

상당한 수소이온농도에서 성장하는 *Methylobacterium extorquens* AM1의 메탄올 이용 관련효소와 Cytochrome *c* 및 폴리아민

박기정 · 이순희 · 김영민*

연세대학교 이과대학 생물학과

Methylobacterium extorquens AM1이 pH 5.5와 7.0에서 메탄올을 이용하여 성장할 때의 세대 시간은 각각 25시간과 8.3시간 이었다. pH 7.0에서 성장한 세균은 pH 5.5에서 성장한 세균보다 spermidine과 putrescine을 더 많이 함유하고 있었다. 두 조건에서 성장한 세균들은 모두 지수 성장기 중기에서 가장 높은 methanol dehydrogenase (MDH)의 활성을 나타내었고, MDH 함유량은 성장시기에 따른 변화를 보이지 않았다. 세포내 cytochrome *c*는 정체기에서 높게 나타났고 pH 7.0에서 성장한 세균에 더 많이 존재하였다. Putrescine 또는 spermidine이 첨가된 pH 5.5의 배지에서 성장한 세균에서는 putrescine의 함량은 증가하였으나 spermine의 함량은 감소하였고 spermidine의 함량에는 변화가 없었다. Spermine을 첨가한 배지에서 성장한 세균에서는 폴리아민 함량에 변화가 없었다. Putrescine 또는 spermidine이 첨가된 배지에서 성장한 세균에서 MDH와 hydroxypyruvate reductase의 활성이 증가되었고 MDH와 cytochrome *c*의 함량에는 변화가 없었다. 폴리아민은 *in vitro* 상태에서 MDH와 hydroxypyruvate reductase의 활성을 증가시키지 않았다.

KEY WORDS □ *Methylobacterium extorquens*, methanol, methylotroph, polyamine, methanol dehydrogenase, cytochrome *c*, hydroxypyruvate reductase.

폴리아민은 거의 모든 생물들에서 발견되고 있는 다가양이온 화합물로서 세균의 경우 세포의 성장과 분화, DNA와 RNA 및 단백질의 생합성과 안정화를 포함한 생체내의 여러가지 생리현상과 관계되어 있는 것으로 알려져 있다(25, 26). 폴리아민은 동물에서 처음 발견되었지만 이들의 생합성 과정이나 생물학적인 기능에 대한 연구는 미생물에서 먼저 시작되었고, 최근에는 폴리아민과 관련된 돌연변이체들을 이용하여 폴리아민의 생리학적 기능을 밝히는 연구도 진행되고 있다(15, 25, 26).

메탄올자화세균은 독성물질인 메탄올을 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 세균들로, 현재까지 이들의 메탄올 산화에 대한 생리, 생화학 및 분자유전학적 연구가 여러학자들에 의해 활발히 진행되고 있다(3, 5, 23). 그러나 이 세균들을 대상으로한 폴리아민에 대한 연구는 동성 메탄올자화세균인 *Methylobacterium extorquens* AM1을 대상으로 이 세균의 세포내에 존재하는 폴리아민의 구성(1)과 이 세균이 메탄올을 이용하여 다양한 조건하에서 성장할 때 세포내의 폴리아민 양과 성장속도와의 관계(2)를 조사한 것 외에는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 메탄올자화세균의 메탄올 산화와 폴리아민과의 관계를 밝히기 위한 연구의 첫단계로 *M. extor-*

quens AM1이 서로 다른 수소이온농도하에서 메탄올을 이용하여 성장할 때 세포내의 폴리아민 함량과 메탄올 이용과 관련된 주요 효소 및 cytochrome *c*의 활성 또는 함량을 측정, 비교함으로써 이 세균의 메탄올 이용 시스템의 주요 구성요소의 함량 및 활성에 대한 폴리아민의 영향에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

세균배양

메탄올 이용과 연관된 폴리아민의 역할을 조사하기 위해 *M. extorquens* AM1(NCIB 9133)을 0.5% (v/v)의 메탄올이 첨가된 최소배지(pH 5.5 또는 7.0)를 이용하여 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 최소배지의 기본 염류조성은 Kim과 Hegeman(16)의 염류배지조성과 동일하게 하였으며, 세균의 성장속도는 분광분석기를 이용하여 436 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

세포추출액 준비

배양한 세균을 12,000 × g로 10분간 원심분리하여 균체를 모은 후 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5)로 세번 세척하였다. 세척한 세균을 동일한 완충용액에 재현탁하여 0°C에서 초음파분쇄기로 파쇄한 후 원심분리(15,000 × g/30분/4°C)하여 상등액을 세포추출액으로 사용하였다. 세포추출액내의 단백질량은 bovine

*Corresponding author.

serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등 (22)의 방법으로 결정하였다.

폴리아민 분석

세포추출액에 존재하는 폴리아민은 Seiler (24)의 방법을 변형하여 분석하였다. 즉, 세포추출액에 5% HClO₄ 용액을 처리한 뒤 15,000 × g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액과 dansyl chloride 용액 (10 mg/ml/아세트) 및 포화된 Na₂CO₃ 용액을 ependorf tube에 1:2:1의 비율로 혼합, 빛이 없는 곳에서 60°C에 1시간 동안 방치한 후 proline (250 mg/ml)을 넣어 반응을 정지시켰다. 세포추출물내에 형성된 dansyl 유도체는 benzene으로 추출, silica gel plate에서 chloroform과 triethylamine의 혼합용액 (100:9)으로 전개한 다음, 자외선 아래에서 표준시료의 위치와 비교하여 끊어낸 뒤 ethyl acetate로 용출하여 형광분광분석기 (Hitachi F-2000, extinction: 350 nm, emission: 500 nm)로 형광강도를 측정하여 정량하였다.

효소활성측정

세포추출액에 존재하는 methanol dehydrogenase (MDH)의 활성은 Anthony와 Zatman (6)의 방법을 이용하여 메탄올 존재하에서 2,6-dichlorophenol indophenol ($\epsilon_{600} = 1.91 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$)을 환원시키는 정도를 30°C에서 측정하여 결정하였다. 효소반응은 세포추출액을 포함하고 있는 반응혼합물에 메탄올을 첨가하면서 시작하였고, 메탄올 첨가 후 1분 동안에 600 nm에서의 흡광도를 0.01 변화시키는데 필요한 효소의 양을 효소활성 1 unit로 정하였다.

Hydroxypyruvate reductase의 활성은 Large와 Quayle (21)의 방법에 따라 NADH ($\epsilon_{340} = 6.20 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$)의 산화속도를 측정하여 결정하였다. 효소반응은 세포추출액을 포함하고 있는 반응혼합물에 lithium hydroxypyruvate를 첨가하면서 시작하였고, lithium hydroxypyruvate 첨가 후 340 nm에서의 흡광도의 감소를 측정하여 1분 동안 10 μmole 의 NADH를 산화시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

MDH와 cytochrome c의 정량

세포추출액에 존재하는 MDH의 양은 세포추출액을 Laemmli (19)의 방법을 변형한 Kim 등 (17)의 방법에 따라 12.5% polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 다음, 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하고, 7.5% 빙초산과 5% 메탄올이 혼합된 용액으로 탈색한 후 (16, 28), densitometer (Pharmacia LKB Ultrosan XL)를 이용하여 단백질 band를 scanning한 후 세포추출액에 포함된 전체 단백질에 대한 MDH 단백질의 비율을 산출하여 결정하였다.

세포추출액내의 cytochrome c의 양은 Tani 등 (27)의 방법에 따라 세포추출액을 sodium hydrosulfite로 환원시킨 다음, 환원된 cytochrome c가 551 nm와 535 nm에서 나타내는 흡광도를 분광분석기로 측정

하여 " $\mu\text{g cytochrome c/m} = 600 \times (A_{551} - A_{535})$ "의 공식을 이용하여 산출하였다.

외부폴리아민의 영향

0.5% (v/v)의 메탄올이 첨가된 최소배지에서 성장하고 있는 세균 세포내의 MDH와 cytochrome c 및 hydroxypyruvate reductase의 함량 또는 활성에 미치는 외부 폴리아민의 영향을 조사하기 위하여 pH 5.5의 배지에 putrescine, spermidine 또는 spermine을 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 배양하면서 MDH의 활성 및 함량, cytochrome c의 함량, hydroxypyruvate reductase의 활성 등을 조사하였다.

결 과

성장속도

M. extorquens AM1을 30°C에서 0.5% (v/v)의 메탄올이 포함된 pH 5.5와 7.0의 배지에 접종하여 진탕배양하였을 때의 세대시간은 각각 25시간과 8.3시간으로 나타났다.

폴리아민구성 및 함량에 미치는 수소이온농도의 영향

pH 5.5와 7.0의 배지에서 성장한 세균들에서 공통적으로 spermidine이 가장 많이 발견되었으며 이 spermidine은 putrescine과 함께 pH 7.0에서 성장한 세균에 더 많이 존재하였다 (Table 1). 그리고 두가지 서로 다른 수소이온농도에서 성장하고 있는 세균들은 정체가 초기나 중기에서 보다 지수성장기 중기에 있을 때에 모든 폴리아민을 상대적으로 더 많이 함유하고 있었다 (Table 1).

MDH 활성에 미치는 수소이온농도의 영향

pH 5.5와 7.0에서 성장한 세균의 MDH 활성은 지수성장기 중기에서 가장 높게 나타났고 그 이후에는 급격히 감소하였다 (Table 2).

Table 1. Polyamine content in *M. extorquens* AM1 grown on methanol under different pHs^a

pH	Growth phase	Polyamines ($\mu\text{mol/mg protein}$)		
		Putrescine	Spermidine	Spermine
5.5	ME ^b	10.5	42.8	4.2
	ES ^c	1.4	32.5	2.6
	MS ^d	3.5	26.0	2.9
7.0	ME	12.6	51.7	3.1
	ES	5.6	48.6	2.9
	MS	4.9	38.4	2.7

^aCells were grown at 30°C in mineral media of different pHs supplemented with 0.5% (v/v) methanol. The media were agitated at 200 rpm.

^bMid-exponential.

^cEarly stationary.

^dMid-stationary.

Table 2. MDH activity in *M. extorquens* AM1 grown on methanol under different pHs^a

pH	Growth phase	Specific activity ^b
5.5	ME ^c	123.7
	ES ^d	79.7
	MS ^e	37.4
7.0	ME	150.6
	ES	69.7
	MS	34.2

^aCells were grown at 30°C in mineral media of different pHs supplemented with 0.5% (v/v) methanol. The media were agitated at 200 rpm.

^bUnits/mg protein/min.

^cMid-exponential.

^dEarly stationary.

^eMid-stationary.

Table 3. Amount of MDH and cytochrome *c* in *M. extorquens* AM1 grown on methanol under different pHs^a

pH	Growth phase	Amount (µg/mg protein)	
		MDH	Cytochrome <i>c</i>
5.5	ME ^b	212.5	7.5
	ES ^c	202.5	9.8
	MS ^d	222.5	7.6
7.0	ME	217.5	9.3
	ES	207.5	11.4
	MS	225.0	12.0

^aCells were grown at 30°C in mineral media of different pHs supplemented with 0.5% (v/v) methanol. The media were agitated at 200 rpm.

^bMid-exponential.

^cEarly stationary.

^dMid-stationary.

MDH와 cytochrome *c*의 함량에 미치는 수소이온농도의 영향

세포내에 존재하는 MDH의 양은 pH 5.5나 7.0에서 자라고 있는 세균들 모두 성장시기에 따른 큰 변화를 보이지 않았다 (Table 3). 그리고 세포내 cytochrome *c*의 함량은 pH 5.5와 7.0에서 성장하는 세균들에서 공통적으로 정체기에서 높게 나타났고, pH 7.0에서 성장하는 세균이 pH 5.5에서 성장하는 세균보다 전반적으로 더 많은 cytochrome *c*를 함유하였다.

성장속도와 세포내 폴리아민 함량에 미치는 외부 폴리아민의 영향

0.5%의 메탄올 (v/v)을 포함하고 있는 pH 5.5의 배지에 putrescine과 spermidine, spermine을 첨가하여 *M. extorquens* AM1을 배양하였을 때 세균의 성장속도와 spermidine의 함량에는 큰 변화가 없었다

Table 4. Effect of exogenous polyamines on the composition of polyamine in *M. extorquens* AM1 grown on methanol^a

Polyamine added	Growth phase	Polyamines (µmol/mg protein)		
		Putrescine	Spermidine	Spermine
None	ME ^b	10.5	42.8	4.2
	ES ^c	1.4	32.5	2.6
	MS ^d	3.5	26.0	2.9
Putrescine	ME	12.0	35.3	2.2
	ES	8.4	31.0	2.1
	MS	5.6	29.7	1.5
Spermidine	ME	20.4	41.3	1.6
	ES	10.0	31.1	1.3
	MS	16.1	35.4	1.2
Spermine	ME	7.5	34.9	3.3
	ES	3.6	26.2	1.7
	MS	1.2	29.7	2.0

^aCells were grown on methanol (0.5%, v/v) at 30°C in a medium (pH 5.5) containing putrescine, spermidine, or spermine. The medium was agitated at 200 rpm.

^bMid-exponential.

^cEarly stationary.

^dMid-stationary.

(Table 4). 그리고 동일한 배지에 spermine을 첨가한 경우에는 세포내 putrescine과 spermine의 함량에도 큰 변화를 주지 않았다. 그러나 putrescine을 첨가하여 배양한 경우에는 putrescine을 첨가하지 않은 배지에서 성장한 세균보다 putrescine을 더 많이 함유하였고 spermine은 약간 적었다 (Table 4). 그리고 spermidine이 첨가된 배지에서 성장한 세균은 putrescine이 첨가된 배지에서 성장한 세균보다도 더 많은 양의 putrescine을 가지고 있었고, 대신 spermine은 더 적게 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. MDH와 hydroxypyruvate reductase 활성에 미치는 외부 폴리아민의 영향

pH 5.5의 배지에 putrescine을 첨가하여 세균을 배양하였을 때 세포내의 MDH의 활성이 크게 증가하고 hydroxypyruvate reductase의 활성도 약간 증가하였으며, spermidine을 첨가하였을 경우에도 MDH와 hydroxypyruvate reductase의 활성이 증가하였다 (Table 5). 그러나 spermine을 첨가하였을 때는 MDH 활성에는 변화가 거의 없었고 hydroxypyruvate reductase의 활성만 증가하였다.

MDH와 cytochrome *c*의 함량에 미치는 외부 폴리아민의 영향

pH 5.5의 배지에 putrescine, spermidine 또는 spermine을 첨가하여 *M. extorquens* AM1을 배양한 경우 세포내 MDH와 cytochrome *c*의 함량에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다 (Table 6).

Table 5. Effect of exogenous polyamines on MDH and hydroxypyruvate reductase activity in *M. extorquens* AM1 grown on methanol^a

Polyamine added	Growth phase	Specific activity ^b	
		MDH	hydroxypyruvate reductase
None	ME ^c	123.7	89.1
	ES ^d	79.7	92.3
	MS ^e	97.4	101.0
Putrescine	ME	225.0	97.2
	ES	227.5	110.3
	MS	156.3	128.5
Spermidine	ME	193.5	93.5
	ES	191.0	96.7
	MS	214.3	140.4
Spermine	ME	130.5	102.3
	ES	84.3	107.9
	MS	92.2	113.6

^aCells were grown on methanol (0.5%, v/v) at 30°C in a medium (pH 5.5) containing putrescine, spermidine, or spermine. The medium was agitated at 200 rpm.

^bUnits/mg protein/min.

^cMid-exponential.

^dEarly stationary.

^eMid-stationary.

*In vitro*에서 MDH와 hydroxypyruvate reductase의 활성에 미치는 폴리아민의 영향

폴리아민이 MDH와 hydroxypyruvate reductase의 효소활성에 직접적으로 영향을 미치는지 알아보기 위하여 pH 7.0에서 배양한 세균의 세포추출액을 이용하여 MDH와 hydroxypyruvate reductase 효소활성 측정시 기질을 첨가하기 전에 먼저 putrescine, spermidine 또는 spermine 을 10 mM 농도로 첨가한 후 30분과 1시간 동안 실온에 보관한 다음 기질을 첨가하여 각 효소의 활성을 측정하였으나 폴리아민을 첨가하지 않은 대조군과 거의 동일한 효소활성을 나타내었다.

고 찰

세균 세포내에 존재하는 폴리아민의 종류 및 역할에 대한 연구는 대장균에서 가장 활발하게 진행되어 왔다 (7, 8, 14, 18, 25, 26). 그러나 최근에는 일산화탄소 산화세균 (10), 질소고정세균 (12), 고초균 (9, 11), 호열성세균 (13), 메탄올 산화세균 (1, 2) 등에서도 새로운 폴리아민 유도체의 발견, 폴리아민의 세포내 분포 또는 생리학적 역할 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서 *M. extorquens* AM1이 pH 7.0에서 성장하였을 때의 성장속도가 pH 5.5에서 성장하였을

Table 6. Effect of exogenous polyamines on the amount of MDH and cytochrome c in *M. extorquens* AM1 grown on methanol^a

Polyamine added	Growth phase	Amount (μg/mg protein)	
		MDH	cytochrome c
None	ME ^b	212.5	7.5
	ES ^c	192.5	9.8
	MS ^d	222.5	7.6
Putrescine	ME	195.0	7.2
	ES	207.5	10.7
	MS	212.5	9.8
Spermidine	ME	217.5	7.7
	ES	220.5	8.4
	MS	222.5	9.3
Spermine	ME	195.0	5.7
	ES	202.5	8.8
	MS	217.5	8.5

^aCells were grown on methanol (0.5%, v/v) at 30°C in a medium (pH 5.5) containing putrescine, spermidine, or spermine. The medium was agitated at 200 rpm.

^bMid-exponential.

^cEarly stationary.

^dMid-stationary.

때의 성장속도 보다 3배나 빨랐으며 세포내의 putrescine과 spermidine의 함량도 더 많았다. 이와같은 사실은 putrescine과 spermidine이 *M. extorquens* AM1의 성장과 관계된 제반 생리현상에 관계되어 있음을 보여준다. 그러나 putrescine과 spermidine이 첨가된 pH 5.5의 배지에서 성장한 세균의 경우 putrescine의 함량은 증가하였으나 spermidine의 함량과 성장속도에는 거의 변화가 없는 것으로 보아 염등 (1, 2)의 결과에서와 같이 spermidine이 이 세균의 성장진반에 보다 더 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

MDH는 메탄올 대사과정중 이화작용의 첫단계에 필요한 효소이다 (3, 4). pH 5.5와 pH 7.0에서 성장한 *M. extorquens* AM1의 세포내에 존재하는 MDH의 양은 모든 성장시기에 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 지수성장기 중기에 있는 세균에 존재하는 MDH의 활성은 정제기에 있는 세포에 존재하는 MDH 활성보다 3~4배 높았다. 따라서 서로 다른 수소이온농도에서 성장하는 세균들의 각 성장시기에서의 세포내 폴리아민 함량을 감안할 때 이와 같은 결과들로부터 폴리아민이 MDH 합성에는 영향을 미치지 않으나 세 가지 폴리아민 중 putrescine과 spermidine이 MDH의 활성을 긍정적으로 조절할 수 있음을 추측할 수 있다. 그러나 putrescine과 spermidine이 첨가된 배지에서 성장한 *M. extorquens* AM1의 경우 세포내 spermidine의 함량에는 변화가 없었으나 putrescine의 함량과 MDH의 활성은 증가

하였다. 이와 같은 사실은 메탄올을 이용하여 성장하고 있는 *M. extorquens* AM1의 세포내에 존재하는 MDH의 활성이 putrescine에 의해 조절될 수 있음을 보여주며 이는 *Streptococcus faecalis* (20)의 경우처럼 putrescine이 탄백질의 구조를 안정화시켜 효소의 활성을 높여주기 때문인 것으로 생각된다. 그리고 *in vitro*에서 세포추출액을 폴리아민으로 전처리 했을 경우에는 MDH의 활성이 증가되지 않은 것은 세포내에서 putrescine이 MDH의 안정화에 간접적으로 관계하며 *in vitro*에서는 이와 같은 안정화시스템이 작용할 수 없음을 암시한다. 그리고 폴리아민이 첨가된 배지에서 성장한 세균에서 세포내의 폴리아민 함량의 변화에도 불구하고 MDH의 양이 거의 변하지 않은 것은 폴리아민이 MDH 합성에 영향을 주지 않고 있음을 더 뒷받침하여 준다.

MDH로부터 전자를 수용하는 가용성 cytochrome *c*는 메탄올을 에너지원으로 이용하여 성장하기 위해 꼭 필요한 전자전달물질이다 (3, 4). pH 7.0에서 성장한 세균이 pH 5.5에서 성장한 세균보다 putrescine과 spermidine 및 cytochrome *c*를 조금 더 함유하고 있다는 사실은 cytochrome *c*의 합성에 이들 폴리아민이 관계되어 있을 것임을 추측케한다. 그러나 putrescine과 spermidine이 첨가된 pH 5.5의 배지에서 성장한 세균에서 putrescine의 양만 증가하고 spermidine의 양과 cytochrome *c*의 양에는 큰 변화가 없는 것으로 보아 spermidine이 세포내 cytochrome *c*의 함량조절과 관계되어 있는 것으로 추측된다.

M. extorquens AM1은 메탄올을 기질로 하여 성장할 때 serine 경로를 사용하여 세포구성물을 합성하며 hydroxypyruvate reductase는 이 경로의 주요 효소이다 (3, 4). 폴리아민이 첨가된 pH 5.5의 배지에서 성장한 세균은 폴리아민이 첨가되지 않은 배지에서 성장한 세균보다 전반적으로 약간 더 높은 hydroxypyruvate reductase의 활성을 나타내었지만 그 활성은 세포내 폴리아민함량 변화와는 무관하게 배양시간이 길어질수록 더 높아졌다. 이와 같은 사실은 *in vitro*에서 폴리아민을 전처리한 세포추출액내에 존재하는 이 효소의 활성이 증가되지 않은 사실과 함께 폴리아민이 hydroxypyruvate reductase의 활성에 관계되어 있지 않을 것임을 암시해준다.

이상의 결과들을 종합해 볼때 메탄올을 이용하여 성장하는 *M. extorquens* AM1에서 spermidine은 세포내의 cytochrome *c* 함량조절을 포함한 세균성장 전반에 영향을 미치며, 메탄올 이화과정의 주요 효소인 MDH의 활성은 putrescine에 의해 조절될 수 있으나 세포내의 MDH 함량과 이 세균의 메탄올 동화과정의 주요 효소인 hydroxypyruvate reductase의 활성은 폴리아민의 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학연구소 학술

연구조성비에 의해 수행된 것입니다.

참 고 문 헌

1. 엄치용, 이순희, 김영민. 1990. 상이한 에너지원을 이용하여 성장한 *Methylobacterium extorquens* AM1 내의 폴리아민. 한국미생물학회지 28, 290-296.
2. 엄치용, 박기정, 강빈구, 김영민. 1991. *Methylobacterium extorquens* AM1의 메탄올 성장과 세포내 폴리아민 구성에 미치는 배양조건의 영향. 한국미생물학회지 29, 387-391.
3. Anthony, C. 1982. The biochemistry of methylotrophs. Academic Press, Inc., New York.
4. Anthony, C. 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microbiol. Physiol.* 27, 113-210.
5. Anthony, C. 1988. Quinoprotein and energy transduction. In "Bacterial energy transduction" (Anthony, C., ed.), pp. 293-316. Academic Press, Inc., New York.
6. Anthony, C. and L.J. Zatman. 1964. The methanol-oxidizing enzyme of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* 92, 614-621.
7. Cataldi, A.A. and I.D. Algranati. 1986. A probable new pathway for the biosynthesis of putrescine in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 234, 617-622.
8. Cataldi, A.A. and I.D. Algranati. 1989. Polyamines and regulation of ornithine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 1998-2002.
9. Chen, K.Y. and S. Cheng. 1988. Polyamine metabolism in an obligately alkalophilic *Bacillus alkalophilus* that grows at pH 11.0. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 185-191.
10. Hamana, K. and S. Matsuzaki. 1990. Polyamines of carbon monoxide-utilizing bacteria, *Pseudomonas thermocarboxydovorans* and *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 353-356.
11. Hamana, K., S. Matsuzaki, M. Niitsu, and K. Samejima. 1990. Synthesis of novel polyamines in *Paracoccus*, *Rhodobacter*, and *Micrococcus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 267-274.
12. Hamana, K., K. Minamisawa, and S. Matsuzaki. 1990. Polyamines in *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, and *Agrobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 71, 71-76.
13. Hamana, K., M. Niitsu, K. Samejima, and S. Matsuzaki. 1991. Polyamine distribution in thermophilic eubacteria belonging to *Thermus* and *Acidothermus*. *J. Biochem.* 109, 444-449.
14. Huang, S.C., C.A. Panagiotidis, and E.S. Canellakis. 1990. Transcriptional effects of polyamines on ribosomal proteins and on polyamine synthesizing enzymes in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3464-3468.
15. Kashiwagi, K., N. Hosokawa, T. Furuchi, H. Kobayashi, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, and K. Igarashi. 1990. Isolation of polyamine transport deficient mutants of *Escherichia coli* and cloning of the genes for polyamine transport proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 20893-20897.

16. Kim, K.S., Y.T. Ro, and Y.M. Kim. 1989. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. *J. Bacteriol.* **171**, 958-964.
17. Kim, Y.M. and G.D. Hegeman. 1981. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.* **148**, 904-911.
18. Koski, P. and M. Vaara. 1991. Polyamines as constituents of the outer membrane of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 3695-3699.
19. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
20. Lahti, R., R. Hannukainen, and H.L. nnberg. 1989. Effect of spermine and spermidine on the inorganic pyrophosphatase of *Streptococcus faecalis*. *Biochem. J.* **259**, 55-59.
21. Large, P.J. and J.R. Quayle. 1963. Microbial growth on C₁ compounds. *Biochem. J.* **87**, 386-395.
22. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
23. Murrell, J.C. and H. Dalton. 1992. Methane and methanol utilizers. Plenum Press, London.
24. Seiler, N. 1983. Liquid chromatographic methods for assaying polyamines using prechromatographic derivatization. *Methods Enzymol.* **94**, 10-23.
25. Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.
26. Tabor, C.W. and H. Tabor. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**, 81-99.
27. Tani, Y., B.D. Yoon, and H. Yamada. 1985. Production of cytochrome *c* by an obligate methylotroph, *Methylomonas* sp YK1. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2385-2391.
28. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

(Received November 20, 1992)

(Accepted December 11, 1992)

ABSTRACT: Polyamine, Cytochrome *c* and Enzymes Related to the Utilization of Methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1 Growing at Different pHs
 Park, Ki Jung, S.H. Lee and Young Min Kim* (Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

The generation time of *Methylobacterium extorquens* AM1 growing on methanol at pH 5.5 and 7.0 was found to be 23 h and 8.3 h, respectively. The bacterium grown at pH 7.0 were found to contain more amounts of spermidine and putrescine than the cell grown at pH 5.5. Cells grown at both conditions exhibited strong methanol dehydrogenase (MDH) activity at the mid-exponential growth phase. The amounts of MDH, however, were found to be almost equal through all growth phases. Cells growing at the stationary phase contained large amounts of cytochrome *c*. The cytochrome *c* content was higher in cells growing at pH 7.0 than the cells growing at pH 5.5. Cells growing at pH 5.5 in the presence of putrescine or spermidine contained increased amounts of putrescine. The level of spermine, however, was decreased and that of spermidine was not changed. Spermine added into the medium was found to have no effect on the level of cellular polyamines. Putrescine or spermidine added into the medium stimulated MDH and hydroxypyruvate reductase activities, but did not affect the contents of MDH and cytochrome *c*. It was found that preincubation of cell-free extracts with polyamines does not stimulate MDH and hydroxypyruvate reductase activities.