

Fed-Batch Production of High-Content RNA Yeast by Using Industrial Medium

김재범, 남수완

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1537, FAX (051) 891-7740

In order to maximize the RNA accumulation and biomass production in *Saccharomyces cerevisiae* MTY62, a high-content RNA yeast strain, fed-batch cultures were performed with optimized industrial medium including molasses and corn steep liquor. Among the feeding modes examined, the constant feeding mode resulted in the cell concentration of 35.7 g-DCW/L and the RNA concentration of 5434 $\mu\text{g-RNA/mL}$, which were about 2-fold increased levels, compared to the results of batch culture. However, the RNA content (153 mg-RNA/g-DCW) in the fed-batch cultures was lower than that in the batch culture (171 mg-RNA/g-DCW).

서론

효모는 세포 자체의 기능성과 영양성을 보장하거나 변형시킴으로써 oligonucleotides (식품의 방향성 증강제), oligosaccharides (동물과 인간 장내 미생물의 증식을 촉진하는 probiotics), oligopeptides (whey 단백질 분해로 생산, 면역증강제로 축산 사료에 첨가) 등의 생산에 다양하게 응용되고 있다.¹⁻³⁾ 천연 풍미 소재로 효모를 이용하려면, RNA 또는 핵산 함량이 높아야 하는데 효모는 비교적 RNA의 함량이 다른 미생물에 비해 높을 뿐 아니라, 값싼 배지에서 잘 자라며 균체 수율도 높고 균체의 회수와 RNA의 추출 조작도 쉬워 RNA 생산에 많은 이점을 가지고 있다.¹⁾ 핵산 함량이 높은 효모를 고농도로 배양하기 위해서는 빵효모의 고농도 유가배양 기법을 적용할 수 있으나, 특이한 점은 효모 세포내 RNA 함량은 μ 가 높을수록 증가한다는 것이다.^{4,5)} 즉, 균체수율 ($Y_{x/s}$) 값이 높게 유지되는 비증식 속도(μ)의 범위내에서 최대한 높은 μ 를 유지하도록 기질공급속도를 정밀하게 조절해야 한다. 본 연구에서는 RNA 함량이 높은 *S. cerevisiae* MTY62 균주의 유가배양에서 공급기질로 molasses와 corn steep liquor (CSL) 등을 이용하는 유가배양 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* MTY62 였으며, 배지는 탄소원으로 molasses ((주)제일제당)를, 질소원으로 CSL ((주)삼양사)을, 기타 성분 (urea 0.03%, KH_2PO_4 0.004%, MgSO_4 0.02%, ZnSO_4 0.02%, biotin 0.0001%)을 함유하는 SS 배지를 사용하였다. Molasses는 105°C에서 30분간 열처리 후 원심분리 하여 상등액을 사용하였고, CSL은 원심분리만 하여 상등액을 사용하였다. 발효조 (KFC)에서의 회분배양은 10% molasses, 5% CSL을 함유한 기본배지를 사용하였다. 유가배양에서는 회분배양 9시간 후부터 에 molasses와 CSL의 농축 배지를 공급하였으며, intermittent feeding에서는 농축배지 50 mL을 간헐적으로 공급하였고, constant feeding에서는 농축배지의 공급속도를 12~48 mL/hr로 변화시켰다. 유가배양에서 초기 배양부피는 1.0 L, pH는 5.5로 조절하였고, 교반속도의 조절로 DO를 공기포화의 30% 이상으로 유지하였다.

각종 분석법

균체농도는 탁도(OD_{600})로 측정된 후 건조균체량(DCW)으로 환산하였고, 잔존 환원당 농도는 dinitrosalicylic acid 방법을 사용하여 측정하였다. 회수한 효모 균체에 10% perchloric acid를 첨가한 후 90°C에서 1 hr 처리하여 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 orcinol 법으로 정량하였다. 이때 Sigma사의 효모 RNA를 표준품으로 사용하였다.

결과 및 고찰

10% molasses와 5% CSL이 함유된 SS 배지로 MTY62 균주를 회분배양한 결과 최대 세포농도는 17.5 g-DCW/L였고, 최대 RNA 농도는 2988 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 RNA 함량은 171 mg-RNA/g-DCW였다. 회분배양에서의 최대비증식속도는 0.303 hr^{-1} 이었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 농축배지 (40% molasses, 20% CSL)를 간헐적으로 공급한 경우 배양 48시간에서 가장 높은 세포농도 33.8 g-DCW/L를 나타내었고, 이때의 RNA농도는 5177 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 이때의 RNA 함량은 153 mg-RNA/g-DCW를 나타내었다. 유가배양 동안 잔존 환원당은 7~22 g/L 수준에서 유지되었으며 완전한 소모가 일어나지 않은 것은, 아마 molasses 내 존재하는 non-fermentable sugar 때문으로 생각된다. 회분배양에 비해 세포농도는 약 2배 증가되었지만 RNA 농도는 균체농도에 비례하여 증가되지 않음을 알 수 있고, 결과적으로 RNA 함량이 회분배양에 비해 감소하였다. 그러나, 정지기 때의 RNA 농도는 회분배양 때와는 달리 매우 안정하게 유지되었다.

회분배양에서의 비증식속도와 균체수율 값으로 기질 비소모속도를 예측하여 균체증식에 따라 농축배지의 공급속도를 변화시킨 (9시간에서 13시간까지는 48 mL/hr, 13시간이후는 12 mL/hr) 유가배양에서 최대 세포농도와 RNA 농도는 각각 35.7 g-DCW/L과 5434 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었고, 이때의 RNA 함량은 152 mg-RNA/g-DCW를 나타내었다 (Fig. 2). 잔존 환원당은 약 11 g/L 수준에서 유지

되었으며, 앞의 intermittent 유가배양에서처럼 균체농도에 비례하여 RNA 농도는 증가되지 않았다.

이상의 배양결과를 요약하여 Table. 1에 나타내었다. 초기 유가배양기간 (10~18시간) 동안 비증식속도는 0.06~0.10 hr⁻¹ 범위로 유지되었다. 농축배지의 공급속도를 다양하게 변화시킨 유가배양에서도 최대 균체농도는 약 43 g-DCW/L 정도였고, RNA 함량은 135 mg-RNA/g-DCW으로 더욱 감소하여, 세포내 RNA 축적 (함량) 저하가 낮은 비증식속도와 molasses 또는 CSL 내에 존재하는 미지의 RNA 축적 저해물질인 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Nagodawithana, T. "Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action" (1992), *Food Technol.*, **11**, 139-144.
2. Dann, H.M., J.K. Drackley, G.C. McCoy, M.F. Hutjens, and J.E. Garrett. "Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows" (2000), *J. Dairy Sci.*, **83**, 123-127.
3. Belem, M.A. and B.H. Lee. "Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative" (1998), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **38**, 565-598.
4. Kim, S.Y., H.S. Nam, and H.J. Lee. "Change of yeast growth and its RNA content in fed-batch fermentation" (1996), *Kor. L. Food Sci. Technol.*, **28**, 122-126.
5. He, R.Q., C.Y. Li, J. Xu, and X.A. Zhao. "Estimation of the optimal concentrations of residual sugar and cell growth rate for a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*" (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **60**, 229-244.

Table 1. Comparison of cell concentration and RNA content for intermittent and constant fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* MTY62

Culture Mode	Cell Conc. (g-DCW/L)	RNA Conc. (μ g/mL)	RNA content (mg-RNA/g-DCW)
Batch	17.5	2988	171
Intermittent Fed-Batch	33.8	5177	153
Constant Fed-Batch	35.7	5434	152

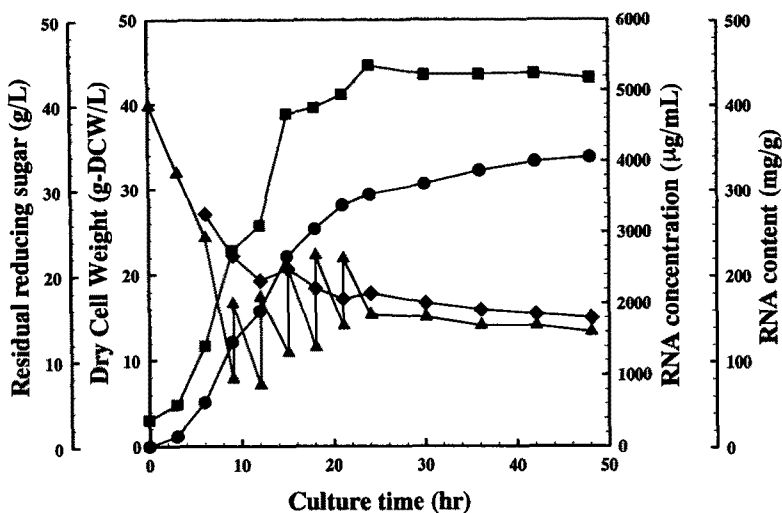


Fig. 1. Time profiles of cell concentration, sugar consumption, RNA concentration, and RNA content by intermittent fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* MTY62. 50 mL of feeding medium (40% molasses and 20% CSL) was added at each feeding. Symbols : (●), cell concentration; (▲), residual reducing sugar; (■), RNA concentration; (◆), RNA content

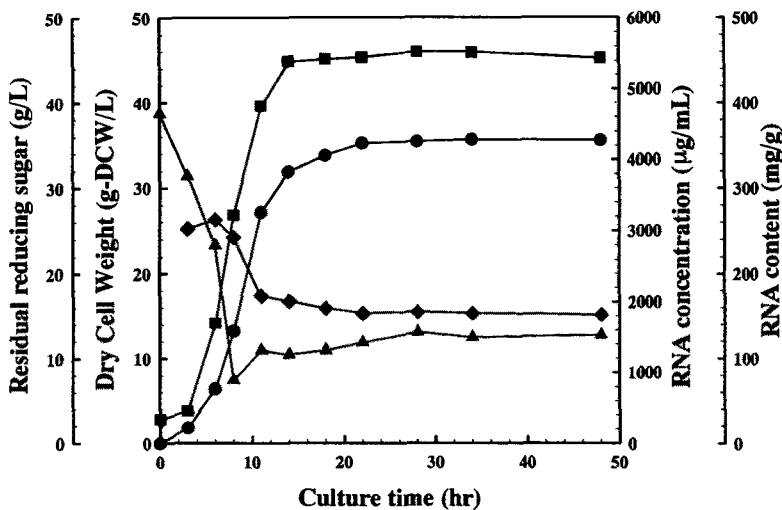


Fig. 2. Time profiles of cell concentration, sugar consumption, RNA concentration, and RNA content by constant fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* MTY62. Feeding medium was 40% molasses and 20% CSL. Feeding rates was changed from 48 mL/hr for 9~13 hr to 12 mL/hr after 13 hr. Symbols are the same as Fig. 1.