 Area)	CV (coefficient of variation)
control	2.79	94.51
4HBA (750 uM)	3.63	234.46
TPA (750 uM)	3.23	85.39

그림 3-13. #0212 cassette의 기질별 FACS를 통한 형광분석
- X축: FL1 Area
- Y축: cell count

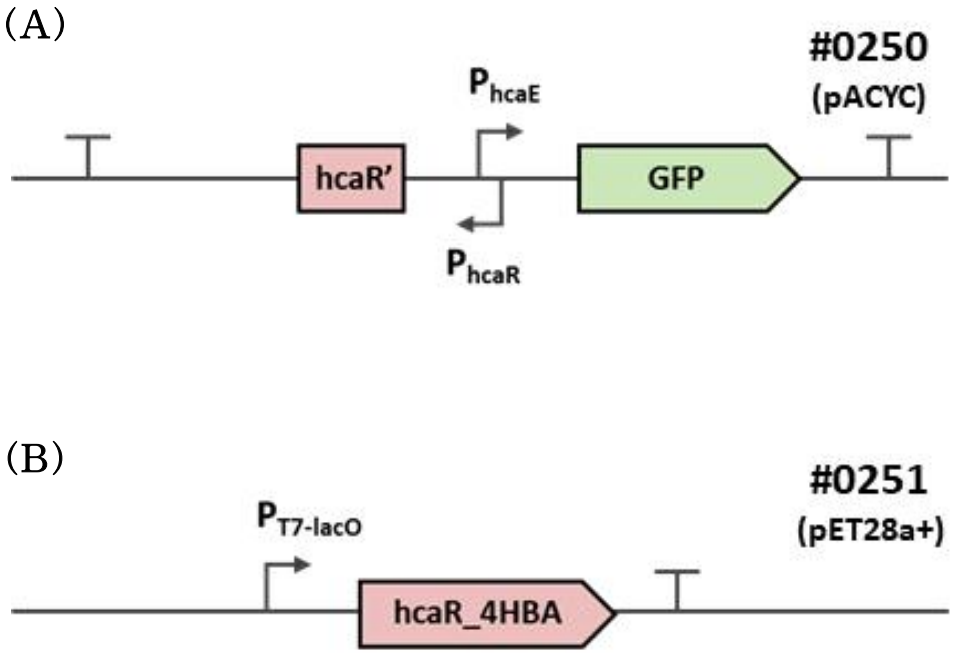


그림 3-14. HcaR 발현문제 해결을 위한 벡터 시스템 scheme. (A) GFP 발현벡터_#0250, (B) HcaR 발현벡터_#0251

차이를 유도해, HcaR 발현량별 형광반응을 비교하고자 하였다. BL21(DE3)에 #0250과 #0251을 동시에 형질전환하였다. 그 후 진행한 실험에서, 4HBA에 대한 용량-반응곡선에서의 FC값은, IPTG를 넣어준 경우, IPTG 농도와 관련 없이 형광반응을 하지않는 것으로 나왔다. 하지만 IPTG를 넣어주지 않은 경우, 4HBA 농도에 따라 형광값이 증가하는 경향성을 확인하였다 (그림 3-15A). 750 uM 4HBA 기준으로 1.23 배의 낮은 FC이지만, 이는 (그림 3-12B)에서 확인할 수 있듯이, FC가 #0212 cassette와 750 uM 4HBA 기준으로 1.73 배로서, 형광반응이 DH5α에 비해 상대적으로 매우 약한 BL21(DE3)에서 실험을 진행한 요인이 작용했기 때문이라고 판단하였다.

이어서 SDS-PAGE 분석을 통한 HcaR의 발현을 확인해보고자 하였다. IPTG를 첨가해 인덕션 시킨 경우, Total fraction에서의 HcaR의 과발현은 잘 이루어졌음을 확인하였다 (그림 3-15B). 하지만 과발현을 시킨 경우, 모두 soluble fraction에서의 HcaR은 사실상 찾아볼 수가 없었다. 이와 반대로, IPTG를 넣어주지 않은 경우, HcaR의 과발현이 일어나진 않았지만, T7 프로모터의 leakiness한 특성 때문에 소량의 HcaR 만이 발현되었음을 확인하였다. 이 경우 total fraction에서의 HcaR은 IPTG 인덕션의 경우보다 현저히 적었지만, 오히려 soluble fraction 상에서의 HcaR은 가장 많음을 확인하였다. 이는 프로모터의 세기가 약해짐에 따라 HcaR이 천천히 발현되어 soluble protein의 양이 증가한 것으로 해석되어진다. 위의 결과를 토대로, HcaR 단백질의 전반적인 solubility는 낮다는 것을 확인하였다. 그리고 soluble HcaR의 양이 증가함에 따라 HcaR 바이오센서의 형광반응에 더욱 유리함을 확인할 수 있었다. 그렇기에 HcaR의 soluble expression 증가에 초점을 맞춘 연구의 필요성이 확인되었다. 이에 대한 2가지 가능한 계획은

1. T7 프로모터보다 약한 세기의 *E.coli* constitutive 프로모터(J23117, J23108, J23100)를 이용하여 HcaR을 천천히 발현시킨다.
2. T7 프로모터를 이용하되, HcaR의 soluble expression 증가를 위해 인덕션 조건을 18℃로 변경하여 발현 속도를 늦춘다.

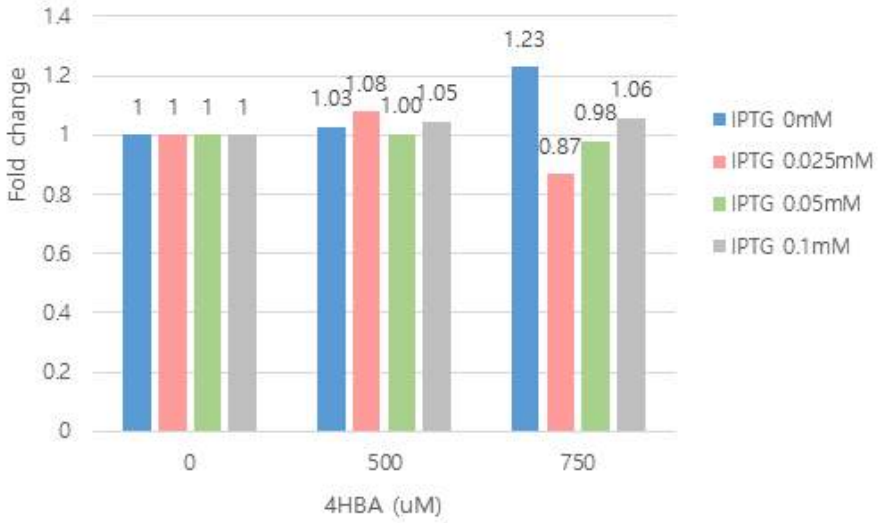
로 요약할 수 있다.

3. 2. 6. HcaR-Constitutive 프로모터 시스템

앞선 계획대로, HcaR 단백질을 다양한 세기의 *E.coli* constitutive 프로모터로 발현해보고자 하였다. 또한 프로모터 엔지니어링에 대한 용이성을 위해 시퀀스가 잘 알려진 constitutive 프로모터를 이용하기로 하였다. *E.coli* constitutive 프로모터 중, J23117(약한 세기), J23108(중간 세기), J23100(강한 세기)의 3가지 프로모터를 통해 실험을 진행하였다. 세 경우 모두 RBS는 BBa B0032를, 벡터는 pET28a+를 사용하였다. 해당 프로모터-RBS 조합을 통해 구축한 cassette를 순서대로 #0253-117, #0253-108, #0253-100이라 명명하였다 (그림 3-16). 이를 #0250을 가지고 있는 DH5α에 각각 형질전환하였다. 구축한 3종류의 DH5α와 #0212 DH5α에 대하여 4HBA 농도별 형광반응을 조사해보았다 (그림 3-17). #0253-117, #0253-108, #0253-100를 통해 HcaR_4HBA를 발현한 경우, #0212보다 형광반응의 dynamic range와 FC가 저조한 것으로 확인되었다. 또한 constitutive 프로모터를 이용한 경우, 이미 500 uM 4HBA에서 어느정도 GFP 형광의 포화상태에 도달한 것으로 보이며, #0212 대비 operational range 또한 저조한 것으로 확인되었다.

후속연구로는 constitutive 프로모터 중에서 상대적으로 좋은 형광반응을 보인 #0253-100을 기반으로, RBS를 교체해가며, 더 나은 프로모터-RBS 조합을 찾을 필요성이 확인되었다. 이를 통해 HcaR 바이오센서의 FC와 operational range를 증가시킬 예정이다.

(A)



(B)

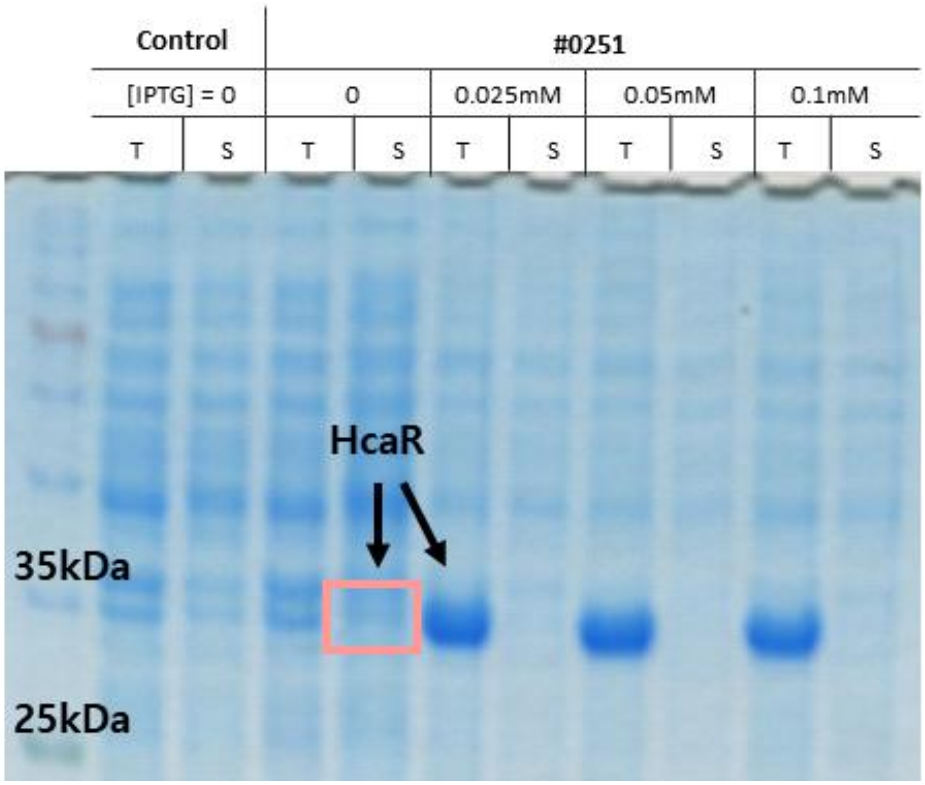


그림 3-15. #0251 cassette의 형광반응 및 HcaR 발현 조사 (A) IPTG 농도별 4HBA에 대한 GFP 형광값 fold change, (B) HcaR 발현에 대한 SDS-PAGE 분석

T: total fraction, S: soluble fraction, HcaR MW: 34kDa

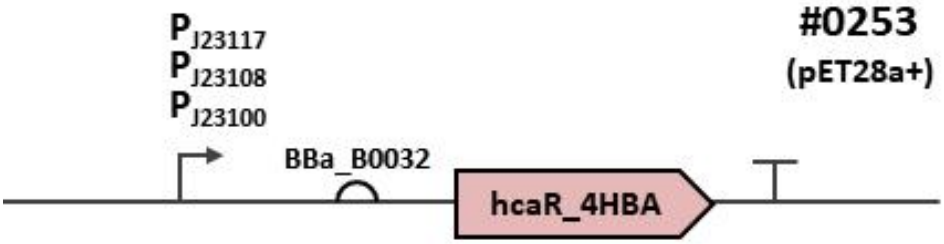


그림 3-16. HcaR 발현벡터_#0253

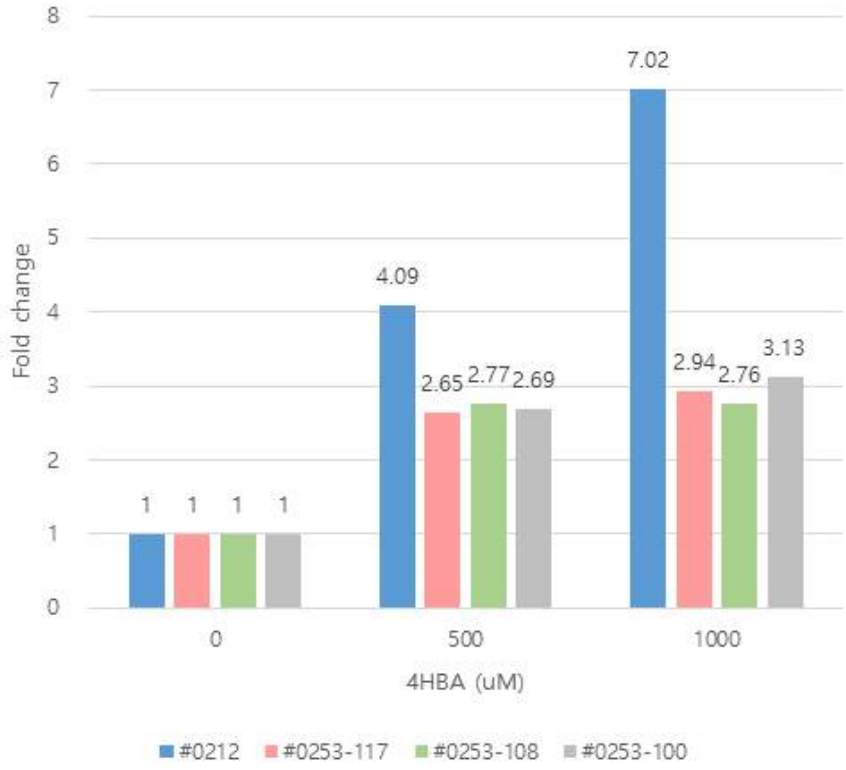


그림 3-17. constitutive 프로모터 종류별 4HBA에 대한 GFP 형광값 fold change

4. 결론

전 세계적인 PET 생산으로 인해, 폐 PET 처리 및 재활용 또한 중요한 환경문제로 떠오르고 있다. 특히 PET분해효소들을 이용한 친환경적인 PET분해방법이 주목을 받고 있으며, 이러한 PET분해효소들을 효소공학 측면의 엔지니어링을 통해 PET분해-activity를 증가시키는 연구 또한 활발하다. 본 연구에서는 현재 연구가 많이 진행되지 않은, PET분해효소 돌연변이간의 PET분해-activity 비교를 위한 활성분석방법 및 스크리닝 시스템 개발을 주제로 연구를 진행하였다. 활성분석방법 개발 연구를 위해, PET분해효소 중, 특성과 돌연변이에 관한 연구가 많이 진행된 LCC 효소를 선정하였고, 특히 signal peptide 없이도 세포막 밖으로 분비되는 특성에 주목하여 스크리닝 시스템을 구상하였다.

LCC의 PET분해산물 중, TPA만이 hydroxyl radical과 결합하여 형광특성을 나타내는 HOTP가 생성된다는 원리를 이용하여 in vitro 스크리닝 시스템을 만들고자 하였다. 생물학적 pH조건에서 hydroxyl radical을 생성할 수 있는 Fe(II)-EDTA 펜톤반응을 적용하였다. LB 배지의 autofluorescence 반응이 HOTP 형광측정에 문제를 야기함을 확인하였다. 이를 해결하기 위해 ethyl acetate를 이용한 액액 추출법을 적용하였다. 구축된 스크리닝 시스템을 HOTPEA 스크리닝이라고 명명하였고, HOTPEA 스크리닝 시스템의 유효성 평가하고자 하였다. 여러 농도의 TPA를 첨가하여, HOTP의 형광값을 측정해보았다. 첨가한 TPA 양과 HOTP 형광값 사이의 검량선를 그린 결과, 양의 상관관계가 형성됨을 확인하였다. 또한 LOD 값은 316.85 uM로 계산되었다. 그다음 과정으로는 HOTP 형광값과 실제 PET분해반응을 진행한 샘플 속의 TPA 양을 HPLC로 정량하여 교차검증하기로 하였다. LCC_야생형과 2개의 LCC_돌연변이를 이용하였다. 교차검증 결과, HOTP 형광값 세기가 커짐에 따라 HPLC를 통한 TPA 정량값 또한 높게 나옴을 확인하였다.

HOTPEA 스크리닝 시스템의 LOD 값보다 더 낮은 TPA 농도에서 TPA 존재를 확인가능하고 PET분해효소를 위한 스크리닝의 throughput을 증가시키고자, *E.coli*를 이용한 in vivo 방법을 구축하고자 하였다. HcaR 단백질에 대한 구조분석을 진행하였고, ligand binding pocket에 돌연변이를 가할 잔기를 선정하였다. 이를 통해 HcaR_4HBA에 대한 기질특이성을 변화시켜 TPA에 반응하게 만들고, 이 HcaR_돌연변이를 이용한 HcaR_TPA 바이오센서를 구축하고자 하였다. HcaR_4HBA 바이오센서를 깁슨어셈블리를 통해 구축하였다. 구축한 바이오센서 #0212 cassette를 여러 농도의 4HBA와 반응을 시켜보았으나, 추후 FACS 분석을 위해 바이오센서의 FC값 증가가 필요함을 확인하였다. 반응조건 최적화를 통해, 배양배지는 1 % glycerol이 포함된 LB 배지, 스케일업 시 dilution ratio는 1/100, 균주비교를 통해 DH5α가 적합함을 확인하였다. 해당 조건들을 이용하여 GFP 형광값을 측정한 결과, 1 mM 4HBA에 대해서, 대조군 대비 6배 정도의 FC를 얻을 수 있었다. 최적화된 조건으로 해당 #0212 cassette가 FACS 분석이 가능한지, 4HBA를 이용하여 분석을 진행하였으나, *E.coli* 전반적으로 GFP 발현에 문제가 있음을 확인하였다. 유전공학 측면에서 프로모터 엔지니어링이 필요함을 인지하였다. 우선, HcaR 발현문제를 해결하고자, hcaR 시퀀스만 pET28a+벡터로 옮긴 후, T7 프로모터를 이용해 과발현시키는 HcaR-T7 프로모터 시스템을 구축하였다. 실험결과, IPTG 인덕션을 진행시키지 않아 소량의 HcaR만이 생성된 경우에, HcaR의 soluble expression이 잘 일어남을 확인하였다. 이는 프로모터의 세기가 약해짐에 따라 HcaR이 천천히 발현되어 soluble protein의 양이 증가한 것으로 해석되어진다. 또한 soluble expression이 좋아야 바이오센서의 형광반응도 잘 일어남을 확인하였다. 그렇기에 T7 프로모터보다 약한 세기인, *E.coli* constitutive 프로모터를 사용한 HcaR-Constitutive 프로모터 시스템을 구축하였다. 해당 시스템의 경우, #0212 cassette보다 FC가 좋지 않음을 확인하였다. 하지만 프로모터의 시퀀스가 잘 알려져있다는 점에서 gene work에 대한 용이성이 존재한다. 그렇기에 실험한 constitutive 프로모터 중에서 상대적으로 좋

은 형광반응을 보인 #0253-100을 기반으로, RBS를 교체해가며 더 나은 프로모터-RBS 조합을 찾을 필요성이 확인되었다. 이를 통해 후속연구로는 HcaR 바이오센서의 FC와 operational range를 증가시킬 예정이다. 최종적으로, HcaR_4HBA의 ligand binding site를 이루는 잔기들에 대한 위치포화 돌연변이를 시도한다. 제작한 HcaR_돌연변이 바이오센서의 TPA에 대한 형광 반응성을 FACS를 통해 확인할 예정이다.

TPA 검출을 위한 2가지 활성분석방법 및 스크리닝 시스템 개발시도는, 앞으로 PET분해효소의 돌연변이 연구에 도움이 되어 친환경적 PET 처리에 기여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ren Wei, et al. (2020). Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. *Nature catalysis*, 3, 867-871
2. Ya-Hue Valerie Soong, et al. (2022). Recent Advances in Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Wastes. *Bioengineering*, 9(3), 98
3. Hee Taek Kim, et al. (2019). Biological Valorization of Poly(ethylene terephthalate) Monomers for Upcycling Waste PET. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 7, 24, 19396-19406
4. Gina Welsing, et al. (2021). Chapter Eighteen - Upcycling of hydrolyzed PET by microbial conversion to a fatty acid derivative. *Methods in Enzymology*, 648, 391-421
5. Vijaykumar Sinha, Mayank R. Patel & Jigar V. Patel. (2010). Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 18, 8-25
6. Rui Gao, et al. (2021). Recent advances in the discovery, characterization, and engineering of poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolases. *Enzyme and Microbial Technology*, 150, 109868
7. MRB Chaves, et al. (2018). A Practical Fluorescence-Based Screening Protocol for Polyethylene Terephthalate Degrading Microorganisms. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 6
8. Ren Wei, et al. (2012). A high-throughput assay for enzymatic polyester hydrolysis activity by fluorimetric detection. *Biotechnology Journal*, 7, 1517-1521
9. Xiao-Feng Yang, et al. (2001). Fe(ii) - EDTA chelate-induced aromatic hydroxylation of terephthalate as a new method for the evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability. *Analyst*, 6
10. Sarah E. Page, William A. Arnold & Kristopher. (2010).

Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *Journal of Environmental Monitoring*, 9

11. Shosuke Yoshida, et al. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351, 6278, 1196-1199
12. Lingqia Su, et al. (2013). Extracellular location of Thermobifida fusca cutinase expressed in Escherichia coli BL21(DE3) without mediation of a signal peptide. *Appl Environ Microbiol*, 79(14), 4192-8
13. V. Tournier, et al. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580, 216-219
14. Xingxiang Xi, et al. (2021). Secretory expression in Bacillus subtilis and biochemical characterization of a highly thermostable polyethylene terephthalate hydrolase from bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109715
15. Evelyne Turlin, et al. (2001). Regulation of the Early Steps of 3-Phenylpropionate Catabolism in Escherichia Coli. *JMMB Research article*, 3(1), 127-133
16. Evelyne Turlin, et al. (2005). 3-phenylpropionate catabolism and the Escherichia coli oxidative stress response. *Research in Microbiology*, 156, 3, 312-321
17. Lion Konstantin, et al. (2021). Development of Biosensor Platform for Phenolic Compounds Using a Transition Ligand Strategy. *ACS Synthetic Biology*, 10, 8, 2002-2014
18. Lion Konstantin, et al. (2019). Displaced by Deceivers: Prevention of Biosensor Cross-Talk Is Pivotal for Successful Biosensor-Based High-Throughput Screening Campaigns. *ACS Synthetic Biology*, 8, 8, 1847-1857
19. Yuxin Qiao, et al. (2022). Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 424, B, 127417
20. Isabel Pardo, et al. (2020). Gene amplification, laboratory

evolution, and biosensor screening reveal MucK as a terephthalic acid transporter in Acinetobacter baylyi ADP1. *Metabolic Engineering*, 62, 260-274

21. Vikas D. Trivedi, et al. (2022). Cheating the Cheater: Suppressing False-Positive Enrichment during Biosensor-Guided Biocatalyst Engineering. *ACS Synthetic Biology*, 11, 1, 420-429

22. Jiawei Li, et al. (2022). Engineering Transcription Factor XylS for Sensing Phthalic Acid and Terephthalic Acid: An Application for Enzyme Evolution. *ACS Synthetic Biology*, 11, 3, 1106-1113

Abstract

Development of Activity Analysis Method for PET Degradation Enzyme

Taeseo Park

School of Chemical and biological Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Based on the petrochemical industry, various polymer materials have been synthesized since the 1950s. And today, the problem of plastic waste disposal is emerging all over the world. Among them, polyethylene terephthalate(PET) based on ester bonds occupies the largest proportion in plastic waste. Recently, starting with *Is*PETase, PET degradation enzymes such as leaf-branch compost cutinase(LCC) have been discovered in nature, and a method for decomposing PET waste is attracting attention. Furthermore, in terms of enzymatic engineering of these enzymes, studies to improve PET degradation-activity, which degrade PET to terephthalic acid(TPA), are also in the spotlight. However, to date, high throughput screening(HTS) for PET degradation-activity comparison of PET degradation enzyme mutants has not been reported properly.

In this study, two activity analysis method and screening system

based on *Escherichia coli*, which will be the basis for the development of HTS for the comparison of PET degradation-activity in the future, were attempted.

First, TPA was synthesized with a fluorescent substance, 2-hydroxyterephthalate(HOTP), and then detected in vitro. It uses the principle that a hydroxyl radical combines with TPA to become HOTP. Hydroxyl radicals were generated under biological pH conditions using the Fe(II)-EDTA fenton reaction. To remove the autofluorescence reaction of LB media, a liquid extraction method using ethyl acetate(EA) was applied. A calibration curve with a positive correlation between TPA concentration and HOTP fluorescence intensity was obtained. The LOD value was measured to be 316.85 uM. To confirm the effectiveness of the HOTP screening assay, cross-validation was attempted by quantifying the fluorescence value of HOTP and TPA through HPLC. Under actual reaction conditions(70°C), the PET film was decomposed with His-tag purified LCC_wild-type and mutant-type enzymes. Among the comparative groups, it was confirmed that the quantitative value of TPA through HPLC was also high as the intensity of HOTP fluorescence value increased. This screening assay was named HOTPEA screening.

Second, it was attempted to confirm TPA in vivo through a biosensor using an activator and green fluorescent protein(GFP) on *E.coli*. As an activator, the hca operon transcriptional activator(HcaR) protein derived from the *E.coli* K12 genome was selected. Through Gibson assembly, an HcaR_4HBA biosensor using 4-hydroxybenzoic acid(4HBA) as a ligand was constructed. To change the substrate specificity for 4HBA to TPA, the protein tertiary crystal structure of HcaR_4HBA was predicted using homology modeling, and the mutation location for the ligand binding site was selected through

docking simulation. Through reaction conditions and strain optimization, a fold change in GFP fluorescence value of about 6 times compared to the control was obtained for 1 mM 4HBA. Although the constructed HcaR_4HBA biosensor was analyzed through FACS, it was confirmed that there was a problem in the expression of GFP and HcaR. In terms of genetic engineering, there was a need to adjust the promoter responsible for hcaR expression. Therefore, using the T7 promoter, HcaR was overexpressed at various IPTG concentrations. In this case, when IPTG was not added, it was confirmed that the soluble expression of HcaR occurred well. Through this, it was confirmed that as the strength of the promoter was weakened and the soluble expression of HcaR increased, it was advantageous for the fluorescence reaction of the biosensor. Therefore, a new biosensor was constructed using the *E.coli* constitutive promoter with a weaker strength than the T7 promoter. Although the fluorescence response was not better than that of the existing biosensor using the promoter derived from the *E.coli* K12 genome, the J23100 promoter was used among the constitutive promoters and the best results were obtained. In addition, due to the ease of promoter engineering, as a follow-up study, the need to increase the fluorescence response of the biosensor was confirmed through combination with RBS of various strengths based on the J23100 promoter cassette.

Attempts to develop two activity analysis method and screening system for TPA detection are expected to contribute to eco-friendly PET treatment by helping to study mutations in PET degradation enzymes in the future.

keywords : PET degradation enzyme, terephthalic acid(TPA),

ethyl acetate(EA), 2-hydroxyterephthalate(HOTP), hca operon transcriptional activator(HcaR), biosensor

Student Number : 2020-27773