

## 세포외 Cytosine Deaminase 생산균 *Arthrobacter* sp. JH-13 의 분리 및 효소생산 조건

전 홍 기·박 정 혜

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

(1984년 12월 11일 수리)

### Isolation of Extracellular Cytosine Deaminase Producing Strain *Arthrobacter* sp. JH-13 and Cultural Conditions of It's Enzyme Production

Jun, Hong-Ki and Jeong-Hae Park

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University

(Received December 11, 1984)

#### ABSTRACT

A strain producing an extracellular cytosine deaminase was isolated from soil samples. The enzyme obtained from the strain possessed the substrate specificity to both cytosine and 5-fluorocytosine. From the results of its morphological, cultural, physiological, and biochemical properties, the strain was thought to be the genus *Arthrobacter*. Therefore, it was named as *Arthrobacter* sp. JH-13. The composition of optimum medium for the enzyme formation was 0.5% of peptone, 0.5% of meat extract, 0.5% of soluble starch, and 0.1% of KCl. The optimum pH for the enzyme formation was 8.0. When the microorganism was cultured aerobically in the above medium, enzyme production reached at maximum in 54 hours at 30°C.

#### 서 론

일반적으로 purine 및 pyrimidine 의 nucleotide 는 핵산 구성성분으로서 유전정보가 전달되는 분자적 기작에 참여하며 세포내 중간물질 대사와 에너지 전달반응에 있어서 중요한 역할을 담당하는 등 생체의 기능수행에 중요한 역할을 하므로 생화학적인 측면에서 또는 생리학적 면에서 purine 및 pyrimidine 유도체에 관한 연구는 많이 이루어져 왔다. Pyrimidine nucleotide 중 cytosine 5'-monophosphate(CMP)의 물질대사에 있어서 key enzyme 의 위치를 차지하는 cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 1)는 pyrimidine 염기중의 하나인 cytosine 을 4번 탄소에서 탈아미노화하여 uracil 로 전환시키는 반응을 촉매시키는 효소로

서 1920년경에 Hahn 등(1923)에 의해서 처음으로 발견되었다.

Cytosine 관련물질의 일반적인 대사경로에서 CMP 의 분해는 5'-nucleotidase 등에 의해서 인산이 제거되어 cytosine 을 생성함으로써 시작되는데 uracil 의 생성에는 2가지 경로가 있다. 그 하나는 cytidine deaminase 와 nucleoside hydrolase 가 차례로 촉매하는 경로이고, 다른 하나는 nucleoside hydrolase 와 cytosine deaminase 가 차례로 촉매하는 경로이다. 그외, Sakai 등은 (1968; 1971a; 1971b) 또 다른 분해경로, 즉 pyrimidine nucleotide N-ribosidase 가 관여하여 CMP 에서 직접 ribose 5'-phosphate 와 cytosine 이 생성되는 경로를 제시하였다. 미생물내에서는 cytidine 5'-monophosphate(CMP) pyrophosphate phosphoribosyl transferase 와 cytidine phosphorylase 가 없으므로 위의 세가지 경

로에서 생성되는 cytosine 은 nucleotide 로 재합성될 수도 없으며 또한 분해 경로로 들어가지도 못한다. 그러므로 미생물내에서 생성된 cytosine 은 일단 uracil 로 전환되어야 nucleotide 의 salvage pathway 로 재이용되거나, 분해되어 urea 와 acetyl-CoA 로 될 수 있다. 이와 같이 cytosine 의 uracil 로의 전환에 관여하는 cytosine deaminase 는 cytosine 관련물질의 대사에 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다. 1920년경 Hahn 등(1923)에 의해서 cytosine deaminase 가 yeast 와 *Escherichia coli* 에서 최초로 발견된 이후 다른 여러 미생물에서도 발견되었다(Kream and Chargaff, 1952; Kaltwasser and Kramer, 1968). *E. coli*(Hayaishi and Kornberg, 1952)와 *Serrachia marcescens*(Sakai et al., 1975 a)의 cytosine deaminase 는 cytosine 을, 빵효모(Ipata et al., 1971)와 *Pseudomonas aureofaciens*(Sakai et al., 1975 b)의 cytosine deaminase 는 cytosine 과 5-methylcytosine 을 탈아미노화 할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

이러한 연구 결과 cytosine deaminase 는 그 기원에 따라 서로 다른 특징을 가지고 있다는 것이 밝혀졌으며, 최근 Sakai 등(1975a; 1975b)은 세균의 cytosine deaminase 를 검토했던 후 두 종류의 효소를 정제하여 그 성질을 비교 검토한 바 있으나 이들은 모두 세포내 효소에 관한 보고였다.

본 연구는 미생물의 pyrimidine nucleotide 의 대사에 관한 연구의 일환으로 지금까지 거의 연구되지 않은 cytosine 및 5-fluorocytosine 에 특이성을 가지는 세포의 cytosine deaminase 를 검토했 목적으로 진행하였다. 본 논문에서는 먼저 토양분리균을 중심으로 cytosine 과 5-fluorocytosine 을 기질로 사용하는 cytosine deaminase 생성균을 검색하여 효소 생산균인 JH-13균주의 분류학상의 위치와 분리균의 배양 조건에 따른 효소 생산능을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용시약 및 기구

Cytosine 은 Kohjin Co., LTD. (Japan)와 Wako Pure Chemical Industries, LTD. (Japan)

의 제품을 사용하였으며, 5-fluorocytosine 은 Sigma Chemical Co.의 제품을, uracil 은 Merk 제를, 5-fluorouracil 은 Karai chemical, LTD (Japan)제품을 사용하였다. 분리균의 동정시약으로서 nutrient agar, nutrient broth 는 Difco(U.S.A.)제를, MacConkey agar 는 Decton Dicknson and Company(U.S.A.)제품을 사용하였으며, 이 이외의 시약은 시판 특급품과 1급 시약을 사용하였다. 또한 본 실험에서 효소활성, 단백질의 정량, 균의 증식도를 측정하기 위해서는 Shimadzu recording spectrophotometer UV-240(Japan)을 사용하였다.

#### 세포의 cytosine deaminase 생산균의 분리

부산권을 중심으로 하여 담양, 대구등 각지에서 채집한 토양시료 약 0.5 g 을 5 ml 의 멸균수에 현탁하였다. 그 상등액 1~2백균이를 상법에 따라 배지 A(Table 1)에 접종하여 30°C 에서 평판 배양하였다. 5~10일간 배양한 후 배지 상에 출현한 colony 중에서 서로 상이하다고 생각되는 균을 배지 B(Table 1)에서 충분히 생육시킨

Table 1. Media for cultivation

Medium for isolation(Medium A)	
Soluble starch	1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%
NH <sub>4</sub> Cl	0.05%
Agar	1.5%
	pH7.0
Medium for stock culture(Medium B)	
Dextrose	1%
Yeast extract	0.1%
Meat extract	0.1%
Poptone	0.2%
Agar	1.5%
	pH 7.0
Medium for enzyme formation(Medium C)	
Soluble starch	1%
Peptone	1%
Meat extract	0.1%
Yeast extract	0.1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%
NaCl	0.01%
MgCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01%
	pH7.0

다음 냉암소에 보존하였다. 이것을 보관균주로 하여 cytosine 및 5-fluorocytosine 분해여부를 검토하여 보다 안정하고 강력한 효소를 생성한다고 생각되는 균을 순수 분리하였다.

#### 세포의 cytosine deaminase의 활성 검출법

보존 분리균을 액체배지 C(Table 1)를 5 ml 씩 분주한 시험관에 접종한 다음 30°C에서 2~3일간 진탕 배양(110 Rev. × 6cm stroke)하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였으며 조효소액의 효소 활성 유무는 paper chromatography를 이용하여 확인하였다. 즉 3 μmole의 cytosine 또는 5-fluorocytosine, 50 μmole의 tris-HCl 완충액(pH 9.0)과 적당량의 조효소액이 들어 있는 효소 반응액 1 ml를 37°C의 항온조에서 30분간 반응시킨 후 반응액에 생성되는 uracil 혹은 5-fluorouracil를 paper chromatography에 의하여 검출하였다. Paper chromatography의 전개액으로서는 methyl alcohol-ethyl alcohol-conc HCl-H<sub>2</sub>O(50:25:6:19, v/v/v/v)를 사용하였고, 동양여지 No. 50(Toyo No. 50 filter paper)에 의해 상승법으로 전개하였다. Cytosine 혹은 5-fluorocytosine 및 uracil 혹은 5-fluorouracil의 검출은 ultraviolet light(Short wave)를 이용하였다.

#### 균의 동정법

분리균의 균학적인 성질은 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 제 7판(Breed *et al.*, 1957)과 8판(Buchanan *et al.*, 1974)에 의거하여 검토하였다.

#### 사용균주 및 배지

효소의 생산조건을 검토하기 위한 기본배지는 glucose 0.5%, peptone 0.5%, meat extract 0.5% 및 KCl 0.5%의 조성으로 하였고, pH는 7.0으로 하였다. 배양방법은 배지 90 ml가 들어 있는 500 ml 용량의 진탕 flask를 110rev. × 6 cm stroke의 왕복진탕 배양기 내에서 30°C에서 72 시간동안 배양하였다.

#### 균체의 증식도 측정 및 조효소액의 조제

균체의 증식도는 일정량의 배양액을 10,000 × g에서 10분간 냉동 원심분리하여 집균된 균체를 증류수로 2번 씻은 후, 일정량의 증류수에 현탁하여 660 nm에서의 흡광도로서 측정하였다. 배

양액을 원심분리하여 그 상등액을 모아서 조효소액으로 사용하였다.

#### 세포의 cytosine deaminase의 활성 측정법

Cytosine deaminase의 활성은 cytosine과 uracil이 갖는 특정 판장에서의 흡광도 차이를 이용하여 측정하였다. 효소의 활성단위는 3 μmole의 cytosine과 200 μmole의 tris-HCl 완충액(pH 9.0) 및 효소액이 들어있는 1 ml의 반응액을 37°C에서 30분동안 반응시킨 후 4 ml의 0.1N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 290 nm에서 측정하였다. 이 반응 조건에서 1시간동안에 1 μmole의 cytosine을 분해하는 효소량을 1단위로 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 세포의 cytosine deaminase 생산균의 분리 및 분류학적 검색

효소 생산균의 분리: 토양시료로부터 방선균 약 130주, 곰팡이 약 30주, 세균 약 200주, 효모 약 40주를 평판배양법을 이용하여 분리하였다. 이들 분리균 중에서, 세포의 cytosine deaminase 생산능을 나타내는 3주의 곰팡이, 2주의 효모, 3주의 방선균 및 20주의 세균을 분리할 수 있었으며, 이들 균주들의 세포의 cytosine deaminase는 5-fluorocytosine도 분해하는 것으로 나타났다.

본 실험에서는 cytosine 및 5-fluorocytosine에 특이성을 가지는 세균의 세포의 cytosine deaminase 생산균 중에선 JH-13균주를 선택하여 실험균주로 사용하였다.

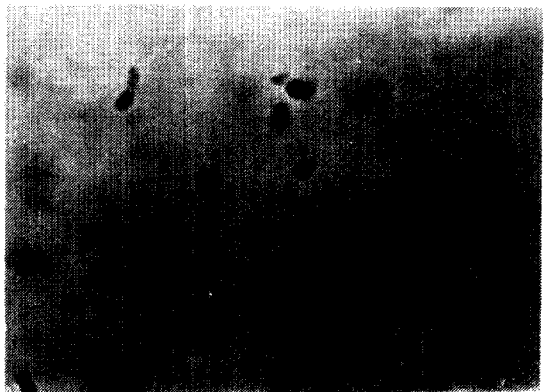


Fig. 1. Photomicrograph of Strain JH-13.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of *Arthrobacter* JH-13

Morphological characteristic	
Shape	Rods, 0.2~0.5 by 1.0~4.0 $\mu\text{m}$
Motility	Negative
Sporulation	Negative
Gram reaction	Negative
Capsule	Negative
Acid-fast stain	Negative
Cultural characteristic	
Growth on nutrient agar	Circular, convex, entire, very slightly wrinkled and cream-colored colony
Growth in nutrient broth	Not membranous
Growth on MacConkey agar	No growth
Pigmentation	Negative
Fermentation	Negative with glucose, maltose, lactose, inositol, melibiose, salicin, galactose, soluble starch, xylose, ribose, sorbose, raffinose, trehalose, sorbitol, mannitol, rhamnose, sucrose, dextrin, fructose, cellobiose, arabinose, amylose, amylopectin, glycogen and mannose

**JH-13 균주의 균학적 성질** : 세포의 cytosine deaminase 생성균주인 JH-13 균주의 형태학적, 생리학적 성질을 검토한 결과, JH-13 균주는 Gram 음성, 호기성 간균(Fig. 1)으로서 본 균주의 형태적 및 배양적 특성(Table 2)과 생리적 특성(Table 3)을 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 제 7 판(Breed *et al.*, 1957)과 제 8 판(Buchanan *et al.*, 1974) 등에 준하여 검토한 결과, *Arthrobacter simplex*의 유연균으로 사료되었으나, *Arthrobacter simplex*는  $\text{H}_2\text{S}$ 를 생성하는 균으로 알려져 있는 반면 JH-13 균주는  $\text{H}_2\text{S}$ 를 생성하지 않았다.

이상의 실험결과로부터 JH-13 균주를 *Arthrobacter* sp. JH-13으로 명명하였다.

**분리균주 JH-13의 세포의 cytosine deaminase 생산 조건**

세포의 cytosine deaminase의 생성능에 대한 최적 조건을 설정하기 위해 탄소원, 질소원 및

Table 3. Physiological characteristics of *Arthrobacter* JH-13

Hydrolysis of starch	Negative
Formation of indole	Negative
Methyl red test	Positive
Voges-Proskauer test	Positive
Citrate utilization	Negative
KCN, growth in.	Positive
$\text{H}_2\text{S}$ production	Negative
Methylene blue reduction	Positive
Nitrate reduction	Positive
Gelatin liquefaction	Positive
Tween 80 hydrolysis	Positive
Urease	Negative
Catalase	Positive
Oxidase	Negative
Decarboxylase	
Lysine	Positive
Ornithine	Positive
Arginine	Positive
Phenylalanine deaminase	Negative
Antibiotics	
	Resistant to ampicillin with exception of penicillin G, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, gentamycin and kanamycin
Anaerobical growth on nitrate	Negative
Temperature for growth	Good growth at 37°C
Optimum pH	7.0

초발 pH의 영향등을 검토하였다.

**탄소원의 영향** : Peptone 0.5%, meat extract 0.5% 및 KCl 0.5%를 넣은 기본 배지(pH 7.0)에 각종의 탄소원, 즉 당류와 유기산 염류를 각각 0.5%씩 첨가하여 30°C에서 72시간 동안 배양한 후 원심분리하고, 그 상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 soluble starch, dextrin과 maltose 등에서 효소생성이 비슷하게 나타났으며, 이 중에서 soluble starch가 가장 효과적이었다. 그러나 fructose, lactose 및 유기산 염류의 대부분에서는 효소생성이 거의 없는 것으로 나타났다(Table 4). 또한 본 균주는 탄소원을 이용한 후 배지의 pH를 알칼리성으로 변화시

Table 4. Effect of carbon sources<sup>a</sup> on the production of extracellular cytosine deaminase

Carbon source	Final pH	Growth (O.D. at 660 nm)	Activity (units/ml)
None	8.8	0.45	— <sup>b</sup>
Dextrin	8.8	0.40	1.5
Glucose	8.8	0.28	1.0
Fructose	8.8	0.30	—
Lactose	8.6	0.40	—
Maltose	8.6	0.10	1.4
Sucrose	8.8	0.08	1.3
Soluble starch	8.8	0.18	1.8
Mannitol	8.8	1.30	1.2
Inositol	8.4	0.75	1.2
Glycerin	8.6	0.30	0.7
Sodium acetate	8.8	0.45	—
Sodium citrate	8.8	0.65	—
Sodium formate	8.8	0.55	—
Sodium succinate	8.8	0.30	—
Sodium tartrate	8.8	0.45	0.5

<sup>a</sup>The cultivation was carried out in 500 ml of shaking flask with 90 ml of medium containing 0.5% of each carbon source, 0.5% of peptone, 0.5% of meat extract, and 0.5% of KCl(pH 7.0) by shaking method for 55 hours at 30°C, <sup>b</sup>Not detected.

켰다.

질소원의 영향 : Glucose 0.5%와 KCl 0.5%를 넣은 배지(pH 7.0)에 무기, 유기 질소원을 0.5%씩 첨가하여 각 질소원이 효소생성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 5에 나타내었다. 유기 질소원으로서 peptone과 meat extract를 각각 0.5%씩 첨가한 배지에서 가장 효소생성 효과가 높았으며, gelatin에서는 거의 효소생성이 없는 것으로 나타났고, 한편 ammonium chloride를 포함한 무기 질소원은 모두 효소 생성효과를 나타내지 않았으며, 균의 증식도와 효소 생성능과는 아무런 상관성을 보이지 않았다.

KCl 및 NaCl 농도의 영향 : 기본배지에 첨가된 KCl 및 NaCl은 효소생성에 중요한 인자로 작용하였다(Table 6). KCl의 첨가로 균체 증식도가 대체로 감소하는 경향을 보였으며 0.1%의 KCl 농도에서 균체증식과 효소생성능이 대체로 높았다. NaCl의 경우, 0.05%의 농도에서 대체로 효

Table 5. Effect of nitrogen sources<sup>a</sup> on the production of extracellular cytosine deaminase

Nitrogen source	Final pH	Growth (O.D. at 660 nm)	Activity (units/ml)
None	7.0	0.15	— <sup>b</sup>
Inorganic nitrogen			
Ammonium chloride	7.0	0.25	—
Ammonium sulfate	7.0	0.05	—
Ammonium phosphate, monobasic(1%)	8.8	0.50	—
Ammonium phosphate, dibasic(1%)	8.8	0.45	—
Ammonium nitrate	7.0	0.10	—
Sodium nitrate	7.0	0.20	—
Organic nitrogen			
Peptone	8.8	0.30	0.7
Yeast extract	8.8	0.30	0.4
Meast extract	8.8	0.75	0.3
Peptone(0.5%)+Meat extract(0.5%)	8.8	0.30	1.0
Gelatin	8.8	1.05	—
Urea	8.8	0.15	—

<sup>a</sup>The cultivation was carried out in 500 ml of shaking flask with 90 ml of medium containing 0.5% of glucose, 0.5% of each nitrogen source, and 0.5% of KCl(pH 7.0) by shaking method for 55 hours at 30°C. <sup>b</sup>Not detected.

Table 6. Effect of potassium chloride and sodium chloride<sup>a</sup> on the production of extracellular cytosine deaminase

Addition	Conc.(%)	Final pH	Growth (O.D. at 660 nm)	Activity (units/ml)
None	—	8.6	1.45	— <sup>b</sup>
KCl	0.5	8.8	0.30	1.0
	0.1	8.8	1.00	1.9
	0.05	8.8	0.35	1.2
	0.005	8.8	0.60	1.1
NaCl	0.5	8.8	0.40	1.2
	0.05	8.8	1.10	1.0
	0.005	8.8	0.45	0.6

<sup>a</sup>KCl or NaCl was added to the medium containing 0.5% of glucose, 0.5% of peptone, and 0.5% of meat extract(pH 7.0) and the cultivation was carried out in 500 ml of shaking flask with 90 ml of medium by shaking method for 55 hours at 30°C.

<sup>b</sup>Not detected.

Table 7. Effect of soluble starch<sup>a</sup> on the production of extracellular cytosine deaminase

Concentration (%)	Final pH	Growth (O.D. at 660 nm)	Activity (units/ml)
None	8.8	1.2	— <sup>b</sup>
0.5	8.8	2.6	2.0
1.0	8.8	10.0	0.4
2.0	8.8	13.0	0.4
3.0	8.8	12.0	0.4

<sup>a</sup>The cultivation was carried out in 500 ml of shaking flask with 90 ml of medium containing 0.5% of peptone, 0.5% of meat extract, 0.1% of KCl, and each concentration of soluble starch (pH 7.0) by shaking method for 55 hours at 30°C. <sup>b</sup>Not detected.

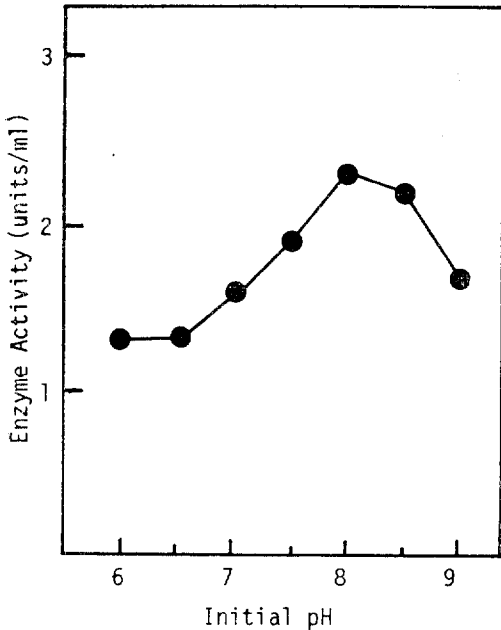


Fig. 2. Effect of the initial pH of medium on the formation of an extracellular cytosine deaminase.

The cultural medium contained 0.5% of glucose, 0.5% of peptone, 0.5% of meat extract, and 0.1% of KCl, and pH was adjusted with 1 N NaOH or 1 N HCl.

소생성 및 균의 증식이 높은 것으로 나타났다.

**Soluble starch 농도의 영향:** 효소생성에 효과적인 것으로 인정되는 soluble starch 를 선택하여 그 농도에 따른 효소의 생성능을 검토한 결과, 0.5%농도에서 대체로 좋은 효소 생성능을 보였으며, 1%, 2%, 및 3%의 농도에서는 균체의

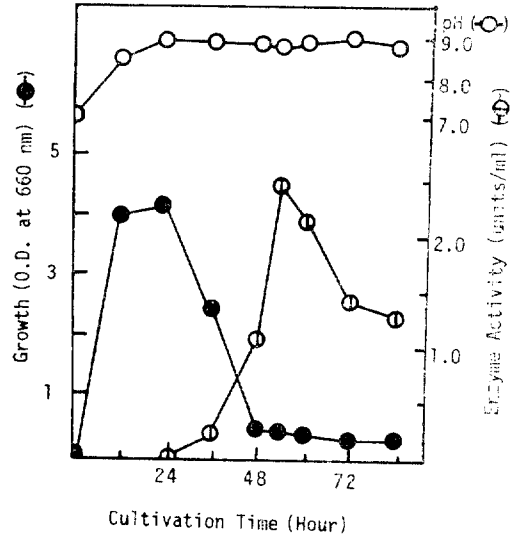


Fig. 3. Relationship between the culture time and production of an extracellular cytosine deaminase.

The cultivation was carried out in 500 ml of shaking flask with 90 ml of medium containing 0.5% of soluble starch, 0.5% of peptone, 0.5% of meat extract, and 0.1% of KCl (pH 7.0) for 72 hours at 30°C.

증식은 매우 좋았으나 효소의 생성은 0.5%농도 인 때보다 낮은 결과를 보였다 (Table 7).

**초발 pH의 영향;** Glucose 0.5%, peptone 0.5%, meat extract 0.5% 및 KCl 0.1%를 넣은 기본배지의 초발 pH에 따른 효소생성능을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 초발 pH에 따른 효소 생성능의 차이는 크지 않았으나 pH 8.0부근일 때에 효소 생성능이 큰 것으로 나타났고 이때의 효소활성은 2.2 units/ml 이었다.

설정된 최적 배양조건에서의 효소의 생성관계; 앞에서 검토한 여러가지 최적조건을 종합하여 세포의 cytosine deaminase의 생성능과 균체의 증식도 및 pH의 변화를 시간의 경과에 따라서 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Soluble starch 0.5%, peptone 0.5%, meat extract 0.5% 및 KCl 0.1%를 첨가한 배지 (pH 8.0)를 250 ml 용량의 삼각 flask에 30 ml씩 분주하여 멸균한 후 균주를 이식하였다. 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양한 배양액을 전배양액으로 사용하였다. 전배양용 배지와 조성이 같은 본 배양용 배

지 90 ml 를 500 ml 용량의 shake flask 에 분주, 멸균한 후 전배양액 3 ml 를 접종하여 30°C 에서 진탕배양하면서 경시적으로 관찰하였다. 그 결과 균체의 증식은 12~24시간 배양에서 최대값을 나타내었으며 효소 생성은 약 54시간 부근에서 가장 높았다. 이 때의 효소 활성은 2.5 units/ml 이었다. 일반적으로 효소 생성은 균증식의 대수적 증식기나 정지기에서는 전혀 생성되지 않

았으며, 사멸기가 시작되는 시기에서 생성되기 시작하였다. 한편 배양기간 동안 pH 의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 1983년도 한국과학재단의 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이를 감사드립니다.

## 적 요

토양시료로부터 cytosine 과 5-fluorocytosine 에 특이성을 갖는 세포의 cytosine deaminase 를 생산하는 균주 JH-13을 분리하였다. 분리균 JH-13을 분류학적으로 검색한 결과 *Arthrobacter* 속에 속하는 것으로 밝혀졌으며 *Arthrobacter* JH-13으로 명명하였다. 분리균의 세포의 cytosine deaminase 생성을 위한 최적 배지의 조성은 peptone 0.5%, meat extract 0.5%, soluble starch 0.5%, KCl 0.1%로, 배지의 초발 pH는 8.0으로 설정하였다. 500 ml 용량의 진탕 flask 에 최적배지 100 ml 를 넣고 110 Rev. × 6 cm stroke 로 30°C 에서 진탕배양하였을 때 효소생산은 54시간 부근에서 최고에 달하였다.

## REFERENCES

- Breed, R.S., E.G.D. Murray, and N.R. Smith, 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 7th ed.
- Buchanan, R.E., N.E. Gibbens, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murry, C.F. Niven, A. W. Ravin, and R.Y. Stainer, 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 8th ed.
- Hahn, A., W. Lentzel, 1923. Uber das verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen. I. Einfluss von hefe and pyrimidinderivate, *Z. Biol.* 79, 179.
- Hayaishi, O. and A. Kornberg, 1952. Metabolism of cytosine, thymine, uracil, and barbituric acid by bacterial enzymes. *J. Biol.Chem.* 197, 717.
- Ipata, P.L., F. Marmochi, G. Magni, R. Felicioli, and G. Polidoro, 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochemistry*, 10, 4270.
- Kaltwasser, H. and Krämer, 1968. Verwerfung von cytosin and uracil durch *Hydrogenomonas facilis* and *Hydrogenomonas* H 16. *Arch. Mikrobiol.* 60, 172.
- Kream, J. and E. Chargaff, 1952. On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 5157.
- Sakai, T., T.S. Yu, and H. Tabe. 1975 a. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1623.
- Sakai, T., T.S. Yu., K. Taniguchi, and S. Omata, 1975 b. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 2015.
- Sakai, T., T. Watanabe, and I. Chibata, 1968. Metabolism of pyrimidine nucleotides in bacteria. *J. Ferm. Technol.* 46, 202.
- Sakai, T., T. Watanabe, and I. Chibata, 1971 a. Metabolism in pyrimidine nucleotides in bacteria. II. Studies on the regulation system of the degradation of nucleotides in *Pseudomonas oleovorans*. *J. Ferm. Technol.* 49, 488.
- Sakai, T., T. Watanabe, and I. Chibata, 1971 b. III. Enzymatic production of ribose-5-phosphate from pyrimidine by *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Microbiol.*, 22, 1085.