

항변이원성 물질을 생성하는 미생물의 분리방법

박용일¹ · 조문구^{2*} · 정호권³

¹Univ. of McGill, Quebec, H2X 2E2, Canada

²강원대학교 생물응용공학과, ³건국대학교 미생물공학과

Isolation of a Desmutagenic Substance Producing Microorganisms

Park, Yong-Il¹, Moon-Gu Cho^{2*} and Ho-Kwon Jung³

¹Dept. of Immunology & Microbiology, University of McGill, Quebec, Canada

²Dept. of Applied Biology & Tech., National Kangweon Univ., Chunchon 200-701, Korea

³Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — In the screening process of anti- or desmutagenic substance from the various microbial metabolites with the method of Ames and Rec-assay, a desmutagenic substance producing bacterial strain which inactivates the mitomycin C-induced mutagenicity was isolated and identified as *Pseudomonas* sp. AM-10.

돌연변이를 억제하는 인자는 1950년 경부터 세균의 자연돌연변이에 대한 anti-mutagen 연구가 시작되었으며, Kada 등(4)은 세포수준에서 관찰되는 anti-mutagenesis와 구별하기 위해 “desmutagen”(1, 2)이라는 용어를 제안하였다. Desmutagenicity란 화학변이원이나 대사활성화 등으로 생체에서 생성된 화학변이원을 실험시키는 효소적 불활화과정(enzymic deactivation)을 의미한다. 합성화합물외에도 자연계에 존재하는 다양한 변이원을 대상으로한 항변이원성에 대한 연구는 McCann 등(6)이 Salmonella system을 이용하여 변이원성 및 발암성, 이들의 억제인자에 대한 연구방법(Ames test)와, Kada 등(4)은 *Bacillus subtilis* Rec⁺와 Rec⁻ system을 이용한 돌연변이 유발억제인자를 찾는 방법(Rec assay)가 있다.

피검균주(Test stains)

Ames test(3, 6) : *Salmonella typhimurium* LT₂ 중에서 변이원성 실험에 널리 사용되고 있는 *Sal. typhimurium* TA98과 TA100을 사용하였다.

Rec-assay(4) : *Bacillus subtilis* 중에서 DNA 재조합 능력이 있는 Wild type H17(Rec⁺)과, DNA 재조합 능력이 없는 M45(Rec⁻)를 사용하였다.

배지

Ames test 배지 : Table 1에 나타난 stock 1, 2를 살균한 다음, 별도로 살균한 stock 3이 45~50°C 되었을 때 서로 혼합하여 최소배지를 만들어 사용하였다.

Rec-Assay용 배지 : 0.5%(w/v) NaCl을 함유한

Table 1. Composition of the minimal glucose medium for Ames test

Stock 1: 50X VB salts solution (per litre)	
Warm distilled water (ca. 45°C)	670 ml
Citric acid, monohydrate	100g
K ₂ HPO ₄	500g
Sodium ammonium phosphate	175g
Stock 2: 40% (w/v) solution	
Stock 3: 1/5% (w/v) agar solution (per litre)	
Distilled water	930 ml
Agar	15g

For minimal glucose plates: Take 20 ml of stock 1, 50 ml of stock 2 and stock 3 are autoclaved separately. Mix while warm, and pour into sterile Petri dishes.

Key words: Isolation, desmutagenic substances, microorganisms

*Corresponding author

nutrient agar를 이용하였다.

Mitomycin C 유효 처리농도

Rec⁻의 생육저지대 길이가 활성측정에 적정한 정도가 되어야하므로, 100 µg/ml로 조절하여 사용하였고, Ames test는 TA 98과 TA 100주를 이용하여 spontaneous revertant colonies수보다 mitomycin C-Induced revertant colonies(His⁻)수가 2배 이상 나타나는 농도(0.1 µg/ml)를 사용하였다.

Isolation and Purification

Table 2. Some morphological characteristics of isolates strain on nutrient medium with 0.5% w/v NaCl

Agar slant	Agar plate	Broth
Good growth	Raised large colony	Pellicle
No pigment	Milky white	
Arborescent form	Rhizoid form	
	Filamentous margin	

Table 3. Physiological characteristics of isolated strain

Test	Result	Test	Result
Optimum temperature	39°C	KCN utilization	Negative
Optimum pH	7.0	Citrate utilization	Positive
Oxygen demand	Aerobic	Methyl red test	Negative
Maximum growth by O.D.	21 h	Voges-Proskaur test	Positive
Cell size	1.5×2.0 µm	Motility test	Positive
Sheep blood agar	No hemolysis	KIA	A/K
MacConkey agar	No growth	Oxidation/fermentation	Negative
Malonate agar	No growth	Fermentation of	
Oxidase test	Positive	glucose	Positive
Catalase test	Positive	lactose	Positive
Gelatin hydrolysis	Positive	sucrose	Positive
Indole formation	Negative	mannose	Negative
H ₂ S formation	Positive	arabinose	Positive
Urease formation	Negative	mannitol	Positive
Starch hydrolysis	Positive	inositol	Negative
Lipid hydrolysis	Negative	sorbitol	Positive
Casein hydrolysis	Positive	malate	Positive
Arginine dihydrolase	Negative	salicin	Positive
Lysine decarboxylase	Negative	adipic acid	Positive
Phenylalanine deaminase	Negative	citrate	Positive
Nitrate reduction	Positive	gluconate	Positive
Litmus milk (peptonization)	Negative	dulcitol	Negative
Esculin hydrolysis	Positive	phenyl acetate	Negative

Isolation : Mitomycin C를 대상으로 Ames test를 이용하여 일차 분리하였고, *Sarcina lusia* ATCC 6528, *E. coli* ATCC 9637, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 항생물질 피검균주들에 대한 항균력이 없는 균주를 이차적으로 분리한 다음, 항변이원성을 갖는 균으로 사용하였다. 분리균은 glucose 최소배지에 배양하였다.

Partial purification : 2,000l Erlenmyer flask에 1l의 항변이원 생산배지를 넣고, 분리균을 3%(v/v) 수준으로 접종하여 37°C에서 2일간 진탕배양(200 rpm)한 다음, 원심분리하여 acetone을 최종농도가 80% (v/v)되게 가하여 5°C에서 5시간 정치시키고, 10,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물만을 모아 최종적으로 phosphate buffer(pH 7.0) 20 ml에 녹인 것을 crude desmutagen으로 사용하였다. 항변이원 생산용 배지는 증류수 대신 1 mM Mn²⁺로 만든 glucose 최소배지를 사용하였다.

단백질의 측정

Table 4. Desmutagenic spectra of the culture filtrate of the isolated strain on the various chemical mutagen and effects of NADP, Ca²⁺ ion on the activity

Mutagen	Positive control (mm)		Culture filtrate		Culture filtrate + NADP ^f		Culture filtrate + NADP + Ca ²⁺ ^g	
	Rec ⁺	Rec ⁻	Rec ⁺	Rec ⁻	Rec ⁺	Rec ⁻	Rec ⁺	Rec ⁻
Acriflavin ^a	3.5	6.0	1.2	5.0	2.3	5.5	1.5	3.0
MMC ^b	0	10.0	2.0	9.0	0	5.0	0	8.5
EMS ^c	8.0	15.0	8.0	14.5	7.0	14.0	5.0	8.5
EtBr ^d	6.0	10.0	5.0	12.0	3.5	11.0	4.5	8.5
MNNG ^e	0	4.5	0	3.0	0	4.0	0	3.5

The concentrations of mutagens per disc were applied as follows: ^a1 µg; ^b5 µg; ^c0.01 ml of 50% (w/v) EMS; ^d(etidium bromide): 5 µg; ^e7.5 µg, respectively, ^fNADP was added to culture filtrate as a concentration of 2 × 10³ µg/ml, ^gCa²⁺ was added to culture filtrate as a concentration of 5 mM.

BSA(Bovine serum albumin)을 표준물질로 써서 Lowry법(5)으로 처리한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항변이원 활성의 측정

Mitomycin C가 나타내는 변이활성을 얼마만큼 저하시키는가를 지표로 측정하여, 다음 식으로 계산하였으며, 항변이원활성의 단위는 Mitomycin C에 의한 생육저지 길이를 5 mm 감소시키는 것을 1 unit로 정의하였다.

$$\{(A - C^*) / A\} \times 100 = \text{항변이원 활성} \quad (\text{Eq. 1})$$

- A : Mitomycin C(positive control)에 의한 Rec⁻ 생육저지 길이, mm
- C* : Mitomycin C의 잔류 변이원성을 나타내는 Rec⁻ 생육저지 길이, mm

분리균의 동정

분리한 균주는 Bergey's Manual 8판에 준하여 동정하였다.

Pseudomonas sp. AM10은 nutrient agar plate에서 milk-white colour, 단간균(길이 2 µm)이었으며, Table 2, 3과 같이 생리적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas cepacia*와는 65%, *Agrobacter* sp.와는 약 60%의 근연성을 보였으나, Bergey's manual과 일치되는 균을 찾을 수 없었으므로, *Pseudomonas* sp.로 결정하였다.

Pseudomonas sp. 배양액에서 추출한 물질이 mitomycin C를 불활성화시키는 것을 확인하였으며(Table

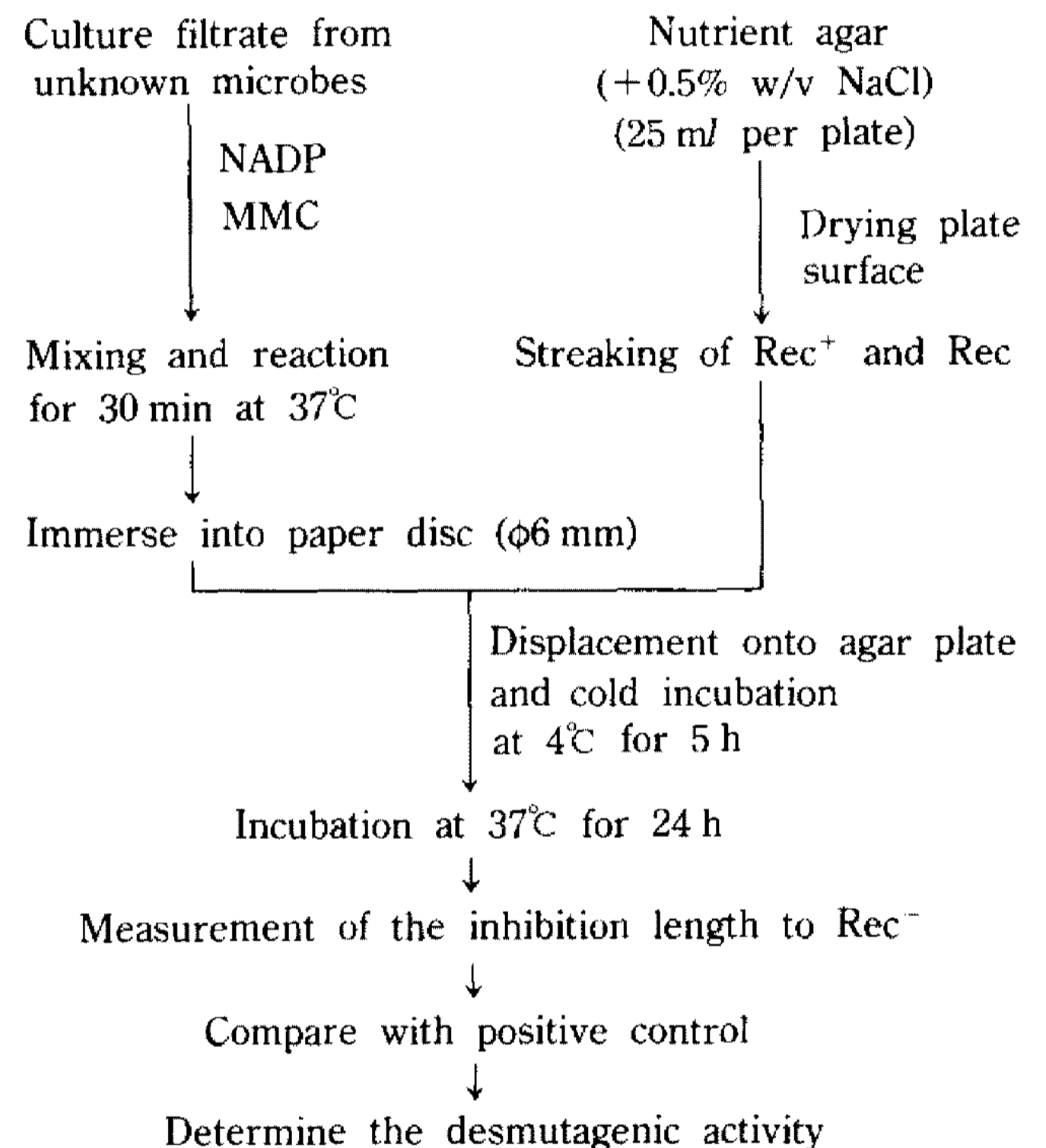


Fig. 1. Screening flowchart of potent microbial desmutagenic substance against the mitomycin C-induced mutagenicity by Rec-assay with streaking method.

The desmutagenic activity was measured by comparing the decreased inhibition length against the MMC-induced mutagenicity with the inhibition length by the MMC to the strain Rec⁻.

4), 이 실험으로 확인한 항변이원성 물질을 생산하는 균주의 분리방법(Fig. 1)과 같이 정제방법(Fig. 2)을 결정하였다.

지금까지 각각의 방법으로 항변이원성 물질 생산 균주를 분리하는 것보다, Ames test와 Rec-assay를

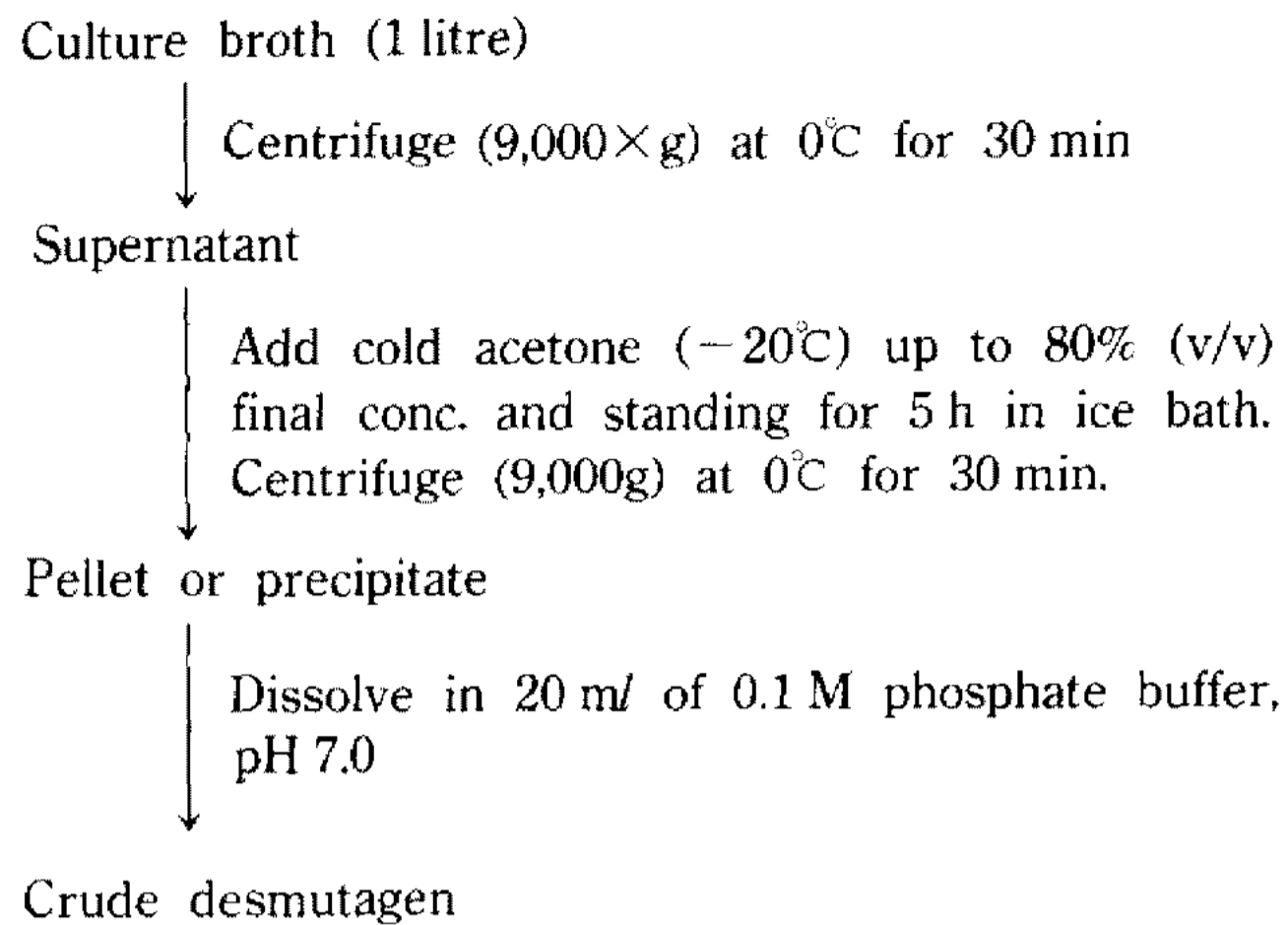


Fig. 2. Preparation of crude desmutagenic substance against MMC-induced mutagenicity.

Culture condition: 1 litre of culture medium in 2l Erlenmeyer flask, 3% (v/v) of inoculum size, at 37°C, for 2 days shaking at 190 rpm.

함께 이용하여, 항종양성 항생물질이면서 강한 변이 원성을 나타내는 mitomycin C를 불활성화시키는 능력이 있는 균주를 자연계에서 분리하는 간편한 방법을 고안하였다.

참고문헌

1. Osawa, T., H. Ishibashi, M. Namiki and T. Kada.

1980. Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrol mutagen formed by the reaction between food additives: sorbic acid and sodium nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 835-841.

2. Morita, T., Hara and T. Kada. 1978. Studies on natural desmutagenes: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1235-1238.

3. Dorothy, D., M. Maron and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**: 173-216.

4. Kada, T., K. Tutikawa and Y. Sadaje. 1972. In vitro and hostmediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens; and phloxine, a desmutagenic red dye detected. *Mutation Res.* **102**: 165-174.

5. John, M.M. 1984. *Method in Molecular Biology*. P. 1. Vol. 1. J.H. Waterborg and H.R. Matthews (ed.), Humana press, Clifton

6. McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori, and B.N. Ames. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72**: 979-983.

(Received December 9, 1991)