

## *Streptomyces californicus* KS-89 변이주에 의한 청자색소의 생산

이 병 호 · \*이 상 훈

동의대학교 식품영양학과, \*부산시 수질검사소

## Production of Bluish Purple Pigment from *Streptomyces californicus* KS-89

Byeong Ho Lee and \*Sang Hoon Lee

Department of Food and Nutrition, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

\*Water Quality Institute of Pusan City

### ABSTRACT

A study was carried out for production of a pigment: bluish purple, using a mutant *Streptomyces californicus* KS-89-7. The mutant was induced from *Streptomyces californicus* KS-89 with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG). It was immobilized on an inert substance made of colloidal silica and 3.5% sodium alginate with 1 to 10 ratio. The diameter of inert bead was 2mm, and number of immobilized mutant spore was approximately  $1.0 \times 10^7$ /ml. It was packed in a column reactor and fermentation was conducted with a substrate made of soluble starch 1%, glycerol 1.0%, sodium glutamate 0.1%, sodium nitrate 0.05%, L-prolin 0.025% and with some trace elements. The aeration for production of the pigment was 2.5ml/min with semi-continuous fermentation. The pigment production reached at peak on 8 days of fermentation, and the mutant produced the pigment 1.8 times more than its parent strain with the maximum pigment production of 1.72g/ℓ. The pigment production continued for 24 hours of fermentation, and at the end of the fermentation the mutant produced the pigment 1.52g/ℓ.

### 서 론

식품의 색은 식품의 풍미와 더불어 식품의 품질을 유지하여 기호성을 높여주고 있다. 식품 중의 천연 색소는 이화학적으로 불안정하여 식품의 가공, 저장 및 판매유통과정 중에 쉽게 퇴색하여 식품의 가치를 크게 손상시키고 있으나 그 대체품이 없어 그 독성을 인정하면서도 인공색소를 사용하고 있는 안타까운 실정이다.

현재 사용하고 있는 식품의 색은 대부분이 식품첨

가물인 색소를 화학적 합성공정에 의하여 만들어지고 있으므로 비록 보사부에서 허용하고 있으나 식품 위생상 유해한 것은 부인할 수 없다(1-7).

그러나 식품위생상 안전한 천연색소 중 자연에 존재하는 색소인 카로티노이드, 클로로필 및 후라보노이드 등을 추출하여 가끔 사용하고 있으나 값이 고가(高價)이고 이들 천연색소가 가지고 있는 냄새가 특이하여 사용상 문제점이 많을 뿐 아니라 식품의 가공저장 및 수송 그리고 열, pH, 자외선 및 산소에 불안정하여 퇴색되기 때문에 널리 사용하지 못하고

있는 실정이다(8-21). 그러므로 천연식용색소의 개발이 전세계적으로 관심있는 과제로 알려지고 있다.

천연식용색소에는 carotenoid, chlorophylls, flavonoids(22) 그리고 Anatto, saffron, Gardenia(23-25) 및 cochineal(16) 등이 있으며 이들 성분의 추출 내지는 생합성을 시도하고 있으나 이들 구조적 특성 때문에 합성에 애로점이 많으며(26) 또 식품에 첨가했을 때 퇴색이 쉽게 일어나 사용을 기피하고 있는 실정이다(27, 28). 이러한 결점을 보완하여 식품의 가공, 저장 및 판매중에 퇴색되지 않고 또 저렴하게 천연색소를 생산할 목적으로 미생물을 이용하는 연구가 진행되고 있다. 미생물에 의하여 생산되는 색소는 독성이 없으며 경제적이고 대량생산이 가능한 이점 때문에 앞으로 식품업계에 크게 공헌할 것으로 생각된다. 미생물에 의하여 생산되어 지금까지 이용되고 있는 색소는 *Monascus*속인 *Monascus anka*(22, 29-31)와 *Monascus purpureus*(25, 27, 32-34)가 있으며 이들 미생물이 생산하는 색소는 적색색소로서 열, pH, 자외선 및 금속염에도 안전하다. 최근에는 이들 색소를 대량 생산할 목적으로 *Monascus* sp.을 돌연변이 내지는 세포융합(cell fusion)등(36)의 방법을 이용하여 연구를 진행하고 있다. 또한 편방선균에 의한 색소의 생산에 관한 연구로는 *Streptomyces echinoruber*에 의한 적색색소의 생산(37)과 *Streptomyces propurpuratus*에 의하여 독성이 없는 적자색 색소의 생산을 시도하였고(38) *Streptomyces propurpuratus*와 다른 세균과 혼합배양하여 적자색 색소를 생산하고(39-43), 식품에 대한 적응성 등을 검토하였다(43).

류 등(44)은 *Streptomyces propurpuratus* ATCC 21630을 *Bacillus* sp.와 혼합배양하여 적자색 색소의 생성을 보고한 바 있다.

한편 지(45) 및 류 등(46)은 천연식용색소를 대량 생산할 목적으로 토양에서 분리하여 청자색 색소의 생성을 확인하여 *Streptomyces californicus* KS-89로 명명하였고(47, 48), 이의 기질 특이성, 독성 유해여부를 확인하였다(40, 41, 48-51).

본 연구는 *Streptomyces californicus* KS-89을 이용하여 대량생산을 할 목적으로 균주를 변이시켜 고정화하여 발효하고 대량 생산을 시도하였다.

## 재료 및 실험방법

### 미생물

본 실험에 사용된 균주는 *Streptomyces californi-*

*cus* KS-89을 사용하였다(47, 48).

본 균주는 glycerol-glutamate(GSG)한천 사면배지에 보존하였다.

### 배지

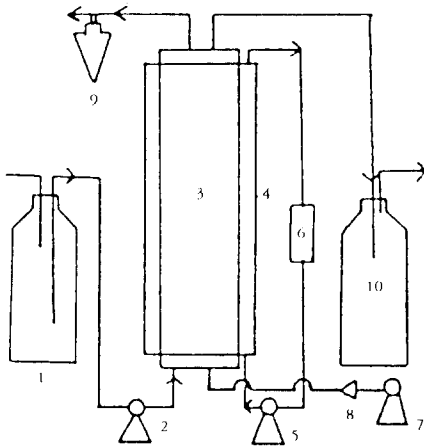
본 실험에 사용된 배지의 조성은 1.0% soluble starch, 1.0% glycerol, 0.1% sodium glutamate, 0.05% NaNO<sub>3</sub>, 0.025% L-proline, 0.025% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O와 0.01% Thiamine 및 1ml trace element를 첨가하였다. Trace element로는 0.5g B(OH)<sub>3</sub>, 0.04g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.2g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.4g MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.4g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O를 1ℓ에 녹여 사용하였다. 최소배지로는 2g NH<sub>4</sub>Cl, 4.3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.75g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.48g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.03g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.01g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.01g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01g CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.001g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O를 H<sub>2</sub>O 1ℓ에 녹였다.

### 균주의 변이방법

*Streptomyces californicus* KS-89을 전배양한 다음 0.2ml을 새로운 완전액배지 20ml에 재접종하여 30℃의 온도에서 배양한 후, 원심분리(5,000rpm, 10min)하여 얻어진 균체를 0.05MTris-maleate buffer(pH 7.0)로서 2회 세척한 다음 동일한 buffer로서 2×10<sup>8</sup> cells/ml의 현탁액을 만든 후, 200-2, 500ug 농도의 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)액을 동량 가하여 30℃에서 30분간 처리하고 원심분리(5,000rpm, 10min)하여 얻어진 균체를 0.05M Tris-maleate buffer(pH 7.0)로 2회 세척하여 MNNG을 여과한 다음 냉 최소배지로 희석한 후 이 희석액 0.1ml를 완전고체배지상에 도달하여 30℃의 항온기에서 2시간 배양하였을 때 생긴 colony를 최소고체배지에 replica시켰다.

### 변이주의 농축

변이주가 1×10<sup>8</sup> cells/ml에 도달했을 때 Kanneko 등(52)의 방법에 따라 0.3unit/ml의 penicilin-G로 약 1.5시간 처리한 후 원심분리(5,000rpm, 10min)하여 생긴 균체를 Tris-maleate buffer로 2회 세척한 다음 300ug/ml의 lysozyme을 함유한 Tri-maleate buffer로 희석하여 30℃에서 배양시킨 후 원심분리(5,000rpm, 10min)하였다. 이때 얻어진 균체를 Tris-maleate buffer로 2회 세척



1. Culture mediums stock vessel
2. Peristaltic pump
3. Continuous colum reactor
4. Water jacket
5. Water jacket pump
6. Warm water pool
7. Air pump
8. Air filter
9. Gas vent
10. Harvest tank

Fig 1. Schematic diagram of the reactor.

하여, 질소원을 제거하고, 0.1%-yeast extract를 첨가한 최소 액체배지에서 6시간 동안 N-starvation시킨 다음 Lederberg 등(53)의 방법을 적용하여 배지에서 2시간 동안 penicillin 처리를 행하였다.

Penicillin처리된 변이주를 원심분리(5,000rpm, 10min)하고, Tris-maleate buffer로 회석하여 완전 배지상에 도말하여 생긴 colony를 최소배지에 replica하여 변이주를 농축하였다.

#### 변이주의 고정화

*Streptomyces californicus* KS-89의 변이주의 고정화는 colloidal silica : 3% sodium alginate을 1 : 10의 비율로 섞은 담체를 사용하였다(54). MNNG로 변이시켜 얻은 균주는 37℃에서 32시간 배양시킨 후 원심분리하여 모든 균체를 생리식염수로 씻은 다음 상기 담체를 0.1M 염화칼슘용액에 떨어뜨려 bead를 4℃에서 보관하여 두고 사용하였다.

#### Cloum형 Reactor에 의한 분해

*Streptomyces californicus* KS-89의 변이주에 의한 청자색 색소를 생산하기 위한 연속 분해장치는 유리로 만든 colum형 reactor(용량 300ml, 직경

28mm)을 사용하였다. 본 발효장치는 고정화 균체의 bead를 무균적으로 충전한 다음 peristaltic pump를 사용하여 밑에서 위로 기질을 공급하면서 발효시켜 이를 여과한 다음 분석하였다(Fig. 1).

#### 청자색 색소의 측정

*Streptomyces californicus* KS-89 및 변이주를 액체배지로 30℃에서 7~10일 동안 배양한 다음 배양액을 3,000g로 원심분리한 후 상정액을 575nm에서 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 변이주의 선별

청자색 색소 생산 균주인 *Streptomyces californicus* KS-89를 색소의 생성능을 높이기 위하여 500ug/l의 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)로 처리하여 돌연변이 시키고 penicillin농축법에 따라 선별된 변이주를 흡광도로 측정하여 변이주 중 청자색 색소의 생성능이 가장 우수한 균주를 선별하였다(Table 1).

약 300개의 변이주를 300ml의 삼각 플라스크에 120ml에 배지를 넣고 각각의 변이주를 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 결과 친주인 *Streptomyces californicus* KS-89보다 변이주 중에서 *Streptomyces californicus* KS-89-7이 흡광도가 가장 높았다. 그러므로 *Streptomyces californicus* KS-89-7을 이용하여 색소 생산능을 검토하게 되었다.

Table 1. Mutants for bluish purple pigment production derived by *Streptomyces californicus* KS-89.

Mutants	OD(575nm)
<i>S. californicus</i> Ks-89(parent)	0.53
<i>S. californicus</i> Ks-89-1	0.94
<i>S. californicus</i> Ks-89-2	0.89
<i>S. californicus</i> Ks-89-3	0.70
<i>S. californicus</i> Ks-89-4	0.80
<i>S. californicus</i> Ks-89-5	0.94
<i>S. californicus</i> Ks-89-6	0.90
<i>S. californicus</i> Ks-89-7	0.98
<i>S. californicus</i> Ks-89-8	0.88
<i>S. californicus</i> Ks-89-9	0.92

Each mutant was incubated at 30℃ for 7-10 days.

The broth was centrifuged at 3,000g and OD were measured at 575nm.

**Table 2. Bluish purple pigment productivities of whole cells and spores immobilized in various polymer matrices.**

Concentration of matrices for immobilization	%	OD 575nm	
		Whole cells	Spores
Ca-alginate	3.5	0.64	0.94
Polycrylamide	6.0	0.64	0.80
Agar	2.0	0.53	0.79
K-Carrageenan	2.5	0.40	0.63

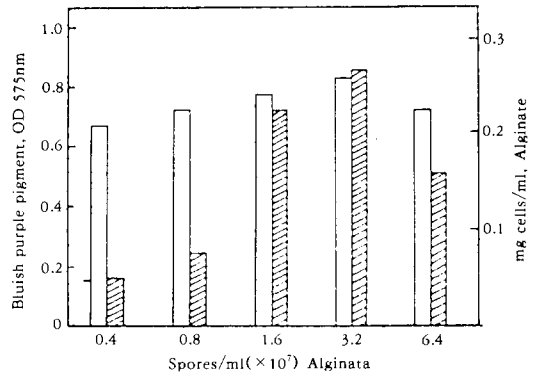
**단체의 선별**

균체의 고정화에 있어서는 목적 생산물을 효율적으로 생산하기 위하여 담체의 선택이 중요하다(55-61). Table 2는 여러 종류의 담체를 사용하여 균체를 고정화시켰을 때의 결과를 나타낸 것이다. 여러 가지 담체중 청자색 색소의 생산에는 3.5% sodium alginate를 이용한 고정화 균체가 청자색 색소를 가장 많이 생산하였다. 그의 담체인 agar, polyacrylamide 및 K-carrageenan gel은 sodium alginate로 고정화시킨 균체에 의한 색소 생성능보다 약 1.5 배 낮았다. 이러한 결과 sodium alginate의 담체가 청자색 색소의 생산에 유용하다고 판단되어 본 연구에서는 sodium alginate를 사용하게 되었다.

**청자색 색소 생산에 있어서 변이주의 포자 고정화의 농도**

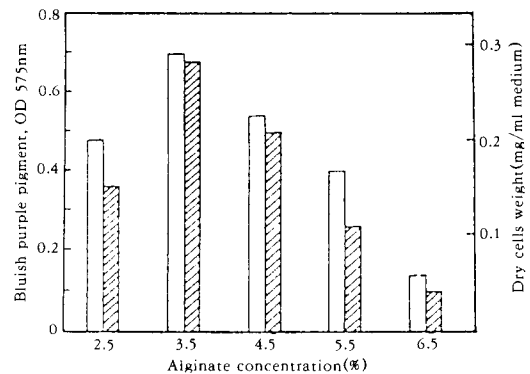
고정화 균체를  $0.4 \times 10^7$  spores/ml에서  $6.4 \times 10^7$  spores/ml로 조절한 후 청자색 색소의 생성능을 조사한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 청자색소의 생성능은  $3.2 \times 10^7$ /ml에서 가장 많았고 그 다음이  $1.6 \times 10^7$ ml이었으며  $4.0 \times 10^7$  spores/ml에서는 가장 낮았다. 균체 고정화의 물리적 특성은 겔에 결합되어 있는 균체의 수가 영양과 산소 공급에 영향을 주므로 균체의 양과 생성물에 영향을 준다.

한편 균체의 고정화에 사용되는 알긴산의 농도는 호기적 조건하에서는 영양원 공급과 산소 투과도와 균체의 증식에 관계되므로 적절한 농도의 사용이 요구된다(61, 62). Fig. 3는 sodium alginate의 농도를 2.5~6.5%로 구분하여 균체를 고정화하고 청자색 색소의 생산성을 조사한 결과 3.5% sodium alginate에서 가장 높은 생산성을 나타내었으며 3.5% sodium alginate보다 농도가 높거나 낮은 경우는 색소의 생산이 적었다. 이러한 결과는 *Bacillus subtilis* (63) 및 *Streptomyces aureofaciens* (64)와 유사하였다.



**Fig 2. Effect of spires density by alginate immobilized spires if *Streptomyces californicus* KS-89-7**

□ : Cell density (mg of cells/ml, gel)  
 ▨ : Bluish purple pigment concentration



**Fig 3. Effect of various alginate concentrations on bluish purple pigment concentration.**

□ : bluish purple pigment production  
 ▨ : dry cells weight (mg/ml medium)

**고정화 겔의 크기에 따른 영향**

*Streptomyces californicus* KS-89을 3.5% sodium alginate로 고정화시킬 때 겔의 직경에 따른 청자색 색소의 생성을 Fig. 4에 나타내었다. 겔의 크기를 2, 4 및 6mm로 만들어 30℃에서 8일 동안 4회 발효되는 동안 청자색 색소의 생성을 조사한 결과 겔의 크기가 2mm일 때 청자색 색소의 생성능이 가장 높았고, 1회 발효시 청자색 색소의 생성능이 가장 많았으나 2회 3회 및 4회로 발효횟수가 증가할수록 청자색 색소의 생성능이 저하되었다. 균체를

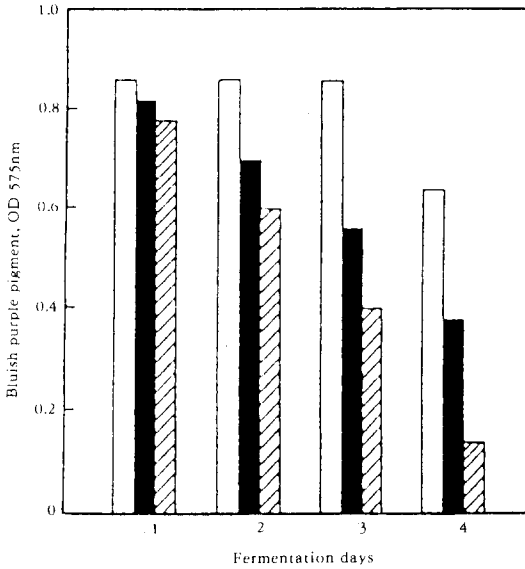


Fig 4. Effect of size of immobilized cells on bluish purple pigment production by semicontinuous fermentation.

Sizes of immobilized cells □:2mm, ■:4mm, ▨:6mm, One fermentation cycle was taken on every 8 days.

1. First fermentation Cycle
2. Second fermentation Cycle
3. Third fermentation Cycle
4. Fourth fermentation Cycle

고정화하여 발효시킬 때 고정화 균체의 크기가 클수록 기질의 확산이 제한되므로 기질과의 접촉이 줄어들어 색소의 생성이 적다고 본다(61).

유리균체와 고정화 균체에 의한 청자색 색소의 생산

Fig. 5은 *Streptomyces californicus* KS-89-7을 유리균체와 sodium alginate로 고정화한 후 column형 반응조에서 발효한 결과이다. *Streptomyces californicus* KS-89-7의 유리균체와 고정화 균체를 30°C에서 8일간을 1회 발효횟수로 하여 4회 32일간 발효하였다. *Streptomyces californicus* KS-89-7의 고정화 균체가 1회 발효되는 동안 유리균체보다 색소의 생성량이 많았고 발효횟수가 증가할수록 유리균체에 의한 색소 생성량은 줄어드는 반면 고정화 균체에 의한 생성량은 1, 2, 3회에서는 크게 차이가 없었으나 4회 발효시에는 색소 생성량이 차이가 나

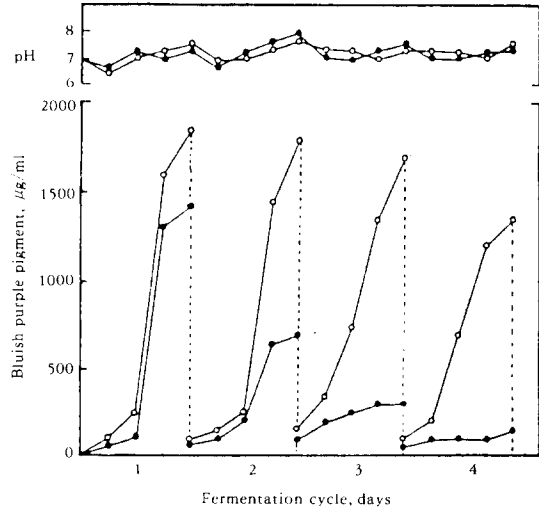


Fig 5. Semicontinuous fermentation of bluish purple pigment production by immobilized and free cells of *californicus* KS-89-7 in tube fermenter.

One fermentation cycle was taken on every 8 days.

- : Immobilized spore
- : Free cells
- : Exchange of fresh production medium

는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 발효 3회째까지는 sodium alginate 겔의 탄력이 겔 내부의 압력에 견딜 수 있으나, 4회째 발효시에는 압력에 약하여 겔과 결합하고 있는 균체가 떨어져 나가거나 또는 겔에서의 성장이 약해지기 때문이다. 이때 발효액의 pH는 유리균체나, 고정화 균체에서는 변화를 찾아볼 수 없었다. 그리고 발효가 장시간 연속적으로 지속되면 고정화 균체의 겔에 피막이 형성되어 산소의 확산이 제한되고 균체의 생육이 어려워지며 여기에서 떨어져 나온 균체가 자가 분해를 일으키게 된다(61, 62). 반연속발효시의 청자색 색소의 생성능은 1회 발효시 고정화 균체와 유리균체에서 각각 1,860µg/ml 및 1,450µg/ml씩 생성되었다.

Aeration의 영향

Column형 반응조에서 청자색 색소의 발효시 aeration의 영향을 조사하기 위하여 공기를 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 및 3.0 l/min의 유속으로 조절하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 4회 발효를 계속하

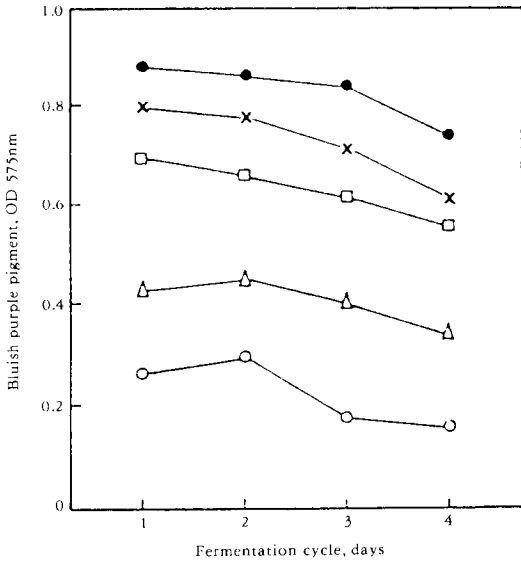


Fig 6. Effect of aeration volume on bluish purple pigment productivity on semicontinuous fermentation aeration volume.

- : 0.5ml/min
- △—△: 1.0ml/min
- : 1.5ml/min
- : 2.5ml/min
- ×—×: 3.0ml/min

는 동안 공기의 유속이 2.5 l/min일 때 청자색 색소의 생성능이 가장 좋았다. 공기의 유속을 3.5 l/min으로 조절하여 주입하면 청자색 색소의 생성은 높은 편이지만 sodium alginate에 고정된 균체의 유속이 증가함으로써 공기압에 의한 손상이 일어난다 (57-59).

고정화 균체에 의한 청자색 색소의 연속 생산  
고정화 균체의 활성

앞에서 실험한 조건으로 column형 반응조에 넣어 청자색 색소의 생산을 연속적으로 시도하였다. Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 청자색 색소는 발효를 시작하여 8일과 16일에 가장 높게 나타났으며, 24일 경과시에 감소하다가 발효 32일 경과시에는 다소 감소하였고 40일 경과부터는 고정화 균체의 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있다.

균체 고정화에 의한 발효시 균주의 종류에 따라 *Streptomyces* sp.(46)은 32일 *Aspergillus niger*는 104일까지 활성을 나타내고 있는데 이는 균주의 특

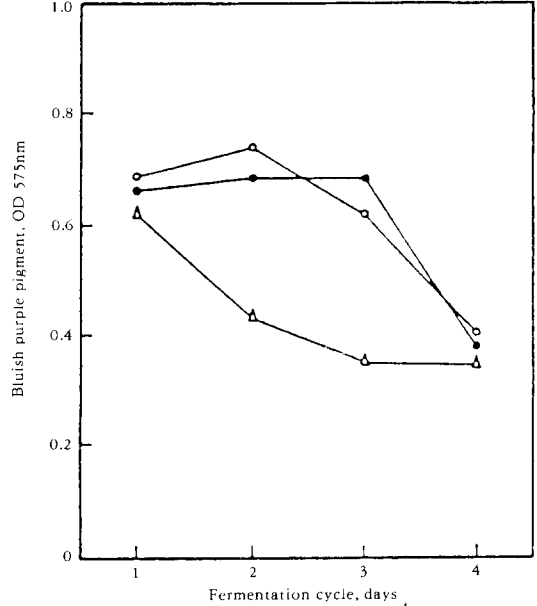


Fig 7. The semicontinuous fermentation with reactivated immobilized cells of *Streptomyces californicus* KS-89-7.

- : Reactivation of beads in medium after each fermentation cycle for 12h.
- : Reactivation of beads in medium after each fermentation cycle for 24h.
- ▲—▲: Control(without activation)

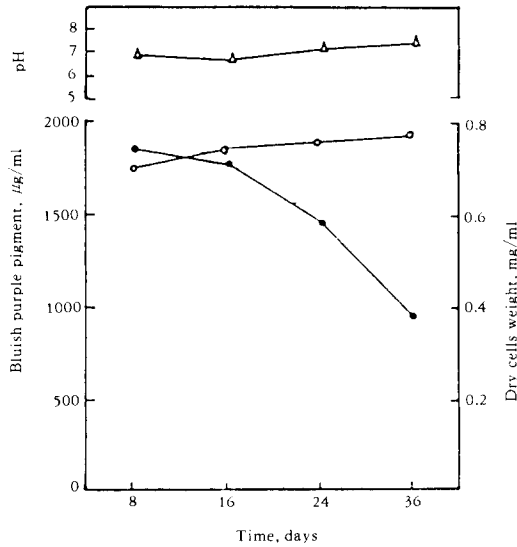
성 및 발효 생산물의 종류에 따라 다르기 때문이다 (49, 50, 51).

청자색 색소의 연속생산

청자색 색소를 연속적으로 생산하기 위하여 *Streptomyces californicus* KS-89-7의 고정화 균체를 column형 반응조에 넣고 연속적으로 발효시킨 결과 Fig. 8과 같다.

발효를 시작하여 16일까지는 청자색 색소의 생산이 좋았으나 발효 24일 경과시에는 약간 감소하였다. 이때 pH는 큰 변화를 찾아볼 수 없었다. 연속발효시 발효 8일째 청자색 색소의 생성량은 1,870 ug/ml이었고, 발효 16일째에는 1,720ug/ml이었으며 발효 24일째에는 1,520ug/ml, 36일째에는 960ug/ml 정도 생산되었다.

본 실험에서 연속적인 청자색의 발효를 시도하여



**Fig 8.** Continuous fermentation of bluish purple pigment production by immobilized cells of *Streptomyces californicus* KS-89-7 in tube fermentor.

●—●: Bluish purple pigment  
 ○—○: Dry cells weight  
 △—△: pH

24일까지 색소 생산이 가능하다는 결론을 얻었다.

**감 사**

본 연구는 1993년도 산학협동재단의 학술연구비와 신광식품산업주식회사의 matching fund의 지원으로 수행되었으며 이에 대하여 심심한 사의를 표하는 바입니다.

**참 고 문 헌**

1. G. G. Vaillant(1972), Aztecs of Meaxico, 142, Penguin Book, Ltd, Harmondsworth.
2. N. Goldenberg(1979), Why Additives the Safety of Foods, Chapter 6 Colours-do We Need Them?, British Nutrition Foundation, London.
3. World Health Organization(1974), Toxicological Review of Certain Food Additives with a Review of General Principles and of Speci-

fication, 17th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva.

4. F. J. Francis(1977), Incurrent Aspects of Food Colorants. ED. T. E. Furia, 19-27 IRC Press, Ohio.
5. R. F. Crampton(1977), Colouring Agents in Why Additives, The Safety of Foods. The British National Foundation. Forbes Publications, London.
6. K. Kojima(1978), The Toxicological Assessment of National Food Colorants, *In Chemical Toxicology of Food*. Elsevier.
7. M. Yoshimoto, H. Okamoto, S. Hatano and T. Watanabe(1977), *J. Food. Hygi.* (Japan), **182**, 154-158.
8. J. C. Bauernfeind (1973), Direct and Indirect Coloring with Carotenoid Food Colors, In *Ift World Directory & Guide, Institute of Food Technologists Chicago*, III.
9. D. K. Dougall, J. M. Johnson and G. H. Whitten(1980), Production of Shikonin Derivatives by Cell Cultures of Wild Carrot, *Plantanta*, **149**, 292.
10. Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto (1881), A Clonal Analysis of Anthocyanin Accumulation by Cell Cultures of Wild Carrot, *Plantanta*, **149**, 292.
11. A. Emodi(1978), Carotenoids-Properties and Application, *Food Technol.*, **32**(5), 38.
12. J. Clulson(1980), Naturally Occuring Colouring Materials for Food, Chap. 7. In "Development in Food Colours- I", ed. John Walford, 212, *Applied Science Pub.*, England.
13. F. J. Francis(1986), Handbook of Food Colorant Patents, Food and Nutrition Press(in press).
14. H. Inouye(1983), Chemistry of the Constituents of Gardenia Fruits, *Gendai, Toyo Izaku*, **4**(1), 48-53.
15. L. A. A. Gunatilaka, S. R. Sirimone, S. Sothersworan and H. T. B. Sreyani(1982), Flavonoids of *G. Cramerii* and *G. Fosbergii* Bud Exusates *Phytochem*, **21**(3), 805-811.
16. A. G. Lloyd(1980), Extraction and Chemistry

- of Cochineal, *Food Chem.*, **5**(1), 91-106.
17. M. Tabata, T. Umetani, K. Shima and S. Tanaka(1984), Glucosylation of Esculation by Plant Cell Suspensions, *Plant Cell Tissue Organ, Cultyer.*, **3**(1), 3-9.
  18. The Colouring Matter in Food Regulations (1976), Ministry of Agriculture, *Ficheries and Food*, FMSO, London, SI, No, 2086.
  19. J. D. Suramtis and A. Ofner (1961), *J. Org. Chem.*, **26**, 1171.
  20. FAD, Beta-Apo-8'-Carotenal. Code of Federal Regulations, Title 21, 73, 90. April, ed, *Food and Drug Administration*, Washington D. C.
  21. H. T. Gordon and J. C. Bauernfeind(1983), Carotenoids as Food Colorant, In "CT Critical Review in Food Science and Nutrition", **18**, 1, ed. T. E. Furia, 59. CRC Press, Boca Ration, Fla.
  22. L. A. A. Gunatilaka, S. R. Sirimanni, S. Sothersworan and H. T. B. Sreyani(1982), Flavonoids of *G. Carmerii* and *G. Fosbergii* Bud Exudtes *Phytochem*, **21**(3), 805.
  23. K. Hasegawa(1979), Blue Food Coloring Agent from *Gardenia* Fruit, *Jap. Patent*, **79**, 152, 026.
  24. K. Komura, H. Okayama, R. Toyoma, Y. Sawada and S. Ichinose(1976), Pigment Production, *JAP. Patent.*, **76**, 006, 230.
  25. H. Inouye (1983), Chemistry of the Constituents of *Grdenia* Fruits, *Gendai Toyo Ixaku.*, **4** (1), 48.
  26. F. J. Francis(1986), Handbook of Food Colorant Patents, *Food and Nutrition Press*(in press).
  27. M. Riboh(1977), Natral Colors, Whaks .....What doesn't, *Food Eng.*, **49**(5), 66.
  28. F. J. Francis (1987), Lesser-Known Food Colorants, *Food Technol.*, **4**, 62-68.
  29. M. Tsukiota, T. Hiroi, T. Suzuki and T. Konno(1986), Pigment Production by Mutants of *Monascus Anka*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **60**, 451-459.
  30. T. Hiroi, T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka and Osagaswera(1979), Hyperpigment Productive Mutant of *Monascus Anka* for Solid Culture, *Agri. Biol. Chem.*, **43**(9), 1975-1976.
  31. I. Suich(1973), Prepartion of Soluble *Monascus* Pigment, *Patent*, 48-4480, 245~247.
  32. C. F. Lin(1973), *J. Ferment. Technol.*, *J. ferment. Technol.*, **51**(6), 407-414.
  33. M. Yoshimura, S. Yamanaka, K. Mitsugi and Y. Hirose(1975), *Agric. Biol. Chem.*, **39**(9), 1789-1795.
  34. C. F. Lin and S. T. Suen(1973), *J. Ferment Technol.*, **51**, 757-759.
  35. B. H. Ryu, B. H. Lee and H. S. Kim(1989), *Kor. T. Food Soc. Tech.*, **83**, 31-36.
  36. B. H. Ryu, B. H. Lee, B. G. Park, H. S. Kim, D. S. Kim and M. H. Roh (1989), *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **21**(1), 37-44.
  37. N. J. Palleroni, K. E. Reichelt, D. Mueller, R. Epps, B. Tabenkin, D. N. Bull, W. Schuep and J. Berger(1978), *J. of Antibiotics*, **16**(12), 1218-1125.
  38. M. Oshima, N. Ishizki and Y. Tonooka (1985), *J. Ferment. Technol.*, **63a**(1), 79-83.
  39. M. Oshima, N. Ishizaki, A. Handa, Y. Tonooka and N. Kanda(1981), *J. Ferment. Technol.*, **59**(3), 209-213.
  40. R. Shinobu (1970), *Streptomyces purpurrratus* Nov. sp., A New *Streptomyces* Which Produces a Soluble, Deep Purlish-Res pigment in Mixed Culture with the other Microorganisms, *J. of Antibiotics.*, **13**(3), 125-130.
  41. M. Oshim, N. Ishizki, A. Hando, Y. Tonook and N. Kanda(1981), *J. Ferment. Technol.*, **59** (5), 335-339.
  42. M. Oshima, N. Ishizaki, A. Handa and Y. Tonooka(1983), *J. Ferment. Technol.*, **61**(1), 31-36.
  43. K. Imada, M. Oshima, T. Yoshid, S. Yasuda, and S. Yoshino(1993), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **30**(5), 270-275.
  44. B. H. Ryu, B. G. Park, Y. E. Chi and J. H. Lee (1989), *Kor. J. Appl., Microbiol., Bioeng.*, **17**(4), 327-332.
  45. Y. E. Chi (1990), Production of Bluish Purple



- Pigment by *Streptomyces Clifonicus* KS-89 and Characteristics of Pigment. Thesis of Ph. D. Kyungsung Univ., 1-130.
46. B. H. Ryu and Y. E. Chi(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol Biotech.*, **18**(5), 443-448.
  47. Y. E. Chi, B. H. Lee, W. Y. Park and B. H. Ryu (1990), *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **19**(3), 201-206.
  48. B. H. Ryu, Y. E. Chi, B. H. Lee and W. Y. Park(1990), *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **19**(3), 263-269.
  49. G. Durand and J. M. Navrro (1978), Immobilized Microbiol Cells, *Process Biochem.*, B, 14-23.
  50. B. P. Sharma, L. F. Bailey and K. A. Messing (1982), Immobilized Biomaterials-Techniques and Appilications, *Angrew Chem. Int. Ed. Engl.*, **21**, 837-854.
  51. J. Klien and F. Wagner(1978), Immobilized Whole Cells. Dechema Minographien. BL. 82. "Biotechnology", *Verlag Chemie, Weinheim*, 142-164.
  52. H. Kaneko and K. Sakaguchi (1979), Genetic Recombination of *Brevibacterium Flvum*, *Agri. Bio. Chem.*, **43**(5), 40.
  53. J. Ledergerg and N. Zender (1948), Concentration of Biochemical Mutants of Bacteria with Penicillin J. A. C. A., **70**, 4267.
  54. Y. Fukashima, K. Okamura, K. Imai and H. Motai(1988), A New Immobilization Technique of Whole Cells and Enzymes with Coloidal Silica and Alginate, *Bioeng.*, **32**, 584-594.
  55. G. Durnd and J. M. Navrro(1978), Immobilized Microbiol Cells, *Process Biochem.*, B, 14-23.
  56. B. P. Sharma, L. F. Bailey and K. A. Messing (1982), Immobilized Biomaterials-Techniques and applications, *Angrew Chem., Int. Ed. Engl.*, **21**, 837-854.
  57. J. Klien F. Wagner(1978), Immobilized Whole Cells. Dechema Monographien. BL. 82. "Biotechnology", *Verlg Chemie, Weinheim*, pp. 142-164.
  58. J. Klien and F. Wagner (1978), Immobilized Whole Cells Physical Characterization. Dechema Monographien, Bd "Charaterization of Immobilized Biocataysts", *Verg Chemie, Weinheim*, 274-313.
  59. I. Chibata and L. B. wingard (1983), Immobilized Microbial Cells. In Wingard, L. B. Katchalskikatzter, E., Goldstein, L. (eds), *Appl. Bioeng. Vol. 4*, Academic Press, New York, London.
  60. B. Mattiasson (1983), Immobilized Cells and Organelles, Mattiasson B ed Vol. 1. *CRC-press, Boca Raton, Florida*.
  61. H. Tanaka, M. Matsumura and I. A. Veliky (1984), Deffusion.
  62. P. Linko and Y. Y. Linko (1984), Industrial Applications of Immobilized Cells, *CRC Critical Reviews in Biotechnology Vol. 2. Stewart, G. G. Ressel. 1* (eds), **4**, 289-339.
  63. I. V. Gorbacheva and N. A. Rodionove, (1977), *Biochem. Biophys. Acta.*, **484**, 79.
  64. A. I. Chosh(1981), *Arch. Microbiol.*, **140**, 126.
  65. M. Pibber and J. C. Toha(1982), *J. Ferment. Technol.*, **60**, 247.
  66. H. T. Rehm and G. Reed(1983), *Biotechnology*, Vol. 3-Biomass, p. 293, Deerfield Beach, Florida, Basel.
  67. J. Weigel(1982), *Experiential*, **38**, 151.
  68. M. Mandels and D. Sternberg(1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 267.
  69. S. B. Virendr and T. K. Ghose(1981), *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90.
  70. S. K. Garg and S. Neclakanten(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 109.
  71. S. M. Trivedi and J. D. Desai, (1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**, 211.
  72. 박석규, 문일식, 최옥자, 성낙계(1993), *산업미생물학회지*, **21**, 440.
  73. C. Kohchi and A. Tohe(1986), *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 89.
  74. S. Murao, J. Kanamito and M. Arai(1979), *J. Ferment. Technol.*, **57**, 151.
  75. M. Tanaka, M. Taniguchi, T. Morinaga, R. Matsuno and T. Kamikubo(1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 149.
  76. M. Taniguchi, M. Tanaks, R. Matsuno and T.

- Kamikubo(1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 143.
77. S. Takao, Y. Kamagata and H. Sasaki, (1985), *J. Ferment. Technol.*, **63**, 127.
78. M. Kawamori, K. Takayama and S. Takasawa(1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 647.
79. 송은경, 허태린, 이세영(1982), 한국생화학회지, **15**, 228.