

# 微生物에 의한 5'-Phosphodiesterase 生産에 관한 研究 第一報 *penicillium sclerotiorum*의 5'-Phosphodiesterase에 對하여

## Studies on 5'-Phosphodiesterase produced by microorganisms.

### Part I. On the 5'-Phosphodiesterase of *Penicillium sclerotiorum*

Ho Sik, Kim and Ke Ho, Lee

서울대학교 農科大學 農化學科 · 國防部 科學研究所

金 浩 植 · 李 啓 瑚

(1962年 12月 15日 受理)

### Summary

(1) The 30 strains of Penicillia and the 52 strains of Aspergilli have been screened for their producibility of 5'-Phosphodiesterase, and *Penicillium sclerotiorum* 7321, *Penicillium sp M-11* and *Penicillium citrinum UV-mutant* 2032-72 were selected as having high 5'-Phosphodiesterase activity.

(2) Using the wheat bran medium the 5'-Phosphodiesterase production was reached at maximum state by the plate culture for 10 days at 30°C

(3) The optimum conditions of the 5'-phosphodiesterase activity of *Penicillium sclerotiorum* 7321 and *Penicillium sp M-11* were pH 4.0 at 62.5°C, while the optimum condition of the 5'-Phosphodiesterase activity of *Penicillium citrinum UV-mutant* 2032-72 was pH 5.0 at 50°C

### 1. 緒 言

RNA 分解酵素로 既知的 것은 大部分 3'-Phosphodiester linkage로 分解하는 3'-Phosphodiesterase 에 屬하고 5'-Phosphodiester linkage로 分解하여 5'-Mononucleotide를 生成케 하는 酵素인 5'-Phosphodiesterase는 이제껏 蛇毒, 腸粘膜, Rye grass 等 特殊材料에만 局限되었으나 微生物에 의한 5'-Phosphodiesterase에 關하여 *Penicillium citrinum* <sup>(1,2,3)</sup> *Asterococcus mycoides* <sup>(4)</sup> *Azotobacter agile*

<sup>(5)</sup> *Aspergillus oryzae* <sup>(6,7)</sup> molds, *Actinomyces* <sup>(8)</sup> 其他 微生物<sup>(9,10)</sup>에 存在한다는 報告가 있는等 最近 이方面에 對한 研究가 活發하다 著者等도 *Penicillium*屬과 *Aspergillus*屬의 여러 菌株에 對하여 5'-Phosphodiesterase activity를 Screening하여 強力한 菌株를 分離 選拔 하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

### 2. 實驗方法

#### A. 使用菌株

本實驗에 使用한 菌株는 研究所藏인것, 分離한 菌株 및 蒐集한 것으로 *Penicillium*屬 30株 *Aspergillus*屬 52株 總 82株에 對하여 5'-Phosphodiesterase activity와 Phosphomonoesterase activity를 比較하였다.

#### B. 酵素溶液의 調製

밀기울 20g에 물 10ml를 加하여 비진다음 2時間 放置後 滅菌된 500ml 容 三角 flask에 넣고 15Lbs 에서 20分間 Autoclave한 後 菌株를 接種 30°C에 서 10日間 靜置培養한다음 蒸溜水 100ml를 添加 Waring blender 處理를 3分間하고 冷藏庫(4°C)에 4時間 放置, 濾過後 濾液을 冷藏庫에 保存하고 隨時, 酵素溶液으로 使用하였다.

#### C. Enzyme reaction

酵素基質은 Merck製인 Yeast RNA를 使用하여 RNA Final concentration이 1%가 되게 하였다.

#### ① Screening Test

Screening method는 Enzyme activity의 簡易檢 出法<sup>(6)</sup>을 變改한 Petri dish의 1.5% Agar plate上

에서 行하는 Paper disk method로 RNA의 Final concentration이 1%가 되게 하며  $1/10$ M Veronal buffer solution으로 pH 5.0로 한 基質溶液을 4mm厚로 Petri dish에 流入 放冷凝固시키고 Disk paper(徑 6mm)를 酵素溶液에 적시어 Agar plate上에 並置시켜 Enzyme reaction을  $50^{\circ}\text{C}$ 定溫器에서 60分間시켰다.

定溫이 끝난後 Disk paper를 除去하고 Uranium reagent<sup>(12,13)</sup> (Uranyl acetate 0.25g, Trichloroacetic acid 2.5g를 蒸溜水 100ml에 녹인것)를 Agar plate 全面에 流入한다. 未反應部는 白濁이나 RN-depolymerase가 存在하여 反應이된 部分은 Uranium reagent에 可溶性임으로 透明한 Ring을 나타내며 Ring의 徑, 透明度에 依해 RN-depolymerase activity를 半定量的으로 比較할 수 있다. RN-depolymerase를 確認한後 Uranium reagent를 除去하고 Fiske-Subbarow<sup>(11,14)</sup>의 Molybden酸 II solution (25g Ammonium molybdenate를 蒸溜水 200ml에 溶解시키고  $1/10$ N- $\text{H}_2\text{SO}_4$  300ml를 加하여 Final volume을 1,000ml로한것) 10ml와 Aminonaphthol sulfonic acid solution (0.5g의 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid를 15%  $\text{NaHSO}_4$  solution 195ml에 녹이고 20%  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  solution 5ml를 加한液, 暗冷密栓保存 2週 使用可) 4ml를 混和한 溶液을 透明해진 Ring의 部分에 一滴씩 滴下하여 5~20分間에 發現하는 靑色有無로 RN-depolymerase中에 Phosphomonoesterase activity를 分別比較하였다.

靑色反應이 없는部分은 Uranium reagent에 依한 可溶性有機磷酸에서 脫離한 無機磷酸이 없으므로 Phosphomonoesterase가 欠如한 것이고 靑色反應이 있는 部分은 RN-depolymerase中 Phosphomonoesterase가 共存하므로 RNA가 分解되어 5'-Mononucleotide가 最終產物로 蓄積되지 않고 더 分解되어 Base나 無機磷酸으로 되기때문에 靑色되는 것이다.

#### ② phosphomonoesterase의 Inhibitor로서 NaF와 溫度의 영향<sup>(1,8)</sup>

PNA가 5'-Phosphodiesterase에 依하여 5'-Mononucleotide가 生成된다해도 Phosphomonoesterase가 共存하면 5'-Mononucleotide는 單純한 反應中間物에 지나지 않으므로 共存하는 Phosphomonoesterase活性을 弱화 乃至 阻止하기 爲하여 酸性에 最適 pH를 갖는 菌株에 對하여 Phosphomonoesterase의 阻害劑인 NaF를  $0, 1/100$ M,  $1/50$ M濃度로 基

質에 加하여 pH 5.0로 調整, 反應溫度를 40, 50,  $62.5^{\circ} \pm 0.5$ C로 各各 反應시켜 RN-depolymerase와 Phosphomonoesterase activity를 比較하였다.

#### ③ Optimum Condition에 對하여

酵素力價의 보다더 定量的인 比較를 하기 爲하여 原酵素溶液을 10倍로 稀釋하였다. Optimum condition을 追究하기 爲하여 基質을  $1/10$ M Veronal buffer solution으로 pH를 4, 5, 5.0, 6, 0 그리고 NaF  $1/50$ M濃度로 調整하고 反應溫度를 40, 50,  $62.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 各各 Enzyme reaction을 시켜 RN-depolymerase 및 Phosphomonoesterase activity를 ①의 Screen Test에 準하여 比較하였다.

#### ④ 培地組成과 培養條件에 따른 영향

##### Glucose-peptone media<sup>(1)</sup>

##### Composition of media

Glucose	50g	dissolved in
Polypeptone	5g	
Monobasic potassiumphosphate	0.5g	distilled water 1, 000ml
Calcium chloride	0.4g	
Dibasic potassium phosphate	0.5g	
Magnesium sulfate	0.4g	
		pH adjusted to 5.0

Glucose-peptone media 100ml를 500ml容 圓底 Flask에 넣고 15L/B 15分間 Autoclave하고 接種하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 96hrs, Shaking culture(往復運動 振巾 5cm) 한後 菌體를 Waring blender 3分間 處理하여 Final volume을 100ml로 하여 原酵素液으로 하고 또 10倍 稀釋한液 두가지를 Shaking culture한 酵素液으로 하였고 밀기울 培地에서은 原酵素液 또한 10倍 稀釋한液 두가지를 麴麴培養酵素液 Total 4種식의 酵素液으로 D法에 依한 Enzyme activity를 比較하였다.

#### D. 5'-Mononucleotides의 檢索

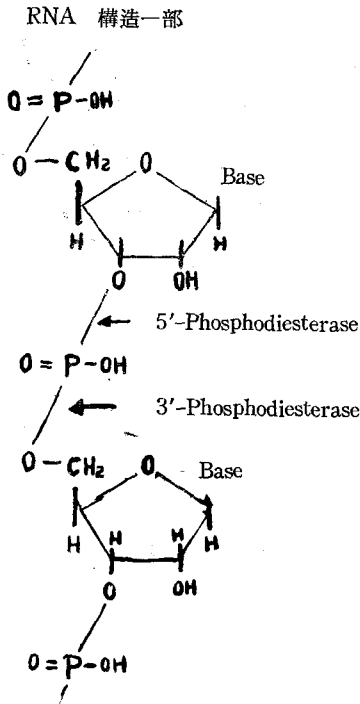
##### ① Electrophoresis<sup>(1)</sup>

Electrophoresis는 Beckmann electrophoresis Spinco Model R type를 利用하여 Kuninaka method<sup>(1,15)</sup> 變改한 方法으로 行하였다. 各菌株의 酵素를 그 optimum pH를 주기爲하여 Substrates를  $1/10$ M Veronal buffer solution으로 調整하고 RNA의 Final concn.을 1%로한 2ml를 試驗管(100×10)에 取하고 밀기울에서 오는 10倍液의 酵素液 0.2ml를 加하여 各 Enzyme의 最適溫度에서 反應을 60分間 시킨後 反應液 0.04ml를 Filter paper (Watman No.1 巾3cm 長30cm)에 Applicator로서 올리고 Constant Voltage 350V, Constant current 0.55mA-mp/per paper strip, 室溫( $17^{\circ}\text{C}$ ), 電解質 10% Acetic

acid solution에서 4, 5時間 계속하여 끝냈다. Electrophoresis가 끝나는데로 75°C dry oven에서 風乾시킨後 253m $\mu$ 의 UV-Ray (HANAU UV lamp Filter付)를 照射시키면 濾紙全體가 螢光을 發하거나 RNA分解物이 存在하는 Spot는 UV-Ray를 吸收하여 약간 검게 보이며 이것을 鉛筆로 check한다.

② Periodate Oxidation<sup>16)</sup>

1% Sodium meta periodate solution을 UV吸收物質이 있는 Paper에 Spray하고 室温에서 約 60分間放置 風乾 한後 SO<sub>2</sub> gas로 脫色하고 미리 SO<sub>2</sub> gas로 漂白된 0.1% Rosaniline solution을 Spray하



고 室温에 放置乾燥하며 呈色하는 紫色 Band가 5'-Mononucleotide 아니면 5'-Nucleoside임을 確認한다. RNA 分解物中 Ribose에 cis-form의 OH가 存在하면 그部分이 Sodium meta periodate<sup>16)</sup>에 依해 酸化되며 Aldehyde로 되고 Rosaniline에 依한 Schiff 反應으로 紫色이 呈色된다. RNA分解物中 cis-form의 OH를 갖은 UV-吸收物質은 5'-Mononucleotides 및 Nucleoside에 限하고 2'-or 3'-의 Nucleotides에는 cis-form의 OH는 없다. 또 Nucleosides는 cathode에 流動<sup>15)</sup>함으로 Anode side에 UV-吸收 spot가 이操作으로 發色하면 이 spot는 5'-Mononucleotides임을 알수있다.

3. 結果 및 考察

Enzyme activity를 screening하여 Table I에서와 같이 RN-depolymerase activity가 強하고 Phosphomono esterase activity가 弱거나 或은 弱한 即 Molybden II와 Aminonaphthol sulfonic acid<sup>(11)</sup>에 依한 Molybdenum blue의 color reaction이 negative인 12個의 菌株를 選拔하였다.

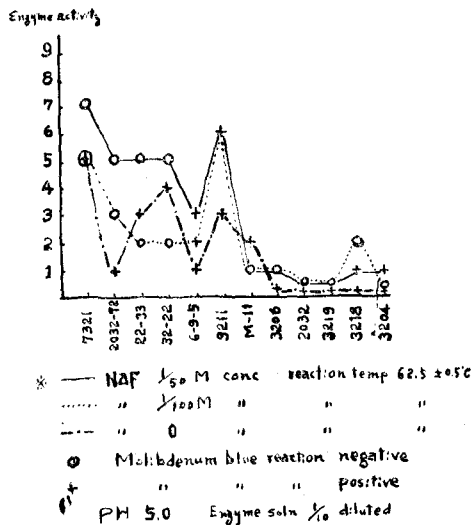
Table I

Test organisms	Strain	RN-depolymerase activity	Molybdenum blue reaction
<i>Penicillium citrinum</i>	3204	+++-	+
" "	2032	++++	-
" <i>citrinum</i> UV mutant	2032-72	+++++	-
" SP	M-11	++++	-
" <i>spinosum</i>	3219	++++	-
" <i>Javanicum</i>	3218	+++++	+
" <i>Sclerotium</i>	7321	+++++	-
" <i>Notatum</i>	3211	+++++	+
" <i>Citrea Virde</i> Bourge	22-33	+++++	-
" <i>Islandicum</i>	32-22	+++++	-
" <i>expansum</i>	3206	++++	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	6-9-5	+++++	+

Condition of Enzyme reaction PH 5.0 temp 50 ± 0.5°C  
time 1 hrs NAF 1/50 M conc.

Paper disk用 Plate調製에 所要되는 Agar濃度는 RN-depolymerase activity比較에 큰 영향이 있었다. RNA가 Phosphodiesterase에 依한 分解로 5'-Mononucleotide가 分解過程의 中間物이 아니고 反應最終產物로서 蓄積을 期待하려고 Phosphomonoesterase activity를 Fig. 1에서와 같이 NaF로 阻止하였다. Phosphomonoesterase의 阻止로서 NaF의 영

Fig I Sodium fluoride 阻害의 영향

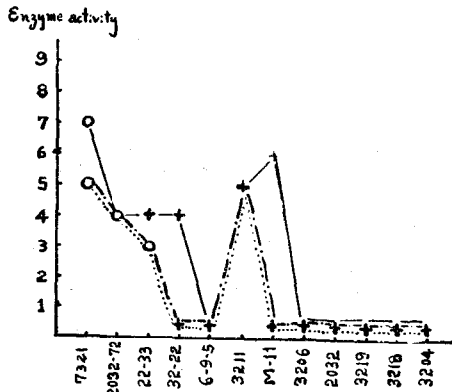


향은 菌株과 温度 및 NaF의 濃度에 따라 各各 다르다.

*Penicillium sclerotiorum* 7321, *Penicillium citrinum* UV mutant 2032-62, *Penicillium citreavirid-ebourge* 22-33, *Penicillium islandicum* 32-22 등은 NaF 1/50M concn. 이  $62.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , pH 5.0에서 NaF 無添加區 및 1/100M concn. 보다 Phosphomono-

condition을 나타내어 RN-depolymerase activity가 두드러지게 强했고 Phosphomonoesterase activity가 없었다. 여기 *Penicillium* SP M-11은 Table 1이나 Fig I, II, III에서 RN-depolymerase나 Pho-

Fig II 40°C 에서 PH의 영향



esterase activity가 없고 RN-depolymerase activity가 높아진 것으로 보아 NaF 濃度와 温度가 Phosphomonoesterase 活性을 현저하게 低下시키는 것으로 興味있는 사실이다. 또한 Enzyme reaction에서 가장 영향이 큰 pH와 温度에 있어서 Fig. II, III 그리고 VI에서와 같이 pH 4.0 温度  $62.5^\circ\text{C}$ 에서 *Penicillium sclerotiorum* 6321, *Penicillium* SP M-11이 opt. condition을 나타냈고 pH 5.0 温度  $50^\circ\text{C}$ 에서 *Penicillium citrinum* UV mutant 2032-62가 Opt

Fig III 50°C 에서 PH의 영향

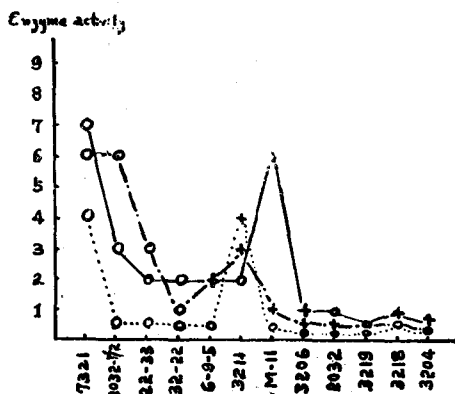
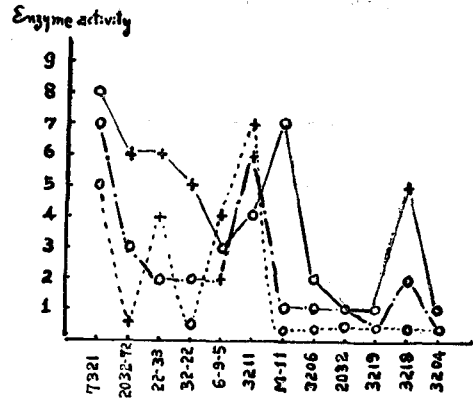


Fig IV 62.5°C 에서 PH의 영향



\* Fig II, III, IV에서 反應條件과 表示는 아래와 같다

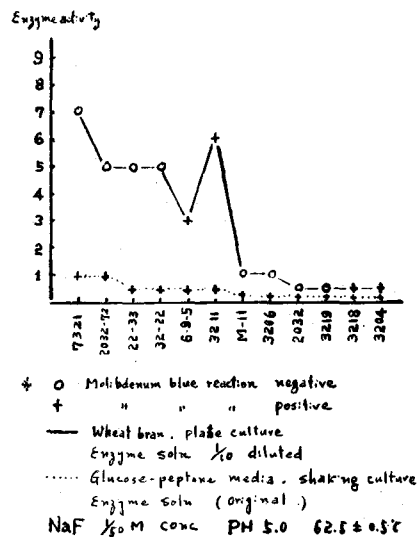
— pH 4.0 } NaF 1/50M conc.  
 - - - " 5.0 }  
 ····· " 6.0 }

Enzyme soln 1/10 diluted.

sphomonoesterase activity에 있어서 强한 菌이 못되었지만 Fig VI에서와 같이 强力한 菌으로 台頭된 點으로 보아 滋味있는 實驗結果의 하나이다.

Fig V

培地組成 그리고 培養 時間 影響의 영향

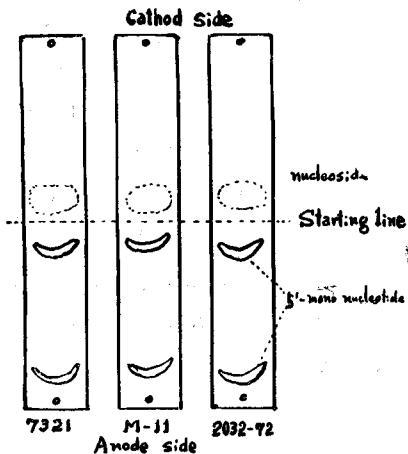


○ Molybdenum blue reaction negative  
 + " " " positive

— Wheat bran, plate culture  
 - - - Enzyme soln 1/10 diluted  
 ····· Glucose-peptone media, shaking culture  
 Enzyme soln (original)  
 NaF 1/50 M concn pH 5.0  $62.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$

培地組成과 培養條件에 따른 영향을 보면 Fig V 에서와 같이 밀기울의 平面靜置培養한 酵素液보다 Glucose-peptone media의 Shaking culture한 酵素液이 RN-depolymerase activity가 約 17배나 떨어지는 엄청난 差異를 보여주며 Glucose-peptone media에서 Shaking culture한 酵素液은 Phospho-monoesterase activity뿐인것이 매우 興味있는 結果라 아니할수없다.

Fig VI Periodate oxidation of Electrophoresis Paper Strip



이것은 밀기울이 大概의 Enzyme formation media로 좋다는것은 既知의 事實이나 Glucose-peptone media로 Shaking culture한것은 菌自體의 增

殖만 營爲하지않았나 思慮되는 바이며 한편으로 培養時間을 더 延長시켰더라면 Enzyme activity가 울르지 않을까 하는 點도 지적하고 싶다. Nucleotides와 Nucleosides를 檢定하는데 있어서 Paper chromatograph method<sup>1)</sup>도 있으나 Solvent 및 Standard reagent가 入手困難이어서 Paper Electrophoresis method<sup>1,15)</sup>로서 比較的 簡單하게 分離되었다. 5'-Mononucleotide는 Anode side로만 流動되므로 濾紙中央點인 Starting line에서 Anode side에서만 流動된 褐色 Band가 檢出되면 RNA는 Nucleotide까지만 分解된것이고 反對로 流動된 褐色 Band가 Cathode side에 檢出되면 Nucleoside, Base까지 分離된 것이다. Anode side로 流動된것이 Periodate Oxidation에 따른 Rosaniline에 의한 Schiff 反應으로 褐色된것은 5'-Mononucleotide인데 Fig VI와 Table II에서 같이 *Penicillium sclerotiorum* 6321, *Penicillium* SPM-11, *Penicillium citrinum* UV mutant 2032-62 3菌株의 5'-Phosphodiesterase에 의한 RNA分解物에서 Anode side에 Periodate Oxidation과 Rosanilin의 Positive (violet color) Band가 Starting line에서 부터 3~4cm 그리고 11~12cm의 流動距離를 나타냈으므로 5'-Mononucleotide임을 最終적으로 確認되었으며 나아가서

Table II Identification of 5'-mononucleotides

5'-mononucleotides		Distance migrated from Origine to the anode side by electrophoresis (cm)		Periodate Oxidatio	$\lambda$ max (m $\mu$ ) +
		泳動文献値	泳動實驗値※		
Standarnd Substance	Adenosine-5'-manophosphate	4.5		+	257
	Inosine-5-mono-phosphat	12.5		+	250
nucleotide fraction obtained	<i>P. sclerotiorum</i> 7321		4.0 & 12	+	257 & 250
	<i>P. sp</i> M-11		3.0 & 11	+	258 & 250
	<i>P. citrinum</i> UV mutant 203272		4.0 & 12	+	257 & 250

※ Paper electrophoresis was performed in 10% Acetic acid with 350 V and 0.55 m amp/cm at room temp (17°C) for 4.5 hrs

+ Ultraviolet absorption spectra of nucleotides were measured in 0.1-N Hcl

Paper strip을 縱으로 보아서 呈色된 Band가 약간 꼬부러진 (Vibrio form) 모양으로 兩邊이 조금 끌리듯 流動하였다. Kuninaka<sup>1)</sup>가 實驗한 Standard Substances의 文獻上 流動値와 本實驗에서 行한 實測 流動値와 약간 다르게 나타났것은 反應物을 Ion exchange resin column을 通하지않어 어떤 不純物에 依한 Tailing (Paper chromatography에서와 같이) 때문에 Band모양이 꼬부러지고 實測 流動値가 약간 流動한것으로 思慮되는 바이며 Standard인 Adenosine-5'-monophosphate와 Inosin-5'-monophosphate의 流動値보다 0.5cm가 流動했지만 以上과 같은 諸條件때문에 完全一致는 안되었지만 거의 비슷한 近似値인點을 보면 一致한다고도 生覺이 된다. *Penicillium sclerotiorum* 7321, *Penicillium SP M-11*, *Penicillium citrinum UV mutant* 2032-62가 5'-Phosphodiesterase를 強力히 生産하여 이 酵素로서 RNA를 分解하여 5'-Mononucleotides를 生成케 하는 結論으로 끝을 맺는다.

## 5. 要 約

① *Penicillium* 菌 30株 *Aspergillus* 菌 52株의 5'-Phosphodiesterase activity를 screen하여 強力한 *Penicillium sclerotiorum* 6321, *Penicillium SP M-11* 그리고 *Penicillium citrinum UV-mutant* 2032-72를 選拔하였다.

② 밀기울 培地로 30°C 10日의 靜置培養에서 5'-Phosphodiesterase 生産이 强했다.

③ *Penicillium sclerotiorum* 7321가 *Penicillium SP M-11*의 5'-Phosphodiesterase 最適條件이 pH 4.0, 62.°C이고 *Penicillium citrinum UV-mutant* 2032-72의 5'-Phosphodiesterase 最適條件은 PH 5.0 50°C이다.

## 參 考 文 獻

1. A. Kuninaka et al.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., 23, 239 (1959)
2. A. Kuninaka. et al.: Agr. Biol. Chem., 25, 693 (1961)
3. A. Ballio et al.: Biochim. Biophys. Acta., 20, 414 (1956)
4. P. Plakett et al.: Biochim. Biophys. Acta., 26, 664(1957)
5. A. Stevens et al.: Federation proceedings, 18, 332 (1957)
6. A. Kuninaka et al.: J. Agr. Chem. Soc. Japan., 29, 52, 797~801 (1959)
7. A. Kuninaka et al.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., 23, 281 (1959)
8. H Sugimoto, T. Iwasa, J. Ishiyama., & T, Yokotsuka, : J. Agr. Chem. So. Japan., 36, 277, 690 (1962)
9. J.M. Newton et al.: J. Bact., 69, 977 (1957)
10. A. L. Koch et al.: J. Biol. Chem. 203, 227 (1953)
11. Fiske-Subbarow et al, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
12. A. Kuninaka et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 3, 55 (1957)
13. H.S. Kaplan & L. B. Heppel, : J. Biol. Chem. 222, 907 (1956)
14. 赤堀四郎: 酵素硏研法Ⅱ P43 (1956) 東京朝倉書店
15. 國中 明: 食品工業., 14, 11, 10 (1961)
16. J.G. Buchanan, C. A. Dekker & A.G. Long, : J. Chem. Soc. 3162 (1950)