

홍색 유황세균 *Thiocapsa roseopersicina*가 생산하는 수소생산 효소의 정제 : Ammonium sulfate 침전 및 열처리의 효과

최은혜^{*,**}, 오유관^{*}, 김미선[†]

*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터, **충남대학교 미생물학과

Purification of Hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* : Effect of Ammonium Sulfate Precipitation and Heat-Treatment

Eun-Hye Choi^{*,**}, You-Kwan Oh^{*}, Mi-Sun Kim[†]

*Bioenergy Research Center, Korea Institute of Energy Research, 71-2, Jang-dong, Yusong-gu, Daejeon, 305-343, Korea

**Department of Microbiology, Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and heat-treatment on hydrogenase which was extracted from the cytoplasmic fraction of the phototrophic purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347 was studied. Crude enzyme extract was prepared by centrifugation(28,000×g, 400,000×g) after sonication of cells grown under photosynthetic condition for 96 hrs. Various conditions of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and heat-treatment were examined and the effect of protein concentration was analyzed by SDS-electrophoresis between the treatments. Optimum conditions for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and heat-treatment for evolution hydrogenase activity were 40-60% saturation and 60°C for 20 min, respectively, which exhibited the specific hydrogenase activity of 0.78 U/mg-protein. Specific hydrogenase activity was decreased to 31.6% when the heat-treatment at 60°C increased from 20 min to 5 hrs.

KEY WORDS : *thiocapsa roseopersicina*(광합성 홍색 유황세균), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전), heat-treatment(열처리), hydrogenase(수소생산효소)

1. 서 론

지구 온난화와 같은 심각한 환경문제와 아울러

화석연료의 한계성은 인류에게 새로운 에너지를 개발하여야 한다는 경고를 주고 있다. 수소는 에너지로써 많은 장점과 환경에 부합되는 차세대 연료로써 적극 개발되고 있다.

다양한 수소생산 기술 중에서도 미생물을 이용

[†]Corresponding author : bmmskim@kier.re.kr

하여 수소를 생산하는 기술은 이러한 화석연료의 문제점을 극복할 수 있는 청정에너지로써 주목 받고 있다¹⁻³⁾. 지구상에 존재하는 많은 미생물은 세포 내에 존재하는 수소생산효소를 이용한 수소생산/소비를 통해 에너지 대사를 조절하고 있으며 그 외에도 다양한 역할이 알려져 있다⁴⁾. 미생물에 존재하며 생물학적 수소생산에 관여하는 수소생산효소는 열이나 산소에 의해 쉽게 활성을 잃기 때문에 수소생산 공정에 적용할 때 혐기 상태를 유지해야 하며, 또한 미생물 생육에 적절한 온도를 유지해야 한다⁵⁾. 최근에 분리된 광합성 홍색 유황세균인 *Thiocapsa roseopersicina*가 생산하는 수소생산효소는 그 활성 중심에 니켈과 철과 같은 금속이온을 갖고 있으며, 세포막에 2개의 세포막 결합(membrane-bound) 수소생산·소비 효소 및 세포질에 수소감지효소 및 soluble 수소생산효소 등 총 4종류의 효소가 존재한다. 이중 세포질 내에 존재하는 soluble 수소생산효소는 산화 환원 전위에 따라 생산과 소비를 동시에 할 수 있는 membrane-bound 수소생산효소와는 달리 주로 수소생산을 한다고 보고되어 있다⁶⁾. 또한 이 효소는 고온성 균주에서 분리한 효소와 같은 내열성을 갖고 있으며 산소, 단백질 분해 효소, 계면 활성제 등 효소 활성에 치명적 저해효소가 되는 것들에 강한 내성을 갖고 있다고 알려져 있으나 세포질 내부에 존재하고 있어서 분리 정제에 관한 연구 사례가 제한되어 있다^{7,8)}.

*T. roseopersicina*가 생산하는 수소생산효소가 갖고 있는 강한 내열성과 산소 내성과 같은 장점은 생물학적 촉매제를 이용하는 생물학적 수소생산 기술에 있어서 중요한 가치를 지니고 있다고 사료되어 산업적 연구 가치가 있는 수소생산 효소를 좀더 빠르고 수소생산 활성을 가능한 유지하면서 대량 생산하는 기술은 수소생산을 상용화 할 수 있는 지름길로 여겨진다.

본 연구에서는 효율적인 효소생산을 위한 기초 연구로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 침전 농도와 열처리 온도 및

시간 등이 수소생산효소를 분리 정제하는데 미치는 영향에 대해서 연구하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 사용균주 및 배양 조건

본 실험에서 사용한 균주는 광합성 홍색 유황세균인 *T. roseopersicina* NCIB 8347이다. 이 균주를 pfennig's 배지⁹⁾에 접종하고 할로겐 램프를 8,000 lux로 조사하면서 25°C에서 광합성 배양하였다. 이때 $\text{CO}_2(2\pm 0.5\%)$ 를 함유한 N_2 를 200 ml/min의 속도로 공급하여 독립영양 조건을 유지하였다. *T. roseopersicina* NCIB 8347 균체를 다량 배양하여 수소생산효소를 분리하기 위하여 다음과 같이 연속적으로 배지를 첨가하면서 배양하였다. 즉 초기 균체 농도를 660 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 pfennig's 배지에 접종하고, 24시간 광합성 배양 후 0.05% acetate, 6 mM ammonium chloride와 각종 trace elements(Na_2EDTA 8 μM , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 μM , $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.7 μM , $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 μM , ZnCl_2 0.3 μM , $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 μM , H_3BO_3 5 μM , $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 μM)를 첨가하였다. 이와 같이 연속적으로 배지를 첨가하여 약 96시간 배양하고, 균체 농도가 660 nm에서 흡광도 약 3.0일 때 수확하였다.

2.2 수소생산 효소 역가

5 ml vacuum vial에 1.3 ml의 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)와 2.5 mM methyl viologen, 수소생산효소를 넣어 섞고, 10분 동안 50°C water bath에서 미리 온도적응 시킨 후 0.2 ml의 230 mM sodium dithionite를 넣어 반응을 시작하였다. 이때 희석은 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)로 하였고, 반응은 N_2 가스로 치환한 후 혐기 조건하에서 이루어졌다. 반응 시작 후 10분 간격으로 40분 동안 gas chromatograph를 측정하여 생성된 수소의 양을 측정하였다¹⁰⁾. 효소 활성 1 Unit은 분당 1 μmol 의 수소가 생산되는 양으로 정하고, 효소 비활성도

는 U/mg-protein으로 정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 시료로 하여 Lowry method(Bio-rad protein assay)를 이용하여 측정하였다.

2.3 Enzyme extract 및 cytoplasmic fraction

T. roseopersicina NCIB 8347 배양액을 원심 분리(5,500×g, 40분)하여 균체를 얻은 후 균체와 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 섞어 4°C, 혐기 조건으로 sonication(20 kHz, 5분; Sonic dismembrator 550, Fisher)을 5번 반복하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄액을 4°C에서 원심 분리 (28,000×g, 20분)하여 얻은 상등액을 cell extract로 하였으며, 이를 다시 4°C에서 초원심 분리(400,000×g, 1시간)하여 상등액인 cytoplasmic fraction(세포질 분획)을 준비하였다.

2.4 (NH₄)₂SO₄ 농도에 의한 분리

전술한 방법으로 준비한 세포질 분획에 (NH₄)₂SO₄를 20%넣고, 3시간 동안 4°C에 두어 단백질을 침전시킨 후 원심 분리(5,500×g, 20분)하여 침전된 단백질을 분리 하였다. 이 단백질에 침전 시 섞여 있는 (NH₄)₂SO₄는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 vivaspin 20(molecular cut-off 10,000 dalton; Vivascience, London, UK)에 넣어 원심분리(4,000×g)하여 (NH₄)₂SO₄를 제거 시켰다. 단백질을 얻고 남은 상등액을 반으로 나누어 전술한 방법과 동일하게 20-40, 40-60, 60-100%와 20-35, 35-60, 60-100%의 침전 농도에서 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 N₂ 치환해서 -70°C에서 보관하여 수소 생산 활성과 단백질 측정 시 사용했다.

2.5 열처리에 의한 분리

준비한 세포질 분획을 60°C water bath에서 각각 10, 20, 30, 60분 동안 열처리 후 얼음물에 담가 온도를 낮추고, N₂ 치환하였다. 4°C 혐기 조건에서

원심분리(28,000×g, 20분)하여 변성되어 침전된 단백질은 제거하고 상등액만 취하여 수소 생산 활성과 단백질 측정 시 사용하고 -70°C에서 보관하였다.

2.6 Sodium Dodecyl Sulfate 전기영동

세포 파쇄액과 초원심 분리한 세포질 분획, (NH₄)₂SO₄ 40-60%에서 침전시켜 얻은 단백질, 60°C에서 20분 동안 열처리 한 단백질을 SDS전기영동 하였다. SDS-polyacrylamide 젤 전기영동은 Laemmli와 Favre의 방법¹¹⁾에 따라 10% acrylamide 젤을 조제하여 사용하였다. 표준 단백질로 SDS전기영동(row range, M.W. 14,000-100,000; Bio-rad, CA, USA)을 사용하였고, 전기영동은 stacking 젤까지는 18 mA로 행하였으며 이후에는 20 mA로 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도효과

T. roseopersicina NCIB 8347에서 얻은 세포질 분획에는 수소생산효소를 비롯하여 각종 효소와 염색체 등 많은 단백질과 함께 세포 내 기능에 필요한 당, 아미노산 등을 함유하고 있다. 본 실험에서 행하는 (NH₄)₂SO₄ 침전은 세포질 분획에 함유되어있는 다양한 단백질을 용해도에 의해서 분리하는 방법으로 수소생산 효소와 유사한 용해도를 갖는 단백질을 동시에 침전 시키는 salting-out 효과를 이용한 정제방법이다. 이때 사용한 (NH₄)₂SO₄는 높은 salting-out 효과와 용액의 낮은 온도, pH 변화, 높은 용해도 등의 유용한 특징들을 갖고 있어 salt로 이용하였다. 단백질은 구조상 소수성 부분은 분자 내부에 존재하고 친수성 부분이 분자 밖에 위치하여 물과 단단하게 결합되어 안정을 유지하는 구조이다. Salt의 이온 세기는 각 이온의 농도에 비례하기 때문에 양이 많아질수록 이온의 세기가 증가하고 이때 세기가 증가한 이온은 친수성 부분에 있는 물 분자에 붙어 물 분자만을 잡아 끌기 때문에 단백질이 침전되게 되는 것인데 salt

Table 1 Effects of (NH₄)₂SO₄ precipitation from hydrogenase

	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (%)	Protein (mg/ml)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Relative specific activity (%)
Experiment 1	0	0.65	0.05	0.08	1.62
	0-20	0.76	0.20	0.27	5.27
	20-40	1.70	1.42	0.84	16.48
	40-0	2.60	13.20	5.08	100.00
Experiment 2	60-100	1.01	0.02	0.02	0.39
	20-35	0.99	0.52	0.52	10.30
	35-60	4.48	5.94	1.33	26.15
	60-100	0.61	0.08	0.13	2.48

로 사용한 (NH₄)₂SO₄의 농도에 따라 각기 다른 종류의 단백질이 침전되고 pH, 온도, 단백질 순도 등의 다양한 요인에 따라 침전되는 단백질의 종류가 달라진다. 또한 침전 되는 단백질은 (NH₄)₂SO₄가 녹는 동안 산성화되는 것을 막기 위해 50 mM K-phosphate buffer(pH 7.0)조건에서 침전시켰다.

T. roseopersicina NCIB 8347에서 생산되는 수소생산화소는 (NH₄)₂SO₄ 70% 또는 25-35%에서 membrane-bound 수소생산/소비효소를 침전시켰다는 보고가 있었으나^{7,8)}, 본 연구에서는 (NH₄)₂SO₄의 농도 0, 20, 40, 60, 100%를 실험 1이라 하고 0, 20, 35, 60, 100%를 실험 2라 정하여 단백질을 침전시키고 남은 상등액에 다시 (NH₄)₂SO₄를 넣어 단백질을 침전시키는 방법으로 단백질을 얻어 비교 분석하였다(Table 1).

(NH₄)₂SO₄ 침전 농도별로 50°C에서 10분 간격으로 40분 동안 수소생산 활성을 측정한 결과 (NH₄)₂SO₄를 세포질 분획에 20% 첨가하였을 때 침전되는 단백질은 수소생산 비활성도가 0.27 U/mg-protein으로 첨가하지 않았을 때 보다 약 3.38배 높았으나 최대 수소생산 비활성도를 나타낸 40-60%(5.08 U/mg-protein)보다는 약 18.81배 낮은 5.27%에 불과하였다. 실험1에서 나타난 것처럼 (NH₄)₂SO₄ 40%에서 침전한 단백질의 수소생산 비활성도가 0.84 U/mg-protein으로 최대 비활성도를 나타낸 40-60%의 침전물에 비해 약 6배 낮았다.

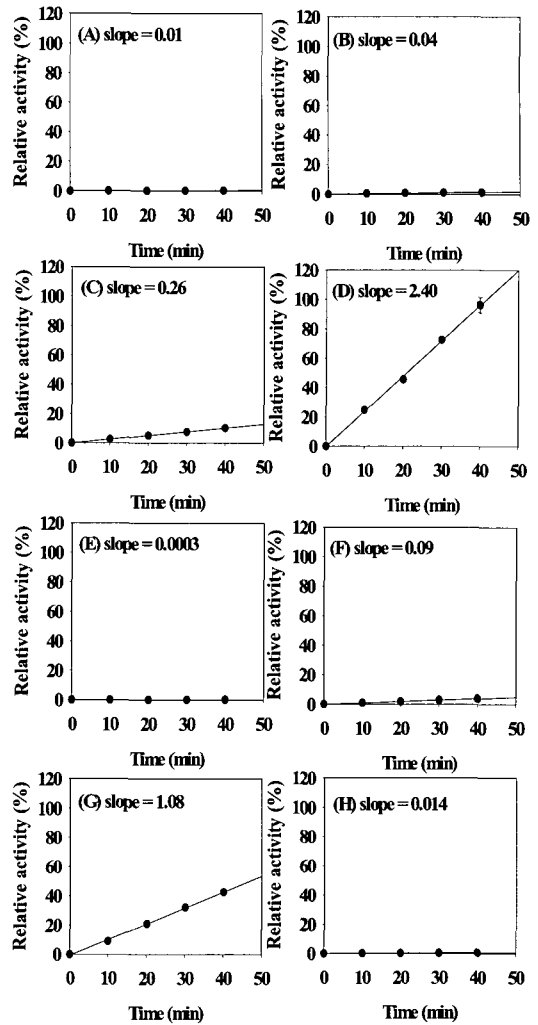


Fig. 1 Effect of (NH₄)₂SO₄ precipitation fraction on the relative hydrogen evolution activity of hydrogenase. (A) 0% (B) 20% (C) 40%^a (D) 60%^a (E) 100%^a (F) 35%^b (G) 60%^b (H) 100%^b (NH₄)₂SO₄ saturation
a Experiment 1, b Experiment 2

100%에서 침전시킨 단백질은 (NH₄)₂SO₄로 침전시키지 않았을 때와 비교하여 단백질의 양은 약 1.33배 증가하였으나 활성은 약 2.5배 감소하여 최대 수소생산 비활성도의 약 0.39%에 불과한 수소생산 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 40-60%의 농도에서 침전시킨 단백질에서 대부분의 수소생산효소가 침전 되었다고 유추할 수 있었다. 그러나 40%의 농도에서 침전된 단백질도 40-60% 기준으

홍색 유헤세균 *Thiocapsa roseopersicina*가 생산하는 수소생산 효소의 정제 :
Ammonium sulfate 침전 및 열처리의 효과

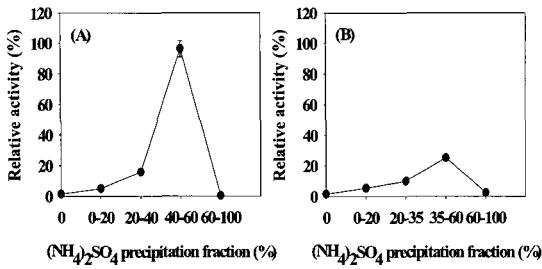


Fig. 2 Effect of (NH₄)₂SO₄ precipitation on the relative hydrogen evolution activity of hydrogenase

로 약 16.48%에 해당하는 상당량의 수소생산 활성이 나타났기 때문에 수소생산효소를 포함한 단백질을 좀더 많이 얻기 위해 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도 범위를 달리하여 실험2의 침전농도로 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도효과를 측정하였다.

실험 2에서는 35%의 농도에서 침전된 단백질은 40%보다 약 1.72배 낮은 단백질과 약 1.62배 낮은 수소생산 비활성도를 얻었고, 35-60%에서 1.33 U/mg-protein으로 가장 높은 수소생산 비활성도를 나타내었으나 이는 실험 1의 최대 수소생산 활성 농도인 40-60%의 농도에서 침전된 단백질과 비교하면 약 26.15%에 불과하다. 이 같은 결과는 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도를 높여 40-60%에서 얻은 단백질 양 보다 35-60%일 때 약 1.72배 많은 단백질을 얻기는 하였으나 역가는 오히려 약 2.05배 낮아져 상대적으로 수소생산 비활성도가 낮아졌기 때문이다(Table 1). 40-60, 35-60%의 농도에서 침전된 단백질에서는 수소생산 비활성도 비교 slope에서 볼 수 있듯이 다른 농도들에서 침전된 단백질들에 비해 현격히 높은 수소생산 활성을 보였는데 이는 40-60, 35-60%의 농도에서 침전된 단백질에 수소생산효소가 다량 포함되어 있음을 나타낸다(Fig. 1). 전체 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도별로 수소생산 활성도를 비교해 보았을 때도 실험2에서는 35-60%가 가장 높지만 실험 1과 2 전체를 비교해 보았을 때 40-60%가 가장 수소생산 활성이 높았다(Fig. 2). 따라서 *T. roseopersicina* NCIB 8347에서 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도가 40-60%이외의 농도

Table 2 Effects of heat-treatment from 60°C of hydrogenase

Heat treatment time (min)	Protein (mg/ml)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Relative specific activity (%)
0	0.72	0.28	0.39	49.47
10	0.48	0.30	0.63	80.65
20	0.45	0.35	0.78	100.00
30	0.45	0.32	0.72	91.66
60	0.45	0.32	0.72	92.14
300	0.46	0.23	0.49	68.36

에서도 약간의 수소생산효소를 포함하는 단백질을 분리 할 수는 있지만 이들 농도에서 침전된 단백질에는 수소생산효소 이외의 단백질이 다량 함유되어 있어 수소생산 활성은 매우 낮기 때문에 (NH₄)₂SO₄ 침전 농도 40-60%에서 단백질을 침전시키는 것이 가장 적합하다고 사료된다.

3.2 열처리 효과

본 연구에서는 60°C의 열처리 온도 조건에서 수소생산 활성을 극대화 시키면서 정제의 효율성을 높일 수 있는 열처리 시간을 알아보기 위해 0, 10, 20, 30, 60, 300분 동안 각각 열처리 한 후 열에 의해 변성되어 가라앉은 단백질은 제거하고 상등액으로 수소생산 활성과 단백질을 측정하였다. 20분간 열처리한 후 단백질의 양은 0.45 mg/ml로 다른 시간 동안의 열처리 경우와 비교하였을 때 단백질의 양은 거의 동일 하였으나 효소의 역가가 높아져 수소생산 비활성도가 0.78 U/mg-protein으로 가장 높았다. 열처리 30분 및 60분의 경우 20분에 비해 비활성도는 10% 정도 감소한 것으로 관찰되었다. 열처리를 하지 않은 경우와 5시간 이상 열처리 하였을 경우를 비교해보면 단백질의 양은 열처리 하지 않았을 때가 5시간 열처리 한 경우보다 약 1.57배 많지만 역가는 5시간 열처리 했을 때가 약 1.22배 낮아서 수소생산 비활성도로 비교했을 때는 5시간 열처리 한 경우가 높은 것으로 나타났

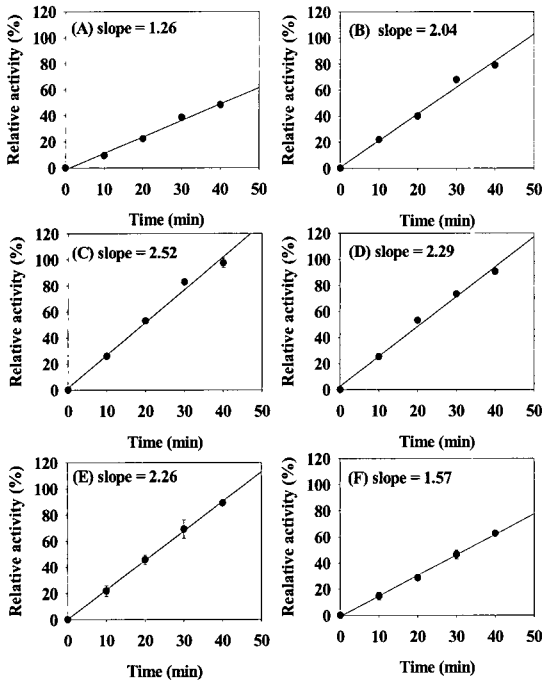


Fig. 3 Effect of heat-treatment at 60°C on the relative hydrogen evolution activity of hydrogenase (A) 0 min (B) 10 min (C) 20 min (D) 30 min (E) 60 min (F) 5 hrs of heat-treatment

다. 5시간 열처리 후 수소생산 비활성도가 열처리를 하지 않았을 때 보다 높기는 했지만 역가로 미루어 이미 단백질의 변성으로 수소생산에 저해를 받고 있음을 알 수 있다(Table 2). 60°C에서 단백질은 열처리를 하지 않았을 때보다 열처리를 했을 때 약 1.5배 정도 감소하였으나 50°C에서 10분 간격으로 40분 동안 측정된 수소량의 각 시간대별 비활성도를 slope로 나타내어 비교 분석한 결과 20분 동안 열처리 하였을 때가 가장 수소생산 활성이 좋았고 처리시간이 5시간으로 길어짐에 따라 수소생산이 저해되어 활성이 낮아졌다(Fig. 3). 열처리 하지 않았을 때와 열처리한 경우의 전체적인 수소생산 비활성도를 비교해 보았을 때 60°C에서 20분 간 열처리 하였을 때 가장 높은 수소생산 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4). *T. roseopersicina* NCIB 8347에서 생산되는 수소생산효소의 높은 내열성을 이용하여 열처리해서 단백질을 분리하는

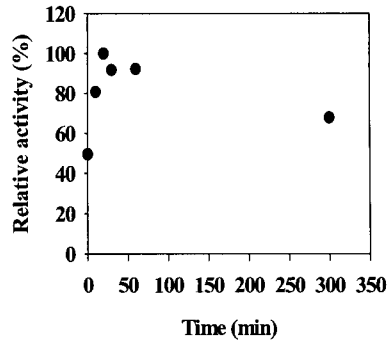


Fig. 4 Effect of heat-treatment at 60°C on the relative hydrogen evolution activity of hydrogenase

방법은 열처리를 하지 않았을 때 보다 60°C에서 열처리 하는 것이 정제의 효율성을 높여주지만 지나치게 오랜 시간 열처리 하면 오히려 역가를 떨어뜨려 결론적으로는 정제의 효율성을 저해하는 요소가 될 수 있다. 따라서 60°C에서 20분 열처리 하는 것이 열에 높은 안정성을 갖고 수소생산 활성이 높은 수소생산효소를 얻는데 도움이 된다고

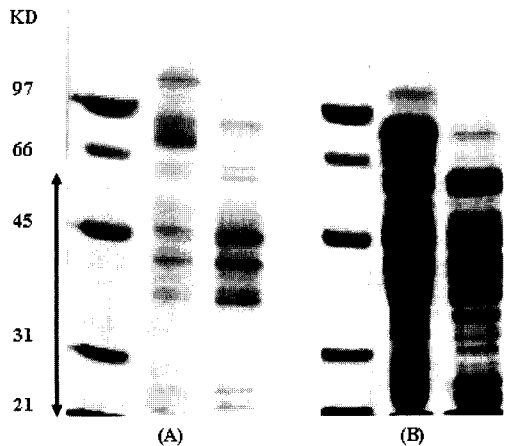


Fig. 5 Sodium dodecyl sulfate electrophoresis pattern of (A) cytoplasmic fraction after ultracentrifugation at 400,000×g at 4°C(Lane 1, molecular std.; Lane 2, cell extract ultracentrifugation at 400,000×g Lane 3, cytoplasmic fraction) and (B) after (NH₄)₂SO₄ precipitation at 40-60% saturation and heat-treatment at 60°C, 20 min(Lane 1, molecular std.; Lane 2, after (NH₄)₂SO₄ precipitation Lane 3, after heat-treatment)

사료된다.

3.3 Sodium Dodecyl Sulfate 전기영동

Cell extract로부터 세포질 분획 각 단계마다 단백질이 제거되는 것을 sodium dodecyl sulfate 전기영동으로 확인하였다. Sodium dodecyl sulfate 전기영동은 단백질을 분자량에 따라 분리할 수 있다. 수소생산효소의 분자량은 60-21 KD 사이에 존재하는 것으로 알려져 있는데 cell extract를 400,000×g로 초원심 분리하였을 때 60 KD이상의 고분자량의 단백질 밴드가 상당량 제거되었다 (Fig. 5(A)). $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-60% 침전 단백질을 전기영동 한 경우 salt의 제거가 충분히 이루어지지 않아 tailing이 되어 단백질 밴드가 정확히 구분되지 않지만 97 KD 이상의 고분자량 단백질은 대부분 제거되는 것으로 보였다 (Fig. 5(B)). 그러나 60°C에서 20분 동안 열처리한 단백질의 경우 수소생산 활성이 없는 부분의 단백질은 제거된 것이 확연히 보이지만 단백질의 농축이 이루어지면서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-60% 침전 단백질에서 제거된 것으로 보인 97 KD이상의 단백질 밴드가 나타났다. 정제 단계를 거치면서 수소생산 활성이 없는 단백질 부위는 제거되고 수소생산 활성이 있는 부분은 동일 단백질량을 전기영동 하였으나 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-60% 침전 단백질과 60°C에서 20분 열처리한 단백질의 결과에서 볼 수 있듯이 단백질이 농축되어 밴드가 진하게 보였다.

4. 결 론

본 연구에서는 *T. roseopersicina* NCIB 8347에서 수소생산효소를 정제하는데 있어서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전과 열처리하는 것이 효소의 활성과 정제에 미치는 영향을 연구하였다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전 농도가 40-60%일 때 가장 많은 단백질을 침전시킬 수 있었고 수소생산 활성 효율 측면에서 가장 높은 활성을 가진 효소를 얻을 수 있었다. 또한 열처리 효과는 60°C에서 20분 동안 열처리 하는 것이 내열성을 갖고 있는 수소생산 효소를 단백질의 변성을

최소화 하면서 수소생산 활성을 높여주는 최적의 조건인 것으로 나타났다. Cell extract와 cytoplasmic fraction들의 단백질을 각각 sodium dodecyl sulfate 전기영동 한 결과에서는 정제 단계를 거치면서 수소생산 활성을 가진 단백질 이외의 다른 단백질들이 상당량 제거되었고 수소생산 활성을 가진 단백질은 농축된 것을 알 수 있었다.

후 기

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) D. B. Levin, L. Pitt, and M. Love, "Biohydrogen production : prospects and limitations to practical application", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 29, 2004, pp. 173-185.
- 2) J. Benemann, "Hydrogen biotechnology: progress and prospects", Nature Biotechnology, Vol. 14, 1996, pp. 1101-1106.
- 3) P. F. Weaver, S. Lien, and M. Seibert, "Photobiological production of hydrogen", J. Solar Energy, Vol. 24, 1973, pp. 3-45.
- 4) O. A. Zadovny, N. A. Zorin, and I. N. Gogotov, "Influence of metal ions on hydrogenase from the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*", Biochemistry (Moscow), Vol. 65, 2000, pp. 1525-1529.
- 5) J. Schnackenberg, M. Miyake, J. Miyake, N. A. Zorin, and Y. Asada, "In vitro and in vivo coupling of *Thiocapsa* hydrogenase with cyanobacterial and algal electron mediators", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 88, 1999, pp. 30-34.
- 6) G. Rakhely, A. T. Kovacs, G. Maroti, B. D. Fodor, G. Csanadi, D. Latinovics, and K. L.

- Kovacs, "Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, 2004, pp. 722-728.
- 7) K. L. Kovacs and C. Bagyinka, "Structural properties functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria", *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 87, pp. 407-412.
- 8) N. A. Zorin, O. N. Pashkova, and I. N. Gogotov, "Isolation and characterization of two forms of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*", *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 60, 1995, pp. 379-384.
- 9) N. Pfennig and H. G. Truper, "The family Chromatiaceae", In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, Springer, Berlin, 1991, pp. 3200-221.
- 10) J. S. Baek, E. H. Choi, Y. S. Yun, S. C. Kim, and M. S. Kim, "Comparison of hydrogenases from *Clostridium butyricum* and *Thiocapsa roseopersicina*: hydrogenases of *C. butyricum* and *T. roseopersicina*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 16, 2006, pp. 1210-1215.
- 11) U. K. Laemmli and M. Favre, "Maturation of the head of bacteriophage T4", *J. Mol. Biol.*, Vol. 80, 1973, pp. 575-599.