

***Chlamydomonas reinhardtii*에서 정제한 Ascorbate Oxidase의 특성**인용호 · 이정현 · 채영규 · 최영길¹ · 강사육² · 정가진² · 하영철²한양대학교 생화학과 · ¹생물학과²서울대학교 미생물학과

생물체내의 ascorbic acid : dehydroascorbic acid system 을 조절하는데 관여하는 것으로 알려진 ascorbate 산화 효소의 활성을 단세포 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 확인함으로써 이 효소의 존재와 특성을 고찰하였다. 조효소는 native gel 전기 영동에 의한 활성 염색과 분광광도계에 의한 ascorbic acid의 흡광도 감소 측정에서 뚜렷한 활성을 나타내었다. 황산암모늄 침전, hydroxyapatite 흡착 크로마토그래피, 그리고 Sephadex G-150 gel 여과 크로마토그래피로 분리한 결과 26.1 units/mg 의 specific activity를 나타내었다. 분리된 ascorbate 산화 효소는 55°C, pH 4.6 에서 가장 활성도가 높았다. Native gel 전기 영동에서 88,000 dalton 가량의 분자량을 가지고 있었고 소단위체의 분자량은 55,000 이었다. 또한 Western blotting technique을 이용하여 *C. reinhardtii*의 ascorbate oxidase를 확인하였다.

KEY WORDS □ Ascorbic acid, ascorbate oxidase, *Chlamydomonas reinhardtii*

생체내의 중요한 환원제 중의 하나인 ascorbic acid (vitamin C)는 식물이나 동물에서 모두 생성되며, 조직에 널리 분포되어 있으나, 사람, 원숭이 그리고 guinea-pig 등의 경우 합성능력이 없어 외부로부터의 섭취를 필요로 한다. Ascorbic acid는 1920년대 말에 Szent Györgyi에 의해 분리된 이후 화학, 생화학, 물리화학적 특성에 대한 많은 연구가 진행되어 왔지만, 수용액 상태에서 나타나는 이 물질의 불안정성 때문에 그 기능에 대한 연구는 많은 제한을 받게 되었다 (12, 28). 그럼에도 생체내에서의 ascorbic acid의 알려진 기능으로는 ascorbic acid의 부족시 collagen 생성을 방해하여 (34), 괴혈병을 초래하며 (33), 그 산화산물인 dehydroascorbic acid는 체세포 분열을 조절 (11, 12) 하는 것으로 보고되어 있다. 또한 임상적으로는 암의 치료에 관련되어 있음을 시사하는 보고를 비롯하여 여러 생리적 기능에 관련되어 있다고 알려져 있다 (5, 17, 23, 24, 28, 30).

생체내에서 ASC는 효소의 촉매로 dehydroascorbic acid (DHA)로 산화된다 (20). Edgar (11)는 생체내의 ASC와 DHA의 농도비가 질병의 발발, 세포 분열이나 여러가지 세포생리 현상에 대한 indicator로 작용한다고 하였다. 이들 ASC:DHA의 농도비 (13)를 조절할 수 있는 효소의 하나인 ascorbate oxidase가 양배추에서 발견된 이후 (4) 여러 종에서 발견되고 있다. 이 효소는 구리이온을 포함하는 ascorbate oxidase가 산소를 전자수용체로 이용하여 ASC를 DHA로 산화시키고 (10, 17, 22, 30), 동물에서는 dopamine β -hydroxylase (15)와 같은 효소들이 ASC를 산화시키며, 균류의 한종류인 *Myrothecium*

verrucaria (35)의 포자와 균사체에서 이러한 ascorbate oxidase와 ascorbate oxygenase의 활성이 있는 것으로 확인되었다 (18). 또한 *Pleurotus ostreatus*의 균사에서 ascorbic acid 산화효소의 활성이 있는 것이 확인되었다 (19). 식물에서 흔히 발견되는 ascorbate oxidase는 분자량이 140,000이고 8 분자의 구리를 함유하고 있는 효소이며 (10, 22, 25), 대부분이 식물의 엽록체나 콩과식물의 뿌리혹에서 주로 발견되는 ascorbate peroxidase는 ascorbate oxidase와는 달리 분자량도 30,000 정도이며, 구리대신 heme group을 가지고 있다 (7, 8, 26).

본 실험에서는 단세포 녹조류의 일종인 *C. reinhardtii*에서 ASC의 산화작용에 연관되어 있는 ascorbate oxidase의 활성을 확인하였고, 이 효소를 분리, 정제하여 몇가지 물리화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법**사용 균주 및 배양조건**

본 실험에 사용한 균주는 *C. reinhardtii* strain이며, *Chlamydomonas* stock center (14)로부터 분양 받아 사용하였다. 균주의 계대 배양은 4 주 간격으로 하였으며, TAP 한천 배지 (29)에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 효소를 분리정제하기 위한 *C. reinhardtii*의 대량배양은 20 L 짜리 배양기에서 지수생장기까지 5일간 TAP 배지에 배양하였으며, 균주의 보관용이나 장시간 배양할 경우에는 HSM을 사용하였다.

Ascorbate oxidase 효소활성도의 측정 및 단백질 정량

*C. reinhardtii*에 존재하는 ascorbate 산화 효소의 활성을 측정하기 위하여 다음의 두 가지 방법을 사용하였는데 native polyacrylamide gel 전기영동 (9)을 수행한 후 이 gel에서 효소의 활성도를 Anton과 Markakis의 방법 (1)을 사용하여 측정하였다. 활성 염색을 위한 ASC 용액은 0.1 mM EDTA를 포함하는 0.1 M sodium phosphate 완충용액 (pH 5.6, 25°C)에 0.1 mM 이 되도록 ASC를 용해시켜 만들었으며 전기영동하여 얻은 gel을 담그어 실온에서 30분간 반응시킨후, 이 gel을 1 mM 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) 수용액과 5-10 분간 반응시켜 band를 확인하였다. 분광 광도계에 의한 효소활성 측정 방법 (16, 27)은, 반응액에 2.7 ml의 0.1 M NaPB (pH 5.6, 25°C), 0.2 ml의 효소시료를 넣고 100 μ l의 3 mM ASC를 넣어 반응을 개시하였으며, 반응은 265 nm에서 5분간의 흡광도 감소로 측정하였다. 효소의 활성단위는 위의 반응에서 1분 동안에 1 μ M의 ASC가 감소하는 경우를 1단위(unit)로 정하였다. 모든 흡광도는 Beckman DU-50 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

단백질 양은 Smith 등 (31)의 방법인 BCA (Bicinchoninic acid) protein assay reagent (Pierce, Holland)를 사용하여, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 사용하였다.

효소의 정제

조효소(crude extract)의 제조

TAP 배지에서 *C. reinhardtii*를 5 일 동안 액체 배양시킨 후, 원심분리기(5,000 \times g, 10분)를 이용하여 세포를 수확하였다. 이를 3회에 걸쳐 freeze, thawing 한 후, 수확한 세포 부피의 2 배가 되도록 50 mM NaPB (pH 8.6, 0. mM EDTA, 7 mM ME와 0.5 mM PMSF가 첨가된)를 첨가한 뒤, 세포를 4°C로 유지시키면서 초음파 분쇄장치 (Cole-Parmer Instrument Co., USA)를 이용하여 15초 동안 80 watt로 다섯번 분쇄하였다. 이 과쇄액을 15,000 \times 로 4°C에서 60분간 원심분리(Hanil Industrial Co.)하여 상층액을 얻었으며, 이것을 조효소 원으로 사용하였다. 이하의 모든 과정은 0-4°C에서 실시하였다.

황산암모늄 침전

조효소 용액에 고체 황산암모늄을 포화도 40-60%가 되도록 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 염석시킨 후, 10,000 \times g 에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었고, 이를 동일 완충용액으로 용해시켜 사용하였다.

Hydroxyapatite 흡착 크로마토그래피는 평형이 이루어진 hydroxyapatite column (2.7 \times 15 cm)에 황산암모늄의 침전물을 용해한 효소시료를 넣고, sodium phosphate 완충용액이 50 mM, 150 mM, 300 mM이 되는 농도의 step 농도 기울기로 효소를

용출시켰다. Hydroxyapatite의 제조는 Bernardi (2)의 방법을 개량한 Chai 등 (6)의 방법에 따라 수행하였다. 완성된 백색 침전물, 즉 hydroxyapatite $[(PO_4)_6(OH)_2]$ 는 사용하기 전까지 4°C에 보관하였다.

Sephadex G-150 gel 여과 크로마토그래피

Hydroxyapatite 흡착 크로마토그래피에서 용출된 분획 중 활성이 있는 부분을 모아 Centri-Prep Concentrator (Amicon, USA)로 농축시키고, 여기서 얻어진 효소액을 50 mM NaPB (pH 5.6, 0.1 mM EDTA, 5 mM ME)로 평형시킨 Sephadex G-150 (Pharmacia Fine Chemicals, USA) column (1.5 \times 90 cm)에 넣은 후, 동일한 완충용액으로 용출시켰다.

효소의 특성

Native gel 전기영동에 의한 분자량 측정

Native gel 전기 영동은 Davis (9)의 방법으로 수행하였고 분자량의 계산 방법은 Sigma Chemical Company의 protocol에 따라 수행 하였다. 표준 단백질로는 Jack bean urease (Mr=272,000와 545,000), bovine serum albumin (Mr=132,000와 200,000), chicken egg albumin (Mr=45,000), bovine erythrocytes carbonic anhydrase (Mr=29,000), bovine milk α -lactalbumin (Mr=14,200)의 non-denatured protein molecular weight marker kit (Sigma, USA)를 사용하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli (21)방법을 이용하였다. 사용한 acrylamide 농도는 separating 8.5 %, stacking 4%의 discontinuous system를 사용하였다. 표준 분자량은 Bio-rad의 high molecular marker와 low molecular marker를 필요에 따라 선택하여 사용하였다.

효소 활성도에 대한 온도 및 pH의 영향

효소 활성도에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 16°C에서 70°C사이의 온도에서 0.1 M NaPB (pH 5.6, 25°C)을 사용하여 활성도를 측정하였다. 효소 활성도에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 4에서 pH 5.6까지는 0.1 M acetate 완충용액, pH 5.6에서 pH 7.6까지는 0.1 M NaPB를 사용하여 활성도를 측정하였다.

K_m 및 V_{max} 값의 측정

분리된 효소의 기질에 대한 apparent K_m 및 V_{max} 값을 측정하기 위하여 여러 기질농도에 대한 효소활성도를 30°C, 0.1 M NaPB (pH 5.6, 25°C)에서 측정하였다. ASC의 농도범위는 0.01-0.1 mM로 하였다.

항체의 형성 및 western blotting.

*Cucurbita*에서 분리 정제된 ascorbate oxidase를 Boehringer Mannheim에서 구입하여 사용하였다. 이에대한 항체는 서울대 정가진 박사의 도움으로 생성하였다.

Western blotting을 위한 시료 조제.

Ascorbate oxidase의 중간 특이성을 연구하기 위한 *E. coli* 및 *C. reinhardtii* 세포를 stationary phase (OD₆₆₀:0.9)까지 배양한 후 수확 (5,000×g)하여 pellet 10 배의 RIPA buffer에 suspension한 후에 0°C에서 10분동안 sonication (5 cycles/15 sec)하였다. Sonication한 후 30분 동안 원심분리 (15,000×g)하여 얻어진 상층액을 Western blotting의 시료로 사용하였다. 이 상층액들을 SDS-PAGE sample buffer (21)에 넣고 10분간 끓인다음 사용할 때 까지 -20°C에 보관하였다. Western blotting을 위한 SDS-PAGE는 위에 기술한 사항대로 수행하였고, 표준 분자량은 Sigma Chemical Co.에서 pre-stained molecular weight marker를 구입하여 사용하였다.

Immunoblotting

전기영동이 끝난후 gel를 transfer buffer (20 mM Tris-glycine buffer, pH 8.3)에 10분 동안 incubation한 후 Trans-Blot cell (BIO-RAD)에 gel과 Nytran membrane filter (0.2 μm pore, Schleier and Schuell)를 assembly한후에 30 V에서 5시간동안 transfer를 수행하였다. Transfer efficiency는 prestained protein standards의 transfer 정도로 측정하였다. Transfer가 끝난후 3 시간 동안 Blotto/Tween blocking solution에서 membrane를 blocking시킨후 Tris-buffered saline에서 두번 세척하였다. 이후 500 배 희석한 primary antibody (rabbit anti-ascorbate oxidase antibody)에 2 시간 반응시키고, 세척한 후 3,000배 희석된 horse-radish peroxidase conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG serum; Bio-rad)에 반응시키고 한 시간 흔들어 주었다. Horse-radish peroxidase의 substrate는 insoluble product를 생성시키는 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitro-blue tetrazolium chloride를 사용하여 staining하였다.

결과 및 토의

Ascorbate oxidase를 검정하기 위한 활성염색에 사용한 시료는 40-60% 포화 황산암모늄을 처리하였을 때 얻어진 침전물을 직접 native gel로 electrophoresis하거나, hydroxyapatite에서 얻어진 활성이 있는 분획을 모아 Centri-Prep Concentrator로 농축한 것을 사용하였다. Acrylamide 농도가 7%인 native gel 전기영동에서 ascorbate 산화효소의 활성을 지니는 부분은 푸른색의 band로, 활성을 지니지 않는 부분은 무색으로 나타났다 (Fig. 1). DCPIP는 수용액 중에서 산화된 상태일 때는 푸른색을 나타내지만, 환원되면 무색으로 변하는 redox indicator로서 gel 상에서 활성이 있는 부분은 ascorbate oxidizing enzyme에 의해 ASC가 DHA로 바뀌었으므로 푸른색이 그대로 남아 있게 되지만, 그 이외의 부분은 존재하는 ASC에 의해 DCPIP가 환원되므로 색이

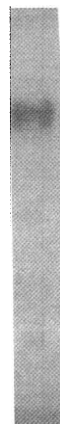


Fig. 1. A: Activity staining of ascorbate oxidizing enzyme in the eluant of hydroxyapatite chromatography by the method proposed by Anton and Markakis (1).

변하게 된다. 조효소액을 시료로 사용하여 native gel에 전개시킨 후 활성염색을 수행하였을 경우 4-5 종류의 ascorbate oxidizing enzymes 및 isoenzyme을 볼수 있었으나 (date not shown), hydroxyapatite를 한번 거치는 동안 나머지 isoenzyme의 대부분은 제거되고 한 종류만 남았고 이 밴드에 해당하는 효소에 대한 분리정제를 시도하였다. Fig. 1에서 볼수 있듯이 hydroxyapatite column을 한번 거친 시료를 사용하였을 경우, *C. reinhardtii*에 존재하는 ascorbate oxidizing enzyme의 gel pattern은 주된 한가지 밴드를 형성하였다. 이러한 결과는 Hwang 등 (19)이 *Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ascorbate oxidase와 비슷한 양상을 보이나, Marchesini와 Kroneck (25)가 *Cucubita pepo medullosa*에서 분리한 ascorbate oxidase 등 이미 알려진 개체들과 존재 양상이 많이 다른것을 알 수 있다. 분광광도계를 이용한 ascorbate 산화 효소의 활성도를 265 nm에서 측정한 결과, 반응이 진행됨에 따라 ASC의 흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2). A에서 D의 peak는 각 5분 후의 absorption spectrum을 나타내고 있으며, E는 ASC를 넣지 않은 경우인데, 25분 경과한 후인 D에서의 ASC의 흡광도가 E와 거의 일치하는 것으로 보아 모든 ASC가 산화되었음을 알 수 있다.

황산암모늄 처리에서 얻어진 시료를 hydroxyapatite column에 흡착시켜 50, 150, 300 mM의 NaPB 농도 기울기로 용출시켰을 경우, NaPB 농도가 0.1-0.2 M에 해당하는 분획에서 효소의 활성을 나타내었다 (Fig. 3). Table 1에 나타난 것과 같이, 이 과정에서 specific activity가 160 units/mg 으로 크게 증가 하였으나, 반면 수율은 70% 에서 16%로 크게 감소하였다. 이는 ascorbate oxidase가 분리과정을

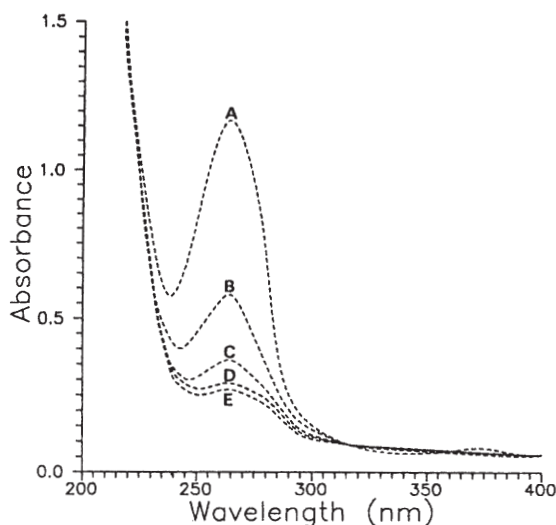


Fig. 2. Absorption spectra of ascorbic acid after enzymatic oxidation. Scan interval was 5 minute. A-D reaction mixture contains 0.2 mM ascorbic acid and 200 μ l eluant of hydroxyapatite chromatography. E reaction mixture contains eluant only.

거치면서 불안정함을 나타내고 있으나, 활성염색에서 one band로 나오기 때문에 이 방법이 효소의 분리 동정에 효과적이라고 생각하였다. Hydroxyapatite 과정에서 나머지 ascorbate oxidizing enzyme 들을 제거하면서 많은 양의 ascorbate oxidase가 같이 제거되어 ascorbate oxidase를 많이 필요로 하는 경우가 방법을 사용하는 것은 적합하지 않다고 생각한다. Ascorbate oxidase 활성이 부분을 분리하여 농축시킨 후 Sephadex G-150 gel 여과 크로마토그래피에서 용출시켰을 경우 35-55 분획과 80-95 분획에서 효소의 활성이 검출되었고 (Fig. 4), 이들을 각각 F1과 F2로 명명하였으며 순수도가 높은 F1을 분리하고, F2는 제거하여 버렸다. F1의 경우는 specific activity가 85.7 units/mg으로 나와 1.8%의 수율로 분리되어 분리정제가 쉽지않음을 알 수 있다.

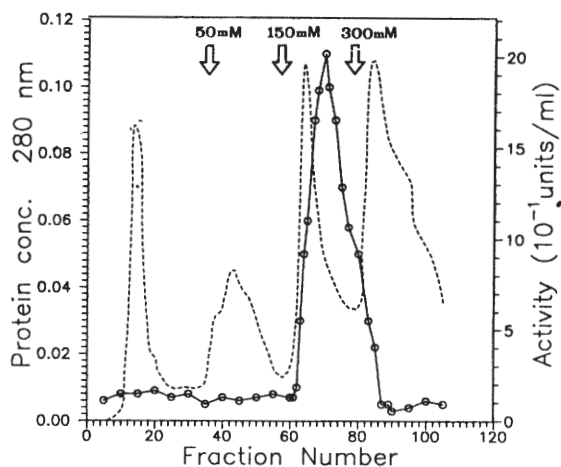


Fig. 3. Hydroxyapatite chromatography of ascorbate oxidase. The volume of each fractions was 3 ml. Protein, ---; Ascorbate oxidase, -○-○-○-.

분리한 효소의 분자량은 표준단백질을 지표로 하여 acrylamide 농도가 6, 7, 7.5, 8, 9%인 native gel (non-denatured gel) 전기영동을 수행하여 구하였다. 상대적 이동율을 분자량의 상용대수값에 대한 회귀 곡선을 그려 직선을 얻었으며 (Fig. 5), 그 결과 분자량은 88,000으로 추정되었다. 보통 고등식물체에서 분리된 ascorbate oxidase들의 경우 분자량이 132,000-140,000 정도이고 (4), *Celuloplasmin*의 경우에도 분자량이 151,000인 것에 비추어 보면 *C. reinhardtii*에서 분리한 ascorbate oxidase는 분자량이 상당히 작다고 할 수 있다.

또한 SDS-PAGE 전기영동을 통한 소단위체 (sub-unit)의 분자량을 점검한 결과 (Fig. 6) 분자량이 55,000으로 나타나 Strothkamp와 Dawson (32)이 고등식물에서 분리한 ascorbate oxidase와 유사하며, *Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ascorbate oxidizing enzyme도 ascorbate oxidase인 것으로 사료되어 동종의 소단위체가 이합체를 형성하는 것으로 여겨진다.

이 효소의 반응온도에 대한 영향은, 55°C가 최적 반응온도임을 알 수 있었으며 효소 활성도를 반으로

Table 1. Purification of ascorbate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*.

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	284.4	995.4	3.5	100
Ammonium sulfate precipitation	86.6	710.1	8.2	71.3
Hydroxyapatite chromatography	2.6	160.3	61.7	16.1
Sephadex G-150 chromatography	0.2	18.0	90.0	1.8

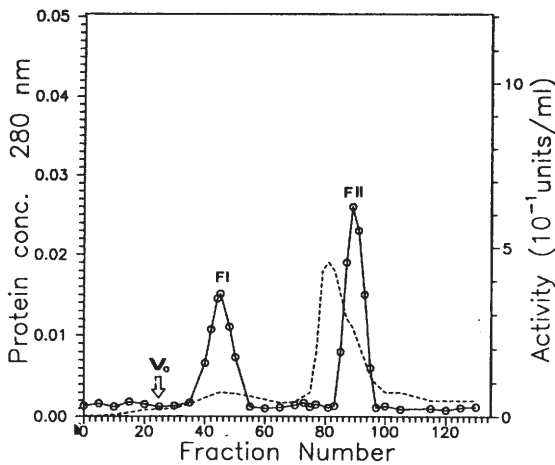


Fig. 4. Gel filtration chromatography of ascorbate oxidase on Sephadex G-150. The volume of each fractions was 3 ml. Protein, ---; Ascorbate oxidase, $\circ-\circ-\circ$.

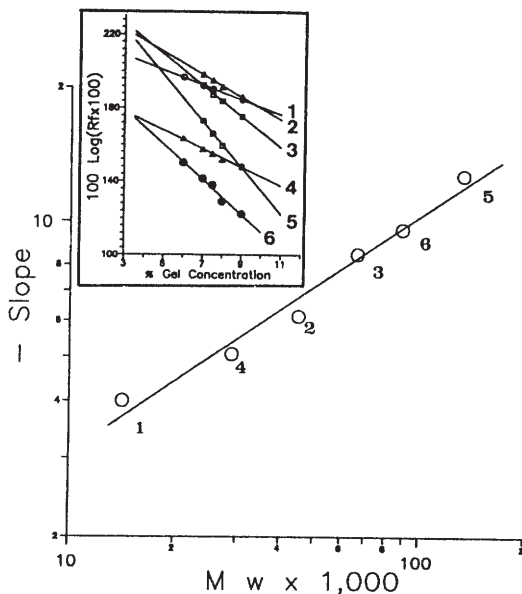


Fig. 5. Molecular weight estimation of ascorbate oxidase by native gel electrophoresis. Molecular standard markers: 1, α -lactalbumin (14,000); 2, chicken egg albumin (45,000); 3, bovine serum albumin, monomer (66,000); 4, carbonic anhydrase (29,000); 5, bovine serum albumin, dimer (132,000); 6, ascorbate oxidase.

낮추는데 필요한 온도는 65°C 와 30°C 이었다 (data not shown). 분리된 ascorbate oxidase의 활성도에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 (data not shown)



Fig. 6. Electrophoretogram of ascorbate oxidase. Left lane; Molecular standard marker; phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (42,300), soybean trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,400). Right lane; purified ascorbate oxidase.

pH 4.5 에서 가장 높은 활성도를 나타냈고, pH 5.5 이상에서는 효소활성도가 반 이하로 감소되었다. 대부분의 고등식물체나 *Pleurotus ostreatus*에서 분리된 ascorbate oxidase는 pH 5.2 부근이 최적 pH인데 (3), *C. reinhardtii*의 경우 pH 5.2 에서도 80%의 활성도를 나타내나, pH 4.5에서 더 높은 활성을 가지고 있었다. 이는 기질로 사용되는 ascorbate monoanion 상태로 존재하는 pH 위치에 있기 때문인 것으로 사료된다. 분리된 ascorbate oxidase의 기질인 ascorbate의 농도변화에 따른 반응속도를 구하여 apparent K_m 값과 V_{max} 값을 계산하였다. L-ASC에 대한 ascorbate oxidase의 K_m 값은 $2.3 \mu\text{M}$ 을 나타내었다 (Fig. 6. C). 이는 Hwang 등 (19)이 보고한 *Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ascorbate oxidase가 ASC에 대한 K_m 값, $2.2 \mu\text{M}$ 과 거의 일치하고 있다.

본 실험에서 분리한 ascorbate oxidizing enzyme를 *Cucurbita*에서 분리하여 얻은 ascorbate oxidase의 항체와 Western blotting을 한 결과 (Fig. 7), 분자량이 55,000이었고, *Chlamydomonas*에서도 비슷한 분자량의 위치에서 *Cucurbita*의 ascorbate oxidase에 대한 항체를 인식하는 band를 관찰할 수가 있어, 본 실험에서 얻어진 효소가 ascorbate oxidase라고 확인하였다. 더욱이 *E. coli*에서도 ascorbate oxidase가 존재하여 이것은 *Chlamydomonas*나 *Cucurbita*와 같은 크기의 단백질 분자이어서 ascorbate oxidase가 진화적으로 보존되어 있는 것이 아닌가 여겨진다. 물론 *E. coli*의 경우 여러개의 밴드 (분자량이 약 86,000; 55,000; 40,000; 37,000)가 *Cucurbita*의 ascorbate oxidase의 항체를 인식하고 있어 흥미를 끌고 있다.

이상의 결과로 미루어 *Chlamydomonas*가 진화적으로 중간단계에 속하고 있어 비교적 진화적으로 *Pleurotus ostreatus*와 유사한 위치에 있는 것으로 생각된다. 아울러 *E. coli*에서도 *Cucurbita*의 ascorbate oxidase 항체를 인식하는 major band (Fig. 7)가

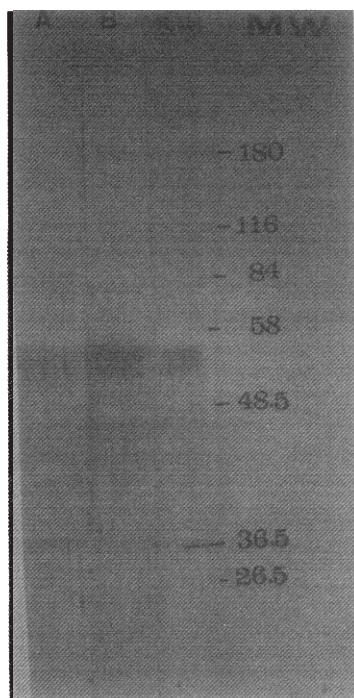


Fig. 7. A: Ascorbate oxidizing enzymes (from *E. coli*) subjected to electrophoresis under denaturing conditions and blotted onto Nytran filter and probed using rabbit anti-ascorbate oxidase antibody; B: Ascorbate oxidase (from *Chlamydomonas reinhardtii*); C: Ascorbate oxidase (from *Cucurbita* sp.). MW: Molecular standard marker; triosephosphate isomerase (26,600), lactic dehydrogenase (36,500), fumarase (48,500), pyruvate kinase (58,000), fructose-6-phosphate kinase (84,000), β -galactosidase (116,000), and α_2 -macroglobulin (180,000).

있어 진화적으로 비교 검토하는 연구가 필요하다고 하겠다.

사 사

본 연구는 1989-1992년도 한국과학재단 목적기초 연구비에 의하여 수행된 것입니다.

참 고 문 헌

1. Anton, A. and P. Markakis, 1969. Ascorbate oxidase isozymes. *Phytochemistry*, **8**, 997-998.
2. Bernardi, G., 1971. Chromatography of proteins on hydroxyapatite. *Methods Enzymol.*, **22**, 325-339.
3. Brenda, G., S.R. Burstein and J. Westley, 1974. Ascorbate oxidase: Inhibition, activation and pH effects. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2005-2008.
4. Bruno, M. and A. Luciana, 1984. Copper proteins and copper enzymes. Vol. 3., CRC Press, New York.
5. Cameron, E., L. Pauling and B. Leibovitz, 1979. Ascorbic acid and cancer; A review. *Cancer Res.*, **39**, 663-681.
6. Chai, Y.G., B.R. Shingh, P.S. Songh, J. Lee and G.W. Robinson, 1987. Purification and spectroscopic properties of 124-kilodalton phytochrome. *Anal. Biochem.*, **164**, 322-330.
7. Dalton, D.A., S.A. Russell, F.J. Hanus, G.A. Pascok and H.J. Evans, 1986. Enzymatic reaction of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3811-3815.
8. Dalton, D.A., S.A. Russell, F.J. Hanus, G.A. Pascok and H.J. Evans, 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.*, **83**, 789-794.
9. Davis, B.J., 1964. Disc-electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
10. Dawson, C.R., K.G. Strothkamp, and K.G. Krul, 1975. Ascorbate oxidase and related copper proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **258**, 209-220.
11. Edgar, J.A., 1970. Dehydroascorbic acid and cell division. *Nature*, **227**, 24-26.
12. Friedrich, W., 1988. Vitamin C. In: *Vitamins*. Walter de Gruyter, Berlin; New York. pp. 929-1002.
13. Hans, W.M., 1986. Is there an equilibrium between ascorbic acid and dehydroascorbic acid? *Z. Naturforsch.*, **41**, 1145-1146.
14. Harris, H.E., 1989. An overview of the genus *Chlamydomonas*. In: *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. (Harris H.E. eds.) Academic Press, San Diego. pp. 1-22.
15. Herman, H.H., K. Wimalasena, L.C. Fowler, C.A. Beard, and S.W. May, 1988. Demonstration of the ascorbate dependence of membrane-bound dopamine β -monooxygenase in adrenal chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.*, **263**, 666-672.
16. Hewitt, E.J. and G.J. Dicks, 1961. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues. *J. Biol. Chem.*, **78**, 384-391.
17. Holmberg, C.G. and C.B. Laurell, 1951. Investigations in serum copper. Effect of different anions on the enzymatic activity of ceruloplasmin. *Acta Chem. Scand.*, **5**, 921-928.
18. Hughes, M.N., 1984. The inorganic chemistry of biological processes. 2nd ed. Wiley and Sons, New York.
19. 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
20. Kang, S.-O., 1985. A possible enzymatic catabolism of L-ascorbic acid via α -ketoaldehydes. *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 302-308
 21. Laemmli, U.K., 1970. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
 22. Lee, M.H. and C.R. Dawson, 1973. Ascorbate oxidase: Spectral characteristics of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6603-6609.
 23. Levin, E.Y., B. Levenberg and S. Kaufman, 1960. The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2080-2085.
 24. Lohmann, W., K.G. Bensch, H. Sapper, A. Pleyer, J. Schreiber, S.-O. Kang, H. Löffler, H. Pralle, K. Schwemmler, and R.D. Filler, 1982. Free radicals and cancer. In: Free radicals, lipid peroxidation and cancer. (McBrien, D.C.H., and Slater, T.F. eds.) Academic Press, London. pp 55-73
 25. Marchesini, A., and P.M.H. Kroneck, 1979. Ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo medullosa*: New method of purification and reinvestigation of properties. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 65-76.
 26. Nakano, Y., and K. Asada, 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radicals. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 131-140.
 27. Oberbacher, M.F., and H.M. Vines, 1963. Spectrophotometric assay of ascorbic acid oxidase. *Nature*, **197**, 1203-1204.
 28. Richards, E., 1991. Vitamin C and cancer: medicine or politics? Macmillan Professional and Academic Ltd. London.
 29. Rochaix, J.D., S. Mayfield, M. Goldschmidt-Clermont and J. Erickson, 1988. Molecular biology of *Chlamydomonas*. In: Plant molecular biology: A practical approach. (Show, C. eds.) IRL Press, Oxford. pp. 253-275
 30. Sapper, H., S.O. Kang, H.H. Paul and W. Lohmann, 1982. The reversibility of the vitamin C redox system: Electrochemical reasons and biological aspects. *Z. Naturforsch.*, **37c**, 942-946.
 31. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
 32. Strothkamp, K.G., and C.R. Dawson, 1974. Concerning the quaternary structure of ascorbic oxidase. *Biochemistry*, **13**, 434-440.
 33. Szent Györgyi, A., 1977. The living state and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2844-2847.
 34. Udenfried, S., 1966. Formation hydroxyproline in collagen. *Science*, **152**, 1335-1340.
 35. 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 May 13, 1992)

(Accepted May 28, 1992)

ABSTRACT: Properties of Purified Ascorbate Oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*
 In, Y.H., J.H. Lee, Y.G. Chai, Y.K. Choi¹, S.-O. Kang², G. Jeong² and Y.C. Hah² (Dept. of Biochemistry, ¹Biology, Hanyang Univ. and ²Dept. of Microbiology, Seoul National Univ.)

To identify and characterize an ascorbate oxidizing enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*, we studied as follows. Ascorbate oxidizing enzyme activity from the crude extract of *Chlamydomonas reinhardtii* was detected by specific active staining through native gel electrophoresis and ultraviolet spectroscopy. Ascorbate oxidizing enzyme was partially purified by various procedures including ammonium sulfate precipitation, adsorption chromatography on hydroxyapatite and Sephadex G-150 gel filtration chromatography. The molecular weight of the native enzyme was about 88,000 dalton by native gel electrophoresis and subunit molecular weight 55,000 of this enzyme was determined by SDS-PAGE. The optimum temperature for the enzyme was about 55°C and pH 4.6 was the optimum. Moreover, ascorbate oxidase in *C. reinhardtii* was confirmed by Western blotting technique.