

Monascus anka Y70이 생성하는 황색소의 항균 특성

이호재[†] · 박미연*

동의공업대학 식품생명과학과
*부경대학교 수산식품연구소

Antimicrobial Characteristics of Yellow-Pigment Produced by *Monascus anka* Y7

Ho Jae Lee[†] and Mi Yeon Park*

Dept. of Food and Biotechnology, Dongeui Institute of Technology, Busan 614-715, Korea
*Institute of Seafood Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

Antimicrobial activity of yellow pigment produced by *Monascus anka* Y7 (Y7) was studied. The crude yellow pigment of Y7 showed antimicrobial activity against some bacteria and yeasts. The diameter of inhibition zone against gram-positive bacteria was a little smaller than that of gram-negative bacteria to the crude yellow pigment. Especially, E2 fraction obtained from the crude yellow pigment by TLC method showed high antimicrobial activity against *E. coli*. The fraction had bright yellow pigment, showing fluorescent light and having the maximum absorption at 373 nm. Citrinin, a mycotoxin which had been characterized as an antimicrobial substance from a *Monascus* strain, was not detected in the E2 fraction and in the crude yellow pigment by the results of TLC and HPLC. This indicates that the antimicrobial activity of Y7 pigments did not any relationship with citrinin. Yellow degree (b/a of Hunters color value) of Y7 pigment was much higher than that of other natural colorants such as annatto, gardenia yellow and carthamus yellow. But the colors of all of the yellow pigments were similar by panels. Thus, the yellow pigment of Y7 could be used as a useful alternative colorant for food industry, having the advantage of antimicrobial activity.

Key words: *Monascus anka*, yellow pigment, antimicrobial activity, citrinin

서 론

홍국균(*Monascus* sp.)은 반자낭균과(*Hemiascomycetaceae*) 홍국균속(*Monascaceae*)에 속하며 약 70여종의 균주가 밝혀져 있다. 홍국균이 생성하는 색소는 한국, 대만, 동남아시아 등지에서 오랫동안 홍주와 홍두부 등의 착색에 사용되어온 물질로서 주로 수산연제품, 잼, 토마토케찹, 조미료, 식육 등 가공식품의 착색제로서 일본과 우리나라에서 상당량이 사용되고 있으며 소화불량, 이질 등의 질병 치료에도 응용되어 온 물질이다(1,2).

Monascus 색소의 항균활성은 *Monascus purpureus* 및 그 변이주가 생성하는 색소의 항균 특성에 관하여 최초로 보고된 바 있다(3). 이 보고에 의하면 *Monascus purpureus*가 식품의 주요 위해미생물들인 대부분의 *Bacillus* 속과 *Streptococcus* 속 및 *Pseudomonas* 속의 일부 균에 대하여 항균 활성을 나타내고 있으나 넓은 범위의 균주에 대한 항균 활성을 나타내지는 않았다. Kim 등(4)도 누룩에서 분리한 *Monascus* 속의 한 균주가 *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*,

Bacillus subtilis 등에 미약한 항균활성이 있다고 보고하였다. Nozaki 등(5)은 *Monascus anka*로부터 *E. coli*와 *B. subtilis*의 생육을 저해하는 Ankalactone을 분리한 바 있다.

한편 *Monascus* 균주들은 인류가 수 백년 이상 식용으로 사용하여 안전성에 별다른 문제점이 지적된 바 없으며 Kozumi 등(6)은 *Monascus* 색소가 rat와 mice에 대한 실험에서 독성이 없다고 보고하였다. Kim 등(7)의 mouse를 이용한 경구투여 시험과 Kim 등(4)의 용혈반응시험 및 mouse를 이용한 급성독성 시험 결과에서도 안전성에 문제가 없는 것으로 보고되었다. 또한 Suzuki(8)는 급성, 아급성, 독성, 변이원성 등 많은 연구 결과에서도 독성을 발견하지 못했다고 보고한 바 있다. 그러나 Blanc 등(9)은 *Monascus* 균주가 생산하는 항균물질인 Monascidin A가 mycotoxin의 일종인 citrinin인 것으로 확인한 바 있다.

Citrinin은 1931년에 *Penicillium citrinum*에서 최초로 분리된 곰팡이 독소로서(10) *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속의 여러 종에서 생성되며 돼지의 신장병 발병에 관여하고 있고 옥수수, 밀, 보리 등에 널리 오염되어 있어 사람이나

[†]Corresponding author. E-mail: hjlee@dit.ac.kr
Phone: 82-51-860-3170. Fax: 82-51-860-3331

동물에게도 만성질환을 유발할 수 있는 물질로 알려져 있다 (11). 따라서 *Monascus* 색소를 대체 색소자원으로 안전하게 이용하기 위해서는 색소 생성물 내에 citrinin 함유 여부를 반드시 검증할 필요성이 있다. 본 연구에서는 양질의 황색소 원을 확보하기 위한 연구의 일환으로 *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478로부터 UV조사와 NTG 처리에 의하여 분리한 변이주 *Monascus anka* Y7(12)이 생성하는 황색소가 지니는 항균활성 특성 및 citrinin 검출 시험을 실시한 바 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

조색소

Monascus anka Y7(12)을 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 30°C로 10일 동안 배양하여 평판 그대로 진공동결건조기(SDSF12L, 삼원냉열, Korea)에서 건조시켰다. 건조된 평판 30장을 15장씩 3 L 분액여두 2개에 나누어 넣고 70% 에탄올을 2 L 씩 사용하여 24시간 진탕 추출한 후 추출액을 모아 여과하고(Toyo No.1)여액을 회수하였다. 이 여액을 회전진공농축기로 농축하여 용매를 완전 제거한 다음 얻은 약 1.2 g의 시료를 50% 메탄올 3 mL로 용해시켜 조색소로(이하 조색소로 칭함) 사용하였다.

항균력 검사균주 및 배지

추출물의 항균력 실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* ATCC 1129, *Bacillus subtilis* ATCC 35421, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Candida bodinii* CBS 8106 과 *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1200을 사용하여 항균 spectrum을 검토하였다. 미생물의 배양에 사용된 배지는 모두 Difco사(USA) 제품을 사용하였다. 세균과 효모의 배양에는 nutrient broth(agar)와 YM broth를 각각 사용하였으며 항균력 측정용 배지로는 Mueller Hinton broth(agar)를 사용하였다.

항균력 검사

항균력 검사는 Vitor Lorian의 방법에 따라 디스크 확산법(Disk diffusion method)으로 항균력을 측정하였다(13,14). 미리 전배양한 시험균주의 배양액을 10⁶/mL 정도 되게 희석하여 무균적으로 조제된 Mueller Hinton agar 평판에 도달한 후 색소 시료를 40 µL 씩 흡수시킨 paper disc(Toyo Rashi Kaisha Ltd., 8 mm)를 얹어 세균은 35°C 그리고 효모는 30°C에서 1~2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 평판의 disk 주변에 형성된 투명환의 직경(mm)을 대조구와 비교하여 항균력을 조사하였으며, 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 조색소의 경우는 50% methanol(methanol : distilled water = 50 : 50, v/v)을 그리고 각 TLC 획분의 경우는 methanol을 대조구로 사용하였다.

항균성물질의 분리

조색소는 0.1 N 염산 용액을 이용하여 pH를 5.5 이하로 낮춘 후 chloroform으로 분액 추출한 다음 chloroform층을 분리하였다. 이 용액을 회전진공농축기로 농축하여 용매를 제거한 후 소량의 methanol로 용해시켜 분취용 박층크로마토그래피(silicagel 60, 0.5 mm, Merck)에 올려 혼합 이동상(ethylacetate-acetone-water, 4 : 4 : 1, v/v)으로 전개하여 각 분획의 항균 활성을 측정하였다.

HPLC 조건

항균성물질의 citrinin과의 동질성 여부를 확인하기 위한 HPLC(Hewlette Packard series 1100, USA) 조건은 다음과 같다. 즉 분석용 column은 SB C18 column(4.6×250 mm, Zorbax), 측정온도는 25°C 항온 조건, 이동상은 인산완충용액(pH 2.8)과 acetonitrile의 혼합 용매(60 : 40, v/v)를 1.0 mL/min 유속으로 흘려 형광검출기(λ_{ex}: 331 nm, λ_{em}: 500 nm)로 검출하였다. 내부 표준물질로 사용된 citrinin 표준품은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다.

색조분석

항균물질의 색조는 색차계(Minolta CR-300, Japan)로 측정하여 Hunter's system values(L, a, and b)로 나타내었다. 잘 알려진 천연 황색소인 아나토색소, 치자황색소, 홍화황색소를 선택하여 색소 특성을 비교, 분석하였다. 각 색소의 L값을 90정도로 희석한 후 a와 b값을 비교하여 황색소의 색조를 비교하였다.

결과 및 고찰

조색소의 항균활성

Monascus anka Y7이 생성하는 조색소는 Blanc 등(9)의 결과와 비슷하게 세균과 효모에 대하여 항균활성을 보였지만 그 양상은 매우 달랐다. 즉 그람 양성균보다 그람 음성균에 대한 항균 활성이 더 크게 나타났으며 *Candida* 등과 같은 효모에 대해서도 항균활성을 나타냈다(Table 1). 특히 Blanc 등(9)의 결과에서는 추출된 조색소가 *E. coli*에 대해서는 항균활성이 전혀 없는 것으로 보고되었으나 Y7의 조색소는 *E. coli*에 대한 항균 활성이 높고(Fig. 1) *Enterobacter aerogenes*에 대한 항균 활성도 나타났다. *Monascus* 색소는 *Bacillus*속, *Streptococcus*속 그리고 *Pseudomonas*속에 대한 항균 활성이 알려져 있고 (3), 국내에서는 Mah and Hwang (15)과 Park 등(16)이 30주의 *Monascus* sp.를 대상으로 항균성을 검색한 결과 적색소를 생성하는 3주에서 항균 활성이 있다는 것을 밝힌 바 있으나 *E. coli* 및 *Enterobacter aerogenes*에 대한 활성이 없다고 보고한 바 있다. Nozaki 등(5)만이 *Monascus anka*로부터 *E. coli*와 *B. subtilis*의 생육을 저해하는 Ankalactone을 분리한 바 있다. 또한 이들 대부분의 항균물질이 monascidine A(3)를 제외하면 대부분이 적

Table 1. Antimicrobial activity of yellow pigment produced by *Monascus anka* Y7

Classification	Microorganisms	Growth inhibition	
Gram -	<i>Escherichia coli</i> ATCC1129	+++	
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	+	
	Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC35421	++
		Gram +	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090			+
Yeast	<i>Candida bodinii</i> CBS8106	++	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS1200	-	

Growth inhibition size of clear zone: +++, larger than 14 mm; ++, 10~14 mm; +, smaller than 10 mm.

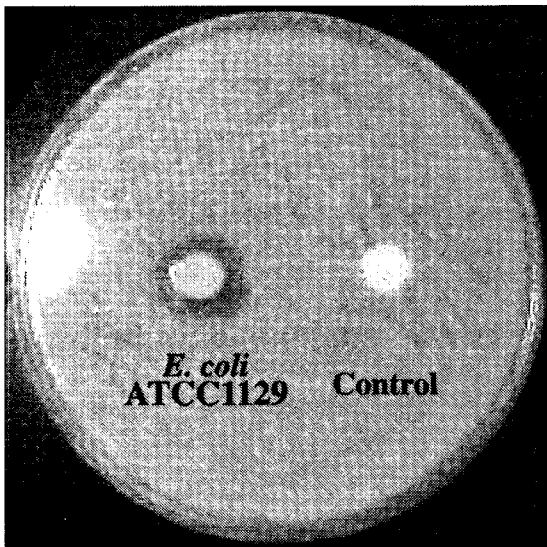


Fig. 1. Antimicrobial activity of the yellow pigment of *Monascus anka* Y7.

색소에 해당하는데 반하여 Y7의 조색소는 황색소이면서 식품의 오염 지표미생물인 장내세균 및 대장균에 대한 항균활성을 나타내고 있으므로 식품의 보존제 및 착색제 소재로서 매우 유용할 것으로 사료된다. 항균 물질의 분리, 농축을 위하여 chloroform과 물을 사용하여 분액 추출한 결과 항균성을 나타내는 chloroform층 분획을 분취용 박층 크로마토그래피로 분리하여 조색소에 대하여 가장 높은 항균 활성을 보인 *E. coli* ATCC 1129 균주를 대상으로 항균활성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 조색소의 분획결과 총 8개의 분획을 얻었으며 이 중 4개의 분획(E2, E4, E7, E8)은 자외선 조사시 형광이 감지되었고 5개의 분획(E1, E2, E4, E6, E7)에서 항균 활성을 보였다. 이 중 특히 형광을 나타내며 밝은 황색조를 띄고 있는 E2 분획의 항균활성이 크게 나타났다. E2 분획은

Table 2. Antimicrobial activity of TLC fractions against *E. coli* ATCC 1129

Fractions	R _f value	Growth inhibiting ¹⁾	Hue ²⁾
E1	0.80	+	YG
E2	0.73	+++	bY, F
E3	0.64	-	dY
E4	0.55	++	Yb, F
E5	0.49	-	Yp
E6	0.44	+	Yp
E7	0.40	++	F
E8	0.33	-	F
DW ³⁾		-	Y
Citrinin	0.58		Y, F

¹⁾Growth inhibition size of clear zone: +++, larger than 14 mm; ++, 10~14 mm; +, smaller than 10 mm larger than 14 mm; ++, 10~14 mm; +, smaller than 10 mm.

²⁾Yg (yellow greenish), bY (bright yellow), dY (dark yellow), Yb (yellow brownish) Yp (yellow pinky), F (fluorescent).

³⁾Distilled water layer of the extract.

가장 넓은 밴드를 형성하여 조색소의 주성분을 이루고 있는 분획인 점을 감안할 때 조색소의 항균활성 특성을 대표하는 성분으로 사료된다.

Citrinin 검출실험

Monascus 속이 생성하는 색소는 수 백년 동안 식용으로 이용되어 왔고 또 안전성에 관련된 기존의 연구들을 통하여 안전한 물질로서 인정되었으나(6-8), Blanc 등(9)에 의하면 적색소를 생성하는 균주인 *M. ruber*와 *purpureus*가 생성하는 monascidin A가 곰팡이 독소인 citrinin임이 보고된 바 있다. 따라서 항균성을 나타내는 *Monascus anka* Y7의 황색소 내에 citrinin이 생성되는지를 확인하기 위하여 각 TLC 분획의 전개 특성을 비교한 결과 조색소 성분 중에는 citrinin(R_f 0.58)과 동일한 R_f값을 지닌 분획이 확인되지 않았다(Table 2). 또한 각 TLC 분획의 citrinin 동질성 확인을 위하여 HPLC를 이용하여 분석을 실시하였다. Citrinin은 형광 검출기에서 검출감도가 매우 높는데 분석 pH에 따라서 검출 감도에 영향을 받으며 특히 산성 영역에서의 감도가 가장 좋은 것으로 알려져 있다(17). 본 실험에서는 예비실험 결과 pH 2.8에서 citrinin의 검출 감도가 pH 5.0에서의 약 10배 정도의 고감도를 나타냈으며 UV검출기에 비하여 형광 검출기가 약 3배 정도로 검출 감도가 높았다(data 미공개). 그러나 이 pH 조건에서 형광 검출기를 사용하여 HPLC분석을 실시한 결과 *Monascus anka* Y7의 조색소에서 citrinin이 검출되지 않았으며 황색소의 주류를 이루는 E2 분획, citrinin과 R_f 값이 유사한 E4분획을 비롯한 모든 TLC 분획에서도 citrinin이 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 10⁻⁶M의 citrinin을 조색소에 혼합하여 분석한 크로마토그램을 통하여서도 citrinin이 생성되지 않음을 재 확인할 수 있어 *Monascus anka* Y7이 생성하는 황색소는 citrinin 독성으로부터 안전함을 확인하였다. 그러나 citrinin을 생성하는 *Monascus*속의 일부 좋은 배지조성 및 배양조건에 따라서 그 생성능이 변화

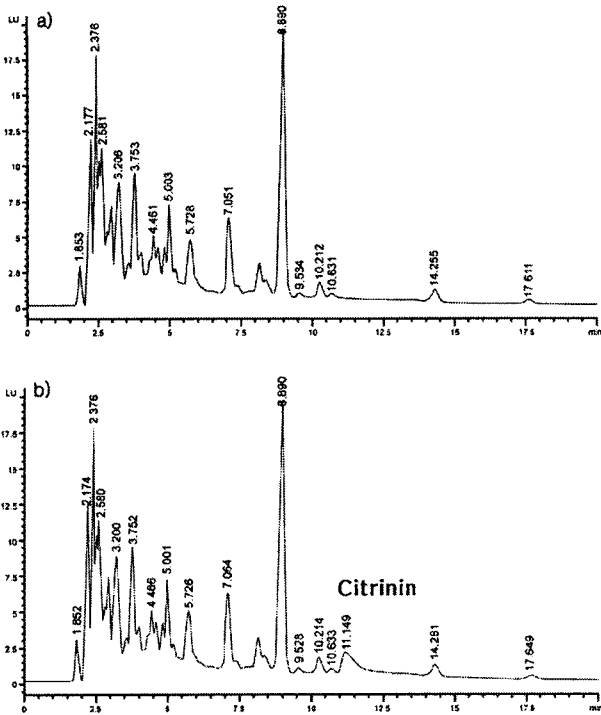


Fig. 2. HPLC chromatograms of Y7's crude pigments; (a) non spiked, and (b) spiked with 1.0×10^{-6} M citrinin. All signals were detected at 331 nm with fluorescence detector ($\lambda_{ex} = 331$ nm and $\lambda_{em} = 500$ nm). Analytical column was SB C₁₈ column (4.6 × 250 mm, Zorbax), mobile phase was a mixture of phosphate buffer (pH 2.8) and acetonitrile (60 : 40, v/v) and the flow rate was 1.0 mL/min.

될 수 있으므로 색소의 산업화를 위해 배지조성을 변경할 때마다 citrinin 생성 여부를 확인하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

항균물질의 색조분석

Monascus anka Y7의 조색소 조성물 중 항균활성을 가장 크게 나타내는 E2 분획의 spectrum은 Fig. 3과 같았다. E2 분획은 373 nm에서 주된 흡광 특성을 보이고 있으나 흡수 파장 범위가 장파장 부위로 넓어져 있어 외관상 진한 밝은 황색을 나타내고 있었다. 이는 조색소의 주된 흡광 특성과 일치하는 것으로서 조색소의 주 색소단과 항균 활성 성분의 색소단이 밀접하게 관련되어 있을 것으로 사료된다. Monascus가 생성하는 황색소는 monascin (λ_{max} 390 nm) (18)과 ankaflavin (λ_{max} 382 nm) (19)의 구조가 알려져 있으나 이들과는 흡광 특성 및 극성이 상이한 것으로 보아 발색단의 구조가 다를 것으로 판단되며 구조분석 연구를 통한 물질규명 연구가 진행되어야 할 것이다. 한편 단파장 부위의 흡광도가 증가된 것은 E2 분획이 지니고 있는 형광 특성과 관련되어 있을 것으로 사료된다. E2 분획의 색조를 식품에 일반적으로 사용되고 있는 천연황색소인 치차황색소, 아나토색소, 홍화색소와 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. E2 분획은 황색도 (b/a)가 매우 높아 원색소 자원으로서 좋은 조건을 지니고

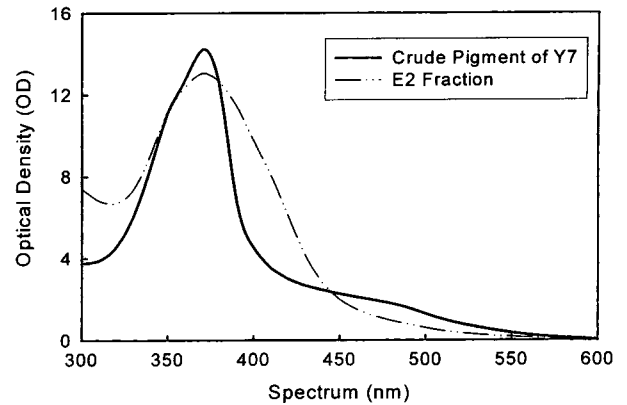


Fig. 3. UV-Visible absorption spectra of pigments.

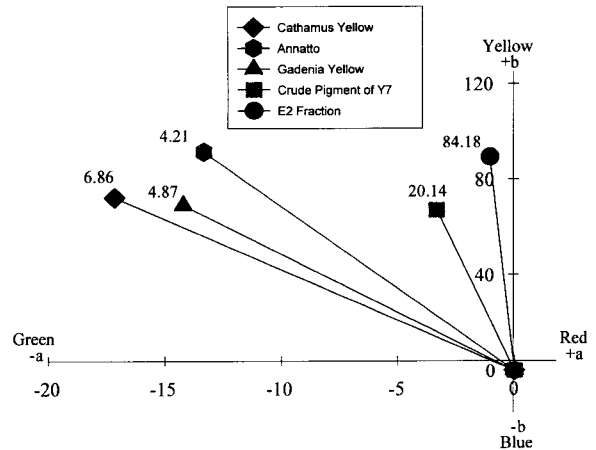


Fig. 4. Yellow degree of Y7's pigment.

있고 기존의 이들 색소와 유사한 색조를 나타내고 있었다. 이상의 결과로 Monascus Y7이 생성하는 황색소는 citrinin 과는 무관한 항균기능을 지니고 있으며 밝은 황색을 띄고 있으므로 항균성을 보유한 대체 황색소로서의 가치가 높을 것으로 사료된다. 향후에는 이들 항균물질의 생산 최적화와 다양한 식품에 대한 적용연구 등이 진행되어야 할 것으로 생각되어진다.

요 약

Monascus anka Y7이 생성하는 황색소의 항균활성 특성을 규명하였다. Y7의 조황색소는 그람 양성균보다 그람 음성균에 대한 항균 활성이 더 크게 나타났으며 Candida 등과 같은 효모에 대해서도 항균활성을 나타냈다. 특히 황색소의 항균성분 중 TLC로 분리한 E2 분획은 E. coli에 대한 항균활성이 크며 373 nm에서 주된 흡광 특성을 보이고 있고 흡수 파장 범위가 장파장 부위로 넓어져 있어 외관상 진한 밝은 황색을 나타내는 형광색소이다. Y7의 조색소 및 각 TLC 분획의 HPLC 분석 결과 citrinin이 검출되지 않았다. 이는 Y7의 항균 특성이 최근 Monascus 색소에서 안전성의 논란이

되고 있는 citrinin과는 무관한 것을 의미한다. 한편 E2 분획을 주로하는 조황색소는 식품에 일반적으로 사용되고 있는 천연황색소인 치자황색소, 아나토색소, 홍화색소보다 황색도(b/a)가 매우 높고 이들 색소와 유사한 색조를 나타내므로 항균성을 보유한 대체 황색소로서의 가치가 높을 것으로 사료된다.

문헌

- Lin CF. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J Ferment Technol* 51: 407-414.
- Carels M, Shepherd D. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture. *Can J Microbiol* 23: 1360-1372.
- Wong HC, Bau YS. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus* Went. *Plant Physiol* 60: 578-581.
- Kim HS, Chang U, Son CH, Bae JC, Yu JH. 1980. Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2 (part 3) Safty test of yellow pigment. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 9: 167-172.
- Nozaki H, Date S, Kondo H, Kiyohara H, Takaoka D, Tada T, Nkayama M. 1991. Ankalactone, a new α, β -unsaturated γ -lactone from *Monascus anka* *Agric Biol Chem* 55: 899-900.
- Koizumi K, Niwayama S, Nitahara Y, Miyamura S. 1978. Toxicity of *Monascus* pigment. *Niigata Igakkai Zasshi* 92: 815-820.
- Kim CS, Ree SH, Kim I. 1977. Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by mold (*Monascus* sp.). *Korean J Food Sci Technol* 9: 277-283.
- Suzuki H. 1988. Application of *Monascus* pigment to processed food. *New Food Industry* 30: 20-24.
- Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International J Food Microbiology* 27: 201-213.
- Hetherington AC, Raistrick H. 1931. Studies in biochemistry of microorganisms XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Phil Trans R Soc Lond B* 220: 269-297.
- Scott PM, van Walbeek V, Kennedy B, Anyeti D. 1972. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J Agric Food Chem* 20: 1103-1107.
- Lee HJ. 2002. Characterization of yellow pigments produced by a *Monascus anka* mutant Y7. *PhD Thesis*, Seoul National University.
- Jeong ET, Park MY, Lee EW, Park UY, Chang DS. 1998. Antimicrobial characteristics against spoilage microorganisms and food preservative effect of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) bark extract. *Korean J Life Science* 8: 648-653.
- Jeppesen VF, Huss HH. 1993. Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *Inter J Food Microbiol* 18: 305-320.
- Mah JH, Hwang HJ. 1996. Screening of *Monascus* strains for antimicrobial activity and effect of change of nutrients and incubation conditions on antimicrobial activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 1080-1086.
- Park SY, Mah JH, Choi YI, Kim DH, Hwang HJ. 1999. Optimization of red pigmentation and effect of the metabolites produced by *Monascus* strains on microbial and colorization in processed ham. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 172-178.
- Franco CM, Fente CA, Vazquez B, Cepeda A, Lallaoui L, Prognon P, Mahuzier G. 1996. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *J Chromatography A* 723: 69-75.
- Fielding BC, Holker JSE, Jones DF, Powell ADG, Richmond KW, Robertson A, Whalley WB. 1961. The chemistry of fungi part 39. The structure of monascin. *J Chem Soc* 4579-4589.
- Manchand PS, Whalley WB, Chen FC. 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. *Phytochemistry* 12: 2531-2532.

(2002년 1월 30일 접수; 2002년 3월 28일 채택)