

***Streptomyces viridochromogenes*의 ascorbic acid 산화 활성**

김성욱 · 노재영 · 김재현

충남 천안시 안서동, 단국대학교 자연과학대학 미생물학과, 330-714

**The Ascorbic Acid Oxidizing Activity in
*Streptomyces Viridochromogenes*****Kim, Seong-Ug, Jae-Yung Rho, and Jae-Heon Kim**

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dan Kook University, Cheonan, 330-714

ABSTRACT: The competence time of *Streptomyces viridochromogenes* for aerial mycelium formation was determined. Within 10 hrs after spore inoculation the submerged mycelium was programed to form aerial mycelium, when the former was laid on agar plate. The white aerial mycelium was formed 17-22 hrs after the transfer. Ascorbic acid oxidizing enzyme band on native gel showed characteristic mobility change during aerial mycelium formation. Total activity of this enzyme did not show any correlation with the differentiation. The assay condition for the crude enzyme was determined. EDTA and FeCl₂ showed stimulatory effect. Approximate ratio of oxygen consumed to ascorbic acid oxidized was 1:1.

KEY WORDS | *Streptomyces viridochromogenes*, aerial mycelium formation, ascorbate oxidation

Ascorbic acid의 산화 반응은 여러 종류의 생물에서 알려져 왔다. *Cucumis sativus*로부터 얻어진 ascorbic acid 산화 효소인 ascorbate oxidase는 효소 분자 당 8개의 구리를 함유하는 단백질이다(Nakamura 등, 1969). 녹색 호박(*Cucurbita pepo medullosa*)의 ascorbate oxidase 역시 구리 함유 단백질로 ascorbate의 산화에 의해 4개의 전자가 산소분자에 전달되어 물이 생성되는 반응을 촉매 한다(Marchesini와 Kroneck, 1979). 느타리(*Pleurotus ostreatus*)로부터도 ascorbic acid 산화 효소의 존재가 알려 졌는데, 분자량이 140,000으로 식물의 효소와 유사하게 나타났다(Hwang 등, 1988). *Aerobacter aerogenes*를 비롯한 몇 종의 세균에서도 ascorbic acid 산화 효소가 발견 되었으나, 효소가 particulate fraction에 위치하기 때문에 보다 자세한 성질은 밝혀지지 못하였다(Volk와 Larsen, 1963). 균류의 일종인 *Myrothecium verrucaria*에서는 ascorbate oxidase 외에 ascorbate oxygenase도 존재 하는데, 이 효소에는 ferrous ion이 결합되어 있고 효소반응의 산물은 oxalic acid와 threonic acid인 것으로 밝혀졌다(White와 Krupka, 1965). 콩과 식물의 뿌리혹에서는 ascorbate peroxidase가 얻어졌는데 이 효소는 heme-protein으로 반응산물은 dehydroascor-

bate이며, 세포의 H₂O₂ 제거에 기여할 것으로 보고되었다(Dalton 등, 1987). 본 실험실에서는 *Streptomyces lavendulae*에서도 ascorbic acid 산화 활성을 나타내는 효소가 존재하며, 균사체 발달에 따른 동위효소 양상 변화가 나타나고 있음을 보고하였다(Lee와 Kim, 1988). 본 논문에서는 *Streptomyces viridochromogenes*의 ascorbic acid 산화 활성을 측정하기 위한 반응 조건을 조사하고 균사체 발달에 따른 활성도 변화를 측정하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법**균주 및 배지**

Streptomyces viridochromogenes KCTC 9009가 사용되었으며, malt extract-yeast extract media(malt extract 5g, yeast extract 2g, glucose 2g, 증류수 1l, pH 7.0; 필요한 경우에 한천을 최종농도가 2%가 되도록 첨가)를 사용하였다.

접종 및 배양조건

포자 용액은 14일 배양된 사면배지로부터 얻었으며 배양액에 10⁷~10⁸ spores/ml의 포자를 접종하여 30°C, 120 r.p.m에서 진탕배양 하였다.

Aerial mycelium 형성 유도

진탕배양 중의 균사체를 5시간 간격으로 꺼내어 원심분리하여 모은 후, 멸균된 증류수로 세척하였다. 수분을 제거한 후 얻은 균사체를 한천 배지에 미리 놓여진 membrane filter(pore size 0.2 µm)에 얹은 다음, aerial mycelium이 생성되는 시간을 측정하였다.

조효소 제조

수분을 충분히 제거한 후 얻은 균사체에 2.5배(g/ml)의 70 mM 인산 완충용액(pH 7.8, 1 mM EDTA)을 넣고, dismembrator(Fisher 300)의 semimicro-tip으로 20초 씩 6회 반복하여 균사체를 파괴시켰다. 이를 18,000×g에서 30분간 원심분리(Hitachi model SCR 20B)한 후 얻어진 상청액을 조효소로 사용하였다.

단백질 정량

Lowry 등(1951)의 방법을 주로 사용하였으며, 효소 분리를 위한 column 용출액의 경우는 280 nm의 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 결정하였다. 표준 단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소의 활성 측정

효소용액 0.2 ml와 반응 완충용액 [0.1 M-0.011 M potassium phosphate-citrate buffer(pH 5.6, 2 mM EDTA)를 사용직전 30°C에서 30분간 air-equilibration] 2.8 ml를 섞은 후 기질용액 (2 mM ascorbic acid) 0.1 ml를 넣고 분광광도계(Shimadzu UV 250)로 265 nm에서 5분간의 흡광도 감소를 측정하였다. 이 때 spectrophotometer의 reference cell에는 buffer와 효소용액이, standard cell에는 buffer, 효소 용액 그리고 기질이 모두 첨가되었다. 효소의 활성 단위는 1분간 1 µmole의 ascorbic acid가 감소하는 경우를 1 unit로 하였다. 또한 같은 조건에서 산소 측정기(Instech사의 Cell과 YSI Model 53 oxygen monitor)로 산소 감소를 측정하였다. 산소 용해도는 1 기압 25°C 상태의 산소 용해량 8.24 mg/l를 표준으로 계산하였다.

효소의 부분 정제

75% acetone 침전으로 얻은 효소시료를 0.01 M 인산 완충용액(pH 7.6)으로 평형시킨 Sephadex G-150 gel filtration column에 얹고, 동일한 완충용액으로 용출시켰다. 용출속도는 12 ml/hr이고, 3 ml씩 4°C에서 분획하였다(2 cm×60 cm column 사용). 활성이 있는 분획을 수합하여 다시 동일한 완충용액으로 평형시킨 DEAE-cellulose ion exchange column에 얹고, 동일한 완충용액을 일정양 흘려 원하는 효소 시료를 결합시킨다음 같은 완충용액에 NaCl을 0~0.2 M의 일농도 기울기로서 용출시켰다. 용출속도는 12 ml/hr이고, 3 ml씩 4°C에서 분획하였다(2.5 cm×10 cm column 사용).

Table 1. Ascorbate oxidizing activity in submerged mycelium

Culture	Time (day)	Enzyme activity (units/min)
seed culture	1	4.70
main culture	1	4.45
main culture	2	2.15
main culture	3	1.70
main culture	4	2.00

Seed culture was carried out for 1 days at 30°C, 120 r.p.m. 10 ml/ seed culture solution was poured to 90 ml new medium and incubated at same culture condition.

Polycarylamide gel 전기영동

Lee와 Kim(1988)의 방법을 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

효소 활성의 측정 조건

수분을 충분히 제거한 균체와 추출용액의 비가 1:2.5(g/ml)일 때 가장 좋은 효소 추출 효과를 얻었다. 포자 접종 후 24시간 경과된 균체의 활성이 가장 높았으며, 균체를 수확하여 새 배양액에 접종한 경우에도 접종 후 24시간 경과된 균체의 활성이 가장 높았다. 배양시간이 48시간 이후의 효소활성은 24시간 균체의 약 절반수준의 활성을 나타내었다(Table 1). 반응 system에 EDTA 2 mM이 첨가 되었을 때 효소활성이 증가되었다(Fig. 1). Cu^{2+} 보다는 Fe^{2+} 에 더 영향을 받았으며, 따라서 이 효소는 식물에서 보고된 구리 함유 효소와는 다른 것 같았다. Ascorbic acid의 철이온에 의한 autooxidation의 효과가 최소로 유지되면서 효소의 활성을 높여주는 Fe^{2+} 의 농도는 0.017×10^{-2} mM이었다(Table 2). 따라서 ascorbic acid 산화반응을 위한 reaction mixture에는 2.8 ml buffer (2 mM EDTA, 0.017×10^{-2} mM FeCl_2 포함)에 0.2 ml 효소용액과 0.1 ml 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 실시하였다.

Aerial mycelium 형성능력

*Streptomyces viridichromogenes*의 aerial mycelium 형성은 표면배양에서만 일어나며, 진탕배양의 경우 발달된 균사체는 작은 덩어리를 이루며 존재한다. 진탕배양에서 얻은 균사체를 한천배지위로 옮기면 일정 시간 후에 aerial mycelium 형성이 유도된다(Table 3). 이러한 aerial mycelium 형성능은 진탕 배양 시간에 관계없이 항상 존재하는 것으로 생각되며, 한천 배지에서 17~22시간 경과된 후 aerial mycelium 형성을 육안으로 관찰할 수 있었다. 단지 포자를 한천배지에 바로 접종하거나, 진탕배양된 시간이

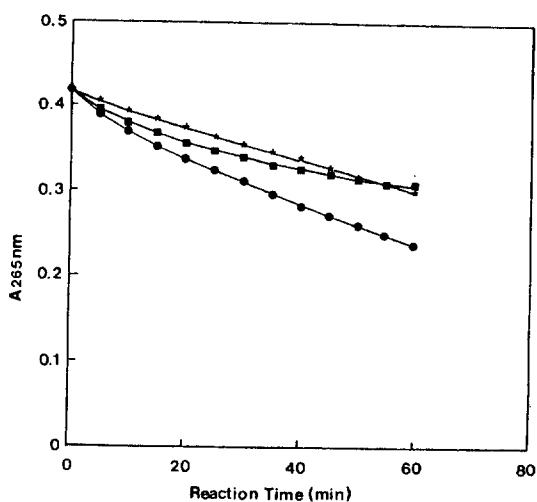


Fig. 1. Effect of EDTA and reaction volume on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme.

The reaction mixture were composed of 1 ml/ crude extract, 0.1 ml/ 2 mM ascorbic acid and 0.1M-0.01M phosphate-citrate buffer (pH 5.6) with 1 mM EDTA (★-★) or without EDTA (■-■). When the buffer containing 2 mM EDTA (●-●) was used, 0.2 ml/ crude extract was added.

Table 2. Effect of metal ion on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme

Metal compound (0.033 mM)	Relative activity (%)
none (crude)	100
CuCl	44
CuCl ₂	54
FeCl ₂	502
FeCl ₃	375
CaCl ₂ ·2H ₂ O	51
ZnCl ₂	70
HgCl ₂	65
MnCl ₂ ·4H ₂ O	81
MgCl ₂ ·6H ₂ O	65
NaCl	70
KCl	65
FeCl ₂ *	121

To the reaction system 0.033 mM of each metal compound was added.

*; 0.017×10^{-2} mM FeCl₂ was added to avoid autooxidation of ascorbic acid.

Table 3. Determination of competence time

Time (hours) of transfer*	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Time (hours) of aerial mycelium formation	33	39	16	16	17	19	18	18	22	21

*; Submerged mycelium were collected at each time and transferred to solid medium.

Table 4. Purification of ascorbic acid oxidizing enzyme from *Streptomyces viridiochromygenes*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold
Crude extract	247.10	74.3	0.30	1.0
Acetone precipitation	145.00	25.7	0.18	0.6
Sephadex G-150 chromatography	2.20	8.0	3.70	12.3
DEAE Cellulose chromatography	0.13	6.5	66.9	223.2

5시간 정도로 짧은 경우에는 aerial mycelium 형성이 늦게 일어나는데 이는 포자의 발아와 균사체 증식에 필요한 시간이 모두 포함되어 나타나는 것으로 이해

된다. 따라서 포자 접종 후 10시간 경에 aerial mycelium 형성에 대한 균사체의 잠재능이 이미 결정되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 *Streptomyces griseus*의 butyrolactone autoregulator에서도 이 물질의 효과는 배양 초기에 이미 결정된다는 것과 일치하였다 (Gräfe 등, 1984). 전기영동상에서 효소의 염색 결과 ascorbic acid 산화 효소는 band-1, band-2로 나타났으며, aerial mycelium 형성 후 약간 빠른 mobility를 갖는 band-1', band-2'로 나타났다(Fig. 2). *Streptomyces griseus*에서 단백질의 ADP-ribosylation이 streptomycin 생성능이 결핍된 균주에서는 현저히 감소되는 것으로 관찰되어, 포자형성이 억제되면 ADP-ribosyl-transferase 활성이 나타나지 않음을 보고한 바 있다(Barabás 등, 1988). 따라서 protein modification이 분화와 연관되리라 생각된다. Aerial mycelium 형성과 ascorbic acid 산화 효소 활성과는 직접적인 관계가 없었다. 즉, aerial mycelium 형성 전 후의

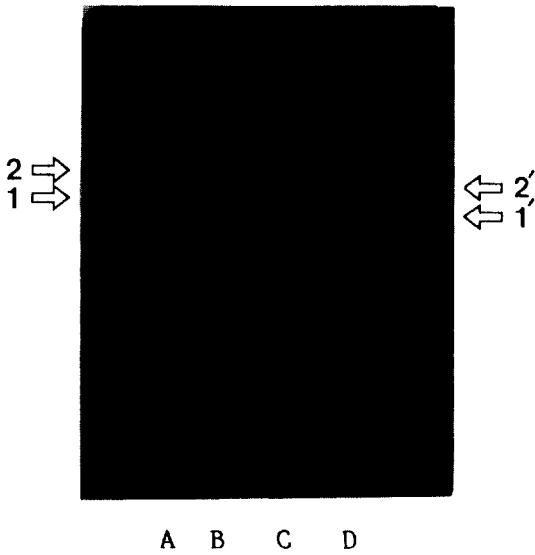


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of ascorbic acid oxidizing enzyme from crude extract. Lane A; mycelium from 45 hours submerged culture, Lane B; mycelium from 25 hours submerged culture followed by 20 hours surface culture, Lane C; mycelium from 63 hours submerged culture, Lane D; mycelium from 48 hours submerged culture followed by 15 hours surface culture.

산화 활성 사이에 일정한 증가 또는 감소경향을 측정할 수 없었다(Fig. 3).

효소의 부분정제 및 순수도 확인

효소의 정제과정은 Table 4에서 보는 바와 같다. 황산암모늄 침전시에는 효소활성이 완전히 소멸되므로 acetone으로 침전시켰다. Acetone 침전과정에서 specific activity가 감소하였으나 여기서 얻어진 시료를 Sephadex G-150 column으로 용출시켰을 때 Fig. 4에서 보듯이 두 개의 단백질 peak를 얻었으며, 그 중 fraction number 27~37에 해당하는 peak에서 효소의 활성을 검출할 수 있었다. 이 과정에서 specific activity는 3.70 units/mg으로 조효소보다 12배 정도 증가하였다. 이 부분을 다시 수합하여 Fig. 5에서 보는 바와 같이 DEAE-cellulose column에 적용한 결과 두 개의 단백질 peak를 얻었으며, 0.1 M NaCl 농도에 해당되는 부분에서 효소활성을 나타내는 peak를 얻었다. 이 과정에서 specific activity는 66.96 units/mg으로 조효소에 비해 약 220배 정도 증가하였으나, 이 때 얻어진 효소의 양이 극소량이어서 효소 특성 조사에는 Sephadex G-150 column 용출액을 사용하였다.

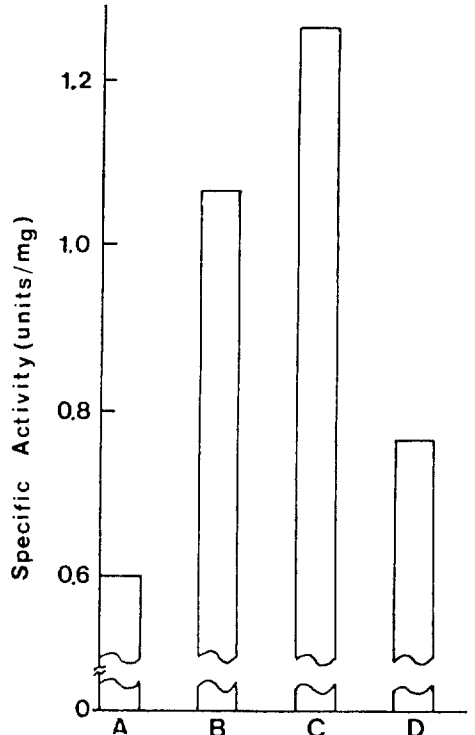


Fig. 3. Ascorbic acid oxidizing enzyme activity from crude extracts. A; mycelium from 45 hours submerged culture, B; mycelium from 25 hours submerged culture followed by 20 hours surface culture, C; mycelium from 63 hours submerged culture, D; mycelium from 48 hours submerged culture followed by 15 hours surface culture.

Table 5. Effect of temperature on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme

Temperature (°C)	Activity (units)	Autooxidation ¹	Stability ²
30	1.30	0.40	2.15
40	1.70		2.00
50	1.70		2.30
60	1.85	2.09	2.55
70	2.30		2.45
80	2.55		2.55
90	2.55	7.11	2.45

¹Autooxidation was determined by ascorbic acid degradation in buffer without enzyme.

²To assay enzyme stability, enzyme was heated for 30 minutes at different temperature then cooled.

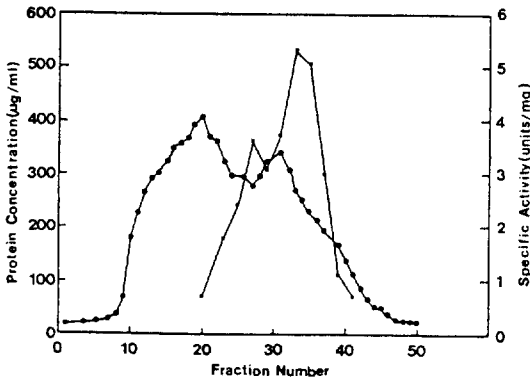


Fig. 4. Gel filtration chromatography of ascorbic acid oxidizing enzyme on Sephadex G-150. ●; protein content, ■; specific activity.

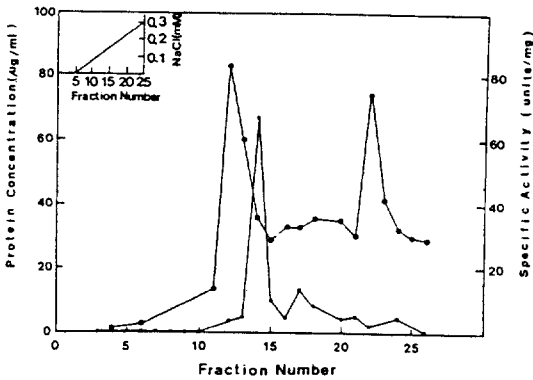


Fig. 5. Ion exchange chromatography of ascorbic acid oxidizing enzyme on DEAE-Cellulose. ●; protein content, ■; specific activity.

효소의 활성에 미치는 온도와 pH의 영향

온도의 변화에 따른 효소의 활성을 측정된 결과 80°C에서 최고의 반응속도를 나타냈으나, ascorbic acid의 autooxidation 역시 온도가 증가할 수록 높아 지므로 최적 반응온도는 결정하지 못하였다. 따라서 autooxidation을 최소로 유지하기 위하여 30°C에서 반응을 시켰다(Table 5). 반면에 ascorbic acid를 제외한 효소용액을 일정 온도로 유지시킨 후 실내온도로 냉각시킨 다음, ascorbic acid를 첨가하여 효소의 활성을 측정된 결과 80°C에서 가장 높은 반응속도를 나타내었다. 이것은 녹색호박에서 80°C에서 10분간 처리할 경우 활성을 완전 상실했다는 보고(Lee와 Dawson, 1973)와 비교해 볼 때, 식물 효소와는 완전히 달랐다. 따라서 이 효소는 열에 대해 안정성을 지니는 것으로 판단된다. pH 조건만 변화시켜 효소의 활성을 측정된 결과, 이 경우에도 pH 증가에 따른 autooxidation이 급격히 증가하였다. 따라서 autooxidation을

Table 6. Effect of pH on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme

pH ¹	Activity (units)	Autooxidation ²
4.0	0	0
4.5	0	
5.0	0.09	
5.6	0.31	0.29
6.0	0.23	0.54
6.5	0.26	
7.0	0.57	
7.5	0.74	
8.0	0.97	2.86

¹0.1-0.01M potassium phosphate-citrate buffer was used for pH 4.0-6.0, 0.1 M potassium phosphate buffer was used for pH 6.5-8.0.

²Autooxidation was determined by ascorbic acid oxidation in reaction mixture without enzyme.

Table 7. Effect of inhibitor on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
non	100
potassium cyanide	107
EDTA(disodium)	127
EDTA(tetrasodium)	107
sodium azide	87
2-mercaptoethanol	87
p-CMB	80

최소로 유지시키기 위해 pH 5.6에서 반응시켰다(Table 6). 오이의 ascorbate oxidase는 pH 5.5~7.0(Nakamura 등, 1968), 세균의 ascorbate oxidase는 pH 6.3(Volk와 Larsen, 1963)에서 최적 반응을 나타내며, 균류의 ascorbic acid oxygenase는 pH 5.0(White와 Krupka, 1965), 버섯의 ascorbate 산화효소는 pH 5.2(Hwang 등, 1988)로 밝혀졌다. 따라서 ascorbic acid 산화 반응은 pH 5.0~7.0 사이가 최적 반응 조건으로 생각된다.

기질 친화도

Lineweaver-Burk plot을 이용하여 Km값을 계산한 결과 10.18 mM 이었다(Fig. 6). 이것은 이미 밝혀진 세균의 ascorbate oxidase의 23.6 mM(Volk와 Larsen, 1963)에 비교하여볼 때 기질친화도가 높으며, 균류의 ascorbic acid oxygenase의 6.7 mM보다는 낮은 친화성을 보였다(White와 Krupka, 1965).

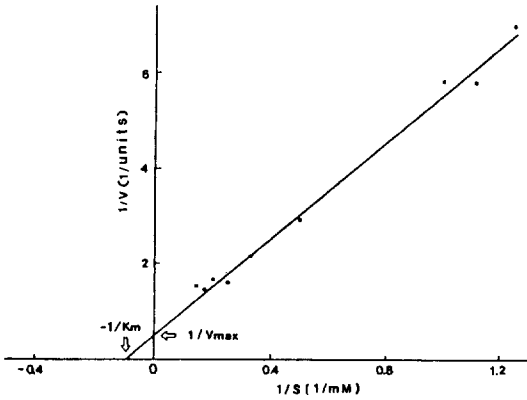


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of ascorbic acid oxidizing enzyme for ascorbic acid.

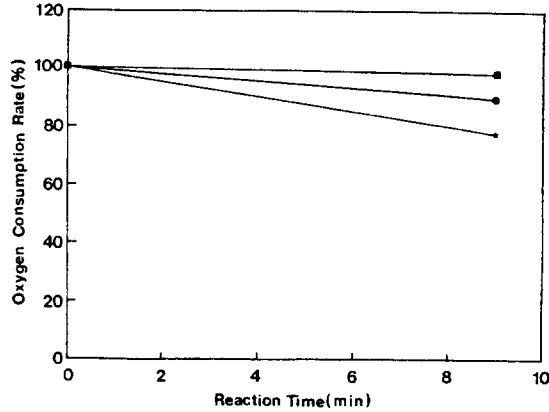


Fig. 7. Oxygen consumption during the enzyme reaction. Reaction buffer was air saturated for 30 minutes by bubbling. The oxygen concentration of this buffer was assumed to be 8.24 mg/l based on oxygen solubility at 25°C, 1 atm. Enzyme was added to the reaction buffer, and oxygen concentration was monitored by oxygen electrode. Autooxidation of ascorbic acid (■-■), partial purified enzyme from Sephadex G-150 (●-●), crude enzyme (★-★).

inhibitor와 metal ion의 영향

효소의 활성은 EDTA나 potassium cyanide에는 억제되지 않았으며 sodium azide, 2-mercaptoethanol과 p-CMB에는 억제되었다(Table 7). 이것은 cyanide 억제 효과를 보이는 녹색호박의 효소와 차이를

Table 8. Effect of metal ion on the activity of ascorbic acid oxidizing enzyme

Metal compound (1 mM)	Relative activity (%)
none	100
MnCl ₂	73
CaCl ₂	60
ZnCl ₂	60
MgCl ₂	67
HgCl ₂	107
NaCl	87
KCl	80
CuCl*	73
CuCl ₂ *	80
FeCl ₂ *	789
FeCl ₃ *	133

To assay the effects of CuCl, CuCl₂, FeCl₂ and FeCl₃ 0.033 mM, not 1 mM, of each metal compound was added in order to eliminate the interfering effects of the metal ions on measuring A₂₆₅.

보이며(Lee와 Dawson, 1973), EDTA나 cyanide에 억제되지 않는 점에서 균류의 ascorbic acid oxygenase와 유사하였다. 그러나 균류의 효소는 sodium azide와 p-CMB에 의해 활성화 되었다(White와 Krupka, 1965). 또한 세균의 ascorbate oxidase는 p-CMB와 cyanide에 의해 모두 억제되었다(Volk와 Larsen, 1963). Metal ion의 영향을 조사한 결과 구리 이온 보다는 철이온에 의해 반응이 활성화 되었다(Table 8). 그러나 autooxidation 효과가 동시에 일어나므로 철이온의 효과는 명확하게 분석되지 못하였다.

반응에 따른 산소 소모량

효소 반응에 따른 산소 소모량은 0.0713 μM/min/ml(Fig. 7)로써, ascorbic acid 소모량 0.0934 μM/min/ml과 비교해 볼 때 거의 1:1의 mole 비율로 소모되었다.

이들 결과를 종합해 볼 때 이 효소는 이미 밝혀진 ascorbate oxidase의 특성을 보였으며, ascorbate oxygenase의 특성도 같이 보였다. 특히 조효소에 대한 철이온의 효과와 산소 소모량으로 볼 때 oxygenase일 것으로 추측하였다.

적 요

얻은 균체는 한천배지위로 옮겨지면 17~22 시간 후에 aerial mycelium을 발달시켰다. 이 때 ascorbic acid 산화활성 효소는 전기영동에서 이동도의 변화를 나타내었다. 그러나 균체의 ascorbic acid 산화 활성은 일정한 경향의 증가 또는 감소를 나타내지 않았다. Ascorbic acid 산화 반응은 EDTA 및 $FeCl_2$ 에 의해 촉진되었으며, p-chloromercuribenzoate에 의해 억제되었다. 산화된 ascorbic acid와 소모된 산소의 양은 약 1:1이었다.

알 림

본 연구의 일부는 한국과학재단의 지원(과제번호 890-0407-008-2)에 의해 이루어 졌습니다.

참고문헌

1. Barabás, G.Y., A. Penyige, I. Szabó, J. Barabás, and J.C. Ensign, 1988. Posttranslational protein modification by ADP-ribosylation in *Streptomyces*. *In Biology of Actinomycetes*, **88**, 439-44.
2. Dalton, D.A., F.J. Hanus, S.A. Russell and H.J. Evans, 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant physiol.*, **83**, 789-794.
3. Gräfe, U., G. Reinhardt, D. Krebs, I. Eritt and W.F. Fleck, 1984. Pleiotropic effects of a butyrolactone-type autoregulator on mutants of *Streptomyces griseus* blocked in cytodifferentiation. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1237-1245.
4. Hwang, Y.Y., Y.R. Kim and S.O. Kang, 1988. Properties of ascorbate-oxidizing enzyme purified from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Microbiol.*, **26**, 324-331.
5. Lee, M.H. and C.R. Dawson, 1978. Ascorbate oxidase. *In Methods in Enzymology*, **62**, 30-39.
6. Lee, H.M. and J.H. Kim, 1988. The change of ascorbate oxidase isozyme pattern during mycelial development of *Streptomyces lavendulae*. *Kor. J. Microbiol.*, **26**, 136-142.
7. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.R. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
8. Marchesini and M.H. Kroneck, 1979. Ascorbate oxidase from *Cucurbita pepomedullosa*. *J. Biochem.*, **101**, 65-76.
9. Nakamura, T., N. Makino and Y. Ogura, 1968. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber. *J. Biochem.*, **64**, 189-195.
10. Volk, W.A. and J.L. Larsen, 1963. Bacterial ascorbic acid oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **67**, 576-580.
11. White, G.A. and R.M. Krupka, 1965. Ascorbic acid oxidase and ascorbic acid oxygenase of *Myrothecium verrocaria*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 448-461.

(Received September 29, 1990)

(Accepted December 7, 1990)