

Enterobacter cloacae MG820에 의한 Triphenylmethane 흡수 특성과 탈색효소의 세포내 위치

정민선 ·곽순전³ ·김병홍¹ ·정영건 ·강사옥² ·민경희^{3*}

영남대학교 식품가공학과, ¹한국과학기술원 환경연구센터,
²서울대학교 미생물학과, ³숙명여자대학교 생물학과

Uptake of Triphenylmethane and Cellular Localization of Enzyme for its Decolorization in *Enterobacter cloacae* MG82. Min-Seon Jeong, Soon-Jun Kwak³, Byung-Hong Kim¹, Young-Gun Chung, Sa-Ouk Kang² and Kyung-Hee Min^{3,*}. Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea, ¹Environmental Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 136-791, Korea, ²Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea, ³Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul, 140-742, Korea. - Triphenylmethane was decolorized rapidly by *Enterobacter cloacae* MG 82 at initial reaction time. The spheroplast showed higher activity of triphenylmethane decolorization than that of intact cell suspension. The outer part of the bacterial cell envelope and the peptidoglycan are important for the function of transport barrier of triphenylmethane. In intact cell, decolorization activity was higher at 37°C than at 0°C, indicating that triphenylmethane decolorization is due to the enzyme reaction. Culture filtrate showed no decolorization activity, while cell-free extract appeared high activity of 1.45 units, clearly showing that decolorization activity was due to the cell-free extract. Comparing decolorization activities of cell fractions, it was found that decolorization activity was located at the compartment of cytoplasmic membrane. The enzyme activity was also shown to be Mg⁺⁺-dependent. The optimum pH and temperature of enzyme activity were 7.0 and 50°C, respectively. The thermostability of this enzyme at 35°C was kept to 58% for 3 hours.

Triphenylmethane 염료는 매우 중요한 상업용 염료 중 하나로 여러방면에서 이용되고 있다. 이 염료는 직물의 염색, 인쇄업등 일상생활에서 광범위하게 사용되고 있으나(1, 2, 3), 일반적인 폐수처리공정으로는 제거되지 않고 토양과 강의 퇴적층에 축적된다(4). Buttler 등은 triphenylmethane 염료 중 가장 대표적인 염료인 triphenylmethane의 독성을 연구하여 이 염료가 포유동물에서 발암성을 나타낸다고 하였다(5, 6).

지금까지 미생물에 의한 triphenylmethane 염료분해의 연구는 활발하게 진행되지 않았다. 곰팡이인 *Phanerochaete chrysosporium*는 영양소 제한 조건하에서 lignase 또는 lignin peroxidase 등에 의해 cresol red, malachite green, triphenylmethane 등을 분해하고(7, 8), 세균인 *Nocardia corallina*, *Pseudomonas pseudomonallei*, *Bacillus subtilis* 등도 triphenylmethane, victory blue 등을 분해하는 것으로 알려져 있다(9-11).

*Nocardia corallina*는 triphenylmethane염료의 일종인 triphenylmethane을 산화시켜 4,4'-bis(demethyl-

amino)benzophenone과 *p*-demethylaminophenol로 분해하며(9), *Phanerochaete chrysosporium*는 triphenylmethane의 말단의 methyl잔기를 분리하여 pentadimethyl-*p*-rosaniline, tetra-*p*-rosaniline, tri-*p*-rosaniline으로 분해한다는 보고(7, 8)가 있다. 이들 보고는 균주특성과 균체에 의한 염료탈색능에 관한 것이 대부분으로 염료분해기작이나 염료분해효소에 관한 보고는 거의 없다. Triphenylmethane염료의 분해효소인 쥐의 microsome에 있는 triphenylmethane demethylase만이 알려져 있을 뿐(12), 아직까지 미생물이 생산하는 triphenylmethane 염료분해효소에 관한 연구는 보고된 바 없다.

Triphenylmethane이 이를 분해하는 능력이 없는 *Escherichia coli*의 세포안으로 흡수되는 것으로 보고된 바 있다(13). 그람 음성 세포인 *E. coli*에서 triphenylmethane은 세포의 표면에 우선적으로 흡수되어 세포 내로 투과되며, 세포내로의 투과 형태는 2가지 다른 기작으로 이루어 진다. 즉, triphenylmethane이 세포의 periplasm에만 흡수되는 Type I형태와 원형질막을 통과해서 원형질내 ribosome까지 수송되는 Type II형태의 흡수가 있다.

Type I형태의 투과는 야생종에서 일어나며, Type II형태의 흡수는 세포외막 변이주에서 일어난다고 하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-710-9415, Fax. 82-2-706-3249
E-mail: khm 9415@egret.sookmyung.ac.kr
Key words: Triphenylmethane dye, Uptake, Decolorization activity, Cytoplasmic membrane bound, Mg⁺⁺-dependent enzyme

또, Type I형태의 투과는 에너지 소비를 필요하지 않는 단순 확산에 의해서만 일어나고 Type II형태의 흡수시의 원형질막에서 원형질내로 수송되는 기작은 아직 밝히지 못하였다. 원형질내로 흡수된 triphenylmethane dye는 ribosome에 주로 흡수된다. Triphenylmethane이 세균에 독성을 나타내는 이유는 ribosome에 흡수된 triphenylmethane이 ribosome의 단백질 합성을 억제하기 때문인 것으로 추정하였다(13).

본 실험에서는 우수한 triphenylmethane 염료탈색능을 가진 것으로 보고(14)된 *Enterobacter cloacae* MG 82에서의 triphenylmethane dye의 흡수에 미치는 흡수저해구조와 이들 세균이 생산하는 triphenylmethane 염료탈색효소의 특성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주와 시약

본 실험에 사용된 균주는 대구 염색 공단에서 분리한 *Enterobacter cloacae* MG82(24)를 사용하였고 *E. coli* K110은 KIST 생물공정실에서 분양 받아 사용하였다. Triphenylmethane은 Aldrich Chemical Co.(U.S.A.)로부터 구입하였다.

균의 배양 및 조효소액의 조제

기본배지(glucose 0.3%, yeast extract 1.0%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.002%, pH7.0)를 이용하여 37°C에서 8시간 진탕배양한 전배양액(O.D._{660nm}=0.8)을 같은 배지에 1% 접종하여 전배양의 조건으로 15시간 동안 본배양하였다.

E. cloacae MG82를 배양하여 660 nm에서 흡광도의 값이 1.0-1.3인 세균배양액은 4°C, 8000×g의 조건으로 25분간 원심분리(Sorvall RC50 rotor)하여 균체를 분리하였다. 분리한 균체는 같은 양의 10 mM citrate-phosphate buffer(pH7.0)에 현탁시켰다. Glass bead로 4°C에서 1분씩 5회 반복하여 균체를 파쇄한 다음 4°C, 20,000×g의 조건으로 2시간 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Triphenylmethane의 균체내 흡수실험을 위한 조효소액은 Gustaffson 등의 방법에 따라 준비하였다(13). 즉, 기본 배지에서 12시간 배양한 다음 세포농도가 660 nm에서 흡광도 1.3이 되도록 하여 10 mM citrate-phosphate 완충액에 현탁시켰다. 이 세포현탁액을 같은 완충액으로 2번 세척한 다음 세포현탁액 중 하나에는 10 mM EDTA만을, 그리고 다른 세포 현탁액에는 10 mM EDTA와 400 µg/ml의 lysozyme을 함께 첨가하여 37°C에서 10분동안 반응시켰다. 4°C, 8000×g의 조건으로

원심분리한 다음 EDTA 만을 첨가한 세포균은 10 mM citrate-phosphate완충액에 현탁하였고, spheroplast가 된 세포균은 30% sucrose가 첨가된 같은 완충액에 현탁시켰다. 이 때 세포농도는 660 nm에서 흡광도가 1.3이 되도록 조절하였다.

Periplasm의 분리

van der Western 등(15)의 방법에 따라 periplasm fraction을 분리하였다. 균체 12.3 g을 50 mM의 EDTA를 첨가한 120 ml의 10 mM citrate-phosphate 완충액(pH 9.0)에 현탁한 후, 35°C에서 20분간 반응시켰다. 20,000×g에서 4°C의 조건으로 30분간 원심분리하여 그 상등액을 periplasm fraction으로 사용하였다.

Cell-free extract와 membrane fraction의 분리

Cell-free extract와 membrane fraction의 분리는 Niviere 등의 방법으로 수행하였다(16). Periplasm fraction을 분리한 후의 균체를 10 mM citrate-phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁한 후 French press(20,000 psi, 4°C)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 20,000×g, 4°C의 조건으로 40분간 1차 원심분리하였다. 그 상등액 만을 200,000×g에서 5시간동안 초원심분리하여 상등액은 원형질 분획으로 사용하였고, pellet은 10 mM citrate-phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁하여 원형질막 분획으로 사용하였다.

Triphenylmethane의 Uptake율의 측정

균체에 흡수되는 triphenylmethane의 양을 Gustafsson 등의 방법에 의하여 측정하였다(13). 이 때 최종 균체량은 O.D._{660nm}값이 1.3이 되게 조절하였으며, 대조구로 같은 농도의 *E. coli* 균체를 사용하였다. 균체 현탁액에 10 µg/ml의 농도의 triphenylmethane을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액에 남아있는 triphenylmethane의 농도를 spectrophotometer(Shimazu UV-265)를 이용하여 측정하였다.

흡수된 triphenylmethane의 회수율은 흡수 실험에 사용한 다음의 균체를 회수하여 0.85% NaCl용액으로 2번 세척한 후 50 mM EDTA가 첨가된 10 mM phosphate buffer(pH 9.0) 10 ml에 재현탁하였다. 이를 30°C의 수욕조에서 1시간동안 충분히 반응시킨 다음 20분동안 sonication하여 균체를 파쇄하였다. 그 후, 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액에 용출된 triphenylmethane의 농도를 spectrophotometer(Shimazu UV-265)를 이용하여 측정하였다.

Triphenylmethane 탈색능의 측정

탈색능은 이 염료를 조효소액과 일정 시간동안 반응시킨 다음 감소된 triphenylmethane의 양을 측정하였다. 반응액으로 pH 7.0인 10 mM citrate-phosphate완충액 890 μ l와 기질인 1.25 mM 농도의 triphenylmethane stock solution 10 μ l, 그리고 조효소액 100 μ l을 넣고 최종 용량이 1000 μ l가 되도록 하였다. 기질을 첨가하여 반응을 37°C에서 개시하였고, 일정시간 반응시킨 다음 590 nm에서 흡광도의 감소량을 측정하였다. 1분 동안에 1.25 μ mole($O.D._{at\ 590\ nm}=0.01$)의 triphenylmethane을 감소시키는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

Triphenylmethane 탈색 활성의 최적온도의 조사는 10-70°C 수욕조에서 일정 시간 반응시킨 후 상대활성도를 측정하여 최적온도를 결정하였으며, 열안정성의 측정은 0, 35, 50, 70°C에서 1시간 동안 반응한 다음 남아 있는 triphenylmethane 탈색 효소의 활성을 측정하여 결정하였다.

염료분해 최적 pH 조사는 pH 5에서 pH 8까지는 50 mM citrate-phosphate완충용액을 사용하였으며, pH 9에서 10까지는 50 mM glycerin-phosphate 완충용액을 사용하였다.

분 석

단백질은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Bradford법에 의해 595 nm에서 비색정량하였고(17), triphenylmethane의 양은 흡광도 590 nm에서 측정하여 표준곡선에 준하여 그 농도를 측정하였다(14). 균체량은 0.5 M HCl 30 μ l를 첨가하여 색소의 색을 제거한 다음 흡광도 660 nm에서 그 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

E. cloacae MG82의 성장과 triphenylmethane의 탈색

E. cloacae균주에 의한 triphenylmethane의 시간에 따른 분해를 조사하기 위해 125 μ M의 triphenylmethane이 포함된 기본배지에서 균체의 성장에 따른 triphenylmethane의 분해를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 염료가 첨가되지 않은 기본 배지에서의 E. cloacae MG82의 성장속도 μ_{max} 값은 1.46(hr^{-1})의 값을 나타내었지만, 염료가 첨가되었을 경우의 성장속도 μ_{max} 값은 0.48(hr^{-1})이었다. 따라서 triphenylmethane이 E. cloacae MG82의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 triphenylmethane이 E. cloacae MG82의 성장을 억제하는 결과는 이 염료의 독성 때문에 생장이 저해를 받는 것으로 추정된다. Yatomé 등(9)은 Nocardia corallina의 초기생장이 triphenylmethane에 의하여 억제된다고 보고하였으며, Gustafsson 등(13)은 triphenylmethane의 독성은 세포질까

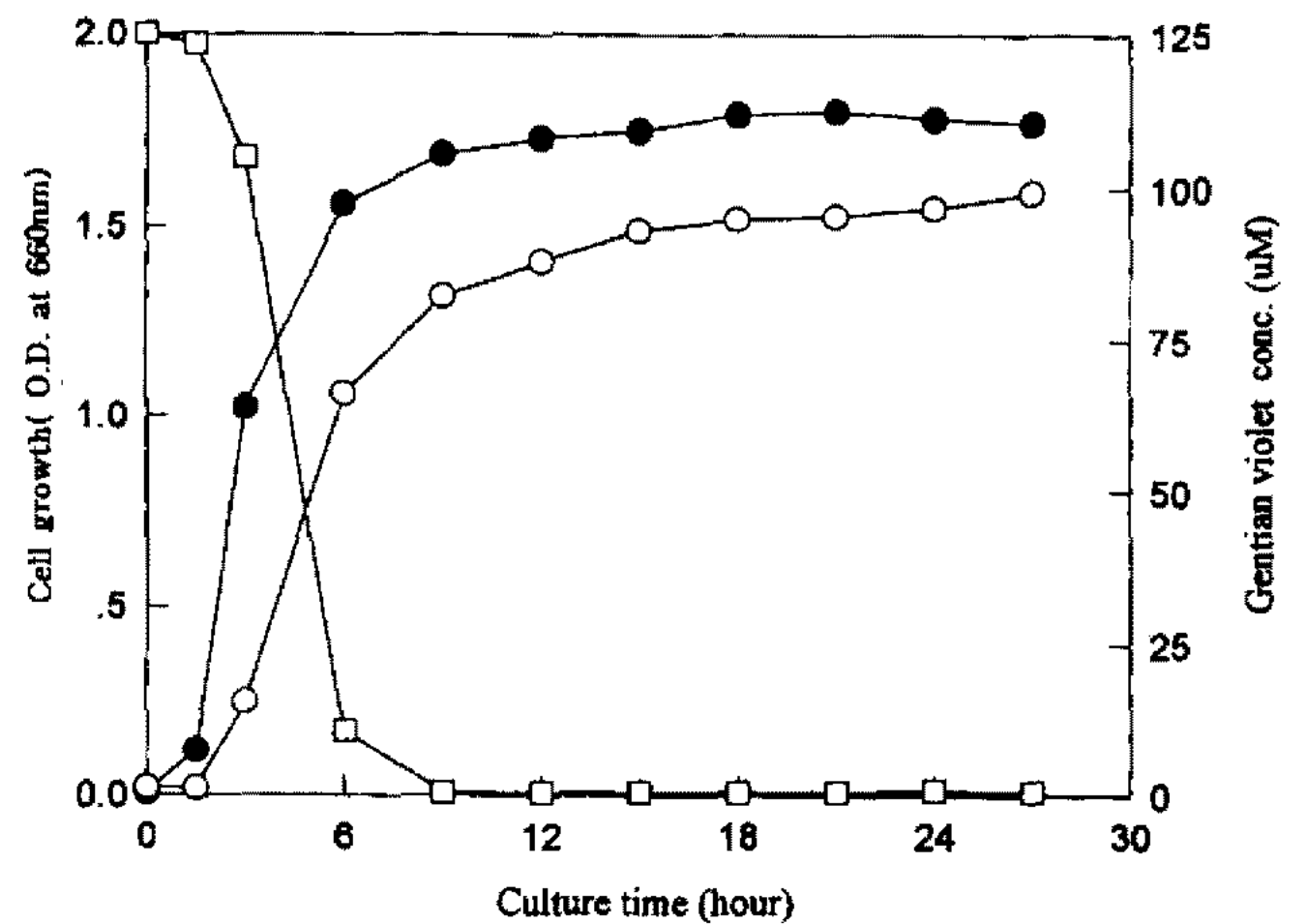


Fig. 1. Time course of cell growth and the decolorization of triphenylmethane by E. cloacae MG82.

Cultivation was carried out at 37°C and pH 6.8 on a shaking incubator (180 rpm). Initial dye concentration was 125 μ M for the cell growth. —●—: cell growth without the dye, —○—: cell growth with the dye, —□—: triphenylmethane decolorization.

지 수송되어 라이보솜과 결합하여 단백질합성을 억제하기 때문이라고 보고하였다.

Triphenylmethane를 첨가한 후 E. cloacae MG82의 배양 시작 후 6시간 내에 배양 상등액중 염료의 농도가 약 20%만 남을 정도로 신속하게 탈색되었으며 9시간에는 거의 탈색이 완료되었다. Triphenylmethane의 감소는 세포의 수의 증가와 어느정도 비례하는 것으로 보아 세포의 흡수에 의한 것 또는 세포의 효소작용과의 상호작용으로 추정된다. 이 염료의 탈색량을 측정하기 위하여 배양초기의 배양액을 원심분리한 결과 침전된 배양초기의 균체가 이 염료의 색인 청색을 띠었다. 이 결과는 세균의 성장 초기에 많은 양의 triphenylmethane이 균체에 흡수되는 것으로 생각할 수 있다.

E. coli에서도 triphenylmethane이 균체에 첨가되는 즉시 흡수되는 것으로 보고되었으므로(13) 본 연구에서도 E. cloacae MG82의 triphenylmethane의 흡수능을 조사하였다.

E. cloacae MG82에 의한 triphenylmethane의 uptake

앞의 실험으로부터, 발효초기 상등액으로 부터 제거된 염료가 흡수만 되는 지 흡수된 염료가 세포내에서 분해되는 지를 조사하였다.

E. coli와 E. cloacae MG82의 현탁액을 10 μ g/ml농도의 triphenylmethane와 10분간 반응시킨 다음 흡수율을 조사한 결과는 Table 1에서 보여 주는 바와 같다. E. coli의 경우 최초에 첨가한 triphenylmethane 농도가 10 μ g/ml이었으나 반응 10분후 세포에 흡수되고 상등액 중에는 triphenylmethane이 7.46 μ g/ml 남아 있었고, 세포내에 남아 있는 triphenylmethane양은 2.45 μ g/ml이었

Table 1. Triphenylmethane uptake of cell suspensions

Strain	Dye conc. ($\mu\text{g/ml}$)			Uptake ratio (%)
	Supernatant	Pellet	Total	
<i>E. coli</i> K110	7.46	2.45	9.91	25.4
<i>E. cloacae</i> MG82	4.74	0.95	5.69	52.6

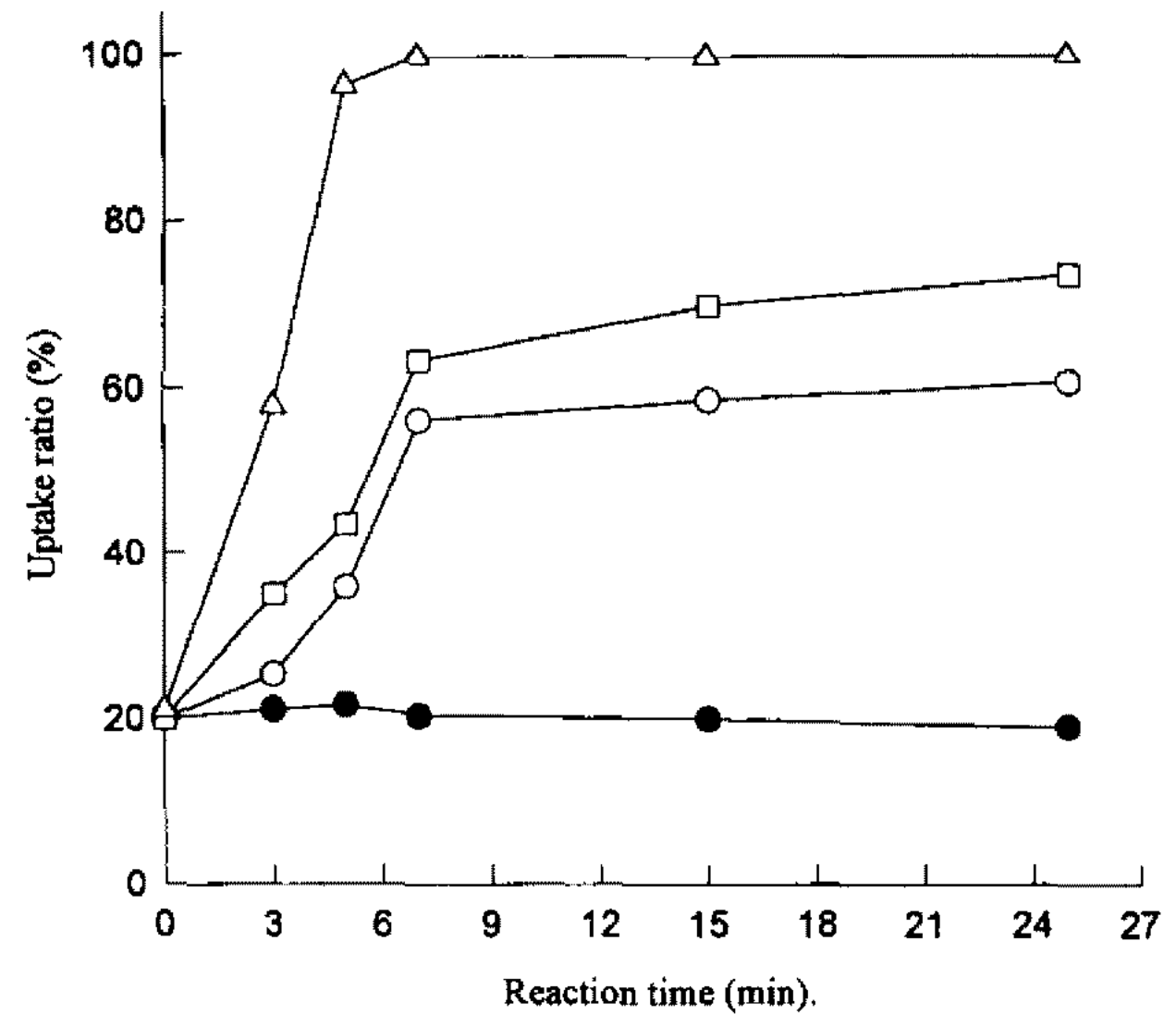
Cells (2×10^8 cell/ml) were suspended in 10 ml of 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 7.0) containing 10 $\mu\text{g/ml}$ triphenylmethane and incubated at 37°C for 10 min. Triphenylmethane concentrations of the supernatant and cell pellet were determined after 10 min uptake to the cells. The uptake of dye into intact cells was measured. The uptake ratio of triphenylmethane was calculated as follows: Uptake ratio (%) = [(initial concentration of triphenylmethane) - (the concentration after reaction) / (initial concentration)] \times 100

다. *E. cloacae* MG82의 경우 반응 후 상등액중에는 4.74 $\mu\text{g/ml}$ 의 triphenylmethane이 남아 있었고 세포에 남아 있는 triphenylmethane양은 0.95 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. *E. cloacae* MG82의 uptake율은 52.6%로서 이는 *E. coli*의 uptake율 25.4%보다 2배나 높은 uptake율을 보여주었다.

Gustaffson 등(13)은 triphenylmethane은 그람음성 세균인 *E. coli*의 세포표면의 음전하를 띤 화합물과 강한 결합을 하며, 더 많은 triphenylmethane을 첨가하면 세포표면에 엉성한 결합을 한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 *E. coli*의 경우보다 *E. cloacae* MG82에서 약 2배 많은 양의 triphenylmethane이 흡수된 것은 *E. coli*와 *E. cloacae* MG82는 같은 그람음성세균이지만 이 두세균의 각기 표면구조의 성분이 약간 상이하기 때문인 것으로 추정된다. 세포벽의 탄수화물의 양이 감소하면 triphenylmethane의 흡수율이 증가한다는 보고(13)가 있는 것으로 미루어 보아, 본 연구의 경우 *E. cloacae* MG82의 세포벽 성분이 *E. coli*보다 아마도 탄수화물의 함량이 적은 것으로 사료된다.

또한 *E. cloacae* MG82는 상등액에 triphenylmethane이 4.74 $\mu\text{g/ml}$ 포함되어 있으므로 세포에는 5.26 $\mu\text{g/ml}$ 의 염료가 남아 있어야 함에도 불구하고 실제로는 0.95 $\mu\text{g/ml}$ 의 염료만이 균체에 남아 있었다. 이 결과는 염료의 52.6%가 흡수되었다가 흡수된 양의 2%만이 남아 있는 것으로 염료가 흡수된 후 세포내에서 효소작용에 의해 탈색된 것으로 추정된다.

따라서 최초로 첨가된 염료의 양에 대하여 반응 후 남아 있는 전체양을 고찰하여 볼 때, 대조균인 *E. coli*는 triphenylmethane탈색능력이 없으므로 첨가한 염료의 양인 10 $\mu\text{g/ml}$ 중 전체 triphenylmethane 9.91 $\mu\text{g/ml}$ 의 염료가 남아 있었으나 *E. cloacae* MG82의 경우에는 이 양이 5.69 $\mu\text{g/ml}$ 에 불과하였다. 이 결과는 *E. coli*의 경우 이 염료가 흡수된 다음 99.1%의 염료가 분해되지 않고 그대로 남아 있는 결과이나 *E. cloacae* MG82의 경우는 이

**Fig. 2. Uptake of triphenylmethane *E. cloacae* MG82 treated with EDTA or lysozyme -EDTA.**

The bacterial cell suspension grown exponentially in basal medium to a cell density corresponding to 0.9 O.D._{at 600nm} (1×10^8 cells/ml). At zero time, 10 $\mu\text{g/ml}$ of triphenylmethane was added per ml of culture. The uptake of triphenylmethane was measured at intervals. Intact cell suspension was incubated at 0°C (—●—) and 37°C (—○—). Incubation temperature was 37°C for the cells treated with EDTA (—□—), and for the cells treated with EDTA & lysozyme (—△—).

염료의 52.6%가 흡수되었다가 거의 탈색되고 흡수된 양의 2%만이 남아 있는 결과로 추정된다.

이 결과로 미루어 보아 *E. cloacae* MG82의 경우 *E. coli*보다 더 많은 양의 triphenylmethane를 흡수한 다음 세포내에서 대부분 분해되었음을 알 수 있었다.

E. cloacae MG82의 Triphenylmethane의 uptake 특성

Outer membrane과 peptidoglycan층이 염료의 흡수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *E. cloacae* MG82 현탁액을 EDTA 또는 EDTA와 lysozyme으로 처리한 다음 대조구와 함께 triphenylmethane의 흡수 정도를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 무처리구인 대조구에서의 경우 0°C에서는 triphenylmethane을 첨가하자마자 곧 20%의 염료가 흡수되었고 반응 25분후에는 triphenylmethane 흡수율이 증가하지 않았다. 그러나 37°C에서는 시간이 경과함에 따라 흡수율이 증가하여 반응 시작 7분후에 55%의 흡수율을 보여 주었다.

이상의 결과로 보아 0°C에서 흡수된 염료는 효소작용에 의한 것이라기 보다는 단순한 흡수에 의한 것으로 생각되며 37°C에서 55%의 흡수율을 보여준 것은 단순한 흡수이기 보다는 세균의 효소에 의한 분해가 아닌가 추정된다.

EDTA로 outer membrane을 제거한 균체에서의 triphenylmethane의 탈색율은 반응 7분 후에 62%에 달하였

Table 2. Decolorization activity of triphenylmethane by culture filtrate and cell-free extract of *E. cloacae* MG82

Cell compartment	Enzyme activity (units)	Protein concn. (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Culture filtrate	0.00	0.04	0.00
Cell-free extract	8.00	5.46	1.45

다. 이 결과는 outer membrane이 친유성인 triphenylmethane의 세포내로의 흡수를 저해하는 것으로 추정된다.

더구나 EDTA와 lysozyme으로 처리한 세포의 흡수율은 98%에 달하였다. 이결과는 EDTA처리시 보다 높은 값이었으므로 peptidoglycan층도 outer membrane과 함께 triphenylmethane 흡수를 저해함을 알 수 있다. 아울러 흡수 저해 구조인 peptidoglycan층과 outer membrane을 제거한 spheroplast에서만 가장 높은 흡수율을 보여 주었다. 그러므로 triphenylmethane은 일단 세포내로 흡수된 다음 세포내의 효소에 의하여 분해되는 것을 알 수 있었다.

Gustaffson 등(13)은 *E. coli* 세균을 시료로 하여 EDTA와 lysozyme으로 처리하여 만든 spheroplast는 triphenylmethane흡수율이 증가한다고 하였다. 이 결과는 세포벽의 탄수화물성분의 변화가 있는 *emvA* 돌연변이주와 같은 triphenylmethane흡수율을 보여 주었다. 본 실험에서도 EDTA와 lysozyme으로 처리한 *E. cloacae* MG82의 spheroplast는 triphenylmethane흡수가 현저하게 증가한 결과로 미루어 볼 때, triphenylmethane 흡수의 저해구조는outer membrane과 peptidoglycan임을 추정할 수 있었다.

Triphenylmethane 탈색효소의 위치

Triphenylmethane이 세포의 어느 위치에서 탈색되는지 확인하기 위하여 culture filtrate분획과, glass bead로 파쇄한 cell-free extract분획을 이용하여 30분 동안 반응하여 triphenylmethane의 탈색 활성능을 측정하였다. Table 2에서 보여 주는 바와 같이 culture filtrate에서는 탈색능이 거의 나타나지 않았으나, cell-free extract에서는 1.45 units/mg의 triphenylmethane 탈색 활성을 보여 주었다.

Yatome 등(9)은 *Norcardia corallina*의 세포현탁액에 의하여 triphenylmethane이 탈색됨을 보고하였으며, Yatome 등(11)은 *Pseudomonas pseudomallei*에 의하여 triphenylmethane이 생분해됨을 발표하였으나 이 염료가 세포내에서 분해되는 지 세포내 상등액에서 분해되는지는 보고한 바 없다. 정 등(14)도 *Enterobacter cloacae*의 세포현탁액이 triphenylmethane를 탈색하는 결과를 보고하였다.

Yatome 등(10)은 *Bacillus subtilis*에 의한 tripheny-

Table 3. Comparison of decolorization activities of triphenylmethane by cell fractions of *E. cloacae* MG82

Cell fraction	Enzyme activity (units)	Protein concn. (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Periplasm	0.16	2.18	0.07
Cytoplasm	2.26	40.30	0.06
Cytoplasmic -membrane	4.27	32.25	0.13

lmethane의 분해는 세포내 효소에 의한 것으로 추정할 바 있다. 본 실험에서는 실정적인 결과에 의하여 triphenylmethane 탈색효소는 세포내에 존재함을 처음으로 확인할 수 있었다.

세포내의 어느 부위에 탈색효소가 존재하는지를 규명하기 위하여 periplasm, cytoplasm, 그리고 cytoplasmic membrane fraction의 탈색능을 조사하였다. Table 3에서 보여 주는 바와 같이 triphenylmethane을 탈색하는 specific activity를 비교한 결과 cytoplasmic membrane 분획은 0.13 units/mg으로 cytoplasm분획(0.06 units/mg)보다 3.2배 그리고 periplasm분획 보다는 2.4배나 높게 나타났다. Periplasm분획의 specific activity가 0.07 units/mg의 수치를 보여 주었지만 단백질 양과 효소활성이 다른 분획에 비하여 월등히 낮았으므로 periplasm분획이 갖는 탈색효소활성은 EDTA로 처리하는 과정에서 원형질막으로 부터 이탈한 효소가 오염된 것으로 판단되며, cytoplasm분획의 경우도 비활성이 낮은 것으로 보아 초원심분리과정에서 오염된 것으로 생각된다. 따라서 이 세균에서 triphenylmethane을 탈색하는 효소는 원형질막의 외측에 있을 것으로 생각된다.

이와 같은 triphenylmethane 탈색효소에 관한 연구는, M. Donard 등(12)은 triphenylmethane demethylase가 쥐의 microsome에 있다고 하였고, Yatome 등(10)은 triphenylmethane 탈색효소는 그람양성세균에 한하여 있으며, 그람양성세균인 *B. subtilis*의 경우 세포질내에 있다고 추정할 바 있다.

***E. cloacae* MG82 triphenylmethane 탈색효소의 최적 온도 및 열안정성**

Triphenylmethane 탈색효소의 최적 온도를 검토하기 위하여 cell-free extract를 조효소액으로 10-70°C의 범위에서 10°C 간격으로 15분간 반응시켜 효소활성을 측정 한 결과를 Fig. 3에 정리하였다. 그 결과 triphenylmethane 탈색효소는 50°C에서 최대활성을 나타내었다. 또한, 효소의 열 안정성을 조사하기 위해, 0, 35, 50, 70°C의 온도에서 1시간 처리한 후 잔여 효소의 활성을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같이 4°C에서의 triphenylmethane 탈색활성은 6시간 동안 거의 100%의 열안정성을 보여 주었으나, 35°C에서는 1시간 동안에 활성이 58%로

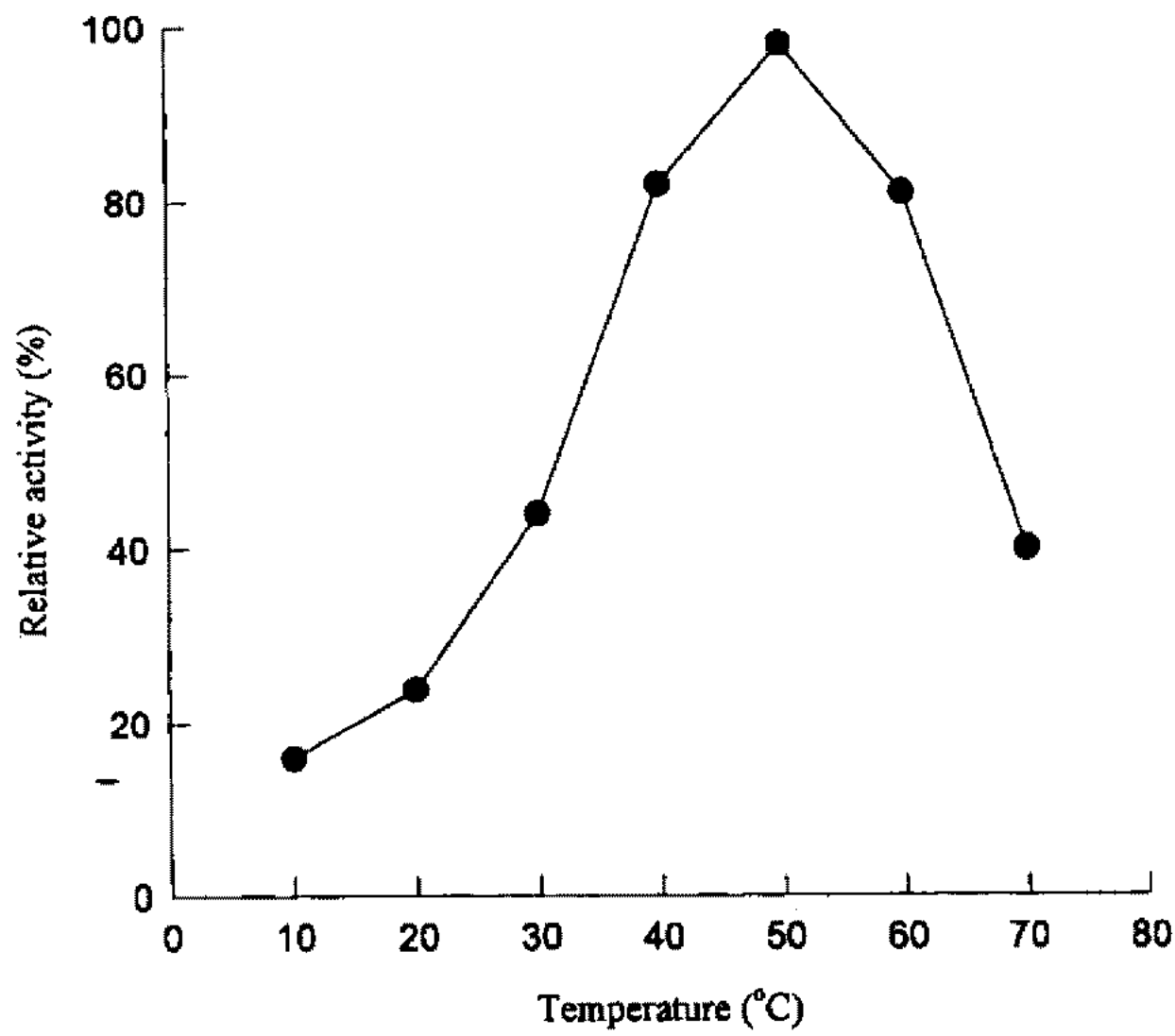


Fig. 3. Effect of temperature on the decolorization activity of triphenylmethane by the cell-free extract of *E. cloacae* MG82. The reaction was carried out at various temperatures in 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 7.0) for 10 min.

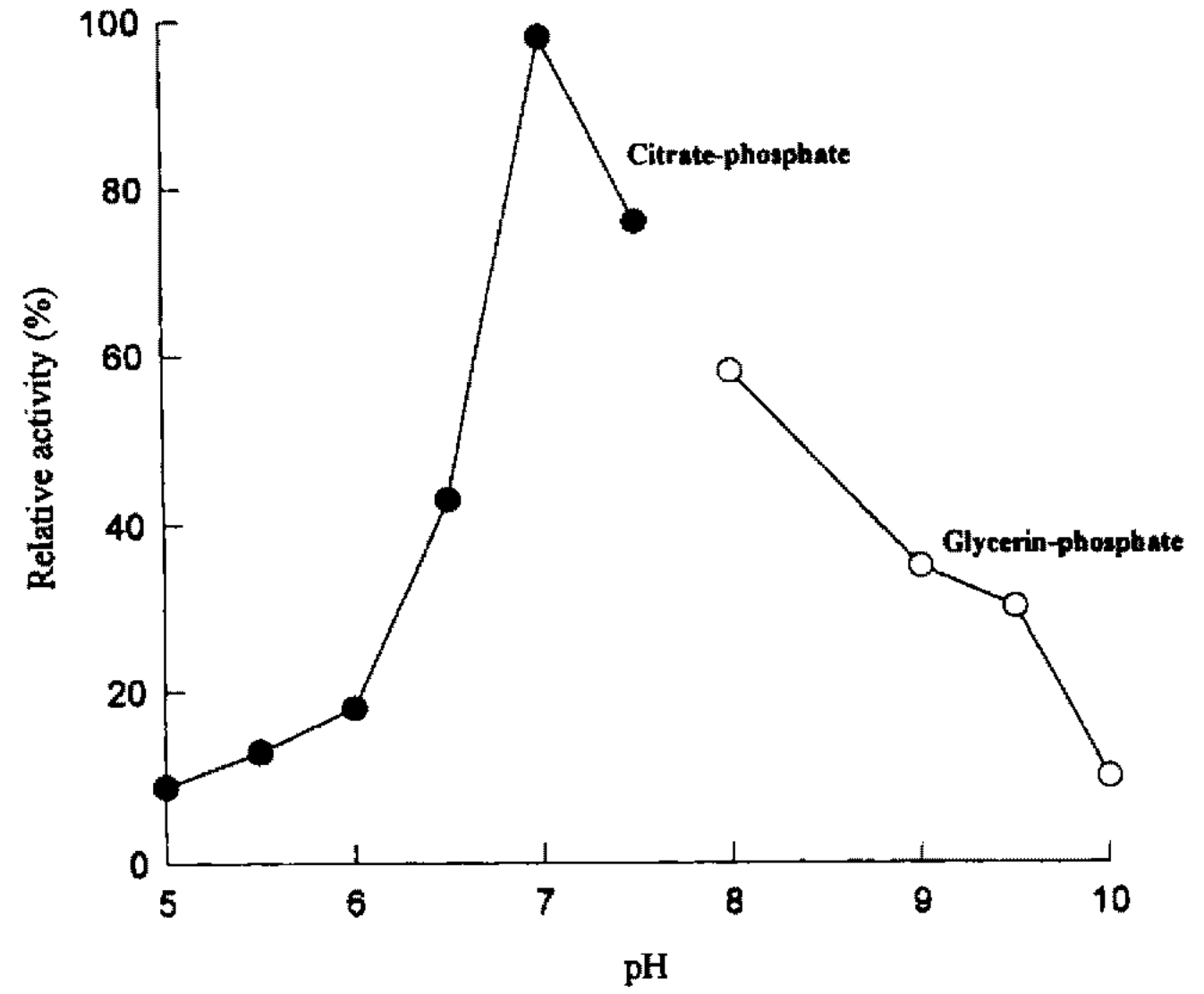


Fig. 5. Effect of pH on the decolorization activity of triphenylmethane by *E. cloacae* MG82. —●—; 50 mM citrate-phosphate, —○—; 50 mM glycerin-phosphate.

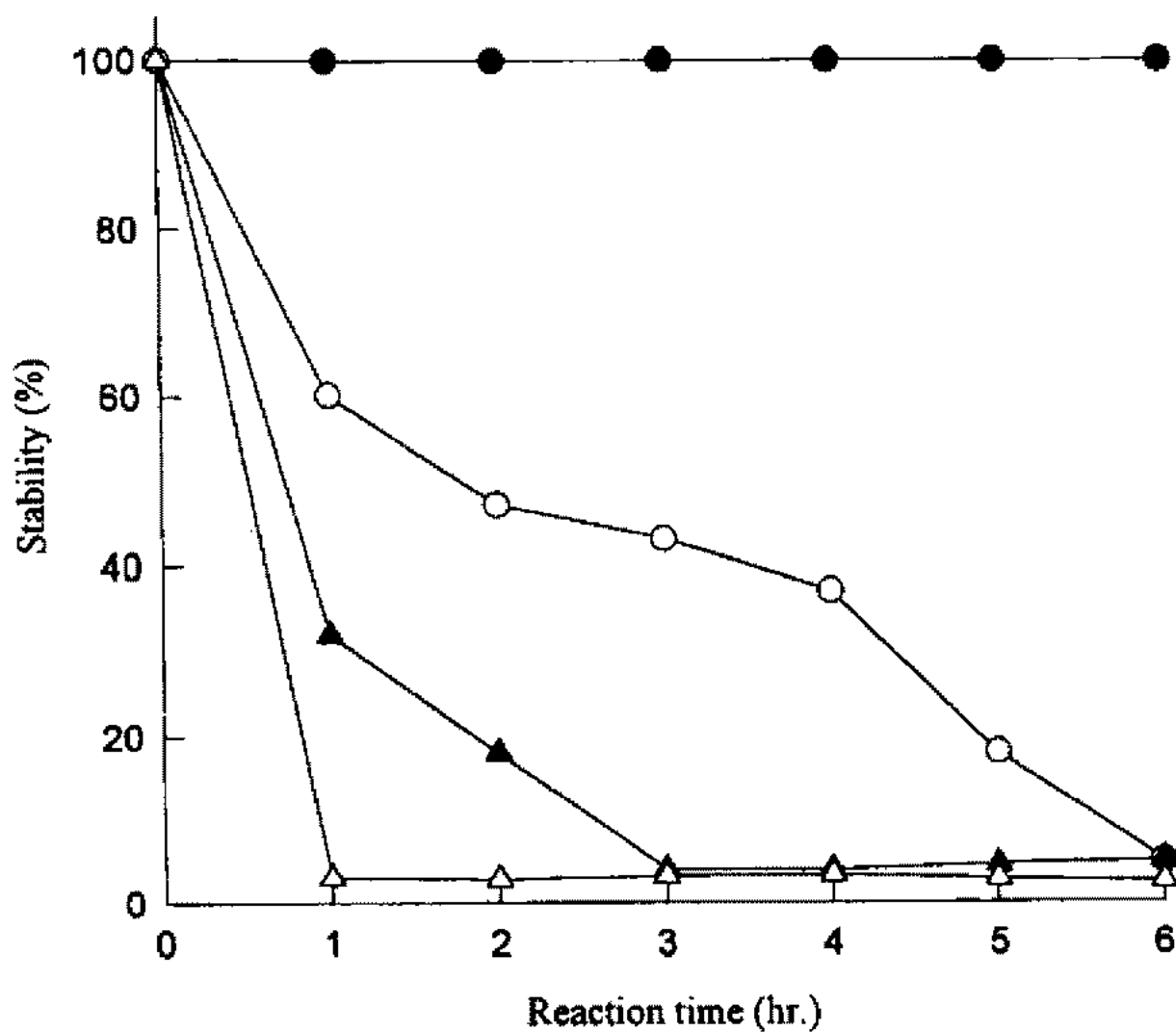


Fig. 4. Thermal stability of the decolorization activity of Triphenylmethane by *E. cloacae* MG82.

Cell-free extract was incubated at various temperatures at intervals, and the remaining activities were determined. —●—; 4°C, —○—; 35°C, —▲—; 50°C, —△—; 70°C

감소하였고 6시간 후에는 활성이 나타나지 않았다. 50°C에서는 3시간에서, 그리고 70°C에서는 1시간에서 활성이 완전히 소실되었다.

Triphenylmethane 탈색효소의 최적 pH

Triphenylmethane 탈색효소의 최적 pH는 50 mM citrate phosphate buffer와 50 mM glycerin phosphate buffer를 사용하여 조사한 결과 Fig. 5에서 보여 주는 것과 같다. Triphenylmethane 탈색효소는 pH 7.0에서 가장 높은 효소활성을 보여 주었다. 이 결과는 *B. subtilis*,

Table 4. Effect of metal ions on the decolorization activity of triphenylmethane *E. cloacae* MG82

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
Na ⁺	124.6	128.9
Mg ⁺⁺	153.5	154.2
Fe ⁺⁺	128.3	134.5
Zn ⁺⁺	125.3	116.1
Ca ⁺⁺	118.4	123.9

P. pseudomonallei 13NA 등의 탈색 최적 pH가 7.0인 것과 유사한 결과이었다(10, 11).

Triphenylmethane 탈색효소에 대한 금속이온의 영향

금속 이온이 Triphenylmethane 탈색 효소에 미치는 영향을 규명하기 위하여 원형질막 분획용액을 조효소액으로 여러가지 금속이온이 포함된 50 mM citrate-phosphate 완충액을 이용하여 37°C수욕조에서 10분간 반응시킨 다음 상대활성도를 측정하였다. 이 경우 금속이온의 최종농도는 각각 1 mM과 5 mM로 하여 triphenylmethane탈색활성을 조사하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이, 실험에 이용한 모든 금속이온이 대조구에 비하여 높은 효소 활성을 보여 주었으며, 이들 중 Mg⁺⁺이온이 탈색활성에 가장 효과적이었으며 1 mM에서 보다 5 mM에서 탈색활성이 높게 나타났다.

요 약

Enterobacter cloacae MG82에 의한 triphenylmethane

의 탈색은 배양 초기 triphenylmethane첨가 즉시 세포가 triphenylmethane을 흡수한 다음 세포내에서 효소에 의하여 triphenylmethane을 탈색시키는 것으로 추정되었다. *Enterobacter cloacae* MG82의 triphenylmethane 흡수 저해구조는 outer membrane과 peptidoglycan층임을 알 수 있었으며 세포현탁액이 0°C보다 37°C에서 탈색율이 증가한 것은 탈색과정에 효소가 관여하는 것으로 추정되었다. 배양 상등액에는 triphenylmethane탈색능이 없었으나 무세포 추출액에는 1.45 units/mg의 탈색활성을 보여 주었으므로, triphenylmethane탈색효소는 세포내 효소임을 알 수 있었다. 세포내 분획을 조사한바 triphenylmethane 탈색활성은 세포내 원형질막에 존재하였으며 이효소는 Mg⁺⁺의존성임을 밝혔다. 이 효소의 최적 pH는 7.0, 최적 온도는 50°C, 열 안정성은 35°C에서 1시간에 58%의 활성이 유지되었다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부의 기초과학연구 조성비(BRSI-95-4432)와 서울대학교 분자미생물학 연구센터(Research Center for Molecular Microbiology)를 통한 한국과학재단 우수 연구센터의 지원금으로 이루어 졌으므로 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Kean, B. H., Haskin, D. W. 1978. Drugs for intestinal parasitism. P_p 371-381. In W. Modell(ed), *Drugs of Choice*. C.V, Mosby Co, St. Louis.
2. Kingland, G. V. and Anderson, J. 1976. A Study of the feasibility of the use gentisin violet as a fungester for poultry feed. *Poult. Sci.* **55**: 852-885.
3. Wald, F. R., Synyder, M. J., and Gutberlet, R. L. 1977. Group B beta-hemolytic streptococcal colonization acquisition persistence and effect of umbilical cord treatment with triple dye. *Am. T. Dis. Child.* **131**: 178-180.
4. Nelson. C. R., and Hites, R. A. 1980. Aromatic amines in and near the Buffalo River. *Environ. Sci. Technol.* **14**: 1147-149.
5. Au. W., Butler, M. A., Bloom, S. E., and Maltmey, T. S. 1979. Futher study of the genetic toxicology of triphenylmethene. *Mutat. Res.* **66**: 103-112.
6. Au. W., Pathak, C. J. C., and Hsu, T. C. 1978. Cytogenic toxicity of triphenylmethene and crystal violet on mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.* **58**: 269-276.
7. Crpps, C., Bumpus, J. A. and Aust, S. D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Enviorn. Microbiol.* **54**: 1114-1118.
8. Ollikka, P., Alhomaki, K., Leppanen, V.M., Gloumoff, T., Rajjola, T. and Suominen, I. 1993. Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Enviorn. Microbiol.* **59**: 4010-4016.
9. Yatome, C., Yamada, S., Ogawa, T., and Matsui, M. 1993. Degradation of crystal violet by *Norcardia coralina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 565-569.
10. Yatome, C., Ogawa, T., and Matsui, M. 1991. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. *J. Environ. Sci. Health.* **26**: 75-87.
11. Yatome, C., Ogawa, T., Koga, D., and Idaka, E. 1981. Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomonallei* 13NA. *J. Soc. Dye. Colour.* **97**: 166-169.
12. McDonald, J. J., Breeden, C. R., North, B. M., and Roth, R. W. 1984. Species and strain comparision of the metabolism of triphenylmethene by liver microsomes. *J. Agric. Food Chem.* **32**: 596-600.
13. Gustafsson, P., Nordström, K., and Normark, S. 1973. Outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12 : Kinetics of the uptake of triphenylmethene by wild type and envelope mutants. *J. Bacteriol.* **116**: 893-900.
14. 정민선, 정영희, 지원대, 임재윤, 김영창, 김영수, 정영건, 민경희 1995. 내열성 *Enterobacter cloacae* MG 82에 의한 triphenylmethane색소의 분해. *미생물과 산업.* **21**: 325-330.
15. van der Western, H. M., Mayhew, S. G., and Veeger, C. 1978. Seperation of hydrogenase from intact cells of *Desulfovibrio vulgaris*, Purification and properties, *FEBS Lett.* **86**: 122-126.
16. Nivi re, V., Forget, N., Gayda, J. D. and Hatehikean, E. C. 1986. Characterization of the soluble hydrogenase from *Desulfovibrio afrucanus*. *Biochem. Biophy. Res. Comm.* **139**: 658-665.
17. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.

(Received 10 December 1996)