

Adenine 要求變異株의 分離에 關한 研究

金 浩 植 · 李 春 寧 · 李 啓 瑚

서울大學校 農科大學

金 尙 淳*

淑明女子大學校*

(1969年 2月 28日 受理)

Studies on the Isolation of Auxotrophic Mutants of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

H.S.Kim, C.Y.Lee, K.H.Lee

College of Agriculture, Seoul National University

S.S.Kim*

Sook Myung Women University*

Summary

In order to obtain amino acids and nucleic acid derivatives from adenine auxotrophic mutants of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, vitamin, nucleic acid analogue, streptomycin as well as ultraviolet light were adopted for the production of adenine auxotrophic mutants and the results showed efficient production of desired mutants.

1. Ultraviolet ray (2530 Å 2080 erg/mm²) irradiation to *Bacillus subtilis* and *E. coli* at a distance of 30 cm for 80—90 sec. and for 15—20 sec. respectively induced four and eight strains of auxotrophic mutants.

2. Treatment of aminopterin (200 µg/ml) inhibited the growth of *Bacillus subtilis* significantly but a subsequent irradiation of ultraviolet light at the above mentioned conditions induced six times as much mutants as compared to the irradiation alone. In case of *E. coli* a similar tendency was observed

with treatment of streptomycin (200 µg/ml) with doubled induction rate of adenine auxotrophic mutants as compared to the irradiation alone.

緒 論

Amino 酸 및 核酸 關連 物質을 醱酵 生産하는데 工業의 으로 應用하기 爲하여 榮養 要求 變異 株를 利用 하려 하고 있다.

榮養 要求 變異 株를 分離 育成코져 Davis 等에 依한 Penicillin screening method^(1,2) Gorini 等에 依한 Replica method^(3,4) Iyer 等에 依한 Heat shock method⁽⁵⁾ 그리고 Kojima 等에 依한 U.V.-ray 其他 方法^(6,7,8) 等이 報告 되었다.

本報에서는 Gram positive bacteria 인 *Bacillus subtilis*, Gram negative bacteria 인 *E.coli* 에 對하여 核酸 및 Vitamin analogue 와 Streptomycin 그리고 U.V.-ray 處理로서 Adenine 要求 變異 株를 分離하는데 檢討한 結果를 報告하는 바이다.

實驗 方法

1) 供試菌株 : *Bacillus subtilis* 429-1~5

E. coli 921-1~5

2) 培地 : 最少培地(Minimum media)로서 Gray and Tatum⁽⁹⁾의 培地를 使用하였고 補強培地(Enriched media)로서 各 Minimum media에 Vitamin free casamino acid 0.3 g, Cysteine or Cystine 50 mg, Threonine 20 mg, Tryptophane 25 mg/l 그리고 또는 Vitamin mixture⁽¹⁰⁾를 加한 培地를 使用하였으며 完全培地(Complete media)로서 代用肉汁⁽¹¹⁾을 利用하고 各培地의 pH는 7.0으로 調整하여 Agar 2.0%를 加하여 固體培地로 使用하였다.

Table 1. Composition of Minimum Media

| M-1 media (for <i>Bac. subtilis</i>) ⁽⁸⁾ | | M-2 media (for <i>E. coli</i>) ⁽¹⁰⁾ | |
|---|---------|--|---------|
| NH ₄ Cl | 5 g | NH ₄ Cl | 5 g |
| (NH ₄) ₂ CO ₃ | 5 g | Na ₂ SO ₄ | 2 g |
| K ₂ HPO ₄ | 6 g | K ₂ HPO ₄ | 3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g | KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| Glucose | 1 g | Glucose | 0.5g |
| Polypeptone | 0.3g | NH ₄ NO ₃ | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1g | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1g |
| Distilled water | 1000ml. | CaCl ₂ | 10mg. |
| | | Distilled water | 1000ml. |
| pH | 7.0 | pH | 7.0 |

3) Mutagen:

- ① 8-Azaguanine (Cal.Bio.Chem.Co.) 100μg/ml.
- ② 8-Azaxanthine (Cal.Bio.Chem.Co.) 100μg/ml.
- ③ 6-Azathymine (Cal.Bio.Chem.Co.) 100μg/ml.
- ④ 6-Azaauracil (Cal.Bio.Chem.Co.) 100μg/ml.
- ⑤ Aminopterin (Cal.Bio.Chem.Co.) 100~200μg/ml.

- ⑥ Streptomycin (Pfeizer Co.) 20~200μg/ml.
- ⑦ U.V.-ray(2530 Å) irradiation, Intensity: 2080 erg/mm², Irradiation: 5, 10, 15, 20, 30~70, 75, 80, 85, 90, 100 sec.

4) Mutation:

*Bacillus subtilis*를 M-1 media 6 ml에 *E. coli*를 M-2 media 6 ml에 各各 接種하여 37°C에서 18時間 培養(對數增殖期인것)한 것을 種菌으로 하고 이 種菌 0.1 ml.를 所定의 Minimum media 各 5 ml(Mutagen ①~⑥이 各各 含有됨)에 接種하고 37°C에서 24時間 Shaking culture 하고난 다음 Adenine sulfate solution(2 mg/ml.) 1 ml를 無菌의으로 添加한 다음 繼續 37°C에서 24~48時間 Shaking culture

를 한 即時 -20°C의 冷凍室에서 一夜放置(暗所)함으로서 處理를 끝냈다. 그리고 희석한 0.5 ml를 Complete agar가 들어있는 Petri dish에 Plate culture 한後 生成되는 Colony를 Replica-plating method로써 Adenine이 補強된 M-1, M-2 media와 Minimum media에 Printing하고 培養하여 比較함으로서 一次로 Adenine 要求變異株를 選拔하였다. 한편 Complete agar에 生成된 Adenine 要求變異株가 아닌 一般 Colony를 採菌하여 Minimum media에서 Viable cell 10⁵/ml으로 하여 이 5 ml를 Magnetic stirrer가 들어있는 φ 9 cm Petri dish에 取하여 Mutagen^⑦인 U.V-ray照射로서 Adenine 要求變異株를 二次選拔케 하였다.

5) 細菌의 增殖度

培養 및 Mutagen 處理에 따른 菌의 增殖度測定은 生菌數를 Pour plate method로써 Total viable cell counting하고 한편 Turbidity를 Coleman junior spectrophotometer로 620 mμ에서 Optical density를 測定比較하였다.

結果 및 考察

*Bacillus subtilis*를 M-1, E-1, C-1 media에 *E. coli*를 M-2, E-2, C-2 media에 接種하여 37°C에서 培養하여 時間別로 增殖度를 比較하여 增殖曲線으로서 Fig. 1에 表示하였다. 對數增殖期의 種菌을 接種한後 培養 7時間에 이르러 C-1, C-2 media에서 對數增殖期를 나타냈고 E-1, E-2 media는 8~9時間後에 M-1, M-2 media에서는 11時間後에야 對數增殖期가 始作됨을 보여주었다.

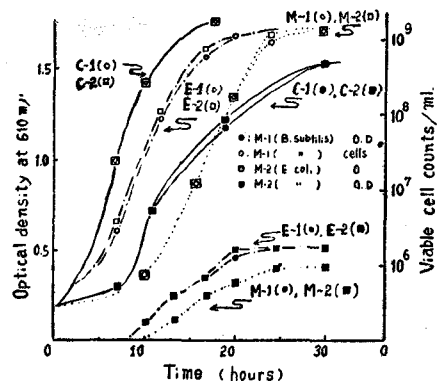


Fig. 1. Growth curves of *Bacillus subtilis* and *E. coli*

Mutagen ①~⑥(reagents) 處理에 依한 Minimum media上에서 細菌의 增殖度를 生菌數 및 O.D.로써 表示한 것은 Table 2.에서와 같다.

Table 2. Influence of Reagents on the Growth of *Bacillus subtilis* and *E. coli*

| Reagents | Conc. | | Viable cell counts/ml. (upper line) Optical density at 620 mμ (lower line) | |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| | 0 time | | 24 hours | |
| | M-1 | M-2 | M-1 (<i>Bac. subtilis</i>) | M-2 (<i>E. coli</i>) |
| None | 4.6×10^5 0.01 | 4.7×10^5 0.01 | 1.4×10^9 0.35 | 1.5×10^9 0.36 |
| 8-Azaguanine | 100 μg/ml | | 1.2×10^9 0.37 | 1.4×10^8 0.29 |
| 8-Azaxanthine | 100 μg/ml | | 1.5×10^9 0.36 | 1.9×10^8 0.34 |
| 6-Azathymine | 100 μg/ml | | 1.8×10^9 0.37 | 2.1×10^9 0.35 |
| 6-Azauracil | 100 μg/ml | | 1.1×10^9 0.37 | 2.0×10^9 0.36 |
| Aminopterin | 100 μg/ml | | 2.0×10^8 0.32 | 1.3×10^9 0.34 |
| Aminopterin | 200 μg/ml | | 4.1×10^8 0.01 | 1.2×10^8 0.30 |
| Streptomycin | 200 μg/ml | | 2.4×10^4 0.04 | 6.4×10^3 0.01 |
| Streptomycin | 20 μg/ml | | 1.8×10^8 0.31 | 1.5×10^5 0.29 |

藥劑處理後 24 時間 37°C에서 培養하였을때 Purine analogue 인 Mutagen ①~④은 菌의 增殖을 阻止하지 않은 것을 볼수있고 Aminopterin 및 Streptomycin 200 μg/ml 添加區는 *Bacillus subtilis*의 增殖을 顯著하게 阻止하였으며 한편 *E. coli*의 增殖 阻害作用이 顯著한 것은 Streptomycin 200 μg/ml 임을 알았다.

Streptomycin 200 μg/ml 은 Gram 陽性菌인 *Bacillus subtilis*와 陰性菌인 *E. coli*의 增殖阻止作用이 있는 데 Aminopterin 은 陰性菌인 *E. coli*의 增殖阻止能은 僅少함을 보여주어 興味있는 것임을 알았으므로 *Bacillus subtilis*에 對하여는 Aminopterin 을 *E. coli*에 對하여는 Streptomycin 을 處理하고 時間에 따른 生菌數의 消長을 Fig. 2에 表示하였다.

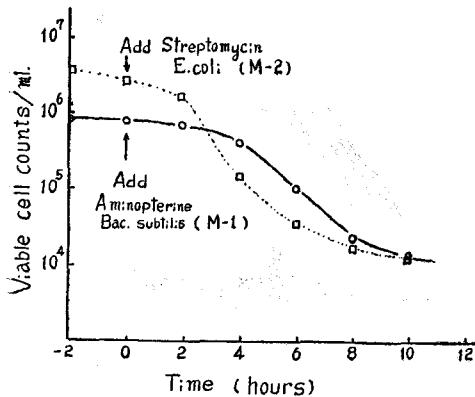


Fig. 2. Effect of reagents on the *E. coli* and *Bacillus subtilis*

Streptomycin(200 μg/ml) 處理된 *E. coli*는 處理後 2 時間에서 급격하게 生菌數의 減少를 보이는데 Aminopterin(200 μg/ml) 處理된 *Bacillus subtilis*는 處理後 4 時間부터 生菌數가 減少함을 보였으며 두 가지 藥劑處理에 依한 두菌이 處理後 10 時間에 비슷한 生菌數가 됨을 알았다.

Bacterial suspension(viable cells 2.1×10^4 /ml)에 對하여 U.V.-light 照射時間에 따라 Viable cell을 測定한 結果를 Table 3에 表示하였다.

Table 3. Effect of U.V-ray Irradiation on Bacterial Cells

| Time exposure to U.V.-light | Viable cell counts/ml | |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>E. coli</i> |
| 8 sec | 1.8×10^4 | 6.5×10^2 |
| 10 " | 1.7×10^4 | 2.1×10^2 |
| 15 " | 1.5×10^4 | 6.1×10 |
| 20 " | 1.4×10^4 | 1.2×10 |
| 30 " | 1.2×10^4 | — |
| 40 " | 0.8×10^4 | — |
| 50 " | 7.2×10^3 | — |
| 60 " | 4.8×10^3 | — |
| 70 " | 8.2×10^2 | — |
| 80 " | 7.1×10 | — |
| 90 " | 10 | — |
| 100 " | — | — |

Bacterial suspension(saline): Viable cell 2.1×10^4 /ml

U.V.-ray(2530 A, 2080 erg/mm², distance 30 cm) 에서 Bacterial viable cell 이 *Bacillus subtilis* 의 경우 50~60 sec.에서 顯著히 減少하기 始作하여 80~85 sec.인때 그리고 *E. coli* 인 경우는 10 sec.에서 顯著히 減少하였으며 15 sec.照射인 때 突然變異가 잘 일어나는 것으로 생각되고 그 以上の 長時間照射區에서는 生殘細胞가 全無하게 死滅되었다.

Bacillus subtilis 를 Aminopterin(200 µg/ml) 處理區와 無處理區에 各各 U.V.-light 를 照射시켜 얻어지는 榮養要求株를 Table 4에 表示하였다. Aminopterin 處理區이든 無處理區이든 80 sec.照射한 區에서 榮養要求變異株의 出現이 많았고 特히 Aminopterin 處理區에서 無處理區의 6倍가 많은 12株를 얻었다.

한편 *E. coli* 의 경우는 15 sec.照射區에서 變異株 出現率이 많았고 더우기 Streptomycin(200 µg/ml.) 處理區에서 無處理區의 2倍가 더 出現했음이 Table 5에서 나타내고 있다.

榮養要求變異株를 分離하는데 Gram 陽性이고 胞子形成細菌인 *Bacillus subtilis* 는 Aminopterin 處理와 U.V. -light 을 같이 照射하고 한편 Gram 陰性菌인 *E. coli* 는 Streptomycin 處理와 U.V. -light 를 照射함으로써 榮養要求變異株를 効率的으로 分離育成할 수 있음을 알았다.

Table 4. Isolation of Auxotrophic Mutants of *Bacillus subtilis* by Aminopterin

| Time of exposure to U.V. -light | No. of Auxotrophic Mutants | |
|---------------------------------|----------------------------|-----------|
| | Non treatment | Treatment |
| 75 sec | 1 | 6 |
| 80 " | 2 | 12 |
| 85 " | 1 | 5 |
| 90 " | — | — |
| | 4 | 23 |

Table 5. Isolation of Auxotrophic Mutants of *E. coli* by Streptomycin Treatment

| Time of exposure to U.V. -light | No. of Auxotrophic mutants | |
|---------------------------------|----------------------------|-----------|
| | Non treatment | Treatment |
| 10 sec | 1 | 3 |
| 15 " | 5 | 11 |
| 20 " | 2 | 4 |
| 25 " | — | — |
| | 8 | 18 |

Bacillus subtilis 를 Aminopterin, 그리고 *E. coli* 를 Streptomycin 을 各各 處理한 後 U.V.-light 를 照射하여 *Bacillus subtilis* Auxotrophic mutants 27株와 *E. coli* Auxotrophic mutants 26株를 얻어 Auxanography 法으로 各 E-media 에서 確認한 結果를 Table 6에서 表示하였다.

Table 6. Auxotrophic Mutants Obtained in the *Bacillus subtilis* and *E. coli*

| Supplements required | No. of Obtained mutants | |
|----------------------|---|------------------------------------|
| | <i>Bac. subtilis</i> by the Aminopterin | <i>E. coli</i> by the Streptomycin |
| Adenine | 8 | 3 |
| Guanine | 2 | 1 |
| Hypoxanthine | 3 | 4 |
| Uracil | 1 | — |
| Thymine | 1 | — |
| Cytosine | — | 1 |
| Vitamines | 4 | 5 |
| Amino acids | 8 | 12 |
| Total | 27 | 26 |
| Purine | 13 | 8 |

Adenine auxotrophic mutants 8株

Guanine auxotrophic mutants 2株

Hypoxanthine auxotrophic mutants 3株

Purine 要求變異株가 13株가 *Bacillus subtilis* 를 Aminopterin 處理로서 核酸合成을 억제 시킨다음 Adenine sulfate 를 供給시켜서 變異가 잘 야기되게 한 것으로 보여지며 이것은 *E. coli* 의 Streptomycin 處理로 얻어진 Purine 要求株 8株보다 約 1.5倍가 더 分離育成됐다고 볼 수 있다. 이와같이 核酸合成 機作을 阻止하여 菌生育이 안되게 한 다음 Adenine sulfate 같은 Purine base 를 外部에서 供給시켜서 突然變異가 일어나게 하는 어떤 作用이 있는것 같아 이에 對한 研究은 앞으로 興味있는 課題가 될 것으로 생각하는 바이다.

要約

Amino acid 核酸關連物質等을 醱酵生産하는데 應用키 爲하여 Adenine auxotrophic mutants 를 分離하려고 Gram positive 이며 Spore forming bacteria 인 *Bacillus subtilis* 및 Gram negative bacteria 인 *Escherichia coli* 를 試驗菌株로 하였다.

이들 菌株에 U.V.-light 處理와 그리고 Vitamin 및 核酸 Analogue 와 Aminopterin, Streptomycin 處理로서 効率 좋게 Adenine auxotrophic mutants 를 分離하였다.

1. U.V. -light(2530 Å, 2080 erg/mm², distance 30 cm) 80~90 sec. 照射가 *Bacillus subtilis* 의 Auxotrophic mutants 4株 그리고 *E. coli* 에 15~20 sec. 照射는 Auxotrophic mutants 8株를 分離하는데 最適條件임을 알았다.

2. *Bacillus subtilis* 에 對하여 위의 最適條件으로 照射하는데 Aminopterin(200 µg/ml.) 處理區가 生育을 顯著히 阻止시켰고 無處理區보다 더욱 效果的으로 Adenine 要求變異株를 約 6倍程度 더 分離케 하였다.

E. coli 에 對하여도 위의 最適條件으로 照射하는데 Streptomycin(200 µg/ml) 處理區는 生育을 顯著히 阻止시켰고 無處理區보다 Adenine 要求變異株를 2倍나 效果的으로 分離할 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Davis, B. D.: J. Am. Chem. Soc., 70, 4267 (1948)
2. Lederberg, J. and Zinder, N.: J. Am. Chem. Soc., 70, 4267 (1948)
3. Lubin, M.: J. Bact., 83, 696 (1962)
4. Gorini, L.: Science, 131, 604 (1960)
5. Iyer, V.: J. Bact., 79, 309 (1960)
6. Kojima, M., Koaze, Y. and Hara, T.: Agr. Biol. Chem., 26, 655 (1962)
7. 石田宙夫, 瀬戸進, 大澤岳義, 山本外男: 日農工, 44, 203 (1966)
8. Okada, T., Homma, J. and Sonohara, H.: J. Bact., 64, 602 (1952)
9. Ryan, F.J., Schneider, L.K.: Genetics, 34, 72 (1949)
10. 東京大學 農藝化學教室: 實驗農藝化學(上) 269 p 朝倉書店 東京(1960)
11. 東京大學 農藝化學教室: 實驗農藝化學(上) 188 p 朝倉書店 東京(1960)