

Saccharomyces cerevisiae D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S로부터 조제한 원형질체의 안정성

정창기¹·김찬조^{2*}·이종수²

¹오뚜기식품(주) ²충남대학교 식품가공학과

Stability of Spheroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S

Chung, Chang-Ki¹, Chan-Jo Kim^{2*} and Jong-Soo Lee²

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

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

Stability of spheroplasts prepared from *Saccharomyces cerevisiae* D-71, a thermophilic strain and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S, an osmotolerant strain were studied. Stability of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 was highest in 0.8M KCl and 1.0M sorbitol; that from *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S was highest in 0.4M KCl and mannitol and that from both strains was less than 10% for sonic oscillation at 20Kc for 60 sec. In centrifugation at 10000 x g for 10 min., stability of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 was 93% and that from *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S was 84%. Breakage of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 was 99% and that from *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S was 55% for UV irradiation with 15W UV lamp at a distance of 20 cm for 60 min.

전보(1, 2)에서는 Zymolyase-20T에 대한 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 감수성과 이들의 원형질체 형성 및 융합조건 등을 검토하여 보고하였다.

원형질체는 세포학적 연구(3, 4)와 세포융합 및 형질전환 등에 의한 균주육성연구(2, 5~8)의 재료로서 근래에 많이 이용되고 있다. 효모원형질체의 안정성에 관한 연구로서 Arnold 등(9)은 *Sacch. rouxii*의 원형질체를 분리하여 삼투압 안정성 등을 조사보고하였고 Svihla 등(10)과 Nakamura 등(11)은 *Candida utilis* 원형질체의 삼투압, 초음파, 자외선 및 원심력 등에 대한 안정성을 조사한 결과 *Candida utilis* 원형질체를 10 Kc로 60초간 초음파 처리했을 때 95% 이상이 파괴되었고 10000×g에서 10분씩 4회 처리했을 때 92.3%의 안정성을 보였다 고 보고하였다.

이 연구에서는 고온발효성인 *Sacch. cerevisiae*

D-71과 내삼투압성인 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체를 조제하고 분리하여 몇가지 안정성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

효모균주 및 배지는 전보(1)와 같다.

원형질체의 조제 및 분리

이 등(2)의 방법에 따라 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 30°C에서 18~40시간 배양한 후 6000×g에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하고 삼투압안정제와 EDTA가 함유되어 있는 완충용액(이하 set medium이라 함)에 현탁시킨 다음, 2-mercaptoethanol을 1% 가하여 30°C에서 15분간 전처리하고 Zymolyase-20T 0.4 mg/ml를 가하

Key words: Spheroplast, stability, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*

* Corresponding author

여 90분간 반응시켜 원형질체를 조제하였다. 또한 이들 원형질체를 500×g에서 10분씩 2회 원심분리하여 세척한 후 원형질체의 각종 안정성을 검토하였다.

삼투압 안정성

KCl과 sorbitol 및 mannitol 등을 0.2~3.0M까지 일정농도로 조정한 용액 10 ml에 *Sacch. cerevisiae* D-71의 원형질체 현탁액(6.7×10⁶/ml)과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체 현탁액(6.3×10⁶/ml)을 각각 0.2 ml씩 첨가한 다음 4°C에서 2시간 동안 방치하고 500×g에서 10분간 원심분리한 다음 그 상정액의 흡광도를 260 nm에서 측정하여 아래와 같이 (10) 안정성을 계산하였다.

$$\text{Stability (\%)} = \left(1 - \frac{D_s - D_{min}}{D_{max}} \right) \times 100$$

D_{max} : 원형질체를 완전히 파괴시킨 시료의 260 nm에서의 흡광도

D_s : 실험시료의 260 nm에서의 흡광도

D_{min} : 원형질체가 가장 안정한 상태의 시료의 260 nm에서의 흡광도

초음파에 대한 안정성

Sacch. cerevisiae D-71의 원형질체 현탁액(2.7×10⁷/ml)과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체 현탁액(2.3×10⁷/ml)을 30 ml씩 100 ml 비어키에 취하고 Sonicator(Model GT 107, 日本)로 20 Kc에서 일정시간 처리한 후 상기와 같은 방법으로 안정성을 측정하였다.

원심력에 대한 안정성

상기 원형질체 현탁액 10 ml를 원심관에 취한 후 냉동원심분리기(Europa 24 M, 영국)로 일정 원심력

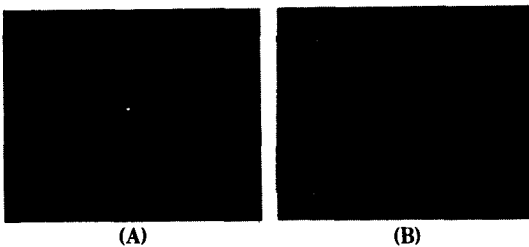


Fig. 1. Micrographs of *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S cells.

A; Cell grown on NaCl free-YPDM medium for 3 days at 30°C, B; Cell grown on 2.0M NaCl containing YPDM medium for 3 days at 3°C (400 X)

에서 10분간 처리하고 재현탁시킨 후 상기와 같이 안정성을 측정하였다.

자외선에 대한 안정성

원형질체 현탁액 10 ml를 페트리접시에 취하고 15W의 자외선 등(Toshiba사, 일본)으로 20 cm의 거리에서 교반하면서 일정시간 조사한 후 상기와 같이 안정성을 구하고 100%에 대한 차이값으로 파괴율을 계산하였다.

결과 및 고찰

삼투압에 대한 안정성

1 M NaCl을 함유한 YPD 배지(1)에 *Sacch. cerevisiae* D-71를 배양하여 NaCl의 첨가에 따른 세포의 형태변화를 조사한 결과 크기와 형태의 변화가 없었으나 2 M NaCl을 함유한 YPD 배지(1)에 배양시킨 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 세포는 Fig. 1과 같이 형태가 구형에서 타원형으로 변하였고 단축/장축의 평균비율도 0.89에서 0.73으로 변하였다. 이는 Watanabe 등(12)이 *Sacch. rouxii* ATCC 42981를 사용하여 염농도의 변화에 따른 형태변화를 관찰한 결과 염농도가 증가함에 따라 구형에서 타원형으로 그 형태가 변하였고 단축/장축 평균비율도 무염배지에서의 0.90이 2 M 배지에서 0.65로 변하였다는 보고와 같은 결과이었다.

한편 두 효모 원형질체의 삼투압에 대한 안정성은 Fig. 2와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 0.8 M KCl과 1.0 M sorbitol에서 가장 안정하였는데 이는 Svihla 등(10)이 *Candida utilis*의 원형질체가 0.75

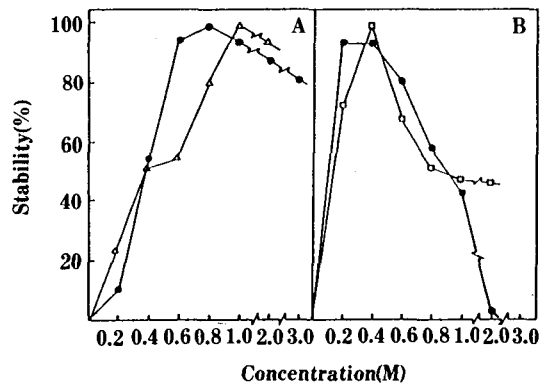


Fig. 2. Effect of the concentration of potassium chloride (●), sorbitol(△) and mannitol(□) on the stability of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B).

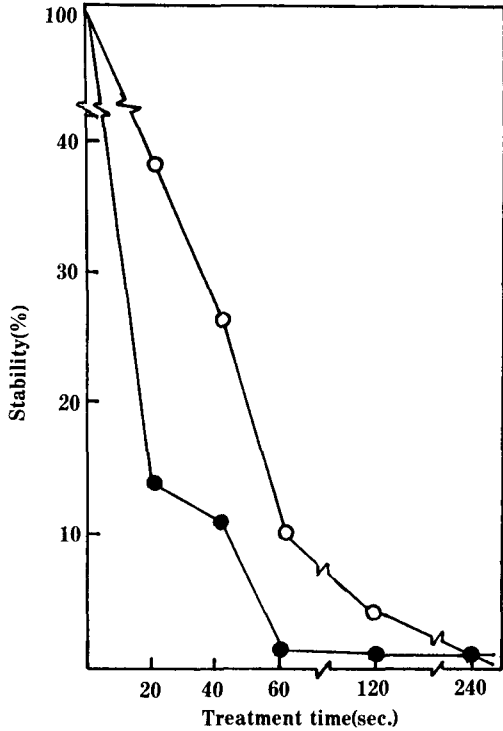


Fig. 3. Effect of sonic oscillation on the stability of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 (○) *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(●). Sonic oscillation was done at 20 Kc.

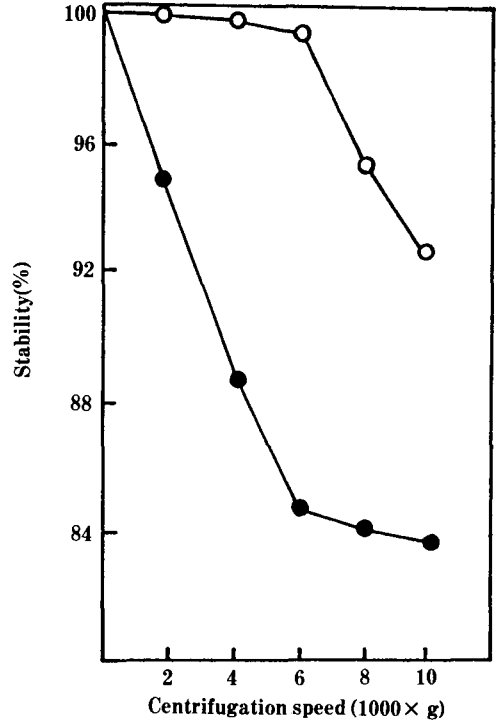


Fig. 4. Effect of centrifugation speed on the stability of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71(○) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(●). Centrifugation was done for 10 min.

M의 KCl에서 가장 안정하였다는 결과와 같았다. 또한 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 0.4M KCl과 mannitol에서 가장 안정하였다. Arnold 등(9)은 *Sacch. rouxii*의 원형질체가 2.0M KCl에서 삼투압에 대한 안정효과가 가장 좋았고 이를 1.0M mannitol로 대체시켰을 때도 매우 안정하였다고 보고한 바 있다.

초음파에 대한 안정성

일반적으로 원형질체는 초음파에 대하여 매우 민감한 것으로 알려져 있다(10). 따라서 두 효모의 원형질체의 안정성에 미치는 초음파의 영향을 검토한 결과 Fig.3과 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71의 원형질체는 20 Kc로 60초간 처리하였을 때 약 90%, 240초간 처리하였을 때는 99% 이상이 파괴되었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 20 Kc, 60초 처리로 99% 이상이 파괴되었다. Svihla 등(10)은 *Candida utilis*의 원형질체를 10 Kc로 60초간 처리하였을 때 95% 이상이 파괴되었다는 결과를 보고한 바 있다.

원심력에 대한 안정성

두 효모 원형질체의 안정성에 미치는 원심력의 영향을 검토한 결과 Fig.4와 같이 10000xg에서 10분간 처리하였을 때 *Sacch. cerevisiae* D-71의 원형질체는 93%, *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 84%의 안정성을 보였다. Svihla 등(10)은 *Candida utilis*의 원형질체를 10000xg에서 10분씩 4회 처리하였을 때 92.3%의 안정성을 보였다고 보고하였고 Nakamura 등(11)은 이 원형질체를 5000xg에서 10분간 처리했을 때 97%의 안정성을 보였다고 보고하였다.

자외선에 대한 안정성

두 효모 원형질체의 자외선에 대한 안정성은 Fig. 5와 같이 60분 처리시 *Sacch. cerevisiae* D-71의 원형질체는 99%, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 약 55%가 파괴되었다. Svihla 등(10)은 *Candida utilis*의 원형질체에 자외선을 조사하여 원형질막이 파괴되면서 세포내의 액포가 세포밖으로 유출됨을 현미경으로 확인하였다고 보고한 바 있다.

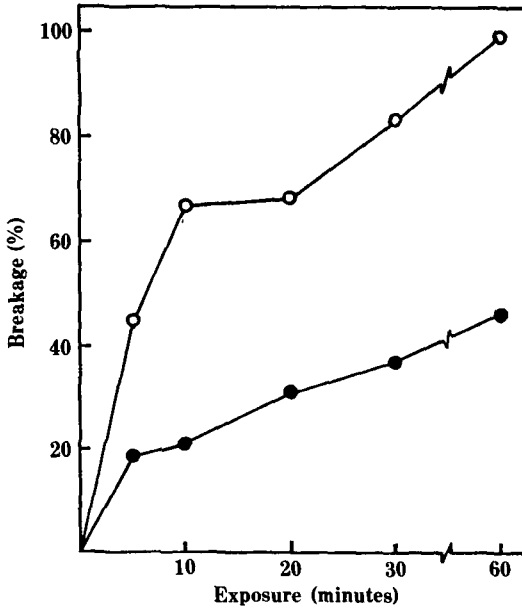


Fig. 5. Effect of UV irradiation on the breakage of spheroplast from *Saccharomyces cerevisiae* D-71(○) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(●).

UV irradiation was done with 15W UV lamp at a distance of 20cm.

요 약

고온발효성인 *Sacch. cerevisiae* D-71과 내삼투압성인 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체를 조제하고 분리하여 그의 안정성을 검토하였다.

Sacch. cerevisiae D-71의 원형질체는 0.8M KCl과 1.0M sorbitol에서, *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 0.4M KCl과 mannitol에서 가장 안정하였고 두 효모의 원형질체들을 20Kc로 60초간 초음파 처리하였을 때 90% 이상이 파괴되었다. 또한 10000×g로 10분간 처리하였을 때 *Sacch. cer-*

visiae D-71의 원형질체는 93%, *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 84%의 안정성을 보였고 이들 원형질체들을 15W의 자외선 등으로 20cm에서 60분간 처리하였을 때 *Sacch. cerevisiae*의 원형질체는 99%, *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체는 55%가 파괴되었다.

참고문헌

1. 정창기, 김찬조, 이종수: 한국산업미생물학회지, **16**(2), 136(1988).
2. 이종수, 김찬조: 한국산업미생물학회지, **16**(2), 142(1988).
3. Eddy, A.A. and D.H. Williamson: *Nature*, **179**, 1252 (1952).
4. Kuo, S.C. and S. Yamamoto: *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 69 (1979).
5. Yamamoto, M. and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.* **41**(9), 1829 (1977).
6. Ito, H., Murata, K. and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(2), 341 (1984).
7. Fukuda, Y., Yamaguchi, S., Hashimoto, H., Shimosaka and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(11), 2877 (1984).
8. Claro, M. and J.R. Santiago: *Ann. Rep. of ICME*, **5**, 435 (1982).
9. Arnold, W.N. and R.G. Garrison: *J. of Bacteriol.*, **137**(3), 1386 (1979).
10. Svihla, G., Schlenk, F. and J.L. Dainko: *J. of Bacteriol.*, **82**, 808 (1961).
11. Nakamura, K. and F. Schlenk: *J. of Bacteriol.*, **116**(3), 1472 (1983).
12. Watanabe, Y. and M. Takakuwa: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(10), 2415 (1984).

(Received June 17, 1988)