

해양미생물 *Erythrobacter* 속으로부터 Carotenoid의 생산 및 그 생리활성

김종덕[†] · 강동수* · 김민용** · 노승배*** · 최명락 · 송상호 · 백승한**** · 서효진 · 김대현 · 공재열*****

여수대학교 생명공 · 화학공학부, *식품공학 · 영양학부, **냉동공학과, ***양산대학 식품가공과,
****경상대학교 식품영양학과, *****부경대학교 생물공학과

Production of Carotenoid from Halophilic *Erythrobacter* sp. and Characterization of Physiological Properties

Jong-Deog Kim[†], Dong-Soo Kang*, Min-Yong Kim**, Seung-Bae Roh***, Myeong-Rak Choi,
Sang-Ho Song, Sung-Han Baek***, Hyo-Jin Seo, Dae-Hyun Kim and Jai-Yul Kong*****

Dept. of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

**Dept. of Refrigeration Engineering, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

***Dept. of Food Processing, Yangsan College, Yangsan 625-800, Korea

****Dept. of Food and Nutrition, Kyeongsang National University, Jinju 600-701, Korea

*****Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

A marine bacterium producing carotenoid was isolated from the Yosu coastal area of South Korea, which was recorded as MCK-1. It was identified as *Erythrobacter* sp. Optimum conditions of marine carotenoid fermentation from *Erythrobacter* sp. were pH 6.0, a temperature of 25°C, 16 mM mannitol as a carbon source, 0.5% tryptone as a nitrogen source, 0.1 mM Fe²⁺ ion as a mineral source and 1 µM of cyanocobalamine as a growth factor in a jar-fermentor. *Erythrobacter* sp. was produced 351.27 mg/100 mL of the marine carotenoid in these optimum conditions. This marine carotenoid was composed of 4 different compounds, like as notoxanthin (61.4%), canthaxanthin (24.6%), fucoxanthin (8.2%), and zeaxanthin (5.8%). Physiological properties including antibacterial activity, cytotoxic effect, antioxidative effect and free radical scavenging activity were characterized with crude carotenoid. Carotenoid exhibited no antibacterial activity against *E. coli* and *Lactobacillus bulgaricus*, but showed cytotoxic effect against cancer cells such as HepG2 (*Hepatocellular carcinoma*, human, ATCC HB-8065) and HeLa (*Cervical carcinoma*, human, ATCC CCL-2) cells. The impediment ratios for HepG2 and HeLa cell were 37.14% and 33.78%, respectively. This carotenoid expressed a strong antioxidative effect (77%) against CCL-13 (diploid, monotypic hepatocyte, human, ATCC CCL-13) and free radical scavenging activity (36.7%) when using 5 µg/mL and 50 µg/mL crude carotenoid, respectively.

Key words: carotenoid, *Erythrobacter* sp., notoxanthin, canthaxanthin, fucoxanthin, zeaxanthin, cytotoxic effect, anti-oxidative effect

서 론

Carotenoids는 광선에 의해서 유발되는 광감광 산화반응에 있어서 활성화 산소에 대해 강력한 소거제로 작용하여 광감광 산화반응시 형성되는 활성화된 일중항 산소와 반응하여 전체적인 반응의 진행을 억제하고(1-5), free radical 반응의 억제 기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(6). 뿐만 아니라 carotenoids는 암발생을 억제하고 강력한 항산화력으로 동물의 번식 촉진, 성장률 개선, 질병발생 억제, 어육의 색상개선 등 유용한 기능성을 나타내는 것으로 알려지고

있어 의약품, 사료, 건강식품 등에 이용가치가 클 것으로 기대되고 있다(7-9). Carotenoids는 색소로서 뿐만 아니라 식품첨가물, 사료첨가물, 의약품제로서 다양하게 이용되면서 수요가 높아지고 있으나(7), 천연 carotenoids의 생산은 야채, 과일류, 감각류 등에서 생산이 가능하지만 원재료비 비중이 높고 함유량이 최대 1% 이내로 합성품보다 가격이 높아 경쟁력에 한계가 있으므로, 미국, 호주 및 이스라엘 등지에서는 *Dunaliella salina*(10,11), *Haematococcus pluvialis*(12,13), *Phaffia rhodozyma*(14,15) 등 조류 혹은 균체로부터 얻는 생물공학적 생산 기술이 연구되고 있다(1,16,17). *Dunaliella salina*의 β-carotene 생산공정의 장점으로는 *Dunaliella salina*

[†]Corresponding author. E-mail: pasteur@info.yosu.ac.kr
Phone: 82-61-659-3305, Fax: 82-61-659-3305

는 호염성이 가장 큰 진핵생물로 최적 염도는 해수의 7~8배인 22%이며 30% 이상의 염에도 견딜 수 있어 광범위한 open culture가 가능하며, 이 조류는 건조물 중량당 14%라는 높은 β -carotene 함량을 보여 부가가치가 매우 높은 생물이라고 할 수 있다. 반면에 문제점으로는 growth pond에 biomass가 1 g/L에 불과하고 밀도 역시 배지의 밀도와 유사하다는 점이며, 이에 따라 양식이 복잡하고 비용이 많이 든다는 점이다 (18). Astaxanthin(12,13)도 *Haematococcus pluvialis*에 의해서 생물공학적으로 생산이 가능한 것으로 알려지고 있으나 astaxanthin이 축적되는 aplanospore의 세포벽이 두터워 파괴시켜야 하는 점과 함량이 건조중량당 1~2%에 지나지 않는 문제가 있다.

이와 같이 carotenoid는 free radical을 잡아내는 항산화제로서, 또는 생체의 필수 불가결한 요소로서 생체 내에서 많이 필요로 하는 물질로 판단되나, 대부분의 carotenoid는 과일류나 생선의 외피 등(19)에 제한된 범위로 존재하기 때문에 대량 생산이 불가피하다. 그러나, 식물 및 동물로부터의 carotenoid의 추출은 많은 양의 원료로부터 추출되어야 하기 때문에 한계가 있고, 추출과정이 복잡하며 그 수율 또한 낮을 수밖에 없다. 따라서, 본 연구에서는 carotenoid의 대량 생산을 위하여 육지의 미생물보다 열악한 환경에서 서식함으로써 생존을 위하여 많은 유용물질을 생산 할 것으로 사료되는 해양 미생물로부터 carotenoid를 생산하는 균주를 분리, 동정하고, 발효조를 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, 어류 양식 및 축산 사료 등의 산업에 전반적으로 이용이 가능하게 하고자 한다(20).

재료 및 방법

균주 및 실험방법

본 실험에 사용한 균주는 여수, 여천 연안 해안으로부터 carotenoid를 생산하는 세균을 분리하여 MCK-1으로 명명하여 사용하였다. 배지는 여과한 해수 1 L에 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g을 넣은 LB(Difoco Co.)배지를 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 nm에서 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 3.0~9.0까지 1단위 간격으로 조정

하여 25°C에서 사멸기까지 배양하면서 carotenoid최적 생산을 검토하였고, carotenoid 생산 최적온도는 pH 6.0의 배지를 사용하여 25°C, 30°C 및 40°C에서 사멸기까지 배양하면서 최적조건을 검토하였다. 탄소원은 glucose, galactose, fructose, sucrose, mannitol, xylose, arabinose 및 lactose를 사용하여 25°C, pH 6.0, 200 rpm에서 배양을 하여 그 영향을 검토하였으며, 질소원으로는 yeast extract, casein, peptone, tryptone, gelatin 및 urea 등을 사용하였다. 미량인자로서 EDTA, Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이온 등을 사용하였고, growth factor의 영향을 검토하기 위하여 biotin, cyanocobalamin 및 mevalonic acid를 사용하여 균주의 성장 및 색소 생산량을 측정하였다.

균주의 동정

추출된 DNA와 universal primer(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 이전에 알려진 조건(21)에 따라 PCR를 행하여 16S rDNA(16S rRNA coding gene)를 증폭하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR product purification kit(Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였다. 염기서열 결정은 Genetic analyzer 377(Perkin-Elmer 사)을 이용하였으며 염기서열의 분석은 주로 CLUSTAL W 프로그램(22) 및 PHYLIP 프로그램(23)을 사용하였다.

Carotenoid의 추출과 정량

Carotenoid 추출은 Fig. 1에 제시된 바와 같이 채취한 배양액을 7,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 침전을 수거하여

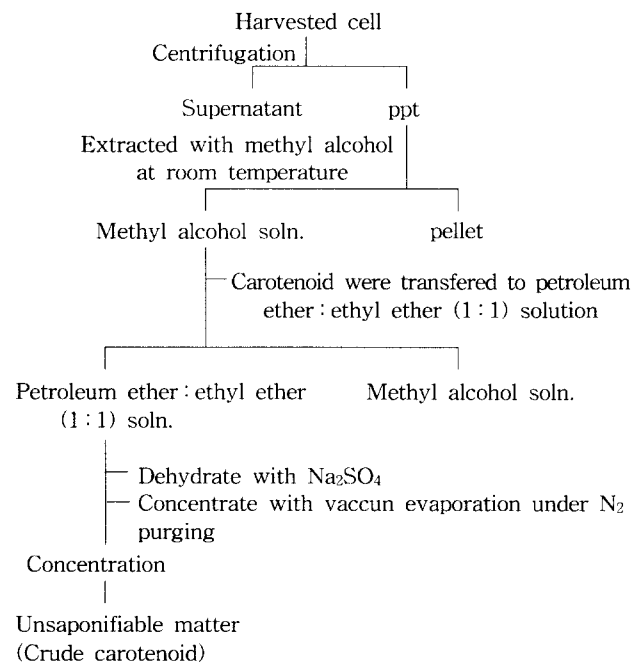


Fig. 1. Extraction procedure of total carotenoid produced by MCK-1.

MeOH를 가하여 추출한 후, ether : ethyl ether(1 : 1)로 이행시키고 N₂기류 하에서 Na₂SO₄로 탈수시켜 얻은 것을 crude carotenoid로 하여, 각 시험의 시료로 사용하였다. 그리고, carotenoid의 정량은 petroleum ether중에서의 가시부 흡수 spectrum의 흡수극대치의 흡광도를 McBeth의 방법(24)에 따라 흡광계수 $E_{1cm}^{1\%} = 2400$ 으로 하여 다음식에 의하여 계산하였다.

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

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 MCK-1으로부터 생산된 carotenoid의 동정은 carotenoid의 획분을 acetone에 녹여 spectrophotometer로 측정하여 표준품의 가시부 흡수 spectrum과 비교하였고 동정하였으며, 분리, 결정화된 carotenoid의 관능기의 종류를 알기 위하여 IR spectrum을 측정하여 표준품의 문헌치와 비교하였다. 그리고, 분리된 각 carotenoid 획분의 이성체의 분리 및 단일 성분임을 확인하기 위하여, 또한 crude carotenoid를 분리, 동정하기 위하여 HPLC에 의한 분리도 행하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. I₂에 의한 이성화 반응(25)은 carotenoid 획분의 petroleum ether 용액 4 mL에 1%의 I₂ petroleum ether 용액 2~3 drops 가한 후, 실온에서 반응시킨 후 가시부 흡수 spectrum의 변화로서 확인하였다.

NaBH₄에 의한 환원반응(26)은 carotenoid에 95%의 ethanol을 가하여 용해시키고 5%의 NaBH₄ ethanol 용액에 재 용해시킨 후 하룻밤 방치시키고 TLC 및 가시부 흡수 spectrum의 변화로서 확인하였다. 그리고 carotenoid 획분을 line spotting한 TLC plate와 c-HCl를 같이 넣고서 일어나는 반응을 검토하여 epoxy group을 가지고 있는지의 여부를 조사하였다(27).

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

Carotenoid의 항균활성

해양세균 MCK-1가 생산하는 carotenoid의 항균활성을 검토하기 위한 균주로서는 *E. coli*(KCTC 1039) 및 *Lactobacillus bulgaricus*(KCTC 3188)를 37°C에서 각각 TGY(tryptone, glucose, yeast extract) 및 MRS(DeMan, Rogosa and Sharpe) 배지에서 배양한 후 10, 25, 50 및 100 µg/mL의 carotenoid를 첨가하여 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 fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5%의 CO₂로 조절된 incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 여러 가지 농도의 carotenoid가 들어있는 신선한 배지를 첨가하고 72시간 배양하여 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 배양한 후 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척하고 hemocytometer로 균수를 측정된 뒤 sonication 하였다. Sonication한 시료는 TBA 방법(28,29)에 준하여 실험한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 malonaldehyde의 표준정량곡선으로부터 TBA 값을 구하였다.

Free radical 소거 활성

Carotenoid의 free radical 소거 활성은 DPPH 방법(30,31)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

Fig. 2에서 보는 바와 같이 균주 MCK-1은 16S rDNA 5-부분 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석에서 *Erythrobacter* 속에 속하는 균주이며 99.3%의 상동성으로서 *Erythrobacter* 속 균주로 동정되었다.

Carotenoid의 최적 생합성 조건과 생산성

pH 6.0, 16 mM의 mannitol을 탄소원으로하여 25°C에서 배양 시간에 따른 peak의 변화를 보면 해양세균 *Erythrobacter* sp.의 carotenoid 생합성은 배양 후 48시간에서 완전하게 되

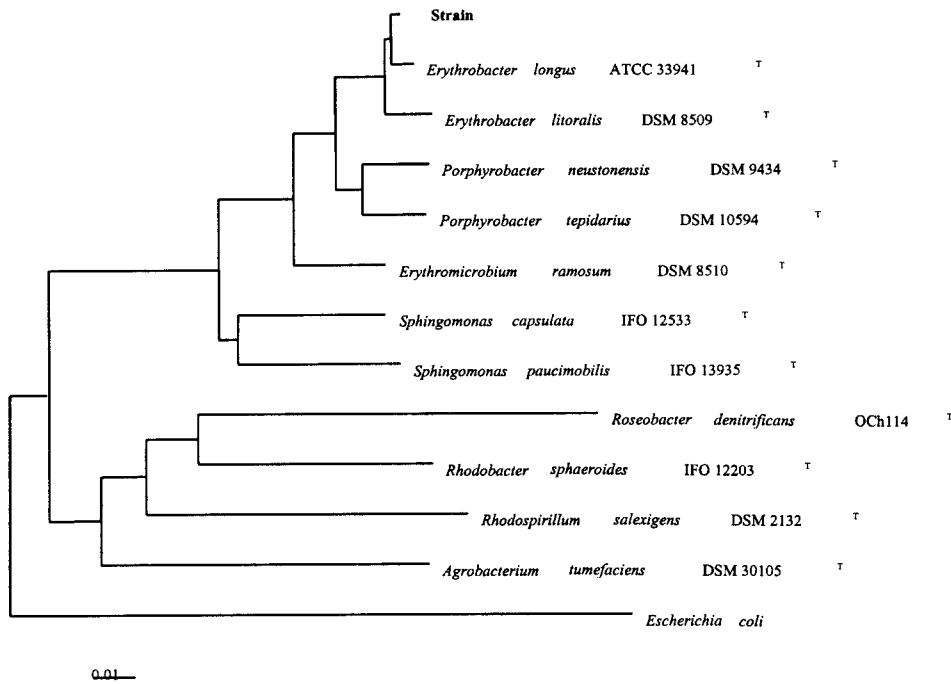


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA 5-partial sequences showing the position of strain MCK-1 and some other taxa. Scale bar represents 0.01.

는 것으로 나타났다(Fig. 3). 배양 시간에 따라 300~500 nm 에서 carotenoid 특유의 peak를 볼 수 있으며, 이 spectrum은 carotenoid에 따라 특성이 다르므로 여러 가지의 carotenoid 를 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 생각된다. 또한, pH를 달리하여 25°C에서 3일간

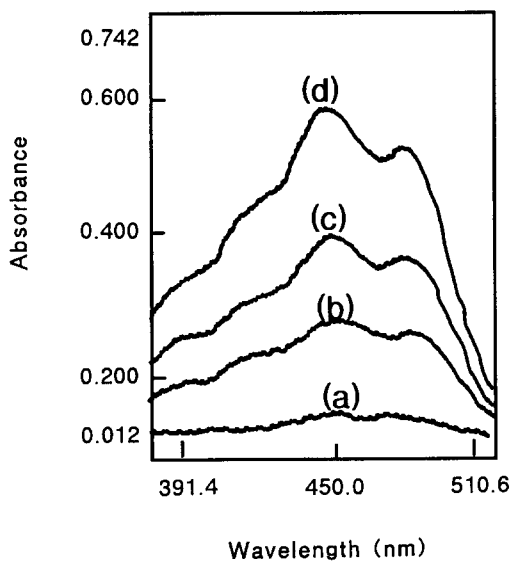


Fig. 3. Change of visible spectrum during fermentation of *Erythrobacter* sp. in 5L Jar fermentor. Cultivation after (a) 26 hr, (b) 33 hr, (c) 40 hr, (d) 48 hr.

배양하였을 때 pH 6.0에서 다량의 carotenoid가 생산되어 최적조건으로 판단되었다(Fig. 4). pH 7.0, pH 8.0 및 pH 9.0에서는 균주의 성장은 좋게 나타났으나, carotenoid의 생산은 현저히 줄어들었다. 이것은 carotenoid가 생산은 되지만 알칼리하에서 분해되거나 색소가 용해되지 않기 때문으로 여겨진다. 그리고, carotenoid의 생산 및 균주의 성장은 25°C에서 가장 좋은 것으로 나타났으며(Fig. 5A), carotenoid의 생산은 온도가 증가할수록 급격한 감소를 보였다. 또한 생산물을 scanning해 보았을 때에도 25°C에서의 peak의 형성 정도(Fig. 5B)가 30°C에서의 것보다 완벽한 것을 볼 수 있다(Fig. 5C). 따라서 이 세균으로부터 carotenoids의 생산은 25°C에

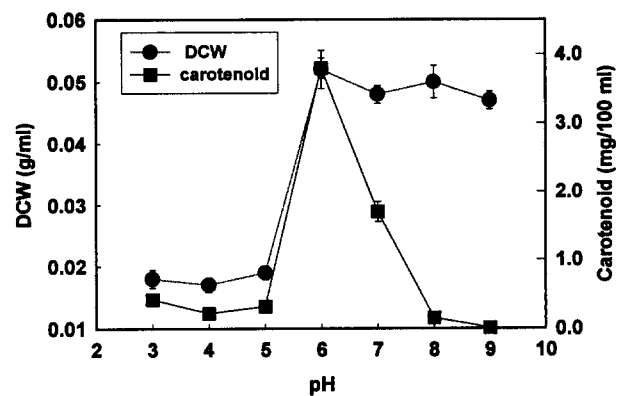


Fig. 4. Effect of pH on cell growth and carotenoid production by *Erythrobacter* sp. Fermentation was performed at 25°C for 3 days at indicated pH. All values are mean \pm SE (n=3).

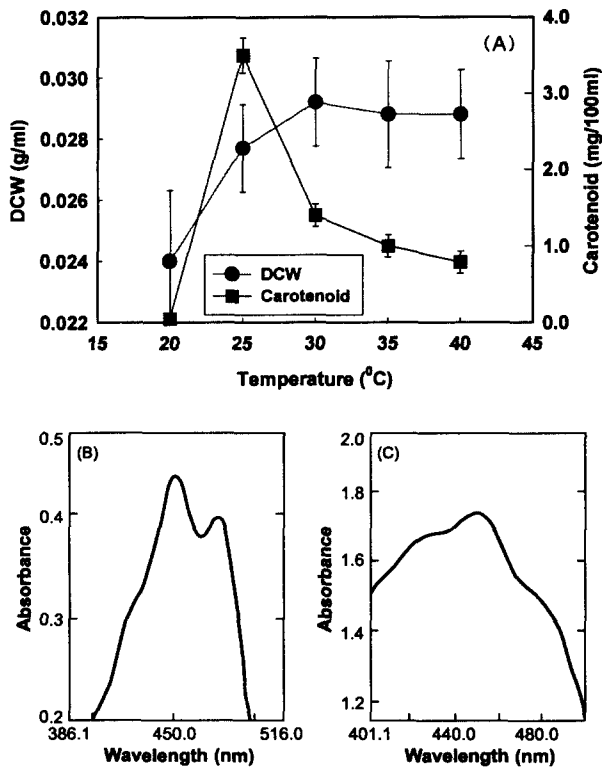


Fig. 5. Effect of temperature on cell growth and carotenoid production by *Erythrobacter* sp. Fermentation was performed at 25°C for 3 days at indicated temperature (A). Peak patterns of marine carotenoid production on temperature 25°C (B) and 30°C (C) for 48 hours culturing. All values are mean \pm SE (n=3).

최적임을 알 수 있었으며, 해양 세균의 특성으로 사료된다. 또한, 탄소원으로 여러 형태의 유기물질을 사용하여 세균의 성장 및 carotenoid의 생산을 검토한 결과 mannitol이 다른 탄소원보다도 적합한 것으로 나타났다(Fig. 6A). 또한 16 mM의 mannitol이 다른 농도의 mannitol보다 carotenoid의 생산에 적합한 농도라고 판단되었다(Fig. 6B). 여러 종류의 다른 무기 질소원을 사용하여 carotenoid의 생산을 향상시키고자 하였으나 무기 질소원은 carotenoid의 생산에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7A). 유기질소원으로서 yeast extract, tryptone, peptone 등 여러 형태의 유기 질소원을 사용하여 검토하였을 때 tryptone이 중요한 유기 질소원으로 판단되었으며(Fig. 7B), 0.5%의 tryptone이 carotenoid의 생산에 최적 조건으로 나타났다(Fig. 7C). 또한, 여러 가지의 미량원소들 중에는 Fe²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 등의 이온이 Zn²⁺, Mn²⁺, EDTA 등보다 carotenoids의 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 0.1 mM의 Fe²⁺의 존재 하에서 carotenoid의 생산이 많이 이루어져 *Erythrobacter* sp.이 균주는 carotenoid의 생합성 효소가 Fe²⁺ ion을 cofactor로 이용하는 것으로 사료된다(Fig. 8). Growth factor로서는 cyanocobalamine이 biotin이나 mevalonic acid보다 좋은 효과를 나타내었는데, cyanocobalamine이 CO₂를 전달하는 biotin이나 carotenoid의

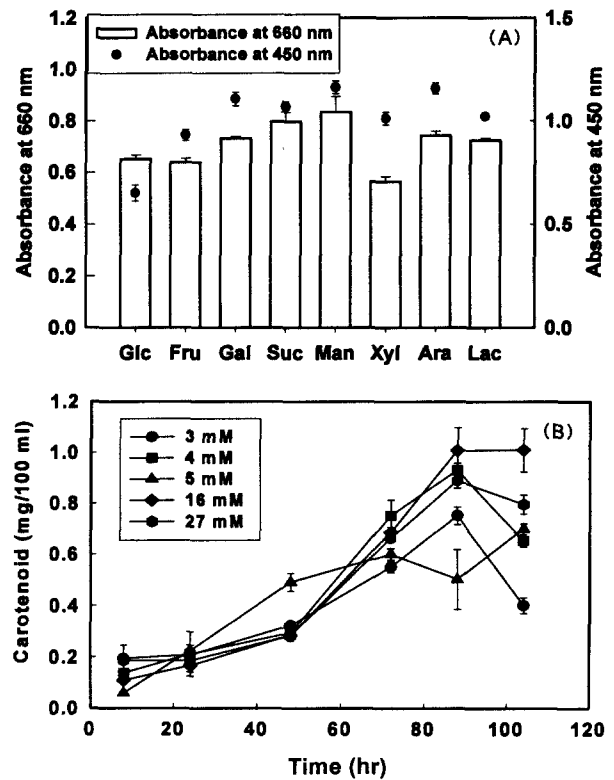


Fig. 6. Effect of carbon source (A) and concentration of mannitol (B) on cell growth and carotenoid production by *Erythrobacter* sp. All values are mean \pm SE (n=3).

전구체인 mevalonic acid보다 carotenoid의 생산의 보조효소로서 역할을 하는 것으로 사료된다(Fig. 9). 그리고 온도, pH, 탄소원, 질소원, 미량원소 및 growth factor 등이 최적의 조건으로 갖추어졌을 때 7 L의 jar-fermentor에 의한 carotenoid의 생산량은 351.27 mg/100 mL로 나타났다(Fig. 10). 식물류가 가지고 있는 1% 내외의 량과 비교해보면 *Erythrobacter* sp.로부터 carotenoid는 대량생산이 가능할 것으로 사료된다.

Carotenoid의 동정

해양세균 *Erythrobacter* sp.로부터 생산된 carotenoid를 TLC로 분석하였을 때 4가지의 다른 화합물로 나타났고, 이들 band를 더욱 분리 정제하기 위하여 carotenoid를 비누화한 후 column chromatography 및 HPLC를 행한 결과 4개의 band로 분리되었으며, 각 fraction을 동정한 결과 다음과 같이 동정되었다.

Fraction 1 : 5%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 1은 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 acetone 용매에서 459 nm의 keto carotenoid 특유의 single band로 나타났고, NaBH₄에 의한 환원 반응 결과, 449, 476 nm의 β -carotene type의 흡수 spectrum을 나타냈으며, I₂에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 445, 474 nm로서 2 nm blue shift하였다. 표준품 canthaxanthin(F. Hoffman-La Roche사 제품)과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과 단일대가

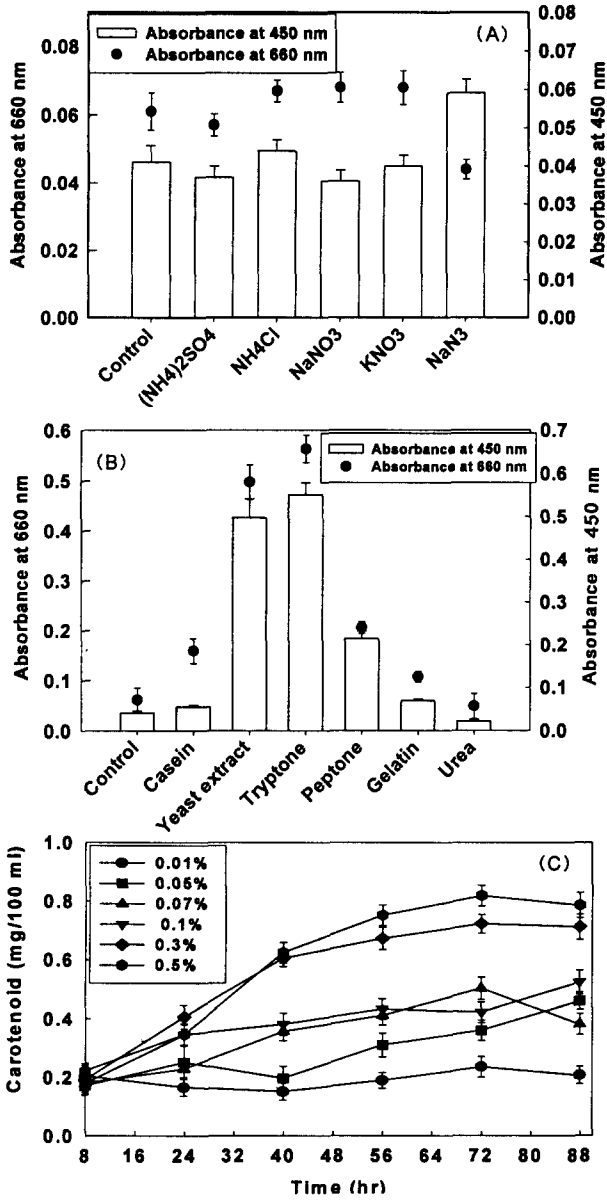


Fig. 7. Effect of various inorganic (A) and organic (B) nitrogen sources, and optimum concentration of tryptone (C) on cell growth and carotenoid production by *Erythrobacter* sp. All values are mean \pm SE (n=3).

얻어져 canthaxanthin으로 동정하였다.

Fraction 2: 10%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 2의 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 447, 474 nm의 β -carotene type의 흡수 극대치를 나타냈으며, I₂에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 443, 471 nm로서 4 nm blue shift하였다. 한편 옥수수로부터 추출한 표준품 zeaxanthin과 co-TLC 및 co-HPLC한 결과, 단일 대가 zeaxanthin으로 동정하였다.

Fraction 3: 30%의 acetone/hexane으로 용출된 fraction 3은 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 425, 446, 473 nm의 β -carotene type의 흡수 spectrum을 나타냈으며,

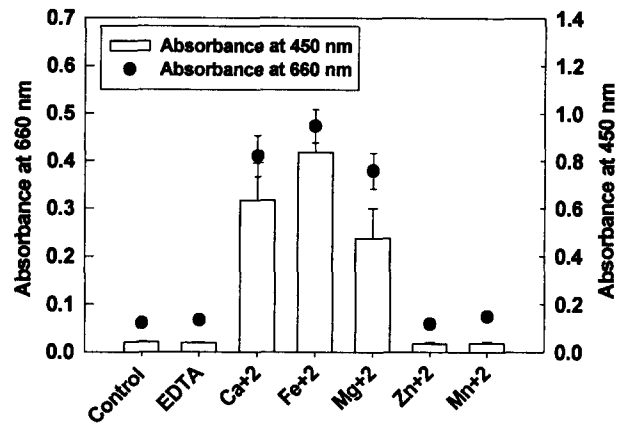


Fig. 8. Effect of ions for cell growth and carotenoid production from marine bacterium *Erythrobacter* sp. All values are mean \pm SE (n=3).

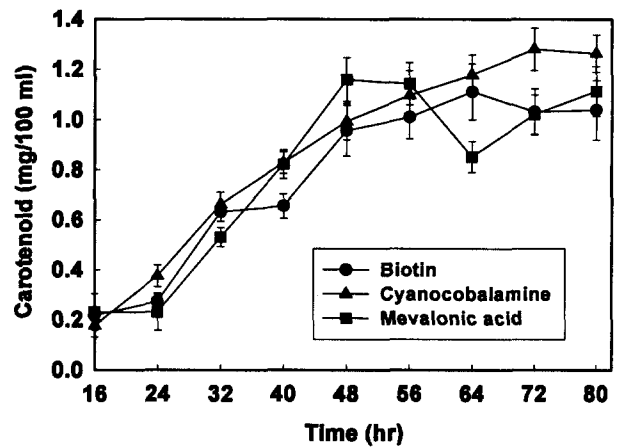


Fig. 9. Change of cell growth and carotenoid production during fermentation from different growth factors. All values are mean \pm SE (n=3).

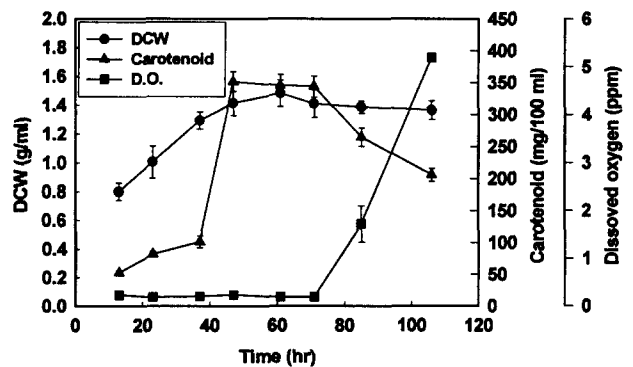


Fig. 10. Effect of fermentation time on cell growth and carotenoid production at optimum conditions. Optimum conditions of marine carotenoid production from *Erythrobacter* sp. were pH 6.0, a temperature of 25°C, 16 mM mannitol as a carbon source, 0.5% tryptone as a nitrogen source, 0.1 mM Fe²⁺ ion as a mineral source and 1 μ M of cyanocobalamine as a growth factor in a jar-fermentor. In this optimum condition, 351.27 mg/100 mL of the marine carotenoid were produced. All values are mean \pm SE (n=3).

I₂에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 425, 445, 471 nm로서 2 nm blue shift하였다. 또한 IR spectrum의 측정결과, 1930 cm⁻¹(C=C=C)과 1660 cm⁻¹(C=O)으로 나타났으며, epoxide test 결과 양성반응을 보였고, TLC 및 HPLC를 행하여 문헌(30)과 비교한 후, fucoxanthin으로 동정하였다.

Fraction 4: 100% acetone으로 용출된 fraction 4의 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 447, 471.5 nm의 β-carotene type의 흡수 극대치를 나타냈으며, I₂에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 446, 471 nm로서 1 nm blue shift하였고, IR spectrum의 측정결과, Vmax 3300cm⁻¹(-OH)의 흡수대가 나타났으며, ¹H-NMR spectrum의 측정결과, δ 1.13s(6H, Me-16, 17), 1.01s(6H, Me-,16',17')의 signal이, Mass spectrum의 측정결과, C₄₀H₅₆O₄ 600 [M]⁺의 peak가 확인되었고 이 data들로부터 2,3,2',3'-tri-OH-bat-acarotene로 밝혀졌으며 녹조류의 일종인 *Anacystis nidulans*에서 분리된 nostaxanthin의 문헌(31)과 일치하여 nostaxanthin으로 동정하였다.

그리고, 분리한 carotenoid를 HPLC를 수행한 결과를 Fig. 11에 나타내었고, 이로부터 함량을 계산하였으며, 해양세균 *Erythrobacter* sp.로부터 생산되는 carotenoid는 notoxanthin(61.4%), canthaxanthin(24.6%), fucoxanthin(8.2%), zeaxanthin(5.8%) 등의 4가지의 산물로 구성되어 있었으며, *Erythrobacter* sp.은 notoxanthin을 주산물로 생산하는 균주이며 그 외의 구성성분은 생합성 과정의 대사산물로 사료된다.

Carotenoid의 항균활성 및 세포독성

Erythrobacter sp.가 생산하는 carotenoid의 항균 활성은 *E. coli*(Fig. 12A) 및 *L. bulgaricus*(Fig. 12B) 균주에 대한 항균 활성을 control군과 carotenoid의 농도별로 비교하여 볼 때 항균 활성은 없는 것으로 판단된다. 그리고, 암세포에 대한 저해 활성을 HepG2(*Hepatocellular carcinoma*, human, ATCC HB-8065) 및 heLa(*Cervical carcinoma*, human, ATCC CCL-2) 세포에 대하여 저해 효과를 검토한 바, carotenoid의 농도 60 µg/mL에서 HepG2세포에 대해서는 37.14%의 저

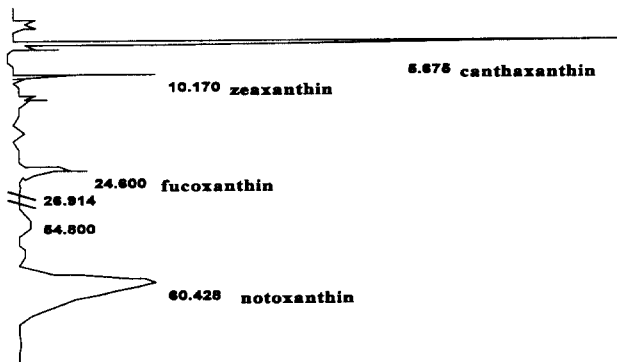


Fig. 11. Compositions and peaks pattern of carotenoid produced by *Erythrobacter* sp. with their retention time from HPLC.

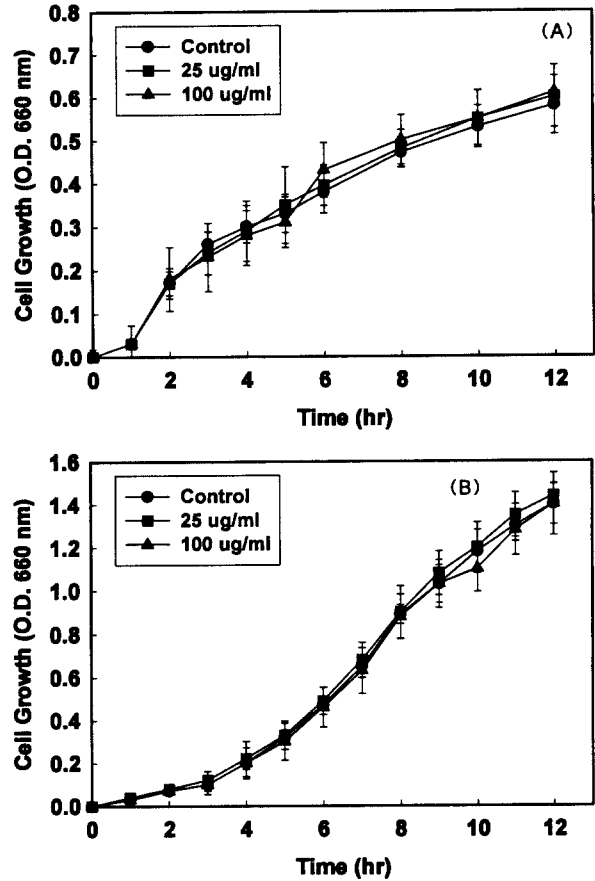


Fig. 12. The growth curve of *E. coli* (A) and *L. bulgaricus* (B) with various concentrations of bacterial carotenoid from *Erythrobacter* sp. All values are mean ± SE (n=3).

해효과를 나타내었고, HeLa 세포에 대해서는 33.78%의 저해효과를 나타내었다(Fig. 13). HepG2의 암세포에 대한 저해

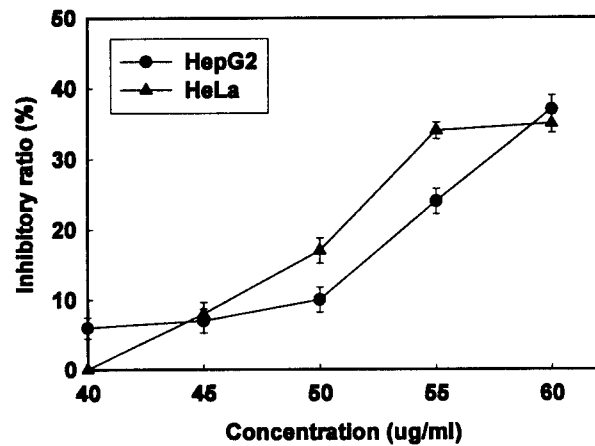


Fig. 13. Growth inhibitory effect of marine carotenoid from *Erythrobacter* sp. on cancer cells. At 60 µg/mL of marine carotenoid, it showed an 37.14% inhibitory effect on HepG2 cell and exhibited a 33.78% inhibitory effect on HeLa cell. All values are mean ± SE (n=3).

Table 2: The antioxidative effect of carotenoid from *Erythro-bacter* sp. by TBA method

Concentration (µg/mL)	Content of malondialdehyde (nM/10 cells/mL)	antioxidative activity (%)
25	42	77
50	57	69
75	68	63
100	62	66
Control	186	-

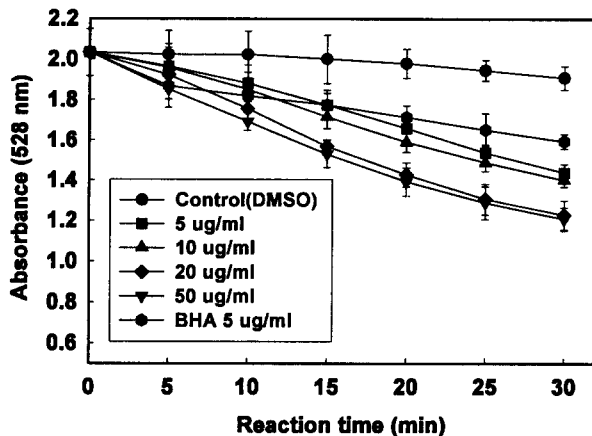


Fig. 14. Changes in the free-radical scavenging level of DPPH by carotenoid from *Erythrobacter* sp.
All values are mean \pm SE (n=3).

활성은, 이 carotenoid가 4가지의 carotenoid로 구성되어져 상호작용에 의하여 저해 활성을 나타내며(32), 특히 canthaxanthin의 C-4 및 C'-4에 위치한 oxo- 그룹과 관계 있는 것으로 사료된다(5).

Carotenoid의 항산화성 및 Free radical 소거능

Carotenoid의 농도를 25, 50, 75 및 100 µg/mL의 4가지의 다른 농도로 항산화성을 시험하였을 때, Table 2에서 보는 바와 같이 25 µg/mL의 carotenoid의 농도에서 77%의 강한 항산화 활성을 나타내었으며, 이 농도가 CCL-13(diploid, monotypic hepatocyte, human, ATCC CCL-13)에 대하여 내량 (tolerated dose)으로 사료된다. 또한 *Erythrobacter* sp.가 생산하는 crude carotenoid 자체로서 항산화 능력이 강하여 어류 및 축산사료로 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이 carotenoid의 free radical 소거 기능은 아주 강한 것으로 나타났다며, 여러 가지 carotenoid의 농도 중 50 µg/mL에서 36.7%의 강한 항산화 활성을 나타내어(Fig. 14), 식품의 보존제, 첨가물, 착색제 등으로의 이용 가능성을 보였다.

요 약

전남의 여수지역의 해양에서 분리한 carotenoid를 생산하는 세균은 *Erythrobacter* sp.으로 동정되었다. 이 균의 carotenoid 생산 최적조건은 pH 6.0, 최적온도 25°C, 탄소원으로

서는 16 mM의 mannitol, 질소원으로는 0.5%의 tryptone, 미량원소 및 growth로서는 각각 0.1 mM의 Fe^{2+} 이온, 1 µM의 cynocobalamine이었으며, 이 최적조건에서의 carotenoid의 생산량은 351.27 mg/100 mL이었다. 이 carotenoid는 notoxanthin(61.4%), canthaxanthin(24.6%), fucoxanthin(8.2), zeaxanthin(5.8)의 4가지의 다른 성분으로 구성되어 있었으며, 주로 notoxanthin을 생산하는 균주였다. *E.coli* 및 *Lactobacillus bulgaricus* 등에 대해서는 항균활성은 나타내지 않았으나, HepG2(*Hepatocellular carcinoma*, human, ATCC) 및 HeLa(*Cervical carcinoma*, human, ATCC) 등의 암세포에 대하여 각각 37.14% 및 33.78%의 저해 활성을 나타내었다. CCL-13 세포를 사용한 항산화 활성은 25 µg/mL의 carotenoid의 농도에서 77%의 강한 항산화 활성을 보였고, DPPH 법에 의한 free radical의 소거 기능도 36.7%의 높은 활성을 나타내었다. 따라서 해양세균 *Erythrobacter* 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(N0. 1998-020-G00001)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

문 헌

1. Tee, E.S. : Carotenoids and retinoids in human nutrition., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **31**, 103-163 (1992)
2. Mohammed, H.S. and Barrie, T. : Separation and identification of cis/trans, carotenoid isomers. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1438-1443 (1991)
3. Oota, S.Y. : *Food and Preservation*. Syokuhinzairyokenkyukai, p.1-235 (1987)
4. Hoffmann, J., Linseisen, J., Riedl, J. and Wolfram, G. : Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation *ex vivo* in humans. *Eur. J. Nutr.*, **38**, 278-285 (1999)
5. Farombi, E.O. and Britton, G. : Antioxidant activity of palm oil carotenes in peroxy radical-mediated peroxidation of phosphatidyl choline liposomes. *Redox. Rep.*, **4**, 61-68 (1999)
6. Krinsky, N.I. : Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.*, **51**, 649-654 (1979)
7. Hong, S.P. : Biological activity and prospects of natural carotenoid. *Food Tech.*, **9**, 127-132 (1996)
8. Bauerfeind, J.C. : *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, New York, p.1-250 (1981)
9. Pierre, A. : Food carotenoids and cancer prevention-An overview of current research. *Trends in Food Sci. Tech.*, **8**, 406-411 (1997)
10. Michael, A.B. : Products from microalgae. *Infofish International*, **5**, 21-27 (1993)
11. Rau, W. : Mechanism of photoregulation of carotenoid biosynthetic in plants. *Pure Appl. Chem.*, **57**, 777-783 (1985)
12. Makio, K. : Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferm. Bioen.*, **74**, 61-66 (1992)

13. Makio, K. : Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferm. Bioen.*, **74**, 17-22 (1992)
14. Sedmak, J.J. : Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.*, **4**, 107-113 (1990)
15. Tony, J.F. : Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Farm. Bioen.*, **75**, 466-471 (1993)
16. Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P. : Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 181-187 (1991)
17. Johnson, E.A. : Astaxanthin from microbial sources. *Cri. Rev. Biotech.*, **11**, 297-302 (1991)
18. Hong, S.P., Kim, M.H. and Hwang, J.K. : Physiological function and production techniques of carotenoids. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1297-1306 (1998)
19. Macrae, R., Robbison, R.K. and Sader, M.J. : *Encyclopedia of food science and technology*. Academic Press, London, p.293-313 (1992)
20. Lim, S.Y., Rhee, S.H., Yi, S.Y. and Park, K.Y. : 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 (1997)
21. Yoon, J.H., Lee, S.T., Kim, S.B., Kim, W.Y., Goodfellow, M. and Park, Y.H. : Restriction fragment length polymorphisms analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 111-116 (1997)
22. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. : CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680 (1994)
23. Felsenstein, J. : *PHYLIP: Phylogenetic Inference Package*. Version 3.5, University of Washington, Seattle (1993)
24. McBeth, J.W. : Carotenoid from *mudibranshus*. *Comp. Biochem. & Physiol.*, **41B**, 55-61 (1972)
25. Matsuno, T., Eita, S. and Chiyou, K. : Biochemical comparative studies of fisheries carotenoid V, Comparison of a Mullet in freshwater and seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 459-465 (1975)
26. Matsuno, T. and Makou, K. : Separation of new carotenoid 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- β -carotene in *Mytilus orassitesta*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 3767-3772 (1975)
27. Maciaszek, J.W., Coniglio, S.J., Talmage, D.A. and Vigi-lianti, G.A. : Retinoid-induced repression of human immunodeficiency virus type 1 core promoter activity inhibits virus replication. *J. Virol.*, **72**, 5862-5869 (1998)
28. Kojuran, S. and Shimazaki, H.S. : *Protocol of Lipid-Peroxide and Free Radical*. Conference Publishing Center, Japan, p.144-158 (1995)
29. Kawakishi, S.R. : *Protocol of Functional Control Substance for Body from Foods*. Conference Publishing Center, Japan, p.13-20 (1995)
30. Ookubo, M. and Matsuno, T. : Carotenoids of sea squirt-II. comparative biochemical studies of carotenoids in sea squirt. *Comp. Biochem. & Physiol.*, **81**, 137-143 (1985)
31. Buchecker, R., Synnove, L.J., Gunner, B. and Harold, W.S. : Carotenoids of ANACYSYIS NIDULANS, structures of caloxanthin and nostoxanthin. *Phytochemistry*, **15**, 1015-1018 (1976)
32. Stahl, W., Junghans, A., Boer, B., Driomina, E.S., Briviba, K. and Sies, H. : Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage-Synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.*, **427**, 305-308 (1998)

(2000년 11월 20일 접수)