

化粧品 製造用 이온교환수에서 分離한 細菌 1種에 對한 同定 및 이 細菌이 生産하는 色素에 關한 研究

梁 承 珪

(太平洋技術研究所 微生物研究室)

1. 緒 論

化粧品の 第1次 微生物 汚染要因으로서는 原材料 副材料 製造設備가 있으나 가장 중요한 要因은 제조용수인 이온교환수이며 대표적인 汚染 細菌은 Pseudomonas, Enterobacter, Aeromonas, Klebsiella, Xanthomonas, Flavobacterium 등 (1~4,7)이 알려져 있다.

Smart 등(5)은 이들 微生物 汚染으로 일어날 수 있는 다각적인 製品的 變質問題를 論하였는데 그 중 製品的 색상변화를 들 수 있다. 색상 변화는 미생물의 대사 산물에 의한 pH, 산화환원, 다른 변화 要因에 기인할 수 있으나 色素를 分비하는 微生物 汚染(5,6)에 의할 수도 있다.

본 연구는 化粧品の 微生物的인 品質管理에 도움을 주고자 이온교환수에서 生育하고 있는 색소 分비균으로서 violet 色素를 多量 生産하는 細菌 1種을 순수분리, 同定하여 이 細菌의 特性을 조사하였으며 또한 이 細菌이 分비하는 색소를 추출 정제하여 이 물질을 조사하였다.

2. 實驗方法

1) 菌株分離

이온교환수에 汚染되어 있는 細菌 중 violet 色素를 分비하는 細菌 1種을 Nutrient Agar에 streaking하여 純粹分離하였다.

2) 菌株同定(9~13)

純粹分離한 菌株를 細胞學的 考察 生長의 特性, 生化學的 實驗을 거쳐서 同定하였으며 同定方法은 다음과 같다.

(1) 形態 및 生長特性

① 形態

본 細菌의 形態 및 크기는 Gram염색법에 의하여 염색시킨 후 光學顯微鏡(Model: Phase star, A.O. Spencer)으로 觀察하였다. 확실한 본 細菌의 形態를 알기 위하여 전자현미경(Model: MiNi-SEM, Hitachi-Akashi)을 使用했다. 純粹分離된 細菌을 백금이로 취하여 멸균수에 회석 후 이를 wax block 위에 한 방울 적하하고 이에 0.5% uranyl acetate 同量 가하여 2분간 방치하여 Negative staining한 후 두께 20~30Å의 Collodion막을 입힌 grid에 이 細菌을 塗抹하여 40°C의 oven 속에서 30分間 乾燥한 後 電子顯微鏡으로 관찰하였다. 그리고 Capsule을 觀察하기 위하여 Novelli(8)의 方法을 使用하였다.

② 生長特性

본 細菌의 生育狀態는 Nutrient Broth 및 Ager上에서 觀察하였으며 60°C에서 10, 20, 30분간, 70°C에서 5, 10, 15, 20분간 열처리하여 死滅 如否를 調査하였다.

(2) 生理的 特性

① Hydrolysis of gelatin

10~20% gelatin을 첨가한 Nutrient Broth에 stab culture하여 25°C에서 2~3일간 배양한 후 iced water에 넣어 gelatin 액화 유무를 관찰한

다.

② Hydrolysis of casein

milk agar를 petri dish에 부어 굳힌 후 streaking하여 30°C에서 2일간 배양한 후 배지 표면에 Meceric chloride solution을 부어 Clear Zone의 생성 유무를 관찰한다.

③ Production of indole from tryptophan

peptone water를 실험관에 5ml씩 넣어 멸균한 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 Kovacs's indole reagent 0.5ml를 첨가하여 색상변화를 관찰한다.

④ Voges-Proskaur test

glucose phosphate broth를 실험관에 5ml씩 넣어 멸균한 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 배양액 1ml에 6% α -naphthol용액과 16% KOH용액 각각 0.5ml씩 첨가하여 색상변화를 관찰한다.

⑤ Reduction of nitrate

Nitrate peptone water를 Durham tube가 들어 있는 실험관에 분주 멸균한 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 Griess-iolosvay's Reagent 2ml를 첨가하여 gas 발생유무 및 색상변화를 관찰한다.

⑥ Production of Ammonia from peptone

peptone water를 실험관에 분주 멸균한 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 배양액 1ml에 Nessler's reagent 1ml를 첨가하여 색상변화를 관찰한다.

⑦ oxidation and fermentation of carbohydrate

Huge and Leifson's medium을 2개의 실험관에 5ml씩 분주 멸균한 후 세균을 접종하여 접종된 한 개의 실험관에 멸균된 paraffin으로 배지표면을 봉한 후 30°C에서 2일간 배양하여 색상변화를 관찰한다.

⑧ utilization of citrate

Simmon's citrate agar를 멸균하여 petri dish에 부어 굳힌 후 세균을 streaking하여 30°C에서 2일간 배양하여 배지의 색상변화를 관찰한다.

⑨ Methyl Red test

glucose phosphate broth를 실험관에 5ml씩 분주 멸균한 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 Methyl Red용액 1~5방울을 첨가하여 색상변화를 관찰한다.

⑩ Catalase test

Nutrient agar에 배양된 colony상에 10% Hydrogen peroxide 한 방울을 떨어뜨려서 gas bubble의 생성 유무를 관찰한다.

⑪ oxidase test

Nutrient Agar에 배양된 colony상에 1% tetra methyl-p-phenylenediamine hydrochloride용액을 떨어뜨렸을 때 pink color가 나타나며 10~30분내에 dark red, purple과 black으로 변화되면 양성이다.

⑫ Urease test

Christensen's Urea Agar를 실험관에 분주 멸균하여 굳힌 후 세균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후培地의 색상변화를 관찰한다.

⑬ KCN test

KCN Broth를 실험관에 분주 멸균한 후 24시간 이내에 배양된 Broth Culture를 접종하여 30°C에서 2일간 배양하여 성장 유무를 관찰한다.

⑭ Turbidity from egg yolk

Nutrient Broth에 10% (v/v) egg-yolk emulsion을 첨가하여 細菌을 接種한 후 30°C에서 1~4일간 배양하여 배지의 透明度를 관찰한다.

⑮ Møller's decarboxylase test

Møller's decarboxylase medium을 4개의 실험관에 분주 멸균하고 하나의 실험관은 control로 그리고 나머지 각 medium에 lysine, ornithine, arginine를 1%씩 되게 첨가하여 stab culture한 후 멸균된 liquid paraffin으로 봉하고 25°C에서 1~7일간 배양하여 색상변화를 관찰한다.

⑯ Acid produced from carbohydrate

멸균된 Huge and Leifson medium에 최종 농도를 1%되게 멸균한 carbohydrate용액을 첨가하여 細菌을 接種한 후 30°C에서 1~4일간 배양한 후培地의 색상변화를 관찰한다.

실험에 사용된 carbohydrate;
maltose, mannitol, mannose, glucose, sorbitol,
lactose, xylose, fructose, adonitol, dulcitol,
esculin, arabinose, trehalose.

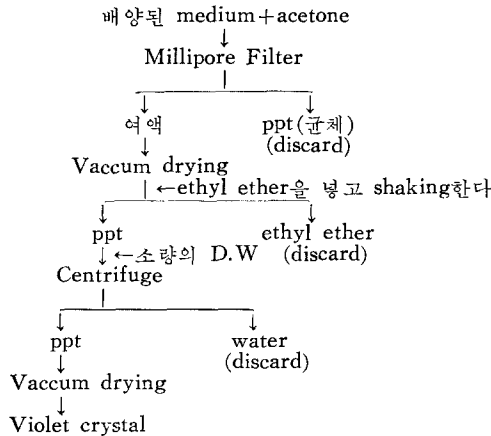
3) 色素 (15, 16)

(1) 色素 抽出 및 精製

Tryptic Soy Agar에 tryptophan을 添加하여
滅菌한 후 petri dish에 부어 굳혀 본 細菌을
streaking하여 30°C에서 4일간 培養한 후 다음
(도 1)의 方法으로 抽出 및 精製하였다.

(2) 特性 實驗

精製된 色素는 ethanol 및 H₂SO₄를 10% 加한
ethanol에 용해시킨 후 U.V spectrophotometer
(Model : Hitachi 200-10)으로 파장 400~900nm
까지의 흡수 spectrum을 각각 測定하였다.



도 1. 색소추출 및 정제방법

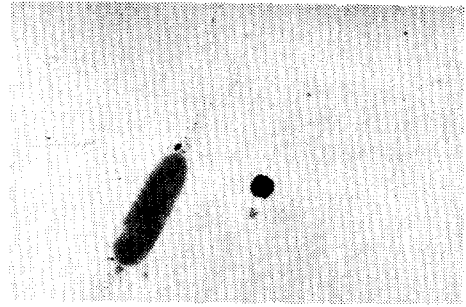
4) 製品의 色狀變化 如否實驗

微生物 成長에 좋은 原料만을 使用하여 milk
lotion base를 만들고 이 base에 본 細菌을 接種
하여 30°C incubator에서 20일 동안 培養하면서
製品의 色狀變化 如否를 관찰하였다.

3. 實驗結果 및 考察

1) 形態 및 生長特性

본 細菌은 Gram Negative이며 운동성이 있



도 2. 전자현미경으로 촬영한 본 세균의 형태(×20,000)

고 Single이며, 끝부분이 둥근 rod形이다. 크기는 0.6~0.9×1.5~3um이며 capsules, endospore는 없고 single polar flagella가 있었다. 전자현미경(Model; Mini-SEM, Hitachi Akash)으로 관찰한 본 세균의 形態(16)는 다음 (도 2)과 같다.

Nutrient Agar로 25°C에서 4일간 배양하면 Violet pigment가 생성되며 培養時間이 길어질수록 더욱 더 黑色으로 變한다. 培養된 colony는 dark violet, smooth, convex, circular, raised, entire와 gelatinous하며 fluorescence는 나타나지 않았다. cell은 두껍고 점액질을 생성하였다.

Tryptose glucose yeast extract broth에 배양하면 violet surface ring을 나타내며 침전물이 생겼다. 또한 acidity에서 보다 alkainity에 저항성이 더 컸으며 약 pH 9.5에서 성장하나 pH 5.0에서는 성장하지 못했다.

2) 生理的 特性

본 細菌의 生育溫度는 optimum 30°C, maximum 40°C, minimum 10°C였으며 60°C에서 10분간 열처리로 사멸되었다. 기타 결과는 다음 (표 1)과 같다.

3) 色素의 特性

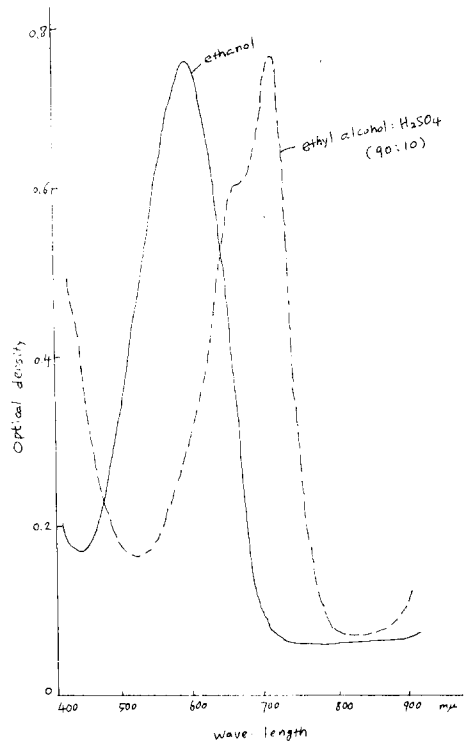
(도 1)의 方法으로 정제된 색소의 특성은 needle상의 紫黑色結晶으로 물, chloroform에 불용이고 alcohol, acetone, oils에 용해한다.

TEST	Species
Growth at 41°C	-
Growth at 4°C	-
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of gelatin	+
Indol production from tryptophan	-
V P test	-
Reduction of nitrate	+
Production of Ammonia from peptone	+
Utilization of citrate	+
Methyl Red test	+
Catalase test	+
Urease test	-
H ₂ S production	-
KCN (growth on)	+
Phosphatase test	+
Turbidity from egg yolk	+
Hydrolysis of Esulin	
(a) Broth	-
(b) Agar	-
Carbohydrate (acid from)	
maltose	+
glucose	+
sorbitol	+
mannose	+
arabinose	-
xylose	-
fructose	+
adonitol	-
trehalose	+
dulcitol	-
lactose	-
mannitol	-

+; Positive reaction -; Negative reaction

표 1. Main biochemical characters of species

Ethanol에 용해시킨 본 색소와 ethanol에 H₂SO₄ 10%를 첨가한 액에 용해시킨 본 색소의 Spectrophotometer(Model 200-10 Hitachi)에 의한 흡수스펙트럼은 다음 (도 3)과 같다(10). (도3)에서 보는 바와 같이 본 색소는 Ethanol에 용해시킨 경우 578nm에서 그리고 Ethanol에 H₂SO₄ 10%에 용해시킨 경우 700nm에서 각각 흡수 극대를 가지고 있다. 또 pigment용액에 NaOH를 첨가하면 violet에서 green이 되고 시간이 경과



도 3. absorption spectrum of violacein

되면 reddish brown으로 변색된다. 또한 indicator성질을 가지고 있다. 즉 pH 8.5 이하에서 violet color이고 pH 8.5~9.0에서 blue green이 되며 pH 9.0 이상이면 green color가 된다.

이상과 같은 실험 결과로 이온교환수에서 분리된 violet pigment를 합성하는 본 細菌은 *Chromobacterium violaceum* (10,14~16,18~20)으로 同定하였고 violet pigment는 violacein (10, 15, 21)으로 추정하였으며 본 細菌이 製品에 汚染되었을 경우 製品의 色狀變化에 미치는 영향을 조사한 結果 10일부터 色상의 變化를 일으켰다.

4. 結 論

제조용수인 이온교환수에 汚染되어 있는 細菌 중 violet pigment를 生産하는 細菌 1種을 純粹 分離 同定 및 violet pigment를 확인한 結果는

다음과 같았다.

1. 본 細菌은 *Chromobacterium violaceum*으로 同定되었다.

2. Violet Pigment는 Violacein으로 推定되었다.

3. 본 細菌이 製品에 汚染되었을 경우 製品에 色狀變化를 일으킬 수도 있다.

4. 본 細菌의 耐熱성은 60°C에서 10분간이므로 이 細菌이 汚染되어 있는 公業용수 및 제조용수로 사용할 때 열처리 또는 適當한 方法으로 殺菌하여 使用하여야 한다.

參 考 文 獻

1. Phyllis. C. Flawn, S.A. Malcolm and R.C.S Woodroffe. JSCC 24, 229~238 (1973)
2. Saul Tennenbaum MS. JSCC 18, 797~807(1967)
3. 藤田幸夫 Fragrance J. 13, 74~76 (1973)
4. 竹内一豊 Fragrance J. 20, 87~91 (1976)
5. R. Smart and D.F Spooner, JSCC 20, 721~737 (1972)
6. 服部靜夫 下部山正己 生體色素 朝倉書店 160~161 (1967)
7. Corpe, W.A J. Bacteriol. 62, 515~517 (1951)
8. Novelli A, Experimentia 9, 34 (1953)
9. W.F. Harrigan and Margaret E. Mc Cance, Laboratory Method in Microbiology. Academic Press (1966)
10. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, Bergey's manual of determinative bacteriology. eighth edition
11. C. Booth, Method in Microbiology. vol. 4 Academic Press (1971)
12. Difco manual, Difco Laboratories. ninth edition
13. Michael J. Pelczar J.R and E.C.S Chan, Laboratory Exercises in Microbiology. third edition
14. Efthimion, M.H. and W.A Corpe, Appl. Microbiol. 17, (1) 169~175 (1969)
15. Sebek. J. Bacteriol. 90 (4) 1026~1031 (1965)
16. Seitz E.W., P.R Elliker and W.E. Sandine, Appl. Microbiol. 9, 287~290 (1961)
17. Clarke E.G.C, Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and post-mortem material.
18. Sneath. P.H.A Iowa State J. Sci 34 (3) 243~500 (1960)
19. Sneath. P.H.A. J. Gen. Microbiol. 15, 70~98 (1956)
20. Leifson E, J. Bacteriol. 71 (4) 393~400(1956)
21. DeMoss, R.D in Gofflieb and Shaw (Editors) Antibiotics vol.2 Springer Verlag, New York p. 77~81.