

Monascus SP. 가 생산하는 황색색소에 관한 연구

제 2 보 황색 색소의 분리 및 정제

김현수, 장 욱, 이희인, 배종찬, *유주현
제일제당(주)식품연구소, *연세대학교 식품공학과
(1980년 6월 28일 수리)

Studies on the Yellow Pigment Produced by Monascus SP. CS-2

Part II Isolation and Preparation of Yellow Pigment.

Hyun Su Kim, Uk Chang, Hee In Yi, Jong Chan Bae, Ju Hyun Yu*

Foods Research and Development Center, Cheil Sugar Co.,
*Department of Food Engineering Yonsei Univ. Seoul, Korea

(Received June 28, 1980)

Abstract

Yellow pigments were extracted with mixture of 60% ethanol and petroleum ether (1:2) by method of partition chromatography in petroleum ether phase.

The absorption curve of yellow pigments solution exhibits maximum peak at wave length range of 394-403nm.

By thin layer chromatography yellow pigments preparation were found to consists of monascin(yellow), monascidin A (pale yellow) and one unknown (orange-yellow) compound.

Isolated fat soluble yellow pigments were changed to water soluble by N-KOH (adjust pH 9). The resulted product obtained were yellow pigments of K-salt complex.

서 론

황색색소를 생산하는 미생물은 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*^{1,2)} 등 여러 종류가 있으며 紅麴菌인 *Monascus* 속에 대하여는 1890년대 후반부터 연구되어 왔다³⁾.

현재까지 구조가 밝혀진 6종의 紅麴色素 중 황색계 색소는 monascin 과 ankaflavin 의 두 종류가 있으며 1926년 西川^{4,5)}이 액체 배양액에서 결정성 색소를 분리하여 monascoflavin(monascin 과 동일명)으로 명명하였고 1960~1961년에 Fielding 등^{6,7)}

에 의하여 monascin 과 ankaflavin 의 구조가 밝혀졌으며 1973년 Manchand 등⁸⁾에 의하여 이들 황색색소의 분리 및 구조가 연구된 바 있다.

Monascus 속의 배양액으로부터 색소추출 방법은 주로 적색색소를 목적으로 ethanol 또는 methanol로 추출하였고^{9,10,11,12)} petroleum ether 등으로 추출한 방법¹³⁾과 배양액에 각각 petroleum ether 나 ethyl acetate¹⁴⁾ 또는 ethanol, propylene glycol, acetic acid 및 물 등으로 추출한 방법¹⁵⁾과 전보¹⁶⁾에서와 같이 ethanol, petroleum ether 를 각각 사용한 방법 등이 있다.

본 연구자 등은 배양액을 건조하여 ethanol, petroleum ether 의 복합 유기용매를 동시에 사용하여 적색제와 황색제 색소를 분리하고 특히 황색제 색소만을 petroleum ether 층으로 분리하여 보다 많은 황색색소를 얻었으며 추출된 脂溶性 황색색소를 식용색소로 적용키 위해 K염 복합 형태의 水溶性물질로 정제 하였기에 이에 대한 연구결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 배양액

Monascus sp. CS-2 균주를 이용한 전보 황색색소 배양조건에 따라 배양된 broth 를 사용하였다.

2. 색소의 추출과 측정

배양액을 75°C 에서 진공건조하여 60%-ethanol 과 석유에테르 (1:2) 복합 유기용매로 실온에서 4 시간 진탕시킨 다음 ether phase 에 용출시키고 황색색소의 흡수 극대치인 400nm 에서 O.D 를 측정 (Hitachi: Spectrophotometer 200-20) 하여 색소량을 환산 하였다.

3. Thin layer chromatography

Gel plate (Merck: HPTLC 60F-254) 를 이용하였으며 전개용매는 n-butylalcohol: absolute alcohol: 1%-ammonia (6:2:3)¹⁷⁾ 과 benzene: methanol: chloroform (30:10:9)¹⁴⁾ 를 사용하였으며 추출한 색소의 spotting 량은 각 20 μ l 이었다.

4. High pressure liquid chromatography

Waters Model 440 을 이용하였으며 column 은 μ Bondapak C₁₈ (4mm \times 30cm), solvent 로 methanol, detector 는 UV405nm 와 UV546nm 를 사용하였다.

5. 황색색소의 정제

petroleum ether 층에 용출된 황색색소를 여과 (Millipore: FH 0.45 μ) 하여 N-KOH 로써 검화시키고 (pH 9 로 조절) 45°C 에서 진공 건조시켜 K염 복합황색색소를 정제 하였다.

실험결과 및 고찰

1. 흡광도 곡선

배양액을 건조하여 60%-ethanol 단용으로 추출한 색소는 전보¹³⁾에서와 같이 500nm 부근에서 적색제, 400nm 부근에서 황색제의 최대 흡광도를 보여 주었다.

Monascus SP. CS-2 균을 이용하여 황색색소 생산이 유리한 배양조건으로 배양할 경우 적색제인 500nm 부근에서 보다 황색제인 400nm 부근에서 보

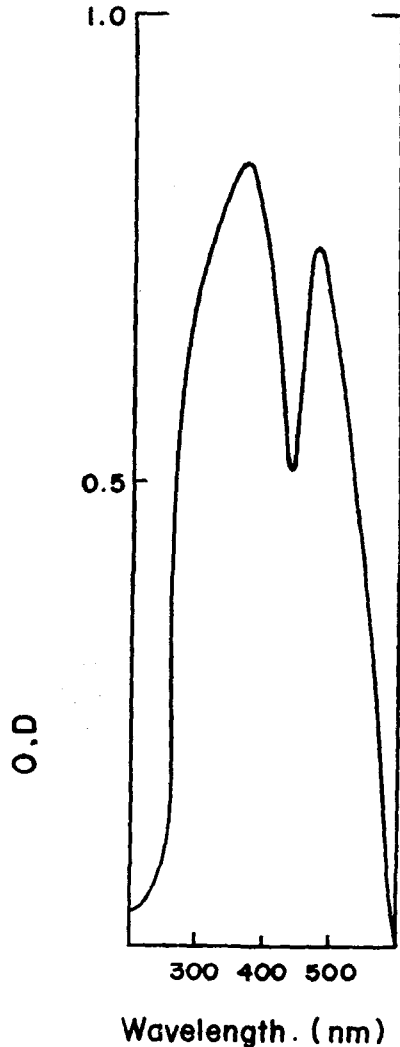


Fig. 1. Absorption spectra of extracted pigment solutions.

다 큰 흡광도 곡선을 보여 주었다 (Fig. 1).

60%-ethanol 과 petroleum ether (1:2) 복합유기용매를 이용하여 partition chromatography 상 ethanol phase (이하 ethanol 층) 에 황색색소, petroleum ether phase (이하 petroleum ether 층) 에 황색색소를 각각 용출하여 흡광도 곡선을 조사해 본 결과 petroleum ether 층의 황색제 색소는 400nm 부근에서 (Fig. 2), ethanol 층의 색소는

2. Thin layer chromatography

n-butyl alcohol: absolute alcohol: 1%-ammonia (6:2:3) 의 전개용매를 사용했을 경우 60%-ethanol 단용으로 추출시킨 색소액은 6 fraction 중 적색제 R₁~R₅ 의 5 가지와 Y₁ 의 황색제 1 가지, Partition chromatography 상 petroleum ether 층은 Y₁ 의 황색제 1 가지만, ethanol 층은 적색제 R₁~R₅ 와 황색제 Y₁ 을 소량 보여 주었다 (Fig. 4).

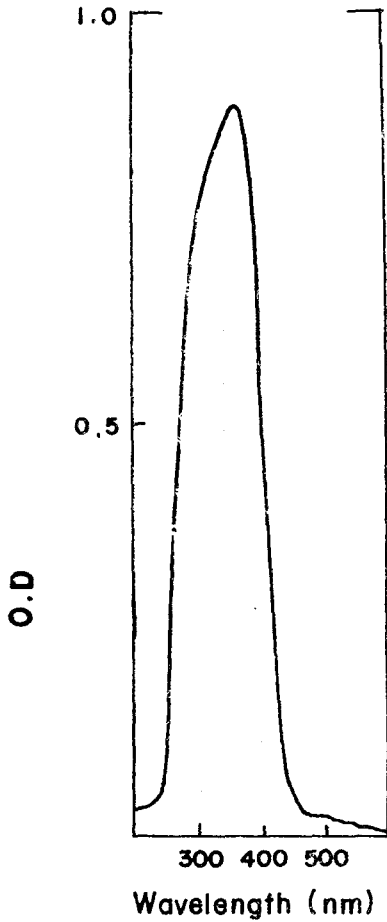


Fig. 2. Absorption spectra of yellow pigments in petroleum ether.

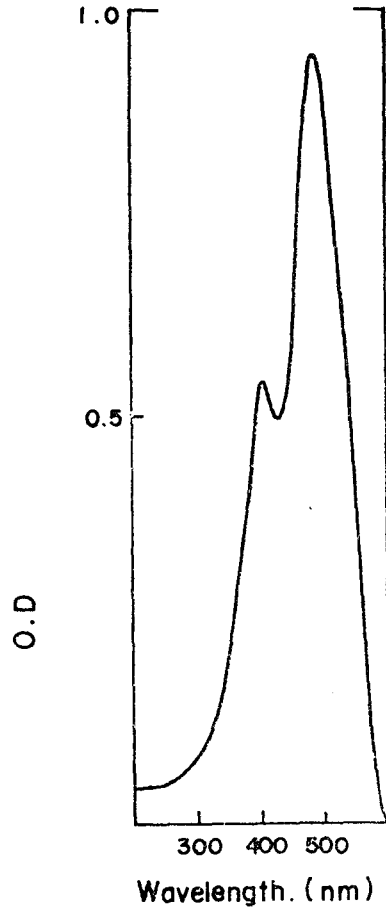


Fig. 3. Absorption spectra of red pigments in 60%-ethanol.

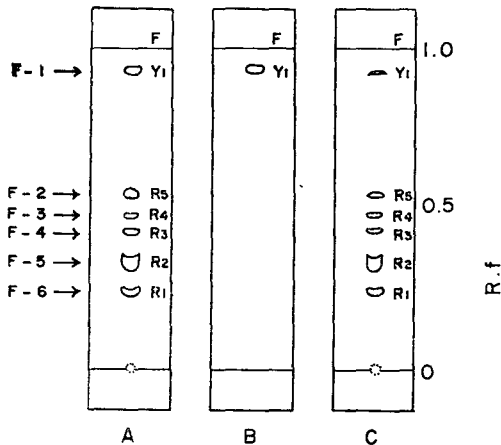


Fig. 4. Thin layer chromatogram of extracts of *Monascus* sp. CS-2 strain developed with *n*-butylalcohol absolute alcohol-

1%-ammonia (6:2:3).

A: Extracted by 60%-ethanol; B: Extracted by petroleum ether (petroleum ether phase); C: Extracted by 60%-ethanol (ethanol phase); R₁, R₂, R₃, R₄ and R₅: Red pigments; Y₁: Yellow pigment; F: Solvent front.

benzene:methanol:chloroform (30:10:9)의 전개 용액을 사용했을 경우 Petroleum ether 층의 황색 색소는 (F-1, F-2, F-3) 3가지로 구분되었고 ethanol 층의 적색계 색소는 spotting 량 20 μ l에서는 전개가 어려웠고 F-1의 황색색소만 미량 보여 주었다(Fig. 5).

같은 전개 용매에서 Wong 씨 등¹⁴⁾은 *Monascus* 속의 황색색소를 Rf 치가 가장 높고 량적으로 많은

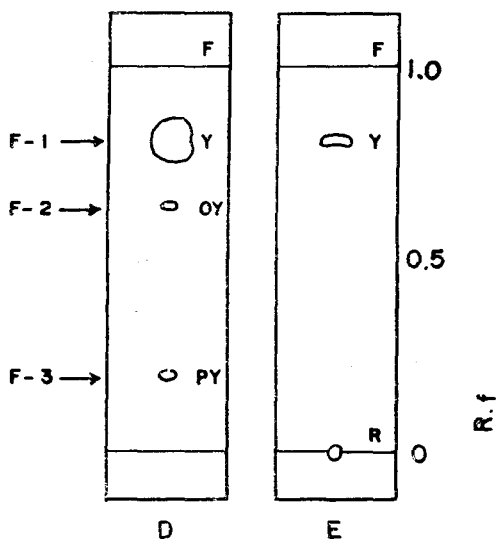


Fig. 5. Thin layer chromatogram of extracts of *Monascus* sp. CS-2 strain developed with benzene-methanol-chloroform (30:10:9).

D: Extracted by petroleum ether; E: Extracted by [60%-ethanol (ethanol phase)]; Y: Yellow pigment; OY: Orange-yellow [pigment]; PY: Pale yellow pigment; R: Red pigment; F: Solvent front.

Table 1. R. f values of yellow pigments of *Monascus* sp. CS-2 by thin layer chromatography.

Fraction No.	Compound	Color	R. f	
			benzene-methanol-chloroform (30:10:9)	
F-1 (Y)	Monascin	Yellow	0.79	0.80*
F-2 (OR)	Unknown	Orange-yellow	0.65	0.76*
F-3 (PY)	Monascidin A	Pale-yellow	0.18	0.14*

*The values of pigments by Hin-CHUNG WONG and YUN-SHEN BAU.

F-1을 monascin, Rf 치가 가장 낮은 F-3를 monascidin A 라고 하였으며 F-2의 오렌지 색은 미지의 물질로 아직 균명되어 있지 않다.

Monascus SP. CS-2가 생산한 황색색소는 Table 1에서와 같이 Rf 치로 비교할 때 monascin, monascidin A 및 unknown 물질의 오렌지 색으로 되어 있음을 알 수 있다.

3. High pressure liquid chromatography

황색색소의 분리 확인과 색소를 측정하기 위한 자료를 얻기 위하여 petroleum ether층의 황색 색소와 ethanol층의 적색계 색소 및 60%-ethanol 단용으로부터 추출한 색소를 Table 2와 같은 조건으로 Chromatogram을 조사하였다 (Fig. 6).

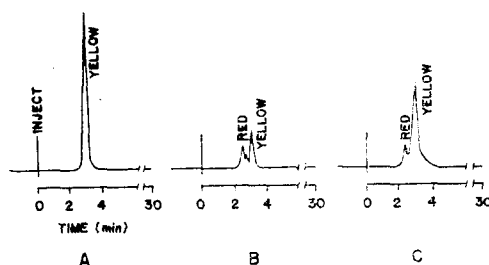
Table 2. Conditions of High pressure liquid chromatography.

Model	Waters	440
column	μ Bondapak	C ₁₈ (4mm×30cm)
Solvent	Methanol	
Sample	5 μ l	
Flow rate	1.5ml/min	
Detector	UV 405 and UV 546nm	

detector: UV 405nm를 사용했을 경우는 petroleum ether층의 황색색소만 동정되고 (A) detector 546nm에서는 전혀 동정되지 않았다(D). ethanol층의 색소는 detector 405nm에서 적색 및 황색이 모두 동정되었고(B) detector 546nm에서는 적색계 색소만(E) 동정되었으며 특히 미량의 황색색소도 detector 405nm에서는 상기조건에서 검출이 용이한 것을 알 수 있다.

60%-ethanol 단용으로 추출한 색소의 경우(C, F)

DETECTOR: UV 405 nm



DETECTOR: UV 546 nm

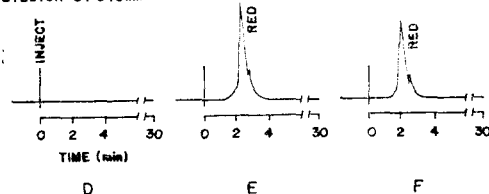


Fig. 6. Liquid chromatogram of extracts of *Monascus* sp. CS-2 strain.

A, D: Extracted by petroleum ether; B, C: Extracted by 60%-ethanol (ethanol phase); C, F: Extracted by 60%-ethanol.

도 B, E와 같은 상을 나타내었다.

결과 상기와 같은 조건에서 황색색소의 분리를 확인할 수 있었고 petroleum ether 층에 분리된 황색색소는 적색이 혼입되어 있지 않음을 알 수 있다.

4. 황색 색소의 정제

Fig. 7에서와 같은 공정으로 배양액을 건조하여 ethanol 층과 petroleum 층으로 적색 및 황색 색소를 추출, 유도하여 황색색소만을 N-KOH 용액으로 적가하면서 pH 9 부근으로 맞추고 진공건조하여 수용성인 K염 복합 황색색소를 정제 하였다.

N-KOH로 검화 시킬 때 pH 6 이하에서는 물과 친화되지 않고 유리되었으며 색조도 떨어졌다.

pH 7에서부터 물과 친화성이 높아지고 pH9~pH 10에서 최고의 색조 및 물과 친화성이 높은 분말 형태로 정제할 수 있었다.

정제한 황색색소는 배양액으로 환산하여 1당 2.4~3.0g을 획득 할수 있었다.

5. 정제 황색색소의 흡광도 곡선

정제 황색색소를 수용액으로 하여 흡광도를 측정 한 결과 400nm 부근 (394~403nm)에서 최대 흡광도를 나타내었으므로 적색계 색소혼입이 없는 황색계 색소만이 분리 정제 되었음을 알 수 있었다 (Fig. 8).

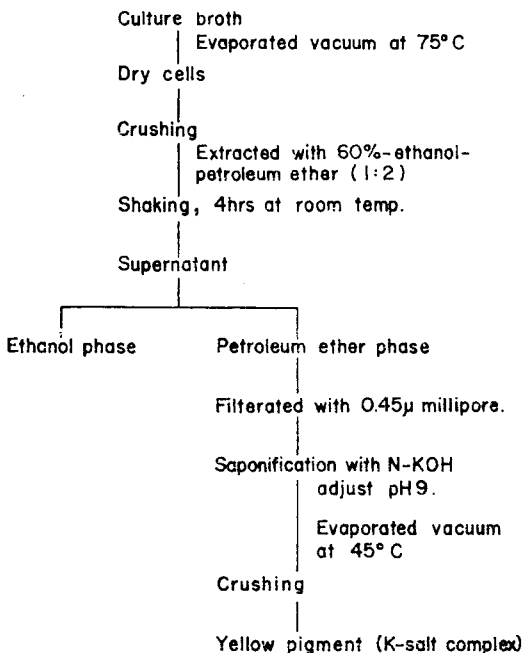
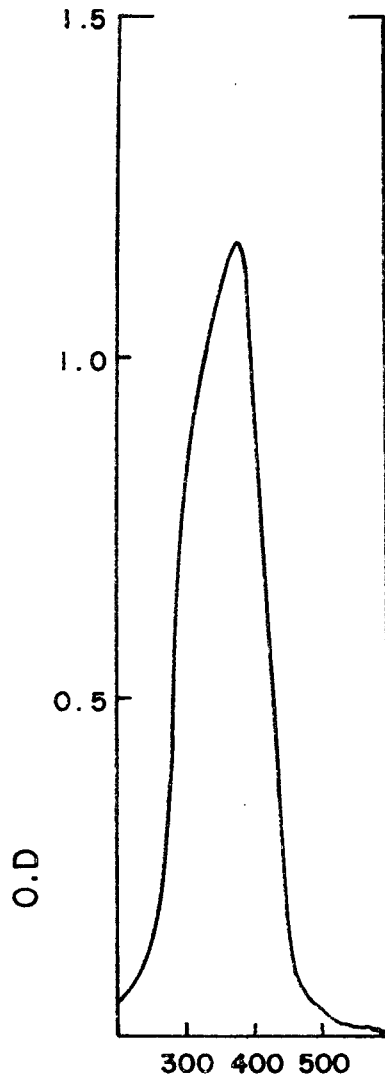


Fig. 7. Preparation of yellow pigment (K-salt complex).



Wavelength. (nm)

Fig. 8. Absorption spectra of yellow pigment (K-salt complex).

요 약

홍국균의 배양액으로부터 황색 색소를 분리하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 60%-ethanol-petroleum ether (1:2)의 혼합유기용매로부터 partition chromatography 방법으로 색소를 추출하여 petroleum ether 층에서 황색 색소를 얻었다.
2. 추출한 황색 색소의 최대 흡광도는 394-403nm이었으며 적색계색소는 함유되어 있지 않았다.
3. Thin layer chromatography에 의한 황색계 색소는 황색의 Monascin이 대부분이었고 주황색의 unknown 물질 및 pale yellow의 Monascidin A가 소량 함유되어 있었다.
4. 분리한 지용성의 황색 색소를 N-KOH로 검화시켜 수용성인 K염 복합 황색색소로 정제

하였다.

參 考 文 獻

- 1) 有馬啓, 柳洲鉉, 田村學造: 日本農藝化學會誌 **42**, 571 (1967).
- 2) Ju Hyun Yu, Gakuzo Tamura, Nobutaka Takahashi and Kei Arima: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 831 (1967).
- 3) 尾上旦, 片山誠: 食品工學, **20**, 52 (1977).
- 4) 西川英次郎: 日本農藝化學會誌 **2**, 688(1926).
- 5) 西川英次郎: 日本農藝化學會誌 **8**, 1007(1932).
- 6) Fielding, B. C.: *Tetrahedron Letters* **5**, 24 (1960).
- 7) Fielding, B. C.: *The Chemistry of Fungi Part XXXIX*, 4579 (1961).
- 8) Manchand, P. S.: *Pytochemistry* **12**, 2531 (1973).
- 9) Tadao Hiroi: 榮養と食糧 **31**, 149 (1978).
- 10) Ching FWu Lin: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 407 (1973).
- 11) Carels and Shepherd: *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1361 (1977).
- 12) Minoru Yoshimura: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1789 (1975).
- 13) 金炫洙外: 産業微生物學會誌 **7**, 23 (1979).
- 14) Hin Chung Wong and Yun Shen Bau: *Plant Physiol* **60**, 578 (1977).
- 15) 金昌湜, 李淑熙, 金 一: 韓國食品科學會誌 **9**, 277 (1977).
- 16) 金炫洙外: 産業微生物學會誌 **7**, 31 (1979).
- 17) 神藏美枚子: 食品工業 **18**, 34 (1975).