

*Pleurotus ostreatus*에서 분리한 아스콜빈산 산화효소의 특성

황윤엽·김연란·강사옥
서울대학교 자연과학대학 미생물학과

**Properties of Ascorbate-Oxidizing Enzyme
Purified from *Pleurotus ostreatus***

Hwang, Yoon-Yeop, Yeon-Ran Kim, and Sa-Ouk Kang

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University

ABSTRACT: Ascorbate oxidizing enzyme from the crude extract of *Pleurotus ostreatus* was purified by ammonium sulfate precipitation, preparative polyacrylamide gel electrophoresis, DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography and Sephadex G-150 gel filtration chromatography. The molecular weight of the enzyme estimated by Sephadex G-150 gel filtration chromatography was 140,000 and that of its subunit by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 66,000. The optimum pH for the maximum activity of the enzyme was 5.2 and the isoelectric point of the enzyme was 6.0. Km values for L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid were both 2.2 μ M, which indicates that the enzyme has the same affinity towards both substrates.

KEY WORDS □ *Pleurotus ostreatus*, ascorbate oxidizing enzyme

Edgar(1969와 1970)는 생체내의 ascorbic acid와 dehydroascorbic acid의 농도비가 질병의 상태, 세포분열 등, 여러가지 세포생리의 현상에 대한 indicator라고 보고하였다. 이와 같은 역할을 하는 ascorbic acid와 dehydroascorbic acid의 농도비를 조절하는 ascorbate oxidase(L-ascorbate : oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.3.)는 Szent-Györgyi(1931)가 최초로 양배추잎에서 그 활성도를 보고하였다. 이 효소는 ascorbic acid와 O₂의 반응을 촉매하여 dehydroascorbic acid와 H₂O를 생성한다(Dawson 등, 1975). Hallaway 등(1970)은 이 효소가 식물체에서는 세포벽 부분과 연관되어 있다고 보고하였고 Suzuki와 Ogiso(1973)는 이 효소의 활성도가 왕성한 부분이 성장이 왕성한 부분과 일반적으로 일치한다고 보고하였다. 이들 결과로 판단하여 보면 이 효소는 식물 생장기에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다(Bruno와 Luciana, 1984). 이밖에 ascorbic acid

의 oxidation에 관계하는 효소로서 균류의 한종류인 *Myrothecium verrucaria*의 spore와 mycelium에 존재하는 ascorbic acid oxygenase와 ascorbic acid oxidase가 보고되어 있는바(White와 Krupka, 1965), ascorbic acid oxygenase는 ascorbic acid와 O₂의 반응을 촉매하여 oxalic acid와 threonic acid를 생성한다. 또 이 균주에 존재하는 ascorbate oxidase는 고등식물의 ascorbate oxidase와 마찬가지로 ascorbic acid와 H₂O를 생성하지만 metal chelator, sulfhydryl reagent, enzyme inactivator에 의해 활성이 저해받지 않고 cyanide나 EDTA 처리시 활성을 상실하지 않는 특성이 있는 것으로 보고되었다(White와 Krupka, 1965). 본 실험실에서는 *Pleurotus ostreatus*에서 ascorbate oxidizing enzyme의 활성을 확인한 바 있다(Kim, 1986). 본 논문에서는 *Pleurotus ostreatus*로부터 ascorbate oxidizing enzyme을 분리하여 그 효소가 가지고 있는 몇가지 특성을 조사하고자 하였

다.

재료 및 방법

시 약

본 실험에 사용한 시약은 다음의 곳에서 구입하였다. Malt extract, yeast extract, peptone은 Difco사(USA)에서 구입하였으며, L-ascorbic acid, D-isoascorbic acid, β -mercaptoethanol, methanol은 Merck사(W. Germany)에서, Coomassie blue R 250과 acetic acid는 Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그외의 전기영동 시약, Sephadex G-150, DEAE Sepharose CL-6B 등을 비롯한 모든 시약은 Sigma사(USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

균주 및 배양조건

본 실험실에서 사용된 균주는 한국 산림조합 연합회에서 분양받은 *Pleurotus ostreatus* (strain No.2)로서 potato dextrose 한천 사면배지에 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였으며 4주 간격으로 계대배양하였다. 대량 배양시에는 증류수 1ℓ에 malt extract 20g, yeast extract 5g, dextrose 10g, peptone 5g을 용해시킨 malt 배지를 사용하였으며, 7일간 배양한 균체를 omnimixer (Du Pont Instrument, USA)로 분쇄하여 그 현탁액을 610nm의 흡광도가 $5 \times 10^{-3} \text{ l}^{-1}$ 되게 접종하고 25°C에서 7일간 진탕배양 하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

Davis(1964)의 방법을 변형하여 discontinuous buffer system, slab gel system, 그리고 tris-glycine (pH 8.3) 완충용액계를 채택하였다. Acrylamide의 농도는 stacking gel과 resolving gel이 각각 3%와 12%되게 하여, 4°C에서 5시간 동안 효소시료를 전기영동하였다. 효소시료는 단백질농도가 10 μl 에 1 μg 이 되게 하여 여기에 bromophenol blue를 0.02%, ficoll type 400을 6.7% 되게 섞어 만들었다. 단백질 band는 Carl등(1984)의 방법을 사용하여 positive-image silver 염색법으로 염색하였다. 활성염색은 Anton과 Markakis(1969)가 제시한 방법을 변형하여 수행하였다: 0.05 mM의 ascorbic acid가 용해되어 있는 0.1 M acetate 완충용액 (pH 5.2)을 사용하

여 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 이 gel을 다시 1 mM 2, 6-dichlorophenolindophenol 수용액에서 반응시켜 band를 확인하였다.

효소활성도 측정

Boehringer Mannheim (W. Germany)사에서 제안한 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 M acetate 완충용액 (pH 5.2) 3 ml에 0.1 mM이 되게 ascorbic acid를 넣고 효소시료를 넣어 30°C, 265 nm에서 5분간의 흡광도 감소를 측정함으로써 그 활성도를 평가하였다. 효소의 활성단위는 위의 반응에서 1분간 1 μM 의 ascorbic acid가 감소하는 경우를 1단위 (unit)로 정하였다.

단백질 정량

Lowry 등(1951)의 방법을 주로 사용하였으며 효소분리를 위한 column 용출액의 경우는 280 nm의 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 결정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

Crude Extract의 제조

대량배양한 균체를 균체부피의 5배 이상되는 0.1 M 인산-시트르산 완충용액 (pH 5.6)으로 세척하였다. 이에 산화알루미늄을 섞어 omnimixer로 균체를 분쇄한 다음, 3,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상청액을 조효소로 사용하였다.

황산암모늄에 의한 침전

조효소용액에 고체 황산암모늄을 포화도 20~80% 되게 첨가하여 염석시킨 후 침전물을 0.1 M 인산-시트르산 완충용액 (pH 5.6)에 녹여 동일한 완충용액으로 4°C에서 48시간 투석시킨 후, 원심분리하여 상청액을 얻었다.

Preparative Polyacrylamide Gel 전기영동

조효소에 존재하는 isozyme의 종류를 확인하기 위해 resolving gel의 acrylamide 농도를 8%로 하여 활성염색의 방법대로 활성염색을 실시하였고, 전기영동 속도가 가장 빠른 isozyme만을 분리하였다. Preparative polyacrylamide gel 전기영동은 활성염색시 사용한 방법을 그대로 적용하였으나, 효소시료를 대량으로 처리하기 위하여 전기영동 gel의 두께를 16 mm로 하였다. 활성염색을 한 후 나타난 band를 절단하여 전기용출방법 (Hanaoka 등, 1979)으로 효소시료를 회수하였다.

DEAE Sepharose CL-6B 이온교환크로마토그래피

0.05M 인산-시트르산 완충용액 (pH 6.5)으로 평형시킨 column에 동일한 완충용액으로 평형시킨 효소시료를 얻고 40 ml의 완충용액을 흘려 원하는 효소시료를 결합시키고 다시 같은 완충용액에 NaCl을 0~0.4M의 일정농도기울기로 하여 이를 용출시켰다. 용출속도는 $4 \text{ ml} \cdot \text{hour}^{-1}$ 이고 4 ml씩 4°C에서 분획하였다.

Sephadex G-150 gel 여과크로마토그래피

0.1M 인산-시트르산 완충용액 (pH 5.6)으로 평형시킨 column에 동일한 완충용액으로 평형시킨 효소시료를 얻고 동일한 완충용액으로 용출시켰다. 용출속도는 $4 \text{ ml} \cdot \text{hour}^{-1}$ 이고 4 ml씩 4°C에서 분획하였다.

Isoelectric focusing

Acrylamide와 bisacrylamide의 농도가 각각 9.7%와 0.3%인 slab gel에서 pH 범위가 4.0~6.0인 6.25% ampholine (LKB)을 사용하였다. Focusing은 1.0M H_3PO_4 와 1.0M NaOH 수용액을 각각 음극과 양극의 용액으로 하여 4°C에서 4W의 일정전력과 1030 V의 일정전압으로 3시간 행하였다. Focusing이 끝난 후 12cm의 gel strip을 1cm의 간격으로 잘라 0.025M KCl 수용액으로 용출시켜 각각의 pH를 측정하여 pH 기울기를 구하였다. Gel상의 단백질 band는 고정액 (17.3g의 sulfosalicylic acid와 57.5g의 trichloroacetic acid를 500ml의 증류수에 녹임)에 고정시킨 후 염색용액 (0.1% Coomassie blue R 250 수용액/methanol/acetic acid의 부피비율이 5:5:2)에 담그어 관찰하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Laemmli (1970)의 방법에 따라, polyacrylamide gel 전기영동과 같은 조건하에서 SDS (sodium dodecyl sulfate)를 0.1% 되게 첨가하였다. 1mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 1% SDS, 5% β -mercaptoethanol을 녹인 0.01M tris-HCl 완충용액 10 μ l에 효소시료 1 μ g을 녹여 2시간 동안 37°C에서 반응시켜 효소를 소단위 (subunit)로 나눈 뒤 이를 시료로 사용하였다. 분자량 결정을 위해 표준단백질로 β -lactoglobulin (18,000), trypsinogen (24,000),

egg albumin (45,000), bovine serum albumin (66,000) 등을 포함하고 있는 SDS molecular weight markers MW SDS-70 kit (Sigma Chemical, USA)을 사용하였다. 전개조건과 단백질 band의 확인은 앞절의 전기영동 방법과 동일하게 하였다.

Gel 여과크로마토그래피에 의한 분자량 측정

효소분리시 사용한 Sephadex G-150 gel 여과 크로마토그래피와 같은 방법으로 하였다. 표준단백질로는 alcohol dehydrogenase (150,000), bovine serum albumin (66,000), carbonic anhydrase (29,000), cytochrome C (12,400) 등의 gel filtration molecular weight markers MW-CF-20 kit (Sigma Chemical, USA)을 사용하였다. 이들 표준단백질의 농도는 각각 5, 10, 3, 2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 로 하였다.

효소활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소의 활성도에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 20°C에서 95°C 사이의 온도범위에서 0.1M acetate 완충용액 (pH 5.2)을 사용하여 활성도를 측정하였다. 효소반응의 활성화에너지는 Arrhenius 공식으로 구하였다 (Segel, 1975).

효소의 활성도에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 4.4에서 pH 5.6까지는 0.1M acetate 완충용액, pH 5.6에서 pH 7.6까지는 0.1M 인산 완충용액을 사용하여 효소의 활성도를 측정하였다.

Km값 측정

순수분리된 ascorbate oxidizing enzyme의 ascorbic acid에 대한 Km 및 Vmax 값을 측정하기 위하여 여러 기질농도에 대한 효소활성도를 30°C, 0.1M acetate 완충용액 (pH 5.2)에서 측정하였다. Ascorbic acid 농도의 범위는 0.01~0.1 mM로 하였고 Km 값은 Lineweaver-Burk 도표에서 산출하였으며, 이성질체인 D-isoascorbic acid에 대한 친화도 역시 동일한 조건하에서 측정되었다.

결과 및 고찰

효소의 순수분리 및 순수도 확인

황산암모늄 침전과정에서 specific activity의 증가가 미미하였고 (Table 1), 여기서 얻어진 시료를

Table 1. Purification of ascorbate oxidizing enzyme from *Pleurotus ostreatus*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units·mg ⁻¹)	Yield (%)
Crude extract	7,600.00	2,365	0.31	100.0
Ammonium sulfate precipitation	6,000.00	1,923	0.32	81.0
Preparative PAGE	26.00	256	9.85	10.8
DEAE Sepharose CL-6B chromatography	2.05	40	19.51	1.7
Sephadex G-150 chromatography	0.81	25	30.71	1.1

column chromatography에 적용하기 위해 처리하는 과정에서 효소 활성이 급격히 감소되었기 때문에 황산암모늄에 의한 침전물을 직접 preparative polyacrylamide gel에 적용하여 전기영동을 실시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 전기영동에 의한 활성염색의 결과, 모두 네 개 혹은 다섯개의 bands를 보여주었고, preparative polyacrylamide gel 상에서도 같은 양상이었다. 이중 전기영동 속도가 가장 빠른 band를 절단하여 전기

용출법으로 효소시료를 수확하였다. 이렇게 해서 얻어진 효소용액은 비교적 순도가 높은 것으로 생각되는데, 그 specific activity는 9.85 units·mg⁻¹으로 crude extract와 비교했을 때 약 30배의 증가를 보여주었다(Table 1). 이 방법은 효소를 순수분리하는 과정에서 효과적인 방법중의 하나라고 생각되나, crude extract에 비해 total activity에 있어 대체로 90%가 상실되었다는 점을 생각할 때, 많은 양의 효소를 정제하기 위해서는 적절하지 못하다고 생각된다. 이 효소용액을 다시 DEAE Sepharose CL-6B 이온교환크로마토그래피에 적용하였을 때, Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.2M NaCl 농도에 해당하는 부분에서 효소활성을 나타내는 peak(fraction number 41~49)가 분리되었다. 이 과정에서 specific activity는 19.51 units·mg⁻¹으로 전기영동의 결과보다 두배 정도 증가하였고, 또한 단백질의 양도 70% 이상이 감소하여 상당량의 불순단백질이 제거된 것으로 보인다(Table 1). 이 부분을 다시 수확하여 Fig. 3



Fig. 1. Activity staining of ascorbate oxidizing enzyme in the crude extract by the method proposed by Anton and Markakis (1969).

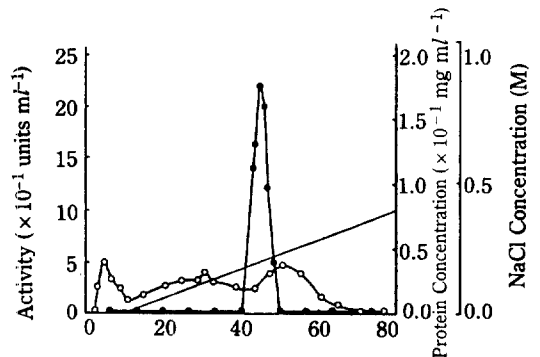


Fig. 2. Ion exchange chromatography of ascorbate oxidizing enzyme on DEAE Sepharose CL-7B. The volume of each fraction was 4 ml and collected at flow rate of 4 ml·hr⁻¹. O, protein content; ●, ascorbate oxidizing enzyme activity.

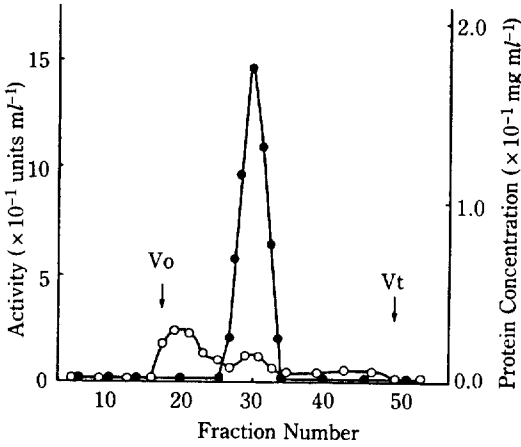


Fig. 3. Gel filtration chromatography of ascorbate oxidizing enzyme on Sephadex G-150. The volume of each fraction was 4 ml and collected at flow rate of 4 ml·hr⁻¹. Vo, void volume; Vt, total volume; ○, protein content; ●, ascorbate oxidizing enzyme activity.

에서 보는 바와 같이 Sephadex G-150 gel 여과 크로마토그래피에 적용한 결과 두개의 단백질 peak를 얻었으며 그중 fraction number 27~33에 해당하는 peak에서 효소의 활성을 검출할 수 있었다. 이 효소시료가 가지고 있는 specific activity는 30.71 units·mg⁻¹로 전단계에 비해 1.5배 정도 증가하였으며 (Table 1), 단백질량도 불순단백질의 양만큼 감소를 보였고, 단백질의 peak와 효소활성 peak가 일치하는 것으로 보아 순수분리 되었다고 판단하였다 (Fig. 3). 그 순도를 polyacrylamide gel 전기영동과 isoelectric focusing을 이용하여 검증한 결과, Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 각각 단일 band를 나타내어 분리한 효소시료가 단일 종류의 단백질을 확인할 수 있었다.

효소의 분자량과 등전점

Sephadex G-150 gel 여과크로마토그래피를 사

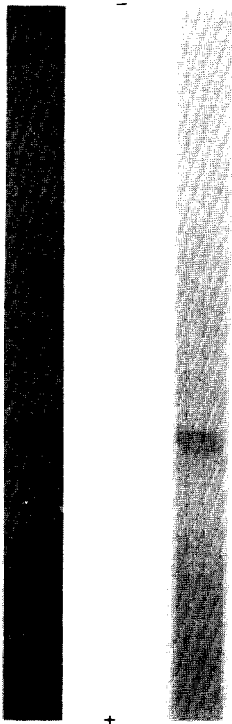


Fig. 4. Electrophoretogram of ascorbate oxidizing enzyme. Right; activity staining by the method proposed by Anton and Markakis (1969). Left; protein staining by the method proposed by Carl *et al.* (1984).



Fig. 5. Analytical isoelectric focusing of ascorbate oxidizing enzyme. Concentrations of acrylamide and bisacrylamide was 9.7 and 0.3 %, respectively. 6.25 % of ampholine (LKB) with pH range from 4.0 to 6.0 was used.

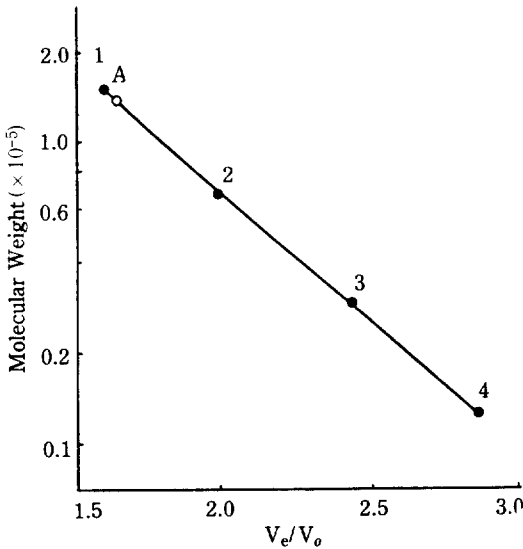


Fig. 6. Molecular weight estimation of ascorbate oxidizing enzyme by gel filtration chromatography. Molecular weight markers: 1, alcohol dehydrogenase (150,000); 2, bovine serum albumin (66,000); 3, carbonic anhydrase (29,000); 4, cytochrome C (12,400); A, ascorbate oxidizing enzyme.

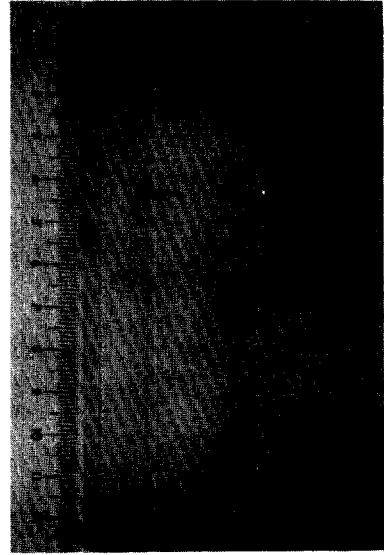


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of ascorbate oxidizing enzyme.

Concentrations of acrylamide and bisacrylamide were 12 and 3%, respectively. Molecular weight markers: A, ascorbate oxidizing enzyme; B, β -lactoglobulin (18,000); C, trypsinogen (24,000); D, egg albumin (45,000); E, bovine serum albumin (66,000).

용하여 측정된 분자량은 140,000 정도로 (Fig. 6) 고등식물에서 보고된 ascorbate oxidase와 유사하였다 (Bruno 등 1984). 또한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 소단위체의 분자량을 추정한 결과 (Fig. 7과 Fig. 8), 66,000 정도로 Strothkamp와 Dawson (1974)이 고등식물에서 분리한 ascorbate oxidase의 경우와는 약간 차이가 나지만 Luciana 등 (1983)이 고등식물에서 분리한 ascorbate oxidase와는 거의 유사하였다. 이 결과로부터 생각하여 보면 *Pleurotus ostreatus*로부터 분리한 ascorbate oxidizing enzyme은, 동일한 분자량을 갖는 2개의 소단위가 disulfide bond로 결합된, 이합체 (dimer)인 것 같다. Isoelectric focusing의 결과 (Fig. 5), 본 효소의 등전점은 6.0인 것으로 계산되었다.

효소활성도에 미치는 온도의 영향

온도조건만 변화시켜 효소의 활성도를 측정한 결과 85°C가 최적반응온도임을 알 수 있었다. 효소의 온도에 따른 활성도로부터 활성화에너지를 구하여 Arrhenius plot을 하였다 (Fig. 9). 활성화 에너지는 20~25°C에서 $28.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 65~

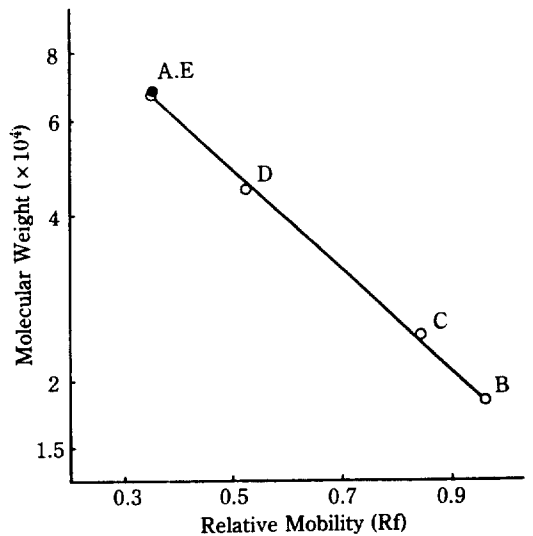


Fig. 8. Molecular weight estimation of subunit of ascorbate oxidizing enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Molecular weight markers: A, ascorbate oxidizing enzyme; B, β -lactoglobulin (18,000); C, trypsinogen (24,000); D, egg albumin (45,000); E, bovine serum albumin (66,000).

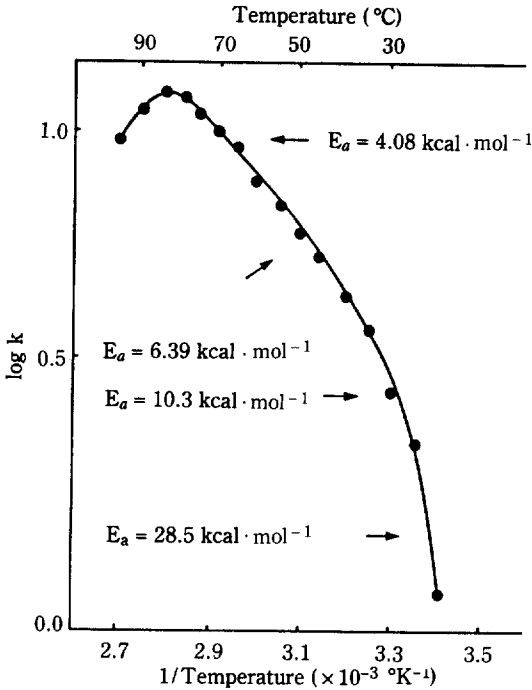


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of ascorbate oxidizing enzyme.

80°C에서 4.08 kcal·mol⁻¹의 값으로 감소하였고, 85°C 이상에서는 효소의 활성도가 감소하는 것으로 보아 효소가 변성된다고 생각된다. 최적반응온도가 이렇게 높은 것으로 보아 효소자체에 효소의 형태를 단단히 유지시키는 disulfide bond 같은 요소들이 많을 것으로 추정된다.

효소활성도에 미치는 pH의 영향

pH 조건만 변화시켜 효소의 활성도를 측정할 결과 Fig. 10의 경우와 같이 pH 5.2 부근이 최적 pH 이었다. 이 사실은 고등식물체로부터 분리한 ascorbate oxidase와 일치하여 (Brenda 등, 1973) 기질로 사용되는 ascorbic acid가 ascorbate monoanion 상태로 존재하는 pH와도 일치한다. (Brenda 등, 1973). Ascorbate oxidase가 실제로 사용하는 기질 (real substrate)은 ascorbate monoanion이라고 보고된 바와 같이 (Brenda 등 1973), 이 효소도 ascorbate monoanion을 기질로 사용한다고 생각된다.

기질 친화도

L-Ascorbic acid와 D-isoascorbic acid 각각에 대하여 농도에 따른 반응속도를 구하여 Km 값을 계산하였다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 L-ascor-

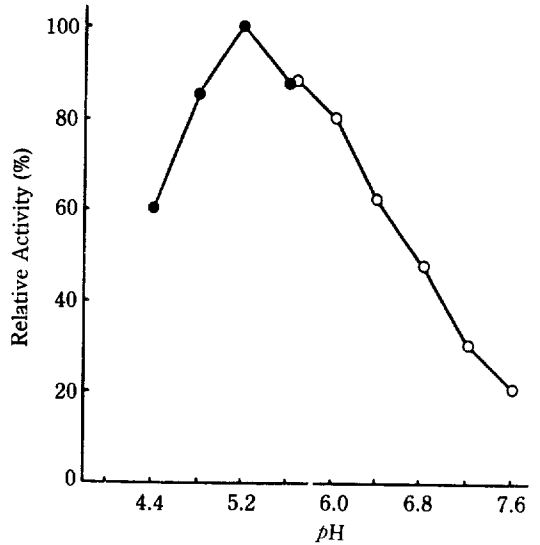


Fig. 10. Effect of pH on the activity of ascorbate oxidizing enzyme using phosphate buffer(○) and acetate buffer(●).

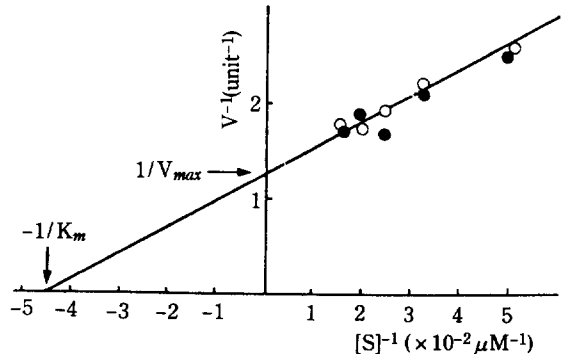


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of ascorbate oxidizing enzyme for ascorbic acid(○) and isoascorbic acid(●).

bic acid에 대한 ascorbate oxidizing enzyme의 Km 값은 2.2 μM 이었으며, D-isoascorbic acid의 경우도 같은 값을 보였다. L-Ascorbic acid와 D-isoascorbic acid는 5번째 탄소의 입체배열이 다르다 (Hvoslef과 Pedersen, 1981)는 점에서 볼 때 이 효소는 그 입체배열의 차이에 관계없이 효소의 활성은 같은 것으로 추정된다.

사 사

본 논문은 한국과학재단 목적기초연구비 (1986 ~ 1989)로 진행되었다.

적 요

*Pleurotus ostreatus*로부터 ascorbate oxidizing enzyme을 황산암모늄 침전, preparative polyacrylamide gel 전기영동, DEAE Sepharose CL-6B 이온교환크로마토그래피, Sephadex G-150 gel 여과크로마토그래피의 단계를 거쳐 순수분리 하였다. 이 효소의 분자량은 gel 여과크로마토그래피에 의하여 140,000 정도로, 효소의 소단위 분자량은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 66,000 정도로 추정되었다. Isoelectric focusing에 의하여 이 효소는 6.0의 등전점을 갖는 것으로 밝혀졌고, 최적반응온도는 85°C 정도, 최적반응 pH는 5.2 정도인 것으로 나타났다. 본 효소는 L-ascorbic acid와 D-isoascorbic acid에 대하여 동일한 친화도를 갖는 것으로 보이며, Km 값은 두가지 기질에 대해 모두 2.2 μ M 이었다.

REFERENCES

- Anton, A., and P. Markakis, 1969. Ascorbate oxidase isozymes. *Phytochemistry* **8**, 997-998.
- Brenda, G., S.R. Burstein, and J. Westley, 1973. Ascorbate oxidase: Inhibition, activation, and pH effects. *J. Biol. Chem.* **249**, 2005-2008.
- Bruno, M., and A. Luciana, 1984. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Vol. 3. ed. by L. Rene, CRC Press, New York, pp.101.
- Carl, R.M., D. Goldman, and M.L.V. Keuren, 1984. In *Methods in Enzymology*, Vol. 104. Academic Press, New York, pp. 441-447.
- Davis, B.J., 1964. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Dawson, C.R., K. Strothkamp, and K. Krul, 1975. Ascorbate oxidase and related copper proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **258**, 209-220.
- Edgar, J.A., 1969. Is dehydroascorbic acid an inhibitor in the regulation of cell division in plants and animals. *Experientia* **25**, 1214-1215.
- Edgar, J.A., 1970. Dehydroascorbic acid and cell division. *Nature(London)* **227**, 24-26.
- Hallaway, M., P.D. Phethean, and J. Taggart, 1970. Critical study of the intracellular distribution of ascorbate oxidase and a comparison of the kinetics of the soluble and cell wall enzyme. *Phytochemistry* **9**, 935-944.
- Hanaoka, F., J.L. Shaw, and G.C. Mueller, 1979. Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **99**, 170-174.
- Hvoslef, J., and B. Pedersen, 1981. Structure of dehydroascorbic acid isomers in solution. *Carbohydrate Research* **92**, 9-20.
- Kim, Y.R., 1987. Fctivity of ascorbate oxidase from *Pleurotus ostreatus*. M.S.-Thesis, Seoul National University.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**, 680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luciana, A., V. Paola, S. Patrizia, M. Giordana, M. Augusto, and M. Bruno, 1983. A re-investigation on the quaternary structure of ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo medullosa*. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **56**, 107-112.
- Segel, I.R., 1975. In *Enzyme Kinetics: Behavior and analysis for rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. Wiley-Interscience, New York, pp. 931-934.
- Strothkamp, K.G., and C.R. Dawson, 1974. Quarternary structure of ascorbate oxidase. *Biochemistry* **13**, 434-440.
- Suzuki, Y., and K. Ogiso, 1973. Development of ascorbate oxidase activity and its isozyme pattern in the roots of pea seedings. *Physiol. Plant* **29**, 169-172.
- Szent-Györgyi, A., 1931. The function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *J. Biol. Chem.* **90**, 385-393.
- White, G.A., and R.M. Krupka, 1965. Ascorbic acid oxidase and ascorbic acid oxygenase of *Myrothecium verrucaria*. *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 448-461.

(Received Sep. 12, 1988)