

## 액침 진탕 배양에 의한 *Monascus* sp. 가 생산하는 적색 색소에 관한 연구

第2報 적색조색소의 생산과 물리적 성질 및 생리적 성질

金炫洙, 郭孝聖, 梁鎬錫, 卞裕亮\*, 柳洲鉉\*

(주) 종근당 미생물 실험실, \*연세대학교 식품공학과  
(1979년 2월 18일 수리)

## Studies on the Red Pigment Produced by *Monascus* sp. in Submerged Culture.

### Part II Production of Crude Pigment, Physical and Physiological Characteristics.

Hyun Su Kim, Hoy Sung Kwak, Ho Suk Yang, Yu Ryang Pyun\*, Ju Hyun Yu\*

Microbiological Lab. Chong Kun Dang Co., \*Department of Food Engineering Yonsei Univ.  
(Received Febo 18, 1979)

#### Abstract

Yellow pigment was extracted by petroleum ether, and red pigment by 60% ethanol. By thin layer chromatography red pigment preparation consists of more than five species whereas yellow pigment preparation consist of single species. The absorption curve of pigment solution exhibits maximum peak at wavelength range of 495~500 nm and endo pigment at 394~403 nm. Pigment solution was relatively stable at the pH range of 3~9. Extracted pigment solution gave negative hemolysis test and pigment showed no bio-activity and nontoxicity.

#### 서 론

西川<sup>(1)</sup>의 *Monascus purpureus* Went가 생산하는 홍국색소에 대한 결정(結晶)과 분자량 부여, Manchand<sup>(2)</sup> 등이 *Monascus Anka*로부터 새로운 홍국색소인 Ankafravin<sup>(3,4)</sup>, Fielding 등의 홍국색소에 대한 구조결정 연구로 현재 6종의 홍국색소 구조

가 밝혀져 있다.

전보에서 발표한바 있는 *Monascus* sp. (T-1 균주)의 색소 배양액으로부터 식품용에 적용하기 위하여 조색소분말의 생산, 물리적 성장과 생리적 성질의 기초적 자료를 얻었기에 보고하는 바이며 *Monascus* sp. (T-1 균주)가 생산하는 홍국색소의 구조적 결정은 더욱 연구할 과제이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 조색소의 생산

배양액에 60% ethanol을 가하여 실온에서 3~4시간 진탕시키고 Membrane filter (0.45  $\mu$ )로 여과시킨 뒤 여액에 무수 ethanol을 가하여 4°C에서 24시간 정지한 후 원심분리시켜서 변성 단백질과 침전된 당류 등을 제거시킨 뒤 petroleum ether를 가하여 진탕시킨 뒤 ethanol층에서 적색 조색소를, petroleum ether층에서 황색 조색소를 진공 건조시켜 조색소 분말을 얻었다.

### 2. Thin layer Chromatography

Thin layer용 chromatography는 gel plate (Merck: 60 F-254)를 이용하였으며 전기용매는<sup>(6)</sup> 神藏이 사용한 *n*-buthylalcohol: absolute alcohol: 1% ammonia (6:2:3) 용액을 사용하였다.

### 3. Gel filtration

Sephadex G-50 (Uppsala: Fine)을 column (3×20 cm)에 넣어 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형시킨 뒤 검체 band가 4 mm 되게 하여 3 ml씩 (0.5 ml/min.) 70 tube를 Fraction collector (Buchler Ins., Fractometre Alpha 200)로 분리하였다.<sup>(6,7)</sup>

### 4. pH 안정성

추출한 색소액의 pH를 N NaOH와 N HCl로써 pH를 1에서 11까지 조절하여 색조의 변화를 조사하였다.

### 5. 용혈반응시험

배양액을 세균여과기 (Toyo Roshi Co., : KG-47)에서 membrane filter (Sartorius membrane filter: Type SM 0.2  $\mu$ )로 여과하여 토끼의 탈섬유혈을 이용한<sup>(11)</sup> 용혈반응시험을 하였다.

### 6. 생물학적 역가시험

생산된 적색 조색소를<sup>(8,9)</sup> 항생물질시험법에 준하는 농도에서 7종의 병원성 균류에 대하여 항균력 유무를 시험하였다.

### 7. 안전성 시험

생산된 적색 조색소의<sup>(10)</sup> 급성독성을 시험하기

위하여 체중 18.0~20.0 g의 건강한 mouse를 이용하여 경맥주사로 1마리당 0.5 ml(조색소 1000 mcg/ml 기준)씩 8~12초동안 주사하고 경구로 1마리당 0.5 ml(조색소 50 mg/ml 기준) 투여한 다음 건강상태를 48시간 관찰하였다.

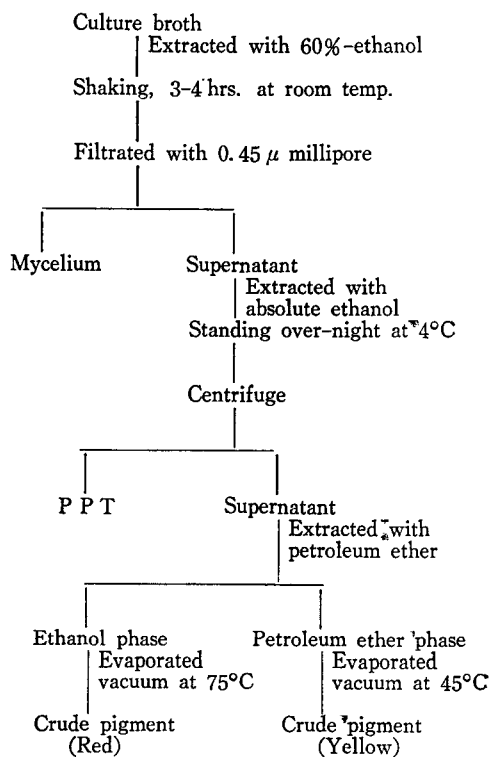


Fig. 1. Preparation of Crude Pigment.

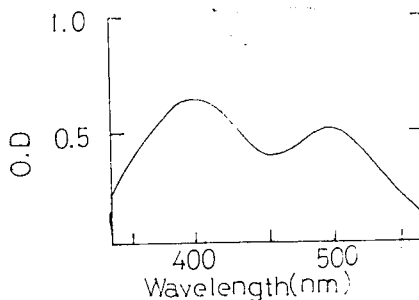
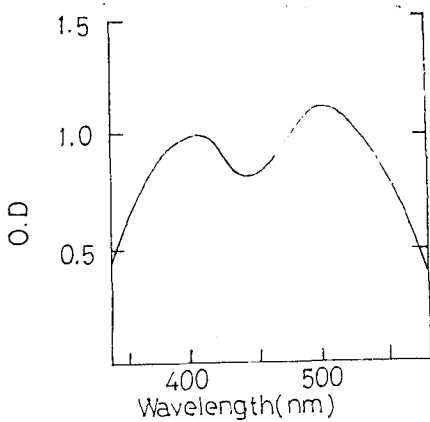


Fig. 2. Absorption Spectrum of extracted Pigment Solutions.



**Fig. 3.** Absorption spectrum of Extracted Endo-pigment in the mycelium.  
Mycelium was Destroyed by Sonicator at 10 HZ for 5 min.

### 실험결과 및 고찰

#### 1. 조색소의 생산

배양액으로부터 Fig. 1에서의 같은 공정으로 유기용매를 이용하여 추출한 다음 감압건조(Sibata: Type SPC)시켰다. 적색조색소는 배양액 100 ml로부터 약 400 mg, 황색조색소가 80 mg 정도 생산되었고 황색조색소의 경우 점성이 높았다.

#### 2. 흡광도 곡선

추출한 색소액을 600 nm에서 300 nm 사이의 O. D curve 를 측정할 결과 495~500 nm에서 흡수 극

대를 나타내었다. (Fig. 2) 그러나 균체내 색소의 O. D curve 는 broth 와 달리 394~403 nm에서 495~500 nm 보다 높은 peak를 나타낸 점으로 보아 균체내 색소물질의 조성비율은 다르다고 생각된다. (Fig. 3)

#### 3. Thin layer Chromatography

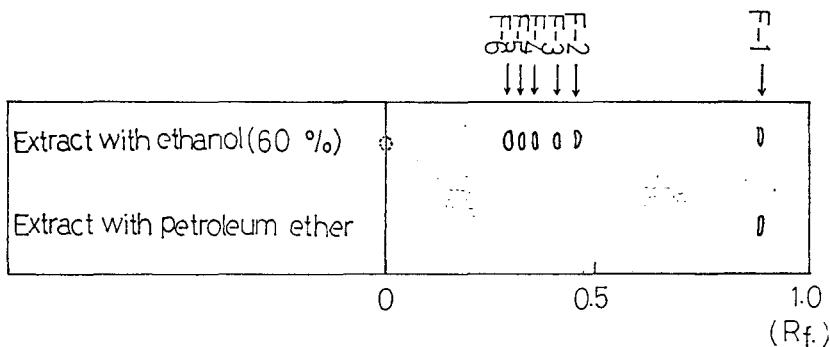
*n*-buthylalcohol: 무수 alcohol: 1%-ammonia(6 : 2 : 3)의 전개 용액에서 4시간(Room Temp) 전개시킨 결과 Fig. 4에서 보여주는 것과 같이 배양액에 60% ethanol만을 사용하여 추출한 색소액의 TLC fraction은 Rf치가 가장 높은 황색계(F-1)과 적색계(F-2부터 F-6까지)로 구분되었으며 배양액에 petroleum ether만을 사용하여 추출한 색소액과 60% ethanol로 추출한 뒤 다시 petroleum ether로 추출한 색소액은 Rf치가 같은 황색계의 F-1만 보여주었다.

결과 적색계 색소는 5가지 색소물질이 복합되어 있고 황색계색소는 비교적 단일물질로 존재한다고 생각된다.

#### 4. Gel filtration

추출한 색소액을<sup>(6,7)</sup> Gel filtration방법으로 Sephadex G-50을 이용하여 fraction시킨 결과 두개의 peak를 나타내었다. (Fig. 5)

Yoshimura<sup>(7)</sup> 등의 보고에서 첫번째 peak는 MW가 35000가량이며 두번째 peak는 MW가 5000으로 보고되었고 첫번째 peak는 적색계 색소로, 두번째 peak는 황색계 색소로 추정되어 되었다.



**Fig. 4.** Thin layer Chromatogram of Extracts.

Extract with 60%-ethanol or petroleum ether was developed on thin-layer plate with *n*-buthylalcohol-absolute alcohol-1%-amonia (6 : 2 : 3).

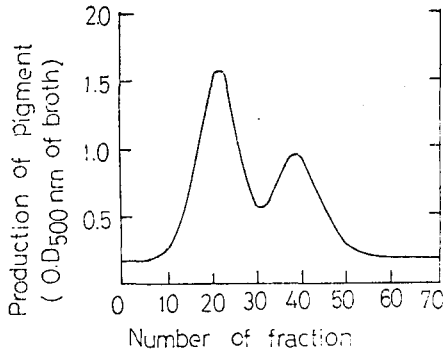


Fig. 5. Chromatogram of Pigment on Sephadex G-50.

Sephadex G-50 (Fine) was packed in a column (3 cm×20 cm) and equilibrated with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), and same buffer was used as effluent.

### 5. pH의 안정성

추출한 색소액의 pH에 의한 색조의 변화를 조사하기 위하여 N NaOH와 N HCl로서 pH 1부터 pH 11까지 변화시켜 실온에서 4시간 정치시킨 후 O. D값을 측정된 결과 pH 3에서 pH 9까지는 비교적 안정하였다.

색조의 변화는 pH 2에서 완전히 등황색으로 변화하였으며 pH 10에서부터는 주황색으로 변화하였다.

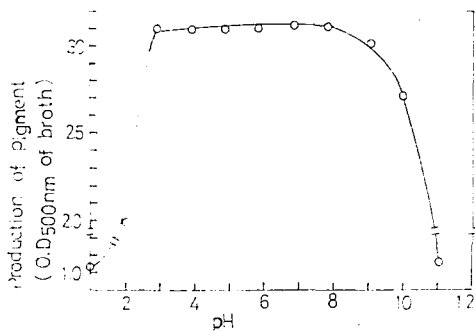


Fig. 6. Effect of pH on Stability of the Pigment.

### 6. 용혈반응시험 (Hemolysis test)

생산된 색소액의 용혈반응을 조사하기 위하여<sup>(11)</sup> 용혈반응시험법에 따라 색소액을 희석배율 5배, 10배, 50배 되게 하여 표준액과 대조하여 37°C에서 24시간 반응시킨 결과 용혈반응은 없었다. (Table1)

Table 1. Hemolysis Test of Pigment Broth *in vitro*.

Dilution of pigment broth	Reaction of hemolysis	Result
× 5	—	Negative
×10	—	Negative
×50	—	Negative
Standard sol'n	—	Negative

### 7. 생물학적 역가시험 (Bio-activity test)

7종의 병원성 균주를 (Table 2) 사용하여 적색조색소의 항균력 유무를<sup>(8)</sup> Microbiological agar diffusion assay방법에 따라 표준곡선법에서 규정하는 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration)의 항생물질 농도와 생산된 적색조색소의 농도를 표준중간농도계열이 가장 높은 Chloramphenicol 농도 기준으로 m/당 50 mcg로 일정하게 하여 동일 조건에서 억제환을 측정하였다.

적색조색소의 단위기준은 1 mg당 1000 mcg 역가로 정하였고 감수성 판정은 억제환이 대조항생물질 최소농도보다 클 때 +, 적을 때 -로 표시하였으며 시험결과 항균력은 거의 없는 것으로 나타났다. (Table 3)

Table 2. List of Test Organisms for Bio-activity Test.

Test organism-A	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC* 6538p)
Test organism-C	<i>Sarcina lutea</i>	(ATCC 9341)
Test organism-D	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
Test organism-F	<i>Bordella bronchiseptica</i>	(ATCC 4617)
Test organism-G	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>	(ATCC 11778)
Test organism-H	<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
Test organism-W	<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	(NCTC** 10490)

\* American Type Culture Collection. U. S. A.

\*\* National Collection of Type Culture. England.

### 8. 안전성 시험 (Safety test)

체중 18~20 g의 건강한 mouse를 이용하여 적색

**Table 3.** Bio-activity Test of crude Pigment by Microbiological agar diffusion method.

Ant.	Final concentration		Diameter of inhibition zone		Test Org.	Sensitivity
	Ant. (mcg/ml)	Red pig. (mcg/ml)	Ant. (mm)	Red pig. (mm)		
Ampicillin	0.064	50	16.5	8.7	C	—
Carbenicillin	12.8	50	16.2	8.8	W	—
Cephaloridine	0.64	50	16.7	8.6	H	—
Chloramphenicol	32.0	50	17.0	10.1	C	—
Erythromycin	0.64	50	16.3	8.9	C	—
Gentamicin	0.064	50	15.2	10.2	D	—
Kanamycin	0.64	50	15.9	10.5	A	—
Neomycin	0.64	50	14.0	10.6	A	—
Penicillin G-K	0.64(u)	50	18.5	10.0	A	—
Polymyxin	6.4 (u)	50	13.8	8.6	F	—
Refampin	32.0	50	17.1	9.0	H	—
Streptomycin	0.64	50	17.3	8.6	H	—
Tetracycline	0.64	50	17.3	8.8	G	—
Distilled water			8.4-8.8			—
Potassium phosphate buffer			8.6-8.8			—

Ant. : Antibiotics                      Org. : Organisms  
 Red pig. : Red pigment              u : unit

**Table 4.** Safety Test of Crude Pigment, *in vivo.*

	Mouse No.	Body weight (g)	Dose (ml)		General condition Subsequent			Result
			I. V. Oral.	1000 mcg/ml 50 mg/ml	to the inj.	24 hrs	48 hrs	
Intravenous injection	1	19.1		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	2	18.6		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	3	18.8		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	4	18.4		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	5	19.0		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
Oral administration	1	18.9		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	2	18.1		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	3	18.4		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	4	18.6		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic
	5	18.4		0.5	Normal	Normal	Normal	Non-toxic

I. V. : Intravenous injection  
 Inj. : injection

조색소의 급성독성을<sup>(10)</sup> 시험하였다.

정맥주사로 1마리당 0.5 ml (1000 mcg/ml)씩 8~12초동안 주사하고 경구로 1마리당 0.5 ml (50 mg/ml)씩 투여한 다음 건강상태를 48시간 관찰한 결과 General condition은 먼두 정상으로 독성이 없

는 것으로 생각된다.

투여량의 기준은<sup>(9,10)</sup> 항생물질기준에서 투여량이 비교적 많은 Chloramphenicol succinate, Chloramphenicol palmitate 등의 량과 비슷하게 조작하였고 적색조색소의 기준은 1000 mcg/mg으로 하였

다. (Table 4)

## 요 약

배양된 색소액으로부터 조색소의 생산, 물리적 성질, 생리적 성질을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 유기용매를 이용하여 Petroleum ether에서 황색계 조색소, 60% ethanol에서 적색계 조색소를 얻었으며 배양액 100 ml당 적색조색소 400 mg, 황색조색소가 80 mg 정도 생산되었다.

2) 배양된 색소액의 흡광도곡선은 495~500 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고 균사체를 파괴하여 추출한 균체내 색소의 최대 흡광도는 394~403 nm이었다.

3) Thin layer Chromatography에 의한 적색계 색소는 5가지 색소물질로 구성되어 있었고 황색계 색소는 1가지였으며 pH 안정성은 pH 3에서 pH 9까지 비교적 안정하였다.

4) 추출한 색소액의 용혈반응시험은 음성이었고 적색조색소의 항균력시험은 감수성이 없었으며 급성 시험의 결과에서는 독성이 없었다.

## 참고문헌

- 1) 西川英次郎 : 日本農藝化學會誌, 2, 688 (1932).
- 2) Manchand, P. S., and Whalley, W. B. : Pytochemistry, 12, 2531, Pergamon Press (1973).
- 3) Fielding, B. C., et al. : *The Chemistry of Fungi*, Part XXXIX, 4579 (1961).
- 4) Fielding, B. C., et al. : *Tetrahedron Letter* 5, 24 (1960).
- 5) 神藏美枝子 : 食品工業, 18, 34 (1975).
- 6) 柳洲鉉, 梁漢喆, 鄭東孝, 梁隆 : 食品工學實驗, 探求堂, p. 577 (1975).
- 7) Yoshimura, M., and Yamanaka, S., et al. : *Agr. Biol. Chem.*, 39, 1793 (1975).
- 8) U. S. Gov. printing office; *Code of Federal Regulation Part 300 to 499*, p.210 (1976).
- 9) 藥業時報社 : 日本抗生物質醫藥品基準解析 (1974).
- 10) U. S. Gov. printing office: *Code of Federal Regulation Part 300 to 499*, p. 206 (1976).
- 11) 日本公定書協會 : 日本藥局方解説, p. B-258 (1976).