

Acetone 으로 추출한 *Rhodospirillum rubrum*의 황색색소

김 용 환 · 이 상 섭*

경기대학교 식품가공학과, *경기대학교 생물학과

Yellow Pigment from *Rhodospirillum rubrum* by Acetone Extraction

Yong-Hwan Kim and *Sang-Saub Lee

Dept. of Food Technology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

*Dept. of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Abstract

A study of general characteristics of acetone extracted pigment from the cell mass of *Rhodospirillum rubrum* DSM 467 was carried out for the development of natural food colorant. Through visible absorption scanning, it showed seven absorption peaks at 355, 410, 529, 624, 680 and 747nm, and it was shown to be yellow color. In acidic and neutral conditions, the color was yellow, while in the alkaline condition it was greenish yellow. This pigment was stable at pH range between 3.0~10.0, and below 40°C. In the presence of light and oxygen, the stability of pigment rapidly degraded and it became unstable in the presence of metal ions such as Cu^{2+} , Al^{3+} and Fe^{3+} . Through TLC analysis, it was shown to be composed of seven color fractions.

Key words : *Rhodospirillum rubrum*, yellow pigment.

서 론

식품색소는 합성색소계와 천연색소계로 구분되어지며 색소의 사용 편의성 고효율 및 안정성에 따라 합성색소계가 주로 이용되어 왔다. 하지만 근년에 이르러 이들의 안전성(safety)문제가 사회적으로 심각하게 제기되면서 점차 천연색소로의 사용요구가 증대되어 가고 있다. 이러한 천연색소는 주로 식물로부터 추출하여 사용하고 있는 실정으로서 황색색소에 대해서는 olive의 chlorophyll과 carotenoid에 관한 연구¹⁾를 비롯한 많은 연구가 진행되어 상업적으로도 대량 생산되어 이용되고 있으며, 수산물 중의 황색색소에 대한 연구^{2, 4)}와 *Monascus*속의 황색색소에 관한 연구⁵⁾ 그리고 효모의 황색색소에 관한 연구^{6, 7)}도 알려져 있다. 그러나 세균의 황색색소에 관한 경우 색소생산조건에 관해서는 다수^{8 ~ 13)}가 있으나 이들의 직접적인 이용에

관해서는 극히 미미한 실정으로서 이들의 색소를 실생활에 응용하면 유익하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 이에 광합성 세균중 normal spirilloxanthin series를 가지고 있는 것으로 알려진 홍색 비황세균(purple nonsulfur bacteria)인 *Rhodospirillum rubrum*으로 부터 acetone 추출한 황색계통의 색소를 식품색소로 이용하기 위한 기초자료로 삼고자 이의 안정성과 광화학적 특성중 일부를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 균체배양 및 색소추출

균주는 *Rhodospirillum rubrum* DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) 467을 사용하였으며 DSM의 27 배지를 이용하여 조도 2,000 lux, 28~30°C의 배양실에서 5일간 정지 배양하였다. 배양액 3,000ml를 원심분리(6,000rpm, 15min, 4°C)하여 얻은 균체를 충분한 양의 증류수로 2회 세척하고

acetone 2,000ml로 2시간씩 2회 진탕 추출하고 원심 분리하여 얻은 상등액을 35℃에서 감압건조시켜 사용할 때까지 -18℃의 냉동실에 보관하였다.

2. 색소의 안정성

안정성을 측정하기 위한 색소용액은 건조시료 0.1g을 10ml의 acetone에 용해시킨 후 25% EtOH 1,000ml로 희석한 것을 취하여 사용하였다. pH에 의한 영향을 알아보기 위하여 색소용액에 동량의 각 pH별 완충용액(pH 1.0~2.0 : Clark-Lubs, pH 3.0~8.0 : McIlvaine, pH 9.0~12.0 : Sørensen)을 가하여 25℃에서 4시간 방치후 흡광도를 측정하였고, pH에 따른 색도의 변화는 색소용액에 pH 3.0~10.0까지의 완충용액을 동량 가하여 25℃에서 4시간 방치 후 color and color difference meter(Yasuda Seiki. UC 600IV)로 투과색도를 측정하여 Hunter의 색계인 L, a 및 b로 나타내었으며 이때 표준백색판의 L, a 및 b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다. 광선에 의한 영향은 25℃의 암소와 백열등(110V, 30W)조건하에서, 산소의 영향은 N₂ gas로 공기를 치환한 후 밀봉한 경우와 100ml culture flask에 시료20ml를 가하고 진탕시킨 경우로 나누어 25℃의 암소에서 실시하였다. 온도의 영향은 4℃, 25℃, 40℃ 그리고 70℃의 암소에서, 금속이온에 의한 영향은 25℃의 암소조건에서 1.0 × 10⁻³ M의 각종 금속이온용액을 각각 1.0%의 농도가 되도록 가하였다. 이때 이들은 모두 10일간씩 보관하면서 24시간 간격으로 UV/Vis spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)를 이용하여 390nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

3. Thin Layer Chromatography

추출된 색소를 100℃의 drying oven에서 24시간 활성화시킨 20 × 20cm, 두께의 0.25mm의 유리판(Kiesel gel 60 × F254, precoated, Merck Art No. 5715)을 사용하여 petroleum ether-acetone (90:10)을 전개 용매로 색소를 분리하여 각 획분별 발현색과 Rf값을 검토하였고 그들의 흡수특성을 알아보기 위하여 분리된 각 획분들을 acetone으로 재 추출하여 UV/Vis spectrophotometer(Shimadzu UV-240)를 이용하여 330~800nm 까지 scanning 하였다.

결과 및 고찰

1. 색소의 안정성

pH에 의한 색소의 안정성은 Fig. 1에서와 같이 pH 3.0~10.0 까지의 아주 넓은 범위에서 80% 이상의 높은 안정성을 나타내어 모든 식품의 조건에서 사용 가능하리라 판단된다. 이에 따라 Hunter value를 측정 한 결과 Table 1에서와 같이 a값과 b값을 비교해 볼때 본 색소는 녹색색소가 있는 황색색소로서 L값은 pH의 변화에 따라 별차이가 없으나 pH 9.0을 기점으로 a와 b값의 변화폭이 증대되어 산성 및 중성에서는 황색색소를 우세하게 나타내지만 alkali 영역에서는 녹색이 보다 발현되어 녹황색 색소로 변화된다는 사실을 알 수 있었다. 이는 혼재되어있는 chlorophyll계 색소인 bacteriochlorophyll a⁴¹가 alkali영역에서 발현되는 것으로 판단된다.

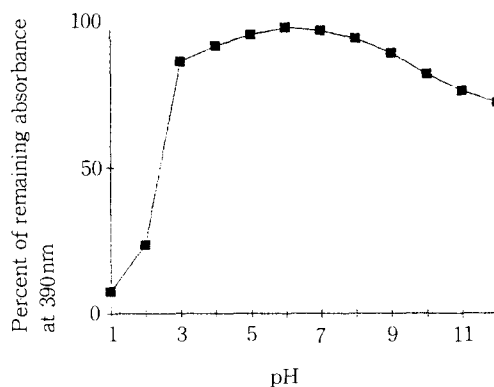


Fig. 1. Stability of yellow pigment under various pH conditions at 25°C

광선 및 산소에 의한 영향은 Fig. 2에서와 같이 N₂ gas 존재하의 암소에서는 6일 까지 90% 이상, 10일 까지 85% 이상, 암소조건만의 경우 역시 3일 까지 90% 이상, 7일 까지 85% 이상, 그리고 10일 까지 80% 이상의 높은 안정성을 나타내었다. 반면 암소의 산소존재하와 광조사 만의 두경우 모두 급격한 안정성의 저하가 일어났으며 각각 4일과 5일 경과후 부터 50% 이하의 낮은 잔존율을 나타내었다. 가시적으로도 이때 부터 심각한 퇴색현상이 나타나기 시작하였으며 광조사에 의해 안정성에 보다 큰 손상을 받은 것을 알

수 있었다. 따라서 본 색소는 일반적인 천연색소와 마찬가지로 광선과 산소에 의해 쉽게 산화 퇴색되는 것으로서 색소사용시 이들을 차단함으로써 안정성을 유지시킬 수 있다하였다.

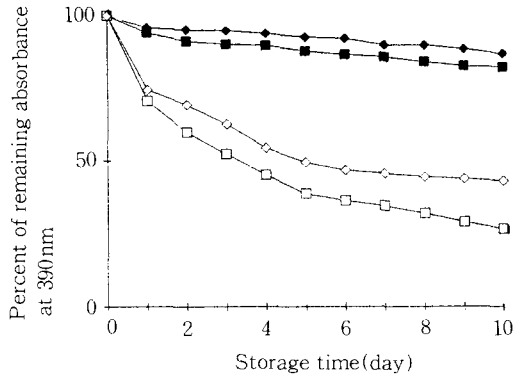


Fig. 2. Effect of light and oxygen on the stability of yellow pigment at 25°C

—■— : under 25°C, —□— : under light
 —◆— : under N₂ and dark
 —◇— : under O₂ and dark

여러 온도 조건하에서의 본 색소는 Fig. 3 에서와 같이 4°C에서 10일 까지 90% 이상으로서 변화가 극히 미미한 상태였으며 25°C에서는 3일 까지 90% 이상, 7일 까지 85% 이상, 10일 까지 80% 이상, 40°C에서는 3일 까지 85% 이상, 8일 까지 80% 이상의 높은 안정

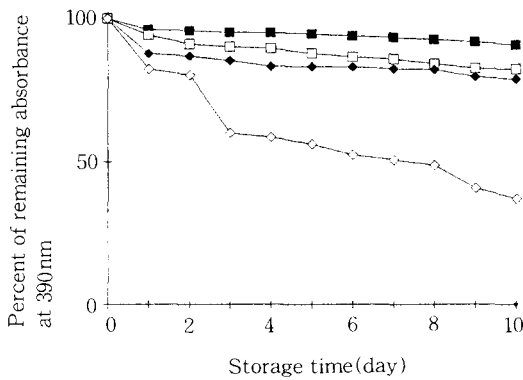


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of yellow pigment in the dark.

—■— : 4°C, —□— : 25°C, —◆— : 40°C, —◇— : 70°C

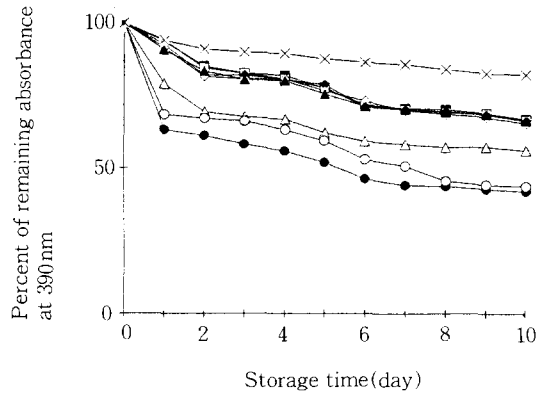


Fig. 4. Effect of metal ions ($1.0 \times 10^{-3}M$) on the stability of yellow pigment in the dark at 25°C

—■— : NaCl, —□— : KCl, —◆— : MgCl₂
 —◇— : CaCl₂, —▲— : ZnCl₂, —△— : CuCl₂
 —●— : FeCl₃, —○— : AlCl₃, —×— : Control.

성을 나타내어 40°C이하에서는 안정성이 매우 우수한 것으로 나타났으며, 70°C에서는 2일 까지만 80% 정도의 안정성을 나타내고 그 후 부터는 급격한 안정성의 저하현상이 일어났다. 따라서 본 색소는 열처리에 약하므로 가공 및 저장 기간 중 저온 처리가 가능한 아이스크림 및 빙과류 등의 식품에 사용하면 높은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

8종의 금속이온의 영향을 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ 및 Mg²⁺의 경우 4일까지는 80% 정도, 7일까지는 70% 정도의 안정성을 나타내어 대조구 보다는 낮으나 비교적 안정한 것으로 나타났다. 이는 배지조성상 이들 이온들이 첨가되므로 이에 의한 영향일 것으로 판단된다. 하지만 Cu²⁺, Al³⁺ 및 Fe³⁺의 경우 안정성이 저하되었으며 Al³⁺ 및 Fe³⁺의 경우 색소가 혼탁성 물질을 생성하게 되어 탁도가 증가하고 색소의 응집현상이 발생하여 색소가 저하되어 이들이 색소와 chelate 되어 혼탁을 일으킨 것으로 판단되어진다. 그러므로 본색소는 정제과정중 금속이온의 제거에 의해 금속의 영향이 없는 상태인 butter, cheese, margarine 등의 유식식품에 사용하면 높은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Table 1. Hunter's color values of yellow pigment at various pH conditions.

| pH | L(lightness) | a(Redness) | b(Yellowness) |
|----|--------------|------------|---------------|
| 3 | 88.7 | -1.27 | 17.4 |
| 4 | 88.2 | -1.06 | 17.9 |
| 5 | 88.4 | -0.872 | 18.0 |
| 6 | 88.8 | -1.86 | 18.0 |
| 7 | 87.9 | -1.26 | 18.3 |
| 8 | 88.0 | -1.19 | 18.2 |
| 9 | 90.4 | -2.39 | 16.6 |
| 10 | 90.9 | -2.32 | 15.9 |

* Pigment were dissolved in acetone and then diluted with 25% EtOH.

2. TLC

R. rubrum 균체를 acetone /MeOH (7:3) 혼합용액으로 추출하면 주로 적갈색을 나타내는 경향을 보였으나 acetone만의 추출액 자체는 전반적으로 황색을 나타내어 추출용매에 따라 색소의 발현상태가 달라지는 것을 알 수 있었으며 황색계통색소인 acetone 추출액의 가시광선 흡수 특성을 조사한 결과 흡수극대가 335, 410, 529, 624, 680 및 747nm인 7개의 peak를 확인하였으며, 색소의 조성을 알아보기 위한 TLC결과 Table 2 에서와 같이 육안으로 확인되는 7개의 획분으로서 황색계통은 F-2, F-3 및 F-5 였으며 적색계통인 F-1 및 F-4 와 자색인 F-6, 그리고 녹색인 F-7로 나타났다. 이는 *R. rubrum*의 황색계 색소가 가시적으

로 6개의 획분으로 나타났다는 Davies의 보고¹³⁾와 비교하여 볼 때 정제과정에 의한 차이일 것으로 판단되어진다.

이들 중 F-3의 max가 342, 362, 373, 454, 482와 514nm로, F-4의 max가 370, 386, 466, 492와 526nm로 나타나 Takaichi 등¹¹⁾이 보고한 *Erythrobacter longus*의 경우와 비교하여 볼 때 F-3는 anhydrosphodovibrin(304,373, 454, 481, 513nm), F-4는 spirilloxanthin (315, 385, 464, 492, 524nm)으로 판단되어지며 F-7의 경우는 광합성 색소인 bacteriochlorophyll a 로 판단¹⁴⁾ 되어진다. 그러나 F-6의 자색은 지금까지 잘 알려져 있지 않은 상태로서 이에 대해서는 계속적인 검토가 필요하다고 하겠다. 이들 분리된 색소의 각획분을 acetone 재추출후 실내의 25℃ 조건에서 6시간 보관 후 300~800nm까지 scanning 한 결과 F-3, F-4, F-6 및 F-7은 색소가 잔존되어 있는 상태였으나 F-1, F-2 및 F-5들은 색소가 전반적으로 퇴색되어 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 색소는 각각으로 분리된 경우보다 혼합상태로 존재할 경우 전체적으로 안정한 황색을 유지 할 수 있는것을 알 수 있었으며 이에 대해서는 이들 각 획분들의 상호작용이거나 배지조성 및 추출용매에 기인한 것이지 명확하지 않아 추후 계속적인 검토가 필요하다고 사료된다.

요 약

천연 식용 색소로의 개발을 위하여 *Rhodospirillum*

Table 2. Color, Rf value and spectral characteristics of the isolated pigments by TLC

| Pigments No. | Color | Rf value* | Absorption wavelength maxima (nm)** | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Acetone extract | Brownish yellow | 0 | 355, | 384, | 410, | 529, | 624, | 680, | 747. | |
| F - 1 | Light pink | 0.88 | 346, | 366, | 413. | | | | | |
| F - 2 | Yellow | 0.75 | 339, | 413. | | | | | | |
| F - 3 | Light orange | 0.68 | 342, | 362, | 373, | 454, | 482, | 514. | | |
| F - 4 | Scarlet red | 0.62 | 370, | 386, | 466, | 492, | 526. | | | |
| F - 5 | Light orange | 0.16 | 374, | 388, | 414, | 428, | 482, | 514, | 684, | 749. |
| F - 6 | Violet | 0.11 | 354, | 383, | 523, | 621, | 679, | 746. | | |
| F - 7 | Green | 0.08 | 380, | 410, | 510, | 540, | 620, | 679, | 746. | |

* TLC developing solvent : petroleum ether /acetone (90:10), ** Absorption spectra of pigment in acetone.

rubrum DSM 467균체로부터 acetone 추출한 색소의 일반적 특성을 검토하였다. 가시광선 범위에서의 흡수 극대는 355, 410, 529, 624, 680 그리고 747nm인 7개로 나타났으며 전반적으로 황색을 나타내었고 산성 및 중성 조건하에서는 황색을, 알카리 조건에서는 녹황색을 나타내었다. 색소의 안정된 pH영역은 3.0~10.0이었고, 40℃이하의 온도에서 안정하였다. 광선과 산소존재하에서는 안정성이 급격히 저하 되었고 Cu^{2+} , Al^{3+} 및 Fe^{3+} 등에 의해서도 안정성이 저하되었다. TLC한 결과 7개의 색소 획분으로 구성되어진것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Minguez-Mosquera, M. I. and Garrido-Fernandez, J. : Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.*, 37(1) : 1 (1989)
- 하봉석, 강동수, 조영숙, 박미연 : 넝치와 방어의 carotenoid 색소성분. *한국영양식량학회지*, 21(4), 407 (1992)
- 이태녕, 이대형, 박수남 : 전복 (*Haliotis discus hannai*) 내장에 함유된 지질 단백질 결합 카로티노이드. *한국농화학회지*, 27(1), 1 (1984)
- 안승효 : 전복 (*Haliotis discus hannai*) 내장의 carotenoid에 관한 연구. *한국농화학회지*, 17(4), 257 (1974)
- 김수연, 김정구 : *Monascus anka*의 균주선발 및 색소생성조건. *한국농화학회지*, 3(3), 239 (1990)
- Koh, M.S., Kim, S.M. and Chun, S.B. : Construction of astaxanthin overproducing strain of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2(1), 46 (1992)
- Nam, H.S. and Rhee, J.S. : Effect of carbon source and carbon to nitrogen ratio on carotenogenesis of *Rhodotorula glutinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1(1), 75 (1991)
- Dobson, S.J., James, S.R., Franzmann, P.D. and McMeehin, T. A. : A numerical taxonomic study of some pigmented bacteria isolated from organic lake, an antarctic hypersaline lake. *Arch. Microbiol.*, 156, 56 (1991)
- Caumette, P., Baulaigue, R. and Matheron, R. : *Thiocapsa halophila* sp. nov., a new halophilic phototrophic purple sulfur bacterium. *Arch. Microbiol.*, 155, 170 (1991)
- Takaichi, S., Furihata, K. and Harashima, K. : Light-induced changes of carotenoid pigments in anaerobic cells of the aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans* (*Erythrobacter* species Och 114) : reduction of spheroidenone to 3,4-dihydro-spheroidenone. *Arch. Microbiol.*, 155, 473 (1991)
- Takaichi, S., Shimada, k. and Ishidsu, J. : Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus* : β -carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch. Microbiol.*, 153, 118 (1990)
- Eichler, B. and Pfennig, N. : Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pediformis* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 146, 295 (1986)
- Davies, B. H. : A novel sequence for phytoene dehydrogenation in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.*, 116 : 93 (1970)
- James T. Staley, Marvin P. Bryant, Norbert Pfennig and John G. Holt : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Williams and Wilkins press, Vol. 3, P. 1664 Baltimore, S.A. (1989)

(1993년 11월 20일 수리)