

Bacillus amyloliquefaciens k의 생육과 α -Amylase 生産에 대한 Tunicamycin의 影響

金奇哲 · 山崎眞狩* · 高月昭* · 田村學造*

忠北大學校 農化學科, 東京大學校 農藝化學科*

(1981년 12월 23일 수리)

Effect of Tunicamycin on the Cell Growth and α -Amylase Production of *Bacillus amyloliquefaciens* K.

Ki-Cheul Kim, Makari Yamaski*, Akira Takatsuki*, Gakuzo Tamura*

Department of Agricultural Chemistry, Chung Buk National University, Cheng-ju, Korea

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo*, Japan

Abstract

The effects of tunicamycin (TM) on the growth and α -amylase productivity of *B. amyloliquefaciens* K were studied. The minimal growth inhibitory concentration was $0.25\mu\text{g/ml}$ and its α -amylase was stable up to 50°C . When the saking culture with $1\mu\text{g/ml}$ of Tunicamycin caused the change of cell shape from rod to irregular circular form and the mycelium lysis. The growth of His⁻, TM^r mutant obtained by treatment of TM and ultraviolet ray was similar to that of the parent strain, but the productivity of α -amylase, protease, and RNase was lower than that of the parent.

緒 論

細菌細胞膜의 作用은 生體高分子化合物의 生合成과 制御作用, 細胞體의 物質透過, 細胞分裂등에 대한 重要한 役割을 하고 있다.

virus가 宿主細胞內에 導入增殖할 경우에도 virus 粒子의 吸着, 菌體構成分의 合成과 成長過程에 대하여도 細胞膜이 直接의으로 密接한 關係를 가지고 있다.

細胞壁의 生合成機構의 解析은 細菌培養液에 penicillin, litomacetin, pancomycin, pathitoracin 등의 選擇의 細胞壁合成阻害劑를 使用함으로써 解

明이 되었다.^{1~8)} 細胞膜成分인 複合糖質은 細菌細胞의 代謝現象에서 大端히 重要한 作用을 하고 있음을 認識하게 되었으며 이들에 대한 構造 및 生合成의 機能도 많이 밝혀지고 있다.

酵素合成部位의 研究는 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase가 膜區分에서 合成됨을 비롯하여 *E. coli*의 細胞 外酵素인 alkaline phosphatase가 膜結合 ribosome에서 合成되는 등 많이 밝혀지고 있다.

細胞膜의 物質透過性은 *B. licheniformis*의 penicillinase가 疎水性의 느러난 部分의 構造를 透過하는 模式圖와 polypeptide의 末端部分의 疎水の 構造가 吸着點이 되어 細胞膜의 lipid 部分에 들

1980年度 文敎部 國費 敎授 海外研修 計劃에 따라 東京大學에서 1980年~1981년에 遂行되었음.

어가 酵素가 膜을 通過하면서 物質을 透過시키게 되는 現象이 밝혀졌다.

近年에 발견한 抗 virus 抗生物質인 tunicamycin은 細胞膜合成의 特異的인 阻害作用으로 virus의 增殖阻害는 물론이거니와 數種의 gram 陽性菌, 酵母, 糸狀菌의 生育까지도 阻害하고 있다.¹⁰⁻¹³⁾

tunicamycin은 virus나 微生物細胞膜 뿐만이 아니라 動物細胞膜의 糖蛋白合成을 阻害하고 形態의 異常型도 誘起한다.

*B. subtilis*에 대해서는 核酸, 蛋白合成을 阻害하지 않고 細胞形態만 變型시켜 細胞壁成分인 glucosamine의 轉入만을 阻害한다고 報告되었다.^{15,16)}

本研究은 tunicamycin에 의한 *B. amyloliquefaciens*의 生育과 酵素生産 및 外形의 異常에 대한 實驗을 하여 몇 가지의 特異한 事項을 얻었기에 이에 報告한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

Bacillus amyloliquefaciens K (IAM1523)과 *Halobacterium salinarium*을 使用하였다.

2. 培地

nutrient broth (N.B.) 및 minimal medium (Davis)를 使用하였다.

3. 培養

a. 液體培養: L 試驗管에 培地 10ml를 注入하여 加壓殺菌(120°C에서 15分)後 前培養菌株을 0.1ml씩 接種하여 37°C 24時間 振盪培養했다.

b. 固體培養: 乾熱殺菌한 petri-dish에 所定濃度(5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 25 μ g/ml)의 Tunicamycin을 透加한 固體培養基로 平板을 만들고 40°C에서 1時間 水分을 乾燥시키고 菌株을 0.1ml씩 接種한後 塗抹棒으로 塗抹하여 37°C에서 培養하였다.

4. 變異誘起

菌株의 變異는 ultraviolet 光線의 照射 및 Tunicamycin을 添加하여 行하였다.

5. 試藥 및 調製

a. α -amylase 活性度 測定試藥¹⁷⁾

b. protease 및 RNase 活性度 測定試藥

2.5% casein 15ml (RNase의 경우는 精製 RNA), 0.2 M-phosphate buffer (pH7.8) 30ml, 1000 μ g/ml chloramphenicol 3ml을 加壓殺菌(120°C에서 15分間)한 2.5% agar 水 100ml에 加하여 잘 식고 全體容量을 150ml로 調定하고 平板培養器에 注加하여 平板을 만들어 protease 및 RNase 活性度測定 培養基로 使用하였다.

6. 酵素液의 調製 및 活性度測定法

a. 酵素液의 調製

供試菌株의 培養液을 5°C에서 8,000rpm으로 10分間 遠心分離하여 上澄液을 酵素液으로 하였다.

b. 平板培養에 의한 活性度測定

調製된 酵素液을 乾熱殺菌한 5mm의 disc에 吸着시키고 上記方法에 依하여 만든 平板에 接種하여 40°C에서 2時間 反應시킨 後 0.1M-I₂와 5% TCA 溶液에 作用시켜 hole의 透明度의 크기의 比로 α -amylase, protease 및 RNase의 分解力을 測定하였다.

c. 液體培養에 의한 活性度測定

0.04M phosphate 및 acetate buffer (pH 6.0)으로 0.5% soluble starch (當日煮沸調製) 2ml에 酵素液 1ml를 加하고 40°C, 10分間 反應시킨 後 0.2ml를 採取하여 0.1M 요오드 溶液 5ml를 加하고 15~30分間 放置하였다가 700nm에서 OD를 測定하였다.

酵素液 代身에 蒸溜水를 使用한 것을 對照區로 하였다. 酵素의 活性度는 다음 式에 依하여 算出하였다.

$$\text{活性度}(u) = \frac{\Delta OD}{OD(i)} \times \frac{100}{\Delta \text{min}} \times \text{dilution ratio}$$

식에서 OD(i)는 反應時間 i分 때의 OD,

$$\Delta OD = OD(i) - OD(j), \text{ (단 } i < j)$$

Δmin 는 j-i

7. TM 耐性 變異

a. 자외선의 感受性^{20,21,22)}: 本菌에 대한 자외선의 感受性을 檢討하기 위하여 培養液의 log phase cell (OD₅₅₀=0.2) 5ml를 tris-maleic acid 酸 緩衝液(pH 6.0)에 懸濁하여 petri-dish에 塗抹하고 자외선을 照射하여 生存率 $\frac{1}{1000}$ 이 되는 照射時間을 求하였음.

b. 營養要求變異^{20,23)}: *B. amyloliquefaciens* K에 變異標記를 넣기 위하여 培養液(log phase cell)

을 常法으로 처리하여 變異源인 자의선을 60秒間 照射한 後 0.1ml를 N.B. agar media에 塗抹하고 37°C에서 12時間 培養하였다.

그후 colony를 replica method로 分離하여 變異株候補로 하였으며 純化시킨 뒤에 auxanography와 α -amylase의 生産力 關係로 營養要求性을 檢討하여 營養要求性變異株로 하였다.

c. His⁻, TM^r 變異株의 分離^{20~25}: 營養要求性 變異株를 常法으로 培養하고 TM耐性菌을 얻기 위하여 TM含有 nutrient broth agar 培養基에 塗抹하여 37°C에서 24~48時間 培養하였다. 이때 發生된 colony를 His⁻, TM^r (*B. amyloliquefaciens* K의 Tunicamycin 耐性 histidin 要求變異株) 變異株로 하였다.

結果 및 考察

1. *Bacillus* 屬 數菌株의 tunicamycin 感受性

a. tunicamycin (TM)의 最小生育沮止濃度(M.I.C.): *Bacillus* 屬 數菌株와 *Halobacterium salinalium*에 대한 TM의 感受性을 檢討한 結果는 表 1과 같다. TM에 대하여 感受性이 가장 예민한 것은 M.I.C.가 0.25 μ g/ml인 *B. amyloliquefaciens* K이고 가장 耐性이 강한 것은 *H. salinalium* (>200 μ g/ml)이다. M.I.C.가 6.5 μ g/ml인 *B. subtilis* NA64는 佐久木¹¹⁾의 結果와 같은 傾向이다.

b. TM이 菌體 生育에 미치는 영향: nutrient broth에 TM을 所定濃度가 되게 添加하여 L試驗管에 10ml씩 分注하고 37°C로 振盪培養한 結果는 그림 1과 같다.

B. amyloliquefaciens K는 0.1 μ g/ml 添加區에서 培養 6時間까지는 계속 生育이 增加되었다가 서서히 減少되고 있으나 1 μ g/ml 添加區는 生育狀態가 급격히 감소되고 있다. *B. licheniformis*는 10 μ g/ml 添加區는 12時間까지 계속적으로 增加되

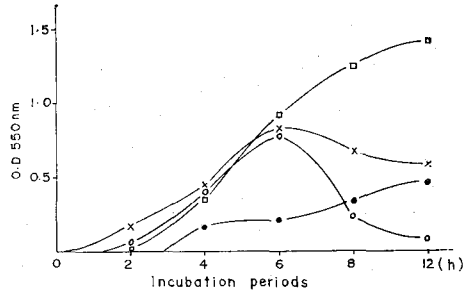


Fig. 1. Growth curve of *B. amyloliquefaciens* K and *B. licheniformis* by the Tunicamycin.

- ×—×: *B. amyloliquefaciens* K (0.1 μ g/ml)
- : *B. amyloliquefaciens* K (1 μ g/ml)
- : *B. licheniformis* (10 μ g/ml)
- : *B. licheniformis* (100 μ g/ml)

고 있으나 100 μ g/ml 區는 增加率이 極히 낮다.

兩菌株 共히 TM의 添加濃度가 높아짐에 따라 生育率이 급격히 減少되었다. 이것은 高月 등^{18,19)}이 TM을 低濃度로 添加培養한 細菌이 生育이 沮害되고 形態가 變形된다는 結果와 같은 傾向이다.

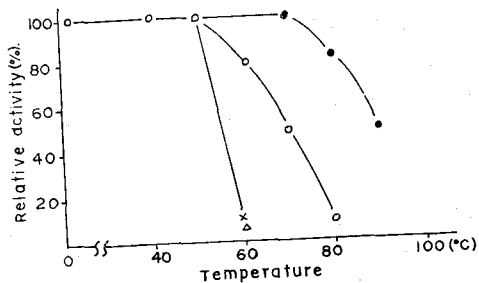


Fig. 2. Heat stability of α -amylase.

- : *B. amyloliquefaciens* K,
- ×—×: *B. subtilis* NA64,
- △—△: *B. subtilis* B₇,
- : *B. licheniformis*

Table 1. Minimal inhibitory concentration (M.I.C.) and α -amylase activity of *Bacillus* and *Halobacterium* by the tunicamycin

Strains	M.I.C. (μ g/ml)	α -amylase activity (μ /ml)
<i>B. subtilis</i> NA64	6.5	51.7
<i>B. subtilis</i> B ₇	50	229.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> K	0.25	1060.0
<i>B. licheniformis</i> IFO 12195	100	236.0
<i>H. salinalium</i>	>200	—

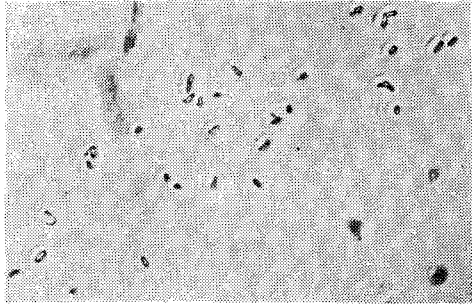


Fig. 3. Cell phase of *B. amyloliquefaciens* K (control)

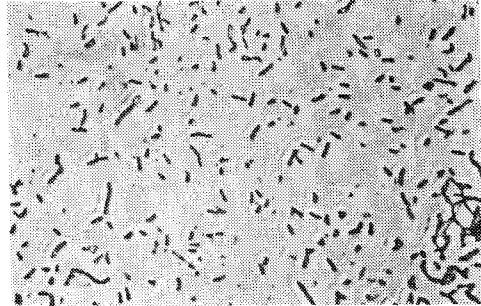


Fig. 4. Cell phase of *B. licheniformis* (control)

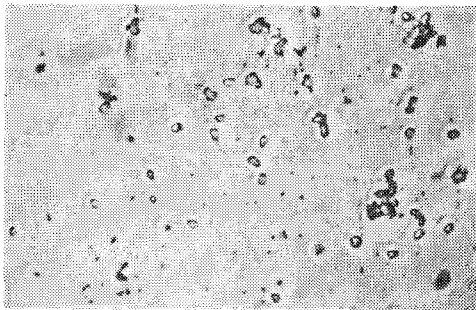


Fig. 5. *B. amyloliquefaciens* K was treated with tunicamycin (0.1 µg/ml) at 37°C and the photographs were taken after a 10-hour period of treatment (×800)

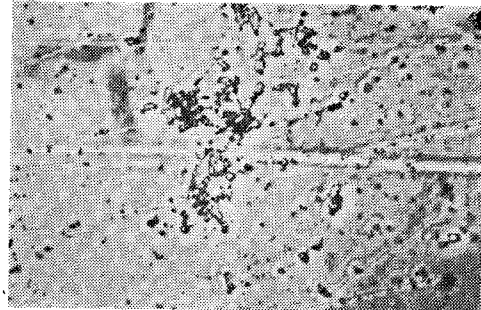


Fig. 6. *B. amyloliquefaciens* K was treated with tunicamycin (1 µg/ml) at 37°C and the photographs were taken after a 10-hour period of treatment (×800)

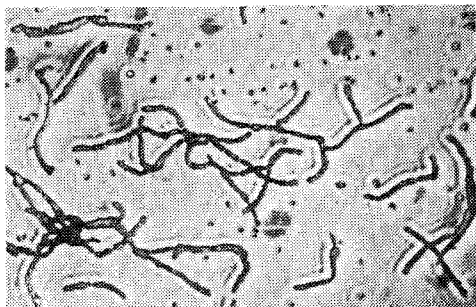


Fig. 7. *B. licheniformis* was treated with tunicamycin (10 µg/ml) at 37°C and the photographs were taken after a 10-hour period of treatment (×800)



Fig. 8. *B. licheniformis* was treated with tunicamycin (100 µg/ml) at 37°C and the photographs were taken after a 10-hour period of treatment (×800)

2. α -amylase의 耐熱性

B. amyloliquefaciens K가 生産한 α -amylase의 耐熱性을 比較檢討한 結果는 그림 2와 같다. 즉, 50°C까지는 安定하였고 70°C에서는 50%가 失活되었으며 *B. subtilis* NA64와 *B. subtilis* B₇보다는 強하고 *B. licheniformis* 보다는 떨어지는 傾向

이었다.

3. TM 添加 培養에 依한 菌體의 變化

nutrient broth에 所定의 濃度로 TM를 添加培養하고 菌體를 經時的으로 檢鏡한 結果 그림 3~11과 같다.

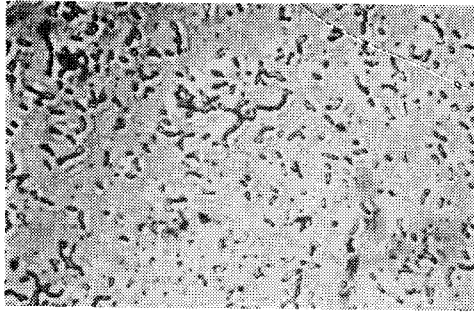


Fig. 9. *B. amyloliquefaciens* K was treated with tunicamycin (0.1 μg/ml) at 37°C and the photographs were taken a 24-hour period of treatment (×800)

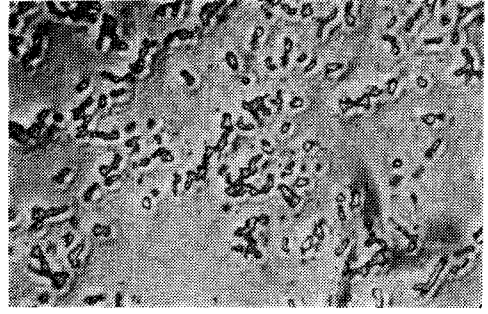


Fig. 10. *B. licheniformis* was treated with tunicamycin (10 μg/ml) at 37°C and the photographs were taken after a 24-hour period of treatment (×800)

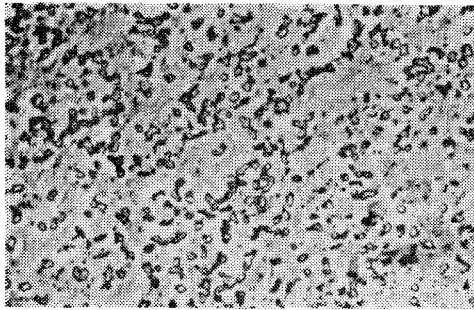


Fig. 11. *B. licheniformis* was treated with tunicamycin (100 μg/mg) at 37°C and the photographs were taken a 24-hour period of treatment (×800)

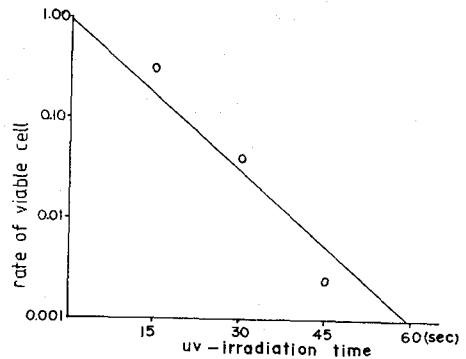


Fig. 12. Curve of viable cell on the UV treated

그림 3, 4는 nutrient broth에 TM 無添加培養한 것으로 對照區이며 *B. amyloliquefaciens* K, *B. licheniformis*는 共に 桿狀을 이루고 있다.

培養 10時間後에는 그림 6의 TM(1 μg/ml) 添加區가 形態의 變形이 가장 심하고 그 정도는 TM (0.1 μg/ml), TM(100 μg/ml), TM(10 μg/ml)區의 順이었다.

이 結果는 TM에 대하여 感受성이 강한 *B. amyloliquefaciens* K가 外形의 變化도 민감하고 반면 耐성이 강한 *B. licheniformis*는 外形의 變化도 늦게 나타나는 것을 알 수 있었다.

培養 24時間後에는 TM (1 μg/ml)區에서 菌體가 全部 溶解되어 培養液이 맑게 되었고 그 외는 그림 9~11의 球形에 가까운 一定치 않은 形態로 變形 되었다.

4. TM 耐性 變異株

a. 本菌에 대한 자외선의 感受성과 生存率關係는 그림 12와 같이 UV線에 대한 變異誘起照射時

間을 60秒로 決定하였다.

b. 營養要求性 變異

UV線의 照射에 의해서 얻은 變異株의 營養要求量을 본 結果는 표 2와 같이 histidine을 要求하고 α-amylase를 生産하는 것은 단 4菌株이며 이들中 α-amylase의 生産력이 큰 *B. amyloliquefaciens*-K-2 (HiS⁻)를 變異株候補로 定하였다.

c. HiS⁻, TM^r 變異株의 分離

K-2 (HiS⁻)에 대한 TM 耐性(TM^r)을 본 結果는 표 3과 같이 44菌株 HiS⁻, TM^r 變異株(*B. amyloliquefaciens* K의 tunicamycin 耐性 histidin 要求變異株)을 얻었다.

TM의 濃度가 낮은 培地에서는 培養 24時間內에 大部分의 colony가 發生하였으나 高濃度의 培地에서는 48時間 培養으로 發生하고 其數도 적다. 이는 TM의 濃度에 影響을 받아 生育이 阻害되었거나 變異率이 減少되었다고 본다.

Table 2. Effect of auxanotrophy and production of α -amylase on the UV treated *B. amyloliquefaciens* K

Strains number	Auxanotrophy	Production of α -amylase
K-1	—	—
K-2	his	+
K-3	his	+
K-4	his	+
K-5	his	+
K-6	—	—

Table 3. Colony number of His⁻, TM^r mutant from *B. amyloliquefaciens* K-2 (His⁻)

TM concentration (μ g/ml)	Colony number of His ⁻ , TM ^r		
	24 hrs	48 hrs	total
3	10	2	12
5	9	1	10
10	6	4	10
20	2	8	10
25	1	3	4
total	28	16	44

5. His⁻, TM^r의 α -amylase 生産

a. 平板에 의한 判定: His⁻, TM^r 變異株의 分離菌 44株에 대하여 平板法에 依하여 α -amylase, protease 및 RNase의 分解力을 比較檢討한 結果는 표 4 와 같이 全般的으로 酵素의 生産量은 親菌株에 比하여 떨어지는 傾向이고 protease 및 RNase는 더욱 甚한 差를 보이고 있는 것은 高月 등¹⁶⁾의 *B. subtilis* α -amylase 및 protease는 TM 存在下에서는 菌體內에 蓄積되고 있다는 結果와 같으며 protease 및 RNase를 産生하지 않은 6個菌株(NO. 16, 23, 24, 26, 31, 32)는 酵素分泌缺損變異態로 變異된 것으로 생각된다.

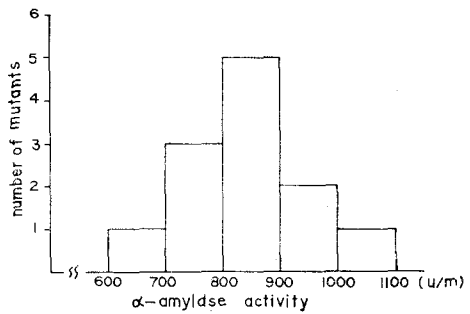


Fig. 13. α -amylase activity of His⁻, TM^r mutant

Table 4. α -amylase protease and RNase activity by the His⁻, TM^r.

Enzyme activity	Strain number																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
α -amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
protease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
RNase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
remark	His ⁻ TM ^r	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Enzyme activity	Strain number																								
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46		
α -amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
protease	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
RNase	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
remark	His ⁻ TM ^r	-	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

⊃ : high ⊃ : middle + : trace 0 : inactivity

Table 5. α -amylase activity of His⁻, TM^r mutants

TM concentration (μ g/ml)	His ⁻ , TM ^r mutant number	α -amylase activity (μ /ml)
25	1	820
	2	930
	5	860
	7	780
20	11	790
	13	820
	14	880
	17	1180
10	22	966
	30	800
	40	625
5	44	790
His ⁻ parent		1130
		1000

하였다. 生育曲線은 培養 8時間까지 對數期가 계속되어 生育이 急激하게 增加되었으며 12時間까지 完滿하였다가 正常期로 들어갔다. 生育速度는 變異株가 親株보다 初期의 生育은 完滿하였으나 正常期에 들어가는는 거의 같은 結果였다.

抄 錄

Bacillus amyloliquefaciens K의 生育과 α -amylase 生産에 대한 Tunicamycin (TM)의 影響을 檢討한 結果 最少生育阻止濃度는 0.25 μ g/ml 이고 生産된 α -amylase의 耐熱性은 50°C이었다.

TM 添加量이 1 μ g/ml인 液體培地에서 10時間 振盪培養할 경우 菌의 形態는 桿形에서 不定形의 球形으로 變形되었으며 24時間培養으로 溶解되었다.

TM와 자의선의 처리로 分離한 his⁻, TM^r 變異株의 生育은 親株와 같은 傾向 이었으나 α -amylase, protease, 및 RNase의 生産量은 떨어지는 傾向이다.

參 考 文 獻

1. Takatsuki, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 24 : 215 (1971)
2. Takatsuki, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 24 : 224 (1971)
3. Takasutki, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 24 : 232 (1971)
4. Takatsuk, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 24 : 785 (1971)
5. Takatsuki, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 25 : 75 (1972)
6. Takatsuki, A., Shmizu, K., and Tamura, G.: J. Antibiotics, 25 : 362 (1972)
7. 高月昭, 星野達雄, 田村學造: 日農化學會 昭和 46年度大會講演要旨集, p.30 (1971)
8. 高月昭, 星野開雄, 田村學造: 日農化會 昭和 47年度大會講演要旨集, p.183 (1972)
9. Hasilik, A. and Tanner, W.: J. Antimicrob. Ag. chemother. 10, 402 (1974)
10. 佐佐木隆, 野村慎太郎, 山崎眞狩, 高月昭, 田村學造: 日農化會大會講演要旨集, p.419 (1977)
11. 山崎眞狩, 宋邦鎬, Bautista, A.P., 佐佐木隆, 高月昭, 田村學造: 生化學, 50, 697 (1978)

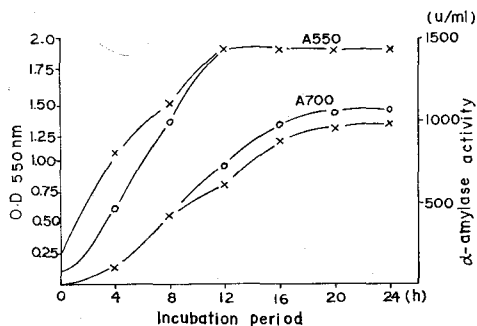


Fig. 14. Growth and α -amylase activity by the His⁻, TM^r.

X-X: p, O-O: His⁻, TM^r.

b. 液體培養에 의한 活性度測定: 平板判定에서 比較的 活性이 크게 나타난 12個菌株를 選拔하여 液體培養에 의한 α -amylase의 活性度를 測定한 結果는 표 5와 그림 13와 같이 α -amylase 生産力은 一般의으로 親株보다 떨어지는 傾向이었으나 No. 17 만이 若干 높은 率을 나타냈다.

c. 生育曲線과 α -amylase 生産: 親株(P)와 變異株(No. 17)의 生育曲線과 α -amylase 生産力을 檢討한 結果는 그림 14와 같다. α -amylase의 生産은 枯草菌과 같이 正常期 初期부터 活性度는 活發해졌으며 生産量은 別로 큰 差異는 認定되지 못

12. 宋邦鎬, 山崎眞狩, 高月昭, 田村學造 : 日農化會大會講演要旨集, 226 (1979)
13. Sasaki, T., Yamasaki, M., Takatsuki, A. and Tamura, G.: Biochem. Biophys. Res. commun, in press (1979)
14. 高月昭 : 日農化誌, 52, 11 167~177 (1978)
15. 高月昭, 田村學造 : 醱酵と工業, 39, 4 286~297 (1981)
16. 高月昭, 田村學造 : 生化學 51, 969~1008 (1979)
17. Fuwa, E.A.: J. Biochem. 41(5) 583 (1954)
18. Takatsuki, A., Shmizu, K., and Tamur, G.: J. Antibiotics. 24. 75 (1971)
19. Kohno, K., Hlragun, A., Mitsui, H., Takatsuki, A. and Tamura, G.: Agri. Biol 43(7) 1553~1561 (1979)
20. 南條正男 : 細菌フージ遺傳實驗法別冊蛋白質核酸酵素共立出版株式會社, 16 (1972)
21. Jagger, J.: Introduction to research in ultra-violet photobiology, prentice-Hall (1967)
22. 近藤宗平, 加藤武司 : 續生物物理學講座, 吉岡書店, 3, 301 (1968)
23. Lederberg J.,: Methods in Medical Research. 3, The year Book publisher. Inc. Chicago (1950)
24. Lederberg, J., Lederberg, E.M.: J. Bacteriol. 63, 399 (1952)
25. Szybalski, W. and Bryon, V.: Bacterial. 64, 389 (1952)