

반응 표면 분석법을 사용한 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 유래 carotenoid 생산 배지 최적화*

봉기문** · 김공민** · 서민경** · 한지희*** · 박인철*** · 이철원**** · 김평일*****

Optimization of Medium for the Carotenoid Production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 Using Response Surface Methodology

Bong, Ki-Moon · Kim, Kong-Min · Seo, Min-Kyoung · Han, Ji-Hee ·
Park, In-Chul · Lee, Chul-Won · Kim, Pyoung-Il

Response Surface Methodology (RSM), which is combining with Plackett-Burman design and Box-Behnken experimental design, was applied to optimize the ratios of the nutrient components for carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 in liquid state fermentation. Nine nutrient ingredients containing yeast extract, sodium acetate, NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, mono-sodium glutamate, Na₂CO₃, NH₄Cl and CaCl₂ were finally selected for optimizing the medium composition based on their statistical significance and positive effects on carotenoid yield. Box-Behnken design was employed for further optimization of the selected nutrient components in order to increase carotenoid production. Based on the Box-Behnken assay data, the secondary order coefficient model was set up to investigate the relationship between the carotenoid productivity and nutrient ingredients. The important factors having influence on optimal medium constituents for carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 were determined as follows: yeast extract 1.23 g, sodium acetate 1 g, NH₄Cl 1.75 g, NaCl 2.5 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ 1.0 g, mono-sodium glutamate 7.5 g, Na₂CO₃ 3.71 g, NH₄Cl 3.5g, CaCl₂ 0.01 g, per liter. Maximum carotenoid yield of 18.11 mg/L was measured by confirmatory experiment in liquid culture using 500 L fermenter.

Key words : *carotenoid, response surface methodology, Rhodobacter sphaeroides, optimal medium constituent*

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ010513)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

** 전남생물산업진흥원 생물방제연구센터

*** 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

**** 전남대학교 자연과학대학 화학과

***** Corresponding author, 전남생물산업진흥원 생물방제연구센터(pikim30@gmail.com)

I. 서 론

자연계에 매우 다양하게 분포되어 있는 carotenoid는 다양한 구조를 갖는 천연 색소 화합물로서 강력한 항산화 기능을 가지고 있다. Carotenoid를 생합성 하는 대표적인 생물 종은 광합성세균과 같은 원핵생물, 미세조류(microalgae)와 같은 진핵생물이 있다(Armstrong, 1997). 천연 carotenoid의 경우 대부분 생합성 과정의 중간산물로 세포 내에 매우 소량 존재하기 때문에 충분한 양을 순수분리하기가 어렵다. 또한 각각에 대한 기능분석이 쉽지 않은 단점이 있으며 수율이 매우 낮고, 온도의 영향을 받는 등 생육을 고려하는 경우 지속적인 공급이 어렵다는 한계가 있다. 포유류, 조류, 양서류, 어류, 갑각류, 곤충 등 carotenoid 생합성 능력이 없는 생물체는 외부로부터 섭취를 통하여 carotenoid가 체내로 공급되며 이로부터 생성되는 metabolite들이 다양한 생물학적 역할을 한다(Sung, 2004). 원핵생물 중 대표적으로 광합성세균은 carotenoid를 생합성 하는데 그 경로는 neurosporene에서 시작하여 crtC, crtF, crtD 및 crtA 등이 관여하는 cyclic carotenoid 합성과정을 거친다(Armstrong et al., 1989; Bartley and Scolnik, 1989). 이러한 cyclic carotenoid 합성과정은 *Agrobacterium aurantiacum*에서도 발견되는데 β -carotene으로부터 crtW 및 crtZ가 관여하여 canthaxanthin, zeaxanthin 및 astaxanthin을 합성한다(Wang et al., 1999).

Carotenoid계 화합물은 현재 약 600종 이상의 화합물이 알려져 있으며, 이들 중 몇몇은 유기농업제제, 축산사료, 식품 첨가제, 의약, 화장품 등 산업적으로 이용되고 있다. 현재 산업적으로 이용되고 있는 carotenoid의 대부분은 화학합성에 의존하고 있으며, 천연 carotenoid는 식물이나 미생물로부터 획득하고 있다(Joshi et al., 2007). 천연 carotenoid의 경우 소비자들의 선호도가 높지만 원재 생산에 많은 비용이 소요되어 경제적인 측면에서 비효율적인 문제점을 가지고 있으며, 합성제품의 경우 천연 carotenoid에 비해 경제적이지만 생물기능이나 화학구조가 천연 carotenoid와 차이가 있고 유해 가능성이 있으며, 소비자들의 거부감이 높다는 점이 문제가 되고 있다(Nells, 1991). 따라서 산업적으로 다양하게 사용되고 있는 carotenoid를 생산하는 균주의 개발은 사료첨가제, 항산화제 및 착색제 등으로 유용한 용도를 갖는 천연 색소를 안정적으로 대량 공급할 수 있다는 측면에서 다양한 산업 분야에 매우 유용할 것이다(Pierre, 1997). 특히, carotenoid의 종류인 B-carotene의 비타민 A 전환은 축산분야에서 소의 번식기능, 모돈(母豚)의 감염 저항력 감소 등과 같은 생리학적 기능에서 인정되고 있다(Hong et al, 1998). 이처럼 유용한 carotenoid를 생산하는 광합성세균의 개발에는 대량배양이 필수적으로 이루어져야 한다. 광합성세균의 배양조건 중 배지 최적화는 균체의 증식 및 회수의 용이성과 경제성 등 다양한 변화의 조건을 고려해야 한다. 배지 최적화의 고전적 방법은 다른 변수는 일정 농도로 고정하고, 오직 한개 변수의 농도 변화를 이용하여 측정하는 one factor at a time method가 대부분이다. 하지만, 이 경우 오랜 시간이 소비되고 다양한 변수와의 상호작용을 파악하기 어려우며, 많은 비용을 초래하는

단점을 지니고 있다(Klauri, 1982). 따라서 본 연구에서는 통계학적 방법을 응용한 반응표면 분석법을 이용하여 배지 최적화를 탐색하고자 한다. 반응표면분석법은 요인실험을 통하여 반응표면식을 구하고 최대 반응치를 나타내는 요인들의 조합을 구하는 방법으로서 전통적인 최적화 방법인 one factor at a time method의 단점을 보완하는 방법이다. 즉, 각 요인들 간의 시너지 효과를 찾아낼 수 있고, 두 가지 이상의 결과를 동시에 예측할 수 있으며, 실험에 소요되는 시간과 경비를 절약할 수 있는 장점이 있다. 반응표면분석법은 여러 개의 인자가 상호작용을 하는 경우, 원인보다는 최적화를 통해 얻고자 하는 결과에 근거하여 최적점을 찾는 통계학적 방법의 하나이다(Oasim et al., 2003). 반응표면분석법과 같은 통계학적 방법을 응용한 배양 배지의 최적화는 최적 배지 조성 확립과 배지 성분 간의 상호 관계를 확인하는데도 유용한 방법이며(Jeong et al., 2014), 이와 같은 방법을 통해 기존의 복잡한 공정을 간소화하는 효과를 얻을 수 있고, 최적화를 수행하는데 소요되는 비용을 절감하는 장점이 있어 생물공학에서 최적 조건을 확립하는 연구에 다양하게 응용되어 사용되고 있다.

본 연구에서는 carotenoid를 생합성하는 광합성세균을 최적배양하기 위해 배지 조성 간 변수들의 상호 관계를 분석하고, 반응표면분석법을 이용하여 carotenoid를 생합성하는 배지 조건의 최적화를 수행하였다. 유기농축산업 분야에 유용한 천연 carotenoid를 생산하는 광합성세균의 대량배양(500 L 발효조 이용) 후 다양한 생리 기능을 가지고 있는 carotenoid를 추출하여 함량을 분석한 뒤 유기농축산업에 활용이 가능한 미생물제제로의 가능성을 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. Carotenoid 생산 균주 분리 및 배양

Carotenoid를 생산하는 광합성세균의 분리 및 선발을 위해 논, 밭 토양, 호소 및 하천의 퇴적 토양 등 20개소에서 시료를 수집하였다. 수집된 각각의 시료 0.1 g을 Biebl & Pfennig's 배지(KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, yeast extract 0.05 g, malic acid 0.3 g, succinic acid 1 g, Na-acetate 1 g, 0.1% ferric citrate 5 ml, Trace Element Solution SL-7* 1 ml, per liter) 30 ml가 포함된 150×20 mm의 culture tube에 접종한 후 28°C, 호기·암조건에서 정치 배양하였다(Biebl and Pfennig, 1978). Tube 표면에 형성된 적색 또는 갈색의 균체를 분취하여 Biebl & Pfennig's 고체배지에 평판법으로 도말하여 광합성세균의 1차 분리를 수행하였다. 광합성세균의 2차 순수분리를 위해 modified Van Niel's yeast 배지 (yeast extract 10 g, sodium acetate 1 g, NaCl 2.5 g, K_2HPO_4 2 g, MgSO_4 0.5 g, mono-sodium

glutamate 7.5 g, Na₂CO₃ 2.2 g, NH₄Cl 3.5 g, CaCl₂ 0.1 g, per liter)에서 28°C, 48시간 동안 배양한 뒤 적색의 colony 형태를 나타내는 단일균주를 순수 분리하여 carotenoid 생산을 위한 후보 균주로 선발하였다(Van Niel, 1944). 선발한 광합성세균의 동정에 필요한 염기서열 분석을 위하여 각각의 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다. 광합성세균의 16S rRNA 염기서열 분석은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database 정보와 비교 분석하여 상동성을 확인하였다. 균주의 분류학적 동정을 위하여 다양한 생화학적 성상검사 및 전자주사현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's manual of systematic bacteriology의 색인에 따라 최종 분류 동정하였다(Vos et al., 2011).

2. Carotenoid 추출 및 정량분석

광합성세균이 생산하는 carotenoid를 추출하기 위해 modified Van Niel's yeast 배지에서 호기·암 조건으로 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 100 ml (*V*₂) 배양하였으며, 염산 추출법 (HCl-assisted extraction)으로 추출하였다(Gu et al., 2008). Carotenoid는 광합성세균의 균체 내부에서 합성되기 때문에 상등액이 제거된 광합성세균 균체를 사용하였으며, 3 M HCl을 첨가하여 carotenoid가 추출 될 수 있도록 균체를 분해하였다. 3 M HCl에 의해 분해된 균체는 10,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 3 M HCl이 포함된 상등액은 제거하였다. 상등액이 제거된 시료에 acetone (*V*₁)을 첨가하여 28°C, 100 rpm, 30분 동안 교반하여 carotenoid를 추출하였다. Acetone로 추출한 carotenoid의 정량 분석을 위해 추출 carotenoid를 480 nm 파장에서 측정하였으며(Chen et al., 2006), 총 carotenoid 함량은 흡광도(*A*)에 따라 산출식 (1)에 근거하여 정량 분석하였다(*D*: dilution ratio, 0.16: extinction coefficient of carotenoid).

$$Total\ pigment = \frac{ADV_1}{0.16 V_2} \quad (1)$$

3. 반응표면분석법을 이용한 통계분석

광합성세균의 배양 시 배지성분 각각의 농도 변화가 carotenoid 생산을 위한 발효과정 및 생산 공정을 최적화하는데 절대적으로 필요하다. 따라서 배지성분의 최적 농도를 결정하기 위하여 가장 영향력이 있는 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하여 통계학적 최적화를 수행하였다. Carotenoid 생산에 사용되는 광합성세균 배양용 배지조성 최적화 및 배지성분의 효능 평가를 위해 반응표면분석법 중 Plackett-Burman (PB) 및 Box-Behnken design 분석법을 이용하였다(Plackett and Burman, 1946). PB는 배지 구성성분 중에

서 높은 영향을 미치는 요인을 검정하며, Box-Behnken design은 PB에서 선정된 요인을 대상으로 하여 최적의 농도를 설정하는 통계방법론이다. 본 실험에서는 광합성세균 배양용 배지인 modified Van Niel's yeast 배지의 구성성분 yeast extract, sodium acetate, NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, mono-sodium glutamate, Na₂CO₃, NH₄Cl, CaCl₂를 각 독립변수로 하였으며, 성분의 농도를 기준으로 하여 고농도 수준(+1)과 저농도 수준(-1)으로 구분하여 각 독립변수 별 carotenoid 생산에 미치는 영향을 산출하였다(Table 1). 각 중요 독립변수의 최적농도 산출은 Box-Behnken design을 이용하였으며 3개의 독립변수를 -1, 0, 1의 3개로 부호화하여 각각 15개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다(Table 2). Carotenoid 생산량의 결과는 Minitab 16 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 산출하고, 각각 인자간의 상호영향을 조사하였다. 회귀방정식 산출에 있어서, 코딩 된 값과 실제 값 사이의 관계는 아래 계산식에 표시하였다. X_i는 i번째 변수의 코딩 된 값이며, A_i는 i번째 변수의 실제 값이며, A₀ 중심점에서의 i번째 변수의 실제 값이다. ΔA_i는 변수의 단계 변화 값이며, 다음과 같은 반응과 3개의 변수 간의 상관관계를 다음과 같은 다항식 (2)에 적용시켰다.

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A_i} \tag{2}$$

다항식 Y는 carotenoid 생산량을 나타내며(mg/L), β₀는 절편, β_i는 선형계수(linear coefficient), β_{ii}는 제곱계수, β_{ij}는 상호작용계수를 나타낸다(3). X_i와 X_j는 부호화 값의 형태로 독립변수를 나타내었으며, 정확성과 다항식 모델의 일반적인 기능은 회귀식에 따른 R²에 의해 평가된다. 각각 분석된 통계결과는 분산 분석(ANOVA)을 이용하여 최적값을 산출하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijj} X_i^2 \quad i = 1, 2, 3, \dots, \dots, k \tag{3}$$

Table 1. High (+1) and low (-1) values of the independent variable in the Plackett-Berman design

Variable	Component	-1 Value (g/L)	+1 Value (g/L)
X ₁	Yeast extract	1	10
X ₂	Sodium acetate	0.2	2
X ₃	NaCl	0.25	2.5
X ₄	K ₂ HPO ₄	0.1	2
X ₅	MgSO ₄	0.05	0.5

Variable	Component	-1 Value (g/L)	+1 Value (g/L)
X ₆	Mono-sodium glutamate	0.5	7.5
X ₇	Na ₂ CO ₃	0.2	2.2
X ₈	NH ₄ Cl	0.4	3.5
X ₉	CaCl ₂	0.01	0.1
D ₁	Dummy	-1	+1

Table 2. Coded and real values of factors in the Box-Behnken design

Factor	Level of factor		
	-1 Value (g/L)	0 Value (g/L)	+1 Value (g/L)
Yeast extract	1	10	20
Na ₂ CO ₃	0.2	2	4
MgSO ₄	0.05	0.5	1

4. 최적배지를 이용한 대량배양

천연 carotenoid 대량생산을 위한 광합성세균의 대량배양을 수행하였다. 반응표면분석법을 통해 선발된 최적배지를 대상으로 scale-up을 통한 대량생산 최적화를 위해 5 L, 50 L, 500 L 발효기(KoBioTech Co., Ltd.)를 이용하여 광합성세균의 배양을 수행하였다. 5 L, 50 L 발효조를 기본으로 하여 온도, 교반속도 및 공기 투입량 등을 최적화 한 뒤 500 L 대량배양을 수행하였다. 500 L 배양은 100 ml 최적배지가 포함된 500 ml 삼각플라스크에서 1차 종균 배양을 진행하였으며, 2차 종균의 경우 최적 배지 2 L를 포함한 5 L 삼각플라스크에서 동일한 조건으로 배양한 후 500 L 발효기에서 300 L 대량배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 배양 조건은 호기·암 상태, 120 rpm, 30°C, 48시간 동안 배양하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Carotenoid 생산 균주 선발

논, 시설재배 밭 토양, 쓰레기장, 하천 및 호수의 퇴적 토양 등으로부터 광합성세균을 선

발하기 위해 Biebl & Pfennig's 배지를 이용하여 혐기·광 조건, 28°C, 72시간 정치배양한 후 culture tube 표면에 형성된 적색 또는 갈색의 균체 총 6종을 분리하였다. 그 중 호기·암 배양이 가능한 1종의 광합성세균을 선별하였으며, 선별한 광합성세균을 동정하기 위하여 Genomic Plus DNA Prep Kit (Inclone co.)를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 PCR primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3')을 합성하여 PCR 증폭에 사용하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 솔젠트(주)(대전, 대한민국)에 상기 16S rRNA 염기서열 분석을 의뢰하였다. 선별된 광합성세균의 16S rRNA 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database 정보와 비교 분석을 통해 균주 염기서열의 상동성을 확인하였다. 수집된 염기서열들 간의 Multiple alignment는 DNASTar program을 이용하였으며, MEGA 6.0 program의 neighbour-joining method, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 확인한 결과, *Rhodobacter sphaeroides* ATH2.4.1과 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1).

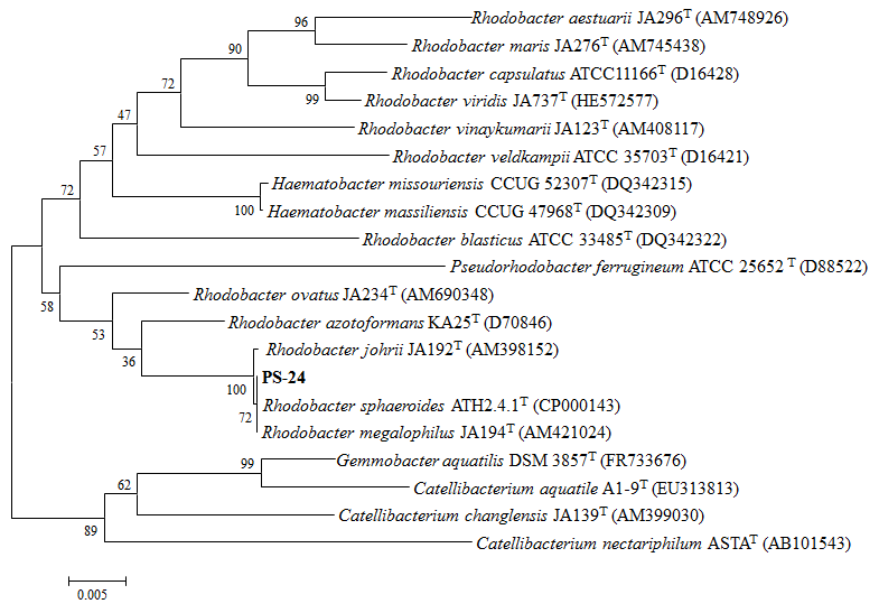


Fig. 1. Phylogenetic relationship between the identified *Rhodobacter* strain and representative *Rhodobacteraceae* based on 16S rRNA gene sequences developed with the ClustalW program in MEGA 6.0 and constructed using the neighbour-joining method with 1000 bootstrap replicates.

선별한 광합성세균은 그람음성세균으로 운동성을 나타내었으며, 호기 조건뿐 아니라 혐기 환경에서도 성장 가능한 통성혐기성 균주로 확인되었으며, Protease 활성은 나타내고 amylase,

cellulase, xylanase는 활성을 나타내지 않았다. 이러한 각종 생리적 특성을 조사한 결과 선발 균주는 *Rhodobacter sphaeroides*와 가장 가까운 특성을 나타내었으며, 본 연구에서는 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24로 명명하였다.

2. Carotenoid 추출 및 생산용 최적배지 확립

최적배지(100 ml)에서 배양한 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24가 생산하는 carotenoid의 정량분석을 위해 염산(HCl-assisted extraction) 추출법을 수행하였다. 추출용매는 acetone을 이용하였으며, 추출물은 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 바탕으로 carotenoid를 정량분석하는 산출식에 대입한 결과 12.03 ± 0.15 mg/L의 함량이 측정되었다. 광합성세균 배양용 배지조성 중 실제 carotenoid 생산에 가장 큰 영향을 미치는 인자를 확인하기 위하여 PB분석방법을 이용하여 최적값을 산출하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. PB 분석방법을 이용하여 최적값을 산출한 결과를 바탕으로 pareto chart (Fig. 2)를 적용하여 사용된 9개 독립변수의 유효값을 분석한 결과 가장 높은 유효값을 가지는 독립변수들은 X_1 (yeast extract), X_5 ($MgSO_4$), X_6 (mono-sodium glutamate), X_7 (Na_2CO_3)은 99.38%, 73.33%, 83.65% 및 99.24%로 각각 확인되었다. 이후 각 인자의 최적농도를 도출하기 위한 Box-Behnken 분석방법에는 X_1 (yeast extract), X_5 ($MgSO_4$), X_7 (Na_2CO_3)을 독립변수로 사용하였다. 83.65%의 유효값을 가진 X_6 (mono-sodium glutamate)를 제외하고 73.33%의 유효값을 가진 X_5 ($MgSO_4$)를 Box-Behnken 분석방법의 독립변수로 선정한 이유는 X_6 (mono-sodium glutamate)의 P value 값이 0.05보다 높은 값을 나타내어 유의성이 낮다고 판단되었기 때문에 X_6 (mono-sodium glutamate)를 대신한 X_5 ($MgSO_4$)를 독립변수로 선정하여 Box-Behnken 분석을 수행하였다. 선정한 각 독립변수의 요인변수들은 -1, 0, 1의 3개로 부호화하여 각 레벨에 따른 carotenoid를 측정하여 Box-Behnken 분석 결과 다음과 같은 모델식과 Table 4를 도출할 수 있었다.

$$\begin{aligned} \text{Total carotenoid} = & 11.91 + 0.71X_1 + 2.27X_5 + 12.51X_7 - 0.41X_1X_7 - 0.02X_1X_5 \\ & + 0.29X_5X_7 + 0.81X_1^2 + 2.63X_5^2 + 1.08X_7^2 \end{aligned}$$

Table 3. Plackett-Berman design matrix (trials No. 1 to 20) with corresponding result

Run order	Independent variables									Dummy variables	Total Carotenoid (mg/L)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	D_1	
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	3.312 ± 0.076
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	4.812 ± 0.050
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1.984 ± 0.104

Run order	Independent variables									Dummy variables	Total Carotenoid (mg/L)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	D ₁	
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	0.876±0.160
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1.500±0.145
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	14.560±0.123
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	2.131±0.186
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1.608±0.114
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	0.785±0.101
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	16.252±0.017
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	0.955±0.101
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	2.424±0.121
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	0.822±0.076
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	0.715±0.155
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	0.950±0.146
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	0.890±0.079
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	12.904±0.156
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	0.795±0.050
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1.856±0.182
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.4875±0.260

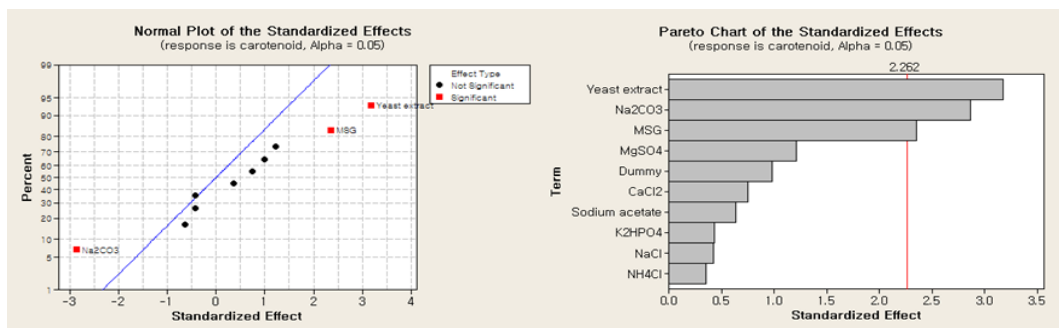


Fig. 2. Normal plot and pareto chart of the 9-factor standard effects on carotenoid production.

일반적으로 변수의 유의 확률(Probability value) 값이 0.05보다 작으면 각 변수간의 효과 차이가 유의성을 가진다고 하며, 0.01보다 작으면 매우 유의하다고 본다. 분산분석에 따라 모델식의 유의 확률이 0.0026으로서 매우 높은 유의성을 보였으며, 이차회귀식에 따른 R²값

은 0.7550으로 나타났다. 각 실험군에서 나타난 결과를 종합한 결과 모델식의 낮은 R^2 값은 전체 모델식에서 도출된 최적값에 대해 영향이 크지 않을 것으로 판단되어 위 모델식을 최적화 도출 모델로 결정하였다. 모델식에 따라 Na_2CO_3 : Yeast extract와 MgSO_4 : Yeast extract 및 MgSO_4 : Na_2CO_3 의 독립변수 간의 상호 관계를 분석하여 contour plot으로 나타내었다 (Fig. 3). 각 독립변수들의 최적값을 산출한 결과 yeast extract 0.4144 (1.23 g/L), Na_2CO_3 0.8541 (3.71 g/L)와 MgSO_4 1.00 (1.00 g/L)로 나타났다. 모델식의 결과를 검증하기 위하여 기존 광합성세균 배양 배지와 산출된 값에 근거한 최적 배지에서 *R. sphaeroide* PS-24를 배양한 결과 carotenoid가 18.05 mg/L로 기존의 배지에 비하여 약 1.5배의 생산이 증가하였으며, Chen 등(2006)과 비교하였을 때도 약 0.81 mg/L 높은 carotenoid 함량이 조사되었다.

Table 4. Box-Behnken design matrix with experimental values of carotenoid production

Run	Yeast extract (g/l)	Na_2CO_3 (g/l)	MgSO_4 (g/l)	Total Carotenoid (mg/L)
1	1	0.2	0.5	4.484±0.118
2	20	0.2	0.5	10.747±0.079
3	1	4	0.5	17.684±0.020
4	20	4	0.5	18.294±0.120
5	1	2	0.05	11.431±0.064
6	20	2	0.05	12.905±0.201
7	1	2	1	17.852±0.058
8	20	2	1	19.221±0.024
9	10	0.2	0.05	13.715±0.030
10	10	4	0.05	14.800±0.250
11	10	0.2	1	15.852±0.064
12	10	4	1	18.115±0.030
13	10	2	0.5	5.642±0.036
14	10	2	0.5	9.747±0.030
15	10	2	0.5	20.352±0.021

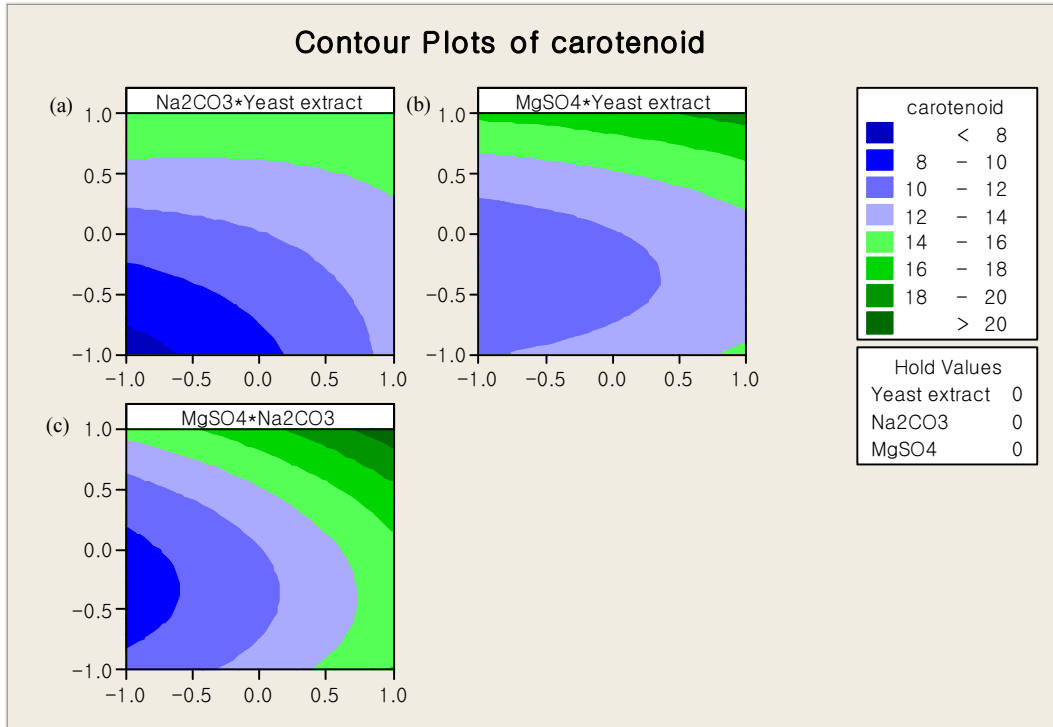


Fig. 3. Contour plots showing the medium compositions and their synergistic effects on the carotenoid production. (a) Na_2CO_3 and Yeast extract, (b) MgSO_4 and Yeast extract, (c) MgSO_4 and Na_2CO_3 .

3. 최적배지를 이용한 대량배양

반응표면분석법을 통해 carotenoid 생산에 적합한 *R. sphaeroides* PS-24의 최적배지를 선정하였다. Carotenoid 대량생산을 위해 최적배지를 대상으로 5 L, 50 L, 500 L 발효기를 이용하여 *R. sphaeroides* PS-24를 호기·암 조건에서 pilot-scale 대량배양을 수행하였다. 배양조건은 30°C, 120 rpm에서 배양액의 1%를 접종하여 48시간 배양하였다. 산소 공급량은 0.3 vvm으로 설정하였으며, 초기 pH 6.5-7.0에서 최종 pH 8.5-8.55로 배양이 종료되었다. 5 L jar-fermenter에서 배양한 결과 최종 carotenoid는 17.98 mg/L, 50 L 발효기에서 배양한 후 최종 carotenoid는 18.03 mg/L, 500 L 대용량 발효기를 이용하여 호기·암 배양한 결과 최종 carotenoid는 18.11 mg/L로 측정되었다. 대량배양 scale-up 결과 5 L, 50 L, 500 L 발효기에서 배양된 *R. sphaeroides* PS-24가 생산하는 carotenoid는 큰 차이를 나타내지 않았다.

광합성세균을 포함한 다양한 종류의 미생물의 경우 배양조건, 배지조성에 따라 생균수는 같더라도 carotenoid와 같은 색소물질 및 이차대사산물의 생산량은 달라질 수 있다. 따라서

대량배양을 위한 scale-up 과정을 통해 carotenoid의 함량이 크게 변화하지 않은 것은 천연 carotenoid 생산비용 절감과 함께 유기농축산업 분야에 이용가치가 클 것으로 판단된다.

IV. 적 요

본 연구를 통해 논, 시설재배 밭 토양, 쓰레기장, 하천 및 호수의 퇴적 토양 등 22개소에서 분리한 총 6종의 광합성세균 중 호기·암 배양이 가능한 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24를 분리하였다. 형태학적 특징으로는 그람음성의 막대모양으로, 운동성이 있었다. 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Rhodobacter sphaeroides* ATH2.4.1과 99%의 상동성을 나타내었으며, 본 연구에서 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24로 명명하여 연구를 수행하였다. 선별균주를 modified Van Niel's yeast 배지에서 배양 후 생성된 carotenoid를 추출한 결과 12.03 ± 0.15 mg/L의 함량이 측정되었으며, 반응표면분석법 중 Plackett burman 분석방법과 Box-Behnken 분석방법을 통해 carotenoid 생산에 영향을 미치는 요인을 분석하고 농도를 최적화하였다. 분석결과 각각의 독립변수 yeast extract -0.4144 (1.23 g/L), Na_2CO_3 0.8541 (3.71 g/L)와 MgSO_4 1.00 (1.00 g/L)의 농도를 선정하였으며, 이를 바탕으로 배지 조성을 최적화한 결과 yeast extract 1.23 g, sodium acetate 1 g, NH_4Cl 1.75 g, NaCl 2.5 g, K_2HPO_4 2 g, MgSO_4 1.0 g, mono-sodium glutamate 7.5 g, Na_2CO_3 3.71 g, NH_4Cl 3.5 g, CaCl_2 0.01 g/ liter로 선정하였다. 최적배지를 대상으로 5 L, 50 L, 500 L scale-up을 진행한 결과 최종 carotenoid는 각각 17.98 mg/L, 18.03 mg/L, 18.11 mg/L로 조사되었다. 최적배지의 경우 modified Van Niel's yeast 배지보다 약 1.5배 많은 carotenoid를 생산하였으며, 대량배양을 통한 scale-up 과정 시 carotenoid의 생산량은 크게 변화하지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구를 바탕으로 산업적으로 다양하게 사용되고 있는 carotenoid를 생산하는 광합성세균 *Rhodobacter sphaeroides* PS-24를 개발하였으며, 본 연구를 바탕으로 유기농축산에 사용이 가능한 기능성 미생물제제를 개발하고자 한다.

[Submitted, November. 4, 2016 ; Revised, December. 21, 2016 ; Accepted, December. 26, 2016]

References

1. Armstrong, G. A., M. Alberti, F. Leach, and J. E. Hearst. 1989. Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster

- of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen Genet. 216: 254-68.
2. Armstrong, G. A. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. Annu Rev. Microbiol. 51: 29-59.
 3. Bartley, G. E. and P. A. Scolnik. 1989. Carotenoid biosynthesis in photosynthetic bacteria. J. Biol. Chem. 267: 13109-13113.
 4. Biebl, H. and N. P. Pfennig. 1978. Growth yields of green sulfur bacteria in mixed culture with sulfur and sulfate reducing bacteria. Arch. Microbiol. 117: 9-16.
 5. Chen, D., Y. Han, and Z. Gu, 2006. Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. Process Biochemistry. 41(8): 1773-1778.
 6. Gu, Z., D. Chen, Y. Han, Z. Chen, and F. Gu. 2008. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. Food Science and Technology. 41(6): 1082-1088.
 7. Hong, S. P., M. H. Kim, and J. K. Hwang. 1998. Biological Functions and Production Technology of Carotenoids. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27(6): 1297-1306
 8. Jeong, Y. S., J. W. Kim, E. S. Lee, N. Y. Gil, S. S. Kim, and S. T. Hong. 2014. Optimization of alkali extraction for preparing oat protein concentrates from oat groat by response surface methodology. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 43: 1462-1466.
 9. Joshi, S., S. Yadav, A. Nerurkar, and A. J. Desai. 2007. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 313-319.
 10. Klaui, H. 1982. Industrial and commercial uses of carotenoids, In Britton G and Goodwin TW (ed.), Carotenoid chemistry and biochemistry. Pergamon Press, Inc., Oxford, England. pp. 309-328
 11. Nells, H. J. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods feeds, Journal of Applied Bacteriology. 70: 181
 12. Pierre, A. 1997. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. Trends in Food Sci. Tech. 8: 406
 13. Plackett, R. L. and J. P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33: 305-325.
 14. Qasim, K. B., S. Vikram, and G. Rani. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. Process Biochem. 39: 203-209.
 15. Sung, H. Y. 2004. Isolation and identification of novel bacterium producing carotenoid and cloning of carotenoid gene clusters from Jeju marine environment. MS. Thesis, Jeju National University, Jeju, Korea.

16. Van Niel, C. B. 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological Reviews* 8: 1.
17. Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, W. Rainey, and Whitman (eds). 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, USA.
18. Wang, C. W., M. K. Oh, J. C. Liao. 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 20; 62(2): 235-241.