

*Microbacterium laevaniformans*에서 정제한 Isocitrate lyase의 특성

김 정 호

경산대학교 환경학부

1. 서 론

TCA cycle에서 acetyl Co-A가 oxaloacetate와 작용하여 citrate가 생성되고 이 citrate는 분해되어 isocitrate로 된다. 그러나 isocitrate는 isocitrate dehydrogenase의 작용을 받지 않고 TCA cycle에서 변형된 isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)작용을 받는 glyoxylic acid cycle경로가 보고되었다(정기택 등, 1993a). Glyoxylic acid cycle 경로는 isocitrate lyase가 citrate를 분해하여 succinate와 glyoxylate를 생성한다.

아세트알데히드 폐수의 생물학적 처리를 위하여 폐수 자화균을 자연계에서 분리, 동정한 *Microbacterium laevaniformans*를 사용하고 있다. *Microbacterium laevaniformans*를 종균하여 아세트알데히드 폐수를 활성슬러지법으로 처리하였을 때 폐수처리에 의한 COD 및 BOD의 감소원인이 glyoxylate cycle을 경유하였을 것으로 예상된다. Glyoxylate cycle의 경유는 glyoxylate cycle의 지표효소인 isocitrate lyase 생성을 조사함으로써 확인할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 폐수처리에 이용된 *Microbacterium laevaniformans*에서 glyoxylate cycle의 지표효소인 isocitrate lyase를 정제하여 그 특성을 조사하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 본 실험에 사용한 균주는 활성슬러지법으로 Acetaldehyde공장폐수의 처리를 위하여 *Microbacterium laevaniformans*를 사용하였다.

효소의 활성측정은 isocitrate를 기질로 사용하여 Mcfadden법(1969)에 의해 측정하였다. 효소활성 단위는 기질로 사용한 isocitrate로부터 분당 1mole의 glyoxylate 생성을 촉매하는 활성을 1unit로 하였다.

2) 효소의 정제

균 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 집균하고, 50mM Tris-HCl완충액 (pH 7.5)으로 세척하였다. 여기에 5mM MgCl₂를 함유한 동일 완충액을 소량 가하여 균체를 현탁하고 초음파 파쇄기(Ultrasonic Ltd.)로 2분간 균체를 파쇄하였다. 이를 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

조효소액에 ammonium sulfate분획을 하였다. 투석한 효소액을 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)으로 평형화한 DEAE-cellulose column(1.6×24cm)에 흡착시킨 후 동일 완충액으로 비 흡착 단백질 부분을 완전히 씻어내었다. 그 다음 흡착된 단백질 부분을 NaCl 0-0.3M 농도의 직선농도 기울기로 용출시켰다. 그리고 효소활성이 있는 분획을 한외여과

법(Amicon Co.)으로 농축하였다.

DEAE-cellulose column chromatography에서 효소활성이 높은 분획을 모아 동일 완충액으로 투석하였다. 그 후 평형화시킨 DEAE-Sephacel column (1.4×13.5cm)에 주입한 다음 동일 완충액으로 비 흡착단백질 부분을 완전히 씻어내었다. 그 다음 흡착단백질 부분을 0-0.3M농도의 NaCl로 직선농도 분배법으로 용출시켜 투석하고, 한외여과법으로 농축시켰다.

농축된 효소용액을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column (1.6×105cm)에 넣고 분획 당 3ml씩, 시간당 8ml의 유속으로 분획 하였다. 활성분획을 한외 여과시켜 농축된 효소용액을 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column (1.8×90cm)에 다시 주입시킨 후, 시간당 10ml의 유속으로 2.7ml씩 분획하였다.

3) 전기영동 및 분자량 측정

Polyacrylamide gel 전기영동은 Davis의 방법(1964)에 따라 10% polyacrylamide을 사용하여 전기영동하였다. 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE는 10%의 polyacrylamide를 사용하여 Laemmli의 방법(1970)에 따라 표준 단백질의 상대적인 농도와 대수 값의 표준 직선을 작성하고 이 직선을 이용하여 효소분자량을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

조효소액으로부터 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획에 이어 DEAE-cellulose, DEAE-sephacel과 Sephadex G-200 gelfiltration에 의하여 효소를 정제한 결과 수율은 9%였으며, 약 43.6배 정제할 수가 있었다(Table 1). 그리고 정제효소는 전기영동분석법에 의하여 순수하게 정제되었음을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 54000Da으로 측정되었다. 그리고 Km치는 0.83mM, Vmax는 0.33units/ml로 나타났다. 또한 cysteine-HCl에 의해서는 강하게 저해되었다.

Table 1. Summary of purification procedure of isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*.

Purification step	Total Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	75	270.0	733.5	2.8	1.0	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24	66.1	427.2	6.4	2.3	56
DEAE-cellulose	42	14.2	347.1	24.4	8.7	45
DEAE-sephacel	21	3.9	175.7	44.9	16.0	23
1st. Sephadex G-200	15	1.1	116.1	100.5	35.8	14
2nd. Sephadex G-200	10	0.57	69.7	122.5	43.6	9

본 연구에서 Acetaldehyde 생산공장 폐수처리에 이용된 *Microbacterium laevaniformans* 균주에서 isocitrate lyase 생성을 확인하였다. 따라서 *Microbacterium laevaniformans* 균주는 glyoxylate cycle이라는 대사과정을 가지고 있음이 확인되었다. 즉 *Microbacterium laevaniformans* 균주는 Acetaldehyde 생산공장 폐수의 주성분인 acetic acid를 탄소원으로 하여 세포성분을 합성하고 에너지원으로 이용하는 glyoxylate cycle이라는 합성계가 존재하였다.

참 고 문 헌

서승교, 김정호, 김영호, 1997, 활성슬러지공정에 의한 Acetaldehyde 제조공장 폐수의 처리, 한국환경과학회지, 6(3), 259-265.

정기택, 서승교, 우철주, 1993a. *Microbacterium lacticum*에서 Isocitrate lyase의 정제 및 특성, Kor. J. Microbiol., 31, 335-339.