

# CO<sub>2</sub>를 고정하는 화학독립영양미생물인 *Aeromonas* sp. strain JS-1의 Form I Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase 정제 및 특성 파악

나숙현<sup>1</sup> · 배상옥<sup>2</sup> · 정수정<sup>3</sup> · 정선용<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 환경공학과, <sup>2</sup>초당대학교 조리과학부, <sup>3</sup>영산강유역환경청

## Form I Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from CO<sub>2</sub>-Fixing Chemoautotrophic bacterium, *Aeromonas* sp. strain JS-1: Purification and Properties

Suk-Hyun Na<sup>1</sup>, Sang-Ok Bae<sup>2</sup>, Soojung Jung<sup>3</sup>, and Seon-Yong Chung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Department of Culinary Art, Chodang University, Muan-Kun 534-800, Korea

<sup>3</sup>Yeongsan River Basin Environmental Office, Gwangju 502-862, Korea

**Abstract** A new hydrogen-oxidizing bacterium, *Aeromonas* sp. strain JS-1, that can fix CO<sub>2</sub> via the reductive pentose phosphate cycle (Calvin-Benson cycle) under chemoautotrophic conditions but not photoautotrophic conditions was isolated from fresh water. Strain JS-1 showed considerable CO<sub>2</sub> fixation ability during continuous cultivation even at high CO<sub>2</sub> concentration. Strain JS-1 used H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> fixation as energy and carbon sources, respectively. Carbon dioxide fixation is carried out through the Calvin-Benson cycle, in which ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is the key enzyme. Hydrogen-oxidizing chemoautotrophic *Aeromonas* sp. strain JS-1 exhibited remarkably strong RubisCO [EC 4.1.1.39] activity. RubisCO was purified as an L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>-type hexadecamer with molecular mass of 560 kDa by gel filtration. The enzyme consisted of two different subunits eight large (56 kDa) and eight small (15 kDa), as demonstrated by SDS-PAGE. The specific activity of the purified enzyme was about 3.31 unit/mg and stable up to 45°C. The *K<sub>m</sub>* values for RuBP, CO<sub>2</sub>, and Mg<sup>2+</sup> were estimated to be 0.25 mM, 5.2 mM and 0.91 mM, respectively.

**Keywords:** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (RubisCO), *Aeromonas* sp. strain JS-1, Chemoautotrophic microorganism, Calvin-Benson cycle, CO<sub>2</sub> fixation

### 서 론

현재 전 세계적으로 가장 이슈화된 문제는 기후변화이다. 기후변화는 전 세계 모든 사람과 그 후손들에게 영향을 미치

고 장기간에 걸쳐 발생하는 특성을 가진 매우 중대하고 시급한 문제로 인식되기 시작했다. 기후변화에 적응하고 지속적인 경제발전을 이루기 위한 대안으로 저탄소 녹색성장이 대두되고 있는 가운데 화석 연료에 의한 지구상의 온실가스 증가는 지구온난화의 중요한 원인으로써 인식되고 있다. 이 산화탄소는 온실가스로써 지구상에 존재하는 유일한 탄소원이며 탄소순환을 통해 일정하게 유지되지 못하게 되면 생태계 불균형을 초래하게 된다. 따라서, 연소가스로부터 CO<sub>2</sub>를

#### \*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1858, Fax: +82-62-530-0742

e-mail: sychung@chonnam.ac.kr

제거하기 위한 많은 연구들은 실행되어왔다 [1,2]. 그 중에서 물리화학적 특성을 이용하여 CO<sub>2</sub>를 다른 형태로 전환시킴으로서 제거하는 방법과 생물학적 방법을 이용하여 CO<sub>2</sub>를 고정하는 기술들이 개발되어져 왔다 [3,4]. 이때 이용된 미생물은 광합성 미생물 즉, 조류나 광합성 세균 등이 대부분이었다 [5-7].

본 연구에서는 빛을 이용하여 이산화탄소를 고정하는 광합성독립영양미생물이 아닌 무기화합물을 이용하여 이산화탄소를 고정하는 화학독립영양미생물을 대상으로 하였다. 실험에 이용되는 화학독립영양미생물은 모든 영양물질을 무기물에서 얻고 있으며, 이때 이용되는 에너지원은 태양에너지가 아닌 다른 무기화합물에서 산화된 에너지이다.

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO: EC 4.1.1.39)는 Calvin-Benson cycle를 경유하는 key enzyme로서, RubisCO 활성에 의해 탄산고정능력이 결정되어진다. RubisCO는 기질로써 Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)를 이용하여 CO<sub>2</sub> 혹은 O<sub>2</sub>의 반응을 선택적으로 촉매작용하며, 식물에 다량 함유되어 있으며 아마 세상에서 가장 풍부한 단백질일 것이다.

CO<sub>2</sub> 고정 박테리아는 두 가지 서로 다른 분자량을 지닌 Form I과 Form II의 두 종류 RubisCO를 함유하고 있다. CO<sub>2</sub>가 유일한 탄소원으로 공급되는 광영양조건에서 주로 관여하는 효소는 Form I의 RubisCO이다. Form I 효소는 이형다량체 복합구조로써 동일한 여덟 개의 large subunit (L<sub>8</sub>)와 여덟 개의 small subunit (S<sub>8</sub>)의 두가지 종류의 subunits를 함유하는 사각구조이며, Form II 효소는 단지 large subunit (L<sub>2</sub>)로 구성되어 있다 [8,9].

이전 연구에서, 해수에서 분리된 수소산화세균인 *Pseudomonas hydrogenothermophila*와 *Hydrogenovibrio marius* MH-110의 조효소액이 Reductive pentose phosphate cycle (Calvin-Benson cycle)를 경유하여 탄소를 동화한다는 연구가 보고된 바 있다 [10,11].

본 연구는 Calvin-Benson cycle을 경유하여 빛에 의존하지 않고 무기 화합물의 공급에 의해 CO<sub>2</sub>를 고정하는 미생물을 분리 동정하였으며, RubisCO를 정제하여 그 효소의 분자 형태 및 생화학적 특성을 밝혔다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리 및 배양

호수와 웅덩이의 표층수를 시료로 채취하여 100 mL baffie flask에 배지 10 mL를 넣고 멸균한 후, 시료 5% (V/V)를 접종하였다. 배양 배지는 C-medium (배지조성: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, NaCl 2 g, CaCl<sub>2</sub> 10 mL, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mL, trace elements solution 2 mL in deionized water 1 L, pH 7.0. Trace Elements Solution: MoO<sub>3</sub> 1 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 7 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0.4 mg, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1 mg, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1 mg, NiSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg in deionized water 1 L)에서 탄소원으로써 이용될 수 있는 yeast extract를 제외하여 사용하였고, CO<sub>2</sub>를 유일한 탄소원으로 이용하였다. 배양액이 담긴 baffie flask에 실리콘 마개를 하고, needle을 이용하여 vacuum pump로 충분히 진공상태로 한 후, mass flow controller가 내장된 Gas blender LK-301C (WOOIL HIGHTECH CO., LTD.)로 일정 비율로 혼합된 가스를 1 L/min의 유량으로 35초 동안 주입시켰다. 이 과정을 2~3회 반복한 후 H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> = 7 : 2 : 1의 비율로 혼합된 가스를 넣어 30°C, shaking incubator (150 rpm)에서 배양하면서 분리하여 단일균종만 획득하였다. 분리된 균주의 형태학적 분류를 위해 SEM 관찰을 하였으며 (HITACHI, S-2400), 균주를 동정하기 위하여 API 20E kit를 사용하였다.

### 이산화탄소 고정경로 확인

분리된 균주가 광합성을 하는 대부분의 식물과 세균들의 이산화탄소 고정 경로인 Calvin cycle을 갖는지의 여부를 조사하기 위해, 이산화탄소와 RuBP를 결합시키는 효소인 RubisCO의 활성을 방사성 동위원소 (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>)를 이용하여 Scintillation Counter (LSC CTRI-CARB 4000 series, United Technology, Packard)로 측정하였다.

### RubisCO 활성 측정

RubisCO 활성은 Yaguchi [12] 등의 방법에 의해 측정하였으며 NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>를 이용하므로써 실행되었다. 반응은 37°C에서 1분 동안 10 mM RuBP 20 μL를 첨가하므로써 반응이 시작된다. 활성 효소 1 unit는 37°C에서 1 μmol CO<sub>2</sub>/min의 고정을 촉매하는 양으로 정의하였다.

### 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford [13] 등의 방법을 이용하여 bovin serum albumin (Sigma Co. USA)을 표준 단백질로 하여 측정하였으며 효소정제 과정 중의 단백질의 농도는 분광광도계를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소의 정제

효소의 정제는 대량 배양하여 sonication (45 W, 20 min)한 후 원심분리에 의해 얻은 조효소액을 ammonium sulfate (25%~40%)로 분별 침전시키고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 PD-10 column을 통해 탈염시킨 후, 20 mM Tris-EDTA (pH 7.0)로 용해시키고 미리 평형화시킨 DEAE-Sephrose CL-6B column (0.7 × 10 cm)에 RubisCO 효소를 흡착시키고 용출시켜 0.5 M NaCl 용액을 이용하여 linear gradient로 실시하였으며 용출한 후, 활성

획분을 회수하였다.

활성획분의 효소액은 ammonium sulfate 40%농도로 주입하여 농축시킨 후 완충액으로 overnight동안 투석하였다. 농축한 효소는 동일 완충액으로 평형화 시킨 Bio-gel A-0.5 m gel filtration column (1.5 × 80 cm)에 통과시켜 정제되었다.

**전기영동**

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법 [14]에 준하여 60 mA에서 이행되었다. 전기영동 후 gel은 0.125% coomassie brilliant blue R-250으로 10분간 염색되고 탈색용액에서 탈색시켜 단백질 밴드를 확인하였다.

**효소 화학적 성질**

정제된 효소를 이용하여 최적 pH와 온도, pH 안정성과 온도 안정성 등의 성질을 규명하였다. 최적 pH는 정제 효소액을 이용하여 37°C에서 pH 4부터 9까지 변화시키면서 효소활성을 측정하였고 최적온도는 pH 7.0에서 25°C에서 60°C까지의 범위에서 효소활성을 측정하였다.

온도 안정성 실험은 효소액을 최적 pH의 완충 용액과 혼합하여 25~60°C에서 30 min간 전 배양 시킨 후, 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해 냉각시킨 후 pH 7.0, 37°C에서 활성을 측정하였다.  $K_m$  값은 RubisCO의 기질인 RuBP 및 CO<sub>2</sub>, 안정 활성화제로써 buffer중에 있는 Mg<sup>++</sup> 대한 것을 측정하여 Lineweaver-Burk plot법에 의해  $K_m$  값을 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**수소산화 세균의 분리 및 동정**

부영양화된 웅덩이에서 채취한 시료로부터 CO<sub>2</sub>를 고정하는 화학독립영양 세균이 분리되었다. 분리된 균주의 생리학적, 생화학적 특성을 동정한 결과 그람 음성이었으며 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 비교 분석한 결과 *Aeromonas* sp. strain JS-1으로 명명되었다. SEM 관찰 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

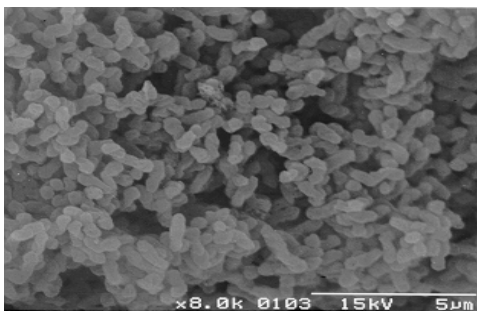


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Aeromonas* sp. strain JS-1.

**최적의 성장 조건**

회분식 배양을 통한 *Aeromonas* sp. strain JS-1의 최적 성장 온도는 37°C, pH는 7~8, NaCl 농도는 0.1% (W/V) 였다. NaCl 0.8% 이상에서는 거의 성장을 보이지 않았으며, 반면에 NaCl을 전혀 첨가하지 않은 배양조건에서는 최적의 농도와 흡사한 성장을 보였다. CO<sub>2</sub> 농도에 따른 성장은 Fig. 2에서와 같이 수소, 산소, 이산화탄소의 비율이 7 : 2 : 1 (V/V)에서 가장 활발한 성장을 보였다.

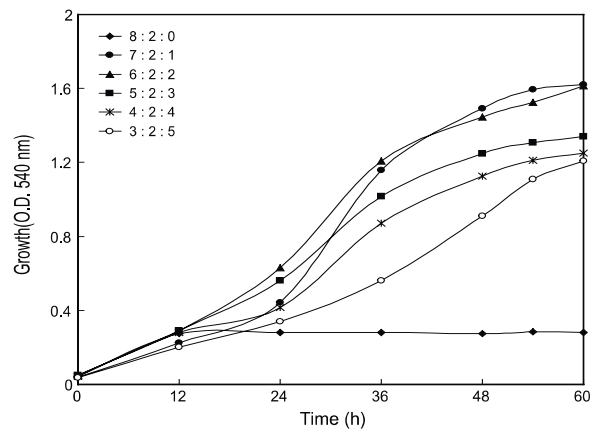


Fig. 2. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on cell growth of *Aeromonas* sp. strain JS-1 in batch cultivation. A preculture solution of 1% (v/v) was inoculated into 50 mL of C-medium in a 500 mL baffled flask. Symbols: ◆, 8 : 2 : 0 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>; ●, 7 : 2 : 1 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>; ▲, 6 : 2 : 2 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>; ■, 5 : 2 : 3 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>; ×, 4 : 2 : 4 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>; ○, 3 : 2 : 5 = H<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>.

*Aeromonas* sp. strain JS-1은 CO<sub>2</sub> 농도가 10~20%에서 가장 활발한 성장을 하고, 40~50%에서도 성장하는 것을 알 수 있다. 대부분의 광합성 미생물은 20~30%이상의 고농도의 CO<sub>2</sub>에서 성장이 느리게 유지되거나 성장할 수 없다고 보고된바 있다 [15]. 따라서, Strain JS-1은 고농도의 CO<sub>2</sub> 농도에서도 성장이 가능하므로 생물학적 CO<sub>2</sub> 고정 process에 이용될 가능성이 높을 것이라고 판단된다.

**에너지원과 탄소원의 이용**

대부분 수소산화 세균은 에너지원으로서 수소를 이용하고, 탄소원으로 이산화탄소를 이용해 성장한다. 본 연구에서는 *Aeromonas* sp. strain JS-1가 수소이외의 다른 에너지원으로 무기·유기탄소원을 이용하는지 여부를 조사하였다 (Table 1). 각각의 무기물을 배양배지에 1% (W/V)를 첨가한 후 CO<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>를 주입한 상태에서 3일 동안으로 배양 (35°C, 150 rpm) 하였을 경우, Sodium Tiosulfate에서 성장을 보였다. 이 결과로 *Aeromonas* sp. strain JS-1은 무기화합물중 reduced sulfur compounds의 일부를 에너지원으로 이용할 수 있는 것으로 판단된다. 같은 실험방법으로 유기탄소원 (유기산, 당, 영양

**Table 2.** Summary of the purification of the RubisCO from *Aeromonas* sp. strain JS-1

Fraction	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell free extract	16.35	563.86	0.029	100.0	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precipitation	8.89	104.46	0.085	54.3	2.9
DEAE-Sepharose CL-6B	4.90	2.97	1.65	16.4	56.9
Gel filtration	1.69	0.51	3.31	5.6	114.1

배지)을 이용하여 strain JS-1의 성장여부를 조사한 결과, 주로 분해하기 쉬운 당과 영양배지인 malt extract, soluble starch, LB liquid medium, MacConkey agar 등에서는 성장이 가능하였지만, 반면에 acetate, cellulose, malic acid등에서는 성장하지 못했다. 따라서, 이들 균주들은 모두 통성의 화학독립영양 세균 (facultative chemoautotrophic)으로서 환경에 따라 임의적으로 유기·무기화합물을 이용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 이전의 수소산화세균인 *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110이 절대화학독립 영양미생물로서 유기탄소원을 이용하여 성장할 수 없다고 보고된 것과 대조적이었다 [11].

**Table 1.** Utilization of organic, inorganic compounds as carbon and energy sources by *Aeromonas* sp. strain JS-1

Inorganic compounds	Growth	Organic compounds	Growth
H <sub>2</sub>	+	Acetate	-
N <sub>2</sub>	-	Acetone	-
elemental sulfur	-	Soluble starch	+
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	Maleic acid	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Ascorbic acid	-
FeSO <sub>4</sub>	-	Cellulose	-
NaNO <sub>3</sub>	-	Sodium oxalate	-
MnCl <sub>2</sub>	-	Malt extract	+
NH <sub>4</sub> OH	-	LB liquid medium	+
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	-	MacConkey agar	+

Positive (+) : Growth, Negative (-) : No Growth.

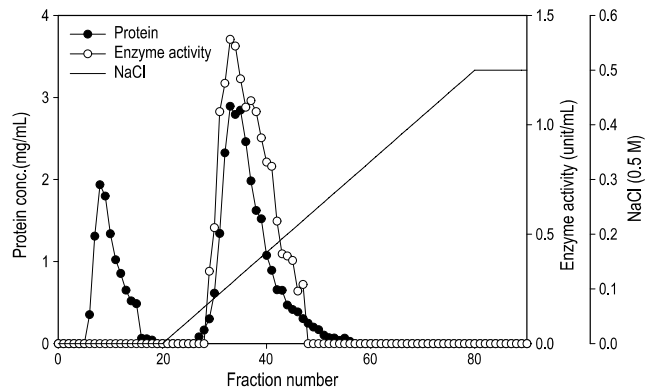
***Aeromonas* sp. strain JS-1의 CO<sub>2</sub> 고정 경로**

Calvin-Benson cycle을 갖는 광합성 식물과 미생물의 세포에는 RuBP (Ribulose biphosphate)가 존재하고 이때 <sup>14</sup>C와 결합하여 반응물질을 생성한다. 이 반응을 촉매하는 효소인 RubisCO (Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase)의 활성의 차이에 따라 <sup>14</sup>C의 방사활성이 scintillation counter에 측정된다. 실험 결과 *Aeromonas* sp. strain JS-1으로부터 추출한 enzyme solution과 반응한 <sup>14</sup>C의 활성은 1900~2500 cpm을 나타냈고, 효소액을 넣지 않은 공시험에서는 30~80 cpm을 나타냈다. 이 결과로부터 *Aeromonas* sp. strain JS-1의 세포에 존재하는 RuBP가 <sup>14</sup>C와 반응하며, 이것은 Calvin-Benson cycle을 통해 CO<sub>2</sub>를 고정한다는 것을 보여주었다.

**RubisCO의 분리 및 정제**

Ammonium sulfate (25~40%)로 포화시켜 50 mL 효소액을 얻었으며 이 효소액에 대하여 DEAE-Sepharose CL-6B

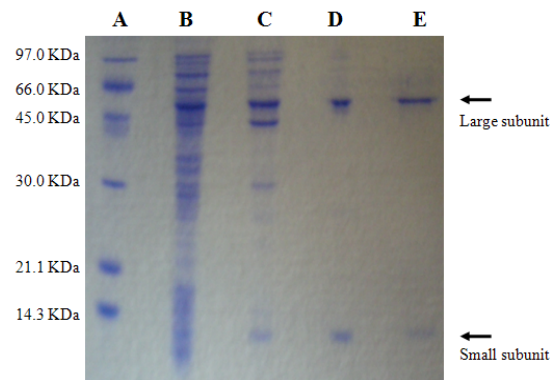
를 실시한 결과 Fig. 3과 같이 fraction No. 30-45에서 활성 peak가 나타났으며 이 부분을 모아 농축시킨 후, Bio-gel A-0.5 m 겔 여과를 통해 정제하였다. 이때 수율은 5.6%였고 정제도는 114.1배, 비 활성도는 3.31 unit/mg으로 효소가 정제되었다. 이상의 정제과정을 요약하면 Table 2와 같다.



**Fig. 3.** DEAE-sepharose CL-6B column chromatography of RubisCO enzyme from *Aeromonas* sp. JS-1. Each fraction (1 mL) was collected and protein was measured by Bradford method (●) and used for RubisCO activity by under standard assay (○)

**RubisCO 분자량, subunits 구조**

정제된 효소를 단계별로 SDS-PAGE를 이용하여 활성

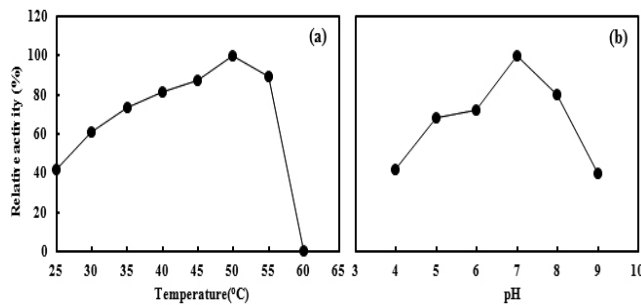


**Fig. 4.** SDS-PAGE pattern of purified RubisCO from *Aeromonas* sp. strain JS-1. A: Molecular mass standard, B: Crude enzyme, C: Sample prepared from ammonium sulfate fractionation, D: Sample prepared from DEAE-Sepharose CL-6B, E: Sample prepared from gel filtration.

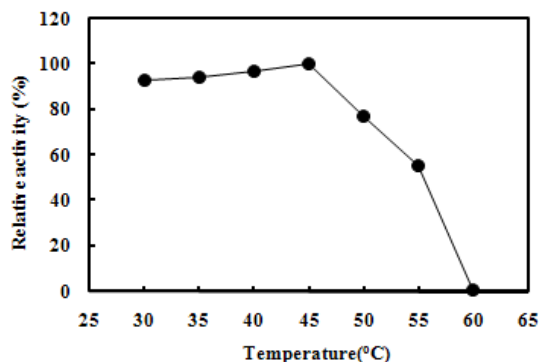
band를 분석한 결과 56,000의 large subunit와 14,000의 small subunit의 구조로 구성된 16양체의 L<sub>8</sub>S<sub>8</sub> type의 전형적인 Form I임을 알 수 있었다 (Fig. 4). Gel filtration에서 정제된 효소를 non-denatured SDS-PAGE를 이용하여 활성 band를 확인한 결과 단백질 크기는 560 kDa이었다 (data not shown). 이는 주로 식물에 존재하는 RubisCO와 Yaguchi와 Chung이 분리한 균주의 RubisCO 효소와 비슷한 형태를 보였다 [10,12]. 또한, 화학독립영양미생물 중 *Aeromonas* sp. strain JS-1은 담수에서 분리된 미생물으로써 calvin cycle을 경유하여 CO<sub>2</sub>를 고정하면서 Form I형태의 RubisCO 효소를 지닌 신종 미생물이다.

**RubisCO의 일반적 성질**

RubisCO의 활성에 미치는 pH와 온도효과를 측정하기 위해 20 mM Tris-EDTA 완충액에 RubisCO를 1%되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 pH (4-9)와 온도 (25~60°C)를 변화시키면서 정제된 효소액을 가하고 활성을 측정한 결과, 효소활성의 최적 온도는 50°C (Fig. 5(a)), 최적 pH는 7.0임을 알 수 있었다 (Fig. 5(b)). 또한 효소의 열에 대한 안정성은 30~60°C까지 온도를 변화하여 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 측정한 결과 30~45°C에서 90%이상의 잔존활성을 나타내었고 50°C 이상부터 40%의 잔존활성을 보이면서 60°C에서는 완전히 활성이 상실되었다 (Fig. 6).



**Fig. 5.** (a) Effect of temperature on RubisCO activity. (b) Effect of pH on RubisCO activity.



**Fig. 6.** Thermal stability of the RubisCO.

**기질 특이성**

*Aeromonas* sp. strain JS-1에서 순수분리 한 RubisCO의 여러 가지 기질에 대한 특이성이 조사되었다. 각 RubisCO에 대한 기질 친화력을 Lineweaver-Burk Plot로부터 측정하였으며, 각 기질에 대한 특이성이 Table 3에 나타내었다. Mg<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, RuBP에 대한 K<sub>m</sub>은 각각 0.91 mM, 5.2 mM, 0.25 mM로 CO<sub>2</sub>에 대한 기질 친화도는 낮고 RuBP에 대한 기질 친화도가 높음을 알 수 있었다. 이 결과는 비활성도와 구조면에서 특히 *Synechococcus* sp.와 비슷하였으며 K<sub>m</sub>은 식물인 spinach와 비교하여 볼 때 CO<sub>2</sub>와 RuBP의 기질 친화도가 상반됨을 알 수 있었다 [12].

또한, Table 3의 결과와 같이 V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>을 각각의 기질에 대해 구하였을 때 RuBP가 가장 높았으므로 RuBP는 RubisCO에 대해 매우 적합한 기질로 작용하는 것을 알 수 있었다.

**Table 3.** Kinetic parameters of RubisCO from *Aeromonas* sp. strain JS-1

Substrate	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (μmolCO <sub>2</sub> fixed/min)	Vmax/K <sub>m</sub>
Mg <sup>2+</sup>	0.91	3.84	4.22
CO <sub>2</sub>	5.2	5.0	0.96
RuBP	0.25	5.5	22

**결 론**

이산화탄소의 생물학적 고정을 위한 지금까지의 연구 개발은 빛을 이용한 미세조류에 관한 것이 대부분이었다. 본 연구에서 분리된 *Aeromonas* sp. strain JS-1는 무기화합물을 에너지원으로 이용하면서 calvin cycle을 경유하여 CO<sub>2</sub>를 고정하는 Form I형태의 RubisCO 효소로서 담수에서 분리된 신종 화학독립영양미생물이다. 분리된 균주의 서식 환경은 유기물과 영양염의 농도가 높은 수역으로써 수소생산 미생물과 함께 공생하며, 수소를 이용하여 에너지를 얻고 이산화탄소를 탄소원으로 하여 성장하는 것을 확인하였다. 또한, 이 균주의 최적성장의 온도는 35°C~37°C, pH는 7~7.5, NaCl 농도는 0.1% 이었으며 CO<sub>2</sub> 10~40% (V/V)의 고농도 범위에서 광합성 미생물보다 성장속도가 더 빠르게 나타났다. *Aeromonas* sp. strain JS-1에서 분리된 RubisCO는 ammonium sulfate 침전, DEAE-spharose CL-6B 및 gel filtration chromatography에 의해 순수 정제되었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE상에서 분자량을 측정한 결과 560 kDa이었으며 Large subunit (56 kDa)과 Small subunit (14 kDa)로 구성된 L<sub>8</sub>S<sub>8</sub> 구조로 구성된 효소이었다. 정제된 효소의 최대 활성을 위한 pH와 온도는 각각 pH 7.0과 50°C이었다. 30분간 열 처리시 열 안정성은 45°C까지 안정하였다. RuBP에 대한 K<sub>m</sub>은 0.25 mM로 기질 친화력이 가장 좋은 것으로 나타났다.

접수 : 2010년 11월 9일, 게재승인 : 2010년 12월 20일

## REFERENCES

1. Hollowaya, S., J. M. Pearce, V. L. Hardsa, T. Ohsumib, and J. Galec (2007) Natural emissions of CO<sub>2</sub> from the geosphere and their bearing on the geological storage of carbon dioxide. *Energy* 32: 1194-1201.
2. Wolter, M., S. Prayino, and F. Schuchardt (2004) Green house gas emission during storage of pig manure on a pilot scale. *Bioresour. Technol.* 95: 235-244.
3. Mavroudi, M., S. P. Kaldis, and G. P. Sakellaropoulos (2003) Reduction of CO<sub>2</sub> emissions by a membrane contacting process. *Fuel* 82: 2153-2159.
4. Skjånesa, K., P. Lindbladb, and J. Mullerc (2007) Bio CO<sub>2</sub> - A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomol. Eng.* 24: 405-4131.
5. González, C. V., F. G. Acién Fernández, J. M. Fernández Sevilla, J. F. Sánchez Fernández, M. C. Cerón García, and E. Molina Grima (2009) Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO<sub>2</sub> removal processes. *Bioresour. Technol.* 100: 5904-5910.
6. Hanagata, N., T. Takeuchi, Y. Fukuju, D. J. Barnes, and I. Karube, (1992) Tolerance of microalgae to high CO<sub>2</sub> high temperature. *Phytochem.* 31: 3345-3348.
7. Maeda, K., M. Owada, N. Kimura, K. Omata, and I. Karube (1995) CO<sub>2</sub> fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convers. Manage.* 36: 717-720.
8. Robert Tabita, F., J. L. Gibson, B. Botho. D. Lubbert, and G. M. Wim (1992) Uniform designation for genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 99: 107-110.
9. Robert Tabita, F. (2007) RubisCO: The Enzyme that Keeps on Giving. *Cell* 129: 1039-1040.
10. Chung, S. Y., K. Yokoyama, M. Gomi, N. Teaumroong, M. Ishii, Y. Igarashi, and T. Kodama (1994) Purification and some properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogothermophila* strain TH-1. *J. Ferment. Bioeng.* 78: 469-471.
11. Chung, S. Y., T. Yaguchi, H. Nishihara, Y. Igarashi, and T. Kodama (1993) Purification of form L<sub>2</sub> RubisCO from a marine obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 49-53.
12. Yaguchi, T., S. Y. Chung, Y. Igarashi, and T. Kodama (1992) Purification of RubisCO from the thermophilic cyanobacterium *synechococcus* sp. strain a-1. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 348-351.
13. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
15. Kim, T. H., K. D. Sung, J. S. Lee, J. Y. Lee, S. J. Ohh, and H. Y. Lee (1997) Biological Fixation of Carbon Dioxide Using Photosynthetic Microalga, *Chlorococcum littorale*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 235-239.