

포도당을 이용하여 성장하는 *Acinetobacter* sp. Strain JC1 DSM 3803에 존재하는 Catalase

신경주 · 노영태 · 김영민*

연세대학교 이과대학 생물학과

포도당을 이용하여 성장하고 있는 호기성 일산화탄소 산화 세균인 *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803에 존재하는 catalase의 활성은 지수성장기 중반에서 높게 나타났으나, 지수성장기 후반 및 정체기 초기에서 낮아졌다가 정체기 중기에서 급격히 증가한 후 다시 감소하였다. 이 세균에는 세종류(Cat1, Cat2, Cat3)의 catalase가 존재하였는데, Cat1과 Cat3의 활성은 성장시기에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 Cat2의 활성은 성장시기에 따라 큰 변화를 나타내었다. Cat3는 이 세균이 포도당을 이용하여 성장할 때만 생성되었고, 일산화탄소나 메탄올을 이용하여 성장할 때는 생성되지 않았다. 세포추출액을 ethanol과 chloroform으로 처리한 후 활성염색을 하였을 때 Cat1과 Cat3의 활성은 안정하였으나 Cat2는 활성을 상실하였다. 세포추출액을 20 mM H₂O₂와 3-amino-1,2,4-triazole (AT)을 처리하였을 때 Cat1과 Cat3의 활성이 반감되었고, Cat2는 H₂O₂에 의해서는 불활성되었으나 AT의 영향은 받지 않았다. Cat1은 80°C에서 1분간 열처리 후에도 활성을 나타내었으나, Cat2와 Cat3는 60°C와 70°C에서 1분간의 열처리 후 각각 활성을 상실하였다. Cat2는 catalase 활성외에 peroxidase의 활성도 나타내었다. 일곱단계의 과정을 거쳐 포도당에서 성장시에만 생성되는 Cat3를 정제하였다. 정제된 Cat3의 크기는 150,000이었고, 63,000의 크기를 가진 두개의 동일한 소단위로 구성되어 있었으며, H₂O₂에 대한 K_m값은 39 mM과 58 mM로 나타났다. 정제된 효소의 활성을 위한 최적 pH는 7.0이었으나 전반적으로 pH 6~9에서 비슷하게 높은 활성을 나타내었다. 정제된 효소의 최적온도는 40°C이었으며 20~50°C에서 비슷한 활성을 나타내었고, 30°C에서는 60분 동안 효소활성이 거의 상실되지 않았다. 정제된 효소는 ethanol과 chloroform 처리에는 안정하였으나 12 mM AT와 0.1 mM Na₂S₂O₃ 및 1 mM KCN에 의해 90% 이상의 활성이 억제되었다.

KEY WORDS □ *Acinetobacter* sp. JC1, catalase, carbon monoxide

산소는 호기성생명체의 성장에 있어서 없어서는 안될 중요한 요소이지만 때로는 이 산소가 반응성이 큰 superoxide anion (O₂⁻)이나 과산화수소 (H₂O₂) 또는 hydroxyl radical (OH·) 등으로 환원되어 생체 내의 DNA, RNA, 단백질 등과 반응함으로써 돌연변이를 유발시키거나 성장속도를 감소시키는 물론 심한 경우에는 세포의 죽음도 초래하는 등 치명적인 손상을 입히기도 한다(3-7, 15, 21, 26, 27). 이와 같은 활성화된 산소의 유독성에 대처하기 위하여 생물들은 여러가지 방어기작을 갖추고 있는데, 그 중 H₂O₂는 catalase에 의해 물과 산소로 분해되거나 peroxidase에 의해 세포내의 다른 물질을 산화시키면서 물로 전환된다.

Catalase는 고등동물에서부터 미생물에 이르기까지 광범위한 생물에서 발견되는데, 그 중에는 대부분의 동식물과 미생물에서 발견되고 서로 공통적인 특징을 가지고 있는 효소로서 catalase활성만 나타내는 typical catalase와 catalase 활성과 peroxidase활성을 함께 가지고 있는 hydroperoxidase (catalase-peroxidase) 등 두가지 유형의 catalase가 존재하고

있고(13, 19, 20, 22, 35, 36). 몇가지 종류의 미생물에는 두가지 이상의 서로 다른 catalase가 존재하는 것으로 알려져 있다(8, 10, 11, 14, 16, 20, 28-30, 40-42). 그러나 미생물, 특히 세균들은 그 종류와 환경에 대한 적응 및 대사능력의 다양성으로 미루어 현재까지 발견된 catalase와는 다른 종류의 catalase를 더 가지고 있을 가능성이 충분히 있다.

Acinetobacter sp. strain JC1 DSM 3803은 국내 토양에서 분리된 호기성 일산화탄소(CO) 산화세균으로 유기물은 물론 CO를 유일한 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있다(9). CO산화세균들에 대한 현재까지의 연구는 이 세균들의 CO산화기작을 생리, 생화학 및 분자생물학적인 측면에서 밝혀가고 있지만, 절대호기성세균이며 특이한 물질대사능력을 지닌 이들을 대상으로한 catalase에 대한 연구는 *Pseudomonas (Comamonas) compransoris*를 대상으로 한 연구외에는 전무하다(24, 33, 34, 38). 따라서 본 연구에서는 호기성 CO산화세균에 존재하는 catalase에 대한 폭넓은 연구는 물론, catalase의 다양성과 H₂O₂의 비독성화 기작에 대한 보다 깊은 이해를 돕기

위해 *Acinetobacter* sp. JC1에 존재하는 catalase의 다양성을 파악하고, 이 세균이 포도당을 이용하여 성장할 때에만 생성되는 catalase를 정제하여 몇가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

서울지역의 토양으로부터 분리한 호기성 CO산화 세균인 *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803 (9)을 30°C에서 0.2% 포도당 또는 0.5% 메탄올이 첨가된 염류배지 (23)에 접종하여 배양하거나, 염류배지에 세균을 접종한 후 30% CO-70% 공기의 혼합가스를 공급하면서 배양하였다.

세포추출액 제조

적절한 기질을 이용하여 성장하고 있는 세균을 4°C에서 10,000×g로 15분 동안 원심분리하여 모은 다음, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0, 표준완충용액)으로 두번 씻은 후, 표준완충용액에 재현탁하여 초음파로 분쇄하고, 재원심분리 (10,000×g/30 min/4°C)하여 상등액을 세포추출액으로 사용하였다.

Catalase 활성측정

Catalase의 활성은 H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 43.6 M^{-1}cm^{-1}$; 18)의 분해결과로 나타나는 240 nm에서의 흡광도의 감소를 분광분석기 (Hitachi U-2000)를 이용하여 1분간 측정하여 결정하였다 (2). 표준완충용액과 H_2O_2 (12.5 mM)를 먼저 혼합하여 30°C에서 30초간 반응시킨 후, 반응액의 최종용량이 1 ml가 되게 세포추출액을 첨가시킴으로써 반응을 시작하였다. 효소활성은 1분 동안 1 μ mol의 H_2O_2 를 분해하는 능력을 1 unit으로 표시하였고, specific activity는 단백질 1 mg당 unit값으로 정의하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등 (31)의 방법에 따라 정량하였다.

전기영동

Vertical slab gel 장치를 이용하여 Laemmli (25)의 방법에 따라 실시하였다. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)의 경우에는 sodium dodecyl sulfate (SDS)가 첨가되지 않은 7.5% acrylamide gel을 사용하였고, denaturing PAGE는 12.5% acrylamide에 SDS가 0.1% (w/v) 포함된 gel을 사용하였다. 전압은 시료가 stacking gel에 있을 때에는 100 V로, resolving gel에 있을 때는 150 V로 일정하게 유지하였고, 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 (CBB) 용액으로 염색하였다 (43).

활성염색

Catalase를 활성염색하기 위하여 효소용액을 non-denaturing PAGE한 후, gel을 표준완충용액 20 ml에 담고 horse radish peroxidase (50 μ g/ml)를 넣어

잘 섞어 45분 동안 상온에서 방치하였다. 여기에 H_2O_2 를 5 mM이 되게 첨가하여 다시 10분 동안 상온에 방치한 후에 용액은 버리고 gel을 증류수로 두번 씻어준 다음, diaminobenzidine을 0.5 mg/ml의 농도로 넣어 염색하였다 (12, 17).

Peroxidase를 활성염색할 경우에는 효소용액을 non-denaturing 전기영동을 한 후 gel을 표준완충용액 20 ml에 담고, 여기에 5 mM H_2O_2 를 첨가하여 15분 동안 상온에 방치한 후 catalase 활성염색방법과 동일한 과정을 거쳐 염색하였다.

유기용매와 H_2O_2 및 3-amino-1,2,4-triazole (AT)의 영향조사

세포추출액내에 존재하는 catalase에 대한 유기용매의 영향을 조사하기 위해 세포추출액을 95% (v/v) ethanol 및 99.9% (v/v)의 chloroform과 10:5:3의 비율로 혼합한 후 상온에서 10분간 vortex한 다음, 유기용매로 변성된 단백질을 원심분리 (10,000×g/5 min)하여 제거하고 상등액을 취하여 표준완충용액으로 4°C에서 12시간 동안 투석하였다. 투석한 세포추출액을 non-denaturing PAGE를 하고 활성염색하였다 (36).

세포추출액에 존재하는 catalase에 대한 H_2O_2 와 AT의 영향을 조사하기 위해 세포추출액을 H_2O_2 와 20 mM AT가 포함된 표준완충용액으로 4°C에서 3시간 동안 투석한 다음, AT를 제거하기 위하여 표준완충용액으로 4°C에서 12시간 동안 재투석한 후 non-denaturing PAGE를 하여 활성염색하였다.

Catalase의 순화

Acinetobacter sp. JC1이 포도당을 이용하여 성장할 때에만 생성되는 catalase를 정제하기 위한 모든 과정은 4°C에서 실시하였다. 포도당 최소배지에서 성장한 세균 73 g으로부터 제조한 세포추출액 292 ml를 50°C에서 3분간 열처리한 후 원심분리 (10,000×g/60 min)하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 protamine sulfate를 최종농도가 0.054%가 되도록 처리하고 초원심분리 (100,000×g/90 min)한 다음, 상등액에 최종농도가 20%가 되도록 황산암모늄을 첨가한 후 2시간 방치하였다. 이 용액을 원심분리 (10,000×g/30 min)하고, 상등액에 최종농도가 60% 되도록 황산암모늄을 더 첨가하여 2시간 동안 방치한 후 동일한 조건하에서 원심분리하여 침전물을 얻고, 이것을 소량의 표준완충용액에 녹였다. 이 시료를 1 M 황산암모늄이 첨가된 5 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 미리 평형화시킨 Phenyl-Sepharose column (3.2×19 cm)에 올린 다음, 0.5 M 황산암모늄이 첨가된 5 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0) 600 ml를 이용하여 먼저 용출시킨 후 (9.4 ml/cm²/hr), 0.5 M 황산암모늄이 첨가된 5 mM potassium phosphate 용액 (pH 7.0) 400 ml와 황산암모늄이 첨가되지 않은 동일 완충용액 400 ml를 이용하여 황산암모늄의 직선농도구배 (0.5~0.0 M)에 따라 9.4 ml/cm²/h의 속도로 용출시켰다. Cat3의 활성이 있는 분획을 모아

ultrafiltration (Amicon YM-10) 방법으로 농축한 후, 표준완충용액으로 12시간 투석 (500 ml씩 3회)하고 이 시료를 표준완충용액으로 미리 평형화시켜 놓은 Sephacryl S-300 column (1.8×110 cm)에 올려 놓고 표준완충용액을 이용하여 7.1 ml/cm²/h의 속도로 용출시켰다. Cat3의 활성을 나타내는 분획을 모아 다시 ultrafiltration (Amicon YM-10)으로 농축한 다음, 표준완충용액으로 평형화시켜 놓은 DEAE-Sephacel column (2.4×10 cm)에 올리고, 먼저 200 ml의 표준완충용액으로 용출한 다음, 500 ml의 표준완충용액에 포함된 KCl의 직선농도구배 (0~0.8 M)에 따라 13.3 ml/cm²/h의 속도로 용출시킨 후 Cat3의 활성이 있는 분획을 모아 ultrafiltration (Amicon YM-10)한 다음, 표준완충용액으로 12시간 동안 투석 (500 ml씩 3회) 후 순화된 효소로 사용하였다. 정제과정중 Cat3가 있는 분획은 먼저 catalase 활성을 나타내는 분획을 효소활성 측정법으로 찾아낸 다음, 그 분획들을 전기영동하여 활성염색함으로써 확인하였다.

결 과

성장시기에 따른 catalase의 발현

포도당을 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장하고 있는 *Acinetobacter* sp. JC1은 지수성장기 중기에서 비교적 높은 catalase 활성을 나타내었다. 그러나 이 활성은 지수성장기 후기와 정체기로 들어가면서 점차 낮아지다가 정체기 중기에서 갑자기 높아진 다음 다시

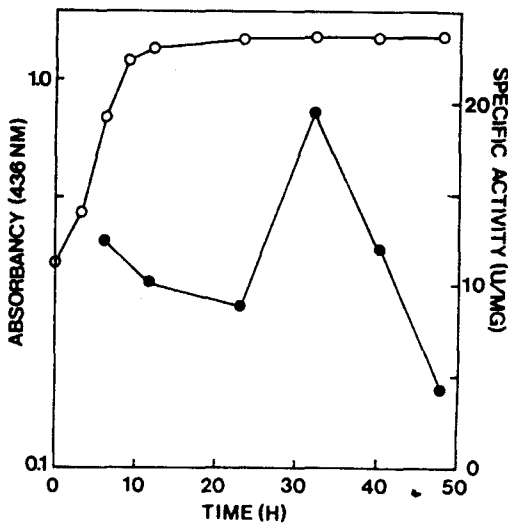


Fig. 1. Catalase activity in cells of *Acinetobacter* sp. strain JC1 growing on glucose. Cells were grown at 30°C in a mineral medium (23) supplemented with 0.2% glucose. growth curve (—○—) and catalase activity (—●—).

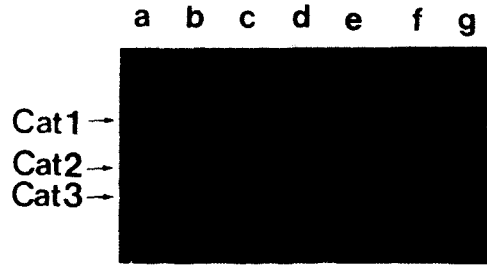


Fig. 2. Activity staining of catalase in cell-free extracts prepared from *Acinetobacter* sp. JC1 growing on glucose.

Activity staining after non-denaturing PAGE (7.5% acrylamide) of cell-free extracts (100 µg each) was carried out with H₂O₂ as a substrate. Cell-free extracts were prepared from cells grown for (a) 6 hr, (b) 12 hr, (c) 24 hr, (d) 28 hr, (e) 32 hr, (f) 40 hr, and (g) 48 hr.

감소하였다 (Fig. 1). 포도당을 이용하여 성장한 세균의 세포추출액을 non-denaturing PAGE한 후 활성염색을 하였을 때 catalase 활성을 나타내는 세개의 단백질띠 (Cat1, Cat2, Cat3)가 나타났는데 (Fig. 2), 이는 이 세균이 최소한 세종류의 catalase를 생산하고 있음을 의미한다.

활성염색결과는 또한 이 세균이 포도당을 이용하여 성장하는 동안 Cat1과 Cat3는 모든 성장시기에 고루 발현되지만 Cat2는 성장시기에 따라 발현되는 정도가 다를 것을 나타내며, 성장시기에 따른 Cat2 활성변화양상이 성장시기에 따른 세포내 전체 catalase 활성의 변화양상 (Fig. 1)과 일치하고 있음을 보여준다.

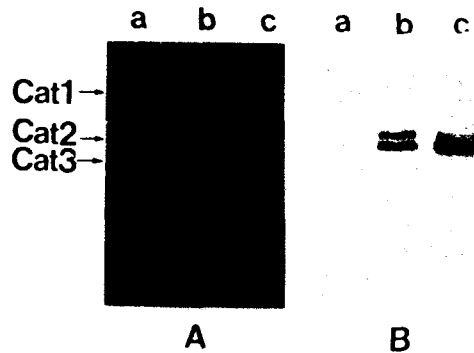


Fig. 3. Staining of catalase and peroxidase by activity. Activity staining for catalase (A) and peroxidase (B) after non-denaturing PAGE (7.5% acrylamide) of crude cell extracts (100 µg each) was carried out using H₂O₂ as a substrate. Cell extracts were prepared from cells grown on (a) glucose, (b) CO and (c) methanol.

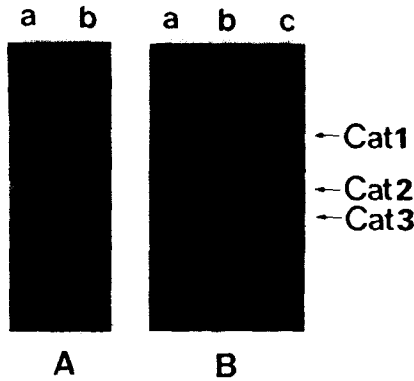


Fig. 4. Activity staining of catalase after treatment with ethanol and chloroform (A) and activity staining of catalase after treatment with H₂O₂ and AT (B).

(A) Activity staining after non-denaturing PAGE (7.5% acrylamide) of cell-free extracts (150 µg) which were (a) not treated with ethanol and chloroform was performed using H₂O₂ as a substrate together with the extracts (150 µg) (b) treated with the two solvents for 3 hr

(B) Activity staining after non-denaturing PAGE (7.5% acrylamide) of cell extracts (150 µg) which were (a) not treated with H₂O₂ and AT (a) was carried out using H₂O₂ as a substrate together with the extracts (150 µg each) treated (b) with H₂O₂ or (c) with H₂O₂ and AT for 3 hr.

성장기질에 따른 catalase의 발현

Acinetobacter sp. JC1을 포도당이 첨가된 기본배지에서 배양하였을 때는 세가지의 catalase가 모두 생성되었으나, CO 또는 메탄올을 이용하여 배양하였을 때는 Cat2의 생성이 두드러졌으며, Cat1은 극히 적은 양이 생성되었고, Cat3는 전혀 생성되지 않았다 (Fig. 3A). 이들 중 Cat2는 peroxidase 활성도 나타내었는데, 메탄올을 이용하여 성장한 세균의 Cat2가 가장 강한 peroxidase 활성을 나타내었고, 포도당을 이용하여 성장한 세균의 Cat2가 가장 약한 peroxidase의 활성을 나타내었다 (Fig. 3B).

세포추출액에 있는 catalase의 유기용매에 대한 안정성

세포추출액을 ethanol과 chloroform의 혼합유기용매로 처리하였을 때, Cat1과 Cat3의 활성은 큰 영향을 받지 않았으나 Cat2의 활성은 완전히 사라졌다 (Fig. 4A).

세포추출액에 있는 catalase 활성에 대한 H₂O₂와 AT의 영향

세포추출액을 H₂O₂로 전처리를 하였을 때, Cat2는 완전히 활성을 상실하였고, Cat1과 Cat3의 활성도

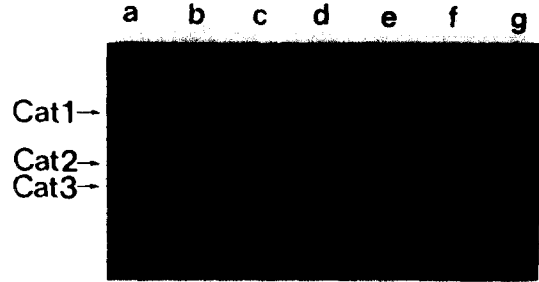


Fig. 5. Thermal stability of catalase in cell-free extracts.

Activity staining after non-denaturing PAGE (7.5% acrylamide) with 100 µg each of cell extracts incubated for 1 min at various temperatures were carried out with H₂O₂ as a substrate. Cell extracts were incubated at (a) 0°C, (b) 30°C, (c) 40°C, (d) 50°C, (e) 60°C, (f) 70°C, and (g) 80°C before electrophoresis.

영향을 받았다 (Fig. 4B). 그리고 세포추출액을 H₂O₂와 AT로 동시에 처리했을 경우, Cat1과 Cat3의 활성이 H₂O₂만 처리하였을 때보다 더 감소하였는데, 이는 Cat1과 Cat3의 활성이 AT에 의해 저해됨을 나타낸다. 이와 같은 사실은 세포추출액을 AT만으로 처리했을 경우, Cat1과 Cat3의 활성이 감소한 사실로부터 확인되었으며, 이때 Cat2의 활성은 영향을 받지 않았다 (결과 미제시).

세포추출액내에 있는 catalase의 온도에 의한 안정성

세포추출액 (100 µg protein)을 30°C에서 80°C까지 10°C 간격을 두고 1분간 열처리한 후, 원심분리 (10,000×g/5 min)하여 얻은 상등액을 non-denaturing PAGE와 활성염색을 하여 각 catalase의 활성을 비교하였다. 30°C, 40°C 그리고 50°C까지 열처리한 시료에서는 대조구에서와 같은 세가지 catalase가 모두 활성을 나타내었다. 그러나 60°C에서 열처리한 시료에서는 Cat2의 활성이 사라졌고, 70°C에서 처리한 시료에서는 Cat2는 물론 Cat3의 활성도 사라졌다. Cat1은 80°C에서 열처리했을 때도 활성이 남아있었다 (Fig. 5).

Cat3의 정제

포도당을 이용하여 성장한 세균으로부터 일곱단계의 정제과정을 거쳐 단백질 1 mg당 약 800 units의 활성을 나타내는 Cat3를 정제하였다 (Fig. 6A).

정제된 Cat3의 몇가지 특성

분자량과 소단위 구성: 정제된 Cat3를 분자량이 알려진 몇가지 표준단백질과 함께 Sephacryl S-300 column chromatography를 수행한 후 Andrews (1)의 방법에 따라 분자량을 측정한 결과, Cat3는 약 150,000의 분자량을 지니고 있는 것으로 확인되었다. 그리고 Cat3를 denaturing PAGE하였더니 63,000

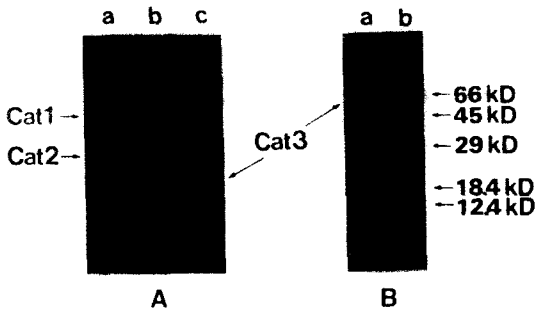


Fig. 6. Purified Cat3 after nondenaturing PAGE (A) and subunit in the purified Cat3 (B).
 (A) The purified enzyme (2.3 μ g) was subjected to PAGE together with cell-free extracts (100 μ g) on 7.5% acrylamide gel by the method of Laemmli (25) without SDS. (a) crude cell extracts and (b) purified enzyme stained by activity (c) purified enzyme stained with CBB.
 (B) Denaturing PAGE (12.5% acrylamide, 0.1 % SDS) was carried out (a) with 4.6 μ g of the purified enzyme together (b) with several marker proteins of known molecular weights.

에 해당하는 하나의 단백질띠를 형성하였다 (Fig. 6B). 따라서 Cat3는 동일한 크기의 소단위 두개로 구성되어 있는 것으로 추측된다.

반응속도론 (Kinetics): Cat3의 활성은 반응용액내의 H₂O₂ 농도가 40 mM이 될 때까지 기질의 농도에 비례하여 증가하다가 H₂O₂의 농도가 증가하면서 약간 감소하였으나 70 mM 이상의 농도에서 활성이 더

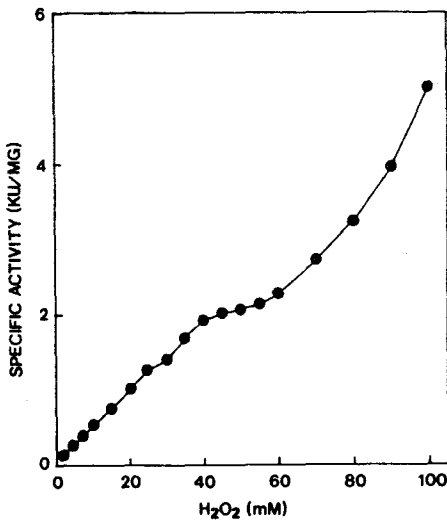


Fig. 7. Effect of H₂O₂ concentration on the activity (B) of purified Cat3.

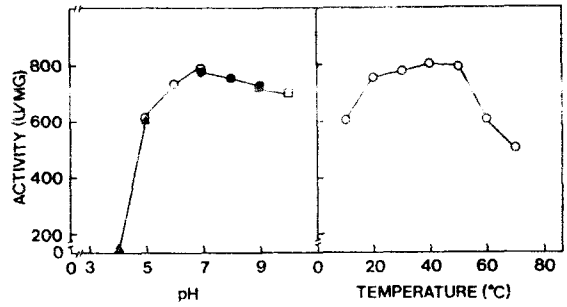


Fig. 8. Effects of pH (A) and temperature on the Cat3 activity on the Cat3 activity (B).
 (A) Catalase activity was measured in 50 mM buffers at the indicated pHs. The buffers used were citrate buffer (—▲—), phosphate buffer (—○—), Tris-HCl buffer (—●—), and NaHCO₃-NaOH buffer (—□—).
 (B) Catalase activity was assayed at various temperatures.

증가하였다 (Fig. 7). Lineweaver-Burk plot을 하여 H₂O₂에 대한 K_m값을 산출한 결과 저농도의 H₂O₂에서는 58 mM, 고농도의 H₂O₂에서는 39 mM로 나타났다.

최적 pH: 정제된 효소는 pH 4.0에서는 활성을 전혀 나타내지 않았고 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 나타내었으나, pH 6.0과 pH 8.0 및 pH 9.0에서도 최적 pH에서 나타난 활성의 94% 이상의 활성을 나타내었다 (Fig. 8A).

온도에 대한 안정성: 정제된 Cat3를 30°C에서 1 시간 동안 방치하였을 때, 효소활성이 96%까지 남아 있었다.

최적온도: 효소활성 측정을 위한 온도를 10°C에서 70°C까지 10°C 간격으로 올려가면서 Cat3의 활성을 측정하였을 때, 40°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 20°C와 30°C 및 50°C에서도 최적온도에서 나

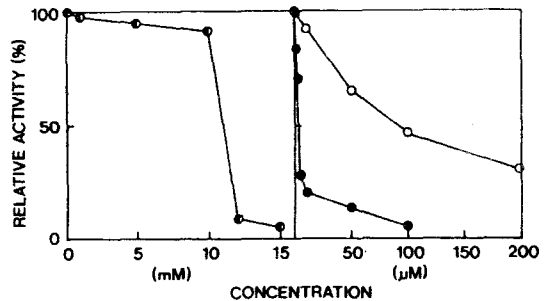


Fig. 9. Effect of inhibitors on the Cat3 activity. Catalase activity was measured in the presence of AT (—○—), NaN₃ (—●—) and KCN (—□—).

탄산 활성의 95% 이상에 해당하는 활성을 나타내었다 (Fig. 8B).

유기용매 및 활성억제물질의 영향: 정제된 효소용액을 세포추출액을 이용한 실험의 경우와 같이 ethanol과 chloroform의 혼합용매와 섞어 5분간 vortexing한 후, microcentrifuge로 10,000 rpm의 속도로 5분간 원심분리하여 상등액에 존재하는 Cat3의 활성을 측정하였을 때, 유기용매를 처리하지 않은 효소의 활성과 차이가 나지 않았다.

AT를 효소활성 측정액에 첨가하여 Cat3의 활성을 측정하였을 때, 10 mM AT까지는 AT를 첨가하지 않은 대조구활성의 90% 이상에 해당하는 활성이 나타났으나, 12 mM 이상의 AT 처리시에는 대조구활성의 10% 미만의 활성만 나타났다 (Fig. 9A). 한편, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 처리시에는 1 μM 첨가에 의해 30% 정도의 활성이 억제되었고, 100 μM 첨가에 의해 95% 이상의 활성이 억제되었다 (Fig. 9B). 그리고 KCN의 경우는 10 μM 처리시 10% 정도의 활성이 억제되었고, 1 mM을 처리하였을 때는 90% 이상의 활성이 억제되었다.

고 찰

본 연구를 통하여 호기성 CO산화세균인 *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803이 포도당을 이용하여 성장할 때 세가지 종류의 catalase를 생산하고 있음이 밝혀졌다. 이와 같은 사실은 다른 종류의 CO산화세균인 *P. compransoris* (38)가 한가지 종류의 catalase를 생산하고 있는 것과는 달리 이 세균이 *Saccharomyces cerevisiae* (39-41)처럼 최소한 세가지 종류의 catalase를 생산하고 있음을 나타낸다.

Acinetobacter sp. JC1이 포도당을 기질로 이용하여 성장할 때 생성되는 세가지 catalase 중 Cat1과 Cat3는 모든 성장시기에서 동일한 활성을 나타내었으나 Cat2는 성장시기에 따라 활성이 변하였다. 그런데, 이와 같은 Cat2의 활성변화 양상이 세균성장에 따른 세포내 전체 catalase 활성의 변화양상과 일치하고 있기 때문에 *Acinetobacter* sp. JC1이 포도당을 이용하여 성장할 때 Cat2가 H_2O_2 의 분해와 연관된 특별한 생리현상에 관여하고 있을 것임을 암시한다.

세포추출액내에 있는 세가지 catalase 중 Cat2는 전형적인 catalase-peroxidase (36)의 특성을 나타내었다. 즉, catalase-peroxidase group에 속하는 catalase는 ethanol-chloroform 혼합용액 처리에 불안정하다고 알려져 있는데, 실험결과 세가지 catalase 중 Cat2의 활성만 영향을 받았다. 그리고 이 group에 속하는 catalase는 H_2O_2 처리와 pH 및 온도변화 등에 대해 typical catalase보다 불안정한데 (20), Cat2는 세가지 catalase 중 열처리에 가장 민감하였음은 물론, 20 mM H_2O_2 를 처리하였을 때 활성이 상실되었고, 이 계통의 catalase에 영향을 주지 않는 것으로 알려진 AT에 의해서는 활성이 저해되지 않았다. Cat2는

CO나 메탄올이 첨가된 배지에서 배양한 세균에서도 생성되었는데, 이들 중 메탄올에서 배양한 세균의 Cat2가 가장 강한 peroxidase 활성을 나타내었기 때문에 *Acinetobacter* sp. JC1이 메탄올을 이용하여 성장할 때 Cat2의 peroxidase 활성이 중요한 역할을 할 것임을 예측할 수 있다. 세가지 catalase중 Cat3는 포도당이 첨가된 배지에서 배양하였을 때만 생성되었고, 유기용매에 대한 안정성과 AT처리에 대한 민감성 및 온도에 대한 안정성 등이 typical catalase와 유사하였다.

일반적으로 typical catalase의 H_2O_2 에 대한 K_m 값 (40.1~78 mM; 20, 28, 29, 35, 37)은 catalase-peroxidase의 K_m 값 (1.93~19.2 mM; 11, 19, 20, 38, 44, 45)보다 높은 것으로 알려져 있는데, 정제된 Cat3의 H_2O_2 에 대한 K_m 값 (39 mM과 58 mM)은 이 효소가 같은 CO산화세균인 *P. compransoris*의 catalase와는 달리 typical catalase임을 뒷받침해 준다.

H_2O_2 에 대한 K_m 값 이외에도 순화된 Cat3는 최적 pH와 ethanol-chloroform 혼합용액 처리 및 AT 처리에 대한 반응 등에 있어서도 typical catalase와 유사한 성질을 나타내었다. 즉, Cat3는 pH 6~9의 범위에서 높은 효소활성을 나타내었는데, 이것은 pH 5.0~10.0의 범위에서 높은 활성을 나타내는 typical catalase의 전형적인 특성이며, ethanol-chloroform 혼합용액 처리에는 안정한 대신 AT처리에 의해 효소활성이 저해되는 것도 typical catalase의 특성이다 (32, 36).

이와 같이 Cat3는 여러가지 면에서 typical catalase와 유사하지만, 기질농도 증가에 따른 효소활성의 증가양상과 기질농도 변화에 따른 두가지의 종류의 K_m 값을 가지는 것 및 분자량과 소단위구성에 있어서 차이를 나타내었다. 즉, 기존 효소들은 모두 기질의 농도가 50 mM에 이를 때까지는 기질농도에 비례하여 활성이 증가하지만 그 이상의 농도에서는 활성이 서서히 또는 급격히 떨어지는데 (38), Cat3의 경우는 H_2O_2 의 농도가 70 mM 이상이 될 때 2~40 mM 기질 농도에서 보다 더 높은 활성을 나타내어 H_2O_2 에 대한 K_m 값이 두가지로 나타났다. 이와 같은 사실은 이 효소가 다른 catalase들과는 달리 고농도의 H_2O_2 존재 시에만 활성화되는 제2의 활성중심을 가지고 있기 때문에 두가지의 K_m 값을 나타낼 가능성이 있음을 나타내는 것으로 이에 대한 연구는 흥미있을 것으로 생각한다. 그리고 현재까지 연구된 typical catalase들은 모두 225,000~320,000의 분자량을 지니고, 네 개의 동일한 소단위로 구성되어 있는데 (22, 36), Cat3는 분자량이 150,000이고, 63,000 정도되는 두개의 동일한 소단위로 이루어져 있기 때문에 기존의 catalase들과는 구분이 된다. 이상의 결과들은 Cat3가 기존의 typical catalase들과는 다른 종류의 효소임을 나타내며, CO산화세균을 포함한 모든 미생물과 고등생물의 catalase가 지금까지 예상했던 것보다 훨씬 더 다양함을 보여주고 있다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 연세대학교 교내연구비의 지원에 의해 수행된 것이다.

참고 문헌

1. Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.
2. 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.
3. Boehme, D.E., K. Vincent, and O.R. Brown, 1976. Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis. *Nature (London)* **262**, 418-420.
4. Brawn, K. and I. Fridovich, 1981. DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 414-419.
5. Brot, N., L. Weissbach, J. Werth, and H. Weissnach, 1981. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2155-2158.
6. Carlsson, J., E.H. Berglin, R. Claesson, Maj-Britt K. Edlund, and S. Persson, 1988. Catalase inhibition by sulfide and hydrogen peroxide-induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutation Research* **202**, 59-64.
7. Cathcart, R., E. Schwiers, R.L. Saul, and B.N. Ames, 1984. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: A possible assay for oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5633-5637.
8. Chary, P. and D.O. Nativg, 1989. Evidence for three differentially regulated catalase gene in *Neurospora crassa*. Effect of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* **171**, 2646-2652.
9. Cho, J.W., H.S. Yim, and Y.M. Kim, 1985. *Acinetobacter* isolates growing with carbon monoxide. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 1-8.
10. Claiborne, A., D.P. Malinowski, and I. Fridovich, 1979. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**, 11664-11668.
11. Claiborne, A. and I. Fridovich, 1979. Purification of the o-dianisidine peroxide from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**, 4245-4252.
12. 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 stains for catalase. *Anal. Biochem.* **140**, 532-537.
13. Deisseroth, A. and A.L. Dounce, 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* **50**, 319-375.
14. Diaz, G.A. and L.G. Wayne, 1974. Isolation and characterization of catalase produced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Resp. Dis.* **110**, 312-323.
15. Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
16. Goldberg, I. and A. Hochman, 1989. Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 124-128.
17. Gregory, E.M. and I. Fridovich, 1974. Visualization of catalase on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **58**, 57-62.
18. Hildebrandt, A.G. and I. Roots, 1975. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 385-397.
19. 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.
20. Hochman, A. and I. Goldberg, 1991. Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1077**, 299-307.
21. Hollstein, M.C., P. Brooks, S. Linn, and B.N. Ames, 1984. Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4003-3007.
22. Jacob, G.S. and W.H. Orme-Johnson, 1979. Catalase of *Neurospora crassa*. 1: Induction, purification and physical properties. 2: Electron paramagnetic resonance and chemical properties of prosthetic group. *Biochemistry* **18**, 2967-2979.
23. Kim, Y.M. and G.D. Hegeman, 1981. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.* **148**, 904-911.
24. Kim, Y.M. and G.D. Hegeman, 1983. Oxidation of carbon monoxide by bacteria. *Intl. Rev. Cytol.* **81**, 1-32.
25. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* **227**, 680-685.
26. Levin, D.E., L.J. Marnett, and B.N. Ames, 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella tester* strain TA 102. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4457-4461.
27. Levin, D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, E.A. Schwiers, and B.N. Ames, 1982. A New *Salmonella tester* strain (TA 102) with A·T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7445-7449.
28. Loewen, P.C. and J. Switala, 1987a. Purification and characterization of catalase-I from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 939-947.
29. Loewen, P.C. and J. Switala, 1987b. Multiple catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3601-3607.

30. Loewen, P.C. and J. Switala, 1988. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.* **66**, 707-714.
31. 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.
32. Margoliash, E., A. Novogrodsky, and A. Schejter, 1960. Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* **74**, 339-348.
33. Meyer, O., 1993. Biochemistry of the aerobic utilization of carbon monoxide, p. 433-459. In J.C. Murrell and D.P. Kelly (ed.). Microbial growth on C₁ compounds. Intercept Ltd., Andover.
34. Meyer, O. and H.G. Schlegel, 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 277-310.
35. 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.
36. Nadler, V., I. Goldberg, and A. Hochman, 1986. Comparative study of bacterial catalase. *Biochem. Biophys. Acta.* **882**, 234-241.
37. Nahmias, J.A. and G.C. Bewley, 1984. Characterization of catalase purified from *Drosophila melanogaster* by hydrophobic interaction chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 355-364.
38. Nies, D. and H. G. Schlegel, 1982. Catalase from *Comamonas compransoris*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 311-319.
39. Seah, T.C.M., A.R. Bhatti, and J.G. Kaplan, 1973. Novel catalytic proteins of bakers' yeast. I: An atypical catalase. *Can. J. Biochem.* **51**, 1551-1555.
40. Seah, T.C.M., A.R. Bhatti, and J.G. Kaplan, 1978. A catalytic nucleoprotein of bakers' yeast. *FEBS Lett.* **85**, 305-309.
41. Seah, T.C.M. and J.G. Kaplan, 1973. Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. *J. Biol. Chem.* **248**, 2889-2893.
42. Wayne, L.G. and G.A. Diaz, 1988. Detection of a novel catalase in extracts of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect. Immun.* **56**, 936-941.
43. Weber, K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
44. Yamada, T., A. Tanaka, and S. Fukui, 1982. Properties of catalase purified from whole cells and peroxisomes of n-alkane grown *Candida tropicalis*. *Eur. J. Biochem.* **125**, 517-521.
45. Yumoto, I., Y. Fukumori, and T. Yamanaka, 1990. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*. *J. Biochem.* **108**, 583-587.

(Received March 21, 1994)

(Accepted April 7, 1994)

ABSTRACT: Catalases in *Acinetobacter* sp. Strain JC1 DSM 3803 Growing on Glucose

Shin, Kyoung Ju, Young Tae Ro, and Young Min Kim* (Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

Cells of *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803, an aerobic carbon monoxide-oxidizing bacterium, growing on glucose exhibited high catalase activity at the mid-exponential growth phase. The enzyme activity decreased gradually after then until the early stationary phase, increased again at the mid-stationary phase, and then decreased again thereafter. Cells growing on glucose was found to contain three kinds of catalases, Cat1, Cat2, and Cat3. The activities of Cat1 and Cat3 did not change significantly during growth, but that of Cat2 exhibited significant variation. Cat3 was found to present only in cells growing on glucose, but not in cells growing on carbon monoxide or methanol. The activities of Cat1 and Cat3 in cell-free extracts were stable upon treatment with ethanol and chloroform, but decreased to some extent when the enzymes were treated with 20 mM H₂O₂ and/or 3-amino-1,2,4-triazole (AT). Cat2 was found to be extremely sensitive to the ethanol-chloroform and H₂O₂ treatments, but was insensitive to the AT treatment. Cat1 exhibited enzyme activity after incubation for 1 min at 80°C. Cat2 and Cat3 did not show enzyme activity after incubation for 1 min at 60°C and 70°C, respectively. Cat2 was found to have peroxidase activity. Cat3 was purified to homogeneity in seven steps. The molecular weight of the native enzyme was estimated to be 150,000. Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis revealed two identical subunits of molecular weight 65,000. The enzyme was found to show two K_m values of 39 mM and 58 mM. The optimal pH for the enzyme activity was 7.0, but the activities at pH 6.0, 8.0, and 9.0 were found to be comparable to that at the optimal pH. The optimal temperature for the enzyme activity was found to be 40°C. The enzyme also exhibited strong activity at 20°C, 30°C, and 50°C. The purified enzyme was not affected by the ethanol-chloroform treatment. The enzyme, however, showed less than 10% of the original activity when it was treated with 12 mM AT, 0.1 mM NaN₃, or 1 mM KCN.