KOR. JOUR. MICROBIOL. Vol. 10, 73~78 (1972)

微生物에 依한 核酸關連物質의 生產에 關한 硏究(第 1 報)

—— *Brevibacterium* 屬 細菌의 營養要求變異株分離 ——

裵 武 · 李 啓 準
(韓國科學技術硏究所 應用微生物硏究室)

Studies on Production of Nucleic acid Derivatives by Microorganisms (I)

—— Isolation of Adenineless mutants from *Brevibacterium ammoniagenes* ——

BAE, Moo and Kye Joon LEE
(Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology)

ABSTRACT

As the first step in the production of nucleic acid derivatives by microorganisms, adenineless mutants were derived from *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872.

A culture of *Br. ammoniagenes* was exposed to ultraviolet rays for 120 second and treated with diethylsulfate in phosphate buffer for 2 hours to reach the designed death rate.

The yield of mutants induced was 0.28% by the ultraviolet irradiation and 0.66% by the diethylsulfate treatment. By the treatment of penicillin G in a hypertonic minimal medium, the yield of mutants was increased from 0.28% to 0.54% and from 0.66% to 1.5%, respectively.

Thus, it was demonstrated that diethylsulfate treatment was much more efficient than UV irradiation to induce adenineless mutants of the bacteria, and total strains of 120 adenineless mutants were obtained.

緖 論

미생물이 생육하는 동안 핵산관련물질을 균체외로 분비하여 배지내에 축적시키는 현상에 관한 연구가 지난 10년동안 활발히 수행되어 왔으며 그 총설을 Ogata, K. (1963) 및 Demain, A.L. (1968)가 발표한바 있다.

미생물을 배양하는 도중 화학적 또는 물리적인 작용을 줄 때 핵산관련물질의 축적량이 증가한다는 사실은 Mitchell, P.,(1951) Strominger, J.L., (1961), Billen, D. (1965) 및 Skoda (1958) 등이 발표한 바 있다.

특히 미생물의 유전적 상태에 결함이 있는 adenine 요구변이주를 배양할 때 축적량이 훨씬 증가함을 Partridge, C.W.H.(1957)가 발표하였고 Uchida, K.(1961)는 공업적으로 이용할 수 있을 정도로 다량 축적시키는 변이주를 얻었다.

이것은 미생물의 핵산관련물질의 *de novo* 합성경로가 변이제에 의해서 한 단계 또는 단계적으로 차단되어 효소적 결함을 보충하기 위하여 어느 특정물질을 요구하며 균체외로는 효소결함 전단계의 물질을 축적하는 것

으로 알려졌다. 일반적으로 adenine 요구변이주는 hypoxanthine 계통의 물질을, guanine 요구변이주는 xanthine 계통의 물질을 축적하는 것으로 Misawa, J. (1968), Demain, A.L. (1966) 및 Magasanik, B. (1954)등이 발표하였다.

본보에서는 핵산관련물질을 직접발효법으로써 얻을 목적으로 *Brevibacterium ammoniagenes*를 자외선 조사 및 diethylsulfate처리로 인공변이주를 유도시켜 그중 adenine 요구변이주를 분리하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

(1) 使用菌株

한국과학기술연구소 응용미생물 연구실에 보존하고있는 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872를 모균으로 사용하였다.

(2) 培地組成

adenine 요구변이주를 얻기위한 최소배지는glucose 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, urea 0.1%, (별도살균), casamino acid(vitamine free) 0.25%, L-cysteine 50mg/*l*, L-tryptophane 10mg/*l*, biotin 30μg/*l*, thiamine 5mg/*l*(별도살균) *p*H 7.3이며, 완전배지는 최소배지에 adenine HCl 20mg/*l*을 보충하여 사용하였다. 고형배지로 쓸때는 agar 2%를 첨가하였다. 분리한 변이주를 보존하는 데에는 nutrient broth에 adenine-HCl 10 mg/*l* 및 agar 2%를 첨가한 사면배지를 사용하였다.

(3) adenine 要求變異株의 取得方法

최소배지내에서의 모균의 성장곡선은 30°C의 진탕배양기에서 220 rpm의 회전속도로 배양하면서 660 mμ에서 OD를 측정하여작성하였다.

① 紫外線에 依한 方法

자외선 등의 강도를 안정시킨 뒤에 최소

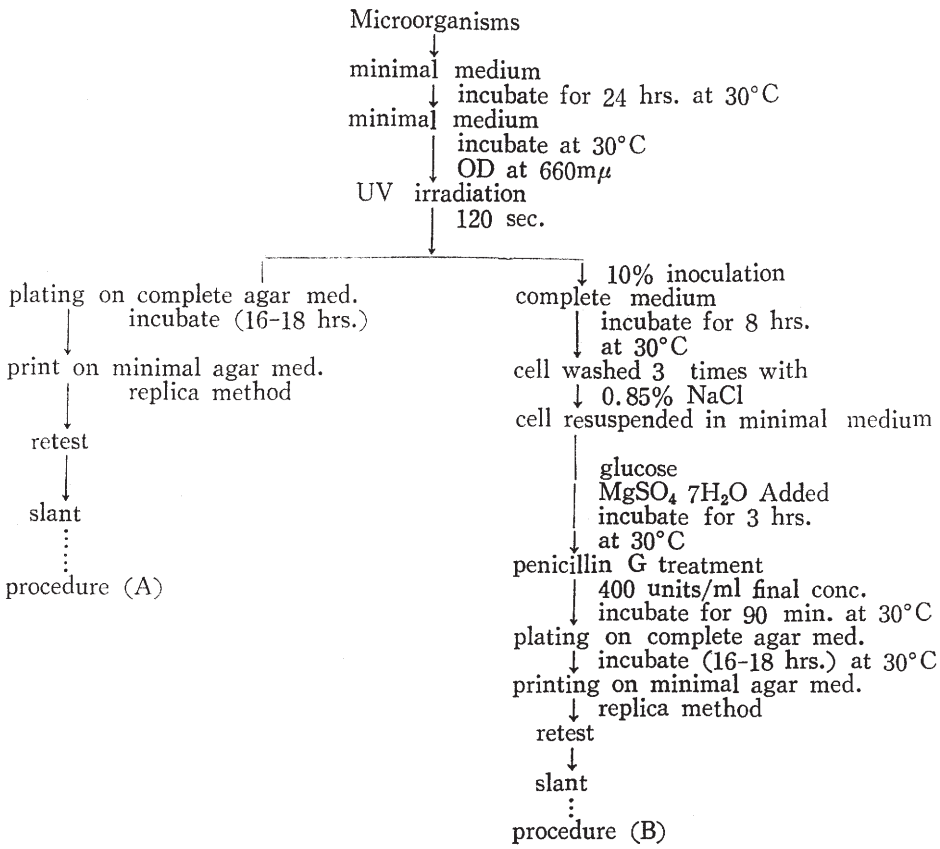

Fig. 1. Isolation Scheme of Auxotrophs by UV Irradiation.

배지에서 대수 성장기의 균액 5 m*l*를 직경 9 cm의 멸균 petri dish에 넣고 lamp로부터 수직으로 50cm 떨어진 위치에서 60~120초 동안 서서히 흔들면서 조사하였다. 완전배지에서 생성되는 colony의 수로서 사멸률을 측정하였다.

Penicillin 처리법 (Lederberg, J. *et al* 1948) 및 replica 방법 (Davis, B.D. 1948)을 적용 그림 1의 방법으로써 adenine 요구변이주를 분리하였다.

② Diethylsulfate에 依한 方法

Diethylsulfate(D.E.S.)를 ethanol에 녹여 16%(v/v)의 농도로 만들어 사용하였다. 사용시마다 새로 만들어 nutrient의 평판배지에 자체의 무균성을 확인한 뒤에 사용하였다

100 m*l*의 삼각 flask에 phosphate buffer (*p*H 7.0)를 21.5 m*l* 넣고 멸균한 뒤 resting cell 상태의 균액 2.5 m*l*, D.E.S. 16% 용액 1 m*l*씩 넣고 30°C에서 1~2시간 진탕시켜 작용시켰다. 작용을 끝낸 즉시 millipore filter로서 여과하고 생리식염수로서 씻어 D.E.S.를 제거시키고 완전배지에서 사멸률을 측정하였다.

그림 2의 방법으로 adenine 요구변이주를 분리하였다.

Microorganisms
↓
minimal medium
↓ incubate for 24 hrs. at 30°C
D.E.S. treatment
| in phosphate buffer *p*H 7.0
↓ conc. 0.64%, incubate for 1-2 hrs.
cell washed 3 times
↓ 0.85% NaCl soln.
cell resuspended in 0.85% NaCl soln.
↓ 10% (v/v) inoculation
complete medium, incubate for 8 hrs. at 30°C
↓
cell washed 3 times with 0.85% NaCl soln.
↓
cell resuspended in minimal medium
| glucose
| $MgSO_4 7H_2O$ added
↓ incubation for 3 hrs. at 30°C
penicillin G treatment
| 400 units/ml (final conc.)
↓ incubate for 90 min. at 30°C
plating on complete agar med.
↓
printing on minimal agar med.
↓ replica method
retest
↓
slant

Fig. 2. Isolation Process of Auxotrophs by D.E.S. treatment.

(4) 試藥 및 器具

adenine HCl; Taketa kosan Co.(日本)
Casamino acid (vitamine free); Difco. (America)
Diethylsulfate (D.E.S.); 和光純藥工業社 (日本)
Penicillin G.; Nutritional Biochemicals Corporation (America)
Ultraviolet lamp 253mμ 15₩ 三共電機 (日本)
Millipore filter & filter membrane; 0.45μ 25mm (America)

結果 및 考察

(1) 紫外線照射에 依한 變異株의 取得

최소배지에서 *Br. ammoniagenes*의 성장곡선은 그림 3과 같다. 대수 성장기중 균의 증식이 가장 왕성할 5시간 배양한 균을 자외선 조사시킨 결과 나타난 생존률 및 치사률은 표 1과 같다.

치사률과 변이주의 생성률이 반드시 비례하지는 않지만 자외선을 변이제로 사용할때 99.9%의 치사률을 얻는 조건을 택하기 위하여 120초 조사한 균액에서 adenine 요구변

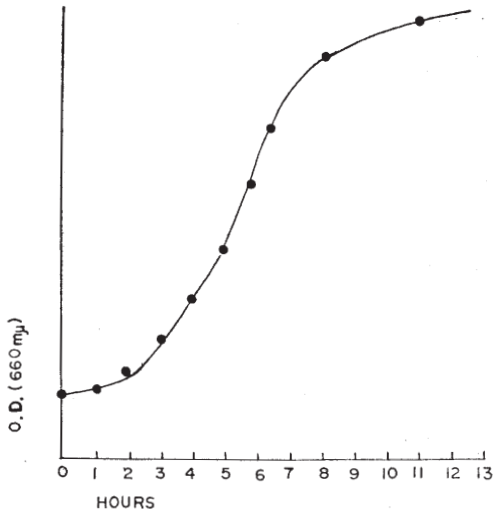

Fig. 3. Growth curve of *Br. ammoniagenes* in minimal medium

Table 1. Survival of *Br. ammoniagenes* against UV irradiation

Time of irradiation (sec.)	Total colony/ml after UV irradiation	Death rate (%)	Survival (%)
0	3.0×10^7	0	100
60	2.0×10^5	99.3	0.7
90	1.6×10^5	99.7	0.3
120	0.3×10^5	99.9	0.1

Table 2. Yield of Adenineless Mutant of *Br. ammoniagenes* by UV irradiation

Time of UV irradiation	Incubation time in C-*medium	Incubation time in M-*medium	Incubation time in M+glucose+ $MgSO_4$*medium	Time of P.G.* treatment	No. of mutants per total colony	Rate (%)
120 (sec.)	—	—	—	—	1/360	0.28
120	8 (hr.)	—	3 (hr.)	60 (min.)	1/470	0.21
120	8	—	3	90	4/690	0.58
120	8	—	3	120	5/1420	0.28
120	8	3 hr	—	120	1/420	0.25

* P.G.: penicillin G, M—medium; Minimal medium, C—medium; Complete medium M+glucose+$MgSO_4$ medium; minimal-medium+20% glucose+0.01M $MgSO_4$

이주를 분리한 결과 표 2와 같다.

본 연구에서 사용한 *Brevibacterium* 속 세균에서 변이주를 효률적으로 얻기 위하여는 UV조사한 균액을 adenine이 첨가된 완전배지에서 배양하여 adenine 요구성 변이주와 모균을 증식시킨 뒤에 penicillin 처리로서 모균을 사멸시키는 방법이 필요하다.

UV 조사한 균액을 완전배지에서 8시간 배양하여 모균과 adenine 요구변이주가 모두 충분히 증식하였을때 millipore filter로서 여과하고 균체를 세척하여 adenine을 제거시킨 뒤에 최소배지에 다시 배양하면 모균은 계속 증식하나 adenine요구변이주는 휴지(resting) 상태로 존재하게 된다. Lederberg, J.(1948, 1956)에 의하면 penicillin은 성장세포만을 살균시키므로 이때 peniclilin을 작용시키면 성장하는 모균은 사멸되나 변이주는 성장하지 않으므로 사멸되지 않는다. 따라서 변이주의 취득률을 높일 수 있다.

그러나 penicillin 처리중에 성장하는 모균의 분비물이나 penicillin에 의해서 결과적으로 용해된 사멸균의 균체 물질이 변이주에 cross feed 되므로써 변이주가 성장하게되어 사멸되는 현상이 생긴다.

이 현상을 감소시키기 위하여 본 연구에서는 (1) penicillin 처리시간을 가능한 한 축소시키고, (2) hypertonic minimal medium에서 penicillin을 처리하며, (3) 이때 균 농도가 10^6~10^7 cells/m*l* 이하 일것등이 고려되었다.

완전배지에서 증식시킨 것을 glucose 20%와 $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.01M 되게 첨가한 최소배지에 3시간 배양하면 모균은 성장하여 대수성장초기에 이르고 변이주는 resting cell로서 존재하므로 penicillin에 의해서는 모균만이 사멸된다. penicillin의 세포벽 형성 저해로 생성된 protoplast도 hypertonic minimal medium이므로 용해되는 율도 감소하여 변이주에 cross feed되는 현상도 저하된다. 따라서 adenine 요구변이주의 취득률이 0.28%에서 0.58%로 증가한 것이 표 2에 명백히 나타나 있다.

penicillin 처리시간은 90분이 적당하며 60분에서는 모균이 충분히 사멸되지 않았고 120분에서는 모균뿐만아니라 변이주까지 사멸되었을 것으로 판단되며 이 실험결과는 Gorini 등의 보고와 일치하였다.

(2) Diethylsulfate에 依한 變異株의 取得

D.E.S.의 최종농도가 0.64%인 phosphate buffer (*p*H 7.0)내에서 균액을 작용시켰을때 그 생존률은 표 3과 같다.

그림 2의 방법대로 adenine 요구변이주를 분리한 결과는 표 4와 같다.

자외선 조사에 의한 방법보다 adenine 요구변이주의 생성률이 훨씬 높았다. D.E.S.가 변이를 유발시키는 이유에 대해서는 Bautz 등이 발표한 바 있으며 Nara, T.등은 D.E.S.가 자외선보다는 훨씬 우수한 율로서 adenine 요구변이주를 생성시켰다고 보고한 바 있다.

본 실험의 결과에서도 자외선조사보다는 D.E.S.가 훨씬 우수한 변이제로 나타났으며 분리한 adenineless mutant는 핵산관련물질의 축적 여부를 조사하는 시험균으로 사용되었으며 그 결과를 제 2 보에 보고한다.

Table 3. Survival of *Br. ammoniagenes* against D.E.S. treatment

Time of D.E.S. treatment (hr.)	Conc. of D.E.S. (%)	No. of total colony/ml after D.E.S. treatment	Survival (%)
0	0.64	2.3×10^7	100
1	0.64	9.6×10^5	4.17
2	0.64	1.2×10^5	0.52

Table 4. Yield of Adenineless Mutant of *Br. ammoniagenes* by D.E.S. treatment.

Time of treatment	Incubation time in C-*medium	Incubation time in M*+glucose+$MgSO_4$ medium	Time of P.G.* treatment	No. of mutants per total colony	Rate (%)
2 (hr.)	—	—	—	14/2,150	0.66
2	8 hr.	3 hr.	90 min.	94/6,300	1.5

* P.G.: penicillin G, M—medium; Minimal medium, C—medium; Complete medium

摘 要

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872를 자외선 조사 및 diethylsulfate 처리로서 adenine 요구변이주 120주를 분리하였으며 이를 요약하면 다음과 같다.

1. 대수 성장기의 균체를 120초 동안 자외선 조사하여 0.28%의 취득률로서 adenine 요구주를 취득하였다.

2. 120초 동안 자외선 조사한 액을 완전배지에서 8시간 증식시키고 hypertonic minimal medium에서 3시간 배양한 후 penicillin G를 400units/ml의 농도로 90분 동안 처리하여 adenine 요구변의 취득률을 0.54%로 증진시켰다.

3. Diethylsulfate 0.64%로서 phosphate buffer (*p*H 7.0)내의 균액에 작용시킬때 0.66%의 취득률로서 adenine 요구변이주를 분리하였으며 penicillin G처리 방법으로 1.5%까지 취득률을 높일 수 가 있었다.

引 用 文 獻

1. Bautz, E. and E. Freese, 1960. On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1585.
2. Billen, D., 1965. Modification of the release of cellular constituents by irradiated *Escherichia Coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 333.
3. Davis, B. D., 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J.A.C.S.*, **70**, 4267.
4. Demain, A. L., 1968. Production of purine nucleotide by fermentation. *Progress in Industrial Microbiol.*, **8**, 35.
5. Demain, A. L., M. Jakson, R. A. Vitali, D. Hendlin and T.A. Jacob, 1966. Production of guanosine-5-monophosphate by fermentation. *Appl. Microbiol*, **14**, 821.
6. Gorini, L. and H. Kaufman, 1960. Selecting bacterial mutants by the penicillin method.

Science **131**, 604.

7. Lederberg, J. and N. Zinder, 1948. Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J.A.C.S.* **70**, 4267.
8. Lederberg, J. and Lederberg E. M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.*, **63**, 399.
9. Lederberg, J., 1956. Bacterial protoplosts induced by penicillin. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, **42**, 574.
10. Magasanik, B. and M. S. Brooke, 1954. The accumulation of xanthosine by a guanineless mutent of *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **206**, 83.
11. Misawa, J., T. Nara and S. Kinoshita, 1968. Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. *Amino Acid and Nucleic Acid.* **19**, 150.
12. Mitchell, P. and J. Moyle, 1951. Relationships between cell growth, surface properties and nucleic acid production in normal and penicillin treated *Micrococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 421.
13. Nara, T. M. Misawa and S. Kinoshita, 1968. Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 561.
14. Partridge, C. W. H., 1957. Identification of major accumulation products of adenine specific mutants of *Neurospora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 237.
15. Ogata, K., 1963. 核酸關連物質の生産に關する研究の展望, *Amino Acid* and *Nucleic Acid* **8**, 1.
16. Skoka and F. Sorm 1958. Accumulation of nucleic acid metabolites in *E-coli* exposed to the action of 6-azauracil. *Biochem. Biophys. Acta* **28**, 659.
17. Setlow, R. B. and W. L. Carrier, 1964. The disappearance of thymine dimers from D.N.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 226.
18. Strominger, J. L., 1959. Accumulation of uridine and cytidine nucleotides in *staphylococcus aureus* inhibited by gentia violet. *J. Biol. Chem.*, 234, 1520.
19. Uchida, K., A. Kuninaka, H. Yoshino and M. Kibi. 1961. Fermentative production of hypoxanthine derivatives. *Agr. Biol. Chem.* **25**, 804.