한국생물공학회지 제15권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 6, 673-676(2000)

호염세균 *Haloarcular* sp. EH-1으로부터 추출한 카로테노이드 색소의 특성

†정 영 기 · [1]최 병 대 · [1]강 석 중 · [1]정 성 훈 · [2]이 용 규 · 김 해 윤 · 정 명 주
동의대학교 미생물학과, [1]경상대학교 해양생물이용학부/해양산업연구소, [2]동서대학교 식품공학부
(접수 : 2000. 11. 14., 게재승인 : 2000. 12. 20.)

Characteristic of Carotenoid Component from Halophilic Bacteria, *Haloarcular* sp. EH-1

Yong-Kee Jeong†, Byeong-Dae Choi[1], Seok-Joong Kang[1], Sung-Hoon Jeong[1], Yong-Kyn Lee[2], Hae-Yun Kim, and Myung-Ju Jung
Department of Microbiology, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea
[1]Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
[2]Division of Food and Biotechnology, Dongseo University, Pusan 614-716, Korea
(Received : 2000. 11. 14., Accepted : 2000. 12. 20.)

In order to identification of carotenoid pigments of *Haloarcular* sp. EH-1 as a food for fish were analyzed. The content of carotenoids cultured in 3 L and 5 L bioreactor were 83.1 and 82.7 mg%, respectively. Identification of each carotenoid was achieved by means of co-TLC and co-HPLC with authentic specimens, spectroscopic and instrumental analyses, and chemical treatments as usual. The main components identified were β-carotene(8.1%), 3′-hydroxyechinenone (42.0%) and astaxanthin(25.0%).

Key Words : halophilic bacteria, carotenoids, TLC, HPLC

서 론

해양에는 많은 종류의 생물자원이 서식하고 있으며, 이들 해양생물은 육상생물과 전혀 다른 환경에서 생육하기 때문에 생리적 대사과정과 그 성분에 있어서도 다른 점이 많아 그들이 생산하는 대사산물도 새로운 물질이 많을 것으로 기대된다. 해양생물의 천연색소인 카로테노이드는 항산화, 항종양, 체색 개선 등의 효과를 갖는 것으로 밝혀져 기능성 소재로서 가치가 높아 식품, 화장품, 어류의 체색 개선제 등으로 사용되고 있다(1). 지금까지 알려진 많은 종류의 카로테노이드들은 해양 미생물, 조류, 동물에 분포하고 있으며, 이들 해양생물에 존재하는 카로테노이드는 매우 독특한 구조를 갖고 있다. 예를들면 aromatic, allenic, epoxide, glycoside 및 sulfate와 같은 원자단을 함유하고 있다(2,3). Yokoyama et al.(4)은 많은 종류의 해양 박테리아로부터 높은 극성을 갖는 오렌지색의 2가지 새로운 형태의 sulfate형 카로테노이드를 발견하기도 하였다.

카로테노이드는 천연색소를 함유한 재료로부터 추출하여야 하나, 원재료의 색소함유량이 매우 낮아 합성품보다 경쟁력이 떨어지며, 각 나라마다 천연색소의 사용에 대한 규정이 다르기 때문에 천연색소의 식품첨가물로서의 이용이 어려운 실정이다(5). 그러나 최근 천연산 식품첨가물의 사용에 대한 소비자의 요구가 높아지면서 천연색소의 사용량도 증가하고 있어 미국, 호주 및 이스라엘 등지에서는 *Dunaliella salina* (6), *Haematococcus pluvalis*(7,8), *Phaffia rhodozyma*(9) 등 조류 혹은 균체로부터 얻는 생물공학적 생산기술의 개발이 이루어지고 있으며, 특히 해양 미생물을 이용한 대량배양을 통한 색소의 생산을 위해 많은 연구가 진행되고 있다(10).

따라서 본 연구에서는 해양에서 분리된 호염 세균이 함유한 적색색소의 함량과 성상을 분석함과 동시에 그 응용가능성을 검토하기 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

세균 배양조건

천일염으로부터 분리한 *Haloarcular* sp. EH-1을 사용하였으며, 색소생산을 위한 기본배지(11)는 1.0% sucrose, 1.0% yeast extract, 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulfate, 0.002% ferric sulfate로 조성하여 500 mL 삼각플라스크에 100 mL 씩 분주한 후, 40℃에서 5일간 진탕배양(180 rpm)하여 색소추출

†Corresponding Author : Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea
Tel : +82-51-890-1534, Fax : +82-51-894-0840
E-mail : ykjeong@hyomin.dongeui.ac.kr

Table 1. Pigments content of cultured *Haloarcular* sp. EH-1

Bioreactor volume (L)	Pigment content (mg%)
3*	83.1
3**	82.7

* Bioreactor 3 L.
** Bioreactor 5 L.

을 위한 균을 얻었다.

총 카로테노이드의 추출 및 정량

균체로부터 카로테노이드의 추출은 Calo 등(12)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 배양액을 4℃에서 원심분리(7,000 rpm, 20 min)한 후 침전물만을 회수하여 실온에서 증류수로 세포를 용해시킨 후 acetone 일정량을 가하여 마쇄기 (Handy homogenizer, T25-S1, Staufen, Germany)로 잘 마쇄하여 실온, 암소에 하룻밤 방치한 다음 색소 성분을 추출, 여과하였다. 이 조작을 3회 반복하여 시료로부터 색소를 충분히 용출시켰다. 여과된 acetone 추출물을 회전진공증발 농축기로 40℃ 이하에서 농축하여 100 mL로 정용하였다. 총 카로테노이드 함량은 diethyl ether를 control 용매로 사용하여 460 nm에서 McBeth(13)의 방법에 따라 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Tokyo, Japan)로 측정하였고 흡광계수는 $E^{1\%}_{1cm}$ = 2,200으로 계산하였다(14).

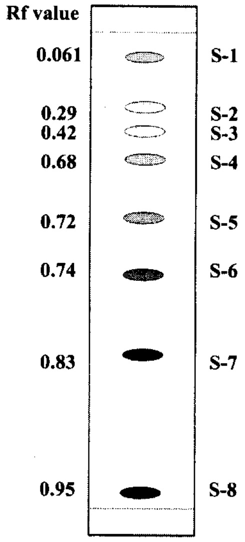
카로테노이드의 분석 및 동정

색소 추출물은 회전진공증발 농축기로 40℃ 이하에서 완전히 농축하였다. 농출물에 2 mL의 hexane을 첨가하여 Silica SEP-PAK column에서 분리하였다(14). TG(triglyceride)를 분리하기 위하여 약 8 mL의 hexane을 용출시키고, 카로테노이드 색소는 약 40 mL의 acetone으로 용출시켰다. 용출된 색소 추출물은 질소 기류하에서 농축한 다음 TLC 및 HPLC 분석에 이용하였다. 농축된 카로테노이드는 Kieselgel 60G를 도포한 thin layer chromatography (TLC) 상에서 hexane/acetone (7:3, v/v)을 용매로 하여 분리하였다. 분리된 카로테노이드를 정제하기 위하여 HPLC 시스템을 사용하였다. 칼럼은 250× 45 mm의 LiChrosorb RP 18(Hewlett Packard, Germany)을 사용하였고, 흡광도는 LKB UVM 2141 uv-visible spectrophotometer로 460 nm에서 측정하였다. 용매 A는 acetone/methanol (75:25, v/v), 용매 B는 acetone/water(75:25, v/v)를 사용하여 1.0 mL/min씩 용출시키면서 분석하였다. 용매 혼합조건은 용매 A(0%)가 10분 후에 65%, 30분 후에 80%, 60분 후에 100%가 되도록 하였다. 각 peak의 동정은 용출되는 순서와 retention time, 표품과의 co-TLC, co-HPLC 및 가시부 흡수극대치의 비교, 화학적 변화(15) 등을 비교하여 동정하였다.

결과 및 고찰

카로테노이드의 분획

Bioreactor에서 5일간 배양된 세균을 원심분리하여 균체만 모으고 이 균체로부터 색소를 추출하였다. 배양기에 따른 차이를 알아보기 위하여 3 L 및 5 L 용량의 bioreactor를 각각 사용하여 배양한 결과(Table 1), 83.1 및 82.7 mg%의 카로테노이드 색소함량을 나타내어 배양기에 따른 변화는 적은 것으로 나타났다. Calo 등(12) 등이 호염세균 세가지 종류를 이용하여 배양한 결과 *Halobacterium salinarium*은 2,400 μg/g의 탄소수 40 및 탄소수 50의 카로테노이드를 합성하였고, *Haloarcular hispanica*는 1,350 μg/g의 카로테노이드를 합성하였으며, 이 중 45%는 탄소수 40의 카로테노이드였고, *Haloferax mediterrania*는 700 μg/g의 카로테노이드를 합성하였다고 하였다. 본 실험 결과 830 μg/g의 카로테노이드를 함유한 것으로 나타나 이들 균보다는 적은 양의 색소를 합성하는 것으로 나타났다. 이들 균체의 카로테노이드 색소조성을 분석하기 위하여 각각의 시료를 TLC(Kieselgel 60G, Germany)한 결과 같은 조성을 나타내었다(Figire 1). 균체에 함유된 카로테노이드는 적색을 띠었으며, 이들에 함유된 색소조성을 파악하기 위하여 hexane/acetone(7:3, v/v) 혼합용매로 전개시켜 분리하였다. 분리된 색소는 5개의 band로 분리되었으며, 이들 각각의 band를 분취하여 농축한 후 각 band를 정제하였다. Band 1은 yellow, band 2는 red orange, band 3은 deep red, band 4는 pink 그리고 band 5는 red를 각각 나타내었다.



Figuer 1. Thin-layer chromatogram of carotenoids of *Haloarcular* sp. EH-1 on silica gel 60 using hexane/acetone(7:3, v/v).

카로테노이드의 동정

양식 산업에 있어 어류의 체색개선제는 매우 중요하다. 1992년 미국 FDA에서는 인공합성색소의 어류 체색개선제로의 사용을 금지함에 따라 천연색소원의 탐색에 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다(16). *Phaffia rhodozyma*를 비롯한 다른 유기체로부터 카로테노이드 색소를 추출하여 양식 및 식품산업에 응용하려고 하였으나, 효모 세포벽의 파괴를 쉽게 할 수 있는 방법의 개발이 이루어지지 않아 산업에의 적용이 어려움을 겪고 있다. 이를 개선하기 위한 방법의 하나로 세균을 이용한 천연색소 생산에 관심을 갖게 되었고, 그 중 호염성 세균을 이용하면 첫째, 25% 이상의 염분농도에서 성장하기 때문에 다른 균의 오염을 막을 수 있고, 둘째, 15% 이하의 염분농도에서 쉽게 세포벽 분해가 일어나기 때문에 복잡한 세포벽 분해과정을 거칠 필요가 없게 되며, 셋째, 유기

Table 2. Absorption maxima and identification of carotenoids isolated from the *Haloarcular* sp. EH-1

Fraction No*	Absorption maxima(nm)			Identification
	Ethanol	Petroleum ether	Chloroform	
1	448	451	464	β-Carotene
2	480	478	490	β-Carotene
3	453	454	467	3'-hydroxyechinenone
4	476	467	488	Astaxanthin
5	-	449	-	Unknown

* The fractions were isolated by thin-layer chromatography(TLC).

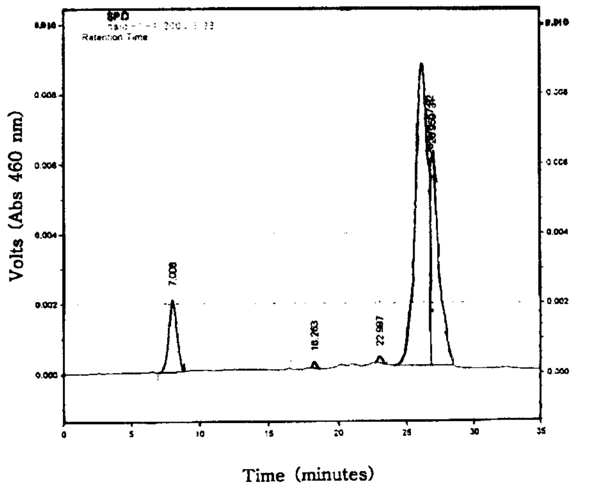


Figure 2. HPLC chromatogram of carotenoids from *Haloarcular* sp. EH-1.

용매를 사용하지 않고 색소추출이 가능하기 때문에 용매추출에 의한 동물의 피해를 줄일 수 있는 장점을 갖고 있으므로 경제적인 배양만 확립된다면 매우 우수한 천연색소 생산산업이 형성될 것으로 생각된다(12). 분리 정제된 각 분획의 용매에 따른 가시부 흡수극대치를 Table 2에 나타내었다.

Band 1; 용매에 따른 가시부 흡수극대치를 보면 ethanol에서 448, 480 nm, petroleum ether에서 451, 478 nm 그리고 chloroform 용액에서 464, 490 nm로 나타나 전형적인 β-carotene type의 흡수극대치로 나타났으며, 당근으로부터 추출한 표품의 β-carotene과 co-HPLC한 결과(Figure 2) 단일대가 얻어져 β-carotene으로 동정하였다.

Band 2; 희미한 흔적 량으로 나타나 동정하기 어려웠다.

Band 3; 각 용매에 따른 가시부 흡수극대치를 보면 ethanol에서 453 nm, petroleum ether에서 454 nm, chloroform에서 467 nm로 각각 단일 흡수대를 나타내었다. $NaBH_4$로서 환원시켰을 때 petroleum ether 내에서 450, 479 nm로 전이되어 β-carotene type으로 나타났다. Acetyl화 반응, allylic-OH 활성시험, $NaBH_4$에 의한 환원반응 등(15)의 결과로 미루어 볼 때 allyl 탄소인 C-3에 한개의 oxo 원자단과 OH 원자단을 각각 갖는 것으로 나타났다. 그리고 녹조류인 *Spirulina maxima* 로부터 분리된 3′-hydroxyechinenone과 co-HPLC 한 결과 단일 band로 나타나 3′-hydroxyechinenone으로 동정하였다.

Calo 등(12)이 보고한 호염성 세균인 *Halobacterium salinarium* NRC-1에서 추출된 카로테노이드의 주성분은 3′-hydroxyechinenone이라 하였고, Johnson(17)이 *Halobacteria*로부터 탄소수 40개인 카로테노이드가 sataxanthin과 매우 유사한 합성과정에 의하여 3′-hydroxyechinenone이 합성된다고 보고하고 있어 band 3를 3′-hydroxyechinenone으로 동정하였다.

Band 4; ethanol 내에서의 흡수극대치는 476 nm, petroleum ether 내에서 467 nm, chloroform 내에서 488 nm로 나타나 keto type 카로테노이드 특유의 단일 흡수대를 보였고, krill (18)에서 얻은 표품 astaxanthin과 co-HPLC 한 결과 단일 band로 나타나 astaxanthin으로 동정하였다.

Band 5; petroleum ether내에서 449 nm에서 흡수 극대치를 나타내었으며, 그 외 다른 유기용매 내에서는 흡수를 보이지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 band 5는 알려지지 않은 물질로 예상되며 이 물질의 동정은 더 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

호염성 세균이 갖는 특성 즉, 다른 균에 의한 오염 감소, 세포벽 파괴의 수월성, 용매를 이용하지 않는 색소추출 등을 응용하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 호염성 세균인 *Haloarcular* sp. EH-1 으로부터 추출한 천연색소를 bioreactor에서 배양한 후 색소의 함량을 조사한 결과 3 L 용량에서는 83.1 mg%, 5 L 용량에서는 82.7 mg%의 카로테노이드를 함유하는 것으로 나타났다. 이들의 주된 성분은 β-carotene (8.1%), 3'-hydroxyechinenone (42.0%) 및 astaxanthin(25.0%)으로 동정되었으며, 이들 성분을 동정하기 위하여 표품과의 co-TLC, co-HPLC, 가시부 흡수스펙트럼, 화학적 변화 등을 조사하였다.

감 사

본 연구는 해양수산부에서 시행한 1997년도 해양수산 특정연구 개발사업 과제의 현장애로기술개발사업에 의해 수행된 연구결과이며 연구비를 지원해 주신 해양수산부에 심심한 사의를 표합니다.

REFERENCES

1. Matsuno, T.: Mechanism of carotenoid, carotenoid of marine of organisms, Kanshohen, Kouseisha kouseikaku, Tokyo, p.9-22 (1994)
2. Liaaen-Jensen, S. : Marine carotenoids: recent progress. *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 1-12 (1990)
3. Matsuno, T. : Animal carotenoids. In *Carotenoids chemistry and biology* Krinsky, N. I., Mathews-Roth, M.M. and Taylor, R. F. (ed.), Plenum Press, New York, p.59-74 (1990)
4. Yokoyama, A., Izumida, H. and Shizuri, Y. : New carotenoid sulfates isolated from a marine bacterium. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1187-1191 (1996)
5. Hong, S.P., Kim, M.H. and Hwang, J.K. : Biological functions and production technology of carotenoids. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1297-1306 (1998)
6. Michael, A. B. : Products from microalgae. *Infofish Inter-*

national, **5**, 21-26 (1993)
7. Makio, K. : Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferm. Bioen.*, **74**, 17-24 (1992)
8. Makio, K. : Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green algae, *Haematococcus pluvialis. J. Ferm. Bioen.*, **74**, 61-66 (1992)
9. An G. H., Kim C. H., Choi, E. S. and Rhee, S. K. : Medium optimization for cultivation of carotenoid hyper-producing *Phaffia rhodozyma mutant* HT-5FO1C. *J. Ferm. Bioen.*, **82**, 515-518 (1993)
10. Johnson, E. A. : Astaxanthin from microbial sources. *Cri. Rev. Biotech.*, **11**, 297-301 (1991)
11. Kim, T.S., Jung M.J., Ryu, B.H., Joo, W.H., Park, J.U. and Jeong, Y.K. : Optimal growth conditions for carotenoid pigment production from marine microorganism. *J. Korean Soc. Foos Sci. Nutr.*, **28**, 1239-1243 (1999)
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. Bactriol.*, **79**, 282-285 (1995)
13. McBeth, J. W. : Carotenoid from nudibranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **41B**, 55-68 (1972)
14. Akhtar, P., Gray J.A., Cooper T. H., Garling, D. L. and Booren, A. M. : Dietary pigmentation and deposition of α-tocopherol and carotenoids in rainbow trout muscle and liver tissue. *J. Food Sci.*, **64**, 234-239 (1999)
15. Matsuno, T. and Maoka, T. : Isolation of a new carotenoid 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-dihydro-β-carotene from sea mussels. *Nippon Suisan Gakkaishi,* **47**, 377-384 (1981)
16. Lovell, T. : Dietary enhancement of color in ornamental fish. *Aquaculture Magazine*, **18**, 77-79 (1992)
17. Johnson, E.A. : New advances in astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma.* In *Profiles and Biotechnology* Villa, T.G. and Abalde, J. (ed.) Universidad de Santiago de Compostela, p.289-299 (1992)
18. Yamaguchi, K., Miki, W., Toriu, N., Kondo, Y., Murakami, M., Konosu, S., Satake, M. and Fujita, T. : The composition of carotenoid pigments in the Antarctic krill *Euphausia superba. Nippon Suisan Gakkaishi,* **49**, 1411-1415 (1983)