

## **Bacillus subtilis에 의한 치자황색소 부산물로부터 치자청색소의 생산**

김희구·이상준

부산대학교 미생물학과

### **Production of Gardenia Blue Color from Gardenia Waste by the *Bacillus subtilis***

Hee-Goo Kim and Sang-Joon Lee

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### **Abstract**

For waste recycle, we were investigated on Gardenia blue color production using Gardenia by-product by *Bacillus subtilis*. Optimum conditions for producing blue pigment were found to be 30°C, initial pH 6.5, glucose as a carbon source 3% and yeast extract as a nitrogen source 0.5%, respectively. Optimum conditions for fermentor culture were agitation speed 400rpm, aeration 2 vvm and inoculum 5%. The optimum preculture time for inoculum was 20 hrs for blue pigment producton.

Key words : Gardenia blue color, *Bacillus subtilis*.

#### **서 론**

현재 각종 식품에 사용되고 있는 천연색소는 코치닐 추출색소, 모나스키스색소 등의 적색소와 치자, 홍화 등의 황색소가 대부분으로서 색의 삼원색중의 하나인 천연 청색색소는 아직까지 제대로 개발되어 있지 않다. 우리나라 식품첨가물 공전에는 스피룰리나 청색소(*Spirulina color*)<sup>1)</sup>와 치자청색소(*Gardenia blue*)<sup>2)</sup>가 천연색소로 분류되어 있지만, 사용량은 거의 전무하며 합성색소 청색 1호 및 2호가 대부분 사용되고 있다.

천연의 청색색소중 스피룰리나 청색소는 배양생물이 조류(algae)이기 때문에 배양기간이 다른 미생물보다 상당히 길고, 색소 함량이 적어서 국내외적으로 연구가 거의 연구되어 있지 않다. 최근에는 *Bacillus*, *Azotobacter*<sup>3-5)</sup> 등의 세균을 이용하여 청색소를 생산하려고 하지만, 상업적으로 만족할 만한 성과가 없다. 천연의 청색색소는 식물체를 직접 이용하거나, 미생물을 배양하여 얻으려는 연구가 있으며<sup>10,11)</sup>, *Penicillium* 및 *Trichoderma* 속을 이용하여 식물색소를 변환

하고자 하는 보고<sup>12)</sup>외에는 거의 연구 결과가 없다.

1969년 치자 과실중의 iridoid배당체에 관한 보고 이래, 현재까지 9종류의 배당체가 확인되었다. 이중 주성분은 genipin의 배당체인 geniposide로 전체 iridoid배당체의 약 70%를 차지하고 있다<sup>13)</sup>.

본 연구는 치자에서 천연의 황색색소를 추출, 정제한 후 잔존하는 iridoid배당체 등의 부산물을 미생물을 이용하여 천연의 청색색소를 생산하는데 목적이 있다.

#### **재료 및 방법**

##### **1. 사용균주 및 배지조성**

청색색소의 생성균주는 *Bacillus subtilis* 균주들로서 (KCCM 11914, KCCM 11314, KCCM 11316) 한국미생물 보존센터에서 분양받았다.

청색색소의 생성용 기본배지는 nutrient broth (beef extract 0.3%, peptone 0.5%)를, 보존용 배지로는 LB배지(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%)를 사용하였다. 배지의 조제를 위해서는 치자황색소를 정제한 후 나오는 iridoid배당

Corresponding author : Hee-Goo Kim

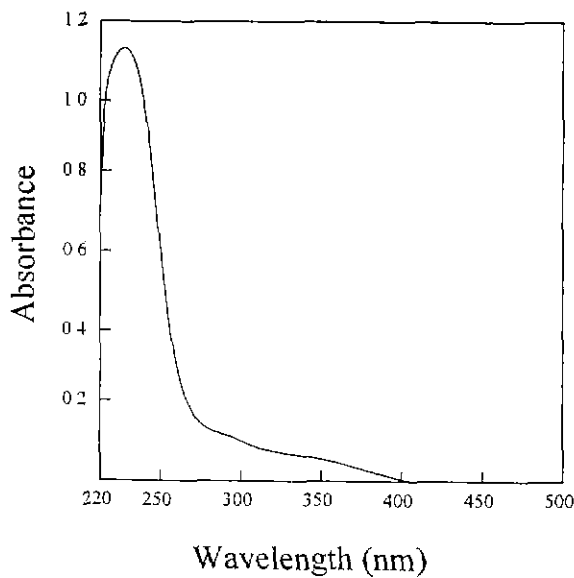


Fig. 1. Absorption spectra of isolated glycoside from crude extracted yellow color.

체 추출물(Fig. 1)을 회전식 진공 농축기(Büchi Rotavapor R-114)로 농축한 후 증류수 대신에 사용하였다. 250ml 삼각플라스크에 배지량을 50ml로 조정 한 후, 전배양액의 접종량을 1.0%(v/v)로 접종한 후 25℃에서 3일간 왕복 진탕배양하였다(120 Rev × 6cm, stroke 진탕배양기).

#### 2. 청색색소 생성균주의 선별

각 배양액을 원심분리(15,000×g, Hanil Supra 22K)하여 상정액을 여과지(Whatman No.1)로 여과하고 증류수로 희석한 후 분광광도계(Shimadzu UV 160-A)로 600nm에서 흡광도를 측정하여 청색소 생성력이 우수한 균주를 선정하였다.

#### 3. Bacillus subtilis의 생육도 및 색소생성량의 변화

선정된 *Bacillus subtilis* KCCM 11314 균주를 nutrient broth에서 왕복 진탕배양하여 생육도와 색소생성력을 비교 관찰하였다.

생육도의 측정은 membrane filtration method에 의한 건조균체량(dry cell weight; DCW)으로서 cell mass를 측정하였다. 즉 배양액중의 균체를 원심분리(15,000×g)하여 모은 후 생리적 식염수로 3회 세척하여, 0.2μm의 membrane filter로 집균하여 membrane filter가 100℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 그 중량을 건조 균체량으로 하였다.

색소생성량은 청색색소의 흡수파장인 600nm에서의 흡광도로 구하였다. 즉 추출액의 흡광도(A<sub>600nm</sub>)가 0.4~0.8의 범위에 들도록 달아 pH 5.28의 구연산~인산이나트륨 완충액에 녹여 100ml로 하고, 이 액 1ml에 pH 5.28의 구연산~인산이나트륨 완충액을 가하여 100ml로 한 후, 분광광도계로 흡광도(absorbance)를 구하여, 다음식으로 추출액의 색가를 구하였다.

$$\text{색가}(E^{10\%}) = \frac{\text{흡광도} \times 1,000}{\text{시료의 채취량}(g)}$$

#### 4. 색소생성 최적조건을 검토

*Bacillus subtilis* KCCM 11314 종균을 보존용 사면배지에서 1 백금을 취하여 평판배지에 도말한 후 24 시간동안 배양후에 분리된 1개의 콜로니를 nutrient broth에 접종하여 공시균의 생육곡선을 작성하였다. 24 시간대의 대수증식기 말기의 전배양액 1%(v/v)를 본배양에 접종하여 색소생성 최적조건을 검토하였다.

##### 1) 배양온도의 영향

배양액의 온도를 20℃에서 50℃까지 단계적으로 조절 한 진탕배양기에서 왕복 진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하였다.

##### 2) pH의 영향

배양액의 pH를 4.0에서 9.0까지 단계적으로 조절하여 30℃의 진탕배양기에서 왕복진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하였다.

##### 3) 탄소원의 첨가에 의한 영향

Nutrient broth에 단당류, 이당류, 5탄당 및 6탄당 등의 탄소원을 1.0%씩 첨가하여 초기 pH를 7.0으로 조정하고 30℃의 진탕배양기에서 왕복진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하였다. 탄소원의 최적농도는 최적 탄소원의 농도를 단계적으로 조절하여 30℃의 진탕배양기에서 왕복진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하여 최적 농도를 조사하였다.

##### 4) 질소원의 첨가에 의한 영향

Nutrient broth에 최적 탄소원을 첨가한 기본배지에 유기질소원, 무기질소원을 0.3% 첨가하여 질소원의 첨가에 의한 색소 생산량의 변화를 조사하였다. pH를 7.0으로 조정하고 30℃의 진탕배양기에서 왕

복진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하였다. 또한 생육 최적 질소원은 질소원의 최적농도를 결정하기 위하여 최적 질소원의 농도를 단계적으로 조절하여 30℃의 진탕배양기에서 왕복진탕배양한 후, 색소생성량을 측정하여 최적 농도를 조사하였다.

#### 5) 교반속도에 의한 영향

5ℓ 짜리 발효조(5ℓ-JAR Fermentor SY-500)에 색소 생성 최적배지 2ℓ를 첨가한 후, 교반속도를 100rpm에서 1,000rpm까지 조절하여 색소 생성량을 측정하였다. 온도는 30℃, 1vvm의 조건에서 24 시간동안 배양하였다.

#### 6) 통기량에 의한 영향

5ℓ 용량의 발효조에서 색소 생성 최적배지 2ℓ를 첨가한 후, 통기량을 1vvm에서 5vvm까지 단계적으로 조절하여 색소 생성량을 측정하였다. 조건은 30℃, 400 ppm의 조건에서 상기 5)와 같다.

#### 7) 종균의 접종량에 의한 영향

5ℓ 용량의 발효조에서 색소 생성 최적배지 2ℓ를 첨가한 후, 종균 접종량을 1%에서 5%(v/v)까지 조절하여 균을 배양하면서 색소 생성량을 측정하였다. 조건은 30℃, 400ppm, 2vvm의 조건에서 상기 5)와 같다.

#### 8) 종균의 배양시간에 의한 영향

5ℓ 용량의 발효조에서 색소 생성 최적배지 2ℓ를 첨가한 후, 12, 18, 24, 30 시간씩 배양한 종균을 5%(v/v)씩 접종하여 배양하면서 색소 생성량을 측정하였다. 조건은 상기 5)와 같다.

## 결과 및 고찰

### 1. 청색색소 생성균주의 선별

*Bacillus subtilis* KCCM 11314, KCCM 11914 및 KCCM 11316 균주에 의한 청색색소 생성 결과는 Fig. 2와 같다. 청색색소 생성량이 가장 높은 *Bacillus subtilis* KCCM 11314를 실험균주로 선정하였다. 이것은 치자추출물을 청색색소로 전환시키는 데는 *Bacillus*, *Trichoderma* 속 등을 이용한다는 石黑 善夫<sup>4)</sup>의 결과와 일치한 결과이다.

### 2. 청색색소 생성균주의 생육도 및 색소생성량의 변화

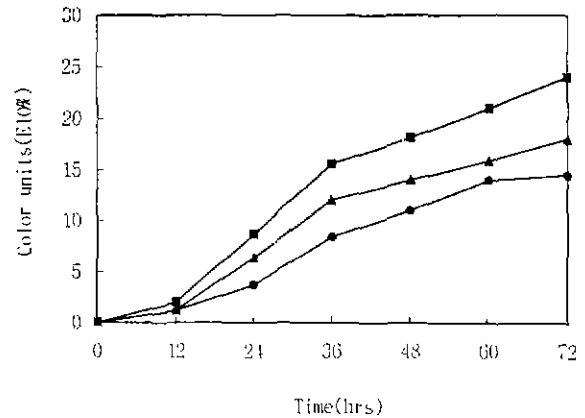


Fig. 2. Selection of microorganism for blue color production. ■-■ : *Bacillus subtilis*, KCCM 11314, ▲-▲ : *Bacillus subtilis* KCCM 11914 ●-● : *Bacillus subtilis* KCCM 11316.

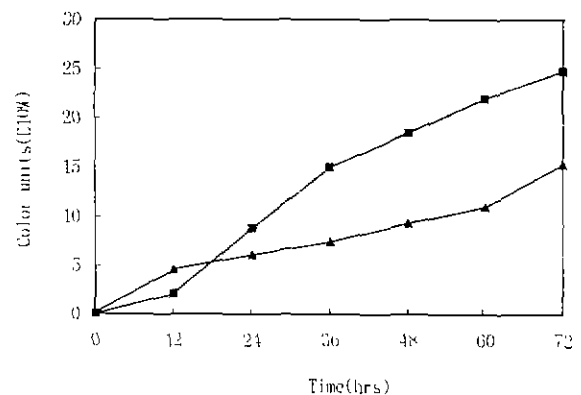


Fig. 3. Growth and blue color production of *Bacillus subtilis* KCCM 11314. ■-■ : *Bacillus subtilis*, KCCM 11314, ▲-▲ : Blue color production.

색소생성량이 가장 우수한 *Bacillus subtilis* KCCM 11314 균주를 nutrient broth 배지에서 배양하여 그 생육도와 색소생성량을 비교한 결과, Fig. 3과 같이 약 12시간의 유도기를 거쳐서, 72시간만에 정지기에 도달하였다. 그리고 대수증식기인 12시간에서 72시간 사이에 색소생산량이 가장 높아 *Bacillus subtilis*(KCCM 11314) 균주의 증식곡선과 비례하고 있다.

### 3. 배양온도에 따른 청색색소의 생성량

배양온도에 따른 *Bacillus subtilis* KCCM 11314 균주의 청색색소 생성량은 Fig. 4-A와 같이 25~35℃에서 높았으며, 30℃에서 가장 높았으므로 이

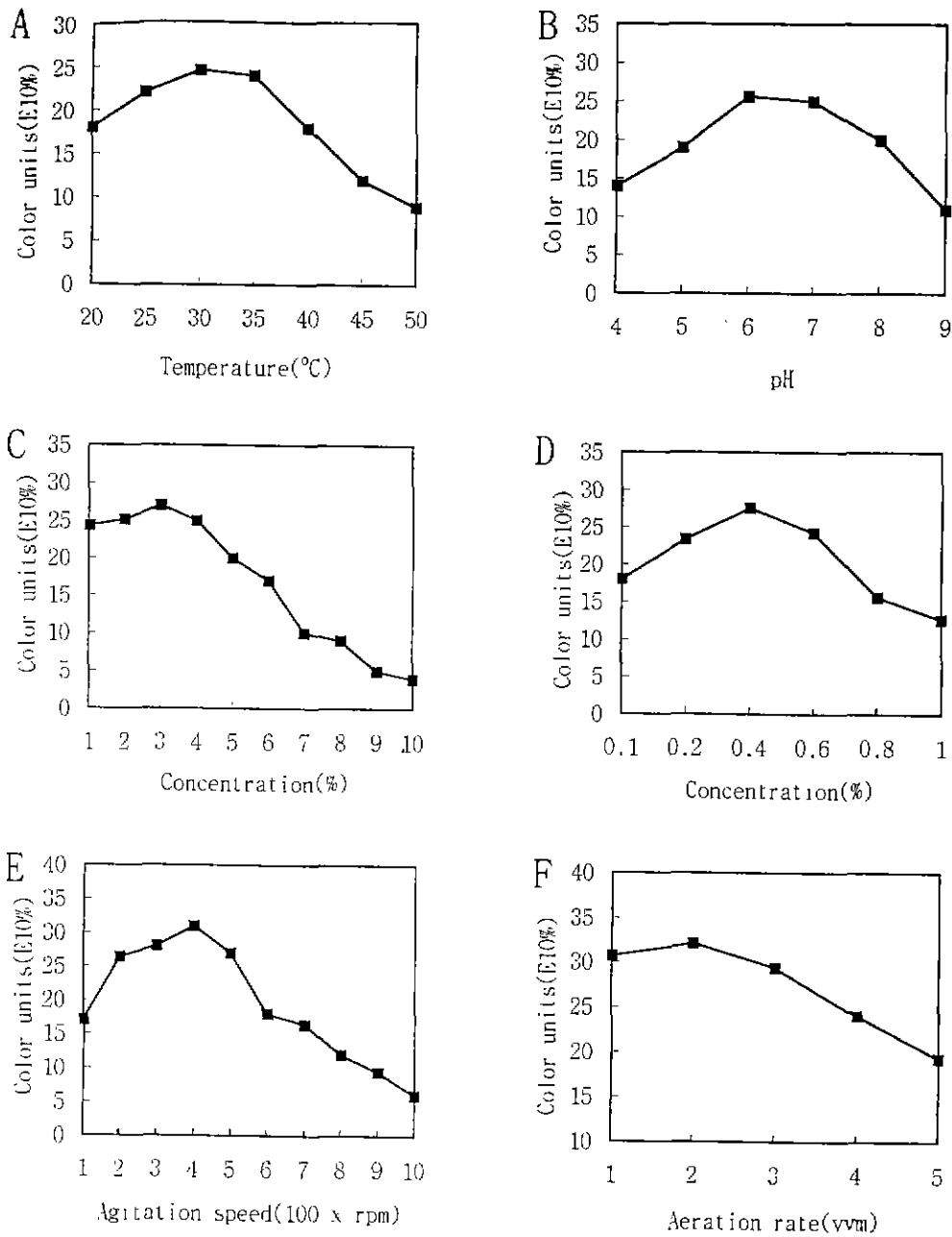


Fig. 4. Effect of various conditions on the Gardenis blue color production.

의 실험은 30°C에서 하였다.

4. pH에 따른 청색색소의 생성량

배지의 초기 pH에 따른 청색색소의 생산량은 Fig. 4-B와 같이 pH 6.0~7.0에서 높았으며 pH 6.0에서 가장 높았다. pH 4.0 이하의 산성 영역과 pH 9.0 이상의 알칼리 영역에서는 색소 생산량이 상대적으로 감소하였다.

5. 최적 탄소원 및 농도

탄소원에 따라 색소 생성량을 측정된 결과는 Table 1과 같이 glucose, mannose, fructose 등의 단당류가 비교적 높은 생성량을 나타냈다. 그중 glucose가 가장 높았다. 다른 탄소원의 색소 생성량은 낮았다.

Glucose를 최적 탄소원으로 선정된 후, glucose의 농도를 1%에서 10%까지 단계적으로 첨가하여

**Table 1. Effect of carbon sources on the production of blue color**

Carbon source (1.0%)	Absorbance at 600 nm.
None	0.25
Glucose	0.46
Galactose	0.29
Xylose	0.24
Lactose	0.30
Sorbitol	0.32
Fructose	0.37
Mannose	0.39
Arabinose	0.27
Ribose	0.29
Inositol	0.27
Maltose	0.28
Salicin	0.26
Trehalose	0.25

**Table 2. Effect of nitrogen sources on the production of blue color**

Nitrogen source (0.1%)	Absorbance at 600 nm.
None	0.48
Yeast extract	0.64
Polypeptone	0.60
NH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	0.59
CH <sub>3</sub> COONH <sub>2</sub>	0.58
Asparagine	0.50
NH <sub>4</sub> Cl	0.51
NaNO <sub>2</sub>	0.48
KNO <sub>3</sub>	0.50
NaN <sub>3</sub>	0.52
Beef extract	0.51
Tryptone	0.49
Casamonic acid	0.52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.53

배양한 결과는 Fig. 4-C와 같이 3%까지는 색소 생성량이 높았으나 농도가 높아지면 감소하였다. 따라서 최적 탄소원인 glucose의 농도를 3%로 결정하였다.

#### 6. 최적 질소원 및 농도

질소원에 따른 색소 생성량의 결과는 Table 2와 같이 yeast extract에서 가장 높았고, polypeptone, CH<sub>3</sub>COONH<sub>2</sub> 및 NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> 등도 색소 생성에 이용하였다.

Yeast extract의 농도는 Fig. 4-D와 같이 0.4%에서 생성량이 가장 높았다.

#### 7. 최적 교반속도

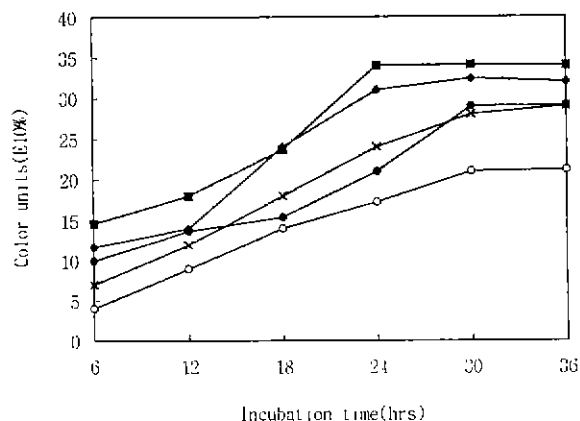
교반속도에 따른 색소 생성량은 Fig. 4-E와 같이 400rpm에서 가장 높았다. 최대 색소 생성을 위한 교반 속도는 400rpm으로 결정하였다.

#### 8. 최적 통기량

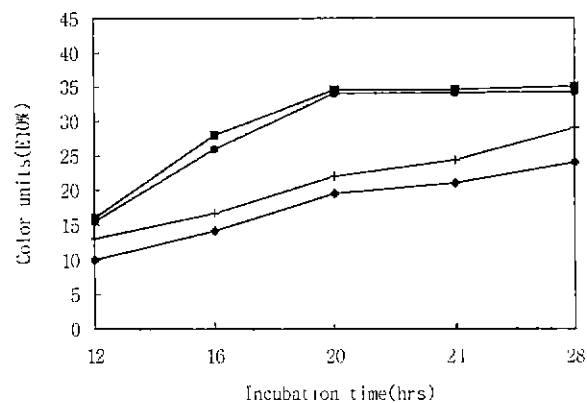
최적 통기량을 조사한 결과는 Fig. 4-F와 같이 2vvm에서 생성량이 가장 높아서 2vvm으로 결정하였다.

#### 9. 최적 종균 접종량

최적 종균 접종량은 Fig. 5와 같이 1 및 2%의 접종시에는 약 36시간 경과한 후에 최대를 나타내지만, 5%농도의 종균 접종시에는 약 20시간에 최대를 나타내서 5%로 결정하였다.



**Fig. 5. Effect of inoculum size on the *Gardenia* blue color production. ■-■ : 5%, ◆-◆ : 4%, ●-● : 3%, ×-× : 2%, ○-○ : 1%.**



**Fig. 6. Effect of inoculum age on the *Gardenia* blue color production. ■-■ : 24hour, ●-● : 20hour, +-+ : 16hour, ◇-◇ : 12hour.**

### 10. 최적 종균 배양시간

종균 시간대에 따른 색소 생성량은 Fig. 6과 같이 20, 24 시간 배양한 종균에는 큰 차이가 없으나, 배양 시간이 짧을수록 색소 생성량은 낮아졌다. 그래서 종균의 배양시간을 20시간으로 결정하였다.

### 요 약

치자에서 황색색소를 제조한 후 생기는 부산물을 *Bacillus*를 이용하여 청색색소로의 전환실험을 한 결과, 색소생성의 최적조건은 온도 30℃, pH 6.0, 최적 탄소원인 glucose의 농도는 3%, 최적 질소원인 yeast extract의 농도는 0.4%였다. 발효조내에서 청색색소로의 전환을 위한 최적반응 조건은 교반속도 400 rpm, 최적통기량은 2vvm, 최적 종균 접종량은 5%, 최적 종균 배양시간은 20시간으로 나타났다.

### 참고문헌

1. 한국식품공업협회, 식품첨가물공전, 927-929(1997).
2. 한국식품공업협회, 식품첨가물공전, 986-988(1997).
3. Min, E.G., Ham, J.H. and Han, Y.H. : Microbial transformation of yellow pigment extracted from seeds of *Gardenia jasminoides* into blue pigment., *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 12(5), 550-553(1997).
4. 石黒善夫, 森田和良, 伊藤由紀子 : 紫青色色素を産生する新規な細菌, 公開特許公報(A), 昭63-245666(1988).
5. 竹下佐知子, 佐藤充克, 八木佳明 : イリトイト配糖醣體酵素處理色素の安定化法, 公開特許公報(A), 平1-163268(1989).
6. 古賀邦正, 藤川茂昭, 福井祐子 : 天然青色系色素組成物及びそれを用いた着色剤, 公開特許公報(A), 昭63-3064(1988).
7. 田村至, 駒井強, 見上洋一郎, 支島泉 : 明色化された天然青色系色素の製法, 公開特許公報(A), 昭56-92792(1981).
8. 小畑昌彦, 香田隆俊 : クチナシ青色色素の安定化法, 公開特許公報(A), 昭62-19067(1987).
9. 和田盛隆, 石原茂正 : クチナシ色素轉換物の製造方法, 公開特許公報(A), 昭59-20357(1984).
10. Bae, S.J., Kim, K.H., Kim, B.W. and Kim, Y.H. : Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* strain A80 producing water-soluble blue pigment, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 43-46(1995).
11. Shin, J.H. and Lee, H.J. : Culture conditions and growth characteristics of indigo(*Polygonum tinctorium*) cells in air-lift bioreactor, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 8, 193-199(1993).
12. 양광자, 진기봉 : 치자열매로부터 청색계 색소를 제조하는 방법, 공개특허공보, 공개번호 87-5085(1987)
13. 臺糖株式會社 : クチナシ酵素處理天然色素の理化學的性質とその安全性について, 食品工業, 別刷, 23, 1-27(1980).

(1998년 9월 17일 접수)