

Saccharomyces cerevisiae Hansen CBS5926의 고농도 배양 및 동결건조 보존

방규호 · 김갑진¹ · 오덕환¹ · 이영하^{2*}

코오롱제약(주) 기술연구소, ¹(주) 고합 대덕연구소, ²충남대학교 자연과학대학 미생물학과

정장용 효모로 알려져 있는 *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS5926의 생균제 제조를 목적으로 생균수 증대를 위한 배양조건과 배양 후 얻은 균체의 효과적인 동결건조 보존법에 관하여 조사하였다. 포도당을 탄소원으로 하는 회분식과 유기식 배양에 비해 에탄올을 탄소원으로 하는 유기식 배양이 장점이 많은 것으로 나타났으며, 배양 72시간 후 2.2×10^9 cfu/ml의 생균수와 38 g/l의 건조 균체량을 얻을 수 있었다. 에탄올을 탄소원으로 하는 유기식 배양으로부터 얻은 균체의 동결보존을 위한 보호제의 효능을 비교한 결과, 20% 백당 (w/v)과 30% 유당 (w/v)에서의 생존율이 16.3%로서 비교된 다른 종류의 동결보호제보다 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 백당, 유당 및 탈지분유의 혼합에 의한 동해방지 보호 효과를 비교한 결과 생존율이 12.4~16.5%로서 보호제의 혼합에 따른 생존율의 상승효과는 나타나지 않았다.

Key words □ cryoprotective effect, freeze-drying, high-density cultivation, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS5926

*Saccharomyces cerevisiae*는 인류가 가장 오래 전부터 이용해 왔던 미생물이다. 이 효모는 핵산, 효소, 지질 및 단백질 등의 원료로서(12) 제빵, 제과 및 주류산업에 이용되어 왔을 뿐 아니라, 효모의 자가소화(autolysis)에 의해 생산된 효모 추출액은 미생물 배지, 조미료 및 건강식품의 원료로서 사용되고 있다 (9). 또한, 효모 추출액 제조시 부산물로 얻게 되는 세포벽 성분은 비타민 D₂ 및 ergocalciferol의 원료인 ergosterol의 주 공급원으로도 알려져 있으며(3), 이외에도 최근 활발히 연구되고 있는 생리활성물질인 glucan은 비수용성의 다당류로서 면역조절 기능을 지니고 있어 의약품 및 건강식품 등으로 개발되고 있다 (7). 이처럼 효모의 산업적 유용성은 다른 미생물에 비해 매우 높다. 그러나, 현재까지 효모의 산업적 이용에 관해 알려져 있는 대부분의 연구는 효모가 생산하는 발효산물 및 생리활성물질에 초점이 맞추어져 있을 뿐, 생균제제로서 효모 자체가 의약품으로 이용되고 있다는 사실은 상대적으로 잘 알려져 있지 않다.

1920년대에 프랑스의 Henri Boulard에 의해 인도차이나 반도의 망고열매 껍질에서 분리된 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 균은 1962년 이후 생균제제의 정장용 의약품으로 개발되어 유럽을 중심으로 현재까지 사용되고 있는 효모이다(4, 5). 정장효과를 지니는 생균제제 산업에서 가장 중요한 것은 매우 높은 수준의 생균을 생산하고 유지하는 것이다. 생균을 보존하기 위해 산업적으로 이용되고 있는 동결건조의 경우, 액체질소에서 균주를 보관하는 동결보존에 비해 보관과 취급에 편리한 점이 많지만 동결건조 과정 중에 동해를 입고 생균수가 감소하는 문

제점을 안고 있다(8). 따라서 생균제제로서 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 효모균을 생산하여 정장용 효모로 이용하기 위해서는 고농도 배양이 가능하고 그로부터 많은 생균수를 얻을 수 있어야 하며, 이들이 동결건조 과정을 거치면서 생균수가 적절하게 유지되기 위한 동결보존 방안이 확보되어야 한다. 그러나 정장용 생균제제로 유산균을 대상으로 한 연구가 많이 이루어지고 있는데 반하여 효모를 대상으로 한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 정장용 효모 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 균의 산업적 생산을 위한 기초연구로서 에탄올을 기질로 하여 다른 미생물의 오염을 줄이면서 성상이 좋은 고농도의 효모 세포를 얻기 위한 발효조건과 획득된 균체를 효과적으로 동결건조 보존하기 위한 방법에 대하여 조사하였다. 본 연구에서 수행된 결과는 고부가가치의 의약품 정장 효모의 산업적 응용을 위한 기초 자료로서 이용 가능할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 캐나다 Rosell Institute Inc.에서 공급받은 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 균이다. 종균배양용 배지는 YM broth(10)를 사용하였다. 회분 및 유기식 배양을 위한 기본배지 조성은 yeast extract 10.0 g/l, malt extract 10.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, KH₂PO₄ 6.0 g/l, Na-citrate 1.0 g/l, trace-metal solution 10 g/l (CaCl₂·2H₂O 11.0 mg/l, FeSO₄·7H₂O 7.0 mg/l, MnSO₄·5H₂O 2.0 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 2.0 mg/l, CuSO₄·

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 042-821-6413, Fax : 042-822-7367
E-mail : yhrhee@hanbat.chungnam.ac.kr

5H₂O 0.4 mg/l, CoCl₂·6H₂O 0.4 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 mg/l, H₃BO₄ 0.5 mg/l)이며, 배양액의 pH는 1N NaOH 용액을 사용하여 멸균전에 6.0으로 조정하였다.

유가식 배양을 위한 feed용 배지의 조성은 yeast extract 30.0 g/l, malt extract 10.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, Na-citrate 1.0 g/l, trace-metal solution 5 ml/l 이었으며, 탄소원으로서 함수 포도당(450 g/l)과 에탄올(300 g/l)을 각각 사용하였다.

배양방법

한천평판 배지에 보관중이던 보존균주 1 백급이를 취하여 50 ml의 YM broth를 포함하는 250 ml 삼각 플라스크에서 30°C로 24시간 배양한 것을 회분식 배양을 위한 종균으로 사용하였으며, 유가식 배양을 위해서는 5 l 삼각 플라스크에서 YM broth 1 l에 배양한 종균을 사용하였다.

회분식 배양은 5 l Jar fermenter (MD300, Marubishi, Japan)에서 3 l의 멸균된 기본배지 조성에 50 ml의 종균 배양액을 접종하고 초기 탄소원 농도로는 포도당을 100 g/l로 첨가하여 수행하였다. 유가식 배양은 30 l pilot plant (Hitachi, Japan)를 사용하여 종균 배양액 1 l를 접종 후 균의 호흡율 (respiratory quotient)에 따라 탄소원의 공급속도를 조절하여 실시하였다. 배양온도는 모두 30°C로 하였으며, pH 제어는 1N NaOH용액을 사용하여 pH를 6.0으로 유지시켜 주었다.

동결건조

동결보호제는 이당류 2종류 (lactose, sucrose), 탈지분유, 펩톤, GCGS(gelatin 5%, sodium citrate 5%, monosodium glutamate 20%, sucrose 10%)(2), 글리세롤, 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 및 이들을 조합한 것을 선정하였고, 대조용으로는 생리식염수를 사용하였다. 동결건조를 위하여서는 배양액을 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 균을 회수하고 여기에 동결보호제액을 넣어서 혼합시킨 후 냉장고에서 1시간 방치하였고, 이것을 -25°C의 alpha I-6 freezer (Christ, Germany)에 넣어서 신속동결을 행한 다음 0.1~0.07 atm에서 24시간 동안 건조하였다.

생균수 측정법

생균수 측정용 배지는 YEPD 한천배지(yeast extract 10 g, peptone 20 g, glucose 20 g, 한천 20 g, 0.25% 클로람페니콜 10 ml, 증류수 1 l)를 사용하였다. 동결건조가 끝난 시료는 매회 수분을 측정하고 수분 함유량만큼 보정된 시료를 채취하여 계열희석법에 따라 희석한 다음, 희석액을 YEPD 한천배지와 섞고 30°C에서 48시간 배양 후 나타난 집락으로 생균수를 측정하였다.

분석방법

균의 증식속도는 건조 균체량에 의하여 측정하였다. 채취한 배양액은 5°C로 급냉하고 1 ml를 원심분리 후 아세톤으로 세척하고 잔류물을 dry oven에서 80°C로 항량이 될 때까지 건조하여 건조균체량 (g/l)을 환산하였다. 배지중의 포도당 농도는 Glucose kit (Glucoscot GT-4310, Daiichi, Japan)를 사용하여 측정하였고, 에탄올 농도는 n-butanol을 internal standard로 하여

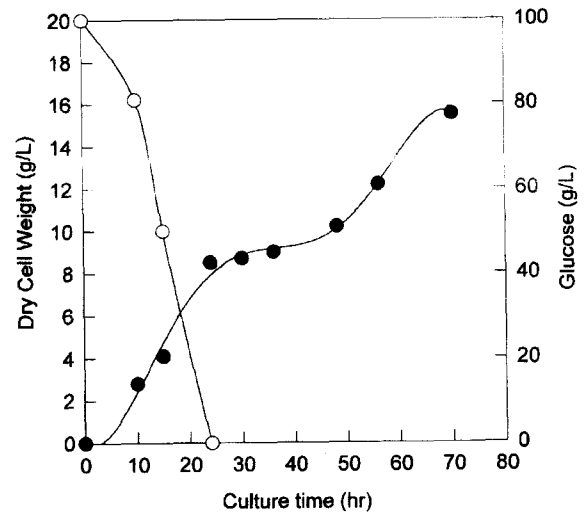


Fig. 1. Batch culture profile of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 using glucose as the sole carbon source. Symbols: ●, dry cell weight; ○, glucose.

gas chromatography (G3000, Hitachi, Japan)를 이용하여 정량하였으며, 균의 호흡율은 Infrared O₂, CO₂ gas analyzer (Horiba, Japan)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

회분식 배양

S. cerevisiae Hansen CBS5926 균을 교반속도 500 rpm, 통기량 1 vvm의 조건으로 회분배양한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체농도는 초기 0.06 g/l에서 포도당이 고갈되는 24시간 후 8.2 g/l에 도달하였으며, 36시간까지 정체기를 거친 후에는 다시 서서히 증가하기 시작하여 70시간째에는 15.8 g/l에 도달하였다. 초기에 과량으로 넣어준 포도당에 의하여 lag time이 상당히 길어졌으나 초기에 넣어준 당을 이용하여 자라면서 에탄올발효가 일어나고, 포도당의 고갈 후 배양액 중에 생성된 에탄올을 소모하면서 다시 성장한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 균체를 얻기에는 회분식 배양의 효율성이 낮은 것으로 판단되었다.

포도당을 이용한 유가식 배양

초기의 포도당 농도를 50 g/l로 하여 배양을 개시함으로써 lag time을 줄이고 균체농도를 증가시키고자 유가식 배양을 실시하였다. 초기 통기조건은 1.0 vvm으로 유지시키고 교반속도는 300 rpm으로부터 600 rpm까지 단계적으로 증가시켜 주었으며, 교반속도가 600 rpm으로 도달한 후에는 공기유량을 5.0 vvm까지 증가시켜 주었다. 배양 결과는 Fig. 2와 같다. 전체 배양시간을 회분식 배양보다 단축하였으나 54시간만에 건조균체는 27 g/l에 도달하였으며, 이 때의 생균수는 1.2×10^9 cfu/ml이었다. 배양 40시간 이후 용존산소의 고갈로 인하여 증식속도는 감소하였으나, 순수산소의 공급과 포도당이 계속적으로 공급된다면

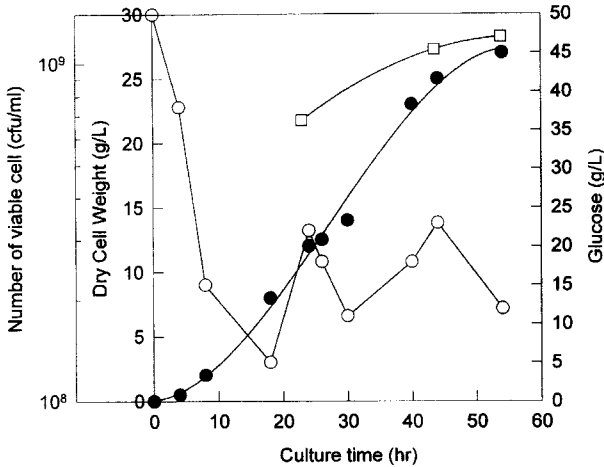


Fig. 2. Fed-batch culture profile of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 using glucose as a sole carbon source. Symbols: ●, dry cell weight; ○, glucose; □, number of viable cells.

균체농도를 보다 증가시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

에탄올을 이용한 유가식 배양

에탄올을 기질로 한 유가식 배양은 특수 효모생산에 사용되는 방법이다(6). 본 연구에서는 본 배양에 앞서 초기 에탄올 농도를 결정하기 위해서 20~100 g/l 범위에서 균체의 비증식 속도를 비교하였다 (Fig. 3). 그 결과 초기 에탄올 농도가 낮을수록 비 증식 속도는 증가하는 것으로 나타났다. 그러나, 에탄올 농도 40 g/l 까지는 급격한 차이가 없어 오염문제 해소와 대량 생산 공정시 feed용 배지의 공급 간격 등을 고려하여 초기 에탄올 농도를 30 g/l로 하여 배양을 실시하였다. 포도당을 탄소원으로 이용한 결과보다 전체 배양시간은 길어졌으나 100시간만에 58 g/l의 건조균체를 얻을 수 있었다. 생균수는 72시간제에

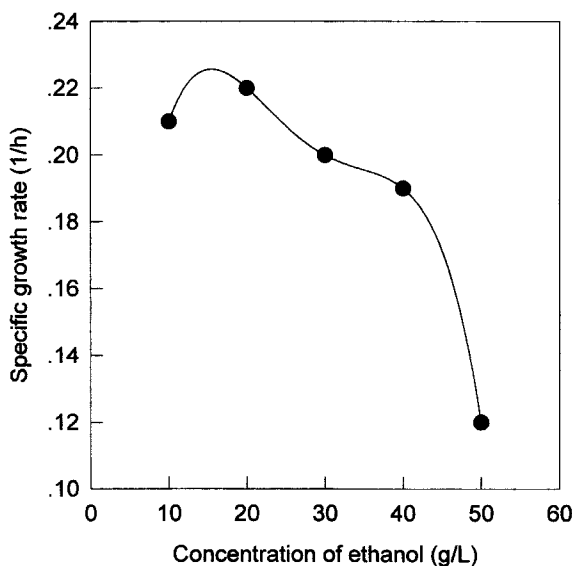


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on the growth rate of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926.

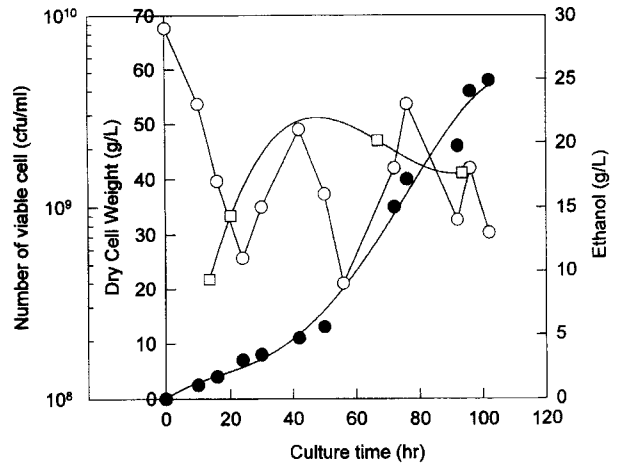


Fig. 4. Fed-batch culture profile of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 using ethanol as a sole carbon source. Symbols: ●, dry cell weight; ○, ethanol; □, number of viable cells.

2.2×10⁹ cfu/ml로서 나타났고, 시간이 경과하면서 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4). 균체의 성장속도는 포도당을 기질로 한 배양보다 느려져서 비 증식 속도는 절반 수준이었으나, 에탄올의 공급 및 배양 조절이 용이한 장점이 있었다. 특히 생산된 균체의 성상이 포도당을 기질로 이용한 경우보다 우수한 것으로 나타났는데, 포도당을 기질로 한 경우 균체의 색깔이 다소 황색에 가깝고 균체 크기나 모양이 불규칙하였으나 에탄올을 기질로 한 경우 균체 색깔이 유백색에 가깝고 균체의 모양도 일정하였다. 이러한 결과는 미생물 발효공정적 측면에서 에탄올을 기질로 하는 것이 고농도의 건조균체 및 많은 생균을 얻는데 어려움이 없을 뿐 아니라 오염의 빈도를 낮춘 상태에서 성상이 보다 우수한 효모를 획득할 수 있음을 보여주는 것으로서, 생균체 생산시 포도당을 기질로 한 유가식 배양보다는 산업적 적용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

동결보호제의 동결보호 효과

에탄올을 기질로 이용한 유가식 배양을 통해 얻은 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 균의 동결건조 보존방법을 확립하고자 7종류의 기지의 동결보호제에 의한 동결보호 효과를 비교하였다 (Table 1). 각 보호제들의 농도를 달리하여 첨가한 결과 보호제의 농도가 증가할수록 생존율 역시 증가하는 경향이 나타났다. 그러나, 백당의 경우 농도가 30%(w/v)로 높아졌을 때 배양액의 점도가 높아져서 동결건조에 잘 건조되지 않는 문제가 있었으며, 그에 따라 건조시간을 늘릴 경우 생균수 역시 다소 감소되는 것으로 평가되었다. 펩톤의 경우에도 30%(w/v)의 농도에서는 생균수가 감소하는 결과를 나타내었다. 7종류의 기지의 보호제들에 대한 보호 효과를 비교해 본 결과 20%(w/v) 백당과 30%(w/v) 유당에서의 생존율이 공통적으로 16.3%로서 본 효모의 동결보호에 가장 효과적이었다.

글리세롤과 PEG와 같은 poly올류는 건조과정중 물대신 세포 성분과 수소결합할 수 있는 성질 때문에 효과적인 것으로 생각되어 사용하였으나(12), 생존율이 최고 11%밖에 나타나지 않았

Table 1. Cryoprotective effect of freeze-drying protectants on the viability of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926

Suspending media	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml (Viability ^a , %)		
		10% ^b	20%	30%
Saline, 0.85%	5.9×10 ¹⁰ ±2.1 ^c	0.8×10 ⁹ (1.4)		
Glycerol	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	1.2×10 ⁹ (2.0)	3.3×10 ⁹ (5.6)	6.5×10 ⁹ (11.0)
Polyethyleneglycol	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	1.0×10 ⁹ (1.7)	3.8×10 ⁹ (6.8)	5.8×10 ⁹ (9.8)
Lactose	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	0.8×10 ⁹ (1.4)	9.2×10 ⁹ (15.6)	9.6×10 ⁹ (16.3)
Sucrose	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	8.0×10 ⁹ (13.6)	9.6×10 ⁹ (16.3)	9.2×10 ⁹ (15.6)
GCGS ^d	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	3.4×10 ⁹ (5.8)	5.1×10 ⁹ (8.6)	6.3×10 ⁹ (10.7)
Skim milk	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	8.6×10 ⁹ (14.6)	9.0×10 ⁹ (15.3)	9.2×10 ⁹ (15.6)
Peptone	5.9×10 ¹⁰ ±2.1	4.3×10 ⁹ (7.3)	6.1×10 ⁹ (10.3)	2.0×10 ⁹ (3.4)

^a100×(mean value of count before drying/count after drying). ^bConcentrations of freeze-drying protectants (w/v). ^cP<0.05, Value is the mean±SD., n=4. ^dGelatin 5%, sodium citrate 5%, monosodium glutamate 20%, sucrose 10%.

다. 당류는 균체 농축액의 점도를 높여 동해방지 상승 효과를 나타내는 것으로 판단되었는데(1), 일반적으로 알려져 있는 효모의 동결건조 보호제인 10%(w/v) 탈지분유(11)의 경우보다 훨씬 동결보호 효과가 우수한 것으로 나타났다. 유당의 경우 10%(w/v) 농도에서는 동결보호제를 첨가하지 않은 경우와 동일한 생존율(1.4%)을 나타내었는데, 이는 당의 농도가 소량일 경우에는 동해방지 효과가 없음을 보여주는 결과로 해석되었다. 특히 본 연구에서 *S. cerevisiae* Hansen CBS5926 효모의 보존을 위한 보호제로서 가장 효과적인 것으로 나타난 백당은 비교적 값싼 보호제라는 면에서 산업적 유용성이 매우 높을 것으로 보인다. 동결보호제로서 GCGS, 탈지분유, 펩톤 등의 작용기전은 분명하지는 않으나 널리 사용되고 있는 보호제로서 30%(w/v)의 농도에서 GCGS 와 탈지분유의 경우 각각 10.7%와 15.6%의 생존율을 보여 주었으며 펩톤은 20%(w/v) 농도에서 10.3%의 생존 효과를 나타내었다.

본 실험에서 나타난 백당과 유당에서의 최고 생존율 16.3%의

결과는 유산균(*Lactobacillus casei*)을 대상으로 백당, 유당, 글리세롤, 탈지분유를 동결보호제로 사용하였을 때 나타난 생존율(26.8~50.0%)과 비교시 매우 낮은 것으로서(13), 이러한 동결보호제가 세균에 비하여 효모의 동결건조에 대한 저항성을 높여 주지 못함을 보여주었다. 이는 세균에 비하여 효모 세포가 크기 때문에 동결과정 중 세포가 받는 손상정도가 보다 크게 나타나는 것에 기인하며, 이러한 이유로 효모의 경우 동결보호제를 사용해도 대조액과 비교시 생존율의 차이가 14% 수준에 그치는 것으로 추정된다.

동결보호제의 혼합에 따른 보호 효과

각 동결보호제에 대한 농도별 동결보호 효과를 관찰하였기에 이 중에서 효과가 우수한 것으로 나타난 백당, 유당 및 탈지분유를 혼합하여 첨가할 경우 동결보호 효과가 상승할 것으로 생각되어 상승 효과에 대한 여부를 실험하였으나 단일 보호제를 사용했을 때와 거의 비슷한 것으로 나타났다(Table 2). 이는 각 동결보호제의 동결건조 보호 기능이 최적의 농도를 넘어서 과량 사용될 때에는 더 이상 상승 효과를 나타내지 않고 동해방지의 효과는 동일하다는 결과로 해석되었다.

Table 2. Cryoprotective effect of sucrose supplemented with skim milk and lactose on the viability of *S. cerevisiae* Hansen CBS5926

Suspending media (w/v)	Viable counts (cfu/ml)		Viability (%)
	before drying	after drying	
Sucrose, 20%+ Skim milk, 10%	4.9×10 ¹⁰	7.0×10 ⁹	14.2
Sucrose, 20%+ Lactose, 20%	4.9×10 ¹⁰	8.1×10 ⁹	16.5
Sucrose, 20%+ Skim milk, 10%+ Lactose, 20%	4.9×10 ¹⁰	6.1×10 ⁹	12.4

참고문헌

1. 대한민국특허공보 제 92-8363.
2. 이상기. 1977. 동결 및 동결건조시의 유산균 starter의 생존도 증가를 위한 연구, 석사학위논문, 한국과학기술원.
3. Arnezder, C. and W.A. Hanmpel. 1990. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast cells. *Biotechnol. Lett.* **12**, 277-282.

4. **Bioflor**. 1984. p. 25-26. Biocodex Inc., France.
5. **James, J.S.** 1995. Diarrhea and the experimental treatment *Saccharomyces boulardi*. *AIDS Treatment News* **224**, 1-4.
6. **Kamzilova, S.V., I. Chystyakova, E.G. Dedyukhina, N.V. Shishkanova, and T.V. Finogenova.** 1996. Effects of temperature, pH, and ethanol concentration on the maximal specific growth rate and composition of *Yarrowia lipolytica* mutant strain No. 1. *Microbiol.* **65**, 202-207.
7. **Kery, V., L. Novotny, K. Tihlarik, J. Haplova, M. Kacurakora, J. Sandula, and E. Balazova.** 1990. Preparation, properties and antileukemic activity of arabinosylcytosine polysaccharide conjugates. *Int. J. Biochem.* **22**, 1203-1207.
8. **Kirsop, B.E.** 1991. Maintenance of microorganism and cultured cells-A manual of laboratory methods, 2nd ed. Academic Press, London.
9. **Lee, S.K., K.H. Park, U.H. Pék, and J.H. Yu.** 1993. Production of brewer's yeast extract by enzymatic method. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 276-280.
10. **Lodder, J.** 1970. The yeasts, A taxonomic study, p. 39. 2nd ed. North-Holland Publishing, Amsterdam.
11. **Nobuo, T.** 1982. Preservation of yeast, p. 275-289. In N. Tokio (ed.), Preservation of microorganisms. Tokyo university, Tokyo.
12. **Roman K., S. Ernest, and S. Jan.** 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Food Biotechnol.* **6**, 225-237.
13. **Yoon S.S., H.O. Lee, and J.H. Yu.** 1986. Effect of the amino acid mixture on freeze-drying and preservation of *Lactobacillus casei* YIT9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 421-426.

(Received September 29, 1999/Accepted November 1, 1999)

ABSTRACTS : High-density Cultivation and Cryopreservation of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS5926

Kyu Ho Bang, Gap Jin Kim¹, Deok Hwan Oh¹, and Young Ha Rhee^{2*}(Kolon Pharmaceutical Inc. R&D Center, Taejon 306-220, ¹Kohap Ltd. R&D Institute, Taejon 305-348 and ²Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

Production of biomass by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS5926, which is used to treat intestinal disorders, was investigated using ethanol as the sole carbon source. Ethanol was a better carbon source than glucose for high cell density culture of the strain since it could decrease the frequency of contamination while increasing the efficiency and final productivity of the fermentation process. Under optimal conditions, 38 g/l of dry cell weight with 2.2×10^9 cfu/ml of maximum viable cell count was achieved after 72 h cultivation. Freeze-drying of the cultured yeast cells resulted in severe reduction of viability. Of the freeze-drying protectants tested, 20% sucrose and 30% lactose were most effective for the preservation of yeast cells with a viability level of 16.3%. A combination of skim milk and lactose with 20% sucrose (w/v) exerted no synergistic influence upon the viability of the cells during cryopreservation by freeze-drying.