

*Serratia marcescens*로부터 추출한 적색 색소의 정제와 특성에 관한 연구

민슬기 · 박희역†

목원대학교 테크노과학대학 생의약화학부
(2016년 8월 5일 접수; 2016년 9월 2일 수정; 2016년 9월 30일 채택)

Study upon the Red Pigments Extracted from the *Serratia Marcescens*

Seul-Ki Min · Hee-Aurk Park†

Division of Biomedical Chemistry and Cosmetics, Mokwon University,
88 Doanbuk-ro, Seo-gu, Daejeon, 35349 Korea
(Received August 5, 2016; Revised September 2, 2016; Accepted September 30, 2016)

요약 : *Serratia marcescens* (*S. marcescens*)는 Gram-음성 박테리아로 soytone과 에탄올이 함유된 Cang's soytone (CS) 배지에서 28 °C, pH 7.5의 조건으로 배양할 때 가장 많은 붉은 색소를 생성하였다. *S. marcescens* 균주로부터 붉은 색소를 분리, 정제하기 위하여 여러 가지 유기용매를 사용하였다. 분리 정제한 붉은 색소는 가시광선 영역의 537 nm에서 λ_{max} 를 가지고 있었고, HPLC-Mass로 분석한 결과 분자량 537과 565 g을 가지는 두 가지 물질로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 상온과 pH 6 이하의 산성조건에서는 태양광에도 안정함을 확인하였다.

주제어 : *Serratia marcescens*, 붉은 색소, 색소의 분리 정제, 색소의 흡수 spectra, 색소의 안정화 조건

Abstract : *Serratia marcescens*, a Gram-negative bacterium characterized by production of a nondiffusible red pigment. *Serratia marcescens* 2354 (ATCC 25419) was production and purification a high concentration of red pigments when growing on Cang's soytone (CS) culture broth with soytone and ethanol. The optimal temperature and initial pH range for the production of the red pigments were 28 °C and pH 7.5, respectively. The red pigments was separated and purified through organic solvents extraction. Characterization of the red pigments is studied by UV-spectrophotometer at λ_{max} 537 nm. The HPLC-Mass analysis of the partially purified compounds showed two major peaks with the molecular masses of 537 and 565 g. The red pigments were stable at room temperature under the acidic pH (up to pH 6) but were unstable at the strong alkaline condition. And red pigments were stable at sun light.

Keywords : *Serratia marcescens*, Red pigments, Purification of pigments, Absorption spectra of pigments, Stable conditions of pigments

†Corresponding author
(E-mail: pha6205@mokwon.ac.kr)

1. 서론

색소는 크게 천연색소와 합성색소로 나누어지며 이러한 색소들은 색조를 필요로 하는 다양한 분야에서 활용되고 있다. 19세기 이후 화학공업의 발달과 함께 합성색소가 천연 색소보다 가격과 안정성 및 응용성 등에서 이용 가치가 뛰어나 폭넓게 이용되어 왔으나, 발암성 등 합성색소의 부작용으로 인해, 상대적으로 천연색소의 안전성이 부각되고 있다. 또한 천연색소의 다양한 기능이 보고되면서 식품, 화장품, 의약품 및 가축사료의 첨가제 등에서 점차 천연색소에 대한 사용이 크게 증가하고 있다^{1,2)}.

현재 널리 쓰이고 있는 천연색소 중 색의 종류는 적색, 황색, 녹색, 갈색 등으로 다양하나, 이러한 동·식물에서 주로 생산되는 flavonoids, carotenoids, chlorophylls, betalaines 계열의 천연색소들은 생산할 때 동·식물의 생육 조건 및 자연환경에 따라 품질의 변화가 심하여 산업적으로 일정품질을 다량으로 공급할 수 없는 단점을 지니고 있다^{3,4)}.

그러나 미생물을 이용한 천연색소의 경우는 사용배지와 배양방법을 동일한 조건으로 조절하면 일정품질의 색소를 짧은 시간에 다량으로 생산할 수 있고, 동일한 균주일 경우에도 배지의 성분, 배양온도, pH 등에 따라 색소 함량이 조절되어 색조가 다양한 색소의 생산도 가능한 것으로 알려져 있다^{5~7)}. 따라서 미생물 배양에 의한 색소의 추출은 산업적으로 이용가치가 충분히 있을 것으로 판단되어지나, 현재까지 미생물을 이용한 천연색소의 생산이 미흡한 것은 미생물 배양조건과 색소를 분리해내는 방법 등의 연구와 색소 생산에 관여하는 생합성 경로에 관한 연구가 매우 미미한 실정이기 때문이었다.

본 연구에서는 그램 음성균인 *Serratia marcescens* (*S. marcescens*)을 이용하여 안정한 적색 색소의 생산을 위한 고체와 액체 상태에서의 최적배지 조성조건과 배양방법 등에 대한 포괄적인 연구를 시도하였고, 배양된 균주로부터 적색 색소를 분리하고 분리된 색소를 정제할 수 있는 보다 편리하고 진보된 방법을 연구함과 동시에 농도, 온도, 빛 등의 다양한 조건하에서 색소의 안정성 등도 조사하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 균주의 선별 및 배양

본 실험에 사용한 균주 *Serratia marcescens* 2216 (ATCC 27117), 2354 (ATCC 25419), 2356 (ATCC 21074)는 생물공학연구소 생물자원센터 유전자은행으로부터 분양받았다. YMA (Yeast malt agar)와 NA (Nutrient Agar)를 포함한 미생물 배양 배지들은 Difco Laboratories (Michigan, USA) 사를 사용하였으며 pH 6.7의 조건하에 접종한 다음 28°C에서 3일간 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 1. The results of cultivation at pH 6.7 and 28°C

<i>S. marcescens</i>	YMA*	NA**
2356	-	-
2216	+	+
2354	+	++

* : Mannitol 10.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, Yeast extract 0.5 g, Agar 15 g in distillation water 1L

** : 0.5 % pepton, 0.3% beef extract, 1.5% agar

배양 결과 3가지 *S. marcescens* 중에 2356 (ATCC 21074) 균주는 붉은 색소를 생성하지 않았고, 2216 균주와 2354 균주는 붉은 색소를 생성했으나 2216 균주에 비해 2354 (ATCC 25419) 균주가 더 붉은 색을 띠었으며, 2354 (ATCC 25419) 균주는 YMA 배지보다 NA 배지에서 더 붉은 색소를 생성하였다.

2.2. 균체에 함유된 적색 색소의 측정방법

균체에 함유되어 있는 색소를 측정하기 위해 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액과 균체를 분리하고, 균체를 증류수 40 mL에 현탁시켜 초음파 파쇄기를 이용하여 약 10분 동안 파쇄한 다음, 파쇄용액 1 mL, 0.2 M citrate 완충용액 (pH 3.0) 1 mL, acetone 3 mL를 넣고 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상등액만 모아 535 nm에서 흡광도 측정을 하

였다.

2.3. 균체에 함유된 적색 색소의 분리, 정제방법

배양된 *S. marcescens* 균주의 분리 및 세척은 배지에서 자란 3 plate의 균체를 모아서 2차 증류수 35 mL에 현탁 시켰다. 그리고 균체가 들어 있는 용기를 조심스럽게 흔들어 균체 밖에 묻어 있는 당을 비롯한 여러 가지 물질들을 세척하고, 이것을 원심 분리관에 넣고 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 분리관 바닥에 있는 균체를 모은 후 같은 방법으로 2회 더 반복하였다.

균체의 외벽에 있던 이물질의 제거 과정이 끝난 뒤 균체로부터 적색 색소를 분리 정제하는 과정은 박희익 등이 이미 특허 출원한 방법^[8]을 기반으로 하였다. 먼저 세포막을 파괴하기 위하여 ethyl acetate를 물과 1 : 1 부피비로 섞은 후 sonication을 시켜 세포내의 색소를 추출하고, 이것을 15,000 rpm으로 10분간 고속 회전시켜 색소를 분리관의 바닥에 모았다. 이것 역시 2회 더 반복하였다.

다음으로 색소에 들어 있는 지용성 물질과 지방산 등을 제거하기 위하여 ethyl ether를 물과 부피비로 1 : 1로 섞은 후 잘 흔든 다음 같은 방법으로 원심분리 하였다. 그리고 2.0 N HCl을 이용하여 색소에 결합되어 있을 수 있는 당의 제거 과정을 반복하였고, 이때 당 제거가 잘 이루어질 수 있도록 sonication을 시켰고, HCl에 의해 분리된 당을 제거하기 위하여 증류수로 3회 세척하였다. 이런 방법으로 얻은 적색색소는 수용액에 잘 녹지 않는 지용성 물질이었다.

마지막으로 동일한 방법으로 chloroform을 첨가한 후 상층부의 적색 층을 포집하여, methanol에 용해시키고, sonication 시킨 후 15,000 rpm에서 10분간 고속회전 시켜 색소의 상등 액만을 모았다. 이렇게 모은 적색 색소용액을 진공 농축기를 사용하여 농축하였다. 최종적으로 초록색으로 반짝이는 진한 적색 색소를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 적색 색소를 silicagel (blue, 5~10 mesh)을 깔고, P₂O₅를 넣은 desiccator 안에 넣고 건조시켰다. 건조하여 얻어진 색소는 빛이 들어가지 않도록 은박지로 감싼 후에 4℃의 냉장고에 저장하면서 본 실험에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주의 선별 및 배양 방법

3.1.1. 고체배지에서 *Serratia marcescens* 의 배양

색소 생성을 위한 최적의 배지조성과 조건 등을 찾기 위하여 2354 (ATCC 25419) 균주를 Table 2.와 같이 여러 종류의 고체 배지에 균주를 옮긴 다음 28℃에서 4일 이상 배양하였다. 대부분의 고체배지는 이미 알려져 있는 배지였고, CI와 CS 배지는 Cang^[9]의 배지조성을 근간으로 대두 (Soytone)의 조건을 약간 달리한 배지이었다. 고체배양의 결과 BHI (brain heart infusion) 배지와 CS배지에서 균주의 색소 생성과 균주의 생육이 가장 활발한 것을 확인할 수 있었다.

Table 2. Growth of strains 2354(ATCC 25419) in solid culture medium

	색소	생육크기
PDA	-	-
Bennett	-	-
CI*	++	+
NA	+	+
Malt	+	+
LB	+	++
SCA	++	+
PCA	++	++
BHI	+++	+++
CS*	+++	+++

* CS : Cang's soytone, CI : Cang's Isolate soy protein

3.1.2. 액체 배지에서 *S. marcescens* 의 배양

균주의 대량생산을 위해서 색소의 생성이 가장 활발한 BHI 배지와 CS 배지의 조성과 동일하게 액체배지 50 mL를 만들어 250 mL 삼각 baffle-flask에 넣은 후 *S. marcescens* 균주 single colony를 접종하여, 96시간 이상 30℃에서 120 rpm으로 배양하였다.

CS 배지에서는 시간이 지남에 따라 생균주의 수와 색소의 흡광도가 증가하지만 72시간 이후에는 색소의 흡광도가 점차 감소하였고, BHI 배지에서도 72시간이 경과되면서 생균주의 수와 색소가 점차 감소되어졌다. 따라서 두 배지 모두 48

Table 3. Measuring the concentration of pigments and number of living strains and the concentrations of pigments in CS and BHI broth

Media	Condition	24 h	48 h	96 h
CS	pH	7.46	7.25	6.95
	A ₅₃₅	1.058	1.097	1.087
	A ₆₁₀	1.026	1.068	1.057
	Numbers of viable cells ($\times 10^{-6}$)	1.6×10^{-10}	2.8×10^{-10}	2.9×10^{-10}
BHI	pH	7.32	8.05	8.55
	A ₅₃₅	1.056	1.099	1.094
	A ₆₁₀	1.022	1.068	1.063
	Numbers of viable cells ($\times 10^{-6}$)	2.4×10^{-10}	3.7×10^{-10}	1.4×10^{-10}

시간 이후 72시간 부근이 균주들의 생성과 색소 형성이 가장 극대 값을 갖는 것으로 확인되어졌다^[10]. 또한 실험결과 균주 수의 증가와 색소의 생성이 꼭 일치하지 않는 것으로 보아, 배지의 조성과 조건에 따라 균주가 색소생성에 영향을 주는 것으로 판단되어졌다.

그리고 고체배양에 비해 액체배양으로 얻어지는 균주의 양에는 큰 차이가 없었으나, 액체배지에서 배양된 균주가 갖는 적색 색소는 고체배지에서 배양된 균주가 갖는 적색 색소에 비해 단위 그램 당 흡광도가 많이 부족하였다. 즉 색소의 배양 능력에서는 오히려 액체배양보다 고체배양이 더욱 효과적임을 확인할 수 있었고, 이는 균주 배양 시 색소의 생합성 경로^[11, 12]에 공기 또는 산소가 매우 중요한 영향을 주는 인자^[10] 일 것이라고 판단할 수 있었다.

3.2. 적색 색소의 추출 및 흡수분광학적 특성

본 실험에서 *S. marcescens* 균주로부터 적색 색소를 분리, 정제한 적색색소를 methanol에 녹여 UV spectrophotometer (Cary 1)로 측정된 흡수 spectra가 Fig. 1이며, 가시광선 영역에서의 λ_{\max} 는 537 nm 이었고, 외견상 단일 물질로 보였다. 일반적으로 *S. marcescens* 균주로부터 분리 정제한 적색 색소는 분자량이 323.4 g/mol인 prodigiosin으로 λ_{\max} 536 nm이며, 화학적 구조까지 알려져 있는 물질^[13, 14]로 흡수 spectra의 모양도 본 실험의 Fig. 1의 결과와 유사하였다^[14].

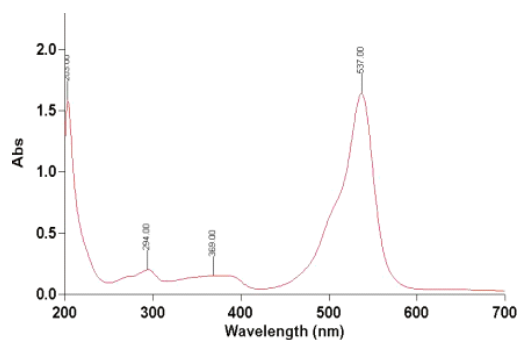


Fig. 1. The absorption spectra of red pigment in methanol solution at 25°C.

3.3. 적색 색소의 조성

본 실험에서 분리한 적색 색소가 단일 색소로 구성되어 있는지 확인하기 위해서 HPLC-Mass spectra를 측정하였다. Fig. 2는 HPLC-Mass spectra를 측정한 결과이며, Retention Time(분) 6.993 분, 8.400 분 그리고 9.601 분 부근에서 각각 1개의 peak를 확인할 수 있었다. 이것을 자세히 관측하기 위해서 세 peak의 분자량을 측정한 결과, Fig. 3.은 6.993 분에 나타난 peak로써 분자량이 537.0 g이었으며, 다음에 나타난 두개의 peak는 Fig. 4.에서와 같이 분자량 565.0 g이었다.

일반적으로 *S. marcescens* 균주로부터 분리 정제한 적색 색소는 분자량이 323.4 g/mol인 prodigiosin으로 알려져 있으나, 본 실험에서 분리 정제한 적색 색소의 분자량은 prodigiosin과

상당한 차이가 있으며, 흡수 spectra의 유사성을 비교할 때 염산 등으로 당류들의 분자를 제거했음에도 완전하게 제거되지 않은 상태인 것으로 유추되었다.

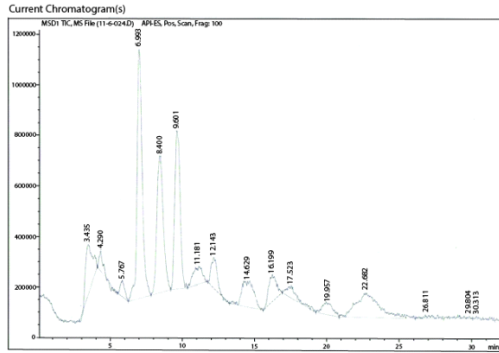


Fig. 2. HPLC-Mass Spectra of red pigments

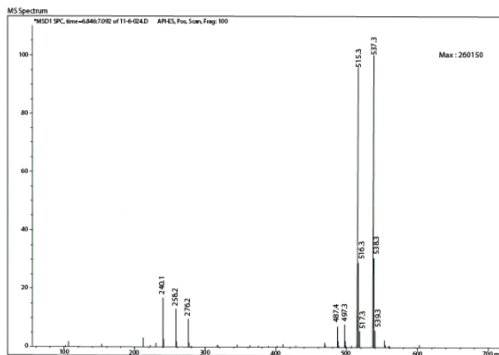


Fig. 3. HPLC-Mass Spectra of red pigments at 6.993 min.

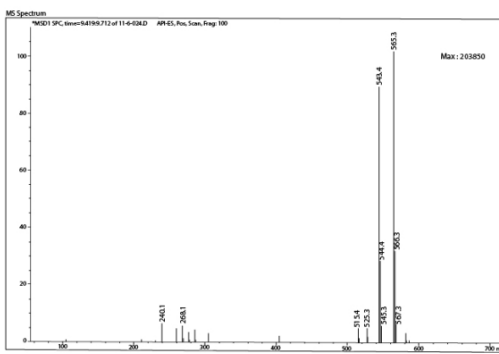


Fig. 4. HPLC-Mass Spectra of red pigments at 8.400 and 9.601 min.

3.4. pH의 변화에 따른 색의 변화

Fig. 5는 pH의 변화에 따른 색소의 안정성을 조사하기 위하여 색소를 methanol에 녹이고, 1.0 N HCl과 1.0 N NaOH을 사용하여 pH를 1 ~ 12까지 조절하면서 측정한 흡수 spectra이다. pH 2.0인 산성상태에서의 최대흡광도는 537 nm 이었으며, pH 7이상의 염기성 조건하에서 최대 흡광도는 467 nm를 나타냈다. 또한 pH 변화에 따른 색소용액의 색변화를 관측한 결과, pH ≤ 6에서는 붉은색을 띠면서 색변화가 없었고, pH ≥ 6 부터는 붉은색이 급격하게 감소하여 염기성으로 갈수록 노란색으로 변화되는 것을 관측할 수 있었다^[15]. 그리고 pH ≥ 10 이상에서는 노란색의 색소에 검은색 침전이 발생하였다. 그리고 pH를 염기성에서 산성으로 변화시키면 색소의 색은 다시 붉은색으로 환원되었다.

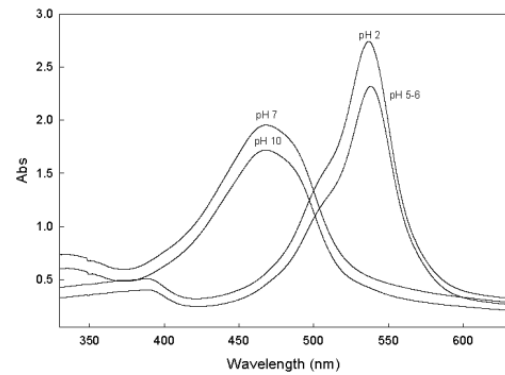


Fig. 5. The absorption spectra of pH-dependent change in methanol solution at 25°C.

Table 4. pH-dependent color change at 25°C

pH	Color
1 ~ 4	Reddish pink
5 ~ 6	Pink
7 ~ 8	Dark yellow
9 ~ 12	Yellow

3.5. 온도의 변화에 따른 색의 변화

적색 색소의 안정성에 대한 온도의 영향을 측정하기 위하여 추출한 적색 색소용액을 methanol에 녹이고, 온도를 15°C~75°C로 변화시키면서 색의 변화를 관측한 결과, 색의 변화는 없었고, 온도가 증가함에 따라 537 nm의 흡수대가 약간

감소하는 경향만을 보였다. 따라서 본 실험에서 분리, 정제한 적색 색소는 온도에 매우 안정한 색소임이 밝혀졌다.

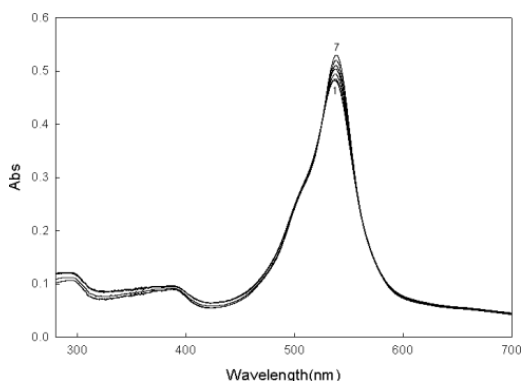


Fig. 6. The absorption spectra of temperature-dependent change in methanol solution. 1 : 75°C, 2 : 65°C, 3 : 55°C, 4 : 45°C, 5 : 35°C, 6 : 25°C, 7 : 15°C

3.6. 빛의 변화에 따른 색의 변화

적색 색소의 빛에 대한 안정성을 검토하기 위하여, 적색 색소를 methanol에 녹이고, 이것을 태양광에 노출시켜 실온에 방치한 후 색의 변화를 3일간 관측한 결과 색의 변화는 없었다. 따라서 본 실험에서 분리, 정제한 적색 색소는 빛에도 매우 안정한 색소임이 밝혀졌다. 일반적으로 천연색소는 당류들이 binding 되어 있을 때 색의 안정성이 유지되나 당류들을 제거하면 온도와 빛에 의해 급격히 색의 변화가 수반되는 것으로 알려져 있다.^[16] 따라서 본 실험에서 추출한 적색 색소는 빛과 온도에 안정한 것으로 보아서 당류들이 binding 되어진 prodigiosin으로 판단하는 것이 합리적일 것이고, 색소로써의 가치는 순수한 prodigiosin보다 본 실험 방법에 의해 추출한 적색 색소의 가치가 높은 것으로 판단하였다.

4. 결론

본 실험을 통해 *Serratia marcescens* 2354 (ATCC 25419) 균주가 가장 많은 적색 색소를 함유하는 것으로 밝혀졌고, 사용한 배지 중에서는 K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, EtOH, mineral 용액, Soytone가 함유된 CS배지에서 pH 7.5, 28°C, 72 시간동안 배양했을 때 가장 많은

적색 색소를 얻을 수 있었다.

그리고 ethyl acetate, ethyl ether, 2.0 N HCl, chloroform 등의 유기용매를 이용하여 균주를 분리, 정제한 결과 λ_{max} 가 537 nm인 깨끗한 흡수 spectra를 얻을 수 있었다. pH의 변화에 따른 흡광도 spectra에서는 pH 2의 산성조건에서 λ_{max} 는 537 nm이었으며, pH 10인 알칼리성에서는 최대 흡광도 467 nm을 나타냈다. 즉, 본 실험에서 추출한 적색 색소의 변색범위는 pH 6~7이었다.

추출한 적색색소를 HPLC-Mass 분석법으로 측정된 결과 분자량 537.0 g과 565.0 g을 갖는 두 가지 색소로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 온도의 변화에 민감하게 작용하지 않으며, 빛에 의해 변색되지 않았다.

References

1. Lauro, G. J. A primer on natural colors. *Cereal Foods World*. **1991**, *36*, 949-953.
2. Francis, F. J. Lesser-known food colorants. *Foodtechnol*. **1987**, *41*, 62-68.
3. Fowler, M. W. Production of commercially useful compounds by plant cell culture. In S. H. Mantell and H. Smith (eds.), *Plant Biotechnology*, Cambridge University Press, London. **1983**, 3-38.
4. Hannagata, N., A. Ito, Y. Fukuju, and K. Murata. Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus-Tinctorius* L. *Biosci. Biotech-nol. Biochem*. **1992**, *56*, 44-47.
5. Carels, M. and D. Shepherd. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture, *Can. J. Microbiol*. **1997**, *23*, 1360-1372.
6. Yongsmith, B., W. Tabloka, W. Yongmanitchai, and R. Bavavoda. Culture condition for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB10 grown on cassava medium, *World J. Microbiol. Biotechnol*. **1993**, *9*, 85-90.
7. Wong, H. C., Y. C. Lin, and P. E. Koehler. Regulation of growth and pigmentation of

- Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. *Mycologia*. **1981**, *73*, 649–654.
8. 정상호, 박희억, 김영철, 김진환, 천연색소의 추출 방법. 한국 특허등록번호 10-0671318, **2007. 1. 12.**
 9. Song Cang. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters*. **2000**, *22*, 1761–1765.
 10. Kamble K.D, Hiwarale V.D, Prodigiosin production from *Serratia marcescens* strains obtained from farm soil. *International Journal of Environmental Sciences Volume 3 No.1*, **2012** : 631–638.
 11. Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RA, Goldet G, Slater H, Woodley L, Leeper FJ, Salmond GP, Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*. *Mol. Microbiol.* **2005** May. *56*(4) : 971–989.
 12. Robert P. Williams, Biosynthesis of Prodigiosin, a Secondary Metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol.* **1973** Mar. *25*(3) : 396–402.
 13. Nakashima, T.; Kurachi, M.; Kato, Y.; Yamaguchi, K.; Oda, T.; Characterization of bacterium isolated from the sediment Coast area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated. *Microbiol Immunol.* **2005**, *49*, 407–415.
 14. Helvia W. Casullo de Araújo, K. Fukushima, and Galba M. Campos Takaki, Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules* **2010**, *15*, 6931–6940.
 15. Matt S. Melvin, John T. Tomlinson, Gyungse Park, Cynthia S. Day, Gilda r. Saluta, Gregory L. Kucera, and Richard A. Manderville, Influence of the A-Ring on the Proton Affinity and Anticancer Properties of the Prodigiosins. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**. *15*, 734–741.
 16. 손준호, 정명근, 최희진, 장운빈, 배중호, 이희덕, 최청, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 제45권 제3호 (2002, 8) 179–184.