

생육속도 및 배양온도가 효모 RNA 축적과 autolysis 효율에 미치는 영향

김성룡 · 권오성 · 남희섭* · 이형재

(주)농심 기술개발연구소

Effect of Growth Rate and Cultivation Temperature on the Yeast RNA Accumulation and Autolysis Efficiency

Sung-Yong Kim, Oh-Sung Kwon, Hee-Sop Nam* and Hyung-Jae Lee

Research and Development Center, Nong Shim Co., Ltd.

Abstract

Continuous fermentations were performed in order to investigate the effect of culture condition on the yeast RNA accumulation and autolysis efficiency. The content of intracellular RNA increased with increasing dilution rate, showing its maximum value of 14.8% at $D=0.35 \text{ h}^{-1}$. Also, both RNA productivity and specific RNA productivity tended to increase with the increase of dilution rate. The maximum biomass was obtained at 30°C in the fixed dilution rate of 0.2 h^{-1} , whereas the maximum RNA content appeared at the lowest temperature experimented. Growth rate affected significantly on the yeast autolysis efficiency such that the extraction ratio(TN/TN) increased with increasing growth rate, whereas the hydrolysis ratio(AN/TN) was reversed. On the other hand, its efficiency was little affected by cultivation temperature.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, ribonucleic acid(RNA), continuous fermentation, autolysis efficiency

서 론

식품산업에서 사용되고 있는 천연 풍미 소재의 사용량이 증가함에 따라 다양한 소재 개발이 활발히 이루어지고 있다. 효모 extract는 대표적인 추출형 천연 풍미 소재로서, autolysis에 의한 분해 및 추출, 농축, 건조 등의 공정에 의해 제조된다. 효모 extract는 아미노산, peptide 등의 정미성이 있는 물질들이 풍부히 함유되어 있어 여러 식품에서 풍미 소재로 많이 사용하고 있다^(1,2). 근래에 효모 extract 제품 중 IMP, GMP 등의 정미성 nucleotide들이 다량 함유되어 있는 고핵산 효모 extract가 개발되었는데, 이 제품은 기존의 효모 extract보다 정미력이 월등히 우수하여 향후 그 사용량이 급증할 것으로 예상된다^(3,4).

고핵산 효모 extract를 제조하기 위해서는 먼저 효모 균체내 ribonucleic acid(RNA) 함량이 높아야 한다. 효모내 RNA의 축적에 대한 연구는, 대사 생리적인 측면에서 균체 생육속도에 따라 단백질과 ribosome의 합성속도의 변화⁽⁵⁻⁸⁾와 배양온도에 따른 ribosome 함량의 변화⁽⁹⁻¹²⁾ 등이 연구된 바 있다. 한편 배양학적 수율 측

면에서 보면, 효모내 RNA 함량 뿐만 아니라 균체량도 같이 검토되어야 하는데 이 분야에 대한 연구는 미미한 실정이다. 더불어 균체 생육속도, 배양온도 등의 배양조건은 균체내 autolytic enzyme의 함량과 활성에 영향을 미쳐 궁극적으로 autolysis 효율에 영향을 줄 것으로 예상된다. 이와 같이 효모 배양시 균체량, 균체내 RNA 함량, autolysis 효율 등은 고핵산 효모 extract 제조에 중요한 가격 결정 인자가 되기 때문에, 배양학적 연구를 통해 이들 관계를 규명하는 것이 가치있다고 할 수 있다.

본 연구에서는, 연속식 배양을 통해 배양환경의 변화가 효모내 RNA 축적과 autolysis 효율에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 균주는, 본 실험실에서 분리하여 보관 중인 *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031로 YM 한천 배지에서 4주마다 계대배양하여 사용하였다.

배지 및 배양

사용된 배지조성은 2.5% sucrose, 1% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.2% NH_4Cl , 0.02% MgSO_4 , 0.003% CaCl_2 였다. 균체 배양중에서 접종용 배양은 250 ml 삼각 플

Corresponding author: Hee-Sop Nam, Research & Development Center, Nong Shim Co., Ltd., 203-1, Dangjeong-Dong, Kumpo-si, Kyungki-do 435-030, Korea

라스크에 100 ml의 배지를 담아 삼균한 뒤 plate상의 균을 한 두 백금이 취하여 접종하고, 배양온도 26°C, 교반속도 180 rpm으로 16시간 배양하였다.

연속식 배양중 생육속도의 영향을 살펴본 실험은, 2.5 L 발효조(New Brunswick Scientific Instrument Co., model Bioflo II, USA)에서 working volume 1.5 L로 하고 집중용 배양액 100 ml를 집중하여 배양온도 30°C, 교반속도 500 rpm, 통기량 1 vvm으로 8시간 배양한 후 공급용 배지를 dilution rate에 따라 공급하였다. 공급용 배지 조성은 회분식 배양용 배지와 동일한 배지를 사용하였다. 배양이 steady state에 도달한 시기는 균체량이 일정하게 유지되는 시기로 결정하였다. 연속식 배양중 배양온도의 영향을 살펴본 실험은, 위와 동일한 조건에서 dilution rate을 0.2 h⁻¹로 고정시키고, 배양온도를 24°C에서 36°C까지 변화시켜 실험하였다.

균체량 정량

균체를 정량하기 위해 배양액 5 ml를 취하고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 모았다. 그 다음 2회 세척한 뒤에 적당한 농도로 희석하여 spectrophotometer(Tegimenta Co., type Uvicon 930, Swiss)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 후 미리 작성하여둔 건조 균체량과 흡광도와의 상관식에서 건조 균체량을 구하였다.

RNA 추출 및 정량

균체내 RNA를 추출하기 위하여 Schmidt-Thanhauser-Schneider법⁽¹³⁾을 변형시켜 사용하였다. 배양액중의 균체를 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 모은 뒤 10% perchloric acid를 첨가하여 90°C에서 1시간 처리하였다. 추출된 RNA는 orcinol법⁽¹⁴⁾에 의해 정량하였다. Orcinol 시약(Sigma)은 무색결정의 순품이 사용되었으며, FeCl₃와 함께 실험 직전에 HCl에 녹여서 사용하였다. 그 적정법은 검액 0.2 ml에 물을 가해 1.5 ml를 만들고, orcinol 시약 1.5 ml와 혼합한 뒤, 95°C에서 20분간 가열 반응시켰다. 반응이 끝나면 냉각시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여, calf liver RNA(Type IV, Sigma)로 작성한 검정곡선과 비교하여 정량하였다.

아미노산 정량

균체의 총아미노산 분석은 서⁽¹⁵⁾와 Chang⁽¹⁶⁾의 방법에 따랐다. 적당량의 균체를 6N HCl(1% phenol 함유) 15 ml에 넣어 105°C에서 24시간 산분해시켰다. 그뒤 100 ml volumetric flask로 부피를 맞추고, 일정량을 취해 seppak C₁₈ cartridge(Waters, USA)를 통과시켜 단백질, 지질 등의 고분자 물질과 색소를 제거하였다. 전처리된 시료 50 µl를 취해 진공펌프가 장착된 Pico-Tag workstation(waters)에서 건조한 후, water : methanol : triethylamine (2 : 2 : 1) 혼합용액 10 µl를 첨가하여 재건조시켰다. 재건조된 시료에 methanol : water : triethylamine : pheny-

lithiocyanate(7 : 1 : 1 : 1) 혼합용액 20 µl를 첨가하여 phenylthiocarbonyl-amino acid로 유도체화시킨 후, 다시 건조시켰다. 여기에 sample diluent(Waters) 250 µl를 첨가하여 건조된 시료를 용해한 후, HPLC 분석을 행하였다. 분석은 Waters 510 HPLC system, 486 UV detector, 746 data module로 이루어진 HPLC system에서 행하였고, column은 Pico-Tag column(3.9×150 mm, Waters)을 사용하였으며, 분석중에는 45°C로 유지하였다. 이때 mobile phase로는 Eluent A(Waters)를 사용하였고, Eluent B는 acetonitrile를 제조하여 사용하였다. 유리아미노산 정량의 경우에는 산분해를 하지 않은 점 이외에는 총아미노산 정량의 경우와 동일한 방법을 따라 분석하였다.

효모의 autolysis 효율 분석

배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 모으고, 2회 세척하였다. 그뒤 적당량의 물을 첨가하여 19% 효모 현탁액을 만든 뒤, 1% NaCl과 3% Ethanol을 첨가하고, 50°C에서 120 rpm으로 24시간 autolysis시켰다. Autolysis가 끝난 액은 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분석하였다.

Total nitrogen(TN)은 micro-kjeldahl법으로 정량했으며, amino nitrogen(AN)은 유리 아미노산을 분석하여 각 아미노산의 고유계수로 나눈 값을 더하여 구하였다. 본 실험에서 효모 extract의 추출율(TN/TN)은 효모 균체로부터 autolysis하여 얻은 nitrogen의 회수율이며, 분해율(AN/TN)은 autolysis액의 원심분리 후 상층액 내 질소성 화합물의 분해율을 의미하였다.

결과 및 고찰

배양조건에 따른 균체 RNA 함량의 변화

Dilution rate, 즉, 균체 생육속도가 균체내 RNA 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 연속식 배양을 통해 dilution rate를 0.1 h⁻¹에서 0.35 h⁻¹까지 변화시켜 steady state에서의 균체량, 균체내 RNA 함량 및 배양액 중 RNA 농도를 관찰하였다.

균체량은 dilution rate 0.2 h⁻¹ 이상에서 급격히 감소한 반면, 균체내 RNA 함량은 dilution rate가 커짐에 따라 대수적으로 증가하는 양상을 나타내어, dilution rate 0.1 h⁻¹에서 8.9%였다가 0.35 h⁻¹에서는 14.8%가 되어 1.6배 증가하였다(Fig. 1). 이에 따라 RNA productivity는 0.1 h⁻¹의 91.6 mgL⁻¹h⁻¹에서 0.35 h⁻¹의 285 mgL⁻¹h⁻¹로서 3.5배 증가하였고, specific productivity는 8.9 mgg⁻¹h⁻¹에서 48.3 mgg⁻¹h⁻¹로 5배의 증가를 보였다(Fig. 2). 이와 같은 균체 생육속도와 RNA 축적 관계는 세포내 RNA와 단백질 합성속도에 기인되는 것으로 보여진다. 일반적으로 전체 효모 RNA 중 ribosomal RNA(rRNA)가 80~90%를 차지하기 때문에 생육속도의 증가에 따른 RNA 함량 증가는 주로 rRNA의 증가에서 기인된다⁽¹⁷⁾고 할 수

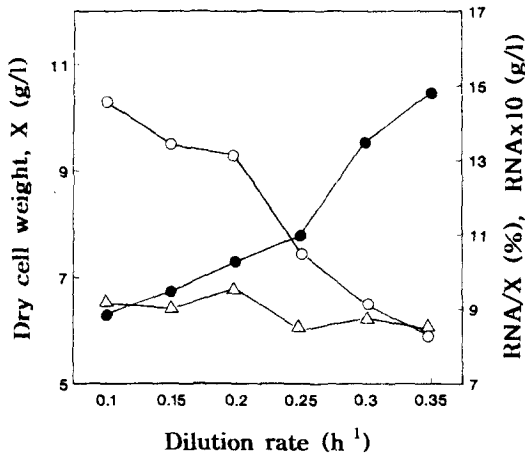


Fig. 1. Effect of dilution rate on the RNA accumulation of *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031
○; dry cell weight, ●; RNA/X, △; RNA

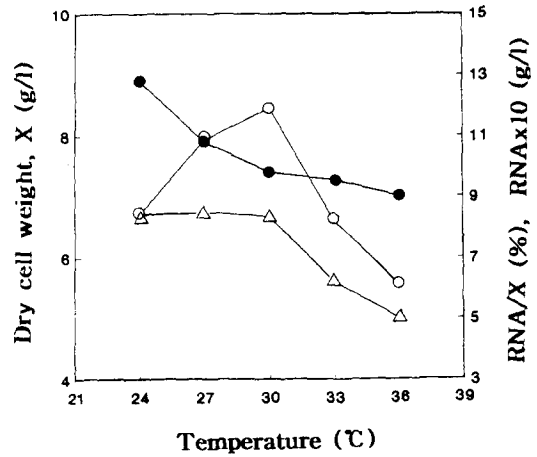


Fig. 3. Effect of cultivation temperature on the RNA accumulation at the fixed dilution rate of 0.2 h⁻¹
○; dry cell weight, ●; RNA/X, △; RNA

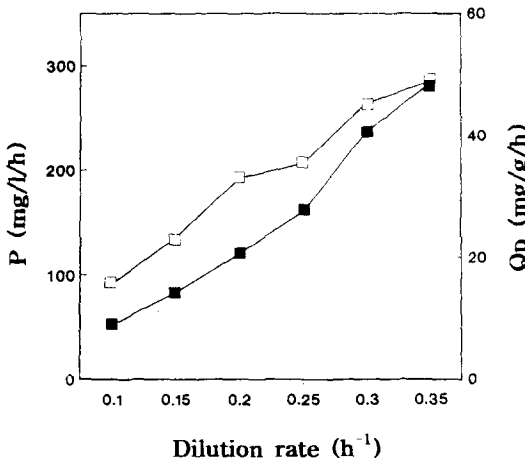


Fig. 2. Changes of RNA productivity (P) and specific RNA productivity (Qp) with various dilution rates
□; RNA productivity, ■; specific RNA productivity

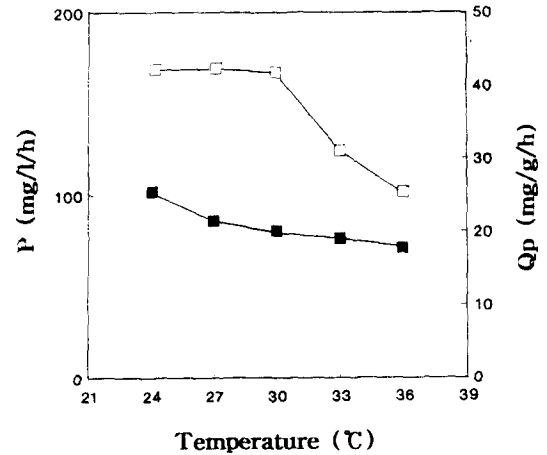


Fig. 4. Changes of RNA productivity (P) and specific RNA productivity (Qp) with several growth temperatures
□; RNA productivity, ■; specific RNA productivity

있다. 한편, 생육속도가 빨라질수록 그에 상응하는 대사 수준을 유지하기 위하여 균체내 대사 관련 단백질 합성속도가 높아져야 하고, 단백질 합성은 ribosome 함량과 비례적 관계를 가지고 있기 때문에, 따라서 생육속도가 빨라질수록 균체내 rRNA 함량이 증가하는 것으로 보여진다⁽¹⁷⁾. 또, 생육속도가 높아지면 RNA polymerase 함량이 증가하여 RNA 합성속도가 증가하고, 생육속도가 낮아지면 전반적인 대사의 퇴조로 인해 RNA polymerase에 대한 기질 제한 현상이 발생하여 결과적으로 RNA 합성 속도는 감소되는 것으로 알려져 있다⁽⁷⁾.

배양온도가 균체의 RNA 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 dilution rate를 0.2 h⁻¹로 고정시키고 배양 온도를 달리한 연속식배양 실험을 하였다. 고정된 dilu-

tion rate에서 균체량은 배양온도 30°C 일 때 8.4 g/l로 가장 높은 값을 나타내었으며, 배양온도가 높아짐에 따라 균체내 RNA 함량은 감소하는 경향을 나타내어 24°C의 배양에서 RNA 함량이 12.7%이던 것이 36°C 배양에서 8.9%로 낮아졌다(Fig. 3). 배양온도가 낮아짐에 따라 균체 RNA 함량의 증가와 더불어 specific RNA productivity도 증가하는데(Fig. 4), 이와 같이 생육속도가 일정할 때 낮은 온도에서 RNA 함량의 증가는 주로 rRNA 증가에 기인되는 것으로 보여진다. 즉, 일정한 생육속도로 자라는 균체는 배양온도가 낮을수록 ribosome의 단백질 합성 효율이 저하되기 때문에(Fig. 5), 일정한 생육속도를 유지하기 위해서는 균체의 ribosome 함량 증가가 요구된다.

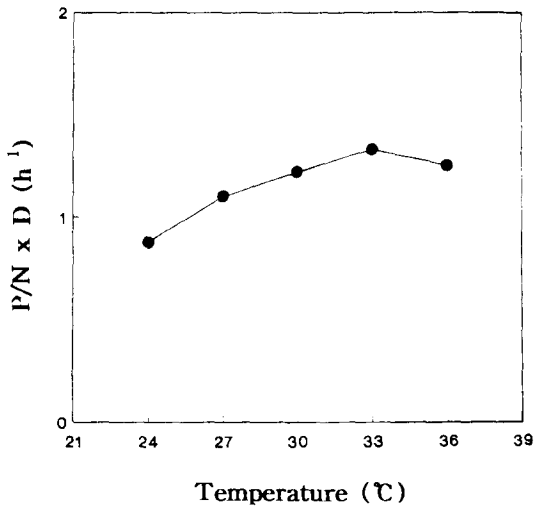


Fig. 5. Changes of efficiency of nucleic acid in protein synthesis with different cultivation temperatures at the fixed dilution rate of 0.2 h⁻¹ (P; Protein, N; Nucleic acid, D; Dilution rate)

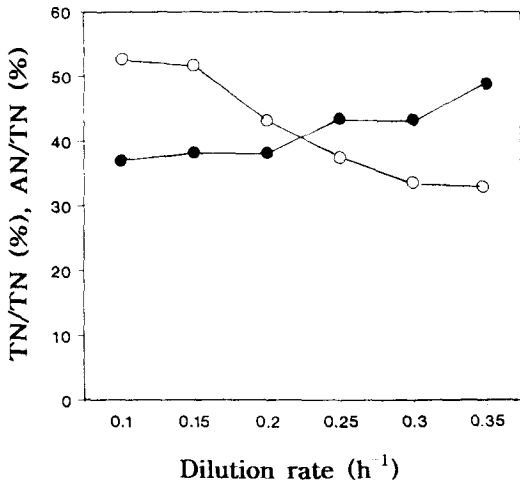


Fig. 6. Efficiency of autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031 grown at various dilution rates ○; TN/TN, ●; AN/TN

결과적으로 단백질 합성 속도는 부가적인 RNA 합성에 의하여 균체 생육속도에 맞게 유지됨으로, 저온에서 균체내 RNA 함량은 증가하는 것이다. 배양액중 RNA 농도는 30°C까지는 일정하게 유지되다가 그 이상의 온도에서는 떨어졌으며(Fig. 3), RNA productivity도 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 4).

배양 조건에 따른 효모의 autolysis 효율의 변화
 균체의 배양조건이 효모 extract 제조시 autolysis 효

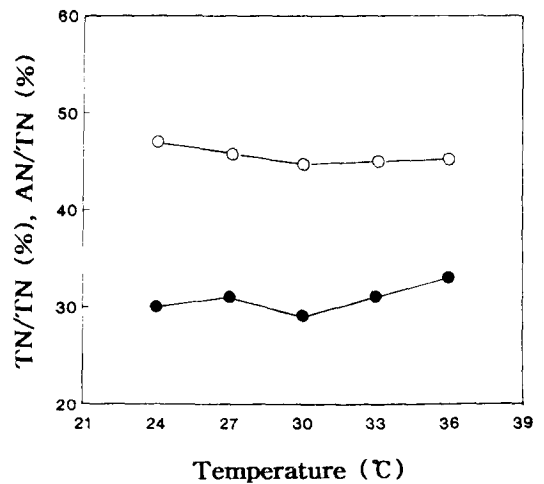


Fig. 7. Efficiency of autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031 grown at various cultivation temperatures ○; TN/TN, ●; AN/TN

율에 미치는 영향을 조사하였다. 효모 extract의 추출율은 dilution rate가 높아질수록 감소하여, dilution rate 0.1 h⁻¹일 때 53%이던 것이 dilution rate 0.35 h⁻¹일 때 33%로 크게 낮아졌다(Fig. 6). 일반적으로 효모 extract 제조시 autolysis에 의한 추출율에 영향을 미치는 주요 인자는 균체내 autolytic enzyme의 함량과 활성이다. 효모의 경우 autolytic enzyme는 periplasmic membrane에 존재하는 β-(1,3)-glucanase와 액포에 존재하는 protease가 있는데⁽¹⁸⁾, 본 실험의 결과에서 생육속도가 빠를수록 이들 효소의 함량 혹은 활성이 상대적으로 저하되는 것으로 사료된다. 한편, 효모 extract 자체의 분해율은 추출율과는 반대로 높은 dilution rate에서 증가하였다(Fig. 6). 효모의 autolysis 중 단백질 분해에 관여하는 protease A의 최적 활성 온도는 35°C에서 40°C인데 비해, 본 실험의 autolysis 온도는 50°C였으므로 배양 조건에 따른 효모 균체내 이 효소의 변화와 관계 없이 효모 extract의 분해율에는 영향을 미치지 않을 것이다. 따라서 효모 extract 자체의 분해율은 균체 내의 nitrogen들이 autolysis 중에 물리적으로 얼마나 추출되어져 나오는가에 따른다. 즉, 균체 내에 대사 과정을 통해 이미 존재하고 있던 일정량의 amino nitrogen이 생육속도에 관계 없이 대부분 균체 밖으로 추출되어 나오고⁽¹⁹⁾, 생육속도가 빠를수록 추출율이 상대적으로 감소하였기 때문에(Fig. 6) 결과적으로는 분해율이 증가한 것으로 사료되었다.

일정한 생육속도에서 자란 효모 균체들은 배양온도에 관계 없이 효모 extract 추출율이 45%에서 47%로 유지되어(Fig. 7), 배양온도는 autolysis시 autolytic enzyme의 함량과 활성 변화에 중요한 영향 인자가 아닌 것으로 추측되었다.

요 약

배양환경이 효모 RNA 축적과 autolysis 효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 연속배양을 실시하였다. Dilution rate의 증가에 따라 균체내의 RNA 함량은 증가하여 dilution rate = 0.35 h⁻¹에서 14.8%를 나타내었고, 더불어 RNA productivity와 specific RNA productivity도 증가하였다. 고정된 D = 0.2 h⁻¹에서 최적 균체량은 배양온도 30°C에서 얻어졌으나, RNA 함량은 배양온도가 낮아질수록 높은 값을 보여 24°C에서 12.7%로 나타났다. 한편, autolysis 효율 측면에서 균체 생육속도가 증가할수록 효모 extract의 추출율은 감소하였고, 효모 extract의 분해율은 증가하는 경향을 보였으나, 배양온도는 효모 autolysis 효율에 큰 영향을 미치지 않았다.

문 헌

1. 太田 静行: 天然 調味料. *New Food Industry*, **34**, 38 (1992)
2. 杉本 洋: 酵母エキス製造法の變遷. *New Food Industry*, **36**, 41 (1994)
3. 青柳 吉紀. 5'-IG 高含有 酵母エキス [アロマイルド]. 月刊 フードケミカル, **6**, 99 (1990)
4. Nagodawithana, T.: Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.*, **11**, 139 (1992)
5. Waldron, C. and Lacroute, F.: Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acid in yeast. *J. Bacteriol.*, **122**, 855 (1975)
6. Boehlke, K.W. and Frieser, J.D.: Cellular content of RNA and protein in *Saccharomyces cerevisiae* as a function of exponential growth rate. *J. Bacteriol.*, **121**, 429 (1974)
7. Sebastian, J. and Halvorson, H.: Effect of the growth rate on the DNA dependent RNA polymerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **34**, 159 (1973)
8. Hartwell, L.H.: Macromolecular synthesis in temperature sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.*, **93**, 1662 (1967)
9. Hunter, K. and Rose, A.H.: Influence of growth temperature on the composition and physiology of microorganisms. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **22**, 527 (1972)
10. Ryu, D.Y. and Mateles, R.I.: Transient response of continuous cultures to change in temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 385 (1968)
11. Alroy, Y. and Tannenbaum, S.R.: The influence of environmental conditions on the macromolecular composition of *Candida utilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 239 (1973)
12. Tempest, D.W. and Hunter, J.R.: The influence of temperature and pH value on the macromolecular composition of *Aerobacter aerogens* growing in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.*, **41**, 267 (1965)
13. Schmidt, G., Thanhauser, S.J. and Schneider, W.C.: Fractionation of cell components. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945)
14. Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.*, **3**, 680 (1957)
15. 서동순, 김광옥, 김용수, 이영춘: 효모 자가 분해물을 사용한 된장 찌개 믹스 조성물의 최적화. 한국식품과학회지, **25**, 411 (1993)
16. Chang, K.C., Skarge, L.H. and Satterlee, L.D.: Analysis of amino acids in soy isolates and navy beans using precolumn derivatization with phenylisocyanate and reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, **54**, 756 (1989)
17. Jensen, K.F. and Pedersen, S.: Metabolic growth rate control in *E. coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus. *Microbiol. Rev.*, **54**, 89 (1990)
18. Reed, G. and Nagodawithana, T.W.: Baker's yeast production. In *Yeast Technology*, 2nd ed., AVI book. Inc., New York, p.261 (1991)
19. Phaff, H.J.: Enzymatic yeast cell wall degradation in food proteins, In *Advances in Chemistry Series*, vol. 60, American Chemical Society, Washington, DC. p.244 (1977)

(1994년 12월 12일 접수)