

치자황색소로부터 변환된 색소의 특성

정형석 · 박근형
전남대학교 식품공학과

Characteristics of the Conversion Pigment from *Gardenia jasminoides* Yellow Pigment

Hyung-Seok Jeong and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

Conversion of *Gardenia jasminoides* yellow pigment into blue-green pigment by 8 bacterial species was examined. Bioconversion pattern can be categorized into three types according to absorption spectra characteristics. The same pattern of the value of ΔE estimated by color differencemeter was also observed. Conversion rate by *S. epidermidis* was faster than other bacterial species. It took 16 hour for *S. epidermidis* to convert pigment at 37°C. *Gardenia jasminoides* yellow pigment and conversion pigment were completely separated by Amberlite XAD column chromatography with H₂O-MeOH solvent system. Storage stability of the conversion pigment was better than *Gardenia jasminoides* yellow pigment.

Key words: *Gardenia jasminoides* yellow pigment, bioconversion, absorption spectra, Amberlite XAD, stability

서 론

예로부터 식물에서 얻어진 각종색소가 식용색소 및 염료로 이용되어 왔으나 근대에 와서 값싸고 안정한 합성색소로 대체되고 있는 실정이다⁽¹⁾. 그러나 인공합성색소의 독성과 발암성의 문제가 제기됨에 따라 다양한 천연색소의 개발이 요구되고 있다⁽²⁾.

치자황색소는 꼭두서니과에 속하는 상록활엽관목인 치자나무의 열매에서 얻어지는 색소^(3,4)로 carotenoid계 색소인 crocin이 주성분^(5,6)으로 알려져 있다. 치자황색소는 식용 및 염료로 오래 이용되어온 천연 색소이자 또한 수용성색소이어서 치자황색소는 중요한 색소소재가 될 수 있어 보다 다양한 이용방법의 개발이 필요하다. 여기에 저자들은 치자색소의 이용방법을 검토하던 중 일부 미생물이 치자황색소를 청녹계색소로 변환능이 있음을 보고 한 바 있다^(7,8). 본 연구에서는 색소변환과정을 분광학적으로 조사하여 미생물에 따른 변환특성을 파악하고자 하였으며, 아울러 변환된 색소의 분리방법과 변환된 색소의 저장안

정성에 대한 정보를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

치자황색소의 제조

치자(*Gardenia jasminoides*)의 열매는 전라남도 보성군 회천면에서 채취하여, 음건하여 마쇄한 후, *n*-hexane으로 세척한 다음, EtOH로 황색소를 추출하고, 이 추출액을 진공농축기(EYELA TYPE N-N)로 37°C에서 용매를 제거한 후, 증류수로 추출하고, freeze dryer (Edward EF4)로 동결건조하여 분말형태로 치자황색소를 제조하였다.

미생물에 의한 색소의 변환

색소변환용 미생물은 Gram 양성세균 5종(*Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538)과 Gram 음성세균 3종(*Vivrio vulnificus* CDC C7184, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430)을 사용하였다. 배지는 *L. plantarum*은 MRS배지(Difco), *V. vulnificus*은

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Kwangju 500-757, Korea

LB배지(Difco), *S. mutans*는 BHI배지(Difco), 그밖의 세균은 Nutrient배지(Difco)를 사용하여, *L. plantarium*, *V. vulnificus*, *B. subtilis* 등은 30°C, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *S. aureus* 등은 37°C에서 진탕 혹은 정치배양하였다.

액체배지에 의한 색소변환은 121°C에서 15분간 가압살균한 배지 20 mL에 0.1% (v/v)농도의 균주를 접종하고 shaking incubator (140 rpm)로 6시간 배양한 후, 황색소를 배지량의 0.25% (w/v)씩 첨가하고 진탕 배양하였다. 고체배지에 의한 색소변환은 같은 방법으로 균주를 접종하여 6시간 배양한 후, 황색소를 배지량의 0.25% (w/v)씩 첨가하고 정치배양하였다.

Spectrophotometer에 의한 경시적인 색소변환 측정 각 균주에 의해 배양된 배양액을 121°C에서 5분간 살균하고, 원심분리기(BECKMAN J2-21)로 25분간(9, 820×g) 원심분리하여, 얻어진 상등액을 spectrophotometer (Jasco V-550)를 사용하여 350~750 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

색차계에 의한 경시적인 색조의 변환 측정

고체배지에 의해 변환된 색소를 121°C에서 5분간 가압살균하고, 냉각한후 homogenizer (NISSEI AM-7)로 80% EtOH과 함께 마쇄하고 100 mL로 정용하고, 같은 방법으로 원심분리하여, 얻어진 상등액을 색차계(HunterLab,USA)로 측정하여 ΔE 로 표시하였는데 $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ 로 계산 하였다⁽⁹⁾.

Amberlite XAD column chromatography

Amberlite XAD-4 (Sigma, 20-60 mesh)를 MeOH, acetone, H₂O 순으로 세정하고, 감압탈기 시킨후 column에 충전하였으며⁽¹⁰⁾, 용출용매는 H₂O-MeOH 용매계로 10% 씩 MeOH의 농도를 증가시킨 step-wise 용출 방법으로 색소액을 용출하였다.

색소의 저장안정성 실험

치자황색소와 *S. epidermidis*에 의해 변환된 색소를 Amberlite XAD-4 column chromatography로 정제한 다음, cap test tube (직경 20 mm, 40 mL)에 넣고 변환된 색소의 광 및 온도에 대한 저장안정성을 김 등⁽⁹⁾의 방법으로 조사하였다. 광의 영향은 실온에서 일광에 노출시킨 균과 암실에 저장하는 균으로 나누었으며, 온도의 영향은 실온(20~30°C), 40°C, 60°C의 암실에 색소를 보관하면서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도값의 변화를 경시적으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

치자황색소로부터 변환된 색소의 분광학적인 성질

미생물에 의해 변환되는 색소의 분광학적 성질을 경시적으로 추적하면 색소의 변환형태가 Fig. 1-3과 같이 3군으로 나뉘어진다.

*L. plantarium*에 의한 치자황색소의 변환에 따른 흡광도의 변화를 경시적으로 관찰하면 치자황색소유래의 흡수극대값인 438 nm의 흡광도는 작아지면서 588 nm대의 새로운 흡수극대가 발생하면서 배양시간이 경과함에 따라 흡광도가 증가하는 형태를 보여준다. 이와 유사한 경향을 보이는 균주는 *V. vulnificus*가 있었고, 이들 미생물에 의해 변환된 색소의 색상은 청색을 나타냈다.

Fig. 2는 *P. aeruginosa*에 의한 치자황색소의 변환에 따른 흡광도값의 변화를 경시적으로 관찰한 것이다. 이 균주에 의한 변환은 588 nm의 새로운 흡수극대가 나타나며 흡광도는 배양시간이 경과함에 따라 증대되며, 치자황색소유래의 438 nm대의 흡광도는 배양시간이 경과와 함께 약간 감소하나 존재하는 형태를 보여

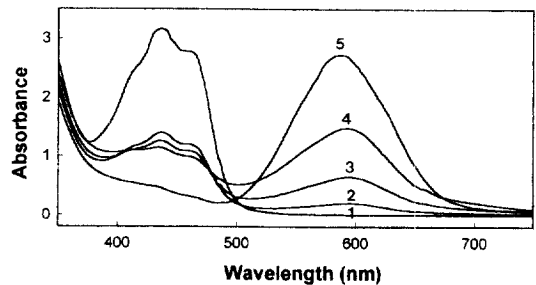


Fig. 1. Visible absorption spectra of *Gardenia jasminoides* yellow pigment during incubation with *Lactobacillus plantarum*. Incubation time: 1 (0 hr), 2 (12 hr), 3 (24 hr), 4 (48 hr), 5 (96 hr)

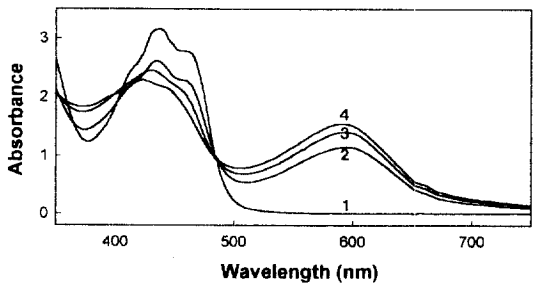


Fig. 2. Visible absorption spectra of *Gardenia jasminoides* yellow pigment during incubation with *Pseudomonas aeruginosa*. Incubation time: 1 (0 hr), 2 (24 hr), 3 (48 hr), 4 (96 hr)

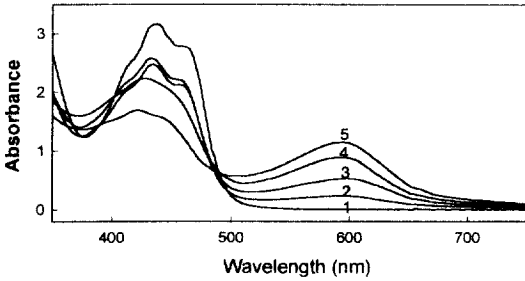


Fig. 3. Visible absorption spectra of *Gardenia jasminoides* yellow pigment during incubation with *Staphylococcus epidermidis*. Incubation time: 1 (0 hr), 2 (4 hr), 3 (8 hr), 4 (12 hr), 5 (16 hr)

준다. 이와 유사한 경향을 보이는 균주는 *S. mutans*, *B. subtilis* 등이 있었고, 이들 미생물에 의해 변환된 색소의 색상은 녹색을 나타냈다.

Fig. 3은 *S. epidermidis*에 의한 치자황색소의 변환에 따른 흡광도의 변화를 경시적으로 관찰한 것으로 치자황색소의 438 nm의 흡수극대의 흡광도값이 크게 감소하면서 418 nm대의 새로운 흡수극대로 blue shift 현상을 보이면서, 588 nm의 흡수극대가 생성되는 형태를 보여 주었는데, 이와 유사한 경향을 보이는 균주는 *S. typhimurium*, *S. aureus* 등이 있었고, 이들 미생물에 의해 변환된 색소의 색상은 청녹색을 나타냈다.

각균주에 의해 치자황색소의 변환과정을 색차계에 의해 측정된 ΔE값의 변화를 Fig. 4에 나타냈다. 변환된 색소가 녹색을 띠는 *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *B. subtilis* 등에 의한 변환 유사한 변화양상을 보였으나, 청녹색을 나타내는 *S. epidermidis*와 청색을 띠는 *L. plantarum*에 의한 변환은 다른변환양상을 보여 색조의 변환도 3군으로 나뉘는 양상을 보여주었다.

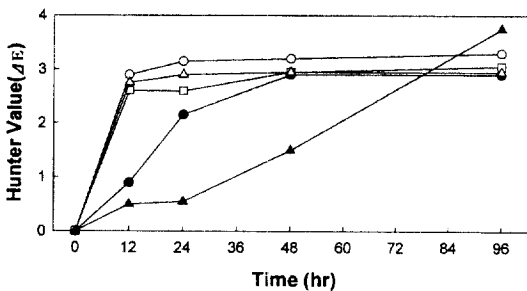


Fig. 4. Changes of Hunter visible of *Gardenia jasminoides* yellow pigment during incubation with microorganisms. ○—○: *P. aeruginosa*, △—△: *S. mutans*, □—□: *B. subtilis*, ●—●: *S. epidermidis*, ▲—▲: *L. plantarum*.

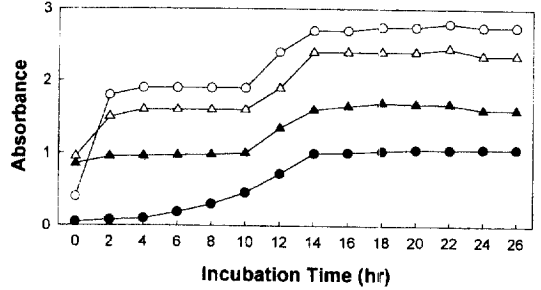


Fig. 5. Absorbance changes of *Gardenia jasminoides* yellow pigment during incubation with *Staphylococcus epidermidis*. ○—○: 418 nm, △—△: 438 nm, ▲—▲: 458 nm, ●—●: 588 nm

변환속도가 빠른 균주의 선발

균주에 따라 청녹계색소로의 변환속도에 차이를 나타냈다. 검토된 8종의 미생물중 *S. epidermidis*는 다른 균주에 비해 변환속도가 빠름을 보여, *S. epidermidis*에 의한 변환양상을 추적하고자 치자황색소유래의 438, 458 nm의 흡수극대 그리고, 변환과정에서 발생하는 588과 418 nm의 흡수극대의 흡광도를 2시간 간격으로 측정하여 Fig. 5에 나타냈다. 색소의 변환은 배양과 함께 진행되어 배양 14시간까지 거의 직선적으로 증가하였으며 배양후 16시간 이후에는 588 nm 및 418 nm의 흡수극대값의 변화가 일정하여 *S. epidermidis*는 배양 16시간에 색소의 변환이 완성됨을 보여주어, 변환속도가 빠른 균주로 *S. epidermidis*를 선발할 수 있었다.

Amberlite XAD column chromatography에 의한 용출양상

Amberlite XAD-4 column에 의한 치자황색소와 변환된 색소의 용출양상을 Fig. 6에 나타냈다. 588 nm와

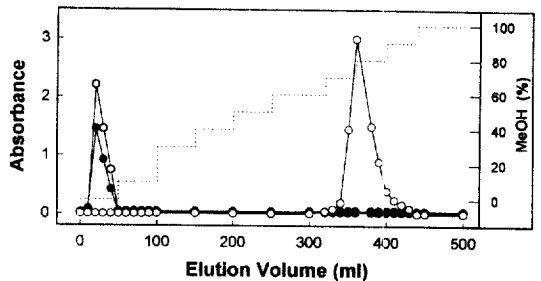


Fig. 6. Column chromatogram of *Gardenia jasminoides* yellow pigment and conversion pigment with *Staphylococcus epidermidis*. column: Amberlite XAD-4 (3.0×45 cm). ○—○: 438 nm, ●—●: 588 nm

438 nm의 흡수를 갖는 변환된 색소는 용출용매가 0% MeOH (H₂O)에서 용출되어지나, 588 nm의 흡수는 없고 438 nm의 흡수를 갖는 황색소는 70~90%의 MeOH 용매에 색소가 용출된다. 따라서 Amberlite XAD-4 column chromatography에 의해 두색소를 완전히 분리 (baseline separation)할 수 있어 배양중의 치자황색소와 변환된 색소의 분리 정제에 Amberlite XAD-4 column chromatography가 좋은 수단이 될 것으로 기대된다.

치자황색소와 *S. epidermidis*에 의해 변환된 색소의 저장안정성

Fig. 7은 두색소의 광에 의한 영향을 조사한 것으로, 치자황색소와 변환된 색소 모두 암조건에 비해 일광에 노출된 조건에서 안정성이 떨어졌다. 그러나, 변환

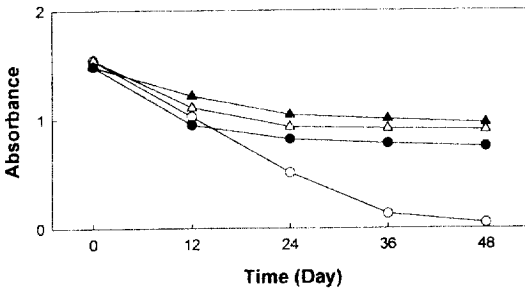


Fig. 7. Effect of light sources on discoloration of *Gardenia jasminoides* yellow pigment and conversion pigment with *Staphylococcus epidermidis*. ○—○: yellow pigment (light, 438 nm), △—△: yellow pigment (dark, 438 nm), ●—●: conversion pigment (light, 588 nm), ▲—▲: conversion pigment (dark, 588 nm)

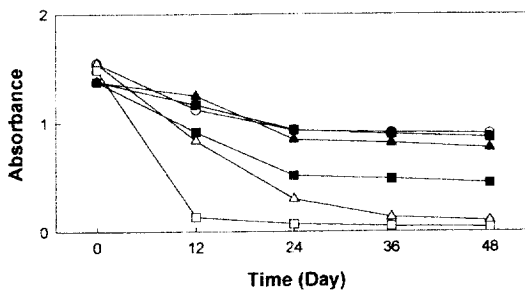


Fig. 8. Effect of storage temperature on discoloration of *Gardenia jasminoides* yellow pigment and conversion pigment with *Staphylococcus epidermidis*. ○—○: yellow pigment (room temp., 438 nm), ●—●: conversion pigment (room temp., 588 nm), △—△: yellow pigment (40°C, 438 nm), ▲—▲: conversion pigment (40°C, 588 nm), □—□: yellow pigment (60°C, 438 nm), ■—■: conversion pigment (60°C, 588 nm)

된 색소는 48일 경과시에도 안정성이 유지되어, 48일 경과시 대부분 변색되어버린 치자황색소보다 일광에 대한 안정성이 있음을 보여주었다.

Fig. 8은 두색소의 열에 의한 영향을 조사한 것으로, 온도가 높을수록 특히 40°C 이상의 온도는 색소변색에 크게 영향을 주었으나, 실온에서는 색소변화가 작았다. 변환된색소는 40°C와 60°C 저장구 모두 변색의 정도가 치자황색소에 비하여 완만하고, 오랫동안 색상을 유지함을 보여 열에 보다 안정함을 보여 주었다.

요 약

치자의 황색소를 *L. plantalium*, *V. vulnificus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *S. aureus* 등 8종의 균주의 배지에 첨가하고 배양하면 청녹색계 색소로 변환된다. 미생물에 의해 변환된 색소의 분광학적 성질을 경시적으로 추적하면 색소의 변환형태는 3군으로 나뉘어지며, 색차계로 측정된 ΔE 값의 변환형태도 그러하였다. 청녹색계색소로의 변환속도는 균주에 따라 차이를 보였는데 8종의 미생물중 *S. epidermidis*는 가장 빨리 배양 16시간에 색소변환이 완성되었다. 치자황색소와 변환된 색소는 H₂O-MeOH 용매계에 의한 Amberlite XAD-4 column chromatography에 의해 완전히 분리되었으며, 광과 열에 대한 저장안정성은 치자황색소보다 변환된 색소가 보다 안정함을 나타냈다.

감사의 글

이 연구는 목포대학교 식품산업연구센터를 통한 한국과학재단지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Zollinger, H: Color Chemistry, 2nd. Ed., VCH, Weinheim (1991)
- Yoon, J.M., Cho, M.H. and Hahn, T.R.: Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety as natural food colorants (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 211-217 (1997)
- Lee, T.B.: Illustrated Flora of Korea. p.694 (1992)
- Yu, J.H., Hong, Y.M., Yoo, S.K. and Kim, Y.S.: Studies on the extraction of natural compounds from plants and microorganism (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **6**, 1-5 (1974)
- Herdry, G.A.F and Houghton: Natural Food Colorants. Avi, New York, p.249 (1992)

6. 谷村顯雄, 片山 脩, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司: 天然着色料ハンドブック. 光琳, 東京, p.212 (1985)
 7. Jeong, H.S., Kim, S.J. and Park, K.H.: Bioconversion of *Gardenia jasminoides* yellow pigment into blue pigment by microorganisms. Abstract of 58th Korean Food Sci. Technol. Conference, p.164 (1997)
 8. Jeong, H.S., Kim, S.J. and Park, K.H.: Bioconversion of *Gardenia jasminoides* yellow pigment by microorganisms. Abstract of '97 Agricultural Biotechnology Symposium, p.129, The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture (1997)
 9. Kim, S.J. and Park, K.H.: Studies on the storage stability of Jindo Hongju pigment (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**, 183-186 (1992)
 10. Kim, J.S., Lee, Y.W., Ohh, S.H. and Yi, Y.K.: Isolation and identification of antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* (in Korean). *Korean J. Plant Pathol.*, **7**, 169-175 (1991)
-

(1998년 2월 7일 접수)