

화학독립영양미생물 *Aeromonas* sp. strain JS-1의 RubisCO 정제 및 특성

나숙현 · 배상옥 · 김민정 · 김성준 · 정선용

전남대학교 공과대학 환경공학과

전화 (062) 530-0741, FAX (062) 530-1859

Abstract

A Chemoautotroph identified as an *Aeromonas* sp. strain JS-1 was isolated from fresh water. *Aeromonas* sp. strain JS-1 used the H₂ and CO₂ as energy and carbon sources, respectively. Growth characteristics for improving the CO₂ fixation rate were examined in batch cultivation. Its results shown that the optimal growth appeared at culture conditions of 35°C, pH 7 and NaCl 0.1%(w/v). Some hydrogen-oxidizing bacteria were reported that the enzyme activity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase- oxygenase (RubisCO-EC 4.1.1.39), in the key enzyme of the Calvin-Benson cycle. A RubisCO was purified from a chemoautotrophic bacterium, *Aeromonas* sp. strain JS-1. the enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose CL-6B and gel filtration chromatography. The RubisCO showed that molecular mass was about 560KDa from gel filtration chromatography and nondenaturing PAGE, and the RubisCO was confirmed to consist of L₈S₈ enzyme structure by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. A large subunit was about 56KDa and small one was about 15kDa. The K_m values of the enzyme for ribulose 1,5-bisphosphate(RUBP), NaH¹⁴CO₃, and Mg⁺⁺ were estimated to be 0.25mM, 5.2mM, and 0.91mM, respectively. The optimum temperature for RubisCO enzymatic activity were 50°C, and the enzymatic activity was stable up to 45°C.

서 론

전세계적인 환경문제의 하나가 온실가스의 증가로 인한 지구 온난화 현상이다. 지구 온난화에 의한 기후 변화는 대기중의 CO₂량이 탄소순환을 통해 일정하게 유지되지 못하는 생태계의 불균형에서 기인하였고, 앞으로도 가속될 전망이다. 본 실험에 이용되는 화학독립영양 미생물인 수소산화세균은 Calvin-Benson cycle의 key enzyme인 RuBisCO를 이용하여 CO₂를 고정한다. RubisCO는 기질로써 RuBP을 이용하여 CO₂ 혹은 O₂의 반응을 선택적으로 촉매작용을 하며, 식물의 잎에 다량 함유되어 있으며 세상에서 가장 풍부한 protein이라고 한다.¹⁾ RubisCO 형태로써 Form I (L₈S₈)는 native 분자량이 약 560,000의 천연분자량을 소유하고 있는 이형다량체 복합구조이며, 동일한 여덟 개의 large subunit(Mr 55,000)와 여덟 개의 small subunit(Mr 15,000)로써 거대한 분자구조를 소유하고 있다. 이 RubisCO형태는 거의 대부분 eukaryotic photosynthetic 유기물질에 존재한다.²⁾ 두 번째 RubisCO 형태로써 Form II는 단지 large subunit(Mr ~56,000)로 구성되어 있는데, Form II형을 지닌 large subunit의 수는 다양하다. 본 연구에서 이용된 *Aeromonas* sp. strain JS-1는 모든 영양물질을 무기물에서 얻고 있는 화학독립 영양 미생물을 대상으로 한 수소산화 박테리아이며, 이는 담수에

서 분리·동정하였으며 Calvin-Benson cycle을 경유하여 CO₂를 고정한다. 본 연구에서는 화학독립영양미생물 중 수소산화세균인 *Aeromonas* sp. strain JS-1을 이용하여 CO₂고정 효소의 key-enzyme인 RubisCO를 정제하여 그 효소의 생화학적 특성을 밝혔다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

호수와 웅덩이의 표층수를 시료로 채취하여 수소 산화 세균을 분리 및 동정하였다. 100ml baffled flask에 배지10ml를 넣고 멸균한 후, 시료 5%(V/V)를 접종하였다. 배양 배지는 C-medium³⁾에서 탄소원으로써 이용될 수 있는 yeast extract를 제외하여 사용하였고, CO₂를 유일한 탄소원으로 이용하였다. H₂:O₂:CO₂=7:2:1의 비율로 혼합된 가스를 넣어 30°C, shaking incubator (150rpm)에서 배양하였다. 분리된 균주의 형태학적 분류를 위해 SEM 관찰을 하였으며(HITACHI, S-2400), 균주를 동정하기 위하여 API 20E kit를 사용하였다.

조효소액 조제

원심분리(4°C)한 균체를 부유 시킨 후, sonication(45 W, 20 min)하여 이를 다시 원심분리해서 얻어진 상등액을 조효소액으로 하였다.

RubisCO 활성 및 단백질 정량

RubisCO 활성 측정은 Yaguchi 방법⁴⁾에 의해 측정하였으며 단백질 정량은 bovin serum albumin(Sigma Co. USA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 방법⁵⁾에 따라 총 단백질량을 정량하였다.

RubisCO 정제

조효소액을 ice bath상에서 서서히 교반하면서 (NH₄)₂SO₄을 포화도 25%~40%농도까지 첨가하였고 이때 염을 제거한 효소액을 20 mM Tris-EDTA(pH 7.0)에서 평형화시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(0.7×10cm)에 RubisCO 효소를 흡착시키고 용출시켜 0.5 M NaCl 용액을 이용하여 linear gradient로 실시하였으며 활성분획액을 모아 PD-10 column을 통해 탈염시킨 후 다시 2nd DEAE-Sepharose CL-6B column에 같은 방법으로 분획하였다. 완충용액으로 평형화시킨 Bio-gel A-0.5m gel filtration column(1.5×80cm)에 DEAE-Sepharose CL-6B에서 얻은 활성분획액을 (NH₄)₂SO₄, 40%농도로 주입하여 농축시킨 후 완충용액으로 overnight동안 투석하였다. 농축한 효소는 동일한 완충용액을 사용하여 1.0 ml/min의 유속으로 단백질을 용출시켜 분획을 채취한 후 활성분획액을 얻었다.

분자량 측정

RubisCO 효소 단백질은 정제과정 중 단계마다 Laemmli의 방법⁶⁾에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하였다

RubisCO의 생화학적 특성

최적온도를 결정하기 위해 preincubation 및 효소 반응의 온도를 25~60°C의 각각의 온도를 설정하여 측정하였으며 온도의 안정성은 35~60°C 온도로 30 min간 처리한 다음 잔존활성을 측정하였다. Km값은 RubisCO의 기질인 RuBP 및 CO₂, 안정 활성화제로써 buffer중에 있는 Mg⁺⁺ 대한 것을 측정하여 Lineweaver-Burk plot법에 의해 Km값을 산출하였다.

결과 및 고찰

수소산화 세균의 분리 및 동정

다양한 수 환경으로부터 채취한 시료 중 부영양화된 웅덩이에서 채취한 시료로부터 CO₂를 고정하는 화학독립영양 세균이 분리되었다. 분리된 균주의 생리학적, 생화학적 특성을 동정한 결과 그람 음성이었으며 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁷⁾에 준하여 비교 분석한 결과 *Aeromonas* species로 동정되었다. SEM 관찰 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

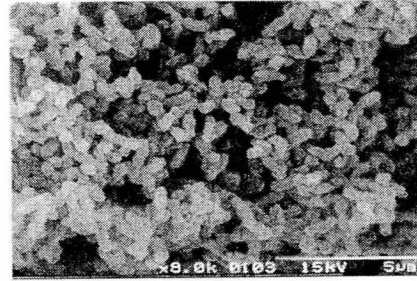


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Aeromonas* sp. strain JS-1

최적의 성장 조건

회분식 배양을 통한 *Aeromonas* sp. strain JS-1의 최적성장 온도는 37°C, pH는 7~8, NaCl 농도는 0.1%(W/V) 였다. NaCl 0.8% 이상에서는 거의 성장을 보이지 않았다.

RubisCO의 분리 및 정제

RubisCO는 strain JS-1의 효소액으로써 (NH₄)₂SO₄, 1st-DEAE-Sepharose CL-6B, 2nd-DEAE-Sepharose CL-6B와 Bio-gel A-0.5m gel filtration column에 의해 정제한 결과 회수율은 16.03%였고 정제도는 25.33배 비활성도는 3.31 unit/mg으로 나타났다.(Table 1)

Table 1. Summary of the purification of the RubisCO from *Aeromonas* sp. JS-1

Purification step	Total activity (units)	Total Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	purification fold
Cell free extract	47.51	363.86	0.131	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	22.75	124.46	0.183	47.9	1.4
DEAE-Sepharose CL-6B(first)	20.83	32.9	0.633	43.8	4.9
DEAE-Sepharose CL-6B(second)	13.14	7.97	1.65	27.67	12.64
Gel filtration	7.62	2.303	3.31	16.03	25.33

RubisCO 분자량, subunit 구조

정제된 효소를 단계별로 SDS-PAGE를 이용하여 활성 band를 분석한 결과 56,000의 large subunit와 14,000의 small subunit의 구조로 구성된 16양체의 L₈S₈ type의 전형적인 Form I임을 알 수 있었다. 이는 주로 식물에 존재하는 RubisCO 구조와 비슷하였다. Gel filtration에서 정제된 효소를 non-denatured SDS-PAGE를 이용하여 활성 band를 확인한 결과 단백질 크기는 560 kDa이었다

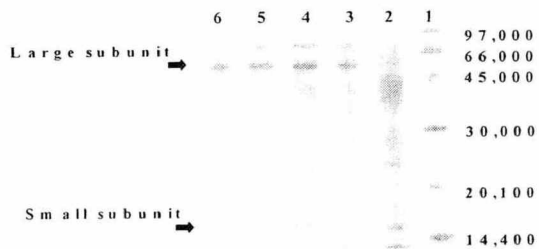


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of purified RubisCO from *Aeromonas* sp. JS-1

Lane 1 : Molecular mass standard, Lane 2 : Crude enzyme, Lane 3 : ammonium sulfate fractionation, Lane 4 : 1st DEAE-Sepharose CL-6B, Lane 5 : 2nd DEAE-Sepharose CL-6B, Lane 6 : gel filtration.

RubisCO 생화학적 특성

25~60℃의 각각의 온도에서 최적 활성을 측정한 결과 효소활성의 최적온도는 50℃임을 알 수 있었고, 열 안정성은 45℃에서 효소활성이 감소하였고 60℃에서는 완전히 활성이 상실되었다. Mg^{++} , HCO_3^- , RuBP에 대한 K_m 값을 측정한 결과 각각 0.91 mM, 5.2 mM, 0.25 mM였다. 이러한 결과로부터 strain JS-1은 CO_2 에 대한 기질 친화도가 낮고 RuBP에 대한 기질 친화도가 높음을 알 수 있었으며 비활성도와 구조면에서 특히 *Synechococcus* sp.와 거의 3.3, 3.31로 비슷하였으며 K_m 은 식물인 spinach와 비교하여 볼 때 CO_2 와 RuBP의 기질 친화도가 상반됨을 알 수 있었다.

요 약

화학독립영양미생물 *Aeromonas* sp. strain JS-1은 호수와 웅덩이의 표층수에서 분리·동정되었고 분리된 strain JS-1은 에너지원과 탄소원으로써 각각 H_2 와 CO_2 를 이용하였다. RubisCO(EC 4.1.1.39)는 *Aeromonas* sp. strain JS-1으로부터 ammonium sulfate 침전과 DEAE-sepharose CL-6B, gel filtration chromatography 방법으로 정제되었다. RubisCO의 분자량은 gel filtration에 의해 대략 560 kDa임을 확인되었으며, SDS-PAGE에 의해 Large subunit(56 kDa)와 Small subunit(14 kDa)로 구성된 L_8S_8 구조를 가지고 있음이 확인되었다. Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP), $NaH^{14}CO_3$ 와 Mg^{++} 의 K_m 값은 각각 0.25 mM, 5.2 mM, 0.91 mM이었으며, 효소반응의 최적온도는 50℃였으며, 열 안정성은 45℃까지 안정하였다.

참고문헌

- 1) Ronald, M., Atlas, "Principle of microbiology", Wm. C. Brown Publishers, Printed in the United State of America, 201-203 (1997)
- 2) Tabita, F. R., "Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganism", *Microbiology Rev.* **52**: 155-189 (1988)
- 3) Chung, S. Y., Maeda, E. Song, K. Horikoshi and T. Kudo, "A Gran-positive Polychlorinated Biphenyl-degrading Bacterium, *Rhodococcus erythropolis* strain TA421, Isolated from a Termite Ecosystem", *Biosci. Biotech. Biochem.* **158**: 2111-2113 (1994)
- 4) Yaguchi, T., Chung, S. Y., Igarashi, Y., and T. Kodama. "Purification of RubisCO from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain a-1", *J. Ferment. Bioeng.*, **73**: 348-351 (1976)
- 5) Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**: 248 (1976)
- 6) Laemmli, U. K., "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**: 680-685 (1970)
- 7) Krieg, N. R. and J. G. Holt., Gram negative aerobic rods and cocci. In Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ED. The Williams and Wilkins Co. Baltimore., 140-1945 (1984)