

Rhodobacter sphaeroides D2300이 생성하는 산소 유도체에 작용하는 효소의 특성

김동식 · 이해주*

동아대학교 자연과학대학 화학 생명과학부 생명과학전공

산소의 존재 유·무 등과 같은 배양 환경의 변화에 따라 통성 혐기성 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides* D-2300이 만들어내는 산소 유도체에 작용하는 효소의 특성을 조사한 결과 세포내 SOD는 호기적 배양에서는 초기 배양액의 pH가 7일 때, 혐기적 배양에서는 pH 8일 때 활성이 높은 반면 세포외 방출 SOD는 두 배양조건에서 모두 약산성인 pH 6에서 활성이 높았다. Catalase는 두 조건 모두 중성 부근에서 최고의 활성을 보였으며, 산성 pH 부위에서는 급격히 활성이 낮아졌다. Mn-SOD의 활성 유도체인 methyl viologen을 첨가했을 때 두 조건 모두에서 성장의 저해를 보였으며, 배지에 철 이온을 첨가하여 배양 하였을 때 호기적 조건에서만 두 배 이상 활성이 증가되었다. 혐기적 조건에서는 전체적인 활성이 낮아 금속이온의 추가적인 첨가에도 더 이상 활성이 유도되지 않았다. Mn-SOD 활성 저해제인 NaN_3 와 CuZn-SOD 활성 저해제인 NaCN를 배양액에 첨가했을 때 NaCN은 두 가지 배양 조건에서 생성되는 SOD 모두를 저해하지 않았으며, NaN_3 는 혐기적 배양조건에서만 0.3 mM 이상에서 급격한 SOD활성의 저해를 가져왔다. 따라서 *Rhodobacter sphaeroides* D-2300도 혐기적 배양 조건에서 Mn-SOD가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 호기적 조건에서는 Fe-SOD가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. Catalase의 활성도 두 가지 배양조건 모두에서 methyl viologen에 의해 활성이 유도되었으며, NaCN와 NaN_3 에 의해서 급격히 저해되었다.

Key words □ catalase, methyl viologen, photosynthetic bacteria, *Rhodobacter sphaeroides* D-2300, superoxide dismutase (SOD)

산소는 호기적 생물체에는 매우 필수적인 물질이지만, 그것이 매우 유독한 산소 유도체(O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , $^1\text{O}_2$, OCl^- 등)를 생성하기 때문에 이것이 바로 제거되지 않으면 활성산소로 인한 장애를 받기 쉽게 되며, 면역반응능력의 저하 및 노화현상까지 초래한다고 보고 되고 있다(31).

1969년 McCord와 Fridovich(26)는 superoxide dismutase (SOD)가 생체에 유해하게 작용하는 활성 산소를 제거해 주는 역할을 한다는 보고를 하였으며, SOD에 의해 합성된 H_2O_2 는 catalase, peroxidase 등에 의해 물로 되어 생체 내에서 합성되는 유해한 산소 유도체가 제거된다.

최근 NO가 superoxide와 결합하여 강력한 산화제인 peroxynitrite를 생성하며 이외에도 다른 radical들을 생성하기도 한다는 것이 알려져 있으며, 생체 내에서 NO는 superoxide에 대해 SOD와 경쟁하여 SOD보다 빠르게 반응 할 수 있는 유일한 물질로 알려져 있다.

SOD는 활성 부위가 산화·환원 금속으로 이루어진 금속성 단백질로 이러한 금속들의 종류에 따라 Cu·Zn-SOD, Mn-SOD와 Fe-SOD와 같이 세 가지로 분류되며(7), 배양 조건(3), 즉 산소의 존재 유무 등과 미생물의 종류에 의해 서로 다른 isoenzyme의

형태를 가진다(19, 27, 34, 37, 38). 그러나 최근에는 이 세 종류 외에 Zn-SOD, Ni-SOD(20, 23), Mn-SOD와 Fe-SOD, Fe·Zn-SOD와 같은 혼합(hybrid)-SOD와 2개의 Fe 원자와 1개의 Zn 원자를 함유하는 새로운 SOD를 분리하기도 했다. 뿐 만 아니라 세포외 SOD(EC-SOD)가 최근에 몇몇 제한된 생물체에서 분리되었다(5, 25). 각 형태의 SOD는 생물체간의 분포 양상(2, 5, 34)과 물리·화학적 특성(35, 36, 37)이 서로 다르며, 또 혐기적, 호기적 배양 조건에 따라서도 다양한 형태의 SOD를 만든다(9). 또 배양 배지에 제공되어지는 금속 이온의 종류에 따라서 만들어지는 SOD의 종류도 다르다는 보고가 있다(29).

Catalase는 고등식물에서부터 미생물에 이르기 까지 광범위한 생물에서 발견되는데, 그 중에는 대부분의 동식물과 미생물에서 발견되고 서로 공통적인 특징을 가지고 있는 효소로서 catalase활성만 나타내는 전형적인 catalase와 catalase 활성과 peroxidase 활성을 함께 가지고 있는 hydroperoxidase (catalase-peroxidase) 등 두 가지 유형의 catalase가 존재하고 있는 것으로 알려졌고(15, 28), 몇 가지 종류와 미생물에는 두 가지 이상의 서로 다른 catalase가 존재하는 것으로 알려져 있다(17). 그러나 미생물, 특히 세균들은 그 종류와 환경에 대한 적응 및 대사 능력의 다양성으로 미루어 현재까지 발견된 catalase와는 다른 종류의 catalase를 더 가지고 있을 가능성이 충분히 있다.

SOD와 catalase등과 같은 생물체가 만들어 내는 산소 유도체

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 051-200-7264, Fax: 051-200-7269
E-mail: leehj@daunet.donga.ac.kr

에 대한 연구는 질병, 노화 등과 관련하여 진핵생물을 재료로 하여 많은 연구가 진행되고 있고, 원핵생물의 경우도 질병과 관련이 있는 병원성미생물을 재료로 하여 많은 연구가 되고 있다. 그러나 질병과 큰 관련이 밝혀지지 않은 자연계에 존재하는 미생물을 재료로 한 연구는 거의 없는 실정이다.

광합성 세균은 폐기물에 존재하는 유기물을 분해하는 능력이 우수하고, 그 결과 청정 에너지인 수소의 생성도 가능하며(22), 생 분해능이 우수한 광합성 체초제인 α -amino leuvalinic acid (17, 21, 33)의 생성도 가능한 균으로 산업적으로 유용성이 대단히 큰 미생물이다. 뿐만 아니라 광합성 세균은 호기적, 혐기적 조건에서 모두 자랄 수 있는 특징을 가지고 있기 때문에 산소의 존재 유, 무 등과 같은 배양환경의 변화에 따라 어떤 종류의 SOD를 만들어 내는지를 파악할 수 있고, 혐기성 상태에서도 합성되는 SOD는 생체 내에서 어떠한 역할을 하는지를 밝히기 위한 좋은 기초 자료를 제공 할 수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서 분리 보관하고 있는 통성 혐기성 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides* D-230을 이용하여, 산소의 존재 유, 무 등과 같은 배양환경의 변화에 따라 SOD와 catalase, peroxidase의 발현과 상호 연관 관계에 관하여 조사하여, 산소 유해 산물인 superoxide radical, hydrogen peroxide의 비독성화 기작에 대한 보다 깊은 이해를 돕고, 진화학적 산소가 존재하지 않았던 원시시대의 SOD의 역할과 위치를 파악하기 위한 기초 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

균주는 본실험실에 보관중인 김해 논외의 수계 혐기성 균에서 분리한 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides* D-230을 실험 균주로 사용하였다(22). 배지는 광합성 세균이 잘 자라는 Ormerod 배지(30)를 사용하였으며 배양조기의 배지의 pH는 7.0에 맞추었다. 배양 조건에서 혐기적 배양은 Ar 가스를 산소와 대체하여, 30°C, 3~4 Klux의 백열등 아래에서 24시간 배양하였으며, 호기적 배양은 250 ml 삼각 flask에 배지를 넣어 멸균한 후 균을 접종하여 위와 같은 조도와 온도에서 100 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액의 균체량은 분광광도계(Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer, JAPAN)를 사용하여 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

효소액 추출

배양한 균체를 6,500 × g, 4°C에서 25분 동안 원심 분리하여 균체를 모은 후, 0.85 % NaCl 용액으로 1회 세척하여, pH7.0인 5 mM 인산완충용액 적당량으로 현탁하고, 현탁한 균체를 knob 5, % out put 20의 조건으로 초음파 파쇄기(ultrasonic processor XL-2015, HEAT system)을 사용하여 파쇄 하였다. 파쇄액은 원심 분리를 하여 찌꺼기를 제거하고 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 활성 측정

단백질 정량은 Lowry의 방법(24)에 의하여 실시하였으며, 표준

단백질은 bovin serum albumin (Sigma, U.S.A.)를 사용하였다.

SOD의 활성은 Giannopolitis 등(8)의 방법과 Dhindsa 등(6)의 방법을 수정하여 측정하였다. SOD의 활성은 효소 용액의 총량 중 nitro blue tetrazolium(NBT)의 광환원을 50% 억제시키는 효소 용액의 양을 1 unit로 표시하였다. NBT의 광환원은 13, 000 lux (20 W 형광등, 7 cm)의 빛으로 9분 동안 반응을 시켜 측정하였다.

Catalase, Peroxidase의 활성은 Bergmyer(1)의 방법으로 하였다. catalase의 1 Unit는 1분 동안 1 μ M의 H₂O₂를 분해하는 능력으로 표시하였다. peroxidase의 1 Unit는 1분 동안 1 μ M의 Guaiacol을 감소시키는 효소의 양으로 표시하였다.

Nitrite 정량

배양한 균체를 6,500 × g, 4°C에서 25분 동안 원심 분리한 상층액을 nitrite 측정에 이용하였으며, Griess reaction 방법(18)에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

파쇄시간이 SOD, catalase 활성에 미치는 영향

파쇄시간에 따라 효소의 활성정도가 달라지고, 오랜 기간 파쇄할 경우에는 효소의 파괴로 인한 활성 소실이 야기되므로, 효소 활성에 미치는 파쇄시간의 최적 조건을 찾기 위하여 총 파쇄시간을 2분에서 10분으로 하여 효소의 활성을 비교하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 SOD의 경우 6분의 파쇄시간에서 최고 활성을 나타내었으며, catalase는 파쇄시간을 8분으로 했을 때 가장 높은 활성을 보였다. 이후의 실험에서 효소 액을 6분 파쇄하여 사용하였다.

배양조건에 따른 SOD, catalase의 활성 측정

호기성 배양조건, 혐기적 배양조건등과 같이 배양조건을 달리

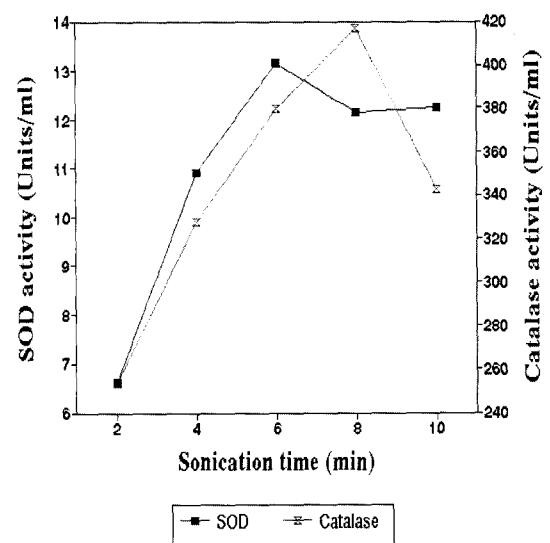


Fig. 1. Effect of sonication time on SOD and Catalase activity

Table 1. SOD and Catalase activity of *R.sphaeroides* D-230 after culturing for 30 hours under aerobic or anaerobic conditions.

| Culture Condition | Growth (A_{660}) | Final pH | Nitrite (ppm) | IC-SOD (units/ml) | EC-SOD (units/ml) | Catalase (units/ml) |
|-------------------|----------------------|----------|---------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Aerobic | 3.12 | 9.44 | 0.039 | 12.416 | 1.705 | 480.4 |
| Anaerobic | 3.28 | 9.33 | 0.0328 | 5.261 | 0.369 | 417.1 |

할 경우, 배양조건이 SOD와 catalase활성에 어떤 변화를 주는지를 알아 보기위하여, 호기적, 혐기적인 배양조건으로 30시간 배양한 균체에서 효소 액을 추출하여 nitrite 생성량과 SOD와 catalase의 활성을 측정하였다(Table 1).

호기적 배양조건에서 추출한 IC-SOD(세포내 SOD), EC-SOD(세포외 방출 SOD)와 catalase의 활성이 높은 것은 혐기적인 조건 보다 높은 산소독성에 의한 것임을 알 수 있었다. 일반적으로 절대혐기성 미생물은 산소가 존재하면 미생물이 생존할 수 없는 것은 미생물이 생성한 유해한 산소 유도체를 제거할 수 있는 SOD가 없어서 이라고 생각을 하나, 혐기성 미생물의 경우에도 SOD와 catalase등과 같이 유해한 산소를 제거하는 효소를 합성을 한다. 그러나 아직 혐기적 조건에서 이들 효소들이 어떠한 기능을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다. 본 실험에서 사용한 통성 혐기성 미생물인 *R. sphaeroides* D-230도 혐기성 조건에서도 SOD가 합성되거나 활성이 호기적 조건보다 혐기성 조건에서 낮음을 알 수 있다. 또 두 배양 조건에서 모두 IC-SOD의 활성이 EC-SOD의 활성보다 높으므로 합성된 SOD가 체외에 방출되는 것보다 체내에 저장되어 있음을 알 수 있었다.

배양 초기 pH가 SOD와 catalase 활성에 미치는 영향

Ormerod 배지를 각 pH로 조절하여 실험과정에 제시한대로 두 조건에서 배양하였다. 배양된 균체에서 효소 액을 추출하여 SOD 활성을 측정하였다(Table 2). 세포내 SOD는 호기적 배양에서는 pH 7, 혐기적 배양에서는 pH 8과 같이 중성과 약알칼리에서 활성이 높은 반면 세포외 방출 SOD는 둘 다 약산성인 pH 6에서 활성이 높았다. Catalase는 두 조건 모두 중성부근에서 최고의 활성을 보였으며, 산성 pH 부위에서는 급격히 활성이 낮아졌다.

Table 2. Effect of initial pH on nitrite concentration, final pH, SOD, and catalase activity

| Culture Condition | pH | Final pH | Nitrite (ppm) | IC-SOD (units/ml) | EC-SOD (units/ml) | Catalase (units/ml) |
|-------------------|----|----------|---------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Aerobic | 5 | 5 | 0.00406 | 2.099 | 9.068 | 201.1 |
| | 6 | 9.33 | 0.0104 | 10.321 | 9.317 | 342.6 |
| | 7 | 9.45 | 0.00986 | 13.353 | 0.04 | 558.6 |
| | 8 | 9.39 | 0.00782 | 12.595 | 1.242 | 528.8 |
| | 9 | 9.33 | 0.00551 | 9.446 | 3.665 | 424.5 |
| Anaerobic | 5 | 5.03 | 0.00609 | 2.933 | 9.119 | 89.3 |
| | 6 | 6.88 | 0.00377 | 5.22 | 14.164 | 141.5 |
| | 7 | 8.16 | 0.0171 | 5.455 | 6.687 | 387.3 |
| | 8 | 8.93 | 0.0203 | 7.683 | 0.02 | 350.1 |
| | 9 | 8.95 | 0.0058 | 6.804 | 0.182 | 312.8 |

Methyl viologen이 SOD와 catalase 활성에 미치는 영향

*E. coli*의 Mn-SOD의 유도제로 알려진 methyl viologen(13)이 통성혐기성인 *Rhodobacter sphaeroides* D-230에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각 농도별로 배지에 첨가하여 배양한 균체에서 효소액을 추출하여 SOD 활성을 측정하였다(Fig. 2).

일반적으로 methyl viologen은 세포내에 O_2^- 의 생성량을 증가 시킴으로써 SOD 유도를 초래한다고 알려져 있다. 또한, *Dunaliella salina*에서 methyl viologen에 의해 SOD와 catalase isozymes 이 동시에 유도되는 것이 보고되었다(32).

본 연구에서는 호기적 배양과 혐기적 배양 두 조건 모두에서 methyl viologen의 첨가에 의해 균의 성장이 저해되었으며, 혐기적 조건에서만 0.5 mM methyl viologen를 첨가하였을 때 첨가하지 않았을 때 보다 약 2배 이상의 SOD활성 증가를 나타냈다. 이에 따라 혐기적 배양에서 Mn을 함유한 SOD가 생성된다는 추측을 할 수 있었다.

또한, cyanide 저항성 호흡에서는 O_2^- 보다 H_2O_2 의 생성이 증가하는 것으로 알려져 있으며(12), 이러한 경우에는 methyl viologen이 H_2O_2 를 제거하는 효소의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 H_2O_2 를 제거하는 능력이 있는 catalase의 활성이 호기적, 혐기적 배양조건 둘 다에서 유도되는 것으로 보아, 두 가지 배양조건 모두에서 cyanide 저항성 호흡을 하는 것으로 추측된다.

금속이온의 변화에 따른 효소의 활성 변화

SOD는 금속이온을 함유하는 metalloenzyme이기 때문에 methyl viologen의 유도에서와는 다르게 생장의 저해 없이 금속이온에 맞는 특징의 isozyme의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다(4).

본 실험에서는 배지의 성분 중에서 금속이온과 효모 추출물을

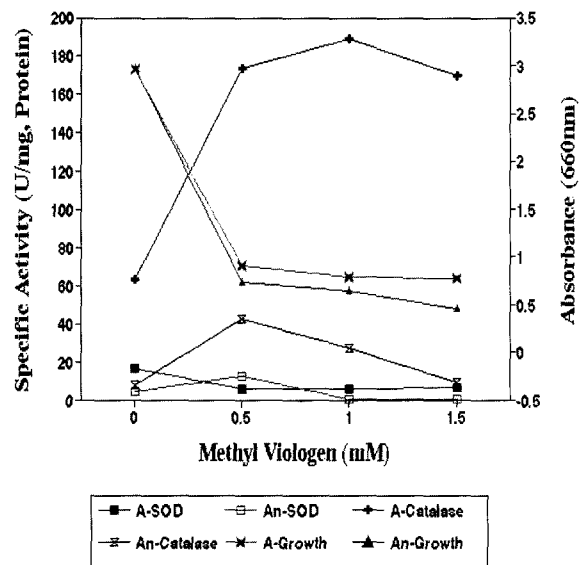


Fig. 2. Effect of methyl viologen on SOD and Catalase activity

Table 3. Effect of metal ions on growth, final pH, nitrite concentration, SOD, and catalase activity

| Culture condition | Metal (1 mM) | Growth (A_{660}) | Final pH | Nitrite (ppm) | SOD (units/ml) | Catalase (units/ml) |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------|----------|---------------|----------------|---------------------|
| Aerobic | None | 2.4 | 9.15 | 0.00290 | 5.33 | 148.98 |
| | Fe ²⁺ | 3.4 | 9.04 | 0.00232 | 13.17 | 504.52 |
| | Fe ³⁺ | 3.6 | 9.08 | 0.00290 | 12.69 | 446.93 |
| | Fe ²⁺ + Fe ³⁺ | 5.5 | 8.83 | 0.00232 | 12.78 | 479.73 |
| | Mn ²⁺ | 2.4 | 8.02 | 0.00464 | 4.46 | 1483.98 |
| Anaerobic | None | 1.5 | 7.85 | 0.00435 | 2.95 | 17.132 |
| | Fe ²⁺ | 3.2 | 8.57 | 0.00435 | 3.34 | 46.928 |
| | Fe ³⁺ | 3.2 | 8.66 | 0.00377 | 3.15 | 41.714 |
| | Fe ²⁺ + Fe ³⁺ | 4.0 | 8.66 | 0.00435 | 3.92 | 67.040 |
| | Mn ²⁺ | 0.7 | 9.5 | 0.00551 | 11.57 | 74.488 |

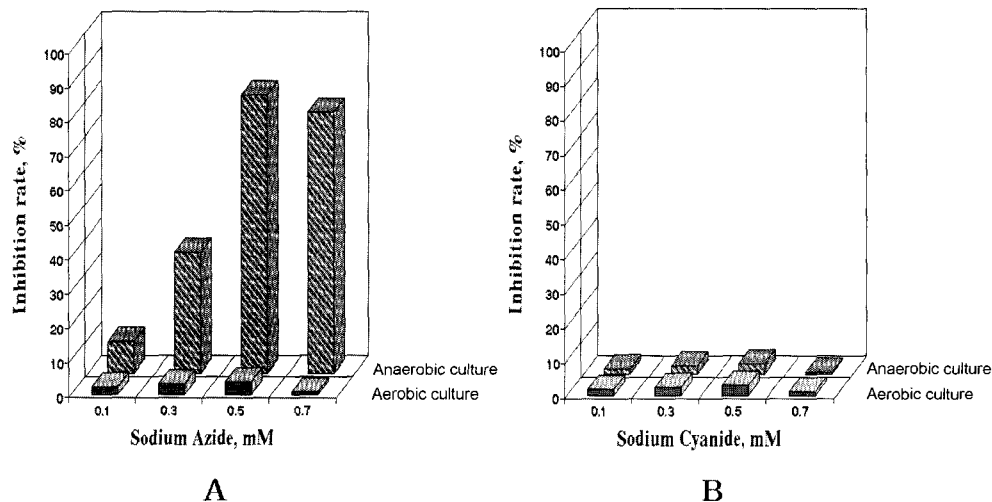
제외한 기본배지에 금속이온(ferrous ammonium sulfate), Fe³⁺(ferric ammonium sulfate), Mn²⁺(manganese sulfate)을 최종 농도가 1 mM이 되게 달리 첨가하고(None, Fe²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺+Fe³⁺, Mn²⁺), *Rhodobacter sphaeroides* D-230의 생육인자(20, 31)인 biotin(10 µg/L), thiamine(1 mg/L), nicotinic acid(1 mg/L)을 첨가하여 24시간 배양한 후 효소의 활성 변화를 확인하였다.

Table 3에 나타난 것처럼 호기적 조건에서 Fe²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺+Fe³⁺가 첨가된 경우에 금속이온이 첨가되지 않은 것보다 두 배 이상의 활성을 보이는 반면에, Mn²⁺만을 첨가 할 때는 금속이온이 첨가되지 않은 상태와 비슷한 양상을 보이는 것으로 보아 Mn²⁺이 호기적 조건에서는 SOD 활성에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상이 호기적 조건에서 생성되는 SOD의 보결원자단의 결실에 의한 것인지 또는 Mn²⁺이 SOD 활성을 저해하는 것인지는 알 수 없었다. 반면 혐기적 조건에서는 이와 반대의 양상을 보였다. 따라서 호기적 조건에서는 Fe-SOD가 생성됨을 알 수 있다. *Bacteroides fragilis*와 같은 몇몇 종에서 추출한 SOD는 활성부위에 Mn 또는 Fe를 가지는 것으로 보고 되어 혼란스러운 종들도 있다(9). 호기적 조건에서 catalase의 활성은 Mn²⁺이 첨가된 경우가 Fe 계 금속이온의 첨가에서 보다 높게 나타났으며, 혐기적 조건에서는 금속이온의 종류에 관계

없이 비슷한 활성을 나타내었다. 이는 본 연구에 사용된 균주가 일반적인 catalase의 형태인 ferric 계 금속성 효소이며, 혐기적 조건에서는 전체적인 활성이 낮아 금속이온의 추가적인 첨가에도 더 이상 활성이 유도되지 않는 것으로 사료된다.

저해물질에 따른 SOD와 catalase의 활성 변화

배양액에 SOD isozyme의 활성 저해제로 알려져 있는 NaCN과 NaCN를 각각 최종농도가 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mM이 되게 첨가한 ormerod 배지에서 균을 배양한 후에 추출한 효소 액의 활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 두 배양 조건에서 배양한 *R. sphaeroides* D230에서 추출한 효소가 NaCN에 의해 저해되지 않았으며, NaCN은 혐기적 배양 조건에서만 0.3 mM 이상에서 급격한 활성의 저해를 가져왔다. 따라서 *R. sphaeroides* D-230은 혐기적 배양에서는 Mn-SOD가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. Catalase의 활성은 NaCN과 NaCN에 의해 급격한 활성저해를 보였다. *R. sphaeroides* D-230을 혐기적 배양을 할 때 0.5 mM NaCN을 처리하여 catalase의 활성을 조사하면 약 7.5%의 활성만 나타내었으며 0.5 mM NaCN에 의해서는 약 8.13% 정도의 활성만 나타내었다. 또 호기적 배양에서는 0.5 mM NaCN에 의해 약 13.75%의 활성만 나타내었고 0.5 mM NaCN에 의해

**Fig. 3.** Effect of sodium cyanide (A) and sodium azide (B) on SOD activity by adding various concentration of inhibitors in culture medium.

서는 약 12.5%의 활성만 나타내었다. 이는 전형적인 hydroperoxidase의 형태를 나타내는 연구결과와 일치함을 알 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 동아대학교 학술연구지원재단의 학술연구비에 의하여 연구되었음

참고문헌

- Bergmyer, H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. 1.494-495. Verlag Chemie Weinheim. New York and London.
- Britton, C.J., and I. Fridovich. 1973. Intracellular localization of the superoxide dismutase of *E. coli*; Intracellular localization and function. *J. Bacteriol.* 131, 815-820.
- Camella, S.M., and H.M. Hassan. 1984. Anaerobic Biosynthesis of the Manganese-containing Superoxide Dismutase in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 12821-1285.
- Charles J. Lwenstein and Solomon H. Synder Nitric Oxide, A novel biological Messenger. *Cell.* 70, 705-707
- Clare, D.A., J. Blum, and I. Fridovich. 1984. A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese. *J. Biol. Chem.* 259, 5932-5936.
- Dhindsa, R.S., P.P. Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 52, 93-101
- Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* 58, 61-97.
- Giannopolitis, C.N., and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutase, 1, Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Gregory, E.M., and C.H. Dapper. 1983. Isolation of iron-containing superoxide dismutase from *Bacterioides fragilis*: Reconstitution as a Mn-containing enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 220, 293-300.
- Gutteridge, J.M., R. Rihmond, and B. Halliwell. 1979. Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and lipid peroxidation by desferrioxane. *Biochem. J.* 184, 469.
- Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. 1989. Free radicals in Biology and Medicine, 87-187, 2nd. Oxford University Press. New York.
- Hartman, J.R., T. Geller, Z. Yavin, D. Bartfeld, D. Kanner, H. Aviv, and M. Gorecki. 1986. High-level expression of enzymatically active human CuZn-superoxide dismutase in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 7142-7146.
- Hassan, H.M., and I. Fridovich. 1977. Regulation of the Synthesis of Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252, 7667-7672.
- Hjalmarsson, K., S.I. Marklund, A. Engstrom, and T. Edlund. 1987. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc. Acad. Sci. USA.* 84, 6340.
- 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.
- Hochman, A., I. Goldberg. 1991. Purification and characterization of a catalase -peroxidase and a typical catalase from the *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1077, 299-307.
- Jin-Sook Lee, In-Ho Park, and Hye-Joo Lee. 1997. Production of δ -Aminolevulinic acid by *Rhodospirillum rubrum* DM. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 12, 1-8.
- Jon M. Fukuto, Adrian J. Hobbs and Louis J Ignarro 1993. Conversion of nitroxyl to nitric oxide in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO₃. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 707-713
- Joseph, P., Jr. Martin, and I. Fridovich. 1981. Evidence for a Natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. *J. Biol. Chem.* 256, 6080-6089
- Kim E.J., H.J. Chung, B. Suh, Y.C. Hah, and J.H. Roe. 1998. Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of sodN gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. *Mol Microbiol.* 27, 187-95.
- Lee, Hye Joo. 1995. Identification of Photosynthetic bacterium producing α -aminolevulinic acid. *Bull. of Basic Sciences.* 12, 101-118.
- Lee, H.J. 1986. Characterization of a hydrogen evolving strain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Kor. J. Microbiol.* 24, 62-66.
- Lee J.W., J.H. Roe, and S.O. Kang. 2002. Nickel-containing superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 349, 90-101.
- 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.
- Marklund, S.L. 1984. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem. J.* 220, 269-272.
- McCord, J.M., and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244, 1049.
- Misra, H.P., and I. Fridovich. 1972. The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 247, 3410.
- Mitchell, M.J., S. Ahmad, and R.S. Pardini. 1991. Purification and properties of highly active catalase from cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* 882, 234-241.
- Nakayama, K. 1994. rapid viability loss on exposure to air in a superoxide dismutase-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 176, 1939-1943.
- Ormerod, J.G., K.S. Ormerod, and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; Relationship with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 449-463.
- Oyanagui, Y. 1981. Superoxide and medicine. Kyoritsu-Shuppan. Tokyo.
- Rabinowitch, H.D., C.T. Privalle, and I. Fridovich. 1987. Effects of paraquat on the green alga *Dunaliella salina*: protection by the mimic of superoxide dismutase, desferal-Mn(IV). *Free Rad. Biol. Med.* 3, 125-131.
- Sasaki, K., I. Satoshi. 1987. Production of δ -aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65, 511-515.
- Schnell, S., H.M. Steinman. 1995. Function and stationary-phase induction of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase and catalase/peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 177, 5924-5929.
- Steinman, H.M. 1978. The amino acid sequence of mangao superoxide dismutase from *E. coli* B. *J. Biol. Chem.* 253, 8708-8720.
- Steinman, H.M., and R.L. Hill. 1973. Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 3725-3729.

37. Steinman, H.M. 1985. Bacteriocuprein superoxide dismutase in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 162, 1255-1269. and evidence for a precursor form. *J. Biol. Chem.* 262, 1882-1887.
38. Steinman, H.M. 1987. Bacteriocuprein superoxide dismutase in *Photobacterium leiognathi* : Isolation and sequence of the gene 39. Zollner, H., Handbook of enzyme Inhibitor. 1993. 105-484. USA

(Received 2 March 2004, Accepted 1 April 2004)

ABSTRACT : Characterization of Enzymes Against Oxygen Derivatives Produced by *Rhodobacter sphaeroides* D-230

Dong-Sik Kim and Hye Joo Lee* (Biological Science, college of Natural Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea)

The activities of enzymes that act on oxygen derivatives in *Rhodobacter sphaeroides* D-230 were investigated under various culture conditions. Intracellular SOD activity from the cells grown in aerobic or anaerobic culture conditions was highest at pH 7.0 and pH 8.0, respectively. On the other hand, extracellular SOD activity was highest at pH 6.0. Catalase activity was highest at neutral pH in both cases. Growth of *R. sphaeroides* D-230 in aerobic or anaerobic culture conditions was inhibited by methyl viologen. As *R. sphaeroides* D-230 was cultured aerobically, SOD activity was increased about 2-fold by addition of iron ion. But Mn^{+2} had little effect on the SOD activity of *R. sphaeroides* D-230 grown in aerobically. NaCN, the inhibitor of Cu·Zn-SOD, did not inhibit SOD activity. But, NaN_3 , the inhibitor of Mn-SOD, inhibited SOD activity in anaerobic cultures condition. Therefore, *R. sphaeroides* D-230 produce Mn-SOD in anaerobic condition, although Fe-Sod is produced in aerobic condition. The activity of catalase was induced by methyl viologen, however, extremely inhibited by NaCN and NaN_3 .