

알파-아밀라제 저해제 생산 방선균 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144의 균주개량

최응철* · 김숙경 · 강동희 · 이재우 · 김병각

서울대학교 약학대학

Strain Improvement of *Streptomyces minoensis* DMCJ-144, An α -Amylase Inhibitor Producing Actinomycetes

Eung-Chil CHOR*, Sook-Kyung KIM, Dong-Hee KANG,
Jae-Woo LEE and Byong-Kak KIM

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received February 11, 1993; accepted March 2, 1993)

Abstract—Strain of *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 was tried to be improved so that it produces much more the α -amylase inhibitor. *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 was treated with 1 mg/ml (pH 9.0) of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine at 30°C for 60 min and irradiated with UV light distanced 30 cm for 20 min. After mutagenesis, surviving colonies were cultured on the CM containing acriflavine (10 μ g/ml) three times in order to enhance the mutability. And then through multi-level screening, colonies that α -amylase inhibitor productibility was improved were selected by modified-blue value method. After third acriflavine treatment, α -amylase inhibitory activities of selected colonies were found to be much better as compared with that of parent strain. One mutant strain showed 5.4 time inhibitory activity than the parent strain.

Keywords □ α -amylase inhibitor, mutagenesis, UV light, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, acriflavine, multi-level screening, *Streptomyces minoensis*.

대부분의 인간의 섭취음식에 있어서 탄수화물의 주종인 전분은 위장관에서 α -amylase에 의해 맥아당으로 소화된다. 맥아당은 소장의 maltase에 의해 포도당으로 더욱 가수분해 되어, 결국 능동수송 과정을 통하여 혈류로 흡수된다. 전분의 소화는 신속한 과정으로써 이를 통해 혈당량과 인슐린 치의 상승이 이루어진다.

이와같은 postprandial hyperglycemia 및 이에 수반되는 인슐린량의 급격한 증가는 비만환자 또는 당뇨병상을 보이는 환자들에게 있어서는 바람직하지 못한 것이다.

따라서 postprandial hyperglycemia 또는 hyperinsulinemia는 식이요법중의 전분함량을 조절하거나, 일반적인 당뇨병나 비만환자에 대하여 권장되고 있는 크기로 식사량을 조절하여 경감시킬 수 있다. 이러한 병적증상은 이론상으로 적당한 식이요법을 통해 개선이 가능하나,

실제적으로 이와같은 유형의 치료법은 환자측의 이해, 협력의 부족문제에 인하여 그 실효를 거두기가 어려울 가능성이 높다(Brodbeck, 1980 ; Deshpande 등, 1988).

따라서 α -amylase나 α -glucosidase에 의한 전분소화의 제한은 이러한 질병들의 치료에 유용하게 이용할 수 있을 것이다. 이와같은 목적으로 여러종류의 α -amylase 저해제들과 기타 α -glucosidase 저해제들이 연구되어 왔다.

이들 α -glucosidase류 효소들의 저해제들은 탄수화물, 특히 전분의 소화속도를 지연시킴으로써 그 흡수 동력학에 영향을 미치게 되어 치료기간 동안에 혈당량의 고른 분포를 가능하게 하여 식이요법의 치료효과를 극대화시킬 수 있고 인슐린 및 sulfonylurea류의 당뇨병 치료약물과 병행하여 사용될 때 복용량의 감소, 치료기간의 단축, 그리고 부작용의 경감 등의 유용성이 있는 것으로 보고된 바 있다(Brodbeck, 1980).

이중 α -amylase 저해제는 주로 oligosaccharide계통의 물질과 polypeptide계통의 물질들로 보고되어 왔다. *Stre-*

* To whom correspondence should be addressed.

ptomyces 속에서는 glucosidase 저해제인 nojirimycin (Niwa 등, 1970) 이래로 약 10여종의 물질이 보고되었다. Oligosaccharide의 물질에는 Murao 등이 보고한 S-AI, (Murao 등, 1979) Itoh 등이 발표한 oligostatin(Itoh, 1981), Namiki 등의 adiposins(Namiki 등, 1982) 등이 있으며 *Actinoplanes*속에서 Schmidt 등이 분리한 Baye 4609가 보고되어 있다(Schmidt 등, 1977). Peptide계통의 물질에는 Murao 등에 의해 보고된 Haim 등이 있다(Murao 등, 1981).

한편 산업적으로 유용한 균주는 그의 생성능을 높이는 것이 중요한 과정이며 균주개발은 복잡하면서도 원래의 목적에 맞도록 응용되어야 하는 다원성이 있다. 최근에 사용되는 균주개발 기술에는 전통적 검색법과 유전공학법이 있으며 전통적인 방법으로는 돌연변이법과 무작위 검색법이 사용되고 있다.

본 연구에서는 이 방법들 중에서 특히 경제적이고도 단기간 내에 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있는 돌연변이 방법과 다단계 검색법을 이용하여, 한국 토양에서 분리한 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주의 α -amylase 저해 활성을 향상시키기 위한 균주개발을 시도하였다.

실험방법

실험균주

한국 토양에서 채취된 토양에서 얻은 균주 중 modified-blue value method를 이용한 assay system의 검색에 의해 선발되어 보관중인 균주 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주를 이용하였다. 이 균주의 α -amylase 저해 활성은 32 U/ml이었다(Chung 등, 1989).

돌연변이체의 액내배양

2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.0002% thiamine·HCl, 0.01% ZnCl₂, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% CuSO₄·5H₂O, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl의 조성의 배지를 제조하고 pH 7.2로 하였다. 30°C에서 180 rpm으로 5일간 진탕 배양하였다(Seo 등, 1992).

저해활성의 측정

저해활성은 α -amylase와 시료를 반응시킨 후 잔류하는 효소활성을 modified blue value method로 측정하여 앞의 연구에서 적용한 다음 계산식에 의해 계산하였다(Kwak 등, 1985).

$$\text{Percent inhibition(P.I.)} = \frac{T-C}{B-C} \times 100(\%)$$

위에서 T, C와 B는 test, control 및 blank 각각의 optical density이다. 1 inhibition unit는 50% 저해활성을 보이는 저해물질의 양으로 하였다.

포자의 제조

Streptomyces minoensis DMCJ-144 모균주를 sporulation agar slant에 접종하여 27±1°C에서 10일간 배양

하여 충분히 포자를 형성시킨 후 0.05% tritonX-100을 1 ml/slant로 가하여 소수성인 포자를 모았다. 이를 초음파처리(15 μ , 60 sec)로 분절한 다음 glass fiber filter로 여과하여 섞여있는 균사체를 제거하였다. 여액인 포자 현탁액을 원심분리(6,000 xg, 30 min)하여 포자 pellet을 얻고 그 pellet을 20% glycerol용액에 10⁷ spores/ml 농도로 현탁시켜 -20°C 냉동고에 보관하였다.

돌연변이 방법

UV Irradiation(Saunders and Holt, 1982 ; Setlow and Setlow, 1963) : 포자 현탁액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 0.1 M TM buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 다시 원심분리하여, 포자 pellet을 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시켰다(10⁷ spores/ml). 이를 glass petridish에 옮기고 가볍게 교반해 주면서 암소에서 UV lamp(15 W, germicidal lamp, 253 nm)를 30 cm거리로 시간을 달리 하여 (15 sec-30 min)조사시켰다. UV lamp는 15내지 20분 전에 미리 켜두어 prewarming을 시켜두고 post-irradiation repair를 방지하기 위하여 암소에서 30분간 방치한다. 완전배지(CM)에 도달하고 27±1°C에서 4일간 배양하였다.

NTG Treatment(Delic 등, 1970 ; Adelberg 등, 1965 ; Gichner 등, 1982 ; Rebeyrotte, 1983) : UV 조사때와 마찬가지로 포자 현탁액을 원심분리한 후 상등액을 제거하고 0.1 M TM buffer(pH 7.0)로 2회 세척하였다. 다시 원심분리하여 얻은 포자를 5배 용량의 NTG용액(1 mg/ml NTG in 0.1 M buffer, pH 9.0)에 현탁시키고, 30°C에서 60분간 진탕 하면서 반응시켰다. 반응액을 원심분리하고 0.1 M sod. phosphate buffer(pH 7.0)로 세척한 다음 이 buffer에 현탁하여 plating하고 27±1°C에서 4일간 배양하였다.

Mutant Selection and Multi-Level Screening (Alper, 1963 ; Onadipe 등, 1987 ; Witkin, 1963) : UV나 NTG 처리에 의한 돌연변이 후 살아남은 집락을 5, 10, 20, 30 μ g/ml의 농도로 acriflavine을 포함하는 CM배지에 옮겨 4일간 배양하였다. 대조로 acriflavine이 없는 CM배지의 동일 위치에 동일 집락을 옮겨 배양하였다. Acriflavine 함유 배지에서 살아남은 집락을 선발하여 다시 동일 농도의 acriflavine을 포함하는 CM배지에 옮겨 배양하였을 때 성장하는 안정한 돌연변이체를 선택하였다. 선택된 집락을 액내 배양하고, modified-blue value method로 저해 활성을 측정하여 이 중에서 가장 유효성이 높은 acriflavine의 농도를 결정하였다. 결정된 농도의 acriflavine 함유 CM배지에서 3차례 계대하면서 enrichment효과를 증가 시키고, 계대할 때 마다 저해활성을 측정하여 활성이 증가된 집락을 선발하였다.

실험결과 및 고찰

최적 UV 조사 시간

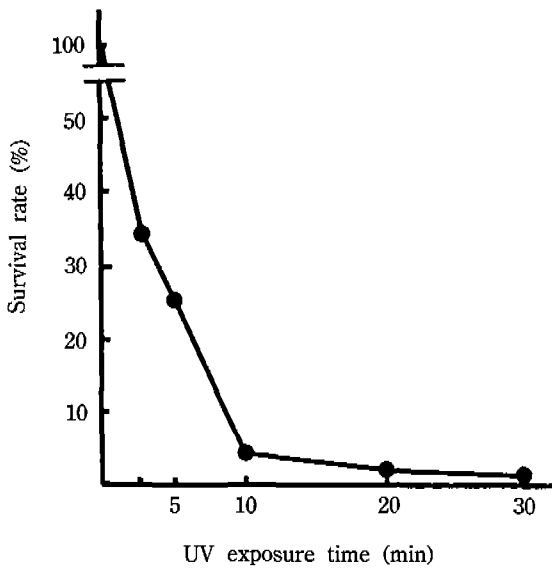


Fig. 1. Survival curve of the spore of *Streptomyces* DMCJ-144 after UV irradiation.

UV lamp(15 W, Germicidal lamp, 253 nm)를 30 cm 높이에서 시간을 달리하여(15 sec~30 min) *Streptomyces* DMCJ-144 균주의 포자 현탁액에 조사하였을 때의 생존율은 Fig. 1과 같았다. 방선균의 돌연변이능은 돌연변이원을 처리한 후 그 생존율이 0.1~1.0% 일 때 가장 높다고 보고되어 있다. 본 실험결과 0.1~1.0%의 생존율을 보이는 시간은 본 실험 조건으로는 20분이었으며, 그 후의 실험에는 20분으로 실험하였다.

Mutant Enrichment 때의 최적 acriflavine 농도

UV 조사에 의한 돌연변이 : UV 조사 후에, 다양한 농도(5~30 µg/ml)의 acriflavine을 포함하는 CM 고체배지에서 배양 하였을때, Fig. 2와 같은 생존율을 나타내었다. 생존율은 처리 acriflavine의 농도가 높을 수록 감소하여 acriflavine의 농도가 5 µg/ml일 때 29.2%, 30 µg/ml일 때 3.2%였다. 각 농도의 acriflavine 함유 CM 배지에서 성장한 각 집락을 액내 배양하고 저해 활성을 측정하였을 때, 모 균주 보다 높은 저해 활성을 나타내는 돌연변이 균주의 빈도수와 저해활성의 증감 정도를 Table I에 표시하였다. 그 결과 처리 acriflavine의 농도가 10 µg/ml일 때 47%의 균주가 모 균주보다 높은 저해 활성을 보였다. 그 후의 실험에서는 10 µg/ml의 acriflavine의 농도에서 enrichment를 실시하였다.

NTG에 의한 돌연변이 : NTG로 돌연변이 시킨 후 다양한 농도(5~30 µg/ml)의 acriflavine을 포함하는 CM 고체배지에서 배양하였을 때의 생존율을 Fig. 2에 같이 도시하였다. 생존율은 UV에 의한 돌연변이때와 마찬가지로 처리 acriflavine의 농도가 높을 수록 감소하여 acriflavine의 농도가 5 µg/ml일 때 34.3%, 30 µg/ml일 때 9.6%였다. 그러나 저해 활성을 측정한 결과 모 균주 보다

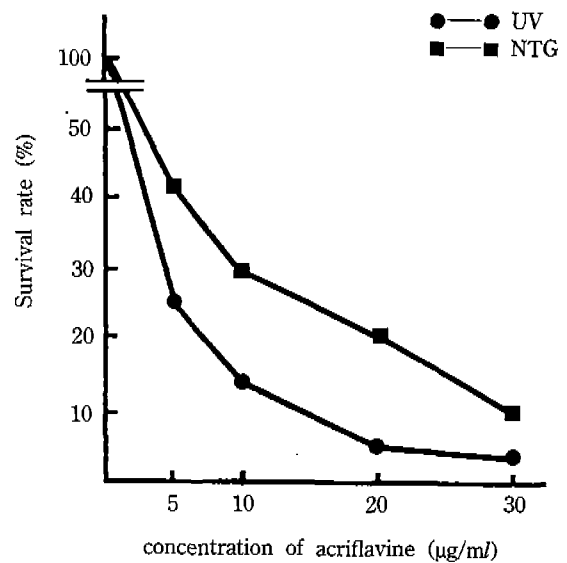


Fig. 2. Survival rates of after acriflavine treatment.

Table I. The inhibitory activities of mutants survived on the acriflavine contained media

Conc. (µg/ml)	Mutants percentage	
	less active than wild	more active than wild
5	87	13
10	53	47
20	64	36
30	62	38

Total 100 colonies.

높은 저해 활성을 보이는 돌연변이 균주의 빈도수는 UV에 의한 돌연변이때와 비교하여 10배 정도 낮았으며 저해 활성의 증가량도 10% 정도에 불과하였다.

다단계 검색

앞의 결과에 따라 UV lamp를 20분 조사시킨 집락을 다시 10 µg/ml의 acriflavine을 포함하는 CM배지(이하 CM+A배지)에 옮겨 연속적으로 검색을 실시하였다. 초기 3차례의 UV에 의한 돌연변이 후 살아남은 균주를 액내배양 하고 저해 활성을 측정하였을 때의 결과를 분석하였을 때 모 균주의 활성과 비교하여 평균 7±0.3%의 활성을 나타내었고 모 균주 보다 높은 균주는 거의 없었다. 따라서 UV light 처리후, CM+A 배지에서 3회에 걸쳐 enrichment 검색을 실시하였다. 총 14회의 돌연변이후에 살아남은 6500여개의 집락을 CM+A배지에 옮겨 배양하였더니, 478개(7.4%)가 성장하였고 그것들을 액내 배양 하고 저해 활성을 측정한 결과는 Table II와 같다. 모 균주의 활성에 비하여 거의 활성이 없거나, 50% 이하로 저하된 것이 평균 61.5%, 50~100%로 저하된 것이 27.4%이고, 반대로 저해 활성이 100~150%로 증가된 것은 7.7%, 150% 이상 증가된 것은 3.3%였다. 각 돌연변이마다 저해 활성이 증가된 상위 30%의 균주에 대해서

Table II. Mutants percentage after 1st acriflavine treatment

Mutagenesis No.	Activity (units)			
	<16	16~32	32~48	>48
1 *(40)	22	13	4	1
2 (34)	21	11	2	0
3 (39)	17	17	3	2
4 (21)	14	6	1	0
5 (35)	24	9	2	0
6 (30)	20	2	3	5
7 (38)	28	5	4	1
8 (40)	29	6	4	1
9 (45)	26	14	3	2
10 (29)	26	2	1	0
11 (37)	18	13	5	1
12 (26)	14	9	2	1
13 (34)	20	12	1	1
14 (30)	15	12	2	1
Total (478)	294(61.5)*	131(27.4)	37(7.7)	16(3.3)

*(): surviving colonies on CM+A.

*(): percentage.

다시 2차 enrichment한 다음 Table III의 결과를 얻었다.

1차 enrichment 때와 마찬가지로 모 균주보다 저하된 것과 향상된 것이 있었다. 그러나 16 unit 이하로 저하된 것은 없었으며 1차 enrichment 때와는 달리 200% 이상 향상된 것이 23.0%였다. 1차 enrichment에 비하여 활성이 증가한 것은 전체 집락의 55.2%이고, 별 차이가 없는 것이 33.6%, 그리고 오히려 더 떨어진 것이 11.2%를 차지하여 역 돌연변이가 생겼음을 알 수 있었다. 그 중 저해 활성이 높은 상위 20%인 28개의 균주를 다시 CM+A배지에서 배양한 후 저해 활성을 측정하여 우수하고 안정한 개량균주 14개를 얻어 oat meal slant에 보관하였고 각각의 저해 활성은 다음의 Table IV에서 보는 바와 같다.

Streptomyces minoensis DMCJ-144 균주에 대하여 돌연변이원의 작용특이성을 고려하여 pyrimidine dimer를 생성시켜 GC→AT transision, transversion과 유전자의 탈락을 야기하는 자외선을 처리하여 그 생존율이 0.1~1.0%가 되는 조건을 찾았다. 최적 조사 시간은 본 실험 조건에서는 20분이었으며 살아남은 집락을 액내 배양한 후 저해 활성을 측정해 본 결과 모 균주의 비하여 평균 25%의 활성을 나타내어 자외선 처리에 의해 α -amylase 저해제 유전자에 직간접으로 영향을 크게 미침을 추정할 수 있었다.

한편, replication fork의 DNA base를 alkylation 함으로써 GC→AT로 transition 하는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)을 이 균주에 그 생존율이 50%가 되도록 1 mg/ml (pH 9.0)의 농도로 30°C에서 60분간 반응 시켰다. NTG 처리 후 살아남은 집락은 모 균주와 비교 하였을 때 평균 35%의 활성을 보여 역시 NTG 처

Table III. Mutants percentage after second acriflavine treatment

Mutagenesis No.	Activity (units)				
	16~32	32~48	48~64	64~80	>80
1 *(14)	3	4	4	1	1
2 (10)	0	4	3	2	1
3 (17)	2	8	3	2	1
4 (5)	1	2	1	1	1
5 (7)	3	3	0	1	0
6 (9)	1	2	4	1	1
7 (8)	1	1	5	1	0
8 (9)	0	4	2	2	1
9 (15)	3	5	5	0	2
10 (3)	0	1	0	1	1
11 (15)	0	5	8	1	1
12 (9)	0	1	6	1	1
13 (11)	0	4	2	4	1
14 (12)	2	4	3	0	3
Total (143)	16(11.2)	48(33.6)	46(32.2)	18(12.6)	15(0.5)

*(): selected colonies after 1st. enrichment.

Table IV. α -Amylase inhibitory activity units of improved strains after third acriflavine treatment

No.	Activity	No.	Activity	No.	Activity
1~1	120.3	2~1	80.5	3~1	85.5
4~1	80.2	6~5	64.2	7~5	76.0
8~8	99.0	9~1	120.8	9~4	92.4
10~5	98.4	11~5	75.0	12~4	98.4
13~9	175.4	14~10	85.2	14~12	125.6
wild	32.0				

리에 의해서도 저해제 유전자에 직간접으로 영향을 미치고 있음을 추정할 수 있었고, α -amylase 저해제를 생성하는 유전자에 대해 NTG보다 UV light의 영향이 더욱 큼을 추정할 수 있었다.

돌연변이원 처리 후, 살아남은 집락을 mutation enrichment를 위하여 acriflavine을 포함하는 CM 배지에서 배양하였다. acriflavine은 replication 과정 중 DNA 염기배열 사이에 intercalating agent로 작용 하는데 CM+A 배지에서 살아남은 집락을 선발하여 액내 배양한 후 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 UV light 또는 NTG를 처리한 것과 그 후 acriflavine을 처리한 것을 비교하면 후자의 경우가 훨씬 저해활성이 높아졌으며 두가지의 돌연변이원의 경우를 비교하면 UV 조사한 것이 10배 정도 높았으며 그 균주의 빈도수는 10% 정도 높았다. 이는 DNA base가 frame-shift 상태로 deletion되거나 transversion된 유전자가, base가 alkylation되어 점 돌연변이를 일으킨 유전자보다 acriflavine의 작용기전이 더 유리한 것으로 추정된다. 또한 다 단계 검색으로 우수균주를 선발하였는데, 1차 선발을 위한 실험에서는 대부분의 균주들의 저해제 활성이 떨어져 부정적인 변

이가 일어났음을 알 수 있었으나, 저해제 활성이 증가한 것도 11%이어서 2차 선발을 가능하게 하여 균주개발량으로 적합함을 제시하였다. 제 2차 선발 및 제 3차 선발에 의해, 모 균주에 비해 저해제 활성이 최고 5.4배 이상 증가한 것을 얻을 수 있었다. 물론 이 정도의 활성 증가는 다량 생산면에서 충분한 가치가 있는 것은 아니지만, 비교적 활성이 높은 균주들을 재 출발 모 균주로 하여 산업적으로 유용성이 있는 균주 개발이 가능하리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건사회부의 신약 개발 연구 지원비와 한국과학재단의 일반 기초 연구비 (911-0407-073-2)에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사합니다.

참고문헌

- Adelberg, E.A., Mandel, M. and Chen, G.C.C. (1965). Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K 12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 788-795.
- Alper, T. (1963). Effects on irradiated microorganisms of growth in the presence of acriflavine. *Nature* **200**, 534-536.
- Brodbeck, U. *Enzyme inhibitors*, Verlag Chemie, 109-162.
- Chung, Y.J., Choi, K.H., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1989). Studies on α -amylase inhibitors produced by soil microorganisms. Isolation and activities of the α -amylase inhibitors from *Streptomyces* strain DMCJ-144. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **14**, 1-14.
- Delic, V., Hopwood, D.A., and Friend, E.J. (1970). Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mut. Res.* **9**, 167-182.
- Deshpande, B.S., Ambedkan, S.S. and Shewale, J.G. (1988). Biologically active secondary metabolites from *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 455-473.
- Gichner, T. and Velemiosky, J. (1982). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mut. Res.* **99**, 129-242.
- Itoh, J., Omoto, S., Shomura, T., Ogino, H., Iwamatsu, K. and Inouye, S. (1981). Oligostantins, new antibiotics with amylase inhibitory activity. I. Production, Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **34**, 1424-1428.
- Kwak, J.H., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1985). Studies on screening and isolation of α -amylase inhibitors of soil microorganisms(I) Isolation and activities of the inhibitor of *Streptomyces* strain DMC-225. *Arch. Pharm. Res.* **8**, 67-75.
- Murao, S., Goto, A., Matsui, Y. and Ohyama, K. (1981). New proteinous inhibitor (Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1679-1681.
- Murao, S. and Ohyama, K. (1979). Chemical structure of an amylase inhibitor, S-AI. *Agri. Biol. Chem.* **43**, 679-681.
- Namiki, S., Kangouri, K., Nagate, T., Hara, H., Sugita, K. and Ohmur, S. (1982). Studies on the α -glucosidase inhibitor, adiposin I. Isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiotics* **35**, 1234-1236.
- Niwa, T., Inouye, S., Tsuruoka, T., Kanze, Y. and Niida, T. (1970). Nojirimycin as a potent inhibitor of glucosidase. *Agri. Biol. Chem.* **34**, 966-968.
- Onadipe, O. and Bushell, M.E. (1987). The use of multivariate analysis for the design of selective isolation conditions for mutants of *Streptomyces cattleya* with improved antibiotic titre. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **39**, 237-249.
- Rebeyrotte, N. (1983). Induction of mutation in *Micrococcus radiodurans* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mut. Res.* **108**, 57-66.
- Rowlands, R.T. (1984). Industrial strain improvement; Mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 3-10.
- Saunders, G. and Holt, G. (1982). Far UV light sensitive derivatives of *Streptomyces clavuligenis*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 381-385.
- Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Wingen-der, W., Truscheit, E. and Schafer, D. (1977). α -Glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**, 535-536.
- Seo, S.O., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1992). Optimum culture conditions for α -amylase inhibitor production of *Streptomyces minoensis* DMCJ-144, a α -amylase inhibitor producing actinomycetes. *Yakhak Hoeji* **36**, 390-396.
- Setlow, J.K. and Setlow, R.B. (1963). Nature of the photoreactive ultra-violet lesion in deoxyribonucleic acid. *Nature* **197**, 560-562.
- Witkin, E.M. (1963). The effect of acriflavine on photoreversal of lethal and mutagenic damage produced in bacteria by ultraviolet light. *Genetics* **50**, 425-430.