

Zooshikella sp. 17TA 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 항균활성

The Physicochemical Stabilities and Antimicrobial Activities of Pigment Extracts from *Zooshikella* sp. 17TA

박재명¹, 박진숙^{2,*}

Jae-Myeong Park¹, Jin-Sook Park^{2,*}

¹대학원생, 한남대학교 생명시스템학과, 대전, 34054, 대한민국

²교수, 한남대학교 생명시스템학과, 대전, 34054, 대한민국

^{1,2}Department of Biological Science and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

(Received 21 November 2019, First Revision Received 6 December 2019, Second Revision Received 13 December 2019, Third Revision Revised 16 December 2019, Accepted 16 December 2019)

Abstract In this study, the stability of the extracted natural pigments against light, temperature, pH, metal ions, and antimicrobial activity were evaluated in marine bacteria *Zooshikella* sp. 17TA. The pigment of the strain used in the study was red with maximum absorption at a wavelength of 541 nm. The stability of the pigment was evaluated by measuring the absorbance while preserving for 15 days and examining the retention rate. After 15 days of irradiation, the pigment of this bacterium showed 98% retention in the dark and 91% retention in the temperature range of -20°C ~ 30°C. When the pH was in the range 4-7, the retention was about 80%, and the retention rate was higher than 85% for all kinds of metal ions except for CuCl₂, ZnCl₂, and KCl. The bacterial pigments showed high stability under the given irradiated pH, temperature, and metal ion conditions and had shown activity against gram-positive strains. These results suggest that this highly conserved microbial pigment can be applied to the food industry.

Keywords : bacterial pigment, red pigment, marine bacteria, *Zooshikella*, antimicrobial activities

서 론

색소란 화장품이나 식품, 의약품 등에 색을 띠게 하는 목적으로 첨가하는 물질로서 [1] 시각적 효과를 증대시켜 상품성 및 기호성을 향상하는 효과를 갖는다 [2]. 19세기 이후 화학공업이 발달함에 따라 다양한 합성색소가 개발되었으며 생산성과 화학적 안정성을 이유로 최근까지 다양한 목적으로 사용되고 있으나 [3-5], 건강에 관한 관심이 늘어나고 합성색소의 안전성 등에 문제가 제기되면서 천연색소

의 사용과 개발이 요구되는 실정이다 [6-8].

대표적인 천연색소의 예로는 식물에서 발견되는 carotene, xanthophyll, carotenoid 등이 있으며 이들 천연색소의 상당수는 식품의 구성 성분으로 섭취하는 것이 가능하다 [9]. 또한, 이러한 천연색소는 착색 외에 항산화나 항균 같은 약리적 효과 및 영양성 등 다양한 면에서 주목을 받고 있다 [10-12]. 그러나 동식물로부터 유래한 천연색소는 가격이 비싸며 품질이 일정하지 않은 등의 단점을 가지고 있다 [13-15]. 이러한 단점을 극복하기 위해 식물조직 배양 등의

* Corresponding author
Phone: +82-42-629-8771 Fax: +82-42-629-8769
E-mail: jspark@hnu.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

연구가 진행되어 일부 색소는 상품화가 되기도 하였으나 식물조직배양의 경우 배양 기간이 길고 생산성이 떨어지는 결점을 지닌다 [16,17]. 이 때문에 최근에는 대량으로 생산할 수 있으며, 품질이 안정된 색소를 생산하는 미생물 색소에 대한 관심이 증가하고 있다 [6, 18-20].

미생물 색소는 자외선 등 세포를 자극으로부터 보호하고, 에너지의 습득 등 미생물의 환경에 대한 적응과 생존에 있어 중요한 역할을 수행한다. 때문에 미생물 색소는 다양한 생리 활성을 가질 것으로 기대되고 있다. 특히 세균을 활용한 색소의 개발 및 생산의 경우 유전자 조작 등이 간단하므로 균주의 개발이 쉽고 [1], 호염성 세균의 경우 높은 염 농도에서 성장하여 오염의 가능성이 적으며, 색소의 추출이 용이하다는 장점이 있다 [4,5].

이에 본 연구에서는 색소 생성능이 뛰어난 *Zooshikella* sp. 17TA 균주로부터 색소를 추출하고, 추출한 색소의 빛, 온도, pH 그리고 금속이온에 대한 색소의 안정성 및 유해 세균에 대한 항균 활성을 평가하여 추출 색소의 이용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 색소추출

본 연구에서 천연색소를 얻기 위해 사용한 균주는 서해안에서 채집한 해면으로부터 분리하였다. 해면을 균질화한 후 Marine broth 2216 (Difco, USA) 배지를 이용하여 25°C에서 3일간 배양하여 색소 생성능이 우수한 균주를 일차적으로 선별한 후 빨간색 색소를 생산하는 *Zooshikella* sp. 17TA 균주를 선별하여 본 연구에 사용하였다. 균주는 MBRIS에 기탁 (MPRBM-20191125001) 하였으며, 균주의 염기서열 정보를 GenBank에 등록 (accession number MN784481)하였다.

Zooshikella sp. 17TA 균주의 균체로부터 에탄올을 이용하여 색소를 추출하고, 추출 용액을 회전진공증발농축기 (EYELA, Japan)로 건조하여 분말화된 색소를 사용하였다 [13].

2. 미생물 색소의 안정성 평가

색소 추출물의 안정성을 평가하기 위하여 색소 분말의 용매로는 에탄올을 사용하였으며, 빛, 온도, pH, 금속이온에 대한 색소 추출물의 안정성을 조사하였다. 실험의 재현성을 확인하기 위해 2회 이상 동일 실험을 반복하였다.

빛에 의한 영향

실험에 사용한 색소 추출물은 에탄올에 0.025 mg/ml의 농도로 색소 분말을 녹여 사용하였으며 모든 안정성 평가에서 동일 농도의 색소 추출물을 사용하였다. 색소 추출물을 시험관에 넣고 25°C에서 110 V, 30 W 조명으로부터 30 cm의 거리에 위치시킨 후, 15일간 보존하면서 매 24시간 단위로 541 nm에서 Evolution™ 3S UV-Visible Spectrophotometer(Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)로 흡광도를 측정하여 잔존율을 조사하였다. 대조군은 빛을 차단하고 같은 조건에서 실험을 수행하였다.

온도에 의한 영향

색소 추출물을 시험관에 넣고 각각 -20°C, 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 40°C의 암실에서 15일간 보존하면서 541 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존율을 조사하였다.

pH에 의한 영향

색소 추출물을 1M KOH, 1M HCl을 사용하여 pH 4부터 pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10까지 조정 후 암실에서 25°C, 15일간 보존하면서 매 24시간 단위로 541 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존율을 조사하였다.

금속이온에 의한 영향

색소 추출물에 금속이온, NaCl, AlCl₃, CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂와 KCl을 1.0%가 되도록 각각 첨가하여 25°C의 암실에서 15일간 보존하면서 매 24시간 단위로 541 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존율을 조사하였다. 대조군은 금속이온을 넣지 않은 색소 추출물을 사용하였다.

3. 미생물 색소의 항균 활성

색소의 항균 능력을 확인하기 위해 식품 유해균인 그람양성균 2종과 그람음성균 1종에 대해 디스크 확산법 (disk agar method)을 이용하였다 [1]. 에탄올에 용해한 50 µg, 100 µg, 200 µg, 400 µg의 색소를 멸균한 8 mm paper disc에 가한 후 암실에서 건조하여 그람양성균인 *Bacillus subtilis* ATCC 130170, *Staphylococcus aureus* ATCC 1928, 그람음성균인 *Escherichia coli* KCTC 1116를 도말한 평판 배지에 올리고 30°C에서 24시간 배양하여 투명대의 지름을 측정하였다. 대조군으로는 에탄올을 가한 후 건조시킨 멸균 paper disc와 penicillin 10 U를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 미생물 색소의 안정성 평가

빛에 의한 영향

실험 균주의 빨간색 색소의 빛에 대한 안정성을 초기 흡광도 대비 15일간의 흡광도로 잔존율을 계산하여 평가한 결과, 빛이 있는 경우 15일 후 70.7%, 암소에서 잔존율은 98%로 빛에 노출된 경우보다 빛이 차단된 경우 더 높은 안정성을 나타내었다(Figure 1). *Kocuria* sp. K70에서 분리된 노란 색소 [21]와 *Pseudoaltermonas* sp. Jul1-1에서 분리된 빨간 색소 [1]의 경우 14일까지 70%이상의 잔존율을 나타내어 본 실험결과와 유사한 결과를 나타내었다. 빛이 있는 조건에서 50% 이하의 잔존율을 나타낸 *Rhodospillum rubrum*에서 분리된 색소 [22]와 비교했을 때 상대적으로 안정함을 확인할 수 있었다.

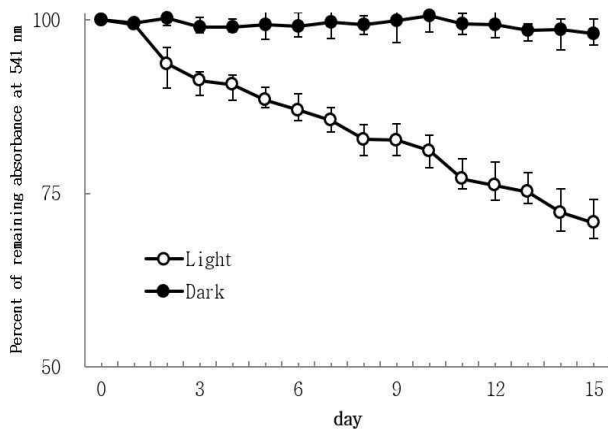


Figure 1. Effect of light on the stability of the bacterial pigment at 25°C.

온도에 의한 영향

색소 추출물의 초기 흡광도 대비 15일간의 흡광도로 잔존율을 계산하여 온도에 대한 안정성을 평가한 결과, 40°C의 고온에서 약 70% 잔존율을 나타내었다. 40°C 이외의 실험온도인 -20°C, 4°C, 20°C 그리고 30°C의 온도 범위에서는 모두 90% 이상의 잔존율을 나타내었으며(Figure 2) -20°C에서 98.7%의 잔존율을 보여 가장 높은 안정성을 나타내었다. 특히 30°C에서 90% 이상의 잔존율을 나타내어 상온에서 매우 안정함을 확인하였다. 이는 25°C와 40°C에서 10일 경과 후 각각 약 80% 그리고 50% 미만의 잔존율을 나타낸 *Rhodospillum rubrum* [22]에서 분리된 색소와는 대비되는 결과로 본 색소는 상온 및 고온에서 상대적으로 안정함을 확인할 수 있었다.

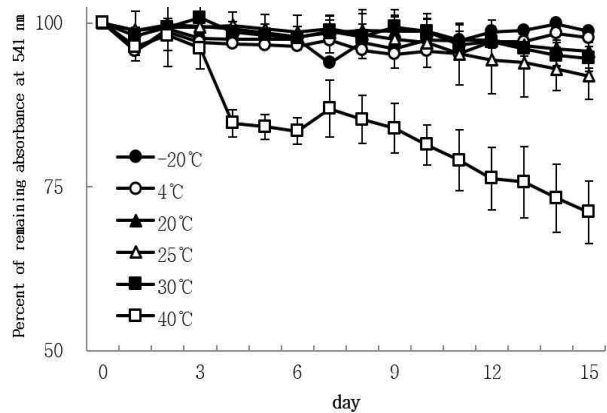


Figure 2. Effect of temperature on the stability of the bacterial pigment in the dark.

pH에 의한 영향

색소 추출물의 초기 흡광도 대비 15일간의 흡광도로 잔존율을 계산하여 pH 안정성을 평가한 결과, pH 8, pH 9, pH 10에서 노란색으로 변화하였으며, 10% 이하의 낮은 잔존율을 나타내었다. pH 7의 중성에서 92% 이상의 높은 잔존율을 나타내었으며, pH 6 이하 특히 pH 4에서도 약 80%의 잔존율을 나타내었다(Figure 3). *Pseudoaltermonas* sp. Jul1-1에서 분리된 빨간 색소 [1]의 경우 pH 4에서 90%가 넘는 잔존율을 나타내어 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 본 실험의 결과는 Hearn 등 [23]의 pH에 따른 색소의 색 변화 연구에서 밝힌 prodigiosin이 pH 8 이상의 염기성 조건에서 노란색으로 변색된 것과 같은 패턴이었으며 *Zooshikella* sp. 17TA가 생산하는 색소 역시 prodigiosin 계열의 색소로 예측된다. 본 색소는 알칼리성 보다는 중성 및 산성에서 높은 안정성을 나타내었다.

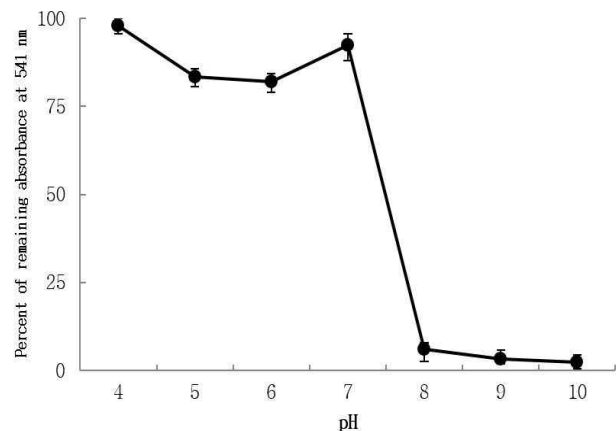


Figure 3. Effects of pH on the stability of the bacterial pigment in the dark at 25°C.

금속이온에 의한 영향

색소 추출물의 초기 흡광도 대비 15일간의 흡광도로 잔존율을 계산하여 각각의 금속이온에 대한 안정성을 조사한 결과, 15일 후의 잔존율은 CuCl₂가 첨가되었을 때 5.6%로 CuCl₂에 대한 안정성은 매우 낮았다. ZnCl₂와 KCl 경우 각각 53.6%, 74.6%로 비교적 낮은 잔존율을 나타내었다. 반면 NaCl의 경우 85% 이상의 잔존율을, AlCl₃, MgCl₂, CaCl₂의 경우 95% 이상의 잔존율을 나타내어 매우 안정하였다(Figure 4). 이는 *Pseudoaltermonas psicida* TA20에서 분리한 주황색 색소 [24] 및 *Pseudoaltermonas* sp. Ju11-1에서 분리된 빨간 색소 [1]가 AlCl₃가 있는 조건에서 50% 미만의 안정성을 나타낸 것과는 대조적인 것으로 *Zooshikella* sp. 17TA 색소의 경우 특히 AlCl₃등에 매우 뛰어난 안정성을 나타내었다. 또한 NaCl에 색소의 안정성이 비교적 우수하였다.

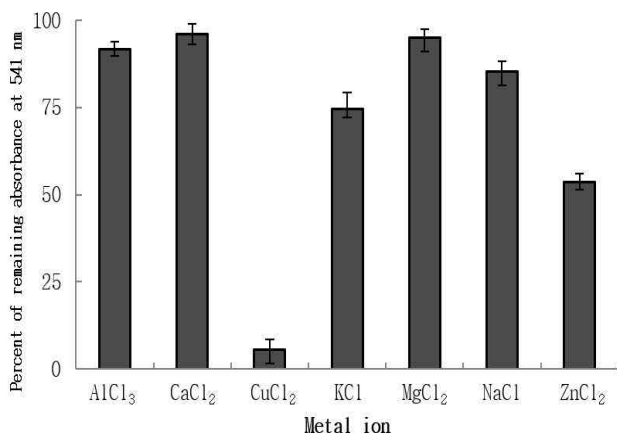


Figure 4. Effect of metal ions (1%, w/v) on the stability of the bacterial pigment in the dark at 25°C.

2. 미생물 색소의 항균 활성

색소 추출물의 항균활성을 측정된 결과 그람음성균인 *Escherichia coli*에서는 항균활성이 나타나지 않았으나, 그람양성균인 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에서는 투명대가 확인되었으며, 항균활성은 100 µg을 가했을 때 가장 높았다(Table 1). Kim 등 [25]의 *Zooshikella* sp. JE-34 균주에서 추출한 prodigiosin계 색소에 대한 연구에서는 *Streptococcus* 속 3 균주, *Staphylococcus aureus* 등 실험에 사용한 그람양성균주 전체에서 항균능이 확인되었으나, *Escherichia coli* 등 다수의 그람음성균주에서는 항균능이 없는 것으로 확인되었다. 이는 본 실험의 결과와 일치하였다. 하지만 Ji 등 [26]이 연구한 *Serratia* sp. PDGS120915 균주에서 추출한 적색 색소에 관한 연구에서는 0.15 mg 이하에서 *Staphylococcus aureus*에 대한

항균능이 나타나지 않았으며, *Bacillus subtilis*의 경우 항균능을 전혀 갖지 못하는 것으로 나타나, 본실험에서 사용한 색소의 항균능이 우수한 것으로 나타났다.

Table 1. Anti-microbial activity of the bacterial pigment

Strain	Diameter of clear zone (mm)				
	50µg	100µg	200µg	400µg	
Gram (+)	<i>B.subtilis</i>	16	23	19	18
	<i>S.aureus</i>	17	20	18	15
Gram (-)	<i>E.coli</i>	0	0	0	0

결론

본 연구에서는 빛, 온도, pH, 금속이온에 대한 해양 세균 *Zooshikella* sp. 17TA 균주로부터 추출된 천연 색소의 안정성을 평가하였다. 연구에 이용된 균주의 색소는 빨간색으로 색소의 안정성은 541 nm에서 측정하여 확인하였다. 색소의 안정성은 15일간 보존하면서 흡광도를 측정하여 잔존율을 조사하여 평가하였다. 본 세균의 색소는 조사 15일 후, 어두운 곳에서 98%의 잔존율을 보였으며 -20~30°C에서 90% 이상 잔존하였다. pH 4-7일 때 80% 정도의 높은 잔존율을 나타내었고, CuCl₂, ZnCl₂와 KCl을 제외한 조사한 모든 종류의 금속이온에 대하여 85% 이상의 잔존율을 나타내었다. 항균 활성의 경우 그람 양성균에서 활성능을 보여주었다. 본 세균 색소는 조사된 pH, 온도, 금속이온 조건에서 높은 안정성을 보여주었고, 항균능이 있음이 확인되었다. 이러한 결과는 비교적 높은 염도의 산성 및 중성의 알루미늄 통조림 식품 등에 적용 가능한 기능성 미생물 색소로서 식품산업에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 정부(해양수산부)의 재원으로 해양수산과학기술진흥원 해양수산생명공학기술 개발사업(No. 20170431) 및 2019학년도 한남대학교 학술연구 조성비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Park, J. S., Cho, H. H. and Kang, M. H. 2009. The Physicochemical stabilities and biological activities of pigment extracts from *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 and *Pseudoalteromonas* sp. Ju14. *Korean J. Microbiol.* **45**, 404-410.
- Ko, M. H. and Kim, J. W. 2011. Seoul Elementary school students perception and information needs on artificial food colorants. *Korean J. Food Cook. Sci.* **27**, 643-651.
- Boo, H. O., Shin, J. S., Hwang, S. J., Bae, C. S. and Park, S. H. 2012. Antimicrobial effects and antioxidative activities of the cosmetic composition having natural plant pigments. *Korean J. Plant Res.* **25**, 80-88.
- Jeong, D. W. and Park, J. S. 2008. Characterization of pigment-producing *Pseudoalteromonas* spp. from marine habitats and their optimal conditions for pigment production. *J. Life Sci.* **18**, 1752-1757.
- Yong, H. Y. and Park, J. S. 2004. Diversity of pigment-producing halophilic bacteria isolated from coastal seawater and solar saltern in Korea. *Korean J. Microbiol.* **40**, 302-306.
- Jeon, C. P., Lee, J. B. and Kwon, G. S. 2013. Stability of *Monascus* pigment produced by *Monascus* sp. MK2. *J. Life Sci.* **23**, 669-675.
- Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H. and Song, W. S. 2011. Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Korean J. Plant Res.* **24**, 105-112.
- Tak, E. S., Bae, M. W., Kang, S. H., Bae, Y. J., Kang, S. Y., Jung, S. K. and Hong, I. K. 2010. Presentation of target color with extraction variables in natural dyes extraction. *Appl. Chem. Eng.* **21**, 559-563.
- Cho, G. S. 2018. Production of edible paints using to the *Monascus* spp. pigments. *Kwang Jang*, **219**, pp 271-291.
- Seo, Y. I. E., Jung, H. J., Hong, S. M. and Yu, T. S. 2007. Optimization of production of pigment from *Monascus* sp. in liquid culture. *Korean J. Microbiol.* **43**, 59-65.
- Won, N. I., Lee, G. E., Ko, K., Oh, D. C., Na, Y. H. and Park, J. S. 2017. Identification of a bioactive compound, violacein, from *Microbulbifer* sp. isolated from a marine sponge *Hymeniacidon sinapium* on the west coast of Korea. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 124-132.
- Park, C. D., Jung, H. J. and Yu, T. S. 2005. Isolation of pigment overproducing mutant from *Monascus purpureus* and optimization of pigment production. *Korean J. Microbiol.* **41**, 130-134.
- Lee, G. E. and Park, J. S. 2017. Dyeing effects of natural pigment from marine bacterium, *Microbulbifer* sp. PPB12. *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc.* **18**, 527-533.
- Shin, Y., Kang, C. H. and So, J. S. 2016. Red pigment producing *Serratia marcescens* isolated from abalone (*Haliotis discus*). *KSBB Journal*, **31**, 214-218.
- Choi, J. M. and Kim, Y. S. 2009. Dyeing properties of microbial violacein on multifiber fabrics. *Fashion and Text. Res. J.* **11**, 818-826.
- Kim, J. S., Kim, M. C., Lee, K. J. and Heo, M. S. 2009. Isolation and optimal culture conditions of prodigiosin-like pigment produced by *Zooshikella* sp. JE-34. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **37**, 219-225.
- Kim, Y. S. and Choi, J. M. 2011. Physicochemical and dyeing properties of microbial prodiginine from *Zooshikella* sp. *J. Korean Soc. Cloth. Text.* **35**, 431-441.
- Park, H. A. 2019. Absorption Spectroscopic studies of prodigiosin extracted from *Serratia marcescens* strain. *Appl. Sci. Converg. Technol.* **36**, 355-361.
- Lee, Y. R., Mitchell, R. J. and Whang, K. S. 2016. Isolation and characterization of antifungal violacein producing bacterium *Collimonas* sp. DEC-B5. *Korean J. Microbiol.* **52**, 212-219.
- Choi, J. M., Kim, Y. S. and Yi, E. J. 2010. Colorimetric properties and color sensibility factors for naturally dyed fabrics by microbial prodiginine colorant. *Korean J. Sci. Emot. Sensib.* **13**, 693-702.
- Kim, Y. S. and Park, J. S. 2010. Characterization of pigment-producing *Kocuria* sp. K70 and the optimal conditions for pigment production and physical stability. *KSBB Journal*, **25**, 513-519.
- Kim, Y. H. and Lee, S. S. 1993. Yellow pigment from *Rhodospirillum rubrum* by acetone extraction. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **6**, 322-328.
- Hearn, W. R., Medina, J. and Elson, M. K. 1968. Colour change of prodigiosin. *Nature*, **220**, 170-171.
- Park, J. S., Jeong, D. W. and Kang, M. H. 2009. The physicochemical stabilities and biological activities of pigment extract from marine bacterium *Pseudoalteromonas piscida* TA20. *J. Life Sci.* **19**, 1132-1138.
- Kim, J. S., Kim, M. C., Harikrishnan, R., Han, Y. J. and Heo, M. S. 2009. Taxonomical characterization and antimicrobial activity of red pigment-producing marine bacterium strain JE-34. *Korean J. Microbiol.* **45**, 368-376.
- Ji, K. and Kim, Y. T. 2019. Antimicrobial activity of prodigiosin from *Serratia* sp. PDGS 120915 against intestinal pathogenic bacteria. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**, 459-464.