

## Monascus sp. CS-2 가 生産하는 黄色色素에 關한 研究

(第 3 報) 黄色色素의 安全性 試驗

金炫洙, 張 旭, 孫忠弘, 裒鍾燾, \*柳洲鉉

第一製糖(株) 食品研究所

\*延世大學校 食品工學科

(1981년 6월 1일 수리)

## Studies on the Yellow Pigment Produced by *Monascus* sp. CS-2

(Part 3) Safety Test of Yellow Pigment

Hyun Su Kim, Uk Chang, Choong Hong Son, Jong Chan Bae and Ju Hyun Yu\*

Foods Research and Development Center, Cheil Sugar Co.,

\*Department of Food Engineering, Yonsei Univ., Seoul, Korea

(Received June 1, 1981)

### Abstract

Safety of yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2 was evaluated. Acute oral toxicity, pyrogen test, and histamine test, as well as antimicrobial activity were determined. The results obtained were; LD oral in mice was 132.5 mg/20 g, pyrogen test in rabbit was 5 mg/kg, and histamine test in cat was 10 mg/kg. Also the pigment was particularly sensitive to *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 P), whereas not sensitive to *Pseudomonas pyosyanea* (ACTC 10490), *Bacillus var. mycoides* (ATCC 11778), *Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

### 緒 論

紅麴菌은 古代로부터 酒類, 紅乳腐 기타 음식물 着色에 이용되어 왔으며 홍국균을 배양하여 홍국 색소를 생산하게 되었고 이에 대한 安全性시험으로 經口투여 및 腹腔투여에 의한 LD<sub>50</sub>, 亞急性 및 慢性毒性시험이 연구되었다<sup>(1)</sup>.

紅麴 및 紅麴色素에 대한 毒性시험은 金 등<sup>(2)</sup>이 mouse 를 이용한 經口투여 시험과 金 등<sup>(3)</sup>의 溶血反應, 抗菌作用시험 및 mouse 를 이용한 急性毒性 시험결과 安全性이 좋은 것으로 보고되었고 Wong

등<sup>(4)</sup>은 홍국균 變異株로부터 분리한 색소가 *Bacillus subtilis* sp. 에 감수성을 나타낸 것으로 보고한 바 있다.

홍국균을 배양하여 홍국색소 중에서 黄色色素만을 따로 분리하여<sup>(5,6)</sup> mouse, rabbit 및 cat 를 이용한 安全性 시험과 몇가지 pathogens 를 이용한 실험적 결과를 얻었다.

### 實驗材料 및 方法

#### 1. 實驗材料

##### 1) 使用色素

전보<sup>(5,6)</sup>에서 배양 및 분리 정제한 黄色色素를 사용하였다.

2) 使用器械

Mouse의 경구투여는 cannula(3/4 inch)로 사용하였고 pyrogen 시험은 Ellab a-s Type Te 3-S (Denmark) 온도계를 사용하여 측정하였다.

Histamine 측정에는 Patipps and Bird社(U.S.A)의 Kymography 장치를 사용하였다.

2. 實驗方法

1) LD<sub>50</sub> 시험

체중 20 g의 ICR系 mouse를 사용하여 Behrens-Kaerbar 방법<sup>(7)</sup>에 따라 평균 치사량으로 계산하였다.

2) Pyrogen 시험

Pyrogen 시험법<sup>(8,9)</sup>에 따라 체중 1.8kg 이상의 영양상태가 좋은 Newzealand産 white rabbit를 사용하여 발열성 실험을 하였다.

3) Histamine 시험

Histamine 시험법<sup>(10,11)</sup>에 따라 체중 2.3Kg의 고양이(Female)를 사용하여 혈압 강하작용 실험을 하였다.

4) 감수성 시험

Microbial Agar Difusion 시험방법<sup>(12)</sup>에 따라 황색색소가 ml 당 500mcg의 농도일 때 표준균주에 미치는 영향을 증류수 및 인산염완충액과 대조하여 실험하였다.

實驗結果 및 考察

1. LD<sub>50</sub> 시험에 의한 安定性

Mouse의 수를 10개群으로 나누고 1群당 10마리씩 나누어 최저 50mg부터 25mg 간격으로 최대

Table 1. Toxicity Test of Oral LD<sub>50</sub> in Mice

Mouse No.	Amount of Sample(mg)	Mortality ratio	Died	Survived
1	50	0/10	0	10
2	75	2/10	2	8
3	100	3/10	3	7
4	125	5/10	5	5
5	150	7/10	7	3
6	175	6/10	6	4
7	200	9/10	9	1
8	225	10/10	10	0
9	none	0/10	0	10

Oral LD<sub>50</sub> in mice: 132.5mg per 20g (Behrens-Kaerbar method).

투여량 225mg까지 경구투여한 다음 72시간 관찰한 결과는 Table 1과 같다.

$$LD_{50} = 225 - \{(1 \times 25) + (2.5 \times 25) + (4 \times 25) + (6 \times 25) + (6.5 \times 25) + (7.5 \times 25) + (9.5 \times 25)\} \times 1/10 = 132.5 \text{ (mg)}$$

위 결과로부터 실험동물(체중 약 20g 당) 50% 치사량은 132.5mg으로 몸무게의 0.6625%에 해당되는 많은 양이며 ppm 단위로 사용하는 색소의 用 量面으로 볼 때 安全性이 높다고 볼 수 있다.

2. 발열성 물질시험

토끼를 사용하여 黄色色素중에 함유된 발열성 물질을 검출하기 위하여 색소를 실험동물(rabbit)에 직접 주사하여 외래성 발열성 물질로 작용하여 나타내는 발열한도치를 抗生物質 기준치에 비교하여 사용 가능한 양을 실험하였다(Table 2).

실험결과 kg 당 5mg을 정맥주사 투여시에 마리당 최고 상승온도는 0.48°C(기준치 : 0.6°C 이상인 것이 2마리 이상일 때 양성)로 적합하였고 3마리 토끼의 발열 한도는 -0.10°C와 +1.14°C(기준치 : 1.4°C 이상일 때 양성)로 적합하였다.

그러나 kg 당 10mg을 정맥주사 투여시에 2마리가 1.18°C와 0.73°C로 0.6°C 이상이었고 3마리의 온도상승이 2.49°C로 양성 반응을 나타내었으므로 이 색소의 적정 사용량은 발열성물질로 볼 때 kg 당 5mg 이하가 적합하다고 보며, 경구투여량은 주사투여량의 수십배가(일반적으로) 사용되는 것으로 보아 安全性이 좋은 것으로 볼 수 있다.

3. 혈압강하 물질 시험

검체중의 histamine 및 histamine과 유사한 물질이 있는지 알기 위하여 histamine 표준품으로 histaminedihydrochloride(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>; Merck 제)를 사용하여 standard curve를 작성하였고 고양이의 마취는 phenobarbital(Merck 제)을 kg 당 225mg 복강내에 투여하여 마취시킨뒤 해부하여 대퇴정맥과 경동맥을 노출하여 각각 cannula로 연결시키고 Kymography 장치로서 상법에 따라 실험한 결과는 Fig. 1과 같다.

표준품의 농도는 kg 당 0.05, 0.10 및 0.15mcg로 조제하여 표준곡선을 만들었고 黄色色素의 농도는 kg 당 0.625, 1.250, 2.50, 50 및 10.0mg으로 주사한 결과 표준품의 제한 농도인 kg 당 0.10mg peak까지 접근하는 양은 kg 당 10.0mg으로 실제 이 색소의 사용은 histamine 물질시험결과로 볼 때 kg 당 10.0mg 이하로 사용됨이 요구되었다.

4. 감수성 시험

Table 2. Pyrogen Test of Yellow Pigment in Rabbit.

Rabbit No.	Body weight (kg)	Box No.	Time 5	Normal temperature control (°C)											Maximum temperature change (°C)			
				10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	-	+		
A	2.30	1	38.63	.65	.78	.78	.90	.85	.80	.90	.80	.83	.90	.83	.90	39.00	0	0.37
	2.80	2	39.28	.23	.10	.13	.10	.08	.13	.03	.03	.00	38.93	.80	38.93	.80	0.48	0
	2.50	3	39.18	.50	.00	.03	.00	38.80	39.00	38.90	.98	.90	.80	.80	.80	.80	0.38	0
B	2.20	4	39.43	.23	.03	.20	.23	.15	.25	.30	.20	.20	.23	.20	.23	.20	0	0.28
	2.20	5	38.70	.68	.63	.60	.60	.60	.58	.50	.35	.38	.30	.30	.30	.30	0	0.40
	2.40	6	39.35	38.95	39.03	.30	.10	38.90	.90	.60	.60	.68	.45	.40	.40	.40	0.95	0

Rabbit No.	Normal temperature (°C)	Dose *(I.V)	Time 15	Time temperature control (°C)											Maximum temperature change		Result
				30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	-	+	
A	39.00		38.90	38.83	.98	39.00	.15	.20	.23	.23	.20	.13	.10	.08	0.10	0.23	--0.10
	38.80	5mg/kg	38.90	39.08	38.90	39.10	.15	.23	.18	.18	.15	.18	.18	.08	0	0.43	+1.14
	38.80		39.00	.00	.90	39.03	.00	.00	.05	.05	.10	.23	.28	.18	0	0.48	Negative
B	39.20		39.40	.13	.50	.90	40.10	.35	.38	.03	39.75	.58	.33	.18	0.07	1.18	--0.09
	38.30	10mg/kg	38.30	.40	.40	.50	.50	.55	.58	.70	.78	.85	.88	39.03	0	0.73	+2.49
	38.40		38.38	.50	.40	.45	.60	.55	.73	.75	.73	.85	.98	.95	0.02	0.58	Positive

\* I.V: Intravenous injection.

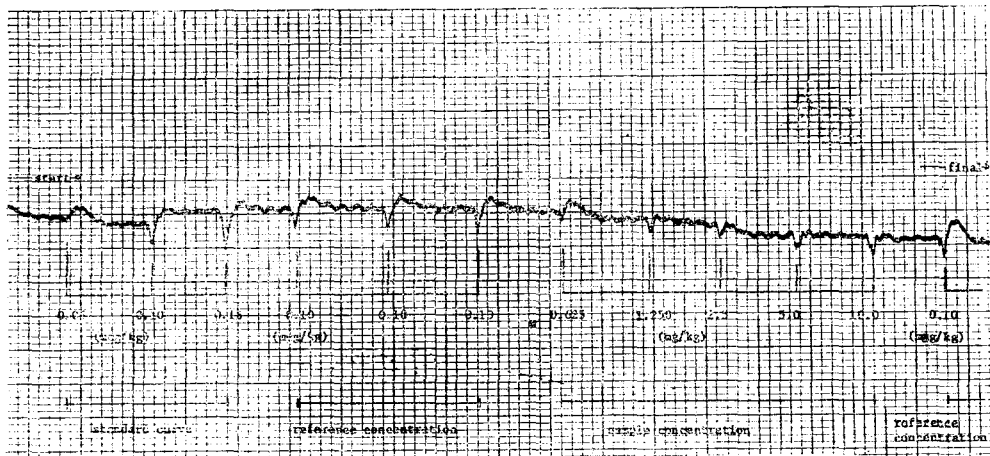


Fig. 1. Histamine Test of Yellow Pigment by Kymography Method.

Table 3. Bioactivity Test of Yellow Pigment by Microbiological Agar Diffusion Method.

Concentration of pigment(mcg/ml)	Diameter of inhibition zone (mm)	Test organism **(ATCC No.)	Sensitivity
500	9.1	<i>S. aureus</i> (6538-P)	+
500	9.6	<i>S. lutea</i> (9341)	+
500	8.6	<i>S. epidermidis</i> (12228)	-
500	8.9	<i>B. bronchiseptica</i> (4617)	-
500	8.4	<i>B. cereus</i> var. <i>mycooides</i> (11778)	-
500	10.2	<i>B. subtilis</i> (6633)	+
500	8.8	<i>P. pyocyanea</i> *** (NCTC 10490)	-
Distilled water	8.4 0.2		-
*1 %-PPB	8.4 0.2		-

\* 1 %-potassium phosphate buffer (pH 6.0)

\*\* American type culture collection U.S.A.

\*\*\* National collection of type culture England.

- : not sensitive

+ : partially sensitive

7종의 병원성 균주를 이용하여 황색색소의 항균력을 조사하였다.

전보<sup>(3)</sup>에서 적색색소의 항균력은 ml 당 50mcg으로 사용했을 때 억제환이 13종 항생제의 최소발육 저지농도(MIC)이하로 항균력이 인정되지 않았으며 황색색소의 경우 적색색소의 10배인 ml 당 500mcg 농도로 사용했을 때 억제환의  $\phi$ mm는 Table 3과 같다.

위 결과 인산염 완충액 및 증류수의 대조용 억제환이  $\phi$  8.4~8.6mm였고 황색색소의 억제환은 대조용 억제환과 비슷한  $\phi$  8.4~8.9mm로 감수성이 거의 없었다.

그리고 억제환이  $\phi$  9.1~10.2mm인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P), *Sarcina lutea* ATCC 9341) 및 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)의 경우 미량의 감수성을 가지고 있으나 색소의 농도나 항생제의 최소발육 저지농도가 나타내는 억제환으로 볼 때 항균력은 거의 없다고 볼 수 있다.

## 要 約

분리 정제한 黄色色素의 안전성을 검토하기 위하여 *in vivo* 및 *in vitro* 시험을 한 결과는 다음과 같다,

1. Mouse를 이용한 안전성 시험은 經口 투여시  $LD_{50}$ 은 체중 20g 당 0.13245g이었다.

2. 본 色素를 이용한 발열성물질 시험결과 발열 한도량은 體內투여시 kg 당 5mg이었다.

3. 본 色素를 이용한 histamine 물질 시험은 혈압강하물질 표준품으로 비교할 때 시험동물 kg 당 10mg 까지 安定하였다.

4. 본 色素의 병원성균에 대한 감수성 시험결과 500mcg/ml 농도에서 *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 8341) 및 *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538-P)에 대하여 미량의 저해 작용을 나타내었다.

### 參考文獻

- 1) 尾上旦, 片山城: 食品工業, 20, 52 (1977).
- 2) 金昌滉, 李淑熙, 金一: 韓國食品科學會誌, 9, 77 (1977)
- 3) 金炫洙, 郭孝聖, 梁鎬錫, 卞裕亮, 柳洲鉉, 産業微生物學會誌, 7, 31 (1979).
- 4) Hin Chung Wong and Yun Shen Bau: Plant Physiol., 60, 578 (1977).
- 5) 張旭, 金炫洙, 孫忠弘, 裴鍾橫, 柳洲鉉: 産業微生物學會誌, 8, 119 (1980).
- 6) 金炫洙, 張旭, 李熙寅, 裴鍾橫, 柳洲鉉: 産業微生物學會誌, 8, 167 (1980).
- 7) 약사연구소: 약물학실험, P. 21. (1969).
- 8) U. S. Gov. printing office: Code of Federal Regulation Part 300 to 499. P. 239 (1979).
- 9) 보건사회부 약정국: 항생물질 의약품기준, 보건사회부 고시 제120호. P. 740 (1978).
- 10) U. S. Gov. printing office; Code of Federal Regulation Part 300 to 499. P. 242 (1979).
- 11) 보건사회부 약정국: 항생물질 의약품기준, 보건사회부 고시 제120호. P. 764 (1978)
- 12) U. S. Gov. printing office; Code of Federal Regulation Part 300 to 499. P. 244 (1979).