

Monascus anka의 균주선발 및 색소생성 조건

김수언 · 김정구

서울대학교 농과대학 농화학과

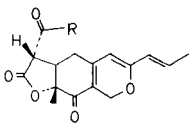
초록: 유기 용매에 추출되는 유리형의 홍국 색소를 보다 많이 얻기 위하여 *Monascus anka*의 균주를 자연 및 자외선 변이균주에서 선발하고 배양 조건을 탐색하였다. 균주 N3를 Lin's medium에서 진탕 배양, Nishikawa's medium에서 정치 배양 및 진탕 배양하여 균체 성장과 색소생성에 소요되는 시간, 유기용매에 추출되는 색소의 양을 비교하여 보았다. Lin's medium에서의 액체 배양에서는 수용성 색소가 우세하게 생성되는 반면 Nishikawa's medium에서의 정치 배양에서는 보다 많은 유기용매 가용성의 색소를 얻을 수 있었다. 한편 탄소원으로는 자당외에 에탄올이 가장 효과적이었다. Sterol 합성저해제를 처리하였을 때는 상당한 색소 형성의 증가를 볼 수 있었다. 이차원 TLC로써 아직 보고된 바 없는 색소들이 존재함을 알 수 있었다. 이 균주의 색소중 가장 다량으로 존재하는 황색소의 하나를 분리하였고 분광학적 방법으로 ankaflavin으로 동정하였다(1990년 9월 7일 접수, 1990년 9월 20일 수리).

홍국균(*Monascus spp.*)이 생산하는 색소(*Monascus pigments*)는 한국, 대만, 동남 아시아, Morocco 등지에서 오랫동안 홍주, 홍두부의 착색에 사용되어 왔는데¹⁻³⁾ 그 색소로는 황색소 monascin(1) 및 ankaflavin(2), 홍색소 rubropunctatin(3), monascorubrin(4), 그리고 적색소 rubropunctamine(5) 및 monascorubramine(6)이 알려져 있다⁴⁾. 홍국 색소는 근래에 동물 실험에서 매우 안전함이 확인되었으며^{5, 6)} 진탕 배양에서 얻어지는 결합형, 수용성의 색소가 일본에서 상품화되어 일본 및 국내에서 어육 등의 가공 식품의 착색제로 상당량이 사용되고 있다³⁾. 아울러 遠藤에 의하여 cholesterol 합성저해제 monacholin(7)이 발견

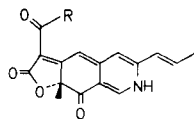
되기도 하였다³⁾.

홍국균이 생성하는 색소들은 일반적으로 quinone methide 또는 γ -pyrone methide로 취급되는데, 이들 색소의 연구는 1890년대부터 비롯되었다. 1932년에 이르러 Nishikawa는 *M. purpureus* Went.를 자신이 고안한 액체 배지에서 대량 배양하고 그 균체를 Et₂O로 추출하여 적색의 침상 또는 프리즘상 결정을 얻어 그것을 monascorubrin이라고 명명하였다⁷⁾. 1950년대 이후 앞서 언급된 색소들의 구조가 해명되었으며 3, 4의 에테르 결합의 산소가 암모니아나 amine에 의하여 비효소적으로 질소원자로 치환될 수 있음이 밝혀지고⁸⁾, Hadfield등 및 Birch등에 의하여 이들 색소들이 polyketide경로에 의하여 생합성됨이 밝혀졌다^{9, 10)}.

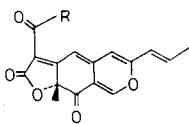
식품 산업적 색소의 생산에서는 수용성 거대분자에 결합된 수용성인 색소의 형성이 식품 첨가의 목적상 바람직하나, 이들 색소의 생합성 연구에는 방사성 또는 안정 동위원소의 feeding을 고려한다면 화학적으로 단리되어 분광학적 또는 화학적 연구에 이용될 수 있는 유리형 유기용매 가용성 색소의 형성이 더욱 유용하다. 이 연구에서는 생합성 연구에 이용될 수 있는 선발에 의한 균주의 개량과 함께 구조가 비교적 간단한 선구체인 EtOH을 feed하여 유리형의 색소를 얻는 적절한 조건을 생합성 실험의 기초 자료로 검색



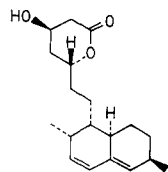
1 Monascin (R = n-C₅H₁₁)
2 Ankaflavin (R = n-C₇H₁₅)



5 Rubropunctamine (R = n-C₅H₁₁)
6 Monascorubramine (R = n-C₇H₁₅)



3 Rubropunctatin (R = n-C₅H₁₁)
4 Monascorubrin (R = n-C₇H₁₅)



7 Monacholin L

Key words : *Monascus anka*, yellow pigment, ankaflavin
Corresponding author : S.U. Kim

하였으며 색소 분리의 적절한 방법을 찾아 보았고 황 색소의 하나인 ankaflavin을 분리 확인하였으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 유지

제일제당 식품연구소의 김현수 박사로부터 분양받은 *Monascus anka*(KFCC 11832, IFO 4478)를 사용하였다. 균주들은 malt extract agar 상에서 30°C로 유지하였으며 30일마다 계대배양하였다. 색소생성의 실험을 위하여는 medium C⁽¹¹⁾에 배양하여 분생자를 얻은 후 50% glycerol현탁액으로서 -20°C에 보관하였다가 필요시마다 적정량을 취하여 사용하였다. 실험에는 선발균주인 N3 strain을 사용하였다.

시 약

시판의 EP 및 GR급 시약을 사용하였다. 색소 분리에 사용한 유기용매는 재증류후 사용하였으며 특히 Et₂O 및 1,4-dioxane은 sodium-benzophenone ketyl법으로 정제하여 사용하였다. Scintillation cocktail은 Beckman사의 PPO 4.0g과 DMPOPOP 0.1g을 toluene 1,000ml에 녹여 사용하였다. Chlorocholine chloride(CCC), (±)-miconazole nitrate, precoated TLC plate(Silica gel coated polyester, 250µm)는 Sigma제품을 사용하였다.

배 지

분생자를 얻는데에는 medium C⁽¹¹⁾를, 균 집락의 색소생성을 육안으로 비교하는데에는 medium P⁽¹²⁾를, 대량배양 및 색소생성능의 정량적 비교에는 Lin's medium⁽¹²⁾ 및 Nishikawa's medium⁽⁷⁾을 사용하였다. 탄소원 비교 실험시는 서당을 배제한 Nishikawa's medium을 준비하고 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0g의 탄소원(acetamide, acetic acid, sodium acetate, hexanoic acid, octanoic acid, methyl hexanoate, ethanol)을 배지 10ml에 가한 후 균을 접종하여 배양하였다. 이 때 배지에 잘 용해되지 않는 hexanoic acid, octanoic acid, methyl hexanoate는 0.3ml의 dimethylsulfoxide와 함께 가하여 배지에 잘 섞이도록 하였다. 이들 탄소원은 살균없이 가하였으며, 배지에 포함된 As₂O₃에 의하여 오염은 방지되었다.

배 양

Malt extract agar 및 medium C는 시험관에 사면으로 사용하였으며, 접종 후 30°C, 암조건으로 항온기에서 배양하였다. Medium P는 petri dish에 평판으로 사용하였다. 배양 조건은 앞의 두 배지와 같았다. Lin's medium의 경우는 500ml Erlenmeyer flask에 100ml를 가하고 분생자 20만개를 접종한 후 30°C에서 150rpm으로 진탕배양하였다. Nishikawa's medium은 9cm petri dish에 배지 10ml를 가한 후 Lin's medium에서 2일간 배양된 배양액을 접종하여 30°C, 암소에서 정지 배양하였다.

균주의 선발

분생자 현탁액을 200/ml의 농도로 희석하여 0.25ml씩을 Nishikawa's medium에 접종하고 10일간 배양하여 적색이 진하고 백색 균사를 생성하지 않는 균개를 선별하여 자연 선발을 하였고, 자연 선발에 의하여 선발된 균주에서 분생자를 얻어 15W의 자외선 살균등으로써 40cm거리에서 미리 사별 곡선을 얻어 95~98%사멸 시간인 1분간 자외선(Sylvania G15T8)을 조사한 후 medium P에 이를 도말한 다음 육안으로 색소생성이 우수한 집락을 분리하고 이들을 Lin's medium, Nishikawa's medium에서 배양하여 균체성장 및 색소생성을 비교하였다.

색소의 분리

21일간 배양한 균체는 동결 건조 후 분쇄한 다음 Soxhlet 연속 추출장치에서 Et₂O로써 6시간 동안 연속 추출하였다. 소량의 경우(5g 이하)는 100ml 삼각플라스크에 분쇄된 균체를 넣고 50ml의 Et₂O를 가한 후 밀봉하여 48시간 동안 방치하여 추출하였다. 추출물을 농축 후 -20°C에서 메탄올에 불용성인 백색의 물질을 제거한 다음, 추출물 양의 2배의 celite에 흡착시킨 후 200g의 Kiesel gel 60을 충전한 내경 10cm의 관에 색소의 celite 흡착물을 가하여 충전하고 n-hexane에 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 67, 75% 디옥산을 첨가하여 250ml 씩을 용리하여 진공 액체 크로마토그래피(vacuum liquid chromatography; VLC)^(13, 14)를 수행하였다. 얻어진 분획들을 TLC로써 검색하고 황색소 분획은 다시 celite에 흡착시킨 후 42g의 Kiesel gel이 충전된 내경 4.5cm의 관에 충전하고 0.5%의 빙초산을 함유한 n-hexane에 대하여 0, 1, 2%의 디옥산을 첨가하여 보다 완만한 극성구배로 용리하였다. 2회의 VLC를 거쳐 정제된 황색소는 n-hexane-dioxane-acetic acid 20 : 10 : 1 (HDA 용매계)로 전개, 분취 박

층 크로마토그래피로써 분리하였다.

분 석

균체 중량의 측정 : 균체를 여과지(Whatman No.2) 상에서 압착하고 동결건조한 후 중량을 측정하였다.

색소의 정량 : 진탕 배양된 배양액을 JA-20 (Beckman) rotor로써 12,000rpm에서 15분간 원심분리하고 그 상정액을 50mM sodium-phosphate buffer (pH 6.9)로써 희석하여 흡광도를 측정, 이것을 세포의 색소의 양으로 삼았으며 균체는 70% EtOH로 추출하고 흡광도를 측정, 이를 세포내 색소의 양으로 삼았다. 정치 배양된 균체는 동결 건조후 분쇄한 다음, 에틸 에테르로써 48시간 추출하여 390nm 및 460nm에서의 흡광도를 측정, 황색소량 및 적색소량을 삼았다. 모든 배양의 결과는 반복 실험에 의하여 얻었다.

TLC : Petroleum ether-acetone-acetic acid 21 : 18 : 1 (PAA) 또는 HDA의 두 용매계를 사용하여 색소를 검색하였다.

방사능 계측 : Scintillation counting은 Beckman LS 100C로 위에 언급된 cocktail을 counting efficiency는 external standard channels ratio법으로 구하였다.

EI MS : GC-Mass spectrometer(Finnigan GC-MS MAT 4500)로써, direct expose probe를 써서 70eV에서 mass spectrum을 얻었다.

¹H NMR : CDCl₃를 용매로 TMS를 표준물질로 하여 Bruker사의 FT NMR (AM 200 MHz) spectrometer를 사용하였다.

결과 및 고찰

선발된 균주들의 균체성장 및 색소생성

분양된 균주는 계대 배양에 의하여 급격히 색소의 생성 능력이 쇠퇴되어 백색 균사가 형성되었다. 이는 *Monascus*의 특성 parasexual conjugation에 의한 것이라고 생각된다¹⁵⁾. 따라서 균주의 선발과 개량은 이 실험을 계속하기 위한 필수 조건이었다. 자연 변이와 자외선에 의한 변이주 중 선발된 균주들의 색소생성 능력을 Table 1에 보였다. 이들 균주들에 있어서 색소의 양 뿐 아니라 적색소 대 황색소의 비(A_{460}/A_{390} 의 값)도 차이가 났으며 이차원 TLC상에서도 색소의 존재비의 차이가 뚜렷하였다. 이 결과는 변이에 의하여 황색소의 형성 능력과 적색소의 형성 능력이 독립적으로 영향을 받는다는 것을 시사한다. 그러나 색소 중 하나만을 선택적으로 생합성하는 균주는 발견되지 않았다. 또한 색소의 생성 능력을 잃은 돌연변이

주, 예를 들면 U89-07도 나타났다. 여기에 보인 대부분의 균주들은 수세대의 계대배양에도 색소 생성 능력이 상실되는 back mutation이 나타나지 않았다. 그러나 이들 중 균체 성장은 매우 불량하나 색소 생성은 매우 우수한 균주인 U89-02, U89-03은 계대 배양을 함으로써 균체 성장은 보다 왕성해지고 색소 생성은 급격히 불량해졌다.

Table 1. Growth and pigment production of selected strains on Nishikawa's medium

Strain*	Dry weight (g/Petri dish)	OD at 460nm	OD at 390nm
Original	0.26	0.8	3.2
N1	0.27	4.6	15.4
N2	0.14	2.5	8.4
N3	0.12	12.1	23.3
U88-01	0.31	3.7	13.7
U88-02	0.16	1.3	4.5
U88-03	0.23	5.1	14.5
U88-04	0.22	2.8	10.8
U88-05	0.16	2.0	8.4
U88-06	0.32	2.3	9.5
U88-07	0.21	2.2	8.4
U88-08	0.17	3.9	17.0
U88-09	0.49	3.8	15.2
U88-10	0.26	2.9	11.7
U88-11	0.28	2.1	8.7
U88-12	0.29	4.5	16.7
U88-13	0.17	6.5	14.0
U88-14	0.16	7.9	20.2
U88-15	0.27	4.8	17.0
U88-16	0.11	3.4	12.5
U88-17	0.25	6.4	18.2
U88-18	0.15	2.7	13.0
U89-01	0.26	24.9	64.8
U89-02	0.17	154.0	140.0
U89-03	0.20	117.7	105.7
U89-04	0.18	5.8	17.4
U89-05	0.26	18.3	51.5
U89-06	0.25	7.4	29.9
U89-07	0.26	0.4	0.5
U89-08	0.23	6.8	26.8
U89-09	0.22	6.2	25.4
U89-10	0.29	22.8	58.9
U89-11	0.27	6.2	32.7
U89-12	0.25	18.5	60.7

*N for spontaneously arisen strain and U for UV-induced

배양 조건과 균체성장 및 색소의 생성

Lin's medium에서 진탕 배양시 균체의 성장은 접종 후 3일 후까지 왕성하고 그 이후에는 완만하여지다가 5일에 최대가 되었다(Fig. 1). 유기용매 가용성의 세포내 색소의 양은 4일 뒤까지 증가하다가 그 후 감소하였으며 수용성 세포외 색소의 양은 7일후까지 계속 증가하였다. 이는 색소가 어느 정도 생합성된 뒤에는 고분자에 결합된 수용성인 형태로 되어 세포외로 배출되는 것으로 생각되며 이미 Su^{15} 에 의하여 그러한 보고가 있었다. 이 고분자 물질의 정체는 알려지지 않았으나 홍색소가 비효소적인 반응으로 amine과 반응하여 적색소로 전환되는 것으로 보이⁸⁾ 이는 홍색소가 단백질의 유리 아미노기와 결합된 것으로 생각되며 앞으로의 연구가 필요하다. 이상의 결과에서 수용성, 결합형의 색소를 얻는데는 액침 진탕 배양이 적합하나 유기용매에 추출되는 유리형의 색소를 얻는데는 부적절한 것으로 생각되어 Nishikawa's medium에서의 정치 배양에 의하여 대량 배양을 하고 색소를 분리하였다.

Nishikawa's medium에서 정치 배양시 균체의 성장은 4일까지 현저하였고 그 후 완만해졌다. 색소의 양은 6일까지는 매우 변화가 없다가 6일 이후 급격하

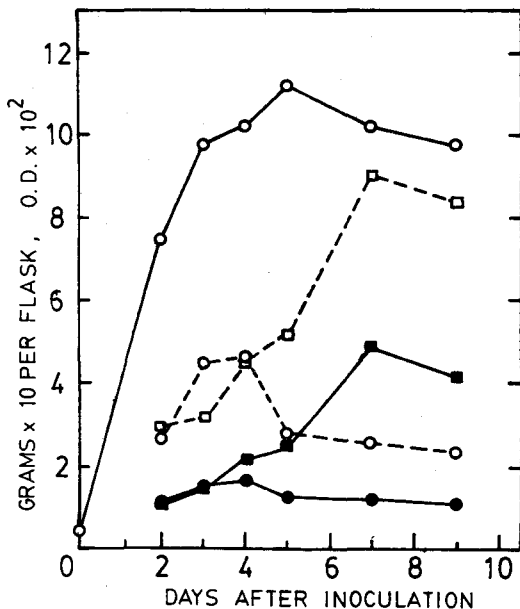


Fig. 1. Changes in mycelial growth and pigment production of *Monascus anka* grown on Lin's medium.

○—○ Mycelial growth, ○··○ Intracellular yellow pigments, □··□ Extracellular yellow pigments, ●··● Intracellular red pigments, ■··■ Extracellular red pigments

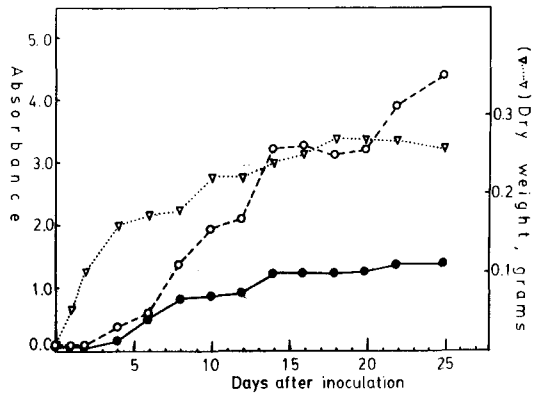


Fig. 2. Changes in mycelial growth and pigment production of *Monascus anka* grown on Nishikawa's medium.

▽ Mycelial growth, ○ Yellow pigments, ● Red pigments

게 증가하였다. 그리고 적색소의 양의 증가는 8일 이후에 완만하여지는 반면, 황색소의 양의 증가는 13일 경부터 완만하여졌다(Fig. 2). 이때 세포외 색소의 양은 매우 적었다. 즉, 유리형의 색소를 얻는데는 Nishikawa's medium에서의 정치 배양이 보다 유리하였다. 한편 500ml Erlenmeyer flask에 Nishikawa's medium 100ml를 가지고 Lin's medium 배양액 20ml를 접종하여 30°C에서 150rpm으로 진탕 배양(액침배양)한 결과 15일에 이르기까지 세포내 유기용매 가용성 색소의 형성은 Lin's medium에서 결과의 약 1/2에 불과하였다.

최적 배지량

액침배양에서는 배지의 종류와 관계없이 유기용매 가용성 색소의 생성은 매우 낮았음을 앞서 지적하였다. 여기에서 균체가 액체표면에서 부유하여 성장하는 정치배양에서도 배지의 양과 색소형성에는 어떠한 상관관계가 존재하리라는 것을 추론할 수 있었다. 이러한 관계를 확인하기 위하여 정치배양의 표면적을 일정하게 하고 배양액중 초기의 세포밀도를 동일하게 한 조건에서 배양액의 부피를 달리하여 배양하였다. 이때 배지량과 균체성장 및 색소생성은 Table 2와 같았다. 즉, starter 2ml를 배지 10ml에 접종하였을 경우 색소생성에 가장 효율적이었고 동일한 표면적에 배양액이 이보다 많거나 적은 경우는 좋지 않았다. 따라서 이후의 모든 배양에서는 이 조건을 이용하였다. 이렇게 배양액의 부피에 따라 색소의 형성이 다른 결과는 정치 배양시 배지가 과다할 때에는 starter로 사용한 균체가 배지의 하부로 침강하여 표

면에서 성장할 기회가 작아진 데 일부 기인하리라 생각되나 배양 기일이 21일로 충분히 길었기 때문에 이 효과는 거의 무시될 수 있을 것이다. 그러나 배지의 양을 줄였을 때 균체의 성장과 색소의 형성이 극적으로 감소하는 것은 단순한 영양 효과만으로 해석할 수 없었다.

Table 2. Effect of medium level on mycelial growth and pigment production^{a, b}

Starter (ml)	Medium (ml)	Dry weight ^a	Red pigments ^c	Yellow pigments ^d
1.0	5.0	0.179	0.046	0.051
2.0	10.0	1.000	1.000	1.000
3.0	15.0	0.768	0.917	0.880
4.0	20.0	0.980	0.670	0.760
5.0	25.0	1.311	0.430	0.560

a : Values are relative to the second row experiment
 b : Incubated for 21 days
 c : Estimated from OD at 460 nm
 d : Estimated from OD at 390 nm

색소의 분리

Soxhlet에서 6시간동안 연속 추출한 후 PAA 및 HDA의 두 용매제로써 이차원 전개 TLC를 하여 육안 관찰, 옥소 증기에 의한 증색으로 황색소 7종, 홍적색소 8종의 존재를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 지금까지 분리되어 보고된 황색소는 1과 2의 두 종류가 있고 홍적색소는 3과 4의 두종이 있음을 고려할 때, 특히 황색소에서 몇 개가 더 분리 연구되어야 할 것으로 앞으로의 연구가 기대된다. 그러나 이들은 너무 적은 양이 나타나고 있어 효과적인 유기용매 가용성 색소를 얻을 수 있는 대량 배양법이 개발되어야 연구가 가능해질 것이다.

n-Hexane과 dioxane을 이용한 1차 VLC에서 얻어진 주황색소 분획을 모아 TLC로 확인하고 이들을 합쳐 2차 VLC에 사용하였다. 2차 VLC에서는 Fig. 3의 Y2 및 Y3에 해당하는 황색소들이 겹쳐서 나타났다. 이들을 함유하는 분획을 농축하여 분취 박층 크로마토그래피로써 Y3을 분리하였고 이의 동정을 시도하였다.

분리된 황색소의 이화학적 특성

분리된 황색소 Y3의 ¹H NMR spectrum과 EI MS spectrum은 각각 Fig. 4 및 Fig. 5와 같았다.

¹H NMR spectrum은 다음과 같이 해석되었다.

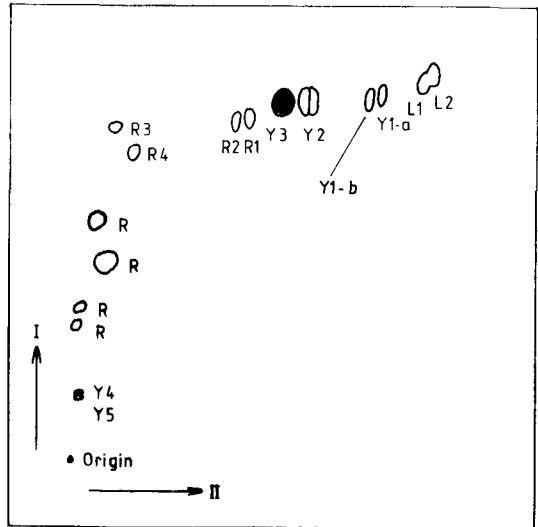


Fig. 3. Two dimension thin layer chromatogram of Et₂O extract of *Monascus anka*(strain N3).

Letters L, Y, and R represent lipid, yellow, and red, respectively.

Assign으로 표시된 alphabet은 Fig. 4에 표시된 것과 같다 : δ(ppm, TMS); 1.0(3H, t, a), 1.4(10H, m, b), 1.5(3H, s, c), 1.9(3H, d, d), 2.4(2H, m, e), 2.6(1H, m, f), 3.0(1H, d of d, g), 3.3(1H, d of d, h), 3.7(1H, d, i), 4.7(1H, d, j), 5.1(1H, d, k), 5.3(1H, s, m), 5.9(1H, d, n), 6.5(1H, m, o). 이는 0.6ppm의 신호, 2.2-2.8ppm의 splitting pattern을 제외하면 이론적으로 ankaflavin의 구조에 모순이 없었으며, EI MS결과 (Fig. 5) m/e 386의 M⁺ peak의 존재, m/e 162의 base peak¹⁷⁾, 기타 fragmentation pattern을 보여 분리된 황색소가 ankaflavin임을 확인할 수 있었다.

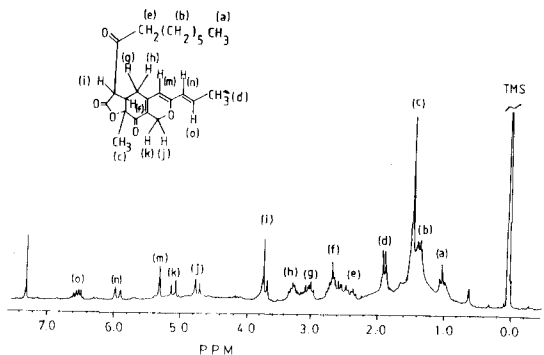


Fig. 4. ¹H NMR spectrum of the yellow pigment Y3 isolated from VLC and preparative TLC

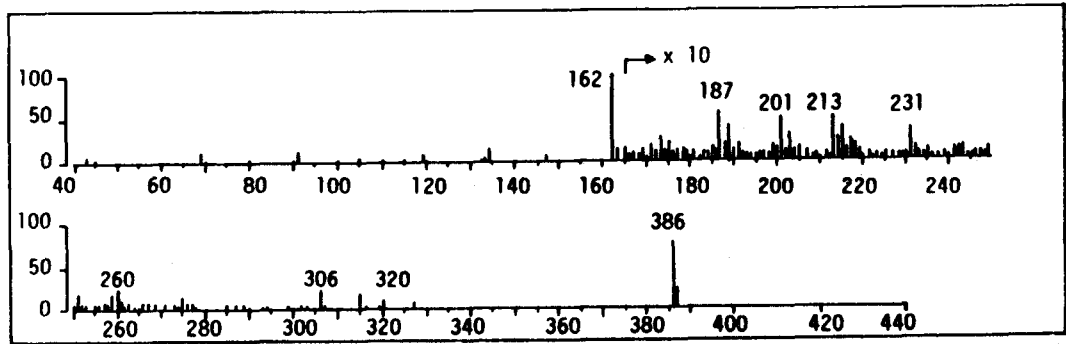


Fig. 5. EI MS spectrum of the yellow pigment Y3 isolated from preparative TLC

균체의 성장 및 색소의 생성에 있어 탄소원의 영향

Monascus 색소의 생합성 실험을 위하여 안정 동위원소를 탄소원으로 사용할 것을 염두에 두고 몇가지 가능한 탄소원을 시험한 비교의 결과는 Table 3과 같았다. 일곱가지 시험된 탄소원 중 서당보다 우수한 탄소원은 없었으며, 이외에는 균체성장 및 색소생성에 있어 에탄올이 가장 우수하였다. Acetic acid, sodium acetate, hexanoic acid, octanoic acid의 경우는 1~10%의 어느 수준에서도 균체 건조 중량은 0.08 g 이하였고 OD₄₆₀ 및 OD₃₉₀의 값은 0.008, 0.002 이하였다. 반면에 ethanol 처리시는 10% 수준에 이르기까지 처리량의 증가에 따라 균체의 성장과 색소의 생성이 거의 선형으로 비례하여 증가하였다. 이것은 다른 보고¹⁶⁾에서도 우수한 탄소원으로 보고되어 있는 것과 일치하는 사실이었다. 균체성장 및 색소생성 모두에 있어서 탄소원의 효율성은 자당 > ethanol > methyl hexanoate ≥ acetamide > octanoic acid ≥ hexanoic acid > sodium acetate ≥ acetic acid 순이었다. 이상의 결과에서 지방산 및 그 에스테르, 지방산 염, 아마이드 따위의 탄소원은 균체성장 및 색소생성에 부적절하며 ethanol과 서당이 매우 우수함을 알 수 있었다. 이는 아마도 세포막 투과성의 차이, 지방산 분해 효소의 활성, 아마이드 분해 효소(amidase)의 활성 등 몇몇 요인에 기인할 것으로 생각된다.

Ethanol의 이용효율

Ethanol이 서당외에 효과적인 탄소원이라면 ethanol이 얼마나 효율적으로 색소형성에 이용될 것인가를 알아야 할 것이다. 이 때 탄소원의 이용효율을 높이기 위하여 균체의 성장이 어느 정도 이루어지고 색소의 형성이 시작되는 배양 5일째에 displacement 배양을

Table 3. Effect of carbon sources on pigment production in *M. anka* grown on Nishikawa's medium

Treatment	Dry weight	OD at	OD at
(% in medium)	(g)	460nm	390nm
Acetamide	1	0.106	0.04
	2	0.121	0.05
	3	0.108	0.07
	5	0.104	0.08
	10	0.041	0.04
Methyl hexanoate	1	0.226	0.09
	2	0.215	0.12
	3	0.066	0.04
	5	0.064	0.05
	10	0.065	0.04
Ethanol	1	0.302	0.09
	2	0.421	0.16
	3	0.614	0.31
	5	0.338	0.43
	10	0.398	1.03
Sucrose	10	0.542	2.62
			7.04

시도하였다. 다른 실험을 통하여 대치될 배지는 5.0ml이 최적임을 알았고 이 배지의 량에 동량의 [1-¹⁴C]ethanol을 포함한 1~5%의 ethanol을 첨가하였다. 색소로 이행된 방사성 탄소의 량은 매우 적었으므로 가해진 ethanol을 진공에서 충분히 건조한 후 methanol에 용해되는 분획의 방사능을 측정하여 색소의 이용효율은 아니나 상대적인 이용효율을 조사하였다(Table 4). 그 결과 표지물질의 % incorporation은 ethanol이 증가할수록 감소하였으나 가해진 ethanol을 고려할 때 ethanol의 농도가 높을수록 전체 incorporation이 높아지는 경향을 보여 실험이 실시된 5%까

Table 4. Incorporation of [$1-^{14}$ C]ethanol into MeOH soluble fraction

% Ethanol* (g in 10ml medium)	% Incorporation of [$1-^{14}$ C]EtOH ^b	Relative total incorporation ^c
1 (0.10 g)	5.97	5.97
2 (0.20 g)	3.80	7.60
3 (0.30 g)	3.79	11.37
5 (0.50 g)	3.02	15.10

a Containing 4.47×10^5 dpm per petri dishb (dpm of MeOH soluble part/dpm of applied EtOH) $\times 100$ c (% EtOH) \times (% Incorporation)Table 5. Effect of sterol biosynthesis inhibitors on mycelial growth and pigment production in *M. anka* grown on Nishikawa's medium

Treatment (%)	Dry weight (g/10ml)	OD at 390nm	OD at 460nm
Control	0.12	11.5	3.0
(\pm)-Miconazole	0.10	9.2	6.3
nitrate	0.25	12.0	8.3
	0.50	14.0	7.0
	1.00	14.0	9.0
	2.00	15.5	7.0
	4.00	4.2	6.5
Chlorocholine	0.10	17.1	3.8
chloride	0.25	21.0	11.0
	0.50	33.0	7.0
	1.00	48.0	10.0
	2.00	49.5	8.6
	4.00	14.0	5.9

지 ethanol농도가 높을수록 높아지는 이용효율을 알 수 있었다.

Sterol 합성저해제의 영향

Monascus 색소는 acetate에서 출발하여 polyketide 경로로 생합성된다^{9, 10}. 그러나 생체내에서 acetate는 중요한 생합성의 중간물질로서 TCA 회로로 들어 가는 외에 지방산 합성과 sterol로 가는 mevalonate 경로에 이용된다. 따라서 이들 경로를 적당히 여닫으므로 특정 경로로 acetate를 보내어 생합성산물의 생산을 늘일 수 있을 것이다. 이 실험에서는 이러한 시도로서 sterol 합성저해제인 CCC와 (\pm)-miconazole¹⁸을 0.1~4% 수준으로 배지에 처리하였다. (\pm)-Miconazole보다 CCC가 색소형성에 큰 효과를 보였다 (Table 5). 이 결과는 CCC의 독성과 miconazole의 가격때문에 그대로 상업적 색소 생산에 쓰이기에는 어

렵겠지만 실험실적 조건에서는 상당한 가치를 가진다고 생각된다.

결 론

이 연구에서는 실험실 조건에서 유기용매 가용성 *Monascus* 색소가 최적으로 생성되는 조건을 검색하고자 수행되었다. 먼저 균주의 열화가 문제가 되어 균주의 선발을 행하여 몇몇 유용한 균주를 얻었으며, 균주의 개량과 변이는 이 실험실에서 지금도 계속되고 있다. 앞서의 보고와는 달리 액침배양에서는 유기용매 가용성 색소가 거의 생성되지 않았고 단지 Nishikawa's medium을 이용한 정치 배양이 가장 효과적이었음을 알았다. 앞서의 보고에서 나타난 유기용매 가용성 색소의 형성이 균주의 차이인지 알 수 없었다. 그러나 *Monascus purpureus*로 본 실험실에서 비슷한 실험을 행한 결과 역시 이러한 색소의 형성은 매우 낮았다. 그러므로 이 현상은 균주의 차이가 아니고 이 속의 곰팡이의 고유의 특성이라 보인다. 생합성 실험, 즉 선구체의 *in vivo* incorporation을 염두에 두고 정치 배양에서 색소가 가장 잘 형성되는 조건과 가능한 탄소원을 검색하여 ethanol이 좋은 탄소원임을 알았다. 그리고 배지의 양에 따라 균의 성장과 색소의 형성이 달라짐을 관찰하였다. 균의 생합성 대사 경로를 조절하여 색소의 형성을 증대시키고자 sterol 합성 저해제인 (\pm)-miconazole과 CCC를 처리하여 sterol의 생합성을 저해함으로 생체 탄소의 흐름을 polyketide 경로로 움직일 수 있음을 알았다. 이것은 이 색소형성 연구만이 아니라 다른 polyketide 합성 연구에도 적용될 수 있는 우수한 방법이라고 생각된다. 이러한 현상은 방사성 선구체를 이용한 cell-free 실험에서도 실증되어 잘 이용되고 있어¹⁹ 앞으로 일반적인 이용이 가능하리라 보인다.

사 사

이 연구에서 서울대학교 농과대학의 선경농학연구비에 의하여 수행된 것임을 밝히며 감사드립니다. 그리고 균주를 분양하여 주신 제일제당 연구소 김 현수 박사님, 균주의 분리를 도와 준 유 봉기와 황 유식, 그리고 이 실험을 시작한 양 환기에게 감사를 표합니다.

참 고 문 헌

1. 김호식 : 발효 미생물학, 4판, p.304, 향문사, 서울 (1979)
2. 鈴木 秀昭 : 食品と科學, 5月號, pp.94~97(1986)
3. 遠藤 章 : 醸酵と工業, 43(6) : 544~552(1985)
4. Stoessl, A. : In "CRC Handbook of Microbiology", 2nd ed., Vol. V, Laskin, A. I. and Lechevalier, H. A. ed., CRC Press, Boca Raton(1984)
5. 김창식, 이숙희, 김 일 : 한국식품과학회지, 9 : 277~283(1977)
6. 김현수, 장 욱, 손충홍, 배종찬, 유주현 : 한국산업미생물학회지, 8 : 117~121(1981)
7. 西川 英次郎 : 日本 農藝化學會誌, 8 : 1007~1015 (1932)
8. Haws, E.J., Holker J.S.E., Kelly, A., Powell, A.D.G. and Robertson, A. : J. Chem. Soc., 3598~3610 (1962)
9. Hadfield, J.R., Holker, J.S.E. and Stanway, D.N. : J. Chem. Soc., 751~755(1967)
10. Birch, A.J., Cassera, A., Fitton, P., Holker, J.S.E., Smith, H., Thompson G.A. and Whalley, W.B. : J. Chem. Soc., 3583~3586(1962)
11. Hiroi, T., Shima T., Suzuki, T., Tsukioka, M. and Nagahiro, O. : Agric. Biol. Chem., 43 : 1975~1976 (1979)
12. Wong, H.C., Lin, Y.C. and Koehler, P.E. : Mycologia, 73 : 649~654(1981)
13. Pelletier, S.W., Chokshi, H.P. and Desai, H.K. : J. Nat. Prod., 49 : 892~900(1986)
14. Coll, J.C. and Bowden, B.F. : J. Nat. Prod., 49 : 934~936(1986)
15. Su, Y.C. : Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 11 : 325~337(1983)
16. Yoshimura, M., Yamanaka, S., Mitsugi, K. and Hirose, Y. : Agric. Biol. Chem., 39 : 1789~1795 (1975)
17. Kudakasseril, G.J., Lam, L. and Staba, E.J. : Planta Medica, 280~285(1987)
18. Fielding, B.C., Holker, J.S.E., Jones, D.E., Powell, A. D.G., Richmond, K.W., Robertson, A. and Whalley, W.B. : J. Chem. Soc., 4579~4589(1961)
19. Kim, S.U., Kim, J., Hong, Y.J. and Woo, H.C : Unpublished result

Pigment production in *Monascus anka*

Soo-Un Kim and Jeong-Gu Kim (Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : *Monascus anka* strains with higher pigment production were developed using UV mutation and natural selection. To obtain organic solvent soluble pigments from *Monascus anka*, the following culture conditions were compared; standing and shaking culture with Nishikawa's medium, and shaking culture with Lin's medium. Shaking culture in Lin's medium exhibited decrease in solvent-soluble intracellular pigments after initial increase. The decrease was accompanied by the increase in water-soluble extracellular pigments. *Monascus anka* preferred sucrose and ethanol among 7 carbon sources tested. Treatment of sterol biosynthesis inhibitors, (\pm)-miconazole and chlorocholine chloride(CCC), directed carbon pool to the biosynthetic pathway leading to the pigments with CCC's more pronounced effect. Two dimensional TLC revealed at least 7 yellow pigments suggesting existence of hereto unreported pigment. One of the most abundant yellow pigments was isolated and found to be ankaflavin by NMR and MS analysis.