

머캅탄류 검출을 위한 *Thiobacillus thiooxidans*가 생산하는 메칠머캅탄 산화효소의 분리 및 정제

¹김 상 준 · ²신 현 재 · ²이 대 실 · [†]양 지 원
¹한국과학기술원 화학공학과 생물환경공학연구소, ²생명공학연구소 당생물학 연구실
(접수 : 2000. 3. 3., 게재승인 : 2000. 4. 7.)

Isolation and Purification of Methyl Mercaptan Oxidase from *Thiobacillus thiooxidans* for Detection of Mercaptans

Sang-Joon Kim¹, Hyun-Jae Shin², Dae-Sil Lee², and Ji-Won Yang^{1†}
¹Dept. of Chemical Engineering, KAIST, Taejon 305-701, Korea
²Glycobiology Laboratory, KRIBB, Taejon 305-333, Korea
(Received : 2000. 3. 3., Accepted : 2000. 4. 7.)

Methyl mercaptan oxidase was isolated and purified from *Thiobacillus thiooxidans* KCTC2505 for the detection of mercaptans. The procedure of purification involved DEAE-Sephacel and Superose 12 column chromatographies with recovery yields of 40 and 6.3%, and specific activity of 19.7 and 80.1 units/mg-protein, respectively. The molecular weight of purified methyl mercaptan oxidase was determined to be 68.1 kDa by SDS-PAGE. The extract from DEAE-Sephacel column chromatography had a high activity in oxidizing methyl mercaptan to produce formaldehyde which can be easily detected by purpald-coloring method. Optimum temperature for activity was observed at 43°C. This enzyme was activated by NH₄Cl and (NH₄)₂SO₄, and inhibited by KCl and NaCl.

Key Words : methyl mercaptan oxidase, *Thiobacillus thiooxidans*, purpald, enzyme purification

서 론

미국 의학계의 통계에 따르면 미국내 성인 인구의 65%에 해당하는 사람들이 만성 입냄새 증상(bad breath symptom)을 보이고 있으며(1) 이 중 2천 5백만 이상이 병적인 입냄새로 고통받고 있다고 한다. 이러한 인식과 같이하여 국내의 구강청정제(mouthwash) 시장은 1997년 한해 50억원 이상의 매출을 올리며 최근 크게 성장하고 있으며 미국의 경우에는 입냄새에 극히 민감한 문화적 특성상 연간 8억 5천만 달러를 상회하고 있다.

현재 많은 치과에서는 입냄새를 정량화하기 위하여 헬리미터(halimeter)를 사용하고 있으나(2) 고가이고 질량 여부를 판단하기 위한 임상용이기 때문에 일상적인 진단용으로는 적합하지 않다. 따라서 입냄새 검출을 위한 범용센서의 개발이 절실히 요구된다고 할 수 있다.

입냄새의 대부분은 황화합물에 기인하며 황화수소(hydrogen sulfide), 디메칠머캅탄(dimethyl mercaptan) 그리고 메칠머캅탄

(methyl mercaptan, MM)이 주요구성성분이다(3). MM의 농도는 정상적인 구강상태인 경우 4-20 nmol/L이고 잇몸에서 피가 나는 염증이 있는 경우 4배로 증가한다(4). MM은 메칠머캅탄 산화효소(methyl mercaptan oxidase, MMO)와 반응 후 포름알데하이드와 과산화수소를 형성하며(5-7), 이 생성물들은 이미 보고된 다양한 발색법에 의하여 비교적 쉽게 정량이 가능하다(8-11). MMO의 MM에 대한 반응식은 아래와 같이 나타낼 수 있다.



MM을 대사할 수 있는 대표적인 미생물로는 *Thiobacillus* 종과 *Hyphomicrobium* 종이 있으며 MMO의 분리·정제 및 특성이 보고되어 있다(5-7). 본 연구에서는 황화수소 혹은 MM과 같은 악취가스에 높은 탈취능을 보이는 *Thiobacillus thiooxidans*에(12, 13) MM을 기질로 공급하여 MMO를 유도하였으며 유도된 효소를 분리·정제하고 저농도의 MM을 검출할 수 있는 발색법을 제안하였다.

재료 및 방법

시약 및 균주

효소의 활성측정을 위해 사용된 발색시약인 purpald는 Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였으며 4,800 ppm농도의

†Corresponding Author : Ji-Won Yang, Dept. of Chemical Engineering, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon, 305-701, Korea
Tel : 042-869-3964, Fax : 042-869-3910
E-mail : jwyang@kaist.ac.kr

MM 가스(in N₂)는 (주)덕양가스에서 구입하였다. 단백질 분자량 표준품은 Bio-rad(Hercules, CA, USA)의 low range protein molecular markers를 사용하였으며 효소의 분리·정제에 사용된 DEAE-Sephacel과 Superose 12 column은 Pharmacia LKB(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. 효소액 제조를 위해 사용된 균주 *Thiobacillus thiooxidans* KCTC2505은 생명공학연구소의 유전자은행으로부터 분양받아 배양하였다.

균주 배양 및 효소액의 제조

*T. thiooxidans*는 증류수 1 L당 Na₂S₂O₃ · 5H₂O 8.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, NH₄Cl 0.4 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.2 g, FeSO₄ · 7H₂O, glycerin 15 mL를 첨가한 배지에서 발효조 배양(30 °C, pH 6.7)을 실시하였다(13).

균체의 성장특성을 확인하기 위하여 500 mL 플라스크배양을 수행하였고 효소를 얻기 위한 대량배양일 경우는 10 L의 미국 Nalgene사의 증류수 용기를 발효조로 이용하였으며 이때 총 배양부피는 4 L였다. 용기의 screw cap은 중앙에 구멍을 뚫어 공기 주입관 및 MM 주입관 그리고 가스 배출관을 연결하였다. 배지와 접촉하는 가스 주입관의 끝에는 산기석을 연결했으며 반응기 밑 부분의 밸브를 통하여 균체를 채취·측정하였다. 통상적으로 균체 성장이 정지기에 이를 때까지 공기를 150 mL/min로 공급하였으며 MMO의 유도를 위하여 균체의 성장이 정지기에 도달한 후 공기의 공급을 중단하고 4,800 ppm MM 가스를 40시간동안 20 mL/min으로 공급하였다. 배지의 탁도는 UV spectrophotometer(8562A, Hewlett Packerd, U.S.A)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

상기 발효기에서 키운 균체를 4 °C, 5,000 g에서 10분간 원심분리한 후 침전된 균체를 15 mL의 10 mM Tris/HCl 완충액(pH 8.2)에 분산한 후 4 °C에서 초음파를 이용하여 분쇄하였다. 균체 잔류물질은 4 °C, 17,000 g에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 효소를 분리·정제하기 위하여 음이온 교환수지인 DEAE-Sephacel column (25×80 mm)에 KCl을 이용하여 0.0-0.5 M까지 농도 구배를 주면서 효소를 용출시켰다. 용출액은 8 mL/tube로 분획하였으며 활성분획을 회수하여 Amicon사의 ultrafiltration cell(MWCO: 10,000)을 이용하여 농축시킨 후 gel filtration chromatography인 Superose 10/30 column (25×300 mm)을 이용하여 최종 정제하였다. 각 분리단계 후의 각각의 효소액에 포함된 총단백질농도는 Bradford 방법을 이용하여 분석하였으며(14) 내부 기준물질로는 알부민(bovine serum albumin)을 사용하였다.

효소활성 측정 및 발색조건

효소활성은 MM의 효소반응생성물인 포름알데하이드를 purpald를 이용하여 발색시켜 정량하였다. 기질인 MM 수용액은 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5)에 4,800 ppm MM 가스를 3시간 동안 산기하여 얻었으며 최종 농도는 1.55 mM이었다. 발색시약은 34 mM purpald(in 2 N NaOH) 용액을 이용하였다(8). 분석할 효소액과 증류수의 혼합부피를 400 μL로 만들고 이를 둥근 바닥의 screw-test tube에 넣은 후 purpald 수용액 400 μL와 MM 수용액 200 μL를 차례로 섞고 밀폐하였다. 이 혼합액을 rotary incubator 내에서 36 °C, 30 rpm의 조건으로 20분간 배양한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소

활성 1 단위(unit)는 상기 반응조건에서 분당 생성되는 포름알데하이드의 nmol 수로 정의하였다.

SDS-PAGE

단백질의 분자량은 sodium-dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하여 확인하였으며 발색은 Pierce사(Rockford, USA)의 silver staining kit를 사용하였다.

효소의 활성에 미치는 염과 유기용매의 영향

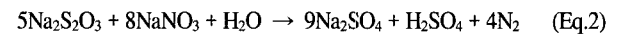
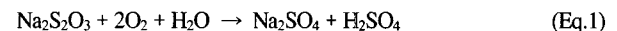
NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂SO₄ 그리고 NaCl을 각각 20에서 200 mM의 농도범위로 첨가하여 효소활성의 변화를 살펴보았다. 그리고 글리세린, 메탄올, 에탄올 그리고 아세톤과 같은 유기 용매를 반응혼합용액 1.0 mL에 10 혹은 20%의 부피비로 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. 이때 효소액은 gel filtration 후의 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

배양 특성

Thiobacillus thiooxidans KCTC2505의 배양특성을 확인하며 효과적인 MMO의 유도시기를 결정하기 위하여 플라스크배양을 실시하였다. 배양성분 중 글리세린은 공기 혹은 수용액 중에 있는 이산화탄소와 함께 미생물의 탄소원으로 이용하기 위해 첨가되었고(15), 에너지원으로는 미생물의 접촉이 쉽고 균체를 배지에서 분리하기가 용이하도록 유리황 대신 이온상태의 thiosulfate(S₂O₃²⁻)를 첨가하였다.

플라스크 배양 시 Figure 1과 같이 약 32시간 이후에는 미생물의 성장이 멈추었고 이때의 탁도(optical density, OD)는 2.3이었으며 thiosulfate는 80시간 후에 완전히 산화되었다. pH는 8시간까지는 감소하다가 점점 증가하여 결과적으로 초기치보다 0.7 상승하였는데 초기 pH가 내려간 까닭은 배지 성분 중 황성분이 아래의 (Eq.1)의 산화경로를 통해 황산을 생성하기 때문으로 유추되며(10), 그 이후 혐기적 상태와 가까워지므로 인산염 혹은 황산염이 환원됨에 따라 중탄산염(HCO₃⁻)이 형성되고 탄산(H₂CO₃)농도는 감소되어 pH가 상승하는 것으로 생각된다.



이때 균체의 성장이 정지기에 이르는 시간과 pH가 상승하는 시점의 큰 차이를 보이는 원인은 용존산소와 같은 전자수용체의 부족이라고 유추되었다. 따라서 nitrate(NO₃⁻)와 같은 전자수용체를 추가로 포함하는 (Eq.2)의 조건을 만들기 위해 KNO₃ 9 g/L를 초기배지에 첨가하였다. 이 경우 Figure 2와 같이 정지기는 47시간이며 pH는 34시간까지 감소하다가 증가하는 것이 관찰되었다. 즉, 전자의 경우에서 thiosulfate가 정지기에서도 완전히 산화되지 않은 것은 배지 속의 초기 산소농도뿐만 아니라 교반에 의한 공기에서 배지로의 산소의 공급이 충분치 않기 때문이며 후자의 경우는 nitrate가 부족한 산소의 공급을 대신하므로 균체의 성장이 정지기에 도달한 비슷한 시점에 pH가 다시 상승하는 것을 알 수 있었다. 이로부터 nitrate를 포함하지 않는

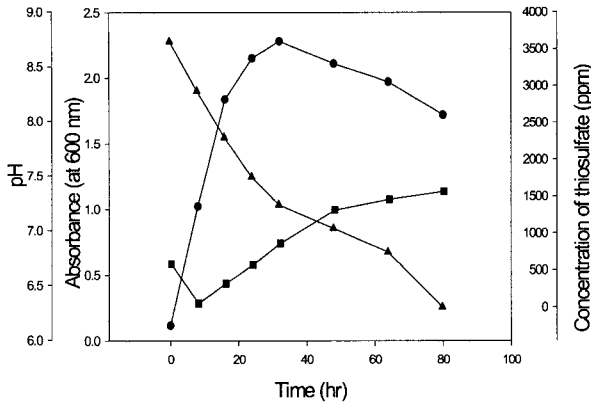


Figure 1. Time course on cultivation of *Thiobacillus thiooxidans* KCTC2505. ●, Cell growth; ■, pH; ▲, Thiosulfate.

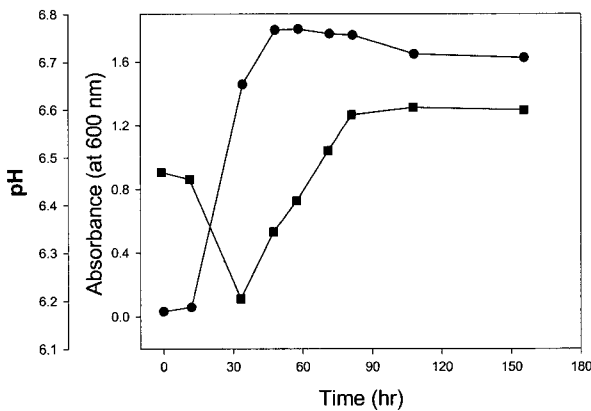


Figure 2. Time course on cultivation of *Thiobacillus thiooxidans* KCTC2505 with addition of nitrate. ●, Cell growth; ■, pH.

배지에서 균체 배양의 경우 MMO를 유도하기 위한 MM의 주입시기를 배지의 황성분이 거의 고갈될 시점인 정지기로 정하였으며 MM을 40시간동안 20 mL/min으로 주입하였다.

효소의 정제 및 특성

상기조건에서 유도된 MMO의 분리·정제 결과를 요약하여 Table 1에 나타내었다. DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피로 분리한 효소액의 비활성은 19.7 units/ mg-protein로서 crude extract에 비해 40.7 배 농축되었으며 수율은 40%였다. Gel filtration 크로마토그래피를 통해 최종 얻어진 비활성은 80.1, 수율은 6.3%로서 비활성은 크게 증가하였지만 수율은 상당량 감소되었음을 알 수 있었다. 본 효소를 적절한 검출시스템에 적용하기 위해서는 효소의 활성뿐만 아니라 수율도 고려되어야 한다고 사료되어 실제 응용에서는 DEAE-Sephacel 컬럼 분리 후의 효소액을 사용하는 것이 적합하다고 유추할 수 있다.

Table 1. Summary of purification of methyl mercaptan oxidase from *T. thiooxidans* KCTC2505

	Total units (mmol min ⁻¹)	Total protein (mg)	Specific Activity (units/mg-protein)	Purification Ratio	Recovery Yield (%)
Crude extract	72.8	150.5	0.48	1	100
DEAE-Sephacel	29.9	1.52	19.7	40.7	40
Gel filtration	4.57	0.057	80.1	167	6.3

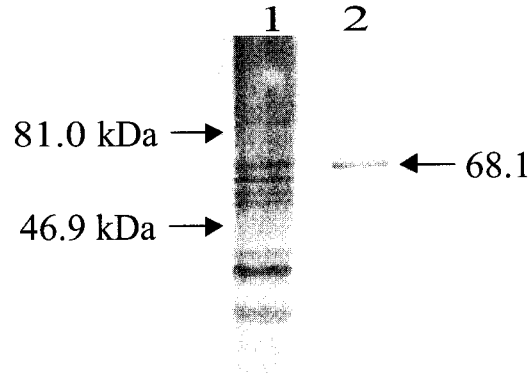


Figure 3. Silver-stained SDS-PAGE of MMO. Lane 1, Crude extract; Lane 2, After DEAE-Sephacel chromatography.

Figure 3은 상술한 유추를 검증하는 결과로서 *T. thiooxidans*는 DEAE-Sephacel 컬럼 분리 후 MMO로 추정되는 분명한 밴드가 관찰되었으며 68.1 kDa의 분자량을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 기질로 사용한 *Hyphomicrobium* EG에서는 40-50 kDa의 MMO가 유도되었고 (7) DMS(dimethyl sulfide)를 기질로 이용한 *T. thioiparus* TK-m에서는 40 kDa의 단백질 밴드(protein band)가 관찰되었다(5). 따라서 균주의 종에 따라 MMO의 특성이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 한편 본 효소의 최적 온도는 43℃였다.

본 MMO를 MM 검출시스템에 사용할 경우 효소의 안정성과 활성에 관계되는 염의 영향을 Figure 4에 나타내었다. NH₄Cl 100 mM에서 최대활성이 관찰되었으며 염을 첨가하지 않았을 경우에 대하여 그 활성이 1.6배로 향상되었고 (NH₄)₂SO₄에 경우는 200 mM까지 약 1.7 배 활성이 증가되었다. *T. thioiparus* TK-m와 *Hyphomicrobium* EG의 MMO는 10 mM이하의 적은 농도에서 각각의 염에 대해서 모두 활성이 감소되는 것과는 상반되는 결과이다(5, 7). KCl의 경우에는 100 mM에서 원래활성의 54.5%의 극심한 활성저하를 보였으나 K₂SO₄에서는 대체로 증가하였고 NaCl에서는 10 mM까지 원래활성의 약 25%까지 급격히 감소하다가 농도가 증가함에 따라 원래의 값으로 증가하였다. 상기 결과로부터 효소의 안정성과 활성을 높이기 위해서 NH₄Cl는 100 mM, (NH₄)₂SO₄는 200 mM의 조건이 적절하였음을 알 수 있었다.

발색단을 이용한 검출시스템 제작에 있어서는 발색단과 효소와 같은 분자수용체의 고정화를 위해 흔히 유기용매에 각 성분을 용해하여 고정상에 도포하고 증착하는 방식이 일반적인데(16) 이 경우 효소의 활성유지를 위한 적절한 유기용매의 선택이 매우 중요하다. 부피비 10%의 글리세린과 메탄올에

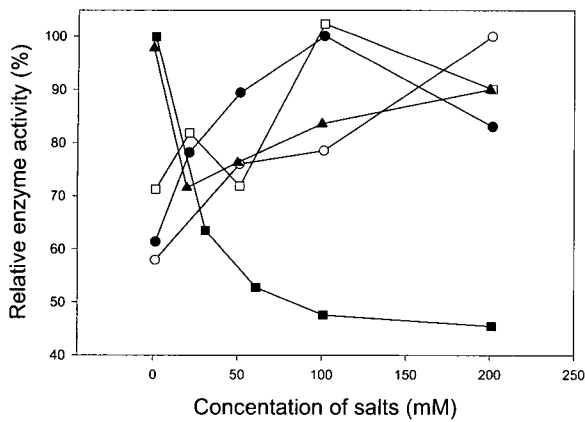
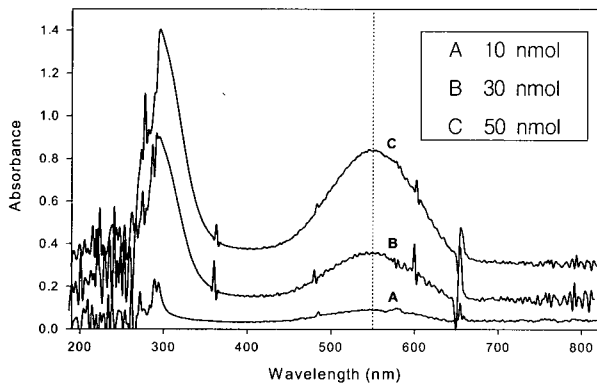
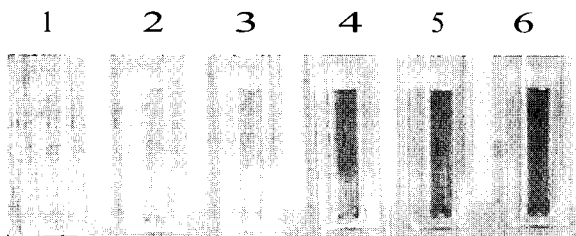


Figure 4. Effect of salt concentrations on enzyme activity. ●, NH₄Cl; ○, (NH₄)₂SO₄; ■, KCl; □, K₂SO₄; ▲, NaCl.



(a)



(b)

Figure 5. Change of absorbance at 550 nm (a) and photograph (b) from the reaction of purpald with formaldehyde. No. 1: 0, No. 2: 10, No. 3: 20, No. 4: 30, No. 5: 40 and No. 6: 50 nmol of formaldehyde.

대해서는 각각 76.2, 44.2%의 활성저하가 일어났으며 20%의 에탄올은 58.1%, 아세톤에는 완전히 활성이 저해되었다(미발표자료). 결과적으로 위와 같은 범위의 유기용매의 선택에서 첨가부피에 따른 가장 적은 활성의 저해가 관찰된 에탄올이 가장 적절한 유기용매임을 알 수 있었다.

구강내 가스중 수 십 nmol로 존재하는 MM이 효소반응으로 100% 전환된다고 가정한다면 최대 수 십 nmol의 포름알데하이드가 생성되게 된다. 본 연구에서는 효소활성 측정을 위해 purpald라는 발색단을 이용한 검출을 시도하기 위하여 상기 농도범위에서 눈으로 인지가능한 정도인지를 확인하였다. 따라서 효소활성측정 방법 중 효소액의 첨가를 3차 증류수로

대체한 동일한 조건에서 수 십 nmol의 포름알데하이드를 첨가한 결과 Figure 5-(a)와 같이 550 nm의 파장범위에서 포름알데하이드 농도에 비례하여 흡광도의 변화가 관찰되었으며 이때의 기울기는 0.0105, 상관계수(r^2)는 0.99로 높은 선형성을 나타내었다. Figure 5-(b)와 같이 색상은 자주색으로 30 nmol 이상의 범위에서 뚜렷한 색의 변화가 관찰되므로 purpald 발색법은 MM으로 대표되는 입냄새증상을 확인할 수 있는 검출 시스템에 적용가능한 민감도를 가지고 있다고 사료된다.

요 약

Thiobacillus thiooxidans KCTC2505에서 메칠머캅탄(MM) 가스를 기질로 메칠머캅탄 산화효소(MMO)를 유도할 수 있었으며 DEAE-Sephacel과 Superose 12 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 이때 얻어진 각 효소의 비활성은 각각 19.7과 80.1 units/mg-protein이었으며 효소의 최적 온도는 43 °C였다. 상기 정제된 효소액은 SDS-PAGE상에서 68.1 kDa의 분자량을 가진다. 이 효소는 암모늄염의 존재하에서는 활성이 증가하였으나 KCl 존재하에서는 감소하였으며 NaCl에 대해서는 거의 영향을 받지 않는 특성을 가지고 있다. 에탄올, 메탄올, 글리세린의 첨가에 대해 효소활성은 부분적으로 불활성화되었으며 아세톤의 경우에는 완전히 저해되었다. Purpald 발색법을 이용한 흡광도의 변화는 구강내 존재하는 MM 가스로부터 생성될 수 있는 수 십 nmol의 범위의 포름알데하이드에 대해 눈으로 인지가능한 발색시스템에 사용할 수 있음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 1999년도 한미창업투자(주)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

- Rosenberg, M., and Christopher A.G. McCulloch (1992), Measurement of oral malodors: current methods and future prospects, *J. Periodontol*, **63**, 776-782.
- Hennet, Philippe R., Béatrice Delille, and Jean Louis Davot (1998), Oral malodor measurements on a tooth surface of dogs with gingivitis, *AJVR*, **59**, 255-257.
- Quiryneen, M., C. Mongaridini, and D. van Steenberghe (1998), The effect of a 1-stage full-mouth disinfection on oral malodor and microbial colonization of the tongue in periodontitis patients. A pilot study, *J. Periodontol*, **69**, 374-382.
- Prete, G., G.R. Huggins, and J. Tonzetich (1978), Method of predicting and determining ovulation by monitoring the concentration of volatile sulfur-containing compounds present in mouth air, US patent 4119089.
- Gould, W.D. and T. Kanagawa (1992), Purification and properties of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thiooxidans* TK-m, *J. Gen. Microb.*, **138**, 217-221.
- Bont, J.A.M. De, J.P. Dijken, and W. Harder (1981), Dimethyl Sulphoxide and dimethyl sulphide as a carbon, sulphur and energy source for growth of *Hyphomicrobium* S, *J. Gen. Microb.*, **127**, 315-323.

7. Suylen, G.M.H., P.J. Large, J.P. Van Dijken, and J.G. Kuenen (1987), Methyl mercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium* EG, *J. Gen. Microb.*, **133**, 2989-2997.
8. Quesenberry, M.S. and Y.C. Lee (1996), A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: Application under periodation condition, *Analytical Biochemistry*, **234**, 50-55.
9. Lee, C.H. and C.M. Tsai (1998), Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation, *Analytical Biochemistry*, **267**, 161-168.
10. Muginova, S.V., I.A. Veselova, and T.N. Shekhovtsova (1999), Kinetics and pathways of oxidation of *o*-phenylenediamine, 3,3-dimethoxybenzidine, and 3,3,5,5-tetramethylbenzidine with hydrogen peroxide, catalyzed with horse radish peroxidase immobilized on various supports, *Russian J. Applied Chemistry*, **72**, 803-810.
11. Muginova, S.V., N.A. Akovbyan, and T.N. Shekhovtsova (1999), Use of paper as a support for immobilized peroxidase in a test method for the determination of mercury (II) traces, *J. Analytical Chemistry*, **54**, 569-573.
12. Shinabe, K., S. Oketani, T. Ochi, and M. Matsumura (1995), Characteristics of hydrogen sulfide removal by *Thiobacillus thiooxidans* KS1 isolated from a carrier-packed biological deodorization system, *J. Fermentation and Bioengineering*, **6**, 592-598.
13. Lee, U.Y. (1999), Isolation and deodorizing characteristics of sulfur oxidizing bacteria and ammonia oxidizing bacteria for the removal of sulfur containing malodorous compounds and ammonia, Ph.D. Dissertation, Ewha Womans University, Seoul.
14. Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
15. Briand, L.E., R.D. Bonetto, J.L. Ladaga, and E. Donati (1999), Bulk and surface characterization of crystalline and plastic sulphur oxidized by two *Thiobacillus* species, *Process Biochemistry*, **34**, 249-256.
16. Kwon, S.K. (1994), A study on the preparation of polyurethane diagnostic membrane for urine glucose test, *J. Korea Ind. & Chemistry*, **5**, 975-980.