

## 해양미생물로부터 Carotenoid의 생산 및 그 생리활성

†김종덕·<sup>1</sup>강동수·<sup>2</sup>김민용·최명락·임현수·<sup>3</sup>백승한·서효진·김대현·<sup>4</sup>공재열  
여수대학교 생명공·화학공학부, <sup>1</sup>식품공학·영양학부, <sup>2</sup>냉동공학과, <sup>3</sup>경상대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>부경대학교 생물공학과  
(접수 : 2000. 10. 6., 게재승인 : 2000. 12. 14.)

### Production and Characterization of Physiological Properties of Carotenoid from a Marine Bacterium *Curtobacterium* sp.

Jong-Deog Kim†, Dong-Soo Kang<sup>1</sup>, Min-Yong Kim<sup>2</sup>, Myeong-Rak Choi, Hyun-Soo Lim, Sung-Han Baek<sup>3</sup>,  
Hyo-Jin Seo, Dae-Hyun Kim, and Jai-Yul Kong<sup>4</sup>

Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu, Cheonnam 550-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Yosu National University, Yosu, Cheonnam 550-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Refrigeration Engineering, Yosu National University, Yosu, Cheonnam 550-749, Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Kyeongsang National University, Jinju 600-701, Korea

<sup>4</sup>Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

(Received : 2000. 10. 6., Accepted : 2000. 12. 14.)

A marine bacterium producing carotenoid was isolated from the Yosu coastal area of South Korea, and has been recorded as MCPBK-1. It was identified as *Curtobacterium* sp.. The optimum conditions of marine carotenoid fermentation from *Curtobacterium* sp. were pH 7.0, a temperature of 25°C, 4 mM fructose as a carbon source, 0.07% tryptone as a nitrogen source, 0.5 mM Mg<sup>+2</sup> ion as a mineral source and 1 μM of cyanocobalamine as a growth factor in a 7 l jar-fermentor. 13.0 mg/ml of the marine carotenoid were produced under optimum conditions. The crude marine carotenoid isolated was composed of 5 different compounds, i.e : tunaxanthin(86.6%), diatoxanthin (7.1%), β-carotene (2.1%), canthaxanthin(1.9%) and cynthiaxanthin(1.9%). Physiological properties including antibacterial activity, cytotoxic effect, antioxidative effect and free radical scavenging activity were characterized with the crude carotenoid, which exhibited no antibacterial activity against *E.coli* and *Lactobacillus bulgaricus*, but a strong cytotoxic effect against cancer cells such as HepG2 (Hepatocellular carcinoma, human, ATCC HB-8065) and HeLa (Cervical carcinoma, human, ATCC CCL-2) cells, the ratios of impediment were 86.4% and 39.2%, respectively. This carotenoid, also, expressed a strong antioxidative effect (83%) against CCL-13 (diploid, monotypic hepatocyte, human, ATCC CCL-13) and exhibited free radical scavenging activity (43.4%) when using at a concentration of 50 μg/ml of the crude carotenoid.

**Key Words** : carotenoid, *Curtobacterium* sp., fermentation, tunaxanthin, diatoxanthin, β-carotene, cytotoxic effect, antioxidative effect

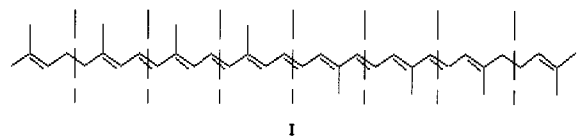
### 서론

Carotenoids는 hydrocarbons계열인 carotenes와 이들의 산화 유도체인 xanthophylls로 나누어지며, 8개의 isoprenoid의 단위로 구성되어져 있고(1), C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>의 구조로부터 유도되어지며, 300-500 nm의 파장에서 특성의 흡수대를 가지는 물질이다

(2,3). 이 구조로부터 hydrogenation, dehydrogenation, cyclization 및 oxidation, 그리고 이들의 협력 작용에 의하여 유도되어지며 아래 구조의 I 위치의 골격이 분해되기도 하여 생체에서 필요로 하는 물질이 생성되어진다.

Carotenoid는 식물에 있어서는 광합성을 도와주며, 동물에게는 아름다운 색소를 제공하며, 또한 생체에서는 일반적인 대사의 경로를 통하여, 그리고 환경적인 요인, 방사선이나 오염

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu, Cheonnam 550-749, Korea  
Tel & Fax : +82-61-659-3305  
E-mail : pasteur@info.yosu.ac.kr



등의 여러 가지의 경로를 통하여 발생되어 노화의 원인과 여러 가지의 질병의 원인이 되는 free radical을 중화시키는 중요한 항산화제로 알려져있다(3-6). 이 free radical은 생활 영역 주변으로부터 생체에 들어와 단백질, 불포화 지질 등과 결합하며, 주로 지질로 구성되어 있는 뇌와 백혈구를 파괴하고, 산소의 동화와 DNA, RNA 등을 파괴하며, 면역의 약화와 함께 여러 가지 질병의 과정을 밟고, 주름지게하며 노화를 촉진하는 요소이다(7,8). 그리고 LDL(low-density lipoproteins)의 산화 역시 동맥경화의 진행과 발달에 주요한 요소가 되며 이 LDL의 산화는 polyunsaturated fatty acids의 분해를 일으켜, 산화물질은 세포독, 동맥경화의 발생, 발암 물질로 작용하기도 한다(9). 이와 같은 free radical에 의한 산화작용은 항산화제의 농도에 의존되며 carotenoid는 강한 항산화제로 작용함으로써 LDL의 산화를 방지하고, aryl hydrocarbon hydroxylase의 활성을 변화시켜 발암물질의 무독화에 기여한다(10-13). 또한, carotenoid는 피부암에도 실질적으로 사용할 수 있는 물질로 보고되고 있고(14,15), HIV virus의 복제를 방해하기도 하여 AIDS에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(16). 그리고, 급성골수백혈병에서 blast cell을 성숙화시켜 여러종류의 cytokine을 유도시켜며 병을 호전시키기도 한다(17). 뿐만아니라 carotenoid는 단독으로보다 여러 가지가 혼합되었을 때 상승되며, 노화 및 인류의 질병을 예방하는데 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다(18). 이와 같이 carotenoid는 free radical을 잡아내는 항산화제로서, 또는 생체의 필수불가결한 요소로서 생체 내에서 많이 필요로 하는 물질로 판단되나, 대부분의 carotenoid는 과일류나 생선의 외피 등(19)에 제한된 범위로 존재하기 때문에 대량 생산이 불가능하다. 그러나, 식물 및 동물로부터의 carotenoid의 추출은 많은 양의 원료로부터 추출되어야 하기 때문에 한계가 있고, 추출과정이 복잡하며 그 수율 또한 낮을 수밖에 없다. 따라서, 본 연구자들은 carotenoid의 대량 생산을 위하여 육지의 미생물보다 열악한 환경에서 서식함으로써 생존을 위하여 많은 유용물질을 생산 할 것으로 사료되는 해양미생물로부터 carotenoid를 생산하는 균주를 분리, 동정하고, 발효조건을 사용하여 carotenoid의 생산 최적 조건을 확립하며, 또한 정제를 통하여 그 구조를 밝히고, 생산된 carotenoid를 간단히 추출하여 항균 활성, 세포독성시험, 항산화력 시험을 행함으로써 난치병을 위한 의약품, 식품첨가물, 착색제, 항산화제, 양식 및 축산 사료 등의 산업에 전반적으로 이용이 가능하게 하고자 한다(20-22).

## 재료 및 방법

### 균주 및 실험방법

본 실험에 사용한 균주는 여수, 여천 연안 해안으로부터 Carotenoid를 생산하는 세균을 분리하여 MCPBK-1으로 명명하여 사용하였다. 배지는 여과한 해수 1 ℓ에 Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g을 넣은 LB배지를 사용하였다. Carotenoid의 생산은 7 ℓ Jar fermentor(Korea fermentor)사용하여 필요한 온도 및 pH에서 200 rpm, 통기량을 2 vvm으로 하여 8시간마다 시료를 채취하여 660 nm에서의 흡광도는 세균의 성장도를, 그리고 세균으로부터 추출한 carotenoid는 450 nm

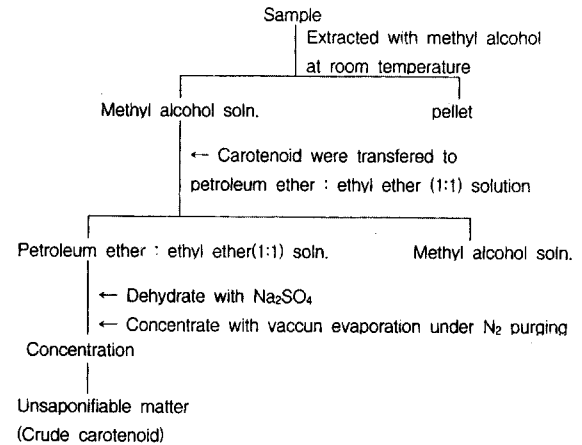


Figure 1. Extraction procedure of crude carotenoid produced by MCPBK-1.

에서 흡광도를 측정하였다. 건조중량(DCW)은 정해진 시간에 채취한 시료의 흡광도를 측정 후 건조시켜 건조중량과 흡광도와의 검량곡선을 작성하여 사용하였다. 균주 성장의 최적 조건을 검토하는 과정에서는 250 ml의 삼각플라스크를 사용하여 shaking incubator에서 배양하였으며, pH는 배지의 pH를 pH 3.0~pH 9.0까지 pH 1단위 간격으로 조정하여 25℃에서 배양하면서 carotenoid 최적 생산을 검토하였고, carotenoid 생산 최적온도는 pH 7.0의 배지를 사용하여 25℃, 30℃ 및 40℃에서 최적조건을 검토하였다. 탄소원은 glucose, galactose, fructose, sucrose 및 mannitol를 사용하여 25℃, pH 7.0, 200 rpm에서 배양을 하여 그 영향을 검토하였으며, 질소원으로는 yeast extract, casein, peptone, tryptone, gelatin 및 urea 등을 사용하였다. 미량인자로써 EDTA, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 및 Ca<sup>2+</sup> 이온 등을 사용하였고, growth factor의 영향을 검토하기 위하여 biotin, cyanocobalamine 및 mevalonic acid를 사용하여 균주의 성장 및 색소 생산량을 측정하였다.

### Carotenoid의 추출

Carotenoid 추출은 채취한 배양액을 7,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 침전을 수거하여 MeOH를 가하여 추출한 후, ether : ethyl ether(1:1)로 이행시키고 N<sub>2</sub>기류하에서 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수시켜 얻은 것을 crude carotenoid로 하여, 각 시험의 시료로 사용하였다(Figure 1).

### Carotenoid의 분리 및 정제

TLC는 Kiesel gel 60F(Merk, Germany)을 사용하여 petroleum ether:acetone(8:2)의 용매로서 전개하여 분리하였다. 또한, column chromatography는 silicagel 60G: Celite 545를 1:1로 혼합하여 column에 충전하고, petroleum ether, acetone 등의 순서로 점차적으로 극성을 증가시키면서 추출, 정제하였다.

### Carotenoid의 동정

해양세균 MCPBK-1으로부터 생산된 carotenoid의 동정은 carotenoid의 희분을 acetone에 녹여 spectrophotometer로 측정하여 표품의 가시부 흡수 spectrum과 비교하여 동정하였고 분리, 결정화된 carotenoid의 관능기의 종류를 알기 위하여 IR spectrum을 측정하여 표품의 문헌치와 비교하였다. 그리고, 분

**Table 1.** Condition of HPLC analysis for carotenoid produced from *Curtobacterium* sp.

Items	Conditions
Instrument	Pharmacia LKB LCC 2252 complete system LKB VWM detector(450 nm) LKB 2221 intergrator
Column	Sumichiral OA-2000 (4 mm i.d × 250 mm)
Mobile phase	Hexane : Dichloromethane : Ethanol (48:16:1.2)
Flow rate	1.0 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min

리된 각 carotenoid 확분의 이성체의 분리 및 단일 성분임을 확인하기 위하여, 또한 crude carotenoid를 분리, 동정하기 위하여 HPLC에 의한 분리도 행하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응(23)은 carotenoid 확분의 petroleum ether 용액 4 ml에 1%의 I<sub>2</sub> petroleum ether 용액 2~3 drops 가한 후, 실온에서 반응시킨 후 가시부 흡수 spectrum의 변화로서 확인하였다.

NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원반응(24)은 carotenoid에 95%의 ethanol을 가하여 용해시키고 5%의 NaBH<sub>4</sub> ethanol 용액에 재 용해시킨 후 하룻밤 방치시키고 TLC 및 가시부 흡수 spectrum의 변화로서 확인하였다. 그리고 carotenoid 확분을 line spotting한 TLC plate와 c-HCl를 같이 넣고서 일어나는 반응을 검토하여 epoxy group을 가지고 있는지의 여부를 조사하였고(16), 이상의 여러 가지 방법으로 carotenoid를 동정하였다.

#### Carotenoid의 정량

Carotenoid의 정량은 petroleum ether 중에서의 가시부 흡수 spectrum의 흡수극대치의 흡광도를 McBeth의 방법(25)에 따라 흡광계수  $E_{1cm}^{1\%}=2400$ 으로 하여 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{mg\%} = \frac{\text{O.D.}(\lambda \text{ max}) \times \text{Vol} \times 1000}{E_{1cm}^{1\%}(2400) \times \text{weight of tissue(g)}}$$

#### Carotenoid의 항균활성

해양세균 MCPBK-1이 생산하는 carotenoid의 항균활성을 검토하기 위한 균주로서는 *E. coli*(KCTC 1039) 및 *L. bulgaricus*(KCTC 3188)를 37 °C에서 각각 TGY 및 MRS(26)에서 배양하여  $3.6 \times 10^5$  및  $9.3 \times 10^5$  CFU/ml으로 조절한 후 10, 25, 50 및 100 µg/ml의 carotenoid를 첨가하여 12시간 배양하면서 한시간 간격으로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 세균의 성장정도를 측정하였다.

#### 세포독성 시험

HepG2 (Hepatocellular carcinoma, human, ATCC HB-8065) 및 HeLa (cervical carcinoma, human, ATCC CCL-2) 세포들을 10%의 FBS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)을 사용하여 37 °C, 5%의 CO<sub>2</sub>로 조절된 incubator에서 배양하였다. 부착된 세포들은 trypsin-EDTA 용액을 가하여 단세포화하여 조직배양 접시에 적하하여  $1 \times 10^5$  cells/2ml로 조절한 후 24시간 배양하고, 배지를 제거한 후 여러 가지 농

도의 carotenoid가 들어있는 신선한 배지를 첨가하여 37 °C, 5%의 CO<sub>2</sub>로 조절된 배양기에서 72시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS(Phosphate Buffred Saline)로 세척하여 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 또한 HepG2 세포가 carotenoid의 첨가배지에서 연속적으로 배양 할 때의 적응 정도를 검토하기 위하여 조직배양접시에 30 µg/ml의 carotenoid를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 배양을 시작한 후 도중에 신선한 배지로 교환하면서 8일간 배양, hemocytometer로 세포수를 측정하였다.

#### Carotenoid의 항산화 시험

CCL-13 (diploid, monotypic hepatocyte, human, ATCC CCL-13)를 10%의 FBS가 함유된 DMEM에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 여러 가지 농도(25-100 µg/ml)의 carotenoid가 들어있는 신선한 배지를 첨가하여 37 °C, 5%의 CO<sub>2</sub>로 조절된 배양기에서 72시간 배양한 후 PBS로 세척하고 hemocytometer로 균수를 측정한 뒤 sonication 하였다. Sonication한 시료는 thiobarbituric acid(TBA) method(27,28)에 준하여 실험한 후 532 nm에서 흡광도 측정하여 malonaldehyde의 표준정량곡선으로부터 TBA 값을 구하였다.

#### Free Radical 소거 활성

Carotenoid의 free radical 소거 활성은 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method(27,28)으로 측정하였다. Carotenoid를 여러 가지의 농도(5~50 µg/ml)로 dimethylsulfoxide에 용해시켜 제조하고, 이 용액 1 ml를 DPPH 시약에 첨가하여 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 동정

MCPBK-1의 균체지방산 분석을 위하여, Trypticase Soy Broth Agar에서 배양한 colony를 배양한 후, saponification, methylation하여 메틸화된 균체 지방산(fatty acid methyl ester: FAMES)을 분석하였다. FAMES는 Hewlett Packard IIP 6890 Gas Chromatography를 사용하여, Microbial Identification System (Microbial ID, Inc., Newark, Del.)으로 동정하였으며, 균주의 지방산은 구성성분인 anteiso-C15:0가 60.51%로 주요 성분으로 존재하고, 그의 iso-C15:0, iso-C16:0, anteiso-C17:0, 그리고 summed feature 7(C18:1)이 소량 검출됨으로써 *Curtobacterium* sp.로 동정되었다(29).

#### Carotenoid의 최적 생합성 시간

배양 시간에 따른 peak의 변화를 보면 해양세균 *Curtobacterium* sp.의 carotenoid 생합성은 배양 후 48시간에서 완전하게 되는 것으로 나타났다(Figure 2). 배양 시간에 따라 300-500 nm에서 carotenoid 특유의 peak를 볼 수 있으며, 이 spectrum은 carotenoid에 따라 특성이 다르므로 여러가지의 carotenoid를 동정할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 반응 산물을 시간에 따라 scanning하여 peak를 검토함으로써 배양 조건에 따른 생합성의 정도 및 목적 carotenoid의 생성 여부를 알 수 있을 것으로 사료된다.

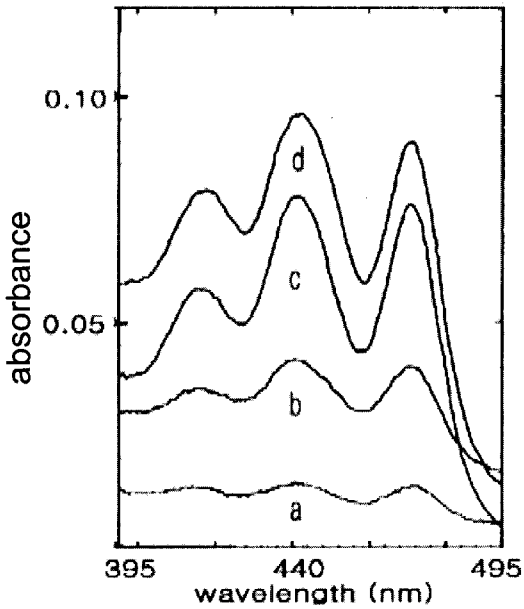


Figure 2. Change of absorption spectra of crude carotenoid extracted from *Curtobacterium* sp. in the visible range during fermentation in 7 l Jar fermentor. (a) cultivation after 16 hr, (b) 24 hr, (c) 32 hr, (d) 48 hr.

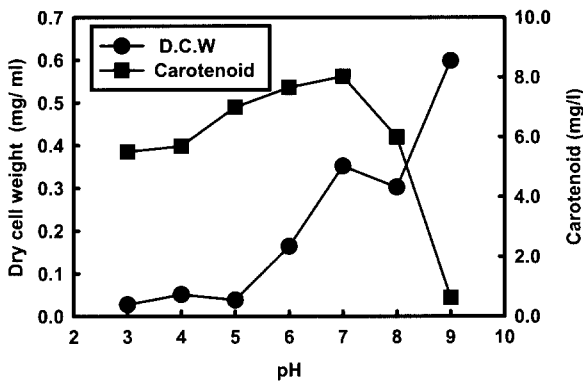


Figure 3. Effect of pH on cell growth and carotenoid production by *Curtobacterium* sp.. Fermentation was performed at 25°C for 3 days at indicated pH.

**최적 pH**

pH가 조절된 배지로써 *Curtobacterium* sp.를 25°C에서 배양하였을 때 pH 7.0에서 다량의 carotenoid가 생산되어 최적 조건으로 판단되었다(Figure 3). pH 8.0, 9.0에서는 균주의 성장은 좋게 나타났으나, carotenoid의 생산은 현저히 줄어들었다. 이것은 carotenoid가 생산은 되지만 알카리하에서 분해되거나 색소가 용해되지 않기 때문으로 사료된다.

**최적 온도**

*Curtobacterium* sp.으로부터 carotenoid의 생산 및 균주의 성장은 25°C에서 가장 좋은 것으로 나타났으며(Figure 4A), carotenoid의 생산은 온도가 증가 할수록 급격한 감소를 보였다. 또한 생산물을 scanning 해 보았을 때에도 25°C에서의 peak의 형성 정도가 30°C에 보다 완벽한 것을 볼 수 있다(Figure 4B). 따라서 이 세균으로부터 carotenoids의 생산은 25°C

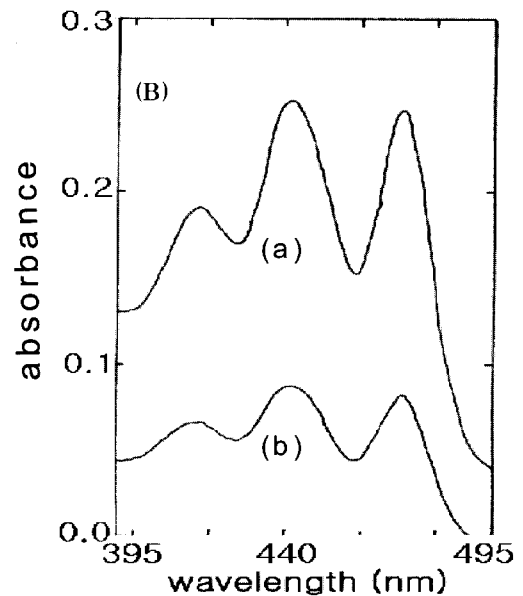
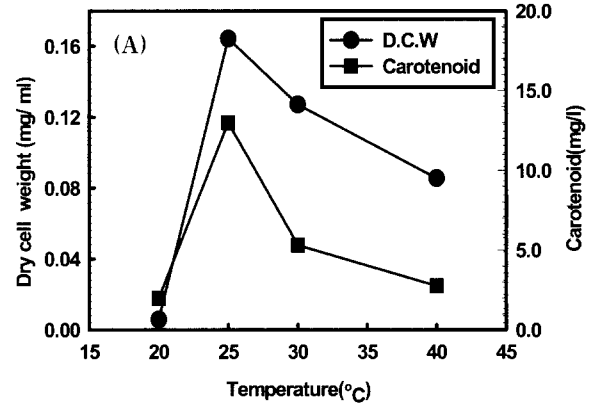


Figure 4. Effect of temperature on cell growth and carotenoid production by *Curtobacterium* sp.. Fermentation was performed at 25°C for 3 days at indicated temperature(A). Scanning spectra of crude carotenoid extracted from *Curtobacterium* sp. cultured at 25°C(a) and 30°C(b) for 48 hr(B). The productivity of carotenoid at 30°C was more less than that of 25°C.

에 최적임 알 수 있었으며, 해양의 세균의 특성으로 사료된다.

**영양원**

탄소원으로서 여러형태의 유기물질을 사용하여 세균의 성장 및 carotenoid의 생산을 검토한 결과 fructose가 다른 탄소원보다도 적합한 것으로 나타났다(Figure 5A). 또한 4 mM의 fructose가 다른 농도의 fructose보다 carotenoid의 생산에 적합한 농도라고 판단되었다(Figure 5B). 그리고 질소원으로는 무기질소원으로서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등 여러 종류의 다른 무기 질소원을 사용하여 carotenoid의 생산을 향상시키고자하였으나 무기 질소원은 carotenoid의 생산에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Figure 6A). 유기질소원으로서 yeast extract, tryptone 및 peptone 등 여러 형태의 유기 질소원을 사용하여 검토하였을 때 tryptone이 중요한 유기 질소원으로 판단 되었으며(Figure 6B), 0.07%의 tryptone이 carotenoid의 생산에 최적 조건으로 나타났다(Figure 6C). 또한, 여러 가지의 미량원소들

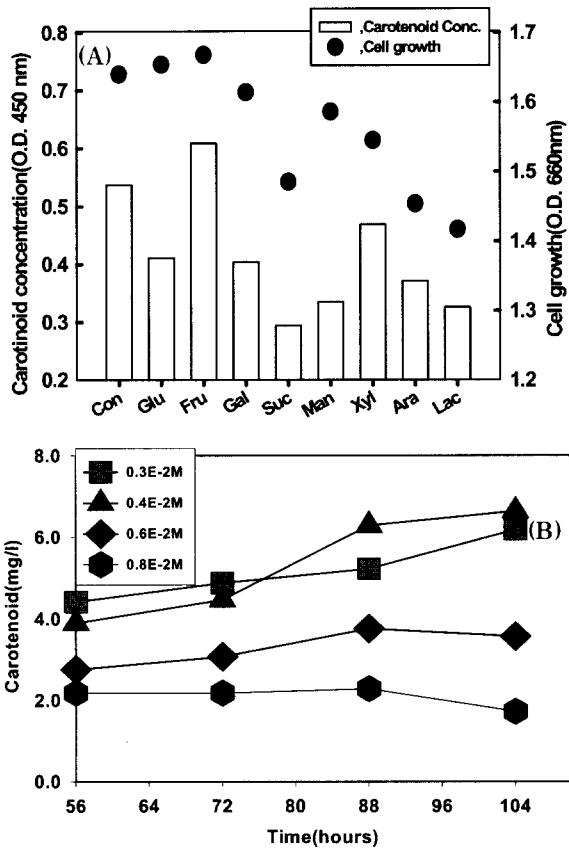


Figure 5. Effect of carbon source on cell growth and carotenoid production by *Curtobacterium* sp. at optimum condition (pH 7.0, 25°C) with 250 ml flask for 3 days. Various type of organic compounds as a C-sources(A), optimum concentration of fructose for carotenoid production(B).

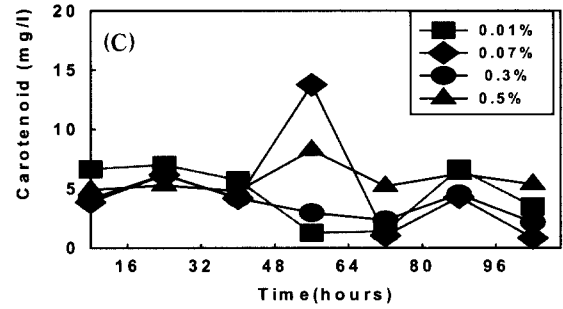
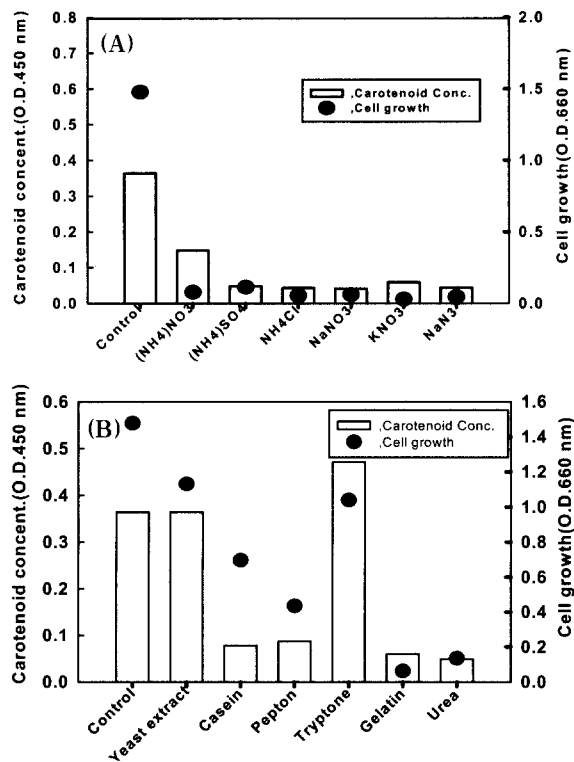


Figure 6. Effect of various inorganic and organic nitrogen sources, and optimum concentration of tryptone on cell growth and carotenoid production by *Curtobacterium* sp. at optimum condition (pH 7.0, 25°C) with 250 ml flask for 3 days. Various type of inorganic(A), and organic compounds(B) as a N-sources. Optimum concentration of tryptone for carotenoid production(C).

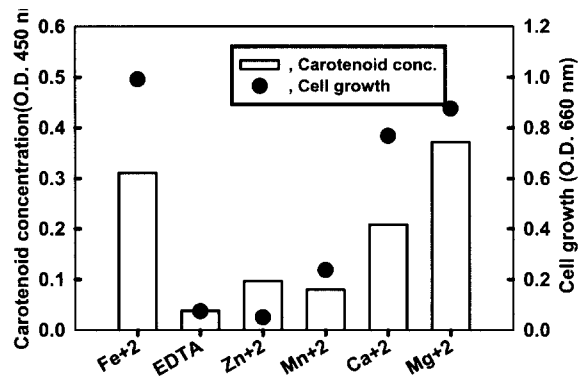


Figure 7. Effect of various micro quantity sources on cell growth and carotenoid production from marine bacterium *Curtobacterium* sp..

Figure 8. Change of carotenoid production during fermentation from various growth factors at optimum condition (pH 7.0, 25°C) with 250 ml flask for 3 days.

중에는 0.1 mM의  $Mg^{2+}$ 의 존재하에서 carotenoid의 생산이 많이 이루어져 엽록소가 클로로필의 형성에  $Mg^{2+}$  이온이 요구 되는 것처럼 색소의 형성에는  $Mg^{2+}$  이온이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다(Figure 7). Growth factor로서는 cyanocobalamine이 biotin이나 mevalonic acid보다 좋은 효과를 나타내었는데, cyanocobalamine이  $CO_2$ 를 전달하는 biotine이나 carotenoid의 전구체인 mevalonic acid보다 carotenoid의 생산 효소의 cofactor로서 역할을 하는 것으로 사료된다(Figure 8).

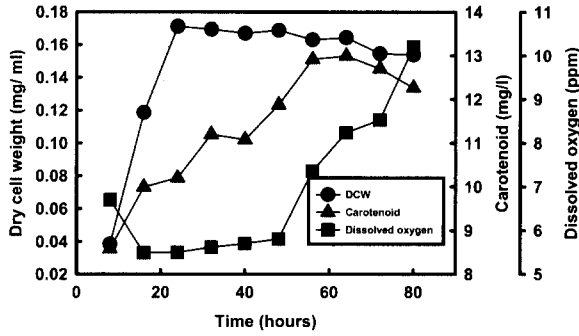


Figure 9. Effect of fermentation time on cell growth and carotenoid production at optimum conditions. Optimum conditions of marine carotenoid production from *Curtobacterium* sp. were pH 7.0, 25°C, 4 mM fructose as a carbon source, 0.07% tryptone as a nitrogen source, 0.5 mM Mg<sup>+2</sup> ion as a mineral source and 1 μM of cyanocobalamine as a growth factor in a 7 ℓ jar-fermentor. In this optimum condition, 13.0 mg/ℓ of the marine carotenoid were produced in these optimum conditions.

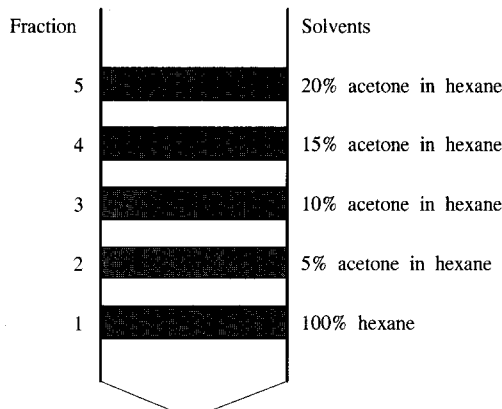


Figure 10. Column chromatography of saponified carotenoid produced from *Curtobacterium* sp.. column was packed with silicagel 60G/celite 545 (1:1). carotenoid was eluted with different solvent according to their polarity.

**Carotenoid의 최적 생산 조건**

온도, pH, 탄소원, 질소원, 미량원소 및 growth factor 등이 최적의 조건으로 갖추어졌을 때 7 ℓ의 jar-fermentor에 의한 carotenoid의 생산량은 13.0 mg/ℓ로 나타났다(Figure 9).

**Carotenoid의 동정**

해양세균 *Curtobacterium* sp.로부터 생산된 carotenoid를 TLC로 분석하였을 때 4가지의 다른 화합물로 나타났으나, carotenoid를 비누화하여 column chromatography를 수행하였을 때 5가지의 다른 화합물로 나타났으며, 각 fraction을 동정한 결과 다음과 같이 동정되었다(Figure 10).

Fraction 1 : 100%의 hexane으로 용출된 fraction 1은 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 448, 475.5 nm로 나타나 β-carotene과 일치하였으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 446, 473 nm로서 2 nm blue shift 하였다. 표준의 β-carotene (F. Hoffman-La Roche 사 제품)과의 co-TLC 및 co-HPLC 한 결과 단일대가 얻어져

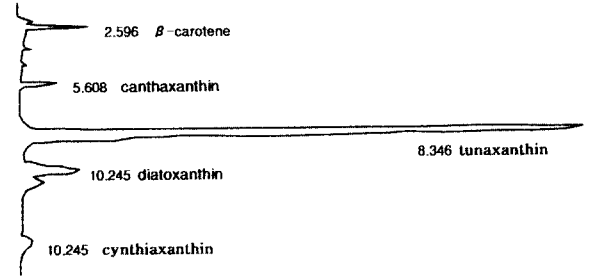


Figure 11. Composition and peaks pattern of carotenoids produced by *Curtobacterium* sp. with their retention time from HPLC.

β-carotene으로 동정하였다.

Fraction 2 : 5%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 2는 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 459 nm의 keto- carotenoid 특유의 single band로 나타났고, NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 반응 결과, 449, 476 nm의 β-carotene type의 흡수 spectrum을 나타냈으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 445, 474 nm로서 2 nm blue shift 하였다. 표준 canthaxanthin (F. Hoffman-La Roche사 제품)과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과 단일대가 얻어져 canthaxanthin으로 동정하였다.

Fraction 3 : 10%의 acetone/hexane로 용출된 fraction 3은 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 415, 436, 466 nm의 ε-carotene type의 흡수 극대치를 나타냈으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 415, 435, 466 nm로서 1 nm blue shift 하였다. 한편, epoxide test 결과 음성으로 나타났으며, 방어로 부터 추출한 표준 tunaxanthin (30)과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과, 단일대가 얻어져 tunaxanthin으로 동정하였다.

Fraction 4 : 15%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 4의 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 449, 475.5 nm를 나타냈으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 442, 467 nm로서 7 nm blue shift 하여 acetylenic bond가 1개인 diatoxanthin은 7~8 nm blue shift 한다는 보고(31)와 일치하였으며, 한편 승어(31)로부터 추출한 표준 diatoxanthin과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과, 단일대가 얻어져 diatoxanthin으로 동정하였다.

Fraction 5 : 20%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 5의 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 450, 479 nm를 나타냈으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 439, 468 nm로서 11 nm blue shift 하여 acetylenic bond가 2개인 cynthiaxanthin은 10-12 nm blue shift 한다는 보고(23)와 일치하였으며, 한편 우렁쟁이(23)로부터 추출한 표준 cynthiaxanthin과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과, 단일대가 얻어져 cynthiaxanthin으로 동정하였다.

그리고, 분리한 carotenoid를 HPLC를 수행한 결과를 Figure 11에 나타내었고, 이로부터 함량을 계산하였으며, *Curtobacterium* sp.로부터 생산된 carotenoid의 구성비율과 구조식을 Figure 12에 나타내었다. Figure 11으로부터 해양세균 *Curtobacterium* sp.로부터 생산되는 carotenoid는 tunaxanthin(86.6%), diatoxanthin (7.1%), β-carotene (2.1%), canthaxanthin(1.9%), cynthiaxanthin (1.9%) 등의 5가지의 산물로 구성되어 있었으며, *Curtobacterium*

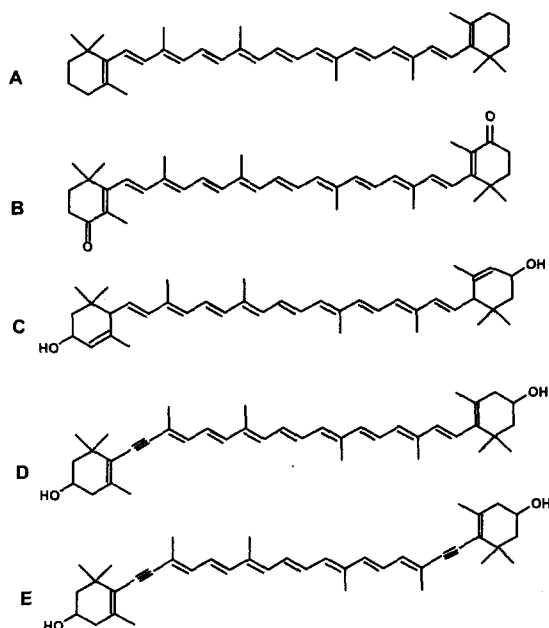


Figure 12. Structures of carotenoid produced from *Curtobacterium* sp.  
 A,  $\beta$ -carotene(2.1%); B, canthaxanthin(1.9%);  
 C, tunaxanthin(86.6%); D, diatoxanthin(7.1%);  
 E, cynthiixanthin(1.9%)

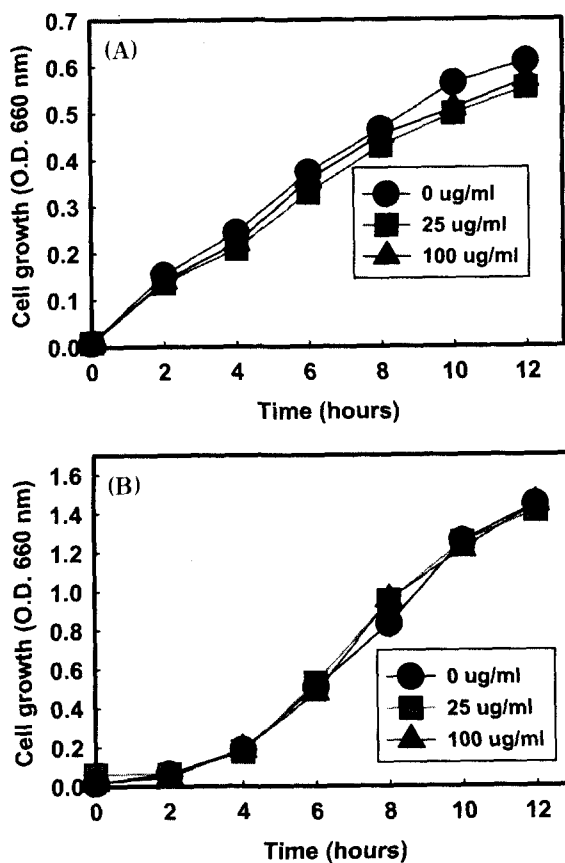


Figure 13. The growth curve of *E. coli*(A) and *L. bulgaricus*(B) by adding bacterial carotenoid from *curtobacterium* sp. according to various concentrations.

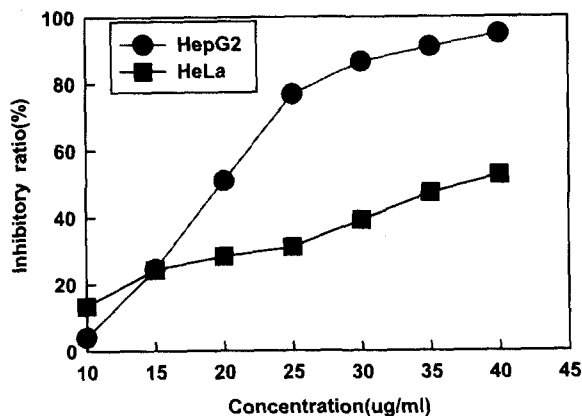


Figure 14. Growth inhibitory effect of marine carotenoid from *curtobacterium* sp. on cancer cells. At 30  $\mu\text{g/ml}$  of marine carotenoid, it showed an 86.45% inhibitory effect on HepG2 and exhibited a 39.19% inhibitory effect on HeLa.

sp.은 tunaxanthin을 주산물로 생산하는 균주이며 그 외의 구성성분은 생합성 과정의 대사산물로 사료된다.

**Carotenoid의 항균활성**

*Curtobacterium* sp.가 생산하는 carotenoid의 항균 활성은 *E. coli* (Figure 13A) 및 *L. bulgaricus* (Figure 13B) 균주에 대한 항균 활성을 control군과 carotenoid의 농도별로 비교하여 볼 때 항균 활성은 없는 것으로 사료된다.

**세포독성 시험**

*Curtobacterium* sp.가 생산하는 carotenoid의 암세포에 대한 저해 활성을 HepG2 및 HeLa 세포에 대하여 저해 효과를 검토하였다. Carotenoid의 농도 30  $\mu\text{g/ml}$ 에서 HepG2세포에 대해서는 86.4%의 저해효과를 나타내었고, HeLa 세포에 대해서는 39.2%의 저해효과를 나타내었다(Figure 14). Carotenoid는 여러 가지의 항암 효과를 갖는 것으로 알려져 있으며 (9-15), *Curtobacterium* sp.가 생산하는 carotenoid도 HepG2의 암세포에 대하여 강한 저해 활성을 나타냈고, 이 carotenoid는 5가지의 carotenoid로 구성되어 상호작용에 의하여 강한 저해 활성을 나타내며(18), 특히 canthaxanthin의 C-4 및 C'-4에 위치한 oxo- 그룹과 관계있는 것으로 사료된다(6,18). 그리고, 암세포의 carotenoid에 대한 적응성을 알아보기 위해 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 carotenoid를 함유한 배지로 연속적으로 HepG2 세포를 배양하였을 때 배양 5일째부터 저해효과를 나타내기 시작하여 7일째는 56.7%의 저해율을 보여(Figure 15) 간암 세포에 대한 보조 제제로서의 가능성을 보여 주었다.

**Carotenoid의 항산화 시험**

Carotenoid의 항산화 시험은 TBA 방법(26,27)으로 CCL-13 세포를 사용하였고, carotenoid의 농도를 25, 50, 75 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 4가지의 다른 농도로 시험하였을 때, Table 2에서 보는 바와 같이 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 carotenoid의 농도에서 83%의 강한 항산화 활성을 나타내어 다른 농도에서보다 최적의 농도로 사료된다. 또한 *Curtobacterium* sp.가 생산하는 crude carotenoid 자체로서 항산화 능력이 강하여 어류 및 축산사료로 사용할

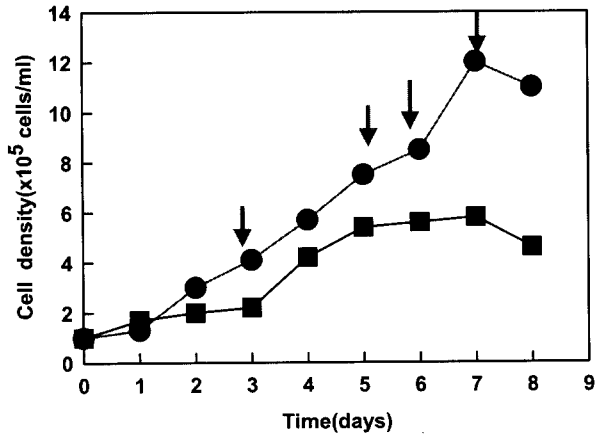


Figure 15. Effects of marine carotenoid from *Curtobacterium* sp. on the growth of HepG2. ● : normal medium, ■ : medium containing marine carotenoid (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ↓ : changed with fresh medium.

Table 2. The antioxidative effect of marine carotenoid from halophilic *Curtobacterium* sp. by TBA method.

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Content of Malondialdehyde (nM/ $10^5$ cells/ml)	Antioxidative activity(%)
25	74	60
50	31	83
75	63	66
100	77	58
Control	186	

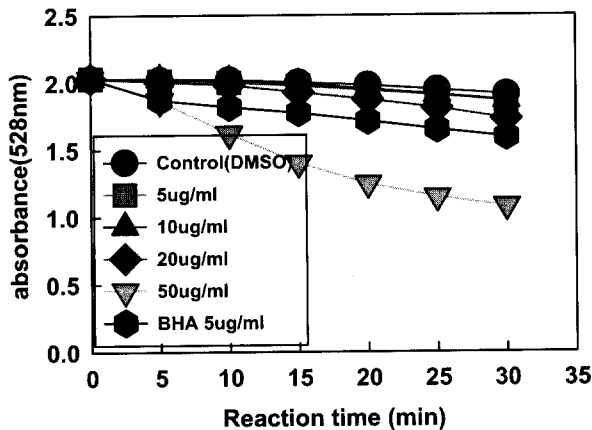


Figure 16. Changes in the free-radical scavenging level of DPPH by carotenoid from *Curtobacterium* sp.

수 있을 것으로 생각된다.

**Free Radical 소거 활성**

DPPH 방법에 의한 이 carotenoid의 free radical 소거 기능은 아주 강한 것으로 나타났으며, 5, 10, 20 및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러 가지의 carotenoid의 농도 중 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 43.4%의 강한 항산화 활성을 나타내어(Figure 16), 식품의 보존제, 첨가물, 착색제 등으로의 이용 가능성을 보였다.

**요 약**

전남의 여수지역의 해양에서 carotenoid를 생산하는 세균을 분리하여 사용하였으며, 이 세균은 *Curtobacterium* sp.으로 동정되었다. 해양세균 *Curtobacterium* sp.의 carotenoid 생산 최적조건은 pH 7.0, 최적온도 25 $^{\circ}\text{C}$ , 탄소원으로는 4 mM의 fructose, 질소원으로는 0.07%의 tryptone, 미량원소 및 growth로서는 각각 0.5 mM의  $\text{Mg}^{+2}$  이온, 1  $\mu\text{m}$ 의 cynocobalamine 이었으며, 이 최적조건에서의 carotenoid의 생산량은 13.0  $\text{mg}/\ell$  였다. 해양세균 *Curtobacterium* sp.로부터 생산된 carotenoid는 tunaxanthin (86.6%), diatoxanthin (7.1%),  $\beta$ -carotene (2.1%), canthaxanthin (1.9%), cynthiaxanthin (1.9%) 5가지의 다른 성분으로 구성되어 있었으며, 주로 tunaxanthin을 생산하는 균주로 사료된다. 그리고 분리 정제하지 않은 crude corotenoid을 이용한 생리활성 시험에서 *E. coli* 및 *L. bulgaricus* 등에 대해서는 항균활성은 나타내지 않았으나, HepG2 (Hepatocellular carcinoma, human, ATCC HB-8065) 및 HeLa (cervical carcinoma, human, ATCC CCL-2) 등의 암세포에 대하여 각각 86.4% 및 39.2%의 강한 저해 활성을 나타내었다. CCL-13 (diploid, monotypic hepatocyte, human, ATCC CCL-13) 세포를 사용한 항산화 활성은 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 carotenoid의 농도에서 83%의 강한 항산화 활성을 보였고, DPPH법에 의한 Free radical의 소거 기능도 43.4%의 높은 활성을 나타내었다. 따라서 해양세균 *Curtobacterium* sp.로부터 생산된 이 carotenoid는 정제하지 않은 상태로도 어류 및 축산사료, 첨가물, 항산화제, 의약품 등의 다양한 분야에 사용이 가능할 것으로 판단된다.

**감사의 글**

본 연구는 학술진흥재단 자유공모과제(NO. 1998-020-G00001)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

**REFERENCES**

- Internet site : <http://www.vitabooks.com/>
- Alan, T. (1995), Encyclopedia of Analytical Science, In *Pigments and Dyestuffs Vol.7*, p.3993, Academic Press, New York.
- Mohammed, H. S. and T. Barrie (1991), Separation and Identification of Cis/Trans, Carotenoid Isomers, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1438-1443.
- Oota, S. Y. (1987), Food and Preservation, p. 1, syokuhinzairyokenkyukai.
- Hoffmann, J., J. Linseisen, J. Riedl, and G. Wolfram (1999), Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans. *Eur. J. Nutr.*, **38**(6), 278-285.
- Farombi, E. O. and G. Britton (1999), Antioxidant activity of palm oil carotenes in peroxy radical-mediated peroxidation of phosphatidyl choline liposomes. *Redox Rep.*, **4**(1-2), 61-68.
- Nipponkagakukai (1990), Kikan Kagaku Sosetsu, In *ROS and Chemistry Vol. 7*, p.133, Kakaisyutpan Center.
- Enrique, C. (1996), Handbook of Antioxidants. In *Carotenoids as Scavengers of Active Oxygen Species*, p.259,



Marcel Dekker, New York.

9. Dobreanu M. and E. Mody (1997), Influence of natural antioxidants on in vitro lipoprotein oxidation, *Rom. J. Intern. Med.*, **35**(1), 55-62.
10. Balz, F. (1994), Natural Antioxidants in Human Health and Disease. In *Carotenoids and Cancer*, p.239, Academic Press, San Diego.
11. Krinsky, N. I. (1998), Over view of lycopene, carotenoids, and disease prevention, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **218**(2), 95-97.
12. Nishino, H. (1997), Cancer prevention by natural carotenoids, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **27**, 86-91.
13. Peng, Y. M., Y. S. Peng, J. M. Childers, K. D. Hatch, and P. Lin (1998), Concentration of carotenoids, tocopherols, and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, precancer, and noncancerous diseases, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**(4), 347-350.
14. Kumpulainen, J. T. (1996), Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Preservation, In *Biological Activity of Carotenoids and Their Bioavailability in the Human Organism*, p.95, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
15. Kang S., X. Y. Li, and J. J. Voorhees (1996), Pharmacology and molecular action of retinoids and vitamin D in skin, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **1**(1), 15-21.
16. Maciaszek, J. W., S. J. Coniglio, D. A. Talmage, and G. A. Viglianti (1998), Retinoid-induced repression of human immunodeficiency virus type 1 core promoter activity inhibits virus replication, *J. Virol.*, **72**(7), 5862-5869.
17. Fenaux, P, and D. Botton (1998), Retinoic acid syndrome. Recognition, prevention and management, *Drug Saf.*, **18**(4), 273-279.
18. Stahl, W., A. Junghans, B. Boer, E. S. Driomina, K. Briviba, and H. Sies (1998), Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein, *FEBS Lett.*, **427**(2), 305-308.
19. Macrae, R., R. K. Robbison, and M. J. Sader (1992), *Encyclopedia of food science and technology*, p 293, Academic Press, London.
20. Lim, S. Y., S. H. Rhee, S. Y. Yi, and K. Y. Park (1997), Growth inhibitory effect and changes in membrane phospholipid fatty acid composition on MG-63 and AZ-521 Human cancer cells by linoleic acid. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 662-668.
21. Maciaszek, J. W., S. J. Coniglio, D. A. Talmage, and G. A. Viglianti (1998), Retinoid-induced repression of human immunodeficiency virus type 1 core promoter activity inhibits virus replication, *J. Virol.*, **72**, 5862-5869.
22. Eastwood, M. A. (1999), Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease?, *Q.J.M.*, **92**(9), 527-530.
23. Matsuno, T., S. Eita, and K. Chiyu (1975), Biochemical comparative studies of fisheries carotenoid V, Comparison of a *Mullet* in freshwater and seawater, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 459-465.
24. Matsuno, T. and K. Makou (1975), Separation of new carotenoid 3,4,3'- trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene in *Mytilus orassitesta*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 37-3867.
25. Mcbeth, J. W. (1972) Carotenoid from *mudibranshus*, *Comp. Biochem. & Physiol.*, **41B**, 55-61.
26. KCTC (1999), Catalogue of Strains, 5th ed., p 465, KRIBB.
27. Kojuran, S. and H. S. Shimazaki (1995), Protocol of Lipid-Peroxide and Free Radical, p 144, Conference Publishing Center, Japan.
28. Kawakishi, S. R. (1995), Protocol of Functional Control Substance for Body from Foods. p. 14, Conference Publishing Center, Japan.
29. Yang, P., L. Vauterin, M. Vancaneyt, J. Swing, and K. Kersters(1993), Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, 47-71.
30. Ha, B. S., D. S. Kang, Y. S. JO, and M. Y. Park (1992), Color compenents of carotenoids from flat fish and yellow tail, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(4), 407-413.
31. Tsuchiya, Y. and Y. Suzuki (1960), Biochemical studies of the ascidian, *Cynthia roretzi* v. Drasche IV. Carotenoids in test. *Tohoku J. Agric. Res.*, **10**, 397-405.