

Pseudoalteromonas sp. Ju11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 기능성

박진숙^{1*} · 조현희¹ · 강명희²

¹한남대학교 생명공학과, ²한남대학교 식품영양학과

해양세균 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 에탄올 색소 추출물에 대한 안정성과 기능성을 검토한 결과, Ju11-1의 세균 색소는 pH 5.0의 조건과 25°C 이하에서 매우 안정하였으며, 금속이온침가의 경우 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에서 높은 안전성을 나타내었다. Free radical 소거 활성은 IC_{50} 95.2 $\mu\text{g/ml}$, 인체세포에 대한 DNA 손상 회복능은 ED_{50} 82.3 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 항산화능이 매우 우수한 것으로 나타났다. 한편 *Pseudoalteromonas* sp. Ju-14의 세균 색소의 경우 pH 4.0에서 pH 8.0까지의 조건과 40°C 이하에서 매우 안정하였으며, 25°C, 14일간 90% 이상의 잔존율을 나타내어 빛에 대한 안정성이 매우 우수한 것으로 나타났다. 금속이온의 경우 Fe^{2+} , Al^{3+} , Cu^{+2} 를 제외한 실험된 모든 금속이온에 대하여 매우 안정하였으며 특히, Na^+ 에 대한 안정성이 매우 높은 것으로 나타났다. Free radical 소거 활성은 IC_{50} 208.6 $\mu\text{g/ml}$, 인체세포에 대한 DNA 손상 회복능은 ED_{50} 96.4 $\mu\text{g/ml}$ 으로 항산화능이 우수한 것으로 나타났다. 해양세균 *Pseudoalteromonas* 속의 Ju11-1과 Ju14, 두 균주의 색소 추출물은 우수한 물리화학적 안정성을 갖고, free radical 소거 활성 및 인체세포에 대한 DNA 손상 회복능에서 높은 활성을 나타내어 항산화 활성을 갖는 기능성 색소로의 적용을 검토할 수 있을 것으로 기대된다.

Key words □ bacterial pigment, comet assay, DPPH, marine bacteria, physicochemical stability, *Pseudoalteromonas* sp.

색소는 식품, 의약품, 화장품 등에 색깔을 내는 능력을 갖는 물질로써 주로 상품성, 저장성을 높이는 용도로 사용된다. 과거에는 자연에 존재하는 동식물로부터 추출한 천연색소가 주로 사용되어왔으나 추출의 어려움과 소재와 용도의 제한성이 커져 제한적으로 사용되어왔다. 1900년대 화학 공업의 발달과 함께 합성색소가 개발되어 광범위하게 사용되어 왔으나 최근 들어 합성색소의 인체에 대한 발암성과 유해성이 문제점으로 제기되면서 합성 색소에 대한 규제가 점차 증가되고 있는 추세이다. 반면 소비자들의 건강에 대한 관심은 증가되고 있어 천연 색소에 대한 사용과 개발에 대한 요구는 점차 커지고 있다(7, 21). 그러나 천연색소는 가격이 비싸고 생육 조건 및 환경에 따라 품질의 변화가 심하다는 단점을 갖는다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에는 대량생산이 가능하고 안정된 품질의 색소를 생산할 수 있는 천연 미생물 색소에 대한 관심이 증가하고 있다(21). 현재까지 곰팡이(14), 효모(3, 10), 세균(1, 11, 12) 등을 이용한 미생물 색소에 관한 연구가 수행되어졌으며, 홍국색소를 비롯하여 몇몇 색소는 실질적으로 생산되어 이용되고 있다. 미생물 중 효모나 곰팡이를 이용할 경우 세포벽의 파쇄 등이 어렵고 균주 개발시, 유전자 조작이 복잡한데 비해 세균을 이용할 경우 이러한 문제점이 완화될 수 있으며 특히 해양세균은 높은 염 농도에서 생장하므로 오염의 염려가 적고, 또한 낮은 염농도에서도 세포 용

해가 쉽게 일어나 색소의 추출이 용이하다는 장점을 갖는다(5). 한편, 천연 색소는 열, pH, 빛, 금속이온 등에 내성이 약하고 식품 등의 가공 저장 중에 쉽게 탈색된다는 결점이 있다(21). 따라서 본 연구에서는 색소 생성능이 우수한 해양세균으로 보고된 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14 균주(6)로부터 색소를 추출하여 pH, 온도, 빛 그리고 금속이온에 대한 색소의 안정성을 검토하고, free radical 소거활성과 DNA 손상 회복능의 평가를 통하여 색소의 생물학적 활성을 조사하고 나아가 주요 유해세균에 대한 항균활성을 조사하여 천연 기능성 색소로의 적용성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양 조건

본 실험에는 제주도의 해수로부터 빨강 색소를 생산하는 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 균주와 노랑 색소를 생산하는 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14 균주를 사용하였으며(6), Marine broth 2216 (Difco, USA) 배지에서 30°C, 200 rpm으로 30시간 진탕 배양하였다.

색소의 추출 및 색소 시료의 조제

배양액은 6,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 균체와 상등액을 분리하고, 얻은 균체를 증류수로 세척한 후, 추출 효율이 우수하고(6), 색소의 안정성이 높은 것으로 보고된 에탄올을 사용

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-629-8771, Fax: 82-42-629-8769
E-mail: jspark@hnu.kr

하여 세균 색소를 추출하였다(2). 색소추출물 시료는 에탄올을 첨가하여 3회 반복하여 진탕 추출한 후 원심 분리하여 상등액을 회전진공증발농축기로 증발 건조하였다. 건조 시료 50 µg을 에탄올 1 ml에 녹여 사용하였다.

색소의 안정성

pH의 영향

pH에 대한 색소의 안정성을 알아보기 위하여 색소 용액에 pH 3에서 pH 10 사이의 완충용액(pH 3.0~5.0: sodium citrate, pH 6~7: sodium phosphate, pH 8: Tris-HCl, pH 9~10: sodium carbonate-HCl)을 동량 가하고 25°C에서 4시간 방치한 후 흡광광도계(Spectronic Genesys 5, Miltonroy, USA)를 이용하여 Ju11-1 균주의 색소와 Ju14 균주 색소의 최대 흡수파장인 537 nm과 378 nm에서 각각 측정하였다.

온도의 영향

온도에 대한 안정성은 50 µg/ml의 색소 추출물 3 ml을 시험관에 넣고 parafilm을 이용하여 밀봉한 후 이를 각각 -20°C, 4°C, 25°C, 40°C의 압소에서 15일간 보존하면서 24시간 간격으로 각각의 최대 흡수 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다.

광선의 영향

광선에 대한 안정성은 50 µg/ml의 색소 추출물 3 ml을 시험관에 넣은 후 110 V, 30 W의 조명으로부터 30 cm의 거리에 위치시키고, 25°C에서 15일간 보존하면서 24시간 간격으로 각각의 균주의 최대 흡수파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 대조구는 빛을 완전히 차단하고 같은 조건하에서 실험을 수행하였다.

금속이온의 영향

금속이온에 대한 안정성은 50 µg/ml의 색소 추출물 3 ml에 1.0×10^{-2} M 농도의 NaCl, AlCl₃, FeCl₂, CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂와 KCl의 금속이온 용액을 각각 1.0% 첨가하여(11), 25°C의 압소에서 15일간 보존하면서 24시간 간격으로 각각의 최대 흡수파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 대조구는 금속이온을 첨가하지 않고 같은 조건에서 실험을 수행하였다.

Free radical 소거 활성

분리된 색소의 *in vitro* 항산화능력은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 환원에 의한 free radical 소거 활성 반응에 의한 방법(13)으로 평가하였다. 에탄올에 녹여 농도별(5~50 µg/ml)로 희석한 시료에 DPPH/ethanol solution을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 각각의 최대 흡수파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도별로 3회 반복하여 실험을 수행하였다. 비교구로 합성 항산화제인 BHA (butylate hydroxy anisole)를 각 시료와 같은 농도로 사용하였으며 시료를 첨가하지 않은 대조구의 DPPH radical을 50% 소거시키는데 필요한 시료의 농도를 IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration)으로 표기하였다. 통계처리

는 SPSS-PC + 통계 package (version 10.0)를 사용하였으며, DPPH 소거능은 평균치±평균편차(SD)로 표시하였다. 시료의 DPPH radical 소거능 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)를 시행하고 군 간의 비교는 Duncan의 다중비교검정법에 의해 사후 검증하였으며, 통계적 유의성은 0.05 이하 수준에서 평가하였다.

DNA 손상 회복능

실험균주로부터 추출한 색소의 인체 세포 DNA 손상 회복능에 대한 조사는 Margarita 등(16)의 방법에 따라 comet assay를 이용하였다. 색소 추출물 시료는 에탄올에 녹여 농도별(5~100 µg/ml)로 준비하였다. 건강한 성인 여성의 혈액으로부터 임파구 세포를 1,300 rpm, 6분간 원심 분리하여 준비하고, 색소추출물 시료를 인체 임파구 세포에 적정 농도별로 PBS (160 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.3 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 희석하여 혼합한 후 4°C에서 30분간 전처리하였다. 전처리가 끝난 각 인체 임파구 세포에 100 µM H₂O₂를 1 ml씩 넣어 혼합한 뒤 4°C에서 5분 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. 세척 후 25 V, 300 mA에서 20분간 전기영동을 실시하였다. 양성대조구는 PBS 처리된 임파구세포에 DNA 손상을 야기하는 물질인 H₂O₂를 100 µM 농도로 처리하였으며, 음성대조구는 PBS 처리세포에 H₂O₂를 처리하지 않고 사용하였다. 대조 시료인 β-carotene (Sigma, USA)은 색소 추출물과 동일한 방법으로 준비하였다.

임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL)에 tail 내 함유된 DNA 양(Tail % DNA)을 곱해준 tail moment (TM)값을 측정하여 나타내었으며, DNA 손상 회복에 대한 비교는 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 DNA의 tail 길이에 대한 손상회복 효과(%)와 투여군의 50%에서 효과가 나타나는 유효 용량을 의미하는 ED₅₀ (the effective dose in 50% of the subjects)으로 표시하였다. 각 처리구 당 2개의 슬라이드를 만들어 그 중에서 50개 세포를 관찰하여, H₂O₂에 의한 DNA 손상 억제정도를 측정하였고, 모든 실험 과정은 blind 방식으로 수행하였다. 모든 자료의 처리는 SPSS-PC + 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 처리구별로 50개의 세포에서 측정된 DNA 손상도(TL, Tail %DNA, TM)의 평균값과 표준오차를 구하였으며, 양성대조구와 음성대조구를 기준으로 각 농도별로 상대적 DNA 손상도를 relative score로 표시하였다. 시료의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하였고, 모든 통계적 유의성은 P<0.05 수준에서 평가하였다.

항균 활성

색소의 항균 활성은 주요 식품유해균, 그람음성 세균 3종과 그람양성 세균 2종에 대하여 디스크 확산법(disk agar method)을 이용하여 확인하였다(7). 우선 8 mm paper disk에 에탄올에 녹인 색소를 10 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg이 되도록 하여 대상 균주가 도달된 평판배지에 올려놓고 30°C에서 24시간 배양 후 투명대의 지름을 측정하였다. 균주는 그람 음성균인 *E. coli* KCTC

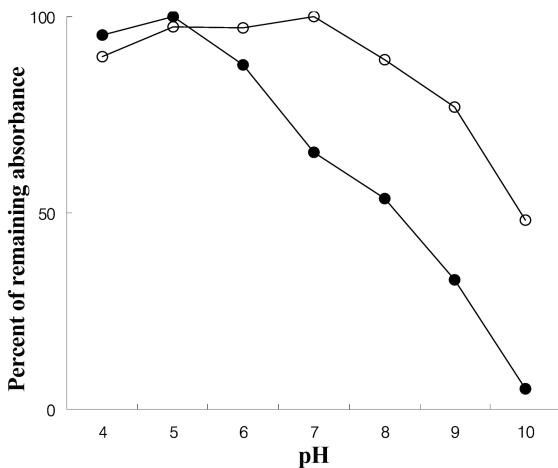


Fig. 1. Effects of pH on the stability of the bacterial pigments in the dark at 25°C. Absorbances of the pigment extracts from bacterial strains, Ju11-1 and Ju14 were estimated at their λ max, 537 nm and 378 nm, respectively. (●) *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1; (○) *Pseudoalteromonas* sp. Ju14.

1116, *Salmonella typhimurium* KCTC 2514^T, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750^T와 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* IAM 12188^T, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923^T을 사용하였다.

결 과

색소의 안정성

pH의 영향

색소에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1의 붉은 색소는 pH 5에서는 90% 이상의 안정한 색소 잔존율을 나타내었으나 pH 5와 6을 제외한 나머지 pH에서는 색소 잔존율 70% 이하를 나타내어 매우 좁은 범위의 pH 안정성을 나타내었다. 반면 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 노랑 색소는

pH 5, 6, 7에서 95% 이상의 잔존율을, pH 4와 8에서는 89%, pH 9에서는 각각 77%를 나타내었다. pH 10에서는 48%의 색소 잔존율로 현저한 감소를 보였으나, pH 4-8까지의 비교적 넓은 범위의 pH에서 안정하였다(Fig. 1).

온도의 영향

빛이 없는 조건에서, 온도가 색소의 안정성에 미치는 영향을 검토한 결과 Ju11-1의 경우, -20°C와 4°C에서 15일간 93% 이상의 높은 잔존율을 나타내었다. 25°C에서는 8일 이후, 40°C에서는 6일 이후 색소의 잔존율이 90% 이하로 감소하였으며 15일 후 25°C에서는 87%, 40°C에서는 78%의 잔존율을 나타내었다(Fig. 2A). Ju14의 경우, -20°C, 4°C, 25°C, 40°C 모두에서 15일간 95% 이상의 높은 잔존율을 나타내었다(Fig. 2B).

광선의 영향

빛이 색소에 미치는 영향은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Ju11-1 색소의 경우, 25°C, 빛이 없는 조건하에서 14일 경과 후 92%의 잔존율을 나타내었으나 빛이 있는 조건에서는 14일 후 색소의 잔존율이 75% 이하로 감소하는 현상을 나타내었다. 한편 Ju14의 색소의 경우는 빛이 없거나 혹은 광조사한 경우 모두 14일 경과 후에도 95% 이상의 색소 잔존율을 나타내었다.

금속이온의 영향

금속이온이 색소에 미치는 영향은, 빛이 없는 25°C 조건에서 금속이온을 첨가하지 않은 경우와 NaCl, AlCl₃, FeCl₃, CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂와 KCl을 첨가한 경우를 비교하였다. Ju11-1의 색소의 경우(Fig. 4A), 조사한 8종의 금속이온 중 Ca²⁺과 Mg²⁺의 첨가 시 14일 경과 후, 약 97%의 잔존율을 나타내어 대단히 높은 안정성을 나타내었다. Al³⁺와 Cu²⁺에서는 각각 76%, 71%의 잔존율을 나타내어 이들 금속이온에 대하여는 다소 낮은 안정성을 나타내었으며 Fe²⁺ 금속 이온에 대하여는 14일 경과 후 38%의 잔존율을 보여 가장 낮은 안정성을 나타내었다. Ju14 색소의 경우(Fig. 4B), Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺의 첨가 시 14일 경과 후,

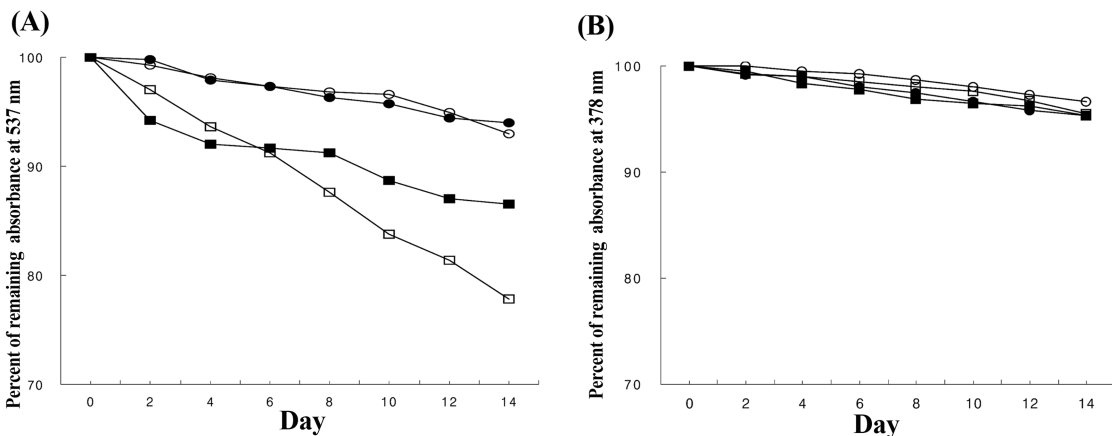


Fig. 2. Effect of temperature on the stability of bacterial pigments from *Pseudomonas* sp. Ju11-1 (A) and *Pseudomonas* sp. Ju14 (B) in the dark. (●) -20°C; (○) 4°C; (■) 25°C; (□) 40°C.

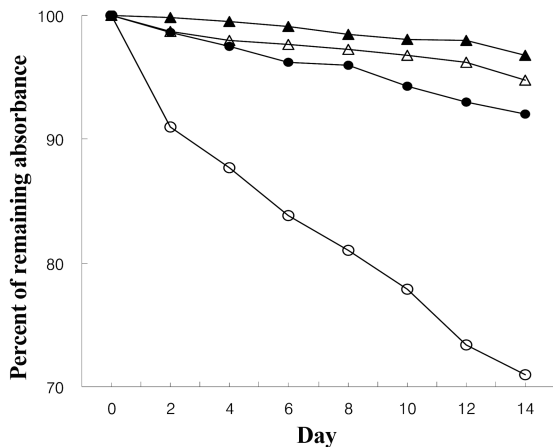


Fig. 3. Effects of light on the stability of the bacterial pigments in the dark at 25°C. Absorbances of the pigment extracts from bacterial strains, Ju11-1 and Ju14 were estimated at their λ max, 537 nm and 378 nm, respectively. (○) Ju11-1 Light; (●) Ju11-1 Dark; (△) Ju14 Light; (▲) Ju14 Dark.

이들 3종의 금속이온에 대하여 약 92% 이상의 잔존율을 나타내어 매우 높은 안정성을 나타내었다. 한편, Cu^{2+} 의 경우 14일 경과 후 71%를 나타내어 색소의 안정성이 다소 저하되었으며 Al^{3+} 과 Fe^{2+} 첨가의 경우, 14일 경과 후 각각 30%와 38%의 잔존율을 나타내었다.

Free radical 소거 활성

색소의 항산화 활성은 합성 항산화제인 BHA (butylate hydroxy anisole)를 비교구로 하여 합성 항산화제인 BHA를 각 시료와 같은 농도로 사용하여 DPPH법에 의해 평가한 결과, BHA의 IC_{50} 은 19.3 $\mu\text{g/ml}$ 인 반면, *Pseudoalteromonas* sp. 11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 색소추출물은 각각 95.2 $\mu\text{g/ml}$ 과 208.6 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

DNA 손상 회복능

DNA 손상 회복능은 임파구 세포에 H_2O_2 를 이용하여 인위적

인 손상을 가하고 여기에 *Pseudoalteromonas* sp. 11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. 14군주로부터 추출한 세균색소를 처리하여 손상에서 회복되는 정도를 comet assay를 통하여 관찰하였다. 이들 세균 색소의 DNA 손상 회복능은 양성대조구와 비교하여 본 결과(Fig. 5), Ju11-1의 경우, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 색소 농도에서 40%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 41%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 45%의 회복능이 있는 것으로 나타났으며, Ju14의 경우, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 색소 농도에서 33%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 36%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 34%의 회복능이 있는 것으로 나타나 이들 색소는 유의한 DNA 손상 회복능을 가진 것으로 나타났다. 두 종의 세균 색소의 DNA 손상 회복능의 정도를 비교하고자 동일한 조건에서 β -carotene에 대하여 comet assay를 수행한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 β -carotene의 DNA 손상 회복능은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 51%의 DNA 손상 회복능을 나타낸 데 비하여 Ju11-1의 세균 색소는 41%, Ju14 색소는 36%를 나타내었다. β -Carotene의 경우, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 DNA 손상 회복능이 79%를 나타내어 최고치에 달한데 비하여 실험된 두 세균 색소의 경우 농도 증가에도 DNA 손상 회복능이 증가하는 경향은 보이지 않았다.

세균색소의 DNA 손상 회복능을 ED_{50} 으로 환산하여 본 결과는 Fig. 7과 같다. β -Carotene이 24.8 $\mu\text{g/ml}$ 인데 비해 Ju11-1과 Ju14의 세균 색소는 각각 82.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 96.4 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 각각 β -carotene의 30% 및 26%에 달하는 DNA 손상 회복능을 나타내었다.

항균 활성

색소 추출물의 항균활성은 그람 음성세균 3종과 그람 양성세균 2종 대하여 검토하였으며 그 결과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14는 항균 활성은 갖지 않는 것으로 나타났다.

고찰

해양으로부터 분리한 *Pseudoalteromonas* 속의 색소를 생성하는 2군주, Ju11-1과 Ju14의 색소 추출물에 대한 물리화학적 안정

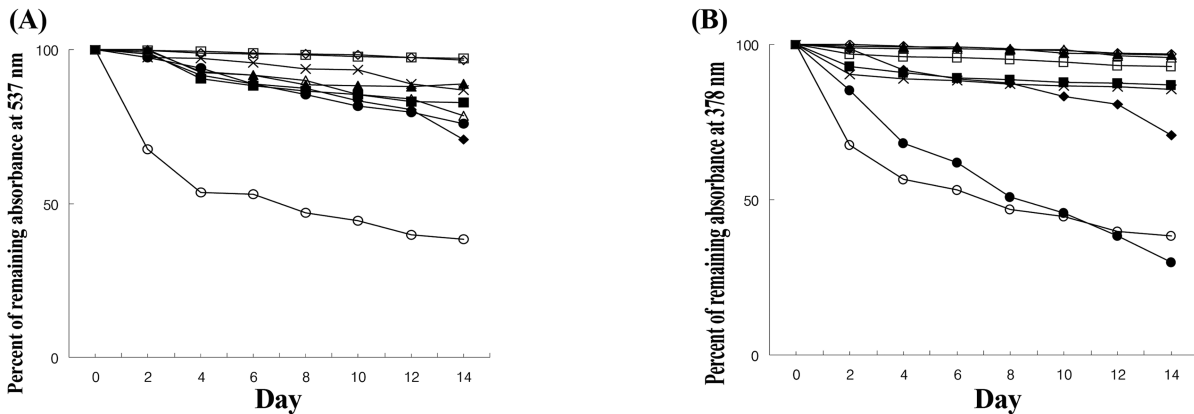


Fig. 4. Effect of metal ions (1%, w/v) on the stability of bacterial pigments from strain Ju11-1 (A) and Ju14 (B) in the dark at 25°C. (▲) None; (△) NaCl; (●) AlCl_3 ; (○) FeCl_2 ; (◇) CaCl_2 ; (◆) CuCl_2 ; (■) ZnCl_2 ; (□) MgCl_2 ; (▽) KCl.

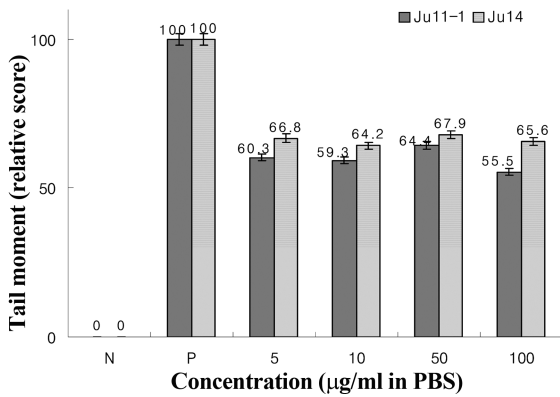


Fig. 5. Effects of various concentration of the bacterial pigments on DNA damage in human lymphocytes using the comet assay. N, negative control (no H₂O₂); P, positive control (H₂O₂); 5, sample 5 µg/ml PBS; 10, sample 10 µg/ml PBS; 50, sample 50 µg/ml PBS; 100, sample 100 µg/ml PBS.

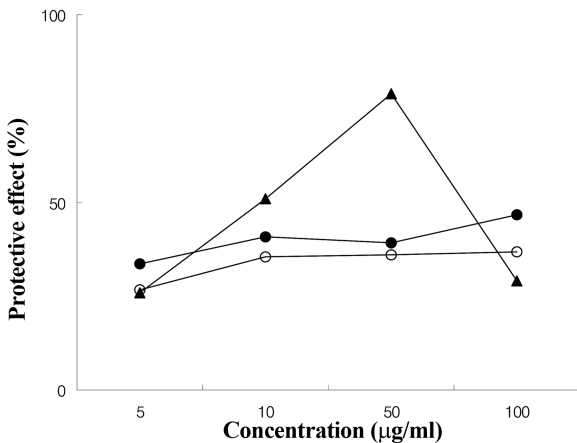


Fig. 6. Comparison of the protective effect between β-carotene and the bacterial pigments in human lymphocyte cells using the comet assay. (▲) β-carotene; (●) Ju11-1; (○) Ju14.

성과 생물학적 활성을 조사하였다.

pH에 대한 안정성은 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 색소는 pH 5와 6에서, *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 경우 pH 4-8에서 매우 안정하였다. Ju14 색소의 pH 안정성은 *Stereptomyces propurpuratus*와 *Bacillus* No. 751의 혼합배양에 의해 생산된 적자색의 색소는 pH 3.6-8.2에서 안정하다는 보고와 일치하는 것이었으며(4), *Rhodospirillum rubrum*의 황색색소(12) 및 *Monascus* 유래 적색 색소(15)의 pH 안정성과 유사한 결과였다. *Rhodophila globiformis*로부터 생산된 적색색소는 pH 6-11에서(10), *Rhodopseudomonas viridis*로부터 추출한 녹색색소가 pH 6-9 사이에서 안정한 것에(11) 비하여, *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 색소는 보다 산성쪽에서 안정한 것으로 나타났다. 따라서 이들 색소는 약산성 및 중성 조건에서 사용이 가능할 것으로 생각된다. 온도에 대한 안정성 시험 결과, 두 균주 모두 40°C이하에서 비교적 안정하여 *Rhodospirillum rubrum*의 황색색소를 비

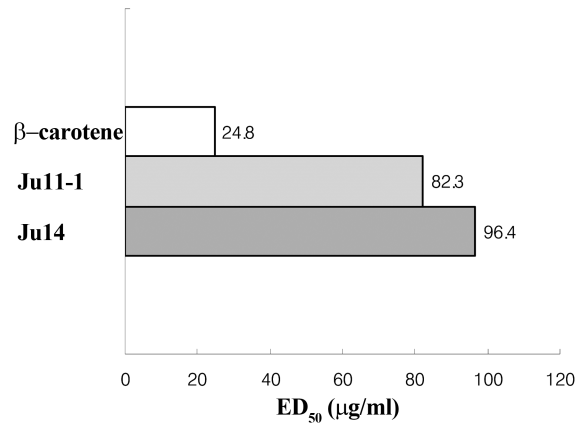


Fig. 7. Comparison of the antioxidant activities among various concentration of bacterial pigment extracts and β-carotene in the comet assay by the estimated dose that would result in a 50% (ED₅₀) of oxidative DNA damage in human lymphocytes. Ju11-1 and Ju14 mean pigment extracts from *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 and *Pseudoalteromonas* sp. Ju14, respectively.

롯하여(12) 세균 유래의 색소들이 40°C이하에서는 비교적 안정하다는 결과(10, 11)와 일치하는 것이었다. 특히, *Rhodophila*의 적색색소가 40°C에서 5일 이후(10), *Rhodospirillum*의 황색색소가 25°C에서 3일 이후에는 90% 이하로 색소 잔존율이 감소한 것과(12) 비교할 때, 특히 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14의 노랑색 색소는 조사된 모든 온도에서 색소의 잔존율이 95% 이상으로 나타나 상온에서도 색소의 안정성이 매우 뛰어난 것으로 관찰되었다. Ju11-1의 색소의 경우 25°C이하에서, Ju14 색소의 경우 상온에서의 사용과 보관이 가능할 것으로 생각된다. 빛에 대한 색소의 안정성은 두 균주 모두 빛이 없는 조건에서는 92% 이상의 색소 잔존율을 나타내었으며, Ju14의 색소 추출물은 광조사의 경우에도 거의 동일한 안정성을 보여 빛에 매우 안정한 색소임을 알 수 있었다. 단 Ju11-1의 경우, 광조사 시 14일 경과 후 71%의 색소 잔존율을 나타내어 다소 안정성이 저하되었으나, 광조사 조건에서 5일 이후 급격한 퇴색 현상을 일으켜 50% 이하의 낮은 잔존율을 나타낸 *Rhodospirillum rubrum*의 황색색소(12) 및 호염세균으로부터 에탄올 추출한 카로테노이드 색소의 경우 2일 이후 88% 이상의 파괴율을 나타낸 것과(2) 비교할 때 색소의 온도 안정성은 우수한 것으로 관찰되었다. 특히 Ju14의 색소는 빛에 대하여 매우 안정한 것으로 나타났다. 금속이온은 식품 등에 자체적으로 함유되어있거나 포장조건, 가공과정 중의 오염이나 고의적으로 염을 첨가하는 등의 가공과 관련성이 크다(22). Ju11-1과 Ju14 두 균주의 색소 모두 Fe²⁺, Al³⁺, Cu²⁺ 제외한 금속이온에 대하여는 높은 안정성을 나타내었다. Ju11-1의 색소의 경우 Fe²⁺에 대하여, Ju14 색소의 경우 Al³⁺과 Fe²⁺에 대하여 낮은 안정성을 나타내었다. *Rhodospirillum*의 황색색소(12)와 *Rhodophila*의 적색색소의 경우 Fe²⁺, Al³⁺, Cu²⁺에서 색소의 안정성이 현저히 저하된다(10)는 결과 및 *Rhodopseudomonas*의 녹색색소의 경우 Fe²⁺, Al³⁺ 첨가 시 신속히 퇴색하였다는 보고(11)와 유사한 결과였다. 한편 두 균주의 색소 모두 Ca²⁺, Mg²⁺ 이온에 대하여

높은 안정성을 나타내었으며 특히 Ju14 색소의 경우 Na^+ 의 첨가 시에도 높은 안정성을 나타내어 염농도가 비교적 높은 식품의 경우에도 적용 가능할 것으로 사료된다. 금속이온에 대한 안정성 시험 결과, 본 색소는 Fe^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} 등이 존재하지 않는 용기의 사용과 가공공정에 이들이 제거된 식품에 사용하면 높은 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

균주 Ju11-1과 Ju14의 색소추출물의 free radical 소거 활성 (IC_{50})은 각각 $95.2 \mu\text{g/ml}$ 과 $208.6 \mu\text{g/ml}$ 나타내어, 거봉종 포도의 에탄올 종자 추출물의 IC_{50} 값이 $628.9 \mu\text{g/ml}$, 과피 추출물의 경우 $12,779.5 \mu\text{g/ml}$ (18), 캠벨 종 포도의 에탄올 추출물의 경우, 종자는 $16.8 \mu\text{g/ml}$, 과피는 $2437.5 \mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 값을 보인다는 연구 결과(19)와 비교할 때 두 균주의 색소추출물은 매우 우수한 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다. 두 균주의 색소 추출물은 해양으로부터 분리한 *Pseudoalteromonas psicida* 균주의 색소(17)에 비해 DPPH 라디칼 소거활성으로 본 항산화 활성이 매우 높게 나타났으며 또한, Ju11-1 균주의 색소는 Ju14에 비하여 더 강한 항산화능을 나타내었다.

체내에서 free radical과 항산화물질간의 균형이 깨져 산화 스트레스를 받게 되면 DNA가 손상이 되며 이것이 원인이 되어 암으로까지 발전할 수 있다. 따라서 어떤 물질의 DNA 손상 회복능을 측정하는 것은 항산화 생리활성을 측정하는 또 하나의 민감한 지표로 최근 많이 사용되고 있다. β -Carotene의 DNA 손상 회복능은 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 51%를 나타내었으며, $50 \mu\text{g/ml}$ 에서 DNA 손상 회복능이 79%를 나타내어 최고치에 달한데 비하여 Ju11-1과 Ju14의 세균 색소는 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 41%와 36%의 DNA 손상 회복능을 나타내었으며 처리농도의 증가에도 DNA 손상 회복능 역시 크게 증가하지 않았다. 이는 포도주스와 녹차의 DNA 손상 회복능이 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 약 45%를 나타내며 처리농도 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상에서는 처리 농도의 증가에도 DNA 손상 회복능이 증가하지 않은 것과(20) 유사한 경향이였다. 한편 녹차와 포도주스의 DNA 손상 회복능은 flavonoids나 항산화비타민인 α -tocopherol 보다 효과가 우수한 것으로 보고되어 있다(20). 또한 DNA 손상 회복능에 대한 객관적인 비교를 위하여 β -carotene, Ju11-1 및 Ju14 색소의 ED_{50} 을 계산하였다. 각각의 ED_{50} 은 24.8, 82.3 그리고 $96.4 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 Ju11-1과 Ju14 균주의 색소 추출물은 강력한 항산화제인 β -carotene과 비교하였을 때 각각 DNA 손상 회복능이 β -carotene의 30% 및 26%에 달하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과들에 비추어 볼 때 본 세균 색소의 항산화능은 매우 우수함을 알 수 있었다.

Ju11-1과 Ju14 두 균주의 색소 추출물은 시험한 5종의 세균에 대하여 항균활성은 나타내지 않았으며 이는 *Pseudoalteromonas psicida* TA20의 색소 추출물이 $50 \mu\text{g}$ 이상에서 그람 음성과 양성세균 모두에 대하여 항균 활성을 나타낸 것(17)과는 대조적인 결과였다. 그러나 해양세균인 *Erythrobacter* 속이 생산하는 카로테노이드 색소(9)의 경우 대표적인 식품 유해균인 *E. coli*에 대하여 항균활성을 갖지 않는 것으로 보고된 바 있다.

해양으로부터 분리한 *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1과 *Pseudoalteromonas* sp. Ju14는 16S rDNA 염기서열 유사도

98.5%의 매우 유사한 균주(6)이나 각각 서로 다른 색깔의 색소를 형성하며 물리화학적 안정성은 Ju14의 색소가 뛰어난데 비해 항산화 활성과 같은 생물학적 활성은 Ju11-1이 더 우수한 차이를 나타내었다. 유전공학적 방법을 이용한다면 두 균주를 사용하여 색소생성을 위한 우수한 균주의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 또한 두 균주 모두, 보고된 천연 색소들과 비교할 때 색소의 안정성이 매우 뛰어나고 항산화능이 우수하여 항산화 효과를 가지는 기능성 색소로의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 2009학년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 43-46.
- Choi, B.D. and Y.K. Jeong. 1997. The stability of carotenoids extracted from halophilic bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 1405-1407.
- Costa, I., H.L. Martelli, I.M. da Silva, and D. Pomeroy. 1978. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnol. Lett.* 9, 373-375.
- Imada, K., M. Oshima, T. Yoshida, S. Yasuda, and S. Yoshino. 1983. Evaluation of neopurpuratin, a purplish-red substance produced by microorganism, as food colors. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 30, 270.
- Jeong, Y.G., B.D. Choi, S.J. Kang, S.H. Jeong, Y.K. Lee, H.Y. Kim, and M.J. Jung. 2001. Characteristic of carotenoid component from halophilic bacteria, *Haloarcula* sp. EH-1. The Institute of Marine Industry. *J. Mol. Biol.* 15, 673-675.
- Jong, D.W. and J.S. Park. 2008. Characterization of pigment-producing *Pseudoalteromonas* spp. from marine habitats and their optimal conditions for pigment production. *J. Life Sci.* 18, 1752-1757.
- Kim, E.Y. and M.R. Rhyu. 2008. Antimicrobial activities of *Monascus koji* extracts. *Korean J. Sci. Technol.* 40, 76-81.
- Kim, H.J., H.J. Park, S.K. Bae, J.D. Kim, I.S. Kong, and J.Y. Kong. 1996. Characterization of red-pigment produced by marine bacterium *Vibrio* sp. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25, 294-300.
- Kim, J.D., D.S. Kang, M.Y. Kim, S.B. Roh, M.R. Choi, S.H. Song, S.H. Baek, H.J. Seo, D.H. Kim, and J.Y. Kong. 2001. Production of carotenoid from halophilic *Erythrobacter* sp. and characterization of physiological properties. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30, 143-151.
- Kim, Y.H. and S.S. Lee. 1994. A study on pigments from *Rhodospira globiformis* by acetone extraction : Stability of red pigments. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23, 25-29.
- Kim, Y.H. and S.S. Lee. 1994. A Study of greenish pigments from *Rhodospseudomonas viridis* by acetone extraction : Characteristics of potential food colorant. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26, 93-97.
- Kim, Y.H. and S.S. Lee. 1993. Yellow pigment from *Rhodospirillum rubrum* by acetone extraction. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 6,

- 322-328.
13. Lee, E.J. and H.D. Jang. 2004. Antioxidant activity and protective effect of five edible mushrooms on oxidative DNA damage. *Food Sci. Biotechnol.* 13, 443-449.
 14. Lee, S.M., H.S. Kim, and T.S. Yu. 2003. The optimal condition for production of red pigment by *Monascus anka* on solid culture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 155-160.
 15. Lim, S.I. and E.J. Kwak. 2004. Stability of the pigments from *Monascus purpureus* CBS 281.34. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 711-715.
 16. Margarita, T., P.T. Doulias, A. Barbouti, U. Brunk, and D. Galaris. 2005. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.* 387, 703-710.
 17. Park, J.S., D.W. Jeong, and M.H. Kang. 2009. The physicochemical stabilities and biological activities of pigment extract from marine bacterium *Pseudomonas piscida* TA20. *J. Life Sci.* 19, 1132-1138.
 18. Park, S.J. and D.H. Oh. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympic grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J. Sci. Technol.* 35, 121-124.
 19. Park, S.J., B.K. Park, H.Y. Lee, J.H. Lee, J.D. Kim, and D.H. Oh. 2002. Biological activities of ethanol extract and fractions of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J. Food Preserv.* 9, 338-344.
 20. Park, Y.K., E.J. Jeon, and M.H. Kang. 2003. Protective effect of flavonoids on lymphocyte DNA damage using comet assay. *Korean J. Nutr.* 36, 125-132.
 21. Ryu, B.H. and M.J. Kim. 2000. Production of red pigment from marine bacterium utilizing colloidal chitin. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 264-269.
 22. Yang, M.O. and E.J. Cho. 2006. Stability for rose petals pigment as a food material. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 16, 468-473.

(Received December 10, 2009/Accepted December 24, 2009)

ABSTRACT: The Physicochemical Stabilities and Biological Activities of Pigment Extracts from *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 and *Pseudoalteromonas* sp. Ju14
Jin-Sook Park^{1*}, Hyun-Hee Cho¹, and Myung-Hee Kang² (¹Department of Biotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea, ²Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea)

We investigated the physicochemical stabilities and biological activities of ethanol- extracted pigment from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 and *Pseudoalteromonas* sp. Ju14. The bacterial pigment of strain Ju11-1 was very stable at pH 5.0 below 25°C. The stability of the pigment showed higher stability in the presence of metal ions such as Cu²⁺ and Mg²⁺. The pigment has activity of free-radical scavenging (IC₅₀ 95.2 µg/ml) and the protective antioxidant effect (ED₅₀ 82.3 µg/ml) against DNA damage in human lymphocytes. The bacterial pigment of strain Ju14 was very stable at pH range between 4.0 and 8.0 below 40°C. In the presence of light, the pigment was also very stable, showing more than 90 percent of remaining absorbance during 14 days at 25°C. The stability of the pigment, when metal ions were present, showed higher stability in all examined metal ions except for Fe²⁺, Al³⁺, and Cu²⁺, especially in the presence of Na⁺. The pigment has activity of free-radical scavenging (IC₅₀ 208.6 µg/ml) and the protective antioxidant effect (ED₅₀ 96.4 µg/m) against DNA damage in human lymphocytes. The result indicates that the bacterial pigments from marine bacteria, *Pseudoalteromonas* sp. Ju11-1 and *Pseudoalteromonas* sp. Ju14 showed higher physicochemical stability and significant effects for reduction in oxidative DNA damage. Therefore, the results suggest that these bacterial pigments could be used as a natural colorant having the advantages of antioxidant.