

## *Streptomyces coelicolor*의 연속 배양시 산소 분압에 따른 방어 효소의 활성 변화

박용두 · 이계준 · 노정혜\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 분자미생물학 연구센터

## Effect of Partial Oxygen Pressure on the Growth and Defense Enzyme Activities of *Streptomyces coelicolor* in continuous culture system

Park, Yong-Doo, Kye-Joon Lee and Jung-Hye Roe\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
and Research Center for Molecular Microbiology,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**— Effect of partial oxygen pressure on the cell growth and the activities of oxidative defense enzymes were measured in the continuous culture of *Streptomyces coelicolor*. Both the wild type and the mutant strain resistant to hydrogen peroxide were cultured and the dry cell weight of the two cultures were measured at different oxygen tensions. Growth of the wild type was inhibited by oxygen at above 0.5 vvm. Growth of the hydrogen peroxide resistant mutant was stimulated by pure oxygen at 0.5 vvm but was inhibited by oxygen at 1.0 vvm. Therefore, growth of the hydrogen peroxide resistant mutant was less affected by the deleterious oxidative stress of oxygen. Activities of the several defense enzymes were also measured at different oxygen tensions. Activities of catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase increased significantly as oxygen pressure increased in the wild type culture. In the mutant, however, increase in those enzyme activities was not obvious whereas the uninduced levels of the above enzymes were higher than those of wild type. As judged by Western blotting, the amount of the major catalase increased as the oxygen pressure increased. This indicates that the induction of the catalase activity by oxygen pressure is mostly due to the increase in the expression level for the major catalase.

산소는 호기성 세균의 경우 생존에 필수 요소로 작용한다. 그러나, 산소에 전자가 단계적으로 첨가되면 생물체에 해를 입히는 여러 가지 활성 산소종이 만들어지게 된다. Hydroxyl radical, hydrogen peroxide, 및 superoxide radical 등이 그것이고, 이들은 생물체에 손상을 주며 성장 저해 요인으로 작용한다. 그러나, 생물체는 이런 활성 산소종들에 대한 방어 기작을 가지고 있다. Catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등과 같은 방어 효소들과 glutathione이나 vitamin C와 같은 물질들이 활성 산소

종의 독성을 감소시키는 역할을 하고 있다. 산화적 스트레스는 세포내 방어 작용 기작들과 활성 산소종들과의 사이에 균형이 깨질 때 일어난다(1). 이런 산화적 스트레스에 대한 연구는 미생물에서도 많이 수행되었는데, 특히, *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium*에서는 산화적 스트레스에 대한 반응의 조절군(regulon)에 대한 특성 분석이나 조절 인자의 클로닝 등에 대한 연구가 진행되어 왔다. *E. coli*와 *S. typhimurium*에서 과산화수소에 의해 발현이 유도되는 단백질들이 서른 여가지가 존재하는데, 그 중 catalase를 포함한 아홉 가지는 OxyR에 의해 발현이 조절됨이 밝혀졌다. 또한 *E. coli*에서 superoxide radical에 의해 발현이 유도되는 단백질들 중 superoxide dismutase와 G6PDH 등은 전사 단계에서 SoxS 단백질이 promoter에 부착하여 발현을 증대시킴이 알

**Key words:** *Streptomyces coelicolor*, partial oxygen pressure, continuous culture, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase

\*Corresponding author

려졌다(2, 3). 또한, SoxRS 조절군은 SoxR과 SoxS에 의해 두 단계를 거쳐 유도되며 조절되는 것이 밝혀졌다(4).

이런 연구를 바탕으로 하여 *Streptomyces coelicolor*에서는 과산화수소로 산화적 스트레스를 주어 생리적 변화를 관찰하는 실험이 수행되었다(5). 지수 성장기의 세포에 100  $\mu$ M의 과산화수소를 미리 처리한 후 20 mM의 과산화수소를 처리하면 미리 처리하지 않은 세포보다 생존률이 증가하며 여러 방어 효소들의 활성이 처리하지 않은 세포보다 증가하는 적응 현상을 볼 수 있었다. 또한, 돌연변이를 유발하여 과산화수소에 저항성을 보이는 돌연변이체를 분리하였다. 이 돌연변이체는 산화적 스트레스가 주어지지 않은 상태에서 야생형에 비해 여러 가지 방어 효소(catalase, glutathione reductase, G6PDH)들의 활성이 높으며, 따라서 방어 기작의 조절인자에 돌연변이가 유발된 것으로 추정되었다(5).

본 실험에서는 과산화수소가 아닌 고압 산소로 산화적 스트레스를 일으켰고, 연속 배양을 하여 세포의 생리적 상태를 일정하게 유지하고 산소 분압에 따른 세포의 성장 정도와 방어 효소의 활성 정도를 측정하였다. 또한, 과산화수소에 저항성을 보이는 돌연변이체에 고압의 산소로 산화적 스트레스를 주면서 배양한 후 야생형과 성장 정도와 효소 활성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*S. coelicolor* Muller(ATCC 10147)를 본 연구의 공시 균주로 사용하였으며, 과산화수소에 저항성이 증가하고 다발적 형질 변화가 일어난 돌연변이체로는 Lee 등(5)이 분리한 돌연변이체 중 N7 돌연변이체를 사용하였다.

### 배양

종균 배양은 포자를 최소 배지(Difco casamino acids 5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.6 g, polyethylene glycol 50 g, trace elements solution 1 ml,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.1 M, pH 6.8) 150 ml, glucose (20%) 25 ml)에 접종하여 30°C 진탕 배양기에서 150 rpm으로 2일간 배양하였다.

연속 배양은 7.5 l 유리 발효조(Chemap-fermenter)를 사용하였으며 배지는 최소 배지를 사용하였고 배지량은 2 l로 고정하여 수행하였다. 회석률은 0.1 h<sup>-1</sup>로 고정시켜 사용하였고, 온도는 30°C로 유지시켰

다. pH는 연동성 펌프를 이용하여 7.0으로 유지시켰고 산소 유입량은 공기로 0.25 vvm(volume/volume/minute), 1.5 vvm으로 유지하거나, 순수 산소로 0.5, 1.0 vvm으로 유지하였다. 세포 성장 정도를 알아보기 위하여 건조 중량을 측정하였다. 10 ml의 배양액을 얻어내어 미리 무게를 재어 놓은 여과지를 이용하여 진공 펌프로 배양액을 분리 제거한 다음 90°C에서 하룻밤 동안 말린 후 무게를 측정하였다.

### 효소 활성 측정법

**세포 추출액의 제조** : 세포 배양액 1.5 ml을 원심 분리하여 세포를 수확하고, 인산 완충 용액(potassium phosphate buffer, pH 6.2)으로 세척한 후, 침전균체와 같은 부피의 유리 구슬(지름 0.1 mm), 500  $\mu$ l의 인산 완충 용액, PMSF 100  $\mu$ M을 첨가하여 deep freezer에서 한시간 이상 얼린다. Mini-bead beater로 세포를 분쇄하고, 분쇄액을 원심 분리하여 세포 추출물을 얻었다.

**Catalase 활성 측정** : 세포 추출물의 catalase 활성 측정은 Beers와 Sizer 등(6)에 의한 방법을 사용하였다. 과산화수소의 감소 속도를 spectrophotometer로 240 nm에서 측정하였다. 반응 혼합물에는 3%(v/v) 과산화수소 18.2  $\mu$ l와 효소 혼합액 그리고 50 mM 인산 완충 용액을 넣어 총 부피가 1 ml이 되도록 하였다. 측정은 30°C에서 경로 길이 1 cm 인 수정 큐벳을 사용하였다. 효소 1 unit는 일분 동안 1  $\mu$ mol의 과산화수소가 효소에 의해 분해되는 양으로 정의하였다.

**Superoxide dismutase (SOD)의 활성 측정** : 활성 측정은 Beauchamp와 Fridovich(7)에 따라 반응 혼합물은 0.1 mM xanthine, 25  $\mu$ M NBT, 0.1 mM EDTA, 0.01% xanthine oxidase를 sodium carbonate 완충 용액(50 mM, pH 10.2)에 세포 추출액을 첨가하여 최종 부피가 1 ml이 되도록 했다. SOD가 없는 조건에서 xanthine oxidase에 의한 NBT 환원의 초기 속도를 560 nm에서 측정하고, 환원 속도를 50% 방해할 수 있는 효소량을 이 조건에서 SOD 1 unit로 정의하였다.

**Glutathione reductase 활성 측정** : Smith 등(8)의 변형된 방법을 사용하여 측정하였다. 즉, 환원된 glutathione에 의해 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)가 환원됨으로써 412 nm에서의 흡광도가 증가하는 것을 측정하였다. 반응 혼합물에는 100 mM 인산 완충 용액(pH 7.6)에 1 mM EDTA, 0.3 mM DTNB, 0.1 mM reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)가 첨가되었다. 1 unit는 일분 동안 1  $\mu$ mol의 thiobis(2-nitrosobenzoic acid)

(TNB)가 생산되는 효소양으로 정의하였다.

**Glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성 측정**  
: Decker(9)의 방법을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 340 nm에서 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP)의 흡광도 감소를 측정하였다. 반응 혼합물은 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 30 mM glucose 6-phosphate 30  $\mu$ l와 23 mM NADP 10  $\mu$ l를 첨가한 세포 추출물을 넣은 용액의 총부피가 1 ml가 되도록 하였다. 1 unit는 일분 동안 1  $\mu$ mol의 NADP를 감소시키는 양으로 정의하였다.

#### Catalase의 Western blotting

**SDS-polyacrylamide gel 전기 영동** : Hames와 Rickwood(10)의 방법을 변형하여 SDS-불연속 완충 용액 방식으로 상단 겔은 4%, 하단 겔은 7.5%로 사용하였다. 시료는 동량의 2배 농축 SDS sample buffer(125 mM Tris(pH 6.8), 4% SDS, 23% glycerol, 0.002% bromophenol blue)와 잘 혼합하고 5분간 중탕 후 전기 영동하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 fructose-6-phosphate dehydrogenase(85,200 Da), glutamate dehydrogenase(55,400 Da), 및 aldolase(39,200 Da) 등을 사용하였다.

**Immunoblotting** : Gershoni와 Palade(11)의 방법을 사용하였다. SDS-PAGE 겔을 증류수로 씻은 후, 미리 transfer buffer(15.6 mM Tris, 120 mM glycine)에 20분 정도 적신 nitrocellulose filter에 4°C에서 170 mA로 90분 동안 electroblotting을 하였다. 5 ml의 blocking buffer(0.05% Tween 20, 0.1% BSA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 $\times$ TBS 5 ml)로 filter를 1시간 동안 blocking시켰다. Catalase를 인지하는 항체(본 실험실 김형표 제공)를 1 : 500의 희석 비율로 넣어 주고 상온에서 16~20시간 동안 반응시켰다. Blocking buffer로 10분간 세척한 후 alkaline phosphatase와 연결된 2차 항체를 1 : 10,000의 희석 비율로 첨가한 후, 상온에서 한시간 동안 반응시켰다. Filter를 다시 blocking buffer로 10분간, alkaline phosphatase buffer(100 mM Tris(pH 9.5), 0.01%  $\text{MgCl}_2$ )로 두번 씻어 주고 발색 반응을 진행하였다. 70% dimethylformamide에 p-nitroblue tetrazolium chloride(NBT)를 50 mg/ml로 녹인 용액 66  $\mu$ l와 100% dimethyl-formamide에 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate(BCIP)를 50 mg/ml로 녹인 용액 33  $\mu$ l을 alkaline phosphatase buffer 10 ml에 넣어 섞은 후 filter가 들어 있는 용기에 넣어 반응시켰다. 약 30분간 보라색을 띠는 band가 나타날 때까지 반응시킨 후, 증류수로 씻고 filter를 보관하였다.

## 결과 및 고찰

### 산소 분압에 따른 세포 성장

야생형의 *S. coelicolor*를 연속 배양하면서 산소 유입량에 따른 세포 성장 정도를 건조 중량으로 측정하였다(Fig. 1). 공기 0.25 vvm의 유입시보다 1.5 vvm을 유입할 경우 세포량이 증가하였으나, 산소 0.5 vvm 이상에서는 세포량이 감소하였다. 이로써, 공기를 1.5 vvm 넣어 준 상태까지는 산소의 공급량이 성장에 활성적인 조건으로 보여지나 산소 0.5 vvm은 이미 산소 분압이 세포 성장의 저해 요인으로 작용하여 산화적 스트레스로 작용함을 알 수 있었다.

과산화수소 저항성 돌연변이 세포의 성장은 야생형과는 다른 양상을 보였다. 이 경우 공기 1.5 vvm을 유입시킨 경우까지는 야생형과 유사한 성장 속도를 보이나, 산소 0.5 vvm을 유입시킨 경우 공기 1.5 vvm 유입시보다 세포량이 현저히 증가하였다(Fig. 2). 산소를 1.0 vvm으로 유입시켰을 경우는 세포량이 감소하였으나, 공기 1.5 vvm 유입시보다는 여전히 높은 성장량을 보였다. 따라서, 과산화수소에 저항성을 보이는 돌연변이체는 산소 유입량을 높인 경우, 야생형에 비해 현저하게 산화적 스트레스에 대한 내성을 갖는 것을 연속배양 상태에서 확인 할 수 있었다. 따라서 과산화수소 저항성 돌연변이체 N7은 비단

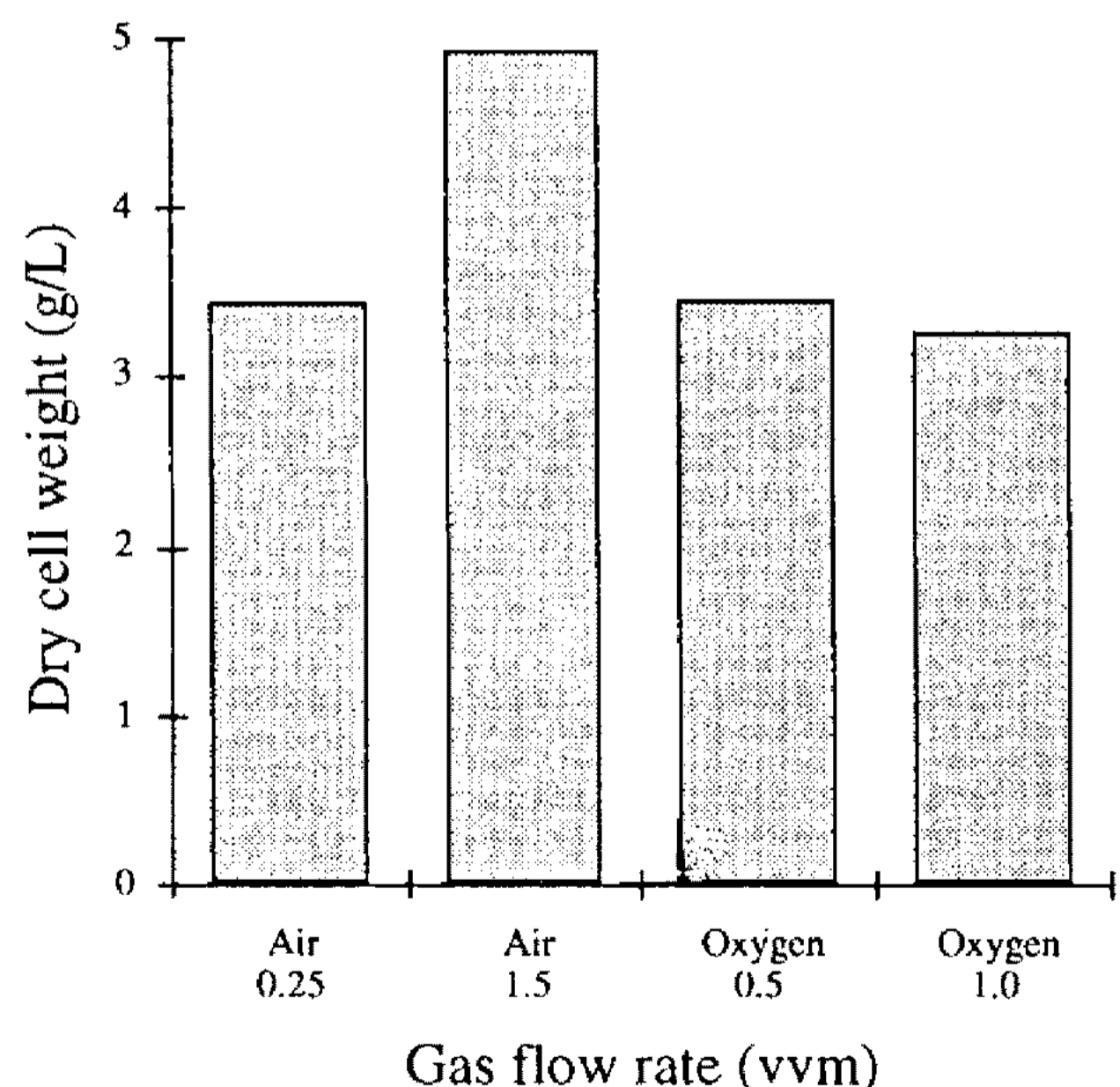


Fig. 1. Effect of oxygen on the growth of *S. coelicolor* in continuous culture.

The partial oxygen pressure was modulated either by bubbling air at 0.25 vvm and 1.5 vvm or by bubbling pure oxygen at 0.5 vvm and 1.0 vvm into the fermentor. Cell growth was monitored by measuring dry cell weights as described in the Material and Methods.

과산화수소 뿐 아니라 산소 분압을 포함한 일반적인 산화적 스트레스에 대한 내성을 가지며 이는 N7 돌연변이체가 superoxide radical 발생화합물인 paraquat에 대한 내성도 가진다는 것을 관찰(12)과 상통되는 결과라 하겠다.

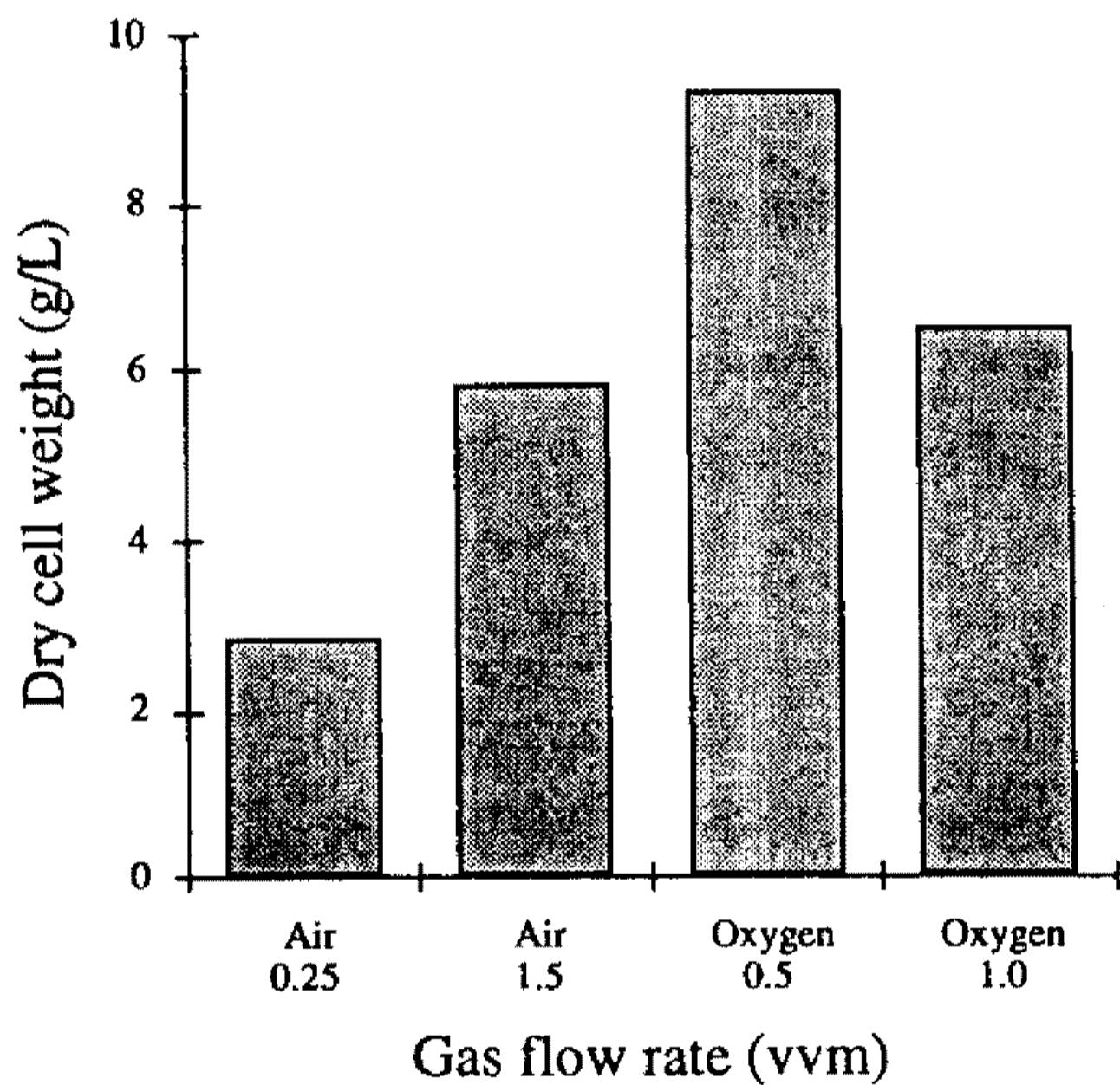
**산소 분압에 따른 효소 활성의 관찰**

산소 유입량 증가에 따른 *S. coelicolor*의 생리적 변화를 알아보기 위하여 산화적 스트레스에 대응하는 방어 효소들의 활성을 측정하였다(Table 1).

*S. coelicolor*의 야생형에서 catalase는 산소량의 증가에 따라 효소 활성이 현저하게 증가함을 볼 수 있

었다. 특히, 산화적 스트레스로 작용한다고 생각되는 산소 0.5 vvm의 경우 공기 1.5 vvm의 경우에 비해 약 4배, 공기 0.25 vvm에 비해서는 약 7배의 catalase 활성 증가를 볼 수 있었다. 또한, 산소 1.0 vvm에서도 산소 0.5 vvm에 비해 효소 활성이 증가하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase는 공기 0.25, 1.5 vvm에서 활성을 측정한 결과 공기 0.25 vvm의 경우보다 공기 1.5 vvm의 경우, 효소 활성이 약 6배 증가한 것을 볼 수 있었다. Glutathione reductase나 superoxide dismutase는 산소 유입량의 변화에 따른 효소 활성의 지속적 증가를 관찰할 수 없었다. Glutathione reductase는 산소가 성장 저해 요인으로 작용하는 산소 0.5 vvm에서 공기 1.5 vvm 유입 때에 비해 약 1.5배의 효소 활성의 증가를 볼 수 있었고, superoxide dismutase는 1.3배의 증가를 볼 수 있었다. 따라서 야생형 *S. coelicolor*의 경우 산소 분압이 점점 높아짐에 따라 catalase와 G6PDH는 연속적으로 증가하면서 산화적 스트레스에 대응 현상을 보이는 반면, superoxide dismutase와 glutathione reductase의 활성은 별로 변화가 없음을 보아 산화적 스트레스의 대응에 catalase와 G6PDH가 더 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 특히, catalase와 G6PDH의 경우, 산소가 성장 촉진 효과를 나타내는 구간(공기 0.25~1.5 vvm)에서도 현저히 증가됨을 보아, 스트레스 상태가 아닌 경우에도 이들 효소가 유도되어 세포 성장을 촉진함을 확인할 수 있었다.

반면, 돌연변이체의 방어효소 활성을 관찰해 본 결과 야생형과는 다른 양상을 볼 수 있었다(Table 1). 공기 1.5 vvm으로 산소를 유입시키는 환경에서 돌연변이체의 catalase 활성은 야생형에 비해 약 1.5배 높았으며, G6PDH는 약 50%, glutathione reductase는 거의 비슷한 활성을 보였다. 이는 Lee 등(5)이



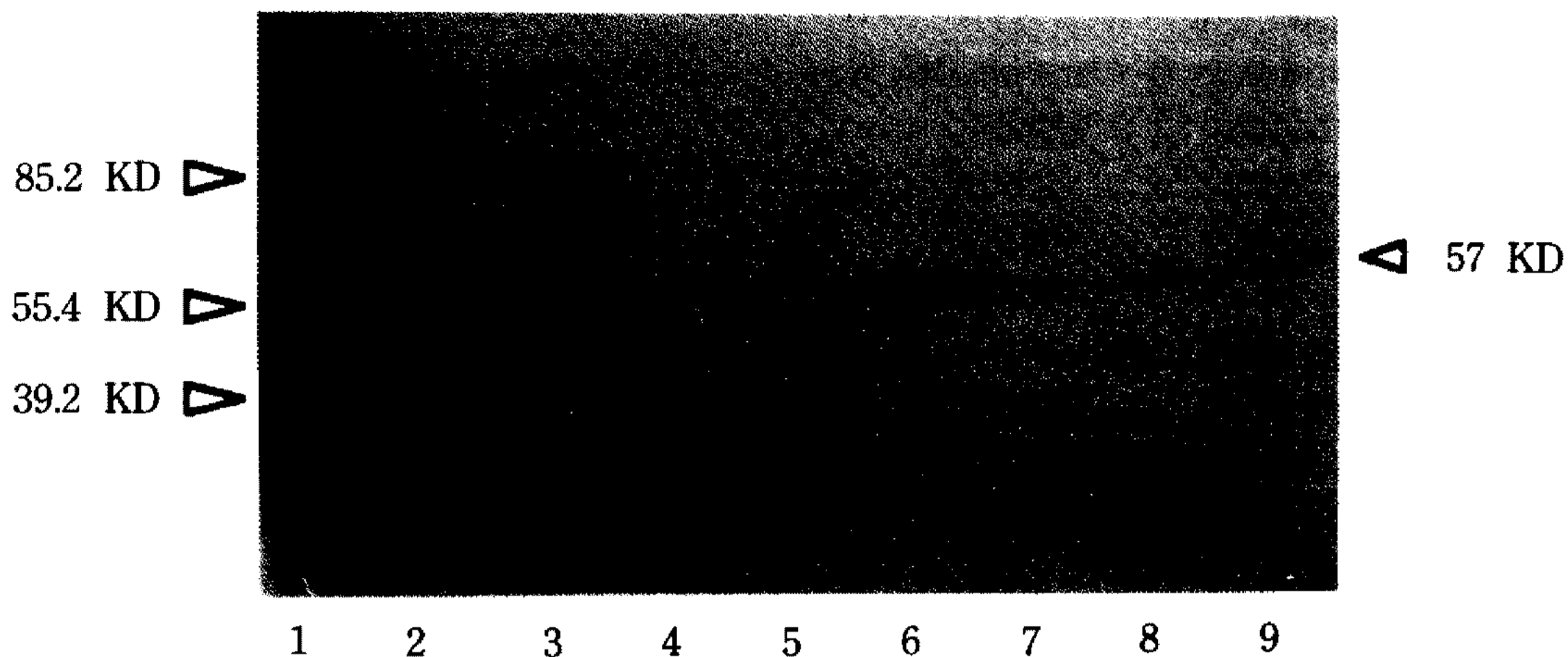
**Fig. 2. Effects of oxygen on the growth of hydrogen peroxide resistant mutant N7 in continuous culture.** Cell growth was monitored as described in the legend to Fig. 1.

**Table 1. Specific activities (U/mg protein) of defense enzymes in wild type and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant N7 mutant at different oxygen partial pressures**

Wild Type enzyme	Air 0.25 vvm	Air 1.5 vvm	Oxygen 0.5 vvm	Oxygen 1.0 vvm
Catalase	228	441	1615	1910
G6PDH	6.1 × 10 <sup>-6</sup>	3.7 × 10 <sup>-5</sup>	NT	NT
Glutathione reductase	2.1 × 10 <sup>-2</sup>	1.6 × 10 <sup>-2</sup>	2.5 × 10 <sup>-2</sup>	2.9 × 10 <sup>-2</sup>
SOD	38.1	42.1	56.1	42.5
Mutant N7 enzyme	—	Air 1.5 vvm	Oxygen 0.5 vvm	Oxygen 1.0 vvm
Catalase	—	683	968	1110
G6PDH	—	1.4 × 10 <sup>-5</sup>	1.1 × 10 <sup>-5</sup>	0.9 × 10 <sup>-5</sup>
Glutathione Reductase	—	2.0 × 10 <sup>-2</sup>	1.7 × 10 <sup>-2</sup>	1.5 × 10 <sup>-2</sup>

The values are averages from more than three experiments. G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, NT: not tested





**Fig. 3. Changes in the amount of the major catalase at different oxygen partial pressure.**

Western blotting was done as described in the text using antibody against the major catalase Cat 3~2. Protein from cells cultured at air flow rate of 1.5 vvm (lanes 1~3), oxygen 0.5 vvm (lanes 4~6) and oxygen 1.0 vvm (lanes 7~9) were loaded on each line. The total amount of protein was loaded 10 µg in lanes 1, 4, 7; 20 µg in lanes 2, 5, 8; and 50 µg in lanes 3, 6, 9. The positions of molecular size markers were indicated on the left.

관찰한 플라스크 배양시 방어 효소의 증가 폭에 비하면 큰 차이가 있다. Lee 등(5)의 관찰에 따르면 플라스크 배양시 지수 성장기의 돌연변이체와 야생형의 효소 활성을 비교하면 돌연변이체가 catalase는 8배, glutathione reductase는 1.7배, G6PDH는 4배의 증가를 보임을 관찰한 바 있다. 더욱이 과산화수소 저항성 돌연변이체는 연속 배양시, 산소 분압을 높여 주어도 뚜렷한 방어 효소의 증가가 관찰되지 않았다 (Table 1). 이는 연속배양 상태에서 N7 균주의 산소 저항성 증가가 본 연구에서 측정된 방어 효소 이외의 다른 요인에 의해서 기인함을 추측하게 하며, 산화적 스트레스에 대한 저항성의 기작이 플라스크 배양과 연속 배양시에 다른 양상으로 일어날 수 있는 가능성을 제시한다. 또 다른 가능성으로는, 돌연변이체와 야생형의 연속 배양시 세포의 성장 단계(growth phase)가 서로 달라, 절대적인 효소 활성의 수준 자체를 비교하는 것이 적합하지 않다는 설명을 할 수 있다. 이러한 경우, 야생형의 방어 효소는 산소 분압에 따라 꾸준히 증가하나, 돌연변이체의 방어 효소는 항상적으로 발현되는 양상은 플라스크 배양이나 연속 배양시 마찬가지로 결론을 내릴 수 있다.

야생형 균주에서 catalase 활성의 변화가 세포내 주된 catalase의 양적 변화와 일치하는지 알아보기 위하여 Western blotting을 수행하였다(Fig. 3). *S. coelicolor*에는 전기영동시 이동 속도가 다른 6종류의 catalase가 생산되는 것으로 알려졌는데(13), 그 중 주된 catalase인 Cat 3-2(subunit 분자량 57 kDa)를 인지하는 항체를 이용하였다. Western blot 결과 사용한 ca-

talase의 항체는 분자량 57 kDa의 단일 단백질을 인지함을 확인하였고, 따라서 본 실험에 사용한 세포 추출액 내에는 cross-reactivity를 보이는 다른 단백질은 존재하지 않음을 확인하였다. 항체 반응의 결과 발색된 정도는 단백질 양과 비례관계를 보이고 있음을 확인하였다(lane 1~3, 4~6). 그러나, lane의 폭이 불규칙한 경우는 비례관계를 확인하기가 어려웠다(lane 7~9). Lane 1~6까지의 단백질 양과 발생된 정도(band intensity)를 비교한 결과 lane 3과 4의 밴드 굵기가 거의 비슷한 것으로 미루어 보아 공기 1.5 vvm 유입시 세포 총 단백질 50 µg 내의 catalase 양이 산소 0.5 vvm 시의 세포 총 단백질 10 µg 내의 catalase 양과 같음을 알 수 있었다. 따라서 효소 활성으로 측정된 증가폭과(Table 1), 단백질 양으로 측정된 증가폭이 거의 일치함을 볼 때 catalase 활성의 유도는 실질적인 단백질 양의 증가에 기인하며, 유도된 catalase 활성은 거의 대부분 주된 catalase인 Cat 3-2에 기인함을 알게 되었다.

연속 배양시 과산화수소를 처리했을 경우 과산화수소에 의한 catalase 활성의 증가가 플라스크 배양의 결과와 일치하는지 알아 보았다. 과산화수소 100 µM을 발효조의 배양액에 처리한 30분 후 세포를 얻어 활성을 측정하고 처리 전과 비교해 본 결과 처리 전에는 896 U/mg protein의 catalase 활성이 처리 후에는 1239 U/mg protein으로 증가하였다. 이는 Lee 등(5)의 실험 결과와 일치하는 증가 폭이다. 이로서 야생형의 연속 배양시 과산화수소의 영향은 플라스크내 배양시의 양상과 거의 같음을 알 수 있다. 따라서 야생형의

연속 배양시 catalase 활성은 과산화수소 처리보다 산소 분압의 변화가 더 큰 폭의 유도를 초래함을 알 수 있었다.

## 요 약

*S. coelicolor* 야생형과 과산화수소에 저항성을 보이는 돌연변이체 N7을 연속 배양하면서 산소 유입량을 변화시켜 산소량 변화에 따른 생리적 변화를 관찰하였다. 각 조건에서 세포량을 측정된 결과, 야생형은 공기 1.5 vvm까지는 공기 유입량에 의해 성장이 촉진되나 산소 0.5 vvm 이상에서는 성장이 저해됨이 관찰되었고, 돌연변이체는 산소 0.5 vvm까지 성장이 촉진되나 산소 1.0 vvm 이상의 조건에서는 산화적 스트레스를 받는 것으로 나타났다. 따라서 과산화수소에 저항성을 보이는 돌연변이체는 산소 분압을 변화시켜 스트레스를 주어도 야생형에 비해 보다 큰 저항성을 보인다는 것을 알았다. 산화적 스트레스에 대한 방어 효소의 활성을 측정된 결과 야생형은 catalase와 G6PDH의 활성이 산소 유입량의 증가에 따라 현저히 높아짐을 알 수 있었다. 그러나 돌연변이체는 방어 효소들의 활성이 야생형보다 약간 높으나 산소 유입량의 증가에 따라 증가하지 않는 항상적 발현 양상을 보이는 것으로 나타났다. *S. coelicolor*의 주된 catalase의 발현 양과 산소 분압의 연관성을 알아보기 위해 Western blotting을 한 결과 주된 catalase(Cat 3-2)의 단백질의 생산량과 전체 효소 활성이 비례함을 알 수 있었다. 따라서 산소 분압에 따른 catalase 활성의 증가는 거의 전적으로 주된 catalase(Cat 3-2)의 유도에 의한 것임을 확인하였다.

## 감사의 글

본 실험의 발효조 운용을 도와 준 이정현군에게 감사드린다. 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터)의 연구비 지원에 의하여 수행되었다.

## 참고문헌

1. Sies, H. 1985. *Oxidative stress*, Pp. 1-15. 1st ed. Aca-

- demic press, London.
2. Tsaneva, I.R. and B. Weiss. 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *E. coli* K 12. *J. bacteriol.* **172**: 4197-4205.
  3. Storz, G., L.A. Tartaglia, and B.N. Ames. 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*. **248**: 189-194.
  4. Wu, J. and B. Weiss. 1992. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J. bacteriol.* **74**: 3915-3920.
  5. Lee, J.S., Y.C. Hah, and J.H. Roe. 1993. The induction of oxidative stress enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1013-1018.
  6. Beers, R.F., Jr and I.W. Sizer. 1951. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
  7. Beauchamp, C.I. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276-287.
  8. Smith, I.K., T.L. Vierheller, and C.A. Throne. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **175**: 408-413.
  9. Decker, L.A. 1977. *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical Corporation., New Jersey, U.S.A.
  10. Hames, B.D. and D. Rickwood. 1981. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. IRL press, Oxford and Washington, D.C.
  11. Gershoni, J.M. and G.E. Palade. 1983. Protein blotting: Principles and Application. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15.
  12. Lee, J.S. 1994. Response of *Streptomyces coelicolor* against the hydrogen peroxide stress. Ph. D. Thesis. Seoul National University.
  13. Kim, H.P., J.S. Lee., Y.C. Hah., and J.H. Roe. 1992. Multiple catalases in *Streptomyces coelicolor*. *Kor. Jour. Microbiol.* **30**: 291-2984.

(Received May 2, 1994)