

## *Xanthophyllomyces dendrorhous* 변이균주에 의한 Carotenoids 생산 발효의 특성 연구

<sup>1</sup>박기문 · <sup>1</sup>김영준 · <sup>1</sup>송민우 · <sup>2</sup>강석진 · †이재흥  
성균관대학교 생명공학연구소, <sup>1</sup>식품생명공학과, <sup>2</sup>(주)우진  
(접수 : 2006. 4. 14., 게재승인 : 2006. 8. 12.)

### Fermentation Kinetics for Production of Carotenoids by $\beta$ -ionone Resistant Mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Ki Moon Park<sup>1</sup>, Young Jun Kim<sup>1</sup>, Min Woo Song<sup>1</sup>, Seog Jin Kang<sup>2</sup>, and Jae Heung Lee†  
Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
<sup>2</sup>Woojin Co., Ltd, 316-1 2nd St., Hangang-ro, Youngsan-gu, Seoul 140-012, Korea  
(Received : 2006. 4. 14., Accepted : 2006. 8. 12.)

Various  $\beta$ -ionone resistant mutants were isolated from the wild-type red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* KCTC 7704. Although the growth of *X. dendrorhous* KCTC 7704 was strongly inhibited at 0.025 mM  $\beta$ -ionone, one of the  $\beta$ -ionone resistant mutants isolated at 0.1 mM  $\beta$ -ionone by NTG mutagenesis showed rather 70% of relative survival at 0.15 mM  $\beta$ -ionone. Fermentation kinetics study with the mutant was carried out at 20°C for 4 days in 300-mL baffled flasks. The mutant yielded up to 2.3-fold higher carotenoids content (viz. 1.2  $\mu$ g of total carotenoids per mg of dry cells) compared with the wild-type strain. The production of metabolites such as organic acids could be neglected. Studies on the kinetics with various carbon substrates revealed both an increase in final dry cell mass and a higher total carotenoids content in cell mass with glucose when compared to fructose or sucrose. As a further part of study, the effect of pH on the fermentation kinetics was investigated in glucose-limited chemostat at a dilution rate of 0.04 h<sup>-1</sup>. When compared to steady-state kinetic parameters obtained at pH 4.0, a significant reduction in cell concentration at pH 3.0 and a lower carotenoids content at pH 5.2 were evident.

**Key Words** : Astaxanthin, chemostat, fermentation kinetics,  $\beta$ -ionone, total carotenoids

#### 서 론

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ , $\beta$ -carotene-4,4'-dione)는 carotenoid 계 색소로서 연어, 송어, 새우 등에 존재하는데 이들이 핑크색을 띠는 것은 바로 astaxanthin 때문이다(1-3). 현재 astaxanthin은 주로 사료첨가제로 사용되고 있는데, astaxanthin의 가장 큰 시장은 양식업 분야이다(4). 그러나 문헌에 의하면 astaxanthin을 투여한 가금류에 있어서 수정율이 향상되고 폐사율이 획기적으로 감소하며, 산란계에 있어서 비브리오 감염 감소 뿐만 아니라 계란의 노른자위 색깔이 보다 진

해지는 것으로 알려져 있다(4, 5). 특히 유럽인들이 이러한 계란을 선호하기 때문에 현재의 시장은 적지만 앞으로 점차 확대될 것으로 보인다. Astaxanthin은 색소로서 뿐만 아니라 비타민과 같은 특성이 있는 것으로 알려지고 있다. Astaxanthin은 1) 비타민E의 100배,  $\beta$ -carotene의 10배 강력한 항산화제이며, 2) 항암제로서의 특성이 있고, 3) 면역계를 도와주며, 4) 눈과 중추신경계 관련 질병 (Alzheimer's disease, Parkinson's disease)에 유효할 뿐만 아니라, 5) *Helicobacter* 감염 등의 치료에도 가능성이 알려지고 있다(4-8). 따라서 astaxanthin은 식의약품 (nutraceuticals)으로서의 새로운 용도가 점차 확대 개발되고 있다(4, 6).

Astaxanthin은 화학 구조적으로 3가지 enantiomers (3S-3'S, 3R-3'R, 3R-3'S)가 존재하는데 제조방법 차이에 따라 구조가 결정된다(9). 자연계에서 발견되는 astaxanthin의 형태는 3S-3'S이며 조직 (tissue)에 따라서도 존재하는 형태

† Corresponding Author : Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
Tel : +82-31-290-7893, Fax : +82-31-290-7884  
E-mail : jaeheung@skku.ac.kr

가 다른 것으로 알려지고 있다. 즉 피부, 눈동자 등에는 esterified astaxanthin이 대부분인 반면 serum이나 연어의 내부 조직 등에서는 free astaxanthin으로 존재한다. 지금까지 사료용 색소 첨가제는 주로 화학 합성법으로 제조된 로슈사의 canthaxanthin (상품명 CAROPHYLL® Red)와 astaxanthin (상품명 CAROPHYLL® Pink)이 사용되었다. 그러나 안전성 관점에서 시장에서는 합성형에서 점차 천연형 astaxanthin 쪽으로 변화되고 있는 추세이다. 로슈사는 1990년부터 합성법으로 astaxanthin를 생산해오고 있는데 가격이 매우 고가(USD 2,500/kg)이다(4, 10). 현재 astaxanthin의 시장규모는 98년 현재 USD 1.75억 규모(연어 및 송어 양식 사료)인데 매우 빠르게 성장되고 있다(10). 한편 천연형 astaxanthin은 주로 조류중의 하나인 *Haematococcus pluvialis*를 이용하여 생산되고 있으나 이 조류는 성장속도가 매우 느리고 현재 생산설비 부족으로 생산이 제한되고 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 비교적 배양이 용이하고 당밀, 포도 주스액과 같은 공업원료의 사용이 가능한 효모 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (과거에는 *Phaffia rhodozyma*로 불렸음)를 이용한 발효법으로의 전환이 모색(3, 11, 12)되고 있는데, 특히 *X. dendrorhous* 세포에 축적되는 total carotenoid 중에서 astaxanthin의 비율이 80-90%로 매우 높은 것으로 알려져 있다(13-15, 25).

본 연구의 목적은 효모 *X. dendrorhous*로부터 저렴하게 astaxanthin을 생산할 수 있는 생물공정을 개발하기 위하여 우선 carotenoids 생합성 저해제로 알려진  $\beta$ -ionone 내성변이균주(16-18)를 스크리닝하고 그 특성을 조사하였으며, 발효공정 최적화를 위하여 회분식 및 연속식 발효 속도론적 특성연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

본 실험에 사용된 wild-type 균주는 *X. dendrorhous* KCTC 7704로서, 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 구입하여 사용하였다. 이 균주는 YM (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%) 배지의 배양 완료액에 동액량의 살균된 80% (v/v) glycerol 용액을 넣어 혼합한 후 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

### 변이균주의 선별

YM배지에서 4-5일간 배양한 *X. dendrorhous* KCTC 7704를 원심 분리하여 50mM citrate buffer (pH 5.5)로 2회 세척한 후, 여러 농도의  $\beta$ -ionone (Sigma)함유 YM 배지에 도말하여 상대 생육정도를 측정하였다. 또한 이 세포현탁액을 실온에서 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)로 30분 동안 처리 (최종농도 0.6 mg/mL)한 후 2회 세척하고, 0.05 - 0.1 mM 농도의  $\beta$ -ionone 함유 YM 배지에 도말하여 변이균주들을 선별하였다.

### 회분식 및 연속식 발효의 배양조건

회분식 발효 실험은 300 mL baffled-flasks에 본 배양배지

(2.5% glucose, 0.1% yeast extract, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O)를 50 mL씩 넣어 살균 (pH 5.0 조절)한 후 *X. dendrorhous* KCTC 7704 및  $\beta$ -ionone 내성 변이균주를 식균하여 20°C에서 4일간 진탕배양 (100 rpm)시켰다.

연속발효 (continuous culture) 실험은 2.5 L (working volume 0.8 L) 소형 발효조 (Kobiotech, Korea)를 사용하여 20°C에서 희석율 (dilution rate) 0.04 h<sup>-1</sup>인 조건에서 수행하였다. 탄소원이 제한되는 연속발효실험을 위하여 본 배양매지 조성 중에서 포도당 농도만 0.5%로 하향 조정하였고 발효 pH control을 위하여 2 N NH<sub>4</sub>OH 및 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 특정 pH에서의 정상상태 실험 데이터를 얻기 위하여 적어도 working volume 5배 이상의 발효배지가 통과되도록 충분한 발효시간을 유지하면서 운전하였고, 교반기 회전수를 조절 (300 rpm)하여 용존산소농도 (dissolved oxygen tension)는 약 20% 이상으로 유지시켰다. 용존산소농도의 측정은 dissolved oxygen electrode (Mettler-Toledo GmbH, Germany)를 사용했으며, N<sub>2</sub> gas를 사용하여 이 전극을 calibration한 후 실험하였다.

### 균체농도 및 총 카르티노이드 분석

균체농도는 통상의 방법으로 발효액 10 mL을 취하여 원심분리 한 후 2회 세척하고 80°C에서 20시간 건조하여 계산하였다. 총 카르티노이드 분석은 이미 보고된 방법(19)을 약간 수정하여 시행하였다. 즉, 발효액 샘플 2 mL을 취하여 원심분리하고 2회 세척한 후 수분을 완전히 제거시키고 나서, 55°C로 가열된 2.0 mL의 DMSO를 가하고 30초간 vortex시킨 후 55°C에서 5분간 처리하였다. 여기에 0.1 mL의 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)을 가해준 후 30초간 vortex 시키고, 다시 2 mL의 혼합용매 (ethylacetate : hexane = 1 : 1) 을 넣고 30초간 vortex시켰다. 그리고 나서 이것을 약 15분간 원심분리 (10,000 x g)하여 총 분리시키고, 총 카르티노이드가 녹아있는 유기용매 층을 분리한 다음 480 nm에서 흡광도를 측정하고 astaxanthin (Sigma)을 기준으로 하여 총 카르티노이드를 정량(19, 20)하였다.

### 발효 완료액의 유기산 분석

발효 완료액 중의 유기산을 분석하기 위하여 HPLC (Tosoh CO-8010, Japan) 및 이온크로마토그래피 (DX-600, Dionex, USA)를 사용하였다. HPLC column (75 mm × 4.6 mm id)은 Cogent Bidentate C18 (MicroSolv, USA)을 사용했으며 용리제는 0.05% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>이었다. 용리제의 유속은 0.8 mL/min이었으며 UV detector (Tosoh UV-8010, Japan)를 사용하여 220 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ion Chromatography의 경우 column은 Dionex의 IonPac ICE-AS6 (9 × 250 mm), 용리제는 0.4 mM Heptafluorobutyric acid, 그리고 유속은 1.0 mL/min이었다.

## 결과 및 고찰

### $\beta$ -ionone에 대한 *X. dendrorhous*의 생육특성

문헌(16-18)에 의하면  $\beta$ -ionone은  $\beta$ -carotene의 end-ring

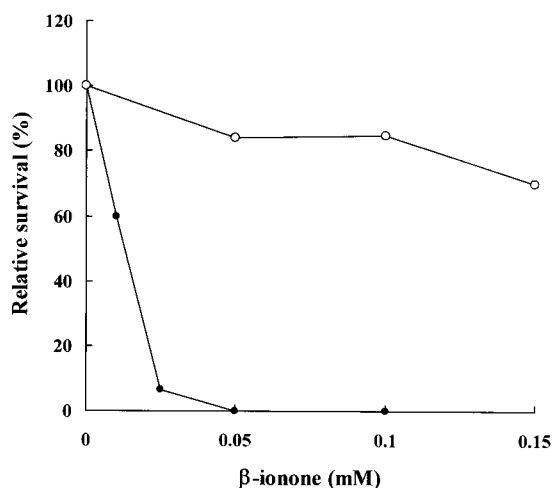
**Table 1.** The effect of NTG mutagenesis on the colour of colonies, size of colonies, and number of colonies on YM plate with or without 0.025 mM  $\beta$ -ionone

Strain	Colour of colonies	YM		YM + 0.025 mM $\beta$ -ionone	
		Colony size (mm)	Number of colonies (cells/mL)	Colony size (mm)	Number of colonies (cells/mL)
Wild (Before NTG treatment)	Red-pink	2.0	$5 \times 10^7$	1.5-2.0	$3 \times 10^6$
Mutants (After NTG treatment)	Red-pink	0.5-1.0	$6 \times 10^6$	0.5-1.0	$5 \times 10^6$
	Yellow-white	1.0-1.5	$10 \times 10^6$	1.0-1.5	$4 \times 10^6$

**Table 2.** Batch Fermentation kinetic data with various mutant strains derived from wild-type strain of *X. dendrorhous* KCTC 7704

Kinetic parameter	Strain				
	KCTC 7704	SKKU 00501	SKKU 00502	SKKU 00503	SKKU 0107
Dry cell weight (mg/mL)	4.24	4.24	3.89	4.24	3.08
Cell yield (mg/mg glucose)	0.17	0.17	0.16	0.17	0.12
Carotenoids content ( $\mu$ g/mg dry cell weight)	0.5	0.8	0.81	0.7	1.2
Total carotenoids ( $\mu$ g/mL)	2.1	3.4	3.2	3.0	3.7

analog로서 일반적으로 고역가 *X. dendrorhous* 선별에 많이 사용되어져 왔다. Fig. 1은 wild-type strain *X. dendrorhous* KCTC 7704의  $\beta$ -ionone 농도에 따른 상대적 생육저해정도를 나타내고 있다. 균주 KCTC 7704 생육은  $\beta$ -ionone의 농도가 0.025 mM 조건에서 현저히 저해받았으며, 0.05 mM에서는 완전히 저해(100%)됨을 알 수 있었다. 균주 KCTC 7704를 YM 고체 배지에 도말하여 5일간 20°C에서 배양했을 때 모두 red-pink colony가 출현되었고 colony size는 약 2.0 mm이었다.

**Figure 1.** The effect of  $\beta$ -ionone concentration on the growth of *X. dendrorhous* KCTC 7704 (●) and *X. dendrorhous* SKKU 0107 (○).

한편 Table 1에서와 같이 wild-type strain을 NTG로 처리한 후 세척하고 이를 다시 YM agar plate에 도말하여 5일간 배양했을 때 red-pink colony와 yellow-white colony (albino strain)가 동시에 출현되었는데, NTG처리 후에 나타난 colony의 직경은 NTG 처리 전 wild-type strain의 경우와 비교했을 때보다 작았다. 이는 NTG 처리 후 나타난 변이 균주들의 성장속도가 wild-type strain보다 전반적으로 느리기 때문인 것으로 사료된다. 한편 yellow-white colony들의

직경은 1-1.5 mm로서 red-pink colony (0.5-1.0 mm)보다 훨씬 컸으며, 0.025 mM  $\beta$ -ionone 함유 YM agar plate에서 출현된 red-pink colony와 yellow-white colony의 직경을 비교할 때도 YM agar plate에서의 경우와 비슷한 결과가 나타났다. 이러한 결과는 carotenoids 생산능을 가지는 변이균주들 (red-pink colonies)은 그렇지 못한 균주들 (yellow-white colonies)보다 specific growth rate가 상대적으로 작고, 균체 내의 carotenoids 축적이 자신에게 오히려 metabolic load로 작용되기 때문인 것으로 생각된다. 통상 *X. dendrorhous*의 변이처리제로서는 NTG 외에도 UV나 EMS (ethyl methane-sulfonate)가 사용되었는데, 변이처리 후 yellow-white colony인 albino strain의 출현(21, 22)이 이미 알려졌지만 colony들의 특성에 대하여는 지금까지 보고되지 않았다.

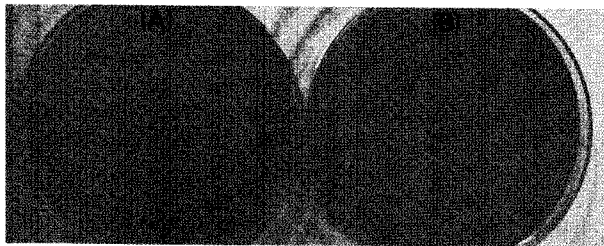
#### $\beta$ -ionone 내성 변이 균주의 선별과 회분식 발효 특성

*X. dendrorhous* KCTC 7704를 NTG로 처리하여 돌연변이를 유발시킨 후 Fig. 1의 결과를 기초로 하여  $\beta$ -ionone 0.05 mM 및 0.1 mM에서 내성을 가지는 변이 균주를 스크리닝하였다. Table 2는 이렇게 선별된 여러 변이균주들에 대한 회분식 발효 특성을 나타내고 있다. Table 2에서 알 수 있듯이 0.1 mM  $\beta$ -ionone 함유 plate에서 선별한 변이균주 SKKU 0107은 wild-type strain 또는 0.05 mM에서 스크리닝된 변이균주와 비교하였을 때 최종 건조균체농도가 매우 작았고 따라서 cell yield도 70% 수준으로 낮았다. 그러나 균체 내의 total carotenoids는 1.2  $\mu$ g/mg dry cell mass로서 wild-type strain에 비하여 2.3배 향상된 결과를 나타내었다. 이 결과는 Yu 와 Ryu(7)가 NTG, acriflavin, UV를 순차적으로 3차례 변이 처리하여 얻은 우수 균주의 역가 (1.26  $\mu$ g/mg)와 매우 비슷한 결과이며, 여러 문헌(16, 17, 19, 21)에서 보고된 변이균주의 역가 범위 (0.7-1.3  $\mu$ g/mg dry cell mass)와 비교할 때도 매우 비슷하거나 약간 향상된 결과이다. Fig. 2는 균체농도가 같은 조건 (4.6 g/L)에서 촬영한 야생균주(Fig. 2, A)와 변이균주(Fig. 2, B)의 최종 발효 완료액의 사진이다. 한편 변이균주 SKKU 0107의 여러  $\beta$ -ionone농도에 대한 내성정도를 측정해 본 결과 Fig. 1에서와 같이 놀랍게도 0.15 mM 농도에서도 70% 이상의 상대 생육율을 나타내 주었고,

0.5 mM에서도 내성을 가지고 있음이 확인되었는데 colony의 색깔은  $\beta$ -ionone의 농도가 증가할수록 점차 연해지는 것으로 보아  $\beta$ -ionone이 carotenoids 생합성을 어느 정도 비례적으로 저해함을 알 수 있었다. 더욱 중요한 것은 여러 계대배양을 통하여 확인해본 결과 변이균주 SKKU 0107로부터 복귀변이주로 생각되는 albino colony들은 전혀 나타나지 않았고 따라서 변이균주 SKKU 0107은 유전적으로 매우 안정함을 확인 할 수 있었다. Table 3는 *X. dendrorhous* SKKU 0107을 여러 탄소원 (포도당, 과당, 자당)을 사용하여 회분식 발효로 그 특성을 비교한 결과를 나타내고 있다. 여러 탄소원 들에 대한 발효특성 비교 연구 결과 과당이나 자당을 사용했을 때보다 포도당 배지에서 최종 균체농도 및 총 카로티노이드 생성량이 많았다. 이러한 결과는 Yamane 등(23)의 보고와는 다르지만 Yu 와 Ryu (7)와는 같은 결과인데, 배양 조건과 사용 균주에 따라 서로 다른 결과가 얻어지는 것으로 사료된다.

**Table 3.** Batch fermentation kinetic data for growth of *X. dendrorhous* SKKU 0107 on 25 g/L various carbon sources at 20°C

Kinetic parameter	Carbon source		
	Glucose	Fructose	Sucrose
Dry cell weight (mg/mL)	3.1	2.8	3.0
Cell yield (mg/mg carbon source)	0.12	0.11	0.12
Carotenoids content ( $\mu$ g/mg dry cell mass)	1.2	1.1	1.0
Total carotenoids ( $\mu$ g/mL)	3.7	3.1	3.0

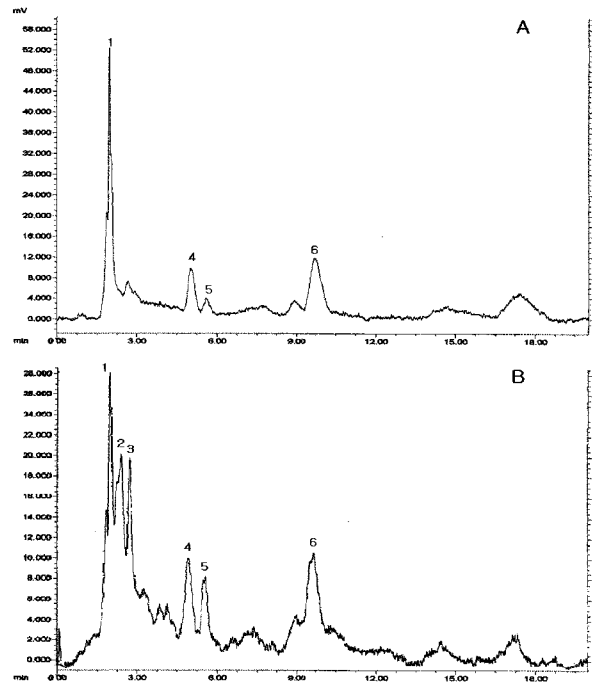


**Figure 2.** Photographs of two fermentation broth samples obtained with *X. dendrorhous* KCTC 7704 (A) and *X. dendrorhous* SKKU 0107 (B).

**발효배지 및 발효 완료액의 유기산 분석**

회분식 발효 완료액의 pH는 2.0-2.2로서 살균된 발효배지의 pH 5.0에 비하여 현저히 낮았다. 문헌(7, 18)에 의하면 *X. dendrorhous* 발효과정 중에 유기산이 생성되는 것으로 추정 했지만 현재까지 구체적으로 어떤 물질인지 보고 되지 않았다. 한편 효모에 의해 생산되는 포도주등에는 ethanol 이외에 tartaric acid, malic acid, succinic acid, lactic acid, acetic acid 등의 유기산들이 발효 부산물로 생성됨이 이미 알려져 있다(24). 따라서 본 연구에서는 발효 완료액 중에 어떤 유기산이 포함되어 있는 지를 조사하기 위하여 HPLC 및 이온크로마토그래피에 의한 정성 및 정량분석을 추진하였다. Fig. 3는 배양 전 살균된 발효배지(A)와 최종 발효 완료액(B)의 HPLC chromatograms을 보여주고 있다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 발효배지와 발효 완료액의 크로마토그램 상에는 큰 차이가 없었고, 살균된 발효배지에서는 나타나지 않았지만 최종 발효 완료액에서 추가로 나타

난 peak 2와 peak 3의 retention time은 각각 2.41 min과 2.71 min으로 밝혀졌다. 이들 물질에 대한 기본적인 정성분석을 목적으로 8개의 유기산 표준품 즉 oxalic, tartaric, formic, lactic, acetic, citric, succinic, propionic에 대한 retention time을 조사해본 결과 Fig. 4에서와 같이 순서대로 1.97 min, 2.32 min, 2.57 min, 3.50 min, 4.0 min, 4.63 min, 5.4 min, 9.37 min이었다. 따라서 peak 1과 peak 2는 위 8개 표준품들과는 retention time이 일치되지 않았다. 한편 이온 크로마토그래피를 사용하여 발효 완료액의 유기산 농도를 분석해 본 결과 formic acid, acetic acid, succinic acid가 각각 36, 11, 4 mg/L로서 그 농도가 매우 낮았다. 따라서 발효 완료액의 pH 저하 원인이 유기산과 같은 발효대사산물에 의한 것이라기보다는 무기질소원으로 사용되는  $(NH_4)_2SO_4$ 로부터 발효 과정 중에  $NH_4^+$ 가 소비(23)되면서 생성되는 유리산에 의한 것으로 사료된다.



**Figure 3.** Comparison of HPLC chromatograms obtained with 25 g/L glucose fermentation medium (A) and its final fermentation broth (B).

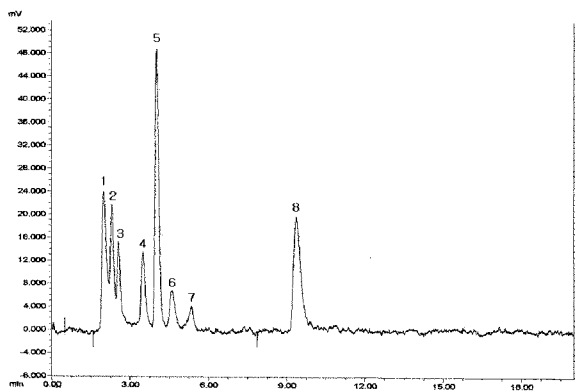
**연속발효실험에 의한 배양 pH 영향 특성 연구**

문헌(3, 17, 18, 25)에 의하면 astaxanthin 발효에서 배양 pH가 *X. dendrorhous* 균체 농도 및 astaxanthin 축적에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 보고하고 있다. 지금까지 대부분의 연구들은 회분식 또는 유가식 발효방식에 의하여 이루어졌는데, 이러한 발효방식에서는 발효가 항상 비정상 상태에서 진행되기 때문에 정확한 발효변수의 pH 영향을 조사하는 데는 어려움이 따르게 된다. 그러나 연속 발효방식을 채택하게 되면 정상상태에서의 데이터를 얻을 수 있기 때문에 온도나 pH 등 발효변수의 영향을 정량적으로 연구하기에 보다 적절한 발효 방법이다. 그러나 불행히도 지금까지 *X. dendrorhous*의 연속발효실험에 대한 연구는 매우 제한적이었다(25, 26). Table 4는 희석율 (dilution rate)이

0.04 h<sup>-1</sup> 조건하에서 *X. dendrorhous* SKKU 0107을 연속배양했을 때 얻어진 정상상태에서 pH영향에 대한 결과이다. *X. dendrorhous* SKKU 0107은 변이균주로서 비성장속도가 매우 작고, 또한 최적배양조건에서 밀리 떨어진 pH 조건에서는 더욱 이 값이 작아지기 때문에 그러한 조건에서는 소위 "wash-out"이 일어나기 쉬워서 넓은 pH 영역에서의 실험이 가능하지 않다. Table 4에서 알 수 있듯이 pH 4.0에서의 발효결과를 기준으로 비교해 볼 때, pH 3.0에서는 균체농도 및 균체수율의 저하 그리고 pH 5.2에서는 carotenoids content의 감소가 일어남을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서의 배양 최적 pH는 4.0으로 사료되는데, 이 결과는 배양 최적 pH가 5.0~6.0으로 보고한 문헌(3, 26)들과 비교해 볼 때 약간 상이하지만 이는 균주 특성이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다. 한편 Table 1에 나타난 회분식 배양의 결과와 비교했을 때 연속배양의 경우 상대적으로 carotenoids content가 적은 것은 발효 평균체류시간이 25 h (회석율 0.04 h<sup>-1</sup>)로 낮아 균체내에서 충분한 carotenoids의 생합성이 이루어지지 않았기 때문이다.

**Table 4.** Effect of pH on steady-state data of continuous culture with *X. dendrorhous* SKKU 0107 using 5 g/L glucose medium at 20°C

Kinetic parameter	pH		
	3.0	4.0	5.2
Dry cell weight (mg/mL)	0.42	1.0	0.98
Cell yield (mg/mg glucose)	0.11	0.20	0.20
Carotenoids content (µg/mg dry cell mass)	0.5	0.49	0.28
Total carotenoids (µg/mL)	0.21	0.49	0.27



**Figure 4.** HPLC chromatogram of various organic acids (1. oxalic (1.97 min), 2. tartaric (2.32 min), 3. formic (2.57 min), 4. lactic (3.50 min), 5. acetic (4.0 min), 6. citric (4.63 min), 7. succinic (5.4 min) and 8. propionic (9.37 min)).

## 요 약

본 연구에서는 적효모 *X. dendrorhous* KCTC 7704로부터 여러 β-ionone 내성 변이균주를 선별하였다. 야생균 KCTC 7704는 β-ionone 0.025 mM 농도에서 생육이 현저히 저하되었지만, NTG처리 후 β-ionone 0.1 mM 농도에서 선별된 변이균주는 β-ionone 0.15 mM에서도 70% 이상의 상대 생육

율을 나타내는 매우 강한 β-ionone 내성을 갖고 있었다. 여러 β-ionone 농도에서 선별한 변이균주들을 20°C에서 4일간 회분식 발효로 배양하여 그 특성을 조사하였다. 선별된 가장 우수한 변이균주는 야생균주보다 카로티노이드 생성능이 2.3배 향상 (즉 1.2 µg of total carotenoids per mg of dry cells)되었으며 유기산과 같은 대사산물은 거의 생성하지 않았다. 여러 탄소원 들에 대한 비교 발효특성 연구 결과 과당이나 자당을 사용했을 때와 비교하여 포도당 배지에서 최종 균체농도 및 총 카로티노이드 생성량이 많았다. 포도당이 제한되는 연속발효 (dilution rate 0.04 h<sup>-1</sup>) 실험을 통하여 pH의 영향을 조사한 결과 균체농도 및 총 카로티노이드 생성은 pH 4.0 조건하에서 최적인 것을 알 수 있었다.

## 감 사

이 논문은 2005년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며 (KRF-2005-050-D00005), 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- 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.
- 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.
- Ramirez J., H. Gutierrez, and A. Gschaedler (2001), Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology, *J. Biotechnol.* **88**, 259-268.
- Lorenz, R. T. and G. Cysewski (2000), Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin, *Trends Biotechnol.* **18**, 160-167.
- Parajo, J., V. Santos, and M. Vazquez (1998), Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood, *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 501-506.
- Guerin, M., M. E. Huntley, and M. Olaizola (2003), *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition, *Trends Biotechnol.* **21**, 210-216.
- Yu, S. S. and Y. W. Ryu (2001), Selection of mutant *Phaffia rhodozyma* and determination of optimum culture conditions for astaxanthin production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 96-103.
- Kobayashi, M. (2003), Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnol. Bioprocess Bioeng.* **8**, 322-330.
- Renstorm, B., G. Broch, O. M. Skulberg, and S. Liaen-Jensen (1981), Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Phytochemistry* **20**, 2561-2564.
- McCoy, M. (1999), Astaxanthin market a hard one to crack, *Chem. & Eng. News* **77**, 15-17.

11. Haard, N. F. (1988), Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses, *Biotechnol. Lett.* **10**, 609-614.
12. Vazquez, M. and A. M. Martin (1998), Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology, *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 314-320.
13. Yamane, Y., T. Mikami, K. Higashida, T. Kakizono, and N. Nishio (1996), Estimation of the concentrations of cells, astaxanthin and glucose in a culture of *Phaffia rhodozyma* by near infrared reflectance spectroscopy, *Biotechnol. Tech.* **10**, 529-534.
14. Siva Kesava, S., G. H. An, C. H. Kim, S. K. Rhee, and E. S. Choi (1998), An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*, *Bioprocess Eng.* **19**, 165-170.
15. Visser, H., A. J. J. van Ooyen, and J. C. Verdoes (2003), Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *FEMS Yeast Research* **4**, 221-231.
16. Lewis, M. J., N. Ragot, M. C. Berlant, and M. Miranda (1990), Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionone, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2944-2945.
17. 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.
18. Lim, D. T. and E. K. Lee (2000), Fermentation process characteristics of *Phaffia rhodozyma* mutant B76 for astaxanthin biosynthesis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 125-133.
19. Sedmak, J. J., D. K. Weerasinghe, and S. O. Jolly (1990), Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*, *Biotechnol. Tech.* **4**, 107-112.
20. An, G. H. and E. S. Choi (2003), Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin, *Biotechnol. Lett.* **25**, 767-771.
21. Calo, P., J. B. Velazquez, C. Sieiro, P. Blanco, E. Longo, and T. Villa (1995), Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants, *J. Agri. Food Chem.* **43**, 1396-1399.
22. An, G. H., O. S. Suh, H. C. Kwon, and E. A. Johnson (2000), Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence, *Biotechnol. Lett.* **22**, 1031-1034.
23. 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.
24. Tsukatani, T. and K. Matsumoto (1999), Enzymatic quantification of L-tartarate in wines and grapes by using the secondary activity of D-malate dehydrogenase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1730-1735.
25. Vazquez, M. and A. M. Martin (1998), Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology, *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 314-320.
26. Meyer, P. S. and J. C. Du Preez (1994), Effect of continuous conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 780-785.