

放射菌에 의한 5'-Nucleotide類의 生産에 관한 研究

第 1 報 5'-Phosphodiesterase生産菌의 分離

金洪執 · 裴鍾燾 · 黃圭仁 · 孔雲泳

(1979년 8월 28일 수리)

Studies on the Production of 5'-Nucleotides by *Streptomyces* spp.

Part 1. Isolation of 5'-phosphodiesterase Producing Microorganisms

Hong-Jip Kim, Chong-Chan Bae, Kyu-In Hwang, Un-Young Kong

Cheil Sugar Co. LTD

Abstract

RNA degrading bacteria were isolated from soil of Korea. One strain (no. JSC-114), having strong 5'-phosphodiesterase activity, was identified as belonging to the genus *Streptomyces* on the basis of taxonomic characteristics.

The optimum conditions of 5'-phosphodiesterase production were found at 30°C for 4 day in a medium containing 4.5% of soluble starch, 0.15% of peptone, 0.6% of yeast extract, 0.1% of MgSO₄·7H₂O, 0.01% of CaCl₂·2H₂O, 0.25% of KNO₃, and 0.5% of KH₂PO₄(pH 7.0).

The maximum production rate of 5'-nucleotides from yeast RNA was 95% at 40-45°C for 4hrs, and the products were identified as 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-CMP and 5'-UMP(5.5 : 5.0 : 4.9 : 5.0).

緒 論

核酸이 酵素分解에 의한 5'-nucleotides의 生産이 工業化되기 시작한 것은 1959年 Kuninaka⁽¹⁾가 核酸에 작용하여 5'-nucleotide로 分解하는 酵素인 5'-phosphodiesterase(P Dase)를 *Penicillium citrinum*에서 발견한 이후 1961년경의 일이다.

그러나 微生物界에 분포되어 있는 核酸加水分解 酵素는 oligonucleotide로 분해하는 endonuclease와 5'-mononucleotide까지 분해하는 exonuclease가 존재하며, endonuclease를 생성하는 균으로는 *Aspergillus oryzae*(Nuclease O)⁽²⁾, *Neurospora crassa*⁽³⁾, *Saccharomyces fragilis*, *Sacch. dozhanskii*등의 酵母⁽⁴⁾, 그리고 放線菌으로 *Streptomyces aureus*⁽⁵⁾등과 그외에 不完全菌⁽⁶⁾, 細

菌⁽⁷⁾등에서도 존재한다고 알려져 있다.

한편 5'-mononucleotide까지 분해하는 효소는 통칭 5'-phosphodiesterase(EC. 3.1.4.1)이라 불리워지고 있으며 *Penicillium citrinum*,⁽¹⁾ *Phoma curcurbitacearum*⁽⁸⁾의 여러가지 糸狀菌⁽⁸⁾과 放線菌⁽¹⁰⁾ 및 細菌⁽¹¹⁾ 등에 존재한다고 보고되어 있고 酵母에서도 존재하기는 하나 균체외에 分泌하는 균은 아직 보고되지 않고 있다.

공업적으로 5'-nucleotide를 生産하기 위해서는 일반적으로 (1)臭味성이 강한 5'-isoinosinic acid와 5'-guanylic acid를 동시에 生産할 수 있는 分解 酵素가 있어야 하고 (2)이러한 酵素들이 菌體外로 분비되어야 하며 (3) 또한 3'-phosphodiesterase, nucleotidase등 불필요한 阻害酵素가 되도록 생성되지 않아야 유리하다. 이러한 諸性質을 가장 잘 구비하고 있고 또 현재 공업적으로 가장 많

이 사용하고 있는 균주가 放線菌屬으로 알려져 있다⁽¹²⁾.

著자들은 이와같이 RNA를 분해하여 工業的으로 5'-nucleotide類의 生産菌株을 分離할 목적으로 국내 각처에서 수집한 토양중에서 5'-phosphodiesterase의 酵素活性이 강한 放線菌을 分離하고 酵素培養用 기본 培地組成檢討를 하였기에 그 結果를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 核酸分解菌株 分離方法

전국 각처(서울 加陽洞, 禾谷洞, 경기도 용인, 수원, 충청남도 천안, 강원도 춘천, 경상북도 대구 및 경상남도 부산 등)의 토양에서 채취한 試料 각 1g을 생리식염수에 현탁시킨후 일정량을 glucose 1.0%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.01%, KCl 0.05%, asparagine 0.05%, agar 2.0%의 分離用培地에 도말하고 30°C에서 2~7일간 배양하면서 糸狀菌 및 放線菌屬으로 생각되는 colony를 分離, glucose 1.0%, peptone 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, agar 2.0%, pH 7.0의 保存 slant에 이식한 후 5'-phosphodiesterase activity測定에 사용하였다.

2. 5'-phosphodiesterase activity 測定方法

토양에서 분리한 각 colony를 glucose 5%, peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KNO₃ 0.2%, pH 7.0의 발효배지에 접종하고 30°C에서 5일간 진탕배양한후 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 粗酵素液으로 使用하였다.

PDase activity測定은 5% RNA용액(Merck社 製品을 Sevag등⁽¹³⁾의 方法에 따라 정제한 Na염) 0.2ml, 0.026M veronalacetate buffer(pH6.0)와 적당량의 粗酵素液 1.0ml을 넣고 증류수로 2.0ml로 한 반응액을 60°C에서 10분간 반응시킨후 100°C의 열탕에서 5분간 열처리하여 반응을 중지시켰다. 또한 여기에 5'-nucleotidase(Sigma Chemical Co.) 0.5ml, 0.05M tris-HCl buffer(pH 8.5)와 MgCl₂ 0.002M혼액 1.0ml을 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 생성된 무기인산을 Allen⁽¹³⁾등의 方法에 따라 OD 660mμ에서 측정하고 PDase반응 및 5'-nucleotidase처리에서 측정된 흡광도차이를 PDase activity로 표시하였다.

3. 5'-nucleotide類의 定量方法

粗酵素液을 사용하여 반응시킨 RNA分解液을 MeOH-EtOH-c.HCl-H₂O (50 : 25 : 6 : 19)의 용매를 사용하여 Whatman No.2 filter paper에 20 λ spotting하고 상온에서 상승법으로 전개한 후 풍건하고 암실에서 UV 吸光物質을 확인하여 標準物質의 R_f值 및 periodate oxidation후의 sugar moiety로써 5'-nucleotide類를 確認하였으며 생성량은 spot를 열수추출하여 260mμ에서 흡광도 측정으로 定量하였다.

實驗結果 및 考察

1. 5'-PDase 生産菌株의 分離 및 同定

24개 지점의 試料에서 분리된 colony중 PDase activity를 측정하여 본 결과 대부분 효소활성을 가지고 있었으며 이중 660mμ에서의 흡광도가 0.6 이상이 되는 균주 8株를 분리하였다. 이들 균주를 재차 순수분리하고 효소생산용배지에 배양한 후 RNA分解物質의 確認 및 生成량을 비교하여 strain No. JSC-114를 최종적으로 분리하였다.

분리된 strain No. JSC-114의 현미경 검경은 Fig.1에서 보는 바와 같다. 이 균주를 미국 세균학협회에서 발행한 Manual of Microbiological Method⁽¹⁴⁾에 따라 菌學的性質을 조사한 결과 Table 1과 같으며, 이러한 제성질을 Bergey's Manual⁽¹⁵⁾에 기재된 分類同定方法和 상세히 비교 검토한 결과 streptomycetaceae의 streptomyces屬으로 인정되었다.

Table 1. Microbial Characteristics of 5'-Phosphodiesterase Producing Strain No. JSC-114.

Morphological characteristics	
Mycellium	non-septa, multi-mycellium (1.2) milk-grayish
Spore	rod coccus(1.2-1.6), spira, smooth
Mobility	non-motile
Gram stain	positive
Cultural characteristics	
Agar plate	circular, convex, entire, milk-grayish
Nutrient agar (stick culture)	growth on surface

(계속)

Agar slant	moderate growth, milkwhite,	Catalase	surface positive
Physiological characteristics		Voges-proskauer test	positive
Opt. temperature	30—35°C	Urease	positive
Opt. pH	7.0	Milk test	no coagulation
Oxygen demand	aerobic	Ammonia production	positive
Nitrate reduction	negative	Utilization of carbohydrates	glucose, fructose, lacto- se, maltose, sucrose, xy- lose, soluble starch
Hydrogen sulfide production	positive		
Gelatin liquefaction	negative, growth on		

Table 2. Differences between Strain No. JSC-114 and Similar Strains.

	Strain No. JSC-114	<i>St. aureofaciens</i>	<i>St. abelaneus</i>
Color ⁽¹⁾	GY(gray)	GY(grayish brown)	GY(blight brown)
Soluble pigment ⁽²⁾	brown	golden yellow	brown
Spore chain	spira	spira	spira
Melanoid pigment	—	—	—
Antibiotics	—	tetracycline	tetracycline
Litmus milk	alkaline negative weak peptonize	neutral to alkaline negative peptonize	neutral to alkaline negative peptonize
Carbohydrate utilization ⁽³⁾			
Glucose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Arabinose	—	+	—
Fructose	+	+	+
Galactose	—	+	—
Sucrose	+	+	+

1) color of mature sporulated aerial mycellium with oatmeal agar plate culture

2) Czapeck's agar medium

3) obtained on P & G basal medium

그러나 Bergey's Manual에 기재된 463株의 *st. reptomyces*屬 어느 균주와도 동일한 것은 없었고 Table 2에서 보는 바와 같이 *st. aureofaciens* 나 *st. abelaneus*와 유사한 성질을 가졌으나 성숙한 기균사의 색이 회색계중에서도 회색인점과 Litmus Milk Test 및 carbohydrate 이용성질등이 일치하지 않고 약간 상이하므로 동일균주가 아닌 친균주로 생각되었다.

2. 5'-PDase의 生成에 미치는 탄소원의 영향

酵素生成에 적합한 배지조성을 확립하기 위하여 여러가지 炭素源을 첨가한 기본배지에 배양하여 효소활성을 측정하여 본 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 xylose, sodium acetate, paraffin을 제외

하고는 대부분 강한 酵素活性을 보이고 있음을 알 수 있다. 이들 탄소원중 가장 효소활성이 양호한 포도당 및 가용성 전분의 농도에 따른 효소활성을 검토한결과 포도당은 4%에서, 가용성 전분은 4.5%에서 가장 좋았다.

3. 5'-PDase生成에 미치는 窒素源의 영향

또한 각종 질소원에 대한 PDase의 活性度를 보면 Table 4에서 보는 바와 같이 有機窒素源에 대해서는 대체적으로 강한 활성을 보이는 반면, 無機窒素源은 요소를 제외하고 대체적으로 낮은 활성을 보였다.

또한 같은 질소원을 사용할 경우에도 탄소원으로 포도당보다는 가용성 전분이 양호한 효소활성

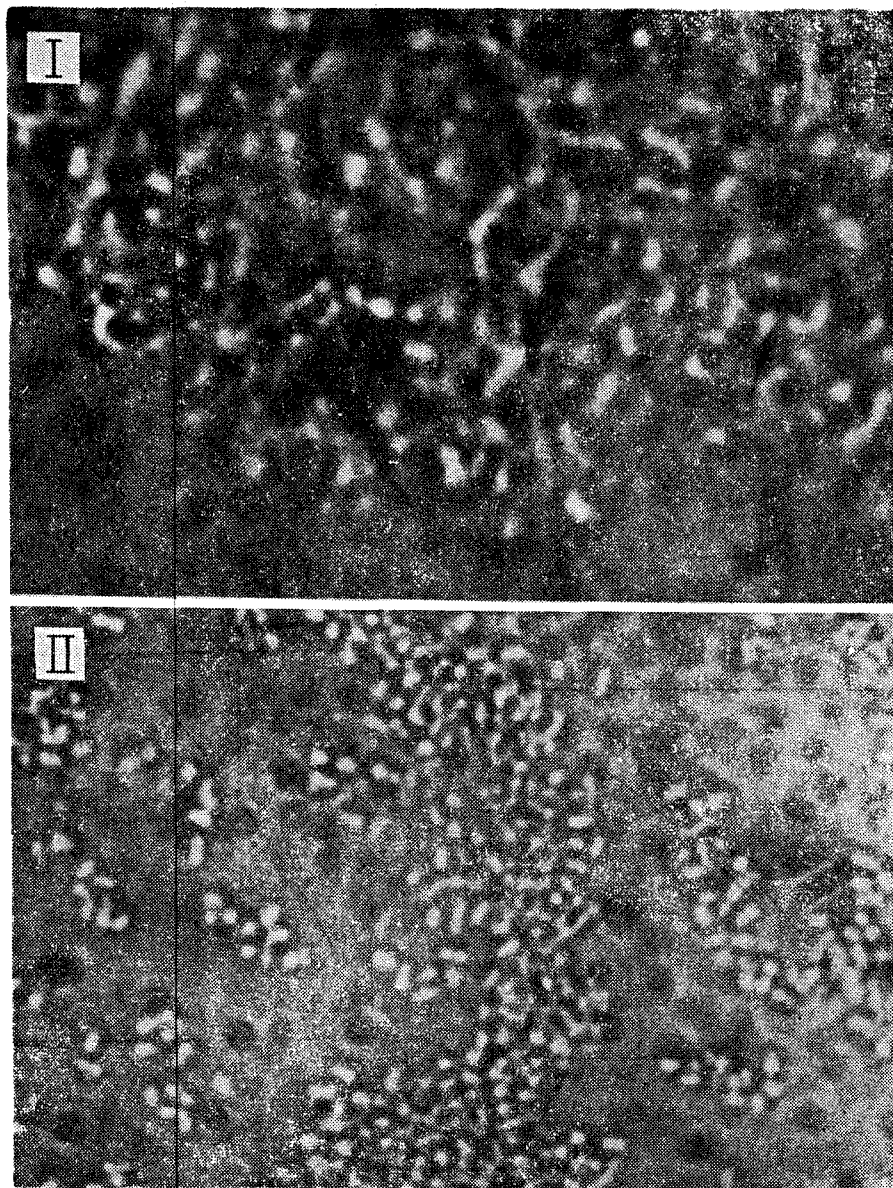


Fig.1. Microscopic Obserbation of Strain No. JSC-114

I. Mycellium

II. Conidia

을 보임은 특이할만한 사실이었다.

따라서 효소활성이 좋은 peptone 및 yeast extract의 最適濃度를 검토하여 Fig.3과 같은 결과를 얻었다.

peptone과 yeast extract의 최적농도는 상당한 차이가 있었으며 peptone은 0.15%에서, 그리고 yeast eyxtract는 0.6%에서 가장 좋았다.

이러한 결과는 Sugimoto, 등⁽¹⁶⁾이 토양에서 분리

한 *streptomyces* sp. strain No.41이 생산하는 RNase의 배지검토에서 酵母와 澱粉의 C/N比가 낮을수록 효소활성이 낮고 CSL이나 페당밀등을 첨가하브로써 RNase活性이 좋아졌다는 보고와 유사한 경향을 보이고 있다. 특히 탄소원으로서의 페당밀을 사용했을경우 PDase activity가 0.70 (Table 3)으로 양호한 결과로 나타냄을 볼 때 탄소원으로써 뿐만아니라 질소원 및 기타 촉진인자

Table 3. Effects of Various Carbohydrates on 5'-PDase Activity of Strain No. JSC-114.

Carbohydrates	Growth, DCW (mg/ml)	Enzyme activity (OD 660m μ)
Glucose	17	0.81
Fructose	16	0.61
Soluble starch	17.5	0.82
Sucrose	15	0.62
Lactose	13	0.43
Maltose	14	0.59
Molasses	15	0.70
Xylose	9	0.08
Na-acetate	0	0
Paraffin	0	0

Basal medium: carbohydrate 5%, peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KNO₃ 0.2%, pH 7.0

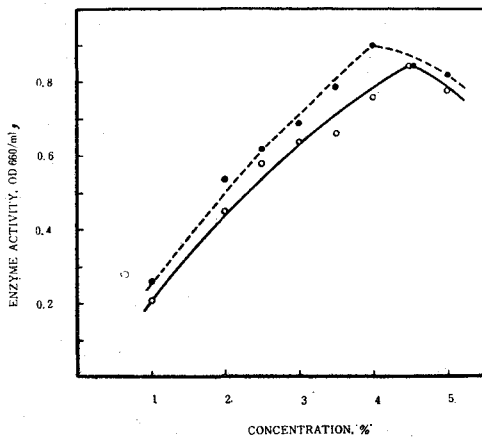


Fig. 2. Effects of the Concentration of Carbon Source on 5'-Phosphodiesterase Activity of Strain No. JSC-114.

Basal medium: peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KNO₃ 0.2%, pH 7.0

가 함유되어 있기 때문인 것으로 추측된다.

4. 5'-PDase生成에 미치는 無機鹽의 영향

이상에서 검토한 탄소원 및 질소원 이외에도 酵素生産에 중요하다고 인정되는 몇몇 무기염에 대한 最適濃度를 검토한 결과는 Fig.4에서 보는 바와 같다.

Table 4. Effects of Various Nitrogen Sources on 5'-PDase Activity of Strain No. JSC-114.

Nitrogen	Growth, DCW (mg/ml)		Enzyme activity (OD 660m μ)	
	Glucose	Soluble starch	Glucose	Soluble starch
Peptone	11.6	13	0.83	0.85
Casein	12	12.5	0.74	0.68
Yeast extract	16	17	0.76	0.80
Urea	4.3	5	0.60	0.65
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.9	2.4	0.34	0.23
NaNO ₃	—	—	—	—
NH ₄ Cl	8.2	8.6	0.37	0.31

Basal medium: glucose or soluble starch 5%, nitrogen sources 0.5%, Mg SO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂ 2H₂O 0.01%, KNO₃ 0.2%, pH 7.0
enzyme activity: same as Table 3.

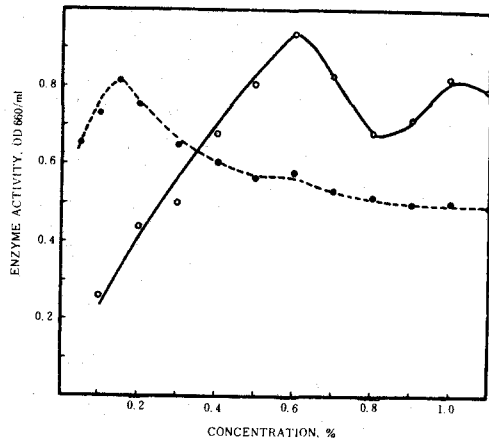


Fig. 3. Effects of the Concentration of Nitrogen Sources on 5'-Phosphodiesterase Activity of Strain No. JSC-114.

Basal medium: soluble starch 4.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂·2H₂O 0.0%, KNO₃ 0.2%, pH 7.0

KH₂PO₄는 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, 및 KNO₃ 0.25%, 이상에서는 거의 평형상태에 유지되고 그 이하에서는 급격한 감소를 나타내고 있음을 알 수 있다.

또한 KH₂PO₄의 경우 0.6%이상의 경우 酵素活性이 급격히 감소하는 것은 K⁺이온으로써의 영향보다는 인산이온의 농도가 더 중요한 인자로 생각되며 이는 Sugimoto⁽¹⁷⁾ 등의 보고나 Iwasa 등⁽¹⁸⁾의

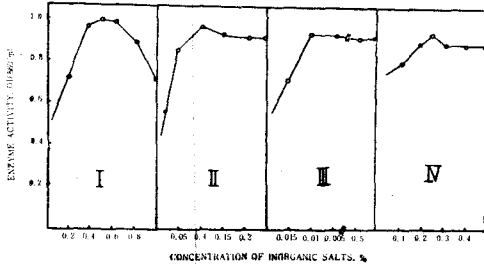


Fig. 4. Effects of the Concentration of Inorganic salts on 5'-Phosphodiesterase Activity of Strain No. JSC-114.

Basal Medium: soluble starch 4.5 %, peptone 0.15%, yeast extract 0.5%, inorganic salts 2%, pH 7.0 (I: KH_2PO_4 , II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, III: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, IV: KNO_3)

보고와도 일치되는 경향을 보이고 있다.

5'-PDase의 효소활성은 금속이온 특히 Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} 등의 이온이活性化경향이 강하여 重金屬이온에 현저히 저해받는다는 사실이 이미 보고되어 있다. 특히 Ca^{++} 이온은活性化경향이 강하여 10^{-3}M 의 CaCl_2 첨가가 양호하고 그 이하 또는 그 이상에서는 activity의 감소가 나타난다는 보고가 있으나⁽¹⁷⁾, Fig. 4의 결과에서는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01% 정도에서 activity가 가장 좋았고, 그 이상에서는 완만한 감소현상을 나타내어 酵素의 stability와 배양액의 activity가 약간 상이한 결과가 나타남을 알 수 있다.

5. 培養中の 酵素活性變化 및 核酸分解結果

500ml의 진탕용 삼각플라스크에 상기에서 검토된 효소생산용배지 500ml을 넣고 streptomyces sp. strain No. JSC-114 균주를 접종하여 30°C 에서 7일간 진탕배양하면서 효소활성변화를 측정할 결과 Fig. 5와 같다. 5'-PDase activity는 배양 2일에서부터 증가하기 시작하여 4일경에서 peak를 이루다가 배양시간이 경과하면서 점차 감소하였다.

또한 4일 배양한 상등액에 10% 酵母核酸(as pure) 현탁액을 10:1로 가하여 pH 7.0~8.0. 온도 $40\sim 45^\circ\text{C}$ 에서 5시간동안 반응시키면서 RNA 분해율과 총 5'-Nucleotide類의 生成率을 보면 Fig. 6에서 보는 바와 같이 分解率은 반응 3시간까지 증가하다가 4시간경에 거의 95%수준에서 평형상태로 유지됨을 알 수 있다. 반면 총 5'-nucleotide類의 生成率은 반응 4시간경에 분해율과 비슷한 95%수준에 도달하다가 5시간경에 약간 감소하는 경향이 보였으며 生成된 5'-nucleotide類

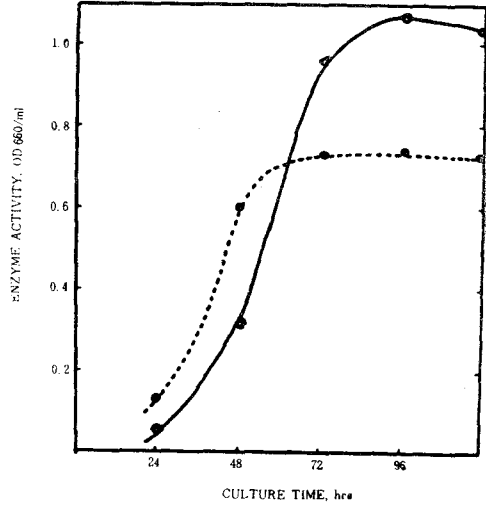


Fig. 5. Time Course of 5'-Phosphodiesterase Activity of strain No. JSC-114.

Culture medium: soluble starch 4.5%, peptone 0.15%, yeast extract 0.6%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, KNO_3 0.25%, pH 7.0 5'-PDase, Growth, DCW)

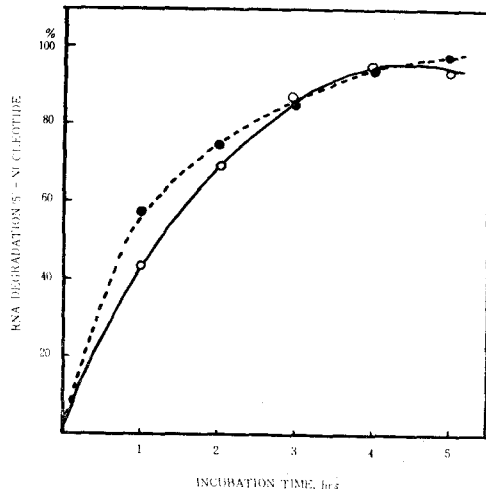


Fig. 6. Degradation of Yeast RNA by Strain No. JSC-114.

Incubation conditions: The reaction mixture contained enzyme broth and 10% RNA soln (10:1) was incubated at $40\sim 45^\circ\text{C}$, pH 7.0~8.0 for 5hrs 5'-nucleotide production rate RNA degradation rate)

의 구성비는 5'-IMP : 5'-GMP : 5'-UMP : 5'-CMP가 5.5 : 5.0 : 4.9 : 5.0이었다. 그러나 5'-AMP는 거의 인정되지 않았다.

한편 adenosine이나 guanosine등과 같은 nucleoside의 R₂에 유사한 spot가 혼적정도 생성되는 것으로 보아 5'-nucleotidase가 존재하는 것으로 추측되었으며 앞으로 본군이 생산하는 제효소의 정제 및 특성이 검토되어야 할 것이다.

要 約

核酸系調味料로 사용되는 맛성 nucleotide類의 國內生産을 目的으로 토양에서 酵母核酸分解力이 강한 菌株 JSC-114를 分離하고 이를 同定한 결과 streptomyces屬의 新菌株로 確認되었으며 5'-phosphodiesterase 生産能力이 우수하여 核酸分解率 및 5'-nucleotide 生成率은 95~98%이었다.

또한 streptomyces sp. strain No. JSC-114의 분해효소 생산용배지를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 炭素源으로는 포도당과 가용성전분이 양호하였으며 最適濃度는 4~4.5%이었다.
2. 窒素源은 有機窒素源의 경우 대체적으로 강한 활성을 나타냈으나 無機窒素源은 尿素를 제외하고 일반적으로 낮은 활성을 보였다.
3. 無機鹽은 MgSO₄·7H₂O 0.1%, KNO₃ 0.25% 이상에서 양호하였으나, KH₂PO₄는 0.6% 이상에서 강한 저해를 받았다.

참 고 문 헌

- (1) A. Kuninaka: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **23**, 239(1959)
- (2) T. Uozum: Agr. Biol. Chem., **10**, 1517 (1969)
- (3) M.P.De Garihe: Enzymes in Nucleic Acid

- Research, Holden-day (1967)
- (4) Y. Nakao: Biochem. Biophys. Acta, **151**, 114 (1968)
 - (5) P.E. Spahr and R.F. Gesteland: Proc. Nat. Acad. Sci. US, **59**, 876 (1968)
 - (6) I. Suhara and M. Yoneda: J. Biochem., **73**, 647 (1973)
 - (7) M. Nestle and W.K. Roberts: J. Biol. Chem., **244**, 5213 (1969)
 - (8) H. Tone and A. Ozaki: Enzymologia, **34**, 101 (1968)
 - (9) I. Suhara: J. Biochem., **75**, 1135 (1974)
 - (10) Y. Nakao: Agr. Biol. Chem., **27**, 291 (1963)
 - (11) J.N. Oavidson: The Biochemistry of the Nucleic Acids, Methuen (1969)
 - (12) K. Ogata, A. Imada and Y. Nakao: Agr. Biol. Chem., **27**, 110 (1963)
 - (13) M.G. Sevag, D.B. Lackman and J. Smokns: J. Biol. Chem., **124**, 425 (1938)
 - (14) R.J.L. Allen: Biochem. J., **34**, 858 (1940)
 - (15) Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Method, Mckillo Hill Book Comp. (1957)
 - (16) R.E. Buchana n and N.E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
 - (17) H. Sugimoto, T. Iwasa and T. Yokotsuka: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **38**, 144 (1964)
 - (18) H. Sugimoto, T. Iwasa and T. Yokotsuka: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **38**, 567 (1964)
 - (19) T. Iwasa, H. Sugimoto, T. Ishiyama and T. Yokotsuka: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **38**, 84 (1964)