

최 종
연구보고서

식품 색택관능을 증진시키는 종균개발에
관한 연구

Studies on the development of genetically engineered
micorbial starters for applying as food colorants

연 구 기 관
경 기 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식품 선택관능을 증진시키는 종균개발에 관한 연구”
과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2003 년 11 월 15일

주관연구기관 : 경기대학교

총괄연구책임자 : 김 용 환

세부연구책임자 : 김 용 환

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 이 석 찬

위탁연구기관명 :

한국식품개발연구원

위탁연구책임자 : 이 명 기

요 약 문

I. 제목

식품 색택관능을 증진시키는 종균 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

소득이 증가하여 건강에 대한 관심이 증대되어가고 있는 현 시점에서 식용색소는 안정성(Stability)이 높은 합성색소보다 안전성(Safety)이 강조되는 천연색소 사용이 최우선적으로 고려되어야 할 사항이며 이에 대한 요구가 날로 증대되어가고 있다.

일본의 1990년 초 식용색소 시장규모는 약 260억엔/년으로서 이 중 천연색소가 약 88%의 높은 점유율을 나타내어 천연색소에 대한 요구가 상당한 수준에 이르렀다.

우리나라는 약 100억원의 식용색소 시장규모 중 천연색소 점유율은 10% 정도일 뿐으로서 천연색소는 국내에서도 다량 생산되지만 많은 부분을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이에 대량생산이 가능하고 저렴한 천연색소 개발이 필요하며 김으로부터 phycoerythrin을 추출·분리하여 식품공업에 이용하고자 하였다.

년 평균 190,000M/T 이상 대량생산되어 수산물 정부비축사업에서 막대한 예산이 소요('99년 758M/T, 13,166백만원), ('00년 800M/T, 13,143백만원), ('01년 810M/T, 13,243백만원)되는 홍조류(김, 海苔, *Pophyra tenera*)로부터 순도 높은 식품첨가물급 적색색소를 대량으로 생산하여 식품 및 향장품의 원료로, 그리고 고순도의 시약급 phycoerythrin까지 생산하여 활용함으로써 부가가치를 증대시키고자 함이다.

즉, 기존의 ammonium sulfate 처리, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography 등에 의한 생산과 비교하여 단기간에 경제적으로 형광성이 양호한 식품첨가물급과 정제 phycoerythrin의 새로운 대량생산 체계를 구축하여 산업화에 적용하고자 한다. 현재 김색소는 식품활용이 극히 미미한 상태이며 정제된 *Pophyra* phycoerythrin은 약 150,000원/mg(Sigma Co.)의 고가로 판매되고 있는 실정이므로 경제적으로 대량생산하여 활용성과 가격경쟁력을 증대시키고자 한다. 이에 따라 대량 생산된 경제성 있는 식품첨가물급의 적색색소인 Phycoeythrin은 안정성과 다양한 식품에의 활용가능성을 검토하여 식품첨가물로서의 가치를 확인하고 천연색소라는 장점을 가공식품에 적용하여 식품공업

에 폭넓게 활용하고자 한다. 또한 phycoerythrin을 균주에 gene cloning하여 재조합 phycoerythrin을 대량생산하고 이를 경제성 있는 식품첨가물급과 정제 phycoerythrin으로 생산하고자 하며, gene cloning을 효모에까지 확대하여 발효 식품 제조 시 발효와 색소형성이 동시에 이루어지도록 하여 공정의 단순화도 추구하여 보고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 식품첨가물급 및 시약급 Phycoerythrin의 대량생산 및 Microencapsulation.
 - 남조류 및 홍조류 Phycoerythrin의 추출 및 정제.
 - 홍조류로부터 식품첨가물급 Phycoerythrin의 대량생산방법 검토.
 - 식품첨가물급 및 시약급 Phycoerythrin의 대량생산 및 Microencapsulation
- Phycoerythrin의 독성유무 및 식품 활용성 검토.
 - 남조류 및 홍조류 색소의 독성유무 및 식품 활용성 조사.
 - 홍조류로부터 대량생산된 색소의 독성유무 및 식품 활용성 조사.
 - Microencapsulation된 홍조류 색소의 식품 활용성 조사.
- Phycoerythrin을 대량생산할 수 있는 재조합균주 생산.
 - 남조류 및 홍조류로부터 Phycoerythrin 유전자 분리.
 - Phycoerythrin 유전자의 식품미생물 내 발현.
 - 천연색소 대량생산을 위한 식품미생물 내 최적조건 확립.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 홍조류로부터 식품첨가물급 및 시약급 Phycoerythrin의 대량생산방법이 확립되어 산업화를 통하여 대량생산하면 경제적으로 상당한 가치가 있다.
 - 간편하고 신속하며 경제적이므로 경쟁력 제고와 부가가치 증대
 - 김은 년 평균 190,000M/T(통계청 자료)으로 과량 생산되며 수산물 정부비축 사업에서 막대한 예산이 소요('99년 758M/T, 131.6억원), ('00년 800M/T, 131.4억원), ('01년 810M/T, 132.4억원)되고있어 이를 해소해야 할 필요성 제기)
- 남조류 및 홍조류의 색소는 혈액 용혈성의 독성이 없었고 유용미생물 억제성도 없었으며 주류, 음료류, 떡류 등에 이용이 가능하였다.
 - 김(海苔)으로부터 생산한 Phycoerythrin은 천연물로 안전성 제한이없다.

- ◎ Microencapsulation coating제로 사용한 HPMCP-55는 현재 소화제의 위산 내성을 위한 coating제(20,000원/kg)로 사용하고 있으므로 별도 안전성 검사 없이 식품에 직접 적용 가능하며 유기산 함유 식품에도 안정성 유지 가능함.
- 음료류, 주류, 떡류에 활용 가능성 확인.
- 색조화장품 등에 활용 가능성 확인
- 새로운 유전공학 기반기술과 식품에의 첨단기술 적용 발전에 기여.
 - ◎ 붉은 색소인 재조합 Phycoerythrin을 생산하는 균주의 개발은 전 세계적으로 전무한 상태에 있으며 어떠한 학술보고도 없으므로 본 연구에서 대장균 내에 두개의 operon 백터 도입은 총 4가지의 외부 단백질의 발현을 유도·제어하는 기술로 국·내외적으로 새로운 유전공학기술을 확립할 수 있을 것으로 기대.
- 김(海苔) 생산지 및 시기별로 phycoerythrin의 색상 및 분자량에 차이점 발생.
 - ◎ 시약급 Phycoerythrin의 생화학적 특성을 일정하게 유지하기 위해서는 포자 및 재배조건(영양원, 수온, 재배기간 등)과 수확시기 등의 균일성 유지 필요.
- 실험실 규모의 실험결과로 산업화 추진을 위해서는 무리가 있는 것으로 나타났다.
 - ◎ 예상치 못한 몇 가지의 문제점으로 Pilot plant급 장비가 추가로 필요하였다.
 - ◎ 청징화 작업 및 추출액을 회수하기 위하여 원심분리를 실시하였으나 대량처리 시 한계를 나타내어 filter press, decanter, continuous-flow centrifuge 등이 필요.
 - ◎ 투석과 농축을 위한 Hollow fiber type UF system 활용 시 slurry에 의하여 fiber가 막히는 현상이 자주 발생하여 대량 처리 곤란하여 vibration UF system 등이 필요.
 - ◎ 추출, 분리, 농축, 건조 및 encapsulation 시 경제성을 확보하고자 사용되는 시약을 회수하는 과정에서 용매 폭발로 인한 사고를 방지하기 위한 방폭(防爆) 회수용 system이 부착된 대용량 농축기 또는 대용량 건조기 등이 필요.
- 새로운 유전공학 기술인 대장균 내에 두개의 operon 백터 도입은 총 4가지의 외부 단백질의 발현을 유도, 제어하는 기술이기 때문에 외부 단백질 복합체의 원활한 생성을 위해서는 다양한 백터개발과 같은 심도 있는 연구 필요.
- 앞으로 대장균 뿐만 아니라 발효시에 이용되는 효모와 식물체에 도입할 수 있는 연구를 계속해서 진행한다면 식품산업에서의 공정의 단순화를 추구할 수 있을 것이며 보다 효율적인 대량생산체계를 확립할 수 있으리라 기대.

SUMMARY

Studies on the development of genetically engineered microbial starters for applying as food colorants

Phycoerythrin was extracted from laver (*Porphyra tenera*) with deionized water, NaCl solution or phosphate buffer, and purified by procedure including ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography and gel filtration through Sephadex G-150. But this traditional purification method was very difficult, complicated, highly labored and expensive not to apply this method for producing phycoerythrin as purified reagents and food grade colorants. With these reasons, we have tried to produce food and reagent grade phycoerythrin without ammonium sulfate fractionation, DEAE cellulose and gel filtration chromatography. Now, we developed new methods for mass production of highly purified and safe phycoerythrin with easy, simple, short and unexpensive ways by only organic solvent treatment (95% Ethanol, 99% Acetone, 99% Methanol). This result indicated that phycoerythrin might be potential sources of natural colorant for food and cosmetics, and reagent for biological process. This methods will anytime apply for production of food and reagent grade phycoerythrin from genetically engineered microbial starters.

It is increasing necessity of creating new microorganisms for mass production of natural pigments for many application such as food industry, cosmetics and medical usages because of both increase of natural pigments demands and preference of natural pigments in foods. The phycoerythrin (PE), which produces red colors under the white light, contents of two major subunits such as alpha and beta subunits of phycobilisomes in the marine algae of *porphyra sp.* We have focused on over production of

phycoerythrin from prokaryotic system to apply this recombinant pigments in many areas directly or indirectly. This report covers the molecular isolation, purification and characterization of PE from the red alga *porphyra* sp and expression in *E. coli* system. The nucleotide sequence of approximately 1.1 kb which contain two open reading frames of 565 and 496 nucleotides respectively with linker sequences. These genes were named rpe β and rpe α . The arrangement of the coding sequences parallels that of the Rodophyta PE genes, with rpe β located 5' of rpe α . The two genes are separated by an intergenic region of 76 nucleotides, and both are transcribed from the same DNA strand in coordination manner. cDNA sequences coding RPE was a member of a homologous family of peptides, the phycoerythrin.

In this experiment, the phycoerythrin was expressed in *E.coli* by diverse methods in genetic engineering such as expression in single subunits, coexpression, expression of mutant genes. Even though the production of the each apoprotein of phycoerythrin was established, the formation of functional phycoerythrin complex was not completed harmoniously. The holoproteins of phycoerythrin seems to be caused by the formation of multiple protein complex including heme-like structures and other accessory proteins. The production of colorless phycoerythrin was detected by western blot analysis.

Further plans for this study to do mass production of the red holo phycoerythrin are to introduce HY2 (phytochromobilin synthase), other accessory components, or cyanobacterial phycoerythrin reductase. These genes were cloned and recently these genes have been expressed in many different manners.

Phycoerythrin was no proteolytic, amylolytic, hemolytic activity, no inhibition against beneficial intestinal microbes. The rat dieted with phycoerythrin was no difference of body weight, liver tissue weight, spleen tissue weight, and GOT content, GPT content, SOD activity.

For color food manufacturing phycoerythrin applied in the beverage, alcohol

beverage and solid type food. Commercial red color foods had absorbance at 424~521nm wavelength, Hunter value at 6.49~66.57 and pH 2.40~5.62. Phycoerythrin had absorbance at 498nm, 562nm, 614nm, 651nm, different optical density at different wavelength. The optimum concentration of phycoerythrin was 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in beverage and 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in alcohol beverage.

Mass produced phycoerythrin was no proteolytic, amylolytic, hemolytic activity, no inhibition against beneficial intestinal microbes. Solubility tests of phycoerythrin powder were carried with emulsifier and sonicator. The sonication had better solubility than emulsification. Phycoerythrin application for color food were tested Hunter value, stability under different temperature and ultraviolet radiation at liquid and solid state. Commercial foods for applying phycoerythrin pH 2.86~7.0.

Hunter value was increased by increasing concentration of phycoerythrin in transparent liquid food. Phycoerythrin had stable during 6 days storage, and unstable in steamed food like jeongpyon of rice cake.

For increasing stability phycoerythrin was encapsuled. The encapsuled phycoerythrin had 1/7 appearance of Hunter value for the original raw phycoerythrin.

The optimum concentration of phycoerythrin was 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in transparent type food and 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in non-transparent type food. The purified phycoerythrin had higher Hunter value than crude type contained polysaccharide. There were no difference between microencapsuled phycoerythrin and raw phycoerythrin at different temperature, under different ultraviolet condition, But microencapsulated phycoerythrin had better stability than raw phycoerythrin at different pH.

CONTENTS

Studies on the development of genetically engineered microbial starters for applying as food colorants

I . Synopsis of the project

II. Statements of technical developments in local and foreign country

III. Performed research and results

- Development of mass production methods of natural phycoerythrin as potential food colorants and reagents

Chapter 1. Materials and Methods

1. Low materials

2. methods

2.1. Purification of Phycoerythrin

2.2. HPLC

2.3. Electrophoresis

2.3.1. Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

2.3.2. SDS-PAGE

2.4. Detection of UV Visible spectra

2.5. Detection of color difference

2.6. Detection of fluorescence intensity

- 2.7. Mass production of Phycoerythrin used by DEAE-cellulose with organic solvent(DEAE, I-P, II-P, III-P)
- 2.8. Stability of Phycoerythrin
 - 2.8.1. effect of light
 - 2.8.2. effect of salt, sugar and ethanol
 - 2.8.3. effect of metal ion
 - 2.8.4. effect of organic acid, alkali and pH
- 2.9. Mass production of Phycoerythrin used by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with organic solvent
- 2.10. Improvement methods for Mass production of high quality food grade Phycoerythrin without DEAE-cellulose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 2.10.1. production of Phycoerythrin(R-1, R-2, R-3)
 - 2.10.2. production of Phycoerythrin(2R-1, 2R-2, OR)
 - 2.10.3. production of Phycoerythrin with organic solvent(AC, MT, ET)
 - 2.10.4. production of Phycoerythrin used by Spray drying method for saving organic solvent(NSD, SD)
- 2.11. Mass production of purified Phycoerythrin(B1, B2, B3, B4, B5)
- 2.12. Mass production of high quality food grade and purified Phycoerythrin used by low temperature(-70P, -70S)
- 2.13. Microencapsulation
- 2.14. Industrialization

Chapter 2. Results and Discussion

1. Purification of Phycoerythrin
2. Electrophoresis
3. Mass production of Phycoerythrin used by DEAE-cellulose with organic solvent(DEAE, I-P, II-P, III-P)
4. Stability of Phycoerythrin
 - 4.1. effect of light
 - 4.2. effect of salt

- 4.3. effect of sugar
- 4.4. effect of ethanol
- 4.5. effect of organic acid, alkali and pH
5. Mass production of Phycoerythrin used by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with organic solvent
6. Improvement methods for Mass production of high quality food grade Phycoerythrin without DEAE-cellulose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 6.1. production of Phycoerythrin(R-1, R-2, R-3)
 - 6.2. production of Phycoerythrin(2R-1, 2R-2, OR)
 - 6.3. production of Phycoerythrin with organic solvent(AC, MT, ET)
 - 6.4. production of Phycoerythrin used by Spray drying method for saving organic solvent(SD, NSD)
7. Mass production of purified Phycoerythrin(B1, B2, B3, B4, B5)
8. Mass production of high quality food grade and purified Phycoerythrin used by low temperature(-70P, -70S)
9. Microencapsulation
10. Industrialization

● Production of Recombinant Phycoerythrin in *E. coli*

Chapter 1. Materials and Methods

1. Isolation of Natural Phorphyra phycoerythrin and Sequence analysis
 - 1.1. Phycoerythrin genomic DNA from Rodophyta
 - 1.2. Isolation of total RNA from Rodophyta
 - 1.3. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR and Sequence analysis
2. Expression of Recombinant Phorphyra phycoerythrin into *E.coli*

- 2.1. Isolation of plasmid DNA
- 2.2. Amplication of phycoerythrin gene
- 2.3. Construction of expression vector and Transformation
- 2.4. Expression of recombinant phycoerythrin
- 2.5. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
3. Antibody Production of Natural Phorphyra phycoerythrin and Recombinant phycoerythrin subunit
 - 3.1. Antigen extraction and Immunization
 - 3.2. Western blot analysis
4. Cloning of Recombinant mutational Phycoerythrin for operon vector into *E. coli*
 - 4.1. Isolation of plasmid DNA
 - 4.2. Amplication of mutational phycoerythrin gene
 - 4.3. Construction of expression vector and Transformation
5. Expression of Recombinant mutational phycoerythrin into *E.coli*
 - 5.1. Expression of recombinant mutational phycoerythrin
 - 5.2. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
6. Expression of Accessory protein into *E.coli* for recombinant mutational phycoerythrin
 - 6.1. Isolation of plasmid DNA
 - 6.2. Isolation of Total RNA from Arabidopsis
 - 6.3. RT-PCR and subcloning
 - 6.4. Amplication of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) genes
 - 6.5. Construction of expression vector and Transformation
 - 6.6. Expression of Chromophore synthase into *E.coli*
 - 6.7. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Chapter 2. Results and Discussion

1. Isolation of Natural Phorphyra phycoerythrin and Sequence analysis
 - 1.1. Phycoerythrin genomic DNA from Rodophyta

- 1.2. Isolation of total RNA from Rodophyta
- 1.3. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR
- 1.4. Sequence analysis
2. Expression of Natural Phorphyra phycoerythrin gene
 - 2.1 Cloning of Porphyra Phycoerythrin
 - 2.1.1. Subcloning of Phycoerythrin α subunit
 - 2.1.2. Subcloning of Phycoerythrin β subunit
 - 2.1.3. Isolation of Plasmid DNA and Screening
 - 2.2 Expression of Recombinant Phycoerythrin subunit into *E. coli*
 - 2.2.1. Expression of Phycoerythrin α , β subunit
 - 2.2.2. SDS-PAGE of recombinant phycoerythrin protein
3. Antibody Production of Natural Phorphyra phycoerythrin and Recombinant phycoerythrin subunit
 - 3.1. Antigen extraction and Immunization
 - 3.2. Western blot analysis
4. Isolation of Putative Phycoerythrin rod-linker gene
 - 4.1 Analysis of N-terminal aminoacid sequence
 - 4.2 Analysis of internal aminoacid sequence
5. Expression of Recombinant mutational phycoerythrin operon into *E.coli*
 - 5.1 Primer design of mutational phycoerythrin operon
 - 5.2 Expression of Recombinant mutational phycoerythrin operon into *E.coli*
 - 5.2.1. Expression of Recombinant mutational phycoerythrin operon
 - 5.2.2. SDS-PAGE of recombinant mutational phycoerythrin protein
6. Expression of Arabidopsis Phytochromobilin synthase HY2 into *E. coli*
 - 6.1 Primer design of Phytochromobilin synthase HY2 gene
 - 6.2 solation of total RNA from Arabidopsis
 - 6.3 RT-PCR and subcloning
 - 6.4 Expression of Phytochromobilin synthase HY2 into *E.coli*
 - 6.4.1. Expression of Phytochromobilin synthase HY2
 - 6.4.2. SDS-PAGE of Phytochromobilin synthase HY2 protein

7. Expression of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) into *E. coli*
 - 7.1 Primer design of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B)
 - 7.2 Expression of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B)
 - 7.2.1. Expression of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B)
 - 7.2.2. SDS-PAGE of Phycoerythrobilin synthase(PEB A,B)

● Studies on the bio-hazard test and application for food manufacturing with phycoerythrin producing strain

Chapter 1. Materials and Methods

1. Materials
2. Methods

Chapter 2. Results and Discussion

1. Bio-hazard test and application for food manufacturing with phycoerythrin of blue green algae and red algae
 - 1.1. Test of proteolytic, amylolytic and hemolytic activity of phycoerythrin
 - 1.2. Inhibition spectrum against beneficial intestinal microbes and minimal inhibition concentration for food microbes by phycoerythrin
 - 1.2.1. Inhibition spectrum against beneficial intestinal microbes
 - 1.2.2. Minimal inhibition concentration for food microbes by phycoerythrin
 - 1.3. Bio-hazard test of phycoerythrin
 - 1.4. Application for beverage and alcohol beverage with phycoerythrin
 - 1.4.1. Color difference of pigments in commercial foods
 - 1.4.2. Color changes of phycoerythrin at different pH and concentration
 - 1.4.3. Phycoerythrin application for food manufacturing

2. Phycoerythrin application for food manufacturing purified by mass production method
 - 2.1. Bio-hazard test of phycoerythrin purified by mass production method
 - 2.2. Phycoerythrin application for beverage
 - 2.2.1. Solubility test of phycoerythrin powder with emulsifier
 - 2.2.2. pH test of commercial food
 - 2.2.3. Phycoerythrin application for color food
 - 2.2.3.1. Phycoerythrin application for liquid type food
 - 2.2.3.1.1 Color test of phycoerythrin on food
 - 2.2.3.1.2. Stability of phycoerythrin
 - 2.2.3.2. Phycoerythrin application for solid type food
 - 2.2.3.2.1. Color test of phycoerythrin on food
 - 2.2.3.2.2. Stability of phycoerythrin
3. Microencapsulated phycoerythrin application for food manufacturing
 - 3.1. Color test of microencapsulated phycoerythrin
 - 3.2. Color test of microencapsulated phycoerythrins made from different procedures
 - 3.2.1. Hunter value of transparent type beverage
 - 3.2.2. Hunter value of turbid type beverage
 - 3.2.3. Hunter value of alcohol beverage
 - 3.2.4. Hunter value of the other food
4. Color stability of microencapsulated phycoerythrins
 - 4.1. Stability at different temperature
 - 4.2. Stability under UV radiation
 - 4.2.1. In plastic ware
 - 4.2.2. In glass ware
 - 4.3. Stability at different pH
 - 4.4. Observed color with naked eye at different concentration

- IV. Object accomplishment and contribution to related fields
- V. Practical application of the results
- VI. Acquisition of foreign scientific informations during this research
- VII. References

요 약

식품 색택관능을 증진시키는 종균개발에 관한 연구

Phycoerythrin은 홍조류인 김(海苔 : *Porphyra tenera*)으로부터 탈이온수, 염용액 또는 phosphate buffer 등을 사용하여 추출하고 황산암모늄 분획, DEAC cellulose chromatography와 gelfiltration chromatography를 통하여 정제하고 있다. 그러나 이러한 일반적 방법은 대단히 불편하고, 복잡하며 장시간 소요되고 비경제적이다. 이에 황산암모늄 분획과 DEAC cellulose chromatography 및 gelfiltration chromatography를 하지 않고 식품첨가물용 및 시약급의 phycoerythrin 생산 시 경제성을 갖도록 생산하고자 하였다. 이번에 개발된 방법은 유기용매(95% Ethanol, 99% Acetone, 99% Methanol)만을 사용하므로 일반적 방법에 비하여 생산이 용이하고, 간단하며 단시간에 경제적으로 생산할 수 있는 새로운 방법으로 확립되었다. 따라서 새로운 방법을 활용한다면 양질의 천연 식용색소와 향장품 및 생화학적 처리에 소요되는 시약으로까지 활용할 수 있을 것이다. 이렇게 확립된 방법은 적색색소를 다량 생산하는 재조합균주가 새롭게 개발되면 차후 언제라도 적용이 가능하다 하겠다.

현대에 있어 천연색소 수요의 증가와 식품의 천연색소의 선호로 인해, 식품공업과 화장품 및 의약적 이용 등의 다양한 응용을 위한 대량 생산에 필요한 새로운 균주의 필요성이 증가하고 있다. 백색광 하에서 붉은 빛을 내는 phycoerythrin(PE)은 해조류인 *Porphyr*a sp.의 phycobilisome에 존재하는 색소로, α 와 β , 두개의 주된 subunit으로 이루어져있다. 본 연구는 원핵생물체계를 phycoerythrin을 대량생산에 적용함으로써 이러한 재조합색소를 여러 분야에 직간접적으로 응용하는데 초점을 두고 있으며, *Porphyr*a sp.로부터 PE를 분자생물학적으로 분리, 정제하여 그 특성을 분석하고, *E.coli* 체계에서의 발현에 역점을 두고 있다.

Phycoerythrin은 약 1.1Kb에 달하는 염기서열로서, 565, 496 nucleotides 사이에 linker 서열을 포함하는 두 개의 ORF (*rpe α* , *rpe β* 라 명하였다)를 포함하고 있으며

그 배열은 *rpea*의 5' 앞쪽에 *rpeβ*가 평행하게 존재한다. 이 두 유전자는 76 nucleotides의 intergenic region에 의해 분리되어 있으며, 두 유전자 모두 같은 DNA가닥으로부터 순차적으로 전사된다. RPE를 암호화하는 cDNA서열은 phycoerythrin peptide의 homologous family의 일원이다. 본 실험에서는 phycoerythrin을 각각의 subunit의 발현, 동시 발현, 변이 유전자의 발현 등 다양한 유전공학적인 방법으로 발현시켰다. 재조합 phycoerythrin의 각 apoprotein의 발현 조건이 확립되었지만 기능적인 phycoerythrin 복합체는 순조롭게 형성되지 않았다. Phycoerythrin의 holoprotein은 heme-like 구조와 다른 보조단백질들을 포함하는 multiple 단백질 복합체의 형성에 의해 유발되는 것으로 보인다. 색깔을 띠지 않는 phycoerythrin의 생성은 western blot analysis에 의해 확인되었다. 앞으로 보조단백질인 HY2 (phytychromobilin synthase)와 또 다른 보조인자인 cyanobacterial phycoerythrin reductase를 도입함으로써 붉은 색소를 나타내는 재조합 phycoerythrin의 대량 생산 체계를 확립할 것이다. 이러한 유전자들은 현재 분리되어 clone되어졌으며 다양한 방식으로 발현시킨 상태에 있다.

남조류 및 홍조류 색소는 식중독균의 특성으로 나타나는 단백분해성, 전분분해성 및 용혈성이 나타나지 않았고 동물급여 실험에서도 섭취량, 체중, 간 및 비장 조직의 무게, GOT 함량, GPT 함량, SOD 활성 인체 유해성이 없을 것으로 나타났으며, 장내 유익균 및 식품 미생물도 억제하지 않았으므로 이들을 종균으로 사용하는 식품발효공정에 영향이 없을 것으로 생각되었다. 일반 시판 색소식품의 붉은색소는 424~521nm의 흡수파장을 나타냈고 Hunter value의 적색도인 a는 6.49~66.57로 다양하였으며 pH는 2.40~5.62로 나타났다. 홍조류 색소는 498nm, 562nm, 614nm, 651nm의 흡수 파장을 나타냈고 pH 변화에 따라서 파장별 흡광량 및 흡광 비율도 달리 나타났다. 식품에서 홍조류 색소의 첨가량은 음료류에서는 50 μ l, 주류에서는 100 μ l가 우수하였다.

대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소는 단백분해성, 전분분해성 및 용혈성이 나타나지 않았고 장내유익균 및 식품 미생물도 억제하지 않았으므로, 이들을 종균으로 사용하는 식품발효공정에 영향이 없을 것으로 생각되었다. 보관하기 용이하게 만든 색소 분말은 유회제 및 초음파처리로 용해가 쉬웠다. 색소를 첨가하여 사용하기 위한 시판식품의 pH는 2.86~7.0으로 나타났다. 투명식품에서는

색소 첨가량에 따라 Hunter value의 a값이 증가하였으나 불투명시료는 일관성이 없었다. 식품에 첨가된 색소는 온도별로 6일간 저장에서 안정한 것으로 나타났다. 증편 같이 찌는 식품은 열처리 시간이 증가할수록 적색도는 감소하였다.

Microencapsulation된 색소의 Hunter value a값의 발색도는 원색소의 1/7 이하로 나타났으며, 투명한 사이다에서 오미자 음료를 기준으로 한 첨가량은 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 불투명한 베지밀은 $12\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. Microencapsulation 방법에 따른 Hunter value a값은 polysaccharide가 제거된 색소를 사용한 처리방법이 우수하였다. Microencapsulation된 색소는 첨가량에 따라 Hunter value a값이 증가하였으나 원액의 색소 증가폭에 비하여 미미하였다. Microencapsulation에 의한 색택 안정성은 온도 및 자외선에서는 원래의 색소와 차이가 없었으나 pH에서는 안정한 것으로 나타났다.

따라서, 홍조류색소는 유해성 및 식품사용에서 안전하였고 음료류, 주류 등에 사용가능 할 수 있으며 microencapsulation 처리방법으로 안정성을 증대시킬 수 있었다.

목 차

식품 색택관능을 증진시키는 종균개발에 관한 연구

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

● 식품첨가물용 및 시약급 정제 Phycoerythrin의 대량 생산방법 개발

1 절 재료 및 방법

1. 재 료

2. 실험 방법

가. Phycoerythrin 정제

나. HPLC

다. 전기영동

1) Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

2) SDS-PAGE

라. UV Visible spectra 측정

마. 색도 측정

바. 형광도 측정

사. DEAE-Cellulose와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin 대량 생산

아. Phycoerythrin의 안정성

1) 광선의 영향

2) 염(鹽), 당(糖) 및 ethanol의 영향

- 3) 금속이온의 영향
- 4) 유기산, 알카리 및 pH의 영향
- 자. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin의 대량생산
- 차. DEAE-cellulose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하지 않는 새로운 방법에 의한 양질의 식품첨가물용 Phycoerythrin의 대량생산
 - 1) Phycoerythrin 생산(R-1, R-2, R-3)
 - 2) Phycoerythrin 생산(2R-1, 2R-2, OR)
 - 3) 유기용매에 의한 Phycoerythrin 생산(AC, MT, ET)
 - 4) 유기용매 절약을 위한 분무건조에 의한 Phycoerythrin 생산(NSD, SD)
- 카. 정제 Phycoerythrin 대량생산
- 타. 저온처리에 의한 양질의 식품첨가물용 및 정제 Phycoerythrin 대량생산
- 파. Microencapsulation
- 하. 색소생산의 산업화

2 절 연구수행 결과

- 1. Phycoerythrin 정제
- 2. 전기영동
- 3. DEAE-Cellulose와 기용매를 이용한 Phycoerythrin 대량생산 (DEAE, I-P, II-P, III-P)
- 4. Phycoerythrin의 안정성
 - 가. 광선의 영향
 - 나. 염(鹽)의 영향
 - 다. 당(糖)의 영향
 - 라. ethanol의 영향
 - 마. 유기산, 알카리 및 pH의 영향
- 5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin의 대량생산
- 6. DEAE-cellulose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하지 않는 새로운 방법에 의한 양질의 식품첨가물용 Phycoerythrin의 대량생산
 - 가. Phycoerythrin 생산(R-1, R-2, R-3)
 - 나. Phycoerythrin 생산(2R-1, 2R-2, OR)

- 다. 유기용매에 의한 Phycoerythrin 생산(AC, MT, ET)
- 라. 유기용매 절약을 위한 분무건조에 의한 Phycoerythrin 생산
- 7. 정제 Phycoerythrin 대량생산
- 8. 저온처리에 의한 양질의 식품첨가물용 및 정제 Phycoerythrin 대량생산
- 9. Microencapsulation
- 10. 색소생산의 산업화

● *E. coli*에서의 재조합 phycoerythrin 생산

1 절 재료 및 방법

1. Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 분리 및 염기서열 분석
 - 가. Isolation of genomic DNA from Rodophyta
 - 나. Isolation of total RNA from Rodophyta
 - 다. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR 및 염기서열분석
2. Natural Phorphyra의 재조합 phycoerythrin의 발현
 - 가. Plasmid DNA의 분리
 - 나. Phycoerythrin 유전자의 증폭
 - 다. 발현 vector의 construction 및 형질 전환
 - 라 재조합 Phycoerythrin의 발현
 - 마. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
3. Natural Phorphyra phycoerythrin 및 Recombinant phycoerythrin subunit의 항체 생산
 - 가. 항원 추출 및 Immunization
 - 나. 면역 항혈청의 특이성 및 역가 측정 (Western blot analysis)
4. 대장균내 오피론백터 발현을 위한 재조합 변이 Phycoerythrin의 cloning
 - 가. Plasmid DNA의 분리
 - 나. 변이 Phycoerythrin 유전자의 증폭
 - 다. 발현 vector의 construction 및 형질 전환

5. 변이 재조합 Phycoerythrin의 대장균내 발현
 - 가.. 변이 재조합 Phycoerythrin의 발현
 - 나. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
6. 보조 단백질인 chromophore synthase 유전자의 대장균 내 발현
 - 가. Plasmid DNA의 분리
 - 나. Arabidopsis로부터 Total RNA의 분리
 - 다. RT-PCR 및 subcloning
 - 라. Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 증폭
 - 마. 발현 vector의 construction 및 형질 전환
 - 바. Chromophore synthase 유전자의 대장균 내 발현
 - 사. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

2 절 연구수행 결과

- 1 Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 분리 및 염기서열 분석
 - 가. Isolation of genomic DNA from Rodophyta
 - 나. Rodophyta의 total RNA분리
 - 다. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR
 - 라. 염기서열분석
2. Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 발현 및 발현 조건
 - 가. 대장균 발현을 위한 Porphyra Phycoerythrin의 cloning
 - 1) Phycoerythrin α subunit의 subcloning
 - 2) Phycoerythrin β subunit의 subcloning
 - 3) Plasmid DNA의 분리 및 균주 선발
 - 나. 재조합 Phycoerythrin subunit의 대장균내 발현
 - 1) 재조합 Phycoerythrin α , β subunit의 발현
 - 2) 재조합 Phycoerythrin의 SDS-PAGE 확인
3. Natural Phorphyra phycoerythrin 및 Recombinant phycoerythrin subunit의 항체 생산
 - 가. 항원 추출 및 Immunization
 - 나. 면역 항혈청의 특이성 및 역가 측정 (Western blot analysis)

4. Putative Phycoerythrin rod-linker 유전자의 분리
 - 가. N-말단 아미노산 염기서열 분석
 - 나. Internal 아미노산 염기서열 분석
5. 재조합 변이 Phycoerythrin 오페론백터의 대장균내 발현
 - 가. 변이 phycoerythrin 오페론 유전자의 primer 설계
 - 나. 변이 재조합 phycoerythrin 오페론백터의 대장균 내 발현
 - 1) 변이 재조합 Phycoerythrin operon의 발현
 - 2) 재조합 Phycoerythrin의 SDS-PAGE 확인
6. 보조단백질 Arabidopsis(애기장대) Phytochromobilin synthase HY2 대장균내 발현
 - 가. Phytochromobilin synthase HY2 유전자의 primer 설계
 - 나. Arabidopsis로부터 Total RNA의 분리
 - 다. RT-PCR 및 subcloning
 - 라. Phytochromobilin synthase HY2 대장균내 발현
 - 1) Phytochromobilin synthase HY2의 발현
 - 2) Phytochromobilin synthase HY2의 SDS-PAGE 확인
7. 보조단백질 Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B)의 대장균내 발현
 - 가. Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 primer 설계
 - 나. Phycoerythrobilin synathase(PEB A,B) 대장균 내 발현
 - 1) Phycoerythrobilin synathase(PEB A,B) 의 발현
 - 2) Phycoerythrobilin synathase(PEB A,B)의 SDS-PAGE 확인

● 색소 생성균의 색소독성 검사 및 식품활용성에 관한 연구

1 절 재료 및 방법

1. 실험재료
2. 실험방법

2 절 연구수행 결과

1. 남조류 및 홍조류 색소의 독성 시험 및 식품 활용성 검사

가. 남조류 및 홍조류 색소의 단백질해성, 전분분해성 및 용혈성 조사

나. 남조류 및 홍조류 색소에 의한 장내 유익균 억제 및 식품 미생물에 대한 최소 억제 농도 조사

1) 색소에 의한 장내 유익균 억제 조사

2) 식품미생물에 대한 색소의 최소 억제농도 조사

다. 색소의 독성시험

라. 음료류와 주류에서 색소의 활용성 검토

1) 시판식품의 선택 조사

2) 색소의 pH 및 농도에 따른 색조사

3) 색소의 식품 활용성 조사

2. 대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소의 식품 활용성연구

가. 대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소의 독성시험

나. 음료류에서 활용성 검사

1) 유화제 첨가에 의한 분말색소의 용해성 검토

2) 시판색소의 pH 조사

3) 홍조류색소 첨가 식품의 활용성 검토

가) 액상 식품에서의 활용성 검토

(1) 선택조사

(2) 안정성 조사

나) 고체상 식품에서의 활용성 검토

(1) 선택조사

(2) 안정성 조사

3. Microencapsulation된 색소의 식품활용성에 관한 연구

가. Microencapsulation된 색소의 첨가농도에 따른 선택 조사

나. Microencapsulation 방법에 따른 선택조사

1) 투명 음료에서의 Hunter value 조사

2) 불투명 음료에서의 Hunter value 조사

3) 주류에서의 Hunter value 조사

- 4) 기타식품에서의 Hunter value 조사
- 4. Microencapsulation에 의한 색택의 안정성 조사
 - 가. 온도에 따른 안정성
 - 나. 자외선 조사에 따른 색소의 안정성 검토
 - 1) Plastic 용기에서 자외선 안정성 조사
 - 2) 유리 용기에서 자외선 안정성 조사
 - 다. pH에 따른 색소의 안정성 검토
 - 라. 색소 농도별 육안 관측

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

소득이 증가하여 건강에 대한 관심이 증대되어가고 있는 현 시점에서 식용색소는 안정성(Stability)이 높은 합성색소보다 안전성(Safety)이 강조되는 천연색소 사용이 최우선적으로 고려되어야 할 사항이며 이에 대한 요구가 날로 증대되어가고 있다.

일본의 1990년 초 식용색소 시장규모는 약 260억엔/년으로서 이 중 천연색소가 약 88%의 높은 점유율을 나타내어 천연색소에 대한 요구가 상당한 수준에 이르렀다. 우리나라는 약 100억원의 식용색소 시장규모 중 천연색소 점유율은 10% 정도일 뿐으로서 천연색소는 국내에서도 다량 생산되지만 많은 부분을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이에 대량생산이 가능하고 저렴한 천연색소 개발이 필요하며 김으로부터 phycoerythrin을 추출·분리하여 식품공업에 이용하고자 하였다.

년 평균 190,000M/T 이상 대량생산되어 수산물 정부비축사업에서 막대한 예산이 소요('99년 758M/T, 13,166백만원), ('00년 800M/T, 13,143백만원), ('01년 810M/T, 13,243백만원)되는 홍조류(김, 海苔, *Pophyra tenera*)로부터 순도 높은 식품첨가물급 적색색소를 대량으로 생산하여 식품 및 향장품의 원료로, 그리고 고순도의 시약급 phycoerythrin까지 생산하여 활용함으로써 부가가치를 증대시키고자 함이다. 즉, 기존의 ammonium sulfate 처리, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography 등에 의한 생산과 비교하여 단기간에 경제적으로 형광성이 양호한 식품첨가물급과 정제 phycoerythrin의 새로운 대량생산 체계를 구축하여 산업화에 적용하고자 한다. 현재 김색소는 식품활용이 극히 미미한 상태이며 정제된 *Pophyra phycoerythrin*은 약 150,000원/mg(Sigma Co.)의 고가로 판매되고 있는 실정이므로 경제적으로 대량생산하여 활용성과 가격경쟁력을 증대시키고자 한다.

이에 따라 대량 생산된 경제성과 가격 경쟁력이 있는 식품첨가물급의 적색색소인 Phycoeythrin은 안정성과 다양한 식품에의 활용가능성을 검토하여 식품첨가물로서의 가치를 확인하고 천연색소라는 장점을 가공식품에 적용하여 식품공업에 고가전략으로 폭넓게 활용하고자 한다. Phycoerythrine은 남조류 및 홍조류에서 나타나는 붉은 색소로서 단백질에 의하여 stack구조로 되어 있어서 색이

아주 진하고 형광을 나타내며 수용성을 나타내는 특성을 가지고 있어서 생체 염색 등에 사용되고 있는 고가의 천연색소이다.

이 색소를 nature-identical colorant로서 유전공학적으로 대량생산하여 저렴하게 공급하면 천연색소와 동일한 구조이므로 선호도가 매우 높을 것으로 생각된다.

그리고, 이 색소는 홍조류인 김에 많이 함유되어 있고 김은 우리나라에서 대량으로 생산되므로서 효과적인 추출 방법으로 추출한다면 저렴하게 이용할 수 있을 것이다.

즉, phycoerythrin을 균주에 gene cloning하여 재조합 phycoerythrin을 대량생산하고 이를 경제성 있는 식품첨가물급과 정제 phycoerythrin으로 생산하고자 하며, gene cloning을 효모에까지 확대하여 발효식품 제조 시 발효와 색소형성이 동시에 이루어지도록 하여 공정의 단순화도 추구하여 보고자 한다.

그러나, 식품에 사용할 때에는 최근 논쟁이 되고 있는 GMO 식품 수준에서 안전성을 고려하여야 할 것이고 추출 과정에서 유독물질의 혼입이 염려되므로 독성 검사로 안정성을 증명하여야 할 것이다.

(세부과제 : 경기대학교)

1차 년도에서는 홍조류의 phycoerythrin을 정제하여 종균개발의 기초로 삼고자 하였으며, 아울러 식품첨가물급 phycoerythrin의 생산 방법을 다각도로 검토하였다. 2차 년도에서는 다각도로 검토된 방법 중 신속하고 간단하며 경제적인 방법으로 양질의 식품첨가물급 phycoerythrin을 생산할 수 있는 몇 가지의 생산체계를 검토하고자 하였다. 3차 년도에서는 보다 선택이 양호한 식품첨가물급 phycoerythrin의 대량생산 체계를 확립하고 이를 통하여 대량생산을 시도하고, 아울러 색소의 안정성 증대를 위한 Microencapsulation을 실시하고자 하였다. 한편 고순도로 정제된 phycoerythrin을 대량생산 할 수 있는 새로운 정제방법을 확립하여 부가가치를 높이고자 하였다.

(협동과제 : 성균관대학교)

1차 년도에 재조합 phycoerythrin을 대량 생산하기 위해 phycoerythrin을 생산하는 일부 남조류와 홍조류로부터 phycoerythrin 유전자를 분리하고 그 염기서열을 분석하였다. 2차 년도에서는 이 유전자의 발현조건 및 발현 기구를 분석

하고 재조합 phycoerythrin의 대량 생산을 위하여 홍조류의 엽록체와 유사한 원핵세포인 대장균에서 다각적으로 연구하였다. 3차 년도에서는 phycoerythrin 색소 유전자의 발현 조건을 확립하고 이 phycoerythrin 이외에 phycoerythrin의 안정성과 발색 과정에 관여하는 보조 단백질의 분리와 발현 효율 조건을 조정 하므로써 고부가가치의 재조합 phycoerythrin을 대량 생산하고자 하였다.

(위탁과제 : 한국식품개발연구원)

1차 년도에서는 남조류 및 홍조류 색소인 phycoerythrin의 단백질분해성, 진분 분해성 및 용혈성, 색소에 의한 장내 유익균 억제 및 식품 미생물에 대한 최소 억제 농도를 조사하고 쥐를 이용하여 색소의 독성시험하며 음료류와 주류에서 phycoerythrin의 활용성을 검토하였다. 2차 년도에서는 대량추출방법에 의하여 추출된 홍조류색소의 안전성을 조사하고 음료류, 주류, 기타식품에서 활용성을 검토하였다. 3차 년도에서는 Microencapsulation한 홍조류 색소의 음료류, 주류, 기타 식품에서 활용성을 검토하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

천연 적색색소로 사용하기 위하여 식물로부터 Anthocyanin계와 Carotenoid계가 주종을 이루고 있으며, 미생물인 *Monascus anka*로부터도 추출하여 활용하고 있는 홍주가 활용되고 있다. 또한 곤충으로부터 획득하는 Cochineal 색소는 실제 활발하게 사용되고 있으나 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다.

그러나 김으로부터 추출한 김색소를 식품첨가물용으로 식품공전에 명시해 놓고 있으나 실제 식품가공용 색소로 사용한 경우는 찾아 볼 수 없었으며, 특히나 본 색소는 김 전체의 색소가 아닌 불순물의 함유를 최소한으로 한 양질의 식품첨가물급으로 개발한 것으로서, 적색을 나타내는 색소단백인 Phycoerythrin을 순도높게 추출 분리한 것을 활용하고자 함이다. 한편으로는 고가로 판매되고 있는 정제 Phycoerythrin의 수요를 국내에서 대체하고 나아가 수출까지 고려하여 경제성을 갖도록 한 최초의 방법이라 하겠다.

시약급으로는 R/D Systems Inc.에서 인간의 cytokine TNF- α 를 검색하기 위하여 phycoerythrin을 결합시킨 진단시약 Flurokine를 판매 중이며, Sigma Co. 와 Prozyme Inc. 에서 Phycoerythrin을 전기영동과 Chromatography indicator dye 용도로 고가로 판매 중이다.

2001년 재조합 C-phycoerythrin 생산을 cyanobacteria에서 유도한 예가 Analytical Biochemistry에 보고되었다. 이는 고가에 판매되고 있는 molecular probe의 생산에 용이하게 Affinity Tags, 형광 마커를 함께 fusion 시킬 수 있도록 하는 기술을 첨가하였지만 이는 cyanobacteria 자체 내의 phycoerythrin의 bilin을 이용하였으며 또한 cyanobacteria의 대량생산 체계의 확립을 도모할 필요가 있기 때문에 그 경제적 효과는 높지 않다고 할 수 있다. 붉은 색소인 재조합 phycoerythrin을 생산하는 균주 개발은 전 세계적으로 전무한 상태에 있으며 어떠한 학술보고도 없다. 또한 본 연구에서 대장균 내에 두개의 operon 백터 도입은 총 4가지의 외부 단백질의 발현을 유도, 제어하는 기술로서 국내외적으로 새로운 유전공학 기술을 확립할 수 있을 것으로 기대되며, gene cloning에 의한 색소생산 중간개발은 세계 최초로 시도한 상태이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

식품첨가물용 및 시약급 정제 phycoerythrin의 대량생산방법 개발(경기대학교)

1 절 : 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험은 홍조류인 김(海苔, *Porphyra tenera*)을 사용하였으며, Phycoerythrin의 정제와 생화학 특성 및 안정성 측정을 위해서는 충남 광천산, Phycoerythrin의 대량 생산체계 구축을 위해서는 전남 완도산을, 식품첨가물급 및 고순도의 Phycoerythrin 대량생산을 위해서는 전남 압해도산을 사용하였으며, 이들은 수확 직후 냉장상태로 수송하여 -20℃로 냉동보관하며 사용하였다.

2. 실험 방법

가. Phycoerythrin 정제

냉동된 시료에 탈이온수를 가하여 waring blender로 1회에 3분씩 3회 처리하고 상온에서 2시간 교반·추출한 후 압착·여과하였으며, 이들을 원심분리(8,000rpm, 20min at 4℃) 한 후 상등액에 황산암모늄을 10~50%까지 농도별로(10%간격) 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 상등액을 분획하였다. 각각의 분획은 4℃의 탈이온수에서 48시간 교반·투석한 후 원심분리하여 상등액을 HPLC로 분석하여 황산암모늄 분획조건을 설정하였다. 정제시료 생산을 위해서 조색소액에 황산암모늄을 설정농도로 처리하고 4℃에서 12시간 정치한 후 원심분리하여 얻은 침전을 투석한 후 이를 다시 0.001M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 투석하고, 0.0~0.2M NaCl로 gradient 시킨 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이들을 DEAE-cellulose ion exchange chromatography(column : 4.5 x 28cm, buffer : 0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.5) with NaCl gradient(0.2~0.4M), 10.0ml/tube)하였으며, 각 획분들을 HPLC로 분석하여 Phycoerythrin 획분을 확인하였다. 이들을 투석한 후 Sephadex G-150으로 gel filtration chromatography (column 4.0 x 98cm, buffer : 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.5) + 0.2M NaCl, 4.7ml/tube)하였으며, 각 획분들을 HPLC로 분석하여 Phycoerythrin 획분을 확인한

후 이들을 탈이온수에서 12시간 투석 후 원심분리하고 상등액을 동결건조하여 정제 시료로 하였다.

나. HPLC

일반적 방법으로 Phycoerythrin을 정제하는 과정에서 사용한 HPLC는 Shimadzu system(Japan)으로, Synchropak GPC-100 column에 100 μ l를 injection하여 0.05M Tris-HCl buffer(pH7.5) + 0.2M NaCl을 용매로 하여, 0.7ml/min. 조건으로 하였으며, UV detector를 사용하여 280nm와 565nm에서 측정하였다. 또한 고순도 Phycoerythrin 순도를 검정하고자 사용한 HPLC는 Waters system (USA)이었으며 동일한 조건으로 분석하였다.

다. 전기영동

1) Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

동결건조된 Phycoerythrin을 3차 증류수에 용해시킨 후 filtration하여 sample buffer(1% BPB, 100% glycerol, 1M Tris/HCl, pH 6.8)와 1 : 4로 혼합하여 100 μ g을 loading 하였다. separating gel은 8%, stacking gel은 5% polyacrylamide를 사용하였으며, stacking gel 15mA, separating gel 30mA로 약 50분간 전기영동 하였으며, 영동 후 coomassie blue gel staining solution으로 염색하고 탈색하였다.

2) SDS-PAGE

filtration한 시료는 probe buffer와 1 : 4로 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 2~10분 끓인 후, 10 μ l를 loading하였다. separating gel은 15% polyacrylamide, stacking gel은 5% polyacrylamide를 사용하였으며, stacking gel 15mA, separating gel 30 mA로 약 60분간 전기영동 하였으며, 영동 후 coomassie blue gel staining solution으로 염색하고 탈색하였다.

라. UV Visible spectra 측정

색소를 정제단계별로 정제되어 판매되는 표준품(Sigma 3종)과 비교하기 위하여, 그리고 생산된 색소의 spectrum을 비교하기 위하여 Shimadzu UV 1201을 사용하여 700nm~200nm까지 scanning하여 그들의 absorption spectra의 변화를 측정하였다. 한편 안정성을 측정하기 위해서는 Phycoerythrin의 최대흡수파

장인 565nm에서 그들의 흡광도를 측정하였다.

마. 색도 측정

생산된 색소의 색도를 알아보기 위하여 색차계(Yasuda Seiki, UC 600 IV, Japan)를 사용하여 Hunter의 색계인 L, a, b값으로 나타내었다. 이때 표준백색 판의 L, a, b값은 각각 100.01, 3.15, 10.89였다.

바. 형광도 측정

색소의 형광도를 알아보기 위하여 luminescence spectrometer LB50B (Perkin Elmer)를 사용하여 측정하였다. 즉, well에 각각 50 μ l씩 넣고 Exciting 380nm, Emission 630nm의 조건으로 하여 측정하였고, 이때 silt은 10으로 하였다.

사. DEAE-Cellulose와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin 대량 생산

DEAE-Cellulose와 유기용매를 이용한 식품첨가물급 Phycoerythrin의 대량생산을 위하여 다음의 몇 가지 방법을 사용하였으며, 시료는 충남 광천에서 생산된 신선한 김을 -20 $^{\circ}$ C의 냉동실에 보관하며 사용하였으며 조색소액 조제를 위하여 시료에 0.5M NaCl 용액을 10배량 가하여 waring blender로 1회에 3분씩 3회 처리 후 4 $^{\circ}$ C에 12시간 정치한 후 압착 여과하여 원심분리(8,000rpm, 20min at 4 $^{\circ}$ C) 하였다. 상등액을 탈이온수로 4 $^{\circ}$ C에서 72시간 교반·투석 후 원심분리하고 상등액을 0.001M Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-Cellulose에 흡착시켜 12시간 정치 후 압착하였으며 압착된 DEAE-Cellulose를 0.1M NaCl이 함유된 0.001M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 1시간 현탁 후 압착하였다. 압착된 DEAE-Cellulose는 0.15M NaCl이 함유된 0.001 MTris-HCl buffer(pH 7.5)에 8시간 현탁시켜 색소가 용출되도록하고 압착 후 원심분리하여 상등액을 조색소액으로 하였다.

1) 조색소액을 탈이온수에서 48시간 교반·투석하고 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 DEAE로 표기하고, lip gloss를 제작하여 색상을 검토하였다.

2) 조색소액을 탈이온수에서 48시간 교반·투석하고 원심분리 후 상등액에 95% Ethanol 동량을 가하고 12시간 정치한 후 원심분리하고 상등액을 12시간

투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였다. 이를 I-P로 표기하였고, lip gloss를 제작하여 색상을 검토하였다.

3) 조색소액을 탈이온수에서 48시간 교반·투석하고 원심분리 후 상등액에 99% Acetone 동량을 가하고 12시간 정치한 후 원심분리하여 얻은 침전을 Rotary vacuum evaporator로 농축한 후 동결건조 하였으며, 이후 독성 및 안정성 검사에 시료로 사용하였다. 이를 II-P로 표기하였고, lip gloss를 제작하여 색상을 검토하였다.

4) 조색소액을 탈이온수에서 48시간 교반·투석하고 원심분리 후 상등액에 95% Ethanol 동량을 가하고 12시간 정치한 후 원심분리하고 상등액에 99% Acetone 동량을 가하여 12시간 정치 후 원심분리하여 침전을 얻었으며, 이를 탈이온수에서 48시간 교반·투석하고 원심분리 후 상등액을 동결건조 하였다. 이를 III-P로 표기하였고, lip gloss를 제작하여 색상을 검토하였다.

아. Phycoerythrin의 안정성

1) 광선의 영향

색소의 광선에 대한 안정성과 각종 포장재의 광선차단효과에 의한 색소 안정화 효과를 알아보기 위하여 일정농도로 조제한 색소 용액을 알루미늄호일과 4종의 유색셀로판(황, 청, 적, 녹)으로 2겹 포장한 상태 및 비포장 상태로 실온의 자연채광 조건하(서향)에서 9일간 정치하며 일정 간격으로 이들의 잔존 흡광도를 565nm에서 측정하였다.

2) 염, 당 및 ethanol의 영향

염(鹽)의 영향을 알아보기 위하여 색소액에 4종의 염(NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂)을 각각 10.0%의 농도가 되도록 첨가하였으며, 당(糖)의 영향을 알아보기 위하여 색소액에 4종의 당(glucose, fructose, sucrose, maltose)을 각각 20.0%의 농도가 되도록 첨가하였다. 또한 ethanol의 영향을 알아보기 위하여 색소액에 각각 5%, 15%, 25%, 40% 및 50%의 농도가 되도록 95% Ethanol을 첨가하였다. 이들 모두 4℃ 암소에서 30일간 보관하며 일정 간격으로 이들의 잔존 흡광도를 565nm에서 측정하였다.

3) 금속이온의 영향

금속이온의 영향을 알아보기 위하여 3종의 금속이온(FeCl₃, AlCl₃, CuSO₄)을

각각 $1.0 \times 10^{-3}M$ 과 $1.0 \times 10^{-4}M$ 의 농도가 되도록 첨가하여 4°C 암소에서 4시간 정치 후 경시적 변화를 측정하였다.

4) 유기산, 알카리 및 pH의 영향

citric acid, tartaric acid, acetic acid, lactic acid 및 Na-citrate, Na-tartrate, Na-acetate, $NaHCO_3$, Na_2CO_3 가 색소의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 색소용액에 이들의 농도가 1.0%가 되도록 첨가하고 25°C 암소에 24시간 정치 후 700~200nm까지의 흡수스펙트럼을 측정하였다. 또한 pH에 의한 영향을 알아보기 위하여 색소용액에 3배량의 각 pH별 완충용액(pH3 ; M/10 glycine-N/10 HCl, pH4~8 ; M/5 Na_2HPO_4 -M/10 citric acid, pH9, 10 ; M/10 glycine-N/10 NaOH)을 가하고 이들을 25°C 암소에 24시간 정치 후 700~200nm까지 그들의 흡수스펙트럼을 측정하였다. 이때의 pH는 각각 pH 3.08, 4.03, 5.17, 5.98, 7.03, 8.08, 8.96 및 9.88을 나타내었다.

자. $(NH_4)_2SO_4$ 와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin의 대량생산

$(NH_4)_2SO_4$ 와 유기용매를 이용한 방법에 의한 식품첨가물급 Phycoerythrin의 대량생산을 위하여 다음의 몇 가지 방법을 사용하였으며, 시료는 전남 완도에서 생산된 신선한 김을 -20°C의 냉동실에 보관하며 사용하였으며 조색소액을 조제하기 위하여 시료에 0.5M NaCl 용액을 10배량 가하여 waring blender로 1회에 3분씩 3회 처리 후 4°C에 48시간 정치한 후 압착 여과하고 원심분리(8,000rpm, 20min at 4°C)하여 상등액을 얻었으며 이를 시료액 Z로 하였다.

1) 시료액 Z에 황산암모늄을 0.35 포화시켜 12시간 정치하였다. 이를 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 72시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액에 동량의 95% Ethanol을 가하고 12시간 정치하였다. 이를 원심분리하고 상등액을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하여 원심분리하고 상등액을 동결건조 하였으며, 동결건조된 시료는 Z-1로 표기하였다.

2) 시료액 Z에 황산암모늄을 0.2 포화시켜 12시간 정치(4°C)한 후 원심분리 한 상등액에 황산암모늄을 0.35 포화시켜 12시간 정치 후 원심분리하여 침전물을 얻었으며, 이를 흐르는 탈이온수로 72시간 투석하고 원심분리 후 상등액에 95% Ethanol 동량을 가하고 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액을 흐르는 탈이온수로 24 시간 투석하고, 원심분리한 후 상등액을 동결건조 하였다. 동

결건조된 시료는 Z-2로 표기하였다.

3) 시료액 Z에 황산암모늄을 0.2 포화시켜 12시간 정치하였으며, 그 후 원심분리하고 상등액에 황산암모늄을 0.35 포화시켜 12시간 정치하였고 원심분리 한 후 침전물을 흐르는 탈이온수로 72시간 투석 후 원심분리 하고 상등액에 동량의 95% Ethanol을 가하여 12시간 정치 후 원심분리 하였다. 상등액에 동량의 99% Acetone을 가하여 12시간 정치하였으며, 이를 원심분리 한 후 침전물을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였다. 동결건조된 시료는 Z-3으로 표기하였다

차. DEAE-cellulose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하지 않는 새로운 방법에 의한 양질의 식품첨가물용 Phycoerythrin의 대량생산

DEAE-cellulose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하지 않아 공정이 단순하고 경제성 있는 양질의 식품첨가물용 Phycoerythrin 대량생산체계를 확립을 위하여 다음의 몇 가지 방법을 사용하였으며, 시료는 전남 압해도에서 생산된 신선한 김을 -20°C 의 냉동실에 보관하며 사용하였다.

1) Phycoerythrin 생산(R-1, R-2, R-3)

시료를 10배량의 탈이온수로 3회 세척하고 탈수 후 5배량의 0.5M NaCl 용액을 가하고 waring blender로 1회에 3분씩 3회 처리 후 15°C 에서 24시간 정치한 후 압착 여과하고 원심분리(8,000rpm, 20min, 4°C)하여 조색소액으로 하였으며, 잔사는 5배량의 0.5M NaCl 용액을 가하고 15°C 에서 24시간 정치한 후 원심분리하여 상등액을 1차 추출 조색소액과 혼합하여 조색소액 R로 하였다.

가) 조색소액 R에 동량의 95% Ethanol을 가하고 -70°C 의 deep freezer에 12시간 정치한 것을 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 R-1로 표기하였다.

나) 조색소액 R에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4°C 에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 상등액에 동량의 99% Acetone을 가하고 4°C 에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 R-2로 표기하였다.

다) 조색소액 R에 동량의 99% Acetone을 가하고 4°C 에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후

상등액에 다시 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 R-3으로 표기하였다.

2) Phycoerythrin 생산(2R-1, 2R-2, OR)

시료를 10배량의 탈이온수로 3회 세척하고 탈수 후 2배량의 0.75M NaCl 용액을 가하고 세포벽 분해를 촉진시키기 위하여 30℃의 항온기에 24시간 정치하였다. 이후 3배량의 0.75M NaCl 용액을 가하여 교반하고 15℃에서 72시간 정치(8시간 간격 교반) 한 후 압착 여과하고 원심분리(8,000rpm, 20min, 4℃)하여 조색소액으로 하였으며, 잔사는 5배량의 0.75M NaCl 용액을 가하고 15℃에서 36시간 정치(8시간 간격 교반)후 원심분리하여 1차 추출 조색소액과 혼합하여 조색소액 2R로 하였다.

가) 조색소액 2R에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 상등액에 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 2R-1로 표기하였다.

나) 조색소액 2R에 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액에 다시 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석하고 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 2R-2로 표기하였다.

다) 조색소액 2R에 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 OR로 표기하였다.

3) 유기용매에 의한 Phycoerythrin 생산(AC, MT, ET)

유기용매의 종류를 달리하여 생산한 색소의 색택을 알아보기 위하여 조색소액 R을 시료용액으로 사용하였다.

가) 조색소액 R에 2배량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 다시 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을

동결건조 하였으며, 이를 AC로 표기하였다.

나) 조색소액 R에 2배량의 99% Methanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 다시 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 MT로 표기하였다.

다) 조색소액 R에 2배량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 다시 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리 하였고, 침전을 흐르는 탈이온수로 12시간 투석 후 원심분리하여 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 ET로 표기하였다.

4) 유기용매 절약을 위한 분무건조에 의한 Phycoerythrin 생산

식품첨가물용 Phycoerythrin의 대량생산 시 경제성 증진을 위한 유기용매 절감을 위하여 조색소액 R을 분무건조한 경우와 분무건조 상태와 비교하기 위하여 건조하지 않은 상태로 하여 추가 처리하고 색소를 얻었다.

가) 조색소액 R을 분무건조(nozzle ID : 0.7mm, spraying pressure : 2kg/cm^2 , spraying time : 2sec/times, inlet temp. : 95℃, outlet temp. : 115℃)한 시료에 탈이온수를 1 : 50(w/v)의 비율로 가하여 용해시킨 후 원심분리하고 상등액에 95% Ethanol 동량을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하고, 얻은 상등액에 99% Acetone 동량을 가하여 4℃에서 12시간 정치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고, 재원심분리 한 후 상등액 세척을 위하여 99% Acetone 동량을 가하여 4℃에서 12시간 정치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고, 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 SD로 하였다.

나) 분무건조에 의한 열손상 여부를 확인하기 위하여 조색소액 R에 95% Ethanol 동량을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하고, 얻은 상등액에 99% Acetone 동량을 가하여 4℃에서 12시간 정치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고, 재원심분리 한 후 분무건조한 경우와 동일한 공정으로 하기 위하여 99% Acetone 동량을 가하여 4℃에서 12시간 정치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간

투석하고, 원심분리 한 후 상등액을 동결건조 하였으며, 이를 NSD로 하였다.

카. 정제 Phycoerythrin의 대량생산

조색소액 R을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석 후 원심분리하여 얻은 상등액을 비색소 단백질의 냉동변성을 유도하기 위하여 -20℃의 냉동실에서 48시간 냉동시킨 후 동결건조 하였으며, 이를 탈이온수에 용해시킨 후 원심분리(10,000rpm, 30min at 4℃)하여 불용성물질을 제거하고 상등액을 시료용액 B로 하였다.

1) 시료용액 B에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리(10,000rpm, 30min at 4℃)하여 얻은 상등액을 흐르는 탈이온수에서 24시간 투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 B1로 하였다.

2) 시료용액 B에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액에 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 침전을 얻었다. 이를 흐르는 탈이온수에서 24시간 투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 B2로 하였다.

3) 시료용액 B에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 침전을 얻었다. 이를 흐르는 탈이온수에서 24시간 투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 B3으로 하였다.

4) 시료용액 B에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액을 -70℃의 deep freezer에 12시간 정치 후 원심분리하여 침전을 얻었다. 이를 흐르는 탈이온수에서 24시간 투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 B4로 하였다.

5) 시료용액 B에 동량의 95% Ethanol을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액을 -70℃의 deep freezer에 12시간 정치 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 여기에 동량의 99% Acetone을 가하고 4℃에서 12시간 정치 후 원심분리하여 침전을 얻었으며, 이를 흐르는 탈이온수에서 24시간 투석한 후 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 B5로 하였다.

다. 저온처리에 의한 양질의 식품첨가물용 및 정제 Phycoerythrin의 대량생산 양질의 식품첨가물급 및 정제 Phycoerythrin의 대량생산을 위하여 조색소액

R을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석 후 원심분리하여 얻은 상등액을 시료용액 HQ로 하였다. 여기에 95% Ethanol 동량을 가하고 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액을 -70℃의 Deep freezer에 12시간 정치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고, 재원심분리 한 후 상등액을 얻었다. 불순물 제거를 위하여 상등액에 다시 95% Ethanol 동량을 가하고 12시간 정치 후 원심분리하여 얻은 상등액을 -70℃의 Deep freezer에 12시간 정치한 후 원심분리하여 침전(HQP)과 상등액(HQS)으로 분리하였다.

1) 침전(HQP)은 흐르는 탈이온수로 24시간 투석하고 재원심분리 한 후 상등액을 동결건조하여 -70P로 하였다.

2) 상등액(HQS)은 동량의 99% Acetone을 가하여 4℃에 12시간 정치한 후 원심분리 하였으며, 침전을 흐르는 탈이온수로 24시간 투석 후 원심분리하고, 상등액을 동결건조하여 -70S로 하였다.

과. Microencapsulation

생산된 색소가 유기산에 영향을 받으므로 이로부터 안정성을 확보하여 활용성을 증대시키고자 색소 R1과 R2를 microencapsulation하였다. 먼저 Paste상으로 하기 위하여 색소를 탈이온수에 용해시킨 후 유화제를 첨가하고 fat을 가하여 45℃에서 1분간 균질화 한 후 coating하여 encapsulation시켜 paste상으로 제조하였으나 저온에서도 1주일이 경과하자 색도가 현저히 감소하였다. 이에 저장안정성을 증대시키기 위하여 분체로 생산하고자 현재 일본에서 수입 판매되고 있는 피막제로서 내산성을 가진 것으로 알려진 HPMCP-55를 사용하여 coating 하였다.

즉, 일정량의 95% Ethanol을 45℃로 가온하여 0.5%의 지방산 에스테르를 용해시키고 균질화(45℃) 한 후 99% Acetone 동량을 가하여 잘 혼합한다. 혼합액에 HPMCP-55를 5%, 2.5%의 농도로 첨가한 후 색소를 2%의 농도로 첨가하고 가온하여 균질화(45℃)한 후 분무건조(nozzle ID : 0.7mm, spraying pressure : 2kg/cm², spraying time : 2sec/times, inlet temp. : 95℃, outlet temp. : 115℃) 하였다.

하. 색소생산의 산업화

색소의 산업화 생산을 위해서는 현재의 실험실 규모의 경우보다 scale up이 필요하므로 몇 가지의 장비에 대하여 검토하였으며 경제성도 검토하였다.

2 절 : 연구수행 결과

1. Phycoerythrin 정제

황산암모늄 분획의 최적조건을 설정하기 위하여 황산암모늄을 10~50%까지 농도별로(10%간격) 가하고 원심분리 한 후 투석한 상등액을 HPLC로 각 포화 획분의 상태를 분석한 결과 Fig. 1에서와 같이 0.2~0.3포화 획분에서 280nm와 565nm에서의 peak가 크게 나타났다. 이에 정제를 위해서는 0.2~0.3포화 획분을 사용하였으나, 대량생산을 위해서는 수율을 증대시키기 위하여 0.15~0.35 포화 사이의 획분을 사용하였다. 황산암모늄 0.2~0.3포화 획분을 탈이온수로 투석 후 농축하여 DEAE-cellulose ion exchange chromatography하여 Fig. 2 에서와 같이 50~60번 tube에서 색소와 단백질이 일치하여 이들을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 3 에서와 같이 53~55번 tube가 양호한 상태를 나타내었다. 따라서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography의 53~55번 tube를 분획하여 Sephadex G-150으로 gelfiltration chromatography 하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 각 tube 들을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 5에서와 같이 104~105번 tube에서 단일 peak가 나타나 이들을 분획하여 4℃에서 24시간 교반·투석 후 원심분리(8,000 rpm, 20min at 4℃)하여 상등액을 동결건조 하였다. 한편 정제된 색소의 정제도 확인을 위하여 기준(562nm/280nm) > 5.3, 562nm/496nm < 1.5, 612nm/562nm < 0.005)과 비교할 때 Table 1에서와 같이 표준품<(Sigma) (R-phycoerythrin : 0.993, 0.743, 0.080), (r-phycoerythrin : 1.754, 1.076, 0.066), (B-phycoerythrin : 2.662, 2.289, 0.043)>, 정제시료는(2.85, 1.254, 0.018)로 나타나 본 정제 phycoerythrin은 표준품에 비하여 상당히 양호한 정제 상태를 나타내었다.

Table 1 Comparison of phycoerythrin by absorption spectra

	562 / 280 > 5.3	562 / 496 < 1.5	612 / 562 < 0.05
R-phycoerythrin(Sigma)	0.993	0.743	0.080
r-phycoerythrin(Sigma)	1.754	1.076	0.066
B-phycoerythrin(Sigma)	2.662	2.289	0.043
purified sample	2.850	1.254	0.018

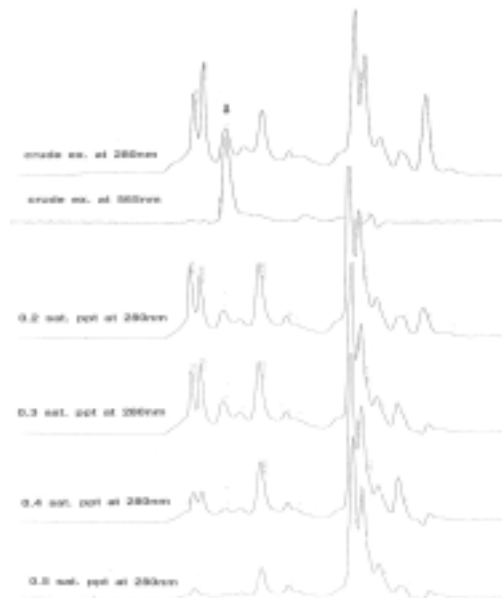


Fig. 1 HPLC pattern of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction

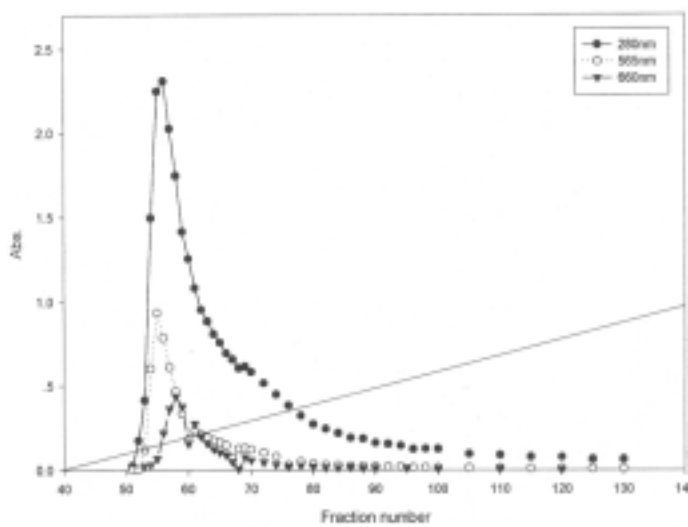


Fig. 2 DEAE-cellulose ion exchange chromatogram

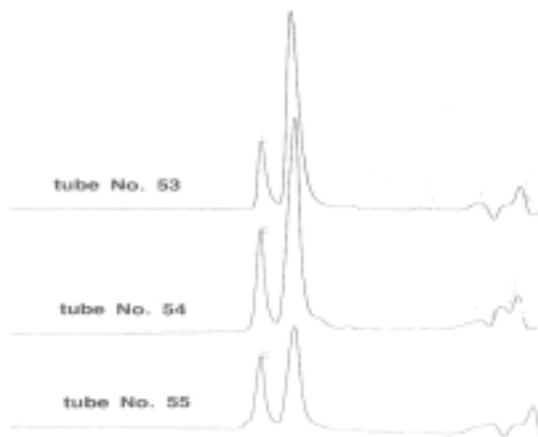


Fig. 3 HPLC pattern of each fraction from DEAE
-cellulose ion exchange chromatography

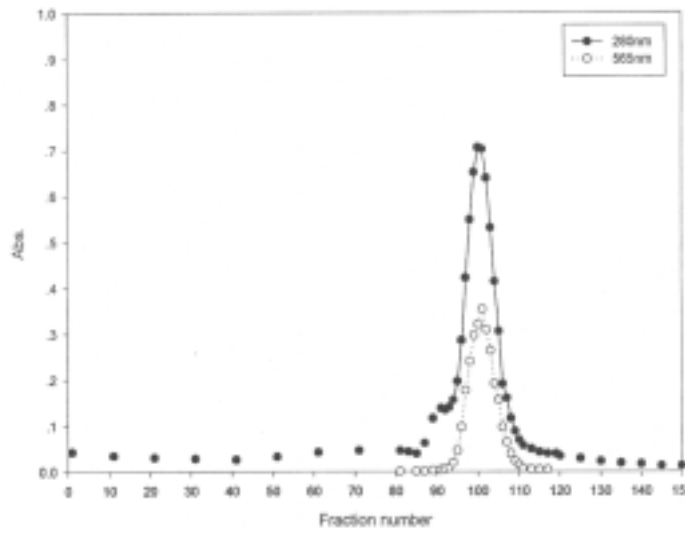


Fig. 4 Sephadex G-150 gelfiltration chromatogram

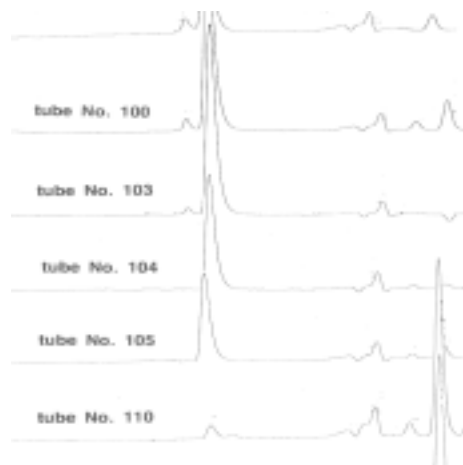


Fig. 5 HPLC pattern of each fraction from gelfiltration chromatography by Sephadex G-150

또한 정제 phycoerythrin의 순도검정을 위하여 UV/Visible scanning 한 결과는 Fig. 6에서와 같이 정제한 phycoerythrin은 표준품(Sigma)에 비하여 보다 전형적인 Phycoerythrin spectrum을 나타내었다.

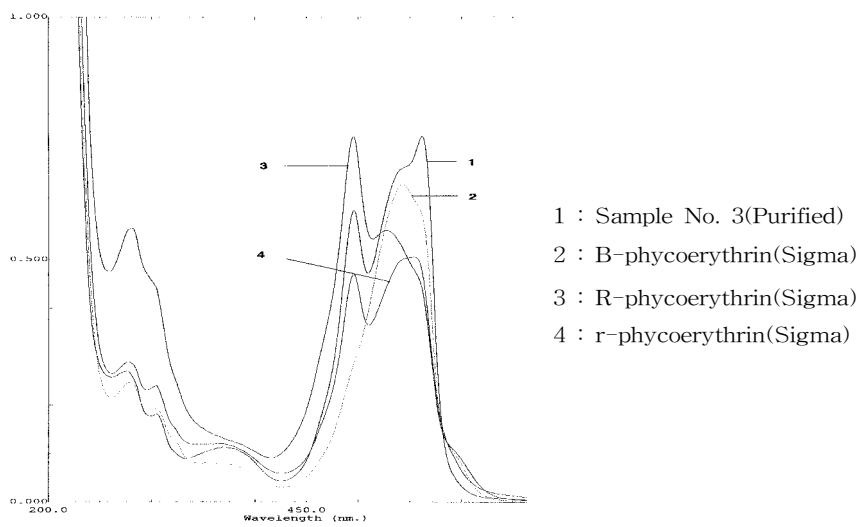


Fig. 6 Comparison of purified and standard phycoerythrin by Visible spectra

2. 전기영동

정제된 시료의 순수도를 측정하기 위하여 실시한 PAGE pattern은 Fig. 7에서와 같이 sample No. 1, No. 2는 약 150kDa에서의 main-band와 약 200kDa에서 희미한 band가 나타났다. 그러나 sample No. 3은 sample No. 1, No. 2에서 동일하게 나타난 150kDa에서 main-band만이 보이므로 No. 3이 가장 순수도가 높은 것으로 나타나 정제된 것으로 확인하였으며, 이를 다음 실험에 사용하였다.

한편 PAGE에서 단일밴드로 확인된 Sample No. 3의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 8에서와 같이 약 20kDa의 main-band를 보였으며, 40kDa 크기의 minor-band가 보인다. 이는 native gel에서 main-band로 보인 150kDa과 비교되며, 이 sample의 색소 단백질은 20kDa monomer 7~8개로 구성된 복합단백질로 판단된다.

3. DEAE-Cellulose와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin 대량생산

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 처리 후 ion exchange 및 gelfiltration chromatography 하여 생산하는 경우 시간과 인력이 많이 사용되고 공정 단계가 많아 대량생산에 상당한 문제점이 있다고 판단된다. 이에 공정을 단축하기 위하여 DEAE-Cellulose 처리 후 유기용매로 처리하여 생산한 결과 DEAE, I-P, II-P, III-P의 4가지 색택의 색소를 생산하였으며 Fig. 9 에서와 같이 몇 가지 색상으로 발현되었다. 본 색소는 색택이 양호하여 식품첨가물용 phycoerythrin으로의 사용이 가능하다고 판단되며, 이들로 Lip gloss를 제조하고 2°C의 암소에서 30일간 저장한 결과는 Fig. 10 에서와 같이 색택에 변화가 극히 미미한 것으로 나타나 저온에 저장할 경우 안정성이 있는 것으로 판단된다. 한편 적자색을 나타내는 색소 I-P에 3종의 금속이온(FeCl_3 , AlCl_3 , CuSO_4)을 $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ 이 되도록 처리한 결과 Fe^{3+} 의 경우 황색으로 변화하였으며 Al^{3+} 의 경우 탈색되었으며 Cu^{2+} 의 경우 청색을 나타내었다. $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 이 되도록 처리한 결과는 Fe^{3+} 의 경우 적색이 보다 선명해졌으나 Al^{3+} 의 경우 역시 탈색되었으며 Cu^{2+} 의 경우도 역시 청색을 나타내었으므로 Fig. 11 에서의 A, B, C 에서와 같은 색상의 변화도 기대할 수 있게 되었다. 이로 미루어 본 색소는 미량의 Fe^{3+} 을 가하면 적색도를 높일 수 있어 활용범위를 넓힐 수 있을 것으로 기대된다.

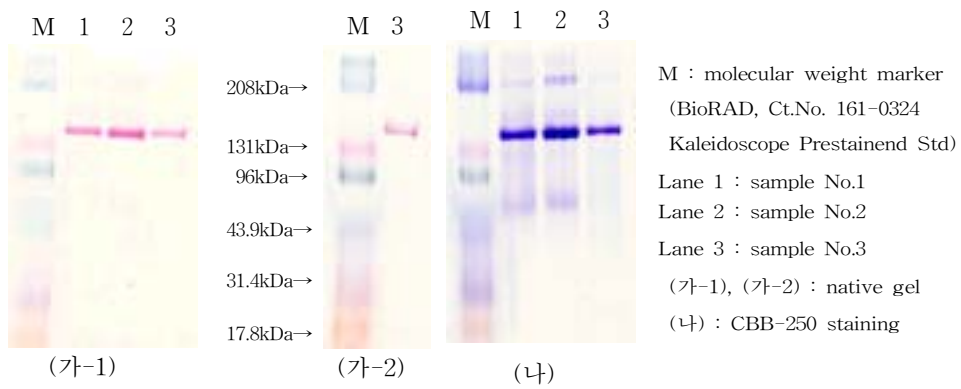


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern

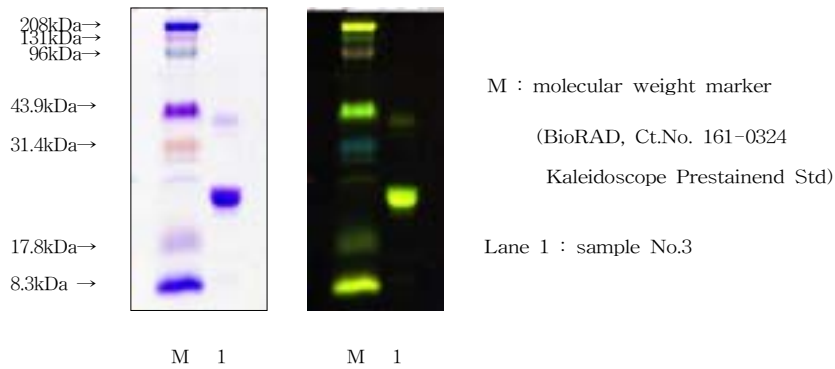


Fig. 8 SDS-PAGE pattern



Fig. 9 Color pattern of phycoerythrin from *Phorphyra*



Fig. 10 color pattern of lip gloss stored in the dark at 2°C

- * 0 day
 1 : DEAE fraction
 2 : DEAE with Ethanol fraction
 3 : DEAE with Acetone fraction
 4 : DEAE with Ethanol and Acetone fraction
- * after 30 day in the dark at 2°C
 5 : DEAE fraction
 6 : DEAE with Ethanol fraction
 7 : DEAE with Acetone fraction
 8 : DEAE with Ethanol and Acetone fraction

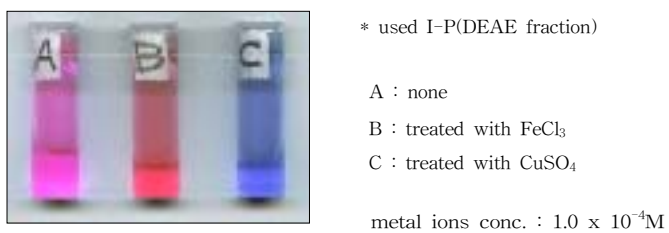


Fig. 11 Color pattern of phycoerythrin with some metal ions

4. Phycoerythrin의 안정성

가. 광선의 영향

광선에 대한 색소의 안정성은 Fig. 12에서와 같이 알루미늄호일에 의해서 광선이 차단된 경우 3일 97%, 6일 96.4%, 9일 경과 후 95.1%의 색소잔존율을 나타내었다. 유색셀로판 포장의 경우에도 적색 3일 95.8%, 6일 94.8%, 9일 경과 후 92.6%의 색소잔존율을, 녹색 3일 95.2%, 6일 93.9%, 9일 경과 후 91.7%의 색소잔존율을, 청색 3일 94.1%, 6일 93.5%, 9일 경과 후 90.4%의 색소잔존율을, 나타내었으며, 이때의 발현색은 형광을 발하는 양호한 적자색을 나타내었다. 한편 황색의 경우 3일 87.9%, 6일 76.9%, 9일 경과 후 55.1%의 낮은 색소잔존율을, 광선을 차단하지 않고 노출된 상태에서는 3일 84.4%, 6일 64.1%, 9일 경과 후 43.6%의 아주 낮은 색소 잔존율을 나타내어 황색포장은 효과가 미미함을 알 수 있었다.

이로 미루어 본 색소는 불투명 포장이나 적색, 청색, 녹색의 각종 광선차단용 포장을 병용할 경우 광선에 대한 안정성이 양호한 형광성 색소로서 색소안정화 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 상온에서는 색소의 변질이 진행되므로 filtration하여 측정하였지만 장기간의 측정은 하지 못하였으므로 본 색소는 저온을 유지 할 수 있는 경우에 보다 효과적으로 사용될 수 있으리라 판단된다.

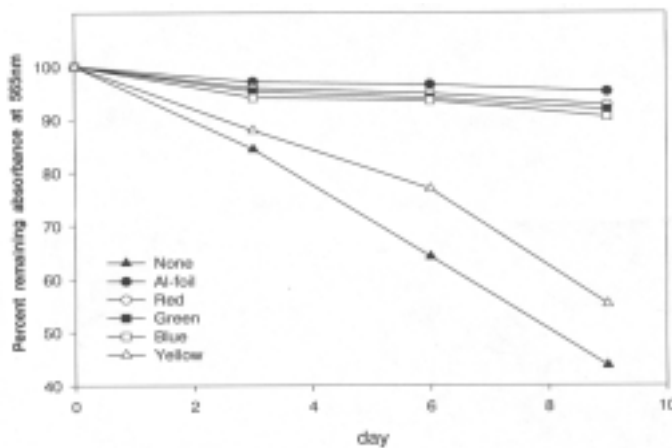


Fig. 12 Effect of Light on the stability of phycoerythrin under various filter conditions

나. 염(鹽)의 영향

4종의 염(鹽)이 색소에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 13 에서와 같이 비처리구의 경우 3일 99.2%, 9일 98.8%, 18일 97.9%, 30일 경과 후 97.2%의 색소잔존율을, NaCl을 첨가한 경우 3일 99.5%, 9일 98.8%, 18일 98.3%, 30일 경과 후 97.2%의 색소잔존율을, KCl을 첨가한 경우 3일 99.2%, 9일 98.8%, 18일 98.3%, 30일 경과 후 96.4%의 색소잔존율을, MgCl₂를 첨가한 경우 3일 98%, 9일 96.6%, 18일 95.7%, 30일 경과 후 93%의 색소잔존율을 나타내어 비처리구와 동일한 경향을 나타냈으므로 이들에 의해서는 영향을 받지않고 상당히 안정한 것으로 나타났다. 하지만 CaCl₂에 의해서는 상당한 영향을 받아 첨가 직후 84.4%로 색소잔존율이 감소하기 시작하여 3일 63.9%, 9일 53.2%, 18일 46.3%, 30일 경과 후 34.4%의 극히 낮은 색소잔존율을 보여 급격한 안정성 저하현상이 나타났음을 알 수 있었다.

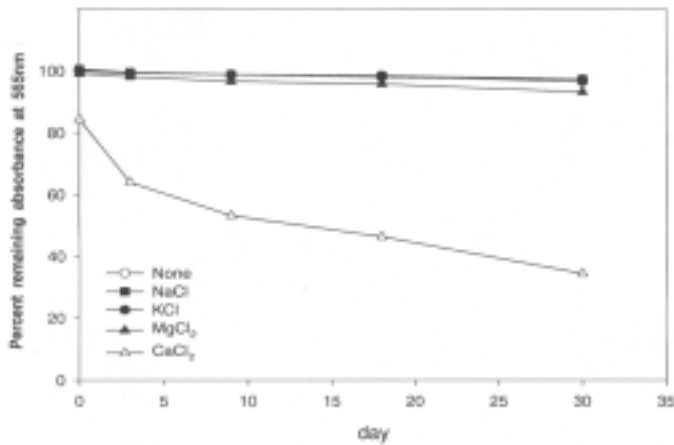


Fig. 13 Effect of salt on the stability of phycoerythrin prepared in the dark at 4°C

다. 당(糖)의 영향

4종의 당(糖)이 색소에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 14 에서와 같이 비처리구의 경우 3일 99.2%, 9일 98.8%, 18일 97.9%, 30일 경과 후 97.2%의 색소잔

존율을, glucose를 첨가한 경우 3일 99.7%, 9일 98.8%, 18일 98%, 30일 경과 후 97.3%의 색소잔존율을, fructose를 첨가한 경우 3일 99.4%, 9일 98.6%, 18일 98.2%, 30일 경과 후 97%의 색소잔존율을, sucrose를 첨가한 경우 3일 99.8%, 9일 99.2%, 18일 98.6%, 30일 경과 후 97.5%의 색소잔존율을, maltose를 첨가한 경우 3일 99.7%, 9일 98.8%, 18일 97.6%, 30일 경과 후 96.4%의 색소잔존율을 나타내어 이들에 의해서는 별다른 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다.

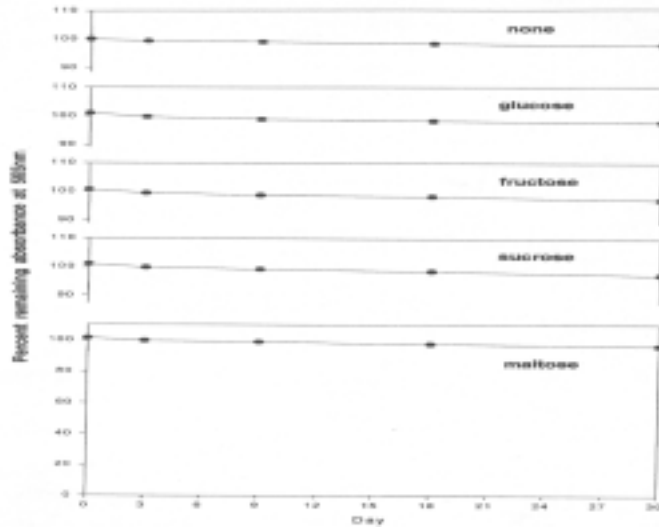


Fig. 14 Effect of sugar on the stability of phycoerythrin prepared in the dark at 4°C

라. Ethanol의 영향

Ethanol이 색소에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 15 에서와 같이 ethanol 농도 5%로 조정한 경우 3일 98.1%, 9일 98.6%, 18일 98.1%, 30일 경과 후 98.1%의 색소잔존율을, ethanol 농도 15%로 조정한 경우 3일 98.8%, 9일 98.7%, 18일 98.7%, 30일 경과 후 99%의 색소잔존율을, ethanol 농도 25%로 조정한 경우 3일 100%, 9일 99.8%, 18일 100%, 30일 경과 후 99.8%의 색소잔존율을, ethanol 농도 40%로 조정한 경우 3일 99.4%, 9일 99.3%, 18일 99.4%, 30

일 경과 후 99.3%의 색소잔존율을 나타내어 이들에 의해서는 별다른 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다. 즉, 40%의 농도까지는 미약하지만 색소의 농색화 현상이 발생하여 유사한 농도의 맥주, 청주, 소주 등에 적용한다면 형광을 나타내는 적색으로부터 핑크색까지의 선택이 양호한 새로운 주류 제조에 기여할 수 있을 것이다. 그러나 ethanol 농도 50%로 조정된 경우는 3일 95.6%, 9일 93.4%, 18일 85.5%, 30일 경과 후 74.2%의 색소잔존율로 점진적으로 감소하는 경향을 보여 alcohol 농도가 50% 부근인 장기간 숙성 위스키 등에는 적용이 곤란할 것으로 판단된다.

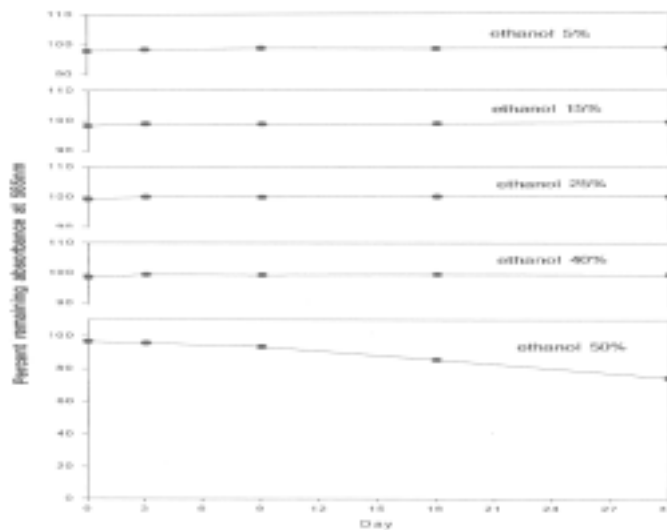


Fig. 15 Effect of ethanol on the stability of phycoerythrin prepared in the dark at 4°C

마. 유기산, alkali 및 pH의 영향

유기산 및 알칼리가 색소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 색소에 이들을 각각 1.0%의 농도가 되도록 첨가한 결과 Fig. 16 에서와 같이 UV/Visible spectrum을 통하여 대조구의 λ_{max} 가 565nm이고 이때의 흡광도값이 1.5311인 점과 비교할 때 Na-acetate, Na-tartrate, Na-acetate, NaHCO_3 모두 λ_{max} 가 565nm로 나타났고 흡광도값은 각각 1.4834, 1.5420, 1.5282, 1.4381로 나타나 안

정한 상태를 나타내었으며 형광성이 있는 적색을 나타내었다. 하지만 Na_2CO_3 를 1% 첨가한 경우는 즉시 탈색되었으며 0.1% 첨가 시 일부 색소의 잔존율이 나타났으나 형광이 소실되었다. 그러나 citric acid, tartaric acid, acetic acid, lactic acid의 조건에서는 λ_{max} 가 각각 557nm, 556nm, 559nm, 557nm로 천색 이동되었고 흡광도값도 각각 0.8046, 0.7876, 0.9499, 0.7680으로 저하되었으며 형광성이 크게 감소한 적청색이 되어 내산성이 약한 것을 알 수 있었으므로, 유기산이 함유된 식품에 적용하고자 할 경우 별도의 안정화 작업이 선행되어야 할 것으로 판단된다.

한편 pH에 따른 색소의 변화는 Fig. 17 에서와 같이 pH 4~10 까지는 λ_{max} 가 565nm에서 변하지 않고 적색을 유지하고 있으나 pH 3의 경우는 λ_{max} 가 560nm로 천색이동되고 색상도 일부 저하되어 적자색을 나타내었다.

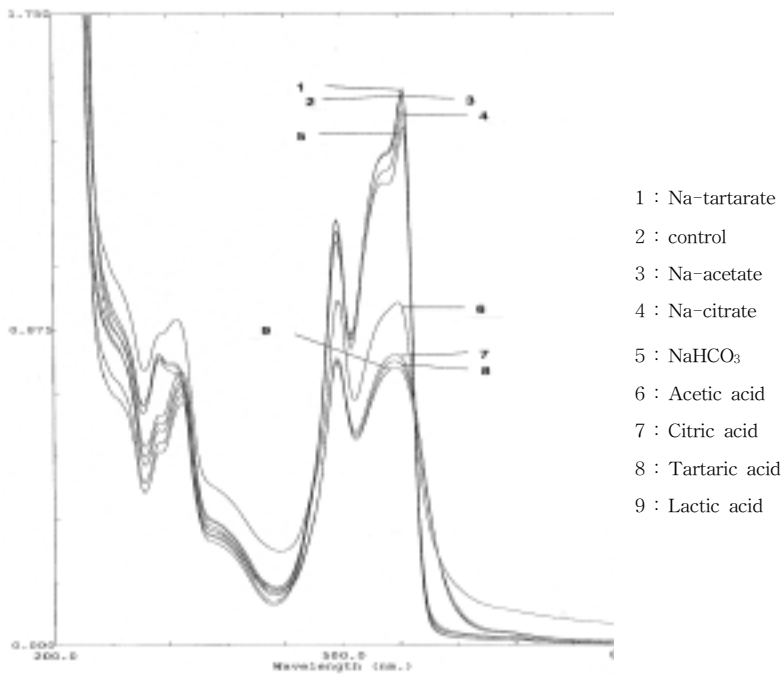


Fig. 16 UV/Vis spectra of phycoerythrin on the acids and alkalis

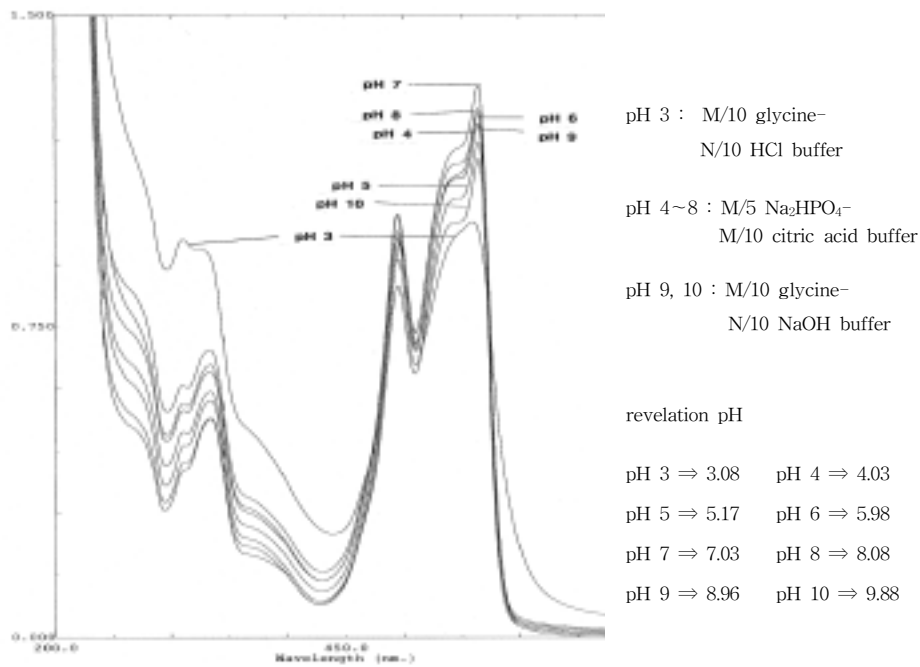


Fig. 17 UV/Vis spectra of phycoerythrin at different pH

5. (NH₄)₂SO₄와 유기용매를 이용한 Phycoerythrin의 대량생산

DEAE cellulose를 사용할 경우의 경제적 부담을 감소시키기 위하여 (NH₄)₂SO₄를 사용하여 색소를 대규모로 침전시켜 생산할 경우 공정단축과 순도를 높일 수 있을 것으로 판단하여 (NH₄)₂SO₄ 처리 후 유기용매로 처리하여 생산한 결과 Z-1, Z-2, Z-3의 3가지 색택의 색소를 생산하였다. 이들은 공정에 따라 Fig. 18 에서와 같은 색상으로 발현되었으며 그 색택은 식품첨가물급 phycoerythrin으로의 사용이 가능하다고 판단되며, 이들을 H 화장품 회사로부터 입수한 skin lotion base에 0.005%를 첨가하여 적색 skin lotion을 제조하고 2°C 암소에서 30일간 저장한 결과 Fig. 18 에서와 같이 색택 변화가 미미하므로 저온 저장할 경우 안정성이 있는 것으로 판단된다.

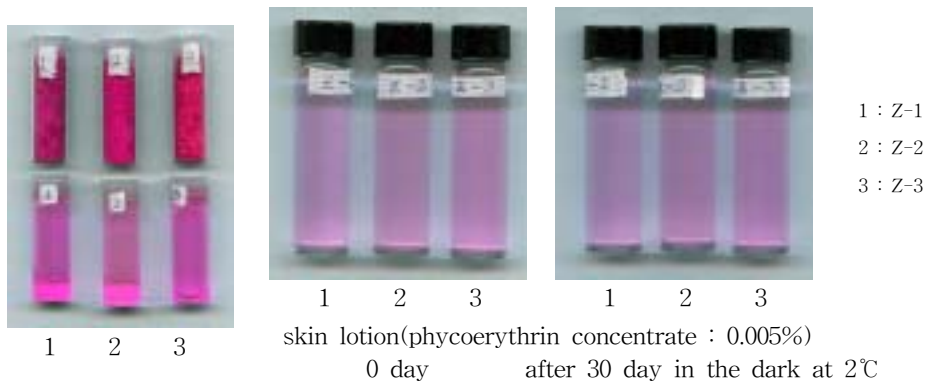


Fig. 18 Color pattern of phycoerythrin Z-1, Z-2, Z-3 and skin lotion made by Z-1, Z-2, Z-3

6. DEAE cellulose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하지 않는 새로운 방법에 의한 양질의 식품 첨가물용 Phycoerythrin의 대량생산

가. Phycoerythrin 생산(R-1, R-2, R-3)

생산된 색소의 가시광선 흡수특성, Hunter value, 형광도 및 수율을 측정한 결과 Table 2 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었으며 R-2가 적색도와 형광도가 높아 가장 양호한 상태를 나타내었다. 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위한 전기영동 결과와 선택은 Fig. 19 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인 Phycoerythrin임을 확인하였다. 한편 이들 색소의 선택은 분체 및 액체 모두 양호한 적색을 나타내어 식품첨가물로서의 가치가 입증되었다고 판단된다.

Table 2 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	Hunter value			Fluorescence intensity	yields (%)
		a	b	L		
R-1	564.0, 496.5, 370.0	87.16	-35.18	56.02	39.36	0.78
R-2	564.5, 496.5, 372.0	91.74	-33.61	53.65	49.55	0.73
R-3	564.5, 496.5, 366.0	83.64	-32.06	54.95	37.24	0.68

나. Phycoerythrin 생산(2R-1, 2R-2, OR)

생산된 색소의 가시광선 흡수특성, Hunter value, 형광도 및 수율을 측정한 결과 Table 3 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었으며 2R-1이 적색도와 형광도가 높아 가장 양호한 상태를 나타내었다. 이는 95% Ethanol로 색소부분을 분리한 후 99% Acetone으로 추출하는 동일한 방법을 사용한 것으로 이 방법이 양질의 색소를 획득하는 방법이라고 판단된다. 한편 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위한 전기영동 결과와 선택은 Fig. 20 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인 Phycoerythrin임을 확인하였다. 또한 이들 색소의 선택은 분체 및 액체 모두 양호한 적색을 나타내어 식품첨가물로서의 가치가 입증되었다고 판단된다. 또한 수율을 증대시키기 위하여 세포벽 분해를 시도하였으나 시간만 더 소요될 뿐 별다른 차이가 발생하지 않아 마쇄하여 추출하는 것이 유리한 것으로 판단된다.

Table 3 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	Hunter value			Fluorescence intensity	yields (%)
		a	b	L		
2R-1	565.0, 496.5, 371.5	90.48	-30.62	53.64	54.47	0.76
2R-2	564.0, 496.5, 371.0	88.30	-29.89	52.45	46.70	0.75
OR	562.0, 496.5, 306.0	80.30	-20.32	48.73	31.07	0.78

다. 유기용매에 의한 Phycoerythrin 생산(AC, MT, ET)

생산된 색소의 가시광선 흡수특성, Hunter value, 형광도 및 수율을 측정한 결과 Table 4 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었으며 AC가 적색도와 형광도가 높아 가장 양호한 상태를 나타내었으나 ET와 MT도 양호하였다. 하지만 MT는 99% Methanol을 사용하는 것이므로 생약 추출의 경우 추출수율을 높이기 위하여 허용범위 이내에서 허가되고 있지만 본 색소는 식품첨가물로 사용할 경우이고 색상 및 수율에서도 차이가 미미하므로 잔류 Methanol에 의한 문제점이 제기와 건강을 위하여 사용하지 않는 것이 좋겠다고 판단된다. 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위한 전기영동 결과와 선택은 Fig. 21 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인

Phycoerythrin임을 확인하였다. 한편 이들 색소의 색택은 분체 및 액체 모두 양호한 적색을 나타내어 식품첨가물로서의 가치가 입증되었다고 판단된다.

Table 4 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	Hunter value			Fluorescence intensity	yields (%)
		a	b	L		
AC	565.0, 496.0, 372.0, 305.5, 278.5	90.79	-22.97	51.71	55.08	0.86
MT	565.0, 496.5, 371.5, 305.5, 278.0	89.82	-28.85	53.36	55.19	0.83
ET	565.0, 545.5, 496.0, 377.0, 305.5, 277.0	89.84	-27.31	52.88	55.33	0.81

다. 유기용매 절약을 위한 분무건조에 의한 Phycoerythrin 생산(SD, NSD)

색소생산을 위하여 다량 소요되는 유기용매의 절감을 위하여 분무건조한 시료로부터 생산한 색소와 건조하지 않은 색소액으로부터 생산한 색소의 가시광선 흡수특성, Hunter value, 형광도 및 수율을 측정하여 Table 5 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었다. 하지만 분무건조하지 않은 경우 a값 92.59, 형광도 55.18로서 양호한 적색을 나타내었으나 분무건조한 경우 a값 27.47, 형광도 6.95로 나타났으며 565nm와 496nm에서의 흡광도값도 상당히 낮아 색소단백질이 변성되어 제거된 것으로 판단된다. 따라서 분무건조를 할 경우 열에 의한 손상으로 색택이 불량해지고 갈색물질이 생성되어 추가로 용매세척을 해야하는 문제점이 나타나 적색색소로 사용하기에는 부적절한 것으로 판단된다. 그러므로 유기용매를 절약하기 위해서는 탈염 후 진공농축이나 UF system을 활용하여 탈염과 농축을 동시에 실시하면 효과적일 것이라 판단된다. 하지만 UF system의 경우 일반system은 처리시 hollow fiber이나 membrane이 막히는 경우가 자주 발생하므로 Vibration system이 부착되어야 할 것으로 판단된다. 한편 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위한 전기영동 결과와 색택은 Fig. 22 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인 Phycoerythrin임을 확인하였다. 한편 이들 색소의 색택은 분무건조 하지 않은 경우 양호한 색택을 나타내었으나 분무건조한 경우 색택이 불량한 것으로 나타났다.

Table 5 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	Hunter value			Fluorescence intensity	yields (%)
		a	b	L		
NSD	565.5, 545.0, 496.5, 366.0, 334.5, 311.0, 276.5	92.59	-31.34	54.13	55.18	0.76
SD	565.0, 543.5, 495.5, 332.5	27.47	-11.77	81.46	6.95	1.29

7. 정제 Phycoerythrin의 대량 생산

생산된 색소의 가시광선 흡수특성 및 수율을 측정한 결과 Table 6 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었으며 B-3과 B-4가 566nm/280nm 값이 각각 3.110, 3.2082로 나타나 단백질 대비 색도가 높은 것으로 나타났으며, 620nm/566nm 값은 B-2와 B-3에서 각각 0.1335, 0.1126으로 나타나 양호한 정제상태를 나타내었다. 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위하여 20 μ g을 loading한 전기영동 결과 Fig. 23 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인 Phycoerythrin임을 확인하였으며, 분자량은 약 100kDa으로 나타났다. 이는 충남 광천산으로 정제했을 경우의 150kDa과 차이가 나는 것으로서 B group의 경우 전남 압해도산임을 감안할 때 산지의 차이에 기인한 것으로 판단된다. B-2와 B-3의 경우 단일 band가 나타나 순도가 높은 것으로 판단되었다. 이에 정제여부를 재확인하기 위하여 B-2와 B-3를 각각 50 μ g을 loading한 전기영동 결과 Fig. 24 에서와 같이 단일 band가 나타났다. 한편 이들 B group의 색택은 Fig. 25 에서와 같이 양호한 적색을 나타내었다. 또한 HPLC로 분석하여 정제여부를 확인한 결과 Fig. 27, 28 에서와 같이 565nm와 280nm에서 측정한 결과 정제된 것을 알 수 있었으며 B-2 280nm의 경우 후반부에 나타나는 peak는 비단백질로서 차후 용이하게 제거될 수 있다고 판단된다. 또한 흡수스펙트럼에 의한 값을 비교한 결과는 Table 6 에서와 같이 순도가 양호한 것을 알 수 있었다.

Table 6 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	566/280	566/495	620/566	yields (%)
		> 5.3	< 1.5	< 0.05	
B-1	565.5, 546.0, 496.5, 331.5	0.9851	1.1490	0.0341	0.10
B-2	564.5, 496.5, 402.5, 333.5	1.7985	1.3421	0.0083	0.68
B-3	565.5, 496.0, 334.5, 278.0	3.1110	1.3990	0.0046	0.38
B-4	564.5, 496.0, 334.5, 279.0	3.2082	1.2053	0.0126	0.14
B-5	565.5, 496.0, 334.0, 274.0	0.5241	1.1814	0.0685	0.35

8. 저온처리에 의한 양질의 식품첨가물급 및 정제 Phycoerythrin의 대량 생산

보다 공정이 단순하며 99% Acetone을 사용하지 않고 95% Ethanol만을 사용하여 다량 소요되는 용매의 절감효과 및 99% Acetone의 폭발 및 gas 흡입에 따른 위험성을 회피하고 양질의 색소생산과 부산물을 활용한 정제색소를 생산하여 경제성과 안전성을 제고하고자 -70℃의 저온에 의한 색소단백질 냉동변성에 의한 생산을 시도하였다. 이에 따라 생산된 색소의 가시광선 흡수특성, Hunter value, 형광도 및 수율을 측정된 결과 Table 7 에서와 같이 전형적인 Phycoerythrin 가시광선 흡수특성을 나타내었으며 -70P의 경우 a값 91.46, 형광도 54.63으로 양호한 적색을 나타내었으나 -70S의 경우 a값 35.32, 형광도 13.65로 적색도가 낮게 나타났다. 이들의 색소단백질 여부를 알아보기 위한 전기영동결과와 선택은 Fig. 26 에서와 같이 색소부분과 단백질 부분이 동일하게 나타나 색소단백질인 Phycoerythrin임을 확인하였으며, -70S의 경우 단일 band가 나타나 순도가 높은 것으로 판단된다. 이에 정제여부를 확인하기 위하여 흡수 스펙트럼에 의한 값을 비교한 결과는 Table 7 에서와 같이 -70P가 566/280 값이 3.6566, 620/566 값이 0.0041로 양호한 정제상태를 나타내었다. 그러나 -70S는 566/280 값이 0.6973으로 단백질 대비 색도가 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 HPLC로 분석한 결과 Fig. 29 에서와 같이 565nm와 280nm에서 측정된 결과 정제된 것을 알 수 있었으며 280nm의 경우 후반부에 나타나는 peak는 비단백질로서 차후 용이하게 제거될 수 있다고 판단된다. 한편 이들 색소의 선택은 -70P의 경우 분체 및 액체 모두 양호한 적색을 나타내어 식품첨가물로서의 가치가 입증되었다고 판단된다. 하지만 -70S의 경우 단백질량에 비하여 색소량이 부족(566nm/280nm = 0.6973)한 것으로 나타나 적색도가 낮으므로 색소로 활용

하기는 곤란하겠지만 정제색소로 활용한다면 양질의 식품첨가물용 색소와 고가의 정제색소를 저렴한 가격으로 다량 생산 할 수 있다고 판단된다.

Table 7 Spectral characteristics, Hunter values, Fluorescence intensity and yields

Sample	maximum absorption wavelength(nm)	566/280	566/495	620/566	Hunter value			Fluorescence intensity	yields (%)
		> 5.3	< 1.5	< 0.05	a	b	L		
-70P	565.5, 545.5, 496.5, 335.0, 309.0, 278.5	3.6566	1.4202	0.0041	91.46	-19.30	50.06	54.63	0.62
-70S	565.5, 545.0, 496.0, 333.0	0.6973	1.2594	0.0232	35.32	-16.06	78.08	13.65	0.98

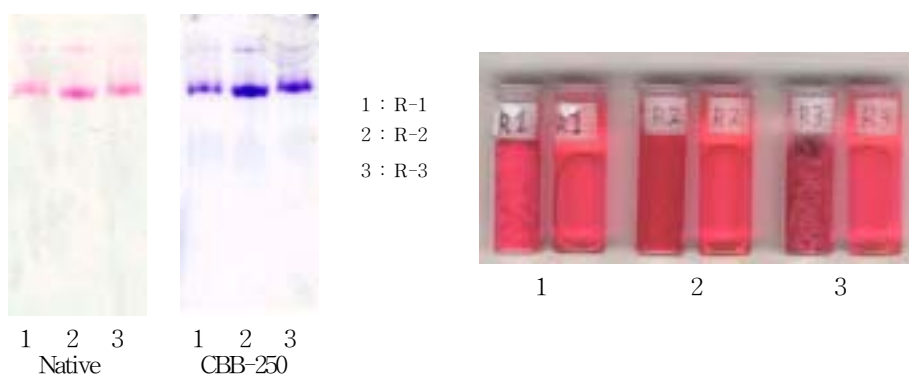


Fig. 19 Electrophoresis and color pattern of R group

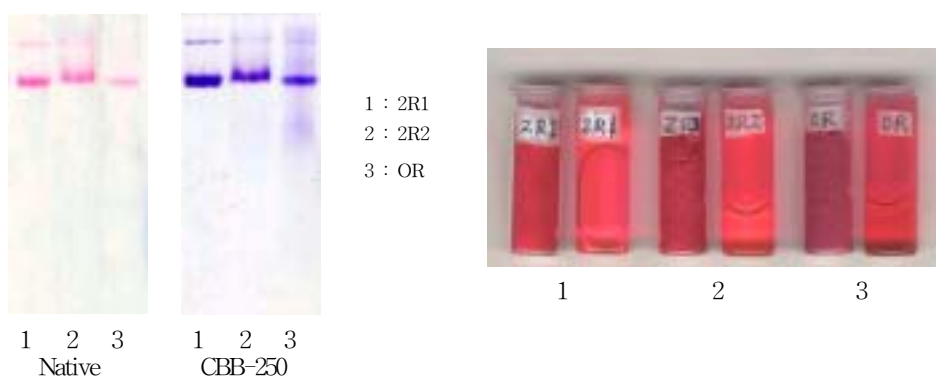


Fig. 20 Electrophoresis and color pattern of 2R group

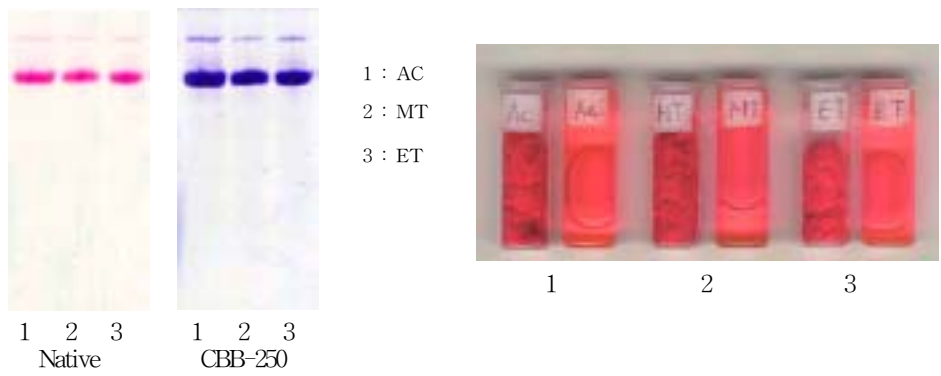


Fig. 21 Electrophoresis and color pattern of Organic solvent group

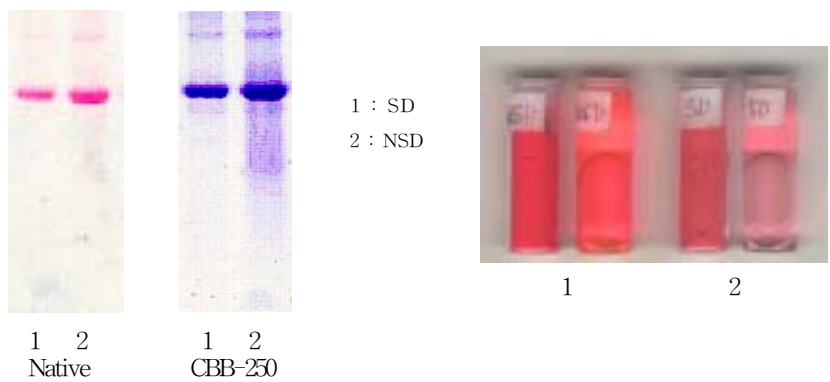


Fig. 22 Electrophoresis and color pattern of SD group

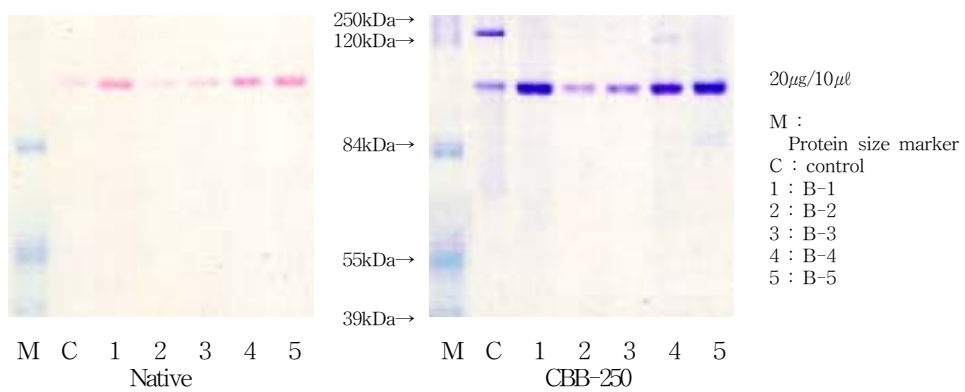


Fig. 23 Electrophoresis pattern of B group

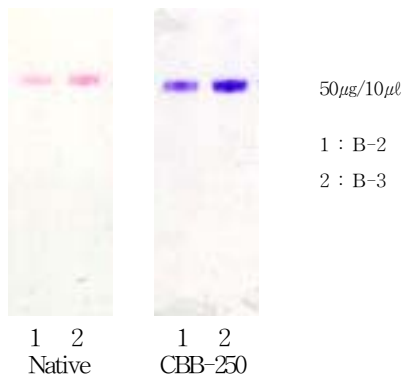


Fig. 24 Electrophoresis pattern of B-2, B-3

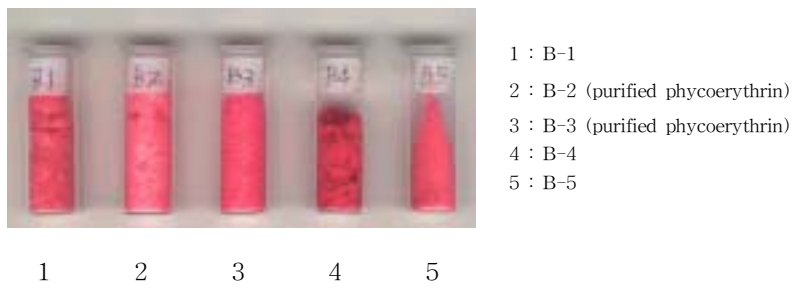


Fig. 25 Color pattern of B group

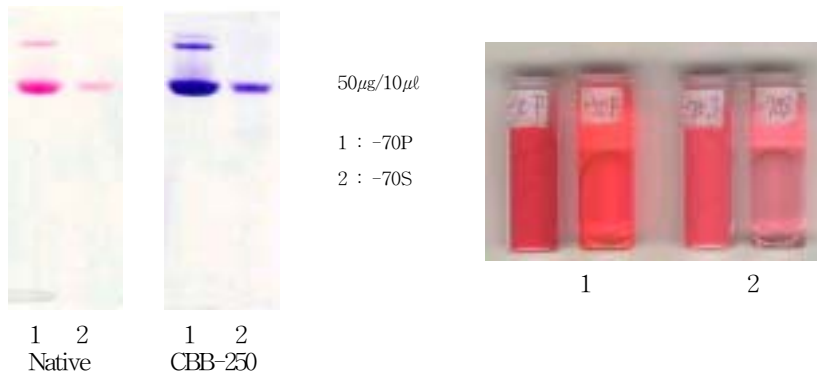
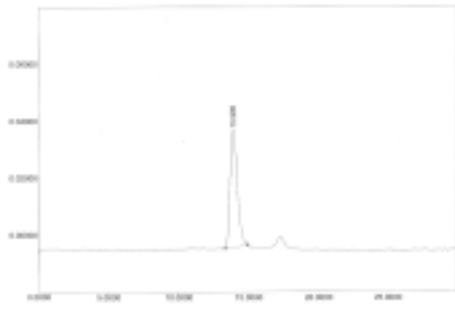
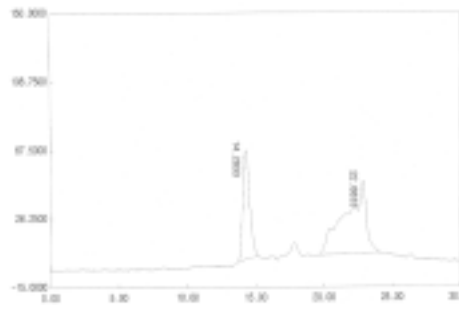


Fig. 26 Electrophoresis and color pattern of -70 group

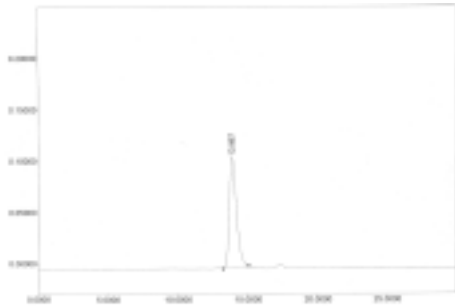


at 565nm

Fig. 27 HPLC pattern of B-2

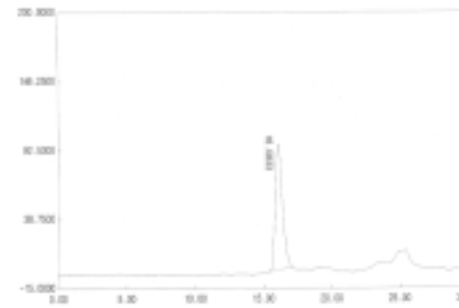


at 280nm

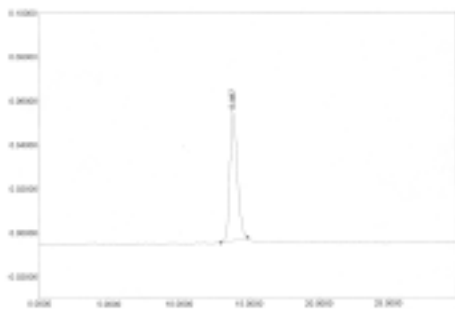


at 565nm

Fig. 28 HPLC pattern of B-3

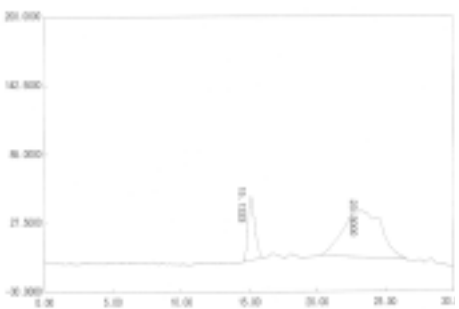


at 280nm



at 565nm

Fig. 29 HPLC pattern of -70S



at 280nm

9. Microencapsulation

색소 2R-1과 2R-2를 내산성이 강한 HPMCP-55로 coating한 색소는 Fig. 30에서와 같이 본래의 색소보다 색도가 저하되었다. 이는 coating 시 사용한 분무건조기가 건조탑의 길이가 짧아 고온으로 처리하게되는 과정에서 열에 노출되어 색도가 저하된 것으로 판단된다. 이를 해결하기 위해서는 분무건조탑의 길이가 길어서 저온에서 건조가 이루어질 수 있는 설비가 필요하다 하겠다. 이는 처리과정에서 Ethanol과 Acetone을 사용하므로 저온에서도 용이하게 휘발하게 되므로 가능하리라 판단된다. 한편 다른 문제점으로는 현재까지 알려진 다수의 coating제 자체의 불투명성에 의한 문제점이라 하겠으며 피막 두께 조절에 의하여 일부 투명성을 증가시킬 수 있으나 안정성에 문제가 제기되어 곤란한 실정이다. 하지만 추후 투명성이 우수한 새로운 coating제가 개발·생산된다면 용이하게 적용할 수 있을 것이다.



- 1 : none microencapsulated phycoerythrin 2R-1
- 2 : microencapsulated phycoerythrin 2R-1
- 3 : none microencapsulated phycoerythrin 2R-2
- 4 : microencapsulated phycoerythrin 2R-2

Fig. 30 Color pattern of none microencapsulated and microencapsulated phycoerythrin

10. 색소생산의 산업화

가. 원료수급문제에서 김(海苔)은 12월부터 익년 3월까지만 한정 생산되므로 원료의 장기보관이 필수적이라 하겠다. 현재 김은 건조되어 장기저장되고 있으나 건조과정에서 색소 일부의 색도가 저하되므로 양질의 색소를 얻기 위해서는 냉동보관이 고려될 수 있다. 하지만 냉동보관의 경우 냉동 후 보관비용이 부담스럽게 될 수 있으므로 산지에서 청수(淸水)로 세척 후 동결건조하는 방법이 고려될 수 있겠다. 이는 건조에 의하여 중량과 부피가 감소하므로 운송비용 및 보관비용의 절약을 기대할 수 있으며 장기보관 중의 변질 방지도 가능하므로 최선의 방법이라 하겠다.

나. 본 방법은 유기용매를 사용하여 색소를 생산하므로 고가인 유기용매가 다량 소요되어 경제성이 나빠질 수 있으므로 용매의 질감을 위하여 사전에 조색소액의 농축이 필요하다. 이를 위해서는 membrane 이용법(UF), 건조법(분무, 동결), 진공농축 등이 필요하다. 하지만 건조법과 진공농축은 에너지비용이 부담스럽기 때문에 Hollow fiber type 등의 membrane을 이용하는 농축시설이 경제적인 것이다. 그러나 membrane 이용법은 사용 중 membrane 또는 fiber에 농축물이 부착되어 효율성이 상당히 저하되기도 하므로 Vibration system의 부착이 필요하다고 판단된다.

다. 용매처리 후 폐기대상인 유기용매의 재활용시설이 필요하다. 고가인 유기용매는 폐기 시 경제적인 손실이 클 뿐만 아니라 환경오염도 고려되어야 하기 때문이다.

한편 microencapsulation 할 경우에도 유기용매를 사용하며 건조시키므로 이의 회수도 필요하다 하겠다. 그러나 유기용매의 회수와 건조 시 누출에 의한 화재와 폭발의 위험성도 고려가 되어야 하므로 방폭시설이 갖추어져야 하겠다.

라. waring blender로 마쇄 시 공기가 다량 함유되어 색소의 산화가 우려되고 마쇄과정에서 발열이 되므로 색소단백질의 변성이 우려되었다. 따라서 저온이 유지되는 마쇄기가 필요하며 탈기장치가 부착되어 탈기상태가 유지되면 보다 높은 수율과 색소의 양질화를 기대할 수 있겠다.

마. 색소의 추출 시 지속적 교반이 필요하며 하절기 교반 중의 변질을 방지하기 위하여 저온유지 시스템의 부착이 필요하다 하겠다.

바. 추출액의 원심분리에 상당한 시간이 소요되므로 연속식 원심분리기의 설치가 필요하나 고가이므로 압착기(filter press, decantor 등)의 사용이 필요하다 하겠다.

■ 김은 년 평균 190,000M/T(통계청 자료)으로 과량 생산되며 수산물 정부비축 사업에서 막대한 예산이 소요(('99년 758M/T, 131.6억원), ('00년 800M/T, 131.4억원), ('01년 810M/T, 132.4억원)되고 있어 이를 해소해야 할 필요성이 제기되고 있으므로 이를 활용하여 대량생산한다면 경쟁력은 충분하다고 판단된다.

- 김(海苔)으로부터 추출한 Phycoerythrin의 산업화에 따른 가격경쟁력 및 부가가치는 다음과 같다. (인건비, 시설비 및 감가상각비 제외)
 - 식품첨가물급 Phycoerythrin의 생산량 = 6.8gr/물김 1kg
 - 시약급 Phycoerythrin의 생산량 = 95mg/물김 1kg
 - 식품첨가물급 및 시약급 Phycoerythrin의 생산비 총계 = 110,000원/물김 1kg
 - 대량생산 시약급(정제) Phycoerythrin의 생산비 = US\$ 1/mg. (1,120원/mg)
 - ◎ Phycoerythrin(시약)은 현재 US\$ 100/mg(SIGMA Co.)의 고가로 판매 중

- 이같이 확립된 생산기술을 활용하면 재조합균주로부터의 phycoerythrin 생산에 언제라도 적용이 가능할 것이다.
- Ethanol 처리 후 얻은 Acetone 침전을 투석하면 청자색 침전이 발생하며 이를 색소로 활용하는 방안도 검토할 필요가 있다.
- 추출잔사는 다당류를 추출하거나 다당류 추출 전·후 사료화를 시도하면 사료 판매액과 폐기물 처리비용 절감에 의한 부수적 이익도 기대할 수 있겠다.

*E. coli*에서의 재조합 phycoerythrin 생산(성균관대학교)

1 절 재료 및 방법

1. Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 분리 및 염기서열 분석

가. Isolation of genomic DNA from Rodophyta

준비된 rodophyta sample을 급속냉동하여 High-speed tube에 2 x CTAB buffer 15ml와 PVPP 약 1.5g을 넣어서 60°C water bath에 1hr동안 incubation 하였다. Chloroform/isoamylalcohol을 15ml 첨가한 후 12,000g 20분 동안 원심분리하여 상층액을 isopropyl alcohol을 2/3 volume을 첨가한 후 precipitated DNA를 hooking out하여 5,000g 20분 동안 centrifugation하여 TE buffer을 넣어서 dissolve시킨 후 RNase A를 3 μ l를 첨가하였으며 3번의 phenol과 chloroform을 처리과정을 통하여 다시 1volume의 alcohol과 1/10volume의 NaOAc로 precipitated DNA를 얻을 수 있었다.

나. Isolation of total RNA from Rodophyta

4가지의 species인 rodophyta를 급속 냉동한 후 곱게 갈아 미세한 분말이 되도록 하였다. 여기에 2ml의 extratction buffer(8M LiCl, 2% β -mercaptoethanol)를 첨가하여 voltexing을 하여 overnignt incubation을 한후 13,000g 20분 동안 원심분리하였다. SPNT는 버리고 pellet을 solubilization buffer (0.5% SDS, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 2% β -mercaptoethanol)에 dissolve 시킨 후 동량의 volum으로 phenol을 첨가한후 voltexing을 하여 13,000g 20분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻은 후 3M sodium acetate와 1.5volum의 ethanol을 첨가하여 cyanobacteria로부터 total RNA를 분리하였다.

다. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR 및 염기서열분석

Primer는 현재 보고되어있는 rodophyta에서 전체 염기서열이 밝혀진 것을 근거로 하여 phycoerythrin gene의 일부를 포함한 주변 부위가 증폭되도록 하여 detection 할 수 있도록 제작하였다.

RT-PCR은 각각의 total RNA, primer, reverse transcriptase buffer, dNTP, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase를 첨가하여 37°C에서

1시간 동안 reverse transcription 을 수행하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 primer, Taq buffer, dNTP, 그리고 Taq polymerase를 첨가하였다. 94°C 1분, 58°C 1분 30초, 72°C 1분 조건으로 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 이렇게 분리한 PCR product는 promega의 pGEM T easy vector system을 사용하여 cloning하였고 perkin elmer의 자동염기서열 분석장치를 사용하여 그 염기서열들을 분석하였다.

2. Natural Phorphyrin의 재조합 phycoerythrin의 발현

가. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 변형하여 수행하였다(Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid DNA를 가지고 있는 균주를 ampicillin이 포함된 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양시킨 후 균체를 회수한 다음, lysis buffer 100 μ l 에 현탁하여 실온에 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 N NaOH/1% SDS 용액 200 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 후, 3 M potassium acetate 용액 150 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 모아 동량의 TE 포화 phenol과 chloroform/isoamylalcohol (24:1)로 추출하였다. 이를 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에 5분간 방치한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 DNase free RNase를 포함한 TE buffer에 녹여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 3/5배의 20% PEG 6000/2.5 M NaCl 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후 얼음에 1시간 이상 방치하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, DNA 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 사용하였다.

나. Phycoerythrin 유전자의 증폭

1차 년도에 홍조류(Rhodophyta)인 김(porphyrin)으로부터 확보하여 pGEMT-easy vector에 cloning 된 1.1kb size의 phycoerythrin를 주형으로 해서 이 유전자의 염기 서열을 바탕으로 제작된 primer들을 이용하여 PCR을 수행하였다. Primer들은 각 subunit 유전자의 coding 영역 양쪽 끝에 annealing하여, PCR 산물이 coding 영역 내에 존재하지 않는 제한효소 절단 부위를 양쪽 끝에 갖게 하도록 제작되었다. PCR은 94°C에서의 denaturation 1분, 58°C에서의 annealing 50초, 그리고 72°C에서의 polymerization 1분의 3단계 과정을 30회 반복하여 수행하였다.

다. 발현 vector의 construction 및 형질 전환

위와 같이 증폭된 PCR 산물을 적절한 제한효소로 절단한 후, 저용점 agarose gel에 전기 영동하여 단편을 분리하였다. 이렇게 분리한 단편을 동일한 절단 및 분리 과정을 수행한 T7 promoter를 가지는 발현 vector pET22b, pET28b와 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation시킨 후, ligase를 이용하여 *E. coli*에 Electroporation 방법으로 형질 전환시켰다. 이렇게 해서 얻은 colony들을 다시 배양하여 plasmid DNA를 분리한 다음, 제한 효소 절단을 통해 재조합 plasmid를 가지고 있는 형질 전환체를 선별하였다.

라. 재조합 Phycoerythrin의 발현

준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 적절한 항생제가 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가한 후, 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하도록 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

마. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Transformation 시킨 *E. coli*에서 total protein을 확인하기 위하여 10% polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. *E. coli*의 전체 단백질을 Laemmli 방법을 기초로 한 SDS-PAGE를 이용하여 분자량에 따라 분리하였다 (Laemmli,1970). 먼저 분리된 *E. coli*의 전체 단백질 25 μ l에 sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% bromophenol blue) 5 μ l를 첨가한 다음 100°C에서 5분간 끓여주고 난 후, aggregation을 막기 위해 9,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 6% Polyacrylamide gel 의 well 당 25 μ l의 시료를 적하한 다음, 30 mA의 전원을 공급하여 분리하였다.

Coomassie blue 염색법으로 염색하여 발현 양상을 확인하였다.

3. Natural Phorphyra phycoerythrin 및 Recombinant phycoerythrin subunit의 항체 생산

가. 항원 추출 및 Immunization

각각의 단백질에 대한 면역 항혈청을 생산하기 위하여, 15% SDS-PAGE를 사용하여 분획한 purified Natural phycoerythrin 및 putative linker protein과 recombinant phycoerythrin subunit α, β 단백질을 gel로부터 잘라내어 1X PBS로 5번 washing한 후 잘 파쇄하였고, 다시 초음파 분쇄방법을 통해 아크릴아마이드 겔로부터 추출하였다. 이렇게 분리 준비된 각각의 단백질을 항원으로 하여 실험동물(쥐 : *balb/c*) 면역을 4차에 걸쳐 10일 단위로 실시하였다. 면역 실시 전에, 면역 전 혈청(pre-immune serum)을 확보하기 위하여 실험동물의 꼬리에서 100 μ l를 채혈하였다. 1차, 2차, 3차 면역에서는 분리한 겔 extract만을 실험동물의 복부에 복강 주사하였으며, 4차 면역에서는 1×10^6 의 암세포인 sarcoma cell 과 함께 겔 extract를 잘 혼합한 후, 복강 주사하였다. 4차 면역 주사 후 10일이 지난 후에 항혈청을 분리하기 위하여 5 ml의 복수를 추출한 후, 대장팩으로부터 1 ml의 혈액을 채혈하여 4°C에서 하루 보관한 후, 원심분리(1,000 \times g, 상온, 10분)하여 상층액인 항혈청(antiserum)을 분리하였다.

나. 면역 항혈청의 특이성 및 역가 측정 (Western blot analysis)

각각의 항원 단백질에 대한 다클론 항체의 특이성을 조사하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. 먼저 10 μ g의 항원 단백질을 추출하여 15% SDS-PAGE를 사용하여 분획한 후, semidry electroblotting 방법을 사용하여 니트로 셀룰로즈 membrane에 transfer하였다. 실온에서 0.05% Tween 20, 5% BSA가 들어있는 PBS buffer로 overnight blocking을 실시하였으며, 각 항원 단백질에 대한 다클론 항체를 1 : 2500 배율로 첨가하여 실온에서 2시간 배양한 후, PBS로 4번 세척하였다. 다시 Alkaline phosphatase 가 conjugate된 2차 항체를 1 : 2000 배율로 첨가하여 실온에서 1시간 배양하였다. PBS로 4번 정도 세척한 후 NBT/BCIP substrate를 사용하여 발색 반응을 관찰하였다.

4. 대장균내 오피론백터 발현을 위한 재조합 변이 Phycoerythrin의 cloning

가. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 변형하여 수행하였다(Sambrook *et*

al., 1989). Plasmid DNA를 가지고 있는 균주를 ampicillin이 포함된 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양시킨 후 균체를 회수한 다음, lysis buffer 100 μ l 에 현탁하여 실온에 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 N NaOH/1% SDS 용액 200 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 후, 3 M potassium acetate 용액 150 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 모아 동량의 TE 포화 phenol과 chloroform/isoamylalcohol (24:1)로 추출하였다. 이를 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에 5분간 방치한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 DNase free RNase를 포함한 TE buffer에 녹여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 3/5배의 20% PEG 6000/2.5 M NaCl 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후 얼음에 1시간 이상 방치하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, DNA 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 사용하였다.

나. 변이 Phycoerythrin 유전자의 증폭

1차 년도에 홍조류(Rodophyta)인 김(porphyra)으로부터 확보하여 pGEMT-easy vector에 cloning 된 1.1kb size의 phycoerythrin를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 김으로부터 분리한 Phycoerythrin operon은 진핵생물의 translation 체계를 가지고 있기 때문에 대장균에서 Phycoerythrin operon을 발현시키기 위해 대장균의 translation 체계를 가질 수 있도록 ribosomal binding site를 인위적으로 제작한 linker을 이용하여 치환하였다. Primer들은 각 subunit 유전자의 coding 영역 양쪽 끝과 인위적으로 제작한 linker 부위에 annealing하여, PCR 산물이 변이 phycoerythrin 유전자 영역 내에 존재하지 않는 제한효소 절단 부위를 양쪽 끝에 갖게 하도록 제작되었다. PCR은 두단계로 실시하였으며 첫 번째 단계에서는 linker을 포함한 각 subunit을 증폭하기 위해 94°C에서의 denaturation 1분, 58°C에서의 annealing 50초, 그리고 72°C에서의 polymerization 1분의 3단계 과정을 30회 반복하여 수행하였다. 두 번째 단계에서는 두개의 증폭된 변이 subunit을 주형으로 100°C에서 10간 완벽히 denaturation 시킨 후에 4°C에서 5분간 방치하였고 다시 37°C에서 annealing되도록 한 후, 45°C에서 *Taq* polymerase를 첨가하여 extension되도록 하였으며, 94°C에서의 denaturation 1분, 58°C에서의 annealing 50초, 그리고 72°C에서의 polymerization 1분의 3단계 과정을 30회 반복하여 수행하였다.

다. 발현 vector의 construction 및 형질 전환

위와 같이 증폭된 PCR 산물을 적절한 제한효소로 절단한 후, 저용점 agarose gel에 전기 영동하여 단편을 분리하였다. 이렇게 분리한 단편을 동일한 절단 및 분리 과정을 수행한 T7 promoter를 가지는 발현 vector pET22b, pET32b와 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation시킨 후, ligase를 이용하여 *E. coli*에 Electroporation 방법으로 형질 전환시켰다. 이렇게 해서 얻은 colony들을 다시 배양하여 plasmid DNA를 분리한 다음, 제한 효소 절단을 통해 재조합 plasmid를 가지고 있는 형질 전환체를 선별하였다.

5. 변이 재조합 Phycoerythrin의 대장균내 발현

가. 변이 재조합 Phycoerythrin의 발현

준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 적절한 항생제가 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 rpm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 약 3시간 정도 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가한 후, 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하도록 28°C에서 6시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

나. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Transformation 시킨 *E. coli*에서 total protein을 확인하기 위하여 15% polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. *E. coli*의 전체 단백질을 Laemmli 방법을 기초로 한 SDS-PAGE를 이용하여 분자량에 따라 분리하였다 (Laemmli,1970). 먼저 분리된 *E. coli*의 전체 단백질 25 μ l에 sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% bromophenol blue) 5 μ l를 첨가한 다음 100°C에서 5분간 끓여주고 난 후, aggregation을 막기 위해 9,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 6% Polyacrylamide gel 의 well 당 25 μ l의 시료를 적하한 다음, 30 mA의 전원을 공급하여 분리하였다. Coomassie blue 염색법으로 염색하여 발현 양상을 확인하였다.

6. 보조 단백질인 chromophore synthase 유전자의 대장균 내 발현

가. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 변형하여 수행하였다(Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid DNA를 가지고 있는 균주를 ampicillin이 포함된 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양시킨 후 균체를 회수한 다음, lysis buffer 100 μ l 에 현탁하여 실온에 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 N NaOH/1% SDS 용액 200 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 후, 3 M potassium acetate 용액 150 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 모아 동량의 TE 포화 phenol과 chloroform/isoamylalcohol (24:1)로 추출하였다. 이를 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에 5분간 방치한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 DNase free RNase를 포함한 TE buffer에 녹여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 3/5배의 20% PEG 6000/2.5 M NaCl 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후 얼음에 1시간 이상 방치하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, DNA 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 사용하였다.

나. Arabidopsis로부터 Total RNA의 분리

Arabidopsis ecotype인 Col-O와 Sei-O를 액체질소를 사용하여 급속 냉동한 후 곱게 갈아 미세한 분말이 되도록 하였다. 여기에 1ml의 extraction buffer (8M LiCl, 2% β -mercaptoethanol)을 첨가하여 vortexing을 하여 overnight incubation을 한 후 13,000g 20분 동안 원심분리하였다. pellet을 취하여 solubilization buffer(0.5% SDS, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 2% β -mercaptoethanol)에 dissolve 시킨 후 동량의 phenol을 첨가하고 vortexing하여 13,000g 20분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻은 후 3M sodium acetate와 1.5volume의 ethanol을 첨가하였고 원심분리하여 얻은 pellet을 70% ethanol로 washing, 0.1%의 DEPC로 처리된 물에 용해시켜 RNA를 분리하였고, 농도 및 순도를 측정하였다.

다. RT-PCR 및 subcloning

RT-PCR은 total RNA 5 μ g, backward primer 30pmol, 5X reverse transcriptase buffer, 10mM dNTP, Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV) Reverse Transcriptase 100 Unit를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 reverse

transcription 을 수행하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 forward, backward primer, 10X reaction buffer, 2.5 mM dNTP, 그리고 *Taq* polymerase 를 첨가하였다. 94°C 1분, 56°C 1분 30초, 72°C 1분 조건으로 30회 반복하여 HY2 유전자를 증폭하였으며, 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 pGEM T-easy 벡터에 서브클로닝하여 그 염기서열을 분석하였다.

라. Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 증폭

Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 증폭은 미국 ATCC로부터 *Nostoc spp.*의 genomic DNA (29133D)를 구입하여 실시하였다. 먼저 300 ng의 genomic DNA를 주형으로 94°C에서의 denaturation 1분, 45°C에서의 annealing 2분, 그리고 72°C에서의 polymerization 1분의 3단계 과정을 30회 반복하여 수행하였다.

마. 발현 vector의 construction 및 형질 전환

위와 같이 증폭된 PCR 산물을 적절한 제한효소로 절단한 후, 저융점 agarose gel에 전기 영동하여 단편을 분리하였다. 이렇게 분리한 단편을 동일한 절단 및 분리 과정을 수행한 T7 promoter를 가지는 발현 vector pET22b, pET28b에 PEB를 pET28a, pET29a에 HY2를 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation시킨 후, ligate를 이용하여 *E. coli*에 Electroporation 방법으로 형질 전환시켰다. 이렇게 해서 얻은 colony들을 다시 배양하여 plasmid DNA를 분리한 다음, 제한 효소 절단을 통해 재조합 plasmid를 가지고 있는 형질 전환체를 선별하였다.

바. Chromophore synthase 유전자의 대장균 내 발현

준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 적절한 항생제가 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 약 3시간 정도 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가한 후, 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하도록 28°C에서 6시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

사. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

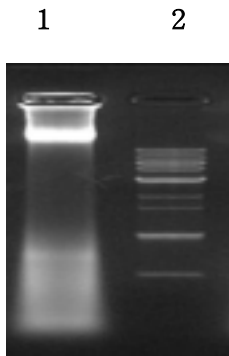
Transformation 시킨 *E. coli*에서 total protein을 확인하기 위하여 15% polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. *E. coli*의 전체 단백질을 Laemmli 방법을 기초로 한 SDS-PAGE를 이용하여 분자량에 따라 분리하였다 (Laemmli,1970). 먼저 분리된 *E. coli*의 전체 단백질 25 μ l에 sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% bromophenol blue) 5 μ l를 첨가한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여주고 난 후, aggregation을 막기 위해 9,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 6% Polyacrylamide gel 의 well 당 25 μ l의 시료를 적하한 다음, 30 mA의 전원을 공급하여 분리하였다. Coomassie blue 염색법으로 염색하여 발현 양상을 확인하였다.

2 절 : 연구수행 결과

1. Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 분리 및 염기서열 분석

가. Isolation of genomic DNA from Rodophyta

Phycoerythrin을 가장 많이 가지고 있다고 알려진 Rodophyta에서 실제로 gene을 가지고 있는지를 알기 위하여 genomic DNA를 분리하였다.(Figure 1. 참조)



Lane 1 : Porphyra sp.

Lane 2 : Marker

Fig. 1 Genomic DNA of phorphyra

나. Rodophyta의 total RNA분리

Rodophyta의 total RNA를 분리하여 1% formaldehyde gel 에 전기영동 한 결과 5개의 RNA band를 확인하였다.(Figure 2. 참조)

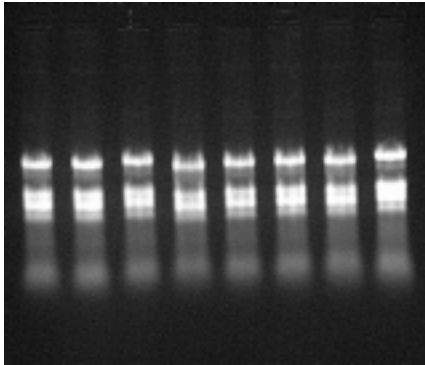


Fig. 2 Total RNA from Rhodophyta

다. Phycoerythrin gene amplification by PCR and RT-PCR

Primer는 현재 보고되어 있는 rodophyta에서 전체 염기서열이 밝혀진 것을 근거로 하여 제작한 한종류의 primer set을 준비하였고 이는 다음과 같다.

PE-Forward : 5'-ATGCTTGATGCATTTTCTAGAGT-3'

PE-Reverse : 5'-TTAGCTTAAAGCGTTGATAAGGT-3'

Rodophyta의 증폭결과 1.1kb의phycoerythrin의 full gene을 dection할 수 있었다. RT-PCR은 각각의 total RNA, primer, reverse transcriptase buffer, dNTP, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase를 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 reverse transcription 을 수행하였다. 합성된 first strand cDNA 를 주형으로 primer, Taq buffer, dNTP, 그리고 Taq polymerase을 첨가하였다. 94℃ 1분, 62℃ 1 분 30초, 72℃ 1분 조건으로 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다.

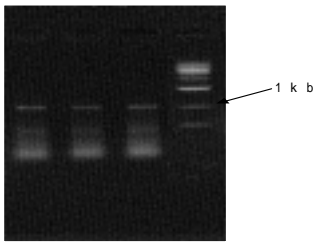


Figure 3. PCR amplification of phycoerythrin

RT-PCR을 수행한 결과 1.1 kb의 target band를 확인할 수 있었다.

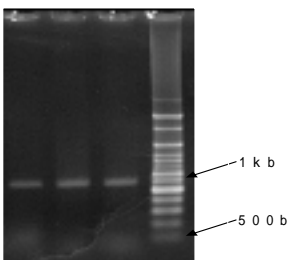


Fig. 4 RT-PCR amplification of phycoerythrin

라. 염기서열분석

Rodophyta인 4가지의 species에서 분리된 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후, T-vector에 cloning하여 sequencing을 수행하였다. 얻어진 염기서열을 GenBank™의 데이터베이스에서 homology를 조사한 결과는 아래와 같다.

Porphyra tenera

```

ATGCTTGATGCATTTTCTAGAGTTGTAGTAAATCCGACGCTAAAGCTGCTTATGTAGGCGGTAGCGATCTAC
AAGCTCTAAAAAATTCATCGCAGATGGTAACAAACGTTTAGATTCTGTTAACGCAATTGTTTCTAACGCTAG
TTGTATCGTTTCTGATGCTGTTTCTGGTATGATCTGTGAAAATCCTGGTCTAATTGCACCTGGTGGAAATTGT
TACACTAATCGTCGATGGCTGCTTGTCTACGTGACGGTGAAATTATTTTACGTTAAGTTTCCTACGCTCTTC
TTGCTGGAGATCCTTCTGTCTTGAAGATCGTTGTCTTAACGGTCTTAAAGAACTTACATCGCTTTAGGTGT

```

ACCTACTAACTCTTCTGTAAGAGCTGTAAGCATCATGAAGGCAGCAGCAGTTGCATTCACTAATACTGCT
TCCCAACGTAAGATGGCAACAGCAGACGGTGATTGTTCTGCTTTAGCTTCTGAAGTAGCTAGCTATTGCGACA
GAGTAGCTGCAGCTATTAGCTAAAAGTTTGAATAACTCCAAGCCGTAAGTTTGAAAAGTATTTAAAATAAGT
ACTTAATCCATTTAGGAGAAAAACATGAAATCAGTTATTACTACTACGATCAGTGCAGCAGATGCTGCTGGTC
GTTTCCCGTCCAGTTCCGATCTTGAATCCGTTCAAGGTAATATCCAACGTGCAGCAGCTCGACTAGAAGCAGC
TGAAAAACTAGCTGGCAACCGTGAAGCAGTTGTTAAAGAAGCTGGCGATGCTTGTGTTTGCTAAATACTCTTAC
TTGAAAAATCCAGGTGAAGCTGGTGACAGTCAAGAAAAAGTAAACAAATGCTACAGAGATGTAGATCATTATA
TGCGTCTAGTTAACTACTGCTTAGTTGTTGGTGGTACTGGTCCAGTAGAGAGTGGGGCATTGCTGG
TGCTCGTGAAGTTTACCGTACTTTAAATTTACCAACTTCTGCTTACGTAGCATCCTTTGCGTTTGCTCGTGAC
AGATTATGTTCCACGTGACATGCTGCTCAAGCAGGTGTTGAATATGCTGGTAATTTAGGCTACCTTATCA
ACGCTTTAAGCTAA

Gelidium amansii

ATGCTTGATGCATTTTCTAGAGTCGTAGTAAATCCGACGCTAAAGCTGCTTATGTAGGCGGTAGCGATCTAC
AAGCTCTAAAAAATTCATCGCAGACGGTAACGAACGTTTAGATTCTGTAAACGCAATCGTTTCTAACGCTAG
TTGTATCGTTTCTGATGCTGTTTCTGGTATGATCTGTGAAAATCCTGGTCTAGTTGCACCTGGTGGAAATTGT
TACACTAATCGTCGATGGCTGCTTGTCTACGTGACGGTGAAATTATTTTACGTTATGTTTCCCTACGCTCTTC
TTGCTGGAGATCCTTCTGTTCTTGAAGATCGTTGTCTTAAACGGTCTTAAAGAACTTACATCGCTTTAGGTGT
ACCTACTAACTCTTCTGTAAGAGCTGTAAGCATCATGAAGGCAGCAGCAGTTGCATTCACTAATACTGCT
TCCCAACGTAAGATGGCAACAGCAGACGGTGATTGTTCTGCTTTAGCTTCTGAAGTAGCTAGCTATTGCGACA
GAGTAGCTGCAGCTATTAGCTAAAAGTTTGAATAACTCCAAGCCGTAAGTTTGAAAAGTATTTAAAATAAGT
ACTTAATCCATTTAGGAGAAAAACATGAAATCAGTTATTACTACTACGATCAGTGCAGCAGATGCTGCTGGT
CGTTTCCCGTCCAGTTCCGATCTTGAATCCGTTCAAGGTAATATCCAACGTGCAGCAGCTCGACTAGAAGCAG
CTGAAAAACTAGCTGGCAACCATGAAGCAGTTGTTAAAGAAGCTGGCGATGCTTGTGTTTGCTAAATACTCTTA
CTTGAAAAATCCAGGTGAAGCTGGTGACAGTCAAGAAAAAGTAAACAAATGCTACAGAGATGTAGATCATTAT
ATGCGTCTAGTTAACTACTGCTTAGTTGTTGGTGGTACTGGTCCAGTAGACGAGTGGGGCATTGCTGGTGTCTC
GTGAAGTTTACCGTACTTTAAATTTACCAACTTCTGCTTACGTAGCATCCTTTGCGTTTGCTCGTGACAGATT
ATGCGTTCCCGTGACATGCTGCTCAAGCAGGTGTTGAATATGCTGGTAATTTAGACTACCTTATCAACGCT
TTAAGCTAA

Pachymeniopsis elliptica

ATGCTTGATGCATTTTCTAGAGTCGTAGTAAATCCGACGCTAAAGCTGCTTATGTAGGCGGTAGCGATCTAC
AAGCTCTAAAAAATTCATCGCAGATGGTAACGAACGTTTAGATTCTGTAAACGCAATCGTTTCTAACGCTAG
TTGTATCGTTTTGATGCTGTTTCTGGTATGATCTGTGAAAATCCTGGTCTAGTTGCACCTGGTGGAAATTGT
TACACTAATCGTCGTATGGCTGCTTGTCTACGTGACGGTGAAATTATTTTACGTTATGTTTCCTACGCTCTTC
TTGCTGGAGATCCTTCTGTCTTGAAGATCGTTGTCTTAACGGTCTTAAAGAACTTACATCGCTTTAGGTGT
ACCTACTAACTCTTCTGTAAGAGCTGTAAGCATCATGAAGGCAGCAGCAGTTGCATTCACTAATACTGCT
TCCCAACGTAAGATGGCAACAGCAGACGGTGATTGTTCTGCTTTAGCTTCTGAAGTAGCTAGCTATTGCGACA
GAGTAGCTGCAGCTATTAGCTAAAAGTTTGAATAACTCCAAGCCGTAAGTTTGAAGATATTTAAAATAAGT
ACTTAATCCATTTAGGAGAAAAACATGAAATCAGTTATTACTACTACGATCAGTGCAGCAGATGCTGCTGGTC
GTTTCCCGTCCAGTTCCGATCTTGAATCCGTTCCAGGTAATATCCAACGTCAGCAGCTCGACTAGAAGCAGC
TGAAAAACTAGCTGGCAACCATGAAGCAGTTGTTAAAGAAGCTGGCGATGCTTGTTTTGCTAAATACTCTTAC
TTGAAAAATCCAGGTGAAGCTGGTGACAGTCAAGAAAAAGTAAACAAATGCTACAGAGATGTAGATCATTATA
TGCGTCTAGTTAACTACTGCTTAGTTGTTGGTGGTACTGGTCCAGTAGACGAGTGGGGCATTGCTGGTGTCTG
TGAAGTTTACCGTACTTTAAATTTACCAACTTCTGCTTACGTAGCATCCTTTGCGTTTGCTCGTGACAGATTA
TGCGTTCCGCGTGACATGTCTGCTCAAGCAGGTGTTGAATATGCTGGTAATTTAGACTACCTTATCAACGCTT
TAAGCTAA

Lomentaria catenata

ATGCTTGATGCATTTTCTAGAGTCGTAGTAAATCCGACGCTAAAGCTGCTTATGTAGGCGGTAGCGATCTAC
AAGCTCTAAAAAATTCATCGCAGATGGTAACGAACGTTTAGATTCTGTAAACGCAATCGTTTCTAACGCTAG
TTGTATCGTTTTGATGCTGTTTCTGGTATGATCTGTGAAAATCCTGGTCTAGTTGCACCTGGTGGAAATTGT
TACACTAATCGTCGTATGGCTGCTTGTCTACGTGACGGTGAAATTATTTTACGTTATGTTTCCTACGCTCTTC
TTGCTGGAGATCCTTCTGTCTTGAAGATCGTTGTCTTAACGGTCTTAAAGAACTTACATCGCTTTAGGTGT
ACCTACTAACTCTTCTGTAAGAGCTGTAAGCATCATGAAGGCAGCAGCAGTTGCATTCACTAATACTGCT
TCCCAACGTAAGATGGCAATAGCAGACGGTGATTGTTCTGCTTTAGCTTCTGAAGTAGCTAGCTATTGCGACA
GAGTAGCTGCAGCTATTAGCTAAAAGTTTGAATAACTCCAAGCCGTAAGTTTGAAGATATTTAAAATAAGT
ACTTAATCCATTTATGAGAAAAACATGAAATCAGTTATTACTACTACGATCAGTGCAGCAGATGCTGCTGGTC
GTTTCCCGTCCAGTTCCGATCTTGAATCCGTTCCAGGTAATATCCAACGTCAGCAGCTCGACTAGAAGCAGC
TGAAAAACTAGCTGGCAACCATGAAGCAGTTGTTAAAGAAGCTGGCGATGCTTGTTTTGCTAAATACTCTTAC

TTGAAAAATCCATGTGAAGCTGGTGACAGTCAAGAAAAAGTAAACAAATGCTACAGAGATGTAGATCATTATA
 TGGCTCTAGTTAACTACTGCTTAGTTGTTGGTGGTACTGGTCCAGTAGACGAGTGGGGCATTGCTGGTGTCTG
 TGAAGTTTACCGTACTTTAAATTTACCAACTTCTGCTTACGTAGCATCCTTTGCGTTTGGCTCGTACAGATTA
 TGGTTCCGGTGCATGTCTGCTCAAGCAGGTGTTGAATATGCTGGTAATTTAGACTACCTTATCAACGCTT
 TAAG

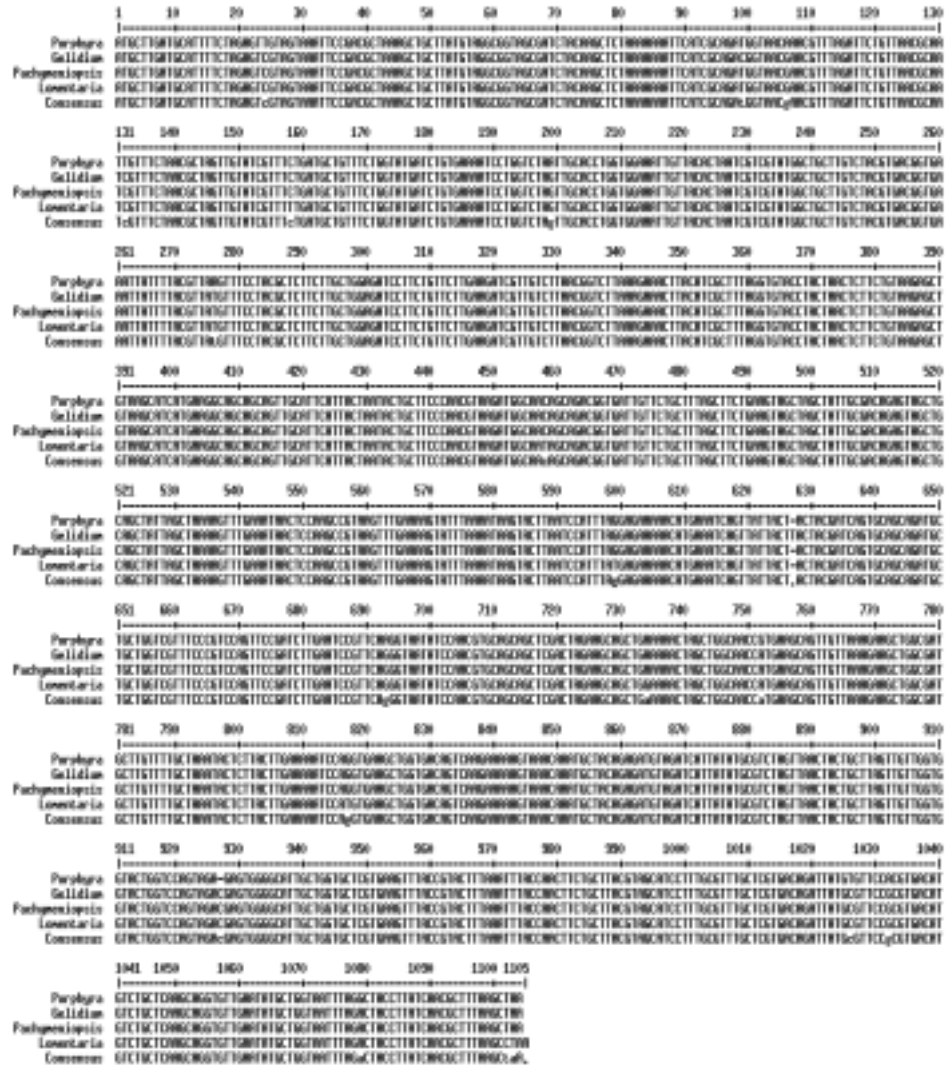


Fig. 5 Alignment of Rhodophyta phycoerythrins (NCBI blast search program 사용)

2. Natural Phorphyra phycoerythrin 유전자의 발현 및 발현 조건

가. 대장균 발현을 위한 Porphyra Phycoerythrin의 cloning

홍조류(Rodophyta)인 김(phorphyra)으로부터 분리된 phycoerythrin은 약 1.1 kb의 size로서 α, β 두 개의 subunit으로 구성된 operon의 구조를 가지고 있다.

따라서 본 실험에서는 각각의 subunit을 따로 발현백터에 cloning하는 방법과 하나의 백터에서 동시에 두 개의 subunit을 발현시켜 보고자 하였다.

1) Phycoerythrin α subunit의 subcloning

pGEMT-easy vector에 cloning 된 1.1kb size의 phycoerythrin을 주형으로 PCR을 수행하기 위해 다음과 같은 primer를 제작하였다.

RPE α -forward : 5'-NNNNCCATGGAATCAGTTATTACTACT-3' (*Nco* I)

RPE α -backward : 5'-NNNNCTCGAGGCTTAAAGCGTTGATAAGGTA-3' (*Xho* I)

상기의 primer를 사용하여 94°C 1분, 58°C 50초, 72°C 1분의 조건 (30cycle)으로 PCR을 수행하였다. 약 500 bp의 PCR Product을 확보하였고 *Nco* I 과 *Xho* I 으로 절단한 pET28b 발현백터에 subcloning을 실시하였다.

2) Phycoerythrin β subunit의 subcloning

α subunit과 마찬가지로 제작된 1.1 kb의 phycoerythrin을 주형으로 발현백터인 pET22b에 서브클로닝을 수행하기 위하여 다음과 같은 primer를 제작하였다.

RPE β -forward : 5'-NNNNCATATGCTTGATGCATTTTCTAGA-3' (*Nde* I)

RPE β -backward : 5'-NNNNCTCGAGGCTAATAGCTGCGACTACTCT-3' (*Xho* I)

위의 α subunit의 서브클로닝과 같은 방법으로 증폭된 β subunit의 size는 약 540 bp 임을 확인하였으며, *Nde* I 과 *Xho* I 으로 절단한 pET22b vector에 성공적으로 클로닝하였다.

준비된 Phycoerythrin α, β subunit construct를 대장균 JM109에 electroporation 방법을 사용하여 형질전환시킨 후 균체를 선발하였다.

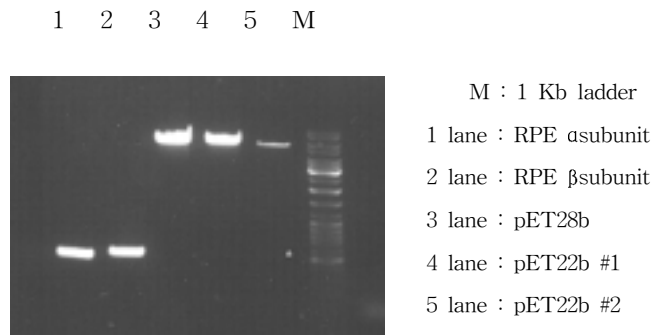


Fig. 6 Porphyra phycoerythrin subunit의 cloning

3) Plasmid DNA의 분리 및 균주 선발

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 변형하여 수행하였다(Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid DNA를 가지고 있는 균주를 ampicillin(pET22b-RPEα), kanamycin(pET28b-RPEβ)이 포함된 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양시킨 후 균체를 회수한 다음, lysis buffer 100 μ l 에 현탁하여 실온에 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 N NaOH/1% SDS 용액 200 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 후, 3 M potassium acetate 용액 150 μ l를 첨가하여 얼음에 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 동량의 TE 포화 phenol과 chloroform /isoamylalcohol (24:1)로 추출하였다. 이를 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에 5분간 방치한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 침전물을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시킨 후 DNase free RNase를 포함한 TE buffer에 녹여 37°C에서 30분간 반응시켰다.

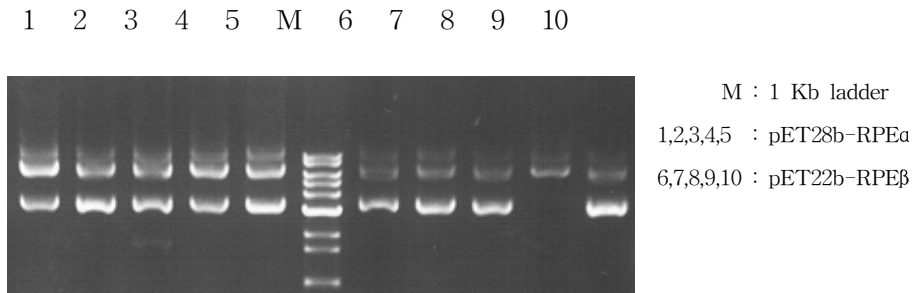


Fig. 7 Construction of Expression vector

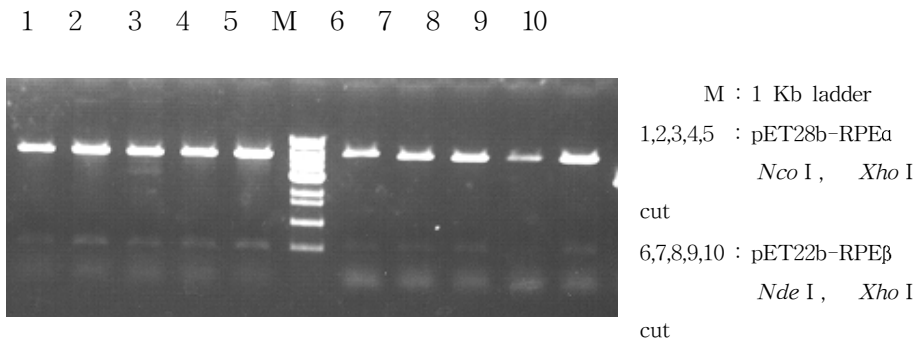


Fig. 8 Identification of Expression vector

나. 재조합 Phycoerythrin subunit의 대장균내 발현

1) 재조합 Phycoerythrin α , β subunit의 발현

준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 ampicillin(pET22b-RPE α), kanamycin (pET28b-RPE β)이 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하여 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하기 위해 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

2) 재조합 Phycoerythrin의 SDS-PAGE 확인

재조합 Phycoerythrin α , β subunit의 발현여부를 확인하기 위하여 5% stacking, 15% separating gel을 이용한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)를 실시하였다. 전기영동한 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 염색한 후, 탈색 용액 (10% acetic acid, 10% methanol)으로 탈색하였다.

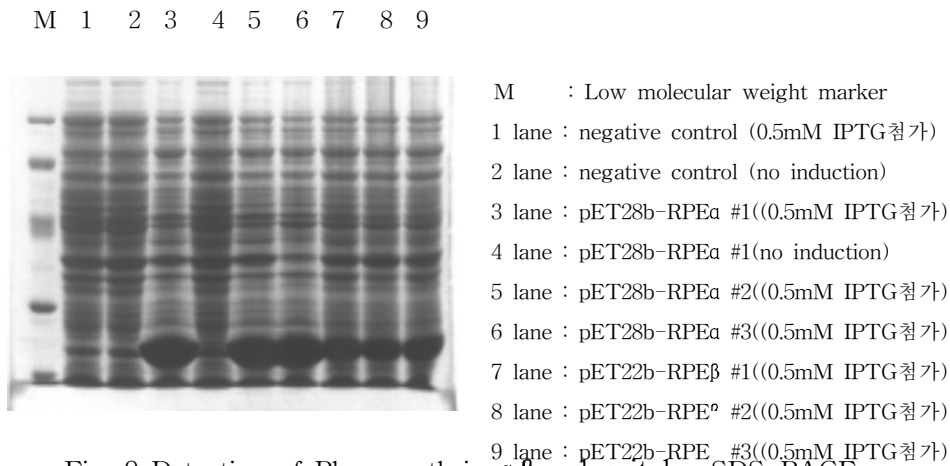


Fig. 9 Detection of Phycoerythrin α, β subunit by SDS-PAGE

3. Natural Phorphyra phycoerythrin 및 Recombinant phycoerythrin subunit의 항체 생산 가. 항원 추출 및 Immunization

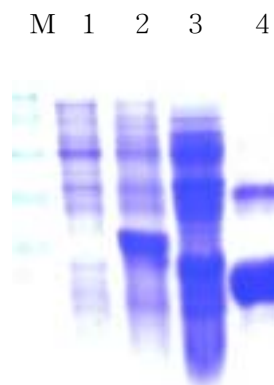
각각의 단백질에 대한 면역 항혈청을 생산하기 위하여, 15% SDS-PAGE를 사용하여 분획한 purified Natural phycoerythrin 및 putative linker protein과 recombinant phycoerythrin subunit α, β 단백질을 gel로부터 잘라내어 1X PBS로 5번 washing한 후 잘 파쇄하였고, 다시 초음파 분쇄방법을 통해 아크릴아마이드 겔로부터 추출하였다. 이렇게 분리 준비된 각각의 단백질을 항원으로 하여 실험동물(쥐 : *balb/c*) 면역을 4차에 걸쳐 10일 단위로 실시하였다. 면역 실시예 앞서, 면역 전 혈청(pre-immune serum)을 확보하기 위하여 실험동물의 꼬리에서 100 μ l를 채혈하였다. 1차, 2차, 3차 면역에서는 분리한 겔 extract만을 실험동물의 복부에 복강 주사하였으며, 4차 면역에서는 1×10^6 의 암세포인 sarcoma cell 과 함께 겔 extract를 잘 혼합한 후, 복강 주사하였다. 4차 면역주사 후 10일이 지난 후에 항혈청을 분리하기 위하여 5 ml의 복수를 추출한 후, 대정맥으로부터 1 ml의 혈액을 채혈하여 4°C에서 하루 보관한 후, 원심분리(1,000 \times g, 상온, 10분)하여 상층액인 항혈청(antiserum)을 분리하였다.

나. 면역 항혈청의 특이성 및 역가 측정 (Western blot analysis)

각각의 항원 단백질에 대한 다클론 항체의 특이성을 조사하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. 먼저 10 μ g의 항원 단백질을 추출하여 15%

SDS-PAGE를 사용하여 분획한 후, semidry electroblotting 방법을 사용하여 니트로 셀룰로즈 membrane에 transfer하였다. 실온에서 0.05% Tween 20, 5% BSA가 들어있는 PBS buffer로 overnight blocking을 실시하였으며, 각 항원 단백질에 대한 다클론 항체를 1 : 2500 배율로 첨가하여 실온에서 2시간 배양한 후, PBS로 4번 세척하였다. 다시 Alkaline phosphatase 가 conjugate된 2차 항체를 1 : 2000 배율로 첨가하여 실온에서 1시간 배양하였다. PBS로 4번 정도 세척한 후 NBT/BCIP substrate를 사용하여 발색 반응을 관찰하였다.

현재 Figure 10의 결과처럼 김(Phorphyra)에서 정제한 천연 Phycoerythrin 및 Rod linker like protein, 그리고 재조합 phycoerythrin α β subunit 모두의 다클론 항체 제작을 성공적으로 수행하였으며 확연하게 천연과 재조합 단백질 모두에서 그 항체가 서로 교차적으로 역가를 나타낼 수 있었다. 앞으로 이렇게 만들어진 항체를 사용하여 붉은 색을 가지는 변이 재조합 phycoerythrin의 역가측정뿐만 아니라 여러 가지 목적으로 요긴하게 사용할 것이다.



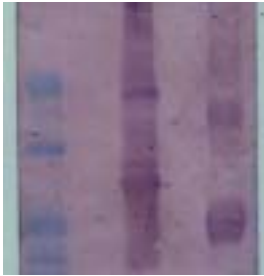
coomassie staining

M 1 2 3 4



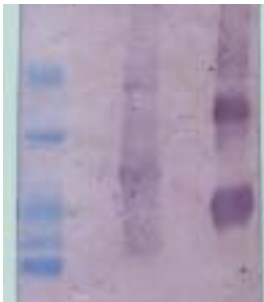
anti- β antibody

M 1 2 3 4

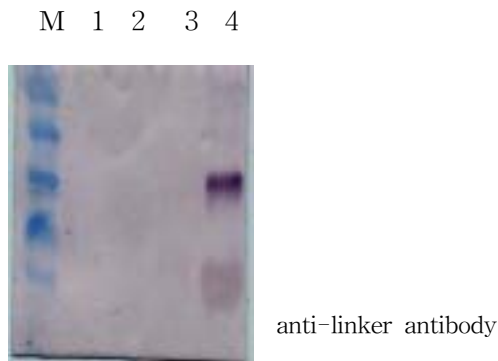


anti- α antibody

M 1 2 3 4



anti-RPE antibody



1. lane : negativer control (BL21DE3 without plasmid)
2. lane : total protein of expressed recombinant beta subunit
3. lane : total protein of expressed recombinant alpa subunit
4. lane : partial purified natural Phycoerythrin

Figure 10. Western analysis

4. Putative Phycoerythrin rod-linker 유전자의 분리

가. N-말단 아미노산 염기서열 분석

먼저 10 μ g의 정제된 natural phycoerythrin 단백질을 추출하여 15% SDS-PAGE 를 사용하여 분획한 후, 겔을 유리판에서 분리하여 증류수로 살짝 행군 후 transfer buffer에 담가 두었다. PVDF membrane은 메탄올에 2초간 살짝 담근 후 마찬가지로 증류수에 행겨 함께 transfer용 sandwich을 만들어 50 mA로 3시간 eletro-blotting을 실시하였다. 염색은 0.1% ponceau S(1% acetic acid)로 2분간 실시한 후 증류수로 destaining 해준 후 잘 말려 약 30 KDa 에 해당하는 putative phycoerythrin linker protein band만을 오려 한국기초과학지원연구원 서울분소(전화 : 02-920-0732)에 있는 정밀 분석 기기설의 Precise 491 protein sequencing system(Applied biosystem)을 사용하여 분석하였다.

N-말단 아미노산 염기서열 분석 결과는 다음과 같다.

Met Leu Gly Phe Ser Leu Ile Ile Tyr

나. Internal 아미노산 염기서열 분석

Putative phycoerythrin rod linker protein의 내부 아미노산 염기서열을 분석하기 위해 Trypsin을 이용한 in gel digestion 방법을 사용하였으며 다음과 같다. 약 300 pmol 이상의 SDS-PAGE 상의 band를 잘라 0.1%TFA로 헹군 튜브에 넣고 50% acetonitrile로 5번 washing 한 후 동결 건조하여 10mM NH₄CO₃에 0.3 ug의 trypsin을 첨가하여 37°C에서 24시간 반응시켰다. 그후 0.1 % TFA / 60% acetonitrile을 이용하여 1시간씩 2번 washing 한 후 동결 건조하여 0.1% TFA에 용해시켜 한국기초과학지원연구원 서울분소 (전화 : 02-920-0732)에 있는 정밀 분석기기실의 SMART HPLC 기기를 통해 분리한 후 다시 Precise 491 protein sequencing system(Applied biosystem) 기기를 사용하여 분석하였다. 내부 아미노산 염기서열 분석 결과는 다음과 같다.

22번 fraction : Val Ile Tyr Ala Leu Ile Ala Gly Asp Pro Val Gly Arg Phe Pro

25번 fraction : Leu Asn Leu Pro Thr Ser Ala Tyr Val Ala Ser Phe Ala Phe Ala Arg

위에서 분석한 아미노산 염기서열을 이용하여 cyanobacteria에서 분리 분석된 Rod linker protein과 homology test 결과 유사성이 거의 없었고 NCBI N blast(아미노산 서열) 결과 홍조류의 phycoerythrin subunit과 약 90%의 유사성을 나타내어 예상한 Rod linker like protein이 아니라 phycoerythrin subunit의 다량체이거나 기타 우리가 예상하지 못한 단백질에 대한 데이터 오류로 결론내릴 수 있었다. 현재까지 분석된 Rod linker protein은 극히 일부분이기 때문에 linker 단백질의 분리는 매우 어려울 것으로 여겨지며 또한 본 실험의 목적인 붉은 색의 재조합 phycoerythrin의 형성에 필수요소로는 여겨지지 않기 때문에 이상의 결과로 실험을 마무리하였다.

5. 재조합 변이 Phycoerythrin 오페론백터의 대장균내 발현

가. 변이 phycoerythrin 오페론 유전자의 primer 설계

홍조류(Rodophyta), 김(porphyra)으로부터 분리된 R-phycoerythrin(RPE)은 약 1.1 kb의 size로서 α, β 두 개의 polypeptide로 구성된 operon의 구조를 가지고 있다. Phycoerythrin은 chloroplast genome에 coding되어 있으며, 각 subunit의 유전자 크기와 분자량은 α 495bp (21KDa), β 534bp (23KDa)이다. 김으로부터 분리한 Phycoerythrin operon은 진핵생물의 translation 체계를 가지고 있기

때문에 대장균에서 Phycoerythrin operon을 발현시키기 위해 대장균의 translation 체계를 가질 수 있도록 ribosomal binding site를 인위적으로 제작한 linker를 이용하여 치환하였다. linker로 제작한 primer는 다음과 같다(ggaga를 gaagga로 치환).

Linker-Forward : 5'-**GAAGG**AAAAACATGAAATCAGTTATTA-3'

Linker-Backward : 5'-CATGTTTTTCCTTCTAAATGGATTAAGTAC-3'

RPE α-backward : 5'-NNNN**CTCGAG**GCTTAAAGCGTTGATAAGGTA-3' (*Xho* I)

RPE β-forward : 5'-NNNN**CATATG**CCTTGATGCATTTTCTAGA-3' (*Nde* I)

RPE β-forward2 : 5'-NNNN**CCATGG**TTGATGCATTTTCTAGA-3' (*Nco* I)

Table 2. Gene structure of phorphyra phycorythrin

```

1 atgcttgatg cattttctag agtagtagta aattccgacg ctaaagctgc ttatgtaggc
61 ggtagcgatc tacaagctct aaaaaattc atcgcagatg gtaacaaacg ttagattct
121 gttaacgcaa ttgtttctaa cgctagtgtg atcgttctg atgctgttc tggatgatc
181 tgtgaaaatc ctggtctaata tgcacctggt ggaaattgtt acactaatcg tcgtatggct
241 gcttgctac gtgacgggta aattattta cgttatgtt cctacgctct tcttgctgga
301 gatcctctg tcttgaaga tcgtgtctt aacggctcta aagaaactta cattgcttta
361 ggtgtaccta ctaactctc tgtaagagct gtaagcatca tgaaggcagc agcagttgca
421 tcattacta atactgctc ccaacgtaag atggcaacag cagacgggta ttgtctgct
481 ttgcttctg aagtagctag ctattgacg agagtagctg cagctattag ctaaaagttt
541 gaaataactc caagccgtaa gtttgaaga tatttaaat aagtactta tccatttgg
601 agaaaaacat gaaatcagtt attactacta cgatcgggac agcagatgct gctggcgtt
661 tcccgccag ttccgatctt gaatccgctc aaggaatat ccaacgtgca gcagctcgac
721 tagaagcagc tgaaaaaacta gctagcaacc atgaagcagt tgtaaagaa gctggcagat
781 ctgttttgc taaatactct tacttgaaaa atccaggtga agctgggac agtcaagaaa
841 aagtaaaca atgctacaga gatgtagatc attatatgag tctagttaac tactgcttag
901 ttgttggtg tactggcca gtgacgagc ggggcattgc tgggctcgt gaagttacc
961 gtactttaa ttaccaact tctgcttac tagcatcctt tgcgttgcgt cgtgacagat
1021 tatgtgtcc acgtgacatg tctgctcaag caggtgttga atatgctggt aatttagact
1081 acctatcaa cgcttaagc taa

```

1-534 bp : β subunit, 609-1103 bp : α subunit
598-603 bp : eukaryotic ribosomal binding site

위의 Primer를 사용하여 변이 beta subunit (beta-F, linker-B,B2)과 변이 alpha subunit (linker-N, alpha-B)을 증폭한 후 2단계로 이렇게 증폭된 각 subunit을 주형으로 변이 재조합 phycoerythrin을 성공적으로 증폭하여 pGEM T easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석하여 확인하였다 (Figure 13. 염기서열분석 참조). 이렇게 확보한 약 1100 bp의 PCR Product를 *Nco* I 과 *Xho* I 으로 절단한 pET32b에 *Nde* I 과 *Xho* I 으로 절단한 pET22b발현벡터에 각각 subcloning을 실시하였다.

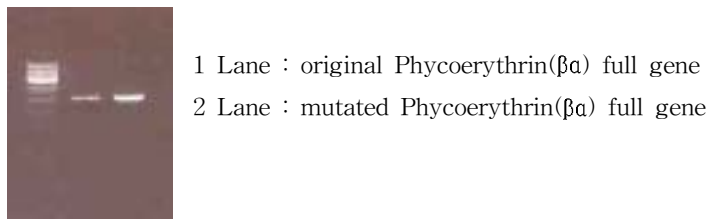


Fig. 11 Detection of Mutated Phycoerythrin full gene by PCR-based mutagenesis

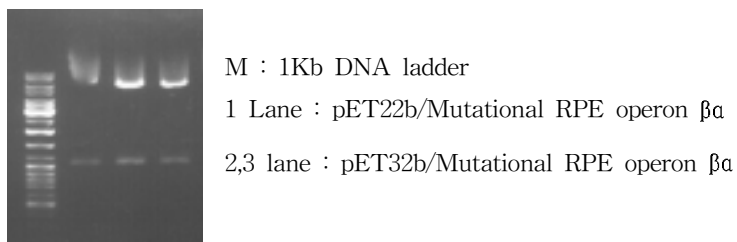


Fig. 12 Identification of mutated Phycoerythrin constructs



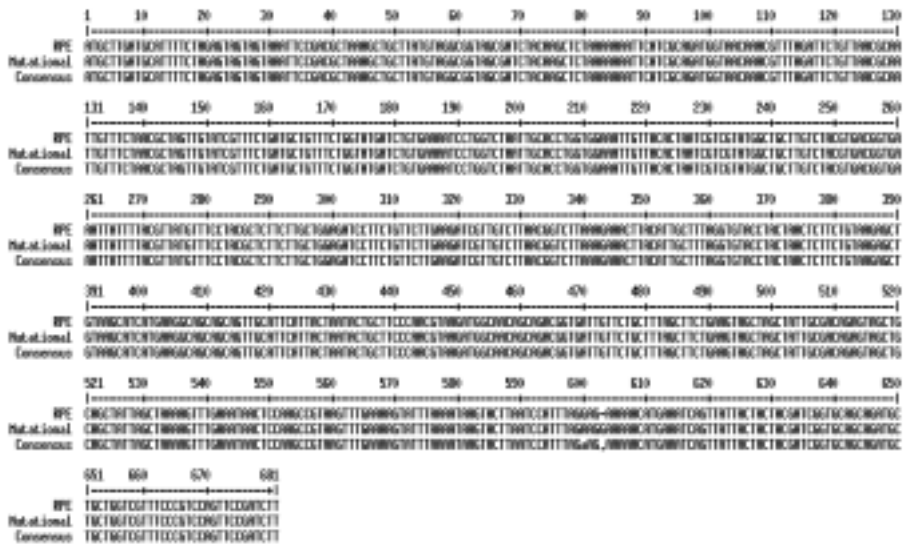


Fig. 13 Alignment between phorphyra phycoerythrin and mutational phycoerythrin (NCBI blast search program 사용)

위의 그림에서 알 수 있듯이 ribosomal binding site가 대장균의 것으로 성공적으로 치환되었음을 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있었다.

나. 변이 재조합 phycoerythrin 오피론백터의 대장균 내 발현

1) 변이 재조합 Phycoerythrin operon의 발현

준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 ampicillin(pET22b-RPE β a), (pET32b-MRPE β a)이 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 rpm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하여 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하기 위해 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

2) 재조합 Phycoerythrin의 SDS-PAGE 확인

변이 재조합 Phycoerythrin β a의 발현여부를 확인하기 위하여 5% stacking,

15% separating gel을 이용한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)를 실시하였다. 전기영동한 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 염색한 후, 탈색 용액 (10% acetic acid, 10% methanol)으로 탈색하였다.

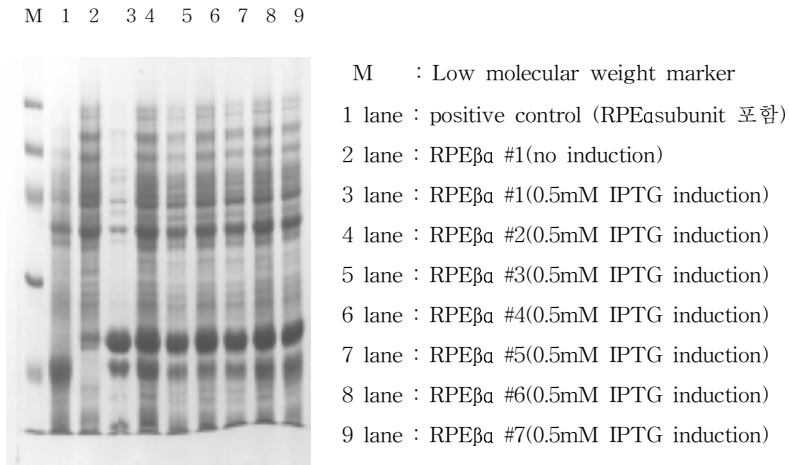
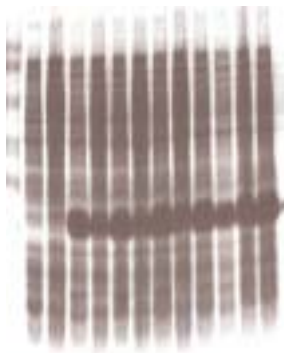


Fig. 14 Detection of pET22b cloned Mutational recombinant Phycoerythrin operon among the Total protein in *E.coli* BL21DE3

위의 결과에서 알 수 있듯이 phycoerythrin N 말단의 beta subunit의 발현량에 비해 alpha subunit의 발현량이 적으나 heterologous protein이지만 안정적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 앞으로 accessory protein인 HY2 나 PEB A,B 와 함께 발현을 시킴으로서 색깔을 갖는 재조합 phycoerythrin을 생성하고자 한다 (Figure 14, 15 참조)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



M : Low molecular weight marker
1 lane : negative control (0.5mM IPTG induction)
2 lane : negative control (no induction)
3 lane : RPEβ #1(0.5mM IPTG induction)
4 lane : RPEβ #2(0.5mM IPTG induction)
5 lane : RPEβ #3(0.5mM IPTG induction)
6 lane : RPEβ #4(0.5mM IPTG induction)
7 lane : RPEβ #5(0.5mM IPTG induction)
8 lane : RPEβ #6(0.5mM IPTG induction)
9 lane : RPEβ #7(0.5mM IPTG induction)
10 lane : RPE #8(0.5mM IPTG induction)
11 lane : RPE #9(0.5mM IPTG induction)
12 lane : RPE #10(0.5mM IPTG induction)

Fig. 15 Detection of pET32b cloned Mutational recombinant Phycoerythrin operon among the Total protein in *E.coli* BL21DE3

6. 보조단백질 Arabidopsis(애기장대) Phytochromobilin synthase HY2 대장균내 발현 가. Phytochromobilin synthase HY2 유전자의 primer 설계

Phytochromobilin synthase HY2는 Ferredoxin-dependent bilin reductase로서 광합성 유기체에 존재하는 Linear tetrapyrrole 전구체인 Phytobilin을 합성하는데 관여하는 효소이다. 본 실험의 목표인 Recombinant phycoerythrin의 assembly에 사용하기 위하여 arabidopsis로부터 분리하고자 하였다. HY2 유전자의 분리에 사용하기 위한 primer는 NCBI의 genebank (gi:13359272)로부터 제공받은 유전 정보를 바탕으로 설계하였으며 대장균 내 발현벡터인 pET28a 및 pET29a에 서브클로닝할 수 있게 제한효소 염기서열을 첨가하였으며 그 sequence는 다음과 같다.

HY2-forward : 5'-NNNNGAGCTCATGGCTTTATCAATGGAGTTTG-3' (*Sac* I)

HY2-backward : 5'-NNNNAAGCTTTTAGCCGATAAATTGTCCTGTT-3' (*Hind*III)

Phytochromobilin synthase HY2 유전자의 cDNA size는 990 bp이며 다른 bilin reductase와 상당한 유사성을 가지고 있음이 보고되었다.

나. Arabidopsis로부터 Total RNA의 분리

Arabidopsis ecotype인 Col-O와 Sei-O를 액체질소를 사용하여 급속 냉동한 후 곱게 갈아 미세한 분말이 되도록 하였다. 여기에 1ml의 extratction buffer(8M LiCl, 2% β -mercaptoethanol)을 첨가하여 vortexing을 하여 overnight incubation을 한후 13,000g 20분 동안 원심분리하였다. pellet을 취하여 solubilization buffer(0.5% SDS, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 2% β -mercaptoethanol)에 dissolve 시킨 후 동량의 phenol을 첨가하고 vortexing하여 13,000g 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 얻은 후 3M sodium acetate와 1.5volume의 ethanol을 첨가하였고 원심분리하여 얻은 pellet을 70% ethanol로 washing, 0.1%의 DEPC로 처리된 물에 용해시켜 RNA를 분리하였고, 농도 및 순도를 측정하였다.

다. RT-PCR 및 subcloning

RT-PCR은 total RNA 5 ug, backward primer 30pmol, 5X reverse transcriptase buffer, 10mM dNTP, Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV) Reverse Transcriptase 100 Unit를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 reverse transcription을 수행하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 forward, backward primer, 10X reaction buffer, 2.5 mM dNTP, 그리고 *Taq* polymerase를 첨가하였다. 94 °C 1분, 56°C 1분 30초, 72°C 1분 조건으로 30회 반복하여 HY2 유전자를 증폭하였으며, 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 pGEM T-easy 벡터에 서브클로닝하여 그 염기서열을 분석하였다.

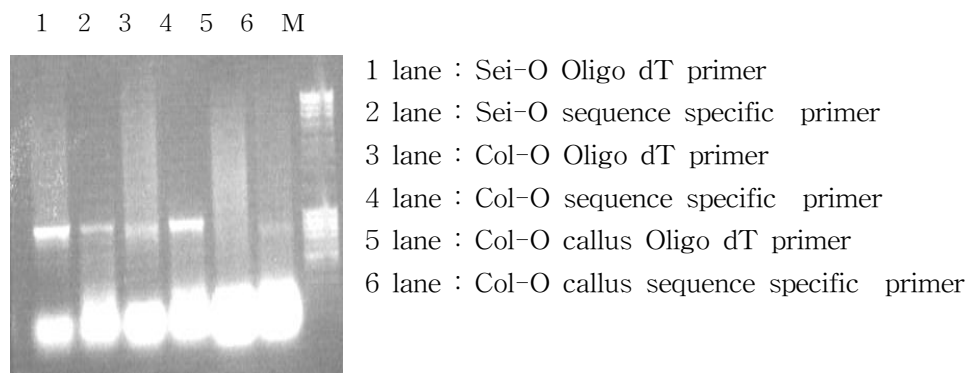


Fig. 16 RT-PCR of Arabidopsis Phytochromobilin synthase HY2

Cloned Arabidopsis Phytochromobilin synthase HY2 sequence

atggagttgggtttcaattgggtcatgcttcaaggcaccacacacgttctaatctctgcaagccctataagatcaa
ttcacgttgagaaggagaaagaaaagattcttacttagagtctctgctgtctgtataaggaattcgcagagtctgctt
tagaagaaccaggaaaaggatcgttcttgaaccttcacatctccaggaaaagtatagtagcatgacaggactagatggtaaga
ccgaactcaaatgcttctttaaacttcaagattagactcttggaggatggaatagagaatgagacaatgcaggctttg
actttgcggtttcatggagcctgagatgatactccatattctgtgtaacttttcacatctaccaacgttaacatagttgtattg
gacctaatcctttgcatcagttgactgaccagacggattaccaagacaagtattataacaagataatgtccatatacacaatat
gctgagactttccatggggaggaaattgactggatccataaagttttctcgctttggtgatgtggactaggtttcgtct
agcaaaagaaaacataaggctttgttctctgcttttagagtactatcaggcatggcttgagatgacaatccaagtgaggag
gagatggaaccatctcatgtgagaccaattgtgaagcacaacacaagtacctgacatggcgagcacaaggatcctggac
atggtcttctaaaagattagtaggtgaagcaaaggcaaaggagctgctaaggatttctgttcaatggggtggatgagttg
gcacaaaacattcattgattactttccagagtaccaaacagaagatggaactgtaagcgataaagaagtatcattgggaagtca
tatgaaactcgtccatgggatttaacaggacaattatcggctaa

Table 1. Nucleotide sequences of Arabidopsis phytochromobilin synthase HY 2

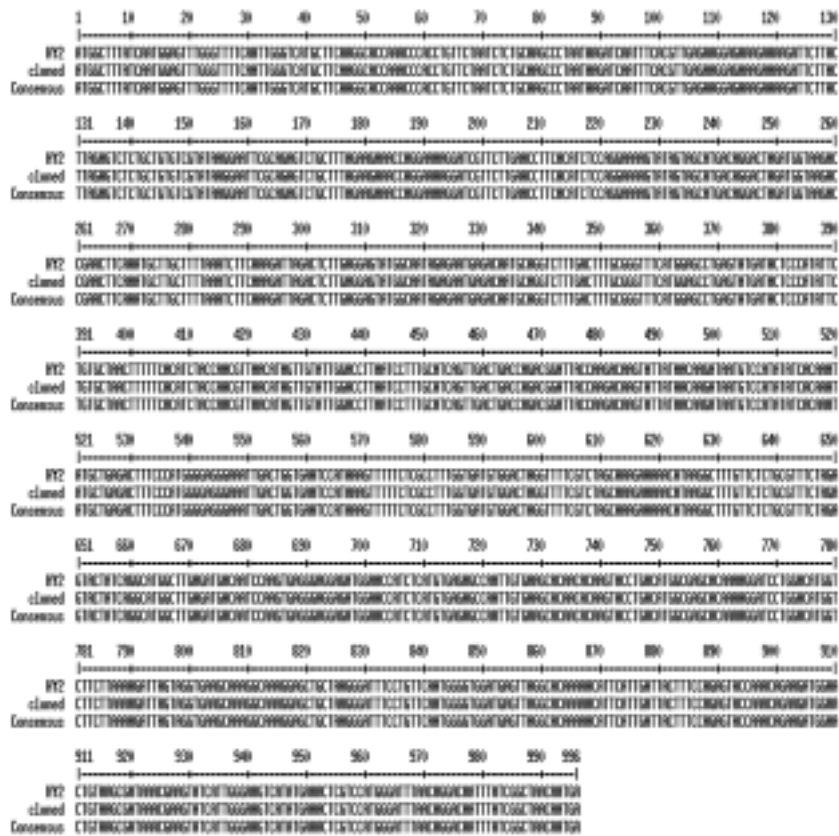


Fig. 17 Alignment between Arabidopsis Phytochromobilin synthase HY2 and cloned HY2 (NCBI blast search program 사용)

라. Phytochromobilin synthase HY2 대장균내 발현

1) Phytochromobilin synthase HY2의 발현

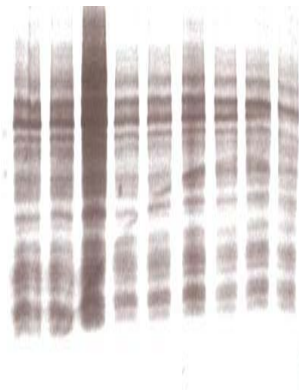
준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 kanamycin(pET28a-HY2), (pET29a-HY2)이 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하여 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하기 위해 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM

Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

2) Phytochromobilin synthase HY2의 SDS-PAGE 확인

Phytochromobilin synthase HY2의 발현여부를 확인하기 위하여 5% stacking, 15% separating gel을 이용한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)를 실시하였다. 전기영동한 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 염색한 후, 탈색 용액 (10% acetic acid, 10% methanol)으로 탈색하였다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



M : Low molecular weight marker

1 lane : negative control (0.5mM IPTG induction)

2 lane : negative control (no induction)

3 lane : HY2 #1 (0.5mM IPTG induction)

4 lane : HY2 #1 (no induction)

5 lane : HY2 #2 (0.5mM IPTG induction)

6 lane : HY2 #3 (0.5mM IPTG induction)

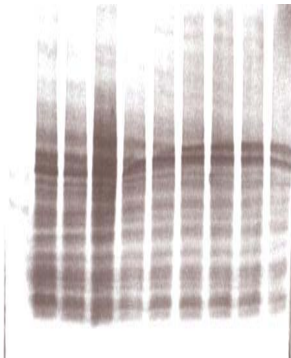
7 lane : HY2 #4(0.5mM IPTG induction)

8 lane : HY2 #5(0.5mM IPTG induction)

9 lane : HY2 #6(0.5mM IPTG induction)

Fig. 18 Detection of pET28a cloned Phytochromobilin synthase (HY2) among the Total protein in *E.coli* BL21DE3

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



M : Low molecular weight marker
1 lane : negative control (0.5mM IPTG induction)
2 lane : negative control (no induction)
3 lane : HY2 #1 (0.5mM IPTG induction)
4 lane : HY2 #1 (no induction)
5 lane : HY2 #2 (0.5mM IPTG induction)
6 lane : HY2 #3 (0.5mM IPTG induction)
7 lane : HY2 #4 (0.5mM IPTG induction)
8 lane : HY2 #5 (0.5mM IPTG induction)
9 lane : HY2 #6 (0.5mM IPTG induction)
9 lane : HY2 #7 (0.5mM IPTG induction)

Fig. 19 Detection of pET29a cloned Phytychromobilin synthase (HY2) among the Total protein in *E.coli* BL21DE3

현재 대장균 발현백터인 pET28a 및 pET29a에 성공적으로 서브클로닝하였지만, 그 발현량이 너무 약하여 앞으로 발현조건을 확립하여 변이 재조합 phycoerythrin을 생산하는 오피노백터인 pET22b or 32b/ Mutational RPE βα와 함께 co-transformation시켜 재조합 phycoerythrin의 assembly가 성공적으로 이루어져 붉은 색깔을 띠는지 확인할 예정이다.

7. 보조단백질 Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B)의 대장균내 발현

가. Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 primer 설계

Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) 유전자의 증폭은 미국 ATCC로부터 *Nostoc spp.*의 genomic DNA (29133D)를 구입하여 Genomic PCR을 실시하였다. PCR에 사용한 primer는 대장균 내 발현백터인 pET22b 및 pET28b에 서브클로닝할 수 있게 제한효소 염기서열을 첨가하였으며 그 sequence는 다음과 같다.

NosPEBA-forward : 5'-NNNCATATGCTCAATTCCCAATCCCA-3' (*Nde* I)

NosPEBA-backward : 5'-NNNCTCGAGTCTTTTACTTGCACTAACTGC-3' (*Xho* I)

NosPEBB-forward : 5'-NNNCATATGAATTTCGGAGCGAAGCGAC-3' (*Nde* I)

NosPEBB-backward : 5'-NNNCTCGAGCTTGACGACTGTTAATTTTCT-3' (*Xho* I)

그리고 PEB A,B 유전자의 분리 및 성공적인 벡터 구축을 Fig. 20, 21을 통해 확립하였다. 벡터의 구축은 각각의 유전자를 발현시키는 방법과 함께 두 개의 유전자를 하나의 promoter하에 두어 operon에 의해 발현시키는 방법을 모두 구축하였다. 특히 이 실험과 함께 오피론벡터인 pET22b와 32b/ Mutational RPE $\beta\alpha$ 와 함께 co-transformation시켜 재조합 phycoerythrin의 assembly가 성공적으로 이루어져 붉은 색깔을 나타내는지 확인할 예정이다.

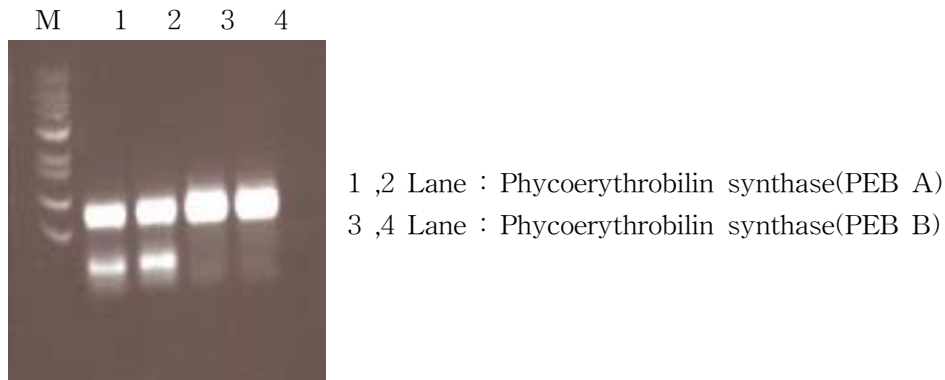


Fig. 20 Detection of Phycoerythrobilin synthase (PEB A,B) full gene by genomic PCR

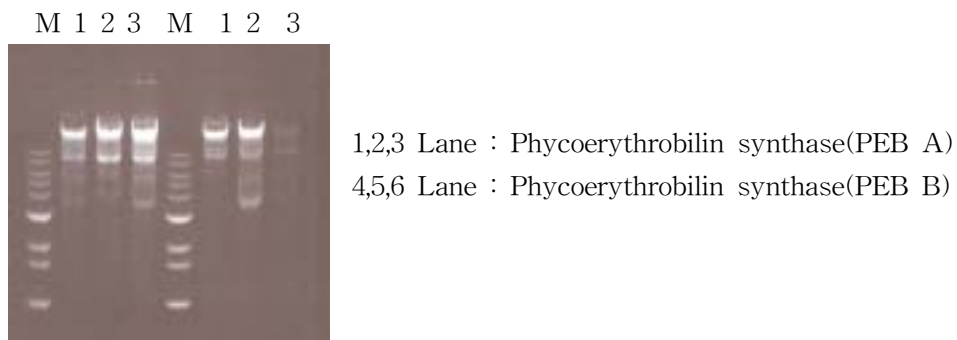


Fig. 21 Construction of Expression vector

나. Phycoerythrobilin synathase(PEB A,B) 대장균 내 발현

1) Phycoerythrobilin synathase(PEB A,B) 의 발현

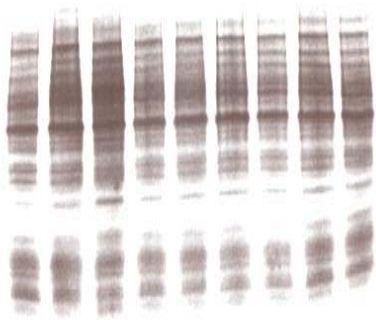
준비된 재조합 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21DE3를 kanamycin(pET28a-HY2),

(pET29a-HY2)이 첨가된 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6 정도가 되었을 때까지 키운 후, IPTG를 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하여 재조합 단백질의 inclusion body 생성을 억제하기 위해 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1 mM PMSF와 1 mM DTT가 포함된 protein extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후, 20,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 *E. coli* cell debris를 제거하였다.

2) Phycoerythrobilin synthase(PEB A,B)의 SDS-PAGE 확인

Phycoerythrobilin synthase(PEB A,B)의 발현여부를 확인하기 위하여 5% stacking, 15% separating gel을 이용한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)를 실시하였다. 전기영동한 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 염색한 후, 탈색 용액 (10% acetic acid, 10% methanol)으로 탈색하였다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



M : Low molecular weight marker

1 lane : negative control (0.5mM IPTG induction)

2 lane : negative control (no induction)

3 lane : PEB A #1 (0.5mM IPTG induction)

4 lane : PEB A #1 (no induction)

5 lane : PEB A #2 (0.5mM IPTG induction)

6 lane : PEB A #3 (0.5mM IPTG induction)

7 lane : PEB A #4 (0.5mM IPTG induction)

8 lane : PEB A #5 (0.5mM IPTG induction)

9 lane : PEB A #6 (0.5mM IPTG induction)

9 lane : PEB A #7 (0.5mM IPTG induction)

Fig. 22 Detection of pET22b cloned phycoerythrobilin synthase (PEB A) among the Total protein in *E.coli* BL21DE3

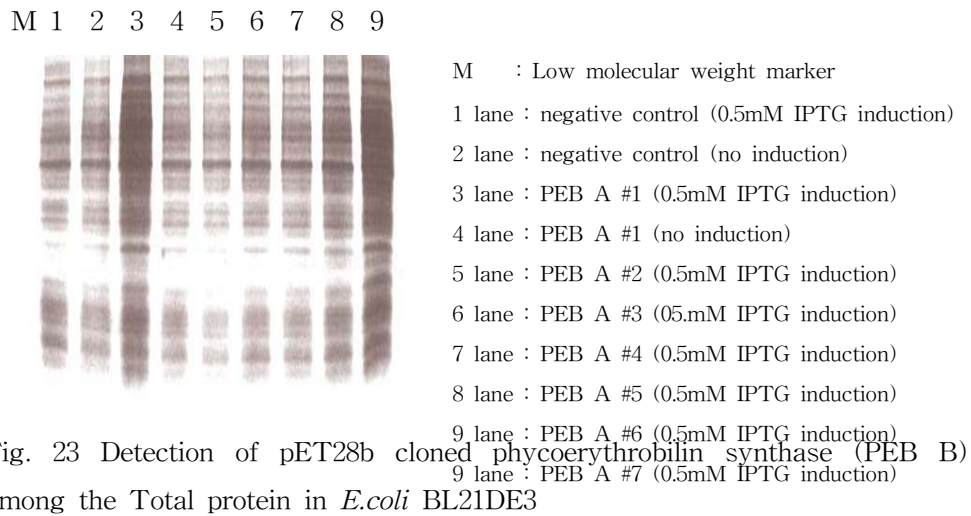


Fig. 22, 23을 통해 알 수 있듯이 지금까지의 실험으로 충분한 양의 발현량을 확보하지 못하였으나 발현조건을 확립하여 본 연구의 목적에 맞게 실험을 진행할 예정이며 PEB A/B가 정상적으로 발현이 되면 phycoerythrin과 함께 coexpression 시켜 붉은색을 나타내는 실험 조건을 확립하고자 한다.

1 절 재료 및 방법

1. 실험재료

Phycoerythrin의 표준색소(단백질함량 30%)는 홍조류의 B-phycoerythrin (*Porphyridium crueutum*), R-phycoerythrin(*Porphyra tenera*), r-phycoerythrin (*Porphyra tenera*)를 사용하였고 선택 관능미가 우수한 0.2 mg/ml 농도를 사용하였다. 실험색소로 남조류(*Trichodesmium erythraeum*)색소 및 홍조류색소를 사용하였다.

유익균억제 실험에 지표균으로 사용한 균주는 *L. acidophilus* KFRI162, *Lactobacillus brevis* KFRI146, *Lactobacillus casei* KFRI228, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N3와 SKD1016, *Lactobacillus plantarum* KFRI163, *Lactobacillus sake* KFRI237, *Enterococcus faecium* KFRI133, KFRI134, KFRI195, *Luconostoc cremori* KFRI241, *Luconostoc mesenteriodes* KFRI351, KFRI155이었다.

색소 분석에 사용된 시료는 캔디류로 오 맛캔디, 종합 캔디, 자두 캔디, 허브류 플러스를, 젤리류로 과일 나라, 후르스마, Trolli를, 카라멜로서 새콤달콤을, 음료류로 네버스탑 레드, MASH, 게토레이, Mystic, 파워에이드, Welch 's, 딸기우유를, 빙과류로 죠스마, 스크류바를, 소스류로 딸기시럽을, 육가공품으로 알뜰소시지를, 수산가공품으로 게맛살을, 주류로 Boon's, 홍주를, 분말식품으로 제티를, 과자류로 스타베리를, 그리고 일반색소로 치자 황색소, 식용색소 황색 4호, 파프리카, rose bengal, neutral red를 사용하였다.

사용장비 및 기구는 Sonicator(Fisher Scientific, FS110), Water bath(Chang Shin Scientific Co.), Spectrophotometer(Jasco, V-550), Spectrocolorimeter(Color Quest Spere, 6321 Hunter Lab), Color-Chips(시부카와 이쿠요시 색도 표)이었다.

2. 실험방법

남조류색소는 10일간 창가에서 배양한 1 L 남조류를 10 ml에 재현탁 시켰으며 10분간 sonication 시킨 후 0.45 μ m Filter로 여과시키고 30,000 Mwt Filter로

걸러진 상층 부분을 멸균 증류수 10 ml로 현탁하여 사용하였고, 홍조류(laver) 색소는 0.5 M NaCl로 추출하여 30,000 Mwt filter에 여과 한 뒤 상층을 동량의 멸균 증류수로 현탁하여 사용하였다. 단백질해 및 용혈성 비교 시료는 치즈 starter인 *Enterococcus faecalis* SKD1012, 1013, 1014, 1015 균주, 그리고 대표적 식중독균주인 *Escherichia coli* O157 H:7과, *Staphylococcus aureus* KFRI171을 12시간 배양한 후에 원심분리 상등액을 0.45 μ m Filter로 여과하여 사용하였다.

단백분해성은 1%, 5%, 10%의 milk agar를, 당분해성은 1%, 5%, 10%의 전분 agar를, 용혈성은 5%의 blood agar를 사용하였고 스텐레스 실린더에 100 ul씩 점적하여 30 $^{\circ}$ C에서 12시간 방치후에 분해환을 조사하였다. 그리고, 액상에서 용혈성은 2%의 blood broth에 시료를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치 후에 540nm에서 흡광도를 조사하였다.

색소에 의한 장내 유익균 억제는 MRS hard agar(1.5%) 위에 MRS soft agar(0.75%)와 지표균을 섞어 lawn으로 하였고, 그 위에 스텐레스 실린더에 100 ul씩 점적하여 유익균의 억제환을 조사하였다.

식품 미생물에 대한 최소 억제 농도는 표준색소는 최적 선택 농도를 기준(0.2 mg/ml)으로 하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 조사하였고, 남조류 색소와 홍조류 색소는 stock solution의 원액 1/2, 1/4, 1/8 희석액을 유익균 억제 방법과 같이 하였고 지표균으로는 *L. acidophilus* KFRI162를 사용하였다.

동물에 대한 독성 실험은 수컷 Sprague-dawley(SD) 쥐를 기본 식이(퓨레 쥐 사료)로 2주일간 예비 사육하였고 동물 실험실의 사육조건은 온도 24 \pm 2 $^{\circ}$ C 습도 55~60%로 항상 유지시켰으며 명암은 낮 12시간(07: 00~19: 00)을 주기로 자동 조절 되도록 하였고 물과 고형 사료는 자유급식 시켰다. 실험동물은 처리군당 16마리씩 대조군, 홍조류색소 투여군(시판식품 색소의 동량 발색량의 홍조류 색소량), 홍조류색소 2배 투여군, 홍조류색소 3배 투여군, 남조류색소 투여군으로 나누어 3주 사육하였다. 쥐는 처치전 18시간을 절식시켜 dry ice로 마취하였고 혈액을 복부 대동맥과 심장에서 채혈하여 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT)를 측정하였으며, 간과 지라를 적출하여 0.9% saline으로 세척 한 후 여과지로 물기를 제거하여 무게를 측정하였고, 간은 냉동실(-20 $^{\circ}$ C)에 보관하면서 superoxide dismutase(SOD) 활성도를

측정하였다.

혈청 중의 효소 활성 측정은 혈청 중의 glutamic oxalocetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성은 Reitman-Frankle법에 따라 조제된 kit 시액(영동제약)을 사용하여 측정하였고, 효소활성 단위는 혈청 1ml당 karmem unit로 표시하였다.

간 조직의 Superoxide dismutase활성도 측정은 간 조직 g당 4배량의 0.25M sucrose buffer를 가하여 균질기(Ultra-turrax J25)로 15000rpm에서 3분동안 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 12,000rpm에서 15분간 원심분리(Beakman, Annti J 25I centrifuge) 하였으며 상층액을 cytosol 분획으로 사용하였다.

또한 간 조직 중에 SOD 활성도는 조제된 Ransod kit(Randox)를 사용하여 측정하였다.

홍조류 색소와 비교하기위한 시판식품의 색소 추출은 다음과 같이 하였다.

캔디류와 젤리류는 20g씩 취하였고 증류수를 가하여 100ml가 되도록 정용시켰으며 70℃에서 30분간 가열하면서 잘 저어 녹인 다음에 Whatman No. 42 filter paper로 여과시켜 여과액을 색소 추출액으로 하였다.

카라멜은 20g씩 취하였고 증류수를 가하여 100ml가 되도록 정용시켰으며 70℃에서 30분간 가열하면서 잘 저어 녹인 액을 11,325×G로 20분간 원심분리 하였으며, 최상층의 유지 부분을 시약스폰으로 제거하였으며 상층액을 Whatman No. 42 filter paper로 여과시켜 여과액을 색소 추출액으로 하였다.

진한 시료인 스포츠 음료와 주류는 20ml를 취하여 증류수를 가하였고 100ml가 되도록 정용시킨 후 Whatman No. 42 filter paper로 여과하여 사용하였고 또한 알코올을 함유한 시료는 80℃에서 가열하여 알코올을 휘발시켜 제거한 다음 다시 증류수를 보충하여 색소 추출액으로 하였으며 열은 시료인 우유 탄산음료와 희석 과즙음료는 50ml의 증류수를 가하였으며 100ml가 되도록 정용시킨 후 Whatman No. 42 filter paper로 여과하였다. 또 탄산음료인 Welch's는 5배 희석하여 실온에서 탄산 gas기포가 발생되지 않을 때까지 충분히 방치시켜 사용하였으며 색소 추출이 어려운 딸기우유는 17,096×G에서 20분간 원심분리한 후에 최상층의 유지부분을 시약스폰으로 제거하였고, pH를 4.7로 조절하여 단백질 성분을 응고시키고 다시 17,096×G에서 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 pellet은 dichloromethan, benzen, hexane, buthannol, methanol, ethylacetate,

acetone, alcohol, chloroform, ether를 처리하였다.

육가공품과 수산가공품은 착색부분 30g을 큰 여과지에 취하여 에테르로 몇 번 씻어 탈지하였고 실온에서 24시간 방치하여 에테르를 날려보낸 후에 5배의 증류수를 가하였고 70℃에서 30분간 가열하면서 색소를 용출하였다. 그 용출액을 11.325×G로 20분간 원심분리 하였고 고형물을 제거하였고 그 액을 Whatman No.42 filter paper로 여과하여 사용하였다.

분말식품은 10g을 증류수로 100ml가 되도록 정용시켜 녹인 후에 그 액을 Whatman No. 42 filter paper로 여과하여 사용하였다.

과자류는 20g을 70%(v/v) 에탄올 200ml에 정용시켜 24시간 방치하였고, 80℃에서 그 액의 알코올을 휘발시켜 제거 한 다음 증류수를 보충하여 Whatman No. 42 filter paper로 여과하여 색소 추출액으로 하였다.

빙과류는 녹인 후 2ml을 취하여 증류수로 100ml가 되도록 정용시켜 Whatman No.42 filter paper로 여과하여 색소 추출액으로 하였다.

치자황색소, 식용색소 황색4호, rose bengal, neutral red는 0.04g을 증류수 100ml에 녹였고 파프리카 색소는 0.04g을 70%(v/v) 에탄올 100ml에 용해하여 Whatman No. 42 filter paper로 여과하여 추출액을 사용하였다.

그리고, 색소가 추출 된 액상 시료의 흡광 peak는 spectrophotometer(Jasco, V-550, UV/ vis spectrophotometer)로 700에서 300nm까지 scanning하여 조사하였으며, 색소가 추출 된 액상 시료의 L, a, b값은 spectrocolorimeter(Color Quest Sphere, 6321 Hunterlab)를 사용하여 측정하였다. 또한, 색소가 추출 된 액상 시료는 직경 40mm인 plastic petridish에 각 5ml씩 넣어 흰종이를 바닥에 깔 후, 색을 시부카와 이쿠요시의 COLOR-CHIPS 색도표와 육안으로 비교하여 등급화 하였다.

분말색소 용해도 증진을 위한 실험은 동결건조한 phycoerythrin을 0.25%, 0.5%, 0.75%의 농도별로 유화제 첨가에 따른 실온, 물중탕, 물리적 방법을 달리 하여 색의 1~15로 구분한 척도로 경시적인 변화와 Lab값으로 색의 변화를 살폈다.

2절 연구수행 결과

1. 홍조류 색소의 독성 시험 및 식품 활용성 검사

가. 남조류 및 홍조류 색소의 단백질해성, 전분분해성 및 용혈성 조사

단백분해성 조사에서 3개의 표준 phycoerythrin, 남조류 및 김의 phycoerythrin, 그리고 식중독 균인 *E.coli*와 *S. aureus* 배양액에서는 분해성이 나타나지 않았고 치즈 starter인 *E. faecalis* 배양액에서는 단백질분해성이 나타났다. *E. faecalis*는 우유를 응고시켜서 치즈를 제조하므로 배양액으로 단백질분해효소를 분비하는 것으로 여겨졌으며 다른 시료는 단백질분해효소 특성이 없는 것으로 생각되었다 (Table 1).

Table 1. Proteolysis of pigments and cultured broth on skim milk

Concentration of skim milk	Pigments and cultured broth										
	B-phycoerythrin	R-phycoerythrin	r-phycoerythrin	Blue green algae	Laver	SKD 1012	SKD 1013	SKD 1014	SKD 1015	<i>E.coli</i> O157 H:7	<i>S. aureus</i> KFR1171
Skim milk 1%	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Skim milk 5%	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Skim milk 10%	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

* SKD: *Enterococcus faecalis*

전분단백분해성 조사에서 표준 phycoerythrin, 남조류 및 김의 phycoerythrin, 그리고 *E.coli*와 *S. aureus*, *E. faecalis* 배양액에서 전분을 분해하지 못하여 모두 전분분해효소 특성이 없는 것으로 생각되었다 (Table 2).

Table 2. Amyolytic activities of pigments and cultured broth on starch solution

	B-phycoerythrin	R-phycoerythrin	r-phycoerythrin	Blue green algae	Laver	SKD 1012	SKD 1013	SKD 1014	SKD 1015	<i>E.coli</i> O157 H:7	<i>S. aureus</i> KFRI171
Starch 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

** SKD: *Enterococcus faecalis*

용혈성 조사에서 3개의 표준 phycoerythrin, 남조류 및 김의 phycoerythrin에서는 용혈성이 나타나지 않았고, 식중독 균인 *E.coli*와 *S. aureus* 배양액과 치즈 starter인 *E. faecalis* 배양액에서는 용혈성이 나타났다(Table 3). *E.coli*와 *S. aureus*는 식중독균의 특성인 용혈성을 나타내었고 *E. faecalis*는 강력한 단백질 효소를 분비(Table 1)하여 용혈성을 나타낸 것으로 생각되었다.

Table 3. Hemolysis of pigments and cultured broth on sheep blood

	B-phycoerythrin	R-phycoerythrin	r-phycoerythrin	Blue green algae	Laver	SKD 1012	SKD 1013	SKD 1014	SKD 1015	<i>E.coli</i> O157 H:7	<i>S. aureus</i> KFRI171
Blood agar(5%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Blood broth(2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

* SKD: *Enterococcus faecalis*

나. 색소에 의한 장내 유익균 억제 및 식품 미생물에 대한 최소 억제 농도 조사

1) 색소에 의한 장내 유익균 억제 조사

식품에서 phycoerythrin 색소와 식품발효 유익균의 병행사용과 경구 투입시 장내 유익균의 억제 가능성을 조사하였다. 장내 젖산균인 *L. acidophilus*, *L. brevis*, *Enterococcus faecium*과, 치즈 starter인 *L. casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*와 김치 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*, *Luconostoc cremoris*, *Luconostoc mesenteriodes*, 그리고 술 젖산균인 *Lactobacillus sake*를 억제하지 못하여 발효식품 종균 및 장내 유익균에 해로운 영향이 없을 것으로 생각되었다 (Table 4).

Table 4. Inhibition zone of indicated strain on agar plate by phycoerythrin and cultured broth (unit: mm)

Indicator Strain	B-Phycoerythrin	R-Phycoerythrin	r-Phycoerythrin	Blue green algae	Laver	SKD 1013	SKD 1014	SKD 1015	<i>E.coli</i> 0157 H:7	<i>S. aureus</i> KFRI171
KFRI 162	-	-	-	-	-	13	10	9	-	-
KFRI 146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKD 1016	-	-	-	-	-	11	11	9	-	-
KFRI 163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 133	-	-	-	-	-	8	7	7	-	-
KFRI 134	-	-	-	-	-	12	10	9	-	-
KFRI 195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFRI 352	-	-	-	-	-	16	13	12	-	-
KFRI 155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* KFRI162: *L. acidophilus*, KFRI146: *Lactobacillus brevis*, KFRI228: *Lactobacillus casei*, N3, SKD1016: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, KFRI163: *Lactobacillus plantarum*, KFRI237: *Lactobacillus sake*, KFRI133, KFRI134, KFRI195: *Enterococcus faecalis*, KFRI241: *Luconostoc cremori*, KFRI351, KFRI155: *Luconostoc mesenteriodes*

2) 식품 미생물에 대한 색소의 최소 억제 농도 조사

Crude하게 추출된 색소에 어느정도의 순수 색소가 포함되어 있는지 농도를 구하기 위하여 표준 색소와 김색소, 남조류색소를 scanning하여 공동의 흡수과정을 조사하였다. 표준색소의 흡광 peak를 조사한 결과, B-phycoerythrin는 540 nm와 563nm, R-phycoerythrin는 496nm와 539nm, r-phycoerythrin는 496nm와 521 nm에서, Laver색소는 496nm, 546nm, 564nm, (539nm는 다른 peak에 가렸을 수도 있음), 남조류 파쇄액은 439nm, 490nm와 675nm에서 흡수 peak가 나타났다(Table 5). 각 색소는 각각 고유의 흡수 peak를 가지고 있어서 일정 peak에서 농도비교가 어려웠고, 단백질 흡수 파장인 280nm에서는 농도 0.2 mg/ml로 첨가된 3개의 표준 색소는 OD, 0.3으로 OD값이 일률적으로 나타났으나, partial purification된 남조류(OD, 0.68)와 홍조류(OD, 0.45)는 표준색소의 색농도 보다 높게 나타나 다른 단백질의 혼입이 많이 되었음을 알수 있었다. 또한, 일반적으로 phycoerythrin을 분석하는 545nm에서 흡수 peak가 남조류는 OD값이 0.20, 김은 OD값이 0.25, B-phycoerythrin는 0.50로 나타나 남조류와 김의 정확한 색소농도는 알기 어려웠다(Table 5).

Table 5. Optical characters of standard and crude extracted phycoerythrins

Pigments	Optical characters		
	Absorbance(OD)		Peaks on visable range (λ nm)
	280 nm	565 nm	
B-phycoerythrin	0.30	0.44	540, 563
R-phycoerythrin	0.30	0.16	496, 539
r-phycoerythrin	0.28	0.33	496, 521
Laver	0.45	0.32	496, 546, 564
Blue green algae	0.68	0.24	439, 490, 675

식품 미생물에 대한 최소 억제 농도는 표준색소의 최적 선택 농도를 기준(0.2 mg/ml)으로 하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 조사하였고, 남조류 색소와 홍조류 색소는 stock solution의 원액 1/2, 1/4, 1/8 희석액을 유익균 억제 방법과 같이

하였으며 지표균으로는 *L. acidophilus* KFRI162를 사용하였다. 표준색소에서는 최적 색택 농도 보다 높은 0.4 mg/ml에서도 억제제가 나타나지 않았고 남조류 색소와 홍조류 색소도 원액에서 억제제가 나타나지 않았으므로 적당한 색택을 지닌 식품사용농도 보다는 최소억제농도가 높을 것으로 생각되었다(Table 6).

Table 6. Minimal inhibition concentration of standard and crude extracted phycoerythrins against *Lactobacillus acidophilus*

Pigments	Concentration, mg/ml (or dilution ratio for original concentration)			
	0.05	0.2	0.1	0.4
B-phycoerythrin	-	-	-	-
R-phycoerythrin	-	-	-	-
r-phycoerythrin	-	-	-	-
	1/8	1/4	1/2	1/1
Laver	-	-	-	-
Blue green algae	-	-	-	-

따라서, phycoerythrin은 일반 식품에 나타나는 단백질, 당 등에 영향을 주지 않고 식중독의 원인 중에 하나인 hemolysin의 특성도 나타나지 않으므로 식품에서 사용이 안전할 것으로 생각되었다.

다. 색소의 독성시험

실험동물의 체중, 간, 지라의 무게는 Table 7 및 8에 표시한 바와 같다. 1주간 실험 식이를 투여하여 체중변화를 분석한 결과 식이 섭취량은 D군이 114.36g 가장 많았으나 체중 증가량은 B군이 223.89±11.5로 가장 높게 나타났다. 2주째는 D군이 식이섭취량과 체중 증가량이 각각 228.741g과 249.21±12.8로 가장 높은 수치를 나타내었다. 마지막으로 3주째는 D군이 320.215g으로 식이 섭취량은 많았으나 체중 증가량은 A군이 296.05±28.4로 가장 높은 증가량을 나타내었다. 3주간의 식이 섭취량과 체중 변화는 비슷하게 증가된 것으로 보여졌

으며 홍조류 색소 3배투여군이 대조군과 가장 비슷한 증가율을 보였고 5군 모두 차이는 있었으나 그 범위가 크지 않아 유의적 차이는 보이지 않았다. 간의 총 중량은 대조군과 실험군이 비슷하였고 체중 100 g 당 간 중량은 홍조류색소 2배투여군을 제외한 실험군들은 대조군에 비하여 낮게 측정되었다. 이러한 점으로 보아 홍조류색소 및 남조류색소는 간 중량에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 지라는 림프구를 생산하고 수명이 다된 혈구를 파괴하는 장소이며, 비장의 크기는 필요에 따라 매우 빈번하게 변하는 것으로 알려져 있다. 실험동물의 비장 무게를 측정된 결과 홍조류 색소를 3배처리 한 군이 비장무게가 가장 높게 측정되었으나 체중 100 g 당 비장의 중량은 대조군과 실험군이 비슷하여 개체간 유의적 특성은 나타나지 않았다.

Table 7. 실험동물의 몸무게 및 식이 섭취량

	A		B*		C*		D*		E*	
	몸무게	식이 섭취량(g)	몸무게	식이 섭취량(g)	몸무게	식이 섭취량(g)	몸무게	식이 섭취량(g)	몸무게	식이 섭취량(g)
2주 (예비사육)	167.21 ±6.1	.	157.04± 7.4	.	164.01 ±4.2	.	174.76 ±4.3	.	158.73 ±5.8	.
3주	214.45 ±14.1	94.093	223.89± 11.5	108.281	209.75 ±8.2	105.48	208.41 ±15.6	114.36	200.26 ±9.8	90.96
4주	251.09 ±17.3	189.175	248.12± 18.3	218.45	226.18 ±13.6	210.972	249.21 ±12.8	228.741	228.99 ±11.2	185.07
5주	296.05 ±28.4	263.445	280.88± 23.4	323.44	267.47 ±16.7	315.05	281.68 ±18.5	320.215	265.92 ±13.6	311.6

-A:대조군 -B:홍조류(시판 적색색소 발색량에 동일한 양)색소처리군 -C:홍조류색소2배처리군

-D:홍조류3배처리군 -E:조류처리군

* 색소 첨가하여 제조한 사료 ^ 모든 수치는 평균과 표준편차를 사용하여 나타 냄

Table 8. 실험동물의 간 무게 및 비장무게 측정 값

	A	B	C	D	E
ΔA	5.17±0.33	0.33±0.29	2.763±.72	0.64±0.24	0.5±0.15
SOD Activity (U/g Haemoglobin)	43.81	2.79	23.41	5.42	4.23

-A:대조군 -B:홍조류(시판 적색색소 발색량에 동일한 양)색소처리군 -C:홍조류색소2배처리군

-D:홍조류3배처리군 -E:남조류처리군 ^ 모든 수치는 평균과 표준편차를 사용하여 나타 냄

GOT 및 GPT는 간세포에 다량 존재하는 효소로 간 손상시 세포외로 다량 유출되어 혈액에 농도가 증가됨으로서 간 손상의 지표로 이용되는 효소이다. 혈청 GOT활성도는 대조군(142.93±12.1unit/ml serum)과 비교하였을 때 B군(133.18±11.26unit/ml serum)과 C군(130.01±9.31unit/ml serum)은 낮은 수치를 나타내었고, D군(169.09±16.96unit/ml serum)과 E군(164.369±12.33unit/ml serum)은 높은 수치를 나타내었으나, 간 100g당 효소 증가율이 대조군은 98%, B군은 93%, C군은 92%, D군은 112%, E군은 103%으로 대조군에 비하여 높은 증가율을 보이지 않아 유의적 차이가 없었다. 그러나 일반적으로 간염의 지표로서 GOT보다 GPT를 더 많이 이용하는 경향이 있는데 본 실험에서의 혈청 중 GPT 활성도는 대조군(60.635±4.87)에 비하여 모든 처리군이 높았고 간 100g당 효소 증가율은 대조군은 73%, B군은 87%, C군은 93%, D군은 126%, E군은 121%으로 높은 증가치를 나타내어 유의적 차이를 나타내었으며 색소를 투여한 군 모두 간염의 우려가 있다고 생각되었다.

간 손상의 지표인 GOT는 대조군에 비하여 효소 증가율에 유의적 차이를 나타내지 않았지만, GPT는 효소 증가율이 현저하게 증가되어 유의적 차이가 있었으며 간 기능 회복시키는 작용에 영향이 있다고 판단되었다(Table 9).

Table 9. 혈청 중 GOT, GPT 측정 값

Enzyme activity (u/ml serum)	5weeks				
	A	B	C	D	E
GOT	142.93±12.1	133.18±11.26	130.01±9.31	169.09±16.96	164.369±12.33
GPT	60.635±4.87	75.938±6.23	77.291±7.29	109.854±11.36	112.063±8.26

-A:대조군 -B: 홍조류(시판 적색색소 발색량에 동일한 양)색소처리군 -C:홍조류색소2배처리군

-D:홍조류3배처리군 -E:남조류처리군 ^ 모든 수치는 평균과 표준편차를 사용하여 나타 냄

SOD는 세포내 해독 체계 중 하나로 활성은 Superoxide anion(O₂⁻)과 같은 free radical의 생성이 많을 때 증가되는데 대조군이 43.81U/g Haemoglobin로 나머지 군들에 비해 높은 수치를 나타내었다. 대조군을 제외한 실험군은 낮은 SOD활성을 나타내어 홍조류 색소 및 남조류 색소는 간세포 손상에 문제가 되지 않는 것으로 생각되었다(Table 10).

Table 10. 간 조직 중 SOD 활성도에 미치는 영향

	A	B	C	D	E
간무게	10.88±3.24	10.057±2.96	9.957±2.24	9.424±2.56	8.83±1.99
비장무게	1.638±0.32	1.364±0.24	1.553±0.33	1.714±0.48	1.384±0.19

-A:대조군 -B: 홍조류(시판 적색색소 발색량에 동일한 양)색소처리군 -C:홍조류색소2배처리군
 -D:홍조류3배처리군 -E:남조류처리군 ^ 모든 수치는 평균과 표준편차를 사용하여 나타 냄

라. 음료류와 주류에서 색소의 활용성 검토

1) 시판 식품의 선택 조사

식품에 사용된 색소를 추출하여 분광 광도계, 색차계, 색도표를 사용하여 흡수 파장과 L, a, b값 그리고 색 등급화를 하여 홍조류 색소 이용에 기초자료로 활용하였으며 시판 식품에서 색소를 추출하여 각 각 측정된 결과는 Table 11과 같았다.

캔디류에서 적색 2호, 40호를 사용하여 제조된 오 맛캔디의 색소의 흡수 파장은 507nm 였으며, 밝기 정도를 나타내는 L값은 57.30으로 적색에서 파란색 정도를 나타내는 a값은 66.57로, 노란색에서 녹색정도를 나타내는 b값은 19.77로 나타났고, 색도표의 등급은 156에 해당되었다. 오 맛캔디 상표에는 적색 2호와 적색 40호의 색소를 사용하였는데 흡광 peak가 하나로 나타난 것으로 보아 두 색소 중 한 색소는 미량이 첨가되어 검출되지 않았거나 두 색소 모두 비슷한 지점에서 최대 흡광 peak를 갖는 것으로 보여졌다. 적색 2호를 사용하여 제조된

중합캔디는 흡수파장이 521nm 였으며 L값은 92.46으로 a값은 33.38로, b값은 4.25로, 나타났으며 색도표의 등급은 11에 해당되었다. 중합캔디는 a값이 상대적으로 높았다. 합성착색료를 사용하여 제조된 자두캔디의 흡수파장은 507nm였고 L값은 90.82으로 a값은 5.60로, b값은 6.71로, 나타났으며 색도표의 등급은 2에 해당되었다. 자두캔디는 색차계로 측정한 결과 밝기를 나타내는 L값과 노란색 정도를 나타내는 b값이 높았다. 합성착색료를 사용하여 제조된 허브큐 플러스는 최대 흡광도는 515nm였으며 L값은 68.598으로, a값은 47.17로, b값은 7.20로, 나타났고 색도표의 등급은 125에 해당되었다. 허브큐 플러스는 적색을 나타내는 a값이 상대적으로 높았고 흡수 파장도 적색쪽으로 높은 값을 나타내었으며 다른 시료에 비해 매우 붉은색을 나타내었다. 따라서, 캔디류 중 밝기를 나타내는 L값은 중합캔디가 높았고 적색에서 녹색 값을 나타내는 a값과 노란색에서 파란색 값을 나타내는 b값은 오 맛캔디가 높은 값을 가졌으며 오맛캔디는 다른 캔디에 비해 적색을 많이 띠었다.

젤리류에서 적색 2호, 황색 40호를 사용하여 제조된 과일 나라는 흡수파장이 424, 516nm였으며 L값은 80.70으로, a값은 6.49로, b값은 13.47로, 나타났고 색도표의 등급은 8에 해당되었다. 과일나라는 L값이 높았으며 b값이 높고 a값이 낮아 식품 자체는 진한 주황색으로 보였다. 합성착색료를 사용하여 제조한 후르스바의 흡수파장은 496nm였으며 L값은 89.65로, a값은 8.96으로, b값은 -0.61로, 나타났으며 색도표의 등급은 25에 해당되었다. 적색40호를 사용하여 제조한 Trolli는 최대 흡광도는 498nm였으며 L값은 59.94으로 a 값은 55.49로, b값은 19.99로, 나타났으며 색도표의 등급은 123에 해당되었다. Trolli는 a값이 시료 평균값에 비해 높았고 노란색 정도를 나타내는 b값도 상대적으로 높았으나 매우 붉은 색으로 보였다. 따라서, 젤리류 중에 L값은 후르스 바, a값과 b값은 Trolli가 높았다.

합성착색료를 사용하여 제조한 새콤달콤 카라멜은 최대 흡광도는 495nm였으며 L값은 89.37으로 a값은 8.41로, b값은 3.91로, 나타났고 색도표의 등급은 11에 해당되었다. 음료류에서 적색 2호와 황색 4호를 사용하여 제조된 네버스탑 레드는 흡수파장이 504nm였으며 L값은 58.94으로, a값은 66.48로, b값은 21.13로, 나타났으며 색도표의 등급은 156에 해당되었다. 네버스탑은 두 색소를 혼합하여 사용하였고 a값이 b값보다 상대적으로 높아 시료 자체는 매우 붉은색이

나타났다. 합성착색료를 사용하여 제조한 Mash는 L값은 62.46으로 a값은 7.12로, b값은 10.97로, 나타났고 색도표의 등급은 3에 해당되었다. 이 시료는 자체의 탁도가 높아 색소의 흡수과자를 읽을 수 없었으며 b값이 a값보다 상대적으로 높은 값을 가져 식품자체의 색은 분홍색으로 보여졌다. 적색 2호를 사용하여 제조한 게토레이는 최대 흡광도는 521nm였으며 L값은 70.00으로 a값은 44.04로, b값은 -6.28로, 나타났으며 색도표의 등급은 69에 해당하였다. 합성착색료를 사용하여 제조한 Mystic은 최대 흡광도는 448, 648nm였으며 L값은 86.97 으로 a값은 5.60로, b값은 7.32로, 나타났고 색도표의 등급은 2에 해당하였다. Mystic은 시료 자체색이 매우 열었으며 착색이 불용성으로 정확한 흡수 과장이 넓게 나타났기 때문에 색깔에 따른 정확한 흡수과장을 알 수 없었고, 또한 b값이 a값에 비해 상대적으로 높은 값을 나타냈다. 합성착색료를 사용하여 제조한 파워에이드의 흡수과장은 453, 521nm였으며 L값은 64.43으로, a값은 38.12로, b값은 28.27로, 나타났으며 색도표의 등급은 95에 해당하였다. 파워에이드는 a값이 b값보다 상대적으로 높게 나타났으며 흡수과장이 두 곳에서 나타난 것으로 보아 두 색소를 적절히 조합하여 제조한 것으로 보여졌다. 적색40호를 사용하여 제조한 Welch's는 흡수과장이 505nm였으며 L값은 69.24으로, a값은 49.50로, b값은 9.08로, 나타났으며 색도표의 등급은 97에 해당하였다. 흡수과장이 적색을 흡수하는 파장중에서 상대적으로 높은 파장에서 나타났다. 합성착색료를 사용하여 제조한 유제품인 딸기우유는 L값은 7.58으로, a값은 13.51로, b값은 4.96로, 나타났으며 색도표의 등급은 11에 해당하였다. 우유를 원심분리하여 유지분을 제거하고 pH 4.7로 조정하여 단백질을 응고시키고 여러 종류의 유기용매를 사용하여 색소 추출을 시도하였지만 추출이 불가능하였다. 하지만, 유지분을 제거하고 색차계로 측정 결과 a값이 상대적으로 높았고 우유 성분과 혼합하여 제조되어 시료 자체색은 분홍색을 띄었다. 따라서, 음료류 중, L값은 Mystic, a값은 welch's, b값은 파워에이드가 높은 값을 나타내었다.

빙과류에서 합성착색료와 적색2호를 사용하여 제조된 죠스바는 흡수과장이 516nm였으며, L값은 75.32으로 a값은 27.40로, b값은 -0.78로, 나타났고 색도표의 등급은 25에 해당하였다. 죠스바는 b값이 음(-)값으로 매우 붉은색을 나타내었다. 합성착색료를 사용하여 제조한 스크류바는 최대 흡광도는 518nm였으며 L값은 66.78으로, a값은 50.15로, b값은 -0.79로, 나타났고 색도표의 등급은 70에 해당

하였다. 스크류바는 a값이 상대적으로 높았으며 b값이 음값으로 매우 순수한 적색을 나타내었다. 따라서, 빙과류는 두 시료 모두 비슷한 L값, b값을 가졌으나 a값은 스크류바가 상대적으로 높은 값을 가졌다.

적색40호를 사용하여 제조한 소스류의 딸기시럽은 최대 흡광도는 506nm였으며 L값은 53.77으로 a값은 65.50로, b값은 -27.38로, 나타났고 색도표의 등급은 123에 해당하였다. 소스류의 흡수파장은 다른 적색 40호를 사용한 다른 시료와 비슷하였다. 이시료는 b값이 상당히 낮은 값을 가졌고 a값이 매우 높게 나타났으며 식품 자체색도 붉은색을 띄었다. 합성착색료를 사용하여 제조한 육가공품인 알뜰 소시지의 L값은 71.39으로 a값은 18.24 로, b값은 19.98로, 나타났으며 색도표의 등급은 25에 해당하였다. 시료를 에테르로 탈지한 후 증류수로 색소를 추출하였지만 시료자체의 탁도가 높아 흡수파장을 읽을 수가 없었다. 알뜰 소시지는 a값과 b값이 비슷한 값을 나타냈고 옅은 홍색을 띄었다.

합성착색료를 사용하여 제조한 수산가공품의 게맛살은 L값은 54.70으로 a값은 11.16로, b값은 11.45로 나타났으며 색도표의 등급은 24에 해당하였다. 게맛살도 에테르로 탈지하여 증류수로 추출하였지만 시료자체의 탁도가 높아 소시지와 마찬가지로 흡수파장을 읽을 수 없었다. a값과 b값이 비슷한 값을 가졌고 식품 자체색이 분홍색을 나타내었다. 주류에서 합성 착색료를 사용하여 제조된 Boon's는 흡수파장이 518nm였으며 L값이 75.08으로, a값이 24.12로, b값이 8.86로, 나타났고 색도표의 등급은 11에 해당하였다. Boon's는 최대 흡광도가 상대적으로 높은 값을 가졌고 a값도 높았지만 식품자체의 색은 약간 분홍빛을 나타내었다. 천연색을 사용하여 제조된 홍주의 흡수파장은 518nm였으며 L값은 75.08으로 a값은 24.12로, b값은 8.86로, 나타났고 색도표의 등급은 11에 해당하였다. 적색 40호를 사용하여 제조한 분말식품인 제티의 흡수파장은 504nm였으며 L값은 63.87으로 a값은 55.29로, b값은 -18.93로, 나타났고 색도표의 등급은 155로 나타났다. 적색40호를 사용하여 착색한 과자류인 스타베리의 흡수파장은 510nm였으며 L값은 58.87으로, a값은 64.13으로, b값은 22.92로, 나타났고 색도표의 등급은 124에 해당하였다.

치자 황색소의 흡수파장은 442nm였으며 L값은 78.42으로, a값은 45.90로, b값은 51.10로, 나타났고 색도표의 등급은 117에 해당하였다. 식용색소 황색4호의 흡수파장은 426nm였으며 L값은 76.73으로, a값은 13.51로, b값은 50.46으로, 나

타났고 색도표의 등급은 179에 해당하였다. Rose bengal의 흡수파장은 546nm였으며 L값은 41.17으로 a값은 19.53으로, b값은 24.40로, 나타났고 색도표의 등급은 194에 해당하였다. 파프리카의 흡수파장은 467nm였으며 L값은 64.29으로 a값은 74.46으로, b값은 42.33로, 나타났고 색도표의 등급은 180에 해당하였다. 파프리카는 지용성 색소로 알콜을 용매로 추출하였으며 a값과 b값이 상당히 높게 나타났고 주황색을 띄었다. Neutral red의 최대 흡광도는 529nm였으며 L값은 59.53으로 a값은 33.78으로, b값은 55.94로, 색도표의 등급은 124에 해당하였다. 따라서, 참고 색소 중에 흡수파장은 Rose bengal, 밝기를 나타내는 L값과 노란색을 나타내는 b값은 치자황색소, 붉은색을 나타내는 a값은 파프리카가 높은 값을 나타내었다.

한편, 홍조류 phycoerythrin은 김에서 분리한 단백질 색소로 pH 5.5~ 7.0에서 안정한 붉은색을 나타내었으나 시판식품의 pH를 조사 결과 alcohol을 함유한 식품을 제외 한 식품들이 4.0이 되지 않는 낮은 pH 가졌고 일반 색소도 alcohol로 추출한 파프리카 이외의 색소가 낮은 pH를 나타내어 식품 등에 이용하려면 낮은 pH를 고려하여야 할 것으로 보여졌다.

Table 11. 각 sample의 분광광도계, 색차계, 색도표의 측정 값

Brand name	Pigments	Items	peaks (nm)	Colorimeter value				Color table value	pH
				L	a	b	DE*		
오 맛캔디(청우식품)	적색2호,40호	캔디류	507	57.30	66.57	19.77	78.27	Y20 M80(156)	2.40
종합캔디(정든식품)	적색2호	"	521	92.46	33.38	4.25	5.67	M20(11)	2.59
자두캔디(해태)	합성착색료	"	507	90.82	5.60	6.71	9.38	Y10 M10(2)	2.41
허브큐 플러스(해태)	합성착색료	"	515	68.598	41.71	7.20	47.89	Y10 M70(125)	3.90
과일나라(맛고을식품)	적색2호, 황색40호	젤리	424,516	87.70	6.49	13.47	17.07	Y20 M10(8)	3.56
후르스바(맛고을식품)	합성착색료	"	496	89.65	8.98	-0.61	10.49	M30(25)	3.43
Trolli(에스통상)	적색40호	"	498	59.94	55.49	19.99	68.98	Y50 M70(123)	3.21
새콤달콤 카라멜(크라온)	합성착색료	카라멜류	495	89.37	8.41	3.91	10.48	M20(11)	2.68
네버스탑 레드(해태)	적색2호, 황색 4호	음료	504	58.94	66.48	21.13	74.70	Y20 M80(156)	3.00
Mash(일화)	합성착색료	"	-	62.46	7.12	10.97	31.80	M10(3)	2.78
계토티(제일제당)	적색2호	"	521	70.00	44.04	-6.28	49.00	Y10 M50(69)	3.24
Mistic(한미)	합성착색료	"	448,684	86.97	5.60	7.32	11.49	Y10 M10(2)	2.73
파워에이드(한국코카콜라)	합성착색료	"	453,521	64.43	38.12	28.27	64.20	Y60 M60(95)	3.47
Welch's(동서)	적색40호	"	505	69.24	45.90	9.08	52.22	Y20 M60(97)	3.35
딸기우유(빙그레)	NM	유제품		7.58	13.51	4.96	94.36	M20(11)	5.62
쫄스타(롯데)	합성착색료 적색2호	빙과류	516	75.32	27.40	-0.78	33.46	M30(25)	2.80
스크류바(롯데)	합성착색료	"	518	66.78	50.15	-0.79	54.93	M50(70)	2.96
딸기시럽(두리물산)	적색40호	소스류	506	53.77	65.50	27.38	89.19	Y50 M70(123)	2.76
알뜰소시지(롯데햄)	합성착색료	육가공품	-	71.39	18.24	19.98	37.63	M30(25)	4.43
계맛살(삼호물산)	합성착색료	수산가공품	-	54.70	11.16	11.45	40.12	Y10 M30(24)	3.73
Boone's(금영인터네셔널)	NM	주류	520	80.22	11.39	1.56	13.44	M20(11)	2.85
홍주(진도)	NM	"	518	75.08	24.12	8.86	31.22	Y40(45)	3.70
제티(동서식품)	적색40호	분말식품	504	63.87	55.29	18.93	65.59	Y30 M80(155)	3.76
스타베리(동서식품)	적색40호	과자류	510	58.87	64.13	22.92	94.36	Y30 M70(124)	5.43
치자황색소		색소	442	78.42	45.90	51.10	122.99	Y70(117)	3.87
식용색소 황색4호		"	426	76.73	13.51	50.46	129.53	Y100(179)	2.96
Rose bengal		"	546	41.17	19.53	24.30	106.72	M100(194)	3.69
파프리카		"	467	64.29	74.46	42.33	121.34	Y100 M10(180)	5.36
Neutral red		"	529	59.53	33.78	4.46	55.94	M50(70)	3.81

* peaks- nm of wavelength absorbance, L-lightness, a-Redness, b-yellowness

2) 홍조류 색소의 pH 및 농도에 따른 색 조사

pH 농도에 따라 색차계를 이용하여 분석한 결과 pH가 높아짐에 따라 L값은 큰 차이가 없었고 a값과 b값은 pH 4.0에서 pH 4.5로 증가하였을 때 a는 11.11로 급격하게 증가하였고 b는 -11.25로 급격한 감소가 있었으나 그 이상에서는 큰 변화가 없었다.(Table 12)

Table 12. 홍조류 색소의 pH별 spectrophotometer 측정값

	pH2.0	pH2.5	pH3.0	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH7.5	pH8.0
L	63.19	64.24	64.89	65.18	65.91	63.06	64.17	65.72	67.86	62.87	65.70	66.11	65.09
a	33.28	35.46	39.11	35.51	21.22	32.33	35.85	35.06	33.23	38.91	35.43	35.44	38.22
b	-30.82	-34.10	-35.98	-33.91	-19.39	-30.64	-35.46	-33.99	-31.42	-36.75	-34.11	-33.47	-33.67

* L : lightness, a : redness, b : yellowness

Spectrophotometer로 측정한 결과는 pH 4.0~5.0까지는 흡수 파장의 분리도가 낮아 불안정한 spectrum을 보였고 일부 파장은 나타나지 않았으나 pH 5.5 이상 부터는 650nm 부근에서 하나의 새로운 peak가 나타났으며 pH가 증가할수록 전반적인 가시영역에서 파장의 분리가 양호하였다(Table 13).

Table 13. pH별 홍조류 색소의 흡수 파장 및 흡광도

pH2.0			pH2.5			pH3.0			pH3.5			pH4.0			pH4.5			pH5.0		
peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i
498	0.18	2/3	498	0.18	1/2	498	0.23	1	362	0.25	1/2	502	0.81	1	499	0.51	1	498	0.44	4/5
562	0.21	nt	564	0.21	2/3	561	0.26	nt	498	0.35	3/4	561	0.78	7/8	564	0.54	1	565	0.51	1
614	0.07	1	614	0.06	1	614	0.09	1	565	0.46	1	nt	0.67?	nt.	617	0.39	3/5	612	0.28	2/5
651	0.07	nt	669	0.05	1/5	666	0.07	1/4	614	0.21	1/2	681	0.78	7/8	653	0.24	2/5	652	0.18	2/5

pH5.5			pH6.0			pH6.5			pH7.0			pH7.5			pH8.0		
peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i	peak	abs.	ra.i
498	0.26	2/3	498	0.24	2/3	498	0.29	1/2	498	0.26	1/2	498	0.26	1/2	497	0.27	2/3
564	0.38	1	564	0.35	1	564	0.43	1	564	0.40	1	564	0.40	1	564	0.37	1
614	0.17	1/3	615	0.15	1/3	614	0.18	1/2	616	0.17	1/3	614	0.17	1/3	614	0.11	1/3
651	0.07	1/4	653	0.06	1/5	650	0.07	1/6	652	0.07	1/6	651	0.07	1/6	651	0.07	1/5

* abs. : absorbance, rat : ratio, nd : not detectable

홍조류 색소를 육안으로 색도표를 이용하여 분석한 결과 pH 4.5 이후부터 푸른색에서 붉은색으로 변하는 것을 볼 수 있었다.(Table 14)

Table 14. 홍조류 색소의 pH별 색도 등급 측정

	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
색도 등급	M80 (157)	M70 (126)	M71 C10 (126)	M70 Y10 (125)	M70 C30 (129)	M80 C30 (160)	M80 C10 (158)	M80 (157)	M70 (126)	M70 (126)	M70 Y10 (125)	M60 (98)	M70 Y10 (125)
색상	진한 분홍색*	진한 분홍색*	분홍색*	분홍색*	청색*	진한 보라색*	보라색*	진한 분홍색*	진한 분홍색*	분홍색*	분홍색*	분홍색*	연한 분홍색*

- 시부카와 이쿠요시 COLOR-CHIPS 색도표

*: pH가 높아질수록 청색에서 붉은색으로 전환

pH 농도에 따른 색소의 분석을 한 결과는 pH 5.5에서 안정한 붉은 색을 나타내었고 가장 붉은 색을 나타내는 pH는 6.5였고, 분광광도계를 사용하여 측정 한 결과는 pH 5.5 이상부터 하나의 흡수 파장이 더 나타났으며 육안으로 색도를 측정 한 결과 pH가 높아질수록 안정한 붉은 색을 가졌다. 홍조류 색소를 식품에 이용할 때 pH를 고려하여 사용하여야 할 것으로 생각되었다.

홍조류 색소의 농도에 따라 발색시킨 후 spectrophotometer로 L, a, b값을 측정한 결과 홍조류 색소를 700 μ l 넣었을 때 pH 5.0~5.5 정도와 색상이 비슷하였고 200 μ l를 넣어 발색시켜 육안으로 색을 분석한 결과 시판 식품에 이용한 발색도와 유사하였다.(Table 15)

Table 15. 홍조류 색소의 농도별 spectrophotometer 측정값

	Concentration, $\mu\text{l}/50\text{ ml}(\text{mg}/\text{ml})$						
	100(1.3)	200(1.3)	300(1.3)	400(1.3)	500(1.3)	600(1.3)	700(1.3)
L	79.68	66.28	54.90	48.25	36.91	39.96	34.73
a	19.16	34.80	47.08	53.65	63.00	63.69	64.29
b	-17.55	-32.83	-44.95	-51.36	-60.62	-58.38	-61.98
색상**	열은 분홍색	열은 분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	진한 분홍색	진한 분홍색

* L-lightness a-redness b-yellowness

** : 농도가 높아질수록 붉은색과 청색이 증가

3) 색소의 식품 활용성 조사

홍조류 색소를 농도에 따라 시료에 첨가하여 spectrophotometer와 색도표를 이용하여 측정된 결과는 다음과 같았다. 농도가 짙어짐에 따라 붉은색이 증가하였지만 푸른색도 같이 짙어지는 것을 볼 수 있었다.(Table 16)

홍조류 색소를 $75\mu\text{l}$ 첨가하였을 때 시판되는 우유의 색소와 유사하였으나 관능적으로는 $100\mu\text{l}$ 첨가하였을 관능적으로 우수하였다. 또, $100\mu\text{l}$ 첨가하였을 때 시판 candy와 유사하였고 관능적으로도 우수하였으며, $50\mu\text{l}$ 첨가하였을 때 주류와 색택이 유사하였고 관능적으로는 $100\mu\text{l}$ 첨가하였을 우수한 색택을 가졌다. 그리고 음료 대용으로 사용한 buffer 용액은 pH 5.5가 시판 음료류와 비슷한 색택을 가졌으며 pH 5.5에서도 홍조류 색소 $50\mu\text{l}$ 를 첨가한 용액이 관능적으로 우수하였다. 따라서 시료에 첨가하여 실험해본 결과 일반적으로 쓰이는 인공 착색료인 적색색소를 대체하는 식품재료로 가능하다고 생각된다(Table 17).

Table 16. 홍조류 색소를 이용한 시료의 spectrophotometer 측정값

	25 μ l, 0.33mg/ml			50 μ l 0.65			75 μ l 0.98			100 μ l 1.30		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
우유	73.54	5.68	-1.15	70.44	9.47	-3.92	67.12	10.34	-5.56	62.42	11.54	-5.14
20% alcohol	50.14	9.97	-4.39	46.48	14.10	-6.55	42.77	14.34	-7.52	40.01	16.29	-8.09
1% gellan	58.04	16.2	-5.86	44.13	19.27	-5.94	39.44	21.74	-14.33	40.18	29.57	-10.59
candy	36.77	7.02	-0.30	50.41	14.20	-5.67	43.47	14.67	-5.39	41.96	15.36	-5.68
pH 4.5	50.91	3.60	-1.72	46.10	5.49	-4.78	42.70	6.42	-6.13	36.86	10.00	-10.17
pH 5.0	48.78	7.18	-3.93	40.38	12.59	-8.38	36.65	14.11	-9.79	38.09	16.57	-12.59
PH 5.5	50.07	8.67	-5.18	42.50	11.99	-8.43	42.34	14.51	-10.66	36.55	15.04	-11.73
pH 6.0	46.97	7.84	-4.52	42.16	14.09	-9.74	39.66	16.46	-11.94	37.68	15.76	-10.83
pH 6.5	46.80	9.26	-5.42	42.35	12.46	-8.18	41.32	16.35	-11.10	37.06	17.94	-12.60

* L- lightness a-redness b-yellowness

Table 17. 홍조류 색소를 이용한 시료의 색등급

	25 μ l		50 μ l		75 μ l		100 μ l	
	색도표*	육안**	색도표	육안	색도표	육안	색도표	육안
우유	M10	연한 분홍	M20	연한 분홍	M30	분홍	M40	분홍
20% alcohol	M20	연한 분홍	M30	분홍	M50	분홍	M70	진한 분홍
1% gellan	M20	연한 분홍	M30	분홍	M50	분홍	M70	진한 분홍
candy	M20 C10	연한 분홍	M30 C20	분홍	M40 C30	분홍	M70 C30	진한 분홍
pH 4.5	M20 C10	연한 분홍	M30 C20	분홍	M40 C30	분홍	M70 C30	진한 분홍
pH 5.0	M30	분홍	M50	진한 분홍	M60	진한 분홍	M70 C20	진한 분홍
PH 5.5	M30	분홍	M40	분홍	M60	진한 분홍	M70	진한 분홍
pH 6.0	M30	분홍	M50	진한 분홍	M60	진한 분홍	M70	진한 분홍
pH 6.5	M20	연한 분홍	Y10 M50	진한 분홍	M60	진한 분홍	M70	진한 분홍

*: 시부카와 이쿠요시의 COLOR-CHIPS 색도표

** : 농도가 높아질수록 붉은색이 짙어짐

2. 대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소의 식품 활용성연구

가. 대량추출방법에 의하여 추출된 홍조류색소의 독성시험

독성실험에서 색소의 단백질해성, 전분분해성, 용혈성 등, 식중독균의 특성은 나타나지 않았다(Table 18).

Table 18. Test of proteolysis, amylolysis, hemolysis activity of laver phycoerythrin by the cylinder cup method on the skim milk agar, starch agar or blood agar

Concentration of skim milk	Pigments and cultured broth					
	Laver	SKD 1012	SKD 1014	SKD 1015	<i>E.coli</i> O157 H:7	<i>S. aureus</i> KFRI171
Skim milk 1%	-	+	-	+	-	-
Starch 1%	-	-	-	-	-	-
Blood broth 2%	-	+	-	+	+	+

* SKD: *Enterococcus faecalis*

나. 음료류에서 활용성검사

1) 유화제 첨가에 의한 분말색소의 용해성 검토

분말색소의 용해성 검토로서 용해성 방법을 달리한 시간경과에 따른 녹는 정도는 sonicator를 이용한 것이, 또한 유화제 첨가량이 많을수록 녹는 정도는 높은 것으로 나타났다. 그러나 물리적 방법에서는 유화제를 첨가하나, 하지 않는 것과 비슷한 용해성을 나타내어 본 연구에서는 유화제를 첨가하지 않는 물리적 방법이 용해성이 가장 좋다고 생각되었다(Table 19, 20, 21).

Table 19. 용해 방법을 달리한 시간 경과에 따른 용해도의 경시적 변화

Sample		1회	2회	3회	4회	5회
실온	control	1	2	2	3	3
	유화제0.01%	3	4	5	5.5	5.5
	유화제 0.05%	4	5	6	6.5	6.5
	유화제 0.1%	5	6	7	7.5	7.5
물중탕	control	1	4	5	5.5	5.5
	유화제0.01%	5	5	6	6.5	6.5
	유화제 0.05%	5	5	5	5.5	5.5
	유화제 0.1%	2	2	7	7.5	7.5
물리	control	5	6	7	7.5	7.5
	유화제0.01%	5	6	6	6.5	6.5
	유화제 0.05%	5	6	6	6.5	6.5
	유화제 0.1%	5	6	6	7.5	7.5

Table 20. 용해 방법을 달리한 색소의 경시적 L, a, b 값 변화

sample		L		ΔL	a		Δa	b		Δb
		전	후		전	후		전	후	
중류수		95.59	95.91	0.32	-0.4	-0.28	0.12	0.62	0.52	-0.1
실온	control	80.07	83.25	3.18	19.77	25.13	5.36	-8.83	10.86	19.69
	유화제0.01%	76.15	85.23	9.08	27.79	32.41	4.62	-12.3	-14.6	-2.3
	유화제0.05%	68.95	77.7	8.75	38.92	36.46	-2.46	-16.6	-16.2	0.39
	유화제0.1%	70.62	71.96	1.34	46.71	45.04	-1.67	-20.2	-19.2	1.01
물중탕	control	83.55	85.08	1.53	19.18	16.18	-3	-8.74	-7.38	1.36
	유화제0.01%	79.53	87.92	8.39	21.91	15.36	-6.55	-9.12	-6.28	2.84
	유화제0.05%	83.29	84.47	1.18	16.95	18.66	1.71	-7.01	-8.64	-1.63
	유화제0.1%	76.2	83.3	7.1	28.1	26.76	-1.34	-11.7	-10.4	1.29
물리	control	69.29	73.91	4.62	43.28	40.53	-2.75	-18.5	-17.6	0.9
	유화제0.01%	72.97	78.21	5.24	33.27	31.89	-1.38	-14.5	-13.8	0.78
	유화제0.05%	76.82	62.67	-14.2	21.83	14.61	-7.22	-9.5	-7.18	2.32
	유화제0.1%	72.19	72.72	0.53	33.58	28.06	-5.52	-14.6	-12.3	2.27

Table 21. 표준화 설정에 따른 분말 phycoerythrin의 Lab 측정치

sample		L		ΔL	a		Δa	b		Δb
		전	후		전	후		전	후	
실온	0.25%	44.45	46.66	2.21	82.94	86.53	3.59	-18.2	-20.1	-1.86
	0.5%	62.47	81.1	18.63	49.86	29.17	-20.7	-19	-13.3	5.65
	0.75%	61.87	78.59	16.72	53.42	34.36	-19.1	-21.8	-15.2	6.53
(실온)	0.25%	66.06	73.25	7.19	48.72	42.37	-6.35	-20.2	-18.4	1.76
유화제 첨가	0.5%	55.5	78.23	22.73	37.88	32.02	-5.86	-15.1	-14.1	1.02
	0.75%	51.5	74.74	23.24	51.44	40.34	-11.1	-19.4	-17.2	2.2
물리	0.25%	60.15	84.98	24.83	20.88	18.09	-2.79	-10.1	-7.42	2.69
	0.5%	60.12	85.38	25.26	26.89	17.35	-9.54	-12.6	-6.75	5.86
	0.75%	49.69	71.71	22.02	52.37	43.97	-8.4	-22.4	-18	4.45
(물리)	0.25%	58.8	82.42	23.62	30.7	23.64	-7.06	-12.9	-9.08	3.85
유화제 첨가	0.5%	39.2	55.56	16.36	70.5	76	5.5	-19.5	-26.1	-6.55
	0.75%	58.62	88.11	29.49	37.41	13.13	-24.3	-15.2	-3.92	11.3

2) 시판색소의 PH 조사

phycoerythrin은 pH5.5~6.0에 안정하여 식품자체의 pH의 영향을 받을 수 있다는 전반부 연구결과로 식품자체의 pH를 측정하였다. 탄산음료, 스포츠음료의 경우가 pH가 낮았고, 유제품 및 주류등은 pH가 약산성을 띠었다(Table 22).

따라서, 색소를 첨가하여 활용하기 용이한 식품은 그린소주, 아침햇살, 아이스크림, 마요네즈이었다.

Table 22. 액상식품(원액)의 pH

sample	pH	sample	pH
그린소주	5.59	아침햇살	5.48
과실담금주	4.22	두유	7
칠성사이다	2.93	우유	6.57
웅진초록사이다	2.86	이동막걸리	4.04
런던진	7.7	휘핑크림	3.87
2%	3.15	아이스크림	6.49
포카리스웨트	3.32	물엿	5.01
밀키스	3.21	마요네즈	6.81
뉴청하	3.43	흑주	3.68

3) 홍조류색소 첨가 식품의 활용성 검토

가) 액상 식품에서의 활용성 검토

(1) 선택조사

색소의 농도를 달리하여 각 액상식품에 응용시킨 후 Lab값의 변화를 살펴 보았다. 투명한 액상시료의 경우는 0.1%(A), 0.5%(B), 1%(C)로 농도를 조절하고, 불투명한 액상시료의 경우는 1%(A), 2.5%(B), 5%(C)로 농도를 조절하였다.

따라서, 홍조류 색소를 첨가하여 적색도가 높게 나타난 투명식품은 그린소주, 과실담금주, 밀키스로 나타났고, 불투명시료는 아침햇살로 나타났다

(Table 23, 24, 25)

Table 23. 색소 첨가 농도별 액상식품의 L, a, b(투명액상식품)

sample	L				a				b			
	원액	A	B	C	원액	A	B	C	원액	A	B	C
그린소주	95.84	94.99	89.99	84.31	-0.32	0.79	5.48	12.00	0.54	0.04	-1.97	-4.38
과실담금주	96.06	94.85	89.80	84.22	-0.28	0.79	5.26	11.55	0.60	0.00	-1.77	-4.05
칠성사이다	95.01	94.61	89.88	84.37	-0.34	0.57	3.91	8.39	0.66	-0.03	-1.92	-4.38
웅진초록사이다	94.42	94.15	89.33	84.42	-0.61	0.14	3.70	7.91	2.11	1.68	-0.37	-2.68
런던진	95.8	94.68	89.89	85.48	-0.30	0.61	4.99	1.40	0.53	0.18	-1.25	-2.70
2%	95.78	94.10	88.97	83.97	-0.41	0.50	4.45	9.00	0.76	0.21	-2.01	-4.41
포카리스웨트	95.14	93.42	88.88	83.23	-0.28	0.77	4.50	10.25	0.13	-0.41	-2.45	-5.05
밀키스	37.05	36.32	33.71	30.72	2.73	3.82	7.27	11.11	7.23	6.99	5.94	4.81
뉴청하	94.58	92.21	87.90	82.40	-0.58	0.51	4.03	8.81	3.77	3.32	1.40	-0.97
흑주	90.17	87.76	83.54	78.27	-2.91	-1.82	1.42	5.84	16.77	16.43	14.52	12.09

* A: 0.1%, B: 0.5%, C: 1%

Table 24. 색소 첨가 농도별 액상식품의 L, a, b(불투명액상식품)

sample	L				a				b			
	원액	A	B	C	원액	A	B	C	원액	A	B	C
아침햇살	16.73	13.92	11.11	7.99	5.88	10.22	12.57	11.57	10.10	8.46	6.79	4.80
두유	0.91	0.97	1.12	1.16	0.01	-0.23	-0.06	-0.12	-0.20	0.06	-0.26	0.19
우유	6.56	3.83	2.54	1.55	2.43	4.80	3.39	1.15	4.14	2.35	1.25	0.19
이동막걸리	8.84	7.31	6.68	4.93	4.89	6.55	7.63	7.82	5.45	4.53	4.10	2.85
휘핑크림	4.78	2.00	7.78	1.18	1.93	2.33	2.11	0.42	2.86	1.04	2.44	-0.03
아이스크림	5.27	4.04	3.88	1.62	5.54	3.59	1.78	0.97	3.21	2.00	1.33	0.11
물엿	95.72	91.26	76.22	71.38	-0.49	4.65	21.03	27.97	1.20	-0.35	-7.54	-9.38
마요네즈	4.84	3.18	25.05	2.55	4.35	3.09	2.97	2.65	2.90	1.79	5.78	1.05

* A: 0.1%, B: 0.5%, C: 1%

(2) 안정성조사

홍조류색소 첨가 식품의 저장온도별 안정성은 6일째까지 L, a, b값이 큰변화가 없어 안정하였다(Table 25)

Table 25. 액상식품의 저장온도별 L, a, b

(저장초기)

	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
그린소주	85.32	86.09	84.31	86.52	12.37	12.59	13.48	13.52	-4.97	-4.58	-4.13	-3.99
칠성사이다	85.69	85.28	84.61	87.24	8.76	8.86	8.95	9.21	-4.44	-4.25	-4.03	-3.85
2%	85.48	86.25	87.22	84.54	10.02	10.34	10.94	11.64	-4.65	-4.55	-4.21	-3.95
밀키스	30.63	30.55	32.52	34.41	11.65	11.88	12.54	12.86	-5.03	-4.89	-4.52	-4.16
아침햇살	13.92	14.26	14.55	13.88	10.22	10.56	10.99	11.26	8.46	8.29	8.13	7.21
우유	3.83	3.98	4.21	4.02	4.80	4.89	5.21	5.59	2.35	2.11	1.98	1.95
휘핑크림	2.00	2.01	2.15	2.48	2.33	2.38	2.59	3.01	1.04	1.01	0.89	0.77
물엿	91.26	92.62	91.56	92.46	4.65	4.95	5.21	5.68	-1.35	-1.22	-1.08	-0.95

(저장2일째)

	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
그린소주	85.18	86.12	84.56	86.59	12.57	12.68	13.47	13.15	-4.98	-4.15	-4.15	-3.96
칠성사이다	85.16	85.26	84.24	87.16	8.79	8.16	8.98	9.35	-4.28	-4.98	-4.66	-3.15
2%	85.41	86.16	87.28	84.16	10.25	10.16	10.84	11.59	-4.58	-4.46	-4.79	-3.16
밀키스	30.86	30.16	32.59	34.79	11.26	11.38	12.49	12.86	-5.16	-4.76	-4.79	-4.28
아침햇살	13.29	14.26	14.76	13.59	10.73	10.26	10.49	11.28	8.76	8.59	8.76	7.19
우유	4.09	4.19	4.59	4.16	4.76	4.76	5.59	5.76	2.19	2.76	2.06	2.79
휘핑크림	2.16	2.56	2.76	2.94	2.76	2.19	2.76	3.59	1.54	1.29	1.01	0.96
물엿	91.53	92.79	91.95	92.68	4.68	5.06	5.59	5.86	-1.59	-1.25	-1.26	0.01

(저장4일째)

	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
그린소주	85.29	86.19	84.31	86.9	12.16	12.68	13.25	13.58	-4.88	-4.79	-4.99	-3.91
칠성사이다	85.13	85.32	84.73	87.58	8.88	8.9	8.97	9.37	-4.72	-4.29	-4.09	-3.97
2%	85.48	86.25	87.22	84.54	10.02	10.34	10.94	11.64	-4.65	-4.55	-4.63	-3.68
밀키스	30.19	30.49	32.19	34.59	11.69	11.27	12.28	12.83	-5.19	-4.28	-4.56	-4.16
아침햇살	13.29	14.19	14.55	13.46	10.81	10.49	10.29	11.99	8.46	8.29	8.19	7.28
우유	3.53	3.39	4.26	4.95	4.27	4.52	5.58	5.52	2.28	2.13	1.82	1.52
휘핑크림	2.21	2.27	2.13	2.57	2.41	2.51	2.21	3.71	1.21	1.08	0.86	0.79
물엿	91.28	92.68	91.57	92.52	4.65	4.84	5.28	5.6	-1.38	-1.18	-1.51	-0.92

(저장6일째)

	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
그린소주	85.39	86.19	84.85	86.49	12.28	12.57	13.51	13.75	-4.51	-4.85	-4.28	-3.28
칠성사이다	85.46	85.58	84.46	87.28	8.27	8.79	8.24	9.54	-4.71	-4.13	-4.43	-3.72
2%	85.43	86.22	87.46	84.57	10.07	10.38	10.79	11.51	-4.51	-4.84	-4.16	-3.87
밀키스	30.27	30.25	32.46	34.42	11.57	11.94	12.28	12.51	-5.08	-4.25	-4.84	-4.21
아침햇살	13.19	14.2	14.42	13.8	10.29	10.42	10.9	11.2	8.71	8.51	8.45	7.47
우유	3.92	3.51	4.11	4.08	4.82	4.8	5.27	5.46	2.51	2.19	1.9	1.97
휘핑크림	2.08	2.07	2.14	2.47	2.31	2.37	2.57	3.11	1.07	1.09	0.79	0.78
물엿	91.21	92.84	91.54	92.44	4.69	4.91	5.24	5.67	-1.31	-1.27	-1.1	-0.97

나) 고체상 식품에서의 활용성 검토

(1) 선택조사

색소를 첨가하지 않은 시료를 Control로 정하고, 상업용 분홍색 바람떡과 맛살의 붉은 부분과 phycoerythrin 색소첨가 농도에 따른 시료들과의 Lab값을 비교하였다. 증편의 경우는 찌내는 시간에 다른 색의 변화를 알아보기 위하여 10분간격으로 Lab값의 변화를 관찰하였다(Table 26, 27).

Table 26. 고체식품 활용성 Lab

Sample	L				a				b			
	cont	A	B	C	cont	A	B	C	cont	A	B	C
증편10분	86.94	85.36	78.12	60.45	-5.1	0.287	12.16	26.52	15.62	12.49	6.206	-0.48
증편20분	90.02	86.01	77.47	60.39	-3.98	-0.84	4.538	17.89	14.73	13.29	8.56	-0.95
증편30분	88.70	83.88	77.68	59.53	-5.12	-2.74	2.77	14.10	15.57	13.44	8.73	1.37
증편40분	88.46	87.21	75.36	62.69	-5.52	-2.91	3.52	9.06	15.86	13.13	9.44	5.55
쿠키반죽	75.63	67.86	61.62	55.37	6.75	18.95	26.05	25.69	43.03	33.93	20.71	15.08
쿠키	82.42	79.27	72.65	67.66	3.64	7.50	10.62	13.52	32.71	23.12	15.25	8.45
치즈	92.34	90.22	81.28	78.45	-0.07	5.94	23.41	24.78	30.52	25.17	18.13	16.02
맛살	77.49	75.81	69.02	62.74	10.66	25.41	39.17	52.53	12.56	6.26	3.14	1.29
바람떡 (상업용)	77.58				14.26				4.87			
맛살 (색소)	51.53				36.83				20.48			

(2) 안정성조사

Table 27. 고체식품의 저장온도별 L, a, b 값

(저장초기)

Sample	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
증편	77.70	77.68	77.56	77.24	2.73	2.75	2.87	3.12	8.73	8.65	8.53	5.20
쿠키	79.28	79.28	79.28	79.28	7.52	7.58	7.54	7.54	23.15	23.13	23.16	23.17
치즈	90.49	90.51	90.53	90.55	5.83	5.83	5.83	5.79	25.22	25.22	25.21	25.23
맛살	75.81	75.94	75.96	75.96	25.41	25.3	25.25	25.27	6.62	6.61	6.62	6.63

(저장2일째)

Sample	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
증편	77.77	77.57	77.50	77.17	2.81	2.72	2.84	3.24	8.81	8.57	8.57	5.21
쿠키	79.21	79.20	79.20	79.30	7.59	7.50	7.59	7.58	23.19	23.10	23.10	23.11
치즈	90.52	90.59	90.60	90.61	5.88	5.84	5.89	5.66	25.51	25.81	25.51	25.51
맛살	75.87	75.90	75.90	75.99	25.51	25.34	25.29	25.31	6.69	6.69	6.54	6.69

(저장4일째)

Sample	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
증편	77.78	77.51	77.50	77.36	2.54	2.71	2.81	3.81	8.51	8.82	8.51	5.24
쿠키	79.31	79.27	79.31	79.30	7.54	7.54	7.57	7.57	23.51	23.21	23.24	23.25
치즈	90.48	90.61	90.57	90.54	5.82	5.89	5.85	5.70	25.29	25.27	25.27	25.24
맛살	75.89	75.78	75.90	75.91	25.21	25.31	25.27	25.20	6.65	6.66	6.69	6.67

(저장6일째)

Sample	L				a				b			
	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃	4℃	10℃	20℃	30℃
증편	77.74	77.67	77.50	77.32	2.68	2.81	2.81	3.17	8.71	8.61	8.51	5.25
쿠키	79.21	79.20	79.41	79.18	7.45	7.51	7.50	7.54	23.25	23.14	23.21	23.21
치즈	90.44	90.44	90.50	90.54	5.87	5.82	5.84	5.70	25.24	25.23	25.28	25.27
맛살	75.66	75.92	75.89	75.82	25.47	25.31	25.27	25.31	6.64	6.67	6.69	6.92

3. Microencapsulation된 색소의 식품활용성에 관한 연구

가. Microencapsulation된 색소의 첨가농도에 따른 선택 조사

홍조류 색소와 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별 spectrophotometer 측정값 비교는 시료 식초에 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별로 첨가하여 혼합하여 조사하였다(Table 28).

즉, 시중에 판매되는 오미자 음료와 홍조류 색소, 식초에 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별 첨가한 시료 Lab값을 비교하였다. 홍조류 색소 8 μ g/ml을 첨가한 L값이 48.25로 나타났고, 코팅한 색소에서는 색소에 2 μ g/ml첨가한 값이 42.31로 나타나 오미자 음료의 L값 46.88로 유사한 값을 나타냈으며, 홍조

류 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 코팅한 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료와 유사하다는 것을 알 수 있었다. 홍조류 색소의 a값은 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 19.16로 나타났고, microencapsulation 코팅 처리한 색소는 색소 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 10.22로 나타나 홍조류 색소의 a값과 유사한 색을 띠게 하려면 코팅한 색소를 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 첨가하여야 할 것이라 생각되었다. 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타났고, 코팅한 색소 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 색소 6.17로 나타나 코팅한 색소의 a값이 높게 나타났다. 홍조류 색소와 코팅한 색소의 b값은 모두 -값을 나타낸 반면 오미자 음료의 b값은 11.12로 나타나 오미자 음료에는 yellow가 띠는 것을 알 수 있었고, 홍조류 색소와 코팅한 색소에는 yellow보다 red가 더 높게 나타남을 알 수 있었다(Table 28).

Table 28. 홍조류 색소와 식초에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	42.31	19.16	4.31	-17.55	-1.06
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	38.70	34.80	6.17	-32.83	-1.92
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	34.51	47.08	7.36	-44.95	-2.58
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	34.31	53.65	8.46	-51.36	-3.11
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	33.00	63.00	9.50	-60.62	-3.59
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	30.83	63.69	9.79	-58.38	-3.77
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	30.00	64.29	10.22	-61.98	-4.01
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

홍조류 색소와 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별 spectrophotometer 측정값 비교는 시료별로 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별로 첨가하여 혼합하였다. 홍조류 색소와 사이다에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 Lab값을 시중에 판매되는 오미자 음료의 Lab값과 비교하였다. 오미자 음료 L값은 46.88로 나타나

홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료의 L값 48.25와 코팅한 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 43.22로 나타나 가장 유사한 밝기를 나타냈고, 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타나 코팅한 색소 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 5.78과 가장 유사한 색을 나타냈다. 홍조류 색소는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 19.16으로 나타나 오미자 음료와 코팅한 색소보다 붉은색이 가장 강함을 알 수 있었다(Table 29).

Table 29. 홍조류 색소와 사이다에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	43.22	19.16	4.26	-17.55	-1.56
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	40.81	34.80	5.53	-32.83	-2.00
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	39.92	47.08	5.78	-44.95	-2.07
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	37.92	53.65	7.23	-51.36	-2.57
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	39.06	63.00	6.64	-60.62	-2.29
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	29.84	63.69	10.34	-58.38	-3.75
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	29.99	64.29	10.03	-61.98	-3.76
오미자 음료	46.88		5.66		11.12	

밀키스에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 시료와 홍조류 색소 농도별 시료와 시중에 판매되는 오미자 음료를 각각 Lab값을 비교하였다. L값은 홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 48.25와 코팅한 색소 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 40.88로 나타났고, 오미자 음료는 46.88로 나타났다. 코팅한 색소 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료의 L값만 높게 나타났고 a값과 b값은 각각 4.71, -1.31로 나타나 농도별로 첨가한 다른 시료에 비해 낮게 나타났다. 밀키스에 코팅한 색소 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료의 a값이 9.64로 농도별로 첨가한 다른 시료에 비해 가장 높았다. 시중에 판매되는 오미자 음료의 a값과 유사한 값을 맞추려면 코팅한 색소는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가하는 것이 좋을 것이라 생각되었다. 홍조류 색소는 붉은색이 강한 반면 노란색은 약한 것을 알 수 있었다(Table 30).

Table 30. 홍조류 색소와 밀키스에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	39.69	19.16	5.40	-17.55	-2.1
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	40.88	34.80	4.71	-32.83	-1.31
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	36.72	47.08	7.72	-44.95	-3.42
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	36.19	53.65	8.2	-51.36	-3.45
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	35.55	63.00	8.56	-60.62	-3.36
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	33.49	63.69	9.64	-58.38	-4.14
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	33.08	64.29	9.6	-61.98	-4.15
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

아침햇살에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 시료와 홍조류 색소를 농도별로 첨가한 시료, 시중에서 판매되는 오미자 음료의 Lab값을 비교하였다. L값은 홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 48.25로, 코팅한 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 42.27로 나타났고 오미자 음료는 46.88로 나타나 홍조류 색소가 가장 밝게 나타났으며 다음으로 오미자 음료와 코팅한 색소 순이었다. a값은 홍조류 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 19.16으로 나타났고, 색소 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 64.29로 가장 높았다. 다음으로 코팅한 색소 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 9.92로 나타났으며, 코팅한 색소 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 9.83으로 나타났다. 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타나 홍조류 색소와 코팅한 색소가 붉은색의 정도가 진함을 알 수 있었으며, b값은 오미자 음료가 11.12로 가장 높게 나타나 홍조류 색소와 코팅한 색소보다 yellow가 진하게 나타남을 알 수 있었다(Table 31).

Table 31. 홍조류 색소와 아침햇살에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 μ g/ml	79.68	42.27	19.16	4.39	-17.55	0.56
4 μ g/ml	66.28	41.24	34.80	5.27	-32.83	-0.29
6 μ g/ml	54.90	37.43	47.08	8.32	-44.95	-2.38
8 μ g/ml	48.25	36.16	53.65	8.45	-51.36	-3.09
10 μ g/ml	36.91	35.65	63.00	8.92	-60.62	-3.53
12 μ g/ml	39.96	34.28	63.69	9.92	-58.38	-3.79
14 μ g/ml	34.73	34.11	64.29	9.83	-61.98	-3.94
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

베지밀에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 시료와 홍조류 색소를 농도별로 첨가한 시료, 시중에서 판매되는 오미자 음료를 Lab값을 비교하였다. 베지밀에 코팅한 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료의 L값은 48.01로 나타나 오미자 음료 L값 46.88 보다 높게 나타났다. 홍조류 색소는 색소 8 μ g/ml 첨가한 시료가 48.25로 나타나 가장 높은 값을 나타냈다. a값은 베지밀에 코팅한 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료가 1.8로 나타나 가장 낮은 값을 나타냈으며, 코팅한 색소 12 μ g/ml 첨가한 시료가 5.32로 나타나 오미자 음료의 a값인 5.66가 유사하였으며, 홍조류 색소는 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료가 19.16으로 나타나 가장 높은 값을 나타냈다. b값은 오미자 음료가 11.12로 가장 높게 나타났고, 코팅한 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료가 5.66으로 나타나 오미자 음료보다 낮게 나타났다. 베지밀의 원래의 색인 아이보리색을 갖고 있기 때문이라 생각되었고, 베지밀에 색소량을 늘릴수록 b값은 낮게 나타남을 알 수 있었다(Table 32).

Table 32. 홍조류 색소와 베지밀에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	48.01	19.16	1.8	-17.55	5.66
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	47.37	34.80	2.54	-32.83	4.79
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	46.29	47.08	3.39	-44.95	3.75
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	45.85	53.65	3.84	-51.36	3.07
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	45.03	63.00	4.63	-60.62	2.31
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	44.11	63.69	5.32	-58.38	1.69
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	41.11	64.29	7.66	-61.98	-0.5
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

나. Microencapsulation 방법에 따른 색택변화

1) 투명음료에서의 Hunter value 조사

색이 거의 없는 투명한 음료 칠성사이다, 2%, 포카리 스위트, 사과즙스에 각각 색소 원색소와 코팅처리한 색소를 ①번 처리구(Polysaccharide 제거된 원료에 코팅용 HPMCP 5% 처리), ②번 처리구(Polysaccharide 제거된 원료에 코팅용 HPMCP 2.5% 처리), ③번 처리구(Polysaccharide 제거 없이 처리된 원료에 코팅용 HPMCP 5% 처리)를 0.01mg/ml 되게끔 첨가하여 혼합한 후 petridish에 담고 색차계로 L, a, b값을 측정하였다(Table 33).

원액 첨가구에서 밝기는 사이다 ①번 처리구가 72.03으로 가장 높았고 적색도는 사이다 ③번 처리구가 33.12로 가장 높았으며, microencapsulation 하여 코팅된 색소 첨가구에서 밝기는 포카리스웨트 ①번 처리구가 68.93으로 가장 높았고 적색도는 사이다 ①번 처리구가 13.24로 가장 높았으며 증가도 7.13으로 나타나 가장 높았다. 코팅에 의하여 밝기가 증가된 구는 포카리스웨트, 2%와 사과즙스 이었고 사이다는 감소하였으며, 적색도는 처리구마다 달랐으나 대부분이 감소하였고 2%의 ②번 처리구가 28.2가 감소되어 가장 많이 감소하였다(Table 33).

Table 33. Microencapsulation된 홍조류색소를 첨가한 투명한 음료류에서의 Hunter value

Transparent sample	number	원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b
사이다	①	72.03	+6.11	-2.11	40.5	+13.24	-4.87
	②	60.96	+29.49	-10.64	60.87	+9.22	-3.34
	③	57.21	+33.12	-16.01	62.48	+9.61	-5.24
포카리스웨트	①	43.26	+10.47	-3.34	68.93	+6.58	-5.12
	②	61.61	+25.65	-9.25	64.77	+6.3	-2.2
	③	57.15	+32.03	-13.45	62.47	+8.77	-4.66
2%	①	44.23	+9.75	-3.18	63.72	+11.5	-4.49
	②	59.68	+30.94	-10.76	70.79	+2.78	-0.97
	③	57.1	+5.08	-2.96	68.04	+5.08	-2.96
사과주스	①	46.70	+4.02	+1.6	44.8	+3.40	+2.42
	②	36.74	+21.21	-4.09	45.8	+1.86	+3.07
	③	35.88	+22.5	-4.77	42.37	+4.56	+1.30

2) 불투명음료에서의 Hunter value 조사

원액 첨가구에서 밝기는 밀키스 ①번 처리구가 61.39로 가장 높았고 적색도는 밀키스 ②번 처리구가 25.81로 가장 높았으며, microencapsulation 색소 첨가구에서 밝기는 우유 ①번 처리구가 51.55로 가장 높았고 적색도는 밀키스 ①번 처리구가 9.94로 가장 높았으며 증가는 우유가 3.09로 나타나 가장 높았다. 코팅에 의하여 밝기가 증가된 구는 우유, 아침햇살의 ②번과 ③번이었고, 적색도는 각처리구의 ①번이 약간씩 증가하였고 각 처리구의 ③번이 감소폭이 컸다 (Table 34).

Table 34. Microencapsulation된 홍조류색소를 첨가한 불투명한 음료류에서의 Hunter value

Turbid sample	number	원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b
우유	①	51.55	+1.49	+0.67	49.5	+4.58	+0.13
	②	45.54	+18.26	-0.02	50.89	+2.61	+0.18
	③	32.72	+22.16	+2.1	49.66	+4.21	-0.22
아침햇살	①	40.72	+5.43	+1.62	40.27	+7.70	-0.1
	②	36.67	+21.05	+2.14	39.9	+6.81	-1.12
	③	38.98	+24.04	+4.78	40.88	+4.13	-0.85
밀키스	①	61.39	+9.36	+0.32	37.73	+9.94	-3.07
	②	57.21	+25.81	-2.67	41.05	+4.92	-1.24
	③	56.73	+25.53	-5.4	43.6	+2.54	-0.17

3) 주류에서의 Hunter value 조사

시료 소주에 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별로 첨가하여 혼합하였다.

홍조류 색소와 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 L, a, b값의 a, b값은 많이 차이를 나타내었다. 홍조류 색소와 코팅한 색소의 L값은 코팅한 색소 8 μ g/ml 첨가한 양에서는 큰 차이를 나타내지 않았는데, 홍조류 색소 2, 4, 6 μ g/ml 첨가한 시료는 각각 79.68, 66.28, 54.90으로 나타난 반면 코팅한 시료는 각각 44.96, 45.35, 43.06으로 나타나서 홍조류 색소가 더 밝게 나타나는 것을 알 수 있었다. 홍조류 색소 2 μ g/ml을 첨가한 양의 a값이 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 14 μ g/ml 첨가한 양보다 더 높게 나타내었다. 홍조류 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료의 a값이 19.16으로 나타난 반면, 코팅한 색소는 14 μ g/ml 첨가한 시료의 a값이 10.48로 나타나 홍조류 색소의 a값이 높은 것으로 알 수 있었다. 시중에 판매되는 오미자 음료와 홍조류 색소, 코팅 처리한 색소로 비교하였더니

오미자 음료의 L값은 46.88로 나타나 홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료보다 약 1.37 낮게 나왔고, 코팅한 색소는 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 45.35로 오미자 음료보다는 낮은 값을 나타냈다. 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타나 홍조류 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 19.16보다도 낮게 나타났고, 코팅한 색소는 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 6.37로 오미자 음료보다 높게 나타났다. 오미자 음료의 유사한 붉은 색을 띠게 하려면 코팅한 색소 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 첨가하여야 할 것이다. 홍조류 색소와 비교하였을 때 microencapsulation 코팅 처리한 색소는 붉은 색보다도 파란색을 띄어서 a값에 차이가 나타난 것으로 생각되었다. 오미자 음료의 b값은 11.12로 나타났고, 홍조류 색소와 코팅한 색소는 -값을 나타내어 b값이 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. 홍조류 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료의 b값이 -17.55로 나타났고, 코팅한 색소 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 -3.73으로 나타나 홍조류 색소에는 yellow가 거의 나타나지 않는 것으로 생각되었다(Table 35).

Table 35. 홍조류 색소와 소주에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	44.94	19.16	5.29	-17.55	-2.20
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	45.35	34.80	4.81	-32.83	-1.97
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	43.06	47.08	6.37	-44.95	-2.49
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	41.25	53.65	7.44	-51.36	-2.81
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	38.25	63.00	9.39	-60.62	-3.44
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	37.16	63.69	9.40	-58.38	-3.43
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	35.25	64.29	10.48	-61.98	-3.73
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

홍조류 색소와 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별 spectrophotometer 측정값 비교는 시료 드라이진에 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도별로 첨가하여 혼합하였다.

시료 드라이진에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 시료와 홍조류 색소 농도별로 첨가한 시료, 시중에 판매되는 오미자 음료와 Lab값을 비교하였다. 오미자 음료의 L값은 46.88로 나타나 홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 색소가 유사하였고, 드라이진에 코팅한 색소를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 45.17로 가장 유사한 밝기를 나타냈다. 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타나 홍조류 색소보다 코팅한 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 5.58로 유사한 값을 나타냈다. 홍조류 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 19.16로 나타나 오미자 음료나 코팅한 색소보다 진한 색으로 나타났다. 오미자 음료 b값은 11.12로 나타나 홍조류 색소의 -로 나타난 값과 코팅한 색소 -로 나타난 값에 비해 yellow가 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 홍조류 색소에 비해 microencapsulation 코팅 처리한 색소의 a값이 낮게 나온 것은 알 수 있었다. 홍조류 색소는 붉은색이 강한 반면 코팅한 색소는 붉은색과 파란색을 띠기 때문이라 생각되었다. 오미자 음료는 붉은색과 노란색이 나타남을 알 수 있었다(Table 36).

Table 36. 홍조류 색소와 드라이진에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류 색소	코팅한 색소	홍조류 색소	코팅한 색소	홍조류 색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	42.31	19.16	4.31	-17.55	-1.06
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	38.70	34.80	6.17	-32.83	-1.92
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	34.51	47.08	7.36	-44.95	-2.58
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	34.31	53.65	8.46	-51.36	-3.11
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	33.00	63.00	9.50	-60.62	-3.59
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	30.83	63.69	9.79	-58.38	-3.77
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	30.00	64.29	10.22	-61.98	-4.01
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

4) 기타식품에서의 Hunter value 조사

물엿에 코팅한 색소를 농도별로 첨가하여 홍조류 색소를 농도별 첨가한 시료와 시중에 판매되는 오미자 음료와 비교하였다. L값은 물엿에 코팅한 색소 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 44.72로 홍조류 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료 48.25를 나타내어 오미자 음료 L값 46.88가 유사하였고, 코팅한 색소를 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료는 홍조류 색소 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료와 유사하게 나타났다. a값으로 오미자 음료는 5.66으로 나타났고, 홍조류 색소는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 19.16으로 나타났으며 코팅한 색소는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료가 4.09로 나타나 가장 낮은 값을 나타냈지만, 코팅한 색소 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료는 7.13으로 오미자 음료보다 높게 나타났다. 홍조류 색소에 비해 코팅한 색소의 a값이 낮게 나왔지만 오미자 음료보다 높은 값을 띠게 할 수 있을 것이라 생각되었다. 물엿은 투명한 시료여서 색소를 첨가하였을 때 b값에서 -값을 나타냄을 알 수 있었고, 오미자 음료 b값은 11.12로 높게 나타났다. 홍조류 색소와 코팅한 색소에는 yellow가 거의 없는 것을 알 수 있었다(Table 37).

Table 37. 홍조류 색소와 물엿에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g/ml}$	79.68	44.72	19.16	4.09	-17.55	-2.17
4 $\mu\text{g/ml}$	66.28	40.02	34.80	7.13	-32.83	-3.25
6 $\mu\text{g/ml}$	54.90	37.00	47.08	8.1	-44.95	-3.41
8 $\mu\text{g/ml}$	48.25	33.61	53.65	9.03	-51.36	-3.36
10 $\mu\text{g/ml}$	36.91	34.9	63.00	8.93	-60.62	-3.51
12 $\mu\text{g/ml}$	39.96	32.80	63.69	8.96	-58.38	-3.05
14 $\mu\text{g/ml}$	34.73	32.54	64.29	9.26	-61.98	-3.15
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

마요네즈에 코팅한 색소를 농도별로 첨가한 시료와 홍조류 색소 농도별로 첨가한 시료, 시중에서 판매하는 오미자 음료의 Lab값을 비교하였다. L값으로 홍조류 색소에 색소 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료는 각각 79.68, 66.28, 54.90, 48.25로 나타났고, 마요네즈에 코팅한 색소를 첨가한 시료는 색소 2 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료가 56.23으로 나타났다. 동일한 양을 첨가한 홍조류 색소보다는 낮은 값이었지만, 코팅한 색소 6 $\mu\text{g/ml}$ 이상 첨가한 시료는 홍조류 색소 8 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료보다 높게 나타났고 코팅한 색소 10 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료가 46.71로 나타나 동일한 양을 첨가한 홍조류 색소가 36.91로 코팅한 색소가 높게 나타났다. a값으로 홍조류 색소 2 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료가 19.16으로 나타나 동일한 양을 첨가한 코팅한 색소가 2.85로 낮게 나타났으며, 코팅한 색소 14 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료가 12.42로 홍조류 색소보다는 낮은 값을 나타냈다. 시중에서 판매되는 오미자 음료의 a값은 5.66으로 나타나 코팅한 색소 4 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 시료 5.98로 오미자 음료와 유사한 값을 나타냈다(Table 38).

Table 38. 홍조류 색소와 마요네즈에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별로 첨가한 L, a, b값 비교

색도값 농도별	L		a		b	
	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소	홍조류색소	코팅한 색소
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	79.68	56.23	19.16	2.85	-17.55	5.25
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	66.28	51.88	34.80	5.98	-32.83	2.02
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.90	49.66	47.08	8.40	-44.95	-0.22
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48.25	46.85	53.65	9.24	-51.36	-0.92
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.91	46.71	63.00	9.90	-60.62	-1.78
12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.96	42.26	63.69	12.09	-58.38	-3.44
14 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34.73	40.39	64.29	12.42	-61.98	-3.58
오미자음료	46.88		5.66		11.12	

원액 첨가구에서 밝기는 마요네즈 ①번 처리구가 57.89로 가장 높았고 적색도는 마요네즈 ③번 처리구가 20.80으로 가장 높았으며, microencapsulation 색소 첨가구에서 밝기는 마요네즈 ②번 처리구가 61.19로 가장 높았고 적색도는 휘핑크림 ③번 처리구가 4.02로 가장 높았다. 코팅에 의하여 밝기가 증가된 구는 휘핑크림 ①번 처리구를 제외하고 모두 증가하였고, 적색도는 휘핑크림 ①번 처리구를 제외하고 모두 감소하였으며 마요네즈 ③번이 17.92가 감소하여 감소폭이 가장 컸다(Table 39).

Table 39. Microencapsulation된 홍조류색소를 첨가한 크림류에서 color Hunter value

Turbid sample	number	원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b
휘핑크림	①	52.75	+1.74	+1.75	51.82	+3.90	+1.25
	②	48.73	+14.92	+0.46	51.69	+3.58	+0.84
	③	50.46	+17.6	+2.21	51.45	+4.02	+0.87
마요네즈	①	57.89	+4.46	+5.05	59.97	+5.12	+5.18
	②	56.49	+16.34	+2.81	61.19	+1.86	+6.92
	③	56.72	+20.80	+3.71	59.70	+2.88	+6.75

4. Microencapsulation에 의한 설탕의 안정성 조사

가. 온도에 따른 안정성

시료를 4, 10, 20, 30℃별로 0, 2, 4, 6일 간격으로 색차계를 이용한 L, a, b값 측정하였다(Table). 원액 처리구에서 L값이 0일 51.84로 가장 높았던 2% 시료 ①번은 6일에 4, 10, 20, 30℃에서 각각 51.92, 49.6, 49.20, 48.64로 나타나 온도가 높을수록 변화폭이 크게 나타났고,microencapsulation된 경우에도 L값이 0일 52.80으로 가장 높았던 포카리스웨트 시료 ①번은 각각 51.33, 51.46 49.78, 49.99로 온도가 높을수록 변화폭이 크게 나타났으나 원액처리구 보다 변화가 적었다. 적색도의 경우, 밀키스 원액 a값이 6일에 4, 10, 20, 30℃에서 각각 2.36, 1.75, 1.43, 1.30으로 나타나 온도가 높을수록 변화폭이 크게 나타났고,microencapsulation된 경우에도 각각 .32, 1.82, 2.29, 2.33으로 나타나 변화가 거의 없었다. 따라서, 온도가 높을수록, 처리 시간이 길수록 변화폭이 높았고 microencapsulation 처리구가 원액 처리구 보다 안정하였다(Table 40).

Table 40. Microencapsulation된 홍조류색소를 첨가한 식품에서 보관온도에 따른
경시적 Hunter value 변화

(0일)

		4℃						10℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	51.84	+1.24	-0.48	50.67	+1.67	-0.61	51.74	+1.03	-0.68	52.55	+1.53	-1.08
	②	50.62	+3.76	-1.67	52.31	+0.52	-0.25	50.31	+3.41	-1.78	52.35	+0.49	+0.5
	③	49.91	+4.19	-2.07	52.55	+0.66	-0.35	50.42	+4.12	-2.31	51.74	+0.69	-0.65
포카리 스웨트	①	51.57	+1.12	-0.45	52.80	+0.82	-0.35	51.31	+1.43	-1.43	51.98	+0.91	-0.55
	②	48.58	+3.25	-2.44	50.4	+1.38	-1.52	51.06	+2.79	-1.46	52.39	+1.05	-0.42
	③	49.82	+4.13	-2.03	52.09	+1.04	-1.10	49.43	+4.39	-3.12	50.52	+1.32	-0.93
사이다	①	51.67	+0.8	-0.39	50.41	+2.06	-1.62	52.15	+0.98	-0.74	49.71	+1.98	-1.04
	②	50.92	+3.05	-1.50	49.93	+1.55	-0.37	50.74	+3.44	-1.92	49.39	+1.70	-0.7
	③	50.41	+3.91	-2.19	51.30	+1.45	-1.93	49.98	+3.88	-2.41	50.37	+1.42	-1.01
밀키스	①	45.99	+1.94	+1.50	45.78	+2.59	+0.58	46.19	+2.04	+1.67	45.72	+2.49	+1.11
	②	46.27	+4.28	+1.68	46.51	+1.3	+1.92	45.96	+4.35	+1.4	46.32	+1.38	+1.44
	③	46.10	+4.01	+1.1	46.97	+0.75	+1.76	45.46	+3.92	+0.95	47.18	+0.78	+1.34
아침 햇살	①	45.46	+1.17	+2.96	45.78	+1.18	+2.58	43.87	+1.54	+1.02	45.94	+0.96	+2.6
	②	43.22	+10.36	+1.85	46.15	+0.98	+2.48	43.39	+10.42	+1.66	47.74	+1.19	+1.79
	③	43.81	+12.71	+2.90	44.99	+1.5	+1.39	43.56	+12.72	+2.72	52.46	+0.81	+2.17

		20℃						30℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	51.60	+1.04	-0.35	51.37	+1.4	-0.54	56.15	+0.65	-0.68	55.83	+0.92	-0.7
	②	50.57	+2.91	-1.55	52.52	+0.52	-0.46	55.61	+2.04	-1.4	55.38	+0.42	-1.97
	③	50.52	+4.08	-2.06	50.83	+0.86	-1.73	54.62	+3.02	-2.15	54.60	+0.51	-1.42
포카리 스웨트	①	51.08	+1.18	-1.10	51.94	+0.7	-0.57	55.45	+1.32	-0.66	56.65	+0.35	-0.61
	②	50.96	+2.39	-0.61	50.81	+0.94	-0.49	54.13	+2.03	-3.41	55.11	+0.73	-1.34
	③	49.99	+3.62	-2.03	50.62	+1.10	-0.75	54.69	+3.15	-2.16	54.23	+1.17	-1.59
사이다	①	52.21	+0.67	-0.64	50.66	+1.70	-0.92	50.52	+1.11	-1.49	48.32	+1.81	-2.23
	②	51.02	+2.60	-1.53	50.24	+1.29	-0.59	48.34	+2.63	-2.9	48.65	+1.23	-0.53
	③	50.29	+3.66	-2.36	50.33	+1.27	-0.98	49.07	+2.83	-1.92	48.83	+0.95	-0.76
밀키스	①	46.24	+1.57	+1.75	46.28	+1.89	+1.35	44.60	+1.78	+1.64	43.97	+1.88	+0.93
	②	46.23	+3.66	+1.6	46.52	+1.23	+1.51	44.48	+3.20	+0.93	44.79	+1.18	+0.83
	③	45.78	+3.3	+0.44	46.82	+0.93	+1.19	44.50	+2.98	+1.04	46.03	+0.71	+1.59
아침 햇살	①	44.81	+1.16	+2.69	44.08	+1.54	+1.65	42.54	+1.45	+1.01	44.45	+1.08	+2.09
	②	42.94	+10.23	+1.75	45.13	+1.19	+2.01	41.67	+9.33	+1.23	43.77	+0.97	+1.49
	③	42.40	+11.69	+1.01	44.57	+1.32	+1.4	42.28	+11.57	+2.16	44.44	+0.8	+2.09

(2일)

		4℃						10℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	49.85	+1.48	-0.82	49.23	+1.56	-0.85	49.12	+1.23	-0.67	49.05	+1.36	-0.81
	②	49.17	+3.19	-1.77	50.31	+0.47	-0.48	47.87	+2.98	-2.85	49.77	+0.43	-0.43
	③	48.88	+3.76	-2.21	50.08	+0.52	-0.54	48.14	+3.49	-2.06	48.69	+0.72	-1.6
포카리 스웨트	①	50.26	+0.85	-0.61	50.36	+0.79	-0.6	48.94	+1.08	-0.59	49.20	+0.75	-0.52
	②	49.40	+2.79	-1.53	49.69	+0.88	-0.48	48.19	+3.05	-1.64	49.15	+0.85	-0.50
	③	47.48	+3.92	-3.04	48.89	+1.14	-0.84	48.38	+3.14	-1.89	48.88	+0.91	-0.65
사이다	①	50.72	+0.73	-0.66	49.92	+1.51	-0.9	49.89	+0.51	-0.83	46.82	+2.26	-2.91
	②	49.69	+2.69	-1.62	48.75	+1.36	-0.6	47.81	+2.78	-3.03	48.34	+1.19	-1.20
	③	48.59	+3.54	-2.49	48.49	+1.32	-0.94	48.68	+3.13	-2.11	48.13	+1.15	-0.80
밀키스	①	45.11	+1.69	+1.52	44.83	+1.93	+1.14	44.25	+1.74	+1.36	44.03	+2.21	+0.2
	②	44.51	+4.04	+1.37	45.28	+1.29	+1.28	43.54	+4.00	+0.93	44.32	+1.39	+1.06
	③	44.75	+3.32	+1.02	45.9	+0.72	+1.38	43.77	+3.5	+0.51	45.18	+0.85	+0.95
아침 햇살	①	44.3	+1.04	+2.34	44.64	+1.35	+1.93	43.50	+1.13	+1.77	43.16	+1.02	+0.38
	②	42.34	+10.03	+1.31	44.56	+1.07	+1.81	42.29	+9.69	+1.3	43.16	+1.38	+0.94
	③	41.85	+12.09	+0.62	44.98	+0.89	+1.95	42.45	+11.93	+2.13	44.45	+1.17	+1.69

		20℃						30℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	49.56	+1.17	-0.34	49.08	+1.3	-0.40	48.02	+1.11	-1.40	47.36	+1.58	-1.54
	②	48.86	+2.66	-1.68	50.86	+0.38	-0.62	48.31	+2.43	-1.73	48.63	+0.60	-1.63
	③	48.74	+3.11	-1.79	46.68	+1.18	-2.12	48.70	+2.29	-1.53	47.14	+0.84	-1.23
포카리 스웨트	①	49.19	+1.35	-0.22	50.31	+0.68	-0.53	52.68	+0.84	-0.51	49.39	+0.65	-0.70
	②	49.62	+1.81	-0.96	49.50	+0.92	-0.51	49.14	+1.45	-0.92	46.9	+1.26	-2.42
	③	47.01	+3.03	-3.48	47.68	+1.13	-1.77	47.52	+2.35	-1.53	47.85	+0.96	-0.59
사이다	①	50.9	+0.35	-0.45	49.27	+2.14	-0.62	52.68	+0.11	-0.25	48.04	+1.81	-2.76
	②	49.65	+2.33	-1.05	48.06	+1.81	-0.57	49.72	+1.67	-1.12	47.76	+1.34	-0.58
	③	49.24	+3.3	-1.76	49.56	+1.07	-0.81	49.57	+2.19	-1.54	47.09	+1.6	-2.14
밀키스	①	44.68	+1.85	+1.56	45.06	+1.83	+1.26	46.21	+1.44	+1.37	44.35	+1.88	+1.25
	②	43.84	+3.45	+0.21	45.26	+1.3	+1.27	45.17	+2.55	+1.81	44.94	+1.40	+1.12
	③	43.26	+3.36	+0.41	45.96	+0.77	+1.59	43.78	+3.14	0.00	45.37	+0.69	+1.58
아침 햇살	①	43.68	+1.09	+2.15	44.87	+0.29	+2.66	43.13	+1.24	+1.38	42.93	+0.96	+0.71
	②	42.45	+9.92	+1.47	42.84	+1.61	+0.05	40.38	+9.21	+2.63	43.68	+1.58	+2.91
	③	42.02	+11.92	+1.78	43.79	+1.79	+1.58	40.13	+10.49	-0.96	44.15	+0.82	+3.87

(4일)

		4℃						10℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	49.67	+1.59	-1.43	49.55	+2.00	-0.54	49.14	+1.48	-0.13	47.48	+2.07	-1.15
	②	50.02	+2.55	-0.97	50.28	+0.56	+0.02	49.00	+2.82	-2.46	51.06	+0.44	-0.38
	③	49.38	+3.59	-1.62	50.17	+0.73	-0.52	48.97	+3.32	-1.78	49.79	+0.8	-0.2
포카리스웨트	①	50.71	+0.89	-0.83	50.98	+0.81	-0.17	49.21	+1.97	-0.52	49.3	+1.35	-0.38
	②	49.42	+2.79	-1.59	49.68	+1.08	-0.11	49.51	+3.21	-1.74	48.43	+1.49	-1.15
	③	48.27	+3.66	-3.17	49.34	+1.95	-0.97	51.11	+0.80	-0.40	47.84	+1.4	-1.86
사이다	①	51.08	+0.90	-0.29	49.08	+2.52	-0.8	50.59	+0.48	-0.64	49.51	+2.36	-0.93
	②	49.52	+3.23	-1.48	48.99	+1.57	-1.43	49.88	+2.7	-1.33	48.43	+1.69	-0.56
	③	49.54	+3.31	-1.99	49.67	+1.18	-0.44	49.65	+3.23	-1.86	47.52	+1.8	-2.34
밀키스	①	45.7	+1.69	+2.01	45.01	+2.53	+1.33	45.72	+1.58	+1.79	44.60	+2.50	+1.15
	②	45.94	+3.46	+1.96	45.95	+1.44	+1.67	44.78	+3.89	+0.91	45.49	+1.7	+1.29
	③	45.41	+3.46	+1.41	46.21	+0.82	+1.84	44.33	+4.54	+0.76	45.41	+1.12	+0.19
아침햇살	①	44.31	+1.38	+2.31	44.56	+0.81	+1.28	44.97	+1.17	+2.48	44.44	+1.42	+1.51
	②	42.7	+10.13	+1.48	44.49	+0.56	+0.81	42.75	+10.1	+1.56	44.70	+1.07	+1.74
	③	43.46	+12.47	+2.59	44.84	+1.53	+1.64	43.11	+12.44	+2.61	45.18	+0.66	+2.37

		20℃						30℃					
		원액			코팅			원액			코팅		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	47.18	+2.18	-0.02	46.90	+1.89	+0.6	47.7	+1.28	+0.42	47.56	+1.71	-0.8
	②	49.53	+1.88	-0.07	47.28	+1.04	+1.27	48.31	+1.88	+0.09	46.62	+1.09	+1.45
	③	48.48	+2.64	-0.47	46.32	+0.87	-0.34	47.11	+2.76	-2.1	47.55	+1.05	-0.64
포카리스웨트	①	48.33	+2.18	0.00	50.32	+0.44	+0.38	47.99	+1.63	-2.91	50.2	+0.87	+0.02
	②	47.83	+1.38	-0.88	48.24	+1.78	-0.17	49.51	+1.12	+0.12	49.29	+0.99	-0.61
	③	48.11	+2.39	-1.64	49.27	+1.17	-0.10	48.71	+2.17	-0.82	46.3	+1.91	-2.29
사이다	①	51.83	+0.31	-0.09	49.71	+1.54	-0.35	50.46	+0.52	-1.41	49.8	+1.43	-0.41
	②	50.27	+1.76	-0.78	49.66	+1.16	-0.44	49.21	+1.79	-1.86	48.66	+1.32	-0.48
	③	49.9	+2.46	-1.29	43.83	+2.40	+0.62	49.96	+1.87	-1.16	49.61	+1.05	-0.57
밀키스	①	44.88	+2.6	+0.94	47.16	+0.86	+2.01	44.45	+1.90	+0.37	45.06	+2.08	+1.39
	②	43.04	+3.39	-0.83	46.05	+0.89	+1.97	45.8	+2.69	+1.98	44.70	+1.78	+0.09
	③	45.04	+2.18	+1.49	44.26	+1.39	3.08	45.12	+2.74	+1.11	46.24	+0.73	+1.67
아침햇살	①	42.60	+9.92	+1.77	44.73	+1.94	+2.63	43.02	+0.93	+1.45	44.66	+1.33	+3.66
	②	42.98	+11.79	+2.75	42.32	+1.94	-0.68	39.82	+6.08	+2.21	42.81	+0.93	+3.56
	③	44.96	+0.89	+2.65	44.71	+0.82	+2.51	39.31	+7.46	-0.84	45.02	+0.22	+4.32

(6일)

		4℃						10℃					
		원액 색소			코팅 색소			원액 색소			코팅 색소		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	51.92	+0.32	+0.17	50.61	+1.77	-0.04	49.6	+1.54	+0.65	47.6	+1.33	+0.69
	②	50.84	+1.97	-0.34	51.81	+0.32	+0.44	50.93	+1.81	-0.24	50.85	+0.21	+0.83
	③	50.14	+2.98	-0.93	51.26	+0.43	+0.4	48.68	+2.69	-0.25	48.20	+0.62	+0.87
포카리스웨트	①	50.83	+1.06	-0.02	51.33	+0.69	+0.29	50.11	+1.60	+0.30	51.46	+0.63	+0.35
	②	49.75	+2.82	-1.41	49.95	+1.09	+0.35	50.68	+0.93	+0.41	49.67	+1.13	+0.43
	③	50.11	+2.83	-0.92	49.94	+1.10	+0.18	49.92	+2.46	-0.55	50.37	+0.81	+0.5
사이다	①	51.73	+0.73	-0.27	49.91	+1.93	-0.56	52.28	+0.04	+0.42	49.66	+2.27	-0.31
	②	50.16	+2.82	-0.89	47.96	+2.06	-1.16	50.91	+1.91	-0.46	49.66	+1.15	-1.61
	③	50.24	+2.83	-1.37	49.75	+1.48	-0.19	50.52	+2.74	-1.03	50.13	+0.47	+0.01
밀키스	①	45.19	+2.36	+1.82	45.68	+2.32	+1.74	45.87	+1.75	+2.34	46.18	+1.82	+1.98
	②	45.67	+3.65	+2.24	46.01	+1.50	+1.83	45.99	+3.38	+2.33	46.22	+1.28	+1.96
	③	45.62	+3.64	+1.64	46.34	+0.85	+1.13	45.21	+3.86	+1.49	47.04	+0.62	+2.18
아침햇살	①	44.52	+1.83	+2.6	45.86	+0.69	+2.85	45.06	+1.53	+3.16	45.84	+0.61	+2.95
	②	43.18	+10.51	+1.83	45.14	+1.02	+2.06	43.41	+10.52	+2.03	44.74	+1.57	+2.06
	③	43.76	+12.60	+2.97	44.40	+1.36	+0.53	43.75	+12.73	+3.1	45.41	+0.6	+2.98

		20℃						30℃					
		원액 색소			코팅 색소			원액 색소			코팅 색소		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
2%	①	49.20	+2.16	+1.12	47.34	+1.63	+0.80	48.64	+0.8	+1.38	49.00	+0.86	+0.97
	②	49.12	+0.77	+1.53	46.26	-0.54	+2.23	48.82	+1.19	+1.47	38.72	-0.67	+4.82
	③	48.03	+1.64	-0.39	47.30	+0.56	+1.47	49.03	+1.34	+1.22	46.64	+0.79	+0.86
포카리스웨트	①	48.73	+2.25	+0.67	49.78	+0.27	+1.18	50.25	+1.05	+0.86	49.99	+0.57	+0.23
	②	47.45	+0.33	+2.04	48.95	+0.82	+0.72	49.1	+0.7	-0.16	49.42	+1.07	+0.33
	③	48.62	+1.28	+1.11	47.25	+0.73	+0.66	49.76	+1.62	+0.52	48.09	+0.84	-0.38
사이다	①	52.23	+0.09	+0.44	50.74	+1.07	+0.26	54.74	+0.14	+0.07	50.5	+1.01	+0.47
	②	51.38	+1.06	-0.09	49.46	+1.20	+0.25	51.38	+1.23	-0.1	49.22	+1.24	+0.2
	③	50.69	+1.89	-0.58	50.83	+0.56	+0.60	50.94	+1.23	+0.02	50.33	+0.19	+1.05
밀키스	①	46.01	+1.43	+2.44	46.45	+1.48	+2.29	46.98	+1.30	+2.53	48.17	+0.64	+2.33
	②	45.44	+2.05	+2.73	39.26	+0.32	+2.15	47.06	+2.08	+2.51	47.34	+0.94	+1.96
	③	45.44	+2.89	+2.01	47.18	-0.19	+3.32	45.06	+1.49	+1.25	46.7	+0.03	+2.5
아침햇살	①	44.00	+2.4	+3.25	45.17	+0.74	+3.28	43.85	+2.73	+6.00	44.23	+2.15	+5.18
	②	42.34	+9.25	+1.06	44.71	+1.13	+2.82	38.52	+2.38	+4.59	43.63	-0.02	+4.99
	③	41.09	+11.97	+4.04	43.75	+0.81	+3.28	37.67	+4.58	+3.25	46.10	-0.42	+5.67

나. 자외선 조사에 따른 색소의 안정성 검토

원액색소와 코팅색소를 각각 plastic tube와 glass tube에 담아 UV를 2시간 간격으로 조사하였다.

1) Plastic 용기에서 자외선 안정성 조사

원액 처리구에서 0, 2, 4, 6, 8시간 간격으로 측정된 결과 소주 ①번 처리구의 경우에 L값이 50.80, 51.31, 51.21, 50.74, 50.67로 나타나 큰 변화가 없었고 코팅처리구에서도 50.80, 50.70, 50.69, 50.72, 50.31로 나타나 큰 변화가 없었다. a 값의 경우에는 원액이 1.38, 0.29, 0.74, 0.44로 나타나 많이 감소하였고 코팅된 시료가 1.38, 0.49, 0.41, 0.67, 0.40으로 나타나 많이 감소하였으나 원액과 코팅된 시료간의 차이는 없는 것으로 생각되었다(Table 41, 42, 43, 44, 45, 46).

Table 41. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 원액 색소의 L값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	50.8	51.31	51.21	50.74	50.67
	②	49.24	48.52	49.93	49.44	48.06
	③	48.62		49.68	48.93	48.58
드라이진	①	49.02	50.75	51.05	50.54	50.32
	②	48.72	50.27	50.59	50.25	49.31
	③	47.16	49.27	49.59	49.57	48.74
사과즙	①	47.74	49.66	48.98	48.15	48.90
	②	44.78	46.08	46.74	46.12	46.04
	③	46.06	45.29	46.66	45.81	45.48
막걸리	①	42.1	42.11	42.46	42.21	41.88
	②	39.29	39.59	40.18	39.96	39.61
	③	39.38	40.02	40.10	39.62	39.49
휘핑크림	①	55.85	50.89		54.82	54.89
	②	54.64	48.66		54.49	54.37
	③	54.39	48.98		54.42	54.1

Table 42. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 원액 색소의 a값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	+1.38	+0.29	+0.74	+0.99	+0.44
	②	+7.54	+6.07	+3.59	+4.28	+5.72
	③	+7.73		+6.55	+7.32	+5.24
드라이진	①	+1.35	+0.66	+0.39	+0.74	+0.40
	②	+4.25	+1.70	+1.20	+1.59	+1.41
	③	+5.72	+3.51	+3.47	+3.3	+2.99
사과즙스	①	+1.43	+0.2	+0.98	+1.54	+0.18
	②	+6.86	+5.93	+5.20	+5.90	+5.25
	③	+7.03	+6.85	+5.39	+6.53	+5.96
막걸리	①	+0.99	+0.69	+0.57	+0.65	+0.6
	②	+10.05	+8.36	+8.53	+8.21	+7.95
	③	+9.45	+7.38	+8.57	+8.28	+7.38
휘핑크림	①	-0.82			-0.66	-0.62
	②	+3.30			+3.32	+3.24
	③	+3.95			+4.12	+4.24

Table 43. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 원액 색소의 b값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	-0.07	-0.46	+0.22	-0.37	+0.08
	②	-2.16	-1.83	-0.4	-1.01	-1.29
	③	-2.41		-1.9	-2.63	-1.53
드라이진	①	-0.83	-0.33	+0.31	-0.27	+0.18
	②	-1.07	-0.76	+0.09	-0.52	+0.05
	③	-2.61	-0.6	-0.54	-1.06	-0.53
사과즙스	①	+1.73	+2.71	+2.96	+2.48	+3.08
	②	+0.59	+0.35	+1.02	+0.48	+0.87
	③	+0.34	-0.16	+0.8	+0.16	+0.52
막걸리	①	+4.14	+4.12	+4.24	+3.92	+4.30
	②	+2.18	+2.12	+2.27	+2.06	+2.35
	③	+1.36	+1.33	+1.67	+1.52	+1.93
휘핑크림	①	+3.46			+3.00	+2.98
	②	+2.81			+2.69	+2.68
	③	+2.76			+2.94	+2.84

Table 44. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 코팅 색소의 L값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	50.8	50.7	50.69	50.72	50.31
	②	49.24	50.89	51.13	51.08	50.51
	③	48.62	49.92	50.46	50.21	49.79
드라이진	①	49.02	51.09	51.34	51.09	50.14
	②	48.72	50.76	50.98	50.96	50.21
	③	47.16	50.25	51.2	51.10	50.11
사과즙	①	47.74	49.32	48.94	48.15	48.96
	②	44.78	47.94	49.41	48.77	48.14
	③	46.06	48.81	49.12	49.02	48.14
막걸리	①	42.1	42.22	42.47	41.98	41.97
	②	39.29	42.96	43.14	42.59	42.58
	③	39.38	42.74	43.04	42.36	42.24
휘핑크림	①	55.85			55.48	55.29
	②	54.64			56.07	55.45
	③	54.39			55.69	55.39

Table 45. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 코팅 색소의 a값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	+1.38	+0.49	+0.41	+0.67	+0.4
	②	+7.54	+0.58	+0.39	+0.49	+0.34
	③	+7.73	+0.67	+0.58	+0.76	+0.5
드라이진	①	+1.35	+0.17	+0.06	+0.34	+0.15
	②	+4.25	+1.70	+0.08	+0.31	+0.19
	③	+5.72	+0.32	+0.12	+0.36	+0.23
사과즙	①	+1.43	+0.37	+0.48	+1.06	+0.30
	②	+6.86	+0.45	-0.20	+0.14	+0.01
	③	+7.03	+0.37	+0.36	+0.41	+0.32
막걸리	①	+0.99	+0.93	+1.10	+1.05	+0.98
	②	+10.05	+0.03	+0.14	+0.23	+0.04
	③	+9.45	+0.26	+0.33	+0.43	+0.22
휘핑크림	①	-0.82			-0.56	-0.5
	②	+3.30			-0.51	-0.49
	③	+3.95			-0.67	-0.60

Table 46. 자외선광에 의한 plastic 용기 보존 코팅 색소의 b값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	-0.07	-0.33	+0.28	-0.33	+0.18
	②	-2.16	-0.76	-0.15	-0.7	-0.23
	③	-2.41	-0.6	-0.11	-0.6	-0.17
드라이진	①	-0.83	-0.55	+0.19	-0.48	+0.07
	②	-1.07	-0.36	+0.32	-0.33	+0.22
	③	-2.61	-0.52	+0.30	-0.48	+0.03
사과즙스	①	+1.73	+2.97	+3.64	+2.96	+3.30
	②	+0.59	+2.35	+3.87	+3.65	+3.58
	③	+0.34	+2.93	+3.36	+2.89	+3.25
막걸리	①	+4.14	+3.66	+3.87	+3.71	+4.22
	②	+2.18	+4.06	+4.26	+4.08	+4.42
	③	+1.36	+4.15	+4.14	+4.22	+4.53
휘핑크림	①	+3.46			+3.42	+3.26
	②	+2.81			+3.43	+3.23
	③	+2.76			+3.43	+3.28

2) 유리 용기에서 자외선 안정성 조사

원액 처리구에서 0, 2, 4, 6, 8시간 간격으로 측정된 결과 소주 ①번 처리구의 경우에 L값이 50.80, 50.89, 49.87, 50.77, 49.86로 나타나 큰 변화가 없었고 코팅처리구에서도 50.80, 50.54, 50.83, 50.49, 50.09로 나타나 큰 변화가 없었다. a값의 경우에는 원액이 1.38, 0.60, 1.53, 0.81, 0.82로 나타나 많이 감소하였고 코팅된 시료가 1.38, 0.79, 1.53, 0.81, 0.59로 나타나 많이 감소하였으나 원액과 코팅된 시료간의 차이는 없는 것으로 생각되었다(Table 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Table 47. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 원액 색소의 L값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	50.8	50.89	49.87	50.77	49.86
	②	49.24	48.66	48.83	48.16	47.68
	③	48.62	48.98	49.12	48.83	48.03
드라이진	①	49.02	51.08	50.11	49.79	50.06
	②	48.72	49.44	49.32	49.34	49.18
	③	47.16	49.30	49.54	49.63	49.31
사과즙	①	47.74	48.79	49.19	47.92	47.94
	②	44.78	45.98	46.5	45.29	45.31
	③	46.06	45.36	46.74	45.56	44.64
막걸리	①	42.1	42.91	42.85	42.25	41.83
	②	39.29	40.5	40.48	39.66	39.88
	③	39.38	39.72	40.25	39.73	39.33
휘핑크림	①	55.85	55.54		55.74	55.65
	②	54.64	53.98		54.37	54.09
	③	54.39	54.18		54.62	54.17

Table 48. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 원액 색소의 a값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	+1.38	+0.6	+1.53	+0.81	+0.82
	②	+7.54	+7.0	+6.70	+7.41	+7.08
	③	+7.73	+7.60	+7.20	+7.71	+6.75
드라이진	①	+1.35	+0.45	+0.63	+1.2	+0.49
	②	+4.25	+3.07	+2.69	+3.00	+2.72
	③	+5.72	+3.73	+3.47	+3.56	+3.27
사과즙	①	+1.43	+0.85	+0.49	+1.52	+0.88
	②	+6.86	+5.93	+5.74	+6.66	+6.28
	③	+7.03	+6.01	+5.37	+6.68	+7.01
막걸리	①	+0.99	+0.32	+0.67	+0.63	+0.74
	②	+10.05	+6.99	+8.66	+8.83	+8.03
	③	+9.45	+8.04	+8.99	+8.62	+8.29
휘핑크림	①	-0.82	-0.58		-0.7	-0.68
	②	+3.30	+3.79		+3.28	+3.3
	③	+3.95	+3.13		+4.10	+4.03

Table 49. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 원액 색소의 b값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	-0.07	-0.33	+0.47	-0.4	+0.2
	②	-2.16	-2.20	-1.56	-2.24	-1.73
	③	-2.41	-2.59	-1.96	-2.70	-1.93
드라이진	①	-0.83	+0.45	+0.46	+0.02	+0.29
	②	-1.07	+3.07	-0.45	-1.07	-0.54
	③	-2.61	+3.73	-0.7	-1.33	-0.78
사과주스	①	+1.73	+2.64	+3.27	+2.51	+3.21
	②	+0.59	+0.61	+0.90	+0.72	+0.79
	③	+0.34	+0.11	+0.87	+0.11	+0.15
막걸리	①	+4.14	+3.37	+4.4	+4.12	+4.15
	②	+2.18	+1.58	+2.3	+2.17	+2.26
	③	+1.36	+1.2	+1.8	+1.53	+1.73
휘핑크림	①	+3.46	+3.14		+3.24	+3.26
	②	+2.81	+2.88		+2.65	+2.6
	③	+2.76	+2.7		+2.92	+2.95

Table 50. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 코팅 색소의 L값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	50.8	50.54	50.83	50.49	50.09
	②	49.24	50.69	51.43	50.90	50.94
	③	48.62	50.81	50.78	49.65	49.50
드라이진	①	49.02	51.09	51.2	50.90	50.41
	②	48.72	50.69	51.25	50.84	50.15
	③	47.16	50.49	51.39	51.00	49.89
사과주스	①	47.74	48.77	49.07	47.93	48.62
	②	44.78	49.64	49.28	49.12	47.92
	③	46.06	48.59	48.98	48.25	48.12
막걸리	①	42.1	42.27	43.08	42.07	41.90
	②	39.29	42.46	43.4	42.60	42.33
	③	39.38	42.67	43.14	42.60	42.63
휘핑크림	①	55.85	55.74		55.48	54.16
	②	54.64	54.79		55.14	55.25
	③	54.39	55.52		55.42	54.70

Table 51. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 코팅 색소의 a값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	+1.38	+0.79	+1.53	+0.81	+0.59
	②	+7.54	+0.83	+6.70	+0.7	+0.54
	③	+7.73	+0.48	+7.20	+1.15	+0.65
드라이진	①	+1.35	+0.22	+0.03	+0.36	+0.17
	②	+4.25	+0.3	+0.04	+0.38	+0.13
	③	+5.72	+0.37	+0.14	+0.38	+0.24
사과즙스	①	+1.43	+0.52	+0.41	+1.17	+0.15
	②	+6.86	-0.21	-0.06	+0.04	+0.09
	③	+7.03	+0.59	+0.31	+0.75	+0.30
막걸리	①	+0.99	+1.00	+1.05	+1.14	+0.98
	②	+10.05	+0.10	+0.22	+0.14	+0.16
	③	+9.45	+0.27	+0.37	+0.33	+0.22
휘핑크림	①	-0.82	-0.47		-0.57	-0.5
	②	+3.30	-0.37		-0.53	-0.48
	③	+3.95	-0.77		-0.66	-0.63

Table 52. 자외선광에 의한 glass 용기 보존 코팅 색소의 b값 변화

sample	number	Reaction time(hour)				
		0	2	4	6	8
소주	①	-0.07	-0.43	+0.1	-0.5	+0.18
	②	-2.16	-0.85	-0.27	-0.84	-0.49
	③	-2.41	-0.64	-0.20	-0.88	-0.27
드라이진	①	-0.83	-0.44	+0.14	-0.42	+0.08
	②	-1.07	-0.27	+0.21	-0.34	+0.13
	③	-2.61	-0.43	+0.13	-0.49	+0.05
사과즙스	①	+1.73	+3.09	+3.69	+3.09	+3.37
	②	+0.59	+3.43	+3.82	+3.4	+3.68
	③	+0.34	+2.85	+3.26	+2.69	+3.10
막걸리	①	+4.14	+3.35	+3.88	+3.81	+3.95
	②	+2.18	+3.82	+4.31	+4.1	+4.07
	③	+1.36	+3.67	+4.03	+4.13	+4.1
휘핑크림	①	+3.46	+3.46		+3.38	+3.05
	②	+2.81	+3.15		+3.29	+3.21
	③	+2.76	+3.48		+3.27	+3.24

다. pH에 따른 색소의 안정성 검토

pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.5로 조정 한 결과 L값의 경우에 원액은 pH 4.5에서 일부 크게 증가하였으나 pH 5.0 이상에서는 큰 변화가 없었고, 코팅시료는 pH 4.5에서도 변화가 적었으나 pH가 올라갈수록 서서히 증가하였다. 이것은 pH 4.0과 4.5에서 색소단백질의 등전점이 있어 원액의 경우에는 일부색소의 용출의 영향으로 생각되며, 코팅색소의 경우에는 코팅에 의하여 pH 영향을 덜 받았으나 코팅물질이 pH 상승에 따라서 밝기가 증가하는 것으로 생각되었다(Table 53).

Table 53. pH 변화에 따른 홍조류 색소의 L값 변화

	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH7.5	pH8.5
원액1	47.59	48.38	46.96	47.88	47.95	47.28	45.21	49.42	49.09
원액2	42.65	46.79	41.71	43.85	43.25	44.41	44.91	41.98	41.86
원액3	40.32	45.99	46.06	40.30	46.06	46.81	46.33	44.48	48.40
코팅1	43.90	44.23	43.40	43.66	45.65	45.63	46.45	47.33	46.91
코팅2	43.88	43.21	45.46	47.13	46.92	48.31	48.65	48.43	48.25

a값의 경우에 원액은 pH 4.5에서 크게 감소하였으나, 코팅시료는 조사된 전 pH 영역에서 안정하였다(Table 54).

Table 54. pH 변화에 따른 홍조류 색소의 a값 변화

	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH7.5	pH8.5
원액1	+4.19	3.74	5.07	4.72	4.35	4.90	6.19	2.42	2.51
원액2	+16.83	11.19	21.66	18.93	21.09	17.96	17.82	23.18	23.54
원액3	+21.56	15.87	15.75	30.20	17.01	15.11	15.40	20.98	11.06
코팅1	+4.86	5.78	7.68	7.59	6.18	6.37	5.07	4.30	4.19
코팅2	+3.31	4.06	5.65	4.46	5.26	4.12	3.89	4.23	4.21

b값의 경우에 원액 1, 2는 pH에 따른 영향이 적었고 polysaccharide가 덜 추출된 원액3은 변화폭이 pH 4.5에서 크게 증가하였으며, 코팅시료는 조사된 전 pH 4.5부근에서 감소되었다가 증가되는 경향을 나타냈다(Table 55).

Table 55. pH 변화에 따른 홍조류 색소의 b값 변화

	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH7.5	pH8.5
원액1	-1.62	-1.44	-1.42	-1.15	-0.82	-0.32	1.10	0.79	1.58
원액2	-5.73	-3.87	-6.21	-5.49	-5.72	-4.83	-4.52	-4.86	-4.44
원액3	-8.28	-5.27	-4.90	-6.08	-4.78	-4.26	-4.17	-5.20	-3.11
코팅1	-1.47	-2.31	-2.63	-2.28	-1.71	-0.90	0.24	0.76	1.83
코팅2	-0.77	-0.91	-2.40	-1.79	-1.83	-1.11	-0.63	-0.42	-0.01

라. 색소 농도별 육안 관측

색소의 농도별 변화를 COLOR-CHIPS 색도표와 육안으로 비교해 보았다. 시료별로 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별 색의 변화를 육안으로 관측하였다(Table 56). 시료에 색소를 첨가한 농도별로 색이 점점 진하게 나타나는 것을 알 수 있었고, 농도가 높아질수록 파란색이 짙어지는 것을 알 수 있었다. 투명한 시료는 농도가 높아질수록 보라색으로 나타났고, 불투명한 시료는 농도가 높아질수록 진한분홍색으로 나타났다. 불투명한 시료는 원래의 색인 아이보리색, 흰색을 가지고 있기 때문에 혼합할 경우 색의 농도가 달라지는 것을 알 수 있었다. 투명한 시료에 농도별로 색소를 첨가한 시료보다 식초, 물엿, 불투명한 시료에 농도별 색소를 첨가한 시료가 색소의 첨가량에 따라 색의 변화가 크게 달라지는 것을 알 수 있었고, 점성이 강한 식품이 색소의 혼합이 잘 되고 색도 선명하게 나타남을 알 수 있었다. 1차년도 실험에서는 색소를 2 μ g/ml 첨가한 시료가 관능적으로 우수하였고, 10 μ g/ml 첨가한 시료가 주류와 색택이 유사하였다. 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료는 시판 candy와 유사하였고 관능적으로 우수한 색택을 가졌다. 1차년도 시료와 비교하였을 때는 색소를 10 μ g/ml 첨가한 색과 유사한 색을 띄는 것으로는 시료 사이다, 밀키스에 코팅한 색소 2 μ g/ml 첨가한 시료와 아침햇살에 코팅한 색소 6 μ g/ml 첨가한 시료가 1차년도 시료인 우유에 색소 10 μ g/ml 첨가한 시료와 같은 색으로 나타났다. candy와 유사한 색

을 띄는 시료로는 사이다에 색소 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 시료였으며, microencapsulation 코팅 처리한 색소의 농도가 높으면 붉은색과 파란색이 진하게 나타난 것을 알 수 있었다. 관능적으로는 마요네즈에 색소를 농도별로 첨가한 시료들이 좋게 판단되었다. 3차년도 실험에서는 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 이용하여 식품에 첨가하는 실험을 하였는데, 원액 홍조류 색소를 첨가하였을 때와 비교하여 코팅 처리한 색소는 음료나 주류에는 적색보다는 보라색에 가깝게 나타나 시중에 판매되는 오미자 음료나 캔디의 색과는 다른 느낌의 색이었다. 그리고 코팅 처리한 색소로 식품에 첨가하였을 때 혼합이 잘 되지 않는 문제점이 있었다. 식초나 물엿, 마요네즈에는 혼합이 잘 되었는데 식품에 첨가하였을 때의 색에 대한 기호도가 필요할 것이라 생각되었다

Table 56. 식품에 microencapsulation 코팅 처리한 색소를 농도별 첨가한 시료의 색등급 비교

농도별 시료	2 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	4 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	6 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	8 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	10 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	12 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)	14 (10 $\mu\text{g}/5\text{ml}$)
소주	M40 C10 연한보라빛	M40 C20 연보라색	M50 C20 연보라색	M60 C10 보라색	M60 C20 보라색	M60 C30 진보라	M60 C40 진한보라
드라이진	M40 C10 연한보라빛	M40 C20 연보라색	M50 C10 연보라색	M50 C20 보라색	M60 C30 보라색	M60 C40 진보라	M70 C50 진한보라
식초	M40 C10 연한보라빛	M50 C10 분홍빛보라	M50C20 연보라	M60 C30 보라색	M60 C40 진보라	M70 C50 파란빛 진한보라	M80 C30 진보라
사이다	M20 연한분홍	M20 C10 연한보라	M30 C10 연분홍빛 보라	M30 C20 연보라	M40 C10 분홍빛보라	M40 C20 보라	M50 C20 보라
밀키스	M20연분홍	M20 C10연보라	M20 C20 연보라	M30 C10 연분홍빛 보라	M30 C20 연보라	M40 C10 분홍빛보라	M40 C20 보라
아침햇살	Y20 M10 연베이지색	Y10 M20 연분홍빛 살색	M20 연분홍	M20 C10 연보라	M20 C20 연파랑빛 보라	M40 C10 보라	M40 C20 보라
베지밀	Y20 M10 연베이지색	Y30 M20 연한살색	Y30 M30 살색	Y20 M30 분홍빛살색	Y10 M30 분홍색	M30 C10 분홍빛보라	M30 C20 보라색
물엿	M60 C10	M70 C30	M80 C20	M80 C30	M80 C50	M100 C50	M100 C60
마요네즈	Y10 M10	M10	M10 C10	M20 C10	M40 C10	M40 C20	M40 C30
시중에 판매되는 오미자 음료 Y100M70(주황색)							

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(세부과제 : 경기대학교)

1. 남조류 및 홍조류 Phycoerythrin 색소의 정제

남조류는 성장속도가 늦을뿐만 아니라 정제과정에서 Phycoerythrin 함량이 미미한 것으로 나타나 Phycoerythrin이 다량 함유된 홍조류로 대체하여 생화학적 특성분석이 가능한 충분한 량(약 200mg)의 Phycoerythrin을 정제하였다. 이의 정제여부를 확인하기 위하여 PAGE를 실시한 결과 색소부분 및 coomassie blue 염색상에서 단일 band를 나타내어 정제된 것으로 확인하였으며 PAGE 에서 분자량은 약 150kDa 정도로서 SDS-PAGE 에서 20kDa 정도의 main band와 40kDa 정도의 minor band가 나타나 20kDa 4개와 40kDa 1개의 subunit를 가진 것으로 판단된다.

2. 홍조류 Phycoerythrin의 안정성 측정

홍조류로부터 신속하고 경제적으로 대량생산한 식품첨가물급 Phycoerythrin은 4℃의 암소에서 안정성을 검토한 결과 20일 까지도 염, 당, 알코올 및 알카리(Na_2CO_3 제외)에 상당히 안정한 상태를 나타내어 우수한 색소로서의 활용 전망이 밝다고 하겠다. 한편 상온의 실내(서향)에서 실시한 광선에 대한 안정성은 광선에 노출시킨 경우와 황색포장은 안정성을 부여하지 못했으나 Al-foil 포장, 적색, 청색 및 녹색 포장은 상당한 안정성을 부여하였다.

3. 식품첨가물급 및 정제 Phycoerythrin의 대량생산 체계 확립

식품첨가물급 phycoerythrin의 대량생산 체계가 상당한 수준으로 진행되었으며, 이들 phycoerythrin으로 제조한 Lip gross는 2℃의 냉장실 보관조건에서 1년이 경과하였지만 동일한 색상을 유지하였으며, skin lotion에도 phycoerythrin을 첨가하여 보관한 결과 2℃의 냉장실 보관조건에서 60일간 보관하였으나 안정하였다. 또한 간편하고 경제적인 식품첨가물급 및 전기영동과 HPLC 상에서 단일 색소단백으로 확인된 정제 phycoerythrin의 간편한 대량생산 체계가 확립되어 보다 저렴한 가격으로 생산할 수 있게 되어 부가가치를 높이게 되었다.

4. 재조합균주 Phycoerythrin의 정제 및 안정성 측정

조합균주를 대량 배양하여 Phycoerythrin의 정제 및 생화학적 특성을 검토하고, 식품첨가물급 및 정제 Phycoerythrin을 대량생산하여 식품공업에 이용하고자 하였으나 재조합균주가 완벽하게 개발되지 못하여 실행하지 못하였다.

그러나 홍조류 Phycoerythrin의 간편한 생산방법이 확립되었으므로 차후 재조합균주가 개발될 경우색을 나타낼 경우 적절하게 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

5. Microencapsulation

대량생산된 색소의 pH에 대한 안정성을 증대하고자 microencapsulation하였으며 이를 위하여 현재 저가(20,000원/kg)로 수입·판매되고 있으며 내산성이 우수한 HPMCP-55를 활용하여 coating하였다. HPMCP-55는 pH 5 이하에서도 안정한 것으로 알려져 있으며 소화제가 위산에 대해서는 내성을 갖고 소장 내에서 제거됨으로서 약효가 발현될 수 있도록 하기 위한 coating제제로 사용되고 있으므로 독성검사가 불필요하므로 별도의 독성검사 비용이 절약되는 효과가 있다.

6. 색소생산의 산업화 검토

품 및 향장품 첨가물로의 활용을 위한 대량생산용 plant에 대하여 몇 가지 방법을 검토하였으며, 조추출액의 청징화를 위한 원심분리 또는 여과장치와 방폭시스템 및 용매회수시스템의 부착을 전제조건으로 하였다.

- 청징화작업 시 원심분리시간 단축 : Filter press 또는 Decanter 사용
- 농축 및 투석 시 slurry에 의한 막힘 현상 방지 : Vibration UF 사용
- 색소추출액 분무건조 시 함유 유기용매 폭발방지 : 방폭장치 부착 분무건조기 사용
- 시료 농축 또는 encapsulation 시 함유 유기용매 회수 : 용매회수장치 부착장비 사용

(협동과제 : 성균관대학교)

1. 대장균내의 재조합 Phycoerythrin 발현을 위한 오피론백터 구축

본 실험의 주재료인 홍조류(Rodophyta)인 김(*porphyra tenera*)으로부터 분리된 R-phycoerythrin(RPE)은 약 1.1 kb의 size로서 α, β 두 개의 polypeptide로 구성된 operon의 구조를 가지고 있다. Phycoerythrin은 chloroplast genome에 coding 되어 있으며, 각 subunit의 유전자 크기와 분자량은 α 495bp (21KDa), β 534bp

(23KDa)이다. Phycoerythrin의 assembly는 기본적으로 $\alpha\beta$ monomer의 형성 (apoprotein) 후에 accessory protein인 각종 chromophore synthase로부터 특이적으로 생성된 billins (phycoerythrobilin (PEB), phycourobilin (PUB) : open chain tetrapyrrole 형태의 chromophore)들과 phycoerythrin $\alpha\beta$ 내의 cysteine 잔기와의 thioether bonds를 통해 붉은 색의 형광을 나타내는 완벽한 구조를 형성한다. 따라서 본 연구에서는 Recombinant Phycoerythrin을 생산하기 위하여 각각의 $\alpha\beta$ polypeptide를 따로 cloning하여 발현시키는 방법과 더불어 mutagenesis방법을 통해 오피온백터에 제작하므로써 동시에 α , β subunit을 발현시켜 원 상태의 구조와 유사한 apoprotein을 최신유전공학 방법을 사용하여 구축하고자 하였다.

2. 대장균내의 재조합 Phycoerythrin 발현의 안정성 확보를 위한 보조단백질 발현백터 구축

완벽한 구조를 안정한 형태로 가지는 재조합 Phycoerythrin을 생성하여야만 붉은색의 단백질을 인위적으로 만들 수 있기 때문에 본 연구의 방향을 bilin synthase의 도입에 역점을 두어 연구를 진행하였다. 먼저 bilin synthase family는 phytychromobilin synthase 라고 불리워지는 HY2 계열로서 현재까지 고등식물인 애기장대에서 최초로 발견되어진 후 현재까지 몇몇의 cyanobacteria 종에서 분리되어졌으며 HY2 외에 phycoerythrobilin synthase (PEB A, B)와 phycocyanobilin synthase(PCY) 두 종류가 있다.

본 연구를 위해 *Nostoc spp.*로부터 phycoerythrobilin synthase (PEB A, B)의 유전자와 애기장대 HY2 유전자를 분리 확보하였으며, 그 발현 백터를 구축하였다.

(위탁과제 : 한국식품개발연구원)

1. 남조류 및 홍조류 색소의 독성 시험 및 식품 활용성 검사

남조류 및 홍조류 색소는 식중독균의 특성으로 나타나는 단백분해성, 전분분해성 및 용혈성이 나타나지 않았고 동물급여 실험에서도 섭취량, 체중, 간 및 비장 조직의 무게, GOT 함량, GPT 함량, SOD 활성 인체 유해성이 없을 것으로 나타났으며, 장내 유익균 및 식품 미생물도 억제하지 않았으므로 이들을 종균으로 사용하는 식품발효공정에 영향이 없을 것으로 생각되었다. 일반 시판 색소식품의 붉은 색소는 424~521 nm의 흡수파장을 나타냈고 Hunter value의 적색도인 a는 6.49~66.57로 다양하였으며 pH는 2.40~5.62로 나타났다.

홍조류 색소는 498 nm, 562 nm, 614 nm, 651 nm의 흡수 파장을 나타냈고 pH 변화에 따라서 파장별 흡광량 및 흡광 비율도 달리 나타났다. 식품에서 홍조류 색소의 첨가량은 음료류에서는 50 μl , 주류에서는 100 μl 이 우수하였다.

2. 대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소의 식품 활용성연구

대량추출방법에 의한 추출된 홍조류색소는 단백분해성, 전분분해성 및 용혈성이 나타나지 않았고 장내 유익균 및 식품 미생물도 억제하지 않았으므로, 이들을 종균으로 사용하는 식품발효공정에 영향이 없을 것으로 생각되었다.

보관하기 용이하게 만든 색소 분말은 유화제 및 초음파처리로 용해가 쉬웠다.

색소를 첨가하여 사용하기 위한 시판식품의 pH는 2.86~7.0으로 나타났다. 투명식품에서는 색소 첨가량에 따라 Hunter value의 a값이 증가하였으나 불투명 시료는 일관성이 없었다. 식품에 첨가된 색소는 온도별로 6일간 저장에서 안정한 것으로 나타났고, 증편 같이 찌는 식품은 열처리 시간이 증가할수록 적색도는 감소하였다.

3. Microencapsulation된 색소의 식품활용성에 관한 연구

Microencapsulation된 색소의 Hunter value a값의 탈색도는 원색소의 1/7 이하로 나타났으며, 투명한 사이다에서 오미자 음료를 기준으로 한 첨가량은 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 불투명한 베지밀은 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다.

Microencapsulation 방법에 따른 Hunter value a값은 polysaccharide가 제거된 색소를 사용한 처리방법이 우수하였다.

Microencapsulation된 색소는 첨가량에 따라 Hunter value a값이 증가하였으나 원액색소 증가폭에 비하여 미미하였다.

Microencapsulation에 의한 선택의 안정성은 온도 및 자외선에서는 원색소와 차이가 없었으나 pH에서는 안정한 것으로 나타났다.

따라서, 홍조류색소는 유해성 및 식품사용에서 안전하였고 음료류, 주류 등에 사용 가능할 수 있으며 microencapsulation 처리방법으로 안정성을 증대시킬 수 있었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 식용인 김(海苔)으로부터 추출하였으므로 안전성이 입증되어 독성검사 불필요.
2. 홍조류로부터 새로운 방법으로 간단하며 경제적인 색소 대량생산으로 고부가가치 산업화 가능 : 홍조류를 활용하여 간단하고 경제적인 대량생산방법에 따라 생산된 food grade 및 시약급 phycoerythrin을 대량생산하여 색소의 수입대체효과 기대 및 저렴한 가격으로 국내에 공급하려한다. 따라서 고부가가치 상품으로 개발하여 이익의 극대화 도모 및 국내 식품산업 발전에도 기여하고자 한다.
또한 국내에서 저렴한 생산비로 대량생산하므로 시장장악에 따른 지속적인 판매이익도 상당할 것으로 판단된다.
3. 공정단축으로 인원 및 경비절감효과와 소득증대효과가 나타날 것이다.
4. 적색색소를 저렴한 가격으로 대량 생산할 수 있어 수입대체 및 외화절약 효과를 기대할 수 있어 국가경제에 이바지 할 것임.
5. 안전 식품 생산 : 적색 40호 등의 타르색소 대체품으로 활용
6. 향장품에도 적용하여 천연색소단백질임을 바탕으로 고가전략화가 가능하다고 판단된다.
7. 대장균에 phycoerythrin 유전자를 cloning한 재조합 색소의 생산과 활용에 대한 첨단기술 축적이 가능 함.
8. 이후 다른 균주에도 적용할 수 있는 기틀을 마련함으로써 식품산업 발전에 기여할 것으로 판단됨.
9. 고부가가치 창출을 위한 첨단가공 기술 개발에 따른 산업화가 가능함.
10. 식품에 균주를 직접 이용함으로써 색소추출 비용이 낮아 저렴한 가격 경쟁력 확보 가능.
11. 균주를 이용한 발효식품 제조 시 색소생성균주를 사용한다면 발효공정과정에서 색소까지 동시에 이용하는 one step 공정으로 식품의 기호성 증대 가능.

12. 이를 토대로 하여 색소형성 껌산균 등의 새로운 균주를 개발하여 발효유 및 침채류 등의 식품산업발전에 기여하고자 함.

13. 전세계적으로 아직까지 phycoerythrin 재조합 단백질에서 붉은 색소의 발현을 확립한 예가 없어 붉은 색을 나타낼 수 있는 분야에 연구를 수행하였다. 하지만 당초 계획했던 것보다 대장균내에서 단백질 발현은 정상적으로 이루어졌으나 현재까지 발현시킨 단백질 또는 균주가 붉은색을 나타내지 않았다.

이는 phycoerythrin 발색과정의 key protein인 phycoerythrin 이외의 여러 보조적인 단백질 및 chromophore, 그리고 이들 chromophore의 대사에 관여하는 유전자 및 단백질이 함께 복합적으로 관여하는 것으로 보여지므로 이들 보조단백질을 분리하여 phycoerythrin 과 함께 발현시키려는 시도를 하였으나 아직까지는 본 실험의 목표인 붉은색을 만들어 내는 균주를 개발하지 못하였다.

따라서 이 연구는 보다 기초적인 정보와 자료를 토대로 아직까지 본 과제를 수행하면서 고려하지 못한 다른 발현 조건 및 단백질을 조사하여 연구하여야 할 것으로 생각되며, 차후 성공적으로 이루어진다면 천연 식품첨가물 적색색소 자원으로서의 가치가 크다 하겠다.

이에 본 과제의 종결 후에도 계속해서 phycoerythrin 발현 및 정상적 기능을 나타낼 수 있도록 새로운 유전자의 분리와 적용 실험을 계속 수행할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1996년 PNAS에 발표된 methylotrophic yeast인 *Pichia sp.*에서의 phytochrome의 발현이나 2001년 Analytical Biochemistry에 보고된 cyanobacteria *Anabaena sp.*에서의 재조합 C-phycoyanin의 생산은 균주 자체 내에 phytochrome이나 phycoyanin의 accessory component인 bilin이 존재하기는 하지만 phycoerythrin과 다른 phycoyanin의 bilin 계통이기 때문에 phycoerythrin의 발현에 있어 필수적인 보조단백질 (PEB : phycoerythrobilin) 없이 phycoerythrin의 assembly는 불가능할 것으로 추측된다. 2001 PNAS에 발표된 최근 경향도 효모나 cyanobacteria가 아니라 대장균에서 보조단백질인 phytochromobilin synthase를 함께 도입함으로써 유전공학적으로 고효율의 녹색의 phytochrome 생산을 구축한 것으로 보고되어 있다. 현재까지 전세계적으로 phycoerythrin 재조합 단백질에서 붉은 색소의 발현을 확립한 예는 없으며 대장균에서의 phycoerythrin 색소 생산 연구가 진행되어 마무리된다면 좋은 시스템으로서 전문 학술지에 게재할 수 있는 학문적인 가치가 충분할 뿐만 아니라 천연색소의 식품첨가와 같은 특성을 검토함으로써 각종 식품에의 적용을 통한 활용에 대한 최신과학기술을 확보할 수 있을 것이다.

제 7 장 참고문헌

- Bakker, J. and C. F. Timberlake (1997) Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(1), 35~43.
- Baublis, A., A. Spomer and M. D. Berber-Jimenez (1994) Anthocyanin pigments : comparison of extract stability. *J. Food Sci.*, **59**(6), 1219~1221, 1233.
- Brigitte U. Bruns, Winslow R. Briggs, and Arthur R. Grossman (1989) Molecular characterization of phycobilisome regulatory mutants of *Fremyella diplosiphon*. *J. Bacteriol.*, **171**(2), 901~908.
- Cemeroglu, B., S. Velioglu and S. Isik (1994) Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.*, **59**(6), 1216~1218.
- Cho, M. H., Yoon, H. H. and Hahn, T. R. (1996) Thermal stability of the major color component, cyanidin 3-glucoside, from a korean pigmented rice variety in aqueous solution. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **39**(3), 245~248.
- Cormier, F., R. Couture, C. B. Do, T. Q. Pham and V. H. Tong (1997) Properties of anthocyanins from grape cell culture. *J. Food Sci.*, **62**(2), 246~248.
- David M. Arciero and Alexander N. Glazer (1988) In vitro Attachment of Bilins to Apophycocyanin. *J. Bio. Chem.*, **263**(34), 18350~18357.
- Dekazos, E. D. (1970) Anthocyanin pigments in red tart cherries. *J. Food Sci.*, **35**, 237~241.
- Du, C. T., P. L. Wang and F. J. Francis (1975) Anthocyanins of ornamental cherries. *J. Food Sci.*, **40**, 1142~1144.
- Giusti, M. M. and R. E. Wrolstad (1996) Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.*, **61**(2), 322~326.
- Gregory A. Gambetta and J. Clark Lagarias (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *PNAS.*, **98**(19), 10566~10571.
- Hendry, G. A. F. and J. D. Houghton (1996) Natural food colorants. 2nd Ed. Blackie Academic and Professional, London.

- Kim, K. S., Lee, S. J. and Yoon, T. H. (1979) Studies on the utilization of plant pigments II. stability of anthocyanin pigments in Ganges Amaranth. *Korean J. Food Sci., Technol.*, **11**(1), 42~49.
- Kim, M. H., Lee, T. K. and Yang, H. C. (1992) Red pigment production from *Monascus anka albidus*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**(5), 451~455.
- Kim, S. J., Rhim, J. W., Lee, L. S. and Lee, J. S. (1996) Extraction and Characteristics of purple sweet potato pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(2), 345~351.
- Kim, S. U. and Kim, J. G. (1990) Pigment production in *Monascus anka*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **33**(3), 239~246.
- Kim, Y. H. (1999) Stabilities of anthocyanin pigments obtained from Crab apple (*Malus prunifolia* Wild. Borkh. "Red fruit") by ethanol extraction. *Korean J. Food & Nutr.*, **12**(1), 85~90.
- Kim, Y. H. (1999) The characterization of anthocyanin pigments prepared from Cherry(*Prunus serrulata* L. var. *spontanea* Max. Wils.) for the potential sources of red colorant. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **42**(2), 134~139.
- Kim, Y. H. and Lee, S. S. (1994) A study on pigments from *Rhodopila globiformis* by acetone extraction : stability of red pigments. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(1), 125~129.
- Landgraf F.T. and J. Hughes (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lettes.*, **508**, 459~462.
- Lee, L. S., Rhim, J. W., Kim, S. J. and Chung, B. C. (1996) Study on the stability of anthocyanin pigment extracted from purple sweet potato. *Korean J. Food Sci., Technol.*, **28**(2), 352~359.
- Price, C. L. and R. E. Wrolstad (1995) Anthocyanin pigments of royal okanogan huckleberry juice. *J. Food Sci.*, **60**(2), 369~374.
- Shim, K. H., Kang, K. S., Choi, J. S., Seo, K. I. and Moon, J. S. (1994) Isolation and stability of anthocyanin pigments in grape peels. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(2), 279~286.

- Shrikhande, A. J. and F. J. Francis (1973) Anthocyanin pigments of sour cherries. *J. Food Sci.*, **38**, 649~651.
- Shu-Hsing Wu and J. Clark Lagarias (1996) The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* synthesizes a functionally active chromophore precursor of the plant photoreceptor phytochrome. *PNAS.*, **93**, 8989~8994.
- Teale F. W. and R. E. Dale (1970) Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. *Biochem., J.* **116**, 161~169.
- Vernon T. Ol, Alexander N. Glazer and Lubert Stryer (1982) Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J. Cell Biol.*, **93**, 981~986.
- Wang, H., M. G. Nair, A. F. Iezzoni, G. M. Strasburg, A. M. Booren and J. I. Gray (1997) Quantification and characterization of anthocyanins in balaton tart cherries. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(7), 2556~2560.
- Yang, H. C., Lee, J. M. and Song, K. B. (1982) Anthocyanins in cultured Omija(*Schizandrae chinensis* Baillon) and its stability. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **25**(1), 35~43.
- Yoon, J. M., Cho, M. H., Hahn, T. R., Paik, Y. S. and Yoon, H. H. (1997) Physicochemical stability of anthocyanins from a korean pigmented rice variety as natural food colorants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(2), 211~217.
- US Patent No. 4859 : purification of phycobillin
- 김선재 (1992) 진도홍주 색소에 관한 연구, 전남대학교 석사논문
- 김수연, 김정구 (1997) 미생물이 생산하는 식용색소. -홍국색소를 중심으로-식품기술, **10**(2) 81-88.
- 김정구 (1990) 색소 생산능력이 높은 *Monascus anka* 돌연변이주의 개발 및 색소 생성 조건의 최적화, 서울대학교 석사논문
- 남궁석 (1976) 한국산 김 중의 색소단백질에 관한 연구, 중앙대학교 석사논문
- 박형신 (1992) 홍조식물 *Campylacphora crassa*와 유사종에 대한 R-Phycoerythrin 정제와 면역학적 유연관계, 충남대학교 석사논문
- 박효진 (1993) 해양미생물로부터의 적색색소 생산에 관한 연구, 부산수산대학교 석사논문

- 송재철, 조원대 (1997) 가공식품과 식용색소. 식품기술, **10**(2), 62~80.
- 신지윤 백성봉, 이규순 (1991) 식미에 미치는 색의 영향. *Korean J. Dietary culture*, **6**(1)
- 이강윤 외 2명 (1994) 착색료. 식품첨가물, 103~150.
- 이문주 (1998) Colloidal chitin을 자화하는 해양세균으로부터 적색색소의 생산, 부산 경성대학교 산업대학원 석사논문
- 이삼빈 (1998) 선인장 열매로부터 추출된 점질물 및 색소의 기능성. *Korean Sci. Nutr.*, **7**(5), 821~826.
- 정미숙, 이미순 (1998) 자근으로부터 분리한 Naphthoquinone류 색소의 당 및 산에 대한 안정성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(2), 319~323.
- 정형석, 박근형 (1998) 차자황색소로부터 변환된 색소의 특성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(2), 319~323.
- 채수규 : 투석(dialysis) 식품분석학, 671~673(1998)