

## Rhodopila globiformis로 부터 Acetone 추출한 색소에 대한 연구 : 적색색소의 안정성

김용환<sup>1</sup> · 이상섭<sup>\*</sup>

경기대학교 식품가공학과

<sup>\*</sup>경기대학교 생물학과

## A Study on Pigments from *Rhodopila globiformis* by Acetone Extraction : Stability of Red Pigments

Yong-Hwan Kim<sup>1</sup> and Sang-Seob Lee<sup>\*</sup>

Dept. of Food Technology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

<sup>\*</sup>Dept. of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

### Abstract

The acetone extracted pigment from the cell mass of *Rhodopila globiformis* DSM 161 was generally red. In pH 5~6 condition, the color of pigment was red, while in pH 7~9 condition it was yellowish red. The pigment was stable at pH range between 6.0~11.0 and below 40° C. In the presence of light and oxygen, the pigment was rapidly degraded and became unstable in the presence of metal ions such as Fe<sup>3+</sup>(1.0×10<sup>-3</sup>M, 1.0×10<sup>-3</sup>M), Al<sup>3+</sup>(1.0×10<sup>-3</sup>M, 1.0×10<sup>-3</sup>M) and Zn<sup>2+</sup>(1.0×10<sup>-2</sup>M). But in the presence of Zn<sup>2+</sup>(1.0×10<sup>-3</sup>M) it was very stable. Through visible absorption scanning, it showed five sharp absorption peaks at 358, 385, 494, 680 and 748nm with three shoulder peaks at 410, 466 and 522nm. On the result of TLC analysis, it was shown to be composed of seven color fractions.

**Key words :** *Rhodopila globiformis*, bacterial pigment, red pigment, stability

### 서 론

식품첨가물로서의 착색제는 인공색소와 천연색소가 있는 바 각종 안정성면에서 인공색소는 높은 효율을 가지고 있으나 천연색소는 일부 비효율적이다. 그러나 합성색소의 안전성(safety)문제가 심각하게 제기되고 있는 실정으로서 일부의 비효율성을 고려하더라도 차후 천연색소의 요구가 급격히 증대 될 것이다. 이러한 천연색소 중 식물의 적색색소인 anthocyanin에 대해서는 고구마 외피색소에 관한 연구<sup>1)</sup>를 비롯하여 다수의 연구가 이루어져 왔으며 실제 다량의 색소가 실생활에 이용되고 있으나 원료생산시기가 일정하게 제한되어 있고 넓은 면적의 생산장소가 필요한 것 등의 문제점이 있을 수 있다. 하지만 미생물의 경우 단기간의 배양 기간에 의해 년중 계속 생산이 가능하여 생

산시기에 제한을 받지 않을 뿐만 아니라 생산장소 측면에서도 좁은 공간에서 대량생산의 효율성이 있으며 저렴한 배지원의 사용으로 인한 경제성이 있는 장점이 있으며 이들의 이용에 대하여 *Monascus*속을 이용한 홍색색소에 관한 연구<sup>2,3)</sup>를 비롯하여 *Rhodotorula*속의 carotenoid 생성에 관한 연구<sup>4,7)</sup>, 그리고 *Claviceps*속의 적갈색 색소에 관한 연구<sup>8)</sup> 등이 있다.

한편 세균의 적색색소에 관해서는 *Streptomyces purpuratus*에 의한 생산조건에 관한 연구<sup>9)</sup>를 비롯하여 다수<sup>10-16)</sup>가 있으나 실제적인 이용면에 접근한 경우는 극히 미미한 실정이다. 이에 광합성 세균중 Okenone series와 Ketocarotenoids를 가지고 있는 것으로 알려진 홍색비황세균(purple nonsulfur bacteria)인 *Rhodopila globiformis*로 부터 적색계통의 색소를 추출하여 식품색소로의 이용을 위한 가능성을 검토하기 위하여 이의 안정성 및 분광학적 특성중 일부를 검토하였다.

<sup>1</sup>To whom all correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양조건

균주는 *Rhodospila globiformis* DSM (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen) 161을 사용하였으며 DSM 25의 배지를 이용하여 조도 2,000Lux, 28~30°C에서 5일간 정지 배양하였다.

### 색소추출 및 색소용액 조제

배양액 3,000ml를 원심분리 (6,000rpm, 15min, 4°C) 하여 얻은 균체를 증류수로 충분히 세척하고 acetone 2,000ml로 2시간씩 2회 진탕추출하여 원심분리하고 상등액을 rotary vacuum evaporator로 35°C에서 감압 건조시켜 사용할 때까지 -18°C의 냉동실에 보관하였으며 색소용액은 건조시료 0.1g을 acetone 10ml에 용해시킨 후 25% EtOH 1,000ml로 희석한 것을 사용하였다.

### pH의 영향

색소에 미치는 pH의 영향은 색소용액에 동량의 각 pH별 완충용액(pH 1.0~2.0 : Clark-Lubs buffer, pH 3.0~8.0 : McIlvaine buffer, pH 9.0~12.0 : Sørensen buffer)을 가하여 25°C에서 3시간 방치후 그들의 흡광도를 측정하였고, pH에 따른 색도의 변화는 색소용액에 pH 3.0~9.0까지의 완충용액을 각각 동량씩 가하여 25°C에서 3시간 정지 후 Color and Color difference meter (Yasuda seiki UC 600 IV)로 투과색도를 측정하여 Hunter의 색계인 L, a 및 b로 나타내었다. 이때 표준 백색판의 L, a 및 b 값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다.

### 광선 및 산소의 영향

색소에 미치는 광선의 영향을 알아보기 위하여 색소용액을 25°C의 암소와 백열등 (110V, 30W) 조건하에서, 산소의 영향은 N<sub>2</sub> gas로 공기를 치환한 후 밀봉한 경우와 100ml culture flask에 시료 20ml를 가하고 진탕시킨 경우로 나누어 25°C의 암소조건하에서 실시하였다.

### 온도 및 금속이온의 영향

색소에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 색소용액을 암소조건에서 4°C, 25°C, 40°C 및 70°C에 정지하여 그들의 흡광도 변화를 측정하였고, 금속이온의 영향은 25°C의 암소조건에서 색소용액에  $1.0 \times 10^{-2}$ M과  $1.0 \times 10^{-3}$ M의 금속이온용액을 각각 1.0%가 되도록 첨

가하여 실시하였다.

### Thin layer chromatography

추출된 색소의 조성 상태를 알기 위하여 100°C의 dry oven에서 24시간 활성화시킨 20×20cm, thickness 0.25mm의 glass plate (Kiesel gel 60 F254, precoated, Merck Art No. 5715)에 색소를 line spot하여 petroleum ether (b.p. 35~60°C) acetone (85 : 15)를 전개용매로 하여 분리하였다. 이때 분리된 각 획분들은 그들의 발현색과 Rf값을 검토하였고, 분리된 각 획분 및 acetone 추출색소를 acetone으로 재용해시켜 가시광선 흡수 특성을 검토하였다.

### 측정조건 및 자료처리

안정성에 대한 측정은 각 조건별로 10일간씩 보관하며 24시간 간격으로 UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu UV-1201)을 이용하여 500nm에서 그들의 흡광도 변화를 측정하였으며 가시광선 흡수특성은 UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu UV-240)을 이용하여 330~800nm까지 측정하였다. 이때 모든 실험은 3 반복으로 실시하였으며 실험항목별 결과를 평균치로 구하여 자료로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### pH의 영향

색소의 pH에 의한 영향을 검토한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 6.0으로부터 11사이의 넓은 범위에서 80%이상의 안정성을 나타내었으며 이는 Imada 등<sup>11)</sup>의 *Streptomyces propurpuratus*와 *Bacillus* sp. No.751의 혼합배양

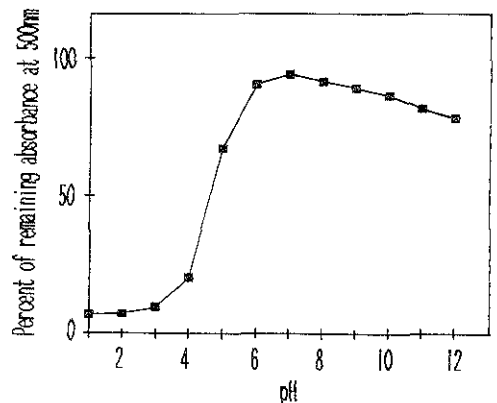


Fig. 1. Stability of *Rhodospila globiformis* red pigment under various pH conditions at 25°C.

에 의해 생산된 적자색 색소의 안정성이 pH 3.6 ~8.2 라는 보고 보다 알카리쪽의 안정범위로서 중성 및 알카리성 식품에 사용가능할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 pH를 달리한 Hunter value를 조사한 결과 Table 1에서와 같이 L값은 pH가 증가함에 따라 비교적 소폭으로 증가하여 명도에는 별 차이가 없는 것으로 나타났으며 a값은 pH 5와 6에서 보다 높은 적색도를 나타내었고, b값은 pH 7과 9 사이에서 보다 높은 황색도를 나타내어 알카리에 갈수록 적색도는 감소하고 황색도가 증가되었다. 따라서 본 색소는 pH 5~6 범위내의 식품에는 적색위주로, pH 7~9 범위내에서는 황적색 색소의 사용이 유리할 것이다.

광선 및 산소의 영향

광선과 산소가 미치는 영향은 Fig. 2에서와 같이 N<sub>2</sub> gas로 공기를 치환한 후 암소 정치한 경우 5일까지 95% 이상, 10일까지 90% 정도의 안정성을 나타내었으며, 암소만의 경우 3일까지 95% 이상, 8일까지 90% 이상, 10일까지 85% 정도의 높은 안정성을 나타내었다. 그러나 암소의 산소존재 및 광조사의 경우 안정성이 급격히 저하되어 3일 경과후 부터 색소 잔존율이 급격히 저하되면서 심각한 퇴색현상이 나타나게 되었다. 그러므로 본 색소는 일반적인 천연 색소와 마찬가지로 광선과 산소에 의한 색소분해가 신속히 발생하는 것을 알 수 있었으며 이들의 접촉 차단만이 색소의 안정화에 기여할 것이다. 따라서 광선 및 산소 차단성 film을 사용하면 높은 안정성을 기대할 수 있을 것이다.

온도 및 금속이온의 영향

온도에 대한 색소의 안정성은 Fig. 3에서와 같이 4° C에서는 6일까지 95% 이상, 10일까지 90% 이상의 높은 안정성을 나타내어 색조의 변화에 영향을 받지 않았으며, 25° C에서도 8일까지 90% 이상, 10일까지 85%

% 정도의 안정성을 나타내었고, 40° C에서도 5일까지는 90% 이상, 8일까지 85% 이상의 안정성을 나타내었다. 그러나 70° C의 경우 기간이 경과할수록 급격한 색조의 저하현상이 발생하여 본 색소는 40° C이하에서 안정한 상태를 유지할 수 있는 것으로 미루어 저온처리 및 저온유통 식품의 경우에 한정되게 사용하면 높은 효과를 기대할 수 있을 것이다. 금속이온에 의해서는 Table 2에서와 같이 Zn<sup>2+</sup>의 첨가시 1.0×10<sup>-3</sup>M의 경우 8일까지 90% 이상, 10일까지도 85% 이상의 높은 안정성을 나타내었으나 1.0×10<sup>-2</sup>M의 경우는 혼탁을 일으켰으며 색조 자체가 황색으로 변색되며 안정성이 현저히 저하되었다. 한편 Fe<sup>3+</sup>와 Al<sup>3+</sup>의 첨가시 두

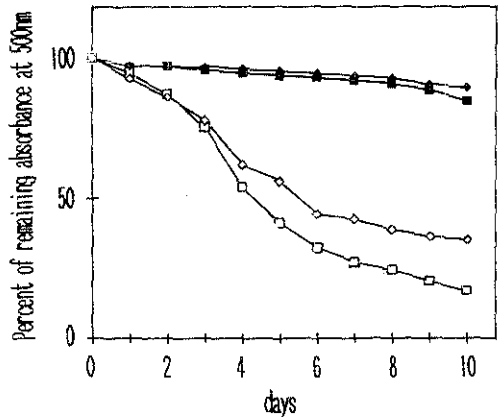


Fig. 2. Effect of light and oxygen on stability of Rhodospila globiformis red pigment during storage at 25° C.

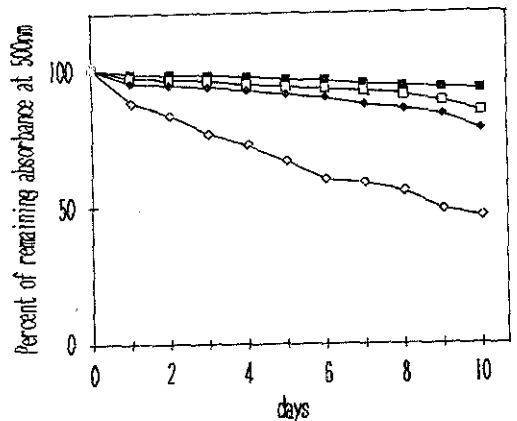


Fig. 3. Effect of temperature on stability of Rhodospila globiformis red pigment during storage in the dark.

Table 1. Hunter's color values of Rhodospila globiformis red pigment at various pH conditions

pH	L (Lightness)	a (Redness)	b (Yellowness)
3	60.5	-0.74	-0.51
4	52.6	3.69	4.27
5	62.5	12.1	10.3
6	68.2	11.4	12.6
7	78.8	9.36	16.0
8	76.0	8.85	15.1
9	82.2	7.82	16.0

\*0.1g pigment was dissolved in 10ml acetone and then diluted to 1,000ml with 25% EtOH

농도 모두 황색으로 변하며 심한 혼탁을 일으켜 안정성이 현저히 저하되었다.  $\text{Cu}^{2+}$ 의 경우  $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ 의 경우는 비교적 양호한 색조유지가 되었으나  $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 의 경우 미황색으로 전환되면서 소규모의 혼탁이 발생되었다. 그러나  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 의 첨가시 두 농도 모두 4일까지 85% 이상, 10일까지 80% 정도의 안정성을 유지한 것으로 나타나 이들에 의해서는 색조에 커다란 영향을 받지 않은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Imada 등<sup>11)</sup>이 보고한  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ 에 의한 퇴색과 비교할 때 유사한 결과였으나  $\text{Zn}^{2+}$ 의 경우 농도에 따른 차이가 커져 지속적인 검토가 필요하다고 사료된다. 그러므로 본 색소는 저온이 유지되는 ice cream 및 빙과류 등과, 정제과정중 금속이온이 제거되는 유지 식품 등에 사용하면 높은 안정성을 기대할 수 있을 것이다.

#### TLC 및 absorption spectra

색소의 특성을 알기 위하여 가시광선 영역의 흡수특성을 조사한 결과 및 색소의 조성을 검토하기 위한 TLC 결과 이들의 특성은 Table 3과 같다. 즉 본 색소는 흡수극대가 358, 385, 494, 680과 748nm인 5개의 peak 및 410, 466과 522nm의 shoulder peak 3개가 확인되었으

며 TLC상에서 육안으로 확인되는 7개의 색소 획분을 나타내었고 이들 획분들을 acetone으로 재추출하여 25°C의 실내에서 6시간 보관한 결과 F-1, F-2 및 F-7은 안정성이 낮아 전반적으로 퇴색되었으나 F-3, F-4, F-5 및 F-6는 안정성이 높게 유지되었다. 주 적색색소는 F-3와 F-4로 나타났으며 자색의 F-5와 녹색의 F-6도 다량의 상태를 나타내어 순수한 적색 위주의 사용시 이들 F-5와 F-6의 제거가 필요하다 하겠다. 이중 F-3의 경우 흡수극대가 372, 388, 466, 494와 524nm로서 Takaichi 등<sup>12)</sup>이 보고한 *Erythrobacter longus*의 경우와 비교하여 볼때 spirilloxanthin으로 판단되어지며, F-6의 경우는 녹색을 나타내어 광합성 색소인 bactriochlorophyll a로 판단<sup>13)</sup>되어진다. 한편 F-5의 자색은 지금까지 잘 알려져 있지 않으며 이는 균체특성, 배양조건 및 추출용매에 기인한 것인지 명확하지 않아 이 색소에 관해서는 추후 지속적인 검토가 필요하다고 사료된다.

#### 요 약

*Rhodospila globiformis* DSM 161 균체로부터 acetone 추출한 색소는 흡수극대가 358, 385, 494, 680 및

Table 2. Effect of metal ions ( $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$  and  $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ ) on stability of *Rhodospila globiformis* red pigment during storage in the dark at 25°C

Metal	$1.0 \times 10^{-3}\text{M}$						$1.0 \times 10^{-4}\text{M}$					
	0	2	4	6	8	10(days)	0	2	4	6	8	10(days)
None	100	96.1	94.4	92.8	90.6	84.5	100	96.1	94.4	92.8	90.6	84.5
NaCl		88.6	86.5	83.4	81.9	80.9		91.6	85.2	81.7	80.2	78.9
KCl		91.1	86.1	82.9	81.1	79.9		90.4	86.4	83.0	81.1	79.8
MgCl <sub>2</sub>		80.1	78.5	76.7	75.1	73.4		82.3	80.4	80.3	79.0	76.7
CaCl <sub>2</sub>		76.8	76.2	75.8	75.1	69.0		77.9	77.5	76.1	75.1	69.9
ZnCl <sub>2</sub>		65.4	55.2	52.9	50.5	49.8		96.4	95.2	93.7	90.9	86.6
CuCl <sub>2</sub>		66.0	60.2	57.7	54.0	52.7		90.0	85.5	82.8	78.8	76.2
FeCl <sub>3</sub>		47.7	42.6	37.6	27.9	23.4		58.0	51.7	41.3	34.6	33.4
AlCl <sub>3</sub>		50.9	47.4	40.2	34.8	31.8		58.4	57.7	55.9	53.1	51.3

\* Percent of remaining absorbance at 500nm

Table 3. Color, Rf value and spectral characteristics of isolated pigments by TLC

Pigments No.	Color	Rf value*	Maximum absorption wavelength (nm)**
Acetone extract	Red	0	358, 385, 410, 466, 494, 522, 680, 748
F-1	Pink	0.85	358, 488, 515
F-2	Red orange	0.72	390, 468, 494, 526
F-3	Red	0.68	372, 388, 466, 494, 524
F-4	Purple red	0.48	394, 471, 497, 529
F-5	Violet	0.37	356, 383, 410, 492, 523, 620, 679, 747
F-6	Green	0.34	360, 379, 410, 514, 620, 679, 747
F-7	Orange	0.31	358, 379, 486, 516, 680, 749

\* TLC developing solvent : petroleum ether (b.p. 35~60°C)/acetone (85 : 15)

\*\* Absorption spectra of collected pigments dissolved in acetone

748nm인 5개의 peak와 410, 466 및 522nm인 3개의 shoulder peak로 구성되어 있었으며 전반적인 색조는 적색을 나타내고 있었다. 본 색소의 안정된 pH영역은 6.0~11.0이었으며 pH 5~6 사이에서는 적색을, pH 7~9 사이에서는 황적색을 나타내었고, 광선과 산소 존재하에서는 안정성이 급격히 저하되었다. 40°C이하의 온도에서 안정하였고,  $Zn^{2+}$  ( $1.0 \times 10^{-3}M$ )의 첨가는 안정도를 증대시켰다. 그러나  $1.0 \times 10^{-2}M$ 의 경우는 안정도가 저하되었으며  $Fe^{2+}$ 와  $Al^{3+}$ 은  $1.0 \times 10^{-2}M$ 과  $1.0 \times 10^{-3}M$  모두 안정도를 크게 저하시켰다. 본 색소는 TLC결과 7종의 색소획분을 나타내었다.

## 문 헌

- Zulin, S., Bassa, I. A., Gabriel, S. L. and Francis, F. J. : Anthocyanin pigments of sweet potatoes—*Ipomoea batatas*. *J. Food Sci.*, **57** (3), 755 (1992)
- 김명희, 이태경, 양한철 : *Monascus anka albidus*의 적색색소 생산. *한국식품과학회지*, **24** (5), 451 (1992)
- 김수연, 김정구 : *Monascus anka*의 균주선발 및 색소 생성조건. *한국농화학회지*, **3** (3), 239 (1990)
- Nam, H. S. and Rhee, J. S. : Effect of carbon source and carbon to nitrogen ratio on carotenogenesis of *Rhodotorula glutinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1** (1), 75 (1991)
- Matelli, H. L., da Silva, I. M., Souza, N. O. and Pomeroy, D. : Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. *Biotechnol. Lett.*, **12** (3), 207 (1990)
- Costa, I., Martelli, H. L., da Silva, I. M. and Pomeroy, D. : Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnol. Lett.*, **9** (5), 373 (1978)
- 박기현, 박성오 : 미생물에 의한 carotenoid 색소 생성에 관한 연구 (제1보). *한국농화학회지*, **19** (4), 243 (1976)
- Cho, S. H. and Anderson, J. A. : Pigmentation of *Claviceps* species after on tryptophan media. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **25** (3), 155 (1982)
- Ohshima, M., Ishizaki, N. and Tonooka, Y. : Production of neopurpuratin, a purplish-red pigment, by pure culture of *Streptomyces propurpuratus*. *J. Ferment. Technol.*, **63** (1), 79 (1985)
- Ohshima, M., Ishizaki, N., Handa, A. and Tonooka, Y. : Cultural conditions for production of neopurpuratin, a purplish-red pigment, by mixed culture of *Streptomyces propurpuratus* with *Bacillus* sp. *J. Ferment. Technol.*, **61** (1), 31 (1983)
- Imada, K., Ohshima, M., Yoshida, T., Yasuda, S. and Yoshino, S. : Evaluation of neopurpuratin, a purplish-red substance produced by microorganism, as food colors. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.*, **30** (5), 270 (1983)
- Shimizu, S., Sato, K., Hiraoka, M., Yamashita, F. and Kobayashi, T. : Carotenoids formation by a facultative methylotroph, *Protaminobacter ruber*. *J. Ferment. Technol.*, **60** (2), 163 (1982)
- Sato, K., Mizutani, T., Hiraoka, M. and Shimizu, S. : Carotenoid containing sugar moiety from a facultative methylotroph, *Protaminobacter ruber*. *J. Ferment. Technol.*, **60** (2), 111 (1982)
- Ohshima, M., Ishizaki, N., Handa, A., Tonooka, Y. and Kanda, N. : Isolation and properties of neopurpuratin, a purplish-red pigment produced by mixed culture. *J. Ferment. Technol.*, **59** (5), 335 (1981)
- Palleroni, N. J., Reichelt, K. E., Mueller, D., Epps, R., Tabenkin, B., Bull, D. N., Shuep, W. and Berger, J. : Production of a novel red pigment, rubrolone, by *Streptomyces echinoruber* sp. Nov. 1. Taxonomy, fermentation and partial purification. *J. Antibiot.*, **31** (12), 1218 (1978)
- Shinobu, R. : *Streptomyces propurpuratus* sp. Nov. A new streptomycete which produces a soluble, deep purplish-red pigment in mixed culture with the other microorganisms. *J. Antibiot.*, **23** (3), 125 (1970)
- Takaichi, S., Shimada, K. and Ishidzu, I. : Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythro-bacter longus* :  $\beta$ -carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch. Microbiol.*, **153**, 118 (1990)
- James, T. S., Marvin, P. B., Norbert, P. and John, G. H. : "Bergey's manual of systematic bacteriology" Williams and Wilkins Press, Vol.3, p.1667 (1989)

(1993년 12월 14일 접수)