

## Monascus pilosus M-15에 의한 콜레스테롤 합성저해제 Monacolin의 생산

류병호<sup>†</sup> · 안문규\* · 박종옥\*\*

경성대학교 식품공학과

\*경성대학교 약학과

\*\*경성대학교 화학과

## Production of Cholesterol Inhibitor, Monacolin Produced from *Monascus pilosus* M-15

Beung-Ho Ryu<sup>†</sup>, Moon-Kyu Ahn\* and Jeung-Ok Park\*\*

Dept. of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

\*Dept. of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

\*\*Dept. of Chemistry, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

### Abstract

The monacolin retard *in vivo* synthesis of cholesterol. This study was conducted to select the best strain of *Monascus* sp. for monacolin production among 21 strains. In addition, research on suitable condition for mass production was conducted. *Monascus pilosus* M-15 was selected as the best strain for production of monacolin. The appropriate substrate for the monacolin production seem to be as follow : glycerin 5%, glucose 2%, corn steep liquor 0.5%, sodium nitrate 0.5% and length of fermentation was at 25°C for 10~12days, respectively. The monacolin obtained from this organism was compared with standard monacolin using UV, IR, and GC/MS system and it was very close to the standard monacolin.

Key words : *Monascus pilosus*, cholesterol, monacolin

### 서 론

홍국균은 중국 대륙과 대만에서 옛날 부터 양조(술, 장류)의 제국으로 이용되어왔으며, 이 곰팡이가 홍색계의 색소를 많이 축적하기 때문에 홍국균이라 불려 왔고 그 대표적인 균이 *Monascus*속이다.

*Monascus* sp.에서 분비되는 색소는 monascarubin, monascarubramin, rubropunctatin, rubropunctamine, moscasin의 구조를 가지고 있으며<sup>1</sup> 이는 독성이 없는 성분으로 알려져 천연 적색 색소로서 의약품의 제조나 식품에 필요한 색소로서 각광을 받고 있다<sup>2-9</sup>.

근년에 와서는 *Monascus*속의 일종인 *Monascus pilosus*, *Monascus ruber*, *Monascus pubigerus* 등에서 강력한 콜레스테롤의 합성저해제인 monacolin이 발견되고

또 monacolin과 유사한 생리 활성 물질이 분리되었다<sup>10</sup>. 이러한 성분은 콜레스테롤 합성계의 효소로서 HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하는 특징이 있다<sup>11-14</sup>.

이와같이 Monacolin에 대한 연구가 진행되어 각종 동물(쥐, 고양이, 개 등)에 소량 투여하여 혈중 콜레스테롤이 저하되는 것을 확인하였고 중증의 고콜레스테롤 환자에 대하여 유효하다고 하였다<sup>14,16</sup>. 그리고 동맥 경화를 유발시키는 low density lipoprotein 콜레스테롤을 우선적으로 저하시키는 특징이 있다<sup>15</sup>. 이와 같이 중국과 대만 및 일본에서는 홍국균을 이용한 약리 및 생리 활성물질에 대한 연구가 진행되어 건강보조 식품 및 고혈압 치료약의 개발을 서두르고 있다<sup>16,17</sup>.

그러나 우리나라에서는 *Monascus*속에 의한 색소의 생산에 대하여 약간의 연구 보고<sup>8,9</sup>가 있을 뿐 건강 식품의 개발 및 고혈압 치료제 등에 대한 연구는 찾아볼

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

수 없는 실정이다. 국외에서의 *Monascus*속에 대한 연구로는 홍콩균에 의하여 *Bacillus*, *Streptococcus* 및 *Pseudomonas*에 대한 항균활성에 관하여 보고하였고<sup>10)</sup> *Monascus ruber*에서 강력한 콜레스테롤 합성 저해제인 monacolin의 발견 이후 동물실험을 통하여 혈중 콜레스테롤 저하 및 중증의 고콜레스테롤증에 대하여 효과가 우수하다고 보고하였다<sup>10,13,15)</sup>.

따라서 본 연구는 *Monascus*속을 사용하여 monacolin 및 그 유도체를 대량 생산하여 의약품으로 활용하기 위해 우선 *Monascus* sp.에서 monacolin 생산성이 높은 균주를 선별한 다음 이 균주의 생육특성 및 monacolin의 생산조건을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 선별 배지

Glycerin 50g, glucose 30g, soybean meal 30g, peptone 8g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10g 및 NaNO<sub>3</sub> 2g을 물 1L에 녹이고 pH를 5.0으로 조절한 다음 멸균 후 배지로 사용하였다.

#### 생산배지

균주의 선별 배지를 기초로 하여 탄소원과 질소원 등 각종 기질을 첨가하여 0.52의 Fermentor에서 30°C에서 10일간 대량 배양하였다.

#### Monacolin 및 그 유도체의 검출

Endo 등의 방법<sup>10)</sup>에 따라 배양액을 인산으로 pH 3~4로 조절한 후 같은 양의 초산에틸로서 2회 추출한 다음 용매층을 채취한 후 이를 무수황산나트륨으로 탈수하고 흡입여과 후 같은 양의 5% 중탄산소다로 씻은 후 불용물을 여과하고 제거한다. 그 메탄올용액에 대하여 액체크로마토그래피 (column ODS : 4.6 × 260cm, 이동상 : acetonitrile/0.1% 인산 (55/45), 측정파장 : 237 nm)로 측정하였다.

#### Monacolin의 추출법

Endo<sup>10)</sup>의 방법에 따라 배양액 (5L)을 6N-HCl로 pH 3.0으로 조절한 후 5L의 ethyl acetate로 2회 추출하였다. Ethyl acetate층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 후 여과하고 진공농축하였다.

유상(油狀)의 농축물을 20ml의 benzene에 녹이고 여과한 다음 5% NaHCO<sub>3</sub> 100ml로서 2회 세척하고 여기에 0.2M-NaOH 100ml를 넣고 δ-lactone ring을 분

해하기 위하여 상온에서 2시간 동안 교반시켰다. 용매층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수시키고 증발건고시켰다. 이때 얻은 유상(油狀) 건고물을 10ml의 benzene에 녹이고 불용성 물질은 여과하여 제거한 후 재결정시킨다.

#### Monacolin의 확인

추출 정제한 시료와 표준품을 UV, IR(Perkin-Elmer, model 577) 및 GC/MS(Hewlett-Packard HP-5985)로 spectrum과 비교하여 동정하였다.

### 결과 및 고찰

#### *Monascus* sp.에서 monacolin의 생산능

*Monascus* sp. 중에서 monacolin의 생성 여부를 알아보기 위하여 각 균주를 배양한 각 배양액을 초산에틸로 추출하여 HPLC에 의하여 분석한 monacolin 생성균주는 Table 1에 나타내었다.

*Monascus* sp. 21종의 *Monascus* sp. 중에서 5% glycerin, 3% glucose, 3% soybean, 0.8% peptone, 0.2% NaNO<sub>3</sub> 및 0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (pH 6.4) 배지에 접종하여 30°C에서 10일간 배양한 후 ethyl acetate로 추출하여 monacolin의 생성여부를 조사한 결과 *M. pilosus*, IFO 4480, *M. pilosus*, IFO 4520, *M. ruber*, IFO 4492,

**Table 1. Screening of monacolin production from *Monascus* sp.**

| Species                                      | Production of monacolin |
|--|-------------------------|
| <i>M. albidus</i> var <i>glaber</i> IFO 4486 | -                       |
| <i>M. albidus</i> IFO 4489                   | -                       |
| <i>M. anka</i> IFO 4478                      | -                       |
| <i>M. anka</i> IFO 6540                      | -                       |
| <i>M. araneosus</i> IFO 4482                 | -                       |
| <i>M. Fuliginosua</i> IFO 4484               | -                       |
| <i>M. major</i> IFO 4485                     | -                       |
| <i>M. paxi</i> IFO 8201                      | -                       |
| <i>M. pilosus</i> IFO 4480                   | +                       |
| <i>M. pilosus</i> IFO 4520                   | +                       |
| <i>M. pilosus</i> M-15                       | +                       |
| <i>M. purpureus</i> IFO 4513                 | -                       |
| <i>M. pubigerus</i> IFO 4521                 | +                       |
| <i>M. ruber</i> IFO 4492                     | +                       |
| <i>M. ruber</i> IFO 9203                     | +                       |
| <i>M. ruber</i> M-12                         | +                       |
| <i>M. serorubescena</i> IFO 4487             | -                       |
| <i>M. serrorubescena</i> IFO 4525            | -                       |
| <i>M. vitereus</i> IFO 4532                  | +                       |
| <i>M. vitereus</i> IFO 7537                  | +                       |
| <i>M. sp.</i> M-25                           | +                       |

+ : Producted, - : Not producted

IFO 9203, *M. pubigerus* IFO 4521, *M. vitereus* IFO 4532 및 *M. vitereus* IFO 8201, *M. ruber* M-12, *M. sp-25*에서 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 검색된 *Monascus sp.* 중에서 monacolin을 가장 많이 생산하는 균주는 *Monascus pilosus* M-15이었으며, 이 균주를 선별하여 다음 실험을 계속하였다.

#### *Monascus pilosus* M-15에 의한 monacolin의 생산 pH와 온도의 영향

*M. pilosus* M-15에서 monacolin을 생산할 때 온도에 따른 균사량과 monacolin 생산량을 Fig. 1에 나타 내었다.

배양온도는 22, 25, 28, 30 및 32°C에서 10일 동안 진탕 배양시킨 결과 25°C에서 monacolin이 200µg/ml로 가장 많이 생산되었으며 28°C에서는 180µg/ml이 생성되었고, 22, 30 및 32°C에는 생성량이 매우 낮았다. 배양액의 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조절하여 25°C에서 10일 동안 배양한 후 건조 균사체와 monacolin의 생성량을 조사한 결과를 Table 2에 나타 내었다. 배양액의 pH가 6.0일 때 monacolin 생성량은 206µg/ml으로 가장 높았고 pH 7.0일 때는 monacolin의 생성량은 167µg/ml이었으며, pH 4.0, 5.0 및 8.0 일 때에는 매우 감소하였다.

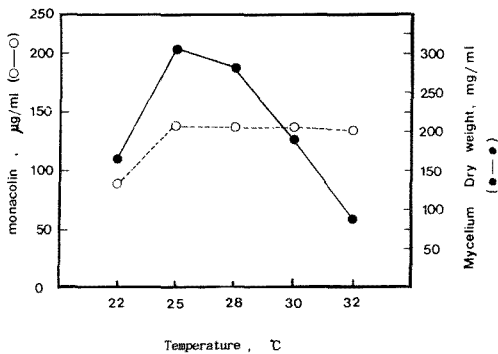


Fig. 1. Effect of cultivation temperature on the monacolin production by *Monascus pilosus* M-15.

Table 2. Effect of initial pH on the monacolin production by *M. pilosus* M-15

| Initial pH | Monacolin (µg/ml) | Mycelium dry weight (mg/ml) |
|------------|-------------------|-----------------------------|
| 4.0        | 126               | 173                         |
| 5.0        | 140               | 186                         |
| 6.0        | 206               | 212                         |
| 7.0        | 167               | 190                         |
| 8.0        | 143               | 178                         |

#### 탄소원의 영향

Table 3에서 보는 바와 같이 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 monacolin 생성량이 207µg/ml로 가장 높았고 그 다음이 fructose가 183µg/ml 및 galactose가 168µg/ml의 순으로 높게 나타났으나, 반면에 sucrose, mannose, lactose 및 soluble starch을 탄소원으로 첨가하여 배양한 결과는 낮았다.

#### 질소원의 영향

*M. pilosus* M-15를 monacolin 생산용 배지(1% glu-

Table 3. Effect of carbon sources on the monacolin production by *M. pilosus* M-15

| Carbon sources* | Monacolin production (µg/ml) |
|-----------------|------------------------------|
| Glucose         | 207                          |
| Fructose        | 183                          |
| Galactose       | 168                          |
| Mannose         | 96                           |
| Lactose         | 64                           |
| Soluble starch  | 57                           |

\*Two% of the indicated carbohydrate was added to the medium containing 1% peptone, 0.5% corn steep liquor and 0.5% NaNO<sub>3</sub>, pH 6.0

Cultivation was carried out on a rotary shaker at 25°C for 10 days

Table 4. Effect of nitrogen sources on the monacolin production by *M. pilosus* M-15

| Nitrogen sources*  | Monacolin production (µg/ml) |
|--------------------|------------------------------|
| Yeast extract      | 120                          |
| Peptone            | 189                          |
| Malt extract       | 98                           |
| Corn steep liquor  | 196                          |
| NH <sub>4</sub> Cl | 123                          |
| NaNO <sub>3</sub>  | 160                          |
| KNO <sub>3</sub>   | 187                          |
| L-Aspartic acid    | 84                           |
| L-Glutamic acid    | 82                           |
| L-Glycine          | 90                           |
| L-Valine           | 83                           |
| L-Threonine        | 68                           |
| L-Arginine         | 80                           |
| L-Tyrosine         | 76                           |
| L-Alanine          | 78                           |
| L-Serine           | 80                           |
| L-Proline          | 65                           |
| L-Leucine          | 87                           |

\*One% of the indicated nitrogen source was added to the medium containing 2% glucose, 5% glycerol, and 0.5% corn steep liquor, pH 6.0

Cultivation was carried out on a rotary shaker at 25°C for 10 days

cose, 2% glycerol 및 0.5% NaNO<sub>3</sub>)에 각종 질소원을 첨가하여 monacolin 생산을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다.

질소원으로는 peptone, corn steep liquor가 유기 질소원으로 첨가하여 배양하면 monacolin의 생산량이 증가하였으며, 무기질소원으로는 NaNO<sub>3</sub>을 배지에 첨가하면 높게 나타났다. 또 질소원으로 각종 아미노산을 첨가하여 사용한 결과 peptone, corn steep liquor 및 NaNO<sub>3</sub>을 배지에 첨가하여 사용할 때 보다는 훨씬 낮았다.

한편 monacolin 생산용 배지에 질소원으로 peptone, corn steep liquor 및 NaNO<sub>3</sub>을 첨가하여 배양하였을 때 monacolin의 생산량이 높았으므로 이들 질소원을 농도별로 첨가하여 실험하였다. Table 5에서 나타난 바와 같이 corn steep liquor는 0.5% 첨가하였을 때 monacolin은 203µg/ml로 가장 높았고, NaNO<sub>3</sub>은 0.5% 첨가하였을 때 monacolin은 210µg/ml로 생산량이 가장 높았다. 따라서 *M. pilosus* M-15의 생산용 배지는 2.0% glucose, 5.0% glycerol, 0.5% corn steep liquor, 0.5% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O (pH 6.0)으로 25°C에서 10일 동안 배양하였을 때 생산량은 가장 높았다.

*M. pilosus* M-15에 의한 monacolin의 생산

*M. pilosus* M-15을 생산용 배지에 접종하여 5L fermenter에서 10일 동안 발효시간에 따른 monacolin의 생산량을 Fig. 2에 나타내었다.

발효를 시작하여 2일째에는 monacolin은 생산되지 않았으며, 발효 4일, 6일째 약간 생산되기 시작하여 발효 8일째에는 180µg/ml 생산되었으며 발효 10일째에는 214µg/ml로 가장 많이 생성되었으며 발효 12일째에는 발효 10일째와 거의 비슷한 함량이었다. 균사체의

Table 5. Effect of nitrogen sources concentration on the monacolin production

| Nitrogen sources  | Concentration (%) | Monacolin produced (µg/ml) |
|-------------------|-------------------|----------------------------|
| Corn steep liquor | 0.1               | 183                        |
|                   | 0.3               | 192                        |
|                   | 0.5               | 203                        |
|                   | 0.7               | 194                        |
|                   | NaNO <sub>3</sub> | 0.1                        |
|                   | 0.3               | 198                        |
|                   | 0.5               | 210                        |
|                   | 0.7               | 203                        |

\*Each indicating nitrogen was added to the medium containing 1.0% glucose, 1.0% glycerol, with corn steep liquor or NaNO<sub>3</sub>

생성은 발효 2일째는 거의 생성되지 않았으며, 발효 8일째 건물량 175mg/ml이었고, 발효 10일째는 218mg/ml이었으며, 발효 12일째는 220mg/ml이었다. 이때 pH는 발효시작일 부터 발효가 끝나는 12일 까지 큰 변화가 없었다.

Monacolin의 추출 및 확인

Monacolin의 추출

*Monascus pilosus* M-15를 접종하여 5L fermenter로 25°C에서 10일 동안 발효시킨 발효액을 유기용매로 추출하여 245mg의 유상(油狀)의 추출물을 얻었으며 이를 5ml의 benzene에 다시 녹힌 다음 불용성 물질을 제거하고 건고시킨 후 5ml의 아세톤으로 녹인 후 불순물을 제거하고 정제하여 무색결정 72mg의 monacolin을 얻었다.

Monacolin의 확인

UV Spectrophotometer로 monacolin 표준품과 *Monascus pilosus* M-15의 발효액에서 추출하여 정제한 시료의 UV spectrum을 비교하였다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 시료와 표준품의 메탄올용액에 대한 극대흡수 부위는 229, 240 및 248nm로서 표준품과 거의 비슷한 경향이였다.

Endo는 *Monascus* sp.의 배양액에서 분리정제한 monacolin K의 UV spectrum은 229, 237 및 246nm에서 최대 흡광도를 나타내었다고 하였다. IR spectrum (KBr)은 3350, 2970, 1696 및 1220cm<sup>-1</sup>에서 최대의 흡수대를

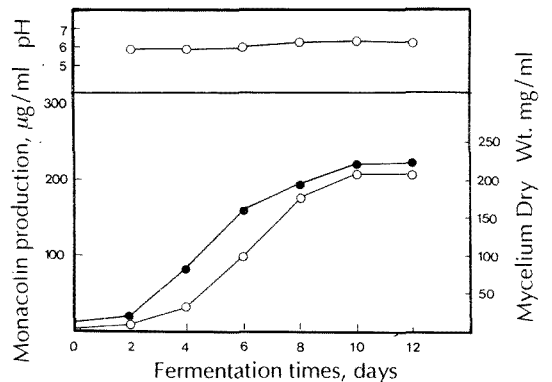


Fig. 2. Time course of the monacolin productivity from *M. pilosus* M-15 in 5L fermenter.

○—○ : monacolin produced, ●—● : mycelium. Cultivation was carried out monacolin production medium containing 1.0% glucose, 2.0% glycerol, 0.5% corn steep liquor, 0.5% NaNO<sub>3</sub> and 0.2% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O at 25°C for 12days in the 5L fermenter.

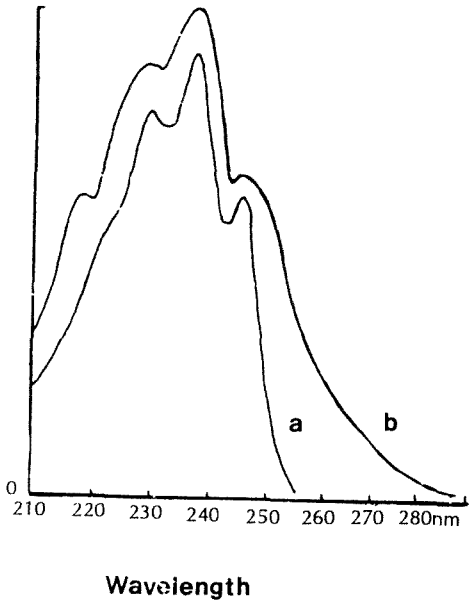


Fig. 3. UV spectra of monacolin obtained from *Monascus pilosus* M-15.  
 a : monacolin standard  
 b : monacolin from *M. pilosus* M-15

나타내었다(Fig. 4). GC/MS spectrum의 peak는 m/z 419 (M+H), 303 (M+H-116), 285 (M+H-134), 243 (M+H-176), 225 (M+H-194), 199 (M+H-220), 173 (M+H-246), 159 (M+H-260) 및 157 (M+H-262)이었고, 표준품인 monacolin과 잘 일치하였다(Fig. 5).

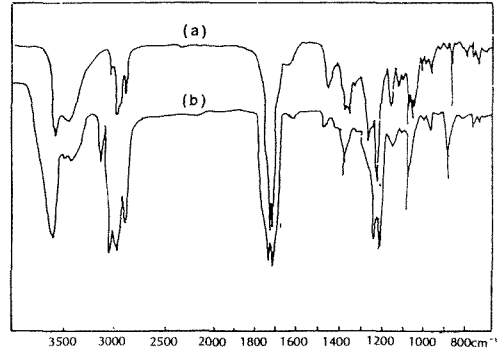


Fig. 4. IR spectra of monacolin obtained from *Monascus pilosus* M-15.  
 a : monacolin standard  
 b : Monacolin from *M. pilosus* M-15

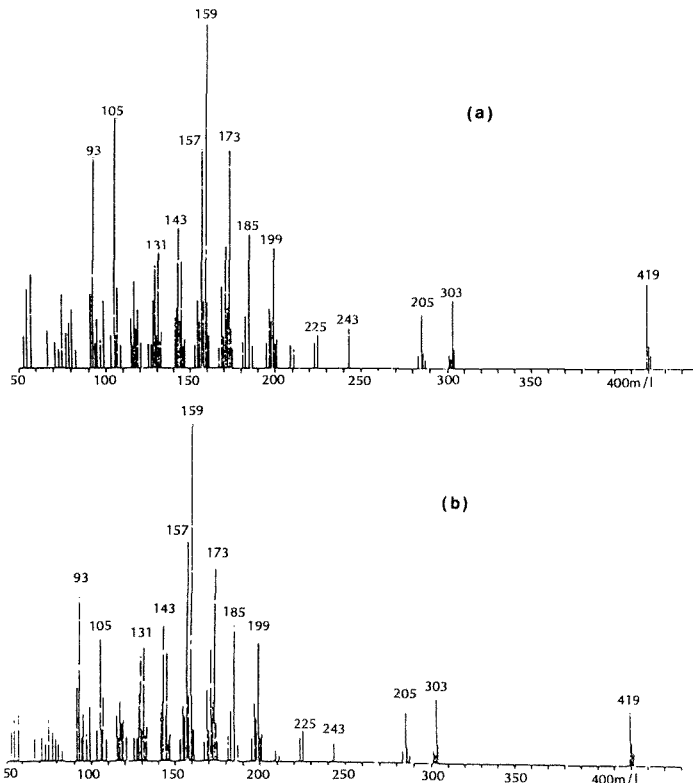


Fig. 5. Mass spectrum of monacolin obtained from *Monascus pilosus* M-15.  
 (a) monacolin standard, (b) monacolin from *M. pilosus* M-15

요 약

본 연구는 콜레스테롤 합성저해제인 monacolin을 생산하기 위하여 *Monascus* sp.에서 생산균주를 선발하고 생산조건을 검토하였다. *Monascus* sp. 중에서 *Monascus pilosus* M-15에 의하여 생산되는 monacolin의 생산조건은 최적 생산 배지로는 5% glycerin, 2% glucose, 0.5% corn steep liquor, 0.5% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O이었으며, 최적 pH는 6.0이었고, 25°C에서 10~20일간 배양하였을 때 monacolin을 추출하여 UV, IR, 및 GC/MS로 확인한 결과 표준품인 monacolin과 거의 비슷한 경향을 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 93년도 태평양 장학재단의 지원의 일부로 이루어진 것으로 감사의 뜻을 포함합니다.

문 헌

1. Suich, I. : Preparation of water soluble monascus pigment. *Patent, Japan*, **48**, 245 (1973)
2. Lin, C. F. : Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in submerged culture. *J. Ferment. Technol.*, **51**, 407 (1973)
3. Yoshimura, M., Yammanaka, S., Mitsugi, K. and Hirose, S. : Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 9 (1975)
4. Lin, C. F. and Suen, S. T. : Isolation of hyperpigment productive mutants of *Monascus* sp. F-2. *Ferment. Technol.*, **51**, 757 (1973)
5. Hiroi, T., Shima, T., Tsukioka, M. and Ogasawara, N. : Hyperpigment productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 9 (1975)
6. Tsukioka, M., Hiroi, T., Suzuki, T. and Konno, T. : Pigment production by mutants of *Monascus anka*. *Nippon Noeikagaku Kaishi*, **6**, 451 (1986)
7. Hiroi, T., Takahashi, T., Sima, T. and Suzuki, T. : Production of red koji in solid culture. *Nippon Noeikagaku Kaishi*, **55**, 1 (1981)
8. Ryu, B. H., Lee, B. H., Park, B. G., Kim, H. S. and Lee, J. H. : Production of red pigment by mutants of *Monascus anka*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 31 (1989)
9. Ryu, B. H., Lee, B. H., Park, B. G., Kim, H. S. and Roh, M. H. : Production of red pigment by using protoplast fusion of *Monascus anka*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 37 (1989)
10. Endo, A. : Monacolin, a new hypercholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *J. Antibiotics*, **33**, 334 (1980)
11. Endo, A. : Monacolin, a new hypercholesterolemic agent produced by *Monascus* sp. *J. Antibiotics*, **32**, 852 (1979)
12. Endo, A. : Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol lowering agents that inhibits HMG-CoA reductase. *J. Medicinal Chem.*, **28**, 402 (1985)
13. Kroon, P. A., Hand, K. M., Huff, J. N. and Alberts, A. W. : The effects of Mevinolin on serum cholesterol levels of rabbits with endogenous hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **44**, 41 (1980)
14. Kovanen, P. T., Bilheimer, D. W., Goldstein, J. L., Jaramillo, J. J. and Brown, M. S. : Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors *in vivo* in a dog. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 1194 (1981)
15. Bilheimer, P. W., Grundy, S. M., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. : Mevinolin and Colestipol stimulate receptor mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 4124 (1983)
16. 遠藤章 : 紅麴と紅麴菌をめぐる歴史と最近の動向. 醸酵と工業, **43**, 544 (1985)
17. 日刊工業新聞 : *Monascus* sp. による血圧降下製開發. 1號, p.929 (1992)
18. Wong, H. C and Koohlar, P. E. : Production and isolation of an antibiotic from *M. purpureus* and it's relationship to pigment production. *J. Food Sci.*, **46**, 589 (1981)

(1994년 10월 4일 접수)