

광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum* S1이 생성한 Catalase-Peroxidase의 부분 정제 및 특성 규명

김영미¹, 이동현¹, 강형일^{1,2}, 오덕철^{1,2*}

제주대학교 자연과학대학 생물학과¹, 기초과학연구소²

호기적으로 배양한 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum* S1은 5 가지의 catalase를 생성함을 알 수 있었다. 그 중 peroxidase의 기능도 동시에 갖는 catalase-peroxidase(Cat-3)를 부분 정제하고 그 특성을 조사하였다. 부분정제된 catalase-peroxidase의 수율은 catalase가 1.6% 그리고 peroxidase가 5.1% 였으며, 정제 배수가 4.6배와 14배로 증가한 효소를 얻을 수 있었는데, catalase보다 peroxidase의 정제배수가 더 높았다. pH에 대한 영향은 catalase활성은 pH6에서, peroxidase활성은 pH5에서 가장 높게 나타났다. 온도에 대한 영향은 catalase와 peroxidase 활성이 모두 30°C에서 최고의 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 온도에 대한 효소의 안정성은 50°C에서 catalase가 peroxidase보다 더 안정함을 알 수 있었다. 부분정제된 catalase-peroxidase에 유기용매와 10mM 3-amino-1,2,4-triazole을 처리한 결과, 유기용매에 대해 catalase의 활성은 79%, peroxidase의 활성은 85%까지 억제됨을 알 수 있었으며, 10mM 3-amino-1,2,4-triazole에 대한 각 효소의 활성은 그대로 유지되고 있었다. 전형적인 heme단백질 효소들의 저해제로 알려진 NaCN, NaN₃, NH₂OH를 농도별로 처리한 결과, NaCN인 경우 catalase는 8.72×10^{-6} M의 농도에서, peroxidase는 5.1×10^{-6} M의 농도에서, NaN₃에서 catalase는 4.2×10^{-7} M, peroxidase는 3.2×10^{-7} M, NH₂OH에서는 catalase인 경우는 2.0×10^{-7} M, peroxidase인 경우는 2.5×10^{-7} M 농도에서 억제되었으며, 이들 저해제들은 catalase활성과 peroxidase활성을 동시에 저해하는 것으로 나타났다.

I. 서 론

산소는 호기성 생물이 살아가는데 없어서는 안될 필수적인 요소이지만, 때로는 생체 내에서 반응성이 큰 superoxide anion(O₂⁻)이나 과산화수소(H₂O₂) 또는 hydroxyl radi-

cal(OH⁻)을 생성하여 DNA, RNA, 단백질등과 반응함으로써 돌연변이를 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 ;

Key words □ Catalase-peroxidase, Photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* S1
*Corresponding Author ; Tel : 064)754-3524 E-mail : duckoh@cheju. cheju. ac. kr

Brown *et al.*, 1981). 그러나 세포는 이러한 활성 산소들에 대한 효소적 방어기작과 비효소적 방어기작을 가지고 있다. 효소적 방어기작에는 catalase, peroxidase, superoxide dismutase 등이 관여하며, 비효소적 방어기작으로는 glutathion(GSH)과 thioredoxin 등이 있다(Meister and Anderson, 1983).

Catalase는 미생물에서 고등동물에 이르기까지 광범위하게 존재하며, 다양한 종으로부터 분리되고 연구되어왔다. 고등동물로부터 분리된 catalase는 서로 유사한 반면에 미생물에 존재하는 catalase는 매우 다양하며, 하나의 생명체안에 여러 종류의 catalase가 존재하기도 한다(Hochman and Goldberg, 1991). 지금까지 미생물에서만 발견된 catalase-peroxidase는 catalase와 peroxidase활성을 동시에 가지는 효소로 전형적인 catalase와는 다른 특성을 가지고 있다(Hochman and Goldberg, 1991). 또한 구조적으로 전형적인 catalase와는 다르기 때문에 생리화학적 특성에 있어서도 차이가 있는데, pH 6~8의 좁은 범위에서 활성을 나타내며, 온도와 유기용매에 민감하고, 전형적인 catalase 저해제인 3-amino-1,2,4-triazole에 의해 저해받지 않는다고 하였다(Claiborne *et al.*, 1979 ; Goldberg *et al.*, 1989; Yumoto *et al.*, 1990; Shin *et al.*, 1994). Catalase-peroxidase에 대한 연구는 *Rhodospseudomonas capsulata* (Hochman and Shemesh, 1987), *Escherichia coli* (Claiborne and Fridovich, 1979), *Bacillus strearothermophilus* (Loprasert *et al.*, 1989), *Chlorobium* (Hochman and Goldberg, 1991), *Klebsiella pneumoniae* (Hochman and Goldberg, 1991),

Halobacterium halobium (Brown-Peterson and Salin, 1993), *Mycobacterium smegmatis* (Marcinkeviciene *et al.*, 1995), *Streptomyces* sp.(Youn *et al.*, 1995), *Deinococcus radiophilus* (Lee *et al.*, 1995), *Synechocystis* PCC 6803 (Gunther *et al.*, 1999) 등 여러 미생물에서 순수분리되고 생화학적 특성이 규명되었다. 이와 같이 여러 미생물에서 두가지 이상의 서로 다른 catalase가 존재하는 것으로 알려져 있다(Lowen *et al.*, 1987). 그러나 미생물들의 다양한 대사능력과 환경에 대한 높은 적응성을 고려해 볼 때 지금까지 보고된 catalase와는 다른 종류를 가지고 있을 가능성이 있다.

비유황 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*은 광의 유무에 따라 혐기적 광합성이나 호기적 호흡으로 성장할 수 있으며, 광이 없고 혐기적 조건에서도 발효에 의해 성장할 수 있다(Oelze *et al.*, 1976; Olsen *et al.*, 1968; Uffen *et al.*, 1970; van Niel *et al.*, 1941). 이러한 다양한 대사능력을 가지고 있는 광합성세균에서의 catalase-peroxidase에 대한 연구는 *Rhodospseudomonas capsulata* (Hochman and Shemesh, 1987)외에 보고된 바 없다.

본 실험은 호기적 조건에서 성장한 *Rhodospirillum rubrum* S1에 존재하는 catalase-peroxidase를 부분정제하여 몇가지 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양조건

Rhodospirillum rubrum ATCC 11170(S1)을 30°C, 암소에서 2일간 Bose 등(1962)의 배

지에서 호기적으로 진탕배양한 후 새 배지로 옮겨 다시 3일간 동일조건으로 배양한 후 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

2. 조효소의 추출

대수기 후기때의 배양액을 냉동원심분리기로 4 °C에서 6,000 xg로 30분간 원심분리하여 세균을 수집한 후 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 3~4회 세척하였다. 수집된 균은 초음파 파쇄기(Bandelin sonopuls HD2070)를 이용하여 파쇄시켰다. 파쇄된 균은 다시 4°C에서 1시간 동안 10,000 xg로 원심분리한 후 상정액을 수집하여 조효소액으로 하였다.

3. Catalase-Peroxidase의 부분 정제

조효소액을 25% ammonium sulfate를 처리하여 원심분리한 후 상정액을 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 상정액을 정제단계의 시료로 사용하였다. 전처리하여 얻은 조효소액을 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피(2.5×30cm, 30mL/hr, 5mL/fraction, 50mM potassium phosphate buffer, pH 6.8), Sephadex G-200 젤 여과 크로마토그래피(1×90cm, 10 mL/hr, 2mL/fraction, 50mM potassium phosphate buffer, pH 6.8), Phenyl-Sepharose CL-4B 크로마토그래피(2.5×10cm, 20mL/hr, 2 mL/fraction, 10mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)으로 부분 정제하였다.

4. 단백질 정량

단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry(1951)방법으로 측정하였고, Column fraction의 단백질 농도는 280nm에서의 흡광도로 정량하였다.

5. 효소의 활성도 측정

Catalase의 활성은 H₂O₂의 분해결과로 나타나는 240nm에서의 흡광도 감소로 활성도를 계산하였다. 효소의 활성 단위는 1분동안 1μmol의 H₂O₂(ε₂₄₀=43.6 M⁻¹cm⁻¹)를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 정의 하였다(Beers and Sizer, 1952).

Peroxidase의 활성은 o-dianisidine을 기질로 사용하여 460nm에서의 흡광도 증가로 활성도를 계산하였다. 효소의 활성단위는 1분동안 1μmol의 o-dianisidine(ε₄₆₀=11,300 M⁻¹cm⁻¹)를 변환시키는 효소의 양을 1 unit로 정의 하였다(Caliborne and Fridovich, 1979).

Non-denaturing gel 상에서의 catalase의 활성염색은 ferricyanide를 이용한 Wayne과 Diaz(1986)의 방법에 따라 염색하였고, peroxidase의 활성염색은 o-dianisidine을 이용한 Caliborne and Fridovich(1979)의 방법에 따라 염색하였다.

6. 효소의 활성도에 대한 pH와 온도의 영향

pH에 대한 영향은 pH 3~12 사이의 approximate universal buffer(0.2M boric acid와 0.05M citric acid 그리고 0.1M trisodium orthophosphate)를 1단위 간격으로 준비하여 부분정제한 catalase-peroxidase의 효소에 기

질을 넣고, 상온에서 catalase 활성과 peroxidase 활성을 각각 240nm와 460nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다. 온도에 대한 영향은 30~80°C구간에서 10°C간격으로 효소반응을 수행하여 최적 반응 온도를 조사하였고, 온도에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 온도에서 1시간 동안 처리한 후 catalase 활성과 peroxidase의 활성을 각각 240nm와 460nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다.

7. 효소의 활성도에 대한 저해제들의 효과

3-amino-1,2,4-triazole을 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 10mM이 되도록 녹인 후, 적당량의 효소 시료를 넣고 10분간 상온에서 보관한 후, catalase와 peroxidase 활성을 측정하였다. 유기용매에 대한 효과는 효소시료, ethanol, chloroform을 10:5:3으로 혼합시킨 후, 실온에서 10분 동안 vortex하여 각각 catalase 활성과 peroxidase의 활성을 각각 240nm와 460nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다.

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

III. 결과 및 고찰

1. 효소의 순수분리

호기적 조건에서 성장한 *R. rubrum* S1은 5개의 catalase(Cat-1, Cat-2, Cat-3, Cat-4, Cat-5)를 생성하고 있음을 알 수 있었고(결과 미

제시) 그 중 한개의 catalase(Cat-3)는 catalase-peroxidase 특성을 나타내었다.

호기적 조건에서 성장한 *R. rubrum* S1의 세포를 수확하고 분쇄한 후 25~70% ammonium sulfate를 처리하여 단백질을 농축하였다. DEAE-cellulose 음이온 교환 크로마토그래피, Sephadex G-200 젤 여과 크로마토그래피, Phenyl-Sepharose 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행한 결과, 효소의 활성이 가장높은 분획을 모아서 부분정제하였다. 효소의 활성이 높은 분획은 효소의 활성측정을 이용하여 결정하였으며, 또한 전기영동을 수행한 후에 활성염색을 하여 원하는 band를 확인하였다. 이와 같이 세단계의 크로마토그래피방법으로 부분정제한 catalase와 peroxidase의 수율은 catalase는 1.6% 그리고 peroxidase는 5.1%였으며, 정제 배수(purification fold)가 4.6배와 14배로 증가한 효소시료 0.3mg을 얻을 수 있었는데(Table 1), catalase보다 peroxidase의 정제배수가 더 높았다. 이렇게 네단계의 크로마토그래피를 행하여 얻은 부분정제된 시료를 젤 전기영동 후 활성염색을 하여 확인한 결과 하나의 단일 band(catalase-peroxidase)를 얻을 수 있었다(Fig. 1).

2. 효소활성에 대한 pH와 온도의 영향

pH 3.0~12까지 pH농도를 변화시켜 활성을 조사해 본 결과, 부분 정제된 효소의 catalase-peroxidase에서 최고의 catalase활성은 pH 6.0에서 peroxidase는 pH 5.0에서 최고의 활성을 나타내었다(Fig. 2A). Catalase활성이 pH 5.0~7.0사이에서 50% 이상을 나타내는

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

	Total protein (mg)	Catalase				Peroxidase			
		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	37,626	448	1	100	11,798	141	1.0	100
Ammonium sulfate(25-70%)	37	22,592	611	1.4	60	8,606	233	1.6	72.9
DEAE-cellulose	20	19,768	988	2.2	53	5,512	276	2	46.7
Sephadex G-200	1.5	2,486	1,657	3.7	6.6	2,168	1,446	10	18.4
Phenyl-Sepharose	0.3	640	2,067	4.6	1.6	596	1,987	14	5.1

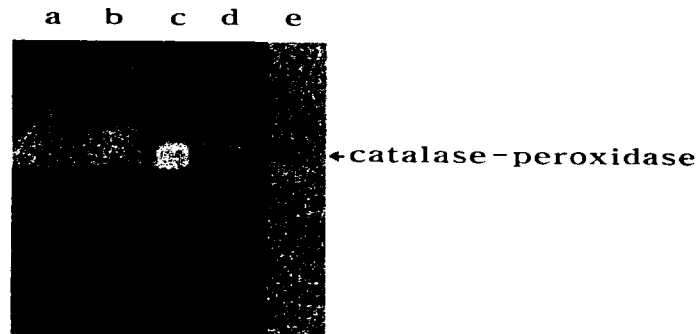


Fig. 1. 7.5% polyacrylamide electrophoresis of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1 at each purification step.

Catalase activity staining (a, crude extract; b, DEAE-cellulose; c, Sephadex G-200; d, Phenyl-Sepharose CL-4B), Peroxidase activity staining (e, Phenyl-Sepharose CL-4B)

반면에, peroxidase활성은 pH 5~6에서 높은 활성을 보였다. 또한, catalase 활성과 peroxidase 활성은 모두 좁은 범위에서만 상대적으로 높은 활성을 나타내고 있다. 이는 대부분의 전형적인 catalase들의 활성이 넓은 pH에 대해 높은 활성을 보이나, 다른 세균들에서 catalase-peroxidase의 최적 pH를 보면 *E.*

*coli*의 HP I은(Claiborne and Fridovich,1979)는 pH 7.5, *Klebsiella pneumoniae*는 pH 6.3 (Hochman and Goldberg, 1991), *Rps. capsulata*는 peroxidatic activity는 pH 5.0~5.3이고 catalatic activity는 pH 6.0~6.5 (Hochman and Shemesh, 1987), *Streptomyces cyaneus*는 pH 8.0 (Mliki and Zimmermann, 1992), *Halo-*

bacterium halobium(Brown-peterson and Salin, 1993)은 catalase인 경우 좁은 범위의 pH 6.0~7.5, peroxidase인 경우 넓은 범위 pH 6.5~8.0, 에서 나타나는 경우와 같이 *R. rubrum* S1에서도 특정 pH에서만 활성이 높게 관찰된 것으로 보아 이러한 차이가 전형적인 catalase와는 다른 catalase-peroxidase의 특징으로 생각된다.

효소활성에 대한 최적온도를 30°C~80°C까지 10°C간격으로 측정한 결과 부분정제된 catalase-peroxidase에서 catalase의 활성과 peroxidase의 활성이 모두 30°C에서 최고의 활성을 보여 최적온도가 30°C임을 알 수 있었다(Fig. 2B), 또한 온도 변화에 따른 효소의 안정도는 30°C보다 40°C에서 활성이 높았으며, catalase활성은 40°C부터 60°C까지 완만하게 저하되었지만 peroxidase의 활성은 40°C부터 갑자기 저하되어 catalase activity가 peroxidase activity보다 온도에 더 안정적임을

알 수 있었다. 이러한 결과는 *Deinococcus radiophilus*(Lee et al., 1995)인 경우 50°C이상에서, *Halobacterium halobium*인 경우 40°C이상에 급격히 감소한다고 결과보고와 유사하여, *Escherichia coli* (Hochman and Shemesh, 1987), *Bacillus strearothermophilus* (Loprasert et al., 1989), *Chlorobium* (Hochman and Goldberg, 1991), *Klebsiella pneumoniae* (Hochman and Goldberg, 1991), *Mycobacterium smegmatis* (Marcinkeviciene et al., 1995), *Streptomyces sp.*(Youn et al., 1995), *Synechocystis* PCC 6803 (Gunther et al., 1999)에서 발현되는 catalase-peroxidase의 경우 온도에 민감하게 반응한다는 결과와 같이 *R. rubrum* S1의 catalase-peroxidase도 온도에 민감한 특성을 보이고 있었다. 또한 이 효소의 최적온도가 생장 온도인 30°C와 관련이 있음을 추측하게 해준다.

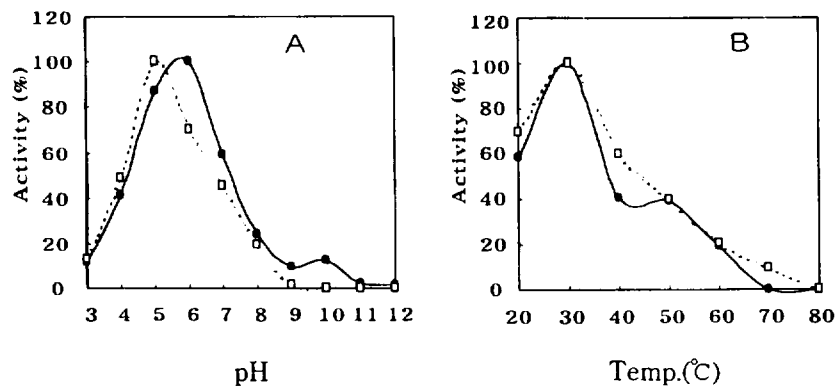


Fig. 2. Effect of pH(A) and temperature(B) on catalase or peroxidase activity of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1.

— ● — catalase activity ... □ ... peroxidase activity

3. 효소 활성에 대한 저해제들의 효과

부분정제한 catalase-peroxidase에 전형적인 catalase의 활성을 저해하는 것으로 알려진 10mM 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 79

%, peroxidase는 활성은 85%까지 억제되었다(Table 2). 위의 결과는 *Rhodopseudomonas capsulata* (Hochman and Shemesh, 1987), *Klebsiella pneumoniae* (Hochman and Goldberg, 1991), *Escherichia coli* (Hochman and Shemesh, 1987), *Halobacterium halobium* (Brown-Peterson and Salin, 1993), *Deinococcus radiophilus*(Lee et al., 1995)에서 보고한 catalase-peroxidase의 특성과도 일치함을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of chemical inhibitors on catalase or peroxidase activity of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1

Chemical inhibitors	Catalase activity(%)	Peroxidase 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 20min.

b : The enzyme solution was mixed with organic solvents to give a final composition of enzyme solution: ethanol:chloroform = 10:5:3, and then vortexed for 20min at room temperature.

전형적인 heme단백질 효소들의 저해제로 알려진 NaCN, NaN₃, NH₂OH을 농도별로 준비함으로써 catalase와 peroxidase활성을 측정하여 각각에 대한 표준곡선을 그린 후, 각 활성을 50% 억제하는 농도를 구하였다(Fig.3).

NaCN인 경우 catalase는 8.72×10^{-6} M의 농도에서, peroxidase는 5.1×10^{-6} M의 농도

에서, NaN₃에서 catalase는 4.2×10^{-7} M, peroxidase는 3.2×10^{-7} M, NH₂OH에서는 catalase인 경우는 2.0×10^{-7} M, peroxidase인 경우는 2.5×10^{-7} M 농도에서 억제되었으며, 이들 저해제들은 catalase활성과 peroxidase활성을 동시에 저해하는 것으로 나타났다(Table 3).

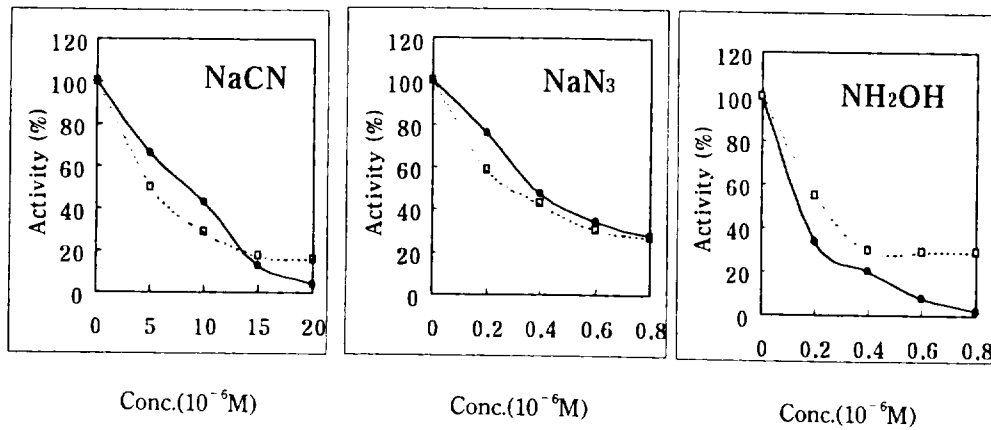


Fig 3. Effect of heme protein inhibitors on catalase or peroxidase activity of the partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1. The enzyme activity was assayed with concentrations of NaCN, NaN₃ and NH₂OH.

— ● — catalase activity ··· □ ··· peroxidase activity

Table 3. Effect of metal inhibitors on catalase or peroxidase activity of partially purified catalase-peroxidase from *Rhodospirillum rubrum* S1

Metal inhibitor	Metal inhibitor concentration(M) required for 50% inhibition of the enzyme activity	
	Catalase activity	Peroxidase 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}

이러한 결과는 *Deinococcus radiophilus*(Lee *et al.*, 1995)에서는 8.1×10^{-6} M cyanide, 2.9×10^{-7} M azide, 2.7×10^{-7} M hydroxylamine, *Halobacterium halobium*(Brown-peterson and Salin, 1993)에서 catalase인 경우 5×10^{-7} M KCN, 6.7×10^{-7} M NaN₃, peroxidase인 경우 3×10^{-7} M KCN, NaN₃, 농도에서 억제하다는 보고와 유사하나 홍색 비유황 광합성 세균인 *Rhodospseudomonas capsulata*에서 cata-

lase인 경우 2.2×10^{-5} M cyanide, 1.5×10^{-4} M azide, 2.15×10^{-6} M hydroxylamine, peroxidase인 경우 2.2×10^{-5} M cyanide, 1.5×10^{-4} M azide, 2.15×10^{-6} M hydroxylamine 농도에 억제한다는 결과(Hochman and Shemesh, 1987)와 차이점을 보이고 있는데 이는 catalase-peroxidase가 구조적으로 단백질 내부의 Heme 위치에 따라 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

IV. 참 고 문 헌

- Beers, Jr. 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.
- 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, 1993. Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. *J. Bacteriol.* 175, 4197-4202.
- Claiborne, D. A., and Fridovich. 1979. Purification of o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 254, 4245-4252.
- Farr, S. B., and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55, 561-585
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radical. *Science* 201, 875-880
- Goldberg, I., and A. Hochman. 1989. Three different types of catalase in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 124-128.
- Gunther Regelsberger, Christian Obinger, Roland Zoder, Friedrich Altmann, Gunter A. Peschek. 1999. Purification and Characterization of a hydroperoxidase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: identification of its gene by peptide mass mapping using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 1-12.
- Halliwell, B., and Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14
- Hochman, A., A. Figueredo, and J. D. Wall. 1992. Physiological functions of hydroperoxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 174, 3386-3391.
- Hochman A., and I. Goldberg. 1991. Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1077, 298-307.
- Hochman, A., and A. Shemesh. 1987. Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 262, 6871-6876.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural

- proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, I-J., and Y. N. Lee. 1995. Purification and characterization of catalase-3 of *Deinococcus radiophilus*. *J. Microbiol.* 33, 239-243.
- Loewen, P. C., J. Switala and B. L. Triggs-Raine. 1985. Catalase HP I and HP II of *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.
- Loprasert, P. C., 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., Magliozzo, R. S. and Blanchard, J. S. 1995. Purification and characterization of the *Mycobacterium smegatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *J. Biol. Chem.* 270, 22290-22295.
- Meister, A., and Anderson, M. E. 1983. *Glutathion*. *Annu. Rev. Biochem.* 523, 711-760
- Mliki, A., and W. Zimmermann. 1992. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyanus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 916-919.
- Nadler, V., Goldberg, I., and A. Hochman. 1986. Comparative study of bacterial catalase. *Biochim. Biophys. Acta.* 82, 234-241.
- Oelze, J., and W. Pahlke. 1976. The early formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 108, 281-285.
- Olsen, I., and J. M. Merrick. 1968. Identification of propionate as endogenous CO₂ acceptor in *Rhodospirillum rubrum* and properties of purified propionyl coenzyme a carboxylase. *J. Bacteriol.* 95(4), 1774-1778.
- 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.
- Solaiman, D., and R. L. Uffen. 1982. Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Cell Physiol.* 30(4), 497-504.
- Thore, A., D. L. Keister, and A. S. Pietro. 1969. Studies on the respiratory system of aerobically(dark) and anaerobically(light) growth *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 67, 378-396.
- Uffen, R. L., and R. S. Wolfe. 1970. Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions. *J. Bacteriol.* 104, 462-472.

- Van Niel, C. B. 1941. The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. *Adv. Enzymol.* 1, 263-328.
- Wayne, L. G., and G. A. Diaz. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamid gels. *Anal. Biochem.* 157, 89-92.
- Youn, H. D., Yim, Y. I., Kim, K., Hah, Y. C., and Kang, S. O. 1995. Spectral characterization and chemical modification of catalase-peroxidase from *Streptomyces* sp., *J. Biol. Chem.* 270, 13740-13747.
- Yumoto, I., Fukumori, Y., and T. Yamanaka. 1990. Purification and characterization of catalase from a facultative alkaliphilic *Bacillus*. *J. Biochem.* 108, 583-587.

Partial Purification and Characterization of a Catalase-Peroxidase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1

Young-Mi Kim¹, Dong-Heon Lee¹, Hyung-Yeel Kahng^{1,2} and Duck-Chul Oh^{1,2}

Department of biology¹, College of Natural science, and Research Institute for Basic Sciences¹, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Five different catalases have been already found in the aerobically grown photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1. Among them, a bifunctional catalase-peroxidase, designated Cat-3 was partially purified and characterized. The enzyme was purified through four steps in 1.6% yield for catalatic activity and 5.1% yield for peroxidatic activity. On the basis of catalatic activity, the protein purification increased nearly 4.6-fold, whereas for peroxidatic activity, an approximately 14-fold purification was achieved. The optimum pHs of the catalatic and peroxidatic activities were 6 and 5, respectively, and the optimum temperature for both activities was 30°C. The catalatic activity of the enzyme maintained at 50°C for 1h was more stably than peroxidatic activity. The catalatic and peroxidatic activities were inhibited about 79% and 85% by exposure to organic solvent(ethanol/chloroform), respectively. Both enzymatic activities were not neally inhibited by 10mM 3-amino-1,2,4-triazole. Fifty percent 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.

Key words : Catalase-peroxidase, Photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* S1,