KOR. JOUR. MICROBIOL. September, 1987 p. 249-253 Vol. 25, No. 3

교류 펄스에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*의 생장억제 효과

정지환·박현근·한홍의
인하대학교 이과대학 생물학과

Growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by alternating current pulse

Chung, J.W., H.K. Park and H.E. Han
Department of Biology, College of Science, Inha University

ABSTRACT: Effects of AC pulse at low voltage on *Saccharomyces cerevisiae* were studied. The treatment of yeast suspensions contained 0.2m NaCl with 500mA for 350 sec at 40°C was shown about 50% of lethality, whereas in the treatment of the same suspensions with 250mA for 250 sec at the temperature (10°C) corresponding to about 10% of lethality, growth was completely inhibited instead of lethality. The effect of growth inhibition was due to occurrence of auxotrophic strains under experimental conditions. Detection of auxotrophic yeasts was done tentatively with the difference of the number of viable yeast cells between direct counting by methylene blue staining and plate-count on yeast morphology agar.

KEY WORDS □ AC pulse, *Saccharomyces cerevisiae*, growth inhibition, lethality, auxotroph.

전기가 미생물에 주는 영향에 대한 연구는 Anderson과 Finklestein(1919)이 우유살균에 대한 실험을 한 이후 고전압에서는 전기수압 효과(electrohydraulic effect)에 의한 미생물의 살균(Allen *et al.*, 1966 ; Gilliland *et al.*, 1967a; 1967b). 그리고 세포융합(Zimmermann, 1966 ; Beers *et al.*, 1984) 등이 보고 되었으며, 저전압의 경우는 *E. coli*의 생존력 감소(Pareilleux *et al.*, 1970)와 형태변화(Ellis, 1985a ; 1985b ; Rosenberg *et al.*, 1965) 등이 보고되어 있을 뿐 광범위하게 연구되어 있지 않은 실정이다.

Allen *et al.* (1966)이 지적했듯이 고전압의 직류 전기수압 충격을 주었을 때 미생물의 살균에 필요한 총 에너지는 *Saccharomyces cerevisiae*가 31 watt hr/ gal으로 가장 높게 나타났었다. 이것은 효모가 전기충격에 대하여 높은 내성을 갖고 있음을 의미하는 것이다. 그런데 우리나라의 식품중 김치에는 많은 야생산막형성 효모가 존재하여 식품보존에 손상을 주는 것으로 보고되어 있다(Choi, 1978). 효모가 서식하는 식품을 보존하려면 이들의 살균 및 생장을 억제하여야 할 필요가 있다. 효모의 살균은 고전압인 14 kV에서 연구되었으나(Allen *et al.*, 1966), 실제적인 사용법은 보고된 바가 없다. 반면에, 저전압에 의한 효모의 치사효과에 대한 연구보고도 없었다. 따라서 본 연구는 사용상 편리한 저전압의 교류(130V)가 식품에 있는 효모에 어떻게 영향을 주는지를 알기 위하여, 우선 단일 효모로써 *S. cerevisiae*에 주는 영향과 조건을 검토하였다. 저전압의 경우는 고전압의 경우와 달리 효모의 치사효과보다도 생장억제 효과를 나타내었다.

재료 및 방법

균주 배양

본 연구에 사용된 균주는 탁주 발효에 사용하고

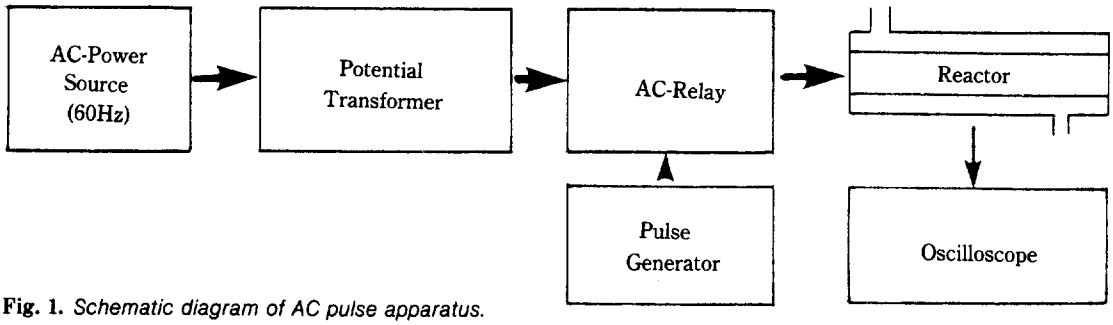

Fig. 1. *Schematic diagram of AC pulse apparatus.*

있는 *Saccharomyces cerevisiae*이며, YM배지(증류수 1L당 yeast extract, 3g; malt extract, 3g; peptone, 5g; 포도당, 10g; agar, 20g)에서 15일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용되는 균락을 얻기 위하여 yeast morphology agar배지(YMA: Difco manual, 1986)에서 2일간 30℃에서 평판배양 후, 여기서 형성된 균락을 채취하여 멸균 생리식염수에 현탁액(10^6-10^7 효모세포/ml)을 만들어 본 실험에 사용하였다.

AC pulse방법

반응조는 용량이 20 ml되도록 1.6 cmD×10 cmL의 원통형 유리관을 사용하였고, 양쪽에 백금선 전극을 설치하였다. 그 외부는 냉각관이 되도록 제작하였다. 전원은 100 V교류(60Hz)를 사용하였고, 변압기로 일정한 전압(100V-130V)이 유지되도록 하였다. 교류 펄스를 발생시키기 위하여, 펄스 발생기(pulse generator)를 이용하여 10 sec 당 1 sec씩 펄스 신호를 발생시키고 이 신호로 교류 계전기(AC-relay)를 통제하여 교류 펄스를 반응조에 흐르게 하였다. 이 때 흐르는 전류 및 펄스시간을 측정하기 위하여 역전류검출관을 설치하였다(Fig. 1). 반응조의 온도는 온도조절 순환기(Thermostatic circulator, LKB produkter, Sweden)를 이용하여 0℃-40℃까지 조절하였다.

생존율 측정

반응조에 20 ml 효모 현탁액(10^6-10^7 효모세포/ml)을 첨가하여, 교류 펄스를 통과시키면서 생존율을 측정하였다. 생균수 측정은 Methylene blue 염색법과 평판배양법을 이용하였다. Methylene blue 염색법에 의한 생균수 측정은 반응조에서 일정 교류 펄스시간 간격으로 100 μl를 취하여 0.1% Methylene blue액을 100 μl 첨가하여 혼합한 후 혈구측정기로 생균수를 측정하였고, 생존율은 100×생균수/총균수'로 계산하여 백분율로 표시하였다. 평판배양법에 의한 생균수의 측정은 반응조에서 일정 교류 펄스시간 간격으로 100 μl를 다시 취해 적당한 균락을 얻도록 희석하여 YMA 배지가 들어있는 petri-dish에 도말한 후 30℃에서 48시간 부란시켜 형성된 균락을 계수하여 생균수를 측정하였다.

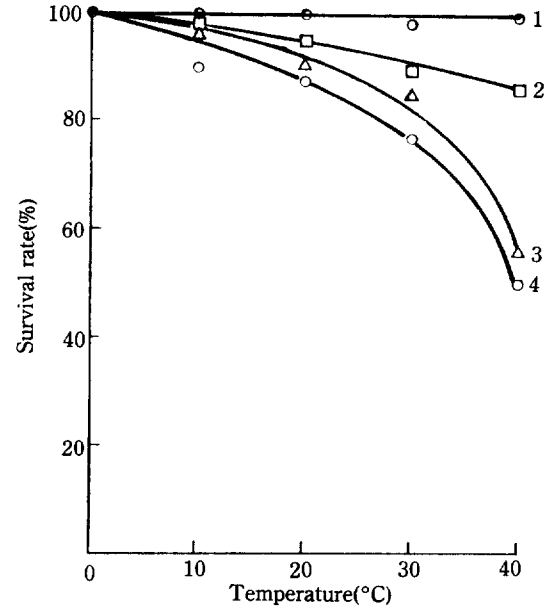

Fig. 2. *Survival rates of S. cerevisiae by the exposure of AC pulse at each temperature.*
Survival rates were calculated by direct counts with methylene blue stain. AC pulse was given to the cell suspensions with interval of 1sec exposure per 10 seconds. Temperature was regulated by thermostatic water circulator. The exposure time was 0sec(1), 100sec (2), 200sec (3), and 350sec (4).

결과 및 고찰

생존율, 교류 펄스시간 및 온도와의 관계

생존율과 교류 펄스시간 및 온도와의 관계는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 생존율은 펄스시간과 온도가 증가함에 따라서 감소되었다. 그러나 온도를 10℃에서 40℃까지 증가시켰을 때 생존율은 대조구에서 보는 바와 같이(Fig. 2) 온도에 의하여 생존율이 감소되는 것은 아니었다. 그렇다면 생존율이 온도가 증가함에 따라서 감소된 것 같이 보이는 결과에 대한 그 원인은 온도가 증가함에 따라서 전하량이 증가됨으로써 주는 영향이라고 할 수 있다. 이 결과는 Fig. 3에서 나타내었다. 즉, NaCl 농도를 일정하게 유지시키고 온도를 10℃-40℃로 증가시키면 전류가 증가되었다. 또한 온도를 일정하게 유지시키고 NaCl 농도를 0.1-0.5 mol로 증가시키면 전류가 증가됨을 알 수 있었다. 따라서 생존율의 감소는 온도와 염농도의 증가에 의한 전류의 증가에 그 원인이 있었다. 교류 펄스가 *S. cerevisiae*에 주는 치사효과는 0.2 mol의 염농도와 40℃에서 가장 높았으며, 이 온도에서 500 mA의 교류 펄스를 350 sec 동안 처리하였을 때 생존율은 50% 이었다. *Escherichia coli*의 경우 교류 전류를 110 mA로 흘렸을 때 100% 치사율이 있었다고

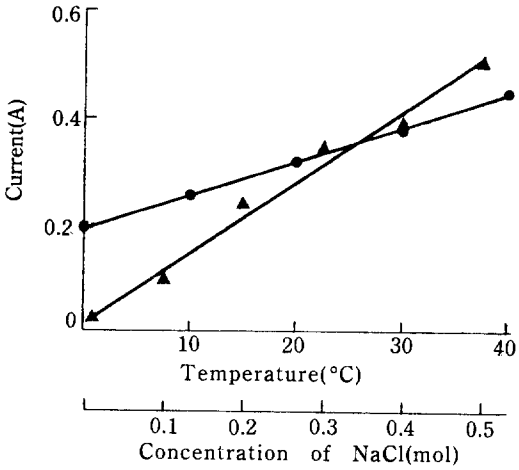

Fig. 3. *Relationship between temperature and salt concentrations in the field of electric current.*
Electric current was measured by ampere-meter at 130V AC. 1.(—●—) ampere at changes of temperature, 2.(—▲—) ampere at changes of salt concentration under room temperature.

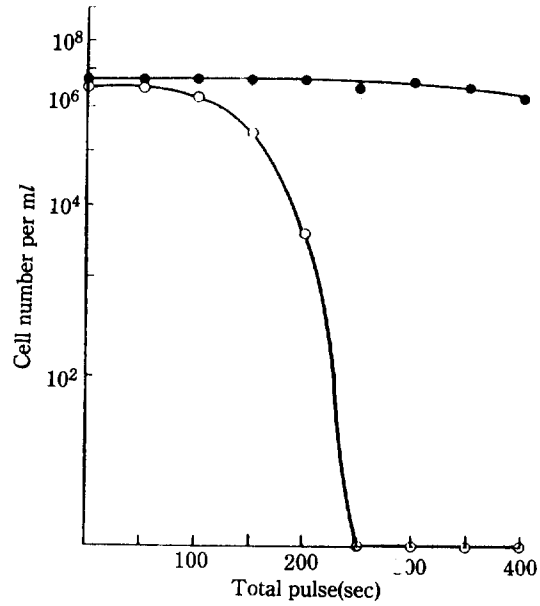

Fig. 4. *Difference of the number of viable cells between direct counts with methylene blue and plate counts on Yeast morphology agar of S. cerevisiae.*
Yeast cells suspended in saline were added in reactor and exposed to AC pulse at 10°C, then test samples were removed and number of viable cells was enumerated by direct count method (—●—) and plate count method(—○—).

보고하였다(Pareilleux *et al.*, 1970).

본 연구 결과에서도 전류가 증가함에 따라 치사율이 높아지는 현상과 일치되었다. 단지, 효모의 경우는 500 mA로 높은 전류가 필요하였다.

전류의 생물학적 효과

전류의 생물학적 효과를 알아보기 위하여 비교적 치사효과가 낮은 온도인 10℃(Fig. 2)에서, 교류 펄스를 주었을 때 생균수의 측정결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 400 sec 동안 교류 펄스를 주었을 때 methylene blue 염색법으로는 전구간에 걸쳐서 생존율이 90% 이상으로 나타났기 때문에 본 실험에 사용된 효모는 YMA(dTMP 없음) 평판 배양에서도 같은 비율로 생장해야 함에도 불구하고, 100 sec 동안 처리한 후 부터 그 수는 감소하기 시작하여 250 sec 이상 처리되었을 때는 YMA 평판 배지상에 전혀 균락이 형성되지 않았다. 이상의 결과로 부터 YMA 평판 배양상에서 효모균락이 형성되지 않았다해서 반드시 효모가

죽었다고는 볼 수 없다. 왜냐하면 methylene blue 염색법은 효모 세포가 죽지 않았을 때는 염색되지 않는다는 사실로 볼 때(Reed *et al.*, 1973), 본 실험에서 효모는 치사할 만큼 손상을 받았다고 믿을 수 없다. 그러므로 YMA 평판 배양법에서 효모균락이 전혀 형성되지 않았다는 것은 여러가지 생장인자(growth factors)를 요구하는 영양요구성 효모로 변이되었다고 설명할 수 있다. 본 실험에서 사용된 YMA 배지에는 dTMP를 비롯하여 17종의 아미노산과 일부의 비타민을 첨가하지 않았으므로, 이와 같은 영양요구성 돌연변이 발생은 Strathern *et al.* (1981)이 지적했듯이, UV를 조사하였을 때 발생된 dTMP 영양요구체는 YMA와 같은 dTMP를 첨가하지 않은 배지에서 죽게 되거나 작은 균락(petit colony)를 형성한다고 하였다.

세균에 있어서도 자외선, 냉동, 열충격 등과 같은 환경 stress를 주었을 때 영양요구체(auxotrophs)가 형성되어 생균수 측정시에 마치 죽은 세포로 계산할 가능성이 있다고 보고하였다(Novitsky *et al.*, 1978 ; Alexander *et al.*, 1982). 세포의 형태적 변화에 있어서도 *E. coli*와 같은 경우 20-30 mA의 직류 전기장을 주었을 때 구형세포가 긴 사상형 세포로 변하나, 다시 새로운 배지로 옮기면 원래의 구형세포로 환원되는 현상을 보고하였다(Ellis, 1985a ; 1985b). 그러므로 dTMP 영양요구체 외에도 많은 영양요구성 돌연변이가 발생되었을 것으로 예측할 수 있다. 그러나 Gilliland *et al.* (1967)이 *E. coli*에 전기수압 충격을 주었을 때 세포내 ATP는 파괴되었으나 DNA에는 손상을 주지 않았다고 한 결과로 볼 때 상기 영양요구성 돌연변이는 유전적이라기 보다는 생리적 돌연변이라고 생각 할 수 있다. 이것은 유전적 및 생리적 문제로 본 연구에서는 취급하지 않았다.

이상과 같이 저전압의 교류 펄스에 의한 환경적 stress는 효모의 치사적인 효과보다도 생장억제 현상이라고 볼 수 있다. 그리고 각각의 영양요구체를 분리하여 실험은 하지 않았으나, 총괄적으로 볼 때 최소한 교류 펄스로 인하여 많은 영양요구체가 발생되었다고 믿을 수 있다.

요약하면 0.2 M NaCl 농도와 40℃에서 350 sec 동안 500 mA의 교류 펄스를 처리하였을 때는 50%의 치사효과를 보여 주었다. 반면에 상기 염농도에서 치사효과가 10% 미만인 10℃에서는 250 sec 동안 교류 펄스를 처리하였을 때는 100% 생장억제 효과를 보여 주었다. 그러므로 100% 치사율을 얻기 위하여 많은 전류를 사용하는 것보다도 적은 전류를 사용하여 100% 생장억제 효과를 주는 것이 식품저장에 이점이 있음을 시사하여 주고 있다.

본 실험의 결과로 부터 낮은 전압의 교류 펄스가 효모에 주는 영향은 영양요구성 균주로 전환되어 생장을 억제시키는 것으로 간주할 수 있고 이러한 현상이 실제적으로 식품저장과 어떠한 관계를 갖고 있는지는 앞으로 연구되어야 할 분야이다.

적 요

저전압의 교류 펄스가 *Saccharomyces cerevisiae*의 생존율에 미치는 영향을 검토하였다. 0.2 M NaCl 농도와 40℃에서 350 sec 동안 500 mA 교류 펄스를 처리하였을 때는 50% 치사효과를 나타냈다. 반면에 상기 염농도에서 치사효과가 10% 미만인 10℃에서는 250 sec 동안 교류 펄스를 처리하였을 때는 100%의 생장억제 효과를 나타냈다. 생장억제의 효과는 영양요구체의 형성에 기인되었다고 볼 수 있으며, 영양요구체의 검출법은 methylene blue 염색법과 평판 배양법에 의하여 측정된 생균수의 차이로 비교하였다.

사 사

본 연구는 서울 기독병원 정계호 원장의 연구비와 인하대학교 기초과학연구소의 연구비 지원으로 수행되었다. 인하대학교 공과대학의 허욱열 교수님과 서울 정진전자 윤경호 연구원이 전기에 대하여 자문하여 주신데 감사를 드린다.

REFERENCES

1. Alexander, M., T. Roswall, and J.H. Slater, 1982. Advances in microbial ecology. Plenum Press. Vol. 6, pp. 171-198.
2. Allen, M., and K. Soike, 1966. Sterilization by electrohydraulic treatment. *Science* **154,** 155-157.
3. Anderson, A.K., and R. Finklestein, 1919. A study of the electropure process of treating milk. *J. Dairy Sci.* **2,** 374-406.
4. Beers, R.F. Jr., and E.G. Bassett, 1984. Cell fusion: gene transfer and transformation. Raven Press Books. pp. 177-187.
5. Choi, K.C. 1978. Studies on the yeasts isolation from Kimchi: Classification and identification of yeasts. *Kor. Jour. Microbiol.* **16,** 1-10.
6. Difco manual 10th ed., 1984. Difco laboratories, pp. 1135-1141.
7. Ellis, H.W., 1985[a]. Morphological changes in spherical *E. coli* induced by a DC-electrical field. *Microbios* **42,** 119-124.
8. Ellis, H.W., 1985[b]. Morphological changes in *E. coli* subjected to direct current electical fields. *Microbios* **42,** 183-201.
9. Gilliland, S.E., and M.L. Speck, 1967[a]. Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Appl. Microbiol.* **13,** 1031-1037.
10. Gilliland, S.E., and M.L. Speck, 1967[b]. Mechanism of bactericidal action produced by electrohydraulic shock. *Appl. Microbiol.* **15,** 1038-1044.
11. Novitsky, J.A., and R.Y. Morita, 1978. Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.* **48,** 289-295.
12. Pareilleux, A., and N. Sicard, 1970. Lethal effects of electric current on *E. coli Appl. Microbiol.* **19,** 421-424.
13. Reed, G., and H.J. Peppler, 1973. Yeast technology. The AVI Publishing company, Inc. pp. 47-52.
14. Rosenberg, B., L. Van Camp, and T. Krigas, 1965. Inhibition of cell division in *E. coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature* **205,** 698-699.
15. Strathern, J.N., E.W. Jones, and J.R. Broach, 1981. The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Lab. pp. 371-414.
16. Zimmermann, U., 1982 Electric field-mediated fusion and related phenomena. *Biochimica et Biophysia Acta* **694,** 227-277.

(Received April 28, 1987)