

## 반응표면분석법을 이용하여 *Sacharomyces cerevisiae* JUL3의 균체량 생산을 위한 배지조성 최적화

<sup>1</sup>김영환 · <sup>1</sup>강성우 · <sup>1</sup>이종호 · <sup>2</sup>장효일 · <sup>2</sup>윤철원 · <sup>3</sup>백현동 · <sup>3</sup>강창원 · † <sup>1</sup>김승욱  
<sup>1</sup>고려대학교 화공생명공학과, <sup>2</sup>고려대학교 생명공학과, <sup>3</sup>건국대학교 동물자원학과  
(접수 : 2006. 10. 23., 게재승인 : 2006. 12. 2.)

## Optimization of Medium Components for Cell Mass Production of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 using Response Surface Methodology

Young-Hwan Kim<sup>1</sup>, Seong-Woo Kang<sup>1</sup>, Jong-Ho Lee<sup>1</sup>, Hyo-Ihl Chang<sup>2</sup>, Cheol-Won Yun<sup>2</sup>, Hyun-Dong Paik<sup>3</sup>,  
Chang-Won Kang<sup>3</sup>, and Seung-Wook Kim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-713, Korea

<sup>2</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea

<sup>3</sup>Division of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

(Received : 2006. 10. 23., Accepted : 2006. 12. 2.)

$\beta$ -Glucan, one of the cell wall components, is most plentiful polysaccharides in cell wall and has several advantages in immune system. In yeast  $\beta$ -glucan is mainly contained in the yeast cell wall, and thus it is important to produce high levels of cell mass for the mass production of yeast  $\beta$ -glucan. The best carbon and nitrogen sources on cell mass production were high fructose syrup and yeast extract. Response surface methodology (RSM) was very potential tool for the optimization of process factor and medium component. It was applied to estimate the effects of medium components on the production of cell mass. Optimal concentrations of high fructose syrup and yeast extract by response surface methodology were 8.0% (v/v) and 5.2% (w/v), respectively and the cell mass predicted was 17.0 g/l at 20 h of cultivation.

**Key Words :**  $\beta$ -Glucan, *Saccharomyces cerevisiae* JUL3, high fructose syrup, response surface methodology

### 서론

피부 생리활성 물질 중의 하나인  $\beta$ -glucan은 포도당이  $\beta$ -(1,3)-D-glycosidic bond로 연결되어 있는 균일다당류이며, 효모 세포벽의 가장 많은 양의 구성성분으로 효모 세포벽에서 추출되거나, 보리와 귀리 같은 맥아류의 식이섬유에서 추출되는  $\beta$ -글루칸이 존재한다(1-3). 식물에서 얻어지는  $\beta$ -glucan은  $\beta$ -(1,3)-결합의 모체사슬에  $\beta$ -(1,4)-결합이 가지 형태를 이루고 있으며, 미생물로부터 얻어지는  $\beta$ -glucan은  $\beta$ -(1,3)-결합의 모체사슬에  $\beta$ -(1,6)-결합이 가지 형태를 이루고 있다.

$\beta$ -Glucan은 항암, 항콜레스테롤, 면역증강 및 피부 재생 등과 같은 여러 가지 생리활성 촉진효과가 있다고 보고되

어 건강식품 첨가물로 이용이 증가되고 있다(4-8). 특히, 효모로부터 얻어지는  $\beta$ -glucan은 피부를 보호하고 피부 손상 시 피부를 재생시키는 역할을 하며, 인체 내에서 면역 시스템을 강화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한,  $\beta$ -(1,3)- 또는  $\beta$ -(1,6)-결합의 분자구조보다  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-결합의 분자구조를 갖는  $\beta$ -glucan이 생리활성 촉진이 우수하다고 알려져 있다(9).

효모 건조중량 중 세포벽이 약 15~25%를 차지하며, 세포벽은 대부분이 glucan, mannoprotein, 그리고 chitin으로 구성되어 있다. 효모 세포벽의 성분 및 구조는 배양배지의 조성과 성장조건에 따라 계속 변화되어진다(10).  $\beta$ -Glucan은 특정비섯에서 추출하거나 효모의 세포벽에서 추출하여 정제하고 있으나 함량이 낮고 정제가 어려워 가격이 높다(11).

효모 세포벽에 함유된  $\beta$ -glucan을 대량생산하기 위해서는 효모의 균체량을 증가시키는 것이 중요하며, 이는 배양배지 최적화와 공정변수 확립으로 이루어질 수 있다. 미생물의 발효 및 생산 공정에서 배지조성 및 배양조건에 관

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-713, Korea

Tel : +82-2-3290-3300, Fax : +82-2-926-6102

E-mail : kimsww@korea.ac.kr

한 최적화를 수행하는데 있어서 가장 강력한 방법이 바로 통계학적 분석 방법인 반응표면분석방법 (surface response methodology)이며 현재 가장 많이 이용되고 있다(12). 반응표면분석방법은 독립변수가 종속변수에 미치는 영향과 독립변수들 간의 상호작용까지 알아볼 수 있는 장점을 가지고 있다.

이전 연구에서 *Saccharomyces cerevisiae*로부터  $\beta$ -glucan을 많이 생산하기 위해 자외선을 처리하여 세포벽에  $\beta$ -glucan 함량이 높은 변이주인 JUL3를 얻었다. 본 연구는 *S. cerevisiae* JUL3 변이주의 균체량을 증가시켜  $\beta$ -glucan를 대량생산하기 위하여 통계학적 분석방법인 반응표면분석법을 이용하여 효모 균체량을 증가시키는데 가장 적합한 배지의 조성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 변이주는 *S. cerevisiae* JH를 자외선 처리하여 선별된 세포벽에  $\beta$ -glucan 함량이 높은 균주이다. *S. cerevisiae* JUL3는 YPD agar 배지를 이용하여 30°C에서 계대배양하였다.

### 배양방법

종균배지는 2.0% (w/v) glucose, 1.0% (w/v) yeast extract, 2.0% (w/v) bacto-peptone을 사용하였고, shaking incubator에서 30°C, 200 rpm으로 16시간동안 배양하였다. 본 배양배지는 3.0% (w/v) glucose, 1.0% (w/v) yeast extract, 2.0% (w/v) bacto-peptone, 0.1% (w/v)  $MgSO_4 \cdot H_2O$ 와 0.5% (w/v)  $KH_2PO_4$  (pH 6.0)를 사용하였다. 본 배양은 종균배양액을 2.0%로 접종하여 shaking incubator에서 30°C, 200 rpm으로 배양하였다. 균체량을 증가시키기 위하여 탄소원과 질소원을 변화시켜 액체배양하였다.

### 반응표면 분석

반응표면분석법 (response surface methodology)은 발효공정과 생산공정의 최적화를 수행하는데 가장 영향력 있는 방법이다. 본 연구에서는 균체량을 증가시킬 수 있는 배지 조성 최적화를 위하여 반응표면 분석법을 사용하였다(12). 배지조성에 대한 실험은 Table 4와 같이 균체량 생산에 중요한 독립변수 ( $X_1$ )로 고려되는 인자 즉, 탄소원 ( $X_1$ )과 질소원 ( $X_2$ )에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화하고 12개의 실험계획으로 이루어진 중심합성계획법 (central composite design)을 실시하였다. 또한, 독립변수의 영향을 받는 종속변수 ( $Y$ ) 즉, 균체량을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였으며, 이때 2개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모형식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

여기서  $Y$ 는 종속변수,  $x_1$ 과  $x_2$ 는 독립변수이며  $b_0$ 는 절편,  $b_n$ 은 회귀계수이다. 회귀분석에 의한 모델식의 예측은 SAS

(statistical analysis system) 9.1 버전의 프로그램을 이용하였다.

### 분석

*S. cerevisiae* JUL3의 건조균체량은 660 nm에서 배양액의 흡광도와 건조균체량의 상호관계로부터 얻었다. 배양액 1.0 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하여 얻은 균체를 동일한 양의 증류수로 세척한 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액의 glucose 농도는 Table 1의 조건으로 HPLC (Young-Lin Instrument Co. Ltd., Korea)를 실시하여 얻어졌다.  $\beta$ -Glucan 함량은 Yeast  $\beta$ -glucan kit (K-YBGL, Megazyme International Ireland Ltd.)를 이용한 분석과정을 통하여 측정되었다(www.megazyme.com).

Table 1. HPLC conditions for glucose analysis

Detector	Refractive Index
Column	ZORBAX NH <sub>2</sub> (21.2 × 250 mm)
Column Temperature	50°C
Mobile Phase	Acetonitrile : Water (80 : 20)
Flow rate	1.0 ml/min

## 결과 및 고찰

### 배양학적 특성과 $\beta$ -glucan 함량 조사

*S. cerevisiae* JUL3 균주를 배양배지에서 배양하였을 때 glucose 농도, pH 그리고 균체량 (Dry cell weight)의 변화를 조사하였다(Fig. 1). Lag phase는 6~8시간이었으며 stationary phase는 18~20시간이었다. Glucose는 배양 10시간부터 급속히 소모되어 18시간에 완전히 소모되었다. 또한 균체량은 20시간에 10.46 g/l이었으며 24시간에 최대 균체량 (11.59 g/L)을 보였다. 각각의 kinetic parameter 값을 Table 2에 나타내었다. 생산된 효모 균체의  $\beta$ -glucan 함량을 Yeast  $\beta$ -glucan kit를 사용하여 분석한 결과 97.2 mg/g of dry cell weight이었다.

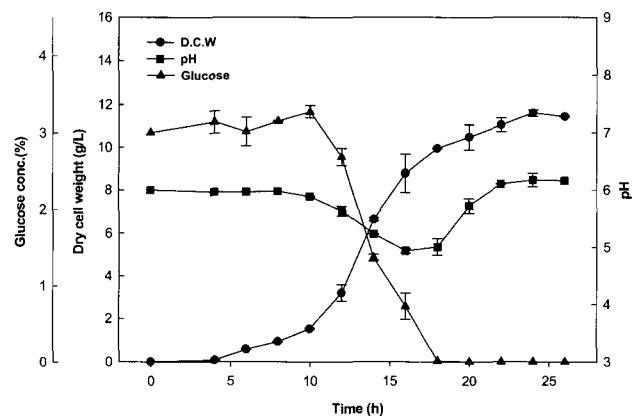


Figure 1. Time course profile of cell mass production by *S. cerevisiae* JUL3.

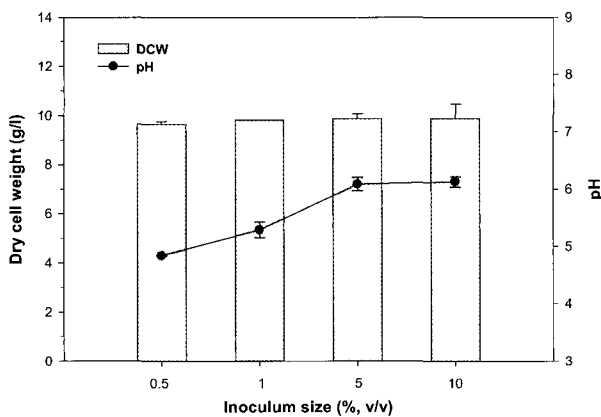
### 접종량과 glucose 농도의 영향

균체량 생산에 대한 접종량의 영향을 조사하기 위하여

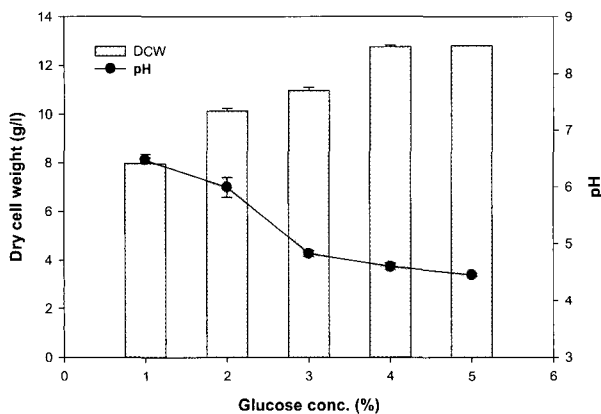
배양매지에 종균배양액을 다양한 농도로 접종하여 20시간 배양하였다. 생산된 균체량은 9.50~9.89 g/l로 비슷하였으며, 당은 모두 소모되었고 최종 pH는 접종량이 증가할수록 증가하였다(Fig. 2).

**Table 2.** Kinetic parameters of *S. cerevisiae* JUL3 in submerged culture

Parameters	
Specific growth rate ( $\mu$ )	0.15 h <sup>-1</sup>
Yield ( $Y_{x/s}$ )	0.33 g/g
Glucose consumption rate ( $q_s$ )	0.44 h <sup>-1</sup>
Productivity (P)	0.48 g/l · h



**Figure 2.** Effect of inoculum size on cell mass production.



**Figure 3.** Effect of glucose concentrations on cell mass production.

균체량 생산에 대한 glucose 농도의 영향을 조사하기 위하여 배양매지에 glucose 농도를 1.0~5.0%로 변화시켜 배양하였다. 최종 pH는 glucose 농도가 증가할수록 감소하였다. 이것은 효모가 배양에 필요한 탄소원을 사용하면서 대사산물로 유기산을 배출하여서 나타난 현상이며 탄소원의 농도가 높을수록 배출되는 유기산의 농도가 높아지기 때문에 pH가 낮게 나타나게 된다. Glucose 농도가 증가함에 따라 균체량이 증가하였으나, 5.0%에서는 4.0% (12.77 g/l)와 비슷하였다(Fig. 3). Calado 등(2003)은 Glucose의 농도가 높으면 균체량이 증가하지 않고 알콜발효 현상이 일어나게 되어 높은 균체량을 얻을 수 없다는 연구를 하였다. 그

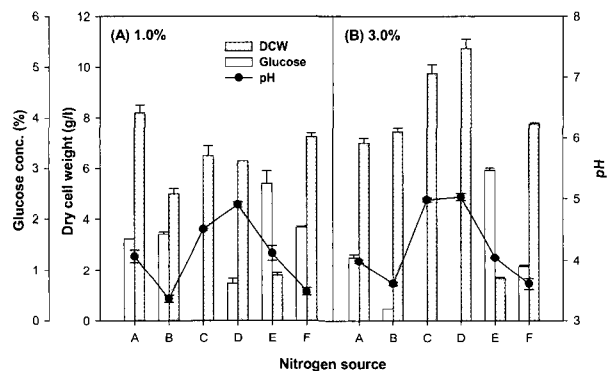
러므로 4% 이상의 glucose 농도에서는 균체량이 더 이상 증가하지 않고 정체되는 현상이 나타나게 되는 것이라 생각된다(13).

**탄소원의 영향**

배양매지에 탄소원 종류와 농도를 변화시켜 배양함으로써 탄소원의 영향을 조사하였다. Sucrose와 fructose보다는 glucose를 이용했을 때 균체량이 다소 높았다. 값싼 산업용 배지인 hydrol, high fructose syrup (고과당), 그리고 molasses (당밀)을 사용하였을 때는 균체량이 glucose와 비슷하여 효모균체 생산에 적합한 값싼 배지로 이용될 수 있음을 확인하였다. 사용된 탄소원 중 high fructose syrup에서 최대 균체량 (13.10 g/l)을 얻었으며, 당밀 (molasses)에서도 glucose와 비슷한 수준의 균체량을 얻어 경제적인 측면을 고려할 때 당밀 (molasses) 또한 우수한 탄소원으로 생각된다(Table 3).

**Table 3.** Effect of carbon source on cell mass production

Carbon source	Concentration (%)	pH	Dry cell weight (g/l)
Glucose	3.0 (w/v)	4.64±0.02	11.0±0.5
Sucrose	3.0 (w/v)	5.71±0.02	9.2±0.2
Fructose	3.0 (w/v)	4.68±0.12	9.7±0.2
Hydrol	4.0 (v/v)	4.60±0.01	10.4±0.8
High fructose syrup	3.0 (v/v)	4.64±0.04	11.7±0.0
	5.0 (v/v)	4.70±0.10	13.1±0.1
Molasses	6.0 (v/v)	5.58±0.02	11.3±0.5
	9.0 (v/v)	5.21±0.01	10.4±0.8



**Figure 4.** Effect of nitrogen sources on cell mass production. A: bacto-peptone; B: polypeptone; C: yeast extract; D: tryptone; E: ammonium sulfate; F: casamino acid.

**질소원의 영향**

배양매지에 다양한 유기질소원을 1.0%와 3.0%로 첨가하여 질소원의 영향을 조사하였다. 유기 질소원을 1.0%로 첨가하였을 때는 bacto-peptone이 최대균체량 (8.20 g/L)을 보였으나, 3.0%로 첨가하였을 때는 tryptone과 yeast extract에서 균체생산량이 각각 9.75 g/l과 10.75 g/l로 가장 높은 균체량을 나타내었다. Glucose 소모량도 유기 질소원이 1%로 첨가되었을 때보다도 3.0%로 첨가하였을 때 좋았으며, 최종 pH는 유기질소원에 따라 다양하게 나타나게 되었다. 무기질소원인 ammonium sulfate를 첨가하였을 때는 균이

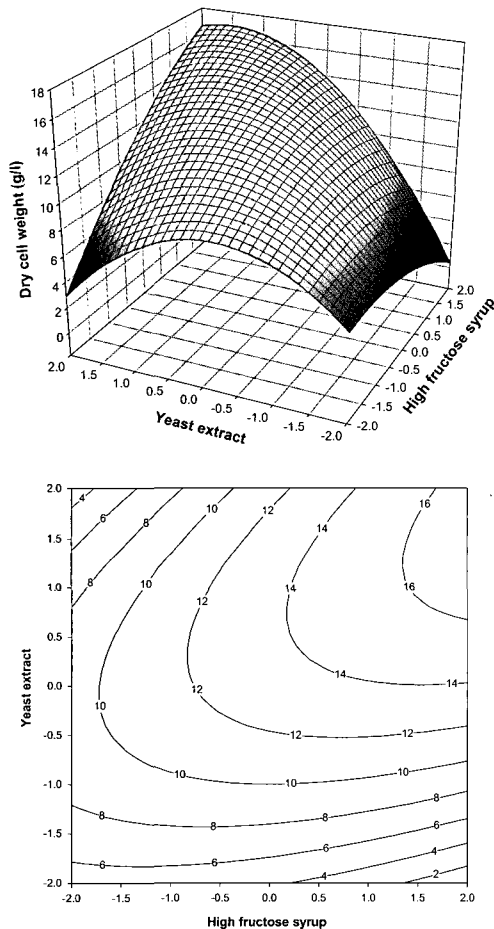
잘 성장하지 못하여 균체량이 2.0 g/l 보다 낮아서 효모의 균체량을 증가시키는데 적합하지 않은 배지조성으로 판명되었다(Fig. 4).

**Table 4.** Range of variables at different levels, experiment design, and results for cell mass production using high fructose syrup and yeast extract

Factors	Symbol	Coded values				
		- 1.414	- 1	0	+ 1	+ 1.414
High Fructose Syrup	X <sub>1</sub> (% v/v)	1.17	2.0	4.0	6.0	6.83
Yeast extract	X <sub>2</sub> (% v/v)	0.88	1.5	3.0	4.5	5.12

Runs	High fructose syrup, X <sub>1</sub> [% (v/v), level]	Yeast extract, X <sub>2</sub> [% (w/v), level]	Final pH	Dry cell weight (g/l)
1	6.0 (+)	4.5 (+)	4.91	14.82
2	6.0 (+)	1.5 (-)	4.38	9.07
3	2.0 (-)	4.5 (+)	5.66	10.11
4	2.0 (-)	1.5 (-)	5.09	8.94
5	6.83 (+1.414)	3.0 (0)	4.51	14.53
6	1.17 (-1.414)	3.0 (0)	6.76	11.47
7	4.0 (0)	5.12 (+1.414)	5.25	13.62
8	4.0 (0)	0.88 (-1.414)	4.93	8.58
9	4.0 (0)	3.0 (0)	4.62	13.26
10	4.0 (0)	3.0 (0)	4.82	13.09
11	4.0 (0)	3.0 (0)	5.12	13.20
12	4.0 (0)	3.0 (0)	4.89	12.85



**Figure 5.** Three-dimensional response surface plot and contour plot of high fructose syrup and yeast extract for cell mass production.

**배지조성의 최적화**

효모의 균체량을 증가시키기 위한 배지조성의 최적화를 위하여 탄소원과 질소원 영향의 실험에서 좋은 효과를 보인 고과당 (high fructose syrup)과 yeast extract를 독립변수로 하고 건조균체량을 종속변수로 하여 2 변수, 5 수준의 중심합성계획법으로 최적화를 실시하였다. High fructose syrup과 yeast extract를 독립변수로 실험을 실시하였고 균체량에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = 13.100 + 1.146x_1 + 1.756x_2 - 0.379x_1^2 - 1.329x_2^2 + 1.145x_1x_2$$

여기서 X<sub>1</sub>은 고과당 (high fructose syrup)이고 X<sub>2</sub>는 yeast extract이며, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 MgSO<sub>4</sub> 농도는 앞의 실험과 같이 각각 0.5%와 0.1%로 고정하였다. 실험 design과 결과를 Table 4에 나타내었고 statistical analysis system (SAS)를 이용하여 분석한 response surface의 3차원 그림과 등고선 그림을 Fig. 5에 도식하였다. 균체량에 대한 R<sup>2</sup>는 0.9352로 높은 유의성을 보였고 변동계수 (Coefficient of Variation, CV)는 6.47로 이전실험과 비교할 때, 상대적으로 낮은 수치를 나타내어 균체량 생산에 변수들의 독립적인 영향이 있을 뿐만 아니라 변수들의 상호작용도 높음을 나타내었으며 Fig. 5에 나타난 타원형과 경사진 그래프의 형상에서 확인하였다(13). 균체량 생산이 가장 높은 고과당과 yeast extract의 최적 수준값 (농도)은 각각 2.0 (8.0%)과 1.467 (5.2%)이었으며, 예측되는 최대 균체량은 16.95 g/l 이었다.

**요 약**

본 연구는 효모의 세포벽에 존재하는 β-Glucan을 대량생산하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae* JUL3의 균체량을 증가시키기 위한 연구를 수행하였다. *S. cerevisiae* JUL3의 배양학적 특성을 알아보기 위해 kinetic parameter를 조사하였을 때 specific growth rate (μ)는 0.145 h<sup>-1</sup>, yield (Y<sub>x/s</sub>)는 0.332 g/g, glucose 소모속도(q<sub>s</sub>)는 0.437 h<sup>-1</sup>이며 productivity (P)는 0.4827 g/l · h을 나타내었다. 균체량이 가장 높게 나타난 탄소원과 질소원은 고과당 (high fructose syrup)과 yeast extract이었다. 효모균체 대량생산 및 scale up을 위하여 반응표면 분석법을 통하여 고과당과 yeast extract에 대한 최적농도를 조사하였다. 균체량이 가장 많이 생산되어 질 수 있는 조건으로 제시된 고과당과 yeast extract의 최적농도는 각각 8.0 %와 5.2 %였으며, 이 때 예측되는 균체량은 16.95 g/l 이었다.

**감 사**

본 연구는 2005년 농촌진흥청 바이오그린 21 사업 (200504010347981870300)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Naohito, O., U. Michkharu, T. Aiko, T. Kazuhiro, N. M. Noriko, A. Yoshiyuki, W. A. Maki, T. Hiroshi, T. Shigenori, and Y. Toshiro (1999), Solubilization of yeast cell-wall  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan by sodium hypochlorite and dimethyl sulfoxide extraction, *Carbohydr. Res.* **316**, 161-172.
2. Navarini, L., J. Bella, A. Flaibani, R. Gilli, and V. Rizza (1996), Structural characterization and solution properties of an acidic branched  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from *Aureobasidium pullans*, *Bio. Macromol.* **19**, 157-163.
3. Sandula, J., G. Kogan, M. Kacurakova, and E. Machova (1999), (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, *Carbohydr. Polymers* **38**, 247-253.
4. Bobek, P. and S. Galbavy (2001), Effect of Pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon, *Br. J. Biomed. Sci.* **58(3)**, 164-168.
5. Delatte, S. J., J. Evans, A. Hebra, W. Adamson, H. B. Othersen, and E. P. Tagge (2001), Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children, *J. Pediatr. Surg.* **36(1)**, 113-118.
6. Hetland, G., N. Ohno, I. S. Aaberge, and M. Lovik (2000), Protective effect of  $\beta$ -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27(2)**, 11-116.
7. Nicolosi, R., S. J. Bell, B. R. Bistrain, I. Greenberg, R. A. Forse, and G. L. Blackburn (1999), Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast, *Am. J. Clin. Nutr.* **70(2)**, 208-212.
8. Tokunaka, K., N. Ohno, Y. Adachi, N. Miura, and T. Yadomae (2002), Application of *Candida* solubilized cell wall  $\beta$ -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice, *Int. J. Immunopharmacol.* **2(1)**, 59-67.
9. Adachi, T., N. Ohno, M. Ohsawa, S. Okinawa, and T. Yacomeae (1990), Macrophage activation in vitro by chemically cross-linked  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan, *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 988-992.
10. Kim, K. S., C. E. Chang, and H. S. Yun (2004), Effect of Glucanex 200G on Yeast Cell Wall, *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **19(4)**, 288-290.
11. Ukawa, Y., H. Ito, and M. Hisamatsu (2000), Antitumor effects of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.), *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 98-104.
12. Lim J. S., M. C. Park, J. H. Lee, S. W. Park, and S. W. Kim (2005), Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*, *Eur. Food. Res. Technol.* **221**, 639-644.
13. Calado C. R. C., C. Almeida, J. M. S. Cabral, and L. P. Fonseca (2003), Development of a Fed-Batch Cultivation Strategy for the Enhanced Production and Secretion of Cutinase by a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 Strain, *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 141-148.