

## Phaffia rhodozyma로부터 Carotenoid 추출에 미치는 고전압 펄스 전기장의 영향

김남훈 · 신정규 · 조형용\* · 변유량

연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구센터, \*전주기전여자대학 식품과학과

### Effects of High Voltage Pulsed Electric Fields on the Extraction of Carotenoid from *Phaffia rhodozyma*

Nam-Hoon Kim, Jung-Kue Shin, Hyung-Yong Cho\* and Yu-Ryang Pyun

Department of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University

\*Department of Food Science & Technology, Chonju Kijeon Women's College

#### Abstract

High voltage pulsed electric fields (PEF) technology is a non-thermal technique which is applicable to extract useful components from biological materials. This research suggested the possibility for extracting carotenoid pigments from *Phaffia rhodozyma* by PEF treatments. The yeast cell suspensions were treated with high voltage pulses in a recycled PEF treatment chamber which consists a pair of thin plates of stainless steel adhering to a small chamber with approximately 1~4 mm gap. A 2.5 log reduction in survivability and more than 98% of electroporation of the yeast cells could be achieved by PEF treatment for 300  $\mu$ s with an electric field of 30 kV/cm and pulse duration of 1  $\mu$ s. When the yeast cell suspended in 0.01% NaCl solution were treated with PEF under various conditions, carotenoid pigments were not extracted. However, the PEF treatment of the yeast cell suspensions in 0.01% CaCl<sub>2</sub> solution, have positive effects on the extraction of carotenoid pigments (27.3  $\mu$ g/g of dried yeast).

Key words: high voltage pulsed electric fields (PEF), *Phaffia rhodozyma*, carotenoid

#### 서 론

고전압 펄스전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF) 기술은 시료의 처리 중에 온도가 거의 상승하지 않고 처리 시간이 짧으며 연속처리가 가능한 비열 살균 기술로서 최근 관심이 집중되고 있다. 현재 고전압 펄스 전기장 기술은 액체 식품, 즉 과일 및 채소 주스, 유제품, 액체 난제품의 가공 시 미생물의 불활성화, 식품의 변패와 관련된 효소의 불활성화, 과일이나 야채로부터의 즙액의 추출 등에 한정되어 연구되어왔다<sup>(1,2)</sup>.

동·식물 세포에서 유용물질을 추출할 때 수율을 높이기 위해서는 저항력이 큰 원형질막을 파괴하여야 하는데 고전압 펄스 전기장을 걸어주면 온도는 거의 상승하지 않고 세포막이 손상되어 추출 효율을 증대시킬 수 있다. Rogob<sup>(3)</sup>는 미세하게 분쇄한 사과를 10<sup>5</sup>

Pa의 압력으로 압착하였을 경우 사과주스의 수율은 약 67~68%이었으나, 동일압력 하에서 전기 원형질 분리를 병행하였을 경우 분쇄 정도에 관계없이 사과주스의 수율이 약 78%까지 향상되었다고 보고하였다. Geulen 등<sup>(4)</sup>은 당근을 거칠게(3.0 mm 입자) 파쇄하여 2.6 kV/cm의 고전압을 처리한 후 상온에서 10 MPa로 5분간 압착한 결과, 재래 단순 압착법의 수율 51.3%에 비하여 최대 수율 76.1%를 얻었다고 하였다.

고전압 전기장 기술은 채소 및 과일 주스의 추출뿐만 아니라 식물 세포로부터 색소를 추출하는 데 유용한 것으로 보고되고 있다. Knorr 등<sup>(5)</sup>은 적색색소를 생성하는 *Chenopodium rubrum* 세포를 상온에서 1.6 kV/cm, 10 펄스 처리한 결과 세포내의 amaranthin 색소가 거의 100% 추출된 것으로 보고하였다. 또한 *Morinda citrifolia* 세포로부터 anthraquinone의 추출에도 효과가 큰 것으로 보고하고 있다. Ohshima 등<sup>(6)</sup>은 *Saccharomyces cerevisiae* 현탁액에 0~18 kV/cm의 PEF 처리를 한 결과, 전기장의 세기를 조절함으로써 세포를 파괴시키지 않고 선

Corresponding author: Yu-Ryang Pyun, Department of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul, 120-749 Korea

택적으로 intracellular enzyme을 방출시킬 수 있다는 가능성을 보고하였다.

Astaxanthin(3, 3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4, 4'-dione)은 자연에 많이 분포되어 있으며, 갑각류 및 연어의 주요색소<sup>7)</sup>로서 주홍색을 띠고 있으며, 다른 carotenoids나 tocopherol 보다도 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있어, 항산화제와 식품색소로 뿐만 아니라 의약적으로 그 중요성이 부각되고 있다. 현재 astaxanthin의 세계 시장 규모는 연간 1,200억원 정도로 추산되고 있다. 최근 생물공학의 발전으로 *Phaffia rhodozyma* 효모로부터 astaxanthin을 생산하는 공정이 개발되고 있다<sup>8)</sup>. *P. rhodozyma* 세포벽은 두터운 glucan 층으로 이루어져 있으며, 세포내에 축적되는 asraxanthin은 지방체와 결합하거나 또는 지방체 안에 존재하므로 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid를 추출하기 위해서는 세포벽을 파괴시켜야 한다. 기계적 파괴법<sup>9)</sup>, 화학적(산 또는 알칼리) 가수분해법<sup>10)</sup>, 효모세포벽 용균효소를 이용하는 방법<sup>11)</sup>, autolysis 시키는 방법<sup>12)</sup> 등이 알려져 있으나 이들 방법들은 carotenoid 색소를 변성시킬 위험이 있으며, 회분 공정이기 때문에 대규모의 공정에 적용하기가 어렵다는 단점이 있다.

본 연구에서는 고전압 PEF를 이용하여 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid 색소의 추출 가능성을 조사하기 위한 기초 연구로서, PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 형태학적 변화와 PEF 처리 조건이 carotenoid의 추출에 미치는 영향에 관하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

균주는 *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202이며, YM 배지(Difco)를 사용하여 21°C에서 20시간 전배양한 배양액을 100 mL 배지에서 2% (v/v) 접종한 후 21°C에서 150 rpm으로 4일 동안 진탕배양하였다. 균체 배양액 시료는 매번 동일조건에서 새로이 배양하여 실험에 사용하였다.

### 펄스전기장 처리

고전압 PEF 발생 장치는 신과 변<sup>13)</sup>이 사용했던 것과 동일한 장치를 이용하였으며, oscilloscope (Leeroy Digital Oscilloscope, Model 9300, USA)를 이용하여 처리 용기 내에 형성되는 파형과 전압의 세기를 측정하였다.

균체 배양액 30 mL를 원심분리하여 균체만을 모은 후 30 mL의 0.01% NaCl 또는 CaCl<sub>2</sub> 용액에 현탁한

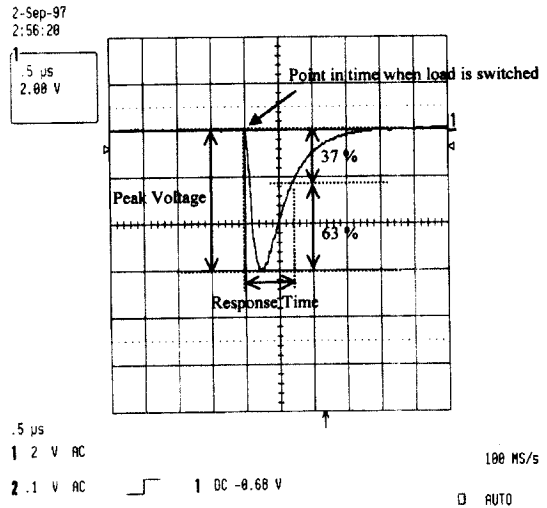


Fig. 1. Waveform of cell suspension in 0.01% NaCl or CaCl<sub>2</sub> solution.

다음, 시료 저장 용기에 넣었다. Peristaltic pump를 이용하여 0.3 mL/s의 유속으로 균체현탁액을 자체 제작한 처리용기에 공급하면서, 전기장(10~50 kV/cm)과 주파수(100~1000 Hz)를 변화시키면서 100~2000  $\mu$ s동안 처리하였다. 0.01% NaCl 또는 CaCl<sub>2</sub> 균체 현탁액에 작용되는 펄스의 형태는 Fig. 1과 같이 exponential decay 형태이며, 펄스폭( $\tau$ )은 1  $\mu$ s로 조절하였다. 자체 제작한 PEF 처리용기로는 electroporation cuvette (Bio-rad, USA)을 사용하였으며, 전극 간격은 1~4 mm, 처리 부피는 0.07~1.00 mL이다.

### 형태학적 변화 및 세포투과성 관찰

PEF처리에 의한 *P. rhodozyma*의 형태학적 변화는 inverted 현미경에 CCD camera가 연결된 화상분석기 (Diaphot 300, Nikon, Japan)를 이용하여 측정하였다. 세포의 투과성의 변화에 의한 세포내 물질의 유출여부는 PEF 처리한 후 세포현탁액을 상온에서 10분간 방치한 다음 4°C에서 8000 g으로 10분간 원심분리 (Sorvall RC2C plus, Dupont, USA)하여 상등액의 흡광도(260 nm)를 측정하여 확인하였다<sup>6)</sup>.

### 생균수의 측정 및 electroporation 관찰

PEF 처리 후의 생균수는 한천평판배지를 이용하여 pour plate method로 측정하여, CFU/mL로 나타내었다. 생균수를 측정할 때 colony 수가 50~300개가 나오도록 희석하였으며, 각 희석배수에서 3번 반복하여 측정하였다. PEF 처리에 의한 세포막의 손상여부와

electroporation 정도를 관찰하기 위하여 Phloxine B (Junsei Chemical Co., Ltd, Japan) 염색 시약을 사용하였다<sup>(14)</sup>. 세포 현탁액에 Phloxine B 염색 시약을 먼저 첨가하고(0.01%, v/v), PEF 처리(10~50 kV/cm, 300  $\mu$ s, 100 Hz, exponential decay pulse)한 다음 화상분석기를 이용하여 세포막에 손상을 입어 빨간색을 띠고 있는 염색된 세포수를 측정하여 아래와 같이 electroporation 비율을 계산하였다. PEF 처리후 세포의 회복율은 세포 현탁액을 동일한 PEF 조건에서 먼저 처리 후 30분 방치한 다음 Phloxine B 시약을 첨가하여 염색된 세포의 수를 화상 분석기로 측정하여 아래식으로 계산하였다.

Percentage of Poration (%)=

$$\frac{\text{분개 염색된 세포수}}{\text{총세포수}} \times 100$$

Percentage of Recovery (%)=

$$\frac{\text{분개 염색된 세포수} - \text{PEF 처리 후 Phloxine B를 넣어 염색된 세포수}}{\text{총세포수}} \times 100$$

#### 총 carotenoids 농도 측정

PEF 처리한 세포 현탁액에 15 mL의 acetone을 첨가한 후 상온에서 10분간 방치한 다음 4°C에서 45분간 원심분리(2,700 $\times$ g)하였다. Acetone extract를 분액깔대기에 넣고 여기에 10 mL의 petroleum ether (ACS grade, Fisher Co.)와 소량의 0.01% NaCl 용액을 첨가한 후 잘 섞어준 다음 약 1분간 방치하여 층 분리가 형성되면 acetone 층을 제거한 후 petroleum ether extract만을 분리하였다. Petroleum ether extract를 lipid globule과 다른 이물질들을 제거시키기 위해 glass wool을 통해 여과한 후 474 nm에서 흡광도를 측정하여  $E_{1cm}^{1\%}=2100$ 을 이용하여 total carotenoid ( $\mu$ g/g of yeast)양을 결정하였다<sup>(6)</sup>.

Total carotenoid ( $\mu$ g/g of dried yeast) =

$$\frac{(\text{mL of petroleum ether})(A_{474})(100)}{(21)(\text{yeast dry weight})}$$

### 결과 및 고찰

#### 고전압 PEF 처리 후의 형태학적 변화

전기장 세기 20 kV/cm와 주파수 250 Hz, 처리시간 100~300  $\mu$ s로 PEF 처리하였을 때 *P. rhodozyma*의 형태적 변화와 무처리 시료를 관찰한 광학현미경 사진을 Fig. 2에 나타내었다. 무처리 시료인 (a)와 비교해

볼 때 PEF 처리 후의 시료인 (b)~(e)에서는 세포가 팽창되고 응집된 부분을 나타냈으며, (c)와 (e)에서는 세포의 일부가 파괴되어 세포내 물질이 빠져나오는 현상을 관찰할 수 있었다. 동일한 전기장 조건에서 처리시간을 달리하여 처리했을 때 처리시간이 길어질수록 세포의 구조적 변화가 더 커졌으나, 주파수의 영향은 거의 없었다.

#### 세포내 물질의 유출

고전압 PEF 처리에 의해 세포의 투과성이 변화되고 세포벽의 파괴로 인해 세포내 물질이 유출되는 현상을 확인하기 위하여 *P. rhodozyma* 현탁액을 PEF 처리 후 원심분리하여 상등액의 흡광도를 260 nm에서 측정된 값을 Fig. 3에 나타내었다. 각각의 처리시간(100  $\mu$ s, 300  $\mu$ s)에서 전기장의 세기(10~50 kV/cm)가 증가할수록 흡광도가 증가하였다. 300  $\mu$ s 처리했을 때 30 kV/cm 이상에서 흡광도는 거의 증가되지 않아, 더 이상 세포내 물질이 유출되지 않았으나, 상대적으로 100  $\mu$ s 처리했을 때 높은 전기장에서도 흡광도가 계속 증가하였다. 이로써 PEF 처리에 의해 세포내 물질이 유출되는 현상을 확인할 수 있었으며, PEF 처리로 세포내 유용물질을 효율적으로 추출할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다. 이러한 사실은 Ohshima 등<sup>(6)</sup>은 효모로부터 세포내 유용물질을 선택적으로 추출할 수 있다는 가능성을 제시한 보고한 바 있으며, Knorr와 Angersbach 등<sup>(15)</sup>도 식물 세포를 고전압 처리했을 때 투과성이 현저히 향상된다고 하였다.

#### 세포 불활성화

고전압 PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 불활성화정도를 Fig. 4에 나타내었다. 전기장세기 10~50 kV/cm, 주파수 100 Hz의 전기적 조건에서 100  $\mu$ s 및 300  $\mu$ s 동안 각각 처리하였을 때 최대전기장 50 kV/cm에서 각각 생균수가 1.5 및 2.5 log만큼 감소하였다. 그러나 효모의 PEF 살균에 관한 기존의 연구결과와 비교해 볼 때 사멸효과가 낫다. Matsumoto 등<sup>(16)</sup>은 phosphate buffer 용액에 *S. cerevisiae*를 현탁한 후 30 kV/cm의 전기장 세기에서 처리하였을 때 약 5 log cycle의 사멸효과를 얻었다고 보고하였으며, Hofmann 등<sup>(17)</sup>은 yogurt에 있는 *S. cerevisiae*를 25 kV/cm의 전기장 세기에서 처리하였을 때 약 3 log cycle의 사멸효과를 얻었다고 보고하였다. 이와 같이 살균효과에 상당한 차이를 보이는 것은 Hülshager 등<sup>(18)</sup>이 보고한 것과 같이 *P. rhodozyma*의 세포막 특성과 관계가 있는 것으로 판단되었다. *P. rhodozyma*는 다른 효모에 비하

Fig. 2. Light micrographs of untreated(a) and treated *P. rhodozyma* cells with 50 kV/cm, 250 Hz for 100  $\mu$ s (b,c) and 300  $\mu$ s(d,e).

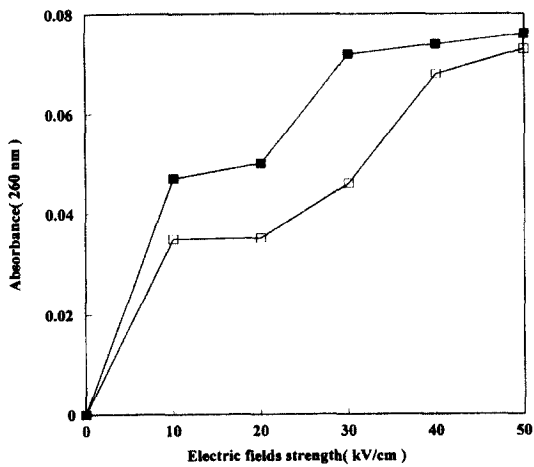


Fig. 3. Effect of electric field strength on absorbance at 260 nm of supernatant of *P. rhodozyma* cells suspension after PEF treatment at frequency of 100 Hz. treatment time: 100 ms (□), 300 ms (■)

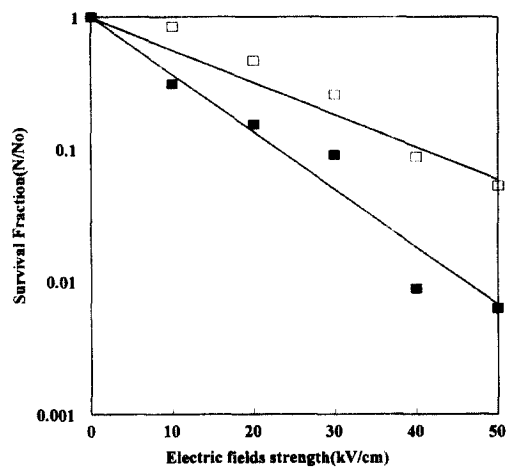


Fig. 4. Inactivation of *P. rhodozyma* cells treated with PEF at frequency of 100 Hz. treatment time: 100  $\mu$ s (□—□), 300  $\mu$ s (■—■)

여 두터운 glucan층으로 외벽을 형성하고 있어 현저한 열적·기계적 저항성을 가지기 때문인 것으로 생각된다. 또한 exponential decay파를 사용하였기 때문에 square파에 비하여 미생물 살균효과가 적은 데도 기인하는 것으로 추측된다.

#### 세포염색과 Electroporation

Phloxine B 염색시약으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. 300  $\mu$ s 처리했을 때, 전기장의 세기가 증가할수록 적색세포의 수가 크게 증가하였으며, 30 kV/cm의 전기장 세기에서 이미 80%이상의 적색세포를 관찰할 수 있었다. 그러나 PEF 처리를 받은 세포는 일정시간이 지난 후에는 회복되는 것으로 보고<sup>(4)</sup>되고 있으며, 가역적인 electroporation이 일어나는 한계 전기장의 세기를 임계전기장( $E_c$ )이라한다. PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 electroporation되는 정도와 일정시간(10분)이 지난 후 회복정도를 Fig. 6에 나타내었다. 전기장의 세기가 증가할수록 회복율은 급격히 감소하였으며, 40 kV/cm 이상의 전기장에서는 회복율이 약 10%였으며, 50 kV/cm일 때 electroporation 정도는 98%, 회복율은 5% 이하였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 임계 전기장 이상

의 상당한 고전압으로 처리하여도 일부 세포는 회복되는 것을 알 수 있으며, 50 kV/cm이상의 고전압으로 처리하여야만 거의 모든 세포가 비가역적으로 손상되

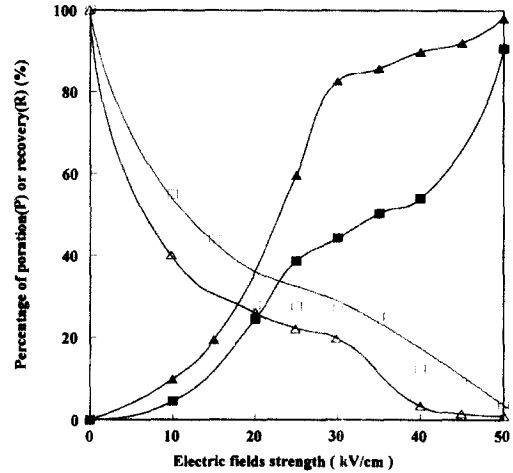


Fig. 5. Effect of electric field strength on poration and recovery of *P. rhodozyma* treated with PEF at frequency 100 Hz. treatment time: ■—■ 100  $\mu$ s (P), ▲—▲ 300  $\mu$ s (P), □—□ 100  $\mu$ s (R), △—△ 300  $\mu$ s (R)

Fig. 6. Effect of electric fields strength on the inclusion of phloxine B dye reagent (0.01%, v/v) into *P. rhodozyma* untreated(a) and treated with PEF at 10 (b), 20 (c), and 50 (d) kV/cm for 300  $\mu$ s.

는 것으로 생각된다.

### Carotenoid 추출에 미치는 전기적 조건의 검토

*P. rhodozyma* 배양액 30 mL를 원심분리하여 균체만을 회수한 후 다시 0.01% NaCl 용액에 현탁시킨 후 1 mm의 간격을 가진 순환식 용기(recycle chamber)를 이용하여 전기장 세기 30~50 kV/cm, 주파수 100~900 Hz 및 처리시간 1000~2000  $\mu$ s의 조건에서 PEF 처리하였다. 여러번의 실험결과 spark와 열발생으로인해 50 kV/cm 이상의 전기장세기는 부적절하였으며, 또한 가능한 열발생을 줄이기 위한 처리시간과 주파수는 1000  $\mu$ s, 300 Hz임을 확인하였다. 그러나 PEF 처리만으로는 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid 색소가 거의 추출되지 않았는데, 이는 세포내의 색소가 세포막의 인지질층과 결합된 형태로 존재하기 때문에 세포막의 투과성 증진만으로는 색소를 추출할 수가 없기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 우선 세포를 현탁시키는 전해질 용액을 변화시켜 색소의 추출이 촉진되는지 확인하였다. Table 1에서 보듯이 세포를 현탁시키는 용액을 0.01% CaCl<sub>2</sub> 용액으로 바꾼 결과 약간의 색소가 추출되었다. 이는 2가양이온(Ca<sup>2+</sup>)이 세포막의 투과성을 증진시키는 동시에 세포현탁액의 전기전도도에 영향을 미치게 때문인 것으로 생각된다. NaCl 현탁용액의 전기전도도는 228.5  $\mu$ s/cm 이었으며, CaCl<sub>2</sub> 현탁용액의 전기전도도는 177.5  $\mu$ s/cm이었다. Jayaram 등<sup>(9)</sup>은 처리시료의 전기전도도에 따라 미생물의 치사효과가 달라지고, 효과적으로 세포막의 비가역적인 파괴를 일으키기 위한 임계 전기장의 세기는 약 25 kV/cm이고 최적의 전기전도도는 약 170  $\mu$ s/cm라고 보고하였다. Table 2는 0.01% CaCl<sub>2</sub> 세포현탁액에 전기장의 세기와 처리시간, 주파수를 달리 하였을 경우에 추출되는 carotenoid량을 비교하였다. 1000 Hz의 주파수와 1000  $\mu$ s의 처리 시간에서 전기장세기를 달리하여 처리한 결과, 색소추출에는 거의 차이가 없었으나 오히려 처리조건이 강해질수록 추출량이 약간 감소하였다. 이는 50 kV/cm 이상의 전기장세기에서는 spark에 의한 열발생으로 오히려 추출량이 감소하는 것으로

**Table 1. Effect of treatment media on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells**

Treatment media	Total carotenoid concentration ( $\mu$ g/g of dried yeast)
0.01%NaCl	ND <sup>1</sup>
0.01% CaCl <sub>2</sub>	27.3

<sup>1</sup>ND=not detected.

**Table 2. Effect of high-voltage PEF treatment conditions on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells.**

Treatment Condition			Total Carotenoid Concentration
Strength (kV/cm)	Treatment time ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	( $\mu$ g/g of dried yeast)
50	1000	1000	27.3
60	1000	1000	21.3
70	1000	1000	11.6
80	1000	100	11.3
50	1000	300	27.3
50	1000	500	10.3
50	1000	700	12.9
50	1000	900	10.9
50	2000	300	13.8
50	2000	500	11.9
50	2000	700	8.9
50	2000	900	9.2

\**P. rhodozyma* cultured broth was suspended in 0.01% CaCl<sub>2</sub> solution.

생각되었다. 또한 50 kV/cm의 전기장세기에서 주파수와 처리시간을 달리하여 실험한 결과, 마찬가지로 색소추출에는 거의 차이가 없었다.

## 요 약

고전압 펄스 전기장(PEF)가 *P. rhodozyma* 세포의 형태학적 변화와 carotenoid의 추출에 미치는 영향을 연구하였다. 전기장 세기 10~50 kV/cm와 처리시간 100~300  $\mu$ s의 범위에서 세포를 PEF 처리했을 때 전기장의 세기와 처리시간이 증가함에 따라 세포의 팽창, 손상 정도와 세포내 물질이 유출되는 정도가 증가하였다. 10~50 kV/cm, 100 Hz의 exponential decay파로 세포현탁액을 100  $\mu$ s 또는 300  $\mu$ s 처리하였을 때 최대 전기장(50 kV/cm)에서 생존수가 각각 1.5 및 2.5 log 감소하였다. 50 kV/cm의 전기장에서 세포막에 형성되는 electroporation 정도는 98%에 달하였고, 이 때 세포의 회복률은 5% 미만으로 확인되었다. Phloxine B 색소로 세포를 염색했을 때 생존세포는 염색되지 않았으나, PEF 처리한 세포는 색소가 내부로 침투되어 적색으로 염색되었으므로 세포막이 손상된 것을 알 수 있었다. Carotenoid 색소가 *P. rhodozyma* 세포막의 지방체와 결합한 상태로 존재하기 때문에 고전압 PEF 처리에 의한 세포막 투과성 증진의 효과만으로는 색소 추출이 어려웠으나, 세포현탁액 조제시에 0.01% NaCl 용액 대신에 0.01% CaCl<sub>2</sub> 용액을 사용하는 경우에는 10~20  $\mu$ g의 색소 추출 증진 효과가 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 첨단 농업기술 개발사업 과제로서 연구비를 지원 받아 진행되었기에 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Barbosa-C novas G.V. and Swanson, B.G.: Nonthermal pasteurization of liquid foods using high intensity pulsed electric fields. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.* **36**(6), 603-627 (1996)
2. H.Y. Cho, Shin, J.K. and Pyun, Y.R.: Nonthermal food process technology by high voltage pulsed electric fields. *Food Sci. Ind.* **29**(3), 28-35 (1996)
3. Rogob, E.A.: Electrical plasmolysis, In *Electrical and Physical Process of Foods, Agricultural production of Moscow*, 86-95 (1988)
4. Guelen, M., Teichgraber, P. and Knorr, D.: *Z. Lebensmittelwirtschaft* (in press)
5. Knorr, D., Geulen, M., Grahl, S.L. and Sitzmann, W.: Food application of high electric fields pulse, *Trend in Food Sci. Technol.*, **5**, 71-75 (1994)
6. Ohshima, T., Sato, M. and Sito, M.: Selective release of intracellular protein using pulsed electricfield. *J. of Electrostatics*, **35**, 103-112 (1995)
7. Torrissen, O.J., Hardy, R.W. and Shearer, K.D.: Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism in salmonides. *CRC Crit. Rev. Aquatic Sci.*, **1**, 209 (1989)
8. An, G.H., Schuman, D.B. and Johnson, E.A.: Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 116-124 (1989)
9. Johnson, E.A. and Lewis, M.J.: Astaxanthin formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 173-183 (1979)
10. Calo, P., Velazquez, J.B., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E. and Villa, T.G.: Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1396-1399 (1995)
11. Okagbue, R.N. and Lewis, M.J.: Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 243-255 (1985)
12. Okagbue, R.N. and Lewis, M.J.: Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma* : A potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 247-250 (1984)
13. Shin, H.H. and Pyun, Y.R.: Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high voltage pulsed electric fields treatment. *Kor. J. of Food Sci.*, **29**, 1175-1183 (1997)
14. Wataru, T., Masafumi, M. and Tomoo, F.: The relationship between electroporation and growth phase in a suspension of yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nippon Nogekagaku Kaisi.*, **70**, 563-568 (1996)
15. Knorr, D. and Angersbach, A.: Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends Food Sci. & Technol.*, **9**, 185-189 (1998)
16. Mastsumoto, Y., Satake, T., Shioji, N. and Sakuma, A.: Inactivation of microorganisms by pulsed high voltage applications. *Conf. Tech. of IEEE Industrial Applications Society Annual Meeting*, 652-659 (1991)
17. Hofmann, G.A.: Microflora reduction in liquids with pulsed electric fields. In *International Technical Report, Biotechnologies and Experimental Research*, Inc. San Diego. (1984)
18. Hülshager, H., Potel, J. and Niemann, E.G.: Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.*, **22**, 149-162 (1983)
19. Jayaram, S., Castle, G.S.P. and Margaritis, A.: The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 117-122 (1993)

(1999년 2월 18일 접수)