

Baker's Yeast로부터 1,4-Benzoquinone Reductase의 분리

김경순 · 석희원

명지대학교 이과대학 화학과

Isolation of 1,4-Benzoquinone Reductase from Baker's Yeast

Kim, Kyung-soon · Suk, Hee-won

Department of Chemistry, Myong Ji University

(Received Oct., 30, 1997)

ABSTRACT

An intracellular, soluble 1,4-benzoquinone reductase was purified from Baker's Yeast by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephacel anion exchange chromatography, and Sephacryl S-200 gel filtration chromatography.

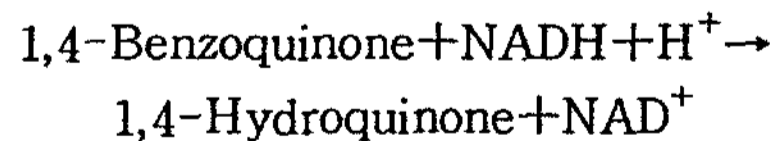
1,4-Benzoquinone reductase was achieved 123.8 fold purification from crude homogenate with a yield of 11.1%.

I. 서 론

방향족 오염물질의 일종인 2,4-dinitrotoluene (I)은 polyurethane과 폭약의 제조에 대량으로 사용되며, 포유동물에서 돌연변이를 일으키고, 발암물질로 작용한다고 알려져 있다¹⁾. 또한 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin(II)은 펄프 공장의 유출물과 연소과정에서 생성되는 재에서 발견되는 화합물로서 동물에서 급성독성을 나타내며²⁾, 제초제인 2,4-dichlorophenoxyacetic acid의 합성에 사용되는 2,4-dichlorophenol(III)은 생태계를 오염시키는 중요한 오염물질이다³⁾.

이들 다양한 방향족 오염물질은 곰팡이에 의한 분해과정에서 2-methoxy-1,4-benzoquinone(IV), 2-hydroxy-1,4-benzoquinone(V), 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone(VI) 등의 quinone 중간체로 변환되며, 곰팡이에 의한 lignin의 분해과정에서도 치

환된 quinone이 생성된다는 것이 확인되었다⁴⁻⁶⁾. 방향족 오염물질과 lignin의 peroxidase 산화에 의해 생성되는 quinone들은 곰팡이에 의한 방향족 화합물 분해에서 중요한 중간체이며^{7,8)}, 이들 quinone은 환원되어 hydroquinone을 생성한 후 ring cleavage된다⁹⁻¹¹⁾. 이때 관여하는 1,4-benzoquinone reductase는 1,4-benzoquinone을 이 전자가 관여하는 환원반응으로 1,4-hydroquinone으로 변환시키는 효소이다¹²⁾.



최근에 1,4-benzoquinone reductase의 생체내에서의 기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Chung 등은 quinone reductase가 생체내에서 ethanol metabolism에 관여한다고 주장하였고¹³⁾, MacDonald는 quinone reductase의 inhibitor인 dicumarol이 glucose에 의해 유발되는 insulin분비

를 방해한다고 하였다¹⁴⁾.

본 연구실에서는 오염물질의 무공해 제거기술 개발의 기초연구로서 Baker's Yeast로부터 1,4-benzoquinone reductase를 정제하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 시약 및 기기

Sephacryl S-200-HR, diethylaminoethyl-Sephacel(DEAE-Sephacel), molecular weight marker, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), Coomassie Brilliant blue R-250, ammonium sulfate, tris[hydroxymethyl] aminomethane(Tris), lauryl sulfate(SDS), ammonium persulfate, bovine serum albumin, bromophenol blue, trichloroacetic acid(TCA), glycine, acrylamide, N,N'-methylene bisacrylamide, sucrose, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), β -NADH 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Coomassie Brilliant blue G-250은 Bio-rad사에서 구입하였고, 1,4-benzoquinone은 Aldrich사 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 내지 일급 시약을 사용하였다.

정제과정은 모두 cold lab chamber를 사용하여 4°C에서 수행하였으며, 효소의 활성은 Shimadzu UV 3100 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, Bio-rad Econo low pressure liquid chromatograph, fraction collector, high speed centrifuge, ultra low temperature freezer, microcentrifuge 등을 사용하여 효소를 정제하였다.

2. 실험방법

1) 1,4-Benzoquinone reductase의 활성도 측정
25mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0), 0.25mM 1,4-benzoquinone, 0.2mM NADH와 시료액을 혼합한 후, 340nm에서 NADH의 흡광도 감소를 이용하여 활성도를 측정하였다¹²⁾.

2) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Bradford 방법¹⁵⁾으로 정량하였다.

3) 1,4-Benzoquinone reductase의 정제

(1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의한 분별침전

Baker's Yeast(Sigma type I) 30g에 1mM EDTA를 포함하는 100mM potassium phosphate 완충액(pH 7.5) 400mL를 가하여 4°C에서 균질화시키고 10,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 40%가 포화되도록 서서히 가하면서 자성막대로 천천히 저어 주었다. 20,000g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 상층액에 다시 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 80% 포화시켜 20,000g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 1mM EDTA를 포함하는 10mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 녹인 후 4°C에서 동일한 완충액으로 투석하고 불용성물질은 원심분리하여 제거하였다.

(2) Anion exchange chromatography on DEAE-sephacel

1mM EDTA를 포함하는 10mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephacel column에 위 과정에서 얻은 효소용액을 주입한 다음 같은 완충액으로 충분히 씻어준 후, 같은 완충액을 사용하여 0M에서 0.5M까지의 NaCl 상승 농도 기울기로 흡착된 단백질을 용출시켰다. 효소 활성부분을 모아 농축하여 1mM EDTA를 포함하는 10mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 투석한 후 불용성 물질은 원심분리하여 제거하였다.

(3) Gel Filtration on Sephadex S-200

1mM EDTA를 포함하는 10mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화된 Sephadex S-200 column에 위의 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 얻은 효소용액을 주입한 후 같은 완충액으로 전개시켰으며 용출속도는 12mL/h로 하였고 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다.

이상의 과정은 모두 0~4°C에서 수행하였다.

(4) Disc Polyacrylamide Gel Electrophoresis

정제된 1,4-benzoquinone reductase 용액을 Laemmli 등의 방법¹⁶⁾으로 disc polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하였다. 10% glycerol, 0.0001% bromophenol blue, 2% SDS를 포함하는 0.0625M Tris-HCl buffer(pH 6.8)를 sample buffer로 사용하였으며, 정제된 1,4-benzoquinone reductase 용액 10 μ L에 sample buffer 5 μ L를 가하여 100°C 물증탕에서 1분간 가열한 후, 즉시 냉각하여

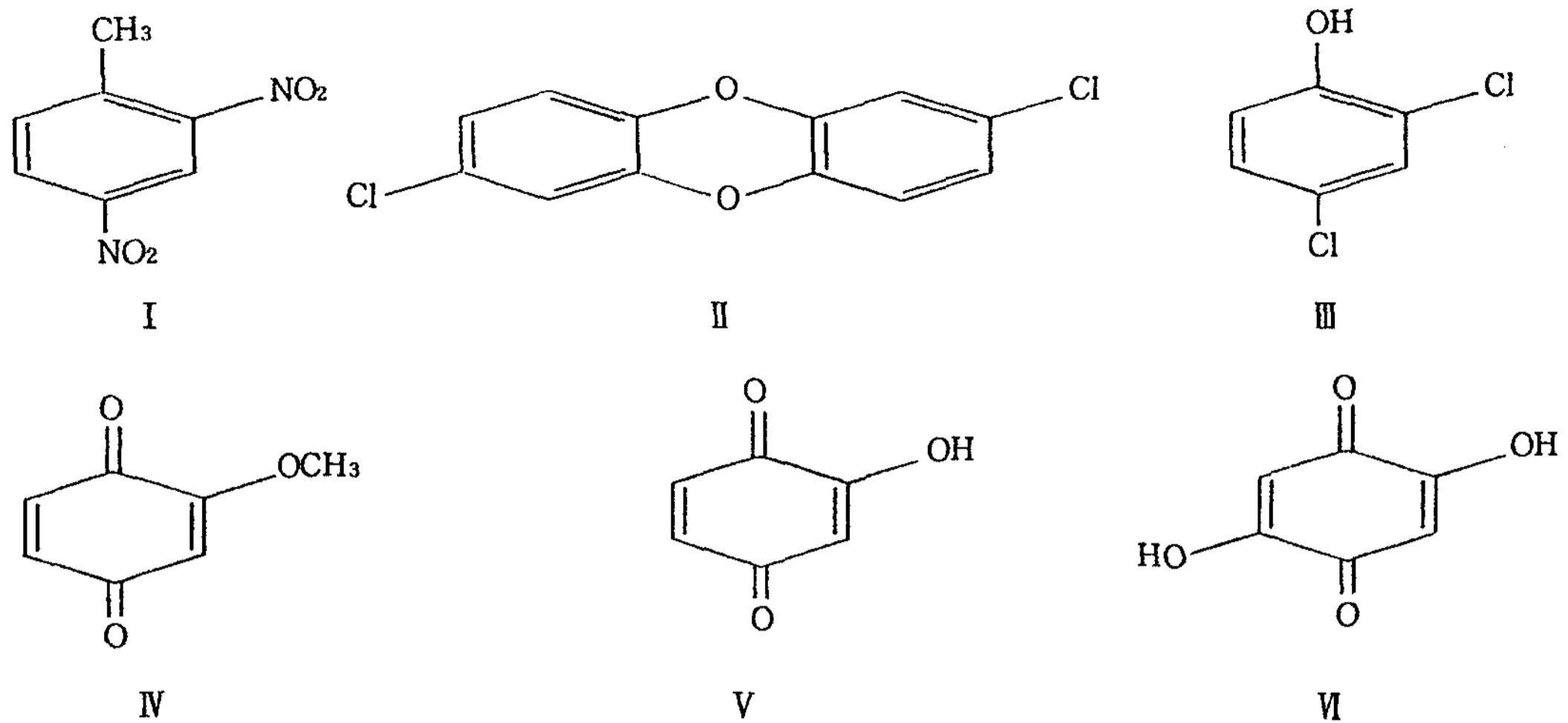


Fig. 1. Structural formulae of the quinones and aromatic pollutants.

gel에 주입하였다. 9% acrylamide running gel과 3% acrylamide stacking gel이 되도록 만든 slab gel에 정제된 1,4-benzoquinone reductase 용액을 주입하여 stacking할 때는 100V, 전개할 때는 200V의 직류 전압을 가해 약 2시간 동안 전개하였다. 이때 lower buffer는 25mM Tris-HCl(pH 8.9)을 사용하였고, upper buffer는 25mM Tris-HCl(pH 8.3)이었다. 전개가 끝난 후 gel을 10% trichloroacetic acid(TCA)용액에 10분간 담가두어 단백질을 고정시킨 다음, Coomassie brilliant blue R-250으로 12시간 정도 염색시킨 후 탈색하여 gel에 나타난 띠를 관찰하였다.

II. 결과 및 고찰

Baker's Yeast(Sigma type I)를 균질화한 후 10,000×g에서 15분 원심분리하여 얻은 용액의 1,4-benzoquinone reductase의 비활성은 2.02×10⁻¹ units/mg protein이었다. 이 용액에(NH₄)₂SO₄를 가하여 40% 포화되었을 때의 침전을 제거한 후 80% 포화되었을 때 침전되는 부분을 모아서 측정된 비활성은 3.85×10⁻¹ units/mg protein으로서 약 1.9배 정제되었다. 이렇게 하여 얻은 효소용액을 DEAE-Sephacel column으로 이온교환 크로마토그래피한 결과 1,4-benzoquinone reductase가 ion exchanger에 결합되어 있음을 알 수 있었고, 단백

질을 용출시키기 위하여 0~0.5M NaCl을 포함하는 완충용액으로 농도기울기한 결과, 1,4-benzoquinone reductase는 약 0.18M NaCl에서 용출되었다(Fig. 1). 이 과정에서 많은 양의 단백질이 제거되었

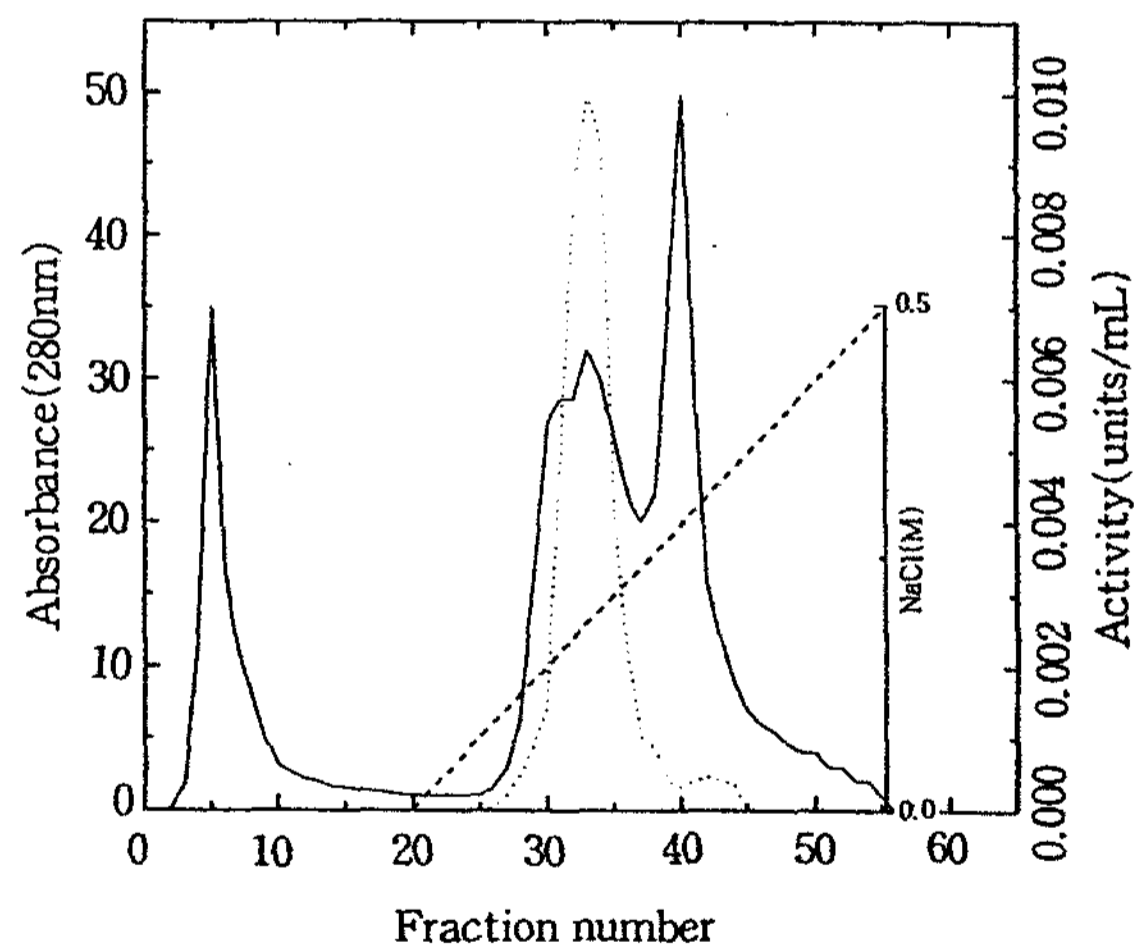


Fig. 2. DEAE-Sephacel anion exchange chromatography from the protein fraction precipitated between 40% and 80% saturation with ammonium sulfate.

Protein peak(—) was monitored with absorbance at 280nm and 1,4-benzoquinone reductase activity(----) was measured as described in the experimental section. The solid represents salt(NaCl) gradient concentration.

Table 1. Purification of the 1,4-Benzoquinone reductase from Baker's yeast

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U) ^a	Specific activity (U/mg×10 ⁻⁴)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	3563	0.7200	2.02	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (40~80%)	832.4	0.3204	3.85	1.9	44.5
DEAE-Sephacel chromatography	34.86	0.1712	49.1	24.3	23.8
Sephacryl S-200 chromatography	3.195	0.0799	250	123.8	11.1

^a 1U=1μmol of NADH oxidized min⁻¹ mL⁻¹

고 비활성은 4.91×10^{-3} units/mg protein이었으며 약 12.8배 정도 더 정제되었다. 활성부분을 모아 Sephacryl S-200 겔 크로마토그래피로 정제한 1,4-benzoquinone reductase의 비활성은 2.50×10^{-2} units/mg protein으로서(Fig. 2) 위의 정제 과정을 거쳐 1,4-benzoquinone reductase는 약 123.8배 정제되었고 11.1%의 회수율을 나타내었다(Table 1). 이렇게 정제된 1,4-benzoquinone reductase를 disc polyacrylamide gel electrophoresis한 결과, 하나의 주 band로 나타났으며(Fig. 3), 정제된 1,

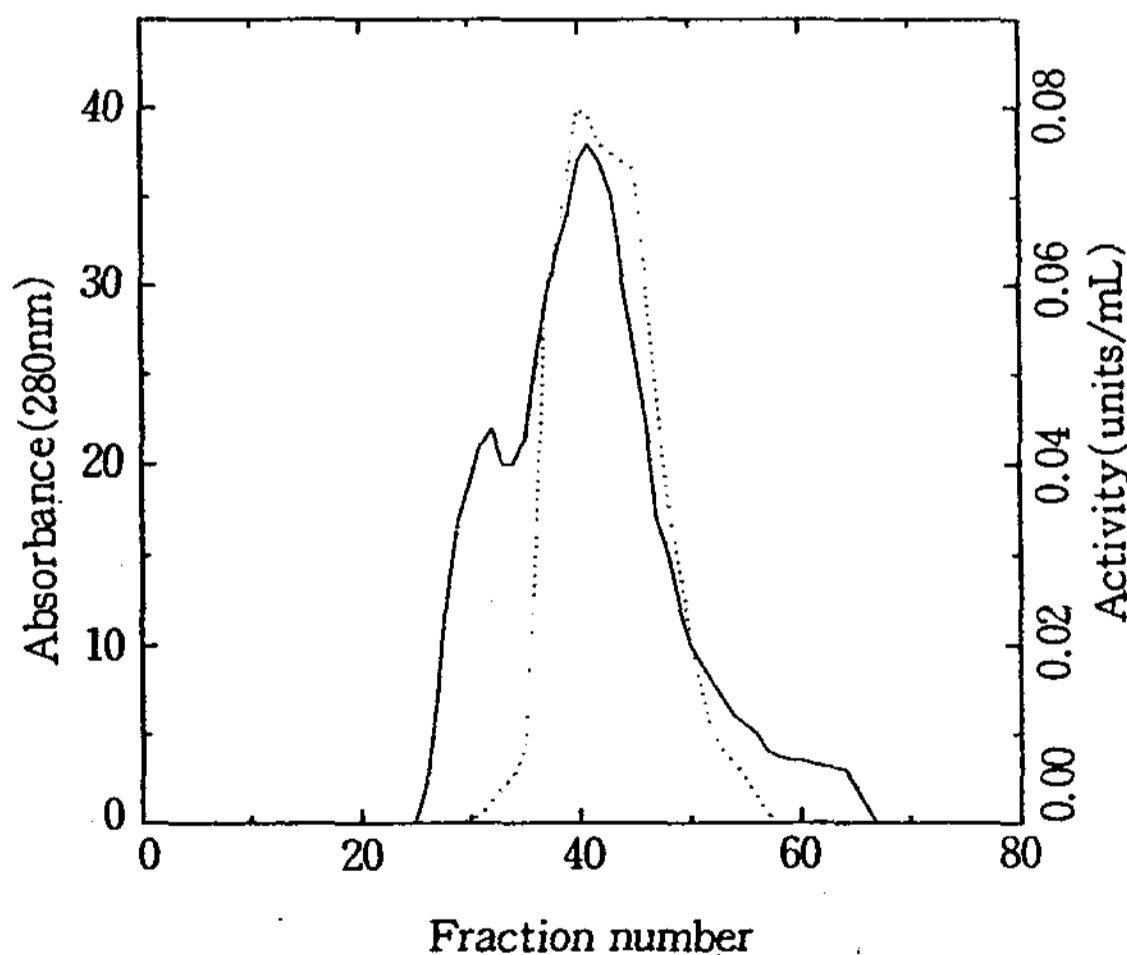


Fig. 3. Sephacryl S-200 gel filtration of pooled fractions containing 1,4-benzoquinone reductase activity from DEAE-Sephacel column.

Absorbance at 280nm(—) and 1,4-benzoquinone reductase activity(----) were measured.

4-benzoquinone reductase의 물리화학적 성질을 측정하고 그 효용성을 평가하는 연구를 수행하고 있다.

IV. 결 론

Baker's Yeast로부터 fractional precipitation, anion exchange chromatography, gel filtration chromatography를 이용하여 1,4-benzoquinone reductase를 정제한 후, polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하여 그 순도를 확인하였다.

1. ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel chromatography, Sephacryl S-200 chromatography 등의 정제과정에 의하여 1,4-benzoquinone reductase가 약 124배 정제되었고 11.1%의 회수율을 나타내었다.

2. 정제된 1,4-benzoquinone reductase를 사용하여 disc polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 결과 하나의 주 band가 나타났다.

감 사

본 연구는 명지대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Rickert, D. E., Butterworth, B. E., and Popp, J. A., *Crit. Rev. Toxicol.*, 13, p. 217

- (1983).
2. Hansen, D. J., *Chem. Eng. News*, 69, p. 7 (1991).
 3. Joshi, D. K., and Gold, M. H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, p. 1779(1993).
 4. Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., and Gold, M. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, p. 1077(1983).
 5. Kirk, T. K., and Farrell, R. L., *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, p. 465(1987).
 6. Tien, M., and Kirk, T. K., *Science*, 221, p. 661(1983).
 7. Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H. E., and Gold, M. H., *Biochemistry*, 31, p. 4986 (1992).
 8. Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, p. 269 (1991).
 9. Rieble, S., Joshi, D. K., and Gold, M. H., *J. Bacteriol.*, 176, p. 4838(1994).
 10. Schmidt, H. W. H., Haemmerli, S. D., Schoemaker, H. E., and Leisola, M. S. A., *Biochemistry*, 28, p. 1776(1989).
 11. Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H., *Biochemistry*, 28, p. 6017(1989).
 12. Constam, D., Muheim, A., Zimmermann, W., and Fiechter, A., *J. Gen. Microbiol.*, 137, p. 2209(1991).
 13. Chung, J. -H., Cha, Y. N. and Rubin, R. J., *Toxi. Appl. Phar.*, 124, p. 123(1994).
 14. MacDonald, M. J., *Endocrinology*, 129, p. 1370(1991).
 15. Bradford, M., *Anal. Biochem.*, 72, p. 248 (1976).
 16. Laemmli, U. K., *Nature*, 227, p. 680(1970).