

Bacillus sp. PY123균주가 생성하는 수용성 황색색소의 부분 정제 및 그 안정성

김지연 · 김광현* · 김병우* · 이광배**

동의대학교 기초과학연구소 · 동의대학교 미생물학과 · **대구보건대학 보건위생과

Partial Purification and Stability of a Water-soluble Yellow Pigment from Bacillus sp. PY123.

Ji-Youn Kim · Kwang-Hyeon Kim* · Byung-Woo Kim* · Kwang-Bae Lee**

*Institute of Basic Science, Donggeui University, Pusan, 614-714, Korea

†Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan, 614-714, Korea

**Department of Health Hygiene, Taegu Health College, Taegu, 702-260, Korea

Abstract

For application of a yellow pigment as food additives, stability of a water-soluble yellow pigment from Bacillus sp. PY123 was investigated.

The yellow pigment from Bacillus sp. PY123 was purified with pH treatment, activated carbon and silica gel column chromatography. The partial purified yellow pigment appeared only one spot on silica gel TLC after I₂ evaporation and under irradiation of UV253nm at dark room. R_f value of the pigment was measured at 0.04 and 0.12 with development of a solvent mixture (Butanol:Acetic acid:Water = 4:1:5) and a solvent mixture (Isopropanol:Ammonia:Water = 9:1:2), respectively. The partial purified pigment appeared a white fluorescence under UV365nm irradiation. The partial purified yellow pigment had a main peak and a minor peak on HPLC using 20mM phosphate buffer(pH 7.0) at 1ml/min flow rate. The partial purified pigment was stable at heat treatment, acidic pH, oxido-reductants and surfactants.

I. 서 론

식품용 착색제는 식품 재료가 지니고 있는 고유의 자연색이 제조, 가공 또는 보존 등의 과정에서 변색되거나 퇴색된 것을 본래의 색으로 복원시키거나 가공식품의 상품적 가치를 높이기 위하여 사용되고 있다.

옛날에는 식품의 착색에 천연색소가 주로 사용

되었으나¹⁾, 식품공업이 발전함에 따라 천연색소 만으로는 그 수요를 충족할 수 없으므로 다양한 합성착색료가 고안되어 사용되고 있다. 또한 식품에 사용 가능한 천연색소는 색상이 다양하지 못하고 값이 비싸므로 지금은 값이 싸고, 안정성이 높으며, 다양한 색을 내며 구하기 쉬운 합성착색료가 사용되고 있다. 현재 석탄 tar에서 얻은 방향족 탄화수소를 원료로 합성한 tar색소 중에 독성이 적은

산성계 색소를 허용하고 있다. 그러나, 최근 tar 색소의 독성에 대한 소비자들의 인식이 높아지면서 천연색소의 요구도가 증가하고 있다. 또한 천연색소가 식품첨가물로 사용될 때 식품의 가공, 저장, 판매 중에 쉽게 탈색되어 식품의 질을 떨어뜨리는 문제점이 있으며, 또한 색소는 식품위생에도 중요한 의미가 있다.

지금까지 천연 색소는 동식물을 대상으로 다양하게 연구되어 왔으나^{2, 4, 7)}, 외부환경 조건의 변화에 따른 재료공급과 색소의 동질성 문제가 제시되었다¹⁾. 이를 해결하기 위하여 식품의 조직배양이나 발효동으로 색소를 생산하는 연구가 진행되고 있으며^{2, 4)}, 미생물로부터 얻는 색소는 미생물의 배양이 용이함으로 실내에서도 단시간에 다량의 색소를 얻을 수 있다는 잇점이 있다^{5, 8)}.

본 연구의 목적은 *Bacillus*속의 균주가 생성하는 황색색소⁶⁾를 식품첨가물로 이용코자 이를 정제하고 그 안정성을 검토되었다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 Kim and Kim⁶⁾이 분리한 *Bacillus* sp. PY123균주를 사용하였다.

2. 배지조성 및 배양방법

설탕 1% 와 CoCl_2 0.1mM이 함유된 감자 배지⁶⁾가 황색색소 생성용 배지로 사용되었으며, *Bacillus* sp. PY123균주는 30°C에서 3일간 진탕배양(200rpm)하였다.

3. 황색 색소의 정제

Bacillus sp. PY123균주의 배양액은 원심분리(13,000rpm, 15min)하여 균체를 제거하고 회수된 상층액에 구연산을 100mℓ 당 0.5g을 첨가한(pH 3.0) 다음, 100°C에서 30분간 가열하였다. 가열에 의해 형성된 침전은 냉각시킨 후 원심 분리하여 제거하고, 그 상층액은 활성탄이 함유된 column을 통과시켜서 황색색소를 흡착시킨 후 아세톤으로 용출하였다. 용출된 황색색소는 아세톤을 제거하기

위해 감압농축시켜서 건조시켰다. 건조된 황색색소는 증류수에 녹인 다음 silica gel column chromatography를 행하여 비흡착 부분을 모았다. 이렇게 모은 용액에 3배량의 아세톤을 가하여 형성된 황색 침전물은 원심분리(13,000rpm, 5min.)하여 모으고, 그 침전물은 다시 아세톤과 증류수가 3:1로 혼합된 용액으로 2~3회 씻은 후 감압 농축하였다. 농축된 황색색소는 적당히 증류수로 현탁시키고, 동량의 1M의 탄산완충액(pH 10)을 가한 후 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열처리에 의해 형성된 침전은 원심분리하여 제거하였고, 상등액은 모아서 2배의 아세톤과 혼합시킨 후 다시 원심분리하였다. 원심분리하여 모은 황색 침전물은 다시 아세톤으로 2~3번 씻은 후 감압농축하여, 냉동저장(-20°C)하면서 실험에 사용하였다.

4. 황색 색소의 순도 측정

황색 색소의 순도 측정은 Thin Layer Chromatography(TLC)를 행하였으며, TLC는 silica gel이 도포된 plate인 Merck(Art.5735)사의 제품이 사용되었고, 전개용매는 n-Butanol : Acetic acid : Water(BAW) = 4 : 1 : 5와 Isopropanol : Ammonia : Water(PAW) = 9 : 1 : 2가 사용되었다. 이때 spot의 확인은 암실에서 UV253nm를 조사와 병행하여 밀폐된 용기에 I2를 기화시켜서 TLC상에 형성된 유기물의 spot를 확인하였다. 또한 HPLC column은 Shim pack CLC-ODS(Shimadzu사, 일본)를 사용하였고, 분리용매는 20mM 인산완충액(pH 7.0)을 사용하였으며, 분당 1ml의 속도로 시료를 용출하고 UV/Vis detector를 사용하여 380nm에서 황색색소 peak를 측정하였다.

5. 황색 색소의 안정성 및 용해성

1) 열 안정성은 황색 색소용액 1mℓ를 분광광도계로 A380 = 1.4가 되도록 증류수로 조정한 후 100°C에서 30분간 가열하였다. 그 후 이를 상온까지 냉각하여 열처리된 색소 용액의 흡광도의 변화를 조사하였다. 2) pH 안정성은 황색 색소용액 500μℓ에 각각 동량의 완충액 [1M 구연산완충액(pH 3.0), 1M 인산완충액(pH 7.0), 1M 탄산완충액

(pH 10.0)를 1:1로 혼합하고 100℃에서 30분간 경시적으로 가열시킨 후 변화된 흡광도를 측정하였다. 3) 산화·환원제에 대한 안정성은 황색 색소의 수용액 1ml에 각종의 산화·환원제를 1mM이 되도록 첨가하여 상온에 하룻밤 동안 방치하면서 황색이 무색으로 되는 현상을 육안으로 조사하였다. 4) 계면 활성제에 대한 안정성은 황색 색소용액 1ml에 계면 활성제를 최종 농도가 0.02%가 되도록 첨가하고 100℃에서 10-30분까지 경시적으로 가열한 후 380nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 5) 각종 용매에 대한 용해성은 건조 분말화된 색소 1mg을 각종의 용매 1ml에 용해시켜 육안 관찰 및 380nm에서 그들의 흡광도를 측정하여 각각의 용해도를 측정하였다.

6. 색소 및 균체의 독성시험

건조 분말화된 색소 100mg과 균체 108cell/ml를 각각 1ml씩 마우스(체중20-25g) 5마리의 복강에 주사하였다. 주사를 맞은 마우스는 대조구에 비해 48시간 이내에 음식물 섭취나 활동상태의 불량 또는 사망하는 현상이 있으면 급성 독성이 있다고 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수용성 황색 색소의 순도 검정

정제과정을 거친 황색 색소의 순도 검정을 위해

Table 1. Determination of purity of purified yellow pigment on TLC

Composition of development solvents	R _f value
n-Butanol : Acetic acid : H ₂ O 4 : 1 : 5	0.04
Iso-propanol : Ammonia : H ₂ O 9 : 1 : 2	0.12

The spot appeared on TLC after I₂ evaporation and under irradiation of UV_{253nm} at dark room.

TLC에 시료를 spot하여 전개시킨 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 2가지 다른 용매계에서 모두 단일 spot가 형성되었으나, HPLC를 행한 결과는 하나의 main peak 이외에도 약한 하나의 minor peak가 존재하였으며, 양 peak의 retention time은 각각 1.450분과 1.883분으로 대단히 인접해 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 따라서 본 황색색소를 정제한 결과는 HPLC상에서 비록 약한 minor peak가 확인되었으나, 식품첨가물로 본 색소를 사용하기 위해서는 pH처리 및 chromatography 등과 같이 1) 비교적 간편한 정제 공정이 필요하며, 이는 제조공정 상에서 단가를 절약하는데 아주 유리하다고 판단되었으며, 2) 황색은 시각적으로 따뜻한 느낌을 주고 미각을 자극하므로 식품첨가물로서 가장 쓰임새가 크다는 잇점도 있다.

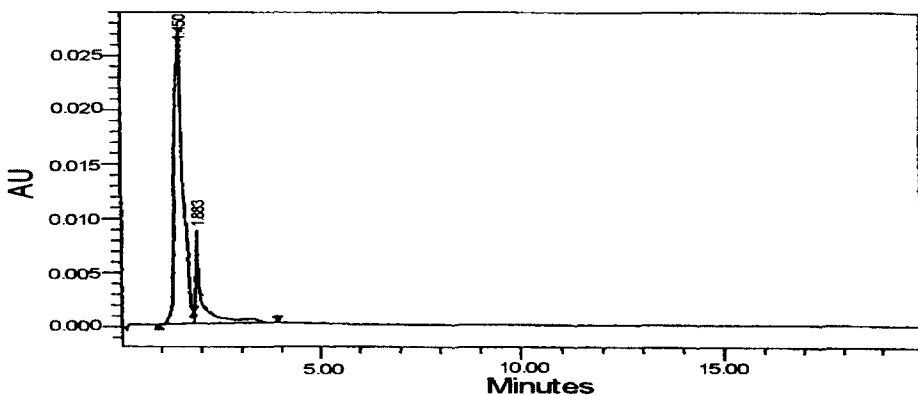


Fig. 1. Purity of yellow pigment on HPLC after silica gel column chromatography.

2. 수용성 황색 색소의 안정성

2.1. 열에 대한 안정성

일반적으로 식품에 색소가 이용되기 위해서는 열에 안정해야 변색이 일어나지 않아 상품 가치가 유지되기 때문에 열에 대한 안정성이 무엇보다도 중요하다. Table 2.에서 보는 바와 같이 황색색소 수용액은 열처리하기 전과 후에 측정된 흡광도의 값이 거의 일치하였으므로 열에 비교적 안정함을 알 수 있었다. 자연 색소의 대부분은 열에 불안정하여, 실용성에 문제가 되고 있는 경우가 종종 있으나, 본 균주에서 분리된 황색 색소는 열에 안정하여 식품 첨가물로 활용이 가능할 것이라고 생각된다.

2.2. pH에 대한 안정성

Table 3.에서 보는 바와 같이 황색 색소는 산성에는 비교적 안정하였으나, 알카리에서는 가열하지 않아도 암황색으로 변화되었으며 UV spectrum상에서는 대조구에 비해 약 2배 정도 진하게 나타났다. 따라서 본 황색색소는 산도가 강한 식품에 활용이 가능하며, 알카리 용액에서는 다소 불안정하여 갈색화 현상이 나타남으로 사용에 유의해야 한다

Table 2. Heat stability of purified yellow pigment.

Spectrum \ Heat treatment	Before	After
A ₃₈₀ nm	1.406	1.371

The yellow color was determined at A380nm after heat treatment at 100°C for 30min.

Table 3. Stability of purified yellow pigment on pH.

Time (min)	Control	Buffer		
		pH 3.0	pH 7.0	pH 10.0
0	0.664	0.664	0.563	1.140
10	0.750	0.687	0.568	1.593
20	0.729	0.684	0.622	1.523
30	0.762	0.693	0.760	1.519

The mixture of 500 μ l purified pigment and the same volume of each buffer was heated at 100°C. The change of yellow color was determined at A380nm after heat treatment.

다고 사료된다.

2.3. 산화·환원제에 대한 안정성

Table 4.에서 보는 바와 같이 대부분의 산화환원제에서 황색을 유지하였으나, Na₂SO₃만이 본 황색색소를 완전히 탈색시켜 무색화 하였다. 따라서 Na₂SO₃가 첨가되지 않은 식품에는 본 황색 색소가 안정하여 식품첨가물로 사용이 가능할 것이라고 생각된다.

2.4. 계면 활성제에 대한 안정성

Table 5.에서 보는 바와 같이 본 황색색소는 계면 활성제를 첨가하여도 전혀 색깔에 변화를 나타

Table 4. Stability of purified yellow pigment on oxido-reductants

Oxido-reductants(1mM)	Decolorization
H ₂ O ₂	-
Ascorbic acid	-
Na ₂ SO ₃	+
Na-thioglycolate	-
KSCN	-
NaNO ₂	-

Each oxido-reductant was added in 1ml purified pigment and kept at room temperature overnight. The change of yellow color was observed by eyes. Symbols :

+ ; decolorization, - ; yellow color.

Table 5. Stability of purified yellow pigment on surfactants.

Heat Treated Time(min)	Control	SDS	Tween-20	Triton X-100
0	0.664	0.750	0.576	0.612
10	0.729	0.828	0.594	0.631
20	0.750	0.803	0.624	0.668
30	0.755	0.805	0.633	0.699

Each surfactant(0.02%) was added to 1ml of purified pigment and heated at 100°C for 30min. The change of yellow color was detected at A380nm after heat treatment.

Table 6. Solubility of purified yellow pigment in organic solvent.

Organic Solvent	Solubility	Organic Solvent	Solubility
Water	++	DMSO	++
Acetone	-	Iso-propylalcohol	+
Ethylether	-	Iso-amylalcohol	-
1,4-dioxane	-	Chloroform	-
CCl4	-	Xylene	-
Methanol	++	1,2-dichloro ethane	-

Dry powder of the purified the yellow pigment was used for solubility on organic solvents at room temperature. Symbols : - : insoluble, + : soluble.

내지 않았다. 따라서, 계면 활성제가 첨가되는 제품에도 색소의 사용이 가능하다고 생각된다.

3. 각종 용매에 대한 용해성

Table 6.에서 보는 바와 같이 본 황색색소는 수용성인 용매인 물과 methanol 등에는 대단히 잘 용해되지만 acetone등 비수용성 용매에는 전혀 용해되지 않아서 수용성인 식품에 첨가제로서 활용이 될 수 있다고 사료된다.

4. 색소 및 균체의 독성시험

Table 7.에서 보는 바와 같이 균체와 색소를 투여한 마우스는 건강상태가 계속 유지되었으므로 적어도 황색색소나 균체는 급성 독성이 없다고 사료된다. 일반적으로 색소는 주로 만성장애가 문제임으로 추후 만성독성에 관한 구체적인 검토가 더 요구지만, Table 6.에서 나타난 바와 같이 이 균주로부터 얻어진 색소는 수용성 색소로서 지용성 색소와 같은 장기간 침착에 의한 만성독성은 일어나지 않으리라고 사료된다. 또한 Bacillus균주들 중에는 대부분이 비병원성이지만 Bacillus anthraxis등 극히 소수의 Bacillus균주들은 병원성이 있다. 그러나 이는 Table 7.에서 보는 바와 같이 균체를 마우스에 투여했어도 독성이 나타나지 않았으므로 병원성 균주일 가능성은 희박하지만 식품첨가물로 이용하기 위해서는 이 균주를 더욱 상세히 분류

Table 7. Toxicity of purified yellow pigment and Bacillus sp. PY123.

Injected Materials	No. of Mice (Death / Alive)	Toxicity	Condition
Control	0/5	-	Healthy
Pigment	0/5	-	Healthy
Bacteria cell	0/5	-	Healthy

PBS(phosphate buffer containing saline) was used as control. Symbols : - : none toxicity.

및 동정을 행할 필요가 있다고 사료된다.

IV. 결 론

미생물 유래의 수용성 황색색소를 식품에 이용코자 이를 정제하고 그 안정성이 검토되었으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 황색색소는 pH처리, 활성탄 및 silica gel column chromatography를 사용하여 정제하였으며, TLC상에서 I2반응 및 UV253nm조사로 단일한 spot를 확인하였다.
2. HPLC에서는 20mM 인산 완충액(pH7.0)을 사용하여 정제된 색소의 순도를 측정해 본 결과 하나의 main peak 이외에 또 하나의 minor peak가 존재하였다.
3. 부분 정제된 황색 색소는 산성, 온도, 산화환원제 및 계면활성제에 비교적 안정하였고, 수용성 용매에 용해가 잘 되었다.
4. 황색색소 및 균체를 마우스의 복강에 주사한 결과 급성 독성은 나타나지 않았다 따라서 본 미생물 유래의 황색색소는 정제가 용이하고, 산성, 온도, 산화제 및 계면활성제에 대단히 안정하며, 독성이 없다는 점에서 식품첨가물로 사용될 가능성이 있다.

참 고 문 헌

1. Lauro, G. J.: A primer on natural colors. Cereal Foods World. 36, 949-953, 1991.
2. Zhong, J. J., T. Seki, S. I. Kinoshita, and T.

- Yoshida : Effects of surfactants on cell growth and pigment production in suspension culture of *Perilla frutescens*. World J. Microbial. & Biotechnol. 8, 106-109, 1992.
3. Hanagata, N., A. Ito, Y. Fukuju, and K. Murata : Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus-Tinctorius* L. Biosci. Biotechnol. & Biochem. 56, 44-47, 1992.
 4. Masahiro, K. O., K. Mine, M. Taya, S. Tone, and T. Ichi. : Production and release of anthraquinone pigments by hairy roots of madder(*Rubia tinctorum* L.) under improved culture conditions. J. Ferment. Bioeng. 77, 103-106, 1994.
 5. Ju, J. Y., H. W. Nam, J. C. Yoon, and C. S. Shin. : Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech. 22, 85-91, 1994.
 6. Kim, J. Y., and K. H. Kim. : Isolation and characterization of *Bacillus* sp. PY123 producing a water-soluble yellow pigment. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 454-458, 1997.
 7. Taya, M., K. Yakura, M. Kino-oka, and S. Tone : Influence of medium constituents on enhancement of pigment production by batch culture of red beet hairy roots. J. Ferment. Bioeng. 77(2), 215-217, 1994.
 8. Han, O., and R. E. Mudgett. : Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations. Biotechnol. Prog. 8, 5-10, 1992.