

## 광합성세균 *Rhodospseudomonas gelatinosa*의 시토크롬 c 산화효소의 정제 및 특성\*

강대길 · 최원기

전남대학교 자연과학대학 화학과

화학 영양성으로 배양한 *Rps. gelatinosa*에서 2회의 시토크롬 c 친화성 크로마토그래피와 DEAE-Sephacel 이온 교환크로마토그래피 등 3단계의 크로마토그래피를 수행하여 시토크롬 c 산화효소를 정제하였다. 정제된 시토크롬 c 산화효소는 Sephacryl S-300에 의한 분자량이 약 110,000 Da이고 SDS-gel 전기영동에 의한 분자량이 약 52,000 Da으로써 이량체일 것으로 보인다. 정제된 시토크롬 c 산화효소는 온도에 매우 불안정하고 말 심장 시토크롬 c를 기질로 사용했을 때 Km값은 20  $\mu$ M, Vmax값은 44 unit/mg prot.이며 pH 6.4의 효소반응 최적 pH와 25°C의 최적 온도를 보였다. 환원된 시토크롬 c 산화효소는 554, 523, 421 nm에서  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet 흡수대를 보였고 chromatophore에서와 마찬가지로 KCN과  $\text{NaN}_3$ 에 의해서는 효소 활성도가 저해를 받았지만 CO와 antimycin A, myxothiazol에 의해서는 효소 활성도가 저해를 받지 않았다. 빛을 에너지원으로 배양하거나 또는 화학영양성으로 배양하든지 모두 시토크롬 c-551이 생성되었고 환원된 시토크롬 c-551은 시토크롬 c 산화효소에 의해 산화되었다. 시토크롬 c-551을 기질로 이용하였을 때 시토크롬 c 산화효소의 Km값은 26  $\mu$ M이었고 Vmax값은 31 unit/mg prot.로써 말 심장의 시토크롬 c를 기질로 이용할 때 보다 오히려 낮았다. 이와같은 결과로 보아 화학 영양성으로 배양한 *Rhodospseudomonas gelatinosa*에서 호흡에 의한 전자전달은 시토크롬 c-551이 시토크롬 bc<sub>1</sub> 복합체로부터 전자를 받아 b-형 시토크롬 c 산화효소에 전자를 전달해 주고 최종적으로 산소를 환원시킬 것으로 생각된다.

KEY WORDS □ *Rhodospseudomonas gelatinosa*, cytochrome c oxidase, electron transfer chain

시토크롬 c 산화효소(ferrocytochrome c:O<sub>2</sub> oxidoreductase, EC 1.9.3.1)는 미토콘드리아 전자전달계의 말단 산화효소이다. 이 효소는 ferrocytochrome c를 ferricytochrome으로 산화시키고 동시에 O<sub>2</sub>가 물로 환원되는 반응을 촉매한다. 또한 내부 미토콘드리아 막을 통하여 양성자 전기화학적 전위(proton electrochemical potential)를 만들고, 이는 ATP 합성에 추진력으로 이용된다(15). *Rhodospseudomonas sphaeroides*의 cyt b<sub>561</sub>은 Takamiya와 Tanaka(19)에 의해 정제되어 시토크롬 c 산화효소로써의 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. Hudig와 Drews(7)등이 *Rps. capsulata*에서 정제한 b형 시토크롬은 전자전달의 말단효소인 시토크롬 c 산화효소의 기능을 하는 것으로 보고하였는데 pyridine hemochrome 차이 스펙트럼에서  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet 흡수대가 각각 555, 523, 421 nm에서 보여 전형적인 b형 시토크롬의 스펙트럼을 보이거나 KCN과  $\text{NaN}_3$ 에 의해 효소 활성도가 저해를 받는 시토크롬 c 산화효소의 기능을 뚜렷이 보였다. 또한 이 시토크롬 c 산화효소는 *Rps. palustris*의 시토크롬 o와 유사한 스펙트럼을 보이지만 CO에 의해

효소 활성이 저해를 받지 않는다는 점에서 시토크롬 o와는 다르게 b형 시토크롬 c 산화효소라고 명명하였다. *Rps. capsulata*에서 발견된 시토크롬 c 산화효소는 분자량이 약 130,000 Da (Sephadex G-150에 의해)이고 소단위체의 분자량이 각각 65,000 Da인 이량체일 것으로 보고되었다.

Takamiya와 Tanaka(19)가 *Rps. sphaeroides*에서 정제한 시토크롬 b<sub>561</sub>은 시토크롬 c 산화효소의 활성을 보이거나 소단위체 분자량이 각각 23,000 Da, 19,000 Da, 6,000 Da이고 자연상태의 분자량이 45,000 Da(sephadex G-100에 의한 분자량)으로서 *Rps. capsulata*의 것과는 많은 차이를 나타냈다.

진핵세포의 시토크롬 c 산화효소는 기질이 가용성 시토크롬 c인데 대해 원핵세포의 시토크롬 c 산화효소의 기질은 다양하다. 자색 비유황 광합성 세균인 *Rps. viridis*(16) *Rps. acidophilla*, *Rhodobacter capsulata*(8)에는 시토크롬 c<sub>2</sub>가 존재하여 광순환 전자전달 과정에서는 ubiquinol로부터 전자를 받아 photosystem에 전자를 전달해 주고 호흡에 의한 전자전달 과정에서는 시토크롬 c 산화효소의 기질로서 각각 기능을 한다. *Rs. tenue*, *Rps. gelatinosa*, *Rc. purpureus*, *C. vinosum*등에는 cyt c<sub>2</sub>가 존재하지 않은 것으로 알려져 있는데(2) *C. vinosum*에는 cyt c-551(Mw.

\* 이 논문은 1991년도 전남대학교 학술 연구비에 의하여 연구 되었음.

15.5 kDa)이 존재하고(21) 이 cyt c-551은 환원 흡수대의  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet 흡수대가 각각 551, 523, 418 nm이고 광순환 전자전달에 기여할 것으로 추정된 바 있다. Mayer 등(14)에 의해 *Ectothiorhodospira halophila*에서도 정제된 시토크롬 c-551은 환원 흡수대가 551, 522, 417 nm(ox. 411 nm)이었고 Sone 등(17)은 *Thermophilic bacterium* PS<sub>3</sub>에서 정제한 cyt c-551이 시토크롬 bc<sub>1</sub> 복합체와 전자전달계의 말단 산화효소로써 기능을 하는 시토크롬 o와 반응한다고 보고하였다.

광합성세균 *Rps. gelatinosa*에는 시토크롬 c-551이 존재하고(10), 광합성 생체막인 chromatophore에는 시토크롬 c 산화효소가 각각 존재하여 호흡에 의한 전자전달을 수행하는 것으로 알려 졌는데(11) 본 연구에서는 통성 혐기성 자색 비유황 광합성 세균인 *Rps. gelatinosa*의 전자전달계의 수립에 도움을 주고자 시토크롬 c 산화효소를 분리 정제하여 그 특성을 연구하고 가용성 시토크롬 c-551과의 반응성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양

통성 혐기성 광합성 세균 *Rhodospseudomonas gelatinosa* ATCC 17013 을 American type culture collection으로 부터 분양 받아 화학 영양 조건(chemotrophically growth)으로 배양하기 위하여 1% Yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2 액체배지에 carotenoid 생성을 억제하기 위하여 50  $\mu$ M diphenylamine을 첨가하고 빛이 없는 조건하에서 30 °C에서 진탕 배양하여 대수기 후기에 수확하여 시료로 사용하였다.

### 시토크롬 c 산화효소의 정제

혐기성으로 배양하여 증류수로 세척한 균 50 g (wet wt.) 을 200 ml의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)에 현탁시키고 초음파 파쇄기(Ultrasonic Ltd. USA)를 이용하여 세포를 파쇄시킨 후 10,000×g 에서 20분 원심분리(Hitachi model SCR-20BA)하여 상등액을 얻었다. 여기서 얻어진 상등액을 다시 원심분리기(Sorbal Model OTD75B, TFT 50.38 rotor)를 이용하여 145,000×g에서 2시간 원심분리하여 침전된 광합성 생체막인 chromatophore를 얻었다. 조 chromatophore를 1% Triton X-100이 포함된 Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)에 현탁하여 120분간 부드럽게 저어주고 130,000×g에서 120분간 원심분리하여 chromatophore막에서 추출된 막결합단백질 용액을 얻었다. 여기서 얻어진 막 결합 단백질을 용출시키고 50 ml의 200 mM NaCl로 column에 남아있는 단백질을 용

출시켰다. 일차 cytochrome c 친화성크로마토그래피를 하여 효소활성도가 가장 높게 나타난 분획을 초여과장치(amicon, PM-10)를 이용하여 농축한 후 0.1 % Triton X-100이 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)에 현탁하고 같은 완충용액으로 미리 평형되어진 cytochrome c-agarose column (1.6×10 cm)에 주입하여 분당 0.4 ml의 속도로 용출하였다. 시토크롬 c에 결합된 단백질은 100 ml의 0-100 mM KCl 농도 기울기로 용출시켰으며 column에 남아있는 단백질은 200 mM KCl로 재용출시켜 분획당 5.2 ml씩 받아 분석하였다. 이차 cytochrome c-agarose 크로마토그래피를 하여 나온 효소시료를 다시 초여과장치를 이용하여 농축 및 탈염을 시킨 후 0.1% Triton X-100이 포함된 50 mM Tris-HCl(pH 7.2) 완충용액으로 미리 평형되어진 DEAE-Sephacel column(1.6 cm×10 cm)에 분당 0.8 ml의 속도로 주입하여 수지에 결합된 효소들은 0-300 mM KCl 직선농도 기울기로 용출하여 분당 4.3 ml씩 분획을 받았다.

### 시토크롬 c-551의 정제

시토크롬 c-551의 정제는 Kang과 Choi(10)의 방법을 이용하여 CM-Cellulose 이온교환 크로마토그래피, DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피, Sephacryl s-200 gel 여과 크로마토그래피, SP-5PW column을 이용한 고속 액체 크로마토그래피등 4단계의 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

### 시토크롬 c 산화효소의 활성도 측정

0.5% tween-80, 25 mM KCl, 75 mM choline chloride가 포함되어 있는 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.8)에 sodium dithionite에 의해 환원된 시토크롬 c를 최종농도 약 20  $\mu$ M 이되게 첨가하여 25°C에서 1분간 방치한 후 정제된 시토크롬 c 산화효소를 가하여 산화된 시토크롬 c를 550 nm에서의 흡광도 감소를 읽어  $\epsilon_{mM,550\text{ nm}} = 19(4)$ 로 부터 계산하였다.

### 분자량 측정

정제된 시토크롬 c 산화효소의 자연상태의 분자량 측정 50 mM KCl과 0.1% Triron X-100을 포함하고 있는 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH, 7.2)로 평형된 sephacryl s-300 gel 여과 크로마토그래피(1.8×46 cm)를 이용하였다. 배제부피는 blue dextran을 이용하여 측정하였고 표준 단백질로는 Sigma Co.의 cytochrome c(Mw. 12,400 Da), carbonic anhydrase (Mw. 29,000 Da), bovine serum albumin(Mw. 66,000 Da), yeast alcohol dehydrogenase(Mw. 150,000), potato  $\beta$ -amylase(Mw. 200,000 Da)을 이용하였다.

### 기타방법

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli (12)방법을 이용하여 12.5%의 slab gel을 만들어 사용하였고 subunit 분자량 측정을 위한 표준단백질로는 Sigma Co.의 lysozyme(14,300 Da),  $\beta$ -lactoglobulin(18,400 Da), trypsinogen(24,000 Da), pepsin

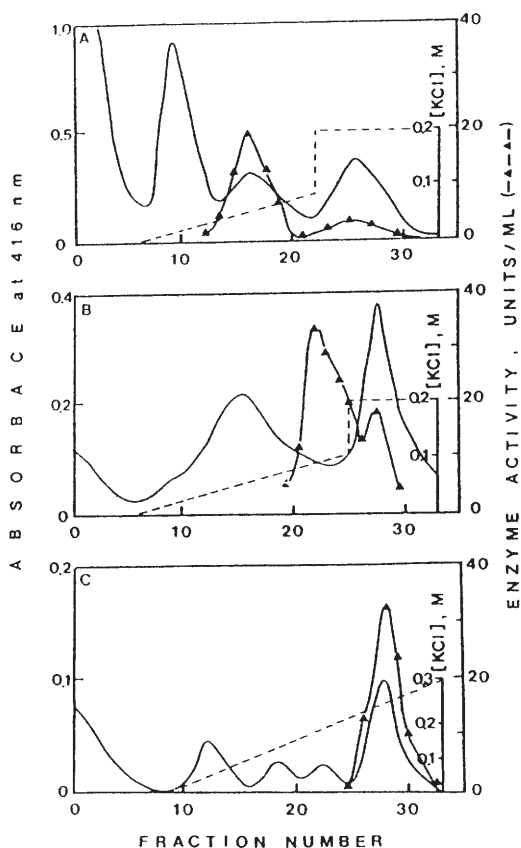


Fig. 1. Elution profile of 1st affinity chromatography (A), 2nd affinity chromatography (B), and DEAE-sephacel ion exchange chromatography (C) for purification of cytochrome c oxidase from *Rps. gelatinosa*. (-----:  $A_{416m}$ , —▲—: activity of cytochrome c oxidase)

(34,700 Da), albumin (from egg ovalbumin, 45,000 Da), albumin (from bovine plasma, 66,000 Da)을 사용하였다. 단백질 정량은 변형된 Lowry 법(13)을 이용하였고 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 시토크롬 c 산화효소의 정제

Bill 등(3)과 Azzi 등(1)이 미토콘드리아의 시토크롬 c 산화효소를 정제하기 위하여 사용했던 시토크롬 c 친화성 크로마토그래피 방법을 응용해 본 세균에서 시토크롬 c 산화효소 기능을 하는 효소를 정제하기 위한 방법으로 이용하였다. 소 심장의 미토콘드리아에서는 시토크롬 c에 시토크롬 c 산화효소 시토크롬 bc<sub>1</sub> 복합체, 시토크롬 c1 등이 결합하여 단지 1단계의

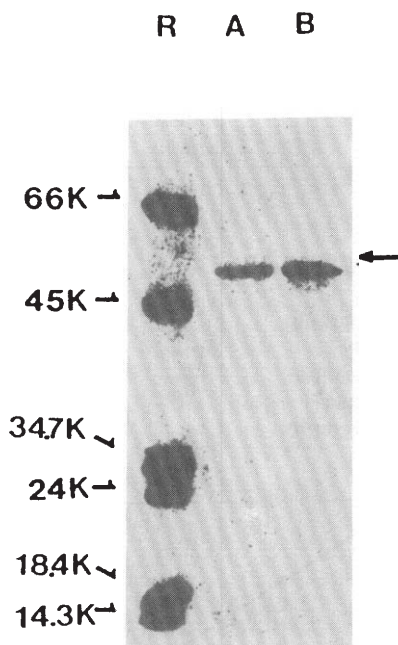


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12.5%) of purified cytochrome c oxidase from *Rps. gelatinosa*. Lane R, A, and B are samples from reference, fraction 26, and 27 of DEAE-Sephacel chromatography.

크로마토그래피만의 높은 활성을 지닌 시토크롬 c 산화효소로 정제하였다 (1).

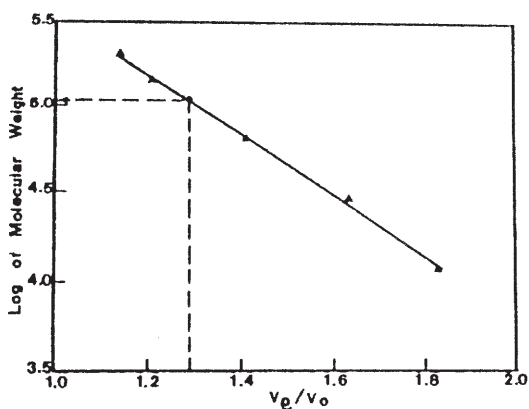
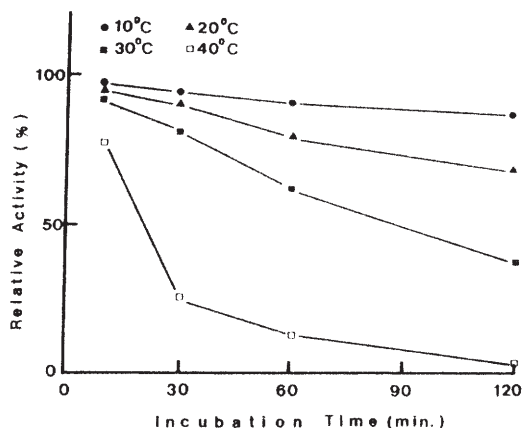
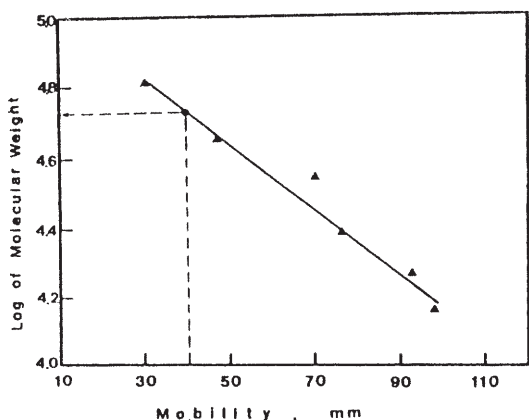
본 실험에서는 matrix로써 agarose를 이용하고 yeast의 시토크롬 c를 disulfide결합에 의해 결합된 cytochrome c-agarose 친화성 수지를 이용하였는데 본 균주에서는 비교적 많은 단백질들이 시토크롬 c에 결합하였고, 두단계의 시토크롬 c 친화성 크로마토그래프 및 한 단계의 DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래프를 거쳐야 비로소 시토크롬 c 산화효소의 정제가 가능했다(Fig. 1, 2). 정제과정을 요약하면 Table 1.과 같고 34.6%의 수율로 29.9배 정제된 시토크롬 c 산화효소의 비 활성도는 41.52 unit/mg prot.였다.

#### 분자량 측정

Sephacryl s-300에 의한 분자량을 약 110,000 Da (Fig. 3)이고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 분자량은 약 52,000 Da이었다(Fig. 4). 이와같은 결과로 볼때 *Rps. gelatinosa*의 시토크롬 c 산화효소는 subunit 분자량이 52,000 Da인 이량체일 것으로 여겨진다. Hudig와 Drew (7)가 *Rps. capsulata*에서 정제한 b-형 시토크롬 c 산화효소의 Sephadex G-150에 의한 분자량이 130,000 Da 으으로써(subunit 65,000 Da의 이량체) 본 균주 시토크롬 c 산화효소 보다는

**Table 1.** The purification steps of cytochrome c oxidase from chemotrophically grown *Rhodopseudomonas gelatinosa*.

Step	Total protein (mg)	Total Cyt. co oxidase activity (units)	Sp. activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude extract	1,460	2,038	1.39	1	100
Crude chromatophore	545	1,700	3.12	2.2	83.4
1st affinity chromatography	95	1,530	15.77	11.3	75.1
2nd affinity chromatography	43	1,310	30.46	21.9	64.2
DEAE-Sepacel chromatography	17	706	41.52	29.9	34.6

**Fig. 3.** Determination of native molecular weight of cytochrome c oxidase of *Rps. gelatinosa* by Sephacryl s-300 gel permeation chromatography.**Fig. 5.** Effect of temperature on the stability of cytochrome c oxidase of *Rps. gelatinosa*.**Fig. 4.** Determination of molecular weight of cytochrome c oxidase of *Rps. gelatinosa* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(12.5 %).

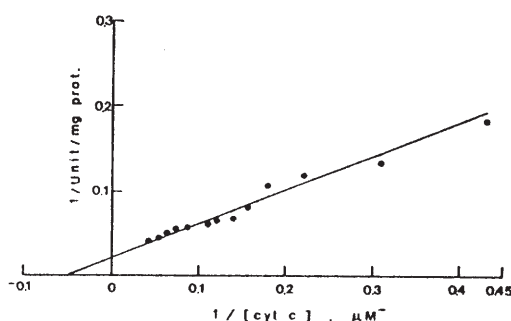
약간 큰 분자량을 가지고 있고 *Rps. sphaeroides*의 cyt b-561은 Sephadex G-100에 의한 분자량이 45,000 Da이고 23 kD, 19 kDa, 그리고 6kDa(20)인 세개의 Subunit로 구성되어 있고 본 균주에 있는 시토크롬 c 산화효소 보다는 훨씬 작은 분자량을 가지고 있다.

#### 최적 pH 및 최적 온도

정제된 시토크롬 c 산화효소의 potassium phosphate 완충용액에서 효소반응 최적 pH 는 6.4로써 *Rps. capsulata*의 최적 pH 8.5(7) 와는 큰 차이를 보이고 있고 오히려 *Rps. sphaeroides*의 적정 시토크롬 c 산화효소 활성을 가진 cyt b-561의 최적 pH 6.0 (20)과 비슷하였다. 또한 시토크롬 c 산화효소의 반응 최적 온도는 25°C에서 가장 높은 활성도를 보였으며 정제된 효소를 4°C에 보관하여도 24 시간후에 약 50 %의 활성도가 감소할 정도로 온도에 매우 불안정하였고, 40°C에서는 2시간도 못 되어서 거의 모든 활성도를 잃어 버렸다(Fig. 5 ).

**Table 2.** The inhibition effect of KCN and  $\text{NaN}_3$  on the activity cytochrome c oxidase.

Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Relative Activity (%)	
	KCN	$\text{NaN}_3$
None	100	100
0.5	78	96
1.0	52	92
5.0	31	64
10.0	16	40
50.0	—	18

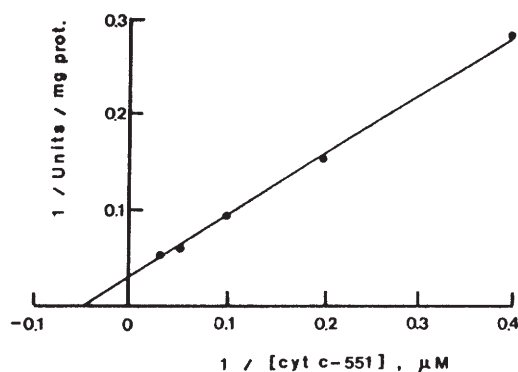
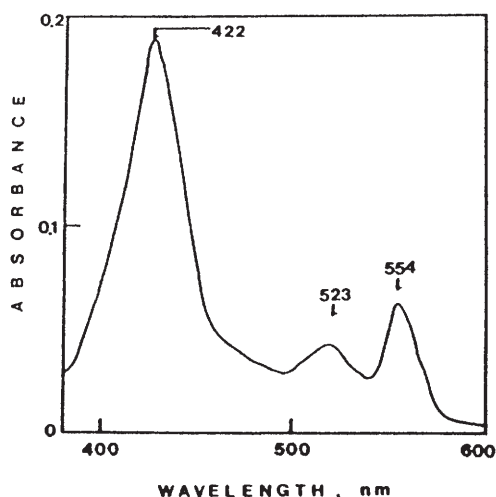
**Fig. 6.**  $K_m$  and  $V_{max}$  of cytochrome c oxidase purified from *Rps. gelatinosa* by using horse heart cytochrome c as a substrate.

### 저해제의 영향

*Rps. sphaeroides*의 정제된 시토크롬 c 산화효소 활성을 가진 cyt b-561 KCN과  $\text{NaN}_3$ 와  $\text{NH}_2\text{OH}$ 에 의해서 활성 저해를 받고 CO와 결합하여 활성이 저해되는 것으로 보고되었고(20), antimycin에 의해서는 활성도를 잃지 않았다. *Rps. capsulata*의 b-형 시토크롬 c 산화효소는 1.5  $\mu\text{M}$ 의 KCN에 의해 50%, 10  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NaN}_3$ 에 의해 50% 정도 효소활성이 저해받으나 CO에 의해서는 저해되지 않는다고 보고한 바 있다(7). 본 균주에서 정제된 시토크롬 c 산화효소는 *Rps. capsulata*의 b-형 시토크롬 c 산화효소와 같이 KCN과  $\text{NaN}_3$ 에 의해서는 활성이 저해를 받았지만 (Table 2) CO와 시토크롬 bc<sub>1</sub> 복합체의 저해제인 antimycin A와 myxothiazol에 의해서는 전혀 저해를 받지않았다(data not shown). 이는 시토크롬 c 산화효소는 CO에 의해 저해를 받는데 b-형 시토크롬 c 산화효소는 CO에 의해 저해를 받지않는 특성이 있으므로 *Rps. gelatinosa*의 시토크롬 c 산화효소는 b-형 시토크롬 c 산화효소 일것으로 생각된다.

### Km값과 Vmax값

본 균주의 시토크롬 c 산화효소의  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값은 말 심장 시토크롬 c(Sigma type II-S)를 기질로 이용하였을때 20  $\mu\text{M}$ 과 44 U/mg protein으로써 (Fig. 6)  $K_m$ 값은 *Rps. sphaeroides*(20)의  $K_m$ 값(14  $\mu\text{M}$ )보다

**Fig. 7.**  $K_m$  and  $V_{max}$  of cytochrome c oxidase purified from *Rps. gelatinosa* by using cytochrome c-551 as a substrate.**Fig. 8.** The sodium dithionite reduced spectrum of purified cytochrome c oxidase of *Rps. gelatinosa*.

크고  $V_{max}$ 는 *Rps. sphaeroides*(7)값( $V_{max}=120$  U/mg protein)보다 훨씬 작게 나타났다. 또한 *Rps. gelatinosa*의 시토크롬 c-551을 기질로 이용했을때  $K_m$ 값은 26  $\mu\text{M}$ 이었고  $V_{max}$ 값은 31 unit/mg protein으로 말 심장의 시토크롬 c를 기질로 이용했을때 보다 오히려 낮았다(Fig. 7).

### 환원 스펙트럼

시토크롬 c 산화효소의 활성을 보인 *Rps. sphaeroides* b-561의 환원spectrum은  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet 흡수대가 각각 561, 530, 428 nm(20)이고 *Rps. capsulata*의 b-형 시토크롬 c 산화효소의 환원 스펙트럼은  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet-흡수대가 각각 555, 523, 421 nm(7)인데 본 균주에서 정제된 시토크롬 c 산화효소는 554, 521, 424 nm에서  $\alpha$ ,  $\beta$ , solet 흡수대가 나타나므로 *Rps. capsulata*의 b-형 시토크롬 c 산화효소의 환원 스펙트럼과 비슷하였다(Fig. 8).



### 시토크롬 c-551과의 반응성

혐기성으로 배양한 *Rps. gelatinosa*의 가용성 시토크롬 c-551과 시토크롬 c 산화효소와의 반응성을 조사하기 위하여 시토크롬 c-551을  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 이용하여 환원시키고 여분의  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 제거한 후 약 4 unit의 b-형 시토크롬 c 산화효소를 첨가한 결과 시토크롬 c-551의 흡수대가 시간의 변화에 따라 점점 감소함을 보였다. 이와같은 결과로 볼때 시토크롬 c-551이 호흡에 의한 전자전달 과정에서 시토크롬 c 산화효소에 전자를 공급해 주는 기질로 작용할 것으로 생각된다. 화학 영양성으로 배양한 가용성 단백질을 alkaline pyridine hemochrome 방법(18)에 의해 환원-산화 차이 스펙트럼을 얻은 결과 혐기성으로 배양한 가용성 단백질 용액에서와 마찬가지로 시토크롬 c-551이 존재함을 알 수 있었고 가용성 용액을 환원시켜 시토크롬 c 산화효소와 반응시킨 결과 550 nm에서 흡광도가 감소함을 보였다. 또한 시토크롬  $c_2$ 을 기질로 이용하는 대부분의 자색 비유황 광합성 세균은 광순환 전자전달일때와 호흡에 의한 전자전달일때 모두 공통으로 시토크롬  $c_2$ 를 중간 기질로 이용하는데(9,22) 본 균주에서는 시토크롬 c-551이 시토크롬  $c_2$ 와 같은 기능을 하는것으로 생각된다.

이상과 같은 결과로 볼때 *Rps. gelatinosa*의 전자전달과정은 광순환 전자전달과 호흡에 의한 전자전달시 모두 가용성 시토크롬 c-551이 시토크롬  $bc_1$  복합체로 부터 전자를 받는 기능을 하고 시토크롬 c-551은 다시 광 순환 전자전달 과정에서는 Bacteriochlorophyll<sup>2+</sup>로 호흡에 의한 전자전달 과정에서는 시토크롬 c 산화효소로 전자를 전달할 것으로 사료된다. 또한 화학 영양성으로 배양하면 b-형 시토크롬 c 산화효소가 생성되어 시토크롬 c-551로 부터 전자를 받아  $\text{O}_2$ 에 전자를 최종 전달하면서 chromatophore 막을 통한 양성자 기울기도 동시에 수행할 것으로 생각되어 진다.

### 참 고 문 헌

1. Azzi, A., K. Bill, C. Broger, 1982. Affinity chromatography purification of cytochrome c binding enzymes. *Biochem.*, **479**, 2447-2450.
2. Bartsch, R.G., 1983. "Cytochromes" in the photosynthetic bacteria (Clayton, R.K. and Sistrom, W.R. ed.). Plenum Press, N.Y., pp. 249-279.
3. Bill, K., R.P. Casey, C. Broger and A. Azzi, 1980. Affinity chromatography purification of cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.*, **120**, 248-250.
4. Gabellini, N., J.R. Bowyer, E. Heart, B.A. Melandri and G. Hauska, 1982. A cytochrome  $bc_1$  complex with ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides* GA. *Eur. J. Biochem.*, **26**, 103-111.
5. Gennis, R.B., R.P. Casey, A. Azzi and B. Ludwig, 1982. Purification and characterization of cytochrome c oxidase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.*, **125**, 189-195.
6. Gennis, R.B., 1991. Some recent advances relating to procaryotic cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1058**, 21-24.
7. Hudig, H. and G. Drews, 1982. Characterization of b-type cytochrome c oxidase of *Rhodopseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.*, **146(2)**, 389-392.
8. Jones, M.R., A.G. Mcwan and J.B. Jackson, 1990. The role of c-type cytochrome c in the photosynthetic electron transport pathway of *Rhodobacter capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1019**, 59-66.
9. Kampf, C., R.M. Wynn, R.W. Shaw and D.B. Knaff, 1987. The electron transfer chain of aerobically grown *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **891**, 228-238.
10. Kang, D.G. and W.K. Choi, 1991. Purification of cytochrome c-551 from photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013. *Kor. J. Microbiol.*, **29**, 92-96.
11. Kang, D.G., M.J. Choi and W.K. Choi, 1991. Identification and characterization of cytochrome  $bc_1$  complex and cytochrome c oxidase in chromatophore of *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *Kor. J. Microbiol.*, **29**, 243-249.
12. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**, 680.
13. Markwell, M.A.K., S.M. Hass, N.E. Tolbert and L.L. Bieber, 1981. Methods Enzymol., **72**, 293-303.
14. Mayer, R.P. and M.A. Cusanovich, 1985. Soluble cytochrome composition of the purple phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides* ATCC 17023. *Biochim. Biophys. Acta.*, **807**, 308-319.
15. Nicholls, D.G., 1982. In Bioenergetics; an introduction to the chemiosmotic theory (Nicholls, D.G. ed). Academic press. pp. 99-131.
16. Shill, D.A. and P.M. Wood, 1984. A role for cytochrome  $c_2$  in *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **764**, 1-7.
17. Sone, N., E. Kutoh and Y. Yanagita, 1989. Cytochrome c-551 from the thermophilic bacterium PS3 grown under air limited conditions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **977**, 329-334.
18. Takaish, S. and S. Morita, 1981. Procedure and conditions for application of the pyridine hemochrome method to photosynthetically grown cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Biochem.*, **89**, 1513-1519.
19. Takamiya, K., H. Tanaka, 1983. Isolation and purification of cytochrome b-561 from photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1449-1455.
20. Takamiya, K., 1983. Properties of the cytochrome c oxidase activity of cytochrome c-561 from photoanaerobically grown *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1457-1462.
21. Tomiyama, Y., M. Doi, K. Takamiya and M. Nishimura, 1983. Purification and some properties of cytochrome c-551 from *Chromatium vinosum*.

- Plant Cell Physiol.*, **24**, 11-16.
22. Venturoli, G., C. Fenoll and D. Zannoni, 1987. On the mechanism of respiratory and photosynthetic electron transfer in *Rhodospirillum rubrum*. *Bio-*

*chim. Biophys. Acta*, 172-184.

(Received February 10, 1992)

(Accepted February 28, 1992)

---

**ABSTRACT: Purification and Characterization of Cytochrome c Oxidase from Photosynthetic Bacterium, *Rhodopseudomonas gelatinosa*.**

**Kang, Dae-Gil and Won-Ki Choi**(Department of Chemistry, College of Natural Science, Chonnam National University, Kwangju, Korea, 500-757)

Cytochrome c oxidase from chemotrophically grown *Rps. gelatinosa* was purified by cytochrome c affinity chromatography and DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. The molecular weight of the cytochrome c oxidase was approximately 110,000 Da by sephacryl s-300 gel chromatography and approximately 52,000 Da by SDS-gel electrophoresis, respectively. Therefore, cytochrome c oxidase of *Rps. gelatinosa* seems to be dimer. The cytochrome c oxidase was very sensitive to temperature. Its  $K_m$  and  $V_{max}$  were 20  $\mu M$  and 44 unit/mg protein for horse heart cytochrome c as a substrate, respectively, and its optimum pH and temperature were 6.4 and 25°C, respectively. The absorption peaks of the reduced cytochrome c oxidase showed at 554 nm, 523 nm, and 422 nm. The activity of cytochrome c oxidase was inhibited by KCN, and NaN<sub>3</sub>, but not by CO, antimycin A, and myxothiazol. The cytochrome c-551 was produced either in phototrophically or chemotrophically grown *Rps. gelatinosa*. The reduced cytochrome c-551 was oxidized by b-type cytochrome c oxidase from *Rps. gelatinosa*.  $K_m$  and  $V_{max}$  of cytochrome c oxidase was 26  $\mu M$  and 31 unit/mg protein for cytochrome c-551 as a substrate, respectively. Therefore, the electron transfer chain of chemotrophically grown *Rps. gelatinosa* seems to be ubiquinol cytochrome bc<sub>1</sub> complex  $\rightarrow$ cytochrome c-551  $\rightarrow$  b-type cytochrome c oxidase  $\rightarrow$  O<sub>2</sub>.