

## 미생물 효소에 의한 핵산 및 그의 관련물질의 분해에 관한 연구

김 상 순

(숙명여자대학교)

(1970. 3. 31. 수리)

### Studies on Degradation of Nucleic acid and their Related Compounds by Microbial Enzymes.

Sang Soon Kim

(Sook Myung Women's University)

(Received March 31. 1970)

#### Summary

As a series of studies on the nucleic acids and their related substances 210 samples were collected from 76 places such as farm soil, compost of heap, nuruk and meju to obtain microbial strains which produce 5'-phosphodiesterase.

From these samples total of 758 strains were isolated by the use of dilution pour plate method. For all isolated strains primary screening of the productivity of RNA depolymerase was performed and useful strains with regard to 5'-phosphodiesterase productivities were identified.

For these useful strains optimum condition, the effect of various compounds on the activity of 5'-phosphodiesterase, and the optimum condition for enzyme reaction were discussed.

The quantitative of 5'-mononucleotides produced by the action of 5'-phosphodiesterase was performed using anion-exchange column chromatography and their identified was done by paper chromatography, thinlayer chromatography, ultra violet spectrophotometry, and characteristic color reaction using carbazole and schiff's reagent.

(1) *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 and *Streptomyces aureus* SOA 4-21 from soil were identified as a potent 5'-phosphodiesterase producing strains.

(2) Optimum culture conditions for *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain isolated were found to be pH 5.0 and 30°C, and the optimum conditions for enzyme action of 5'-phosphodiesterase were pH 4.2 and 60°C.

Best carbon source for the production of 5'-phosphodiesterase was found to be sucrose and ammonium nitrate for nitrogen source. Addition of 0.01% corn steep liquor or yeast extract exhibited 20% increase in the amount of 5'-phosphodiesterase production compared to the control.

5'-phosphodiesterase produced by this strain was activated by Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> and was inhibited by EDTA, citrate, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>.

5'-phosphodiesterase produced 5'-mononucleotide from RNA at a rate of 65.81%, and among the 5'-mononucleotides accumulated 5'-GMP only was found to have flavourous and the strain was also found lack of 5'-AMP deaminase.

Productivity of flavourous 5'-GMP was found to be 186.7mg per gram of RNA.

(3) Optimum culture conditions for the isolated *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain were pH 7.0 and 28°C, and the optimum conditions for the action of 5'-phosphodiesterase were pH 7.3 and 50°C.

The best carbon source for 5'-phosphodiesterase production was found to be glucose and that of nitrogen was asparagine.

Addition of 0.01% yeast extract exhibited increased productivity of 5'-phosphodiesterase by 40% compared to the non-added control.

5'-phosphodiesterase produced by this strain was activated by Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> and was inhibited by citrate, EDTA, Cu<sup>++</sup>.

It was also found that the strain produce 5'-AMP deaminase in addition to 5'-phosphodiesterase. For this reason although decomposition rate was 63.58% the accumulation of 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP and 5'-UMP occurred by the breakdown of RNA.

In the course of these reaction 5'-AMP deaminase converted 60% of 5'-AMP thus produced into 5'-IMP and flavourous 5'-mono nucleotide production was significantly increased by this strain over the above mentioned one.

Production rates were found to be 171.8mg per gram of RNA for 5'-IMP and 148.2mg per gram of RNA for 5'-GMP, respectively.

## 서 언

식품의 palatable taste는 단맛, 짠맛, 신맛 및 쓴맛의 네가지 맛이 잘 조화된 맛에 해당되며 그 대표적인 맛은 protein 또는 nucleic acid 등이 분해되어 생긴 유리아미노산 및 정미성(呈味性) 5'-mono nucleotide에서 올 수 있다. glutamic acid는 Ikeda<sup>(2)</sup>가 다시마(昆布)에서 처음 구수한 맛의 주 성분으로 분리하여 amino acid가 식품의 맛과 관계됨을 보고하였고 정미 주성분으로서의 핵산계화합물에 대한 본격적인 연구는 Kodama<sup>(1)</sup>가 katsuo bushi (dried bonito)의 정미주성분이 inosinic acid의 histidine 염일을 보고한 이래 약 40년이 지나서 이루어졌다.

즉 1960년 Kuninaka<sup>(3)</sup>에 의하면 5'-mononucleotide인 5'-guanylic acid(5'-GMP)와 5'-xanthylic acid(5'-XMP) 5'-inosinic acid(5'-IMP)는 같은 정미성을 가지며 그맛의 강도가 5'-GMP > 5'-IMP > 5'-XMP의 순서로 낮아지고 또한 mononucleotide의 화학 구조에서 purine base의 6 위치에는 OH기가 붙어 있는 것과 5탄당인 ribose의 5 위치에는 인산기가 결합하고 또한 purine base의 2 위치에 H가 결합된 5'-IMP, NH<sub>2</sub>가 결합된 5'-GMP, OH가 결합

된 5'-XMP와 같이 purine base의 2 위치에 일정한 기(基)가 연결된 구조에서만이 정미성이 발현(發現)된다고 보고한 이래 이 방법의 연구가 활발히 이루어졌다. Ogata<sup>(4)</sup>는 DNA 유도체인 5'-dIMP, 5'-dGMP도 정미성분임을 보고 하였고 Shimazono<sup>(5)</sup>는 식품중의 정미성 5'-mononucleotides를 meat type 수조어육(獸鳥魚肉) 중의 AMP에서 유래되는 IMP형, plant type(표고버섯) 등의 GMP-형, milk type(orotic acid) 그리고 autolysis type(RNA 분해, 추출물) 4가지로 분류 보고한바 있다.

한편 Huang<sup>(6)</sup>은 5'-mononucleotides에서 purine ring이 필수적으로 정미성과 연관하지는 않음을 지적하면서 purine ring이 개열된 상태로 있는 5-amino-4-imidazole carboxamide-ribose(AICAR) 및 5-amino-4-imidazole(N-Succinyl) carboxamide ribotide(SAICAR)가 정미성이 있음을 보고한바 있다. Shimazono<sup>(5)</sup> Kuninaka<sup>(7)</sup> 등은 5'-inosinic acid 5'-guanylic acid 등의 맛을 mono sodium glutamate(M.S.G.)의 그것과 비교하여 정미성 5'-mononucleotide인 5'-IMP, 5'-GMP가 MSG보다 맛이 강력하고 보드러운 맛을 주며 또한 5'-IMP(2.5g), 5'-GMP(2.5g)과 MSG 95g을 혼합 병용하면 맛의 상승작용(相乘作用)이 두드러지게 발현됨을 보

코하였다.

정미성 5'-mononucleotide 가 수용액 중에서 식품가공 또는 조리과정에서 100°C 까지 가열하여도 안정하고 100°C 이상에서도 증성, 약 alkali 성에서는 안정하나 pH 5.0 이하의 산성에서는 불안정하여 분해됨이 岡本<sup>(8)</sup> 鹿又<sup>(9)</sup> 栗山<sup>(10)</sup> 藤田<sup>(11)</sup> 橋田<sup>(12)</sup> 등에 의하여 밝혀졌다. 그리고 Tidus<sup>(13)</sup>는 5'-IMP, 5'-GMP 를 식품의 맛을 특미(特味)있게 개량하는 Flavor enhancer 라 하였으며 Kurtzman<sup>(14)</sup> Caul<sup>(15)</sup> 등이 5'-IMP 의 flavor modifying property 에 관하여 41 종의 식품에 대하여 검토한바 식품의 풍미가 두드러지게 향상됨을 강조하고 가수분해취(臭) 등 불쾌취를 감소시키는 효과가 있음을 밝힌바 있다. 그리하여 근래에 와서 polynucleotides 인 RNA 에 대한 연구가 Rosen<sup>(16)</sup> Stevens<sup>(17)</sup>에 의하여 시작되어 RNA 에서 5'-mononucleotides 로 분해하는 5'-phosphodiesterase 에 관한 연구는 Plakett<sup>(18)</sup>에 의한 *Asterococcus mycoides* 의 효소, Cohn<sup>(19)</sup>에 의한 snake venom 의 효소 및 intestinal mucosa<sup>(20)</sup> 그리고 Shustter<sup>(21)</sup>에 의한 rye grass 효소, Ballio<sup>(22)</sup>에 의한 *Penicillium citrinum* 효소 그밖에 여러 미생물이 생성하는 핵산분해효소<sup>(23-24)</sup>의 연구와 Kuninaka<sup>(25-27)</sup>에 의한 *Aspergillus oryzae* 의 핵산분해 효소 및 *Penicillium citrinum* 의 5'-phosphodiesterase<sup>(28-30)</sup>에 관한 연구가 있고 Nakashima 에 의한 5'-nucleotidase, 3'-nucleotidase 의 연구<sup>(31-33)</sup> 그리고 Sugimoto<sup>(34)</sup>와 Ogata<sup>(35-50)</sup> 등의 이에 관한 연구 보고와 *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Neurospora*, *Glomerell*, *Monascus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Candida*, *Helminthosporium*, *Rhodotorula* 등의 효소에 의한 핵산분해로 5'-mononucleotide 생성과 *Streptomyces aureus albogriseolus*<sup>(37)</sup>는 RNA 를 70% 분해하여 5'-mononucleotide 로 됨을 보고 하였고 *Asp. quercinus*(IFO 4363)<sup>(45)</sup>가 5'-phosphodiesterase 우수생산 균주이며 이 효소를 pH 8.75 로 하여 RNA 를 분해한 결과 5'-mononucleotide 만을 생성함을 보고한바 있다.

5'-phosphodiesterase 생산균의 효소화학적 screening 에서 Kuninaka<sup>(29)</sup>는 Buchanan<sup>(52)</sup>의 방법을 modify 하였고 Omura<sup>(51)</sup>는 Kalckar<sup>(53)</sup> 방법을 modify 하여 좋은 성과를 얻었다고 보고하였으며 Ibuki<sup>(54-55)</sup> 등은 밀뿌리의 microsome 중의 5'-phosphodiesterase 에 관한 여러가지 특성과 RNA 분해에 의한 5'-mononucleotide 생성 그리고 bovine milk 의 microsome 과 pancreatin의 5'-phosphodiesterase

에 미치는 pH, 온도, 무기이온 등의 특성과 효소의 amino acid 조성 그리고 chromatography 법, electro-phoresis 법의 적용, RNA 분해 및 5'-mononucleotide 생성조건 등에 대한 일련의 연구를 보고하였다.

Kakinuma<sup>(59)</sup> 등은 RNA 분해균으로서 *Streptomyces*, *Neurospora* 등에 속하는 7 균주를 선택하여 5'-mononucleotide 생산능력을 비교하여 *Streptomyces aureus*, *Streptomyces albogriseolus* 의 2 균주가 가장 강하며 70% 수율(收率)로 5'-mononucleotide 를 생산함을 확인하였다.

杉森<sup>(60)</sup>는 *Pichia* 의 효소로 RNA 를 분해시키면 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP 외에 Oligonucleotide 가 생성됨을 보고 하였고 猿野<sup>(61)</sup>는 *Monascus purpureus* Went 가 3'-phosphodiesterase 외에 배양조건 여하에 따라서 5'-phosphodiesterase 를 동시에 생성 시키든가 또는 어떤 한쪽의 효소만을 많이 생산할 수 있음을 보고하였으며 長谷川<sup>(62,63)</sup>는 *Pellicularia H-11* 의 배양 여액으로 RNA 를 분해시켜 74% 수율로 5'-mononucleotide 가 생성됨을 확인하는 동시에 이 조효소(粗酵素)에 대한 여러가지 특성을 조사하였다.

刀根<sup>(64)</sup>는 불완전균류를 이용한 RNA 의 분해법을 써서 균을 screen 하였으며 Iwasa<sup>(65)</sup> 등은 *Streptomyces aureus* 의 5'-phosphodiesterase 로 yeast RNA 를 분해하는데 이 5'-phosphodiesterase 와 공존하는 phosphatase 는 무기 인산에 의하여 현저히 저해됨을 확인하며 5'-phosphodiesterase 는 종래 보고된것과는 완전히 다른 type 의 nuclease 임을 밝혔고 5'-AMP deaminase, 5'-nucleotidase 가 공존함을 발견하였으며 5'-nucleotidase 는 열처리에 의하여 제거되고 5'-AMP 는 5'-IMP 로 전화(轉化)함을 보고 하였다.

그리고 Kawata<sup>(68)</sup> 등은 mung bean sprouts 중의 nuclease pattern 을 구명하는 동시에 5'-phosphodiesterase 에 의한 RNA 분해율과 5'-mononucleotides 생성 그리고 각 nuclease 에 대한 여러가지 특성과 정제에 대하여 보고 한바 있다.

그러나 아직도 우리나라에서는 핵산분해 효소에 의한 5'-mononucleotides 생성에 관한 연구로는 李 등<sup>(69,70)</sup>에 의한 약간의 연구가 되어 있을 뿐이다.

본 연구는 식품의 정미성분으로서 flavor enhancer 인 5'-mononucleotide 를 미생물 효소에 의하여 RNA 를 분해시켜 생산키 위한 기초적 연구를 시도하여 5'-phosphodiesterase 생성 미생물을 분리

선정하고 선정된 우수균주의 5'-phosphodiesterase 를 보다 많이 생산하는데 관한 여러가지 인자를 검토하는 효소생성을 위한 최적조건을 구명하고 이 균의 배양적 형태적 생리학적 제 특성을 검토하여 동정하였다. 동정된 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 의 최적조건과 이 효소의 RNA 분해율을 구명하는 동시에 이 효소에 의한 분해산물로서의 5'-mononucleotide 의 확인, 정량 및 생성조건 등도 검토하였던바 흥미있는 결과를 얻었으므로 여기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### I. 실험 재료

#### [1] 시 료

전국 76 개 지역에서 논, 밭, 산, 하천 등 표층 5 cm 의 토양을 취하고 퇴비, 메주, 누룩 등에서 채취한 총 210 종을 수집하여 균을 분리하는 시료로 하였다.

### II. 실험 방법

#### [1] 미생물의 순수분리

시료 약 5 g 을 멸균한 300 ml 드리 erlenmeyer flask 에 취하고 여기에 멸균된 saline water 100 ml 을 가한 다음 약 5 분간 진탕하며 시료중의 미생물을 균일하게 현탁시키고 미리 멸균한 pipette 와 멸균증류수로서 10 진법으로 희석하는 dilution pour plate method 를 사용하여 petri dish 에 현탁액 1 ml 씩 주입하며 Table I 의 media 에 접종 배양시켜 생겨나는 독립 colony 를 채취 순수분리하되 streak culture 를 하여 냉장고(5°C)에 보관하여 균을 screening 하는데 사용하였다.

Table I. Composition of media for isolation

Medium-1(Mold)		Medium-2(Actinomycetes)	
Sucrose	3.0%	Soluble starch	5.0%
Peptone	1.0%	Asparagine	0.7%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%	Peptone	0.3%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%	NaCl	0.5%
CaCl <sub>2</sub>	0.02%	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02%		
pH	5.6	pH	7.2

#### [2] RNA-depolymerase 생성균주의 1 차 scree-

### ning

#### (1) 효소액의 조제

분리균주 별로 Table I 의 각 media 를 기본배지로 하여 분리균을 각각 접종하여 30°C 에서 5 일간 정지 배양한 후 여과하여 얻은 여액에 toluol 0.5 ml 을 가하여 냉장고에 보관하여 조효소액으로 사용하였다.

#### (2) 효소기질의 조제

Kuninaka,<sup>(26)</sup> Sugimoto<sup>(84)</sup> 법을 modify 하여 yeast RNA(E. Merck 계) 1 g 와 agar(Difco 계) 2.5 g 에 효소의 optimum pH 를 감안하여 M/10 acetate buffer solution 20 ml, M/10 tris malate-NaOH buffer solution(pH 9.5) 20 ml, 및 borate buffer solution(pH 8.0) 20 ml 를 각각 넣고 이에 또다시 증류수 80 ml 을 가한 후 60°C 이하에서 녹여서 RNA 의 고체기질로서 사용하였다.

#### (3) RNA-depolymerase 및 Phosphodiesterase activity 의 비교<sup>(67-70)</sup>

1% RNA 의 buffered substrate 18 ml 를 직경 9 cm 의 petri dish 에 유입방냉(流入放冷)하여 plate 를 만들고 stainless steel 재 cup(height 1cm, width 0.8cm)을 plate 에 병치(並置)하고 여기에 효소액 0.5 ml 씩을 분주하여 40°C 의 incubator 에서 1 시간 효소를 작용시킨 다음 cup 과 효소액을 제거하고 uranyl reagent<sup>(26)</sup>(uranyl acetate 0.25g, trichloroacetic acid 2.5 g 을 증류수 100 ml 에 용해한것)를 plate 전면에 유입한 후 약 10 분간 실온에 방치하여 효소작용을 저지(沮止)시키면 효소에 의하여 반응하지 않은 부분은 백탁이 되고 RNA-depolymerase 가 작용하여 분해된 RNA 부분은 uranyl reagent 에 용해 됨으로 투명한 ring 을 나타낸다. 투명한 ring 의 투명도와 직경을 vernier 로 측정하여 RNA-depolymerase activity 를 비교하였다. 그리하여 uranyl reagent 를 제거하고 Fiske Subbarow<sup>(71,72)</sup>의 molybden 산 II solution(2.5g의 ammonium molybdate 를 증류수 200 ml 에 녹인 다음 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 300 ml 을 가하여 final volume 을 1 l 로 한것) 10 ml 와 amino naphthol sulfonic acid solution(0.5g 의 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 를 15% NaHSO<sub>4</sub> solution 195 ml 에 녹인 다음 20 % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O solution 5 ml 를 가하여 혼합한 용액) 4 ml 를 혼합한 용액을 투명한 ring 부위에 1 방울씩 떨어뜨려 실온에 방치하여 5~20 분 사이에 청색으로 나타나면 RNA-depolymerase 중에 유리인산으로 분해시키는 phosphomonoesterase 가 공

존함을 알수 있다. 한편 청색이 나타나지 않으면 phosphomonoesterase 는 들어있지 않고 phosphodiesterase 만이 작용하여 RNA 가 분해되어 최종 분해산물로서 mononucleotide 가 생성됨을 알수 있으므로 이때의 RNA-depolymerase 활성도를 phosphodiesterase activity 로 간주하여 비교하였다.

### [3] RNA-depolymerase 생성균주의 2 차 screening

1 차 screen 에서 선발된 균주에 대하여 Table I 의 기본 배지 또는 밀기울등에 yeast extract, corn steep liquor, casamino acid, vitamin free casamino acid 및 mineral salts 등을 첨가하여 1 차 screen 방법에 의하여 효소생성 능이 우수한 균주를 선정하였다.

### [4] 선정된 우수균주의 배양 및 5'-phosphodiesterase 의 작용 최적 조건 구명

앞에서 분리, 선정된 우수균주에 대하여 pH, 온도, 탄소원, 질소원, growth factor, 등을 달리한 배지에서 5 일간 배양하여 5'-phosphodiesterase 의 생성을 비교하고 이들이 생성한 효소의 특성을 pH, 온도, mineral salts 별로 비교검토하였다.

#### (1) pH 의 영향

선정된 우수균주에 대하여 배지 및 효소기질의 pH 를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 으로 조정하여 시험하였다.

#### (2) 온도의 영향

선정된 우수균주를 optimum pH 로 조정하여 24, 28, 32, 36, 40, 45°C 에서 검토하였다.

#### (3) 탄소원의 영향

배지의 탄소원을 달리하여 optimum pH, optimum temperature 에서 배양, 비교하였다.

#### (4) 질소원의 영향

최적탄소원으로된 배지의 질소원을 달리하고 optimum pH, optimum temperature 에서 5 일간 배양 비교하였다.

#### (5) Miscellaneous compounds 의 영향

배지 1 l 에 0.1g 의 yeast ext., corn steep liquor, casamino acid, vitamin free casamino acid 를 각각 첨가한 구와 이와 같은 것을 넣지않은 control 구와 비교하였다.

#### (6) Mineral salts 의 영향

$10^{-3}M$  의  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ , Na-Citrate 및 EDTA 를 각각 첨가한 구와 이것을 첨가하지 않은 control 구와 비교하였다.

### [5] 선정된 우수균주의 동정

분류학적 연구로 Pelczar<sup>(75)</sup>의 "Manual of Microbiological method"에 따라 2 차 screening 에서 phosphodiesterase 생성이 우수한 것으로 선정된 균주중 *Streptomyces* 속은 배양적, 형태학적, 생리학적 특성을 검토하여 Bergey's<sup>(76)</sup> manual 에 의하여 동정하고 Thom & Raper<sup>(77)</sup>의 Manual of *Penicillia* 에 의하여 *Penicillium* 속은 동정하였다.

### [6] Adenylic acid deaminase activity

#### (1) 효소액의 조제

분리 선정된 균주의 최적조건으로 배양한 배지를 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로하며 전기와 같이 보관하여 사용하였다.

#### (2) 효소기질액

$3 \mu$  mole 의 5'-adenylic acid(buffered-solution) solution 을 효소기질액으로 사용하였다.

#### (3) 효소반응 및 활성도의 확인

Buffered substrate 4.0 ml 에 효소액 1 ml 를 가하며 40°C 에서 1 시간 반응시킨 다음 가열처리하여 반응을 정지시킨 것을 paper chromatography 로 전개하여 UV-흡수와 Rf 값으로 5'-AMP 와 5'-IMP 를 동정하고 또한 효소액의희석도에 따라서 adenylic acid deaminase 의 활성도를 비교, 확인하였다

### [7] Chromatography

(1) Chromatography(thinlayer 및 paper)용 시료의 조제<sup>(78,79)</sup>

Fig. 1 에서와 같이 처리한 것을 spotting 하였다.

#### (2) 조작법

##### ㄱ) Thin layer chromatography

Randerath<sup>(78)</sup>의 DEAE-Cellulose powder(Fa.Machinery und Nagel. Düren)를 흡착제로 사용하고 0.02 N HCl 를 solvent 로 하여 실온에서 약 40 분간 전개시킨 것을 60°C 에서 건조하여 UV-absorbing spot 를 확인하였다.

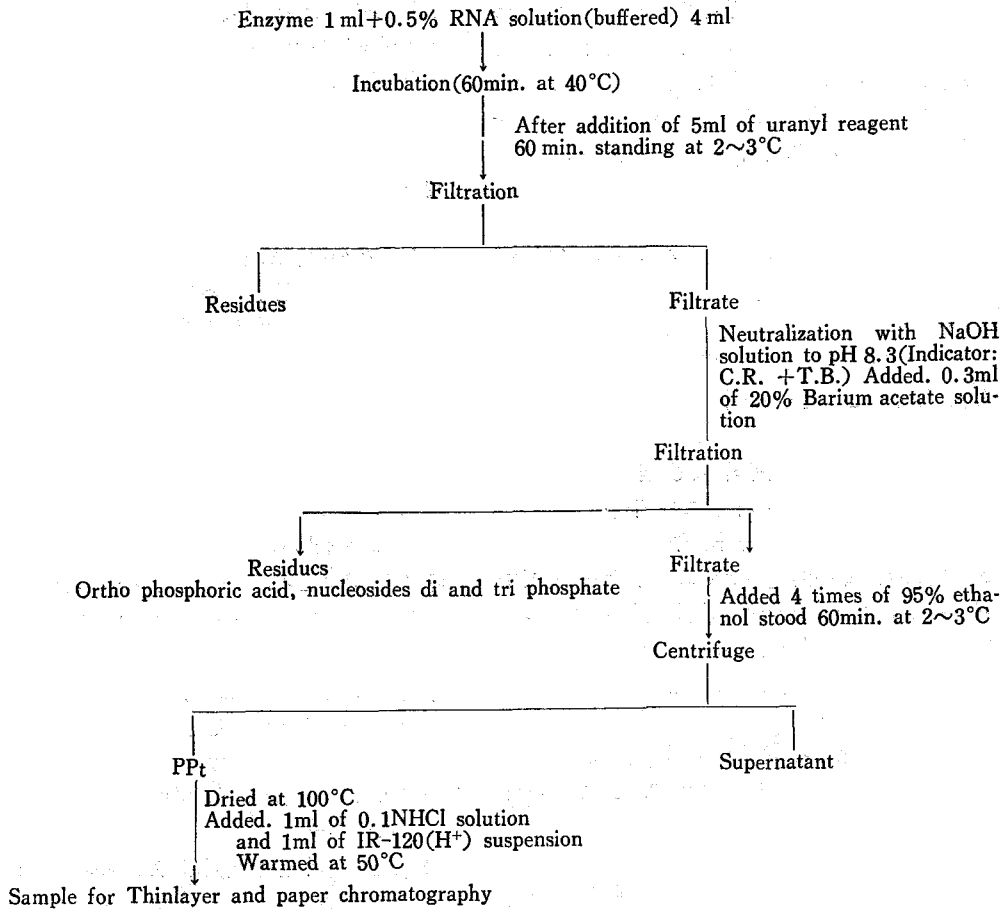
##### ㄴ) paper chromatography

Markham, Smith<sup>(80)</sup>의 Isopropanol:saturated ammonium sulfate:IM sodium acetate(2 : 79 : 19)를 solvent system 으로 하여 whatman paper No. 1 을 사용하며 일반적인 방법에 의하여 실온에서 10 시간 전개한 후 60°C 에서 건조하여 UV-absorbing spot 를 확인하였다.

#### [8] UV-흡수물질의 확인

Holiday<sup>(81)</sup>에 의한 방법으로 thin layer chromatography 그리고 paper chromatography 에서 분리된 spot 에 Ultra Violet light (filter-2537Å)를 조사하여 spot 가 검게 보인것을 UV 흡수물질로 표

Fig. 1. Preparation of sample for chromatography



식하였다.

[9] Carbazole reaction 및 Periodate oxidation

Thin layer chromatography 조작법에서 UV absorbing spot 로 Rf 값을 확인한 후 Dische<sup>(74)</sup> 등의 carbazole reaction 으로 UV-absorbing spot 가 blue 로 나타나면 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-IMP 임을 알수 있고 그밖의 다른 mononucleotide 는 blue 로 발색 하지 않으므로 이를 분별할 수 있었다.

그리고 Buchanan Dekker<sup>(62)</sup>의 periodate oxidation 은 UV-absorbing spot 에 1% sodium meta periodate solution 을 충분히 spray 한 후 60°C 에서 건조 하여 SO<sub>2</sub> gas 로 처리하고 미리 SO<sub>2</sub> gas 로 표백된 0.1% rosaniline solution 을 spray 한 것을 실온에서 1~2 시간 방치한 후 blue spot 가 나타나면 pentose 의 5'-위치에 인산이 붙은 5'-mononucleotide 임을 확인 동정하고 purple spot 로 나타나면 3', 2'-mononucleotide 임을 확인하였다.

[10] RNA 분해물중의 5'-mononucleotide의 정

량

(1) Column chromatography 용 시료 조제<sup>(31,82,83)</sup>  
2% RNA buffered solution 0.5ml 에 효소액 0.5ml 를 가하여 optimum temperature 에서 2 시간 반응 시켜 uranyl reagent 0.25 ml 를 가하여 반응을 정지시킨 후 이것을 원심분리하고 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 를 가하여 pH 2.0 으로 조정하고 coconut active charcoal column 에 흡착시킨 후 0.01 M EDTA 를 함유한 ethanol 로 용출하여 얻은 액을 Amberite IR 120 column 을 통과시킨 액에 1 N NH<sub>4</sub>OH 를 가하여 pH 9.5 로 조정하여 Dowex-1×8 column (formic type) 용 시료로 하였다.

(2) Ion exchange resin column<sup>(31,84)</sup>의 준비

Ion exchange resin 은 Dowex-1×8(200-400 mesh) 을 사용하였으며 강염기성 ion 교환수지를 증류수에 넣고 교반하여 부유되는 입자를 경사제거한 후 column 에 이 수지를 충전하고 수지량의 5-10 배량(v/v) 에 해당하는 6 N-formic acid 와

IM-sodium formate 용액을 같은 양 섞은 혼합액을 column 에 통과시키고 이어서 5-6 배량(v/v) 의 88% formic acid 를 통과시킨후 재증류수를 통과시켜 유출액이 증성이 될때까지 계속 세척하였다.

이와같이 하여 활성화된 formic acid type ion 교환 수지를 pyrex 제 column(0.9×7cm)에 약한 압력을 가하면서 기포가 생기지않게 균일하게 수지를 충전하였다. 그리하여 상압하에서 이 column 에 서로액을 서서히 가하여 nucleotide 성분을 수지에 흡착시켜 재증류수로 1~2 회 세척하여 column 준비를 완료하였다.

### (3) Stepwise elution system

Formic acid 와 formate solution 을 용출액으로 사용하고 수압을 조절하여 1ml/min.의 유속(流速)이 되게하여 automatic fraction collector(Rinco Co. 제)로 10 ml씩 분취하였다. 이리하여 150개의 fraction 을 얻을수 있었다.

### (4) Optical density 측정<sup>(31,84)</sup>

Fraction collector 로 얻은 fraction 을 silica cell에 넣어 Beckman spectrophotometer DU-type 을 사용하여 파장 260m $\mu$ ~280m $\mu$ 에서 O.D 를 측정하였으며 이 O.D 값을 각 fraction No. 에 대하여 plot 하여 각 nucleotide 가 column 에서 용리(溶離)되는 위치를 표준 nucleotide 의 각 peak 와 비교하였다.

### (5) 각 nucleotide 의 동정

260 m $\mu$  의 파장에서 흡수가 peak 로되는 각 개의 fraction 을 모아 1 N-HCl 를 사용하여 pH 2.0 으로 조정하고 active charcoal column 에 흡착시켜 수세한 후 1.4% NH<sub>4</sub>OH 를 함유한 50% ethanol 로 용출하여 rotary vacuum evaporator 로 농축하고 UV-absorption spectra 측정용 및 paper chromatography 용 시료로 하였다.

UV-absorption curve 는 220 m $\mu$ 에서 300 m $\mu$ 까

지 5 m $\mu$  간격으로 O.D 를 연속 측정하여 authentic compound 의 표준곡선과 비교동정하였으며 paper chromatography 의 Rf 값 등에 의하여 동정을 재확인하였다.

### (6) 각 nucleotide 의 mol 농도 산출<sup>(85,86)</sup>

각 peak 의 O.D 합계에서 back ground 를 빼 다음 각 nucleotide 의 extinction coefficient 로 나눠서 각 nucleotide 의 mol 농도를 산출하였고 이때 260 m $\mu$ 의 extinction coefficient 는 pH 2.0 으로 조정된 경우의 E 260=14.2(AMP), E 260=11.8(GMP), E 260=6.2(CMP), E 260=9.9(UMP), E260=7.4 (IMP)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### [1] 미생물의 순수분리

전국 76 개 지역에서 논, 밭, 산, 하천등의 토양, 퇴비, 누룩, 메주 등의 시료 210 종을 수집하고 이 시료에서 Table 1.의 배지조성과 dilution pour plate method 로 여러가지 미생물을 순수분리한바 Table 2.에서와 같이 *Aspergillus* 속 240 주, *Penicillium* 속 232 주, *Neurospora* 속 19 주, *Monascus* 속 16 주 그리고 *Streptomyces* 에 속하리라 믿어지는 균주 265 주 등의 독립 colony 에 대하여 형태적 특성을 관찰하고 특징이 다른 균주만을 선택하여 총 758 주를 분리하였는데 그 분리원을 보면 논, 밭, 산의 토양이 압도적으로 많이 분리되었으며 특히 *Streptomyces* 속에 속하는 것이 현저하였다.

### [2] RNA-depolymerase 생성균주의 1차 screening

분리된 모든 균주를 Table 1의 조성인 분리배

Table 2. Isolates from the various collected samples

Isolates	Samples						
	Soil	Compost of heap	Household waste stream	Rotten vegetable	Meju	Nuruk	Total
<i>Aspergillus</i> spp.	103	59	15	12	20	17	240
<i>Penicillium</i> spp.	125	68	5	13	11	10	232
<i>Neurospora</i> spp.	14			2	2	1	19
<i>Monascus</i> spp.	9			4	1	2	16
<i>Streptomyces</i> spp.	232	24	6	3	—	—	265
							758

지에서 배양한 액을 조효소(crude enzyme)로 하여 RNA 분해도를 비교 측정하였다. 즉 plate에서 생성인 uranyl reagent에 가용성인 clear zone의 직경이 12 mm 이상인 것만을 선발하여 Table 3에서 표시하였다. 이렇게 선발된 균주는 molds가 38주 *Streptomyces* 속이 18주, 모두 56주를 선발하였는데 이들은 RNA 분해력가에서 양호한 균주임을 알 수 있다. 그런데 Fiske Subbarow<sup>(71,72)</sup>의 molybden reaction이 blue color인 positive로 되면 RNA가 mononucleotide로 분해된 다음단계인 유리인산과 nucleoside로 분해됨을 알려준다. 본 연구의 목적은 RNA의 분해 최종산물로서 mononucleotides만의 측적을 기대하기 때문에 molybden reaction이 colorless인 negative로 되면 균주의 효소가 RNA를 분해하되 mononucleotides로 측정케하는 phosphodiesterase임을 확인하여 Table 3에서 molybden reaction negative인 5 균주만을 선정하였다.

Table 3. Degradation of RNA by RNA-depolymerase

Strain No.	From isolates	
	RNA-depolymerase activity clear zone(mm)	Molybden reaction
A 8-20	12.1	blue
A 12-4	15.2	"
A 16-9	16.8	"
A 18-11	13.4	indistinct blue
A 19-2	17.7	blue
A 23-8	14.4	"
A 24-10	16.2	"
A 24-16	16.3	"
P 1-3	12.5	indistinct blue
P 2-14	14.8	blue
P 4-7	14.2	"
P 4-24	15.4	"
P 11-3	16.1	"
P 17-6	14.5	indistinct blue
P 19-11	12.4	blue
P 22-8	14.8	"
S 2-18	12.2	colorless
S 4-6	11.8	blue
S 5-1	13.7	"
S 7-16	12.8	colorless
S 7-18	12.0	blue
S 9-3	11.8	"

S 9-8	14.2	blue
S 11-5	16.3	indistinct blue
S 12-3	13.8	blue
S 22-4	16.7	"
AO 4-1	14.6	"
AO 3-8	13.9	"
AO 4-14	11.0	colorless
AO 6-7	16.2	blue
PO 2-11	14.7	colorless
PO 5-7	15.4	blue
SO 4-7	14.5	"
SO 5-8	13.2	"
SO 7-14	17.7	"
SOA 4-21	14.0	colorless
SOA 8-18	14.8	blue
SOA 9-20	15.1	"
SOY 3-18	16.4	"
SOE 7-11	13.4	indistinct blue
SOG 8-18	16.1	blue
SOK 2-17	16.8	"
NO 8-11	12.1	blue
NO 11-13	15.2	"
NO 16-8	18.8	"
MO 17-7	13.8	"
WO 4-11	14.4	indistinct blue
MO 7-14	16.2	blue
MO 8-19	17.1	"
MO 10-6	14.2	"
POA 3-8	15.4	"
POC 4-9	14.5	"
POG 9-11	16.7	"
POK 11-7	12.8	indistinct blue
POX 11-4	13.9	blue
POY 14-9	16.8	"

### [3] RNA-depolymerase 생성균주의 2차 screening

1차 screening에서 얻은 5 균주에 대하여 기본 배지(Table 1)에다 phosphodiesterase 생성능을 높이는 물질을 추구한 결과는 Table 4에서와 같다.

즉 선정된 균주중 PO 2-11 strain은 yeast extract 또는 corn steep liquor를 각각 첨가한 구에서 배양한 것이 두드러진 효소생성능이 높았음을 보였는데 특히 wheat bran 만의 배지에서 배양을 한 조효소의 생성능이 가장 높아서 흥미 있는 사실임을



**Table 4.** Effect of various compounds on phosphodiesterase productivities of isolated strain

Strain No.	Phosphodiesterase activity(mm)				
	Yeast extr.	Corn steep liquor	Casamino acid	Vitamin free casamino acid	Wheat bran
S 2-18	13.4	12.8	12.7	12.1	11.5
S 7-16	14.6	14.0	13.6	13.0	13.4
AO 4-14	15.3	14.7	12.5	11.8	14.5
PO 2-11	21.5	19.0	16.0	15.9	22.4
SOA 4-21	20.8	16.3	15.2	15.4	12.7

**Table 5.** Degradation of RNA by the phosphodiesterase from isolates

Strain No.	Apparent degradation of RNA*(%)	Molybden reaction	Carbazole reaction	Periodate reaction
S 2-18	52.4	negative	blue	blue
S 7-16	64.7	"	"	"
AO 4-14	65.3	"	"	"
PO 2-11	74.2	"	"	"
SOA 4-21	72.8	"	"	"
Alkaline hydrolysate(control)	100.0	blue(positive)	—	purple

\* Calculated from the equation(T/D×100)

T: Optical density at 260m $\mu$  of enzymatic hydrolyzates

D: Optical density at 260m $\mu$  of alkaline hydrolyzates

알았다. 그리고 SOA 4-21 strain 은 yeast extract 를 첨가한 구에서 배양한 조효소의 생성능이 가장 현저하게 높았다.

**Table 6.** Rf-values of 5'-mononucleotides on DEAE-collulose thin layer chromatography.

5'-mononucleotides	Solvent system	
	0.01N HCl	0.02N HCl
5'-Adenylic acid	0.45	0.65
5'-Guanylic acid	0.36	0.60
5'-Cytidylic acid	0.46	0.65
5'-Uridylic acid	0.31	0.49

Thin layer-chromatogram:10<sup>-2</sup> $\mu$  Mol./starting point

그러므로 분리균주 PO 2-11 strain 을 wheat bran 에서 배양하고 SOA 4-21 strain 은 yeast extract 를 보강한 Table 1 의 기본 배지에서 배양하여 crude enzyme 과 RNA 기질용액을 각각 작용시켜 uranyl reagent 로 반응을 정지시킨 후 260 m $\mu$  에서의 O.D 를 측정하고 control 인 alkaline hydrolysate 를 100 으로하여 비교한 RNA 분해율은 Table 5 와

같다. 즉 PO 2-11 strain 이 74.2%이고 SOA 4-21 strain 이 72.8%의 높은 분해율을 나타내었는데 이들은 다같이 molybden 반응이 negative(colorless)이였으며 carbazole 반응과 schiff's 반응은 positive 이였으므로 5'-mononucleotide 임을 확인할 수 있었다. 한편 thinlayer chromatography 로 전개시킨 후 U.V 흡수 spot 를 검토하는 동시에 carbazole 및 schiff's reaction 으로 발색시켜서 확인한 5'-mononucleotides 의 spot 에 대한 Rf 값은 Table 6 및 Fig. 2 와 같다.

그리하여 분리 선발된 균주중 PO 2-11 strain 과 SOA 4-21 strain 은 5'-phosphodiesterase 생성능이 우수한 균주로 선정하였다.

**[4] 선정된 우수균주의 배양 및 5'-phosphodiesterase 의 작용 최적조건 구명**

RNA-depolymerase 활성의 2 차 screen 에서 분리 선정된 2 strain 에 대한 배양상의 생육 최적조건을 구명하기 위하여 배지의 pH 를 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 으로 조정하여 배양하고 또한 배지의 pH 로 optimum pH 를 하고 24, 28, 32, 36, 40°C 의 온도에서 각각 5 일간 배양하여 PO 2-11 strain 은

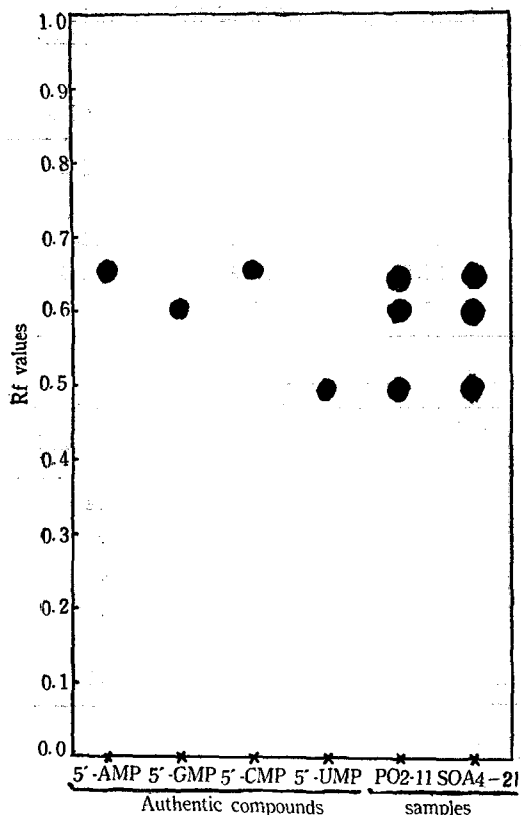


Fig. 2. Thinlayer chromatogram of 5'-mononucleotides.

Solvent system: 0.02N HCl.  
DEAE-cellulose powder.  
Ascending method. at room temp. 9.2cm  
in 40 min.

세포의 dry weight를 비교하고 SOA 4-21 strain은 viable cell을 colorimeter로 검토했으며 그 결과는 Fig. 3의 (a) (b)와 같다.

즉 PO 2-11 strain은 optimum pH가 5.0, optimum temperature가 30°C이고 SOA 4-21 strain은 7.0 및 28°C임을 알았다.

그리고 PO 2-11 및 SOA 4-21 strain이 생성한 5'-phosphodiesterase가 RNA를 분해하는 효소반응의 optimum condition으로서 최적 pH를 구명하기 위하여 RNA 1%의 buffered substrates를 pH 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0으로 하고 배양액을 조효소로 하여 효소반응시킨 결과는 Fig. 4의 (a)와 같으며 PO 2-11 strain이 생산한 효소는 Opt. pH가 4.2이고 SOA 4-21 strain은 Opt. pH 7.3임을 알았다.

효소반응의 최적온도는 Fig. 4의 (b)에서와 같이 PO 2-11 strain의 효소는 60°C이고 SOA 4-21 strain의 것은 50°C이었다.

한편 이들 균주가 생성한 5'-phosphodiesterase의 RNA 분해 반응에서 pH의 안정성을 구명한 결과는 Fig. 4의 (c)에서와 같이 PO 2-11 strain이 생성한 효소는 pH 3.8~5.4에서, 그리고 SOA 4-21 strain의 효소는 pH 6.0~7.5에서 비교적 안정하였다.

이와같이 각균주가 생성한 효소의 최적작용 pH는 이들 균주의 생육최적 pH와 밀접한 상관성을 갖는 것이라 생각된다. 또한 이들 균주가 생성한 5'-phosphodiesterase의 heat stability를 구명한 결

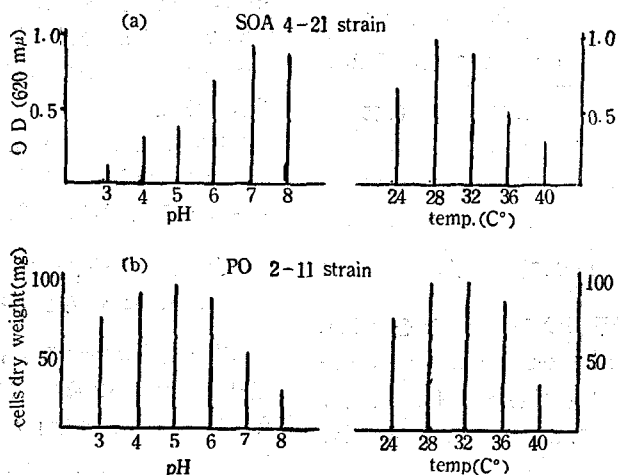


Fig. 3. Optimum conditions of cultivation for selected strain

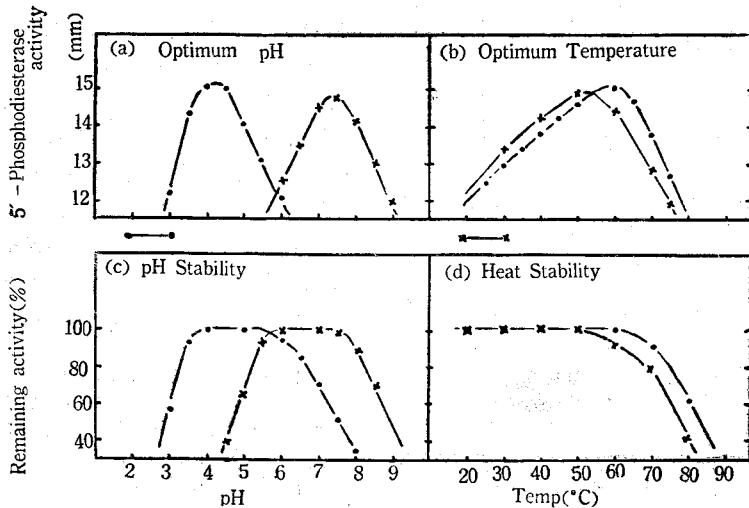
과는 Fig. 4의 (d)에서와 같이 PO 2-11 strain의 효소는 65°C까지는 안전하고 70°C에서 효소활성 감소가 현저하였고 SOA 4-21 strain의 효소는 60°C에서 활성감소를 나타냈으므로 PO 2-11 strain의 효소와 SOA 4-21 strain이 생성한 효소와의 사이에는 내열성에서 약간 차이가 있음을 알았다.

**Table 7.** Effect of various carbon and nitrogen sources on 5'-phosphodiesterase productivities of selected strains

C & N sources	5'-Phosphodiesterase activity (clear zone mm)	
	PO 2-11 strain	SOA 4-21 strain
Glucose	16.2	18.2
Fructose	15.8	16.4
Mannose	15.6	16.1
Galactose	10.2	9.5

Sucrose	18.8	17.6
Maltose	16.4	17.8
Dextrin	17.2	17.0
Starch	17.8	17.2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	18.4	16.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.0	15.4
NH <sub>4</sub> Cl	16.4	15.1
NaNO <sub>3</sub>	15.8	15.9
KNO <sub>3</sub>	14.9	15.6
Casamino acid	18.6	17.9
Peptone	18.1	17.6
Tryptone	18.1	17.8
Asparagine	17.8	18.7

Effect of sole nitrogen source were detected with sucrose and glucose as carbon source for PO 2-11 strain and SOA 4-21 strain, respectively.



**Fig. 4.** Properties of the crude enzymes from isolates PO 2-11 strain and SOA 4-21 strain.

- (a): Reaction mixture was incubated at 50°C for 60 min.  
 (b): Reaction mixture was incubated for 60 min.  
 (c): Remaining 5'-phosphodiesterase activity was measured after the enzyme solution was kept at 25°C for 24 hrs.  
 (d): Remaining 5'-phosphodiesterase activity was measured after the enzyme solution was heated for 30 min. at optimum pH.

Legend: · — · 5'-phosphodiesterase of PO 2-11 strain  
 × — × 5'-phosphodiesterase of SOA 4-21 strain

그리고 5'-phosphodiesterase 생성에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 검토한 결과는 Table 7과 같다.

즉 탄소원으로서 PO 2-11 strain은 sucrose가 그리고 SOA 4-21 strain은 glucose가 가장 양호하였고 이들을 각각 탄소원으로 하여 선정된 균주별

질소원의 영향을 보면 PO 2-11 strain은 casamino acid와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 다같이 비슷하게 우수하였고 SOA 4-21 strain은 asparagine이 가장 우수하였다 선정된 PO 2-11 및 SOA 4-21 양 균주에 대하여 miscellaneous compounds 별로 5'-phosphodiesterase productivity를 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

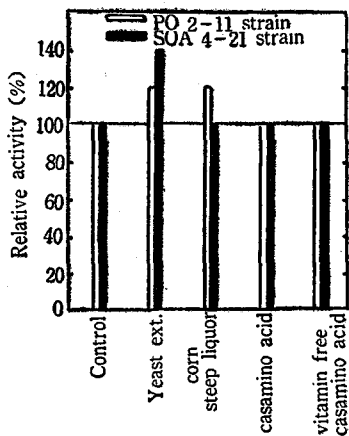


Fig. 5. Effect of miscellaneous compounds on the 5'-phosphodiesterase productivities from isolates.

즉 PO 2-11 및 strain 은 yeast ext. 0.01% corn steep liquor 0.01% 첨가한 구에서 첨가하지 않은 control 구보다 효소 생성이 20% 증가하였음을 알았으므로 PO 2-11 strain 은 yeast extract 또는 corn steep liquor 가 5'-phosphodiesterase 생성에 어떤 촉진효과가 있는 것으로 생각되고 SOA 4-21 strain 은 yeast extract 0.01% 첨가가 control 구보다 40% 증가하였음을 알았으므로 5'-phosphodiesterase 생성에 촉진효과가 있지않는가 생각된다.

그리고 PO 2-11 및 SOA 4-21 균주에 대하여

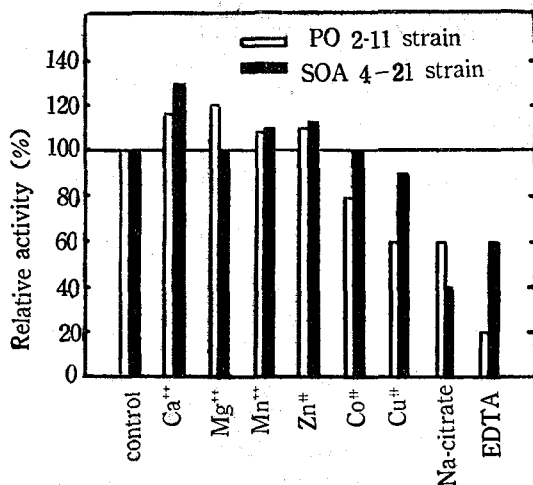


Fig. 6. Effect of metal ions or chemical agents on the 5'-phosphodiesterase activities from isolates.

mineral salt 및 chemical agent 별로  $10^{-3}M$  로 첨가하고 효소반응을하여 5'-phosphodiesterase 의 효소 반응에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 6 과 같다.

즉 PO 2-11 strain 의 5'-phosphodiesterase activity 는  $Mg^{++}$  이 control 구에 비하여 더욱 활성화되어 20% 의 활성증가도를 나타내고  $Ca^{++}$  은 16%,  $Zn^{++}$  이 10%,  $Mn^{++}$  은 8% 의 활성 증가를 나타내고 있으므로 이 효소의 activator 라 할 수 있다. SOA 4-21 strain 의 5'-phosphodiesterase activity 는  $Ca^{++}$  이 30% 의 활성 증가를 보였고  $Zn^{++}$  은 12%, 그리고  $Mn^{++}$  은 10% 의 활성 증가를 보이고 있음은  $Ca^{++}$   $Zn^{++}$   $Mn^{++}$  등이 현저한 activator 가 됨을 알 수 있다. 그와는 반대로 PO 2-11 strain 의 5'-phosphodiesterase 활성이 EDTA 존재하에서 80%, citrate 및  $Cu^{++}$  은 40% 그리고  $Co^{++}$  은 20% 의 감소를 보였는데 EDTA, citrate,  $Cu^{++}$  및  $Co^{++}$  이 현저한 저해현상을 나타내었음은 흥미있는 사실이라 생각된다. 그리고 SOA 4-21 strain 에 있어서도 citrate 는 60%, EDTA 는 40%,  $Cu^{++}$  은 10% 의 활성감소를 보였으므로 이들이 5'-phosphodiesterase 의 inhibitor 임을 알 수 있다.

Table 4 에서와 같이 PO 2-11 strain 이 wheat bran 에서의 5'-phosphodiesterase productivity 가 가장 우수한 것을 보고 wheat bran 을  $5\sim 10^{\circ}C$  의 증류수로 24 시간 동안 syphon 장치를 설치하여 세척

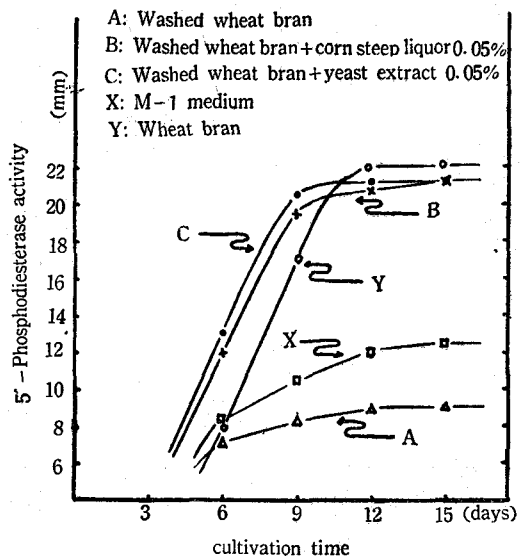


Fig. 7. Time course of 5'-Phosphodiesterase productivities in various media for using isolate PO 2-11 strain

한 후 건조한 washed wheat bran 을 기본배지로 하였다. 여기에 corn steep liquor, yeast extract, M-1 medium 과 not washed wheat bran 을 각 배지구(各培地區)로 하여 배양시간에 따른 5'-phosphodiesterase productivity 를 검토한 결과는 Fig. 7 에서와 같다. yeast extract 및 corn steep liquor 첨가구는 배양개시 9일에서 13일에 최고치를 보였으며 not washed wheat bran 구는 배양 개시후 12일에 이르러서 최고치에 달하였다. 이것은 yeast extract 및 corn steep liquor 첨가구가 약 3일간이 빠르게 효소 생성이 최고치에 이루었고 이들 compounds 중에 growth factor 는 물론 효소 생성에 어떤 promoter 의 인자가 있지 않은가 생각되는 바이며 washed wheat bran 구는 M-1 medium 구보다 5'-phosphodiesterase productivity 에서 수율이 낮았고 wheat bran 구에서 최고치를 보였는데 이것은 wheat bran 의 세척과정에서 growth factor 나 효소생성에 관여하는 어떤 promotor 의 인자가 되는 성분이 washing out 되는것이 아닌가 생각된다.

#### [5] 선발된 우수균주의 동정

##### Identification

The results of the identification and the sources of isolation of 5'-phosphodiesterase producing strains PO 2-11 and SOA 4-21 is shown in following description.

*Penicillium citreo-viride* Biourge (Raper & Thom) strain: PO2-11

This strain was isolated from farm soil. Taxonomical characters of this strain agreed with the standard description of *Penicillium citreo-viride* given by A manual of the Penicillia<sup>(77)</sup>

1. Penicilli: Czapek agar not divaricate, not divergent monoverticillate
2. Colony: Predominantly velvety,  
Color: Yellowish green in conidial area.  
Odor: Slight moldy.  
Reverse: Bright yellow shades
3. Conidiophore: Arising mainly from trailing and branching hyphae.  
Surface marking: Smooth walled.  
Length: 50~120 $\mu$   
Width: 1.4~2.2 $\mu$
4. Sterigmata: In compact usual number and

arrangement 8~12

Length: 9~14 $\mu$

Width: 2.0~2.8 $\mu$

##### 5. Conidia:

Form & marking: Globose thin walled smooth.

Arrangement of chains: Mostly 3 or 6 conidia

Dimension: 2.2~2.8 $\mu$

##### 6. Perithecia, Sclerotia, Ascospores: not produced.

*Streptomyces aureus*(Waksman and Curtis)

Strain: SOA 4-21

This strain was isolated from farm soil. Taxonomical characters of this strain agreed with the standard description of *Streptomyces aureus* given by Bergey's manual of determinative Bacteriology<sup>(76)</sup>

1. Aerial mycelium: Shows numerous spirals.  
Conidia: Spherical to ellipsoidal 0.6~1.0 $\times$ 0.8~1.4 $\mu$
2. Synthetic agar  
Growth; Thin, spreading, colorless  
Reverse: Pale orange  
Aerial mycelium: Thin, gray, becoming cinnamon-drab.
3. Glucose asparagine agar  
Growth: Spreading, light orange, thin, brownish ring  
Reverse: Pale yellow  
Aerial mycelium: Thin gray
4. Starch agar  
Growth; Thin transparent, spreading
5. Glucose agar  
Growth: Restricted, gray.
6. Starch plate  
Growth: Brown  
Aerial mycelium: Thin gray  
Enzymatic zone: 18~20mm wide
7. Potato plug  
Growth: Abundant, wrinkled, brown, becoming black
8. Gelatin Stab  
Growth: Fair, cream-colored, surface growth, becoming brown, spreading liquefaction.
9. Litmus milk

- Growth: Black ring, no coagulation, peptonization doubtful
10. Synthetic solution
    - Growth: White, growth on surface
    - Soluble pigment Brown(after 15days)
  11. Nitrite from Nitrate
  12. Proteolytic action: Fainte in milk good on gelatin
  13. Diastatic action: Very good in plate, enzymatic zone 18~20mm wide in 15 days
  14. Aerobic
  15. Optimum temperature, 28°C
  16. Antagonistic properties: Not produced
  17. Source: Isolated from farm soil

[6] Adenylic acid deaminase activity

선정된 두 균주 *Penicillium citreo-viride* PO2-11 strain 과 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 을 배양하여 얻은 crude enzyme 을 5'-adenylic acid 의 효소기질에 작용시킨 반응액을 열처리하여 효소불활성화한 다음 whatman No. 1 paper 에 전개한 것을 UV-absorption 과 Rf-values 로서 5'-AMP 와 이것이 deamination 된 5'-IMP 임을 확인한 결과는 Fig. 8 과 같다.

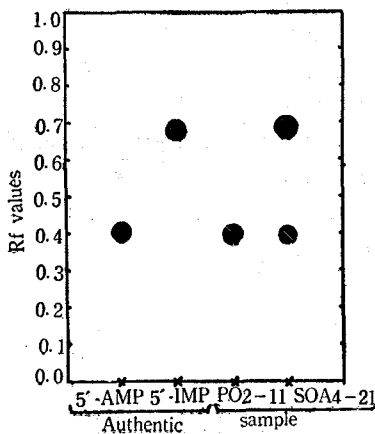


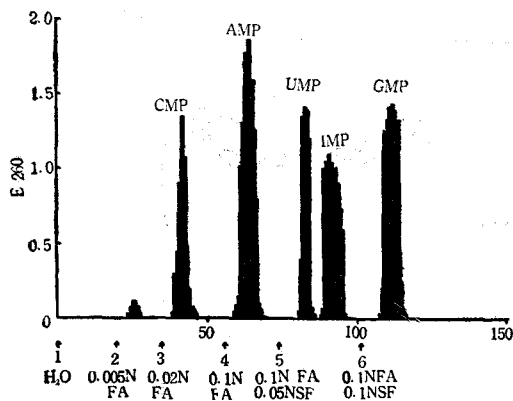
Fig. 8. Paper chromatograms of deaminated 5'-AMP from selected strains  
Solvent system: Isopropanol: saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>:IMNa-acetate(2:79:19)  
Whatman No.1, 20°C, Ascending method

*Streptomyces aureus* 를 배양하여 얻은 crude enzyme 중에는 5'-AMP deaminase 활성이 있어 5'-AMP 의 대부분이 deamination 되어 5'-IMP 로 전환(轉換)되었음을 알 수 있었고 *Penicillium citreo-viride* 의 crude enzyme 중에는 5'-AMP deaminase 가 전혀 없음을 알았다. 그러므로 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 을 배양하여 얻은 crude enzyme 은 RNA 를 5'-mononucleotides 로 분해. 축적할 수 있는 5'-phosphodiesterase 가 있을뿐 아니라 5'-AMP deaminase 의 효소작용에 의하여 5'-IMP 까지 만들 수 있는 매우 우수한 균주임을 알았다.

[7] RNA 의 효소분해 및 5'-mononucleotides 의 정량

동정된 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 과 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 에 대하여 각각 최적조건으로 배양한 액을 20 분간 원심분리 (4,000 RPM) 하고 11 용 mess cylinder 에 넣어서 5°C 에서 24 시간 방치한 후 상정액만을 425 ml 씩 취하고 여기에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 239.7 g 씩을 가하여 0.8 포화도(飽和度)로 하고 5°C 에서 24 시간 방치하여 crude enzyme 을 염석(鹽析)하여 침전된 효소를 cellophane tube 에 넣어 1~5°C 에서 약 50 시간 투석하여 얻은 효소에 10 배의 증류수를 가하여 효소액으로 하고 효소액 0.5 ml 와 2% RNA 용액 (buffered) 0.5 ml 를 5'-phosphodiesterase 활성의 최적 조건하에서 반응시켜 반응물을 시료로하여 column chromatography 로 정량하였다.

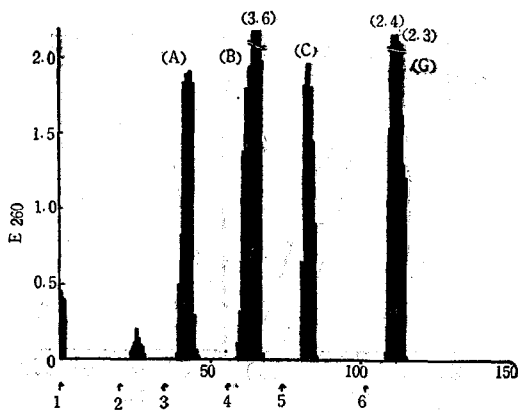
Standard nucleotides 로서는 Sigma Co. 제 5'-adenylic acid 3.16 μ mole, 5'-guanilyc acid 6.12 μ mole, 5'-inosinic acid 4.71 μ mole, 5'-cytidylic acid 2.82 μ mole 및 5'-uridylic acid 2.92 μ mole 을 함유하는 혼합액을 시료로 하여 ion exchange column chromatography 를 하여 그 용리상(溶離相)으로서 Fig. 9 와 같은 용리곡선을 얻었고 5 종의 5'-mononucleotides 는 완전히 분리되어 Table 8 에서와 같은 정량결과를 얻었으며 회수율도 양호하였으므로 RNA 를 동정된 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 과 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 의 투석하여 얻은 효소와를 반응시켜 얻은 생성물을 ion exchange column chromatography 법으로 전개한 결과 5'-mononucleotides 는 잘 분리되었으며 Fig. 10, 11 에서와 같은 용리곡선을 얻었다. 즉 *Pen. citreo-viride* PO 2-11 strain 의 5'-phosphodiesterase



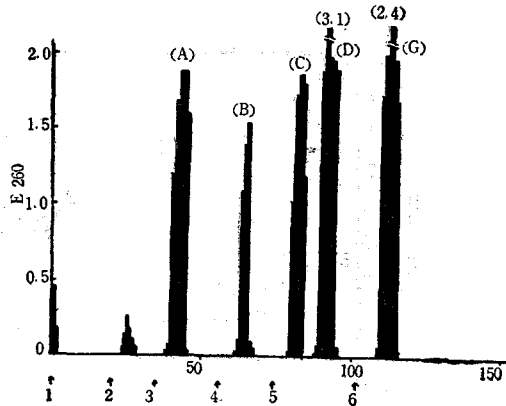
**Fig. 9.** Ion exchange column chromatography of standard 5'-mononucleotides  
Column: Dowex-1×8 (200-400mesh). Formic type (1×7cm). Tube number (10 ml. fraction size) and elution system.  
Extinction coefficients used: AMP 14.2, GMP 11.8, IMP 7.4, CMP 6.2, UMP 9.9, FA:Formic acid. SF: Sodium formate.

**Table 8.** Recovery of standard 5'-mononucleotides by column chromatographic method

Mononucleotides	Assay values (μmol.)	Recovery (%)
5'-Adenylic acid	3.20	
5'-Inosinic acid	4.78	
5'-Guanylic acid	6.17	101
5'-Cytidylic acid	2.86	102
5'-Uridylic acid	2.91	99.6



**Fig. 10.** Ion exchange column chromatography of RNA-hydrolysates by enzyme of selected *Penicillium citreo-viride* PO2-11 strain



**Fig. 11.** Ion exchange column chromatography of RNA-hydrolysates by enzyme of selected *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain

에 의한 RNA 분해 산물은 A, B, C, G 등 4 fraction으로 분리되었고 *Streptomyces aureus* SOA4-21 strain의 5'-phosphodiesterase에 의하여는 A, B, C, D, G 등 5 fraction을 얻었다.

이 여러 fraction을 우선 standard와 비교하여 용리 위치로 확인하고 한편 이들을 각각 모아 감압농축하여 paper chromatography로서 authentic compound와 UV-absorption으로 비교하였는데 Fig. 12 및 Table 9의 결과를 대조하여 R<sub>f</sub> 값으로

**Table 9.** R<sub>f</sub>-values of Mononucleotides on paper chromatograms

Mononucleotides	R <sub>f</sub> values
5'-AMP	0.40
2'-AMP	0.32
3'-AMP	0.21
5'-IMP(Na)	0.68
5'-GMP	0.56
2'-GMP(Na)	0.52
3'-GMP(Na)	0.45
5'-CMP	0.80
2'-CMP	0.74
3'-CMP	0.74
5'-UMP	0.80
2'-UMP	0.74
3'-UMP	0.74

Solvent system: Isopropanol: Saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>: 1M Na-acetate(2:79:19)

Whatman No. 1, 20°C, Ascending method.

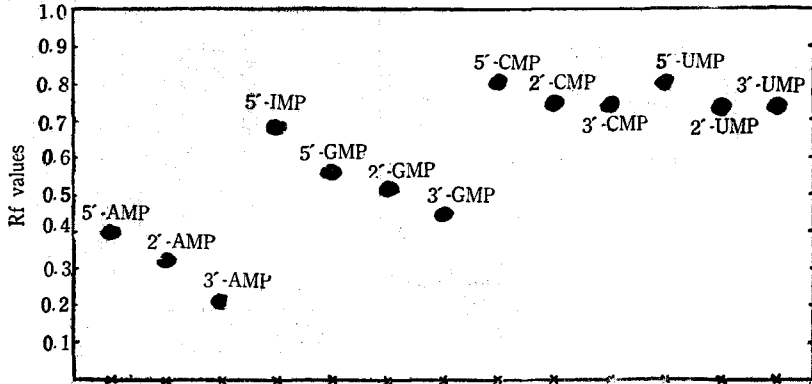


Fig. 12. Paper chromatograms of standard mononucleotides  
Solvent system: Isopropanol: Saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 1M Na-acetate=2:79:19  
Whatman No. 1, 20° C, Ascending method.

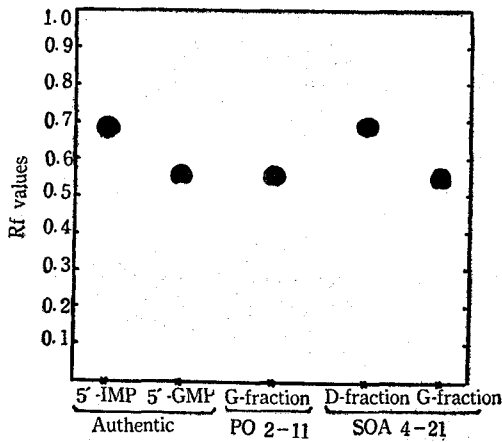


Fig. 13. Paper chromatograms of RNA-hydroly-  
sates by enzyme of selected strains.  
Solvent system: Isopropanol: Saturated  $(\text{N}$   
 $\text{H}_4)_2\text{SO}_4$ : 1M Na-acetate (2:79:19)  
Whatman No. 1, 20° C, Ascending method.

확인하였다.

그런데 정미성 5'-mononucleotides 로서는 *Pen. citero-viride* 에 의한 RNA 가수분해물에서의 fraction 은 G-fraction 으로 5'-GMP 임을 Fig. 13의 authentic 5'-GMP 와 Rf 값이 일치함을 확인하였으며 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 에 의한 RNA 가수분해물에서의 fraction 은 D-fraction 과 G-fraction 두개가 각각 5'-IMP 및 5'-GMP 임이 Rf 값으로 일치함을 아울러서 확인하고 paper 위에 carbazole

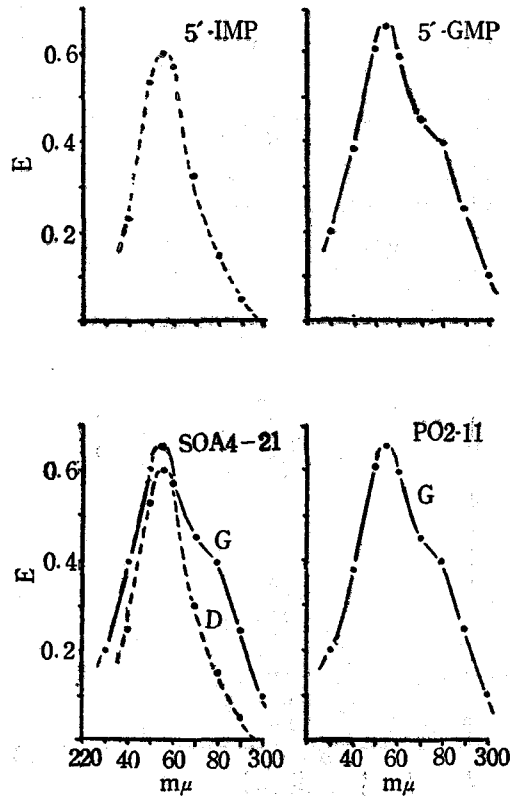


Fig. 14. UV-absorption spectra of G.D.G. fractions (pH 2.0)



reaction 및 periodate oxidation 에 의한 Schiff's reaction 으로서 각각 동정하였다. 또한 standard 5'-IMP 와 5'-GMP 를 control 로하고 이 두 균에 의한 가수분해물의 fraction 3 개에 대하여 감압농축한 것을 pH 2.0 으로 조정하고 UV-absorption spectra 를 check 한 결과는 Fig. 14 에서와 같이 authentic compound 와 일치하였다. *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 의 효소는 정미성 5'-mononucleotide 로서 5'-GMP 만을 얻을 수 있는데 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 의 효소는 5'-GMP 는 물론 5'-IMP 도 동시에 생성됨을 알았다. 이것은 이

균의 crude enzyme 중에는 5'-AMP deaminase 가 공존하고 있으므로 효소반응 중에 RNA 가 5'-mononucleotide 로 분해 축적하는 동안에 5'-AMP 의 adenine 의 6 위치에 붙은 NH<sub>2</sub> 기를 탈아미노하여 hypoxanthine 으로 하기 때문에 5'-IMP 로 되는 것이라 생각된다.

분리 동정된 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 과 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 이 생성한 5'-phosphodiesterase 로서 RNA 를 효소 분해하여 5'-mononucleotide 의 정량한 결과는 Table 10 과 같다.

Table 10. 5'-Mononucleotide contents of RNA-hydrolysates by Isolates

5'Mononucleotides Samples	5'-CMP,	5'-AMP,	5'-UMP, (mg/RNA g)	5'-IMP,	5'-GMP	Ratio of hydrolysis (%)
<i>Pen. citreo-viride</i> PO 2-11	117.4	235.8	118.2	—	186.7	65.81
<i>Streptomyces aureus</i> SOA 4-21	126.4	84.8	104.7	171.8	148.2	63.58

RNA 분해로 5'-mononucleotide 생성에서 분해율을 보면 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 의 경우가 양호하여 65.81%를 보였는데 정미성 5'-mononucleotide 로는 5'-GMP 밖에 없고 5'-AMP 를 2 차적인 방법 으로서 5'-AMP deaminase 처리를 해야만 5'-IMP 를 얻을 수 있다. 그런데 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 의 경우는 분해율이 63.58%인데 RNA 를 분해하여 정미성 5'-mononucleotide 인 5'-GMP 와 5'-IMP 를 동시에 상당량을 축적시키는 특성이 있으므로 RNA 의 효소분해로서 정미성 mononucleotide 를 얻는데 전자의 균주보다 매우 우수한 균주임을 밝히는 바이다.

## 요 약

핵산 및 그 관련물질 연구의 일환으로서 미생물 효소에 의하여 핵산을 분해하여 5'-mononucleotides 생성을 목적으로 미생물에서 5'-phosphodiesterase 생성균주를 얻기 위하여 전국 각지 76 개 지역에서 논, 밭, 산, 하천의 토양 그리고 퇴비, 누룩, 배주 등 시료 210 종을 수집하였다.

이 수집 시료로부터 dilution pour plate method 로서 *Aspergillus* 속 240 주, *Penicillium* 속 232 주, *Neurospora* 속 19 주, *Monascus* 속 16 주, 그리고 *Streptomyces* 속 265 주로 총 758 주를 순수 분리하였다.

분리된 모든 균주에 대하여 RNA-depolymerase

productivities 를 1 차 screening 하고 5'-phosphodiesterase productivities 로서 2 차 screening 하여 우수균주를 얻고 동정하였다.

우수균주의 5'-phosphodiesterase productivity 에 대하여 배양상의 optimum condition 을 검토하고 5'-phosphodiesterase activity 에 미치는 여러 화합물의 영향과 효소반응의 최적 조건을 구명하였다.

우수균주가 생성한 5'-phosphodiesterase 에 의하여 RNA 분해로 반응 최종 산물을 ion exchange column chromatography 법으로 정량하고 최종 분해 산물인 5'-mononucleotide 를 paper chromatography, thinlayer chromatography, UV-absorption spectra, carbazole reaction 및 Schiff's reaction 등으로 동정한 결과는 다음과 같다.

[1] 5'-phosphodiesterase productivity 가 가장 우수한 두 균주를 선정하였고 이들은 토양에서 분리되었으며 선정된 푸른 곰팡이는 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 로 동정되었고 방사선균은 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 로 동정되었다.

[2] 분리 선정된 *Penicillium citreo-viride* PO 2-11 strain 은 배양상의 optimum condition 이 pH 5.0 이고 temperature 는 30°C 이었고 이 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 의 효소 반응상의 optimum condition 이 pH 4.2 이고 temperature 는 60°C 이었다.

그리고 5'-phosphodiesterase 생성에서 최적 탄소원은 sucrose 이고 질소원은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 이고 corn steep

liquor 나 혹은 yeast extract 를 각각 0.01%씩 첨가한 구는 첨가하지 않은 control 구보다 20%의 5'-phosphodiesterase 생성증가를 나타 내었다.

이 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 는  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$  등 금속이온은 activator 이고 EDTA, citrate,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$  등은 inhibitor 임을 알았다.

이 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 는 RNA 를 분해하여 분해율 65.81%이었고 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-UMP 및 5'-CMP 를 생성하며 이때 측정되는 5'-mononucleotides 중 5'-GMP 만이 정미성이 있음을 알았고 이균은 5'-AMP deaminase 가 없음을 확인하였다.

이 균의 효소에 의하여 RNA 에서 정미성 5'-GMP 186.7 mg/RNA(g)를 생산할수 있음을 알았다.

[3] 분리 선정된 *Streptomyces aureus* SOA 4-21 strain 은 배양상의 optimum condition 이 pH 7.0이고 temperature 는 28°C 이었고 이 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 의 효소반응상의 optimum condition 이 pH 7.3 이고 temperature 는 50°C 이었다. 그리고 5'-phosphodiesterase 생성에서 최적탄소원은 glucose 이고 질소원은 asparagine 이고 yeast extract 0.01% 첨가구가 control 구보다 40%의 5'-phosphodiesterase 생성증가를 나타내었다. 이 균이 생성한 5'-phosphodiesterase 는  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$  등 금속이온은 activator 이고 citrate, EDTA,  $Cu^{++}$  등은 inhibitor 임을 알았다.

또한 이 균은 5'-phosphodiesterase 뿐만 아니라 5'-AMP deaminase 도 생성함을 확인하였다. 그러므로 RNA 분해율은 63.58% 이었고 RNA 를 분해하여 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP 및 5'-UMP 로 측정시키고 RNA 가 효소 분해됨과 동시에 5'-AMP deaminase 도 작용하며 생성된 5'-AMP 의 60% 상당을 5'-IMP 로 전환시키는 특성이 있어서 정미성 5'-mononucleotide 생성이 전자의 균보다 두드러지게 증가함을 밝혔다. 이 균에 의하여 RNA 에서 정미성 5'-IMP 171.8 mg/RNA(g) 및 5'-GMP 148.2 mg/RNA(g)를 생산할 수 있어 정미성 5'-mononucleotide 320mg/RNA(g)를 생산할 수 있음을 알았다.

#### 참 고 문 헌

1. Kodama, S.: J. Tokyo Chem. Soc., 34, 751 (1913)
2. Ikeda, K.: J. Tokyo Chem. Soc., 30, 820 (1909)
3. Kuninaka, A.: J. Agri. Chem. Soc. (Japan), 34, 489 (1960)
4. Ogata, K. and Y. Nakao: Agri. Biol. Chem., 26, 1118 (1962)
5. Shimazono, H.: Food Technol., 18, 294(1964)
6. Huang, H.T.: Biochemistry, 4, 58 (1965)
7. Kuninaka, A.: Food Technol., 18, 287(1964)
8. 岡本武; 日釀協, 56, 628 (1961)
9. 鹿又和郎; 愛知食品工試報, 3, 32 (1962)
10. 栗山千枝子; 榮養と食糧, 17, 337 (1965)
11. 藤田榮一; 榮養と食糧, 18, 98 (1966)
12. 橋田慶; 缶詰時報, 43, 65 (1964)
13. Tidus, D.S.: Food, 24, 150 (1963)
14. Kurtzman, C.H.: Food Technol., 18, 221 (1964)
15. Caul, J.F.: Food Technol., 18, 353 (1964)
16. Rosen, O.: Arch. Biochem. 25, 262 (1950)
17. Stevens, A. and R.J. Hilmore: Fed. Proceed, 18, 332 (1959)
18. Plakett, P.: Biochem. Biophys. Acta, 26, 664 (1957)
19. Cohn, W.E.: J. Biol. Chem., 203, 319(1953)
20. Cohn, W.E.: Nature, 167, 483 (1951)
21. Shustter, L.: J. Biol. Chem., 201, 535 (1953) 229, 289 (1957)
22. Ballio, A.: Biochim. Biophys. Acta., 20, 414 (1956)
23. Koch, A.L.: J. Biol. Chem., 203, 227 (1953)
24. Newton, J.W.: J. Bact., 69, 677 (1957)
25. Kuninaka, A.: J. Agr. Chem. Soc. (Japan), 28, 282 (1954)
26. Kuninaka, A.: ibid., 29, 52, 767, 801 (1955)
27. Kuninaka, A.: ibid., 30, 583 (1956)
28. Kuninaka, A. and K. Sakaguch: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan. 23, 239, 281 (1959)
29. Kuninaka, A.: Agr. Biol. Chem., 25, 693(1961)
30. Kuninaka, A.: J. Gen. Appl. Microbiol., 3, 55 (1957)
31. Nakashima, N. & E. Fujida: J. Agr. Chem. Soc. (Japan), 35, 797, 803 (1961)
32. Nakashima, N. & E. Fujida: ibid., 37, 558 (1963)
33. Nakashima, N. & E. Fujida: J. Ferment.

- Technol. 41, 420 (1963)
34. Sugimoto, H., T. Iwasa and J. Ishiyama: J. Agr. Chem. Soc. (Japan), 36, 277 (1962)
  35. Ogata, K., S. Igarasi & N. Kakinuma: Agr. Biol. Chem., 26, 213 (1962)
  36. Ogata, K., S. Igarasi & N. Kakinuma: *ibid.*, 26, 218 (1962)
  37. Ogata, K., S. Igarasi & N. Kakikuma: *ibid.*, 26, 221 (1962)
  38. Ogata, K. and Y. Nakao: Agr. Biol. Chem., 27, 110 (1963)
  39. Ogata, K. and Y. Nakao: *ibid.*, 27, 116(1963)
  40. Ogata, K. and Y. Nakao: *ibid.*, 27, 119(1963)
  41. Ogata, K. and Y. Nakao: *ibid.*, 27, 199(1963)
  42. Nakao, Y. and K. Ogata: *ibid.*, 27, 291(1963)
  43. Nakao, Y. and K. Ogata: *ibid.*, 27, 491(1963)
  44. Nakao, Y. and K. Ogata: *ibid.*, 27, 499(1963)
  45. Nakao, Y. and K. Ogata: *ibid.*, 27, 507(1963)
  46. 國中明; 日醱酵協會誌, 19, 72 (1961)
  47. 國中明; 日醱酵協會誌, 20, 5 (1962)
  48. 國中明; 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 403 (1961)
  49. Kawasaki, S.: New Food Ind., 3, 31 (1961)
  50. 佐藤三郎; 蛋白質, 核酸, 酵素, 2, 57 (1957)
  51. 大村榮之郎; 酵素化學 Symposium 16, 115 (1964)
  52. Buchanan, J.G., C.A. Dekker and A.G.Long: J. Chem. Soc., 3162 (1950)
  53. Kalcker, H.M.: J. Biol. Chem., 167, 445(1947)
  54. Ibuki, F., A. Aoki and S. Matsushita: Agr. Biol. Chem., 27, 316 (1963)
  55. Ibuki, F., A. Aoki and S. Matsushita: Agr. Biol. Chem., 28, 144 (1964)
  56. Matsushita, S., F. Ibuki, T. Mori and T.Hata: *ibid.*, 27, 736 (1963)
  57. Matsushita, S., F. Ibuki, T. Mori and T.Hata: *ibid.*, 29, 436 (1965)
  58. Matsushita, S., F. Ibuki, T. Mori and T. Hata: *ibid.*, 29, 635 (1965)
  59. Kakimura, A., M. Nakao, S. Igarashi, & K. Ogata: Agr. Biol. Chem., 28, 300 (1964)
  60. 杉森恒武; Amino acid & Nucleic acid 醱酵と代謝, 10, 129 (1964)
  61. 猿野琳次郎; 日醸工., 42, 475 (1964)
  62. 長谷川安弘, 藤村有信; 日農化, 38, 461(1964)
  63. 藤村有信, 長谷川安弘; 日農化, 38, 467(1964)
  64. 刀根弘; Amino acid & Nucleic acid 醱酵と代謝, 10, 135, 142 (1964)
  65. Iwasa, T. & H. Sugimoto: J. Agri. Chem. Soc. (Japan), 38, 84, 90, 135 (1964)
  66. Iwasa, T. & H. Sugimoto: *ibid.*, 38, 144, 441, 448, 454 (1964)
  67. Iwasa, T. & H. Sugimoto: *ibid.*, 38, 562, 567 (1964)
  68. Kawata, H., K. Kataya, M. Akimoto & K. Nishimoto: J. Ferment. Technol., 47, 25, 32, 41 (1969)
  69. 金浩植, 李啓瑚; 韓農化, 4, 11 (1963)
  70. 李啓瑚; 韓農化 11, 1 (1969)
  71. Fiske Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
  72. 赤堀四郎; 酵素研究法Ⅱ(東京 朝倉書店) p.943 (1956)
  73. Randerath, K.: Angew. Chem., 74, 484 (1962)
  74. Dische, Z. & E. Landsberg: Biochem. Biophys., 24, 193 (1957)
  75. Pelczar, M.J.: (Soc. of American Bacteriologists) Manual of Microbiological Methods (Mc Graw Hill) (1957)
  76. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N. P.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. (William & Wilkins) (1957)
  77. Raper, K. & C. Thom: A manual of the Penicillia (William & Wilkins) (1949)
  78. 關口豊三; 生化學, 26, 476 (1953)
  79. 眞野嘉長; 生化學, 27, 62 (1954)
  80. Markahm, R. and Smith: Biochem. J., 49, 401 (1951)
  81. Holiday, E.R. & E.A. Johnson: Nature 163, 216 (1949)
  82. Pontis, H.G., Cabib, E. and Leloir, L.F.: Biochim, Biophys. Acta. 26, 146 (1957)
  83. Iwasa, T. & H. Sugimoto: J. Agri.Chem. Soc. (Japan), 36, 690 (1962)
  84. Bergkvist, R. and A. Deutch: Acta. Chem. Scand., 8, 1877 (1954)
  85. Volkin, E. and W.E. Cohn: Methods of Biochemical Analysis. 1, 287 (1954)
  86. Cohn, W.E.: Methods in Enzymology Vol. III (Academic press) p.724 (1957).