

석사학위논문

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*
ATCC11170이 생성하는 catalase의 특성



제주대학교 대학원
제주대학교 중앙도서관
생물학과
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

임 희 경

110.419

2000년 12월

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*
ATCC11170이 생성하는 catalase의 특성




지도교수 : 오 덕 철

임 희 경

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함



임희경의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 高 碩 贊 
위 원 김 인 태 
위 원 吳 德 鐵 

제주대학교 대학원

2000년 12월

Characterization of Catalase from Photosynthetic
Bacterium *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170

Hee Kyoung Lim

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)



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

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2000. 12.

목 차

| | |
|-------------------|----|
| ABSTRACT..... | 1 |
| I. 서론..... | 3 |
| II. 재료 및 방법..... | 6 |
| III. 결과 및 고찰..... | 12 |
| IV. 요약..... | 32 |
| V.참고문헌 | 33 |



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Table

Table 1. Effect of various carbon sources on catalase activity of *R. rubrum*30

List of Figures

Fig. 1. Cell growth and catalase activity of crude extracts from *R. rubrum* cultured under aerobic condition.....13

Fig. 2. Cell growth and catalase activity of crude extracts from *R. rubrum* cultured under anaerobic condition.....14

Fig. 3. Identification of catalase and peroxidase by nondenaturing PAGE(5%-15% gradient acrylamide) of the crude extract from *R. rubrum*.16

Fig. 4. Determination of molecular weight of catalases by nondenaturing PAGE.17

Fig. 5. Effect of temperature on the catalase activity of crude extracts from *R. rubrum*.19

Fig. 6. Effect of pH on the catalase activity of crude extracts from *R. rubrum*.20

Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the reaction velocities of the crude catalase extract from *R. rubrum* for hydrogen peroxide.21

Fig. 8. Survival of *R. rubrum* in early exponential and stationary growth phase after 1hr treatment of hydrogen peroxide at the various concentrations.24

Fig. 9. Comparison of catalase activities of crude extracts from *R. rubrum* of exponential and stationary phases.25

Fig. 10. Comparison of catalase activities of crude extracts from *R. rubrum* grown with and without hydrogen peroxide (100 μ M) at the beginning of culture.26

Fig. 11. Discontinuous nondenaturing PAGE (8%) of different cell fractions of *R. rubrum* showing catalase activity.29

Fig. 12. Activity staining of catalases after nondenaturing PAGE of crude extracts from *R. rubrum* grown on various carbon sources.31

ABSTRACT

Several properties of catalases in crude extracts from aerobically grown photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 were examined. Aerobically grown *R. rubrum* on malic acid as a sole carbon source contained five different types of catalases, designated Cat1, Cat2, Cat3, Cat4, and Cat5. But anaerobically grown cells contained only Cat2 and Cat4. Among them, Cat3 and Cat4 exhibited bifunctional catalase-peroxidase activities. The others were monofunctional typical catalases. The molecular weights of Cat1, Cat2, Cat3, Cat4, and Cat5 were 337kDa, 282kDa, 235kDa, 188kDa, and 150kDa respectively. In terms of catalase activity, the crude extract of aerobically grown *R. rubrum* revealed maximum activity (about 705U · mg protein⁻¹) at late stationary phase, in contrast, the crude extract of anaerobically grown *R. rubrum* revealed maximum activity (about 109U · mg protein⁻¹) at late logarithmic phase. Catalase in crude extract showed stability at broad ranges of temperature (30°C to 60°C), and pH (6.0 to 10.0). It's K_m value for hydrogen peroxide was about 10mM. *R. rubrum* was much more resistant to hydrogen peroxide in the stationary phase than in the exponential phase. Cells of stationary phase treated with 15mM hydrogen peroxide for 1hr showed 3 fold increase in total catalase activity compared with the untreated cells. The localizations of catalases in the cell of *R. rubrum* were determined. Cat2, Cat3 and Cat4 were located in the cytoplasmic space, but Cat5 was located in both cytoplasmic and periplasmic spaces. The localization of Cat1 could not be determined by denaturation in the process. Effect of various substrates as a sole carbon source on the

induction and activity of catalase of *R. rubrum* was determined. Different carbon sources exhibited different effects. L-glutamate induced 80-fold increase in total catalase activity of *R. rubrum* compared with malic acid. Interestingly, the sixth band of catalase activity was detected after nondenaturing PAGE of the crude extract from *R. rubrum* cultured on glutamate as a sole carbon source. The sixth catalase band revealed highest molecular weight among 6 catalase bands of *R. rubrum* on the native PAGE.



I. 서 론

혐기성 생물을 제외한 모든 생물들은 생명체를 유지하기에 필요한 에너지를 얻기 위해 산소를 필요로 한다. 또한 세포는 산소의 생리적 활성으로 환원된 형태인 $O_2 \cdot$, OH , H_2O_2 와 같은 유해 산소물질들을 생성한다. $O_2 \cdot$ 은 1개의 비공유 전자쌍을 가지고 있으므로, 산소 그 자체보다 약한 라디칼이나, 수용액 속에서 염기로 작용함으로써 양자를 받아들여 $HO_2 \cdot$ 과 같은 또 다른 활성 산소들을 생성한다 (Halliwell and Gutteridge, 1986).

산화적 스트레스는 높은 분압의 산소 뿐 아니라, γ -radiation, near-UV radiation, ozone, peroxide, redox-cycling drug에 의해서도 유발될 수 있으며, 여러 종류의 free-radical들이 관여한다 (Imlay *et al.*, 1988). *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium*은 이러한 산화적 스트레스에 대해 자신을 방어하고 적응시키는 기작을 가지고 있는데, 이들 세균에 낮은 농도의 H_2O_2 를 처리하면 나중에 세포에 치명적인 손상을 입힐 수 있는 농도의 H_2O_2 를 처리했을 때 그렇지 않은 세포에 비해 훨씬 더 잘 살아 남을 수 있다 (Dempfle and Halbrook, 1983). 마찬가지로 *E. coli*에 superoxide를 생성하는 화합물을 낮은 농도로 처리하면 나중에 높은 농도의 화합물을 처리했을 때 더 잘 적응할 수 있다. 이러한 적응기작에는 단백질 합성의 유도가 필수적인 것으로 알려져있다 (Farr *et al.*, 1985).

Catalase는 다양한 생물로부터 분리되고 연구되어왔다. 고등생물로부터 분리된 catalase는 서로 유사한 반면에 미생물에서 얻은 catalase는 매우 다양하며, 하나의 세포 안에 여러 종류의 catalase가 존재하기도 한다 (Hochman and Goldberg, 1991). *E. coli* (Claiborne *et al.*, 1979; Claiborne and Fridovich, 1979)와 *Bacillus subtilis* (Loewen *et al.*,

1987a, b), *Saccharomyces cerevisiae* (Seah *et al.*, 1973a, b)를 포함한 많은 미생물은 두 가지의 독특한 catalase들은 가지고 있는데 반해, *Neurospora crassa* (Jacob *et al.*, 1979), *Proteus mirabilis* (Jouve *et al.*, 1983) 등은 한 종류의 catalase만을 가지고 있다. *P. mirabilis*와 *S. cerevisiae* 등의 catalase는 4개의 protoheme IX group을 가지고 있고 4개의 60kDa 단위체를 가지고 있는 등 포유류의 catalase와 유사하지만 *E. coli*나 *N. crassa* 등의 catalase는 단위체의 구성이나 크기, protoheme 조성 등에서 포유류의 catalase와 많은 차이를 보이고 있다.

*E. coli*는 catalase와 peroxidase의 기능을 동시에 가지고 있는 Hydroperoxidase I 과 catalase의 기능만을 가지고 있는 Hydroperoxidase II 라는 두 종류의 catalase를 가지고 있는데 이들은 각각 *katG* 와 *katE* 라는 유전자로부터 합성된다 (Loewen *et al.*, 1984, 1985a). 이 두 효소를 분리하여 그 특성을 조사해본 결과 이들은 전형적인 catalase뿐만 아니라 이들 서로간에도 많은 차이점을 보이고 있었다. HP I 은 81kDa의 단위체로 구성된 tetramer로서 두 개의 protoheme IX group을 가지고 있는데 반해 (Claiborne and Fridovich, 1979), HP II 는 93kDa의 단위체로 구성된 hexamer로서 heme d-like group을 가지고 있다 (Loewen and Switala, 1986). 그리고 이들은 서로 다른 자극에 반응한다. HP I 의 합성은 배지에 H₂O₂를 첨가할 때 유도되며 HP II 의 합성은 세포가 정지기에 들어가거나 TCA 회로의 중간 산물을 이용해서 성장할 때 유도된다 (Loewen *et al.*, 1985b).

B. subtilis (Loewen and Switala, 1987c), *E. coli* (Loewen *et al.*, 1985), 그리고 *N. crassa* (Chary and Natvig, 1989)를 포함하는 몇몇 생물체에 대해서 성장 단계에 따른 catalase의 서로 다른 발현 양상이 보고된 바 있다. *B. subtilis*는 두 종류의 독특한 catalase를 가지고 있는데 catalase-1은 중기 지수 성장기에서 유일하게 발현되는 catalase로서 세포가 정지기에 들어서거나 H₂O₂에 노출되었을 때 그 활성이 유도되는 것으로

로 알려져 있다 (Loewen and Switala, 1987c).

*S. coelicolor*에 낮은 농도의 H_2O_2 를 처리하면 나중에 세포에 치명적인 손상을 입힐 수 있는 농도의 H_2O_2 를 처리했을 때 그렇지 않은 세포에 비해 더 잘 살아 남을 수 있고 (Roe *et al.*, 1991), 이러한 적응 기작은 낮은 농도의 H_2O_2 를 처리했을 때 catalase, peroxidase, glutathion reductase, 그리고 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등의 활성이 증가하는 것과 연관이 있을 것이라고 추정하고 있다. 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides*에서는 H_2O_2 를 넣어 pre-incubation 하였을 때 catalase 활성이 다섯배로 증가한다고 보고되어 있다 (Terzenbach and Blaut, 1998).

호기상태나 절대 혐기상태에서 생육이 가능한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170의 catalase에 관한 연구로는 Nadler 등 (1986)에 의하여 보고된 바 있다. 혐기 배양한 *R. rubrum* 에서 두 개의 catalase를 확인할 수 있었고, typical catalase의 경우 pH의 변화에 대하여 pH 5.5-pH 10.0 까지 넓은 범위에서 활성을 나타내었고 온도의 변화에서는 50°C에서 5분간 incubation하였을 때 188%의 활성이 증가함이 보고되었다. 그리고 2mM의 H_2O_2 를 한시간 이상 처리한 후에도 아무런 영향이 없다고 보고되어 있다.

본 실험은 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170에서 나타나는 catalase의 여러 가지 특성에 관하여 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 배양

1.1. 균주 및 배지

사용한 균주는 *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170였고 배지는 Bose 등 (1962)의 배지를 사용하였다.

배지의 조성은 다음과 같다.

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

여기에 탄소원인 DL-malic acid를 3g 첨가하여 멸균하기 전에 1N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조절하였다.

1.2. 접종 및 배양조건

혐기적 배양: 균주를 680nm에서 OD 0.05가 되도록 접종하여 100mL 배양병에 가득 채운 후 백열등으로 2,000 Lux가 되도록 조절하여 30°C에서 정치배양하였다.

호기적 배양: 혐기배양한 공시균주를 680nm에서 OD 0.05가 되도록 조절한 접종배양액을 300mL 삼각플라스크에 100mL를 넣어 30°C에서 150rpm으로 진탕 배양하였다.

2. 조효소액의 추출 및 단백질 정량

2.1. 조효소의 추출

배양한 세균을 4℃에서 원심분리 (5,000×g, 10분)하여 모은 다음 1mM EDTA가 함유된 50mM potassium phosphate buffer (pH6.8)로 세 번 세척한 후 1mM EDTA가 함유된 50mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)로 재현탁하여 sonication (Bandelin sonoplus HD2070, 60%, 30 초 간격) 하였다. Sonication한 액을 4℃에서 재원심분리 (10,000×g, 30 분)하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

2.2. 단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등 (1951)의 방법을 따라 정량하였다.



3. Catalase 활성 측정

3.1. Spectrophotometer를 이용한 활성 측정

Beers와 Sizer의 방법 (1952)에 따라 효소의 기질인 과산화수소의 감소속도를 240nm에서 흡광도의 감소로서 측정하였다. 효소의 1 unit는 30℃에서 1분 동안 1μmole의 과산화수소를 분해하는 효소의 양으로 정하였다 ($\epsilon_{240}=43.6M^{-1}cm^{-1}$).

3.2. 전기영동을 이용한 catalase 확인

3.2.1. Nondenaturing PAGE

Davis (1964)의 방법을 변형하여 불연속 완충용액 체제로 상단 겔은

4%, 하단 젤은 8%로 사용하였다.

3.2.2. 활성염색

Catalase의 활성 염색은 Wayne과 Diaz (1986)의 ferricyanide 염색법을 이용하였다. 전기영동한 젤을 증류수로 세 차례 행군 다음 5mM H₂O₂가 함유된 증류수 100mL에 넣어 10분 정도 흔들어서 주었다. 용액을 버리고 증류수로 한 차례 행군 다음 2% ferric chloride, 2% potassium ferricyanide 용액을 각각 25mL씩 섞은 후 젤에 부었다. 염색이 될 때까지 light box에서 천천히 흔들어서 주었다. Catalase 활성이 보이는 위치만 제외하고 젤 전체가 초록색으로 염색되어 음성염색을 이룬다.

Peroxidase의 활성 염색은 0.5mM o-dianisidine을 포함하는 acetate buffer (pH 5.5)에 젤을 10분 동안 담근 후 H₂O₂를 최종 농도가 4mM이 되도록 첨가하였다 (Caliborne and Fidovich, 1979). 상온에서 적당한 시간 동안 반응시키면 o-dianisidine을 기질로 이용하는 peroxidase는 오랜 지 빛 활성 띠를 보인다.

4. Catalase 특성조사

4.1. 성장기에 따른 catalase 활성 측정

지수기까지 자란 *R. rubrum* 을 680nm에서 OD 0.05가 되도록 접종하여 호기배양과 혐기배양을 하였다. 호기배양은 4시간 간격으로 OD를 측정하였고, 혐기배양은 12시간 간격으로 OD를 측정한 균체를 모아 조효소액을 만들어 catalase 활성을 측정하였다.

4.2. 분자량 산정

분자량 산정을 위하여 5%에서 15%까지 농도구배를 주어 하단젤을

만든 후 standard marker protein과 조효소액을 같은 젤에 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 marker protein이 있는 lane은 잘라서 Coomassie blue 염색을 하였고, 조효소액이 있는 lane은 catalase 염색 부분과 peroxidase 염색부분을 잘라 각각 염색한 후, marker protein들의 상대적 이동거리 (Relative mobility : Rf)를 산출하여 표준곡선 (standard curve)을 작성하고 catalase bands의 Rf값을 대응시켜 분자량을 산정 하였다. 표준단백질로는 urease (545kDa, hexamer; 272kDa, trimer), bovine serum albumin (132kDa, dimer; 66kDa, monomer)을 사용하였다.

4.3. 효소의 활성화에 대한 온도와 pH의 영향

효소의 활성화에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 각 효소 활성 측정용액을 20℃~80℃까지 10℃간격으로 준비하여 각각의 온도에서 10분 동안 처리한 후 catalase 활성을 측정하였다.

효소의 활성화에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 50mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0-6.0), 50mM potassium phosphate buffer (pH 6.0-7.0), 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0), 그리고 50mM carbonate buffer (pH 9.0-11.0)를 pH 1.0단위로 준비하여 조효소액에 기질을 넣고 30℃에서 10분 동안 처리한 후 catalase 활성을 측정하였다.

4.4. 효소와 기질의 반응성

K_m 값을 결정하기 위해서 catalase 활성화에 대해서 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60mM의 H_2O_2 를 준비한 후 효소의 반응속도를 측정하였다.

4.5. 성장기에 따른 H_2O_2 에 대한 *R. rubrum*의 생존력 조사

H_2O_2 를 처리한 후 *R. rubrum*의 생존도를 측정하였다.

DL-Malic acid 배지에서 지수기까지 성장한 *R. rubrum*을 OD_{680} 에서 0.05가 되도록 접종하여 0.2와 1.2가 될 때까지 배양하였다. 다 자란 *R.*

rubrum 에 3%의 H_2O_2 를 0mM에서 120mM까지 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 30°C에서 1시간 동안 진탕배양한 *R. rubrum* 을 0.9% NaCl 에 적당량 희석하여 malic acid agar plate에 접종하였다. 24시간 동안 배양한 후 colony forming units (CFU)를 측정하였다.

4.6. 성장기별 H_2O_2 처리에 의한 catalase 활성 측정

OD₆₈₀에서 0.2와 1.2까지 자란 *R. rubrum*에 H_2O_2 를 5, 10, 15, 20mM로 처리한 후 1시간 동안 30°C에서 150rpm으로 진탕 배양하였다. 1시간 동안 배양한 후 균체를 모아 조효소액을 만들어 catalase 활성을 측정하였다.

4.7. H_2O_2 전처리에 의한 catalase 활성 측정

OD₆₈₀에서 0.2까지 자란 *R. rubrum*에 H_2O_2 를 100 μ M이 되도록 처리하여 OD₆₈₀에서 1.2가 될 때까지 진탕 배양하였다. 대조구로서 H_2O_2 를 처리하지 않은 *R. rubrum*을 1.2까지 진탕 배양하였다. 1.2까지 자란 *R. rubrum*에 H_2O_2 를 5, 10, 15, 20mM로 처리한 후 1시간 동안 30°C에서 150rpm으로 진탕 배양하였다. 1시간 동안 배양한 후 균체를 모아 조효소액을 만들어 catalase 활성을 측정하였다.

4.8. Catalase의 세포 내 위치

R. rubrum 에 있는 catalase의 세포 내 위치를 확인하기 위하여 Ames 등 (1984)의 방법을 사용하였다. Periplasmic fraction과 cytoplasmic fraction으로 나누기 위해 25mL의 배양액을 5,000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 모은 후 30mM $MgCl_2$ 이 함유된 10mM Tris (pH 7.3)로 세척하였다. 세척한 균체는 1mL의 buffer로 재현탁한 후 chloroform을 15 μ L을 첨가하였다. 4°C에서 15분간 방치한 sample에 ice-cold buffer를 1mL 넣고 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상징

액은 periplasmic fraction으로 사용하였고 pellet을 1mL의 buffer에 재현탁한 후 sonication하여 35,000×g에서 60분간 원심분리하여 cytoplasmic fraction으로 사용하였다.

4.9. 탄소원에 따라 유도된 catalase 활성의 비교 분석

탄소원 실험에 사용된 배지는 Bose 등 (1962)의 배지에서 탄소원으로 DL-malic acid, sodium pyruvate, sodium succinate, L-sodium glutamate, sodium acetate, sodium lactate, fructose, ethanol을 각각 3% (w/v)가 되도록 첨가하여 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절한 후 멸균하여 사용하였다. 균주는 PYS (0.3% Peptone, 0.3% Yeast extract, 2mM MgSO₄, 2mM CaCl₂) 배지에서 지수기까지 혐기배양한 *R. rubrum* 을 탄소원 배지별로 OD₆₈₀에서 0.05가 되도록 접종한 후 호기배양하였다. DL-malic acid, sodium pyruvate, sodium succinate, L-sodium glutamate, fructose에서는 3일간 진탕배양하여 균체를 모은 후 조효소액을 만들어 catalase 활성을 측정하였다.

성장이 느린 sodium lactate, sodium acetate, ethanol은 5일간 배양하여 균체를 모은 후 조효소액을 만들어 catalase 활성을 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 성장기별 catalase 활성

호기환경에서 *R. rubrum* 을 배양했을 때, *E. coli* (Loewen *et al.*, 1985b), *Pseudomonas syringae* (Katsuwon and Hutchison, 1992) 등과 마찬가지로 균이 성장함에 따라 total catalase activity가 증가함을 볼 수가 있었다. 그리고 정지기 말에 가장 높은 catalase activity를 확인 할 수가 있었다 (Fig. 1). 그리고 혐기환경에서 배양했을 때 지수기말 정지기로 들어갈 때 가장 높은 catalase activity를 확인할 수가 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 포도당을 이용하여 성장하는 호기성 일산화탄소 산화세균인 *Acinetobacter* sp. Strain JC1 DSM에 존재하는 catalase에서도 활성이 정지기 중기에서 다시 급격히 증가한 후 다시 감소하는 변화 (Shin. *et al.*, 1994)와 일치한다고 볼 수 있고, *B. subtilis* (Loewen and Switala, 1987 c), *E. coli* (Loewen *et al.*, 1985b) 그리고 *N. crassa* (Chary and Natvig, 1989)를 포함한 몇몇 미생물에 대해서 성장단계에 따른 catalase의 서로 다른 발현 양상이 보고된 바 미생물의 성장기별 catalase의 변화는 다양한 것으로 생각된다. 그리고 호기배양과 혐기배양시 약간의 다른 결과가 보이는 데 이것은 호기와 혐기 모두에서 성장할 수 있는 *R. rubrum*만의 특성으로 생각되어진다. Fig. 1과 Fig. 2를 비교하여 보았을 때 혐기상태에서 catalase activity가 현저히 줄어들음을 확인할 수 있고, Fig. 3에서는 호기 환경일 때 5개의 catalase가 생성되는 것을 nondenaturing PAGE로 확인할 수가 있었고, 혐기환경일 때는 catalase가 2개로 줄어들음을 확인할 수가 있었다. 이러한 결과로 보아 *R. rubrum*은 질소고정세균인 *Arcobacter nitrofigilis*와 마찬가지로 산소의 노출에 의해 catalase가 더 활성화되는 것으로 보인다 (Park and Han, 1997). 그리고 catalase는 빛에 의해서 비활성화될 수 있는 효소라는 결과들이 알려져 있고 (Cheng and Packer, 1981), 혐기배양시 2000 Lux의 빛을 쬐여주면서 배양하기 때문에

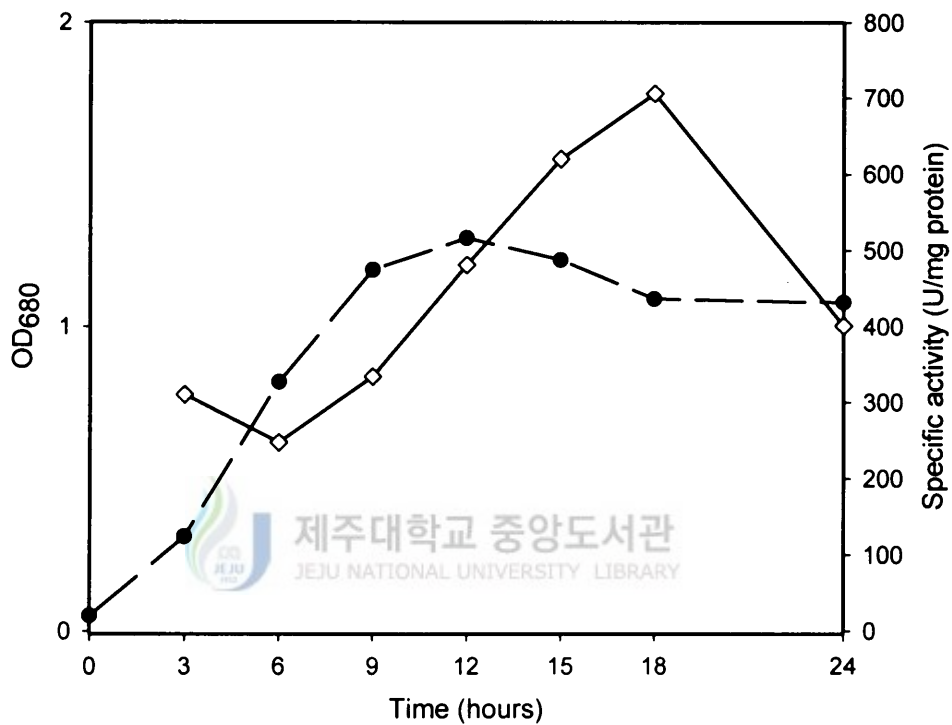


Fig. 1. Cell growth (●) and catalase activity (◇) of crude extracts from *R. rubrum* cultured under aerobic condition. Data are the means of two experiments.

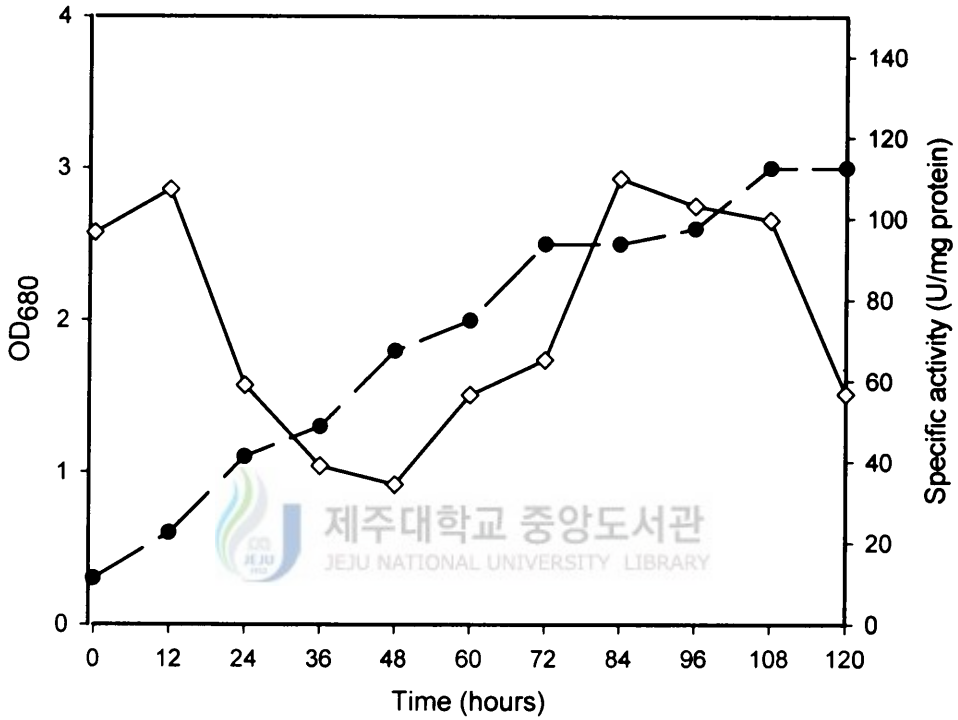


Fig. 2. Cell growth (●) and catalase activity (◇) of crude extracts from *R. rubrum* cultured under anaerobic condition. Data are the means of two experiments.

catalase의 활성화에 다소 영향을 주지 않았나 생각된다.

2. Catalase의 분자량 측정

호기배양한 *R. rubrum*은 5개의 catalase를 갖고 있었으며, 혐기배양한 *R. rubrum*은 2개의 catalase를 갖고 있었다. 그리고 peroxidase의 활성염색을 하였을 때 catalase 3번과 4번 band 위치에서 peroxidase의 활성도 같이 나타나는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3). Fig. 1과 Fig. 2의 catalase activity를 비교하였을 때 활성이 감소하는 것과 같은 결과를 활성염색을 한 결과로도 재확인 할 수 있었다. Nondenaturing PAGE상에서 표준단백질과 비교하여 분자량을 구한 결과, 표준단백질과 비교하였을 때 Cat1은 337kDa, Cat2는 282kDa, Cat3은 235kDa, Cat4는 188kDa 그리고 Cat5는 150kDa의 분자량을 갖고 있었다 (Fig. 4). 일반적인 catalase는 같은 크기의 4개의 subunits로 구성되어 있고 분자량은 225kDa에서 270kDa 정도이지만, 세균의 경우 그 종류와 환경에 대한 적응 및 대사능력의 다양성으로 인하여 여러 가지 다른 종류의 catalase를 갖고 있을 가능성이 있으며 이미 발견되고 있다. *Proteus mirabilis*의 경우 240kDa의 catalase를 갖고 있고 (Jouve *et al.*, 1983), *E. coli*의 경우 HP I 은 81kDa크기의 subunit가 4개로 구성되어 있으며 (Claborne and Fridovich, 1979), HP II 는 93kDa 크기의 subunit가 6개로 구성되어 있다고 보고되어있다 (Loewen and Switala, 1986). *R. rubrum*의 Cat3는 광합성 세균 *Rhodospseudomonas capsulata*가 가지고 있는 236kDa의 catalase-peroxidase (Hochman and Shemesh, 1987)와 동일한 크기이면서 catalase-peroxidase의 특징을 갖고 있어 *Rhodospseudomonas capsulata*와 거의 유사한 효소일 것으로 사료된다. 그리고 Cat5는 *Rhodobacter sphaeroides*의 150kDa크기의 catalase-peroxidase (Terzenbach and Blaut, 1998)와 동일한 크기이나 typical catalase의 특성을 갖고 있어 광합성 세균들도 여러 가지의 다른 catalase를 가지고 있는 것으로 보인다.

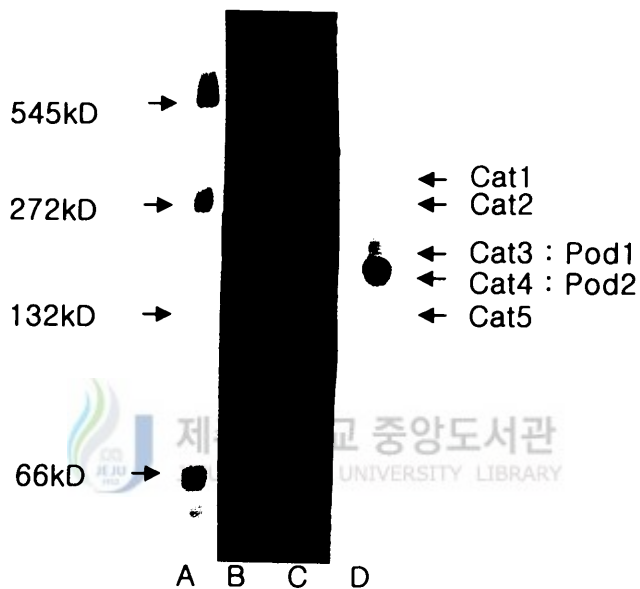


Fig. 3. Identification of catalase and peroxidase by nondenaturing PAGE (5%-15% gradient acrylamide) of the crude extract from *R. rubrum*. (A) Markers; urease (545kDa, hexamer; 272kDa, trimer), bovine serum albumin (132kDa, dimer; 66kDa, monomer) (B) catalase activity staining (aerobic culture), (C) catalase activity staining (anaerobic culture), (D) peroxidase activity staining (*o*-dianisidine).

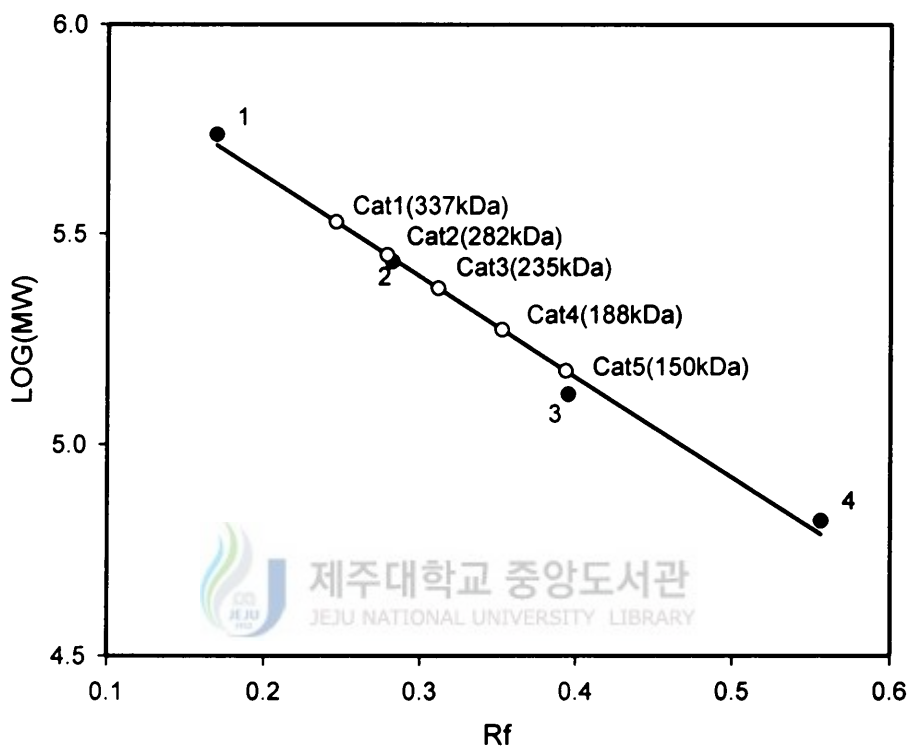


Fig. 4. Determination of molecular weight of catalases (○) on nondenaturing PAGE. Electrophoresis was performed on 5% to 15% gradient polyacrylamide gel as Fig. 3. The protein markers (●); 1, urease (hexamer, 545kDa); 2, urease (trimer, 272kDa); 3, bovine serum albumin (dimer, 132kDa); 4, bovine serum albumin (monomer, 66kDa).

3. 효소의 활성화에 대한 온도와 pH의 영향

효소의 활성화에 대한 온도의 영향은 30℃에서 최대의 활성이 나타났고 60℃에서도 50%이상의 활성을 보였으나 그 이상에서 활성이 급격히 감소하였다 (Fig. 5). 이는 Nadler 등 (1986)의 결과와 비교해 볼 때 typical catalase의 경우 50℃에서도 강한 활성을 보인다고 보고되어 있고, 전체적으로 온도에 강함을 보였지만 typical catalase와 peroxidase-catalase가 섞여 있는 상태에서는 typical catalase만 있을 때보다 온도에 민감함을 알 수 있었다. 효소의 활성화에 대한 pH의 영향은 pH 6.0에서 pH 9.0까지 최대활성의 60% 정도의 활성을 나타내었다 (Fig. 6). 일반적인 typical catalase는 광범위한 pH에서 효소의 활성이 보인다고 보고되어 있고 *R. rubrum*의 경우에도 typical catalase에서 pH 5.5에서 pH 10.0까지 광범위한 pH에서 효소의 활성이 나타난다고 보고되어 있는데 (Nadler *et al.*, 1986), 본 실험의 결과 typical catalase와 peroxidase-catalase가 섞여 있는 상태에서는 typical catalase만 있을 때보다 다소 좁은 범위의 pH에서 활성을 보임을 확인할 수가 있었다.

4. 효소와 기질의 반응성

Lineweaver-Burk plot를 작성한 결과 (Fig. 7), 이 효소의 K_m 은 약 10 mM 이었다. 일반적으로 typical catalase의 경우에는 K_m 값(40~80mM)이 높은 (Hochman and Goldberg, 1991; Loewen and Switala, 1987a, 1987c) 반면에 catalase-peroxidase는 K_m 값이 1~10mM (Claiborne and Fridowich, 1979; Yumoto *et al.*, 1987)로서 상대적으로 낮다고 알려져 있는데, 이 자료들을 본 실험에 적용한다면 typical catalase와 catalase-peroxidase가 섞여 있는 조효소액에서 K_m 값을 구한 결과 catalase-peroxidase의 K_m 값에 가까이 나타난 것으로 보아 *R. rubrum*이 H_2O_2 를 분해할 때 catalase-peroxidase가 typical catalase보다 더 많이 작용하는 것으로 해석되어진다.

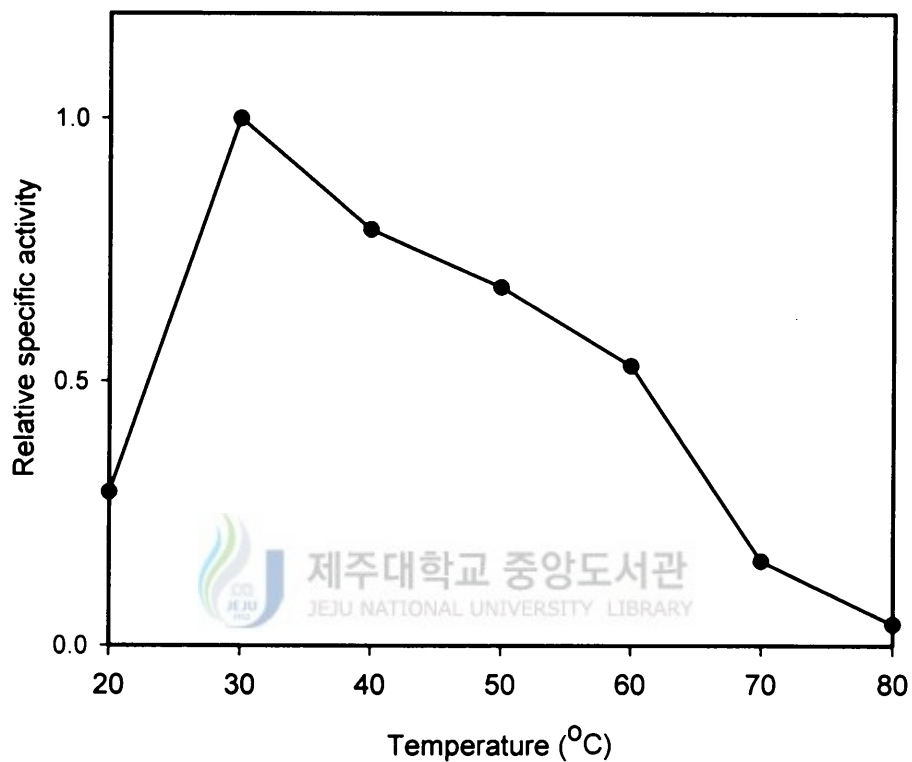


Fig. 5. Effect of temperature on the catalase activity (●) of crude extracts from *R. rubrum*. Crude extracts was incubated for 10 min at the indicated temperature prior to the initiation of the reaction. Enzyme activity was assayed in the standard assay solution of different temperatures as described in Materials and Methods.

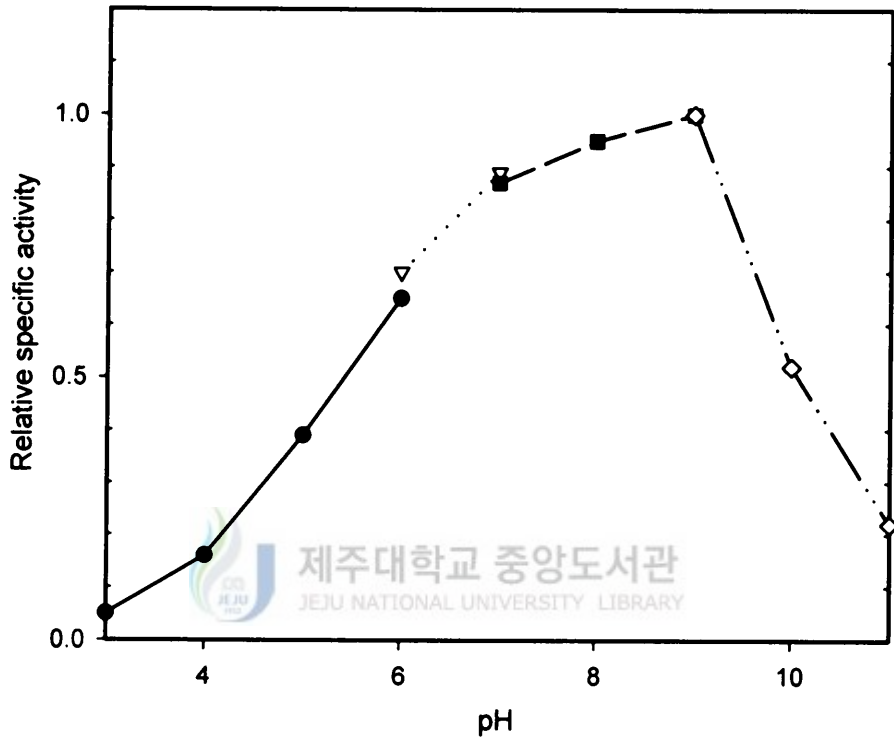


Fig. 6. Effect of pH on the catalase activity of crude extracts from *R. rubrum*. Crude extracts was incubated for 10 min at the indicated temperature prior to the initiation of the reaction. Different buffer systems were used according to pH ranges; 50mM citrate-phosphate buffer (●) for pH 3.0-6.0, 50mM potassium phosphate buffer (▽) for pH 6.0-7.0, 50mM tris-HCl buffer (■) for pH 7.0-9.0, and 50mM carbonat buffer (◇) for pH 9.0-11.0.

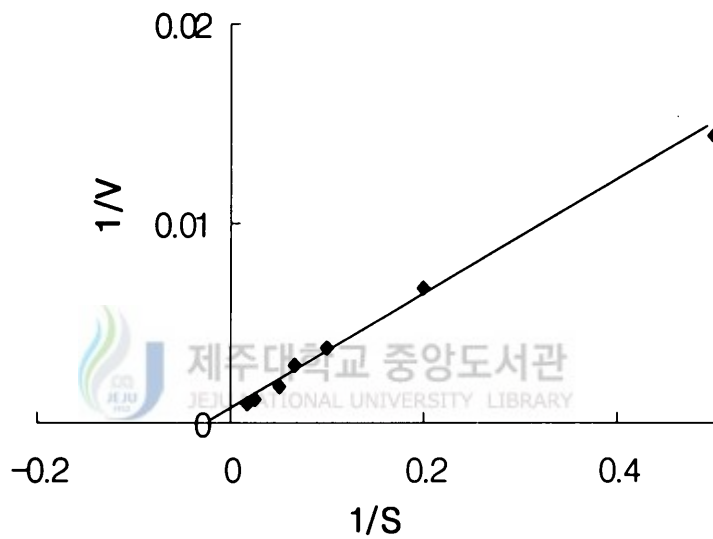


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the reaction velocities (◆) of the crude catalase extract from *R. rubrum* for hydrogen peroxide. The enzyme assay was performed at various concentrations of hydrogen peroxide in the standard assay condition as described under Materials and Methods.

5. 성장기에 따른 H₂O₂에 대한 *R. rubrum* 의 생존력

초기 지수기와 정지기 상태의 *R. rubrum* 에 H₂O₂를 농도별로 처리한 후 CFU를 측정하였을 때 5mM까지는 초기 지수기나 정지기 모두 비슷한 생존력을 보였으나, 농도가 높아질 수록 정지기 상태의 균이 초기 지수기의 균보다 높은 생존력을 보였다 (Fig. 8). 이러한 결과는 *E. coli*와 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.에서 보고된 결과와 일치하는 데, *E. coli*에서는 정지기에서 지수기 세포보다 heat, hydrogen peroxide, antibiotics, 그리고 osmotic stress등에서 강한 저항을 보인다 (Farr and Kogoma, 1991)고 보고되어 있고, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 의 경우 성장기에 의존하여 killing oxidative stress에 저항성을 보이는 데, 정지기의 세포들은 hydrogen peroxide, organic peroxide, superoxide generator의 killing 농도에서 early log와 min-log phases의 세포들 보다 더 강한 저항성을 보인다고 보고되어 있다 (Vattanaviboon *et al.*, 1995). 이것으로 *R. rubrum*도 마찬가지로 H₂O₂에 대하여 정지기에 강한 저항을 보임을 확인할 수 있었다.

6. 성장기에 따른 H₂O₂에 의한 catalase 활성

초기 지수기에서 H₂O₂를 농도별로 처리한 결과 처리하지 않은 것에 비해 5mM에서 1.1배정도 증가하였고, 다른 농도에서는 활성이 아주 줄어든 것이 보였다. 그러나 정지기에서는 농도가 증가할수록 전체적으로 catalase activity가 증가하였다. H₂O₂를 처리하지 않은 것에 비해 5mM의 경우 2배 가까이 증가하였고, 15mM의 경우 3배 정도 증가하였다. 20mM의 경우 15mM보다는 감소했지만 처리하지 않은 것에 비해 1.5배 정도 증가하였다 (Fig. 9). *E. coli*에서 catalase는 성장기와 oxidative stress에 의존하여 변하였는데 bifunctional catalase-peroxidase (HP I)은 mid-logarithmic phase와 H₂O₂에 의해 유도되었고, typical monofunctional catalase (HP II)는 정지기에서 증가하고, H₂O₂에 의해서

는 증가하지 않는다 (Loewen *et al.*, 1985b, Schellhorn and Hassan, 1988)고 보고되어 있는데, *R. rubrum*이 정지기에 starvation에 의한 typical catalase의 활성 증가와 H₂O₂ 처리에 의한 catalase-peroxidase의 활성 증가 모두가 이루어져 정지기에 H₂O₂에 대한 강한 저항을 보이는 것으로 사료된다. Fig. 9는 성장기에 따른 H₂O₂에 의한 생존력에서와 똑같은 결과를 보였고, Nadler 등 (1986)에서 보면 *R. rubrum*의 typical catalase를 2mM의 H₂O₂에 한시간 동안 처리하였을 때 활성이 감소하지 않는다고 알려져 있는데, Fig. 8과 Fig. 9의 결과를 종합하여보면 *R. rubrum*에 존재하는 catalase는 H₂O₂에 대하여 강한 저항성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

7. H₂O₂ 전처리에 의한 catalase 활성 및 적응력

낮은 농도의 H₂O₂나 radical-producing oxidants를 세포에 처리하였을 때 방어하는 단백질들이 유도되어 oxidant들에 저항성과 적응력이 생성된다. *Rhodobacter sphaeroides* (Terzenbach and Blaut, 1998)는 열이나 starvation 또는 ethanol을 전처리 하였을 때 oxidative stress에 좀더 잘 견뎌 낼 수 있다는 보고가 있고 100 μM의 H₂O₂를 넣어 전처리하였을 때 다섯 배의 catalase 활성이 증가한다고 보고하고 있다. *R. rubrum*에 100 μM의 H₂O₂로 전처리한 후 H₂O₂를 농도별로 처리하였을 때 전처리하지 않은 cell에 비하여 적어도 3배 이상의 catalase activity를 보였다 (Fig. 10). 그리고 최대로는 5배 가까이도 증가함을 볼 수가 있었는데 이는 *Rhodobacter sphaeroides*에서 전처리한 결과와도 일치함을 알 수 있었다.

그리고 *E. coli* (Demple *et al.*, 1983)와 *B. subtilis* (Dowds *et al.*, 1987)에서도 마찬가지로 전처리한 H₂O₂에 대한 catalase 활성능력이 증가함이 보고되어 있고, *Streptomyces coelicolor* (Muller) (Lee *et al.*, 1993)의 유사한 실험결과도 본 실험의 결과와 일치하였다.

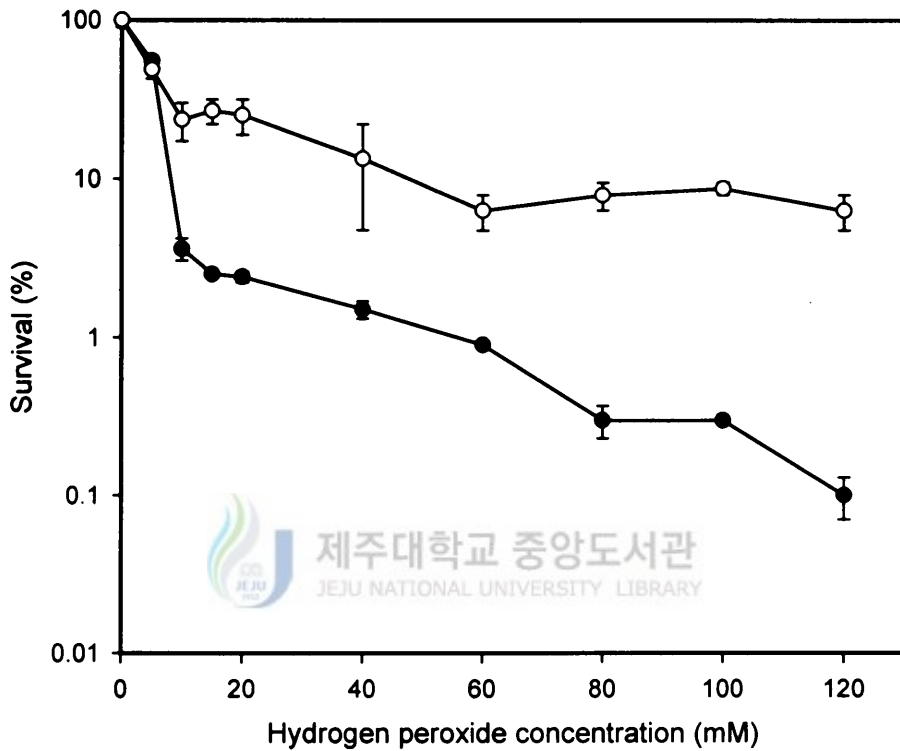


Fig. 8. Survival of *R. rubrum* in early exponential (●) and stationary growth phase (○) after 1hr treatment of hydrogen peroxide at the various concentrations. Data are the means of three experiments (\pm SE).

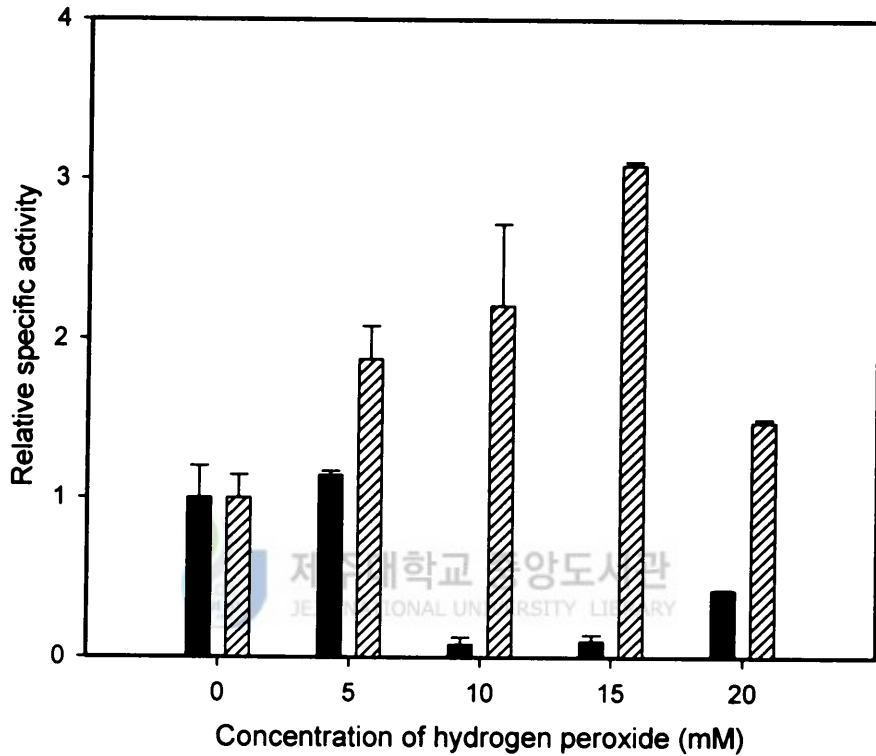


Fig. 9. Comparison of catalase activities of crude extracts from *R. rubrum* of exponential (■) and stationary phases (▨). Cells of different growth phases were treated with hydrogen peroxide of indicated concentrations for 1hr before harvest and activity assay. Data are the means of three experiments (\pm SE).

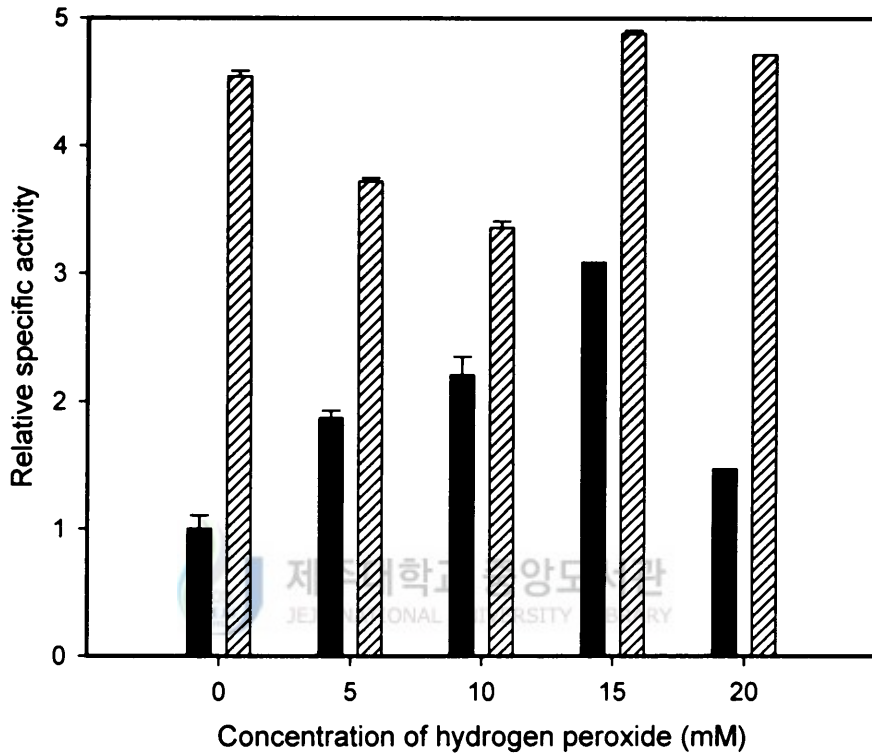


Fig. 10. Comparison of catalase activities of crude extracts from *R. rubrum* grown with (▨) and without (■) hydrogen peroxide ($100\ \mu\text{M}$) at the beginning of culture. Cells of each culture were treated with hydrogen peroxide of indicated concentrations for 1hr before harvest and activity assay. Data are the means of three experiments ($\pm\text{SE}$).

8. Catalase의 세포 내 위치

Chloroform을 이용하여 periplasmic부분과 cytoplasmic부분에 있는 catalase를 조사한 결과 Cat5가 periplasmic부분에 존재하는 것을 확인할 수가 있었다. Cat5는 periplasmic부분과 cytoplasmic부분에 모두 존재하는 것으로 확인이 되었고, 그 외의 Cat2, Cat3, Cat4는 cytoplasmic부분에 존재하는 것이 확인되었다 (Fig. 11). 그리고 Cat1은 periplasmic과 cytoplasmic부분 모두에서 보이지 않고 있는데, chloroform을 이용하여 분리하는 과정 중에 변성된 것으로 추정된다. Catalase의 세포 내 위치는 *Pseudomonas syringae* (Klotz *et al.*, 1992)에서도 확인되고 있는데, *R. rubrum*이 그람음성세균이므로 가질 수 있는 특성으로 판단된다.

9. 탄소원에 따라 유도된 catalase 활성의 비교 분석

미생물들, 특히 세균들은 그 종류와 환경에 대한 적응 및 대사 능력이 다양하므로 catalase가 탄소원에 따라 다양하게 변화할 수 있는 가능성이 충분히 있다. 탄소원에 따른 catalase의 유도를 보기 위하여 기본배지에 탄소원으로 DL-malic acid, fructose, lactate, L-glutamate, succinate, pyruvate, ethanol, acetate를 3%씩 넣어 배양한 후 catalase의 활성을 측정 한 결과 L-glutamate에서 가장 큰 활성을 보였고, lactate와 acetate, pyruvate에서도 높은 활성을 보였다. L-glutamate에서는 기본배지인 malic acid보다 80배 가까이 활성이 증가되었고, 특이하게도 6개의 catalase를 확인 할 수가 있었는데 이것으로 *R. rubrum*은 5개 이상의 catalase를 갖고 있는 것으로 사료된다 (Table 1, Fig. 12). 이러한 결과는 *E. coli* (Hassan and Fridovich, 1978)와, *Acinetobactor sp.* JC1 (Shin *et al.*, 1994)의 탄소원에 따른 catalase의 변화와 일치하는데, *E. coli*에서는 glucose에 의해 catalase의 활성이 억제되고 여러 가지 탄소원에 따라 다른 catalase의 활성을 보인다고 보고되어 있고 (Hassan and Fridovich, 1978), *Acinetobactor sp.* JC1의 경우 포도당을 이용하여 성장할 때는 세

개의 catalase 생성되나 CO 또는 메탄올을 이용하여 성장할 때는 두 개의 catalase만을 생성한다고 보고되어 있다 (Shin *et al.*, 1994). Fig. 12를 보면 탄소원에 따라 매우 다른 양상의 catalase 활성을 볼 수 있었다. 그러나 활성의 변화는 다양했지만 기본적인 catalase의 band는 일정하였고 그중 Cat2는 모든 탄소원에서 유사한 활성을 보였다. *R. rubrum*은 탄소원의 대사과정에 따라 약간의 다른 catalase 활성이 나타나는 것으로 생각된다.





Fig. 11. Discontinuous nondenaturing PAGE (8%) of different cell fractions of *R. rubrum* showing catalase activity. Lanes A, periplasmic; B, cytoplasmic fraction.

Table 1. Effect of various carbon sources on catalase activity of *R. rubrum*

| Carbon source | Catalase specific activity (U/mg protein) | Cell yield (OD ₆₈₀) |
|---------------|---|------------------------------------|
| Malic acid | 25.47 | 1.328 |
| Fructose | 35.66 | 0.974 |
| Lactate | 595.01 | 0.827 |
| L-Glutamate | 2097.85 | 1.071 |
| Succinate | 65.48 | 0.983 |
| Pyruvate | 199.77 | 1.032 |
| Ethanol | 27.23 | 0.543 |
| Acetate | 251.72 | 0.302 |

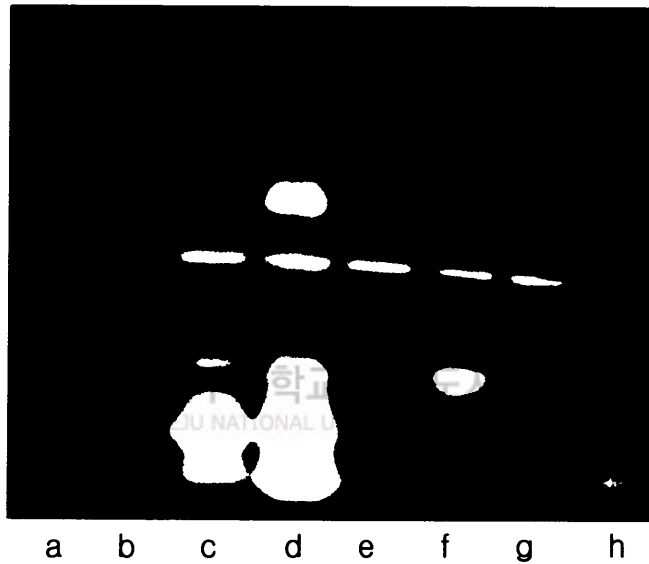


Fig. 12. Activity staining of catalases after nondenaturing PAGE of crude extracts from *R. rubrum* grown on various carbon sources. Lanes a, malic acid; b, fructose; c, lactate; d, L-glutamate; e, succinate; f, pyruvate; g, ethanol; h, acetate. *R. rubrum*, precultured on PYS medium, was inoculated for main culture on each carbon source.

요 약

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170을 호기배양하여 생성되는 catalase의 몇 가지 특성을 조사하였다. *R. rubrum*을 호기배양하였을 때 여러 개의 catalase를 갖고 있는 것을 확인하였다. Malic acid를 유일한 탄소원으로 사용하여 호기배양한 경우, 5개의 catalase (Cat1, cat2, Cat3, Cat4, Cat5)를 갖고 있었고, 혐기배양한 경우 2개의 catalase (Cat2, Cat4) 만을 갖고 있었다. 그리고 Cat3와 Cat4는 catalase-peroxidase 활성을 갖고 있었고, 그 외 Cat1, Cat2, Cat5는 typical catalase 활성을 갖고 있었다. Cat1, Cat2, Cat3, Cat4 그리고 Cat5의 분자량은 각각 337kDa, 282kDa, 235kDa, 188kDa, 그리고 150kDa였다. 호기배양한 *R. rubrum*은 낮은 정지기에서 최대 catalase 활성을 보였고 (약 $705\text{U} \cdot \text{mg protein}^{-1}$), 혐기배양하였을 때 낮은 지수기에서 최대 catalase 활성을 보였다 (약 $109\text{U} \cdot \text{mg protein}^{-1}$). 효소활성의 최적 조건은 30°C , pH 9.0이었으며, 넓은 범위의 온도 (30°C - 60°C)와 pH (6.0-10.0)에서 상당한 안정성을 보였다. 과산화수소를 기질로 한 효소의 K_m 값은 약 10mM로 측정되었다. *R. rubrum*은 정지기일 때 지수기보다 과산화수소에 대한 강한 저항성을 갖고 있었다. 정지기인 세포에 15mM의 과산화수소를 한시간 동안 처리하였을 때 처리하지 않은 세포들 보다 3배의 catalase 활성이 증가함을 알 수 있었다. Catalase의 세포 내 위치를 조사한 바 cytoplasmic에는 Cat2, Cat3, Cat4가 확인되었고, Cat5는 cytoplasmic과 periplasmic 모두에서 확인되었다. Cat1은 변성되어 나타나지 않았다. 탄소원에 따른 catalase 활성은 L-glutamate에서 malic acid일 때보다 80배의 증가를 보였고, 높은 분자량의 6번째 catalase를 전기영동으로 확인하였다.

V. 참고문헌

- Ames, G. F-L., C. Prody, and S. Kustu. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* **166**: 6536-6544.
- Beers, R. F., and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
- Bose, S. K., H. Gest, and J. G. Ormerod. 1962. Light-activate hydrogenase activity in photosynthetic bacterium : A permeability phenomenon. *J. Biol. Chem.* **236**: 13-14.
- Brown. S. M., M. L. Howell, M. L. Vasil, A. J. Anderson, and D. J. Hassett. 1995. Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **177**: 6536-6544.
- Chary, P., and D. O. Natvig. 1989. Evidence for three differently regulated catalase genes in *Neurospora crass*: Effects of oxidative stress, heat shock, and development, *J. Bacteriol.* **171**: 2646-2652.
- Cheng, L., E. W. Kellogg, and L. Packer. 1981. Photo inactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.* **34**: 125-129.
- Claiborne, D. A., and I. Fridovich. 1979. Purification of o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**: 4245-4252.

- Claiborne, D. A., D. P. Malinowski, and I. Fridovich. 1979. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**: 11664-11668.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Demple, B., and J. Halbrook. 1983. Inducible repair of oxidative DNA damage in *E. coli*. *Nature* **304**: 466-468
- Dowds, B. C. A., P. Murphy, D. J. McCinnell, and K. M. Devine. 1987. Relationship among oxidative stress, growth cycle, and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 5771-5775.
- Farr, S. B., D. O. Navig, and T. Kogoma. 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**: 1309-1316.
- Farr, S. B., and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress in *Escherichia coli* and *Salminella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585
- Hassan, H. M., and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**: 6445-6450.
- Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge. 1986. Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-514.
- Hochman, A., and I. Goldber. 1991. Purification and characterization of catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1077**: 299-307.
- Hochman, A., and A. Shemesh. 1987. Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium

- Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* **262**: 6871-6876.
- Imlay, J. A., and S. Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. **240**: 1302-1309.
- Jacob, G. S., and W. H. Orme-Johnson. 1979. Catalase of *Neurospora crassa*. I. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry*. **18**: 2967-2975.
- Jouve, H. M., C. Lasouniere, and J. Pelmont. 1983. Properties of a catalase from a peroxide-resistant mutant of *Proteus mirabilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **62**: 1219-1227.
- Katsuwon, J., and A. J. Anderson. 1990. Catalase and superoxide dismutase of root-colonizing sarophytic fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3576-3582.
- Klotz, M. G., and S. W. Hutcheson. 1992. Multiple periplasmic catalases of phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringe*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2468-2473.
- Lee, J. S., Y. C. Hah, and J. H. Roe. 1993. The induction of oxidative Enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1013-1018.
- Loewen, P. C., and J. Switala. 1987a. Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **65**: 939-947.
- Loewen, P. C., and J. Switala. 1987b. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **66**: 707-714.
- Loewen, P. C., and J. Switala. 1987c. Multiple catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3601-3607.
- Loewen, P. C., 1984. Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli*

- mutants and genetic mapping of *katE*, 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 HP I and HP II in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 144-149.
- Loewen, P. C., and J. Switala. 1986. Purification and characterization of catalase HP II from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 638-646.
- 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.
- Nadler, V., I. Goldgerg, and A. Hochman. 1986. Comparative study of bacterial catalases. *Biochim. Biophys. Acta.* **882**: 234-241.
- Park, Y. B., and Y. H. Han. 1997. Increased activities of SOD and catalase on aerobic growth in *Arcobacter nitrofigilis*. *Kor. J. Microbiol.* **35**: 239-240.
- Roe, J. H., J. S. Lee, H. P. Kim, and Y. C. Hah. 1991. Responses of *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide stress. *Proceedings of Seoul conference on Actinomycetes.* 33-44.
- Schellhorn, H. E., and H. M. Hassan. 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**: 4286-4292.
- Seah, T. C. M., R. Bhatti, and J. G. Kaplan, 1973. Novel catalatic proteins of baker's yeast. I. An atypical catalase. *Can. J.*

- Biochem.* **51**: 1551-1555.
- Shin, K. J., Y. T. Ro, and Y. M. Kim. 1992. Catalase in *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 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.
- Vattanaviaboon, P., W. Praituan, and S. Mongkolsuk. 1995. Growth phase dependent resistance to oxidative stress in a phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1043-1037.
- Wayne, L. G., and G. A. Diaz. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalases in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* **157**: 89-92.
- Yumoto, I., Y. Fukumor, and T. Yamanaka. 1990. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*. *J. Biochem.* **108**: 583-587.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저를 끊임없이 지도와 사랑으로 이끌어주신 오덕철 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 기꺼이 심사를 맡아 미흡한 논문을 다듬어주신 김원택 교수님과 고석찬 교수님께도 감사드립니다. 언제나 사랑으로 지도편달을 아끼지 않으셨던 허인옥 교수님, 오문유 교수님, 이용필 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 김세제 교수님께도 감사드립니다. 그리고 항상 따뜻한 눈길로 저에게 큰 힘이 되어주신 여의주 교수님과 조문제 교수님께도 감사드립니다.

까불거리는 후배 때문에 고생 많이 하신 이동현 선생님, 정배오빠, 윤석오빠, 병준오빠 그리고 강형일 선생님께도 감사드립니다. 그리고 언제나 티격태격 거리면서도 진심으로 저를 걱정해주고 도와준 상현오빠, 지권오빠, 그리고 가까이에서 많은 충고와 격려를 해주신 미희선생님과 여러 대학원 선배님들에게도 감사드립니다.

항상 옆에 있어주고, 힘들 때마다 나에게 용기를 주었던 영탁오빠에게도 진심으로 감사드립니다. 밤늦게 집에 갈 때마다 잠자지 않고 나를 기다리던 동생들 (은지, 지우, 현아, 정훈) 고맙다. 그리고 언제나 사랑의 눈길로 나를 이끌어주신 부모님께 이 논문을 바칩니다.