

## Optimization of cell growth and TAPS production by *Pichia ciferrii* mutant in batch culture

오대일, 홍성갑, 유연우\*

아주대학교 분자과학기술학과, 발효 및 대사공학 실험실  
전화 (031) 219-2449, FAX (031) 216-8777

### Abstract

Batch culture of mutant derived from *Pichia ciferrii* ATCC 14091 was investigated for producing the intracellular tetraacetylphytosphingosine (TAPS). Composite experimental design was used to optimize the composition of the culture medium for maximizing the productivity of TAPS. In this experiment, various culture parameters were investigated that were the effects of temperature, the initial culture pH, the carbon-to-nitrogen ratio, the concentration of trace elements, and the concentration of cofactors. The optimal temperature for cell growth and TAPS synthesis appeared to be 25°C. An initial pH value of 7.5 gave the best results. Under the best condition, the maximum TAPS concentration indicated 7.2 g/L and its productivity was 0.06 g/L-hr in a 2.5 L jar

### 서 론

Ceramide는 SC 구조의 lipid lamellar의 주요 구성성분으로 lipid의 40~50%를 차지하는 가장 중요한 피부지질로서 알려지면서 근래에는 피부의 보습과 손상된 피부 보호 층의 복원 기능을 가진 기능성 화장품 원료로서 널리 이용되고 있다. 그 밖에 구성성분으로는 free fatty acids, cholesterol 등이 있다. Ceramide는 sphingolipid의 기본 구조를 이루고 있으며, 이 ceramide는 sphingoid base 기본 골격에 지방산의 acyl chain이 amide linkage를 통해 연결된 형태로서 sphingoid base의 종류와 결합되는 지방산의 길이, hydroxylation, saturation 정도 등에 따라서 heterogeneity가 결정되어 진다. Sphingolipid는 모든 생물의 membrane의 막 구조를 형성하는 성분으로서 중요한 역할을 할 뿐 아니라 free form으로 존재하는 sphingosine, phytosphingosine을 비롯한 sphingoid base 유도체들은 epidermis의 최상층인 stratum corneum에 분포하면서 미생물에 대한 항균작용을 하는 것으로 알려졌다. 한편, 최

근에는 신호전이체계의 중간 신호전달물질로서 다양한 생물학적 기능이 밝혀지고 있으면서 sphingolipid의 응용 범위는 피부재생, 항염증치료 나아가 항암제 개발로 까지 모색되기에 이르렀다. Ceramide는 효모와 곰팡이에서 생산이 가능하나, 이중 효모인 *P. ciferrii*는 phytosphingosine의 아세틸화된 유도체인 TAPS를 합성하여 세포 외로 분비하는 특성을 가지고 있다. 또한 발효를 통해 얻어진 TAPS는 아세틸기를 제거하는 과정을 통하여 phytosphingosine으로 쉽게 전환되며, 이때 얻어지는 phytosphingosine의 입체화학적 구조가 사람의 피부에 존재하는 sphingosine와 동일한 D-erythro (2S, 3R) 구조를 갖고 있어 사람의 피부와 친화성이 있는 ceramide를 합성하는데 필요한 전구체로 사용될 수 있다. 본 연구에서는 *P. ciferrii* mutant를 이용한 TAPS 발효조건 최적화하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 균주는 TAPS를 생산하기 위하여 *Pichia(Hansenula) ciferrii* ATCC 14091을 두산 바이오텍 BU로부터 분양 받아 사용하였다.

배지는 100 g/L glycerol, 2 g/L yeast extract, 1.5 g/L CSP, 3 g/L KNO<sub>3</sub>, 1.5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L sodium citrate를 기본 발효배지로 하여 사용하였다. Flask를 이용한 회분식 배양은 발효배지 50 mL를 250 baffled flask에 넣고 진탕배양기에서 25°C, 180 rpm으로 교반하여 4~6일간 배양하였다.

균체량 측정은 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, TAPS의 정량 분석은 발효가 끝난 TAPS 배양액을 chloroform과 methanol을 2 : 1 비율로 혼합한 용매를 배양액 부피의 4배가 되도록 가하여 1분간 혼합한 뒤 4000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 층 분리가 이루어지도록 하였다. 분리된 아래층을 회수하여 0.2 µm filter로 여과한 TAPS 추출액을 ELSD detector (Alltech ELSD 2000, USA)를 이용하여 분석하였다. 시료전개는 Hexane과 Acetone을 1:1로 혼합한 용매를 전개용매로 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 분석에 사용한 column은 YMC-pack SIL (YMC, Japan)을 사용하였으며 detector tube 온도는 57°C, gas flow (N<sub>2</sub>)는 1.7 L/min으로 설정하였다.

### 결과 및 고찰

배지의 초기 pH가 TAPS 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 6.0~9.0까지 변화시키면서 flask 배양을 수행하였다. Table 1과 같이 효모의 증식을 위한 최

적 pH는 7.0이었다. TAPS 생산을 위한 적정 pH는 7.0~8.0이며 최적 pH는 7.5이었다. 이러한 pH 범위는 Lodder 등(2)이 *P. ciferrii*가 YMGL 배지에서 초기 pH 3.0~9.0에서 성장하며, 박 등(1)이 배지의 초기 pH 7.5~8.5에서 TAPS 농도가 높다고 보고한 것과 동일한 결과이었다.

박 등(1)은 통기와 교반이 TAPS 생산을 위한 중요한 조건임을 보고하였다. 즉 일반적인 포화지방산의 유도체인 TAPS 생산을 위해서는 충분한 산소공급이 있어야 한다고 보고하였다. 그 이유는 지질합성을 위해서는 많은 에너지를 필요로 하며, 이 에너지를 공급하기 위해서 충분한 통기에 의한 TCA cycle 활성이 필요하기 때문이다. 또한 산소공급이 부족하면 불포화 지방산의 함량이 늘어나며, 균체 성장에 해를 준다. 이러한 특성에 맞추어 발효조에서 통기와 교반 속도 조건을 최적화하기 위하여 우선 통기조건을 0.5 vvm로 고정하였다. Antifoam으로 silicone oil을 사용하여 foam을 제어했음에도 불구하고 통기조건에 관계없이 800 rpm 미만의 교반 속도에서는 배양을 시작한 후 10~24 시간 동안 계속적으로 발생하는 foam으로 인해 실험을 진행할 수 없었다. 따라서 foam을 제어할 수 있는 교반 속도인 800~1200 rpm의 범위에서 최적의 교반조건에 대한 실험을 수행하였다. 균체량은 800~1000 rpm에서 차이가 없었으나 교반 속도 1000 rpm에서 보다 높은 TAPS 농도를 나타내었으므로 물리적 stress가 TAPS 생산을 유도함을 알 수 있었다.

TAPS 생산을 위한 최적 배양온도를 검토하기 위하여 2.5 L 발효조 (KFC)에서 20, 25, 30°C에서 0.5 vvm의 통기 조건과 1000 rpm의 교반 조건에서 실험을 수행하였다. 실험결과 Table 2에서 보는 바와 같이 배양온도 20°C에서는 균체의 증식이 미약함과 동시에 TAPS의 생산도 낮아졌으며, 25°C에서 균체의 증식과 TAPS의 생산이 최대로 나타났다. Hunter 등 (3)은 *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 균주의 경우 최적 증식 온도 이하에서 배양하였을 경우에 더 많은 lipid 함량을 나타내었다고 보고하였다. 반면에 John 등 (4)은 *Rhodotorula gracilis*의 경우 22°C에서 배양하였을 경우가 28°C에서 배양하여 얻은 lipid 함량보다 낮았다고 보고하였다. 따라서 최적 증식 온도와 lipid 생성 온도가 항상 일치하지 않고 균주마다 다르다는 것을 알 수 있다. *P. ciferrii*를 이용한 TAPS 생산에서 박 등(1)은 25°C, Casey 등(5)은 30°C가 최적 TAPS 생산을 위한 온도라고 보고하였다.

TAPS 생산을 위한 최적 C/N ratio를 알아보기 위하여 2.5 L 발효조 (KFC)에서 TAPS 생산배지 성분 중 glycerol의 농도를 80~120 g/L (w/v)의 범위에서 변화시

키면서 관찰한 결과 Table 3과 같이 탄소원인 glycerol 농도가 높아질수록 초과분의 탄소원이 lipid를 형성함으로 균체와 TAPS의 농도가 증가하였다. Glycerol 100 g/L을 첨가한 C/N ratio가 38.4인 경우가 TAPS 농도와 수율면에서 가장 유리하였다. Glycerol 100g/L 이상의 경우 균체는 증가하였지만 TAPS 농도는 증가하지 않았으며, 상대적으로 질소원의 부족으로 인하여 전체 배양기간이 길어졌다.

배양조건에 대한 연구를 종합하면 *P. ciferri* UV-p63-NTG4를 TAPS 생산에서 초기 pH가 7.5인 TAPS 생산 배지 1.0 L을 2.5 L jar 발효조에 넣고 25°C에서 1000 rpm의 교반과 0.5 vvm의 통기조건에서 배양한 결과 최대 TAPS 농도는 7.2 g/L이고, TAPS 수율과 생산성은 각각 7.2%와 0.06 g/L-hr이었다. 또한 Fig 1에서 보듯이 TAPS는 세포의 농도 증가에 따라 증가하는 growth-associated form이었다.

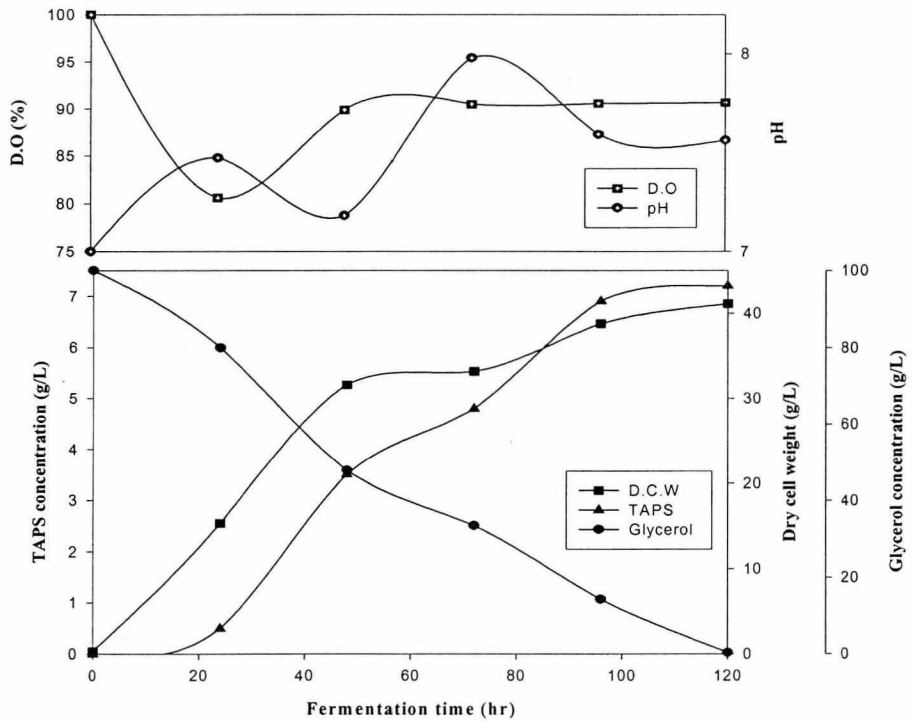


Fig 1. Profiles of C/N (38.4) ratio on the TAPS production with *Pichia ciferrii* UV-P63-NTG4 at glycerol 100 g/L, pH 7.5 and 25°C.

Table 1. Effect of pH on the cell growth and TAPS production with *P. ciferrii* UV-P63-NTG4.

Initial pH	Final pH	Cell mass (g/L)	TAPS (g/L)
6.0	8.1	28.6	2.6
7.0	7.2	31.7	3.2
7.5	7.8	30.7	3.4
8.0	8.0	29.0	3.1
8.5	7.9	26.5	1.4
9.0	7.2	14.7	0.5

Table 2. Effect of fermentation temperature on the cell mass and TAPS production with *P. ciferrii* UV-P63-NTG4 in 2.5 L fermentor.

Temperature (°C)	Culture time (hr)	Cell mass (g/L)	Final pH	TAPS (g/L)	$Y_{T/G}$ (g/g)	$P_T$ (g/L·hr)
20	120	30.0	7.5	4.4	0.056	0.034
25	120	41.1	7.6	7.2	0.072	0.060
30	96	38.9	7.4	6.7	0.067	0.070

Table 3. Effect of C/N ratio on the cell mass and TAPS production with *P. ciferrii* UV-P63-NTG4 in 2.5 L jar fermentor.

Glycerol (g/L, w/v)	80	100	120
C/N ratio	30.7	38.4	46.1
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	0.21	0.28	0.24
Cell mass (g/L)	33.3	41.1	46.4
Final pH	7.6	7.56	5.90
TAPS (g/L)	5.0	7.2	7.2
$Y_{T/G}$ (g/g) <sup>2</sup>	0.066	0.072	0.066
$P_T$ (g/hr) <sup>3</sup>	0.052	0.060	0.060

### 참고문헌

1. 박장서, "세라마이드의 산업적 생산기술 개발에 관한 연구", 산업자원부에서 시행한 공업기반기술개발사업의 기술개발보고서, 44-55, 1998
2. Lodder, J., "The yeast", North-holland Publishing Co. Amsterdam, 2nd ed., 1-33, 1971
3. Hunter, K. and A. H. Rose., "In the Yeast", Academic press, New York, 1971
4. D. Weete, "Lipid biochemistry of fungi and other organisms", Plenumpress, NewYork, 39-40, 1942
5. Casey, John, Maume, Katherine A., Peters, Alfons L. J., Veloo, Rudolf M., "Preparation of phytosphingosine derivative", United States Patent 5618706, 1997