

## *Micrococcus luteus*에서 정제한 Isocitrate Lyase의 특성

정기택 · 서승교<sup>1\*</sup> · 우철주 · 박임동 · 정병태 · 박영호

경북대학교 농과대학 식품공학과

<sup>1</sup>신일전문대학 환경관리과

*Micrococcus luteus*가 생산하는 isocitrate lyase의 효소 단백질을 ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose, DEAE-sephacel, 1차 Sephadex G-200, 2차 Sephadex G-200 column chromatography 과정을 통하여 분리 정제하였으며 정제된 효소의 분자량과 효소학적 특성을 조사하였다. 정제된 isocitrate lyase는 상기 정제과정을 통하여 10.2%의 회수율과 38.8%의 정제도를 나타내었으며, 전기영동시 단일밴드를 얻을 수 있었고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량은 약 60,000이며 1개의 subunit로 나타났다. 본 효소의 최적 pH는 7.5이었으며, 최적 온도는 40°C 부근이었고 45°C까지는 안정하였다. 2가 금속염의 첨가시  $Mg^{2+}$ 를 제외한 다른 금속이온들은 효소활성을 저해하는 것으로 나타났으며,  $Mg^{2+}$ 의 농도는 5 mM에서 최대활성을 나타내었다. 또한 기질인 DL-isocitrate의  $K_m$ 치는 0.95 mM로 나타났으며, thiol 화합물의 첨가시 cysteine은 1 mM, glutathione과  $\beta$ -mercaptoethanol은 5 mM의 농도에서 효소활성이 최대에 달하였다.

**KEY WORDS** □ isocitrate lyase, *Micrococcus luteus*

TCA cycle에서 acetyl CoA가 oxaloacetate와 작용하여 citrate가 생성되고 이 citrate는 분해되어 isocitrate로 생성된다. 그러나 isocitrate는 isocitrate dehydrogenase의 작용을 받지 않고 TCA cycle에서 변형되어진 isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)의 작용을 받아 succinate와 glyoxylate를 생성하게 되는 glyoxylic acid cycle(G.C.)이 존재한다고 알려져 있다(2, 5, 11, 13, 16). 그리고 isocitrate lyase는 G.C.에 있어서 주요 효소로 보고되어 있다. 이 회로는 유일 탄소원으로 acetate와 fatty acid 등을 기질로 생육하는 식물의 종자, 곰팡이, 세균 등 다양한 미생물에서 작용하고 있는 것으로 보고되어 있고, 또한 isocitrate lyase의 효소학적 특성에 관하여 많은 연구가 이루어져 있다(3, 5-7, 10, 11, 14, 15, 17, 18).

아세트 알데히드 생산공장 폐수를 활성슬러지법에 의하여 처리하였을 때 공장폐수의 주성분인 acetic acid 등을 분해할 수 있는 세균을 분리하여 형태, 구조, 생화학적 특성 등을 조사하여 보고한 바 있다(1). 그러므로 아세트 알데히드 제조시 발생하는 폐수를 활성슬러지법으로 처리하였을 때 사용되어진 미생물들의 생육에 있어 glyoxylate cycle이 존재할 것이라는 가정하에 *Micrococcus luteus*에서 G.C.의 지표효소라 할 수 있는 isocitrate lyase의 생성조건을 규명하고 이 균으로부터 추출한 효소를 분리 정제하여 효소의 일반적 특성에 대하여 조사하여 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험 균주 및 배양 방법

실험균주는 정 등이 분리하여 연구실에 보관중인 *Micrococcus luteus*를 사용하였다(14). 공시균의 배양 조건은 아래와 같이 행하였다.

즉 배지는 2.0%  $CH_3COONa$ , 0.5%  $NH_4NO_3$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.005%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 0.05% yeast extract를 함유한 배지를 pH 7.5로 조절하여 사용하였다. 배양조건은 30°C에서 24시간 100 rpm으로 왕복식 진탕배양 시켰다. 균의 생육도는 분광광도계(CE 393, Cecil Co.)를 사용하여 660 nm의 흡광도를 측정하여 생육도로 표시했다.

#### 효소활성의 측정

Isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)의 활성은 McFadden (12)의 방법에 의하여 측정하였다. 효소활성 단위는 기질로 사용되어진 isocitrate로부터 분당 1  $\mu$ mole의 glyoxylate의 생성을 촉매하는 활성을 1 unit로 하였다.

#### 효소의 정제

배양된 균체를 원심분리하여 집균하고 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 2회 세척했다. 세척된 균체를 5 mM  $MgCl_2$ 를 함유한 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 현탁시켜 60  $\mu$ A에서 3분간 초음파 파쇄시켰다. 파쇄된 균체 현탁액을 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상등액을

조효소액으로 사용하였다.

**효소의 분획**

조효소액에 황산 암모늄을 첨가하여 0.5~0.8 포화 농도가 되도록 첨가하여 효소 단백질을 분획하였고, 50 mM Tris-HCl 완충액(5 mM MgCl<sub>2</sub> 함유, pH 7.5)에 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석하였다. 투석하여 얻은 효소액을 동일 완충액으로 평형화 되어진 DEAE-cellulose column(1.4×14.5 cm)에서 chromatography하였다. 이때 비흡착 단백질을 제거시킨 다음 흡착 단백질을 NaCl 0~0.3 M로 직선농도 구배법으로 각 fraction당 4 ml씩 수집하였다. 활성효소 단백질을 모은후 평형화되어진 DEAE-sephacel column (1.4×13 cm)에서 다시 chromatography하였고, 또한 비흡착 단백질을 씻어낸 다음 흡착 단백질을 NaCl 0~0.3 M로 직선농도 구배법으로 각 fraction당 4 ml씩 수집하고 활성부위를 모아 평형화되어진 Sephadex G-200 column에서 1차(1.6×105 cm), 2차(1.8×95 cm) gel filtration을 행하였으며 각 fraction당 수집량은 3.0 ml이었다.

**단백질 정량**

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Bradford법에(4) 의하여 595 nm에서 비색 정량하였으며 chromatography과정 중의 단백질은 280 nm에서 흡광도로 표시하였다.

**SDS-polyacrylamide Gel 전기영동**

SDS-전기영동은 Laemmli 방법에(8) 따라 10% polyacrylamide gel(0.1% SDS함유)에 전개하였다. 또한 정제효소의 분자량측정에 사용된 표준단백질은 β-galactosidase(116,000 Da), phospholylase(97,400 Da), bovine serum albumin(66,000 Da), egg albumin(45,000 Da), carbonic anhydrase(29,000 Da) 이었고, gel 염색은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였다.

**시 약**

시약은 Sigma Chemical Co. 제품만을 사용하였다.

**결 과**

**효소의 정제**

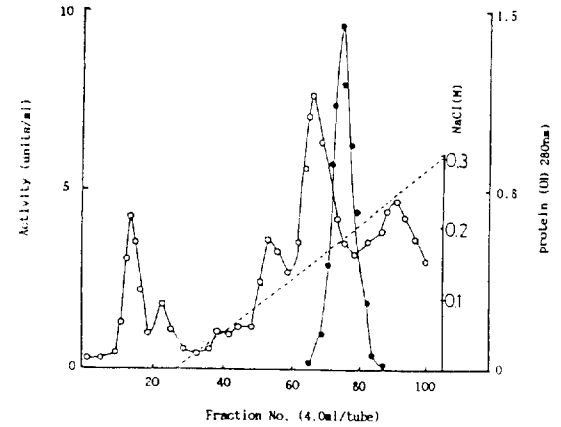


Fig. 1-A. Elution pattern of isocitrate lyase on DEAE-cellulose column chromatography. ●-●, activity; ○-○, protein

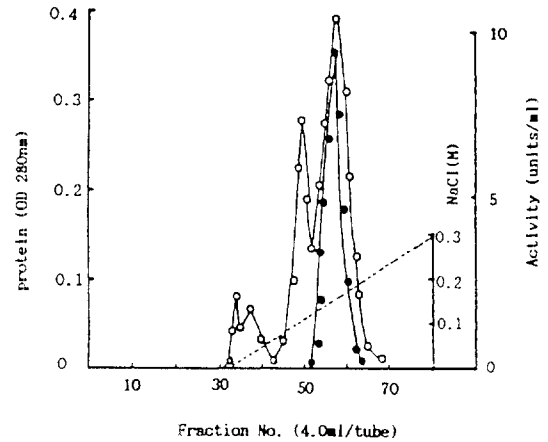


Fig. 1-B. Elution pattern of isocitrate lyase on DEAE-sephacel column chromatography. ●-●, activity; ○-○, protein

전체적인 효소정제 과정을 Table 1에 요약하였다. Isocitrate lyase는 38.8배 정제되었고 약 10%의 회

Table 1. Summary of purification procedure of isocitrate lyase.

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	70	305.3	516.1	1.69	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18	57.7	326.1	5.65	3.3	63.2
DEAE-cellulose	44	14.6	250.8	17.8	10.2	48.6
DEAE-sephacel	28	6.4	140.4	21.94	13.0	27.2
1st Sephadex G-200	21	1.7	89.3	52.53	31.1	17.3
2nd Sephadex G-200	12	0.8	52.5	65.63	38.8	10.2

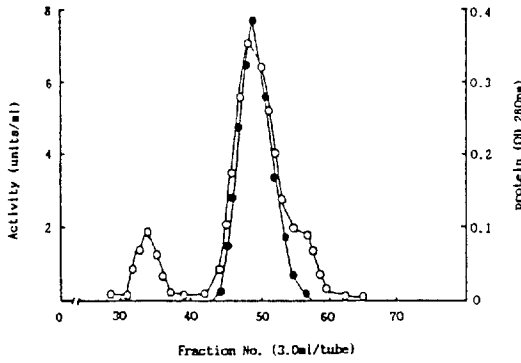


Fig. 2-A. Elution pattern of isocitrate lyase on 1st Sephadex G-200 column chromatography. ●—●, activity; ○—○, protein

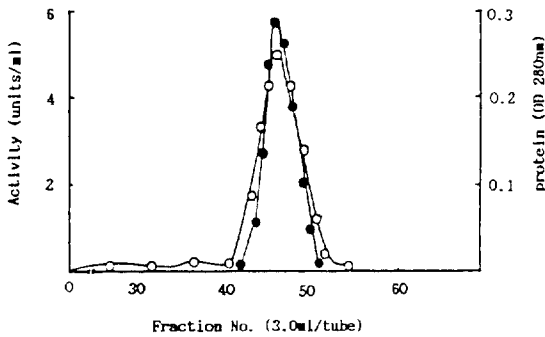


Fig. 2-B. Elution pattern of isocitrate lyase on 2nd Sephadex G-200 column chromatography. ●—●, activity; ○—○, protein

수율을 얻었다. DEAE-cellulose column(Fig. 1-A)과 DEAE-sephacel column(Fig. 1-B)에서 chromatography한 결과, 세척부위에서 효소활성은 나타나지 않았으며, NaCl에 의한 농도구배에서 0.15~0.18 M 부근에서 용출됨을 알 수 있었다. 1차 Sephadex G-200 column chromatography(Fig. 2-A)후 2차 Sephadex G-200 column chromatography(Fig. 2-B)를 하여본 결과, 단백질 부분과 효소활성 부위가 일치함을 알 수 있었다. 또한 정제효소를 전기영동 하여본 결과 단일 단백질 밴드를 얻을 수 있었고(Fig. 3). SDS-PAGE와 gel filtration에 의해 정제효소의 분자량은 약 60,000 dalton으로 추정할 수 있었다(Fig. 4). 정제효소의 특성

**온도의 영향**: 온도를 20°C에서 45°C 사이에서 효소활성을 측정한 결과(Fig. 5), 온도가 증가함에 따라 효소활성이 증가하여 40°C 부근에서 최대 효소활성을 나타내었고, 온도 안정성을 조사하기 위하여 각 온도에서 20분간 처리하면서 측정된 결과(Fig. 6), 45°C 부근까지는 비교적 안정하였으나 그 이상의



Fig. 3. PAGE analysis of purified isocitrate lyase.

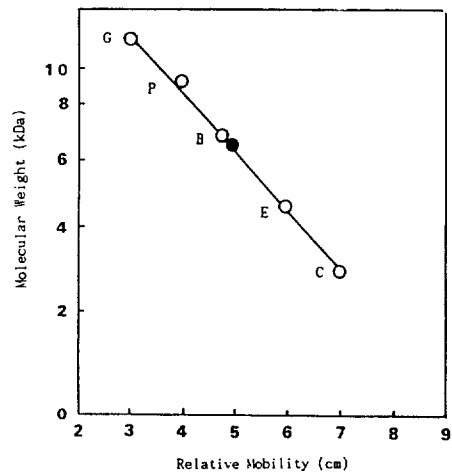


Fig. 4. Determination of molecular weight of purified isocitrate lyase by SDS-PAGE.

●: isocitrate lyase; G: β-galactosidase (116,000 Da); P: phosphorylase (97,000 Da); B: bovine serum albumin (66,000 Da); E: egg albumin (45,000 Da); C: carbonic anhydrase (29,000 Da).

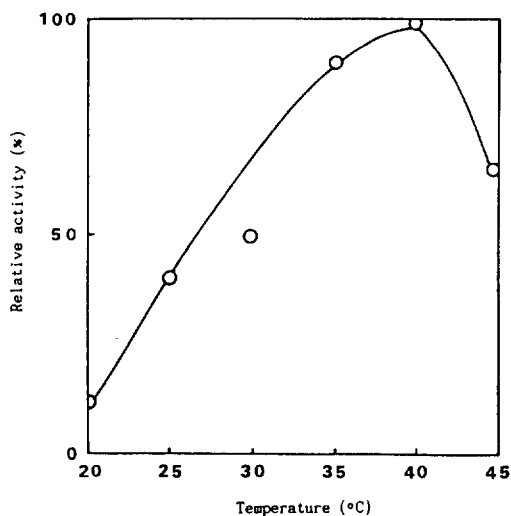


Fig. 5. Effect of temperature on activity of purified isocitrate lyase.

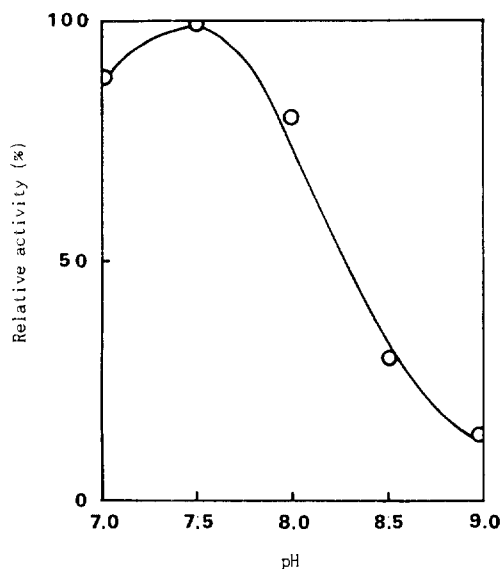


Fig. 7. Effect of pH on the activity of purified isocitrate lyase.

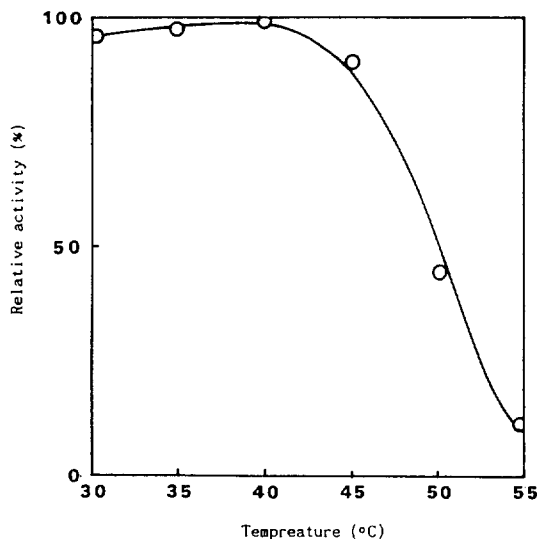


Fig. 6. Effect of temperature on stability of purified isocitrate lyase.

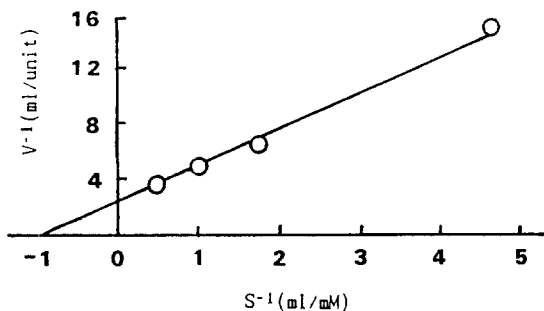


Fig. 8. Effect of isocitrate concentration on the rate of formation of glyoxylate by isocitrate lyase.

Table 2. Substrate specificity of isocitrate lyase.

Compounds	Relative activity (%)
Citrate	0
Cis-aconitate	0
DL-isocitrate	100

온도에서는 효소활성이 감소하는 것으로 나타났다.

**pH의 영향** : pH를 pH 7.0에서 pH 9.0사이에서 효소활성을 측정한 결과(Fig. 7), pH 7.5에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

**기질 특이성** : 정제 isocitrate lyase의 기질특이성을 조사하기 위하여 40 mM 농도의 몇가지 기질에 대하여 효소활성을 측정한 결과(Table 2), DL-isocitrate만이 정제효소의 기질로서 작용하였고 기질의 농도가 정제효소의 반응속도에 미치는 영향을 조사한 결과

(Fig. 8) DL-isocitrate를 기질로하여 Lineweaver Burk 방법(9)에 따라 plot하였을 때,  $K_m$  value는 0.95 mM/m이었으며  $V_{max}$ 는 5.3 units/m/로 나타났다.

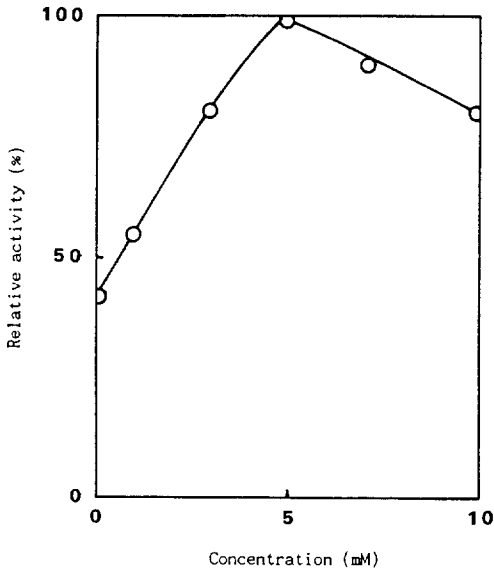
**금속 이온의 영향**

다양한 금속 화합물을 최종농도가 5 mM이 되게 첨가하여 정제효소에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 3),  $Mg^{2+}$ 를 제외한 다른 금속 화합물들은

**Table 3.** Effect of metal ions on isocitrate lyase activity.

Metal ions	Relative activity (%)
None	100.0
Mg <sup>2+</sup>	163.2
Mn <sup>2+</sup>	81.8
Cu <sup>2+</sup>	30.5
Ca <sup>2+</sup>	48.2
Zn <sup>2+</sup>	87.3
Co <sup>2+</sup>	62.6
Mo <sup>2+</sup>	39.3
Hg <sup>2+</sup>	18.2

Metal ions was used as chloride salts.



**Fig. 9.** Effect of MgCl<sub>2</sub> on the activity of purified isocitrate lyase.

효소활성을 저해하는 것으로 나타났다.

**MgCl<sub>2</sub>의 영향**

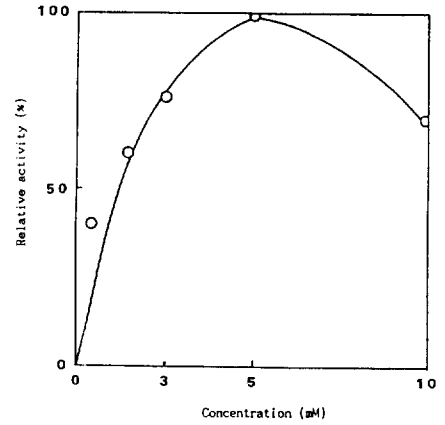
정제효소의 활성을 증가시키는 MgCl<sub>2</sub>의 농도에 따른 영향을 조사하여 본 결과(Fig. 9), MgCl<sub>2</sub> 5 mM의 농도에서 isocitrate lyase의 활성이 최대인 것으로 나타났다.

**Thiol 화합물의 영향**

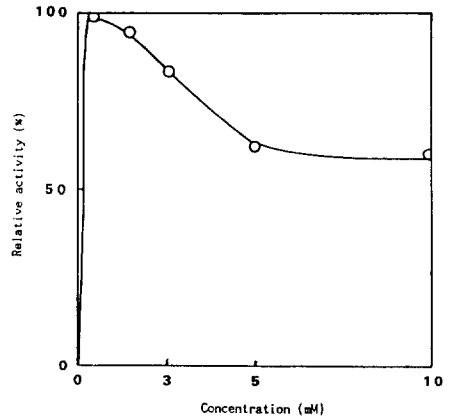
Thiol 화합물인 cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol에 대하여 농도에 따른 활성을 측정된 결과(Fig. 10, 11, 12) cysteine은 1 mM, glutathione과 2-mercaptoethanol은 5 mM의 농도에서 효소활성이 최대인 것으로 나타났다.

**고 찰**

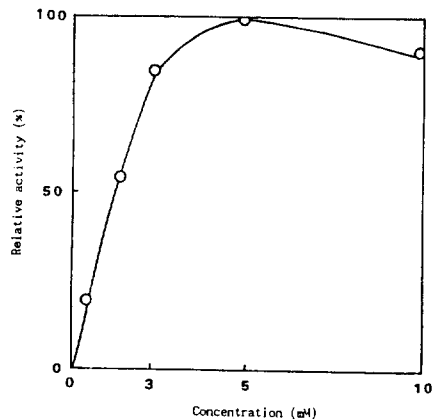
Isocitrate lyase를 정제하기 위하여 ion exchange



**Fig. 10.** Effect of 2-mercaptoethanol on the activity of purified isocitrate lyase.



**Fig. 11.** Effect of cysteine on the activity of purified isocitrate lyase.



**Fig. 12.** Effect of glutathione on the activity of purified isocitrate lyase.

chromatography를 1차 DEAE-cellulose와 2차 DEAE-sephacel을 사용하였으며, 최종적으로 효소를 정제하기 위하여 1차 Sephadex G-200과 2차 Sephadex G-200 gel filtration으로 isocitrate lyase를 정제하였다. 본 실험에서 정제된 isocitrate lyase에서 나타난 정제도는 38.8이었으며 회수율은 10.2%이었고, 분자량은 60,000 정도이며 1개의 subunit로 나타났다. 이것은 *Pinus densiflora*에서(18) 나타난 분자량 65,000과 *Saccharomyces lipolytica*에서(2) 나타난 분자량 59,000과 유사하였다. pH는 기질농도, 이온력, 완충액 종류 등과 함께 효소에 많은 영향을 주는데, 본 실험에서 나타난 최적 pH는 7.5 부근이었는데, 이것은 *Neurospora crassa*에서의(18) pH 6.8 부근과 *Acinetobacter calcoaceticus*에서의(3) pH 6.0과는 다소 상이하였으나, 대부분의 분리된 isocitrate lyase의 pH는 7.8~8.0이라는 보고와(6, 7, 14, 17, 18) 거의 유사하였다. 그리고 정제된 효소의 활성 최적온도는 40°C 부근이었다. 온도 안정성도 45°C까지는 비교적 안정하였는데 이는 Malhotra와 Srivastara가 *Caster endosperm*에서(10) 45°C에서 20분만에 약 80%의 효소활성이 실패한다는 보고와는 상이하였다. 그리고 금속이온의 영향으로 본 실험에서는  $Mg^{2+}$ 를 제외한 모든 금속이온들이 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다는데 이는 대부분의 효소에  $Mg^{2+}$ 가 효소활성을 증가시키는 것으로 보고되어 있으며  $Mg^{2+}$ 를 제외한 거의 모든 금속이 효소활성을 저해하는 것으로 보고한 Tsukamoto의 결과와(18) 일치하였다. 또한  $Mg^{2+}$  농도에 따른 영향을 조사하였을 때 5 mM 농도  $Mg^{2+}$  첨가에서 효소활성이 최대로 나타났는데 Malhotra 등(10)의 보고에서 나타난 최대활성을 위한 농도가 3~5 mM의 첨가라는 결과와(7, 10, 18) 거의 일치하였다. 또한 기질 특이성은 DL-isocitrate만을 기질로 사용하였다. 이는 Smith 등(17)이 *Pseudomonas aeruginosa*에서 보고한 결과와 일치하였다. Isocitrate lyase의 반응속도는 DL-isocitrate를 기질로 사용하였을 때 본 효소의  $K_m$ 치는 0.95 mM이었는데, higher plant에서의 0.033 mM, chlorella에서의(7) 0.023 mM과는 큰 차이가 나타났으나 *Pseudomonas indigofera*에서의(13) 0.82 mM과는 유사하였다. *Neurospora crassa*에서의 1.85 mM, baker's yeast 1.2 mM 과도 차이를 나타내었다(16). Thiol 화합물이 정제 isocitrate lyase에 미치는 영향을 조사해 본 결과 cysteine은 1 mM에서 최대 활성이 나타났으며 glutathione과  $\beta$ -mercaptoethanol은 5 mM 농도에서 최대활성이 나타났는데 이는 *Pseudomonas indigofera*에서(13) thiol 화합물이 촉매제로 요구되었고, yeast에서는(14) 최대활성을 위하여 thiol 화합물이 요구되었다는 보고와는 일치하였으나, 1~4 mM의 고농도에서 본 효소활성이 저해된다고 보고한 결과와는 상이하였다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 기초연구비(1991~1993) 지원에 의해 수행된 연구의 일부분이며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 정기택, 박임동, 서승교, 1987. Analysis of wastewater and isolation of strains assimilating wastewater from acetaldehyde plant. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 328-332.
2. 조석금, 1987. *Saccharomycopsis lipolytica* isocitrate lyase의 精製와 性質. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 420-424.
3. Bahk, Y.Y., and Y.S. Kim, 1987. Acidic isocitrate lyase from *Acinetobacter calcoaceticus* grown on malonate. *Kor. J. Biochem.* **20**, 191-197.
4. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Chem.* **72**, 248-254.
5. Claassen, A.M., and A.J. Zehnder, 1986. Isocitrate lyase activity in *Thiobacillus versutus* grown anaerobically on acetate and nitrate. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 3179-3185.
6. Howes, W.V., and B.A. McFadden, 1962. Isocitrate lyase and malate synthase in *Pseudomonas indigofera*. *J. Bacteriol.* **84**, 1216-1221.
7. John, P.C.L., and P.J. Syrett, 1967. The purification and properties of isocitrate lyase from chlorella. *Biochem. J.* **105**, 409-416.
8. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
9. Lineweaver, H., and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658-666.
10. Malhotra, O.P., and P.K. Srivastava, 1982. Isolation and characterization of isocitrate lyase of castor endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**, 164-171.
11. Matsuoka, M., Y. Ueda, and S. Aiba, 1980. Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*. *J. Bacteriol.* **144**, 692-697.
12. McFadden, B.A., 1969. Methods in enzymology, vol. 13. Academic Press, London. p. 127-134.
13. McFadden, B.A., and W.U. Howes, 1963. Crystallization and some properties of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. *J. Biol. Chem.* **238**, 1737-1742.
14. Okada, H., M. Ueda, M. Uchida, and A. Tanaka, 1987. Isocitrate lyase and malate synthase of *Candida tropicalis* grown on different carbon sources. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 869-875.
15. Pinzauti, G., E. Giachetti, G. Camici, G. Manao, G. Cappugi, and P. Vanni, 1986. An isocitrate lyase of higher plant. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 85-93.
16. Sjogren, R.E., and A.H. Romano, 1967. Evidence for multiple forms of isocitrate lyase in

- Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **93**, 1638-1643.
17. **Smith, R.A., and I.C. Gunsalus**, 1958. Isocitrate lyase, enzyme properties and reaction equilibrium. *J. Biol. Chem.* **229**, 305-319.
18. **Tsakamoto, C., S.I. Ejiri, and T. Kastumata**, 1986. Purification and some properties of isocitrate lyase from the pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 409-416.

(Received April 29, 1993)

(Accepted May 24, 1993)

---

**ABSTRACT: Characterization of Isocitrate Lyase from *Micrococcus luteus***

**Chung, Ki-Taek, Seung-Kyo Suh<sup>1\*</sup>, Cheol-Joo Woo, Im-Dong Park, Bung-Tae Chung, and Young-Ho Park** (Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Kyungpook National University, and <sup>1\*</sup>Department of Environmental Management, Shinil Junior College, Taegu 702-701, Korea)

The isocitrate lyase extracted from *Micrococcus luteus* was purified 38.8 folds with the overall yield of 10.2%, by the ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose, 1st Sephadex G-200 and 2nd Sephadex G-200 column chromatography. The purified enzyme showed to be a single protein band by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the purified enzyme was estimated 60,000 by the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The apparent Michaelis constant,  $K_m$  value for isocitrate was 0.95 mM. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were pH 7.5 and 40°C, respectively. The enzyme was activated by  $Mg^{2+}$  and inhibited by  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $CO^{2+}$ . In addition, the activity of isocitrate lyase was increased by glutathione and 2-mercaptoethanol at 5 mM and cysteine at 1 mM.