

해양에서 분리한 *Vibrio* sp.가 생산하는 적색색소의 특성

김학주 · 박효진* · 배승권 · 김종덕** · 공인수 · 공재열†

부산수산대학교 생물공학과

*부산수산대학교 미생물학과

**여수수산대학교 생물공학과

Characterization of Red-Pigment Produced by Marine Bacterium *Vibrio* sp.

Hak-Ju Kim, Hyo-Jin Park*, Seung-Kwon Bae, Jong-Deog Kim**, In-Soo Kong and Jai-Yul Kong†

Dept. of Biotechnology and Bioengineering, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

**Dept. of Biological Engineering, Yosu National Fisheries University, Yosu 550-250, Korea

Abstract

A marine bacterium producing red-pigment was isolated from southern sea of Korea and was identified as *Vibrio* sp.. The strain was growing well on LB culture medium and red-pigment was accumulated intracellularly. The productivity of red-pigment reached the maximum value after 24 hours and increased with addition of 1% fructose or 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The extracted red-pigment from the cell showed the highest absorbance at 531nm by UV-VIS spectrophotometer and the value of wavelength($\lambda=531\text{nm}$) was similar to that of anthocyan group. Using thin layer chromatography, red-pigment was separated into two different components ; in addition, the purity of these components were analyzed by HPLC. Molecular weight of these components were 281 and 236, respectively. Therefore, the red pigment from marine bacterium *Vibrio* sp. was most likely to be composed mainly of cyanidin(M.W.=281).

Key words: marine bacterium, *vibrio* sp., red-pigment, anthocyan

서 론

색소는 식품의 첨가물로서 그 품질의 유지와 기호성의 향상을 위해 널리 사용되고 있으며, 화학공업적으로 이용가치가 매우 높다고 할 수 있다. 예로부터 식품의 착색을 위해서 주로 자연계에 존재하는 식물로부터 추출한 색소를 이용하여 왔으며, 현재 이용되고 있는 식물성 천연색소로서는 chlorophyll, carotenoid, anthoxanthin, anthocyanin, flavonoid 등(1)을 들 수 있다. 그러나 천연색소로 주로 사용되고 있는 식물성 색소의 경우, 그 추출에는 여러 가지 어려운 점이 많을 뿐만 아니라 생산비가 많이 들고, 선명도가 떨어지며 색의 종류도 다양하지 못하기 때문에 실제의 사용에는 많은 제한이 따르고 있다(2,3). 따라서 보다 손쉽게 구

할 수 있고 가격이 저렴하며 색의 종류도 다양한 화학 합성 색소가 실제로는 널리 이용되고 있는 실정이다. 그러나 화학합성된 색소의 경우에는 위생상의 안전을 이유로 그 사용이 제한되어 있을 뿐만 아니라, 유해성이 전혀 없다고 할 수 없기 때문에 세계적으로 많은 연구자들이 인체에 무해하고 안정성이 뛰어난 천연색소의 개발에 관한 연구를 수행 중에 있다. 특히 생물공학 분야의 발달로 말미암아 식물조직배양에 의한 식물 유래 색소 생산과 미생물을 이용한 색소생산 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 중에서도 미생물을 이용한 색소생산에 관한 연구는 변이 균주의 개발을 통한 다양한 색소생산과 대량 생산이 가능하다는 점에서 최근 크게 주목을 받고 있다.

지금까지 개발된 미생물 유래 색소로서는 홍국균

† To whom all correspondence should be addressed

(*Monascus* sp.)(4-7)이 생산하는 적색색소와 남조류의 일종인 *Spirilla* sp.가 생산하는 pycocyanin 등이 있으며, 치자 청색소(8) 처럼 색소가 아닌 성분에 미생물이나 효소처리를 함으로써 유색화시킨 것 등이 있다.

본 연구에서는 현재 대부분의 경우에 사용되어지고 있는 화학합성 색소를 대신하여 다양하고 안전한 천연 색소의 개발을 목표로 해양으로부터 적색색소 생산 균주를 분리하여 동정한 후, 색소생산의 최적 조건을 조사함과 동시에 분리·정제된 색소의 특성을 살피고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 사용배지

우리나라 남해 연안의 해역으로부터 해수를 채취하여, 인공해수(NaCl, 23.5g; KCl, 0.7g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10.6g; $CaCl_2$, 1.1g; Na_2SO_4 , 3.9g; $NaHCO_3$, 0.2g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0g; K_2HPO_4 , 0.01g; Tris, 6.05g/중류수, 1L, pH 7.8)(9)가 첨가된 변형된 해수 배지(peptone, 5g; yeast extract, 3g; ammonium nitrate, 0.0016g; disodium phosphate, 0.008g; agar, 15g; sea water, 1L; pH 7.8)(10)를 이용하여 21°C에서 5일간 항온 배양한 후 적색 colony를 선별하여 실험에 이용하였으며, Luria broth(LB)배지(tryptone 10g, yeast extract 5g, 중류수 1L, pH 7.0)를 이용하여 배양하였다.

균주의 동정

선별된 적색색소 생산 균주는 Gram 염색을 통한 형태적 관찰(Carl Zeiss Jenane-2, $\times 1,000$ 배)과 API-20E kit(A analytical Lab product Inc.)를 이용한 각종 생화학적 검사 등을 통하여 동정하였으며, 균주의 분류는 Bergey's manual of systematic bacteriology(11)에 의해 행하였다.

균주의 성장과 색소생산의 최적조건

LB배지를 이용하여 21°C에서 24시간 진탕 배양하였으며, 매 4시간 마다 균주의 성장과 색소 생산량을 spectrophotometer(Gilford 240)를 이용하여 각각 660nm와 535nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 최적 배양시간을 확인하였다

NaCl 농도에 따른 영향

LB배지에 NaCl을 1%에서 5%까지 첨가하여 각 농도에서 진탕배양기를 이용하여 21°C에서 24시간 배양

한 후 균주의 성장과 색소 생산량을 측정하였다.

탄소원의 종류에 따른 영향

Glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, potato starch 등의 탄화수소원을 각각 1%씩 LB에 첨가한 후 (12), seed culture한 균을 1% 접종하여 21°C의 진탕배양기에서 24시간 배양한 후, 균주 성장과 색소 생산량을 측정하였다.

무기질소원의 종류에 따른 영향

LB 배지에 무기질소원인 $(NH_4)_2SO_4$, CH_3COONH_4 , NH_4NO_3 , $NaNO_3$ 를 각각 0.3%씩 첨가하여(13), 21°C에서 24시간 진탕배양한 후, 균주의 성장과 색소 생산량을 측정하여 최적 무기질소원을 구하였다.

색소의 분리·정제

LB배지를 이용하여 21°C에서 24시간 배양한 배양액을 14,489×g로 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 동결건조하여, methanol을 이용하여 색소를 추출하고, 진공회전증발기를 이용하여 농축하였다. 또한 시료를 silica gel이 충전된 glass column(5×30cm)에 10g씩 넣고 methanol로써 재차 분리한 후 진공회전증발기로 농축하였으며, 이 시료를 이용하여 각종 분석을 행하였다.

UV-VIS spectrophotometer를 이용한 색소 분석

Silica gel 충전 glass column을 이용하여 methanol에 의해 분리한 후, 농축된 색소 시료를 대상으로 spectrophotometer를 이용하여 최대 흡수 파장을 조사하였다.

TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 분리·정제

TLC 실험에서는 silica gel 60F₂₅₄ glass plate(20×20cm)에 methanol을 전개용매로하여 색소를 분리·정제한 후 진공회전 증발기로 농축하였다.

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분리·정제

Ultrapac ODS-120T(Pharmacia LKB) 4.6×250mm column을 이용한 HPLC(Pharmacia LKB-LCC2252)에서는 A 용매(water : acetic acid=85 : 15)와, B 용매(methanol : acetic acid=85 : 15)를 1 : 3의 비율로 혼합한 용매를 분당 1.2ml의 유속으로 흘리면서 정제하였고, 정제된 시료는 UV-VIS detector(Pharmacia LKB-VWM2141)를 이용하여 $\lambda=535nm$ 에서 분석하였다.

GC/MS 분석

HPLC 실험에 사용된 시료와 동일한 색소성분을 농축한 후 GC / MS(Kratos profile HV-3)로써 SPB-1 column을 이용하여 분자량을 조사하였다(injector 온도, 270°C ; detector 온도, 250°C ; 시료량, 1µl ; 초기 온도, 70°C ; 최종 온도, 285°C).

결과 및 고찰

균주의 동정

우리나라 남해 연안 해역으로 부터 채취한 시료로부터 적색색소를 생산하는 세균을 분리하여, 이 균주는 성장 과정 중에 적색색소를 세포내에 축적시키고 있음이 밝혀졌으며, Gram 염색을 통한 형태학적 관찰과 각종 생화학적 검사 등을 통하여 동정한 결과 *Vibrio* sp.로 판명되었다(Table 1).

균주의 성장과 색소의 최적 생산

변형 해수배지상에서 형성된 colony로 부터 분리한 *Vibrio* sp.에 대하여 기존의 각종 배지상에서 배양시킨 결과, LB배지상에서 균주의 성장이 가장 뛰어나, 이후 본 균주의 배양은 LB배지를 이용하였다. 미생물

이 색소를 생성하는 원인으로서, *Erythrobacter* sp., *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroide* 등으로 부터 분리된 bacteriochlorophyll(14-16)의 경우, 생체내에서 전자전달을 통해 에너지를 얻기 위한 수단으로 색소를 생산함이 밝혀져 있다. 그리고 세균에서 발견된 carotenoid(17)의 경우에는 광산화반응으로부터 세균을 보호하기 위해 생산하거나 동물세포에서의 cholesterol의 역할에 해당되는 생체막의 구조 강화 작용을 위해 생산되는 것으로 추측되어지고 있다. 본 연구에서 사용된 *Vibrio* sp.는 태양광의 존재 유무에 따라 색소 생산량에 약간의 차이를 보였으나, 그 기작에 관해서는 현재 검토 중에 있다.

LB 배지에 seed culture된 균을 1% 접종하여 21°C에서 24시간 진탕 배양하여, 매 4시간 마다 균주의 성장과 색소 생산량을 측정하였으며, 최적 배양시간을 측정한 결과, 24시간 배양하였을 때 가장 많은 색소 생산량을 보였으며, 균은 20시간 이후부터 서서히 사멸기에 들어감을 알 수 있었다(Fig. 1). 균주의 성장과 색소의 생산량에 미치는 NaCl의 농도의 영향을 조사한 결과, NaCl을 첨가하지 않거나 1~2% 농도의 NaCl을 첨가하였을 때에 균주의 성장이 뛰어났으며, 색소 생산량은 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서 최대의 값을 보였다(Table 2). Table 3은 균주의 성장과 색소 생산량에 미치는 배지 중에 함유된 탄소원 종류의 영향을 살펴본 결과이다. 탄소원으로서는 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, potato starch를 각각 사용하였다. 각 탄소원을 LB배지 중에 1% 농도로 첨가시켜 균주의 배양을 행한 결과, 대부분이 균주의 성장을 향상시키는 효과를 나타내었으며, 그 중에서도 특히 fructose

Table 1. Identification of marine bacterium producing the red-pigment

Test	Results
Gram strain	-
Oxidase	+
Catalase	+
β-Galactosidase(ONPG)	+
Arginine dihydrolase(ADH)	+
Lysine decarboxylase(LDC)	+
Ornithine decarboxylase(ODC)	+
Citrate utilization(CIT)	-
H ₂ S production(H ₂ S)	-
Urease(URE)	+
Tryptophane desaminase(TDA)	+
Indole production(IND)	-
Acetoin production(VP)	-
Gelatinase(GEL)	+
Glucose utilization(GLU)	+
Mannitol utilization(MAN)	+
Inositol utilization(INO)	+
Sorbitol utilization(SOR)	+
Rhamnose utilization(RHA)	+
Sucrose utilization(SAC)	+
Melibiose utilization(MEL)	+
Amygdalin utilization(AMY)	-
Arabinose utilization(ARA)	+
NO ₂ production(NO-NO ₂)	+

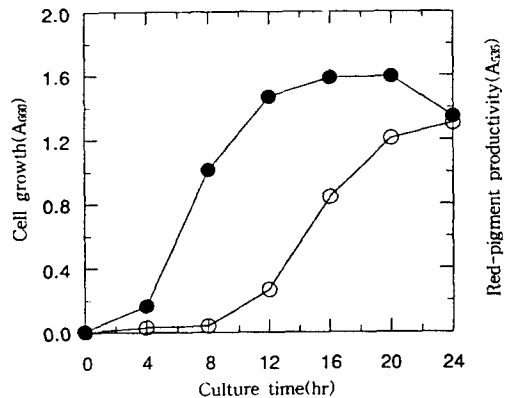


Fig. 1. Cell growth and the production of red-pigment. (●: Cell growth, ○: Red-pigment productivity)

Table 2. Effect of NaCl concentration on the cell growth and the red-pigment productivity

NaCl concentration(%)	Cell growth(A_{660})	Pigment productivity (A_{535} of pigment solution)
0	1.065	1.040
1	1.046	0.342
2	1.050	0.168
3	0.819	0.060
4	0.622	0.050
5	0.447	0.052

Table 3. Effects of carbon sources on the cell growth and the red-pigment productivity

Carbon sources(1%)	Cell growth(A_{660})	Pigment productivity (A_{535} of pigment solution)
None	1.005	1.140
Glucose	1.234	0.705
Fructose	1.324	8.100
Maltose	1.148	1.860
Lactose	0.969	0.645
Sucrose	1.240	2.715
Potato starch	1.030	0.675

Table 4. Effects of inorganic nitrogen sources on the cell growth and the red-pigment productivity

Inorganic nitrogen sources(0.3%)	Cell growth(A_{660})	Pigment productivity (A_{535} of pigment solution)
None	1.314	0.885
$(NH_4)_2SO_4$	1.318	2.610
CH_3COONH_4	1.279	0.630
NH_4NO_3	1.212	0.375
$NaNO_3$	1.247	0.345

를 첨가하였을 경우, 균주의 성장과 색소 생산량은 최대값을 보여, 탄소원으로는 fructose의 사용이 색소 생산에 적합함을 알 수 있었다. 또한 $(NH_4)_2SO_4$, CH_3COONH_4 , NH_4NO_3 , $NaNO_3$ 등의 무기염류를 LB배지에 0.3% 농도(13)로 첨가하여 균주를 배양한 실험 결과로부터 $(NH_4)_2SO_4$ 의 첨가가 색소 생산의 향상을 위해 첨가 효과가 큰 것을 알 수 있었다(Table 4). 이상의 결과로부터 균주의 배양 중에 생성되는 색소의 생산량 향상을 위한 최적 배지 조건으로써는 기존의 LB배지 구성 성분외에 1%의 fructose와 0.3%의 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

UV-VIS spectrophotometer를 이용한 색소의 spectrum분석

LB배지에서 배양하여 얻어진 균체로부터 methanol로 추출한 적색색소를 UV-VIS spectrophotometer로 분석한 결과 531nm의 파장에서 최대치를 나타내었다. 이는 기존에 알려져 있는 anthocyan계열의 색소와 유사한 흡수파장인 점으로 미루어 본 실험에서

사용된 해양유래 *Vibrio* sp.가 생산하는 적색색소는 anthocyan계열로 사료되어진다(Fig. 2).

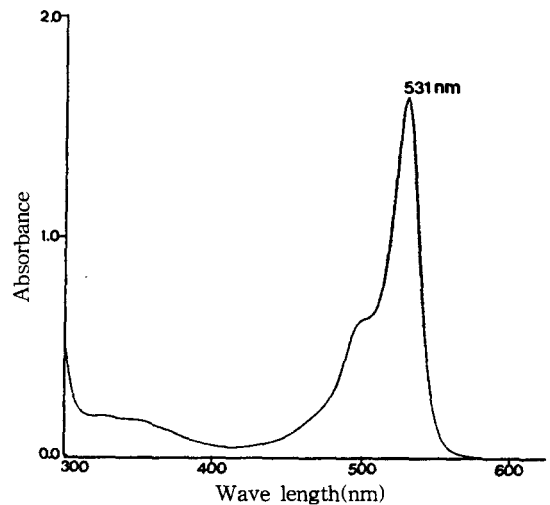


Fig. 2. UV-VIS spectrophotometer spectrum of the red-pigment produced by marine bacterium *Vibrio* sp..

적색색소의 분리·정제 및 분석

LB배지상에서 배양된 균체로부터 methanol을 이용하여 추출한 미정제된 상태의 색소를 silica gel 충전 column상에서 재차 methanol을 이용하여, 추출한 후 농축시켰다. 농축 색소시료에 대하여 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)에 의한 분리·정제 실험을 행한 결과, 농축 색소시료는 anthocyan 계열의 색소로 분자량이 서로 다른 2종류(A, B)의 물질로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). ODS-column을 이용한 HPLC 분석 결과로부터 그림에 나타난 바와 같이 TLC를 이용한 분리·정제만으로도 비교적 높은 정제도의 색소시료를 얻을 수 있었다(Fig. 4). 또한, GC/MS 실험을 통해 각 성분의 분자량을 조사한 결과, 각각의 분자량은 281(좌측)과 236(우측)임을 확인하였다(Fig. 5). 한편 GC/MS 분석 결과 얻어진 분자량 281과 분자량 236을 지니는 색소 성분들은 모두 anthocyan 계열의 물질로 사료되며, 그 중에서도 특히 분자량이 281인 물질의 경우에는 Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 anthocyanin의 기본 구조에 OH기가 5개 존재하는 cyanidin의 분자량과 일치하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 해양유래 *Vibrio* sp.가 성장 과정에서

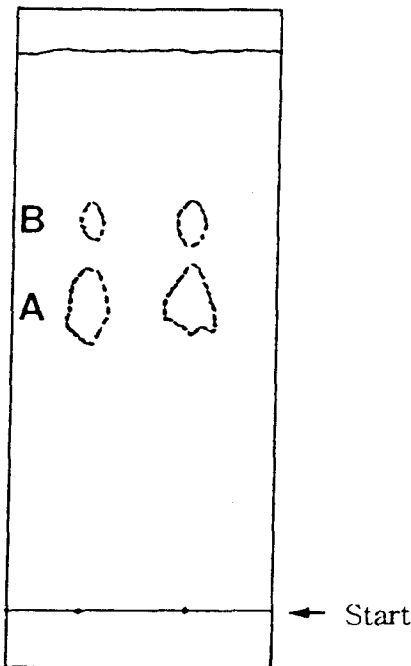


Fig. 3. TLC separation of the red-pigment produced by marine bacterium *Vibrio* sp.. (A: anthocyanin of M.W. 281, B: anthocyanin of M.W. 236)

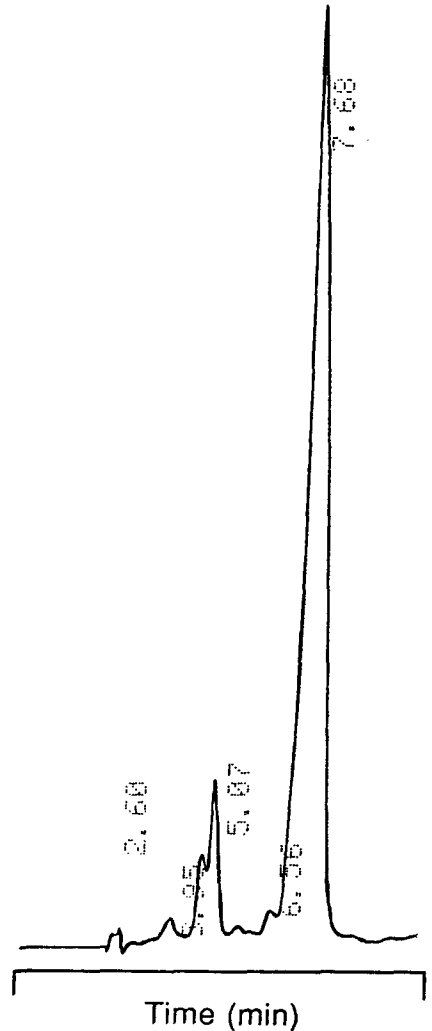


Fig. 4. HPLC chromatogram of the red-pigment.

세포내에 축적하는 적색색소는 주로 cyanidin으로 구성되어있는 anthocyan 계열의 색소임이 확인되었다.

요 약

우리나라 남해 연안 해역으로부터 적색색소를 생산하는 균주를 분리하여 동정한 결과 *Vibrio* sp.로 판명되었다. 본 균주는 성장과정 중에 적색색소를 생산하여 세포내에 축적시키며 이때의 적색색소 생산량은 배양 후 24시간 이후부터 최고치에 도달하였으며, 배지 중의 첨가물로서 0~2%의 NaCl, 1% fructose, 0.3%의

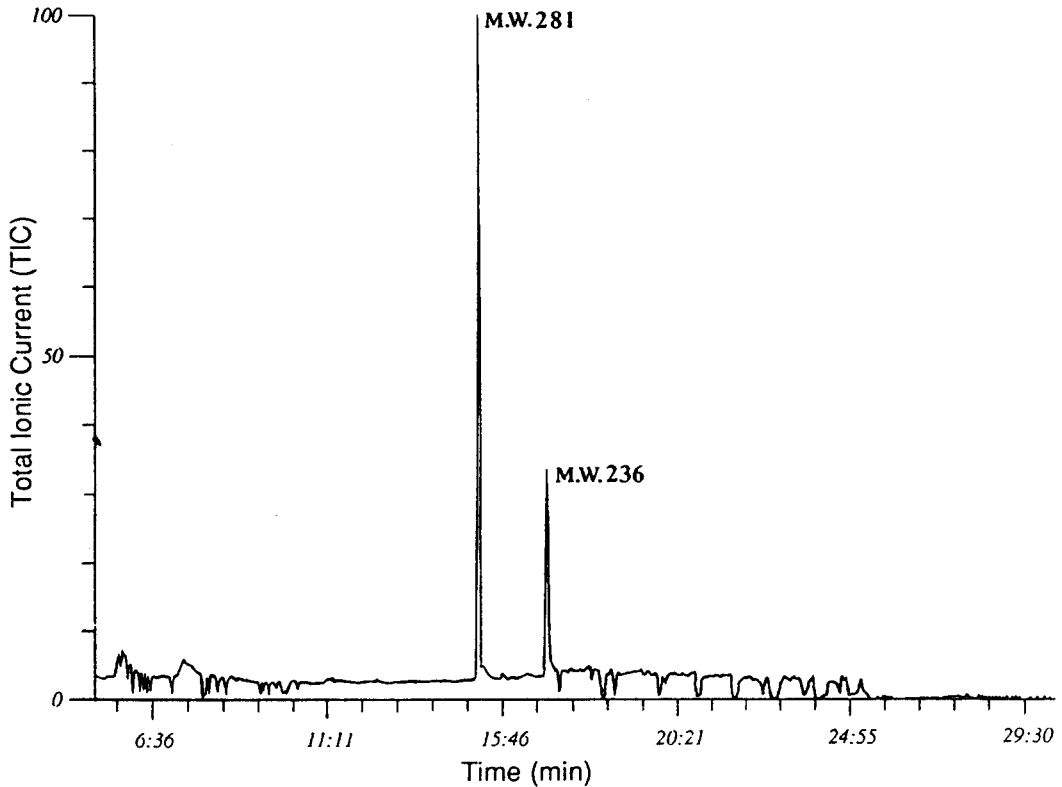


Fig. 5. GC chromatogram of the red-pigment produced by marine bacterium *Vibrio* sp..

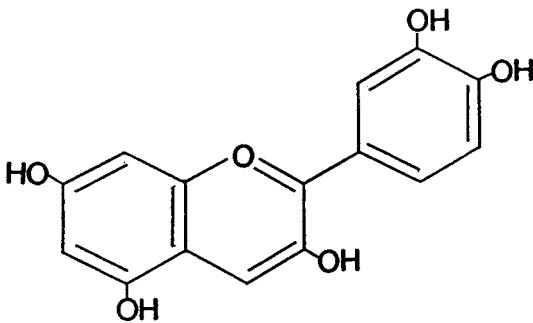


Fig. 6. Chemical structure of cyanidin.

(NH₄)₂SO₄를 첨가되었을 때 높은 생산량을 보였다. 한편 배양하여 얻어진 균체로부터 methanol로 추출한 적색색소는 UV-VIS spectrophotometer로 분석한 결과 최대 흡수파장이 531nm이었으며, 현재까지 널리 알려진 anthocyan계열의 색소와 동일한 흡수파장을 지니는 것으로 알 수 있었다. 또한 methanol 추출 색소를 TLC와 HPLC로 분리·정제하여 GC/MS로 분석한

결과 분자량 281과 236인 2종류의 물질이 검출되었으며, 281의 분자량을 가지는 물질의 경우 anthocyanin의 기본 구조에 OH기가 5개 존재하는 cyanidin으로 추정되었다. 따라서 본 실험에서 사용한 해양 유래 *Vibrio* sp.가 생산하는 적색색소는 cyanidin을 주성분으로 하는 anthocyan 계열의 색소임이 확인되었다. 유전공학적 기법을 이용한 균주 개량과 대량생산 체제가 구축된다면, 현재 널리 사용되고 있는 화학 합성 색소를 대체할 수 있는 천연색소로서, 식품, 의약품, 화장품, 화학, 염료 공업 등에 사용될 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 동원학술재단의 학술 연구비의 지원과 일부 1995년도 교육부 기초과학 연구소 학술 연구 조성비 지원(과제 번호 : BSRI 94-4410)에 의해서 이루어졌으며, 이에 대하여 감사드립니다.

문헌

1. Gunatilaka, L. A. A., Sirimanni, S. R., Sothersworan, S. and Sreyani, H. T. B. : Flavonoids of *G. carmerii* and *G. fosbergii*. *Bud Exudtes Phytochem.*, **21**, 805(1982)
2. Riboh, M. : Natural colors. *Food Eng.*, **49**, 66(1977)
3. Francis, F. J. : Lesser-Known food colorants. *Food Technol.*, **4**, 62(1987)
4. Inouye, H. : Chemistry of the constituents of gardenia fruits. *Gendai Toyo Ixaku.*, **4**, 48(1983)
5. Tsukiota, M., Hiroi, T., Suzuki, T. and Konno, T. : Pigment production by mutants of *Monascus anka*. *Nippon Nogekagaku Kaishi.*, **60**, 451(1986)
6. Lee, B. H. and Lee, S. H. : Production of bluish purple pigment from *streptomyces californicus* KS-89. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 147(1994)
7. Suich, I. : Preperation of soluble *Monascus* pigment. *Patent*, **48**, 245(1973)
8. Yu, J. H., Yoo, S. K. and Yang, R. : Extraction of orange yellow pigment from defatted gardenia. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **7**, 30(1975)
9. Larsen, H. : The family halobacteiaceae. *The procar-yote*, **1**, 976(1981)
10. Hiromi, K., Sullivan, C. W. and Hiroaki, S. : Bacterial plasmids in antarctic natural microbial assemblages. *Appl. Env. Microbiol.*, **48**, 515(1984)
11. Krig, N. R. and Holt, J. G. : "Bergey's manual of systematic bacteriology", Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 1, p.140(1984)
12. Chi, Y. E., Lee, B. H., Park, W. Y., Park, B. G. and Ryu, B. H. : Cultural conditions of *Streptomyces californicus* KS-89 for the production of bluish purple pigment. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 201(1990)
13. Kim, H. S., Kim, D. H., Yang, H. S., Pyun, Y. R. and Yu, J. H. : Studies on the red pigment produced by *Monascus* sp. in submerged culture ; Part I. Isolation of strain and cultural conditions of pigment produced. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **7**, 23(1979)
14. Tsuneo, S., Simidu, U. and Taga, N. : Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 43(1979)
15. Kazuyoshi, S., Hagiwara, K. and Shimizu, S. : Effect of cultural conditions on tetrapyrrole formation, especially bacteriochlorophyll formation in a facultative methylotroph, *Protaminobacter ruber*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1(1985)
16. Tsuneo, S., Shioi, Y., Takamiya, K. I., Sutton, D. C. and Wilkinson, C. R. : Distribution and physiology of aerobic bacteria containing bacteriochlorophyll *a* on the east and west coasts of Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 295(1991)
17. Alain, R., Oszmianski, J. and Sapis, J. C. : Determination of carotenoids in fruits of *Rosa* sp. (*Rosa canina* and *Rosa rugosa*) and of chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J. Food Sci.*, **54**, 774(1989)

(1996년 1월 12일 접수)