

*Neurospora crassa*의 L-Ascorbic Acid 생산효소의 순수 분리 및 이의 특성에 관한 연구

김인실 · 이연희*

서울여자대학교 생물학과

*Neurospora crassa*에서 L-ascorbic acid 합성 효소는 mitochondria에 위치하며 배지에 D-glucono- γ -lactone과 L-gulono- γ -lactone을 첨가하였을 때 각각의 기질에 대한 효소 활성도가 증가함을 볼 수 있었다. 이 효소의 순수 분리에는 ammonium sulfate 분획, DEAE-Sephrose CL-6B에 의한 이온 교환 크로마토그래피, Sephacryl S-200에 의한 gel filtration 크로마토그래피, Reactive yellow 3-agarose dye column 크로마토그래피 등의 방법들이 이용되었다. 그 결과 2.1%의 수율에 specific activity가 239.6배 증가되었다. Sephacryl S-200 gel filtration을 통해 본 이 효소의 분자량은 약 150,000 dalton이었다. 그리고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였을 때는 분자량이 약 75,000 dalton이었으므로 이 효소는 동일한 단위체로 구성된 이합체로 생각되었다. 이 효소의 최적 반응 pH는 9.0으로 나타났으며 D-galactono- γ -lactone을 기질로 하였을 때의 K_m 값은 0.073 mM이었다.

KEY WORDS □ L-ascorbic acid-producing enzyme, *Neurospora crassa*, D-glucono- γ -lactone, L-gulono- γ -lactone

L(+)-Ascorbic acid [vitamin C: L(+)-threo-2-hexenono-1,4-lactone]는 인간, 원숭이, guinea pig 등을 포함한 몇몇 고등 생물을 제외한 많은 종류의 생물체에서 생합성되는 것으로 알려져 왔다 (8). L-Ascorbic acid는 생체내에서 생성되는 자유 라디칼 제거제로서의 역할 (6, 7) 이외에 collagen 합성시 proline의 hydroxylation (19), neuroendocrine peptides의 생합성 (5), carnitine 생합성 (17) 등의 효소 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 암에 대한 치료 효과가 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험 등을 통해 보고되고 있다 (11, 16).

지금까지 발표된 L-ascorbic acid의 생합성 과정들은 D-glucose가 궁극적인 전구 물질로 사용되며 대사 과정 중 여섯 개의 탄소 사슬이 보존된다는 공통점을 갖고 있다. 그러나 식물과 동물은 서로 다른 경로를 이용하여 D-glucose로부터 이를 합성하며 그 결과 합성된 L-ascorbic acid는 각기 다른 탄소 배열을 갖고 있다. L-Ascorbic acid 생합성의 최종 단계에 관여하는 효소로서 동물 (12)에서는 L-gulono- γ -lactone oxidase (L-gulono- γ -lactone: oxygen 2-oxidoreductase, EC 1.1.3.8), *Saccharomyces cerevisiae* (2, 14)에서는 L-galactonolactone oxidase, *Penicillium cyano-fulvum* (18)에서는 D-glucono- γ -lactone dehydrogenase가 분리되었다. 이와 같이 하등 진핵 생물에서도 각기 다양한 생합성 경로로 L-ascorbic acid를 생산하는 것으로 알려져 있다. L-Ascorbic acid를 생합성하는 쥐의 L-gulono- γ -lactone oxidase의 유전자를 L-ascorbic acid를 생합성하지 못하는 guinea

pig나 원숭이의 유전자들과 비교하였을 때 원숭이와 guinea pig의 유전자에 많은 mutation이 일어나 있는 것이 관찰되기도 하였다 (13, 23).

본 연구에서는 *Neurospora crassa*에서의 L-ascorbic acid 생합성 경로의 마지막 단계에 관여하는 효소에 대한 연구를 하였다. *N. crassa*는 하등한 진핵 생물로 generation time이 짧고, 대량 배양이 용이하며, 생화학적 정보와 유전 정보가 많이 누적되어 있고, 돌연변이를 얻기가 용이하다. 또한 식물과 같은 세포벽과 액포 등을 가지고 있으며 사람의 요소 회로와 동일한 요소 회로를 갖고 있다 (10). 이처럼 *N. crassa*는 조작이 용이한 하등 생물의 특징과 함께 고등 생물의 대사 과정을 갖고 있기 때문에 연구하기에 많은 장점을 가지고 있다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에서 사용한 균주는 *Neurospora crassa* (wild type 73a)로, 1.5%의 sugar를 포함한 Vogel's agar배지 (20)에 접종, 30°C에서 배양한 후, 4주 간격으로 계대 배양하였다. 영구 보존을 위해서는 멸균 증류수로 conidiospore 용액을 만들어 silica gel에 흡착시켜 -20°C에서 보관하였다. 대량 배양시에는 10⁷의 Vogel's 액체 배지에 10⁶ conidia/ml의 농도로 접종한 후 30°C에서 24시간 진탕 배양하여 여과법으로 회수하였다. 회수한 균체는 찬 증류수로 여러번 세척하였다.

세포내소기관의 분리 및 확인

세포내소기관은 다른 논문에서 언급한 방법을 따라 실행하였다(10).

효소 활성 측정법

분리된 세포내 소기관의 각 분획은 UV/visible Spectrophotometer (Beckman DU-68)를 사용하여 다음과 같은 방법들로 여러가지 효소 활성을 측정하였다.

Catalase : 3.0 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 12.5 mM H₂O₂를 적당량 가하여 240 nm에서 흡광도를 0.6~0.8로 만든 후 여기에 시료를 가하여 5분간의 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 1 μmol의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다(1).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase : 0.2 ml의 1 μM glucose-6-phosphate, 0.2 ml의 0.2 μM NADP⁺, 1.3 ml의 0.1 M Tris/HCl (pH 7.8)을 혼합한 후 여기에 0.3 ml의 시료를 첨가하여 340 nm에서 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 흡광도가 0.01의 증가를 보일 때의 효소의 양을 1 unit으로 정하였다(4).

Malate dehydrogenase : 2 ml의 0.25 M glycine buffer (pH 7.4)에 0.01 ml의 0.015 M NADH, 증류수 0.88 ml와 0.01 ml의 0.076 M oxaloacetic acid를 혼합한 후 여기에 0.1 ml의 시료를 첨가하여 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 0.01 흡광도의 감소를 보일 때의 효소의 양을 1 unit으로 정하였다(15).

Peroxidase : 0.1 M acetate buffer (pH 5.2)에 1% H₂O₂와 guaiacol 0.5 ml를 혼합한 5 ml의 반응 용액에 시료를 0.1 ml 첨가하여 500 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다(3).

L-Ascorbic acid 합성 효소 : L-Gulonon-γ-lactone의 농도가 3 mM인 0.1 M phosphate buffer (pH 5.6)에 시료를 0.1 ml 첨가하여 30°C에서 5분간 반응시킬 때 나타나는 265 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성 단위는 1분당 1 μM의 L-ascorbic acid를 생성하는 양을 1 unit으로 정의하였다(22).

단백질 정량

단백질량은 bovine serum albumin (Pierce Co.)을 표준단백질로 하여 bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce Co.)로 측정하였다(21).

배지내 기질에 의한 효소 생산 증감의 여부 확인

Log phase의 *N. crassa*를 여과법(Whatman filter paper GF/C)으로 균사체를 얻었다. 다시 D-gluconon-γ-lactone과 L-gulonon-γ-lactone이 1 mM, 5 mM, 10 mM씩 첨가된 Vogel's 액체 배지에 넣어 6시간 동안 진탕 배양한 후, vaccum manifold (Bio Rad)를 사용하여 균사체를 얻어 여러번 냉각 증류수로 세척하였다. 얻은 균사체를 mini bead beater chamber (Biospec.)에 넣고 10 mM phosphate buffer (pH 5.6, 1% final concentration sarkosyl)로 chamber를 채운 후 파쇄하였다. Microcentrifuge를 이용하여 15,000

rpm에서 30분간 4°C에서 원심분리를 한 후 상등액에 존재하는 효소의 활성을 측정하였다.

효소의 정제

조효소 (crude extract) 제조 : Log phase의 *N. crassa*를 얻은 후 이를 찬 완충용액[10 mM Tris/HCl (pH 8.4), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM o-phenanthroline, 2 mM MgCl₂]과 glass bead (0.1 mm)가 담긴 340 ml chamber에 넣고 20초 분쇄, 20초 쉬는 20번 반복하였다. 이를 100,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소로 사용하였다.

황산 암모늄 (ammonium sulfate) 분획 : 위에서 얻은 조효소에 황산 암모늄을 포화도가 60%되게 첨가하여 용해시킨 후 냉장에 방치하였다. 4시간 후 10,000×g에서 30분간 원심분리로 침전물을 제거한 후, 상등액에 포화도가 80% 되도록 황산 암모늄을 첨가하여 같은 방법으로 침전물을 얻었다. 이 침전물을 완충용액[50 mM Tris/HCl (pH 8.4), 1 mM EDTA]에 용해시킨 후 Sephadex G-25 desalting column에 통과시켜 황산 암모늄을 제거하였다.

DEAE Sepharose CL-6B를 이용한 이온 교환 크로마토그래피 : DEAE Sepharose CL-6B (Sigma Co.)을 컬럼에 충전하여 (bed volume=40 ml, 2.5×8.5 cm) 0.05 M Tris/HCl 완충용액 (pH 8.4)으로 평형시킨 후 위의 시료를 얹고 동일 완충용액에서 NaCl의 농도 기울기 (0 M~0.5 M)로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 1.0 ml/min이었으며 6 ml되는 분획 40개를 얻었다. 효소 활성이 있는 부위를 모아 ultrafiltration concentrator (Amicon 8050)에서 Diaflo YM 10 membrane을 사용하여 농축시켰다.

젤 여과 크로마토그래피 : Sephacryl S-200 (Pharmacia Fine Chemicals)을 컬럼에 충전하여 (bed volume=160 ml, 1.5×80 cm) 0.05 M Tris/HCl 완충용액 (pH 8.4)으로 평형시킨 후 위의 시료를 얹고 같은 완충용액으로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 9.0 ml/hr였으며 3 ml되는 분획 80개를 얻었다. 효소 활성도가 높은 분획을 모아 ultrafiltration concentrator (Amicon 8050)에서 Diaflo YM 10 membrane을 사용하여 10 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 8.0)으로 평형시키면서 농축하였다.

Dye column 크로마토그래피 : Dye column kit (Sigma Chemical Co.)의 각 column에 시료를 얹고 5 ml의 10 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 8.0)으로 세척한 후 흡착된 단백질을 5 ml의 1.5 M NaCl을 포함한 동일 완충용액으로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 0.2 ml/min이었다.

Nondenaturing polyacrylamide gel 전기영동

Nondenaturing gel 전기영동은 stacking gel이 없이 acrylamide의 농도가 7.5%인 resolving gel만을 이용하였다. 시료에 sample buffer [50 mM Tris/HCl (pH 6.8), 0.15% glycerol, 0.02% bromophenol blue]를 섞은 후 loading하여 4°C에서 80 V로 running하였다. 효소 활성을 염색 (activity staining)

하기 위하여 반응 용액 [50 mM phosphate buffer (pH 5.6), 10 mM L-gulono- γ -lactone, 0.33 mM phenazine methosulfate, 0.12 mM nitroblue tetrazolium, 1 mM EDTA]에 gel을 담근 후 30°C에서 10분간 반응시켰다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

단백질의 전기영동은 Laemmli (9)의 방법을 사용하였다. Stacking gel과 resolving gel의 acrylamide 농도는 각각 3.75%와 7.5%가 되도록 하였으며 각각 80 V와 150 V에서 Tris/glycine 완충용액 (25 mM Tris, 0.192 M glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, pH 8.3)으로 전개하였다.

기질 특이성

효소의 기질 특이성을 조사하기 위하여 0.1 M phosphate 완충용액 (pH 5.6)을 사용하여 여러 농도의 L-galactono- γ -lactone, D-galactono- γ -lactone, L-gulono- γ -lactone, D-gulono- γ -lactone, D-glucono- γ -lactone 용액을 만들어 30°C에서 5분간 반응시켜 L-ascorbic acid 생성 정도를 265 nm에서 측정하여 각 기질에 대한 효소 활성도와 K_m 값을 결정하였다.

효소 활성도에 대한 pH의 영향

pH 7.0~9.0에서는 0.1 M Tris/HCl 완충용액을, pH 9.0~10.5에서는 0.1 M carbonate 완충용액을 사용하여 각 pH에 해당하는 완충용액을 만들고 동일한 양의 효소를 사용하여 30°C에서 5분간 반응시켜 각 pH에서의 효소 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

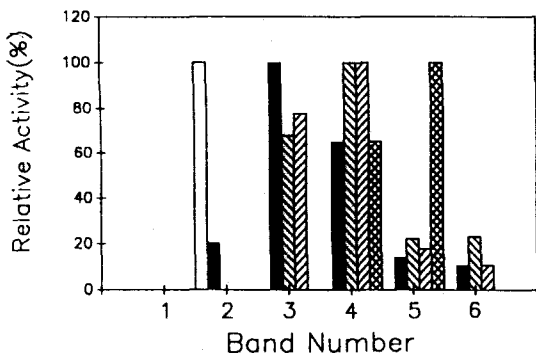


Fig. 1. Marker enzyme activities in each band separated on sucrose density step gradient. Subcellular organelles were separated using sucrose density step gradient (1.8 M, 1.6 M, 1.4 M, 1.2 M) and centrifugation (100,000×g, 2 hr). Enzyme activities in each fraction were assayed after proteins were extracted with 1% (final concentration) sarkosyl from organelles. ... catalase: ■, peroxidase: ▨, malate dehydrogenase: ▩, L-ascorbic acid-producing enzyme: ▤, G-6-P dehydrogenase.

L-Ascorbic acid 생산 효소의 세포내 존재 위치

*N. crassa*내의 L-ascorbic acid의 합성효소의 존재 위치를 확인하기 위하여 *N. crassa*를 Vogel's 액체 배지에서 진탕 배양하였다. *N. crassa*의 세포질과 세포내 소기관들을 원심분리를 이용하여 분리한 후 L-ascorbic acid 합성효소의 효소 활성을 측정해 본 결과, 세포내 소기관 분획에서 활성이 나타났다. 세포내 소기관들을 1.8, 1.6, 1.4, 1.2 M sucrose density step gradient에 있어 초고속 원심분리기를 사용하여 분리한 결과 6개의 band가 나타났으며 L-ascorbic acid 합성 효소의 효소 활성은 malate dehydrogenase의 효소 활성과 함께 나타났다 (Fig. 1). Malate dehydrogenase는 mitochondria의 marker enzyme 이므로 L-ascorbic acid 합성효소는 mitochondria에 위치한다고 생각된다. Baker's yeast에서도 L-ascorbic acid 생산효소인 L-galactono- γ -lactone oxidase 가 mitochondria에 존재한다(2)고 보고된 바 있다.

성장에 따른 효소 활성의 변화

*N. crassa*를 Vogel's 액체 배지에 배양하면서 일정 시간마다 균사체를 얻어 그 무게를 측정하고, 균사체를 파쇄하여 효소의 활성을 측정하였다. Table 1과 같이 성장함에 따라 균사체의 무게가 증가하고 총 효소 활성도 함께 증가하였으나, 이를 균사체의 건조 중량당으로 비교할 경우 log phase까지 증가하고 그 이후는 감소하였다. Specific activity를 비교할 경우도 stationary phase에서 감소함을 관찰할 수 있었다. 즉 효소는 전체 성장 시기에 고루 발현하였으나 log phase에서 가장 많이 발현되었다.

배지내 기질에 의한 효소 생산 증감의 여부 확인

L-Gulono- γ -lactone은 D-glucono- γ -lactone에 비해 효소 활성을 더욱 많이 유도 (induction)시켰으며, 농도가 증가함에 따라 효소 활성이 증가하였다. 각각 배지에 첨가된 기질은 모두 전체 효소 활성을 증가시켰으며, 또한 specific activity도 증가시켰다. 특히 D-glucono- γ -lactone을 첨가하였을 때는 L-gulono- γ -lactone에 비해 각각의 기질에 대한 효소 활성이 3배 이상 증가하였으며, 배지에 첨가한 기질 농도가 증가함에 따라 효소 활성도 함께 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 2). 이것은 각각의 기질에 의한 substrate induction이 일어난 것으로 사료된다.

효소의 분리 및 정제

효소의 분리를 위해 log phase의 *N. crassa* 균체를

Table 1. Activity of L-ascorbic acid-producing enzyme during various culture periods.

Incubation time (hr)	Enzyme activity (U/mg protein)	Dry weight of mycelium (g)
12	11.005	0.03
24	14.196	0.12
48	16.079	0.36
60	11.653	0.45

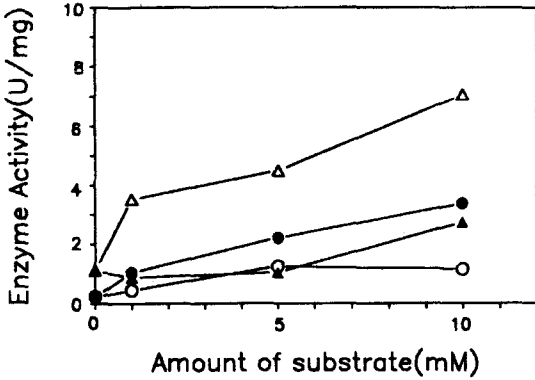


Fig. 2. Substrate effect on the activity of L-ascorbic acid-producing enzyme. ○, D-glucono- γ -lactone as a substrate/L-gulono- γ -lactone in the media; ●, L-gulono- γ -lactone as a substrate/L-gulono- γ -lactone in the media; △, D-glucono- γ -lactone as a substrate/D-glucono- γ -lactone in the media; ▲, L-gulono- γ -lactone as a substrate/D-gulono- γ -lactone in the media.

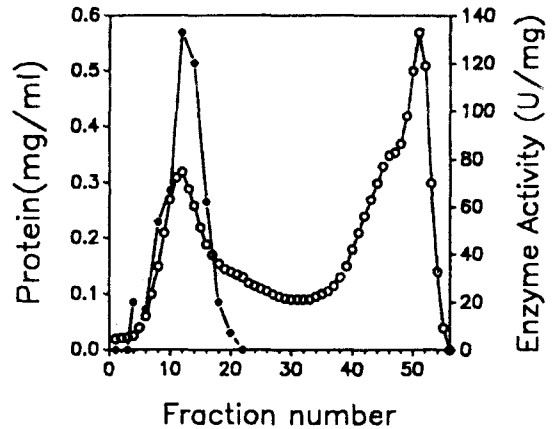


Fig. 4. Molecular sieve chromatography using Sephacryl S-200. The active fractions from anion exchange chromatography were concentrated and loaded on a Sephacryl S-200 column which was previously equilibrated with 50 mM Tris/HCl buffer, and the enzymes were eluted with the same buffer at flow rate of 9.0 ml/hr. ○, protein content; ●, enzyme activity.

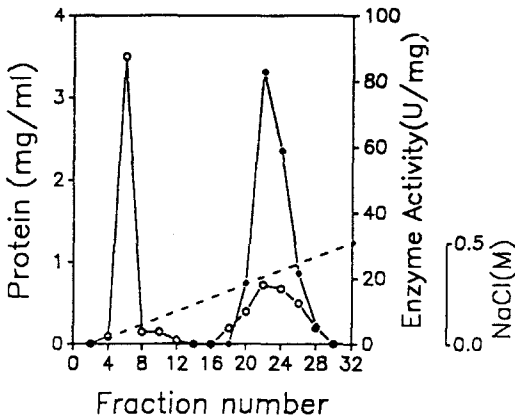


Fig. 3. Anion exchange chromatography using DEAE Sepharose CL-6B. Samples obtained from ammonium sulfate fractionation (60~80%) were loaded on a DEAE Sepharose CL-6B column, which was previously equilibrated with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8.4). After loading, the column was washed with the same buffer at a flow rate of 60 ml/hr. Proteins were eluted with a linear gradient generated from 0 M NaCl to 0.5 M NaCl. Active fractions were pooled and concentrated with ultrafiltration. ○, protein content; ●, enzyme activity

에 황산 암모늄을 최종 포화도가 60~80%되게 salting out fractionation시킨 후 이 시료를 DEAE Sepharose CL-6B 이온 교환 수지에서 NaCl 농도가 0~0.5 M되는 농도 기울기로 용출시켰을 때 0.3 M 농도에 해당되는 분획에서 효소가 용출되었다 (Fig. 3). 효소 활성을 보이는 분획을 모아 Sephacryl S-200을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피를 시행했을 때 8~15분획에서 효소 활성이 나타났다 (Fig. 4). 이 분획들을 모아 Reactive yellow 3-agarose dye column에 흡착시켰을 때 1.5 M NaCl로 용출된 분획들에서 효소 활성을 나타내었다. 각 단계를 거친 후 최종 수율은 2.1%였으며 specific activity는 239.6배 증가하였다 (Table 2). 분리된 효소를 SDS-PAGE (Fig. 5)와 native gel 전기영동 (Fig. 6)으로 확인한 결과, 한 가지 단백질임을 확인할 수 있었다.

효소의 생화학적 특성

효소의 분자량을 겔 여과 크로마토그래피와 SDS-PAGE를 사용하여 측정한 결과 각기 150,000 dalton (Fig. 7), 75,000 dalton (Fig. 8)으로 나타났다. 따라서 이 효소는 동일한 단위체로 구성된 이합체로 생각된다. 분리된 효소의 여러가지 전구체에 대한 기질 특이성을 조사하였을 때 D-galactono- γ -lactone에 대한 활성이 가장 높게 나타났으며 L-galactono- γ -lactone, D-glucono- γ -lactone, L-gulono- γ -lactone, D-gulono- γ -lactone 등에도 작용하는 것으로 나타났다 (Table 3). 이는 baker's yeast에서 분리된 L-galactono- γ -lactone oxidase가 L-gulono- γ -lactone을 기질로 사용한다는 보고 (14)와 L-gulono- γ -lactone이

bead beater로 파쇄하여 100,000×g에서 1시간 원심 분리한 후, 상등액을 조효소로 사용하였다. 여기

Table 2. Purification of L-ascorbic acid-producing enzyme from *N. crassa*.

	Total enzyme activity (U)	Specific enzyme activity (U/mg)	Total proteins (mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	798.7	0.4	2282.0	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60~80%	161.3	1.3	121.3	20.2	3.8
DEAE CL-6B	125.4	54.4	2.3	15.7	155.3
Sephacryl S-200	55.9	79.9	0.7	7.1	228.2
Dye column	16.8	83.9	0.2	2.1	239.6

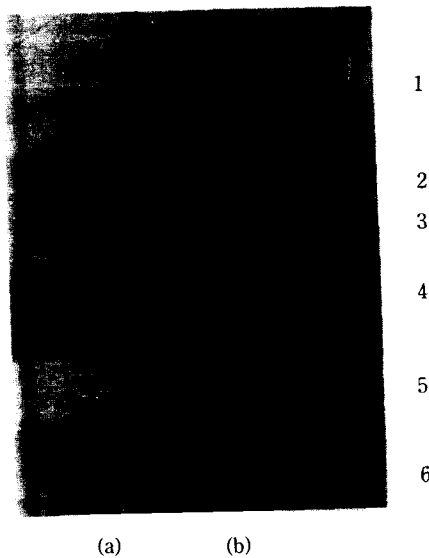


Fig. 5. SDS-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme. Purified enzyme was electrophoresed using a separating gel (7.5%) as described in Materials and Methods.
 a. L-ascorbic acid-producing enzyme; b. molecular weight markers: 1, myosin (205 kDa); 2, β -galactosidase (116 kDa); 3, phosphorylase b (97.4 kDa); 4, bovine serum albumin (66 kDa); 5, egg albumin (45 kDa); 6, carbonic anhydrase (29 kDa).

억제제로 작용한다는 보고(2)로 보아 baker's yeast에 존재하는 효소와 매우 다른 기질 특이성을 보여주는 것이다. 또한 D-glucono- γ -lactone과 L-gulonono- γ -lactone만을 기질로 사용(18)하는 *Penicillium cyano-fulvum*에서 분리된 D-gluconolactone dehydrogenase와도 다른 특징을 보여주는 것으로 보아 이 효소는 *N. crassa*에 특이하다고 생각된다. 이 효소는 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 9). 이는 Takahashi 등이 *Penicillium cyano-fulvum*에서 분리



Fig. 6. Nondenaturing gel electrophoresis. Purified enzyme was electrophoresed using a 7.5% separating gel and stained with (a) Coomassie brilliant blue and (b) activity staining methods.

한 D-glucono- γ -lactone dehydrogenase가 pH 5.6~6.0에서 최대 활성을 보인다는 보고(18)와는 상이하나, Bleeg 등이 yeast에서 분리한 L-galactono- γ -lactone oxidase의 최대 활성 pH가 8.9라는 점(2)에서 이 enzyme과 유사하다고 생각된다. 이러한 여러 가지 특성을 가진 것으로 보아 *N. crassa*의 L-ascorbic acid 합성효소는 지금까지 분리된 효소들과 다른 효소로 생각되어지며, 이는 이들과 다른 L-ascorbic acid 생산 경로를 가지는 것으로 추정된다. 현재 우리 실험실에서는 분리된 효소를 이용하여 이 효소의 유전자를 찾아내어, 유전자 조작을 통한 L-ascorbic acid 합성 억제 돌연변이 생산, 돌연변이와 야생형의 형태와 생리·생화학적 특성을 비교해 봄으로써 L-ascorbic acid의 생체내 역할을 알아보려는 실험들을 진행하고 있다.

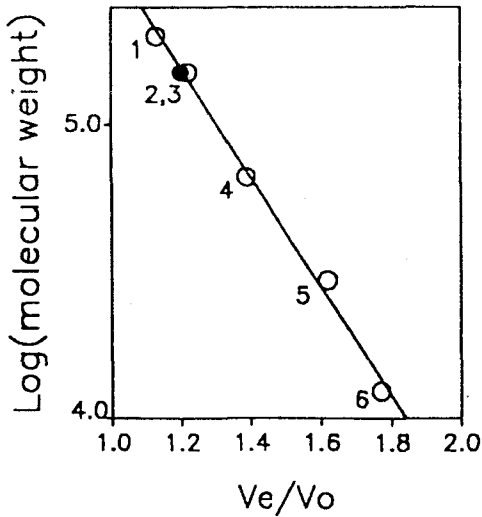


Fig. 7. Molecular weight estimation of L-ascorbic acid producing enzyme based upon the result of gel filtration chromatography on Sephacryl S-200.
 1, β -amylase (200 kDa); 2, alcohol dehydrogenase (150 kDa); 3, L-ascorbic acid producing enzyme; 4, bovine serum albumin (66 kDa); 5, carbonic anhydrase (29 kDa); 6, cytochrome c (12.4 kDa).

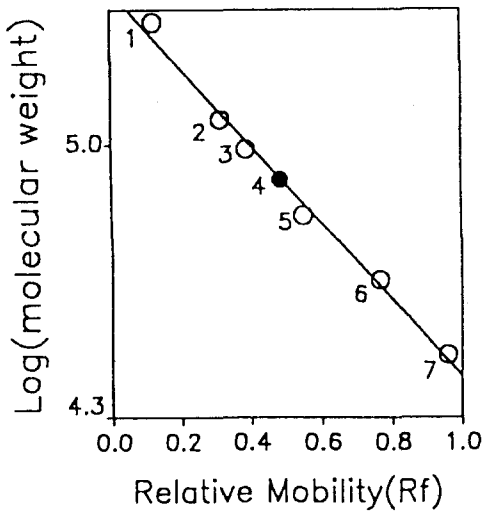


Fig. 8. Molecular weight estimation of L-ascorbic acid producing enzyme based upon the result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
 1, myosin (205 kDa); 2, β -galactosidase (116 kDa); 3, phosphorylase b (97.4 kDa); 4, L-ascorbic acid producing enzyme; 5, bovine serum albumin (66 kDa); 6, egg albumin (45 kDa); 7, carbonic anhydrase (29 kDa).

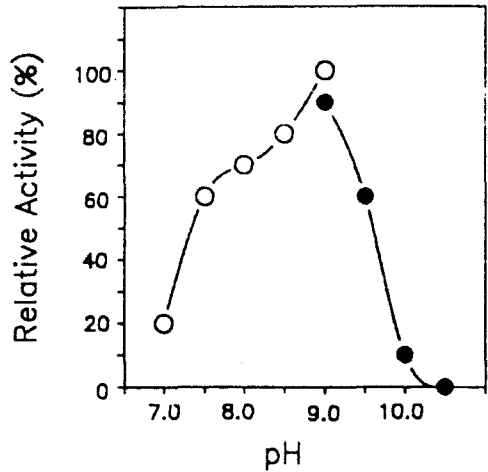


Fig. 9. Effect of pH on the activity of L-ascorbic acid-producing enzyme.
 Reactions were carried out for 5 min. at 30°C in various buffers containing 20 mM D-galactono- γ -lactone. \circ , 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7.0~9.0); \bullet , 0.1 M Carbonate buffer (pH 9.0~10.5).

감사의 말

본 연구에 많은 도움을 주신 서울대학교 미생물학과 강사욱 교수에게 감사를 드립니다. 본 연구는 한국 학술진흥재단에서 지원한 자유공모과제 (1992. 8~1993. 7) 연구비를 지원받아 수행하였습니다.

참 고 문 헌

1. Beers, R.F., Jr. and I.W. Sizer, 1951. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**, 133-140.
2. Bleeg, K.S. and F. Christensen, 1982. Biosynthesis of ascorbate in yeast: Purification of L-galactono-1,4-lactone oxidase with properties different from mammalian L-gulonolactone oxidase. *J. Biochem.* **72**, 248-254.
3. Chance, B. and A.C. Maehly, 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol.* **2**, 764-775.
4. Demoss, R.D., 1955. Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases from *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods Enzymol.* **1**, 328-334.
5. Eipper, B.A. and R.E. Mains, 1991. The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptide. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1153-1156.
6. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

- 85, 9748-9752.
7. Fucci, L., C.N. Oliver, M.J. Coon, and E.R. Stadtman, 1983. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1521-1525.
 8. Hapette, A.M. and S.A. Poulet, 1990. Variation of vitamin C in some common species of marine plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **64**, 69-79.
 9. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 10. Lee, Y., 1988. Identification, characterization and purification of the vacuolar membrane of *Neurospora crassa*. Ph. D. thesis, University of California, Los Angeles.
 11. Liehr, J.G., 1991. Vitamin C reduces the incidence and severity of renal tumors induced by estradiol or diethylstilbestrol. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1256-1260.
 12. Nishikimi, M., B.T. Tolbert, and S. Udenfriend, 1976. Purification and characterization of L-gulonono- α -lactone oxidase from rat and goat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 427-436.
 13. Nishikimi, M., T. Kawai, and K. Yagi, 1992. Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonono- γ -lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *J. Biol. Chem.* **267**, 21967-21972.
 14. Nishikimi, M., E. Noguchi, and K. Yagi, 1978. Occurrence in yeast of L-galactonolactone oxidase which is similar to a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis in animals, L-gulonolactone oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 479-486.
 15. Ochoa, S., 1955. Malic dehydrogenase from pig heart. *Methods Enzymol.* **1**, 735-739.
 16. Park, C.H. and B.F. Kinler, 1991. Growth modulation of human leukemic, preleukemic and myeloma progenitor cells by L-ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1241-1246.
 17. Rebouche, C.J., 1991. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1147-1152.
 18. Takahashi, T., H. Yamashita, E. Kato, M. Mitsumoto, and S. Murakawa, 1976. Purification and some properties of D-glucono- γ -lactone dehydrogenase: D-erythorbic acid producing enzyme of *Penicillium cyano-fulvum*. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 123-129.
 19. Udenfried, S., 1966. Formation of hydroxyproline in collagen. *Science* **152**, 1335-1340.
 20. Vogel, H.J., 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. *Amer. Nat.* **98**, 435-446.
 21. Wiechelman, K., R. Braun, and J. Fitzpatrick, 1988. Investigation of the bicinchoninic acid for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231-237.
 22. Wundering, M., H.H. Paul, and W. Lohmann, 1986. Evaluation of a direct spectrophotometric method for the rapid determination of ascorbate and dehydroascorbate in blood using ascorbate oxidase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**, 1047-1054.
 23. Yagi, K., T. Koshizaka, M. Kito, T. Ozawa, and M. Nishikimi, 1991. Expression in monkey cells of the missing enzyme in L-ascorbic acid biosynthesis, L-gulonono- γ -lactone oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 659-663.

(Received December 10, 1993)

(Accepted December 29, 1993)

ABSTRACT: Isolation and Characterization of L-Ascorbic Acid-Producing Enzyme in *Neurospora crassa*

Kim, Insil and Yeonhee Lee* (Department of Biology, Seoul Woman's University, Seoul 139-744, Korea)

L-Ascorbic acid-producing enzyme in *Neurospora crassa* was found to exist in mitochondria and the activity of this enzyme was increased by the addition of D-glucono- γ -lactone or L-gulonono- γ -lactone in the media. L-Ascorbic acid-producing enzyme in *N. crassa* has been purified with ammonium sulfate precipitation, DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration chromatography and Reactive yellow 3-agarose dye affinity column chromatography. The specific activity of this enzyme was increased to 239.6 fold and the yield was 2.1%. The molecular weight of the native enzyme was 150,000 dalton when it was estimated with Sephacryl S-200 gel filtration chromatography. Its molecular weight appeared as 75,000 dalton by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, which suggested that this enzyme was consisted with two identical subunits. The optimal pH for this enzyme was 9.0 and the K_m value for D-galactono- γ -lactone was 0.073 mM.