

## 질소이온주입법에 의한 *Bacillus licheniformis* 830-3의 육종

리준성, 김영조, 박종원

위대한 수령 김일성동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《오늘 과학자, 기술자들앞에는 매우 중요한 임무가 나서고있습니다. 과학자, 기술자들은 과학연구사업을 더욱 힘있게 벌려 나라의 과학기술수준을 한계단 더 높이며 인민경제를 빨리 발전시키는데 적극 이바지하여야 하겠습니다.》(《김일성전집》 제77권 261페이지)

나라의 미생물효소공업을 하루빨리 첨단수준으로 끌어올리는것은 인민생활을 더욱 향상시켜 사회주의강성국가건설을 다그치는데서 매우 중요한 의의를 가진다.

최근년간 세계적으로 미생물효소공업이 급속히 발전되어 많은 효소제품들이 개발되고 있으며 특히 알카리성프로테아제는 농업, 경공업, 축산업, 가금업, 제약공업 등에 광범히 이용되고있다.[1, 2]

현재 미생물기원의 효소를 실지 생산실천에 도입하는데서 균주의 육종은 효소생성능을 높이는 중요한 고리이다.

우리는 알카리성프로테아제생성균 *Bacillus licheniformis* 830의 효소생합성능을 보다 더 높이기 위하여 새로운 미생물변이방법으로 되고있는 질소이온육종법으로 이 균의 활성을 높이기 위한 연구를 하였다.

### 재료 및 방법

균주로는 알카리성프로테아제생성균인 *Bacillus licheniformis* 830을 이용하였다.

이온가속장치로는 김일성종합대학에서 개발한것을 이용하였다.

질소이온주입시료는 다음과 같이 준비하였다.

펄톤-효모엑스배지에서 고체배양한 균 0.1g정도를 취하여 멸균수에  $1 \times 10^8$ 개/mL정도 되게 현탁시킨 후 현탁액 0.1mL를 멸균한 원형려지( $\phi$  28mm)에 떨어뜨리고 이것을 미리 멸균시킨 주입통에 넣은 다음 마개를 막고 충분히 건조시켰다.

질소이온주입은 선행방법[3, 4]에 준하여 진행하였으며 이때 주입이온으로는  $N^+$ , 가속전압은 20, 25, 30, 35keV로 하였다.

주입시간에 따르는 이온주입량(개/cm<sup>2</sup>)과 생존률(%)은 다음식으로 계산하였다.

$$\text{이온주입량} = \frac{6.25 \times 10^{12} \times \text{주입시간(s)} \times \text{전류}(\mu\text{A})}{\text{주입면적}(\text{cm}^2)}$$

$$\text{생존률} = \frac{N^+\text{이온주입후 살아남은 균수}}{\text{초기균수}} \times 100$$

질소이온을 주입한 균들을 카제인우무평판배지에 도말하여 일정한 기간 배양한 다음 분해도가 큰 균무지들을 선택하여 액체배지에서 다시 배양하였다. 배양후 효소활성이 대조균보다 높은 균주를 선발하여 안정성실험을 하였다.

알카리성프로테아제활성은 카제인을 기질로 하여 폴린시약법[1]으로 측정하였다. 효소활성 1U는 pH 7.0, 37°C에서 1min동안에 1 $\mu$ g의 티로진을 생성하는 효소의 량으로 정하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 질소이온주입조건의 확립

세포변이를 일으키는데 필요한 이온주입조건의 여러 인자들가운데서 우리는 이온가속전압과 이온주입량(주입시간)을 기본인자로 정하고 양성변이률이 최대로 나타나는 질소이온주입조건을 찾았다.

먼저 각이한 가속전압(20, 25, 30, 35keV)으로 질소이온을 주입시키면서 주입시간에 따르는 생존률의 변화를 보았다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 생존률은 가속전압이 상대적으로 높아지고 주입시간이 길어질수록 급격히 낮아졌다. 이것은 주입이온의 에너기가 세균세포의 일정한 부위에 흡수되어 어떤 값을 넘어서게 되면 생존률에 큰 영향을 미친다는것을 보여준다.

가속전압이 20keV인 조건에서 질소이온을 주입시킨 균주의 생존률은 서서히 낮아졌는데 이것은 가속전압이 상대적으로 낮으면 아무리 이온주입량이 커져도 이온들의 침투깊이가 낮은것으로 하여 세균세포에 큰 영향을 주지 못한다는것을 보여준다.

각이한 가속전압하에서 질소이온을 각이한 시간 주입시킨 경우 변이률을 조사한 결과는 그림 2와 같다.

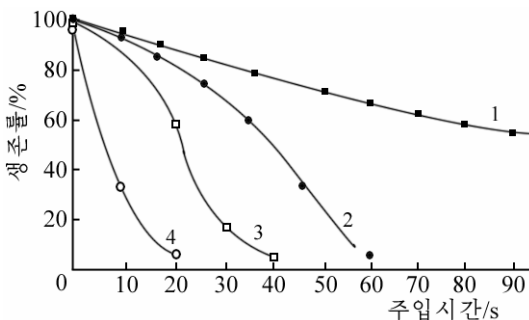


그림 1. 각이한 가속전압하에서 질소이온을 주입하였을 때 주입시간에 따르는 생존률  
1-4는 가속전압이 각각 20, 25, 30, 35keV인 경우

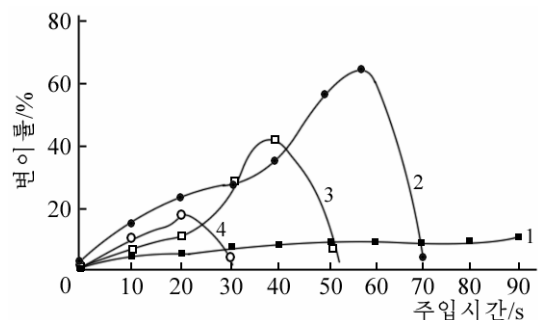


그림 2. 각이한 가속전압하에서 질소이온을 주입하였을 때 주입시간에 따르는 변이률  
1-4는 그림 1의 경우와 같음

그림 2에서 보는바와 같이 변이률은 주입한 가속전압의 크기에 따라 달랐다.

그림 1과 2로부터 변이률은 생존률이 5%이하로 낮아지는 시점들(주입시간)에서 높다는것을 알수 있다.

이로부터 우리는 변이률이 높은(생존률이 5%이하) 주입조건에서 육종한 균주들에 대하여 양성변이률을 조사하였다.(표 1)

표 1. 생존률에 따르는 양성변이률

가속전압 /keV	조사지표	생존률/%								
		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
20	변이률/%	28.3	33.6	51.3	54.2	42.6	21.3	18.2	12.6	7.20
	양성변이률/%	10.8	15.3	17.5	19.3	15.3	9.80	8.70	4.80	—
25	변이률/%	30.6	41.2	62.0	51.7	27.6	24.7	19.3	15.3	6.30
	양성변이률/%	5.40	16.3	21.2	14.6	6.70	5.20	2.20	5.60	—
30	변이률/%	25.6	32.6	36.4	33.5	21.3	13.6	11.2	9.30	2.60
	양성변이률/%	8.70	12.6	15.3	16.5	4.60	3.40	2.60	—	—
35	변이률/%	15.9	17.9	19.6	15.2	13.2	10.6	8.30	3.50	—
	양성변이률/%	—	2.30	4.20	—	—	—	—	—	—

표 1에서 보는바와 같이 25keV의 가속전압으로 이온을 주입시켰을 때 생존률이 2.0% 되는 즉 주입시간이 60s(이온주입량  $4.72 \times 10^{15}$  이온/cm<sup>2</sup>)인 경우에 변이률이 가장 높고 또한 양성변이률도 역시 21.2%로서 가장 높았다.

따라서 가속전압 25keV, 이온주입량  $4.72 \times 10^{15}$  이온/cm<sup>2</sup>를 *Bacillus licheniformis*의 변이를 위한 질소이온주입의 처리조건으로 선정하였다. 이 처리조건은 선행연구의 결과[3]와 거의 일치하였다.

## 2) 균주의 육종과 선발

질소이온주입의 처리조건을 찾는데 기초하여 이 조건하에서 실지 활성균주를 얻기 위한 변이실험을 하였다.

실험은 *Bacillus licheniformis* 830균주를 가속전압 25keV, 이온주입량  $4.72 \times 10^{15}$  이온/cm<sup>2</sup> 조건에서 처리하여 카제인평판배지에 도말하였을 때 분해능이 대조균보다 훨씬 큰 단독균 무지를 얻어내는 방법으로 진행하였다.

카제인평판배지에서 분해능이 큰 4개의 균주를 선발하고 진탕배양하면서 효소생성능을 검토하였다.(표 2)

표 2. 평판에서 분해도가 큰 균주들의 알카리성프로테아제활성

균주	출발균	830-1	830-2	830-3	830-4
균무지직경/mm	1.5	1.8	2.0	2.1	2.3
분해피직경/mm	2.1	3.7	4.5	4.7	4.2
효소활성/(U·mL <sup>-1</sup> )	10 500	12 160	12 230	12 600	11 950

표 2에서 보는바와 같이 830-3균주는 균무지직경에 비한 분해피직경의 비가 가장 클뿐 아니라 효소활성도 가장 높았다.

이로부터 우리는 질소이온 주입에 의하여 알카리성프로테

아제활성이 가장 높은 *Bacillus licheniformis* 830-3을 활성변이균주로 선발하였다.

다음으로 우리는 선발한 *Bacillus licheniformis* 830-3의 계대안정성을 검토하였다.(표 3)

이와 같이 얻어진 *Bacillus licheniformis* 830-3은 계대 9회까지 그 활성이 90%이상 안정하게 유지되었다.

선행연구[3]에서는 계대 4회에서 활

성이 90%정도 유지되었는데 이것은 우리가 육종한 *Bacillus licheniformis* 830-3이 계대안정성이 높은 균이라는것을 보여준다.

표 3. *Bacillus licheniformis* 830-3의 계대안정성

계대수/회	1	3	5	7	9	11
상대효소활성/%	100	100	97.2	94.4	91.8	89.7

## 맺 는 말

1) 알칼리성 프로테아제 생성균 *Bacillus licheniformis* 830에서 양성변이률이 가장 높은 질소이온주입조건은 가속전압 25keV, 이온주입량  $4.72 \times 10^{15}$  이온/cm<sup>2</sup>이다.

2) 이 조건에서 얻은 *Bacillus licheniformis* 830-3의 알칼리성 프로테아제 활성은 출발균주에 비해 1.2배 높다.

3) 질소이온주입법으로 육종한 *Bacillus licheniformis* 830-3의 알칼리성 프로테아제는 세대 9회까지 90%이상의 활성을 안정하게 유지한다.

## 참 고 문 헌

- [1] Hideto Takami et al.; Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 120, 1989.
- [2] G. Prabhavathy et al.; International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4, 1, 332, 2013.
- [3] 杨天佑 等; 核技术, 29, 4, 263, 2006.
- [4] 吴青勋 等; 食品与发酵工业, 32, 1, 15, 2006.

주체104(2015)년 9월 5일 원고접수

## Breeding of *Bacillus licheniformis* 830-3 by N<sup>+</sup> Ion Implantation

Ri Jun Song, Kim Yong Jo and Pak Jong Won

To obtain high-activity alkaline protease-producing strain, the N<sup>+</sup> ion of  $4.72 \times 10^{15}$  cm<sup>-2</sup> was implanted to *Bacillus licheniformis* 830 under 25keV of accelerating voltage.

The alkaline protease activity of strains obtained in this condition increased by 1.2 times than original strain, its stability was kept till 9 generation.

Key words: microbial breeding, ion implantation, *Bacillus licheniformis*