

微生物에 의한 Carotenoid色素生成에 關한 研究 [第 1 報]

Rhodotorula glutinis var. *glutinis* sw-17의 Carotenoid生成에 關하여

朴 基 賢

建國大學校 化學科

朴 性 五*

서울女子大學 食品科學科*

(1976년 11월 30일 수리)

Studies on the Production of Carotenoid Pigments by Microorganisms [Part I]

The Carotenoid Production in *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* Sw-17

Ki-Hyun Park and Sung-Oh Park*

Dept. of Chemistry, Kun Kuk University

Dept. of Food Science, Seoul Woman's College*

(Received Nov. 30, 1976)

SUMMARY

A potent intracellular-lipid-producing yeast, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* sw-17¹⁰ was studied on the production of carotenoids after shaking the cultures for 8 days at 25°C.

The pigments were extracted with solvents and chromatographed with columns for its isolation. The carotenoids were identified by their positions on the column, and by their light-absorption curves. Close agreement was obtained between the absorption maxima of the isolated pigments and published literature values. The characteristic wave length maxima and the extinction values used for quantitative determination.

The carotenoid pigments produced by the yeast were composed of torularhodin(28.52%), torulene(38.16%), neurosporene(1.49%), γ -carotene(9.88%), β -zeacarotene(2.0%), β -carotene(19.95%) and δ -carotene(trace).

緒 論

Carotenoid는 黄色 및 赤色の 色素로서 高等植物과 微生物에서만이 生合成이 可能的인 天然色素中의 하나로 이에 屬하는 色素들의 一部는 비타민 A의 前驅物質임이 밝혀짐에 따라 天然色素라는 面에서 뿐만 아니라 營養學的으로도 매우 重要的인 食品成分中의 하나로 알려져 있다.

한편 carotenoid色素는 化學적으로 炭化水素系인 carotene과 carotene構造에 methoxy기, hydroxy기, carboxyl기, epoxy기 등이 結合된 xanthophyll로 나누어지는데 이들 모두가 8개의 isoprene unit로 構成되어 있는 tetraterpenoid이다.

carotenoid에 對한 研究는 주로 植物組織을 對象으로 그 化學構造 및 生理的 意義 그리고 生合成過程이 研究되어 왔으나 Lederer¹⁾가 微生物中

*Rhodotorula rubra*로부터 carotenoid를分離 確認한 以來 *Blakeslea triposa*, *Neurospora*, *Sporomyces* 等에도 含有되어 있음이 研究되었으며 이 중에서도 *Blakeslea triposa*에 carotenoid色素가 가장 많이 含有되어 있음이 알려져 있다. 그後 이들 微生物에 對한 carotenoid色素의 特性和 培養條件에 따른 carotenoid色素組成의 研究結果는 主色素가 torularhodin, torulone 그리고 β , 및 γ -carotene이며 그밖에 β -zeacarotene, neurosporene 등이 알려져 있으나 微生物의 培養條件 即 培養溫度 및 培養日數, 培地의 組成에 따라 같은 菌株라 하더라도 色素組成의 構成比率에 顯著한 差異를 나타내고 있다.

위 條件을 詳細히 檢討해 보면 Phaff²⁾, Nakagama³⁾, Simpson 등⁴⁾은 *Rhodotorula glutinie*를 低溫(5°C)에서 培養했을때 黃色色素인 β -및 γ -carotene이 主로 生成되고 常溫(25°C)에서는 赤色인 torulene, torularhodin이 主色素로 形成됨을 報告하였으나 最近에 岩本等⁵⁾은 17~37°C의 溫度에서 培養했을때 이들의 報告와는 相反되는 結果로서 培養溫度가 낮으면 赤色 色素인 torulene, torularhodin이 많이 生成되고 또한 色素含量도 增加한다고 報告하였다.

한편 執養日數에 따른 carotenoid의 色素組成은 Goodwin 등⁶⁾이 *R. rubra*의 研究에서 ① 培養中 最高 carotenoid 濃도에 達하는 活發한 合成時期 ② 一定濃도를 維持하면서 繼續 合成하는 時期 ③ 生成된 色素가 損失되는 時期 등 三週기로 나누어 檢討한 結果를 發表한 바 있으며 中川等⁷⁾은 培地의 組成에 따라 *Rhodotorula*의 carotenoid 含量이 最大에 達하는 時期가 서로 差를 밝혔고 Bonner⁸⁾, Peterson⁹⁾ 등은 菌種과 그 變種에 따라 carotenoid 生成量에 差異가 있음을 報告하였다.

따라서, 本 研究에서는 微生物에 依한 carotenoid 色素生產에 對한 研究의 一部로서 朴¹⁰⁾의 *Rhodotorula*屬 菌株에 依한 脂質生產研究中 土壤으로부터 分離한 優秀한 細胞內 脂質生成菌으로 同定된 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*를 carotenoid 色素研究의 菌株로 選定하였다.

實驗方法

1. 菌培養

表 1과 같은 色素生產培養液 100ml를 500ml容 振盪 flask에 分注 殺菌하고 朴¹⁰⁾에 의하여 優秀한 細胞內 脂質生產菌株로 同定된 *Rhodotorula glutinis*

Table 1. Composition of the medium used for carotenoid production

Glucose	40g
Yeast extract	2.5g
KH ₂ PO ₄	1.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
Tap water	1000ml
PH	5.8

var. *glutinis* sw-17菌株를 接種하여 25°C에서 8日 間 振盪培養(Oscillation 165/min., stroke=5cm)하였다.

2. 菌體內에서 Carotenoid 抽出

培養後 蒐集한 菌體의 懸濁液을 遠心分離하여 培養液을 除去하고 蒸溜水로 數回 洗滌한 後 60°C에서 乾燥시켜 藥질구에서 乾燥菌體와 精製海砂를 混合하여 均一하게 磨碎하였다. 磨碎한 乾燥菌體의 混合物를 分液濾斗에서 acetone으로 2回 抽出하였으며 抽出이 안된 菌體는 acetone으로 부터 分離하여 1N-HCl을 加하고 90°C에서 15分 동안 加熱하여 菌體의 細胞膜을 破壞시킨 後 菌體가 無色이 될때까지 acetone으로 抽出(3回程度)하여 처음의 acetone 抽出色素溶液과 함께 모았으며 分液濾斗에서 petroleum ether와 蒸溜水를 加하여 色素가 溶解된 acetone 溶液으로부터 色素를 petroleum層으로 移行시킨 後 acetone-물層을 除去하고 無水 sodium sulfate를 少量 添加하여 脫水시키고 -10°C에서 20時間 放置하여 不純物을 沈澱시켜 除去하였다.

한편 carotenoid의 分離는 Simpson⁴⁾, 岩本等⁵⁾의 方法에 依하여 다음과 같은 方法으로 分離하였으며 이때 使用된 試藥中 alumina(neutral activity)는 80~120mesh의 것을 SiO₂ powder(chromatography用)는 100mesh의 것을 15% HCl로 處理하여 各各 使用하였으며 cellulose ashless powder(chromatography用)는 Whatman製를 使用하였다. 그리고 petroleum ether는 b.p 40~60 것을 다시 silica gel에 通過시켜 精製하였으며 無水 ethyl ether는 alumina를 通過시켜 peroxide를 除去하였고 chloroform은 再蒸溜하였다. 위에서 特別히 言及한 것을 除外하고 그밖의 모든 試藥은 WAKO製 特級試藥用을 使用하였으며 色素의 濃縮過程은 N₂ gas下에서 實施하였다.

3. Carotenoid의 第一次 分離

菌體細胞로 부터 抽出하여 petroleum ether에 溶解시킨 carotenoid 色素溶液을 MgO-SiO₂(1:2)로 充塡한 column(1.5×20cm)을 使用하여 色素를 分離한 다음 色素가 吸着된 吸着製를 column으로 부터 밀어내어 最上段의 赤色 band를 切斷하여 acetate-ethyl ether(1:10)溶液으로 溶出시킨 後 分液濾斗에서 여러번 水洗하여 acetate를 除去한 後 無水 sodium sulfate로 脫水하고 減壓濃縮하여 ethyl ether를 완전히 除去시킨 色素濃縮物을 chloroform에 溶解시켜 첫번째(Sample No. I) 色素로 하였다. 그 밖의 色素 band는 petroleum ether로 溶解시켜 減壓濃縮하였으며 KOH-methanol(10% w/v)溶液을 加하여 10時間 鹼化하고 여기에 petroleum ether를 加하여 色素를 petroleum ether層에 移行시켜서 鹼化物을 除去하고 無水 sodium sulfate를 添加하여 脫水한 後 減壓濃縮하였다.

4. 第二次分離

第一次分離에 使用한 것과 같은 column으로 petroleum ether에 溶解된 色素濃縮物을 再分離시켰다. 色素가 吸着된 吸着製를 column으로부터 밀어내어 吸着力이 弱한 順序로 各各의 色素 band를 sample No. II, III, IV, V, VI, VII의 fraction으로 分離하여 切斷하였으며 II의 色素 band는 ethyl ether-methanol(1:1)溶液으로 溶抽한 後 分液濾斗에 물을 加하여 methanol을 除去한 後 脫水하였으며 減壓濃縮에 依하여 ethyl ether를 除去하였고 petroleum ether에 溶解한 後 cellulose powder로 充塡한 column(1×10cm)으로 分離하여 精製하였다.

III, V 및 VII의 色素 band는 acetone으로 各各 溶出하여 分離하였으며 分液濾斗에 petroleum ether를 加하고 물을 添加하여 acetone-물層을 除去하였으며 色素가 移行된 petroleum ether層을 各各 脫水하고 減壓濃縮한 後 petroleum ether溶液으로 調製하였다.

IV, VI의 色素 band는 위와같이 各各 acetone으로 溶出하고 petroleum ether層으로 色素를 移行시킨 後 alumina column(1×5cm)에 依하여 各各 分離하여 精製하였으며 分離된 위의 모든 色素溶解物은 各各 一定量으로 減壓濃縮하였다.

5. 分離된 Carotenoid의 確認 및 定量

各 fraction의 色素濃縮物을 Beckman Spectrophotometer DK-2로 吸收曲線과 最大吸收波長을 求한 다음 Spectronics 20을 使用하여 各各의 最大吸收波長에서 吸光度를 測定하였고 測定된 값을 Beer의 法則에 따라 各各의 色素流度를 引用된 各文獻^(12,13,14,15,16,17,18)의 吸光係數인 E_{1cm}^{1%}值로 부터 算出하였다.

結果 및 考察

1. Carotenoid의 分離 및 確認

Rhodotorula glutinis var. *glutinis* sw-17을 振盪培養하여 carotenoid色素를 抽出 分離한 結果는 表 2와 같다. 各 carotenoid色素는 이들이 column에 吸着된 順序(表 2의 sample number와 같음)와 各各의 吸收曲線 및 最大吸收波長等을 文獻値와 比較하여 定性確認하였으며 이와같은 結果는 Simpson⁴⁾, 岩本⁵⁾ 등의 實驗結果와는 一致되었다.

Table 2. Comparison of the absorption maxima of carotinoids isolated from *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* sw-17 with literature values.

Order of absorption (Sample No.)	Carotinoids	λ max (mμ)		E% 1cm Reference value	Reference cited
		Reference value	Experimental value		
I	Torularhodin	515	515	1932	12
II	Torulere	484	485	2680	13
III	Neurosporene	439	438	2990	14
IV	γ-carotene	460	460	2760	15
V	δ-carotene	399	398	2500	16
VI	β-zacarotene	426	427	1940	17
VII	β-carotene	450	450	2590	18

Solvent I : Chloroform, II-III : Petroleum ether.

各 carotenoid의 最大吸收波長과 column의 吸差力과는 서로 關係가 없는 것으로 나타났으며 torularhodin을 제외하고는 모든 色素가 400-500

mμ의 波長에서 吸收極大를 보였다.

2. Carotenoid의 定量

參藝文獻에서 引用한 吸光係數를 使用하여 Beer

의 法則에 따라 各各의 carotenoid를 定量한 結果는 다음 表 3에서 보는 바와같이 主色素가 torularhodin, torulene이였으며 그중에서 가장 含有量이 많은것은 torulene으로서 全體의 38.16%를 차지했으며 그 다음이 torularhodin, β -carotene, γ -carotene의 順序로 含有되어 있고 그밖에 neurosporene, β -zeacarotene 등이 2%以下를 含有되어 있었다.

한편 δ -carotene의 含有量은 거의 痕蹟에 불과하여 吸光度 測定이 거의 불가능 하였다.

Table 3. Concentration of various carotenoids produced by *Rhodotorula glutinis* Var *glutinis* sw-17 after growth for 8 days at 25C.

Carotinoids	Conc. of Carotinoid (/g)	Percent
Torularhodin	59.83	28.52
Torulene	80.05	38.16
Neurosporene	3.12	1.49
γ -carotene	20.73	9.88
δ -carotene	trace	—
β -zeacarotene	4.19	2.00
β -carotene	41.86	19.95
Total carotinoid	209.78	100

表 3에 나타난 바와같이 各色素의 含量은 Simpson⁴⁾ 등이 25°C에서 12日동안 Nakayama³⁾ 등의 培地組成으로 培養하여 觀察한 carotenoid의 含量과 色素組成 그리고 그 構成比率이 비슷한 傾向을 나타냈으며 岩本等⁵⁾은 中川等⁷⁾의 培地組成을 다소 수정한 培地에서 培養했을때 菌體의 窒素含量에 따라 各各의 色素含量에 현저한 差異가 있음을 報告하였는데 27°C에서 培養하고 菌體의 窒素含量이 1.94%일때는 本實驗의 結果와 거의 一致하였으나 같은 條件에서 菌體窒素含量이 3.88%일때는 1.94%일때 보다 훨씬 적은 含量을 보여 주었다.

그리고 Peterson⁹⁾ 등은 Wickerham¹¹⁾ 등의 培地組成으로 *Rhodotorula glutinis*를 24°~26°C에서 6日間 培養시켜 carotenoid色素를 分離 定量한 結果 主色素가 torularhodin(66.8%), torulene(27.2%), β -carotene(3.5%), γ -carotene(2.3%)으로서 torularhodin이 torulene보다 2倍以上 生成되었음을 報告한바 있으며 이것은 中川等⁷⁾이 指摘한 바와같이 懸隔한 培地組成의 差異에서 由來되는 것으로 推定된다.

要 約

土壤으로 부터 分離同定된 優秀한 細胞內 脂質 生成菌株인 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* sw-17에 對하여 carotenoid生成能을 檢討하고서 이 菌株를 25°C에서 8日間 振盪培養하여 carotenoid 色素를 抽出分離하여 column에 吸差된 色素層의 順序와 溶出하여 精製한 各色素의 吸收曲線에 의하여 各各의 carotenoid를 確認했으며 이들의 吸光度를 測定하여 Beer의 法則에 따라 參考文獻의 吸光係數를 使用하여 定量한 結果 torularhodin 28.52%, torulene 38.16%, neurosporene 1.49%, γ -carotene 9.88%, β -zeacarotene 2.0%, β -carotene 19.95%이였으며 δ -carotene은 거의 痕蹟에 가까웠다. 따라서 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* sw-17의 主色素는 torularhodin, torulene이였다.

參 考 文 獻

- Lederer, E., Comp. rend. (Paris), 197, 1964 (1933).
- Phaff, H.J., Mrak, F.M. and Williams, O.B.; Mycologia, 44, 432(1952).
- Nakayama, T.O.M., Mackinney, G. and Phaff, H.J.; J. Microbiol. Serol., 20, 217(1954).
- Simpson, K.L., Nakayama, T.O.M. and Chichester, C.O.; J. Bacteriol., 88, 1688(1964).
- 岩本浩明, 高山義博: 醱酵協會誌(日), 30, 123, (1972).
- Goodwin, T.W., The Comparative Biochemistry of the Carotenoids, Chapman and Hall, London, 1952, p. 109.
- 中川昌平, 辰乙忠次: 日本農藝化學會誌, 34, 195(1960).
- Bonner, J., Sandoval, A., Tand, Y.W. and Zechmeister, L.; Arch. Biochem., 10, 113 (1946).
- Peterson, W.J., Evans, W.R., Lecce, E., Bell, T.A. and Etchell; J. Bacteriol., 75, 586 (1958).
- 朴性五: 韓農化., 17, 93(1974).
- Wickerham, L.J.; 1951, Taxonomy of Yeasts, U.S. Dept. Agr. Tech. Bull No. 1029.
- Simpson, K.L., Nakatama, T.O.M. and Chichester, C.O.; Biochem. J., 92, 508(1964).

13. Karrer, P. and Jucker, E.; 1950, The Carotenoids, Elsevier Publishing Co. Inc., New York.
14. Haxo, F., Arch. Biochem.; **20**, 400(1949).
15. Goodwin, T.W., Biochem. J.; **62**, 346(1956).
16. Nash, H.A. and Quackenbush, F.W.; J. Am. Chem. Soc., **70**, 3613(1948).
17. Petzold, E.N. and Quackenbush, F.W.; Arch. Biochem. Biophys., **82**, 117 (1959).
18. Goodwin, T.W.; Biochem. J., **50**, 550(1952).

本學會記事

行事錄

第28次理事會

日時：1976年 9月 28日 (火) 15:00

場所：水原市 서울大學校 農科大學 小會議室

가) 1976年度 秋季臨時總會 및 第31次 學術發表會를 開催키로 아래와 같이 議決함.

韓國食品科學會 第17次學術發表會와 共同開催키로 함

日時：1976年 11月 6日 (土) 10:00

場所：水原市 서울大學校 農科大學 講堂

特別 講演會 開催 演士는 朴官和 博士

나) 學位 取得會員 紹介

朴官和 會員

1976年度 秋季臨時總會 및 第31次 學術發表會

韓國食品科學會와 共同開催

日時：1976年 11月 6日 (土)

場所：水原市 서울大學校 農科大學 大講堂

參席人員：118名

會順

1. 開會辭
 2. 國民儀禮
 3. 國民教育憲章朗讀 金載勳博士
 4. 韓國食品科學會長 人事 金昌湜博士
 5. 韓國農化學會長 人事 李春寧博士
 6. 歡迎辭 서울大農大學長 李春寧博士
- 閉會

○ 招請講演會

I. Wheat Research and Technology in Australia.

P.E. Marston: Bread Research Institute of Australia.

II. On Rice Koji.

The Control of its Alkaline Proteolytic Activity.

Dr. Hideo Shibata: Dept. of Agri-Chemistry Iwate Univ. Japan

○ 特別講演會

I. 酵素의 Microencapsulation 技術과 食品工

業에의 應用

邊時明博士 韓國科學院 生物工學科

II. 食品工業에 重要한 몇가지 酵素들의 熱不活性化와 再活性化

朴官和 博士 서울大 農大 食品工學科

○ 研究論文 發表會

第一分科發表會

1. 脫脂大豆粕에서 製造된 콩蛋白質의 食品學的性質
한국과학원 생물공학과 김철진* 변시명
2. 밀감 Juice의 香氣成分에 關한 研究
서울大農大 이훈영, 김호*, 亞州工大 조도현 박연화
3. 고추씨의 分離에 對한 運動量分析和 乾燥燥作에 미치는 영향. 서울大農大 食工科 朴尙基* 全在根
4. 콩비지加工에 關한 研究[I]
콩비지의 열풍건조
한국과학원 정경수*, 장호남, 박무영

5. 蛋白質의 熱安定성에 關한 研究[I]
우유단백질의 熱安定성에 關하여
延世大 食品工學科 양용 박석원* 송충석, 유주현
6. 洗米時 쌀의 營養損失에 對하여
한국과학기술연구소 유정희*, 조제선, 권태완
7. 複合粉에 依한 제빵에 있어서 添加劑의 영향
延世大 食生活科 이희자* 김형수
8. 몇가지 韓國食品中 Aflatoxin의 檢索
韓國原子力研究所 김용화* 황보경숙, 이서래

第二分科 發表會

9. 乳酸菌에 依한 大豆乳의 醱酵
韓國科學院 生物工學科 박용호*, 박무영
10. 微生物이 生産하는 凝乳酵素에 關한 研究[第13報]
Crystalline Mucor Rennin을 利用한 大豆 치즈에 關한 研究
延世大 食工科 유주현, 실원철*, 양용
11. 보리를 利用한 간장제조에 關한 研究
서울大 農大 食工科 김형수* 김재욱
12. Na-Citrate添加에 依한 담배의 燃焼性 및 有害物 減少에 關한 研究
專賣技研 金基煥* 裴孝元, 李英鍾, 金萬旭, 建國大 朴擇奎
13. 大豆 成熟中 蛋白質 및 Subunit의 定量的 變化
서울大農大 李春寧, 金秀彥*, 金仁洙