

니트로조구아니딘처리에 의한 트레할로즈함량이 높은 빵효모(*Saccharomyces cerevisiae* 6232-53)의 선발육종

리명혁, 김영조

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《경공업공장들에서 현대화, CNC화를 적극 다그치고 원료, 자재의 국산화비중을 높여 생산을 정상화하며 모든 시, 군들에서 자기 지방의 실정에 맞게 지방공업을 발전시켜 여러 가지 질 좋은 인민소비품들을 더 많이 생산하도록 하여야 합니다.》

우리는 빵생산에 쓰이는 건조효모생산균주를 국산화하기 위한 연구를 하였다.

건조효모는 건조과정에 열에 의하여 생존률과 활성이 심히 낮아지는데 이를 막자면 효모세포내 트레할로즈함량이 높아야 한다.[1-3]

우리는 니트로조구아니딘(NTG)처리에 의한 육종방법으로 트레할로즈함량이 출발균에 비해 1.93배 높은 건조효모생산균 *Saccharomyces cerevisiae* 6232-53을 육종하였다.

재료와 방법

출발균주로는 자외선조임으로 육종선발한 *Saccharomyces cerevisiae* 6232-43을 썼다.

균배양배지 사면배지로는 길금즙-우무배지를, 평판배지로는 포도당-펩톤-효모엑스-우무배지(포도당 2.0g, 펩톤 1.0g, 효모엑스 0.5g, KH_2PO_4 0.3g, 우무 2.0g, 수도물 100mL, pH 7.0)를, 진탕배양배지로는 포도당-펩톤-효모엑스배지를 리용하였다.

시약으로는 류산(분석순), 안트론(분석순), 삼염화초산(분석순), 포도당(분석순), 펩톤(《Oxoid》), 효모엑스(《Oxoid》), KH_2PO_4 (분석순)을 썼다.

NTG처리에 의한 트레할로즈활성이 높은 빵효모의 육종방법 자외선조임하여 육종선발한 트레할로즈함량이 높은 균주(*Sac. cerevisiae* 6232-43)를 화학변이제인 NTG로 처리하였다.

먼저 길금즙-우무사면배지에서 활성화시킨 균을 포도당-펩톤-효모엑스배지에 한백금이 접종하여 30°C 조건에서 64h동안 진탕배양하고 멸균한 원심분리관에 넣어 3 000r/min에서 10min동안 원심분리하였다. 침전물에 멸균한 생리적식염수를 넣어 효모균체농도가 10^6CFU/mL 정도 되게 현탁하였다.

현탁액 0.5mL에 각이한 농도의 NTG가 첨가된 생리적식염수를 0.5mL씩 넣고 각이한 시간 처리한다.

시료액 0.05mL를 취하여 평판배지에 도말하고 30°C에서 48h동안 배양한 다음 출현한 균무지수를 측정하여 다음의 식으로 생존률(%)을 구하였다.

$$\text{생존률} = \frac{\text{처리구 0.05mL속의 효모균수}}{\text{대조구 0.05mL속의 효모균수}} \times 100$$

출현한 단독균무지들을 길금즙우무배지에 접종하여 30℃에서 48h동안 배양한 다음 포도당-펩톤-효모엑스배지에 한백금이씩 접종하여 48h동안 진탕배양하였다.

배양액을 3 000r/min에서 10min동안 원심분리하여 균체를 모으고 트레할로즈함량을 측정한 다음 양성변이률(%)을 구하였다.

$$\text{양성변이률} = \frac{\text{출발균보다 트레할로즈함량이 높은 효모균수}}{\text{총효모균수}} \times 100$$

육종균주들의 트레할로즈함량은 류산-안트론법[1]으로 분석하였다.

결과 및 논의

배양시간에 따르는 빵효모 *Sac. cerevisiae* 6232-43의 생장곡선 우리는 NTG처리에 적합한 빵효모의 배양시간을 결정하기 위하여 먼저 배양시간에 따르는 빵효모의 생장곡선을 조사하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 진탕배양조건에서 배양 6h부터 균체수는 급격히 증가하다가 24h이후에는 균체수증가가 거의 없었고 배양 48h이후에는 효모균체수가 감소하였다.

각이한 배양단계에 따르는 NTG의 처리효과 일반적으로 균배양나이에 따라 변이체의 처리효과는 다르므로 우리는 배양시간이 4h(유도기), 8, 16, 24h(대수기), 40h(정상기), 56h(사멸기)인 때의 균들을 취하여 NTG를 같은 농도(2mg/mL)로 1h동안 처리하였는데 그 결과는 그림 2와 같다.

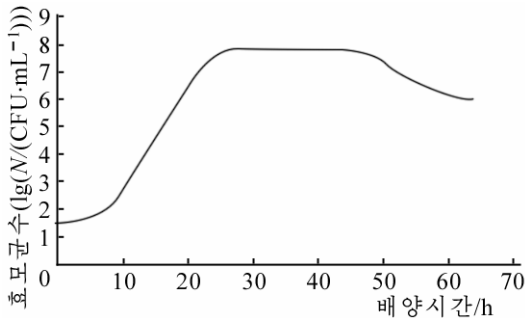


그림 1. 배양시간에 따르는 빵효모의 생장곡선

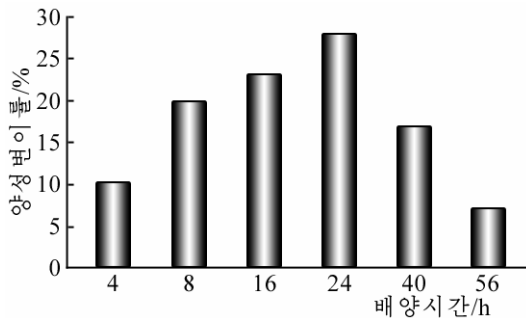


그림 2. 각이한 배양단계에 따르는 NTG의 처리효과

그림 2에서 보는바와 같이 NTG처리효과는 대수기말기(24h)때 높았다. 그러므로 우리는 NTG처리에 적합한 빵효모 *Sac. cerevisiae* 6232-43의 배양시간을 24h로 정하였다.

NTG처리농도와 처리시간에 따르는 빵효모 *Sac. cerevisiae* 6232-43의 생존률변화 NTG농도를 0~5mg/mL에서 1mg/mL씩 변화시키면서 균을 각이한 시간(0.5, 1.0, 1.5, 2.0h)동안 처리하고 평판배지에 도말하여 30℃에서 48h동안 배양하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 NTG농도와 처리시간이 증가함에 따라 빵효모의 생존률은 급격히 낮아지며 같은 NTG처리농도에서도 처리시간에 따라 생존률은 서로 다르다는것을 알 수 있다.

선행연구들[1-3]에서는 처리시간을 1h로 고정시키고 NTG처리농도에 따르는 빵효모의 생존률을 조사하였을뿐 처리시간과 처리농도를 함께 변화시키면서 생존률을 조사한 자료는 제기된것이 없다.

NTG처리농도와 처리시간에 따르는 빵효모 *Sac. cerevisiae* 6232-43의 양성변이를 각이한 NTG처리농도와 시간에서 출현한 효모균무지들을 20개씩 취하여 계대배지에서 각각 배양하고 진탕배양하여 트레할로즈함량을 측정하였다.

출발균에 비하여 트레할로즈함량이 높은 균주들을 조사하고 양성변이률을 구하였다.(그림 4)

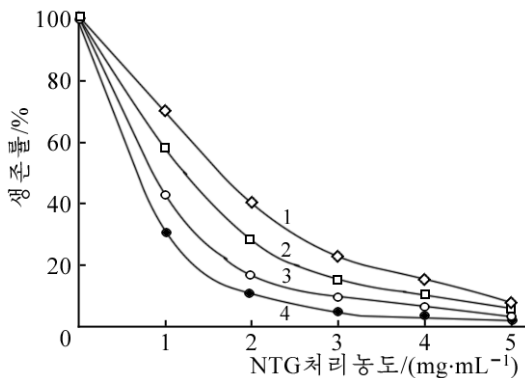


그림 3. NTG처리농도와 처리시간에 따르는 빵효모의 생존률곡선

1-4는 처리시간이 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0h일 때

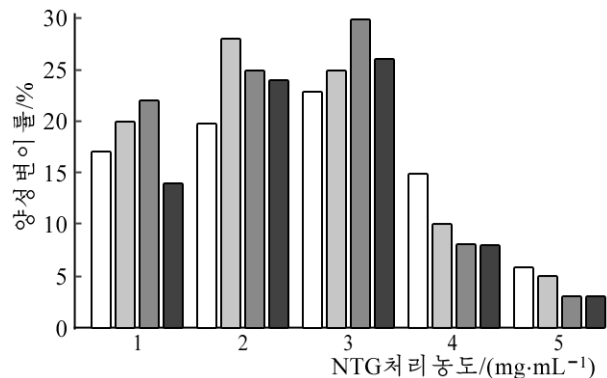


그림 4. NTG처리농도와 처리시간에 따르는 빵효모의 양성변이률

처리시간: □ 0.5h, ▒ 1.0h, ▓ 1.5h, ■ 2.0h

그림 4에서 보는바와 같이 NTG처리농도가 증가함에 따라 빵효모의 양성변이률이 낮아졌다.

NTG 3mg/mL, 1.5h처리구에서 양성변이률이 30%로서 제일 높았다. NTG처리농도 5mg/mL, 1.5h처리구에서는 양성변이률이 3%수준이었는데 이것은 활성이 높은 균주들이 적지 않게 사멸되었기때문이라고 본다.

NTG처리에 의하여 트레할로즈함량이 높은 빵효모 *Sac. cerevisiae* 6232-53의 선발 각이한 농도의 NTG로 각이한 시간 처리하여 출현한 균주들중에서 출발균주보다 활성이 높은 균주 4개를 선발하여 트레할로즈함량을 측정한 결과는 표 1과 같다.

표 1. NTG처리에 의한 트레할로즈함량이 높은 균주선발

균주	균체량/(CFU·mL ⁻¹)	트레할로즈함량/%
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232(초기출발균)	$4.8 \cdot 10^8$	11.8
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232-43(자외선조임)	$4.9 \cdot 10^8$	17.4
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232-18(NTG처리)	$4.6 \cdot 10^8$	19.2
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232-35(NTG처리)	$4.8 \cdot 10^8$	20.0
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232-53(NTG처리)	$4.8 \cdot 10^8$	22.8
<i>Sac. cerevisiae</i> 6232-70(NTG처리)	$5.0 \cdot 10^8$	18.8

표 1에서 보는바와 같이 *Sac. cerevisiae* 6232-53의 트레할로즈함량이 22.8%로서 제일 높았다. 선행연구들[1, 2]에서는 육종균가운데서 트레할로즈함량이 제일 높은 수준이 20%정

도였다. *Sac. cerevisiae* 6232-53은 NTG처리농도 3mg/mL, 1.5h처리구에서 출현한 균주이다.

육종균 *Sac. cerevisiae* 6232-53의 유전학적안정성 육종한 균을 10대까지 계대하면서 트레할로즈함량변화를 측정하였다.(표 2)

표 2. 육종균 *Sac. cerevisiae* 6232-53의 유전학적안정성

계대회수/대	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
균체량 /($\cdot 10^8$ CFU \cdot mL $^{-1}$)	4.8	4.9	4.8	4.7	4.8	4.9	4.9	4.8	4.9	4.8
트레할로즈함량/%	22.8	22.6	22.8	23.0	22.7	22.6	22.8	22.9	22.8	22.6

표 2에서 보는바와 같이 육종균을 10대까지 계대배양해도 균체량과 트레할로즈함량에서는 큰 차이가 없었는데 이것은 육종한 균이 유전적으로 안정하다는것을 보여주는것이다.

맺 는 말

니트로조구아니딘(NTG)처리방법으로 출발균(자외선조임으로 육종한 균)에 비하여 트레할로즈생성량이 1.93배 높은 빵효모 *Saccharomyces cerevisiae* 6232-53을 선발육종하였다.

선발육종한 *Saccharomyces cerevisiae* 6232-53은 트레할로즈생성에서 유전적으로 매우 안정하다.

참 고 문 헌

- [1] 张春玲; 食品科学, 30, 21, 188, 2009.
- [2] 张丽杰; 生物技术, 15, 1, 31, 2005.
- [3] 陈丽君 等; 食品研究与开发, 32, 8, 112, 2011.

주체104(2015)년 9월 5일 원고접수

Selection and Breeding of the Baker's Yeast(*Saccharomyces cerevisiae* 6232-53) having High Contents of Trehalose by Treating Nitrosoguanidine

Ri Myong Hyok, Kim Yong Jo

We selected and bred the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* 6232-53 by treating nitrosoguanidine, which is genetically stable in producing trehalose and the producing amounts of trehalose are 1.93 times higher than the original fungi(bred by ultraviolet irradiation).

Key words: trehalose, nitrosoguanidine(NTG)