

*Monascus anka albidus*의 적색색소 생산

김명희 · 이태경* · 양한철

고려대학교 식품공학과, *고려대학교 생물공학연구소

Red Pigment Production from *Monascus anka albidus*

Myung Hee Kim, Tae Kyung Lee* and Han Chul Yang

Department of Food Technology, Korea University

*Institute of Biotechnology, Korea University

Abstract

In the medium containing 7% rice powder, 0.15% NH_4NO_3 and 0.1% MnSO_4 with initial pH 6.0, the red pigment production by *Monascus anka albidus* was observed. The mycelium were cultured at 30°C for 5 days with reciprocal shaking (130 rpm). As a carbon source, glutinous rice gave the highest production of pigment. Ammonium nitrate and KH_2PO_4 as a nitrogen source and phosphate source, respectively, stimulated best the production of the red pigment. The optimum C:N ratio was found to be 18:1. The production of the pigment by the strain was 2.6 mg/ml in a flask, but 1.8 mg/ml in 5 l fermentor, respectively.

Key words: *Monascus anka albidus*, red pigment, rice powder media

서 론

식품 착색료에는 타르계의 합성 색소와 천연 색소계 두 종류가 있는데 종래 타르계 색소가 많이 사용되어 왔으나 식품에 허용되어 왔던 다수의 합성색소^(1,2)가 인체에 유해함이 밝혀지고 있다.

천연 색소의 구성성분으로는 carotenoid계, flavonoid 계, betacyanin계, phorphyrin계, diketon계, azapyron 계 등이 있으며 특히 미생물이 생산하는 색소로는 효모의 황색 색소와 홍국균의 적색 색소 등이 알려져 있고⁽³⁾ 천연 색소의 수요가 증가함에 따라 연구가 활발히 진행되고 있다.

홍국은 오래 전부터 일본, 중국, 인도네시아 등지에서 홍주, 홍두부 등 발효식품을 만드는데 이용되어 왔으며 홍국의 색을 나타내는 주요 미생물인 *monascus*속 곰팡이는 α -amylase, β -amylase, protease, lipase 등의 가수 분해 효소 뿐만 아니라 다양한 적색, 황색, 자색의 색소를 생산한다. 1895년 Went⁽⁴⁾은 홍국에서 *Monascus purpureus*를 분리하였고 Hibino⁽⁵⁾는 홍국균의 색소는 물에 가용성인 것과 알콜, chloroform에 가용성인 것의 2종이 있다고 보고하였다. 1932년 Nishikawa⁽⁶⁾가 애채배지에서 적색과 황색을 결정화하였다. 최근 동물실험에서 홍국 색소의 안전성이 확인되었으며 어육, 수산가공품, 축육

가공품, 과장, 빙과류의 착색과 육류의 보존제로 사용되고 있다.

본 연구에서는 합성 적색 색소의 대체 색소인 홍국 색소의 대량생산을 위한 산업화의 기초자료로써 *Monascus anka albidus* 균주를 사용하여 배양조건의 최적화를 연구 검討하였다.

재료 및 방법

사용 균주

*Monascus anka albidus*를 생산균주로 하여 potato dextrose 한천배지에 보관하여 사용하였다.

배지

기본배지는 Lin⁽⁷⁾이 보고한 rice 3%, NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.25%를 초기 pH 6.0으로 조절하여 사용하였다. 포자형성배지로는 廣井忠夫 등⁽³⁾이 보고한 C-배지로써 sucrose 10%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaNO_3 0.2%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, yeast extract 0.3%, casamino acid 0.5%, 한천 2%를 초기 pH 4.2로 하여 사용하였다.

색소 측정

光井忠夫⁽³⁾, Lin⁽⁷⁾, Su⁽⁸⁾ 등이 보고한 방법을 변용하였다. 배양 후 7,000 rpm(9,000 × g, HITACHI Centrifuge RPR 9-2)에서 15분간 원심분리하여 얻은 균체에 80% 에탄올 200 ml을 첨가하여 500 ml flask에서 1시간 동안

Corresponding author: Han Chul Yang, Department of Food Technology, Korea University, #1, Anam-dong 5-ka, Sungbuk-ku, Seoul 135-075, Korea

진탕 추출하여 여과지(Whatmann No.2)에 여과한 여액의 흡광도로 측정하였다(80% 에탄올용액에서 monascorubrin 0.0025%의 OD₅₀₀의 값은 1이다).

균체량

균체로부터 80% 에탄올로 색소를 추출한 후 중류수로 세척하여 105°C에서 건조하여 향량을 구하였다.

당정량

Phenol-sulfuric acid법⁽⁹⁾으로 포도당을 표준물질로 하여 총 당량을 정량하였다.

질소정량

Micro-Kjeldahl법⁽¹⁰⁾으로 총 질소량을 정량하였다.

배양 조건

$10^7 \sim 10^8$ 개/ml의 포자 혼탁액 1ml를 기본 배지 100 ml에 접종하여 500 ml 플라스크에서 30°C, 48시간 회전 진탕(130 rpm) 배양한 전 배양액 5ml을 본 배양액 100 ml에 접종하여 회전 진탕 배양하였다.

결과 및 고찰

온도의 영향

기본 배지에서 색소 생산에 대한 온도의 영향을 검토한 결과(Fig. 1 참조), 배양온은 30°C에서의 색소 생산이 가장 높아 0.49 mg/ml의 생산량을 보였으며 30°C 전후의 온도에서는 생산이 감소한 결과를 보였다. 이 결과는 Su⁽⁸⁾와 Yoshimura 등⁽¹¹⁾의 보고와 유사하였다. 그러나, 균체량은 26°C에서 가장 좋았으나 색소 생산의 적온과는 약간의 차이를 보이는 30°C로써 중온성 부근의 온도에서 색소 생산이 활발화 것으로 나타내었다.

pH의 영향

기본 배지의 초기 pH를 4에서 8까지 HCl 및 NaOH로 조정한 후 색소 생산을 검토한 결과(Fig. 2 참조), 초기 pH가 6.0일 때 생산량이 가장 높아 0.39 mg/ml을 보였고 초기 pH 5.0일 때 최대 균체량을 보였다. 이 결과는 Lin⁽⁷⁾, Su⁽⁸⁾ 그리고 Yoshimura 등⁽¹¹⁾의 보고와도 일치하였다.

통기량에 의한 영향

500 ml의 진탕용 플라스크에 기본 배지를 40 ml부터 160 ml까지 넣고 포자수를 $10^7 \sim 10^8$ /ml로 조정한 포자 혼탁액을 배지 용량에 대해 1%씩 접종하여 색소 생산을 검토한 결과, 배지 용량 100 ml에서 0.35 mg/ml의 최대 색소 생산량을 보였다. Lin⁽⁷⁾은 배지 용량 75 ml에서 김 등⁽¹²⁾은 배지 용량 100 ml에서 최적 통기량이라 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보았다.

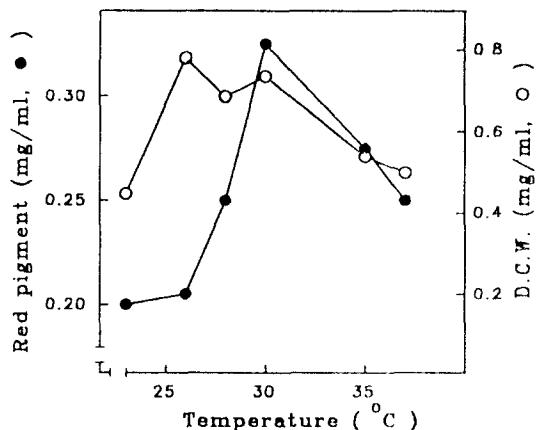


Fig. 1. Effect of temperature on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

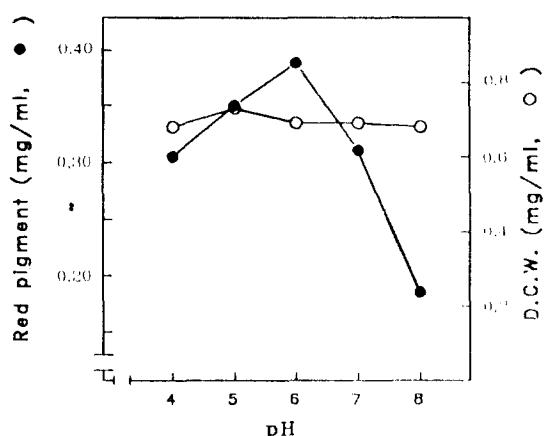


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

탄소원의 영향

각종 탄소원 3%를 함유한 기본 배지 100 ml에 전 배양액을 접종하여 색소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 1 참조), 특히 찹쌀과 쌀을 탄소원으로 할 때 색소 생산량이 0.57 mg/ml과 0.28 mg/ml로 가장 높았다. 단당류나 이당류에 비해 전분류 및 곡류에서 색소 생산량이 높았는데 이 결과는 Lin⁽⁷⁾, 김 등⁽¹²⁾, 박⁽¹¹⁾의 결과와 일치하였으며 이는 *Monascus*속이 생산하는 여러 종류의 효소작용^{(13)~(15)}에 의해 전분류 및 곡류 첨가시 색소 생산이 높은 것으로 사료된다. 찹쌀 가루에서 색소 생산이 세밀 높았으나 경제성을 고려하여 쌀 가루를 선택하였으며 그 농도가 증가함에 따라 색소 생산도 높아졌으나 9% 이상에서는 감소하는 결과를 보였으며 이것은 Su⁽⁸⁾의 결과와 같았다. 그러나 Lin⁽⁷⁾과 박⁽¹¹⁾의 결과는 쌀 5%에서 가장 높은 색소 생산을 나타내었다.

Table 1. Effect of carbon sources on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Carbon sources (3%)	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
Glucose	5.68	0.5	0.04
Galactose	6.06	0.2	0.01
Maltose	5.94	0.4	0.00
Sucrose	6.27	0.2	0.01
Dextrin	5.61	0.9	0.05
Ethyl alcohol	6.00	0.2	0.00
Glycerol	6.00	0.1	0.00
Acetate	6.70	0.1	0.01
Citrate	6.10	0.1	0.00
Soluble starch	5.95	1.7	0.14
Corn starch	5.64	3.0	0.14
Rice powder	6.61	5.5	0.28
Glutinous rice	6.80	5.8	0.57

Table 2. Effect of inorganic nitrogen sources on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Inorganic nitrogen sources (0.15%)	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
None	4.30	17.4	0.89
NaNO ₂	5.97	14.4	0.87
NaNO ₃	6.63	15.0	1.02
KNO ₃	6.50	15.4	1.17
NH ₄ NO ₃	4.85	16.0	1.46
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.20	16.1	0.62

색소 생산에 미치는 쌀의 입자크기(자료는 제시하지 않았음)는 16~100 mesh에서 비슷한 생산을 보인 반면, 16 mesh 이하의 굵은 입자와 100 mesh 이상의 미세한 입자의 쌀 가루에서는 감소하므로 색소 생산에 적합하지 않았다.

무기 질소원의 영향

각종 무기 질소원 0.15%를 기본 배지에 첨가하여 색소 생산에 미치는 영향을 살펴보았다. Table 2에 나타낸 것과 같이 NH₄NO₃가 제일 좋았으며, 0.15%에서 적색 색소 1.46 mg/ml의 높은 생산량을 나타내었다(Fig. 3 참조). 대체로 질산염이 색소 생산에 효과가 좋았다. Carrels와 Shepherd^[16], Kolotila^[17]는 *Monascus* 속 곰팡이는 nitrate 이온을 가하였을 때는 폐자기 증식이 증가되고 ammonium 이온을 가하였을 때는 배양액의 pH가 낮아져 포자형성이 감소하며 이것은 색소의 종류와 양을 결정하게 되고 색소의 최대 생산은 포자형성이 감소하는 배지조건에서 일어난다고 한 결과와 비슷하였다. 그러나 (NH₄)₂SO₄ 첨가시 균체 생산량은 비슷하나 색소 생산이 현저히 낮은 결과는 배지내 질소원 이외에 다른 요인으로 사료된다.

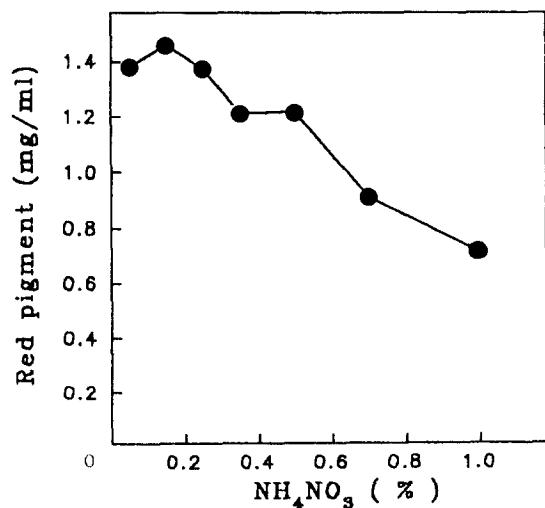


Fig. 3. Effect of ammonium nitrate concentration on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Table 3. Effect of organic nitrogen sources and amino acids on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Organic nitrogen sources and amino acids(0.15%)	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
None	4.20	16.8	0.82
Urea	4.50	16.6	0.97
Casamino acid	4.50	20.9	0.45
Yeast extracts	4.55	18.7	1.31
Peptone	4.55	16.8	1.03
Polypeptone	4.65	16.9	0.74
Soytone	4.70	16.8	0.86
C.S.L.	4.20	16.4	1.40
Tryptone	4.70	14.3	1.27
MSG	4.12	16.6	0.65
Lysine	3.20	16.4	0.08
Glycine	4.15	15.3	1.00

유기 질소원 및 아미노산의 영향

각종 유기 질소원 및 아미노산 0.15%를 기본 배지에 첨가하여 색소 생산에 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. Corn steep liquor, yeast extracts와 tryptone이 색소 생산에 좋았으며 아미노산 중에는 glycine이 다소 생산을 높였다.

탄소원과 질소원의 농도 비율에 따른 영향

쌀의 농도와 NH₄NO₃의 농도를 다양하게 조절하여 색소 생산에 미치는 영향을 본 결과(Table 4 참조), 쌀의 농도가 9%이고 NH₄NO₃의 농도가 0.5% 즉 그 비율이 18 : 1일 때 최대의 생산량 2.1 mg/ml을 보였다. 본 연

Table 4. Effect of different rice and ammonium nitrate concentration on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Rice (%)	NH ₄ NO ₃ (%)	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
1	0.01	4.6	2.2	0.41
	0.05	6.2	2.2	0.23
	0.15	5.4	2.1	0.23
	0.50	5.1	2.2	0.23
	1.00	4.3	2.1	0.14
	5.00	2.7	2.0	0.04
	3	0.01	3.8	6.0
	0.05	4.7	6.4	0.48
	0.15	5.7	6.5	0.39
	0.50	4.3	5.6	0.23
7	1.00	3.3	5.4	0.11
	5.00	2.1	5.4	0.04
	0.01	3.7	13.9	1.34
	0.05	3.9	14.2	1.38
	0.15	4.5	15.6	1.46
	0.50	4.0	16.0	1.22
	1.00	3.3	14.6	0.72
	5.00	2.1	12.1	0.23
	9	0.01	3.6	20.9
	0.05	3.75	20.5	1.32
0.15	4.0	20.0	1.71	
	0.50	3.7	20.9	2.10
	1.00	3.4	23.9	1.96
	5.00	2.2	19.2	0.09

구에서 색소의 최대 생산에 요구되는 질소원 농도는 균체의 최대 생산에 요구되는 질소원 농도에 비해 저농도가 요구됨을 알 수 있는데, 이 결과는 glucose와 NH₄NO₃의 농도가 모두 높을 때 균체 성장은 활발하나 2차 대사물인 색소의 생산은 저해되므로 NH₄NO₃의 농도를 저농도로 조절하는 것이 색소 생산에 유리하다는 Wong⁽¹⁸⁾의 보고와도 일치하였다. 본 연구에서 과량(5%)의 질소원을 공급했을 때는 균체량과 색소량이 감소한 결과를 보였는데 이는 급격한 pH 저하로 인해 균체 증식과 색소 생산에 불리한 환경이 조성되었기 때문이라 사료된다.

인산염의 영향

각종 인산염을 0.05%, 0.25%, 1%씩 첨가하여 색소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 5 참조), KH₂PO₄가 0.05%일 때 1.76 mg/ml의 최대 생산을 보였다. 인산염을 첨가하지 않은 배지에서는 균체량이 다소 감소한 결과를 보였는데, 이는 인산염이 ATP 생산에 필수적 요소이며 탄수화물 대사에 관여하므로 인산염의 결핍은 다른 무기염류의 결핍보다도 균생육의 저지원이 되는 것⁽¹⁹⁾ 같았다.

금속이온의 영향

각종 금속이온을 0.1% 첨가하여 색소 생산에 미치는

Table 5. Effect of phosphate on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Phosphate sources	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
None	2.50	14.4	1.46
KH ₂ PO ₄	0.05%	2.60	16.7
	0.25%	4.50	16.0
	1.00%	5.10	16.8
	0.05%	2.60	16.6
	0.25%	2.60	16.2
	1.00%	5.00	15.7
Na ₂ HPO ₄	0.05%	2.10	15.9
	0.25%	2.30	15.8
NH ₄ H ₂ PO ₄			

Table 6. Effect of metal ions on the production of red pigment by *Monascus anka albidus*

Metal ions (0.1%)	Final pH	D.C.W. (mg/ml)	Red pigment (mg/ml)
None	3.50	13.3	1.01
CuSO ₄	5.60	9.7	0.00
FeSO ₄	3.10	10.4	0.23
Li ₂ SO ₄	4.80	8.9	0.00
NiSO ₄	4.70	8.9	0.00
ZnSO ₄	2.90	12.6	0.73
MgSO ₄	4.80	16.2	1.46
MnSO ₄	3.30	15.0	2.60

영향을 살펴본 결과가 Table 6에 나타내었다. Mn²⁺의 농도가 0.1%일 때 최대의 색소 생산량 2.6 mg/ml을 보였다. Zn²⁺와 Mg²⁺는 0.01%의 농도에서 색소의 생산을 보였고(Table 6 참조) Fe²⁺는 색소 생산을 저하시키는 결과를 Cu²⁺, Li⁺ 및 Ni²⁺은 색소 생산을 완전히 저해시키는 결과를 보였다. 이 결과는 Mn²⁺가 색소 생산에 효과가 있다는 김 등⁽¹²⁾의 보고와 일치하였다. Zn²⁺가 *Monascus purpureus*의 탄수화물 대사와 질소 대사를 조절한다고 보고한 Johnson과 McHan⁽²⁰⁾의 보고와 *Monascus purpureus*의 포도당 흡수를 촉진하고 균체의 성장을 저해하는 반면, 색소의 생산을 촉진한다고 보고한 Yun과 Wang⁽²¹⁾의 보고와 유사하였다. 이를 금속이온들은 미량으로써 주로 효소를 활성화시키거나 효소의 일부분으로써 작용하며 비타민이나 다른 대사 산물의 구성성분에 필수적인 요소로 작용하는 것⁽²²⁾으로 사료된다.

5/ 발효조에서 통기량 효과

플라스틱 배양에서 얻은 최적 배지 3l를 5l 발효조에 넣고 교반수 및 통기량이 색소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, 600 rpm, 1 v/v/m 통기량에서 최대로 1.87 mg/ml의 색소를 생산하였다. 이 결과는 1 v/v/m에서 200 rpm과 300 rpm으로 교반했을 때 균체 성장과 색소 생산에 좋았다는 Su⁽⁸⁾의 결과와는 상이하였으나 600 rpm과 800 rpm에서 색소 생산이 좋았다는 Yoshimura

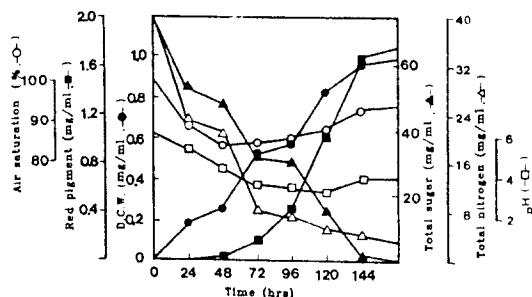


Fig. 4. Time course of the pigment production by *Monascus anka albidus*.

등⁽¹³⁾의 보고와 일치하였다.

최적 배지에서 *Monascus anka albidus*의 생육 곡선

5l 발효조에서 *Monascus anka albidus*의 배양시간에 따른 배양액의 pH, 탄소원과 질소원의 소비량, 균체량 및 적색 색소 생산량의 변화를 검토하였다(Fig. 4 참조). 배양액의 pH는 초기 pH 6.0에서 3.1로 감소하다가 배양 120시간 이후로는 pH 4.1까지 서서히 증가하였다. 탄소원은 배양 144시간까지, 질소원은 배양 72시간까지 급격히 소비되다가 이후로는 완만한 소비경향을 보였다. 균체량은 전 배양시간에 걸쳐 완만한 증가 경향을 보였으며 색소의 생산은 균체량이 증가된 48시간 이후부터 생산되어 168시간에는 1.87 mg/ml의 생산량을 보였다. 이상과 같은 결과는 색소 생산이 플라스크 배양에서 비교할 때 70% 낮은 것은 배양시간이 정과함에 따라 발효기 내벽에 붙은 균체량이 증가하여 또한 색소의 퇴색 등의 문제가 야기되므로 최적 배양시간은 144시간이며 상기 문제들을 해결할 방안을 검토해야 될 것이다.

지금까지 *Monascus anka albidus*에 의한 적색 색소 생산의 최적화를 영양원의 조절과 배양조건을 중심으로 연구하였으며 이상의 결과를 바탕으로 균체내 색소를 효과적으로 추출하기 위한 추출조건의 실험을 진행하고 있다.

요 약

Monascus anka albidus 균사를 쌀가루 7%, NH₄NO₃ 0.15%, KH₂PO₄ 0.05% 및 MnSO₄ 0.1% 조성의 초기 pH 6.0으로 조절한 배지에 접종하여 30°C에서 5일간 진탕 배양 하였을 때 가장 높은 색소 생산을 보였다. 특히 탄소원으로써 쌀가루가 제일 좋았으며 동시에 질소원으로써 NH₄NO₃, 인산염으로써 KH₂PO₄가 가장 우수하였다며 최적 C:N율은 18:1로 나타났다. 상기 조건에서 색소 생산은 플라스크에서 2.6 mg/ml을, 그러나 5l 발효조에서 약 70%인 1.8 mg/ml을 생산하였다.

문 헌

1. 김동훈: 식품의 색깔, 식품화학, 텁구당, p.39(1990)

2. 보건사회부: 식품일반에 대한 공통기준 및 규격, 식품 공전, 일자문화사, p.26(1991)
3. 廣井忠夫: Production of red-koji in solid culture. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 1(1981)
4. Went: *Ann. Sci. Nat. Bot.*, **8**, Ser. 1, 1(1895)
5. Hibino: Proceed. Koninkle. Akad. v. Wetenschapp. te. Amsterdam., **28**, 182(1925)
6. Nishikawa, F.: Studies on the biochemistry of mold. 1. The pigment of *Monascus purpureus* Went. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **8**, 1007(1932)
7. Lin, C.F.: *Monascus* sp. for pigment production. *J. Ferment. Technol.*, **51**, 407(1973)
8. Su, Y.C.: Fermentative production of anka-pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 325(1983)
9. Dubois, M., Gilles, K.A., Manilton, J.K., Reber, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Ana. Chem.*, **28**, 350(1956)
10. A.O.A.C.: Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Arington, Virginia, p.342(1990)
11. 박형은: *Monascus* sp.로부터 색소생성변이주의 분리와 배양조건의 최적화. 속명여자대학교 석사학위논문(1989)
12. 김현수, 김두혁, 양호석, 변유랑, 유주현: 액침진탕배양에 의한 *Monascus* sp.가 생산하는 적색 색소에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **7**, 23(1979)
13. Iizuka, H. and S. Mineki: Studies on the genus *Monascus*. I. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus kaoliang* nov F-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **23**, 217(1977)
14. Iizuka, H. and S. Mineki: Studies on the genus *Monascus*. II. substratespecificity of two glucoamylase obtained from *Monascus kaoliang* F-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **24**, 185(1978)
15. Tsai, M.S., T.H. Hsieu and Y.S. Shen: Purification and characterization of acid protease from *Monascus kao-liang*. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **12**, 293(1978)
16. Carels, M. and Shepherd, D.: The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1360(1977)
17. Kolotila, M.P. and Volz, P.A.: Nitrogen sources and cleistothecial production of *Monascus ruber* Van Tieghem. *Phytologia*, **45**, 438(1980)
18. Wong, H.C., Lin, Y.C. and Koehler, P.E.: Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. *Mycologia*, **73**, 649(1981)
19. Garraway, M.O. and Evans, R.C.: Fungal nutrition and physiology. John Wiley and Sons Inc. U.S.A., p.71(1984)
20. McHan, F. and G.T. Johnson: Zinc and amino acid. Important components of medium promoting growth of *Monascus purpureus*. *Mycologia*, **62**, 1018(1970)
21. Yun, S.B. and Wong, H.C.: Zinc effects of growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascus purpureus*. *Plant physiol.*, **46**, 63(1979)
22. Moore-landecker, E.: Fundamentals of the fungi. Prentice-Hall Inc., New Jersey, p.281(1972)