

효모의 배양시기에 따른 인산화합물의 합성 및 호흡능에 미치는 탄소원의 영향

*李鍾三 · *趙善姬 · 李基渥 · 辛弘基 · 崔榮吉

(*誠信女大 生物學科 · 漢陽大學校 生物學科)

Effect of the Carbon sources on the Synthesis of phosphate compounds and Respiratory activity of Yeast (*Saccharomyces uvarum*) during growth phases

*LEE, Chong Sam, *Sun Hee CHO, Ki Sung LEE, Hong Kee SHIN, and Yong-Keel CHOI.

(*Sungshin Women's University. Hanyang University)

ABSTRACT

The growth rate of yeast population (*Saccharomyces uvarum*) cultivated in the Knopp's modified medium (plus various carbon sources) appeared the highest value when the Knopp's minimal medium was treated to 1.5% with disaccharide such as maltose and sucrose. Also the treatment of lactose and raffinose resulted in population growth as to the population size in case of maltose and sucrose. However, the growth of yeast was not occurred at all when a polysaccharide, such as inulin, was added as carbon source.

The growth form of yeast population in Knopp's modified medium are characterized by the fact that log phase continued 100hrs after inoculation and that stationary state phase appeared in general 250hrs after inoculation. Applying the various carbon sources to respiration substrate for yeast cell, the respiration rate of yeast showed the highest value in treatment of maltose and followed in order of raffinose, lactose, glucose, and sucrose.

Determined the amount of poly-phosphate and turn over pathway of poly-phosphate according to culture phase of yeast, it is revealed that the yeast synthesized 3 types of poly-phosphate (poly-P A,B, and C) and postulated that turn over pathway of poly-phosphate as follows; Inorganic phosphate is converted into each kind of polyphosphates, and then one part of poly-P-C is converted into poly-P-B, the rest poly-P-C and poly-P-B are converted into poly-P-A.

The synthesized poly-phosphate is considered to have a role as energy pool utilizing to synthesis of cellular organic materials. Of the 13 carbon sources used in this experiment,

*本研究는 1980年度 韓國科學財團의 研究費에 의하여 수행되었음.

the useful carbon sources for biosynthesis of poly-phosphate and cellular organic materials are confirmed as disaccharide (maltose and sucrose) as well as glucose. Protein synthesis in yeast cell showed the two peaks on 6th and 8th day after inoculation; nucleic acid on 2nd day (48hrs), carbohydrates on 2nd day (48hrs), and phospholipid on 2nd and 8th day after inoculation, respectively.

I. 緒 論

미생물 세포내의 폴리인산의 존재는 metachromatic granule(volutine)로 세포학적 측면에서 일찌기 관찰되어 왔고, Lewis(1941)와 Nagel(1948) 등은 배양기에 인산을 첨가하여 주었을 때, 이 granule이 형성됨을 주목하고 이것이 일종의 영양소의 축적기능을 가진 것으로 생각하였다. 그 이후 Wiame (1949)은 *Saccharomyces cerevisiae*를 재료로 이 과립상의 존재를 화학적으로 분석한 결과 poly phosphate임을 입증하였다. 한편 Michaelis(1947)도 이 물질이 hexametaphosphate의 polymer인 염색가능한 물질임을 확인하였다. 그 이후 이 poly phosphate의 연구가 활발히 진행되어 여러가지 사실이 밝혀지게 되었는바 Minck(1949) 등은 RNA와 metaphosphate가 charge되었다는 보고, Smith(1954) 등이 영양소의 결핍상태에서 RNA와 protein의 복합물질로 존재한다는 보고, 인산과 에너지폴의 기능을 가지고 있다는 의견(Wiame 1949, Winkler 1953, Mudd *et al.* 1958), 세포질내의 양이온과 복합체를 형성할 수 있는 능력이 있기때문에 효소의 활성, 세포의 성장과 분열의 조절기능을 갖는다고 하였으며(Katchman *et al* 1955, Trevelyan *et al* 1956), 그리고 비교적 최근에 이르러 Ilan Friedberg 등(1968)이 *Micrococcus lysodeikticus*를 재료로 행한 실험의 결과도 세균 배양체 건량의 약 27%가 poly phosphate임을 확인하고 배양시기에 따라, 즉 log phase에 poly phosphate를 축적하다가 정체기에 이르러 점진적으로 감소함을 보고하였다. 폴리인산의 존재는 효모세포에 국한된 것이 아니고 하등식물(Keck and Stich, 1957), 세균(Harold 1966), 균류(Belozersky and Kuayev, 1957), 녹조류(Correll 1965), 시금치와 해조류(李와李 1976, 1978)에서도 발견되고 그 기능의 다양성이 밝혀

졌으며 폴리인산의 세포내 존재형태도 산가용성 폴리인산 A, B와 C(이, 1966) 그리고 RNA-complex poly phosphate의 4형이 존재함이 알려지고 각형의 합성시기와 전환과정이 생물의 종류, 배지 및 배양조건에 따라 그 pattern이 다른 것으로 보고되어 있다.

본 실험에서는 응용면에서 널리 이용되는 순화된 효모의 일종인 *Saccharomyces uvarum*을 재료로하여 각종 탄소원을 달리하는 최소배지에서 이 효모를 배양하여 성장시기에 따른 생장을, 호흡율을 측정하고 생장율과 호흡율이 좋은 탄소원을 선정하여 배양의 최적조건을 규명하여 이에따른 효모세포의 폴리인산의 합성량과 전환과정을 알아보기 위하여 본실험을 착수하였다. 효모세포에 폴리인산이 존재하는 사실은 이미 알려진 사실이지만, 폴리인산의 합성에 가장 유효한 탄소원은 무엇인가, 어느 시기에 합성량이 최대이며 폴리인산의 각형(A, B, C)의 최대 합성시기에 그 전환과정의 pattern이 각종 체구성 물질의 합성시기와 비교하여 어떤 상호관련성을 갖는가를 추적하려 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 효모의 생장에 미치는 탄소원의 영향

효모는 *Saccharomyces uvarum*으로 실험하였으며, 배지는 Knopp씨 최소배지(KH_2PO_4 : 0.25g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25g, KCl : 0.12g, FeCl_3 : trace, $\text{D.H}_2\text{O}$: 1l)에 13종의 당류(arabinose, galactose, glucose, xylose, fructose, salicine, rhamnose, sorbose, maltose, lactose, sucrose, raffinose, inulin)를 각각 1.5%가 되도록 첨가하고 26°C pH 7.0의 조건에서 진탕배양을 실시하였다. 효모는 실험전 배양하여 수확한 후 인산완충용액에 현탁시키고 Knopp 배지 250 ml에 최초의 접종량을 4.3×10^6 세포/ml의 수준에서 출발하였다. 접종배양은 약 300시간 진행

하면서 table 1에서와 같이 시간 간격마다 3ml을 취하여 효모의 세포의 성장량을 측정하였다. 효모세포의 성장량은 spectrophotometer를 사용하여 660nm의 파장에서(김, 1980) 광학밀도(O.D.)를 구하여 산출하였다.

2. 탄소원에 따른 호흡을 측정

전항의 실험결과 효모의 개체군 증식에 효율이 낮은 당류로 판명된 salicine, sorbose, inulin, rhamnose를 제외한 9종의 당류를 호흡기질로 첨가하고 효모의 호흡율을 측정하였다. 실험전 배양한 효모를 수확하여 0.1M 인산완충액(pH 7.0)에 현탁하고 24시간 starvation 시킨 후 효모세포수 측정에 이어 Warburg manometer에 적용하였다. Warburg manometer의 vessel에 주입된 용액총량은 2.9ml로서 세포현탁액 2ml, 20% KOH 0.4ml, side arm 부위에 Knopp씨 용액에 용해한 당용액 0.5ml로서 endogenous 호흡을 측정후 당용액과 세포현탁액을 혼합할 경우 당류농도는 1.5%가 되도록 하였다. 세포현탁액 2ml에는 0.92×10^{10} 의 효모세포수가 존재하는 것으로 측정되고 26°C에서 진탕시키면서 table 2에서 보는바와 같은 시간간격마다 호흡율의 누적치를 측정하였다.

3. 효모의 인산대사와 유기물 합성

효모를 YM배지에서 대량 배양한후 수확하여 Knopp씨의 최소배지에서 24시간 starvation시키고 이어서 Knopp 배지에 1.5%의 당류가 첨가된 배지에 접종시켰다. 제 1항과 제 2항의 실험결과 효모세포의 개체군 증식에 효율이 높고, 효모의 endogenous 호흡율보다 높은 9종의 당류(raffinose, maltose, sucrose, lactose, galactose, glucose, arabinose rhamnose, fructose)가 선정되었다. 배양은 30°C, pH 5.0의 조건에서 진탕배양기(130 cycle/min.)에서 10일동안 배양하면서 성장시기에 따른 효모의 poly-phosphate와 여러가지 인산화합물 함량과 유기물의 합성량을 측정하였다. 위와같이 배양한 세포를 배양초와 배양중간기에 수확하여 0.2M NaCl용액으로 2회 세척한다음 분획실험에 임하였다. 핵산의 분리는 Schmidt와 Tannhauser(1945)의 방법에 의거하였으며, poly-phosphate의 분리는 Miyachi와 Tamiya(1961)의 방법에 의거하였다.

그 처리 순서는 전보 이와최(1981)의 처리 순서와 같다.

III. 結果 및 考察

1. 효모의 개체군 성장과 탄소원의 영향

Knopp씨 최소배지에 1.5%의 농도로 첨가한 13종의 당류는 5탄당, 단당류, 2당류, 3당류, 다당류로서 효모의 개체군 성장에 미치는 영향은 table 1에서 보는 바와 같다. 단당류중에서는 glucose, arabinose, galactose가 가장 성장량이 높았고 xylose, salicine, rhamnose, sorbose의 처리구에서는 성장량이 낮았다. 이당류중에서는 maltose, lactose, sucrose의 순이며 삼당류인 raffinose 처리구에서도 성장률이 좋았다. 그러나 다당류인 inulin에서는 효모의 개체군 성장이 거의 나타나지 않았다. 최초 접종량 4.3×10^6 /ml, 배양액 250ml, 온도 26°C, pH 7.0의 환경하에서 효모의 개체군 성장은 대체로 접종후 100시간 이전에 log-phase를 나타내 보이며 250시간을 전후하여 정체기에 이르는 것을 알 수 있었다. Barnett와 Pankhurst(1974) 등이 *Saccharomyces uvarum*을 재료로한 당류의 이용 실험

Table 1-1 O.D Value of population growth during the culture, treating with various kinds of sugar as carbon source

Sugar	suc-rose	fruc-tose	glu-cose	arab-inose	lac-tose	raffi-nose	gala-ctose
O.D. Hour							
0	0	0.010	0.002	0.015	0	0.02	0
5	0.005	0.010	0.010	0.015	0.002	0.04	0
10	0.005	0.012	0.010	0.018	0.002	0.053	0
23	0.020	0.015	0.010	0.018	0.012	0.068	0.001
34	0.030	0.025	0.010	0.022	0.026	0.07	0.004
46	0.040	0.048	0.010	0.030	0.050	0.078	0.010
70	0.055	0.075	0.020	0.510	0.190	0.1	0.025
94	0.070	0.085	0.030	0.600	0.320	0.11	0.04
120	0.070	0.088	0.045	0.515	0.390	0.122	0.58
142	0.075	0.091	0.050	0.610	0.425	0.14	0.082
166	0.079	0.100	0.062	0.780	0.435	0.17	0.092
190	0.089	0.098	0.085	0.960	0.450	0.22	0.11
214	0.100	0.100	0.115	1.050	0.460	0.27	0.13
238	0.105	0.100	0.160	1.050	0.440	0.34	0.15

Table 1-2. O.D.value of population growth during the culture period, treating with various kinds of sugar as carbon source

Sugar	inulin	maltose	sorbose	salicin	rham-nose	xylose
O.D.						
Hour						
0	0	0	0	0.020	0	0.003
8	0	0.008	0.002	0.020	0.002	0.005
21	0	0.008	0.002	0.022	0.006	0.005
32	0	0.012	0.002	0.027	0.020	0.005
45	0	0.015	0.003	0.040	0.020	0.010
70	0	0.020	0.009	0.022	0.015	0.052
94	0	0.023	0.009	0.022	0.018	0.060
118	0	0.030	0.010	0.032	0.018	0.060
142	0	0.035	0.010	0.030	0.018	0.059
166	0	0.045	0.008	0.028	0.015	0.059
190	0	0.085	0.008	0.028	0.015	0.057
214	0	0.440				
238	0	0.500				

결과 대체로 본 실험의 결과와 유사하나, lactose는 그 이용경로가 산화적 인산화반응, 기질수준의 인산화반응(발효)을 통해서도 이용되지 못하

는 당류로 알려져 있으나 본 실험에서는 그 이용 효율이 좋은 특이한 일례를 보였다. 그러나 inulin 처리구 그 양자의 반응 모두에서 이용되지 못하는 당류라는데 그 결과가 동일하였다.

2. 효모의 호흡율과 탄소원의 영양

Knopp씨 최소배지에 생장량이 비교적 있었던 것으로 판명된 9종의 당류를 1.5% 첨가하고, 배양실험과 동일한 조건하에 호흡율을 측정한 결과 Fig. 1.과 table-2.의 결과와 같다. 즉 maltose, raffinose, lactose, glucose, sucrose, galactose, arabinose, rhamnose, fructose의 순으로 호흡율이 양호하였다. 배양실험결과 생장량이 좋은 탄소원으로 선정된 당 처리구에서 역시 호흡율이 좋은 것은 물론 기질의 산화에 있어 latent period(induction period, adaptation)가 짧았다.

Latent period에 관해서는 많은 연구가 있었는데, Campbell과 Stokes(1951)은 기질수송에 필요한 효소의 합성에 유관함이 있다고 했으며 Kornberg(1973)는 기질의 수송과 산화회로로 들어가는 데 필요한 에너지를 축적하는 과정에

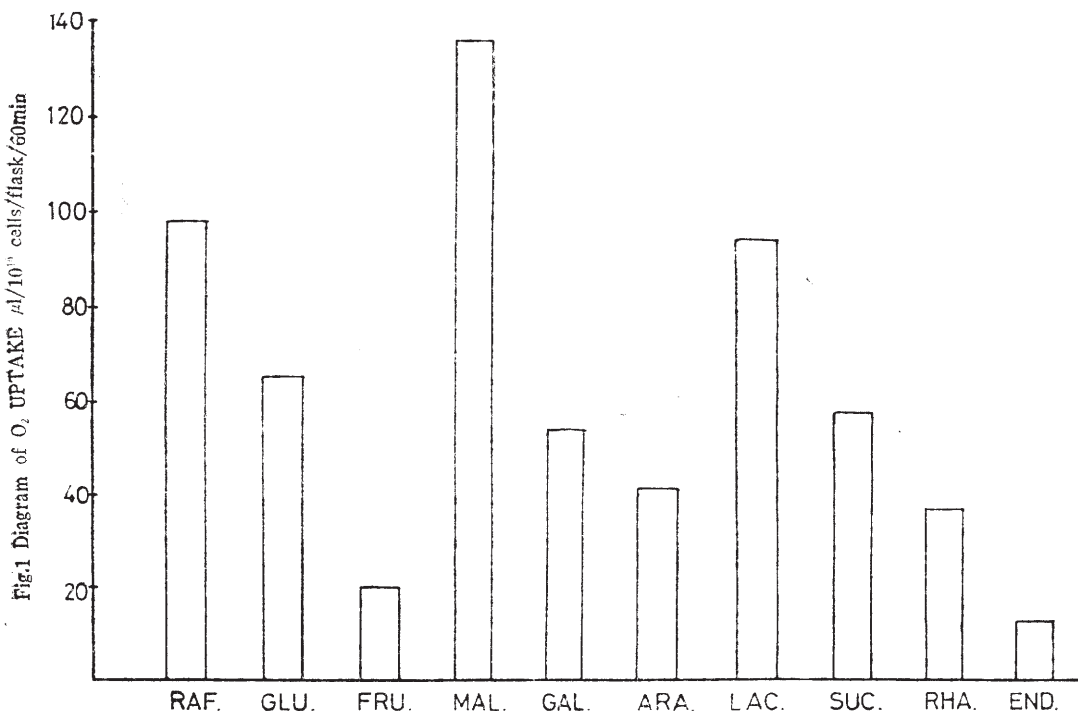
**Fig. 1.** Diagram of O₂ uptake(μl/60min) treating with various carbon sources.

Table 2. O₂ uptake, micro litre/0.92 x10¹⁰ cells, under various conditions treated with nine kinds of sugar as respiratory substrate

Sugar Minute	galactose	raffinose	arabinose	glucose	lactose	fructose	sucrose	maltose	rhamnose
10분	16.08	32.27	3.93	4.32	22.90	0.69	15.71	44.42	2.76
20분	10.72	40.69	9.98	10.80	31.48	9.00	25.95	47.11	4.83
30분	32.16	47.70	16.68	18.72	45.80	4.16	28.69	68.65	16.56
40분	22.78	47.70	22.24	25.20	47.22	9.70	30.05	68.65	22.77
50분	24.12	15.01	29.88	33.84	48.65	9.70	28.69	69.99	28.98
60분	33.50	77.17	35.45	42.48	42.93	1.385	17.76	78.07	34.50

*Endo. respiration=16.5

관련이 있음을 밝혔다. 본실험의 경우, 당당류 (glucose, galactose, arabinose)보다는 이당류 (malose, sucrose)와 삼당류(raffinose)에서 latent period가 더 짧은 것은 Leibowitz와 Hest-rin(1945)이 효모세포에 있어서는 maltose의 경우 glucose보다 빠른 속도로 물질대사에 임한다는 의견과 일치하며, yeast 세포내에서는 이당류를 수송하는데 필요한 효소를 보다 용이하게 합성함에 기인된 것으로 보여진다. 본 연구에서는 탄소원으로 당을 주입시켰으나, Kiyoshi Harada, Ryoichi Higuchi 와 Isamu Utsumi (1967) 등은 효모의 호흡억제에 관한 연구에서는 sorbic acid의 농도를 높게 처리할수록, endogeneous 호흡은 물론 sorbic acid와 glucose, 혹은 pyruvate를 기질로 함께 처리한 구에서 현저히 감소함을 관찰하였다.

3. 효모의 인산함량과 유기물합성과의 관계

(1) 산가용성 인산화합물의 함량변화

각각의 배양시기(start, 2일, 6, 8일, 10일)에 따른 산가용성분획 즉, 산가용성 poly-P A, nucleotidic labile-P, ortho-P의 인산함량 및 total-P의 함량변화는 Fig. 2와 Fig. 3, Fig. 5에 나타내었다. Total-P는 배양기간동안 전반적으로 당을 처리한 모든 시험구에서 control(sugar free)에 비해 높은 함량을 보였으며, 여러가지 당중 특히 glucose는 배양초기에 높았는데 이는 다른 당류보다 sugar-P로의 빠른 전환에 기인된 것으로 보인다. 세포질내의 유리인산인 ortho-P의 경우, control이 당처리구보다 대체로 높은 함량을 보인것은 탄소원 즉, energy source가 없으므로 모든 인산화반응이나 유기물합성시에, ortho-P의 다른 인산화합물로의 전환이 거의 없

는 것으로 보이며, nucleotidic labile-P 분획이 배양기간중 계속적인 증가를 보이면서 log-phase 후반에 최대치를 보인 것은 유기물 특히 DNA, protein 등이 같은 시기에 최대 합성량을 보인 것과 일치하며, starvation 시킨후에는 세포내 ADP의 수준이 너무 낮으므로 2-phosphoenol pyruvate으로부터 ATP를 형성하는데 방해줄 정도이므로, ADP availability 뿐만아니라, p-phosphoenol pyruvate의 형성이 충분한 수준에 도달해야 ATP를 포함한 nucleotidic labile-P의 합성이 정상적으로 된다는 Hoffman-Ostenhof *et al*(1954)의 의견과 일치한다. poly-P A 분획구는 배양초 2일째 급격한 증가를 보이면서 그 이후 완만한 증가를 나타낸 것은 starvation시킨 후 phosphate-rich medium에 세포를 주입시킬 경우 급격히 poly-phosphate를 형성한다는 여러 보고와 일치하며, 특히 control(sugar free)이 계속 급격한 증가를 나타낸 것은 nutrient imbalance 상태에서 poly-P를 많이 형성한다는 여러 보고와도 일치함을 보인다. 특히 nutrient imbalance 혹은 anaerobic culture시에 2-phosphoenol pyruvate가 poly-P의 precursor로 작용된다는 Kornberg *et al*(1956)의 보고와 마찬가지로 nutrient deficient 시기인 stationary phase 때(8일째) poly-P-A가 높은 값을 나타낸 것은 2-phosphoenol pyruvate가 충분한 수준에 도달된 시기때 nucleotidic labile-P의 고에너지인산결합에 공급되는 2-phosphoenol pyruvate의 인산을 nucleotidic labile-P에 뿐만아니라 poly-P A에도 공급됨을 시사해주는 바 Kornberg의 보고와 일치함을 나타낸다.

Table 3-1-1. Amount of phosphate in each fraction of yeast cells during the culture phase

Fraction	day	control ($\mu\text{M/ml}$)	arabinose ($\mu\text{M/ml}$)	fructose ($\mu\text{M/ml}$)	galactose ($\mu\text{M/ml}$)	glucose ($\mu\text{M/ml}$)
Acid soluble -P	0	17.44	17.44	17.44	17.44	17.44
	2	10.31	12.41	10.83	10.50	18.35
	6	14.84	13.77	9.36	11.58	13.82
	8		10.68	10.29	7.23	25.27
	10	21.56	17.19	10.66	5.57	11.76
Ortho-P	0					
	2	0.241	0.758	0.478	0.840	0.120
	6	0.473	0.432	0.684	0.438	0.280
	8		0.378	0.318	0.467	0.139
	10	0.233	0.225	0.264	0.160	0.150
Nucleotidic labile-P	0	0.611	0.611	0.611	0.611	0.611
	2	0.428	0.455	0.586	0.420	1.056
	6	0.710	0.587	0.404	0.387	0.829
	8		0.530	0.345	0.262	1.390
	10	0.767	0.605	0.830	0.330	1.100
Sugar-P	0	13.779	13.779	13.779	13.779	13.779
	2	6.223	7.005	4.908	5.946	15.240
	6	7.897	6.588	3.065	7.185	8.328
	8		4.969	3.982	3.004	18.037
	10	13.840	13.000	5.606	2.082	6.125
Poly-P-A	0	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05
	2	3.42	4.20	4.86	3.30	3.96
	6	5.76	6.30	5.22	4.38	4.32
	8		4.80	5.64	3.50	5.70
	10	6.72	3.36	3.96	3.00	4.38
Lipid-P	0	3.927	3.927	3.927	3.927	3.927
	2	2.579	3.038	1.844	2.955	9.048
	6	2.437	2.794	2.778	1.851	2.600
	8		1.774	2.394	1.554	4.087
	10	3.327	1.588	1.197	1.419	3.745
Poly-P-B	0	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363
	2	0.363	2.265	2.590	0.853	1.008
	6	1.236	3.117	3.195	1.376	0.920
	8		2.184	1.800	1.195	0.973
	10	2.635	1.173	1.883	0.786	1.125
Poly-P-C	0	0.248	0.248	0.248	0.248	0.248
	2	0.333	2.238	1.747	1.213	0.456
	6	0.158	0.173	0.373	0.151	0.160
	8		0.162	0.186	0.112	0.334
	10	0.434	0.138	0.285	0.102	0.326

Table 3-1-2. Amount of phosphate in each fraction of yeast cells during the culture phase and UV absorbance at 260nm of RNA and DNA fraction.

Fraction	day	control ($\mu\text{M/ml}$)	arabinose ($\mu\text{M/ml}$)	fructose ($\mu\text{M/ml}$)	galactose ($\mu\text{M/ml}$)	glucose ($\mu\text{M/ml}$)
RNA-P	0	17.163	17.163	17.163	17.163	17.163
	2	48.840	8.926	21.807	13.881	29.056
	6	6.996	7.893	7.875	8.378	10.182
	8		5.680	5.405	6.300	15.580
	10	13.270	5.262	6.050	5.687	12.830

DNA-P	0	0.825	0.825	0.825	0.825	0.826
	2	0.675	1.258	1.489	1.204	1.320
	6	3.682	2.875	2.487	2.150	2.200
	8		1.060	0.998	0.718	3.655
	10	2.735	0.653	1.338	1.017	1.750
Protein-P	0	1.815	1.815	1.815	1.815	1.815
	2	1.295	9.808	7.493	3.032	1.920
	6	3.682	2.875	2.487	2.150	2.200
	8		1.843	1.624	2.613	8.618
	10	4.340	3.175	2.257	1.450	3.600
UV absorbance						
DNA	0	0.330	0.330	0.330	0.330	0.330
	2	0.074	0.450	0.700	0.840	0.672
	6	0.260	0.520	0.750	0.115	0.640
	8		0.550	0.530	0.640	0.830
	10	0.670	0.420	0.530	0.640	1.000
RNA	0	0.264	0.264	0.264	0.264	0.264
	2	0.222	0.401	0.374	0.437	0.624
	6	0.263	0.270	0.311	0.326	0.360
	8		0.277	0.297	0.336	0.389
	10	0.334	0.201	0.285	0.262	0.350

Table 3-2-1. Amount of phosphate in each fraction of yeast cells during the culture phase.

Fraction	day	rhamnose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	lactose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	maltose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	sucrose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	raffinose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)
Acid soluble-P	0	17.44	17.44	17.44	17.44	17.44
	2	66.22	18.02	19.73	18.14	18.38
	6	83.05	15.71	16.51	17.33	14.9 _△
	8	90.05	22.98	20.45	26.75	20.47
	10	78.91	10.87	9.69	10.88	8.06
Ortho-P	0					
	2	3.908	0.382	0.105	0.250	0.123
	6	4.208	0.406	0.347	0.347	0.406
	8	5.893	0.170	0.263	0.160	0.300
	10	4.583	0.135	0.101	0.218	0.179
Nucleotidic labile-P	0	0.611	0.611	0.611	0.611	0.611
	2	1.575	0.792	0.894	0.750	0.690
	6	2.176	0.891	0.718	0.486	1.516
	8	2.003	1.598	1.205	2.147	1.875
	10	2.125	1.183	0.578	0.983	0.607
Sugar-P	0	13.779	13.779	13.779	13.779	13.779
	2	57.197	11.809	13.751	12.700	13.107
	6	71.168	9.253	10.224	11.514	8.218
	8	75.657	14.490	13.768	13.387	13.074
	10	68.335	4.873	4.686	4.514	3.974
Poly-P-A	0	3.05	3.05	3.05	3.05	3.05
	2	3.54	5.04	4.98	4.44	4.46
	6	6.30	5.16	5.22	4.98	4.81
	8	4.50	6.72	5.21	6.06	5.22
	10	3.84	4.68	4.32	5.16	3.30

Lipid-P	0	3.927	3.927	3.927	3.927	3.927
	2	3.560	5.713	10.652	8.064	5.275
	6	2.223	2.586	2.980	3.857	2.946
	8	1.555	5.428	3.550	13.000	4.013
	10	0.778	6.890	3.380	3.243	2.760
Poly-P-B	0	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363
	2	1.043	0.573	0.947	0.975	1.849
	6	1.225	1.089	1.042	0.903	0.903
	8	0.967	1.190	1.076	1.506	1.000
	10	1.064	2.163	1.408	1.638	1.000
Poly-P-C	0	0.248	0.248	0.248	0.248	0.248
	2	0.276	0.519	0.658	0.575	0.641
	6	0.311	0.173	0.116	0.232	0.085
	8	0.258	0.272	0.287	0.321	0.150
	10	0.133	0.507	0.201	0.191	0.196

Table 3-2-2. Amount of phosphate in each fraction of yeast cells during the culture phase and UV absorbance at 260nm of RNA and DNA fraction.

Fraction	day	rhamnose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	lactose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	maltose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	sucrose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	raffinose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)
RNA-P	0	17.163	17.163	17.163	17.163	17.163
	2	7.400	36.200	21.215	52.884	23.393
	6	7.825	11.117	14.080	16.530	10.642
	8	6.636	11.780	13.000	14.890	14.060
	10	6.272	10.980	12.407		10.643
DNA-P	0	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825
	2	4.605	1.365	1.315	1.576	1.355
	6	1.617	3.715	5.835	3.350	2.880
	8	1.008	4.420	1.960	3.365	3.875
	10	1.088	2.030	1.510	1.640	1.695
Protein-P	0	1.815	1.815	1.815	1.815	1.815
	2	2.508	1.703	2.893	2.750	2.352
	6	3.108	3.460	3.542	3.241	4.227
	8	2.828	12.580	5.903	7.051	8.000
	10	2.077	6.692	3.270	3.550	3.641
UV absorbance						
DNA	0	0.330	0.330	0.330	0.330	0.330
	2	0.240	0.440	0.530	0.650	0.430
	6	0.250	0.590	1.390	1.810	0.850
	8	0.510	0.680	0.720	1.280	0.750
	10	0.490	0.680	1.010	0.820	0.860
RNA	0	0.264	0.264	0.264	0.264	0.264
	2	0.838	0.491	0.658	0.700	0.542
	6	0.311	0.371	0.602	0.370	0.470
	8	0.283	0.408	0.478	0.449	0.500
	10	0.226	0.338	0.128		0.411

(2) poly-P B, poly-P C의 함량변화

Fig. 3.에 나타난 바와같이 poly-P B도 poly-P A와 같이 역시 당치리구 초기에 control 보다 높았으나, 그 이후 배양기간중에는 control

이 현저히 높은 함량을 나타냈으며 2일째 이후 당치리구에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나, poly-P C는 배양초기를 제외하고는 그 이후 급격한 감소를 나타내었다. 특히할만한 일은 p-

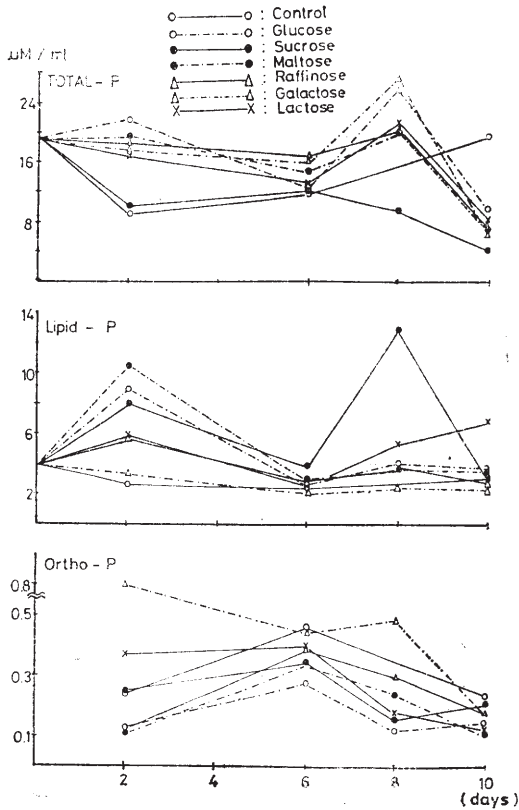
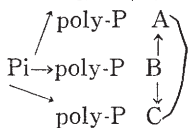


Fig. 2. Changes in amount of Total-P in the acid soluble fraction, lipid-P and ortho-P, treating with various kinds of sugar as carbon source during the culture phase.

oly-P각형 상호간의 turn over pattern에 있어 Fig. 8에서 나타난 함량변화로 볼 때, poly-P C는 poly-P B로, poly-P C와 poly-P B는 poly-P A로 전환되는 경향을 보여주고 있는 바 이는 다른 여러 생물과는 독특한 poly-P turn over pattern을 나타내고 있다. 예를들면 이 (1964)의 chlorella 연구에서 나타난



와 같은 pattern과는 좋은 대조를 이루고 있다. Winder와 Denny(1956), Belozersky와 Kulaev(1957), Kulaev와 Belozersky(1957), Zaitzeva(1960) 등 공동연구자들이 *Mycobacteria*, *Aspergillus*와 *Azotobacter*에서 RNA complex poly-P를 분리하였다. 분리된 RNA complex poly-P는 세포내 산불용성 poly-P에서 인간의 전환으로 형

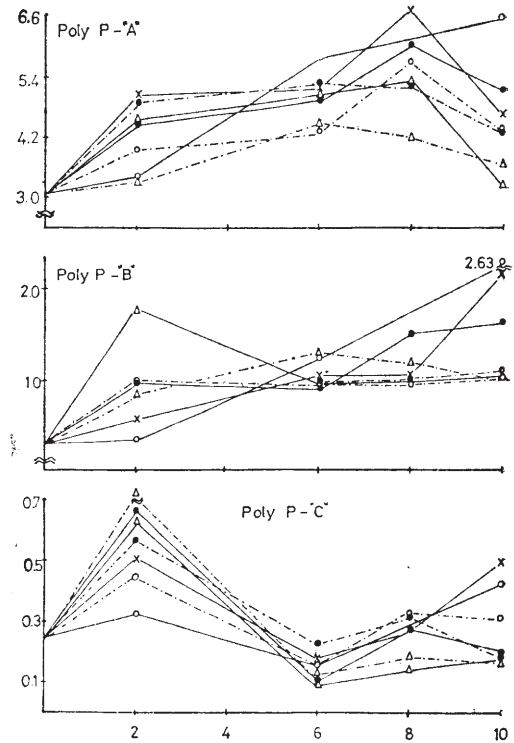


Fig. 3. Changes in amount of total-P in the acid soluble and insoluble polyphosphate fraction of yeast cells, treating with various kinds of sugar as carbon source during the culture phase.

성되며(이, 1967), 직접 또는 간접으로 DNA 및 단백질의 합성에 관여한다. *S. uvarum*의 경우 산불용성 poly-P C가 계속 감소하는 점으로 보아 poly-P C는 RNA complex poly-P의 존재여부에 관계없이 적어도 cytoplasm에서 phosphate pool 및 phosphate의 reserve material의 역할을 하는 것으로 생각된다.

(3) Protein 함량의 변화

Fig. 4에서 보는 바와같이 산가용성분획에서 용출되는 세포질내의 유리아미노산은 배양초인 2일째와 8일째, alkali labile protein은 2일째, 8일째, alkali stable protein은 6일째 가장 높은 함량을 나타내고 있다. alkali stable protein은 유리아미노산의 전환으로 형성되어짐을 볼 수 있으며, 단백질 합성시 가장 좋은 탄소원으로는 이당류인 maltose와 sucrose임을 나타낸다. 또 protein-P의 함량이 protein의 합성시기보다 늦은 것은 protein 합성후 phosphate의 ester bond를 형성하는 것으로 사료된다.

Table 4—1. Amount of ninhydrin reactive substance in each fraction of yeast cells during the culture phase.

Fraction	day	control ($\mu\text{M/ml}$)	arabinose ($\mu\text{M/ml}$)	fructose ($\mu\text{M/ml}$)	galactose ($\mu\text{M/ml}$)	glucose ($\mu\text{M/ml}$)
PCA	0	26.081	26.081	26.081	26.081	26.081
	2	5.844	5.918	6.378	8.542	37.314
	6	9.420	5.293	1.790	5.062	9.940
	8		2.281	3.583	8.192	21.692
	10	13.279	1.557	4.574	4.496	10.200
Alkali-labile	0	16.620	16.620	16.620	16.620	16.620
	2	2.900	33.976	24.435	30.886	1.634
	6	8.142	42.283	27.850	29.083	15.198
	8		23.840	30.065	41.310	29.027
	10	11.813	46.575	3.434	28.030	24.383
Alkali-stable	0	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969
	2	0.710	2.944	10.648	4.838	2.736
	6	2.050	36.225	36.387	18.790	56.640
	8		27.245	27.460	22.872	50.567
	10	9.605	55.118	31.502	34.484	15.445
Total protein	0	17.589	17.589	17.589	17.589	17.589
	2	3.610	36.920	35.083	35.724	4.370
	6	10.192	78.508	64.237	47.873	71.838
	8		51.085	57.525	64.182	79.594
	10	21.418	101.693	34.936	62.514	39.228

Table 4—2. Amount of ninhydrin reactive substance in each fraction of yeast cells during the culture phase.

Fraction	day	rhamnose ($\mu\text{M/ml}$)	lactose ($\mu\text{M/ml}$)	maltose ($\mu\text{M/ml}$)	sucrose ($\mu\text{M/ml}$)	raffinose ($\mu\text{M/ml}$)
PCA	0	26.081	26.081	26.081	26.081	26.081
	2	7.215	18.182	25.270	13.585	25.130
	6	2.618	9.730	16.043	4.963	3.587
	8	3.727	12.116	14.920	13.276	15.836
	10	5.393	7.193	9.094	8.744	9.139
Alkali-labile	0	16.620	16.620	16.620	16.620	16.620
	2	29.063	22.146	9.258	62.100	25.012
	6	17.628	21.980	13.800	9.327	3.766
	8	29.267	29.337	27.610	39.772	27.638
	10	2.460	20.449	26.424		7.473
Alkali-stable	0	0.969	0.969	0.969	0.969	0.969
	2	1.212	20.726	3.156	41.850	
	6	31.535	56.727	166.047	71.395	2.466
	8	16.654	56.790	17.925	36.730	9.750
	10	15.834	21.100	15.694	16.215	9.510
Total protein	0	17.589	17.589	17.589	17.589	17.589
	2	30.275	42.872	12.414	103.950	25.012
	6	49.163	78.707	179.847	80.722	6.232
	8	45.921	86.127	45.535	76.502	37.388
	10	18.294	41.549	42.118	16.216	16.983

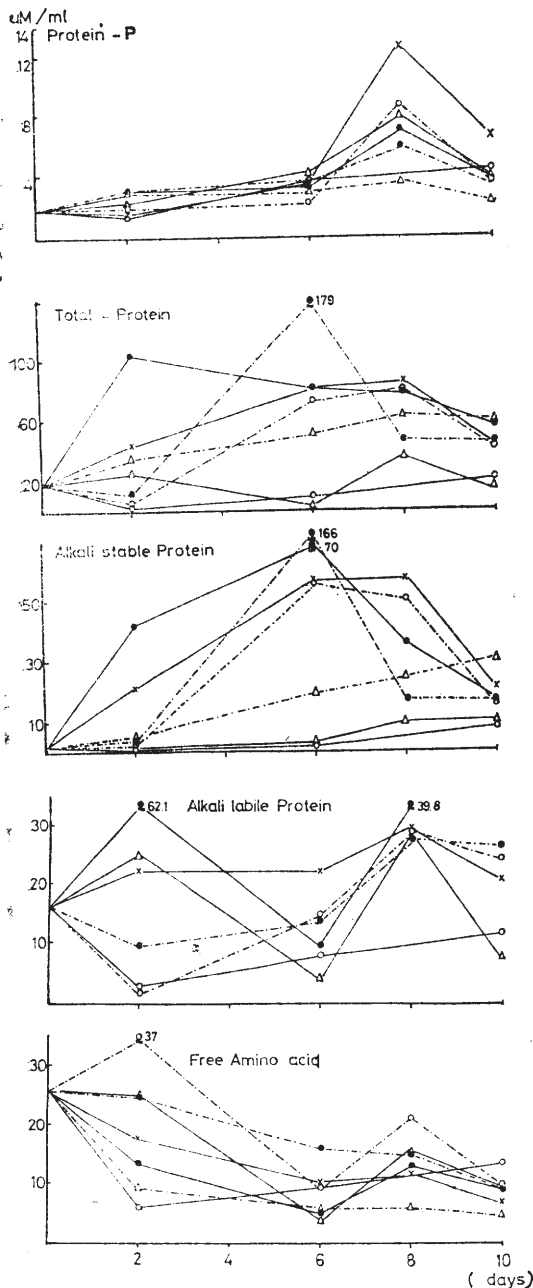


Fig. 4. Changes in amount of ninhydrin reactive substance in each fraction and total-P in phosphoprotein of yeast cells during the culture phase, treating with various kinds of sugar as carbon sources.

(4) 핵산의 함량변화

Fig. 5와 6에서 표시한 바와같이 RNA-P가 배양 초기인 2일째 가장 높은 함량을 나타낸 것은 RNA-P는 세포질내의 무기인산을 그대로 도입하

는 바 ortho-P의 함량이 2일째 낮음은 이와 유관함을 나타내고 있으며 RNA의 함량변화는 배양 초기와 중기가 start에 비해 높은 증가를 나타냈으나 stationary state(10일)때는 감소함을 나타냈다. 특히 핵산과 poly-P는 길항적인 관계가 있음을 Harold (1966)가 밝혔는데, 핵산의 합성은 poly-P의 합성을 억제하고, poly-p의 degradation을 자극한다 하였는데, 본 실험의 경우에서도 핵산이 합성되기 시작한 2일째까지만 poly-P C 등이 급격한 증가를 보이다가 그 이후 시기 즉 핵산이 합성됨에 따라 더 이상의 급격한 증가를 보이지 않고, 오히려 poly-P C의 경우 감소되는 현상을 볼수 있었던 바, Harold의 의견과 일치함을 보인다. DNA의 경우 log phase때 가장 높은 함량을 나타냈으며, poly-P 감소시기(특히 poly-P C)인 6일째에, DNA-P가 같은 시기에 높은 함량을 보인 것은 RNA-P가 세포질내의 무기인산을 직접 도입한 반면, DNA-P는 poly-P로부터 인산이 도입되는 것을 잘 나타내주고 있다.

(5) Lipid-P의 함량변화

Fig. 1에서 나타난 바와같이 배양기간중 control에 비해 계속 높은 함량을 보였으며 특히 maltose 처리구에서 배양초에 높은 증가를 보였으며, sucrose는 배양 8일째에 높은 함량을 보였다. 특히 이(1967)는 lipid-P는 phosphate pool에서 합성된다 하였는데, 본 연구에서는 lipid-P의 합성시 필요한 phosphate는 특히 poly-P에서 전환된 것으로 짐작된다.

(6) 탄수화물의 함량변화

Fig. 7.에 나타난 바와같이 sugar-P의 경우 유기물합성 특히 단백질, 핵산의 합성이 가장 높은 시기인 6일째 가장 낮은 값을 보인 것은 p-phospho-sugar가 유기물합성에 이미 도입되었음을 나타내준다. glucose equivalent 분획구는 전 배양기간에 걸쳐 당을 처리하지 않은 control에 비해 높은 함량을 보인 것은 당연한 것으로 보이며, 지용성 분획구의 경우 6일째(log phase) 때 가장 높은 함량을 보였으며, alkali insoluble 분획구 즉, polysaccharide의 경우는 전 배양기간중 함량변화가 거의 없는 것은 대체로 세포내 구조적인 구성물질인 까닭으로 생각된다.

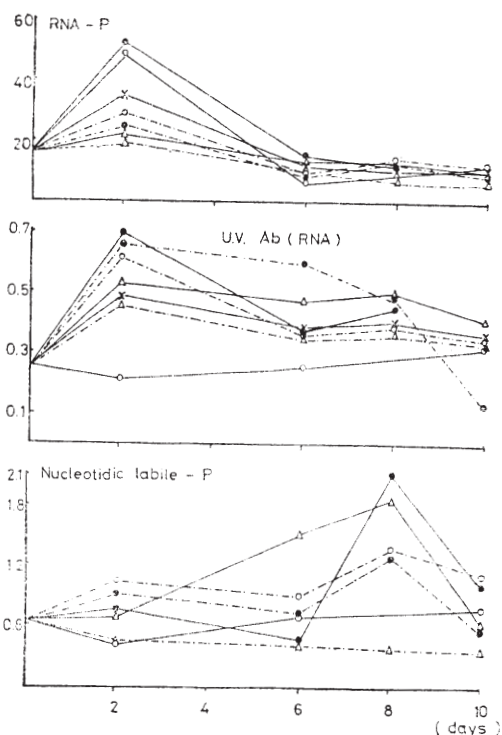


Fig. 5. Changes in amount of total-P and UV absorbing material in RNA fraction and amount of nucleotidic libile-P of yeast cells treating with various kinds of sugar as carbon source.

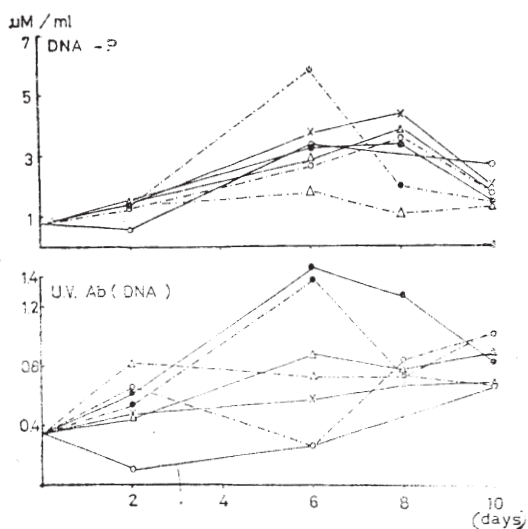


Fig. 6. Changes in amount of total-P and UV absorbing material in DNA fraction treating with various kinds of sugar as carbon source.

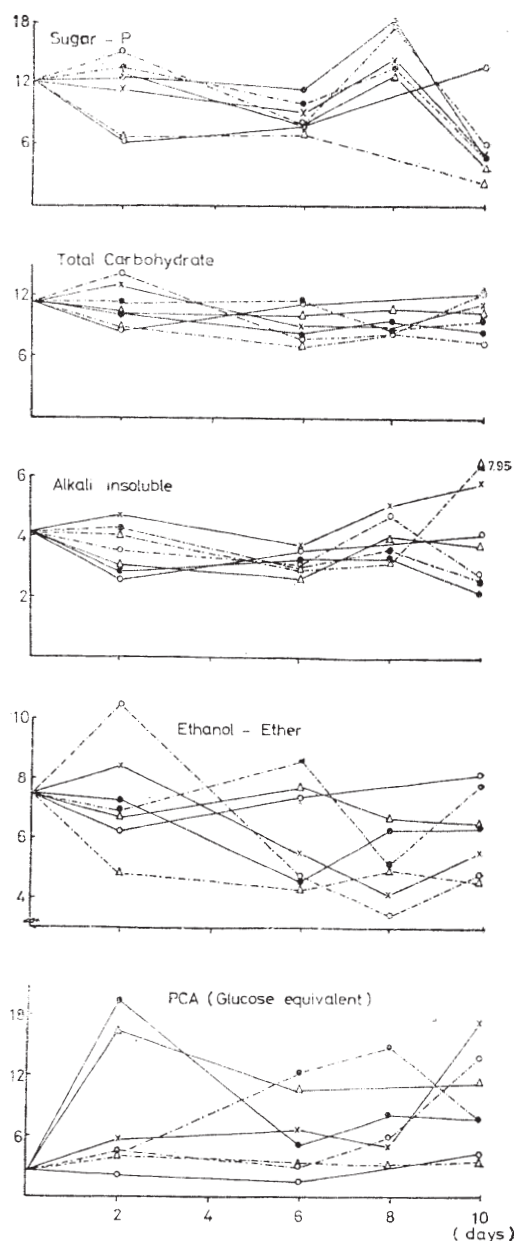


Fig. 7. Changes in amount of carbohydrate in each fraction and sugar-P of yeast cells, treating with various kinds of sugar as carbon source.

Table 5—1. Amount of carbohydrate in each fraction of yeast cells during the culture phase.

Fraction	day	control ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	arabinose ($6\mu\text{M}/\text{ml}$)	fructose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	galactose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	glucose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)
PCA	0	2.800	2.800	2.800	2.800	2.800
	2		3.945	6.055	4.271	4.852
	6	1.923	3.498	5.868	4.133	3.390
	8		4.148	5.773	3.486	6.167
	10	4.374	2.387	5.007	3.000	4.374
Ethanol-ether	0	7.450	7.450	7.450	7.450	7.450
	2	6.164	5.605	4.458	4.728	10.566
	6	7.370	2.939	3.388	4.033	4.821
	8		2.940	2.297	5.194	3.581
	10	8.217	2.618	2.959	4.381	4.494
Alkali-insoluble	0	4.125	4.125	4.125	4.125	4.125
	2	2.609	2.943	1.709	4.131	3.576
	6	3.656	2.674	3.046	3.032	3.058
	8		2.581	5.919	2.211	4.809
	10	4.202	2.974	6.222	7.946	2.900
Total carbohy- -drate	0	11.575	11.575	11.575	11.575	11.575
	2	8.773	8.548	6.167	8.859	14.142
	6	11.026	5.613	6.434	7.065	7.879
	8		5.521	8.216	8.405	8.390
	10	12.419	5.655	9.181	12.327	7.394

Table 5—2. Amount of carbohydrate in each fraction of yeast cells during the culture phase.

Fraction	day	rhamnose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	lactose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	maltose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	sucrose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	raffinose ($\mu\text{M}/\text{ml}$)
PCA	0	2.800	2.800	2.800	2.800	2.800
	2	8.788	6.102	4.627	19.841	16.969
	6	8.486	7.143	12.656	5.482	11.049
	8	7.725	5.442	15.396	8.644	
	10	6.943	17.827	8.048	7.800	11.795
Ethanol-ether	0	7.450	7.450	7.450	7.450	7.450
	2	5.478	8.550	6.959	7.211	6.941
	6	6.109	5.626	8.740	4.630	7.754
	8	7.654	4.156	5.118	6.356	6.848
	10	6.195	5.603	7.812	6.486	6.430
Alkali-insoluble	0	4.125	4.125	4.125	4.125	4.251
	2	3.537	4.750	4.366	2.850	3.131
	6	3.730	3.366	2.986	3.357	2.541
	8	2.803	5.1d4	3.681	3.270	4.000
	10	2.473	5.915	2.741	2.211	3.802
Total carbohydrate	0	11.575	11.575	11.575	11.575	11.515
	2	9.015	13.300	11.325	10.061	10.072
	6	9.839	8.992	11.726	7.987	10.295
	8	10.457	9.290	8.799	9.626	10.848
	10	8.668	11.518	10.553	8.697	10.252

IV. 摘 要

*Saccharomyces uvarum*을 Knopp씨 최소배지에 13종의 당류를 1.5% 첨가하고 배양한 결과 maltose와 sucrose의 2당류에서 최대의 생장을 보이고 lactose에서도 생장효과를 볼 수 있었다. 삼당류인 raffinose도 생장효과는 좋았으나 inulin같은 다당류는 생장효과가 나타나지 않았다. 효모의 개체군 생장은 접종후 100시간을 전후하여 log phase에 이르고 250시간을 전후하여 stationary state 시기에 도달하였다. 각종 당류를 호흡기질로 (1.5%) 주었을때 호흡율은 maltose, raffinose, lactose, glucose, sucrose의 순으로 높았다. 효모의 개체군 생장과 호흡율에 유리한 당류 9종을 탄소원으로 하여 배양하면서 배양시기에 따른 poly-phosphate의 함량과 그 전환과정을 측정된 결과 효모세포에는 poly-P A,B,C 3형이 모두 존재하며 poly-P의 전환경로는 inorganic phosphate가 각형의 poly-P로 전환되고, poly-P C는 poly-P B로, poly-P C와 poly-P B는 poly-P A로 전환되며, poly-P는 DNA-P, protein-bound-P 및 phospholipid로 인산을 공급하는 것으로 추정되었다.

poly-P의 함량과 각종 체구성물질(유기물)의 합성과의 관계에서 가장 유리한 탄소원으로는 2당류(maltose, sucrose)이며, glucose와 lactose도 유용한 탄소원으로 판명되었다. 단백질의 합성은 접종배양후 6일과 8일, 핵산은 2일(48시간) 인지질은 배양초기(48시간)와 후기(192시간)에, 그리고 탄수화물은 배양초기(48시간)에 합성량이 최대에 달하였다.

V. 引用文獻

1. Barnett and Pankhurst. 1974. A new key to the yeast North-Holland Pub. Co.
2. Belozersky A.N. and I.S. Kuayev. 1957. Polyphosphate and their significance in the development of *Aspergillus niger*. *Biochem.* **22**:27-36.
3. Berenblum, I. and E. Chain. 1938. An improvement method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.* **32**:295-298
4. Campbell, J.J.R. and Stokes, F.N. 1951. *J. Biol. Chem.* **190**:858
5. Correll, D.L. 1965. Ribonucleic acid-poly phosphate from algae. III Hydrolysis studies. *Ibid* **6**:661-669
6. Crane, P.K. and F. Lipmann. 1953. The effect of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **201**:235-243
7. Fiske, C.H. and Y. Subbarow (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* **66**:375
8. Gezelius, K. 1974. Inorganic polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Microbiol.* **97**:311-329
9. G.V. Sokolov, S.S. Eremina, and A.B. Lozinov. 1976. Effect of endogenous respiration of *Candida mycoderma* in its oxidation of glucose ethanol, and Krebs cycle acids and functioning of cytochrome system. *Mikrobiologiya.* **46**:907-976
10. Harold, F.M. 1963. Inorganic polyphosphate of high molecular weight from *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.* **86**:855-887
11. ——— 1966. Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30**:772-794
12. Ilan Fried berg and Gad Avigad. 1968. Structure containing polyphosphate in *Micrococcus lysodeikcitus*. *J. Bacteriol.* **87**:544-533
13. Katchmann *et al.* 1955. Phosphorous metabolism in growing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **69**:697-615
14. Kornberg, H.Z. 1973. *Proc. Ro. Soc. B.* **183**:105
15. Kornberg, S.R. 1957. *Biochim. Biophys. Acta.* **26**:294-300
16. Kim, H.H. 1980. A study on methanol assimilating yeast. M.S. thesis.
17. Lee, K.S. and Y.K. Choi (1981), HYU Faculty Paper
18. Lee, Y.N. 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella*, with special reference to polyphosphate. *Kor. Jour. Microbiol.* **4** (1):1-11

19. Lee, Y.N. and P. Chin. 1966. Turnover of p. 32 and total-p in p 32 labelled *Chlorella* cell in a standard cold medium. *Kor. Jour. Microbiol.* 4:14-20.
20. Lee, C.S. and Y.N. Lee 1976. A study on phosphate metabolism of chloroplast isolated from spinach. *Kor. Jour, Botany.* 19:71-84
21. Lee, C.S. 1978. On the presence of inorganic polyphosphate in *Rhodophyta* and *Phaeophyta* cells. Sungshin Univ. Faculty paper. 11:87-94
22. Lewis, I.M. 1941. The cytology of bacteria. *Bacteriol. Revs.* 5:181-230
23. Matsuda, R. 1974. *Biochem. Biophys. Acta.* 36:45-55
24. Minck, R and A. Minck. 1949. Sur la constitution du bacille diphthérique: appareil nucléaire et granulations mélanochromatiques. *Compt. Rend* 228:1313-1315
25. Miyachi, S. 1961. Inorganic polyphosphate in spinach leaves. *J. Biochem.* 50:364-371
26. _____ and H. Tamiya. 1961a. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *Plant and cell physiol.* 2:415-424
27. _____ and _____. 1961b. Some observation on the phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 46:200-202
28. Mudd *et al.* 1958. Polyphosphate as accumulation of phosphorus and Energy. *J. Bacteriol.* 75:224-235
29. Nagel, L. 1948. Volutine. *Bot. Rev.* 14:174-184
30. Schmidt, G and S.J. Tannhauser. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* 161:83-89
31. Smith, I.W *et al.* 1954. Volutine production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *J. Bacteriol.* 68:450-463
32. Stone, R.W. and Wilson, P.W. 1952. *J. Bacteriol.* 63:605
33. Trevelyan *et al.* 1956. Studies on yeast metabolism. *Biochem. J.* 63:23-33
34. Troll, W and P.K. Cannon. 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acids. *J. Biol. Chem.* 200: 803-811
35. Wiame, J.M. 1947a. Yeast metaphosphate. *Federation Proc.* 6:302
36. _____ 1947b. The metachromatic of hexametaphosphate *J. Am. Chem. Soc.* 69:3146-3147
37. _____ 1949. The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in Yeast. *J. Biol. Chem.* 178:919-929
38. Widra, A. 1959. Metachromatic granules of microorganisms *J. Bacteriol.* 78:664-670
39. Winkler, A. 1953. The metachromatic granule of bacteria. Symposium on bacterial cytology. Suppl. to Rend. Ist. super. sanità 39-44