

## *Acetobacter* sp. KM Alcohol Dehydrogenase의 분리 및 특성

전 홍 성 · 차 영 주 · \*김 시 욱 · \*\*김 중 세 · \*\*\*박 중 필 · \*\*\*\*석 근 영 · 김 성 준

조선대학교 유전공학과, \*환경학과, \*\*생물학과, \*\*\*동아전문대학 식품가공학과  
\*\*\*\*조선대학교 병설 공업전문대학 식품영양학과

### Purification and Characterization of Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter* sp. KM

Hong-Sung Chun, Young-Ju Cha, \*Si-Wouk Kim, \*\*Jong-Se Kim, \*\*\*Jong-Phil Park  
\*\*\*\*Keun-Young Seok and Sung-Jun Kim

Department of Genetic Engineering, \*Department of Environmental Science

\*\*Department of Biology, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

\*\*\*Department of Food science and Technology, Donga Junior College, Youngam 526-760, Korea

\*\*\*\*Department of Food Industry, Technical Junior College, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

#### ABSTRACT

Membrane-bound alcohol dehydrogenase (ADH) was purified to homogeneity from the acetic acid producing bacteria, *Acetobacter* sp. KM. The enzyme was solubilized and extracted with Triton X-100 and purified using the Mono-Q ion exchange chromatography and Superose 12 gel filtration chromatography. The enzyme was purified to 12-fold with a yield of 30%. The molecular weight of the purified enzyme was to be 335 KDa. SDS-PAGE of the enzyme showed two subunits with molecular weights of 79 KDa and 49 KDa. It indicated that the enzyme consisted of three subunits of the 79 KDa and two subunits of the 49 KDa. The purified ADH preferentially oxidized straight chain aliphatic alcohols except methanol. Formaldehyde, acetaldehyde and glutaraldehyde were also oxidized. The apparent  $K_m$  for ethanol was 1.04 mM and the optimum pH and temperature were 5.0~6.0 and 32°C, respectively.  $V_{\max}$  and divalent cations such as  $ZnCl_2$  and  $NiCl_2$  inhibited enzymatic activity.

#### 서 론

초산균(Acetic acid bacteria)은 두 종의 속, 즉 *Gluconobacter*와 *Acetobacter*로 분류되며 당과 알코올을 초산으로 산화시킬 수 있는 능력을 가지고 있는 세균의 집단을 말한다(1, 2).

초산균에 의한 초산의 생성은 먼저 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의해 에탄올이 acetaldehyde로 산화되고, acetaldehyde는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 초산으로 산화된다.

여러 종의 초산균 중에서 현재까지 *Acetobacter aceti*(3), *Acetobacter polyoxogenes*(4)와 *Glucono-*

*bacter suboxydans*(5)의 ADH가 분리되어 그 특성이 조사되었다. 즉, 초산균의 ADH는 메탄올을 제외한 광범위한 일차 알코올을 산화할 수 있고 pyrroloquinoline quinone(PQQ)을 보결 분자단으로 가지고 있으며(6), 산성 pH에서 최적 효소활성을 보이는데 바로 이점이 메탄올 이용 세균들의 일차 알코올 산화 효소나 효모, 또는 포유동물의 NAD-linked ADH와의 큰 차이점이라 할 수 있다(7). PQQ는 원핵생물과 진핵생물의 산화환원 효소에서 두루 나타나는 cofactor(8)로써 초산균의 ADH는 PQQ와 함께 호흡 사슬과 연계된 cytochrome c를 갖는다는 점에서 다른 quinoprotein들과 구분된다(9).

Adachi 등(3)의 보고에 의하면 *A. aceti*의 경우 두 종류의 ADH가 발견되었는데 이중 외막에 존재하는 ADH는 분자량 149.5KDa으로 각 분자량이 63KDa, 44KDa, 29KDa, 그리고 13.5KDa인 4개의 소단위체들로 이루어져 있고, pH 4.0에서 최적활성을 나타내며 정상 세포에서는 pH 2에서도 활성을 보이는 것으로 보고되었다. 또 다른 ADH는 세포질에 존재하는 수용성 ADH로서 이는 NAD를 조효소로 이용한다. 그러나 세포질에 존재하는 ADH의 활성이 외막 효소의 활성에 비해 1/300에 불과하다는 점에서 실제 에탄올 산화의 기능은 외막성 ADH가 주역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

Entani 등(10)에 의하면 최근 식초발효 공장에서 직접 분리된 *A. polyoxogenes*에서 정제한 ADH는 분자량 320KDa으로 각 분자량이 72KDa과 44KDa인 두 소단위체가 3개씩 모여 전효소를 이루며 pH 5.0~6.0 사이에서 최적 활성을 보였다. 특히 Tayama 등(4)의 보고에 의하면 40°C에서도 높은 활성을 나타내었으며 *A. aceti*의 ADH에서는 볼 수 없는 aldehyde와 formaldehyde에도 활성을 보였다.

ADH는 초산균을 특성 짓는 가장 중요한 효소임에도 불구하고 위에서 살펴 본 바와 같이 종간에 분자량과 그 구성뿐만 아니라 생리·생화학적 특성에서 많은 차이점을 보인다는 것은 흥미로운 사실이다. 따라서 우리나라에서 분리된 초산균의 ADH를 정제하고 그 특성을 밝히는 것은 단백질의 구조 및 특성이 서로 다른 종간의 효소의 기능적, 진화론적 관계를 규명하는데 큰 도움이 될 뿐만 아니라, 세포 내 생화학적 대사조절 양식을 이해하는데도 중요한 일일 것이며, 아직까지 초산균의 유전자 cloning에 있어 필수적인 vector 등의 개발이 저조한 상태에서

유용한 단백질의 정제 및 특성화는 유전자 cloning을 이용한 균주 개량, 초산생성 및 초산균의 높은 에탄올 저항성과 초산 저항성의 기작을 이해하는데 있어서 필요 불가결한 일로 사료된다.

따라서, 본 연구에서는 한국산 식초에서 분리한 우수 초산 균주인 *Acetobacter* sp. KM(11)의 ADH를 순수 분리하여 그들의 생화학적 특성을 연구하여 초산생성 기작을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 전남 구례 지방의 한 농가에서 생산된 막걸리 식초로부터 분리하여 *Acetobacter* sp. KM(11)이라 명명하였으며 대조 균주로서는 *Acetobacter aceti*(ATCC 23746), *A. polyoxogenes*(NBI 1028)를 사용하였다. 균주배양을 위한 배지는 modified Carr medium(2% yeast extract, 0.5% peptone, 3% ethanol, pH 6.8)을 사용하였으며(12), modified Carr media에 agar를 2.0~2.5% 넣어 고체 평판배지로 사용하였다.

### Alcohol Dehydrogenase 활성도 측정

효소활성 측정은 Ameyama와 Adachi(13)의 방법을 변형하여 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 본 실험에서는 ferricyanide를 사용하여 색깔 변화를 확인하는 방법을 사용하였는데 ethanol 100 $\mu$ moles, McIlvine buffer[pH 4.0] 0.5ml, Triton X-100 0.1ml에 효소용액을 넣어 37°C에서 5분간 사전 배양 다음, potassium ferricyanide 10 $\mu$ mol을 넣고 반응을 시작한 15분 후 ferric sulfate Dupanol reagent[Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5g, SDS 3g, 85% Phosphoric acid 95ml/1,000ml]를 0.5ml 넣어 반응을 끝내고 증류수를 3.5ml 넣어 잘 섞은 후 37°C에서 20분간 반응시켜 나타나는 prussian blue color를 660nm에서 활성도를 측정하였다. 효소활성 1 unit는 1분 동안에 1 $\mu$ mol ethanol의 산화를 촉매하는 양으로 정하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 Bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준시료로 하는 Bradford(14)의 방법을 이용하여 575nm에서의 optical density를 측정하였다.

### Alcohol Dehydrogenase의 정제

효소의 정제과정은 다음과 같으며 모든 과정은 4°C에서 행하였다. Ethanol 배지에서 배양한 균체를 원심분리하여 수확한 후 washing buffer로 2차례 세척한 다음 원심분리하여 균체(40g w/w)를 수확하였다. 20ml의 0.01M potassium phosphate buffer(pH 6.0)에 현탁한 균체를 French press로 분쇄(crude cell extract)한 후 원심분리(120,000Xg, 1hr)하여 얻은 침전물을 membrane fraction으로 사용하였다.

Membrane fraction을 20ml의 buffer A[0.01M potassium phosphate buffer(pH 6.0) containing 1% (W/V) Triton X-100, 10% glycerol]에 현탁하고 2시간 동안 교반한 후 원심분리(70,000rpm, 1hr)하여 얻은 상층액을 solubilized fraction으로 사용하였다.

MONO-Q 5/5(Pharmacia) column을 FPLC에 장착하여 buffer A로 평형화시킨 후 solubilized fraction을 적정한 후 KCl을 0M에서 1M까지의 농도구배를 걸어 용출시켜 활성 분획을 얻었다.

이렇게 얻은 활성분획을 1% Triton X-100이 함유된 0.01M phosphate buffer(pH 6.0)에서 투석한 후 Superose 12gel filtration을 수행하였다.

0.01M phosphate buffer(pH 6.0)로 평형시킨 Superose 12gel filtration(Pharmacia)에 효소 용액을 적정한 후 단계별로 용출시킨 다음 활성분획을 얻어 0.01M phosphate buffer(1% Triton X-100)에서 투석, 농축시켜 사용하였다.

### Gel Filtration Chromatography에 의한 분자량 결정

정제된 효소의 분자량을 결정하기 위하여 0.01M phosphate buffer(0.1% Triton X-100)로 평형화된 Superose 12gel filtration에 동일한 buffer를 사용하여 용출하였다. 표준시료로는 ferritin(MW 440,000), yeast alcohol dehydrogenase(MW 150,000), BSA(MW 66,000)과 carbonic anhydrase(MW 29,000)를 사용하였다.

### 단백질의 전기영동

Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) 및 sodium dodecyl sulphate(SDS)-PAGE는 7.5% acrylamide gel과 0.1% (W/V) SDS를 함유한 10% acrylamide gel을 사용하여 Adachi 등(3)의 방법에 준하여 실시하였다. 표준시료로는 Gibco BRL

사의  $\beta$ -galactosidase(MW 116,000), rabbit muscle phosphorylase(MW 68,000), ovalbumin(MW 45,000), carbonic anhydrase(MW 29,000) 및 lysozyme(MW 14,300)을 사용하였다.

### 효소의 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 조사하기 위하여 ethanol, gluconic acid, glucose, methanol, mannitol, sorbitol, butanol, octanol, glycerol, fructose, isopropanol, pentanol, hexanol, glutaraldehyde, formaldehyde, acetaldehyde, lactic acid를 100mM 농도로 효소 활성 표준 용액에 넣어 효소 활성도를 측정하였다.

### 효소활성의 최적 온도와 최적 pH

ADH의 최적 온도를 구하기 위하여 12, 27, 32, 37, 42, 52°C의 온도에서 효소반응을 시켜 나타나는 ADH 활성을 측정하였다. 그리고 최적 pH를 구하기 위하여 McIlvaine buffer를 사용하여 pH 2.0에서 pH 8.0까지 변화시켜가면서 표준 효소 측정방법으로 ADH의 활성을 측정하였다.

### 금속이온 및 화합물의 영향

ADH에 미치는 금속이온과 화합물의 영향을 조사하기 위하여 효소활성을 측정하는 표준반응용액에 다양한 금속이온 및 화합물들의 최종 농도가 1mM 이 되도록 하였고 sodium arsenate는 10mM 농도가 되도록 하여 효소활성을 측정하였다.

### Km값 결정

ADH의 두 기질인 에탄올과 potassium ferricyanide의 Km값을 구하기 위하여 표준효소활성 측정 반응 용액에서 에탄올 농도를 100mM로 고정시키고 potassium ferricyanide 농도 변화에 따른 반응속도를 구하고, 다시 potassium ferricyanide의 농도를 100mM로 고정시킨 후 에탄올의 농도 변화에 따른 반응 속도를 구하여, 그 결과를 Lineweaver Burk plot을 이용하여 각각의 기질에 대한 Km값을 구하였다.

## 결 과

### Alcohol Dehydrogenase의 정제

French press로 균체를 파쇄하여 FPLC MONO-Q에 통과시킨 후 활성분획을 Superose 12gel에 부

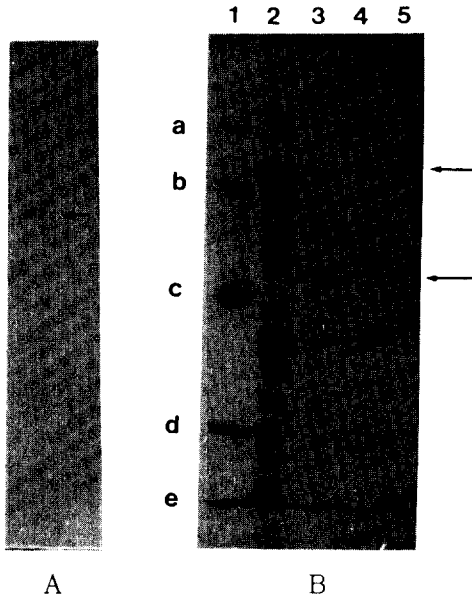


Fig. 1. Polyacrylamide gel(7.5%) and SDS-polyacrylamide gel(12.5%) electrophoresis of purified ADH from *Acetobacter* sp. KM. A :nondenaturing PAGE(arrow indicates purified ADH), B:SDS-PAGE: Lane 1, size markers; Lane 2, crude cell extract; Lane 3, solubilized fraction; Lane 4, purified by FPLC MONO-Q ion-exchange chromatography; Lane 5, purified by Superose-12 gel filtration.  $\beta$ -galactosidase (a, 116kDa), rabbit muscle phosphorylase b (b, 69kDa), ovalbumin (c, 45kDa), carbonic anhydrase (d, 29kDa), lysozyme (e, 14kDa) were used as size standards in 12.5 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The 79KDa and 49KDa bands are indicated by arrows.

착시켜 최종 효소단백질을 분리한 후 효소의 순도를 native polyacrylamide gel 전기영동(Fig. 1A)으로 확인한 결과, 단일 종류의 단백질임을 알 수 있었다. Cell-free extract를 두 번의 chromatography로 분획한 결과 30.0%의 수율로 12배 정제된 ADH의 고유활성도는 56unit/mg이었다(Table 1).

분자량 측정

Superose 12gel filtration에 의한 분자량은 약

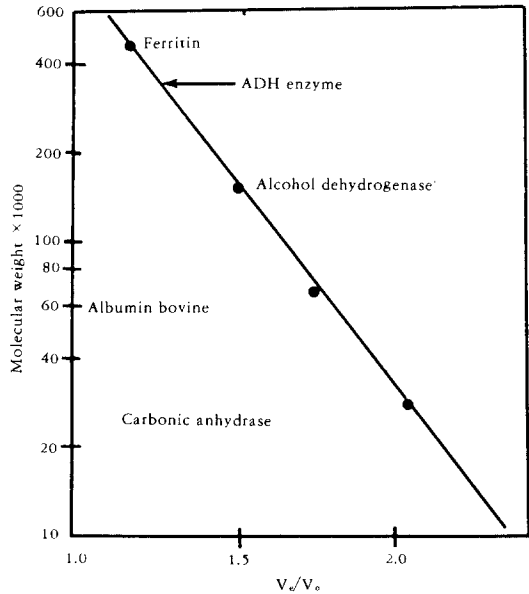


Fig. 2 Determination of the molecular weight of ADH from *Acetobacter* sp. KM by Superose 6 gel filtration gel chromatography.(arrow; ADH of *Acetobacter* sp. KM)

Table 1. Purification of ADH from *Acetobacter* sp. KM.

Furification steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude cell extract	2225	10825	4.86	100
Solubilized fraction	376	8643	23	80
FPLC Mono-Q	117	5462	47	50
Superose 12 gel filtration	58	3292	57	30

335KDa(Fig. 2) 정도이고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동시에는 각 분자량이 79KDa, 49KDa인 2개의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

효소의 기질특이성

다양한 alcohol과 aldehyde 및 유기 화합물에 대한 정제된 ADH의 상대적 활성도를 Table 2에 나타내었다. KM 균주의 ADH는 *A. aceti*와 *A. poly*

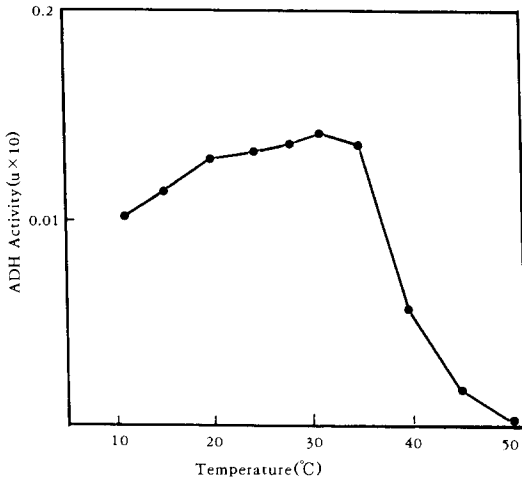


Fig. 3. Effect of temperature on ADH activity from *Acetobacter* sp. KM.

Table 2. Substrate specificity of ADH from *Acetobacter* sp. KM<sup>a</sup>.

Substrate	Relative activity(%)	Substrate	Relative activity(%)
Ethanol	100	tert-Butanol	0
Methanol	0	n-Butanol	100
Gluconate	0	n-Pentanol	90
Glucose	0	n-Hexanol	75
Mannitol	0	1-Octanol	41
Sorbitol	0	Formaldehyde	32
Lactic acid	0	Glutaraldehyde	25
Glycerol	0	Acetaldehyde	25
Fructose	0	Isopropanol	19

<sup>a</sup> Each substrate was added at a final concentration of 100 mM

oxogenes와 마찬가지로 straight chain carbon을 갖는 많은 aliphatic alcohols에 강한 활성을 보였으나 methanol에는 활성을 나타내지 않았다. 또한 aromatic alcohols에는 활성을 보이지 않았으며 formaldehyde, acetaldehyde와 glutaraldehyde에는 약간의 활성을 나타내었다.

효소활성의 최적 온도와 최적 pH

효소활성의 최적 온도를 구하기 위하여 10~50°C의 온도에서 조사한 결과 32°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, 40°C 이상의 온도에서는 활성이 급격히 떨어졌다(Fig. 3). 또한 이 효소활성의 최적 pH

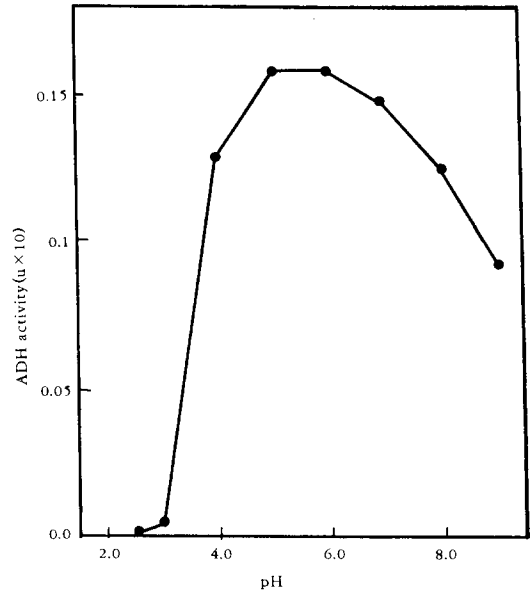


Fig. 4 Effect of pH on ADH from *Acetobacter* sp. KM in McIlvaine buffer(pH 2.5~9.0).

Table 3. Effects of various compounds on ADH activity from *Acetobacter* sp. KM<sup>a</sup>

Compounds(1mM)	Remaining activity(%)
None	100
Sodium azide	100
Sodium arsenate*	96
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50
EDTA**	100
CuSO <sub>4</sub>	81
ZnCl <sub>2</sub>	14
NiCl <sub>2</sub>	61
MnCl <sub>2</sub>	77
MgCl <sub>2</sub>	98
CoCl <sub>2</sub>	100

<sup>a</sup> The enzyme was incubated with compound for 10 min before measuring activity

\*Sodium arsenate was added at a final concentration of 10 mM

\*\* Ethylenediaminetetraacetate

를 구하기 위하여 pH 2.0에서 pH 8.0까지 나타나는 효소활성도를 조사한 결과 pH 5.0~pH 6.0에서 최대의 효소활성을 나타내었으며 pH 3.5 이하에서는 효소활성을 거의 나타내지 않았다(Fig. 4).

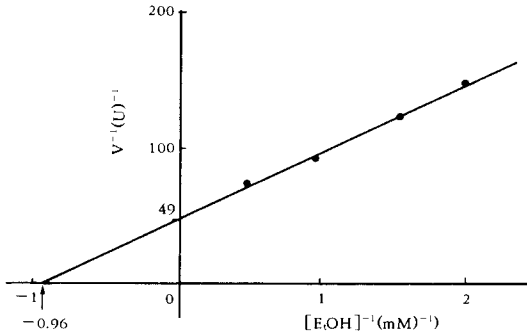


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of ADH from *Acetobacter* sp. KM reaction rate against ethanol concentration.

금속이온의 영향

이 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과  $ZnCl_2$ 와  $V_2O_5$ 는 강력한 저해 효과를 나타내었으나  $NiCl_2$ ,  $MnCl_2$ 와  $CuSO_4$ 는 효소활성에 약간의 저해 양상을 보였다(Table 3).

Km값 결정

이 효소의 Km값을 측정하기 위하여 기질인 에탄올의 농도를 변화시켜 그 반응속도를 구한 다음, 그 결과를 Lineweaver Burk plot으로 나타낸 결과 에탄올에 대한 Km값은 1.04mM이었다(Fig. 5).

고 찰

초산균의 ADH는 세포막의 표면에 존재하는 효소로서 에탄올이 초산으로 산화하는 과정에 처음으로 관여하며 기질의 산화는 곧바로 호흡사슬과 연결되어 있으며 pyrroloquinoline quinone(PQQ)을 보결 분자단위로 가지고 있다. 이 효소는 활성을 유지하는데 ammonia를 필요로 하지 않는다는 점에서 메탄올 이용 세균의 ADH(EC 1.1.99.8)와 구별되며(13), cytochrome c와 결합하고 있는 quinohaemoprotein이라는 점에서 다른 quinoprotein ADH들과 구분되어진다(5).

*Acetobacter* sp. KM의 ADH는 분리과정에서 120,000g의 원심분리 후 침전물(membrane fraction)에 대부분의 활성이 존재하는 것으로 보아 세포막에 존재하는 단백질임을 알 수 있었다. 분리 효소는 pH 5.0~6.0 사이에서 최적 활성을 보였는데 이처럼 산성 pH에서 최적 활성을 보이는 것이 초산 세균의 ADH의 특성 중 하나이며, 이점에서 알칼리

Table 4. Comparison of ADHs characteristics of the strains of *Acetobacter* and KM strain.

	<i>A. aceti</i> <sup>a</sup>	<i>A. polyoxogenes</i> <sup>b</sup>	KM strain
M. W. and structure	160,000 Dal tetramer (63,000, 44,000, 29,000, 13,500)	320,000 Dal hexamer (3 subunits of 72,000, 3 subunits of 44,000)	335,000 Dal pentamer (3 subunits of 79,000, 2 subunits of 49,000)
Optimum pH and temp.	4.0 (pH 2 in intact cells)	5.0~6.0 40°C	5.0~6.0 32°C
Km value	1.70mM	1.20mM	1.04mM
Oxidation of methanol	No	No	No
acetaldehyde & formaldehyde	No	Yes	Yes

<sup>a</sup> Data from reference 3

<sup>b</sup> Data from reference 4

성 pH에서만 활성을 나타내는 메탄올 이용 세균의 primary ADH나 효모와 포유류의 NAD-linked ADH와의 큰 차이점이라 하겠다(7, 15).

*Acetobacter* sp. KM 균주의 ADH를 기존에 분리된 *A. aceti*, *A. polyoxogenes*의 ADH와 비교 분석한 결과(Table 4), KM 균주로부터 분리된 ADH의 뚜렷한 특징은 전효소를 이루는 소단위체의 구성단위에 있었다. 분자량은 약 335KDa으로 *A. polyoxogenes*의 320KDa과 비슷하였으나 *A. polyoxogenes*의 ADH가 각기 같은 분자량을 갖는 3개의 large subunit와 3개의 small subunit로 이루어진 반면에, KM 균주의 ADH는 3개의 large subunit와 분자량이 같은 2개의 subunit가 모인 pentamer로 그 구성 단위면에서 차이가 났으며 *A. aceti*의 ADH와는 구조뿐만 아니라 분자량에서도 확연한 차이를 나타내었다. 기질 특이성에 있어서는 메탄올을 산화시키지 못하는 점에선 여타의 ADH와 같았으나 aldehydes를 산화시키는 점이 특이하였다. 이러한 기질 특이성 역시 *A. polyoxogenes*의 기질 특이성과 유사한 것으로써 ADH에 의한 aldehyde의 산화는 예외적인 것으로 메탄올 이용세균과 몇몇 *Pseudomonas* 균주에서 분리된 methanol dehydrogenase의 경우 aldehyde의 산화가 보고되어 있다(9, 15, 16). 이러한 점에서 *Acetobacter* sp. KM 균주와 *A. polyoxogenes*의 ADH는 다른 미생물에서는 볼 수

없는 새로운 기질 특이성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

결국 ADH의 특성만을 고려한다면 KM 균주는 *A. aceti*보다는 *A. polyoxogenes*와 유연관계가 깊은 종으로 생각할 수 있으나 초산세균의 분류체계에서 중요시 되고 있는 ubiquinone system에서는  $Q_9$ 으로 *A. aceti*와 그 특성을 같이한다. 이는 현재의 초산균의 분류체계가 불완전하다는 것을 말해주는 결과라 하겠다. 따라서 초산균의 분류에 있어서 기존의 생리, 생화학적 특성 및 화학적 분류방법(chemotaxonomy)과 함께 ADH의 특성도 주요한 분류기준에 포함시켜야 할 것이다.

근연종 사이에서 나타나는 단백질 구조 및 특성의 이러한 상이성은 ADH가 *Acetobacter*를 특징 짓는 가장 중요한 효소라는 점에서 매우 흥미로운 사실로 생각되며 초산균의 ADH를 분리하여 특성화하고 유전자를 cloning함으로써 아미노산 서열 및 DNA 염기 서열의 비교를 통한 상동성을 연구하는 것은 초산균의 분류체계를 확립하여 그 진화적 유연 관계를 밝히는데 매우 유용한 방법이 될 뿐 아니라, 초산균의 높은 초산 및 에탄올 저항성의 기작을 규명하고 높은 생산성을 갖는 균주의 개발에도 크게 기여할 것으로 생각된다.

## 요 약

분리균주 *Acetobacter* sp. KM으로부터 ADH를 순수하게 분리하여 정제하였다. Cell-free extract를 solubilization시킨 후 FPLC Mono-Q(5/5)ion exchange와 Superose 12 gel filtration chromatography에 의해서 30.0%의 수율로 약 12배 정제된 효소를 얻었다. 정제된 효소의 분자량은 gel filtration에 의하여 약 335,000 daltons로 측정되었다. 또한 SDS-PAGE 상에서는 분자량이 79KDa와 49KDa인 2개의 band로 확인되었고, 3분자의 79KDa 소단위체와 2분자의 49KDa 소단위체로 이루어졌음을 알 수 있었다. 정제된 ADH의 기질 특이성에서는 메탄올을 제외한 지방족 알코올을 산화시켰고, formaldehyde, acetaldehyde와 glutaraldehyde들도 역시 산화할 수 있는 기질이었다. 에탄올에 대한  $K_m$ 값은 1.04mM이었으며, 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.5~6.0과 32°C이었다.  $ZnCl_2$ 와  $V_2O_5$ 는 효소활성에 강력한 저해효과를 나타내었으며  $NiCl_2$ ,  $MnCl_2$ 와  $CuSO_4$ 는 약간의 저해효과를 보였다.

## 감 사

본 연구는 교육부 기초과학 연구지원(BSRI-93-424)과 조선대학교 교내 학술연구비(CRF-93-050)에 의하여 이루어진 것이며, 지원에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. T. Asai, H. Iizuka and K. Komagata (1964), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 95.
2. T. Asai (1968), *Acetic Acid Bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo.
3. O. Adachi, E. Miyagawa, E. Shinagawa, K. Matsushita and M. Ameyama (1978), *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2331.
4. K. Tayama, M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura and T. Beppu (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 181.
5. E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi and M. Ameyama (1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1823.
6. T. Inoue, M. Sunagawa, A. Mori, C. Imai, M. Fukuda, M. Takagi and K. Yano (1989), *J. Bacteriol.*, **171**, 3115.
7. H. Sund, and M. Theorell (1963), *The Enzymes*, (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myback, eds), Vol. **7**, 57 Academic Press.
8. J. A. Duine, J. Frank, Jr. and J. A. Jongejan (1987), *Advances in Enzymology*, (A. Meister, eds), Vol. **59**, 169, John Wiley and Sons, New York.
9. B. Groen, J. Frank and J. A. Duine (1984), *Biochem. J.*, **23**, 921.
10. E. Entani, S. Ohmori, H. Masai and K. Suzuki (1985), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 475.
11. Park J. P., Kim S. J., Ryu J. C., Pyo B. S., and Kim S. W. (1993), *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **8**(4), 397.
12. J. G. Carr (1968), *Identification Methods for Microbiologists*, (B. M. Gibbs and D.A. Shapton eds), part B, 1, Academic Press, London.
13. M. Ameyama and O. Adachi (1982), *Methods in Enzymology*, **89**, 450.
14. M. M. Bradford (1976), *Analytical Biochemis-*

- try*, **72**, 248.
15. G. T. Sperl, H. S. Forrest and D. T. Gibson (1974), *J. Bacteriol.*, **118**, 541.
16. M. Rupp and H. Gorisch (1988), *Biol. Chem.*, **369**, 431.