

머캅탄류 검출을 위한 *Thiobacillus thioparus*가 생산하는 메틸머캅탄 산화효소의 분리 및 정제

김상준¹, 신현재², 양지원¹

한국과학기술원 화학공학과¹, 생명공학연구소 당생물학 연구실²

전화 (042) 869-3964, 팩스 (042) 869-3910

Abstract

Methyl mercaptan oxidase was isolated and purified from *Thiobacillus thioparus* TK-m for the detection of mercaptans. The procedure of purification involved DEAE-Sephacel and Superose 12 column chromatographies with recovery yields of 47.5 and 48.5 %, and specific activity of 374 and 1240.8 units/mg-protein, respectively. The molecular weight of purified methyl mercaptan oxidase was determined to be 66.1 kDa by SDS-PAGE. Optimum temperature for activity was observed at 55 °C. This enzyme was activated by (NH₄)₂SO₄ and NaCl and inhibited by NH₄Cl.

서론

미국 의학계의 통계에 따르면 미국내 성인 인구의 65 %에 해당하는 사람들이 만성 입냄새 증상(bad breath symptom)을 보이고 있으며(1) 이중 2천 5백만 이상이 병적인 입냄새로 고통받고 있다고 한다. 현재 많은 치과에서는 입냄새를 정량화하기 위하여 헬리미터(halimeter)를 사용하고 있으나 고가이고 질환 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), 디메틸머캅탄(dimethyl mercaptan) 그리고 메틸머캅탄(methyl mercaptan, MM)이 주요구성성분이다. MM의 농도는 정상적인 구강상태인 경우 4-20 nmol/L이고 잇몸에서 피가 나는 염증이 있는 경우 4배로 증가한다(2). MM은 메틸머캅탄 산화효소(methyl mercaptan oxidase, MMO)와 반응 후 포름알데하이드와 과산화수소를 형성하며(3) 이 생성물들은 이미 보고된 다양한 발색법에 의하여 비교적 쉽게 정량이 가능하다(4). MMO의 MM에 대한 반응식은 아래와 같이 나타낼 수 있다.



본 연구에서는 황화수소 혹은 MM과 같은 악취가스에 높은 탈취능을 보이는 *Thiobacillus thioeparus*에 MM을 기질로 공급하여 MMO를 유도하였으며 유도된 효소를 분리·정제하고 저농도의 MM을 검출할 수 있는 발색법을 제안하였다.

재료 및 방법

효소액 제조를 위해 사용된 균주 *Thiobacillus thioeparus* TK-m은 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)에서 분양받아 배양하였으며 배지의 성분은 증류수 1 L당 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, K_2HPO_4 2.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, NH_4Cl 0.4 g, Na_2CO_3 0.4 g, trace metals sol. 1.0 ml, vitamin sol., 3.0 ml를 첨가한 배지에서 발효조 배양(30 °C, pH 6.7)을 실시하였다.

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. MMO의 유도를 위하여 균체의 성장이 정지기에 도달한 후 공기의 공급을 중단하고 4800 ppm MM 가스를 40시간동안 20 ml/min으로 공급하였다. 효소를 분리·정제하기 위하여 음이온 교환수지인 DEAE-Sephacel 컬럼과 gel filtration 크로마토그래피인 Superose 12 컬럼을 이용하여 최종 정제하였다. 효소활성은 MM의 효소반응생성물인 포름알데하이드를 purpald를 이용하여 발색시켜 정량하였다. 단백질의 분자량은 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였으며 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, K_2SO_4 그리고 NaCl을 각각 20에서 200 mM의 농도범위로 첨가하여 효소활성의 변화를 살펴보았다. 또한 글리세린, 메탄올, 에탄올 그리고 아세톤과 같은 유기 용매를 반응혼합용액 1.0 ml에 10 %의 부피비로 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. 이때 효소액은 gel filtration 후의 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

Thiobacillus thioeparus TK-m의 배양특성을 확인하며 효과적인 MMO의 유도시기를 결정하기 위하여 플라스크배양을 실시하였다. 플라스크배양 시 약 210시간 이후 미생물의 성장은 optical density, 2.7에서 정지기에 이르렀으며, 이 때 pH는 6.7에서 5.6으로 약 1.1정도 감소하였다. 따라서 thiosulfate가 황산이온으로 산화되었다고 생각되며 그 과정으로 pH가 감소함을 알 수 있었다. MM의 주입시기를 배지의 황성분이 거의 고갈될 시점인 정지기로 정하였고 MM을 40시간동안 20 ml/min으로 주입하였다.

상기조건에서 유도된 MMO의 분리·정제 결과는 Table 1과 같다. DEAE-Sephacel 컬럼으로 분리한 효소액의 비활성은 374 units/mg-protein으로서 crude extract에 비해 29.6 배 농축되었으며 수율은 47.5 %였다. Gel filtration을 통해 최종 얻어진 비활성은 1240.8, 수율은 48.5 %로서 최종 분리 후 높은 비활성과 안정된 수율을 얻

을 수 있었다. Gel filtration 후 약간의 전체활성의 증가는 DEAE-Sephacel에서 분리한 효소액에 포함된 295 mM 이상의 KCl에 의해 일부 활성이 저해된 것이라고 생각된다.

Figure 1은 gel filtration 후 66.1 kDa에서 MMO로 추정되는 밴드를 보여주고 있으며 효소의 최적 온도는 55 °C였다. 본 MMO를 MM 검출시스템에 사용할 경우 효소의 안정성과 활성에 관계되는 염의 영향을 조사한 결과 NH₄Cl은 200 mM까지 원래효소활성의 27 %을 감소시켰으며 (NH₄)₂SO₄는 20 mM에서 최고활성점이 존재하였다. KCl과 K₂SO₄의 경우에는 200 mM까지 효소활성에 거의 영향을 주지 않았으며 NaCl은 200 mM까지 10 % 증가시켰다. 상기 결과로부터 효소의 안정성과 활성을 높이기 위해서 20 mM (NH₄)₂SO₄ 혹은 200 mM NaCl의 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(5) 이 경우 효소의 활성유지를 위한 적절한 유기용매의 선택이 매우 중요하다. 부피비 10 %의 글리세린, 에탄올, 아세톤에 대해서는 각각 42.7, 78.4, 76.3 %의 활성저하가 일어났으나 메탄올에 의한 저해현상은 관찰되지 않았다. 결과적으로 위와 같은 범위의 유기용매의 선택에서 활성저하가 거의 없었던 메탄올이 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 인지가 가능한 정도인지를 확인하였다. 550 nm의 파장범위에서 포름알데하이드 농도에 비례하여 흡광도의 변화가 관찰되었으며 Figure 2와 같이 색상은 자주색으로 30 nmol이상의 범위에서 뚜렷한 색의 변화가 관찰되므로 purpald 발색법은 MM으로 대표되는 입냄새증상을 확인할 수 있는 검출시스템에 적용가능한 민감도를 가지고 있다고 사료된다.

요약

Thiobacillus thioparus TK-m에서 메칠머캡탄(MM) 가스를 기질로 메칠머캡탄 산화효소(MMO)를 유도할 수 있었으며 DEAE-Sephacel과 Superose 12 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 이때 얻어진 각 효소의 비활성은 각각 374과 1240.8 units/mg-protein이었으며 효소의 최적 온도는 55 °C였다. 상기 정제된 효소액은 SDS-PAGE상에서 66.1 kDa의 분자량을 가지며 20 mM (NH₄)₂SO₄ 혹은 200 mM NaCl의 첨가에 대해 최대 활성을 보였다. 글리세린, 에탄올, 아세톤의 첨가에 대해 효소활성은 부분적으로 불활성화되었으며 메탄올에 대해서는 저해받지 않았

다. Purpald 발색법을 이용한 흡광도의 변화는 구강내 존재하는 MM 가스로부터 생성될 수 있는 수십 nmol의 범위의 포름알데하이드에 대해 눈으로 인지가능한 발색시스템에 사용할 수 있음을 확인하였다.

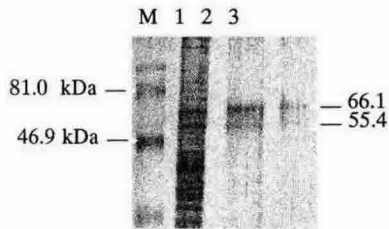


Figure 1. SDS-PAGE of extracts of *T. thioparus* TK-m. M, low range protein marker; lane 1, crude extract; lane 2, DEAE-Sephacel; lane 3, gel filtration.

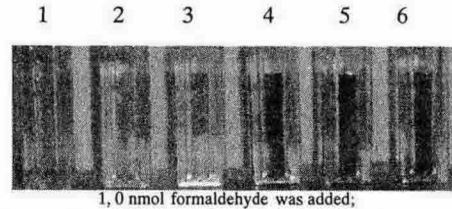


Figure 2. Photograph of purpald solution to the addition of formaldehyde. 1, 0 nmol formaldehyde was added; 1, formaldehyde(nmol)=0; 2, 10; 3, 20; 4, 30; 5, 40; 6, 50.

Table 1. Purification of methyl mercaptan oxidase.

	Vol. (ml)	Total units (nmol min ⁻¹)	Total Protein (mg)	Specific activity [nmol min ⁻¹ (mg-protein) ⁻¹]	Purification ratio	Yield (%)
Crude extract	7.5	27.55	2.18	12.64	1	100
DEAE-Sephacel	5.0	13.09	0.035	374	29.6	47.5
Gel filtration	6.7	16.13	0.013	1240.8	98	48.5

참고문헌

1. Rosenberg, Mel and Christopher A.G. McCulloch (1992), Measurement of oral malodors: current methods and future prospects, *J. Periodontol*, **63**, 776-782..
2. Preti, George, George R. Huggins and Joseph Tonzetich (1978), Method of predicting and determining ovulation by monitoring the concentration of volatile sulfur-containing compounds present in mouth air, US patent 4119089.
3. Gould, W.D. and T. Kanagawa (1992), Purification and properties of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thioparus* TK-m, *J. Gen. Microb.*, **138**, 217-221.
4. Quesenberry, M.S. and Y.C. Lee (1996), A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: Application under periodation condition, *Analytical Biochemistry*, **234**, 50-55.
5. Kwon, Suk-Ky (1994), A study on the preparation of polyurethane diagnostic membrane for urine glucose test, *J. Korea Ind. & Chemistry*, **5**, 975-980.