

재조합 대장균으로부터 고순도 베타-카로틴의 추출 및 정제

조지송·엔구엔트구앙·윤준기·김유나·김유근¹·김성배·서양곤·
이병학²·강문국³·김창준*

경상대학교 생명화학공학과 및 공학연구원, ¹KB코스메틱, ²화이트뷰피부클리닉, ³날씬플러스

Extraction & Purification of β -carotene from Recombinant *Escherichia coli*. Jo, Ji Song, Do Quynh Anh Nguyen, Jun-Ki Yun, Yu-Na Kim, You Geun Kim¹, Sung Bae Kim, Yang-Gon Seo, Byung-Hak Lee², Moon-Kook Kang³, and Chang-Joon Kim*. Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ¹KB Cosmetics, Jinju, Korea, ²Whiteview Clinic, Busan, Korea, ³Nalsinplus, Jinju, Korea – This paper aimed to develop a solvent extraction and purification process to recover high-purified β -carotene from recombinant *Escherichia coli*. Cells harvested from the culture broth were treated through numerous steps: dehydration, solvent extraction, crystal formation and separation. To optimize the extracting condition, experiments were carried out to investigate the effect of cell disruption, temperature, organic solvents, solvent-biomass ratio on the yield of β -carotene extracted from cells. The result indicated that no significant differences of extraction yield were observed from cells with or without step of cell disruption. Among different extracting solvents, the highest extraction yield of β -carotene, 30.3 mg- β -carotene/g-dry cells, was obtained with isobutyl acetate at solvent-biomass ratio 25 mL/g-dry cells at 50°C. Notably, in case of acetone, the extraction yield was quite low when using acetone itself, but increased almost up to the highest value when combining this solvent and olive oil. The purity of β -carotene crystals obtained from crystallization and separation was 89%. The purity degree was further improved up to 98.5% by treating crude crystals with additional ethanol washing.

Key words: Recombinant *Escherichia coli*, β -carotene, solvent extraction, optimization, purification

서 론

베타-카로틴은 비타민 A 전구체로서 면역기능 증강효과가 있고, 강력한 항산화제로서 인체 내 유해한 활성산소를 제거함으로써 노화예방은 물론 항암효과도 있는 것으로 알려졌다. 산업적으로는 의약품, 기능성 식품, 화장품 및 음식물 첨가제로 사용되고 있다[1]. 베타-카로틴은 상업화된 화학합성공정에 의해 생산되고 있으나 최근 미국, 유럽 및 우리나라 정부에서는 식품 및 화장품 첨가제로 합성 베타-카로틴의 사용을 엄격히 금지하고 있어[5, 25], 천연 베타-카로틴을 값싸게 생산할 수 있는 생물공정개발에 대한 관심이 점점 증가하고 있다. 당근, 토마토, 호박과 같은 녹황색 채소에서 추출되는 천연 베타-카로틴은 가격이 매우 비싼데, 이는 식물체 재배에 상당한 기간이 소요되는 반면 생합성되는 베타-카로틴의 함량은 매우 적기 때문이다. 뿐만 아니라 견고한 세포벽 때문에 이를 회수하기 위해서는 복잡한 추출 과정이 필요하고[2, 3, 12], 다른 카로테노이드 성분들도 함께

존재하기 때문에 이들로부터 순수한 베타-카로틴을 얻기 위한 추가적인 분리정제과정이 필요하다[16, 22].

최근에는 조류(algae) 또는 효모 균의 발효를 통해 베타-카로틴을 생산하는 연구가 시도되고 있으나 낮은 생산수율, 다른 카로테노이드의 동시 생성으로 인한 분리정제의 어려움 등 해결해야 할 많은 문제점들이 보고되고 있다[9, 10, 18, 19, 23]. 특히 미생물로부터 베타-카로틴을 추출하기 위해 기존에 사용된 핵산의 독성 문제가 꾸준히 제기되어, 미국 식품의약품 안전청(FDA)에서는 제약 또는 식품 산업에 이의 사용을 엄격히 제한하게 되었다[7]. 뿐만 아니라 화장품에 이를 사용하기 위해서는 고순도 (98% 이상)의 베타-카로틴이 필요하지만[11] 이를 얻는 것은 쉽지 않다.

최근 본 연구팀에서는 베타-카로틴만을 과량으로 생합성하는 재조합 대장균 및 이의 유가식 배양을 통해 베타-카로틴을 대량생산할 수 있는 생물공정을 개발하였다. 특히 사람 섬유아세포(normal human primary fibroblast) 배양을 통하여 재조합 대장균으로부터 회수된 베타-카로틴이 주름개선 활성이 있음을 실험적으로 증명함으로써 이를 기능성 화장품의 주름개선제로 사용할 수 있음을 제시하였다[13].

본 연구는 이의 일환으로서 고순도 베타-카로틴을 얻기 위한 간단하고 효율적인 추출정제방법을 개발하는 데 그 목적

*Corresponding author

Tel: 82-55-751-5391, Fax: 82-55-753-1806

E-mail: cj_kim@gnsu.ac.kr

이 있다. 베타-카로틴은 세포내에 축적되므로 베타-카로틴을 효과적으로 추출하기 위하여 세포 파쇄가 필요한지를 조사하였다. 세포와 추출용매의 적정비율 및 추출온도의 영향을 조사하였다. 또한 추출성능이 뛰어나며 저 독성의 용매를 탐색하기 위하여 미국 식품의약품 안전청(FDA)에서 제약 및 식품산업에 사용을 허가한 3 계열 용매들 중에서 몇 가지를 선별하여 베타-카로틴 추출 성능을 비교하였다. 추출용액으로부터 베타-카로틴 결정을 회수하였고, 결정의 순도를 98% 이상으로 향상시킬 수 있는 간단한 에탄올 세척방법을 개발하였다.

재료 및 방법

재조합 대장균 배양 및 세포 전처리

3.4 L 상단구동 발효기(코바이오텍, 인천, 한국)에 ampicillin(100 mg/L), chloramphenicol(50 mg/L), 글리세롤(20 g/L)을 첨가한 2YT 배지 1.8 L를 넣고 베타-카로틴과 mevalonate 생합성 외래 유전자들을 삽입한 *E.coli* DH5 α 를 접종한 후 회분식 모드로 배양을 시작하였다. 글라이세롤이 거의 고갈될 시점에 pH-stat으로 기질용액(글리세롤:yeast extract=10:1)을 공급하며 유가식 배양을 수행하였다[13]. 배양 종료 후 배양액을 취하여 4°C, 8,000 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 증류수로 2차례 세척하여 세포표면에 존재하는 잔류 배지 성분들을 제거한 후, 1 g wet cell 당 85% 2-프로판올 용액 3 mL를 첨가하여 40°C에서 30분간 교반하며 세포에 존재하는 수분들을 제거하였다. 정량적인 실험을 위하여 탈수 세포를 동결건조기(PVTFD 50A, Cilsin, Korea)에 넣고 건조시킨 후 이를 추출용 세포로 사용하였다.

세포파쇄가 필요한 경우, 세포현탁액을 포함하는 튜브를 얼음통에 넣고 세포파쇄기(Ultrasonic homogenizer, Sonics & Materials, Inc., Danbury, USA)의 tip을 세포현탁액에 담고 반복적인 sonication에 의해 세포를 파쇄한 후 원심분리에 의해 세포잔사물(cell debris)을 회수하였고 이를 베타-카로틴 추출에 사용하였다. 시료 전처리와 베타-카로틴 추출에 일제 특급 시약을 사용하였다. 오일은 해표 압착올리브유(주식회사 사조 O&F, 인천, 한국)를 사용하였다.

베타-카로틴 추출조건 최적화

동결건조 세포 또는 동결건조 후 파쇄된 세포잔사물에 추출 용매를 첨가한 후 물중탕으로 30분간 교반하였다. 추출 용매의 양, 추출온도 및 추출용매의 종류, 용매의 혼합에 따른 추출 수율을 조사하였다. 조사된 추출용매는 아이소부틸 아세테이트(IBA), 아세톤, n-헵탄, 올리브유, 및 이들의 혼합 용액이다.

베타-카로틴 결정 세척

정제된 베타-카로틴의 순도를 향상시키기 위하여 불순물을 제거해야 하는데, 에탄올 또는 아세톤을 세척용매로 사용하였다. 베타-카로틴 결정 약 280 mg에 이들 용매 50 mL를 넣고 50°C에서 30분간 교반한 후, 여과에 의해 세척된 결정을 회수하였다.

베타-카로틴 순도 측정

회수된 베타-카로틴 결정의 순도를 측정하기 위하여 HPLC를 이용하였다. 베타-카로틴 결정 10 mg을 정확히 정량하여 메스플라스크에 넣고 IBA를 첨가하여 100 mL용액을 제조하였다. 이를 적정농도로 희석한 후 HPLC 분석을 수행하였고 표준 용액을 이용하여 작성한 검량선으로부터 제조된 용액의 농도를 계산하였다. 측정된 농도를 제조된 농도로 나눈 후 여기에 100을 곱하여 나온 값이 베타-카로틴 결정의 순도가 된다.

또한 한국 식품의약품 안전청에서 추천하는 방법인 분광광도계(UV-VIS spectrophotometer)를 이용한 베타-카로틴 순도 측정방법[11]을 따라 동일한 시료의 순도를 측정하였다. 베타-카로틴 결정 30 mg을 취하여 메스플라스크에 넣고 사이클로헥산을 첨가하여 100 mL용액(S1)을 제조하였다. S1 10 mL를 취하여 메스플라스크에 넣고 사이클로헥산을 첨가하여 100 mL용액(S2)을 제조하였다. 다시 S2 10 mL를 메스플라스크에 넣고 사이클로헥산을 첨가하여 100 mL용액(S3)을 제조하였다. 340 nm, 362 nm에서 S2의 흡광도를 측정하였고, 434 nm, 455 nm 및 483 nm에서 S3의 흡광도를 측정하였다. 측정값들의 비를 계산하고 이를 허용기준치와 비교함으로써 시료의 순도가 98%이상인지의 여부를 확인하였다.

분석방법

역상칼럼인 J'sphere ODS H80(250 mm×4.6 mm, YMC Co., Ltd, Japan)을 장착한 HPLC를 사용하여 베타-카로틴 농도를 측정하였다. 메탄올(20%), 에탄올(75%) 및 THF(5%)를 포함한 혼합용액을 이동상으로 사용하였다. 펌프(515 HPLC pump, Waters, USA)에 의한 이동상의 유속은 1.5 mL/min이었고, 분리되어 나온 베타-카로틴은 UV 검출기(Waters™ 486, Waters, USA)의 450 nm에서 검출되었다.

질량분석을 통한 β -carotene 동정

질량분석을 위하여 정제된 베타-카로틴 결정을 디클로메탄(CH_2Cl_2)에 녹인 후 JEOL JMS-700 spectrometer를 이용하여 질량분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

세포의 물리적 파쇄 여부에 따른 베타-카로틴 추출

베타-카로틴은 세포 내에 축적되기 때문에 세포의 파쇄여부가 베타-카로틴 추출수율에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 1은 온전한 세포와 파쇄된 세포로부터 추출된 베타-카로틴의 수율을 보여준다. 두 경우의 추출 수율은 각각 16.2 ± 0.3 과 16.7 ± 0.1 mg- β -carotene/g-dry cells로서 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 세포 내 대사산물을 회수하기 위해서는 세포파쇄가 필요하다는 일반적 예상[14]과 상반되는 결과이다. 한편 배양 후 원심분리에 의해 세포를 회수하고 유기용매를 이용하여 베타-카로틴을 추출하게 되는데, 세포표면에 존재하는 수분은 유기용매가 베타-카로틴을 추출하는 성능을 떨어뜨릴 수 있다. 이를 해결하기 위하여 85% 2-프로판올 용액을 사용하여 세포를 탈수시켰다. 이 과정에서 소량의 베타-카로틴이 2-프로판올 용액으로 빠져나오는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과로부터 2-프로판올 용액을 이용한 세포탈수과정에서 상당 부분의 세포막이 파괴되는 것으로 여겨진다. 70-80%의 알코올 (에탄올 또는 프로판올) 용액이 세포의 막단백질을 변성시키고 막의 지질을 분해하는 것으로 알려져 있다[20]. 이는 탈수 세포로부터 베타-카로틴을 추출하는 경우에 별도의 물리적 방법이 필요 없다는 것을 나타낸다.

그러나 두 경우에 추출 후에도 세포가 여전히 불그스름한 색깔을 띠고 있음을 관찰하였다. 이는 세포에 존재하는 베타-카로틴이 완전히 추출되지 않았음을 의미하고 효과적인 추출을 위하여 추출조건을 최적화시킬 필요가 있음을 나타낸다.

추출조건 최적화

베타-카로틴은 비극성의 지용성 물질이므로 세포로부터 이를 회수하기 위하여 비극성 유기 용매를 사용하여야 한다. 추출량을 극대화하기 위하여 적합한 추출 용매 선정, 최적 추출온도 및 세포 대 유기 용매의 최적 비율 결정을 위한 실험을 수행하였다.

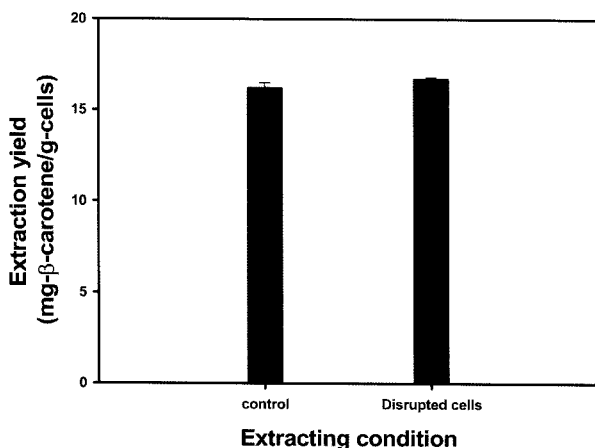


Fig. 1. The extraction of β -carotene from cells (control) or disrupted cells. Extraction was performed on 0.3 g of dehydrated & lyophilized cells with 6 mL of isobutyl acetate at 60°C. Cell disruption was prepared by direct sonication using the ultrasonic probe.

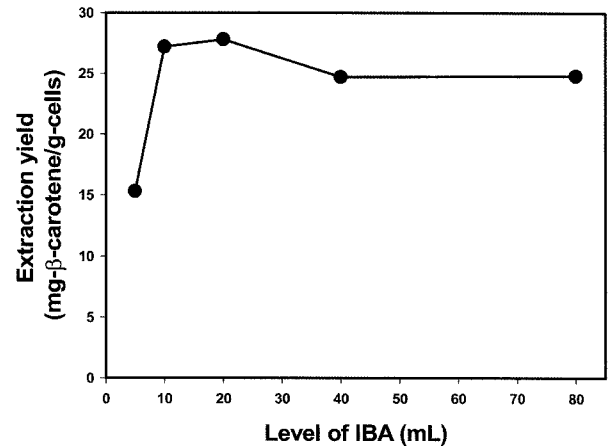


Fig. 2. The effect of amount of isobutyl acetate on extraction yield of β -carotene. Extraction was performed on 0.4 g of dehydrated & lyophilized cells at 60°C.

탈수 및 동결건조된 세포 0.4 g에 IBA를 5-80 mL까지 변화시키면서 세포로부터 추출되는 베타-카로틴의 양을 조사하였다. Fig. 2에 나타내었듯이, IBA양을 5 mL에서 10 mL로 증가시켰을 때 추출수율은 15.3에서 27.2 mg- β -carotene/g-dry cells로 급격히 증가하였고, 이후 용매 양의 증가에도 불구하고 더 이상 증가하지 않았다. 이는 0.4 g의 동결건조 세포로부터 베타-카로틴을 최대 추출하기 위해 필요한 IBA의 최적량은 10 mL임을 나타내고 단위 건조 세포(g-dry cells) 당 25 mL의 IBA가 필요함을 의미한다. 이와 같이 미생물로부터 카로테노이드 추출을 극대화하기 위하여 세포 대 용매 비를 최적화하는 것이 중요하다. 광합성 세균인 *Rhodobacteria. sphaeroides*로부터 베타-카로틴 추출 최적화 연구에서, 용매 대 건조 세포 비는 약 40 mL/g-dry cells로 보고되었다[6].

두 온도수준(30°C와 50°C)에서 용매들의 추출 성능을 비교하였다. 상온에서 추출하는 경우를 예상하여 30°C를 하한 온도로 설정하고 검토 용매 중 끓는점이 가장 낮은 아세톤의 끓는점(56°C)을 고려하여 50°C를 상한온도로 설정하였다. 미국FDA에서는 식품용 물질 추출에 사용가능한 용매를 발표하였는데, 아세톤, IBA, n-헵탄이 여기에 포함된다[7]. 본 연구에서는 이들 세 가지 용매들의 추출성능을 비교하였다. 아세톤은 헥산을 대신하여 카로테노이드 추출용매로 많이 사용하고 있고[4, 6, 15, 24], 최근에는 IBA를 베타-카로틴 추출에 이용하려는 시도가 있다[4]. 한편 두 용매가 극성인 케톤기를 갖고 있는 반면, 극성기가 없는 n-헵탄도 비교대상으로 선정하였다. Fig. 3에 나타내었듯이, 용매의 종류에 관계없이 50°C에서 추출되는 베타-카로틴의 수율은 30°C에서의 값보다 월등히 높았다. 이는 높은 온도에서 추출용매가 세포내부로 침투하기가 더욱 용이하고, 특히 추출용매에 대한 베타-카로틴의 용해도가 증가하기 때문인 것으로 여겨진다[8, 21].

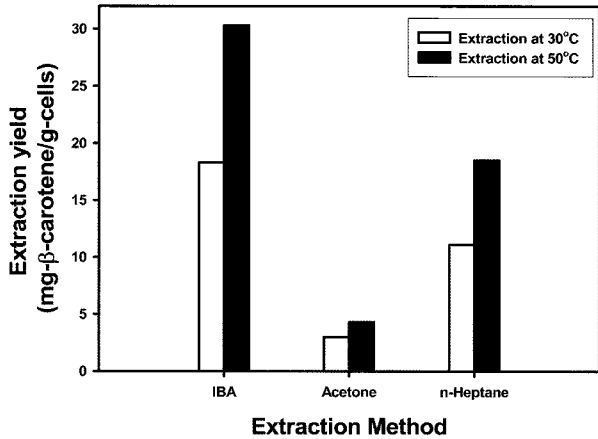


Fig. 3. The β-carotene extraction with three different solvents at two different temperatures. Extraction was performed on 0.4 g of dehydrated & lyophilized cells with 10 mL of each solvent.

한편 추출온도에 관계없이 베타-카로틴 추출수율은 아세톤을 사용한 경우 제일 낮은 반면, IBA를 사용한 경우에 제일 높았다. 즉, 50°C에서 n-헵탄과 IBA에 의해 추출된 베타-카로틴 수율은 각각 18.5와 30.3 mg-β-carotene/g-dry cells로서 아세톤에 의해 추출된 것에 비해 각각 4.3배 와 7.6배 높았다. Fig. 4는 IBA와 아세톤의 추출성능을 명확히 보여 준다. 이와 같은 결과는 베타-카로틴 추출에 널리 사용되는 아세톤의 추출 성능은 높지 않은 반면, IBA가 이를 대체할 우수한 성능을 갖는 추출용매로 사용될 수 있음을 나타낸다. 또한 추출온도를 높게 유지하는 것이 베타-카로틴 추출에 효과적임을 알 수 있다. 그러나 너무 높은 온도의 사용은 추출되는 베타-카로틴의 분해를 촉진시킬 가능성이 있으므로[6], 50°C-60°C가 추출에 적당한 온도로 여겨진다.

유기용매를 이용한 베타-카로틴 추출은 세포로부터 베타-카로틴을 추출하는 단계와 추출된 베타-카로틴을 용액 안에

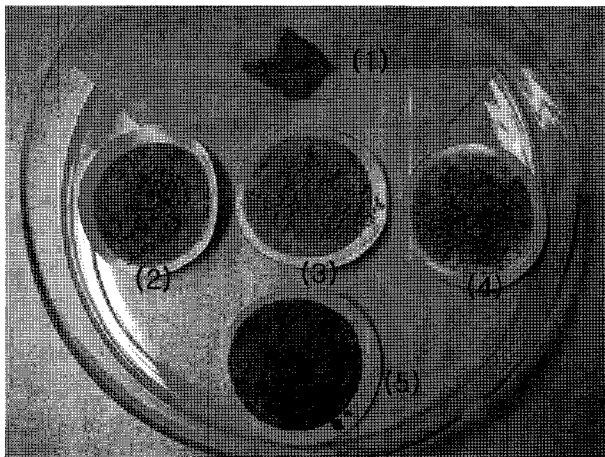


Fig. 4. Cells before or after treating with extracting solvent. (1): control (before extraction), (2): 5 mL of IBA, (3): 10 mL of IBA, (4): 20 mL of IBA, (5): 10 mL of acetone.

가두어두는 단계(용해)를 포함한 총 2단계로 구성될 수 있다. 따라서 베타-카로틴 추출용매는 추출뿐만 아니라 용해시키는 능력이 우수해야한다. IBA, 아세톤, 올리브유, 및 이들의 혼합액을 이용한 추출실험을 수행함으로써 IBA 또는 아세톤을 이용한 베타-카로틴 추출에 있어서의 율속단계를 규명하였다. Fig. 5에 나타내었듯이, 순수한 용매를 이용한 추출에서 수율은 IBA가 가장 높았고, 오일이 중간이었으며, 아세톤이 가장 낮았다. IBA와 아세톤을 동일부피비로 혼합한 용액에서 추출수율은 예상치인 15.7보다 작은 9.8 mg-β-carotene/g-cells인 반면, 아세톤과 올리브유를 동일부피비로 혼합한 용액에서의 추출수율은 예상치인 10.7보다 훨씬 높으며 올리브유만을 사용한 경우보다도 높은 27.1 mg-β-carotene/g-cells였다. 한편 IBA와 올리브유를 동일부피비로 혼합한 용액에서의 추출 수율은 예상치와 비슷한 26.6 mg-β-carotene/g-cells였다. 이와 같은 결과로부터 아세톤의 베타-카로틴에 대한 용해도가 높지 않아 추출되어 나올 수 있는 베타-카로틴의 양에 한계가 있으나 용해도가 높은 오일[8]을 보조적으로 사용 시, 추출수율이 월등히 향상된 것으로 보아 아세톤의 추출능력은 높은 것을 알 수 있다. 따라서 아세톤에 의한 추출과정에서 율속단계는 추출된 베타-카로틴을 용해시키는 과정이라고 여겨진다. 오일은 베타-카로틴에 대한 용해도는 우수하나, 추출능력은 그다지 높지 않은 것으로 여겨지며 이를 이용한 추출에서 추출단계가 율속단계라고 여겨진다. 한편 IBA는 추출성능 뿐만 아니라 베타-카로틴 용해도도 우수하다고 여겨진다. 결론적으로 미국 FDA가 제시하는 가이드라인과 추출성능을 고려하여 재조합 대장균으로부터 베타-카로틴 추출에 IBA가 가장 적합한 용매로 사용될 수 있다고 판단된다.

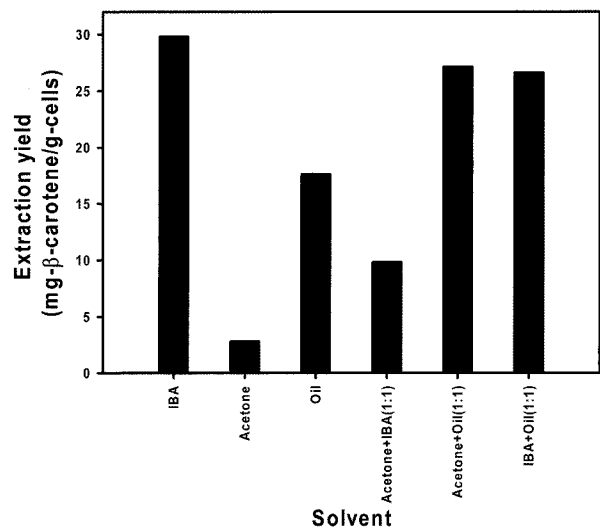


Fig. 5. The extraction of β-carotene with different solvents and solvent mixture. The β-carotene was extracted from 0.4 g of dehydrated & lyophilized cells with 10 mL of solvents at 50°C.

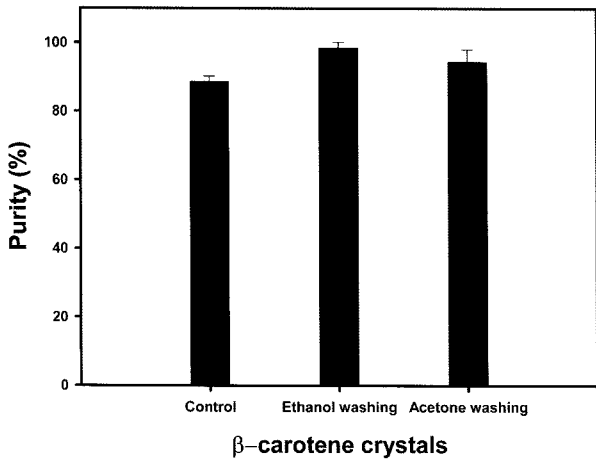


Fig. 6. Purity of β-carotene crystal washed with ethanol or acetone.

결정화, 결정의 세척, 여과를 통한 고순도 베타-카로틴 결정 회수

상기에서 언급한 체계적인 실험을 바탕으로 큰 규모의 추출 및 정제를 수행하였다. 재조합 대장균의 유가식 배양을 재 수행하여 배양액 1.8 L로부터 99 g의 wet cell cake을 회수하였고 이를 증류수로 두 번 세척한 후 85% 2-프로판올 용액으로 세포를 탈수하였다. 이 과정에서 약 20 g의 세포가 소실되어 79 g의 wet cell cake을 얻었다. 여기에 1.6 L의 IBA를 첨가하여 탈수세포로부터 베타-카로틴을 추출하였다. 추출액을 감압 하에 160 mL로 농축한 후 2-프로판올 640 mL를 첨가하였다. 이를 4°C에서 12시간 방치함으로써 428 mg의 베타-카로틴 결정을 얻었다. 이렇게 얻어진 베타-카로틴 결정의 순도는 88.6±1.6(Fig. 6)으로 기능성 화장품의 품질 기준(순도 98% 이상)을 만족시키지 못하는 수준이다. 이와 같이 낮은 순도는 아마도 유기용매에 잘 용해되는 세포 유

Table 1. UV-VIS spectrophotometric analysis of highly purified β-carotene.

Ratios of absorptions	A ₃₆₂ /A ₃₄₀	A ₄₅₅ /A ₃₄₀	A ₄₅₅ /A ₄₃₄	A ₄₅₅ /A ₄₈₃
Measure value	1.19±0.00	1.65±0.02	1.40±0.01	1.08±0.00
Acceptance level	>1	>1.45	1.3-1.6	1.05-1.25
Remark	Pass	Pass	Pass	Pass

래 지질 성분들이 추출과정에서 함께 회수되었기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 이와 같은 불순물들을 제거하기 위하여 지질에 대한 용해도는 높은 반면 베타-카로틴 결정을 용해시키기 힘든 용매로 결정을 세척함으로써 순도를 향상 [17]시키고자 하였다. 에탄올과 아세톤을 검토 대상 용매로 선정하여 이들의 성능을 비교하였다. 약 278 mg의 베타-카로틴 결정을 50 mL 에탄올로 세척하여 약 229 mg의 베타-카로틴 결정을 회수하였다. 세척된 베타-카로틴의 순도는 98.5±1.7로 향상되었다. 한편 148 mg의 베타-카로틴 결정에 50 mL 아세톤을 첨가한 후, 세척하여 얻은 베타-카로틴 결정의 순도는 94.4±3.6이었다. 본 결과는 베타-카로틴 결정을 에탄올로 세척 시 기능성 화장품에 사용가능한 순도의 베타-카로틴을 얻을 수 있음을 나타낸다.

한편 식품의약품 안전청에서 공시한 UV spectrophotometer를 이용한 순도체크방법[11]을 이용하여 에탄올로 세척된 베타-카로틴 결정의 순도를 재확인 하였다. 본 방법은 베타-카로틴 용액의 흡광도를 측정하여 이들의 비(A₃₆₂/A₃₄₀, A₄₅₅/A₃₄₀, A₄₅₅/A₄₃₄, A₄₅₅/A₄₈₃)를 계산한 후, 이들 4가지 지표 값들이 각각 기준치 내에 포함되면 사용된 베타-카로틴 순도가 98% 이상임을 보장한다. 표 1에 나타내었듯이, A₃₆₂/A₃₄₀은 기준치인 1보다 높은 1.19±0.00, A₄₅₅/A₃₄₀은 기준치인 1.45보다 높은 1.65±0.02, A₄₅₅/A₄₃₄는 기준범위인 1.3-1.6사이에 존재하는 1.40±0.01이고 A₄₅₅/A₄₈₃는 기준범위인

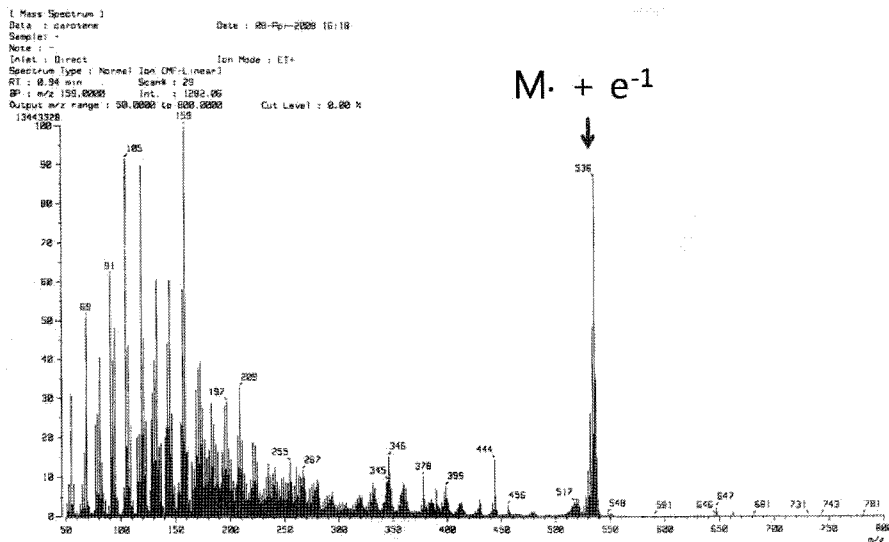


Fig. 7. The mass spectra of highly purified β-carotene.

1.05-1.25사이에 존재하는 1.08 ± 0.00 이다. 따라서 HPLC 분석 결과와 UV-Visible spectrophotometer를 이용한 분석결과는 본 연구팀에 의해 정제된 재조합 대장균 유래 베타-카로틴 결정의 순도가 98% 이상임을 나타낸다. Fig. 7은 고순도로 정제된 베타-카로틴의 질량분석 결과를 나타낸다. 질량분석은 분자에서 전자(e^-)를 떼어낸 후 전하를 띤 분자를 분석하는 방법이다. 베타-카로틴의 분자량이 536.88이고, 전자를 떼어내도 분자량이 변하지 않으므로 베타-카로틴의 분자량인 536에 해당하는 피크가 베타-카로틴에 해당한다.

따라서 이와 같은 결과는 본 연구팀에 의해 개발된 방법으로 재조합 대장균으로부터 고순도의 베타-카로틴을 회수할 수 있음을 시사한다.

요 약

재조합 대장균으로부터 고순도 베타-카로틴을 효율적으로 회수하기 위한 추출정제 방법을 개발하기 위하여 세포파쇄의 유무, 추출온도, 추출용매의 종류, 세포 대 추출용매의 비율 및 결정세척 용매의 선정이 베타-카로틴 추출수율과 순도에 미치는 영향을 조사하였다. 세포파쇄의 유무는 베타-카로틴 추출수율에 영향을 미치지 않았으므로 별도의 물리적 세포파쇄 단계가 생략되었다. 테스트된 용매 종류에 관계없이 50°C에서 베타-카로틴의 추출수율은 30°C에서보다 월등히 높았다. 아이소부틸 아세테이트에 의해 추출되는 베타-카로틴의 양은 추출성능이 제일 낮은 아세톤을 사용한 경우에 비해 7.6배 높았다. 0.4 g의 동결건조세포로부터 베타-카로틴을 최대량 추출하기 위해 필요한 아이소부틸 아세테이트의 최적량은 10 mL였고, 이는 단위 건조 세포(g-dry cells) 당 25 mL의 아이소부틸 아세테이트가 필요함을 의미하였다. 아세톤과 올리브오일을 동일비율로 혼합한 용액에 의한 추출량은 아세톤만을 사용한 경우보다 훨씬 높았고 가장 높은 값을 나타낸 아이소부틸 아세테이트에 의한 값과 비슷한 수치를 나타내었다. 추출액에 용해되어 있는 베타-카로틴의 결정 생성을 촉진시켜 베타-카로틴을 추출용액으로 분리하여 얻어진 베타-카로틴 결정의 순도는 89%이나 이를 에탄올로 세척 시 순도가 98.5%로 향상되었다. HPLC, 분광광도계 분석 외에 추가적으로 질량분석을 수행함으로써 회수된 결정이 베타-카로틴임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본 연구팀에서 개발한 방법으로 식품의약품안전청에서 고시한 화장품 및 식품의 첨가물 기준을 만족시키는 고순도 베타-카로틴을 효율적으로 생산할 수 있음을 시사한다.

감 사

본 연구는 2008년도 산학연 컨소시엄 사업과 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었 (KRF-2008-331-D00132)으며 이

에 감사드립니다. 질량분석 및 해석에 도움을 주신 경상대학교 화학과 이 심성 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Burri, B. J. 1997. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutri. Res.* **17**: 547-580.
- Choudhari, S. M., and L. Ananthanarayan. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem.* **102**: 77-81.
- Cinar, I. 2004. Storage stability of enzyme extracted carotenoid pigments from carrots. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **3**: 609-616.
- Costa Perez, J., A. Estrella Castro, A. T. Marcos Rodriguez, J. E. Gonzalez De Prado, E. E. Peiro Cezon, A. Collados De La Vieja, and M. Esteban Morales. 2003. Method for the production of beta-carotene. *European patent*, 1306444A1.
- Food Hygiene law of 2003, Korea Food Industry Association.
- Gu, Z., D. Chen, Y. Han, Z. Chen, and F. Gu. 2008. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *L.W.T.* **41**: 1082-1088.
- Guidance for industry, Q3C-tables and list. U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, November 2003.
- Heidlas, J., G. Huber, J. Cully, and U. Kohlrausch. 1998. Process for the extraction of carotenes from natural sources. *United patent*, 05714658.
- Hejazi, M. A. and R. H. Wijffels. 2004. Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* **22**: 189-194.
- Howe, J. A. and S. A. Tanumihardjo. 2006. Evaluation of analytical methods for carotenoid extraction from biofortified maize (*Zea mays* sp.). *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 7992-7997.
- 화장품 원료기준, 화장품 제조업 및 제조 (수입) 품목허가 등 처리지침 p.381-382, 한국 식품의약품 안전청, 서울, 2000.
- Jaramillo-Flores, M. E. et al. 2005. Effect of sodium chloride, acetic acid, and enzymes on carotene extraction in carrots (*Daucus carota* L.). *J. Food. Sci.* **70**: E136-E142.
- Jo, J. S., B. M. Ku, S. S. Kang, J. R. Lee, Y. G. Kim, H. Lee, S. B. Kim, S.-W. Kim, C.-J. Kim, and I.-Y. Chung. 2008. Anti-wrinkle activity of β -carotene extracted & purified from recombinant *Escherichia coli*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 513-518.
- Kaiser, P., P. Surmann, G. Vallentin, and H. Fuhrmann. 2007. A small-scale method for quantification of carotenoids in bacteria and yeasts. *J. Microbiol. Methods.* **70**: 142-149.
- 김명국, 조원태, 박진규. 1999. 신균주 *블레이크슬리아 트리스포라(+)* 및 *(-)*, 그리고 이를 이용한 베타-카로틴의 제조방법. *대한민국특허*, 10-0187720.
- Ladislav, F., P. Vera, S. Karel, and V. Karel. 2005. Reliability of carotenoid analysis: a review. *Curr. Anal. Chem.* **1**: 93-102.
- Mieke Sibeyn, A., D. Robertus Mattheus De Pater. 2002. Process for the recovery of crystalline beta-carotene from a

- natural source. *United patent*, 20020025548.
18. Ni, H., Q.-H. Chen, G.-Q. He, G.-B. Wu, and Y.-F. Yang. 2008. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *J. Zhejiang Univ. Sci B.* **9**: 51-59.
 19. Park, P. K., E. Y. Kim, and K. H. Chu. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Sep. Purif. Technol.* **53**: 148-152.
 20. Prescott, L., J. P. Harley, and D. A. Klein. 2002, *Microbiology* pp. 136-151. 5th ed. McGraw Hill, New York, U.S.A.
 21. Rose, P. D., T. D. Phillips, and R. D. Sanderson. 1994. Solvent extraction of beta-carotene. *European patent*, 0612725.
 22. Sajilate, M. G., R. S. Singhai, and M. Y. Kamat. 2008. The carotenoid pigment zeaxanthin-a review. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety.* **7**: 29-49.
 23. Shibata S., C. Ishihara, and K. Matsumoto. 2004. Improved separation method for highly purified lutein from *Chlorella* powder using jet mill and flash column chromatography on silica gel. *J. Agric. Food. Chem.* **52**: 6283-6286.
 24. Weber, R. W. S., H. Anke, and P. Davoli. 2007. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). *J. Chromatogr. A.* **1145**: 118-122.
 25. Yamane, Y.-I., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **639**: 4471-4478.

(Received July 16, 2009/Accepted Aug. 28, 2009)