

유가식 배양에서 효모 생육과 RNA 함량의 변화

김성룡 · 남희섭 · 이형재
(주) 농심 기술개발연구소

Change of Yeast Growth and Its RNA Content in Fed-batch Fermentation

Sung-Yong Kim, Hee-Sop Nam and Hyung-Jae Lee
Research and Development Center, Nong Shim Co., Ltd.

Abstract

Growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031 and its total RNA contents were observed by a fed-batch fermentation with different media-feeding methods. With an exponential feeding pattern, both final cell concentrations and intracellular RNA contents decreased with increasing feeding rates. Intracellular RNA contents also decreased with the growth time. At the same feeding rate of the exponential pattern, final cell concentrations decreased with the increase of total sugar concentration whereas intracellular RNA contents increased. The highest cellular yield was 0.47 at the total sugar concentration of 10%. With increasing feeding rates of the parabolic feeding pattern, final cell concentrations decreased whereas intracellular RNA contents increased, showing a different tendency from the exponential feeding pattern. In comparison of two feeding methods, the exponential feeding pattern was better than the parabolic feeding pattern in terms of cell growth, cellular yields and intracellular RNA contents of *Saccharomyces cerevisiae* NS 2031. Also, the intracellular RNA contents of the exponential feeding pattern was found to be about 2% higher than that of the parabolic feeding pattern at the same instantaneous growth rate (μ_{inst}).

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, ribonucleic acid (RNA), fed-batch fermentation

서 론

근래, 식품산업에서는 고핵산 효모 extract의 개발과 응용에 대한 관심이 커지고 있다^(1,2). 고핵산 효모 extract는 아미노산, peptide 등의 정미성 물질들이 많이 함유되어 있는 기존 효모 extract에 천연의 정미성 nucleotide인 GMP, IMP가 높은 함량 들어 있다. 따라서 기존의 효모 extract보다 정미력이 월등히 우수하여 향후 시장 전망이 밝은 제품이다^(3,4).

고핵산 효모 extract를 제조하기 위해서는 먼저 RNA 함량이 높은 효모를 사용하여 적절한 배양 방법으로 원료 효모를 생산하는 것이 필요하다. 효모내 RNA 축적과 균체량의 변화는 연속배양(continuous fermentation) 실험에 의해 이미 조사되어 생육속도가 증가됨에 따라 균체 내의 RNA 함량이 증가됨을 알았다⁽⁵⁾. 한편, 공업적으로 효모를 생산하기 위해서는 회분식 배양(batch fermentation)과 유가식 배양(fed-

batch fermentation)을 적절히 조합하여 사용한다.

이와 같은 배양 방식은 높은 기질 공급에 의해서 발 생되는 catabolite repression을 방지하기 위하여 배양액 중 기질 농도를 낮게 유지하고, 균체생육속도를 0.2 h⁻¹ 이하에서 배양함으로써 기질이 비효율적으로 이용되는 aerobic fermentation을 막기 위해서 실시한다^(6,7). 즉, 배양 초기 단계에서는 회분식으로 효모를 배양한 뒤, 배양 후기 단계에서는 적당한 당농도가 함유된 기질을 계속적으로 공급하는 유가식 배양을 하여 효모를 생산 하는데, 유가식 배양에서의 기질공급은 여러가지 형태 가 있으며, 주로 배양 말기에서 기질공급량을 감소시 키는 parabolic feeding을 일반적으로 많이 사용하고 있 다^(8,9). 또, 배양중 기질공급속도와 배양액 내의 기질의 농도는 균체수율과 원하는 product의 생산성에 영향을 미치는 중요한 인자들이므로, 적절한 조건으로 설정해 주어야 한다^(10,11).

본 연구에서는 효모의 유가식 배양에서 기질공급 방법에 따라 고핵산 효모 extract의 생산성에 직접 영향을 주는 효모 생육 및 균체내 RNA 변화를 관찰하고 자 하였다.

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

재료 및 방법

사용균주

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

배지 및 배양

균체 배양중에서 접종용 배양은 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 YM broth 배지를 담아 살균한 뒤 plate상의 균을 한 두 백금이 취하여 접종하고, 배양온도 30°C, 교반속도 180 rpm으로 16시간 배양하였다. 본배양용 배지는 폐당밀액 1%, urea 0.03%, KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.05%, ZnSO₄ 0.02%, biotin 1 ppm이었다. 이때 사용된 폐당밀액은 폐당밀을 105°C에서 30분간 처리하고 원심분리하여 얻은 상징액을 사용하였다. 유가식 배양은 2.5 L 발효조(New Brunswick Scientific Instrument Co., model Bioflo II, USA)를 사용하였는데, 먼저 본 배양 배지를 1 L 넣고, 배양온도 30°C, 교반속도 450 rpm, 통기량 1 vvm으로 15시간 회분식 배양한 다음, AFS (Advanced fermentation software, NBS) system에 입력된 feeding program에 따라서 최종 배양액이 2 L가 되도록 유가식용 배지를 공급하여 배양하였다. 이때 사용된 유가식용 배지는 폐당밀 10%, urea 0.3%, KH₂PO₄ 0.04%, MgSO₄ 0.05%,

ZnSO₄ 0.02%, biotin 1 ppm 였다.

분석

균체량 및 RNA 정량은 전보의 방법⁽⁵⁾을 따랐다. 총당 정량은 Phenol-Sulfuric 법⁽⁴⁾을 사용하였다.

Instantaneous growth rate (μ_{inst})의 계산

μ_{inst} 값은 다음의 식에서 계산하여 구하였다.

$$\mu_{inst}(h^{-1}) = \frac{1}{X} \left(\frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \right)$$

X₁; t₁ 시간에서의 균체농도(g/l)

X₂; t₂ 시간에서의 균체농도(g/l)

X; (t₁+t₂)/2 시간에서의 균체농도(g/l)

결과 및 고찰

기질공급속도의 영향

유가식 배양중 기질공급속도의 영향을 살펴보고 그 최적 조건을 설정하기 위하여, 기질공급농도는 폐당밀액 농도 기준 10%로 고정하고 exponential feeding 형태에서 3가지의 서로 다른 기질공급 program (I, II, III)으로 기질을 공급하여 실험하였다(Fig. 1). 이때의 기질공급속도는 배양액중 잔당이 1% 농도 이내에서 유지되도록 균체 생육속도와 기질 이용속도를 고려하

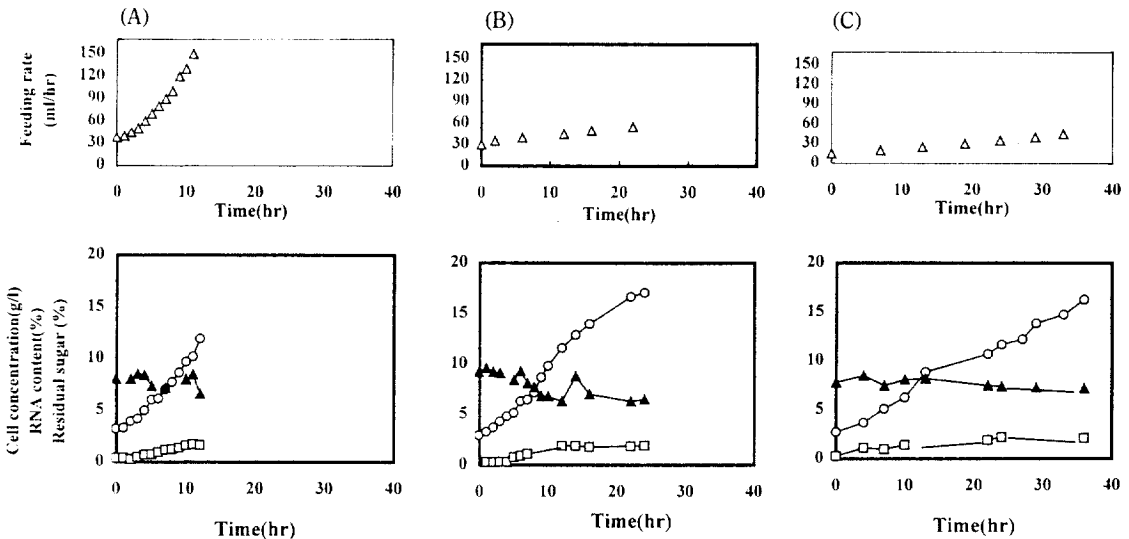


Fig. 1. Time course of cell concentration (X), RNA content (RNA/X), and residual sugar (RS) in the exponential fed-batch fermentation of different feeding rates (total sugar concentration of feeding media was 10%) A) Feeding rate program I, B) Feeding rate program II, C) Feeding rate program III, Δ — Δ ; Feeding rate, \circ — \circ ; Cell concentration, \square — \square ; Residual sugar, \blacktriangle — \blacktriangle ; RNA content

여 조절한 것이다⁽⁴⁵⁾. 기질공급 program I, II, III는 exponential feeding 형태에서 기질공급속도가 빠른 순서를 나타내고 있으며, 1 L의 회분식 배양이 끝난 후 서로 다른 기질공급속도에 따라 최종 배양 부피인 2 L까지 이르며 최종 배양 시간은 각각 14, 24, 36시간을 나타내었다. 배양이 끝난 시점에서 기질공급 program I, II, III의 균체량은 각각 12.5, 17.5, 17.0 g/l 를 생산하여, 기질공급 program I보다 기질공급속도가 비교적 느린 기질공급 program II, III가 더 높았다. 반면 잔당의 경우에는 3가지 기질공급 program 실험 모두 2% 농도에서 비슷하게 유지되어서, 기질공급 속도 변화에 따른 영향이 없음을 보였다. 본 실험에서 잔당량이 높게 유지된 이유는, 기질로 사용된 폐당밀 중에 이용되지 않는 당성분이 상당량 포함되어 있기 때문인 것으로 추측되었다. 당의 소모와 균체량의 생산을 나타내는 균체 수율(Y_x/s)은 기질공급 program II의 실험에서 0.47로 가장 우수하였다. 균체내 RNA 함량은 유가식 배양 초기 8.0% 에서 최종 배양 시간에는 각각 6.1%(I), 6.5%(II), 7.2%(III)로 감소하는 경향을 보였으며, 또한 기질공급속도가 빠를수록 최종 세포내 RNA 함량은 감소하는 경향을 보였다.

기질공급농도의 영향

기질공급 program II에서 기질공급농도를 폐당밀액 농도 기준으로 10, 15, 20%로 조정하여 기질공급농도가 균체량 및 RNA 축적에 미치는 영향을 조사하였다

(Fig. 2). 그 결과, 기질공급농도가 높을수록 균체량은 점차 감소하는 경향을 나타내어, 최종배양 24 시간에서 균체량은 각각 17.5, 15.2, 14.5 g/l로 나타났다. 잔당은 2%정도로 기질공급농도에 따라 큰 차이가 없었다. 따라서 균체 수율(Y_x/s)은 비교적 낮은 기질공급농도인 10%에서 0.47을 보여 가장 우수하였다. 이와 같은 현상은, 기질공급농도가 높을수록 산소 공급이 충분할 때에도 균체 respiration이 저해되는 Crabtree effect가 발생하여 균체 생육이 저해된 것으로 사료된다⁽⁴⁶⁾. 한편 균체 내 RNA 함량은 기질공급농도가 10, 15, 20%로 높아질수록 최종 배양시간에서 각각 6.5%, 7.0%, 8.0%로 증가하는 경향을 나타내었다.

기질공급형태의 영향

기질을 공급하는 형태도 균체 생육과 균체의 RNA 축적에 영향을 줄 수 있는 인자이다. 본 실험에서는 parabolic feeding을 실시했을 때 균체 생육과 RNA 축적에 미치는 영향을 exponential feeding했을 때와 비교하였다. 기질공급농도는 10%로 고정시킨 상태에서 3가지의 서로 다른 기질공급속도로 program (IV, V, VI)하여 기질을 공급하였다(Fig. 3). 최종 배양 시간은 각각 11(IV), 24(V), 24(VI)시간이었으며, 이때 균체량은 각각 10.4, 10.7, 12.6 g/l로 기질공급 program VI에서 다소 높은 결과를 얻었다. 이와 같은 결과는 exponential feeding에서 기질공급속도가 느릴수록 균체량 생산이 높다는 결과와 유사하였다(Fig. 1). 잔당은 3가

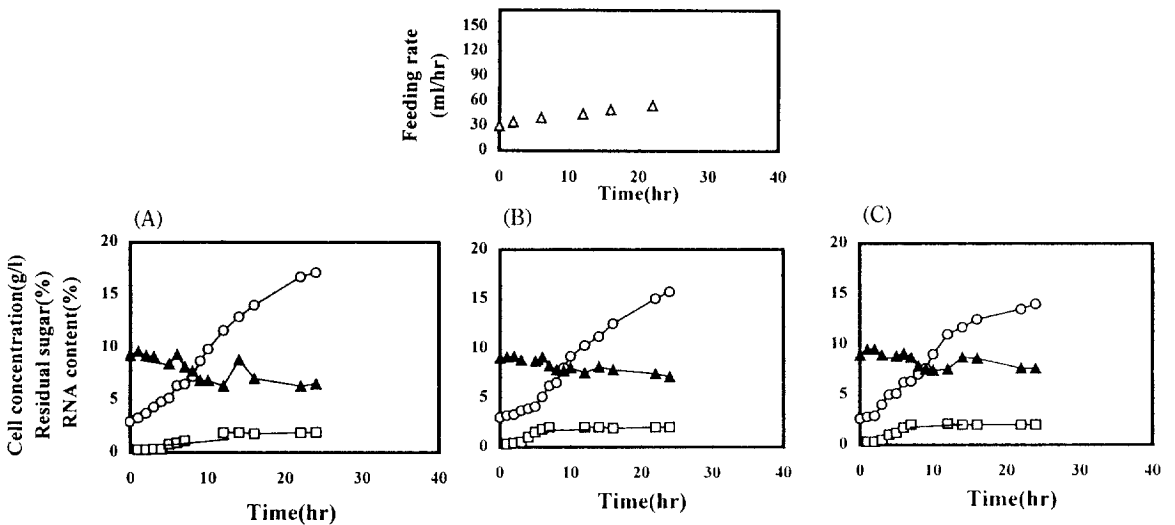


Fig. 2. Effect of total sugar concentrations of feeding media on the cell growth and the intracellular RNA accumulation during the exponential fed-batch fermentation A) Total sugar concentration of feeding media 10%, B) Total sugar concentration of feeding media 15%, C) Total sugar concentration of feeding media 20%, Δ — Δ ; Feeding rate, \circ — \circ ; Cell Concentration, \square — \square ; Residual sugar, \blacktriangle — \blacktriangle ; RNA content

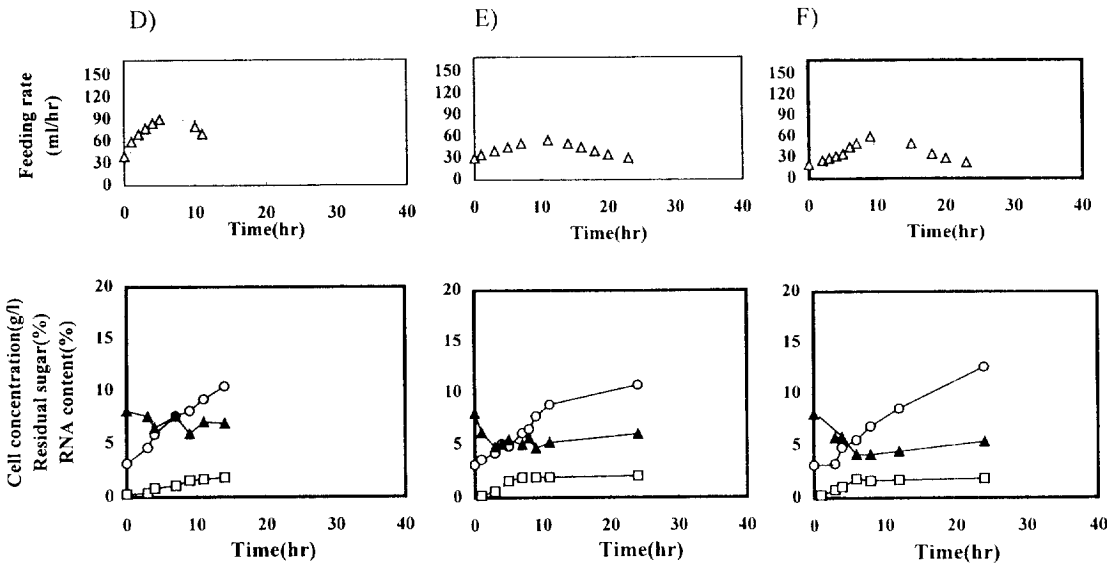


Fig. 3. Time course of cell concentrations (X), RNA contents (RNA/X), and residual sugars (RS) in the parabolical fed-batch fermentation of different feeding rates (Total sugar concentration of feeding media was 10%) D) Feeding program IV, E) Feeding program V, F) Feeding program VI, \triangle — \triangle ; Feeding rate, \circ — \circ ; Cell concentration, \square — \square ; Residual sugar, \blacktriangle — \blacktriangle ; RNA content

Table 1. Overall comparison of exponential fed-batch fermentation with parabolic fed-batch fermentation

Feeding pattern	Exponential	Parabolic
Cell concentration (g/l)	17.1	12.5
RNA content (%)	6.5	5.3
Residual sugar (%)	1.9	1.9
Cellular yield	0.47	0.36

지 실험 모두 2%를 넘지 않는 농도를 유지하였는데 그 값은 exponential feeding에서와 큰 차이가 없었고, 균체 수율(Yx/s)은 기질공급 program VI에서 0.36으로 가장 높은 결과를 보였다. 균체내 RNA 함량은 유가식 배양 초기에 8.0%의 함량을 나타내었다가 배양 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 최종 배양 시간에서는 각각 6.9%(IV), 5.3%(V), 5.0%(VI)를 나타내었고, exponential feeding에서와는 다르게 기질공급속도가 빠를수록 최종 세포내 RNA 함량은 증가하는 경향을 나타내었다.

두 가지 기질공급형태에서 균체생육에 가장 좋은 결과를 보여준 기질공급 program의 결과를 비교하면, exponential feeding(II)에서 균체량이 17.5 g/l, 균체 RNA 함량이 6.5%를 보여, 균체량이 12.6 g/l와 균체 RNA 함량이 5.0%인 parabolic feeding(VI)에 비하여 우수하였고, 균체 수율(Yx/s)도 0.47로서 parabolic feeding(VI)에서의 0.36에 비하여 월등히 높은 값을 보

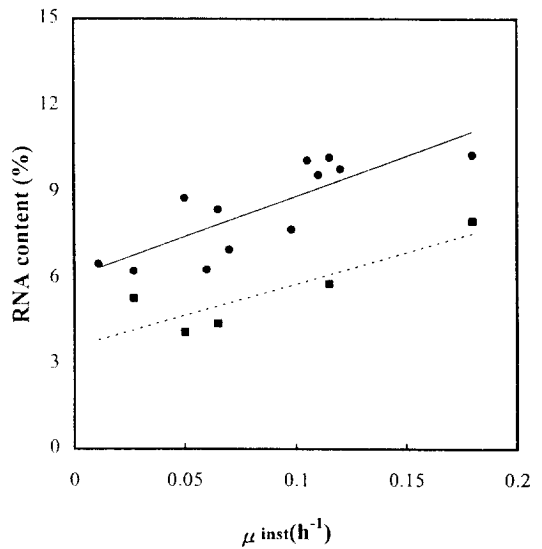


Fig. 4. The effect of instantaneous specific growth rate (μ_{inst}) on RNA contents in fed-batch fermentation \bullet — \bullet ; Exponential fed-batch fermentation, \blacksquare — \blacksquare ; Parabolic fed-batch fermentation

였다(Table 1). 이 결과는 parabolic 기질공급형태가 균체 생리적인 면에서 저장 안정성이 높고, 제빵효모의 경우 제빵 특성이 좋은 효모를 생산할 수 있어서 일반적으로 많이 이용되고 있는 것^(8,9)과는 다소 다른 결과

로, 균체량과 균체 수율을 높이고 RNA 함량이 높은 균체를 얻으려면 exponential feeding에 의해 기질을 공급하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

Fig. 4는 두 가지 기질공급형태중 각각의 instantaneous growth rate (μ_{ms})에서 균체내 RNA 함량을 나타낸 결과이다. 본 실험의 두가지 기질공급형태 모두에서 μ_{ms} 는 0.2 h⁻¹를 넘지 않았고, μ_{ms} 가 증가함에 따라 균체당 RNA 함량도 지속적으로 증가하였다. 그러나 일정한 μ_{ms} 에서 균체가 지나는 RNA 함량을 비교하면, exponential feeding이 parabolic feeding보다 2%가량 높은 RNA 함량을 나타내었다. 이와 같이 균체내 RNA 함량에 영향을 미치는 요인이 균체 생육속도 이외에도, 유가식 배양에서 기질공급형태에 따라 균체내 RNA 축적 상태가 달라짐을 알 수 있었다^(9,10,16,17).

요 약

Saccharomyces cerevisiae NS 2031의 유가식 배양에서 기질공급방법에 따라 효모 생육과 RNA 축적을 관찰하였다. Exponential feeding 형태에서 기질공급속도가 빠를 때 최종 배양 시간에서 균체량과 세포내 RNA 함량은 감소하는 경향을 나타내었으며, 배양시간이 경과함에 따라 균체내 RNA 함량은 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다. Exponential feeding 형태의 동일한 기질공급속도에서, 기질공급농도가 높을수록 최종 균체량은 감소하였으며, 균체수율(Yx/s)은 10%의 기질공급농도에서 0.47로 가장 높았다. 균체내 RNA 함량은 기질공급농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였다. Parabolic feeding 형태에서는 기질공급속도가 빠를수록 균체량은 감소하였으나, 균체내 RNA 함량은 증가하여 exponential feeding 형태에서와 다른 경향을 나타내었다. 두가지 기질공급형태에서 균체생육에 가장 좋은 기질공급 program의 결과를 비교해 보면, 균체량, 균체수율, 세포내 RNA 함량을 높이려면 exponential feeding 형태가 parabolic feeding 형태보다 유리하였다. 또한, 유가식 배양에서 같은 instantaneous growth rate (μ_{ms})에서 균체내 RNA 함량을 비교하면, exponential feeding이 parabolic feeding보다 2%가량 높게 유지되어, 기질공급형태가 균체내 RNA 축적 생리에 큰 영향을 주고 있음을 알았다.

문 헌

1. 太田靜行.: 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**, 29 (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. 김성룡, 권오성, 남희섭, 이형재 : 생육속도 및 배양온도가 RNA 축적과 autolysis 효율에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **27**, 129 (1995)
6. Harrison, J.S.: Yeast production. *Prog. Ind. Microbiol.*, **10**, 129 (1971)
7. Rosen, K.: Production of baker's yeast. In *Yeast Biotechnology*, Berry, D.R., Russel, I. and Stewart, G.G., (ed.), Allen & Unwin Press, London, p.471 (1984)
8. Rong-Qiao, H., Jung, X., Li, C.Y. and Xiu-An, Z.: The principle of parabolic feed for a fed-batch culture of baker's yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 145 (1993)
9. Chen, S.L. and Chiger, M.: Production of baker's yeast. In *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press, p.429 (1985)
10. O'conner, G.M., Fernando, S.R. and Charles, L.C.: Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 293 (1992)
11. Joao, C.C., Eugenio, A., Milton, L.B., Sunao, S. and Walter, B.: Fed-batch alcoholic fermentation of sugar cane blackstrap molasses-Influence of the feeding rate on yeast yield and productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 596 (1993)
12. Reed, G. and Nagodawithana, T.W.: Baker's Yeast production. In *Yeast Technology*, 2nd ed., AVI Book Inc., New York, p.261 (1991)
13. Reed, G.: Production of baker's yeast. In *Prescott & Dunn's Industrial microbiology*, 4th ed., AVI Book Inc., Conneticut, p.593 (1982)
14. Dubois, M., Rebers, P.A., Gilles, K.A. and Hamilton, J. K.: Analysis of total carbohydrates by phenol reaction. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
15. Park, S.C. and Boratti, J.: Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 304 (1991)
16. 三木克哉 and Frank, H.: 酵母菌體の製造方法. 日本公開特許 平 5-176757 (1993)
17. Jeewon, L. and Satish, J.P.: Enhanced production of α -amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN 106 [PAT5]. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1142 (1993)

(1995년 9월 18일 접수)