

Nocardioides sp. J-275L이 생산하는 세포의 Adenine Deaminase의 정제 및 성질

전홍기·박정혜·김태숙
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Properties of Extracellular Adenine Deaminase from *Nocardioides* sp. J-275L

Jun, Hong-Ki, Jeong-Hae Park, and Tae-Sook Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan, 607, Korea

ABSTRACT: The extracellular adenine deaminase from *Nocardioides* sp. J-275L was purified by the following techniques: ammonium sulfate fractionation, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, and Sephacryl S-200 superfine gel filtration. The enzyme was partially purified about 3889.5-fold with about 5.2% yield by these procedures. The molecular weight of the enzyme was 39,000 by a calibrated Sephacryl S-200 superfine column chromatography. The enzyme was stable at pH 7.5 and up to 40 °C. Glycerol was effective on the stabilization of the enzyme during storage. The optimum pH and temperature of the enzyme were around pH 7.5 and 40 °C, respectively. The apparent Michaelis constant K_m of the enzyme for adenine was $7.4 \times 10^{-5} M$. The purine analogues, 6-chloropurine, 2,6-diaminopurine, 6-bromopurine, 4-aminopyrazolo [3,4-*d*]pyrimidine, and 8-azaadenine were substrates for the enzyme. 6-Dimethylaminopurine was a competitive inhibitor of the enzyme. The enzyme was inhibited by 1mM of Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , and Ag^+ , and 1mM of α, α' -dipyridyl, pentachlorophenol, and pCMB.

KEY WORDS □ Extracellular Adenine Deaminase, *Nocardioides* sp. J-275L

Adenine은 생체내에서 ribose-1-phosphate의 존재하에 salvage pathway를 통하여 우선 adenosine으로 전환되고, 그 다음 adenosine이 inosine으로, inosine이 hypoxanthine으로 전환되는 경로로 대사된다. 생체내에서 adenine이 분해되는 또 다른 경로로서 adenine이 adenine deaminase에 의하여 직접 hypoxanthine으로 분해되는 경로가 있다. 일반적으로 adenine deaminase를 합성하지 못하는 미생물에서는 전자의 분해경로에 따라나 adenine deaminase를 생산하는 미생물에서는 adenine이 직접 hypoxanthine으로 분해된다.

저자들은 purine 분해계와 핵산합성 과정에서 중요한 역할을 하며 미생물의 생육저해(Dalal *et*

al., 1966; De Repentigny *et al.*, 1968; Hosono and Kuno, 1974; Newell and Tucker, 1967; 1968)와 생체내 축적물체(Edozien *et al.*, 1970; Yokozaya *et al.*, 1982) 등을 야기시키는 adenine을 직접 hypoxanthine으로 분해하는 효소인 adenine deaminase(EC 3.5.4.2)를 연구대상으로 하여 세포의 adenine deaminase를 생산하는 방선균을 토양으로부터 분리하여 보고한 바 있다(Jun and Park, 1984; Jun *et al.*, 1987).

본 연구에서는 전보(Jun *et al.*, 1987)에서 분리 보고한 *Nocardioides* sp. J-275L의 세포의 adenine deaminase를 부분정제하여 효소의 안정

성을 비롯한 몇가지 효소학적인 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

시 약

DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephacryl S-200 superfine 등은 Pharmacia 제품을 사용하였으며, adenine과 표준 단백질은 Sigma사 제품이며, 기타 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

균주 및 배양

균주는 전보(Jun *et al.*, 1987)에서 분리·동정한 *Nocardioides* sp. J-275L을 사용하였다. 세포의 adenine deaminase를 정제하기 위한 균주의 배양 및 조효소액의 조제방법은 전보(Jun *et al.*, 1987)에서와 같다.

효소의 활성 측정

Adenine deaminase의 활성은 기질과 반응 생성물과의 차에 의해 생기는 265 nm에서의 흡광도의 감소를 이용한 Kalckar(1947)의 방법을 이용하여 초속도로서 측정하였다. Standard assay는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 0.1 mM의 기질에 적당량의 효소액을 첨가하여 최종 용량을 3 ml로 한 반응 system에서 2~5분간 반응을 진행하였다. 효소 1 unit는 standard assay condition에서 1분 동안 1 μ mole의 adenine을 탈아미노화 하는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

Km값을 결정하기 위한 실험은 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mM의 adenine에 대한 초속도를 구하였으며, 여러 기질에서의 효소 활성을 측정하기 위하여 각 기질에 대하여 각각 다른 파장에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 6-chloropurine은 245 nm, 6-iodopurine은 275 nm, 6-bromopurine은 250 nm, 2, 6-diaminopurine은 245 nm, 8-bromo adenine은 275 nm, 4-aminopyrazolo[3, 4-d] pyrimidine과 8-azaadenine은 275 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

효소의 안정성과, 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 검토하기 위한 실험에서는 효소반응

system의 최종 용량을 1 ml로 한 전보(Jun *et al.*, 1987)의 활성측정방법에 준하였다.

단백질의 농도

Egg albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

분자량의 측정

Sephacryl S-200 superfine gel로 여과하여 효소의 분자량을 측정하였다. 표준 단백질로는 α -chymotrypsinogen A(M. W. 25,700), ovalbumin(M. W. 43,000) 및 hemoglobin(M. W. 68,000)을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

균체를 제거한 배양액에 황산 암모늄을 넣어 55%로 포화시킨 후 원심분리(10,000 \times g, 20분)하여 침전물을 버리고 상등액을 모아 다시 황산 암모늄을 가하여 70%로 포화시켰다. 침전물을 원심분리하여 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 동일 완충액에 하룻밤 투석하였다.

투석한 효소액을 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Cellulose column(3 \times 20 cm)에 흡착시켜, column을 같은 완충액 500 ml로 씻은 후 0.2M의 동일 완충액 600 ml로 비흡착 단백질을 용출시켰다. 그 다음 0.2M-0.6M로 점진적으로 완충액의 농도를 높여 주면서 흡착된 단백질을 용출시켰다. Adenine deaminase의 활성 부분은 0.3M 이후에 용출되었으며, 이 부분의 fraction을 모아 80%의 황산 암모늄으로 침전시켜 앞에서와 같은 방법으로 0.2M의 같은 완충액에 하룻밤 투석하였다.

0.2 M의 완충액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(1.8 \times 12 cm)에 상기의 농축 효소액을 흡착시켜 0.2M-0.6M로 완충액의 농도를 점진적으로 높여주면서 흡착 단백질을 용출시킨 결과 본 효소는 0.4M 이후에 용출되었다. 활성부분은 앞에서와 같은 방법으로 황산 암모늄으로 분획하고 완충액에 투석하였다.

마지막으로 효소를 0.05M potassium phos-

Table 1. The purification of extracellular adenine deaminase from J-275L

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Relative purification	Yield (%)
Broth	38750	65210.0	0.6	1	100
Ammonium sulfate saturation (55-70%)	28080.4	1109.5	25.3	42.2	72.5
DEAE-Cellulose	12402.7	79.5	156.0	260.0	32.0
DEAE-Sephadex A-50	4413.6	7.5	588.5	980.8	11.4
Sephacryl S-200	2007.1	0.86	2333.7	3889.5	5.2

phate buffer (pH 7.0)로 평형시킨 Sephacryl S-200 superfine column (1.4×47 cm)에 흡착시켜 gel 여과하였다.

이상의 과정과 같이 정제한 결과 *Nocardioides* sp. J-275L의 세포외 adenine deaminase는 5.2%의 수율로서 약 3889.5배로 부분정제 되었으며 비활성은 약 2333.7 units/mg이었다 (Table 1).

분자량의 측정

Sephacryl S-200 superfine gel을 사용하여 효소의 분자량을 측정하였다. Void volume (V_0)에 대한 elution volume (V_e)의 비 (V_e/V_0)를 단백질 분자량의 대수값에 대하여 plot한 결과 본 효소의 분자량은 39,000 부근으로 측정되었다 (Fig. 1). 이 값은 *Pseudomonas synxantha* A3의 37,

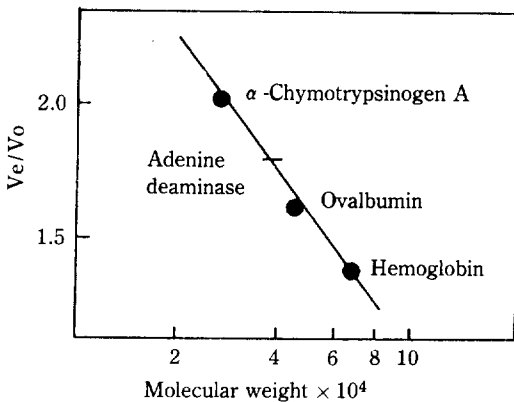


Fig. 1. Determination of molecular weight of adenine deaminase by Sephacryl S-200 superfine gel filtration

Details are given in the text

000 (Sakai and Jun, 1978)과 근소한 값을 보여 세균의 세포내 효소와 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

효소의 안정성

부분정제된 세포외 adenine deaminase를 사용하여 효소의 안정성을 검토하였다.

효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 0.05M의 여러 완충액에 일정량의 효소를 넣어 35°C에서 20분간 유지시킨 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. Fig. 2의 A에 나타낸 것처럼 본 효소는 sodium phosphate buffer에서는 pH 7 부근에서, potassium phosphate buffer에서는 pH 7.5 부근에서 가장 안정하였으며, tris-HCl buffer에서는 70% 이상의 활성을 잃어 아주 불안정한 것으로 나타났다.

효소의 온도 안정성을 검토하기 위하여 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소를 넣고 30°C에서 70°C까지 온도를 달리하여 각 온도에서 10분간 유지시킨 후 잔존활성을 측정한 결과, 본 효소는 40°C 부근까지 대체로 안정하였으나 45°C 이상의 온도에서는 급격히 실활되어 60°C에서는 완전히 실활되었다 (Fig. 2, B).

다음으로 여러가지 alcohol류와 acetone이 본 효소의 안정성에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 본 효소는 4°C에서 15% glycerol에 보관하였을 때에 20일경까지는 대체로 안정하였으며, 65일 경과하였을 때에도 80% 이상의 활성을 유지하였다. 반면에 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에서만 보

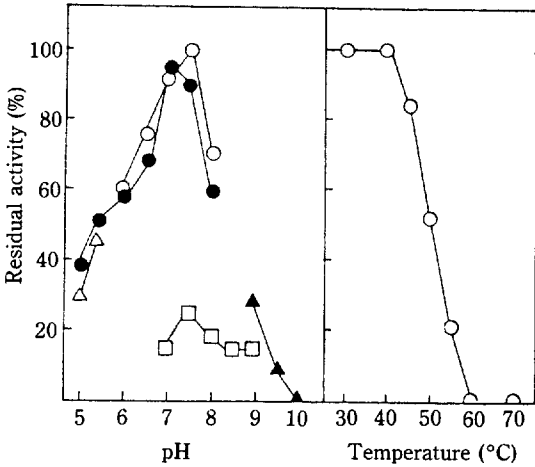


Fig. 2. Effect of pH (A) and temperature (B) on stability of adenine deaminase

(A) After the enzyme solutions in various buffer solutions were treated at 35°C for 20 min, The residual activity was measured by standard assay method.

○, K-phosphate buffer; ●, Na-phosphate buffer; △, Na-acetate buffer; ▲, glycine-NaOH buffer; □, Tris-HCl buffer.

(B) After the enzyme solution in 0.05M potassium phosphate buffer, pH 7.0, was incubated at the indicated temperature for 10 minutes, the activity was measured by standard assay method.

관하였을 때에는 대체로 불안정하여 20일간 보관하였을 때의 잔존활성이 80%이고 65일이 경과하였을 때에는 70% 이상의 활성을 잃었다. 이러한 효소 단백질의 glycerol에 의한 안정화는 단백질의 소수성 group이 용매와의 접촉을 피하여 단백질 속으로 이동하게 되어 단백질의 polypeptide에 공유결합함으로써 glycerol-water mixture내에서 단백질의 3차 구조가 단단히 결합하게 되어 단백질의 chemical potential이 증가하기 때문이라고 설명되고 있다(Gekko and Timasheff, 1981). Sakai와 Jun(1978b)도 ethyl alcohol에 의해 효소가 안정화 되었다고 보고를 하였으나 아직 이러한 용매에 의한 효소의 안정화 기작은 확실하게 밝혀지지 않고 있다.

효소의 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하여 Fig. 4의 A에 그 결과를 나타내었다. 여러 pH의 각 원충액에서 효소의 활성을 측정된 결과 sodium phosphate buffer에서는 pH 7.0 부근에서,

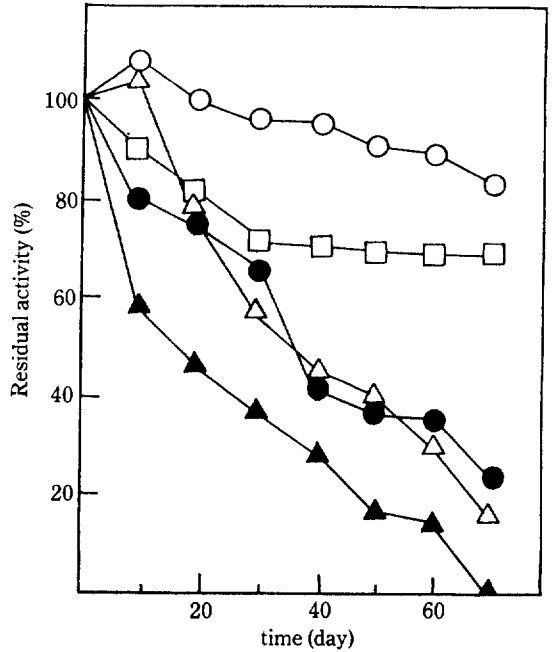


Fig. 3. Effect of various alcohol and acetone on enzyme activity

The enzyme solutions were stored at 4°C in 0.05M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 15% of indicated compound. After standing for indicated period, residual activity was assayed by standard assay method. □, Glycerol; ○, ethylene glycol; △, acetone; ▲, ethyl alcohol; ●, none.

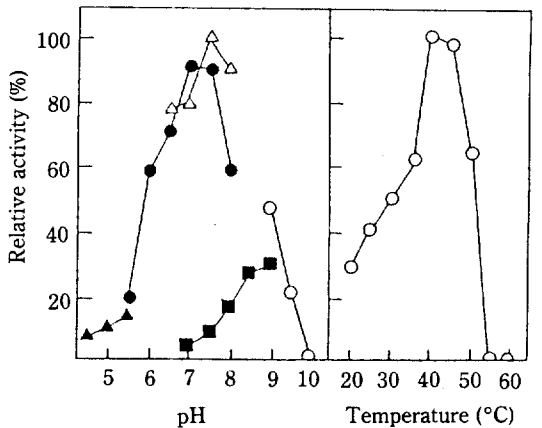


Fig. 4. Effect of pH (A) and temperature (B) on activity of adenine deaminase

(A) ▲, Na-acetate buffer; ○, Na-phosphate buffer; △, K-phosphate buffer; ■, tris-HCl buffer; (B) ○, glycine-NaOH buffer. ○, K-phosphate buffer.

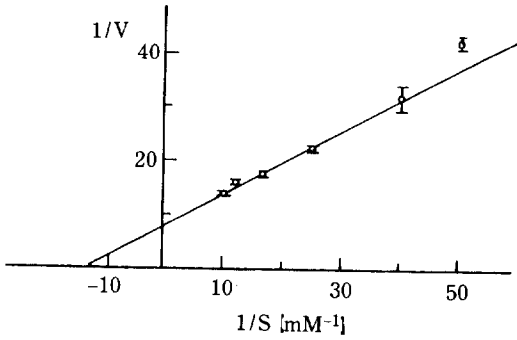


Fig. 5. Effect of substrate concentration on adenine deaminase from *Nocardioides* sp. J-275L

potassium phosphate buffer에서는 pH 7.5 부근에서 본 효소의 활성이 가장 높았으며, tris-HCl buffer에서는 아주 활성이 낮았다.

효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 20°C에서 60°C까지 온도를 달리하여 각 온도에서 효소의 반응을 진행시킨 결과, Fig. 4의 B에 나타낸 바와 같이 40°C 부근까지는 온도의 상승에 따라 효소의 활성은 증가하였으나 50°C 이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소하여 55°C에서 30분간 효소반응을 진행시켰을 때에는 완전히 실패하였다.

기질농도의 영향

3번 반복적으로 행한 실험을 통하여 각 기질농도에서 효소의 초속도를 구하여 Fig. 5에서와 같이 double reciprocal plot으로 나타내었다. plot 결과, 0.4 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에서 adenine에 대한 Km값은 7.4×10^{-5} M로 나타났었다.

기질 특이성

여러가지 purine 관련물질에 대한 효소의 활성을 검토하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 그 활성은 아주 약했지만 본 효소는 6-chloropurine, 6-bromopurine, 2,6-diaminopurine, 8-azaadenine, 4-aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidine을 기질로 이용하여 분해하였으며, 6-mercaptopurine, 6-iodopurine, 6-dimethylaminopurine, 6-bromopurine, 8-bromoadenine에 대하여는 활성을 나타내지 않았다.

Dixon plot (1953)을 실시한 결과, Fig. 6에 나타낸 바와 같이 6-dimethylaminopurine은 aden-

Table 2. Adenine deaminase activity on puring analogues

Compound	Vmax (relative)	Km (mM)
Adenine	100	0.074
6-Mercaptopurine	not reacted	
6-Chloropurine	19.5	0.33
6-Iodopurine	not reacted	
6-Bromopurine	22.7	0.25
6-Dimethylaminopurine	not reacted	
6-Benzyladenine	not reacted	
2,6-Diaminopurine	8.5	0.12
8-Azaadenine	11.7	0.17
8-Bromoadenine	not reacted	
4-Aminopyrazolo [3,4-d] pyrimidine	20.3	0.29

Enzyme activity was determined by standard assay method except that the substrate was changed as indicated. Maximum velocities and Km values were obtained from Lineweaver-Burk plots.

ine에 대한 경쟁적 저해제로, 8-bromoadenine은 비경쟁적 저해제로 작용하였으며, 각각의 adenine에 대한 Ki값은 0.05 mM과 0.264 mM로 측정되었다.

본 효소의 purine analogue에 대한 기질 특이성은 Hartenstein과 Fridovich (1971)가 보고한 세로네 효소와 뚜렷한 차이점을 보였다. 즉 4-amin-

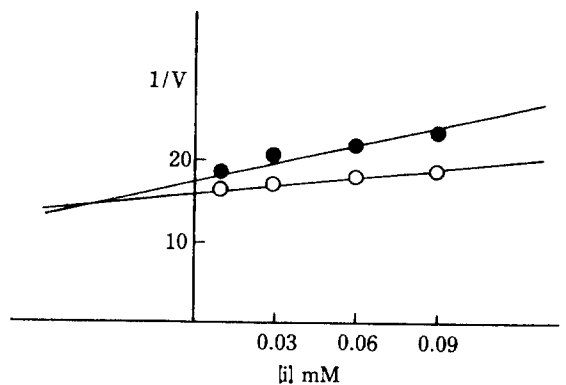


Fig. 6. Inhibition of adenine deaminase by 6-dimethylaminopurine

The reaction mixture and conditions were those of the standard assay system described in the text. ●, 0.06mM of adenine; ○, 0.09mM of adenine.

Table 3. Effect of metal ions on adenine deaminase activity

Metal ion	Relative activity		
	1 mM	0.1 mM	0.01 mM
None	100	100	100
BaCl ₂	72	85	
CaCl ₂	80	98	
CoCl ₂	66	85	
CuCl ₂	32	62	
FeCl ₃	30	89	
Pb(NO ₃) ₂	0	90	31
MgCl ₂	80	72	
HgCl ₂	0	0	
NiCl ₂	62	59	
KCl	77	100	
SnCl ₂	90	100	
AgNO ₃	0	30	
NaCl	76	100	
ZnCl ₂	74	43	
Li ₂ SO ₄	103	106	

The enzyme was preincubated with each metal ion in 0.01M potassium phosphate buffer, pH 7.0 at 37°C. After 10 min, the enzyme activity was measured by standard assay method.

opyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine과 8-azaadenine은 *Candida*와 *Azotobacter*의 효소에 의해 분해되지 않는 반면, 본 효소에서는 기질로 이용되었다.

금속이온의 영향

여러가지 금속이온이 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하여 Table 3에 그 결과를 나타내었다. 본 효소는 1mM의 +2가와 +3가의 금속이온들에 의해 저해되었으며, 그 중에서 Cu²⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Ag⁺ 이온들은 1mM 및 0.1mM 농도에서 본 효소를 크게 저해하였다.

본 효소의 활성을 크게 저해하는 것으로 나타난 Pb²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ag⁺ 등에 의해 저해된 효소에 몇가지 화합물을 첨가하여 활성이 회복되는지 검토하였다. Table 4에 나타난 결과를 보면, 0.5 mM Pb²⁺, 0.1mM Cu²⁺, 0.1mM Ag⁺ 등의 이온에 의해 저해된 효소의 활성은 EDTA에 의해 회복되었으나, 0.01 mM Mg²⁺ 이온에 의한 저해는 EDTA 1mM에 의해 회복되지 않았다. Ag⁺

Table 4. Effect of some reagents on adenine deaminase activity inhibited by metal ion.

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
Pb(NO ₃) ₂ 0.5mM	None	60
	EDTA 1mM	106
	NaCN 1 mM	63
CuCl ₂	None	62
	EDTA 0.2mM	98
	NaCN 0.2mM	31
HgCl ₂	None	31
	EDTA 0.2mM	13
	NaCN 0.2mM	3
AgNO ₃	None	22
	EDTA 0.2mM	100
	NaCN 0.2mM	116

The enzyme was preincubated with each metal ion at 37°C for 10 min, and then with each reagent for further 10 min. The enzyme activity was measured by standard assay method.

Table 5. Effect of some reagents on adenine deaminase

Reagent	Relative activity		
	1 mM	0.5 mM	0.1 mM
None	100	100	100
α, α'-Dipyridyl	0		30
NaCN	102		100
o-Phenanthroline	0	35	81
EDTA*	93		134
Pentachlorophenol	0	36	87
Monoiodoacetate	83		96
Na ₂ AsO ₂	115		112
N-Ethylmaleimide	111		104
p-CMB**	0		70
NaF	97		92
NaN ₃	102		100
Trichloroacetate	98		98

After incubation with the reagent at 37°C for 10 min, the enzyme activity was measured immediately.

*Ethylenediaminetetraacetic acid; **p-chloromercuribenzoic acid.

이온에 의해 저해된 효소의 활성은 NaCN에 의해 회복되었다.

*Pseudomonas*의 세포네 효소의 경우, Hg²⁺ 이

온에 의해 크게 저해되며 Hg²⁺에 의해 저해된 효소의 활성이 EDTA에 의해 회복되었으나 (Jun and Sakai, 1978), 본 효소는 Hg²⁺ 이온에 의해 활성이 크게 저해되지만 EDTA가 활성회복에 아무런 영향을 주지 못하여, 효소의 활성부위에 차이가 있는 것으로 생각된다.

효소 저해제의 영향

효소 활성에 미치는 일반적인 효소 저해제들의 영향을 검토하여 Table 5에 그 결과를 나타내었다. α, α'-Dipyridyl, o-phenanthroline, pentachlorophenol, p-CMB 등이 1 mM과 0.5 mM에서 효소 활성을 크게 저해하였다. 그러나 NaN₃, Na₂AsO₂, NaCN 및 N-ethylmaleimide 등은 효소활성에 별다른 영향을 주지 않거나 효소 활성을 약간 증가시켰다. p-CMB에 의해 저해된 효소에 몇가지 mercurial과 SH 시약을 첨가하여 활성을 검토하였으나 효소의 활성에 아무런 영향도 주지 못하는 것으로 나타났다 (Table 6).

Table 6. Effect of sulphhydryl compounds and alkylating agents on adenine deaminase inhibited by p-CMB

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
p-CMB 0.05 mM	None	73
"	Glutathione 0.1 mM	61
"	2-Mercaptoethanol	73
"	Cystein	65
"	Monoiodoacetate	63
"	N-Ethylmaleimide	71
Monoiodoacetate 0.1 mM	p-CMB 0.05 mM	70
N-Ethylmaleimide		75

Reaction conditions are the same as table 4.

적 요

Nocardioides sp. J-275L이 생산하는 세포의 adenine deaminase를 황산 암모늄 분획, DEAE-Cellulose column chromatography, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 및 Sephacryl S-200 superfine gel filtration 등의 과정에 의해 5.2%의 수율로서 3889.5배로 부분정제하였으며, 본 효소의 분자량은 Sephacryl S-200 superfine gel에 의해 39,000 부근으로 측정되었다.

본 효소의 안정 pH와 온도는 pH 7.5와 40°C로 나타났으며, 15%의 glycerol이 효소를 안정화시키는데 효과적이었다. 효소의 활성 최적 pH와 온도는 pH 7.5와 40°C였다. 효소의 adenine에 대한 Km 값은 7.4 × 10⁻⁵M로 측정되었으며, 검토된 purine analogue 중에서 6-chloropurine, 2,6-diaminopurine, 6-bromopurine, 4-aminopyrazolo[3,4-d] pyridine, 8-azaadenine 이 기질로 이용되었다. 본 효소는 0.1 mM의 Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Ag⁺ 등에 의해 활성이 크게 저해되었으며, Pb²⁺, Cu²⁺, Ag⁺에 의해 저해된 효소의 활성은 EDTA에 의해 회복되었다. 검토된 일반적인 효소 저해제 중에서 1 mM의 α, α'-dipyridyl, o-phenanthroline, pentachlorophenol, p-CMB 등에 의해 효소의 활성이 크게 저해되는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 '86년도 늘원 문화재단 연구비로 수행 되었음.

REFERENCES

1. Dalal, F.R., R.E. Gots, and J.S. Gots, 1966. Mechanism of adenine inhibition in adenine sensitive mutants of *Salmonella typhimurium*.

J. Bacteriol. **91**, 507-513.
 2. De Repentigny, J., L.G. Mathieu, S. Turgeon, and S. Sonea, 1968. Effects of exogenous purines on growth rates and other properties of *Staphylococcus aureus* strains including a pyrimidineless mutant of the wood 46 strain. *Canadian J. Microbiol.* **14**, 39-44.
 3. Dixon, M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **55**, 170-171.

4. Edozien, J.C., U.U. Udo, V.R. Young, N.S. Schrimahaw, 1970. Effects of high level yeast feeding on uric acid metabolism of young men. *Nature*. **228**, 180.
5. Hartenstein, R.C. and I. Fridovich, 1967. Adenine aminohydrolase, An investigation of specificity. *J. Biol. Chem.* **242**, 740-746.
6. Hosono, R. and S. Kuno, 1974. Mechanism of inhibition of bacterial growth by adenine. *J. Biochem.* **75**, 215-220.
7. Jun, H.K. and J.H. Park, 1984. Exogenous adenine deaminase production by *Streptomyces* sp. J-350P. *J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**, 31-36.
8. Jun, H.K., S.M. Yee, and J.H. Park, 1987. Isolation of an Actinomycetes Producing Extracellular Adenine Deaminase and Cultural Conditions of the Isolated Strain for the Enzyme Production. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 212-220.
9. Kalckar, H.M., 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. II. Determination of adenine compounds. *J. Biol. Chem.* **167**, 445-459.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
11. Newell, P.C. and R.G. Tucker, 1967. New pyrimidine pathway involved in biosynthesis of the pyrimidine portion of thiamine. *Nature*. **215**, 1384-1385.
12. Newell, P.C. and R.G. Tucker, 1968. Biosynthesis of the pyrimidine moiety of thiamine. *Biochem. J.* **106**, 279-287.
13. Sakai, T. and H.K. Jun, 1978a. Purification and characterization of adenine deaminase in *Pseudomonas synxantha*, *J. Ferment. Technol.* **56**, 257-265.
14. Sakai, T. and H.K. Jun, 1978b. Purification and crystallization of adenine deaminase in *Pseudomonas iodinum* IFO 3558. *FEBS Letters*. **86**, 174-178.
15. Yokozaya, T., H. Oura, H. Nakagawa and T. Okada, 1982. Adenine-induced hyperuricemia and renal damage in rats. *Nippon Nogei-kagaku kaishi*. **56**, 655-663.

(Received July. 30, 1987)