

## *Staphylococcus epidermidis*와 *Lactobacillus plantarum*에 의한 치자황색소의 변환양상

정형석 · 박근형  
전남대학교 식품공학과

### Conversion Patterns of Yellow Pigment from *Gardenia jasminoides* by *Staphylococcus epidermidis* and *Lactobacillus plantarum*

Hyung-Seok Jeong and Keun-Hyung Park  
Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

#### Abstract

The *Gardenia jasminoides* yellow pigment and converted pigments were completely separated by Amberlite XAD-4 column chromatography. These pigments were gel filtrated on Sephadex LH-20 column chromatography. The characteristics of absorption spectra of eluate and fractionated pigments were investigated. The pigment converted by *Lactobacillus plantarum* showed a single blue color with an absorption peak at 588 nm and its molecular size was bigger than that of crocetin. The pigment, converted by *Staphylococcus epidermidis*, showed blue-green color, which was composed of yellow color with an absorption peak at 418 nm and blue color at 588 nm. Molecular size of the yellow pigment was smaller than crocetin and that of blue color.

Key words : *Gardenia jasminoides* yellow pigment, conversion, gel filtration, *S. epidermidis*, *L. plantarum*

#### 서 론

예로부터 식용색소나 염료로 사용되어오던 색소들은 자연에서 얻을 수 있는 천연의 색소들을 이용하여 왔으며, 이 색소들은 주로 식물에서 얻을 수 있었다<sup>(1,4)</sup>. 그러나 근래에 와서 합성색소가 널리 이용되고 있는 실정이나, 안정성에 문제가 제기됨에 따라 국내외에서 미생물자원 및 식물에서 천연색소의 개발이 진행되고 있다.<sup>(5-10)</sup>

치자황색소는 꼭두서니과에 속하는 치자나무의 열매에서 얻어지는 천연색소로 carotinoide계 색소인 crocetin이 주성분으로 알려진 황색소이다<sup>(11-13)</sup>. 치자황색소는 수용성 색소로 식용 및 염료로 오랫동안 이용되어온 안전한 색소이며, 색소소재로의 가치가 증대되고 있다. 이에 저자들은 치자색소의 다양한 이용방법을 검토하던중 일부미생물이 치자황색소를 청녹계색소로 변환시키는 능력이 있으며<sup>(14-16)</sup>, 미생물에 의해 변환된 색소의 저장안정성과 안정성에 영향을 미치는 요인에 대하여 보고 하였다<sup>(17)</sup>. 이러한 일련의 연구에서 치자황

색소의 미생물에 의한 변환양상은 변환능력이 있는 미생물과 변환능력이 없는 미생물로 구분되어지며, 변환능력이 있는 미생물에 의한 변환도 청색조로 변환시키는 미생물과 청녹색조로 변환되는 미생물이 있는 흥미로운 현상이 관찰되었다<sup>(16)</sup>.

본 연구에서는 청녹계색소를 생성하는 균주로 확인된 *Staphylococcus epidermidis*와 청색색소를 생성하는 것으로 확인된 *Lactobacillus plantarum*의 두종의 미생물<sup>(16)</sup>을 대상으로, 이 두 미생물에 의해 변환된 색소의 조성을 검토하여 변환된 색소의 색조차이를 규명하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 치자황색소의 제조

치자의 열매는 전라남도 보성군 회천면에서 채취하여, 음건한 후, *n*-hexane으로 세척한 다음, ethanol로 황색소를 추출하고, 이 추출액을 진공농축기(Eyela Type N-N, Tokyo, Japan)로 37°C에서 용매를 제거한 후 H<sub>2</sub>O 가용획분을 freeze dryer (Edwards EF4, Edwards, England)로 동결건조하여 분말형태의 치자황색소를 제조하여 사용하였다<sup>(16,17)</sup>.

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

미생물에 의한 색소의 변환

미생물은 *Staphylococcus epidermidis*(ATCC 12228)와 *Lactobacillus plantarum* (KCTC 3104)를 사용하였다. *S. epidermidis*는 Nutrient 배지(Difco, Detroit, MI, U.S.A.)에서 배양온도 36°C로 그리고, *L. plantarum*은 MRS 배지(Difco) 배양온도 30°C로 각각 배양하였다.

색소변환은 정 등<sup>(16,17)</sup>의 방법으로 121°C에서 15분간 가압살균한 각각의 배지 20 mL당 0.1%(v/v) 농도의 균주를 접종하고 shake incubator (150 rpm)로 *S. epidermidis*는 36°C에서, *L. plantarum*은 30°C에서 각각 6시간 배양한 후, 121°C에서 15분간 가압살균한 치자황색소를 배지량의 0.25%(w/v) 첨가한 후, 다시 *S. epidermidis*는 36°C에서 18시간, *L. plantarum*은 30°C에서 96시간 진탕배양하여 얻어진 변환된 색소 배양액을 121°C에서 5분간 살균하고, 원심분리기(Beckman J2-21, Fullerton, CA, U.S.A.)로 25분간 원심분리(9,820 ×g)하여 얻어진 상정액을 취하여 변환된 색소용액을 얻었다.

Column chromatography 및 분광학적 분석

Amberlite XAD-4 column chromatography는 김 등<sup>(18)</sup>과 정 등<sup>(16,17)</sup>의 방법으로 Amberlite XAD-4 (20-60 mesh, Sigma, St. Louis, MA, U.S.A.)를 methanol, acetone, H<sub>2</sub>O순으로 세정하고, 감압탈기 시킨후 column에 충전하였으며, 용출용매는 H<sub>2</sub>O-methanol 용매제로 10%씩 methanol의 농도를 증가시킨 step-wise 용출법으로 치자황색소와 변환된 색소를 분리 하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography는 박 등<sup>(19,20)</sup>과 조 등<sup>(21)</sup>의 방법에 따라 Sephadex LH-20 (25-100 μ, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 70% methanol로 하룻밤 팽윤시킨 후 column (2.0×90 cm, total volumn 250 mL)에 충전하고 동결건조된 각색소들을 동용매제로 주입하고 용출 분획하였다.

색소들의 분광학적 성질은 spectrophotometer (Jasco V-550, Tokyo, Japan)를 사용하여 Amberlite XAD-4 column chromatography에서 분리된 색소는 이동상과 같은 용매제로, Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 색소는 70% methanol 용매로 가시영역인 380~780 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Amberlite column에 의해 분리 정제된 색소의 분광학적 성질

치자황색소와 미생물에 의해 변환된 색소를 분리하

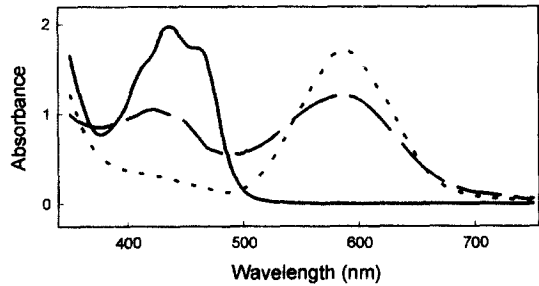


Fig. 1. Visible absorption spectra of the purified pigment by Amberlite XAD-4 column chromatography. — : *Gardenia jasminoides* yellow pigment(70% methanol), --- : converted pigment by *L. plantarum*(H<sub>2</sub>O), - · - : converted pigment by *S. epidermidis*(H<sub>2</sub>O).

기 위하여 H<sub>2</sub>O-methanol 용매제의 Amberlite XAD-4 column chromatography를 실시 하였다. 치자황색소는 70~80% methanol 용매로 용출되나 변환된 색소는 100% H<sub>2</sub>O 용매제에서 용출되어 완전히 분리할 수 있었다<sup>(16)</sup>. Amberlite XAD-4 column chromatography에 의해 분리 정제된 치자황색소와 두종의 미생물에 의해 변환된 색소의 분광학적 특성은 Fig. 1과 같다.

치자황색소는 438 nm와 458 nm에서 흡수극대를 갖는 치자황색소의 전형적인 흡수 spectra를 보여 주며<sup>(11-13)</sup>, 색조는 황색을 띤다.

*L. plantarum*에 의해 변환된 색소는 치자황색소의 400~500 nm대의 흡수극대는 관측되지 않고 588 nm에서만 흡수극대를 갖는 spectra를 보여주며, 색조는 청색을 띤다.

*S. epidermidis*에 의해 변환된 색소는 418 nm와 588 nm에 흡수극대가 관측되어 황색조를 띠는 400~500 nm대의 색소와 청색조를 띠는 588 nm대의 색소가 혼재되어 있어, 청녹색을 띤 것으로 추정된다.

즉, 두 미생물에 의해 변환된 색소는 치자황색소와는 극성의 차이가 있으며, 전혀 다른 분광학적 성질을 가지고 있었다. 또, 변환된 색소는 미생물에 따라 서로 다른 분광학적 성질과 색조를 보여주었다.

변환된색소의 gel filtration 양상

Amberlite XAD-4 column chromatography에 의해 분리된 색소들의 분자크기와조성에 대한 정보를 얻고자 Sephadex LH-20 column을 이용한 gel filtration을 실시하였다. Amberlite XAD-4 column chromatography에 의해 정제된 치자황색소는 Fig. 2에 나타난 바와 같이, 438 nm의 흡수를 갖는 물질은 bed volume에 대한 elution volume의 비(Ve/Vt)가 0.67~0.70의 위치에서

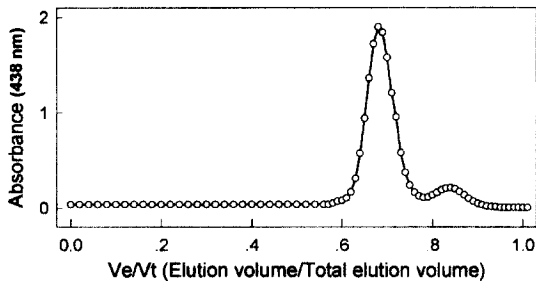


Fig. 2. Elution profile of *Gardenia jasminoides* pigment by Sephadex LH-20 column chromatography.

단일 peak로 관측되었다. 이 물질은 Fig. 1에 제시한 바와 같이 가시영역에서 438, 458 nm의 흡수극대를 갖는 crocetin의 전형적인 흡수 spectra를 보이며, Sephadex LH-20 column의 gel filtration에 의한 Ve/Vt 값과 이 column에 의해 용출된 물질들의 Ve/Vt값<sup>(19,21)</sup>을 비교할 때, 이 황색소는 분자량이 300~400의 물질로 추정되어, 328의 분자량<sup>(22)</sup>(C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>)을 갖는 crocetin임을 알 수 있었다.

*L. plantarum*에 의해 변환되고, Amberlite XAD-4 column에 의해 분리된 색소의 Sephadex LH-20 column에 의한 용출양상을 Fig. 3A에 나타냈다. 588 nm와 418 nm를 모니터한 결과, Ve/Vt 0.34~0.40의 용출위치에 단일 peak만 관측되었다. 즉, 이 미생물에 변환된 청색조의 색소는 단일 색소로 구성되어 있으며, 이 색소의 분자량은 치자황색소의 주성분인 crocetin보다 훨씬 큰 물질임을 알 수 있었다.

*S. epidermidis*에 의해 변환되고 Amberlite XAD-4 column에 의해 분리된 색소의 Sephadex LH-20 column에 의한 용출양상을 Fig. 3B에 나타냈다. 418 nm와 588 nm를 모니터 한 결과, Ve/Vt 0.34~0.40의 용출위치와 Ve/Vt 0.76~0.78의 용출위치에 peak를 보여 분자의 크기가 다른 두종의 색소가 존재함을 알 수 있었다. Ve/Vt 0.34~0.40의 peak는 588 nm와 418 nm에 모두 흡수를 보이고 특히 588 nm에 큰 흡수를 보였다. 또, 이 peak의 색소는 청색을 띠고 있어 *L. plantarum*에 의해 변환된 색소와 분자의 크기, 색조가 일치하였다.

Ve/Vt 0.76~0.78의 peak는 용출위치로 보아 crocetin보다 작은 분자크기를 갖는 물질이며 선명한 황색을 띠었다. 즉, *S. epidermidis*에 의해 변환된 색소는 청색을 띠는 색소와 황색을 띠는 crocetin이 아닌 두종의 색소가 혼재하여 청녹색을 띠는 것임을 확인할 수 있었다.

분리된 색소의 분광학적 성질

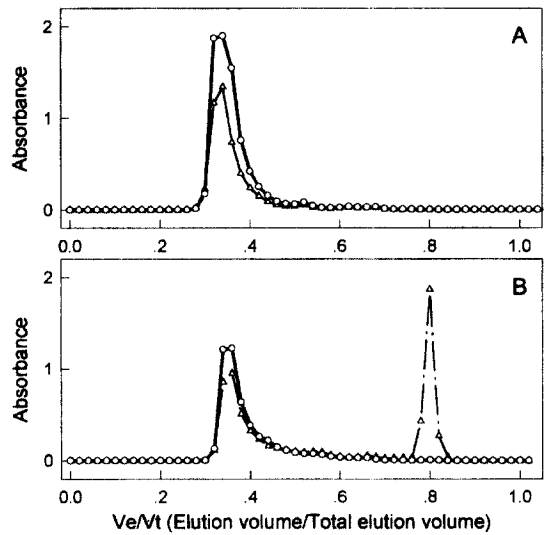


Fig. 3. Elution profiles of converted pigment with *L. plantarum*(A) and *S. epidermidis*(B) by Sephadex LH-20 column chromatography.  $\triangle - \triangle$ : absorbance at 418 nm,  $\circ - \circ$ : absorbance at 588 nm.

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 4종 색소의 분광학적 성질을 동일한 용매(70% methanol)로 측정한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 즉, 두종의 미생물에서 변환된 Sephadex LH-20의 Ve/Vt 0.34~0.40 용출위치에서 분리된 색소는 588 nm에 흡수극대만 갖는 거의 유사한 spectra를 나타냈다. 그리고 *S. epidermidis*에 의해 변환된 Sephadex LH-20의 Ve/Vt 0.76~0.80의 용출위치에서 분리된 황색소는 선명한 황색을 띠며, 438 nm, 462 nm에 흡수극대를 갖는 crocetin보다 blue shift된 418 nm와 442 nm에서 흡수를 갖는 전혀 다른 분광학적 성질을 나타냈다.

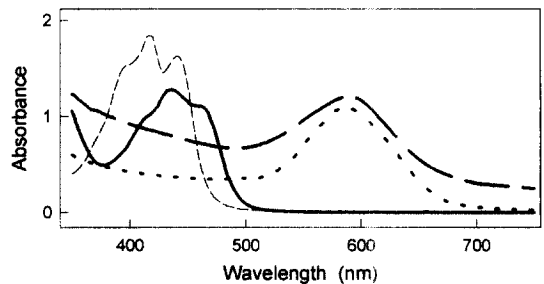


Fig. 4. Visible absorption spectra of separated pigment by Sephadex LH-20 column chromatography. — : *Gardenia jasminoides* yellow pigment(Ve/Vt 0.67-0.70), --- : converted pigment by *S. epidermidis*(Ve/Vt 0.34-0.40), - · - : converted pigment by *S. epidermidis*(Ve/Vt 0.76-0.78), · · · : converted pigment by *L. plantarum*(Ve/Vt 0.34-0.40).

요 약

치자황색소로부터 미생물에 의해 변환된 색소의 색조차이를 규명하고자 *L. plantarum*과 *S. epidermidis*에 의해 변환된 색소를 Amberlite XAD-4 column chromatography로 정제 한 다음 Sephadex LH-20 column의 gel filtration 용출양상과 분리된 색소의 분광학적 특성을 조사 하였다. *L. plantarum*에 의해 변환된 색소는 crocetin보다 큰 분자크기를 갖고 588 nm에서 흡수극대를 갖는 단일의 청색소를 생성하며, *S. epidermidis*에 의해 변환된 색소는 *L. plantarum*에 의해 생성되는 588 nm에 흡수극대를 갖는 청색소와 함께 crocetin 보다 작은 분자크기와, 418 nm에서 흡수극대를 갖는 황색소를 동시에 생성함으로써 청녹색을 띠는 것임이 밝혀졌다.

감사의 글

이 연구는 목포대학교 식품산업연구센터 지원에 의하여 수행된 결과로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Counsell, J.N. Natural Colors for Food and Other Uses. pp. 91-122. Applied Science Publishers Ltd. Essex, U.K. (1981)
2. Herdry, G.A.F. and Houghton, J.D. Natural food colorants. pp. 141-182. In: Carotenoids. Briton, G. AVI, New York, NY, U.S.A. (1992)
3. Gross, J. Pigment in vegetables. pp.75-254. In: Chlorophylls and Carotenoids. AVI, New York, NY, U.S.A. (1991)
4. Yoon, J.M., Cho, M.H. and Hahn, T.R. Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety as natural food colorants. Kor. J. Food Sci. Technol. 29: 211-221 (1997)
5. Francis, F.J. Food colorant-anthocyanins. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 28: 273-314 (1989)
6. Wong, H.C. and Koehler, P.E. Production of red water-soluble Monascus pigments. J. Food Sci. 48: 1200-1203 (1983)
7. Kamikura, M. and Nakazato, K. Natural yellow colors extracted from Gardenia fruit(*Gardenia jasminoides* Ellis) and colors found in commercial Gardenia fruit extract color. In: Analysis of Natural Yellow Colors by High Performance Liquid Chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan 26: 150-159 (1985)
8. Hong, Y.T., Kim, J.G., Woo, H.C. and Kim, S.V. Effect of feeding intermediated and starter units on Monascus pigments production. Agric. Chem. Biotechnol. 38: 31-36 (1995)

9. Chung, M.S. and Lee, M.S. Stability and sensory evaluation of naphthoquinone pigments from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*. Kor. J. Food Sci. Technol. 26: 152-156 (1994)
10. Wong, H.C. and Koehler, P.E. Mutant for Monascus-pigment production. J. Food Sci. 46: 956-957 (1981)
11. Pfister, S., Meyer, P., Steck, A. and Pfander, H. Isolation and structure elucidation of carotenoid glycosyl esters in Gardenia fruits(*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne). J. Agric. Food Chem. 44: 2612-2615 (1996)
12. Nawa, Y. and Ohtani, T. Induction of callus from flesh of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit and formation of yellow pigment in the callus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 1732-1736 (1992)
13. Herdry, G.A.F. and Houghton, J.D. Natural food colorants. pp. 249-252. avi, New York, NY, U.S.A. (1992)
14. Jeong, H.S., Kim, S.J. and Park, K.H. Bioconversion of *Gardenia jasminoides* yellow pigment into blue pigment by microorganisms. Abstract No. P-135 presented at the 58th Korean Food Sci. Technol. Conference, Seoul, Korea (1997)
15. Jeong, H.S., Kim, S.J. and Park, K.H. Bioconversion of *Gardenia jasminoides* yellow pigment by microorganisms. Abstract No. A13 presented at the '97 Agricultural Biotechnology Symposium. The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul (1997)
16. Jeong, H.S. and Park, K.H. Characteristics of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 319-323 (1998)
17. Jeong, H.S. and Park, K.H. Storage stability of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. Kor. J. Food Sci. Technol. 31: 106-109 (1999)
18. Kim, J.S., Lee, Y.W., Oh, S.H. and Yi, Y.K. Isolation and identification of antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Kor. J. Plant Pathol. 7: 169-175 (1991)
19. Park, K.H., Sakurai, A. and Takahashi, N. Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. Agric. Biol. Chem. 51: 3081-3086 (1987)
20. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T. Bassinosteroids and monoglycerides in immature seeds of *Cassia tora* as the active principles in the rice lamina inclination bioassay. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1343-1344 (1994)
21. Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y. and Park, K.H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 2273-2276 (1998)
22. Budavari, S., The Merck Index, 12th ed., p. 438. Merck, Inc. Whitehouse Station, NJ, U.S.A. (1996)