

## *Intrasporangium*속 방선균의 Phenylalanine 분지대사 경로의 조절

조원대<sup>1</sup>·최용진<sup>2</sup>·양한철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 식품공학과 <sup>2</sup>고려대학교 유전공학과

### Regulation of Phenylalanine Specific Pathway in a Species of *Intrasporangium*.

Cho, Won-Dai<sup>1</sup>, Yong-Jin Choi<sup>2</sup>, and Han-Chul Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Technology

<sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701,  
Korea

Studies were made on the regulation of chorismate mutase and prephenate dehydratase of a species of *Intrasporangium*, a phenylalanine producing Actinomycete isolated from soil. Two distinctly regulated species of chorismate mutase, designated CM I and CM II were resolved by DEAE Cellulose and DEAE Sephadex A 50 chromatography. The activity of CM II was inhibited by L-tyrosine, whereas that of CM I appeared to be unregulated. Single species of prephenate dehydratase was also separated in the same purification steps. The activity of the enzyme was strongly feedback inhibited by L-phenylalanine, but by L-tyrosine or L-methionine it was rather slightly stimulated. Synthesis of chorismate mutase was not influenced by the presence of phenylalanine, tyrosine or tryptophan, whereas prephenate dehydratase was found to be subject to strong feedback repression by L-phenylalanine. The rate of repression was 94% at the concentration of 1mM L-phenylalanine but the repression was completely offset by the presence of 5mM tyrosine. The critical regulatory site of the phenylalanine terminal biopathway was, therefore, proved to be the second reaction which was catalyzed by the L-phenylalanine inhibitable and repressible prephenate dehydratase.

대다수의 고등식물과 미생물에 있어서 방향족 아미노산과 방향족 비타민은 Fig. 1에 표시된 바와 같은 공통의 대사과정(common pathway)을 거쳐 합성되는 중간 대사산물인 chorismate로부터 각각의 방향족 화합물 고유의 분지대사 경로(branch pathway)를 거쳐 생합성되고 있다(1). 이 중에 phenylalanine 분지경로는 3단계 반응으로 구성되어 있으며 첫 두단계 반응은 각각 chorismate mutase(E. C. 5. 4. 99. 5)와 prephenate dehydratase(E. C. 4. 2. 1. 51)에 의해 촉매되고 있다.

대표적 장내 세균인 *E. coli*(2), *S. typhimurium*(3, 4) 및 *A. aerogenes*(2, 5) 등의 균종에서는

*phe A* 유전자에 의해 합성되는 단일 단백질인 bifunctional enzyme이 상기 두 반응을 촉매하고 있으며 이 두 효소활성은 정도의 차이는 있으나 다같이 feedback inhibition과 feedback repression을 받아 전체 대사과정이 적절히 조절되고 있다(6, 7, 8). 따라서 이들 미생물에 있어서 phenylalanine 분지경로의 첫 두 단계 반응은 DAHP synthase에 의해 촉매되는 공통경로의 첫번째 반응과 함께 phenylalanine 생합성 과정에 매우 큰 영향을 미치는 주요 대사조절 단계가 되고 있다(1, 9). 이에 비해 *B. subtilis*에서는 *E. coli*와는 달리 DAHP synthase, shikimate kinase 및 chorismate mutase의

Key words: Phenylalanine specific pathway, regulation, *Intrasporangium* sp.

\*Corresponding author

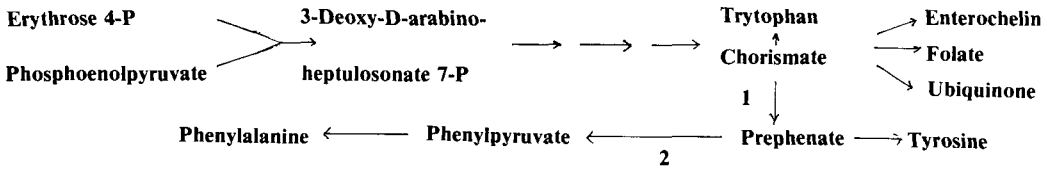


Fig. 1. The biosynthetic pathway of the aromatic amino acids.

1. chorismate mutase 2. prephenate dehydratase.

세 효소활성을 지닌 triple-enzyme complex의 존재가 보고되고 있으며 (10) *Rhodotorula glutinis*는 각각 별개의 단백질로서 prephenate dehydratase와 chorismate mutase I 및 II의 두 isoenzyme이 확인되고 있다(11). 그리고 *N. crassa*(12)와 *Sac. cerevisiae*(13) 등의 미생물과 완두콩의 일종인 *Pisum sativum*(14) 등의 다수 식물체에서도 *E. coli*와는 다른 chorismate mutase-prephenate dehydratase 구성을 하고 있다고 보고되고 있다.

이와 같이 chorismate mutase와 prephenate dehydratase는 효소단백 복합체의 구성은 물론이고 이들의 대사조절 특성 역시 균종에 따라 심지어는 같은 균종이라도 균주에 따라서도 뚜렷한 차이를 나타내고 있어 phenylalanine은 생물체의 종류에 따라 매우 복잡하고 다양한 대사조절 과정을 거쳐 생합성되고 있다고 하겠다.

저자 등은 phenylalanine 생산능이 있는 방선균을 토양으로부터 분리, *Intrasporangium* 속으로 동정하고(15) DAHP synthase의 효소적 성질(16)과 대사조절 특성(17) 등에 관한 기초연구를 실시, 이미 보고한 바 있으며 본 보에서는 phenylalanine 분지대사경로의 대사조절 특성을 조사, 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 연구에 사용된 균주는 전보(15)에 설명한 *Intrasporangium*속 토양 분리 방선균이며 사용 시약 중 chorismic acid는 Gibson 방법(18)에 따라 제조 사용하였고 barium prephenate는 chorismic acid를 알카리용액 중에서 가열처리하여 sodium prephenate로 전환시킨 후 Dayan과 Sprinson 방법(19)에 준해 정제하였다. 그리고 dithiothreitol, DEAE cellulose 등은 Sigma 제품, DEAE sephadex A 50, Sephadex G-200은 Pharmacia 제품, 기타 일반 시약은 시판 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

배지 및 배양조건

사용배지와 균체배양은 전보(17)에 상술한 방법에 따랐다.

조효소액 조제

60시간 진탕배양한 배양액을 원심분리하여 균체를 분리하고 분리 균체는 0.1 mM EDTA를 함유한 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 2회 세척하였다. 세척한 균체는 적당량의 동일 완충용액에 현탁시켜 Sonicator(Karl Kolb 200-W)를 이용, 균체를 파쇄한 다음 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 분리된 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Chorismate mutase 활성 측정

Cotton과 Gibson의 방법(3)에 따라 0.4 μmole chorismate, 0.02 μmole EDTA, 1 μmole dithiothreitol 및 20 μmole tris-HCl 완충용액(pH 7.5)을 함유하고 있는 반응액 0.3 ml에 효소액 0.1 ml를 첨가, 37°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 0.4 ml를 추가하였다. 1 N HCl 첨가후 10분간 반응을 더 계속시킨 다음 1 N NaOH 3.2 ml를 가하고 즉시 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성 phenylpyruvate의 농도는 17,500의 molar extinction coefficient를 이용, 환산하였다.

Prephenate dehydratase 활성 측정

Gibson 방법(20)에 따라 0.5 μmole barium prephenate, 0.05 μmole EDTA, 2.5 μmole dithiothreitol 및 25 μmole tris-HCl 완충용액(pH 7.5)을 함유하고 있는 효소 반응액 0.5 ml를 37°C에서 5분간 예열시킨 다음 효소액 0.5 ml를 가해 10분 반응시키고 1 N NaOH 3 ml를 가한 즉시 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성 phenylpyruvate의 농도를 결정, 이 값으로부터 효소활성을 계산하였다.

단백질 정량

효소 용액중의 단백질량은 Lowry 방법(21)에 따라

정량하였다.

#### 비활성 측정

Chorismate mutase와 prephenate dehydratase의 1 unit는 37°C, 1분간 반응으로 1 mmole의 phenylpyruvate를 생산할 수 있는 효소량으로 정의하였으며 비활성은 단백질 mg당 unit 수로 표시하였다.

#### 효소 정제

모든 정제조작은 4°C에서 행하였으며 효소 회석액으로는 0.1 mM EDTA를 함유한 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)을 사용하였고 각 단계별 정제과정은 다음과 같다.

**Ammonium sulfate 분획:** 조 효소액에 ammonium sulfate를 첨가, 40-60% 포화농도 사이의 단백침전을 분리하고 분리 단백질을 소량의 완충용액에 용해시킨 후 약 16시간 동안 동일 완충용액에서 투석시켰다.

**DEAE cellulose chromatography:** 투석이 끝난 효소액을 미리 완충용액으로 평형화시킨 DEAE cellulose column(2.5×60 cm)에 흡착시키고 충분한 양의 완충용액을 사용, 세척하였다. 세척이 끝난 다음 0.7 M KCl이 첨가된 완충용액을 이용한 linear gradient를 사용, 효소단백질을 용출시켰다. 용출속도는 50 ml/hr 이었으며 tube 당 8ml씩 분획하고 효소활성이 있는 분획을 모아 70% 포화농도의 ammonium sulfate를 첨가, 효소단백을 농축하고 투석시켰다.

**DEAE sephadex A 50 chromatography:** DEAE cellulose chromatography에서 얻은 효소 농축액을 다시 DEAE sephadex A 50 column(1.5×40 cm)에 흡착, 세척하고 0.5 M KCl이 첨가된 완충용액을 이용한 linear gradient로 2ml/씩, 10ml/hr의 유속으로 용출시켰다.

**Sephadex G 200 chromatography:** DEAE sephadex A 50 chromatography를 거친 효소액은 최종적으로 sephadex G 200 gel filtration(2×90 cm: 유속, 10 ml/hr; 분획용량, 2ml)을 실시하였으며 이 과정에서 얻은 부분정제 효소를 본 실험에 시료로 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Chorismate mutase 및 prephenate dehydratase 생산

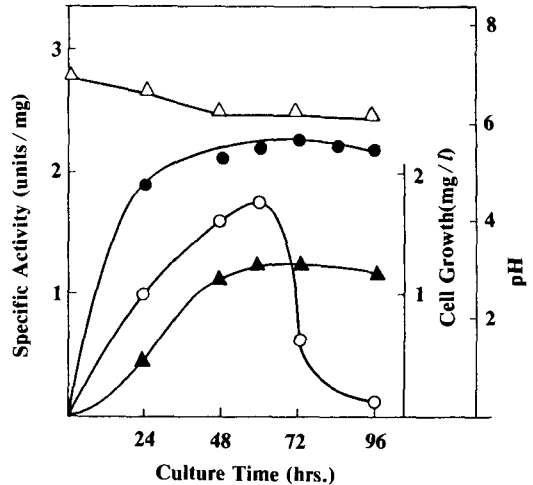


Fig. 2. Variations in chorismate mutase and prephenate dehydratase specific activity and cell growth during culture of *Intrasporangium* sp..

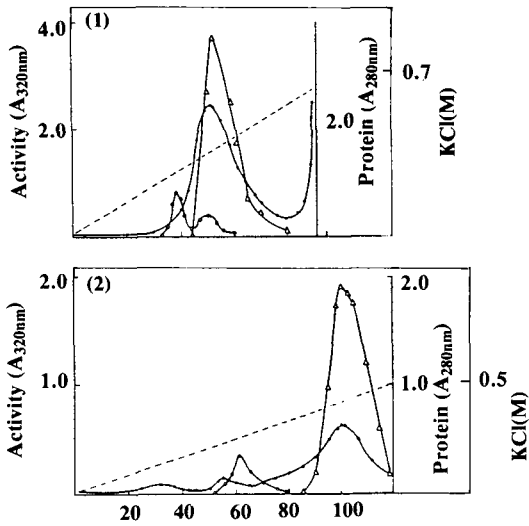
Cells were grown at 30°C in 100ml of the basal medium with reciprocal shaking. ○, chorismate mutase; ●, prephenate dehydratase; ▲, cell growth; △, pH

조효소액을 얻기 위한 기초자료로 삼고져 *Intrasporangium* 속 분리 방선균을 전보에 상술한 배양조건에서 진탕배양하면서 배양시간에 따른 chorismate mutase와 prephenate dehydratase의 세포내 함량변화를 조사, Fig. 2와 같은 결과를 얻었다.

Chorismate mutase와 prephenate dehydratase는 균체증식과 더불어 그 생산량이 비례적으로 증가되어 균체증식 초기, 정체기에서 최고 생산량을 보였으며 prephenate dehydratase는 비교적 안정하여 정체기 이후에도 상당시간 높은 효소활성을 유지하고 있는데 반해 chorismate mutase는 정체기에서 급격한 효소활성 저하현상을 나타내었다. 이와 같은 chorismate mutase의 급격한 효소활성 저하는 chorismate mutase의 안정성 시험 결과(추후 발표 예정)를 분석해 본 바 효소단백 분해가 주원인일 것이라고 판단된다. 따라서 chorismate mutase 안정화 대책은 최종 생산량에 매우 큰 효과가 있을 것이 충분히 예상된다.

#### 효소 정제

최고 효소 생산량을 나타내었던 초기 정체기 균체를 이용, 조효소액을 얻고 이 조효소액을 ammonium sulfate 분획, 약 54%의 효소활성과 가장 높은 비활성을 나타낸 40-60% ammonium sulfate 분획을 분리하여(결과 자료는 제공하지 않았음) DEAE



**Fig. 3. Chromatography of chorismate mutase and prephenate dehydratase on DEAE cellulose(1) and DEAE sephadex A50(2).**

The columns of DEAE cellulose and DEAE sephadex A 50 were equilibrated with 0.05M tris-HCl buffer (pH7.5). DEAE cellulose was eluted with linear gradient of 0.7M KCl with 0.05M tris-HCl buffer at a flow rate 50 ml/hr. and DEAE sephadex A 50 was eluted with linear gradient of 0.5M KCl with 0.05M tris-HCl buffer (pH 7.5) at a flow rate 10 ml/hr. ○-○, chorismate mutase; △-△, prephenate dehydratase; ●-●, protein.

cellulose chromatography를 실시하였다(Fig. 3 참조).

Fig. 3의 결과는 *Intrasporangium* 속 방선균의 chorismate mutase 와 prephenate dehydratase 는 *E. coli*를 비롯한 다수의 다른 균종의 경우와는 달리 두 효소가 완전 별개의 효소단백질인 동시에 chorismate mutase는 두 종의 서로 다른 isoenzyme

으로 존재하고 있다는 것을 보여주고 있다. 따라서 0.29 M KCl 농도에서 prephenate dehydratase와 분리되어 용출되는 chorismate mutase를 CM I, 0.38 M KCl 농도에서 prephenate dehydratase와 함께 용출되는 chorismate mutase를 CM II라고 분리, 명명하였다. CM II와 prephenate dehydratase 활성을 가진 용출액은 다시 DEAE sephadex A 50 chromatography (Fig. 3b)를 실시함으로써 두 효소 단백을 분리할 수 있었다. 이상의 정제과정을 거쳐 분리된 CM I, CM II 및 prephenate dehydratase 는 G 200 gel filtration(자료 제공하지 않았음)을 추가로 실시, Table 1과 2에 표시되어 있는 바와 같이 최종적으로 각각 약 17배, 8배 및 40배 정제된 부분 정제 효소를 얻었다.

본 연구의 공시균인 *Intrasporangium* 속 방선균이 chorismate mutase와 prephenate dehydratase의 상기와 같은 구성은 *R. glutinis*(11)에서만 유사한 결과가 보고되고 있을 뿐 매우 드문 예로서 흥미있는 결과라 하겠다.

**최종대사산물에 의한 효소활성 조절**

정제 chorismate mutase I 과 II에 대한 최종대사산물인 L-phenylalanine, L-tyrosine 및 L-tryptophan에 의한 효소활성 저해관계를 살펴본 결과 Table 3에 표시된 바와 같이 CM I은 세 아미노산에 의해 전혀 활성 저해를 받지 않는 반면에 CM II는 tyrosine에 의해서 현저한 활성 저해(Fig. 4)를 받고 있어 두 isoenzyme 중 CM II만이 feedback regulation에 관여되고 있는 효소임을 알 수 있었다. *R. glutinis*의 chorismate mutase도 같은 양식에 의해 한 종류의 isoenzyme만이 feedback inhibition을 받고 있다고 보고(11)되고 있으나 이들 균종에서 대

**Table 1. Purification of chorismate mutase I and chorismate mutase II.**

Step	Enzyme	Total activity(u)	Total protein(mg)	Specific activity(u/mg)	Yield (%)	Purification fold
1. Crude extract	TCM	777	5450	0.14	100	1
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40-60%	TCM	200	870	0.23	25.7	1.6
3. DEAE-cellulose	CM I	134	220	0.61	17.2	4.4
	CM II	36	110	0.33	4.6	2.4
4. DEAE-sephadex A50	CM II	14.5	32	0.45	1.9	3.2
5. G-200	CM I	20.6	8.8	2.34	2.7	16.7
	CM II	1.0	0.9	1.11	0.1	7.9

TCM, total chorismate mutase; CM I, chorismate mutase I; CM II, chorismate mutase II.

**Table 2. Purification of prephenate dehydratase**

Step	Total activity(u)	Total protein(mg)	Specific activity(u/ mg)	Yield (%)	Purification fold
1. Crude extract	4550	5450	0.8	100	1
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40-60%	2460	870	2.8	54	3.4
3. DEAE-cellulose	886	95.7	9.3	19.5	11.2
4. DEAE-sephadex A50	532	34.5	15.4	11.7	18.6
5. G-200	33.7	1.0	33.0	0.7	39.8

**Table 3. Inhibition of prephenate dehydratase, chorismate mutase I and II by aromatic amino acids.**

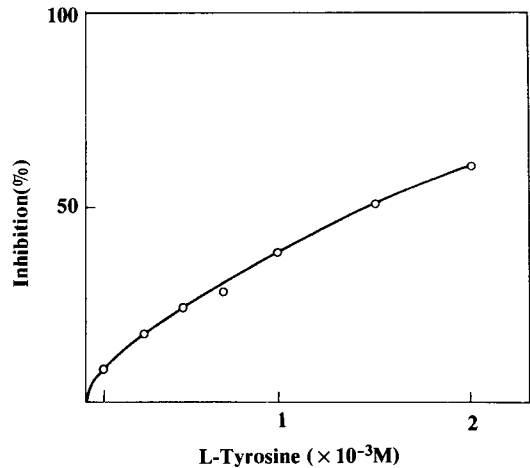
Amino acid added	Enzyme	Relative activity(%)
L-Phenylalanine	PDH	0
	CM I	100
	CM II	100
L-Tyrosine	PDH	108
	CM I	100
	CM II	63
L-Tryptophane	PDH	100
	CM I	100
	CM II	100

The amino acids were added at a final concentration of 1 mM into the standard reaction mixture detailed in Materials and Methods. PDH, prephenate dehydratase; CM, chorismate mutase.

사조절 특성이 다른 두 isoenzyme의 존재 의의는 분자 유전학적 수준에서 앞으로 더욱 많은 연구가 있어야 될 것이라고 생각된다.

한편 prephenate dehydratase 활성은 Table 3과 Fig. 5에 표시된 바와 같이 phenylalanine에 의해서만 강한 저해를 받아 0.04 mM의 phenylalanine이 존재했을 때 100%의 활성 저해를 보였다. 그러나 L-tyrosine은 비록 적은 폭이기는 하나 오히려 prephenate dehydratase를 활성화시키는 효과를 나타내었다(Table 3 참조). L-Tyrosine은 상기와 같은 remote positive effector로서의 효과 뿐만 아니라 Fig. 6에 표시되어 있는 바와 같이 L-phenylalanine의 활성 저해 효과를 현저히 감소시키는 antagonistic allosteric 효과도 동시에 나타내었다.

이와 같은 L-tyrosine 효과는 coryneform bacteria (22), *Pseudomonas* 속(23) 내지는 *Synechococcus* 속(24)의 균종에서도 보고되고 있어 이들 균종에 있어서 prephenate dehydratase의 *in vivo* 활성은

**Fig. 4. Inhibition of various concentrations of L-Tyrosine on chorismate mutase II activity.**

The reaction mixture contained enzyme of 1.7 units, 0.4  $\mu$  mole chorismate and L-tyrosine added as indicated in a total volume of 0.4 ml of 20  $\mu$  mole tris-HCl buffer (pH 7.5).

negative effector인 L-phenylalanine과 positive effector인 L-tyrosine의 세포내 농도에 의해 큰 영향을 받을 것으로 추측된다. Prephenate dehydratase의 remote positive effector로서는 L-tyrosine 이외에도 L-leucine과 L-methionine이 같은 효과를 나타냈으며 특히 L-methionine은 *B. subtilis* (25)와 coryneform bacterium 균종(22)에서의 보고와 같이 본 연구의 *Intrasporangium* 속 방선균에서도 현저한 효과를 나타냈다(Fig. 7).

#### 최종대사산물에 의한 효소합성조절

각 아미노산이 5mM 농도로 첨가된 최소배지에서 30°C, 48시간 진탕배양하여 얻은 균체의 세포내 chorismate mutase 활성을 측정, chorismate mutase 생산에 미치는 최종대사산물의 효과를 조사, Table 4와 같은 결과를 얻었다.

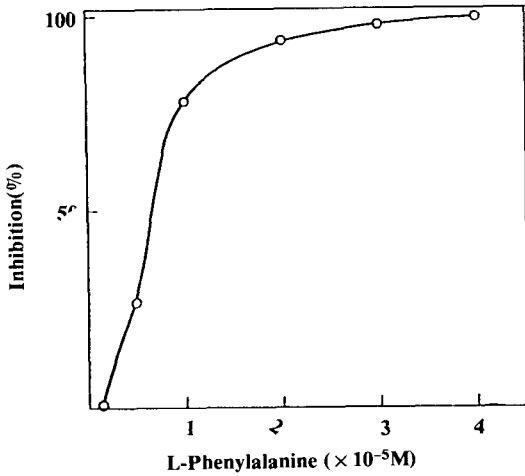


Fig. 5. Inhibition of various concentrations of L-phenylalanine on prephenate dehydratase activity.

The reaction mixture contained enzyme of 2.3 units, 0.5  $\mu$ mole barium prephenate and various concentrations of L-phenylalanine as indicated in a total volume of 1 ml of 25  $\mu$ mole tris-HCl buffer (pH 7.5).

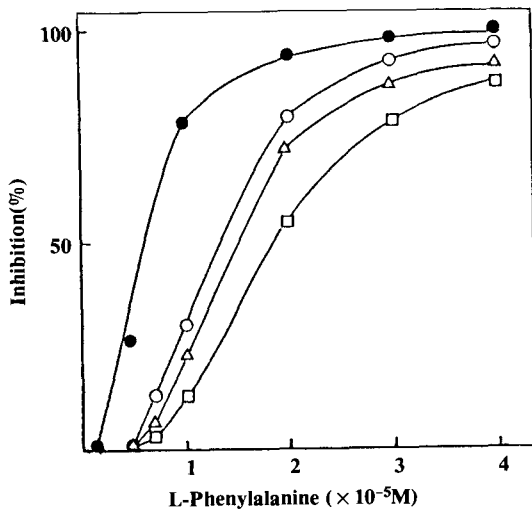


Fig. 6. Antagonistic effects of L-tyrosine and L-phenylalanine on prephenate dehydratase.

The plots shown expressed prephenate dehydratase activity as a function of variable L-phenylalanine in the presence of fixed concentrations of L-tyrosine. Reaction mixtures contained enzyme of 2.3 units, 0.5  $\mu$ mole ba-prephenate and the concentrations of L-tyrosine as indicated. ●, no addition; ○, 0.5 mM; △, 1.0 mM; □, 2.0 mM.

Chorismate mutase는 *E. coli*와는 달리 배지중 최종대사산물인 아미노산의 존재에 관계없이 일정량의 효소를 생산하고 있어 *Pseudomonas aureofaciens*

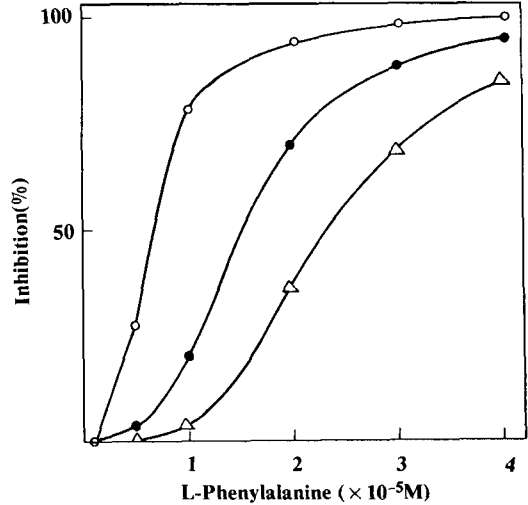


Fig. 7. Inhibition of prephenate dehydratase by L-phenylalanine in the presence of L-leucine and L-methionine.

The reaction mixture contained enzyme of 2.3 units, 0.5  $\mu$ mole Ba-prephenate and various concentrations of L-phenylalanine as indicated. Each L-leucine and L-methionine was added at final concentration of 10 mM into reaction mixture. ○, no addition; ●, L-leucine; △, L-methionine.

Table 4. Repression of chorismate mutase synthesis

Aromatic amino acid added (5mM)	Specific activity
NO addition	0.15
L-Phenylalanine	0.15
L-Tyrosine	0.16
L-Tryptophan	0.16

*Intrasporangium* sp. was cultured at 30°C for 48 hours in the minimal medium supplemented with the aromatic amino acid as indicated in the table.

(26)와 마찬가지로 feedback repression을 받지 않는 것으로 판단되었다. 이에 반해 prephenate dehydratase는 Table 5에서 보는 바와 같이 L-tyrosine과 L-tryptophan에 의해서는 아무런 영향을 받지 않았으나 1 mM phenylalanine 첨가로 약 94%의 효소합성 억제력을 나타내었다. L-phenylalanine의 효소합성 저해는 L-tyrosine을 첨가함으로써 그 효과가 현저히 감소되는 흥미로운 결과를 보이고 있으며 그 효과는 L-tyrosine 첨가 농도에 따라 큰 차이를 보여 1 mM phenylalanine에 대해 5 mM의 tyrosine을 첨가했을 때 L-phenylalanine의 효소합성 억제효과가 완전히

**Table 5. Repression of synthesis of prephenate dehydratase.**

Aromatic amino acids added(mM)		Repression(%)
L-Phenylalanine	1.0	94
L-Tyrosine	1.0	0
L-Tryptophan	1.0	0
L-Phenylalanine	1.0	63
+ L-Tyrosine	1.0	
L-Phenylalanine	1.0	0
+ L-Tyrosine	5.0	
L-Phenylalanine	1.0	59
+ L-Tyrosine	1.0	
+ L-Tryptophan	1.0	

*Intrasporangium* sp. was cultured at 30°C for 48hours in the minimal medium supplemented with the aromatic amino acids as indicated in the table.

상쇄되었다.

이상의 연구결과로 *Intrasporangium* 속 분리 방선균의 L-phenylalanine 생합성 분지경로의 가장 중요한 대사조절 단계는 feedback inhibition과 동시에 feedback repression 조절을 받는 prephenate dehydratase에 의해 촉매되는 두번째 단계라는 것을 알 수 있었으며 L-tyrosine은 효과적인 positive effector로서 prephenate dehydratase의 효소 활성과 생합성에 매우 큰 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

토양에서 분리 동정한 phenylalanine 생산균인 *Intrasporangium* 속 방선균의 phenylalanine 생합성 분지경로의 대사조절 특성을 조사하기 위해 chorismate mutase와 prephenate dehydratase를 부분정제한 결과 chorismate mutase는 prephenate dehydratase와 전혀 별개의 단백질로서 두 종의 isoenzyme, chorismate mutase I (CM I)과 chorismate mutase II (CM II)로 구성되어 있음을 알았다.

CM I은 최종대사산물인 L-phenylalanine, L-tyrosine 및 L-tryptophan에 대해 완전내성을 보였으나 CM II는 1.5mM tyrosine에 의해서 약 50% 활성 저해를 나타내었다. 이에 비해 prephenate dehydratase는 0.02mM phenylalanine 존재하에서 95% 이상의 활성 저해를 나타냈으나 이와

같은 L-phenylalanine 활성 저해효과는 positive effector인 L-tyrosine과 L-methionine에 의해 크게 감소되었다. 또한 chorismate mutase 생합성은 feedback repression을 받지 않는데 비해 prephenate dehydratase는 1mM phenylalanine 존재에 의해 약 94%의 효소합성 저해를 나타냈다. 그러나 5mM tyrosine을 동시에 첨가했을 때는 전혀 저해효과를 인식할 수 없었다.

따라서 *Intrasporangium* 속 방선균 역시 대다수의 다른 미생물 균종과 마찬가지로 phenylalanine 분지 경로에서 prephenate dehydratase에 의해 촉매되는 두번째 반응이 가장 중요한 대사조절 단계가 되고 있다는 것을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- Gibson, F. and J. Pittard: *Bacteriol. Rev.* **32**, 465 (1968).
- Cotton, R.G.H. and F. Gibson: *Biochim. Biophys. Acta.* **100**, 76 (1965).
- Dayan, J. and D.B. Sprinson: *J. Bacteriol.* **108**, 1174 (1971).
- Schmit, J.C., S.W. Artz, and H. Zalkin: *J. Biol. Chem.* **245**, 4019 (1970).
- Koch, G.L.E., D.C. Shaw and F. Gibson: *Biochim. Biophys. Acta.* **212**, 387 (1970).
- Gowrishankar, J. and J. Piard: *J. Bacteriol.* **150**, 1130 (1982).
- Gething, M.J., and B.E. Davidson: *Eur. J. Biochem.* **85**, 165 (1978).
- Gollub, E.G., K.P. Liu, and D.B. Sprinson: *J. Bacteriol.* **115**, 121 (1973).
- Umbarger, H.E.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 533 (1978).
- Nester, E.W., J.H. Lorence and D.S. Nasser: *Biochemistry* **6**, 1553 (1967).
- Fiske, M.J., and J.F. Kane: *J. Bacteriol.* **160**, 676 (1984).
- El-Eryani, A.A.: *Genetics* **62**, 711 (1969).
- Lingens, F., W. Goebel and H. Uessler: *Biochem. Z.* **346**, 357 (1966).
- Cotton, R.G.H. and F. Gibson: *Biochim. Biophys. Acta.* **156**, 187 (1968).
- 이승엽, 조원대, 최용진, 양한철: 고려대학교 농림논집 **27** 131(1987).
- 조원대, 최용진, 양한철: 한국산업미생물학회지 **16** 51(1988).

17. 조원대, 최용진, 양한철 : 한국산업미생물학회지 **16** 38(1988).
18. Gibson, F. : *Methods in Enzymology* **17**, 362 (1970).
19. Dayan, J. and D.B. Sprinson: *Methods in Enzymology* **17**, 559 (1970).
20. Gibson, F.: *Biochem. J.* **90**, 256 (1964).
21. Lowry, O.H., J. Rosebrough, A.C. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 264 (1951).
22. Fazel, A.M. and R.A. Jensen: *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 165 (1980).
23. Cerutti, P. and G. Guroff: *J. Biol. Chem.* **240**, 3034 (1965).
24. Hall, G.C., M.B. Flick, and R.A. Jensen: *J. Bacteriol.* **153**, 423 (1983).
25. Ripel, R.G., and G.I. Glover: *J. Biol. Chem.* **254**, 10321 (1979).
26. Blumenstock, E., D. Salcher, and F. Lingens: *J. Gen. Microbiol.* **117**, 81 (1980).

(Received May 17, 1988)