

자외선과 리팜피진처리에 의한 피브로인분해활성균 *Bacillus pumilus* Rif-12의 선발육종

김국성, 김영조

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《새로운 과학기술분야를 개척하기 위한 사업도 전망성있게 밀고나가야 합니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 138페이지)

오늘날 경제강국건설과 인민생활향상을 위하여 질 좋은 명주실과 여러가지 견제품을 더 많이 생산하는것과 함께 생산과정에 나오는 부산물을 합리적으로 리용하는것은 매우 중요한 문제로 제기된다.[1, 4]

누에고치를 이루는 기본단백질인 피브로인은 아주 견고한 불용성단백질의 한 종류인데 현재 대부분 산-알카리법으로 물작용분해하여 리용하고있다.

이로부터 우리는 미생물에 의한 효소법으로 피브로인을 물작용분해하기 위해 이미 선발된 피브로인분해균에 자외선과 리팜피진을 처리하여 피브로인분해활성을 높이기 위한 연구를 하였다. 선행연구에서는 자연계에서 피브로인분해활성을 가진 몇종의 균주들을 분리 선발[3]하였을뿐 육종한 자료는 아직까지 제기된것이 없다.

재료와 방법

재료 출발균주로는 자연계에서 분리한 *Bacillus pumilus* No. 50을 리용하였다.

피브로인분해활성이 높은 균을 선발하기 위한 배지로는 피브로인분말 2%, 포도당 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 우무 2.0% 넣은것을 리용하였다.

진탕배양배지로는 0.5cm 크기로 자른 피브로인섬유 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%를 넣은 배지를 리용하였다.

자외선조임방법 우선 사면배지에서 24h동안 자래운 균을 한백금이 취하여 무균수에 세포수가 $2 \cdot 10^5 \text{CFU/mL}$ 되도록 희석하였다.

밀면이 평평한 샤레(ϕ 9cm)에 희석한 균액을 10mL정도씩 붓고 각이한 조임시간과 각이한 조임거리에서 자외선처리를 진행하고 빛수복효과를 방지하기 위하여 60min동안 어두운 조건에 두었다가 육종균선발배지에 도말하였다.

리팜피진내성부여방법 선발한 균주의 리팜피진 최소억제농도를 구하고 그보다 높은 농도에서 리팜피진내성을 부여하였다. 리팜피진처리농도와 시간에 따라 리팜피진내성변이를 구하고 적합한 처리농도에서 출현한 내성변이균주들가운데서 대조에 비하여 피브로인분해활성이 높아진 균주를 선발하였다.

육종균주들의 피브로인분해활성은 닐히드린법[3]으로 측정하였다.

효소활성 1U는 1min동안에 $1\mu\text{g}$ 의 로이신을 산생시키는 효소의 량과 같은 값으로 정하였다.

결과 및 논의

1) 자외선조임에 의한 피브로인분해활성균 *B. pumilus* UV-35의 육종

일반적으로 양성변이에 적합한 자외선조임조건은 해당 균주마다 다르게 나타난다. 그러므로 *B. pumilus* No. 50의 변이에 적합한 자외선조임조건을 밝혀야 한다. 30W 자외선등에서 각이한 조임거리에 따르는 생존률과 양성변이률을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 자외선조임거리에 따르는 생존률과 양성변이률

자외선조임거리/cm	15	20	25	30
생존률/%	0.9	1.1	1.6	1.9
출현한 균무지수/개	26	41	42	29
양성변이된 균무지수/개	—	2	4	1
양성변이률/%	—	4.8	9.5	3.5

조임시간 30min

시간에 따르는 생존률과 양성변이률을 보았다.(그림)

그림에서 보는바와 같이 자외선조임시간이 늘어남에 따라 생존률은 급격히 감소하며 30min 조임할 때 양성변이률이 9.5%로서 상대적으로 높았다. 이로부터 이 균주의 자외선조임에 적합한 조건은 30W의 세기로 25cm 거리에서 30min간 처리하는것으로 보았다.

이 조건에서 자외선조임하여 양성변이된 30개의 균주들 가운데서 활성이 높은 균주들은 표 2와 같다.

표 1에서 보는바와 같이 조임거리가 짧아질수록 생존률은 낮아졌으며 양성변이률은 조임거리 25cm에서 9.5%로서 그중 높았다. 따라서 *B. pumilus* No. 50의 자외선조임에 적합한 조임거리를 25cm로 정하였다.

다음 조임거리 25cm에서 조임

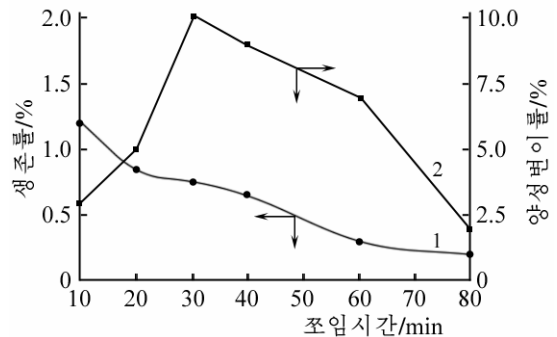


그림. 자외선조임시간에 따르는 생존률(1)과 양성변이률(2)

표 2. 자외선조임에 의해 양성변이된 활성높은 균주들

균주	피브로인분해활성 /(U·mL ⁻¹)	증가률/배
<i>B. pumilus</i> No. 50(출발균주)	80.0±1.5	—
<i>B. pumilus</i> UV-9	92.0±1.6	1.15
<i>B. pumilus</i> UV-11	89.0±1.4	1.11
<i>B. pumilus</i> UV-15	99.0±1.5	1.23
<i>B. pumilus</i> UV-25	95.0±1.7	1.18
<i>B. pumilus</i> UV-29	100.0±1.4	1.25
<i>B. pumilus</i> UV-35	104.0±1.5	1.30

표 2에서 보는바와 같이 출발균주에 비하여 피브로인분해활성이 제일 높아진 변이균주는 UV-35이며 효소활성은 출발균주에 비하여 1.3배로 높았다.

2) 리팜피진처리에 의한 피브로인분해활성균 *B. pumilus* Rif-12의 육종

선발한 *B. pumilus* UV-35에 리팜피진내성을 부여하기 위하여 우선 이 균주의 리팜피진최소억제농도를 결정하였다. 리팜피진농도가 0~10 μ g/mL 범위에서 각이하에 포함된 평판배지에 선발한 균을 일정한 량 도말하고 37°C에서 배양하면서 성장상태를 관찰하였다.(표 3)

표 3. *B. pumilus* UV-35에 대한 리팜피진최소억제농도(MIC)

리팜피진농도 /(μ g·mL ⁻¹)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
성장상태	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ 자람, - 자라지 못함

표 3에서 보는바와 같이 *B. pumilus* UV-35는 리팜피진농도가 2 μ g/mL이상 포함된 평판배지에서 자라지 못하였다.(48h 배양) 따라서 출발균주에 대한 리팜피진최소억제농도를 2 μ g/mL로 보았다. 우리는 이 균에 리팜피진내성을 부여하기 위하여 리팜피진처리농도를 10~30 μ g/mL범위로 정하였다.[2]

리팜피진농도와 처리시간에 따르는 *B. pumilus* UV-35의 리팜피진내성변이률을 본 결과는 표 4와 같다.

표 4. 리팜피진처리농도와 시간에 따르는 리팜피진내성변이률

처리 시간 /d	10 μ g/mL			20 μ g/mL			30 μ g/mL		
	대조구 /(개·mL ⁻¹)	시험구 /(개·mL ⁻¹)	변이률 /%	대조구 /(개·mL ⁻¹)	시험구 /(개·mL ⁻¹)	변이률 /%	대조구 /(개·mL ⁻¹)	시험구 /(개·mL ⁻¹)	변이률 /%
1	2.9 $\times 10^5$	—	—	2.8 $\times 10^5$	—	—	2.9 $\times 10^5$	—	—
2	3.2 $\times 10^5$	1.6 $\times 10^3$	0.51	2.5 $\times 10^5$	1.8 $\times 10^3$	0.72	2.6 $\times 10^5$	1.7 $\times 10^3$	0.65

표 4에서 보는바와 같이 리팜피진을 우의 농도에서 1일간 처리하였을 때에는 내성균이 출현하지 않았으나 2일간 처리하였을 때에는 처리농도구간에서 리팜피진내성변이균주가 0.51~0.72%의 빈도로 나타났다.

리팜피진내성이 부여된 50여개 균주들을 배양하여 피브로인분해활성을 측정한 결과 *B. pumilus* UV-35에 비해 활성이 1.5배이상 높아진 균주들은 표 5와 같다.

표 5에서 보는바와 같이 Rif-12균주의 피브로인분해활성이 제일 높은데 초기 출발균주인 *B. pumilus* No. 50에 비해서는 2.3배 높다.

표 5. 리팜피진내성변이균주들의 피브로인분해활성

변이균주	피브로인분해활성 /(U·mL ⁻¹)	증가률 /배
<i>B. pumilus</i> Rif-37	160.0 \pm 1.6	1.54
<i>B. pumilus</i> Rif-48	167.0 \pm 2.5	1.61
<i>B. pumilus</i> Rif-12	184.0 \pm 3.5	1.77
<i>B. pumilus</i> UV-35	104.0 \pm 1.5	—

3) 육종균 *B. pumilus* Rif-12의 유전학적안정성

우리는 육종한 피브로인분해활성이 높은 *B. pumilus* Rif-12를 10대까지 계대하면서 활성변화를 측정하였다.(표 6)

표 6. 육종균 *B. pumilus* Rif-12의 유전학적안정성

계대수	피브로인분해활성 /(U·mL ⁻¹)	계대수	피브로인분해활성 /(U·mL ⁻¹)
1	184.0 \pm 3.5	6	188.0 \pm 3.2
2	182.0 \pm 2.8	7	184.0 \pm 3.1
3	185.0 \pm 3.0	8	183.0 \pm 2.5
4	189.0 \pm 3.1	9	185.0 \pm 2.3
5	183.0 \pm 3.5	10	182.0 \pm 3.4

표 6에서 보는바와 같이 육종균을 10대까지 계대하면서 배양을 해도 피브로인분해활성에서는 차이가 없었다. 그러므로 육종한 균이 유전학적으로 안정하다고 볼수 있다.

맺 는 말

자외선조임과 리팜피진처리에 의한 육종방법으로 피브로인분해활성이 출발균주에 비해 2.3배 높은 *B. pumilus* Rif-12를 선발육종하였다.

선발육종한 *B. pumilus* Rif-12는 피브로인분해활성에서 유전학적으로 안정하다.

참 고 문 헌

- [1] B. Liu et al.; Colloids and Surface, B 131, 122, 2015.
- [2] Kozo Ochi; Biosci. Biotech. Biochem., 71, 6, 1373, 2007.
- [3] G. Forlani et al.; International Biodeterioration and Biodegradation, 46, 271, 2000.
- [4] Y. Suzuki et al.; Journal of Bioscience and Bioengineering, 108, 3, 211, 2009.

주체106(2017)년 3월 5일 원고접수

Selection of *Bacillus pumilus* Rif-12, heighten Fibroin-Degrading Activities by Treating Ultraviolet and Rifamycin

Kim Kuk Song, Kim Yong Jo

We selected *Bacillus pumilus* Rif-12, which has fibroin-degrading activity 2.3 times higher than the original ones by treating ultraviolet and rifamycin.

The selected *Bacillus pumilus* Rif-12 is genetically stable in degrading fibroin.

Key words: fibroin, *Bacillus pumilus*, ultraviolet, rifamycin