

## 파아지 단백질 및 DNA에 대한 2가철-아스코르빈산착체의 영향

盧日煥 · 村田口晃

日本佐賀大學 農學部 應用生物科學科

### Effect of Iron(II)-ascorbate Complex on Protein and DNA of Phages

Il-Hwan Lho and Akira Murata

Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga 840, Japan

#### Abstract

The inactivating effect of iron(II)-ascorbate complex (Fe-Asc) on various phages was previously reported. This paper describes the molecular target in the phage virion attacked by Fe-Asc. The effect of Fe-Asc on protein was investigated with bovine serum albumin and the structural protein of phage J1. There were no differences in the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (patterns of these two proteins when either they were treated) with Fe-Asc or not. Also, there were no changes in the amino acid composition and ultraviolet spectrum of the proteins. The effects of Fe-Asc on DNA was investigated with pUC18 DNA, M13mp8 DNA and  $\lambda$  DNA as well as DNA from phage J1. Fe-Asc caused initially nicking of the supercoiled form of pUC18 DNA to yield the open circular form and then subsequently the linear form. Strand breaks were also confirmed with M13mp8 DNA and  $\lambda$  DNA as well as J1 DNA. The results indicate that the strand breaks in phage DNA could be responsible for the inactivation of phages by Fe-Asc.

Key words: ascorbate, iron(II)-ascorbate complex, phage, protein, DNA

#### 서 론

세균을 이용하는 발효공업에서는 막대한 수의 세균이 매일 배양되고 있으며 세균을 침입하는 바이러스인 박테리오파지(이하 파아지)에 절호의 번식조건을 제공하고 있다. 실제로 거의 모든 세균이용 발효공업에 있어서 파아지 오염에 의한 발효생산의 이상화가 일어나 피해를 받는 것이 판명되었다. 발효공업에 있어서 파아지 방제를 목적으로 하는 연구가 오랜 기간에 걸쳐 진행되어 왔으나<sup>(1,2)</sup>, 파아지 방제책에 관한 일반적인 방법은 아직까지 확립되어 있지 않다.

발효학 영역에서의 파아지에 관한 연구는 현재도 중요한 과제의 하나이며, 급후 바이오테크놀러지의 진전에 따라 유전자재조합 기법 등으로 조성된 세균의 공업적 사용 확대와 발효의 연속화가 확대되리라는 것 등을 생각하면 파아지 방제에 관한 연구는 점점 중요한 것이 될 것이다.

이러한 배경에서 저자들은 L-아스코르빈산(이하 AsA)의 파아지에 관한 작용에 관하여 일련의 연구를 행하여 왔다<sup>(3-10)</sup>. 그러나 AsA의 파아지 불활화작용은 실용적

견지에서 보면 강력한 것이라고 말할 수 없다. 따라서 실제상 무독성이라고 하는 AsA의 특성을 살려 AsA를 기초로 하여 보다 강력한 파아지 불활화작용을 갖는 것의 개발이 기대되고 있다.

AsA과 2가의 철은 안정한 착체를 생성하지만<sup>(11-14)</sup>, 이 2가철-아스코르빈산착체(이하 Fe-Asc)는 살균작용<sup>(15,16)</sup>, 응집작용<sup>(17)</sup>, 탈취·소취작용<sup>(18-20)</sup>, 암세포 치사작용<sup>(21)</sup>, 선도보지작용<sup>(22)</sup> 등 다양한 기능을 가지고 있으며, 또한 Fe-Asc는 식품산업에 있어서 복합기능을 갖는 신소재로서 널리 사용되기 시작하였다<sup>(23)</sup>.

저자들은 Fe-Asc의 파아지 불활화작용에 관해서 계통적으로 연구를 행하여 Fe-Asc가 검토했던 모든 파아지에 대하여 AsA의 1,000~20,000배라는 강한 불활화작용을 갖는 것을 규명하였다<sup>(24)</sup>. 또한 그 불활화작용의 반응기구에 대하여 free radical 반응기구의 무엇인가가 관여하고 있다는 것과, 그 free radical의 발생과 관여방법이 AsA의 경우와는 다름을 시사하였다<sup>(24,25)</sup>. 또한 Fe-Asc의 돌연변이 유기성은 음성, 마우스에 대한 급성독성(LD<sub>50</sub>)은 60,000 mg/kg 이상이며 안정한 물질임이 확인되었다<sup>(19)</sup>.

본 연구에서는 파아지 불활화에 있어서 이 Fe-Asc가 파아지의 어느 부위에 작용하는가를 해명하기 위해 그들의 중요한 구성성분인 단백질 및 DNA의 작용에 관하여 검토하였다.

Corresponding author: Il-Hwan Lho, Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga 840, Japan

## 재료 및 방법

### 2가철-아스코르빈산착체의 조제

Fe-Asc는 2가철과 AsA의 몰의 비가 9:1의 것을 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 즉 약 170 ml의 증류수에 25.02g의  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 용해한 후 1.76g의 AsA를 용해시켰다. 이것을 24시간 동결건조하여 분말상의 Fe-Asc를 얻었는데 이 착체의 AsA 함량은 약 10%(중량)였다.

### 시약

SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동용의 표준단백질 및 RNase는 Pharmacia Co.의 제품, bovine serum albumin은 Sigma Chem. Co., DNase I, HindIII 및  $\lambda$  DNA는 Toyobo Co.의 제품을 사용하였다. 기타의 시약은 Wako Pure Chem. Ind., Ltd.의 제품을 사용하였다.

### 파아지와 배지 및 배양

J1 파아지를 사용하였으며 숙주균은 *Lactobacillus casei* S1를 사용하였다. *Lactobacillus*는 1백급선량용 MRT<sup>(26)</sup> 액체배지에 접종한 후 37°C에서 약 15시간 정지배양 후 새로운 액체배지에 5% 접종, 같은 온도에서 3~4시간 배양한 후 흡광도(660 nm)가 0.4에 달한 대수증식기의 세포를 사용하였다.

### 파아지 정제 및 파아지 DNA의 조제

파아지 정제는 분리용 초원심기(Hitachi 55 P-72)를 사용하여 분획원심법<sup>(27)</sup>에 의하였으며, DNA는 정제된 파아지로부터 Maniatis<sup>(28)</sup> 방법에 의해 조제하였다.

### SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동

시료와 용해용액(63 mM Tris-HCl(pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol)을 등량혼합하여 끓는 물속에서 10분간 침지시켜 파아지를 분해하였다. 이 용액을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 올려 30 mA에서 2시간 전기영동하였다.

### 아미노산 분석

시료 2 mg에 6N HCl 1 ml를 가해, 감압하에서 탈기 봉관 후 110°C에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해액을 농축한 다음 여기에 1 ml의 구연산완충액(pH 3.15)을 가해 여과 후 아미노산 분석기(JEOL JLC-300)를 사용하여 행하였다.

### 아가로스 겔 전기영동

20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 시료와 Fe-Asc를 혼합하여 37°C에서 반응하였다. 이것에 sucrose와 bromophenol blue를 가해 0.7% 아가로오스 겔에 올려 50 V에서 40분간 전기영동하였다. 전기영동 후 ethidium bromide를 함유한 겔에 자외선을 조사하면서 Polaroid film

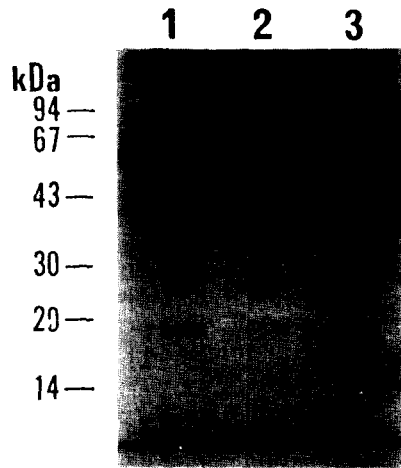


Fig. 1. Patterns of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of bovine serum albumin treated with Fe-Asc

Bovine serum albumin (0.04%) was incubated with Fe-Asc ( $2 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 24 hr at 40°C. The treated bovine serum albumin was denatured by boiling in 63 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol and 10% SDS-polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at 30 mA for 2 hr. Lane 1, untreated; Lane 2, treated for 6 hr at 37°C; Lane 3, treated for 24 hr at 40°C.

(type667)으로 사진을 찍었다.

### 흡수스펙트럼의 측정

정제된 파아지를 20 mM Tris-HCl 완충액에 현탁한 다음 이 현탁액( $1 \times 10^{11}$  PFU/ml)에 Fe-Asc를 혼합하여 37°C에서 반응하였다. 흡수스펙트럼은 자동분광광도계(Shimadzu MPS-2000)를 사용하여 경시적으로 흡광도를 측정하였다.

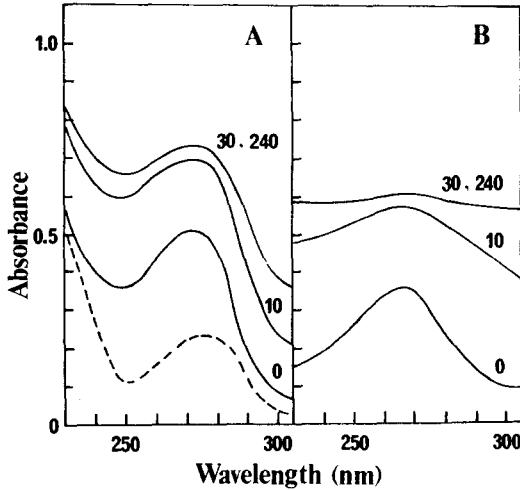
기타의 파아지에 관한 실험방법은 Adams<sup>(29)</sup>가 기재한 표준법에 의하였다.

## 결과 및 고찰

### 2가철-아스코르빈산착체의 단백질에 대한 작용

Fe-Asc의 단백질에 대한 작용에 관하여 그 모델로서 우혈청알부민(bovine serum albumin 이하, BSA)를 사용하여 실험하였다. 즉 BSA와 Fe-Asc(AsA으로서  $2 \times 10^{-5}$  M)를 혼합하여 37°C에서 6시간 및 40°C에서 24시간 반응시켰다. 이들의 조건은 Fe-Asc의 농도, 반응온도, 반응시간에서 99.9% 이상의 파아지가 불활화되는 조건이다.

이 조건에서 반응시킨 BSA에 관하여 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법으로 검토한 결과(Fig. 1) 미반응의 BSA 전기영동 패턴과 비교하여 패턴에 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Fe-Asc가 BSA에 작용하지 않음을 나타내고 있다.



**Fig. 2. Changes in UV spectra of reaction mixture consisting of bovine serum albumin and Fe-Asc**

A: Bovine serum albumin (0.04%) was incubated with Fe-Asc ( $2 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. B: Fe-Asc ( $2 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) alone was incubated in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. Numbers indicated in the figure are incubation time (min). ---, Bovine serum albumin alone.

다음은 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법에서 검토했던 바와 같은 조건으로 반응시켜 그 반응액의 자외흡수스펙트럼의 경시변화를 추적하였다. Fig. 2의 A에 나타난 바와 같이 Fe-Asc와 BSA를 포함한 반응액의 흡광도는 최초의 30분간 전파장에 걸쳐 상승하였으나 그 후의 흡광도의 상승은 보이지 않았다. Fig. 2의 B는 반응에서 사용한 농도의 Fe-Asc 단독 흡수스펙트럼의 경시변화를 나타낸 것으로 흡광도는 최초 30분간 상승한 다음 그 이후는 변화가 보이지 않았다(Fig. 2의 A).

이들의 결과를 종합하면 Fig. 2의 A에 나타난 흡수스펙트럼의 변화는 Fe-Asc의 흡수스펙트럼의 변화에 의한 것이라고 생각된다. 따라서 Fe-Asc는 BSA에 유의의 작용을 하지 않는다고 생각된다.

또한 반응전후의 BSA의 아미노산 조성을 비교검토했던 결과 Table 1에서와 같이 미반응과 반응후의 BSA의 아미노산 조성의 변화는 보이지 않았다.

이상의 여러 가지 실험결과에서 나타난 바와 같이 통상의 불활화작용의 반응조건보다 엄한 조건<sup>(24)</sup> 즉 고농도의 Fe-Asc(AsA으로서  $2 \times 10^{-5}$  M)을 보다 고온의 40°C에서 장시간 반응시켜도 Fe-Asc는 BSA에 유의의 작용은 하지 않음을 알았다.

한편, J1파아지 입자를 사용하여 파아지 구조단백질에 대한 Fe-Asc의 작용에 관하여 검토했다. 즉 정제한 J1 파아지( $1 \times 10^{11}$  PFU/ml)와 Fe-Asc(AsA으로서  $1 \times 10^{-5}$  M)을 혼합하여 반응시킨 후 이 파아지를 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법으로 검토했다 그 결과를 Fig. 3

**Table 1. Amino acid composition of bovine serum albumin treated with Fe-Asc**

Amino acid	Molar ratio (%) <sup>b</sup>	
	Intact	Treated
Asp	9.6	9.7
Thr	5.7	5.9
Ser	4.7	4.8
Glu	15.4	15.7
Pro	4.7	5.0
Gly	3.3	3.1
Ala	8.2	8.5
Cys	2.6	2.3
Val	6.2	5.9
Met	0.5	0.4
Ileu	2.4	2.4
Leu	10.5	10.5
Tyr	2.8	2.6
Phe	4.8	4.9
His	4.3	4.1
Lys	10.3	10.2
Arg	4.0	4.0

<sup>a</sup>Bovine serum albumin (0.04%) was incubated with Fe-Asc ( $2 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 24 hr at 40°C.

<sup>b</sup>Molar ratio(%) is represented by the molar concentration of each amino acid per total amino acid.

에 나타났다.

미반응 파아지와 반응 파아지의 전기영동 패턴에 변화가 보이지 않았다. 이러한 결과로부터 Fe-Asc는 파아지의 구조단백질에 변화를 주지 않는다고 생각된다.

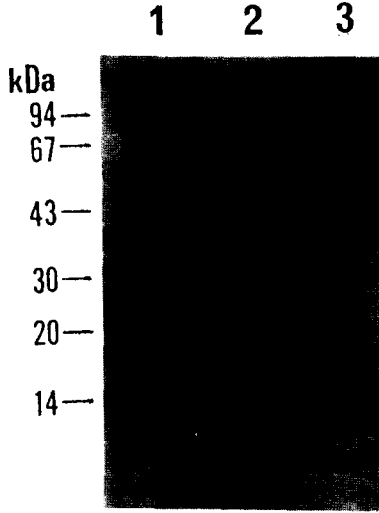
이상의 여러 결과에서 나타난 바와 같이 어느 경우도 유의의 변화가 확인되지 않았으며 Fe-Asc는 단백질에 대하여 작용을 하지 않음을 알 수 있다.

**2가철-아스코르빈산철의 DNA에 대한 작용**

플라스미드 pUC18 DNA를 사용하여 Fe-Asc의 DNA에 대한 작용을 아가로소스 겔 전기영동법에 의해 검토했다. 반응은 Fe-Asc와 DNA를 혼합하여 37°C에서 30분간 행하였으며, 그 결과의 전기영동 패턴은 Fig. 4에 나타내었다.

Fe-Asc와 반응시키면 먼저 수퍼코일형의 두 가닥사슬 DNA의 한쪽 가닥에 절단이 일어나(단일가닥사슬의 절단) 개환형으로 되며 잇따라 두 가닥 사슬절단이 일어나(두 가닥사슬의 절단) 선형으로 되며 최종적으로는 무작위의 사슬절단이 진행되어 DNA가 저분자화 되었다. 이러한 사슬절단에 따른 저분자화는 고농도의 Fe-Asc에서 이들의 진행이 더욱 빠르다는 것을 알 수 있었다.

또한 단일가닥 사슬의 M13mp8 DNA와 두 가닥 사슬의 λ DNA를 사용하여 아가로소스 겔 전기영동법에 의해 Fe-Asc의 사슬 절단을 검토했던 결과 Fe-Asc에 의한 각각의 DNA에 대한 무작위의 사슬 절단이 일어나 저분



**Fig. 3. Patterns of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural protein of phage J1 treated with Fe-Asc**

For other legend, see Fig. 1, but purified phage J1 ( $1 \times 10^{11}$  PUF/ml) was used instead of bovine serum albumin. Lane 1, untreated. Lane 2, treated for 6 hr at  $37^\circ\text{C}$ . Lane 3, treated for 24 hr at  $40^\circ\text{C}$ .

자화 하는 것이 확인되었다(Fig. 생략).

한편, Fe-Asc의  $\lambda$  DNA에 대한 작용에 관하여 분광학적으로 검토하고자  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켜 그 반응액의 자외흡수스펙트럼의 변화를 경시적으로 추적하여 Fig. 5의 A에 나타내었다.

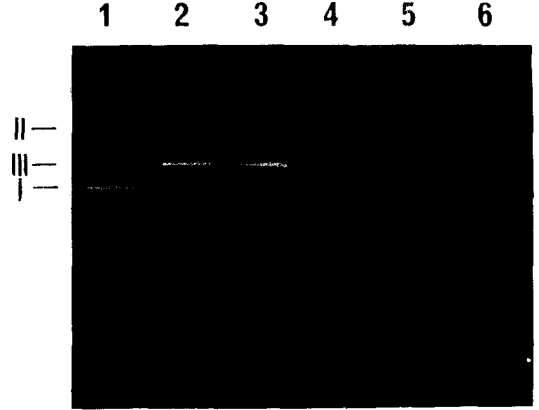
DNA의 최대 흡광과장인 260 nm 부근의 흡광도는 최초 10분간 저하하였으나 그후 계속해 60분까지는 상승하였다. 그러나 그후에는 흡광도의 변화는 보이지 않았다.

Fig. 5의 B는 반응에 사용한 농도와 같은 농도의 Fe-Asc 단독의 흡수스펙트럼을 나타내고 있다. 흡광도는 전과장에 걸쳐서 최초의 30분간 상승하였으나 그후는 변화가 보이지 않았으며 또한  $\lambda$  DNA 단독의 흡수스펙트럼에는 경시변화가 보이지 않았다(Fig. 5A).

따라서 Fig. 5의 A의 흡수스펙트럼의 경시변화는 Fe-Asc에 의해서 DNA가 무언가의 변화를 받는 것을 나타내고 있으며 이러한 결과는 아가로오스 겔 전기영동의 결과와 일치하였다.

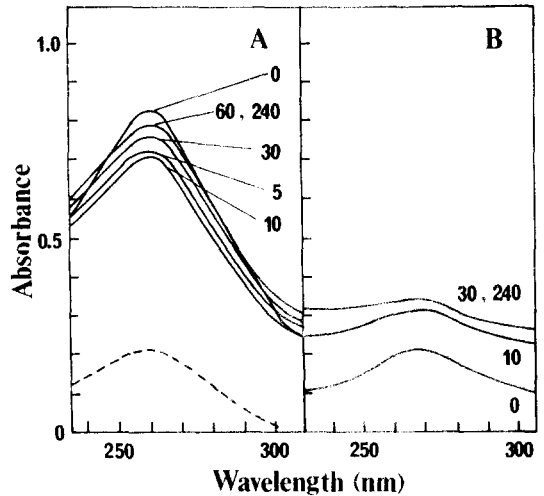
J1파아지( $1 \times 10^{11}$  PFU/ml)로부터의 DNA는 phenol법으로 분리하였으며 Fe-Asc에 대한 직접작용은 아가로오스 겔 전기영동법에 의해 검토하였다. 반응은 Fe-Asc와 DNA를 혼합하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 60분간 행하여 Fig. 6에 그 전기영동 패턴을 나타내었다.

Fe-Asc을 작용시키면 Fe-Asc의 농도가 높게 됨에 따라 DNA 밴드의 발색이 옅게 되어 Fe-Asc에 의한 J1 DNA의 저분자화가 확인되었다.



**Fig. 4. Patterns of agarose gel electrophoresis of pUC18 DNA treated with Fe-Asc**

pUC18 DNA was incubated with different concentrations of Fe-Asc in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . Sourse and bromophenol blue were added to the reaction mixture and these were put on a 0.7% agarose gel. Electrophoresis was carried out at 50 V for 40 min. I, II, and III indicate the supercoiled, open circular, and linear forms, respectively. Lane 1, untreated; Lane 2-6, treated with  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  M, and  $1 \times 10^{-4}$  M as ascorbate, respectively.



**Fig. 5. Changes in UV spectra of reaction mixture consisting of  $\lambda$  DNA and Fe-Asc**

A:  $\lambda$  DNA was incubated with Fe-Asc ( $1 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at  $37^\circ\text{C}$ . B: Fe-Asc alone was incubated in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at  $37^\circ\text{C}$ . Numbers indicated in the figure are incubation time (min). ---,  $\lambda$  DNA alone.

2가철-아스코르빈산착체의 파아지 불활화에 따른 흡수스펙트럼

Fe-Asc의 파아지 불활화작용에 따른 흡수스펙트럼의

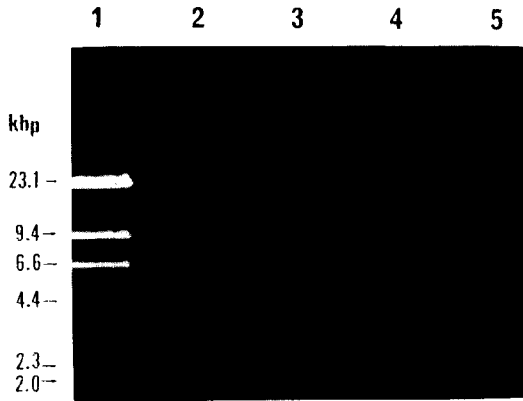


Fig. 6. Patterns of agarose gel electrophoresis of J1 DNA treated with Fe-Asc

J1 DNA was incubated with different concentrations of Fe-Asc in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 60 min at 37°C. For other legend, see Fig. 4. Lane 1,  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III. Lane 2, untreated. Lanes 3-5, treated with  $3 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6}$ , and  $1 \times 10^{-5}$  M as ascorbate, respectively.

경시변동에 관해서 J1 파아지를 사용하여 검토하였다 (Fig. 7A). Fe-Asc와 파아지를 포함한 반응액의 흡광도는 전파장에 걸쳐 30분간 상승하였으나 그 이후는 변화가 보이지 않았다. Fig. 7의 B는 반응에 사용한 농도와 같은 농도의 Fe-Asc 단독의 흡수스펙트럼을 나타내고 있다. 또한 J1 파아지 단독의 흡수스펙트럼 경시변화는 보이지 않았다(Fig. 7A).

이러한 결과로부터 Fig. 7의 A에 보여진 흡수스펙트럼의 변화는 Fe-Asc에 의한 것이라고 생각된다. 또 260 nm의 부근에서의 흡광도의 변화는 보이지 않았으며 파아지 입자로부터의 DNA가 방출되는 것과 같은 파아지의 고오스트(ghost)화는 일어나지 않음을 나타냈다.

Fe-Asc의 파아지 불활화작용의 메카니즘을 규명하기 위해 Fe-Asc의 작용부위에 관하여 검토하였던 바 이상의 결과로부터 Fe-Asc에 의한 파아지 불활화에 단백질은 유의의 변화를 받지 않으며 DNA가 손상을 받는 것이 확실하다. 따라서 이 DNA의 손상이 파아지 불활화의 기인이라고 생각된다.

아스코르빈산과 철(II)의 단순화합물이 free radical 작용에 의해 단백질 및 DNA 손상에 영향을 준다는 결과는 많이 알려져 있다. 浅田<sup>(30)</sup>와 川岸<sup>(31)</sup>은 아스코르빈산과 철(II)의 단순화합물이 관여하는 산화계에 의해서 단백질이 산화적 상해를 받는다고 하였으며 다수의 보문<sup>(5,6,32,33)</sup> 및 총설<sup>(34,35)</sup>에서는 그 화합물이 DNA의 손상에 영향을 끼친다고 보고하였다. 이는 금속이온을 촉매로 한 아스코르빈산이 자동산화에 의해서 생성된 과산화수소( $H_2O_2$ )와 철(II) 이온간의 Fenton 반응으로 생성된 히드록시 라디칼( $OH\cdot$ )에 의해 DNA의 사슬 절단이 일어나고 있음을 시사하고 있다.

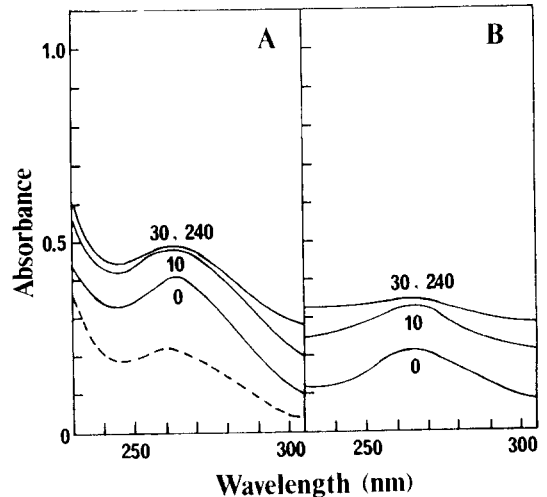


Fig. 7. Changes in UV spectra of reaction mixture consisting of phage J1 and Fe-Asc

A: Phage J1 ( $1 \times 10^{11}$  PFU/ml) was incubated with Fe-Asc ( $1 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. B: Fe-Asc ( $1 \times 10^{-5}$  M as ascorbate) alone was incubated in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. Numbers indicated in the figure are incubation time (min). ---, Phage J1 alone.

본 연구의 결과와 이들<sup>(5,6,32,33)</sup>의 연구결과를 비교 검토해 보면 파아지 불활화의 기인은 아스코르빈산과 철(II)의 화합물로부터 생성한 free radical이 파아지 DNA에 손상을 가해 일어난다고 생각된다.

## 요 약

본 연구는 2가철-아스코르빈산착체(Fe-Asc)에 의한 파아지 불활화에 있어서 Fe-Asc의 작용부위에 관해 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Fe-Asc의 단백질에 대한 작용에 관하여 우혈청알부민과 J1파아지의 구조 단백질을 사용하여 검토한 결과 Fe-Asc의 처리구와 미처리구에 있어서 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동패턴, 아미노산 조성 및 자외선 스펙트럼에 변화는 보이지 않았다. 이에 대하여 Fe-Asc를 pUC18 DNA, M13mp8,  $\lambda$  DNA 및 J1 파아지의 DNA에 작용시키면 아가로오스 겔 전기영동패턴에 변화가 보여 사슬절단이 확인되었다. pUC18 DNA는 Fe-Asc와 반응시 먼저 수퍼코일형의 두 가닥사슬 DNA의 한쪽 가닥에 절단이 일어나 개환형으로 되고 잇따라 두 가닥 사슬 절단이 일어나 선형으로 되어 저분자화하는 것이 확인되었다.

이상의 결과로부터 Fe-Asc에 의한 파아지 불활화는 파아지 DNA의 손상에 기인한다고 생각된다.

## 문 헌

- Ogata, S.: Bacteriophage contamination in industrial

- processes. *Biotechnol. Bioengin.*, **22**, Suppl. 1, 177 (1980)
2. Wünsche, L.: Importance of bacteriophages in fermentation process. *Acta Biotechnol.*, **9**, 395(1989)
  3. Murata, A., Kitagawa, K. and Saruno, R.: Inactivation of bacteriophage by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 294(1971)
  4. Murata, A., Kitagawa, K., Inmaru, H. and Saruno, R.: Inactivation of single-stranded DNA and RNA phages by ascorbic acids and thiol reducing agents. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 3597(1972)
  5. Murata, A. and Kitagawa, K.: Mechanism of inactivation of bacteriophage J1 by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1145(1973)
  6. Murata, A., Oyadomari, R., Ohasi, T. and Kitagawa, K.: Mechanism of inactivation of bacteriophage  $\delta$  A containing single-stranded DNA by ascorbic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 261(1975)
  7. Murata, A. and Uike, M.: Mechanism of inactivation of bacteriophage MS2 containing single-stranded RNA by ascorbic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 347 (1976)
  8. 村田口晃, 末永光, 井上美千代, 田中良博, 加藤富民雄: 2本鎖 RNAファージに対するア스쿨비소酸的の不活化作用. *ビタミン*, **57**, 515(1983)
  9. Murta, A., Suenaga, H., Hidesima, S., Tanaka, Y. and Kato, F.: Hydroxyl radical as reactive species in activation of phages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1481 (1986)
  10. 村田口晃, 加藤富民雄: 비타민Cによるウイルスの不活化. *日本農芸化学会誌*, **64**, 1858(1990)
  11. Conrad, M.E. and Schade, S.G.: Ascorbic acid chelates in iron absorption: a role for hydrochloric acid and bile. *Gastroenterology*, **55**, 35(1968)
  12. Forth, W. and Rummel, W.: Iron absorption. *Physiol. Rev.*, **53**, 724(1973)
  13. Gorman, J.E. and Clydesdale, F.M.: The behavior and stability of iron-ascorbate complexes in solution. *J. Food Sci.*, **48**, 1217(1983)
  14. 猪狩叔将, 大浜千明: 公開特許会報, 特許出願公開, 昭和 58-156539(1983)
  15. 盧日煥, 岸川茂樹, 亀崎裕子, 加藤富民雄, 村田口晃: 2価鉄-아스쿨빈酸錯体の細菌に対する作用. *日本農芸化学会誌*, **65**, 1761(1991)
  16. 盧日煥, 岸川茂樹, 山田いづみ, 日高敏勝, 加藤富民雄, 村田口晃: 2価鉄-아스쿨빈酸錯体の殺菌作用. *ビタミン*, **66**, 109(1992)
  17. 猪狩叔将, 大浜千明: 公開特許会報, 特許出願公開, 昭和 58-156311(1984)
  18. 猪狩叔将, 横山正一郎, 大浜千明, 福井良轉: 公開特許会報, 特許出願公開, 昭和 59-132937 (1984)
  19. 大浜千明, 小島光: *ファインケミカル*, No. 5, 5(1986)
  20. 大浜千明, 小島光: *食品と開発*, **22**, 39(1987)
  21. Miwa, N., Yamazaki, H. and Ikari, Y.: Enhancement of ascorbate cytotoxicity by chelation with ferrous iron through prolonged duration of the action. *Anticancer Res.*, **6**, 1033(1986)
  22. 猪狩叔将, 横山正一郎, 大浜千明, 福井良轉: 公開特許会報, 特許出願公開, 昭化 559-143576(1984)
  23. 編集部: *ファインケミカル*, No. 12, 17(1986)
  24. Lho, I.-H., Morita, K., Miyake, H., Sakamoto, K., Kanda, K., Kato, F. and Murata, A.: Phage-inactivating effect of iron(II)-ascorbate complex. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 720(1992)
  25. 盧日煥, 森多浩三, 白川聡子, 加藤富民雄, 村田晃: 2価鉄-아스쿨빈酸錯体のT5ファージに対する不活化作用. *ビタミン*, **66**, 315(1992)
  26. Murata, A.: Temperature-sensitive growth of wild-type phage J1 of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 667(1971)
  27. Hongo, M. and Murta, H.: Bacteriophages of *Clostridium sacchroperbutylaceticum* Part III. Morphology of the twelve HM-phage. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 292 (1966)
  28. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, T.: Molecular Cloning, a laboratory manual, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.2.80(1989)
  29. Adams, M.H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, New York, p.443(1959)
  30. 浅田浩二: 活性酸素によるタンパク質の損傷. *日本農芸化学会誌*, **62**, 1100(1988)
  31. 川岸舜郎, 内田浩二: タンパク質の酸化的損傷. *日本農芸化学会誌*, **65**, 1351(1991)
  32. Chiou, S.-H.: DNA-scission activities of ascorbate in the presence of metal chelates. *J. Biochem.*, **96**, 1307 (1984)
  33. Stoewe, R. and Prütz, W.A.: Copper-catalyzed DNA damage by ascorbate and hydrogen peroxide: kinetics and yield. *Free Radical Biol. Med.*, **3**, 97(1987)
  34. Shamberger, R.J.: Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutation Res.*, **133**, 135(1984)
  35. 森田潤司, 佐藤郁夫, 柏村直樹: 金属イオンと活性酸素の關與する DNAと多糖の損傷反応. *日本農芸化学会誌*, **65**, 1366(1991)

(1992년 10월 8일 접수)