

수용성 황색색소를 분비하는 *Bacillus* sp. PY123균주의 분리 및 특성

김지연 · 김광현*

동의대학교 자연대학 미생물학과

Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. PY123 Producing Water-soluble Yellow Pigment. Ji-Youn Kim and Kwang-Hyeon Kim*. Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea - To develop a yellow pigment for a food-additive, a strain producing a water-soluble yellow pigment was isolated from phylloplane of tree leaf. The strain PY123 was identified a *Bacillus* sp. based on morphological and biochemical characterization such as a bacillus form, motility, spore formation, Gram positive, and catalase production. The pigment production of the strain PY123 was increased about 3 times in potato broth containing 1% sucrose and 0.1 mM CoCl₂ than in only potato broth after incubation at 30°C for 2 days. When 0.1 mM CoCl₂ was added in potato broth containing 1% sucrose at late log phase during incubation of the strain PY123, cell growth was not inhibited, and the period at maximal pigment production of the strain PY123 was about 12 hrs faster than in potato broth containing 1% sucrose and 0.1 mM CoCl₂ simultaneously.

식품의 색은 식품의 가치와 기호성을 높이는데 큰 구실을 하며, 주로 적색이나 황색이 많이 사용된다. 지금까지 식품공업에는 주로 합성색소가 사용되었으며, 안정하고, 대량 생산에 따른 가격이 저렴하며, 제품에 동질성이 유지된다는 점에서 널리 사용되어 왔다. 그러나 오늘날에는 생활 수준이 향상되면서 질적인 면의 추구에 따른 소비자들의 기호도가 변화되어 천연색소에 대한 요구가 급격히 증가되고 있으나, 천연색소의 사용은 식품의 가공, 저장 및 판매 중에 쉽게 탈색하여 식품의 질을 떨어뜨리는 문제점도 있다.

지금까지 천연색소는 동식물을 대상으로 다양하게 연구되어 왔으나, 외부환경 조건의 변화에 따른 재료공급이나 동질성 유지가 문제로 되었다. 이를 해결하기 위하여 식물의 조직배양이나 발효등으로 색소를 생산하는 연구가 진행되고 있다(1-3). 본인 등은 색소연구를 위해서는 동식물 이외에도 자연에는 다양한 미생물이 존재함으로 미생물에 의해 생산되는 특징적인 색소를 발견할 가능성이 있다고 생각하였다. 또한 미생물로부터 색소생산은 미생물의 배양이 용이하다는 점과 색소의 동질성 유지 뿐만 아니라 단시간에 다량의 색소를 얻을 수 있다는 잇점이 있다(4). 그럼에도 불구하고 미생물 기원의 색소에 대한 연구는 극히 한정되어 있으며, 산업적으로 사용되는 미생물 유래의 색소는 *Monascus anka*가 생산하는 색소(5)가 대표적이다.

본 연구에서는 균체 외로 물질의 분비가 용이한 *Bacil-*

*lus*속의 균주를 대상으로 수용성 황색색소를 생산하는 한 균주(PY123)를 분리하고, 그 특성을 조사하였으며, 아울러 황색색소의 생산에 미치는 영향인자에 대해 검토한 결과를 기술하였다.

재료 및 방법

시료 및 배지 조성

부산 지역의 야산에서 나뭇잎을 채취하여 황색색소를 분비하는 균주를 분리하기 위한 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용된 배지는 PYG배지(peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, glucose 1.0%, pH 7.0), SCP배지(sucrose 1.0%, casamino acid 0.05%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.005%, urea 1.0%, pH 7.0), STP배지(sucrose 1.0%, L-tyrosin 600 µl/ml, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.005%, urea 1.0%, pH 7.0) 및 감자배지가 사용되었으며, 감자배지(pH 7.0)는 다음과 같이 조제하였다. 즉, 껍질을 제거한 감자 200 g을 잘게 절단(약 5 cm³)하고 1 l의 증류수를 넣어 100°C에서 15분간 가열하였다. 가열된 용액은 상온까지 냉각시킨 후 탈지면으로 고풍물을 제거하고, 계란의 흰자 1개를 넣어 잘 현탁시킨 후 다시 가열하였다. 가열하여 형성된 침전물은 다시 상온까지 냉각시킨 후 여과(Toyo No.2)하고, 증류수를 가하여 전체 용량이 1 l가 되게하였다.

균주의 선별 및 형태학적 특성

미리 조제한 감자 한천 배지 표면에 야산에서 채취한 나뭇잎을 살며시 얹어 누른후 떼내는 방법으로 균을 접종하고, 28°C의 항온기에서 1-2일간 배양하면서 형성된

*Corresponding author

Tel. 82-51-890-1533, Fax. 82-51-891-7740

E-mail: kimkh@hyomin.donggeui.ac.kr

Key words: Water-soluble yellow pigment, *Bacillus* sp.

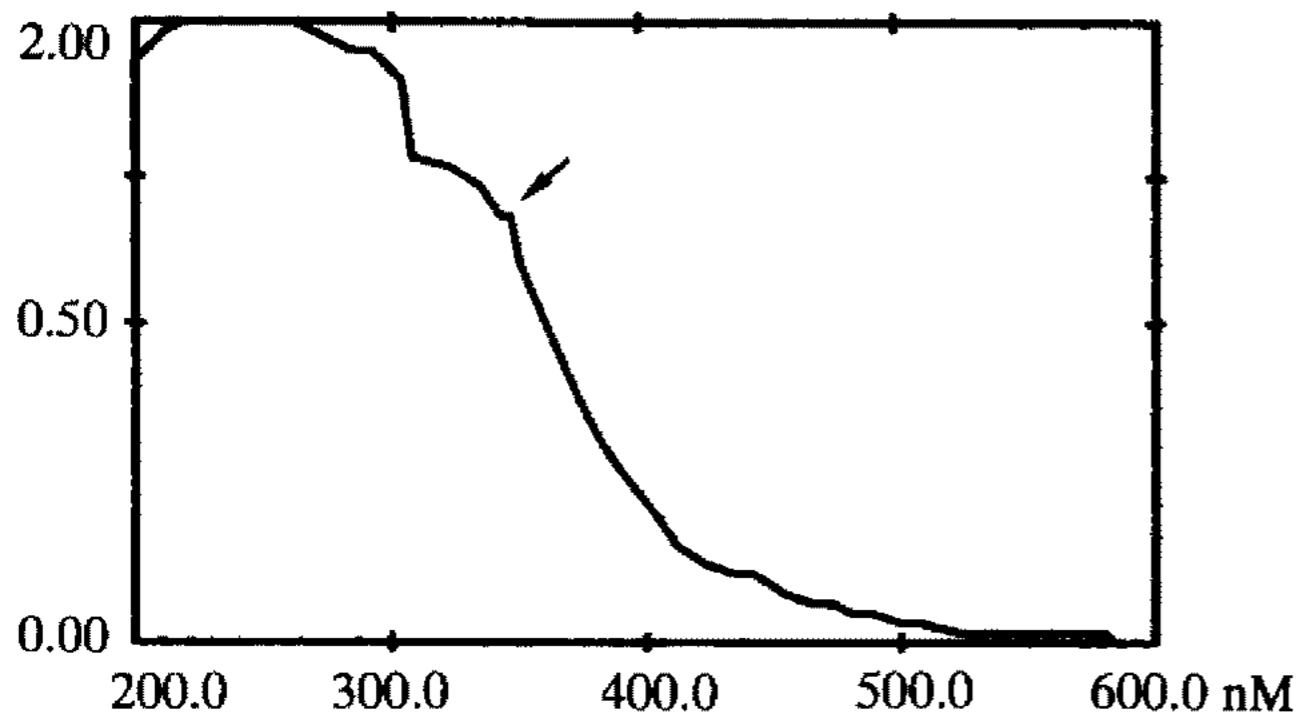


Fig. 1. UV-visible spectrum of yellow pigment from Isolate PY123.

colony 주위로 황색 색소를 분비하는 균주를 선별 하였다. 선별된 균주의 세포형태 및 포자는 위상차 현미경 (Nikon Co., Japan)으로 조사하였으며, 생화학적 특성은 Bergey's manual(6)에 따라 검토하였다. 이때 사용된 표준균주로서 *Bacillus subtilis* ATCC6051과 *Bacillus cereus* ATCC14579가 사용되었다.

균주의 배양 및 색소 측정법

균주는 액체배지 20 ml가 함유된 100 ml용 삼각 플라스크에 접종하고, 30°C에서 진탕 하면서 하룻밤 동안 전 배양하였다. 색소 생성을 위한 본 배양은 액체배지 40 ml가 함유된 100 ml용 삼각 플라스크에 전배양한 균체액을 본 배양액의 1%가 되도록 접종하여 30°C에서 진탕 배양 (200 rpm)하였다.

균주가 생성하는 황색색소를 측정하기 위하여 3일동안 30°C에서 진탕 배양하면서 생육되는 균을 경시적으로 일정량씩 취하고 원심분리(13,000 rpm, 15 min)하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거된 상층액은 분광 광도계 (UV-160A; Shimadzu Co.)로 380 nm에서 흡광도를 측정하여 황색색소량으로 표시하였다. 이때 대조구로는 균을 접종하지 않고 조제한 배지를 사용하여 실험구의 황색색소량을 calibration하였다. 또한 황색색소의 UV-visible 흡수 spectrum을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

황색 색소 생성에 미치는 영향인자

액체감자 배지에 각종 탄소원을 1%가 되도록 첨가하여 균을 접종하고 배양시킨 후 본 균주가 생성하는 황색색소량을 조사 하였다. 또한, 설탕이 1% 함유된 액체감자 배지에 각종 금속염을 0.1 mM이 되도록 첨가하여 균을 접종하고, 배양시킨 후 그 균이 생성하는 황색 색소량을 조사하였다.

결과 및 고찰

황색 색소 분비 균주의 분리 및 선별

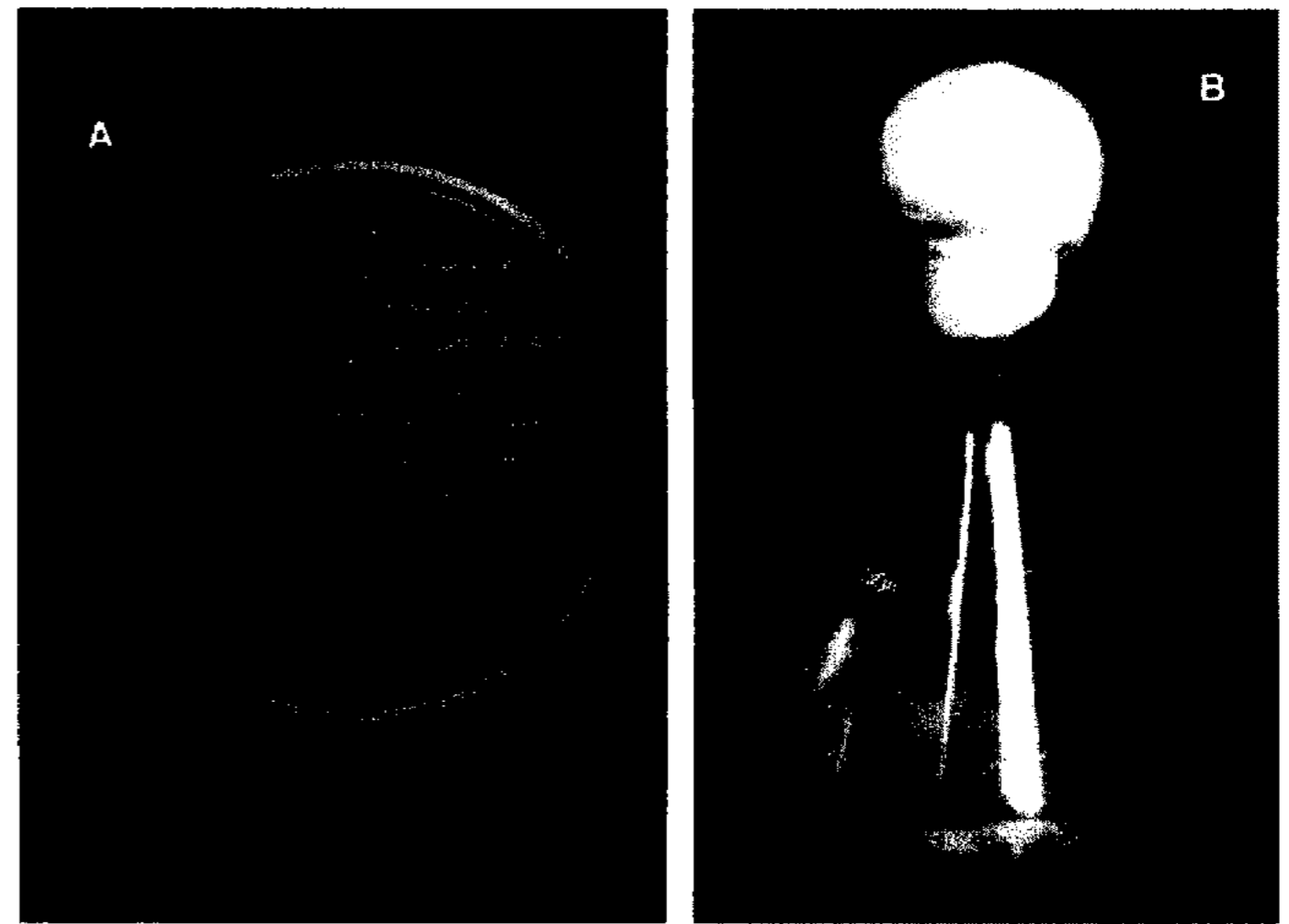


Fig. 2. Yellow pigment production from Isolate PY 123. The strain was incubated on potato-sucrose agar plate (A) and potato-sucrose broth (B) at 30°C for 2 days.

부산 지역의 야산으로부터 나뭇잎을 채취하여 clean bench내에서 한천 감자 배지상에 얹어 누름으로써 균을 접종하여 28°C의 항온기에 1~2일간 배양하였다. 형성된 colony 주위에 황색색소가 분비되는 PY123균주를 선별 하였다(Fig. 2A).

분리 균주의 형태 및 생리학적 특성

PY123균주의 세포형태는 위상차 현미경으로 조사한 결과 단간균이었으며, 포자를 형성하는 특징이 있었다. 또한, 본 균주는 Gram염색에서 양성을 나타내었으며, 운동성이 있는 호기성균이었다. 본 균주의 생리적인 특징 중에서 catalase생성, VP시험, D-glucose로부터 산의 생성 및 질산에서 아질산으로의 환원성 등은 표준균주인 *Bacillus subtilis* ATCC6051과 *Bacillus cereus* ATCC

Table 1. Morphological and chemical properties of Isolate PY123.

Characteristics\Strain	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051	Isolate PY123	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579
Shape	rod	rod	rod
Endospores produced	+	+	+
Motile	+	+	+
Stain Gram	+	+	+
Catalase	+	+	+
Acid from D-glucose	+	+	+
VP Test	+	+	+
Hydrolysis of Casein	+	+	+
Starch	+	+	+
Degradation of tyrosine	-	-	+
Egg yolk lecithinase	-	±	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	-
Pigment formation, potato agar	-	yellow	-

14579와 동일한 성질을 나타내었으나, 황색색소 생산능과 lecithinase 생산에는 차이점이 있었고, 특히 본 균주는 감자한천 배지에서 뿐만 아니라 액체감자 배지에서도 황색색소를 분비하였다(Fig. 2A, 2B). 따라서 본 균주의 형태학적 및 생리학적 특성을 Bergey's manual(6)로 검토해 본 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 *Bacillus cereus* ATCC14579와는 달리 egg-york가 첨가된 PYG배지상에 생육되었을 때 colony주위에 생성된 lecithinase활성이 극히 미약하였다는 점과, 7% NaCl이 함유된 배지에서 생육하였다는 특성이 있어 표준균주들과는 약간의 차이가 있었다.

배지조성에 따른 색소생성

PY123균주가 액체감자 배지에서 황색색소 생성이 미약하므로 배지를 달리하면 황색색소 생성이 증가되는지를 검토하였다. 감자, PYG, SCP 및 STP배지를 사용하여 PY123균주를 배양하였을 때 황색색소의 생성량은 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와같이 PYG, SCP 및 STP배지에서 색소생성은 0.06-0.08인데 비해 천연배지인 감자배지에서는 0.389로 가장 많이 색소가 생성되었다. 이 중 SCP 및 STP배지(7)는 tyrosine을 함유하고 있어 PY123균주가 tyrosine을 이용하여 melanine색소를 생성하는지를 검토코자 하였다. 그 결과 본 균주는 SCP나 STP배지 모두에서 균의 생육이 저조하고 황색색소 생성이 전혀 이루어지지 않았다. 따라서 본 균주가 생산하는 황색색소는 적어도 melanine색소와는 관계가 없으리라고 사료된다. 한편, PYG배지는 감자배지와 마찬가지로 균체생육은 양호하였으나, 황색색소는 거의 생성이 되지 않았으며, 특히 멸균시킨 후에는 배지의 색깔이 황색을 나타내었으므로 본 균주가 황색색소를 생산하는지 여부를 적어도 육안적으로는 판명이 곤란하였다. 따라서 이후의 실험에서는 감자배지가 황색색소 생성용 배지로 사용되었다.

황색색소 생성에 미치는 영향인자

PY123균주의 액체배양에서 색소생성 증가를 위한 영향인자로서 탄수화물과 금속염에 대한 영향이 검토되었다. PY123균주는 감자 한천배지에서 30°C에서 24시간 배양하면 colony 주위에 황색색소를 분비하는 현상을 육

안적으로 뚜렷이 확인할 수 있었으나, 한천이 없는 액체감자배지에서는 황색색소 생성이 다소 미약하였다. 이같은 현상은 Bae등(8)이 기술한 *Azotobacter vinelandii*의 청색색소 생성에서도 관찰되었으며, 이를 해결하기 위해 액체배지에 당류인 chitin을 첨가함으로써 색소생성이 증가되었다고 기술하였다. 따라서 PY123균주도 액체배지에 당류를 첨가하면 색소생성이 증가될 수 있을 것이라고 사료되어, 당류가 색소생성에 영향을 미치는지 조사하기 위해 감자 배지에 각종 탄소원을 1%씩 첨가하여 30°C에서 48시간 배양후 배양 상등액의 색소 생성능을 검토한 결과는 Table 3와 같다. Table 3에서 보는바와같이 액체감자 배지에 설탕이 첨가된 경우는 PY123균주가 당이 전혀 첨가되지 않은 경우 보다 약 2배 정도 더 많이 색소를 생성하였다. 일반적으로 설탕은 멸균중에 단백질과 결합하여 갈변되는 현상이 포도당에 비해 극히 미미하기 때문에 별도로 멸균해야하는 번잡성을 고려하지 않아도 되고, 백색의 감자배지에서는 황색색소의 생성이 육안적으로 용이하게 관찰할 수 있는 잇점이 있다.

뿐만 아니라 설탕이 1% 함유된 액체 감자배지에 각종 금속염이 0.1 mM씩 첨가된 배지에서 PY123균주의 황색색소 생성이 비교 검토 되었다. 그 결과 CoCl₂가 함유된 배지에서 PY123균주는 황색색소를 약 3배정도 많이 생성하였다(Table 3). 따라서 CoCl₂를 농도별(0.01~0.1 mM)로 설탕이 1% 함유된 감자 배지에 첨가하여 PY123균주에 의한 황색 색소 생성능을 조사해 본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.1 mM CoCl₂ 함유 배지에서 가장 황색 색소 생성이 많았다. 그러나, 0.1 mM CoCl₂의 첨가는 PY123균주의 성장을 대수증식기에서도 현저히 억제시켰으나, PY123균주의 생육이 정지기에 도달하여서는 오히려 황색색소의 생성이 균체생육이 억제되었음에도 불구하고 증가하였다. 이같은 현상은 Co이온이 PY123균주의 황색색소 생성을 촉진시키는 또 하나의 인자라고 사료된다. 비타민B₁₂도 분자내에 Co이온을 함유하고 있으므로 CoCl₂대신에 CN-cyanocobalamine을 액체 감자배지에 첨가하여 PY123균주의 황색색소 생성을 검토하였으나 전혀 색소생성을 증가시키지 않았다. 따라서 PY123균주의 색소생성에는 Co이온이 어떤 역할을 하

Table 2. Production of yellow pigment in various medium

Medium	Cell growth (A ₆₆₀)	Pigment production (A ₃₈₀)
PYG	1.188	0.082
SCP	0.068	0.063
STP	0.111	0.078
Potato	1.118	0.389

The strain PY123 was cultivated at 30°C for 48 hrs.

Table 3. Yellow pigment production in potato broth from Isolate PY123

Medium	Cell growth (A ₆₆₀)	Pigment production (A ₃₈₀)
1	1.118	0.389
2	1.270	0.728
3	1.225	0.963

The Isolate PY123 was cultured in potato broth at 30°C for 48 hr. Medium 1 means potato broth only, medium 2 is potato broth containing 1% sucrose, and medium 3 is potato broth containing 1% sucrose and 0.1 mM CoCl₂ · 6H₂O.

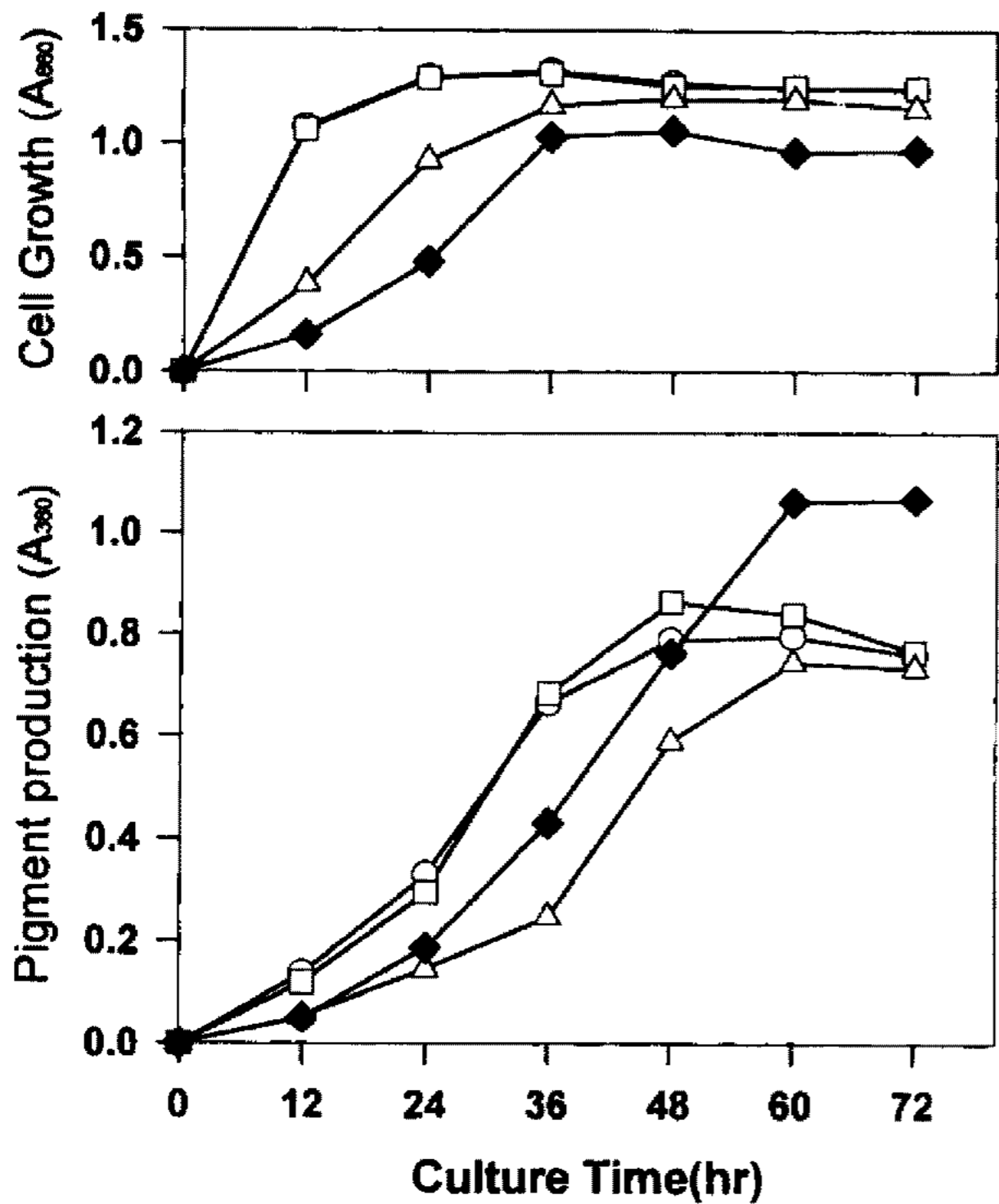


Fig. 3. Effect on concentration of CoCl₂ for yellow pigment production in potato broth containing 1% sucrose.
The potato broth only(O), potato broth containing 0.01 mM CoCl₂(□), potato broth containing 0.05 mM CoCl₂(△), potato broth containing 0.1 mM CoCl₂(◆).

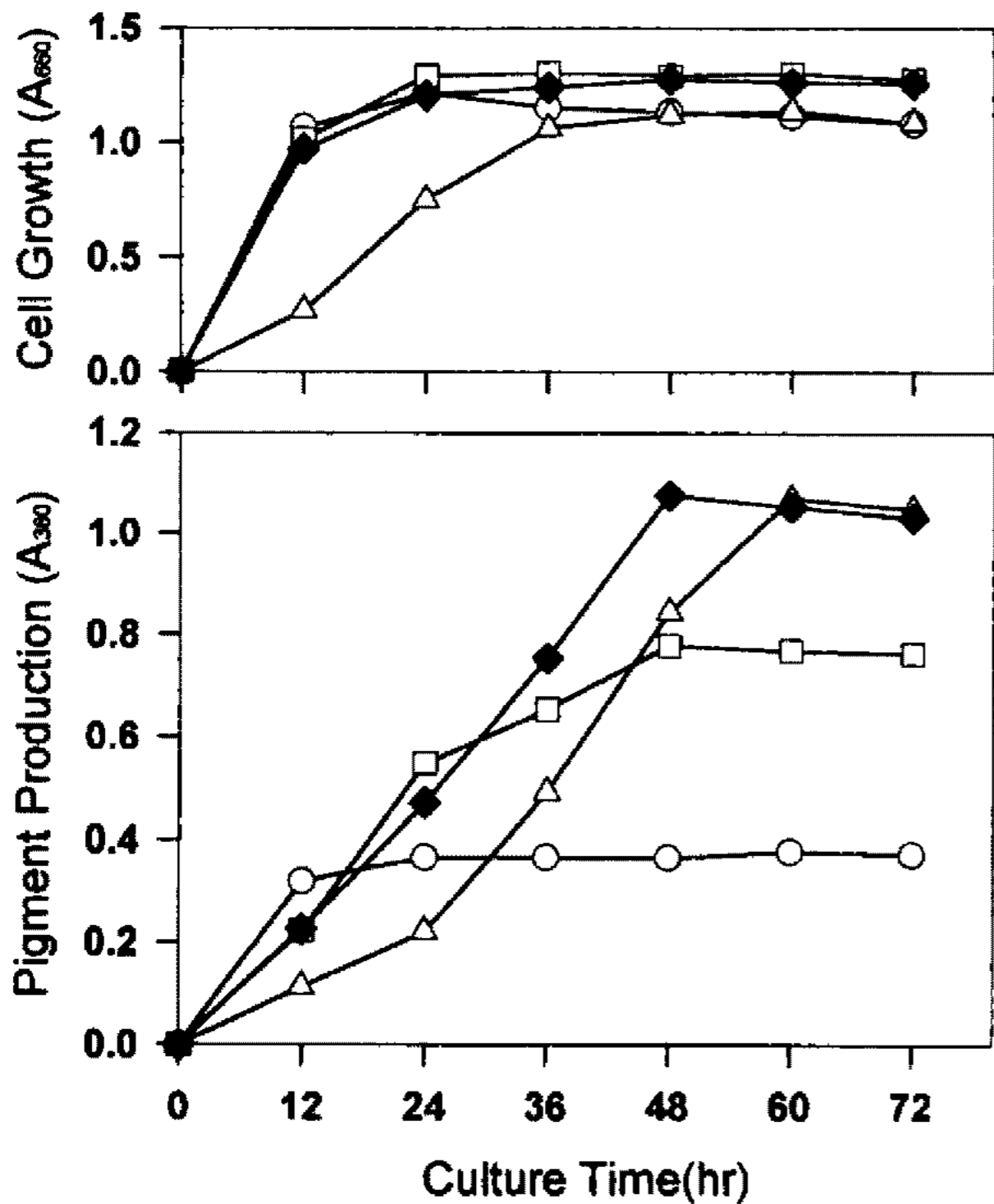


Fig. 4. Effect on period of CoCl₂ addition for yellow pigment production in potato broth.
The potato broth only(O), potato broth containing 1% sucrose (□), potato broth containing 1% sucrose and 0.1 mM CoCl₂(▽), addition of 0.1 mM CoCl₂ after 12 hr incubation in potato broth containing 1% sucrose(◆).

는지는 앞으로 더욱 연구되어야 하겠으나, 황색색소를 많이 생성하기 위해서는 적어도 설탕과 Co이온의 존재가 중요한 인자라고 사료된다.

또한 CoCl₂의 첨가는 PY123균주의 초기생육을 지연시킴으로 색소생성이 늦어진다고 사료되어, 균 생육이 대수증식기 말기 또는 정지기에서 도달하였을 때 CoCl₂를 첨가하면 최대의 색소생성 시기를 앞당길 수 있을 것이라고 생각하고 CoCl₂ 첨가시기를 검토하였다. 그 결과 균 배양 12시간 후에 CoCl₂가 첨가된 경우가 처음부터 CoCl₂를 배지에 첨가한 경우 보다 PY123균주의 황색색소 생성이 최대에 도달하는 시기는 약 12시간 정도 단축되었다(Fig. 4).

요 약

식품첨가물을 위한 천연의 황색색소를 개발하기 위하여 부산 지역의 야산에서 나뭇잎을 채취하여 수용성 황색색소를 생성하는 균주를 분리선택하였다. 선택균주의 형태학적, 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과 단간균으로 포자를 형성하고, Gram(+)이며, 운동성이 있고, catalase생성 등의 특징이 있어 *Bacillus*속의 균주(PY123균주)로 동정하였다.

PY123균주는 설탕 1%와 CoCl₂ 0.1 mM가 함유된 액체감자 배지에서 30℃에서 2일간 배양시킨 결과 액체감자 배지만 사용해서 배양했을 때 보다 약 3배 정도 더 많은 황색색소를 생성하였다. 또한 대수증식기 말기에 0.1 mM CoCl₂를 설탕이 함유된 액체감자 배지에 첨가시킨 결과 처음부터 CoCl₂를 첨가하여 PY123균주를 배양한 경우 보다 균체생장의 억제 현상도 나타나지 않았으며, 황색색소 생산이 최대에 도달되는 시기도 약 12시간 정도 더 빨랐다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 동의대학교 학술연구조성비(자유공모과제)로 연구되었습니다.

참고문헌

1. Zhong, J. J., T. Seki, S. I. Kinoshita and T. Yoshida. 1992. Effects of surfactants on cell growth and pigment production in suspension culture of *Perilla frutescens*. *World J. Microbial. & Biotechnol.* 8: 106-109.
2. Hanagata, N., A. Ito, Y. Fukuju and K. Murata. 1992. Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus-Tinctorius* L. *Biosci. Biosci. Biotechnol. & Biochem.* 56: 44-47.
3. Masahiro, K. O., K. Mine, M. Taya, S. Tone and T. Ichi. 1994. Production and release of anthraquinone pigments

- by hairy roots of madder (*Rubia tinctorum* L.) under improved culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 103-106.
4. Ju, J. Y., H. W. Nam, J. C. Yoon and C. S. Shin. 1994. Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **22**: 85-91.
 5. Han, O. and R. E. Mudgett. 1992. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations. *Biotechnol. Prog.* **8**: 5-10.
 6. 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.
 7. Oliveira, R.G.B. and M. L. de Souza. 1991. Partial characterization of a brown pigment produced by *Azospirillum lipoderum*. *Revista de Microbiol.* **22**: 340-344.
 8. Bae, S. J., K. H. Kim, B. W. Kim and Y. H. Kim. 1995. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* strain A80 producing water-soluble blue pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 43-46.

(Received 30 January 1997)