

해양방선균으로부터 Haloperoxidase의 검색과 특성

조기웅

안양대학교 해양생명공학과

Haloperoxidase를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 국내 연근해와 남북극 등의 해양시료에서 분리된 방선균 균주를 대상으로 탐색을 수행하여 남해 백도 해조류 추출물로부터 분리된 한 종류의 방선균(#1460)에서 높은 haloperoxidase 활성이 확인되었다. 본 균주의 생리·생화학적 특성은 *Streptomyces* 속과 유사하며 생산되는 haloperoxidase는 세포 조 추출물로부터 ammonium sulfate precipitation, High-Q column chromatography, gel permeation chromatography, Hydroxyapatite chromatography 그리고 hydrophobic interaction chromatography를 통하여 42%의 수율과 purification fold 70으로 정제하였다. 본 효소의 최적 반응 pH는 7이고 pH 8에서 더 높은 안정성을 보여 60°C에서 1시간 반응에 효소활성의 50%가 생존한다. 또 cyanide와 azide 이온에 의해 강한 저해현상을 보인다.

Key words □ haloperoxidase, marine actinomycetes, thermostable

해양에는 chloride나 bromide 등 할로젠족의 음이온들의 함량이 Cl^- 는 0.5 M 정도이고 Br^- 는 1 mM, 그리고 I^- 는 1 μM 에 달하는 등 육상에 비해 매우 높은 편이고 연산호나 조류 등 해양 생물들에 의하여 생산되는 2차 대사 산물 중에도 이러한 할로젠 화합물들의 비율이 매우 높다(2, 13). 유기물질의 할로겐화 반응은 유기합성 반응 중에서도 매우 어려운 반응으로 알려져 있는데, 그 이유는 전자친화력(electronegativity)이 매우 높은 이러한 원소들에서 전자를 이탈 시키면서 반응이 진행되기 때문이다. 따라서 유기합성에서 이 반응을 수행하기 위해서는 고온 고압 등의 매우 격렬한 반응 조건이 필요하며 이 경우 필연적으로 할로겐화되는 부위의 입체화학적 특성에 많은 손실을 가져오게 된다(2). Haloperoxidase (HPase)라고 하는 일련의 효소는 유기성 기질을 선택적으로 할로겐화하는 효소로서 종류에는 iodoperoxidase, bromoperoxidase, chloroperoxidase 등이 있으며 이들 효소는 주로 이차 대사산물 중 halogenation된 물질의 생산에 참여하거나 외부에서 유입된 비극성 유기물의 분해의 초기단계에 관여하는 것으로 여겨지고 있으며 조효소의 종류에 따라 Heme-HPase, Mn-HPase, Fe-HPase, Va-HPase, flavin-HPase 등이 존재한다(2, 14).

본 효소들은 중요한 기질로서 자연계에 가장 흔한 음이온인 Cl^- 등 할로젠 음이온을 이용할 수 있으며 또 다른 기질로는 산소 대사에서 필수적으로 발생하는 hydrogen peroxide를 이용한다. 이는 산소 대사과정에서 과다하게 생성된 reactive oxygen species 중 하나인 과산화수소의 독성을 제거하는 peroxidase의 기능도 수행하는 것으로 여겨지고 있으며 이에 따라 함께 산화되는 유기성 기질의 선택폭은 매우 넓은 것으로 보고되어 있다. 또 본

효소는 가장 흔한 가수분해 효소인 esterase와 구조상 상당부분이 유사한 것으로 알려지고 있다(11).

Haloperoxidase reaction:



다양한 생물 종으로부터 여러 종류의 haloperoxidase가 분리, 보고되어 있는데 Mold *Caldariomyces fumago*에서 분리된 chloroperoxidase는 42 kDa 정도의 분자량으로 Fe^{2+} ion을 활성부위에 가지고 있으며 Fe-O-Cl 형태의 특이한 중간체를 형성하여 기질을 chlorination하는 것으로 알려지고 있고(5), lactoperoxidase는 iodine 특이 효소로서 단백질의 Tyr과 His 잔기의 고리형 분자구조에 선택적으로 반응하여 생체막 표면 단백질을 방사선 동위원소 Iodine으로 표식하는데 매우 유용하게 사용되고 있다(3). 또 Polymorphonuclear leukocyte에 존재하는 myeloperoxidase는 과산화수소와 할로젠 음이온을 이용하여 생체 방어 기작을 수행하는데 외부에서 침입한 세균들의 표면 단백질을 halogenation 시킴으로써 이들을 사멸시키는 기능을 가지고 있기도 하다. 해양에서는 몇몇 종류의 홍조류에서 haloepoxidase의 분리가 보고되었으며 방선균 *Streptomyces*와 유기물의 분해 능력이 뛰어난 *Pseudomonas* 속의 세균들에서도 보고되고 있다(1, 15). 세균유래 haloepoxidase는 진핵생물 세포유래 haloepoxidase와는 달리 조효소로 heme system가지고 있지 않은 경우도 많으며 할로겐화 대사 산물의 생산에 직접적인 관계가 없는 것으로 알려져 있으나 그 구체적인 기능에 대해서는 아직 알려져 있지 않다(4, 8).

이렇게 효소반응의 특성상 이들 효소에 의한 할로겐화 반응은 상온, 상압에서 매우 넓은 범위의 기질을 대상으로 반응이 진행되므로 이 할로겐화 반응을 촉매하는 효소는 여러 가지 어려운

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-32-930-6030, Fax: 82-32-930-6215
E-mail: kwcho@anyang.ac.kr

유기 합성반응, 특히 생리활성이 높은 고부가가치 정밀합성에의 응용이 기대된다(2, 10). 따라서 본 연구에서는 해양 세균 및 방선균으로부터 이러한 효소(haloperoxidase)를 검색하는 연구를 수행하였다. 이차대사산물을 생산하는 것으로 확인된 방선균 균주와 유기물 분해능이 높은 균주를 대상으로 탐색을 수행하는 것이 효과적일 것이라는 판단 하에 쉽게 확인할 수 있는 antifungal activity를 보인 방선균 균주를 우선 탐색대상으로 설정하였으며 해양시료에서 분리한 방선균 한 종류에서 HPase 활성을 발견, 해당 효소를 분리·정제하고 생산 균주의 생화학적 성질에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

Phenol red, hydrogen peroxide (30% solution), KBr, EDTA, phosphate 및 TrisHCl, Trizma base 등 완충액용 시약은 Sigma (USA) 제품을 사용하였으며 95% 에탄올은 Merck 제품을 사용하였다. 크로마토그래피용 resin 들은 명시한 제품을 사용하였다.

균주 수집

균주분리를 위한 해양생물 시료는 SCUBA로 채집된 즉시 2~3 g 정도의 시료를 취하여 외부에 묻은 물기를 제거하고 멸균된 가위를 이용하여 최대길이 0.5 cm 이하로 잘게 자른 뒤 1 ml의 멸균된 해수를 가하고 막자사발로 갈았다. 또는 멸균된 마늘짜개를 이용하여 내부에 함유된 체액을 취하여 이를 균주 분리원으로 이용하였는데 이를 미리 준비된 평판 배지(ZoBell 배지, SWC 배지)에 0.1 ml씩 가하고 도말하여 균체 집락이 형성될 때까지 배양하였다. 해저 퇴적물이나 해수는 멸균된 50 ml conical tube에 담아 실험실로 운반하여 처리하였다. 특히 방선균의 경우는 균주 분리원을 60°C water bath에서 약 1시간동안 처리하여 일반 세균을 제거한 후 이를 방선균 분리용 배지(Bennet's, Starch Casein KNO₃, Chitin, M3-I and II 배지 등)에 도말하여 분리하였다. 분리된 균주의 생화학적 특성은 EASY-24Eplus Kit (Komed, Korea)를 사용하여 검사하였다.

효소활성 검색

효소활성 검색은 Hunter-Cevera와 Sotos의 방법(6)을 따라 phenol red를 hydrogen peroxide와 KBr을 이용하여 용액의 색깔이 주황색에서 청자색으로 변하는 것을 595 nm에서 흡광도를 이용하여 검색하였다. 이 방법은 96-microwell plate를 사용할 수 있어 검색 단계에서 뿐 아니라 효소정제 단계에서도 유용하게 사용할 수 있는 방법이다.

검색 용액은 기질용액으로 95% 에탄올에 녹인 0.2% (w/v) phenol red 용액 4 ml와 0.3 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 50 mM KBr 용액 96 ml를 잘 섞은 용액을 제조하였다. 한편 배양된 세균을 한천 평판배지에서 Loop를 이용하여 50 mg 정도 취한 후 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 0.5 ml의 lysis buffer (10 mM EDTA와 10 mg/ml lysozyme을 포함하는 50 mM

Phosphate buffer, pH 7.5)를 넣고 1분간 초음파처리하여 cell을 파괴한 후 원심분리하여(5 min at 23,000×g, Vision High speed centrifuge) cell debris를 제거하고 supernatant를 0.1 ml 취하여 1 ml들이 disposable cuvette에 넣고 1 ml의 검색용액과 10 µl의 3% hydrogen peroxide를 가한 후 잘 섞어서 상온 혹은 25°C에서 30 분간 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 검사하였다. 흡광도가 높을수록 강한 Haloperoxidase 활성을 의미하며 30분간 A₅₉₅를 1.0 증가시키는 효소량을 1 unit HPase로 정한다. 효소 활성이 있으면 용액의 색깔이 red-orange에서 blue-violet으로 변화하게 된다. Spectrum은 430 nm에 나타나는 phenol red peak와 함께 595 nm에 해당되는 새로운 흡광 peak가 생성된다(자료 미제시).

이 방법은 작은 규모로도 수행이 가능한데 96-well microplate의 각 well에 0.15 ml의 균체 추출물을 가하고 미리 준비한 검색용액 100 ml당 1 ml의 3% hydrogen peroxide를 섞은 용액 0.15 ml를 가하여 흔들어 주면서 30분간 반응을 수행한 후 595 nm에서 microplate reader (Bio-Rad Model 3550)를 이용하여 검사하였다.

Agar plate에서 HPase 활성 검색

Agar plate당 10개의 대상 균주를 작은 막대 형태로 배양한 후 colony가 형성되면 이를 여과지로 제작한 replica를 이용하여 colony들을 뜯 뒤 여기에 0.5 ml의 lysozyme solution (1 mg/ml)을 가하고 cell wall을 깨기 위해 30분간 배양한다. 이 여과지를 CHCl₃ 증기로 포화시킨 desiccator에서 30분간 배양하여 세포막을 용해시키고 2~3회 얼렸다 녹였다를 반복하여 cell을 추가로 파괴하여 내용물이 여과지에 스며들게 한다. 이 여과지를 solid buffer (50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1% agar, pH 7.5) 위에 덮어 2시간 방치하여 효소액이 agar로 스며들게 한다. 여기에 15 ml의 반응용액(0.2% phenol red, 50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1% agar, pH 7.5)을 가하고 상온 암실에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 색깔의 변화를 관찰한다.

A1460에서 Haloperoxidase의 분리 정제

Late exponential phase에 도달한 균주 10 L 배양액을 0.2 µm pore size의 tangential flow filter (3,500 cm² surface, Microgon Co., USA)를 이용하여 2 L로 농축시키고 High speed centrifuge (Vision Science Co., Korea)로 15,000×g에서 20분간 원심 분리하여 균체를 수확하였다. Wet weight 100 g 정도의 균체를 얻은 후 여기에 미리 4°C로 식혀둔 400 ml의 lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 cold room에서 1시간동안 교반 시킨 후 세포파괴를 보다 확실하게 하기 위하여 초음파분쇄기를 이용하여 얼음물에 담긴 상태에서 1분간 초음파를 가하고 1분간 교반 시키는 과정을 5회 반복한다. 세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기 위하여 원심분리 (15,000×g, 30 min)하여 상등액을 회수하였다. 그리고 ammonium sulfate 농도 35%와 75% 사이에 침전된 침전물을 회수하였다. 이를 30 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 후

Econo 10-DG desalting column (Bio-Rad, USA)으로 ammonium sulfate를 제거하였다. 이를 3개를 직렬로 연결한 High-Q cartridge column (Bio-Rad Co., 5 ml capacity)에 가하고 column을 50 ml의 동일한 buffer로 씻어준다. 여기서 0.1 M에서 0.8 M까지 NaCl 농도구배를 형성하는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 HPase 활성도를 보이는 분액을 회수하여 ultrafiltration (Amicon stirred cell, 50 ml capacity, with PM30 membrane filter)하여 5 ml로 농축하였다. 이를 Sephadex G-200 column (2.5 cm × 95 cm)에 가하고 column을 0.1 M NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 용출시켰다(Flow rate = 10~12 ml/hr). 활성 분획을 모아 다시 ultrafiltration하여 5 ml로 농축하고 hydroxy apatite chromatography (Phosphate 농도 구배 이용, 20~200 mM)와 Phenyl-Sepharose column을 이용한 hydrophobic interaction chromatography를 NaCl 역농도구배(0.6~0.05 M)를 이용하여 정제하였다.

결과 및 고찰

Haloperoxidase (HPase) 탐색과 최적 배지 선정

HPase의 생산 능력을 검색하기 위하여 약 1,200균주를 조사하였다. 이중 3종이 비교적 뚜렷한 HPase 활성을 보였으며 이중 방선균 한 종류(A1460)가 가장 높은 활성을 나타내었다. 본 균주는 남해안 백도에서 채집한 동정되지 않은 해조류의 표면에서 분리된 방선균이다. 우선 성장과 효소활성의 최적 배지를 선정하기 위하여 ZoBell, Sea water complete (SWC; bactotryptone 5 g, bacto yeast extract 3 g, glycerol 3 ml in 75% aged sea water, pH 7.5), 10 g/L NaCl 대신 75% 해수를 함유하는 변형 LB 배지를 사용하여 성장과 단위 균체 당 HPase 활성을 검사한 growth curve를 구한 결과 SWC 배지가 최적으로 결정되어 이를 주배지로 사용하였다. 본 HPase는 cell mass에 따라 그 함량이 비례하여 증가하는 양상을 보였으며 stationary phase에 도달한 후 급속히 활성이 낮아지는 현상을 보였다. 이에 따라 효소생산을 위한 균주회수의 시기는 초기 stationary phase에서 수행하였다. SWC 배지에서 배양시 조효소액 상태에서 2.3 unit/ml의 높은 HPase 활성을 나타내었다.

HPase 생산 해양방선균 A1460의 생화학적 특성

HPase 생산 해양방선균 A1460의 생화학적 특성은 Table 1에 요약하였으며, 그람 양성으로 흰색의 기균사를 보이는 전형적인 방선균의 모습을 보이고 있고 40°C에서는 성장하지만 4°C에서는 전혀 생존하지 못했다. 운동성은 없었으며 효소 생산에서는 β -galactosidase, urease, gelatinase, amylase 등 분해 효소 활성이 뛰어난 것으로 나타났으며 HPase 활성 이외에 catalase 활성도 있는 것으로 나타났다. 이 catalase 활성은 hydrogen peroxide 3% solution을 가할 때 거품(산소) 발생을 관찰한 것으로 HPase 시료에 Fe ion이 함유되어 있는 것으로 여겨진다. 유일 탄소원으로서 당 이용능력은 비교적 떨어지는 편으로 나타났으며 황산염이 다량 함유된 해수를 배지로 사용함에도 H₂S도 생성되지 않는 것으로

Table 1. Biochemical properties of HPase producing marine actinomycetes A1460

Properties	
Color of aerial mycellium	White
Culture at 4°C	-
at 40°C	+
β -Galactosidase	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Urease	+
Gelatinase	+
Amylase	+
Catalase	+
VP-test	+
Indole production	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
O-F test	F
Gram-staining	+
Mobility	-
Sugar utilization	
Glucose	-
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Arabinose	-

보아 혐기성 유기물 이용능력도 낮은 것으로 나타난다. 세균 유래 haloperoxidase는 주로 *Pseudomonas* 속과 방선균 중 *Streptomyces* 속에서 보고되고 있으며, 본 균주 A1460도 여러 가지 측면에서 *Streptomyces* 속과 유사한 특성을 보이고 있다.

해양방선균 A1460으로부터 HPase의 분리 정제

A1460 균주를 진탕 flask를 이용하여 SWC medium (150 rpm at 25°C) 배지에서 배양한 결과 배양 20시간에서 최대의 효소활성도를 보였으며 이때의 HPase 활성은 2.5 unit/ml였고 건조중량은 4.27 g/L였다. 이 균체를 원심분리로 회수하여 ultrasonicator로 분쇄하여 얻은 조효소액으로부터 35~75% ammonium sulfate precipitation, High-Q ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration chromatography, Hydroxyl-apatite column chromatography, Phenyl-Sepharose column chromatography 등을

Table 2. Purification of HPase from marine actinomycetes A1460

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity ^a	Specific activity ^a
Crude extract	500	3,520	1,820	0.52
35~75% Ammonium sulfate precipitation	40	1,750	1,541	0.88
IEX (High-Q)	36	484	1,284	2.58
Sephadex G-200	55	135	1,077	7.98
Hydroxy apatite chromatography	15	58	899	15.50
Phenyl-sepharose HIC chromatography	8	21	766	36.48

^a Activity : increased absorbance at 595 nm at 25°C, pH 7 for 30 min

통하여 42%의 수율과 purification fold 70으로 정제하였다(Table 2).

해양방선균 A1460 유래 HPase의 최적반응조건

Phenol red (Phenol sulfon phthalein)는 HPase에 의한 halogenation 반응결과 4원자의 halogen이 결합한 tetra-halogenated phenol red가 되는 것으로 알려져 있다(6). Halogen족 이온을 제공하는 기질로는 주로 KBr을 사용하였으나 KCl이나 KI도 기질로 작용할 수 있음을 확인하였다. 그러나 Cl⁻의 경우 Br⁻에 비하여 595 nm에서의 흡광도 기준으로 약 50% 정도의 활성을 보이고 있으며 I⁻의 경우는 이보다 더욱 낮아 불과 25% 수준의 활성을 나타낸다. 염소화된 phenol red나 요오드화된 phenol red의 595 nm에서의 몰흡광계수는 알려진 바가 없으나 브롬화된 phenol red와 유사하다고 가정할 때 반응성이 50% 수준으로 낮게 나타나고 이에 따라 측정 감도가 낮아지므로 본 실험에서는 KBr을 기본 기질로 사용하였다. 그러나 할로젠 원소들의 전자친화력 때문에 chloroperoxidase는 Cl⁻, Br⁻, I⁻ 모두를 기질로 이용할 수 있는 반면 bromoperoxidase는 Br⁻ 및 I⁻, 그리고 iodoperoxidase는 I⁻만을 기질로 이용할 수 있다. 본 효소의 경우 haloperoxidase 중 chloroperoxidase로 볼 수 있는데 이렇게 전자친화도가 높은 Cl⁻를 기질로 이용할 수 있는 chloroperoxidase가 HPase 중 가장 응용도가 높다고 할 수 있다.

본 효소의 최적 pH와 온도를 알기 위하여 pH와 온도 의존도를 조사하였다. 활성에 대한 pH 의존성에서는 pH 5부터 6에 이르기까지 비슷한 정도의 활성을 보이고 있고 pH 7에서 최적 pH가 보인다(Fig. 1A). 또 온도의 영향에서는 45°C가 최적 반응온도로 나타났는데 상온인 25°C에서의 결과에 비해 약 130% 정도 높은 수치를 보이고 있으며 35°C에서는 125% 정도의 강화된 활성을 나타낸다. 55°C에서는 25°C에서의 약 95% 정도로 활성이 감소하고 있으나 효소로는 매우 이례적으로 높은 열 안정성을 가지고 있다(Fig. 1B). 본 효소로서 pH 8에서 가장 안정성이 높아 60°C에서 1시간 배양 후에도 효소활성의 50% 정도가 남아 있는 현상을 보였다(Fig. 2). 70°C에서도 약 15분간 50% 활성이 유지되는데 이러한 높은 열 안정성은 효소의 분리 정제에 큰 장점이 되며 이 효소를 이용한 할로겐화 반응 수행에도 용도가 높을 것으로 기대된다. 많은 세균이나 방선균 유래 HPase가 thermostable esterase와 그 구조가 유사하다는 점을 고려할 때 이러한 높은 열

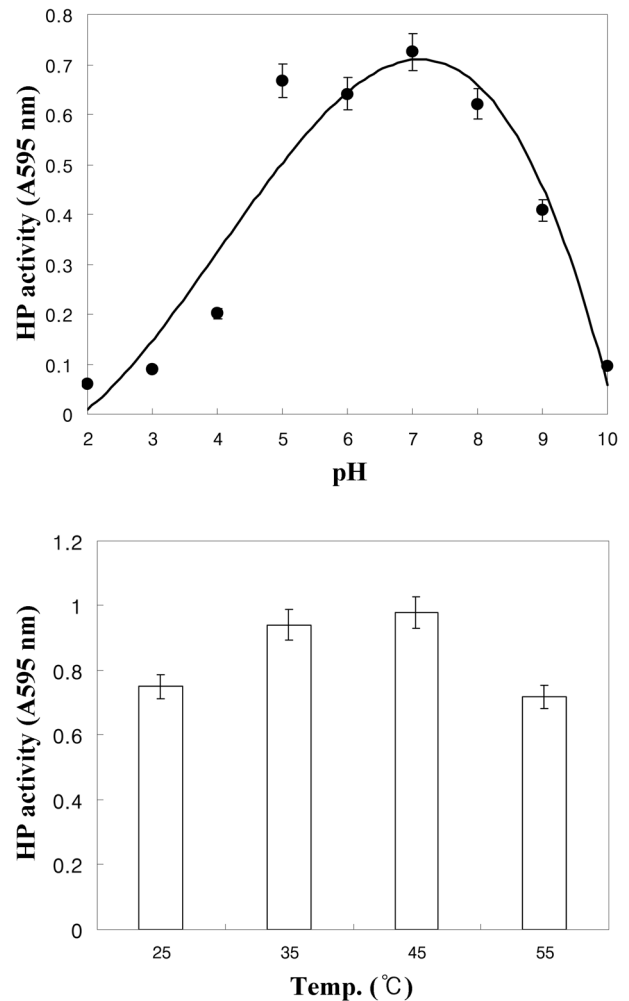


Fig. 1. HPase activity at various pH. A series of buffer with different pH were prepared in 0.1 M solution, and 20 μ l of HP solution were added into 80 μ l of each buffer. Phenol red, KBr, and hydrogen peroxide solution were also prepared with corresponding buffer, and the absorbance at 595 nm were measured after 30 min reaction at room temperature.

안정성도 esterase와의 구조유사성에 기인하는 것으로 추정되며 현재 세제에 사용되는 등 상온에서 보존이 가능한 lipase 등 esterase처럼 사용이 편리할 것으로 생각된다(7).

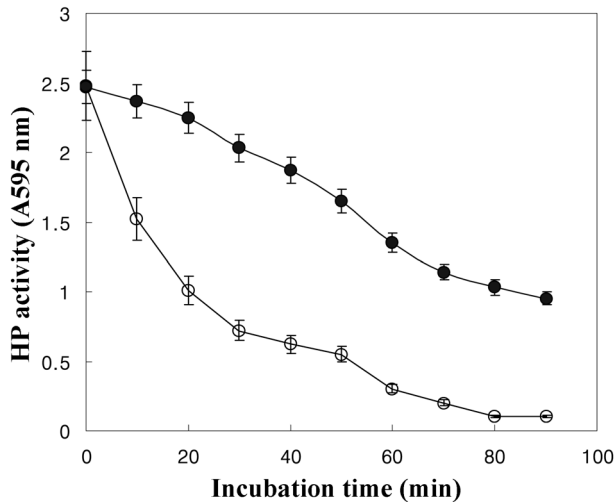


Fig. 2. Thermal stability of haloperoxidase from A1460. one ml of HPase in 50 mM TrisHCl (pH 8.0) was incubated at 60°C water bath, and at every 10 min, 50 μ l of aliquots were taken and analyzed for remaining HPase activity.

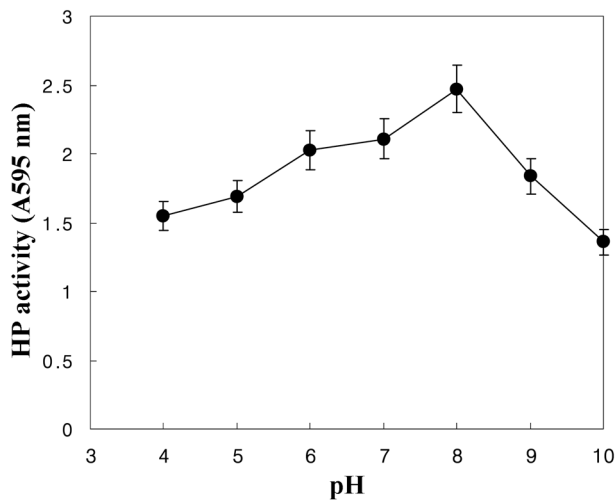


Fig. 3. Stability of haloperoxidase from A1640 at various pH. HPase samples (1 ml each) were incubated in various pH indicated overnight in cold chamber (4°C). Each samples were adjusted to pH 7 with desalting column (10-DG Econo column) and 50 mM phosphate buffer, and assayed for remaining HPase activity at 25°C.

여러 pH에서의 효소 활성 안정성은 pH 8에서 가장 잘 유지되었으나 pH 4에서 pH 10의 범위에서 비교적 안정성이 잘 유지되는 현상을 보였다(Fig. 3). 본 HPase는 sodium azide와 sodium cyanide에 의해 농도 의존적 저해현상을 나타내는 점으로 미루어 cofactor로서 Heme의 유무에 관계없이 Fe^{2+} ion을 갖고 있는 것으로 추정된다(Fig. 4). 본 방선균 A1460 균주는 일반적인 배지에서 매우 잘 성장하며 HPase 활성도 높은 편이지만 그 유전적 특성을 연구하기 위해 해당 유전자의 분석이 향후 필요할 것으로 보인다. 이미 몇몇 *Streptomyces aureofaciens*를 위시한 몇 종

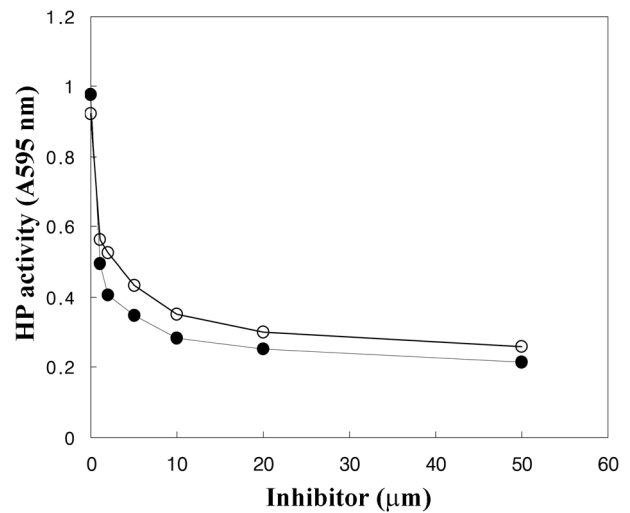


Fig. 4. Inhibition of HPase by sodium azide and sodium cyanide. The inclusion of sodium azide and sodium cyanide dissolved in 0.1 ml of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) into 0.9 ml of reaction mixture, and after 30 min at room temperature, the remaining HPase activity were measured.

의 방선균과 *Pseudomonas pyrocinia*에서 HPase 유전자가 보고된 바 있어(12, 16) 이들과의 연관성에 대한 연구가 향후 필요할 것이다. 또 비교적 높은 열 안정성을 이용하여 보다 빠르고 간편한 분리 정제 방법도 수행되어야 할 것이다.

감사의 말

본 연구는 해양수산부의 특정기초 연구과제의 일환으로 수행되었음을 밝힙니다.

참고문헌

- Bantleon, R., J. Altenbuchner, and K.H. Van Pee. 1994. Chloroperoxidase from *Streptomyces lividans*: isolation and characterization of the enzyme and the corresponding gene. *J. Bacteriol.* 176, 2339-2347.
- Butler, A. and J.V. Walker. 1993. Marine haloperoxidases. *Chem. Rev.* 93, 1937-1944.
- Calbiochem. 2007. Calbiochem manual for lactoperoxidase. CA, USA.
- Dairi, T., T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, and M. Hasegawa. 1995. Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1099-1106.
- Geigert, J., T.D. Lee, D.J. Dalietos, D.S. Hirano, and S.L. Neidleman. 1986. Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 778-782.
- Hunter-Cevera, J.C. and L. Sotos. 1986. Screening for a new enzyme in nature: Haloperoxidase production by death valley dematiaceous Hyphomycetes. *Microb. Ecol.* 12, 121-127.
- Kataoka, M., K. Honda, and S. Shimizu. 2000. 3,4-Dihydrocoumarin hydrolase with haloperoxidase activity from *Acinetobacter*

- calcoaceticus* F46. *Eur. J. Biochem.* 267, 3-10.
8. Kirner, S., S. Krauss, G. Sury, S.T. Lam, J.M. Ligon, and K.H. Van Pee. 1996. The non-haem chloroperoxidase from *Pseudomonas fluorescens* and its relationship to pyrrolnitrin biosynthesis. *Microbiology* 142, 129-135.
 10. Littlechild, J. 1999. Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 28-34.
 11. Pelletier, I. and J. Altenbuchner. 1995. A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* 141, 459-468.
 12. Pelletier, I., O. Pfeifer, J. Altenbuchner, and K.H. Van Pee. 1994. Cloning of a second non-haem bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762: sequence analysis, expression in *Streptomyces lividans* and enzyme purification. *Microbiology* 140, 509-516.
 13. Rush, C., A. Willetts, G. Davies, Z. Dauter, H. Watson, and J. Littlechild. 1995. Purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of the vanadium-dependent haloperoxidase from *Coralina officinalis*. *FEBS Lett.* 359, 244-246.
 14. Van Pee, K.H. 1996. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 375-399.
 15. Wiesner, W., K.H. Van Pee, and F. Lingens. 1988. Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrocinia*. *J. Biol. Chem.* 263, 13725-13732.
 16. Wolfframm, C., F. Lingens, R. Mutzel, and K.H. Van Pee. 1993. Chloroperoxidase-encoding gene from *Pseudomonas pyrrocinia*: sequence, expression in heterologous hosts, and purification of the enzyme. *Gene* 130, 131-135.

(Received May 20, 2008/Accepted June 23, 2008)

ABSTRACT : Screening and Partial Purification of Haloperoxidase from Marine Actinomycetes

Ki Woong Cho (Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Republic of Korea)

In my search of microbial source of novel enzymes, a marine actinomycetes, A1460, producing haloperoxidase was isolated from macroalgae from south sea, Korea and studied for physiological and biochemical properties. The haloperoxidation reaction was followed by the bromination of phenol red in the presence of hydrogen peroxide and potassium bromide. The haloperoxidase was partially purified from the cell extract with 35~75% ammonium sulfate precipitation, High-Q anion exchange chromatography, gel filtration chromatography, hydroxyapatite chromatography and hydrophobic interaction chromatography to a yield of 42% and purification fold of 70. This enzyme showed relatively high heat stability without losing 50% of activity after 1 hr incubation at 60°C. The highest activity was found at 45°C, and the optimal pH was about pH 7, but higher stability was observed at pH 8. Azide and cyanide ion showed strong inhibition at less than 1 μ M level suggesting that the enzyme was Fe ion dependent haloperoxidase.