

核酸分解酵素에 관한 研究

(第 1 報) *Streptomyces*屬 菌株가 生産하는 Phosphomono, diesterase

李政治 · 張孝一 · 金赫一 · 梁漢喆

高麗大學校 農科大學 食品工學科

(1978년 9월 20일 수리)

Studies on the Nuclease

(Part 1) Phosphodiesterase and Phosphomonoesterase
Producing by *Streptomyces* sp.

J. C. Lee · H. I. Chang · H. I. Kim · H. C. Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University

(Received September 20, 1978)

Abstract

This paper deals with investigation on the various effects of phosphodiesterase production of *Streptomyces* sp. and several properties of the enzyme. The results were as follows.

1) As a carbon source, sucrose was most effective PDase production when it was added to the basal medium at 3% concentration.

2) These enzymes were remarkably activated by Ca^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} but inhibited by Cu^{2+} .

It was observed that concentration of metal ions, 0.1% of Ca^{2+} , 0.01% of Co^{2+} and 0.04% of Mn^{2+} were effective on the production of phosphodiesterase and phosphomonoesterase.

3) In case of the effect of aeration volume, 25 ml was very effective, that is, the more sufficient aeration, the better enzyme activity. Enzyme activity was to be found effective at 3% of inoculation volume, and comparatively more effective at 2%, 4% of inoculation volume.

4) Initial pH was 8. The enzyme activity reached to the maximum at 48 hours of cultivation time.

5) The optimum pH of phosphodiesterase was about 8 and that of phosphomonoesterase was about 9. The optimum temperature of phosphodiesterase and phosphomonoesterase was 60°C and 50°C respectively.

서 론

미생물이 생산하는 5'-phosphodiesterase (PDase)에 관하여는 *Penicillium citrinum*⁽¹⁾, *Asterococcus*

mycoides,⁽²⁾ *Azotobacter agile*,⁽³⁾ *Clostridium*⁽⁴⁾ 등을 비롯하여 많은 종류의 사상균, 방선균 및 세균류⁽⁵⁾ 등에 그 존재가 지적되어져 있다. 著者들은 주로 放線菌이 生産하는 PDase의 산업에의 이용 가치를 향상 시키기 위하여 화학적 수식 및 고정화에

대하여 검토하고자 그 일단제로 *Streptomyces* sp.가 생산하는 PDase의 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하던 중 효소 생산 조건에서 몇 가지 지견을 얻었으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주

저자들이 분리한 核酸分解酵素生産能이 있는 *Streptomyces* sp.를 사용하였다.

2. 배양방법

500 ml Sakaguchi flask에 배지 50 ml를 주입하여 상법에 의하여 살균 접종하여 30°C에서 왕복진탕기 (150 strokes/min, 진폭 7 cm)를 사용하여 진탕배양하였다.

3. 효소액의 조제

각 배지에서 일정 시간 배양한 배양액을 냉동원심분리기 (Beckmann Model J-21C)에서 원심분리 (7000 G×10 min)하여 그 상등액을 효소액으로 사용하였다.

4. 효소활성측정법

(1) Nuclease의 측정 國中⁽⁶⁾등의 방법에 준하여 RNA (15 mg/ml) 0.3 ml, veronal 완충액 (pH 5.3) 0.7 ml, 효소액 1.0 ml 시험관에 취하여 잘 혼합하여 37°C 균온조에서 30분간 반응시킨 후 ranyl 시약 (0.25% uranium acetate in 2.5% perchloric acid)⁽⁷⁾ 2 ml를 가하여 얼음조에서 5분간 냉각시킨 후 원심분리 (4000 G×10 min)하여 얻은 상등액의 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 흡광도를 효소의 역가로 하였다.

(2) Phosphomonoesterase (PMase)의 측정 Bessey⁽⁸⁾등의 방법을 변형한 杉本⁽⁹⁾등의 방법에 준하여 *p*-nitrophenylphosphate (2 mg/ml) 1.0 ml, 0.1M veronal 완충액 (pH 9.6) 0.9 ml, 2.5 mM CaCl₂ 용액 0.5 ml, 효소액 (적당희석) 0.1 ml를 시험관에 취하여 잘 혼합하여 37°C 항온조에서 15분간 반응시킨 후 즉시 냉각시켜 이 반응액에 0.3N NaOH 2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 60분 이내에 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 맹검치 (盲檢値)로 이상의 효소반응액 조성에서 효소액을 제거하여 동일 조건에서 반응시킨 후 0.3N NaOH를 가한 후 효소액 0.1 ml를 가하여 흡광도

를 측정하여 두 흡광도의 차이에 10을 곱하여 ml 당 역가로 하였다.

(3) PDase의 측정 杉本⁽⁹⁾등의 방법을 변형하여 Ca-bis-*p*-nitrophenyl phosphate (2 mg/ml) 1.0 ml, 0.1M Tris 완충액 (pH 8.0) 0.9 ml, 2.5 mM CaCl₂ 용액 0.5 ml 효소액 (적당 희석) 0.5 ml를 시험관에 취하여 PMase의 경우와 동일하게 시험조작을 하여 그 흡광도에 2를 곱해서 ml당 효소 역가로 하였다.

실험결과 및 고찰

1. 각종 배지에서 nuclease의 생산

방선균의 RNA 분해효소 생성능이 좋은 10가지 배지 (Table 1)에 *Streptomyces* sp.를 접종, 배양하여 24시간, 30시간, 72시간, 96시간에 nuclease의

Table 1. Production of Nuclease in the Various Media.

Medium No.	Enzyme Activity			
	24	30	72	96 hr.
1	1.12	2.77	3.87	1.62
2	0.60	2.70	3.17	4.17
3	1.62	3.75	3.52	1.45
4	2.67	0.35	0.47	0.62
5	0.17	0.20	0.47	0.32
6	0.69	0.40	4.05	0.22
7	0.44	0.30	2.37	1.77
8	1.72	8.07	7.45	2.95
9	0.57	6.05	5.74	2.19
10	1.05	9.02	22.20	29.51

Reaction mixture consists of 0.7 ml of Veronal buffer (pH 5.3), 0.3 ml of RNA (15 mg/ml), 1 ml of enzyme solution.

Streptomyces sp was inoculated in 50 ml of various media in 500 ml shaking flask and cultivated at 30°C on a reciprocal shaker (150 strokes per minute) for each hour. The measurement of enzyme activity is as described under materials and methods.

생산을 조사한 결과는 Table 2에서 보는바와 같이 soluble starch 3.0%, soybean meal 2.0%, C. S. L. 1.0%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, soybean oil 0.005%, CaCl₂ 0.5%의 조성을 가진 10

Table 2. Composition of Various Media.

1)		2)	
Pressed baker's yeast	5%	Glucose	1%
KH ₂ PO ₄	0.2%	Peptone	0.2%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	Beef extract	0.1%
Glucose	0.5%	Yeast extract	0.1%
pH	6.5	pH	7.2
3)		4)	
Glucose	1%	Glucose	1%
MSG	1%	Asparagine	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.05%	K ₂ HPO ₄	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%	Peptone	0.5%
Yeast extract	0.1%	pH	7.4%
pH	7.0		
5)		6)	
Soluble starch	.0%	Defatted soybean	2.0%
Peptone	1.0%	Soluble starch	2.0%
Beef extract	1.0%	Dried yeast	0.5%
Yeast extract	0.2%	KH ₂ PO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
NaCl	0.5%	pH	7.2%
pH	7.0		
7)		8)	
Glucose	1.0%	Glucose	1.0%
Polypeptone	0.5%	Polypeptone	0.5%
Beef extract	0.5%	CSL	1.5%
NaCl	0.5%	NaCl	0.5%
pH	7.0	pH	7.0
9)		10)	
Dried baker's yeast	1.0%	Soluble starch	3.0%
Soluble starch	2.0%	Solybean meal	2.0%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%	CSL	1.0%
KH ₂ PO ₄	0.5%	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1%
CSL	0.5%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
pH	7.5	Soybean oil	0.005%
		CaCO ₃	0.5%
		pH	7.0

번 배지가 다른 배지에 비하여 nuclease를 월등히 많이 생산하였으며 10번 이외에도 CSL이 함유된 배지가 비교적 높은 nuclease 활성을 나타내 주고 있는데 이러한 결과는 이 균이 nuclease를 생산하는데 CSL이 효과가 있는것으로 생각된다.

2. 생산된 Nuclease중 PDase의 확인

RNA 100 mg을 0.5M Tris 완충액 (pH 8.8) 100 ml에 용해시켜 여기에 효소액 100 ml를 가한 후 잘 혼합하여 37°C에서 5시간 가수분해 시킨 후 100°C

에서 5분간 가열하여 효소반응을 정지시키고 원심분리 (4000 G×10 min)하여 그 상등액을 환성탄 column (200 mm×490 mm)에 흡착시킨 후 증류수 400 ml로 세척하고 1.4% NH₄OH가 함유된 50% ethyl alcohol 용액으로 유출시켜 그 유출 초액 150 ml는 버리고 다음 유출액 200 ml를 37°C에서 감압 (2 mmHg) 농축하여 10 ml로 만든 후 전개용매로 *n*-butanol : acetone : acetic acid : 5% NH₄OH : water (35 : 25 : 15 : 15 : 10)을 사용한 TLC (Silica gel GF 254)에 하여 5'-nucleotide를 확인한 결과는

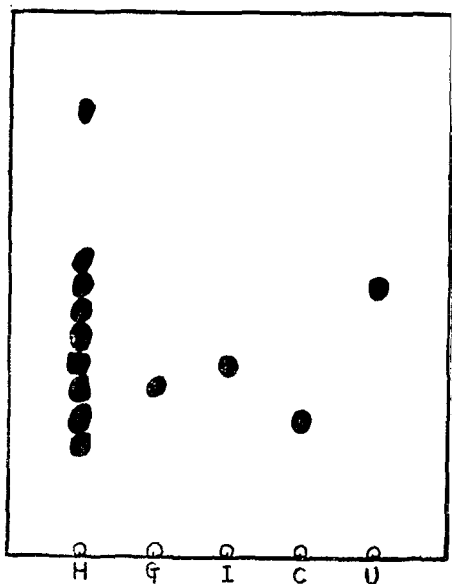


Fig. 1. Thin layer Chromatogram of Hydrolyzate of RNA by Nuclease Produced from *Streptomyces* sp.

(H) : hydrolyzate of RNA, (G) : 5'-GMP
(I) : 5'-IMP, (C) : 5'-CMP, (V) : 5'-UMP. The hydrolysis was carried out in Tris buffer pH 8.8 at 30°C

Layer: Silica gel GF 254

Solvent: *n*-butanol:acetone:acetic acid:5%
NH₄OH:water (35:25:15:15:10)

Spot was identified by UV lamp

Fig. 1과 같다. 이 때 대조 표준품으로 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-CMP, 5'-UMP 등을 사용하였는데 가수분해물중 같은 Rf치를 나타내주는 반점이 4개 모두 나타났으며 이 이외의 반점도 다수 나타나 있으나 무슨 물질인가는 더 이상 확인하지 않았다.

3. 탄소원의 영향

10번 배지조성에서 soluble starch를 제거시키고 여러가지 당을 3% 첨가하여 PMase 및 PDase의 생산을 검토한 결과 Table 3에서 보여주는 바와같이 PMase는 30시간 배양에서는 sorbitol과 sucrose가, 96시간 배양에서는 dextrin과 sucrose가 가장 좋은 효과를 나타냈으며 PDase의 경우는 30시간, 96시간 모두 sucrose가 가장 좋은 효과를 나타내주었다. 또 sucrose의 농도별 효과를 검토한 결과는

Table 3. Effect of Various Carbohydrates on Production of PMase and PDase.

Carbohydrate	Enzyme Activity			
	Enzyme		PMase	PDase
	30	96	30	96hr.
Soluble starch	1.53	25.11	3.75	24.56
Glucose	9.56	23.40	5.47	57.60
Maltose	0.11	2.82	0.24	12.51
Lactose	4.04	16.87	1.77	34.50
Sucrose	10.00	27.93	39.56	74.82
Fructose	0.01	11.50	0.58	47.75
Galactose	0.34	26.42	0.37	35.61
Raffinose	0.57	2.11	0.66	6.47
Dextrin	2.45	32.80	0.63	31.98
Xylose	—	5.33	0.23	8.15
Inulin	0.63	12.66	—	22.34
Sorbitol	14.58	5.07	22.04	6.33
Mannitol	0.23	4.34	0.01	8.21
Inositol	0.25	14.26	0.06	13.92

The basal medium was added with 3% of each carbohydrate and the strain was incubated at 30°C on a reciprocal shaker for 30 and 96 hrs.

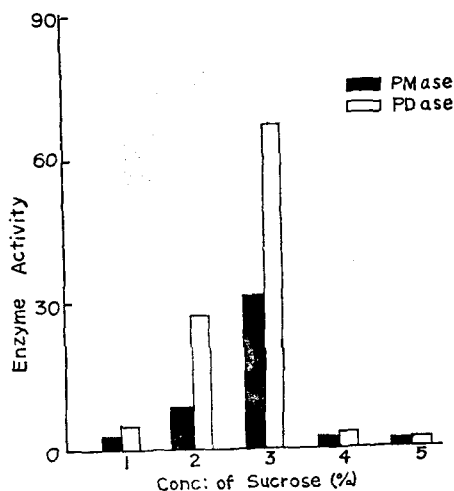


Fig. 2. Effect of Concentration of Sucrose on Production of PMase and PDase.

Reaction mixture for PMase consists of 1.0 ml of PNPP; 0.9 ml of M/10 veronal buffer (pH 9.6), 0.5 ml of 2.5×10^{-3} M-CaCl₂, 0.1 ml of enzyme solution and that for PDase consists of 1.0 ml Ca-pNPP, 0.9 ml of M/10 tris buffer (pH 8.0) 0.5 ml, 2.5×10^{-3} M CaCl₂ 0.5 ml of enzyme solution.

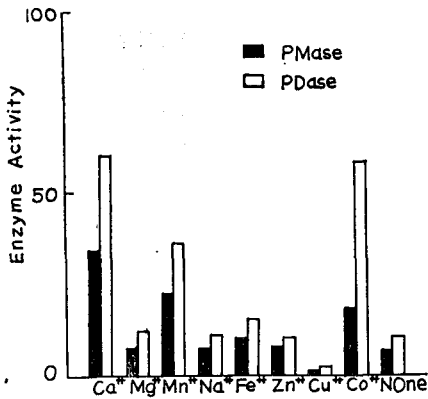


Fig. 3. Effect of Various Metal Ions on Production of PMase and PDase.

Concentration of each metal ion in the medium.

Ca²⁺ ; 5×10⁻¹. Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Fe²⁺ ; 5×10⁻² Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ; 5×10⁻³.

Incubation conditions as for Fig. 9.

Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 sucrose 3%를 함유하는 배지에서 월등히 좋은 결과를 나타냈으며 48시간 배양할 때 제일 높은 역가를 나타내 주었다. 이것은 杉本⁽¹⁰⁾등이 soluble starch를 함유하는 배지에서의 *Streptomyces* sp No. 41의 실험 결과보다 우수한 PDase의 역가를 나타내 주었으며 최대 생산을 나타내는 배양시간도 96시간의 반인 48시간에 서였다.

4. 금속이온의 영향

10번 배지에서 soluble starch를 sucrose로 바꾼 배지조성에 여러 종류의 금속염을 첨가하여 각종 금속이온의 효과를 검토한 결과 (Fig. 3), Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺는 효소생산을 촉진 시키는 작용을 하였으며 Mg²⁺, Na⁺, Fe²⁺, Zn²⁺등은 거의 영향을 주지 않았고, Cu²⁺는 효소생산에 저해를 나타냈다 효소활성을 높이는 Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺등의 농도별 효과를 검토한 결과 (Fig. 4)는 Ca²⁺는 0.6% Mn²⁺는 0.04%, Co²⁺는 0.01%에서 효소의 활성을 최대한 높혀 주었다 杉本⁽¹¹⁾등의 실험 결과에서는 Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺ 등의 효소 역가를 상승시켜 주었으나 본 실험에서는 Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺등이 효과를 나타내 주어 Ca²⁺의 경우만 일치 되었다.

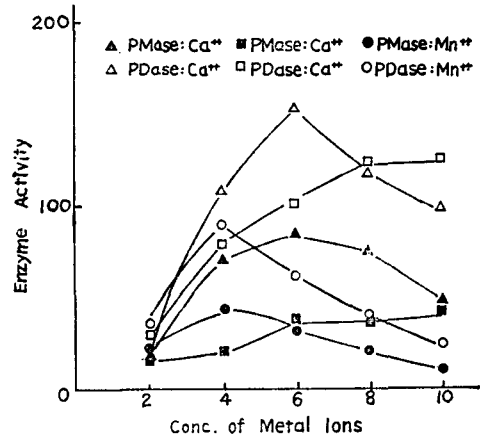


Fig. 4. Effect of Concentration of Ca²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ on the Production of PMase and PDase. Concentration of effective metal ions in the medium:

Ca²⁺ : 0.1% as CaCO₃

Mn²⁺ : 0.01% as MnSO₄

Co²⁺ : 0.001% as CoCl₂

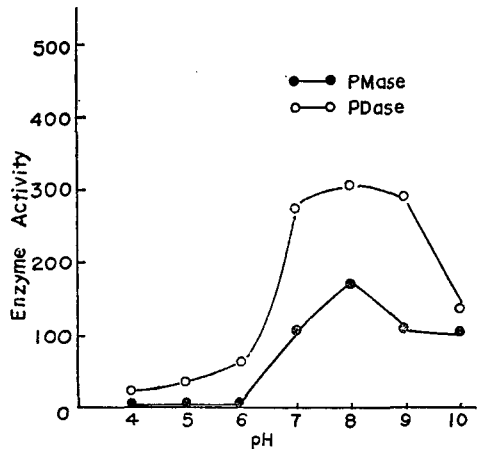


Fig. 5. Effect of Initial pH on Production of PMase and PDase.

Buffer solutions used were veronal buffer for PMase and tris buffer for PDase.

5. PMase 및 PDase 생산에 있어 초기 pH의 영향

PMase 및 PDase의 生産에 있어 培地의 초기 pH를 검토한 결과 Fig. 5와 같았다. PMase는 pH 8에서 PDase는 pH 7~9의 비교적 넓은 pH 범위내에서 좋은 결과를 나타내 주었다. 이상과 같은 실험 결과로 미루어 sucrose 3%, soybean meal 2%, CSL

0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, CaCO_3 0.6%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, soy bean oil 0.05%의 조성을 가지고 pH 8로 조정된 배지가 우수한 PDase를 생산함을 알았다.

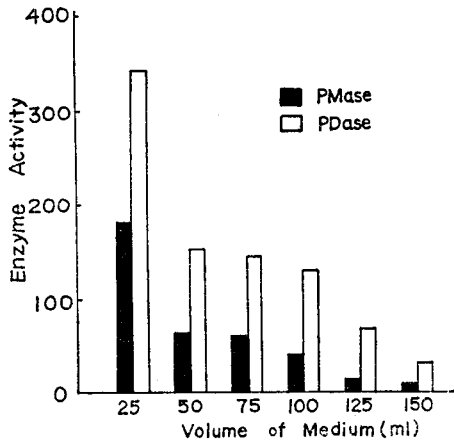


Fig. 6. Effect of Aeration on Production of PMase and PDase.

Medium: Sucross 3.0%, soybean meal 2.0% C. S. L. 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, CaCO_3 0.6%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, soybean oil 0.005%, pH 8

The strain was in each volume of medium in 150 ml flask and cultivated at 30°C on reciprocal shaker for 4 days.

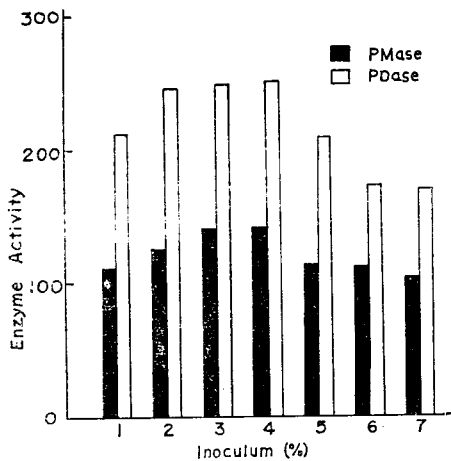


Fig. 7. Effect of Inoculum Volume on Production of PMase and PDase.

Medium and incubation conditions except inoculum as for Fig. 5.

6. 통기량 및 菌接種량의 영향

이상의 결과로 결정된 우수배지를 이용하여 통기량 및 균 접종량의 영향을 검토한 결과 Fig. 6, Fig. 7에서 보여주는 바와같이 통기량이 많을 수록 좋은 결과를 나타내주었으며 접종량은 배지량의 2~4%를 접종할 때 양호한 효소역가를 나타내주었다.

7. 효소생산의 경시적 변화

배양의 경과시간에 따른 PMase 및 PDase의 생산

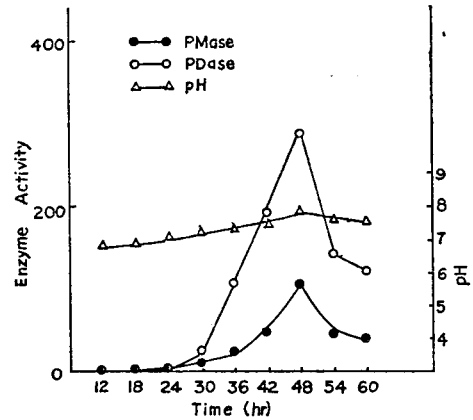


Fig. 8. Time Course of Production of PMase and PDase.

Medium and incubation conditions except incubation time as for Fig. 5.

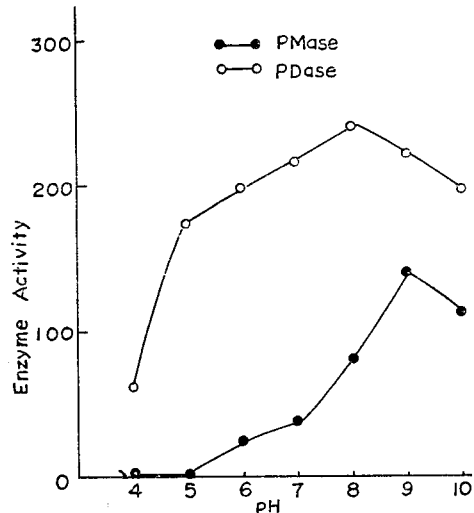


Fig. 9. pH Profile of PMase and PDase.

The Buffer solution used was veronal sodium acetate buffer.

The enzyme solution was incubated at 37°C for 30 minutes on a water bath.

을 검토한 결과 두 효소 모두 48시간 배양에서 최대역가를 나타내주었다(Fig. 8) 이것은 岩淺⁽¹²⁾ 등이 실험한 결과인 30시간보다는 긴 시간이었으나 杉本⁽¹⁰⁾ 등의 96시간에 비교하면 매우 단시간에 최대생산을 나타내 주는 것이다.

8. 生産된 PMase 및 PDase의 작용최적 pH 및 温度

生産된 PMase의 작용최적 pH는 pH 9 부근에서였으며 PDase의 최적작용 pH는 pH 8부근에서였다(Fig. 9). 또한 이들 효소의 작용최적온도는 PMase는 50°C 부근, PDase는 60°C부근 이었다(Fig. 10). 杉本⁽¹³⁾ 등이 生産한 PDase의 작용최적온도는 43°C이었으므로 이보다 높은 작용최적온도를 나타낸다는 것은 산업에 이용할 수 있는 좋은 점으로 사료되

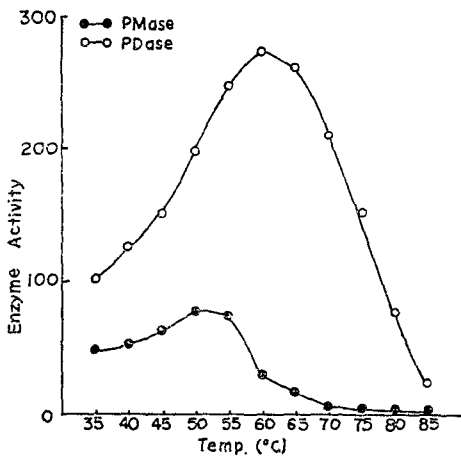


Fig. 10. Optimum Temperature of Reaction of PMase and PDase.

The buffer solution used was veronal-sodium acetate buffer (PMase; 8, PDase; 9). The enzyme solution was incubated at each temperature for 30 minutes in water bath.

며, 특히 PMase와 PDase의 작용최적온도가 10°C 가량 차이를 나타내준은 더 용이하게 산업에 이용될 수 있는 가치가 있다고 생각된다.

요 약

PDase의 생산하는 데에 탄소원으로 sucrose 3% 금속이온으로는 Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} 이온등이 좋은 효과를 나타내 주었고 통기는 많을 수록 좋았으며 초기 pH 8의 배지에서 48시간 배양할 때 가장 좋은 결과를 나타내 주었다. 이렇게 하여 生産된 PDase는 pH 8 부근에서 작용온도 60°C일 때 최대 효소 활성을 나타냈다.

참고문헌

- 1) Kuninaka, A., S. Otsuka, Y. Kobayashi, K. Sakaguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, **23**, 239 (1959).
- 2) Plakett, P.: *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 664 (1957).
- 3) Stevens, A., R. J. Hilmoe: *Federation. Proceedings*, **19**, 332 (1959).
- 4) 杉森恒武, 塚田陽二, 北代次郎, 片桐英郎: 日農化會大會 Symposium 講演要旨, p. 1 (1961).
- 5) 大村榮之助: 日農化會關東支部 第2回大會 Symposium 講演要旨, p. 8 (1968).
- 6) Kuninaka, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 693 (1961).
- 7) Kapland, H. S., L. A. Heppel: *J. Biol. Chem.*, **222**, 909 (1956).
- 9) 杉本洋, 岩淺孝, 横塚保: 日農化, **38**, 135 (1964).
- 10) 杉本洋, 岩淺孝, 横塚保: 日農化, **38**, 144 (1964).
- 11) 杉本洋, 岩淺孝, 横塚保: 日農化 **38**, 567 (1964).
- 12) 岩淺孝, 杉本洋, 石山二郎, 横塚保: 日農化, **38**, 84 (1964).
- 13) 杉本洋, 岩淺孝, 石井茂孝, 横塚保: 日農化, **40**, 93 (1966).