

Zymolyase-20 T에 대한 *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 감수성

정창기¹·김찬조^{2*}·이종수²

¹오뚜기식품(주) ²충남대학교 식품가공학과

Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T

Chung¹, Chang-Ki, Chan-Jo Kim^{2*} and Jong-Soo Lee²

¹ Ottogi Foods Co., LTD, Anyang 430-070, Korea

² Department of Food Science and Technology, Chungnam National University,
Daejeon 302-764, Korea

Susceptibility of a thermophilic strain (D-71) of *Saccharomyces cerevisiae* and an osmotolerant strain (SR-S) of *Zygosaccharomyces rouxii* to Zymolyase-20T were studied in various conditions. Content of glucan and mannan in cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 were 14.5% and 14.8%, and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S were 24.0% and 19.0%, respectively. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 cultured in Wickerham synthetic medium containing 0.5% of methionine and 0.1% of glucose to Zymolyase-20T was 66%, and K₂HPO₄ and aminobenzoic acid were greatly effective to susceptibility. Susceptibility of *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S cultured in Wickerham synthetic medium containing 0.5% of peptone, 0.15% of methionine and 0.1% of glucose to Zymolyase-20T was 80%, and KI and pyridoxine were greatly effective to susceptibility. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 stationary cultured in YMPG medium at 25°C for 12 hours was 76% and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S stationary cultured in YMPG medium at 25°C for 30 hours was 82%.

중래 효모의 원형질체 형성 실험에는 달팽이의 소화액중에 들어있는 세포벽 분해효소를 많이 사용하였으나 근래에는 *Arthrobacter luteus*로 부터 생산되는 Zymolyase를 많이 사용하고 있다. Zymolyase는 β -1, 3 glucan laminaripentaohydrolase로서 효모 세포벽의 β -1, 3 결합을 가진 glucose polymer를 가수분해시켜 laminaripentaose를 특이적으로 생성한다(1~3). Zymolyase는 세포벽 용해작용이 있는 Zymolyase A와 이의 세포벽 통과를 도와주고 세포벽의 peptide mannan을 분해하는 알카리성 protease인 Zymolyase B의 복합체이며 β -1, 3 glucanase와 protease 및 mannanase 활성도 갖고있다.

한편 Zymolyase에 대한 효모의 감수성은 Kitamura 등(4, 5)의 보고와 같이 효모의 종류와 성장시기 및 배지조성과 배양방법 등에 따라 세포벽 성분이 달라지므로 이들에 큰 영향을 받는 것으로 알려지고 있으나(6) 아직 이 분야에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 이 연구에서는 Wickerham 합성배지를 기본배지로 하여 각종 배지 조성과 배양조건이 Zymolyase-20 T에 대한 고온발효성인 *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 내삼투압성인 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 감수성에 미치는 영향을 검토하였다.

Key words: Susceptibility to Zymolyase, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*

* Corresponding author

재료 및 실험방법

재 료

이 등(7)의 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 사용하였고 wickerham 합성배지와 YPG(Yeast extract-Peptone-Glucose)배지 및 YPG 배지에 0.3% malt extract를 가한 YMPG(Yeast extract-Malt extract-Peptone-Glucose) 배지, YMPG 배지에 2% NaCl를 가한 N배지, M배지(3% malt extract), Y배지(0.3% Yeast extract, 2% glucose) 등을 사용하였다. 또한 세포벽 분해효소는 Kirin 맥주사의 Zymolyase-20 T를 사용하였다.

Glucan과 mannan의 정량

YMPG 배지와 N배지에 시험효모를 접종하여 30°C에서 18~40시간 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 동결 건조하고 Lipke 등(8)의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 세포벽의 glucan과 mannan을 정량하였다.

Zymolyase-20 T에 대한 감수성 및 생육도 측정

상기와 같이 일정시간 배양하여 회수한 시험효모를 삼투압 안정제와 EDTA가 함유된 인산완충액에 희석한 후 1%의 2-mercaptoethanol로 30°C에서 15분간 전처리(7)한 다음 Kaneko 등(6)의 방법에 따라 Zymolyase-20 T 0.4 mg/ml를 가한 직후의 800 nm 흡광도(D_o)와 이를 30°C에서 90분 반응시킨 후의 흡광도(D_t)를 측정하여 다음식으로 그 감수성을

측정하였고 생육도는 두 효모를 일정시간 배양한 후 원심분리하여 회수된 세포를 동결건조한 다음 칭량하여 측정하였다.

$$\text{Susceptibility (\%)} = \frac{D_o - D_t}{D_o} \times 100$$

결과 및 고찰

세포의 일반성분

Sacch. cerevisiae D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71의 단백질과 핵산 함량은 각각 41.5%와 5.4%로서 *Zygosacch. rouxii* SR-S보다 높았으나 탄수화물 함량은 29.35%로서 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 36.88%보다 낮았다.

Sacch. cerevisiae D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 glucan과 mannan

Sacch. cerevisiae D-71 세포벽 중의 glucan과 mannan 함량은 각각 14.5%와 14.8% 이었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 24.0%와 19.0%로서 *Sacch. cerevisiae*(일본 발효협회 7호 효모)의 11%와 13.5%보다 그 함량이 다소 높았다(Table 2). 이는 제빵효모중의 glucan과 mannan 함량이 각각 10%와 15~17% 이었다는 Falcon 등(9)의 결과와 Bacon 등(10)이 제빵효모의 glucan과 mannan 함량

Table 1. General composition of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S. (Unit: %)

Compounds	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S
Carbohydrate	29.35	36.88
Protein	41.50	33.20
Lipid	17.91	22.81
Nucleic acid	5.40	4.34
Ash	5.60	2.40

Table 2. Composition of glucan and mannan in cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S. (Unit: %)

Strains	Glucan	Mannan
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	14.5	14.8
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	24.0	19.0

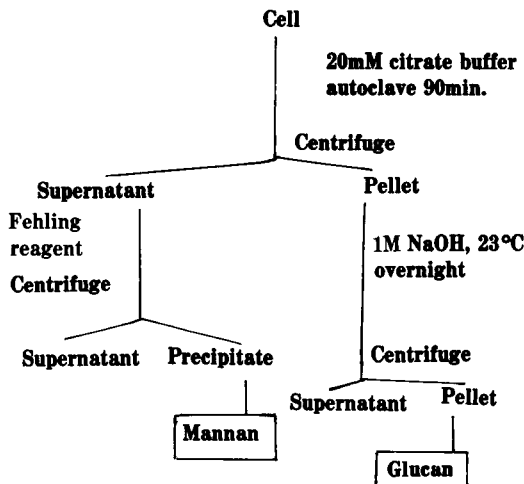


Fig. 1. Flow chart for fractionation of cell wall components.

이 각각 11~12%와 14~15%의 결과보다 다소 높았다.

배지조성이 감수성에 미치는 영향

질소원 : Wickerham 합성배지를 기본배지로 하여 각종 질소원이 Zymolyase-20 T에 대한 두 효모의 감수성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같이 methionine과 peptone 및 (NH₄)₂SO₄이 높은 감수성을 보였다. 특히 methionine의 효과가 좋은 것은 Falcon 등(9)이 제빵효모 세포벽중의 단백질은 2.1%의 높은 함황비율을 가진 pseudokeratin 형이라고 보고한 결과와 Svihla 등(11)이 함황아미노산이 함유된 배지에서 생육시킨 *Candida utilis*는 2시간 만에 거의 모든 세포벽이 제거되어 원형질체를 형성하였으나 함황아미노산이 없는 배지에서 생육시킨 것은 12~24시간이 경과해서야 부분적으로 세포벽이 제거되었다는 보고와 같이 methionine 등의 함황성분이 세포벽의 단백질에 함황비율을 높여서 이를 2-mercaptoethanol 등으로 전처리하면 여러 부위에서 disulfide 결합이 개열되므로 Zymolyase-20 T에 대한 감수성과 원형질체 형성율이 높아지는 것(7)으로 추정된다.

또한 peptone과 (NH₄)₂SO₄ 및 methionine을 혼합하여 감수성에 미치는 영향을 검토한 결과 *Sacch. cerevisiae* D-71에서는 혼용 효과가 없었으나

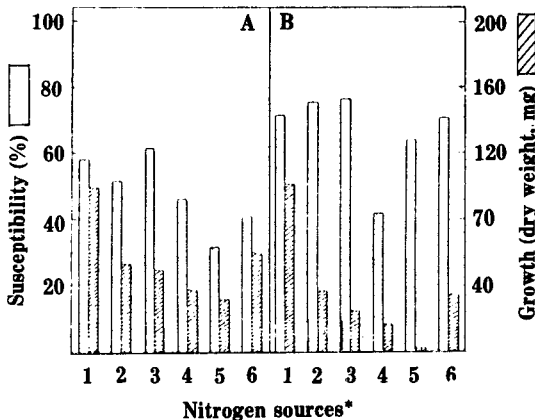


Fig. 2. Effect of nitrogen sources on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B) to Zymolyase-20T.

- 1. Peptone
- 2. Ammonium sulfate
- 3. Methionine
- 4. Tryptophan
- 5. Aspartic acid
- 6. Proline

* Nitrogen source was added 0.5%.
Growth was dry cell weight mg/100 ml of culture broth.

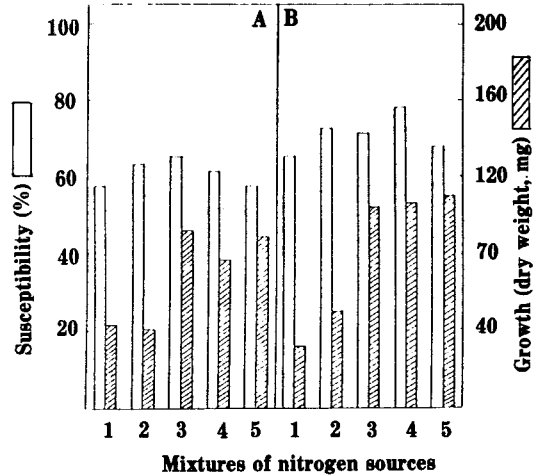


Fig. 3. Effect of the mixture of ammonium sulfate, peptone and methionine on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S (B) to Zymolyase-20T.

- 1: Ammonium sulfate 0.5%
- 2: Ammonium sulfate 0.35% + Methionine 0.15%
- 3: Peptone 0.5%
- 4: Peptone 0.35% + Methionine 0.15%
- 5: Peptone 0.35% + Ammonium sulfate 0.15%

Zygosacch. rouxii SR-S는 0.35% (NH₄)₂SO₄와 peptone에 각각 0.15% methionine을 혼합하여 첨가했을 때 감수성이 좋았으나 methionine 단독시 보다 현저한 감수성의 증가는 없었다(Fig. 3).

탄소원 : 기본배지에 탄소원으로 glucose를 첨가했을 때 그 감수성이 제일 좋았다(Table 3). 또한 glucose 농도의 영향은 Fig. 4와 같이 두 효모 모두 glucose를 0.1% 첨가하였을 때 감수성이 제일 좋았

Table 3. Effect of carbon sources on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T.

Carbohydrates	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71		<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	
	Susceptibility(%)	Growth*	Susceptibility(%)	Growth
Glucose	73	55.25	83	65.40
Mannose	66	55.32	78	52.82
Saccharose	61	62.50	—	t
Maltose	71	43.21	—	t
Glycerol	—	t**	—	t
Ethanol	—	t	—	t

*Dry weight, mg/100ml culture broth
**t: trace

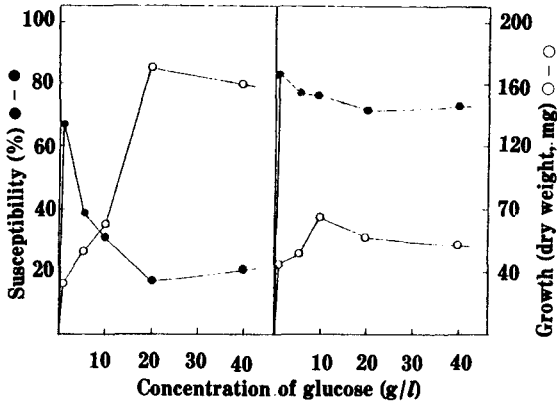


Fig. 4. Effect of the concentration of glucose on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-R(B) to Zymolyase-20T.

고 *Zygosacch. rouxii* SR-S가 *Sacch. cerevisiae* D-71 보다 생육도는 낮았으나 감수성은 오히려 10% 높았다.

미량원소 및 무기염류 : Wickerham 합성배지에 미량원소와 무기염류를 생략법으로 Zymolyase-20 T에 대한 감수성을 측정한 결과 *Sacch. cerevisiae* D-71은 K_2HPO_4 를 결핍시켰을 때 감수성이 32%, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 KI를 결핍시켰을 때 감수성이 68%로서 그 영향이 매우 컸다(Table 4).

비타민 : 생략법으로 Zymolyase-20 T에 대한 감수

성에 미치는 비타민의 영향을 검토한 결과 Table 5와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 aminobenzoic acid를 결핍시켰을 때, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 pyridoxine을 결핍시켰을 때 감수성이 각각 50%와

Table 5. Effect of vitamine on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T

Vitamine*	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71		<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	
	Susceptibility(%)	Growth**	Susceptibility(%)	Growth
Biotine	55	77.50	81	66.04
Calcium pantothenate	53	61.28	—	—
Folic acid	55	76.31	73	55.12
Inositol	55	73.38	79	53.42
Niacine	55	69.46	70	57.53
Aminobenzoic acid	49	62.28	72	72.21
Pyridoxine	61	50.72	69	48.23
Riboflavin	55	61.32	71	84.21
Thiamine	66	65.49	84	69.51
Complete	57	78.01	71	84.25

* Vitamines are defective compounds in WS medium.

** Dry weight, mg/100ml culture broth.

Table 4. Effect of trace elements and salts on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T.

Trace elements and salts*	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71		<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	
	Susceptibility(%)	Growth**	Susceptibility(%)	Growth
Boric acid	44	84.07	80	47.42
Copper sulfate	43	80.21	81	43.63
Potassium iodide	41	72.27	68	63.15
Ferric chloride	44	81.41	80	44.72
Manganase sulfate	57	96.04	82	40.89
Sodium molybdate	50	96.11	72	69.07
Zinc sulfate	41	75.43	73	63.18
Potassium phosphate(monobasic)	53	74.72	79	35.29
Potassium phosphate(dibasic)	32	89.84	77	42.41
Magnesium sulfate	53	67.02	73	15.78
Sodium chloride	35	70.25	74	53.61
Calcium chloride	40	75.05	82	60.31
Complete	33	96.50	73	71.32

* Trace elements and salts are defective compound in WS medium.

** Dry weight, mg/100ml culture broth.

69%로서 영향이 컸다.

천연배지가 감수성에 미치는 영향

배지의 종류 : Zymolyase-20 T에 대한 두 효모의 감수성에 미치는 천연배지의 영향은 Table 6과 같이 탄소원과 질소원이 풍부한 YMPG 배지에서 가장 높은 감수성을 보였고 Y배지에서 얻은 균체가 M배지에서 얻은 균체보다 감수성이 높았으나 합성배지에서의 결과와 큰 차이가 없었다. 그러나 Kitamura 등(4)은 *Sacch. cerevisiae* IFO 0283의 Zymolyase에 대한 감수성에 관한 실험에서 YPG 배지와 M배지에서 얻은 균체가 Y배지에서 얻은 균체보다 감수성이 높았다고 보고한 바 있다.

NaCl의 첨가영향 : YMPG 배지에 NaCl을 3.0M 까지 첨가하여 감수성에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 5와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 0.6M까지 감수성이 증가한 후 감소하였고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 염농도의 증가에 따라 감수성이 감소하였다. 또한 YPG 배지에 대한 NaCl 첨가효과는 두 효모 모두 0.3M에서 감수성이 가장 좋았다(Fig. 6).

생육온도가 감수성에 미치는 영향

Zymolyase-20 T에 대한 두 효모의 감수성에 미치는 생육온도의 영향을 검토한 결과 Fig. 7과 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 35°C에서, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 30°C에서 생육이 양호하였으나 감수성은 두 효모 모두 25°C에서 배양한 세포가 가장 좋았다.

배양방법이 감수성에 미치는 영향

정치 및 진탕배양이 두 효모의 감수성에 미치는 영향을 검토한 결과 *Sacch. cerevisiae* D-71를 12시간 정치배양 했을 때 감수성이 76%, 6시간 진탕배

Table 6. Effect of medium on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T. (Unit: %)

Media	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71		<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	
	24hr	72hr	48hr	96hr
M-medium*	41	17	56	49
Y-medium**	61	45	73	65
YMPG-medium	72	69	81	63

* Malt ext. 3%

** Yeast ext. 0.3%, Glucose 2.0%

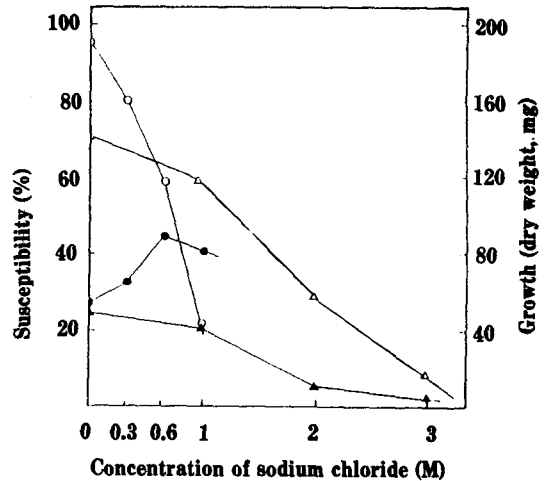


Fig. 5. Effect of the concentration of sodium chloride added in YMPG medium on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(●) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(▲) to Zymolyase-20T.

- : Susceptibility of *Sacch. cerevisiae* D-71
- : Growth of *Sacch. cerevisiae* D-71
- ▲-▲ : Susceptibility of *Zygosacch. rouxii* SR-S
- △-△ : Growth of *Zygosacch. rouxii* SR-S

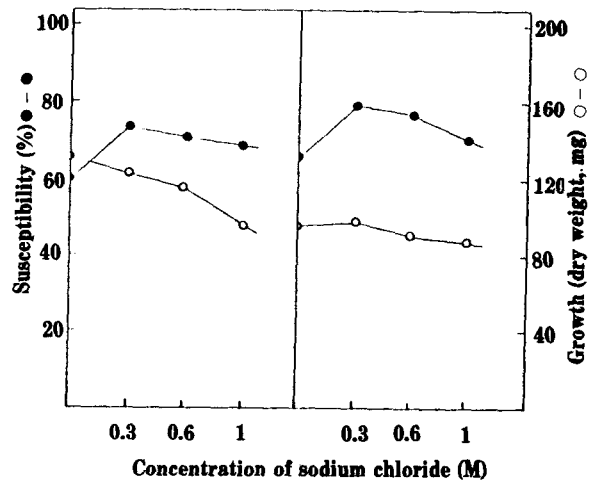


Fig. 6. Effect of the concentration of sodium chloride added in YPG medium on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B) to Zymolyase-20T.

양 했을 때는 58%이었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 30시간 정치배양시 82%의 감수성을 보였고 18시간 진탕배양시 72%의 감수성을 보여 두 효모 모두 정치배양에서 그 감수성 좋았고 대수기 초기에 있는 세포가 감수성이 좋았으며 정치기로 갈수록 낮아졌다(Fig. 8). 이는 Kitamura 등(5)이 Zymolyase에

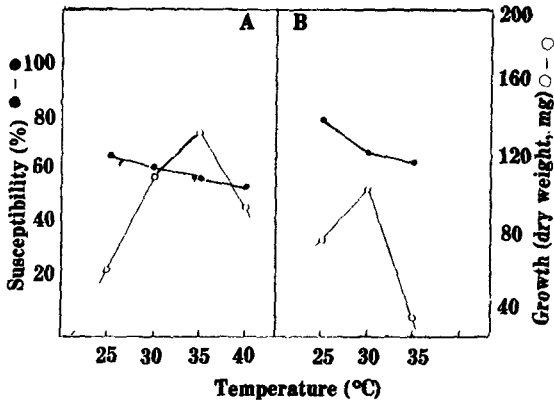


Fig. 7. Effect of growth temperature on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B) to Zymolyase-20T.

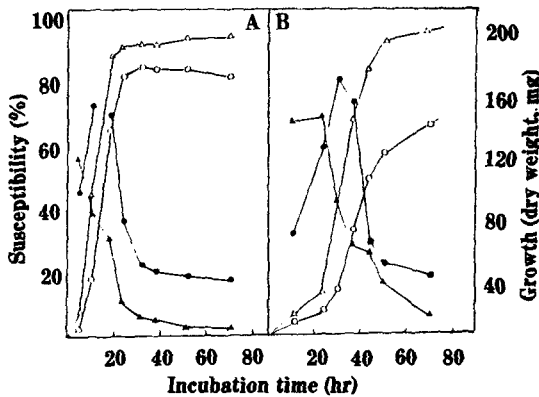


Fig. 8. Effect of culture methods on the susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B) to Zymolyase-20T.

● - ● : Susceptibility of stationary culture
○ - ○ : Growth of stationary culture
▲ - ▲ : Susceptibility of shaking culture
△ - △ : Growth of shaking culture

대한 *Sacch. carlsbergensis* KI 4655의 감수성에 관한 실험결과와 Mcmurrough 등(14)이 통기배양을 하면 효모 세포벽중에는 glucan보다 mannan 함량이 현저히 많았다는 보고와 같은 결과 이었다.

요 약

고온 발효성인 *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 내삼투압성인 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S를 여러 조건에서 배양하여 Zymolyase-20 T에 대한 감수성을 조사하였다.

Sacch. cerevisiae D-71의 glucan과 mannan 함량

은 각각 14.5%와 14.8% 이었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 24.0%와 19.0% 이었다. 0.5% methionine 과 0.1% glucose를 함유한 wickerham 합성배지에 *Sacch. cerevisiae* D-71를 배양하여 얻은 세포의 Zymolyase-20 T에 대한 감수성은 66% 이었고 K₂ HPO₄와 aminobenzoic acid를 결핍시켰을 때 감수성이 가장 낮았다. 또한 0.5% peptone과 0.15% methionine 및 0.1% glucose를 함유한 wickerham 합성배지에 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 배양하여 얻은 세포의 감수성은 80% 이었고 KI와 pyridoxine을 결핍시켰을 때 감수성이 가장 낮았다. 25°C에서 YMPG 배지에 *Sacch. cerevisiae* D-71를 접종하여 12시간 정지배양한 세포의 Zymolyase-20 T에 대한 감수성은 76% 이었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 같은 조건으로 30시간 배양한 세포의 감수성은 82%로서 wickerham 합성배지에서의 감수성보다 더 좋았다.

참고문헌

1. Kitamura, K., T. Kaneko and Y. Yamamoto: *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 402 (1971).
2. Kitamura, K. and Y. Yamamoto: *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 403 (1971).
3. Hampe, W. and E. John: *Adv. in Biochem.*, 381 (1980).
4. Kitamura, K. and Y. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.* 45, 1761 (1981).
5. Kitamura, K. and K. Tanake: *Agric. Biol. Chem.* 46, 553 (1982).
6. Kaneko, T., K. Kitamura and Y. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.* 37, 2295 (1973).
7. 이종수, 김찬조: 한국산업미생물학회지 16:142 (1988).
8. Lipke, P.N., A. Taylor and C.E. Ballou: *J. of Bacteriol.* 116(2), 610 (1976).
9. Falcon, G. and W.J. Nikerson: *Science* 124, 272 (1956).
10. Bacon, T.S.P., V.C. Farmer., D. Tones and I.F. Taybor: *J. of Biochem.* 114, 557 (1961).
11. Svihla, G., F. Schilnk and J.L. Dainko: *J. of Bacteriol.* 82, 808 (1961).
12. Brown, J.P.: *Can. J. Microbiol.* 17, 205 (1971).
13. Cabib, E. and Bowers: *J. of Bacteriol.* 124(3), 1586 (1975).
14. Mcmurrough, I. and A.H. Rose: *J. of Biochem.* 105, 189 (1967).

(Received March 4, 1988)