

微生物에 의한 핵산關連物質의 生産에 관한 研究(第3報)

—*Bacillus subtilis*의 營養要求變異株에 의한 Hypoxanthine의 蓄積—

裴 武·尹 愛 淑·李 啓 準
(韓國科學技術研究所 應用微生物研究室)

Studies on Production of Nucleic Acid Derivatives by Microorganisms(III)

—Accumulation of Hypoxanthine by Adenineless Mutant of *Bacillus subtilis*—

Bae. Moo, Ae Sook Yoon and Kye Joon Lee
(Applied Microbiology Lab, Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea)
(Received March 24, 1973)

Abstract

For the production of Nucleic acid derivatives by microorganisms, adenineless mutants were induced from *Bacillus subtilis* with the mutagens, ultraviolet rays and diethylsulfate. And total strains of 62 adenineless mutants were isolated.

These mutants were found to have an ability of accumulating u. v. absorbing substances in the culture broth. They were analyzed to be hypoxanthine, uracil, and other unknown compound by means of two dimensional thin layer chromatography, u. v. absorption spectra, and I. R. absorption spectrum.

Mutant BS-137 was screened out to accumulate hypoxanthine, which was isolated from the culture broth through activated carbon column and recrystallize from cold water.

The effect of the medium compositions on hypoxanthine accumulation were examined for the mutant BS-137. Glucose appeared to be the best carbon source, but molasses could be substitute for it, NaNO₃ and yeast extract were especially good sources of nitrogen.

序 論

微生物을 이용하여 핵산 및 핵산關連物質의 生産에 관한 연구가 활발히 進行되어 왔다^{1,2)}. 특히 營養要求變異株로서 直接 醱酵法으로 핵산關連物質을 다량 生産하게 되었다^{3,4)}.

著者들은 前報^{5,6)}에서 *Brevibacterium*屬 세균의 adenine 要求變異株를 취득하는 방법과 취득한 變異株로서 5'-inosinic acid의 生産에 관해 보고한 데 이어 本報에서는 *Bacillus subtilis*의 adenine 要求 變異株를 취득 그중 hypoxanthine 만을 축적

하는 變異株를 선발하였고 또 hypoxanthine의 축적량을 증가시키는 조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

한국과학기술연구소 응용미생물연구실에 보존하고 있는 *Bacillus subtilis*를 모균으로 사용하였다.

2. 培地組成

모균 *B. subtilis*는 nutrient agar배지에 보존하였고 胞子形成培地는 potato-dextrose배지를 사용하

Table 1 Media For Auxotroph Isolation

Media Components	Minimal medium	Complete medium
NH ₄ Cl	0.5%	0.5%
NH ₄ NO ₃	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01
K ₂ HPO ₄	0.3	0.3
KH ₂ PO ₄	0.1	0.1
Dextrose	0.1	0.1
Casamino Acid(Vit. free)	0.03	0.03
CaCl ₂	1 mg/L	1 mg/L
Trace element soln *1	1 ml/L	1 ml/L
Adenine·HCl (Agar)	— (2%)	20 mg/L (2%)

pH was adjust to 7.0 after sterilization with 5N NaOH.

*1 Trace element soln.: Na₂B₄O₇ 88mg, ZnSO₄ 800 mg, MnCl₂ 72mg, FeCl₃ 790mg, CuCl₂ 270 mg, (NH₄)₆MoO₄ 37 mg, Dist. water 1L

였다. adenine要求變異株를 취득하기 위한 完全培地(complete medium) 및 最少培地(minimal medium)는 Table 1과 같다. 취득한 變異株는 adenine HCl을 20mg/1.L. 첨가한 nutrient agar배지에 보존하였다. 變異株의 측적물을 검색하기 위하여 사용된 種培養培地 및 醱酵培地는 Table 2와 같다.

Table 2 Media For Fermentation

Seed medium	Fermentation medium
Peptone 0.5%	Basal Medium
Meat ext. 0.5	
Glucose 0.5	
NaCl 0.25	
	KH ₂ PO ₄ 0.2%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05
	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.001
	MnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.001
	Glucose 5%
	NH ₄ Cl 0.4
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4
	Urea*1 0.4
	Peptone 0.5
	Yeast ext. 0.3
	pH 7.0

pH was adjusted to 7.0 after sterilization with 5N NaOH.

*1 Sterilized separately.

3. 變異株 取得方法

모균의 생균 및 胞子液을 變異劑로서 처리하여 그 중 adenine 要求變異株를 취득하는 방법은 Fig. 1, 2 및 3과 같다.

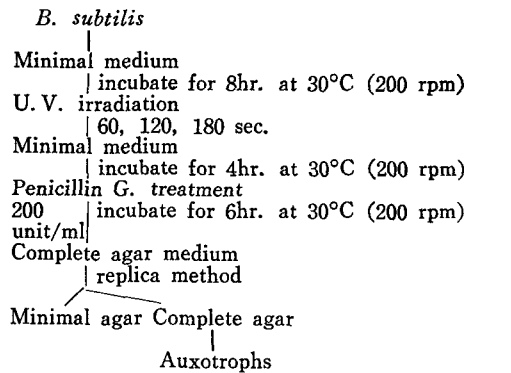


Fig. 1 Process of Auxotroph Isolation (Scheme I)

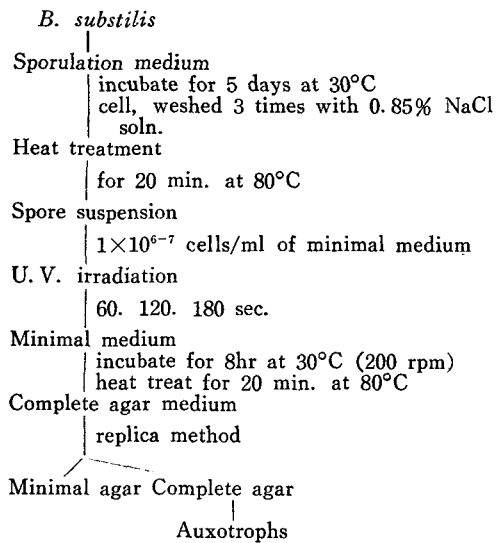


Fig. 2 Process of Auxotroph Isolation (Scheme II)

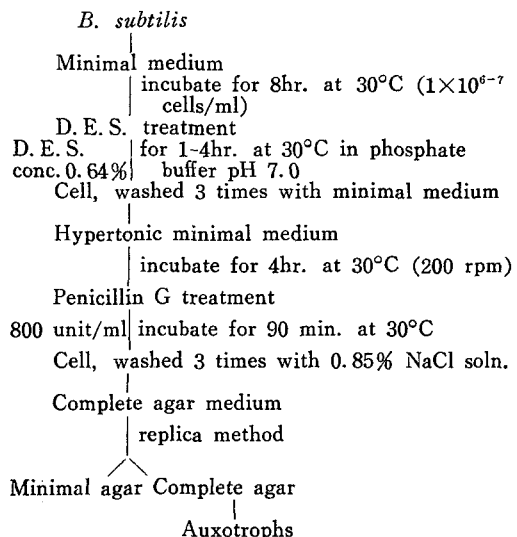


Fig. 3 Process of Auxotroph Isolation(Schme III)

4. 培養方法

취득한 adenine 要求變異株를 內徑 18mm의 시험관에 種培養培地 2ml씩 分注하여 接種하고 30°C에서 24시간 진탕배양하여 種菌으로 하였다. 內徑 28mm의 시험관에 3ml의 醱酵培地를 넣고 種菌을 5%씩 接種하고 30°C에서 72시간 振盪(220 rpm)배양하였다.

5. 蓄積物의 分析方法

培養이 끝난 액을 90~95°C에서 10분간 열처리하고 원심분리(6,000 r. p. m으로 10분간)하여 상등액을 축적물 분석의 시료로 사용하였다.

1) Thinlayer chromatogram; 試料는 cellulose로 작성한 Thin-layer plate위에서 iso-propanol; sat (NH₄)₂SO₄; H₂O=2: 80: 20 및 n-butanol; acetic acid; H₂O=2: 1: 1로 展開하여 자외선 흡수부위를 既知化合物과 비교하였다.

2) 紫外線 吸收曲線; cellulose thin layer chromatogram에 나타난 자외선 흡수부위를 절취하여 pH 6.0의 증류수에 95°~100°C에서 1시간 동안 용출시켜서 자외선 흡수곡선을 작성하였다.

3) 蓄積物의 定量; 試料를 정량적으로 spot하고 展開한 뒤 자외선 흡수부위를 切取하여 열수에 용출하여 pH 6.0에서 250mμ에서 O. D.를 측정하여 hypoxanthine 표준물질로서 작성한 표준곡선에서 산출하였다.

6. 蓄積物의 單離 및 同定

T. L. C. 및 紫外線 吸收曲線 등으로 일차 확인된 배양액을 Fig. 4.의 방법으로 결정을 취하였고 赤外線 吸收曲線을 작성 하였다.

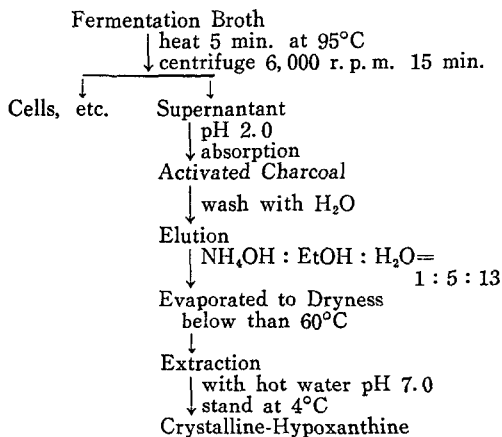


Fig. 4 Isolation of Hypoxanthine from Culture Broth.

7. 試藥 및 器具

Adenine HCl; Taketa kasan Co. Casamino

acid coitamin free); Difco, Piethylsulfate; 和光純藥工業社, penicillin G.; Nutritional Biochemicals Co. (N. B. C.) Hypoxanthine, inosine, uracil; kishida chemical Co., Cellulose powder; Merk Co, ultraviolet lamp 253mμ 15W; 三共電機, Milliporefilter & filter membrane (0.45μ 25mm), U. V. spectrophotometer; Beckmann D. B., I. R. spectrophotometer; Beckmann IR-12.

結果 및 考察

1. 變異株의 取得

Fig. 1, 2 및 3의 방법으로 모균의 생균 및 포자액에 變異劑를 작용시켰을 때 變異劑 처리시간에 따른 모균의 死滅曲線은 Fig. 5와 같다. 99% 이상의 사멸률을 나타낸 조건하에서 adenine 要求 變異株를 총 62株를 분리 취득하였다.

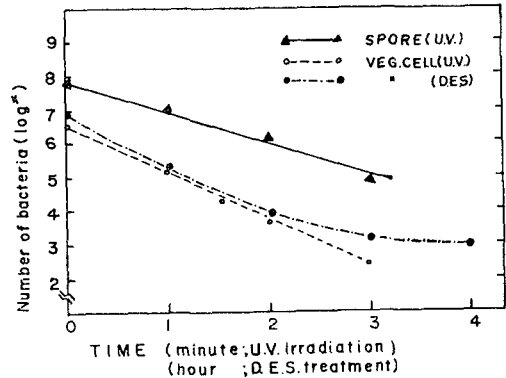


Fig. 5 Survival Curves of *B. Subtilis* upon U. V. treatment and D. E. S. treatment.

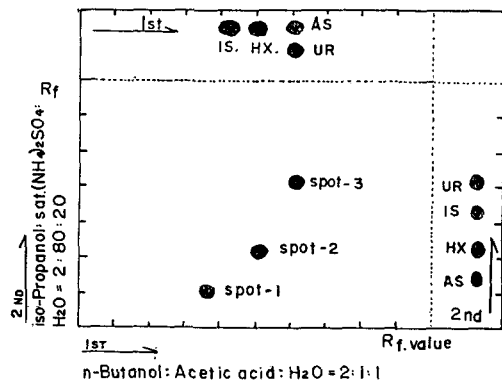


Fig. 6 Two dimensional Thin-layer Chromatograms of U. V. Absorbing Substances produced by Adenineless Mutant (BS-137) of *B. subtilis*. (IS; Inosine HX; Hypoxanthine AS; Adenosine UR; uracil)

2. 蓄積物의 分析 및 同定

취득한 adenine 要求變異株 62株의 培養液을

T. L. C로서 분석하여 본 결과 Fig. 6과 같은 紫外線 吸收物質을 축적하고 있음을 알았다. 즉 표준 물질 hypoxanthine과 Rf치가 일치하는 spot-2만을 축적하는 變異株가 17株, 표준물질 uracil과 Rf치가 일치하는 SPOT-3와 SPOT-2 2종류의 물질을 축적하는 變異株가 30株, SPOT-1, SPOT-2 및 SPOT-3의 3종류의 물질을 동시에 축적하는 變異株가 12株였다.

紫外線 吸收部圖를 용출하여 pH 6.0에서 紫外線 吸收曲線을 작성하였다(Fig. 7) spot-2는 hypoxanthine과 spot-3는 uracil과 일치함을 알수있다.

이상의 결과로서 spot-2는 hypoxanthine으로 spot-3는 uracil로 同定하였으며 spot-3는 아직 同定하지 못하였다.

62株 變異株 중에서 hypoxanthine만을 다량 축적하는 變異株 BS-137.의 배양액을 Fig. 4의 방법

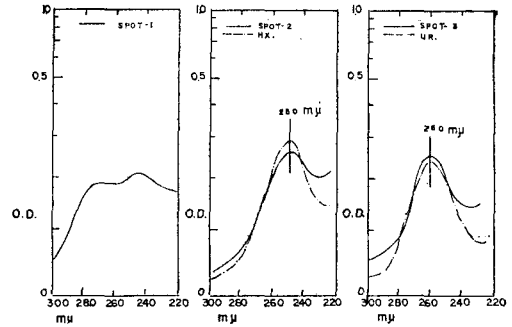


Fig. 7 U. V. Absorption Spectra of Spot-1, 2, 3 produced by Adenineless Mutant of *B. subtilis* Strain BS-137 (pH 6.0)

으로 결정상의 hypoxanthine을 얻고 赤外線 吸光曲線을 작성한바 Fig 8과 같다.

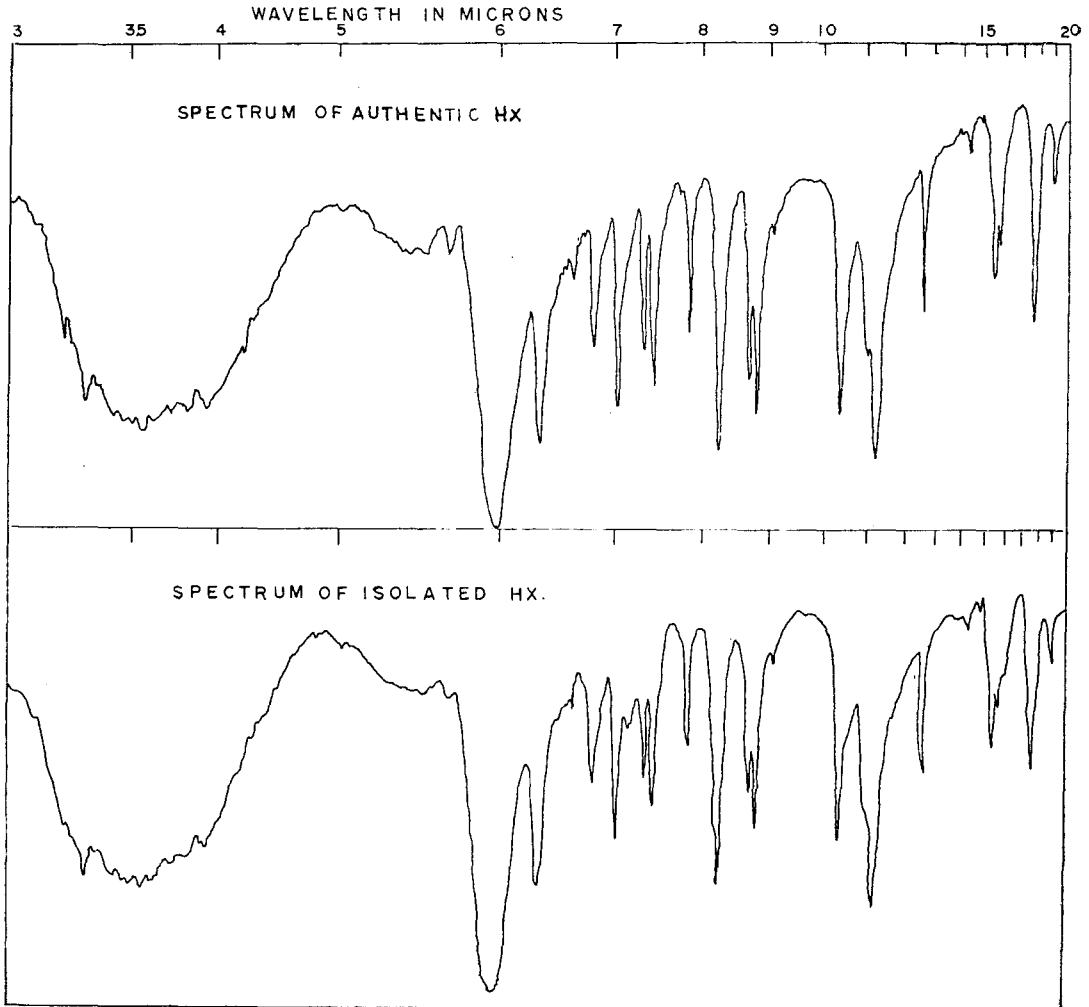


Fig. 8 I. R. Absorption Spectra of Authentic and Isolated Hypoxanthine. (Hx)

따라서 變異株 BS-137은 hypoxanthin만을 배양 중에 배지내에 축적하고 있음을 확인하였다.

3. 變異株 BS-137의 培養條件 檢討

變異株 BS-137의 培養條件을 변경하여 hypoxanthine의 축적량을 증진코저 炭素源, 窒素源 및 有機營養源을 조사하였다.

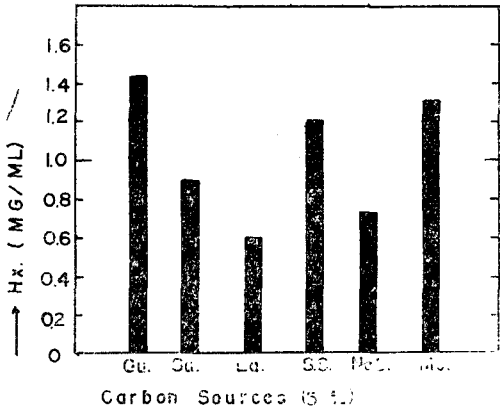


Fig. 9 Effect of Various Carbon Sources on Hypoxanthine Accumulation.

- Medium: Basal Medium Plus NH_4Cl 2%, Yeast Ext. 0.5% and Carbon Sources 5%
- Gu: Glucose, Su; Sucrose, La: Lactose, SS: Soluble Starch
- NaG: Na-D-Glutamate, Mo: Molasse

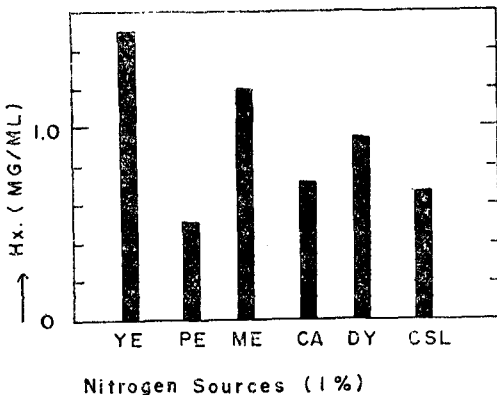


Fig. 10 Effect of Various Nitrogen Sources on Hypoxanthine Accumulation.

- Medium: Basal Medium Plus NH_4Cl 2%, Glucose 5% and Nitrogen Sources 1%
- YE: Yeast Ext. PE: Peptone
- ME: Meat Ext.
- CA: Casamino Acid DY: Dry Yeast
- C. S. L.: Corn Steep Liquor

炭素源으로서 Fig. 9에서 보는바와 같이 glucose가 적당하였으며, 有機營養源으로서 yeast ext.가 좋았으나 yeast ext 내에는 adenine의 함량이 높으므로 yeast ext의 첨가량의 변화가 hypoxanthine의 축적에 미치는 영향을 고려할 필요가 있다.

無機窒素源으로서 Fig. 11과 같이 NaNO_3 2%에서 가장 hypoxanthine의 축적량이 많았다.

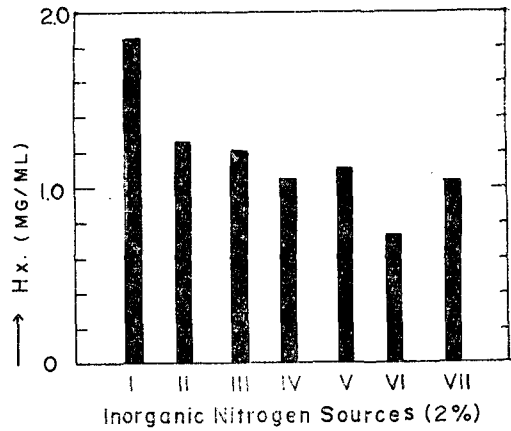


Fig. 11. Effect of Various Inorganic Nitrogen Sources on Hypoxanthine Accumulation.

- Medium: Basal medium plus Glucose 5% Yeast Ext. 0.5% and Inorganic Nitrogen Sources 2%
- I: NaNO_3 II: NH_4Cl III: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- IV: NH_4NO_3 V: $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$
- VI: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ VII: NH_4Cl 1% and $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 1%

이상 검토한 배지성분을 종합하여 變異株 BS-137로서 배양시간에 따른 균의 성장도와 pH의 변화 糖의 소모량 및 hypoxanthine의 축적량을 검토한 결과는 Fig. 12와 같으며 최고 2.26g/l이 축적되었다. 당의 소모는 Nelson-Somogyi 법으로還元糖을 정량하였으며 균의 성장곡선은 배양액을 생리식염수에 희석하여 660m μ 에서 탁도를 측정 작성하였다.

Hypoxanthine의 축적은 72시간에서 가장 많았으며 균의 성장이 끝남과 동시에 급격히 증가하였다.

Adenine要求變異株가 hypoxanthine만을 축적하는 현상에 관한 보고는 적으며 대체로 Inosine 또는 5'-Inosinic acid와 같이 축적되는 것으로 알려졌다⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. 따라서 本 研究에서 사용한 變異株 BS-137가 hypoxanthine만을 축적하는 作用機轉은 흥미있는 것으로 사료된다.

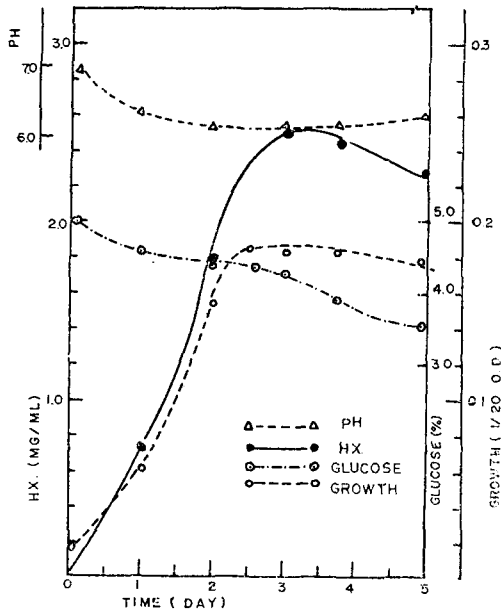


Fig. 12 Time Course of Hypoxanthine Fermentation in *B. subtilis* BS 137.

○ Medium : Basal medium plus Yeast ext. 0.5% Glucose. 5% NaNO₃, 2%

要 約

Bacillus subtilis 의 생균 및 포자액을 자외선 조사와 diethylsulfate 처리로서 adenine 要求變異株 총 62 株를 분리하였다.

이들 變異株는 醱酵培地에 자외선흡수 물질을 축적하고 있음을 확인하였으며 이 축적물은 thin-layer

chromatogram 자외선흡수 곡선등으로 hypoxanthine, uracil 임을 동정하였다.

이중에서 hypoxanthine 만을 축적하는 變異株 BS-137 의 배지성분을 검토한 결과 탄소원소로서는 glucose 가 좋았으며 질소원으로서는 yeastext 와 NaNO₃ 가 적당하였다.

아울러 배양액으로부터 hypoxanthine 을 분리 정제하는 방법을 확립하였다.

參 考 文 獻

- 1) Ogata, K; *Amino Acid and Nucleic Acid*, 8 1 (1963)
- 2) Dermain, A.L.; *Progress in industrial Microbiol.*, 8 35 (1968)
- 3) Uchida, K., A. Kuninaka, H. Yoshino and M. Kibi; *Agr. Biol, Chem.*, 25 804 (1961)
- 4) Nara, T., M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr, Biol, Chem.*, 32 561 (1968)
- 5) Bae M and K. J. LEE; *Kor. J. Microbiol.*, 10 73 (1972)
- 6) Bae M and K. J. LEE; *Kor. J. Microbiol.*, 10 109 (1972)
- 7) Davidson, C; *The Nucleic Acid* (Academy press), Vol. 1, 493. (1955)
- 8) Aoki, R., Y. kondo and H. Momose; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9 387 (1963)
- 9) Yamanoi, A.; Y. Hirose, M. Aoki and T. Shiro; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11 339(1965)
- 10) Hirano, A., T. Akimoto and T. Osawa; *農化 (日本)*, 42, 60 (1968)