

## *Enterococcus faecalis* RKY101 생산하는 Fumarate Reductase의 특성

박미란·<sup>†1,2</sup>김도만·<sup>1</sup>류화원·<sup>3</sup>이진하  
전남대학교 의공학 협동과정, <sup>1</sup>생물화학공학과, <sup>2</sup>촉매연구소, <sup>3</sup>Hokkaido대학교 농업대학원  
(접수 : 2000. 5. 19., 게재승인 : 2000. 6. 19.)

## Characteristics of Fumarate Reductase from *Enterococcus faecalis* RKY1

Mi-Ran Park, Doman Kim<sup>†1,2</sup>, Hwa-Won Ryu<sup>1</sup>, and Jin-Ha Lee<sup>3</sup>  
Department of Biomedical Engineering, <sup>1</sup>Chemical Engineering,

<sup>2</sup>The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan  
(Received : 2000. 5. 19., Accepted : 2000. 6. 19.)

An oxygen-sensitive fumarate reductase has been purified from the cytosol fraction of the *Enterococcus faecalis* RKY1, grown anaerobically on a defined medium containing glycerol and fumarate. A major portion of the purification was performed with employing Triton X-100 and reducing agents by Phenyl-sepharose CL-4B, DEAE-sepharose, and Sephadex G-150. The final activity was 0.42 unit/mg. The deduced molecular mass of active band was 66 kDa. The optimal pH and temperature for the activity were 7.0 and 38°C, respectively. The enzyme activity was not affected by 1mM metal ions such as BaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, and by EDTA. Partially purified enzyme was yellow in color; spectroscopic study indicated the presence of flavins as a cofactor.

**Key Words** : *Enterococcus faecalis* RKY1, fumarate reductase, flavin, enzyme purification

### 서론

Fumarate reductase(FRD)[EC 1. 3. 99. 1]는 최종전자수용체로서 fumarate를 기질로 이용하는 많은 혐기성 미생물에서 fumarate를 succinate로 환원하는 반응을 촉매하는 중요한 효소이다. Fumarate를 환원시키는 능력은 그람음성 박테리아와 통성의 그람양성 박테리아의 일반적인 특성이며(1), 녹조류, 원생동물, 장내기생충 및 해양미생물과 같은 진핵세포의 대사에서도 중요하다. 또한, Fumarate의 환원은 호기성균내에서 생산되는 succinate dehydrogenase(SDH)에 의해 succinate가 fumarate로 산화되는 반응의 역반응이기도 하다(1).

각기 다른 미생물로부터 분리한 fumarate reductase는 매우 다른 생물학적 특성을 지니고 있다. *E. coli*(2,3), *Vibrio succinogenes*(4,5), *Desulfovibrio multispirans*(6)로부터 분리한 효소는 막에 결합되어 있고, 최종 전자전달반응을 촉매하는 반면, 맥주 효모(7)나 빵효모(8,9), *Methanobacterium thermoautotrophicum*(10) 기원의 효소는 세포질 상에 존재하는 용해성 효소이며 생합성적

기능을 갖는다고 보고되고 있다. 막에 결합되어 있는 *E. coli*, *Vibrio succinogenes*, *Desulfovibrio multispirans* 기원의 fumarate reductase는 공유적 또는 비공유적으로 결합된 flavin adenine dinucleotide(FAD)를 포함하고 있으며, 세포질상에 존재하는 효소 중 *M. thermoautotrophicum*에서 분리된 것은 빵효모나 맥주 효모의 효소와는 다르게 보조인자로서 FAD를 함유하고 있지 않다(10). *E. coli*에서 분리된 막에 부착된 fumarate reductase는 촉매작용에 관여하는 두개의 단백질 subunits과 두개의 anchor 단백질로 구성되는데, 촉매 작용에 관여하는 단백질은 69 kDa과 27 kDa의 단량체이고 anchor에 관여하는 단백질은 15, 13 kDa의 단량체로 구성되어 있다(11). 69 kDa인 FRD-A는 FAD를 함유하고 있으며(12), 27 kDa인 FRD-B는 iron-sulfur cluster를 함유하는 것으로 알려져 있다(13).

FRD에 의해 촉매화되어 생성되는 succinic acid는 트리카르복실산화물(TCA)의 중간대사산물로, 비록 농도는 낮지만 거의 모든 식물과 동물세포에서 발견되는 유기물이다. 숙신산과 그 유도체들은 고분자 합성재료, 식품, 의약품 및 화장품, 플라스틱, 1,4-butanediol 및 tetrahydrofuran의 생산을 위해 사용되는 4-탄소의 중간체로 유용성이 크다(14).

본 연구에서는 고농도의 fumarate를 succinate로 전환하는 통성 혐기성, 그람 양성 박테리아인 *Enterococcus faecalis* RKY1(15, 16)이 생산하는 fumarate reductase를 분리·정제하였으며, 이 효소의 특성에 대해 조사하였다.

<sup>†</sup>Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
Tel : 062-530-1844, Fax : 062-530-1849  
E-mail : dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주와 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 *Enterococcus faecalis* RKY1로 fumarate와 glycerol을 포함한 배지(fumarate 100 g/L, glycerol 20 g/L, yeast extract 15 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g/L, NaCl 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L) 내에서 head space를 CO<sub>2</sub>로 치환한 후 38°C에서 혐기적으로 배양하였다(15). 모든 시약은 시약등급을 사용하였다.

### 조효소액의 준비

배양액을 4°C에서 원심분리하여 회수한 세포를 1 mM Dithiothreitol(DTT, Sigma Co. USA), 10 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 sodium phosphate buffer(0.05 M, pH 6.8)로 2회 세척한 후 buffer 1 mL당 0.5 g(wet wt.)의 농도로 현탁하였다. 이 현탁액을 4°C에서 sonicator(VCX 400, Sonics & Materials Inc.)로 파쇄하여 11,000×g로 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 조효소액을 준비하였다. 조효소액은 사용할 때까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

### 효소 활성 측정

Fumarate reductase의 활성은 Lemire 등(17)의 방법을 변경하여 fumarate를 기질로 570 nm에서 환원된 benzyl viologen 산화 초기 속도를 측정하여 결정하였다. 즉, 마개를 막은 4.5 mL 큐벳을 이용하여 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol이 함유된 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 2.5 mL, 100 μL의 benzyl viologen(2.5 mg/mL), 90 μL의 sodium dithionite(20 mM), 50 μL의 효소액을 넣어 천천히 두 번 섞어주었다. 이에 500 mM sodium fumarate(pH 6.8) 100 μL를 첨가하여 UV-Vis recording spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 570 nm에서 연속적인 흡광도 감소를 측정하였다. 활성의 1 unit은 분당 산화된 benzyl viologen의 1 μmol에 해당하며, 570 nm에서 benzyl viologen의 몰흡광계수는  $7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이다(18).

### 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin(1 mg/mL, Sigma, Co. USA)을 표준단백질로 하여 Bradford 법(19)으로 정량하였고, 효소정제과정 중의 단백질 농도는 분광광도계를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### 효소의 정제

조효소액에 비이온성 계면활성제인 0.5%(v/v) Triton X-100 (Duksan Pharmaceutical Co., LTD)을 가하여 4°C에서 1시간 동안 교반시킨 후 이를 26,000×g에서 30분 동안 4°C에서 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상등액을 취하였다.

Triton X-100 추출물(660 mg, 2319 units)을 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 Phenyl Sepharose CL-4B column(4.5×9 cm)에 loading하고 50 mL/hr의 속도로 동일 완충액 250 mL로 세척하였다. 용출은 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 증류수를 이용하여 buffer의 이온강도를 50 mM에서 0 mM로 단계적으로 감소시키면서 실시하였다. 활성이 보이는 분획을

모아 ammonium sulfate로 60%까지 포화시킨 후 침전 분리하였다. 얻은 농축 효소액을 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol을 함유한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)로 평형화시킨 DEAE-sepharose CL-6B column(2.5×10 cm)에 loading하여 흡착시킨 다음, NaCl농도를 0~0.5 M까지 단계적으로 증가시키면서 112 mL/hr의 유속으로 용출하였다. 용출된 분획중 활성이 있는 분획을 모아 ultrafiltration membrane(30 KDa, Amicon INC., USA)을 이용하여 농축하였다. 농축액을 1 mM DTT와 10 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 0.02M sodium phosphate buffer(pH 6.8)로 평형화시킨 Sephadex G-150 column(1.1×90)에 loading하고 10 mL/hr의 유속으로 겔 여과한 뒤, 효소 활성이 있는 부분을 모아 회수하였다.

### SDS-PAGE

Laemmli(20)의 방법에 따라 10% gel를 사용하여 행하였다. Gel 상의 단백질을 Coomassie brilliant blue R을 사용하여 염색하였다.

### 분광분석

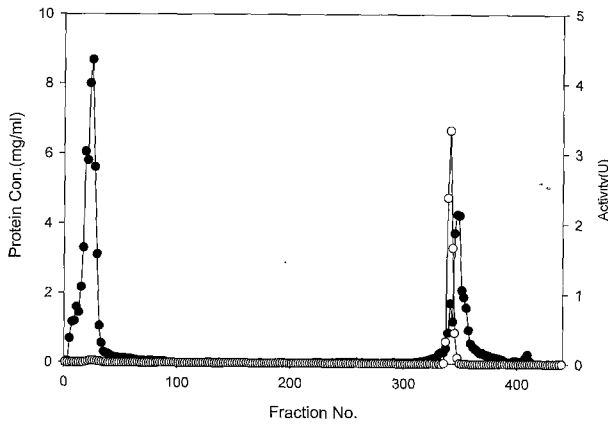
Fumarate reductase의 흡수 스펙트럼은 UV-Vis Recording Spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

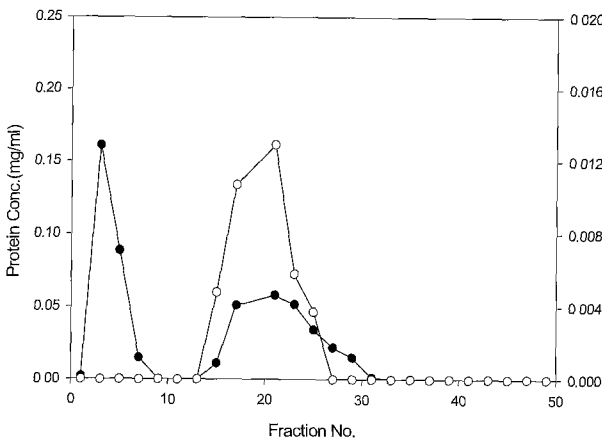
### Fumarate reductase의 정제 및 분자량

막에 결합하고 있는 단백질을 분리하기 위하여 조효소액에 Triton X-100, Triton X-114, Tween 40, Tween 60, Tween 80의 여러 가지 비이온성 계면활성제를 처리하였다. Triton X-100, X-114, Tween 60을 사용하였을 때 세배 정도의 많은 양의 단백질들이 추출되었다. Tween 60의 경우, 효소의 활성면에서는 가장 낮았다. 반면에 Triton X-100를 처리하였을 경우 가장 높은 비활성을 나타내었다. 따라서 Triton X-100(HLB 13.5)을 처리하여 막 단백질을 추출하였다. 이 과정에서 활성 손실은 없었다. 준비된 Triton X-100 추출물을 Phenyl Sepharose CL-4B column을 이용하여 분리한 fraction은 12.11 units/mg의 비활성을 가져 조효소액(3.5 units/mg)에 비하여 3.4배의 정제된 효소액을 얻을 수 있었다(Figure 1). 다음으로 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography를 하고, Sephadex G-150 gel filtration chromatography를 이용하여 fumarate reductase를 부분 정제하였다(Figure 2). 정제 과정에서 Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography과정(12.11 units/mg)을 제외하고는 비활성이 계속적으로 감소하여 gel filtration 후에는 0.42 unit/mg의 비활성을 보였다. 이는 정제 과정이 혐기적인 조건에서 행해지지 않아, 산소와의 접촉으로 인하여 활성이 손실된 것으로 보인다(Table 1).

단계별로 정제된 단백질의 순도 및 분자량을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과는 다음과 같다(Figure 3). Phenyl Sepharose CL-4B column chromatography 과정에서 약 80%의 불필요한 단백질을 제거하였다. Sephadex G-150 gel filtration chromatography를 거쳐서 약 71, 66, 그리고 52 kDa으로 구성된 단백질들을 얻을 수 있었으며, 66 kDa의 단백질 밴드가 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.



**Figure 1.** Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography of fumarate reductase. The column(4.5×9 cm) was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol. The enzyme adsorbed was eluted by a linear decreasing gradient of sodium phosphate concentration from 50 mM to 0 mM at the flow rate of 50 mL/hr. —●—, protein concentration —○—, FRD activity.



**Figure 2.** Gel filtration of fumarate reductase on Sephadex G-150. The column(1.1×90 cm) was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol at the flow rate of 10 mL/hr. —●—, protein concentration —○—, FRD activity.

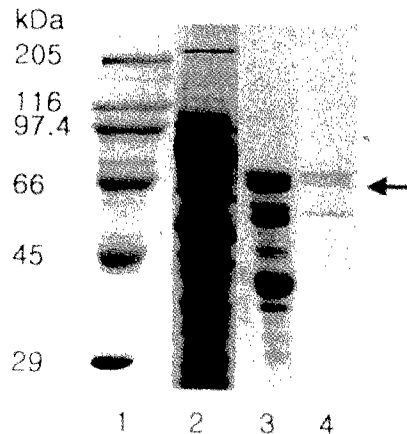
**환원제의 영향**

Fumarate reductase의 산소 민감성을 조사하기 위해, 부분 정제된(15 mg/mL의 단백질 농도) 단백질을 다른 시간간격을 두고 공기 중에 노출시켰다(Table 1). 다양한 환원제의 존재하에서의 효소액에 대한 공기 노출시 영향은 3시간 동안 공기에 노출시에는, 조사한 농도의 모든 환원제가 활성을 유지하였다. 그러나 27시간 후, 어떠한 환원제도 고유의 효소 활성을 100%는 유지할 수 없었으며, 단지 활성 손실 시간을 지연시켜 줌을 확인하였다. 환원제 존재하에서 공기 중 노출 시간을 지연시켜 본 결과 계속적으로 활성이 감소함을 확인하였으며 48시간 동안 공기 중에 노출시켜 본 결과 60%의 역가가 손실됨을 확인하였다. 이 결과는 fumarate reductase 활성 손실이 비가역적임을 가리킨다. 따라서, 모든 정제 과정의 역가 손실을 최소화하기 위해 1 mM DTT, 10 mM 2-mercaptoethanol을 사용하였다.

**Table 1.** Effect of reducing agent on the activity of fumarate reductase.

Reducing agent	Concentration (mM)	% Activity after exposure to air for	
		3 hr	27 hr
None(control)	—	100	84.5
Dithiothreitol	0.5	105.1	93.3
	1	111.45	
	5	105.1	
	10	110.1	
2-mercaptoethanol	5	100.7	91.4
	10	102.6	
	15	100.9	
	20	100.5	

\* The effect of oxygen in air was tested by exposing the enzyme to the air at room temperature. The enzyme preparations were vortexed periodically.



**Figure 3.** SDS-PAGE of fumarate reductase from *Enterococcus faecalis* RKY1. Lane 1, protein molecular weight markers: Lane 2, crude enzyme: Lane 3, after phenyl-sepharose CL-4B column chromatography: Lane 4, after sephadex G-150 gel filtration. The arrow indicates the protein band of deduced fumarate reductase.

**금속이온의 영향**

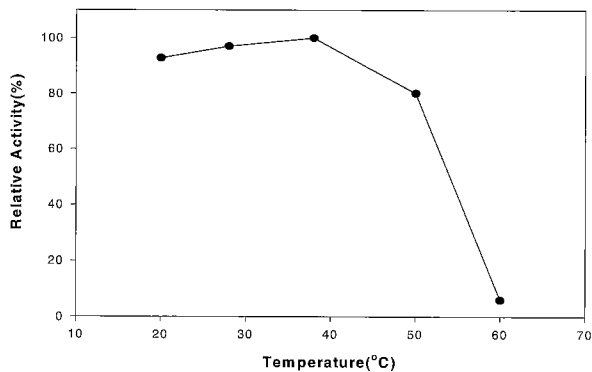
효소 활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 반응액 내에 여러 가지의 2가 금속이온, 즉, BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 그리고 EDTA를 1 mM씩 첨가하여 금속이온을 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다. 조효소액을 금속이온과 혼합하여 실온에서 30분 동안 방치 한 후, 활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같았다. 효소 활성은 모든 금속이온에 대하여 거의 저해를 받지 않았다. 이는, Khandekar 등(10)이 발표한 *Methanobacterium thermoautotrophicum* 유래의 fumarate reductase가 Cu<sup>2+</sup> 첨가시 80%의 활성이 손실되는 결과와 비교되어 효소의 생산 균주 특이성이 있음을 알 수 있다.

**온도의 영향**

*Enterococcus faecalis* RKY1이 생산하는 fumarate reductase 효소 활성의 최적온도를 알아보기 위해 각 온도별로 활성을 측정

**Table 2.** Effect of various metal ions on the fumarate reductase activity.

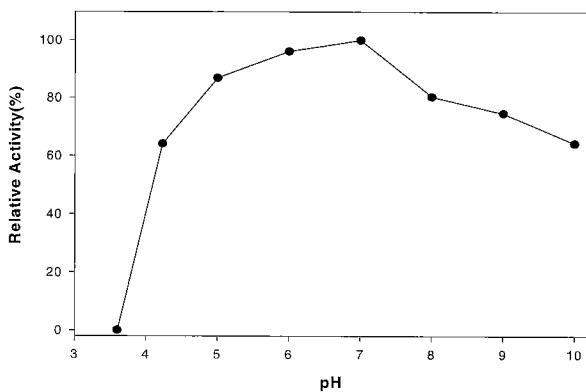
Metal ions(1 mM)	Relative activity(%)
None	100
BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	93
HgCl <sub>2</sub>	99
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	101
ZnCl <sub>2</sub>	103
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	99
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	102
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	104
EDTA	101

**Figure 4.** Effect of temperature on activity of the fumarate reductase.

하였다(Figure 4). 그 결과 38°C에서 최대활성을 나타내었으며 20~40°C에 이르는 넓은 범위에서 높은 활성을 관찰할 수 있었다.

#### pH의 영향

*Enterococcus* sp. RKY1이 생산하는 fumarate reductase의 효소 활성에 대한 최적 pH를 조사하였다. pH 3.6~5는 20 mM sodium acetate buffer, pH 6~8은 20 mM sodium phosphate buffer, pH 9~10은 20 mM glycine-NaOH buffer를 사용하여 실온에서 30분간 방치 후 활성을 측정하였다. 최적 pH는 7.0이었으며, pH 5.0~8.0 사이에서도 80%이상의 활성을 보여주었다(Figure 5).

**Figure 5.** Effect of pH on activity of the fumarate reductase. The following buffers were used: 20 mM sodium acetate buffer (pH 3.6~5), 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6~8), 20 mM glycine-NaOH buffer(pH 9~10).

#### Fumarate reductase의 광학적 특성

부분 정제된 fumarate reductase는 노란색을 띠었다. 이 효소의 UV와 가시광선의 흡수스펙트럼을 조사해본 결과 276, 346, 그리고 465 nm에서 최대 흡수를 보여주어, Weiner 등(2)이 발표한 FRD 효소의 특성과 같은 결과를 보였다. Flavin 분자는 460 nm 근처 영역에서 흡수파장을 갖는다고 알려져 있다. 이러한 결과로부터 flavin이 보조인자로서 효소와 결합하고 있는 것으로 확인되었다.

#### 요약

본 연구에서는 고수율로 fumarate를 succinate로 생물 전환하는 통성박테리아 *Enterococcus faecalis* RKY1이 생산하는 fumarate reductase의 특성을 조사하였다. 세포막에 결합된 단백질을 추출하기 위하여 Triton X-100을 이용하여 가용화시켰으며 Phenyl-Sepharose CL-4B, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-150의 column chromatography를 이용하여 부분 정제하였다. 활성 단백질의 크기는 66 kDa으로 추정되었다. 혐기적으로 배양한 세포로부터 얻은 효소이므로 공기 중에 장시간 노출시 활성이 감소하였다. 이를 보완하기 위하여 1 mM DTT, 2-mercaptoethanol을 첨가하여 활성 손실을 최소화 하였다. Fumarate reductase의 최적 pH 및 온도는 각각 7.0과 세포의 최적 배양온도인 38°C였다. 각종 금속이온의 결과를 조사한 결과 활성 저해를 받지 않았으며, 특히 다른 미생물에서 분리된 효소와는 달리 Cu<sup>2+</sup>와 같은 금속 이온에 대해서 영향을 받지 않았다. 부분 정제된 효소는 노란색을 띠었으며 465 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었고 flavin이 보조인자로서 결합되어 있음을 확인하였다.

#### 감사

본 연구는 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비(1998-020-E00016)에 의하여 지원되었으며 이에 감사를 드립니다. 또한, 지속적으로 cell을 제공해주신 생물분리·정제 실험실의 위영중 학형에게 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Jaap J. Van Hellemond and Aloysius G M. Tielens (1994), Expression and functional properties of fumarate reductase, *J. Biochem.* **304**, 321-331.
2. Dickie, P., and J. H. Weiner (1979), Purification and characterization of membrane-bound fumarate reductase from anaerobically grown *Escherichia coli*. *Can. J. Biochem.* **57**, 813-821.
3. Robinson, J. J., and J. H. Weiner (1982), Molecular properties of fumarate reductase isolated from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Can. J. Biochem.* **60**, 811-816.
4. Kroger, A (1978), Fumarate as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **505**, 129-145.
5. Uden, G., H. Hackenberg, and A. Kroger (1980), Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.* **591**, 275-288.
6. He, S. H., D. B. DerVartanian, and J. LeGall (1986),

- Isolation of fumarate reductase from *Desulfovibrio multi-spirans*, a sulfate reducing bacterium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 1000-1007.
7. Tisdale, H., J. Hauber, G. Prager, R. Turini, and T. P. Singer (1968), Studies of succinate dehydrogenase. 15. Isolation, molecular properties and isoenzymes of fumarate reductase. *Eur. J. Biochem.* **4**, 472-477.
  8. Muratsubaki, H., and T. Katsume (1982), Purification and properties of fumarate reductase from baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2909-2917.
  9. Muratsubaki, H., and T. Katsume (1985), Characterization of fumarate reductase from baker's yeast: essential sulfhydryl group for binding of FAD. *J. Biochem.* **97**, 1201-1209.
  10. Khandekar, S. S., and L. D. Eirich (1989), Purification and characterization of an anabolic fumarate reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(4), 856-861.
  11. Lemire, B. D., J. J. Robinson, and Joel H. Weiner (1982), Identification of membrane anchor polypeptides of *Escherichia coli* fumarate reductase. *J. Bacteriol.* **152**(3), 1126-1131.
  12. Weiner, J. H., and P. Dickie (1979), Fumarate reductase of *E. coli*. Elucidation of the covalent-flavin component. *J. Biol. Chem.* **254**, 8590-8593.
  13. Cole, S. T., T. Grundstrom, B. Jaurin, J. J. Robinson, and J. H. Weiner (1982), Location and nucleotide sequence of *frdB*, the gene coding for the iron-sulfur protein subunit of the fumarate reductase of *E. coli*. *Eur. J. Biochem.* **126**, 211-216.
  14. Nghiem, N. P., B. H. Davison, J. E. Thompson, B. E. Suttle, and G. R. Richardson (1996), The effect of biotin on the production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**(58), 633-638.
  15. Ryu, H. W., J. S. Yun, and K. H. Kang (1998), Isolation and characterization of the *Enterococcus sp.* RKY1 for biosynthesis of succinic acid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(6), 545-550.
  16. Kang, K. H., J. S. Yun, and H. W. Ryu (2000), Effect of culture conditions on the production of succinate by *Enterococcus faecalis* RKY1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(1), 1-7.
  17. Lemire, B. D. and Joel H. Weiner (1986), Fumarate reductase of *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology.* **126**, 377-386.
  18. Spencer, M. E. and J. R. Guest (1973), Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **114**, 563-570.
  19. Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. Protein Methods(2nd edition), 62-67.
  20. Laemmli, J. K. (1970), Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.