

## 청자색 색소를 분비하는 *Streptomyces californicus* KS-89의 분리 및 동정

류병호\* · 지영애 · 박법규 · 박우열 · 김동규

경성대학교 공과대학 식품공학과

### Isolation and Identification of *Streptomyces californicus* KS-89 Produced Bluish Purple Pigment

Ryu, Beung-Ho\*, Young-Eh Chi, Bub-Gyu Park,  
Woo-Yeul Park and Dong-Gyu Kim

Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

The objective intended for this study is that of providing a fairly practical guide to the use of natural pigment in the food industry. *Streptomyces* isolated from soil were carried out test for the excretion of their bluish purple pigment. One strain of *Streptomyces*, strain KS-89 showed a high production of bluish purple pigment on the glycerol starch-glutamate medium. The morphological and physiological characteristics of the strain KS-89 were studied according to the methods of Bergey's manual, Nonomura's classification, and Pridham and Lyons classification. Based on the results obtained in these experiments, strain KS-89 was identified as *Streptomyces californicus*.

식품의 3대 요소의 하나인 식품의 색은, 식품의 가치를 높이고 식품의 품질을 유지하며 기호성을 높이는 데 큰 구실을 하고 있다.

식품 중에 함유되어 있는 천연색소는 물리, 화학적으로 불안정하여 식품의 가공, 저장, 판매 중 쉽게 퇴색하여 식품의 품질을 떨어뜨리고 있으나 그 대체품이 없어 화학적 합성품인 식품 첨가물을 사용하고 있어 그 독성이 식품위생상 문제가 되고 있다(1-7).

현재 사용되고 있는 천연색소 중 식물계에서 carotenoid, chlorophyll, 곤충류에서 cochineal 색소가 있으나 색깔과 사용범위가 한정되어 있고 값이 비싸 부분적으로 사용되고 있어 보다 폭넓은 색소의 생산이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 점에서 색소의 안정성이 높고, 대량생산이 가능한 미생물에 의한 색소의 생산이 바람직스럽다.

미생물에 의한 색소생산은 *Monascus anka* 와 *Monas-*

*cus purpureus*(8-14), *Streptomyces propurpuratus* (15,16), *Streptomyces propurpuratus* 와 *Bacillus* sp. (17-21) 및 *Streptomyces echinoruber* (22)에 의한 연구가 있으며 현재 산업적으로 이용 가능성이 높다.

본 연구는 미생물에 의한 천연색소를 생산하기 위한 방안의 하나로 토양에서 분리한 방선균 중 청자색을 내는 균주를 분리, 동정하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주의 선별 및 배양

실험에 사용한 균주는 부산지역의 토양을 채취하여 70°C에서 30분간 건조한 후, 멸균 생리식염수로 현탁하여 방선균의 분리배지인 glycerol starch glutamate (GSG 배지, 1.0% starch, 1% glycerol, 0.1% sodium glutamate, 0.05% NaNO<sub>3</sub>, 0.025% proline, 0.025% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 0.001% thiamine·HCl) 배지를 사용하여 30°C에서 4~5

Key words: Bluish purple pigment, *Streptomyces californicus* KS-89  
\*Corresponding author

일간 배양하였다.

생성된 colony를 관찰하여 방선균이라고 판단되는 균주를 멸균된 tooth pick로 새로 만든 GSG 고체배지에서 옮긴 후 다시 30°C에서 7~10일간 배양하여 청자색을 나타내는 colony를 분리 선별하였다.

청자색을 분비하는 colony는 50ml GSG 배지가 들어있는 300ml 플라스크에 접종하고 30°C에서 7일간 배양하였다. 배양액 10ml를 취하여 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 575nm(Shimazu, UV-160A, Japan)에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 가장 높은 균주를 실험대상 균주로 하였다.

### 균주의 분리 동정

실험균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성은 Shirling과 Gottlieb(22)와 Waksman(23)의 방법에 준하여 실험하였으며, 실험결과들은 Bergey's manual of determinative Bacteriology(24) 및 Nonomura(25)와 Pridham과 Lyons(26)에 기술되어 있는 항목들과 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 청자색소 생산균주의 선별 및 동정

부산지역에서 채취한 토양으로부터 분리한 약 1000주의 colony로부터 GSG 고체배지에서 청자색 색소를 분비하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 GSG 액체배지에서 30°C에서 7일간 배양하여 그 중 청자색 색소를 가장 많이 분비하는 균주인 strain KS-89를 본 연구의 시험균주로 최종 선별하여 아래와 같이 균주의 동정을

실시하였다.

### 형태학적 특성

Strain KS-89를 10~14일간 전배양한 후 각 배지에 접종 배양하면서 colony 성장, 성장, 기균사의 색 등을 관찰한 결과 colony 성상은 배지에 따라 다양한 형태였으며, 성장은 yeast extract, malt extract agar, bennet agar, starch salts agar 및 oatmeal agar 등에서는 잘 생육하였으나, Czapeks 배지에서는 생육이 아주 약하였다.

또, Shirling과 Gottlieb의 방법(22)에 준하여 실험한 결과 yeast extract, malt extract agar, glycerol asparagine agar 등의 배지에서 기균사의 색이 회색으로 나타났다가 청자색으로 변하였다.

Strain KS-89의 균사는 rectiflexible으로 분류되고, 포자는 0.3~0.7 $\mu$ m의 크기로 타원형이며, 매끄러운 모양이었다.

이와 같은 결과는 Table 1에서와 같이 Nonomura 분류법(25)과 Pridham과 Lyons 분류법(26)에 의하여 strain KS-89와 *Streptomyces californicus* IFO 3386 및 *Streptomyces phaeopurpureus* IFO 3930를 비교하였을 때 형태학적 특성으로 보아 비슷한 경향이였다. 따라서 strain KS-89 균주와 형태학상 유사균주인 *Streptomyces californicus* IFO 3386과 *Streptomyces phaeopurpureus* IFO 3930을 비교 균주로 하여 이하의 실험에서 균주의 동정을 행하였다.

### 생리적 특성

Strain KS-89의 생리적 특징을 실험한 결과를 Table

Table 1. Morphological characteristics of strain KS-89.

	KS-89	<i>S. californicus</i> IFO 3386	<i>S. phaeopurpureus</i> IFO 3930
Spore chain	Rectiflexibles	Rectiflexibles	Rectiflexibles
Substrate mycelium	Not fragmented	Not fragmented	Not fragmented
Spore shape	Ellipsoidal	Ellipsoidal	Ellipsoidal
Flagellated spore	Not detected	Not detected	Not detected
Colony surface	Short colony	Short colony	Short colony
Spore size ( $\mu$ m)	0.3-0.7	0.3-0.7	0.3-0.7
Spore wall ornamentation	Smooth	Smooth	Smooth
Sporephore	Formed form aerial mycelium	Formed form aerial mycelium	Formed form aerial mycelium
Globular sporangium	Not detected	Not detected	Not detected

Table 2. Physiological characteristics of strain KS-89.

Characteristics	KS-89	<i>S. californicus</i> IFO 3386	<i>S. phaeopurpureus</i> IFO 3930
Optimum pH	7.0	7.0	7.0
Growth temp.	30°C	30°C	30°C
Gelatin liquefaction	+	+	+
Melanin formation	-	-	+
Nitrate reduction	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	+	+	+
Catalase production	+	+	+
Cellulase production	-	-	-
Protease production	+	+	+
Elastin production	+	+	+
Xanthine degradation	+	+	+
<i>Resistance to</i>			
Rifampicin (50 µg/ml)	+	+	+
Streptomycin (10 µg/ml)	+	+	-
Growth at 45°C	-	-	-
<i>Growth with (% w/v)</i>			
NaCl (7.0%)	+	+	-
Sodium azide (0.01%)	+	+	-
Phenol (0.1%)	+	+	-

+: positive  
-: negative

2에 나타내었다.

Strain KS-89는 온도범위 20~40°C에서 pH 4.0~8.0에서 생육하였으나, 최적온도는 30°C였고, 최적 pH는 7.0으로 호기성 방선균이었다. 한편, strain KS-89는 glucose-peptone-gelatin 배지에서 젤라틴의 액화상태를 관찰한 결과, 9일째 액화가 일어나기 시작하여, 20일째에는 흑갈색 색소를 형성하면서 액화가 거의 다 일어나 젤라틴 액화의 양성을 나타내는 호기성균임을 확인하였다.

I.S.P System에 준하여 각종 배지에 strain KS-89와 비교 균주를 배양하여 색소 생성관계를 관찰한 결과 strain KS-89와 *Streptomyces californicus* IFO 3386은 peptone yeast iron agar 및 tryptone yeast 액체 배지에서 청색 색소를 형성하였으나, *Streptomyces phaeopurpureus* IFO 3930은 tryptone yeast 액체배지에서 갈색 색소를 형성하므로 strain KS-89와 *Streptomyces californicus* IFO 3386은 분류학상 유사계열의

Table 3. Utilization of carbon compounds by strain KS-89.

Carbon compound	KS-89	<i>S. californicus</i> IFO 3386	<i>S. phaeopurpureus</i> IFO 3930
Control (no carbon)	-	-	-
Xylose	+	+	-
fructose	+	+	-
Sucrose	+	-	-
Mannitol	-	+	-
L-Rhamnose	-	+	-
Raffinose	-	-	-
Sod. citrate	+	+	+
Sod. pyruvate	+	+	+
Inositol	-	-	+
Starch	+	+	+

+: positive  
-: negative

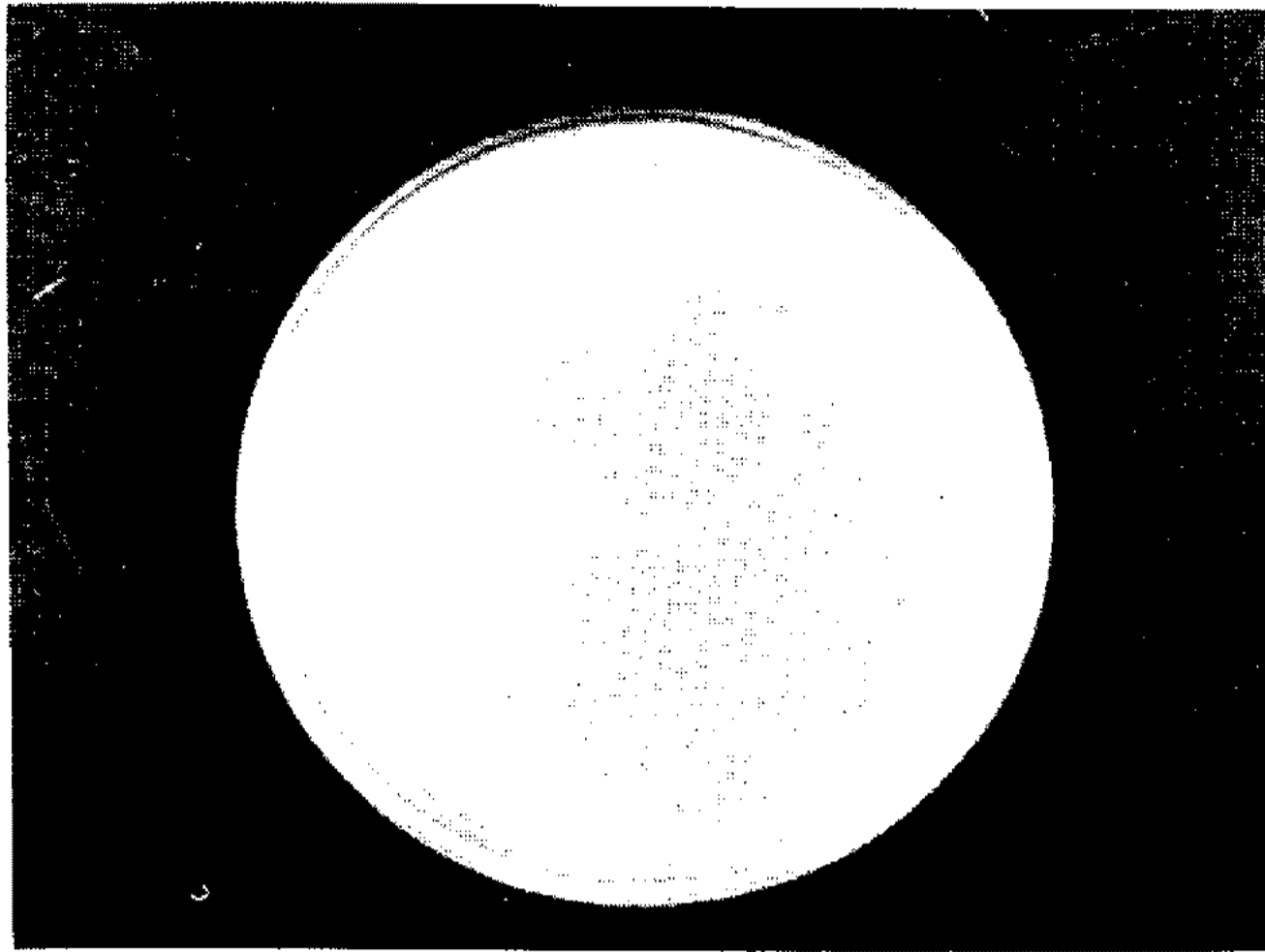
한 균주로 사료된다.

또한, strain KS-89의 질산염환원력, catalase, cellulase 및 단백질 분해효소의 생산력과 xanthine의 분해능은 *Streptomyces californicus* IFO 3386 및 *Streptomyces phaeopurpureus* IFO 3930과 비슷한 경향을 나타내었다.

항생물질에 대한 감수성의 실험결과에 의하면, strain KS-89와 *Streptomyces californicus* IFO 3386은 glucose asparagine 액체배지에 rifampicin (50 µg/ml), streptomycin을 첨가하여 30°C에서 14일간 배양했을 때 거의 영향을 받지 않고 생육하였으나, *Streptomyces phaeopurpureus* IFO 3930은 첨가하지 않는 대조구와 비교한 결과 5일부터 분명한 생육의 차이를 보이면서 10일부터는 생육의 현저한 저해를 나타내었다.

염농도에 대한 내성에 대한 실험결과를 보면 7.0%에서 생육이 가능하였고 0.01% sodium azide에서도 생육함을 관찰할 수 있었다.

탄수화물의 이용성에 있어서는 Pridham과 Gottlieb의 기초배지(26)를 사용하여 당이용성을 실험한 결과 D-xylose, D-fructose, sucrose는 잘 이용하였으며, mannitol, L-rhamnose, raffinose 및 inositol은 소화하지 못하였으나, sodium citrate와 sodium pyruvate 및 starch을 이용하였으므로 *Streptomyces californicus*와 비슷하였다.



**Fig. 1. Chitinolytic colony zone of *Streptomyces californicus* KS-89.**

특히, 방선균을 확인하는 방법 중 chitin의 분해능이 많이 이용되는데 (27), strain KS-89는 chitin을 함유한

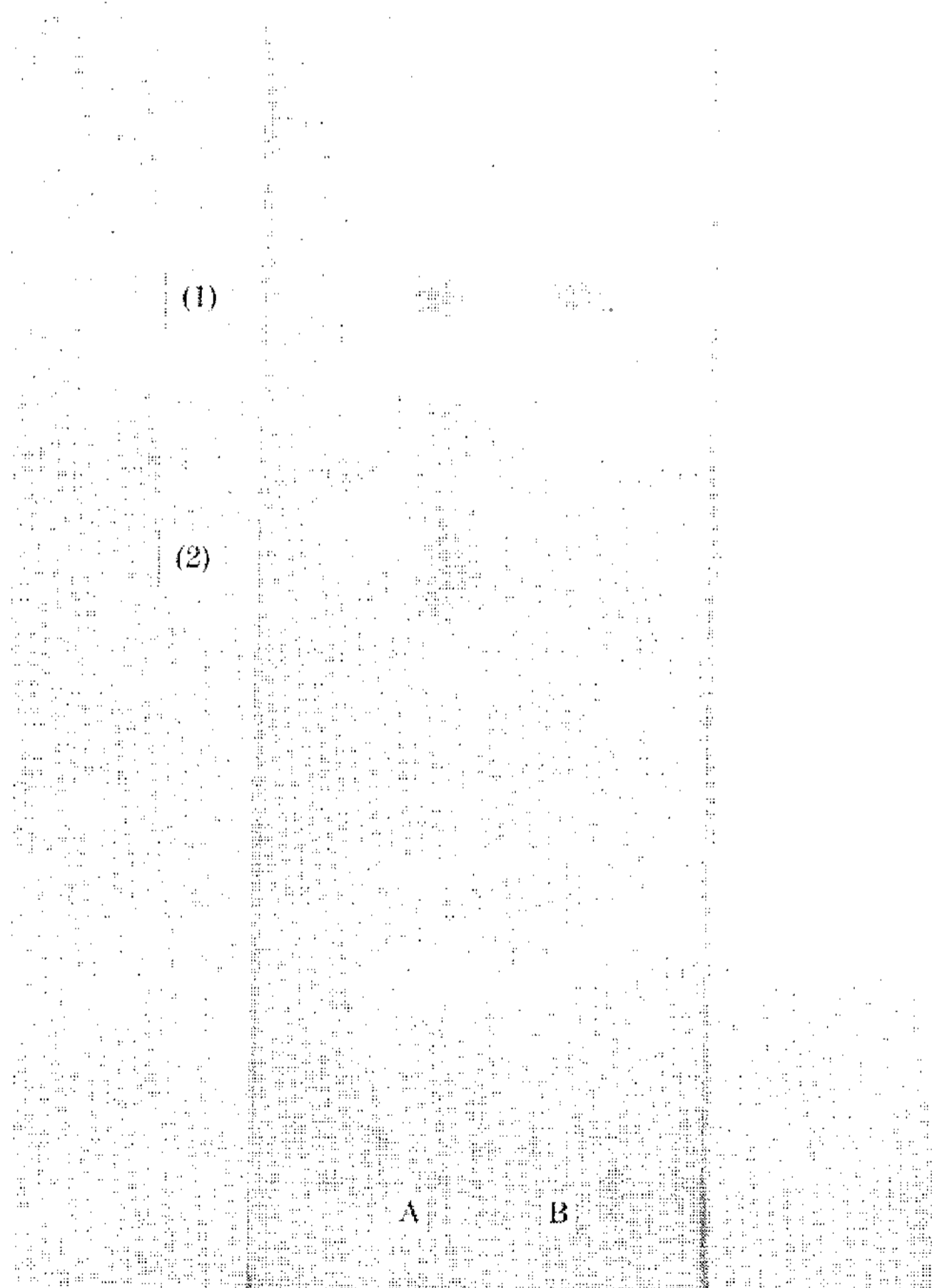
agar 배지에서 clear zone을 생성하였다(Fig.1).

**세포벽 구성성분**

*Streptomyces* 속의 세포벽은 특별히 L,L-diaminopimelic acid가 들어 있으며, 또 아미노산인 alanine, glutamic acid 및 glycine과 약간의 당이 함유되어 있다 (24, 28).

Strain KS-89의 세포벽의 L,L-diaminopimelic acid와 아미노산과 당을 분석하기 위하여 세포벽을 분해한 후 추출하여 박층 크로마토그래피법으로(Fig.2) 검토한 결과 L,L-diaminopimelic acid를 함유하고 있으며, 아미노산으로는 alanine, glutamic acid 및 glycine도 검출되었다(Fig.3).

당성분을 박층 크로마토그래피법으로 분석한 결과는 Fig.4와 같다. 표준물질로 5탄당, 6탄당은 황색으로 나타나 쉽게 구분할 수 있었으나, strain KS-89에서 추출한 시료에서는 미지의 성분으로 5탄당 혹은 6탄당의



**Fig. 2. T.L.C. of diaminopimelic acid and its derivatives in cell wall of *Streptomyces californicus* KS-89.**

A: Standard B: Sample  
1: LL-diaminopimelic acid 2: meso-diaminopimelic acid  
It was carried out by ascending technique using a silicagel plate, developed solvents : Methanol : H<sub>2</sub>O : 10 N-HCL : Pyridine = 80 : 17 : 5 : 2.5 : 10



**Fig. 3. Thin layer chromatogram of amino acids in cell wall of *Streptomyces californicus* KS-89.**

A: Alanine B: Glycine C: Glutamic acid D: Sample  
It was carried out by ascending technique using a silica gel plate, developed solvents ; n-Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O : Acetic acid = 60:40:30:3



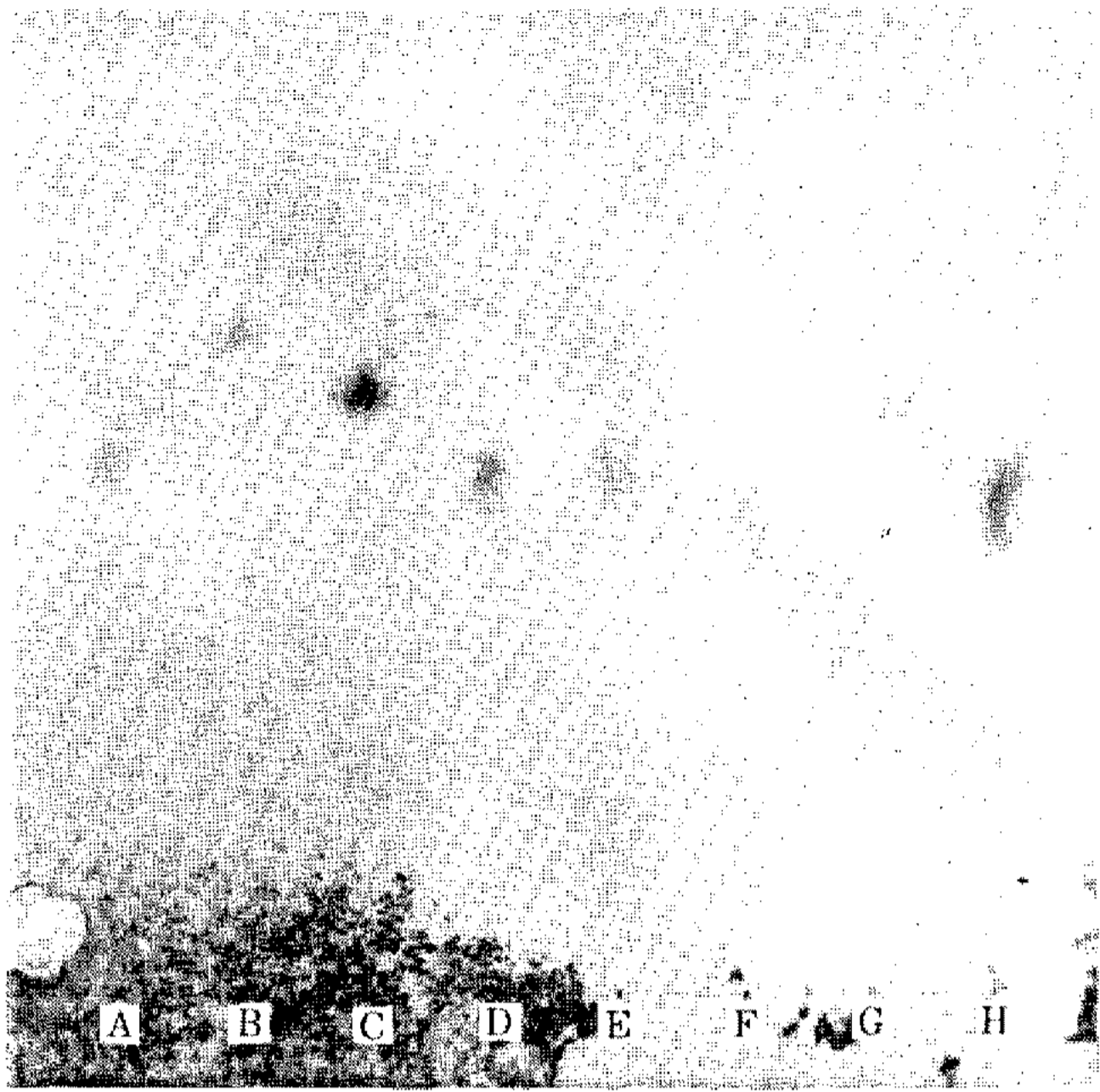


Fig. 4. Thin layer chromatogram of amino acids in cell wall of *Streptomyces californicus* KS-89.

A: Mannose B: Rhamnose C: Xylose D: Glucose E: Arabinose F: Galactose G: Ribose H: Sample  
It was carried out by ascending technique using a silica gel plate, developed solvents : *n*-Butanol : Pyridine : H<sub>2</sub>O : Toluene = 5 : 3 : 3 : 4

특정의 당성분은 확인할 수 없었다.

이상의 실험결과로부터 strain KS-89는 형태적 특성, 특히 smooth type의 포자형성, 기균사의 형성 등으로 보아 전형적인 *Streptomyces* 속임을 알 수 있었으며 세포벽의 구성성분으로는 방선균의 세포벽 주요 구성성분인 L,L-diaminopimelic acid와 glycine 등을 함유하고 있어 *Streptomyces* 속에 속하는 균주로 판정하였다.

한편 Czapek's 배지에서 느린 생육현상, yeast malt agar, oatmeal agar, starch agar 및 glycerol asparagine 등의 배지에서 회색 기균사의 형성 등 배양상의 특징과 당이용성, chitin 분해능 및 streptomycin에 대한 감수성 등 주요한 생리적 특성으로 보아 *Streptomyces*의 *Streptomyces californicus*와 거의 일치하는 성질을 나타내어, strain KS-89를 *Streptomyces californicus*로 동정하였다.

## 요 약

식품산업에 많이 이용되고 있는 인공색소를 천연색소로 대체할 방안의 하나로 청자색 색소를 분비하는 균주를 분리 동정하였다.

토양에서 분리한 *Streptomyces* 중 청자색 색소를 분비

하는 균주인 strain KS-89를 분리하여 그 형태학적, 생물화학적 특성을 Bergey's manual, Nonomura's classification, Pridham 및 Lyons classification으로 비교한 결과 수용성 청자색 색소를 분비하는 *Streptomyces californicus* KS-89로 확인 동정되었다.

## 참고문헌

1. Goldenberg, N.: British Nutrition Foundation, London (1979).
2. World Health Organization: 17th report of the joint FAO/WHO Expert committee on food additives, Geneva (1974).
3. Francis, F.J.: *Food Technol.* **4**, 62 (1987).
4. Crampton, R.F.: Colouring agents, the British National Foundation, Forbes publications, London (1977).
5. Kojima, K.: The toxicology assessment of natural food colorants, *Chem. Toxicol. Food Elsevier* (1978).
6. Yoshimoto, M., H. Okamoto, S. Hatano. and T. Watanabe: *J. Food Hygi. (Japan)*. **182**, 154 (1977).
7. Khera, K.S. and I.C. Munro: *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **6**, 81 (1979).
8. Su, Y.C., W.L. Chen, H.C. Wang and W.H. Wang: *J. Chinese Chem. Soc.* **8**, 46 (1970).
9. Lin, C.F.: *J. Ferment. Technol.* **51**(6), 407 (1973).
10. Yoshimura, M., S. Yamanaka, K. Mitsugi and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.* **39**(9), 1789 (1975).
11. Lin, C.F. and S.T. Suen: *J. Ferment Technol.*, **51**, 757 (1973).
12. Ryu, B.H., B.H. Lee, B.G. Park, H.S. Kim, D.S. Kim and M.H. Roh: *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**(1), 37 (1989).
13. Ryu, B.H., B.H. Lee and H.S. Kim: *Kor. Food Sci. Technol.* **83**, 31 (1989).
14. Hiroi, T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka and N. Ogasawara: *Agric. Biol. Chem.* **43**(9), 1975 (1979).
15. Oshima, M., N. Ishizaki and Y. Tonooka: *J. Ferment. Technol.* **63**(1), 79 (1985).
16. Oshima, M., N. Ishizaki, A. Handa, Y. Tonooka and N. Kanda: *J. Ferment. Technol.* **59**(3), 209 (1981).
17. Shinobu, R.: *J. of Antibiotics.* **13**(3), 125 (1970).
18. Oshima, M., N. Ishizaki, A. Habdo, Y. Tonooka and N. Kanada: *J. Ferment. Technol.* **59**(5), 335 (1981).
19. Oshima, M., N. Ishizaki, A. Handa and Y. Tonooka: *J. Ferment. Technol.* **61**(1), 31 (1983).
20. Ryu, B.H., B.G. Park, Y.E. Chi and J.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**(4), 327 (1989).
21. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Internat. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313 (1966).
22. Palleroni, N.J., K.E. Reichelt, D. Mueller, R. Epps, B. Tabenkin, D.N. Bull, W. Schuep and J. Berger: *J. of Antibiotics.* **16**(12), 1218 (1978).

23. Waksman, S.A.: Actinomycetes, The Williams and Wilkins Co., *Baltimore* 2, 330 (1961).
24. Buchanan, R. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., The Williams and Wilkins Co., *Baltimore* (1989).
25. Nonomura, H.: *J. Ferment. Technol.* 52, 78 (1974).
26. Pridham, T.G. and J. Lyons: Progress in classification of the toxonoimic and nomenclatural status of some problem actinomycetes, *Development Industrial Microbiology*, 10, 183 (1969).
27. Hsu, S.C. and J.L. Lockwood: *Appl. Microbiol.*, 29, 422 (1975).
28. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier: *Intern. J. System Bacteriol.* 20(4), 435 (1970).

(Received February 7, 1990)