

Saccharomyces sake KBA No. 6에 의한 Ergosterol의 생산

박 장 우 · 이 왕 식 · 방 원 기

고려대학교 농과대학 농화학과

초록 : Ergosterol을 생산하기 위하여 *Saccharomyces sake* KBA No. 6가 사용되었으며 ergosterol축적에 관여하는 각종 요인들이 검토되었다. 가장 효율적인 무기 질소원은 ammonium chloride이었으며, C/N 비율이 200/1이었을 경우 3.5%의 ergosterol이 세포 내에 축적되었다. Tween 80 0.2%와 potassium nitrite 0.1%를 동시에 사용하였을 경우, ergosterol 함량(%)과 총 ergosterol량(mg/L)은 각각 56%와 45% 증가하였다. 최적조건에서 ergosterol 함량은 1.73%에서 5.3%로 증가하였으며, 총 ergosterol량은 65.2 mg/L에서 135.15 mg/L로 증가하였다(1989년 11월 17일 접수, 1990년 2월 22일 수리).

Ergosterol은 vitamine D의 전구체로서 식물 및 효모에 존재하며^{1, 2)}, cortical hormone, sex hormone 및 vitamine D의 제조 원료로서 수요의 증대가 예상되고 있다^{3, 4)}. 이들 ergosterol은 효모 내에서 핵, 액포, 미토콘드리아, 소포체, 세포막 등 생체막을 구성하는 주요한 sterol로서 총 sterol의 80% 이상을 차지하기도 한다. 특히, *Saccharomyces* 속 및 *Candida* 속에서 건조 균체당 2% 이상의 ergosterol을 지닌 균주들이 발견되며, 이들은 생체막의 구조유지 및 물질 수송과 관계가 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 한편, 효모의 ergosterol축적에 관한 연구는 상당히 이루어져 있으며, 일반적으로 C/N 비율의 조절, 산소 공급의 조절, 산화제의 첨가, polyene 항생제의 첨가, 수확된 효모의 건조, 일정온도에서 성장시킨 효모를 보다 낮은 온도에서 배양함에 의하여 축적이 증가되며, 생육 단계에 있어서는 대수 증식기에 ergosterol의 축적이 증가된다고 알려져 있다. 반면에, 배양중의 온도 및 초기 pH는 전체 효모 증량에 대한 ergosterol함량 비율에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁹⁾.

본 실험에서는 ergosterol을 생산하기 위하여 ergosterol 생성 균주를 선별하고, 본 균주에 의한 ergosterol의 효과적인 생산을 위하여 배양학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 본 실험실이 보관중인 fungi 중에서 ergosterol함량이 1.6%로 가장 높았던 *Saccharomyces sake* No. 6이었다.

배 지

전배양 배지로는 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% bacto peptone, 1.0% glucose를 함유하는 YM배지를 사용하였으며, 본배양 배지로는 3.0% glucose, 0.023% NH₄Cl, 0.3% K₂HPO₄, 0.4% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% yeast extract를 함유한 배지를 사용하였다. 또한, 균주의 보관에는 전배양 배지에 1.7% 한천이 포함된 평판 및 사면 배지를 사용하였다.

균주의 선별

YM 사면배지에 보관중인 균주를 YM 한천 평판배지에 접종한 후, 30°C에서 48시간 배양하였다. 순수분리된 균주를 YM배지가 10 ml 함유되어 있는 50 ml용 삼각 플라스크에 한 백금니 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양(120 strokes/min)하여 ergosterol함량을 분석한 후 선별하였다.

선별된 균주의 배양

Ergosterol생산을 위한 전배양은 YM한천 평판배지에 한 백금니 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 균주를 한 백금니 취하여 10ml의 전배양배지를 함유하는 50 ml삼각 플라스크에 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였고, 본배양은 본배양배지 100 ml을 지닌 500 ml용 삼각플라스크에 전배양액을 2 ml접종한 후 30°C에서 24시간 진탕배양하였다.

건조 균체량 측정

건조 균체량을 측정하기 위하여 100 ml의 YM배지를 함유하는 500 ml삼각 플라스크에 전배양액을 2 ml접종하였다. 비색계를 사용하여 600 nm에서 혼탁도를 측정하면서 균체가 일정혼탁도에 이르면, 배양액을 4°C에서 원심

분리하여 상등액을 제거하고, 무게를 알고 있는 항량병에 수확된 생균체를 담아 105°C 항온기에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시킨후, 건조 균체량을 측정하였다.

Glucose의 정량

Miller 등¹⁰⁾의 방법을 사용하였다.

Ergosterol의 정성 및 정량

Ergosterol의 정성분석은 thin layer chromatography 법¹¹⁾에 의하여 수행하였다. 정량분석은 Breivik과 Ovades의 방법¹²⁾을 변형하여 사용하였다. 즉, 15 ml cap tube에 배양액 5 ml을 넣어 2,800 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 0.85 % 생리식염수로 2회 세척하였다. 세척한 후, 50 % KOH 1 ml과 ethyl alcohol 1.5 ml을 가하고 뚜껑을 막았다. 물 증탕에서 85~90°C를 유지시키면서 3시간동안 비누화 반응을 시켰다. 비누화과정 중에는 cap tube의 상층부에 선풍기를 틀어 줌으로써 기화된 ethyl alcohol이 다시 환류 냉각되도록 하였다. 비누화 반응이 끝난 후, 증류수 1 ml과 heptane 2.5 ml을 가한 후, 1분간 교반하였다. 층이 분리된 후, heptane층으로 유리된 ergosterol을 ethyl alcohol로 회석하였다. 비색

계를 사용하여 281 nm 및 230 nm에서 흡광도를 측정하고 두 값의 차이로써 ergosterol함량을 결정하였다.

결과 및 고찰

Ergosterol함량이 높은 fungi의 선별

생육 속도가 빠르면서 ergosterol함량이 높은 fungi를 선별하기 위하여 실험 방법에 기술한 바와 같이 20종의 fungi를 30°C에서 24시간 배양한 후, 생육 속도와 ergosterol함량을 비교 검토한 결과 Table 1과 같았다. Table 1에서 보는바와 같이 ergosterol을 생산하는 균주의 선별에 사용한 20종의 균주 중에서 3종을 제외하고는 모두 ergosterol을 생성하였으나, 그 중에서도 *Saccharomyces sake* KBA No. 6가 가장 높은 값인 1.6 %의 ergosterol함량을 나타내었다.

Ergosterol축적에 미치는 각종 ammonium태 질소원의 영향

Ergosterol축적에 미치는 ammonium태 질소원의 영향을 조사하기 위하여, 배지의 탄소원을 3 % glucose로 고정시킨 다음, 각종 ammonium태 질소원을 C/N비율이

Table 1. Comparison of ergosterol content in various fungi

Strains		Dry cell weight (g/L)	Ergosterol (mg/L)	Ergosterol (%) [*]
<i>Saccharomyces sake</i>	KBA No. 6	10.31	165.3	1.60
<i>Saccharomyces peka</i>	IFO 0222	11.07	105.6	0.95
<i>Saccharomyces delbruekii</i>	IFO 0285	3.93	16.2	0.41
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	IFO 9641	9.93	76.6	0.77
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		10.20	101.5	1.00
<i>Pichia polymorpha</i>	IFO 0195	14.46	129.9	0.90
<i>Pichia orientalis</i>	IFO 1279	11.88	109.0	0.92
<i>Hansenula saturnus</i>	IFO 0177	11.11	128.8	1.16
<i>Hansenula capsulata</i>	IFO 0721	13.20	113.7	0.86
<i>Hansenula minuta</i>	IFO 0975	13.21	68.4	0.52
<i>Hansenula polymorpha</i>		3.52	4.6	0.13
<i>Hansenula bimondalis</i>	IFO 1308	10.80	161.2	1.22
<i>Debaryomyces japonicum</i>	IFO 0039	12.80	63.8	0.50
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	IFO 0794	10.24	51.0	0.49
<i>Rhizopus japonicum</i>		3.29	0.0	0.00
<i>Rhodotorula rubra</i>		3.58	24.9	0.69
<i>Candida boidinii</i>		3.49	8.1	0.23
<i>Cryptococcus laurentii</i>	IFO 0609	2.37	0.0	0.00
<i>Torulopsis candida</i>	IFO 0380	9.81	83.5	0.85
<i>Trigonopsis variabilis</i>	IFO 067	3.02	0.0	0.00

^{*}Ergosterol(%) = Ergosterol(g)Dry cell Weight(g) × 100.
Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in YM medium.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the ergosterol production by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Nitrogen sources (C/N ratio 20 : 1)	Dry cell weight(g/L)	Ergosterol (mg/L)	Ergosterol (%)
None	1.80	79.74	4.43
Ammonium chloride	3.53	69.54	1.97
Ammonium nitrate	3.63	68.97	1.90
Ammonium sulfate	3.52	64.41	1.83
Ammonium phosphpate	3.16	56.88	1.80

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30 °C in ergosterol production medium.

20 : 1이 되도록 하였다. Table 2에서와 같이, ergosterol 생성 시에 질소 결핍은 ergosterol의 생산을 향상시킨다는 Horiguchi등³⁾의 결과와 일치하였으나, ergosterol 생산 배지 내에 함유된 0.1%의 yeast extract로는 균체량이 적은 것이 문제였다. 따라서 본 실험에서는 균체량도 충분히 얻고 균체내의 ergosterol함량도 증가시키기 위하여, ergosterol함량이 가장 많은 ammonium chloride를 선택하여 질소 결핍이 ergosterol의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

C/N 비율이 ergosterol생산에 미치는 영향

질소 결핍이 ergosterol생성을 증가시킨다는 것은 잘 알려진 사실이다³⁾. 따라서 C/N 비율이 ergosterol생성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과가 Table 3에 요약되어 있다. 즉, C/N 비율이 50이상이 되면, ergosterol 함량(%) 및 총 생성된 ergosterol량(mg/l)이 대조구에 비하여 증가하는 추세를 나타내었으며, C/N비율이 200일 경우 가장 많은 양의 ergosterol(96 mg/l)을 생산하였으며, 이는 대조구에 비하여 30%가 증가한 양이었다.

Table 3. Effect of ammonium chloride concentration on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

C/N ratio Glucose 3% : NH ₄ Cl	Dry cell weight(g/L)	Ergosterol (mg/L)	Ergosterol (%)
None	1.66	73.53	4.43
400 : 1	2.09	94.30	4.01
200 : 1	2.77	96.20	3.47
100 : 1	3.47	95.43	2.75
50 : 1	3.70	77.33	2.09
20 : 1	3.59	68.21	1.90
10 : 1	3.26	62.59	1.92

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30 °C in ergosterol production medium.

Ergosterol생산에 미치는 pH의 영향

Ergosterol생산에 미치는 최적 pH를 검토하기 위하여 생산배지의 초기 pH를 3.0부터 10.0까지 변화시켰다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, pH 4에서 pH 9까지는 ergosterol의 함량 및 균체량의 변화가 미소하였다. 상기의 결과는 균주가 성장가능한 넓은 영역의 초기 pH의 차이가 ergosterol의 생산에 거의 영향을 미치지 않는다는 Zalashko와 Pidoplichko의 결과⁹⁾와 일치하였다.

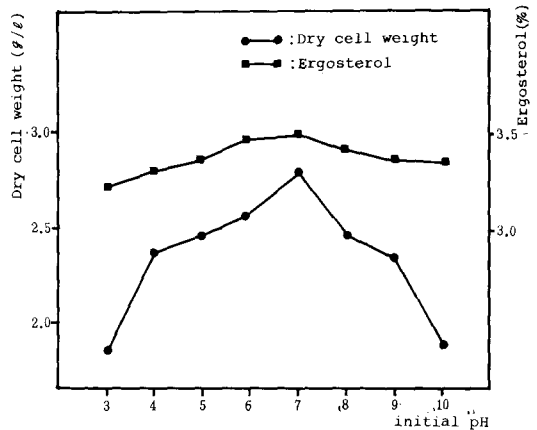


Fig. 1. Effect of initial pH on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Ergosterol생산에 미치는 비 이온성 계면활성제의 영향

일반적으로 비 이온성 계면활성제는 세포막의 투과성을 증가시키는 효과를 나타낸다¹³⁾. 또한 ergosterol의 생산시 효모의 배양환경에 변화를 주기 위하여 사용하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 본 실험에서는 ergosterol의 생산에 미치는 비 이온성 계면활성제의 영향을 조사하기 위하여, 생육에는 커다란 지장을 주지 않지만 균체의 세포막에는 영향을 줄 수 있을 정도의 농도로 ergosterol생산 배지에 계면활성제를 첨가하여 균체의 생육 및 ergosterol 함량을 비교 검토하였다. Table 4에서와 같이 0.2%의 Tween 80을 첨가하였을 경우 균체량은 대조구에 비하여 약 5%가 증가하였으며, ergosterol함량은 18% 증가하였다. 이는 총 ergosterol량이 대조구에 비하여 23% 증가한 것을 의미한다.

Ergosterol생산에 미치는 각종 산화제의 영향

일반적으로 산화제는 ergosterol의 생산시에 효모의 배양환경에 변화를 주기 위하여 사용 가능한 것으로 알

Table 4. Effect of nonionic detergent on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Detergent % (W/V)	Dry cell weight(g/L)	Ergosterol (mg)	Ergosterol (%)
None	2.75	93.50	3.40
Triton X-100			
0.001	2.13	51.76	2.45
0.01	1.66	45.65	2.75
0.05	1.32	42.90	3.25
0.1	-	-	-
Tween 60			
0.05	2.77	100.55	3.63
0.1	2.65	96.73	3.65
0.2	2.35	82.02	3.49
0.3	2.10	70.14	3.34
0.5	1.73	52.42	3.03
Tween 80			
0.05	3.00	109.50	3.65
0.1	2.96	112.50	3.80
0.2	2.87	115.37	4.02
0.3	2.65	104.68	3.95
0.5	2.17	83.55	3.85

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30 °C in ergosterol production medium.

려져 있다⁶⁾. 본 실험에서는 ergosterol의 생산에 미치는 각종 산화제의 영향을 조사하기 위하여, 생육에 커다란 영향을 주지않을 정도로 산화제의 농도를 결정한 후, ergosterol생산 배지에 이들을 첨가하여 균체의 생육 및 ergosterol함량을 비교 검토하였다. Table 5에서 보는 바와 같이, KNO₂ 및 NaNO₂같은 nitrite염들은 *Saccharomyces*속의 효모에는 질소원으로 사용될 수 없는 산화제로서¹⁰⁾, 농도가 0.1% 이상에서는 균체의 생육을 크게 저해시켰지만, 0.1% 정도의 농도에서는 생육 저해 정도도 크지 않았으며, ergosterol의 함량을 크게 증가시키는 효과를 나타내었다. 즉, 산화제로 KNO₂를 0.1% 사용하였을 때, 균체량은 대조구에 비하여 약 10%정도 감소하였으나, ergosterol함량(%)은 40% 정도 증가하였다. 이는 총 ergosterol량(mg/l)이 대조구에 비하여 약 26% 정도 증가한 것을 의미한다.

비 이온성 계면활성제 Tween 80과 산화제 KNO₂가 ergosterol생산에 미치는 공동효과

비 이온성 계면활성제인 Tween 80 및 산화제 KNO₂가 ergosterol 생산에 미치는 공동 효과를 살펴보기 위하여, ergosterol생산 배지에 Tween 80 및 potassium nitrite

Table 5. Effect of oxidizing agent on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Oxidizing agent % (W/V)	Dry cell weight(g/L)	Ergosterol (mg)	Ergosterol (%)
None	2.78	95.08	3.42
K ₂ Cr ₂ O ₇			
1 × 10 ⁻⁴	2.62	81.74	3.12
1 × 10 ⁻³	2.22	67.27	3.03
5 × 10 ⁻³	1.65	46.37	2.81
MnO ₂			
1 × 10 ⁻⁴	2.53	78.43	3.10
1 × 10 ⁻³	2.12	63.18	2.98
5 × 10 ⁻³	1.35	35.51	2.63
KMnO ₄			
1 × 10 ⁻³	2.69	89.58	3.33
1 × 10 ⁻²	2.54	86.87	3.42
5 × 10 ⁻²	1.80	64.08	3.56
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈			
1 × 10 ⁻²	2.70	92.34	3.42
1 × 10 ⁻¹	2.18	77.61	3.56
2 × 10 ⁻¹	1.52	54.42	3.58
NaNO ₃			
5 × 10 ⁻²	2.72	92.48	3.40
1 × 10 ⁻¹	2.63	92.58	3.52
2 × 10 ⁻¹	1.90	79.56	3.60
KNO ₃			
5 × 10 ⁻²	2.70	91.26	3.38
1 × 10 ⁻¹	2.52	91.69	3.46
2 × 10 ⁻¹	1.90	82.25	3.50
NaNO ₂			
5 × 10 ⁻²	2.60	117.78	4.53
1 × 10 ⁻¹	2.52	119.45	4.74
2 × 10 ⁻¹	1.90	87.97	4.63
KNO ₂			
2 × 10 ⁻²	2.70	110.16	4.08
5 × 10 ⁻²	2.58	119.45	4.63
1 × 10 ⁻¹	2.49	120.26	4.83
2 × 10 ⁻¹	1.94	91.96	4.74
5 × 10 ⁻¹	1.23	50.80	4.13

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30 °C in ergosterol production medium.

를 각각 0.1~0.3%의 농도로 함께 첨가하여 균체의 생육 및 ergosterol함량을 비교 검토하였다(Table 6). Tween 80 0.2% 및 potassium nitrite 0.1%를 동시에 사용하였을 경우, ergosterol함량이 대조구에 비하여 56%나 증가하였고, 총 ergosterol량은 45%정도 증가하였다.

Table 6. Synergistic effect of Tween 80 and KNO_2 on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Tween 80 (%)	KNO_2 (%)	Dry cell weight(g/L)	Ergosterol (mg/L)	Ergosterol (%)
0.0	0.0	2.75	93.50	3.40
	0.1	2.49	120.27	4.83
	0.2	1.94	91.96	4.74
	0.3	1.50	67.80	4.52
0.1	0.0	2.96	112.50	3.80
	0.1	2.62	131.52	5.02
	0.2	2.03	97.85	4.82
0.2	0.3	1.60	79.87	4.93
	0.0	2.87	115.40	4.02
	0.1	2.55	135.15	5.30
0.3	0.2	2.22	113.66	5.12
	0.3	1.60	80.00	5.00
	0.0	2.65	104.68	3.95
0.3	0.1	2.40	117.60	4.90
	0.2	2.30	110.86	4.80
	0.3	1.45	69.60	4.80

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30 °C in ergosterol production medium.

최적 조건에서의 ergosterol 생산

상기의 실험결과로부터, ergosterol 생산 배지에 Tween 80 0.2%와 potassium nitrite 0.1%를 첨가하여 배양하였을 경우 가장 효과적인 것으로 나타났다. 상기 조건하에

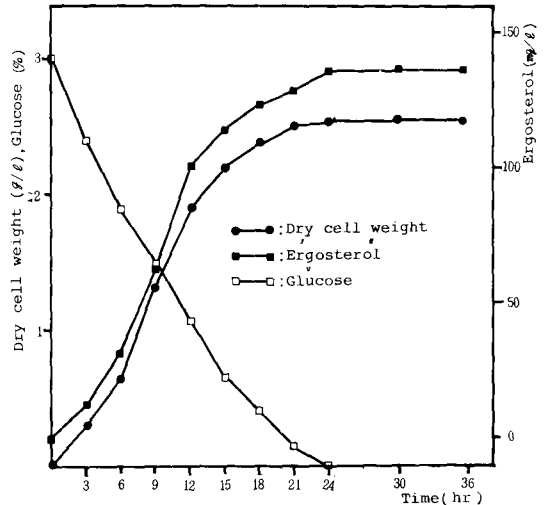


Fig. 2. Time course on the production of ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

서 배양시간에 따른 균체 증식, 기질 소모 및 총 ergosterol량을 조사한 결과가 Fig. 2에 요약되어 있다. 비증식 속도는 $0.27 h^{-1}$ 이었으며, 증배 시간은 256h이었다. 사용한 기질은 배양 24시간에 완전히 소모되었으며, 총 ergosterol량(mg/l)은 배양시간이 24시간 경과되었을 때 최대값인 135.15 mg/l을 나타내었다.

참고 문헌

1. Florent, J. : Vitamines, Biotechnology, Vol. 4, Ed. by Pape, H. and Rehm, H. J., Verlag Chemie, pp.150-158(1985)
2. Green, J. and Price, S. A. : US Patent 3,006,932 (1961)
3. Horiguchi, S., Uemura, J., and Takeda, I. : Japan Patent 73-92,587(1973)
4. Masuda, Y. and Miwa, N. : Japan Patent 75-142,787(1975)
5. Zikmanis, P. B. and Auzame, S. I. : Appl. Microbiol. Biotech., 22 : 265(1985)
6. Dulany, E. L. and Rahway, N. J. : US Patent 2,817,624(1957)
7. Castelli, A. and Barraresi, G. : Ital. J. Biochem., 18 : 91(1969)
8. Nout, M. J. R. and Bonants, T. M. G. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 26 : 456(1987)
9. Zalashko, M. V. and Pidoplichko, G. A. : Microbiol., 43 : 202(1974)
10. Miller, G. L., Blum, R., Glunon, W. E., and Burton, A. L. : Anal. Biochem., 2 : 129(1960)
11. Zwig, G. and Sherma, J. : CRC handbook of chromatography, CRC Press, Cleveland, 486(1972)
12. Breivik, O. N. and Ovades, J. L. : J. Agric. Food Chem., 5 : 360(1957)
13. Miozzari, G. F. Niederberger, P., and Hutter, R. : Anal. Biochem., 90 : 220(1978)
14. Kreger-Van Rij, N. J. W. : The yeast-a taxonomic study, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 382-386(1984)

The Production of Ergosterol by *Saccharomyces sake* KBA No. 6

Jang-Woo Park, Wang-Sik Lee and Won-Gi Bang(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul, 136-701, Korea)

Abstract : To produce ergosterol *Saccharomyces sake* KBA No. 6 was used and various

factors related to ergosterol accumulation were investigated. The most effective inorganic nitrogen source was ammonium chloride and 3.50 % of ergosterol was accumulated in the cell when the C/N ratio was 200/1. When Tween 80 and potassium nitrite were used simultaneously, ergosterol content and total amount of ergosterol were increased by 56 % and 45 %, respectively, compared to their control in which 0.2 % of Tween 80 and 0.1 % of potassium nitrite were used. Under the optimum conditions, ergosterol content increased from 1.73 % to 5.3 % and the total amount of ergosterol was increased from 65.2 mg/l to 135.15 mg/l.