

Acetone 추출한 *Rhodopseudomonas viridis* 녹색색소에 대한 연구: 식용색소로서의 일반적 성질

김용환 · 이상섭*

경기대학교 식품가공학과, *경기대학교 생물학과

A Study of Greenish Pigments from *Rhodopseudomonas viridis* by Acetone Extraction: Characteristics of Potential Food Colorant

Yong-Hwan Kim and Sang-Seob Lee*

Department of Food Technology, Kyonggi University

*Department of Biology, Kyonggi University

Abstract

A study of physical and chemical characteristics of pigments from *Rhodopseudomonas viridis* DSM 133 was carried out for development of natural greenish colorant. Through visible absorption scanning, it showed three main absorption peaks at 378, 414 and 677 nm with three minor peaks at 510, 540 and 618nm, and it was shown to be greenish color. These pigments were more stabilized in alkaline solutions than in acid of between pH 6 and 9, and it was shown to be stabilized at the temperature below 40°C. In the presence of light and oxygen, the stability of pigments rapidly degraded, and it became unstable in the presence of metal ion such as Fe³⁺ and Al³⁺. But in the presence of Cu²⁺ were very stable. On the result of TLC analysis, pigments were shown to be composed of four color fractions and main color fractions were F-4 and F-2.

Key words: *Rhodopseudomonas viridis*, bacterial pigments, greenish pigments, food colorant.

서 론

식품의 색은 기호성을 좌우하는 중요한 요인중의 하나로서 천연의 색택을 유지하는 것이 최상의 방법이지만 가공처리 과정 중의 변색 및 탈색에 의하여 품질이 일부 저하되고 있다. 이에 따라 착색에 의한 기호성 증대를 위하여 여러가지 첨가물이 사용되고 있으며 합성색소가 천연색소에 비하여 안정성과 저렴한 가격으로서의 다량 공급측면에서 상당한 장점을 가지고 있다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 안전성 문제가 심각하게 대두되면서 천연색소의 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이러한 천연색소는 식물로부터 분리된 적색, 황색, 녹색, 갈색 등 여러종류가 일부 사용되고 있으며 이들 중 녹색 색소는 주로 치자로 부터 분리하여 식품첨가물에 실제 이용하고 있다. 그러나 이들 식물색소는 생산 시기와 장소의 구애를 받는 단점이 있어 비경제적이지만 미생물 색소는 생산공간의 제한 없이 년중 계속 배양 가능하기 때문에 다량 생산이 가능하여 경제적인

장점이 있다. 지금까지 알려진 녹색색소에 대해서는 Kiwi fruit의 색소구성에 관한 연구⁽¹⁾를 비롯한 많은 연구와, 녹조류인 *Haematococcus pluvialis*에 관한 연구⁽²⁾ 그리고 marine prokaryote인 *Prochlorococcus marinus*에 관한 연구⁽³⁾가 있으며, 세균색소에 관해서는 Stolz 등의 연구⁽⁴⁾를 비롯하여 다수⁽⁵⁻⁹⁾가 있다. 그러나 실제 이용성에 관한 연구는 극히 미미한 실정으로서 이를 보완하기 위하여 광합성 세균으로서 Bacteriochlorophyll b와 Carotenoids를 가지고 있는 것으로 알려져 있는⁽¹⁰⁾ *Rhodopseudomonas viridis*로 부터 녹색 계통의 색소를 acetone 추출하여 식품색소로의 실용성을 알아보기 위하여 이의 특성 중 일부를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

균주는 *Rhodopseudomonas viridis* DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) 133을 사용하였으며 DSM 27의 배지를 이용하여 조도 2,000 Lux, 28~30°C의 배양실에서 5일간 정치배양 하였다.

색소용액 조제

Corresponding author: Yong-Hwan Kim, Department of Food Technology, Kyonggi University, Suwon, Kyonggi-do 442-760, Korea

배양액을 원심분리(6,000 rpm, 15 min 4°C)하여 얻은 균체는 충분한 양의 증류수로 2회 세척하고 acetone 2,000 ml로 2시간씩 2회 진탕 추출하고 원심분리 하였으며 상등액을 35°C 에서 감압건조시켜 사용할 때까지 -18°C 의 냉동실에 보관하였다. 색소의 안정성을 측정하기 위한 색소용액은 건조시료 0.1g을 acetone 10 ml에 용해시킨 후 25% EtOH 1000 ml로 희석한 비율로 조제하였다.

색소의 안정성

pH에 의한 영향을 알아보기 위하여 색소용액에 동량의 각 pH별 완충용액(pH 1.0~2.0 : Clark-Lubs, pH 3.0~8.0 : McIlvaine, pH 9.0~12.0 : Sørensen)을 가하여 25°C 에서 4시간 방치한 후 410 nm에서 그들의 흡광도를 측정하였고, 색도변화는 색소용액에 pH 3.0~10.0까지의 완충용액을 동량 가하여 25°C 에서 4시간 방치한 후 Color and Color Difference Meter(Yasuda Seiki UC 600 IV)로 투과색도를 측정하여 Hunter의 색계인 L, a 및 b로 나타내었으며 이때 표준백색판의 L, a 및 b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다. 광선에 의한 영향은 색소용액을 25°C 의 암소와 백열등(110V, 30W) 조건하에서, 산소에 의한 영향은 25°C 의 암소 조건하에서 N₂ gas로 공기를 치환한 후 밀봉한 경우와 100 ml Culture flask에 30 ml의 색소용액을 넣고 N₂ gas 처리를 하지않는 상태에서 진탕시킨 경우로 나누어, 온도의 영향은 4, 25, 40 그리고 70°C 의 암소에서, 금속 ion에 의한 영향은 25°C 의 암소 조건하에서 1.0×10⁻²M 농도의 각종 금속 ion용액을 각각 1.0%가 되도록 첨가하였다. 이 때 광선, 산소, 온도 및 금속 ion이 색소에 미치는 영향을 알아보기 위한 안정성 측정은 각 조건별로 모두 10일간씩 보관하면서 24시간 간격으로 UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu UV-1201)를 사용하여 410 nm에서 그들의

흡광도 변화를 측정하였다.

Thin Layer Chromatography

추출된 색소의 조성을 알아보기 위하여 100°C 의 Dry oven에서 24시간 활성화시킨 20×20 cm, thickness 0.25 mm의 glass plate(Kiesel gel 60 F254, precoated, Merck Art No.5715)에 색소를 line spot 하고 petroleum ether (b.p. 35~60°C)/acetone (80 : 20)을 전개용매로 하여 분리하였다. 이때 분리된 각 분획들은 그들의 발현색과 Rf값을 조사하였고, 가시광선 흡수 특성을 알아보기 위하여 acetone으로 재 추출하여 UV/Vis Spectrophotometer(Shimadzu UV-240)를 이용하여 330~800 nm까지 absorption spectra를 측정하였으며 동일한 방법으로 acetone 추출색소자체의 가시광선 흡수 특성도 검토하였다.

결과 및 고찰

색소의 안정성

색소에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 6~9 사이에서 80% 이상의 높은 안정성을 나타내었으며 산(酸)쪽에서는 안정성이 대단히 불량 하였으며, 알카리 쪽에서는 비교적 안정성이 유지되었다. 특히 가시적으로 알카리 쪽에서는 녹색이 약간 열린 것을 알 수 있었으나 산쪽에서는 미미한 혼탁이 발생하며 갈색으로의 변화가 심각하게 나타났다. 이들의 pH에 따른 색 변화를 알아보기 위하여 Hunter value를 측정 한 결과 Table 1에서와 같이 L값은 pH 3일 경우 76.9에서 알카리쪽으로 갈수록 점차 증가하여 pH 10일 경우 92.4로서 밝은 녹색을 나타내었다. 한편 a 값과 b 값과의 관계로 볼 때 pH 3과 4에서는 갈색이, pH 5에서는 옅은 녹색에 황색이 강하게 발현되었고 pH 5를 기점으로 하여 알카리쪽으로 갈수록 a값은 녹색색조를 나타내며 pH 9에서 최대값을 나타내었고, b값은 황색색조가 점차 감소하는 것으로 나타나 전반적으로 녹색 위주의 경향을 보였다. 이러한 변화는 Chlorophyll계 색소가 알카리 쪽

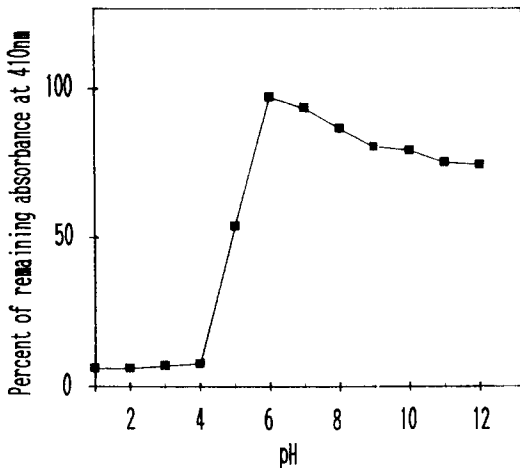


Fig. 1. Stability of greenish pigments under various pH conditions at 25°C

Table 1. Hunter's color value of greenish pigments at various pH conditions

pH	L (Lightness)	a (Redness)	b (Yellowness)
3	76.9	1.90	7.14
4	75.6	2.74	8.77
5	86.5	-0.839	17.9
6	89.1	-1.93	17.4
7	91.0	-2.52	16.1
8	91.5	-2.71	15.6
9	92.2	-3.08	15.7
10	92.4	-2.89	15.0

*Pigments were dissolved in acetone and then diluted with 25% EtOH

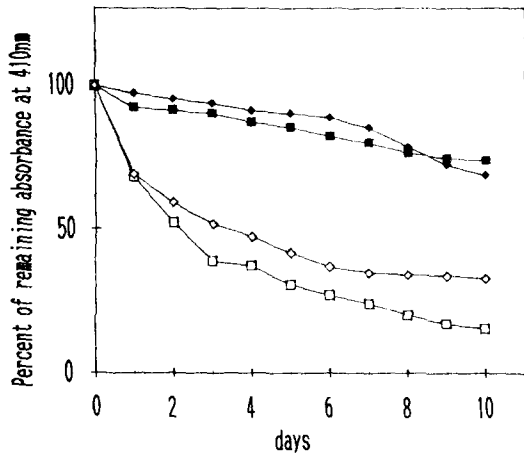


Fig. 2. Effect of light and oxygen on the stability of greenish pigments at 25°C

■—■: Absence of light, □—□: Presence of light, ◆—◆: Absence of O₂ and light, ◇—◇: Presence of O₂ and absence of light

에서 Chlorophyllide가 되어 녹색을 유지하며 산 쪽에서 갈색의 Pheopytin이 형성되는 것과 비슷한 경향을 보인 점으로 미루어 볼 때 본 색소는 Chlorophyll계가 주를 이루는 색소인 것으로 추정된다.

광선 및 산소가 색소에 미치는 영향은 Fig. 2에서와 같이 N₂ gas로 공기를 치환한 후 암소에 장치한 경우 5일 까지 90% 이상이 잔류하여 높은 안정성을 나타내었고, 7일까지도 85% 이상의 안정성을 나타내었으며, N₂ gas 처리를 하지 않은 암소 조건의 경우도 3일까지 90% 이상, 5일까지 85% 이상, 7일까지 80% 이상의 안정성을 나타내었다. 한편 암소에서 진탕시켜 산소 조건으로 처리한 경우 안정성이 현저히 저하되었으며, 백열등에 의한 광조사의 영향 역시 급격한 퇴색 현상이 일어나 4일과 5일 경과후 부터 색소가 거의 퇴색이 된 것을 알 수 있었으며, 특히 산소보다 광선에 의한 퇴색이 더욱 심한 것으로 나타났다. 이로 미루어 본 색소는 광선 및 산소에 의해 쉽게 산화탈색 되는 것으로서 사용시 광 차단 및 산소 투과 역제가 가능한 포장 및 산소 차단제 첨가가 절실히 요구된다 하겠다.

온도가 색소에 미치는 영향은 Fig. 3에서와 같이 4°C에서는 10일 까지 모두 85% 이상의 높은 안정성을 보였으며, 25°C에서도 7일 까지 80% 이상의 높은 안정성을 보였다. 반면 40°C의 경우는 이 보다는 낮으나 2일 까지 80% 정도, 7일까지 약 70% 정도의 안정성을 나타내어 비교적 안정성이 균일하게 유지된 것으로 나타났다. 그러나 70°C의 경우 1일 경과 후 부터 급격한 퇴색으로 인한 안정성의 저하현상이 일어났으며 4일 부터는 완전히 옅은 황갈색으로 변색되었다. 따라서 본 색소는 내열성이 약하므로 Cu-chlorophyll로 전환시켜 열 안정성을

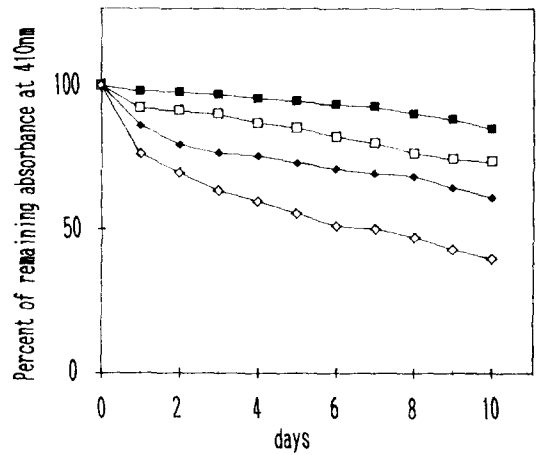


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of greenish pigments in the dark

■—■: 4°C, □—□: 25°C, ◆—◆: 40°C, ◇—◇: 70°C

Table 2. Effect of metal ions (1.0×10⁻² M) on the stability of greenish pigments in the dark at 25°C

Salt	0	2	4	6	8	10 (Days)
None	100	91.4	87.2	82.4	76.6	73.9
NaCl		92.3	77.7	71.6	65.5	60.7
KCl		90.5	76.1	66.8	60.4	54.3
MgCl ₂		86.7	74.0	66.5	59.5	53.3
CaCl ₂		87.0	75.8	66.7	59.8	53.7
ZnCl ₂		86.9	77.2	68.2	60.9	54.2
CuCl ₂		92.5	89.9	83.1	79.6	76.9
FeCl ₃		54.2	45.3	40.7	35.8	31.5
AlCl ₃		63.6	51.6	44.8	39.8	34.1

*Percent of remaining absorbance at 410 nm

부여해 줄 경우 및 식품을 살균 처리한 후 첨가하거나 비가열식품, 특히 냉장 및 냉동용 식품에 사용하는 것이 바람직 하다고 생각된다.

8종의 금속 이온이 색소에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 Cu²⁺ 첨가의 경우 8일 경과 후 까지 약 80% 정도의 안정성을 나타내어 안정성이 대단히 높은 것으로 나타났으며 가지적으로도 안정된 녹색을 유지하고 있었다. 이는 Cu²⁺이 Chlorophyll과 결합한 Cu-Chlorophyll을 형성하여 안정성을 유지한 것으로 판단 되어진다. 하지만 Fe³⁺와 Al³⁺의 경우 가지적으로 갈색을 나타내는 혼탁이 발생하며 신속히 퇴색하는 것으로 나타났다. 즉 Fe³⁺와 Al³⁺ 모두 1일 경과 후 부터 다량의 혼탁이 발생하여 안정성에 치명적인 해를 나타내었다. 이는 Fe³⁺ 및 Al³⁺이 Chlorophyll과 결합하여 Fe-Chlorophyll 등과 같은 갈색의 혼탁성 물질을 형성한 것으로 판단 되어진다. 한편 다른 금속 ion들은 5일 까지 70% 정도의 안정성을 나타내어 대조구에 비하여 안정성은 다소 낮으나 비교적 완만한 색조의 감소를 보여 이들에

Table 3. Color, Rf value and spectral characteristics of isolated pigments by TLC

Pigments No.	Color	Rf value*	Absorption wavelength maxima (nm)**
Acetone extract	Green	0	379, 414, 510, 540, 618, 677.
F-1	Yellowish green	0.54	376, 402, 523, 558, 663, 780.
F-2	Green	0.43	382, 435, 522, 564, 615, 674.
F-3	Light green	0.37	379, 425, 516, 618, 676.
F-4	Brownish green	0.32	378, 420, 511, 542, 619, 678.

*TLC developing solvent: petroleum ether (b.p. 35~60°C)/acetone (80 : 20)

**Absorption spectra of collected pigments in acetone

의해서는 치명적인 해를 입지는 않는다는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 본 색소는 Fe^{3+} 와 Al^{3+} 등이 존재하지 않는 용기의 사용과 가공과정 중 이들이 제거된 식품에 사용하면 높은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

TLC 및 Absorption spectra

색소의 광화학적 특성을 알기 위하여 visible absorption scanning한 결과 및 TLC에 의한 색소의 조성상태는 Table 3에서와 같다. Acetone extract는 흡수극대가 378, 414 및 677 nm인 3개의 main peak와 510, 540 및 618 nm인 3개의 minor peak가 확인되었으며 TLC에 의하여 분리된 색소는 가시적으로 녹색계통의 색조를 나타내는 Rf 값 0.54, 0.43, 0.37과 0.32인 4개의 분획으로 나타났으며 이들을 acetone으로 재 추출한 것을 25°C의 실내에서 6시간 방치한 후 측정된 결과 F-4와 F-2가 F-1 및 F-3보다 안정한 상태를 유지하며 높은 흡광도값을 나타내어 이 분획들이 주 색소를 이루고 있는 것을 알 수 있었다. 이 중 F-4는 녹색계를 띠고 378, 420, 511, 542, 619 및 678 nm에서, F-2는 녹색을 띠고 382, 435, 522, 564, 615 및 674 nm인 흡수 극대를 나타내었다. 이러한 결과는 Watanabe 등이 보고한 *Chlorella*의 녹색 색소⁽¹¹⁾와 비교하여 볼 때 acetone extract와 F-4는 Pheophytin a와 a', F-2는 Chlorophyll a와 a'로 추정된다. 그러나 Chlorophyll b는 확인되지 않아 본 균주는 Bacteriochlorophyll b가 광합성 색소로 존재한다는 보고⁽¹⁰⁾와 각종의 식물 Chlorophyll^(12,13) 및 광합성 세균인 *Chlorobium*속⁽⁴⁾과도 다른 경향을 나타낸 것으로서 균주의 차이이거나 배지조성 및 추출용매에 기인한 것인지 추후 계속적인 검토가 필요하다고 사료된다.

요 약

천연의 녹색 색소를 개발하기 위하여 *Rhodospseudomonas viridis* DSM 133이 생산하는 색소의 물리적, 화학적 특성을 조사하였다. 가시광선 범위에서의 흡수특성을 측정된 결과 이 색소는 흡수극대가 378, 414 및 677 nm인 3개의 main peak와 510, 540 및 618 nm인 3개의 minor peak를 확인할 수 있었으며 전반적으로 녹색색조를 나타내었다. 색소는 산성 영역 보다는 알카리 영역, 즉 pH

6.0~9.0에서 보다 안정한 경향을 보였다. 그러나 광선과 산소 존재 하에서는 색소의 파괴가 촉진되었다. 40°C 이하에서는 안정하였고, Fe^{3+} 및 Al^{3+} 에 의해서는 색조의 저하와 함께 혼탁이 발생되었으나 Cu^{2+} 에 의해서는 안정성이 유지되었다. 본 색소는 TLC결과 4종의 색소로 구성되어 있었으며 주 색소는 F-4와 F-2로 나타났다.

문 헌

- Pilar Cano, M. and Antonia Marin, M.: Pigment composition and color of frozen and canned kiwi fruit slices. *J. Agric. Food Chem.*, **40**(11), 2141(1992)
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. and Nagai, S.: Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.*, **74**(1), 61 (1992)
- Chisholm, S.W., Frankel, S.L., Goerike, R., Olson, R.J., Palenik, B., Waterbury, J.B., West-Johnsrud, L. and Zettler, E.R.: *Prochlorococcus marinus* nov. gen. sp.: An oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Arch. Microbiol.*, **157**, 297 (1992)
- Stolz, J.F., Fuller, R.C. and Redlinger, T.E.: Pigment-protein diversity in chlorosomes of green phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **154**, 422(1990)
- Nishimura, Y., Mukasa, S., Iizuka, H. and Shimada, K.: Isolation and Characterization of bacteriochlorophyll-protein complexes from an aerobic bacterium, *Pseudomonas radiosa*. *Arch. Microbiol.*, **152**, 1(1989)
- Brune, D.C., Nozawa, T. and Blankenship, R.E.: Antenna organization in green photosynthetic bacteria. 1. Oligomeric bacteriochlorophyll C as a model for the 740 nm absorbing bacteriochlorophyll C in *Chloroflexus aurantiacus* Chlorosomes. *Biochemistry*, **26**(26), 8644(1987)
- Shimada, K., Hayashi, H. and Tasumi, M.: Bacteriochlorophyll-protein complexes of aerobic bacteria, *Erythrobacter longus* and *Erythrobacter* species OCh 114. *Arch. Microbiol.*, **143**, 244(1985)
- Shimada, K.: Light-Harvesting pigment-protein complexes of *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *J. Biochem.*, **98**(2), 465(1985)
- Hayashi, H., Nakano, N. and Morita, S.: Comparative studies of protein properties and bacteriochlorophyll

- contents of bacteriochlorophyll-protein complexes from spectrally different types of *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Biochem.*, **92**(6), 1805(1982)
10. James T. Staley, Marvin P. Bryant, Nobert Pfenning and John G. Holt: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 3) Williams and Wilkins press(Baltimore, U.S.A.) p.1674(1989)
11. Watanabe, T., Hongu, A. and Honda, K.: Preparation of chlorophylls and phenophytins by isocratic liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **56**(2), 251(1984).
12. Minguéz-Mosquera M.I. and Garrido-Fernández J.: Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.*, **37**(1), 1(1989)
13. 임선옥, 이미경 : 음지식물(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 엽색소 구성에 대한 비교연구. *한국농화학회지*, **29**(2), 219(1989)
-

(1993년 12월 1일 접수)