

## *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 Cytosine Deaminase의 생성 최적조건

김 정 · 김 현수<sup>1</sup> · 유대식<sup>1\*</sup>

수원여자대학 치위생과, <sup>1</sup>계명대학교 자연과학대학 미생물학과

**Optimal Conditions for the Production of Intracellular Cytosine Deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391.** Kim, Jung, Hyun Soo Kim<sup>1</sup>, and Tae Shick Yu<sup>1\*</sup>. Department of Dental Hygiene, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea – Cytosine deaminase (cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1) stoichiometrically catalyzes the hydrolytic deamination of cytosine and 5-fluorocytosine to uracil and 5-fluorouracil, respectively. Optimal medium compositions for production of cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391 were 0.75% soluble starch, 1.5% peptone, 0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, 0.01% NaCl, 0.01% MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The optimal pH of medium and incubation temperature were 7.0 and 30°C, respectively. *C. violaceum* reached stationary phase after 30 hr, and produced a maximum cytosine deaminase (120 units/ml) after 72 h in batch culture.

**Key words:** Cytosine deaminase, *Chromobacterium violaceum* YK 391

Cytidine nucleotide의 구성염기인 cytosine은 salvage합성계의 기질이 될 수 없고, 직접 분해될 수도 없다. 따라서 cytosine은 반드시 탈 아미노화되어 uracil을 거쳐 salvage합성계로 대사되든지, 또는 분해계로 대사되므로 cytosine deaminase는 pyrimidine nucleotide의 염기 대사계에서 중요한 역할을 하는 효소이다. Cytosine deaminase(CODase, cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1)는 cytosine의 6번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 그 뿐만 아니라 cytosine deaminase는 cytosine의 유도체 중의 하나인 5-fluorocytosine(5-FC)에 대해서 탈 아미노화 반응을 촉매하여 5-fluorouracil(5-FU)와 암모니아를 형성시키기도 한다. 이 효소는 일부 미생물[2-4,6-8]에서는 발견되었으나, 고등 동·식물에서는 생합성하지 못하므로 핵산에서 분해되거나 섭취된 cytosine이 더 이상 대사될 수 없을 뿐만 아니라 salvage생합성도 될 수 없어서 체외로 배설되기만 한다[5].

Cytosine deaminase는 1923년 Hahn과 Lintzel[2]에 의하여 빵 효모로부터 처음 확인되었으며 Hahn과 Schafer[3]에 의하여 대장균으로부터 효소생산이 확인되었다. 그 후, Kream과 Chargaff[6]에 의해 효소화적인 특성이 연구되었으며, 1971년에는 Ipata 등[4]에 의해 빵 효모의 효소가 부분 정제되고 효소학적 특성도 규명되었다. 1975년에는

Sakai 등에 의하여 *Serratia marcescens*[7]와 *Pseudomonas aureofaciens*[8]로부터 전기영동적·초원심적 분석법에 의하여 단일 효소단백질로 정제되어 *S. marcescens*의 효소는 580 kDa의 분자량을 갖고 8개의 subunit(분자량 73 kDa)로 구성되어 있으며, *P. aureofaciens*의 효소는 630 kDa의 분자량을 갖고 14개의 subunit(분자량 45 kDa)로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 1982년에는 West 등[9]이 *Salmonella typhimurium*으로부터 전기영동적으로 단일 효소 단백질로 정제하였으며, Yu 등[16]에 의한 *Aspergillus fumigatus*로부터 효소학적 특성 규명 및 단일 효소단백질로의 정제 등 많은 종류의 연구가 진행되었다. 그리고 본 효소의 활성부위에 관한 연구는 Yergatian 등[10]이 빵효모의 효소를 이용하여 효소활성을 나타내는 활성부위의 아미노산 잔기를 화학수식법에 의하여 cysteine, histidine과 arginine 잔기가 촉매작용에 관여한다고 규명한 이래로 1998년 Yu 등[17]이 *A. fumigatus* 효소의 활성부위에 관여하는 아미노산 잔기를 methionine, cysteine, lysine과 tyrosine으로 규명하였다.

이 효소는 세포외로 분비될 뿐만 아니라 세포내에서도 매우 높은 활성을 나타내는 *Chromobacterium violaceum* YK 391[14]의 세포외 CODase가 이미 순수 정제되어 효소학적 특성이 밝혀져 있다. 효소학적 특성이 밝혀져 있지 않는 세포내 효소와의 효소학적 특성을 비교함으로써 두 효소간의 유전적 관련성을 규명할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 그의 첫 연구로서 세포내 효소를 다량 생산하기 위하여 효소생산의 최적배양 조건을 검토하고자 한다.

\*Corresponding author

Tel. 82-53-580-5252, Fax. 82-53-580-5164

E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용 시약

Peptone, yeast extract는 Difco Co.(U.S.A.)제품을 사용하였으며, cytosine는 Sigma Co.(U.S.A.)제품을 사용하였다.

### 배지조성 및 배양조건

증식용 배지(1% peptone, 0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, 0.75% soluble starch, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% NaCl, pH 7.0) 100 ml를 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 *C. violaceum* YK 391을 1백금이 접종한 후, 30°C에서 5일간 진탕 배양(150 rpm, Vision Co.)하여 이를 종균 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 5 L 발효조(Korea Fermentor Co., LTD.)에 증식용 배지 4 L를 넣은 후, 종균 배양액 400 ml를 첨가하여 28°C에서 2일간 통기배양(20 rpm, 1.5 l/min)시켰다. 통기배양시킨 후, 8,000 rpm에서 원심분리하여 균체를 수거하였다.

### 균의 생육도 측정 및 미생물의 보존

균의 생육도는 분광광도계(Shimadzu Model UV-120-02, Japan)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 생육도로 표시하였다. 그리고 미생물의 보존은 증식용 배지에서 배양한 균체를 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer (-80°C)에서 보관하였다.

### 조효소액의 조제

균이 생산하는 세포내 CODase를 얻기 위하여 2일간 발효조에서 통기배양한 균체를 8,000 rpm에서 원심분리하여 집균하고 증류수로 3회 세척한 다음, 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 1회 세척하였다. 세척한 균체를 다시 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 현탁하고 10°C 이하에서 120 Hz로 50초 간격으로 초음파 파쇄기(Sonics and Materials Inc. USA)를 사용하여 현미경으로 관찰하였을 때 세포가 완전히 파쇄될 때까지 행하였다. 이 때 파쇄시간은 균체 농도에 따라 조정하였다. 현미경상에서 균체가 완전히 파쇄된 것을 확인한 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

### 단백질의 정량

Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 Bradford[1]의 방법에 준하여 단백질을 정량하였으며 표준 단백질로 bovine serum albumin(Sigma Co. U.S.A.)을 사용하였다. 정제과정 중의 단백질 양은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

### 효소활성도 측정

CODase의 활성도는 Sakai 등[7]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 분광 광도계를 사용하여 산성조건에서 290 nm의

기질인 cytosine과 생성물인 uracil이 나타내는 흡광도의 감소로 활성을 측정하였다. CODase의 반응은 5 mM cytosine 용액 0.2 ml와 적당히 희석한 조효소액 0.2 ml 및 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.6 ml로 전체용량이 1 ml되게 하여 37°C에서 30분간 효소 반응시킨 후, 0.1N HCl 4 ml를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 효소 반응후 침전물이 생기면 원심 분리하여 침전물을 제거하고, 효소활성을 측정하였다. 효소활성의 단위는 30분 동안에 1 mmole의 cytosine을 탈 아미노화하여 uracil로 전환시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

## 결과 및 고찰

*C. violaceum* YK 391이 생산하는 세포내 CODase의 최적 생산조건을 검토하기 위하여 배지중의 탄소원, 질소원, 초기 pH 및 배양온도의 영향, 배양시간에 따른 효소생성능을 검토하였다.

### 탄소원의 영향

균의 생육과 세포내 CODase의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 검토하였다. 기본배지(peptone 0.1%, yeast extract 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%)를 효소생성 배지(pH 7.0)로 사용하여 탄소원의 최종농도가 1.0%가 되도록 각각 첨가하였고, 종균 배양액을 1%가 되도록 접종하여 30°C에서 4일간 진탕 배양하여 균의 생육도와 효소활성을 측정하였다.

*C. violaceum* YK 391 균은 Table 1에 나타난 바와 같이, 이당류인 sucrose, 다당류인 soluble starch에서 증식속도와 효

**Table 1. Effects of carbon sources on the production of the CODase from *C. violaceum*.**

Carbon sources (1%)	Growth (600 nm)	CODase activity (units/ml)
None	1.63	84
Glucose	1.84	36
Fructose	1.97	76
Mannose	2.10	108
Lactose	1.74	52
Maltose	1.71	40
Sucrose	1.61	120
Raffinose	1.56	92
Dextrine	1.84	80
Soluble starch	1.61	120
Glycerol	1.67	104
Ethanol	1.64	76

Various carbon sources were added at the final concentration of 1.0% to basal medium that consisted of peptone 0.1%, yeast extract 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, and pH adjusted to 7.0. *C. violaceum* was at 30°C with shaking (150 rpm) for 4 days.

소 생성능이 가장 뛰어났으며 알코올류인 glycerol에 의해서도 어느 정도 효소생성능이 좋았다. 그러나 포도당에 의해서 는 균의 생장이 비교적 양호한 곡선을 나타내었지만 효소생 성능은 가장 낮았다. 이 결과는 이 세균이 생산하는 세포외 효소생성에 포도당이 양호했다는 결과와는 다른 결과였지만 [13], soluble starch가 가장 양호하다는 측면에서는 같은 결 과를 나타내었다. 또한 *Bacillus stearothermophilus*[12]에 의 한 세포내 CODase 생성에서는 soluble starch가 양호하다는 결과도 있었다. Soluble starch가 균의 세포내 효소와 세포외 효소생성에 양호한 것으로 미루어 균은 전분을 가수분해하 는 amylase의 생성도 양호하다고 추측될 뿐 아니라 다당류 를 분해하여 에너지원으로 이용할 수 있는, 균임을 알 수 있 었다.

미생물의 증식에 따른 효소생산에 대하여 가장 양호한 soluble starch의 최적 농도를 알아보기 위하여 효소생성 기 본배지에 soluble starch량을 변화시켜 제조한 배지에 종균 배양액을 1% 접종한 다음, 진탕배양시켜 균의 생육도와 세 포내 효소의 활성을 조사하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이, soluble starch의 농도가 1.5%까지는 농도가 증가함에 따라 효소활성이 양호함을 나 타내었으나 그 이상의 농도에서는 soluble starch의 농도가 증가함에 따라 효소활성이 점차적으로 감소되는 양상을 나 타내었으며 0.75% soluble starch가 가장 양호하였다. 또한 Table 2에는 나타내지 않았지만 soluble starch의 농도가 3% 이상인 경우에 본 균의 생장이 급격히 억제되는 것으로 보 아 어떤 한계점 이상의 농도에서는 당압박(삼투압)에 의하여 생육이 억제되는 것이 아닌가 사료된다.

### 질소원의 영향

*C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase의 생성에 미치

**Table 2. Effects of soluble starch on the production of the CODase from *C. violaceum*.**

Concentration (%)	Growth (600 nm)	CODase activity (units/ml)
None	1.62	84.0
0.50	1.83	99.4
0.75	1.72	130.0
1.00	1.80	126.0
1.25	1.82	114.0
1.50	1.78	120.0
1.75	1.71	118.0
2.00	1.90	90.0
2.50	1.71	72.0
3.00	1.83	88.0

The *C. violaceum* was incubated with different concentration of soluble starch to basal medium that consisted of peptone 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, adjusted to pH 7.0. The cultivations were carried out at 30°C for 4 days with shaking (150 rpm).

는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 soluble starch 0.75%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%를 혼합한 효소생성 배지(pH 7.0)에 각 종의 질소원을 각각 1%씩 첨가하고 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml씩 넣은 후, 종균 배양액을 1%되게 접종 하여 30°C에서 4일간 진탕 배양하였으며 균의 생육도와 효 소생성능을 측정하였다.

Table 3에 나타난 바와 같이, 균은 유기 질소원인 peptone 에서 최적의 생육도와 효소생성능을 나타내었으며, 여러 종 류의 질소원이 함께 첨가된 배지에서는 효소활성이 약간 증 가되는 양상을 나타내었다. 또한 무기질소원인 NH<sub>4</sub>Cl과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서도 다른 유기질소원에 비해서 균의 생육도는 낮았지만 효소생성은 높게 나타났다. 미생물의 증식과 효소 활성에 대하여 가장 양호한 질소원인 peptone의 최적 농도를 알아보기 위하여, 배지의 초기 peptone의 농도를 변화시켜 종 균 배양액을 1% 접종하였다. 즉, soluble starch 0.75%, yeast extract 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%를 함유한 효소생성 기본배지(pH 7.0)에 peptone의 농 도를 변화시켜 제조한 배지에서 30°C에서 4일간 진탕 배양 하여 균의 생육도와 효소생성능을 측정하였다.

Table 4에 나타난 바와 같이, peptone의 농도가 증가함에 따라 균의 생육도와 함께 효소생성이 증가하는 양상을 나타 내었으나, 1.5% 이상의 농도에서는 농도 증가에 따른 효소 생성의 증가 양상은 나타나지 않았으며 최적의 peptone의 농 도는 1.5%이었다.

### 초기 pH의 영향

효소생성에 미치는 배양액의 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 soluble starch 0.75%, peptone 1.5%, yeast extract

**Table 3. Effects of nitrogen sources on the production of the CODase from *C. violaceum*.**

Nitrogen sources (%)	Growth (600 nm)	CODase activity (units/ml)
None	1.90	120
Asparagine	2.13	130
Peptone	2.12	138
Tryptone	2.07	124
Casein	2.33	98
Yeast extract	2.08	130
Soybean meal	2.00	90
NH <sub>4</sub> Cl	1.78	124
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.69	124
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.19	98
KNO <sub>3</sub>	1.28	92
peptone 1% + yeast extract		
0.1% + meat extract 0.1%	2.14	142

Various nitrogen sources were added at the final concentration of 1.0% to the basal medium that consisted of soluble starch 0.75%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05% and pH adjusted to 7.0. The cultivations were carried out at 30°C for 4 days with shaking (150 rpm).

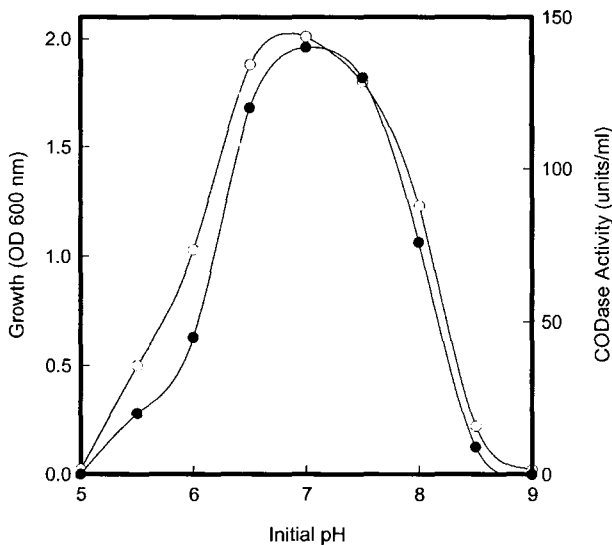
**Table 4. Effects of various concentration of peptone on the production of the CODase.**

Concentration (%)	Growth (600 nm)	CODase activity (units/ml)
None	1.83	120.0
0.50	1.90	135.0
0.75	1.99	138.0
1.00	2.12	142.0
1.25	2.14	148.0
1.50	2.08	150.0
1.75	2.04	138.0
2.00	1.90	142.0
2.50	2.08	142.0
3.00	2.15	145.0

The *C. violaceum* was incubated with different concentration of peptone to basal medium that consisted of soluble starch 0.75%, yeast extract 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05% and pH adjusted to 7.0. The cultivations were carried out at 30°C for 4 days with shaking (150 rpm).

0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%을 함유한 효소생성 배지에 초기 pH를 각각 다르게 조절하여 배지 100 ml를 250 ml 삼각 플라스크에 주입하고 121°C에서 15분간 살균한 다음, 5일간 배양한 종균 배양액을 최종 농도가 1%가 되게 접종하여 30°C에서 4일간 진탕 배양하였으며 균의 생육도와 효소생성능을 측정하였다.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 본 효소생성은 초기 pH가 6.5에서 7.5까지 균의 증식과 더불어 효소 생성이 가장 양호했지만, 산성 혹은 염기성 pH로 갈수록 균의 증식이 감소하



**Fig. 1. Effect of initial pH on the enzyme production.** The cultural medium contained soluble starch 0.75%, peptone 1.5%, meat extract 0.1%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.01%, MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05% and pH was adjusted with 1 N NaOH or HCl. The cultivations were carried out at 30°C for 4 days with shaking (150 rpm). Symbols: ○, growth; ●, CODase activity.

였으며 효소생성도 감소하였다. 이는 세포외 효소의 생성이 pH 7.5에서 가장 높았고 균의 증식도 가장 양호하다는 결과 [12]와 유사하였다. 또한 세포내 CODase의 생성 균인 *P. aureofaciens* [11]와 *B. stearothermophilus*[12]의 효소생성의 최적 초기 pH 7.5와 유사하였다.

**배양 온도의 영향**

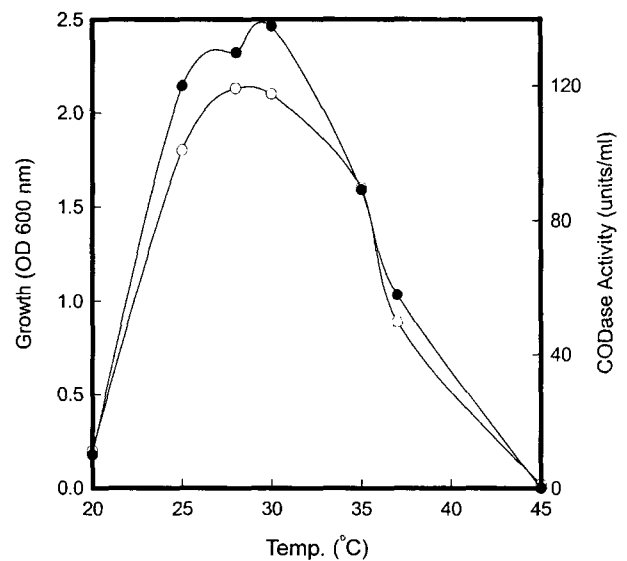
효소생성에 미치는 탄소원의 영향, 질소원의 영향 등의 결과에 따라 선택된 soluble starch 0.75%, peptone 1.5%, meat extract 0.1%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.01%, MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%의 배지 조성에 균에 의한 효소 생성에 미치는 배양 온도의 영향을 검토하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이, 균의 증식은 저온보다는 28°C에서 30°C의 온도에서 양호하였으며 고온 즉, 40°C 이상의 온도에서는 균의 생육도와 효소생성이 점차적으로 낮아졌다. 이 실험 결과 30°C가 가장 양호하여 생육 최적온도와 효소생성의 최적온도가 일치함을 알 수 있었다.

**배양시간에 따른 효소의 생성**

효소 생성 최적 배지 조성인 soluble starch 0.75%, peptone 1.5%, meat extract 0.1%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.01%, MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%의 배지(pH 7.5)에 1%되게 종균 배양액을 접종하여 28°C에서 진탕배양하면서 배양시간에 따른 생육도와 효소생성능을 측정하였다.

Fig. 3에 나타난 바와 같이, 균은 12시간의 유도기를 거쳐 배양 72시간 이후에 최대 생육도를 나타냈으며, 균의



**Fig. 2. Effect of cultural temperature on the enzyme production.** The cultural medium contained the same composition of Figure 1. The cultivations were in accordance with those of Figure 1, except cultural temperature described in Figure 1. Symbols: ○, growth; ●, CODase activity.

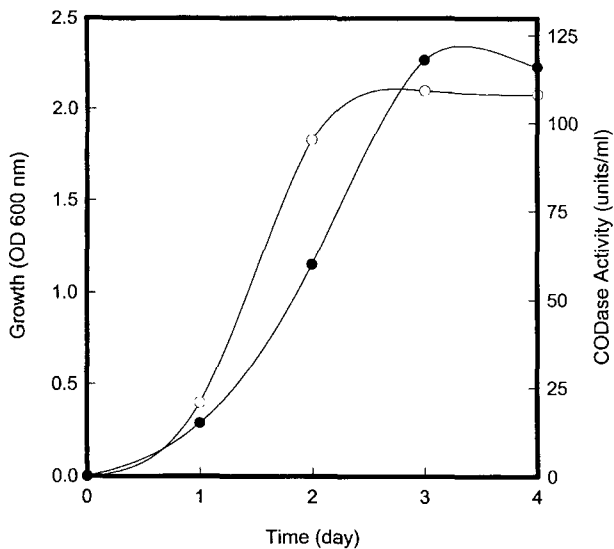


Fig. 3. Growth and the CODase production patterns of *Chromobacterium violaceum* YK 391. The cultivations were carried out as described in Figure 1. Symbols: ○, growth; ●, CODase activity.

증식과 효소생성 정도는 거의 일치하는 양상을 나타냈다. 본 균은 균의 증식곡선과 효소생성 곡선이 거의 일치하게 효소가 생성되었으며 정지기 중기인 배양 3일 이후부터 효소 생성량은 서서히 감소되었다. 이는 *P. aureofaciens*의 세포내 CODase[8,11]가 배양 2~3일 이후 효소활성이 감소한다는 결과와 일치하였다. 균에 의해 세포외로 분비되는 CODase의 경우 효소생성이 가장 우수한 시기가 균의 생육시기 중 정지기 초기부터였으며, 본 균의 세포내 효소생성은 증식곡선과 같이 효소가 생성되어 정지기 전기에 효소생성은 거의 완료되었다. 이상의 결과로부터 본 세포내 효소생성 양상은 전형적인 세포내 CODase임을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 cytosine deaminase(CODase)의 활성이 비교적 높은 *Chromobacterium violaceum* YK 391의 생육과 세포내 CODase의 최적 배양조건을 규명한 결과, soluble starch 0.75%, peptone 1.5%, yeast extract 0.1%, meat extract 0.1%, NaCl 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%였다. 배지의 초기 pH 6.5에서 7.5까지 생육과 더불어 효소생성이 가장 양호했지만, 산성 혹은 염기성 쪽으로 갈수록 균의 증식의 둔화와 더불어 효소생성 정도도 낮아졌다. 효소 생성에 미치는 배양 온도의 영향을 검토한 결과, 균의 생육은 저온보다는 28°C에서 30°C의 온도에서 양호하였으며, 40°C 이상의 고온에서는 생육 및 효소 생성이 점차적으로 낮아졌고 균의 증식과 배양일수에 따른 효소활성에 있어서 균은 12시간의 유도기를 거쳐 배양 72시간 이후에 최대 생육도를 나타냈

며 균의 증식과 효소 생성 정도는 거의 일치하는 양상을 나타냈다.

## REFERENCES

- Bradford, B. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing for the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
- Hahn, A. and W. Lintzel. 1923. Über das Verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen. I. Einfluss von hefe auf pyrimidinderivate. *Z. Biol.* **79**: 179-184.
- Hahn, A. and L. Schafer. 1925. Über das Verhalten von pyrimidin derivaten in den organismen. II. Einwirkung von Bacterium coli auf uracil und cytosin. *Z. Biol.* **83**: 511-514.
- Ipata, P. L., F. Marmochii, G. Magni, R. Felio, and G. Polidoro. 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochem.* **10**: 4270-4276.
- Koechlin, B. A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel, and R. Duschinsky. 1966. The metabolism of 5-fluorocytosine-2<sup>14</sup>C and of cytosine-1<sup>4</sup>C in the rat and the disposition on 5-fluorocytosine-2<sup>14</sup>C in man. *Biochem. Pharmac.* **15**: 435-446.
- Kream, J. and E. Chargaff. 1952. On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* **73**: 5157-5150.
- Sakai, T., T. S. Yu, H. Tabe, and S. Omata. 1975. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1623-1629.
- Sakai, T., T. S. Yu, K. Taniguchi, and S. Omata. 1975. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 2015-2020.
- West, T. M., S. Shanly, and G. A. O'Donovan. 1982. Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta.* **719**: 251-258.
- Yergatian, S., J. B. Lee, M. J. Geisow, and J. C. Ireson. 1977. Cytosine deaminase: Structure modification studies. *Experimentia.* **33**: 1570-1571.
- Yu, T. S. 1976. Nutritional and cultural characteristics of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Kwahaknonzip Keimyung University.* **3**: 97-106.
- Yu, T. S. and T. H. Kim. 1992. Some properties of partially purified cytosine deaminase from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 305-309.
- Yu, T. S. and T. H. Kim. 1997. Optimization of extracellular cytosine deaminase production from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 89-95.
- Yu, T. S. and T. H. Kim. 1997. Isolation and identification of bacterium producing extracellular cytosine deaminase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 9-14.
- Yu, T. S. and T. H. Kim. 1999. Purification and properties of extracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 173-178.
- Yu, T. S., J. K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai, and K. Tonomura. 1991. Purification and some properties of cytosine

deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 266-269.

17. Yu, T. S. and T. H. Kim. 1998. Chemical modification of

cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **36**: 39-42.

**(Received Sep. 19, 2002/Accepted Nov. 15, 2002)**