

碩士學位 論文

Rhodospirillum rubrum S1에서
Catalase-Peroxidase의 부분 정제
및 특성 규명



濟州大學校 大學院
生物 學科

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金 英 美

1999 年 12 月

Rhodospirillum rubrum S1에서
Catalase-Peroxidase의 부분 정제 및
특성 규명

指導教授 吳 德 鐵

金 英 美

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1999年 12月

金英美의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

고 석 찬



委

員 김 시 연



委

員 吳 德 鐵



濟州大學校 大學院

1999年 12月

Partial Purification and Characterization
of a Catalase-Peroxidase from
Rhodospirillum rubrum S1

Young-Mi Kim

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)




제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

목 차

	PAGE
List of Tables	i
List of Figures	ii
ABSTRACT	1
I. 서론  제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY	2
II. 재료 및 방법	4
III. 결과 및 고찰	10
IV. 요약	39
V. 참고문헌	40

List of Tables

Table 1	Partial purification of catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1	25
Table 2	Peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 on various substrates	35
Table 3	The effect of inhibitors on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified of catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1	38

List of Figures



Fig. 1	Activity staining of catalase and peroxidase after nondenaturing PAGE (7.5% acrylamide) of crude cell-free extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	11
Fig. 2	Effect of pH on the catalatic activity of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	12
Fig. 3	Effect of pH on the stability of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	13
Fig. 4	Effect of temperature on the catalatic activity of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	15
Fig. 5	Thermostability of catalatic activity of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	16

Fig. 6	Effect of H ₂ O ₂ on the catalatic activity of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	17
Fig. 7.	Effect of AT, H ₂ O ₂ , urea and ethanol/chloroform on the catalatic and peroxidatic activities of the crude enzyme extracts from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	18
Fig. 8	Anion exchange chromatography of dialyzed ammonium sulfate precipitate of crude enzyme solution on DEAE-cellulose colum.	20
Fig. 9	Gel filtration chromatography of partially purified catalase-peroxidase obtained from DEAE-cellulose column on Sephadex G-200 column.	21
Fig. 10	Hydrophobic chromatography of partially purified catalase-peroxidase obtained from Sephadex G-200 chromatography on Phenyl-Sepharose CL-4B.	22
Fig. 11	7.5% polyacrylamide electrophoresis of partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 each fraction step.	23
Fig. 12	Absorption spectrum of partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	24
Fig. 13	Effect of pH on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	28
Fig. 14	Effect of pH on the stability of partially purified catalase-peroxidase activity from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	29
Fig. 15	Effect of temperature on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	30
Fig. 16	Effect of temperature on the stabilityof of the partially purified	

catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	31
Fig. 17 Effect of H ₂ O ₂ on the catalatic activity of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	32
Fig. 18 Effect of H ₂ O ₂ on the peroxidatic activity of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	33
Fig. 19 Effect of H ₂ O ₂ concentrations on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	34
Fig. 20 Effect of heme protein inhibitors on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	37



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A B S T R A C T

Five different catalases were produced from the aerobically grown photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1. Among them, two were catalase-oxidases. One catalase-oxidase which was produced more than the other was partially purified and characterized. The partially purified enzyme showed the peak at 411 nm. The enzyme showed peroxidatic activity with *o*-dianisidine, pyrogallol and diaminobenzidine as substrate but not with ascorbate and guaiacol. The optimum pHs of the catalatic and peroxidatic activities were 6 and 5, respectively. The optimum temperatures for both activities were same, 30°C. The enzyme showed that the catalatic activity is more stable than peroxidatic activity with 50°C heat treatment for 1 hour. The catalatic and peroxidatic activities were inhibited about 79% and 85% by exposure to organic solvent(ethanol/chloroform), respectively. Both enzymatic activities were not nearly inhibited by 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole. By treatment with 2 mM and 4 mM H₂O₂, the catalatic activity was stable with 2 mM but unstable with 4 mM H₂O₂, and the peroxidatic activity is stable with both concentration. 50% enzyme inhibition of the catalatic activity was reached with 2.0×10^{-7} M, hydroxylamine, 4.2×10^{-7} M azide and 8.7×10^{-6} M cyanide, and that of the peroxidatic activity was obtained with 2.5×10^{-7} M hydroxylamine, 3.2×10^{-7} M azide and 5.1×10^{-6} M cyanide.

I. 서 론

산소는 호기성 생물이 살아가는데 없어서는 안될 필수적인 요소이지만, 때로는 생체내에서 반응성이 큰 superoxide anion(O_2^-)이나 과산화수소(H_2O_2) 또는 hydroxyl radical(OH^-)을 생성하여 DNA, RNA, 단백질등과 반응함으로써 들연 번이를 유발시키거나 성장속도를 감소시키는 물론 심한 경우에는 세포의 죽음도 초래하는 등 세포에 치명적인 문제를 일으킬 수 있다(Fridovich, 1978 ; Farr *et al.*, 1991 ; Boehme *et al.*, 1976 ; Brown *et al.*, 1981). 그러나 세포는 이러한 활성 산소들에 대하여 효소적 방어기작과 비효소적 방어기작을 가지고 있다. 효소적 방어기작에는 catalase, catalase-peroxidase, peroxidase 그리고 superoxide dismutase등의 작용이 있으며, 비효소적 방어기작으로는 glutathione(GSH)과 thioredoxin등이 있다. 이외에도 glutathione peroxidase, glutathione reductase, thiol transferase, DT-diaphorase와 각종 repair 효소들이 관여하고 있다(Meister and Anderson, 1983).

Catalase는 H_2O_2 를 O_2 와 H_2O 로 분해하는 효소로서 세균에서 동·식물에 이르기까지 광범위한 생물에서 발견되며 다양한 종으로부터 분리되고 연구되어왔는데 그 특성을 보면 넓은 pH 범위(pH 5-10.5)에서 활성을 가지며, 3-amino-1,2,4-triazole에 의해 억제되고 유기용매(ethanol/chloroform)에는 영향을 받지않는다. 또 고등생물로부터 분리된 catalase는 서로 유사한 반면에 미생물에서 얻은 catalase는 매우 다양한 특성을 가지고 있으며, 하나의 세포안에 여러 종류의 catalase가 존재하기도 한다(Hochman and Goldberg, 1991).

한편지금까지 단지 원핵미생물에서만 보고된 catalase-peroxidase(hydroperoxidase)는 catalase와 peroxidase활성을 동시에 가지는 효소로서 전형적인 catalase와는 다른 특성을 가지고 있다(Hochman and Goldberg, 1991). 활성은 pH 6-8의 좁은 범위에서 나타나며, 온도와 유기용매에 민감하고, 3-amino-1,2,4-triazole에 의해 저해받지 않는다고 하였다(Claiborne *et al.*, 1979a ; Goldberg *et al.*, 1989 ; Yumoto *et al.*, 1990 ; Shin *et al.*, 1994). *Escherichia coli*에서는 catalase와

peroxidase의 기능을 동시에 가지는 Hydroperoxidase I (HP I)과 catalase의 기능만을 가지는 Hydroperoxidase II(HP II)라는 두 종류의 catalase를 가지고 있는데, 이들은 각각 kat G와 kat E라는 유전자로부터 합성되며 HPI의 합성은 배지에 H₂O₂를 첨가할 때 유도되며 HPII의 합성은 세포가 정지기에 들어가거나 TCA 회로의 중간산물을 이용해서 성장할 때 유도되며, glucose배지에서 catalase와 peroxidase의 유도에 대해 보고하였다(Loewen *et al.*, 1984 a,b; Lowen *et al.*, 1985; Hassan and Fridovich, 1978). 이외에도 호염성세균인 *Halobacterium halobium*로부터 상대적으로 낮은 염농도에 의해 유도되는 mesohalic catalase와 2종류의 catalase-peroxidase에 대한 특성을 보고 (Brown-Peterson and Salin, 1995)하였으며, *Streptomyces* sp.에서는 catalase-peroxidase의 spectral특성 및 생리적 기능에 대해 보고하였다(Hong *et al.*, 1995).

Catalase-peroxidase(hydroperoxidase)의 부분정제에 대한 연구는 *Rhodopseudomonas capsulata* B10과 *E. coli* K10에서 보고된 바가 있으며 (Nadler *et al.*, 1986), 광합성세균에서의 대한 연구는 *Rhodobacter sphaeroides* (Terzenbach and Blaut, 1998), *Rhodopseudomonas capsulata* (Hochman and Shemesh, 1987), *Rhodobacter capsulatus* (Hochman *et al.*, 1992)등에서 보고되었다.

본 실험은 호기 상태나 절대혐기적 상태에서도 생육이 가능한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170(S1)이 생성하는 두가지 catalase-peroxidase 중에서 o -diadisidine을 기질로써 산화하는 것을 부분정제하고 그 특성을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양조건

Rhodospirillum rubrum ATCC 11170(S1)을 30℃, 암소에서 2일간 Bose *et al.*(1962) 배지에서 호기적으로 진탕배양한후 새 배지로 옮겨 다시 3일간 동일 조건으로 배양한 후 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

Bose *et al.*(1962)의 기본배지 조성은 다음과 같다.

D.W. 1 L당 KH_2PO_4 , 600 mg; K_2HPO_4 , 900 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.8 mg; 미량원소용액(D.W., 100 mL; H_3BO_3 , 280 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 210 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24 mg; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg), 1 mL; EDTA, 20 mg; biotin, 15 μg ; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 1.25 mg. 여기에 탄소원으로 3 g malate를 첨가하였다.

2. 조효소액의 추출

대수기 후기때의 배양액을 4℃에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세균을 수집한 후 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 3 - 4회 세척 하였다. 수집된 균은 초음파 파쇄기(Bandelin sonopuls HD2070)를 이용하여 파쇄시켰다. 파쇄된 균은 다시 4℃에서 1시간 동안 15,000 rpm으로 원심분리한 후 상정액을 수집하여 조효소액으로 하였다.

3. 효소의 활성 측정

Catalase 활성은 10 mM H₂O₂를 포함한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 적당량의 효소시료를 넣고, 240 nm에서의 흡광도 감소로 활성도를 계산하였다. 효소의 활성 단위는 1분 동안 1 μmol의 H₂O₂(ε 240= 43.6 M⁻¹cm⁻¹)를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다(Beers and Sizer, 1952).

Peroxidase활성은 50 mM acetate buffer(pH 5.5)에 녹인 0.5 mM o -dianisidine을 기질로 주고, 적당량의 효소시료를 넣은 후 4 mM H₂O₂를 첨가하여 460 nm에서의 흡광도 증가로 활성도를 계산하였다. 효소의 활성단위는 1분 동안 1 μmol의 o -dianisidine(ε 460= 11,300 M⁻¹cm⁻¹)를 변환시키는 효소의 양을 1 unit로 정의 하였다(Caliborne and Fridovich, 1979a).

4. 효소의 활성염색



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Mini-PROTEIN II system(Bio-Rad, U.S.A.)을 이용하여 7.5% non-denaturing polyacrylamide slab gel상에서 전기영동을 수행하였다.

Catalase 염색법은 Wayne과 Diaz(1986)의 ferricyanide 염색법을 이용하였다. 겔을 증류수로 두세 차례 행군 다음, 증류수 100 mL에 30% H₂O₂를 100 μL 녹인 용액에 담그고 10분 동안 흔든다. 용액을 버리고 증류수로 한 차례 행군 다음, 2% ferric chloride, 2% potassium ferricyanide용액을 각각 25 mL씩 부은 후, light box에서 천천히 흔들어 준다. Catalase활성을 보이는 위치만 제외하고 겔 전체가 초록색으로 염색되어 음성염색이 이루어진다.

Peroxidase 염색법은 ① 0.5 mM o -dianisidine을 포함하는 acetate buffer(pH 5.5)에 겔을 10분 동안 담근 후 H₂O₂를 최종 농도가 4 mM이 되도록 첨가하였다(Caliborne and Fridovich, 1979a). 상온에서 적당 시간 반응시키면

o-dianisidine을 기질로 이용하는 peroxidase는 오렌지 빛 활성 띠를 보인다. ② 40 mM pyrogallol을 포함하는 sodium potassium phosphate buffer(pH 6.0)에 켈을 10분 동안 담근 후 H₂O₂를 최종 농도가 7.4 mM이 되도록 첨가하였다 (Loprasert *et al.*, 1988). 상온에서 적당 시간 반응시키면 pyrogallol을 기질로 이용하는 peroxidase는 황갈색 빛을 보인다.

5. 단백질 정량

단백질의 양은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry(1951) 방법으로 측정하였다. 부분정제 과정의 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.



6. Catalase-Peroxidase의 부분 정제

조효소액에 25% ammonium sulfate를 처리하여 원심분리한 후 상침액을 모아 다시 70% ammonium sulfate를 처리하여 원심분리한 후 이 침전물을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시켜 동일 완충용액으로 12시간 동안 투석한 후 다시 원심분리하여 상침액을 정제단계의 시료로 사용하였다.

50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose column (2.5×30 cm)에 효소 시료를 얹고, 300 mL의 동일 완충용액으로 세척한 후 0-0.5 M NaCl이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)의 일정농도 기울기로 용출시켰다. 용출속도는 30 mL/hr이고, 5 mL씩 분획 하였다. 각 분획들은 280 nm의 파장에서 단백질의 흡광도를 측정하였고, 두 효소의 활성이 높은 25-55까지의 분획을 얻어 다음정제단계의 시료로 사용

하였다.

50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)으로 미리 평형화시킨 Sephadex G-200 column (1×90 cm)에 시료를 넣고 동일 용액으로 용출시켰다. 용출속도는 10 mL/hr이고, 2 mL씩 분획 하였다. 각 분획들은 280 nm의 파장에서 단백질의 흡광도를 측정하였고, 활성염색 후 30-40까지의 분획들을 다음단계의 시료로 사용하였다.

0.5 M ammonium sulfate가 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)으로 미리 평형화 시킨 Phenyl-Sepharose CL-4B column (2.5×10 cm)에 시료를 넣고, 40 mL의 동일용액으로 먼저 용출시키고 0.5 - 0 M ammonium sulfate가 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)를 일정농도 기울기로 용출시켰다. 용출속도는 20 mL/hr이고, 2 mL씩 분획하였다. 각 분획들은 280 nm의 파장에서 단백질의 흡광도를 측정하였고, 효소활성을 측정한 다음 두 효소의 활성이 높은 분획들을 수집하여 시료로 사용하였다.

7. 효소의 흡광도 측정



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

부분 정제한 효소의 흡광특징을 알기 위하여 UV/Visible Spectrophotometer(Pharmacia Biotech)로 흡광도를 측정 하였다.

8. 효소의 활성화에 대한 pH, 온도, 그리고 H₂O₂의 영향 조사

효소의 활성화에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 3.0-7.0), 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0-9.0), 50 mM carbonate buffer(pH 10.0-11.0)을 pH 1단위로 준비하여(Shin *et al.*,

1994) 조효소액과 부분정제한 시료 각각에 기질을 넣고, 상온에서 catalase활성과 peroxidase활성을 측정하였다. 효소의 안정도에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 여러 pH buffer에 조효소와 부분정제한 catalase-peroxidase를 넣고 상온에서 1 시간 동안 보관 후 시료를 채취하여 catalase와 peroxidase활성을 측정하였다.

효소의 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 각 효소 활성 측정용액을 30-80 °C까지 10 °C간격으로 준비하여, 조효소와 부분정제한 catalase-peroxidase를 넣고, catalase활성과 peroxidase활성을 측정하였다. 각 효소활성에 대한 최적 pH를 조사하기 위하여 50 mM potassium phosphate(pH 6.8)와 acetate buffer(pH 5.5)를 준비하여 조효소액과 부분정제한 시료를 넣고 30-60 °C까지 10 °C간격으로 온도를 고정하여 1시간동안 보관 후 시료를 채취하여 catalase와 peroxidase활성을 측정하였다.

효소의 활성에 대한 H₂O₂의 영향을 조사하기 위하여 부분정제한 효소시료를 10, 20, 30, 40, 50 mM H₂O₂의 농도에서 catalase활성과 peroxidase활성을 측정하였다. 효소의 H₂O₂에 대한 안정도를 조사하기 위해 조효소와 부분정제한 효소시료를 2 mM H₂O₂와 4 mM H₂O₂에 1시간 동안 보관하면서 10분씩 시간을 달리하여 catalase와 peroxidase활성을 측정하였다.

9. 부분 정제한 효소의 기질특이성 조사

7.5% nondenaturing polyacrylamide slab gel상에서 전기영동을 수행한 다음 기질로써 o-dianisidine, pyrogallol, guaiacol, diaminobenzidine, ascorbate를 이용하여 활성염색을 행하였다. Guaiacol은 15 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 녹인 0.1 mM guaiacol을 겔에 부어 10분정도 담근후 최종농도가 1 mM되게 H₂O₂를 넣어 염색하였다. Diaminobenzidine은 암처에서 겔을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8), 50 mL에 담근후 최종농도가 5 mM 되게 H₂O₂를 넣어 10분간 방치 하여 증류수로 씻은후 diaminobenzidine을 넣어 염색하

였다(Clare *et al.*, 1984).

10. 효소 활성화에 대한 저해제의 영향

금속 저해제들의 영향은 농도별로 준비한 sodium cyanide, sodium azide, hydroxylamine을 각각 효소 시료와 섞어 2분간 반응시킨 후 활성을 측정하여 표준곡선을 작성함으로써 50 % 억제 농도를 구하였다.

3-Amino-1,2,4-triazole을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 10 mM이 되도록 녹인 다음 적당량의 효소 시료를 넣고 10분간 상온에서 보관한 후 catalase와 peroxidase활성을 측정하였다.

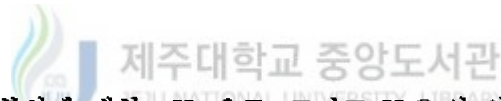
유기용매에 대한 영향은 효소시료, ethanol, chloroform을 10:5:3으로 혼합시킨 후, 실온에서 10분 동안 vortex하여 원심분리 후 각각 catalase와 peroxidase활성을 측정하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Catalase와 peroxidase의 발현양상

호기적 조건으로 배양한 *R. rubrum* S1에서 추출한 조효소액을 전기영동하여 활성염색한 결과 Fig. 1과 같이 5개의 catalase(catalase 1, catalase 2, catalase 3, catalase 4, catalase 5)band가 나타났으며 catalase 3과 4는 pyrogallol을 기질로 사용하는 peroxidase의 기능이 있었고(peroxidase 1, 2), catalase 3은 *o*-dianisidin도 기질로써 사용하였다. 따라서 Catalase 3과 4는 catalase-peroxidase로 판단되었으며(Fig.1), *H. halobium*과 *D. radiophilus*등과 같이 두 개의 catalase-peroxidase를 가지고 있었다(Brown-Peterson and Salin, 1993; Lee and Lee, 1995).



2. 조효소액의 효소활성에 대한 pH, 온도, 그리고 H₂O₂의 영향

pH 3-11까지 pH농도를 변화시켜 catalase활성을 조사해 본 결과 조효소액에서는 pH 5-10까지 넓은 범위에서 높은 활성을 보였다(Fig. 2). 이는 *M. luteus*(Nadler *et al.*, 1986), *R. sphaeroides*(Detlef and Michael, 1998)등에서의 보고한 catalase의 특성과 일치하였으며, 좁은 범위에서 활성을 보이는 부분정제한 catalase-peroxidase활성과는 다소 차이가 있어 조효소액에서는 전형적인 catalase의 특징을 가지고 있는 것으로 사료된다. 각 pH buffer에서 한시간 동안 고정된 후 효소활성을 측정된 결과 pH 6-11 범위에서 50%이상의 활성이 남아있어 pH에 대한 안정성이 매우 큰 것으로 조사되었다(Fig. 3).

효소활성에 대한 온도의 영향을 측정된 결과 최적온도는 30 ℃로 나타났으며, 50 ℃까지는 50%이상의 활성을 보이나 그 이후부터는 낮아져(Fig. 4), 부분정제

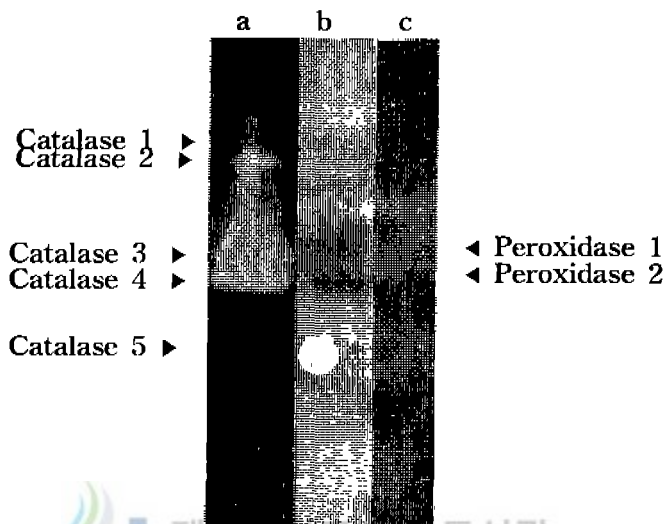


Fig. 1 Activity staining of catalase and peroxidase after non-denaturing PAGE(7.5% acrylamide) of crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1.

Lane a, Catalatic activity staining

Lane b, Peroxidatic activity staining(pyrogallol)

Lane c, Peroxidatic activity staining(*o* -dianisidine)

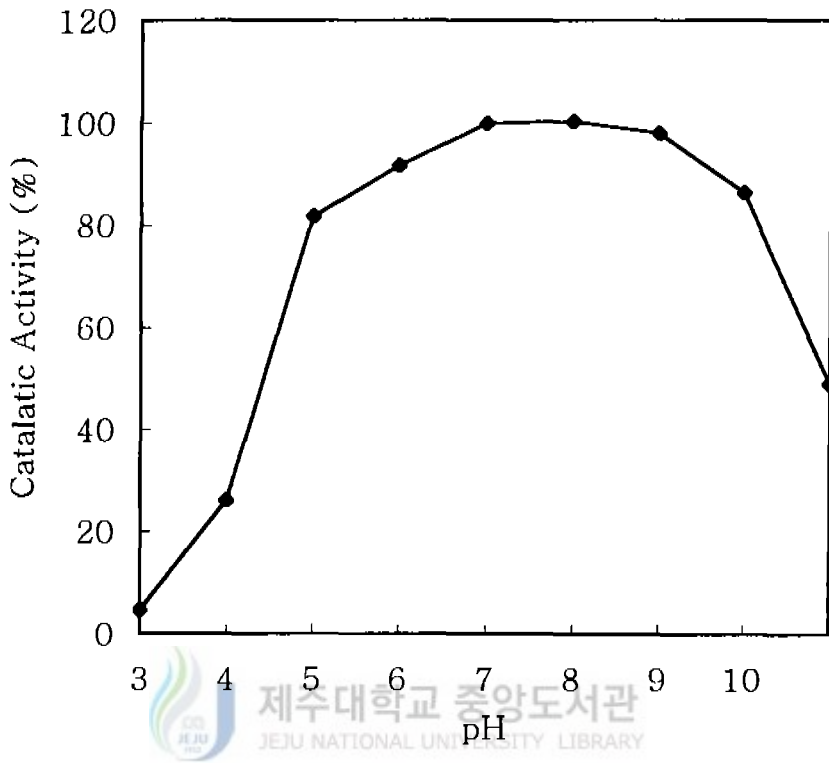


Fig. 2 Effect of pH on the catalatic activity of the crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1.

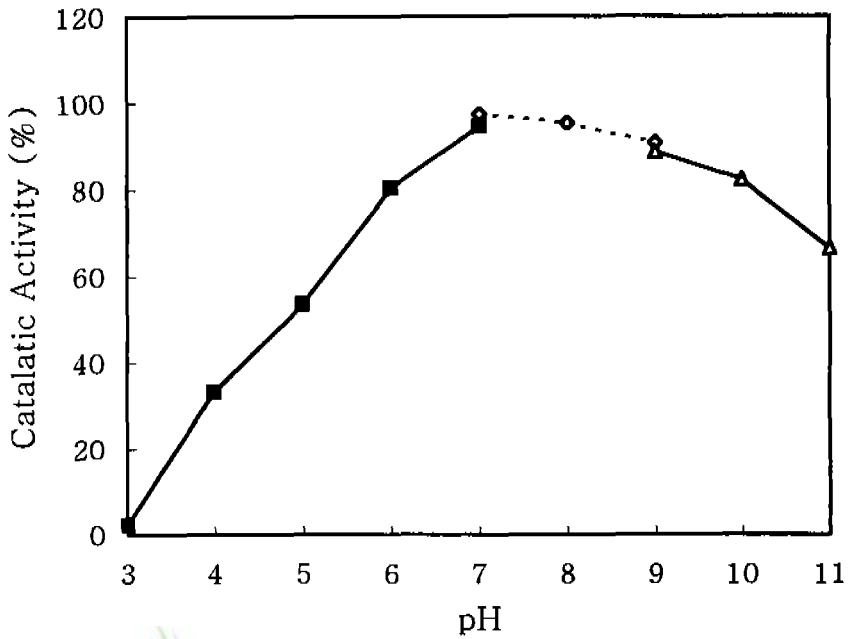


Fig. 3 Effect of pH on the stability of crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1. The crude enzyme extracts with different buffer solutions were incubated at various pHs at 30 °C for 1 hour and residual catalatic activities were determined.

- citrate-phosphate buffer
- ◆·· Tris-HCl buffer
- ▲— carbonate buffer

한 catalase-peroxidase활성과 차이가 있었다. 조효소액을 각 온도에서 1시간 후 활성을 측정한 결과 40 ℃까지는 70%이상의 활성이 남아있었지만 그 이후부터는 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5).

조효소액을 2 mM과 4 mM H₂O₂에서 1시간 동안 활성의 변화를 조사한 결과 거의 변화없이 일정한 형태를 유지하여 안정함을 보였으며(Fig. 6), 2 mM에서의 안정성은 *M. luteus*(Nadler *et al.*, 1986)와 같았다.

3. 조효소액에서 저해제의 효과

Fig. 7에서 보듯이 조효소액에 AT, H₂O₂, 유기용매 그리고 urea를 처리한 다음 활성염색을 통하여 조사한 결과는 catalase활성에서는 유기용매와 8 M urea에서만이 활성이 감소하여 catalase 2와 catalase 4활성만이 나타났다. Peroxidase에서는 유기용매를 처리했을 때는 활성을 완전히 상실하였으며 8 M urea처리 시에는 활성이 조금 나타났다. 이는 *Acinetobacter* sp.에서 유기용매 처리후 전기영동하여 관찰한 결과 cat2의 활성이 소실된 결과와 일치하였다(Sin *et al.*, 1994).

4. 효소의 부분 정제

세포를 분쇄하여 얻은 상침액을 조효소액으로하여 25-70% ammonium sulfate를 처리 후 얻은 액을 12시간동안 투석 후 이를 시료로 DEAE-cellulose 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. NaCl 농도구배를 이용하여 효소를 용출시킨결과 모두 100개의 분획을 얻을 수 있었으며, catalase와 peroxidase활성이 20-80분획에서 함께 관찰되었다(Fig. 8) 이 중 가장활성이 큰 30-50까지의 분획을 취하여 Sephadex G-200 겔 여과 크로마토그래피의 시료로 사용하였다. Sephadex C-200 겔 여과 크로마토그래피 수행한 결과 68개의 분획을 얻었으며

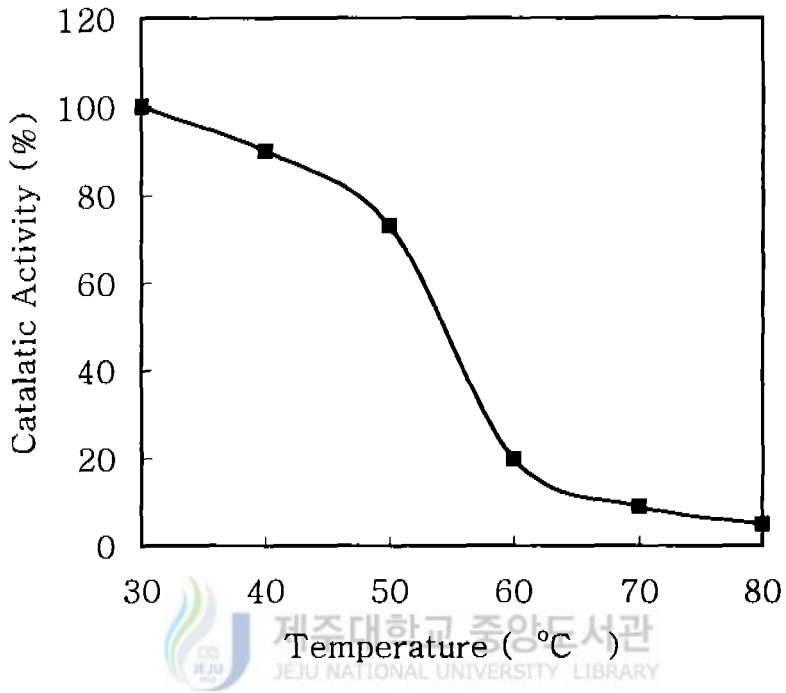


Fig. 4 Effect of temperature on the catalatic activity of the crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1.

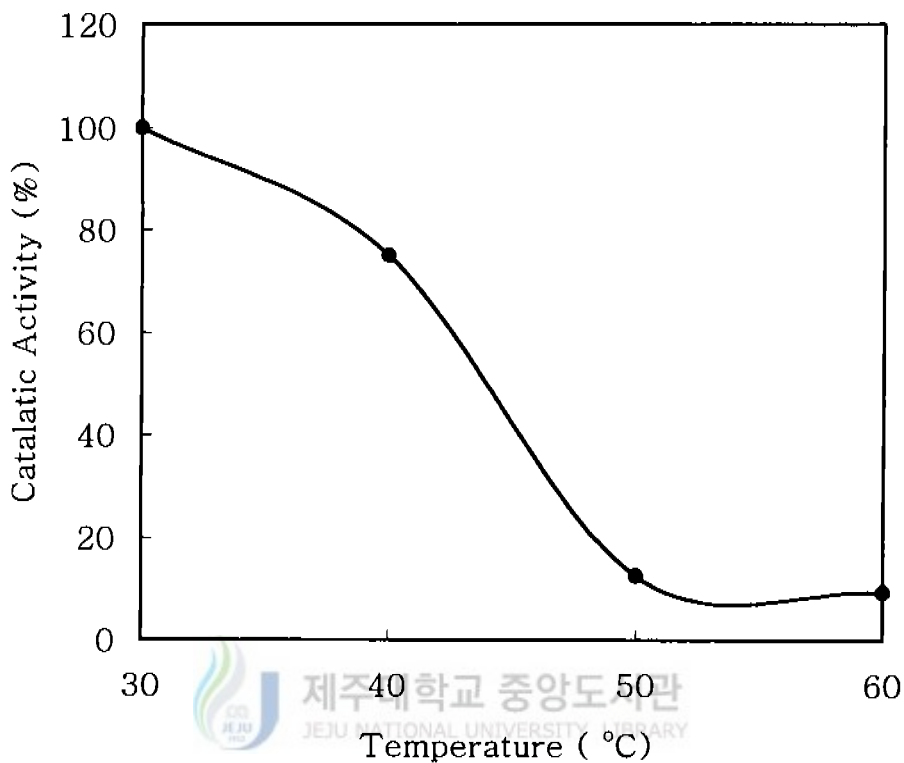


Fig. 5 Thermostability of catalatic activity of crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1. The enzyme solution was incubated for 1 hour at various temperatures. The assay was carried out in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8).

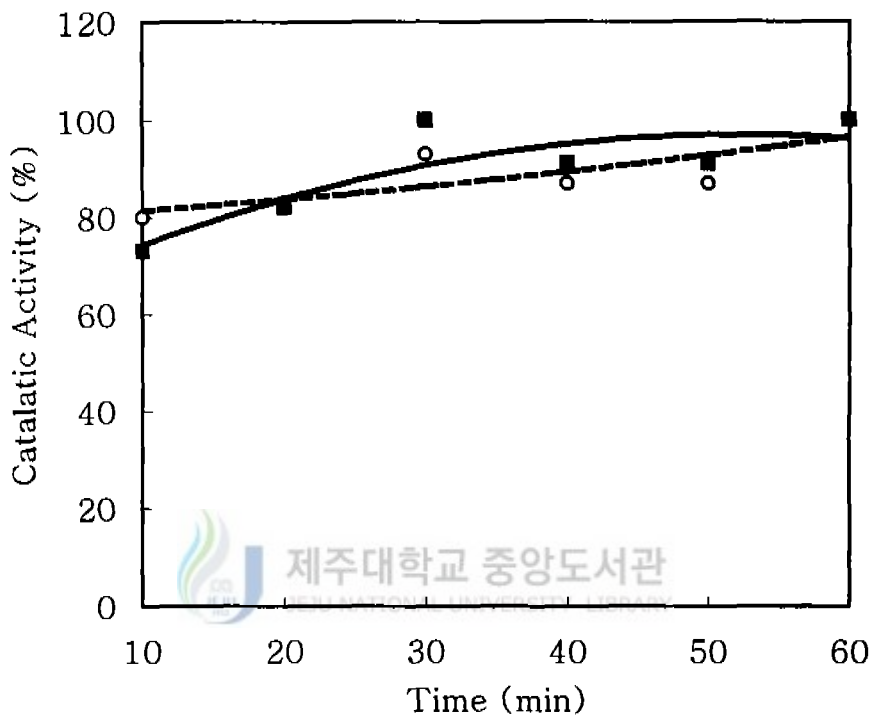
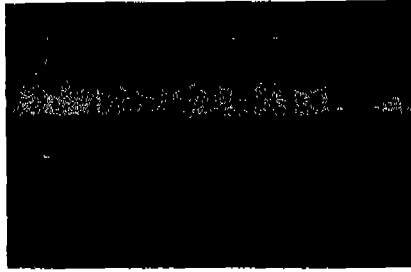


Fig. 6 Effect of H₂O₂ on the catalytic activity of crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1.

--○-- 2 mM H₂O₂ —■— 4 mM H₂O₂

a b c d e f g h i j



(A)

a b c d e f g h i j



(B)



Fig. 7 Effect of AT, H₂O₂, urea and ethanol/chloroform on the catalatic and peroxidatic activities of crude enzyme extracts from *Rhodospirillum rubrum* S1.

Catalatic activity staining(A) and peroxidatic activity staining(B) after non-denaturing PAGE(7.5% polyacrylamide) of crude enzyme extracts.

Lanes a, not treated; b, 10 mM AT; c, 20 mM AT; d, 10 mM AT and 10 mM H₂O₂; e, 10 mM H₂O₂; f, 20 mM H₂O₂; g, 2 M urea; h, 4 M urea; i, 8 M urea; j, ethanol and chloroform

(Fig. 9) 전기영동을 통하여 원하는 band를 확인하여 30-40까지의 분획을 Phenyl-Sepharose 소수성 상호작용 크로마토그래피의 시료로 사용하였다. 0.5-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도구배를 이용하여 용출시킨 결과 농도구배가 거의 끝나는 부분에서부터 catalase와 peroxidase활성이 나타났으며, 활성이 가장 높게 나타나는 10개의 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 10). 세 단계의 크로마토그래피를 수행한 결과 catalase와 peroxidase활성이 거의 같은 분획에서 나타났는데, 이것은 *Rps. capsulata* (Hochman and Shemesh, 1987)에서 보고한 결과와 같음을 알 수 있었다. 이와 같이 세단계의 크로마토그래피방법으로 부분 정제한 catalase와 peroxidase의 수율은 catalase는 1.6% 그리고 peroxidase는 5.1%였으며, 정제 배수(purification fold)가 4.6배와 14배로 증가한 효소시료 0.3 mg을 얻을 수 있었다(Table 1). 그리고 catalase보다 peroxidase의 정제배수가 더 높았으며 이렇게 네 단계의 크로마토그래피를 수행하여 얻은 부분 정제된 시료를 7.5% 젤 전기영동 후 활성염색을 하여 확인 한 결과 하나의 단일 band(catalase-peroxidase)를 얻을 수 있었다(Fig.11).



5. 효소의 흡광측정

흡수스펙트럼을 살펴본 결과, catalase-peroxidase는 411 nm에서 최대의 흡광도를 가지는 heme 단백질임을 알 수 있었으며(Fig.12), *Rps. capsulata*는 403 nm, *Streptomyces* sp.는 407 nm, *Deinococcus radiophilus*는 405 nm등으로 다소 차이가 있었다(Hochman and Shemesh, 1987; Youn *et al.*, 1995; Lee and Lee, 1995).

6. 효소활성에 대한 pH, 온도, 그리고 H_2O_2 의 영향

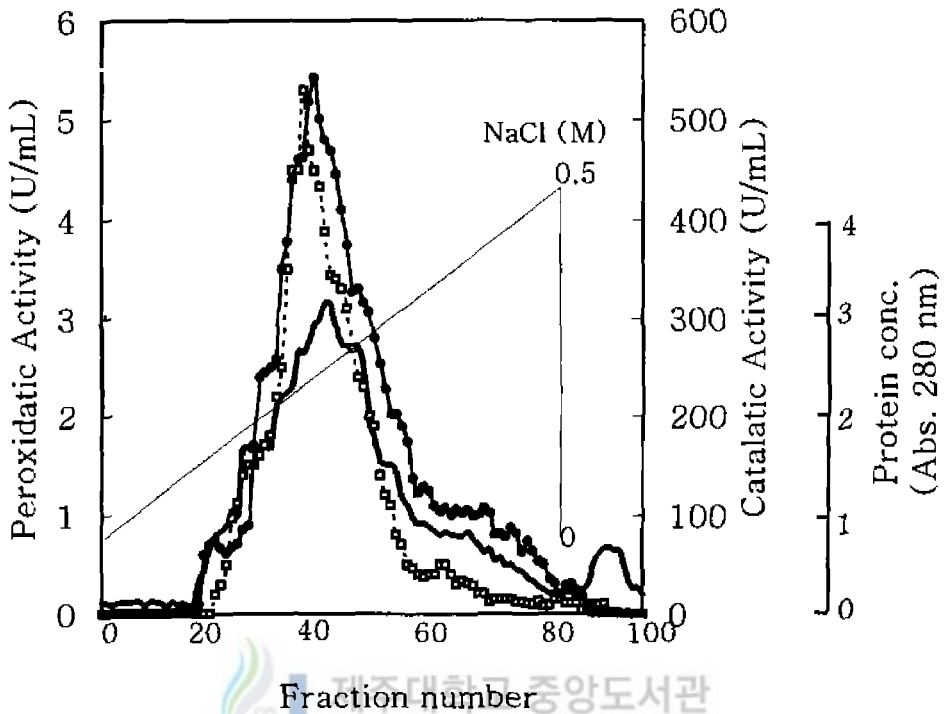


Fig. 8 Anion exchange chromatography of dialyzed ammonium sulfate precipitate of crude enzyme solution on DEAE-cellulose column.

Dialyzed ammonium sulfate precipitate(25-70%) enzyme solution was loaded on a column (2.5x30 cm) equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8) and then eluted with equilibration buffer of 0-0.5 M NaCl in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8), at a flow rate of 30 mL/hr. Fraction size was 5 mL/fraction.

- protein concentration
- - □ - - peroxidatic activity
- catalatic activity

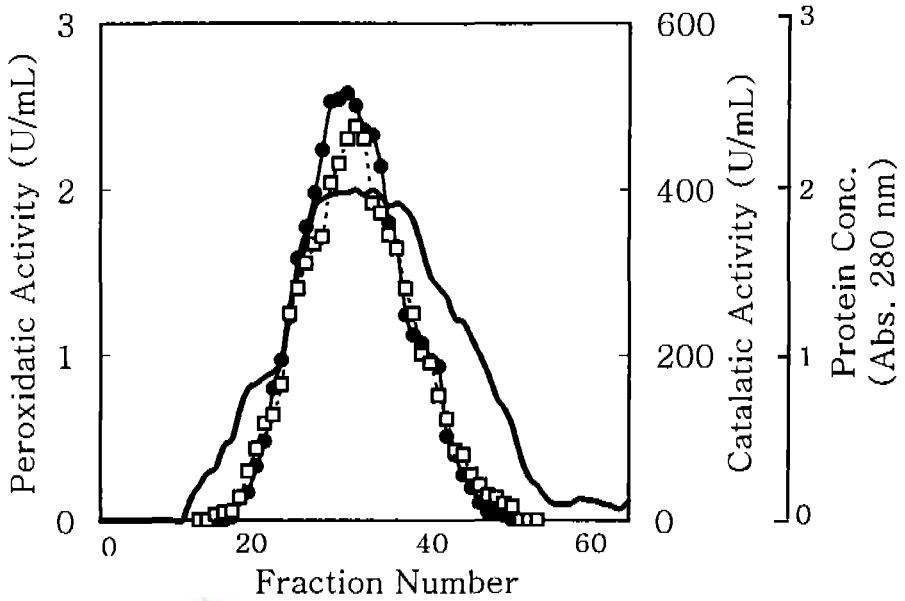


Fig. 9 Gel filtration chromatography of partially purified catalase-peroxidase obtained from DEAE-cellulose column on Sephadex G-200 column. Enzyme solution was loaded on a column(1x90 cm) equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) and then eluted with equilibration buffer, at a flow rate of 10 mL/hr. Fraction size 2 mL/fraction.

- protein concentration
- catalatic activity "
- peroxidatic activity"

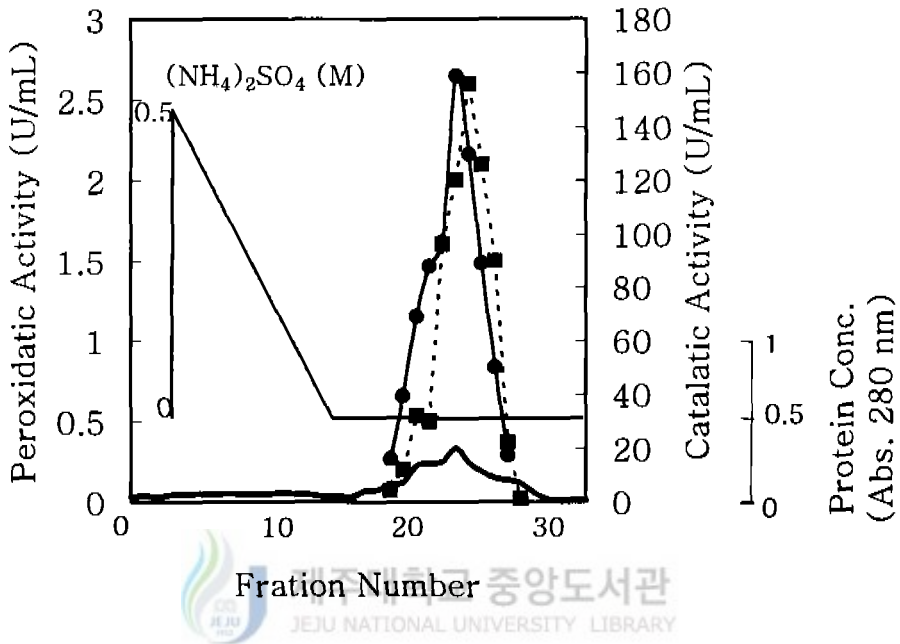


Fig. 10 Hydrophobic chromatography of partially purified catalase-peroxidase obtained from Sephadex G-200 chromatography on Phenyl-Sephadex CL-4B. Partially purified enzyme solution was loaded on a column (2.5x10 cm) equilibrated with 0.5 M ammonium sulfate in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). The column was washed with 50 mL of the equilibration buffer and then enzyme solution was eluted with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) of linear gradient of 0.5 M ammonium sulfate (0.5-0 M), at flow rate of 20 mL/hr. Fraction size was 2 mL/fraction.

- protein concentration
- - ■ - - peroxidatic activity
- ● — catalatic activity

Table 1. Partial purification of catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1

	Catalase					Peroxidase			
	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (n-fold)	Yield (%)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (n-fold)	Yield (%)
Crude extract	84	37626	448	1	100	11798	141	1.0	100
Ammonium sulfate(25-70%)	37	22592	611	1.4	60	8606	233	1.6	72.9
DEAE-cellulose	20	19768	988	2.2	53	5512	276	2	46.7
Sephadex G-200	1.5	2486	1657	3.7	6.6	2168	1446	10	18.4
Phenyl-Sepharose CL-4B	0.3	640	2067	4.6	1.6	596	1987	14	5.1

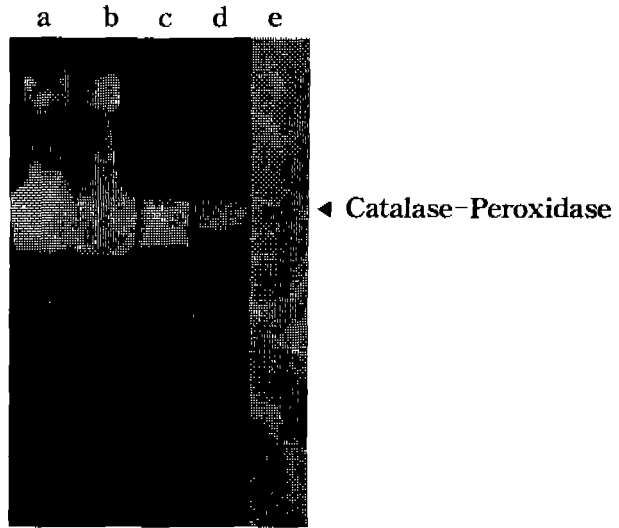


Fig. 11 7.5% polyacrylamide electrophoresis of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1 at each purification step.

Catalatic activity staining(Lane a, crude enzyme extract; Lane b, DEAE-cellulose; Lane c, Sephadex G-200; Lane d, Phenyl-Sepharose CL-4B)

Peroxidatic activity staining(Lane e, Phenyl-Sepharose CL-4B)

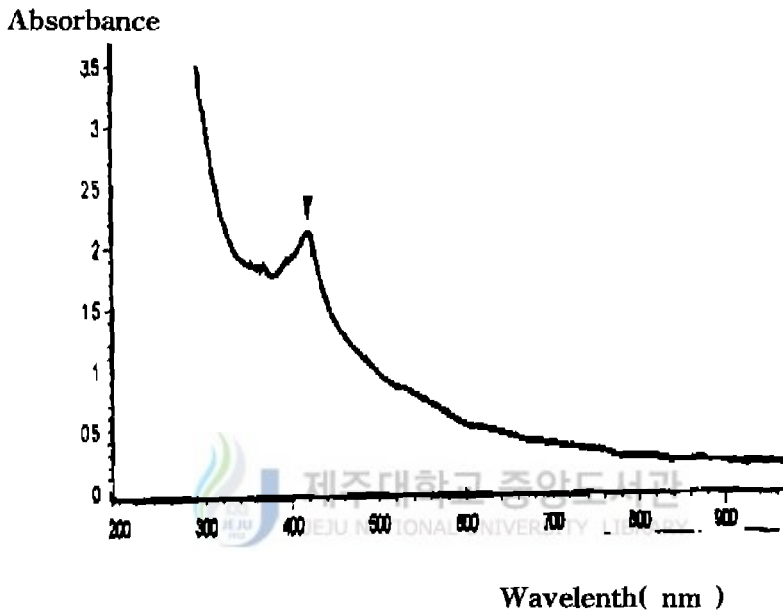


Fig. 12 Absorption spectrum of partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1
It shows a peak at 411 nm.

부분 정제된 catalase-peroxidase활성을 pH 3에서 11까지 pH를 변화시켜 조사해 본 결과, catalase활성은 pH 6에서 peroxidase활성은 pH 5에서 가장 높게 나타났다. Catalase활성이 pH 5부터 7부근에서 50% 이상을 나타내는 반면에, peroxidase활성은 pH 5부터 6부근에서 높은 활성을 보였다(Fig. 13). 다른 세균들에서 최적 pH를 보면 *Rps. capsulata*경우 peroxidase활성은 pH 5-5.3에서 가장 높았으며 catalase활성은 pH 6-6.5에서 높은 활성을 나타낸다고 보고하였으며, *R. capsulatus*경우 peroxidase는 pH 7에서 catalase-peroxidase은 pH 5.5에서 그활성이 가장높게 나타난다고 보고하였다(Hochman and Goldberg, 1991; Hochman et al., 1992), *Klebsiella pneumoniae*는 pH 6.3, *Streptomyces cyaneus*경우는 pH 8.0에서, *H. halobium*은 pH 6-7.5에서 그리고 *E. coli*의 HP I은 pH 7.5에서 catalase-peroxidase활성이 가장 높게 나타난다고 보고하였다(Hochman and Shemesh, 1987; Mliki and Zimmermann, 1992; Brown-peterson and Salin, 1993; Claiborne and Fridovich,1979). 이런 경우와 같이 *R. rubrum* S1에서도 특정 pH부위에서만 활성이 높게 관찰된 것으로 보아 이러한 차이가 전형적인 catalase와는 다른 catalase-peroxidase의 특징으로 생각된다. 부분정제된 catalase-peroxidase시료를 pH 3-11까지의 각 pH buffer에 1시간동안 보관한 다음 활성을 측정한 결과 pH 5-10까지 50%이상의 활성을 보였으며 특히 pH 7에서 가장 안정되게 나타났다(Fig. 14).

부분정제된 catalase-peroxidase에서 효소활성에 대한 최적 온도를 측정된 결과 catalase활성과 peroxidase활성이 모두 30 ℃에서 최고의 활성을 보이는 것으로 나타나 최적온도가 30 ℃임을 알 수 있었다(Fig. 15). *Rps. capsulata*에서 생성되는 catalase-peroxidase(Hochman and Shemesh, 1987)를 비롯하여 다른 세균들과 마찬가지로 *R. rubrum* S1에서 catalase-peroxidase 역시 온도에 민감함을 보여주었다. 온도변화에 따른 효소의 안정도를 보기 위해 부분정제된 catalase-peroxidase시료를 30-50 ℃까지의 온도에 고정하여 1시간 후 활성을 측정된 결과 catalase와 peroxidase활성이 모두 40 ℃에서 높았으며, catalase활성은 40 ℃이후로 60 ℃까지 완만하게 저하되었지만 peroxidase의 활성은 40 ℃이후로 갑자기 저하되어 catalase가 peroxidase보다 더 안정함을 알 수 있었으며(Fig.

16), *K. pneumoniae*에서 활성이 전혀 나타나지 않는다는 보고와는 대조적이었다 (Goldberg and Hochman, 1989).

부분정제된 catalase-peroxidase에서 catalase활성은 2 mM H₂O₂에서는 1시간 동안 활성의 큰 변화 없이 안정한 형태를 보였지만 4 mM H₂O₂에서는 20분 부터 갑자기 활성이 저하되어 불안정한 형태를 보였다(Fig. 17). Peroxidase활성은 조효소액에서와 마찬가지로 2 mM, 4 mM H₂O₂에서 모두 큰 영향을 받지 않는 안정한 형태를 보였다(Fig. 18). Fig. 19과 같이 10-50 mM까지 H₂O₂농도를 변화시켜 catalase와 peroxidase활성을 측정된 결과 catalase활성은 완만하게 계속 증가하여 *R. capsulata*와 *R. spaeroides*에서 catalase 특성과 일치함을 알 수 있었으며, peroxidase활성은 증가하다가 30 mM H₂O₂에 이르게 되면 그 활성이 떨어져 *R. capsulata*에서의 peroxidase활성과는 다소 차이가 있었다(Hochman and Shemesh, 1987; Detlef and Michael, 1998).

7. 효소의 기질 특이성



부분정제된 catalase-peroxidase는 peroxidase기질로써 o-dianisidine, pyrogallol, 그리고 diaminobenzidine은 이용하였지만 guaiacol, ascorbate는 이용하지 않았는데(Table 2), 이는 *Rps. capsulata*에서의 peroxidase의 기질특성과 같았다 (Hochman and Shemesh, 1987). 이외에도 *B. fragilis*의 peroxidase는 pyrogallol에서만, *Synecoccus* PCC 7942는 o-dianisidine과 pyrogallol을 기질로써 이용하였으며 guaiacol과 ascorbate는 이용하지 않는다고 보고되어(Rocha and Smith, 1995; Michinori *et al.*, 1996) 본 실험의 *R. rubrum* S1을 비롯한 peroxidase를 비롯한 결과와 같이 peroxidase는 다양한 기질을 이용한다는 것을 알 수 있었다.

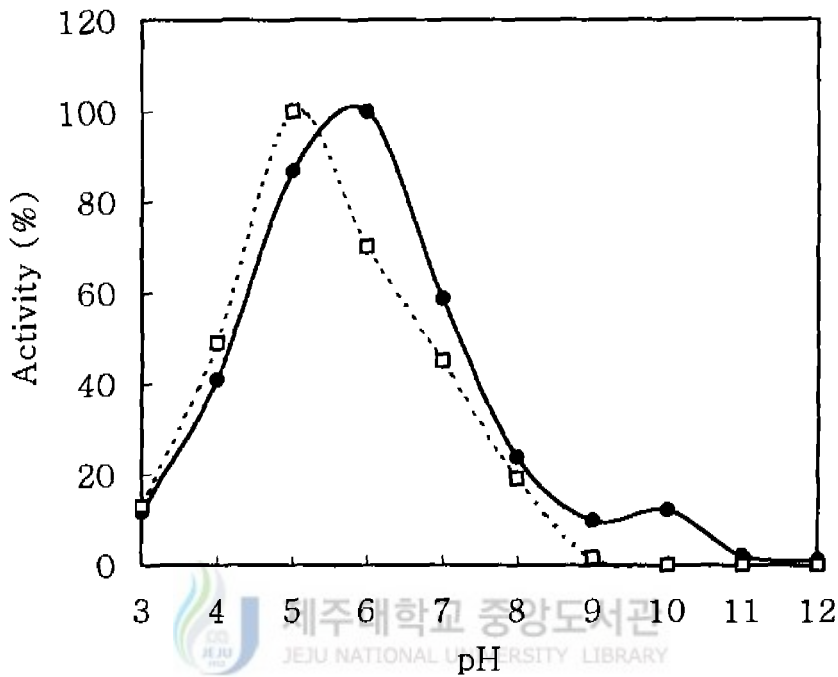


Fig. 13 Effect of pH on the catalytic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

—●— catalytic activity - - □ - - peroxidatic activity

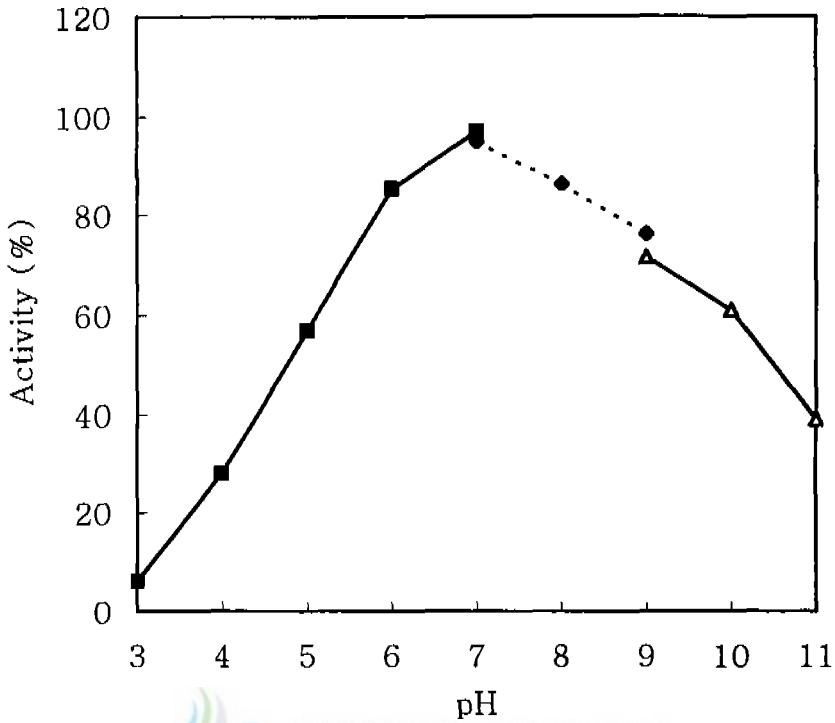


Fig. 14 Effect of pH on the stability of partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1. The enzyme with different buffer solution was incubated at various pHs at 30 °C for 1 hour and residual catalatic activity was determined.

- citrate-phosphate buffer(pH3.0-7.0)
- ◆·· Tris-HCl buffer(pH7.0-9.0)
- ▲— carbonate buffer(pH9.0-11.0)

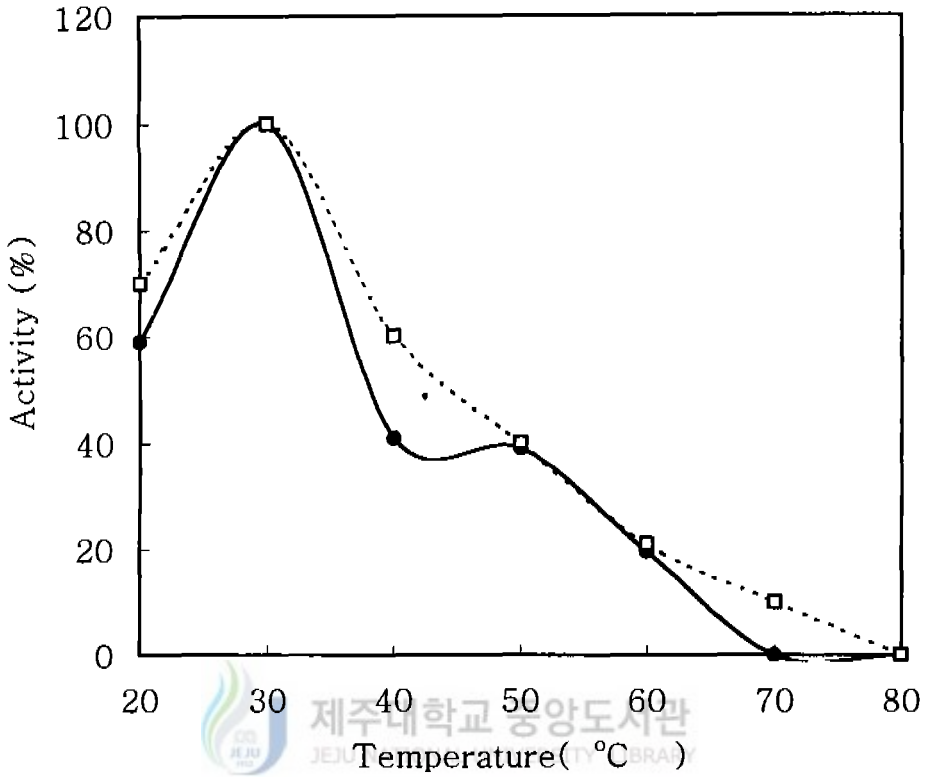


Fig. 15 Effect of temperature on the catalytic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

—●— catalytic activity ···□··· peroxidatic activity

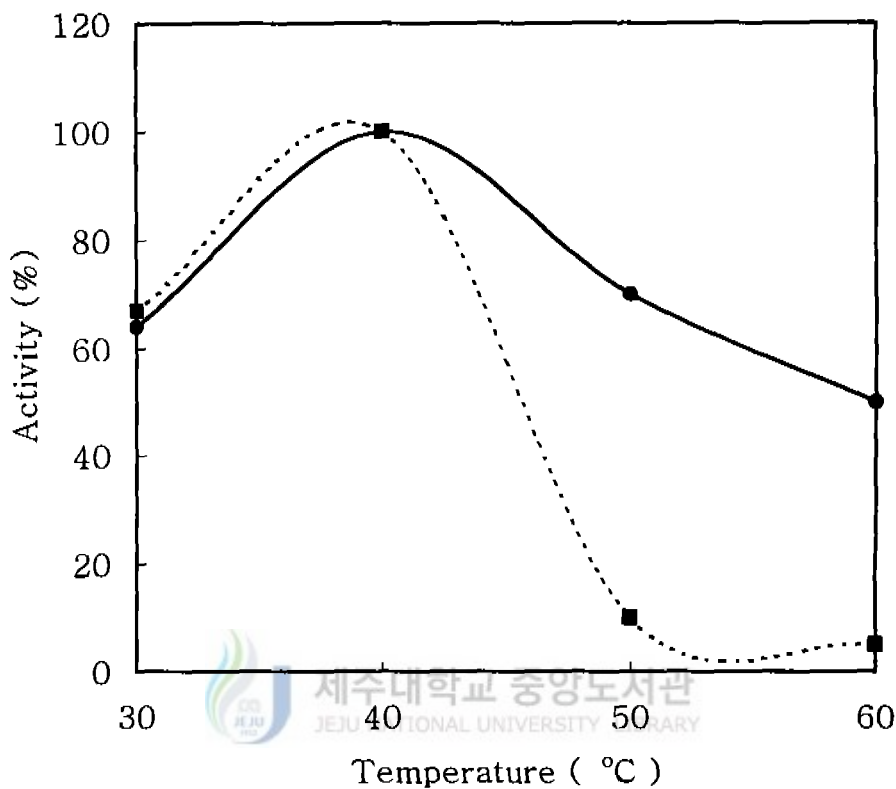


Fig. 16 Thermostability on the catalytic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1. The enzyme solution was incubated 1 hour at various temperatures.

--■-- peroxidatic activity —●— catalytic activity

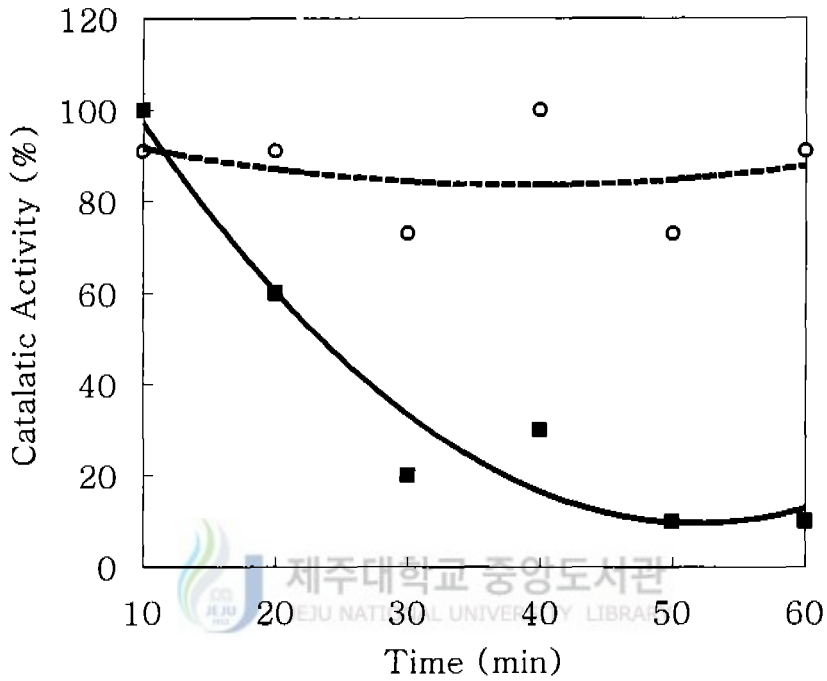


Fig. 17 Effect of H₂O₂ on the catalytic activity of partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

—○— 2 mM H₂O₂ —■— 4 mM H₂O₂

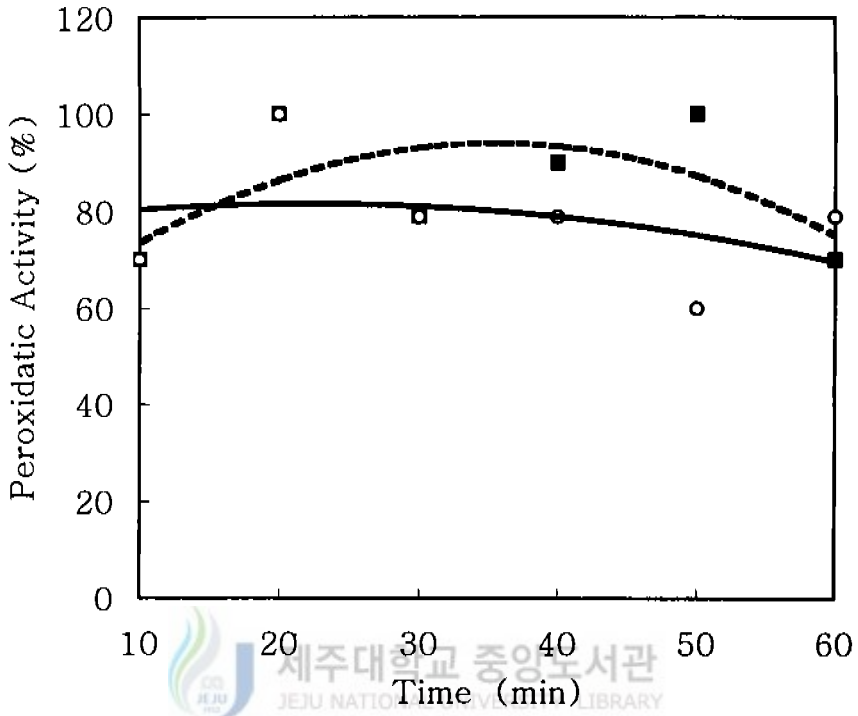


Fig. 18 Effect of H₂O₂ on the peroxidatic activity of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

--○-- 2 mM H₂O₂ —■— 4 mM H₂O₂

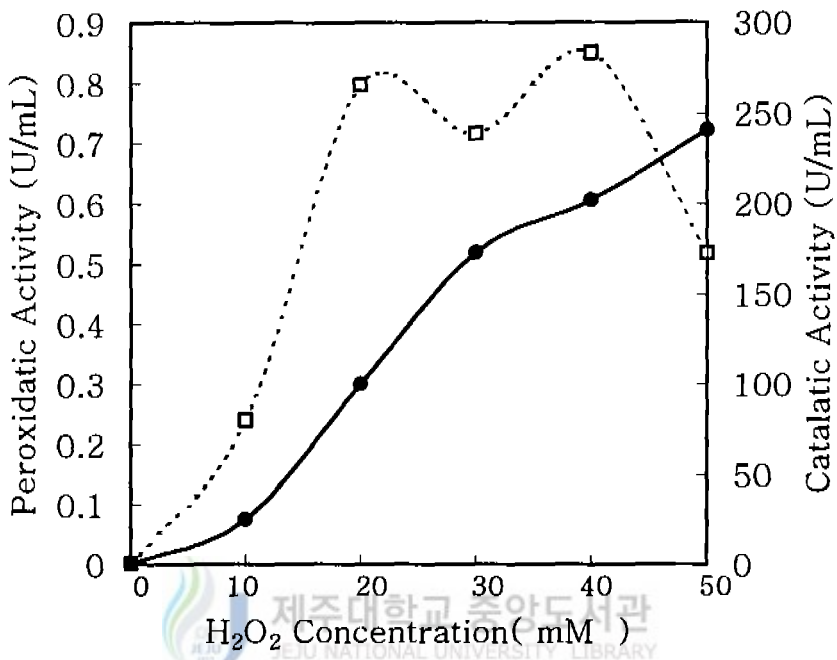


Fig. 19 Effect of H₂O₂ concentrations on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

□ ··· peroxidatic activity

● — catalatic activity

Table 2 Peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1 on various substrates

Electron donors	Peroxidatic activity
<i>o</i> -Dianisidine	+
Pyrogallol	+
Guaiacol	-
Diaminobenzidine	+
Ascorbate	-



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

8. 효소 활성에 대한 저해제들의 효과

Fig. 20과 같이 효소활성에 대한 저해제들의 영향을 보면 NH_2OH 에서는 catalase인 경우 2.0×10^{-7} M, peroxidase인 경우는 2.5×10^{-7} M로 peroxidase가 더 높은 농도에서 50%억제되는 것을 알 수 있었다. NaN_3 에서는 catalase는 4.2×10^{-7} M, peroxidase는 3.2×10^{-7} M로 catalase가 더 높은 농도에서 50%억제가 이루어 졌으며, NaCN 에서는 catalase는 8.72×10^{-6} M의 농도에서, peroxidase는 5.1×10^{-6} M의 농도에서 억제되어 catalase가 peroxidase보다 더 높은 농도에서 50%억제가 되었다. 이들 저해제들은 catalase활성과 peroxidase활성을 동시에 저해하나 서로 다른 정도의 저해 효과를 보였으며(Table 3A), heme단백질 효소들의 저해제가 다른 세균의 효소들에 비해 더 높은 농도에서 억제됨을 알수있었다.

부분정제한 catalase-peroxidase에 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole을 처리한 결과, 지금까지 분리된 몇몇 catalase-peroxidase (Hochman and Shemesh, 1987; Brown-Peterson and Salin, 1993)에서와 마찬가지로 효소의 각 활성이 그대로 유지되고 있었다. 또 전형적인 catalase와는 다른 catalase-peroxidase의 차이점인 유기용매에 대한 민감성을 가지고 있었는데, catalase의 활성은 21%, peroxidase는 활성은 15%정도 남아있었다(Table 3B). 위의 결과는 *Rps. capsulata*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Mycobacterium smegmatis*(Hochman and Goldberg, 1991; Hochman and Shemesh, 1987; Marcinkeviciene *et al.*, 1995)에서 보고한 catalase-peroxidase의 특성에도 일치함을 알 수 있었다.

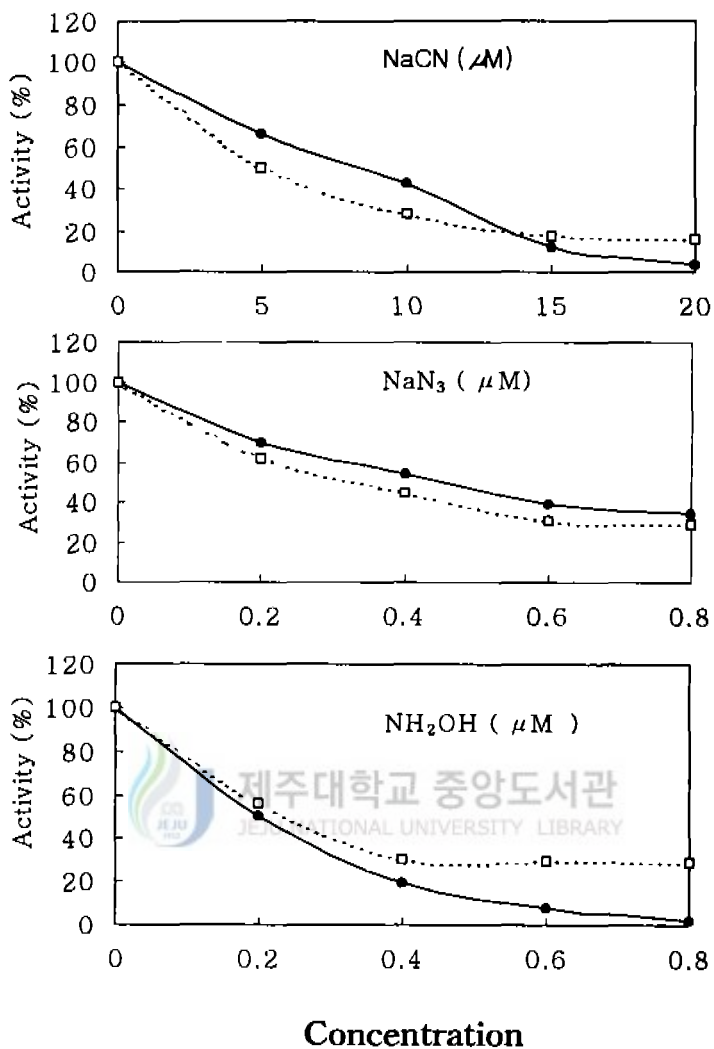


Fig. 20 Effect of heme protein inhibitors on the catalytic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1. The enzyme was assayed with concentrations of NaCN, NaN₃ and NH₂OH.

—●— catalytic activity - - - □ - - - peroxidatic activity

Table 3 The effect of inhibitors on the catalatic and peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1

A. The effect of metal inhibitors on the catalatic-peroxidatic activities of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1

Metal inhibitor	Metal inhibitor concentration(M) required for 50% inhibition of the enzyme activity	
	Catalatic activity	Peroxidatic activity
NaCN	8.7×10^{-6}	5.1×10^{-6}
NaN ₃	4.2×10^{-7}	3.2×10^{-7}
NH ₂ OH	2.0×10^{-7}	2.5×10^{-7}



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

B. The effect of chemical inhibitors on enzyme activities

Chemical inhibitors	Catalatic activity(%)	Peroxidatic activity(%)
None	100	100
3-Amino-1,2,4-triazole ^a	91	89
Organic solvent ^b	21	15

a : The enzyme solution was incubated in 10mM 3-amino-1,2,4-triazole for 10min.

b : The enzyme solution was mixed with organic solvents to give a final composition of enzyme solution: ethanol: chloform = 10:5:3, and then vortexed for 10min at room temperature .

요 약

호기적으로 배양한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170(S1)은 조효소액을 전기영동(7.5% PAGE)하여 활성염색을 한 결과 다섯 가지의 catalase가 생성됨을 알 수 있었다. 그 중 두 가지는 peroxidase의 기능도 동시에 가지는 catalase-peroxidase였다. 부분정제된 이 효소의 흡광 스펙트럼은 411 nm에서 최고를 나타냈으며, *o*-dianisidine, pyrogallol, diaminobenzidine등을 기질로 사용하였으나 ascorbate, guaiacol은 기질로 사용하지 않는 peroxidase활성을 가지고 있었다. 이 효소의 catalase의 최적 pH는 6이었으며 peroxidase의 최적 pH는 5였다. 최적온도는 두 가지 효소활성 모두 30 ℃였고, 30 ℃, 40 ℃ 그리고 50 ℃에서 1시간 동안 고정하여 보관 한 결과 catalase활성은 50%이상 남아있었으나 peroxidase활성은 30 ℃, 40 ℃에서만 50%이상 남아있었다. 유기용매(ethanol/chloroform) 처리시에는 catalase활성은 79%, peroxidase활성은 85% 저해되었다. 10 mM의 3-amino-1,2,4-triazol 처리시에는 두 가지 활성이 모두 거의 영향을 받지 않았다. H₂O₂에 대한 안정성은 catalase활성은 2 mM에서는 안정하였으나 4 mM에서는 불안정하였고, peroxidase활성은 두가지 농도 모두에서 안정하였다. Hydroxylamine, azide, cyanide의 50%억제농도는 catalase의 경우 hydroxylamine은 2.0×10^{-7} M, azide는 4.2×10^{-7} M 그리고 cyanide는 8.7×10^{-6} M이었으며 peroxidase는 hydroxylamine은 2.5×10^{-7} M, azide는 3.2×10^{-7} 그리고 cyanide는 5.1×10^{-6} 이었다.

V. 참고문헌

- Beers, R. F. and I. W. Sizer, 1951. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
- Boehme, D.E., K. Vincent, and O. R. Brown, 1976. Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis. *Nature*(London) 262: 418-420.
- Bose, S. K., H. Gest. and J. G. Ormerod. 1962. Light-activated hydrogenase activity in Photosynthetic Bacterium : A permeability Phenomenon. *J. Biol. Chem.* 236: 13-14.
- Brown, K., and I. Fridovich, 1981. DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 414-419.
- Brown-Peterson, N. J. and M. L. Salin, 1995. Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 177: 378-384.
- Claiborne, A., and I. Fridovich. 1979a. Purification and the o-dianisidine peroxide from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 254: 4245-4252.
- Claiborne, A., D. P. Malinowski, and I. Fridovich, 1979b. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 254: 11664 - 11668.
- Clare, D.A., M.N. Duong, D. Darr, F. Archibald, and I. Fridovich. 1984. Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity strains for catalase. *Anal. Biochem.* 140: 532-537.

- Farr, S. B., and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-585.
- Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals., *Science.*, 201: 875-880.
- Goldberg, I., and A. Hochman. 1989. The different type of catalases in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 124-128.
- Hassan, H.M., and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of Catalase and Peroxidase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253: 6445-6450.
- Hochman, A., and I. Goldberg. 1991. Purification and characterization of catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1077: 299-307.
- Hochman, A., and A. Shemesh. 1987. Purification and characterization of a catalase-peroxidases from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 262: 6871-6876.
- Hong, D. Y., Y.I. Yim, C. H. Yang, and S.O. Kang. 1995. Spectral Characterization and Chemical Modification of Catalase-Peroxidase from *Streptomyces sp.* *J. Biol. Chem.* 270: 13740-13747.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee, I. J., and Y.N. Lee. 1995. Purification and Characterization of Catalase-3 of *Deinococcus radiopilus*. *J. Microbiol.* 33: 239-243.
- Loewen, P.C. 1984. Isolation of catalase deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of Kat E, a locus that affects catalase

- activity. *J. Bacteriol.*, 157: 622-626.
- Loewen, P.C., B.L. Triggs, C.S. George and B.E. Hrabarchuk. 1985a. Genetic mapping of KatG a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 162: 661-667.
- Loewen, P.C., J. Switala, and B.L. Triggs-Raine. 1985b. Catalase HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.*, 243: 144-149.
- Loprasert, S., S. Negoro, and H. Okada. 1988. Thermostable peroxidase from *Bacillus strearophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1971-1976.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Marcinkeviciene, J.A., R.S. Magliozzo, and J.S. Blanchard. 1995. Purification and Characterization of the *Mycobacterium smegmatis* Catalase-Peroxidase Involved in Isoniazid Activation. *J. Biol. Chem.* 270: 22290-22295.
- Meister, A., and Anderson, M. E. 1983. Gluthathion, *Annu, Rev. Biochem.* 523: 711-760
- Mliki, A., and W. Zimmermann. 1992. Purification and Characterization of an Intacellular Peroxidase from *Streptomyces cyaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 916-919.
- Mitchell, M. J., S. Ahmad, and R. S. Pardini. 1991. Purification and properties of a highly active catalase from cabbage loopers. *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* 21: 641 -646.
- Mutsuda, M., Ishikawa, T., T. Takeda, and S. Shigeoka. 1996. The catalase-peroxidase of *Synechococcus* PCC 7942: purification,

nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 316: 251~257.

Nadler, V., I. Goldberg, and A. Hochman. 1986. Comparative study of bacterial catalases. *Biochem. Biophys. Acta.* 882: 234-241.

Rocha, E. R. and C. J. Smith, 1995. Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 177: 3111 - 3119.

Shin, K. J., Y. T. Ro, and Y. M. Kim. 1994. Catalase in *Acinetobacter* sp. strain JCI DS 3803 growing on glucose. *Kor. J. Microbiol.* 32: 155 - 162.

Terzenbach, D. P. , and M. Blaut. 1998. Purification and characterization of a catalase from nonsulfur photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch. Microbiol.* 169: 503-508

Wayne, L. G., and Diaz, G. A. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalases in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 157:

감사의 글

그 동안 사랑과 격려로 못한 제자를 지도해 주시고 격려해 주신 오덕철 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 논문이 만들어지기까지 세심한 관심과 주의를 가져주신 고석찬 교수님, 김세재 교수님께도 감사드립니다.

항상 관심과 사랑으로 지도편달을 아끼지 않으셨던 허인옥 교수님, 김문홍 교수님, 오문유 교수님, 이용필 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님께도 감사드립니다. 지난 기간동안 한 가족처럼 생활하면서 많은 도움을 주신 미생물학 실험실에 이동현 선배님, 이정배 선배님, 회경, 병준, 윤석, 성아에게도 감사하며, 많은 충고와 도움을 주셨던 여러 선배님들과 후배님들에게도 감사드립니다.

그리고 저를 낳아 주시고 오늘날까지 늘 사랑으로 지켜주셨던 부모님과 시부모님, 그리고 언니와 형부, 시누이들, 동생들께도 감사드리며 제가 힘들 때 늘 옆에서 힘이 되어주고 사랑으로 지켜봐 준 남편 손봉조씨께도 감사드리며 마지막으로 범석이와 나연이에게 이 논문을 바칩니다.