

최 종  
연구보고서

토코페롤과 카로티노이드계 성분을 함유한  
산란계용 사료첨가제 개발

Development Of Feed Additives Containing  
Tocopherols And Carotenoids For Layers

기능성 사료생산을 위한 카로티노이드 효모의  
대량생산 기술개발에 관한 연구

Development Of Mass Production Of Yeast, Producing  
Carotenoids, For The Production Of Functional Feed

(주)유진사이언스  
서울시립대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “토코페롤과 카로티노이드계 성분을 함유한 산란계용 사료 첨가제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 30일

주관연구기관명 : (주)유진사이언스

총괄연구책임자 : 노 승 권

세부연구책임자 : 김 명 국

연구 원 : 김 창 곤

연구 원 : 한 정 희

연구 원 : 백 인 기

연구 조 원 : 임 희 석

연구 조 원 : 이 한 규

연구 조 원 : 정 병 윤

위탁연구기관명 : 서울시립대학교

위탁연구책임자 : 김 의 용

# 요 약 문

## I. 제 목

토코페롤과 카로티노이드계 성분을 함유한 산란계용 사료첨가제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

$\beta$ -카로틴과 토롤라호딘은 아스타크산틴과 함께 대표적인 카로티노이드계 (Carotenoids) 물질로서 자연계에 널리 분포하고 있는 테르펜화합물(terpenoid compounds)의 일종으로 식물과 동물 모두에서 발견되어진다. 그러나 다양한 종류의 미생물, 곰팡이, 조류(algae), 식물체 등은 카로티노이드를 생합성할 수 있는데 반하여 동물체는 카로티노이드의 섭취를 전적으로 사료에 의존해야 하므로 카로티노이드계의 사료첨가물에 대한 필요성이 증가되고 있는 실정이다.

한편 식물성 식용유를 정제하는 과정에서 나오는 부산물에는 유용 성분이 많이 남아 있는데 이중 토코페롤과 같이 우수한 항산화 효과와 다양한 생물학적 기능을 지닌 물질도 존재한다. 따라서 이들 물질을 경제적으로 정제하여 닭의 사료첨가물로 사용하면 우수한 항산화 효과를 포함한 다양한 생물학적 기능의 강화란을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 닭 이외에 소, 돼지 등의 면역체계 활성화에 영향을 주게 되므로 질병감염의 예방 및 스트레스 극복에 영향을 주어 궁극적으로 생산성 향상과 번식을 개선으로 축산업계의 생산량이 증대되는 효과를 기대할 수 있을 것이다.

지금까지는 토코페롤과 카로티노이드계 물질이 주로 합성품과 수입에 의존하고 있는 실정이나 본 연구를 통해 이들 물질을 천연물로부터 경제적으로 대량 생산체계를 확립할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 과제에서는 우수한 축산물 생산에 도움을 줄 수 있도록 식용유 정제공정에서 나오는 부산물로부터 경제적인 방법으로 토코페롤을 정제하고 여기에 값싼 배지를 이용해 발효 생산한 토롤라호딘/ $\beta$ -카로틴을 최적비율로 배합한 기능성 성분을 함유한 사료첨가제를 개발하는데에 그 목적이 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 일반 분석 조건 확립/ 계란내 성분분석 조건 확립
- 2) 식용유 부산물로부터 토코페롤 정제 방법
- 3) 효모를 이용한  $\beta$ -카로틴 생산의 최적 조건 확립(위탁)

4) 사양시험 및 필드 테스트

5) Scale up

6) 경제성 평가

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

증류법을 통해 식용유 부산물로부터 순도가 30% 이상인 토코페롤을 90% 이상 분리, 정제할 수 있었다. 토코페롤이 첨가된 기능성 사료를 섭취한 닭으로부터 생산된 계란 내에 토코페롤이 축적되는 효과를 확인하기 위해 계란의 난황에 존재하는 토코페롤의 양을 90% 이상 추출하여 정량하는 방법을 확립하였으며 닭의 사료로 사용시 난황으로 이행 되는 것으로 확인 되었다. 난각질이나 난황의 착색도 등도 토코페롤이 첨가되지 않은 사료를 공급받은 닭의 계란에 비해 상대적으로 우수 한 것으로 확인 되었다. 또한 사료 첨가물의 필드 테스트를 통해 산란계의 난황으로의 전이를 확인 하고 상품의 가치성을 확인 하였다. 그 결과 전체적으로 생산성 향상에 큰 기여를 하지 못하였으나 계란의 품질에는 대체로 긍정적인 영향을 미쳤으며 특히 난황의 색도와 연파란율에 큰 영향을 주었다. 한편 토코페롤과 카로티노이드의 난황으로의 전이는 확인 할 수 있었으나 농도에 따라 뚜렷하게 증가되는 경향을 보이지는 않았다.

따라서 기능성을 갖는 사료성분이 난황으로의 전이성의 확인은 이러한 성분들의 활용이 질병감염의 예방 및 스트레스 극복에 영향을 주어 궁극적으로 생산성 향상과 번식률 개선으로 축산업계의 생산량이 증대되는 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

본 과제를 통하여 식용유 부산물로부터 토코페롤을 정제하는 방법을 개발 함으로서 다양한 유용 산물을 함유하고 있는 식용유 정제공정의 부산물로부터 토코페롤의 기타 유용산물을 추출, 정제하는 기술에 응용 할 수 있으며 고농도의 카로티노이드를 생산하는 효모 배양방법을 통해 미생물 배양기술을 통한 유용산물의 생산 기술에 적용이 가능 할 것이다. 한편 필드테스트를 통해 얻어 진 결과는 철저한 경제성 평가와 필요여부에 따른 보강 실험을 통해 실제 농가에 활용여부를 최종적으로 판단 할 예정이다.

## SUMMARY

$\beta$ -Carotene and torularhodin have been found in plants and animals as kinds of carotenoid and terpenoid compounds which is widely distributed at natural surroundings. Various kinds of microbes, plants can synthesize carotenoid but animals must depend the intake of it fully. So, the necessity of carotenoids as feed additives is increasing.

Tocopherol is remained in by-products which is collected after refining the edible oil. Tocopherol has antioxidizing effect and various biological function. If we isolate tocopherol economically from the by-product, we can use it for the production of functional egg with antioxidizing effect and various biological function. And tocopherol is used increasing productivity of eggs by activating immunity system and overcoming stress.

Currently, tocopherols and carotenoids, which were chemically synthesized, were used by import. But it might be changed natural form of them by this study.

In the present study we developed feed additives containing carotenoids produced by microbial fermentation and refined tocopherol with high purity by distillation method.

As results of field test, feeding of tocopherols and carotenoids can transfer them into the yolk of an egg, and increase the color of egg shell and egg yolk. We didn't have the tendency they were accumulated clearly proportional to the increase of feeding concentration. but it was usually affirmative to have a good influence on the quality of the egg.

## CONTENTS

Chapter 1	Introduction .....	7
Chapter 2	Domestic/Foreign Technology in current situation .....	10
Chapter 3	Substance and Results .....	12
Chapter 4	Achievement and contribution to a related field .....	33
Chapter 5	Plan for a practical use .....	35
Chapter 6	Reference .....	36
	Project Report On Commission .....	38

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	7
제 1 절	연구개발의 목적, 필요성 .....	7
제 2 절	연구내용 및 범위 .....	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	12
제1절	연구수행 방법 .....	12
1.	분석방법 .....	12
2.	토코페롤 정제 .....	12
3.	계란내 성분 분석 .....	13
4.	사료조성물 함량비 조절 및 사양시험 .....	13
5.	필드테스트(사료 첨가제로서의 영향 평가) .....	14
제2절	연구내용 및 결과 .....	18
1.	토코페롤 추출 및 정제 .....	18
2.	사료조성물로서 토코페롤 함량비 조절 및 사양시험 .....	21
3.	필드테스트 .....	23
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	33
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	35
제 6 장	참고문헌 .....	36
위탁 과제	최종 보고서 .....	38

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적, 필요성

본 개발기술은 식용유 정제공정 중 생산되는 부산물로부터 토코페롤(tocopherol)을 분리 정제하고, 프로비타민(provitamin)으로서 월등한 항산화 효과를 지닌 카로티노이드계의 토룰라호딘(torularhodin)을 함유한 효모(yeast)를 이용생산 하여, 이들을 첨가한 고기능성 사료첨가물의 개발에 관한 것이다.

$\beta$ -카로틴과 토룰라호딘은 아스타크산틴과 함께 카로티노이드의 대표적인 카로티노이드계(Carotenoids)물질로서 자연계에 널리 분포하고 있는 테르펜화합물(terpenoid compounds)의 일종으로 식물과 동물 모두에서 발견되어진다. 그러나 다양한 종류의 미생물, 곰팡이, 조류(algae), 식물체 등은 카로티노이드를 생합성할 수 있는데 반하여 동물체는 카로티노이드의 섭취를 전적으로 사료에 의존해야 하므로 카로티노이드계의 사료첨가물에 대한 필요성이 증가되고 있는 실정이다.

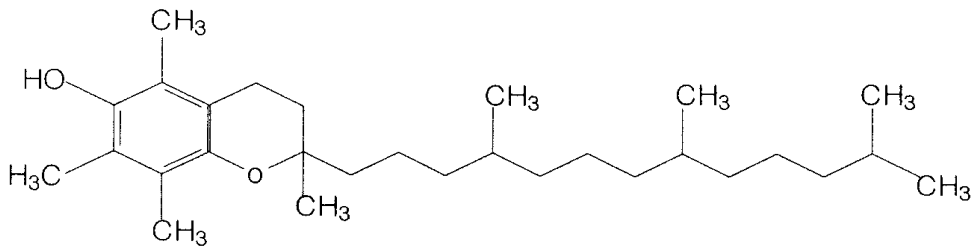
반면에, 식물성 식용유를 정제하는 과정에서 나오는 부산물에는 상당히 유용한 성분들이 많이 남아 있다. 하지만 이제까지 국내에서는 이들을 제대로 활용하지 못하고 대부분 싼 가격에 수출되거나 공업용으로 사용되어 그 이용이 다양하지 못하였다. 최근, 본 신청과제의 주관기관인 (주)유진사이언스에서는 식용유 부산물에서부터 추출한 플랜트 스테롤의 수용성 및 지용성 치환체의 합성에 성공하여 콜레스테롤 흡수를 저해하는 식품첨가물의 개발에 성공하였다. 이와 같이 플랜트 스테롤을 추출한 이후에도 식용유 부산물에는 토코페롤과 같이 우수한 항산화 효과와 다양한 생물학적 기능을 지닌 유용 물질이 존재한다. 이들 물질을 정제하여 사료첨가물로 사용하면 우수한 항산화 효과를 포함한 다양한 생물학적 기능의 강화란을 생산할 수 있고 다른 축산물에도 적용하여 육류의 유통기한 연장도 가능해진다.

또한  $\beta$ -카로틴과 토룰라호딘은 효모인 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*)로부터 동시에 발효생산이 가능하다. 토룰라호딘은 지금까지 많이 알려져 있지 않은 물질로서 다른 카로티노이드계 색소들과 마찬가지로 식품의 색깔, 항산화제, 항암작용이 있으며(*Bioresource Technology* 71, 1999, 41-44) 비타민 A의 프로비타민이지만 가격이 매우 고가이기 때문에 사용이 매우 제

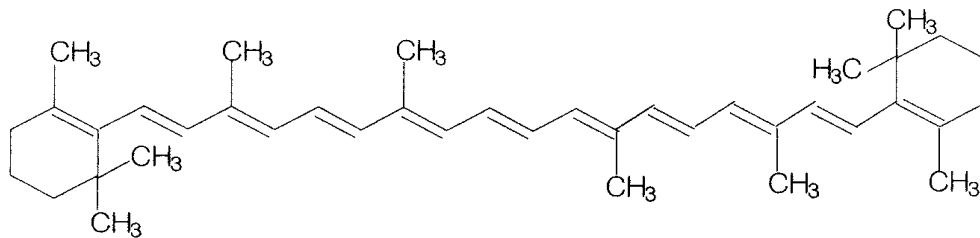


한적이었다. 이번 개발과제에서는 토롤라호딘의 새로운 생산기술을 확립하여 경제적으로 대량생산을 가능하게 하며, 고기능성 사료첨가물로서 우선 양계사료로 적용하여 계란 내 토롤라호딘과  $\beta$ -카로틴의 농축에 의한 비타민 A의 고농도화, 우수한 생리적 활성, 짙은 난황 색깔로 소비자 만족도 재고, 유통기간이 늘어난 고기능성 계란을 제조하고자 한다. 또한 다른 가축의 사료첨가제로서 널리 활용하여 우수한 생리활성, 유통기한 연장의 효과를 낼 수 있게 한다.

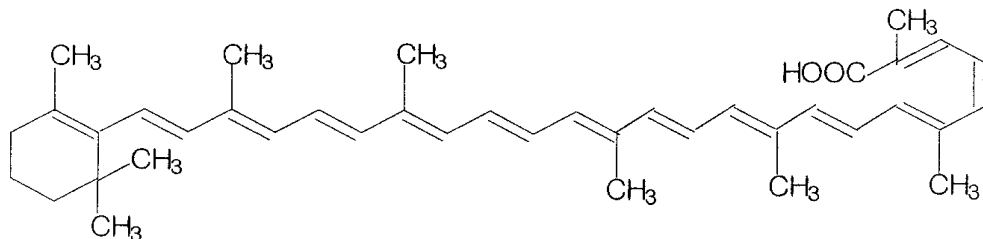
일반적으로 토코페롤,  $\beta$ -카로틴, 토롤라호딘의 구조식은 아래와 같다.



[토코페롤의 구조식]



[ $\beta$ -카로틴의 구조식]



[토롤라호딘의 구조식]

따라서 본 과제에서는 우수한 축산물 생산에 도움을 줄 수 있도록 식용유 정제공정에서 나오는 부산물로부터 경제적인 방법으로 토코페롤을 정제하고 여기에 값싼 배지를 이용해 발효 생산한 토롤라호딘/ $\beta$ -카로틴을 최적비율로 배합한 기능성 성분을 함유한 사료첨가제를 개발하는데에 그 목적이 있다.

## 제 2 절 연구내용 및 범위

구 분	주요개발 내용 및 범위
1단계(기초연구)	① 식용유 부산물로부터 $\beta$ -카로틴과 토코페롤의 정제 방법 확립 및 수율 향상 실험 ② 토롤라호딘과 $\beta$ -카로틴 생산을 위한 실험조건 확립 - 우수 변이주의 확보, 카로티노이드 생합성 조건의 최적화, 효모생산조건의 최적화(위탁) ③ 계란 내 성분분석을 위한 분석조건 결정 ④ 사료 첨가물 배합을 위한 사료조성물 함량비 조절
2단계 (응용연구 및 시제품 제작)	① 경제성을 고려한 복합배지의 개발(위탁) ② 효모의 대량생산체계 기술의 확립(위탁) ③ 사료 첨가물 배합을 위한 사료조성물 함량 비 조절 ④ 계란 내 첨가물의 농축정도 분석실험 ⑤ 계란의 일반적 품질검사 ⑥ 사료첨가물을 함유한 사료의 사양시험
3단계(사업화)	① 사료 첨가물의 사양시험 및 필드 테스트 ② 기능성 사료 생산을 위한 후속 처리공정의 개발 ③ 토코페롤 및 효모의 대량생산을 위한 최적화(Scale up) ④ 사업화에 따른 전체공정의 경제성 평가 및 설계 ⑤ 생산 설비 검토 및 추진

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

우리의 양계산업 수준은 축산업 중에서 비교적 일찍 발달했다고 하나 아직 시설과 기술수준이 선진국에 비해 낮다고 할 수 있다. 이로 인한 취약한 경쟁력과 과잉생산에서 오는 양계산업의 불황으로 계란 값의 폭락을 나타내고 있는 실정이다.

그러나 기능성 계란은 이러한 시장 가격경쟁 속에서 가격이 아닌 비가격 요소로서 시장에서 성공할 수 있는 분야이다. 하지만 기능면에서만 우수한 것으로는 시장에서 살아남기 힘들며, 기능성 계란이 성공하기 위해서는 우수한 기능의 계란을 적은 비용을 들여 생산하는 것이다. 그러나, 사료첨가물을 개발할 때 공급의 제한과 가격 경쟁에 있어 차별화를 이룰 수 없다면 기술이 개발되어도 상업적으로 제품화되는 것이 불가능하다. 그러므로 본 연구에서는 식용유 제조과정 중 생산되는 부산물을 이용하여 경제적이면서도 기술의 파급효과가 큰 토코페롤의 정제 생산을 가능하게 한다. 이로 인해 가격 경쟁력이 있는 고기능성 계란의 판매로 양계업계의 소득이 증대되고, 기능성 사료첨가물로서 다른 축산물 특히 소, 돼지 등의 사료 이용이 기대된다.

현재 기능성 사료 개발에 관한 연구는 가축의 생존유지를 위한 먹이제공에 대한 개념이 아니다. 기본적인 영양소 이외에 기능성을 부과한 사료첨가물을 이용하여 현대인의 건강 지향적인 식품선택경향에 초점을 맞추고 있다.

그 중에서도 소비자의 기호에 따른 기능성 계란 개발에 관하여 많은 관심이 집중되고 있다. 최근에는 난황을 짙은 황색이나 오렌지색으로 착색시키는 기능성계란의 생산방법과 관련하여 카로티노이드계 화합물인 카로틴류와 아스타크산틴을 사용한 특허 등이(KP135673, EP0630578) 보고되었다. 또한 카로티노이드계로서  $\beta$ -카로틴을 당근으로부터 얻어 계란에 강화한 특허(JP9009881) 등도 존재한다. 토롤라호딘에 대해서는 균주에 대한 연구로서 로도토롤라 글루티니스에서 카로티노이드계 물질들을 생산한 연구(*Bioresource Technology* 71, 1999, 41-44)가 보고되었으며, 로도토롤라 글루티니스와 락토바실러스 헬비티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)의 카로티노 프로테인의 생산에 관한 연구(*J. Industrial Microbiology & Biotechnology* 19 97, 18, 272-277)가 있다. 특히 할만한 점은 로도토롤라 글루티니스 효모로부터 토롤라호딘을 생산하여 사료에 첨가시킨 예는 특허 등에서 아직 발견되고 있지 않으며, 국내에서는 더욱이 그러한 기술의 발전이 미비한 상태이다.

토코페롤은 계란 내 난황으로 쉽게 이행되는 것으로 이에 대해서는 많은 연구가 이루어져 왔다(Filmer,1974. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* 18(4) 240-248. 1994). 하지만 합성된 토코페롤은 항산화효과가 천연 토코페롤에 비해서 굉장히 떨어지며, 고순도의 천연토코페롤은 가격이 매우 고가이다. 그러므로 본 기술은 구입이 용이하면서도 경제적인 탈취부산물을 토코페롤의 공급원으로 사용하여 사료첨가물의 가격 상승을 막고 토코페롤 함량을 기존의 강화란에 비해 5~6배로 증가시키고자 한다.

지금까지 카로티노이드계 화합물의 사료첨가에 대한 연구는 많은 발전을 이루어 왔으나 값이 비싸고, 제한적인 생산으로 상업적 가치가 떨어져 직접적으로 양계농가에 적용하기는 힘들었다. 그러나 본 기술은 식용유 정제과정에서 생산되는 부산물을 이용하여 토코페롤을 생산하며 값싼 배지를 이용하여  $\beta$ -카로틴 및 토롤라호딘을 함유하는 미생물 균체의 대량생산을 통해 농가에 직접적인 적용이 가능하도록 비용절감에 초점을 맞추었다.

이번 기술의 개발은 사료첨가물의 원료에 있어 다양한 이용을 가능케 하며, 값싼 사료첨가물 생산방법의 확립으로 카로티노이드계 화합물의 대량 생산이 가능하게 되어 사료첨가물 뿐만 아니라 화장품 및 의약품의 원료로도 사용이 가능해질 것으로 기대된다. 최근 선진국 등에서는 뉴트라슈티컬(Nutraceutical) 개념으로 건강보조식품에 대한 관심이 고조되고 있어 고기능성 계란을 생산하면 또 하나의 기능성식품 원료로서 각광 받을 수 있을 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 연구수행 방법

#### 1. 분석방법

##### 가. 토코페롤 분석

분석 대상 시료 10g을 환류장치에서 90도에서 25분간 검화(Base 용매 ; ethanol 40ml, 50% KOH 10ml, 12% sodium sulphide 2ml, Hydroquinone 100mg) 시키고 Diethyl ether를 이용하여 2회에 걸쳐 추출한 후 질소 가스를 충전하여 건조 시킨 후 HPLC를 이용하여 분석 하였다. 이때 컬럼은 ODS C18을 사용하고 전개용매로는 98% 메탄올을 사용하여 1ml/min의 속도로 흘려주었으며 292nm에서 검출 하였다.

##### 나. 카로티노이드 분석

분석대상 시료를 적당히 농축시킨다음 5×20cm 크기의 silica Gel60, TLC(thin layer chromatography)를 사용하여 전개시킨다. 이때 용매는 30% acetone,70% hexane을 사용하였다. 전개된 각각의 부분들을 ethanol, hexane 그리고 petroleum ether에 녹인 다음 glass wool에 통과시킨 후 UV-spectro photometer을 이용하여 각각의 최대 흡수파장을 구하고 TLC에 전개시켜 얻은 R<sub>f</sub>값과 ethanol, hexane 그리고 petroleum ether에서 얻어진 최대흡수파장값을 이용하여 각각의 카로티노이드를 확인하였다. HPLC를 이용한 카로티노이드의 분석은 u-Bodapak C<sub>18</sub> 컬럼을 사용하고 전개용매는 acetonitrile- tetrahydrofuran-water (5:3:1)로 흘려주며, 검출기는 UV-검출기를 사용하여 436nm에서 측정을 하였다.

#### 2. 토코페롤 정제

식용유 생산과정 중 발생하는 부산물인 탈취 지방산으로부터 비누화와 에테르 추출 방법 및 박막 증류 방법을 이용하여 유리 지방산을 제거함으로써순도가 높은 토코페롤을 정제 하였다.

#### 가. 비누화와 에테르 추출

탈취지방산 10g을 원형 플라스크에 넣고 여기에 메탄올 50ml와 50% KOH, 10ml를 첨가하여 혼합한 후 30분 동안 Reflux시켰다. 비누화 용액을 에테르 60ml을 이용해 추출하고 이 과정을 2회 반복하였으며 에테르 층을 10% 메탄올 40ml과 증류수 40ml을 이용해 세척하였다.

#### 나. 증류

에스테르화 된 지방산을 제거하는 공정에 박막증류기가 사용되었다. 토크페롤을 회수하는데 최적 조건은 온도 180℃, 교반속도 300rpm, 기압 1mbar 였다.

### 3. 계란내 성분 분석

#### 가. 토크페롤

균질화된 난황 10g을 환류장치에서 90도에서 25분간 검화(Base 용매 ; ethanol 40ml, 50% KOH 10ml, 12% sodium sulphide 2ml, Hydroquinone 100mg) 시키고 Diethyl ether를 이용하여 2회에 걸쳐 추출한후 질소 가스를 충전하여 건조 시킨 후 HPLC를 이용하여 분석 하였다. 이때 컬럼은 ODS C18을 사용하고 전개용매로는 98% 메탄올을 사용하여 1ml/min의 속도로 흘러주었으며 292nm에서 검출 하였다.

#### 나. 카로티노이드

난황 2g에 extractant(hexane:acetone:ethanol:toluene=10:7:6:7) 30ml 및 methanolic KOH 2ml을 첨가하고 hot plate에서 환류장치에서 1시간동안 검화 한다. 상온으로 온도를 낮추고 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40ml을 첨가한 후 100ml hexane으로 3번 추출한 뒤 용매를 증발 시키고 최종적으로 5ml의 hexane에 녹여 분석에 이용 하였다. 분석은 450nm의 파장에서 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 전체 카로티노이드의 농도를 측정 하였으며 HPLC를 사용하기도 하였다.

### 4. 사료조성물 함량비 조절 및 사양시험

토크페롤과 카로티노이드를 각각 사료에 첨가 한 후 닭의 사료로 사용시 계

란의 난황으로의 이행 여부를 확인 함으로서 사료 조성물의 함량을 결정하고자 하였다. 실험은 3개 그룹으로 나누어 1개 그룹에 5마리씩 구성하여 진행하였으며 일주일에 2회씩 4주간 계란을 수집하여 난황에 이행된 토코페롤이나 카로티노이드의 함량을 측정 하였다. 한편 특수란의 생산을 위해 사료에 토코페롤을 1%되도록 첨가한 후 실험용 닭에게 먹이고 이들이 낳은 계란으로부터 토코페롤의 함량을 분석하여 계란으로의 이행도와 계란의 일반적인 특성을 조사 하는 품질검사를 진행 하였다.

#### 5. 필드테스트(사료 첨가제로서의 영향 평가)

토코페롤과 카로티노이드 함유효모(*Rhodotorula*)를 각각 사료에 첨가 한 후 산란계의 사료로 사용시 산란율과 연과란율, 사료 섭취량, 사료이용율의 측정과 난각의 품질(색도, 색상) 그리고 난황의 색도를 측정 하였다.

#### 가. 시험사료

시중에서 판매되는 CP 18.5%, ME 2800-2850 kcal/kg, Ca 3.85% 정도의 대표적인 산란중기사료에 1%의 토코페롤을 첨가하여 대조구로 사용하였고 처리에 따른 B-carotene과 카로티노이드 함유효모를 다음과 같이 농도별로 첨가하여 실험 하였다(Table 1). 기초 사료의 formula 와 영양소 함량은 Table 2와 같고, 첨가해준 카로티노이드 함유효모의 성분을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 시험사료를 6주간 급여하고 시험기간 동안 물과 사료는 자유 섭취하게 하였고 정상적인 점등관리를 실시하였다.

Table 1. Treatment of experimental diets

Treatment	Content
1	Control
2	Control + $\beta$ -carotene 25ppm
3	Control + <i>Rhodotorula</i> 0.5%
4	Control + <i>Rhodotorula</i> 1%
5	Control + <i>Rhodotorula</i> 2%
6	Control + <i>Rhodotorula</i> 4%

Table 2. Formula and composition of control diet

	<b>Percent of Mix</b>
Corn	52.622
Soybean meal	25.32
Rice bran	1.0
Wheat bran	3.0
Calcium phosphate	0.8
Limestone	9.3
Tallow	2.76
Salt	0.254
Corn gluten feed	2.76
Additives	0.14
Meat and bone meal	1.0
phytase <sup>3</sup>	0.03
Vitamin premix <sup>1</sup>	0.12
Mineral premix <sup>2</sup>	0.12
Choline	0.06
Methionine	0.11
<b>Total</b>	<b>100</b>
 <b>Calculated composition</b>	
ME, cal/kg	2800
Calcium, %	3.85
Total P, %	0.5
Non-Phytate P, %	0.38
Crude protein, %	18.5
Lysine, %	0.79
Methionine, %	0.4
Meth.+Cys., %	0.72
Choline, mg/kg	1250
Crude fat, %	5.33
Crude fiber, %	3.09
Crude ash, %	13.2

<sup>1</sup>Contains per kg: vitamin A, 10,000,000IU; vitamin D<sub>3</sub>, 2,5000,000IU; vitamin E, 15,000IU; vitamin K<sub>3</sub>, 2,000mg; vitamin B<sub>1</sub>, 1,500IU; vitamin B<sub>2</sub>, 4,000mg; vitamin B<sub>6</sub>, 3,000mg; vitamin B<sub>12</sub>, 3,000 $\mu$ g; Pantoic Acid, 8,000mg; nicin, 25,000mg; folic acid, 500mg

<sup>2</sup>Provides per kg diet: Zn, 52.5mg; Mn, 52.5mg; Fe, 52.5mg; Cu, 5.25mg; I, 1.155mg; Co 0.315mg; Se, 0.315mg

<sup>3</sup>Phytase: provided by BASF Korea Ltd.



Table 3. Composition of *Rhodotorula*

<b>Nutrient content of <i>Rhodotorula</i></b>	<b>Percentage</b>
Dry matter	99.72
Moisture	0.27
Crude ash	5.78
Crude protein	29.4
Crude fat	7.97
Crude fiber	0.067
NFE	52.633
<b>Mineral</b>	
Iron, %	0.0042
Phosphorus, %	0.0176
Calcium, %	0.0967
Potassium, %	0.3521
<b>Amino acid</b>	
Aspartic acid, nM	120.3
Threonine, nM	65.0
Serine, nM	72.6
Glutamic acid, nM	130.2
Proline, nM	57.5
Glycine, nM	139.3
Alanine, nM	145.1
Cystine, nM	4.5
Valine, nM	80.1
Methionine, nM	5.9
Isoleucine, nM	51.2
Leucine, nM	91.0
Tyrosine, nM	27.6
Phenylalanine, nM	36.6
Histidine, nM	110.6
Lysine, nM	23.4
Arginine, nM	66.8

#### 나. 시험 설계

72주령된 산란계(ISA-Brown) 360수를 대조구를 포함하여 총 6개의 처리군으로 구성하여 처리당 3반복, 반복당 10케이지, 케이지당 2수씩(처리당 60수씩 총 360수) randomized block design으로 배치하였다.

#### 다. 조사항목

산란율(hen-day, hen-housed), 평균 난중, 연과란 발생율을 매일 측정하여 주별 평균을 계산하였고 사료 섭취량은 주 1회 조사하여 사료 전환율을 산출하였다.

난각 품질 검사는 주 1회씩 총 6회에 걸쳐 주중 하루에 생산된 총 계란 중 연과란을 제외한 모든 계란을 취하여 실시하였다. 난각강도는 Texture Test Systems(T2100C, Food Technology Co, USA)를 이용해 측정하였고 난각색도와 색상은 Fan과 Color Difference Meter를 이용해 측정하였다.

난황 색도는 주 1회씩 총 6회에 걸쳐 주중 하루에 생산된 총 계란을 취하여 Fan을 이용하여 측정하였다.

#### 라. 통계 처리

사양 성적 및 화학분석 결과들은 SAS<sup>®</sup>(1990)의 GLM(General Linear Model) Procedure를 통해 분석하였으며 처리의 평균 간 비교는 Duncan's new multiple range test에 의하여  $P < 0.05$ 에서 검정하였다.

#### 마. 난황내 토크페롤과 카로티노이드 함량 분석

실험 군 6개(T1-대조구, T2- $\beta$ -carotene, T3-0.5%, T4-1%, T5-2%, T6-4% *Rhodotorula*)에서 매주 각각 3개씩, 6주간 총 108개의 시료를 수집하였다. 시료는 산란계에서 얻어진 달걀에서 난황만 모아 합쳐놓은 것으로 보관 중 산화와 변질을 막기 위해 호일로 싸 뒤, 4°C, 암실에서 보관하여, 실험에 사용하였다. 분석 방법은 위에 언급 한 바와 같다.

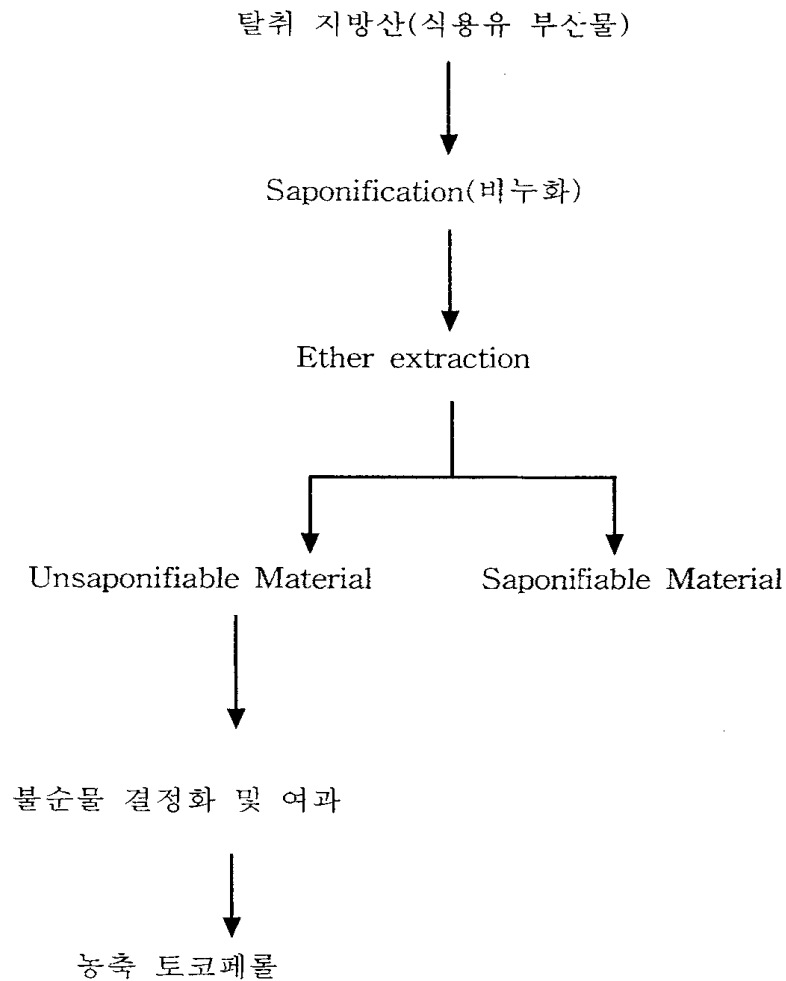
## 제2절 연구내용 및 결과

### 1. 토코페롤 추출 및 정제

토코페롤 정제방법에 대한 문헌 조사를 통해 주요 토코페롤 정제방법으로 비누화 추출법과 증류법을 선정하였다.

#### 가. 비누화 추출법

탈취지방산에 존재하는 유리 지방산과 토코페롤 분획을 분리하는 방법으로 유리 지방산을 비누화한 후 비누화되지 않은 토코페롤을 유기용매를 이용해 추출하는 방법이다.



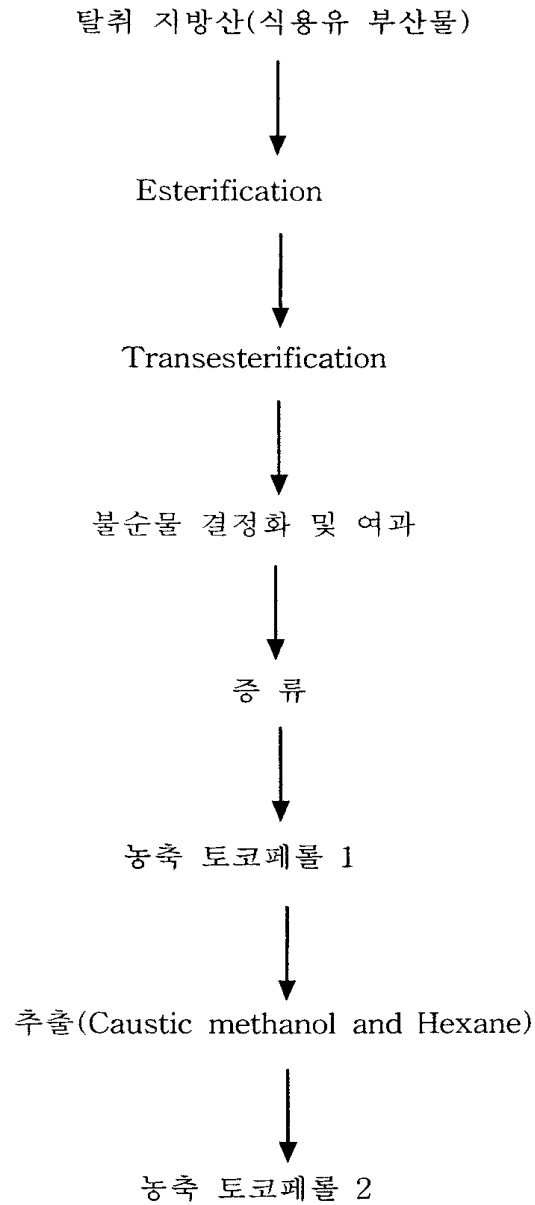
비누화 추출법을 통해 생산된 토크페롤 분획은 두 가지 종류가 있다. 1차 토크페롤은 비누화 공정 후 에테르를 이용해 추출함으로써 유리 지방산과 분리한 비누화되지 않은 분획(Unsaponifiable Material)이고 농축 토크페롤은 비누화되지 않은 분획을 결정화 공정을 통해 스테롤을 분리해 냄으로써 토크페롤의 순도를 높인 분획이다.

분획	토크페롤 농도(%)	수율(%)
Unsaponifiable Material	24.7	74.1
농축 토크페롤	54.5	39.5

각 분획의 농도와 수율을 분석해 보면 비누화되지 않은 분획(Unsaponifiable Material)의 경우 토크페롤 농도 24.7%, 수율 74.1%로 나타났고, 이로부터 불순물을 결정화한 후 여과 과정을 통해 생산된 농축 토크페롤은 농도 54.5%, 수율 53.3%로 나타났다. 비누화 추출법은 공정이 간단하고 목표 수율 70%를 상회하는 74.1%의 토크페롤 회수율을 보였지만 경제적인 측면에서 몇 가지 단점을 가지고 있다. 비누화 공정에 사용되는 용매인 메탄올과 KOH의 사용량이 많아서 전체 반응부피가 커지고 원료 비용이 많이 소요되며 유리 지방산을 제거하는 공정인 비누화 공정에서 토크페롤의 순도와 수율과의 관계가 서로 상반되어 비누화의 정도를 조절하기 어렵다는 단점이 있다. 이는 지방산을 충분히 제거하지 않으면 순도가 저하되고 반면 지방산을 충분히 제거하면 수율이 낮아지기 때문이다. 또한 비누화에 사용되는 염기인 KOH에 의해 토크페롤이 분해되어 손실이 야기되는 단점을 가지고 있다.

#### 나. 증류법

탈취지방산에 포함되어 있는 유리지방산을 에스테르화하여 증류를 통해 이를 제거한 후 토크페롤을 농축하여 정제하는 방법이다. 비누화 추출법에 비해 반응 공정이 복잡하지만 용매와 시약의 사용량이 적어 반응부피가 적고 경제적이다. 증류법의 공정은 다음과 같다.



증류법에서도 비누화 추출법에서와 마찬가지로 수율과 순도가 다른 두 종류의 분획을 얻었다.

분획	토코페롤 농도(%)	수율(%)
농축 토코페롤 1	34.9	92.3
농축 토코페롤 2	55.2	70.1

비누화 추출법과 증류법을 비교해 보았을 때 증류법이 유기용매 및 시약의 사용량뿐만 아니라 분리, 정제된 토코페롤의 순도와 수율 면에서 비누화 추출법 보다 경제적인 것으로 나타났다.

분획 및 사용량		비누화 추출법	증류법
농축 토코페롤 1 (Unsaponifiables)	순도(%)	24.7	34.9
	수율(%)	74.1	92.3
농축 토코페롤 2	순도(%)	54.5	55.2
	수율(%)	39.5	70.1
유기용매 및 시약		다량 사용	소량 사용

기능성 사료첨가제로 사용될 토코페롤은 비누화 추출법 보다 증류법을 이용해 생산하는 것이 토코페롤의 순도와 수율 및 경제적인 측면에서 바람직할 것으로 사료된다.

## 2. 사료조성물로서 토코페롤 함량비 조절 및 사양시험

### 가. 토코페롤 함량비 조절

추출된 토코페롤을 이용하여 사료에 첨가 한 후 닭의 사료로 사용시 계란의 난황으로의 이행 여부를 확인 함으로서 사료 조성물의 함량을 결정하고자 하였다. 실험은 3개 그룹으로 나누어 1개 그룹에 5마리씩 구성하여 진행하였으며 일주일에 2회씩 4주간 계란을 수집하여 난황에 이행된 토코페롤의 함량을 측정 하였다. 다음의 Table 4는 평균 값을 계산하여 나온 결과로 알파 토코페롤의 경우 대조군에 비하여 1%첨가시에는 3.3배, 2%첨가시에는 5.2배가 높은 것으로 나타났으며 감마 토코페롤의 경우에도 각각 8.4배, 14.7배나 높게 나타났

다. 이 결과로부터 사료에 첨가해준 토코페롤이 난황으로 이행이 잘 되는 것으로 확인되었으며 필드 테스트를 위해서는 1%만 첨가해도 유의성이 있는 결과를 도출 할 것으로 판단 하였다.

Table 4. 사료에 첨가된 토코페롤의 농도에 따른 계란 난황내 토코페롤 함량

	알파토코페롤 (mg/g난황)	증가비	감마토코페롤 (mg/g난황)	증가비
대조군	0.063	1	0.023	1
1% 첨가시	0.207	3.3	0.194	8.4
2% 첨가시	0.329	5.2	0.388	14.7

한편 각 경우의 산란율을 조사한 결과 1% 첨가시에는 약 19.6%, 2% 첨가시에는 22.0%의 현격한 증가를 보여 토코페롤이 닭의 산란에 도움을 주는 것을 확인 할 수 있었다.(Table 5)

Table 5. 사료에 첨가된 토코페롤의 농도에 따른 산란율의 변화

	대조군	1% 첨가시	2% 첨가시
산란 합계	117	140	143
산란율	75.5%	90.3%	92.3%
증가율	-	19.6%	22.0%

#### 나. 사양시험

특수란의 생산을 위해 사료에 토코페롤을 1%되도록 첨가한 후 실험용 닭에게 먹이고 이들이 낳은 계란으로부터 토코페롤의 함량을 분석하여 계란으로의 이행도와 계란의 일반적인 특성을 조사하였다. 실험은 신계와 노계로 구분된 각 그룹 당 1회 6마리씩 3회에 걸친 반복 실험을 진행하였으며 일주일 간격으로 각 군에서 3개씩의 계란으로부터 난황만을 취하여 무게를 잰 후 혼합 한 다음 10g의 난황으로 실험을 진행하였다. 그 결과 토코페롤을 첨가하지 않았을 때에 비하여 닭의 연령에 관계없이 1주일이 지나면서부터 평균 4배 정도의 높은 함량을 나타내었으며 1개월이 지나도록 비슷한 양상을 나타내었다. 난각

질이나 난황의 착색도, 사란율에서 상대적으로 우수한 것으로 나타났다.

Table 6. 투여 시간에 따른 계란 난황내 알파토코페롤 함량 (mg/g)

		1일	7일	14일	21일	28일	35일
신 계	대조군	0.697	1.126	1.064	0.841	1.238	0.967
	첨가군	0.845	4.884	4.879	4.569	4.220	4.215
노 계	대조군	0.652	1.310	1.094	0.995	1.157	1.067
	첨가군	0.550	4.220	5.067	4.314	3.702	4.593

### 3. 필드테스트

#### 가. 산란율

일계산란율(hen-day egg production)은 Table 7에서 보는 바와 같이, 6주 평균에서 T1 대조구 보다 T2, T3 처리구에서 높았고 다른 처리와 비교 했을 때에는 유의적 차이가 없었으며 산란지수(hen-housed egg production)는 Table 8에서 보는 바와 같이, 6주 평균에서 T1 대조구 보다 T3 처리구가 높았으며 다른 처리구와는 유의적 차이가 없었다.

#### 나. 연파란율 및 사료 전환율

연파란율(broken&soft egg)은 Table 9에서 보는바와 같이, 실험 중 5주에서 T5(control + Rodotorula 2%)와 T6(control + Rodotorula 4%)가 대조구와 다른 처리구 보다 좋은 경향이 나타났으며, 6주 평균에서도 T1 대조구 보다 좋은 경향이 있었는데 특히 Rodotorula 첨가량이 높아질수록 연파란 율이 감소하는 경향을 보였다. 사료 섭취량(feed intake)은 Table 10에서 보는 바와 같이, 6주 평균에서 T2 처리구(control+β-carotene 25ppm)가 가장 낮았으며, 다른 처리구들은 유의적 차이가 없었다. 사료 전환율(feed conversion ratio)은 Table 11에서 보는 바와 같이, 6주 평균에서 T2 처리구가 T1 대조구와 Rodotorula를 첨가한 처리구보다 좋았다.

#### 다. 난각 강도 및 난각 색

난각 강도(Eggshell strength)는 Table 12에서 보는 바와 같이, 실험 중 1주에서 T6 처리구가 T3 처리구보다 좋았으며 다른 처리구와는 유의적 차이가



없었다. 6주 평균에서는 T6 처리구가 T5 처리구보다 높았으며 대조구와 다른 처리구에서는 유의적 차이가 없었다. Fan을 이용한 난각 색(eggshell color) 측정은 Table 13에서 보는 바와 같이, 실험 중 2주와 3주에서 유의적 변화가 있었으나 6주 평균에서는 대조구와 모든 처리구에서 유의적 차이가 없었다. Color Quest를 이용한 난각 색상(eggshell color tone)은 Table 14에서 보는 바와 같이, 실험 중 3주에서 T6 처리구가 T2 처리구보다 높았으며 다른 처리구들과는 유의적 차이가 없었으며, 6주 평균에서는 T2 처리구가 T3, T4, T6 처리구보다 낮았으며 T1과 T5와는 유의적 차이가 없었다. Color Quest를 이용한 난각 색도(eggshell chromaticity)는 Table 15에서 보는 바와 같이, 실험 중 유의적으로 변화는 있었으나 6주 평균에서 대조구와 모든 처리구에서 유의적 차이가 없었다.

#### 라. 난황 색도

Fan을 이용한 난황색도(yolk color)는 Table 16에서 보는 바와 같이, 실험 중 매주 유의적 변화를 나타내었으며 6주 평균에서 *Rodotorula*를 첨가한 처리구들이 T1 대조구 보다 높았으며  $\beta$ -carotene을 첨가한 T2 처리구보다도 더 높게 나타났다. 그러나 *Rodotorula*를 첨가할수록 높은 경향을 나타냈지만 T5와 T6는 유의적 차이가 없었다. Table 17은 실험하는 기간 동안 생산성과 계란의 난각 품질, 난황 색도의 평균값을 요약한 것이다. 이상의 결과를 종합적으로 고찰해 보면 산란계 사료에 카로티노이드를 함유한 효모인 *Rodotorula*를 첨가하였을 때 난황색도(yolk color)에 가장 큰 영향을 미치며 연과란 울에서도 낮은 경향을 보였다. 그러나 산란율과 사료 섭취량, 사료 전환율, 난각 강도, 난각 색도에는 유의적 차이가 없거나 적었다.

Table 7. Hen-day egg production

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (%) -----						
0	77.82	77.31	81.41	78.08	79.87	78.84	<b>2.768</b>
1	74.52	77.14	77.86	74.05	78.09	75.95	<b>2.549</b>
2	70.00	76.33	75.95	74.05	74.05	76.43	<b>3.494</b>
3	75.00	76.48	78.33	73.81	74.76	71.83	<b>3.208</b>
4	68.10	77.38	75.00	73.33	72.86	76.40	<b>3.185</b>
5	69.42	72.65	76.19	75.00	71.91	74.51	<b>4.400</b>
6	69.97	74.47	75.24	73.33	72.63	74.53	<b>3.924</b>
Average (1-6wks)	<b>71.17<sup>b</sup></b>	<b>75.74<sup>a</sup></b>	<b>76.43<sup>a</sup></b>	<b>73.93<sup>ab</sup></b>	<b>74.05<sup>ab</sup></b>	<b>74.94<sup>ab</sup></b>	<b>1.276</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 8. Hen-housed egg production

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (%) -----						
0	77.82	77.31	81.41	78.08	79.87	78.84	<b>2.768</b>
1	74.52	77.14	77.86	74.05	78.09	75.95	<b>2.549</b>
2	70.00	75.72	75.95	74.05	74.05	76.43	<b>3.649</b>
3	75.00	75.24	78.33	74.05	74.76	70.95	<b>3.518</b>
4	68.10	76.19	75.00	73.33	72.86	76.40	<b>3.400</b>
5	69.42	71.43	76.19	75.00	71.91	74.51	<b>4.405</b>
6	69.97	73.33	75.24	73.33	71.43	72.86	<b>4.151</b>
Average (1-6wks)	<b>71.17<sup>b</sup></b>	<b>74.84<sup>ab</sup></b>	<b>76.43<sup>a</sup></b>	<b>73.97<sup>ab</sup></b>	<b>73.85<sup>ab</sup></b>	<b>74.52<sup>ab</sup></b>	<b>1.336</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%,

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05)

Table 9. Broken &amp; soft egg

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (%) -----						
1	0.89	0.84	1.57	0.93	1.57	0.00	<b>1.004</b>
2	0.52	0.82	1.36	0.40	0.43	0.00	<b>0.564</b>
3	3.05	1.74	1.74	1.28	0.95	0.88	<b>0.669</b>
4	0.98	0.77	1.79	0.49	0.00	0.80	<b>0.970</b>
5	1.44 <sup>ab</sup>	3.92 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	2.39 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	<b>0.791</b>
6	2.53	0.41	0.42	0.00	1.83	0.51	<b>0.906</b>
Average (1-6wks)	<b>1.57<sup>a</sup></b>	<b>1.42<sup>ab</sup></b>	<b>1.72<sup>a</sup></b>	<b>0.99<sup>ab</sup></b>	<b>0.94<sup>ab</sup></b>	<b>0.46<sup>b</sup></b>	<b>0.356</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 10. Feed intake

Weeks	Treatments						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (g/day) -----						
1	137.69	133.82	139.25	138.15	138.98	131.09	<b>3.011</b>
2	135.85	132.92	137.89	125.19	137.86	142.40	<b>5.556</b>
3	137.61	134.06	140.05	133.44	133.77	132.96	<b>2.883</b>
4	133.56	134.17	136.09	134.90	131.86	130.30	<b>3.708</b>
5	136.58	125.94	141.32	135.30	134.01	140.64	<b>4.895</b>
6	131.14	128.62	132.61	135.02	129.12	138.13	<b>4.203</b>
Average (1-6wks)	<b>135.40<sup>ab</sup></b>	<b>131.59<sup>b</sup></b>	<b>137.87<sup>a</sup></b>	<b>133.67<sup>ab</sup></b>	<b>134.27<sup>ab</sup></b>	<b>135.92<sup>ab</sup></b>	<b>1.659</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 11. Feed conversion ratio

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (g/100g egg mass) -----						
1	2.69	2.54	2.64	2.71	2.57	2.52	<b>0.075</b>
2	2.80	2.51	2.63	2.46	2.66	2.68	<b>0.107</b>
3	2.65	2.51	2.61	2.65	2.54	2.69	<b>0.104</b>
4	2.84	2.51	2.65	2.67	2.59	2.47	<b>0.111</b>
5	2.83	2.47	2.72	2.65	2.66	2.76	<b>0.148</b>
6	2.73	2.48	2.58	2.69	2.55	2.71	<b>0.101</b>
Average (1-6wks)	<b>2.75<sup>a</sup></b>	<b>2.50<sup>c</sup></b>	<b>2.64<sup>ab</sup></b>	<b>2.64<sup>ab</sup></b>	<b>2.59<sup>bc</sup></b>	<b>2.64<sup>ab</sup></b>	<b>0.041</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-c</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 12. Eggshell strength

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
	----- (g/cm <sup>2</sup> ) -----						
1	3569.5 <sup>ab</sup>	3742.6 <sup>ab</sup>	3417.3 <sup>b</sup>	3618.7 <sup>ab</sup>	3647.1 <sup>ab</sup>	3951.3 <sup>a</sup>	<b>124.20</b>
2	3567.1	3462.1	3360.8	3437.0	3405.8	3390.9	<b>141.94</b>
3	3904.8	3756.3	3905.2	4086.5	3887.6	3959.4	<b>156.11</b>
4	3567.9	3794.7	3593.9	3939.2	3560.1	4052.6	<b>185.99</b>
5	3910.8	3655.9	3844.3	3927.1	3698.3	4048.3	<b>177.11</b>
6	3503.6	3675.9	3577.3	3697.9	3452.3	3603.1	<b>124.41</b>
Average (1-6wks)	<b>3670.61<sup>ab</sup></b>	<b>3681.25<sup>ab</sup></b>	<b>3616.48<sup>ab</sup></b>	<b>3784.40<sup>ab</sup></b>	<b>3608.53<sup>b</sup></b>	<b>3834.26<sup>a</sup></b>	<b>70.03</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 13. Eggshell color(Fan)

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
1	11.50	11.18	11.94	11.11	10.71	11.47	<b>0.399</b>
2	9.94 <sup>ab</sup>	10.19 <sup>ab</sup>	9.93 <sup>ab</sup>	10.61 <sup>a</sup>	8.94 <sup>b</sup>	9.68 <sup>ab</sup>	<b>0.474</b>
3	8.75 <sup>ab</sup>	8.20 <sup>b</sup>	9.24 <sup>ab</sup>	9.30 <sup>ab</sup>	9.76 <sup>a</sup>	9.62 <sup>a</sup>	<b>0.337</b>
4	9.44	9.41	10.01	9.38	9.32	9.04	<b>0.404</b>
5	8.52	9.59	9.37	9.72	9.41	9.45	<b>0.353</b>
6	9.19	9.49	9.96	10.21	9.30	10.08	<b>0.382</b>
Average (1-6wks)	<b>9.56</b>	<b>9.67</b>	<b>10.07</b>	<b>10.06</b>	<b>9.57</b>	<b>9.89</b>	<b>0.237</b>

<sup>1</sup>T1: Control, T2: Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3: Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4: Control + *Rhodotorula* 1%, T5:Control + *Rhodotorula* 2%, T6: Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a, b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 14. Eggshell color(Color Quest: Color tone)

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
1	14.17	13.77	14.50	14.59	14.18	14.62	<b>0.326</b>
2	15.07	14.67	14.61	14.90	14.53	15.42	<b>0.349</b>
3	13.80 <sup>ab</sup>	13.72 <sup>b</sup>	14.48 <sup>ab</sup>	14.57 <sup>ab</sup>	14.47 <sup>ab</sup>	14.87 <sup>a</sup>	<b>0.335</b>
4	14.19	13.76	14.37	13.88	13.60	14.04	<b>0.432</b>
5	13.89	13.42	14.26	14.06	13.77	13.98	<b>0.276</b>
6	13.63	13.44	13.70	13.88	13.78	13.60	<b>0.312</b>
Average (1-6wks)	<b>14.13<sup>ab</sup></b>	<b>13.80<sup>b</sup></b>	<b>14.32<sup>a</sup></b>	<b>14.31<sup>a</sup></b>	<b>14.05<sup>ab</sup></b>	<b>14.42<sup>a</sup></b>	<b>0.157</b>

<sup>1</sup>T1: Control, T2: Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3: Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4: Control + *Rhodotorula* 1%, T5:Control + *Rhodotorula* 2%, T6: Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a, b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05)

Table 15. Eggshell color (Color Quest : Chromaticity)

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
1	17.50	15.65	17.84	17.60	17.87	17.20	<b>0.243</b>
2	18.22 <sup>ab</sup>	18.17 <sup>ab</sup>	18.67 <sup>a</sup>	18.10 <sup>ab</sup>	17.71 <sup>b</sup>	18.38 <sup>ab</sup>	<b>0.281</b>
3	17.43	17.60	17.84	17.52	17.89	17.13	<b>0.286</b>
4	17.19	17.29	16.95	17.79	17.89	17.13	<b>0.286</b>
5	17.42	17.27	17.47	17.39	17.44	17.11	<b>0.283</b>
6	17.47	17.30	17.36	17.44	17.49	17.20	<b>0.224</b>
Average (1-6wks)	<b>17.54</b>	<b>17.55</b>	<b>17.69</b>	<b>17.64</b>	<b>17.63</b>	<b>17.33</b>	<b>0.127</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-b</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table 16. York color (fan)

Weeks	Treatments <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
1	7.70 <sup>e</sup>	8.40 <sup>d</sup>	9.60 <sup>c</sup>	10.31 <sup>b</sup>	11.51 <sup>a</sup>	11.22 <sup>a</sup>	<b>0.195</b>
2	8.46 <sup>e</sup>	9.45 <sup>d</sup>	10.58 <sup>c</sup>	11.11 <sup>b</sup>	11.63 <sup>a</sup>	10.59 <sup>c</sup>	<b>0.160</b>
3	8.60 <sup>d</sup>	9.29 <sup>c</sup>	10.24 <sup>b</sup>	10.74 <sup>b</sup>	11.38 <sup>a</sup>	10.58 <sup>b</sup>	<b>0.177</b>
4	8.02 <sup>e</sup>	8.76 <sup>d</sup>	9.46 <sup>c</sup>	10.11 <sup>b</sup>	10.67 <sup>a</sup>	10.71 <sup>a</sup>	<b>0.159</b>
5	8.14 <sup>c</sup>	8.47 <sup>c</sup>	9.20 <sup>b</sup>	9.66 <sup>b</sup>	10.52 <sup>a</sup>	10.71 <sup>a</sup>	<b>0.184</b>
6	7.43 <sup>e</sup>	8.11 <sup>d</sup>	8.61 <sup>c</sup>	9.00 <sup>c</sup>	9.94 <sup>b</sup>	10.53 <sup>a</sup>	<b>0.138</b>
Average (1-6wks)	<b>8.06<sup>e</sup></b>	<b>8.75<sup>d</sup></b>	<b>9.62<sup>c</sup></b>	<b>10.16<sup>b</sup></b>	<b>10.94<sup>a</sup></b>	<b>10.72<sup>a</sup></b>	<b>0.142</b>

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-c</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

Table. 17 Summary of performance and eggshell quality during experimental period from 1 to 6wks

Item	Treatment <sup>1</sup>						SEM
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
<b>Performance</b>							
Hen-day egg production, %	71.17 <sup>b</sup>	75.74 <sup>a</sup>	76.43 <sup>a</sup>	73.93 <sup>ab</sup>	74.05 <sup>ab</sup>	74.94 <sup>ab</sup>	1.276
Hen-housed egg production, %	71.17 <sup>b</sup>	74.84 <sup>ab</sup>	76.43 <sup>a</sup>	73.97 <sup>ab</sup>	73.85 <sup>ab</sup>	74.52 <sup>ab</sup>	1.336
Feed intake, g/day	135.40 <sup>ab</sup>	131.59 <sup>b</sup>	137.87 <sup>a</sup>	133.67 <sup>ab</sup>	134.27 <sup>ab</sup>	135.92 <sup>ab</sup>	1.659
Feed conversion ratio, g/100g egg mass	2.75 <sup>a</sup>	2.50 <sup>c</sup>	2.64 <sup>ab</sup>	2.64 <sup>ab</sup>	2.59 <sup>bc</sup>	2.64 <sup>ab</sup>	0.041
<b>Eggshell quality</b>							
Broken&soft egg, %	1.57 <sup>a</sup>	1.42 <sup>ab</sup>	1.72 <sup>a</sup>	0.99 <sup>ab</sup>	0.94 <sup>ab</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.356
Eggshell strength, g/cm <sup>2</sup>	3670.61 <sup>ab</sup>	3681.25 <sup>ab</sup>	3616.48 <sup>ab</sup>	3784.40 <sup>ab</sup>	3608.53 <sup>b</sup>	3834.26 <sup>a</sup>	70.03
Eggshell color (fan)	9.56	9.67	10.07	10.06	9.57	9.89	0.237
Eggshell color, color quest: color tone	14.13 <sup>ab</sup>	13.80 <sup>b</sup>	14.32 <sup>a</sup>	14.31 <sup>a</sup>	14.05 <sup>ab</sup>	14.42 <sup>a</sup>	0.157
Eggshell color, color quest: chromaticity	17.54	17.55	17.69	17.64	17.63	17.33	0.127
Yolk color (fan)	8.06 <sup>c</sup>	8.75 <sup>d</sup>	9.62 <sup>c</sup>	10.16 <sup>b</sup>	10.94 <sup>a</sup>	10.72 <sup>a</sup>	0.142

<sup>1</sup>T1; Control, T2; Control + $\beta$ -carotene 25 ppm, T3; Control + *Rhodotorula* 0.5%

T4; Control + *Rhodotorula* 1%, T5;Control + *Rhodotorula* 2%, T6; Control + *Rhodotorula* 4%

<sup>a-c</sup>Means within each row with no common superscript differ(P<0.05).

마. 난황 내 토코페롤 함량

토코페롤 분석을 위해 난황 10g을 취하여 토코페롤 함량을 정량 분석한 결과 그림에서 보듯이 실험군 1과 2를 제외하고, 실험 2주와 3주차까지 증가하다가 이후로는 토코페롤 함량이 줄어드는 경향을 볼 수 있다. 실험군 1과 2에서는 4주까지 꾸준히 증가하다가 5주차에 접어들면서 급격하게 줄어들었다. 사료 내 토코페롤의 첨가량은 동일하였으나, 각 실험군 마다 차이를 보이는 것은 실험군 마다 사료 섭취량의 차이를 보이기 때문으로 판단된다.

Table 18. 난황내 토코페롤 함량

	Tocopherol( $\mu\text{g/g-yolk}$ )					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1주	219.41	219.57	220.58	219.40	219.75	221.28
2주	220.99	220.77	221.92	222.58	223.47	223.36
3주	222.46	221.65	221.91	222.23	223.66	223.18
4주	223.09	222.86	220.72	220.58	222.54	222.23
5주	221.53	220.46	220.55	219.46	220.41	221.43
6주	219.92	220.71	220.75	219.86	220.77	220.82

바. 난황 내 카로티노이드 함량

총 카로테노이드량은 435nm의 UV에 대한 카로테노이드의 흡광계수 2500인 점을 통해 식 1과 같이 계산할 수 있다. 이의 결과는 Table 19에 나타내었다.

$$Total\ carotenoid\ (\mu\text{g} / \text{g yeasts}) = \frac{(mL\ of\ solvent)(absorbance)}{(0.250)(yeast\ dry\ weight)} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \quad Eq. 1$$

Table에서 보듯이 모든 실험군에서 실험 2주차에 최대량을 나타내고 있으며, 실험군 3, 6을 제외하고 나머지 실험군에서는 3주부터 줄어드는 경향을 보인다. 또한, *Rhodotorula* 를 첨가한 실험군이 그렇지 않은 실험군에 비해 전체적으로 높은 카로테노이드 함량을 나타내는 것을 알 수 있으나, 첨가량에 따른 경향은 일정하게 나타나지 않았다.



Table 19. 난황내 카로티노이드 함량

	Total Carotenoids( $\mu\text{g/g-yolk}$ )					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1주	28.63	28.45	33.66	31.78	37.89	35.05
2주	30.30	31.62	39.60	36.12	41.85	41.19
3주	28.95	27.04	30.57	32.29	31.52	33.54
4주	27.69	25.24	37.04	29.49	31.54	36.57
5주	28.19	25.38	28.57	27.57	30.00	31.37
6주	28.30	25.56	31.37	28.63	29.51	34.00

사. 필드테스트 결과 및 고찰

결론적으로 1% 토코페롤 함유 산란계 사료에 카로티노이드 함유 효모의 첨가는 예상보다는 생산성 향상에 큰 기여를 하지 못하였으나 전체적으로는 계란의 품질 향상에 긍정적인 영향을 미쳤으며 특히 난황의 색도와 연파란율에 큰 영향을 주었다. 한편 토코페롤과 카로티노이드의 난황으로의 전이는 확인할 수 있었으나 농도에 따라 뚜렷하게 증가되는 경향을 보이지는 않았다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 카로티노이드계 화합물인  $\beta$ -카로틴과 토롤라호딘, 그리고 토코페롤이 강화된 사료첨가물의 경제적인 생산 방법의 확립과 이를 함유한 고기능성 계란을 생산하기 위한 사료첨가물 제조에 그 목표를 두고 있다. 식용유 부산물로부터 사료용으로 사용할 수 있는 토코페롤을 분리, 정제하는 공정으로 비누화 추출법과 증류법을 확립하였고 이 중 생산수율과 경제성이 높은 증류법을 토코페롤 생산에 적합한 공정으로 선정하였다. 증류법을 통해 식용유 부산물로부터 순도가 30% 이상인 코토페롤을 90% 이상 분리, 정제할 수 있었다. 토코페롤이 첨가된 기능성 사료를 섭취한 닭으로부터 생산된 계란 내에 토코페롤이 축적되는 효과를 확인하기 위해 계란의 난황에 존재하는 토코페롤의 양을 90% 이상 추출하여 정량하는 방법을 확립하였다.

한편 기 개발된 토코페롤을 이용하여 사료에 첨가 한 후 닭의 사료로 사용 시 계란의 난황으로의 이행 여부를 확인 하는 사양시험 결과 사료에 첨가해준 토코페롤이 난황으로 이행이 잘 되는 것으로 확인 되었으며 필드 테스트를 위해서는 1%만 첨가해도 유의성이 있는 결과를 도출 할 것으로 판단 하였다.

특수란의 생산을 위해 사료에 토코페롤을 1%되도록 첨가한 후 실험용 닭에게 먹이고 이들이 낳은 계란으로부터 토코페롤의 함량을 분석하여 계란으로의 이행정도를 확인하는 필드테스트를 실시하였고 아울러 계란의 난각질 이나 난황의 착색도 등에 대한 품질 검사도 실시하여 계란의 품질을 확인 하였다. 그 결과 토코페롤을 첨가하지 않았을 때에 비하여 닭의 연령에 관계없이 1주일이 지나면서부터 평균 4배 정도의 높은 함량을 나타내기 시작하여 1개월이 지나도록 비슷한 양상을 보였다. 한편 난각질이나 난황의 착색도 등도 토코페롤이 첨가되지 않은 사료를 공급받은 닭의 계란에 비해 상대적으로 우수 한 것으로 확인 되었다.

위의 결과를 기준으로 하여 최종연도에는 사료 첨가물의 필드테스트를 통해 산란계의 난황으로의 전이를 확인 하고 상품의 가치성을 확인하였다. 전체적으로 생산성 향상에 큰 기여를 하지 못하였으나 계란의 품질에는 대체로 긍정적인 영향을 미쳤으며 특히 난황의 색도와 연파란율에 큰 영향을 주었다. 한편 토코페롤과 카로티노이드의 난황으로의 전이는 확인 할 수 있었으나 농도에 따라 뚜렷하게 증가되는 경향을 보이지는 않았다.

그러나, 기능성을 갖는 사료성분이 난황으로의 전이성의 확인은 이러한 성분들의 활용이 질병감염의 예방 및 스트레스 극복에 영향을 주어 궁극적으로 생산성 향상과 번식률 개선으로 축산업계의 생산량이 증대되는 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

먼저 기술적으로는 식용유 부산물로부터 토코페롤을 정제하는 방법을 개발함으로써 다양한 유용 산물을 함유하고 있는 식용유 정제공정의 부산물로부터 토코페롤외 기타 유용산물을 추출, 정제하는 기술에 응용 할 수 있으며 고농도의 카로티노이드를 생산하는 효모 배양방법을 통해 미생물 배양기술을 통한 유용산물의 생산 기술에 적용이 가능 할 것이다. 한편 필드테스트를 통해 얻어진 결과는 철저한 경제성 평가와 필요여부에 따른 보강 실험을 통해 실제 농가에 활용여부를 최종적으로 판단 할 예정이다.

## 제 6 장      참고문헌

1. Miller, G. L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., 45, 525-527
2. Sedmak, J. J., Weerasinghe, D. K., and Jolly, S. O., 1990, Extraction and quantitation of astaxanthin from *phaffia rhodozyma*, Biotech. Technol., 4, 107-112
3. Montgomery, C. D., 1991, Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc., New York
4. Sejong Oh, Sungsoe Rheem, Jaehun Sim, Sangkyo Kim, and Youngjin Back, 1995, Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-yeast Extract-glucose medium by using response surface methodology, Applied Environmental microbiology, 61, No. 11, p3809-3814
5. Perrier, V., Dubreucq, E., and Galzy, P., 1995, Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Arch Microbiol., 164, 173-179
6. Logothetis, N., and Wynn. 1989, Quality through design. Oxford university press, New York

위탁 최종  
연구보고서

기능성 사료생산을 위한 카로티노이드  
효모의 대량생산 기술개발에 관한 연구

Development Of Mass Production Of Yeast,  
Producing Carotenoids, For The Production Of  
Functional Feed

서울시립대학교

(주)유진사이언스

## 제 출 문

(주) 유진사이언스 귀하

본 보고서를 “토코페롤과 카로티노이드계 성분을 함유한 산란계용 사료첨가제 개발에 관한 연구” 과제의 세부과제 “기능성 사료생산을 위한 카로티노이드 효모의 대량생산 기술개발에 관한 연구” 최종보고서로 제출합니다. !

2003 년 7 월 30 일

위탁연구기관명 : 서울시립대학교

위탁연구책임자 : 김 의 용

연 구 원 : 박 평 규

연 구 원 : 이 수 곤

# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 사료생산을 위한 카로티노이드 효모의 대량생산 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

효모 *Rhodotorula glutinis*의 가장 큰 특징은 카로티노이드 성분으로 주된 색소는 torularhodin과  $\beta$ -carotene, torulene으로 밝혀졌으며 난황착색제에 관한 연구는 전혀 연구되어 있지 않고 있다.  $\beta$ -카로틴과 토룰라호딘은 효모인 로도 토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*)로부터 동시에 발효생산이 가능하다. 토룰라호딘은 지금까지 많이 알려져 있지 않은 물질로서 다른 카로티노이드계 색소들과 마찬가지로 식품의 색깔, 향산화제, 항암작용이 있으며 비타민 A의 프로비타민이지만 가격이 매우 고가이기 때문에 사용이 매우 제한적이었다. 따라서 본 연구에서는 새로운 생산기술을 확립하여 경제적으로 대량생산을 가능하게 하며, 고기능성 사료첨가물로서 우선 양계사료로 적용하였으면한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

효모 *Rhodotorula glutinis*의 세포벽 제거방법으로 물리적, 화학적와 생물학적 처리방법을 이용하여 색소를 효율적으로 추출하기 위한 추출조건의 최적화를 확립하였다. Reponse Surface Method를 이용한 카로티노이드 대량생산의 최적화를 확립하였고, 또한 저가의 당밀(sugar cane molasses)를 이용하여 높은 생산성을 보였다.



#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 *Rhodotorula glutinis* 균체를 난황 착색제로 사용할 때 두터운 세포벽으로 인한 색소의 bioavailability의 증진을 목적으로 효모균체의 세포벽제거를 위한 전처리방법으로 화학적 처리, 물리적 처리, 생물학적 처리방법을 제시하였고 DMSO, 60℃일 때 가장 높은 세포벽 파괴율을 보였다. 또한 세포형태별에 따라서 건조된 세포나 습한 세포에 비해 냉동 건조된 세포에서 카로티노이드의 추출효율이 높게 나타났다. 또한 배양조건 중 defined medium 과 complex medium(sugar cane molasses)를 이용하여 대량생산하였다. 당밀을 이용한 경우 세포색의 변화가 카로티이드에 영향을 줌을 확연히 알 수있었으며 산업화에 적절한 영양원으로 고려되며 카로티이드의 생산에 있어 배양조건의 영향을 적절히 고려해야함을 알 수 있었다.

## SUMMARY

Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 was investigated using untreated and treated sugar cane molasses. The yield of carotenoid was found to be reduced using an untreated molasses medium compare to a treated molasses medium. Hence, molasses was subjected to various pretreatment techniques. Pretreatment reduced the level of various colloid and metal ions. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 was investigated using untreated and treated sugar cane molasses. The yield of carotenoid was found to be reduced using an untreated molasses medium compare to a treated molasses medium. Hence, molasses was subjected to various pretreatment techniques. Pretreatment reduced the level of various colloid and metal ions. An efficient method of extraction for carotenoids in *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 was developed. Major carotenoids produced were identified as torularhodin of 61.6%,  $\beta$ -carotene of 28.8%, and torulene of 9.5%. HCl treatment, as a pretreatment on cell, was necessary to carry out together with thermal treatment unlike DMSO pretreatment. The choice of solvent had an important effect on the composition of carotenoids extracted: benzene and chloroform were effective for the extraction of torularhodin, especially. However, diethyl ether was most effective for the extraction of total carotenoids. freeze dried type cells showed high efficiency value for the extraction of carotenids, in compared with dried and wet type cells.

Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 was investigated using untreated and treated sugar cane molasses. The yield of carotenoid was found to be reduced using an untreated molasses medium compare to a treated molasses medium. Hence, molasses was subjected to various pretreatment techniques. Pretreatment reduced the level of various colloid and metal ions.

The nutritional requirements for carotenoid production by *Rhodotorula*

*glutinis* KCTC 7989 were optimized using various substrates. The medium components and environmental factors considered include maltose as a carbon source, valine as a nitrogen source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , pH and temperature in shake flask experiments. Initial screening using a Plackett–Burman statistical design identified carbon/nitrogen ratio (C/N ratio), pH and temperature as significantly influencing carotenoid production. Response surface methodology was applied to determine the mutual interactions between these three factors and optimal levels for carotenoid production. Volumetric production of carotenoid was enhanced by an initial C/N ratio of low present in the medium. Also, the response surface plot is generated which predicts that a high value for the production of carotenoid can be obtained with the maltose 2%, valine = 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 0.1,  $\text{NaCl}$  = 0.1,  $\text{MgSO}_4$  = 0.01,  $\text{CaCl}_2$  = 0.01, C/N ratio = 4, pH = 5.5 and temperature 22 °C. The results from confirmation experiments justify the prediction from the statistical approach.

A two-step optimization strategy experimental designs was employed to enhance carotenoid production from sugar cane molasses (SCM) in the yeast *Rhodotorula glutinis*. In the first step, a fractional factorial design was used to evaluate the impact of five fermentation factors (pH and concentrations of SCM, urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and  $\text{NaCl}$ ). The results revealed that three factors (concentrations of SCM, urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) had a significant influence on biomass and carotenoid production. A full factorial design coupled with response surface methodology was then used in the second step to optimize the three significant factors to further enhance biomass and carotenoid yields. Through this two-step optimization strategy, the carotenoid yield could be increased from an average of 1.4 mg/L to an average of 3.5 mg/L, i.e. a 2.5-fold yield enhancement.

# 목 차

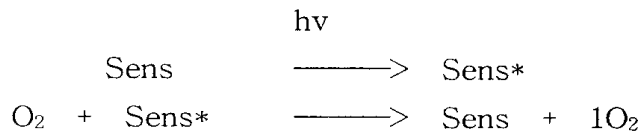
제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	45
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	48
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	49
제 1 절	연구수행방법 .....	49
1.	미생물 .....	49
2.	카로티노이드 생합성 조건의 최적화 .....	49
3.	환경인자들에 의한 카로티노이드 생합성 극대화 및 추출의 극대화 ....	49
4.	단위 세포당 카로티노이드 농도 분석 .....	49
5.	카로티노이드 정성분석 .....	50
6.	건조세포 질량 .....	50
제 2 절	연구수행 내용 및 결과 .....	50
1.	카로티노이드생합성 조건의 최적화 .....	50
2.	카로티노이드 추출의 최적화 .....	56
가.	카로티노이드 분석기술 확립 .....	56
나.	전처리 방법에 따른 카로티노이드 추출 .....	57
다.	용매에 따른 카로티노이드의 회수 영향 .....	58
라.	세포형태에 따른 카로티노이드 추출 .....	60
3.	<i>Rhodotorula glutinis</i> 카로티노이드 조성 검토 .....	61
가.	TLC를 이용한 카로티노이드 조성 .....	61
나.	HPLC를 이용한 카로티노이드 조성 .....	62
4.	경제성 있는 복합배지 개발 .....	65
5.	Fraction Factorial Design을 이용한 영향인자 조사 .....	66
6.	Response Surface Method를 이용한 배양조건의 최적화 .....	75
7.	당밀과 Urea의 농도변화에 따른 인의 영향조사 .....	81
8.	효모의 대량생산 .....	82
가.	Chemical defined medium에 따른 고농도 배양 .....	82
나.	당밀을 이용한 고농도 배양 .....	85

다. 고농도 배양에 따른 NaOH와 NH <sub>4</sub> OH .....	88
9. 세포벽 약화 기술 .....	91
가. 효소를 이용한 세포벽 약화 .....	91
나. 실험기법을 이용한 세포벽 약화 기술 확립 .....	94
10. 당밀의 전처리 .....	103
11. 카로티노이드 생산의 경제성 평가 .....	108
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	110
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	111
제 6 장 참고문헌 .....	112

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

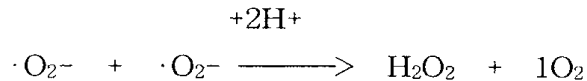
자연계에 널리 분포되어 있는 천연색소인 카로티노이드는 이소프레노이드 화합물의 한 종류로서 크게 베타카로틴과 같은 카로틴계와 이에 산소가 결합되어 있는 톨라호딘과 같은 크산토펴계로 나눌 수 있다. 카로티노이드는 천연색소로서 주로 착색제로 사용되어 왔으며 소비자의 안전지향에 힘입어 그 시장이 해마다 증가하고 있는 추세에 있다. 또한 근래 항산화제, 항암제 등 부가가치가 높은 의약품으로 용도가 점차 개발되고 있다. 일반적으로 카로티노이드는 여러 개의 공액이중 결합이 있어 유해산소( $1O_2$ )를 제거하는 항산화력을 가지고 있으며, 유해산소로 인하여 발생하는 일부 암에 대하여 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다. 유해산소는 반응성이 커 세포막의 지질을 산화시키며 DNA를 공격하여 돌연변이를 일으킬 수 있다. 이러한 유해산소의 3가지 생성 메카니즘은 다음과 같은 것으로 알려져 있다.

첫째, 빛에 의하여 photosensitizer에서 만들어진다.

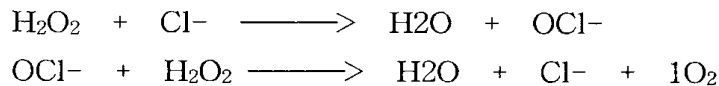


여기서, Sens는 photosensitizer를 의미한다.

둘째, NADH의 산화중에 만들어진다.



셋째, PMN(polymorphonuclear)백혈구의 식균 작용에 의해 만들어진다.



세포내에서 이러한 유해산소는 일반적으로 SOD(superoxide dismutase)와 catalase라는 두 효소의 작용으로 제거되는데 William 등의 연구에 의하면 SOD가 결여되어 있는 세포에서는 카로티노이드가 그 역할을 대신하여 유해산소를 제거하는 것으로 나타났으며, Paola 등은 카로티노이드가 토크페롤과 함

계 생체막의 지질층에 존재하여 유해산소의 공격을 막는 것으로 보고하였다. 카로티노이드의 생물학적 기능에 대한 심포지움에서 비타민 A의 전구체인 베타카로틴( $\beta$ -carotene)이 특히 항산화 효과와 일부 암에 대해 항암효과가 있는 것으로 보고되었으며 Helga는 베타카로틴을 비롯한 일반적인 카로티노이드에 대한 항암효과에 대하여 연구하였는데, 베타카로틴이 특히 폐암에 대해 효과적인 것으로 보고하였다. 또한, Susan등은 사람의 입파구에서 산화에 의한 DNA의 손상을 비타민 E, 비타민 C 그리고 베타카로틴의 투여에 의해서 막을 수 있다고 보고하였다.

본 개발기술은 고기능성 사료첨가물의 개발에 관한 것으로 카로티노이드계의 토룰라호딘(*torularhodin*)을 함유한 효모(*yeast*)를 이용, 생산하고자 하였다.  $\beta$ -카로틴과 토룰라호딘은 아스타크산틴과 함께 카로티노이드의 대표적인 카로티노이드계(*Carotenoids*)물질로서 자연계에 널리 분포하고 있는 테르펜화합물(*terpenoid compounds*)의 일종으로 식물과 동물 모두에서 발견되어진다. 그러나 다양한 종류의 미생물, 곰팡이, 조류(*algae*), 식물체 등은 카로티노이드를 생합성할 수 있는데 반하여 동물체는 카로티노이드의 섭취를 전적으로 사료에 의존해야 하므로 카로티노이드계의 사료첨가물에 대한 필요성이 증가되고 있는 실정이다. 또한  $\beta$ -카로틴과 토룰라호딘은 효모인 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*)로부터 동시에 발효생산이 가능하다. 토룰라호딘은 지금까지 많이 알려져 있지 않은 물질로서 다른 카로티노이드계 색소들과 마찬가지로 식품의 색깔, 항산화제, 항암작용이 있으며(*Bioresource Technology* 71, 1999, 41-44) 비타민 A의 프로비타민이지만 가격이 매우 고가이기 때문에 사용이 매우 제한적이었다. 이번 개발과제에서는 토룰라호딘의 새로운 생산기술을 확립하여 경제적으로 대량생산을 가능하게 하며, 고기능성 사료첨가물로서 우선 양계사료로 적용하여 계란 내 토룰라호딘과  $\beta$ -카로틴의 농축에 의한 비타민 A의 고농도화, 우수한 생리적 활성, 짙은 난황 색깔로 소비자 만족도 재고, 유통기간이 늘어난 고기능성 계란을 제조하고자 한다. 또한 다른 가축의 사료첨가제로서 널리 활용하여 우수한 생리활성, 유통기한 연장의 효과를 낼 수 있게 한다.

지금까지 카로티노이드계 화합물의 사료첨가에 대한 연구는 많은 발전을 이루어 왔으나 값이 비싸고, 제한적인 생산으로 상업적 가치가 떨어져 직접적으로 양계농가에 적용하기는 힘들었다. 그러나 본 기술은 값싼 배지를 이용하여 토룰라호딘의 대량생산을 통해 농가에 직접적인 적용이 가능하도록 비용절

감에 초점을 맞추었다.

이를 위해 기능성 균주 및 변이주의 분리 및 확보하고 C/N 비, 계면활성제, 등에 따른 카로티노이드 생합성 극대화를 시도하고 EPS에 의한 배양액의 점도증가 최소화등을 통해 효모자체의 배양조건을 최적화 하고자 하였다. 나아가 경제성을 고려한 복합배지를 개발하고 효모의 대량생산체계 기술의 확립하여 효모균체 자체를 카로티노이드원으로 사용할수 있도록 하였다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근에는 난황을 짙은 황색이나 오렌지색으로 착색시키는 기능성계란의 생산방법과 관련하여 카로티노이드계 화합물인 카로틴류와 아스타크산틴을 사용한 특허 등이(KP135673, EP0630578) 보고되었다. 또한 카로티노이드계로서  $\beta$ -카로틴을 당근으로부터 얻어 계란에 강화한 특허(JP9009881) 등도 존재한다. 토롤라호딘에 대해서는 균주에 대한 연구로서 로도토롤라 글루티니스에서 카로티노이드계 물질들을 생산한 연구(Bioresource Technology 71. 1999. 41-44)가 보고되었으며, 로도토롤라 글루티니스와 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)의 카로티노 프로테인의 생산에 관한 연구(J. Industrial Microbiology & Biotechnology 19 97. 18. 272-277)가 있다. 특이할 만한 점은 로도토롤라 글루티니스 효모로부터 토롤라호딘을 생산하여 사료에 첨가시킨 예는 특허 등에서 아직 발견되고 있지 않으며, 국내에서는 더욱이 그러한 기술의 발전이 미비한 상태이다.

지금까지 카로티노이드계 화합물의 사료첨가에 대한 연구는 많은 발전을 이루어 왔으나 값이 비싸고, 제한적인 생산으로 상업적 가치가 떨어져 직접적으로 양계농가에 적용하기는 힘들었다. 따라서 값싼 배지를 이용하여 토롤라호딘의 대량생산을 통해 농가에 직접적인 적용이 가능하도록 비용절감에 초점을 맞추었다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구수행 방법

#### 1. 미생물

본 연구에서 사용될 균주는 *Rhodotorula glutinis* 이다. 이 균주는 토양에서 낙엽수로 부터 분리하여 KIST 한국생명과학연구소에서 동정하였다.

#### 2. 카로티노이드 생합성 조건의 최적화

500ml Erlenmeyer flask에 기본배지 100ml를 넣고 초기 pH를 5.5로 하여 22 °C에서 배양한다. 탄소원, 질소원, C/N비, pH, 온도, 용존산소등에 대한 영향을 고찰하여 카로티노이드 생산의 최적인 조건을 찾는다

Glucose, 1.5%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1%; MgSO<sub>4</sub>, 0.05; CaCl<sub>2</sub> 0.01%, NaCl, 0.01기본배지의 조성은 다음과 같이 한다. 사용된 미량원소는 FeSO<sub>4</sub>, 0.004%; AlCl<sub>3</sub>, 0.001%, CoCl<sub>2</sub>, 0.0004; ZnSO<sub>4</sub>, 0.0002%; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.0001%; CuCl<sub>2</sub>, 0.0001%, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.00005%, MnSO<sub>4</sub>, 0.001%를 여과시켜 사용하였다.

#### 3. 환경인자들에 의한 카로티노이드 생합성의 극대화 및 추출의 극대화

카로티노이드 생합성의 환경인자로서 탄소원, 질소원을 조사한 후 Plankett-Burman Design을 이용하여 최적화하였다. 이 방법은 반응계의 최적 반응 조건을 수학적으로 산출하거나 확립(identify)하기 위하여 least-square method를 이용하여 실험을 설계하거나 실험 data를 분석하는데 이용된다. 또한 세포내 카로티노이드의 추출에 영향을 주는 인자(DMSO, petroleum ether, acetone, NaCl, cell weight)들을 통계프로그램인 SAS v6.12을 이용하여 실험 설계 및 분석을 하여 세포내에 존재하는 카로티노이드의 추출을 단시간 내에 최대화하였다.

#### 4. 단위 세포당 카로티노이드 농도 분석

Sample 1ml를 취하여 test tube 에 넣고 2분간 10,000rpm으로 고속 원심분

리 시킨 후 상등액을 버리고 탈이온수를 이용하여 세포를 2회 세척한 후 건조 시킨다. 55℃로 예열시킨 DMSO를 1ml 넣고 여기에 acetone 1ml과 petroleum ether 1ml, saturated NaCl 1ml 넣고 10,000rpm에서 2분간 원심분리시킨다. UV-spectrophotometer로 501nm에서 상등액의 흡광도를 측정한다. 총카로티노이드 농도는 특정 카로틴을 기준으로 하여 다음 식에 의해서 구한다.

$$\text{총 카로티노이드}(\mu\text{g/g yeast}) = \frac{\text{Absorbance(at 501nm)} \times 100}{\text{E1\%1cm} \times \text{dry cell weight(g)}}$$

여기서, E1%1cm 은 extinction coefficient를 나타낸다.

#### 5. 카로티노이드 정성분석

4의 과정에서 얻어진 시료를 농축시킨 다음 5×20cm 크기의 silica Gel60, TLC (thin layer chromatography)를 사용하여 전개시킨다. 이때 용매는 30% acetone, 70% hexane을 사용한다. 전개된 각각의 부분들을 ethanol, hexane 그리고 petroleum ether에 녹인 다음 glass wool에 통과시킨 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 각각의 최대 흡수파장을 구한다. TLC에 전개시켜 얻은 Rf값과 ethanol, hexane 그리고 petroleum ether에서 얻어진 최대흡수 파장값을 이용하여 각각의 카로티노이드를 확인한다. HPLC를 이용한 카로티노이드의 분석조건은 다음과 같다. 칼럼은  $\mu$ -Bodapak C18사용하고 전개용매는 acetonitrile-tetrahydrofuran- water을 5:3:1로 흘려주며, 검출기는 UV-검출기를 사용하여 436nm에서 측정을 한다.

#### 6. 건조 세포 질량

Sample 10ml를 취해서 원심 분리 후 상등액을 버리고 증류수로 3회 세척하여 건조기에서 24시간 건조시킨 후 중량을 잰다.

## 제2절 연구수행 내용 및 결과

### 1. 카로티노이드 생합성 조건의 최적화

본 연구에서 사용된 균주는 *Rhodotorula glutinis*로서 교정 낙엽수로부터 분리하여 KIST 한국생명과학연구소에서 동정하였으며 탄소원 동화에 대한 실험 결과는 다음과 같다.

표 1. 탄소원 동화실험결과

Sorbitol	+	Palatinose	+	Gluconate	-	Galactose	+
D-xylose	+	Erythritol	-	Levulinate	-	Inositol	-
Ribose	+	Melibiose	-	Glucose	+	Lactose	-
Glycerol	+	Glucuronate	-	Sorbose	+	Mannitol	+
Rhamnose	-	Melezitose	+	Glucosamine	-	Maltose	+
Raffinose	+	Cellobiose	-	Esculine	+	Sucrose	+

*R. glutinis*를 이용하여 카로티노이드의 생합성 농도를 극대화시키기 위해서는 배지내 탄소원의 농도를 변화시켰을 때 카로티노이드의 양을 측정하였다. 결과는 표2와 같다. 세포 농도 면에서는 48시간에서 정상기를 보였으며 카로티노이드는 정상기 24시간 후에 측정하였다. 높은 세포농도는 fructose가 가장 높은 수율을 보였으나 카로티노이드양은 285.09 $\mu$ g/g yeast로 낮은 생합성능을 보였다. 따라서 세포농도가 최대를 유지하더라도 카로티노이드의 생합성능은 변화함을 보였다. 이는 문헌상에 보고한 내용과 일치하는 결과였다. 또한, 카로티노이드의 수율을 보면 galactose가 가장 높은 수치인 448.29 $\mu$ g/g yeast를 보였으며 maltose와 fructose순으로 생합성 됨을 보였다. 하지만 경제성을 고려하였을 때 galactose보다 maltose가 보다 저가의 기질로 선정되므로 최적의 탄소원은 maltose로 선정하였다.

표 2. 탄소원에 따른 카로티노이드의 변화.

탄소원	Final pH	Cell weight (g/L)	Total carotenoid (µg/g yeast)	Total volumetric carotenoid(mg/L)
Glucose	2.68	5.46	265.96	1.45
Sucrose	2.64	5.77	260.15	1.50
Maltose	2.71	4.05	440.18	1.78
Galactose	2.75	4.53	448.29	2.03
Fructose	2.67	6.78	285.09	1.93

각종 질소원의 영향은 질소원 중 무기질소원과 유기질소원을 각각 0.15%를 기본배지에 첨가하여 카로티노이드 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 표 3에 나타낸 것과 같이 무기질소원인 valine이 제일 좋았으며, 이 때 총 카로티노이드의 양은 688.55µg/g로 가장 높은 생합성능을 보였다. 이는 문헌상의 보고보다 약 2.5배정도 높은 수치를 보였다. 유기 질소원은 tryptone과 yeast extract가 가장 높은 결과를 보였다.

표 3. 질소원에 따른 카로티노이드의 변화

Nitrogen source	Final pH	Cell weight (g/L)	Total carotenoid (µg/g yeast)	Total volumetric carotenoid(mg/L)
<b>Inorganic nitrogen</b>				
NaNO <sub>3</sub>	6.92	1.10	257.02	0.28
KNO <sub>3</sub>	7.03	2.64	243.11	0.64
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.32	4.47	350.31	1.57
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.71	3.90	440.18	1.78
Glutamic acid	8.02	6.54	161.62	1.06
Valine	5.09	6.28	688.55	4.32
<b>Organic nitrogen</b>				
Yeast extract	4.73	8.51	454.02	3.86
Peptone	4.09	4.67	378.97	1.77
Tryptone	4.19	8.33	491.36	4.09
Corn steep liquor	4.53	3.13	336.40	1.05

저가의 유기질소원인 corn steep liquor는 336.40 $\mu$ g/g으로 질산염 질소원보다 높은 수치를 보이므로 산업화 배지로서 사용될 가능성을 시사하였다. 본 연구 결과 카로티노이드 생합성에 미치는 질소원은 valine으로 정하였다.

이상의 결과로서 탄소원은 maltose를 질소원은 valine을 정한 후 또 다른 환경인자인  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ , pH, 온도, 통기량 등의 Plankett Burman Design은 이용하여 세포성장과 카로티노이드 생합성에 영향을 주는 인자를 조사하였다(표 4). 이 설계에 대한 변환값은 +1, -1인 PBD으로 설계하여 수행하였으며 랜덤화를 갖추어 실험설계를 배치하였다.

표 4. PBD설계 중 변수들의 농도에 따른 수준변화

Factor	Type	-1 Level	+1 Level
Maltose(X1)	Numeric	1	2
Valine(X2)	Numeric	0.02	0.25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (X3)	Numeric	0.1	0.6
$\text{MgSO}_4$ (X4)	Numeric	0.01	0.1
$\text{CaCl}_2$ (X5)	Numeric	0.01	0.06
$\text{NaCl}$ (X6)	Numeric	0.01	0.1
pH(X7)	Numeric	4	6.5
Temp(X8)	Numeric	20	30
Working volume(X9)	Numeric	100	200

카로티노이드 생합성능에 영향을 주는 인자들에 대한 조사는 탄소원인 maltose를 고정한 후 질소원인 valine을 변화시켰다. 이는 탄소원의 농도 변화 시에는 정상기에 도달하기에는 오래 지연되므로 탄소원을 고정하여 C/N비에 대해서도 고려하였다. 또한 용존산소량의 조절은 용량부피(working volume)를 변화시키거나 교반속도를 높이는 방법이 있다. 본 연구에서는 용량부피를 선택

하여 실험하였다. 결과를 표 5에 나타내었다. 실험설계에서 9개를 변수를 선택 하였으며 이중 카로티노이드 생합성에 영향을 주는 인자와 세포성장에 영향을 주는 인자를 조사하였다. 결과로는 cell mass, 효모 무게당 총카로티노이드, 부피당 카로티노이드를 측정하였다.

표 5. 변수들에 대한 PBD의 실행에 따른 response의 변화.

Run	Maltose	Valine	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	pH	Temp	W.V	Cell mass	TC (ug/g)	TC (mg/L)
1	1.00	0.25	0.60	0.01	0.06	0.01	4.00	20.00	200	5.94	965.18	5.73
2	2.00	0.02	0.10	0.06	0.06	0.10	6.50	20.00	200	2.55	826.2	2.11
3	1.00	0.25	0.60	0.10	0.01	0.10	6.50	20.00	200	6.33	87.9	0.56
4	2.00	0.02	0.60	0.01	0.01	0.01	6.50	30.00	200	2.34	85.48	0.20
5	2.00	0.25	0.10	0.10	0.06	0.01	6.50	20.00	100	10.06	987.86	9.94
6	2.00	0.25	0.10	0.10	0.01	0.01	4.00	30.00	200	6.2	525.35	3.26
7	1.00	0.02	0.10	0.10	0.06	0.10	4.00	30.00	200	1.69	963.49	1.63
8	1.00	0.02	0.60	0.10	0.06	0.01	6.50	30.00	100	2.01	230.72	0.46
9	2.00	0.02	0.60	0.10	0.01	0.10	4.00	20.00	100	2.32	648.50	1.50
10	1.00	0.25	0.10	0.01	0.01	0.10	6.50	30.00	100	8.01	313.81	2.51
11	2.00	0.25	0.60	0.01	0.06	0.10	4.00	30.00	100	8.11	868.88	7.05
12	1.00	0.02	0.10	0.01	0.01	0.01	4.00	20.00	100	3.46	711.19	2.46

본 연구결과 세포성장은 C/N가 4일 때 보다 8일 때가 높게 나타났다. 이는 고농도의 질소원의 저해로 세포성장에 영향을 준 것으로 볼 수 있다. C/N비가 8일 때 세포농도는 10.06으로 가장 높았다. 일반적으로 본 실험에서 사용된 *R. glutinis*는 C/N 비가 높아짐에 따라 지질의 생합성 농도가 증가하게 된다. 반면, Toshihide 등은 주요 카로티노이드로 아스타잔틴을 생합성하는 조류인 *Haematococcus pluvialis*의 경우 C/N 비가 높을수록 많은 양의 카로티노이드를 생합성한다고 보고하였다. 또한 배양조건에 따라 세포의 다당류(EPS)의 생성되지는 않았다. 조 등의 보고에 의하면 본 균주에서는 세포의 다당류가 C/N 비가 15일 때 가장 높은 효율을 보였다. 반면 C/N비가 증가 할수록 세포의 다

당류의 생합성능은 급격히 감소하여 50일 땀 거의 생산하지 못하였다. 이는 세포대사과정 중 다당류가 축적되는 대사경로를 블록킹하므로 지질 생합성능을 증가시킨 것으로서 문헌상의 보고와 일치하는 내용이다. 일반적으로 EPS 농도의 증가는 배양액의 점도를 증대시켜 산소를 비롯한 기질의 전달을 저해하게 되며 이러한 현상은 카로티노이드 생합성 및 세포의 대사 작용을 저해시킬 것으로 예상된다. 세포성장에 영향을 주는 9가지 변수 중 가장 큰 영향을 주는 것은 질소원인 valine이었으며 용존산소량이 그 다음으로 보였다. 실험설계와 세포농도의 실험 값과 예상 값의 비교와 실험설계와 총카로티노이드의 실험 값과 예상 값에 대한 독립변수들은 model로부터 계산된 예상 변수를 바탕으로 여러 인자(parameters)들의 조합에 의해 얻어졌다(표 6). 또한 본 연구에서 발견한 배지와 YM배지의 카로티노이드 사진을 보면 쉽게 이해할 수 있다.(그림 1) YM배지에서는 275 $\mu\text{g/g}$ 의 카로티노이드를 생합성한 반면 본 연구에서 발견된 배지(PB배지)에서는 987.86 $\mu\text{g/g}$ 으로 기존의 보고와 약 3.5배 이상 고농도 색소로 생합성함을 보였다.

표 6. 세포농도와 총카로티노이드 생합성에 대한 실험값과 예상값.

Experimental No.	Cell mass (mg/L)		Total carotenoid ( $\mu\text{g/g}$ yeast)	
	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	5.94	6.69	965.18	866.17
2	2.55	2.71	826.20	866.17
3	6.33	5.87	87.90	96.05
4	2.34	2.26	85.48	96.05
5	10.06	9.99	987.86	747.94
6	6.20	6.41	525.35	694.69
7	1.69	1.42	963.49	1106.38
8	2.01	2.31	230.72	507.73
9	2.32	2.40	648.50	454.49
10	8.01	8.17	313.81	336.26
11	8.11	7.82	868.88	866.17
12	3.46	3.28	711.19	694.69



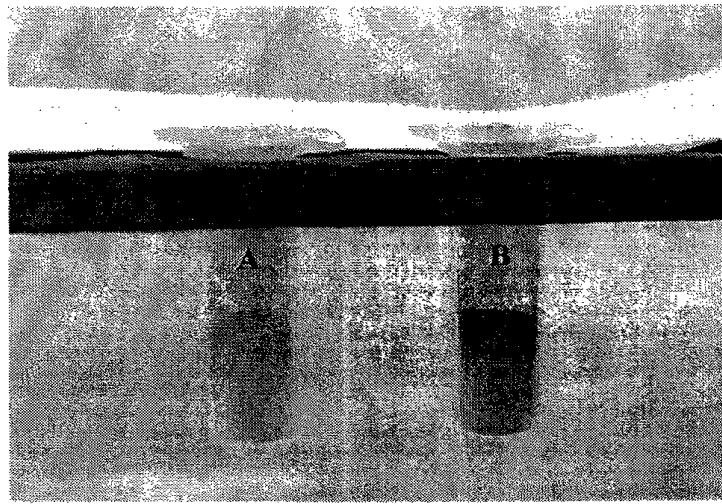


그림 1. YM배지(A)와 PB배지(B)의 카로티노이드 비교사진

## 2. 카로티노이드 추출의 최적화

### 가. 카로티노이드 분석기술확립

기존의 보고와는 단점을 보완하기 위해 카로티노이드의 분석기술을 확립하였다. 문헌상(Biotech. Tech. 4, 107-112, 1990)에서 보고된 방법은 회수율이 80%이하로서 낮은 회수율을 보인 반면 본 기술에서 개발된 카로티노이드 회수율은 91%이상의 높은 회수율을 보였다. 다음은 카로티노이드의 추출공정을 요약하였다.

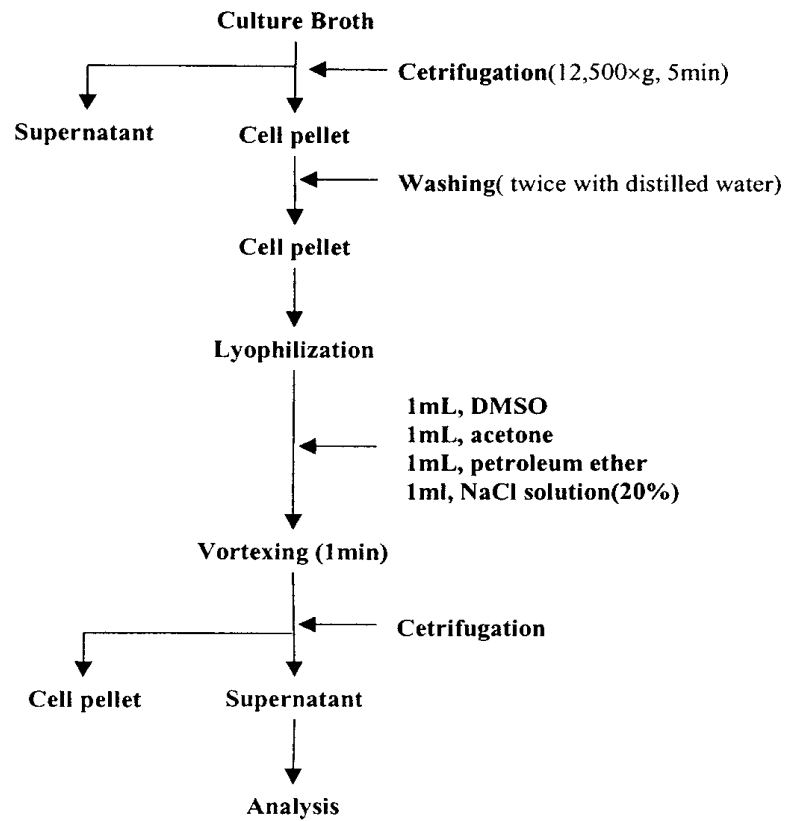


그림 2. 카로티노이드 추출과정

#### 나. 전처리 방법에 따른 카로티노이드의 추출

세포내에 존재하는 카로티노이드를 추출하기 위해서는 전처리로 물리적인 방법 또는 화학적인 방법을 통해 다당류로 구성된 단단한 세포벽을 파쇄하거나 약화시켜야만 한다. 본 실험에서는 세포벽을 약화시키기 위해 전처리 과정으로 물리적 방법인 sonicator, 화학적 방법인 열처리를 병행한 0.5N HCl, 6N HCl과 DMSO를 사용하였다. 후자의 전처리 방법에 따른 카로티노이드의 추출 효율은 표 7에 나타내었다.

표7. 화학적 처리와 열처리를 통한 카로티노이드

Chemical	Heat treatment	Extracted carotenoid ( $\mu\text{g/g}$ yeast)	Relative extraction yield (%)
0.5N HCl	no	0.46	0.2
	60 $^{\circ}\text{C}$	23.31	9.8
	100 $^{\circ}\text{C}$	58.43	24.6
6N HCl	no	0.31	0.1
	60 $^{\circ}\text{C}$	225.36	94.8
	100 $^{\circ}\text{C}$	112.80	47.5
DMSO	no	226.09	95.1
	60 $^{\circ}\text{C}$	237.67	100
	100 $^{\circ}\text{C}$	237.80	99.8

HCl을 사용한 경우 열처리를 병행하지 않으면 카로티노이드가 거의 추출되지 않았다. 열처리를 병행할 경우 0.5N보다는 6N의 진한용액을 사용한 경우가 추출효율이 높았다. 특히 6N HCl의 경우 열처리 온도에 크게 영향을 받아 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추출효율이 급격히 증대되어 225.4 mg/g-yeast 의 고농도로 카로티노이드가 추출되었다. 그러나 열처리 온도가 100 $^{\circ}\text{C}$ 가 되면 고열로 인해 카로티노이드 색소가 파괴되어 추출효율이 급격히 감소되었다. 이는 100 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 열처리를 할 경우 색소가 파괴된다는 Peterson 등의 보고와 일치하는 결과이다. 반면 DMSO를 사용한 경우는 전체적으로 카로티노이드의 추출효율이 높았으며 열처리를 한 경우와 하지 않은 경우 큰 차이를 나타내지 않았다. 결과적으로 60 $^{\circ}\text{C}$ 로 열처리를 병행하여 DMSO로 카로티노이드를 추출한 경우가 237.7mg/g-yeast로 추출효율이 가장 높게 나타났다.

Sonicator만을 사용한 경우는 열처리 유무에 무관하게 카로티노이드의 추출농도는 45.5mg/g-yeast로 추출농도가 가장 높은 DMSO와 열처리를 병행한 경우에 비하여 23.5%의 낮은 추출효율을 나타내었다. 따라서 물리적인 방법으로는 효모의 견고한 세포벽을 약화시키기 어려울 뿐 아니라 추출하는데 장시간 소요되어 좋은 방법이 아님을 알 수 있었다.

#### 다. 용매에 따른 카로티노이드의 회수영향

카로티노이드 각각의 성분들은 용매의 종류에 따라 용해도가 다르므로 용매의 선택에 따라 추출효율에 영향을 주게 된다. 본 실험에서는 7가지 용매

를 사용하여 카로티노이드를 추출하였는데 추출된 카로티노이드의 총 농도와 최대 흡수파장을 표 8에, 흡수파장 스펙트럼을 그림 3에 나타내었다. 카로티노이드 추출용매 중 가장 높은 추출 농도를 보인 용매는 diethyl ether로 350.2mg/g-yeast를 보였고, 다음은 ethanol과 petroleum ether순으로 나타났다. 이상의 결과는 *Rhodotorula rubra*의 색소를 추출하는데 hexane: ethyl acetate 용매보다 diethyl ether가 더 효과적이라는 Martin 등의 보고 내용과 일치한다. 하지만 diethyl ether는 추출 후 잔류 독성이 있기 때문에 ethanol이 카로티노이드의 추출에 더욱 적합한 용매라 할 수 있다. 추출용매에 따라 최대 흡수파장이 변하였는데 benzene과 chloroform은 최대 흡수파장이 502, 500 nm로 torularhodin의 최대 흡수파장인 501nm에 근접하여 이들이 상대적으로 많이 추출되었음을 알 수 있다. 그러나 hexane, diethyl ether, petroleum ether 등은 486-468nm로 benzene이나 chloroform에 비해 torularhodin의 상대적 추출효율이 떨어짐을 알 수 있었다. 이는 TLC에 의해 분리된 띠를 육안으로 관찰한 결과를 통해서도 확인할 수 있었다.

표 8. 용매에 따른 카로티노이드 추출효과

Solvents	Total carotenoid	$\lambda_{max}$
Petroleum ether	237.68	486
Diethyl ether	350.23	488
Hexane	190.85	488
Ethanol	260.25	494
Acetone	208.17	494
Chloroform	192.07	500
Benzene	224.82	502

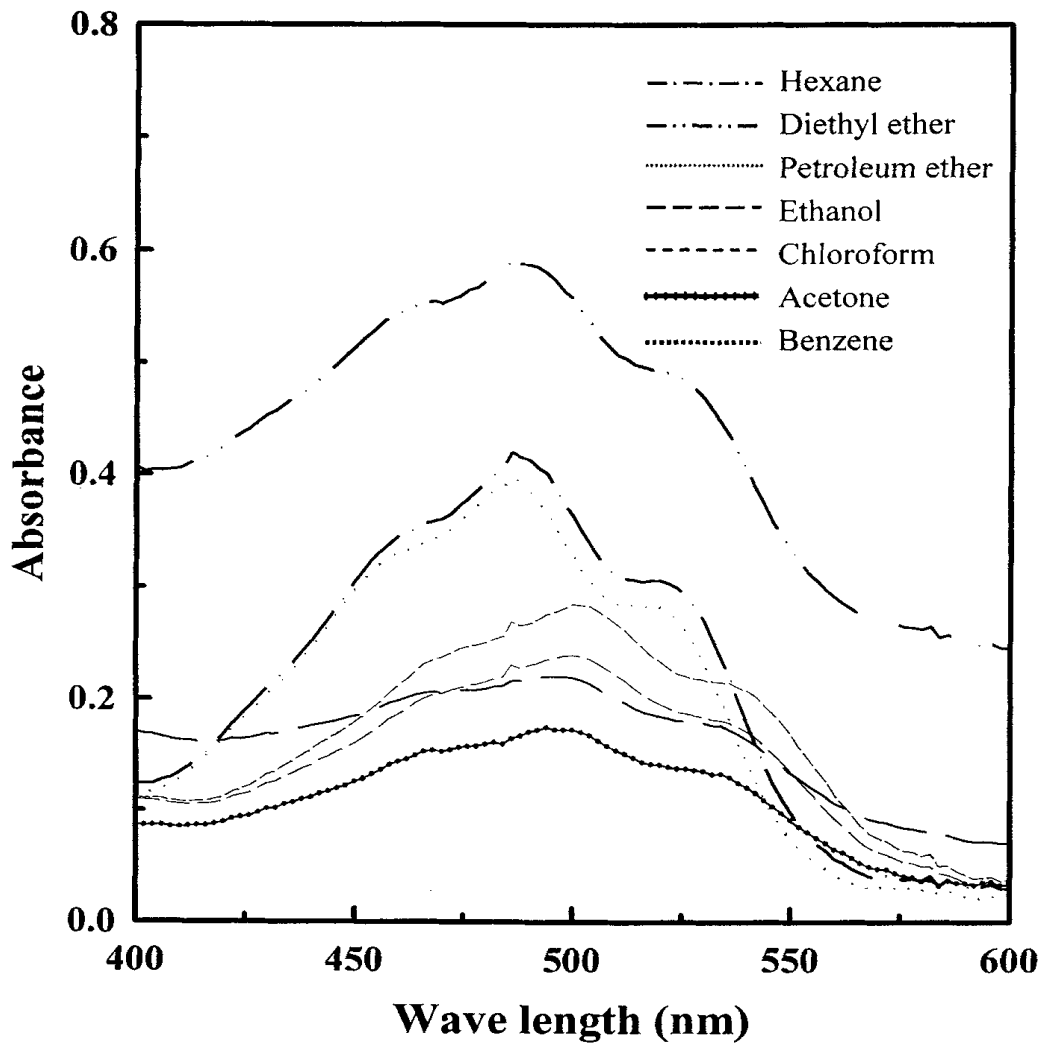


그림 3. 용매에 따른 카로티노이드경향

라. 세포의 형태에 따른 카로티노이드의 추출

동일한 조건 하에서 24시간 균체를 배양한 후 원심분리하여 회수한 다음 균체의 형태를 달리하여 카로티노이드의 추출농도를 측정하였다. 균체의 형태는 습한 상태의 세포(wet cell), 건조된 세포(dry cell), 냉동 건조된 세포(freeze dried cell)로 된 3가지를 사용하였는데 각 방법에 따른 균체 중량의 영향을 없애기 위해 배양액의 부피당 추출된 카로티노이드의 중량으로 측정하였다. 그 결과 카로티노이드의 추출농도는 냉동 건조된 세포가 1,115.6 mg/L 로 가장

높았으며 다음은 건조된 세포, 습한 세포의 순으로 각각 993.9mg/L, 707.7mg/L 인 것으로 나타났다. 이는 습한 세포에 비해 냉동 건조된 세포가 1.6배, 건조세포는 1.4배정도 카로티노이드의 추출 촉진효과가 있는 것이다. 이는 건조 또는 냉동 건조시켜 세포로부터 수분을 가능한한 제거해 줌으로서 용매가 세포내로 용이하게 침투되었기 때문에 나타난 결과라 판단되었다. 유사한 결과로 Osborne 등은 색소를 추출하기 이전에 무수 MgSO<sub>4</sub>로 세포를 탈수하여 보다 높은 색소가 추출됨을 보고하였다. 따라서 건조과정이 카로티노이드 추출 이전에 필수적인 요소임을 알 수 있었다.

### 3. *Rhodotorula glutinis* 카로티노이드 조성 검토

가. TLC plate를 이용한 카로티노이드 조성

*Rhodotorula glutinis*를 YM배지(GLC, 1%; Peptone, 0.5%; Yeast extract, 0.3%; Malt extract, 0.3%)에서 48시간 배양한 후 위의 추출과정을 거친 후 카로티노이드의 정성을 하였다. TLC plates(Kieselgel 60 F254, Merck)를 사용하였다. 전개용매는 30%의 acetone과 70%의 hexane을 사용하였다. 전개된 TLC plates는 다음과 같다. β-carotene, torulene과 torularhodin의 성공적으로 분리 되었으면 각 각의 R<sub>f</sub>값은 0.97, 0.95와 0.35순으로 나타났다(그림 4).

표 9. 로도토룰라 글루티니스의 카로티노이드의 비

Carotenoids	R <sub>f</sub>	Color	Spectra(λ <sub>MAX</sub> )
			In PE*
A; <i>Torularhodin</i>	0.35	Red	501
B; <i>Torulene</i>	0.95	Orange	484
C; β-carotene	0.97	Yellow	450

\* : petroleum ether

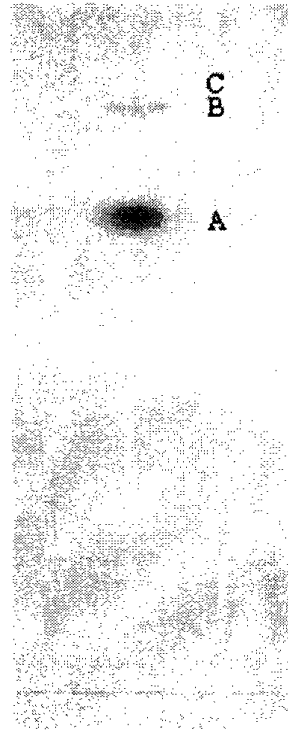


그림 4. TLC를 통한 색소분리

#### 나. HPLC를 이용한 카로티노이드의 조성

본 연구에 사용된 균주는 자색을 띠는 효모로서 주요 산물로 세포 외 지질과 세포 외 다당류를 생성하였다. 카로티노이드의 생성을 확인하기 위해 균주를 YM배지에서 3일 동안 배양하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포로부터 용매를 이용하여 색소를 추출하였으며 이를 TLC상에서 전개시킨 결과 그림 4에 서와 같이 3개의 띠가 나타났는데, 이들은 자색의 극성 색소와 노랑색과 주황색의 비극성 색소임을 알 수 있었다. 이들 분리된 각 분획을 다시 용매에 녹여 흡광도를 측정하여 최대흡수파장을 조사함으로써 각각의 색소를 동정한 결과 최대흡수파장이 각각 450nm, 484nm, 501nm 인 b-carotene, torulene, torularhodin이었다(그림 5,6). HPLC를 통해 정량 분석한 결과 전체 색소 중에서 torularhodin이 61.7%로 가장 많았고 b-carotene과 torulene순으로 각각 28.8%, 9.5%를 나타내 colony색의 대부분을 torularhodin이 점유하고 있음을 알 수 있었다. 추출된 카로티노이드를 HPLC를 이용하여 조성을 조사하였다.

극성인 카로티노인 torularhoin이 가장 먼저 용출되며 torulene과  $\beta$ -carotene 순으로 검출되었다. 각각의 조성을 보면 torularhodin이 79.5%, torulene이 6.4%,  $\beta$ -carotene인 15.1%을 보였다.

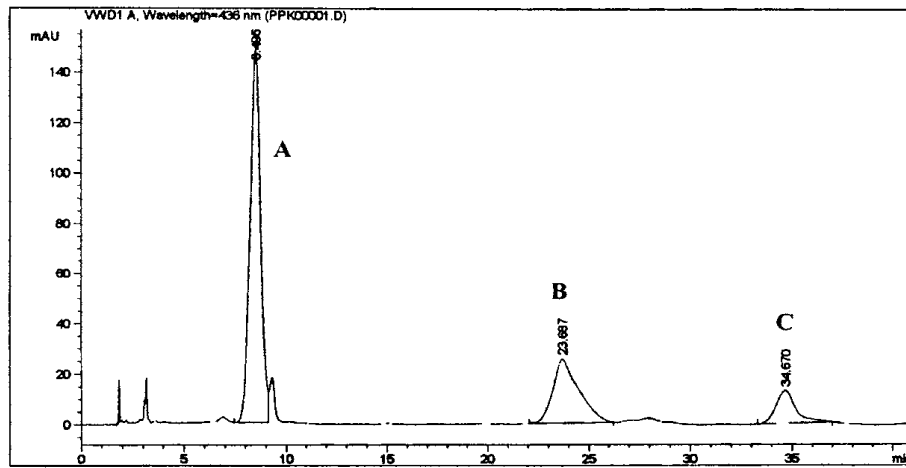


그림 5. 로도토룰라 글루티니스에서 카로티노이드의 HPLC 분석  
(A. torularhodin, B. torulene , C.  $\beta$ -carotene, )



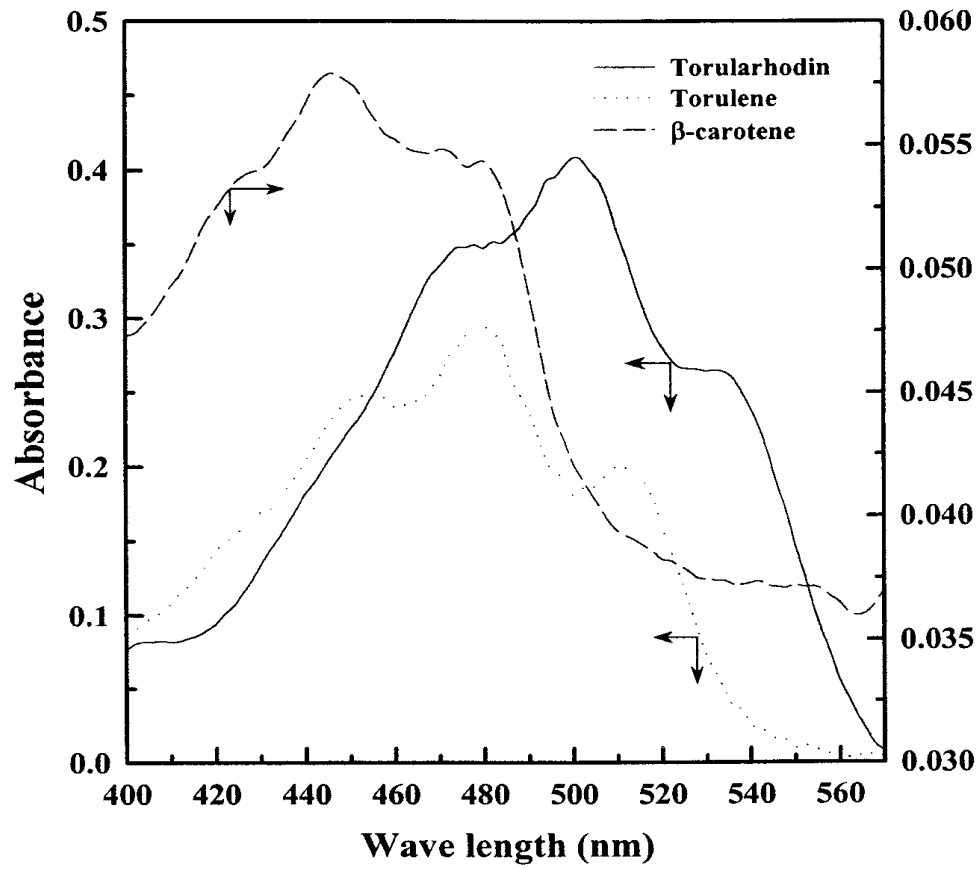


그림 6. 로도토룰라 글루티니스로부터 토룰라후딘, 토룰린,  $\beta$ -카로틴의 흡수스펙트럼

#### 4. 경제성 있는 복합배지의 개발

*R. glutinis*를 이용하여 카로티노이드의 생합성 농도를 극대화하기 위해서는 산업적인 규모를 만족시켜야한다. 이에 따라 본 연구에서는 탄소원으로 sugar cane molasses를 선택하였고 이는 사탕수수에서 설탕을 만들고 남은 부산물로 sugar cane molasses를 사용하였다. 이의 분석은 표 10과 같다.

표 10. 당밀의 조성분석

Materials	분석치 (%)	분석기기
sucrose	33	HPLC
glucose	7.2	HPLC
fructose	9.5	HPLC
TS(%)	64.88	
ASH(%)	7	
Cl <sup>-</sup>	1.263	IC
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.804	IC
Na <sup>+</sup>	0.019	AAS
K <sup>+</sup>	2.38	AAS
Mg <sup>2+</sup>	0.37	AAS
Ca <sup>2+</sup>	0.37	AAS
Fe <sup>2+</sup>	0.004	AAS
Mn <sup>2+</sup>	0.005	AAS

일반적으로 "산업용 당밀"에는 사탕수수 당밀, 사탕무우 당밀, 제당 당밀, 전분 당밀, 감귤 당밀, 헤미셀룰로즈 추출물(목재당밀) 및 수수 당밀이 포함되며 사탕수수와 사탕무우로 부터 생산되는 설탕 1억톤의 35%인 3천 5백 만 톤의 당밀이 연간 생산된다. 또한 질소원도 저가의 기질인 urea를 사용하였다. 일반적으로 미생물을 이용한 carotenoid 생산은 배양조건에 따라 변화할 수 있다. 배양조건들은 탄소원, 질소원, 무기염류, pH, 온도, rpm 등 여러 가지를 고려

할 수 있다. 본 연구에서는 전보에서 보고한 내용을 바탕으로 배양조건 중 SCM(Sugar cane molasses), Urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl와 pH를 영향인자를 선택하였다. 또한 전통적인 접근 방식인, 즉 다변수가 있을 때 한 개의 변수만 변화시키므로 변수간의 상호작용(interaction)을 전혀 감지하지 못하므로 통계적인 방법(statistical approach)을 통하여 보다 빠르고 정확하게 반응치인 volumetric carotenoid를 수치화하였다.

## 5. Fractional Factorial Design을 이용한 영향인자 조사

본 실험에서는 통계적 방법을 이용하여 산업용 배지인 molasses를 기질로 사용하였을 때 carotenoid 최대 생산을 위한 배양조건을 조사하여 최적화된 배양조건을 확립하는데 있다. 일반적으로 carotenoid의 생성은 배양조건에 따라 다양하게 변화된다. 따라서 본 실험에서는 배양조건 중 SCM(sugar cane molasses), urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl와 pH를 영향인자로 보고 Fractional Factorial Design(FFD, 일부실시설계)을 이용하여 표 11와 같이 20번 실험하였다. FFD는 영향인자에 대한 정보를 얻기 위하여 의미가 적은 고차의 교호작용을 희생시켜 실험의 횟수를 작게 할 수 있도록 인자의 조합 중 일부만을 실험하는 방법이다.

영향인자의 농도범위는 문헌상을 기준으로 다음과 같이 사용하였다. SCM은 1 - 3%(wt%), urea는 0.1 - 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 는 0 - 0.3%, NaCl은 0 - 0.3%와 pH는 4 - 7까지 변화시켰다. C/N 비는 2 - 30까지 변화시켰을 때 cell mass, cellular carotenoid와 volumetric carotenoid를 경향을 조사하였다.

Cell mass는 SCM이 증가할수록 크게 증가하여 최대 11.90 g/L의 높은 세포 농도를 유지하였다(run 7). 이때 생합성 수율( $Y_{x/s}$ )은 39.67%였다. 반면 SCM의 농도가 감소하면 cell mass 양이 급격히 감소하여 최소의 세포농도 1.74 g/L을 보였다(run 1). 따라서 SCM의 농도는 세포성장에 크게 영향을 주는 것으로 생각된다. 또한 C/N 비에 따라 세포농도와 carotenoid 생합성능이 크게 변화하였다.

C/N비가 10보다 증가할수록 cell color은 빨강색을 띠었으며 높은 세포농도를 유지하였다(run 3, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 19). 또한 carotenoid 함량도 250 $\mu\text{g/g}$ 로 높은 함량을 보였다. 반면 C/N비가 감소할수록 cell color는 밤색을 띠면 낮은 세포농도와 carotenoid 생산성을 보였다(그림 7). 본 연구결과로 C/N비가

세포성장에 크게 영향을 주는 인자임을 알 수 있었다. Carotenoid 생합성에 주요 영향인자인 SCM, Urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl와 pH를 선정하였다. FFD분석의 중요한 목적은 각각의 독립변수에 대해 종속변수인 volumetric carotenoid 생산성에 영향을 주는 주요 영향인자(main effect)를 screening하는 실험기술로 response surface method 방법(최적화 작업) 이전에 사용되는 기술이다. 본 실험에서는 분산분석(analysis of variance)결과 표 12과 같다. 모형식의 P-value가  $4 \times 10^{-3}$ 으로 신뢰구간 99.96% 이상의 범위에 있다는 것을 알 수 있어 상당히 유의한(significance)결과를 보였다. 변수 변화량(CV)의 값이 28.11이고,  $R^2$ 는 77.33%이므로 volumetric carotenoid의 실제 값과 예상한 값이 약간의 오차가 있음을 알 수 있다.

표 11. 반응변수에 따른 cell mass, cellular carotenoid와 volumetric carotenoid의 실험실계

Run	SCM (%)	Urea (%)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	NaCl (%)	pH	Final pH	Cell mass (g/L)	Cellular Carotenoid (ug/g)	Volumetric Carotenoid (mg/L)	C/N
1	1	0.5	0	0	4	9.09	1.74	279.77	0.49	2
2	1	0.5	0.3	0	7	9.12	2.63	393.44	1.03	2
3	1	0.1	0.3	0.3	7	8.27	4.40	269.03	1.18	10
4	2	0.3	0.15	0.15	5.5	8.78	5.55	161.45	0.69	6.7
5	3	0.5	0.3	0.3	7	8.89	8.01	159.33	1.28	6
6	2	0.3	0.15	0.15	5.5	8.81	5.79	170.33	0.99	6.7
7	3	0.1	0.3	0	7	7.56	11.90	217.43	2.59	30
8	1	0.1	0	0.3	4	8.15	3.87	201.98	0.78	10
9	3	0.1	0	0	4	6.67	11.30	201.09	2.27	30
10	3	0.5	0	0.3	4	8.74	7.32	217.68	1.59	6
11	3	0.1	0.3	0.3	4	5.64	9.81	250.28	2.46	30
12	2	0.3	0.15	0.15	5.5	8.77	5.71	188.84	1.08	6.7
13	1	0.1	0.3	0	4	6.88	4.67	310.31	1.45	10
14	3	0.5	0	0	7	8.86	7.54	220.45	1.66	6
15	1	0.1	0	0	7	8.34	4.28	297.14	1.27	10
16	1	0.5	0	0.3	7	9.04	2.28	299.68	0.68	2
17	1	0.5	0.3	0.3	4	9.01	3.63	192.00	0.70	2
18	3	0.5	0.3	0	4	8.74	9.51	166.65	1.58	6
19	3	0.1	0	0.3	7	7.41	11.62	251.43	2.52	30
20	2	0.3	0.15	0.15	5.5	8.75	5.42	156.45	0.85	6.7

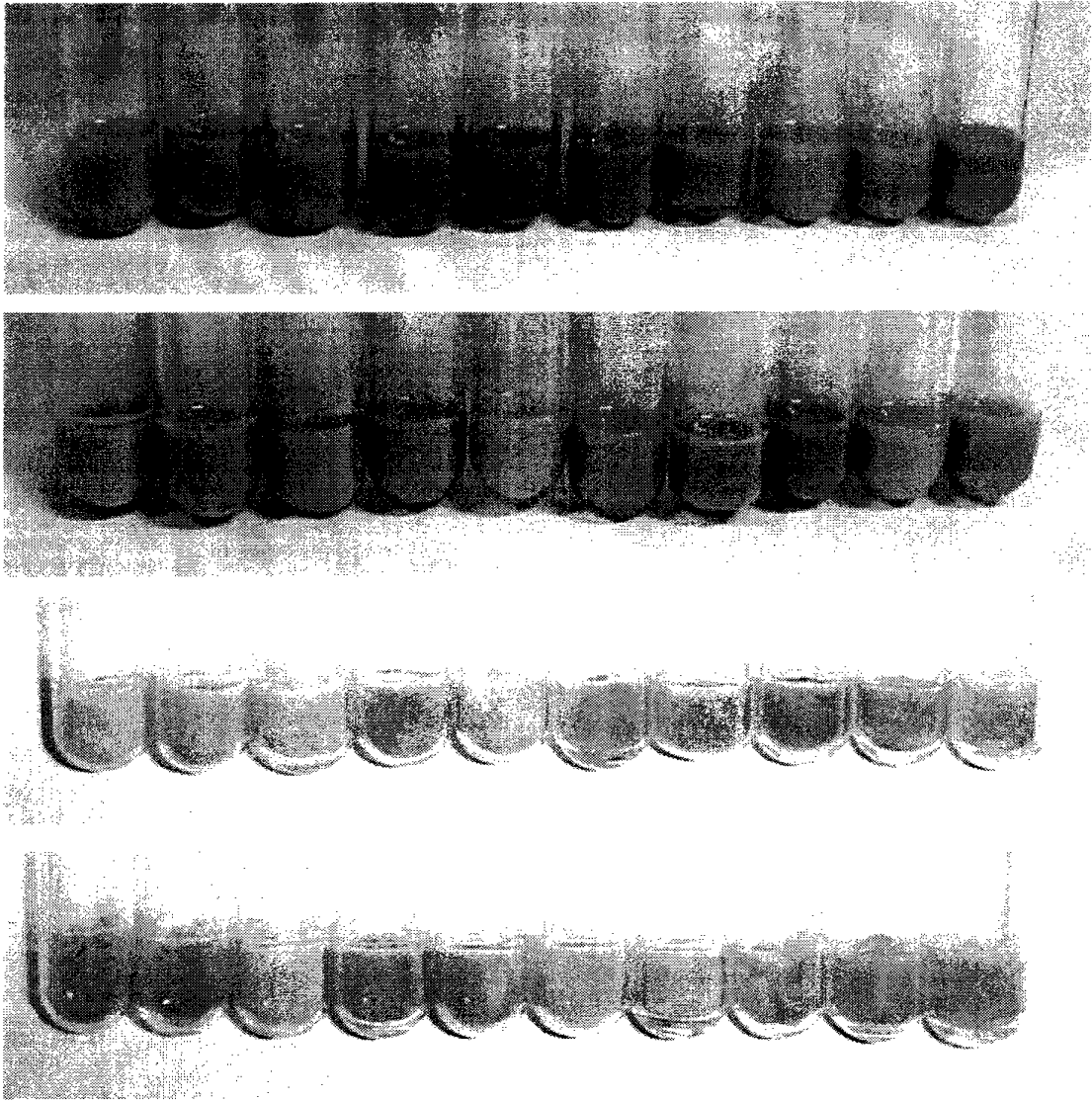


그림 7 . 당밀 배양후 건조세포색깔의 변화  
A; freezed before, B ; freezed after

표 12. Fractional factorial design(FFD)에 의한 분산분석

ANOVA for the Quadratic Model						
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob> F	
Model	7.15	5	1.43	9.55	0.0004	significant
Residual	2.10	14	0.15			
Cor total	9.25	19				

Std. Dev	0.39	R-Squared	0.7733
Mean	1.38	Adj R-Squared	0.6923
C.V	28.11	Pred R-Squared	0.5865
Press	3.82	Adeq R-Squared	9.859

또한, 그림 8에서12는 volumetric carotenoid에 영향을 주는 5가지 영향인자에 대한 response plot과 contour로 표현할 수 있다. 그림 8은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl과 pH를 고정하였을 때 SCM과 urea에 대한 경향을 보여준다. SCM이 증가할수록 volumetric carotenoid함량은 급격히 증가하였으나 urea의 증가는 오히려 volumetric carotenoid생성을 저해하는 결과를 보였다. 반면 urea의 농도가 감소할수록 volumetric carotenoid양은 급격히 증가하였다. 따라서 SCM과 Urea는 volumetric carotenoid와 상호작용이 존재함을 알 수 있다. 그림 9. 은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , urea과 pH를 고정하였을 때 SCM과 NaCl의 volumetric carotenoid의 경향을 보여준다. SCM의 농도가 증가할수록 volumetric carotenoid는 증가하였으며 NaCl의 농도의 증가는 반응치인 volumetric carotenoid 생합성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 반면 Urea농도의 감소는 높은 반응치를 보였다(그림. 11). 또한 반응치에 대한 초기 pH의 영향을 보면 거의 영향을 미치지 않는다(그림. 10, 12). 반면 SCM의 농도와 Urea의 농도는 반응치에 크게 영향을 주었다. 농도변화는 반응치에 크게 영향을 주어 최대 2.4mg/L를 생합성되었다. 아래 그래프들을 분석한 결과 NaCl과 pH의 영향이 미비하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 다음 실험에서는 C/N와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 조건을 변화시켜 실험을 실시하였다.

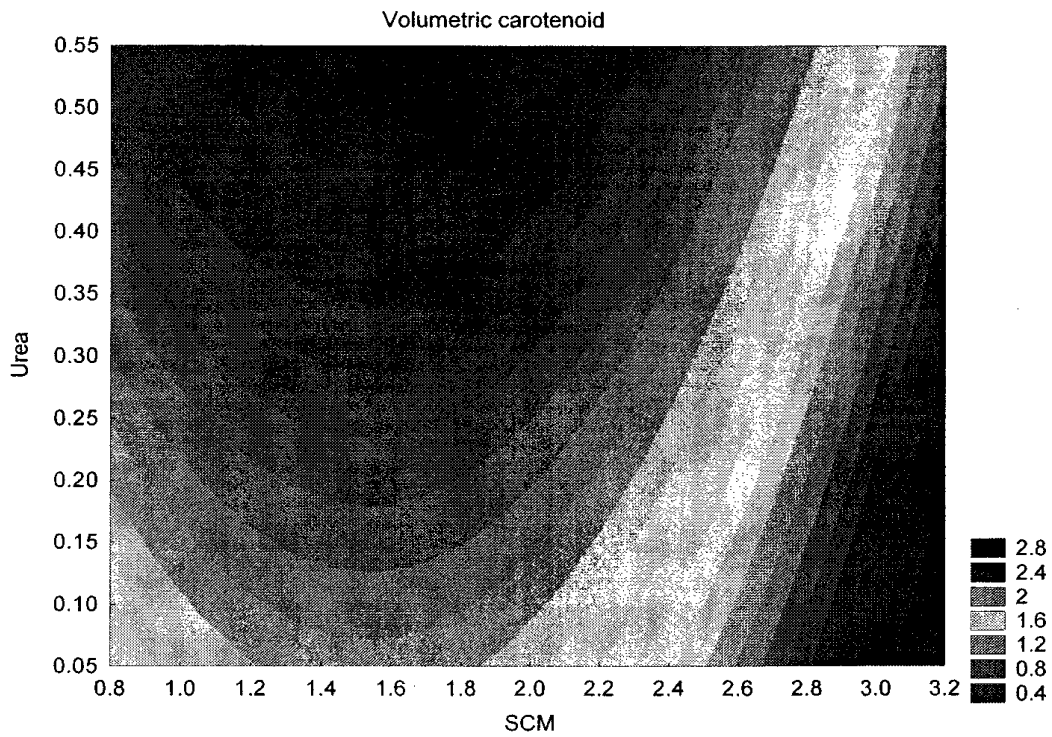
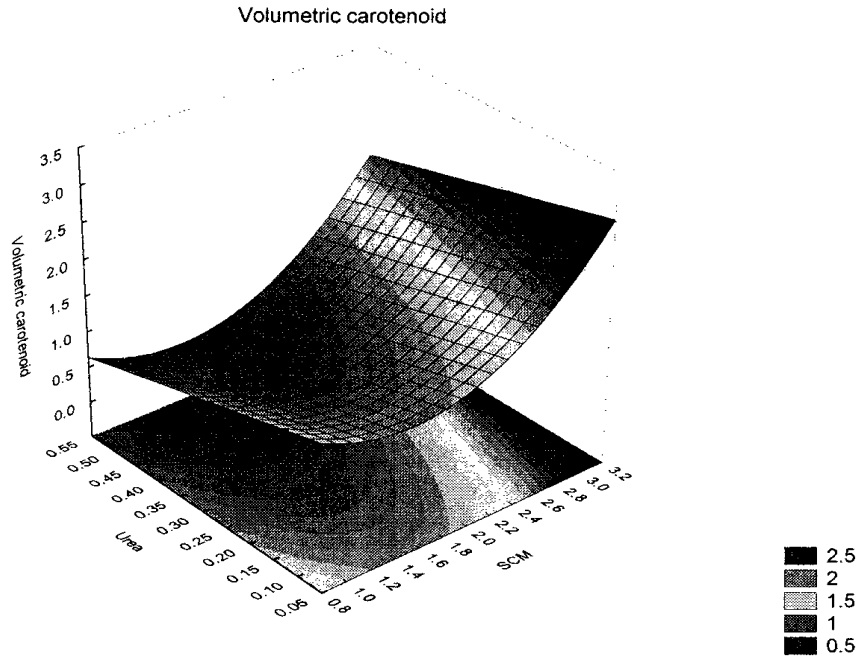


그림 8. SCM 과 Urea 의 상호관계 (Fixed  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, pH)



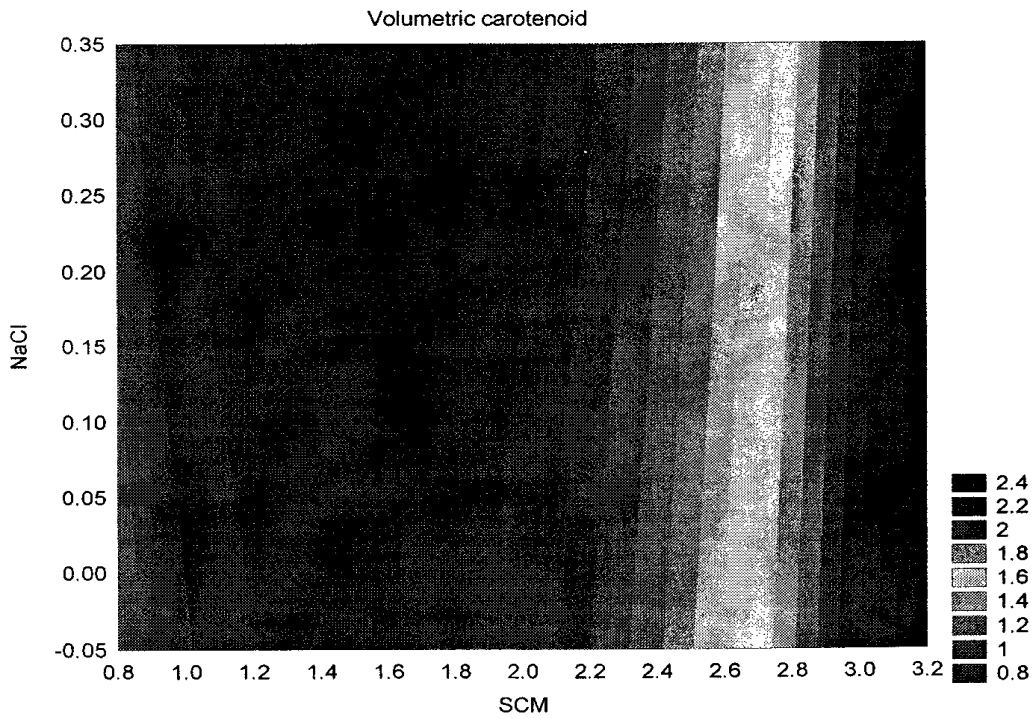
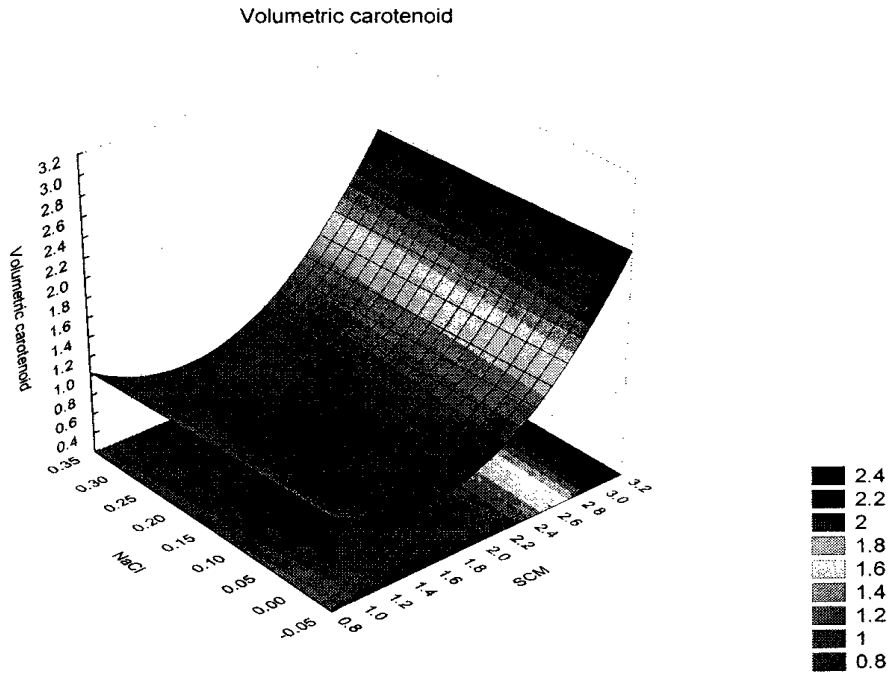


그림 9. SCM와 NaCl의 상호관계 (Fixed  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Urea, pH)

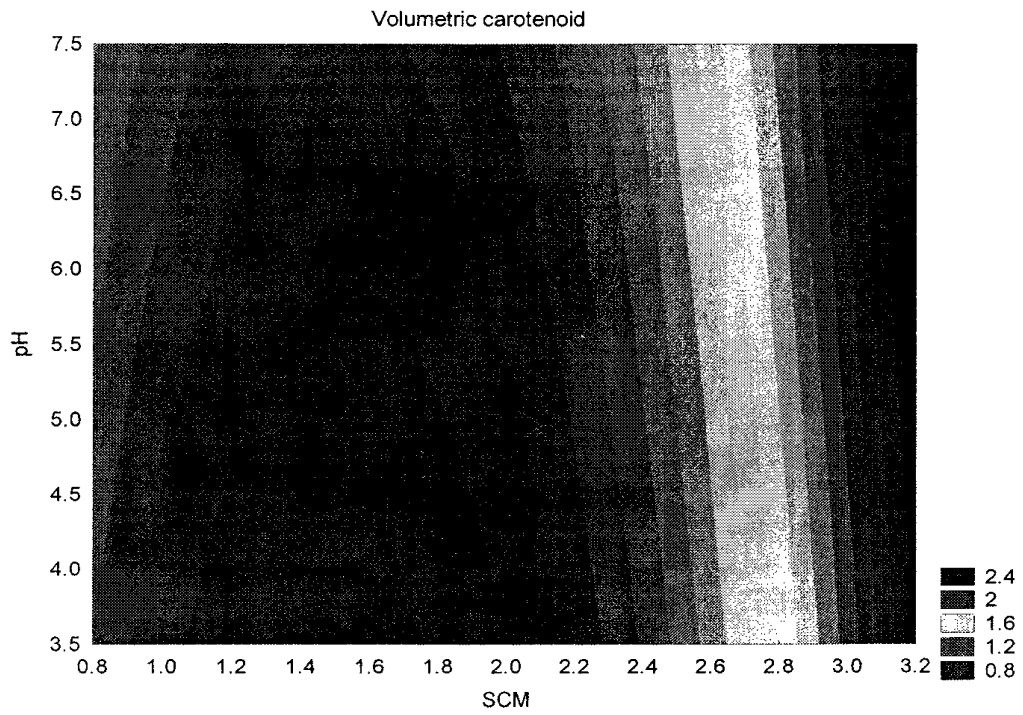
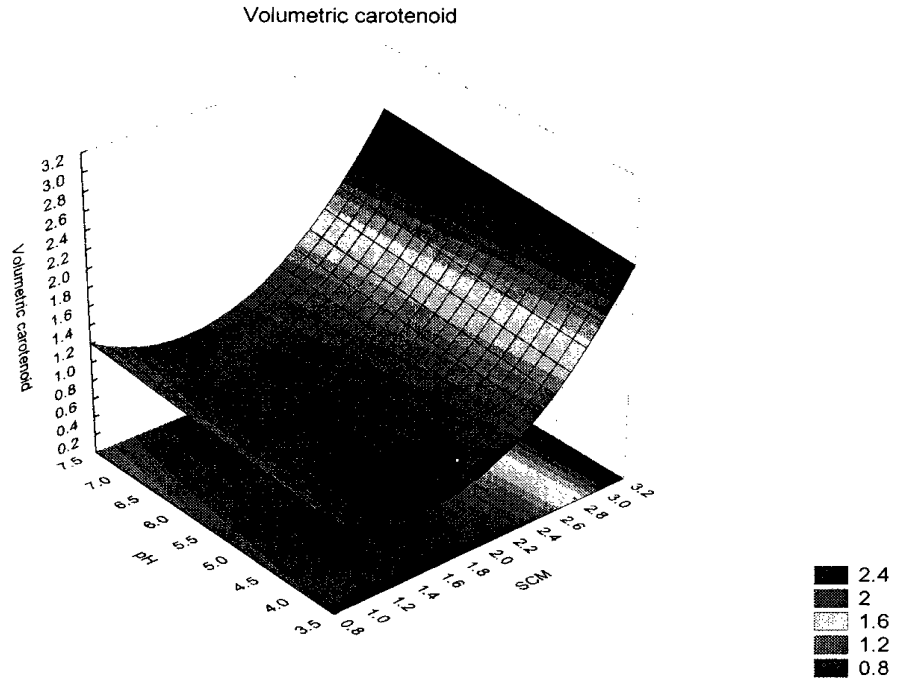


그림 10. SCM와 pH의 관계 (Fixed  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, Urea)

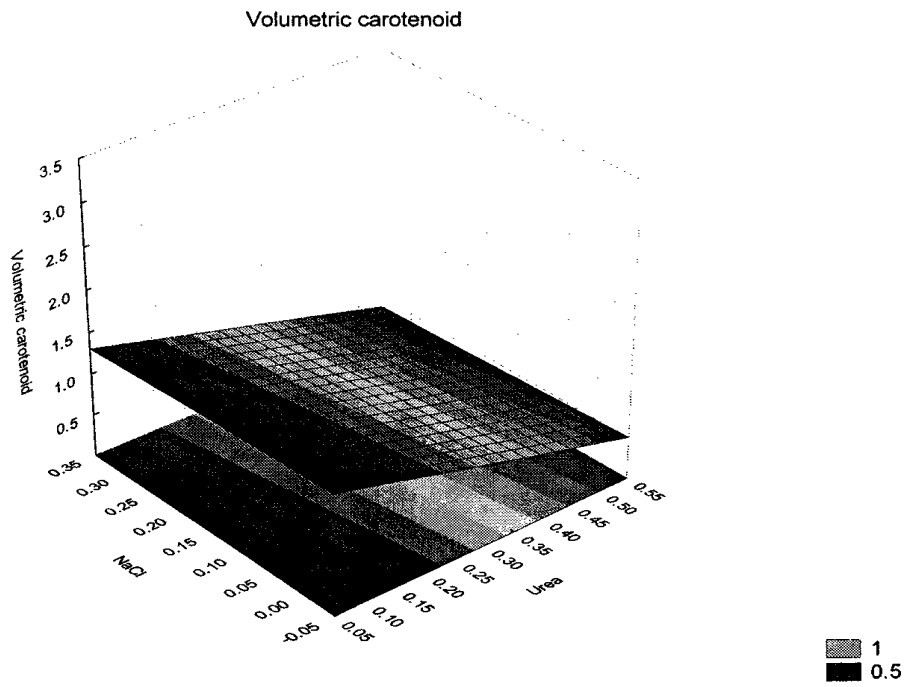


그림 11. Urea와 NaCl의 상관관계 (Fixed SCM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH)

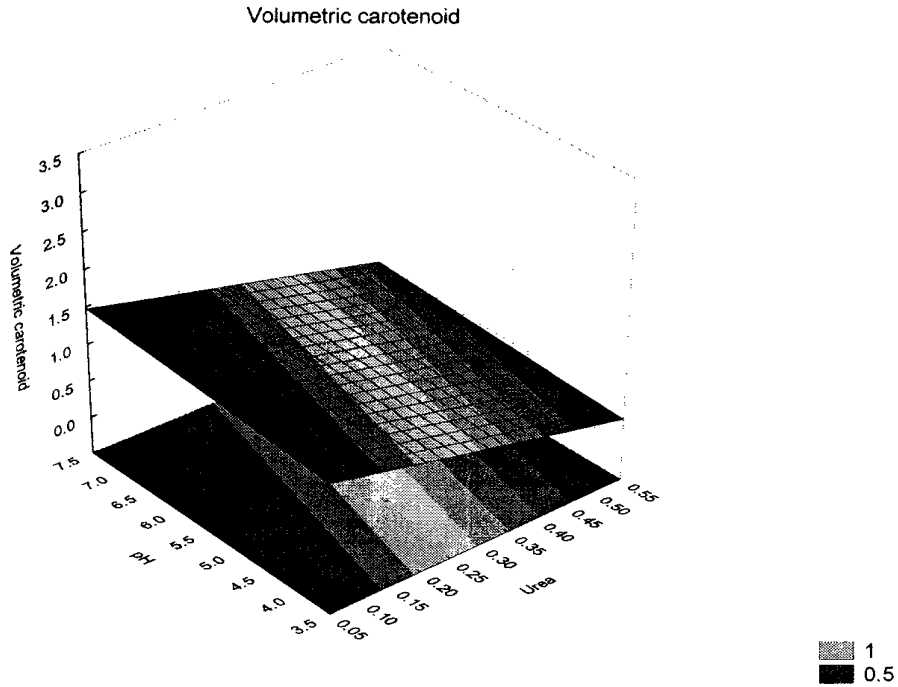


그림 12. Urea와 pH의 상관관계 (Fixed SCM, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

#### 6.. Response Surface Method를 이용한 배양조건의 최적화

FFD방법을 이용하여 volumetric carotenoid에 영향인자인 C/N비와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 선정하여 반응표면분석기법을 이용하여 최적화하였다. 독립변수 변화가 volumetric carotenoid에 미치는 영향을 response surface method를 이용하여 분석하였다. 반응 표면 분석의 중요한 목적은 각각의 독립변수에 대해 종속변수인 volumetric carotenoid 생산성과의 상관관계를 구해 어떠한 영향을 주는지 모니터링하고 높은 carotenoid 생산을 위한 최적배양조건을 결정하는데 있다. 따라서 다음의 식은 least square method에 의해 실험적 data를 얻는데 적합한 일반식이다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \varepsilon$$

다음에 나오는 각각의 변수에 대한 회귀 계수들은 측정 가능하다.

$\beta_0$  - a constant(intercept)

$\beta_1$  - the parameter describing the linear relationship of variable  $x_1$  (culture time) with Y(the dependent variable: enzyme activity or biomass)

$\beta_2$  - the parameter describing the linear relationship of variable  $x_2$ (level of carbon source in the medium) with Y

$\beta_{11}$  - the parameter describing the curvilinear(quadratic) relationship of  $x_1$  with Y

$\beta_{22}$  - the parameter describing the curvilinear(quadratic) relationship of  $x_2$  with Y

$\beta_{12}$  - the parameter describing the linear relationship between  $x_1$  and  $x_2$  in their relation to Y

$\varepsilon$  - residuals

다중 회귀 방정식에서의 독립변수는  $x_1, x_2$ 이다.

$x_1$  - the component in the medium

$x_2$  - the culture time

반응표면분석에 의한 분리조건을 최적화하기 위하여 C/N( $X_1$ ),  $KH_2PO_4$ ( $X_2$ )의 2가지 조건을 요인 변수로 놓고 cell mass concentration과 volumetric carotenoid를 반응치로 하여 상호관계를 수식 모델(second order polynomial equation)로 분석한 결과 회귀식(regression model)은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$\text{Cell mass concentration} = 9.12 + 0.0581C/N + 1.09KH_2PO_4 - 0.0221 C/N * KH_2PO_4$$

$$\text{Volumetric carotenoid} = 0.88145 + 0.073395C/N - 0.18635KH_2PO_4 - 9.50312E-004C/N^2 + 0.068321KH_2PO_4^2$$

즉

$$\text{Cell mass concentration (g/L)} = 11.5 + 0.550X_1 + 0.721X_2 - 0.736X_1 \cdot X_2$$

$$\text{Volumetric carotenoid (mg/L)} = 0.88145 + 0.073395X_1 - 0.18635X_2 - 9.50312E-004X_1^2 + 0.068321X_2^2$$

표 14.의 분산분석표를 살펴보면 모델식의 P-value가  $2.86 \times 10^{-2}$ 로 신뢰구간 97.647% 이상의 범위에 있다는 것을 알 수 있다. 변수 변화량(CV)의 값이 13.46이고, R<sup>2</sup>는 89.90%이므로 volumetric carotenoid의 실제값과 예상한 값이 약간의 오차가 있음을 알 수 있다.

표 15. 에 따르면 volumetric carotenoid의 최적 생산 조건은 C/N 50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g으로 나타났으며 주어진 조건에서의 volumetric carotenoid의 생성량은 실제 실험에서도 거의 일치하였다.

표 13. Design of variables with cell mass, cellular carotenoid and volumetric carotenoid as response

Run	C/N	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Cell Mass (g/L)	Cellular Carotenoid (µg/g yeast)	Volumetric Carotenoid (mg/L)
1	50	1.5	12.4	385.54	4.78
2	4	1.5	11.13	101.43	1.13
3	50	3	11.83	378.51	4.87
4	50	0.1	11.29	404.04	4.56
5	27	1.5	12.01	293.72	3.53
6	4	0.1	8.78	193.52	1.7
7	4	3	12.26	85.36	1.05
8	27	0.1	11.5	351.94	4.05
9	27	3	11.85	540.64	6.41

표 14. Analysis of variance for response surface model :

AVONA for the Quadratic Model						
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob> F	
Model	2.10	4	0.53	8.90	0.0286	significant
Residual	0.24	4	0.059			
Cor total	2.34	8				

Std. Dev	0.24	R-Squared	0.8990
Mean	1.81	Adj R-Squared	0.7979
C.V	13.46	Pred R-Squared	0.4885
Press	1.20	Adeq R-Squared	6.609

표 15. The Volumetric carotenoid relative as compare experiment data and predicted by the models.

No.	C/N	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Volumetric carotenoid(mg/L)	
			Prediction	Experiment
1	50	1.5	4.20	4.79
3	50	3	4.98	4.87
4	50	0.1	4.65	4.56

그림 13. 에서는 반응치가 cell mass인 경우로 C/N 비가 증가함에 따라 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도변화가 반응치인 cell mass에 가장 큰 영향을 줄 수 있다. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 1.5%이상 3.5%이하일 때 가장 높은 세포농도인 12g/L를 보였다. 또한 C/N 비와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도변화에서 volumetric carotenoid의 영향을 조사하였다(그림 14). C/N 비가 30~50 사이일 때 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 높거나 낮을 수록 반응치인 volumetric carotenoid가 최대 6mg/L로 높은 경향을 보였다. 즉 C/N 비가 10이하일 때는 volumetric carotenoid가 거의 생성되지 않았다. 따라서 C/N비의 영향이 주요한 인자임을 알 수 있다.

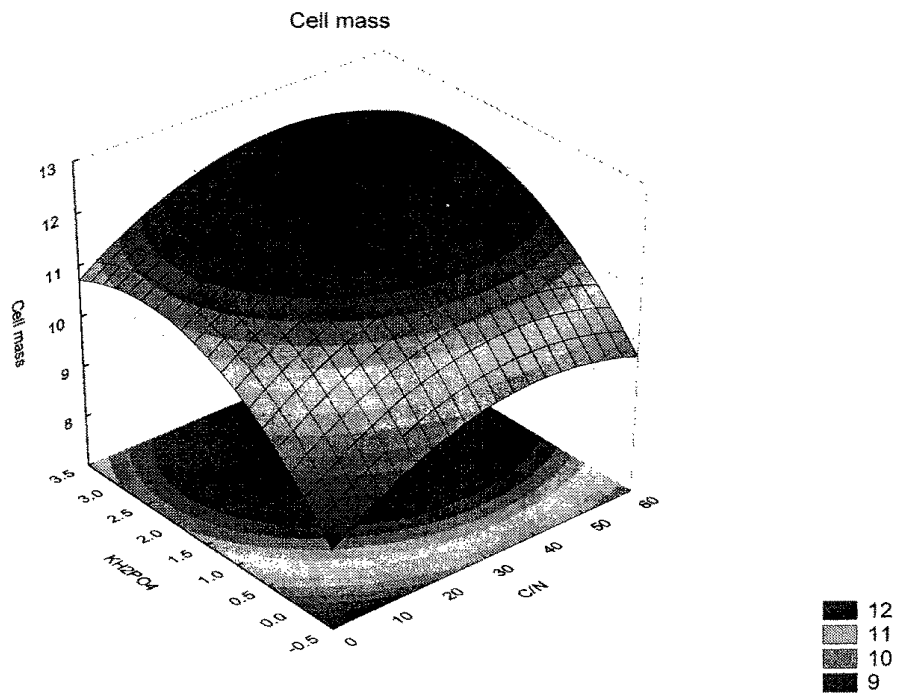
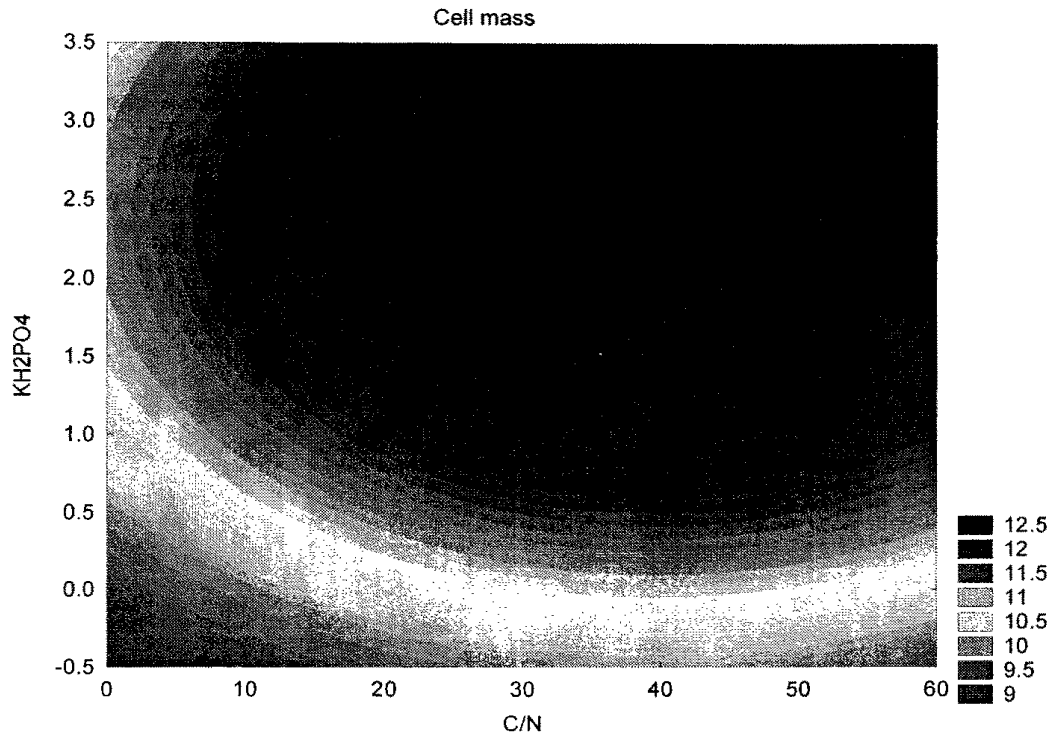


그림 13. The relation of C/N and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> according to cell mas



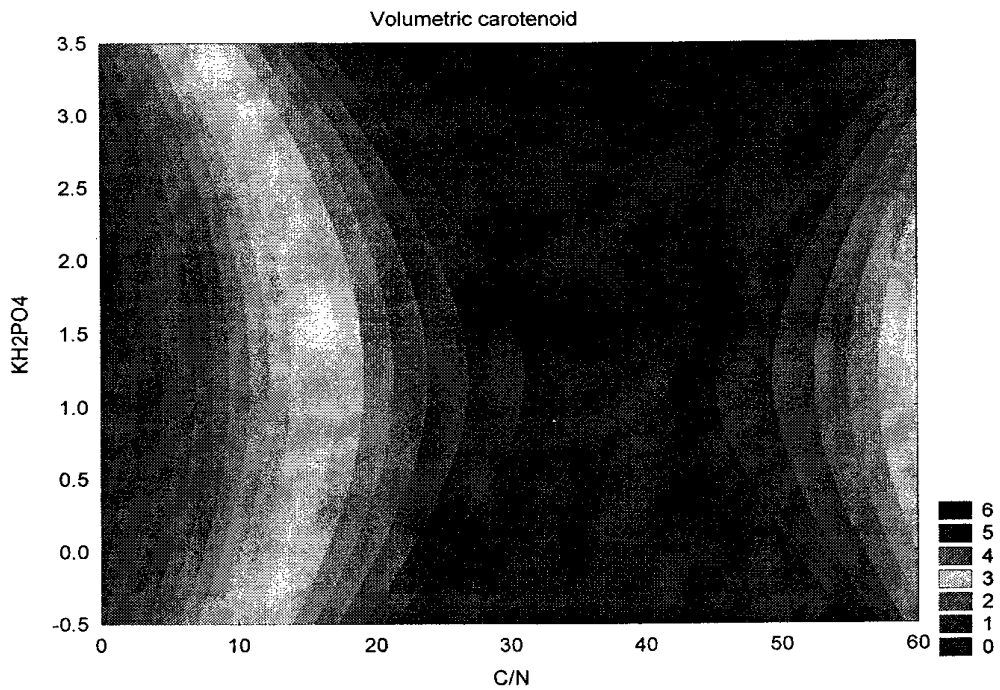
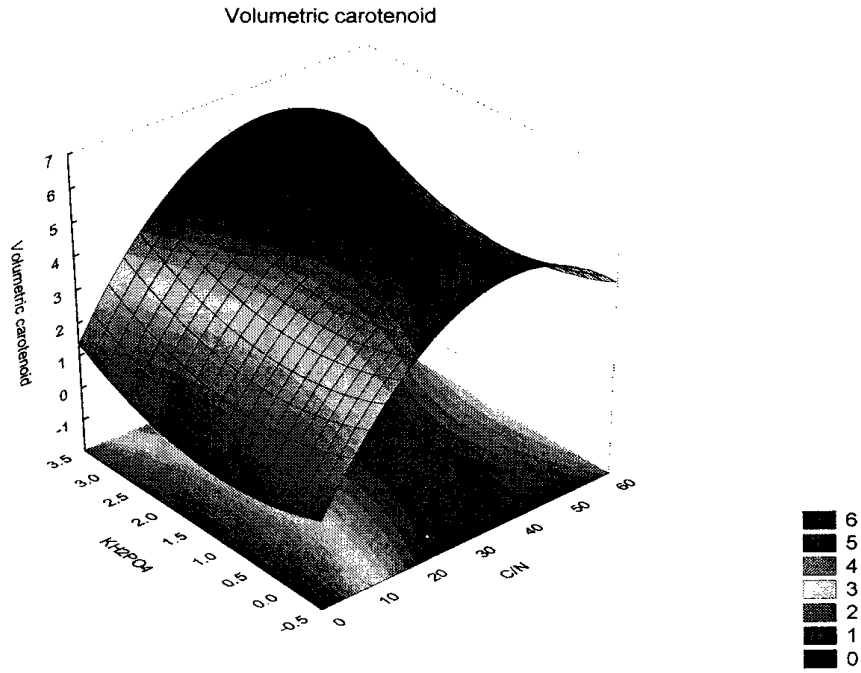


그림 14. The relation of C/N and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  according to volumetric carotenoid

7. 당밀과 urea의 농도변화에 따른 인의 영향조사

당밀 내에는 많은 영양분이 포함되어있다. 이중 효모성장에 필수적인 당분과 무기염류 등이 상당량 포함되어있다. 하지만 당밀 내에는 세포성장에 필요한 인(phosphate)가 소량 존재하기에 인위적으로 인을 첨가시켰을 때 세포성장과 카로티노이드 생산성을 비교 검토하였다. 그 결과는 표 16과 같다. 발효액에는 당밀외에 urea과 NaCl을 첨가하여 C/N ratio, 즉, urea 농도는 0.1%로 고정시키고 당밀 농도를 0.5-4%까지 변화시켰다. 당밀의 농도 즉, C/N ratio에 따라서 세포농도는 최대 11.62g/L, 세포내 카로티노이드 축적량은 292.43µg/g 보였다. 반면 당밀을 4% 첨가하는 세포성장과 카로티노이드생산성도 저해를 받을 수 있었다.

따라서, 당밀 농도가 3%일 때 가장 높은 세포성장과 카로티노이드생산성을 보였기에 이 후에는 3%로 고정하고 urea농도를 0.06%-1.5%까지 변화시켜 세포성장과 카로티노이드생산성을 조사하였다(표 17). urea는 가장 값싼 질소원으로서 산업체에서 많이 이용된다. urea의 농도변화에 따른 세포성장은 0.1%일때 가장 높은 세포성장을 보였다. 0.3%이상에서는 세포성장에 크게 저해를 줄 수 있었다. 또한 이 결과로부터 건조세포중량과 세포 내 카로티노이드 축적량과 선형적인 관계는 없는 것을 조사되었다. 이는 다양한 배양조건에 따라 세포성장과 카로티노이드 합성경로가 변화함을 알 수 있다.

표 16. Effect of sugar cane molasses(SCM) on the carotenoid production(1)

	SCM (%)	Cell mass (g/L)	Cellular Carotenoid (µg/g yeast)	Volumetric Carotenoid(mg/L)
Urea 0.1%	0.5(5(2))	2.61	160.97	0.42
	1(10)	4.29	228.31	0.98
	2(20)	7.91	292.38	2.31
	3(30)	11.62	251.43	2.92
	4(40)	10.24	216.08	2.21

(1) Condition : fixed urea, change SCM, NaCl 0.3%, pH 7.0

(2) C/N ratio

표 17. Effect of urea on the carotenoid production(1)

	Urea (%)	Cell mass (g/L)	Cellular Carotenoid (g/g yeast)	Volumetric Carotenoid (mg/L)
SCM 3%	0.06(50(2))	9.72	120.14	1.17
	0.1(30)	11.62	251.43	2.92
	0.3(10)	8.93	203.59	1.82
	0.5(6)	5.16	219.20	1.13
	1.5(2)	2.90	200.17	0.58

(1) Condition : fixed SCM, changed urea, NaCl 0.3%, pH 7.0 ;

(2) C/N ratio

#### 8. 효모의 대량생산

효모의 대량생산은 baker's yeast를 생산하면서 많은 진보를 가져왔다. 특히 fed-batch배양은 화학공정에서 가장 많이 사용되고 있다. Fed-batch culture란 Yoshida 등 (1973)에 의해 도입되었는데 계속적으로 영양분을 공급해주는 회분식 배양 방법을 일컫는 말이다.

일반적으로 회분식 배양시 메탄올, 에탄올, 아세트산과 방향족(aromatic) 화합물 같은 부산물생성은 낮은 농도에서도 세포서장을 방해할 때 기질을 천천히 공급해 줌으로써 세포성장의 지체시간을 줄일 수 있고 세포 성장의 저해도 크게 감소시킬 수 있다. 배양액 내에 당의 농도가 높으면 충분한 용존산소가 존재하더라도 에탄올이 생성되어 높은 세포농도의 수율을 감소시키는 주요 원인이 된다. 이러한 높은 포도당 하에서의 에탄올의 생산을 포도당 효과라고 한다. 이런 효과를 감소시키기 위해서 fed-batch 배양이 필수적이다. Fed-batch은 원하는 생산물의 수율을 높이기 위해 행해져 왔는데 생산물로는 baker's yeast, SCP(single cell protein), 항생제(antibiotics), 비타민, 효소 그리고 아미노산 등이 있다.

#### 가. Chemical defined medium에 따른 고농도배양

Carotenoid 생산성은 세포농도의 함수로 의존하므로 고농도배양이 필수적이다. 본 연구에서는 고농도배양을 위해 간헐적 모드(intermittence feeding

mode)와 constant feeding mode를 비교하였다. 탄소원은 maltose 2%, valine 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.1%,  $\text{CaCl}_2$  0.1%, NaCl 0.1%, pH 5.5, 22°C의 조건으로 5L Jar fermentor(Kobiotech. Co.)에 2L를 working volume으로 하였다. 세포성장과 카로티노이드 생합성능을 조사하였다(그림 15.) 간헐적인 feeding mode는 기질의 저해를 줄일 수 있다. 회분식 반응기에서 E. coli 배양은 과량의 기질투입으로 인해 acetic acid의 함량이 높게 보여 세포성장을 저해하였다. 반면, 유가식 배양에서는 기질공급은 간헐적으로 한 경우 낮은 acetic acid의 함량을 보여 높은 세포농도를 유지하였다. 본 연구에서는 회분배양에서는 24시간인 경우 정상기에 도달하므로 탄소원이 7g/L일 때 기질을 feeding 하였다. 최대 세포농도는 38g/L를 보였고 volumetric carotenoid 농도는 7mg/L이상을 보였다. 반면 constant feeding mode에서는 세포농도와 volumetric carotenoid 농도가 각각 30g/L와 4.5mg/L를 보였다. 즉 회분식 배양보다 최대 5 배 이상 높은 세포농도를 얻었다. (그림 16)

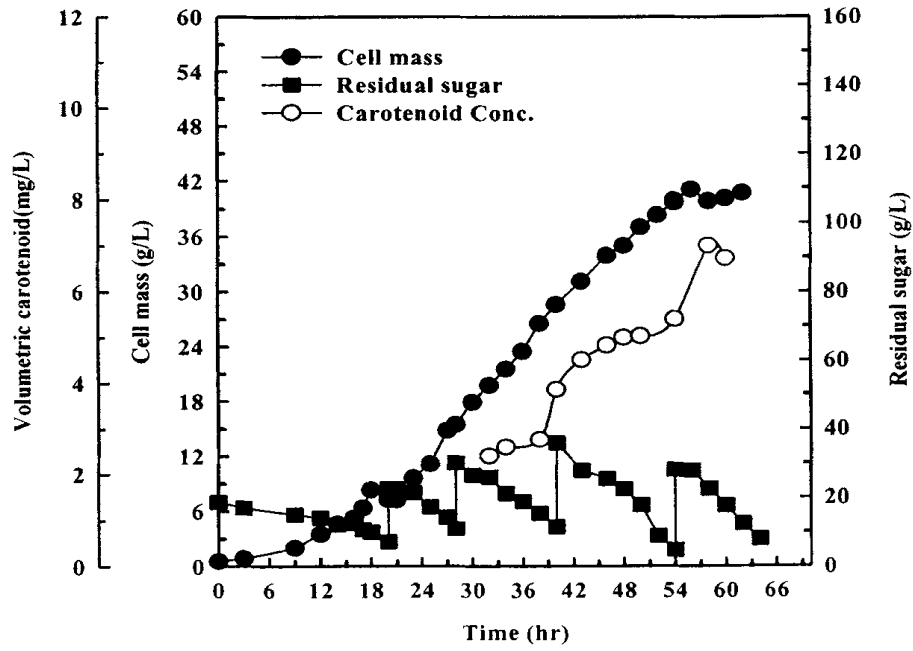


그림 15. The carotenoid production profile in the intermittence feeding mode.

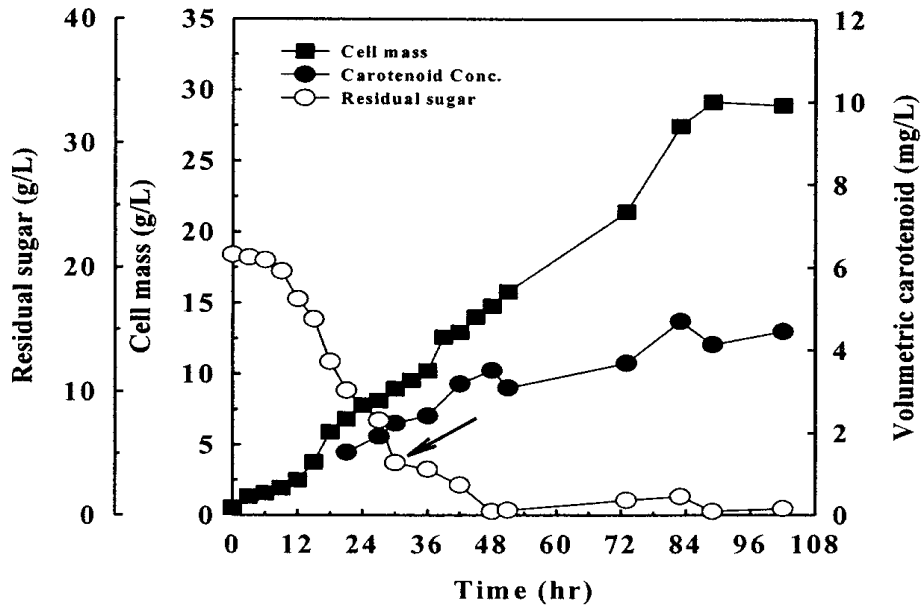


그림 16. The carotenoid production profile in constant feeding mode.

나. 당밀을 이용한 고농도배양

초기 20시간까지는 YM배지로 배양하였다. 이후부터는 당밀을 constant feed mode로 일정하게 기질을 공급하여 시간마다 세포농도와 카로티노이드생산량을 비교하였다. 당밀을 이용했을 때, 카로티노이드의 변화를 아래 그림에서도 확연히 알 수 있다. 이는 배양조건의 변화에 따른 것으로 당밀의 millard 색소들이 세포에 흡착된 것으로 후에 배양하면서 배양조건의 변화에 따라 탈착되는 것을 볼 수 있다. 즉 건조효모색깔이 밤색일 경우 전혀 색소가 검출되지 않았다. 이는 당밀을 탄소원으로 이용 시 배양조건을 최적화하지 않을 경우 산업화에 큰 문제 즉, 카로티노이드 생합성을 저해하게됨을 알 수 있었다.

세포농도는 20시간 때 7.3g/L과 이때의 세포 내 카로티노이드함량은 154.63 $\mu$ g/g을 보였다. 최대의 세포농도는 44.1g/L를 보였다. 또한, 세포 내 카로티노이드함량은 60시간까지 감소하다 C/N ratio에 변화에 따라서 다시 증가하여 145.32 $\mu$ g/g으로 최대를 보였다(표 18. 그림17).

일반적으로 배양 후에 세포를 회수하기 위해 원심분리나 용매침전을 시키고 있다. 하지만 많은 부대비용과 운전비가 많이 드는 게 현실이다. 본 연구에서는 당밀 배지에서 배양할 경우 세포분리회수는 10분간 자유 침강 시(B) 완벽히 상분리가 됨을 보여서 경제적인 측면을 고려할 때 세포회수측면에 많은 절감을 보였다(그림 18).

표 18. 당밀배지를 이용한 고농도배양



<i>Time (hr)</i>	<i>Cell mass (g/L)</i>	<i>Cellular carotenoid (ug/g)</i>	<i>Volumetric carotenoid (mg/L)</i>	<i>C/N ratio</i>
12	4.1	134.74	0.55	3.9
20	7.3	154.63	1.13	5.1
36	12.8	50.07	0.64	1.7
48	17.3	29.28	0.51	6.4
60	29.2	22.19	0.65	10.6
75	35.1	42.38	1.49	49.4
87	39.2	78.36	3.07	45.7
95	41.0	134.36	5.51	10.7
103	43.4	142.52	6.19	12.7
111	44.1	145.32	6.41	10.7

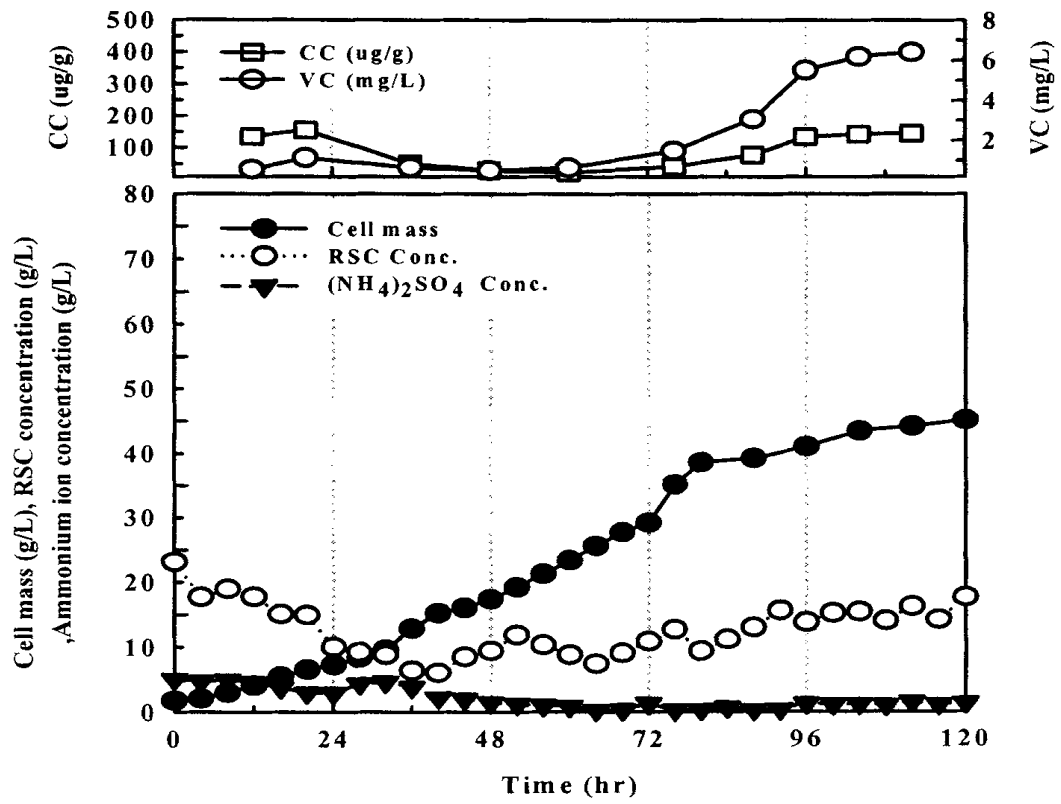


그림17. 당밀을 이용한 고농도배양(Molasses-Urea medium)



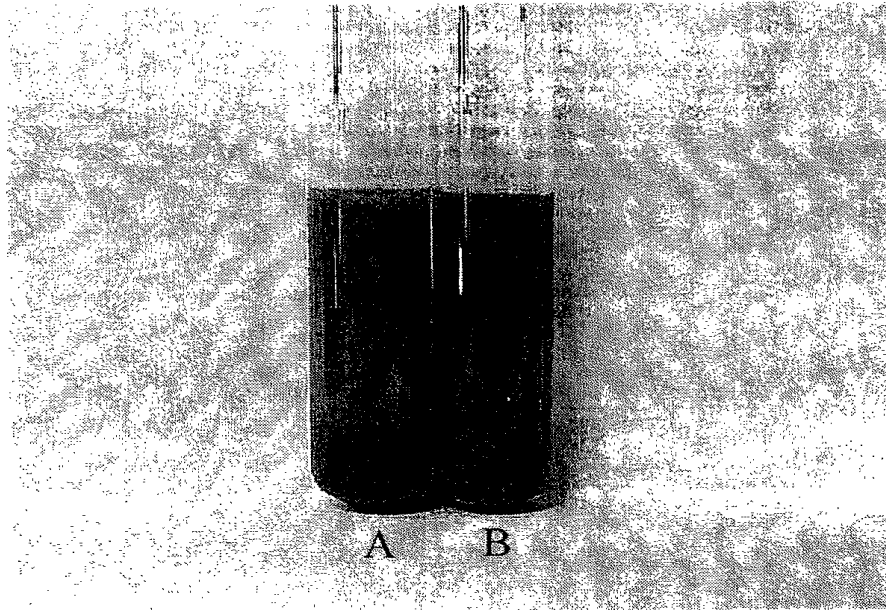
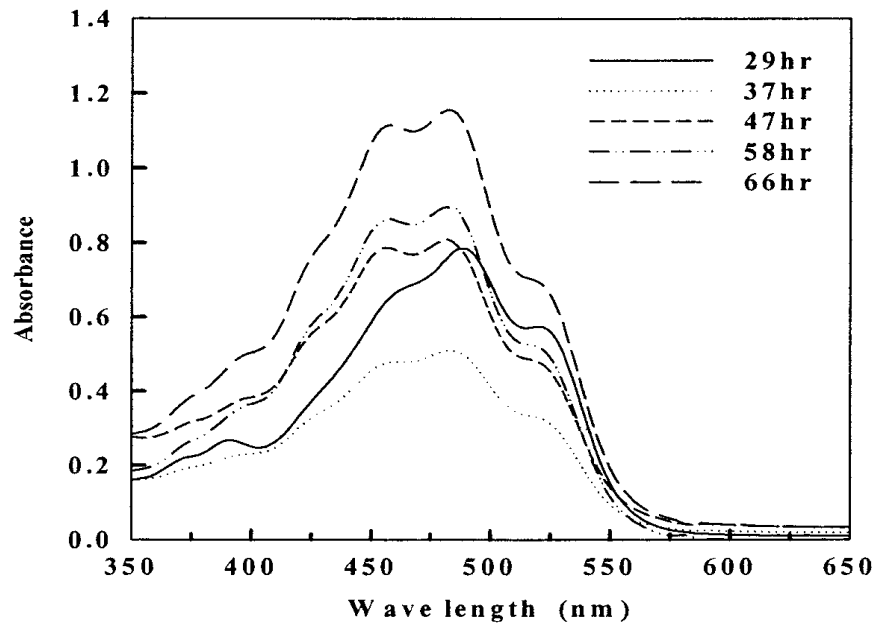


그림 18. 당밀 배양시 10분 후 자유침강

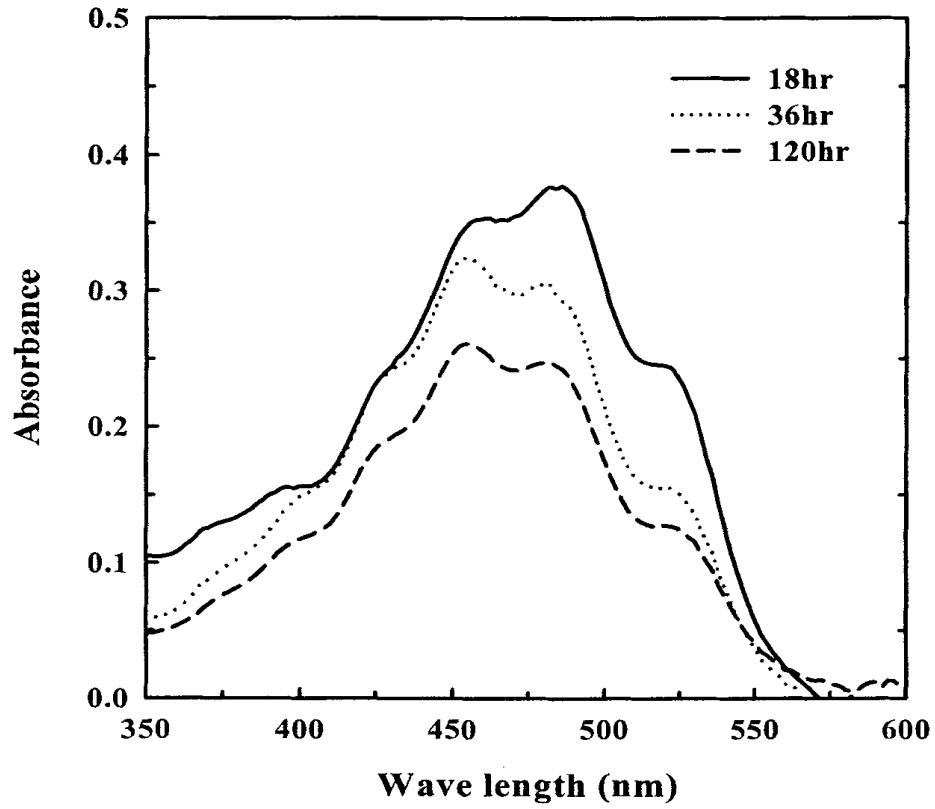
#### 다. 고농도배양에 따른 NaOH와 NH<sub>4</sub>OH의 영향

일반적으로 산업적인 규모에서는 암모니아수가 가장 많이 사용된다. 본 연구에서는 NaOH와 NH<sub>4</sub>OH를 이용하여 서로 고농도 배양 시 카로티노이드 생성량에 영향을 조사하였다. 그림 19에서는 pH를 NaOH로 콘트롤 했을 때의 결과이다. 최대세포농도는 27.76g/L, 세포 내 카로티노이드는 224.54μg/g를 보였다. 즉 시간에 따라서 서서히 증가함을 알 수 있었다. 반면에 그림 20에서는 초기 18시간에는 torularhodin이 많았지만(YM 배지의 정상기 상태) 당밀이 첨가되면서 torularhodin의 양이 감소하는 대신에 β-carotene의 peak가 증가함을 알 수 있다. 세포성장은 58시간에 31.89g/L로 가장 높았으며 그 이후에는 NH<sub>4</sub>OH가 세포성장을 저해하는 것으로 보였다. 시간에 따른 세포 내 카로티노이드함량은 계속 감소하였다. 이는 NaOH로 pH control한 경우보다 세포농도는 거의 변화 없으나 세포 내 카로티노이드 생합성능에 약 6.9배 가량 낮은 수치를 보였다. 따라서 산업적으로 고농도 배양할 경우 NH<sub>4</sub>OH보다는 NaOH를 사용하는 편이 세포 내 카로티노이드 생합성에 큰 영향을 줄 수 있었다.



Time (hr)	Cell mass (g/L)	Cellular caro. (ug/g)	Volumetric caro. (mg/L)
29	14.20	116.43	1.65
37	23.57	99.24	2.34
47	27.76	157.04	4.36
58	25.36	176.22	4.47
66	26.83	224.54	6.02

그림 19. Absorbance spectra of elapsed time on the fed batch mode (pH control 2M NaOH)



Time (hr)	Cell mass (g/L)	Cellular caro. (ug/g)	Volumetric caro. (mg/L)
18	9.27	70.22	0.65
36	14.87	49.58	0.74
58	31.89	25.17	0.80
84	30.00	25.89	0.78
96	29.87	28.40	0.85
120	27.72	31.71	0.88

그림 20. Absorbance spectra of elapsed time on the fed batch mode (pH control 25% NH<sub>4</sub>OH)

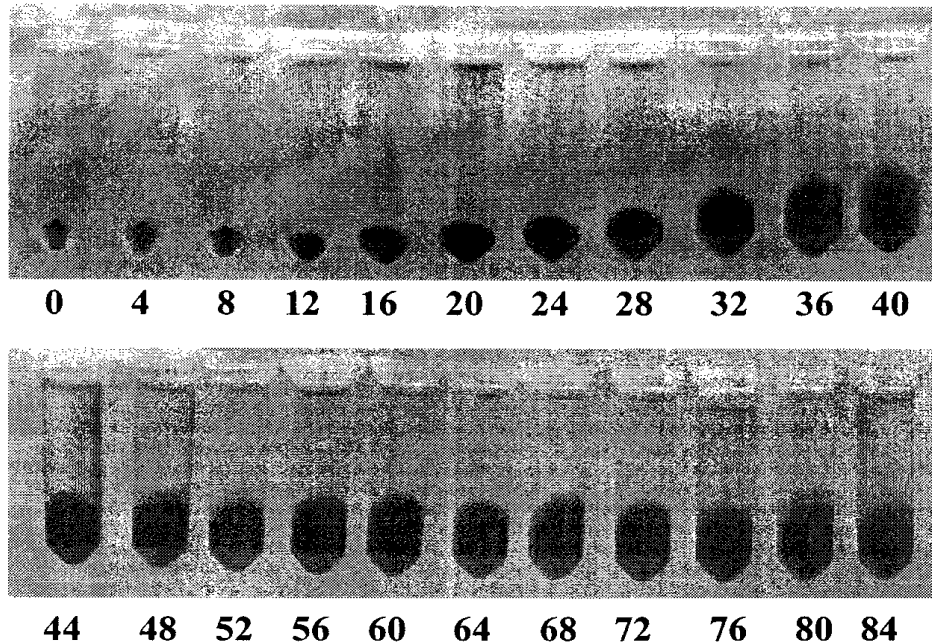


그림 21. 시간에 따른 세포색깔변화.

## 9. 세포벽 약화 기술개발

### 가. 효소를 이용한 세포벽 약화

효모의 세포벽을 약화시키는 기술은 산을 첨가하여 100℃까지 가열하거나 mechanical force를 이용하여 물리적 방법으로 yeast cell wall을 파열시키는 방법이 있다. 하지만 화학적인 방법은 독성이 높아 어려움이 많고 물리적 방법은 낮은 파열효과를 얻을 수 있다. 반면에 효소를 이용한 기술은 낮은 온도에서 높은 효율을 얻을 수 있어 많은 연구가 수행되고 있다.

효모를 YM배지에서 2일 동안 배양한 균체를 회수하여 증류수로 2번 세척 후 냉동 건조하여 시료로 사용하였다. 효모분해역가(lytic activity)의 측정법은 Yokotsuka등의 방법에 준하였다. 즉, 100ml 삼각 플라스크에서 1/15M phosphate buffer (pH 7.5) 5ml에 효모세포 현탁액(파장 660nm에서 흡광도 0.7로 조정) 3ml를 혼합한 후, 효소액 1ml를 첨가하여 37℃ 항온수조에서 120분간 진탕하면서 반응시켰다. 파장은 660nm에서의 흡광도를 spectrophotometer에 의하여 측정하고 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Lytic activity} = \frac{d_o - d_t}{d_o - d_E} \times 100$$

여기서,  $d_o$ 는 반응시간 0에서 반응혼합물의 흡광도,  $d_t$  : 반응시간  $t$ 에서 반응혼합물의 흡광도,  $d_E$  : 효모세포 현탁액 대신에 증류수를 첨가한 반응혼합물의 흡광도를 의미한다.

Glucanase역가 측정은 1/15M phosphate buffer (pH 7.5) 용액에 laminarin을 0.3% 되게 녹인 후 0.5ml를 취해서 기질용액으로 사용하였으며, 여기서 효소액 0.5ml를 첨가한 후 37°C에서 120분간 반응시켰다. 이 반응액에서 DNS용액 3ml를 첨가하여 효소반응을 중지시키고 가열하여 발색시킨 후 반응용액의 흡광도를 파장 546nm에서 측정하였다. 효소 역가 1unit는 반응액 1ml 당 1분간에 glucose 1mole에 상응하는 환원당을 생성시키는 효소량으로 하였다.

Tunicase와 Econase의 효소특성을 살펴보기 위해 pH와 온도변화를 살펴 보았다. 그림 22, 23에서는 Tunicase의 glucanase activity에 활성을 보여주며 최적의 pH는 6, 최적온도는 40°C를 보였다. 반면에 Econase의 mannnase activity 활성은 최적 pH는 7, 최적온도는 50°C를 보였다. Tunicase의 lytic activity를 보면 최적 pH는 7과 최적온도 50°C를 보였으며 Econase의 lytic activity는 최적 pH 2와 최적온도 60°C에서 가장 높은 세포벽 분해능을 보였다. 이 값들은 효소는 효소활성과 상이한 결과를 보였다.(그림 24, 25)

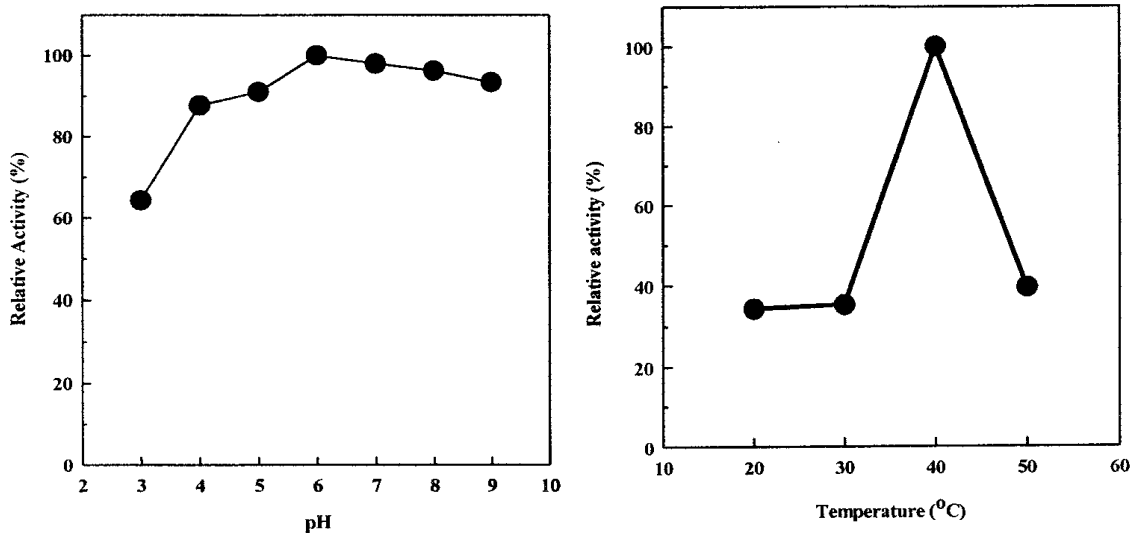


그림 22. Effect of pH and temperature on the glucanase activity.

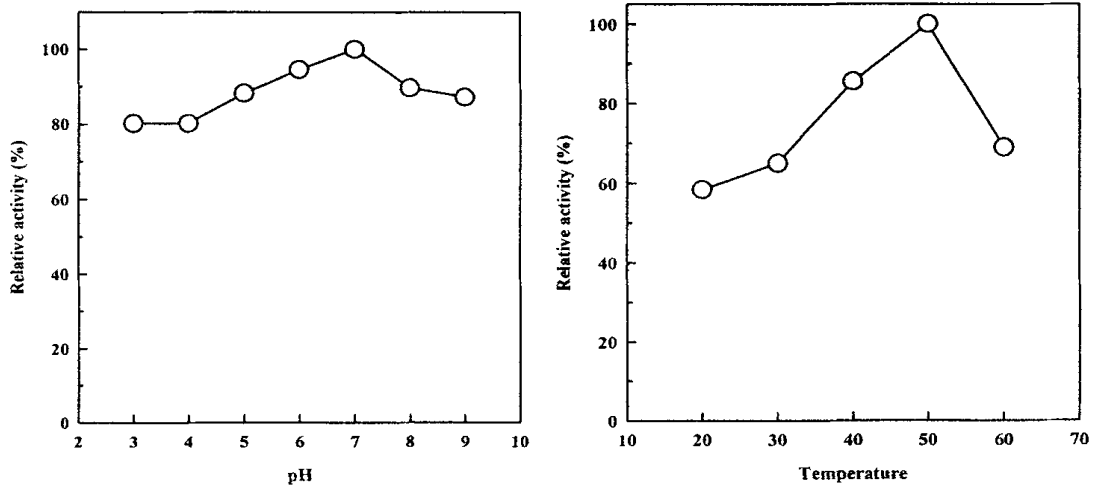


그림 23. Effect of pH and temperature on the mannanase activity.

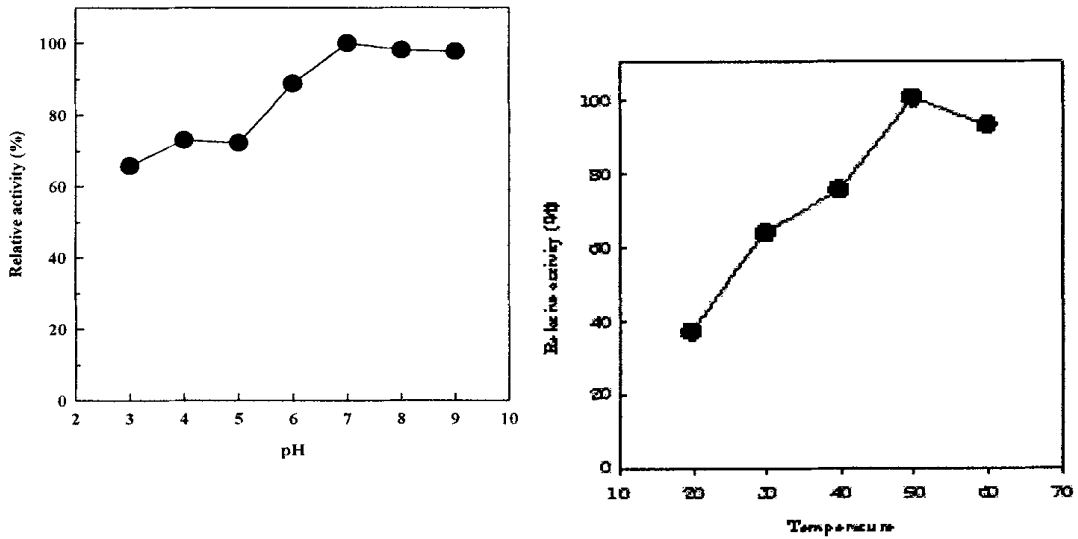


그림 24. Effect of pH and temperature on the lytic activity of glucanase

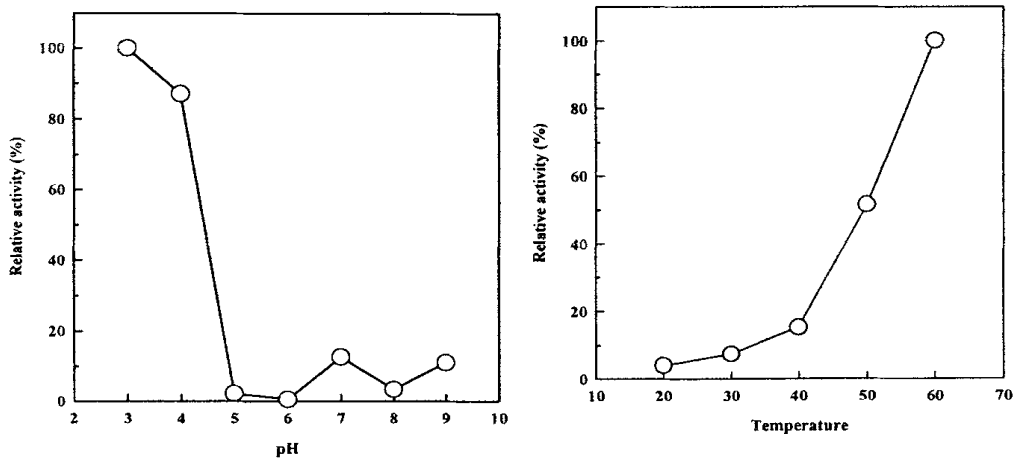


그림 25. Effect of pH and temperature on the lytic activity of mannanase

나. 실험기법을 이용한 최적의 세포벽 약화 기술 확립

일반적으로 두 개 이상의 인자를 다루어야 할 경우에 여러 가지 실험의 설계 방법의 존재한다. 그러나 가능한 모든 수준 조합에서 실험을 하려고 할 때에는 요인설계방법을 사용한다. 본 실험에서는  $2^k$  요인설계 즉,  $k$ 의 인자들의 수준의 수가 2인 경우의 요인설계를 나타낸다. 총 실험의 수는  $2^k$  개다. 순차적인 통계실험의 특성상에서 실험의 초기단계에서 사용되는 실험기법으로 많이 사용된다.

본 실험에서도 표 19와 같이 4개의 인자 즉, 효모의 세포벽에 영향인자인 온도, pH, Tunicase와 Econase를 fractional factorial design을 이용하여 세포벽 약화시키는데 영향인자를 조사하였다. 온도(A)의 경우 2레벨로 20에서 45로, pH(B)는 3-9로 정하고, Tunicase(C) 82U-622U로, Econase(D) 173U-622U로 정하였다. 총 실험 16번을 실험하여 response로는 lytic activity(%)로 나타내었다. 효모의 세포벽 약화시키는데 가장 큰 영향인자, 주효과는 표20의 ANOVA 분석을 보면 Tunicase, 온도, pH와 Econase 순으로 유의(significant)한 것을 보였다. 또한 상호작용은 Tunicase와 Econase가 response에 영향을 주는 것을 보였으며 반면에 온도와 pH는 큰 영향을 보이지 않았다. 따라서 4개의 인자를

다시 CCD를 통해 최적조건을 조사하였다.

CCD(central composite design)를 통한 최적화

일반적으로 CCD는 FFD이후에 수행하여 최적 반응점을 찾는 데 있다. 모형을 살펴보면  $k$ 개의 입력변수  $X_1, X_2, \dots, X_k$ 에 대한 반응을  $\eta$ 이라 하자. 입력변수들의 수준 조절에는 전혀 오차가 없다고 가정할 때 반응  $\eta$ 는 다음과 같은 입력변수들의 함수  $\phi$ 로서 표현된다.

$$\eta = \phi(X_1, X_2, \dots, X_k; \theta_1, \dots, \theta_p)$$

여기서,  $\beta_1, \dots, \beta_q$ 들은 새로 가정된 함수  $f$ 에 대한 모수들이다. 그리고,  $\varepsilon$ 은 관측오차이다. 일반적으로 근사 함수  $f$ 로 저차의 다항식을 사용하며, 특히 일차와 이차식이 주로 사용된다. 물론 설명하기도 매우 복잡한 진짜 반응의 형태를 저차의 다항식으로 근사하는 데는 한계가 있고 무리가 따르지만, 실험 영역이 좁은 경우에는 그렇게 비현실적인 것만은 아니다.

근사 함수로서 입력 변수들의 선형 함수를 선택하면 다음과 같은 일차 모형(first-order model)을 얻는다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon$$

곡선적인 반응을 근사하려면 다음과 같은 이차 모형(second-order model)을 고려할 수 있다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

삼차 이상의 모형은 고려하는 경우가 드물다. 왜냐하면, 차수가 높아질수록 추정해야 할 모수들, 즉 회귀계수들의 숫자가 급속히 증가하기 때문이다. 회귀계수의 추정에는 자유도의 손실이 따른다. 따라서 회귀계수들의 총수보다 더 많은 데이터가 있어야 추정이 가능한데, 많은 실험횟수는 반응표면 설계에서 의도하는 바가 아니다.

일차모형과 설계를 보면 일차 모형에서 회귀계수  $\beta_i$ 는 입력변수  $X_i$ 의 변화에 따른 반응  $Y$ 의 변화량을 측정한다. 이는  $2k$  요인 실험에서 주효과가 주는 정보와 흡사한 것이다. 따라서, 이런 경우에 우선적으로 생각할 수 있는 적절



한 반응표면 설계는 2k 요인 설계나 그의 일부 요인 설계일 것이다.

본 연구에서는 FFD결과 Tunicase가 효모의 lytic activity에 높은 효과를 주었으며 Econase로 유의하지 않아서 최급하강법(method of steepest descent)을 통하여 최적의 반응점을 조사하였다. Tunicase의 농도는 260U-780U, Econase의 농도는 0U-120U까지 변화시켰다. 또한 pH는 3-9, 온도 30-60℃까지 변화시켰을 때 lytic activity를 조사하였다.

표 21에서 Run18의 경우 Tunicase 520U, Econase 120U, pH 6, 45℃조건에서는 45.80%로 FFD방법보다 높은 효율을 보였다. 이 결과로서 FFD결과중 효모의 세포벽약화에 Econase보다는 Tunicase가 보다 높은 효율을 보임을 알 수 있으며 Econase도 소량 필요시된다. 이는 문헌상 효모의 세포벽의 용해는 여러 효소의 복합작용으로 이루어지는바 주로  $\beta$ -1,3 glucanase를 중심으로  $\beta$ -1,6 glucanase, mannanase, protease 및 phosphomannanase등이 보조역할을 함을 알 수 있었다. 가장 높은 lytic activity를 보인 조건은 Run 10으로, Tunicase 780U, pH 3과 60℃에서 49.38%를 보였다. 이 조건에서의 Econase가 전혀 투입되지 않았어도 유일하게 Tunicase 단독으로 높은 효율을 보였다. 또한 분산분석(ANOVA)한 결과 Tunicase와 온도가 가장 유의한 것으로 보였으며 pH와 Econase는 유의하지 않은 결과를 보였다.(표22) 이 결과로서 4개의 인자(Tunicase, Econase, pH, Temp.)를 이용한 경우 효모의 lytic activity의 예상 모델식은 다음과 같이 표현할 수 있었다.

$$\begin{aligned} \text{Lytic activity} = & +21.85 + 0.09 * \text{tunicase} - 0.55 * \text{econase} - 17.20 * \text{pH} + 1.83 * \text{Temp} \\ & - 1.29E-004 * \text{tunicase}^2 - 1.84E-003 * \text{econase}^2 + 0.86 * \text{pH}^2 - 0.04 * \\ & \text{Temp}^2 - 2.82E-005 * \text{tunicase} * \text{econase} + 1.30E-003 * \text{tunicase} * \\ & \text{pH} + 1.84E-003 * \text{tunicase} * \text{Temp} + 0.05 * \text{econase} * \text{pH} + 9.42E-003 * \text{econase} * \\ & \text{Temp} + 0.05 * \text{pH} * \text{Temp} \end{aligned}$$

☒ 19. Fractional factorial design for four variables on the lytic activity.

Run	Temp.(A)	pH(B)	Glucanase (C)	Mannanase (D)	Lytic activity (%)
1	45	9	82	622	12.00
2	20	3	82	173	7.83
3	45	3	622	173	41.39
4	45	3	82	173	38.39
5	45	3	82	622	35.98
6	20	3	622	622	5.94
7	20	9	622	173	24.16
8	20	3	82	622	8.46
9	45	9	622	622	30.97
10	20	3	622	173	21.25
11	20	9	82	173	23.84
12	45	3	622	622	23.38
13	45	9	82	173	10.60
14	20	9	82	622	16.63
15	20	9	622	622	26.97
16	45	9	622	173	44.81

Æ 20. Analysis of variance(ANOVA) for the selective model.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F value	Prob > F	
<b>Model</b>	<b>2666</b>	<b>6</b>	<b>444.3207</b>	<b>5.102041</b>	<b>0.0151</b>	<b>significant</b>
<b>A</b>	<b>453</b>	<b>1</b>	<b>453.0552</b>	<b>5.202337</b>	<b>0.0485</b>	
<b>B</b>	<b>324</b>	<b>1</b>	<b>323.5989</b>	<b>3.715818</b>	<b>0.0860</b>	
<b>C</b>	<b>937</b>	<b>1</b>	<b>936.9961</b>	<b>10.75933</b>	<b>0.0095</b>	
<b>D</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>9.971824</b>	<b>0.114504</b>	<b>0.7428</b>	
<b>AB</b>	<b>201</b>	<b>1</b>	<b>201.2854</b>	<b>2.311318</b>	<b>0.1628</b>	
<b>CD</b>	<b>741</b>	<b>1</b>	<b>741.0167</b>	<b>8.508938</b>	<b>0.0171</b>	
<b>Residual</b>	<b>784</b>	<b>9</b>	<b>87.08686</b>			
<b>Cor Total</b>	<b>3450</b>	<b>15</b>				

☒ 21. Central composite design for four variables.

Run	Tunicase(A)	Econase(B)	pH(C)	Temp.(D)	Lytic activity
1	520	120	6	45	32.90
2	520	120	6	45	31.00
3	520	120	6	45	32.50
4	520	120	6	45	32.00
5	520	120	6	45	32.90
6	780	60	9	30	9.07
7	780	60	3	30	0.06
8	780	0	9	60	34.06
9	260	60	3	60	3.84
10	780	0	3	60	49.38
11	260	0	9	30	5.40
12	260	60	9	60	16.46
13	260	0	3	30	35.59
14	260	120	6	45	16.47
15	780	120	6	45	41.20
16	520	0	6	45	35.71
17	520	60	6	45	26.31
18	520	120	3	45	45.80
19	520	120	9	45	44.87
20	520	120	6	30	23.22
21	520	120	6	60	35.74

Æ 22. Analysis of variance (ANOVA) for the selective model.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	4010.433	14	286.4595	21.13709	0.0006	significant
A	305.6809	1	305.6809	22.55539	0.0032	
B	44.1242	1	44.1242	3.255809	0.1212	
C	61.52563	1	61.52563	4.539815	0.0771	
D	78.43435	1	78.43435	5.787465	0.0529	
A <sup>2</sup>	195.564	1	195.564	14.43015	0.0090	
B <sup>2</sup>	110.5183	1	110.5183	8.154853	0.0290	
C <sup>2</sup>	153.141	1	153.141	11.29987	0.0152	
D <sup>2</sup>	167.8059	1	167.8059	12.38195	0.0125	
AB	0.308465	1	0.308465	0.022761	0.8850	
AC	15.84142	1	15.84142	1.168897	0.3212	
AD	82.43102	1	82.43102	6.082369	0.0487	
BC	563.7418	1	563.7418	41.59703	0.0007	
BD	114.3449	1	114.3449	8.437213	0.0272	
CD	42.64211	1	42.64211	3.146449	0.1265	

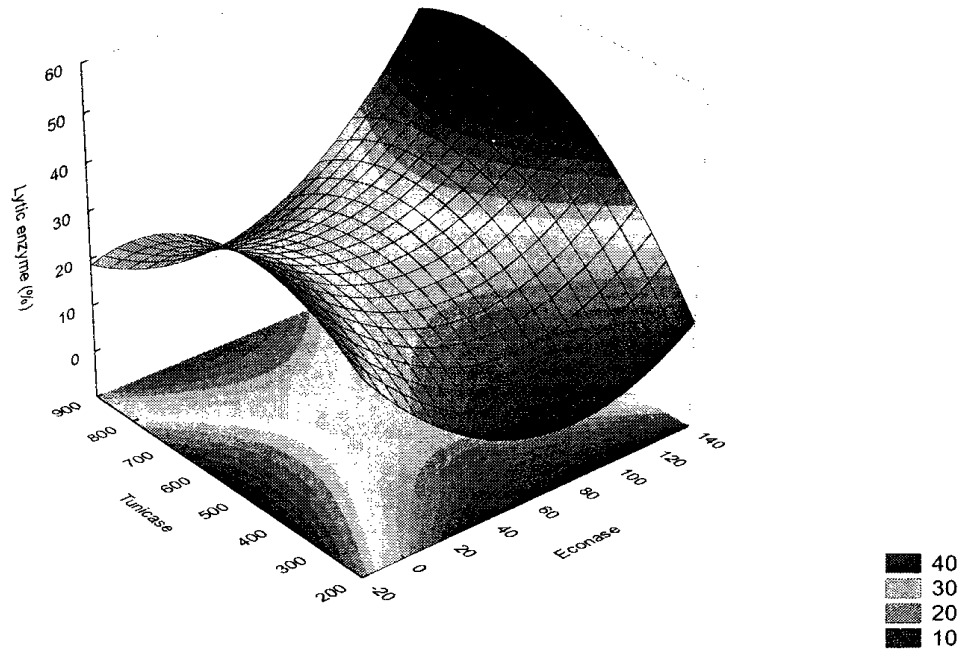


그림 26. pH 6.0 and 45°C에서 Tuicase와 Econase의 lytic activity 영향.

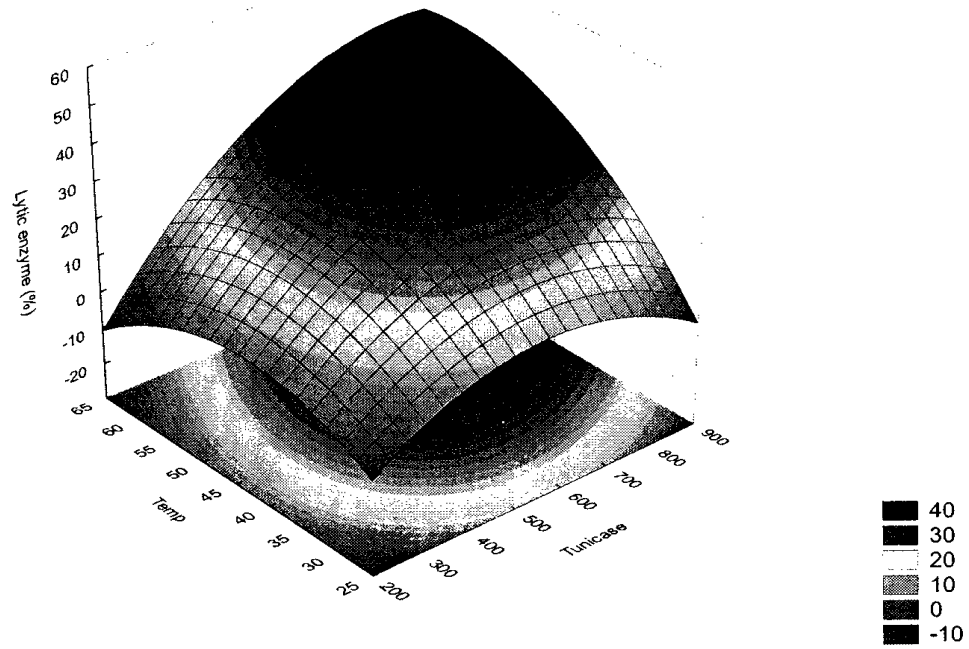


그림 27. pH 6.0 and Econase 79U에서 Tuicase와 온도의 관계

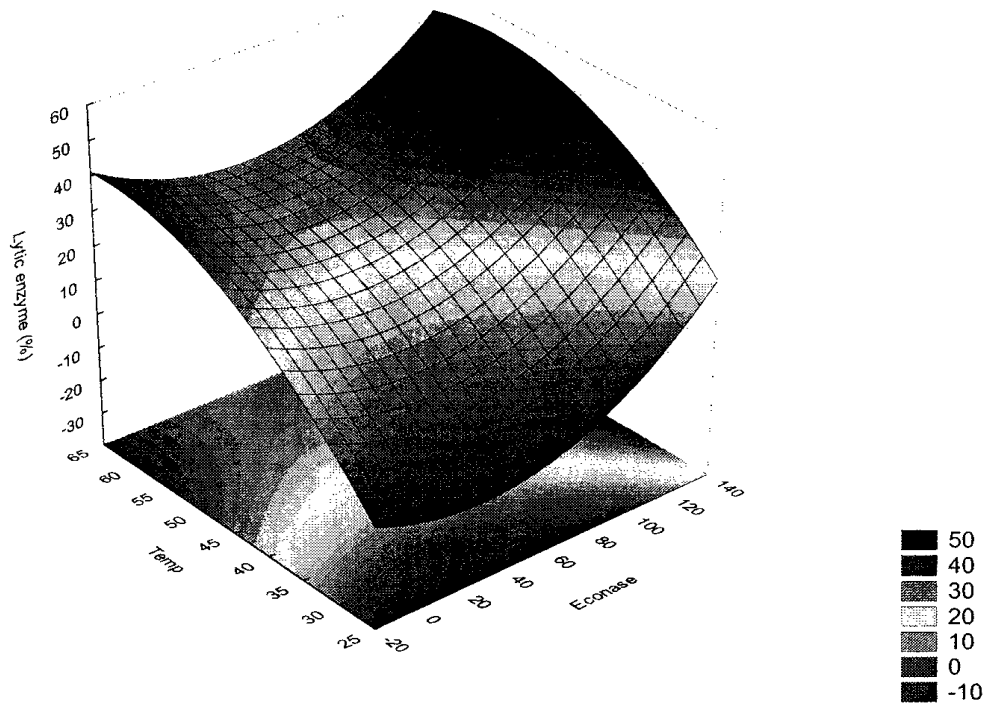


그림 28. pH 6.0 and Tunicase 620U에서 Econase와 온도의 관계

#### 10. 당밀의 전처리

상업적인 효모배양을 위해 저가의 탄소원으로 당밀(sugar cane molasses)을 선택하였다. 하지만 당밀에 포함된  $\text{SO}_2$ , volatile acids, nitrate, colloid, 다량의 중금속 등은 세포성장과 생산물 합성을 저해하기 때문에 배양 전에 고형물과 중금속 등을 제거할 수 있는 전처리 단계가 요구되어진다.

본 연구에서는 당밀 내에 존재하는 trace metal를 제거하기 위해 두 가지 방법 즉, 배양전 전처리로 킬레이트제를 첨가한 후 배양하는 경우와 배양초기부터 킬레이트제를 첨가하였을 때 미량금속 이온들의 영향을 조사하여 세포성장과 카로티노이드의 생합성 효율을 높이고자 하였다.

당밀의 전처리에서는 UM(untreatment molasses), PM(pretreated molasses), PFC(potassium ferrocyanide) 처리를 하였다. UM처리는 일정량의 증류수로



회석한 후 원심분리(1250rpm, 10min)한 시료를 사용하였고 PM는UM처리한 시료를 40℃로 5시간동안 진탕 배양한 후 원심 분리하였다. PFC 처리는 PM 처리한 시료에 potassium ferrocyanide를 0.1%에서 2%까지 농도변화를 주어 첨가시킨 후 수조에서 10분 동안 끓인 뒤 원심 분리하여 시료로 사용하였다. 배양 전에 당밀에서 킬레이트를 첨가하여trace metal를 제거하는 경우와는 달리 배양초기에 킬레이트제인 PFC, EDTA를 0-2%까지 다양한 농도 별로 첨가하였을 때 세포농도와 카로티노이드 생산성을 조사하였다.

그 결과는 그림 29에 나타내었다. 세포 농도면에서 UM이 10.75 g/L로 가장 높은 수치를 보였으며 PM의 세포농도10.36g/L와 유사한 결과를 보였다. 하지만 PFC농도가 증가할수록 최소 세포농도가6.71 g/L를 보였다. 이는 높은 양의 potassium ferrocyanide가 세포성장을 저해하는 결과로서 Purushothaman 등의 보고와 일치하는 결과였다. 또한, 많은 양의 PFC첨가는 침전되는 고형물이 증가함을 알 수 있었다(그림 30). 또한 총 카로티노이드 함량에 있어서 PFC 0.1%을 첨가했을 때 471.09 mg/g로 가장 높은 함량의 보였다. 반면에 PFC 2% 첨가 시 131.92 mg/g으로 가장 낮은 수치를 보였다. 이는 다량의 PFC첨가가 세포농도는 9.45 g/L에서 6.71 g/L로 감소 함을 보였고 이에 카로티노이드 합성에도 큰 영향을 주어 471.09 mg/g 에서 131.92 mg/g 까지 감소함을 보였다. 반면 UM과 PM처리는 40oC, 5시간 동안 열처리를 한 경우와 하지 않은 경우 세포농도와 카로티노이드 함량이 큰 차이를 없었다. 또한 PFC처리하는 당밀 내에 존재하는 고형물 뿐만 아니라, 다량의 metal ion들까지 제거됨을 당밀 전처리에 따른 metal ion들이 경향을 보면 표 23과 같다. PFC처리함에 따라 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>이 metal ion들을 UM과 PM처리와 비교하여 급격히 감소함을 알 수 있다. 반면 Fe<sup>2+</sup>는potassium ferrocyanide 처리 시 용액 내에 많은 Fe<sup>2+</sup> 이온이 많이 녹아있기 때문이다. Cr<sup>2+</sup>와 Ni<sup>2+</sup>도 변화가 없이 일정하였다.

카로티노이드는 각각의 환경인자에 따라 조성이 변한다. 환경인자 중에서 pH는 PT처리한 당밀을 가지고 세포성장과 카로티노이드 생산량을 조사하였다. 그 결과는 그림 31과 같다. pH 2인 경우 세포농도 2.16g/L, total carotenoid는 0.76mg/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. 이 결과는 김 등은 본 군주, *Rhodotorula glutinis*의 이용하여 세포 외 지질생산에 있어서 낮은 pH pH 2에서는 세포성장과 생산물합성에 저해를 주는 것으로 보고하였다. 반면 pH 7일 때 세포농도와 total carotenoid의 농도는 11.23g/L, 165.38mg/L였다.

본 결과로부터 *Rhodotorula glutinis*의 중성부근에서 가장 높은 세포농도를 보였으나 세포 내 카로티노이드의 생산량은 낮았다. 반면, pH 5인 경우는 세포농도는 pH 7보다는 낮고 세포 내 카로티노이드합성이 가장 높은 결과를 보였다. 세포농도가 높을 시 total carotenoid합성이 선형적으로 증가하지 않음을 알 수 있었다.

배양초기에 킬레이트 제를 투입한 후 배양하면 당밀 내에 존재하는 trace metal ion농도를 낮출 뿐만 아니라, metal complex가 metal buffer의 역할을 하여 배양 중 미생물이 필요한 농도의 metal ion농도로 해리하여 배양하는 효과가 있다. 본 연구에서는 배양초기에 EDTA와 PFC를 각각 첨가하여 배양한 결과 배양 전 당밀을 전처리한 결과와 상이한 결과를 보였다.(표24) PFC 첨가해서 배양한 경우는 세포농도와 카로티노이드 생산량이 PFC를 첨가하지 않은 경우보다 급격히 감소하여 0.1% 이상 첨가 한 경우 세포성장을 저해를 주었으며 EDTA는 0-0.2%까지는 세포성장의 저해는 없었으나 카로티노이드 축적량에서 다소 변화를 보였다. 0.5%이상 첨가한 경우는 세포성장에 저해를 주었다. 본 실험결과로 PFC처리를 할 경우는 배양 전에 전처리가 좋을 것으로 생각되며 EDTA는 배양초기에 첨가하여 배양하는 것이 보다 높은 세포농도와 카로티노이드 생성량을 보였다.

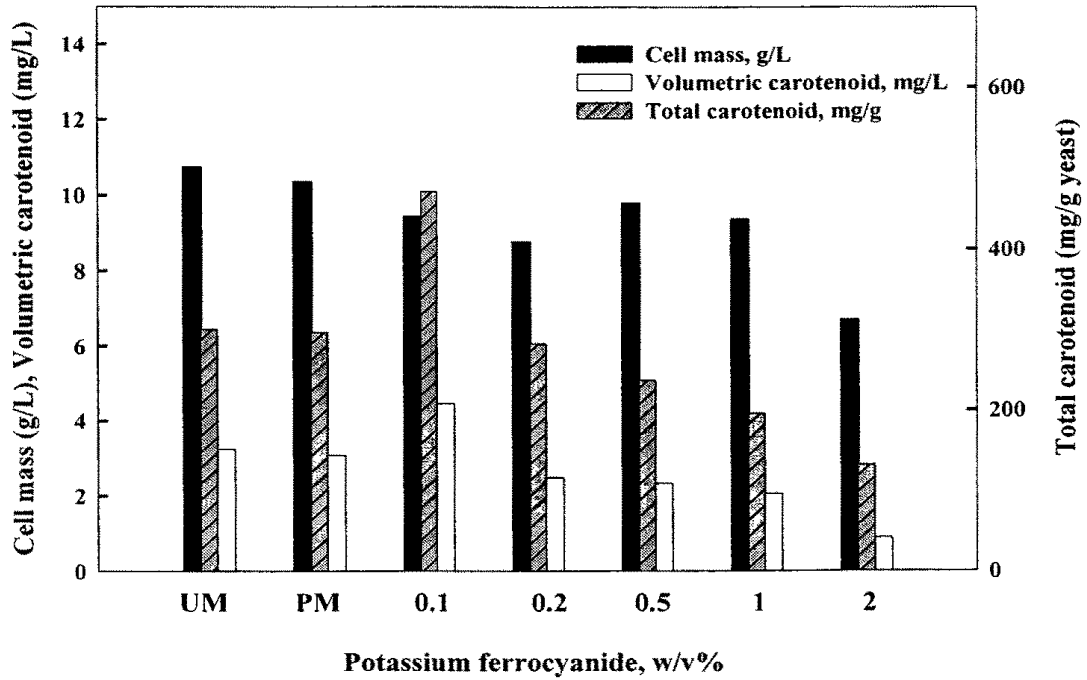


그림 29. Potassium ferrocyanide 첨가에 따른 세포농도와 카로티노이드의 경향

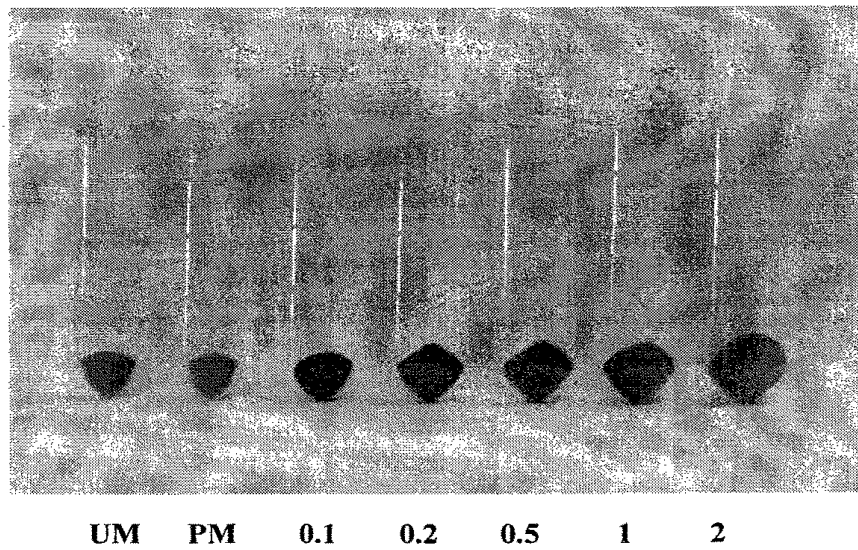


그림 30. PFC 처리에 따른 침전물의 변화

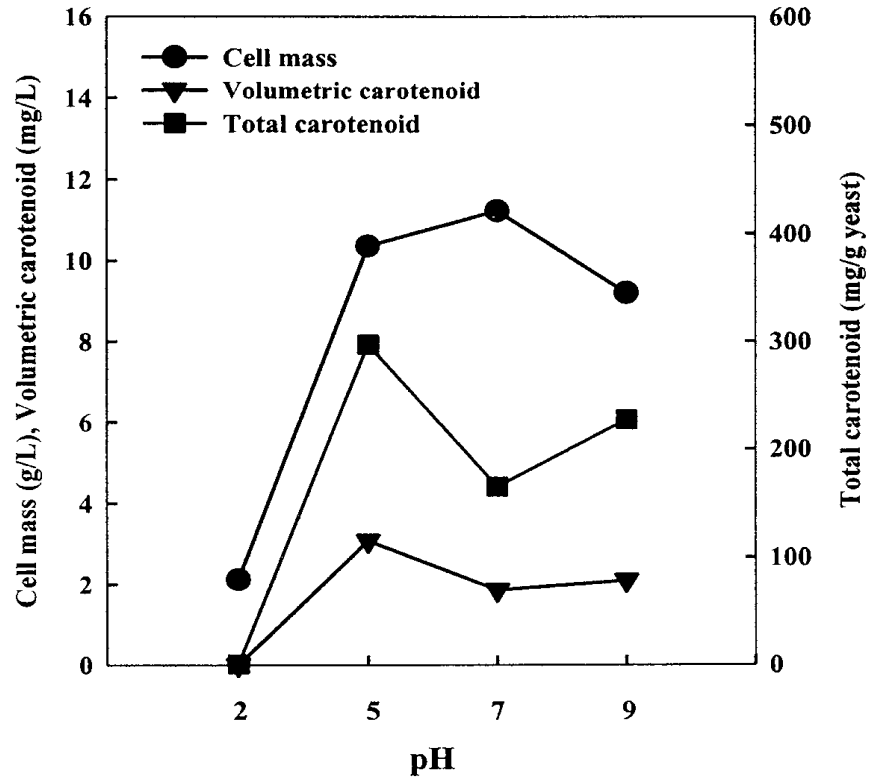


그림 31. pH변화에 따른 세포농도와 카로티노이드변화

표 23. 처리방법에 따른 당밀 내 금속 이온의 변화

Molasses	Metal ion concentration (mg/L)							
	Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Al <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cr <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
UM	2.4	154	12.6	54.6	22.2	2008	0.2	0.4
PM	2.4	132	11.6	56.6	22.2	2198	0.2	0.4
PFC 0.1%	2.4	164	7.8	28.4	25.8	2322	0.2	0.4
PFC 0.2%	1.4	92	3.2	9.4	20.8	2276	0.2	0.4
PFC 0.5%	0.6	156	1.8	3.0	22.0	2124	0.2	0.4
PFC 1.0%	0.4	376	2.0	5.4	17.8	1830	0.2	0.4
PFC 2.0%	0.6	304	3.0	2.6	21.4	880	0.2	0.4

표 24. PFC처리와 EDTA처리와 비교실험

Conc. (%)	PFC treatment			EDTA treatment		
	Cell mass (g/L)	TC (ig/g)	VC (mg/L)	Cell mass (g/L)	TC (ig/g)	VC (mg/L)
0	10.30	338.11	3.48	10.34	338.11	3.50
0.05	9.21	292.31	2.69	10.65	392.05	4.18
0.1	0.43	0.00	0.00	10.36	386.69	4.01
0.2	0.46	0.00	0.00	10.24	406.10	4.16
0.5	0.00	0.00	0.00	1.59	391.77	0.62
1	0.00	0.00	0.00	0.91	488.60	0.45
2	0.00	0.00	0.00	1.23	322.44	0.40

### 11. 카로티노이드생산의 경제성 평가

효모를 이용한 사료첨가제생산의 경우 경제적 생산 단가는 *Rhodotorula glutinis* 배양하는 동안 기질가격에 의존한다. 배치발효서, 당밀 배지에서 *R. glutinis*를 생산단가는 US\$ 1.04kg/dry cell. 이 값은 maltose-valine 배지에 비

해 약 360배정도 낮은 수치를 보였다. 따라서 당밀 배지의 이용은 산업화할 경우 생산단가를 상당히 낮추는 결과를 알 수 있다. 배지반응에서 낮은 생산단가로 높은 건조 균체량을 얻을 수 있다. 또한 고농도배양인, fed-batch culture를 이용한 기술에서는 US\$1.71/kg dry cell를 보였다. 단세포단백질생산(Single cell protein)에서 총생산단가(부대장치, 노동비, 고정자금, 유지비등 포함)에서 62%가 원료물질로 소비되어졌다보면 US\$ 2.76kg/dry cell로 측정된다.

표 25. 당밀 배지와 복합배지의 생산단가비교

Medium	Component	Amount required for cultivation (g/L)	Cost (US\$ kg <sup>-1</sup> )	Producton cost (US\$ kg <sup>-1</sup> )
Molasses	Molasses	13.5	0.06c	0.28
	Urea	0.2	11.00	0.76
Total cost				1.04
Complex	Maltose	20	136.90	202.56
	Valine	2.5	200.00	136.05
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	70.80	9.63
	NaCl	0.1	43.50	5.57
	MgSO <sub>4</sub>	1	113.30	9.06
	CaCl <sub>2</sub>	0.6	71.90	1.43
Total cost				364.3

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 카로티노이드계 생합성하는데 있어 경제적인 복합배지를 개발하며 효모의 대량생산을 위한 기술을 확립하는데 있다. 본 연구에서는 복합배지는 저가의 기질인 sugar cane molasses를 사용하였다. 이는 사탕수수에서 설탕을 만들고 남은 부산물(byproduct)로서 다양한 성분이 많이 존재할 뿐만 아니라 저가의 기질로 선정하였다. 또한, 효모의 대량생산을 위해 회분식반응기, Air-lift 반응기를 이용하여 높은 세포농도를 유지하기 위한 기술인 고농도 배양을 시도하였다. 일반적으로 높은 농도의 기질은 세포성장을 저해하므로 저농도로 feeding하는 기술을 선택하였다.

효모 *Rhodotorula glutinis*의 세포벽 제거방법으로 물리적, 화학적와 생물학적 처리방법을 이용하여 색소를 효율적으로 추출하기 위한 추출조건의 최적화를 확립하였다. Reponse surface method를 이용한 카로티노이드 대량생산의 최적화를 확립하였고, 또한 저가의 당밀(sugar cane molasses)를 이용하여 높은 생산성을 보였다.

한편 *Rhodotorula glutinis* 균체를 난황 착색제로 사용할 때 두터운 세포벽으로 인한 색소의 bioavailability의 증진을 목적으로 효모균체의 세포벽제거를 위한 전 처리방법으로 화학적 처리, 물리적 처리, 생물학적 처리방법을 제시하였다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이번 기술의 개발은 사료첨가물의 원료에 있어 다양한 이용을 가능케 하며, 값싼 사료첨가물 생산방법의 확립으로 카로티노이드계 화합물의 대량 생산이 가능하게 되어 사료첨가물 뿐만 아니라 화장품 및 의약품의 원료로도 사용이 가능해질 것으로 기대된다.

한편 연구결과를 통하여 산업현장에 적용 할 수 있는 기반을 마련하였으며 본 과제로부터 도출된 미생물을 이용한 유용산물의 생산, 미생물의 고농도 배양 그리고 균체 자체의 활용성을 높일 수 있는 균체 세포벽 약화 기술 등은 다양한 바이오 산업 관련 기술이나 균체 사료를 생산하는 축산업 관련 기술에 접목이 가능 할 것으로 여겨진다.

또한 유용한 사료첨가물의 경제적 공급을 목표로 우선 기능성계란의 생산을 일차 목적으로 하지만 다양한 생리적 효과로 생산성과 번식률이 향상되어 모든 축산업계에 적용이 가능한 사료첨가물로 사용할 수 있으리라 전망된다.

본 기술개발은 유용한 사료첨가물의 경제적 공급을 목표로 우선 기능성계란의 생산을 일차 목적으로 하지만 다양한 생리적 효과로 생산성과 번식률이 향상되어 모든 축산업계에 적용이 가능한 사료첨가물로 사용할 수 있으리라 전망된다.



## 제 6 장 참고문헌

1. Bendich, A. (1991), b-Carotene and The Immune Response, Proc. Nutr. Soc. 50, 363-374.
2. Kearsley, M. W., Rodriguez, N. (1981), The Stability and Use of Natural Colours in Foods: Anthocyanin, b-carotene and Riboflavin, J. Food. Technol. 16, 421-431.
3. De Hann, A., Burke, R.M. and De Bont, J.A.M. (1991), Microbial Production of Food Colorants, Med. Fac. Landbouww., Rijksuniv. Gent. 56, 1655-1660.
4. Vandamme, E. J. (1992), Production of Vitamins, Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes, J. Chem. Tech. Biotechnol. 53, 313-327.
5. An, K. W., Donald, B. S, and Eric, A. J. (1989), Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content, Appl. Environ. Micro. 55, 116-124.
6. Neil, H. J, De Leenheer, A. P. (1991), Microbial Sources of Carotenoid Pigments Used in Food and Feeds, J. Appl. Bacteriol. 70, 181-191.
7. Mako, K. (1992), Growth and Astaxanthin Formation of *Haematococcus pluvialis* in Heterotrophic and Mixotrophic Conditions, J. Ferm. Bioen. 74, 17-24.
8. Leach, G., Gisela, O, and Rui, M. (1998), Production of a Carotenoid-Rich Product by Alginate Entrapment and Fluid-Bed Drying of *Dunaliella salina*, J. Sci. Food. Agric. 76, 298-302.
9. Peterson, W. J., T. A. Bell., J. L. Etchells, and W. W. G. Smart, Jr. (1953), A Procedure for Demonstration the Presence of Carotenoid Pigments in Yeast, J. Bact. 67, 708-713.
10. Britton, D., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander (1995), Carotenoids, Vol 1A: isolation and analysis., p91-95, Birkhauser verlag Press, Boston.
11. Kim, E. Y., P. K. Park, and H. J. Chae (1998), Optimization of

- Culture Conditions for Extracellular Lipid Production from *Rhodotorula glutinis* K-501, Korean J. biotechnol. Bioeng. 13, 58-64
12. Sedmak, J. J., Weerasinghe, D. K, and Jolly, S. O. (1990), Extraction and Quantitation of Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*, Biotechnol. Tech. 4, 117-112.
  13. Andrew, Y. and B. George (1993), Carotenoids in Photosynthesis, 3rd ed., p444, Chapman & Hall, New York.
  14. Craft, N. E. (1992), Relative Solubility, Stability and Absorptivity of Lutein and  $\beta$ -Carotene in Organic Solvents, J. Agric. Food. Chem. 40, 431-434.
  15. Michel, D., K. A. Gilles., J. K. Hamilton., P. A. Rebers and F. Simth. (1956), Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem. 28, 351-356
  16. Association of Official Analytical Chemists. (1980), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. pp858-861, Washington, DC.
  17. Terado, J. (1989), Antioxidant Activity of  $\beta$ -Carotene-Related Carotenoids in Solution, Lipid. 24, 659-661.
  18. Delphine, L., L. Beuf, and W. Vermaas. (2000), Increased Production of Zeaxanthin and Other Pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, Appl. Environ. Micro. 66, 64-72.
  19. Martin, A. M., L. Chun, and R. P. Thakor. (1993), Growth Parameters for the Yeast *Rhodotorula rubra* Grown in Peat Extracts, J. Ferm. Bioeng. 76, 321-325.
  20. Osborne. D and P. Voogh. (1987), Methods for the Analysis of Nutrients in Food. pp113-116. Academic press, London.
  21. Kearsley, M. W., Rodriguez, N. (1981), The Stability and Use of Natural Colours in Foods: Anthocyanin,  $\beta$ -carotene and Riboflavin, J. Food. Technol. 16, 421-431.
  22. De Hann, A., Burke, R.M. and De Bont, J.A.M. (1991), Microbial Production of Food Colorants, Med. Fac. Landbouww., Rijksuniv. Gent.

- 56, 1655-1660.
23. Frengova, G., Simova, K., Pavlova, K., Beshkova, D., Grigороva, D. (1994), Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 888-894
  24. Ceika A (1985), Preparation of Media. In : Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol 2. VCH, Weinheim, Germany, 630-682.
  25. Johnson, J. C., (1976), *Food Technology Review* No. 35 Sugars for the Food Industry. N.D.C., Park Ridge, New Jersey, USA, 238-250.
  26. Subba Rao D, Panda T (1994), Critical Analysis of the Effect of Metal Ions on Gluconic Acid Production by *Aspergillus niger* Using a Treated Indian Cane Molasses, *Bioprocess Eng.* 10, 99-107.
  27. Mishra P, Roy B, Prasad R, Das HK (1991), Aminoacid Transport in *Azotobacter vinelandii* Implication of Nonavailability of Aminoacid Autotrophs. *FEMS Microbiol Lett.* 79, 41-44.
  28. Kim, E. Y., P. K. Park, and H. J. Chae (1998), Optimization of Culture Conditions for Extracellular Lipid Production from *Rhodotorula glutinis* K-501, *Korean J. biotechnol. Bioeng.* 13, 58-64
  29. Park, P. K., E. Y. Kim (2002), Extraction Method of Carotenoids from *Rhodotorula glutinis*, *Korean J. biotechnol. Bioeng.* 17, 44-48
  30. Oderinde RA, Ngoka LC, Adesogan EK (1986) Comparative Study of the Effect of Ferrocyanide and EDTA on the Production of Ethyl Alcohol from Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Bioeng.* 28, 1462-1465.
  31. Purushothaman. M., R. K. I. Anderson, S. Narayana, V. K. Jayaraman (2001), Industrial Byproducts as Cheaper Medium Components Influencing the Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) - Biodegradable Plastics, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 24, 131-136.
  32. Michel, D., K. A. Gilles., J. K. Hamilton., P. A. Rebers and F. Simth. (1956), Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28, 351-356.
  33. Mubeccel E., S. F. Mutlu., O. Gurel (1997), Improved Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, Ferrocyanide and

- Zeolite X Addition to Sugar Beet Molasses, J. Chem. Tech. Biotechnol. 68, 147-150.
34. 환경관리연구소, "환경관계법규" (1993)
  35. 조수연, "유지 생산균 *Rhodotorula glutinis*에 의한 carotenoids 색소 생산에 관한 연구", 석사학위논문, 한국과학기술원 (1987)
  36. Andrew young and george Britton, "Carotenoids in photosynthesis", Chapman & Hall (1993)
  37. Helga Gerster, "Anticarcinogenic effect of common carotenoids", Internat. J. Vit. Nurt. Res., 63, 93-121 (1992)
  38. James Allen Olson, "Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A", J. Nutr., 119, 105-108 (1989)
  39. Nakayama, T., G. Mackinney, and H. J. Phaff, "Carotenoids in asporogenous yeasts", J. Microbiol. Serol., 20, 217-228 (1954)
  40. Kenneth L. Simpson, T. O. M. Nakayama, and C. O. Chichester, "Biosynthesis of yeast carotenoids", Journal of Bacteriology, 88, 1688-1694 (1964)