

Colloidal Chitin을 자화하는 해양세균으로부터 적색색소의 생산

류병호* · 김민정
경성대학교 공과대학 식품공학과

Production of Red Pigment from Marine Bacterium Utilizing Colloidal Chitin. Ryu, Beung Ho* and Min-Jong Kim. Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, Pusan, 608-746, Korea – This study is that of providing a fairly practical guide to the use of natural pigment in food industry. A strain isolated from marine resources was carried out the production of red pigment. The pigment showed UV absorption maxima at 520 and 550 nm. The color intensity in aqueous solution was fairly stable in the ranges of pH 5-8. The strain KS-97 produced a maximum yield of red pigment at 25°C for 72 hrs with pH 7.0. The strain KS-97 was identified a *Bacillus* sp. based on morphological and biochemical characterization such as a rod form, motility, spore formation, Gram positive and catalase production. The production of red pigment indicated that the strain KS-97 utilized at high concentration of colloidal chitin as carbon sources obtained maximum yield of red pigment at 25°C for 72 hrs. The highest production of red pigment was observed with cultivation in medium containing 20% colloidal chitin, 2.5 g polypeptone, 2.5 g yeast extract, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g ZnSO_4 , 0.01 g MnSO_4 (per l).

Key words: Colloidal chitin, Red pigment, *Bacillus* sp.

해양 생물은 육상과 전혀 다른 환경에서 자라기 때문에 물질대사의 경로도 육상 생물과 다르며, 그 성분도 육상 생물과는 비교할 수 없을 만큼 새로운 구조를 갖는 화학물질을 생산할 수 있을 것으로 기대된다[17]. 많은 연구자들이 해양 생물의 특이성에 착안하여 새로운 생리활성 물질을 탐색하기 위한 목적으로 연구를 활발히 진행하고 있는 추세이다. 특히, 호르몬류, terpene류, nucleotide류, brom함유 화합물, 당 단백질의 항종양성 및 항 virus성 물질에 대한 기초적 연구가 보고되고 있다[13]. 식품의 기호적인 요소의 하나인 식품의 색은 식품의 가치를 높이고 식품의 품질을 유지하며 기호성을 높이는 데 큰 구실을 하고 있다. 자연계에 분포되어 있는 천연색소는 각종 아름다운 색깔을 지니고 있으나 이들 색소 추출물은 열, pH, 자외선 및 산소 등에 약하여 식품의 가공 저장 중에 쉽게 탈색되어 식품의 품질을 떨어뜨려 사용할 수 없는 결점이 있어 부득이 합성색소를 사용하고 있는 실정이다[16]. 그러나 화학적 합성품인 합성색소는 인체에 대한 발암성 및 안전성 등 식품위생상 문제점으로 지적되고 있다[5]. 1950년대 미국에서는 합성색소 오렌지 1호의 과다 사용으로 어린이들이 집단 식중독이 발생하였고, 인공색소 황색 4호와 5호는 발암성 물질로 알려진 β -naphthylamine의 형성이 확인되었다. 우리나라의 경우는 식품가공 저장시 주로 인공색소를 사용하고 있

으며 특히 소비량이 많은 식품인 사탕류, 빙과류 등에는 사용할 천연색소가 없어 거의 합성색소를 사용하고 있다[4]. 그러나 합성색소의 사용에 따른 발암성이 식품 위생상 문제가 되어 천연물로부터 인체에 무해한 천연 식품색소의 개발을 시도하고 있다[3]. 현재까지 사용되는 천연색소로는 카라멜 색소가 장류 등에 주로 사용되고 있으며[17]. 대부분은 주로 동·식물에서 추출되어 사용되고 있고, 식물성 색소의 생산은 적황색 색소인 치자[3]와 적색 색소인 anthocyanin[8] 및 carotenoid계 색소가 이용되고 있으며[9], 식물의 조직배양으로 색소를 생산하려는 연구가 보고되고, 동물에서 추출한 색소는 헤모글로빈, coxineal 등이 있다[19]. 그러나 천연색소는 색깔과 사용범위가 한정되어 있고 가격이 고가여서 보다 광범위하게 사용될 색소의 생산이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 점에서 색소의 안정성이 높고 대량 생산 가능한 미생물에 의한 색소의 생산이 바람직스럽다. 미생물로부터 천연색소의 생산은 *Monascus anka*[7,15], *Streptomyces echinoruber*[11], *Streptomyces propurpuratus*와 *Bacillus* sp.의 혼합배양에 의한 적색 색소의 생산[10], *Streptomyces californicus*[2,12]에 의한 청색 색소의 생산 등의 연구가 있으며 세균을 이용한 색소의 생산에 관한 연구로는 *Serratia marcescens*를 이용한 황색 색소의 생산[18], *Rhodospseudomonas viridis*를 이용한 녹색 색소의 생산[6], *Azotobacter vinelandii*를 이용한 청색 색소의 생산[1] 및 *Bacillus* sp.을 이용한 황색 색소에 관한 연구[15]가 있어 현재 산업적으로 이용 가능성이 높다.

본 연구는 해양 미생물로부터 적색 색소의 생산에 관한

*Corresponding author
Tel. 051-620-4712, Fax. 051-622-4986
E-mail: bhryu@star.kyung Sung.ac.kr

연구로서 colloidal chitin를 자화하여 적색 색소를 생산하는 균주를 분리 동정하여 적색 색소의 생산성을 검토하였다.

재료 및 방법

시료 및 배지조성

남해안 일대의 해수 및 해산물로부터 적색 색소를 생산하는 균주를 분리하고자 하였으며 균 분리용 기본 배지의 조성은 1당 200 ml colloidal chitin, 2.5 g peptone, 2.5 g yeast extracts, 1.0 g KH₂PO₄, 0.01 g MgSO₄·6H₂O, 0.01 g ZnSO₄ 및 0.01 g MnSO₄이었다. 배지용 시약은 Difco Co. 제품을 사용하였으며 chitin은 Junsei chemical co. 제품을 사용하였다.

Colloidal chitin의 제조

Chitin 2 g을 35% HCl solution 200 ml에 넣어 교반하면서 녹인 다음 37°C에서 30분간 방치한 후 glass wool로 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 여기에 증류수 0.8 l를 넣고 격하게 교반하여 2~3분 이내에 백색의 침전이 생성되면 이를 5°C에서 24시간 방치한 후 상등액을 취하고 다시 이를 pH 5.0이 될 때까지 수세하여 colloidal chitin을 얻었다.

적색 색소 생산균주의 선별

해수 및 해산물을 20 ml 멸균증류수가 담긴 100 ml용 삼각 플라스크에 10⁻²~10⁻⁴ ml의 농도(w/v)로 희석하여 상기의 배지에 접종하여 25°C에서 3일 동안 배양하였다. 이를 고체배지에 도말한 다음 다시 25°C에서 3일간 배양하여 적색 색소를 생산하는 균주를 1차 선별하였다. 적색 색소를 생성하는 균주를 다시 colloidal chitin이 첨가된 배지와 첨가되지 않는 고체배지에 각각 tooth pick하여 적색 색소의 생산 유무를 확인한 후 colloidal chitin 첨가배지상에서 적색 색소를 생산하는 균주를 본 실험에 사용하였다.

분리균주의 균학적 특성

선정된 균주의 세포 형태와 집락의 특징은 Bergey's manual(14)에 따라 배지상에서 30°C의 2일간 배양한 후 colony의 형태 및 표면의 특징을 관찰하였다. 이 때 표준 균주로서 *Bacillus subtilis* ATCC 6051를 함께 사용하였다. 또한 transmission electron microscopy, JEOL 1,200 EX-II.(Japan)를 이용하여 형태학적 특징을 검토하였다.

적색 색소 생산에 영향을 미치는 배양 조건

1) 배양 시간

배양 시간이 색소 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 액체배지에 종 배양액을 1%(v/v)로 접종하여 25°C에서 12시간에서 72시간까지 배양한 후, 배양 상등액을 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 배양 온도

적색 색소 생산에 배양 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 종 배양액을 1%(v/v) 접종하여 10°C에서 35°C까지 배양 온도를 조절하여 72시간 배양한 후, 배양 상등액을 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 초기 pH

적색 색소 생산에 pH가 미치는 영향을 조사하기 위하여 종 배양액을 1%(v/v) 접종하여 배지내의 pH를 5에서 9까지 1N HCl과 2N NaOH로 조정하여 25°C에서 72 시간 배양한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Colloidal chitin의 첨가량

적색 색소 생산 균주인 KS-97은 colloidal chitin을 자화하는 특징이 있기 때문에 배지내에 colloidal chitin의 첨가량에 따라 색소의 생산량을 알아보기 위하여 액체배지에 colloidal chitin을 각각 0, 10, 20, 30 및 40%을 첨가한 후 25°C에서 72시간 배양한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 탄소원

탄소원의 종류에 따라 적색 색소의 생산량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 탄소원 1%(v/v)를 첨가하여 25°C에서 72시간 진탕 배양한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 질소원

질소원의 종류에 따라 적색 색소의 생산량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 질소원 1%(v/v)를 첨가하여 25°C에서 72시간 진탕 배양한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

적색 색소 생산균주의 분리 및 선정

적색 색소 생산균주를 분리를 위한 배지 조성은 20% colloidal chitin, 0.25% peptone, 0.25% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄·6H₂O, 0.01% ZnSO₄, 0.01% MnSO₄ 및 2% agar였으며 25°C에서 3일간 배양하였을 때 가장 색소 생산이 좋았다. 또한, colloidal chitin을 첨가한 배지에서는 colloidal chitin 무첨가 배지에서 보다 적색의 색도가 매우 강하였다. 적색 색소의 UV-visible 흡수 spectrum을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 적색색소의 흡수대가 520 및 550 nm에서 최대 흡수 파장을 나타낸 것으로 보아 적색색소의 색소임을 확인할 수 있다.

적색 색소 생산균주의 균학적 특성

1) 배양 형태학적 특성

현미경하에서 형태학적 특성을 관찰한 결과 끝이 둥근 간균으로 유동성 편모가 있었다. 분리 균주의 전자현미경 사진은 Fig. 2와 같았다. 형태학적 특성은 Table 1에서 처럼

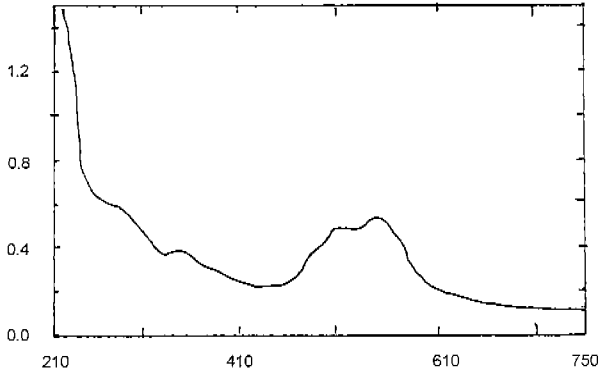


Fig. 1. UV-visible spectrum of red pigment isolated from the strain KS-97.



Fig. 2. Transmission electron microphotograph of the strain KS-97(bar;100 nm).

Table 1. Morphological characteristics of the strain KS-97

Vegetative cells	Rods with round end, single or in a mass, motile by means of peritric flagella, 0.6~0.8 × 1.3~1.8 μm
Endospores	Spores, ellipsoidal to oval, central, 0.7~0.8 × 1.3~1.8 μm
Sporangia	Definitely swollen.
Stain characteristics	Gram positive

타원형 모양의 내생포자를 생산하였고 세포의 형태는 단독 또는 집단으로 생산되어 있었다. Fig. 3는 평판 배지상에서 3일간 배양하여 생산된 colony의 특징을 나타내었다.

2) 생화학적 특성

선발된 균주의 생화학적 특성은 Table 2와 같으며 catalase를 생산하며 gelatin을 액화하는 호기성 간균으로 15~35°C에서 생육이 가능하나 최적 온도는 25°C이었고 pH는 7.0에서 생육이 잘되었으며 내염성이 강하나 10%의 식염농도에서는 생육이 억제되었다. 이상과 같이 적색 색소 생산 균주의 형태 및 배양학적 및 생화학적 특성으로 보아

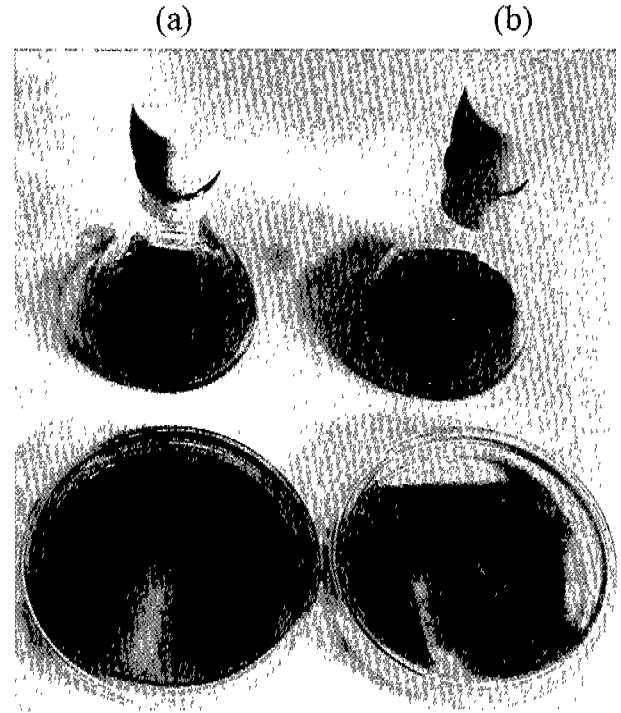


Fig. 3. Photograph of colony appearance and red pigment isolated strain KS-97 on the agar plate containing colloidal chitin (a) and without chitin (b).

Table 2. Physiological characteristics of the strain KS-97

Reduction of nitrate	+
Methyl red test	+
Formation of indole	-
Formation of H ₂ S	-
Formation of acetyl carbinol	+
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	+
Decomposition of tyrosine	-
Catalase activity	+
Urease activity	-
Oxidase activity	+
Liquefaction of gelatin	+
Peptonization of milk	+
Hugh-Leifson test	Oxidative and fermentative
Growth in 7% NaCl	-
Temperature for growth	15~35°C (optimum : 25°C)
pH for growth	5~9 (optimum : 7)
Aerobiosis	Aerobic

Bacillus sp.와 가장 유사한 것으로 판단되나 정확한 동정이 어려워 편의상 잠정적으로 KS-97이라고 명명하였다.

적색 색소 생산에 영향을 미치는 배양조건

적색 색소의 생산에 영향을 미치는 배양 조건을 검토하

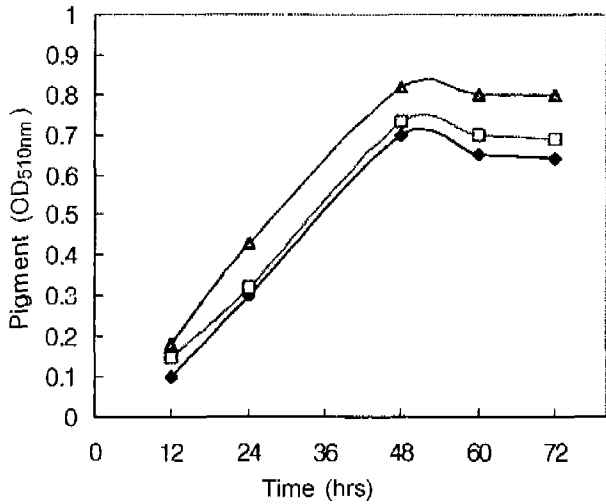


Fig. 4. Effect of culture times on the red pigment production of strain KS-97. ◆—◆ : pH 5.0, □—□ : pH 6.0, ▲—▲ : pH 7.0

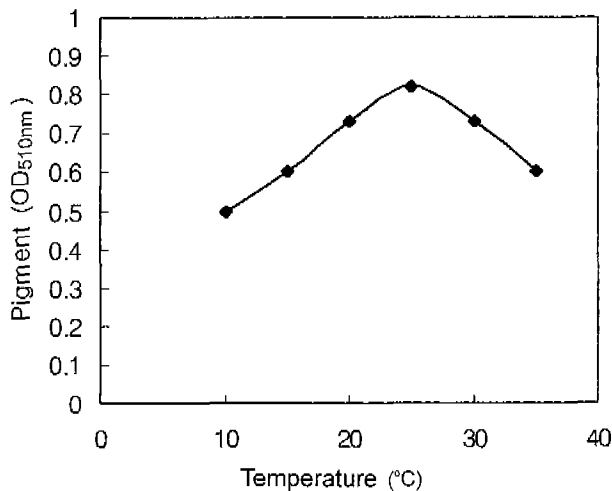


Fig. 5. Effect of temperature on the red pigment production of strain KS-97.

였다. 배양시간에 따라 KS-97이 색소 생산에 미치는 영향을 비교하기 위하여 액체배지에 종 배양액을 1%(v/v)로 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 배양시에 색소 생산이 가장 좋았으며, 48시간 이후에서는 시간이 경과함에 따라 두드러진 변화 없이 적색 색소의 생산이 비교적 높음을 알 수 있었으며, 72시간 이후에서는 매우 완만하게 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다. 균이 생산하는 색소가 열에 대한 안정성 유무와 적색 색소를 생산하기 위한 최적 배양 온도를 검토하기 위하여 배양온도를 10°C에서 35°C까지 변화를 주어 비교 검토한 결과 25°C에서 색소의 생산이 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 5). 또한, pH에 따른 적색의 색소 생산을 검토한 결과는 Fig. 6과 같았다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 전반적

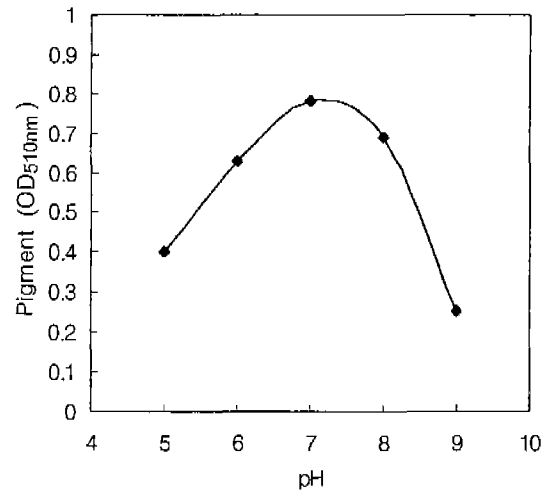


Fig. 6. Effect of pH on the red pigment production of strain KS-97.

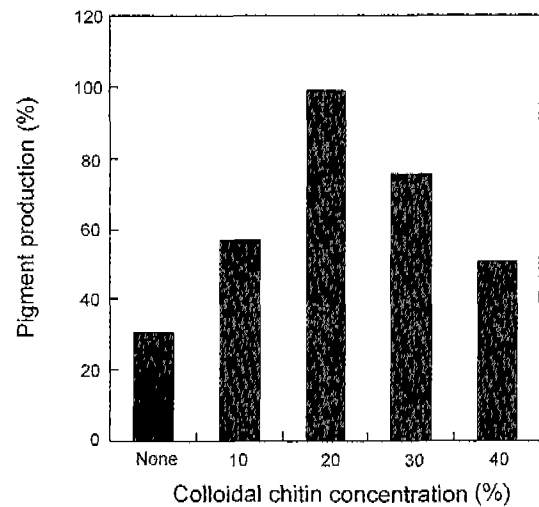


Fig. 7. Effect of colloidal chitin concentration on the red pigment production by strain KS-97.

으로 pH 6.0~8.0에서 색소 생산능이 비교적 좋았으며 pH 6.0 이하와 pH 8.0 이상에서는 급격하게 감소함을 알 수 있었으며 pH 7.0에서 색소의 생산이 가장 높았다. 본 균주가 colloidal chitin을 자화하기때문에 배지내에서의 colloidal chitin의 첨가량을 0에서 40%로 조정하여 색소의 생산에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토한 결과는 Fig. 7과 같았다. KS-97은 colloidal chitin을 자화하는 특징이 있어 colloidal chitin을 생육 배지에 첨가하지 않으면 적색 색소의 생산능이 매우 미약함을 알 수 있었다. 또한, 20%의 colloidal chitin을 첨가하였을 때 적색 색소 생산이 가장 우수함을 알 수 있었으며 20% 이상의 첨가시에는 점차적으로 감소하였다. Colloidal chitin 이외의 여러가지 탄소원들을 배지에 첨가하였을 때 색소 생산에 영향을 미치는 지를 검토한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 나타난 바와 같이

Table 3. Effect of various carbon sources on the red pigment production

Carbon sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD _{620 nm})	Pigment production (500 nm)
None	0.920	0.98
L-Arabinose	0.64	-
Xylose	0.38	-
Rhamnose	0.30	-
Dextrin	0.83	0.72
D-Mannose	0.85	0.70
Galactose	0.90	0.90
D-Fructose	0.88	0.90
Saccharose	0.94	1.0
Glucose	0.90	0.94
Maltose	0.80	0.83
Lactose	0.81	0.80

Table 4. Effect of various nitrogen sources on the red pigment production

Nitrogen sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD _{620 nm})	Pigment activity (%)
None	0.099	0.70
Organic nitrogen sources		
Malt extract	0.565	0.76
Peptone	0.891	0.94
Polypeptone	0.985	1.0
Tryptone	0.975	0.84
Yeast extract	0.951	0.83
Inorganic nitrogen sources		
NaNO ₂	0.020	0.70
NH ₄ NO ₃	0.172	0.74
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.879	0.73
KNO ₃	0.548	0.72

glucose, fructose, galactose 및 saccharose에서는 모두 색소의 생산에 큰 영향이 없었으며, 5 탄당인 L-arabinose, xylose 및 rhamnose에서는 균의 발육과는 무관하게 색소가 전혀 생산되지 않았다. 따라서, 상기의 실험 결과에서 색소 생산면을 고려할 때 KS-97은 colloidal chitin이 유일한 탄소원으로 이용됨을 확인하였다. 배지내의 질소원에 따른 색소 생산을 검토한 결과는 Table 4과 같았다. 유기 질소원에서는 polypeptone, tryptone 및 yeast extract 등의 첨가배지에서는 색소의 생산능이 우수하였고 그 중에서도 polypeptone이 생육과 색소의 생산이 가장 높은 것으로 나타났다. 무기 질소원을 첨가한 배지에서 유기 질소원을 첨가한 배지 보다 색소의 생산능이 다소 낮았다.

요 약

식품 산업에 많이 이용되고 있는 인공색소를 천연색소로

대체할 수 있는 방안의 하나로 적색 색소를 생산하는 균주를 해양으로부터 분리 동정한 결과, *Bacillus*속임을 알 수 있었으며, 잠정적으로 KS-97이라고 명명하여 색소 생산의 최적 조건을 검토하였다. KS-97에 의하여 생산되는 적색 색소는 colloidal chitin을 자화하는 특이성이 있으며 기본 배지 조성은 1당 200 ml colloidal chitin, 2.5 g peptone, 2.5 g yeast extracts, 1.0 g KH₂PO₄, 0.01 g MgSO₄·6H₂O, 0.01 g ZnSO₄ 및 0.01 g MnSO₄였다. KS-97이 생산하는 적색 색소의 최대 흡수파장은 520 및 550 nm이었으므로 적색 색소임을 확인할 수 있었다. 20% colloidal chitin을 첨가하였을 때 색소 생산성이 가장 높았으며, 탄소원으로는 saccharose가 비교적 높았으나 큰 차이는 없었다. 유기 질소원은 polypeptone이 가장 높았으며 무기 질소원으로는 (NH₄)₂HPO₄이 다소 높았으나 유기 질소원 보다는 대체로 낮음을 알 수 있었다. 최적 온도는 25°C, 최적 pH는 7.0에서 48시간 배양하였을 때 생육 및 색소의 생산량이 가장 높았다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국 해양 수산 개발원 해양기술 센터의 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- Bae, S. J., K. H. Kim, B. W. Kim, and Y. H. Kim. 1995. Isolation and Characterization of *Azotobacter winlandii* Strain A80 Production Water-Soluble Blue Pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(1): 43-46.
- Chi, Y. E. 1990. Production of Bluish Purple Pigment by *Streptomyces californicus* KS-89 and Characteristics of Pigment, Ph. D. Thesis, Dept. of Food Science and Technology, Kyungung Univ., Pusan.
- Francis, F. J. 1984. Future trends, in development in food colors-2, Waeford, J., Ed., Applied Science Publishers. 238-247.
- Francis, F. J. 1997. In current aspects of food colorants, Ed. T.E. Furia, 19-27 IRC press, Ohio.
- Goldenberg, N. 1997. Why additives-the safety of foods, Chapter 6. Colours: do we need them, British Nutrition Foundation. London.
- Kim, Y. H. and S. S. Lee. 1994. A Study of Greenish Pigments from *Rhodospseudomonas viridis* by Acetone Extraction: Characteristics of Potential Food Colorant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**(1): 93-97.
- Lin, C. F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* **51**(6): 407.
- Markakis, P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In

- anthocyanins as food colors, Markakis, P. (Ed.) Academic Press, New York. 163.
9. Matsuano, T. 1989. In "Carotenoids Chemistry and Biology" Ed. by Krinsky, N. I, Mathews, M. M., and Taylor, R. F. : Plenum Press. New York. 59-74.
 10. Oshima, M., N. Ishizki, and Y. Tonooka. 1985. Production of Neopurpuratin, a Purplish-red Pigment, by Pure Culture of *Streptomyces propurpuratus*. *J. Ferment. Technol.* **63**(1): 79-83.
 11. Palleroni, N. J., K. E. Reichelt, D. Nueller, R. Epps, B. Tabenkin, D. N. Bullm, W. Schuep, and J. Berger. 1978. Production of a novel red pigment, rubrolone, by *Streptomyces echinoruber* sp. nov. I. Taxonomy, fermentation and partial purification. *J. Antibiotics.* **16**(12): 1218-1225.
 12. Ryu, B. H. and S. H. Lee. 1994. Production of Bluish Purple Pigment from *Streptomyces californicus* KS-89. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**(2): 147-156.
 13. Scheuer, P, J. 1978. "Marine Natural Products" Academic Press
 14. Sneath, P. H. A. 1986. Endospore forming Gram-positive rods and cocci. Pp1104-1138. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 15. Su, Y. C. 1983. Fermentative Production of Ankapigments (*Monascus* pigments). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**(4): 325-337.
 16. Walford, J. 1980. Developments in Food Colours pp. 1-25, Applied Science Publishers, London.
 17. Watanabe. I. 1989. Current topics in marine biotechnology. Fungi Tech., Press, 11.
 18. Yang, I.-Y. and S. O. Hwang. 1995. Isolation and Identification of *Serratia Marcescens* Strain US50-3 Producing Water-Soluble Red Pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(6): 777-780.
 19. Zhong, J. J., T. Seki, S. I. Kinoshita, and T. Yoshida. 1992. Effects of surfacts on cell growth and pigment production in suspension culture of *Perilla frutescens*. *J. Microbial. & Biotechnol.* **8**: 106-109.

(Received August 7, 2000)