

세포외 Cytosine Deaminase의 효소학적 성질

유대식·김대현·박정문·송형익*·정기택*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

*경북대학교 농과대학 식품공학과

Enzymatic Properties of Extracellular Cytosine Deaminase

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: Enzymological properties of an extracellular cytosine deaminase from *Bacillus polymyxa* YL 38-3 were investigated. The extracellular enzyme was very stable, and optimum pH and temperature for the enzyme activity were found to be near pH 6.0 in 0.2M potassium phosphate buffer and at 30°C, respectively. 5-Fluorocytosine was converted to 5-fluorouracil by the enzyme, but 5-methylcytosine was not to thymine by it. The enzyme activity was completely inhibited by some heavy metal ion such as 1mM of Cd²⁺ and Hg²⁺, and by 1mM of *p*-chloromercuribenzoate, respectively. The enzyme activity was inactivated about 75% by 1mM of *o*-phenanthroline and monoiodoacetate. But the enzyme activity was stimulated up to 200% by 1mM of 2-mercaptoethanol.

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

핵산을 구성하고 있는 염기중의 하나인 pyrimidine의 nucleotide는 purine 염기와 다른 기구에 의하여 대사된다.

Nucleotide는 nucleoside를 거쳐 염기와 D-ribose로 분해되어 완전히 산화하든지, salvage 합성계를 거쳐 nucleotide로 재합성되든지 한다. 그러나 cytosine은 다른 염기와 달리 직접 salvage 합성계로 재합성될 수 없을 뿐 아니라 산화되어 완전히 분해될 수도 없는 특이적인 염기로서 반드시 cytosine deaminase의 촉매로 uracil로 분해되어 nucleotide로 재합성되든지 산화한다. 이상과 같이 특이적인 대사계를 영위하는 것은 고등동물에서는 cytosine deaminase를 합성할 수 없으므로 분해된 cytosine은 체외로 직접 배설되므로(Koechlin 등, 1966), cytidyl산은 nucleoside level에서

축매되어 uridine을 거쳐 대사된다(Tatibana, 1969).

Cytosine deaminase는 하등 미생물에서만 발견되며 효소의 안정성이 낮으며, 극미량 생성되므로 효소의 단백질 화학적 연구는 거의 없는 실정이다. 그러나 최근에 cytosine deaminase는 항종양 보조제로 이용성이 대두되어(Nishiyama 등, 1985) 임상학적 측면에서의 연구가 진행되고 있다. 최근 cytosine deaminase의 효소단백질 화학과 임상학적 연구를 위하여 안정성이 높은 효소의 개발이 절실히 요구된다. 이상과 같은 요구에 부응하여 내열성 세균으로부터 열안정성이 높은 효소의 개발이 이루어지고 있으며, 일반적으로 세포외 효소는 안정성이 높으므로 세포외 cytosine deaminase에 관한 연구가 진행되고 있다. 최근

전 등(1984; 1985)은 세포의 cytosine deaminase를 생산하는 *Arthrobacter* sp. JH-13을 분리하여 이균이 생산하는 세포의 효소의 효소학적 성질을 밝힌 바 있다.

저자 등은 이미 세균(Sakai 등, 1975a; 1975b; Yu 등, 1976a; 1976b)과 곰팡이(유 등, 1986)의 세포내 cytosine deaminase를 단일 단백질로 정제하여 효소학적 특성을 규명한 바 있다.

저자 등은 전보(1988a; 1988b)에서 세포의 cytosine deaminase를 생성하는 *Bacillus polymyxa* YL38-3을 분리, 동정하여 효소생성조건을 검토했으며, 본보에서는 이 효소의 효소학적 성질을 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험균주 및 배양조건

실험균주는 전보(유 등, 1988b)에서 보고한 세포의 cytosine deaminase를 생성하는 균주인 *Bacillus polymyxa* YL38-3을 사용했다.

실험균주의 배양조건은 beef extract 0.2%, 포도당 0.5%, NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.1% 조성의 배지(pH6.0) 4L에 전배양액 300 ml를 접종하여 jar fermentor(한국미생물 발효기기주식회사, model SY-500)를 사용하여 30°C, 24시간 통기 배양했다. 전배양은 peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5% 조성의 L-broth(pH7.0) 100 ml에 실험균주를 1백금이 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양(120 strokes/min, amplitude 5 cm)했다.

조효소액 조제

Beef extract와 포도당을 함유한 효소 생성용 배지에 실험균주를 30°C에서 24시간 통기 배양한 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심분리(Beckman, model J2-21, JA-14 rotor)하여 상등액을 조효소액으로 사용했다.

한외여과에 의한 효소농축

조효소액의 농축은 분자량 10,000을 분리할 수 있는 membrane(PTGC OLC M2)을 장착한 Pellicon lab cassette ultrafiltration system (Model XX42 YLC KO Lab cassette kit)을 사

용하여 4°C에서 실시하였다. 조효소액 1L을 100 ml로 농축하는데 약 3시간이 소요되었다.

알코올 분획

한외여과로 농축한 효소액의 pH를 6.0으로 조절하여 4°C이하에서 무수 에틸알코올을 서서히 첨가하여 50%로 포화시켜 5시간 방치한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전된 비효소단백질을 제거했다. 원심분리한 상등액에 다시 무수에틸알코올의 농도가 70% 되도록 첨가하여 포화시켜 10~12시간 방치하여 효소단백질을 원심분리하여 얻었다. 침전된 효소단백질을 1 mM mercaptoethanol이 함유된 0.2 M 인산완충액(pH6.0)에 녹혀 동일 완충액으로 충분히 투석했다. 투석시 생성된 침전물은 원심분리에 의해 제거하여 사용했다.

효소활성 측정

세포의 cytosine deaminase 활성은 산성조건하에서 cytosine과 uracil, 5-fluorocytosine과 5-fluorouracil의 흡광도의 차이에 의하여 측정했다.

효소반응계는 3 mmole의 cytosine, 200 mmole의 인산완충액(pH6.0) 및 적당한 양의 효소액으로 1 ml 용량으로 하여 30°C의 진탕수조에서 진탕(120 strokes/min, amplitude 2.5 cm) 하면서 반응시켰다. 반응시간은 효소활성에 따라 적절히 조절했으며, 조효소액은 24시간 반응시켰다. 그리고 효소반응액에 4 ml의 0.1 N HCl을 가하여 효소반응을 정지시키고 효소반응 전후에서의 290 nm의 흡광도의 감소를 측정했다(Sakai 등, 1975a).

5-Fluorocytosine을 기질로 할 때는 300 nm의 흡광도로 측정했다(이 등, 1985). 효소반응후 반응액중에 약간의 침전물이 생기면 원심분리하여 측정했다. 상기반응조건에서 1시간에 1 mmole의 cytosine 혹은 5-fluorocytosine을 탈아미노화하는 효소량을 1단위로 했다. 비활성은 단백질 mg당 효소량으로 표시했다.

기질 특이성

Cytosine, 5-fluorocytosine 및 5-methylcytosine과 pyrimidine nucleosides 및 nucleotides를 기질로 하여 효소반응을 시킨 후 paper chromatography로 기질의 분해물의 생성 유무를 확인했다.

Paper chromatography

효소반응액의 100 μ l를 동양여지(No. 50)를 사용하여 상승법으로 상온에서 18시간 전개시켰다. 전개제로서 *tert*-butanol-methyl ethyl keton-water-formic acid(44 : 44 : 11 : 0.26 v/v)를 사용했다(Zweig and Sherma, 1972). 각 반응생성물의 검출은 자외선 등(short wave)을 이용하여 자외선 흡수물질을 표준물질과 비교 검정했다.

단백질 정량

효소액의 단백질은 ovalbumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량했다.

시 약

Cytosine과 uracil은 Yamasa Shoyu Co. (Choshi, Chiba, Japan)의 제품을 5-fluorocytosine과 5-fluorouracil은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA)의 제품을 사용했다. 그 이외의 시약은 시판 특급 시약을 사용했다.

결 과

세포의 cytosine deaminase의 농축

본 효소의 농축은 4°C 이하에서 행하였으며, 한 외여과에 의하여 10배 농축하고 50~70% 농도의 에틸알코올에 의하여 침전되는 효소단백질을 모아 0.2M 인산완충액(pH 6.0)에 녹혀 시험효소로 사용했다.

이 공정에 의하여 4L의 배양액으로 한 조효소액으로부터 수율 22.1%, 비활성 2,507 units/mg으로 농축할 수 있었다(Table 1).

저장기간 및 열안정성

Bacillus polymyxa YL38-3이 생성하는 세포외 cytosine deaminase의 저장기간에 따른 안정성을

Table 1. Partial Purification of an Extracellular Cytosine Deaminase.

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	4,000	296.0	304.0	1.027	100.0
UF system	410	88.6	206.1	2.326	67.8
Ethanol Ppt.	10.5	26.8	67.2	2.507	22.1

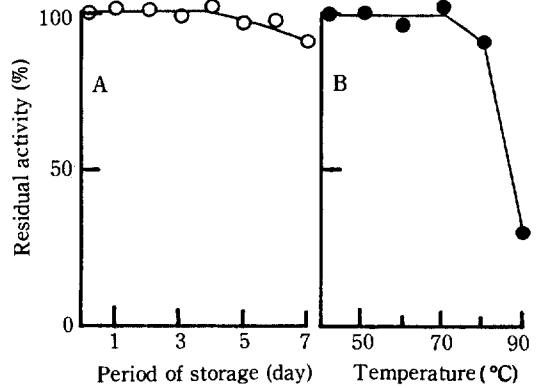


Fig. 1. Effect of the Period of Storage(A) and Temperature(B) on the Extracellular Cytosine Deaminase Stability.

(A) The enzyme in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.0) was stored at 4°C and then the residual activity was assayed. (B) The enzyme in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at the indicated temperatures ranged from 40 to 90°C for 10 min. After cooled, the residual activity was assayed.

검토하기 위하여 효소액을 0.2M 인산완충액(pH 6.0)으로 조절하여 4°C에서 저장하면서 24시간 간격으로 잔존효소활성을 측정했다.

Fig. 1A에 나타난 바와 같이 본 효소는 0.2M 인산완충액(pH 6.0)에서 4일간은 매우 안정했으며, 7일간 저장으로 약 90%의 잔존효소활성을 나타냈다.

세포외 cytosine deaminase의 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 pH 6.0으로 조절한 효소액을 10분간 각 온도로 처리한 후, 4°C 이하로 냉각하여 잔존효소활성을 측정했다.

Fig. 1B에 나타난 바와 같이 70°C까지 효소활성은 거의 변화가 없었으며, 80°C로 10분간 열처리에 의하여 약 10%의 실활을 나타내어 본 효소는 열안정성이 극히 높은 효소였다.

반응최적 pH 및 온도

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 2.5에서 pH 6.0까지의 pH 변화는 McIlvaine 완충액을 사용하고 pH 5.0에서 pH 7.5까지는 인산완충액을 사용했으며 pH 6.5에서 pH 9.0까지는 Tris-HCl 완충액을 사용했다.

다른 pH를 가지는 완충액과 효소액을 혼합하여 Fig. 2A에 명기된 반응액중의 pH로 조절하여 효소

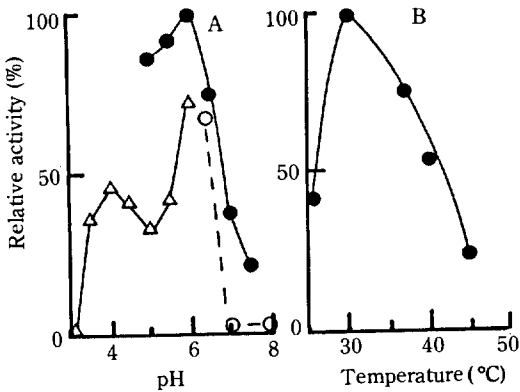


Fig. 2. Effect of pH(A) and Temperature(B) on the Extracellular Cytosine Deaminase Activity.

The enzyme activity was assayed under the standard conditions except that (A) pH was varied using a reaction mixture containing 0.2 M of various buffers and (B) reaction temperature was varied in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.0). (A) Buffers used: \triangle , McIlvaine buffer (pH 3.0 to 6.0); \bullet , potassium phosphate buffer (pH 5.0 to 7.5); \circ , Tris-HCl buffer (pH 6.5 to 8.0).

반응을 시켜 효소활성을 측정했다.

Fig. 2A에 나타난 바와 같이 McIlvaine 완충액과 Tris-HCl 완충액은 인산완충액에 비하여 효소활성이 낮게 나타나며, 반응최적 pH는 6.0이었다.

본 효소활성의 반응최적온도는 30°C였으며 (Fig. 2B), 37°C에서는 약 75%의 효소활성을 나타냈다.

기질 특이성

Cytosine deaminase의 기질은 cytosine뿐 아니라 5-fluorocytosine, 5-methylcytosine, cytidine 과 5'-cytidine monophosphate (5'-CMP)도 가능하다.

실험균주가 생성하는 세포의 효소에 의하여 상기 화합물이 분해하는지를 검토한 결과, 본 효소는 cytosine과 5-fluorocytosine을 탈아미노화시키지만, 5-methylcytosine과 cytidine, 5'-CMP는 기질이 될 수 없었다 (Table 2).

금속이온의 영향

세포의 cytosine deaminase의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토한 결과를 Table 3에 정리했다.

Table 2. Substrate Specificity of the Extracellular Cytosine Deaminase.

Compound (4 mM)	Deamination
Cytosine	+
5-Fluorocytosine	+
5-Methylcytosine	-
Cytidine	-
5'-CMP*	-

Each reaction mixture contained 0.4 ml of the enzyme solution, 4 mM of the substrate and 0.2 M of potassium phosphate buffer (pH 6.0) in final volume of 1 ml and then incubated at 30°C for 24 hour.

*; 5'-Cytidine monophosphate.

Table 3. Effect of Metal Ions and the Extracellular Cytosine Deaminase Activity.

Metal ion (1 mM)	Relative activity (%)
MnCl ₂	52.0
FeCl ₂	114.0
CoCl ₂	23.8
CuCl ₂	28.6
ZnCl ₂	61.2
CdCl ₂	4.0
HgCl ₂	0.0
MgCl ₂	98.3
KCl	96.2
NaCl	99.0
None	100.0

The enzyme activity was assayed under the standard reaction conditions in the presence of metal ions at the indicated concentration and expressed as relative activity to that of control.

실험균주가 생성하는 세포의 효소활성은 1mM Cd²⁺과 Hg²⁺에 의하여 강한 저해를 받으며, Co²⁺과 Cu²⁺에 의하여 70~80%의 효소활성이 저해되며, Mn²⁺과 Zn²⁺에 의하여 40~50%의 효소활성이 저해되었다. 그러나 Fe²⁺에 의하여 약 10%의 효소활성이 촉진되었으며, Mg²⁺, K⁺과 Na⁺은 아무런 영향을 미치지 못했다.

저해제의 영향

효소활성을 저해하는 화합물이 본 세포의 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

실험균주가 생성하는 세포의 효소의 활성은 1 mM p-chloromercuribenzoate에 의하여 완전히

Table 4. Effect of Inhibitors on the Extracellular Cytosine Deaminase Activity.

Inhibitor (1mM)	Relative activity (%)
EDTA*	69.0
p-CMB**	0.0
2-Mercaptoethanol	212.5
Monoiodoacetate	25.0
Trichloroacetate	84.4
Sodium azide	75.0
Sodium cyanide	87.5
Sodium floride	100.0
None	100.0

*; Ethylenediaminetetraacetate,

**; p-Chloromercuribenzoate.

The conditions were in accordance with those described in Table 3.

실행되며, 1 mM *o*-phenanthroline과 monoiodoacetate에 의하여 75% 저해되는 반면, trichloroacetate, ethylenediaminetetraacetic acid, sodium azide 및 sodium cyanide는 약 20~25%의 저해현상을 나타냈다. 그러나 1 mM 2-mercaptoethanol은 본 효소의 활성을 약 200% 이상 활성화시켰다.

고 찰

세포의 cytosine deaminase를 생성하는 *Bacillus polymyxa* YL38-3을 실험균주로 하여, 공시균이 생성한 세포의 효소의 효소학적 성질을 규명했다.

열안정성이 비교적 높은 *Serratia marcescens* (Sakai 등, 1975a)의 세포내 cytosine deaminase는 70°C에서 10분간 열처리 하므로 75%의 잔존효소활성을 나타내며, *Arthrobacter* sp. JH-13(이 등, 1985)의 세포외 효소는 70°C에서 10분간 열처리하므로 완전히 실행되어 열에 대한 안정성이 낮은 효소이다. 본 효소는 70°C에서 10분간 열처리하더라도 전혀 효소활성이 실행되지 않는 열안정성이 극히 높은 효소였다.

Serratia marcescens (Sakai 등, 1975a), *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975b), *Salmonella typhimurium* (West 등, 1982) 및

빵효모(Ipata 등, 1971)의 세포내 효소의 반응최적 pH는 각각 10.0, 9.5, 7.5 및 7.0이었으며, *Arthrobacter* sp. JH-13의 세포외 효소(이 등, 1985)의 반응최적 pH는 8.0~8.5로 중성 또는 알칼리성 영역이다. 그러나 실험균주가 생성하는 세포의 cytosine deaminase는 미산성영역인 pH6.0에서 최대의 효소활성을 나타냈다.

이 등(1985)이 보고한 세포외 효소와 Yu 등(1976a; 1976b)이 보고한 세포내 효소는 40~45°C 부근에서 최적반응온도를 가지나, 본 효소는 위의 효소에 비하여 약 10°C 이하인 30°C에서 효소활성이 최대치를 나타냈다.

이상의 결과는 이미 보고된 어느 효소의 반응최적 pH보다 산성영역에서 최대의 효소활성을 나타내며 열안정성이 극히 높으며 온화한 온도인 30°C에서 최대 효소활성을 나타내므로 임상학적인 이용성이 높은 효소로 사료된다.

Cytosine deaminase의 기질이 될 수 있는 것은 cytosine 뿐 아니라 5-fluorocytosine, 5-methylcytosine 및 isocytosine 등이 알려져 있으나, cytosine deaminase는 효소생성의 기원에 따라 기질이 될 수 있는 것과 없는 화합물이 있다. 즉, 5-methylcytosine은 빵효모(Ipata 등, 1971; Kream and Chargaff, 1952), *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975b), *Aspergillus fumigatus* (유 등, 1986)의 효소에 의하여 촉매될 수 있으나, *Serratia marcescens* (Sakai 등, 1975a)와 *Salmonella typhimurium* (West 등, 1982)의 효소에 의하여 촉매될 수 없는 pyrimidine 염기의 유도체이다. 더우기 항진균제이며 항암보조제로서 이용성이 높은 5-fluorocytosine은 *Salmonella typhimurium* (West 등, 1982)의 세포내 효소와 *Arthrobacter* sp. JH-13(이 등, 1985)의 세포외 효소의 기질로서 작용한다. 특히 빵효모(Kream and Chargaff, 1952)의 효소는 isocytosine을 기질로 이용할 수 없을 뿐 아니라 이효소의 활성을 저해한다는 보고가 있으나, 대장균(Lisy and Skoda, 1966)의 효소는 isocytosine을 탈아미노화할 뿐 아니라, 6-azacytosine과 6-azaisocytosine도 기질로 이용한다는 결과를 보고했다.

실험균주인 *Bacillus polymyxa* YL38-3의 세포

의 효소는 cytosine 뿐 아니라 5-fluorocytosine을 기질로 이용할 수 있으나, 5-methylcytosine은 기질로 이용할 수 없었다. Cytosine deaminase의 기질인 cytosine, 5-methylcytosine과 5-fluorocytosine에 있어서, 5-methylcytosine을 기질로 이용하는 효소는 5-fluorocytosine을 이용할 수 있으나, 5-fluorocytosine을 기질로 이용하는 효소는 5-methylcytosine을 반드시 이용할 수 있다는 가정은 불가능하다.

본 효소와 이미 발표된 효소는 중금속 이온인 Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 등에 의하여 강하게 저해되며, West 등(1982)과 유 등(1986)의 결과에 의하면 Fe^{3+} 와 Fe^{2+} 에 의하여 완전한 실패와 90%의 효소활성이 각각 저해되나, Sakai 등(1976b)과 이 등(1985)은 Fe^{3+} 에 의하여 약 20% 이상의 효소활성이 촉진되었다고 보고하였다. 본 세포의 효소는 Fe^{2+} 에 의하여 14%의 효소활성이 촉진되었다.

이상의 결과로 철이온에 의한 효소활성의 변화는 일률성이 없이 cytosine deaminase의 기원에

따라 상반된 특성을 나타낸다.

Cytosine deaminase의 효소활성은 금속이온에 의하여 변화되며 대사저해제에 의하여 영향을 받기도 한다. *Serratia marcescens*(Yu *et al.*, 1976a)의 효소를 제외한 세포내 및 세포외 cytosine deaminase는 1mM *p*-chloromercuribenzoate(*p*-CMB)에 의하여 효소활성이 완전히 실패된다. 실험균주의 효소도 *p*-CMB에 의하여 완전히 실패되었다. 대부분의 cytosine deaminase는 *p*-CMB에 의하여 강하게 저해되며 일반적으로 *p*-CMB에 의한 저해현상은 가역적인 저해현상이므로 저해의 회복은 환원제인 2-mercaptoethanol, glutathione, cysteine 및 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 등에 의하여 회복되므로(Yu *et al.*, 1976b) thiol 효소로 추정되고 있으며, 본 효소도 *p*-CMB에 의하여 강한 저해를 받으므로 thiol 효소로 사료된다. 그러나 상기의 결과만으로 thiol 효소라 확증할 수 없기 때문에 앞으로 단백질 화학적 측면에서의 연구가 진행되어야 하겠다.

적 요

Bacillus polymyxa YL38-3이 생성하는 세포의 cytosine deaminase의 효소학적 성질을 검토하였다. 본 세포의 효소는 열안정성이 높으며, 인산완충액(pH6.0)과 30°C에서 효소활성이 최대를 나타냈다. 본 효소는 cytosine 뿐 아니라 5-fluorocytosine을 기질로 하나, 5-methylcytosine은 촉매하지 않았다. 더욱이 본 효소는 Cd^{2+} , Hg^{2+} 의 중금속이온과 1mM *p*-chloromercuribenzoate에 의하여 완전히 실패되며, *o*-phenanthroline과 monoiodoacetate에 의하여 75% 저해되었다. 그러나 1mM 2-mercaptoethanol에 의하여 본 효소의 활성을 약 200% 이상 활성화시켰다.

사 사

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

참고문헌

1. 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 nucleo-

tides, *Biochemistry*, **10**, 4170-4176.

2. Koechlin, B.A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel and R. Duschinsky, 1966. The metabolism of 5-fluorocytosine- ^{14}C and of cytosine- ^{14}C in the rat and the disposition of 5-fluorocytosine- ^{14}C in man, *Biochem. Pharmac.* **15**, 435-446.
3. Kream, J. and E. Chargaff, 1952. On the cytosine deaminase of yeast, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5157-5160.
4. Lisy, V. and J. Skoda, 1966. Deamination of some cytosine and cytidine analogues by an *E. coli* extract, *Collect. Cesk. Chem. Commun.*

- 30, 3020-3022.
5. 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.
 6. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Oh-yama, T. Katsuragi and T. Sakai, 1985. Anti-neoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules, *Cancer Res.* **45**, 1753-1761.
 7. Sakai, T., T.S. Yu, H. Tabe and S. Omata, 1975a. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1623-1629.
 8. Sakai, T., T.S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata, 1975b. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2015-2020.
 9. Tatibana, M., 1969. Interrelationship of nucleotide metabolism in mammalian tissues, *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, **14**, 1310-1318.
 10. 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.
 11. Yu, T.S., T. Sakai and S. Omata, 1976a. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.* **40**, 543-549.
 12. *Idem*, 1976b. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.* **40**, 551-557.
 13. Zweig, G. and J. Sherma, 1972. *Handbook of Chromatography*, CRC press, Cleveland, Ohio, 323-326.
 14. 전홍기, 박정혜. 1984. 세포의 cytosine deaminase 생산균 *Arthrobacter* sp. JH-13의 분리 및 효소생성조건, *한국미생물학회지*, **22**, 257-263.
 15. 이인, 박정혜, 전홍기. 1985. *Arthrobacter* sp. JH-13이 생산하는 세포의 cytosine deaminase의 성질, *한국미생물학회지*, **23**, 177-183.
 16. 유대식, 김재근, 坂井 拓夫, 外村 健三. 1986. 곰팡이의 cytosine deaminase에 관한 연구, *한국산업미생물학회지*, **14**, 169-174.
 17. 유대식, 이정식. 1988a. 세포의 cytosine deaminase 생성균의 분리 및 효소생성 조건, *계명대 기초과학연구소 연구논집*, **7**, 95-100.
 18. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택. 1988b. *Bacillus polymyxa* YL 38-3의 세포의 cytosine deaminase 생성의 최적배양조건, *한국미생물학회지*, **26**, 362-367.

(Received Aug. 30, 1988)