

Aspergillus fumigatus IFO 5840의 균체내 Cytosine Deaminase의 생성에 관한 연구

김재근[†] · 하영득*

계명전문대학 식품영양과
*계명대학교 자연과학대학 식품가공학과

Studies on the Conditions of Enzyme Production of Endocellular Cytosine Deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Jae-Keun Kim[†] and Young-Duck Ha*

Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037, Korea

*Dept. of Food Technology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract

The nutritional requirement and cultural condition such as carbon and nitrogen sources, cultural temperature, initial pH, cultural time and aeration for the production of endocellular cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840 were investigated. The cultural broth giving maximum cytosine deaminase yield was found to consist of 2% glucose as a carbon source and 1% yeast extract and 0.1% peptone as a nitrogen source. Optimal initial pH of the culture broth was pH 8.5 and the enzyme production in the cell usually reached a maximum after 28 hours of cultivation in the 500ml shaking flask containing 100ml broth at 30°C. The endoenzyme production of the used strain was inhibited by inorganic nitrogen, but activated by organic nitrogen, yeast extract.

Key words : endocellular cytosine deaminase, *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

서 론

Cytosine deaminase (cytosine aminohydrolase EC 3. 5. 4. 1)는 pyrimidine 염기중의 하나인 cytosine의 4번 탄소 위치의 아미노기를 가수분해에 의하여 탈아미노화시켜 uracil과 암모니아로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다.

이 효소는 1923년 Hahn과 Lintzel에 의하여 빵효모

로부터 처음 확인되었으며¹⁾, 1925년 Hahn과 Schäfer에 의하여 대장균으로부터도 확인되었다²⁾.

다른 핵산염기와는 달리 cytosine은 cytosine deaminase의 촉매에 의해서만 uracil로 분해되거나 nucleotide로 재합성되든지 한다. 그러므로 cytosine deaminase는 cytosine 대사에 필수적으로 중요한 효소이다. 이 효소는 하등생물에서만 존재하며 세균진화와의 관련성이 검토되고 있으며^{3,4)}, 항종양 보조제로서 임상학적 연구도 활발히 이루어지고 있다⁵⁻¹¹⁾.

세포내 cytosine deaminase의 효소학적 연구는 세균

[†]To whom all correspondence should be addressed

¹²⁻¹⁸, 효모^{19,20}, 곰팡이²¹⁻²⁴에서 이루어졌으며 세포의 효소에 관하여는 방선균^{25,26} 과 세균²⁷⁻²⁹에서 연구되었다.

세포내 cytosine deaminase의 생성조건에 관한 연구는 *Pseudomonas aureofaciens*¹⁷와 *E. coli*²⁶에서 이루어졌으며 세포외 효소에 관하여는 *Arthrobacter* sp. JH-13²⁵, *Bacillus polymyxa* YL-38²⁶에서 연구된 바 있다.

이와같이 cytosine deaminase는 진화로 소멸되기 때문에 고등생물에서는 발견되지 않고 주로 하등생물에서 발견되어 왔다. 그러나 최근 다세포인 곰팡이에서 그 활성이 확인되면서 활발히 연구되고 있다²¹⁻²⁴.

따라서 본 연구는 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840이 생산하는 cytosine deaminase의 최적 생산을 찾기위하여 배지조성 및 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에서 사용한 균주는 계명대학교 미생물학연구소에 소장중인 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840²¹⁻²⁴을 사용하였다.

배지 및 배양방법

Table 1과 같은 조성의 GYP 기본배지에 공시균주1백금이를 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양시킨 배양액 10ml를 100ml의 동일 배지에 접종하여 30℃에서 36시간 배양시킨 다음 흡인여과하여 모은 균체를 증류수로 3회 세척·탈수하여 접종용 균체로 사용하였다. 질소원의 영향은 2.0% 포도당 함유 기본배지에 1.0%의 각종 질소원을, 탄소원의 경우에는 1.0% 효모추출물 함유 기본배지에 2.0%의 각종 탄소원을 각각 첨가한 후 pH를 5.6으로 조정하였다.

배양온도와 배양시간의 영향은 2.0% 포도당, 1.0% 효모 추출물을 함유한 기본배지에 0.5g의 균체를 접종하여 주어진 온도와 주어진 시간에 따라 배양하

였다.

통기성 영양의 경우는 2.0% 포도당, 1.0% 효모추출물을 함유하는 기본배지(pH 8.5)의 양을 500ml 진탕 flask에 각각 달리하여 분주한후 배지량에 비례적으로 균체량을 첨가하여 30℃에서 28시간 동안 진탕 배양(120 strokes/min, 진폭 5cm)하였다.

균체증식도 측정

공시균주의 세포 성장은 건조균체 중량측정법³⁰에 준하여 배양액을 흡인여과하여 모은 균체를 saline으로 3회 세척하여 105℃에서 5시간 건조시켜 항량에 도달한 후 칭량하여 중량으로 표시하였다.

조효소액의 조제

조효소액의 조제는 1g의 균체를 1mM 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.02M Tris-HCl 완충용액(pH 6.5) 10ml에 현탁하여 5℃ 이하로 유지하면서 초음파 파쇄기(Lab-Line Co., USA)로 120Hz에서 6분간 세포를 파쇄하였다. 이어 13,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Cytosine deaminase의 활성 측정

Cytosine deaminase의 활성 측정은 산성 조건하에서 cytosine과 uracil이 갖는 흡광도 차이를 이용한 Sakai³¹의 방법에 준하여 측정하였다. 효소반응액의 조성은 5mM의 cytosine 0.2ml 및 조효소액 0.8ml로 전체용량을 1ml로 하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 4ml의 0.1N HCl을 가하여 반응을 정지시킨 다음 290nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 효소단위는 1시간동안에 1μmol의 기질을 분해하는 효소의 양으로 하였으며, 비활성도(specific activity)는 단백질 mg 당 효소단위로 표시하였다.

단백질의 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry³²의 방법으로 정량하였다.

시 약

본 실험에 사용한 cytosine은 Yamasa강유 주식회사(일본) 제품을, bovine serum albumin은 동경화학공업주식회사(일본) 제품을, 기타 시약은 시판 특급 내

Table 1. Composition of basal medium

Ingredient	Content(%)
Glucose	2.0
Yeast extract	1.0
Peptone	0.1
Anti-foamer solution(10%)	0.5
pH	5.6

Table 2. Effect of nitrogen source* on the production of cytosine deaminase from Aspergillus fumigatus IFO 5840

Nitrogen source	Final pH	Growth (dry weight, g/100m)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
Inorganic nitrogen					
Ammonium sulfate	2.55	0.199	-	-	♯
Ammonium sulfite	2.04	0.095	-	-	-
Ammonium acetate	5.38	0.195	-	-	-
Ammonium carbonate	6.82	0.107	-	-	-
Ammonium citrate	5.47	0.298	-	-	-
Ammonium chloride	1.91	0.311	-	-	-
Ammonium phosphate	5.50	0.196	-	-	-
Ammonium nitrate	2.30	0.174	-	-	-
Ammonium oxalate	5.37	0.111	-	-	-
Sodium nitrate	5.64	0.173	-	-	-
Urea	9.44	0.100	-	-	-
Organic nitrogen					
Yeast extract	3.60	0.990	22.20	80.94	0.274
Peptone	4.50	0.510	2.12	26.50	0.080
Meat extract	3.77	0.660	4.64	72.50	0.064
Yeast extract (1%)+peptone (1%)	4.01	0.010	32.96	103.00	0.320
Yeast extract (1%) + peptone (0.1%)	3.40	1.000	20.16	93.94	0.215
Casein hydrolysate	3.66	0.270	-	-	-
None	3.97	0.303	1.70	10.09	0.168

* Various nitrogen sources were added to the final concentration of 1.0% to the basal medium, which consisted of 2.0% of glucose and pH adjusted to 5.6.

The cultivations were carried out in 500ml of shaking flask with 100ml of medium by reciprocal shaking(120 strokes/min. amplitude 5cm) for 22 hours at 30°C. ♯Not detected.

지 일급품을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

질소원의 영향

2%의 glucose를 함유한 기본배지에 각종의 무기 및 유기질소원을 각각 1%씩 첨가한후 pH를 5.6으로 조정하여 500ml 진탕 flask에 100ml씩 분주하여 가압 증기 살균하여 30°C에서 22시간 진탕배양 후 조효소액을 조제하여 효소활성을 측정하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 공시균주의 생육 및 효소생성에 유기질소원인 효모추출물과 효모추출물 및 peptone의 혼용첨가가 가장 양호했으나 무기질소원은 모두 아무런 영향을 주지 않았다.

Arthrobacter sp. JH-13²⁶의 세포의 효소생성은 peptone이, *Pseudomonas aureofaciens*²⁷의 세포내효소의 생성은 peptone과 효모추출물이, *Bacillus polymyxa* YL 38-3²⁶의 세포의효소의 생성에는 beef

extract가 각각 가장 양호하였다. 공시균은 *Arthrobacter* sp. JH-13²⁶과 *Pseudomonas aureofaciens*²⁷의 효소생성에 가장 양호한 peptone보다 효모추출물 단독 혹은 효모추출물 및 peptone 혼용첨가가 생육이나 효소생성에 양호하였다. 혼용첨가가 단일첨가보다 다소 양호하였으나 큰 폭은 아니었으므로 유기질소원 중에서 효모추출물을 질소원으로 하였다.

효모추출물 농도의 영향

2%의 포도당을 함유한 기본배지에 여러농도의 효모추출물을 첨가하여 pH를 5.6으로 조정한 후 진탕 배양하여 효소활성을 조사하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 효모 추출물 함량을 5.0%까지 증가시킬때 균의 증식도가 계속 증가되고 있으나 효모추출물의 농도 증가에 비하여 증식도가 가장 큰 폭으로 증가하는 1.0%를 최적농도로 하였다.

Table 3. Effect of yeast extract^a concentration on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Concentration (%)	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
0.0	4.29	0.383	1.72	4.84	0.355
0.3	4.45	0.958	5.43	14.03	0.387
0.5	4.69	1.098	7.33	17.18	0.427
1.0	4.34	1.552	17.56	27.44	0.640
1.5	4.74	1.706	13.35	36.16	0.369
2.0	4.99	1.749	12.04	34.94	0.345
3.0	5.22	1.783	10.86	31.11	0.349
5.0	5.25	1.826	12.74	34.13	0.373

^a Various concentration of yeast extract were added to basal medium consisted of 2.0% glucose and pH adjusted to 5.6. Other conditions were described in Table 2.

Table 4. Effect of carbon source^a on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Carbon source	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total Activity (unit)	Total Protein (mg)	Specific Activity (unit/mg)
Saccharide					
Glucose	4.54	1.184	42.24	30.25	1.396
Fructose	5.09	0.892	6.80	36.13	0.183
Sucrose	4.95	0.559	6.80	39.85	0.171
Maltose	5.15	0.965	13.44	42.00	0.302
Lactose	6.17	0.433	27.44	73.50	0.373
Dextrin	6.77	0.539	40.00	73.50	0.512
Soluble starch	6.67	0.482	40.11	68.13	0.589
Alcohol					
Ethanol	5.16	5.553	23.60	57.96	0.204
Methanol	6.44	0.310	35.52	61.06	0.291
Mannitol	4.84	0.811	10.92	34.13	0.160
Glycerol	6.03	0.831	3.40	14.18	0.240
Inositol	5.84	0.660	20.46	45.50	0.449
Organic acid					
Sodium citrate	5.63	0.146	—	—	— ^b
Sodium tartarate	5.89	0.201	—	—	—
Sodium acetate	5.57	0.102	—	—	—
Sodium succinate	5.65	0.232	—	—	—
Sodium fumarate	5.73	0.105	—	—	—
None	7.41	0.373	36.35	53.03	0.685

^a Various carbon sources were added to the final concentration of 2.0% to basal medium, that consisted of 1.0% of yeast extract and pH adjusted to 5.6. Other culture conditions were in accordance with those of Table 2. ^b Not detected.

탄소원의 영향

1.0%의 효모추출물을 함유한 기본배지에 당류, 알콜류, 유기산류등의 각종 탄소원을 각각 2.0%씩 첨가하여 pH를 5.6으로 조정 한 후 배양하여 효소활성을 측정하였다. Table 4에 나타난 바와 같이 공시균의 생육 및 효소생성에 포도당이 가장 양호하였으며 유기산류는 모두 공시균의 효소생성을 완전히 억제시켰다. *Arthrobacter* sp. JH-13⁽³⁶⁾의 효소생성은

soluble starch와 dextrin이, *Pseudomonas aureofaciens*의 경우⁽¹⁷⁾는 sodium fumarate, sodium carbonate, glucose 등의 순서로, 그리고 *Bacillus polymyxa* YI 38-3⁽³⁶⁾의 효소생성에는 glucose, dextrin, sucrose 순으로 각각 양호하였다. 그러나 공시균의 생육 및 효소생성은 이상의 균주들과는 달리 당류인 포도당이 가장 양호하였다.

Table 5. Effect of glucose concentration* on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Concentration (%)	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
0.0	7.30	1.500	5.16	64.50	0.080
0.5	5.09	3.398	43.20	32.48	1.330
2.0	4.60	3.673	48.14	28.05	1.716
3.0	4.51	3.950	44.24	26.70	1.657
5.0	4.52	3.627	36.48	25.69	1.420
10.0	4.54	3.319	57.60	36.54	1.576

*The cultivation was carried out in 500ml of shaking flask with 100ml of medium containing 1.0% of yeast extract, and each concentration of glucose (pH 5.6) by shaking method for 22 hours at 30°C

Table 6. Effect of cultural temperature on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840*

Temperature (°C)	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
25	5.96	1.074	44.80	29.75	1.506
30	6.04	1.115	38.48	24.98	1.540
35	5.96	1.231	17.50	24.64	0.710
40	5.88	1.116	14.40	24.30	0.592

*The cultural medium contained 2.0% of glucose, 1.0% of yeast extract, and pH adjusted to 5.6.

Other culture conditions were in accordance with those of Table 2, except cultivated temperature described in Table 6.

포도당 농도의 영향

1.0%의 효모추출물을 함유한 기본 배지에 여러농도의 포도당을 첨가하여 배양 후 효소활성을 측정한 결과 Table 5에 나타난 바와 같이 포도당 농도가 10%가 증식도 및 비활성이 계속 증가하고 있으나 포도당의 농도증가에 비하여 비활성도가 높은 2.0%를 최적농도로 하였다.

배양온도의 영향

2.0%의 포도당, 1.0%의 효모추출물을 함유한 배지 (pH 5.6)에 균체를 접종하여 25, 30, 35 및 40°C의 온도에서 각각 28시간 배양하여 효소활성을 조사한 결과 Table 6에 나타난 바와 같이 35°C까지는 증식이 증가하는 경향이였으나 효소의 생성은 25-30°C에서 가장 양호하였고, 35°C 이상의 온도에서는 효소생성이 급격히 감소되었다. *Pseudomonas aureofaciens*⁽⁷⁾의 효소생성 최적온도는 25-30°C로서 공시균과 아주 비슷한 결과를 나타내었으나 *Bacillus polymyxa* YL 38-3⁽⁸⁾의 효소생성 최적온도인 35°C보다 낮은 온도에서 양호하였다.

초기 pH의 영향

포도당 2.0%, 효모추출물 1.0%를 함유한 배지의 초기 pH에 따른 효소생성능을 검토한 결과 Table 7과 같이 공시균의 증식도는 미산성에서도 양호하였으나 효소의 생성은 알칼리성 영역인 pH 8.5-9.5에서 가장 양호한 것으로 나타났다. *Arthrobacter* sp. JH-13⁽⁶⁾의 세포의 효소생성은 pH 8.0 부근에서, *Pseudomonas aureofaciens*⁽⁷⁾의 경우에는 pH 7.5에서, *Bacillus polymyxa* YL 38-3⁽⁸⁾에서는 pH 4.5와 5.0 사이에서 각각 양호하였다. 공시균은 *Arthrobacter* JH-13⁽⁶⁾과 *Pseudomonas aureofaciens*⁽⁷⁾보다 더 알칼리성 영역인 pH 8.5와 9.5사이에서 가장 양호하였고 pH 12.5 이상에서는 효소생성능이 정지되었다.

배양시간의 영향

2.0% 포도당, 1.0% 효모추출물을 함유한 배지 (pH 8.5)에 균체를 접종하여 30°C에서 진탕배양하면서 경시적으로 증식도 및 효소생성을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 28시간 배양하였을 경우와 증식도와 효소생성이 최대에 달했으며, 그 후 정지기에서도

Table 7. Effect of initial pH* on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Initial pH	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
4.5	3.66	0.847	25.80	19.89	1.297
5.5	4.00	0.887	16.36	12.65	1.530
6.5	4.34	0.903	31.92	19.43	1.643
7.5	4.13	0.788	35.28	19.43	1.816
8.0	4.35	0.761	54.40	28.69	1.896
8.5	4.39	0.463	75.44	25.28	2.984
9.5	4.60	0.332	65.52	22.47	2.916
10.5	4.86	0.291	63.96	23.60	2.710
11.5	6.97	0.232	78.12	39.99	1.950
12.5	7.64	0.054	—	—	— ^b

*The cultural medium contained 2.0% of glucose and 1.0% of yeast extract and pH described in Table 7 was adjusted with 1N NaOH or HCl. Other culture conditions were in accordance with those of Table 2. ^b Not detected

Table 8. Effect of aeration on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840*

Medium volume (ml)	Final pH	Growth (dry weight, g/100ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
25	3.41	0.376	9.72	13.16	0.739
50	3.46	0.678	25.28	7.51	3.366
75	4.11	0.843	33.88	9.63	3.518
100	4.36	1.069	34.96	9.50	3.680
125	4.40	1.273	39.50	12.84	3.076
175	4.53	1.484	53.12	19.71	2.695

*The strain was cultured in 500ml of shaking flask with the indicated volume of medium containing 2.0% glucose and 1.0% yeast extract (pH 8.5) at 30°C for 28 hours with shaking (120 strokes/min, amplitude 5cm).

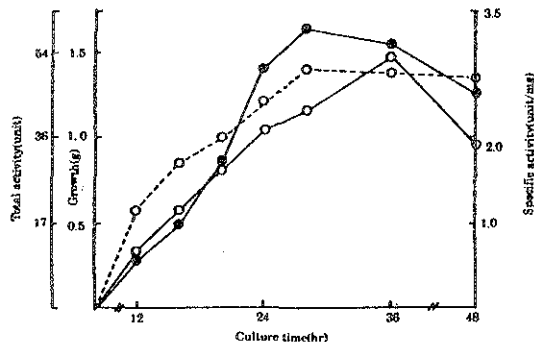


Fig. 1. Effect of cultural time on the production of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840. The strain inoculated with 0.5g wet weight was cultured in 500ml of shaking flask with 100ml of medium containing 2.0% glucose and 1.0% yeast extract (pH 8.5) at 30°C with shaking (120 strokes/min, amplitude 5cm).

효소가 생성되었다. 이는 *Bacillus polymyxa* YL 38-3²⁶⁾과 *Pseudomonas aureofaciens*²⁷⁾의 효소생성은 대수증식기부터 시작되어 정지기에서 최대가 되었다는 보고와 잘 일치되었으나 *Arthrobacter* sp. JH-13의 경우에는 대수증식기와 정지기에서는 전혀 생성되지 않으나 사멸기가 시작되는 시기에서 효소생성이 시작되었다는 보고²⁸⁾와는 상반된 결과였다.

최적 배양조건에서의 통기성의 영향

위에서 검토한 여러가지 최적조건을 종합하여 통기성의 영향을 조사하기 위하여 2.0% 포도당, 1.0% 효모추출물을 함유한 배지 (pH 8.5)를 500ml 진탕 flask에 배지량을 25, 50, 75, 100, 125, 175ml로 달리하여 분주하고 가압 증기살균한 후 배지량에 비례하여 균체를 접종하고 30°C에서 28시간 동안 배양하였다.

Table 8에 나타낸 바와 같이 배지량을 175ml까지

증가시킴으로써 균체의 증식도가 다소 증가되고 있으나 효소의 생성능은 50ml에서 100ml 용량의 배지량에서 가장 양호하였다. 이 때의 비활성도는 3.37-3.68 unit/mg이었다.

요 약

Aspergillus fumigatus IFO 5840을 공시균주로 하여 cytosine deaminase의 생성 최적조건을 밝히기 위하여 각종 탄소원, 질소원과 같은 영양소 및 배양 온도, 초기 pH, 배양시간, 통기성의 영향을 조사하였다. 본 공시균의 cytosine deaminase의 생성을 위한 최적 배지의 조성은 2% 포도당, 1% 효모추출물로, 배지의 초기 pH는 8.5이었다. 배양 최적 조건은 30℃에서 28시간 진탕 배양이 양호했다. 이러한 최적조건에서 500ml 용량의 진탕 flask에 배지 100ml를 넣었을 때 효소생성이 최고에 달하였다. 공시균주의 세포내 효소의 생성이 무기질소원에 의해 억제 되었으나 유기질소원인 yeast extract에 의해서는 촉진되었다.

문 헌

- Hahn, A. and Lintzel, W. : Über das Verhalten von pyrimidin derivaten in den organismen. I. Einfluss von hefe und pyrimidin derivate. *Z. Biol.*, **79**, 179(1923)
- Hahn, A. and Schafer, L. : Über das Verhalten von pyrimidin-derivaten in den organismen. *Z. Biol.*, **83**, 511(1925)
- Sakai, T., Yu, T. S. and Omata, S. : Distribution of enzymes related to cytidine degradation in bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1983(1976)
- 유대식 : Pyrimidine nucleotide 대사계와 세균진화. 계명대 기초과학 연구소 연구논집, **6**, 25(1987)
- Diasco, R. B., Lakings, B. E. and Bennett, J. E. : Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans : Possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 903(1978)
- Hayashi, O. and Kornberg, A. : Metabolism of cytosine, thymine, uracil and barbituric acid by bacterial enzymes. *J. Biol. Chem.*, **197**, 717(1952)
- Lisy, V. and Skoda, J. : Deamination of some cytosine and cytidine analogues by an *E. coli* extract. *Collet. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 3020(1966)
- Sakai, T., Katsuragi, T., Tonomura, K., Nishiyama, T. and Kawamura, Y. : Implantable encapsulated cytosine deaminase having 5-fluorocytosine deaminating activity. *J. Biotechnol.*, **2**, 13(1985)
- Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host. *Current chemotherapy and immunotherapy*, 12th International Congr. of Chemotherapy, Florence, p.1269(1981)
- Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : Antineoplastic effect of 5-fluorocytosine and cytosine deaminase on brain tumor. *Neurol. Med. Chir.*, **22**, 344(1982)
- Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : Antineoplastic effect in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res.*, **45**, 1753(1985)
- Sakai, T., Yu, T. S., Tabe, H. and Omata, S. : Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1623(1975)
- Yu, T. S., Sakai, T. and Omata, S. : Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 543(1976)
- Sakai, T., Yu, T. S., Taniguchi, K. and Omata, S. : Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2015(1975)
- Yu, T. S., Sakai, T. and Omata, S. : Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 551(1976)
- West, T. P., Shanley, M. S. and O'donovan, G. A. : Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **719**, 215(1982)
- 유대식 : *Pseudomonas aureofaciens*의 cytosine deaminase의 생성에 관한 연구. 계명대학교 생활과학연구소 과학논집, **3**, 97(1976)
- Katsuragi, T., Sakai, T., Matsumoto, K. and Tonomura, K. : Cytosine deaminase from *Escherichia coli* -Production purification and some characteristics. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1721(1986)
- Kream, J. and Charrgaff, E. : On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5157(1952)
- Ipata, P. L., Marmocchi, F., Magni, G., Felicioli, R. and Polidoro, G. : Baker's yeast

- cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochemistry*, **10**, 4270(1971)
21. 유대식, 김재근, 정기택 : 곰팡이성 cytosine deaminase의 활성에 미치는 온도의 영향. 계명대학교 기초과학연구소, **5**, 37(1986)
 22. 유대식, 김재근, 坂井拓夫, 外村健三 : 곰팡이의 cytosine deaminase에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **14**, 669(1986)
 23. 김재근 : *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 cytosine deaminase의 정제 및 특성. 경북대학교 박사학위논문(1986)
 24. 김재근 : *Aspergillus* sp. 112K가 생산하는 cytosine deaminase의 효소학적 성질. 계명전문대학 계명연구논총, **7**, 247(1989)
 25. Jun, H. K., Park, J. H. and Yeeh, Y. : Properties of extracellular cytosine deaminase from *Arthrobacter* sp. JH-13. *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 177(1985)
 26. Jun, H. K. and Park, J. H. : Isolation of extracellular cytosine deaminase producing strain *Arthrobacter* sp. JH-13 and cultural condition of it's enzyme production. *Kor. J. Microbiol.*, **22**, 257(1984)
 27. 유대식, 이정식, 김재근 : 세포의 cytosine deaminase 생성균의 분리 및 생성조건. 계명대학교 기초과학연구소, **7**(1), 95(1988).
 28. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택 : *Bacillus polymyxa* YL-38의 세포의 cytosine deaminase 생성의 최적 배양조건. 한국미생물학회지, **26**, 362(1988)
 29. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택 : 세포의 cytosine deaminase의 효소학적 성질. 한국미생물학회지, **26**, 368(1988)
 30. 노완섭, 강훈기, 배정철, 조덕봉, 김영지, 채기수 : 식품미생물학. 지구문화사, p.157(1989)
 31. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)

(1991년 1월 20일 접수)