

미생물에 의한 치자 Iridoid 배당체 변환

청색소의 생산

양승각, 전기봉

(태평양 기술연구소)

I. 서 론

1. 총 론

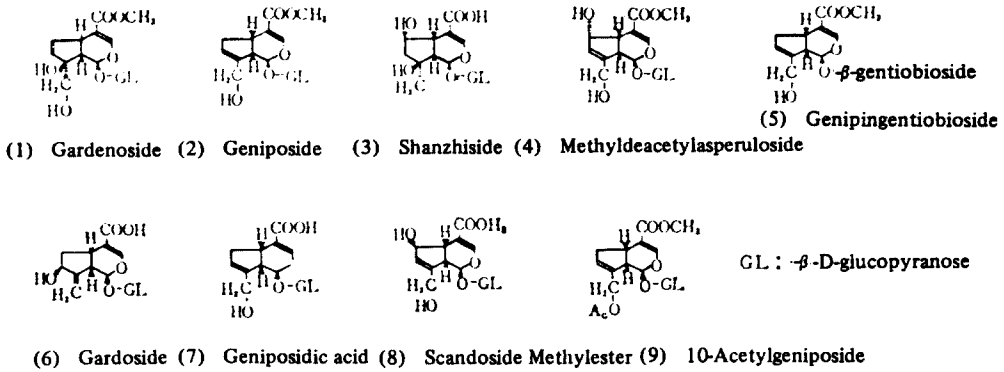
치자는 중국의 「神農本草經」에 수재되어 있는 한약의 일종으로 옛날부터 음식물의 착색료로 널리 사용되어져 왔다. 착색료로 주로 활용되고 있는 성분은 carotinoid 계에 속하는 Crocine의 배당체인 수용성 황색소로 제과, 아이스크림, 음료, 술 등의 착색제 및 화장품의 색소로 이용되고 있다.

이러한 착색료로 곡류의 착색에 치자의 수침액을 사용하는 경우 조건에 따라 녹색~청록색화 하는 현상, 또는 과즙을 피부에 발랐을 경우 암자색으로 변화하는 현상들이 과거부터 알려져 오고 있었는데, Djerassi 등에 의해 처음으로 이러한 현상의 활성성분이 Genipin이라는 Iridoid 화합물의 일종이라는 것이 보고된¹⁾ 이후 이러한 발색현상의 기구를 검토한 결과 치자 과실의 추출액 중에 Crocine 과 공존하는 Iridoid 배당체가 효소의 작용에 의해 당을 잃고 공존하는 단백질등과 반응하여 청변한다는 사실이 판명되었다.

2. 치자의 Iridoid 배당체

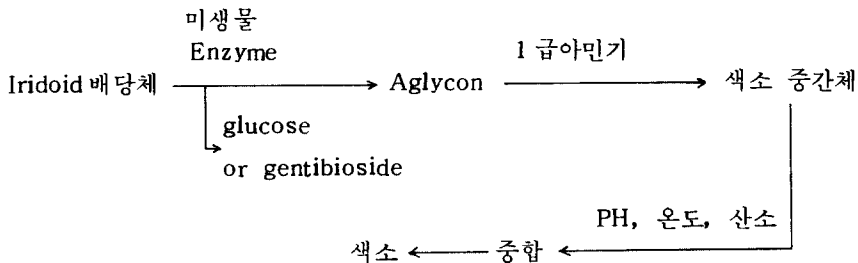
Rubiaceae 식물은 각종 Iridoid 배당체 및 그것과 생합성적으로 관련이 깊은 다수의 Indol alkaloid를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 한편 Gardenia 속 식물의 Iridoid 성분에 대해서는 Gardenia remyi Mann에 asperuloside 특유의 정색 반응을 나타내는 물질이 있다고 보고⁴⁾ 하였으나 순수하게 분리되지 못했다. 그러다 근년에 들어 각종 Iridoid 성분이 순수 분리, 구조 결정이 되어 보고되기에 이르렀다.^{5,8)} 井上등은 Gardenia의 잎과 가지로부터 Gardenoside, Geniposide의 2종이, 과실로부터 Gardenoside, Geniposide, Shanzhiside, Methyl diacetylasperulosidate, Genipingentiboside 등 5종이 분리 되었다고 보고 하였으며⁸⁾ 그 후 4종의 Iridoid 배당체—Gardoside⁹⁾, Geniposidic acid⁹⁾, Gardenia Scandoside methylester⁹⁾, 10-Acetylgeniposide¹⁰⁾—가 더 분리되어 현재 총 9종의 Iridoid 배당체가 Gardenia에 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Gardenia 함유 Iridoid 배당체의 구조는 [Fig 1]과 같다. 이 중 약 70% 이상이 Geniposide이며 Iridoid 배당체의 함유 비율 및 각성분의 구성비율은 원료산

지 및 기후에 따라 차이가 있는 것으로 보고되어져 있다.¹¹⁾



3. Iridoid 변환 색소의 생성기전

종래 Iridoid 배당체에 β-glucosidase 를 가한 경우에 적자~자~청색을 나타낸다는 사실¹²⁾ 과 genipin 이 glycine, Leucine, glutamic acid 에 의해 청색을 나타내며 피부에 부착시 피부가 암자색으로 변한다는 사실¹³⁾이 알려져 있었다. 그러나 구체적인 발색 mechanism은 알려지지 않고 있었는데 근년에 들어 치자 추출물에 미생물을 작용시켜서 청색 색소 조성물을 제조하는 방법¹⁴⁾이 알려지면서 생성기전에 대한 연구가 본격화 되어진 결과, Iridoid 배당체가 효소의 작용으로 당을 잃고 Aglycon이 되고, Aglycon이 제 1 급 아미노기 함유 물질과 쉽게 결합하여 색소 중간체를 형성하며, 이 색소 중간체가 온도, PH, 산소등의 영향을 받아 쉽게 중합하여 공액계의 수를 증가시킴에 의해 발색한다는 것이 밝혀지게 되었고 이를 바탕으로 여러 색조의 색소 생성 방법이 확립되었다.¹⁵⁾¹⁶⁾



[Fig 2] Iridoid 배당체로 부터 색소 생성 과정 모식도

II. Materials and Method.

1. Iridoid 배당체로 부터 색소 생성능이 있는 균주의 screening

- 1) 시 료 : 부식토가 풍부한 토양으로 부터 채취하여 그늘에서 1일 건조한 토양 및 CMC오염품
- 2) 분리용 배지 : 치자 0.1% 수침액을 여과하여 Nutrient agar (Difco.)를 첨가한 후 가열 용해한 다음 121 °C, 15분 멸균해서 petri-dish에 분주, 건조시킨 평판배지
- 3) 분리방법 : 시료 1g을 멸균수 10ml에 넣고 가볍게 현탁한 다음, 약 10분간 정치해 두었다가, 상등액을 1백금이 취하여 분리용 배지에 도말한 다음, 35 °C Incubator에서 24 ~ 72 hrs 배양한 다음, 청색 환을 갖는 colony를 분리

2. 배양 및 색소 생성 조건 검토

1) 배양용 배지

치자 1% 수침액에 Yeast extract (Difco.) 1%를 첨가하여, NaOH로 PH를 7.0으로 수정한 다음 500 ml Δ flask에 100 ml씩 분주하여, autoclave에서 121 °C, 15분간 멸균하여 사용하였다.

2) 생육도 측정

상기 배양용 배지에 분리균을 접종한 다음 35 °C, 150 rpm으로 진탕 배양하면서 일정 시간별로 배양액 10 ml를 취하여 10,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상등액은 590nm에서의 optical density 측정에 사용하고 침전물은 증류수로 한번 세척한 다음 증류수 10 ml를 가해서 현탁시켜 660 nm에서의 O.D값으로 생육도를 측정하였다.

3) 색소 생성에 미치는 protein 분해물의 영향

치자 4% 수침액에 각종 protein 분해물을 0.5 ~ 2% 첨가하여 pH를 7.0으로 조정 한 다음 500 ml Δ flask에 100 ml씩 분주하여 121 °C, 15분 멸균, 냉각하여 분리균을 접종한 다음, 35 °C, 150 rpm으로 72 hrs 진탕 배양하여 590 nm에서의 O.D. 치 및 배양액의 color를 눈으로 확인 하였다.

4) 온도의 영향

치자 1% 수침액에 Yeast extract 1%를 가해서 pH 7.0으로 조정한 배양용 배지에 분리균을 접종한 다음, 20 ~ 40 °C사이의 각 온도에서 150 rpm, 72 hrs 배양한 후 생육도 및 배양액의 color를 확인하였다.

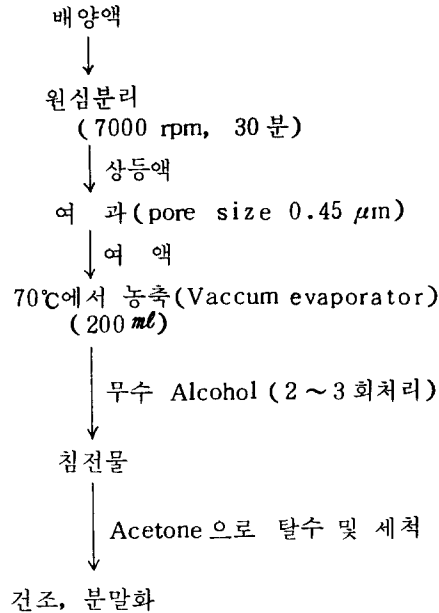
5) pH의 영향

배양용 배지의 초기 pH를 3.5에서 9.0까지 각 pH별로 조정하여 상기와 동일한 방법으로 확인 하였다.

3. 수율 측정 및 색소의 안정성 검토

1) 수율 측정

치자 1% 수침액에 Yeast extract 1%를 가한 다음 pH를 7.0으로 조정, 멸균하여 5ℓ Jar fermenter (L.E. MARUBISHI Co.)에서 35℃, 150 rpm, 1.0 ml/min의 조건으로 2ℓ 배양하였다. 약 3일 경과후 짙은 Blue Color를 띠며 썬 배양을 중단하고 [Fig 3]의 공정에 의해 처리하여 얻어진 색소 분말의 무게를 측정하여, 사용한 치자의 무게에 대한 비율로 수율을 측정하였다.



[Fig 3] 색소 생산 공정

2) 안정성 시험

① 열에 대한 안정성 시험

상기 실험에서 얻어진 분말 색소를 590 nm에서의 O.D값이 0.85 정도 되게 증류수로 희석한 후 80℃ water bath에서 1~4 hrs 처리하여 방냉한 처리액의 O.D값을 측정하여 실활 정도를 측정하였다.

② 광에 대한 안정성 test

분말 색소를 상기와 같이 희석하여 Xonon Fade meter에서 1~4 hrs 처리한 다음 590 nm에서의 OD 값을 측정하여 실활 정도를 측정 하였다.

③ pH에 대한 안정성 test

분말 색소를 pH 5~9의 phosphate buffer로 희석한 다음 상온에서 일야 방치해 두었다가 590 nm에서 OD를 측정하여 실활 정도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 균주 screening 결과

토양 시료로부터 5종(C₁~C₅) 및 오염된 CMC로부터 2종(오1, 오2)을 분리 하였으며 이 중 배양용 배지에서 배양한 결과 C₂ 균이 생육 및 색소 생성이 가장 양호하여 이하의 실험에서는 C₂ 균을 사용하였다.

2. 배양 및 색소 생성 조건

배양 및 색소 생성 조건을 검토한 결과는 Table 1~3에 나타내었으며, 최적 배양 조건으로는 35℃, pH 7.0으로 나타났고, 단백 분해물의 경우는 Bacto peptone을 사용했을 때 색소 생성 속도가 가장 빠른 것으로 나타났으나 color가 매우 탁한 반면, Yeast extract를 사용한 경우 생성 속도는 조금 떨어지나 선명도는 훨씬 높았다.

Table 1. 단백질 분해물의 종류에 따른 색소 생성 정도

사료명 \ 사용농도	0.5 %	1 %	2 %
Neopeptone (Difco.)	23.2* (Green)	40.0 (Green)	50.2 (Blueish-Green)
Peptone	21.6 (Green)	32.8 (Bluish-Green)	37.6 (Blue)
Bactopeptone(Difco)	34.0 (Green)	35.2 (Blue)	
Bactotryptone (Difco)	22.0 (Green)	27.6 (Bluish-Green)	
Yeast ext. (Difco)	22.0 (Green)	38.8 (Blue)	42.6 (Blue)
Malt ext. (Difco.)	- (Yellow)	- (Yellow)	- (Yellow)

* 수치는 590 nm에서의 OD값임. ()안의 것은 눈으로 관찰한 배양액의 color.

Table 2. 온도에 따른 색소 생성 정도

온 도	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
OD 590 nm	3.8	7.2	9.0	10.6	8.4
배양액의 색깔	Yellowish -Green	Green	Greenish - Blue	Blue	Greenish - Blue

Table 3. pH에 따른 색소 생성 정도

pH	3.5	5.0	7.0	9.0
OD 590 nm	1.04	2.7	7.6	3.20
배양액의 색깔	Yellow	Greenish-Yellow	Greenish-Blue	Blueish-Green

3. 균의 생육곡선과 색소 생성 정도 [Table 4 및 Fig 4]

균의 생육은 2일이 지나면서 거의 최대치에 이르지만 색소의 생성은 계속되는 것으로 나타났다. 그러나 2일 이후의 생성 속도는 많이 감소되는 것으로 나타났다.

Table 4. 시간에 따른 생육도 및 청색소 생성 정도

시 간	8 hrs	24	32	48	56	72 hrs
OD 660nm	0.67	4.2	8.4	15.4	15.0	10.2
OD 590nm		1.6		8.6		10.0
배양액의 color	Yellow	Greenish - Yellow	Yellowish - Green	Green	Greenish - Blue	Blue

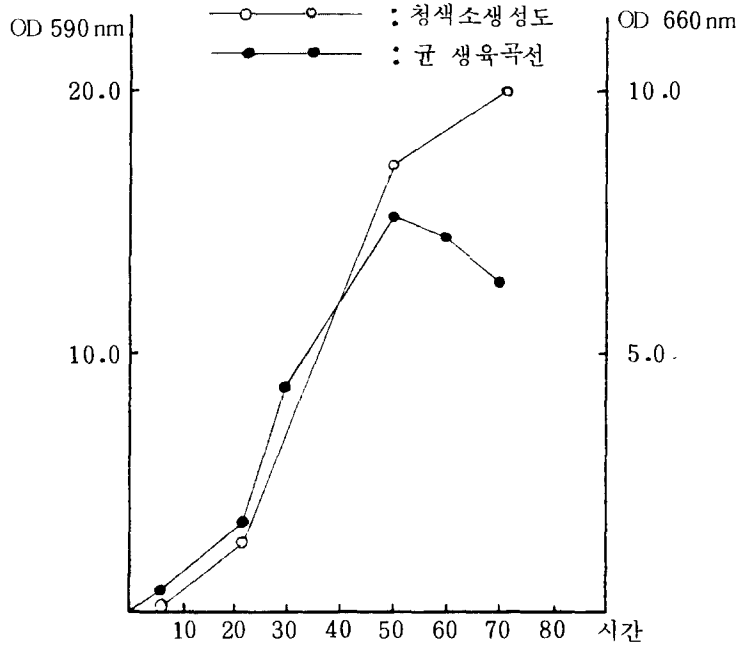


Fig.4 균의 생육에 따른 청색소 생성 정도

4. 수율 및 안정성 test 결과

건조 치자에 대한 수율은 대략 15% 정도로 나타났으며 사용한 치자의 상태에 따라 차이가 나는 것으로 나타났다. 안정성 test의 결과는 Table 5 및 Table 6에 나타나 있는 것과 같이 80°C에서는 색도가 오히려 증가했다가 더 시간이 지나면 약간씩 줄어드는 것으로 나타났다. 그러나 선명도에서는 처리시간이 길어질수록 탁해졌다. 광에 대해서는 4hrs 처리시 약 20% 정도의 실황이 일어났으며 시간이 지남에 따라 가속되는 것으로 나타났다. pH에 대한 안정성은 시험 pH(pH 5~9)에서는 거의 변동이 없었다.

Table 5. 온도에 대한 안정성

처리 온도	80 °C					121 °C
처리 시간	0 hrs	1 hrs	2 hrs	3 hrs	4 hrs	15 분
OD 590 nm	0.85	0.89	0.86	0.85	0.84	0.82

Table 6. 광에 대한 안정성

처리 시간	0	1	2	3	4 hrs
OD 590 nm	0.85	0.85	0.78	0.73	0.67

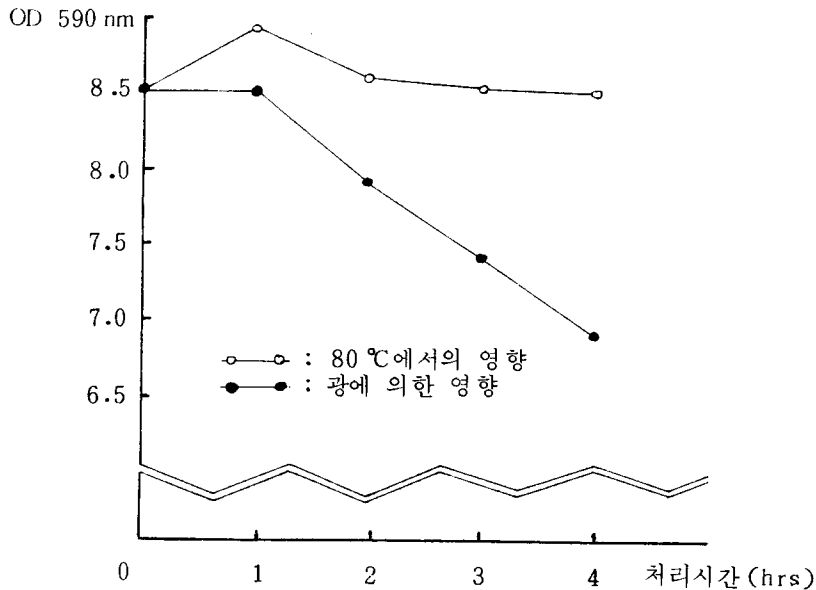


Fig. 5 광 및 열에 대한 안정도 80 °C에서의 영향 광에 의한 영향

IV. 고찰

치자 열매 추출액에 미생물을 작용시켜 천연의 선명한 청색 색소를 높은 수율로 생산할 수 있었다. 이 천연 청색소는 pH, 온도, 일광에 대해 안정성이 높으며 국립보건원 발행 '식품, 첨가물 '규격 기준 및 시험방법'에 수재되어 있는 수용성 색소로 화장품, 의약품, 식품, 음료등에 광범위하게 이용 될 수 있다.

본 실험에서는 청색색소 생산에 한하여 실험을 행하였으나 중합 반응시의 제 조건에 따라 다양한 색소를 생산할 수 있을 것으로 생각되므로 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. C. Djerassi, J.D. Gray & F.A. Kinel, *J. Org. Chem.*, 25, 2174 (1960).
2. M. Hesse; "Indolalkaloide" (1964), Springer Verlag, Berlin.
3. J.M. Bobbit, K.P. Segebarth: *Cyclopentalloid Terpene Derivatives*, Marcel Dekker Inc., New York, (1969).
4. L.H. Briggs, C.A. Nicholls, *J. Chem. Soc.*, 3940 (1954).
5. T. Endo, H. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 18, 1066 (1970).
6. T. Endo, H. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 21, 2684 (1973).
7. H. Inoue, S. Saito, H. Taguchi, T. Endo, *Tetrahedron Letters*, 2347 (1969).
8. 井上, 武田, 齊藤, 西村, 樓水(阿万野); *藥學雜誌*, 94, (5) 577~586 (1974).
9. H. Inoue et al., *Phytochemistry*, 13, 2219 (1974).
10. Y. Takeda, et al. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 24 (11), 2644 (1976).
11. H. Inoue, S. Saito, T. Shingu, *Tetrahedron Letters*, 3581 (1970).
12. *Tetrahedron Letters*, 2347-2350 (1969).
13. *J. Org. Chem.*, 25, 2174-2177 (1960).
14. J. P. 886670.
15. 日, 特, 公., 昭 54-13451
16. 日, 特, 公., 昭 55-5778.

ABSTRACT

Seven bacterial strains capable of conversing Gardenia irridoidglucoside into blue color was isolated on nutrient agar plates with 0.1% water extracted solution

of Gardenia's dried seed.

In the seven, strain No. C₂ was most effective in the production of blue color.

The optimal conditions in production of blue color were when initial pH of medium was 7.0 and cultivation temperature was 35°C.

In 5ℓ-Jar fermentor, the powder of blue color was produced about 15% (W/W). And the color was relatively stable in our test.