

홍색 유황세균 *Thiocapsa roseopersicina*로 부터 생산되는 Hydrogenase의 각종 크로마토그래피에 의한 정제

최은혜^{*,**}, 오유관^{*}, 김미선[†]

*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터, **충남대학교 미생물학과

Purification of Hydrogenases from Purple Sulfur Bacterium *Thiocapsa roseopersicina* Using Various Applications of Chromatography

Eun-Hye Choi^{*,**}, You-Kwan Oh^{*}, Mi-Sun Kim[†]

*Bioenergy Research Center, Korea Institute of Energy Research,
71-2 Jang-dong Yuseong-gu Daejeon 305-343, Korea

**Department of Microbiology, Chungnam National University,
220 Gung-dong Yuseong-gu Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

Crude cytoplasmic fraction of phototrophic purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347, were initially prepared and purified by sonication, ultracentrifugation, ammonium sulfate fractionation and heat-treatment and it has been previously reported. Using various applications of chromatography for the purification of membrane-bound and soluble hydrogenases from heat-treated enzyme fraction were studied at present report. When the heat-treated enzyme preparation was applied to the anion column chromatography using Q-sepharose, Fraction I and II, which were extracted with the KCl 0-0.5 M gradient, showed the specific evolution hydrogenase activity 3.86 and 2.27 U/mg-protein respectively. Specific hydrogenase activities of Fraction I and II were further increased to 4.35 and 7.46 U/mg-protein for Fraction I and to 2.49 and 4.41 U/mg-protein for Fraction II respectively, when hydrophobic interaction column, Phenyl superose, and anion exchange column, Mono-Q, were applied. Size exclusion chromatography using superdex 200 concentrated the hydrogenase Fraction I and II to 9.19 and 7.84 U/mg-protein respectively at the final step of purification.

KEY WORDS : thiocapsa roseopersicina(광합성 홍색 유황세균), hydrogenase(수소생산효소), specific hydrogenase activity(수소생산 비활성도)

1. 서 론

[†]Corresponding author : bmmkim@kier.re.kr

수소생산효소는 분자상의 수소를 산화, 환원하

는 가역 반응을 촉매하는 효소로 중심이 되는 금속이온에 따라 Fe-only 수소생산효소와 NiFe 수소생산효소 두 종류로 나뉜다. 수소생산효소의 중심에 위치한 금속이온들은 미생물이 생장하는데 있어서 필요로 하는 에너지 대사와 긴밀한 관련을 갖고 있으며, 이들 효소는 산소에 의해 수소생산 활성에 저해를 받는다¹⁾. 광합성 홍색 유향세균인 *Thiocapsa roseopersicina*는 NiFe 수소생산효소를 갖고 있는 것으로 보고되어 있는데 세포막에 membrane-bound 수소생산 효소가 2개 존재하고 있으며 세포질 내에 수소생산효소와 수소생산 효과가 없는 수소센서효소가 각각 1개씩 존재하는 것으로 알려져 있다. 일반적인 수소생산효소는 산소와 열에 변성이 쉽게 되어 활성이 낮아지는 것에 비해 *Thiocapsa roseopersicina*에서 분리된 membrane-bound 수소생산효소와 세포질 내 수소생산효소는 열에 대한 안정성이 높아 열에 쉽게 변성되지 않기 때문에 높은 온도에서도 높은 활성을 유지할 수 있는 장점을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 효소를 이용한 생물학적 수소생산에 있어 기존에 알려졌던 고온성 미생물중 예로 들어 *Pyrodictium brockii* 및 *Pyrococcus furiosus* 등에서 분리된 수소생산 효소들은 열에 대한 내성은 높지만 산소에 매우 약해서 수소생산 과정에 까다로운 혐기 조건을 갖추어야하기 때문에 이용이 어려웠다^{2,3)}. 이에 비해 *Thiocapsa roseopersicina*는 혐기 조건에서 배양한 균주지만 이 균주에서 생산되는 효소는 산소에 대한 내성이 높아서 수소생산 과정에서의 산소유입에서 여타 수소생산효소들 보다 높은 안정성을 바탕으로 안정적인 수소생산을 가능하게 할 수 있는 장점을 가진 효소이다. 특히 soluble 수소생산효소는 산소뿐 아니라 계면활성제, 단백질 분해 효소 등 효소에 치명적인 요소들에 대한 내성이 강해 연구 가치가 매우 높지만 세포질 내부에 존재하여 분리 정제가 어려워 알려진 바가 적다^{4,5)}. 본 연구에서는 강한 내열성과 산소 내성을 갖고 있으나 수소생산과 소비 기능 모두를 갖고 있는 membrane-bound 수소생산 효소보다는 주로 수소생산 기능을 하며 더 높은

안정성을 갖는 soluble 수소생산효소를⁶⁾ 생물학적 수소생산에 이용하는 것이 더 효율적이라고 사료하였다.

따라서 본 연구에서는 *Thiocapsa roseopersicina*의 세포질에 존재하는 soluble 수소생산효소의 정제에 중점을 두고 다양한 컬럼을 이용한 크로마토그래피를 행하여 이들이 *Thiocapsa roseopersicina*가 갖는 다양한 단백질 중에서 soluble 수소생산효소의 분리 정제와 정제된 효소의 수소생산 활성에 미치는 영향에 대해서 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료

Thiocapsa roseopersicina NCIB 8347균주를 Pfennig's 배지에서 광합성 독립영양 조건으로 배양한 후 cell을 파쇄하여 4°C에서 초원심분리(400,000×g, 1시간)한 상등액에서 얻은 세포질 분획을 (NH₄)₂SO₄ 60%에서 침전 시킨 후 60°C에서 20분 동안 열처리하여 얻은 단백질을 가지고 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

2.2 수소생산효소 역가

5 ml vacuum vial에 1.3 ml의 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)와 2.5 mM methyl viologen, 수소생산효소를 넣어 섞고, 10분 동안 50°C water bath에서 미리 온도적응 시킨 후 0.2 ml의 230 mM sodium dithionite를 넣어 반응을 시작하였다. 이때 희석은 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)로 하였고, 반응은 N₂ 가스로 치환한 후 혐기 조건하에서 이루어졌다. 반응 시작 후 10분 간격으로 40분 동안 gas chromatograph를 측정하여 생성된 수소의 양을 측정하였다. 효소 활성 1 Unit은 분당 1 μmol의 수소가 생산되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 U/mg-protein으로 정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 시료로 하여 Lowry method(Bio-rad protein assay)를 이용하여 측정하였다⁷⁾.

23 수소생산 효소의 컬럼 크로마토그래피

Q-Sepharose HiLoad 컬럼(2.6×15 cm Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 이용하여 A 완충액(50 mM K-phosphate pH 7.0)으로 평형을 이루고, A 완충액에 1 M KCl을 포함하는 B 완충액을 사용하여 선형 농도구배로 5 ml/min의 유속으로 용출 시켜 tube에 5 ml씩 분획한 후 수소생산 활성을 측정하여 수소생산 활성이 있는 것들을 모아서 vivaspin 20(Vivascience, London, UK)으로 농축하였다.

농축한 것을 Phenyl superose 컬럼(0.5×5 cm Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 적용하여 A 완충액(2 M ammonium sulfate를 포함한 50 mM K-phosphate pH 7.0)으로 평형을 이루고, B 완충액(50 mM K-phosphate pH 7.0)을 사용하여 선형 농도구배로 0.5 ml/min의 유속으로 용출 시켜 tube에 1 ml씩 분획한 후 수소생산 활성을 측정하여 수소생산 활성이 있는 것들을 모아서 vivaspin 20으로 농축하였다.

농축한 것을 다시 Mono-Q 컬럼(0.5×5 cm Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 적용하였다. Mono-Q 컬럼을 이용하여 A 완충액(20 mM Tris-HCl)으로 평형을 이루고, A 완충액에 1 M NaCl을 포함하는 B 완충액을 사용하여 선형 농도구배로 1 ml/min의 유속으로 용출 시켜 tube에 1 ml씩 분획한 후 수소생산 활성을 측정하였다.

수소생산 활성이 있는 것들을 모아서 vivaspin 20으로 농축한 후 다시 Superdex 200 컬럼 (1×30 cm Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 적용하였다. Superdex 200 컬럼을 이용하여 150 mM KCl을 포함한 50 mM K-phosphate 완충액으로 평형을 이루고 1 ml/min의 유속으로 용출 시켜 tube에 1 ml씩 분획한 후 수소생산 활성을 측정하여 수소생산 활성이 있는 것들을 모아서 vivaspin 20으로 농축한 후 50 mM PIPES 완충액(pH 7.0)에 섞어 -70°C에 보관하였다가 단백질과 수소생산 활성도를 측정하였다.

이때 사용한 모든 완충액은 2 mM/L DTT

(Dithiothreitol)가 포함되었고, 완충액 내 산소를 제거 한 후 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Q-Sepharose 컬럼 크로마토그래피

T. roseopersicina NCIB 8347에서 얻은 세포질 분획은 수소생산효소 뿐만 아니라 다양한 종류의 단백질을 다량 포함하고 있다. 따라서 본 실험에서는 세포질 내에 포함되어 있는 soluble 수소생산효소를 분리하기 위한 컬럼 크로마토그래피의 처음 단계로 음이온 교환 크로마토그래피인 Q-Sepharose HiLoad 컬럼을 이용하여 크로마토그래피를 행하였다. 음이온 교환 크로마토그래피는 다양한 단백질을 단백질이 갖는 고유의 전하 성질을 이용하여 분리하기 때문에 단백질을 안정적인 상태로 정제할 수 있는 특징을 갖고 있어서 단백질 정제의 컬럼 크로마토그래피의 처음 단계로 사용하기에 매우 유용하여 본 실험에 이용하였다^{8,9)}.

Q-Sepharose 크로마토그래피를 행하여 얻은 단백질 분획들의 수소생산 활성을 측정하여 수소가 생산되는 분획만을 모은 결과 KCl 0.2-0.25 M과 0.4-0.45 M 두 군데의 농도범위에서 수소생산 활성을 갖는 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 1). *Thiocapsa roseopersicina*에서 생산되는 수소생산효소 중에서 membrane-bound 수소생산효소와 soluble 수소생산효소는 열에 대한 강한 내성을 갖고 있는 것으로 알려져 있는데^{4,5)} 열처리를 하게 되면 여러 종류의 단백질 중에서 강한 내열성을 갖는 membrane-bound 수소생산효소와 soluble 수소생산효소가 남게 되어 컬럼을 이용한 정제 과정에서 수소생산 활성을 갖는 분획이 두 군데로 분리된 것으로 사료된다. Q-sepharose 컬럼을 사용한 본 실험의 KCl 농도가 낮은 구간에서 음이온 전하가 약한 단백질이 먼저 용출되고, KCl 농도가 높은 구간에서 음이온 전하가 강한 단백질이 용출되었다. 이때 KCl 0.2-0.25 M에서 얻은 분획을 fraction I, KCl 0.4-0.45 M 에서 얻은 분획을 fraction II라 정하고 비교 분석하였다. Membrane

홍색 유황세균 *Thiocapsa roseoperscina*로 부터 생산되는 Hydrogenase의 각종 크로마토그래피에 의한 정제

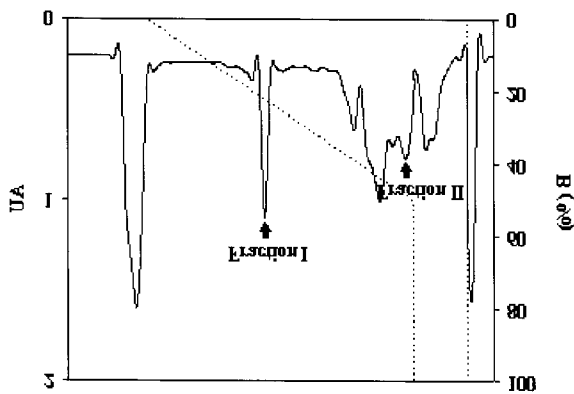


Fig. 1 Elution profile of the hydrogenase on Q-sepharose column chromatography. (A) Fraction I (B) Fraction II

-bound 수소생산효소와 soluble 수소생산효소 둘 다 열에 대한 강한 내성을 갖고 있지만 이중 soluble 수소생산효소가 온도나 산소 등의 여러 요인에 대해 수소생산효소의 역가의 안정성이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 여러 가지 효소의 역가를 저해시키는 요인들에 대한 내성을 측정하였을 때 fraction I보다 II의 내성이 높았기 때문에(data not shown) 먼저 용출된 fraction I은 membrane-bound 수소생산효소이고 나중에 용출된 fraction II가 soluble 수소생산효소라고 사료된다.

본 컬럼에 적용함으로써 fraction I의 수소생산 비활성도는 1.75배 증가할 수 있었다. 이는 fraction I이 컬럼 적용 전인 열처리 때보다 단백질은 4.24배 감소하였고 수소생산 활성도는 210.25 Unit로 2.42배 감소하였기 때문이라고 분석된다. Fraction II의 단백질은 99.2 mg으로 열처리 했을 때보다 2.33배 감소하였고 수소생산 활성도는 2.25배 감소한 225.6 Unit였기 때문에 수소생산 비활성도는 1.03배 증가하였다. Fraction I과 II를 비교해보면 수소생산 활성도는 fraction II가 1.07배 높지만 fraction II의 단백질이 fraction I보다 1.82배 높기 때문에 비활성도가 fraction I이 1.7배 높았다(Table 1).

Q-sepharose 컬럼은 다량의 단백질이 포함된 세포질 분획을 세분화 시켜 높은 수소생산 활성을 갖는 두 개의 분획으로 나누어 주었으며 T.

Table 1 Summary of purification of hydrogenase from *Thiocapsa roseoperscina* NCIB 8347

^a For fraction I
^b For fraction II

Fraction	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Sonication	11701.25	9539.86	0.82	100.00	1.00
Ultra centrifugation	3848.80	4108.13	1.07	43.06	1.31
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	874.44	879.80	1.01	9.22	1.23
Heat treatment	231.20	508.00	2.20	5.33	2.70
Q-sepharose ^a	54.48	210.25	3.86	2.20	4.73
Phenyl superose ^a	23.53	102.30	4.35	1.07	5.33
Mono-Q ^a	4.89	36.50	7.46	0.38	9.16
Superdex 200 ^b	1.45	13.32	9.19	0.14	11.27
Q-sepharose ^b	99.20	225.60	2.27	2.36	2.79
Phenyl superose ^b	32.40	80.80	2.49	0.85	3.06
Mono-Q ^b	8.04	35.43	4.41	0.37	5.41
Superdex 200 ^b	3.00	23.52	7.84	0.25	9.62

roseoperscina NCIB 8347에서 수소생산 능력을 갖지 않는 불필요한 단백질은 다량 제거 해주면서 수소생산 활성의 손실은 적었다. 이 같은 결과로 보아 Q-sepharose 컬럼은 수소생산효소의 정제에 있어 매우 안정적이면서 효율이 높은 컬럼이라고 사료된다.

3.2 Phenyl Superose 컬럼 크로마토그래피

Phenyl superose 컬럼은 지지체에 hydrophobic 성질이 강한 phenyl기를 붙인 물질을 충전한 소수성 상호작용 컬럼이다. 소수성 상호작용 크로마토그래피는 단백질이 갖는 소수성 상호작용과 이온의 세기를 이용하여 단백질을 분리하기 때문에 단백질의 고유 전하를 이용하는 음이온 교환 크로마토그래피 다음 단계로 사용하기에 매우 유용한 컬럼이다^{8,9)}. Membrane-bound 수소생산효소는 hydrophobic한 성질의 효소로 알려져 있는데⁵⁾ membrane-bound 수소생산효소로 사료되는 fraction I의 단백질 분리와 소수성 상호작용 크로

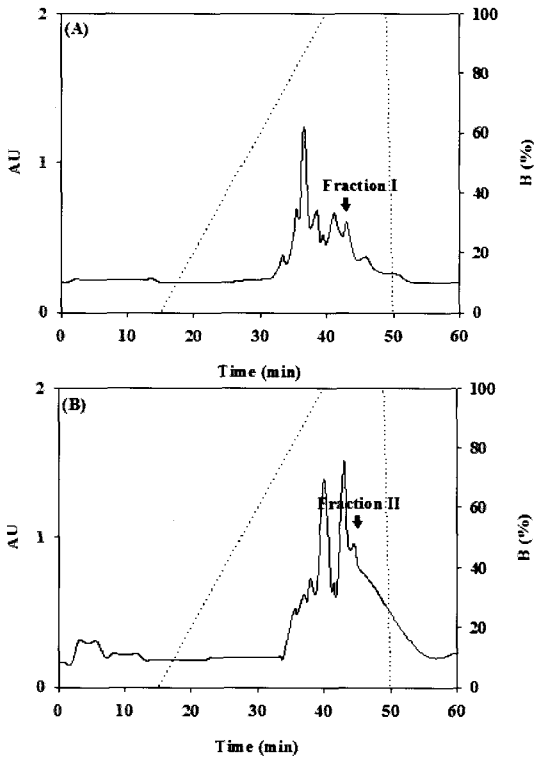


Fig. 2 Elution profile of the hydrogenase on phenyl superose column chromatography. (A) Fraction I (B) Fraction II

마토그래피가 soluble 수소생산효소인 fraction II의 정제에 미치는 영향을 알아보고자 fraction I과 II 모두 Q-sepharose 컬럼 다음으로 소수성 상호작용 크로마토그래피인 Phenyl superose 컬럼을 적용하였다. 소수성 상호작용 크로마토그래피는 단백질이 이온의 세기가 강해짐에 따라 낮은 salt의 조건에서 단백질이 용출되는데 fraction I과 II 모두 salt로 사용된 ammonium sulfate 농도가 0 M 일 때 용출되었다(Fig. 2).

Phenyl superose 컬럼을 적용함으로써 Q-sepharose 컬럼을 적용했을 때보다 fraction I의 경우 수소생산 비활성도가 4.35 U/mg로 1.13배 증가하였다. 이는 fraction I이 Phenyl superose 컬럼을 적용한 후 단백질은 2.32배, 수소생산 활성도가 2.06배 감소하였기 때문이다. Fraction II는 Q-sepharose 컬럼을 적용했을 때보다 단백질이

3.06배, 수소생산 활성도가 2.79배 감소하여 수소생산 비활성도는 2.49 U/mg로 1.1배 증가하였다. Fraction I과 II를 비교해 보면 단백질은 fraction II가 1.38배 높지만 수소생산 활성도가 fraction I이 1.27배 높기 때문에 수소생산 비활성도가 fraction I이 II보다 1.75배 높았다(Table 1).

Phenyl superose 컬럼을 fraction I, II에 적용함으로써 fraction I, II 모두 수소생산 비활성도를 증가시키고, 상당량의 불필요한 단백질을 제거할 수 있었으며 특히 fraction I의 경우 fraction II보다 높은 단백질 분리 효과를 얻을 수 있었다. 따라서 Phenyl superose 컬럼은 hydrophobic한 성질이 강한 membrane-bound 수소생산효소로 사료되는 fraction I의 정제과정에 매우 효율적인 컬럼이라고 사료된다.

3.3 Mono-Q 컬럼 크로마토그래피

Phenyl superose 컬럼을 통해 얻은 fraction I과 II의 수소생산 역가의 안정성을 유지하면서도 좀더 세밀한 정제를 위해 각각의 fraction을 전하의 성질을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피인 Mono-Q 컬럼을 이용하여 단백질을 분리하였다^{8,9)}. 이때 수소생산효소의 역가가 가장 높은 pH 조건을 얻기 위해 컬럼에 사용하는 완충액의 pH를 7.5-8.5의 다양한 범위로 적용하여 용출된 단백질의 수소생산 역가를 비교해 보았다. 비교 결과 fraction I은 pH 7.5, fraction II는 pH 8.0에서 가장 높은 수소생산 역가를 나타내어 이들 각각의 pH 조건의 완충액을 크로마토그래피에 사용하였다. Mono-Q 크로마토그래피를 행한 결과 fraction I은 NaCl 170-190 M 농도에서 용출되었고, fraction II는 NaCl 340-360 M 농도에서 용출되었다(Fig. 3).

Mono-Q 크로마토그래피를 적용한 후 fraction I의 수소생산 비활성도는 7.46 U/mg으로 Phenyl superose 컬럼을 적용하였을 때보다 1.71배 증가하였으며 fraction II의 경우는 수소생산 비활성도가 4.41 U/mg으로 1.77배 증가하였다. 이는 fraction I은 단백질이 4.81배, 수소생산 활성도가

홍색 유황세균 *Thiocapsa roseopersicina*로 부터 생산되는 Hydrogenase의 각종 크로마토그래피에 의한 정제

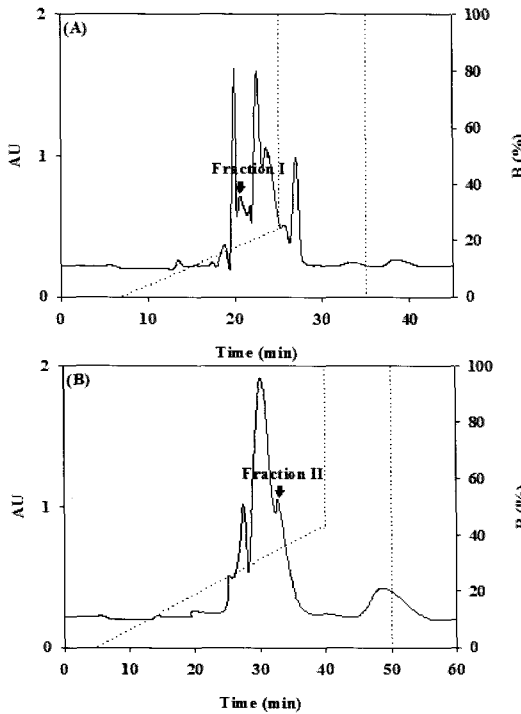


Fig. 3 Elution profile of the hydrogenase on mono-Q column chromatography. (A) Fraction I (B) Fraction II

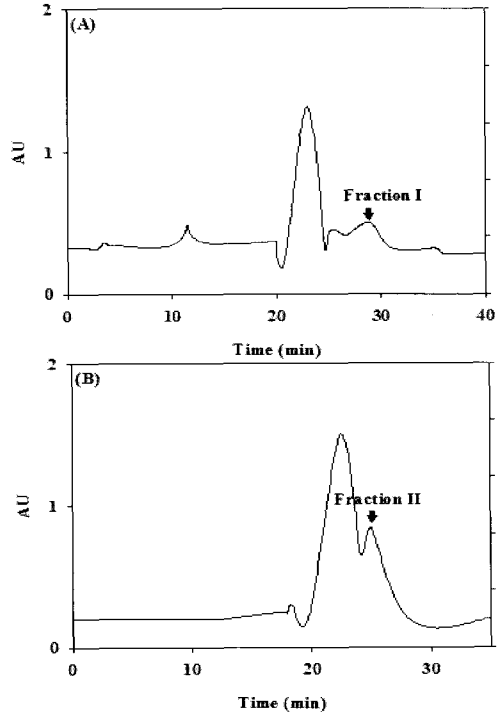


Fig. 4 Elution profile of the hydrogenase on superdex 200 column chromatography. (A) Fraction I (B) Fraction II

2.8배 감소하였고 fraction II는 단백질이 4.03배, 수소생산 활성도가 2.28배 감소하였기 때문으로 분석된다. Fraction I과 II를 비교해 보면 fraction I의 수소생산 비활성도가 fraction II에 비해 1.69배 높았다. 이는 fraction II의 단백질이 fraction I보다 1.64배 높았고, 수소생산 비활성도는 1.03배 낮았기 때문이다(Table 1).

T. roseopersicina NCIB 8347에서 분리한 수소생산 활성을 갖는 fraction I과 II의 정제에 있어서 Mono-Q 컬럼으로 정제하는 것은 Phenyl superose 컬럼단계와 비교했을 때 불필요한 단백질의 감소와 수소생산 비활성도의 증가 효과를 볼 때 효율적인 컬럼 크로마토그래피 방법이라고 사료된다.

3.4 Superdex 200 컬럼 크로마토그래피

Mono-Q 컬럼을 통해 얻은 fraction I과 II를 각

각 젤 여과 크로마토그래피인 Superdex 200 컬럼을 이용하여 분자량 10,000-600,000 dalton을 농축하였다. 젤 여과 크로마토그래피는 단백질의 어떠한 화학적 상호 작용에도 의존하지 않고 단백질의 물리적 특성인 분자의 크기만을 이용하여 분리하는 크로마토그래피로 수소생산효소의 안정적인 농축을 위해 분자크기와 앞선 정제과정을 거치면서 상당량 감소한 효소의 양을 고려하여 행하였다^{8,9}. Superdex 200 컬럼을 행한 결과 fraction I은 16 ml 이후에서 용출되었고 fraction II는 15 ml 이후에서 용출되었다(Fig. 4).

Fraction I을 Superdex 200 컬럼을 이용하여 농축한 결과 수소생산 비활성도가 9.19 U/mg으로 Mono-Q 컬럼을 적용 하였을 때보다 1.23배 증가하였다. 이는 Superdex 200 컬럼을 적용함으로써 단백질이 3.37배, 수소생산 활성도가 2.74배 감소하였기 때문이다. Fraction II는 Superdex 200 컬럼을 적용하였을 때 Mono-Q 컬럼을 적용하였을

때보다 단백질은 2.68배, 수소생산 활성도는 1.51배 감소하여 수소생산 비활성도는 1.78배 증가한 7.84 U/mg였다. Fraction I과 II를 비교해 보면 fraction I이 II보다 수소생산 비활성도가 1.17배 높지만 전체적인 수율은 fraction II가 fraction I보다 1.79배 높은 것으로 분석되었다. 이는 fraction I을 Superdex 200에 적용함으로써 fraction II보다 많은 단백질과 수소생산 활성을 잃었기 때문이다. 그러나 Superdex 200을 적용함으로써 fraction I과 II의 수소생산 효소의 정제도가 각각 11.27배와 9.62배로 높아졌고 수소생산 비활성도가 모두 증가한 것으로 보아 수소생산 효소를 효과적으로 농축시켜 주었음을 알 수 있다(Table 1).

4. 결 론

본 연구에서는 *T. roseopersicina* NCIB 8347에서 수소생산 효소를 정제하는데 있어 여러 종류의 컬럼을 이용한 크로마토그래피가 효소의 정제과정에 미치는 영향을 연구하였다. Q-sepharose를 행한 결과 다량의 단백질 중에서 내열성이 강한 membrane-bound 수소생산효소와 soluble 수소생산효소를 갖는 것으로 사료되는 두 군대의 단백질 분획을 얻을 수 있었고 불필요한 단백질은 상당량 제거하면서 효소의 활성 저하는 낮았다. 따라서 Q-sepharose 컬럼은 수소생산효소의 단백질 분리에 매우 효율적인 컬럼으로 사료된다. Phenyl superose과 Mono-Q 컬럼을 적용한 결과를 보면 fraction I과 II 모두 다량의 단백질제거 효과와 수소생산효소의 정제도 증가의 효과가 있었기 때문에 수소생산효소의 정제에 매우 효과적인 컬럼으로 사료된다. Superdex 200 컬럼의 경우 수소생산효소의 정제도를 높여줌과 동시에 수소생산 효소를 효과적으로 농축시켜 주었음을 알 수 있었다.

후 기

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지사업

단)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) J. Schnackenberg, M. Miyake, J. Miyake, N. A. Zorin, and Y. Asada, "In vitro and in vivo coupling of Thiocapsa hydrogenase with cyanobacterial and algal electron mediators", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 88, 1999, pp. 30-34.
- 2) V. M., Fernandez, K. K. Rao, M. A. Fernandez, and R. Cammack, "Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from Desulfovibrio desulfuricans, Norway strain", Biochimie, Vol. 68, 1986, pp. 43-48.
- 3) R. Cammack, V. M. Fernandez, and K. Schneider, "Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases", Biochimie, Vol. 68, 1986, pp. 85-91.
- 4) K. L. Kovacs and C. Bagyinka, "Structural properties functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria", FEMS Microbiol. Rev., Vol. 87, pp. 407-412.
- 5) N. A. Zorin, O. N. Pashkova, and I. N. Gogotov, "Isolation and characterization of two forms of hydrogenase from Thiocapsa roseopersicina", Biochemistry (Moscow), Vol. 60, 1995, pp. 379-384.
- 6) I. N. Gogotov, "Hydrogenases of phototrophic microorganisms", Biochimie, Vol. 68, 1986, pp. 181-187.
- 7) E. H. Choi, Y. K. oh, and M. S. Kim, "Purification of hydrogenase from *T. roseopersicina* : effect of ammonium sulfate precipitation and heat-treatment", Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society, Vol. 17, 2006, pp. 371-378.

홍색 유황세균 *Thiocapsa roseopersicina*로 부터 생산되는 Hydrogenase의 각종 크로마토그래피에 의한 정제

- 8) T. G. Cooper, "The tools of biochemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1977, pp. 136-192.
- 9) R. K. Scopes, "Protein purification : principles and practice(Third edition)", In C. R. Cantor (eds.), Springer-Verlag, New York, 1994, pp. 146-267.