

수용성 청색색소를 생산하는 *Azotobacter vinelandii* A80 균주의 분리 및 특성

배수장 · 김광현* · 김병우 · 김영희
동의대학교 자연대 미생물학과

Isolation and Characterization of *Azotobacter vinelandii* Strain A80 Producing Water-Soluble Blue Pigment

Soo-Jang Bae, Kwang-Hyeon Kim*, Byung-Woo Kim and Young-Hee Kim

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract — For using additives of foods, or cosmetics, a strain A80 producing blue pigment was isolated from soil. The strain A80 was identified as a strain of *Azotobacter vinelandii* based on morphological and physiological characteristics. The strain A80 was extracellularly secreted the blue pigment on PYG agar plate, but not secreted it into PYG broth. And then, the strain A80 was extracellularly secreted the blue pigment in PYG broth containing 2.0% chitin, while the strain A80 was not secreted the blue pigment in PYG broth containing 2.0% chitin and 1% NaCl simultaneously.

색소는 현재 식품공업, 화장품, 의약품 및 가축사료에 첨가제 또는 보조제 등으로 다양하게 사용되지만, 최근에는 합성색소보다 천연색소에 대한 관심이 점차 증대되고 있다(1). 지금까지 이들 천연색소에 대한 연구는 주로 적색과 황색 계열의 색소로서 식물에서 직접 추출(1, 2)하여 사용되었다. 그러나 식물에서의 추출은 외부 생육조건에 따라 많은 영향을 받기 때문에 색소의 동질성이 문제가 되고 있어, 오늘날에는 식물의 조직배양(3, 4)이나 발효(5) 및 미생물에 의한 색소생산(6, 7)에 관심이 점차 증대되고 있다. 미생물이 생산하는 색소에 대한 연구 중에서 적색이나 황색계통의 천연색소는 *Monascus anka*(6)가 대표적으로 연구되고 있고 이미 실용화 단계에 있다. 적색 및 황색색소는 3원색 중에 하나인 청색과 조합함으로써 다양한 색조를 얻을 수 있다. 이점에 착안하여 본인은 청색을 분비하는 균주의 분리를 시도한 결과 *Azotobacter* 속의 한 균주(A80 균주)가 선별되었으므로 본 균주에 대한 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리, 선별 및 배양방법

토양으로부터 청색색소를 균체 외로 분비하는 미생물 균주를 분리하기 위하여 PYG 배지(peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, glucose 1.0%, pH 7.0)에 한천 2.0%가 함유된 고체배지가 사용되었다. 또한 액체배양은 28°C에서 진탕배양하였으며 PYG 배지에 첨가된 chitin은 Sigma 사(C-3132)의 정제되지 않은 제품을 사용하였다.

균주의 형태 및 생리적 특성

분리균주의 형태는 위상차현미경으로 조사하고 그 생리적 특성은 Tchan과 New(8) 및 Becking(9)의 방법에 따라 검토하였으며 대조균으로는 *Azotobacter vinelandii* ATCC478이 사용되었다.

청색색소 측정방법

분리균주는 PYG 액체배지에 접종시키고 일정한 기간(4~5일간) 동안 28°C에서 배양한 후 그 배양액은 원심분리(10,000 rpm, 15분간)하여 상층액을 분광광도계로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

형태 및 생리적 특성

Key words: *Azotobacter vinelandii*, water-soluble blue pigment

*Corresponding author

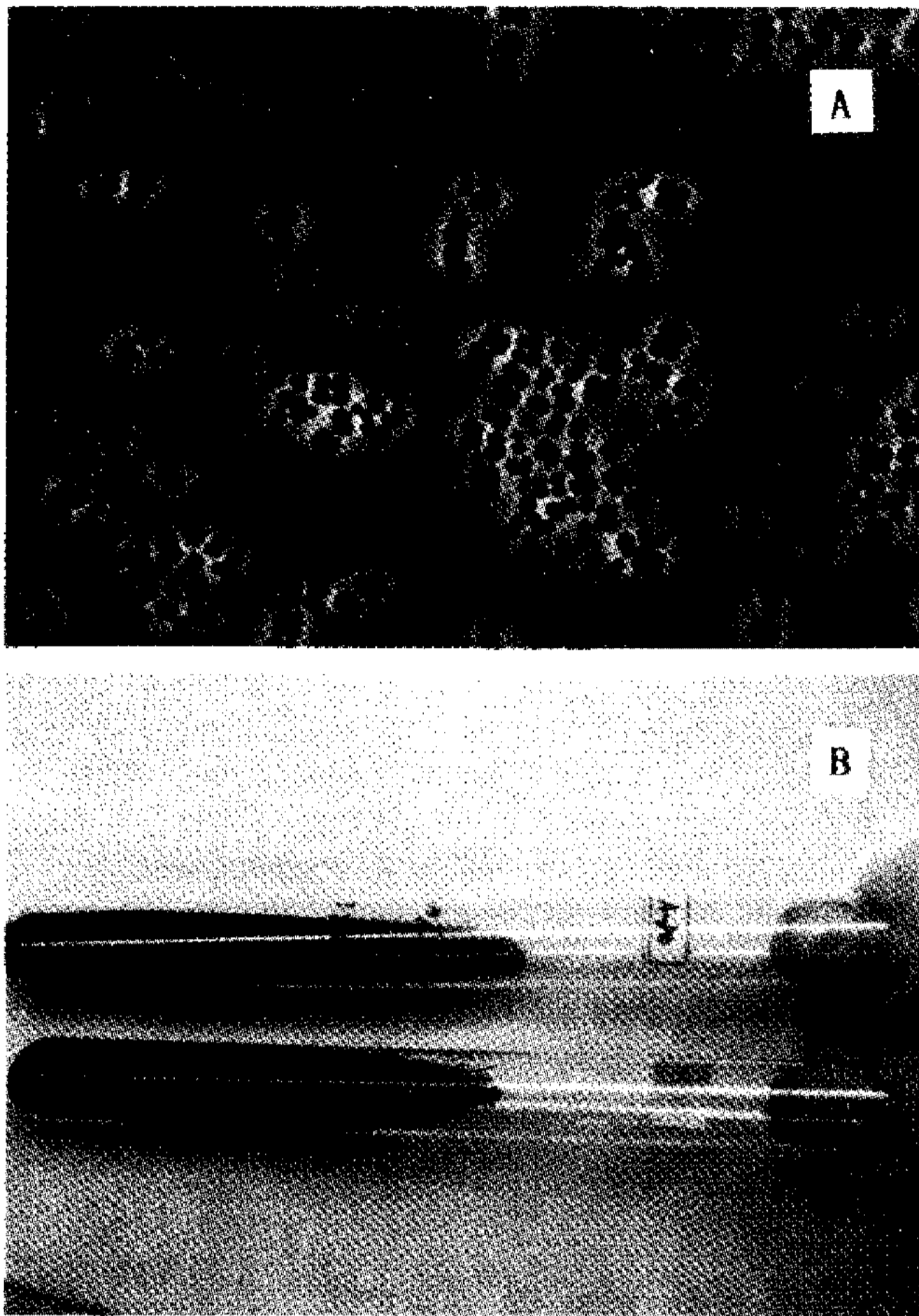


Fig. 1. Morphology of the strain A80 on phase-contrast microscope (A) and secretion of blue pigment from the strain A80 on PYG agar slants (B).

The strain A80 (A) on phase-contrast microscope (Nikon Co. Japan) was magnified 1,000 times.

토양으로부터 분리한 수용성 청색색소 생산균주의 형태학적인 특성을 조사하고자 위상차현미경을 사용하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 보는 바와같이 끝 부분이 난형인 간균으로 단독이나 쌍 또는 4쌍으로 존재하는 소위 "Pleomorphic cell"의 특징을 나타내었다 (Fig. 1A). 또한 본 균주의 생리적 특성을 조사해 본 결과 Table 1에서 보는 바와같이 Gram 음성이며, 운동성이 없고, catalase를 생산하며, 질소고정능이 있고, 생육단계 중에 cyst가 형성됨으로 *Azomonas* 속의 균주가 아닌 *Azotobacter* 속의 균주였다. Tchan과 New(8) 및 Becking(9)에 의하면 *Azotobacter* 속의 균주 중에서도 *Azotobacter vinelandii*는 대부분의 당을 이용하며, 특히 rhamnose를 탄소원으로 이용할 수 있다는 점에서 본 균주와 비교해 볼 때 당의 이용성에서도 비슷한 특성을 가지고 있었다. 따라서 본 A80 균주는 *Azotobacter vinelandii*에 속하는 균주라고 사료되나, 표준균주(ATCC478)와 비교하면 편모 운동성

의 차이, 37°C에서의 생육 및 항생물질에 대한 감수성에 다소 차이가 있었다(Table 1). 또한 본 A80 균주가 생성하는 수용성색소는 표준균주와 또 다른 차이점이 있다. 즉, 표준균주가 생성하는 수용성 색소는 주로 yellow-green으로 형광을 발하지만 본 균주가 생성하는 수용성 색소는 blue-violet(Fig. 1B)로서 형광이 나타나지 않는 차이점이 있었다.

Tchan과 New(8)가 기술한 바에 의하면 *Azotobacter vinelandii* 중에서는 운동성이 없는 균주도 있어 분리된 A80 균주는 *Azotobacter vinelandii* 중에서도 비운동성 균주이며, 항생물질에 대한 감수성 차이는 peptone과 yeast extract가 배지내에 첨가되면 이들 균주가 pleomorphism과 compromised cell wall strength를 일으킨 결과라고 사료된다(8, 10). 일반적으로 *Azotobacter* 속의 균주의 생육은 비록 소량의 peptone이나 yeast extract라 할지라도 배지내에 첨가되면 *A. vinelandii*의 세포막 투과성이나 항생물질에 대한 감수성이 변화된다고 하였다(8). 따라서 A80 균주의 형태학적인 pleomorphism의 현상 및 cyst형성과 생리적인 특징인 당류의 이용성을 고려해 보면 본 A80 균주는 *Azotobacter vinelandii*의 유연균으로 사료되었다.

액체배양에서 A80 균주의 청색색소생성에 따른 chitin과 NaCl의 영향

본 A80 균주는 PYG 한천배지에서 청색의 색소를 생성하였으나 액체배양에서는 청색색소를 생성하지 않았다. 따라서 액체배양에서도 청색색소를 생성하는 조건을 검토한 결과 Table 2에서 보는 바와같이 2.0% chitin이 함유된 PYG 배지에서는 배양 2일째부터 청색색소가 분비되었으며 배양 3일째에는 거의 최대치에 달하였다. 이에 반하여 본 A80 균주는 NaCl에 의해 색소생성이 저해됨을 알았다. 즉, A80 균주의 액체배양에서 0.4% NaCl이 첨가되면 비록 PYG 배지에 2.0% chitin이 함유되어 있어도 청색색소의 생성은 감소되었으며, 1.0%의 NaCl 농도가 첨가되면 chitin이 함유된 PYG에서도 청색색소는 전혀 생성되지 않았다. A80 균주는 7.0% NaCl 농도가 첨가된 배지에서도 생육이 가능하였으나, 1.0% NaCl이 함유된 배지에서 A80 균주는 청색색소를 전혀 생성하지 않는다는 것은 특이한 현상이다.

Tchan과 New(8)들에 의하면 일반적으로 Fe 이온이 *Azotobacter* 속의 균주들에 의해 생성되는 수용성 색소생성을 억제한다고 하였으나, 본 A80 균주에서는 NaCl을 제외한 Fe을 포함한 대부분의 금속이온들은 A80 균주의 액체배양에서 청색색소생성에 어떤 저해

Table 1. Morphology and physiological characteristics of the strain A80

Characteristics	Strain A80	<i>A. vinelandii</i> ATCC478
Morphology	pleomorphic cell	pleomorphic cell
Gram stain	—	—
Motility	—	+
Cysts produced	+	+
Nitrogen fixation under atmospheric partial pressure of O ₂ :	+	+
Nitrogen fixation occurs at pH: 5.0~5.5	+	—
6.0~9.5	+	+
10.0	+	+
Growth at a temperature of: below 9°C	no growth	no growth
14~32°C	growth	growth
above 37°C	no growth	growth
Growth in presence of 1% NaCl	+	+
Peroxidase	+	+
Water soluble pigments production	blue-violet	yellow green fluorescent
Nitrate reduced nitrite	+	+
Utilization as sole carbon source:		
Glucose	+	+
D-Galactose	+	+
Maltose	+	+
Rhamnose	+	+
meso-inositol	+	+
Mannitol	+	+
Raffinose	+	+
Propan-1-ol	+	+
Glycerol	+	+
Sorbitol	+	+
Butan-2-ol	+	—
Suseptibility to antimicrobial agents:		
Streptomycin (0.2 µg/ml)	R	S
Chlorotetracycline (5 µg/ml)	S	R
Chloramphenicol (25 µg/ml)	S	R
Penicillin G (5 U/ml)	S	S
Phenol (0.05%)	R	R
Sodium benzoate (0.5%)	R	R
Mercuric chloride (10 µg/ml)	S	S

By Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.)

Table 2. Effect on chitin and NaCl for production of blue pigment from the strain A80

Comp. of Medium—Cult. time (day)	<i>A</i> ₆₆₀				
	1	2	3	4	5
PYG	0.114	0.103	0.235	0.242	0.179
PYG + 2.0% Chitin	0.091	0.625	1.046	1.430	1.405
PYG + 2.0% Chitin + 0.4% NaCl	0.142	0.278	0.406	0.836	0.983
PYG + 2.0% Chitin + 1.0% NaCl	0.060	0.083	0.119	0.136	0.130

현상이나 촉진현상을 나타나지 않았다. 또한 본 A80 균주가 고체배지에서는 수용성의 청색색소를 강하게 분비하지만, 액체배지에서는 색소를 분비하지 않았다는 이와같은 현상은 Oliveira와 de Souza(7)가 보고한 *Azospirillum lipoferum*이 분비하는 갈색색소의 경우도 유사하였다. 따라서 본인은 *Azotobacter* 속의 A80 균주가 액체배양에서 청색색소를 분비하는데 chitin (Sigma Co. C3132)이 유발인자로 작용한다는 사실은 알았으나, 한천과 chitin 사이에는 화학적으로 공통성이 인정되지 않음으로 본 균주가 청색색소를 생성하도록 유발시키는 인자가 어떤 화학적인 반응에 의한 것인지 또는 단순히 어떤 물리적인 요인에 의한 것인지는 앞으로 연구 검토되어야 하겠다.

요 약

식품이나 화장품의 첨가물로 사용하기 위해 청색색소를 분비하는 A80 균주를 토양에서 분리선별하였다. 분리된 A80 균주의 위상차 현미경에 의한 형태학적인 특성 및 생리화학적 특성을 조사한 결과 A80 균주는 *Azotobacter vinelandii*의 유연군으로 판정되었다.

또한 분리된 A80 균주는 PYG 한천배지에서는 청색색소를 균체외로 분비하였으나, PYG 액체배지에서는 청색색소를 균체외로 분비하지 않았으며, PYG 액체배양에서도 2.0% chitin이 첨가되면 청색색소를 균체외로 분비하였으나 1.0% NaCl이 PYG 액체배지에 첨가되면 2.0% chitin이 첨가되어도 청색색소는 전혀 생성되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 동의대학교 자체 학술연구 조성비에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. Lauro, G.J. 1991. A primer on natural colors. *Cereal Foods World*. **36**: 949-953.
2. Shiobara, Y., S.S. Inoue, Y. Nishiguchi, K. Kato, T. Takemoto, N. Nishimoto, F. Deoliveira, G. Akisue, M.K. Akisue, and G. Hashimoto. 1992. Iresinoside, a Yellow Pigment from *Pfaffia iresinosides*. *Phytochem.* **33**: 953-956.
3. Zhong, J.J., T. Seki, S.I. Kinoshita, and T. Yoshida. 1992. Effects of Surfactants on Cell Growth and Pigment Production in Suspension Cultures of *Perilla frutescens*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 106-109.
4. Hanagata, N., A. Ito, Y. Fukuju, and K. Murata. 1992. Red Pigment Formation in Cultured Cells of *Carthamus-Tinctorius* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 44-47.
5. Ohba, R., H. Kainou, and S. Ueda. 1992. Production of Purple Pigment from Green Malt and Dry Malt Grains by Fermentation Without Steaming. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**(2): 176-179.
6. 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.
7. Oliveira, R.G.B. and M.L. de Souza. 1991. Partial Characterization of a Brown Pigment Produced by *Azospirillum lipoferum*. *Revista de Microbiol.* **22**: 340-344.
8. Tchan, Y.T. and P.B. New. 1984. Genus I. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567AL, Pp. 220-221. In N.R. Krieg and J.G. Holt(ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
9. Becking, J.H. 1992. *The family Azotobacteraceae*, Pp. 3144-3170. In A. Balows(ed.), *The Prokaryotes*(2nd. ed.) IV. Springer-Verlag, Berlin.
10. Vela, G.R. and R.S. Rosenthal. 1972. Effect of peptone on *Azotobacter* morphology. *J. Bacteriol.* **111**: 260-266.
11. Bingle, W.H. 1988. Transformation of *Azotobacter vinelandii* OP with a broad host range plasmid containing a cloned chromosomal nif-DNA marker. *Plasmid.* **19**: 242-250.

(Received 31 October 1994)