

紫外線照射에 의한 탁주酵母의 變異株育成에 관한 연구(제 1 보)

—變異株의 選定 및 同定—

金 燦 祚 · 吳 萬 鎭 · 金 聖 烈

忠南大學校 農科大學
(1974년 10월 12일 수리)

Studies on the Induction of Available Mutants of Takju Yeast by UV light Irradiation. (Part 1)

On the Selection and Identification of the Mutants.

Chan Jo Kim, Man Jin Oh and Seung Yul Kim,

College of Agriculture, Chungnam National University

(Received Oct. 12, 1974)

Summary

These studies were conducted to induce the available mutants in Takju yeasts by the irradiation of UV light.

Two original strains(5-Y-5, 6-Y-6) using for irradiation of UV selected from 24 strains which were isolated from the Takju mashes And Nuruks collected from 12 local regions of Chungnam and Chungbuk provinces in Korea, and the irradiations to the yeasts with UV light were carried out at a distance 10—40cm from the sources of irradiation for 10—220 seconds.

The purpose of this experiment is to report the effects of irradiating distances and times of UV light on the survival ratio of orginal yeasts, and the identification of two orginal yeasts and three mutants induced by the irradiation of UV light.

The results were summarized as follows.

1) The effects of irradiating distances and times on the survival ratio on the yeasts were represented as follows.

Irradiating distances	Survival ratio		Complete death
	1%	0.1%	
10cm	10(sec)	15—20(sec)	25(sec or more)
20	20	40	60
30	30—40	60—70	90
40	70—90	140—160	220

2) Selection of mutants were carried out by the determinations of alcohol fermentability

and acid productivity to the survival strains by the irradiation of UV light.

The selected mutants were the strains 30-24, 40-27 which have more powerful fermentability about 10 percent than those of original strains and a strain 30-81 which have potential acid productivity.

3) The selected yeasts (5-Y-5, 6-Y-6) were identified to *Saccharomyces cerevisiae* by a taxonomic study of Lodder and the mutants(30-81, 40-27, 30-81) induced from above yeasts by the irradiation of UV light have almost same properties two original yeasts in the identical characteristics.

緒 論

濁酒酵母에 관한 研究는 近來 金⁽¹⁾, 愼⁽²⁾, 金⁽³⁾, 李⁽⁴⁾, 韓⁽⁵⁾ 및 朴⁽⁶⁾의 報告가 있으나 이들은 탁주술덧에서 酵母를 檢索分離하여 그 特性을 調査하고 同定한 것이며 濁酒酵母에 變異誘起劑를 處理한 研究는 아직 볼 수 없다.

微生物의 突然變異株가 미생물공업 발전에 크게 공헌하고 있다는 것은 周知하는 바이고 酵母의 育種은 1938年 Winge 와 Lausten 이 種間交配에 성공하고 1943年 Lindegren 에 의하여 接合型이 分化한 Heterothellic strain 이 分離된 이래 발견되었다

한편 酵母의 人爲의 突然變異에 對해서는⁽⁷⁾ 紫外線照射에 의하여 Fogel 등과 Wilkie 등은 酵母 유전형질의 再組合이 일어나는 빈도가 증가한다고 하였으며 Takahashi 는 유전자 전환이 일어나는 빈도가 增加한다고 하였다.

Fabre⁽⁸⁾ 는 *Schizosaccharomyces pombe* 의 生育期와 DNA 含量에 미치는 紫外線의 影響을 報告하였으며 Thomulka 등⁽¹⁰⁾ 은 *Saccharomyces cerevisiae* 의 糖醱性 變異株分離에 amphotericin B 의 效果에 對해서, Moat 등⁽¹¹⁾ 과 Snow⁽¹²⁾ 는 nystatin, amphotericin A 및 B 등의 抗生物質을 使用하여 *Saccharomyces cerevisiae* 의 Auxotroph 의 分離에 對해서 報告한바 있다.

한편 李⁽¹³⁾ 은 *Aspergillus oryzae* 에 紫外線을 照射시켜 Vitamin B₂ 및 B₁₂ 의 生成能이 강한 變異株를 얻은 報告와 金⁽¹⁴⁾, 裴⁽¹⁵⁾ 및 閔⁽¹⁶⁾ 은 *Bacillus subtilis* 와 *Escherichia coli* 의 紫外線 變異株에 依해서 amino 酸 및 核酸관련물질에 對한 生産을 報告한바 있다.

筆者는 탁주양조에 효과적인 耐酸性, 耐 alcohol 性, 번식력 및 醱酵力이 강한 酵母變異株를 얻기 위하여 洪城, 淸原 등 忠南北의 12個 地域에서 수집한 탁, 약주 술덧과 누룩에서 24株의 酵母를 分離한 후 醱酵力이 강한 2菌株를 母菌으로 選定하여

여러조건 下에서 이 母菌에 紫外線을 照射시켜 生存率을 測定하고 또한 醱酵力이 강한 그 變異株와 母菌에서는 없는 生成能이 강한 1變異株를 얻어 이들의 菌學的 性質을 調査하여 同定하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

I. 實驗材料

忠南北의 12個 地域에서 수집한 탁, 약주 술덧 및 누룩을 濁酒酵母 分離源으로 하였다.

II. 實驗方法

1) 優良酵母의 分離 및 選定 : Na-propionate 0.2 %를 첨가한 맥아즙 한천배지(pH 5.0) 및 秋山 B 培地⁽¹⁷⁾ 平板上에 탁, 약주 술덧 및 누룩의 멸균수 현탁액을 塗抹하고 30°C에서 3일간 培養後 發育한 酵母 colony에서 鈞菌하여 다시 맥아즙 한천상에서 48時間 培養시켜 그 一定白金耳量을 맥아즙(Bllg 12°, pH 5.0) 40ml를 넣은 meissel 장치를 부착시킨 100ml容 三角 flask에 接種하고 30°C에서 4日間 培養하면서 12時間마다 그 減量을 測定하여 醱酵力이 강한 2菌株를 母菌으로 選定하였다

2) 紫外線照射 : 井口⁽¹⁸⁾, 下田⁽¹⁹⁾ 및 實驗農藝化學⁽²⁰⁾ 등의 方法을 參考하여 選定한 2菌株의 一白金耳量을 10ml의 맥아즙에 各各 현탁시켜 그 0.5ml를 다시 10ml의 맥아즙에 接種하고 30°C에서 48時間 培養後 그 培養液을 遠心分離하여 얻은 菌體를 2回 10ml의 saline으로 洗滌한 다음 그 菌體를 10ml의 saline에 현탁시켜 haematometer로 菌數를 計數하여 細胞濃도가 約 30~35萬/ml로 되게끔 saline으로 희석시켜 被照射用 菌液으로 하고 無菌暗室의 5W 黃色燈下에서 그 菌液 10ml를 9cm schale에 넣어 magnetic stirrer로 교반하면서 紫外線(Toshiba製, 2,537A 10W 紫外線燈)을 10cm 및 20cm 거리에서는 10秒에서 5秒간격으로 70秒까지 30cm 거리에서는 30秒에서 10秒간격으로 2分까지 그리고 40cm 거리에서는 1분에

서 20秒 간격으로 5分까지 照射하였다.

3) 生存率測定 : 上記와 같이 紫外線을 照射한 菌液 0.1ml를 맥아즙 平板上에 塗抹하여 可視光線의 영향을 막기 위하여 暗室中の 恒溫器를 利用하여 30°C에서 3日間 배양하면서 發育하는 colony를 24時間마다 관찰 計數함으로써 照射거리와 時間에 따르는 生存率을 測定하였다.

그리고 原被照射菌液을 100培 및 1,000培로 稀釋한 것의 0.1ml를 같은 方法으로 塗抹培養하며 1% 및 0.1% 生存率區의 對照로 하였다.

4) 優良變異株의 選定 : 各 조사거리에서 0.1% 生存率區에 發育된 全 colony(約 22~35個)를 鈎菌하고 아울러 同距離의 各照射시간별의 區들에서 發育된 colony의 大·中·小別로 各各 2菌株씩 鈎菌하여 맥아즙 사면배지에서 48時間 前培養시켜 그 醱酵力을 測定한 後 母菌보다 강한 醱酵力을 가지고 있는 菌株을 各區에서 2菌株씩 選別하고 다시 選別한 菌株의 醱酵力 및 그 醱酵液의 滴定 酸度를 測定하여 醱酵力이 가장 강한 2菌株와 醱酵力은 母菌과 비슷하나 顯著히 酸을 生成하는 1菌株을 選定하였다.

5) 選定酵母의 同定 : Lodder⁽²¹⁾의 The yeast, A taxonomic study에 依하여 同定하였다.

結果 및 考察

1) 優良酵母의 分離 및 選定 : 忠南北의 12個 地域에서 수집한 麥, 麥주 슬릿 및 누룩에서 24株의 酵母를 分離하고 그들의 醱酵力을 4日間 測定한 結果 96時間 동안에 1.62g와 1.56g의 減량을 보인 5-Y-5 및 6-Y-6의 2菌株을 優良麥주효모로 選定하였다.

한편 分離한 其他酵母들의 醱酵力은 約 1.35~1.45g의 減량을 보였으며 그리고 이들 減량은 24時間 이내에 70~80%에 達하였다.

2) 紫外線照射 및 生存率 : 照射用菌液의 濃度를 30~360,000/ml 개로 한것은 0.1~1%의 生存率을 보이는 조사구에서 가장 많은 變異率을 보인다는 報告^(9,20)에 따라 피조사액 0.1ml를 接種培養하였을 때 한개의 schale 中에 0.1~1%의 生存率이 되는 35~350個의 colony가 發育되게끔 하기 위해서였다.

各 照射거리에 따른 照射時間別 酵母의 生存率을 보면 圖1과 같다.

圖1에서와 같이 1% 및 0.1% 生存率區에서 350個의 35個와 酵母보다 적은 220個 및 25個 程度의 colony가 發育하여 나오는 것은 死細胞와 計數

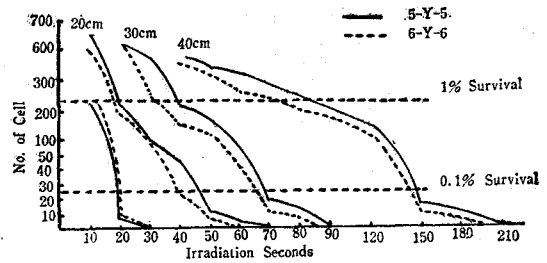


Fig. 1. Survival curve of the selected yeasts by U.V. irradiation

및 稀釋등에서 오는 誤差에 起因되는 것이라 하겠으며 0.1% 및 1%로 被照射用菌液을 稀釋塗抹하여 培養한 것을 對照區로 하여 照射菌液中的 酵母의 生存率을 檢討하면 10cm 거리에서는 10秒 조사에서 約 1%, 15~20秒의 照射에서 約 0.1%의 生存率을 보였고 25秒 以上の 照射로서 거의 完全死滅되었으며 20cm 거리에서는 20秒에서 1%, 40秒에서 0.1%의 生存率을 그리고 60秒 以上の 照射로서 거의 完全死滅되었고 30cm 거리에서는 30~40秒에서 1%, 60~70秒에서 0.1%의 生存率을 그리고 90秒 以上の 照射로서 거의 完全死滅되었으며, 40cm 거리에서는 70~90秒에서 1%, 140~160秒에서 0.1%의 生存率을 보였고 그리고 220秒 以上の 照射로서 거의 完全死滅되었다. 이 生存率試驗의 結果는 大端히 좋은 再現性을 보였으며 또한 一次照射를 받은 菌을 다시 二次, 三次再照射를 하여도 紫外線 耐性에는 별다름이 없었다. 이와같은 生存率에는 供試한 5-Y-5 및 6-Y-6의 兩菌株 사이에 큰 差異는 없었으나 대체로 5-Y-5菌株가 6-Y-6菌株에 比하여 紫外線에 對해서 多少 강한 耐性이 있는 것 같았다.

이 結果는 淸酒酵母를 $10^6 \sim 10^7$ /ml의 濃度로 하여 20W 紫外線燈으로 40cm 거리에서 4~6分의 照射로서 99.9% 以上の 死滅率을 보였다고 한 古川等⁽⁹⁾의 報告와 使用한 紫外線燈의 強度 및 菌濃度 등은 다르나 대체로 같은 경향이라고 생각된다.

3) 優良變異株의 選定 : 母菌으로 選定한 5-Y-5 및 6-Y-6의 2菌株에 前記와 같은 여러 條件으로 紫外線을 照射시켜 各 照射 거리별로 0.1% 生存率區들에서 發育된 colony를 全部 鈎菌한 271菌株와 0.1%內외의 生存率을 보인 各區들에서 colony의 크기에 따라 選別한 165菌株에 對하여 醱酵力과 酸生成能을 測定하여 各照射距離에서 母菌에

Table 1. Fermentative power of two original yeasts and nine mutants (unit : CO₂mg)

Strain No.	Days	1	2	3	4	pH value after 4 days
	Original strains	5-Y-5	1,059	1,526	1,572	
	6-Y-6	1,016	1,472	1,506	1,538	"
Mutants	10-27	1,012	1,493	1,538	1,597	"
	10-43	1,174	1,468	1,542	1,600	"
	20-25	1,110	1,532	1,600	1,633	"
	20-32	1,018	1,419	1,604	1,628	"
	30-24	1,385	1,578	1,639	1,685	"
	30-29	1,396	1,541	1,609	1,644	"
	40-12	1,038	1,551	1,624	1,567	"
	40-27	1,217	1,565	1,604	1,615	"
	30-81	1,281	1,472	1,538	1,565	3.0~3.2

비하여 강한 醱酵力을 나타낸 2菌株씩 計8菌株의 醱酵力은 母菌과 비슷하나 현저히 酸을 生成하는 1菌株을 選定하고 다시 選定한 이들 9菌株의 醱酵力을 同時에 測定한 結果는 다음 表1과 같다.

表1에서와 같이 醱酵力에 依하여 選別한 8菌株中 30~24 및 40~27의 2菌株가 各己 母菌에 比하여 約 10% 程度 더 강한 醱酵力을 보여 가장 강한 醱酵力을 가진 變異株로 選定하였으며 其他菌들은 그들의 母菌에 比하여 5% 内外 강한 醱酵力을 보였다.

그리고 紫外線 照射後 選別한 總 436菌株들의 醱酵力을 比較檢討한 結果 대체로 90% 程度는 母菌과 비슷한 醱酵力을 보였다.

또한 選定한 30~24 및 40~27의 變異株에 對해서 10일 간격으로 二次, 三次로 0.1% 生存率을 보이는 照射條件으로 再照射시켜 發育된 colony

에서 釣菌하여 그들의 醱酵力을 測定하여 본 結果 效果의인 菌株를 얻지 못하였다.

한편 古川等⁽⁹⁾은 淸酒醱酵술덧의 酵母動態를 調査하는데 標識酵母로 쓰기 위하여 紫外線照射로서 얻은 淸酒酵母變異株의 醱酵力이 母菌과 비슷하였다고 한바 있는데 筆者는 母菌에 比하여 醱酵力이 다소 강한 變異株를 얻은 것이다.

그리고 選定한 3變異株中 30~24와 酸生成菌인 30~81은 5-Y-5菌株를 母菌으로 30cm 거리에서 60秒 照射로서 40~27은 6-Y-6菌株를 母菌으로 40cm 거리에서 140秒 照射시켜 그 0.1% 生存率區들에서 얻은 것이다.

4) 選定酵母의 同定 : 分離選定한 5-Y-5 및 6-Y-6의 2母菌株와 30~24, 30~81 및 40~27의 3變異株를 Lodder⁽²¹⁾의 分類法에 依하여 同定한 結果는 表 2, 3, 4, 5와 같다.

Table 2. Morphological characteristics of the selected yeasts and it's mutants

Strain No.	Cell form		Aascospore		Pseudomycelium
	size	shape	number	shape	
5-Y-5	(3.0~6.9) × (3.8~9.7) μ	ovoid	1~2	global, spheroidal	—
6-Y-6	(3.7~7.6) × (4.6~10.7) μ	ovoid, ellipsoidal	1~2	global, spheroidal	—
30-24	(3.8~7.7) × (3.7~9.6) μ	ovoid	1~2	global, spheroidal	—
40-27	(3.0~6.5) × (5.7~10.3) μ	ovoid ellipsoidal	1~2	global, spheroidal	—
30-81	(3.8~7.3) × (3.4~10.0) μ	ovoid	1~2	global, spheroidal	—

Table 3. Cultural characteristics of the selected yeasts and it's mutants.

Strain No.	5-Y-5	6-Y-6	30-24	40-27	30-81
formation of sediment	+	+	+	+	+
formation of pellicle, ring and islet	—	—	—	—	—
splitting of arbutin	—	—	—	—	—
assimilation of KNO ₃	—	—	—	—	—

assimilation of ethylamin hydrochloride	-	-	-	-	-
growth in vitamin free medium	-	-	-	-	-
growth on 50%(w/w) glucose yeast extract agar	+	+	+	+	+
growth on 60%(w/w) glucose yeast extract agar	+	-	+	+	+
cycloheximide resistance	-	-	-	-	-
growth at 37°C	+	+	+	+	+
growth at 40°C	+	+	±	±	-

Table 4. Fermentation of carbohydrates.

Carbohydrates	Strain No.	5-Y-5	6-Y-6	30-24	40-27	30-81
glucose		+	+	+	+	+
galactose		+	+	+	+	+
maltose		+	+	+	+	+
sucrose		+	+	+	+	+
cellobiose		-	-	-	-	-
trehalose		+	+	+	+	+
lactose		-	-	-	-	-
melibiose		-	-	-	-	-
raffinose		$+\left(\frac{1}{3}\right)$	$+\left(\frac{1}{3}\right)$	$+\left(\frac{1}{3}\right)$	$+\left(\frac{1}{3}\right)$	$+\left(\frac{1}{8}\right)$
inulin		-	-	-	-	-
soluble starch		-	-	-	-	-
α -methyl-D-glucoside		+	+	+	+	+

Table 5. Assimilation of carbon compounds.

Carbohydrates	Strain No.	5-Y-5	6-Y-6	30-24	40-27	30-81
glucose		+	+	+	+	+
galactose		+	+	+	+	+
L-sorbose		-	-	-	-	-
maltose		+	+	+	+	+
sucrose		+	+	+	+	+
cellobiose		-	-	-	-	-
trehalose		+	+	+	+	+
lactose		-	-	-	-	-
D-ribose		-	-	-	-	-
L-rhamnose		-	+	-	+	-
ethanol		-	+	-	+	-
glycerol		-	-	-	-	-
erythritol		-	-	-	-	-
adonitol		-	-	-	-	-
dulcitol		-	-	-	-	-
α -methyl-D-glucoside		+	+	+	+	+
melibiose		-	-	-	-	-
salicin		-	-	-	-	-
raffinose		+	+	+	+	+
melezitose		-	-	-	-	-
inulin		+	-	+	-	+
soluble starch		-	-	-	-	-

D-xylose	-	+	-	+	-
L-arabinose	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	+	+	+
DL-lactic acid	+	+	+	+	+
succinic acid	-	-	-	-	-
citric acid	-	-	-	-	-
i-inositol	-	-	-	-	-

表 2, 3, 4 및 5에서와 같이 2母菌株와 3變異株가 다 sucrose, maltose raffinose(半) 및 galactose를 醱酵하고 soluble starch를 醱酵하지 못하고 cellobiose, salicin 및 melibiose를 자화하지 못하며 arbutin을 분해하지 못하는 點 등으로 보아 *Sac. cerevisiae*로 同定되었다.

그러나 2母菌株間에는 탄소원의 자화성에서 若干의 差異가 있었으며 또한 그들의 침전菌體가 6-Y-6菌株는 쉽게 분산되나 5-Y-5菌株는 쉽게 분산되지 않는 點등의 差異를 인정할 수 있었다.

摘 要

忠南北의 12個地域에서 수집한 탁약주 술덧과 누룩에서 24株의 酵母를 分離한 後 醱酵力이 강한 2菌株를 母菌으로 選定하여 여러 條件下에서 紫外線을 照射시켜 그 酵母의 生存率을 測定하고 또한 選定한 2母菌株와 紫外線照射로 얻은 3變異株의 菌學的 諸性質을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 紫外線 照射에 依한 選定酵母의 生存率은 다음과 같다.

照射距離	1%生存率	0.1%生存率	完全死滅
10(cm)	1(sec)	15~20(sec)	>25(sec)
20	20	40	>60
30	30~40	60~70	>90
40	70~90	140~160	>220

2. 選定酵母에 紫外線을 照射시켜 0.1% 生存率區에서 發育한 菌株들의 醱酵力을 測定하여 醱酵力이 母菌보다 約 10% 강한 30~24 및 40~27의 2菌株와 母菌에서는 없든 강한 生酸能을 보인 30~81 菌株를 選定하였다.

3. 選定酵母를 Lodder의 分離法으로 同定한 結果 *Saccharomyces cerevisiae*로 同定되었으며 3變異株들도 同定上의 特性에는 그 母菌들과 差름이 없었다.

參 考 文 獻

- 1) 金燦祚: 한농화지 10, 69 (1968).
- 2) 愼鏞斗, 曹惠鉉: 미생물 학회지 8, 53 (1970).
- 3) 金俊彦, 李培咸: 미생물학회지 8, 77 (1970).
- 4) 李周植, 李泰雨: 미생물학회지 8, 116 (1970).
- 5) 韓容錫: 충남대학교 대학원 연구보고집 1, 187 (1972).
- 6) 朴允仲, 李錫健, 吳萬鎭: 한국농화지 16, 78 (1973).
- 7) 植竹久雄等 編集: 微生物 遺傳學, p.81 (1967). 朝倉書店.
- 8) F. Fabre, Mutation research, 10 415 (1970).
- 9) 古川敏郎, 秋山裕一: 日農化誌 36, 354(1962)
- 10) Thomulka, K. W. & A. G. Moat: J. Bacteriology, 96, 283 (1968).
- 11) Albert G. Moat, et al: J. Bacteriology 77, 673 (1959).
- 12) Richard snow: Nature 211, 206 (1966).
- 13) 李啓瑚, 張健型: 미생물학회지 3, 9 (1965).
- 14) 金浩植, 李春寧, 李啓瑚, 金尙淳: 한농화지 11, 137 (1969).
- 15) 裴武, 李啓準: 미생물학회지 10, 73 (1972).
- 16) 민태익, 김항목, 권태완: 한국식품과학회지 4, 123 (1973).
- 17) 秋山裕一: 日釀協誌 58, 1155 (1963)
- 18) 井口信義: 日農化誌 23, 357 (1950).
- 19) 下田忠次郎: 日農化誌 26, 645 (1952).
- 20) 東京大學 農藝化學教室: 實驗農藝化學上卷, 2 67 (1960). 朝倉書店.
- 21) J. Lodder: The yeast, A taxonomic study. (1971), North holland Publishing Co.