

Microbacterium laevaniformans가 생성하는 Isocitrate lyase의 정제

서 승 교 · 김 정 호*
대구산업정보대학 환경관리과 · 경상대학교 환경학부
(1998년 10월 26일 접수)

Purification of Isocitrate lyase Produced from Microbacterium laevaniformans

Seung-Kyo Suh and Jung-Ho Kim*
Dept. of Environmental Management, Taegu Polytechnic College, Taegu, 706-020
*Faculty of Environmental Science and Engineering, Kyungsan University, Kyungsan, 712-240
(Manuscript received 26 October 1998)

Purification of the isocitrate lyase extracted from *Microbacterium laevaniformans* was investigated. The isocitrate lyase was purified 43.6 folds by the following continuous treatment with ammonium sulfate fraction, DEAE-cellulose, DEAE-sephacel and Sephadex G-200 chromatography. The purified isocitrate lyase was showed to be a single protein band by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the purified isocitrate lyase was estimated 54,000 Da by the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The K_m and V_{max} values for isocitrate were estimated to be 0.83mM and 0.33units/ml, respectively. Activity of isocitrate lyase was inhibited by cystein-HCl and glutathione.

Key words : Purification, Isocitrate lyase, *Microbacterium laevaniformans*.

1. 서 론

석유화학 계통의 공장 중 Acetaldehyde(CH_3CHO) 생산공장에서는 Acetaldehyde를 제조하기 위하여 촉매로서 염화구리를 첨가한 염화팔라듐을 사용하여 Ethylene을 선택적으로 Acetaldehyde로 전환시킨다. Acetaldehyde(CH_3CHO) 생산공장에서 생성된 폐수는 소각법에 의하여 처리되었으나, 이보다 더 경제적인 활성슬러지법이 시도 될 수 있다(서승교, 1997).

Acetaldehyde 생산 제조에 따르는 주된 부생성물은 초산(acetic acid)이며 염소화된 Acetaldehyde가 소량 함유되어 있다. Acetaldehyde 생산공장 폐수에 함유된 이러한 염소화합물들은 미생물에 심한 독작용을 나타낸다. 따라서 Acetaldehyde 생산공장 폐수를 활성슬러지법에 적용하기 위해서는, 폐수성분을 분해할 수 있는 세균을 분리하여 종균 함으로써 활성슬러지법으로 전환할 수 있다(Chung et al., 1987a; Chung et al., 1987b). 서 등(1997)의해 acetaldehyde 공장폐수의 생물학적 처리를 위한 균주의 분리 및 연속배양에 의한 폐수처리 효과와 활성슬러지법 등이 연구되었다.

활성슬러지법을 효율적으로 운전하기 위해서는 유기물의 분해경로에 대하여 연구되어야 한다. 활성슬러지법으로 처리되었을 때 폐수처리에 의한 COD 및 BOD의 감소원인이 glyoxylate cycle을 경유할 수도 있다. 따

라서 유기물의 분해경로에서는 glyoxylate cycle의 지표 효소인 isocitrate lyase의 생성유무를 확인할 필요가 있다.

TCA cycle에서 acetyl Co-A가 oxaloacetate와 작용하여 citrate가 생성되고 이 citrate는 분해되어 isocitrate로 된다. 그러나 isocitrate는 isocitrate dehydrogenase의 작용을 받지 않고 TCA cycle에서 변형된 isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)작용을 받는 glyoxylic acid cycle경로가 보고되었다(정기택 등, 1993a). Glyoxylic acid cycle 경로는 isocitrate lyase가 citrate를 분해하여 succinate와 glyoxylate를 생성한다.

아세트알데히드 폐수의 생물학적 처리를 위하여 폐수 자화균을 자연계에서 분리, 동정한 *Microbacterium laevaniformans*를 사용하고 있다(Chung et al., 1987a). *Microbacterium laevaniformans*를 종균하여 아세트알데히드 폐수를 활성슬러지법으로 처리하였을 때 폐수처리에 의한 COD 및 BOD의 감소원인이 glyoxylate cycle을 경유하였을 것으로 예상된다. Glyoxylate cycle의 경우는 glyoxylate cycle의 지표 효소인 isocitrate lyase 생성을 조사함으로써 확인할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 폐수처리에 이용된 *Microbacterium laevaniformans*에서 glyoxylate cycle의

Table 1. Composition of media for *Microbacterium laevaniformans*

Components	Concentrations
CH ₃ COONa	2.00%
NH ₄ NO ₃	0.50%
KH ₂ PO ₄	0.10%
MgSO ₄	0.05%
Yeast extract	0.05%
pH	7.5

지표효소인 isocitrate lyase를 정제하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 활성슬러지법으로 Acetaldehyde공장 폐수의 처리를 위하여 *Microbacterium laevaniformans*를 사용하였다(Chung et al., 1987a). 종 배양은 100ml 삼각플라스크에 Table 1과 같은 조성의 배지 20ml을 넣고 한천 사면으로부터 한 백금이의 균을 접종하여 30℃에서 24시간 진탕 배양하였다. 효소정제를 위한 본 배양은 종 배양액 5ml를 같은 조성의 배지 500ml를 넣은 2l 진탕 플라스크에 접종하여 30℃에서 24시간 진탕 배양하였다.

2.2 효소활성 측정 및 단백질 정량

효소의 활성측정은 isocitrate를 기질로 사용하여 Mcfadden법(1969)에 의해 측정하였다. 효소활성 단위는 기질로 사용한 isocitrate로부터 분당 1mole의 glyoxylate 생성을 촉매하는 활성을 1unit로 하였다. 단백질정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry등의 방법(1951)에 따라 정량 하였으며 column에서 분리 용출한 각 분획 단백질의 상대적인 양은 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

2.3 효소의 정제

균 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 집균하고, 50mM Tris-HCl완충액 (pH 7.5)으로 세척하였다. 여기에 5mM MgCl₂를 함유한 동일 완충액을 소량 가하여 균체를 현탁하고 초음파 파쇄기(Ultrasonic

Table 3. Substrate specificity of isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*

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

Ltd.)로 2분간 균체를 파쇄하였다. 이를 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

조효소액에 ammonium sulfate분획을 하였다. 투석한 효소액을 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)으로 평형화한 DEAE-cellulose column(1.6×24cm)에 흡착시킨 후 동일 완충액으로 비 흡착 단백질 부분을 완전히 씻어내었다. 그 다음 흡착된 단백질을 NaCl 0.3M 농도의 직선농도 기울기로 용출시켰다. 그리고 효소활성이 있는 분획을 한외여과법(Amicon Co.)으로 농축하였다.

DEAE-cellulose column chromatography에서 효소활성이 높은 분획을 모아 동일 완충액으로 투석하였다. 그 후 평형화시킨 DEAE-Sephacel column (1.4×13.5cm)에 주입한 다음 동일 완충액으로 비 흡착단백질 부분을 완전히 씻어내었다. 그 다음 흡착단백질 부분을 0.3M농도의 NaCl로 직선농도 분배법으로 용출시켜 투석하고, 한외여과법으로 농축시켰다.

농축된 효소용액을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column (1.6×105cm)에 넣고 분획 당 3ml씩, 시간당 8ml의 유속으로 분획 하였다. 활성분획을 한외 여과시켜 농축된 효소용액을 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column (1.8×90cm)에 다시 주입시킨 후, 시간당 10ml의 유속으로 2.7ml씩 분획하였다.

2.4 전기영동 및 분자량 측정

Polyacrylamide gel 전기영동은 Davis의 방법(1964)에 따라 10% polyacrylamide을 사용하여 전기영동하였다. 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE는 10%의 polyacrylamide를 사용하여 Laemmli의 방법(1970)에 따라 표준 단백질의 상대적인 농도와 대수 값의 표준 직선을 작성하고 이 직선을 이용하여 효소분자량을 산출

Table 2. Summary of purification procedure of isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*

Purification step	Total Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	75	270.0	733.5	2.8	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	24	66.1	427.2	6.4	2.3	56
DEAE-cellulose	42	14.2	347.1	24.4	8.7	45
DEAE-sephacel	21	3.9	175.7	44.9	16.0	23
1st. Sephadex G-200	15	1.1	116.1	100.5	35.8	14
2nd. Sephadex G-200	10	0.57	69.7	122.5	43.6	9

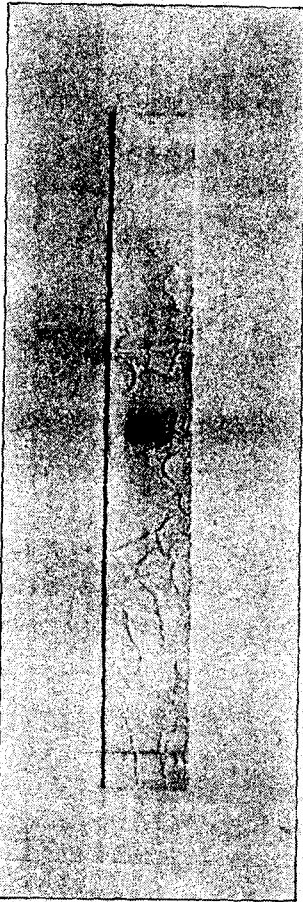


Fig. 1. PAGE analysis of purified isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*. 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Isocitrate lyase의 분리

조효소액을 황산암모늄분획, EDAE-cellulose, DEAE-Sephacel column chromatography, 1차 Sephadex G-200 및 2차 Sephadex G-200 gel filtration을 거쳐 순차적으로 정제한 결과는 Table 2와 같다. 최종적으로 9%의 수율에 specific activity는 43.6 배 증가하였다.

최종적으로 정제된 Isocitrate lyase효소는 Polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 하였을 때 Fig. 1과 같이 단일밴드로 나타났으므로, 단일 단백질로 확인되었다. 따라서 정제된 isocitrate lyase효소가 순수분리 되었음을 확인하였다.

3.2 정제된 효소의 분자량

SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 Sephadex G-200 gel 여과에 의해 효소의 분자량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 정제된 효소의 분자량은 약 54,000이었으며 단량체로 존재하였다. 이와 같은 결과는 *Pinus*

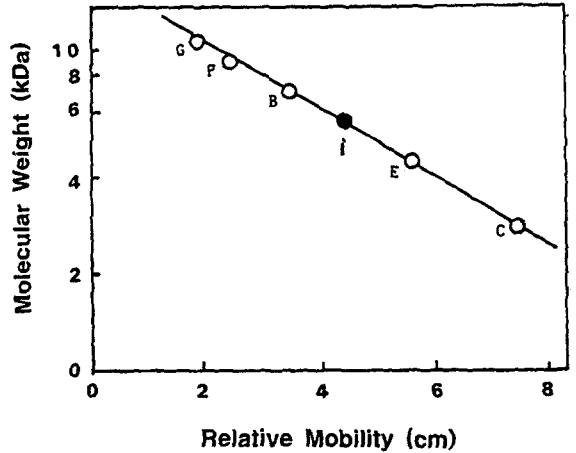


Fig. 2. Determination of molecular weight of purified isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans* by SDS-PAGE. I (●) is Isocitrate lyase. G (○) is Galactosidase with 116,000 Da. P (○) is Phosphorylase with 97,000 Da. B (○) is Bovine serum albumin with 66,000 Da. E (○) is Egg albumin with 45,000 Da. C (○) is Carbonic anhydrase with 29,000 Da.

densiflora (Tsukamoto et al., 1986)에서 65,000을 나타내는 결과와 분자량이 약간 차이가 있었다.

3.3 기질에 대한 영향

정제된 isocitrate lyase의 기질 특이성을 조사하기 위하여 40mM 농도의 기질에 대하여 효소활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 최적기질인 DL-isocitrate를 제외한 Citrate와 Cis-Aconitate 기질은 효소활성이 없는 것으로 나타났다.

이는 *Pseudomonas aeruginosa*에서는 DL-isocitrate만을 기질로 이용하는 Smith 와 Gunsalus (1958)의 결과와 일치하였다.

3.4 기질농도의 영향

기질의 농도가 isocitrate lyase의 반응속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DL-isocitrate를 기질로 하여 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. Lineweaver-Burk 방법(1934)에 따라 plot한 결과는 Fig. 3과 같다. Isocitrate lyase에 대한 Km치는 0.83mM으로 나타났으며 Vmax는 0.33units/ml로 나타났다.

본 실험에서 정제된 Isocitrate lyase의 Km 수치인 0.83mM은, *Actinobacter calcoaceticu*(Bahk and Kim, 1987)에서의 0.004mM과 higher plant (Pinzauti et al., 1986)에서의 0.033mM보다 높았으므로, 이들보다는 기질 친화력이 낮았다. 그리고 *Pseudomonas indigofera*(McFadden and Howes, 1963)에서의 0.82 mM과 비슷하였다. 한편 yeast(Olson, 1959)의 1.2mM 보다는 적었으므로, 이들보다는 기질 친화력

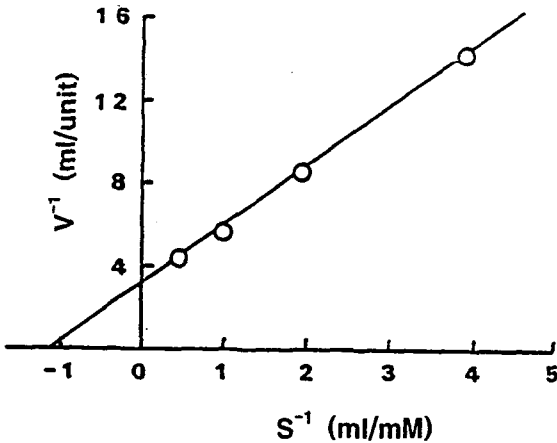


Fig. 3. Effect of isocitrate concentration on the rate of formation of glyoxylate by isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*.

이 큰 것으로 나타났다.

3.5 Thiol 화합물의 영향

Thiol 화합물이 isocitrate lyase의 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. 모든 thiol 화합물은 효소활성을 저해하였다. 특히 10mM cysteine-HCl에 의하여 약 50% 저해되었다.

Peseudomonas indigofera(McFadden and Howes, 1963)에서는 SH화합물이 촉매작용을 위하여 필요하였고, yeast(Olson, 1959)에서는 최대활성을 위하여 SH 화합물이 요구되었다. 그러나 1-4mM의 고농도에서는 저해됨을 보고한 Tsukamoto등의(1986) 결과와 일치하였다.

4. 결 론

*Microbacterium laevaniformans*에서 glyoxylate cycle의 지표효소인 isocitrate lyase의 생성유무 및 그 특성을 조사하였다. 조효소액으로부터 (NH₄)₂SO₄ 분획에 이어 DEAE-cellulose, DEAE-sephacel과 Sephadex G-200 gelfiltration에 의하여 효소를 정제한 결과 수율은 9%였으며, 약 43.6배 정제할 수가 있었다. 그리고 정제효소는 전기영동분석법에 의하여 순수하게 정제되었음을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 54000Da으로 측정되었다. 그리고 Km치는 0.83mM, Vmax는 0.33units/ml로 나타났다. 또한 cysteine-HCl에 의해서는 강하게 저해되었다.

본 연구에서 Acetaldehyde 생산공장 폐수처리에 이용된 *Microbacterium laevaniformans* 균주에서 isocitrate lyase 생성을 확인하였다. 따라서 *Microbacterium laevaniformans* 균주는 glyoxylate cycle이라는 대사과정을 가지고 있음이 확인되었다. 즉 *Microbacterium laevaniformans* 균주는 Acetaldehyde 생산공장 폐수의 주성분인 acetic acid를 탄소원으로 하여 세포성분을 합성하고 에너지원으로 이

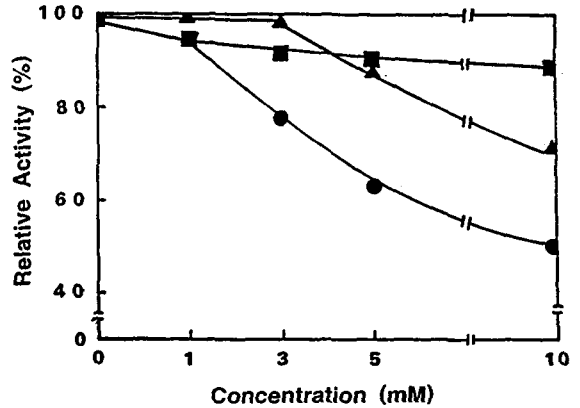


Fig. 4. Effect of thiol compounds on the activity of purified isocitrate lyase with *Microbacterium laevaniformans*. (●: Cysteine, ▲: Glutathione, ■: 2-mercaptoethanol)

용하는 glyoxylate cycle이라는 합성계가 존재하였다.

참 고 문 헌

- 서승교, 김정호, 김영호, 1997, 활성슬러지공정에 의한 Acetaldehyde 제조공장 폐수의 처리, 한국환경과학회지, 6(3), 259-265.
- 정기택, 서승교, 우철주, 1993a. *Microbacterium lacticum*에서 Isocitrate lyase의 정제 및 특성, Kor. J. Microbiol., 31, 335-339.
- 정기택, 서승교, 우철주, 박임동, 정병태, 박영호. 1993b, *Micrococcus luteus*에서 정제한 Isocitrate lyase의 특성, Kor. J. Microbiol., 31, 230-236.
- Bahk, Y.Y. and Y.S. Kim, 1987, Acidic isocitrate lyase from *Acinetobacter calcoaceticus* grown on malonate, Kor. Biochem. J., 20, 191-197.
- Chung, K.T., S.K. Suh, H.I. Song, I.D. Park and K. W. Bang, 1987a, Analysis of wastewater and isolation of strains assimilating wastewater from acetaldehyde plant, Kor. J. Microbiol., 25, 328-332.
- Chung, K.T., S.K. Suh, H.I. Song, I.D. Park and K. W. Bang, 1987b, Studies on the biological treatment of wastewater from acetaldehyde plant, Kor. J. Microbiol. 25, 333-338.
- Davis, B.J., 1964, Disc electrophoresis, method and application to human serum protein, Ann. N. Y. Soc., 121, 401-427.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4., Nature, 227, 680-685.
- Lineweaver, H. and D. Burk, 1934, The determination of enzyme dissociation constants, J. Amer. Chem. Soc., 56, 658-666.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L., Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. B. Chem.*, 193, 265-275.
- McFadden, B.A, 1969, *Methods in enzymology*, 13, p.127-134.
- McFadden, B.A. and W.U. Howes, 1963, Crystallization and some properties of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*, *Biol. Chem.*, 238, 1737-1742.
- Olson, J.A., 1959, The purification and properties of yeast isocitrate lyase, *J. Biol. Chem.*, 234, 5-10.
- 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.
- Smith, R.A and I.C. Gunsalus, 1958, Isocitratase, Enzyme properties and reaction equilibrium, *J. Biol. Chem.*, 229, 305-319.
- Tsukamoto, C., Ejiri, S.I. 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.