

## Monascus sp. 가 생산하는 황색 색소에 관한 연구

### 第 1 報 황색 색소 생산의 배양 조건

장 욱, 김현수, 손충홍, 배종찬, \*유주현  
계일제당(주) 식품연구소, \*연세대학교 식품공학부  
(1980년 6월 28일 수리)

## Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2

### Part I. cultural conditions for yellow pigment produceduction.

Uk Chang, Hyun Sn Kim, Choog hong Son, Jong Chan Bae, \*Ju Hyun Yu

Foods, R&D Center Cheil Sugar Co., \*Department of Food Engineering Yonsei Univ.

(Received, June 28 1980)

#### Abstract

Culture conditions of yellow pigment in *Monascus* sp. were studied. According to the studies of culture conditions optimum condition was found to be pH 4.5, 3 days of incubation with 3% of sucrose as carbon source, 0.2% of yeast extract as nitrogen source and 75ml of medium in the 500ml erlenmyer flask by rotary shaking (rpm 180) at 180 r. p. m.

Effective levels of inorganic compounds were found to be 0.25% of potassium phosphate monobasic and 0.1% of Magnesium sulfate.

#### 서 론

*Monascus* 속이 생산하는 紅麴色素는 크게 나누어 적색계, 황색계 및 자색계의 3종 색소로 구분되고 이들 색소는 현재 monascin, ankaflavin, rubropunctatin, monascorubrin, rubropunctamine 및 monascorubramine의 6종으로 명명되어 있으며 그 구조가 밝혀져 있다.<sup>1)</sup>

*Monascus* 속을 이용한 색소 생산은 주로 적색 색소로 제품화되어 있으며 이들 제품중에는 상기 종류의 색소가 혼합되어 있다.<sup>2)</sup>

황색계 색소에 대한 연구는 1926년 西川<sup>3,4)</sup>이 액체 배양액으로 부터 monascoflavin (monascin 과 동일명)이란 결정성 색소를 분리하였고 또 다른 황색계 색소인 ankaflavin 과 함께 (Fig. 1) 실험적으로 많이 연구되었다.<sup>5,6,7)</sup>

*Monascus* 속균을 이용한 액체배양에서 Carels<sup>8)</sup> 등과 堀井<sup>9)</sup> 등은 배지의 조성분과 pH의 조절 등으로 적색계와 황색계의 생성량이 달라지고 있음을 보고하였다.

본 연구자 등은 *Monascus* sp. CS-2균을 이용한 홍곡 색소 생산 시험중 배양 조건에 따라 황색 색소 생성량이 현저히 달라지고 있는 것을 발견하고 황색 색소의 다량 생산을 위하여 배양조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 실험재료 및 방법

##### 1. 균주의 분리

누룩으로 부터 미홍색 균사를 가진 사상균을 일정량씩 떼어 saline TS액<sup>10)</sup>에 현탁시킨 후 현탁액 1적씩을 CZapek-Dox liquid medium<sup>11)</sup>에 점적한

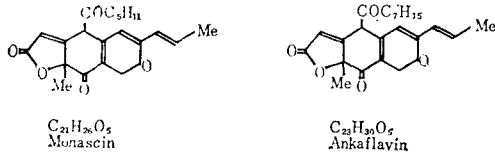


Fig. 1. Structures of monascin and ankaflavin.

후 30°C에서 1차 배양하고 CZapek-Dox Agar<sup>12)</sup> 평판배양기에 3회 이상 분리한 다음 선별된 균주를 CZapek-Dox broth에 각각 28~30°C 7일간 배양하여 황색 색소의 흡수 녹대치인 400mm (spectrophotometer)에서 O.D가 가장 큰 CS-2균을 선정하였다.

### 2. 균주의 동정

분리 선정된 CS-2균을 slide culture 법<sup>13)</sup>으로 배양하여 飯塚<sup>14)</sup>, 蘇<sup>15)</sup>의 분류방법에 따라 형태적 특징을 관찰한 결과 *Monascus* sp.임을 알 수 있었다 (Table. 1).

### 3. 배지 조성 및 배양 조건

CZapek-Dox 액체 배지를 기초 배지로 하여 주

Table. 1. Morphological properties of CS-2 strain

	<i>Monascus</i> sp.*	CS-2
Hyphae	+(pink and red)	+(red)
Septa	+	+
Ascospore	+(2~8 $\mu$ ×3~5 $\mu$ )	+(4~5 $\mu$ ×3~5 $\mu$ )
perithecium	+(21~40 $\mu$ )	+(22~40 $\mu$ )
Conidiospore	+	+
Oidia	-	-
Foot cell	-	-
Rhizoid	-	-
Stolon	-	-
Zygospor	-	-
Sporangiospor	-	-
Sexual propagation	+	+
Asexual propagation	+	+

\*The typical *Monascus* sp.

탄소원으로 가용성 전분을 사용하였으며 필요에 따라 배지조성을 변화시켜 30~32°C에서 3~6일간 배양시켜 생산조건을 검토하였다.

### 4. 색소의 추출 및 측정

배양액에 60%-ethanol을 1:1 되게 가하여 실온에서 4시간 진탕시켜 membrane filter로 여과 (Millipore: FH 0.45 $\mu$ )시킨 후 여액과 petroleum ether를 1:2 되게 하여 용출시킨 다음 황색 색소 흡수 녹대치인 400mm에서 O.D를 측정 (Hitachi: spectrophotometer 200~20)하여 색소량을 환산하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 1. pH에 의한 영향

배지의 초기 pH를 0.1N hydrochloric acid 혹은 Sodium hydroxide로 3.0에서 8.0까지 변화시켜 배양한 결과 pH 4.5 부근에서 가장 높은 색소 생성량을 보여 주었다 (Fig. 2).

### 2. 탄소원에 의한 영향

탄소원의 종류를 달리하여 색소 생성량의 영향을 본 결과 (Fig. 3)에서 보는 바와 같이 sucrose, glucose, soluble starch 등에서 다른 탄소원들보다

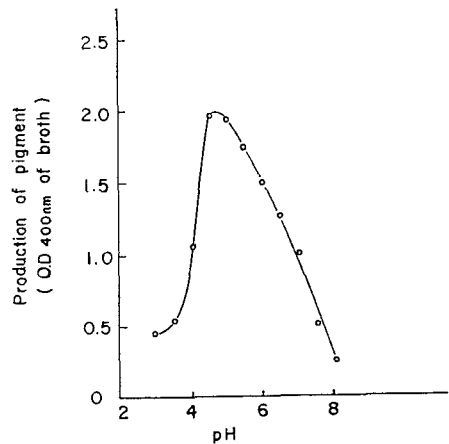


Fig. 2. Effect of pH on the yellow pigment production. Cultivation was carried out on a rotary Shaker (180 rpm) at 32°C for 3-4 days.

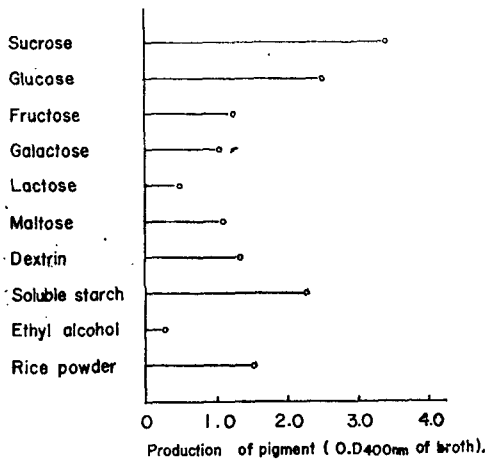


Fig. 3. Effect of carbohydrates on the yellow pigment production.

Each column indicates the effect of 2.5% of the indicated carbohydrate which was added to the pigment producing medium.

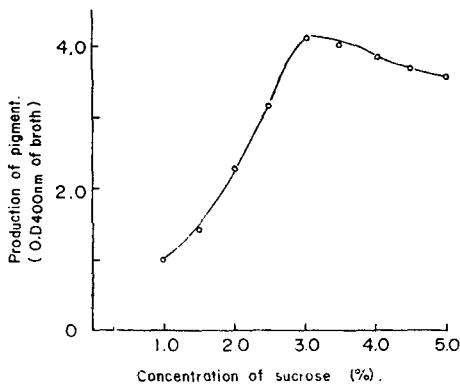


Fig. 4. Effect of the sucrose concentration on the yellow pigment production.

비교적 높은 색소 생성량을 보여 주었으며 특히 이당류인 sucrose가 가장 높은 색소 생성량을 나타내었다. 그러므로 단당류나 다당류보다 이당류인 sucrose 등이 황색 색소 생성을 촉진하는 것으로 사려된다.

Sucrose의 최적농도를 검토한 결과는 (Fig. 4)

Table 2. Effect of nitrogen sources on the yellow pigment.

Nitrogen sources	Production of yellow pigment (O. D 400nm of broth)
Peptone	2.135
Yeast extract	2.790
NaNO <sub>3</sub>	1.024
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.931
KNO <sub>3</sub>	1.253
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.876

Each column indicates the effect of 0.3% of the each described nitrogen sources which were added to the pigment producing medium; pH was adjusted to 4.5.

에서 보는 바와 같이 sucrose의 농도를 1.0%에서 5.0%까지 조절하여 배양한 결과 3.0%에서 가장 색소 생성량이 높았고 3.0% 이하의 농도에서는 색소 생성량이 현저히 떨어지는 경향을 보여 주었으며 3.5% 이상의 농도에서는 생성량이 비교적 큰 차는 안보이나 약간 떨어지는 경향을 나타내었다.

### 3. 질소원에 의한 영향

질소원을 제외한 색소 생산용 액체 배지에 여러 종류의 질소원을 0.3% 첨가시켜 배양하였다.

Table. 2에서 나타난 바와 같이 peptone, yeast extract 등이 비교적 색소 생성량이 양호한 것으로 나타났으며 특히 yeast ext.가 가장 높은 색소 생성량을 보여주었다. 그러므로 유기태 질소원이 무기태 질소원보다 황색 색소 생성량을 높이는 것으로 생각된다.

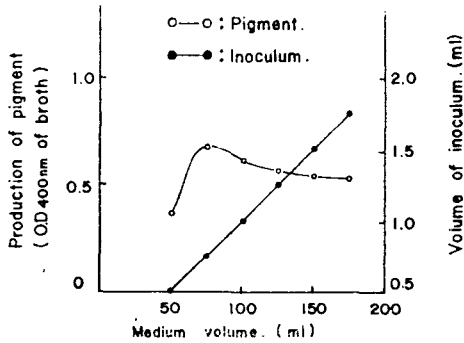
柳<sup>16)</sup>등은 *Aspergillus*의 황색 색소 생산 배지 중 질소원으로 polypeptone과 yeast extract를 사용하는 경우 양호하다는 결과가 보고되어 있다. 아울러 yeast extract의 최적 농도를 검토한 결과 0.2% 첨가가 가장 색소 생성이 좋았다. (Table 3)

### 4. 통기 효과에 의한 영향

진탕용 500ml Erlenmyer Flask에 medium volume을 50ml부터 175ml까지 단계별로 넣고 일정한 투과도의 inoculum을 균일하게 희석하여 배지 50ml당 0.5ml씩 비례적으로 접종하여 배양한 결과 75ml의 배지 용량 이상에서는 비교적 좋은 색소 생성을 보여 주었으며 특히 배지 용량 75ml에서 가장 효과가 좋았다. 결과로 배양중 특별히 유리 산

**Table 3. Effect of the concentration of yeast extract on the yellow pigment production.**

Concentration of yeast extract w/v	Production of yellow pigment (O. D 400nm of broth)
0.05	0.243
0.10	0.497
0.15	3.135
0.20	3.310
0.25	3.184
0.30	3.130



**Fig. 5. Effect of aeration on the yellow pigment.**

Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 32°C for 3-4 days, in pigment producing medium. Varying the volume of medium contained in a 500ml shaking flask.

소가 없어도 색소생성에는 큰 영향을 미치지 않았다. (Fig. 5)

**5. 무기 염류에 의한 영향**

무기 염류를 종류별로 농도를 0.05% 첨가시켜 배양한 결과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  및  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 가장 높은 색소 생성을 나타내었다. (Table. 4)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 농도는 0.25%,  $\text{Mg}_4\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도는 0.1% 첨가가 양호하였다. (Table 5, 6)

**6. 배양 기간에 의한 영향**

이상에서 검토된 조건에 따라서 6일간 배양하

**Table 4. Effect of inorganic compounds on the yellow pigment production.**

Inorganic compounds.	Production of yellow pigment. (O. D 400nm of broth)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.311
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.587
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.987
$\text{MnO}_2$	0.653
$\text{NaCl}$	1.103
$\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.065
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.131
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.210
None	0.430

Each column indicates the effect of 0.05% of the indicated inorganic compounds which were added to the pigment producing medium.

**Table 5. Effect of the concentration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  on the yellow pigment production.**

Concentration of $\text{KH}_2\text{PO}_4$ w/v.	Production of yellow pigment. (O. D 400nm of broth)
0.05	2.037
0.10	2.515
0.15	3.105
0.20	3.850
0.25	4.712
0.30	4.011
0.35	3.953
0.40	3.125

**Table 6. Effect of the concentration of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  on the yellow pigment production.**

Concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . w/v	Production of yellow pigment. (O. D 400nm of broth)
0.01	1.537
0.05	2.150
0.10	3.210
0.15	3.100
0.20	2.875
0.25	2.016

여 정서적으로 검토한 결과 3일간 배양된 것이 가장 색소 생성율이 좋았고 3일 이후 부터는 현저히 생성율이 떨어지는 경향을 보였으며 색소의 성상이 적갈색 내지는 적자색으로 변화하였다.

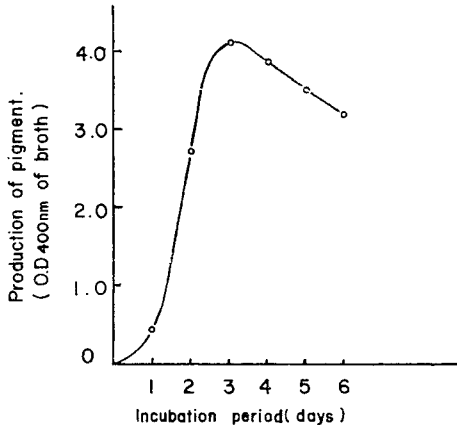


Fig. 6. Time course of the yellow pigment production.

Cultivation on a rotary shaker (180 rpm) at 32°C for 1-6 days on the medium containing 3 % of sucrose, 0.2% of yeast extract, 0.25% of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1% of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH was adjusted to 4.5; 5ml of medium per 500ml shaking flask.

(Fig. 6)

### 요 약

누룩으로부터 사상균을 분리하여 우수한 색소 생산균주를 선별하였고 이를 형태학적으로 분지 동정하였다. 배양조건으로 pH, 탄소원, 질소원, 무기염류, 통기효과 및 배양기간 등이 황색 색소 생산에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선별된 색소 생산 균주를 형태학적으로 군사에 격벽과 군사체 끝에 피자기를 가지고 자낭포자와 분생포자를 형성하며 후막포자가 있는 *Monascus* 속으로 동정되었다.

2. 색소생산의 최적 pH는 4.5 부근이었으며 질소원으로 yeast extract 0.2%, 탄소원으로 sucrose 3% 첨가가 양호하였다. 무기염류에 대한 영향으로  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25% 및  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1% 첨가가 좋았으며 통기효과는 75/500ml (v/v) 배양기간은 3일이 적합하였다.

### 參 考 文 獻

- 1) 尾上旦, 片山誠: 食品工學, **20**, 52 (1977).
- 2) Daiwa Dyestuff MFG. Co.: *Natural food colors*. (1975).
- 3) 西川英次郎: 日本農藏化學會誌, **2**, 688(1926).
- 4) 西川英次郎: 日本農藏化學會誌, **8**, 1007 (1932).
- 5) Fielding, B. C.: *Tetrahedron Letters* **5**, 24 (1960).
- 6) Fielding, B. C.: *The chemistry of Fungi Part XXXIX*, 4579 (1961).
- 7) Manchand, P. S.: *Pytochemistry* **12**, 2531 (1973).
- 8) Carels and Shepherd: *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1361 (1977).
- 9) 堀井外: 日本 特許公報 特開昭 50~140526.
- 10) Mack printing Co.: *The united States pharmacopeia*, **XIX**, p.67 (1975).
- 11) Oxoid Limited: *The Oxoid manual. 3rd edition*, p.104 (1976).
- 12) Oxoid Limited: *The Oxoid manual. 3rd edition*, p.102 (1976).
- 13) Booth, C.: *Methods in Microbiology* (Booth, C., ed.), IU, Academic press, New York, p.66 (1971).
- 14) 飯塚廣: 微生物 Hand book, p. 665~669(1967).
- 15) 蘇遠志: 醱協誌, **33**, (1), 28 (1976).
- 16) 有馬啓, 柳洲鉉, 田村學造: 日本農藏化學會誌 **42**, 571 (1967).