

## Jar Fermentor에서 생산된 치자 생물변환 색소의 특성 및 안정성

김선재<sup>1\*</sup> · 장흥기<sup>2</sup>

<sup>1</sup>목포대학교 식품산업기술연구센터

<sup>2</sup>한국천연물공학연구소

### Characterization and Stability of *Gardenia jasminoides* Biotransformed Pigment Produced in Jar Fermentor

Seon-Jae Kim<sup>1\*</sup> and Hong-Gi Jang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

<sup>2</sup>Natural Engineering Research Institute, Jeonnam 520-330, Korea

#### Abstract

Yellow pigment of *Gardenia jasminoides* was converted into new pigment by whole-cell biotransformation of thirteen different microbial species. The color value of the biotransformed pigment, which was produced by *Streptococcus mutans* MK-34, was higher than those of other biotransformed pigments. The biotransformed pigment produced by *S. mutans* MK-34 displayed a characteristic absorption peak at 588 nm and the absorption value increased during the incubation in a jar fermentor. The effects of light and temperature (60°C) on storage stability of the biotransformed pigment were investigated. As a result, the biotransformed pigments produced by *Streptococcus mutans* and *Bacillus subtilis* were more stable than *Gardenia jasminoides* yellow pigment during storage.

**Key words:** *Gardenia jasminoides* yellow pigment, biotransformed pigment, jar fermentor

#### 서 론

색소는 식품, 의약품, 화장품 그리고 섬유 등 여러 가지 용도로 사용되며, 그 중에서도 특히 식품에 있어서의 색소의 역할은 제품의 가치를 높이고, 소비자의 구매충동과 식욕을 돋우어 주는 중요한 역할을 한다(1-3). 천연색소는 자연에서 얻을 수 있으며 특히 식물에서 얻어지는 각종 색소를 예로부터 식용색소 및 염료로 이용하여 왔고, 근래에 와서 값싸고 안전한 합성색소가 널리 이용되고 있는 실정이다(4). 그러나 인공합성색소의 독성과 발암성 등 안전성에 문제가 제기됨에 따라 인체에 대한 안전성이 확보되면서 또한 산업적인 이용이나 저장시 변색 또는 탈색에 문제가 없는 안전한 천연색소의 개발이 요구된다(5). 천연색소의 다양성은 색깔을 나타내는 본래의 기능 외에 살균, 항염증 등의 생리활성을 갖는 장점을 가지고 있어 산업적인 측면에서 큰 잠재력을 가지고 있다(6,7). 식용 천연색소의 세계 시장은 현재 약 100억불 이상이며 우리나라에는 2,000억원 이상의 수요가 있는 것으로 추정되지만 거의 대부분 완제품 형태로 수입에 의존하고 있다(8). 국내에서 몇몇 중소기업에서 원료를 수입하여 식용 천연색소를 생산 판매하고 있다. 그러나 생산된 색소의 품질

을 향상시키기 위해 많은 노력이 요구되며 천연색소가 합성색소에 비해 가격이 비싸기 때문에 경제적으로 생산할 수 있는 공정을 개발할 필요가 있다.

꼭두서니과에 속하는 상록활엽관목인 치자나무의 열매에서 얻어지는 치자황색소는 carotenoids계 색소로 crocetin과 crocin이 주성분으로 알려져 있다(9,10). 치자황색소는 수용성색소로 식용 및 염료로 오랫동안 이용되어온 안전한 색소로, 색소소재로서의 가치가 증대되고 있고 치자황색소를 생물변환시켜 다양한 색깔의 치자색소를 생산하는 연구가 보고되고 있다(11,12). 치자색소의 생물변환에 대한 연구는 일부 미생물이 치자황색소를 청녹계 색소로 변환시키는 능력을 가지고 있다는 보고(13)와 미생물에 의해 변환된 색소의 저장안전성에 영향을 미치는 요인에 대한 보고(14), 그리고 *Staphylococcus epidermidis*와 *Lactobacillus plantarum*에 의한 치자황색소의 변환양상에 대한 연구(15)가 보고되고 있어 치자황색소로부터 생물변환된 색소에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서는 치자황색소로부터 생물변환된 색소의 대량생산을 위하여 jar fermentor를 이용하여 생산조건을 검토하였고 이들 색소의 안전성 및 특성에 대해 조사하였다.

\*Corresponding author. E-mail: foodkim@mokpo.ac.kr  
Phone: 82-61-450-6453, Fax: 82-61-454-1521

## 재료 및 방법

### 치자황색소의 제조

치자의 열매는 전라남도 진도군에서 채취하여 건조 후 마쇄하고, *n*-hexane으로 세척한 다음, ethanol로 황색소를 추출하고, 이 추출액을 진공농축기(EYELA N-N, Tokyo, Japan)로 37°C에서 용매를 제거한 후 수용성 농축액을 제조하였다.

### 미생물 배양 및 변환색소의 생산

치자황색소로부터 생물변환색소의 생산을 위해 Gram 양성세균 7종(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10830, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus brevis* ATCC 8287)과 Gram 음성세균 4종(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella* Typhimurium KCTC 2515, *Vibrio vulnificus* KCTC 2980, *Esherichia coli* ATCC 10536), 그리고 효모 2종(*Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4105)을 사용하였다. 배지는 *Leu. mesenteroides*와 *L. brevis*는 MRS 배지(Difco), *S. mutans*는 BHI 배지(Difco), *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *V. vulnificus* 및 *E. coli*는 TSB 배지(Difco), 그밖의 세균은 NB 배지(Difco)를 사용하였고, 효모는 YM 배지(Difco)를 사용하였다.

Jar fermentor 배양은 30°C에서 24시간 전배양한 배양액을 본 배양액 4 L에 대하여 2%(80 mL)를 접종하여 발효조에서 배양하였다. 발효조(KF-5L, Cobiotech, Korea)에서 배양 온도 30°C, 초기 pH 6.0, 교반속도 300 rpm 통기량 0.25 vvm의 조건으로 하여 여기에 황색소를 배양액의 10%(v/v) 정도 첨가하고 배양하였다.

### 색가 및 색차계를 이용한 경시적인 색소변환 측정

각 균주에 의해 배양된 배양액을 121°C에서 5분간 살균하

고, 원심분리기(Union 55R, Hanil, Korea)로 3,000 rpm, 15분간 원심분리하여, 얻어진 상등액의 1 mL를 50% alcohol (v/v) 100 mL에 용해한 용액을 spectrophotometer(HP-8452, Hewlett Packard, USA)를 사용하여 438 nm 및 588 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식에 의해 계산하였다(8).

$$\text{색가}(E^{10\%}_{1\text{cm}}) = \text{흡광도값} \times 100(\text{회석배수})/\text{시료무게}$$

그리고 상기의 방법으로 얻어진 상등액에 대하여 색차계(Hunter Lab, USA)를 이용한  $\Delta E$  측정치는  $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ 로 계산하였다.

### 색소의 저장안정성 실험

치자황색소와 *S. mutans* 및 *B. subtilis*에 의해 변환된 색소액을 cap test tube(직경 15 mm, 30 mL)에 넣고 변환된 색소의 광 및 온도에 대한 저장안정성을 Kim과 Park(16)의 방법으로 조사하였다. 광의 영향은 일광에 노출시켜 색소의 안정성을 측정하였으며, 온도는 60°C의 incubator에 저장하면서 색차계를 사용하여 변색도( $\Delta E$ 값)를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 치자 생물변환색소의 배양 중 색가 변화

치자황색소로부터 생물변환색소를 생산하기 위하여 Gram 양성세균 7종, Gram 음성세균 4종, 효모 2종 등 총 13종의 미생물을 jar fermentor에서 배양하고 치자황색소를 첨가한 후 7일간 생물변환된 색소의 색가에 대해 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다.

미생물의 배양에 따른 치자황색소의 고유 흡수극대인 438 nm에서의 색가는 배양 0일에 비해 모두 감소하는 경향을 나타내었고 상대적으로 588 nm에서의 색가는 배양 0일에 비해 배양 7일째에 모두 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* 그리고 *Vibrio vulnificus*를 이용하여 배양한 경우의 색가는 다른 미생물에 비해 상대적으로 높게 나타났다.

Table 1. Color value of *Gardenia jasminoides* yellow pigment and biotransformed pigment

Microorganisms	At 438 nm		At 588 nm	
	0 day	7 days	0 day	7 days
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	14.2	1.4	0.2	12.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	13.8	2.5	0.4	10.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	14.3	2.6	0.7	11.4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 10830	14.2	13.2	0.4	0.2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	18.7	18.1	0.5	0.8
<i>Streptococcus mutans</i> MK-34	17.3	3.6	0.5	25.8
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	14.5	2.8	0.8	16.3
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	15.6	14.3	0.7	0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12.3	2.5	0.4	11.5
<i>Salmonella</i> Typhimurium KCTC 2515	15.5	2.7	0.3	10.7
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2980	17.3	2.7	0.5	11.5
<i>Esherichia coli</i> ATCC 10536	14.3	13.2	0.6	0.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13.2	11.5	0.6	0.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4105	16.4	15.4	0.4	0.2

Jeong과 Park(13)은 치자의 황색소를 *L. plantarum*, *V. vulnificus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. Typhymurium* 그리고 *S. aureus* 등 8종 균주의 배지에 첨가하고 배양한 결과 청녹색계의 변환색소를 얻을 수 있었고, 미생물에 의해 변환된 색소의 분광학적 성질을 경시적으로 추적하면 색소의 변환은 3군으로 나누어진다고 보고하였다. 본 연구에서도 청색 계열의 생물변환색소를 생산하는 미생물은 *V. vulnificus*로 나타났으며, 녹색계열의 생물변환색소를 생산하는 미생물은 *P. aeruginosa*, *S. mutans* 그리고 *B. subtilis*로 나타났다. 청녹색 계열의 생물변환색소를 생산하는 미생물은 *S. epidermidis*, *S. Typhymurium* 그리고 *S. aureus*로 나타나 상기의 결과와 동일한 결과를 얻었다. 그러나 본 연구실에서 분리·동정한 *S. mutans* MK-34에 의해 생물변환되는 색소는 다른 조건에 비해 높은 색가를 나타내었으며, 짙은 녹색 계열의 색을 나타내어 천연의 녹색계열의 치자 생물변환색소를 얻을 수 있었다.

#### 치자 생물변환색소의 분광학적 특성 및 색차변화

치자 생물변환색소의 색가 측정에서 *S. mutans* MK-34에 의한 변환색소가 588 nm에서 측정하였을 때 그 색가가 높았고 이 색소의 대량생산을 위한 jar fermentor 안에서 spectra의 비교는 Fig. 1에 나타내었다. 치자황색소가 jar fermentor 안에서 *S. mutans* MK-34에 의한 변환의 특징은 588 nm에서 새로운 흡수극대가 나타나며, 흡광도값은 배양시간이 경과함에 따라 증가됨을 알 수 있었다. 그러나 치자황색소 고유의 흡수극대인 438 nm의 흡광도 값은 배양시간의 경과와 함께 감소하는 경향을 나타내어, Jeong과 Park(13)이 보고한 치자황색소가 미생물에 의해 생물변환될 때 흡수극대인 438 nm에서 588 nm로 새로운 흡수극대가 나타난다고 하는 결과와 일치하였다.

Akao 등(17)은 치자색소가 호기성 세균에 의해 청색색소

로 변환되는 기작에 대해 보고하였는데, 치자황색소의 geniposide가 bacterial  $\beta$ -glucosidase에 의해 genipin으로 변환되고 이것에 암모니아 또는 아미노산의 존재하에 혐기성 세균에 의해 청색색소로 변환됨을 보고하였다. 본 연구에서는 치자황색소를 이용하여 *S. mutans* MK-34가 자체에서 생산하는 독특한 효소의 작용으로 녹색계열의 색소를 생산하는 것으로 추정되었다.

치자황색소가 미생물에 의해 7일간 경시적으로 변환된 과정을 색차계의  $\Delta E$ 값으로 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 생물 변환된 색소 중에서 본 연구의 내용에 적합한 색조를 나타낸 *S. mutans* MK-34에 의해 변환된 색소, *S. mutans* ATCC 25175에 의해 변환된 색소 그리고 *B. subtilis* ATCC 6633에 의해 변환된 색소의  $\Delta E$ 값은 jar fermentor에서의 배양 1~2일까지 급속히 증가하였으며, *S. mutans* ATCC 25175에 의해 변환된 색소 그리고 *B. subtilis* ATCC 6633에 의해 변환된 색소보다 *S. mutans* MK-34에 의해 변환된 색소의  $\Delta E$ 값의 속도가 더 빠르게 나타났다. 이러한 결과는 *S. mutans* MK-34에 생산되는 치자 생물변환 색소를 산업적으로 생산할 경우 배양시간이 상대적으로 단축되는 점에 있어 의미가 있는 것으로 판단되었다.

#### 치자 생물변환 색소의 저장안정성

치자황색소의 생물변환에 관여하고 녹색계열의 색소를 생산하는 *S. mutans* MK-34, 청록색계 색소를 생산하는 *S. mutans* ATCC 25175 그리고 *B. subtilis* ATCC 6633, 이들에 의해 생산된 색소에 대하여 광 및 온도조건에서의 저장안정성에 대해 조사하였다. 먼저 일광의 조건에서 35일간 치자황색소 및 생물변환 색소에 광 안정성에 대한 결과는 Fig. 3에 나타낸 것처럼 치자 생물변환 색소에 비해 치자황색소가 시간이 경과함에 따라 급속히 감소하는 경향을 나타내었으며, 생물변환 색소 중에서도 녹색계열의 색소를 생산하는

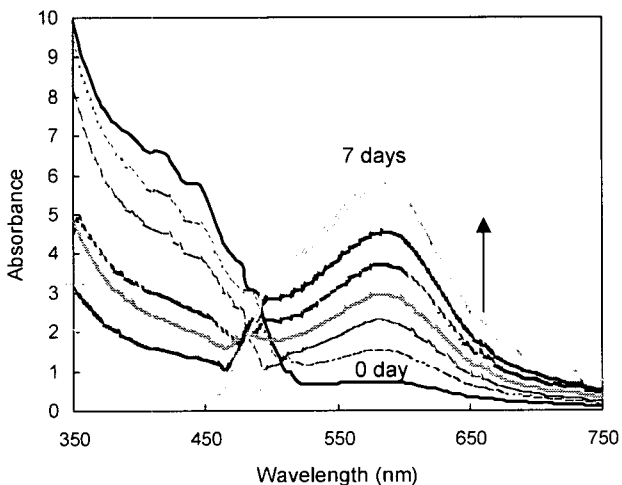


Fig. 1. Visible absorption spectra of *Gardenia jasminoides* biotransformed pigment during incubation with *Streptococcus mutans* MK-35 in jar fermentor.

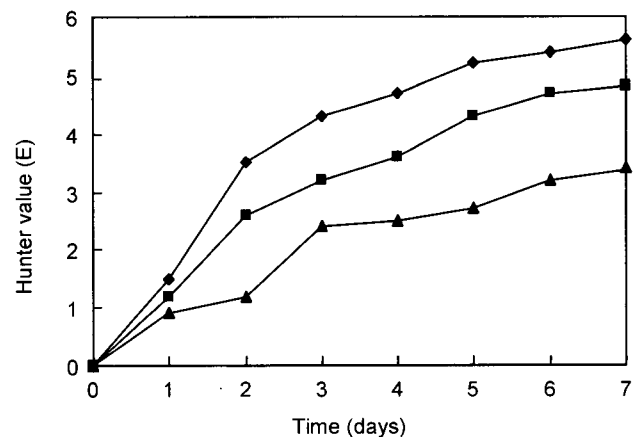


Fig. 2. Hunter value ( $\Delta E$ ) changes of *Gardenia jasminoides* biotransformed pigment during incubation with microorganism.

◆: Pigment converted by *S. mutans* MK-34, ■: Pigment converted by *S. mutans* ATCC 25175, ▲: Pigment converted by *B. subtilis* ATCC 6633.

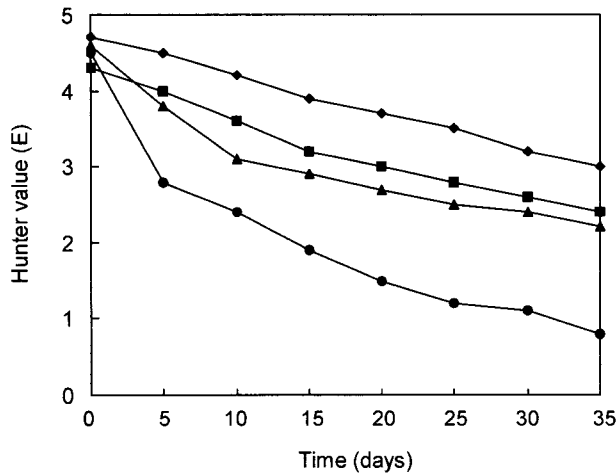


Fig. 3. Stability on the light of *Gardenia jasminoides* bio-transformed pigment produced by microorganism.

◆: Pigment converted by *S. mutans* MK-34, ■: Pigment converted by *S. mutans* ATCC 25175, ▲: Pigment converted by *B. ATCC* 6633, ●: *Gardenia jasminoides* yellow pigment.

*S. mutans* MK-34 색소액이 다른 생물변환 색소에 비해 그 안정성이 우수하였다.

치자 생물변환 색소의 온도에 대한 영향을 60°C 조건에서 35일간 저장하면서 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 것처럼 치자 생물변환 색소에 비해 치자황색소가 시간이 경과함에 따라 급속히 감소하는 경향을 나타냈으며, 치자 생물변환 색소 3가지는 거의 동일한 경향으로 우수한 안정성을 나타냈다. Jeong과 Park(14)은 *S. epidermidis*에 의한 생물변환 색소를 대상으로 광 및 온도에 대한 안정성 조사에서 치자황색소에 비해 생물변환 색소가 광조건에서 40°C 이상의 온도조건에서 안정성을 유지할 수 있었다고 하였으며,

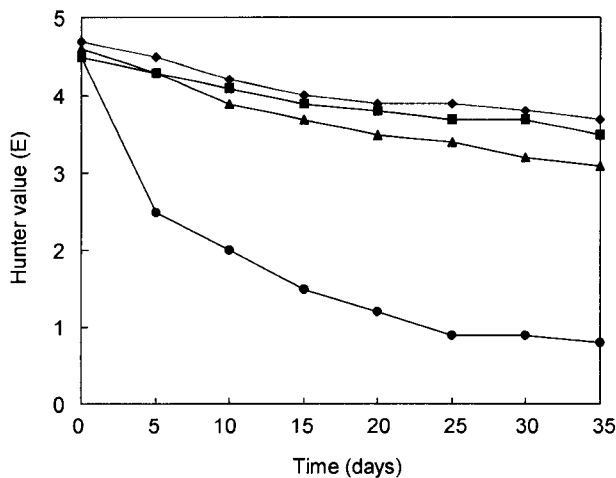


Fig. 4. Stability on the temperature (60°C) of *Gardenia jasminoides* bioconversion pigment produced by microorganism.

◆: Pigment converted by *S. mutans* MK-34, ■: Pigment converted by *S. mutans* ATCC 25175, ▲: Pigment converted by *B. ATCC* 6633, ●: *Gardenia jasminoides* yellow pigment.

일광하에서 green filter를 사용한 저장용기가 광에 대해 안정하였다고 보고하였다.

이상의 결과로 본 연구에서는 치자황색소에 대해 *S. mutans*와 *B. subtilis*를 이용하여 jar fermentor로 생물변환 색소의 대량생산이 가능하며, 광 및 온도에 안정한 청녹색 및 녹색계열의 색소를 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

## 요 약

치자황색소로부터 생물변환색소를 생산하기 위하여 Gram 양성세균 7종, Gram 음성세균 4종, 효모 2종 등 총 13종의 미생물을 jar fermentor에서 배양하고 치자황색소를 첨가한 후 7일간 생물변환된 색소의 색가에 대해 조사한 결과, *S. mutans* MK-34에 의해 변환된 색소의 색가가 가장 높았다. 치자황색소가 jar fermentor 안에서 *S. mutans* MK-34에 의한 변환의 특징은 588 nm에서 새로운 흡수극대가 나타나며, 흡광도값은 배양시간이 경과함에 따라 증가하였다. *S. mutans*에 의한 생물변환 색소를 대상으로 광 및 온도에 대한 안정성 조사에서 치자황색소에 비해 생물변환 색소가 일광 조건 및 60°C 온도조건에서 안정성을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 2003년 지역산업기술개발사업 “진공초음파 기술을 이용한 치자색소의 생산기술 및 산업화”의 지원에 의한 결과이며, 연구수행에 많은 도움을 주신 산업자원부 지원 지역협력연구센터인 목포대학교 식품산업기술연구센터(RRC)에 감사드립니다.

## 문 헌

- Counsell JN. 1981. Natural colors for food and other uses. Applied Science Publishers Ltd., Essex, U.K. p 91-122.
- Herdry GAF, Houghton JD. 1992. Natural food colorants. In *Carotenoids*. Briton G, ed. AVI, New York, USA. p 141-182.
- Gross J. 1991. Pigment in vegetables. In. *Chlorophylls and carotenoids*. AVI, New York, USA. p 75-254.
- Yoon JM, Cho MH, Hahn TR. 1997. Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety as natural food colorants. *Korean J Food Sci Technol* 29: 211-221.
- Francis FJ. 1989. Food colorant-anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 273-314.
- Park SG, Cho MH, Lee YH, Hahn TR, Chung IS. 2000. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase for biotransformation of geniposide into genipin. *Food Engineering Process* 4: 76-80.
- Park YH, Chang SK. 2000. Effects of shikonin pigments from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* on radish platelets. *J Fd Hyg Safety* 15: 167-172.
- Park MS, Hong IK. 2002. Analysis of color difference by mixed solvent composition in natural dyes extraction process. *J Korea Ind Eng Chem* 13: 844-851.

9. Pfister S, Meyer P, Steck A, Pfander H. 1996. Isolation and structure elucidation of carotenoid glycosyl esters in *Gardenia* fruits (*Gardenia jasminoides* E.) and saffron (*Crocus sativus* L.). *J Agric Food Chem* 44: 2612-2615.
10. Nawa Y, Ohtani T. 1992. Induction of callus from flesh of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit and formation of yellow pigment in the callus. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1732-1736.
11. Lee DU, Park CH, Kang SI, Min EG, Han YH, Lee CK. 1998. Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Korean J Pharmacogn* 29: 204-208.
12. Lee JY, Hahn TR, Paik YS. 1998. Physiochemical characteristics for the transformation of blue pigments from genioin of *Gardenia jasminoides* with amino acids. *Agric Chem Biotech* 41: 399-404.
13. Jeong HS, Park KH. 1998. Characteristics of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. *Korean J Food Sci Technol* 30: 319-323.
14. Jeong HS, Park KH. 1999. Storage stability of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. *Korean J Food Sci Technol* 31: 106-109.
15. Jeong HS, Park KH. 1999. Conversion patterns of yellow pigment from *Gardenia jasminoides* by *Staphylococcus epidermidis* and *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1184-1187.
16. Kim SJ, Park KH. 1992. Studies on the storage stability of Jindo Hongju pigment. *Korean J Food Sci Technol* 24: 183-186.
17. Akao T, Kobayashi K, Aburada M. 1994. Enzymic studies on the animal intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biol Pharm Bull* 17: 1573-1576.

(2005년 4월 6일 접수; 2005년 6월 21일 채택)