

## Rhodotorula glutinis로 부터 Carotenoids의 추출방법

박 평 규 · \*김 의 용  
서울시립대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 2001. 12. 10., 게재승인 : 2002. 2. 20.)

### Extraction Method of Carotenoids from *Rhodotorula glutinis*

Pyoung Kyu Park and Eui Yong Kim†  
Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea  
(Received : 2001. 12. 10., Accepted : 2002. 2. 20.)

An efficient method of extraction for carotenoids in *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 was developed. Major carotenoids produced were identified as torularhodin of 61.7%,  $\beta$ -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 carotenoids, in compared with dried and wet type cells.

**Key Words** : carotenoid, extraction, torularhodin,  $\beta$ -carotene, torulene

#### 서 론

카로티노이드는 보통 8개의 isoprene기로 구성된 aliphatic 혹은 aliphatic-alicyclic구조를 갖고 있는 색소물질로 두 그룹으로 나눌 수 있다.  $\beta$ -carotene 및 lycopene 등과 같이 탄소와 수소만으로 구성된 카로틴(carotene)과 lutein, zeaxanthin, violaxanthin 등과 같이 분자내 탄소와 수소 이외에 산소도 갖고 있는 크산토펜(xanthophyll)로 구분된다(Figure 1). 이들 카로티노이드는 항산화 효능이 뛰어나서 인체의 노화방지, 항암효과 및 영양강화 등 의약용으로 사용될 뿐 아니라 동물의 성장촉진, 질병발생 억제 효과를 보였으며 식물에서는 광합성을 도와주는 특성이 있다. 특히 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화 및 산소 라디칼의 제거에 의한 항암작용 등으로 인체에 중요한 대사적 역할을 나타낸다(1-2). 이 외에도 카로티노이드는 식품, 화장품, 가두리 양식 어류의 체색 개선제, 사료 및 건강식품 등으로 산업적인 측면에서 그 수요가 폭증하고 있다(3-4).

1953년 스위스의 Roche사는 항산화력이 우수한  $\beta$ -carotene을 최초로 화학 합성하였으며 현재 canthaxanthin,  $\beta$ -apocarotenal, astaxanthin 등을 생산 보급하고 있다. 하지만 화학 합성된 카

로티노이드는 천연 카로티노이드 보다 항산화 효능이 10배 정도 낮은 수치를 보이며 생체 흡수율이 떨어질 뿐 아니라 유해 안정성 여부 등의 조사가 미비하여 1992년 미국 FDA에서는 합성색소의 어류 체색 개선제의 사용을 금지하고 있다(5).

천연 카로티노이드는 미생물과 고등식물에 의해 생합성되

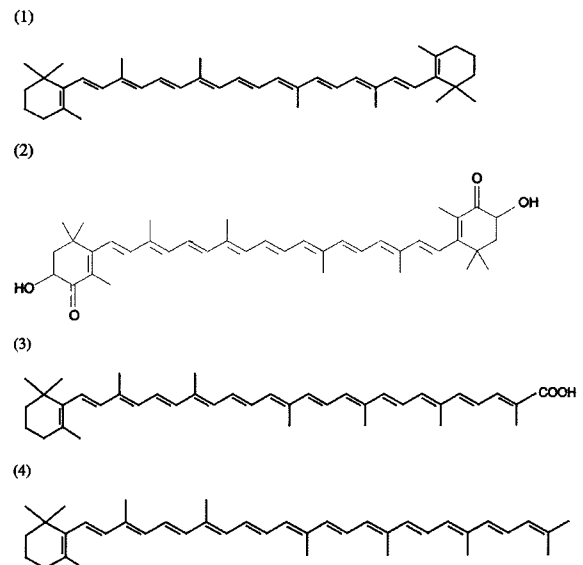


Figure 1. Structures of carotenoids. (1)  $\beta$ -carotene, (2) astaxanthin, (3) torularhodin, (4) torulene.

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
University of Seoul, Seoul 130-743, Korea  
Tel : +82-2-2210-2530, Fax : +82-2-2216-0570  
E-mail : eykim@uos.ac.kr

고 있다. 고등식물은 성장속도가 느리며 색소추출 과정이 복잡하여 수요를 충족 시키지 못하는 단점이 있다. 반면 미생물 중에는 주로 조류와 효모가 연구되고 있다(6). 미국 등에서 미세조류인 *Dunaliella salina*를 배양하여 비타민 A의 전구체인  $\beta$ -carotene을 생산하며 *Haematococcus pluvialis*으로는 항산화력이 우수한 astaxanthin을 생산하고 있다(7-8). 하지만 이들 조류는 균체농도가 매우 낮아 상당히 큰 부지면적이 요구되는 단점이 있다. 이에 반해 효모를 이용한 방법은 고농도 배양이 가능하고 배양이 쉬워 산업적 응용 가능성이 높으나 다당류로 구성된 효모의 세포벽이 견고하여 색소의 추출에 어려움이 있다(9). 색소 추출은 French press와 homogenizer를 이용한 물리적인 방법, 산과 염기를 이용한 화학적인 방법과 효소를 이용해 세포벽을 파괴하는 생물학적 방법이 있다. 그러나 물리적인 방법은 색소의 회수율이 낮으며, 생물학적인 방법은 미생물의 특성에 따라 세포벽 분해효소의 활성이 다르며 비교적 고가의 효소가 필요하다는 문제가 있다. 반면 화학적인 방법은 쉽고 빠르게 색소를 추출할 수 있어 실험실적 규모에서 많이 사용되고 있다. 하지만 색소추출 용매가 잔류함에 따라 야기되는 문제가 보고되고 있다(10).

본 연구에서는 물리·화학적 전처리 방법과 추출 용매의 종류에 따른 카로티노이드의 추출효율을 살펴 보았다. 또한 추출 대상 세포의 형태에 따른 카로티노이드의 추출농도를 측정하여 최적의 추출조건을 설정하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

본 실험에서는 전보(11)에서 보고된 *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 균주를 사용하였다. 성장배지와 카로티노이드 합성배지는 YM배지(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%)를 사용하였다. 균체성장은 건조세포 중량과 흡광도의 상관관계식을 이용하여 확인하였다.

### 카로티노이드의 추출방법

카로티노이드의 추출은 Sedmak(12)의 방법을 수정하여 다음과 같은 절차로 진행하였다. YM배지에서 3일간 배양한 후 일정량의 배양액을 원심분리한 후 증류수로 2번 세척하였다. 다음 특별한 언급이 없는 한 세포는  $-58^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간 이상 냉동건조를 한 후 시료로 사용하였다. 냉동 건조된 일정농도의 효모에 실험방법에 따라 물리적 방법은 sonicator(Branson, USA)를 이용하였고 화학적 방법은 HCl이나 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 1 mL를 첨가하여 세포벽을 파괴한 후 acetone과 petroleum ether를 각각 1 mL첨가하여 petroleum ether층에서 색소를 추출하였다. 이때 acetone과 petroleum ether 층에 존재하는 카로티노이드의 에틸렌화를 파괴하기 위해 20% NaCl 1 mL을 첨가하였다.

### 카로티노이드의 분리 및 정량

추출된 카로티노이드는 hexane: acetone(1:1, v/v) 용매를 이용하여 TLC(Kiesel gel 60F, Merck, Germany)로 분리하였다. 분리된 각각의 카로티노이드는 용매에 녹여 UV/Vis spectrophotometer (HP 8452, USA)로 흡광도를 측정함으로써 정성분석하였다. 또한 세포 내에서 추출된 각각의 카로티노이드는 HPLC(칼럼:



Figure 2. Thin-layer chromatogram of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis*. (A: torularhodin, B: torulene, C:  $\beta$ -carotene).

$\mu$ -Bondapak C18, 검출기: UV detector, 검출 파장: 435 nm, 용매: acetonitrile-tetrahydrofuran- $\text{H}_2\text{O}$  5:3:2)를 이용하여 정량 분석하였다.

카로티노이드의 전체농도는 흡광계수  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2500$ 으로 하여 흡광도를 측정함으로써 다음 식에 의해 계산하였다(13).

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

### 카로티노이드 추출 인자의 영향

카로티노이드를 추출하는 전처리 과정으로 물리·화학적 방법을 서로 비교 검토하였다. 물리적인 방법은 Sonicator를 이용하였으며, 화학적인 방법으로는 HCl과 DMSO를 사용하였다. 카로티노이드는 지용성과 수용성으로 나누어지며 용매에 따라 용해도의 차이가 있으므로(14) 다양한 용매를 사용하여 카로티노이드의 추출효과를 비교하였다. 또한 세포 형태에 따른 카로티노이드의 추출 효과를 비교하기 위해  $22^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 균체를 원심분리하였다. 다음 증류수로 2번 세척한 습한 세포, 습한 세포를  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 수분을 완전히 제거한 건조된 세포, 습한 세포를 냉동 건조시킨 세포를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 카로티노이드의 생성

본 연구에 사용된 균주는 자색을 띠는 효모로서 주요 산물로 세포 외 지질과 세포 외 다당류를 생성하였다(11). 카로티노이드의 생성을 확인하기 위해 균주를 YM배지에서 3일 동안 배양하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포로부터 용매를 이용하여 색소를 추출하였으며 이를 TLC상에서 전개시킨 결과 Figure 2에서와 같이 3개의 띠가 나타났는데, 이들은 자색

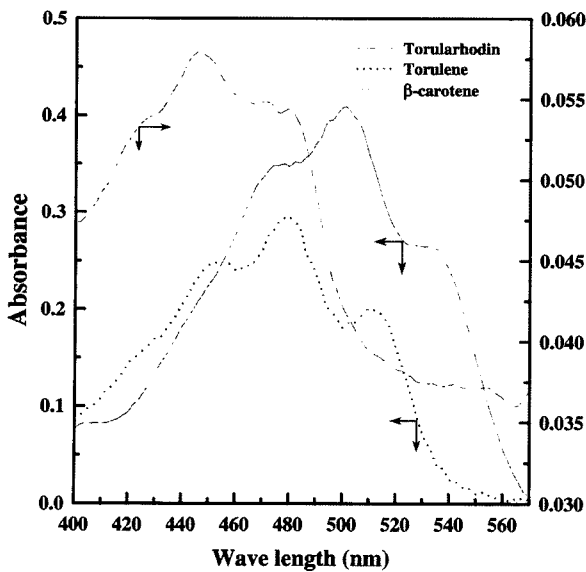


Figure 3. Absorbance spectra of torularhodin, torulene, and  $\beta$ -carotene extracted from *Rhodotorula glutinis*.

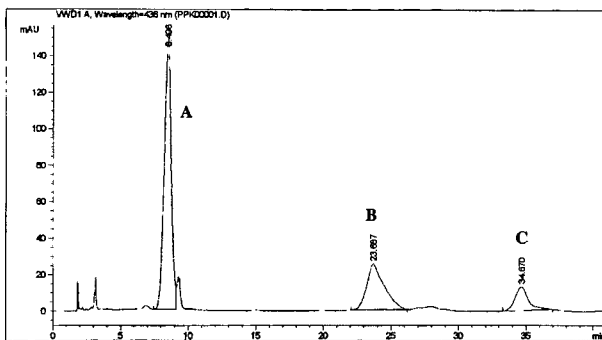


Figure 4. HPLC analysis of carotenoids in *Rhodotorula glutinis*. (A: torularhodin, B: torulene, C:  $\beta$ -carotene).

의 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 450 nm, 484 nm, 501 nm 인  $\beta$ -carotene, torulene, torularhodin이었다(Figure 3). HPLC를 통해 정량분석한 결과 전체 색소 중에서 torularhodin이 61.7%로 가장 많았고  $\beta$ -carotene과 torulene순으로 각각 28.8%, 9.5%를 나타내 colony색의 대부분을 torularhodin이 점유하고 있음을 알 수 있었다(Figure 4).

**전처리 방법에 따른 카로티노이드의 추출**

대부분의 카로티노이드는 미생물의 원형질막 또는 세포질막에 분포하여 막의 유동화에 영향을 주며(17), 자유라디칼 반응의 억제 기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포를 보호하기 위해 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(18). 따라서 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 0.5 N

Table 1. The effect of chemical and heat treatment on the extraction yield of carotenoids.

Chemical	Heat Treatment	Extracted carotenoid ( $\mu\text{g/g}$ yeast)	Relative extraction yield(%)
0.5 N HCl	no	0.46	0.2
	60 $^{\circ}\text{C}$	23.31	9.8
	100 $^{\circ}\text{C}$	58.43	24.6
6 N 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

Table 2. Total concentration of carotenoids extracted according to solvents.

Solvent	Total carotenoids ( $\mu\text{g/g}$ yeast)	$\lambda_{\text{max}}$
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

HCl, 6 N HCl과 DMSO를 사용하였다. 후자의 전처리 방법에 따른 카로티노이드의 추출효율은 Table 1에 나타내었다. HCl을 사용한 경우 열처리를 병행하지 않으면 카로티노이드가 거의 추출되지 않았다. 열처리를 병행할 경우 0.5 N 보다는 6 N의 진한용액을 사용한 경우가 추출효율이 높았다. 특히 6 N HCl의 경우 열처리 온도에 크게 영향을 받아 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추출효율이 급격히 증대되어 225.4  $\mu\text{g/g}$ -yeast의 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 등(9)의 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 237.7  $\mu\text{g/g}$ -yeast로 추출효율이 가장 높게 나타났다. Sonicator만을 사용한 경우는 열처리 유무에 무관하게 카로티노이드의 추출농도는 45.5  $\mu\text{g/g}$ -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.

**용매의 종류에 따른 카로티노이드의 추출**

카로티노이드 각각의 성분들은 용매의 종류에 따라 용해도가 다르므로 용매의 선택에 따라 추출효율에 영향을 주게 된다(14). 본 실험에서는 7가지 용매를 사용하여 카로티노이드를 추출하였는데 추출된 카로티노이드의 총 농도와 최대 흡수파장을 Table 2에, 흡수파장 스펙트럼을 Figure 5에 나타내었다. 카로티노이드 추출용매 중 가장 높은 추출 농도를 보

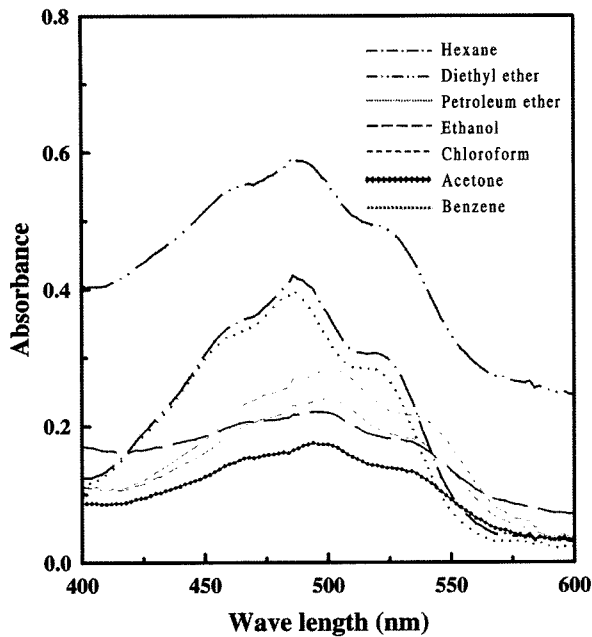


Figure 5. The variation of absorbance spectra for total carotenoids according to extraction solvents.

인 용매는 diethyl ether로 350.2  $\mu\text{g/g}$ -yeast를 보였고, 다음은 ethanol과 petroleum ether순으로 나타났다. 이상의 결과는 *Rhodotorula rubra*의 색소를 추출하는데 hexane: ethyl acetate 용매보다 diethyl ether가 더 효과적이라는 Martin 등(19)의 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 이를 Table 2에 나타내었다. Benzene과 chloroform은 최대 흡수파장이 502, 500 nm로 torularhodin의 최대 흡수파장인 501 nm에 근접하여 이들이 상대적으로 많이 추출되었음을 알 수 있다. 그러나 hexane, diethyl ether, petroleum ether 등은 486-468 nm로 benzene이나 chloroform에 비해 torularhodin의 상대적 추출효율이 떨어짐을 알 수 있었다. 이는 TLC에 의해 분리된 띠를 육안으로 관찰한 결과를 통해서도 확인할 수 있었다.

#### 세포의 형태에 따른 카로티노이드의 추출

동일한 조건하에서 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 1115.6  $\mu\text{g/L}$ 로 가장 높았으며 다음은 건조된 세포, 습한 세포의 순으로 각각 993.9  $\mu\text{g/L}$ , 707.7  $\mu\text{g/L}$ 인 것으로 나타났다. 이는 습한 세포에 비해 냉동건조된 세포가 1.6배, 건조세포는 1.4배 정도 카로티노이드의 추출 촉진효과가 있는 것이다. 이는 건조 또는 냉동건조시켜 세포로부터 수분을 가능한한 제거해 줌으로서 용매가 세포내로 용

이하게 침투되었기 때문에 나타난 결과라 판단되었다. 유사한 결과로 Osborne 등(20)은 색소를 추출하기 이전에 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 세포를 탈수하여 보다 높은 색소가 추출됨을 보고하였다. 따라서 건조과정이 카로티노이드 추출 이전에 필수적인 요소임을 알 수 있었다.

#### 요약

*Rhodotorula glutinis* KCTC 7989내에 존재하는 카로티노이드를 효율적으로 추출하기 위한 방법에 대해 연구하였다. *R. glutinis*에 의해 생합성되는 카로티노이드의 조성은 torularhodin 61.7%,  $\beta$ -carotene 28.8%, torulene 9.5%이었다. 세포 내에 존재하는 카로티노이드를 추출하기 위해 HCl로 세포를 전처리할 경우 열처리의 병행이 중요한 인자였지만, DMSO를 사용한 경우는 열처리 유무에 큰 영향을 받지 않았다. 추출용매에 따라 추출되는 카로티노이드의 조성이 영향을 받았다. 특히 벤젠과 클로로포름은 torularhodin의 추출에 효과적이었으며, 디에틸에테르를 사용했을 때 카로티노이드의 전체 추출농도가 가장 높았다. 건조된 세포나 습한 세포에 비해 냉동 건조된 세포에서 카로티노이드의 추출효율이 높게 나타났다.

#### REFERENCES

- Bendich, A. (1991),  $\beta$ -Carotene and The Immune Response, *Proc. Nutr. Soc.* **50**, 363-374.
- 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.
- 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.
- Vandamme, E. J. (1992), Production of Vitamins, Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **53**, 313-327.
- 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.
- Neil, H. J., De Leeenheer, A. P. (1991), Microbial Sources of Carotenoid Pigments Used in Food and Feeds, *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 181-191.
- Mako, K. (1992), Growth and Astaxanthin Formation of *Haematococcus pluvialis* in Heterotrophic and Mixotrophic Conditions, *J. Ferm. Bioeng.* **74**, 17-24.
- 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.
- 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.
- Britton, D., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander (1995), Carotenoids, Vol 1A: isolation and analysis., p91-95, Birkhauser verlag Press, Boston.
- 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, 3 rd 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 Office Analytical Cheists. (1980), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. pp858-861, Washington, DC.
  17. 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.
  18. Terado, J. (1989), Antioxidant Activity of  $\beta$ -Carotene-Related Carotenoids in Solution, *Lipid.* **24**, 659-661.
  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.