

微生物의 細胞生理에 미치는 電離放射線의 影響에 關한 研究 (第 1 報)

酵母菌 및 乳酸菌의 電離放射線感受性에 미치는 環境條件의 影響에 關하여

金 鍾 協

(原子力研究所生物學研究室)

Studies on the Cellular Metabolism in Microorganisms as influenced by Gamma-irradiation (I)

On environmental effects upon radiosensitivities
of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Kim, Jong Hyup.

(Div. of Biology, Atomic Energy Research Institute.)

Abstract

The environmental effects on radio-sensitivities of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* were studied;

Liquid suspensions of *Lactobacillus* and yeast were gamma-irradiated under various conditions; temperatures, hydrogen ion concentrations, amino acids and vitamins were treated separately with variations of concentrations. (shown in figures)

It is found that simultaneous heat treatment is effective to sterilize microorganisms than pre after treatment, and concentration of hydrogen ion does not affect the lethality of yeast but or *Lactobacilli* was affected at the range of pH. 5.0 to 7.0.

Ascorbic acid, thiamin and pyridoxine were protective dependently against lethal action of gamma-ray and its protective effects increase with the increasings of concentrations.

Glutamic acid, aspartic acid, tyrosine and phenylalanine were proved to be protective for both strains at 0.1 between 1.0 percent.

It can be suggested that industrial sterilizing doses of irradiation by gamma-ray for food should be applied more than those dose of saline or buffer suspension, because natural food stuffs are rich of vitamins and amino acids.

緒 論

微生物에 電離放射線을 照射後 加熱處理를 加함으로써 殺菌效果를 增加시킨 例는 1960年 Kempe의 研究 및 1965年 Oka의 研究에서 볼 수 있다. 한편 pH.의 變化가 微生物의 電離放射線에 對하여 어떻게 感受性을 나타내는지 하는 點은 아직 報文을 보지 못하였으며, 다만 ultraviolet ray에 對해서는 pH.의 影響이없다고 한다(Hollaender, 1955).

微生物의 放射線感受性에 對한 amino acid의 影響에 關하여는 U.V. ray에 對한 保護效果가 있음

을 1964年 Hunt가 報告하였으나 gamma-ray의 경우는 仔細한 報告가 없다. Vitamin의 影響에 關하여는 全然 찾아 볼 수 없었다.

그러나 食品, 醫藥品 및 農水産製品을 貯藏 또는 殺菌의 目的으로 gamma-ray를 照射코저 할때에 溫度, pH, vitamin, amino 酸等이 該當品目에 分布하는 微生物의 放射線感受性을 크게 支配할 것은 明白한 理致이다. 그럼에도 不拘하고 이러한 點에 對한 研究는 그리 흔하지 않다. 特히 本研究所에서 1964년부터 1966년까지 進行하여 온 韓國食品中 김치의 放射線貯藏研究에 있어서, 김치 内部에 分布

라는 乳酸菌 및 酵母菌이 放射線의 照射을 받을 때에 김치의 pH., vitamine, amino 酸等이 김치 自體의 微生物에 對하여 그 放射線感受性を 크게 左右할 것을 考慮하여 本研究을 實施하였던 것이다.

放射線에 依한 食品의 貯藏이나 殺菌은 食品内部에 存在하는 여러가지 天然有機化合物이 食品微生物과 密接한 生態學的 關係를 갖이고 있을 것이 豫想되며 이러한 食品微生物의 環境條件은 外部로부터의 放射線照射에 對하여 그 感受성에 크게 影響을 미칠것을 생각하여 本研究의 方向을 잡았었다.

本研究에 諸般의 便宜를 배풀어 주시고 指導鞭撻하여 주신 서울大學校 李敏載 教授와 原子力研究所 李根培博士께 甚深한 謝意를 표합니다.

實驗材料 및 方法

菌種 및 培地

- 1) *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* 의 二菌株을 使用하였다.
- 2) 培地는 Table. 1, 2, 3, 4 에 記載된 것을 使用하였다.

Table I. Media for *Lactobacillus plantarum*.

Tryptone	2.0%
Glucose	2.0%
Yeast ext.	0.5%
Tomato juice	5.0%
Sodium chloride	0.6%
Dist. water	90.00c.c.
Total 100.00c.c.	
pH.	6.8(adjusted)

Table II. "B" Media for *Lact. plantarum*.

Peptone	2.0%
Glucose	2.0%
Vitamin(each)	0.04—0.32mg/c.c.
Dist. water	96.10c.c.
Total 100.00c.c.	
pH.	6.8

Table III. "C" Media for *Lact. plantarum*.

Sodium chloride	0.9%
Amino acid(each)	0.1—1.0%
Dist. water	99.1c.c.
Total 100. c.c.	
pH.	6.8

Table IV. Media for *Saccharomyces cerevisiae*.

Peptone	2.0%
Glucose	2.0%
Malt ext.	2.0%
Yeast ext	0.5%
Tomato juice	5.0%
Dist. water	87.00c.c.
Total 100. c.c.	
pH.	5.4

方 法

- 1) 照射方法: 上記菌株을 照射前 *Lactobacillus* 는 液體培養을 30°C, 3日間한 後, Yeast 는 液體培養을 25°C, 2日間한 後에 Cobalt-60 1000curie, gamma-ray irradiator 에 一定間隙(1cm 距離)에 定置하여 dose 에 該當하는 時間을 주어서 放射線을 照射하였다. 菌은 一定量을 上記 Table. 1, 2, 3, 4 의 各 該當되는 液體培地에 懸濁시킨 試驗管内에서 照射되었다.
- 2) 生殘菌數의 測定法: 平板寒天培地内에 接種한 後 Incubation 하여 Quebec's colony counter 로서 生菌數를 算定하고 이 數值를 生殘菌數(Survival number)로 잡았다.
- 3) 加熱方法, 小型의 恒溫水槽를 gamma-irradiator (放射線源)에 密着시키고 水槽内部에 菌의 懸濁培地가 들어 있는 試驗管을 15cm 距離로 세우고 加熱과 放射線照射을 同時에 實施하였다.
- 4) 線量率: 本研究所에 備置된 gamma-irradiator 의 線量率은 1m 에서 1320Curie/hr.이다.
- 5) Buffer solution 의 調製: pH.5.0 以下는 citrate phosphate buffer 液을, pH. 6.0 以上은 Sörensen's phosphate buffer 液을 基劑로 하여 培地를 作成하였다.

結果 및 考察

Lactobacillus 의 放射線感受성에 對한 溫度의 影響은 Fig. 1 에서 보는 바와 같다. 20°C, 35°C, 45°C 와 같이 溫度가 上昇함에 따라서 菌의 生殘率(Survival ratio)은 顯著히 低下하였다. Yeast 에 있어서도 Fig. 2 에서 보는 바와 같이 溫度上昇에 따라서 生殘率은 相當히 低下하였다. 55°C 以上の 同時의 加熱處理에 있어서는 $10 \times 10^4 r$. 以下에서 殺菌效果가 明白히 強化됨을 알 수 있었으며, 放射線의

併用이 아닌 單獨 熱處理에서도 殺菌效果가 있었음

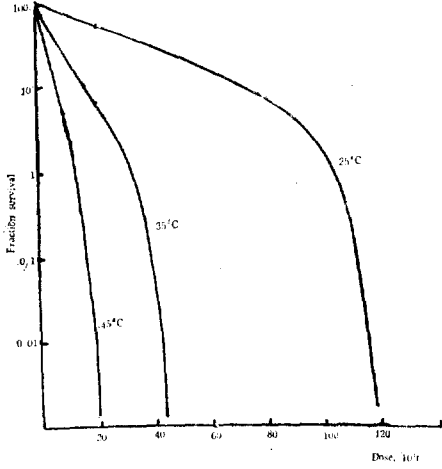


Fig. 1. Lethal curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by heat shock.

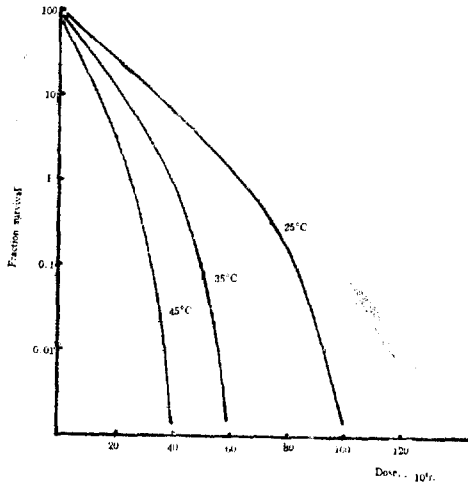


Fig. 2. Lethal curves for *Sacch. cerevisiae* exposed to gamma rays and influenced by heat shock.

으로 45°C 까지만 觀察結果를 表示하였다. 이때의 菌의 懸濁液은 Table. 1의 T.G.Y. tomato 培地이었으므로 培地成分의 保護效果가 加熱 및 放射線效果에 抵抗의으로 作用하였을 것으로 思料된다.

*Lactobacillus*에 對한 pH.의 影響을 보건데 pH. 3.0과 pH. 4.0에 있어서는 Control(pH. 6.8)과 大差없이 Sigmoid curve를 그리면서 生殘率이 低下하고 있으나 pH. 5.0, 6.0, 7.0에 있어서는 初, 中期에서 相當히 低下하면서 curve가 내려가고 있으나 curve의 尾部는 pH. 3.0, 4.0, Control 區와 같이 $120 \times 10^4 r$.에서 合친다. 따라서 實際의 放射線效果는 $120 \times 10^4 r$.에서 殺菌이 되었으나 中間에서 若干의 生殘

率의 差가 생기고 있다. 이 點은 pH. 3.0 및 4.0 區에서 Citrate buffer를 使用하였기 때문에 citrate의 保護效果때문인지 또는 viable count의 error인지 더욱 追試를 要하는 點이라고 생각된다. Yeast에 있어서는 p.H.의 影響이 거의 없는 것으로 看做된다(Fig. 3, 4).

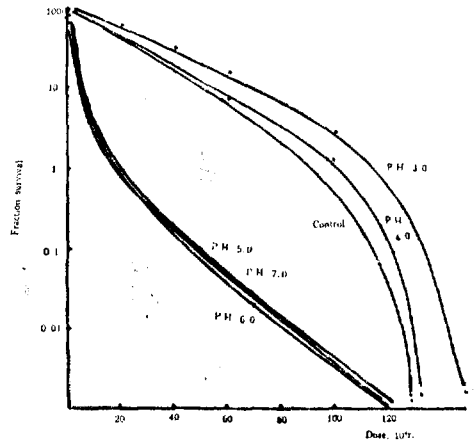


Fig. 3. Lethal curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by hydrogen-ion concentration.

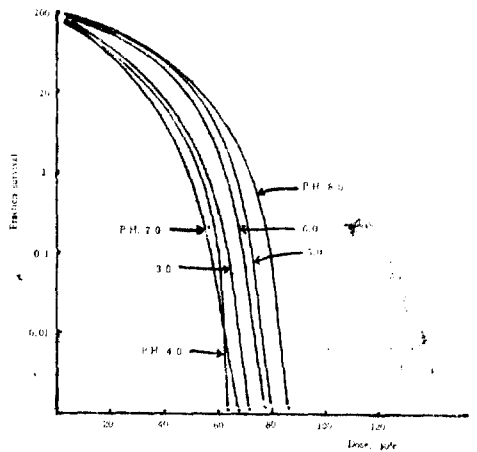


Fig. 4. Lethal curves for *Sacch. cerevisiae* exposed to gamma rays and influenced by hydrogen-ion concentration.

Sodium chloride의 放射線作用에 對한 影響을 보면은(Fig. 5, 6) NaCl의 濃度가 높아짐에 따라서 生殘率은 比例하여 低下된다. 이 現象은 *Lactobacillus*와 Yeast에서 共通의이 있으며 培地의 保護效果가 作用하였음에도 不拘하고 效果는 컸었다. 이 食鹽

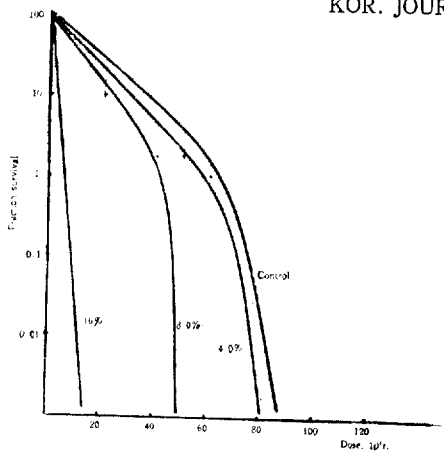


Fig. 5. Lethal curves for *Sacch. cerevisiae* exposed to gamma rays and influenced by sodium chloride.

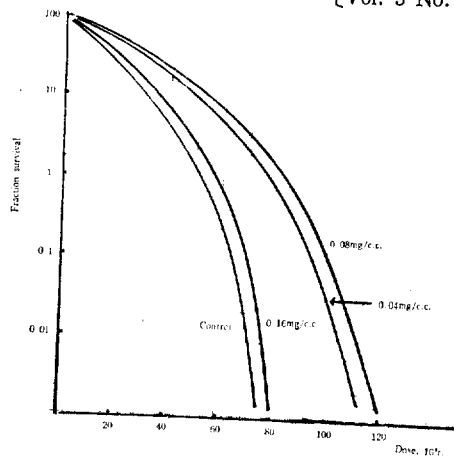


Fig. 7. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by ascorbic acid.

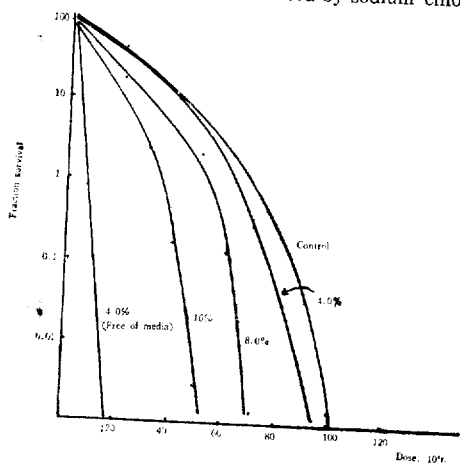


Fig. 6. Lethal curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by sodium chloride.

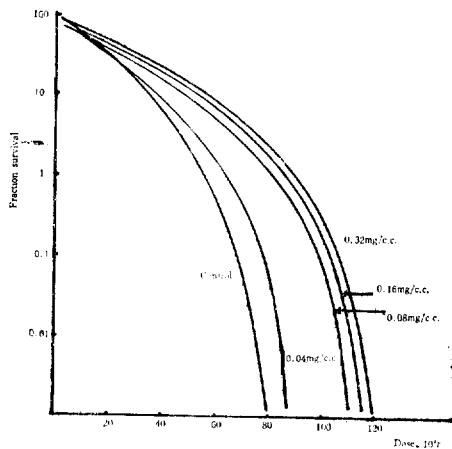


Fig. 8. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by thiamin.

의 放射線殺菌協力作用에 對하여는 E. coli 및 Yeast 에서 Matsuyama(1960~1964年), Meshitsuka(1963年) 等의 研究例가 있다. 그러나 培地가 아닌 phosphate buffer solution 에 懸濁하여 照射하였으므로 實際의 産業的 照射線量과는 差가 있음을 本實驗에서 알았다. 即 培地에 들어있는 天然有機物質(vitamin, amino acid, polypeptide等)이 放射線의 殺菌作用에 保護的으로 作用하고 있는 것은 틀림없다.

Vitamine 中에서 ascorbic acid, thiamin, pyridoxin 等은 Fig. 7, 8, 9에서 보는 바와같이 放射線의 殺菌效果를 減少시키고 있다. 即 保護效果를 나타내며 投與된 範圍內에서는 投與量에 比例하여 保護效果가 있었다.

Amino acid 中의 glutamate, aspartate, tyrosin,

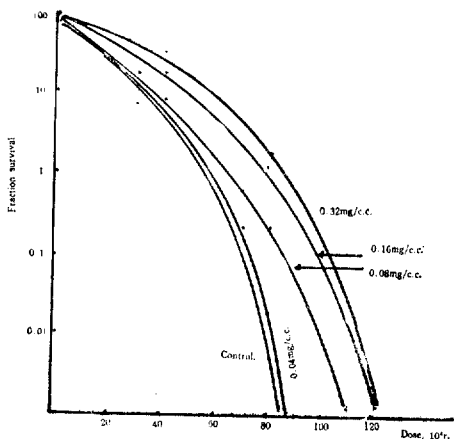


Fig. 9. Protective for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by pyridoxin.

phenylalanine 등은 모두 保護效果를 나타내었으며, 大腸菌(E. coli)에서 行한 Watanabe(1959年)氏의 結果나 또는 紫外線에 對한 Yeast의 感受性에 있어서의 amino acid의 影響(Hunt, 1964年)과 같은 結果를 얻었다. vitamin과 amino acid는 細胞의 代謝生理에 緊要한 物質인 만큼 放射線의 作用이 微生物의 蛋白質合成過程에 미치고 있을 것으로 생각된다.

특히 vitamin의 保護效果보다는 amino acid의 保護效果가 甚大하다는 것은 蛋白質의 構成材料라는 點으로 보아 蛋白質合成과 有關한 것이다.

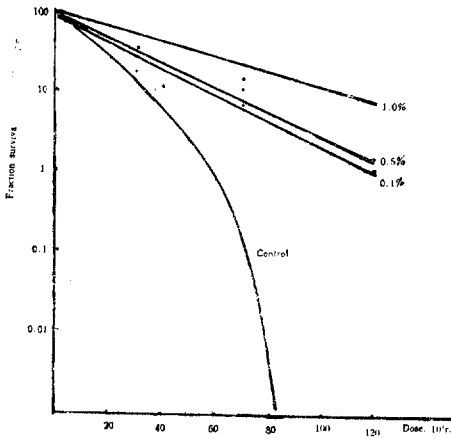


Fig. 10. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by glutamic acid.

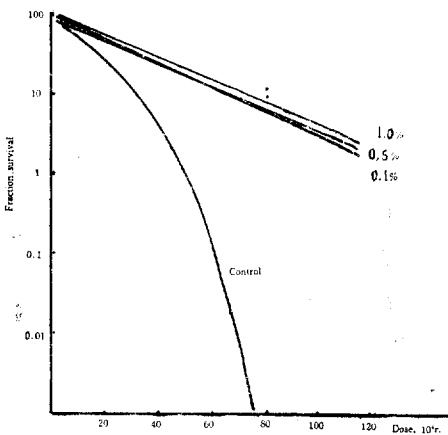


Fig. 11. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by aspartic acid.

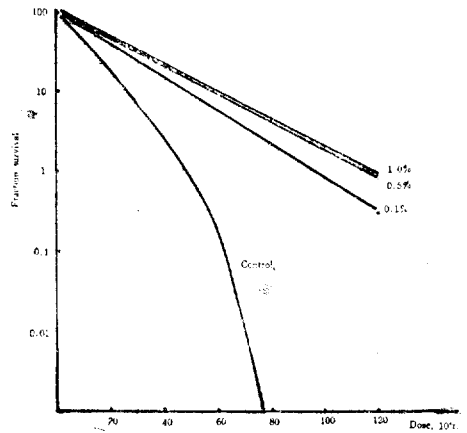


Fig. 12. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by tyrosin.

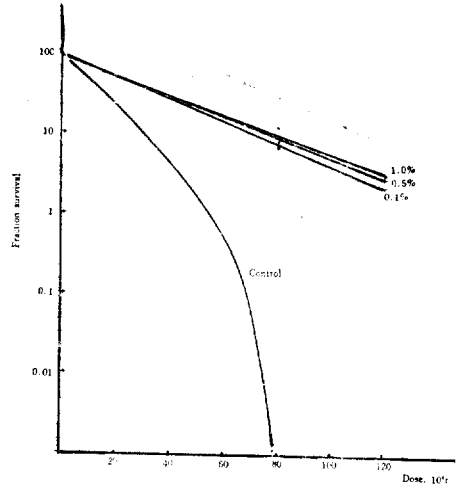


Fig. 13. Protective curves for *Lact. plantarum* exposed to gamma rays and influenced by phenylalanine.

大體로 培地에 懸濁하여 放射線을 照射시킨 微生物의 生殘曲線은 Sigmoid curve를 나타내고 있다. Yeast의 材料는 Diploid cell이었으므로 Sigmoid curve를 보인다고 하더라도 解析이 可能하지마는 *Lactobacillus*에 있어서는 Figure에 나타나 있는 Sigmoid curve는 multy hit theory나 또는 保護的 恢復作用(培地成分으로 因한)의 結果라고 보아진다. 그러나 培地成分으로 因한 保護效果라고 보더라도 初期에는 多少의 急激한 生殘率의 減少가 보여야 할 것이나 全然 그렇지 않다. 따라서 multy hit theory로서 解析함이 妥當할 것이다.

摘 要

Lactobacillus plantarum 과 *Saccharomyces cerevisiae*의 gamm-ray 에 對한 感受性이 溫度, pH, Vitamin, Sodium chloride 및 Amino 酸에 依해서 어떻게 變化하는가를 研究하여 본 結果는 아래의 같다.

1. 兩菌株는 溫度上昇에 따라서 放射線感受性이 커져서 生殘率이 極히 低下하였다.
2. 兩菌株의 放射線感受性은 pH의 變化에 支配되지 않았으나, *Lactobacillus* 만은 pH. 5.0, 6.0, 7.0, 에서 初期에 若干 生殘率의 低下가 있었다.
3. Sodium chloride의 放射線殺菌에 對한 增強效果는 顯著하였다.
4. Amino 酸中에서 glutamate, aspartate, tyrosin, phenylalanine 등은 *Lactobacillus*의 放射線感受性에 對하여 保護效果를 나타내었다.
5. Vitamin 中에서 thiamin, ascorbic acid, pyr-idoxine 등은 *Lactobacillus*에 對하여 保護效果를 보였으나 amino 酸 만큼 크지는 못하였다.
6. Buffer solution 에 懸濁하여 얻은 殺菌線量과 vitamin, amino 酸 등이 豊富한 食品에 對한 殺菌線量과는 顯著한 差異가 있음을 알 수 있다.
7. 微生物의 放射線感受性은 Amino 酸代謝와 密接한 關係가 있음을 알 수 있다.

References

1. Dewey, D.L., 1963, The X-ray sensitivity of *Serratia marcescens*. Radiation Research, 19, 64-87.
2. Dupuy, P., 1963, Study of the radiosensitivity and isolation of radioresistant strains of *Lactobacillus*. I.A.E.A., Research Contracts, 3rd. Report.
3. Frey, H.E., 1966, Ionizing radiation and bacteria; Nature of the effect of irradiated medium, Rad. Res., 28.
4. Hollaender, A., Effects of radiation on bacteria, Radiation Biology, Vol. 2, McGraw-Hill Book Co.
5. Hunt, D.E., 1964, Amino acids as protective compounds in ultra-violet-irradiated *Hansenula wingei*, J. of Bacteriology, Vol. 88, no. 4.
6. Kempe, L.L., 1960, Complementary effects of heat and radiation on food microorganisms; Nucleonics, Vol. 18, no. 4.
7. Kock, R., 1963, The protective action of nicotinamide, Internat. Jour. Radiation Biology, 6 (4) : 400.
8. Lee, K.B. and Kim, J.H., 1967, Studies on the radio-preservation of Korean food, Its microbiological survey, Ann. Report of Atomic Energy Research Institute, no. 7.
9. Matsuyama, A. 1964, The effect of freezing on the radiation sensitivity of vegetative bacteria. J. of Appl. Bact. Vol. 27. no. 1
10. Meshitsuka, G., 1963, Effects of growth conditions on the radiosensitivity of yeasts, Tokyo Metro. Isotope Center, Ann. Report, no. 2.
11. Okazawa, et al. 1960, Enhancement of the over-all lethal effect of ionizing radiations on microorganisms, Bull. of Agr. Chem. Soc. Japan, 24, 435 & 24, 235.
12. Oka, M., et al, 1965, Effect of heating on radiation sensitivities of bacterial spores. Tokyo Metro. Isotope Res. Center, Ann. Report, no. 4.