

# 硫酸銅에 對한 *Saccharomyces cerevisiae*의 抵抗성에 關한 研究

서울大學校 文理科大學

李 敏 載 · 李 鎮 基

(1929年 3月 20日 受理)

## 1. 緒 論

微生物이 抗菌性藥物에 對하여 때때로 강한 抵抗性을 獲得하는 事實은 일찍부터 알려져 있으나 近年 化學療法의 發展에 따라서 이 問題는 더욱 큰 關心事가 되었다.

抵抗性獲得現象에 關한 研究는 實用的인 關點에서 뿐만 아니라 遺傳子의 立場에서도 깊은 研究가 進行되고 있으며 最近에는 特히 細菌의 變異現象의 研究對象으로써 많은 研究者의 注目을 끌고 있다. 微生物의 抵抗性獲得現象의 機作에 關해서 Luria<sup>7)</sup>와 Demerec<sup>1)</sup>는 "Mutation J Selection theory"를 主張하고 Hinshelwood<sup>4)</sup> 一派는 adaptation theory를 主張하고 있어 아직 決定的인 解決을 지우지 못하고 있다.

抵抗菌의 代謝作用에 變化가 일어나는가에 對하여는 아직 報告된바가 적으나 McKinney Mellono<sup>1)</sup>은 Sulphonamide에 抵抗性인 Pneumococcus가 inulin의 醱酵態에 있어서 母株菌보다 低下하였다고 報告하였다.

Hotchkis<sup>8)</sup>는 高濃度의 Penicillin에 抵抗性인 Pneumococcus의 抽出液은 母株菌에 抵抗性을 誘導하는 物質을 生成한다고 報告하였고 柳島<sup>16)</sup> 등은 *S. ellipsoideus*에서 또 岡田<sup>10)</sup> 등은 大腸菌에서 이와 同一한 結果를 報告한바 있어 매우 興味있는 問題가 되고 있다. 從來 抵抗性 變異의 研究材料로서 使用된 微生物에는 Bact. lactis aerogene<sup>1)</sup> Staphylococcus<sup>2)</sup> Escherichia Col.<sup>3)</sup> Pneumococcus<sup>12)</sup> 등의 細菌이 많았고 *Saccharomyces* 屬은 別타 對象이 되지 않았으나 다만 *S. ellipsoideus*<sup>11, 16)</sup>를 材料로 研究한 例가 있고 藥物로서는 主로 抗生物質, Proflavin, Sulphonamides, Methylenblue等 其他 많은 種類의 有機物質이 使用되어 왔으며 無機物로는 LiCl<sup>13)</sup>, NaCl<sup>14)</sup>, CuSO<sup>4)</sup>, CO<sup>15)</sup>, Ni<sup>15)</sup>, 昇汞等이 있으나 그 研究例는 有機物에서 만큼 많지는 못하였다. 이제 筆者 등이 *S. Cerevisia*를 材料로 擇한 理由는 다음과 같다.

酵母菌은

1. 培養條件에 따라 變異하기 쉽고
2. 高等動物에 比하여 生育條件의 調節이 容易하고
3. 細菌類보다는 細胞가 커서 操作이 容易하며
4. 代謝過程이 잘 알려져 있어서 變異를 物質代謝와 關連하여 考察하기 쉽다.

이렇한 理由에서 이것을 材料로 하였을때 抵抗性獲得에 對하여

- 1) 抵抗菌이 어떠한 過程으로 出現하는가 特히 어떠한 機作으로 抵抗性을 獲得하는가
- 2) 抵抗菌은 그의 代謝過程에 어떠한 變化가 있는가
- 3) 抵抗菌은 母株菌에 어떠한 影響을 미치는가
- 4) 硫酸銅의 酵母菌에 對한 生長抑制機作은 어떠한가 등 네가지 問題를 究明함과 同時에

抵抗性獲得機作에 對한 上述의 兩說을 再檢討하는데 實驗의 目的이 있다.

## 2. 材料及方法

本研究에 使用한 酵母는 *Saccharomyces Cerevisiae*이며 中央工業研究所 食品工業科에서 求得한 菌株을 純粹分離한後 使用하였다. 基本培地는 Henneberg 培地와 Malt-henneberg 培地이다.

第一表 培地の 組成 (PH=5.4)

| Henneberg                                | Malt-henneberg                           |
|--|--|
| Cane sugar.....100gr                     | Cane sugar.....100gr                     |
| Pepton.....5 "                           | Pepton.....5 "                           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....5 " | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....5 " |
| Mg SO <sub>4</sub> .....1 "              | MgSO <sub>4</sub> .....1 "               |
| Dist water.....1000ml                    | Malt-extract.....260ml                   |
|  | Dist water 740ml                         |

第二表 醱酵液의 組成

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| Glucose                         | 60gr           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 5 " (PH. =6.3) |
| MgSO <sub>4</sub>               | 5 "            |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 0.75 "         |
| Malt-extract                    | 260ml          |
| Dist. water                     | 740ml          |

固體培地의 境遇에는 寒天 2%를 加하였다. 菌數는 Thoma Hemacytometer를 算定하였고 酵母의 培養溫度는 30°C였다. 醱酵能測定은 Meissel 醱酵裝置를 使用하였으며 醱酵液의 組成은 第2表와 같다.

醱酵液에 接種한 菌은 30°C에 4日間 試驗管에 前培養한것(MH media에)을 滅菌蒸溜水 10c.c에 그白金耳懸濁하여 0.1cc式 減荷 Pippet로 接種하였다.

接種이 끝난後 醱酵裝置의 全重量을 秤量하여 初重量으로하고 每日 一定한 時間에

全重量을 秤量하여 그差를 CO<sub>2</sub>의 排出量으로 看做하였다.

菌體抽出液은 無銅培地와 1m M 銅液體培地에 7日間 Pasteur flask에 多量培養한것을 desicator에 乾燥시키고 各 2gr을 蒸溜水 100cc에 懸濁하여 30分間 沸騰시킨後 遠心分離하여 그 上澄液을 取하였다.

酵母의 脫水素 酵素의 抽出은 Pasteur flask에 多量培養한 酵母菌을 乾燥시킨後 粉碎하여 그 30gr에 蒸溜水 200cc를 加하여 30 C에서 2時間 自家分解로써 放置한後 遠心分離하여 그 上澄液을 取하였다. 脫水素酵素作用은 Thunberg管에 第3表와 如히 試藥을 加하여 Methylene-blue의 脫色時間을 測定하였다.

第三表

|                             |       |           |
|-----------------------------|-------|-----------|
| Glucose (m/6)               | 1.0cc | Main Tube |
| Phosphate buffer (PH=7.0)   | 0.5 " |           |
| Methylen blue (m/1000)      | 0.5 " |           |
| Dist water                  | 1.0 " |           |
| Enzyme Solution             | 1 "   | Side Tube |
| Cu SO <sub>4</sub> Solution | 1.0 " |           |

## 3. 實驗結果

實驗 1. 抵抗菌의 出現과 復歸의 檢討  
MH培地에 硫酸銅을 加하여 母株菌을 培養하였을 境遇 銅의 生長阻害作用을 0.2m M의 濃度에서 부터 나타났고 3mM에서는 全히 Colony 形式이 不可能하였다.

한편 低濃度에서 漸次的으로 高濃度로 移植한 菌株은 (各濃度의 培地에서 接種한 菌이 定常期에 達하였을때 다음 濃度의 培地에 移植하였을) 10mM의 銅培地에서도 生育이 可能하였으며 이 菌을 R<sub>100</sub> 菌이라 稱하였다. (第4表) 1mM 銅培地에 母株菌을 接種하면 細胞는 出芽에 이르는 時間이 길어지고 出芽한 娘細胞는 屢사리 分離되지 않는다. 그러나 同濃度의 培地에 繼續培養하면 個個의 細胞로 分離된다. 1mM 銅培地에 對한 抵抗菌 (以下 Rib 菌이라稱함)은 褐色의 色素를 形成하여 Rib菌의 Colony는 褐色을 나타낸다. 그러나 Rib菌을

無銅培地에 接種하면 色素形成을 일어 나지 않는다. 色素形成은 生育이 可能한 모든 高溫度의 銅培地에서 일어난다. Rib菌을 1mM 銅培地에서 뿐만아니라 2,3,4,5,6,7mM의 銅培地에서도 Colony를 形成하여 (第4表)이 性質은 Rib菌出現의 尺度로서 利用하였다.

5cc의 Henneberg Media와 Malt-Henneberg media에  $5 \times 10^4$ 의 菌을 接種하여 이 培養液의 單位容積 (1/100mm<sup>3</sup>)內에서 生菌數의 變化를 觀察한 結果는 第一圖와 같다.

第4表 各濃度培地에서의 Colony 形成狀況

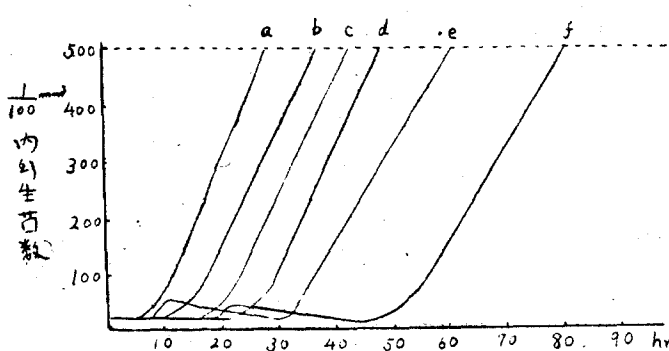
| 濃度      | 0.2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| 母株菌     | +   | + | + | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  |
| Rib 菌   | +   | + | + | + | + | + | + | + | + | - | -  | -  |
| Rib(o)菌 | +   | + | + | + | + | + | + | + | + | - | -  | -  |
| Rlob菌   | +   | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | -  |

第5表 生菌數가 500에 達한 時間

| 區 | 時 間    |
|---|--------|
| a | 27 hrs |
| b | 36 "   |
| c | 42 "   |
| d | 48 "   |
| e | 59 "   |
| f | 80 "   |

Rib菌을 無銅培地에 培養하려는 抵抗性의 復歸가 일어나는가를 實驗하기 위하여 6日間 無銅培地에 培養한 Rib菌과 9日間 無銅培地에 培養한 Rib菌을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7m/M의 MH銅培地에 接種하여 Colony의 形成이 일어나는가를 本結果 第4表에 表示된바와같이 Colony의 形成이 일어난을 보았다. (無銅培地에 培養한 Rib菌을 Rib(o)菌이라 稱함)

第1圖 生菌數의 變化(其一)



- 時 間
- a. 母株菌을 無銅 MH培地에 接種한 培養
  - b. 母株菌을 無銅 H培地에 接種한 培養
  - c. Rib菌을 1mM銅 H培地에 接種한 培養
  - d. Rib菌을 1mM銅 H培地에 接種한 培養
  - e. 母株菌을 1mM銅H培地에 接種한 培養
  - f. 母株菌을 1mM銅H培地에 接種한 培養

實驗 II. 母株菌과 Rib菌의 Alcohol 醱酵能比較

Meissel醱酵裝置에의 50cc의 醱酵液을 넣고 母株菌과 Rib菌의 Alcohol 醱酵能을 比較해본 結果는 第6表와 같다.

第6表에서 보는바와 같이 母株菌은 第4日이던 CO<sub>2</sub>排出이 끝나고 Rib菌은 第5日에 CO<sub>2</sub>排出이 끝났으며 CO<sub>2</sub> 生成量은 母株菌이 Rib菌보다 優勢함을 알수있다.

第7表 銅培地에서의 Colony 形成狀況

|            |       | 7 2 時 間 |   |   |   |   |   |   | 120 時 間 |   |   |   |   |   |   |
|------------|-------|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|
|            |       | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 母株菌의 抽出液   | 0.5cc | +       | + | - | - | - | - | - | +       | + | - | - | - | - | - |
|            | 1 cc  | +       | + | - | - | - | - | - | +       | + | - | - | - | - | - |
| Rib 菌의 抽出液 | 0.5cc | +       | + | - | - | - | - | - | +       | + | + | + | + | + | - |
|            | 1 cc  | +       | + | - | - | - | - | - | +       | + | + | - | - | - | - |

實驗 III. Rib菌體抽出液의 母株菌에 미치는 影響

試驗管에 5cc의 Henneberg液을 넣고 여기에 菌體抽出液 0.5cc乃至 1cc를 各各 加

第6圖 母株菌과 Rib의 Alcohol醱酵能液

|      |   | 初重量<br>第1日 | 第2日   | 第3日   | 第4日   | 第5日   |
|------|---|------------|-------|-------|-------|-------|
| 母株菌  | a | 173.3      | 171.5 | 171.3 | 171.1 |       |
|      | b | 200.4      | 198.6 | 198.4 | 198.4 |       |
|      | c | 200.0      | 198.4 | 198.2 | 198.0 |       |
|      | d | 203.3      | 199.1 | 198.8 | 198.6 |       |
| Rib菌 | a | 202.9      | 202.5 | 201.8 | 201.4 | 201.2 |
|      | b | 203.3      | 203.1 | 202.1 | 201.5 | 201.5 |
|      | c | 205.4      | 205.0 | 204.1 | 203.8 | 203.6 |
|      | d | 195.5      | 195.1 | 194.2 | 194.1 | 194.0 |

[母株菌의 CO<sub>2</sub>生成量平均値 20gr  
[Rib菌의 CO<sub>2</sub>生成量平均値 1.7n

하나 120時間接觸區에서는 Rib菌體抽出液 0.5cc加한 菌이 6mM銅培地에서까지 Colony를 形成하고 母株菌體抽出液을 加한 菌은 3mM 以上에서는 Colony를 形成하지 못하는 것으로 보아 Rib菌體抽出液은 明白히 抵抗性を 誘導하는 作用이 있음을 알수있다.

第9表 Methylen blue의 脫色時間

| 濃度<br>(mM) | 時間<br>(分) | treatment<br>control × 100<br>(%) |
|------------|-----------|-----------------------------------|
| Control    | 8         | 100                               |
| 0.1        | 9         | 89                                |
| 0.25       | 11        | 80                                |
| 0.5        | 15        | 53                                |
| 0.75       | 27        | 30                                |
| 1          | 52        | 15                                |
| 2          | 90        | 8.9                               |
| 3          | 140       | 5.9                               |
| 4          | 230       | 3.5                               |
| 5          | —         | 0                                 |

個體가 藥物感受性에 關하여 不均一 (Mutation and Selection Theory) 한가 하는에 있는것이다.

여기서 筆者等の 實驗結果를 考察하여 보건제 第1圖의 生菌數의 變化曲線을 보면 母株菌을 1mM銅培地에 接種한 區에서는 反듯이 一段 生菌數의 減少가 有은後 다시 增加하게 되는것을 알수있다.

이러한 現象은 他區 (a, b, c, d의 曲線에서는 볼수없는 現象으로서 이 時間에 Popneation 中の 各個體가 Selection을 받는데 基因라는 것으로 생각된다. 柳田等<sup>14</sup>도 Survivor 濃度關係曲線을 求하여 細菌의 藥物感受性이 均一지 않음을 報告하였거니와 本實驗에 있어서도 硫酸銅에 對한 酵母菌의 感受性이 均一지 않음을 알수있다. R'd菌을 無銅培地에 培養하였다가 다시 銅培地에 移植하였을 境遇에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7mM銅培地에서 Colony의 形成이 이러한다는것은 抵抗性的의 復歸가 없다는것을 意味하는 것이며 따라서 抵抗性이라는것은 單純한 適應에 依한 것이 아니라 Demerec가 主張하는바와 같이 遺傳的인 變化에 依한것이라는것을 알수있는것이다.

하여 이 Media內에서의 生菌數의 變化와 72時間 120時間 培養後에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mM銅 MH寒天培地에 接種하여 Colony形成有無를 調査하였다.

第2圖는 生菌數의 變化를 表示하고 第7表는 Colony形成有無를 表示한것이다.

第2圖에서 보는바와 같이 母株菌과 Rib菌의 抽出液은 모두 母株菌의 增殖을 促進하는 傾向이 있음을 볼수있으나 1m 銅培地에는 促進作用의 效果가 보이지 않으며 母株菌의 銅培地에서의 生菌變化曲線에도 影響을 주지못하고 있음을 알수있다.

第7表를 보면 72時間 接觸區에서는 모두 3m M 以上の 銅培地에서 Colony를 形成하지 못

한다. 6mM銅培地에서까지 Colony를 形成하고 母株菌體抽出液을 加한 菌은 3mM 以上에서는 Colony를 形成하지 못하는 것으로 보아 Rib菌體抽出液은 明白히 抵抗性を 誘導하는 作用이 있음을 알수있다.

實驗 IV. 脫水素酵素作用에 빛이는 硫酸銅의 影響

硫酸銅에 依한 Methylen blue의 脫色時間의 延長은 第9表와 같다

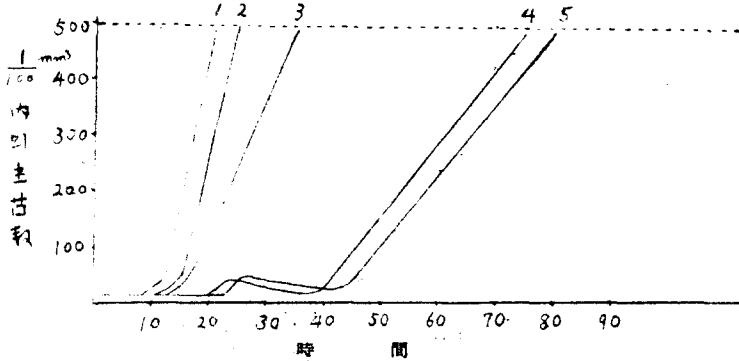
第9表에서 보는바와 같이 硫酸銅은 脫水素酵素의 作用을 阻害함이 顯著하다.

第2圖

四 考 察

微生物의 抵抗性獲得現象의 機作에 關한 Luria, Demerec 一派의 Mutation and Selection theory와 Hinshelwood 一派의 adaptation theory에 있어서 兩說의 本的差異는 Popneation을 構成하는 各

第2圖 生菌數의變化(其二)



第8表 生菌數가500에 達하는 時間

| 區 | 時 間   |
|---|-------|
| 1 | 22hrs |
| 2 | 25 "  |
| 3 | 35 "  |
| 4 | 76 "  |
| 5 | 80 "  |

1. Rib菌抽出液 1cc를 加한 無銅H培地에서의 生菌數變化曲線
2. Rib菌抽出液 0.5cc를 加한 無銅H培地에서의 生菌數變化曲線
3. 蒸溜水 1cc를 加한 無銅H培地에서의 生菌數變化曲線
4. Rib菌抽出液 1cc를 加한 1mM銅 H培地에서의 生菌數變化曲線
5. Rib菌抽出液 0.5cc를 加한 1mM銅 H培地에서의 生菌數變化曲線

以上의 本研究에 있어서의 두가지 現象 (生菌數의 變化와 復歸)은 抵抗性獲得의 機作에 關한 Lusia, Demerec의 Mutation and Selection theory를 支持하는 結果가 되는것이다.

銅培地에서 褐色色素를 形成하는 抵抗菌이 無銅培地에서 色素를 形成하지 않는것으로 보아 色素形成에는 銅의 存在가 直接的으로 影響하는것으로 볼수있다.

Alcohol發酵能에 있어서 Rib菌은 母株菌보다 低下한것을 보여주는데 이것은 抵抗性變異菌이 그의 代謝過程에도 變化가 일어났음을 말하는것으로서 前述한 Macleod<sup>6)</sup>와 Mckinney J Mellon의 實驗結果와 一致하는것이다. Rib菌의 抽出液이 母株菌에 抵抗性을 附與하였다는것은 이 抽出液중에 特殊한 作用性物質이 있음을 말하는것으로서 結論에서 말한바 柳島等의 S. ellipsoideus, Hotchkiss의 Pneumococcus와 岡田等의 大腸菌의 結果에 이어 發見된것으로 特別히 注目할 일이다.

硫酸銅의 發育阻害作用의 機作을 究明하기 위하여 硫酸銅의 脫水素酵素作用에 미치는 影響을 보았던바 從來 從來 發育阻害作用의 機作에 關해서는 大體로 三型으로 나누고 있는데<sup>1)</sup> 培養基에 加한 毒物이 첫째 酸化還元電位의 攪亂을 일으키는 境遇 둘째 發育에 必要한 必須代謝物과 結合하는 境遇 셋째 酵素 또는 該酸素類의 基質과 抵抗하는 境遇等이다.

이제 筆者等의 實驗結果를 볼때 上記한 內容中 第三項과 一致하는 것이라고 생각된다.

上記한 筆者等의 實驗結果를 綜合的으로 考察하여 보면 S. cerevisiae에 있어서 硫酸銅에 對한

1. 抵抗性變異菌의 出現機作은 Mutation J Selection에 依한것이며
2. 抵抗性變異菌은 母株菌과 그 物質代謝에 變化가 있다는것
3. 抵抗菌은 抵抗性을 誘導할수있는 物質을 生産한다는것
4. 硫酸銅은 脫水素酵素作用에 阻害物質이라는것등을 알수 있는것이다.

### 五 摘 要

硫酸銅含有培地에 Saccharomyces Cerevisiae를 培養하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 硫酸銅의 酵母菌에 對한 發育阻害作用은 0.2mM銅培地에서부터 始作하고 3mM銅培地에서는 完全히 Colony의 形成을 不可能하게 한다. 그러나 Rib菌은 7mM 銅培地에서도 Colony를 形成하여서 이 性質을 Rib菌出現에 尺度로 利用하였다.

2. 低濃度培地에서 漸次的으로 高濃度培地로 移植한 菌株은 10mM에 銅培地에서도 生育이 可能하였다.
3. Rib菌은 銅培地에서 褐色色素를 形成한다.
4. Rib菌의 抵抗性은 無銅培地에서도 復歸하지 않는다.
5. 抵抗菌의 出現機作은 Mutation J Selection에 依한것이다.
6. Rib菌은 母株菌보다 Alcohol醱酵能이 低下한다.
7. Rib菌은 抵抗性을 誘導하는 物質을 生成한다.
8. 酵母의 脫水素의 作用은 硫酸銅에 依하여 阻害를 받는다.

#### 文 獻

- 1) Demerec, M; Proc. natl. Acad. Sci. U.S. 31., 16 (1945)
- 2) Doudoroff, M; Jour. Gen. Physiol. 23, 585 (1940)
- 3) Hinshel wood. N; The Chemical kinetics of the Bacterial cell, Oxford (1946)
- 4) 廣田幸敬; 遺雜 28., 4 (1953)
- 6) Hotchkiss, R.D; Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 16, 457 (1951)
- 7) Luria, S. E; Bact. Rev. 11., 1 (1947)
- 8) Macleod, C. M; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 41., 215 (1939)
- 9) Maxnney, R.A. and Mellon, R.R; J. Inf. Dis. 68, 233 (1941)
- 10) 岡田利彦外二名; 遺雜, 28, 4 (1953)
- 11) Pryce J Hinshelwood; Trans Faraday Soc., 43, 742 (1947)
- 12) Rollin D. J Hotchkiss; Exptl. Cell Resevch, Supplement. 2 (1952)
- 13) Woefgang Laskowsky; Science 121, 8139 (1955)
- 14) 柳田友道外二名; 藥物에 對한 細菌의 抵抗性獲得現象, 生物의 變異性 (1954)
- 15) 柳田友道; 酵素化學の遺步 第一集 (1947)
- 16) 柳島直彦外四名; 酵素의 變異現象에 關한 研究, 生物의 變異性 (1954)
- 17) chemical Abstracts. 40, 5362 (1946)
- 18) Wm. V. Trope & R. Tecwyr williams; J. chem. soc. 494 (1937),
- 19) Maxcel peronner & Rene Trnhant; J. pharm. chem. 18, 339—43 (1933)
- 20) M. wagenaar; chem. Abstract. 26 3373 (1932)
- 21) Hanns; chem. Zen. 1909 11 633
- 22) Hanns; chem. Zen. 1906 1 89
- 23) Moulin; Bl, 29 (3) 273
- 24) Weimans; chem. Zen. 1893 11 830
- 25) Ripper; Monatscheffe, 21 1084
- 26) La:tens:hlagor; Ar. 256. 87 (1918)
- 27) Nathan Rubin & Albeit Bloom.; Am J phavn, (1936) 188, 387—388
- 28) H.W. Lemon; Anal Chem. 19, 846—9 (1947)
- 29) Elna Diding & Hans Hefl berg; Chem. Abst 42 3283 (1948)
- 30) A. Castro.; Chem Abst. 37. 2307 (1943)