Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 6, 693-698 (1996)

*Flavobacterium meningosepticum*의 Nucleoside Oxidase와 Peroxidase 생산특성

최양문* · 조홍연[1] · 양한철[2]
고려대학교 생물공학연구소
[1]고려대학교 생명공학원 및 연세대학교 생물산업소재연구센터, [2]고려대학교 생명공학원

Cultural Characteristics of *Flavobacterium meningosepticum* for Production of Nucleoside Oxidase and Peroxidase. Yang-Mun Choi*, Hong-Yon Cho[1] and Han-Chul Yang[2]. *Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, [1]Graduate School of Biotechnology, Korea University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, [2]Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, Korea* — Optimal cultural conditions were investigated for the maximal productivity of nucleoside oxidase and peroxidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Sucrose and Polypepton were the best as a carbon source and a nitrogen source. Fe^{2+}, Fe^{3+} and Cu^{2+} increased the activities of the two enzymes and were essential in medium containing peptone as a nitrogen source. Nucleoside derivatives such as 2′-deoxyguanosine, 2′-deoxyadenosine, N^6-methyladenosine and 1-methyladenosine were effective for the production of the two enzymes. Especially, the addition of N^6-methyladenosine and 1-methyladenosine decreased cell growth, but increased the two enzyme activities. High level of oxygen also was an essential factor for formation and/or induction of these enzymes. From the summary of this study about optimal medium and environmental conditions, nucleoside oxidase was biosynthesized in proportion to peroxidase. These results suggested that the role of peroxidase should be degradation of H_2O_2 generated by nucleoside oxidase in the cell of *Flavobacterium meningosepticum*.

Nucleoside oxidase는 nucleoside를 산화시켜 nucleoside 5′-carboxylic acid를 생성하는 효소로 간담즙선(hepatobiliary tract) 질병의 진단과 5′ 위치에 CH_2OH 기를 갖는 nucleoside계 항종양성 물질의 효소합성에 용도가 개발되고 있는 효소이다(1). 이 효소의 생산미생물은 Isono 등(2-6)이 보고한 *Pseudomonas maltophilia*와 저자들(1)이 밝힌 *Flavobacterium meningosepticum*의 두 종류만이 현재까지 보고되고 있다. 또한 peroxidase(EC 1.11.1.5) (7)는 glucose oxidase(EC 1.1.3.4) (8,9), urinate oxidase(EC 1.7.3.3) (10) 및 cholesterol oxidase(EC 1.1.3.6) (11)에 의해 각각의 기질이 산화될 때 생성되는 H_2O_2를 비색적으로 정량함으로써 효소기질의 농도를 측정하는데 사용되는 임상진단용 효소로서 주로 horseradish로부터 추출된 peroxidase가 시판되고 있다. 최근 미생물로부터 peroxidase를 생산하는 연구가 활발히 진행되어 *Copronus*(12-14), *Pellicularia*(15) 및 *Arthromyces*(16,17) 등의 곰팡이 peroxidase가 보고되고 있으나 peroxidase 활성만을 갖는 효소를 생산하는 세균에 관하여는 보고된 바 없다(18).

저자들은 *Flavobacterium meningosepticum*이 생산하는 nucleoside oxidase의 활성과 최적배양조건을 검토하던 중 catalase와 함께 peroxidase를 생산하는 것을 발견하였다. 한 균주의 세포내에서 이들 효소가 갖는 생리적 역할을 규명함과 동시에 산업적으로 이용성이 높은 nucleoside oxidase와 peroxidase의 생산을 목적으로 배양특성을 조사하였다.

*Corresponding author.
Key words: Nucleoside oxidase, peroxidase, *Flavobacterium meningosepticum*.

재료 및 방법

시약

본 연구에 사용된 Polypepton, peptone과 *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulforopyl)-*m*-toludine(Toos)는 Wako Pure Chemical Industries 제품을 사용하였다.

사용균주

전보(1)에서 보고한 바 있는 토양에서 분리한 *Flavobacterium meningosepticum*을 사용하였다.

배양조건

효소생산을 위한 배양조건의 검토는 1.0% Polypepton, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$가 함유된 pH 7.0의 기본배지 10 m*l*를 시험관(2.5×22 cm)에서 종배양한 후 종배양액 0.2 m*l*를 10 m*l*의 각종 검토용 배지를 넣은 동일 시험관에 접종하고 28℃, 280 stroke/min에서 28시간 동안 왕복진탕배양하였다. 효소생산에 미치는 통기량의 영향은 2 *l*의 Sakaguchi flask에 100~420 m*l*의 배지를 넣고 28℃, 130 stroke/min에서 왕복진

탕배양하였다.

조효소액의 조제

배양액중 5 ml를 원심분리(14,000×g, 10분)하여 얻은 균체에 1.0% lysozyme, 0.2% EDTA와 1.0% Tween 100이 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0) 1 ml를 첨가하여 현탁시키고, 37℃에서 30분간 용균시킨 후 원심분리(14,000×g, 10분)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 하였다.

효소활성 측정

Nucleoside oxidase 전보(1)의 방법에 따라 adenosine으로부터 생성된 H_2O_2량을 정량함으로써 효소활성을 측정하였다.

Peroxidase Peroxidase의 활성은 1.0 mM H_2O_2, 1.5 mM 4-aminoantipyrine, 0.6 mM Toos, 50 mM acetate buffer(pH 5.5)로 구성된 반응액 1 ml에 조효소액 20 μl를 첨가하고 37℃에서 5분간 반응시킨 후 0.5% SDS 용액 2.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 555 nm에서 생성된 보라색 색소의 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 상기의 표준반응계에서 1분당 1 μmole의 H_2O_2를 분해하는 효소량을 1 unit로 하였다.

Catalase Catalase 활성 측정은 Aebi법(18)에 준하여 16 mM H_2O_2를 포함하는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.0 ml에 조효소액 20 μl를 첨가하여 37℃에서 반응시키면서 240 nm의 흡광도 감소로 H_2O_2의 분해력을 측정하였다. 효소활성 단위는 상기의 표준반응계에서 1분당 1 μmole의 H_2O_2를 분해하는 효소량을 1 unit로 하였다.

결 과

탄소원의 영향

기본배지에 각종 탄소원을 1.0% 첨가하여 효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Sucrose, glucose, fructose 순서로 nucleoside oxidase 활성이 높게 나타났으며, *Flavobacterium meningosepticum*는 nucleoside oxidase의 생산과 함께 peroxidase를 생산하는 것을 발견하였다. 또한 peroxidase의 효소활성은 nucleoside oxidase 활성에 비례하여 증가할 뿐만 아니라 효소생산에 미치는 각종 탄소원의 영향이 nucleoside oxidase와 유사한 경향을 나타냄으로써 두 효소의 생합성에 있어 생리적 관련성이 있을 것으로 추정되었다. Nucleoside oxidase의 세포내 효소작용시 생성되는 H_2O_2를 분해할 수 있는 catalase의 활성도 *Flavobacterium meningosepticum*에서 비교적 높게 나타났으나 peroxidase와 같이 nucleoside oxidase의 활성과 유의할만한 연관성이 없이 생산되었다.

질소원의 영향

Table 2는 각종 유기태 질소원이 효소생산에 미치는 영향을 검토한 것으로 nucleoside oxidase와 peroxidase의 생산은 Polypepton, yeast extract, NZ-amine을 질소원으로 이용할 때만 이루어졌으며, 두 효소가 Polypepton에서 가장 높은 생산량을 나타낸 반면 peptone 첨가시 두 효소 모두가 생산되지 않는 점이 특이하였다. 효소생산에 영향을 미치는 질소원은 Polypepton,yeast extract, NZ-amine의 순으로 nucleoside oxidase와 peroxidase가 동일하게 높이 나타났으나 이들 두 효소의 생산과 catalase간의 상관성은 보이지 않았다.

금속이온의 영향

Nucleoside oxidase와 peroxidase의 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 sucrose와 Polypepton을 탄소원 및 질소원으로 사용, 몇 가지의 금속염을 0.001% 되게 첨가하여 생산능을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

Table 1. Effect of carbon sources on production of nucleoside oxidase, peroxidase and catalase.

Carbon source (1.0%)	Cell growth (Abs. at 660 nm)	NOD[a] (U/ml)	POD[b] (U/ml)	Catalase ($\times 10^3$ U/ml)
Glucose	9.3	0.064	0.088	270
Sucrose	9.3	0.114	0.126	268
Maltose	9.2	0.011	0.018	275
Fructose	9.0	0.043	0.071	260
Lactose	3.9	0.001	0.001	0
Galactose	7.0	0.007	0.010	135
Mannose	6.7	0.007	0.010	120
Sorbose	10.0	0.010	0.018	320
Sorbitol	3.7	0.003	0.008	0
Soluble starch	9.5	0.011	0.022	224

[a]NOD : Nucleoside oxidase, [b]POD : Peroxidase.
Each carbon source was added into the medium consisting of 1.0% Polypepton, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and pH 7.0.

Table 2. Effect of nitrogen sources on production of nucleoside oxidase, peroxidase and catalase.

Nitrogen source (1.0%)	Cell growth (Abs. at 660 nm)	NOD (U/ml)	POD (U/ml)	Catalase ($\times 10^3$ U/ml)
Polypepton	9.4	0.114	0.126	268
Yeast extract	10.2	0.106	0.105	321
NZ-amine	8.9	0.072	0.086	248
Meat extract	2.1	0	0	52
Casamino acid	2.1	0	0	51
Peptone	8.7	0	0	101
Tryptone	9.2	0	0	107
C.S.L.	6.2	0	0	121
Amino acid mixture	9.2	0	0	67

Each nitrogen source was added into the medium consisting of 1.0% sucrose, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and pH 7.0.

Table 3. Effect of metal ions on production of nucleoside oxidase and peroxidase in presence of Polypepton as a nitrogen source.

Metal ion (0.001%)	Cell growth (Abs. at 660 nm)	NOD (U/ml)	POD (U/ml)
None	9.0	0.114	0.126
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	9.0	0.145	0.163
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	9.1	0.145	0.163
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	8.9	0.141	0.164
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	9.3	0.095	0.105
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	9.4	0.082	0.083
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	9.6	0.073	0.089
$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	9.6	0.092	0.095
$CaSO_4 \cdot 6H_2O$	9.4	0.097	0.107
$FeCl_3 \cdot 6H_2O + CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9.2	0.171	0.205
$FeSO_4 \cdot 7H_2O + CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9.3	0.160	0.185

Each metal ion was added into the medium consisting of 1.0% sucrose, 1.0% Polypeptone, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and pH 7.0.

Table 4. Effect of metal ions on production of nucleoside oxidase and peroxidase in presence of peptone as a nitrogen source.

Metal ion (0.001%)	Cell growth (Abs. at 660 nm)	NOD (U/ml)	POD (U/ml)
None	9.0	0	0
$FeCl \cdot 6H_2O$	9.0	0	0.072
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	9.1	0.065	0.063
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	8.9	0	0
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	9.3	0	0
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	9.4	0	0
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	9.6	0	0
$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	9.6	0	0
$CaSO_4 \cdot 6H_2O$	9.4	0	0
$FeCl_3 \cdot 6HY_2O + CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9.2	0.098	0.105

Each metal ion was added into the basal medium consisting of 1.0% sucrose, 1.0% peptone, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and pH 7.0.

Fe^{2+}, Fe^{3+} 및 Cu^{2+}을 첨가하였을 때 효소생산이 증가하였으며 Fe^{3+}와 Cu^{2+}를 함께 첨가하였을 경우 효소생산은 상승효과를 나타내었다. 효소생산을 증가시킨 Fe^{2+} 및 Fe^{3+} 이온의 농도에 따라 효소생산량을 검토한 결과 0.001~0.0001%의 첨가농도범위에서 거의 비슷한 생산량을 나타내었다.

또한 철과 구리이온이 nucleoside oxidase와 peroxidase 생산에 필수적인 인자인지를 확인하기 위하여 균체생산은 양호하였으나 두 효소활성을 나타내지 않은 peptone을 질소원으로 사용, 각 금속염을 0.001% 되게 배지에 첨가하여 효소활성을 검토한 결과 Fe^{2+}와 Fe^{3+}의 첨가에 의해서만 두 효소가 생산됨을 알 수 있었다(Table 4). Cu^{2+} 이온 단독 첨가에서는 두 효소의 생산을 나타내지 못하였으나, Fe^{3+}의 존재시 Cu^{2+}의 첨가에 의해 nucleoside oxidase와 peroxidase 생산은 Fe^{3+} 단독 첨가보다 높게 나타났다.

핵산 및 핵산관련물질의 영향

핵산 및 핵산관련물질이 nucleoside oxidase 생산에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. 각 시약을 0.1%되게 첨가하여 효소생산량을 비교한 결과 2′-deoxyguanosine, 2′-deoxyadenosine, N^6-methyladenosine 및 1-methyladenosine의 첨가는 nucleoside oxidase 활성을 각각 110, 150, 230 및 200% 증가시켰으며, peroxidase 활성도 80, 86, 250 및 170% 증가시켰다. 특히 N^6-methyladenosine과 1-methyladenosine의 첨가는 균체증식은 감소하였으나, 두 효소생산이 모두 증가하는 현상을 보였다.

환경인자들의 영향

Nucleoside oxidase와 peroxidase의 생산에 미치는 환경인자들을 검토하였다. Table 5는 2*l* Sakaguchi flask를 사용하여 조사한 효소생산에 대한 통기량의 영향으로 배지 180 ml를 28℃에서 130 stroke/min으로

왕복진탕배양하였을 때 두 효소 모두 시간에 관계없이 가장 높은 효소생산능을 나타내었다. 이는 working volume 20% 내외의 일반적인 통기조건에 비해 약 2배 정도 높은 값으로 효소생산에 많은 양의 용존산소가 요구되며, 세포내로 확산된 산소는 nucleoside oxidase와 peroxidase의 기질 또는 기질의 반응을 위해 소비됨으로써 두 효소의 생합성을 촉진시키는 것으로 추측되었다. 한편 효소생산을 위한 최적 배양온도는 두 효소 모두 28℃ 부근이었으며, 최적 배양 초기 pH는 7.0을 나타내었다(Data 제시하지 않음).

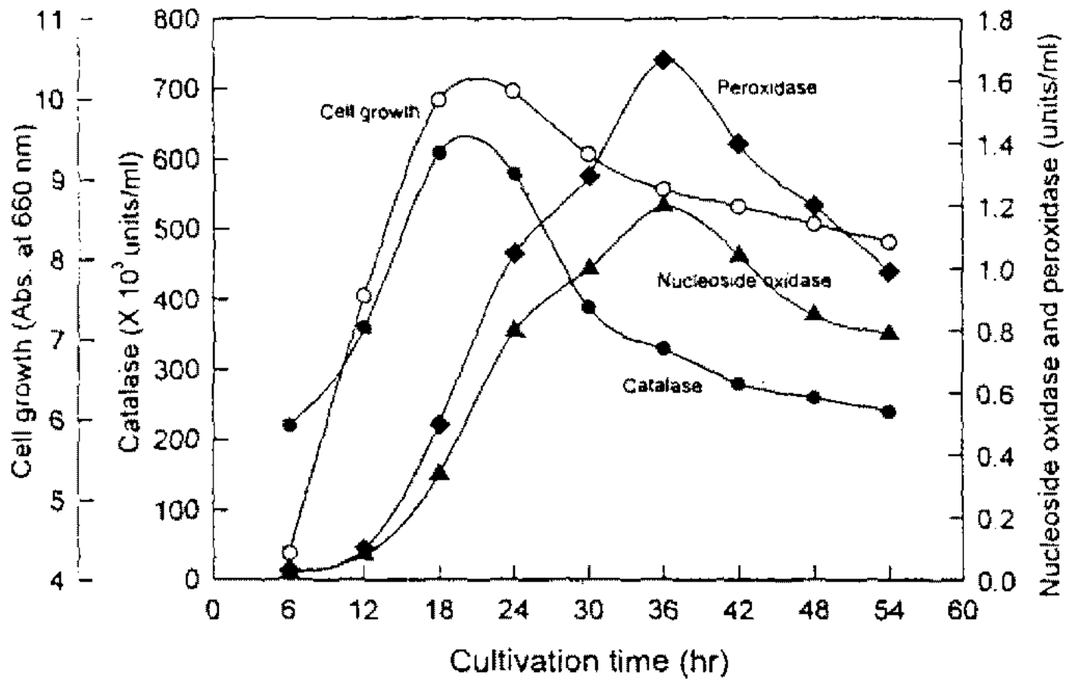

Fig. 1. Effect of additive on production of nucleoside oxidase and peroxidase.
Each additive was added to the basal medium consisting of 1.0% sucrose, 1.0% Polypepton, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, and pH 7.0. The activities of nucleoside oxidase (□) and peroxidase (■) were determined as the standard assay conditions described in "Material & Method". Values in parentheses indicate cell growth (Abs. 660 nm).

배양시간에 따른 효소생산

이상의 실험에서 확립된 효소생산용 최적배지 및 배양조건에서 2 *l* Sakaguchi flask를 사용하여 *Flavobacterium meningosepticum*을 전 배양한 배양액 4 m*l*을 180 m*l* 배지에 접종하고 28℃, 130 stroke/min 왕복진탕배양하면서 배양시간에 따른 균체증식과 효소생산량을 추적하였다(Fig. 2). 균체증식은 18시간까지 급속히 증가하여 24시간에 최대를 나타내었으나 nucleoside oxidase와 peroxidase의 활성은 거의 같은 비율로 증

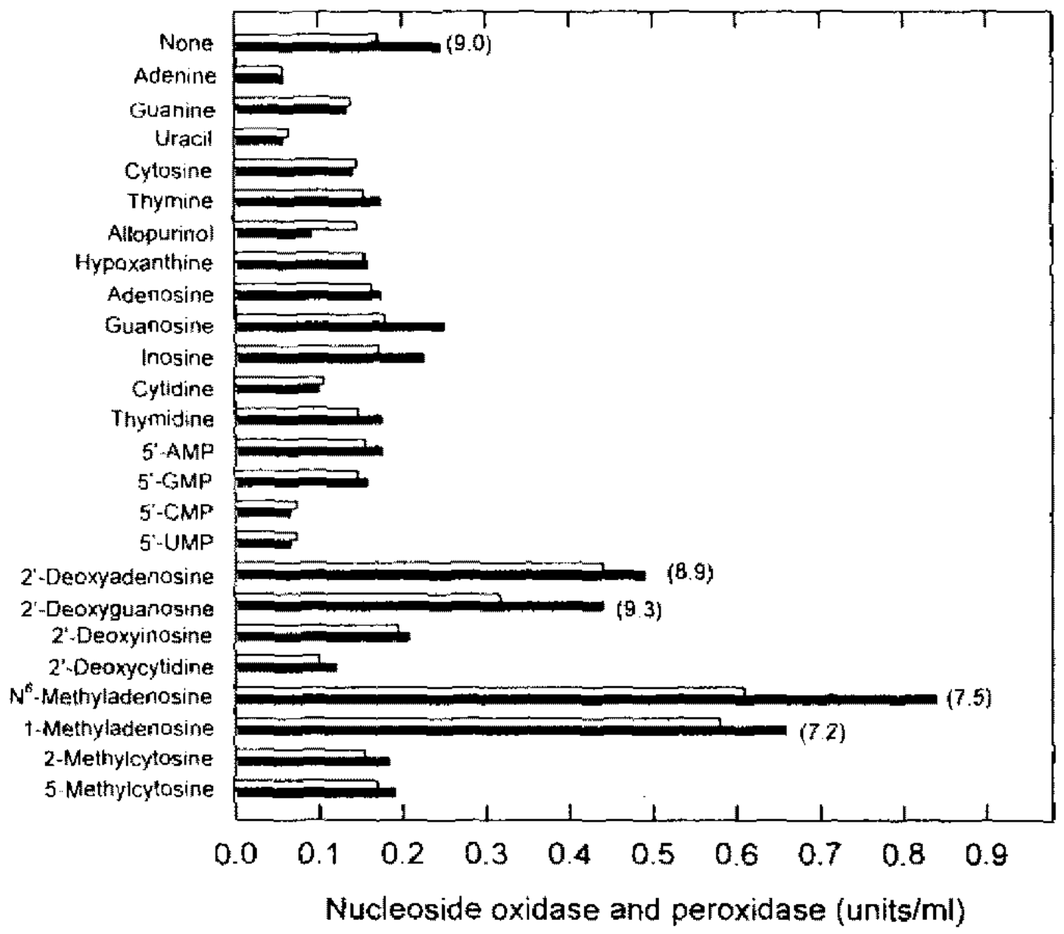

Fig. 2. Time course of growth and enzyme production under optimized culture conditions.
Seed culture of 4 m*l* was inoculated into the optimized medium of 180 m*l* in 2 *l* Sakaguchi flask. Cultivation was carried out with reciprocal shaker controlled at 28℃ and 130 stroke/min.

Table 5. Effect of aeration on production of nucleoside oxidase and peroxidase.

Medium volume	24 hr			36 hr		
	Cell growth (Abs. 660 nm)	NOD (U/m*l*)	POD (U/m*l*)	Cell growth (Abs. 660 nm)	NOD (U/m*l*)	POD (U/m*l*)
100	11.1	0.66	0.87	10.7	0.72	1.00
140	11.2	0.85	1.10	10.5	0.92	1.23
180	10.1	0.88	1.14	9.6	1.12	1.67
220	8.6	0.70	0.91	8.4	0.82	0.94
260	7.5	0.51	0.66	7.2	0.67	0.87
300	6.5	0.25	0.34	6.4	0.35	0.42
340	6.4	0.13	0.19	6.4	0.20	0.27
380	5.6	0.07	0.11	5.7	0.10	0.16
420	5.4	0.01	0.01	5.4	0.02	0.03

Flavobacterium meningosepticum was cultivated at 28℃ for 24 hr and 36 hr in the medium (pH 7.0) consisting of 1.0% sucrose, 1.0% Polypepton, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ and 0.1% 2'-deoxyadenosine. Seed culture of 2% (v/v) was inoculated into various volume medium in 2 *l* Sakaguchi flask Each medium was aerated with a reciprocal shaker controlled at 28℃ and 130 stroke/min.

가하여 36시간에서 최대활성을 보였으며 catalase 활성은 균의 생육곡선과 유사하게 18시간까지 증가한 후 감소하였다. 상기에서 검토한 배지조성 및 환경인자들로부터 nucleoside oxidase와 peroxidase의 세포내 생합성이 거의 동일한 배양조건에서 이루어짐을 알 수 있었다.

고 찰

*Flavobacterium meningosepticum*의 nucleoside oxidase 활성을 검토하던 중 peroxidase와의 공역반응에 의한 nucleoside oxidase 효소활성측정 반응계(1)에서 peroxidase를 제외한 반응액으로부터도 nucleoside oxidase 활성이 검출되었을 뿐만 아니라 조효소액의 효소활성과 효소반응계 blank의 효소활성이 조효소액의 첨가량에 따라 증가하는 것이 발견되어 그 원인을 조사하였던 바 cell free extract에 peroxidase가 존재하는 것으로 확인하였다. 뿐만 아니라 본 균주의 세포내에 비교적 높은 catalase의 활성도 검출됨에 따라 배지의 구성성분과 배양조건들이 이들 효소의 생합성에 미치는 영향을 검토함으로써 효소들간의 생리적 관련성을 조사하고자 하였다. 탄소원인 경우는 균체량과 nucleoside oxidase 및 peroxidase의 생산능에서 매우 유사함을 보인 반면 질소원의 경우에는 균체가 양호하게 증식되었음에도 두 효소의 생산을 나타내지 않는 질소원이 존재하였으며, catalase는 두 효소의 생산조건들과 일치하지 않는 경향을 보임으로써 세포 내에서의 생리적 역할이 다름을 알 수 있었다. 한편 미량원소들이 두 효소 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 두 효소를 생산하지 않았던 peptone을 질소원으로 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과 철이온 첨가시는 모두 효소활성을 나타내었다. 이는 전보(1,19)에서 보고한 바와 같이 두 효소가 hemoprotein으로 두 효소의 생산에 있어 철이온은 중요한 요소이며, *Flavobacterium meningosepticum* 생육에 있어 nucleoside oxidase와 peroxidase가 필수적인 효소는 아님을 시사해 주었다. 각종 염기, nucleoside, nucleotide와 이들의 analogue를 배지에 첨가하여 효소활성을 검토한 결과 2′-deoxyguanosine, 2′-deoxyadenosine, N^6-methyladenosine 및 1-methyladenosine의 첨가는 두 효소의 생산을 증가시켰으며 특히 N^6-methyladenosine과 1-methyladenosine의 첨가는 균체량이 감소되었으나 nucleoside oxidase와 peroxidase 생산을 증가시켰다. 이 두 물질이 *Flavobacterium meningosepticum*을 돌연변이시킴으로써 효소생산을 증가시키는 지의 여부를 확인하기 위하여 N^6-methyladenosine 또는 1-methyladenosine이 0.1% 함유된 액체 최적배지에서 생육시킨 후 한천평판배지에 도말 배양하여 얻은 각각 100개씩의 colony를 1% sucrose, 1% Polypepton, 0.1% K_2HPO_4와 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$로 구성된 배지에서 두 효소의 생산량을 비교검토하였으나 모균주보다 효소생산이 증가된 colony는 없었다. 따라서 이들 nucleoside analogue들은 세포내의 대사과정중 두 효소의 생산을 증가시키는 것으로 사료되었으나 이들 화합물의 첨가에 의해 균체 생산량이 적음에도 불구하고 효소생산을 증가시키는 원인을 규명하기 위해서는 *Flavobacterium meningosepticum* 세포내에서 nucleoside oxidase와 peroxidase의 보다 상세한 생리적 역할에 대한 연구가 요구되고 있다. 검토된 모든 배지조건, 환경인자와 효소생산의 경시적 변화에서 두 효소는 거의 비례적으로 생산되었고 nucleoside oxidase가 생산되지 않은 조건에서는 peroxidase도 생산되지 않았으며 catalase의 생산은 nucleoside oxidase의 생산과 관계없이 세포의 생육곡선의 변화와 유사하게 생산되었다. 이 결과들은 세포내에서 nucleoside oxidase에 의해 nucleoside의 산화시 생성되는 H_2O_2가 catalase보다 peroxidase에 의해 분해되는 것으로 추정되었다.

요 약

*Flavobacterium meningosepticum*로부터 nucleoside oxidase와 peroxidase의 최대생산 조건을 검토한 결과 탄소원으로는 sucrose, 질소원으로는 Polypepton이 좋았으며, Fe^{2+}, Fe^{3+}이나 또는 이들 이온과 함께 Cu^{2+}을 배지에 첨가시 두 효소의 생산량은 증가하였다. 또한 2′-deoxyguanosine, 2′-deoxyadenosine, N^6-methyladenosine 및 1-methyladenosine의 첨가는 두 효소의 생산을 증가시켰으며 특히 N^6-methyladenosine과 1-methyladenosine의 첨가는 생산된 균체량은 적었으나 두 효소생산량은 증가시켰다. 배지조건 및 배양시간에 따른 효소생산의 양상을 검토한 결과 두 효소는 거의 유사한 경향을 보였고 효소생산에 미치는 환경인자들 중 산소의 충분한 공급이 필수적이었다. 이상의 결과들로부터 세포내에서 nucleoside가 nucleoside oxidase에 의해 산화될 때 생성되는 H_2O_2를 peroxidase가 분해할 가능성이 시사되었다.

감사의 글

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. 최양문, 조홍연, 양한철. 1993. *Flavobacterium meningosepticum*이 생산하는 nucleoside oxidase 정제 및 stoichiometry. 산업미생물학회지 **21**: 23-29.
2. Isono, Y., M. Hoshino and T. Sudo. 1988. Some characteristics of a new enzyme, nucleoside oxidase. *Agr. Biol.*

Chem. **52**: 2135-2136.
3. Hoshino, M., Isono Y. and T. Sudo. 1989. Production of a new enzyme, nucleoside oxidase, by *Pseudomonas maltophilia* LB-86. Agric. Biol. Chem. **53**: 399-403.
4. Isono, Y., T. Sudo. and M. Hoshino and. 1989. Production and reaction of a new enzyme, nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1663-1669.
5. Isono, Y., T. Sudo and M. Hoshino. 1989. Properties of a new enzyme, nucleoside oxidase, from *Pseudomonas maltophilia* LB-86. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1671-1677.
6. Isono, Y. H. Tsujmeto and M. Hoshino. 1989. A new kinetic method for assaying serum 5'-nucleotidase using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2667-2671.
7. Shannon, L.M., E. Kay and Y. Lew. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* **241**: 2166-2171.
8. Swoboda, B.E.P. and V. Massay. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **240**: 2209-2215.
9. Yoshimura, T. and T. Isemura. 1971. Subunit structure of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem.* **69**: 839-846.
10. Mahler, H.R. 1963. The Enzyme. Vol. 8, pp. 285-296. Academic Press Inc., New York.
11. Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada. 1974. Properties of crystalline 3β-hydroxysteroid oxidase of Brevibacterium sterolicum. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 1149-1156.
12. 日本 公開特許 昭 61-254189 : パ-オキシダ-ゼの製造法.
13. 日本 公開特許 昭 61-104784 : ペルオキシダ-ゼの製造法.
14. Morita, Y., H. Yamashita, B. Mikami, H. Iwamoto, S. Aibara, M. Terada and J. Minami. 1988. Purification, crystalization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. *J. Biochem.* **103**: 693-699.
15. Ichikawa, K., K. Okazaki, K. Kimoto and Y. Watanabe. 1981. Partial purification and characterization of peroxidase from *Pellicularia filamentosa*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1297-1299.
16. 日本 公開特許 昭 61-43987 : ペルオキシダ-ゼ及びその製造法.
17. Shimmen, Y., S. Asami, T. Amachi and S. Shimuzu. 1986. Crystallization and characterization of extracellular fugal peroxidase. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 247-249.
18. Aebi, H. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2, 2nd ed. pp. 673-684. Academic Press, Inc. New York and London.
19. 최양문, 조홍연, 양한철. 1996. *Flavobacterium meningosepticum*기원 Peroxidase의 정제 및 특성. 산업미생물학회지(in press).

(Received 24 July 1996)