

투과성 증진 방법과 펄스전기장의 병합처리에 의한 *Phaffia rhodozyma*로부터의 Carotenoid 추출

김남훈 · 신정규 · 이석훈 · 조형용* · 변유량
연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구센터, *전주기전여자대학 식품공학과

Extraction of Carotenoid from *Phaffia rhodozyma* by Combining Permeabilizing Methods and Pulsed Electric Fields Treatments

Nam-Hoon Kim, Jung-Kue Shin, Seok-Hoon Lee, 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

This study was done for the extraction of carotenoid from *Phaffia rhodozyma* in combination with PEF and other methods. PEF treatment conditions were 30~80 kV/cm, 100~1000 Hz and 100~1000 μ s. In order to increase permeability of yeast cell wall, various methods such as freezing-thawing, mechanical treatment, solvents, permeabilizing agents, and yeast cell wall lytic enzyme were used before PEF treatment. The combination of PEF (50 kV/cm, 300 Hz, 1000 μ s) and conventional methods such as solvent and freezing-thawing pre-treatment had no effects on the extraction of carotenoid pigments. The extent of extracted carotenoid by the PEF treatment(50 kV/cm, 300 Hz, 1000 μ s) combined with yeast cell wall lytic enzyme and mechanical pre-treatment increased 52% and 69.8% more than the sum of that by each treatment, respectively. Permeabilizing agents, especially Tween 20 and capric acid, enhanced the extraction efficiency of carotenoid pigments from *P. rhodozyma* cells. These results indicated the feasibility for the continuous extracting carotenoid pigments from *P. rhodozyma* by PEF combined with other permeabilizing methods.

Key words : High voltage pulsed electric fields (PEF), carotenoid extraction *Phaffia rhodozyma*, combined treatment

서 론

최근 들어 합성 색소의 인체에 대한 안전성의 문제가 제기되면서 이를 대체할 수 있는 새로운 천연 색소의 추출내지는 개발에 대한 연구, 특히 효소 공정, 미생물 또는 식물 세포 배양과 같은 생물 공정(biotechnological procedures)을 이용한 생산방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 수요량 역시 크게 증대되고 있다. 그러나 이러한 수요를 만족시키기 위해서는 생산되는 색소를 회수할 수 있는 공정이 필요하며, 그 공정은 화학적인 것보다는 물리적 또는 기계적인 방법이 보다 유리하다.

외부에서 세포에 전기장을 가하면 세포막의 변화가 유발된다. 즉 세포막의 전하 분리를 일으킨다. 세포막

전위차가 임계값(critical value)을 넘게 되면 전하 전달 분자(charge carrying molecules)간에 반발력이 생기며 결과적으로 세포막에 세공(pore)을 형성하게 된다⁽¹⁾. 외부 전기장이 이 임계값이나 임계값보다 약간 넘게 되면 세포막에 가역적인 세공이 형성되며 이는 세포내에 외부의 DNA를 도입시키거나 세포의 융합을 용이하게 하는데 사용되고 있다^(2,3).

세포가 임계값 이상의 전기장하에 놓이면 형성되는 세공은 비가역적이 되며 세포막은 파괴된다. 이 기작은 현재 미생물의 불활성화를 위한 방법으로 적용되고 있으며 또한 과일 주스를 만드는 공정이나 색소의 추출공정에서 수율을 향상시키기 위한 방법으로 시험적으로 적용되고 있다.

*P. rhodozyma*의 세포벽은 두터운 glucan 층으로 이루어져 있으며⁽⁴⁾, 세포내에 축적되는 carotenoid는 지방체와 결합하거나 또는 지방체 안에 존재하고 endoplasmic reticulum이나 미토콘드리아에는 존재하지

Corresponding author : Yu-Ryang Pyun, Department of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-ku, Seoul 120-749 Korea

않는 것으로 알려져 있다⁽⁵⁾. 따라서 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid를 추출하기 위해서는 세포벽의 파괴가 선행되어야 한다. 기계적 파괴법^(6,7), 화학적(산 또는 알칼리) 가수분해법⁽⁸⁾, 효모세포벽 용균효소를 이용하는 방법^(9,10), autolysis 시키는 방법⁽¹¹⁾ 등의 기존 방법들은 carotenoid 색소를 변성시킬 위험이 있으며, 회분 공정이기 때문에 대규모의 공정에 적용하기가 어렵다는 단점이 있다. 뿐만 아니라 김⁽¹²⁾ 등은 고전압 펄스 전기장을 이용하여 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid 색소의 추출 가능성을 조사한 결과, 고전압 펄스 전기장에 의해서 발생하는 투과성 증진 효과만으로는 색소 추출 가능성이 어렵다고 보고하였다.

본 연구에서는 고전압 PEF와 yeast로부터 색소를 추출하는 전통적인 방법 중에서 냉동-해동의 반복처리, 기계적인 처리(ultra turrexer), 유기 용매의 혼합처리(toluene, ethanol 및 ethyl acetate), 11개의 permeabilizing agents(Tween 20, Tween 40, DMSO, Glycerin fatty acid ester, Triton X-100, Phthalic acid bis ester, Sodium lauryl sulfate, Lecithin, Capric acid, Caproic acid 및 Chitosan) 첨가, 효모 세포벽 용균 효소 처리 등을 전처리하고 고전압 PEF 처리를 하는 병합처리 방법으로 *P. rhodozyma* 세포로부터 연속적으로 carotenoid pigments를 추출할 수 있는 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서는 한국중균협회에서 분양받은 wild type의 *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202와 yeast cell wall lytic enzyme을 생산하는 *Bacillus circulans* ATCC 21367 균주를 사용하였다. *Phaffia rhodozyma*는 YM 배지(Difco)를 사용하여, 배지 25 mL에 21°C에서 20시간 전배양한 균체를 100 mL 배지에 2% (v/v) 접종한 후 21°C에서 150 rpm으로 4일동안 진탕배양하였다. *Bacillus circulans*는 yeast extract 0.5%, tryptone 0.5%, CaCl₂ · 2H₂O 0.05%, MnCl₂ · 4H₂O 0.05%, KH₂PO₄ 0.02%, soluble starch 1%의 조성을 가진 배지 50 mL를 사용하여 30°C에서 150 rpm으로 24시간 동안 진탕배양한 후 8000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 cell free broth만을 얻어 이것을 효모 세포벽 용균 효소로 사용하였다.

시료의 전처리

4일간 배양한 *P. rhodozyma* 배양액 30 mL를 원심분

리하여 균체만을 모은 후, 30 mL의 0.01% NaCl 또는 0.01% CaCl₂ 용액에 현탁하여 PEF 및 병합처리 시료로 사용하였다. 시료의 병합처리는 세포의 투과성을 증진시킬 수 있는 물리적, 화학적 또는 생물학적인 방법을 다음과 같이 전처리 한 후에 즉시 고전압 PEF 처리를 하였다.

전처리로써 냉동-해동은 0.01% NaCl 또는 CaCl₂ 균체 현탁액을 -80°C에서 급속 냉동하고 상온에서 해동하는 과정을 3번 반복하였으며, permeabilizing agents는 0.01% CaCl₂ 균체 현탁액에 11가지의 permeabilizing agent를 각각 0.01~0.05%(v/v) 농도로 첨가하여 상온에서 2시간 동안 천천히 교반하여 첨가하였다. 효모 세포벽 용균 효소는 *Bacillus circulans*의 cell free broth를 0.01% CaCl₂ 균체 현탁액에 첨가하고 30°C에서 150 rpm으로 24시간 교반하여 반응시켰고, 기계적 방법으로는 0.01% CaCl₂ 균체 현탁액을 ultra turrexer을 이용하여 8000 rpm에서 2분간 처리하여 cell을 파쇄하였으며, 유기용매는 toluene, ethanol 및 ethyl acetate를 적정비율로 섞은 혼합용매를 균체 현탁액에 30%의 부피비율로 첨가한 후 상온에서 2시간 교반 처리하였다.

고전압 펄스 전기장 처리

본 실험에서는 Shin과 Pyun⁽¹³⁾이 사용했던 것과 동일한 고전압 펄스 발생 장치와 Kim⁽¹²⁾등의 처리 용기를 이용하여 PEF 처리하였다. 전처리 전·후의 시료를 시료 저장 용기에 넣고, peristaltic pump를 이용하여 0.3 mL/sec의 속도로 처리용기에 흘려보내면서 임의의 전기장(30~80 kV/cm)과 주파수(100~1000 Hz)에서 처리 시간이 100 μs~1000 μs가 되도록 처리하였다. 이때 펄스폭(τ)은 1 μs이고 펄스 형태는 exponential decay이었다.

총 carotenoids 농도 측정

P. rhodozyma 균체 1g당 생성되는 carotenoid의 기준양을 측정하기 위하여 전통적인 방법인 bead cell homogenizer를 이용하였다. *P. rhodozyma* 배양액 30 mL를 원심분리하여 균체만을 모은 후 증류수로 1회 세척한 다음, 약 5 mL의 균체량과 동일량의 bead(0.25~0.3 mm)를 12 mL의 shaking cap tube에 담은 후 CO₂ 냉각 장치가 달린 Braun cell homogenizer(Bronuill Scientific Inc. Rochester, NY)를 이용하여 4000 rpm, 5분간 처리한 후에 bead와 균체를 분리한 것과 고전압 PEF 단독 처리 및 병합 처리 후의 시료를 Kim⁽¹²⁾ 등의 방법을 이용하여 측정하였다.

형태학적 변화 관찰

주사전자현미경(SEM)과 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 고전압 PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 50 kV/cm, 1000 μ s, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 단독 처리한 균체와 capric acid를 첨가(0.1%, v/v)하여 PEF 처리한 균체, 그리고 무처리 시료를 정착액(5% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde, 0.2 M phosphate buffered saline solution; PBS)에서 고정하고, 이를 유기용매로 탈수하고 자연 건조한 다음, 금 코팅하여 주사전자현미경(JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 또한 1차 고정된 균체 시료를 2차 고정액(2% OsO₄, 0.2 M PBS)에서 다시 고정한 후 탈수하여 유기용매와 epon 혼합물에 침윤시키고 이를 건조기에서 중합화 한 다음 유리칼로 절단하여 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

냉동-해동의 반복처리

Table 1에는 Kim⁽¹²⁾ 등이 균체를 현탁하는 용액의 전기전도도에 따라 carotenoid 추출 효과가 다르다고 보고하였던 결과와 전처리로서 -80°C에서 급속 냉동하고 반복하는 과정을 세 번 거친 후에 50 kV/cm, 300 Hz의 조건에서 1000 μ s 동안 PEF 처리한 후의 carotenoid 추출량을 나타내었다. 미생물은 냉동-해동의 반복에 의해 세포 투과성이 증가한다고 보고되고 있으며^(14,15), 이는 냉동시 얼음결정에 의한 세포막 손상이 원인으로 설명되고 있다. 하지만 전처리로 냉동-해동 과정을 실시한 결과에는 별다른 추출효과가 나타나지 않았다. Table 1의 실험결과에 따라 냉동-해동의 물리적 방법으로는 추출효과를 기대할 수 없으나 색소 추

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

Pretreatment	Treatment media	Total carotenoid concentration (μ g/g of dried yeast)
Control	NaCl	ND ^a
	CaCl ₂	27.3
Freezing-thawing	NaCl ^b	7.6
	CaCl ₂ ^c	22.6

^aND = Not detected, because of small amount.

^bCells were suspended in 0.01% NaCl solution, frozen at -80°C, thawed at room temperature and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000 μ s. ^cCells were suspended in 0.01% CaCl₂ solution, frozen at -80°C, thawed at room temperature and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000 μ s.

Table 2. Effects of PEF treatment combination with permeabilizing agents on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells.

Permeabilizing agents	Total carotenoid concentration (μ g/g of dried yeast)		
	Concentration of permeabilizing agents added(%, v/v)		
	0.01	0.1	0.5
Tween 20	60.7	42.5	59.83
Tween 40	53.5	23.7	8.7
DMSO	7.4	8.4	10.72
Glycerin fatty acid ester	37.6	18.7	8.4
Triton X-100	18.5	24.3	18.9
Phthalic acid bis ester	25.4	22.5	13
Sodium lauryl sulfate	21.2	21.3	12.6
Lecithin	38.6	45.8	13
Capric acid (C ₁₀)	61.7	75.2	35.5
Caproic acid (C ₈)	55.4	67.5	20.3
Chitosan	24	12.7	13.6

All determination were made in duplicate in two independent runs.

All permeabilizing agents were added in 30 mL cell suspension, stirred at room temperature for 2 hr mildly and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000 μ s.

출을 위한 매질로 0.01% CaCl₂ 용액을 선택하여 다른 전처리와 병합처리에 의한 carotenoid의 추출 효과에 대하여 조사하였다.

Permeabilizing agents와의 병합효과

계면활성제인 Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate)과 Tween 40(polyoxyethylene sorbitan monopalmitan), 지방산 에스테르, Triton X-100, 그리고 탄소수 10개의 지방산 capric acid와 8개의 caproic acid가 carotenoid 색소 추출에 미치는 영향을 검토하기 위해서 세포 현탁액에 이들을 각각 0.01~0.5%(v/v) 농도로 첨가 후 PEF 처리하였다. Permeabilizing agents들은 농도에 따라 그 작용 능력에 차이를 보이는 것으로 알려져 있으며 실험 결과도 첨가 농도에 따라 추출량에 차이가 있음을 나타냈다(Table 2). Tween 20과 Tween 40의 경우에는 0.01%의 첨가농도에서 색소의 추출량이 가장 많았으며 Tween 40보다는 Tween 20이 좋은 추출효과를 보였다. 이는 Tween 40에 비해 짧은 탄소수를 가진 Tween 20이 미생물 세포막에 더 용이하게 접근하여 세포막의 구조를 교란하여 투과성을 증가시켰을 것으로 판단된다. Caprylic acid, capric acid 등의 지방산은 yeast의 생육을 억제하고 음이온 계면활성제로서 세포막을 교란하거나 용해할 수 있다. 이러한 지방산의 진균독성(fungitoxicity)은 탄소수의 길이, 농도, pH에 따라 다르며, 탄소수가 11개까지는 길

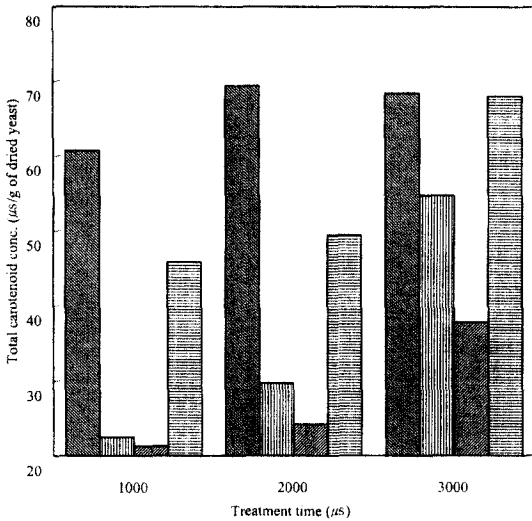


Fig. 1. Effects of treatment time on the extraction of carotenoid by PEF combined with permeabilizing agents.

▨ : Tween 20 (0.01%), ▩ : Phthalic acid bis ester (0.01%), ▧ : Sodium lauryl sulfate (0.01%), ■ : Lecithin (0.01%)

수록 효과가 크고 직쇄상 탄소 구조의 지방산이 가진 달린 탄소구조를 가진 지방산보다 항균력이 크다고 보고되고 있다⁽⁶⁾. 실제 탄소수 8개의 caproic acid와 탄소수 10개의 capric acid를 0.01~0.5% 첨가하여 PEF 처리한 결과 0.1%의 첨가농도에서 최대 색소 추출량을 나타냈으며, 0.5%의 첨가농도에서는 오히려 감소하였는데, 이는 과도한 양의 지방산 소수성기가 세포막의 lipoprotein과 결합하여 세포막의 성분이 빠져나오지 못하도록 망을 형성하는 것으로 생각된다. Lecithin도 농도에 따라 추출량에 큰 영향을 나타내었으며, 0.1%에서 가장 큰 효과를 나타내었다. Lecithin은 tween 계열의 계면활성제와 마찬가지로 세포막구조의 교란에 의한 투과성 증진효과를 갖는 것으로 보고되고 있다. Pemeabilizing agents는 양친매성을 가지고 있어서 소수성기가 세포막의 지질 이중층(lipid bilayer)의 지질단백질과 결합하고 친수성기는 세포밖의 물질과 결합한 상태에서 micelle을 형성하고 마침내 지질단백질 성분을 세포 밖으로 빼냄으로서 세포막의 투과성 변화를 가져오게 되어 PEF와의 병합처리 시 색소의 추출량을 향상시킨다. Fig. 1는 4가지의 permeabilizing agents에 대하여 최적농도 첨가 후 50 kV/cm의 전기장 세기와 300 Hz의 주파수에서 처리시간에 따른 carotenoid 추출량을 비교하였다. 처리시간이 증가함에 따라 대부분 carotenoid 추출량이 증가하였으나, 추출량의 증가정도

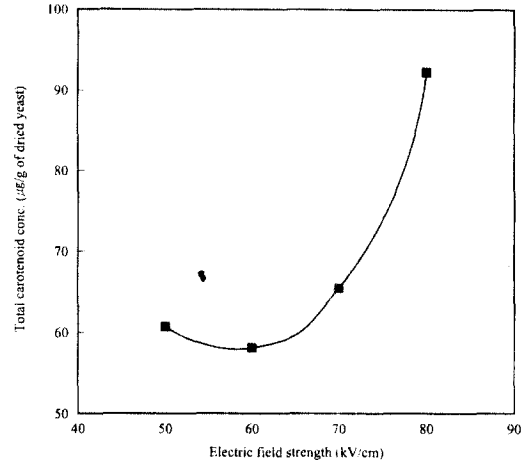


Fig. 2. Effects of electric field strength combined with Tween 20 (v/v, 0.01%) on the extraction of carotenoid by PEF

는 매우 적었다. 즉 처리시간이 carotenoid 추출에 미치는 영향은 크지 않은 것을 알 수 있었다.

Fig. 2는 Tween 20을 0.01% 첨가 후 100 Hz의 주파수와 1000 µs의 처리시간에서 전기장의 세기에 따른 carotenoid 추출량을 비교하였다. 50~70 kV/cm의 전기장 세기에서는 추출량에 큰 차이가 없었으나 80 kV/cm에서 약 30 µg 정도가 더 추출되었다. Capric acid를 0.1% 첨가 후 같은 조건에서 추출량을 비교하였으나 추출량에는 큰 차이가 없었다(data not shown).

용균 효소와의 병합효과

*B. circulan*은 glucanase, xylanase, protease 등의 효모 세포벽 용균 효소를 생산하며 이들 효소체계가 효모 세포벽 용균에 관여하고 있다고 보고되고 있다⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. *P. rhodozyma*의 세포벽은 두터운 glucan 층으로 이루어져 있어 PEF 처리만으로는 세포내 물질인 carotenoid를 추출하기 어렵기 때문에 *B. circulan*의 배양여액을 첨가하여 PEF 처리한 결과, *B. circulan*만 처리한 결과에 비하여 carotenoids의 추출량이 약 65% 증가하였을 뿐만 아니라 PEF 단독처리보다는 추출량이 약 13.7배 증가하였고, 전통적 추출 방법인 bead cell honogenizer를 이용하는 경우보다 추출량이 약 1.9배 증가하였다 (Table 3). 뿐만 아니라 효소 처리와 PEF 단독 처리의 색소 추출량에 대한 산술적 합계보다도 병합 처리를 하는 경우가 약 52% 정도 증진 효과가 있었다. 이러한 결과는 용균 효소와의 병합 처리는 synergy 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of PEF combined with *B. circulan* producing yeast cell wall lytic enzyme on the extraction of carotenoid for *P. rhodozyma* cells.

Treatment condition	Total carotenoid conc. (µg/g dried yeast)
Bead cell homogenizer	200
PEF only	27.3
<i>B. circulan</i> only	242.5
<i>B. circulan</i> +PEF	372

Table 4. Effects of electric fields strength combined with mechanical method on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells by PEF.

Mechanical method	Electric field strength (kV/cm)	Total carotenoid conc. (µg/g dried yeast)
	-	ND
	50	90.6
Ultra turrexer	60	67.1
	70	94.5
	80	97

These samples were, after mechanical treatment, treated with PEF.

기계적 방법과의 병합효과

P. rhodozyma 배양액을 ultra turrexer을 이용하여 8000 rpm, 2분동안 전처리한 다음 1000 µs의 처리시간과 300 Hz의 주파수에서 전기장 세기를 달리하여 PEF 처리한 후 carotenoid를 추출한 결과를 Table 4에 나타내었다. 전처리 단독으로는 색소 추출효과가 없었으나, Ultra turrexer와 PEF 처리의 병합처리에 의해서 색소 추출 효과는 증진되었다. 뿐만 아니라 PEF 단독처리(50 kV/cm, 1000 µs, CaCl₂ solution)보다 약 200%의 색소 추출 증진 효과가 있어 이 방법 역시 synergy 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 전기장 세기의 증가에 따라 추출 효과는 별로 증가하지 않았다.

유기용매와의 병합효과

Toluene과 ethyl acetate는 효모의 세포막 투과성을 증진시키는 대표적인 유기 용매로서 사용되고 있으며, 주로 세포내 효소를 추출하기 위하여 사용되고 있다.^(15,19) Toluene, ethanol 및 ethyl acetate를 임의의 비율로 섞은 혼합용매를 *P. rhodozyma* 배양액에 30%의 부피 비율로 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 교반처리한 후 50~70 kV/cm, 1000 µs, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 처리하여 carotenoid 추출량을 비교하였다. Table 5에서 보듯이 전반적으로 추출에 미치는 효과가 toluene이 ethyl acetate에 비해서 우수함을 확인할 수 있었다. Toluene은 비극성용매로서 toluene만을 이용하여 세포를 현탁하였을 경우 세포가 균일하게 현탁되

Table 5. Effects of electric field strength combined with solvent pretreatment on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells by PEF.

Solvent(v:v)			Electric field strength (kV/cm)	Total carotenoid concentration (µg/g of dried yeast)
Toluene	Ethanol	Ethyl acetate		
			-	75.3
7	3	-	50	77.6
			70	96
			-	73
9	1	-	50	76
			70	121
			-	29.2
-	1	9	50	30
			70	32
			-	18.1
-	-	10	50	41.3
			70	70.5

지 않고 뭉치는 현상을 보여 실험에 적당하지 않았다. 따라서 극성용매인 ethanol을 혼합하여 실험에 사용하였다. Ethanol의 혼합 비율에 따라 추출량에 다소 차이를 보였는데 toluene, ethyl acetate의 경우 모두 ethanol의 함량이 높아짐에 따라 효과가 감소하는 경향을 나타내었다. Toluene이 ethyl acetate에 비해 높은 추출율을 보이는 것은 toluene이 비극성용매로서 극성용매인 ethyl acetate보다 세포막의 지질층과 효과적으로 상호작용하여 나타나는 현상으로 보이며, toluene에 극성용매인 ethanol의 첨가량이 많아짐에 따라 추출량이 줄어드는 것도 같은 원인으로 보인다.

병합처리 후의 형태학적 변화

50 kV/cm, 1000 µs, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 처리만 한 세포, 무처리 세포 및 permeabilizing agent로서 사용된 capric acid(0.1%, v/v)와 병합 처리된 세포의 외관을 관찰한 주사전자현미경(SEM) 사진은 Fig. 3과 같다. 고전압 펄스 전기장 처리만 한 세포의 경우 세포외관이 많이 거칠어지긴 하였으나 원래의 형태를 유지하고 있음을 확인할 수 있었으며⁽²⁰⁾, capric acid와 병합 처리된 세포는 세포내 물질이 과도하게 빠져나가면서 세포가 더 이상 원형의 모습을 유지하지 못하고 쭈글쭈글해진 형태를 띄고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 색소추출정도와 비교해서 생각했을 때 PEF 처리만으로는 색소추출이 거의 되지 않았던 점과 capric acid와의 병합처리가 색소추출에 어느 정도 효과가 있었다는 점을 고려하면 이해가 되는 부분이라고 생각

Fig. 3. Scanning electron micrographs of *P. rhodozyma* treated with PEF. (a) control cells, (b) cells treated with only PEF at 50 kV/cm, 1000 μ s, 300 Hz, (c) cells treated with PEF combined with capric acid(v/v 0.1%) at 50 kV/cm, 1000 μ s, 300 Hz.

된다. *P. rhodozyma* 세포의 미세구조를 관찰한 투과전자현미경(TEM) 사진을 Fig. 4에 나타내었다. Capric acid와 병합 처리된 세포의 경우 세포벽이 부분적으로 파손되었음을 확인할 수 있었으며, 세포막과 세포내의 구성물질이 대부분 파손되고 세포 밖으로 빠져나가 세포 중심부 곳곳이 비어 있는 것을 발견할 수 있었다.

요 약

고전압 PEF는 *P. rhodozyma* 세포막에 손상을 주어 투과성을 80% 이상 증진시키지만, carotenoid 색소가

Fig. 4. Transmission electron micrographs of *P. rhodozyma* treated with PEF. (a) control cells, (b) PEF treated combined with capric acid(v/v, 0.1%) at 50 kV/cm, 1000 μ s, 300 Hz.

P. rhodozyma 세포막의 지방체와 결합한 상태로 존재하기 때문에 고전압 PEF 처리에 의한 세포막 투과성 증진의 효과만으로는 색소 추출 효과가 거의 없다는 김⁽¹²⁾ 등의 보고에 이어서, 본 실험에서는 투과성을 증진시키는 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법을 전처리하고 고전압 PEF 처리를 하는 병합 처리가 색소 추출에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 유기 용매 처리 또는 냉동-해동의 반복 처리 후에 50 kV/cm, 300 Hz에서 1000 μ s 동안 PEF 처리하는 병합 처리의 경우에는 색소 추출에 synergy 효과가 없었다. 효모 세포벽 용균 효소 처리나 ultra turrexer를 이용하는 기계적 처리를 한 후에 PEF 처리를 하는 병합 처리의 경우에는 색소 추출이 PEF 단독 처리보다 각각 13.7배 또는 3.3배 증가하였다. 위의 2가지 경우에는 PEF와 전처리에 따른 색소 추출량의 산술적 합계보다도 병합처리하는 경우의 색소 추출량이 각각 52% 및 69.8% 증가하였다. 따라서 병합처리가 synergy 효과가 있다는 것을 알 수 있었지만 연속 공정으로 적합하지 못하였다. 한편 세포 투과성을 증진시키는 11가지의 permeabilizing agents를 0.01~0.5%(v/v)의 농도로 0.01% CaCl₂ 세포 현탁액에 첨가하여 상온에서 2시간 교반 후에 고전압 PEF 처리하는 병합 처리를 한 결과, 계면활성제인 Tween 20과 탄소수 10개의 포화지방산인 capric acid는 각각 0.01% 및 0.1% 첨가했을 때 색소 추출량이 60.7 및 75.2 μ g으로서 가장 효과적이었다. 이러한 병합 처리는 연속 공정으로서의 가능성도 충분하다. 뿐만 아니라 capric acid를 첨가하고 난 후에 PEF 처리하는 병합 처리 효과를 직접 확인 하고자 무처리, PEF 단독처리 및 병합처리 후의 세포 내·외부의 변화를 SEM과 TEM으로 관찰하였다. SEM으로 관찰한 결과 PEF 처리에 의해서 세포 표면이 거칠어지고 쭈글쭈글한 모양을 띠어 무처리 세포와는 다른 형

태로 나타내었으며, 병합처리의 경우에는 정도가 심하였다. TEM으로 관찰한 결과 병합 처리에 의하여 세포벽은 유지되었으나 세포막은 그 구성물질이 많이 빠져나가 손상된 모습을 나타내었다. 이와 같은 결과들은 *P. rhodozyma*로부터 연속적으로 색소 추출 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부 첨단 농업기술 개발 과제로 지원 받아 진행되었기에 이에 감사드립니다.

문헌

- Zimmerman, U. Electrical breakdown, electroporation and electrofusion. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 105: 175-256 (1986)
- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. and Kimura, A. A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 336-339 (1985)
- Biedinger, U., Youngman, R.J. and Schnabl, H. Differential effects of electrofusion and electroporation parameters on the membrane integrity of plant protoplasts. *Planta* 180: 598-602 (1990)
- 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)
- An, G.H. Production of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Food Nutrition Information*, 6: 22 (1995)
- 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)
- Johnson, E.A. and Lewis, M.J. Astaxanthin formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183 (1979)
- 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)
- 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)
- Okagbue, R.N. and Lewis, M.J. Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources : Yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.* 5: 731-736 (1983)
- 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)
- Kim, N.H., Shin, J.K., Cho, H.Y. and Pyun, Y.R. Effects of high voltage pulsed electric fields on the extraction of carotenoid for *Phaffia rhodozyma*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31(3): 720-726 (1999)
- Shin, H.H. and Pyun, Y.R. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high voltage pulsed electric fields treatment. *Kor. J. Food. Sci. Technol.*, 29, 1175-1183 (1997)
- Thoma, J.N., Dacid, J.H. and Henry, Y.W. Chemical permeabilization of cells for intracellular product release. In *Separation processes in biotechnology*. Juan, A.A. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. p.177 (1990)
- Lawrence, C.P., Kevin, A.S., Nancy, B. and Richard, P.B. Freeze-thawing of *Aquaspirillum magnetotacticum* cells selectively releases periplasmic proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2590-2592 (1987)
- Koh, K.H. Antifungal activity of caproic acid against *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 378-383 (1995)
- Hirosato, T. and Takeshi, W. Glucanases and chitinases of *Bacillus circulans* WL-12. *J. Ind. Microbiol.* 4: 478-483 (1995)
- Kazuhiko, A., Takeshi, O., Nobuo, K., Naoki N., Hiro-sato, T. and Takeshi, W. Comparative studies of β -1,3-glucanase A1 and B of *Bacillus circulans* WL-12 : Purifications and enzymatic properties. *J. Ferm. Bioeng.* 80: 283-286 (1995)
- Esteban, R., Villanueva, J.R. and Villa, T.G. β -D-Xylanases of *Bacillus circulans* SL-12. *Can. J. Microbiol.* 28: 733-739 (1982)
- Pothakamury, U.R., Barbosa-C novas, G.V., Swanson, B.G and Spence, K.D. Ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with pulsed electric fields. *Food Sci. Tech. Int.* 3: 113-121 (1997)

(1999년 6월 8일 접수)