

## Iron Superoxide Dismutase(Fe-SOD)를 생산하는 미생물의 선발 및 배양

이태호<sup>†</sup> · 정숙현\*

부산대학교 미생물학과

\*동서공과대학 식품공학과

## Selection and Cultivation of Microorganism Producing Iron Superoxide Dismutase(Fe-SOD)

Tae-Ho Lee<sup>†</sup> and Sook-Hyun Chung\*

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*Dept of Food Engineering, Dongseo University, Pusan 616-716, Korea

### Abstract

*Pseudomonas polycolor* was used to investigate the optimal culture condition to examine the various properties of superoxide dismutase (SOD). This SOD was inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, azide ion, but not by cyanide ion. This result indicates that the enzyme might be a Fe-SOD. The composition of optimal culture medium for the enzyme production was 3% of glycerin, 1% of polypeptone, 0.5% of meat extract, 0.2% of KCl and the initial pH was 9.0. The cultivation for the enzyme production was carried out in 500ml shaking flask containing 100ml of the optimal medium at 30°C on a reciprocal shaker. The enzyme production reached maximum at 15hrs of cultivation and then declined sharply afterward.

**Key words** : Fe-SOD, superoxide dismutase, *Pseudomonas polycolor*

### 서 론

Superoxide dismutase (SOD, EC 1,15,1,1)는  $O_2 + O_2 + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 의 반응을 통해 생체내에 유독하게 작용하는 활성산소( $O_2$ )를 제거해 주는 역할을 한다<sup>1)</sup>. 이 효소는 활성부위에 금속이온이 존재하는 일종의 metaloprotein으로 보통 3종류로 분류된다<sup>2)</sup>. 그 중 Cu, Zn-SOD는 fungi<sup>3)</sup> 및 mammalian cell<sup>4,5)</sup> 등의 eukaryotic cell에 주로 존재하며 가장 연구가 잘 되어있는 효소이다. Mn-SOD는 eukaryote 및 prokaryote에 함께 존재하는 효소이나 eukaryote의 경우에는 mitochondria에만 국재하고 있으며 prokaryote의 경우에는 matrix 및 periplasmic space<sup>6)</sup>에 존재한다. 한편 Fe-SOD는 bacteria, blue green algae, protozoa 등의 prokaryote에만 존재하는 효소로 알려져있다<sup>7)</sup>. 그러나 최근에와서는 eukary-

otic algae 및 육상 고등식물에도 이 효소가 발견되어 종간의 분포양상이 다양해지고 있다. 더욱이 근래에 와서는 EC-SOD라고하는 고분자량의 세포외 분비성 효소가 mammalian cell로 부터 발견되어 새로운 type의 효소로 분류되고 있으며<sup>8)</sup>, 이 효소는 tetramer로 네 개의 Cu와 Zn을 각각 갖고 있으며 amino acid sequence도 종래의 SOD와는 다른 양상을 나타낸다. Bacteria 유래의 SOD는 bacteriocuprein을 제외하고 모두가 Fe 혹은 Mn type이라고 알려져있지만 그것도 배양시의 산소 요구성에 따라 그 분포가 달라지는 경향이 있다<sup>9)</sup>. 즉, 호기성 및 통성혐기성의 경우는 Mn-SOD 혹은 Fe-SOD가 존재하며 혐기성의 경우는 Fe-SOD만이 존재한다. 현재까지 진핵세포 유래의 Cu, Zn 및 Mn-SOD에 대해서는 많은 연구 결과가 보고되어<sup>10-15)</sup> 그 효소화학적 성질 및 생리적 기능이 상당히 밝혀진 상태에 있으나 원핵세포에만 국재하는 Fe-SOD에 대해서는 그 효소의 특성 및 기능이 거의 알려져있지 않다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

더욱이 Fe-SOD는 현재까지 eukaryote에서는 전혀 발견되지 않아 그 분포가 prokaryote에만 국한되어 있는 효소로 간주되고 있다. 그러나 본 연구실에서는 각종 SOD의 중간 분포 및 기능에 대해 연구를 진행해 오던 중 eukaryote에도 Fe-SOD가 존재한다는 새로운 사실을 밝혀 학계에 보고한 적이 있다<sup>16)</sup>. 이 외에도 각종 SOD의 중간 유연성 및 기능을 밝히기 위해 수종의 효소를 정제하고 그 특성을 조사해 왔으며 또한 해당 gene을 sequencing 하여 단백질의 일차구조를 밝혀 기존 SOD와의 상동성을 비교 검토하기도 하였다<sup>17-21)</sup>.

본 연구는 prokaryote 유래의 Fe-SOD의 중간 유연성 및 효소화학적 성질, 생리적 특성을 규명하기 위해 계획되었으며 이미 *Aerobacter aerogenes* 유래의 Fe-SOD를 정제하여 그 효소적 특성을 밝히고, coding gene을 sequencing하여, 본 효소가 종래의 Fe-SOD와는 전혀 다른 효소임을 확인한 바 있다<sup>21)</sup>. 본보에서는 현재까지 비교적 그 효소적 기능 및 특성이 밝혀져 있지 않은 Fe-SOD의 다양성 및 중간 유연성을 밝힐 목적으로 또 다른 종의 Fe-SOD를 선발하여 그 배양 특성을 조사하고 효소생산의 최적화를 모색하기위해 계획되었다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

연구실에 보관중인 type culture 중 세균 30여 종류를 대상으로 하여 세포내 SOD의 생산성이 비교적 높은 균주를 선발하고, 이들 균주가 생산하는 효소가 Fe-SOD임을 확인하기 위해 이 효소의 특이적 저해제인  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 효소활성 측정시에 첨가하여 저해를 받는 균주를 선발하여 공시균주로 사용하였다.

### 균주배양

최적배지 및 배양조건 검토는 다음과 같은 절차에 의해 행하였다. 즉 500ml 용량 shaking flask에 1% polypeptone, 1% meat extract, 0.1% NaCl(pH 7.0)를 함유하는 배지 100ml를 분주하여 가압멸균 한 후 미리 전배양한 종균을 2ml 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다(120 Rev. stroke/min). 전배양은 nutrient broth 100ml을 넣은 500ml shaking flask에 slant로 부터 균주 1 백급이를 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 것을 사용하였다.

### 효소액의 조제 및 활성 측정법

배양액은 4°C에서 냉동원심분리(6,000rpm, 15min)하

여 집균한 다음 0.85% NaCl-용액으로 2회 세척하고 pH 7.0의 인산완충액(0.01M)에 현탁하였다. 현탁 균체는 4°C 이하를 유지하기 위해 ice bath내에서 냉각하면서 20초 간격으로 sonication(Nissei model US-300) 시켜 파쇄하였다. 세포 파쇄액은 4°C에서 냉동원심분리(12,000rpm, 20min)하여 침전물은 제거하고 상등액을 SOD의 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성 측정에는 여러가지 방법이 있으나 비교적 측정이 간편한 Epinephrine법<sup>3)</sup>에 따랐다. 즉 pH 2.0인 epinephrine stock solution 0.3ml과 EDTA 함유 sodium carbonate buffer(pH10.2) 3ml, 효소액 3ml를 각각 반응 cuvette에 첨가하여 이들의 최종 농도가 epinephrine  $3 \times 10^{-4}\text{M}$ , EDTA  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ , buffer 0.05M이 되도록 조정후 spectrophotometer(480nm)에서의 흡광도 변화를 반응온도 25°C에서 time scanning하여 효소활성을 측정하였다. 대조구는 효소액 대신 100°C에서 5분 동안 열처리한 효소액을 사용하였다. 효소의 활성은 3분 동안에 epinephrine의 자동산화의 10%를 저해하는 효소량을 1unit로 하였으며, 활성표시는 배지 100ml에서 회수한 균체의 total activity를 균체량(660nm에서의 OD)으로 나눈 수치, 즉 OD(optical density) 1.0당의 specific activity로 나타내었다.

### 균체의 생육도 측정

배양액의 균체량은 spectrophotometer를 사용하여 660nm에 있어서의 흡광도로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 선발

Bacteria는 일반적으로 Mn-SOD와 Fe-SOD를 생산

Table 1. Effect of specific inhibitors on SOD activity produced by *Pseudomonas polycolor*

Treatment	Inhibition (%)
1.0mM NaCN	10
5.0mM NaCN	0
1.0mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53
5.0mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-
1.0mM NaN <sub>3</sub>	66
5.0mM NaN <sub>3</sub>	63
1.0mM NaF	8
5.0mM NaF	5
None	0

Specific inhibitors or inactivators as indicated were added to the assay mixture and then the enzyme activity was determined. The effects of inhibitor were represented as percentage of inhibition

- ; unmeasured by inhibition of autoxidation

한다고 알려져있기 때문에 비교적 SOD 활성이 높은 균주 중 Fe-SOD만을 생산하는 세균을 선발하기 위해 각 균주의 배양여액의 효소활성 측정시 SOD에 특이적인 저해제를 첨가하여 저해양상을 검토하였다. 그 결과 Table 1에 나타난 것과 마찬가지로 *Pseudomonas polycolor* 유래의 SOD가  $\text{NaN}_3$  및  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 특이적으로 저해를 받는 것으로 나타나 본 효소가 Fe-SOD임을 확인할 수 있었다.

### SOD 생산에 미치는 배지성분의 영향

#### 탄소원

*Pseudomonas polycolor*의 SOD 최적 생장조건을 설정하기 위해 각종 탄소원의 영향을 검토하였다. 즉 1% polypeptone, 1% meat extract, 0.1% NaCl (pH 7.0)을 함유하는 기본배지에 공시 탄소원을 1%씩 첨가하여 30°C에서 24시간 진탕 배양한 후 집균한 균체를 파쇄하여 SOD의 활성을 측정하였다. Table 2과 같이 공시 탄소원 중 mannose, sorbose, trehalose, glycerin, sodium acetate의 경우가 비교적 효소활성이 높게 나타났

으며 균체의 생육도 대체로 양호하였다. SOD의 생산성이 우수한 이들 탄소원 중에서 경제적인 측면을 고려하여 glycerin을 최종적인 탄소원으로 선발하였다. 통상 탄소원으로 많이 사용되는 glucose 및 fructose의 경우는 균체의 생육 뿐만 아니라 효소의 생산성이 극히 저조하였다.

탄소원으로 선발된 glycerin의 최적 농도를 결정하기 위해 1% polypeptone, 1% meat extract, 0.1% NaCl (pH 7.0)를 함유하는 배지에 glycerin의 농도를 각각 달리 첨가하여 효소의 생산성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 glycerin 농도 3%일 경우가 효소의 생산성이 가장 양호 하였다.

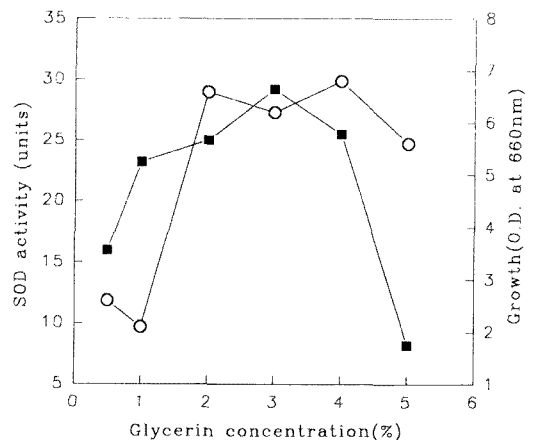
#### 질소원의 영향

3%의 glycerin과 0.1% NaCl을 함유하는 기본배지 (pH 7.0)에 여러가지 무기 및 유기태 질소를 농도별로 첨가하여 각 질소원이 효소생산에 미치는 영향을 검토하였다. Table 3에 표시한 것과 같이 cystein 및 arginin의 첨가가 효소 생산에 대단히 유리한 것으로 나타났으나, 이 경우는 균체의 생육이 극도로 저조하여 총 수율면에 있어서 불리한 결과가 얻어졌다. 한편 polypeptone과 meat extract를 단독으로 첨가할 시에는 효소의 생성능이 별로 좋지 않았으나 양 물질을 조합했을 경우에는 효소의 생산성이 우수하였다. 동시에 균체의 생육도 양호하여 단위 배지당 효소의 수율도 양호하였

**Table 2. Effect of carbon sources on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD**

Carbon source (1%)	Final pH	Growth (O.D. at 660nm)	Specific activity (units)
None	8.3	3.7	2.4
Glucose	4.8	0.7	-
Arabinose	8.1	2.8	11.0
Galactose	8.3	2.3	8.6
Mannose	7.6	4.0	28.2
Mannitol	8.3	2.7	16.2
Sorbitol	8.2	2.9	17.5
Fructose	4.9	0.7	-
Inositol	8.3	2.6	18.8
Lactose	8.3	2.6	7.7
Sodium acetate	8.3	3.7	22.4
Sodium citrate	8.3	2.5	3.5
Xylose	8.1	3.0	3.5
Sorbose	7.9	3.3	26.4
Maltose	6.8	6.0	6.8
Trehalose	6.1	7.2	23.9
Glycerin	6.1	2.3	23.0
Ribose	6.8	4.6	19.5
Rhamnose	8.1	2.7	7.6
Dextran	8.3	3.1	5.2
Soluble starch	8.4	3.3	4.8

Each carbon source was added to the basal medium containing 1% polypeptone, 1% meat extract, and 0.1% NaCl (pH 7.0). *Pseudomonas polycolor* was inoculated to a shaking flask (500ml) containing 100ml of medium and cultivated at 30°C, for 24hr on a reciprocal shaker



**Fig. 1. Effect of glycerin concentration on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD.**

Glycerin as carbon source was added to the basal medium containing 1% polypeptone, 1% meat extract, and 0.1% NaCl (pH 7.0). Cells were inoculated to a shaking flask (500ml) containing 100ml of medium and cultivated at 30°C, for 24hr on a reciprocal shaker.

—■—; SOD activity, —○—; Growth

다. 따라서 효소생산을 위한 액체배지의 질소농도는 polypeptone 1.0%, meat extract 0.5%로 결정하였다. 한편 무기태 질소원의 경우는 균체의 생육 뿐만 아니라 효소의 생산성도 비교적 저조한 편이었다.

#### 무기염의 영향

3% glycerin, 1% polypeptone, 0.5% meat extract를 함유하는 기본 배지에 각종 무기염류를 농도별로 첨가하여 효소생성에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 첨가한 각종 무기염류는 몇 종류를 제외하고는 효소생산에 오히려 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다. 무기염류를 첨가하지 않은 기본배지에서도 효소생산이 상당히 양호하고 균체의 생육도 우수하여 그대로 사용할 수도 있으나 KCl을 소량 첨가하는 것이 효소 생산에 다소 유리하다는 결과가 얻어져 배지에 KCl을 0.2% 첨가하기로 결정하였다.

#### 배양 초기 pH의 영향

3% glycerin, 1% polypeptone, 0.5% meat extract, 0.2% KCl을 함유하는 배지를 pH 5.0에서 9.0로 조절하여, 30°C에서 24시간 배양 후 배양 초발 pH가 효소의

**Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD**

Nitrogen source (%)	Final pH	Growth (O.D. at 660nm)	Specific activity (units)
None	6.0	0.1	9.0
Polypeptone 1.0	6.6	29.8	17.1
Meat extract 1.0	6.6	15.2	32.2
Polypeptone 1.0	6.8	3.2	13.4
Meat extract 0.5	6.6	9.1	17.4
Polypeptone 1.0	6.9	4.1	4.5
Meat extract 0.5	6.8	6.5	10.0
Yeast extract 1.0	5.0	0.7	4.0
Polypeptone 1.0	5.4	114.4	4.3
Yeast extract 0.5	5.4	114.4	4.3
Meat extract 0.5	5.4	114.4	4.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5	5.7	0.2	13.0
NH <sub>4</sub> Cl 0.5	5.3	0.5	7.6
NaNO <sub>3</sub> 0.5	6.1	0.2	7.5
Lysine 1.0	5.8	0.4	14.5
Cysteine 1.0	1.7	0.1	101.0
Arginine 1.0	5.4	0.4	30.3
Bactopeptone 0.5	5.4	0.4	30.3
Meat extract 0.3	6.2	6.5	28.0

Each nitrogen source was added to the basal medium containing 3% glycerin and 0.1% NaCl (pH 7.0). The cultural conditions are the same as Table 2

생산에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 초발 pH 9.0가 효소 생산에 가장 우수한 것으로 밝혀졌다. 균체의 생육은 pH 5.0 근방이 대단히 양호하였으나 효소의 생산은 극히 저조하여 미생물의 생육과 효소의 생산량에는 직접 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

#### 통기량의 영향

일반적으로 SOD는 산소의 분압을 증가시키면 그 생산량이 증가한다고 알려져있기 때문에<sup>23)</sup> 미생물 배양시 산소의 공급량이 SOD의 유도에 상당히 유효할 것이라고 판단되어 통기량에 대한 영향을 검토하였다. 즉 glycerin 3%, polypeptone 1.0%, meat extract 0.5%, KCl 0.2%를 함유하는 배지 (pH 9.0)를 500ml 용량의 shaking flask에 각 용량씩 분주하여 seed culture 2%를

**Table 4. Effect of inorganic salts on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD**

Inorganic salts (%)	Final pH	Growth (O.D. at 660nm)	Specific activity (units)
None	6.8	14.3	29.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.20	6.2	12.2
	0.10	6.4	10.6
	0.05	6.5	10.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20	6.5	10.9
	0.10	6.3	11.0
	0.05	6.3	10.4
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.20	6.3	11.0
	0.10	6.2	11.5
	0.01	6.3	10.5
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.20	6.2	10.9
	0.10	6.2	11.8
	0.00	6.3	10.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.20	6.6	9.8
	0.10	6.4	11.0
	0.01	6.4	10.0
NaCl	0.20	6.3	10.1
	0.10	6.2	9.7
	0.01	6.3	9.9
NH <sub>4</sub> Cl	0.20	6.3	11.0
	0.10	6.3	11.4
	0.01	6.3	8.0
KCl	0.20	6.3	16.0
	0.10	6.2	9.9
	0.01	6.2	9.6
FeSO <sub>4</sub>	0.20	6.4	3.3
	0.10	6.2	13.1
	0.01	6.4	9.9

Each inorganic salt was added to the basal medium containing 3% glycerin, 1% polypeptone, and 0.5% meat extract (pH 7.0). The cultural conditions are the same as Table 2

식균하고 30°C, 24시간 진탕 배양한 후 효소 생산성을 검토하였다. 그 결과는 Table 5에 표시한 것과 같이 50ml의 경우가 효소의 생산에 가장 양호한 것으로 나타났다. 그러나 이 경우 flask당 총균체의 회수량이 많지 않아 실제 배양시에는 100ml의 배지를 사용하였다. 이때 통기량의 증대에 따라 효소의 생산량이 증가하는 것은 산소의 공급량을 높혔을 경우 활성산소의 생성량이 증가하여 SOD의 유도효과가 나타난 것으로 판단된다.

Methyl viologen의 효과

공시균주의 배양시 통기량을 증대시키면 SOD의 생산량이 증가한다고 하는 Table 5의 결과로부터 판단할 때 만약 SOD의 유도효과를 가질 것으로 생각되는

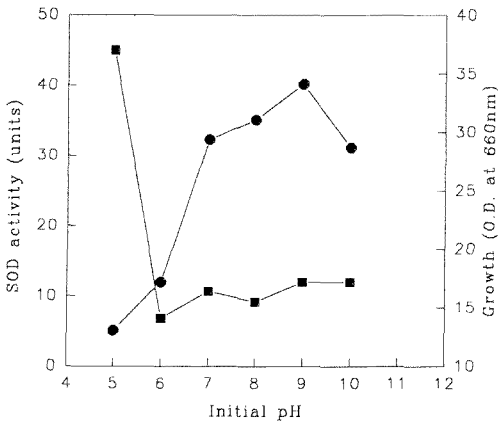


Fig. 2. Effect of initial pH of medium on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD.

The initial pH for cultivation was adjusted as indicated and cultural medium contained 3% glycerin, 1% polypeptone, 0.5% meat extract, and 0.2% KCl. Cells were inoculated to a shaking flask (500ml) containing 100ml of medium and cultivated at 30°C, for 24hr in a reciprocal shaker.

● ; SOD activity, ■ ; Growth

Table 5. Effect of aeration on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD

Volume of medium (ml)	Final pH	Growth (O.D. at 660nm)	Specific activity (units)
50	6.5	15.8	50.1
75	6.5	11.8	43.3
100	6.5	18.3	39.8
125	6.5	20.5	35.4
150	6.5	31.2	20.5

The culture medium contained 3% glycerin, 1% polypeptone, 0.5% meat extract, and 0.2% KCl (pH 7.0). The volume of medium was adjusted to each volume as indicated

활성산소를 공급하는 배양 system을 설정하여 미생물을 배양 한다면 SOD의 생산을 극대화 할 수 있을 것으로 판단된다. Methyl viologen은 세포내의 O<sub>2</sub>의 생성량을 증가시켜 SOD의 유도를 초래한다고 알려져왔으며 실제 *E. coli*의 경우 Mn-SOD의 생산이 몇배나 증가한다고 하는 보고가 있다<sup>22</sup>. 본 연구에서도 SOD의 생산에 미치는 methyl viologen (paraquat)의 영향을 검토하기 위해 *Pseudomonas polycolor*의 배양시 이 물질을 농도별로 첨가하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과를 Table 6에 나타내었으나 본 균주의 경우에는 paraquat에 의한 SOD의 유도효과는 거의 없는 것으로 판명되었으며 오히려 효소의 활성 뿐만 아니라 균의 생육도 크게 억제되는 결과를 초래하였다. Paraquat에 의한 SOD의 유도생산은 *E. coli* 유래의 Mn-SOD에 적용된 예로서 Fe 혹은 Cu, Zn-SOD의 경우는 아직 연구보고가 없는 것으로 보아 이들 효소에는 그렇게 유도효과가 나타나지 않는 것으로 판단되었다. 이상과 같은 여러가지 배양조건을 검토한 결과 효소생성 최적 조건을 Table 7과 같이 결정하였다.

배양시간에 따른 균의 증식 및 효소생성

Table 7에 표시한 최적배지 100ml를 500ml 용량의

Table 6. Effect of methyl viologen concentration on the production of *Pseudomonas polycolor* SOD

Methyl viologen concentration (mM)	Final pH	Growth (O.D. at 660nm)	Specific activity (units)
0.0	6.5	16.0	40.1
0.1	6.5	4.6	10.9
0.2	6.4	4.3	10.1
0.5	6.4	3.7	1.5
0.8	6.3	3.7	0.0
1.0	6.3	3.6	0.0
1.5	6.3	3.7	0.0
2.0	6.4	3.2	0.0

The cultural conditions are the same as Table 5 and methyl viologen was added to the medium with the indicated concentrations

Table 7. The optimum culture condition for SOD production

Medium	Glycerin 3.0% Polypeptone 1.0% Meat extract 0.5% KCl 0.2% Initial pH 9.0
Other conditions	Temperature 30°C Culture time 15hrs Agitation 120 Rev. × 6cm 100ml of medium per 500ml shaking flask

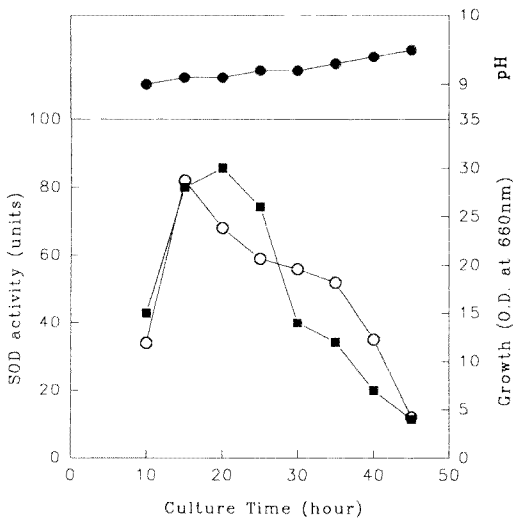


Fig. 3. Time course of growth, pH, and SOD production during the cultivation of *Pseudomonas polycolor*.

The cultural medium contained 3% glycerin, 1% polypeptone, 0.5% meat extract, 0.2% KCl (pH 9.0). Seed culture (2ml) was inoculated into a 500ml shake flask containing 100ml of the optimal medium and cultured at 30°C. The pH, SOD activity, and cell growth during cultivation were measured with time interval.

●—●; pH, —○—; SOD activity, —■—; Growth

shaking flask에 분주, 가압멸균하고 전배양액 2ml를 접종하여 경시적으로 배양한 후 그 때의 균체량, pH 변화, 효소활성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 이때의 효소활성은 배양 15시간 전후 최대를 나타내었고 그 후에는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 균체량도 활성 peak와 거의 유사한 시기에 최대가 되었으며, pH는 배양시간과 더불어 서서히 증가하였다. 본 효소는 배양시간과 더불어 급격히 실패하는 것으로 보아 상당히 불안정한 효소로 생각되었다.

이상과 같은 배양조건의 최적화 실험에 의해 효소의 생산량을 대폭 증대시킬 수 있었으며, 이때의 효소량은 무려 screening시의 3~4배에 해당되는 양이었다. 한편 효소의 정제 등을 위한 대량배양을 위해서 Jar Fermentor 배양을 실시해 본 결과 효소의 생성 및 균주의 생육양상은 flask 배양시와 거의 유사하였으나 aeration의 정도에 따라 효소생성 최대 peak가 다소 빠라지는 경향을 보였다. 본 효소의 정제 scheme에 대해서는 현재 검토 중에 있으며 앞으로는 정제표품을 대량으로 얻어 효소의 특성 및 생리적 기능, coding gene의 구조 및 임상적 응용성 등에 대해서도 검토하고자 한다.

## 요 약

비교적 연구가 미비한 Fe-SOD의 효소화학적 특성 및 그 생리적 기능을 검토하기 위해 여러 종의 세균을 대상으로하여 Fe-SOD의 고생산균주를 screening하였다. 그 결과 Fe-SOD를 대량 세포내에 생성하는 *Pseudomonas polycolor*를 선발하여, 이 균주의 효소생산 최적 배양조건을 설정하였다. 본 균주가 생산하는 효소는 특이적인 저해제의 작용양식에 의해 Fe을 cofactor로 요구하는 Fe-SOD임이 밝혀졌다. SOD 생성을 위한 최적배지조성은 glycerin 3%, polypeptone 1%, meat extract 0.5%, KCl 0.2%이었고, 최적 초발 pH는 9.0이었으며, 이 조건에서 500ml용 shaking flask에 배지 100ml를 넣어 15시간 전 후 배양했을 경우가 효소생산량은 최대가 되었다.

## 문 헌

- McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969)
- Fridovich, I. : Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.*, **58**, 61 (1986)
- Misra, H. P. and Fridovich, I. : The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170 (1972)
- Keele, B. B. Jr., McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase from *Escherichia coli* : A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176 (1970)
- Beauchamp, C. O. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase : Improved assays and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**, 276 (1971)
- Vance, P. G. and Keele, B. B. Jr. : Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 4782 (1972)
- Trant, N. L., Meshnick, S. R., Kitchene, K., Eaton, J. W. and Cerami, A. : Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata* : Purification, characterization, and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. *J. Biol. Chem.*, **258**, 125 (1983)
- Karlsson, K. and Marklund, S. L. : Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem. J.*, **242**, 55 (1987)
- Pennigton, C. D. and Gregory, E. M. : Isolation and reconstitution of iron and manganese-containing superoxide dismutase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.*, **166**, 528 (1986)
- Clare, D. A., Blum, J. and Fridovich, I. : A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5932 (1984)

11. Marklund, S. L. : Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem. J.*, **220**, 269 (1984)
12. Fridovich, I. : Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 147 (1975)
13. Steinman, H. M. : Bacteriocuprein superoxide dismutase of *Photobacterium leiognathi* : Isolation and sequence of the gene and evidence for a precursor form. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1882 (1987)
14. Steinman, H. M. : Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus* : Cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bacteriol.*, **172**, 2901 (1990)
15. Steinman, H. M. and Hill, R. L. : Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3725 (1973)
16. Jung, S. Y., Lee, S. O. and Lee, T. H. : Purification and characterization of superoxide dismutase from *Rhodotorula glutinis*. *Kor. J. Microbiol.*, **31**, 573 (1993)
17. Lee, S. O. and Lee, T. H. : Study on the intracellular superoxide dismutase produced by *Bacillus circulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 382 (1987)
18. Lee, S. O. and Lee, T. H. : Study on the intracellular superoxide dismutase produced by *Bacillus circulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 381 (1987)
19. Lee, T. H. and Lee, S. O. : Purification and properties of superoxide dismutase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1361 (1988)
20. Kim, S. W., Lee, S. O. and Lee, T. H. : Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 101 (1991)
21. Lee, S. O., Kim, S. W., Uno, I. and Lee, T. H. : Direct sequencing of superoxide dismutase genes from two bacterial strains amplified by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1454 (1993)
22. Hassan, H. M. and Fridovich, I. : Enzymatic defence against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **129**, 1574 (1977)

(1994년 9월 14일 접수)