

Zygosaccharomyces의 胞子形成과 Life Cycle 에 미치는 培地中の 糖濃度 및 窒素濃度の 影響

河 德 模

東國大學校 食品工學科

(1968. 8. 20 受理)

Effect of Concentration of Carbon and Nitrogen Sources on the Sporulation and the Life Cycles of *Zygosaccharomyces*

Duk Mo Ha

Department of Food Technology, Dongguk University

SUMMARY

The effect of concentration of carbon and nitrogen sources on the sporulation and the life cycles of three strains of *Zygosaccharomyces* was investigated.

The results are as follows:

1) The good sporulation of *Zygosaccharomyces bisporus*, *delbruekii*, and *Z. steineri* was obtained on solid medium containing 0 to 0.001% of nitrogen and 10 to 20% of glucose.

The high content of nitrogen was detrimental to sporulation and asci were formed under 0.01% of nitrogen.

2) It is widely accepted that the life cycle of *Zygosaccharomyces* proceeds in the following way:

Ascospore...Vegetative cells...Conjugation of vegetative cells...Sporulation...Ascospores

But zygotes of *Z. bisporus* proceeded to vegetative cells when transferred to the suitable medium for vegetative reproduction, and then formed asci.

緒 言

培地中の 榮養成分이 胞子形成에 미치는 影響에 關해서는 glucose 濃度와의 關係에 對해서 比較的 詳細히 檢討되고 있으나 其他 N 源으로써의 若干의 amino acid 의 影響에 對해서 檢討되고 있을 뿐이며 胞子形成時의 榮養要求에 對한 廣範圍하고 具體的인 研究는 거의 볼 수 없다.

著者는 *Schizosaccharomyces octosporus* 를 使用하

여 胞子形成時의 C 源, N 源 및 Vitamin 等의 影響에 對해서 報告¹⁾²⁾³⁾ 할바 있으며 *Zygosaccharomyces* 를 使用하여 培地中の C 濃度 및 N 濃도에 의한 胞子形成 및 增殖에 미치는 影響을 實驗 檢討한바 胞子形成時와 增殖時와의 榮養條件에 있어서 critical 한 N 濃도가 存在함을 알게 되었다.

또 *Zygosaccharomyces* 의 榮養繁殖은 一般적으로 haploid phase 에 있어서 일어나고 接合後 곧 胞子를 形成하며 *Zygosacch. marxianus* 等 極少數의 菌株에 있어서는 diploid vegetative cell 의 存在도 觀察되고 있으나 *Zygosacch. bisporus* 를 使用해서 胞子形成에 影響을 미치게 되는 培地濃度差가 life cycle 에 어떠한 影響을 미치게 되는가를 實驗하여 *Zygosacch. bisporus* 에 있어서도 diploid zygote 가 榮養繁殖하는 現象을 볼 수 있었으며 榮養條件 特別 N 濃도에 의해서 diploid zygote 가 곧 胞子를 形成하지 않고 榮養細胞로 移行함을 알게 되었으므로 이에 對해서 報告코저한다.

實 驗

1) 供試菌株

日本 東京農業大學 農藝化學科 醱酵學研究室 保存의 *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosacch. delbruekii*, *Zygosacch. steineri* 의 3 菌株를 供試菌으로 하였다.

2) 培 地

Table 1 組成의 培地를 使用하였으며 C 源 N 源에 對해서는 各段階 濃도가 되도록 調製하였다.

即 C 源으로써의 glucose 濃도를 0, 5, 10, 15, 20% 의 各段階로 하고 各 glucose 濃도에 對해서 N 源

TABLE 1. Final Composition of Medium

Components	Amount per litre
Dextrose	0, 50, 100, 150, 200g
Casamino acid	0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.4 g(as N.)
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.33g
KI	0.1 mg
H ₃ BO ₃	0.01mg
MnSO ₄	0.01mg
ZnCl ₂	0.07mg
CuSO ₄	0.01mg
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄	0.01mg
FeCl ₃	0.05mg
Thiamine	500.0 mcg
Riboflavin	200.0 mcg
Pyridoxine	500.0 mcg
Nicotinic acid	500.0 mcg
Ca-pantothenate	500.0 mcg
Biotin	10.0 mcg
Folic acid	4.0 mcg
Inositol	2000.0 mcg
p-Aminobenzoic acid	200.0 mcg

으로써의 casamino acid 농도를 N 농도가 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.04%가 되도록 添加한 計 25種類의 培地를 使用하였다. 胞子形成試驗 및 life cycle 試驗에는 寒天斜面培地를 使用하고 増殖試驗에는 液體培地를 使用하였다.

各 培地는 pH 5.6~5.8에 調整後 間斷殺菌하였다.

3) 胞子形成試驗 및 増殖試驗

胞子形成試驗은 供試菌을 미리 Ballg 10° pH 5.6 ~5.8의 麴汁을 使用하여 30°C에서 48時間 前培養한 後 菌體를 遠心分離하고 殺菌生理食鹽水에 懸濁하여 다시 遠心分離한다. 이 操作을 3回 反復하여 菌體에 附着된 前培養培地成分을 除去하고 試驗寒天斜面培地에 劃線하여 25°C에서 72時間 培養하였다.

培養期間中 24時間마다 試料를 取하여 每回 2,000個 以上の 細胞를 顯微鏡으로 觀察하고 全細胞에 對한 ascus의 %를 求하며 各 培地에 있어서의 胞子形成을 比較 檢討하였다.

増殖試驗은 胞子形成試驗과 같은 方法으로 供試菌을 前培養하고 殺菌生理食鹽水로 洗滌한 後 Thomas氏의 血球計數器를 利用하여 懸濁液中에 含有되어 있는 菌體數를 實測하여 殺菌 pipette 한방울 (0.03ml)中에 10⁴個의 細胞가 含有되도록 稀釋하고 이 供試菌懸濁液의 한방울을 各 培地 10ml에 無菌的으로 接種하였다.

接種한 各 試驗培地는 25°C에서 72時間 靜置培養後 570mμ에서 透過率을 測定하여 各 試驗培地에 있어서의 増殖을 比較하였다.

4) life cycle 에 對한 試驗

試驗寒天培地를 加熱 溶融하여 cover glass 上面에 따루어 凝固시킨 film 上面에 各種 段階에 있는 試驗菌을 옮기고 hole slide glass에 固定후 顯微鏡下에서 保溫하면서 連續 觀察하였다.

實驗結果 및 考察

各 段階의 glucose 濃度 및 casamino acid 濃度에 있어서의 各 供試菌의 胞子形成試驗의 結果는 Table 2~Table 4에 表示한 바와같이 全 供試菌이

TABLE 2. Effect of Conntration of Glucose and Casamino Acid on Sporulation of Zygosaccharomyces bisporus

Per Cent of Nitrogen	Per Cent of Glucose	Incubation Days		
		2	6	10
0.	0	+	+	+
	5	+	++	+
	10	++	+++	++
	15	++	++	++
0.001	20	++	++	++
	0	+	+	+
	5	+	+	++
	10	++	+++	+++
0.005	15	++	+++	+++
	20	++	+++	+++
	0	+	+	+
	5	+	+	+
0.01	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
	20	+	++	+
	0	+	+	+
0.04	5	-	-	-
	10	-	-	-
	15	-	-	-
	20	-	-	-

Per cent of ascus: - = 0%; + = 0.1-5.0%; ++ = 5.1-10.0%; +++ = 10.0-30.0%

TABLE 3. Effect of Concentration of Glucose and Casamino Acid on Sporulation of *Zygosaccharomyces delbrueckii*

Per Cent of Nitrogen	Per Cent of Glucose	Incubation Days		
		2	6	10
0.	0	+	+	+
	5	+	++	++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
0.001	0	+	+	+
	5	+	+++	+++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
0.005	0	+	+	+
	5	+	+++	+++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
0.01	0	-	-	-
	5	+	+	++
	10	+	++	++
	15	+	++	++
0.04	0	-	-	+
	5	-	-	+
	10	-	-	+
	15	-	-	+

Per cent of asci: --=0%; +=0.1-5.0%; ++=5.1-10.0%; +++=10.1-30.0%

TABLE 4. Effect of Concentration of Glucose and Casamino Acid on Sporulation of *Zygosaccharomyces steineri*

Per Cent of Nitrogen	Per Cent of Glucose	Incubation Days		
		2	6	10
0.	0	+	++	+++
	5	++	+++	+++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
	20	++	+++	+++
0.001	0	+	++	++
	5	++	+++	+++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
0.005	0	+	++	++
	5	+	+++	+++
	10	++	+++	+++
	15	++	+++	+++
0.01	0	+	+	+
	5	+	++	+
	10	+	++	+
	15	+	++	+
0.04	0	-	-	-
	5	-	-	-
	10	-	-	-
	15	-	-	-

Per cent of asci: --=0%; +=0.1-5.0%; ++=5.1-10.0%; +++=10.1-30.0%

TABLE 5. Effect of Concentration of Glucose and Casamino Acid on Growth of Various Species of *Zygosaccharomyces*

Per Cent of Nitrogen	Per Cent of Glucose	Optical Density		
		<i>Zygosacch. bisporus</i>	<i>Zygosacch. delbrueckii</i>	<i>Zygosacch. steineri</i>
0.	0	0.000	0.001	0.000
	5	0.006	0.008	0.001
	10	0.012	0.012	0.001
	15	0.008	0.004	0.001
	20	0.006	0.004	0.001
0.001	0	0.004	0.001	0.000
	5	0.080	0.110	0.108
	10	0.070	0.077	0.069
	20	0.070	0.077	0.060
0.005	0	0.045	0.065	0.050
	0	0.000	0.001	0.000
	5	0.160	0.125	0.174
	10	0.153	0.108	0.160
0.01	15	0.080	0.098	0.101
	20	0.075	0.078	0.070
	0	0.001	0.004	0.001
	5	0.168	0.158	0.194
0.04	10	0.167	0.120	0.180
	15	0.148	0.018	0.119
	20	0.080	0.018	0.065
	0	0.004	0.004	0.000
0.04	5	0.180	0.174	0.258
	10	0.174	0.148	0.213
	15	0.160	0.104	0.112
	20	0.098	0.091	0.060

N 濃度 0.04%에 있어서 전혀 胞子를 形成하지 않고 0.01%의 濃度 以下에서 胞子를 形成하며 一般的으로 0~0.01%의 N 濃度에 있어서 가장 높은 ascus 形成率을 나타내었다.

糖濃度는 10~20%의 範圍內에서는 濃度差에 의한 顯著한 影響은 없으나 0%에서는 ascus 形成率은 低下되고 前報¹⁾에 있어서의 *Schizosaccharomyces octosporus* 와 같이 10% 以上の 比較的 높은 糖濃度에 있어서 높은 ascus 形成率을 나타내었다.

増殖試驗의 結果는 Table 5에 表示한 바와같이 全供試菌이 糖濃度 5~10%에 있어서 가장 높은 増殖을 나타내고 10% 以上の 糖濃度는 도리어 供試菌의 増殖을 抑制하는 傾向을 보였다.

*Zygosaccharomyces*의 life cycle은 一般的으로 알려져 있는 바와 같이 胞子→營養細胞→發芽繁殖→接合→胞子形成의 cycle을 經由하나 上記의 胞子를 形成하게 되는 N 濃度 0.01% 以下の Casamino acid 含有培地, 例컨데 胞子形成에 가장 適合한 N 濃度 0.001%의 Casamino acid 含有培地에 있어서 形成된 zygote를 胞子를 形成하지 않으며 増殖에 適合한 N 濃度 0.04%의 Casamino acid 含有培地에 移殖하여 連續 觀察한 結果 一段 形成된 zygote가

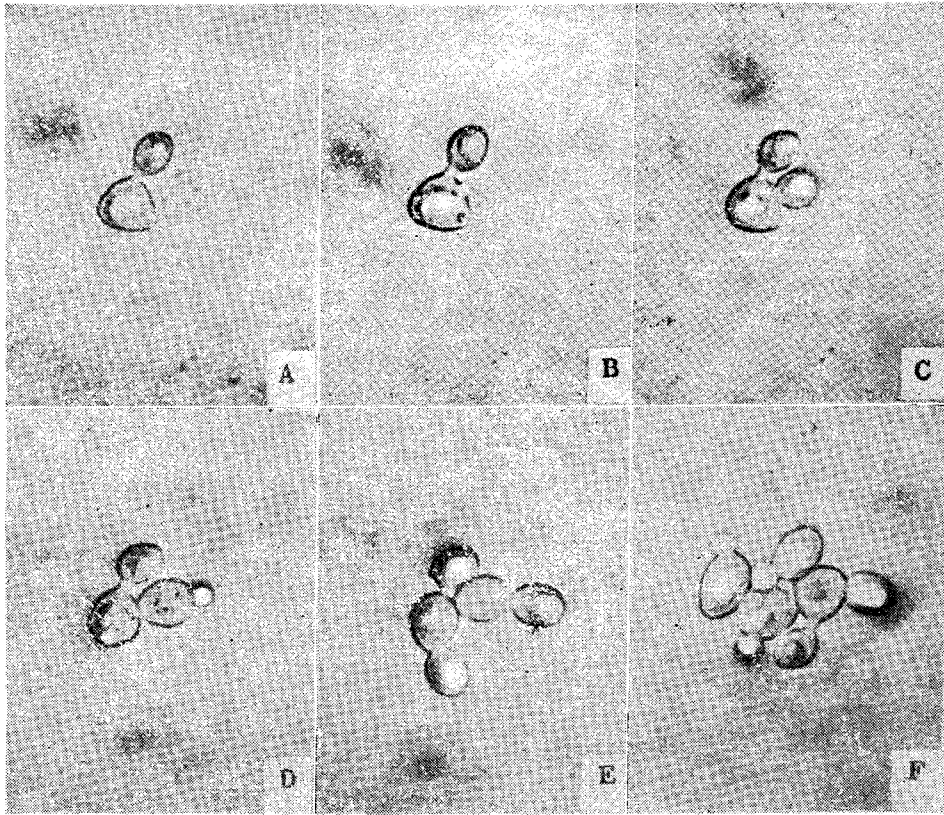


Fig. 1. Vegetative reproduction of zygote of *Zygosaccharomyces bisporus*
 A-F: the same sample at different times

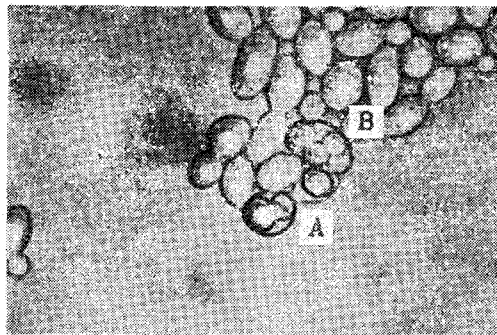


Fig. 1. Asci of *Zygosaccharomyces bisporus* observed
 in a mass culture
 A: ascus derived from diploid zygote.
 B: ascus derived from a vegetative diploid cell.

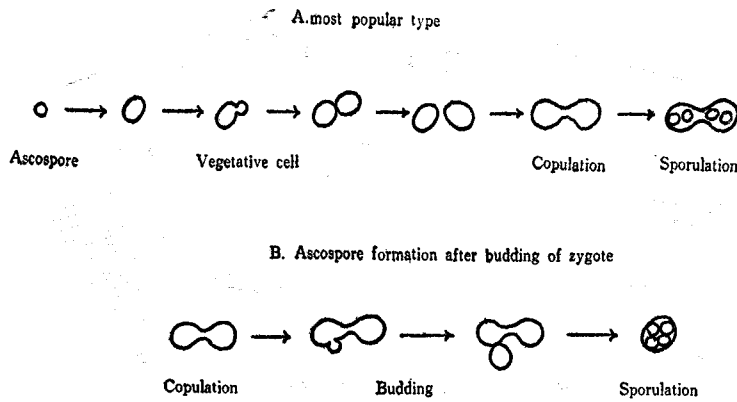


Fig. 3. Life cycles of *Zygosaccharomyces* type

곧 胞子를 形成하지 않고 다시 榮養繁殖하게 된다.
 Fig 1은 *Zygosacch. bisporus*의 diploid zygote를 N 濃度 0.04%의 casamino acid 含有培地에 移植였을 때 곧 胞子를 形成하지 않고 發芽에 의해서 다시 榮養繁殖하게 되는 連續的 變化的 例이다.

이와같이 해서 얻어진 diploid vegetative cell을 含有하는 培養菌을 胞子形成에 가장 適合한 N 濃度 0.001%의 寒天斜面培地에 移植 培養하였을 때 Fig 2에서 보는 바와 같은 形態가 相異한 二種類의 ascus가 觀察된다.

이 二種類의 ascus中 亞鈴形의 ascus는 그 形態로 보아 明白히 diploid zygote가 곧 胞子를 形成한 것이고 橢圓形의 ascus는 diploid의 vegetative cell이 胞子를 形成한 것임을 容易하게 推定할 수 있다.

*Zygosaccharomyces*의 life cycle을 要約해서 模式圖로써 表示하면 Fig3와 같다.

*Zygosaccharomyces*의 life cycle은 一般적으로 haploid phase에 있어서 榮養繁殖하고 接合後 곧 胞子를 形成하나 Lodder等⁴⁾⁵⁾에 의해서 *Zygosacch. marxianus*에 있어서 diploid의 vegetative cell의 存在가 認定되고 있으며 *Zygosacch. bisporus*에 있어서도 diploid의 vegetative cell이 存在한다는 것을 確認하였으며 榮養條件 特히 培地의 N 濃度の 差異에 의해서 接合後 곧 胞子를 形成하지 않고 diploid zygote의 榮養繁殖이 誘導되며 前報에서 報告한 haploid yeast인 *Schizosaccharomyces*에 있어서 確認된 diploid phase에 있어서의 榮養繁殖과 같은 現象이 存在하는 것을 明確히 하였다.

그러므로 前報에서 報告한 *Schizosaccharomyces*의 경우와 같이 各種 酵母의 lifecycle은 固有의 것이 아니고 haploid yeast의 diploid phase에 있어서의 榮養繁殖 또는 diploid yeast의 haploid phase

에 있어서의 榮養繁殖이 榮養等의 培養條件에 의해서 誘導될 수 있는 可能性을 示唆하고 있는 것이다

要 約

C 源과 N 源으로써 glucose와 casamino acid를 使用하여 糖濃度和 N 濃度の 差異가 *Zygosacch. bisporus*, *Zygosacch. debrueckii*, *Zygosacch. steineri*:의 胞子形成 및 增殖과 life cycle에 미치는 影響에 對하여 試驗檢討하였다.

1. 胞子形成最適濃度는 N 0~0.001% 糖 10~20%이며 N 濃度 0.04%에 있어서는 胞子를 全然 形成하지 않고 0.01% 以下の 濃도에 있어서 胞子를 形成하게 된다.

2. 增殖最適濃度는 N 0.04% 糖 5~10%이다.

3. *Zygosacch.*의 一般的인 life cycle은 胞子→榮養細胞→接合→胞子形成의 各 段階를 經由하나 *Zygosacch. bisporus*의 zygote를 增殖에 最適의 N 濃度 0.04%의 培地에 移植하였을 때 곧 胞子를 形成하지 않고 다시 榮養繁殖하며 榮養條件 特히 N 濃도에 의해서 diploid zygote의 榮養繁殖이 誘導된다.

(本論文의 要旨는 1962年 4月 日本農藝化學會에서 發表하였다)

參 考 文 獻

- (1) 河德模; 新韓學報 8, 171(1960)
- (2) 河德模; 東國大學校論文集 4, 517(1967)
- (3) 河德模, 住江金芝; 日本農藝化學會發表(1962)
- (4) Lopder, J.; Anatonie van Leeuwenhoek J. microbiol. Serol. 12, 273(1947)
- (5) Phaff, H. H. and Mrak, E.M.; Wallerstein Labs. Commun. 11, 261(1948)
- (6) Suminoe, K. and Ha, D.; J. Gen. Appl. Microbiol. 9, 243(1963)