

Bacillus polymyxa YL 38-3의 세포외 Cytosine Deaminase 생성의 최적 배양 조건

유대식·김대현·박정문·송형익*·정기택*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

*경북대학교 농과대학 식품공학과

Optimum Culture Conditions for Production of Extracellular Cytosine Deaminase by *Bacillus polymyxa* YL 38-3

Yu, Tae-Shick, Tae-Hyun Kim, Jung-Moon Park, Hyung-Ik Song* and Ki-Taek Chung*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, Korea

*Department of Food Technology, College of Agriculture,

Kyungpook National University, Taegu, Korea

ABSTRACT: The strain YL 38-3, which was capable of producing extracellular cytosine deaminase, was isolated and taxonomically examined. The isolated strain was identified to be *Bacillus polymyxa* YL 38-3. The optimal conditions for the enzyme production from *Bacillus polymyxa* YL 38-3 were investigated. The enzyme production was reached maximum level in the medium containing 0.5% glucose, 0.2% beef extract, 0.5% NaCl and 0.1% KH_2PO_4 (pH 6.0). And the enzyme showed the highest activity when the strain YL 38-3 was cultivated at 35°C for 24 hours under the initial pH 6.0. By the additions of peptone the extracellular enzyme production was inhibited, meanwhile the intracellular enzyme production was highly stimulated. It was, therefore, deduced that peptone was related to the secretion mechanism of the enzyme from this bacterial cell.

KEY WORDS □ extracellular cytosine deaminase, *Bacillus polymyxa* YL 38-3

Cytosine deaminase (cytosine aminohydrolase, EC. 3. 5. 4. 1)는 Hahn과 Schafer(1925)에 의하여 발견된 효소로서, cytosine을 uracil로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 하등미생물에만 존재하며, 세균 진화와의 관련성이 검토되고 있으며(Sakai 등, 1976; 유, 1987), 항종양 보조제로서 임상학적인 연구도 활발히 이루어지고 있다(Nishiyama 등, 1981; 1982; 1985).

Cytosine deaminase는 효모(Kream and Schargaff, 1952; Ipata 등, 1971), 세균(Sakai 등, 1975a; 1975b; Yu 등, 1976a; 1976b; West 등, 1982)과 곰팡이(유 등, 1986a; 1986b)를 대상으로 연구되어 왔다. 이들은 세포내 효소로서 안정성이 낮을 뿐 아니라 극미량 생성되므로

효소단백질의 입체구조 해석, 단백질 화학적 및 임상학적인 측면 등의 연구가 진행되지 못하고 있다. Cytosine deaminase의 실용성을 추구하기 위하여 안정성이 높은 효소의 개발이 절실히 요구되어, 일반적으로 세포외 효소는 안정성이 높으므로 세포외 cytosine deaminase를 생성하는 균주의 분리가 진행되고 있다. 최근 방선균인 *Arthro bacter*로부터 안정성이 비교적 높은 세포외 효소의 생성이 보고된 바 있다(전과 박, 1984; 이 등, 1985).

이상과 같은 현실에서 안정성이 높은 효소의 개발이 절실히 요구되어 저자 등은 세포외 cytosine deaminase를 분비하는 세균을 퇴비로부터 분리하여 세균학적인 특성 및 효소의 생성조건에 관한 홍

미있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

결과 및 고찰

재료 및 방법

실험균주

유와 이(1988)에 의하여 경북 안동군 와룡면 주하동의 퇴비에서 분리된 YL 38-3 균주를 사용했다.

생육도 측정

실험균주의 생육은 분광광도계(Hitachi 100-40)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도(OD)를 측정했다.

조효소액의 조제

실험균주를 효소 생성용 기본배지(1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% KH_2PO_4 , pH 7.0)에 접종하여 30°C, 24시간 진탕배양(120 strokes/min, amplitude 5 cm)하였다. 배양액을 원심분리하여 원심 상등액을 세포의 cytosine deaminase의 조효소액으로 사용했으며, 분리된 균체를 초음파 파쇄(120 Hz, 20 min)시켜 원심분리한 상등액을 세포내 효소의 조효소액으로 사용했다.

효소활성 측정

Cytosine deaminase의 효소활성은 산성 조건하에서 290 nm의 cytosine과 uracil이 갖는 흡광도의 차이를 이용한 Sakai 등(1975a)의 방법에 준하여 측정했다. 효소활성의 단위는 1시간에 1 μ mole의 cytosine을 탈아미노화하는 효소량을 1 단위로 했다.

단백질 정량

효소액중의 단백질 정량은 ovalbumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 측정했다.

실험균주의 동정

실험균주는 長谷川(1985)의 방법에 준하여 분류학적인 성질을 조사하였으며, Bergey's manual of systematic bacteriology(Sneath 등, 1986)에 준하여 동정했다.

사용 시약

Cytosine과 uracil은 Yamasa Shoyu Co. (Choshi, Chiba, Japan)의 제품을 사용했다. 기타 시약은 시판 특급시약을 사용했다.

실험균주의 분류학적 위치

세포의 cytosine deaminase를 생성하는 YL 38-3 균주의 분류학적 특성을 규명하기 위하여 형태 및 생리학적 성질을 조사하여 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 실험균주 YL 38-3은 간균으로 포자형성능, 운동성, 그람 염색, 산생성, catalase 등에 있어서 양성반응을 나타내어 *Bacillus*로 분류했다.

더우기 포도당으로부터 산 및 가스생성능, 카제인 가수분해능, V-P test 등이 양성으로 나타난 결과로 보아 이를 *Bacillus polymyxa* 또는 그 유인균으로 동정되어, *Bacillus polymyxa* YL 38-3으로 명명했다.

Table 1. Morphological and Physiological Properties of YL 38-3 Strain.

Morphological	
Shape and size	rod, (0.3-2.5) × (1.5-3.0) μm
Motility	positive
Sporulation	positive
Gram staining	positive
Acid-fast test	negative
Physiological	
Nitrate reduction	positive
Catalase	positive
Acid from D-glucose	positive
Gas from glucose	positive
Hydrolysis of casein	positive
Voges-Proskauer test	positive
Acetoin	positive

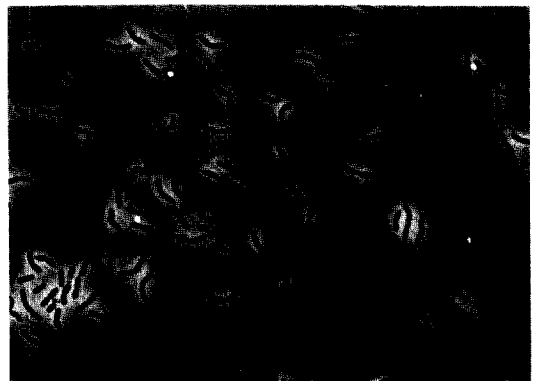


Fig. 1. Photomicrograph of Strain YL 38-3.

세포의 cytosine deaminase의 생성조건

질소원의 영향 : 실험균주가 생성하는 cytosine deaminase의 생성에 미치는 질소원의 영향을 규명하기 위하여 peptone을 제외한 효소생성용 기본배지에 유기질소원과 무기질소원을 1%씩 첨가한 후, 실험균주 YL 38-3을 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양했다. 배양액을 원심분리하여 상등액을 조효소로 하여 효소활성을 측정했다(Table 2).

실험균주에 의한 세포의 효소의 생성은 유기질소원인 beef extract가 가장 양호했으나 균생육은 yeast extract가 양호했다. Beef extract에 의한 세포의 효소생성의 최적 농도는 0.2%였으며, 1.0% 이상의 첨가는 효소생성을 정지시켰다.

Pseudomonas aureofaciens (Yu, 1976)의 세포내 효소의 생성과 *Arthrobacter* sp. JH-13(전과 박, 1984)의 세포외 효소생성은 유기질소원인 peptone이 가장 양호했으나 실험균주에 있어서의 세포외 효소의 생성은 peptone에 의하여 촉진 효

과는 전혀 나타나지 않았다.

탄소원의 영향 : Beef extract 0.2%를 함유한 효소생성용 기본배지에 각종의 탄소원을 0.5%씩 첨가한 후, 상기와 같은 조건에서 실험균주를 진탕배양하여 원심 상등액의 효소활성을 측정했다.

Table 3에 명시된 바와 같이, 당류인 포도당, sucrose와 dextrin에 의하여 실험균주의 생육뿐 아니라 효소생성에 있어서도 양호했다. 더우기 fructose와 glycerol과 같은 알코올류와 유기산 염류인 tartarate 등은 효소생성을 억제시켰다.

이상의 결과는 *Pseudomonas aureofaciens* (Yu, 1976)의 세포내 cytosine deaminase 생성의 결과와 일치했다. 이들 중에서 포도당이 효소생성에 가장 양호했으며, 포도당의 최적농도는 0.5%였다. *Arthrobacter* sp. JH-13(전과 박, 1984)의 세포외 효소생성에는 포도당보다 가용성 전분

Table 2. Effect of Nitrogen Sources on the Production of Extracellular Cytosine Deaminase.

Source	Final pH	Growth (OD _{660nm})	Activity (Units/100 ml)
Inorganic			
Ammonium phosphate (mono basic)	5.96	0.04	0.02
Ammonium phosphate (di basic)	5.99	0.05	0.01
Ammonium chloride	5.82	0.05	0.00
Ammonium nitrate	5.83	0.02	0.00
Ammonium sulfate	5.87	0.03	0.00
Ammonium sulfite	5.86	0.02	0.00
Organic			
Peptone	5.29	1.08	2.50
Yeast extract	6.77	2.34	6.66
Beef extract	6.08	1.38	13.33
None	5.95	0.02	0.00

Various nitrogen sources were added to the final concentration of 1.0% to the basal medium, which consisted of 0.5% of glucose.

0.5% of NaCl and 0.1% of KH₂PO₄, and pH adjusted to 6.0

The cultivations were carried out at 30 °C for 24 hour with reciprocal shaking (120 strokes/min, amplitude 5cm).

Table 3. Effect of Carbon Sources on the Production of Extracellular Cytosine Deaminase.

Source	Final pH	Growth (OD _{660nm})	Activity (Units/100 ml)
Saccharide			
Glucose	6.45	2.20	16.67
Fructose	6.81	2.16	6.67
Sucrose	6.46	2.21	12.50
Dextrine	6.62	2.12	13.33
Soluble starch	7.07	2.19	8.34
Alcohol			
Mannitol	6.42	2.18	10.00
Inositol	6.83	2.03	10.00
Glycerol	4.67	1.95	0.83
Ethanol	7.30	1.66	7.50
Methanol	7.48	1.92	7.53
Organic acid			
Sodium acetate	7.78	2.06	8.34
Sodium citrate	7.91	2.18	9.16
Sodium fumarate	8.17	1.76	7.92
Sodium tartarate	7.63	2.12	1.66
None	7.80	2.03	12.00

Various carbon sources were added at the final concentration of 0.5% to basal medium that consisted of 0.2% of beef extract, 0.5% of NaCl and 0.1% of KH₂PO₄, and pH adjusted to 6.0.

Other culture conditions were in accordance with those of Table 2.

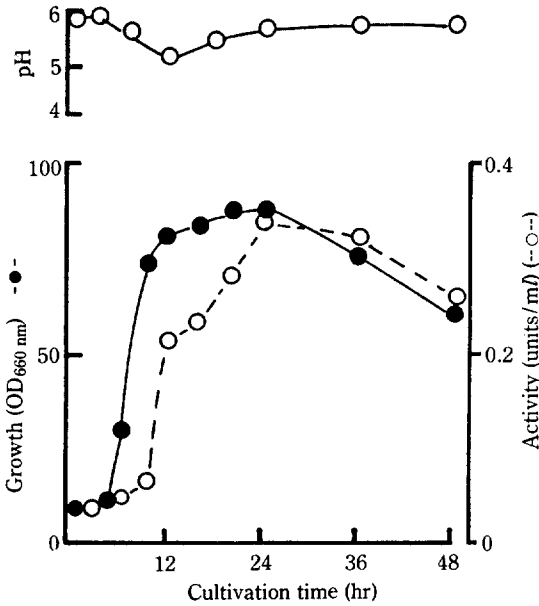


Fig. 2. Time Course of the Extracellular Cytosine Deaminase Production.

Three hundred milliliters of seed was added to a jar fermentor containing 4L of the medium consisted 0.5% glucose, 0.2% beef extract, 0.5% NaCl and 0.1% KH_2PO_4 (pH 6.0). Cultivation was carried out at 35 °C with an aeration.

이 양호하며 실험균주에서는 다당류보다 단당류인 포도당이 양호하여 상반된 결과를 나타냈다.

초기 pH의 영향: 실험균주가 생성하는 세포의 효소의 생성에 미치는 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 beef extract 0.2%, 포도당 0.5%, NaCl 0.5%와 KH_2PO_4 0.1%의 조성인 배지를 1N의 HCl과 NaOH를 사용하여 Table 4에 명기된 바와 같은 pH로 조절한 후, 상기와 동일한 조건에서 공시균을 진탕배양했다. 배양액의 원심 상등액을 조효소로 하여 효소활성을 측정했다.

효소 생성에 미치는 초기 pH의 영향으로 *Pseudomonase aureofaciens*가 생성되는 세포내 cytosine deaminase는 pH 7.5에서 양호했으며 (Yu, 1976), *Arthrobacter* sp. JH-13의 세포의 효소생성은 pH 8.0에서 양호했다(전과 박, 1984). 그러나 Table 4에 명기된 바와 같이 실험균주 YL 38-3의 생육과 세포의 효소의 생성은 상기 2균주보다 산성 영역인 pH 6.0에서 가장 양호했다.

Table 4. Effect of Initial pH on the Production of Extracellular Cytosine Deaminase.

Initial pH	Final pH	Growth (OD _{660 nm})	Activity (Units/100 ml)
4.0	4.20	0.04	0.83
5.0	5.95	1.46	16.16
5.5	6.08	1.60	20.00
6.0	6.14	2.20	25.83
6.5	6.33	1.49	19.16
7.0	6.75	1.50	15.83
8.0	7.02	0.96	2.50

The cultural meidum contained 0.5% of glucose, 0.2% of beef extract, 0.5% of NaCl and 0.1% of KH_2PO_4 , and pH described in Table 4 was adjusted with 1N NaOH or HCl.

Other culture conditions were in accordance with those of Table 2.

Table 5. Effect of Cultural Temperature on the Production of Extracellular Cytosine Deaminase.

Temperature(°C)	Final pH	Growth (OD _{660 nm})	Activity (Units/100 ml)
20	5.91	0.30	3.33
25	6.18	1.01	13.83
30	6.25	1.66	34.16
35	6.15	1.65	37.50
40	4.98	1.81	16.65
45	4.93	1.74	3.33
50	6.05	0.08	2.50

The cultural medium contained 0.5% of glucose, 0.2% of beef extract, 0.5% of NaCl and 0.1% of KH_2PO_4 , and pH adjusted to 6.0.

Other culture conditions were in accordance with those of Table 2, except cultivated temperature described in Table 5.

배양온도의 영향: Beef extract와 포도당을 함유한 배지에서 공시균의 세포의 효소생성에 미치는 온도의 영향을 검토했다(Table 5).

세포의 효소생성은 30~35°C에서 양호했으며, 35°C가 가장 양호한 온도이며, 이 온도에서의 효소활성은 37.50 units/100 ml이었다. 그러나 실험균주의 생육은 효소생성의 최적온도보다 약간 높은 40~45°C였으며, 50°C 이상의 온도에서는 균의 생육과 효소생성이 거의 정지되었다.

Peptone의 효소

실험균주는 peptone에 의하여 세포의 cytosine deaminase의 생성이 다른 유기 질소원에 비하여 억제되므로 (Table 2), 배지중에 peptone의 농도를 0.2%에서 5.0%까지 다른 농도로 첨가하여 세포의 효소 생성능을 비교, 검토했다.

YL38-3 균주의 세포의 효소 생성은 peptone을 0.5%에서 1.5%의 첨가로 미약한 효소 활성을 나타내나, 2.0% 이상의 농도로 첨가하므로 효소 생성은 거의 정지되었다.

Peptone에 의한 세포의 cytosine deaminase의 생성 뿐 아니라 세포내 효소의 생성과의 상관관계를 규명하기 위하여 beef extract와 포도당을 함유한 배지와 여기에 0.5% peptone을 첨가한 배지에 각각 실험균주를 접종하여 35°C에서 24시간 진탕배양하여 효소 활성을 측정했다.

Table 6에 명기된 바와 같이 peptone의 첨가에 의하여 세포의 효소 생성은 억제되었으나, 세포내 효소생성은 오히려 촉진되었다. 그러나 실험균주의 생육은 peptone의 첨가에 의하여 약 40% 촉진되며 약간의 황색 색소를 생성시켰다.

이상과 같은 결과는 peptone이 실험균주 YL38-3의 세포내 효소 생성을 촉진시키지만, 생성된 효소의 세균 세포 밖으로의 분비를 억제하기 때문이 아닌가 사료되어 그 원인에 대해서는 앞으로 연구되어야 할 과제로 여겨진다.

적 요

세포의 cytosine deaminase를 생성하는 YL38-3균주의 분류학적 성질을 검토한 결과, *Bacillus polymyxa* YL38-3으로 동정했다. 실험균주의 세포의 cytosine deaminase의 생성을 위한 최적 배지조성은 0.2% beef extract, 0.5% glucose, 0.5% NaCl, 0.1% KH_2PO_4 로, 배지의 초기 pH는 6.0이었다. 배양 최적조건은 35°C에서 24시간 진탕배양이 양호했다. 배지 중에 peptone의 첨가는 세포의 효소생성을 억제시켰으나, 세포내 효소의 생성은 촉진되므로 peptone이 세포의 cytosine deaminase의 분비기작과 관련이 있는 것으로 추정되었다.

사 사

본 연구는 1986년도 문교부 자유 공모 과제 연구비에 의해 수행된 논문의 일부로서, 이에 깊은 감사를 표시하는 바입니다.

Table 6. Effect of Peptone on the Production of Extracellular and Intracellular Cytosine Deaminase.

Peptone (0.5%)	Final pH	Growth (OD ₆₆₀ nm)	Activity (Units/100 ml)	
			extracellular	intracellular
None	6.3	1.52	50.0	4.4
Added	6.7	2.08	18.5	17.5

A medium was the same composition as in Table 5 and other medium was consisted of 0.5% (W/V) of peptone to the same medium described in Table 5. The cultivations were carried out at 35 °C for 24 hour with reciprocal shaking.

세포의 효소 생성의 time course

Beef extract와 포도당을 함유한 4L의 배지를 jar fermentor (한국발효기기 주식회사, model SY-500)에서 35°C에서 *Bacillus polymyxa* YL38-3을 통기 배양하면서 일정한 간격의 배양시간으로 배지의 pH, 균의 생육도 및 세포의 효소의 생성능을 측정했다 (Fig. 2).

배지의 pH는 초기 pH 6.0에서 12시간 배양으로 pH 5.0까지 떨어지나 서서히 회복되어 48시간으로 pH 5.8로 회복되었다.

균의 증식 곡선은 약 4시간의 유도기를 가지며 12시간 배양으로 정지기에 도입되는 반면, 세포의 효소의 생성도 균의 증식과 거의 같은 경향으로 서서히 생성되어 24시간 배양으로 최고값에 도달했다.

참고문헌

- Hahn, A. and L. Schafer, 1925. Über das Verhalten von Pyrimidinderivaten in den Organismen. *Z. Biol.* 83, 511-514.

2. Ipata, P.L., G. Marmocchi, G. Magni, R. Felicioli and G. Polidoro, 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides, *Biochemistry*, **10**, 4170-4167.
3. Kream, J. and E. Chargaff, 1952. On the cytosine deaminase of yeast, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5157-5160.
4. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
5. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi and T. Sakai, 1981. New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host, *Current Chemotherapy and Immunotherapy*, 1269-1270.
6. *Idem*, 1982. Antineoplastic effects of 5-fluorocytosine and cytosine deaminase on brain tumor, *Neurol. Med. Chir.* **22**, 344-352.
7. *Idem*, 1985. Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules, *Cancer Res.* **45**, 1753-1761.
8. Sakai, T., T.S. Yu and S. Omata, 1976. Distribution of enzymes related to cytidine degradation in bacteria, *Agr. Biol. Chem.* **40**, 1893-1895.
9. Sakai, T., T.S. Yu, H. Tabe and S. Omata, 1975a. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1623-1629.
10. Sakai, T., T.S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata, 1975b. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2015-2020.
11. Sneath, P.H.A., S.M. Nicholas and E.M. Sharpe, 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology (vol. 2)*, Williams and Wilkins, Baltimore.
12. West, T.P., M.S. Shanley and G.A. O'Donovan, 1982. Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*, *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 251-258.
13. Yu, T.S., 1976. Nutritional and cultural characteristics of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *계명대 과학논집*, **3**, 97-106.
14. Yu, T.S., T. Sakai and S. Omata, 1976a. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.* **40**, 543-549.
15. *Idem*, 1976b. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.* **40**, 551-557.
16. 長谷川 武治, 1985. 微生物の分類と同定(下). 學會出版センター, 99-161.
17. 전홍기, 박정혜, 1984. 세포의 cytosine deaminase 생산균 *Arthrobacter* sp. JH-13의 분리 및 효소 생성조건, *한국미생물학회지*, **22**, 257-263.
18. 이 인, 박정혜, 전홍기, 1985. *Arthrobacter* sp. JH-13이 생산하는 세포의 cytosine deaminase의 성질, *한국미생물학회지*, **23**, 177-183.
19. 유대식, 1987. Pyrimidine nucleotide 대사계와 세균진화, *계명대 기초과학연구소 연구논집*, **6**, 25-30.
20. 유대식, 김재근, 坂井 拓夫, 外村 健三, 1986a. 곰팡이의 cytosine deaminase에 관한 연구, *한국산업미생물학회지*, **14**, 169-174.
21. 유대식, 김재근, 정기택, 1986b. 곰팡이성 cytosine deaminase의 활성화에 미치는 온도의 영향, *계명대 기초과학연구소 연구논집*, **5**, 37-41.
22. 유대식, 이정식, 1988. 세포의 cytosine deaminase 생산균의 분리 및 효소 생성조건, *계명대 기초과학연구소 연구논집*, **7**, 95-100.

(Received Aug. 30, 1988)