

해양미생물로부터 카로테노이드 색소의 생산을 위한 최적조건

김태수 · 정명주 · 류병호* · 주우홍** · 박정옥 · 정영기†

동의대학교 미생물학과
*경성대학교 식품공학과
**창원대학교 생물학과

Optimal Growth Conditions for Carotenoid Pigment Production from Marine Microorganism

Tae-Soo Kim, Myung-Ju Jung, Beung-Ho Ryu*, Woo-Hong Joo**,
Jeong-Uck Park and Yong-Kee Jeong†

Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

*Dept. of Food Science and Biotechnology, Pusan 608-736, Korea

**Dept. of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

Abstract

The optimal medium composition for the production of carotenoid pigment from *Haloarcula* sp. EH-1 as a dietary for fishes were 1.0% sucrose, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.002% ferric sulphate (pH 7.0). The incubation temperature, aeration rate and agitation speed were 40°C, 100ml medium/500ml vol. shaking flask, and 180 rpm/min. The carotenoid pigment production was highest after 5 days of incubation with the light.

Key words: carotenoids, pigmentation, marine fishes, halophilic bacteria

서 론

Halobacteriace에 속하는 고호염균은 호기성의 유기영양균으로 생육을 위해 최소 10%의 NaCl을 요구하고, 최적의 생육을 위해 15~23%의 NaCl이 필요하다. 따라서 천연의 염호수와 바닷물이 증발하여 소금이 생기는 지역과 같은 인위적으로 염도를 높인 환경에서 우점 미생물 집단을 형성한다(1). 고호염균이 붉은 색을 띠는 것은 세포막내의 카로테노이드 색소 때문인데, 이것은 광선을 흡수할 수 있고 양자가 세포질 막을 가로질러 이동하는 것을 촉진한다(2). 카로티노이드는 미생물을 비롯하여 식물·동물에 이르기까지 자연계에 널리 분포되어 있는 지용성 색소로서 현재까지 약 600여종이 알려져 있으며 최근에는 상업적인 관심이 증가되고 있는데, 특히 양식어에서 갑각류 및 연어의 채색과 양계장의 난황 및 닭의 살성에 주로 응용되고 있다(3,4). 또한 사람에게도 중요한 대사적 역할을 가지고 있어서 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화, 산소 래디칼의 제거에 의한 암 예방 등 여러 가지 기능을 나타낸다(5).

현대의 식생활 문화로 볼 때 콜레스테롤 및 동물성 지

방이 함유된 식품을 점차 기피하는 경향으로 전환되고 있으며, 이에 따라 수산식품의 소비는 지속적으로 증가할 것으로 사료된다. 현재 소비되고 있는 수산식품의 10~15%는 양식으로 생산되고 있는 가운데, 연어는 중요한 수산양식 자원의 하나로써 생산량은 급속히 증가해 왔으며 앞으로도 계속적으로 증가할 것이다(6). 그러나 연어는 색소를 합성하지 못하므로 사료로서 공급해야 하는데(7), 연어 먹이원으로 붉은 효모 *Phaffia rhodozyma*가 대표적으로 연구되어 왔으며, 그 외에 microalgae *Hamatoctococcus pluvialis*, fungus *Peniophora* sp., bacteria *Mycobacterium lacticola* 및 *Brevibacterium* 103 등이 있다(8-11). 그러나 이들은 세포용해가 어렵고 색소준비 과정이 매우 복잡하다는 단점을 가지고 있어서 새로운 생물학적 원료가 요구되고 있다. 고호염균의 경우 생육을 위해 20% 이상의 NaCl 농도를 요구하므로 다른 미생물에 오염될 염려가 없고, 10% NaCl 농도 이하에서 쉽게 용해되므로 세포 파쇄에 특별한 기술을 요구하지 않으며, 미량의 유기용매로 추출이 가능하므로 독성반응을 줄일 수 있어서 소화가 용이한 잇점을 가지고 있다(14).

따라서 본 연구는 양식어의 먹이원으로 이용하기 위해

†To whom all correspondence should be addressed

서 고호염균으로부터 카로테노이드 색소를 대량으로 생산하기 위한 최적조건을 검토하여 그 산업적 이용분야를 광범위하게 모색하기 위한 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험균 및 배양조건

천일염으로부터 분리한 *Haloarcula* sp. EH-1을 사용하였으며(13), 색소생산을 위한 기본배지는 0.75% cas-amino acid, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.0023% ferric sulphate(pH 7.4)의 Sehgal and Gibbons complex(SGC) 액체배지(14)를 500 ml의 진탕 플라스크에 100ml씩 준비하여 동일배지에서 전배양한 종균액을 2% 접종한 후 40°C에서 5일간 진탕배양(180 rpm)하였다. 배양 중 빛의 영향을 고려할 경우 배양기내에 60 lux의 광원을 설치하여 상기와 같은 조건으로 배양하였다.

총 카로테노이드의 추출 및 정량

카로테노이드의 추출은 Calo 등(12)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 배양액을 4°C에서 원심분리(7,000 rpm, 20 min)한 후 침전물만을 회수하여 실온에서 증류수로 세포를 용해시킨 후 acetone으로 2회 이상 색소를 추출하여 추출액을 ethyl ether와 다량의 물로써 분리 조작하여 색소를 ethyl ether로 전용시킨 후, ethyl ether층을 무수 Na₂SO₄로서 탈수시키고 40°C이하의 N₂ 기류하에서 감압 증류한 것을 총 카로테노이드로 하였다. 총 카로테노이드의 정량은 ethyl ether중에서의 가시부 흡수의 흡수 극대치의 흡광도에 의하여 Davies(17)의 방법에 따라 흡광계수 $E_{1cm}^{1\%} = 2200$ 으로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

총 carotenoid(mg%) =

$$\frac{O.D.(\lambda \max) \times Vol \times 1000}{E_{1cm}^{1\%}(2200) \times \text{weight of tissue(g)}}$$

결과 및 고찰

탄소원의 영향

균의 생육도와 색소 생산에 영향을 미치는 최적 탄소원을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 각각 기본배지에 1%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 모든 탄소원에서 생육도는 저해되었으나 색소의 경우 sucrose에서 우수한 효과를 나타내었으며, 최적농도를 측정된 결과 1%에서 최대의 생육도 및 색소 축적을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 탄소원을 요구하지

Table 1. Effect of carbons on carotenoid from marine microorganism

Carbon sources(1%)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
None	8.20	3.98	37.5
Frcutose	6.83	3.28	16.9
Galactose	7.91	3.12	33.3
Dextrose	6.10	3.56	27.1
Arabinose	5.53	0.09	0
Ribose	5.72	0.07	0
Xylose	5.60	0.09	0
Sorbitol	7.88	3.63	28.6
Maltose	8.01	3.50	30.4
Mannitol	7.81	3.78	22.9
Lactose	8.15	3.70	27.0
Sucrose	8.23	3.35	50.1
Raffinose	8.19	3.54	39.9
Trehalose	8.20	3.18	27.1
Soluble starch	8.13	3.65	31.1

Table 2. Effect of sucrose concentration on carotenoid from marine microorganism

Concentration (%)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
0.5	8.10	3.12	28.3
1.0	8.21	3.40	50.1
1.5	8.13	3.25	37.9
2.0	8.11	3.18	32.1
2.5	8.10	3.03	28.9
3.0	8.10	3.02	28.9

않는 기본배지와 다소 차이가 있었다.

질소원의 영향

색소생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 탄소원으로 1% sucrose가 포함된 기본배지에 각종 질소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 배양한 결과 Table 3에 나타낸 바와 같이 yeast extract, soytone 및 casamino acid의 경우 생육도와 색소가 함께 증가되었으나, polypeptone의 경우 생육도는 저해되었지만 색소량은 증가되었다. 이 중 색소 축적이 가장 우수한 yeast extract를 최적 질소원으로 선정하여 최적 농도를 측정된 결과 1%에서 가장 우수한 효과를 나타내었다(Table 4). 녹조류 *Hamatococcus pluvialis*의 경우 고농도의 질소원이 포함된 배지에서 배양을 시작하였을 경우 배양 5일 후, 저농도의 질소원이 포함된 배지에서 배양을 시작하였을 경우 배양 2일 후 색소 축적이 최대로 나타났으나, 고농도의 질소원이 포함된 배지를 사용할 경우 시간은 오래 경과하지만 축적되는 색소의 양이 저농도의 질소원이 포함된 배지에 비해 비교적 높게 나타났으므로 질소원 농도에 의존해서 색소의 축적이 유도됨을 알 수 있었다(16).

Table 3. Effect of nitrogens on carotenoid from marine microorganism

Nitrogen sources(1%)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
None	7.99	0.50	38.5
NH ₄ Cl	7.20	0.27	32.5
NH ₄ NO ₃	6.40	0	0
(NH ₄) ₃ PO ₄	6.23	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.10	0.21	12.1
KNO ₃	7.95	0.20	31.0
NaNO ₃	7.95	0.20	21.6
Polypeptone	7.60	0.22	40.1
Yeast extract	7.84	3.25	80.3
Malt extract	7.42	0	0
Beef extract	8.10	1.43	24.3
Casamino acid	8.39	1.98	48.7
Lysine	7.91	0.97	11.2
Arginine	8.90	0	0
Soytone	8.30	2.82	56.2
Glutamic acid	8.50	0.47	35.3
SGC ¹⁾	7.78	3.32	40.9

¹⁾SGC: Culture was carried out in basal medium containing 0.75% casamino acid, and 1% yeast extract as a nitrogen source and 1% sucrose as a carbon source.

Table 4. Effect of yeast extract concentration on carotenoid from marine microorganism

Concentration (%)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
0.5	7.68	0.62	57.6
1.0	7.88	3.10	80.5
1.5	7.99	3.19	80.0
2.0	8.01	3.25	80.0
2.5	7.99	3.45	75.1
3.0	7.98	3.65	63.0

무기염류의 영향

기본배지에 함유된 무기염류가 색소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 기본배지에 sodium citrate, potassium chloride, magnesium sulphate 및 ferric sulphate를 각각 0.3%, 0.2%, 2.0% 및 0.002%를 첨가하였을 경우 최적의 색소 생산을 나타내었으나 기본배지에 비해 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

배양온도 및 초기 pH의 영향

배양온도에 따른 생육도와 색소 생산의 영향을 검토하기 위해서 20~50°C로 배양온도를 변화시켜 색소 생산을 측정해 본 결과 Table 6에 나타낸 바와 같이 최적 배양온도는 40°C로써 온도의 증감에 따라 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. 색소 생산에 적합한 초기 pH의 영향을 검토한 결과 Table 7에 나타낸 바와 같이 pH 7.0에서 우수한 생육도와 색소가 생산되었으며 pH 5.0 이하 및 pH 10.0

Table 5. Effect of various metal ion concentration on carotenoid from marine microorganism

Metal ion	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
MgSO₄ · 7H₂O			
0 (%)	7.28	0.17	3.9
0.5	7.60	1.68	22.3
1.0	7.65	3.76	76.2
1.5	7.61	3.28	78.6
2.0	7.60	3.17	92.0
2.5	7.60	3.16	69.0
3.0	7.59	3.15	66.0
KCl			
0 (%)	7.28	3.16	73.5
0.1	7.30	2.95	66.6
0.2	7.60	3.36	91.8
0.5	7.65	3.11	84.7
1.0	7.61	3.06	79.0
2.0	7.60	2.86	78.0
FeSO₄ · 7H₂O			
0 (ppm)	7.85	2.94	65.4
10	7.60	2.86	88.0
20	7.52	3.03	90.8
30	7.49	2.80	86.4
40	7.20	2.53	62.2

Table 6. Effect of temperature on carotenoid from marine microorganism

Temperature (°C)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
20	9.97	0.75	28.8
30	7.29	1.97	20.1
40	7.41	4.13	82.7
50	6.95	0.89	22.7

Table 7. Effect of initial pH concentration on carotenoid from marine microorganism

Concentration (%)	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
5.0	4.97	0.09	0
6.0	7.45	4.05	72.1
7.0	7.56	4.16	89.7
8.0	7.57	4.11	72.9
9.0	7.64	3.71	57.0
10.0	9.87	0.03	0

이상에서는 생육도 뿐만 아니라 색소가 전혀 생산되지 않았다.

통기량의 영향

용존산소가 균 생육 및 색소 생산에 미치는 통기량의 영향을 검토해 보기 위해서 500ml 진탕 플라스크에 50, 100, 150, 200, 250, 300ml씩의 기본배지를 준비하여 배양한 결과 Table 8에서 나타낸 바와 같이 100ml의 배지가 들

Table 8. Effect of aeration concentration on carotenoid from marine microorganism

Volume(ml) in 500ml flask	Final pH	Cell growth (660nm)	Total carotenoids (mg%)
50	7.15	3.32	79.0
100	7.28	3.40	80.1
150	7.18	2.21	45.0
200	7.11	2.10	31.1
250	7.01	1.37	21.3
300	6.82	0.99	22.1

어있는 플라스크의 배양액이 가장 높은 색소 생산을 나타내었다. 고염의 배양액에서 산소공급이 특히 중요하고 이는 고호염균의 생육에 영향을 미치는 것으로서 일반적으로 액체배양에서 적당한 부피는 약 1/3으로 보고되었으나(22) 본 실험의 결과는 이에 비해 보다 높은 산소 요구도를 나타내었다.

빛의 영향과 경시변화

배양조건들을 종합한 최적조건에 따라 배양시간 및 빛의 영향에 따른 색소 생산을 검토한 결과 Fig. 1 및 2와 같이 빛의 유무에 관계없이 균의 생육과 함께 색소 생산이 증가되기 시작하였으며, 균의 생육 정도를 최대로 한 후 색소가 생산되는 2차 대사산물을 알 수 있었다. 또한 빛을 가한 조건(60 lux)에서는 5일(Fig. 1, 3)에, 빛이 없는 조건에서는 7일(Fig. 2)에 가장 높은 색소 생산을 나타내었으며, 빛이 없는 조건에서는 색소 생산 기간은 다소 느리지만 빛을 가한 조건에 비해 보다 높은 색소를 생산하였을 뿐만 아니라 색소의 소실도 천천히 진행되었다. 그러므로 본 균주는 빛이 있는 조건에서는 색소합성이 빠른

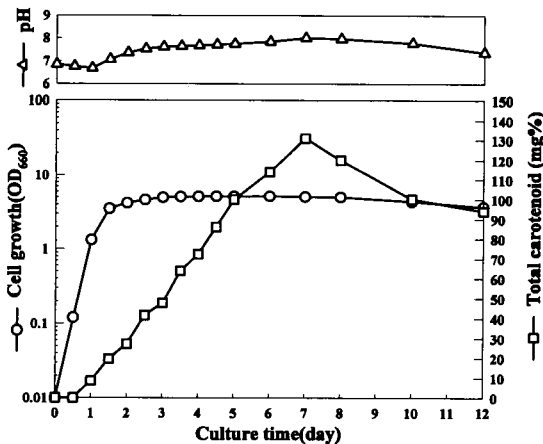


Fig. 1. Carotenoid pigment from marine microorganism during the shaking culture under optimal growth condition(with the light).

Optimal growth condition was as follows: 1.0% sucrose, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.002% ferric sulphate(pH 7.0) at 40°C.

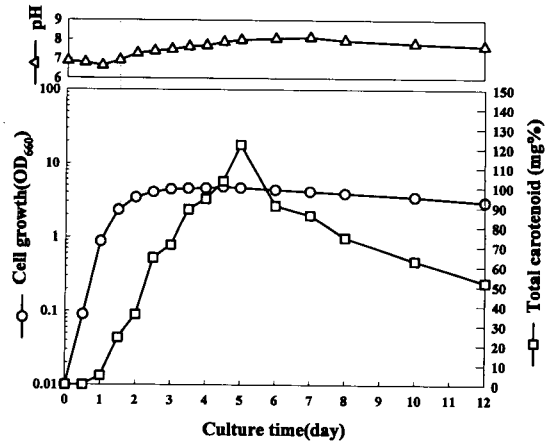


Fig. 2. Carotenoid pigment from marine microorganism during the shaking culture under optimal growth condition(with no light).

Optimal growth condition was as follows: 1.0% sucrose, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.002% ferric sulphate(pH 7.0) at 40°C.



Fig. 3. Carotenoid pigment from marine microorganism under optimal growth condition(with the light).

반면 합성된 색소는 빛에 불안정하여 소실되는 것으로 사료된다.

요 약

양식어의 먹이원으로 이용하기 위해서 25% NaCl 농도에서 증식할 수 있는 고호염균으로부터 카로테노이드 색소를 대량으로 생산하기 위한 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 카로테노이드 색소를 생산하기 위한 배양조건은 40°C, pH 7.0이었으며, 최적 생육배지는 1.0% sucrose, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate, 0.002% ferric sulphate로 조성하여 500ml 삼각 플라스크에 100ml씩 분주하여 진탕 배양하였다. 빛을 가한 조건에서 카로테노이드 색소의 생산은 배양 5일에 가장 높았다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부에서 시행한 1997년도 해양수산 특정과제 개발사업 과제의 첨단기술 개발사업에 의하여

수행된 연구결과이며 연구비를 지원해 주신 해양수산부에 심심한 사의를 표합니다.

문 헌

1. Grant, W. D. and Larsen, H. : Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov. In "Bergey's manual of systematic bacteriology" Pfenning, N.(ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 3, pp.2216-2233 (1989)
2. Kushwaha, S. C., Gochnauer, M. B., Kushner, D. J. and Kates, M. : Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderate halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 241-245(1974)
3. An, G. H., Schuman, D. B. and Johnson, E. A. : Isolation of *phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 116-124(1989)
4. Johnson, E. A., Villa, T. G. and Lewis, M. J. : *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*, **20**, 123-134(1980)
5. Britton, G. : Carotenoids. In "Methods in plant biochemistry" Academic Press, London, Vol. 7, pp.473-518(1991)
6. Bjorndahl, T. : *The economics of salmon aquaculture*. Blackwell Scientific Publications, Oxford(1990)
7. Johnson, E. A., Conklin, D. E. and Lewis, M. J. : The yeast *phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fisheries Research Board Canada.*, **34**, 2417-2421(1977)
8. Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. : Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Fermentation Bioengineering.*, **71**, 335-339 (1991)
9. Arpin, N., Lebreton, J. and Fiasson, J. L. : Recherches chimiotaxinomiques sur les champignons. II. Les caroténoïdes de *peniophora aurantiaca*(Bres.)(Basidiomycète). *Bulletin de la Société de Mycologie de France.*, **82**, 450-459(1966)
10. Nelis, J. K. : Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriology Reviews*, **38**, 272-290(1974)
11. Hsieh, L. K., Lee, T. C., Chichester, C. O. and Simpson, K. L. : Biosynthesis of carotenoids in *Brevibacterium* sp. KY-4313. *J. Bacteriol.*, **118**, 385-393(1974)
12. Calo, P., de Miguel, T., Sieiro, C., Velazquez, J. B. and Villa, T. G. : Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxyechinenone and trans-astaxanthin. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 282-285(1995)
13. Park, H. S. and Jung, M. J. : Isolation and identification of an extremely halophilic bacterium from salar. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 671-677(1996)
14. Sehgal, S. N. and Gibbons, N. E. : Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.*, **6**, 165-169(1960)
15. Davies, B. H. : Carotenoids. In "Chemistry and Biochemistry of plant pigments" Goodwin, T. W.(ed.), 2nd ed., Academic Press, London, Vol. 2, pp.38-165(1976)
16. Boussiba, S., Fan, L. and Vonshak, A. : Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In "Methods in Enzymology", Packer, L.(ed.), Academic Press, London, Vol. 213, pp.386-391(1992)

(1999년 9월 22일 접수)