

*Flavobacterium meningosepticum*이 생산하는 Nucleoside Oxidase의 정제 및 Stoichiometry

최양문 · 조홍연¹ · 양한철*

고려대학교 생물공학 연구소, ¹고려대학교 식량공학과

Purification and the Stoichiometry of Nucleoside Oxidase from *Flavobacterium meningosepticum*

Choi, Yang-Mun, Hong-Yon Cho¹ and Han-Chul Yang*

Institute of Biotechnology Korea University, Seoul 135-075, Korea

¹Department of Food Science and Industry, Korea University, Chungnam 339-800, Korea

Abstract — A bacterial strain producing a nucleoside oxidase was isolated from soil and identified as *Flavobacterium meningosepticum* by its taxonomical characteristics. The enzyme has been purified 150-fold to electrophoretic homogeneity in an overall yield of 18% from the cell free extract of the producer. The enzyme catalyzed oxidation of only nucleosides related to both purine and pyrimidine with very high substrate specificity. The nucleoside oxidase was proved to be a noble enzyme by stoichiometry that 1 mol adenosine as a substrate was especially oxidized via adenosine 5'-aldehyde to 1 mol adenosine 5'-carboxylic acid with the formation of 2 mol H₂O₂.

간담즙선(hepatobiliary tract)에 질병이 발생할 경우 담즙산염에 의해 간세포막으로부터 5'-nucleotidase가 분비되어 serum내에 5'-nucleotidase 활성이 증가한다(1-6). Serum내 5'-nucleotidase 활성측정법으로는 가수분해물인 orthophosphate를 정량하는 방법(7)과 adenosine deaminase와 glutamate dehydrogenase의 coupling 반응계로부터 생성되는 NAD⁺의 양을 추적 정량하는 방법(5)이 있지만 이들은 침전물의 제거를 위한 원심분리조작, 고농도의 NADH 및 장시간의 preincubation 등이 요구되고 있다.

최근 Isono 등은 H₂O₂의 생성없이 nucleoside를 nucleoside 5'-carboxylic acid로 산화시키는 nucleoside oxidase를 *Pseudomonas maltophilia*로부터 분리, 정제하고 효소학적 성질(8-11) 및 그 응용성(12, 13)에 관하여 보고한 바 있다. *Pseudomonas maltophilia* nucleoside oxidase의 촉매적 활성특성은 nucleoside 존재시, phenol 화합물과 4-aminoantipyrine으로부터

quinoneimine dye을 생성하는 laccase와 유사한 활성을 nucleoside oxidase에 비례하여 갖고 있는 점으로 이 성질을 이용하여 nucleoside를 측정함으로써 5'-nucleotidase 활성을 정량할 수 있다고 보고하였다(12).

저자들은 nucleoside의 산화시 H₂O₂와 nucleoside 5'-carboxylic acid를 동시에 생성하는 새로운 type의 nucleoside oxidase 생산균주를 토양으로부터 분리하고 효소를 정제하였으며, 간편 신속한 H₂O₂의 정량에 의해 5'-nucleotidase 활성을 측정하는 임상진단용 시약의 개발을 위한 기초연구의 일환으로 먼저 본 효소의 stoichiometry에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

생산균주의 분리 및 동정

생산균주의 분리는 보관균주와 토양으로부터 분리한 균주를 아래의 배양조건에서 배양한 후 상법에 따라 조제한 균체의 및 균체내 조효소액을 micro cell plate상에서 nucleoside oxidase-peroxidase 효소반응

Key words: *Flavobacterium meningosepticum*, nucleoside oxidase

*Corresponding author

계를 사용하여 실시하였다. 반응액을 적색(aminoantipyrine dye)으로 변화시킨 균주를 대상으로 1차 분리한 후 HPLC를 이용하여 nucleoside oxidase 반응계에서 H_2O_2 와 adenosine 5'-carboxylic acid를 생성하는 균주를 최종 분리하였다.

생산균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 및 H. Wakabashi법(14)에 준하여 실시하였다.

배양조건

2l Sakaguchi flask에 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% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 및 0.1% 2'-deoxyguanosine 조성의 pH 7.0인 액체배지 180 ml를 넣고 전배양한 종균 5%를 접종하여 28°C, 130 rpm에서 왕복진탕배양하였다.

효소활성 측정 및 단백질정량

Nucleoside oxidase의 효소활성은 기질 adenosine으로부터 생성된 H_2O_2 량을 정량함으로써 측정하였다. 1.0 μ mol adenosine, 1.5 μ mol 4-aminoantipyrine, 2.0 μ mol phenol, 4.5 units peroxidase를 포함한 40 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0) 1 ml를 효소반응액으로 사용하였으며, 반응액에 효소용액 50 μ l를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응 후 0.5% SDS 용액 2.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 500 nm에서 생성된 quinoneimine 색소의 양을 정량하였다. 효소활성단위는 표준효소반응계에서 1분간에 1 μ mol의 H_2O_2 를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였으며 quinoneimine 색소의 분자흡광계수($\epsilon = 1.32 \times 10^4 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)로부터 생성된 H_2O_2 량을 환산하였다.

단백질의 정량은 Bradford(15)법에 의한 Bio-Rad protein assay kit를, 표준단백질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소의 정제

Step 1. 조효소액의 조제: 습균체 약 3,000 g을 Dyno mill KDL(W. A. Bachofen, Switzerland)로 마쇄한 후 원심분리(14,000×g, 30분)에 의해 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Step 2. $(NH_4)_2SO_4$ 분획: 조효소액을 1 M potassium 인산염 완충용액(pH 7.0)을 사용하여 pH 7.0로 조정하고 ice bath 상에서 유안분말을 포화 30% 농도까지 첨가하여 1시간 교반 후 원심분리(14,000×g,

30 분)하였다. 상등액에 동일한 방법으로 유안을 첨가하여 포화 60% 농도에서 1시간 교반 후 원심분리(14,000×g, 30분)하여 얻은 침전 단백질을 50 mM 인산염 완충용액으로 용해하고 10 mM 인산염 완충용액에 대하여 5~10시간 간격으로 3회 투석하였다.

Step 3. DEAE-Sephacel treatment: 투석한 효소액을 10 mM 인산염 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-Sephacel(1,000 ml)에 첨가하고 1시간 서서히 교반하여 흡착시킨 후 Büchner funnel에서 0.1 M NaCl이 포함된 10 mM 인산염 완충용액으로 세척하였다. 효소가 흡착된 DEAE-Sephacel은 1 M NaCl이 함유된 10 mM 인산염 완충용액으로 효소를 용출시킨 후 용출된 효소액을 상기와 동일하게 투석하였다.

Step 4. DEAE-Sephacel column chromatography: 전단계에서 투석한 효소액을 10 mM 인산염 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-Sephacel column(6.5×30 cm)에 흡착시키고 0~0.8 M NaCl 직선농도 구배를 사용하여 시간당 60 ml의 속도로 용출시킨 후 활성획분을 모아 투석한 후 YM-30 membrane Amicon 한외여과기(Amicon Co., U.S.A.)를 사용하여 농축하였다.

Step 5. Q-Sepharose column chromatography: 농축 효소액을 10 mM 인산염 완충용액으로 평형화시킨 Q-Sepharose column(3.0×40 cm)에 흡착시킨 후 0~0.8 M NaCl 직선농도 구배를 사용하여 시간당 40 ml의 속도로 용출시켜 높은 비활성 획분을 상기와 같이 투석 농축하였다.

Step 6. Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography: 전단계의 효소액을 pH 7.0으로 조정하면서 4 M까지 NaCl를 첨가한 후 4 M NaCl을 함유한 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 평형화시킨 phenyl Sepharose CL-4B column(1.7×45 cm)에 흡착시켰다. 흡착된 효소를 4~0 M NaCl 직선농도 구배로 용출시키고 활성이 높은 획분을 동일한 방법으로 투석 농축하였다.

Step 7. Hydroxyapatite column chromatography: Hydroxyapatite를 5 mM 인산염 완충용액으로 수회 세척 후 1.4×50 cm column에 충전, 평형화시킨 다음 전 단계에서 농축한 효소액을 흡착시켰다. 5~400 mM 인산염 완충용액 직선농도 구배를 사용하여 시간당 15 ml의 유속으로 목적효소단백질을 용출시키고 10 mM 인산염 완충용액으로 투석 농축하여 사용전까지 -20°C에서 보관하였다.

Adenosine 분해물의 정량

0.1 mM adenosine 50 μ l와 0.5 units/ml 정제 nucleoside oxidase 20 μ l을 37°C 에서 2.5, 5.0, 7.5, 15분간 반응시킨 후 HPLC로 ODS Cosmosil $_5C_{18}$ column(4.6 \times 10 mm, Nakalai Tesque, Japan)을 사용하여 260 nm에서 정량하였다.

O₂의 정량

효소반응 중 소비되는 O₂량은 0.5, 1.0 및 1.5 mM adenosine 용액 1.9 ml와 20 units/ml nucleoside oxidase 0.1 ml을 첨가한 후 30°C 산소전극용기(Rank Brothers, U.K.)내에서 반응시켜 소비된 O₂량을 정량하였다.

H₂O₂의 정량

효소반응에서 생성된 H₂O₂는 4-aminoantipyrine-phenol-peroxidase계에 의해 다음과 같이 정량하였다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 450 μ l, 0.3% 4-aminoantipyrine 100 μ l, 0.2% phenol 100 μ l, 42 units/ml peroxidase 100 μ l, 5.5 units/ml nucleoside oxidase 50 μ l와 0~2.0 mM까지 H₂O₂ 100 μ l을 첨가하고 37°C, 1분간 반응시킨 후 500 nm에서 H₂O₂에 대한 표준검량선을 작성하였다. Nucleoside oxidase-peroxidase 반응계에서는 H₂O₂ 용액을 0.25 및 0.5 mM adenosine 용액으로 치환하여 반응시킨 후 500 nm의 흡광도 변화를 측정, H₂O₂ 표준검량선으로부터 생성된 H₂O₂량을 환산정량하였다.

결과 및 고찰

생산균주의 분리 및 동정

Nucleoside 5'-carboxylic acid와 H₂O₂를 동시에 생성하는 새로운 type의 nucleoside oxidase 생산균주의 분리는 nucleoside oxidase-peroxidase 반응계를 사용하여 보관균주 및 토양분리균주 약 1,300여종을 대상으로 실시하였다. Micro cell plate상에서 반응액을 적색으로 변화시킨 균주 60여종을 1차 선별한 후 adenosine이 함유되어 있지 않은 반응계를 대조구로 적색을 나타내지 않은 균주를 2차 선별한 다음 HPLC를 이용하여 nucleoside 5'-carboxylic acid를 생성하는 균주 T-2799를 최종 선별하였다.

분리균주의 형태학적 생리학적 성질을 조사한 결과 T-2799는 무포자 그람음성 간균으로 비운동성이었고 catalase, oxidase 양성 및 glucose를 발효시키는 성질

Table 1. Preliminary identification of T-2799 on Lab M nutrient agar

Gram stain	: -
Spores	: -
Motility	: -
Colony morphology	: round, regular, entire, dark, yellow, convex, smooth, shiny, translucent single colonies, 2 mm diameter
°C Growth	: 37°C (+), 41°C (+), 45°C (+)
Catalase	: +
Oxidase	: +
Fermentative in glucose O-F medium	: +
Preliminary identification	: <i>Flavobacterium</i>

Table 2. Rapid test (API) of strain T-2799

2 days, 30°C		7 days, 30°C	
NO ₃ reduction	: -	Allantoin	: +
Acid from glucose	: -	Phosphatase	: -
Arginine dehydrogenase	: -	Glycerol(PWS)	: -
Urease	: +	Indol	: -
Aesculin	: +	DNase	: +
Gelatin hydrolysis	: +	Tween 80 ^{a)}	: -
β -galactosidase	: +	Starch ^{a)}	: -
Cytochrome oxidase	: +		
Glucose assimilation	: +		
Arabinose assimilation	: -		
Mannose assimilation	: +		
Mannitol assimilation	: +		
N-acetylglucosamine assimilation	: -		
Maltose assimilation	: +		
Gluconate assimilation	: -		
Caprate assimilation	: -		
Adipate assimilation	: -		
Malate assimilation	: -		
Citrate assimilation	: +		
Phenylacetate assimilation	: -		

^{a)} 3 days incubation only

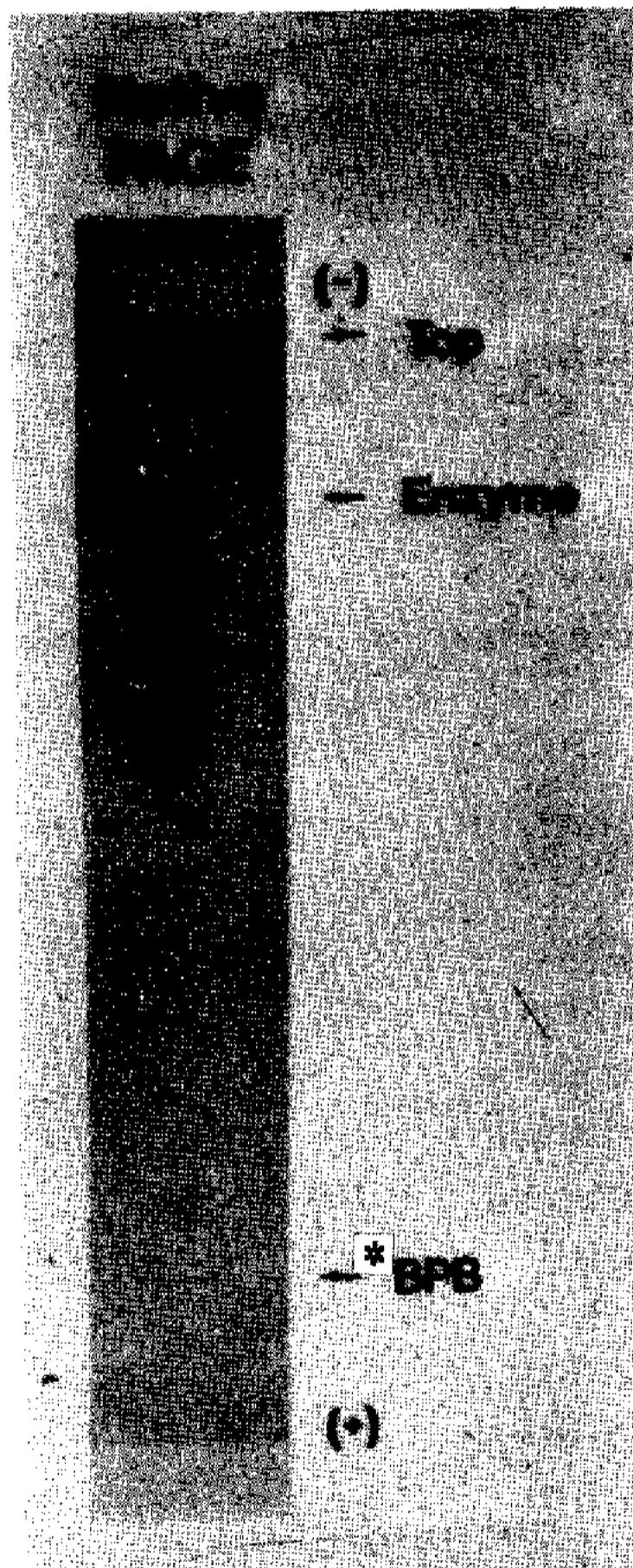
등을 나타냄으로써 1차 *Flavobacterium*속으로 추정할 수 있었으며(Table 1), 배양 7일 동안 관찰한 생리학적 특성들로부터 *Flavobacterium meningosepticum*으로 동정되었다(Table 2).

효소의 정제

*Flavobacterium meningosepticum*의 cell free ext-

Table 3. Purification of nucleoside oxidase from *Flavobacterium meningosepticum* T-2799

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Fold	Yield (%)
Cell free extract	22,100	13,800	0.62	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ Fractionation	11,800	12,100	1.03	1.67	87.7
DEAE-Sephacel (1st)	1,300	11,200	8.87	13.9	81.0
DEAE-Sephacel (2nd)	590	7,530	12.8	21.6	54.4
Q-Sepharose	250	4,720	18.6	30.3	34.2
Phenyl-Sepharose CL-4B	80	3,650	45.2	72.9	26.4
Hydroxyapatite	27	2,480	93.4	151	17.9

**Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified nucleoside oxidase.**

The purified enzyme solution containing 20 µg protein was electrophoresed on 5% polyacrylamide gel at pH 8.9.

*Bromophenol blue

ract로부터 2종류의 음이온 교환수지와 소수성 교환수지 및 hydroxyapatite column chromatography를 이용하여 본 효소를 정제배율 150배, 수율 18%로 전기영동적으로 균일하게 정제하였다(Table 3). 정제 효소는 high performance gel permeation chromatography의 용출 단백질 peak와 활성 peak가 대칭적

Table 4. Substrate specificity of the purified enzyme

Substrate	Relative activity (%)
Adenosine	100
Inosine	91
Guanosine	94
Thymidine	98
Uridine	88
Cytidine	50
Adenine	0
Guanine	0
Thymine	0
Uracil	0
Cytosine	0
D-Ribose	0
2-Deoxy-D-ribose	0
5'-AMP	0
5'-GMP	0
5'-CMP	0
5'-UMP	0

으로 일치하였으며 5% polyacrylamide gel 전기영동에서 단일 band를 나타냄으로써 순도 높은 단일 단백질임을 알 수 있었다(Fig. 1).

효소의 기질특성

효소의 기질특성을 nucleoside, nucleotide 및 nucleoside의 구성요소인 당, 염기 등을 대상으로 oxidase 활성여부를 검토한 결과는 Table 4와 같다. Pyrimidine계 nucleoside에 비해 purine계 nucleoside에 대하여 높은 활성을 보인 본 효소는 nucleotide, 염기 및 당에는 전혀 활성을 나타내지 않음으로써 기질특이성이 매우 높은 nucleoside oxidase로 판명할 수 있었다. 이러한 기질특이성은 5'-nucleotidase와 같이 nucleotide로부터 nucleoside를 생성하는 효소나, nu-

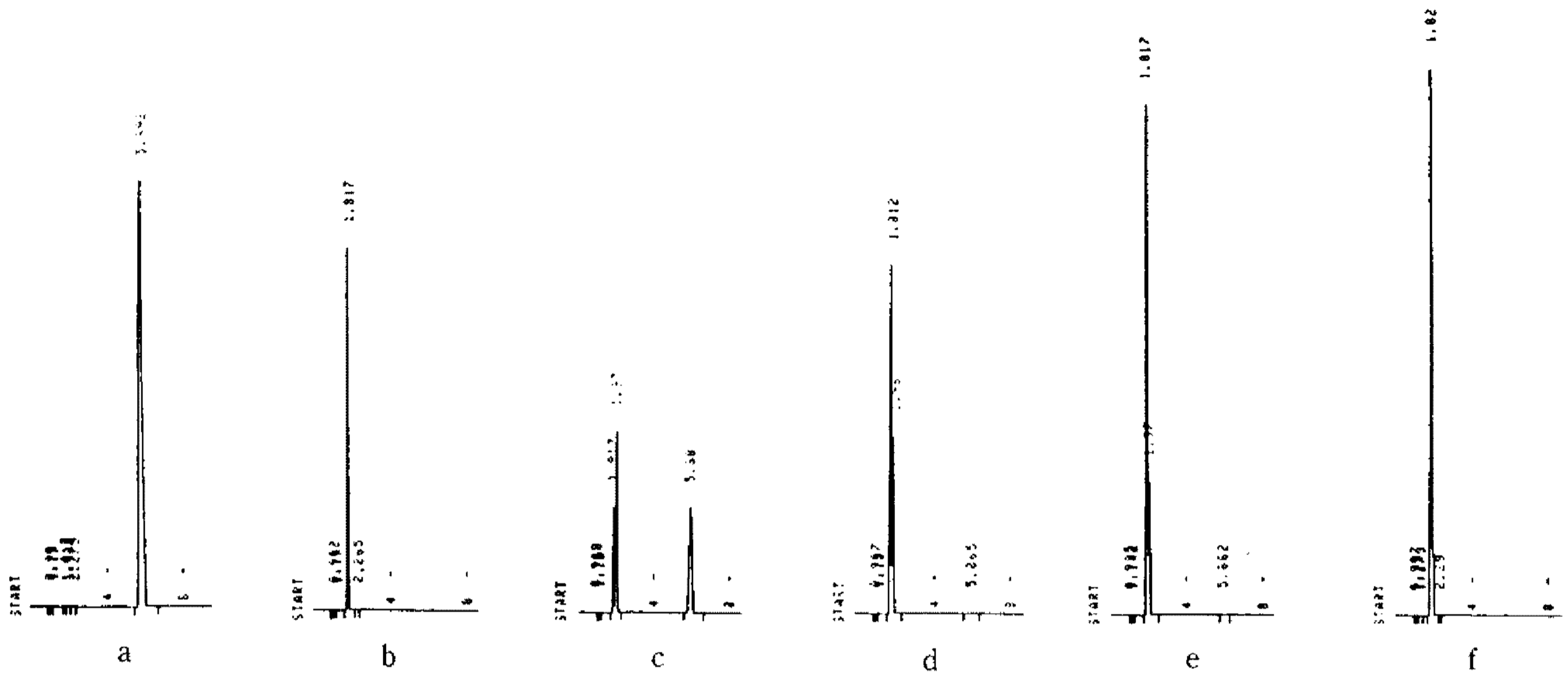


Fig. 2. HPLC profiles of the products from adenosine by the nucleoside oxidase.
 a: Adenosine, b: Adenosine 5'-carboxylic acid, c: Reaction time 2.5 min, d: Reaction time 5.0 min, e: Reaction time 7.5 min, f: Reaction time 15.0 min. Chromatography conditions are as follows: packing material, ODS Cosmosil C_{18} ; column size, $\Phi 4.6 \times 10$ mm; eluent, 0.2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{MeOH}=90:10$; flow rate, 1.0 ml/min.

cleoside phosphorylase와 같이 nucleoside를 염기와 pentose-1-phosphate로 분해하는 효소의 활성을 신속 간편하게 효소학적 방법으로 측정할 수 있을 뿐만 아니라 본 연구의 목적인 임상진단시약용 대상효소로서의 조건을 구비함으로써 본 효소의 이용성을 제 고시켰다. 또한 1988년에 보고된 nucleoside oxidase (8)와 달리 산화반응시 H_2O_2 를 정량적으로 생성하는 반응성은 본 효소와 비교적 입수가 용이한 peroxidase를 간단히 coupling시킴으로써 상기 효소들의 활성측정이 가능한 새로운 assay법에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

Nucleoside oxidase의 반응기구

본 효소의 반응기구를 해석하기 위해 Fig. 2에서와 같이 adenosine을 기질로 한 효소반응계로부터 생성 되는 중간산화물과 최종산화물을 반응시간에 따라 분석한 결과 adenosine은 반응초에 retention time 1.9분의 물질로 산화된 후 최종산화물인 adenosine 5'-carboxylic acid까지 2단계로 산화됨을 알 수 있었 으며 중간산화물은 adenosine 5'-aldehyde로 추정되 었다. 또한 본 효소의 2단계 산화반응에 있어 adeno sine의 1차 산화가 반응초기에 거의 완료됨으로써 반응속도에 영향을 주는 단계는 adenosine 5'-aldehy de의 산화단계로 추측되었다. CH_2OH 기를 COOH 기 로 산화시키는 대표적인 oxidase의 반응기구는 Isono

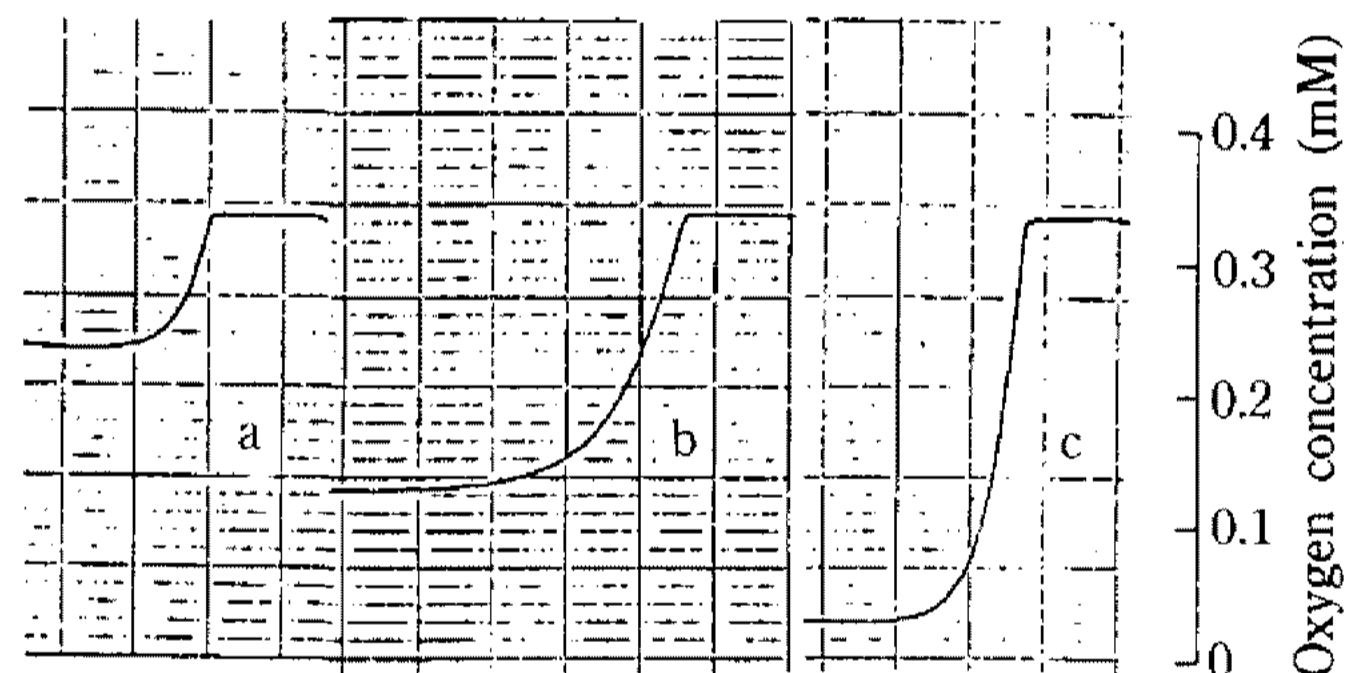


Fig. 3. Oxygen consumption by the nucleoside oxidase.
 a: 50 nmol, b: 100 nmol, c: 150 nmol

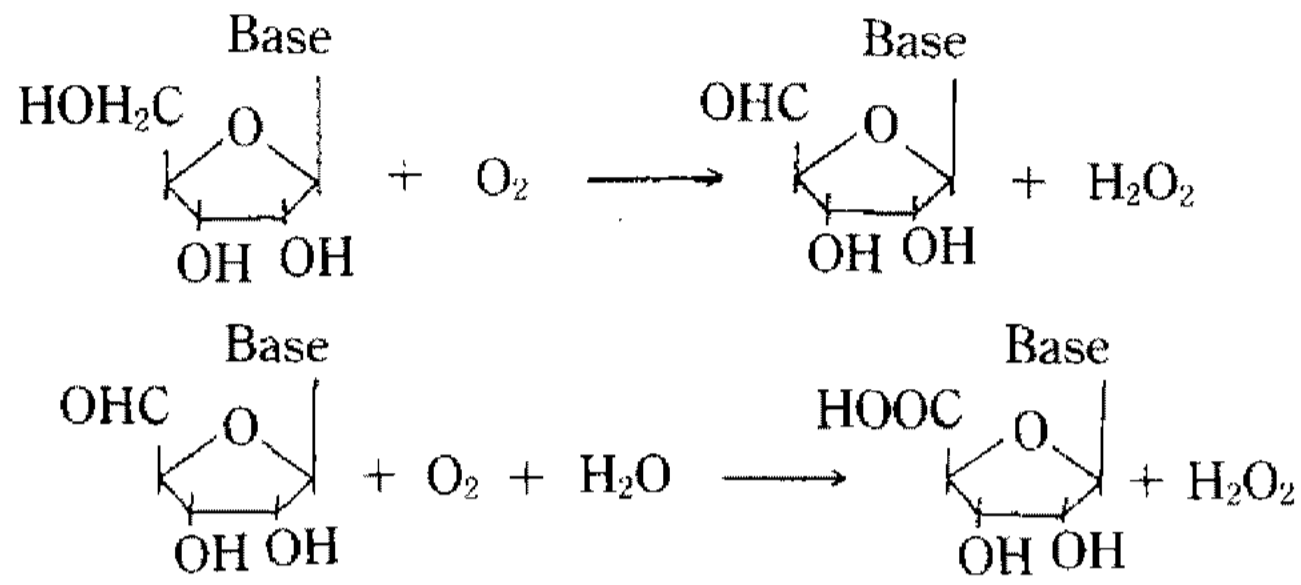
등이 보고한 *Pseudomonas maltophilia*의 nucleoside oxidase(8-14) 이외 choline을 betain aldehyde를 거쳐 betaine으로 산화시키는 choline oxidase(16) 등의 2 단계 반응과 thiamine을 aldehyde의 생성없이 thia mine acetic acid로 직접 산화시키는 thiamine oxi dase(17) 등의 1단계 반응이 보고되어 있다.

Nucleoside oxidase 반응시 흡수된 O_2 량과 생성된 H_2O_2 량

본 효소의 이용성에 앞서 산화 반응시 일어나는 O_2 의 소비와 H_2O_2 의 생성을 adenosine을 기질로 한 표준효소반응계에서 추적함으로써 본 효소의 반응기 구를 정량적으로 확립하고자 하였다. Fig. 3은 adeno sine을 50, 100, 150 nmol의 농도로 반응계에 첨가하

Table 5. Quantitative assay of nucleoside oxidase reaction with 50 nmol adenosine

Adenosine consumed (nmol)	O ₂ consumed (nmol)	Adenosine 5'-carboxylic acid formed(nmol)	H ₂ O ₂ formed (nmol)
50.0	95.4	48.0	102.0

**Fig. 4. Supposed chemical mechanism of nucleoside oxidase reaction.**

였을 때 흡수된 O₂의 양을 표시한 것으로 adenosine의 농도 50 nmol에서 95.4 nmol의 O₂가 흡수 소비되었으며 이 정량적인 관계는 adenosine의 농도에 비례적이었다. 생성된 H₂O₂의 양은 4-aminoantipyrine-phenol-peroxidase 반응계를 이용하여 작성한 0~200 nmol까지의 H₂O₂ 표준검량선으로부터 정량한 결과 adenosine을 함유한 nucleoside oxidase-peroxidase의 coupling 반응계에서 50 nmol의 adenosine 산화시 생성된 H₂O₂의 양은 102 nmol로 이 정량적인 관계 역시 일직선적으로 adenosine 농도에 상응하였다(Table 5).

이상의 결과들을 종합할 때 1 mol의 adenosine이 1 mol의 O₂를 소비하여 각각 1 mol의 adenosine 5'-aldehyde와 H₂O₂를 생성하고 중간산화물인 adenosine 5'-aldehyde 1 mol은 O₂와 H₂O 각 1 mol에 의해 산화되어 1 mol의 H₂O₂와 최종산화물인 adenosine 5'-carboxylic acid를 생성하는 것으로 추정되었다. 따라서 이들의 정량적인 결과로부터 nucleoside 산화시 H₂O₂를 생성하는 새로운 type의 본 nucleoside oxidase의 반응기구를 Fig. 4와 같이 확립할 수 있었다.

요 약

토양으로부터 nucleoside oxidase 생산균주를 분리하고 *Flavobacterium meningosepticum*으로 동정하였다. 생산균주의 cell free extract로부터 본 효소를

정제배율 180배, 수율 18%로 전기영동적으로 균일하게 정제하였으며 정제효소의 기질특이성을 검토한 결과 nucleoside만을 산화시키는 전형적인 nucleoside oxidase이었다. Adenosine을 기질로 한 표준효소반응계에서 stoichiometry를 검토한 결과 본 효소는 1 mol adenosine을 중간 생성물인 adenosine 5'-aldehyde로 산화 후 1 mol adenosine 5'-carboxylic acid까지 2단계로 산화시키면서 동시에 2 mol H₂O₂를 생성하는 새로운 type의 nucleoside oxidase로 확인되었다. 본 효소의 높은 기질 특이성과 H₂O₂를 생성하는 반응성은 nucleoside의 신속 간편한 효소학적 정량법 및 임상진단용 시약의 개발에 응용될 수 있음을 시사하였다.

참고문헌

1. Ellis, G., D.M. Goldberg, R.J. Spoomer and M.H. Sleisenger. 1978. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am. J. Clin. Path.* **70**: 248-258.
2. Kowlessor, O.D., L.J. Haeffer, E.M. Riley and M. H. Sleisenger. 1961. Comparative study of serum leucine aminopeptidase, 5'-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase in diseases affecting the pancreas, hepatobiliary tree and bone. *Am. J. Med.* **31**: 231-237.
3. Arkesteijn, C.L.M. 1976. A kinetic method for serum 5'-nucleotidase using stabilised glutamate dehydrogenase. *J. Clin. Chem. Biochem.* **14**: 155-158.
4. Belfield, A., G. Ellis and D.M. Goldberg. A specific colorimetric 5'-nucleotidase Assay utilizing the berthelot reaction. *Clin. Chem.* **16**: 396-401.
5. Bootsma, J., B.G. Wolthers and A. Groen. 1972. Determination of serum 5'-nucleotidase by means of a NADH-linked reaction. *Clin. Chem. Acta.* **41**: 219-222.
6. Heinz, F., R. Pilz and S. Reckel. 1980. A new spectrophotometric method for the determination of 5'-nucleotidase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **18**: 781-788.

7. Bergmeyer, H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2. pp. 871-873 2nd. ed. Academic Press, Inc., New York.
8. Isono, Y., M. Hoshino and T. Sudo. 1988. Some characteristics of a new enzyme, nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2135-2136.
9. Hoshino, Y., Y. Isono and T. Sudo. Production of a new enzyme, nucleoside oxidase, by *Pseudomonase maltophilia* LB-86. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 399-403
10. Isono, Y., T. Sudo and M. Hoshino. 1989. Production and reaction of a new enzyme, nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1663-1669.
11. Isono, Y., T. Sudo and M. Hoshino. 1989. Properties of a new enzyme, nucleoside oxidase, from *Pseudomonase maltophilia* LB-86. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1671-1677.
12. Isono, Y., H. Tsujimoto and M. Hoshino. 1989. A new kinetic method for Assaying serum 5'-nucleotidase using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2667-2671.
13. Isono, Y. 1990. A new colorimetric measurement of fish freshness using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2827-2832.
14. Wakabashi, H. 1989. *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 213-216.
15. Durr I.F. and H. Rudney. 1960. The reduction of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A to mevalonic acid. *J. Biol. Chem.* **235**: 2572-2578.
16. Zakrzewski S.F. and C.A. Nichol. 1960. Evidence for a single enzyme reducing folate and dihydrofolate. *J. Biol. Chem.* **235**: 2984-2988.
17. Tani, Y., N. Mori, K. Ogata and H. Yamada. 1979. Production and purification of choline oxidase from *Cylindrocarpus didymus* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 815-820.
18. Neal, R.A. 1970. Bacteria metabolism of thiamine. *J. Biol. Chem.* **245**: 2599-2604.

(Received December 5, 1992)