

紫外線照射에 의한 탁주酵母의 變異株育成에 관한 연구 (제 2 보)

—變異株의 生理的性質에 관하여—

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 2)

On the Physiological Characteristics of the Mutants.

Chan Jo Kim, Man Jin Oh and Seung Yul Kim,
College of Agriculture, Chungnam National University
(Received Oct.12, 1974)

Summary

This experiment was carried out to investigate the the physiological characteristics of two original yeasts, 5-Y-5 and 6-Y-6, which selected from 24 Takju yeasts and three mutants, 30-24, 30-81 and 40-27. induced from two original yeasts by the irradiation of UV light. The results were summarized as follows.

- 1) Alcohol tolerances of three mutants were decreased in some degree as compared with those of original yeasts.
- 2) Tolerances of lactic and citric acids of acid producing mutant 30-81, was increased than those of original yeasts.
- 3) In the case of using ammonium sulfate as a nitrogen source, two original yeasts and three mutants required Ca-pantothenate as a essential growth factor and four strains of yeasts except the mutant, 30-81, required biotin as a stimulated growth factor, When asparagine was used as a nitrogen source, two original yeasts and three mutants showed the same as above result but the stimulated effect of biotin was far less.
- 4) Propagation powers of the mutants were weakened than those of original yeasts, particular that of acid producing mutant, 30-81, was the weakest in the three mutants.
- 5) The optimum temperature for fermentation of original yeasts were 30°C to 35°C but three mutants were 25°C to 30°C.
- 6) The optimum pH for fermentation of original yeasts were pH 5 to 6, and there is no appreciable difference between original yeasts and three mutants.
The fermentation power of mutant, 30-81, was decreased more rapidly than those of other mutants according to approach neutral.

Three mutants were more sensible to heat than original yeasts.

- 7) Two original yeasts and three mutants were inhibited more over 20 percent of sugar for fermentation and three mutants were more sensible to sugar concentration than original yeasts.

緒 論

筆者들은 前報⁽¹⁾에서 選定한 2菌株의 濁酒酵母에 여러 條件으로 紫外線을 照射시켜 그 生存率을 測定하고 또한 醱酵力과 酸生成能 및 vitamin 要求性 등에서 母菌과 差異가 認定된 變異株의 菌學的 諸 性質을 調査하여 同定한 結果를 發表하였다.

古川⁽²⁾ 등은 清酒酵母의 紫外線變異株의 醱酵力 및 繁殖力 등 諸 性質에 對한 報告를 한바 있으며 Fabre⁽³⁾는 酵母의 生育期와 그 細胞中의 DNA 含量에 따르는 紫外線의 感受性에 對하여 發表 한바 있다.

한편 濁酒酵母의 生理的 性質에 對한 研究은 金⁽⁴⁾ 및 韓⁽⁵⁾의 報告가 있으나 紫外線照射에 依한 濁酒酵母의 變異에 關한 報文은 없다.

筆者들을 紫外線照射로 얻은 濁酒 酵母의 變異株에 對하여 alcohol 및 酸의 耐性, vitamin 要求性, 繁殖力 및 醱酵力 등을 調査하여 結果를 얻었음으로 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

I. 供試菌株

前報에서 選定한 濁酒酵母 5-Y-5 및 6-Y-6 菌株과 이 兩菌株에 紫外線을 照射시켜 얻은 30-24, 40-27 및 30-81의 3變異株를 供試菌株로 하였다.

II. 實驗方法

1. Alcohol, 酸 및 亞窒酸의 耐性

맥아즙(Bllg 12°)培地에 1%간격으로 ethanol 11~15%, 구연산 2~6% 및 젖산 2~5%를 添加하고 또한 0.001%에서 10배 간격으로 1%까지 NaNO_2 을 各各 添加하여 供試菌株를 接種시켜 30°C에서 5日間 培養하면서 그 耐性을 檢討하였다.

2. Vitamin 要求性

飯塚⁽⁶⁾ 등의 方法에 따라 窒素源을 確安으로 한 Wickerham^(6,7) 合成培地의 vitamin 결핍배지를 基本培地로 하고 biotin, Ca-pantothenate, folic acid, inositol, niacin, P-aminobenzoic acid, pyridoxine-HCl, riboflavin 및 thiamine-HCl의 vitamin을 省略法과 單獨試驗法으로 各各 所定量^(6,7)씩 添加한 培地 10ml에 供試菌株의 懸液 0.1ml를 接種하

여 30°C에서 5日間 培養하면서 24時間마다 Spectrophotometer(Hitachi 124)로 660 μ 에서 O.D.를 測定하여 그 要求性이 絕對的, 刺激的 또는 非要求인가를 判定하였다. 그리고 窒素源을 asparagine으로 한 基本培地를 써서 같은 試驗을 하였다. 接種菌株는 YM培地에 48時間 前培養한 菌株를 saline으로 3회, 滅菌水로서 1회 洗滌後 接種되는 菌數가 約 2,500/ml個가 되게 滅菌水로 희석하여 使用하였다.

3. 繁殖力測定

500ml 삼각 flask에 맥아즙(Bllg 12°, pH5.0) 및 YM培地(pH5.0)를 200ml씩 分注하여 前培養한 供試菌株를 一定量 接種하고 30°C에서 4日間 培養하면서 12時間마다 그 5ml씩을 取하여 증류수로 10배 희석시켜 各 原培地를 對照로 Spectrophotometer (660 μ)로서 O.D.를 測定하였다.

4. 醱酵溫度 및 pH

pH를 1.0의 간격으로 pH3.0~7.0까지 調製한 맥아즙(Bllg 12°) 40ml씩을 meissel 장치를 붙인 100ml 삼각 flask에 分注한 후 맥아즙 斜面上에 48時間 前培養한 供試菌株를 다시 맥아즙(pH5.0)에 48時間 前培養시켜 그 0.2ml를 接種하여 25°C, 30°C 및 35°C에서 4日間 培養하면서 12時間마다 그 減量을 測定하여 判定하였다.

5. 糖度別 醱酵試驗

맥아즙에 糖濃도가 15%, 20%, 25% 및 30%되도록 無水포도당을 添加하여 맥아즙(Bllg 12°, pH5.0)에 48時間 前培養한 供試菌株를 0.2ml 接種시켜 30°C에서 4日間 培養하면서 12時間마다 減量을 測定하였다.

結果 및 考察

1. Alcohol, 酸 및 亞窒酸의 耐性

alcohol, 구연산 및 젖산에 對한 各選定酵母들의 耐性을 測定한 結果는 다음 表 1, 2 및 3과 같다.

表 1, 2 및 3에서 보는 바와 같이 alcohol 耐性은 그 母菌株에 있어서 12%에 對하여 3變異株는 다같이 多少 弱해진 結果를 보였으며 구연산耐性을 5-Y-5菌株와 그 變異株들이 6-Y-6菌株와 變異株보다 強하여 3%에서도 生育함을 보였다. 特히

Table 1. Alcohol tolerances

Strains	Alcohol%	11	12	13	14
	5-Y-5	+	+	-	-
30-24	+	-	-	-	-
30-81	+	-	-	-	-
6-Y-6	+	+	-	-	-
40-27	+	-	-	-	-

Table 2. Acid tolerances

Acids	Strains	Acid%	2	3	4	5	6
		5-Y-5	C	+	+	-	-
	L	+	+	-	-	-	
30-24	C	+	+	-	-	-	
	L	+	+	-	-	-	
30-81	C	+	+	+	+	-	
	L	+	+	±	-	-	
6-Y-6	C	+	-	-	-	-	
	L	+	+	-	-	-	
40-27	C	+	-	-	-	-	
	L	+	+	-	-	-	

C: citric acid
L: lactic acid

Table 3. Sodium nitrite tolerances

Strains	NaNO ₂ %	1%	0.1%	0.01%	0.001%
	5-Y-5	-	+	+	+
30-24	-	+	+	+	
30-81	-	-	+	+	
6-Y-6	-	+	+	+	
40-27	-	+	+	+	

酸生成 變異株로 選定한 30-81菌株은 5%에서도 生育하여 그 母菌인 5-Y-5菌株에 比하여 현저히 強하였다. 또한 젖산耐性を 5-Y-5菌株 및 그 變異株나 6-Y-6菌株 및 그 變異株들이 비슷하여 3%에서 生育하였으나 30-81菌을 젖산에서도 母菌株보다 多少 強한 耐性を 가지고 있었으며 亞窒酸鹽의 耐性은 一般의으로 強하여 酸生成菌인 30-81菌株에 있어서는 0.01%에서 生育하고 其他 菌株은 0.1%에서 生育함을 보였다. 이와같은 耐性を 金⁽⁴⁾ 및 韓⁽⁵⁾의 報告와 비슷한 結果이었으나 30-81菌株은 이들 耐性に 있어서 그 母菌과 많은 差異를 나타냈다.

2. Vitamin 要求性

窒素源을 硫安으로 한 Wickerham 培地에 9種의 供試 vitamin 을 使用하여 省略法과 單獨法으로 그 要求性を 檢討하여 菌體의 生育度를 O.D.로 表示한 結果는 表 4-1 및 4-2와 같다.

Table 4-1 Vitamin requirement of the selected yeasts for growth (Unit:OD)

Strains	Media No	Nitrogen sources										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5-Y-5	A	0	1.230	0.120	0	1.250	1.240	1.260	1.270	1.280	1.270	1.250
	N	0	1.220	0.810	0	1.150	1.150	1.090	1.130	1.030	1.050	1.160
30-24	A	0	1.270	0.080	0	1.280	1.260	1.290	1.260	1.280	1.280	1.260
	N	0	1.250	1.200	0	1.180	1.190	1.210	1.230	1.090	1.210	1.210
30-81	A	0	1.220	0.120	0	1.240	1.200	1.240	1.240	1.240	1.250	1.200
	N	0	1.190	0.800	0	1.130	1.150	1.140	1.150	1.110	1.130	1.140
6-Y-6	A	0	1.320	0.300	0	1.310	1.300	1.310	1.320	1.320	1.320	1.320
	N	0	1.310	1.050	0	1.250	1.290	1.230	1.260	1.220	1.230	1.270
40-27	A	0	1.310	0.090	0	1.300	1.210	1.290	1.320	1.290	1.290	1.300
	N	0	1.150	0.890	0	1.130	1.090	1.080	1.150	1.070	1.090	1.130

Media No. 0: Vitamin free Wickerham medium with ammonium sulfate or asparagine

1: Wickerham's complete medium

2: " " omitted biotin

3: " " Ca-pantothenate

Media No. 4:	Wickerham's complete medium omitted folic acid
" 5:	" " inositol
" 6:	" " niacin
" 7:	" " p-aminobenzoic acid
" 8:	" " pyridoxine-HCl
" 9:	" " riboflavin
" 10:	" " thiamine-HCl

Nitrogen sources A: Asparagine
N: (NH₄)₂SO₄

The yeasts incubated at 30°C for 4 days.

Table 4-2 Vitamin requirement of the selected yeasts for growth (Unit:O.D)

Strain No.	Nitrogen sources	Media No	1	2	3~9
5-Y-5	A		0	0.820	0
	N		0	0.870	0
30-24	A		0	0.440	0
	N		0	0.920	0
30-81	A		0	0.740	0
	N		0	0.880	0
6-Y-6	A		0	0.390	0
	N		0	0.890	0
40-27	A		0	0.180	0
	N		0	1.030	0

Media No. 1: Wickerham's basal medium with biotin

2:	"	Ca-pantothenate
3:	"	folic acid
4:	"	inositol
5:	"	niacin
6:	"	p-aminobenzoic acid
7:	"	pyridoxine-HCl
8:	"	riboflavin
9:	"	thiamine-HCl

Nitrogen sources A: Asparagine
N: (NH₄)₂SO₄

The yeasts incubated at 30°C for 4 days.

表 4-1의 結果에서 보는 바와 같이 5菌株가 Ca-pantothenate 를 必須的인 生育因子로 要求하였으 며 biotin 은 5菌株中 30-24菌株를 除外한 4菌株는 生育에 刺激的인 因子로 要求하나 30-24菌株는 要求하지 않았으며 이 結果는 表 4-2에서와 같이 供試 vitamin 의 單獨試驗法에서도 같은 結果를 얻 었다. 한편 窒素源을 asparagine 으로 하여 試驗한 結果도 위와 一致되는 것이었으며 各菌株의 生育 에 對한 biotin 의 效果가 硫安을 窒素源으로 할때 에 比하여 弱한 傾向을 보였다. 그리고 濁酒酵母 의 vitamin 要求性에서 韓⁽⁵⁾은 必須的인 生育因子 가 되는 vitamin 은 없고 大體로 biotin 이 刺激的

인 生育因子가 된다고 發表하였으나 筆者의 試驗 結果에서는 必須的인 因子로서 Ca-pantothenate 가 要求되었으며 谷⁽⁸⁾은 淸酒酵母에서 硫安을 窒素源 으로 하였을때 必須的인 因子로서 Ca-pantothenate 를 要求하며 biotin, thiamin 및 inositol 등이 刺激 的인 因子로 要求된다고 報告한 바 있다.

3. 繁殖力

맥아즙(Bllg 12°, pH5.0)과 YM 液體培地(pH 5.0)에 選定한 供試菌株를 各各 接種하여 30°C 에 서 4日間 培養하면서 菌株의 繁殖度를 O.D 로 表示한 結果는 圖1 및 2와 같다.

圖 1 및 2에서와 같이 紫外線照射를 받은 3變異

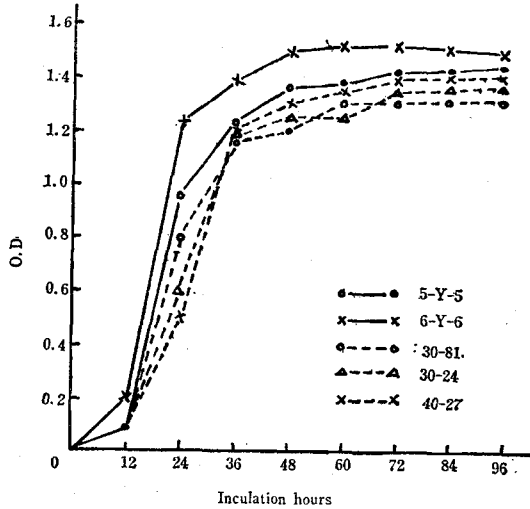


Fig. 1. Time course of cell propagation of the selected yeasts.
The yeast's were cultured at 30°C in malt extract.

株는 그들 母菌에 比하여 繁殖力이 多少 低下되었 으며 Haematometer 로서 그 培養液中の 菌數를 計數한 結果와 맥아즙 및 YM 培地의 平板上에 發育 되는 colony 의 크기를 測定한 結果도 3變異株의 繁殖力이 多少 弱화된 結果를 보였다. 이것으로 紫外線을 照射받은 3變異株의 繁殖力은 母菌에 比하여 弱하여 졌음을 알 수 있었다. 한편 古川等⁽⁹⁾ 은 淸酒酵母에 紫外線을 照射시켜 繁殖力이 母菌과 비슷한 變異株를 얻었다고 報告한 바 있다.

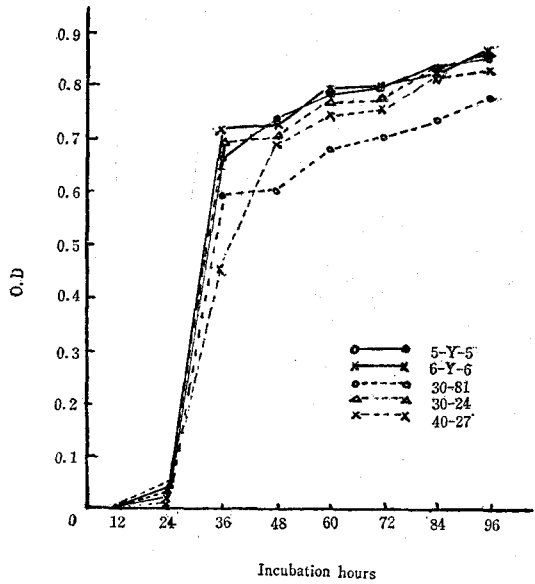


Fig. 2. Timecourse of cell propagation of the selected yeasts.
The yeasts were cultured at 30°C in YM medium.

4. 最適醱酵溫度

供試菌株들을 맥아즙(Bllg12°, pH5.0)에 接種하여 25°C, 30°C 및 35°C에서 4日間 培養하면서 減量을 測定한 結果는 圖3과 같다.

圖3에서와 같이 各變異株의 初醱酵力은 그 母菌株보다 弱하였으나 約 60時間 後부터의 醱酵力이 더 強함을 보였다. 또한 25°C에서의 初醱酵力은

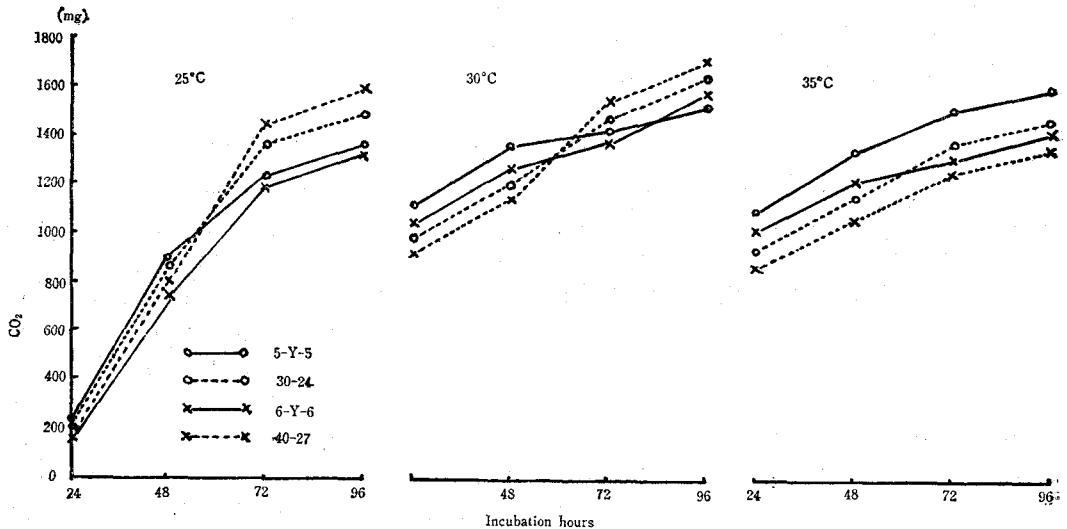


Fig. 3. Effect of individual temperature on the fermentation of the selected yeasts.
The yeasts were cultured malt extract medium.

30°C 以上에서 보다 현저히 낮았으나 시간이 지남에 따라 溫度에 따르는 醱酵力의 差異는 적어지는 傾向이였으며 30°C까지는 變異株가 그 母菌에 比하여 醱酵力이 優勢하나 35°C에서는 反對로 母菌이 더 優勢하였다. 그리고 變異株의 醱酵力은 35°C에서 보다 25°C區가 더 良好함을 보여 이것은 後述하는 變異株의 熱感受性과도 符合되는 結果라고 하겠다. 한편 生育適溫은 醱酵適溫과 비슷하였으나 40°C에서 母菌인 5-Y-5菌株 및 6-Y-6菌株는 多少 發育하였고 變異株인 30-24菌株 및 40-27菌株들은 母菌에 比하여 더 弱하게 發育하고 酸生成菌인 30-81은 全然 發育하지 못 하였다. 이것으로 變異株들은 熱에 對한 感受性이 높아졌음을 알 수 있었다.

5. 最適醱酵 pH

맥아즙(Bllg12°)의 pH를 3~7로 調整한 후 供試菌을 接種하여 30°C에서 4日間 培養하면서 12時間마다 減量을 測定한 結果는 圖 4 및 5와 같다

圖 4 및 5에서와 같이 各菌株의 醱酵最適 pH는 5內外이였으나 醱酵初期에서는 오히려 pH6에서 醱酵力이 强하였다. 酸生成菌인 30-81菌株는 中性으로 됨에 따라 他菌株에 比하여 醱酵力이 低下됨을 알 수 있었으며 이것은 中性附近에서 더 많은 酸을 生成하는 까닭이라고 생각된다. 醱酵最適 pH는 母菌과 變異株사이에 뚜렷한 差異가 없었으며 한편 生育最適 pH도 醱酵最適 pH와 같은 傾向이 었다.

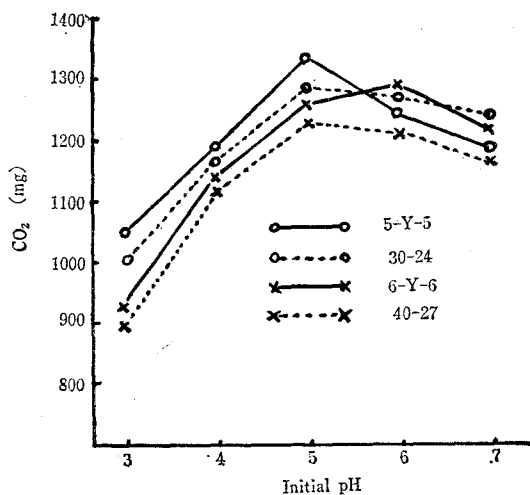


Fig. 4. Effect of pH on the fermentation of the selected yeasts. The yeasts were cultured at 30°C for 2 days in malt extract.

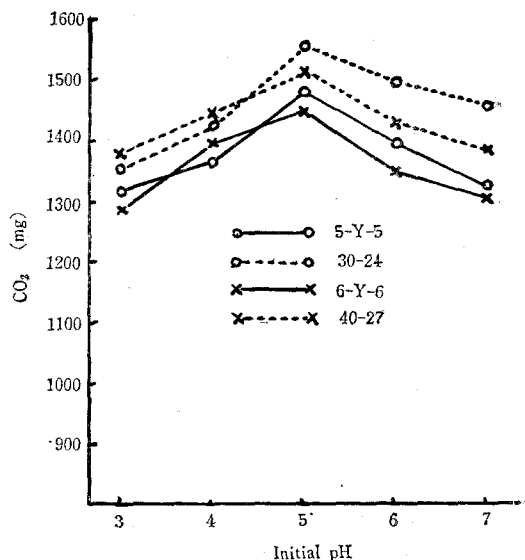


Fig. 5. Effect of pH on the fermentation of the selected yeast. The yeasts were cultured at 30°C for 4 days in malt extract.

6. 糖度別醱酵力

맥아즙(Bllg 12°, pH5.0)에 所定量의 無水포도당을 添加시켜 糖度를 15%, 20%, 25% 및 30%로 調整한 후 供試菌을 接種하여 30°C에서 培養하면서 4日동안 12時間마다 減量을 測定한 結果는 圖 6과 같다.

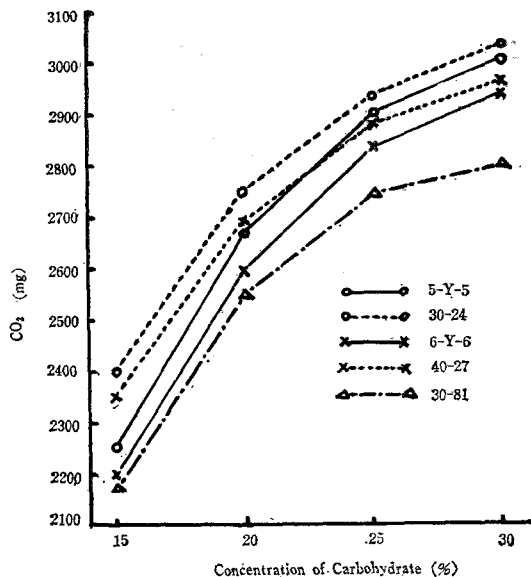


Fig. 6. Effect of concentration of carbohydrate on the fermentation of the selected yeasts. The yeasts were cultured at 30°C for 2 day 2 days in malt extract.

圖6에서의와 같이 糖濃도가 20%까지는 各菌株가 醱酵에 큰 阻害를 받지 않으나 20% 以上에서는 많은 阻害를 받는 것이 나타났으며 變異株는 糖濃度에 對한 感受性이 더 強한 傾向이었다.

摘 要

優良濁酒酵母로서 選定한 2母菌株와 母菌株에 紫外線照射로서 얻은 3變異株의 生理的 性質을 檢討한 結果는 다음과 같다.

1) Alcohol 耐性은 母菌에 比하여 3變異株들이 弱하였다.

2) 구연산 및 젖산耐性은 母菌에 比하여 變異株인 30-81菌株는 強하였으나 其他 2變異株는 비슷하였다.

3) 亞窒酸鹽의 耐性은 30-81菌株는 0.01%에서 生育하였으나 다른 2變異株와 母菌株는 0.1%에서 生育하였다.

4) Vitamin 要求성에 있어서 2母菌株와 3變異株는 Ca-pantothenate 를 必須的인 生育因子로 要求하였으며 變異株인 30-24菌株를 除外한 2變異株와 2母菌株들은 biotin 을 刺激的 生育因子로 要求하였다.

5) 變異株의 繁殖力은 母菌에 比하여 弱하여졌

으며 特히 30-81菌株가 弱하였다.

6) 醱酵適溫은 2母菌株는 30-35°C 였고 3變異株는 25~30°C 였다.

7) 醱酵最適 pH는 5~6으로 母菌과 變異株간에 別差異가 없었으며 30-81菌株는 中性으로 됨에 따라 他菌株에 比하여 醱酵力이 低下되었다.

8) 20% 以上의 糖濃度에서는 各菌株가 醱酵에 많은 阻害를 받았으며 變異株들의 糖濃度에 對한 感受性은 더욱 強하였다.

參 考 文 獻

- 1) 金燦祚, 吳萬鎭, 金聖烈: 韓農化 18, 10 (1975)
- 2) 古川敏郎, 秋山裕一: 日農化誌 36, 354 (1962)
- 3) F.Fabre: Mutation research. 10. 415~426 (1970)
- 4) 金燦祚: 韓農化誌 10, 69 (1968)
- 5) 韓容錫: 忠南大學校 大學院 研究報告集 1, 187 (1972)
- 6) 飯塚 廣, 後藤 照二 著: 酵母의 分離同定法 (1969) 東京大學出版會.
- 7) J. Lodder: The yeasts, A Taxonomic study (1971) North-Holland publishing Co.
- 8) 谷 喜雄: 日釀協誌 57, 30 (1962)
- 9) 古川敏郎, 秋山裕一: 日農化誌 36, 354, (1962)