

## 치자중 호기성 세균에 의해 청색색소로 변환되는 성분의 단리

이동웅\*, 박창훈, 강소임, 민응기<sup>1</sup>, 한영환<sup>1</sup>, 이정규<sup>2</sup>

동국대학교 생화학과, <sup>1</sup>생물학과, <sup>2</sup>경성대학교 약학대학

## Isolation of the Component transformed into Blue Pigments by Aerobic Bacteria in the Fruits of *Gardenia jasminoides*

Dong Ung Lee\*, Chang Hun Park, So Im Kang, Eung Gi Min<sup>1</sup>,  
Yeong Hwan Han<sup>1</sup> and Chung Kyu Lee<sup>2</sup>

Department of Biochemistry; <sup>1</sup>Department of Biology,  
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea; and

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract**—Geniposide, an iridoid glucoside, has been isolated from the butanol fraction of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). The component was found to be transformed into the blue pigments by some aerobic bacteria, suggesting that geniposide is the precursor for the formation of pigments after converting into genipin, an aglycon of geniposide, by  $\beta$ -glucosidase. Some bacteria having a  $\beta$ -glucosidase activity did not form the pigments, which may mean that the formation of pigments can only be occurred by the reaction of any enzyme or compound in the pigment-producing bacteria.

**Key words**—*Gardenia jasminoides*, geniposide, genipin, blue pigment, aerobic bacteria.

치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis, Rubiaceae)는 경기도 이남에 야생하는 상록활엽관목으로서 그 열매를 치자(*Gardeniae Fructus*)라고 하여 한방에서 해열, 토혈, 두통, 소염등의 치료 및 이뇨의 목적으로 사용하여 왔으며 가정에서는 관상용이나 식품의 황색착색료로 이용하고 있다.<sup>1)</sup>

치자의 함유성분으로는 최초로 crocin이 분리되어 구조가 규명되었으며 이 화합물의 식품착색료로서의 안정성이 보고된 이래, 최근의 항산화활성에 관한 연구에 이르기까지 다양한 생리활성이 밝혀졌

다.<sup>2)</sup> Crocin 외에도 치자에는 iridoid glucoside인 geniposide와 gardenoside<sup>3)</sup> 외에도 20종 이상의 각종 성분<sup>4)</sup>이 함유되어 있음이 알려져 있다. 본 연구와 관련된 geniposide는 경구투여시 담즙 분비를 촉진하며 하제로서의 작용이 있음이 보고된 바 있다.<sup>5)</sup> 한편, 천연색소는 동물, 식물 및 미생물에서 얻고 있으나 식물성 색소가 대부분을 차지하고 있으며 적황색계열은 꼭두서니, 울금, 치자 등에서, 청자색계열의 색소는 고구마나 쪽 등의 식물에서 얻고 있다.<sup>6-8)</sup> 그러나 최근 미생물을 이용하여 식물색소를 대량으로 생산하고자하는 시도가 새로운 관심의 대상이 되고 있다. 각종 색소는 식품을 비롯하여

\*교신저자 : Fax 0561-770-2224

의약품, 화장품, 염색공업 등에서 널리 사용되고 있으나 부작용 및 안전성의 문제가 대두되면서 새로운 천연색소에 관한 연구가 주목을 받고 있다. 지금까지 널리 사용되어 온 치자의 황색색소는 주성분인 crocin이며 이는 carotenoid계 물질인 crocetin의 배당체이다. 같은 carotenoid계 색소로서 당근의 성분인  $\beta$ -carotene이 지용성인데 비해 이 화합물은 수용성으로 여러 가지 이점을 가지고 있다. 최근, *Penicillium* 및 *Trichoderma*속 미생물을 이용하여 치자로부터 청색색소를 생산하는 연구보고가 있었으며,<sup>9)</sup> 저자들이 전보<sup>10)</sup>에서 치자의 황색추출물이 호기성 미생물에 의해 청색색소로 변환된다는 사실을 보고한 바 있으나 아직 그 청색색소 생성의 원인이 되는 치자성분에 관한 보고는 없었다. 본 연구에서는 치자의 황색 추출물이 호기성 미생물에 의해 청색으로 변환되는 성분을 분리하여 구조를 동정하였으며  $\beta$ -glucosidase를 사용하여 청색으로 변환되는 경로를 추정하였다.

## 재료 및 방법

**식물재료** - 치자나무의 열매를 동국대학교 한방병원에서 구입하였으며 건조한 후 세절하여 사용하였다.

**기기 및 시약** - 녹는점은 Electrothermal IA 9100을 사용하였으며 보정하지 않았다. 고유광회전도는 Atago Rolax-D를, UV는 UV2001S (Shimadzu)를, FT-IR은 MB100(Bomem)을, 그리고 NMR은 Varian Gemini200(200 MHz) (internal standard:TMS)을 사용하여 측정하였다. 실험에 사용한 모든 용매는 국산특급이며, 대조 실험용  $\beta$ -glucosidase(EC 3.2.1.21, from almonds)는 Sigma제품을 사용하였다.

**균주 및 균주의 배양** - 치자 조추출물에 양성반응을 보인 *Bacillus subtilis* KCTC 1028, *Escherichia coli* KCTC 1039, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 및 *Micrococcus luteus* KCTC 1915 세균은 한국과학기술연구원 생명공학연구소의 유전자은행으로부터 입수하였다. 균주의 배양은 250 ml 삼각 flask에 배양액이 50 ml가 되도록 배지(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl)를 제조하여 멸균한 후, 30°C에서 24시

간 동안 전배양하였다.

**성분단리** - 치자 50 g을 세절하여 methanol 200 ml로 가온하에 2시간 추출하고 농축한 다음, 물을 가하여 현탁시켰다. 이 현탁액을 ethyl acetate 100 ml로 추출한 다음, 수층을 다시 *n*-butanol 100 ml로 추출, 농축하여 butanol분획 4.5 g을 얻었다. 이 분획으로부터 silica gel column chromatography(chloroform-methanol, gradient)법으로 미황색의 결정 0.6 g을 분리하였으며 각종 기기분석을 실시하여 그 구조를 geniposide로 동정하였다. Geniposide:Rf 0.35(chloroform-methanol=3:1), mp. 162~163°C(163~164°C).<sup>2)</sup>  $[\alpha]_D$ : 0°(라세미혼합물). UV(MeOH):  $\lambda_{max}$ (log  $\epsilon$ ) 237 nm(4.01). IR(nujol): 1710  $cm^{-1}$ (ester). <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD+D<sub>2</sub>O)  $\delta$ (ppm): 2.75 (2H, t,  $J=7$  Hz, H-6), 3.11~3.93(6H, m, methine protons and CH<sub>2</sub> of glucose), 3.72(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.30 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10), 4.75(1H, d,  $J=7$ Hz, H-1), 5.18 (1H, d,  $J=7$  Hz, anomeric proton of glucose), 5.82(1H, s, H-7), 7.52(1H, s, H-3).

**Geniposide의 청색색소 변환반응** - Geniposide의 청색색소 변환반응은 LB 한천배지에 전배양된 세균액 100  $\mu$ l를 도말하였다. 준비된 geniposide 용액 40  $\mu$ l를 paper disc(Avantec, thick)에 적신 후, 도말된 한천배지의 중앙에 위치하여 30°C에서 72시간 동안 배양하였다. 액체배지에서의 *B. subtilis* 세균의 청색색소 변환반응은 LB 액체배지에 최종 농도가 1.0%(w/v)가 되도록 geniposide를 첨가하여 72시간 동안 진탕배양(120 rpm)하였다.

**$\beta$ -Glucosidase 활성도 측정** - LB 액체배지를 사용하여 치자 조추출물에 대하여 청색색소 변환반응을 나타낸 *B. subtilis* 및 *E. coli*와 색소반응을 나타내지 않은 *S. aureus* 및 *M. luteus*를 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세균을 원심분리(6,000  $\times$  g, 10 min)하여, 상징액과 pellet으로 분리하였으며, pellet은 potassium phosphate buffer(50 mM, pH 7.0)에 현탁한 후, French press (Cover Co., 15,000 psi  $\times$  3회)로 세포를 파괴하였다. 파괴되지 않은 세균을 제거하기 위하여 재 원심분리한 후, 상징액을 조효소액으로 사용하여  $\beta$ -glucosidase 효소의 활성도를 측정하였다.<sup>11)</sup> 효소

활성 1 unit는 30°C에서 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. 유리된 포도당의 정량은 DNS법<sup>12)</sup>으로, 단백질 농도는 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)를 표준품으로 Bradford 법<sup>13)</sup>을 이용하였다.

**결과 및 고찰**

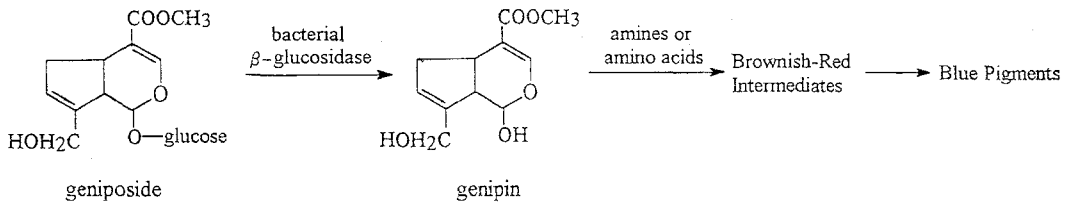
현재까지 보고된 치자 조추출물에 대한 청색색소 변환현상은 진균을 사용한 보고<sup>9)</sup>와 장내 혐기성 세균을 사용한 보고<sup>3,14)</sup>가 있었으며 정 등<sup>15)</sup>은 이 색소 변환 물질이 치자의 주성분인 crocin으로 추정하였다. 저자들은 전보<sup>10)</sup>에서 치자의 조추출물이 호기성 세균에 의해서도 청색색소로 변환된다는 사실을 발견한 바 있다. 이에 따라 본 연구에서는 색소변환의 원인을 추적하고자 먼저 치자중의 색소변환 성분을 단리하였다. 치자의 *n*-butanol분획을 chromatography법으로 단리하여 mp. 162~163°C의 미황색 결정을 얻었으며 기기분석 결과, 이 성분이 iridoid배당체인 geniposide(Fig. 1)임을 동정하였다. 지금까지 geniposide의 색소변환에 관한 보고는 없었으며 최근 geniposide의 분해생성물인 genipin이 암모니아나 아미노산의 존재하에 혐기성 세균에 의해 청색색소로 변환됨이 보고된 바 있

다.<sup>16)</sup> 본 연구에서는 단리한 geniposide를 호기성 세균을 사용하여 색소생성 여부를 관찰한 결과, 이 화합물이 바로 색소를 생성시키는 출발물질임을 확인하였다.

호기성 세균인 *B. subtilis*는 고체 및 액체배지상에서 단리한 geniposide에 대하여 모두 양성의 청색색소 변환반응을 보여 주었다. Salicin과 geniposide가 기질로 주어졌을 때, 각 세균의 배양액 및 세포 파쇄액에서의 β-glucosidase의 비활성은 Table I에서 보는 바와 같다.

Geniposide를 기질로 사용하였을 때의 β-glucosidase 비활성도는 salicin을 기질로 사용하였을 경우, 세포추출액 및 배양액을 사용할 때의 결과와 유사하였다. 이 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 geniposide가 청색색소 변환 양성세균의 β-glucosidase 효소에 의하여 genipin으로 변환된 후,<sup>16)</sup> 계속적으로 아미노산의 존재하에 청색색소로 변환되는 것으로 추정된다.<sup>17)</sup>

Geniposide자체는 담즙분비촉진작용이 없으나 경구투여시 장내세균이 보유하고 있는 β-glucosidase에 의해 가수분해되어 활성형의 genipin으로 변환 다음, 비로소 작용을 나타내는 것으로 보고되어 있으므로<sup>3)</sup> 치자의 조추출물이 미생물에 의해 청색색소를 생성하는 과정의 첫단계는 치자중의



**Fig. 1.** Metabolic pathway of geniposide by bacterial β-glucosidase. Any enzyme may also be involved in the reaction step from genipin to the pigments.

**Table I.** Blue pigmentation and specific activity of β-glucosidase using crude extract and the isolated geniposide from the fruits of *Gardenia jasminoides*

Content	Blue pigmentation		Specific activity of β-glucosidase (Unit/mg · protein)			
	Crude extract	Geniposide	Salicin		Geniposide	
			Supernatant	Cell extract	Supernatant	Cell extract
<i>B. subtilis</i> KCTC1028	+	+	101.9	7.4	86.1	9.7
<i>E. coli</i> KCTC1039	+	+/-	67.2	5.1	131.3	7.0
<i>S. aureus</i> KCTC1916	-	-	111.6	26.6	139.6	34.6
<i>M. luteus</i> KCTC1915	-	-	31.0	16.7	37.3	30.3

\*Strains of Gene Bank of KIST.

geniposide가 genipin으로 가수분해되는 반응을 암시한다. 최근, genipin이 청색색소로 변환되기 전에 적갈색의 중간체 색소가 생성된다는 새로운 보고가 있으며<sup>18)</sup> 본 연구에서도 geniposide를 기질로 사용하였을 때 이러한 중간체 색소의 존재를 확인하였다.

한편,  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 *S. aureus* 및 *M. luteus*에서 geniposide 첨가시 청색색소 변환반응이 관찰되지 않았다. 이러한 실험결과는  $\beta$ -glucosidase활성을 가진 세균에서 geniposide가 우선 genipin으로 변환 다음, 청색색소를 생성하는 세균에 존재하는 어떠한 효소나 화합물에 의해 genipin이 다시 청색색소로 변환되는 것으로 추정할 수 있다. 앞으로 genipin으로부터 청색색소로 바뀌는 과정에 관여하는 효소나 화합물에 관한 연구뿐만 아니라 생성된 색소의 응용가능성을 탐지하기 위하여 색소의 구조가 규명되어야 할 것이다.

## 결 론

치자(*Gardeniae Fructus*)의 추출물로부터 호기성 세균에 의해 청색색소로 변환되는 화합물을 분리하여 geniposide로 동정하였다. Geniposide가 색소로 변환되기 위해서는 먼저 세균의  $\beta$ -glucosidase에 의해 genipin으로 가수분해되어야 하며 genipin을 청색색소로 변환하는 효소나 화합물을 가지고 있는 세균에 의해 색소생성이 이루어지는 것으로 추정된다. 따라서 이들 효소나 화합물 및 색소의 구조 규명에 대한 지속적인 연구가 요망된다.

## 사 사

본 연구는 1997년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-97-3445)에 의해 수행되었기에 이에 감사한다.

## 인용문헌

- Lee, C. H. (1985) Illustrated flora of Korea. 향문사; 약품식물학회 (1980) 약품식물학각론, 진명출판사.
- Han, Y. N., Oh, H. K., Hwang, K. H. and Lee, M. S. (1994) Antioxidant components of *Gardenia* fruit. *Kor. J. Pharmacogn.* 25: 226-232.
- Kawata, Y., Hattori, M., Akao, T., Kobashi, K. and Namba, T. (1991) Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta Med.* 57: 536-542.
- 서울대학교 천연물과학연구소 (1996). 전통동양약물데이터베이스.
- Harada, M., Tenmyo, N., Aburada, M. and Endo, T. (1974) Pharmacological studies of *Gardeniae fructus*. I. Effects of geniposide and genipin on the biliary excretion, the gastric juice secretion, and the gastric contraction, and other pharmacological actions. *Yakugaku Zasshi* 94: 157-162.
- Bae, S. J., Kim, K. H., Kim, B. W. and Kim, Y. H. (1995) Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* strain A80 producing water-soluble blue pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 43-46.
- Yang, I. Y. and Hwang, S. O. (1995) Isolation and identification of *Serratia marcescens* strain US50-3 producing water-soluble pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 777-780.
- Ju, J. Y., Nam, H. W., Yoon, J. C. and Shin C. S. (1994) Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 85-91.
- 양광자, 진기봉. (1987) 치자열매로부터 청색계 색소를 제조하는 방법. 공개특허공보 공개번호 87-5085.
- Min, E. G., Ham, J. H. and Han, Y. H. (1997) Microbial transformation of yellow pigment extracted from seeds of *Gardenia jasminoides* into blue pigment. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 12: 550-553.
- Tokao, S., Kamagata, Y. and Sasaki. (1985) Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93: 217-222.
- Horichi, K. (1984) Cellulase of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 774-779.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Yang, T., Akao, T. and Kobashi, K. (1995) Purification and characterization of a geniposide-

- hydrolizing  $\beta$ -glucosidase from *Eubacterium* sp. A-44, strict anaerobic from human feces. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1175-1178.
15. 정상인, 최철순, 양용태. (1982) 치자(*Fructose gar-deniae*) 수용성 추출액 첨가 배지에서서의 각종 세균의 crocin 반응. *중앙의대지* 7: 301-307.
  16. Akao, T., Kobashi, K. and Aburada, M. (1994) Enzymic studies on the animal intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 1573-1576.
  17. Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T. and Inouye H. (1994) Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanism of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 1571-1578.
  18. Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shingu, T., Yokoi, T. and Inouye H. (1994) Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments leading to the blue pigments. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 668-673.

(1998년 6월 8일 접수)