

微生物에 의한 核酸關連物質의 生産에 關한 研究 (第 2 報)

— *Brevibacterium* 屬 細菌變異株에 의한 5'-Inosinic acid  
및 關連物質의 蓄積 —

裴 武 · 李 啓 準

(韓國科學技術研究所 應用微生物研究室)

Studies on Production of Nucleic acid Derivatives by  
Microorganisms( II )

— Accumulation of 5'-Inosinic acid by adenineless Mutant  
of *Brevibacterium ammoniagenes*—

BAE, Moo and Kye Joon LEE

(Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology)

ABSTRACT

Three strains among 120 adenineless mutants of *Brevibacterium ammoniagenes* described in the previous paper were screened out to accumulate UV absorbing substances in the culture broth.

It was analyzed to be 5'-inosinic acid and hypoxanthine by means of two dimensional paper chromatography, UV absorption spectra and periodate oxidation.

5'-IMP was isolated from the culture broth of the mutant No. 203 with anion-exchange resin amberlite IRA-400 and recrystallized from ethanol. It was proved identical to authentic sample by Infra-red absorption spectrum.

The growth responses of the mutant No. 203 were demonstrated to require adenine, but not with adenosine and 5'-AMP.

緒 論

정미성 물질인 5'-inosinic acid (5'-IMP) 는 *de novo* 합성경로나 salvage 합성경로로서 배지중에 축적되는 것으로 알려지고 있다.

즉 *Micrococcus sodonensis*, *Arthrobacter citreus* 및 *Brevibacterium ammoniagenes* 는 salvage 합성경로로서 배지중에 첨가된 hypoxanthine 을 5'-IMP 로 전환시키는 능력이 있음을 Nara, T. (1967a, 1968) 등이 발표하였다.

한편 *Brevibacterium ammoniagenes* 및 *Micrococcus glutamicus* 의 adenine 요구변이주는

*de novo* 합성경로로서 5'-IMP 를 배지중에 축적함이 보고되었다. (Nara, T. 1967b, Nakayama)

저자들은 전보에서 보고한 *Brevibacterium ammoniagenes* adenine 요구변이주의 발효축적물을 분석해 본 결과 5'-nucleotide 가 현저히 축적하였으므로 이를 분리 및 정제하여 성질을 동정하였기에 그 결과를 보고하는 바이다

材料 및 方法

(1) 使用菌株

전보에서 보고한 바 같이 diethylsulfate 처

리 및 자외선조사로 얻은 120주의 *Brevibacterium ammoniagenes*의 adenine 요구변이주를 대사산물 조사에 사용하였다.

### (2) 培地의 組成

㉔ 種培養培地 : glucose 2%, peptone 1%, yeast ext. 1%, NaCl 0.25%, pH 7.3(멸균전)

㉕ 醱酵培地 : glucose 10%,  $K_2HPO_4$  1%,  $KH_2PO_4$  1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1%,  $CaCl_2$  0.01%,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  100 $\mu g/l$ , urea 0.6% (별도살균), yeast ext. 1%, biotin 30 $\mu g/l$ , pH 8.3(멸균전)

### (3) 培養方法

내경 18mm의 소시험관에 종배양액 2ml씩 넣고 adenine 요구변이주를 접종, 30°C에서 24시간 진탕배양하여 種菌으로 하였다. 내경 26 mm 시험관에 3 ml의 발효배지를 넣고 종배양액을 10%씩 접종하여 30°C의 진탕배양기 220 rpm에서 5~6일간 배양하였다.

### (4) 蓄積物의 分析方法

배양이 끝난액을 90~95°C의 열수에서 10분간 열처리하고 원심분리하여 균체를 제거

한 상등액을 측정물 분석의 시료로 사용하였다.

㉖ Thin layer chromatography; cellulose thin layer plate 위에 시료를 정량적으로 spot 하여 n-butanol; acetone; acetic acid; 5%  $NH_4OH$ ;  $H_2O(7:5:3:2:2)$ 로서 전개시키고 자외선 흡수부위를 찾았다.

㉗ paper chromatography; 자외선 흡수물질이 있음이 확인된 시료를 Wattman No.1. chromatography paper에 spot 한뒤 n-butanol; acetic acid :  $H_2O(2:1:1)$ 와 sat.  $(NH_4)_2SO_4$ ; 1M sodium acetate : isopropanol(80:20:2)의 용매로 2차원 전개하였다.

또한 spot-1을 paper chromatogram 상에서 표준품의 5'-IMP와의 Rf.치를 표 1의 전개재로서 비교하였다.

㉘ 紫外線 吸收曲線 : 나타난 각각의 spot를 절취하여 pH 6.0의 열수로 1시간동안 용출시켜 spectrophotometer로서 자외선 흡수곡선을 작성하였다. 5'-IMP에 해당하는 spot-1 용출액의 자외선 흡수곡선을 산성 중성 알칼리성에서 작성하여  $\lambda_{max}$ 를 보았다

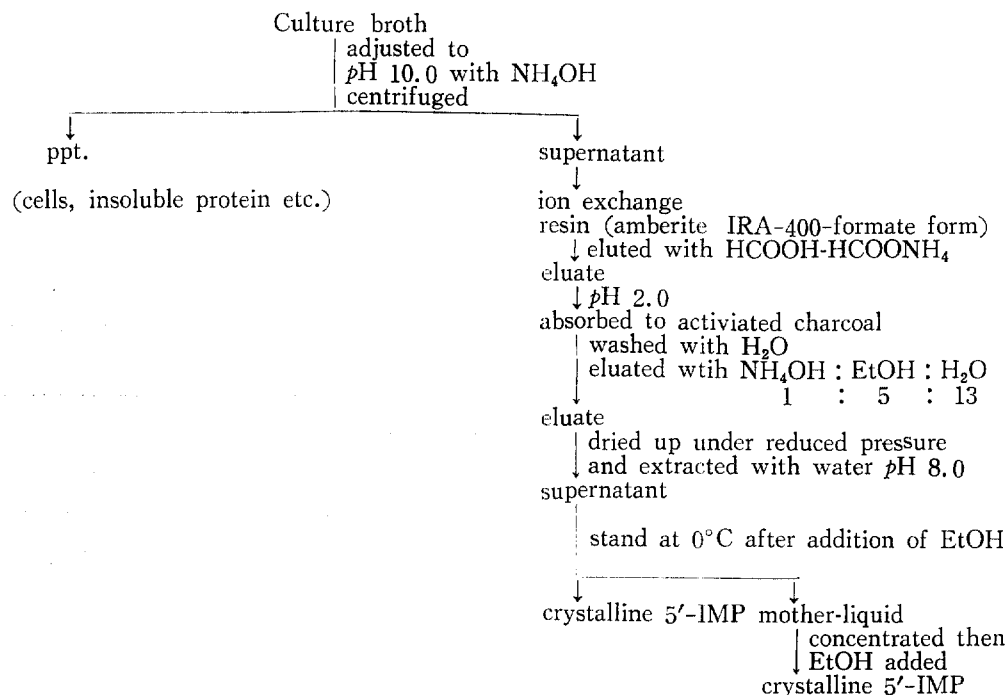


Fig. 1. Isolation procedure of 5'-IMP from the culture broth of *Br. ammoniagenes* adenineless mutant No.203

(Vischer, E.).

④ Periodate oxidation : 過尿酸酸法으로 spot-1 이 5'-nucleotide 인가를 확인하였다 (Buchanan).

(5) 畜積物の 單離 및 同定

Br. ammoniagenes No. 203의 배양액을 그림 1에 표시된 방법으로 이온교환수지와 활성탄을 사용하여 정제하고 재결정시켜 동정하였다. 이물질들을 표준품의 5'-IMP와 함께 분광 광도계로서 흡광곡선을 작성하여 비교하였다.

(6) 變異株의 成長反應典線

Adenine을 첨가한 nutrient의 사면배지에 보존된 변이주의 균체를 생리식염수에 현탁시키고 millipore filter 로시 집균 세척한 뒤 다시 생리식염수에 현탁시킨후 glucose 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.03%, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01%, biotin 30μg/l, casamino acid (vitamin free) 0.01%, urea 0.6% (별도살균), pH 7.3에 5'-AMP adenosine adenine을 0, 20, 40, 60, 80, 100μg/l 씩 각각 첨가된 배지에 접종하고 30°C에서 18시간 진탕배양시킨후 660 mμ에서 OD를 측정하여 균의 성장정도를 조사하였다.

(7) 試藥 및 器機

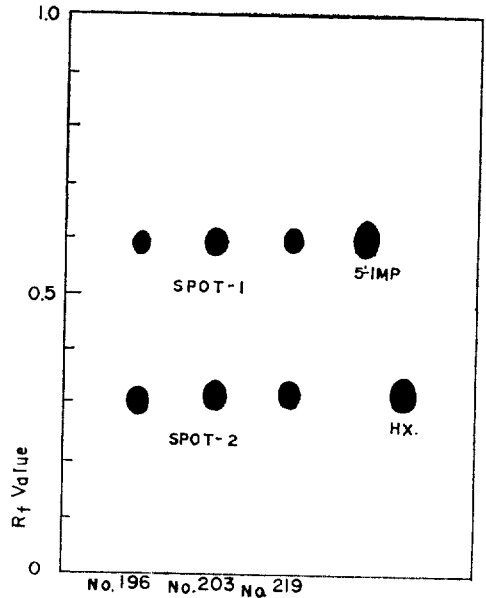
5'-inosinic acid, inosine, hypoxanthine; 이상 Kishida Chemical Co., cellulose powder; Merck Co., chromatographic paper; Wattman No. 1, anion exchanger; amberte IRA-400; 東京有機化學株式會社; 活性炭; 日本和光藥品株式會社, UV spectrophotometer; Beckmann D.B., I.R. spectrophotometer; Beckmann IR-12.

結果 및 考察

각 변이주의 배양액중 cellulose thin layer plate에 자외선 흡수물질들을 나타낸 것은 모균을 diethylsulfate로 처리하여 얻은 변이주중 Br. ammoniagenes No. 196, 203, 219 이었다.

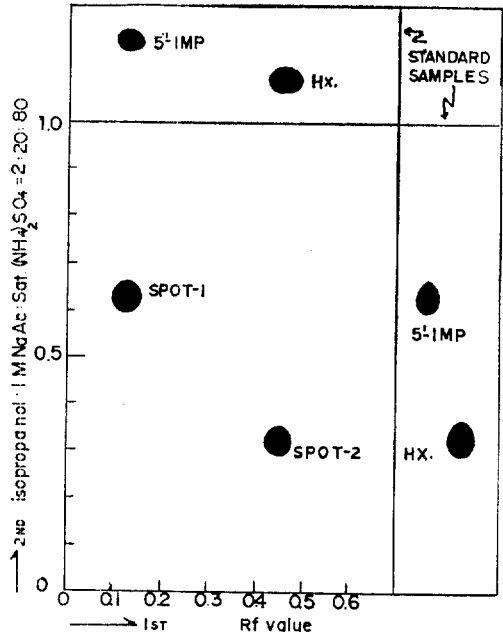
(1) 蓄積物の 分析

Br. ammoniagenes의 adenine 요구변이주



ISOPOPANOL:IM NaAc:Sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>= 2:20:80

Fig. 2. Paper chromatogram of UV absorbing substances produced by adenineless mutants of Br. ammoniagenes No. 196, 203 and 219.



n-BrOH:HAc:H<sub>2</sub>O = 2:1:1

Fig. 3. Two dimensional paper chromatogram of UV absorbing substances produced by adenineless mutant of Br. ammoniagenes No. 203.

(HX: Hypoxanthine)

No. 196, 203 및 203 배양액의 paper chromatography 결과는 그림 2와 그림 3과 같다 나타난 흡광물질 spot-1 과 spot-2 은 5'-IMP 와 hypoxanthine 의 표준품과 Rf. 치가 일치하였다. 그중 spot-1 은 포 1 의 여러 전개제에서도 Rf 치가 표준품의 5'-IMP 와 일치하

였다.

이 두 흡광물질을 용출시켜 작성한 자의 선 흡수곡선은 그림 4와 그림 5에서 나타나는 바와 같이 표준품과 일치하였다.

Buchanan 의 방법으로 spot-1 을 과요소산 산화반응 결과 청색으로 변하는 것으로 5'-

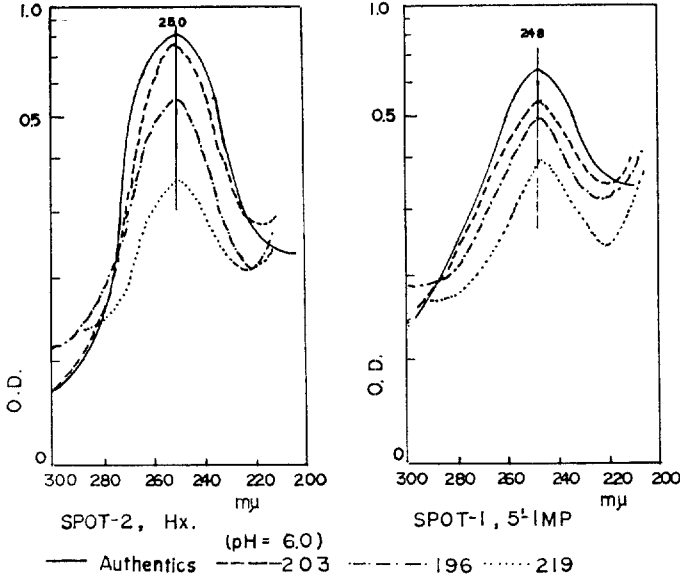


Fig. 4. UV absorption spectra of 5'-IMP and hypoxanthine (HX) produced by adenineless mutants of *Br. ammoniagenes* No. 196, 203, and 219.

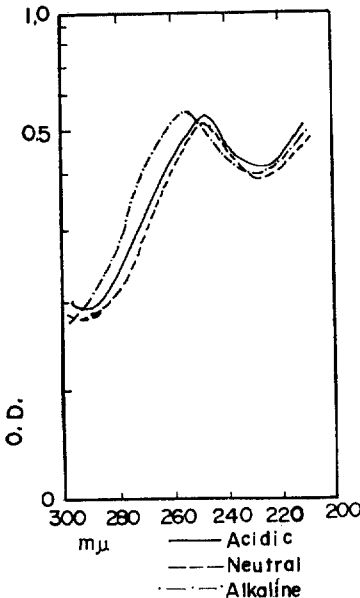


Fig. 5. UV absorption spectra of 5'-IMP produced by adenineless mutant No. 203

Table 1. Comparison of spot-1 with authentic 5'-IMP by paper chromatography

Solvent systems	Rf values	
	5'-IMP	Spot-1
Isobutyric acid : n-PrOH <sup>1</sup> : C-NH <sub>4</sub> OH (10 : 5 : 6)	0.16	0.16
Isobutyric acid : HAc <sup>2</sup> : 1N.NH <sub>4</sub> OH (10 : 1 : 5)	0.31	0.30
n-Propanol : 1N.HCl : H <sub>2</sub> O (65 : 17 : 18)	0.65	0.65
Formic acid : MeOH <sup>3</sup> : H <sub>2</sub> O (3 : 16 : 1)	0.66	0.65

- 1. PrOH : n-Propanol
- 2. HAc : Acetic acid
- 3. MeOH : Methanol

nucleotide임을 확인하였다.

이 변이주 중에서 No. 203을 발효배지에서 5일간 호기배양한 액을 paper chromatogram으로 분리 열수로 용출 정량한 결과 IMP의 측정량은 4.5 mg/ml이었다. 화학반응 결과 청색으로 변하는 것으로 5'-nucleotide임을

확인하였다.

(2) 蓄積物의 分離 및 同定

Paper chromatography 로서 5'-IMP 및 hy-

No. 196, No. 203, No. 219는 5'-IMP 축적하  
고 있음이 밝혀졌다.

이들 변이주가 5'-IMP 와 Hypoxanthine

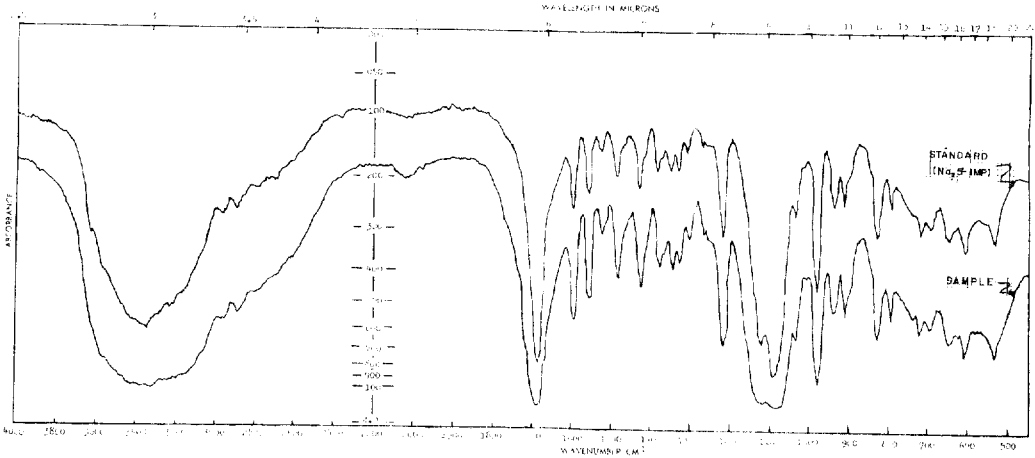


Fig. 6. IR Absorption Spectra of Crystalline 5'-IMP Isolated from Fermentation Beer of *Br. ammoniagenes* Adenineless mutant No. 203.

poxanthine 과 동일시 되는 물질이 함유한 배양액을 pH=10.0에서 amberite IRA-400의 formate 형에 흡착시킨 뒤 260m $\mu$ 에서 흡광이 없을때 까지 증류수(pH 7.0)로 세척하고 6N HCOOH-1M HCOONH<sub>4</sub> (pH 2.0)의 완충용액으로 용출시켜 250 m $\mu$ 에서 자외선 흡수 용출곡선을 그려 용출을 확인하였다. 증류수로 세척할때 hypoxanthine, 殘糖 등의 물질이 제거된다(Cohn).

용출곡선에서 용출된 물질이 단일한 것을 확인한후 pH 2.0에서 활탄에 흡착시키고 증류수로 세척 과량의 HCOOH와 HCOONH<sub>4</sub>를 제거시키고 ethanol : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O(1 : 5 : 13)의 용액으로 용출하여 IMP의 ammonium 염으로 용출시켰다. 감압농축 건조시켜 ammonia를 제거하고 NaOH로 조정한 pH 8.0의 증류수로서 용해시켜 상등액을 적당량의 ethanol을 가하고 냉소에 정치시켜 5'-IMP의 sodium salt를 결정상으로 석출시켰다.

얻은 결정을 KBr wafer 형으로 적외선 흡수곡선을 작성하여 표준품의 5'-IMP와 일치함을 확인하였다(그림 6).

이상의 결과로 분리한 결정은 5'-IMP임이 동정되었고 이균의 adenine 요구변이주

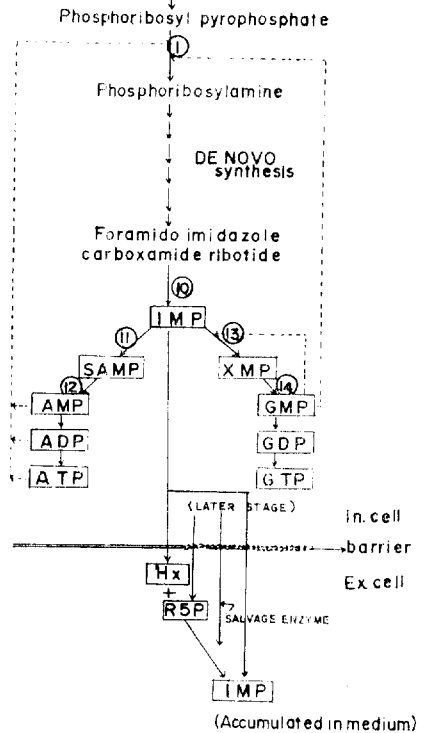


Fig. 7. Regulation scheme of purine nucleotides by *Brevibacterium ammoniagenes*.

(Nara, T. 1969., Demain 1965)

dotted line; feedback inhibition

In cell; intracellular

Ex cell; extracellular

R5P; Ribose-5-P

을 축적하는 이유는 다음과 같이 생각된다.

즉 핵산관련물질 생합성경로(그림 7참조)에서 AMP, ADP, ATP 및 GMP는 최초 1단계의 phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase에 feed back inhibition 작용이 있고 GMP는 또한 단계 13의 IMP-dehydrogenase에 feed back inhibition 작용이 있다 (Demain 1965). 정상적인 균에서는 이러한 여러가지의 feed back inhibition과 repression에 의해서 서로가 조화있게 진행되며 억제되고 있으나 변이체에 의해서 단계 11, 12의 SAMP-synthetase나 adenylosuccinase의 역할이 저지된 변이주는 그 성장을 위해 adenine을 요구하여 극히 소량의 adenine이 존재할 때는 성장하여 IMP를 생성시킨다. 그러나 IMP는 SAMP를 거쳐 AMP로 전환되지 못하고 또한 XMP로 전환되는 것도 단계 13에서 GMP에 의해 feedback inhibition되므로 (Mager, et al) IMP는 축적하게된다.

또한 소량의 adenine에 의해서 생성된 AMP도 그 양이 적으므로 AMP에 의한 단계 1에의 feed back inhibition도 감소되므로 생합성경로는 IMP 단계에까지 계속 진행되어 IMP의 축적량은 증가하게된다.

이렇게 세포내에 축적된 IMP는 배양초기에서는 분해되어 hypoxanthine으로 분비되어 축적되었다가 다시 salvage 합성경로로서 IMP로 전환되며 배양후기에 *de novo*로 합성된 IMP는 그대로 분비되어 배지중에 축적된다(Akira, F.).

즉 *Brevibacterium ammoniagenes*는 hypoxanthine을 IMP로 전환시키는 능력이 있으며 (Nara, T. 1967b), adenine 요구변이주의 배양에서 최초로 hypoxanthine만이 축적되었다가 후기에서 hypoxanthine의 양은 현격히 감소되는 동시에 IMP의 축적량은 급히 증가한다. 이것은 배양후기에 cell autolysis와 세포벽의 투과력에 이상이 생겨 IMP가 직

접분비되며 또한 ribose-5-P와 salvage enzyme이 분비되어 hypoxanthine을 IMP로 전환시키는 것으로 생각된다.

### (3) 變異株의 成長反應曲線

취득한 변이주 No. 203의 adenine 유도체에 대한 성장반응곡선은 그림 8과 같다.

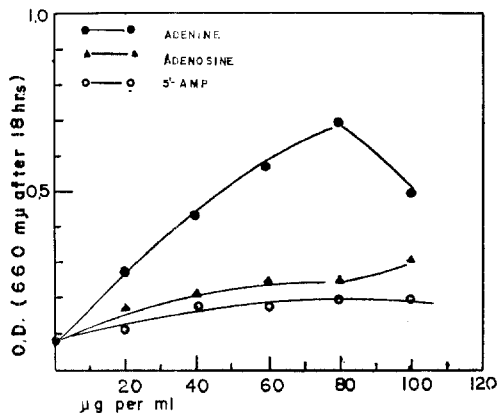


Fig. 8. Growth response of *Br. ammoniagenes* No. 203 to Adenine Derivatives  
Medium: glucose 2%,  $K_2HPO_4$  0.05%,  $KH_2PO_4$  0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03%, Urea 0.6%, (autoclaved separately)  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%, biotin 30μg/l, casamino acid 0.001%, pH 7.3.  
Incubated at 30°C for 18 hrs.

adenine에 의해서만 성장이 촉진되었다. 이것은 *Micrococcus glutamicus*의 adenine 요구변이주와 유사하나 *Bacillus subtilis*의 adenine 요구주와는 다르다(Nakayama, K)(Nara, T).

이런 현상은 세균의 세포벽투과력의 차이에 기인하기도 하며 또한 이때 작용하는 효소의 차이에 의해서 나타나는 것으로 생각된다. 즉 5'-AMP나 adenosine을 adenine으로 분해시키는 역할이 있는 효소가 *Br. ammoniagenes*나 *Micrococcus glutamicus*에는 없는 것으로 추측된다.

이상의 보고에서는 축적산물의 분리 및 동정을 취급하였으며 5'-IMP의 축적량을 증가시키는 방법과 그 결과에 대해서는 다음에 보고하기로 한다.

## 摘 要

*Brevibacterium ammoniagenes*에서 분리한 120주의 adenine 요구변이주 중에서 No. 196, 203, 219가 자외선 흡수물질을 배양액에 축적시키고 있음을 확인하였으며 이 축적물은 paper chromatography, 과산화산 산화반응 및 자외선흡수곡선 등으로 5'-IMP와 hypoxanthine임을 동정하였다.

또한 배양액에서 산물을 분리 정제하기 위하여 Ion 교환수지를 이용 배양액으로부터 축적물을 분리하는 방법을 확립하였으며 5'-IMP를 결정시켜 얻었으며 이것의 IR absorption spectrum은 표준품과 완전히 일치하였다.

변이주 No. 203의 성장은 adenine에 의해서 촉진되나 adenosine 및 5'-AMP에 의해서는 촉진되지 않았다.

아울러 이 연구의 결과에 관한 세균의 생합성경로에 대해서 고찰하였다.

## 引 用 文 獻

1. Akira, F., S. Abe and S. Kinoshita 1969. Production of nucleic acid related substances by fermentative Processes, *Amino Acid and Nucleic-acid*. **20**, 100.
2. Buchanan, J.G., C.A. Dekker and A.G. Long, 1950. Detection of glycosides and nonreducing carbohydrate derivatives in paper partition chromatography. *J. Chem. Soc.* 3162.
3. Cohn, W.E., 1950. The anion-exchange separation of ribonucleotides. *J.A.C.S.* **72**, 1471.
4. Demain, A.L., M. Jackson, R.A. Vitali, D. Hendlin and T.A. Jacob, 1965. Production of xanthosine-5'-monophosphate and inosine-5'-monophosphate by auxotrophic mutants of a *Coryneform bacterium*. *Appl. Microbiol.* **13**, 575.
5. Demain, A.L., M. Jackson, R.A. Vitali, D. Hendlin and T.A. Jacob, 1966. Production of guanoine-5'-monophosphate and inosine-5'-monophosphate by fermentation. *ibid* **14**, 821.
6. Mager, J. and B. Magasanik, 1960. Guanosine 5'-phosphate reductase and its role in the interconversion of purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **235**, 1474. 7.
7. Misawa, M., T. Nara, K. Udagawa, S. Abe and S. Kinoshita, 1964. Production of nucleic acid related substances by fermentative processes. *Agr. Biol. Chem.* **28**, 694.
8. Nakayama, K., T. Suzuki, Z. Sato and S. Kinoshita, 1964. Accumulation of inosinic acid by an adenine auxotroph of *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**, 133.
9. Nara, T., M. Misawa, T. Komura and S. Kinoshita, 1967a. Accumulation of Inosinic acid by *Micrococcus sodonensis* and *Arthrobacter citreus*. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 1224.
10. Nara, T., M. Misawa, T. Komura and S. Kinoshita, 1967b. Fermentative production of 5'-Inosinic acid by an adenine auxotroph of *Brevibacterium ammoniagenes*. *ibid.* **31**, 1351.
11. Nara, T., M. Misawa and S. Kinoshita 1968. Fermentative production of 5'-purine ribonucleotides by *Brevibacterium ammoniagenes*. *ibid.* **32**, 561.

12. Nara, T., T. Komuro, M. Misawa and S. Kinoshita 1969. Regulation of purine ribonucleotide synthesis by *Brevibacterium ammoniagenes*. *ibid* 33, 739.
13. Vischer, E. and E. Chagaff, 1948. The separation and characterization of purines in minute amounts of nucleic acid hydrolyzates. *J. Biol. Chem.* 176, 703.