

## Astaxanthin 생산을 위한 *Phaffia rhodozyma*의 변이균주 선발과 최적 배양조건 결정

유성선 · 유연우\*  
아주대학교 분자과학기술학과

**Selection of mutant *Phaffia rhodozyma* and Determination of Optimum Culture Conditions for Astaxanthin Production.** Yu, Seong Seon and Yeon Woo Ryu\*. Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea – *Phaffia rhodozyma* is the most promising microbial source of astaxanthin production, though wild-type strains are needed to increase the astaxanthin content for commercial production. To increase astaxanthin content for commercial production, a mutant strain of *P. rhodozyma* was selected and culture conditions of the mutant selected were optimized. *P. rhodozyma* was treated with mutagenic agent such as NTG, acriflavine, and UV in serial order and carotenoids hyper-producing mutant strain was selected based on the capabilities of cell growth on the agar plate containing chemical inhibitors and carotenoids production. Among the mutants tested, a mutant WS-2 was finally selected. Mutant WS-2 produced 1.26 mg carotenoids/g-dry cell weight and this value was about 4-folds higher than that of wild-type. The optimum culture conditions were 24°C of temperature, 1.5 vvm of aeration and 300 rpm of agitation. In the optimized condition, cell and carotenoids concentrations were 7.62 g/l and 14.9 mg/l, respectively.

**Key words:** *Phaffia rhodozyma*, mutant, astaxanthin, carotenoids

Carotenoids는 polyene이라 불리는 긴 구조를 가지며, 말단에 ring 구조를 갖는 물질로서 polyene과 ring 구조의 차이에 따라 다양한 carotenoids로 구분된다. Carotenoids는 현재까지 약 400여 종이 밝혀졌고[11], 그 중에서 *trans*-astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ , $\beta$ -carotene-4,4'-dione)은 해양 환경에 풍부하게 존재하는 화합물로서, algae, fungi, 그리고 작은 갑각류로부터 생합성되어 먹이사슬에 의해 연어, 갑각류, 또는 조류 등으로 이동, 축적되어 그들의 착색을 일으킨다[9]. 그러나, astaxanthin은 연어나 다른 많은 고등 동물에서는 생합성이 되지 않으므로 양계를 포함한 가금 산업이나, 연어, 송어 등을 포함한 양식사업에 있어 색소 공급원으로 중요한 첨가제 역할을 하고 있다[4,19]. 전 세계에서 생산된 대부분의 astaxanthin은 양식 연어나 송어의 착색을 위한 색소로서 소비되며, 최근에는 가금 산업에서도 astaxanthin의 수요가 점차 증가하는 추세에 있다. 또한, astaxanthin은 인체 내에서 vitamin A의 전구체 역할을 할 뿐만 아니라, 다른 carotenoids와는 달리 강력한 항 산소 라디칼제로서 항 산화력이 다른 carotenoids 보다 10배, vitamin E 보다는 100배인 것으로 알려져 있어 항 산화제로서도 관심의 대상으로 부각되고 있다[3,16]. 실질적으로

astaxanthin은 다양한 생물체에 대하여 DNA 손상과 단백질 산화로 인해 치명적인 세포막의 손상을 일으키는 산소 라디칼(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 피해를 막아주는 역할에 이용되고 있다[1,21].

현재 astaxanthin을 생성하는 것으로 알려진 균주들 중에서 산업적인 생산에 이용될 수 있는 가능성을 가진 균주는 *P. rhodozyma*와 *Haemacoccus pluvialis* 이고[12], 다른 균주들은 astaxanthin의 생성량이 낮아 산업적인 가치가 떨어진다고 보고되었다[4,12]. 그러나 녹조류인 *H. pluvialis*는 배양방법에 따라 높은 함량의 astaxanthin을 생산할 수 있지만 배양시간이 길며, 배양 후에 색소를 추출해야 하는 등의 단점이 있고, 생성되는 astaxanthin의 대부분이 ester 형태로 존재하기 때문에 동물에 따라 대사 및 색소 축적에 영향을 줄 수 있다고 보고되어 있다[9]. 따라서 최근에는 균체 자체가 물고기 및 닭의 영양원이 될 수 있기 때문에 균체로부터 색소를 추출할 필요가 없는 효모인 *P. rhodozyma*가 색소 공급원으로 부각되고 있다[19]. 즉, astaxanthin 생산에 있어서 *P. rhodozyma*의 우수성은 조류나 곰팡이에 비하여 배양하기가 용이하며, 균체 자체에 풍부한 단백질과 색소 흡수를 촉진하는 불포화 지방산, 비타민 그리고, 독특한 풍미를 가지고 있어 색소원 뿐만 아니라 동물생육에 필수적인 영양공급원으로써의 역할 등 다양한 장점들을 가지고 있다.

*P. rhodozyma*는 1970년대 초에 일본, 알래스카 및 러시아의 산악지역에서 낙엽수 수액으로부터 처음으로 분리되었으며, 합성된 총 carotenoids 색소 중 astaxanthin의 함량

\*Corresponding author  
Tel. 031-219-2449, Fax. 031-216-8777  
E-mail: ywryu@madang.ajou.ac.kr

이 80% 이상인 것으로 알려져 있다[9]. 그러나 야생 균주인 *P. rhodozyma*에서 carotenoids의 생성은 약 0.4 mg/g-dry cell weight(DCW)로서 색소원으로 이용될 수 있을 만큼 높지 않기 때문에, 합성 astaxanthin과의 가격 경쟁력을 갖기 위해서는 높은 농도의 색소를 생산할 수 있는 균주의 개발이 필요하다. 따라서 현재까지 astaxanthin의 생성이 우수한 균주개발을 위한 방법으로 물리적 또는 화학적인 mutagens을 처리한 후에 여러 가지 carotenoids 생합성 저해제에 대한 저항성을 갖는 균주를 선발하여 astaxanthin 생성이 우수한 균주를 개발하여 왔다[2,15]. 또한 *P. rhodozyma*를 이용한 astaxanthin의 최적 생산조건을 확립하는 연구도 활발히 진행되고 있다. 즉 산업적 생산을 위한 탄소원 및 유기질소원의 선정[7,8,9]과 발효조건[10,23] 및 배양방법[24]에 대한 연구들을 수행하고 있다.

따라서 본 연구에서도 mutagens을 순차적으로 처리하여 변이를 유도시킨 후에 우수한 변이균주를 선발하고, 선발된 우수 변이균주의 최적 배지조성 및 배양조건에 대한 연구를 수행하여 astaxanthin의 산업적 생산에 대한 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

사용한 균주는 astaxanthin 생산을 위하여 가장 널리 사용하고 있는 *Phaffia rhodozyma* ATCC24202를 생명공학 연구소에서 분양 받아 이용하였고, 균주 보관용 사면배지에 접종하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

### 배양 배지 및 배양 조건

접종용 균주의 배양은 10 g/l glucose, 3 g/l yeast extract, 3 g/l malt extract, 5 g/l Bacto-peptone이 포함된 YM 배지 50 ml을 250 ml baffled flask에 넣고 멸균한 후에 균주를 접종하여 24°C에서 150 rpm으로 교반하면서 48 시간 동안 배양하여 사용하였다. 변이균주의 선별은 2%(w/v) agar가 포함된 YM 배지에 chemical inhibitors인  $\beta$ -ionone, thymol, 2-methylimidazol, 4(5)-methylimidazol, miconazol 및 clotrimazol가 첨가된 배지를 이용하였다. 선별한 변이균주들의 세포성장과 carotenoids 생성량의 비교를 위한 실험은 20 g/l의 glucose가 포함된 YM 배지를 이용하여 접종용 균주의 배양과 동일한 조건에서 7일간 배양하였다.

발효조건을 이용한 astaxanthin의 생산은 20 g/l glucose, 20 g/l corn steep liquor(CSL), 0.5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.16 g/l  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 가 포함된 배양배지 1.0 liter를 2.5 liter 발효조 (KoBioTech, Korca)에 넣고 24°C에서 1.5 vvm으로 통기하고, 300 rpm으로 교반하면서 실험을 수행하였다. 배양 배지 제조에서 CSL은 증류수에 현탁하여 100°C에서 약 3 시간 동안 처리한 후 상온으로 식혀 pH를 7.0으로 적정하

고 filter paper (Whatman, No. 2, USA)로 여과하여 사용하였다. 멸균과정에서 glucose와  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 는 따로 멸균하여 혼합하였다. 모든 발효를 위한 접종용 균주의 양은 10 % (v/v)로 하였다.

### 분석방법

당류와 당알콜류의 농도는 carbohydrate analysis column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI detector로 측정하였다. 이때 이동상의 용매는 85% acetonitrile를 유속 2 ml/min로 하여 분석하였다. 배양실험에서 glucose 농도는 Glucose Analyzer (YSI, USA)를 사용하여 분석하였다.

건조 균체량 (dry cell weight: DCW)의 측정은 spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선에 의하여 건조 균체량 (g/l)으로 환산하였다. 이때 O.D 1.0 은 균체량 0.565 g/l에 해당되었다. 건조 균체량 측정은 배양액 10 ml를 0.45  $\mu$ m의 membrane filter로 여과하고 10 ml의 증류수로 3회 세척한 후에 60°C, 50 mmHg의 진공건조기 (DAE SAN Eng. Co., Korea)에서 일정한 무게에 도달할 때까지 건조시킨 후 측정하였다.

### 색소의 추출 및 정량

배양액 1 ml를 10 ml의 centrifugal tube에 넣고 3 ml의 증류수를 첨가한 후 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 2회 세척하고 진공건조기로 수분을 제거하였다. 여기에 55°C인 DMSO 원액 2 ml를 넣고 55°C에서 5분간 추가로 처리한 후에 강하게 vortexing 하였다. 상등액에 1 ml의 1 M phosphate buffer (pH 7.0)을 넣고, hexane과 ethyl acetate가 동량으로 혼합된 용매 5 ml를 넣어 색소가 용매층으로 추출되도록 vortexing한 다음 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 불순물이 제거된 용매층을 취하였다.

색소가 함유된 용매층을 spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Japan)로 474 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 total carotenoids 양으로 결정하였다. 이때에 blank는 색소가 포함되지 않은 hexane과 ethyl acetate가 동량 혼합된 동일한 추출용매를 이용하였다. 측정된 흡광도 값과 건조 균체량을 이용하여 1% extinction coefficient = 2100 ( $E_{1\%/1\text{cm}} = 2100$ ) 값을 아래의 식에 적용시켜 정량 하였다[13].

$$\text{Total carotenoid } (\mu\text{g/g-DCW}) = \frac{\text{ml of solvent} \times A_{474} \times 100}{21 \times \text{Dry Cell Weight}}$$

Astaxanthin의 농도는 Nova-Pak C18 column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC에서 474 nm의 UV detector로 측정하였다. 이동상 용매는 methanol과 acetonitrile를 75:25로 혼합하여 사용하였으며, 이동상의 유속은 1.0 ml/min 이었다.

### 우수 변이균주의 선별

N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)를 이용한 변이균주의 유도는 NTG를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 0.3%(w/v)의 농도로 제조하여 사용하였다. 즉 *P. rhodozyma*를 72시간 동안 배양하여 얻은 배양액 5 ml을 멸균된 centrifugal tube에 넣고 4,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 멸균증류수로 2회 세척한 후 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)로 1회 세척하였다. 여기에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여서 만든 0.3%(w/v) NTG용액 5 ml를 첨가하고 진탕 배양기에서 30분간 변이를 유발시킨 후 5%(w/v) sodium thiosulfate를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 변이를 유도시킨 용액을 희석하여 각각의 carotenoids 생합성 저해물질이 포함된 plate에 각각 0.1 ml씩 도말한 후에 5일간 배양하여 붉은 colonies를 변이균주로 간주하였다. 또한 acriflavine을 이용한 변이의 유도는 균주를 48시간 동안 배양하여 얻은 배양액 5 ml을 멸균된 centrifugal tube에 넣고 0.4%(w/v) acriflavine 수용액 300  $\mu$ l를 첨가한 후 24°C의 압 조건에서 2일간 배양하면서 변이를 유도하였다. 배양액을 희석하여 각각의 carotenoids 생합성 저해물질이 포함된 plates에 각각 0.1 ml씩 도말하여 5일간 배양한 후에 붉은 colonies를 변이균주로 선별하였다. UV를 이용한 변이유도는 YM 액체배지에서 3일간 배양한 균주를 적정배수로 희석한 후 0.1 ml을 취하여 YM plate에 도말하고, 254 nm 파장의 UV lamp를 30 cm 거리에서 3분간 UV를 조사한 후에 광활성화를 방지하기 위하여 빛을 차단시키고 24°C에서 5일간 배양하여 시각적으로 보다 붉은 colonies를 분리하여 색소 생성이 우수한 변이균주로 선별하였다. 각각의 돌연변이 유도과정에서 선별된 변이균주들은 액체배양을 통한 세포성장률과 carotenoids 생성량을 검토하여 가장 우수한 변이균주를 선별하였다.

### 배양조건의 최적화 연구

최종 선별된 우수 변이균주의 배양조건을 최적화하기 위하여 탄소원, 질소원 및 무기염과 같은 배지성분과 배양온도가 세포의 성장 및 carotenoids의 생성에 미치는 영향을 flask 배양을 통하여 검토하였다. 즉 탄소원의 영향에 대한 실험은 YM 배지조성에서 10 g/l의 glucose와 같은 농도의 당류 및 당 알콜류 등으로 대체하여 비교하였다. 질소원의 영향에 대한 실험은 YM 배지조성에서 질소원인 bacto peptone 대신에 여러 가지 유기질소원들을 5 g/l의 농도로 각각 첨가하여 비교하였다. 무기염에 대한 영향은 20 g/l의 glucose와 20 g/l의 CSL이 각각 포함된 배지에 각각의 무기염을 첨가하여 실험을 수행하였다. 배양온도에 대한 영향에서는 18°C에서 28°C까지 2°C간격으로 실험을 수행하였다. 통기량의 최적화는 발효조를 이용하여 실험을 수행하였다. 즉 flask 배양을 통하여 결정된 배지조성 및 배양조건에서 최적의 통기량을 결정하기 위하여 교반속도를 300

rpm으로 유지하고 통기량을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 vvm으로 변 화시키면서 세포성장률과 carotenoids의 생성량을 검토하였다.

## 결과 및 고찰

### 우수 변이균주의 개발

연구에 이용한 야생 효모균주인 *P. rhodozyma*는 색소 생산능력이 낮은 단점을 가지고 있다. 즉 사용한 야생균주인 *P. rhodozyma*를 20 g/l의 glucose가 함유된 YM 액체 배지를 이용하여 진탕배양기에서 7일간 배양한 결과 최대 세포농도는 12.4 g/l 이었으며, 색소의 생성은 0.32 mg/g-DCW 으로서 carotenoids의 생성량은 3.95 mg/l 이었다(Table 1). 따라서 천연 색소인 astaxanthin의 산업적인 생산을 위해서는 세포성장률과 색소의 생성이 우수한 효모균주의 개발이 필요하다. 이를 위하여 일차적으로 NTG를 이용한 균주의 개량에서는 YM 액체배지에서 72시간 동안 배양한 세포에 NTG를 30분간 처리한 후 이미 선정된 각각의 carotenoids 생합성 저해물질이 포함된 선별배지에 도말하여 배양하였다. 배양 5일 후에 크고 붉은 색상을 띠는 colonies를 1.0 mM의  $\beta$ -ionone이 포함된 plate와 0.03 mM의 miconazole 이 포함된 plate로부터 선별할 수 있었다. 선별한 변이균주들을 진탕배양기에서 7일간 배양하여 세포성장률과 carotenoids 생성량을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 실험결과에서 세포성장률은 거의 차이가 없었으나 색소의 생성은 변이균주들이 야생균주 보다 1.1~1.4배 우수하였다. 변이균주들 중에서 생합성 저해제로  $\beta$ -ionone이 포함된 plate로부터 선별한 변이균주  $\beta$ 2가 세포성장률과 색소의 생성이 가장 우수하여 다음의 돌연변이 유도를 위한 균주로 선발하였다. 이때  $\beta$ -ionone은  $\beta$ -carotene의 analogue로서  $\beta$ -carotene과 같이 astaxanthin 생합성 과정의 전구체인 isoprenoid 합성에 관여하는 phosphomevalonate kinase와 phosphomevalonate decarboxylase 및 phytoene desaturase의 생성 또는 활성을 억제한다고 알려져 있다[2,15]. 따라서 변이균주  $\beta$ 2는 이 효소들의 작용이  $\beta$ -carotene에 의하여 feedback regulation을 받지 않는 feedback resistant mutant임을 알 수 있었다. 또한  $\beta$ -ionone을 함유한 배지에서 생존능력이 우수하고 carotenoids 생합성 능력이 증가된 균주는 carotenoids

**Table 1. Cell growth and carotenoids production of wild-type and mutants induced by NTG**

Strains	Cell concentration (g/l)	Carotenoid concentration	
		mg/g-DCW	mg/l
Wild type	12.4	0.32	3.95
Mutant Mic10	13.4	0.37	4.90
Mutant Mic12	11.6	0.39	4.50
Mutant $\beta$ 2	12.2	0.45	5.49
Mutant $\beta$ 3	12.2	0.39	4.81

중에서 다른 색소의 함량은 감소하는 반면 astaxanthin의 함량이 증가한다는 보고가 있다[14].

Carotenoids hyperproducing mutants는 야생균주에 비하여 더 많고 조그만 defective mitochondria를 가질 뿐 아니라 defective mitochondria에서 carotenoids 합성을 촉진하는 산소 라디칼이 생성되어 carotenoids의 생성을 증가시킨다는 보고에 의하여 선발한 변이균주 β2에 mitochondrial mutagen으로 알려진 acriflavine을 사용하여 돌연변이를 유도하였다[13]. 돌연변이 시킨 균주들을 각각의 carotenoids 생합성 저해제가 포함된 plates에 도말하여 5일간 배양한 결과 시각적으로 β2보다 색소의 생성이 우수한 변이균주 β2R8과 β2R10을 β-ionone이 포함된 plate에서 얻었다. 선발한 변이균주 β2R8 및 β2R10과 모균주 β2 및 야생균주를 20 g/l의 glucose가 포함된 YM 액체배지를 이용하여 진탕 배양기에서 7일간 배양한 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험결과에서 변이균주 β2R8은 세포성장에서는 야생균주나 모균주인 β2에 비하여 약간 낮았으나 색소의 생성은 야생균주 보다 약 2.0배, 모균주인 β2보다 약 1.4배 증가하였다. 따라서 변이균주 β2R8을 선발하여 다음의 돌연변이 유도를 위한 모균주로 선발하였다.

세 번째의 돌연변이 유도는 YM plate에 선발한 변이균주 β2R8을 도말하고 physical mutagen인 UV를 처리한 후에 알루미늄 foil로 싸서 5일간 배양하였다. 배양 후에 성장한 colonies 중에서 시각적으로 식별하여 colony가 상대적으로 크고 붉은 변이균주 WS-2를 선발하였다. 선발한 변이균주 WS-2와 모균주 β2R8 및 야생균주를 20 g/l의

**Table 2. Cell growth and carotenoids production of wild-type, mutant β2 and mutants induced by acriflavine**

Strains	Cell concentration (g/l)	Carotenoid concentration	
		mg/g-DCW	mg/l
Wild type	10.9	0.31	3.36
Mutant β2	11.9	0.42	5.00
Mutant β2R8	9.6	0.64	6.14
Mutant β2R10	10.8	0.45	4.88

glucose가 포함된 YM 액체배지에서 3일과 7일간 24°C의 진탕배양기에서 baffled flask로 배양한 결과를 Table 3에 나타내었다. 실험결과에서 변이균주 WS-2의 세포성장은 3일과 7일 배양에서 각각 야생균주와 모균주 β2R8에 비하여 낮았으나, 색소의 생성은 7일 배양에서 야생균주와 모균주 β2R8에 비하여 각각 약 4.1배와 2.0배가 증가된 1.26 mg/g-DCW 이었다. 따라서 최종적으로 변이균주 WS-2를 우수 변이균주로 선발하였다. 선발한 변이균주 WS-2의 carotenoids 생합성 저해제들에 대한 내성을 검토하기 위하여 각각의 저해제가 포함된 고체배지에 도말하여 배양한 결과 2-methylimidazol, 4(5)-methylimidazol, β-ionone에 대한 내성을 나타내었다. 따라서 변이균주 WS-2는 phosphomevalonate kinase, phosphomevalonate decarboxylase, phytoene desaturase의 생성 또는 활성이 β-carotene에 의하여 feedback regulation을 받지 않는 feedback resistant mutant 일 뿐만 아니라 cytochrome p-450의 기능이 우수한 변이균주임을 알 수 있었다[2,15].

**Table 3. Cell growth and carotenoids production of wild-type, mutant β2R8 and mutant WS-2**

Strains	3 days culture		7 days culture	
	Cell conc. (g/l)	Carotenoid conc. (mg/g-DCW)	Cell conc. (g/l)	Carotenoid conc. (mg/g-DCW)
Wild-type	8.50	0.27	7.76	0.31
Mutant β2R8	8.06	0.45	7.15	0.61
Mutant WS-2	7.45	1.02	7.05	1.26

**Table 4. Effect of carbon sources on the cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 after 5 days culture**

Carbon sources	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration		Sugar consumed (g/l)
		mg/g-DCW	mg/l	
Glucose	3.75	2.12	7.95	9.22
Fructose	3.26	2.25	7.34	9.15
Xylose	3.03	2.31	7.00	9.20
Cellobiose	3.77	1.71	6.45	8.84
Sucrose	3.60	1.74	6.26	9.65
Maltose	3.97	1.72	6.83	9.46
Lactose	1.30	1.33	1.73	0.60
Raffinose	2.10	1.56	3.28	0.21
Manitol	3.72	2.24	8.33	9.81
Sorbitol	3.95	2.38	9.40	9.82

**배지조성의 최적화**

배지조성의 최적화에 대한 실험에서 탄소원의 선정은 YM 배지에 여러 가지 당류 및 당 알콜류를 각각 10 g/l를 넣고 5일간 배양한 후에 최종 세포 및 carotenoids의 농도를 비교하였다(Table 4). 실험결과에서 변이균주 WS-2는 lactose와 raffinose를 거의 이용하지 못하였고, 세포성장에서는 maltose와 sorbitol이 우수하였다. 색소의 생성은 xylose와 sorbitol이 우수하였으며, carotenoids의 생성량은 sorbitol에서 9.33 mg/l로 가장 우수하였다. 반면에 Johnson 등[10]과 Vazquez 등[22]은 *P. rhodozyma*가 다양한 당을 이용할 수 있으며, 그 중에서 cellobiose가 *P. rhodozyma*의 색소생성을 유도하는데 있어서 가장 효과적이라고 하였다. 반면에 glucose는 세포 성장에 있어서 효과적이지만 색소생성에서는 우수하지 못하다고 하였으며, sucrose는 세포 성장 및 색소생성에서 비교적 모두 우수하다고 하였다. 그러나 경제성을 고려할 때 sorbitol은 glucose의 가격과 비교하여 약 3배 이상으로 높으며, glucose에서도 세포 성장과 carotenoids의 생성이 양호하기 때문에 탄소원으로 glucose를 선정하였다.

*P. rhodozyma*를 이용한 carotenoids의 생성은 질소원의 영향을 많이 받는다고 보고되었다[6]. 따라서 carotenoids 생성에 대한 유기질소원의 영향을 알아보기 위하여 10 g/l의 glucose가 포함된 YM 배지에서 5 g/l의 peptone 대신에 각각의 유기질소원이 5 g/l 포함된 배지를 이용하여 실험한 결과를 Table 5에 나타내었다. 실험결과에서 세포 성장은 yeast extract와 CSL에서 우수하였다. 반면에 색소의 생성은 soy-bean meal이 2.02 mg/g-DCW로 가장 우수하였으며, 그 다음으로 CSL이 1.66 mg/g-DCW으로 우수하였다. 이러한 결과는 peptone이 색소의 생성이 가장 우수하며, 그 외에 beef extract 및 casein hydrolysate가 우수하다고 보고한 Fang 등[6]의 결과와 다르게 나타났다. 따라서 세포 농도 및 색소의 생성이 모두 우수하고, carotenoids의 생산량이 6.82 mg/l로서 가장 높은 CSL을 유기질소원으로 선정하였다.

*P. rhodozyma*를 이용한 astaxanthin의 생산을 최적화하기 위해서는 탄소원과 질소원의 첨가 비율이 매우 중요하다. 따라서 배양매지로 탄소원인 glucose 농도를 10 g/l로 유지

하고 유기질소원으로 선정한 CSL 만을 여러 가지 농도로 첨가하여 C/N ratio가 세포 성장 및 carotenoids의 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 진탕배양기에서 5일간 배양하였다. 실험결과(Table 6)에서 CSL의 농도가 증가할수록 세포 농도는 증가하여 50 g/l의 CSL에서 최대 5.33 g/l이었다. 이는 질소원인 CSL의 농도가 증가함에 따라 세포 성장에 충분한 양의 질소원이 공급되었기 때문이다. 반면 CSL의 농도가 증가할수록 색소의 생성은 감소하였는데, 이는 질소원이 충분한 경우 색소생성 보다는 세포의 성장에 탄소원이 더 많이 이용되기 때문으로 사료된다. 그러나 carotenoids의 생성량은 20 g/l의 CSL에서 5.45 mg/l로 가장 우수하였다. 반면에 CSL의 농도에 관계없이 총 carotenoids 중 astaxanthin이 차지하는 비율은 약 95% 이상으로 유지되었다. 따라서 배지 조성에서 YM 액체 배지에 존재하

**Table 5. Effect of nitrogen sources on the cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 after 8 days culture**

Nitrogen sources	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration	
		mg/g-DCW	mg/l
Yeast extract	4.42	1.06	4.69
Peptone	2.12	1.56	3.31
Beef extract	3.03	1.30	3.94
Soy bean meal	3.04	2.02	6.14
Corn steep liquor	4.11	1.66	6.82
Casein hydrolyzate	3.94	1.59	6.26

**Table 7. Effect of glucose concentration on the cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 after 5 days culture**

Glucose concentration (g/l)	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration	
		mg/g-DCW	mg/l
10	3.59	1.35	4.85
15	4.74	1.41	6.68
20	5.64	1.44	8.12
25	6.45	1.16	7.48
30	7.36	0.97	7.14

**Table 6. Effect of corn steep liquor concentration on the cell growth, carotenoids and astaxanthin production of mutant WS-2 after 5 days culture**

CSL concentration (g/l)	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration		Astaxanthin (mg/l)
		mg/g-DCW	mg/l	
5	2.04	1.46	2.98	2.83
10	2.80	1.40	3.92	3.75
15	3.28	1.38	4.53	4.34
20	3.98	1.37	5.45	5.23
25	4.32	1.26	5.44	5.26
30	4.74	1.13	5.36	5.15
40	4.93	1.00	4.93	4.68
50	5.33	0.93	4.93	4.73

던 yeast extract와 malt extract의 첨가 없이 유기질소원으로 20 g/l의 CSL 만을 첨가하기로 결정하였다.

배양배지로 유기질소원인 CSL을 20 g/l로 하고 glucose를 여러 가지 농도로 하여 glucose 농도가 세포성장 및 carotenoids 생성에 미치는 영향을 검토하기 위한 실험을 진탕배양기에서 5일간 배양하여 수행하였다. 실험결과(Table 7)에서 glucose의 농도가 증가함에 따라 세포농도는 거의 비례하여 증가하였으나, 색소의 생성은 20 g/l의 glucose 농도까지는 증가하다가 그 이상의 농도에서는 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 *P. rhodozyma*가 고농도의 glucose에서는 carotenoids의 생성이 낮아진다는 보고[10]와 일치하였으며, An 등[2]은 이러한 양상에 대해 고농도의 glucose가 carotene oxygenation을 저해하며, carotenoids 생합성에 요구되는 cytochrome P-450s를 제한하기 때문이라고 설명하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 세포농도가 5.64 g/l 이고, 색소의 생성이 1.44 mg/g-DCW로 가장 우수하며, carotenoids의 생성량 8.12 mg/l로 가장 높은 20 g/l의 glucose 농도를 최적조건으로 결정하였다.

일부의 무기염이 조류(algae)와 *P. rhodozyma*에서 carotenoids 생성을 증가시킨다는 보고가 있다[18]. 따라서 glucose와 CSL이 각각 20 g/l가 첨가된 배지에 보고된 문헌을 토대로 하여  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  및  $Ca^{+2}$ 의 첨가에 대한 영향을 검토하였다. 실험결과(Table 8)에서 carotenoids의 생성량이  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 와  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가한 경우에 첨가하지 않은 경우에 비하여 증가하였다. 이때  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 를 첨가한 경우는 세포농도의 증가에서 효과적이었고,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 색소의 생성에서 효과적이었다. 더구나 세포농도 및 carotenoids의 생성량 증가에서  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 와  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함께 첨가한 경우에 세포농도는 6.40 g/l 이고, 색소의 생성이 1.35 mg/g-DCW로써 carotenoids의 생성량은 8.64 mg/l로 가장 우수하였다. 따라서 astaxanthin의 생산을 위한 배양배지에 0.16 g/l의  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 와 0.5 g/l의  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가하기로 결정하였다.

#### 배양조건의 최적화

배양온도는 세포막의 구조와 조성변화 및 색소생성에 영향을 미칠 뿐만 아니라 세포 내의 지방산조성에도 영향을

**Table 9. Effect of culture temperature on the cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 after 5 days culture**

Culture temperature (°C)	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration	
		mg/g-DCW	mg/l
18	4.19	2.16	9.05
20	5.49	1.82	9.99
22	6.49	1.72	11.16
24	6.77	1.65	11.17
26	3.83	1.50	5.75
28	0.30	0.05	0.02

미친다[20]. 특히 *P. rhodozyma*는 0°C에서 27°C 범위의 비교적 낮은 온도조건에서만이 생육이 가능하다. 따라서 배양온도에 따른 세포성장 및 carotenoids 생성에 미치는 영향을 flask 배양을 통하여 검토하였다. 실험결과(Table 9)에서 세포농도는 온도증가에 따라 24°C까지는 증가하였으며, 28°C에서는 세포성장이 거의 없었다. 반면에 색소의 생성은 배양온도가 낮을 수록 증가하였으나, carotenoids의 생산량은 24°C에서 가장 높았다. 따라서 carotenoids의 합성은 낮은 온도에서 더 우수하였지만, 세포성장이 느리기 때문에 carotenoids의 생성량을 고려하여 최적의 배양온도를 24°C로 결정하였다. 이러한 결과는 Johnson 등[10]이 *P. rhodozyma*에서 세포성장 및 색소생성을 위한 최적온도가 20°C~22°C이며, 세포성장이 가능한 최고 온도는 27.5°C 이라는 보고와 유사하였다. 반면에 Fang 등(6)은 15°C에서 20°C 범위의 온도에서 세포성장이 일정하게 유지되며, 15°C 이하나 20°C 이상에서는 세포성장이 현저하게 감소하여 astaxanthin의 생산에서의 최적온도는 15°C로 보고하였다.

통기조건의 최적화를 위하여 2.5 liter 발효조에 1.0 liter 배지를 넣고 실험을 수행하였으며, 이때의 배지조성은 최종적으로 선정된 astaxanthin 생산을 위한 배지를 이용하였다. 즉 통기량이 carotenoids 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 24°C에서 300 rpm의 교반속도와 각각의 통기조건으로 120시간 배양한 실험결과를 Table 10에 나타내었다. 세포의 초기 비성장속도( $\mu$ )는 통기량의 증가에 따라 증가하였으나, 최대의 세포농도는 1.5 vvm에서 7.62 g/l을 얻었다. 따라서 산소가 세포성장에 필요하지만, 과량의 산소공급

**Table 8. Effect of minerals addition on the cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 after 5 days culture**

Minerals	Minerals conc. (g/l)	Cell conc. (g/l)	Carotenoids conc.	
			mg/g-DCW	mg/l
Control	0	6.04	1.26	7.61
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	6.23	1.29	8.04
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.16	6.62	1.23	8.14
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	6.33	1.23	7.89
$MgSO_4 \cdot 7H_2O + MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.5 + 0.16	6.40	1.35	8.64
$MgSO_4 \cdot 7H_2O + MnCl_2 \cdot 4H_2O + CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.5 + 0.16 + 0.1	6.27	1.27	7.96

**Table 10.** Effect of aeration rate on cell growth and carotenoids production of mutant WS-2 in batch culture for 120 hours at 300 rpm agitation

Aeration rate (vvm)	Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	Cell concentration (g/l)	Carotenoids concentration	
			mg/g-DCW	mg/l
0.5	0.006	5.05	2.28	11.5
1.0	0.011	5.40	2.37	12.8
1.5	0.035	7.65	1.96	15.0
2.0	0.036	7.46	1.78	13.3

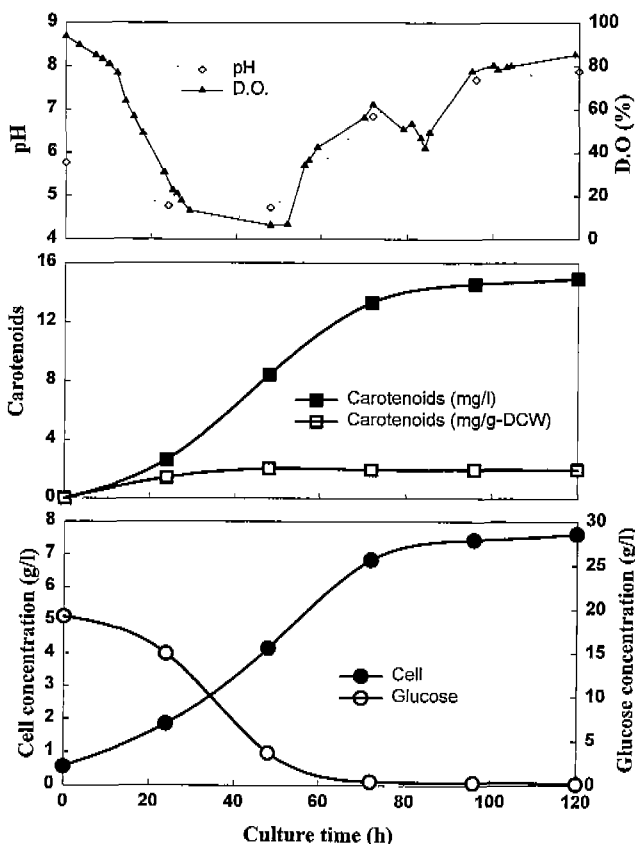
은 오히려 세포성장에 저해요인으로 작용하였다. 색소의 생성은 통기량의 증가에 따라 약간씩 감소하였는데, 이는 통기량의 증가에 의하여 세포성장이 더 유리하여 세포성장에 더 많은 glucose가 이용되었기 때문으로 사료된다. 그러나 carotenoids의 생산량은 세포성장이 가장 우수한 1.5 vvm에서 최대 14.9 mg/l을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 Johnson 등[10]이 30 mmol·O<sub>2</sub>/l-h 이하의 낮은 용존산소량의 조건에서 세포농도 및 astaxanthin 생성이 급격히 감소하지만, 그 이상의 조건에서는 크게 영향을 미치지 않는다는 결과와 Fang 등[5]이 3.6 vvm의 통기조건에서 최고의 균체량인 6.66 g/L

을 보인 반면 carotenoids의 생성량은 2.4 vvm 이하의 조건에서 감소할 뿐 그 이상의 조건에서는 영향을 거의 받지 않는다는 결과와는 약간 다르게 나타났다. 반면에 Yamane 등[23]은 산소공급량이 증가함에 따라 세포농도 및 색소생성량이 증가한다는 결과를 보고하였는데, 이는 산소공급량의 증가에 따라 세포내의 NADH balance를 통하여 설명하였다. 즉, 산소공급이 제한된 조건에서는 NADH가 축적되어 astaxanthin의 생합성이 저해되므로, 충분한 산소를 공급하여줌으로써 NADH를 NAD<sup>+</sup>로 산화시켜서 NADH의 세포내 축적을 막을 수 있으며 astaxanthin의 생합성을 촉진할 수 있기 때문이라고 설명하였다.

따라서 최적의 통기량인 1.5 vvm에서 변이균주 WS-2의 회분식 배양동안에 배양시간에 따른 용존산소량과 pH의 변화, glucose의 소모, 세포농도 및 carotenoids의 생성에 대한 전형적인 실험결과를 Fig. 1에 나타내었다. Glucose는 72시간에서 거의 소모되었으며, glucose의 소모와 함께 pH와 용존산소량도 배양 48시간까지 감소하다가 그 이후에는 증가하였다. 이때 pH의 감소는 glucose의 대사과정에서 일부의 유기산들이 미량으로 생성되기 때문이며, 배양 48시간 이후부터는 pH가 계속적으로 증가하였는데, 이는 생성된 유기산들이 다시 이용되기 때문으로 사료된다. 또한 용존산소량이 배양 48시간까지 감소하는 것은 사용한 균주의 세포 성장을 위하여 glucose 대사에서 산소가 요구되기 때문이며, 48시간 이후에는 급격히 증가하다가 배양 72시간부터 약간 감소하다가 다시 증가하였는데, 이는 흡수한 유기산들을 탄소원으로 다시 이용하기 때문으로 사료된다. 세포의 농도는 glucose가 모두 소모되는 배양 72시간까지 급격히 증가하였으나, 그 이후부터는 세포농도가 약간 증가하였다. 색소의 생성은 약 2.0 mg/g-DCW로 거의 일정하였으나, carotenoids의 생산량은 세포농도와 유사하게 증가하였다.

### 감사의 말

본 연구는 보건복지부에서 지원한 보건의료기술개발사업 (HMP-97-F-5-0027)의 연구비 지원에 의하여 이루어 졌으며, 이에 감사합니다.



**Fig. 1.** Profiles of cell growth, dissolved oxygen, pH and carotenoids production during the batch culture of mutant WS-2 under 1.5 vvm and 300 rpm at 24°C.

## REFERENCES

1. An, G. H. 1997. Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**: 263–268.
2. 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.
3. Burton, G. A. 1988. Antioxidant action of carotenoids. *Amer. Inst. Nutr.* **13**: 109–111.
4. De Leenheer, A. P. and H. J. Nelis. 1991. A review microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 181–191.
5. Fang, T. J. and T. Y. Chiou. 1996. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J. Ind. Microbiol.* **16**: 175–181.
6. Fang, T. J. and Y. S. Cheng. 1993. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture condition. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 466–469.
7. Haard, N. F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.* **10**: 609–614.
8. Johnson, E. A. and G. H. An. 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **57**: 191–203.
9. Johnson, E. A. and G. H. An. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**: 297–326.
10. Johnson, E. A. and M. J. Lewis. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 173–183.
11. Johnson, E. A. and W. A. Schroeder. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 907–912.
12. Johnson, E. A. and W. A. Schroeder. 1995. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**: 119–178.
13. Johnson, E. A., D. B. Schuman, and G. H. An. 1989. Isolation of mutants with increase astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 116–124.
14. Johnson, E. A., G. H. An, J. Bielich, and R. Auerbach. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Bio/Technology.* **9**: 70–73.
15. 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.
16. Mik, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **63**: 141–146.
17. Pringsheim, E. G. 1966. Nutritional requirements of *Haemotococcus phuvialis* and related species. *J. Phycol.* **2**: 1–6.
18. Sanderson, G. W. and S. P. Meyers. 1993. Natural pigment for salmon feeds. *Feed Management* **10**: 12–20.
19. Sanpietro, L. M. D. and M. R. Kula. 1998. Studies of Astaxanthin in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*): effect of inhibitors and low temperature. *Yeast* **14**: 1007–1016.
20. Schroeder, W. A. and E. A. Johnson. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 502–507.
21. Vazquez, M., V. Santos, and J. C. Parajo. 1997. Effect of carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 263–268.
22. Yamane, Y. I., K. Higashida, Y. Nakashima, 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 culture: Kinetics and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4471–4478.
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.

(Received Feb. 22, 2001/Accepted May 24, 2001)