

Astaxanthin 생합성을 위한 *Phaffia rhodozyma* 변이주 B76의 발효공정 특성

¹임 달택 · †이 은규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실
(접수 : 2000. 2. 18., 게재승인 : 2000. 4. 12.)

Fermentation Process Characteristics of *Phaffia rhodozyma* Mutant B76 for Astaxanthin Biosynthesis

Dal Taek Lim¹ and Eun Kyu Lee†
Department of Chemical Engineering, Bioprocessing Research Laboratory,
¹Hanyang University, Ansan, Korea 425-791
(Received : 2000. 2. 18., Accepted : 2000. 4. 12.)

Specific carotenoids and astaxanthin biosynthesis power of *Phaffia rhodozyma* mutant B76, which was obtained after NTG and UV treatments, was higher than those of the wild type by 40% and 50%, respectively. The mutant strain did not show the catabolite repression even at 22%(w/v) glucose concentration. The optimum C/N ratio was 2.0, and the optimum temperature and initial pH were 22°C and 6.0, respectively. Both cell growth and astaxanthin formation decreased drastically as the fermentation temperature was increased over 22°C, whereas they were comparable in the pH range between 5.0 and 7.0. Inoculum size did not affect the final cell density nor the carotenoids biosynthesis, and 3%(v/v) was selected as optimal. Higher dissolved oxygen concentration facilitated astaxanthin biosynthesis, and aeration rate of 1.0 v/v/m and agitation speed of 400 rpm were selected as optimum. The final cell density of 43.3 g/L and the volumetric astaxanthin and carotenoids concentrations of 110.6 mg/L and 149.4 mg/L, respectively, were obtained. The specific carotenoids concentration was 3.45 mg/g-yeast(dry). Y_{x/s} and Y_{p/s} values of 0.37 and 1.08 were obtained. The result of this study will provide basic information useful for mass production of astaxanthin from *P. rhodozyma* fermentation.

Key Words : astaxanthin, *Phaffia rhodozyma* mutant B76, fermentation, carotenoids

서 론

Astaxanthin(3,3'-dihydroxy-carotene-4,4'-dione)은 분자량 596.85 Dalton, 융점 183°C의 carotenoids계 색소화합물로서 Figure 1의 구조에서 나타난 것과 같이 8개의 이소프레노이드 유닛(isoprenoid units)로 구성되어 있다. Astaxanthin은 주홍색을 띠고 있으며 양식어류와 가금류의 색상, 향, 맛 등을 증가시키는 색소 풍미원으로서 중요한 사료첨가제 역할을 하고 있다(1-3). 또한 astaxanthin은 인체내에서 vitamin A의 전구체 역할과 더불어 강력한 항산화 라디칼제로서 다른 carotenoids나 α-tocopherol보다 강한 항산화력을 갖고 있는 것으로 알려

져 있어 의약적으로도 관심의 대상으로 부각되고 있다(4-6). Astaxanthin은 다양한 생물체에 대하여 치명적인 세포막의 손상을 일으키는 산소 라디칼(O₂)의 피해를 막아 줄 수 있는 것으로 보고되고 있다(7, 8).

현재 astaxanthin의 총 세계 시장은 크게 양식어업과 가금류 등의 목축업 시장으로 양분되는데, 양식어업 시장은 1억 2,500만 달러 정도로 추산되고 있고, 목축업은 5~10년 이내에 1억 2,500만 달러 정도의 시장형성이 기대된다. 앞으로도 항산화제에 대한 용도연구와 기능성 천연식품 섭취를 통한 건강증진에 대한 소비자들의 수요 증대로 astaxanthin의 소비량은 매년 약 15% 수준으로 계속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다.

현재 astaxanthin은 크게 4 가지 방법에 의해 생산되고 있다. 첫째는 화학적 합성법으로 Roche사에서 생산하고 있으나 안전성 등의 문제로 미국 FDA의 허가를 받지 못하고 있는 실정이다. 두 번째로는 해양조류의 대규모 해양재배(aqua culture)에 의한 생합성방법으로 미국 Hawaii 등에서 이용되고 있다. 셋째로 새우, 크릴새우, 바닷가재 등의 갑각질에서

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Ansan, Korea 425-791.
Tel : 0345-400-5275, Fax : 0345-408-3779
E-mail : eklee@mail.hanyang.ac.kr

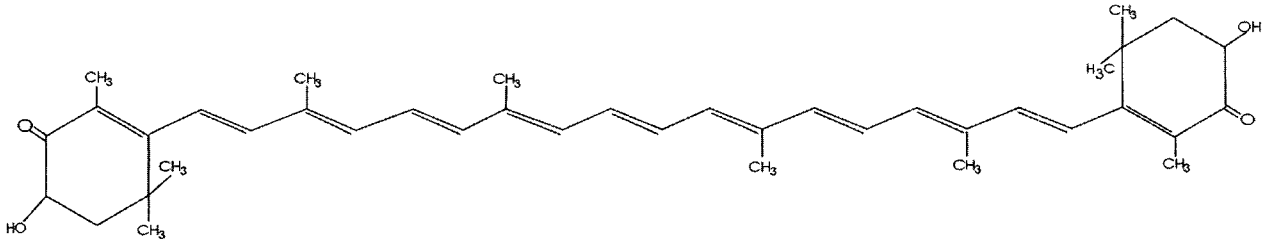


Figure 1. Molecular structure of astaxanthin.

유기용매 또는 초임계유체를 이용하여 추출하는 방법으로 원료물질의 확보와 추출 후 폐기물의 처리 등이 문제점으로 제기되고 있다. 마지막으로 astaxanthin 생합성 기능이 밝혀진 적색효모의 일종인 *Phaffia rhodozyma*의 대량배양을 통한 방법으로 위에 제시한 방법들 중 가장 경제성과 안전성이 우수한 방법으로 평가받고 있다. 따라서 본 연구에서는 astaxanthin의 산업적인 생합성을 위하여 *P. rhodozyma*의 wild type을 돌연변이 처리하여 carotenoids 생합성 능력이 우수한 변이주를 선별하고, 그 변이주의 배지 및 배양조건 최적화 연구를 수행함으로써 산업적인 대량 생산공정에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 astaxanthin 표준품(Sigma사)은 HPLC 정량분석을 위해 메탄올에 녹여 사용하였으며 yeast extract, malt extract, peptone, YM Broth, bacto yeast nitrogen base (YNB) w/o amino acids와 ammonium sulfate는 Difco사에서, glucose, CSL은 (주)대상에서, sucrose는 (주)삼양사에서, NTG 및 그 외의 일반 시약은 Sigma Chemical사의 특급 및 일반 시약을 사용하였다.

균 주

본 연구에 사용된 균주는 wild type 균주로서 *P. rhodozyma* B30((주)태평양화학 기술연구원) 및 이를 이용한 변이주 B76 효모이다. 균주보관은 YM agar(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, bacto-agar 2%) 평판 배지에서 22°C, 약 7일간 배양하여 colony를 형성한 후 4°C에서 보관하였으며 균주활성을 유지하기 위하여 3주마다 계대배양하였다. 또한 장기보관용은 5% YM broth(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%)에서 4일간 배양하여 냉동건조한 애플상태로 4°C에서 보관하거나 25% glycerol에 현탁하여 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

분석방법

총 carotenoids 함량의 측정은 Novozym®에 의해 파쇄된 세포용액을 원심분리하여 상등액을 제거하고 1 ml 메탄올을 첨가하여 5 분간 vortex한 후 원심분리함으로써 carotenoids 색소를 추출한 다음 475 nm에서 흡광도를 측정하여 An 등(9)이 제시한 공식에 의해 총 carotenoids 함량을 구하였다. 이 때 blank는 추출용매인 메탄올을 사용하였다. Astaxanthin 함량

측정은 총 carotenoids 함량 분석 방법과 동일한 방법에 의해 carotenoids 색소를 추출한 후 상등액을 0.2 μm 여과지(Millipore)로 여과하고 적정비율로 희석한 후 reverse phased C18 column(Waters, USA)으로 100% methanol을 사용하여 465 nm에서 HPLC(영인과학) 정량분석하였다. 당 함량 분석은 당분석기(Yellow Springs Instrument Co. Model 27)을 이용하였다.

Carotenoids 고생산 변이주의 제작 및 분리

돌연변이는 UV 조사나 NTG 등을 이용하여 유발하였다. UV 돌연변이는 YM broth에서 22°C, 180 rpm조건으로 48시간 동안 배양한 다음 OD_{660nm} 0.1(약 10⁶ cell/mL) 되게 희석하여 무균 평판에 200 μl pipetting하였다. 30cm 상부에서 15~20분 동안 UV(30 watt, 254 nm)를 조사한 후 22°C 항온기에서 24시간 동안 자라게 한 다음 평판 선별배지에 도말하여 변이균주를 분리하였다. NTG 돌연변이는 YM broth에서 동일하게 배양하여 효모균체를 원심분리하고 50 mM 구연산 완충액(pH 5.0)으로 2회 세척한 후 50 mM 구연산 완충액으로 OD_{660nm} 2 되게 현탁한 효모균체 용액 1 mL에 4 μl의 NTG(10 mg/mL in 0.05 M 인산 완충액(pH 7.0))을 가하여 22°C에서 30분간 배양하고 원심분리하여 50 mM 인산 완충액(pH 7.0)으로 2회 세척하여 돌연변이원을 제거하였다. 그 후 50 mM 구연산 완충액에 현탁하여 평판 선별배지에 도말하여 변이균주를 분리하였다. 우수 변이균주의 선별은 YM 한천배지에 β-ionone(carotenoids 생합성 저해제)이 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mM의 농도를 포함하도록 한 후 wild type 균주를 도말하여 colony 수가 약 95% 이상 감소하는 농도를 선별배지농도로 결정하여 변이균주를 도말한 후 7일간 배양하여 콜로니의 색이 진한 균주를 분리하고 wild type 균주와 함께 YM broth에서 22°C, 180 rpm조건으로 96시간 동안 배양하여 색소 생성량을 비교하였다.

배지조성 및 배양방법

배양배지 및 배양조건은 플라스크 및 발효조 배양을 위한 종균은 YM broth에서 22°C, 180 rpm 조건으로 48시간 동안 배양하였고 플라스크 배양을 위한 기본배지는 YNB에서 22°C, 180 rpm 조건으로 96시간 동안 배양하였다. 발효조 배양은 5 L jar fermentor(한국발효기)를 사용하였으며, 기본배지는 Table 1의 조성물을 working volume 3L, 온도 22°C, 교반속도 400 rpm, 통기속도 1 v/vm, 초기 pH 6.0의 조건에서 120시간 회분식 배양을 실시하였다. 배양배지 멸균은 당과 아미노산의 Maillard 반응을 막기 위하여 탄소원을 별도 멸균하고 3%(v/v)의 종균을 접종하였다. 배양이 진행되는 동안

Table 1. Composition of basic medium used in 5 L jar fermentor

Compounds	Composition (g/L)
Glucose	180
Corn steep liquor (CSL)	60
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
Yeast extract	1
KH ₂ PO ₄	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	9

진한 암모니아수로 pH 4.8이 되도록 제어하였으며, 소포제로 실리콘(LG화학)을 0.05%(v/v) 첨가하였다.

발효조건 최적화 연구

최종 선별된 변이균주 B-76의 세포성장과 astaxanthin 생산을 위한 발효조건 최적화를 위하여 탄소원과 질소원, 미량 원소, 온도, 초기 pH, 종균 접종량 등은 플라스크 배양을 통하여 분석결정하였고, 탄소원의 최대 농도, 통기량과 교반속도 등은 플라스크 배양을 통해서 결정된 기본적인 배지조성 및 배양조건하에서 발효조 배양을 통하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Carotenoids 고생산 변이주의 분리

우수한 변이균주 선별을 위하여 β-ionone의 농도를 변화시켜 최적 선별조건을 위한 실험을 수행한 결과를 Table 2에 제시하였다. β-ionone의 농도가 증가함에 따라 균주의 생존율이 감소할 뿐만 아니라 carotenoids의 생합성이 저해를 받아 colony 색상이 대체로 orange색에서 백색으로 변화하였다. 따라서 최적의 선별조건으로 약 95%의 사멸율과 carotenoids 생합성 저해능이 뛰어난 0.5 mM의 β-ionone이 포함된 고체 배지를 선정하였다.(11, 15) Carotenoids 및 astaxanthin 생합성 능력이 우수한 균주를 선별하기 위하여 UV와 NTG를 반복 처리하여 돌연변이를 유발한 후 β-ionone을 포함하는 선별 평판배지에서 배양하여 변이주를 분리하였다. 그 중에서 육안으로 콜로니의 색이 진한 핑크색을 나타내는 A48, A53, B76, B111, B112 변이주를 1차 선정하였다. 선정된 각 변이주들을 YM broth에서 배양시킨 결과를 Table 3에 제시하였다. 모균주와 비교하여 균체량은 거의 차이가 없었으나 g(단위질량) 균체당 총 carotenoids 함량은 wild type 균주에 비해 B76, B111, B112는 40% 이상의 증가를 나타내었다. 특히, B76 균주는 wild type 균주에 비해 astaxanthin의 함량이 균체당 50% 이상의 증가를 나타내었다. 따라서 B76 균주는 β-ionone에 대하여 내성을 가지는, 즉 phosphomevalonate kinase와 phosphomevalonate decarboxylase의 생성 또는 활성이 우수한 변이균주로 사료되며 이후의 배양조건 최적화는 B76 변이주를 이용하여 실험하였다.

탄소원의 영향

탄소원으로서 단당류인 glucose, arabinose, xylose와 이당류인 sucrose, maltose, cellobiose, 다당류인 maltodextrin, starch 등을 사용하여 비교하였으며 세포의 농도 및 carotenoids 함량

Table 2. Survival rate and color of colonies of wild type *Phaffia rhodozyma* B30 on YM agar media including β-ionone

Conc. of β-ionone (mM)	Survival rate (%)	Color of colonies
0.1	100	orange
0.3	41	orange, white
0.5	4	white
0.7	1	white
1.0	0	-

Table 3. Comparison of cell concentration and carotenoids biosynthesis between wild type and mutants induced by UV and NTG

Strain No.	Cell conc. (g/L)	Carotenoids content		Astaxanthin content	
		mg/g-DCW	mg/L	mg/g-DCW	mg/L
wild type	4.15	1.84	7.58	1.32	5.48
A48	4.44	2.21	9.79	1.39	6.17
A53	4.37	2.32	10.15	1.28	5.59
B76	4.06	2.72	11.03	2.04	8.28
B111	3.51	2.68	9.39	1.53	5.37
B112	3.83	2.58	9.89	1.99	7.62

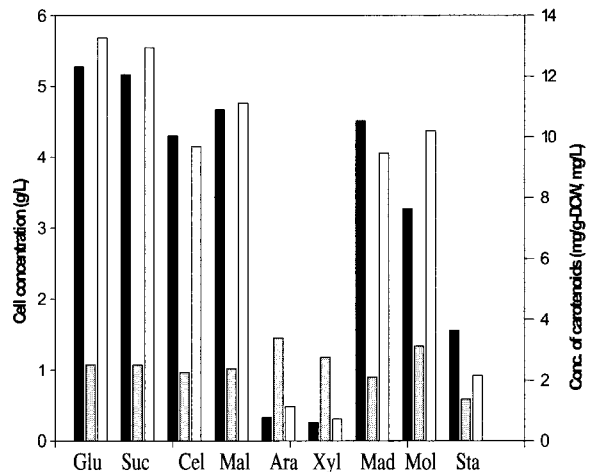


Figure 2. Effects of carbon sources on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days. Glu(glucose), Suc(sucrose), Cel(cellobiose), Mal(maltose), Ara(arabinose), Xyl(xylose), Mad(maltodextrin), Mol(molasses), Sta(starch). ■: Cell concentration (g/L), ▨: concentration of total carotenoids (mg/g-DCW) □: Concentration of total carotenoids (mg/L).

은 탄소원의 종류에 따라 상이한 결과를 나타내었다(Figure 2). B76 균주의 세포 농도는 glucose와 sucrose를 사용시 5.27 g/L와 5.17 g/L로 가장 높게 나타난 반면, arabinose와 xylose 같은 5탄당과 starch와 같은 다당류 사용시 2 g/L 이하로 나타나 기질의 이용효율이 높지 않았다. 또한 총 carotenoids 함량 역시 glucose, sucrose, maltose, molasses 등의 순으로 높게 나타났으며 이는 *P. rhodozyma*가 5탄당보다는 6탄당을, 다당류보다는 단당류를 우선적으로 세포내로 흡수하는 것에 기인하며, 이는 Fang과 Cheng(11)이 보고한 결과와 비슷하였

다. 따라서 탄소원에 대한 실험결과 세포 농도 뿐만 아니라 총 carotenoids 함량이 우수한 것으로 나타난 glucose를 최적의 탄소원으로 선정하였다.

질소원의 영향

질소원의 영향을 조사하기 위하여 최적 탄소원으로 선정된 glucose를 고정하고 무기질소원으로 (NH₄)₂SO₄, NH₄H₂PO₄, NH₄NO₃을, 유기질소원으로 yeast extract, bacto-peptone, CSL, beef extract, malt extract, tryptone을, 그리고 두가지 이상이 혼합된 혼합질소원 등을 사용하여 균체량 및 색소생성에 미치는 영향을 검토하였다(Figure 3). 균체 생성능력은 Fang과 Cheng(11)의 보고와 같이 무기질소원 보다 유기질소원에서 40% 정도 높게 나타났으며, 특히, CSL, (NH₄)₂SO₄, yeast extract가 혼합된 질소원은 균체량과 총 carotenoids 함량이 모두 높은 것으로 나타났다. 따라서 최종적으로 균체량 및 단위 균체당에 대한 색소생산뿐만 아니라 단위부피에 대한 총 carotenoids 함량이 13.9 mg/L로 가장 높은 CSL, (NH₄)₂SO₄, yeast extract 혼합배지를 최적 질소원으로 선정하였다.

미량원소의 영향

미생물에 의한 색소 생산시 Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, SO₄²⁻ 등과 같은 미량원소들이 색소의 생성을 억제하거나 조절하는 것으로 알려져 있다. 이러한 미량이온을 0.05 mM과 1.0 mM 첨가하였을 때와 전혀 첨가하지 않았을 때를 비교한 결과를 Table 4에 제시하였다. 균체량과 carotenoids 함량은 FeSO₄ · 7H₂O와 MnCl₂ · 2H₂O를 제외하고는 미량원소의 사용량이 0.05 mM에서 1.0 mM로 증가함에 따라 급격하게 감소하였으며 이는 B76 변이주가 미량원소에 상당히 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 그리고 미량원소를 사용하였을 때가 미량원소를 전혀 첨가하지 않은 기본배지보다 색소생성능이 대체로 낮았다. 이는 CSL이 여러 가지 미량원소를 포함하고 있는 혼합조성물질이므로 기본배지 이외에 추가의 미량원소 첨가는 미량원소의 농도를 과도하게 증가시켜 오히려 균체생성과 총 carotenoids 합성능력을 감소시키는 것으로 사료된다(16).

Table 4. Effect of trace elements on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days

Trace elements	Concentration (mM)	Cell conc. (g/L)	Carotenoids content	
			(mg/g-DCW)	(mg/L)
basal medium	(control)	5.23	2.67	13.96
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0	2.75	-	-
	0.05	3.14	-	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	4.67	2.38	11.11
	0.05	4.86	2.75	13.37
MnCl ₂ · 2H ₂ O	1.0	4.61	2.25	10.37
	0.05	5.19	2.53	13.13
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	2.57	2.51	6.45
	0.05	3.97	2.46	9.77
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.0	3.76	2.53	9.51
	0.05	4.15	2.41	10.00
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.0	2.24	1.51	3.38
	0.05	3.92	2.14	8.39

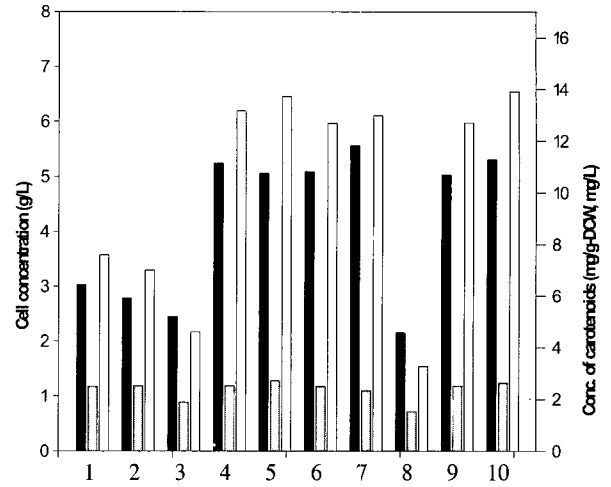


Figure 3. Effects of nitrogen source on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days. 1: (NH₄)₂SO₄, 2: NH₄H₂PO₄, 3: NH₄NO₃, 4: yeast extract 5: bacto peptone, 6: CSL, 7: beef extract, 8: malt extract, 9: tryptone, 10: mixed nitrogen^{*)}. *) mixed nitrogen : CSL : (NH₄)₂SO₄ : yeast extract = 6.0 : 2.0 : 0.1. ■: Cell concentration (g/L), ▨: Concentration of carotenoids (mg/g-DCW), □: Concentration of carotenoids (mg/L).

C/N ratio 영향

*P. rhodozyma*를 이용한 astaxanthin의 생산을 최적화하기 위해서는 탄소원과 질소원의 C/N ratio가 매우 중요하다. 따라서 탄소원으로 결정된 glucose의 농도를 10 g/L로 고정하고, 질소원으로 CSL, (NH₄)₂SO₄, yeast extract(6:2:0.1)의 혼합 질소원 농도를 변화시켜 C/N ratio가 1.25, 1.67, 2.08, 2.86, 4, 10이 되도록 하여 실험한 결과는 Figure 4와 같다. 균체량은 C/N ratio가 2.5 수준까지 5 g/L로 일정하였으나 그 이후에는 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 질소원 부족에 의해 단백질 합성이 어렵기 때문으로 사료된다. 단위 균체당 carotenoids 함량은 C/N ratio가 1.5 이하를 제외하고는 2.5~2.7 g/g-DCW로 유사하였다. 이러한 결과로부터 질소원은 carotenoids 합성보다는 균체형성에 더 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다. 따라서 변이주 B76은 C/N ratio가 1.67과 2.08일 때 단위부피당 carotenoids 함량은 13.2, 13.5 g/L로서 가장 높은 것으로 나타났으며 따라서 최적의 C/N ratio는 2.0 수준으로 결정하였다.

배양온도의 영향

Sanpietro와 Kula(10), Fang과 Cheng(11), Johnson과 Lewis(12) 등의 연구를 종합하여 15℃에서 25℃까지 변화시켜 온도에 따른 세포성장 및 carotenoids 생성에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다(Figure 5). 단위부피당 총 carotenoids 농도는 18~22℃에서는 12 mg/L로 비슷한 수준을 나타냈으나 22℃ 이상에서는 균체성장과 색소 생성량이 급격하게 감소하였다. 이는 *P. rhodozyma*가 저온성 미생물(psychrophiles)이므로 22℃ 이상의 온도에서는 균체생장과 색소생성이 저해되기 때문으로 사료된다. 균체농도는 15℃에서 22℃까지는 온도가 상승함에 따라 계속적으로 증가하여 22℃에서 최대 5.21 g/L를 얻을 수 있었다. 따라서 단위부피당 총 carotenoids 생성량과 균체농도가 가장 높은 22℃의 온도를 최적 배양온도로 선정하였다.

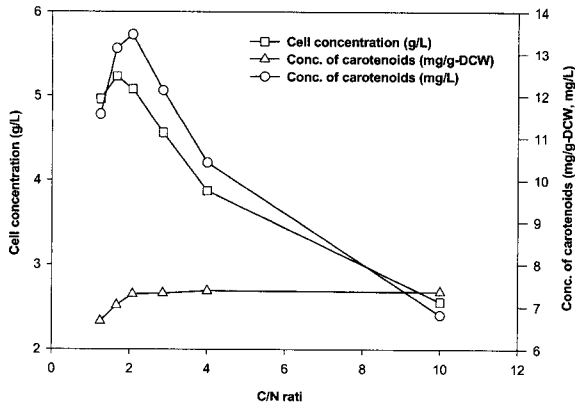


Figure 4. Effects of C/N ratio on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days.

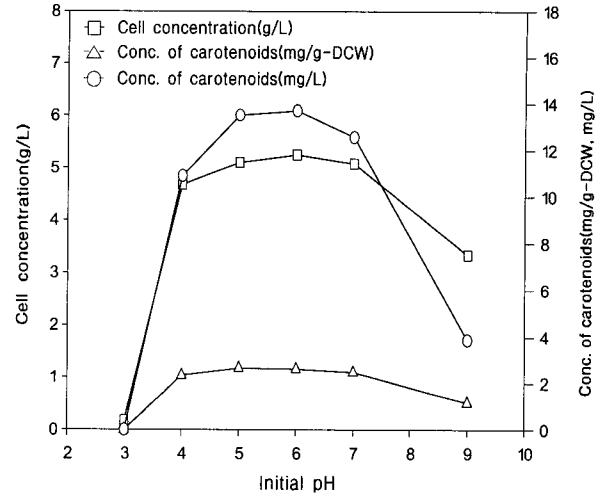


Figure 6. Influence of initial pH on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days.

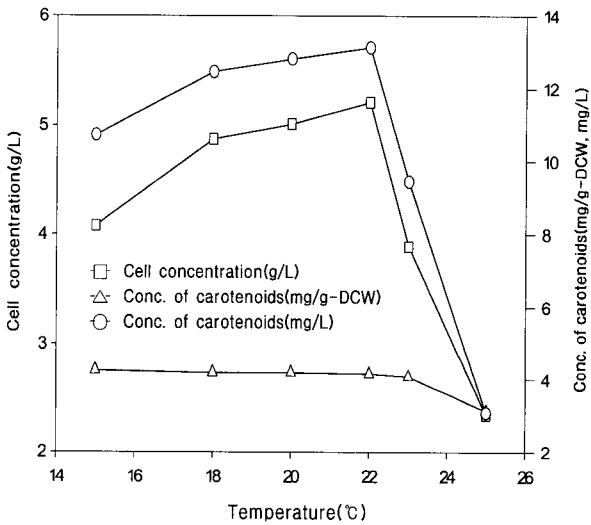


Figure 5. Influence of temperature on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 after 4 days.

초기 pH의 영향

배양배지의 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 Johnson과 Lewis(12)과 Fang과 Cheng(11)의 보고를 기초로 pH 3부터 9까지의 조건에서 실험을 수행한 결과, Figure 6에서와 같이 pH 3에서는 균체의 성장과 색소생산이 없었으며, pH 5~7의 범위에서는 균체량과 carotenoids 생산량이 거의 유사한 수준이었다. 따라서 단위부피당 색소생산량과 균체량이 가장 높은 pH 6을 최적의 초기 pH 조건으로 선정하였다.

중균 접종량의 영향

접종량의 영향에 대한 실험에서는 0.5, 1, 2, 3, 5, 10%(v/v)에 대하여 수행하였다. Figure 7에 나타난 것처럼 3% 이상의 중균을 접종한 경우에는 배양 4일이 경과한 후 glucose를 모두 소비하여 stationary phase에 도달하였으나, 2% 이하의 중균을 접종시에는 lag phase가 길어져 결과적으로 배양일수와 색소 발현이 1일 정도 지연되었다. 특히 0.5%와 1%의 중균 접종시에는 5일 경과후 균체성장이 멈춘 상태에서 계속적으로 색소 생합성을 함으로써 2% 이상의 중균 접종시와 유사한 수준의 carotenoids 함량을 나타냈다. 이는

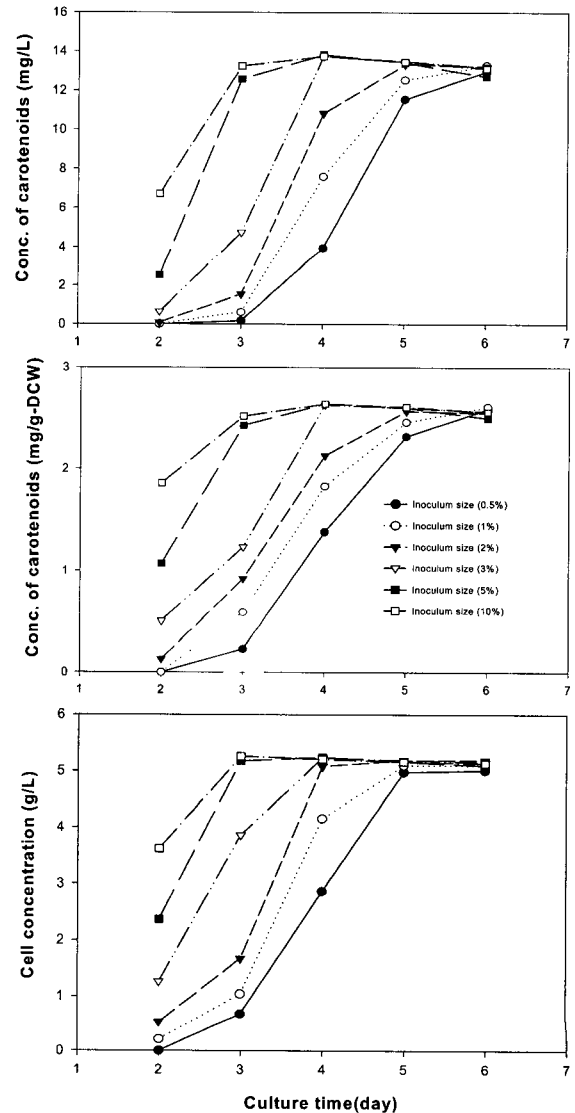


Figure 7. Influence of inoculum size on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76.

변이주 B76에 의한 carotenoids 생합성이 mixed-growth-associated 형태를 나타내는 것을 보여준다. 3% 이상을 접종하였을 때에는 균체성장의 lag phase는 짧아졌으나 carotenoids 생합성은 4일 경과후 단위부피당 carotenoids 함량이 13.4 mg/L 수준으로 비슷하였다. 따라서 산업화에 의한 대량 생산을 위해서는 배양시간을 단축하면서 종균 접종량을 최소화할 수 있는 3% 수준을 최적의 접종량으로 선정하였다.

탄소원의 최대 농도 결정

탄소원의 최대 농도를 결정하기 위하여 glucose의 농도를 1, 5, 10, 14, 18, 22%(w/v)에서 발효조 배양을 하였다(Figure 8). 대체로 10% 이상의 고농도에서 배양시 stationary phase에 도달하는 시간은 5% 이하보다 1일 정도 지연되었다. 그리고 기질에 대한 균체수율($Y_{x/s}$)은 탄소원의 최대 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 이는 급격한 균체성장시

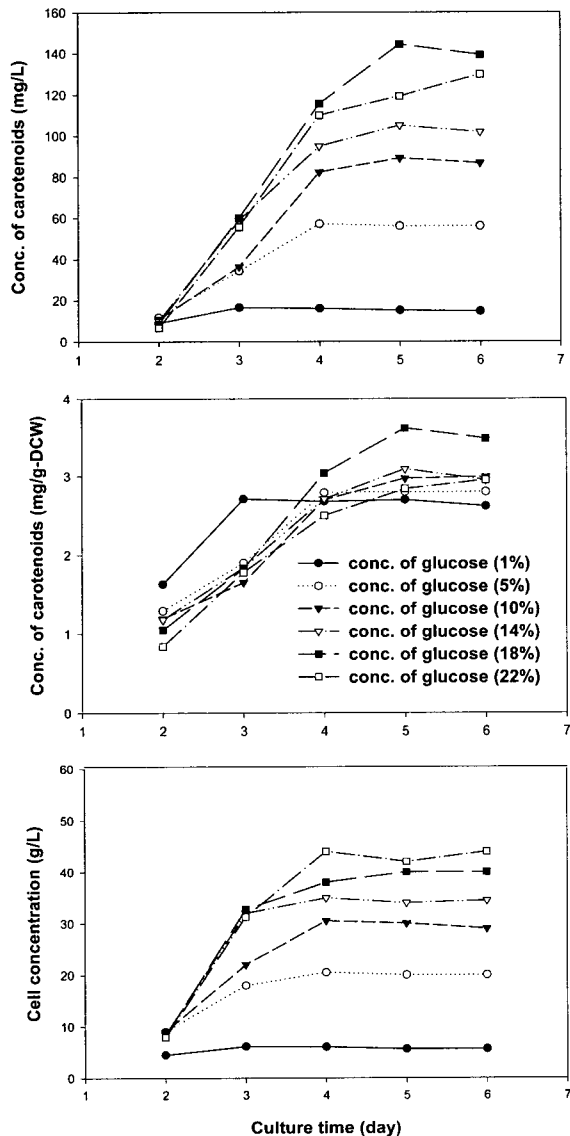


Figure 8. Influence of maximum concentration of glucose on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 in 5 L jar fermentor.

용존산소 부족현상에 의해 기질을 균체형성에 사용하는 대신 혐기적 발효를 하여 산, 알콜류 등을 생성하는 데 이용한 것으로 사료된다. 반면 기질의 농도가 1%에서 18%로 증가함에 따라 단위 균체질량당 carotenoids 함량은 2.7 mg/g-DCW에서 3.6 mg/g-DCW로 대체로 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 혐기적 발효에 의해 생성된 산과 알콜류 등이 astaxanthin 생합성 경로에 precursor와 같은 역할을 하여 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다(14). 그리고 선별된 변이주 B76은 고농도의 glucose 존재하에서도 균체성장과 색소합성이 저해되는 catabolite repression 영향을 거의 받지 않았으며, 이러한 결과는 고농도의 glucose 상태에서 carotenoids 수율이 낮아진다는 Johnson과 Lewis의 보고(12)와 일치하지 않았고 이는 B76 변이주의 특성으로 사료된다. 따라서 탄소원의 최대 농도로서 기질에 대한 균체량은 감소하였지만 산업적인 생산성을 고려하여 5일 배양후 단위부피당 carotenoids 함량이 144.4 mg/L로 가장 높은 18%(w/v)를 선정하였다.

통기속도에 의한 영향

통기속도가 carotenoids 생성에 미치는 영향을 검토하기 위한 실험은 400 rpm의 교반조건에서 통기속도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 v/v/m으로 변화시키면서 수행하였다. 대체로 초기 균체성장은 통기속도가 증가함에 따라 빠른 성장을 하였으나 Figure 9에서와 같이 최종 세포농도와 색소 생성량은 1.0 v/v/m 이상에서는 유사하였다. 균체성장은 대부분이 4일 경과 후부터 stationary phase에 도달하였고 그 이후는 균체성장보다는 색소함량이 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 변이주 B76에서의 carotenoids 생합성은 mixed-growth-associated 형태임을 다시 확인할 수 있었다. Table 5에 나타난 것처럼 균체량과 단위부피당 carotenoids 함량은 1.0 v/v/m에서 각각 42.2 g/L와 146.4 mg/L이었고 1.5 v/v/m에서는 43.1 g/L, 148.7 mg/L로 비슷하였고, 그 이상의 통기속도 증가에도 1.0 v/v/m과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 산업적인 공정경제성을 고려할 때 1.0 v/v/m이 최적으로 사료된다.

교반속도에 의한 영향

교반속도가 균체량과 carotenoids 함량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 최적 통기속도로 선정된 1.0 v/v/m의 조건에서 교반속도를 200, 300, 400, 500 rpm으로 변화시켰다. 200 rpm의 경우 낮은 교반속도로 인한 용존산소 전달의 부족에 의하여 균체성장이 전반적으로 지연되어 lag phase가 길어져 stationary phase는 5일 경과후 도달하였고, 400 rpm 이상의

Table 5. Effect of aeration rate on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 during batch fermentation

Parameters	Aeration rate (v/v/m)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
Cell growth				
Final cell density (g/L)	35.5	42.2	43.1	42.3
Yield (g/g-glucose)	1.97	2.34	2.39	2.35
Carotenoids formation				
Cellular (mg/g-DCW)	2.65	3.48	3.46	3.46
Volumetric (mg/L)	94.1	146.4	148.7	145.9

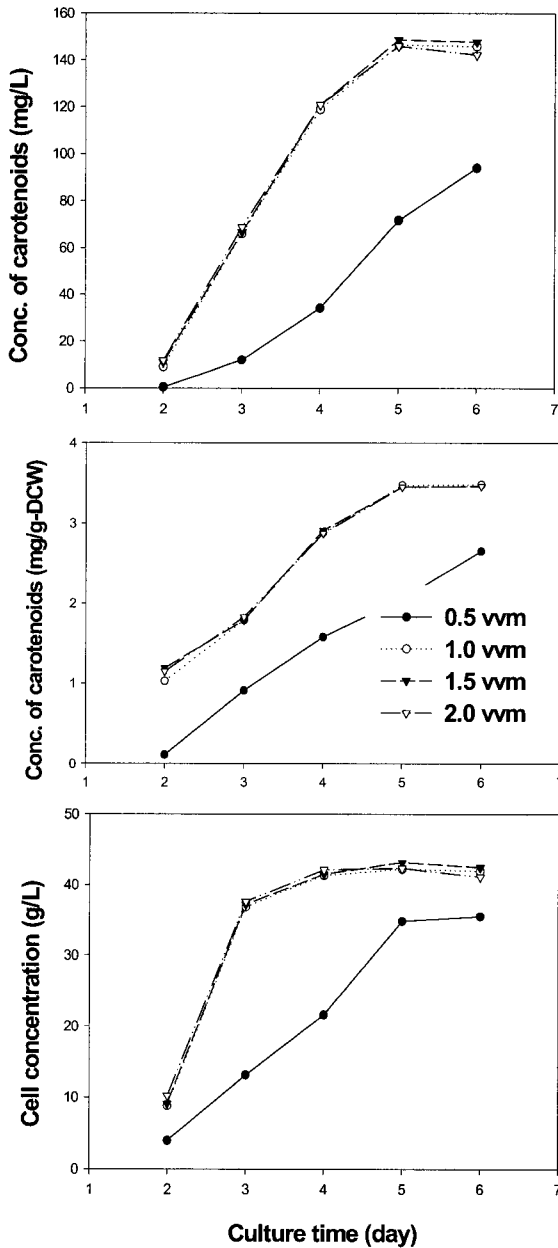


Figure 9. Influence of aeration rate on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 during batch fermentation.

높은 교반속도 조건에 비해 균체량은 약 25%, 단위부피당 carotenoids 함량은 약 40% 낮아진 결과를 나타냈다(Figure 10). 특히 carotenoids 함량이 이처럼 낮은 것은 astaxanthin 생합성 경로중 dehydrogenation되는 과정에서 용존산소가 결핍되어 생합성이 저해받는 것으로 사료된다. 반면 400 rpm 이상에서의 균체성장속도는 lag phase가 짧아져 4일 경과후 stationary phase에 도달하였고, 그 후에는 균체농도는 일정한 상태에서 2차 대사산물인 색소 생합성이 활발히 이루어졌다. 특히 400 rpm 이상의 교반조건에서는 균체성장과 색소함량에 큰 차이가 없었으며 이는 변이주 B76이 일정 수준의 용존산소농도 이상에서는 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 따라서 최대 균체량과 carotenoids 함량을 나타낸 400 rpm을 최적의 교반속도로 결정하였다. 이것은 Johnson과 Lewis(12)의 실험결과

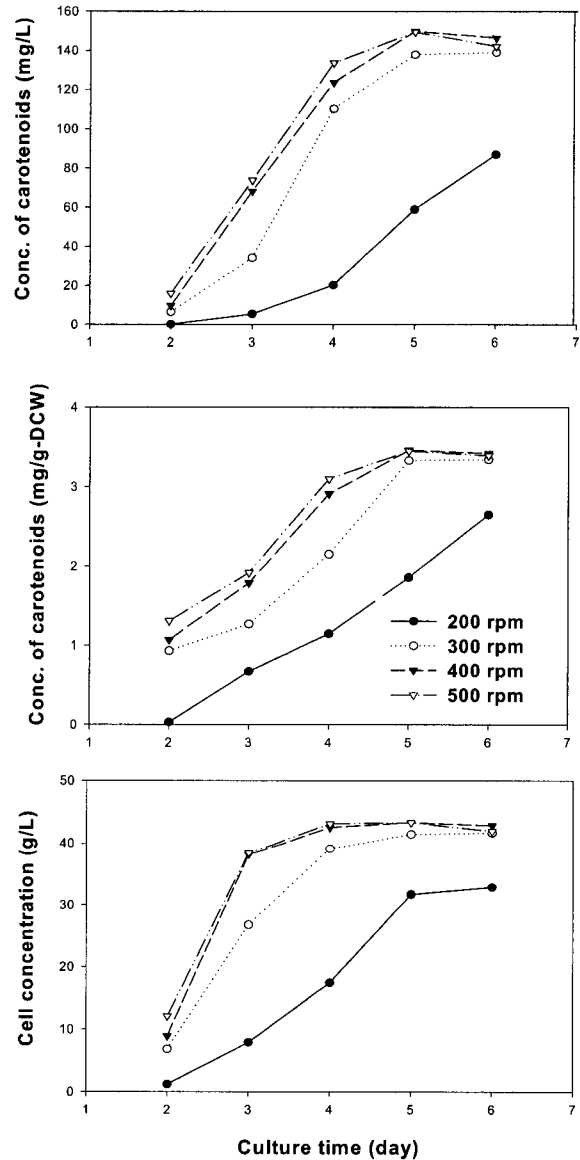


Figure 10. Influence of agitation rate on the cell concentration and carotenoids biosynthesis of mutant B76 during batch fermentation.

와 유사한 것이며, 산소 공급량이 증가함에 따라 astaxanthin 생성량이 증가하는 양상을 NADH balance를 통하여 설명한 Yamane 등(13)의 결과와도 일치하였다.

종합적인 배양 실험

지금까지 확인한 최적조건을 조합하여 변이주 B76을 배양한 결과를 Figure 11에 제시하였다. 고농도(18%)의 glucose가 포함된 배지에서 초기에는 glucose를 소비하면서 균체량이 증가하고, 이때 생성되는 유기산 등에 의해 pH가 감소하며, 균체량의 증가로 인하여 용존산소는 급격하게 감소하여 0 수준에 도달하였다. 그 후 중반기인 4일차에 glucose가 모두 소비되면서 균체성장이 느려지고 용존산소는 다시 급격하게 증가하게 되며, 후반기에 이르러 유기산 등을 소비하면서 pH가 상승하고 약간의 균체성장과 함께 급격한 색소합성이 이루어졌다. 따라서 용존산소는 균체의 성장과 색소형성에 상당한

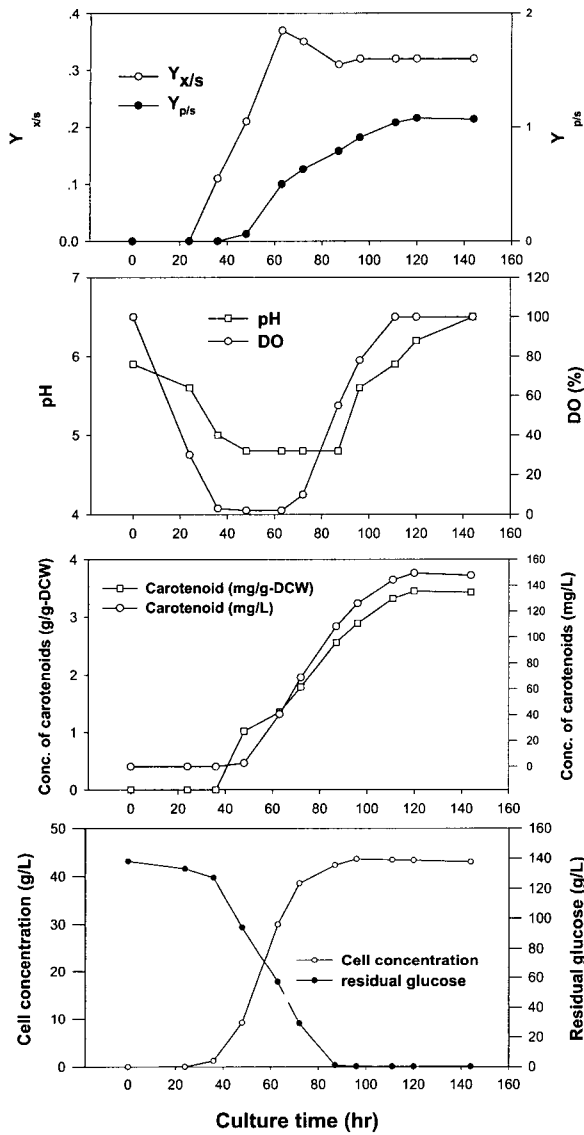


Figure 11. Profiles of fermentation of mutant B76 under 1 v/v/m, 400 rpm in 5 L jar fermentor.

영향을 미치는 것으로 사료되었다. $Y_{x/s}$ 는 배양 3일차에 0.37 전후에서 정점을 형성한 후 감소하여 0.30 부근에서 일정수준을 유지하였으며, $Y_{p/s}$ 는 균체성장이 완료된 배양 5일차에 1.08로 최대를 나타냈다. 이는 이미 설명한 바와 같이 변이주 B76에 의한 astaxanthin 합성이 mixed-growth-associated 형태를 나타내는 것으로 판단된다. 배양중 astaxanthin과 carotenoids 유도체 농도변화를 HPLC로 분석한 결과는 Figure 12와 같다. 배양시간이 지속됨에 따라 astaxanthin의 함량은 상대적으로 증가한 반면 carotenoids 유도체 함량은 상대적으로 감소하였다(Table 6). 이는 Yamane 등(13)의 보고와 같이 배양초기에는 급격한 균체성장으로 용존산소가 부족하여 NADH balance에 의해 astaxanthin 생합성이 저해되었으나 배양 4일차부터 용존산소 농도가 증가하면서 carotenoids의 dehydrogenation 과정이 가속화되어 astaxanthin 합성이 배양 5일차에 급격한 증가를 나타내는 것으로 사료된다.

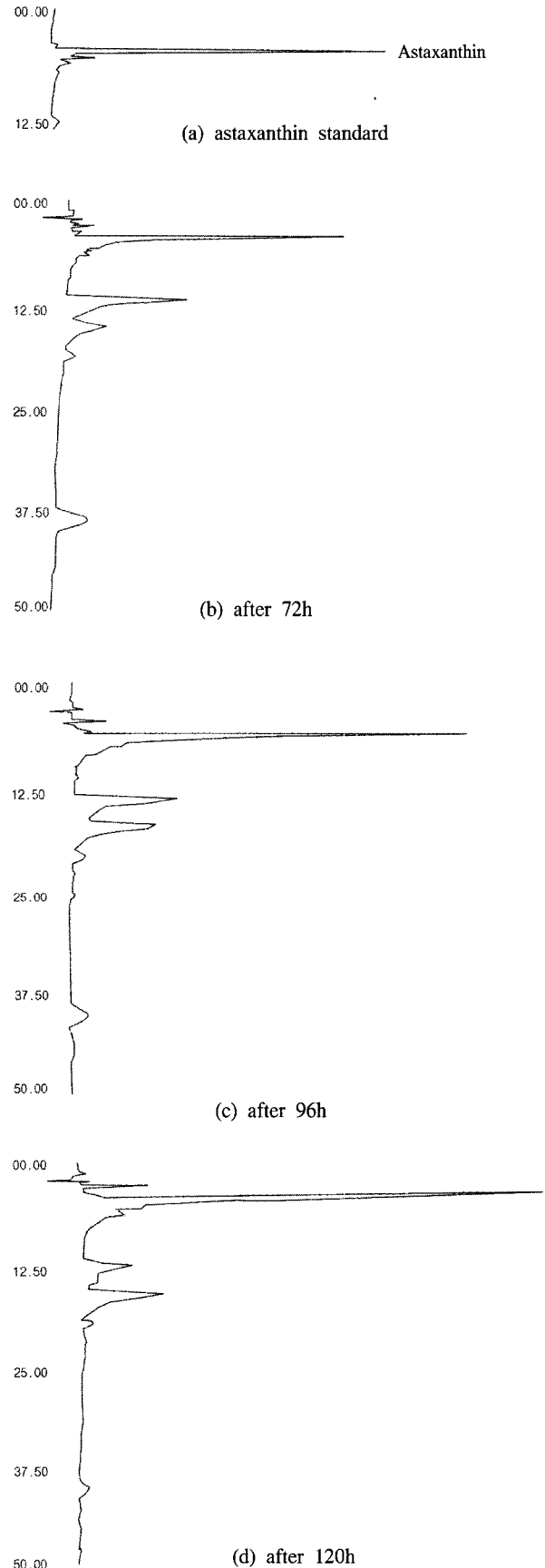


Figure 12. HPLC analysis of astaxanthin during batch fermentation.

Table 6. Time-course profile of carotenoids and astaxanthin concentrations during batch fermentation by mutant B76 *

Culture time (h)	Carotenoids (mg/L) (B)	Astaxanthin (mg/L) (A)	(A/B × 100)%
72	68.9	28.3	41
96	126.0	65.5	52
120	149.5	110.6	74

요 약

Astaxanthin의 산업적인 생합성을 위하여 wild type인 *P. rhodozyma* B30 효모를 UV, NTG 등으로 돌연변이 처리하여 0.5 mM β -ionone이 포함된 선별배지에서 carotenoids 합성능력이 우수한 변이주 B76을 분리하였다. 변이주 B76은 wild type과 비교시 균체 생장능력은 큰 차이가 없었으나 carotenoids 합성능력은 40% 이상, astaxanthin 합성능력은 50% 이상 향상되었다. 선별된 변이주 B76의 최적 발효배지 및 배양 조건 선정에 관한 플라스크 배양실험 결과 최적 탄소원으로 glucose가, 최적 질소원은 CSL : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: yeast extract = 6 : 2 : 0.1이 혼합된 배지가 선정되었다. C/N ratio는 1.7~2.0 범위에서 유사한 발효능을 보였으며(산업적인 생산성을 고려하여 2.0을 최적으로 선정), 배양온도는 22°C가 최적이었다. 초기 pH는 가장 높은 세포농도를 나타낸 6.0을 최적으로 하였다. 평균 집종량은 전반적으로 균체량과 carotenoids 합성능력에는 영향을 미치지 않았으며 산업적인 생산성을 고려하여 3%(v/v) 수준이 적절한 것으로 사료되었다. 이와 같이 플라스크 배양을 통해 확립된 최적 배지 및 배양조건을 기초로 5 L 발효조를 이용한 회분식 배양실험을 통해 탄소원의 최적 농도는 18%임을 확인하였다. 특히 B76 변이주는 22%(w/v)까지의 고농도 glucose 존재하에서도 catabolite repression을 받지 않는 것으로 나타났다. 용존산소가 부족한 경우에는 균체성장 및 색소합성이 저해되었고, 따라서 통기속도 1.0 v/v/m, 교반속도 400 rpm 이상을 유지함이 필요하였다. B76 세포는 배양 3일차에 exponential phase에 진입한 후(최대 $Y_{x/s}$ = 0.37) 배양 4일차에 stationary phase에 도달하였다. Carotenoids 및 astaxanthin 생합성은 세포성장이 정지한 후인 배양 5일차에 급격하게 증가하는(최대 $Y_{p/s}$ = 1.08) 전형적인 mixed-growth-associated 형태를 나타냈다. 이는 exponential phase 동안 급격한 균체성장으로 용존산소가 부족하여 NADH balance에 의해 astaxanthin 생합성 경로 중 탈수소화 단계가 저해되기 때문으로 사료되었다. 최종 세포농도는 43.3 g/L, 단위질량의 세포당 carotenoids 함량은 3.45 mg/g-DCW, 단위부피당 carotenoids 함량은 149.4 mg/L, astaxanthin 함량은 110.6 mg/L로서 산업적인 생산성이 있는 것으로 나타났다. 이번 연구를 통하여 개발된 변이주 B76 및 이의 대량 발효를 위한 최적조건의 정립은 향후 astaxanthin의 산업적 생산공정에 중요한 기초자료로 이용될 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 한양대학교 1999년도 교내연구비에 의해 수행되었습니다. 임달택은 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신

소재공정공학원의 장학금 지원에 감사합니다.

REFERENCES

- Goodwin, T. W. (1986), Metabolism, Nutrition, and Function of Carotenoids, *Ann. Rev. Nutr.* **6**, 273-297.
- Sigurgisladdottir, S., C. C. Parrish, S. P. Lall and R. G. Ackman (1994), Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon(*Salmo salar*) fillet quality, *Food Res. International* **27**, 23-32.
- Johnson, E. A., M. J. Lewis and C. R. Grau (1980), Pigmentation of Egg Yolks with Astaxanthin from the Yeast *Phaffia rhodozyma*, *Poultry Sci.* **59**, 1777-1782.
- Johnson, E. A. and W. A. Schroeder (1993), Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 907-912.
- Tanaka, Y. (1996), Protective Effect against Disease and Physiological Effect of Carotenoids, *Bio Industry* **13**, 5-15.
- Hata, K. (1994) Characteristics of a red pigment, astaxanthin, derived from microorganism, *Food Chemicals Monthly, Food Industry (in Japanese)*, **11**, 63-68.
- Burton, G. W. (1988), Antioxidant Action of Carotenoids, *J. Nutr.* **119**, 109-111.
- An, G. H. (1997), Photosensitization of the Yeast *Phaffia rhodozyma* at a Low Temperature for Screening carotenoids Hyperproducing Mutants, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 263-268.
- An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson (1989), Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 116-124.
- Sanpietro, L. M. D. and M. R. Kula (1998), Studies of Astaxanthin Biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of Inhibitors and Low Temperature, *Yeast* **14**, 1007-1016.
- Fang, T. J. and Y. S. Cheng (1993), Improvement of Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* through Mutation and Optimization of Culture Conditions, *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 466-469.
- Johnson, E. A. and M. J. Lewis (1979), Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.* **115**, 173-183.
- Yamane, Y., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio (1997), Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-batch Cultures : Kinetic and Stoichiometric Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4471-4478.
- Yamane, Y., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio (1997), Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed batch culture with glucose and ethanol feeding, *Biotechnol. Lett.* **19**, 1109-1111.
- An, G. H., C. H. Kim, E. S. Choi and S. K. Rhee (1996), Medium Optimization for Cultivation of carotenoids Hyperproducing *Phaffia rhodozyma* Mutant HT-5FO1C, *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 515-518.
- Demain, A. L. and N. A. Solomon (1986), Substrates for Large-scale Fermentations, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 130-131, American Society for Microbiology.