

재조합 대장균으로부터 추출·정제된 베타-카로틴의 주름개선 활성

¹조지송 · ²구보미 · ²강상수 · ¹이재란 · ³김유근 · ¹이학
¹김성배 · ⁴김선원 · †¹김창준 · ⁵정인영

¹경상대학교 생명화학공학과 및 공학연구원, ²경상대학교 의과대학 해부학교실, ³KB코스메틱,
⁴경상대학교 응용생명과학부, ⁵광운대학교 전자통신공학과
(접수 : 2008. 7. 23., 게재승인 : 2008. 11. 18.)

Anti-wrinkle Activity of β -carotene Extracted & Purified from Recombinant *Escherichia coli*

Ji Song Jo¹, Bo Mi Ku², Sang Soo Kang², Jae Ran Lee¹, You Geun Kim³, He Lee¹, Sung Bae Kim¹,
Seon-Won Kim⁴, Chang-Joon Kim^{1†}, and In-Young Chung⁵

¹Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, GyeongSang National University, Jinju 660-701, Korea

²Department of Anatomy & Neurobiology, GyeongSang National University, Jinju, 660-751, Korea

³KB Cosmetics, Jinju, Korea, ⁴Division of Applied Life Science, GyeongSang National University, Jinju, 660-701, Korea

⁵Department of Electronics and Communications, Kwangwoon University, Seoul, Korea

(Received : 2008. 7. 23., Accepted : 2008. 11. 18.)

This paper described the extraction/purification of β -carotene from recombinant *E.coli* and evaluation of anti-wrinkle activity of purified β -carotene. No significant differences in extraction yields were observed when hexane or isobutyl acetate was used. However, extraction from wet-cell cake resulted in 2-fold higher amount of β -carotene than that from dry cells. Disruption of 5 g-wet cells by ultrasonic homogenizer, acetone dehydration, extraction with isobutyl acetate resulted in 36 mg of β -carotene corresponding to 61.2% of recovery. The formation and separation of β -carotene crystal improved the purity. 633 mg of β -carotene crystal with 93% purity was obtained from 223 g/L of wet-cell cake harvested from 2.5-L fed-batch culture broth. The cultures of normal human primary fibroblast were performed to investigate the effect of β -carotene on cytotoxicity as MTT assay and anti-wrinkle activity as collagen synthesis assays. 1.7 μ M of β -carotene was found to be optimal concentration at which 1.4-fold higher amount of collagen was synthesized than that in absence of β -carotene. This indicates that highly purified β -carotene can be obtained from recombinant *E.coli* by applying simple method with less toxic solvent and can be used in functional cosmetics as anti-wrinkle agent.

Key Words : Recombinant *Escherichia coli*, β -carotene, Extraction, Anti-wrinkle activity, Functional cosmetics

서론

베타-카로틴은 카로테노이드계 물질이고 비타민 A 전구체, 면역 기능의 활성화, 항산화제로서 인체 내 산소라디칼 제거를 통한 노화예방 효과 및 항암효과가 있는 것으로 알려졌다(1-2). 의약품, 기능성 식품, 음식물 첨가제로 사용되고 있는 베타-카로틴

은 전 세계 시장규모가 연 2억 4천만 달러에 이를 정도로 시장성이 광범위한 물질이다(3). 최근 들어 화장품회사들은 베타-카로틴을 함유한 기능성 화장품이 주름개선 효과가 있다고 선전하고 있다. 그러나 이에 대한 정확한 실험적 증거가 발표된 바 없다. 첨가제로 사용되는 천연 베타-카로틴은 당근, 토마토, 호박과 같은 녹황색 채소에서 추출된 것으로서 가격이 매우 비싼데, 이는 식물체에 존재하는 베타-카로틴의 양이 매우 적고 다른 카로테노이드 성분들과 함께 존재하기 때문에 수율이 낮고 회수 과정이 복잡하고 까다롭기 때문이다(4-5).

대부분의 베타-카로틴은 상업화된 화학합성공정에 의해 생산되고 있으나 식품 및 화장품에 이의 사용을 엄격히 규제하고 있다(6). 따라서 미세조류 (microalgae)인 *Dunaliella salina*(1, 7),

† Corresponding Author : Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, GyeongSang National University, Jinju 660-701, Korea

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

E-mail : cj_kim@gnsu.ac.kr

효모균인 *Blakeslea trispora*(4, 8), *Rhodotorula glutinis*(9)를 배양하고 이로부터 베타-카로틴을 회수하기 위한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 이들 미생물들로부터 베타-카로틴을 추출하기 위한 기존의 방법은 세포를 건조한 후 분쇄하는 등 여러 단계의 복잡한 전처리 과정과 핵산, 클로로포름, 톨루엔 등과 같은 유독성 용매를 사용하는 등의 문제점이 있다(4, 10, 11). 미국 FDA에서는 제약 또는 식품 산업에 핵산의 사용을 엄격히 제한하고 있다(12). 이에 식용유를 추출용매로 이용하려는 시도도 있었으나 베타-카로틴 결정이 생성되지 않아 고 순도의 베타-카로틴을 얻을 수 없었다(4, 13). 또한 식물체의 경우처럼 베타-카로틴 외에 다른 카로테노이드 물질이 동시에 생합성 되기 때문에 이들로부터 베타-카로틴만을 분리하기 위한 추가적인 공정이 필요하다고 지적되어 왔다(14).

최근 본 연구팀에서는 다른 카로테노이드 물질의 생성 없이 베타-카로틴만을 과량으로 생합성하는 재조합 대장균을 개발하였다(15). 본 연구는 유독성이 적은 용매를 사용하여 재조합 대장균으로부터 베타-카로틴을 간단하고 효율적으로 추출/정제하는 방법의 개발과 정제된 베타-카로틴을 기능성 화장품의 주름개선제로의 사용 가능성을 알아보는 데 그 목적이 있다. 미국 FDA에서 제약 및 식품산업에 사용을 허가한 class 3 계열 용매인 isobutyl acetate (IBA)(12)를 추출용매로의 사용 가능성을 조사하였다. 또한 세포의 상태 (dry or wet), 탈수 용매의 종류가 추출 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 베타-카로틴 결정을 생성시키고 이를 추출용매로부터 분리함으로써 고순도의 베타-카로틴을 회수하는 방법을 개발하였다. 사람 섬유아세포 (normal human primary fibroblast) 배양을 통하여 정제된 베타-카로틴이 세포에 미치는 독성 및 주름개선 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 배지, 및 배양 방법

베타-카로틴 생산 균주는 *E. coli* DH5 α 에 베타-카로틴 생합성 유전자들을 포함하는 pT-DHB 플라스미드와 mevalonate 생합성 외래 유전자들을 포함하는 pS-NA 플라스미드가 삽입된 재조합 대장균이다(14). -80°C에 보관된 glycerol stock 0.8 mL를 ampicillin (100 mg/L)과 chloramphenicol (50 mg/L)이 첨가된 LB 배지 100 mL를 함유하는 500 mL 플라스크에 접종한 후 진탕배양기 (제이오텍, 서울, 한국)에서 37°C, 180 rpm으로 배양하였다. OD_{600nm}가 0.6에 도달하였을 때, ampicillin (100 mg/L), chloramphenicol (50 mg/L), 글리세롤 (20 g/L)이 첨가된 2 \times YT 배지 1.8 L를 함유하는 3.4 L 상단구동 발효기 (코바이오텍, 인천, 한국)에 접종균을 접종한 후 회분식 모드로 배양을 시작하였다. 글라이세롤이 거의 고갈될 시점에 pH-stat으로 기질을 공급하며 유기산 배양을 수행하였다. pH는 2N 황산과 25% 암모니아 용액을 이용하여 6.8~7.0으로 조절하였고 용존산소 농도는 교반속도와 순수산소를 혼합하여 공급함으로써 조절하였다. Difco Lab. Inc. (Detroit, Mi, USA)배지와 Sigma사 시약을 사용하였다.

세포독성 시험 (MTT-based cytotoxicity assay)과 콜라겐 생합성 시험 (collagen assay)을 위하여 CO₂ 인큐베이터에서 이산

화탄소 농도를 5% 유지하며 37°C에서 사람 섬유아세포 (normal human primary fibroblast, 충남대학교 의과대학 김창덕 교수 제공)를 배양하였다. 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum)과 페니실린 (100 IU/mL), 스트렙토마이신 (10 mg/mL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 배지 (Gibco BRL, California, USA)를 사용하였다.

시료 전처리

배양 종료 후 배양액을 취하여 4°C, 8,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 세포를 회수하였다. 건조 세포를 얻기 위하여 wet-cell cake을 알루미늄 접시 (외경 20cm)에 넣고 골고루 퍼지게 문지른 후 55°C 건조기에서 12시간 건조하였다. 건조 세포를 막자사발에 넣고 5분간 분쇄하여 균일한 건조세포 가루를 얻었다. Wet-cell cake을 이용하는 경우에는 회수된 세포를 그대로 사용하였다. 이들 세포들을 탈수 (또는 탈 지질)하기 위한 용매로 아세톤 혹은 2-프로판올을 사용하였다. 세포현탁액을 포함하는 튜브를 얼음통에 넣고 세포파쇄기 (Ultrasonic homogenizer, Sonics & Materials, Inc., Danbury, USA)의 tip을 세포현탁액에 담근 후 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.

베타-카로틴 추출

전 처리된 세포 (건조 세포 1 g 혹은 wet-cell cake 5 g)를 포함하는 500 mL 삼각플라스크에 핵산 또는 isobutyl acetate (IBA) 40~50 mL를 첨가한 후 물중탕으로 60°C를 유지하며 10분간 교반하였다. 증발에 의한 용매의 손실을 방지하기 위하여 50 mL 플라스크를 마개로 사용하였다. 이후 혼합액을 감압하에 Whatman 나일론 멤브레인 필터 (세공크기 0.25 μ m)를 통과시켜 추출용액과 세포잔사물을 분리하였다.

베타-카로틴 순도 측정

추출액 11 mL를 채취하여 1 mL는 HPLC 분석에 사용하고, 10 mL를 알루미늄 접시에 넣어 55°C에서 12시간 건조한 후, 건조물의 질량을 측정하였다. 건조물의 질량은 추출액 중에 존재하는 모든 추출물질들의 총 질량을 나타내므로 HPLC로 측정된 베타-카로틴의 양을 이 건조물의 양으로 나누면 추출액 중의 베타-카로틴의 순도가 된다.

한편, 정확히 정량된 베타-카로틴 결정 분말을 일정부피의 IBA에 용해시키면 농도를 아는 용액이 제조된다. 표준 베타-카로틴 시약으로 제조된 표준용액으로부터 HPLC 검량선을 작성한 후, 이로부터 제조된 용액의 농도를 측정한다. 측정된 농도를 제조된 농도로 나눈 값이 베타-카로틴 결정의 순도가 된다.

세포독성시험 (MTT-based cytotoxicity assay)

재조합 대장균으로부터 추출·정제된 베타-카로틴이 세포에 미치는 독성 여부를 검사하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소 (dehydrogenase)에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, thiazolyl blue tetrazolium bromide)를 보라색을 띠는 비 수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아

의 능력을 이용하는 검사법이다. 따라서 살아있는 세포의 양이 많을수록 MTT에 의해 생성된 보라색의 색깔이 진해지게 된다(16). 8×10^3 cells/well이 되도록 각각 0.1 mL의 배지를 함유하는 96 well plate에 세포를 분주하여 세포가 부착될 때 까지 24시간 배양하였다. 그 후 THF (tetrahydrofuran)에 적정농도로 희석된 베타-카로틴을 함유한 배지로 교체한 후, 배양을 재개하였다. 배양 24시간 후 MTT 용액을 최종농도 1 g/L가 되도록 배양액에 첨가하고 4시간을 추가로 배양하였다. 배양 종료 후 MTT를 함유하는 배양액을 suction에 의해 제거하면 well에는 MTT-formazan 결정이 남게 되는데, 이를 용해시키기 위하여 0.1 mL의 DMSO (dimethylsulfoxide)를 첨가하였다. 세포의 생존도는 용액의 색깔과 직선적인 상관성을 나타내는데, ELISA reader의 570 nm에서 흡광도를 측정하여 이를 산정하였다.

콜라겐 생합성 실험 (collagen assay)

3.5×10^3 cells/well이 되도록 각각 1 mL의 배지를 함유하는 24 well plate에 세포를 분주하여 세포가 부착될 때 까지 24시간 배양하였다. 그 후 THF에 적정농도로 희석된 베타-카로틴을 포함한 배지로 교체하여 추가로 24시간 배양 후, 배양액 중의 콜라겐 양을 측정하였다. Procollagen type I C-peptide EIA kit (MK101, Takara Bio Inc.)를 이용하고 회사에서 제공된 실험 방법을 따라 콜라겐 양을 측정하였다. 콜라겐 농도는 ELISA reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준농도 곡선을 작성한 후, 실험군에서 발현된 콜라겐 양을 계산하여 얻었다.

분석방법

역상강림인 J'sphere ODS H80 (250 mm×4.6 mm, YMC Co., Ltd, Japan)을 장착한 HPLC를 사용하여 베타-카로틴 농도를 측정하였다. 메탄올 (40%), 아세트니트릴 (48%), 및 디클로로메탄 (12%)이 섞인 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.

결과 및 고찰

재조합 대장균의 유가식 배양 및 베타-카로틴의 추출·정제

Fig. 1은 유가식 배양에서 전형적인 생산균주의 성장 및 베타-카로틴 생산을 나타낸다. 배양 개시 약 12시간 후에 글리세롤이 거의 고갈됨에 따라 pH-stat으로 기질이 공급되었다. 세포의 생장은 배양 24시간 이후부터 중지되었으며, 이때 최대 세포 농도는 25 g/L였다. 베타-카로틴은 지속적으로 생산되었으며 배양 개시 33시간에 최대 농도인 980 mg/L에 도달하였다. 이는 단위 세포 당 베타-카로틴 생산량이 39.1 mg- β -carotene/g-DCW이 됨을 의미한다.

배양 종료 후 회수된 세포를 2-프로판올로 탈수처리하고 건조시켰다. 생성된 베타-카로틴이 세포 내부에 존재하기 때문에 추출효율을 높이기 위하여 세포를 파쇄하였다. 헥산 또는 IBA에 의해 세포 잔사물로부터 추출된 베타-카로틴의 양을 비교하였다. 헥산을 추출용매로 사용하는 경우 10분 이후부터는 추출

양의 증가가 관찰되지 않아 IBA로 추출하는 경우에도 추출 시간을 10분으로 고정하였다. 또한 매 추출 후 새로운 용매로 교체하여 추가적인 추출이 가능한지에 대해서도 조사하였다. Fig. 2에 나타내었듯이, 첫 번째 추출 시 헥산에 의한 추출량은 8.2 mg이었고 IBA에 의해 추출된 양은 7.2 mg으로 두 용매의 성능은 비슷하였다. 두 번째 이후부터는 두 용매에 의해 추출된 양이 모두 1 mg이하였다. 이는 두 번째 이후부터는 더 이상 추출되지 않음을 나타낸다.

Table 1. Comparison of extraction methods for recovery of β -carotene from recombinant *E.coli*

Cell Condition		¹ Dry cells		² Wet cells	
Dehydration Solvent	⁵ Extraction Solvent	β -carotene (mg)	Purity (%)	β -carotene (mg)	Purity (%)
³ Acetone	IBA	11	40	35.8 (⁶ 23.9)	62.3
⁴ 2-propanol	IBA	9	44	36.0 (⁶ 24.0)	58.5
³ Acetone	Hexane	8	31	33.9 (⁶ 22.6)	59.5
⁴ 2-propanol	Hexane	6	32	24.8 (⁶ 16.5)	38.5

¹ 1 g dry cells and ² 5 g wet cells were disrupted using ultrasonic homogenizer.

³ Cell debris was dehydrated with 30 mL acetone at room temperature for 30 min

⁴ Cell debris was dehydrated with 30 mL of 85%(v/v) 2-propanol at 40°C for 30 min

⁵ Extraction was performed with 50 mL solvent at 60°C for 10min.

⁶ The values in parentheses corresponds to β -carotene per 1g dry cells.

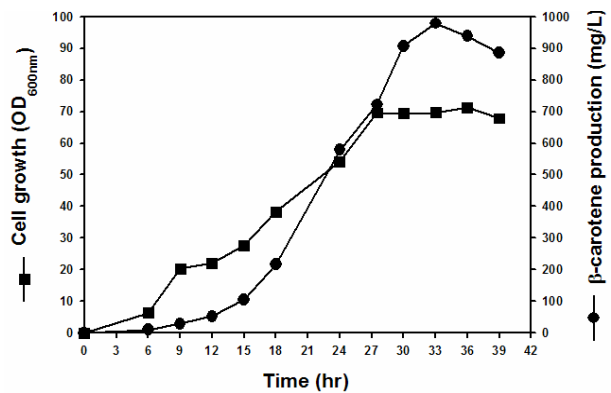


Figure 1. Time profiles of cell growth and β -carotene production in pH-stat fed-batch culture of recombinant *E.coli* cells at 37°C.

추출 후에도 세포잔사물이 여전히 오렌지색을 띠고 있어 추출 방법에 대한 개선이 필요하였다. 따라서 세포의 상태 (dry 또는 wet), 탈수 용매의 종류, 추출용매의 종류에 따른 영향을 전반적으로 조사하였고 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Wet-cell cake의 경우 5 g을 취하였는데, 이는 dry cell 1.5 g에 해당하는 양이다. 이로부터 추출된 베타-카로틴의 양을 dry cell 1 g에 해당하는 양으로 보정한 값을 괄호 안에 표시하였다. 조사된 모든 경우에서 탈수 용매의 종류, 추출용매의 종류는 추출성능에 큰 영향을 미치지 않았다. 두 실험 결과는 재조합대장균으로부터 베타-카로틴의 효율적 추출을 위하여 미국 FDA가 추천하는 IBA를 사용할 수 있음을 의미한다. Wet-cell cake으로부터 추출한 경우가 dry cell로부터 추출한 경우보다 월등히 많은 양의 베타-카로틴이 추출되었다. 결론적으로 wet-cell cake을 아세톤 혹은 2-프로판올로 탈수시킨 후 IBA로 추출 시 36 mg

의 베타-카로틴이 추출되었다. 이는 dry cell 1 g에 해당하는 양으로 환산 시 24 mg에 해당하며 61.2%의 회수율을 나타낸다. 이는 기존에 알려진 효모나 미세조류로부터 베타-카로틴의 추출(4, 10)에 비하여 추출효율이 떨어지지 않음을 나타낸다. 본 결과처럼 algae로부터 베타-카로틴을 추출함에 있어서 dry 세포를 사용 시 그 추출수율이 감소하였고 전처리 용매는 큰 영향을 미치지 않았다는 보고가 있었다(13).

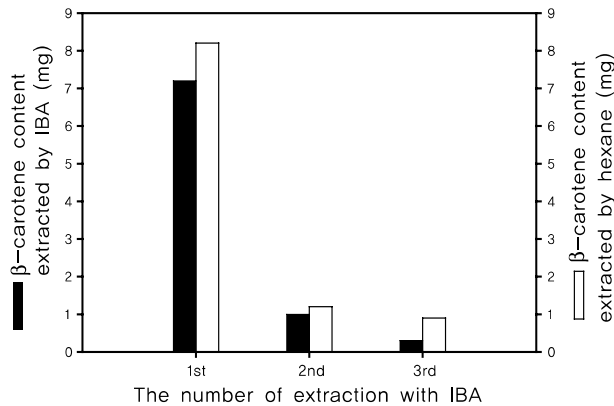


Figure 2. The repeated extraction of beta-carotene from 1 g dry cells with 40 mL IBA at 60°C. Each run was performed for 10 min.

한편, 추출용액 중의 베타-카로틴 순도는 약 60% 수준으로서 이를 주름개선 성능시험을 위한 시료로서 사용이 불가능하였다. 베타-카로틴은 추출과정에서 대장균 세포막의 지질성분들과 함께 추출되는 것으로 여겨지며, 이로 인해 추출액의 순도가 낮아졌을 것으로 여겨진다. 비록 2-프로판올 또는 아세톤으로 세포를 처리하였지만 전처리 과정에서 충분한 양의 지질들이 제거되지 않은 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 고 순도의 베타-카로틴을 얻기 위한 추가적인 정제과정이 필요함을 시사한다. 본 연구에서는 추출액에 용해되어 있는 베타-카로틴의 결정생성을 촉진시켜 베타-카로틴을 추출용액으로부터 분리함으로써 고순도의 베타-카로틴을 얻을 수 있는 방법을 사용하였다. 미생물의 세포막 유래 지질성분들은 불포화지방산 성분이 대부분이므로 결정이 거의 생기지 않는다(10). 그러나 후시 발생할 수 있는 일부 지질성분들의 결정생성을 방지하기 위하여 추출액을 농축하여 용액 중의 베타-카로틴을 과포화 상태로 만든 후, 베타-카로틴에는 불용성이나 지질성분에는 잘 섞이는 2-프로판올(4)을 첨가하였다. 이를 저온에서 12시간 방치 시 상당량의 베타-카로틴 결정이 생성되었다.

이와 같은 기초 실험을 바탕으로 피부주름개선 성능테스트에 필요한 충분한 양의 베타-카로틴을 얻기 위하여 큰 규모의 추출 및 정제 실험을 수행하였다. 즉, 재조합 대장균의 유가식 배양을 재 수행하여 배양액 2.5 L로부터 얻은 wet-cell cake 223 g의 탈수, 세포 파쇄, 세포 잔사물로부터 베타-카로틴 추출, 농축, 결정화 등을 통하여 최종적으로 순도 93%의 베타-카로틴 결정 633 mg을 얻었다. 이와 같은 일련의 과정을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 4는 표준품과 배양액으로부터 추출·정제된 베타-카로틴의 HPLC 피크를 나타낸다. 정제된 베타-카로틴의 피크는 표준품 피크의 용출시간과 일치하고 불순물이 존재하지 않음을 명확히 보여주는 것으로서 본 연구에서 제시된 방법에 의해 정제된 베타-카로틴의 순도가 매우 높음을 의미한다.

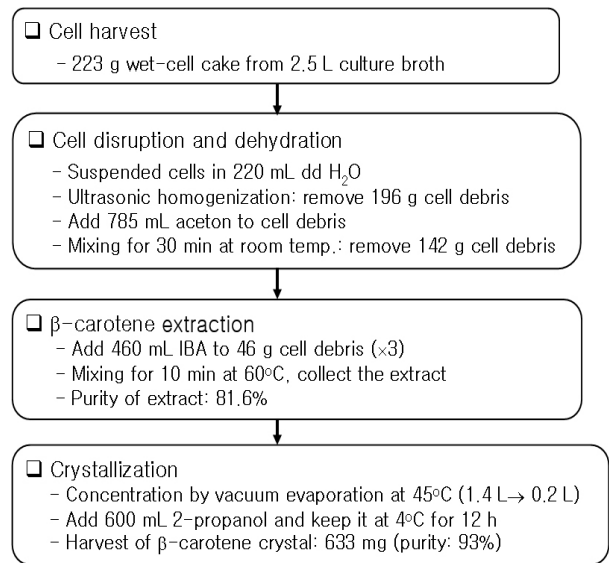


Figure 3. Process for extraction and purification of beta-carotene from recombinant E.coli.

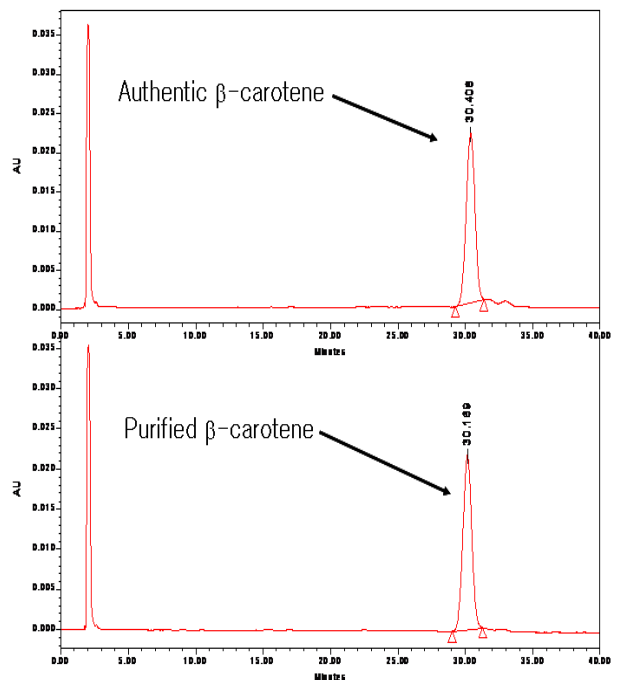


Figure 4. Representative chromatograms of authentic (A) and purified beta-carotene (B) dissolved in IBA.

정제된 베타-카로틴의 주름개선 성능 시험

피부주름의 발생원인 중 하나로 피부 교원질 (콜라겐)의 결핍을 들고 있다. 콜라겐은 피부 진피를 구성하는 주요 단백질로서 피부구조와 탄력을 유지하는 역할을 하고 있다. 콜라겐은 나이가 들면서 생성의 감소를 보이며 분해도 증가되어 피부 진피층의 함몰을 유도하여 피부의 주름을 생성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 콜라겐의 생성정도를 실험하여 피부 주름개선제의 효과를 평가할 수 있다(17). 본 연구에서 사용한 방법은 식품의약품 안전청에 제시한 in vitro 시험법으로서 섬유아세포 배양 시 시료의 세포내 콜라겐 생성 증가 정도를 control과 비교하는 것이다(17-18).

베타-카로틴은 암세포의 성장을 억제하는 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다(2). 이는 다른 정상세포들의 성장도 억제할 가능성이 있으므로, 먼저 베타-카로틴이 정상세포에 미치는 독성여부를 조사하였다. 0.9~17.3 μ M 범위의 베타-카로틴을 농도별로 첨가한 배지를 제조한 후, 그 배지에서 섬유아세포의 생존율 (viability)을 조사하였다. Fig. 5에 나타내었듯이, 0.9 μ M의 베타-카로틴을 첨가 시 섬유아세포의 생존율은 control과 비슷한 반면, 첨가량이 증가함에 따라 점차 감소하여 17.3 μ M이 첨가된 배지에서 control의 71%에 달하였다. Schlipalius등(2)은 농도별로 제조된 베타-카로틴이 흑색종 (human metastatic)변이 세포와 정상 멜라닌 생성세포 (neonatal melanocytes)의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 베타-카로틴의 농도를 1.86 μ M까지 증가시키에 따라 정상세포인 멜라닌 생성세포의 생존율은 control과 거의 비슷한 반면, 흑색종 변이주의 생존율은 control의 50~90% 수준까지 감소하였다. 그러나 베타-카로틴의 농도가 높은 경우 종양세포와 정상세포의 생존율은 모두 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때, 낮은 농도의 베타-카로틴은 특정 암세포에 특이적으로 강한 독성을 나타내는 반면 정상세포에는 거의 독성을 나타내지 않으나 일정농도 이상의 베타-카로틴은 세포의 종류에 관계없이 독성을 나타내는 것으로 판단된다. 일반적으로, 생리활성물질이 세포에 미치는 독성 유무를 검사할 경우 세포의 생존도가 80% 이상이 되는 범위를 안전한 농도 범위로 인정한다(19). 따라서 control의 84% 이상의 생존율을 나타내는 3.5 μ M 이하의 베타-카로틴이 세포에 독성을 거의 나타내지 않는 안전한 농도 범위로 결정되었다.

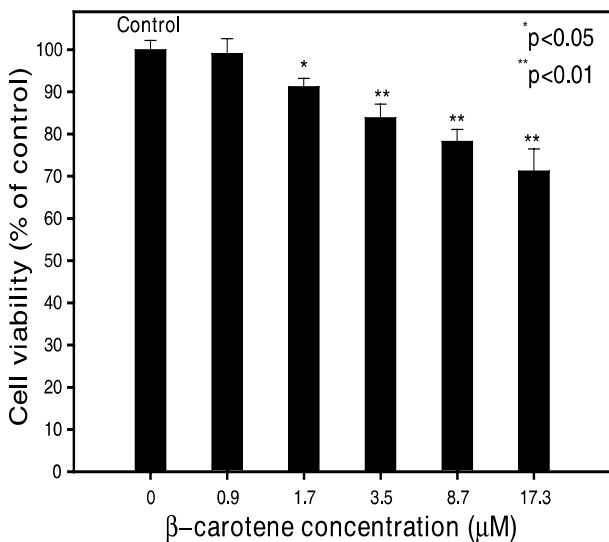


Figure 5. MTT assay for testing the toxicity of purified β -carotene dissolved in THF.

3.5 μ M 베타-카로틴을 최대농도로 설정하여 콜라겐 생합성에 대한 베타-카로틴의 농도별 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. Fig. 6에 나타내었듯이, 생성되는 콜라겐의 농도는 베타-카로틴의 첨가농도에 따라 증가하였고 1.7 μ M의 베타-카로틴이 첨가된 배지에서 최대치인 422 ng/mL에 도달하였다. 이 값은 control에 비해 46% 높은 수치이고 레티놀 1 μ M 또는 아데노신 1 μ M이 첨가된 배지에서 생성된 콜라겐양의

각각 96%와 87%에 해당한다. 한편 배지 중의 베타-카로틴 농도를 3.5 μ M로 증가시켰으나 콜라겐 생성량의 증가는 더 이상 관찰되지 않았다. 본 결과는 베타-카로틴이 생체 내에서 콜라겐 생합성을 촉진시켜 주름개선효과를 나타내고 그 성능은 레티놀과 비슷하지만 아데노신에 비해서는 약간 떨어짐을 나타낸다.

세포독성시험과 콜라겐 에세이 결과를 바탕으로 본 연구팀은 대장균 유래 베타-카로틴이 기능성 화장품의 주름개선제로 사용될 수 있고 이의 적정첨가량은 1.7 μ M이며 기존의 주름개선제로 사용되고 있는 레티놀이나 아데노신과 경쟁 가능한 물질이라고 주장한다.

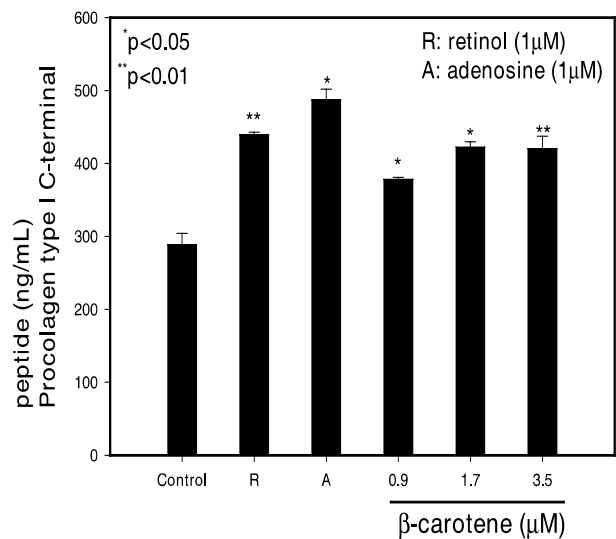


Figure 6. Collagen assay for testing the anti-wrinkle activity of purified β -carotene dissolved in THF.

요약

재조합 대장균으로부터 베타-카로틴을 추출/정제하고 정제된 베타-카로틴의 주름개선 성능을 평가하였다. 탈수 용매, 추출 용매에 따른 추출량의 큰 변화는 발견되지 않았으나, wet-cell cake으로부터 추출한 경우가 dry cell로부터 추출한 경우에 비하여 2배 많은 양의 베타-카로틴이 추출되었다. 5 g의 wet-cell cake을 파쇄하고, 아세톤으로 탈수한 후, isobutyl acetate로 추출한 결과 36 mg의 베타-카로틴이 추출되었는데, 이는 61.2% 회수율에 해당한다. 베타-카로틴의 결정을 생성시키고 이를 분리한 결과 순도가 증가하였다. 재조합 대장균 배양액 2.5 L로부터 얻은 wet-cell cake 223 g의 탈수, 세포 파쇄 후 세포 잔사물로부터 베타-카로틴 추출, 농축, 결정화 등을 통하여 최종적으로 순도 93%인 베타-카로틴 결정 633 mg을 얻었다. 사람섬유아세포 배양을 통하여 정제된 베타-카로틴의 세포 독성 및 콜라겐 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 1.7 μ M의 베타-카로틴을 첨가 시 세포에 독성을 거의 나타내지 않았으며 콜라겐 합성량은 첨가하지 않은 경우에 비하여 1.4배 증가하였다. 본 결과는 저 유독성 용매를 사용하고 기존보다 간단한 방법을 사용하여 재조합 대장균으로부터 고순도의 베타-카로틴을 정제할 수 있고 이를 기능성 화장품의 주름개선제로 사용될 수 있음을 시사한다.

감 사

본 연구는 2007년도 산학연 컨소시엄 사업 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다. 사람 섬유아세포 (normal human primary fibroblast)를 제공하여 주신 충남대학교 의과대학 김창덕 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Raja, R., Hemaiswarya, S., and Rengasamy, R. (2007), Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 517-523.
- Schlipalius, L. E. (1998), US patent, **5**, 773026.
- <http://www.growfish.com.au/content.asp?contentid=4270>.
- Costa Perez, J. and Estrella Castro (2003), A., European Patent, **1**, 306444A1.
- 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.
- Yamane, Y.-I., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N. (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.* **63**, 4471-4478.
- Leon, R., Martin, M., Vigara, J., Vilchez, C., and Vega, J. M. (2003), Microalgae mediated photoproduction of β -carotene in aqueous-organic two phase systems, *Biomol. Eng.* **20**, 177-182.
- Mantzouridou, F., Roukas, T., and Kotzekidou, P. (2004), Production of beta-carotene from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in fed-bact culture. *Food Biotechnol.* **18**, 343-361.
- Wang, S.-L., Sun, J.-S., Han, B.-Z., and Wu, X.-Z. (2007), Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology, *J. Food. Sci.* **72**, M325-M329.
- Haigh, W. G. (1994), US patent, **5**, 310554.
- Park, P. K., Kim, E. Y., and Chu, K. H. (2007), Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments, *Sep. Purif. Technol.* **53**, 148-152.
- Guidance for industry, Q3C-tables and list. U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, November 2003.
- Nonomura, A. M. (1987), US patent, **4**, 680314.
- Lim, G. B. and Lee, E. G. (2003), Korean patent, 10-2002-0028926.
- Yoon, S.-H., Lee, S.-H., Das, A., Ryu, H.-K., Jang, H.-J., Kim, J.-Y., Oh, D.-K., Keasling, J. D., and Kim, S.-W. (2008), β -carotene production in *E.coli* by using engineering bacterial whole mevalonate pathway, submitted to *J. Biotechnol.*
- Freshney, R. I. (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4th ed., p336, Wiley-less, New York.
- Guideline for efficacy evaluation of functional cosmetics, Korea Food & Drug Administration, July 2005.
- Lee, Y.-H., Choi, U.-S., Park, K.-H., Choi, Y.-J., and Gal, S.-W. (2006), Anti-wrinkle effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts, *J. Life. Sci.* **16**, 516-521.
- Pouponneau, P., Yahia, L., Merhi, Y., Epure, L. M., and Martel, S. (2006), Biocompatibility of candidate materials for the realization of medical microdevices, In Proceedings of the 28th IEEE, EMBS Annual International Conference 2006, New York City, pp2362-2365.