

생존능이 증진된 활성 건조효모 생산을 위한 효모세포배양

†김 근·김 재 윤
수원대학교 유전공학과
(접수 : 1999. 8. 20., 게재승인 : 1999. 10. 1.)

Yeast Cell Cultivation to Produce Active Dry Yeast with Improved Viability

Keun Kim† and Jae-Youn Kim
Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon P. O. Box 77, 445-743, Korea
(Received : 1999. 8. 20., Accepted : 1999. 10. 1.)

Optimum conditions for vacuum-drying and cultivation of yeast cells for the production of active dry yeast were examined. At lower temperature, more drying time was required to dry the yeast pellet to reach the desirable water content (8%). Optimum temperature of vacuum oven and time for drying was 63°C and 90 min, respectively. Optimum medium composition for flask culture using cane molasses as the substrate were 0.25% sugar, 0.013% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, and 0.125% (NH₄)₂SO₄. Culture temperature 25°C gave the highest survival rate of dried yeast. After finishing fed-batch culture and the culture was left in the fermentor without adding any sugar or nutrient, survival rate of the dried yeast harvested from the fermentor increased to 86.0% after 36 hr. It was also observed that the yeast cells with higher budding rates showed lower survival rate.

Key Words : active dry yeast, dehydration, survival rate, culture condition

서 론

우리나라에서의 활성효모 수요량은 사료산업, 제빵산업, 양조용 주모생산산업등의 발전과 더불어 증대될 것이다. 활성효모의 공급에서 가장 중요시 되고 있는 것은 바로 효모의 활성도이다. 효모생산 방법 및 제품 제조공정, 유통 방법 및 기간, 유통 방법 부적합 등 여러 원인에 의해서 효모의 활성도가 급격히 감소하는 문제점을 나타내고 있다. 효모는 압착생효모(compressed yeast or cake yeast)와 건조효모(active dry yeast)의 두가지 형태로 유통된다. 압착생효모는 고형분 함량이 20~30% 되는 제품으로 신선한 상태에서는 활성이 좋으나 보관온도와 시간에 따라서 활성이 급격히 떨어지며, 활성을 유지하기 위해서는 4°C에서 보관하며 사용하여야 한다. 활성건조효모는 압착생효모보다는 활성이 낮지만 더 오랜기간 저장할 수 있다.

우리나라의 유통구조상 냉장유통을 공급자에서 소비자까지 지속시키는 것은 중간 유통체계의 영리추구가 번번히 이루어지고

있기 때문에 어렵다. 그래서 품질유지의 어려움이 뒤따르게 마련이다. 또한 취급자의 부주의로 인해 활성도 유지는 어려워지게 되고 정량보다 많이 사용하게 되는 원인이 되며 효모를 이용한 제품생산 단가를 높이는 결과를 초래하기도 한다. 이러한 여러가지 요인으로 효모의 활성도가 저하되는 것을 막기 위하여 효모 세포 자체의 내구성을 증진 시키고, 저장 안정성이 높은 효모를 생산할 필요성이 제시된다. 특히 저장 안정성에는 cell life cycle, 세포내 저장탄수화물인 trehalose가 크게 영향을 미치고(1, 2, 3), cell life cycle, trehalose의 함량은 다시 배양방식에 많이 좌우되는 것으로 알려져 있다(4). 또한 보통 효모는 건조균체생산시 균체로 부터 탈수하는 과정동안 사멸율이 매우 높다.

따라서 본 연구에서는 저장 안정성이 증진되며, 내구성이 증진된 효모를 생산하기 위해 일차적으로 건조후 사멸율이 적은 균주를 생산하기 위하여 우수 균주선별과, 배양배지 및 배양조건 등을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

균 주

국내의 건조효모 상품으로 시판되고 있는 균주, 국내 주정생산균주, 국내에서 새로 분리한 균주, 외국분양기관(NRRL)에서 분양받은 균주등 13균주의 *Saccharomyces*속에 속하는 효모 균주를 사용하였다.

† Corresponding Author : Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon P. O. Box 77, 445-743, Korea
Tel : 0331-220-2344, Fax : 0331-220-2344
E-mail : kkim@mail.suwon.ac.kr

배지 및 배양

일반적 효모성장배지로는 액체배지의 경우 1%(w/v) yeast extract(Y), 2%(w/v) peptone(P), 2%(w/v) dextrose(D)를 사용하였고 고체배지에는 상기의 액체배지 YPD에 2%(w/v) agar를 첨가하였다. 건조효모생산을 위한 배양배지로는 약 46~50%의 total sugar를 포함하는 당밀(cane molasses)을 동량의 D.W.와 혼합후 10여분간 끓이고 식힌 다음 원심분리하여 불순 침전물을 제거하고, 실험에 따라 (보통은 최종 total sugar가 2% 되게) 적당히 희석하고 0.013% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.5% (NH₄)₂SO₄를 첨가하고 pH 5로 조정된 다음 사용하였다. 액체배양은 30°C rotary shaking incubator에서 200 rpm의 속도로 배양하였다.

발효조

한국발효기 제품의 2.5 L 와 5 L 용량의 발효기를 사용하였다. 특별한 경우를 제외하고는 보통 온도 30°C, agitation 200 rpm, 통기율 1 vvm, pH 4.5~5.0에서 운전하였다. 유가식 배양에는 무기염류용액 5배 농축액 [0.065% K₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 2.5% (NH₄)₂SO₄] 20 mL와 16%당을 포함하는 당밀 희석액 적당량 그리고 D.W.를 매시간 한번씩 1 L working volume의 당밀배지의 배양액에 11시간 동안 투여하였다. 여기에서 세포가 증식함에 따라 투여당량은 증가시켰다.

균체건조

효모세포 배양액 300 mL를 8000 rpm으로 원심분리(Hitachi centrifuge, Japan)하여 얻어진 cell pellet 0.5 g을 직경 5 cm 알루미늄 접시에 올려 놓고 63°C vacuum oven에서 1.5 시간 동안 건조시켰다. 진공은 freeze dryer(EYELA Model FD-1, Japan)의 진공펌프에 의해 이루어졌다. 완전히 탈수된 건조 pellet무게를 측정시에는 0.5 g의 cell pellet을 105°C에서 12 시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다.

Cell counting

Viable cell count는 YPD 고체 배지 plate를 사용하여 spread plate method로 측정하였고, total cell count는 haemocytometer를 사용하여 400 배의 배율로 광학현미경을 사용하여 계수하였다.

세포 생존율(Cell survival rate)

건조전 혹은 건조후 cell pellet을 30 mL D.W.에 넣고 40~43°C 수조에서 10분간 rehydration 한 후 세포현탁액을 만들고 이로부터 viable cell count를 측정하였다. 세포생존율은 건조전 viable cell number에 대한 건조후 viable cell number의 백분율(%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

건조조건

진공건조 동안에 수분감소에 따른 물체의 온도 변화를 알아보기 위하여 온도계 아래 끝 부분을 젖은 솜으로 싸고 진공오븐 안에 넣고 온도변화를 관찰하였다(Figure 1). 오븐내부의 온도는 60°C로 계속 유지되었고, 젖은 솜을 가진 온도계는 진공상태에서 초기 42°C에서 수분증발 시 증발열의 상실로 급격한 온도 감소를 나타내었다. 21분 후에서 65분까지 -10°C를 유지하다가 서서히 온도가 오르기 시작하여 260분 후에는 61°C로 회복되었다.

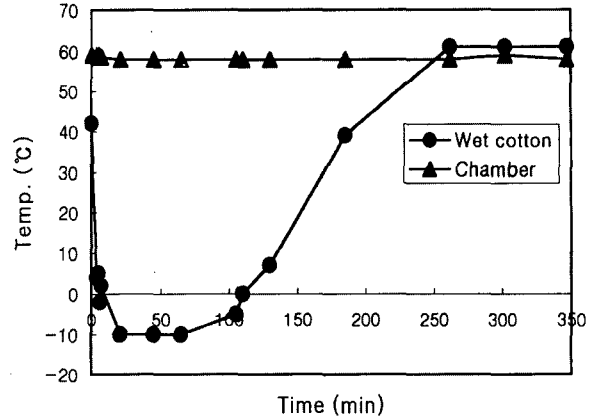


Figure 1. Change of temperature of wet cotton and chamber interior during vacuum-drying

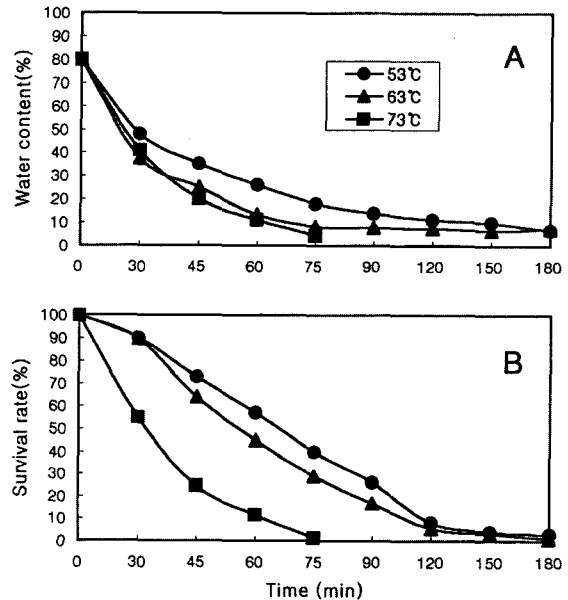


Figure 2. Effect of drying time on the water content of cell pellet (A) and the survival rate (B) of yeast BY-L.

따라서 효모세포도 건조 시에 영하로 내려가는 급격한 온도변화에서도 살아남을 수 있는 내성이 요구된다. 오븐 chamber내부의 온도가 cell pellet 수분함량과 세포 생존율에 미치는 영향을 건조시간별로 조사하였고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 일반적으로 시판되는 활성 건조효모는 8%건조의 수분함량이 적당한데(5) 오븐온도가 올라감에 따라 8%정도의 수분함량 만큼 건조하는데 걸리는 시간이 감소되었다. 53, 63, 73°C 경우 각각 180, 90, 65분이 소요되었다. 한편 8%정도의 수분함량만 되기 위해 건조를 하기 위한 각 온도의 건조시간인 53°C 180분, 63°C 90분, 73°C 65분의 경우 건조 후 세포생존율이 각각 2.8, 16.7, 10.2%로서 63°C의 경우가 가장 생존율이 높아서 63°C의 오븐온도를 앞으로의 효모세포 건조 실험에 사용하기로 결정하였다.

Table 1은 여러 다른 무게의 cell pellet을 건조시켰을 때 건조된 cell pellet의 수분함량을 조사한 것인데, 건조전 초기 cell pellet의 무게가 0.5에서 2.0 g까지인 경우 건조 후 수분함량이 모두

Table 1. Effect of initial wet cell weight on the water content of dried cell pellet.

	Wet cell pellet weight(g) before drying		
	0.5	1.0	2.0
Water content(%) in the dried cell pellet	6.4	6.2	6.2

One loopful of activated yeast BY-L was inoculated into 300 mL YPD and the culture was cultivated at 30°C for 2 days.

Table 2. Effect of rehydration temperature on the survival rate of dried yeast KY4.

	Temperature (°C)				
	25	30	35	40	45
Survival rate(%)	3.8	2.5	8.5	18.5	2.6

One loopful of activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing 0.25% sugar and cultivated at 30°C in a rotary shaking incubator for 2 days.

8%미만으로 적절하였음을 보여주었다. 일반적으로 *S. cerevisiae* 효모는 생존능이 있는 상태로 15~20%의 수분함량까지 낮출 수 있는데 이 수분함량은 물론 더 낮은 12~13% 수분함량도 세포를 장기간동안 보존하는 데에는 적당하지 않고, 8-10%의 수분함량으로 더 낮추어야 장기간 보존에 효과가 있다고 알려져 있다(6).

Rehydration 온도

Table 2는 건조 후 다시 cell을 rehydration시킬 때 생존율이 가장 높은 온도를 결정하는 실험결과이다. 여기에서 생존율 18.5%를 나타낸 40°C가 가장 좋은 rehydration 온도로 나타났으며 그 다음은 8.5%의 생존율을 나타낸 35°C이었고, 30°C 이하나 45°C에서는 생존율이 2.5~3.8%로 낮게 나타났다. 보통 건조효모는 40~43°C에서 rehydration하는 것이 좋으며, 이보다 낮은 온도에서 rehydration시키면 효모세포의 내용물이 세포 밖으로 용출된다고 하며(6), 너무 높은 온도에서는 사멸하게 된다(7).

우수균주 선별

Table 3은 우수 균주를 선별하기 위해 13주의 효모 세포들의 건조 후 세포생존율을 조사한 결과이다. 여기에서 KY3과 NRRL Y2416이 각각 19.10, 16.30%으로서 국내 (KY4, KY5), 국외 (KY1) 건조효모제품의 균주들 보다 생존율이 높게 나왔다. 특히 국내 주정 공장에서 현재 생산에 쓰이고 있는 발원 1호 균주인 BY-L, BY-A주는 제일 낮은 생존율(3% 이하)을 나타내었다. 건조에 대한 효모세포의 내성은 효모의 종류에 따라 다르게 나타나는 데 특히 효모 세포의 화학적 구성 성분을 결정하는 분류학적 그리고 생리학적 성질에 많이 좌우되고, 같은 종(species)내의 효모에서도 건조에 대한 내성이 크게 차이가 난다고 알려져 있다(6).

최적배양조건

KY3 균주를 써서 배지성분과 배양온도 등에서의 최적 배양조건을 flask배양을 통하여 조사하였다. Table 4는 당밀 배지 내의 당 농도가 건조 후 세포생존율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 배지내의 당 농도가 2.00%에서 0.25%로 내려감에 따라 건조 후

Table 3. Survival rate of various yeast strains after drying.

Yeast strain	Survival rate(%)
BY-L	2.42
BY-A	2.99
KY1	4.77
KY2	3.91
KY3	19.10
KY4	15.00
KY5	6.50
KY6	5.60
KY7	10.90
KY8	6.40
KY9	8.90
NRRL-Y567	7.10
NRRL-Y2416	16.30

One loopful of each activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing 2% total sugar and cultivated at 30°C for 2 days in a rotary shaking incubator. The harvest yeast pellet 0.5 g was dried at 63°C in a vacuum oven for 1.5 hr

Table 4. Effect of sugar concentration in molasses broth on the survival rate of yeast KY3 after drying.

	Sugar conc. (%)				
	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00
Survival rate(%)	15.0	36.8	34.7	23.1	19.0

One loopful of activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing various concentration of total sugar, 0.013% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, and 0.5% (NH₄)₂SO₄ and cultivated at 30°C in a rotary shaking incubator.

Table 5. Effect of (NH₄)₂SO₄ concentration on the survival rate of yeast KY3 after drying.

	(NH ₄) ₂ SO ₄ conc. (%)			
	0.125	0.25	0.50	1.00
Survival rate(%)	69.2	43.8	38.5	42.6
Biomass(g/L)	6.2	5.5	6.0	5.7

One loopful of activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing 0.25% total sugar, 0.013% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, and different concentrations of (NH₄)₂SO₄ and cultivated at 30°C in a rotary shaking incubator.

Table 6. Effect of K₂HPO₄ and KH₂PO₄ concentration on the survival rate of KY3 after drying^a.

	K ₂ HPO ₄ and KH ₂ PO ₄ conc.			
	1/4 × ^b	1/2 ×	1 ×	2 ×
Survival rate(%)	54.2	60.2	67.0	50.1
Biomass(g/L)	5.0	4.7	4.8	4.7

^a One loopful of activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing various levels of phosphate(K₂HPO₄ and KH₂PO₄, 0.25% total sugar, and 0.125% (NH₄)₂SO₄, and cultivated at 30°C in a rotary shaking incubator.

^b 1 × means K₂HPO₄ 0.13(g/L), and KH₂PO₄ 1(g/L) and 1/4 × means 1/4 concentration of 1 ×, etc.

세포 생존율은 점진적으로 증가하여 0.25%의 당 농도에서 36.8%의 최고 세포 생존율을 보였다. 그러나 0.25%당 농도보다 더 낮은 당 농도 0.13%에서는 생존율은 15.0%로 하락하였으며 biomass 생산량도 매우 저조하였다(data not shown). Table 5는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 한 당밀 배지에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가량이 건조 후 세포생존율에 미치는 영향을 조사한 결과인데 0.25-1.00%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에서는 38.5~43.8%의 생존율을 나타내 큰 차이는 보이지 않았으나 0.125%의 낮은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에서는 갑자기 69.2%의 높은 세포생존율을 나타내었다. 한편 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가농도의 변화는 biomass 생산량의 변화에는 영향을 미치지 못하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가 농도의 증감에 따른 biomass의 증감은 관찰되지 않았다. Table 6는 배지내의 인의 첨가농도가 건조 후 세포 생존율에 미치는 영향을 나타낸 것인데, 1×의 인농도 즉 0.013%의 K_2HPO_4 및 0.1%의 KH_2PO_4 농도에서 67.0%의 최고 생존율을 나타내었다. 그러나 인의 첨가농도의 변화는 앞에서의 질소원의 첨가농도에서와는 다르게 그다지 큰 세포 생존율의 증감효과는 나타내지를 않았다. 또한 인첨가농도의 변화는 질소원의 경우와 유사하게 biomass 생산량의 증감에도 영향을 미치지 못하였다. Table 7은 배양온도가 건조 후 세포생존율에 미치는 영향을 나타낸 것인데 biomass 생산량을 비교해 보면 30°C가 세포 성장에 있어서는 최적 온도인 것을 알 수 있고 35°C에서는 성장이 매우 저조하였다. 한편 세포생존율을 비교해 보면 낮은 온도로 갈수록 세포 생존율이 증가하여 25°C에서 84.2%의 최고 생존율을 나타내었다.

이상에서 나타난 바와 같이 배양조건에 따라 건조 후 세포 생존율이 많이 달라짐을 알 수 있다. 특히 배지내의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 가장 낮은 농도에서 건조 후 세포 생존율이 가장 좋게 나타났는데, 그 이유는 세포내의 낮은 질소 함량이 더 높은 건조 후 생존율을 나타낸다는 사실(6, 8)에 비추어 볼 때 낮은 질소 배지농도가 낮은 세포 내 질소 농도를 이루게 하고, 낮은 세포 내 질소 농도가 높은 건조 후 생존율을 초래하였다고 분석된다. 일반적으로 배지 내에 질소원 성분이 증가하면 biomass의 단백질과 RNA 함량이 증가하고, 이에 따라 이들 macromolecule에 결합된 물분자의 양이 증가하게 되는데 이들 물분자가 건조시에 추출 제거되어질 때 macromolecule에 비가역적인 손상을 가져다 준다(6). 따라서 건조효모 생산용 배지에서는 과량의 질소원 첨가는 삼가야 할 것으로 사료된다.

위에서 나타난 배지조건을 사용하여 유가식 효모 배양을 하여 보았는데 소모된 당에 대비한 biomass 생산효율은 44.4%이었다. 미생물의 성장속도는 unbudded-cell 혹은 budding-cell phase의 점유비율에 영향을 끼치며, 낮은 성장률에서는 unbudded cell의 점유율이 높아지며, 호흡율은 높아지고, 알콜은 거의 생산되지 않으며, biomass의 생산효율은 높아진다(9). 이 낮은 성장률에서는 또한 세포내의 trehalose의 함량이 높아져서, 건조 후 세포 생존율을 높이는 데에 기여한다(9). 이 낮은 성장률은 유가식 배양방법에 의하여 잘 이루어질 수 있다(9). He 등(4)은 유가식 배양에 의한 활성건조 효모생산에 있어 parabolic nutrient supplementation이 exponential nutrient supplementation보다 더 적은 당의 소비로 더 많은 biomass와 건조에 더 강한 세포를 생산할 수 있었다고 보고하였다. 한편 유가식 배양후에 당과 영양소를 첨가하지 않은 상태로 통기를 거의 줄이고 숙성을 시켜 보았는데 시간이 지날수록 budding rate가 줄어들고, 건조 후 생존율이 증가함을 관찰하였다(Table 8). Krallish 등(10)은 exponential growth phase에서 수집한 효모세포는 건조에 민감하게 되어, 건조동안에 호흡능 뿐

Table 7. Effect of culture temperature on the survival rate of KY3 after drying.

	Survival rate(%) at different temperature		
	25	30	35
Survival rate(%)	84.2	69.2	52.1
Biomass(g/L)	4.1	4.8	2.0

One loopful of activated culture was inoculated into 300 mL molasses broth containing 0.25% total sugar, 0.013% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , and 0.125% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and cultivated at different temperatures in a rotary shaking incubator.

Table 8. The effect of incubation time after fed-batch culture on the survival rate of dried cell and budding rate.

Incubation time (hr)	Survival rate ^a (%)	Budding rate ^b (%)	Cell No. ^c ($\times 10^8/\text{mL}$)
12	37.8	19.7	6.8
38	86.0	13.3	6.8

^a Survival rate of dried yeast right after dehydration.

^b Percentage of budding cell number per total cell number.

^c Cell number per milliliter in a final culture broth.

만 아니라 adenosine phosphate의 상당량을 상실하여 많은 세포가 사멸하게 된다고 보고하였다. Stationary growth phase에 있는 효모는 건조에 강하게 되며 세포내의 탄수화물은 미토콘드리아에서 산화함으로써 ATP를 축적하고, 이 축적된 ATP가 건조세포를 다시 활성화시키는 초기에 에너지원으로 사용된다고 하였다(10). 따라서 성장이 왕성한 exponential growth phase에서 효모세포를 harvest하는 것 보다 숙성기간을 거친 stationary growth phase에 있는 효모를 harvest하여 건조시키는 것이 활성건조 효모생산에 더 바람직하다.

한편 본 연구의 다른 실험에서도 exponential growth phase의 빠르게 증식하고 있는 상태의 효모를 건조시키는 실험을 여러 차례 행한 결과 건조 후 세포 생존율이 stationary growth phase의 효모세포보다 생존율이 적은 것으로 나타났는데(data not shown), 이는 budding하는 어린 세포들이 stress에 약하고, 대수기에 있는 세포들이 건조시에 ATP와 호흡능은 많이 상실하며(10), stress에 내성을 증가시켜주는 trehalose의 축적이 적게되는 이유(9)들 때문으로 분석된다.

요 약

건조활성효모 생산을 위한 진공 건조와 효모세포배양의 최적 조건을 조사하였다. 건조 활성효모의 적정 수분함량 8%에 도달하기 위해서는 낮은 온도에서 건조할수록 더 오랜 시간이 걸렸다. 건조를 위한 적정 진공오븐의 온도는 63°C이었고 시간은 90분이었다. 플라스크 배양에서의 최적 배지조건은 당밀의 경우 0.25% 당, 0.013% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.125% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이었고 최적온도는 25°C이었다. 유가식 배양이 끝난후 당을 공급하지 않고 방치하는 동안 시간이 지날수록 세포 출아율은 감소하였고, 생존능은 증가하였다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부의 생물화학공학 학술연구조성비의 지원(97-B1-14)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Crowe, J. H. and L. M. Crowe (1984), Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose, *Science*, **223**, 701-703.
2. Dijk, P. V., D. Colavizza, P. Smet, and J. M. Thevelein(1995), Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 109-115.
3. Ling, Z. Y., S. Morimura, and K. Kida (1995), Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation, *Ferment. Bioeng.*, **80**, 204-207.
4. He, R-Q., J. Xu, C-Y. Li and X-A. Zhao (1993), The principle of parabolic feed for a fed-batch culture of baker's yeast, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 145-155
5. Rosen, K. (1987), Production of baker's yeast, *Yeast Biotechnology* (D. R. Berry, I. Russell and G. G. Stewart, eds.), p. 471, Allen & Unwin, London.
6. Beker, M. J. and A. I. Rapoport (1987), Conservation of yeasts by dehydration. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol* **35**, 127-171
7. Herrera, T., W. H. Peterson and E and J Cooper and H. J. Pepler (1956), Loss of cell constituents on reconstruction of active dry yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 131-143.
8. Reed, G. (1982), Production of baker's yeast, *Industrial microbiology* (G. Reed, ed.) p. 593, Westport, AVI.
9. Barford, J. P. (1987), The technology of aerobic yeast growth, *Yeast Biotechnology* (D. R. Berry, I. Russell, and G. G. Stewart, eds.), p. 200, Allen & Unwin, London.
10. Krallish, I. L., B. E. Damberga and M. J. Beker (1989), State of adenosine phosphates during dehydration of yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 194-199.