

당밀로부터 Ca^{++} 및 Cu^{++} 이온 제거가 효모 생육 및 RNA 축적에 미치는 영향

김재범 · 허선연¹ · 김종균¹ · 남희섭² · 남수완*
동의대학교 생명공학과, ¹부경대학교 생물공학과, ²(주)농심 개발본부

Effect of Ca^{++} and Cu^{++} Removal from Molasses on Yest cell Growth and RNA Accumulation. Kim, Jae-Bum, Sun-Yeon Heo¹, Joong-Kyun Kim¹, Hee-Sop Nam², and Soo-Wan Nam*. Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Research and Development Center, Nong Shim Co., Ltd. Kyungki-do 435-030, Korea – When *Saccharomyces cerevisiae* MTY62, a high-RNA content yeast, was cultivated by fed-batch mode feeding molasses and corn steep liquor, the cell density less than 45 g-DCW/L and the RNA content less than 140 mg/g-cell were obtained, indicating that unknown compounds inhibiting the cell growth and RNA accumulation are contained in the molasses. Therefore, in order to obtain higher levels of cell density and RNA content, Ca^{++} , Cu^{++} and K^{+} ions in molasses were removed by pretreatments of molasses with various agents such as IonClear BigBead, Na_2HPO_4 , H_2SO_4 , citric acid, K_2HPO_4 , and EDTA. Among them, IonClear BigBead, Na_2HPO_4 , and EDTA gave the highest Ca^{++} removal efficiency of about 60-90%. In the batch culture with pretreated molasses, the cell concentration of 18.6 g-DCW/l and RNA concentration of 3127 mg/l, maximum specific growth rate of $0.459\ h^{-1}$, and specific consumption rate of reducing sugar of 1.28 g-sugar/g-cell·h were obtained, which are about 10%, 17%, 47%, and 36% higher levels, respectively, over the batch culture with untreated molasses.

Key words: Ca^{++} ion, Cu^{++} ion, invertase, molasses, RNA, yeast

효모 추출물이 천연 풍미 소재로 널리 쓰일 수 있게 된 것은 같은 강도의 풍미를 내는 다른 소재들과 비교해 가격이 싸고, 보통 식품에 0.1~0.5%(w/w) 정도로 적은 양이 사용되기 때문이다. 풍향미의 주요물질인 ribonucleic acid (RNA)는 모든 생체에 포함되어 있으며, 특히 효모의 경우에는 그 함량이 매우 높아 효모 세포내 총 핵산량의 약 95%를 차지하며, *Saccharomyces cerevisiae*는 폐당밀과 같은 값싼 배지에서도 잘 자라며 균체 수율도 높고, 균체의 회수와 RNA의 추출 조작도 쉬워 RNA 생산에 많은 이점을 가지고 있다[11]. 이와 같이 핵산 함량이 높은 효모를 당밀배지로 고농도 세포 배양하기 위해서는 빵효모의 고농도 유가배양 기법을 적용할 수 있으나, 특이한 점은 효모 세포내 RNA 함량은 비중식속도 (μ)가 높을수록 증가한다는 것이다[5]. 즉, 균체수율 값이 높게 유지되는 비중식속도의 범위 내에서 최대한 높은 비중식속도를 유지하도록 기질공급속도를 정밀하게 조절해야 한다[4]. 선행 연구에서 RNA 축적능이 우수한 *S. cerevisiae* MTY62 균주를 당밀과 corn steep liquor (CSL)로 유가배양했을 때, 건조균체농도는 45 g-DCW/l 이하, RNA 함량은 140 mg/g-cell 이하 밖에 얻지 못하여, 당

밀 내 미지의 물질에 의해 sucrose 이용능이 저하됨으로서 균체증식과 RNA 축적이 저해 받는 것으로 추정된 바 있다 [6, 7].

빵 효모 및 식·사료 효모의 대량 배양에 널리 사용되는 폐당밀은 사탕수수 당밀과 사탕무우 당밀이 있다. 이 중에는 당이 약 55% 함유되어 있고 빵효모가 이용하지 못하는 비발효성당도 다량 함유되어 있다. 이러한 당은 maillard 반응에 의해 melanoidins라는 천연 고분자물질로 변하므로 배지가 검은 색을 띠는 문제점을 가지며, 이 물질들은 산성 중합체의 고도로 분산화된 colloids 성 물질로서 항산화제로 작용하여 미생물에 대해 독성을 나타낼 뿐만 아니라, 산물의 회수 공정에도 악 영향을 미친다[8, 10, 13]. 또한, 폐당밀은 설탕 산업의 부산물로 sucrose(47~50% w/w), 단백질, 비타민, 아미노산, 유기산, 중금속 등이 다량 함유되어 있다[1, 19]. 고농도의 sucrose에 의해 Crabtree 효과가 발생하여 균체수율을 감소시키며[18], 고농도로 함유된 금속이온도 효모 발효공정에 문제 (invertase를 불활성화시켜 균체수율 감소)를 야기시킨다. 폐당밀 내의 sucrose를 효율적으로 이용하기 위해서는 효모 세포 내, 특히 periplasmic space의 invertase의 활성이 높아야 한다. 그러나 폐당밀 내에는 Cu^{++} (11.9 mg/l), Ca^{++} (5470 mg/l), K^{+} (26,300 mg/l) 등 15종 이상의 금속이온을 함유하고 있어 이들 금속이온이 invertase의 활성을 저해한다. 0.04 M Cu^{++} 은 83%, 1.24 M Ca^{++} 은

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-891-7740

E-mail: swnam@dongeui.ac.kr

47%, 2.0 M K⁺은 52%의 invertase의 활성을 저해한다고 보고된 바 있다[16, 17].

따라서, 본 연구에서는 이와 같이 invertase의 활성을 저해하는 당밀 내 여러 금속이온들을 제거하기 위해, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, EDTA, citric acid, IonClear BigBead, H₂SO₄ 등으로 당밀을 전처리한 후 배지로 사용하여 효모의 균체중식과 RNA 축적 증가에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 (주)농심에서 분리한 RNA 축적 능이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* MTY62였다.

배지 및 배양 조건

일반배양 배지로는 YPD(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였고, 본 배양 배지는 탄소원으로 당밀 ((주)제일제당)를, 질소원으로 CSL((주)삼양사)을, 기타 성분(urea 0.03%, KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.02%, ZnSO₄ 0.02%, biotin 0.0001%)을 함유하는 SS 배지를 사용하였다.

당밀은 105°C에서 30분간 열처리 후 7000 rpm에서 7분 원심분리 하여 상등액을 사용하였고, CSL은 7000 rpm에서 7분 원심분리만 하여 상등액을 사용하였다.

플라스크 배양은 YPD 평판배지의 colony를 10 ml YPD 배지를 함유한 시험관(2.5×19 cm)에서 18시간 배양 후 플라스크(500 ml baffled-flask, 5% molasses, 2% CSL, 50 ml, 30°C, 170 rpm)에 접종 (3%, v/v)하여 배양하였다. 발효조(Ko BioTech., Korea)에서의 회분배양은 10% 당밀, 5% CSL을 함유한 기본배지를 사용하였다. 발효조 회분배양에서 초기 배양 부피는 1.0 l, 배양 온도는 30°C, 배양중의 pH 조절은 50% NH₄OH와 1N HCl를 사용하여 pH 5.5로 조절하였다. 교반속도 200~600 rpm의 조절로 DO를 공기포화의 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 2 vvm을 유지하였다.

균체 농도, 건조 균체량 측정

균체 농도는 일정시간 마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광 광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD600)로 측정하였다. 균체를 증류수로 세 번 세척하고 적당량의 증류수로 희석한 다음 80°C에서 24시간 건조시킨 후 항량을 측정하여 건조 균체량을 계산하였다. 흡광도와 건조 균체량의 보정곡선에 의해 OD600 값을 건조균체농도(g-DCW)로 환산하였다.

당밀 내 Ca⁺⁺ 및 Cu⁺⁺ 이온의 제거

당밀 내 금속이온을 제거하기 위해 최종농도가 Na₂HPO₄와 K₂HPO₄는 0.5 M, EDTA와 citric acid는 100 ppm이 되도록

각각 섞은 다음 12시간 동안 교반 후 원심분리하여 상등액을 사용하였고, IonClear Bigbead(Sterogene Bioseparations Inc., USA)는 당밀 1 ml 당 0.02 g 또는 0.04 g 첨가하여 20분 교반 후 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 1 N H₂SO₄는 당밀과 섞어 pH 3.0이 될 때까지 첨가한 후 24시간 방치, 원심분리 후 NaOH로 pH 5.5로 조절하여 사용하였다.

Ca⁺⁺ 및 Cu⁺⁺ 이온 농도 측정

당밀 내 Ca⁺⁺ 및 Cu⁺⁺ 이온 농도는 atomic absorption spectrometer(Shimadzu AA-6500 series, Japan)를 사용하여 Ca⁺⁺은 423 nm에서 1000 ppm Ca⁺⁺ 표준용액(Junsei, Japan)으로 0~2.0 ppm 범위에서 작성한 정량곡선과 비교하여 정량하였다. Cu⁺⁺은 325 nm에서 1000 ppm Cu⁺⁺ 표준용액(Junsei, Japan)으로 0~10 ppm 범위에서 작성한 정량곡선과 비교하여 정량하였다.

포도당농도, invertase 활성 측정, RNA 추출 및 정량

잔존 환원당 농도는 배양액을 5,000 rpm에서 5분 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법을 사용하였다[9]. 균체 침전물을 Zymolyase 100-T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads(diameter; 0.4-0.5 mm)를 사용하여 전세포 분해를 얻어 세포내 invertase 활성을 측정하였다[12]. Invertase 활성은 2% sucrose를 기질로 사용하여 37°C에서 1분당 1 μmol의 환원당(dextrose equivalent)를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. RNA의 추출은 perchloric acid를 사용하였으며, 추출된 RNA는 orcinol 법으로 정량하였다[14, 15].

결과 및 고찰

당밀 내 금속이온의 제거

당밀 내 금속이온을 제거하기 위해 Na₂HPO₄, K₂HPO₄, IonCler BigBead, EDTA, citric acid, 1 N H₂SO₄ 등으로 처리한 결과, Na₂HPO₄와 K₂HPO₄를 처리했을 때 Ca⁺⁺은 약 90% 제거되었으며, Cu⁺⁺은 거의 제거되지 않았다(Fig. 1). IonClear Bigbead를 사용했을 때는 Ca⁺⁺과 Cu⁺⁺ 둘 다 약 40~60% 제거되었으며, EDTA를 처리했을 때 Ca⁺⁺은 약 50% 정도 제거되었으나, Cu⁺⁺은 약 70% 정도 제거되었다. Citric acid와 H₂SO₄은 Ca⁺⁺과 Cu⁺⁺ 제거에 큰 효과를 나타내지 않았다. 따라서, Ca⁺⁺ 이온 제거에는 Na₂HPO₄와 K₂HPO₄가, Cu⁺⁺ 이온 제거에는 EDTA가 가장 효과적이었다.

Ca⁺⁺ 이온과 Cu⁺⁺ 이온을 제거하지 않은(전처리하지 않은) 당밀(대조구)과 Na₂HPO₄, IonClear Bigbead 및 EDTA로 각각 전처리한 당밀로 플라스크 배양을 통해 *S. cerevisiae* MTY62 균주의 균체중식과 RNA 축적능을 비교한 결과, 세포농도(16~18 g-DCW/l) 및 RNA 농도(1500~1800 mg-

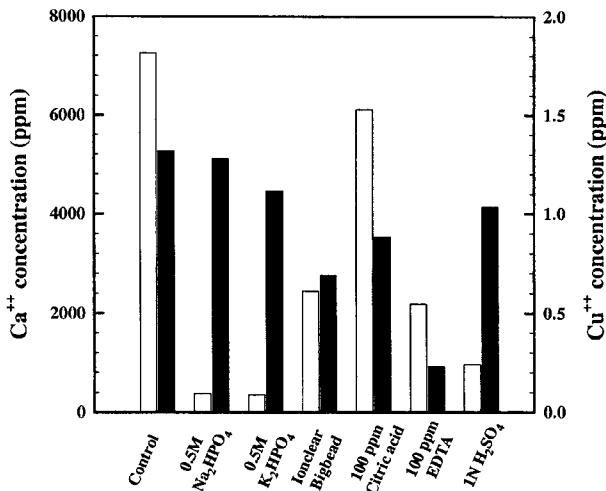


Fig. 1. Removal of Ca^{++} and Cu^{++} ions from molasses by using various pretreatment agents. Symbols: (\square), Ca^{++} concentration; (\blacksquare), Cu^{++} concentration.

RNA/I)가 약간 증가한 경우도 있으나 대체적으로 대조구와 거의 차이가 나지 않았다(data not shown). 이는 당밀 내 Ca^{++} 및 Cu^{++} 가 다 함께 제거되지 않았기 때문으로 사료되었다.

당밀 내 Ca^{++} 과 Cu^{++} 의 동시 제거

Ca^{++} 과 Cu^{++} 이온을 동시에 제거하기 위해 Ca^{++} 이온 제거에 가장 효과적인 Na_2HPO_4 와 Cu^{++} 이온 제거에 가장 효과적인 EDTA를 혼합하여 당밀을 전처리, Ionclear Bigbead의 농도를 2배 증가시켜 당밀을 전처리, 이들 세 가지 (Na_2HPO_4 , EDTA, IonClear BigBead)를 혼합하여 전처리한 3 종류의 당밀을 만들었다. 먼저 IonClear BigBead의 농도를 2배 증가시켜 전처리한 결과에서 Ca^{++} 과 Cu^{++} 둘 다 약 70% 제거되었다. Na_2HPO_4 와 EDTA를 혼합하여 처리했을 때는 Ca^{++} 은 90% 이상, Cu^{++} 은 약 80% 이상 제거되었다. Na_2HPO_4 , EDTA 및 IonClear BigBead 3가지를 혼합하여 전처리한 당밀에서는 Ca^{++} 과 Cu^{++} 모두 90% 이상 제거되는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 따로 처리했을 때 보다 혼합 처리에서 Ca^{++} 과 Cu^{++} 더 많이 제거되는 것은, 각 처리제가 혼합되면서 이들 이온들의 제거에 상승작용을 하는 것으로 생각되었다[2].

Ca^{++} 과 Cu^{++} 제거된 당밀로 플라스크 배양

Ca^{++} 과 Cu^{++} 이온 제거가 균체증식과 RNA 축적에 미치는 영향을 조사하기 위해 전처리 당밀을 사용하여 플라스크 배양을 실시하였다. 즉, 전처리하지 않은 당밀(대조구)과 전처리한 당밀 3 종류(2X IonClear BigBead, Na_2HPO_4 + EDTA, Na_2HPO_4 + EDTA + 2X IonClear BigBead)로 MTY62 균주를 플라스크 배양한 결과(Fig. 3), 대수증식기 구간(6~12 h)에서의 최대비증식속도(μ_{\max})는 대조구인 경우

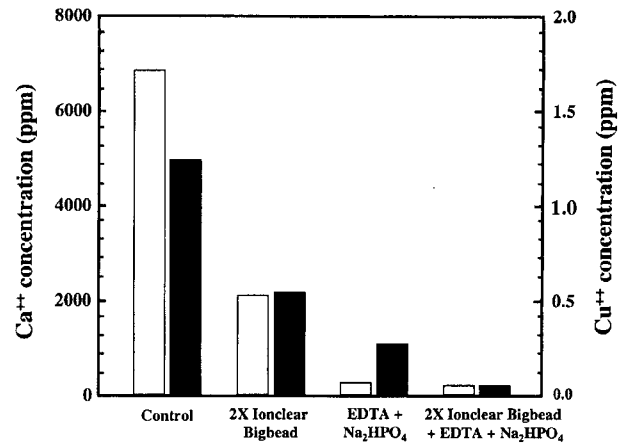


Fig. 2. Removal of Ca^{++} and Cu^{++} ions from molasses by combinations of pretreatment agents. Symbols: (\square), Ca^{++} concentration; (\blacksquare), Cu^{++} concentration.

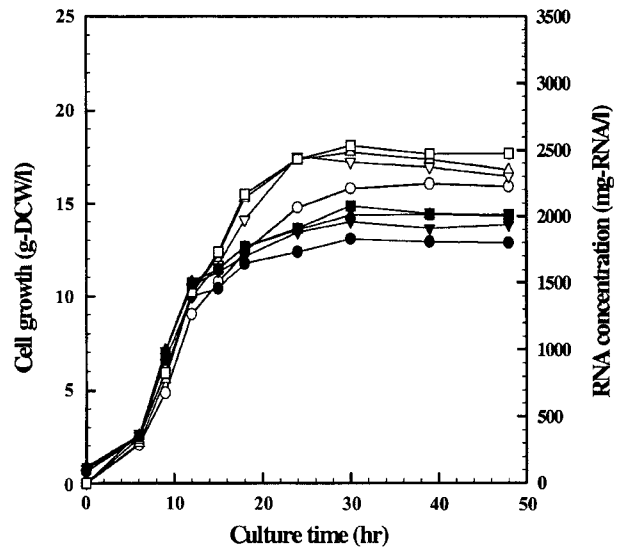


Fig. 3. Time profiles of cell growth and RNA accumulation in the flask culture of *S. cerevisiae* MTY62, in which molasses was pretreated with combinations of Na_2HPO_4 , EDTA, and IonClear BigBead. Medium was consisted of 10% molasses and 5% CSL. Symbols: (\circ , \bullet), control; (∇ , \blacktriangledown), 2X IonClear BigBead; (\triangle , \blacktriangle), Na_2HPO_4 + EDTA; (\square , \blacksquare), Na_2HPO_4 + EDTA + 2X IonClear BigBead (Open symbols), Cell growth; (Closed symbols), RNA concentration.

약 0.27 h^{-1} 값에 비해 전처리 당밀은 $0.28\sim 0.30 \text{ h}^{-1}$ 값을 보여 최대 약 11%가 증가되었다. 배양 30시간 쯤의 균체농도도 대조구는 15.8 g-DCW/l 였으나, 전처리 당밀의 경우 약 $17.2\sim 18.1 \text{ g-DCW/l}$ 에 달해 최대 약 15% 증가하였다. 배양 30시간 쯤 RNA 농도는 대조구인 경우 약 1829 mg/l 에 비해 전처리 당밀들은 $2008\sim 2078 \text{ mg/l}$ 값을 보여 최대 약 14% 정도 증가한 결과를 보였다. 전처리 방법 중 Ca^{++} 과 Cu^{++} 이온 제거에 가장 효과적인 전처리(Na_2HPO_4 + EDTA + 2X IonClear BigBead) 법이 가장 우수한 균체농도(18.1

g-DCW/l)와 RNA 축적(2078 mg/l)을 보였으나, Na₂HPO₄ + EDTA 처리 당밀이 가장 높은 비증식속도(0.30 h⁻¹)를 보였다.

세포 내·외 Invertase의 활성

전처리 당밀에서 증가된 균체증식과 RNA 축적이 당밀내 sucrose 이용능 향상과 관련있는지를 파악하기 위해 세포 내외의 invertase 활성을 측정·비교하였다. 플라스크 배양 12시간(대수증식기)과 18시간(정지기)의 배양액으로 invertase 활성을 측정된 결과, 전처리하지 않은 당밀(대조구)과 전처리한 당밀에서의 세포밖 invertase 활성차이는 당밀에 따른 차이가 크지 않았다(data not shown). 반면, 세포내 invertase 활성은 대수증식기에서 전처리한 당밀이 모두 대조구보다 높았으며 그 중 [Na₂HPO₄ + EDTA] 처리 당밀의 경우 가장 높은 활성(32 munit/mg-DCW)을 보였다. 정지기에서는 2X IonClear BigBead 처리 당밀에서 가장 높은 invertase 활성(35 munit/mg-DCW)이 나타났고, [Na₂HPO₄ + EDTA]와 [Na₂HPO₄ + EDTA + 2X IonClear BigBead] 처리 당밀의 경우는 대조구와 비슷한 활성(22 munit/mg-DCW)을 나타내었다(Fig. 4). 전처리 당밀로 배양시 대수증식기에서 invertase 활성이 높은 것은 invertase 활성을 저해하는 염이온과 중금속이 함께 제거되기 때문으로 사료된다. 실제로 당밀을 dialysis하여 K⁺ 이온을 제거하면 invertase 활성이 크게 증가된 보고도 있다[16].

Fig. 3의 결과와 비교할 때, 대수증식기에서 [Na₂HPO₄ + EDTA] 처리 당밀은 높은 invertase 활성과 빠른 비증식속도를 보였지만, 정지기 구간에서 invertase 활성이 높은 당밀(2X IonClear BigBead)이 높은 균체농도 또는 RNA 축적을

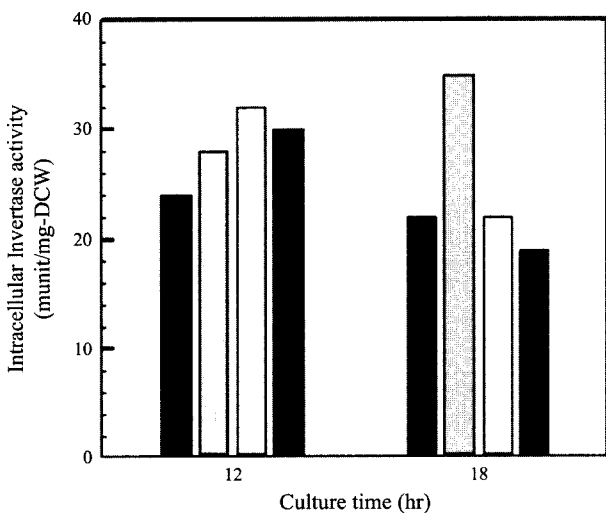


Fig. 4. Comparison of invertase activities in the flask cultures of *S. cerevisiae* MTY62, in which untreated or pretreated molasses was used. Symbols : (black), control; (grey), 2X IonClear BigBead; (white), Na₂HPO₄ + EDTA; (dark grey), Na₂HPO₄ + EDTA + 2X IonClear BigBead.

보이지는 않았다. [Na₂HPO₄ + EDTA]와 [Na₂HPO₄ + EDTA + 2X IonClear BigBead]로 전처리한 당밀에서 배양했을 때, 정지기에서의 invertase 활성이 낮은 이유는, 대수증식기 구간에서의 높은 invertase 활성에 의해 sucrose로부터 생성된 에탄올이 invertase 활성을 저해하는 것으로 사료되었다. 효모에서 invertase 활성을 비가역적으로 불활성화시키는 물질로 에탄올, 당밀 내 높은 NaCl로 알려져 있다[3, 17, 20].

전처리 당밀을 이용한 발효조 회분배양

플라스크 배양에서 가장 빠른 비증식속도를 보이는 Na₂HPO₄와 EDTA로 전처리한 당밀을 10% 농도로 사용하여 발효조 회분 배양을 통해 각종 발효변수들을 측정하였다. 그 결과, 배양 12시간째 기준으로, 전처리하지 않은 당밀을 이용했을 때보다 세포 농도는 약 10% 증가한 18.6 g-DCW/l, RNA 농도는 약 17% 정도 증가한 3127 mg/l를 나타내었다(Fig. 5). 최대비증식속도(μ_{max})는 3-6시간에서 0.459 h⁻¹를 보여 당밀 배지(대조구)에서의 (3-6시간) 0.313 h⁻¹ 보다 47% 증가한 값을 보였다. RNA 함량은 168 mg/g-DCW에 이르러 당밀배지에서의 158 mg/g-DCW 보다 약간 증가한 값을 보였다(Table 1). 즉, 당밀내 Ca⁺⁺과 Cu⁺⁺ 이온 제거가

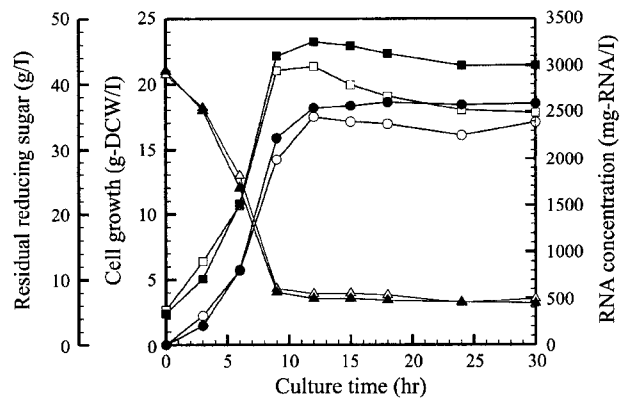


Fig. 5. Time profiles of cell growth, sugar consumption, and RNA accumulation in the fermentor batch culture of MTY62, in which molasses was pretreated with Na₂HPO₄ and EDTA. Medium was consisted of 10% molasses and 5% CSL. (○, ●), Cell concentration; (□, ■), RNA concentration; (△, ▲), Residual reducing sugar concentration (Open symbols), control; (Closed symbols), Na₂HPO₄ + EDTA.

Table 1. Comparison of fermentation parameters in the batch cultures of *S. cerevisiae* MTY62. The yeast cells were grown on the untreated and pretreated molasses with EDTA and Na₂HPO₄.

Molasses	Cell Conc. (g-DCW/l)	RNA Conc. (mg-RNA/l)	RNA Content (mg-RNA/g-cell)	μ_{max} (h ⁻¹)	q_s^m (g-sugar/g-cell·h)
untreated	16.9	2668	158	0.313	0.94
pretreated	18.6	3127	168	0.459	1.28

invertase 활성 증가를 야기하고 이는 다시 환원당 비소모속도(q_s^m , g-sugar/g-cell·h)를 0.94에서 1.28로 약 36% 증가시키고, 이에 따라 균체중식을 증대시켜 μ_{max} 및 RNA 생산을 증가시키는 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 바탕으로 Ca⁺⁺과 Cu⁺⁺ 이온 제거된 전처리 당밀로 다양한 회분배양뿐만 아니라 유가배양을 실시하여 전처리 당밀의 RNA 축적 향상 효과를 정밀 조사를 하여 고핵산효모 생산공정 확립에 활용할 예정이다.

요 약

고함량 RNA 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* MTY62를 당밀과 corn steep liquor를 공급하는 유가배양에서, 세포농도는 45 g-DCW/L 이하, RNA 함량은 140 mg/g-cell로 얻어졌다. 이는 균체중식과 RNA 축적에 당밀 내에 존재하는 저해물질 때문으로 생각되어 이를 제거하기 위해 다양한 당밀 전처리제의 효과를 조사하였다. 당밀로부터 금속이온 제거 효과는 Na₂HPO₄와 EDTA를 혼합 처리했을 때 Ca⁺⁺는 90% 이상 Cu⁺⁺는 약 80% 제거하는 결과를 나타내었고, Na₂HPO₄와 EDTA, IonClear BigBead 등의 3가지를 혼합 처리했을 때는 Ca⁺⁺, Cu⁺⁺ 둘 다 90% 이상 제거되는 결과를 나타내었다. Na₂HPO₄ + EDTA 처리 당밀의 경우 세포내 invertase 활성을 크게 증가시켰다. 전처리 당밀로 회분배양한 결과, 세포농도는 18.6 g-DCW/L, RNA 농도는 3127 mg/l, 최대비중식속도(μ_{max})는 0.459 h⁻¹, 환원당 비소모속도(g-sugar/g-cell·h)는 1.28로, 대조구에 비해 각각 10%, 17%, 47%, 36%로 증가한 값을 보였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 선도기술개발사업의 연구비 지원에 의해 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. de Carvalho, J. C. M., E. Aquarone, S. Sato, M. L. Brazzachi, D. A. Moraes, and W. Borzani. 1993. Fed-batch alcoholic fermentation of sugar cane blackstrap molasses: influence of the feeding rate on yeast yield and productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 596-598.
2. Chung, B. H., W. K. Kim, K. J. Rao, C. H. Kim, and S. K. Rhee. 1999. Downstream processing of recombinant hirudin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 179-183.
3. Goldstein, A. and J. O. Lampen. 1975. α -D-Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.* **42**: 504-511.
4. He, R. Q., C. Y. Li, J. Xu, and X. A. Zhao. 1996. Estimation of the optimal concentrations of residual sugar and cell

- growth rate for a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **60**: 229-244.
5. Kim, S. Y., H. S. Nam., and H. J. Lee. 1996. Change of yeast growth and its RNA content in fed-batch fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 122-126.
6. Kim, J. B., M. J. Kwon, H. S. Nam, J. H. Kim, and S. W. Nam. 2001. Fed-batch fermentation of high-content RNA yeast by using molasses medium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 234-239.
7. Kim, J. B., M. J. Kwon, H. S. Nam, J. H. Kim, and S. W. Nam. 2002. Selection of yeast mutant strain with high RNA content and its high cell-density fed-batch culture. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 68-72.
8. Kim S. J., K. Ishikawa, M. Hirai, and M. J. Shoda. 1995. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 601-607.
9. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
10. Miranda, M. P., G. G. Benito, N. S. Cristobal, and C. H. Nieto. 1996. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* **57**: 229-235.
11. Nagodawithana, T. 1992. Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.* **11**: 139-144.
12. Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.* **15**: 1049-1054.
13. Roukas, T. 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochem.* **33**: 805-810.
14. Schmidt, G., S. J. Thanhauser, and W. C. Schneider. 1945. Fractionation of cell components. *J. Biol. Chem.* **161**: 83.
15. Schneider, W. C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.* **3**: 680-684.
16. Takeshige, K. and K. Ouchi. 1995. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 449-452.
17. Takeshige, K. and K. Ouchi. 1995. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 513-515.
18. Win, S. S., A. Impoolsup, and A. Noomhorm. 1996. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *J. Indust. Microbiol.* **16**: 117-123.
19. Zayed, G. 1997. Production of alcohol from sugar beet molasses without heat or filter sterilization. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 39-42.
20. Zech, M. and H. Gorisch. 1995. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae* : Reversible inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 41-46.

(Received May 14, 2003/Accepted Aug. 29, 2003)