

보리를 이용한 *Monascus* sp. EBF1 고상발효에 의한 기능성 적색 색소 생산

조창현 · 서동진 · 우건조¹ · 강대경*

(주)이지바이오시스템 생물자원연구소, ¹식품의약품안전청 식품미생물과

Functional Red Pigment Production in Solid-state Fermentation of Barley by *Monascus* sp. EBF1. Chang-Hyun Cho, Dong-Jin Seo, Gun-Jo Woo¹, and Dae-Kyung Kang*. Bio-Resources Institute, EASY BIO System, Inc, Korea, ¹Division of Food Microbiology and GMO, Korea Food and Drug Administration. – The time-dependent changes of red pigments production in solid-state plant scale fermentor using barley cultured with *Monascus* sp., instead of rice which was traditionally used, were investigated in this study. A steady increase in the yield of red pigments in barley occurred between the 3rd and 6th days. The optimized conditions (inoculation volume = 6~8%, initial pH = 6, air supply = 0.6~0.8 vvm) promoted the production of red pigments. Short-time steaming of barley (< 20 min) decreased fungal growth and pigments production due to the insufficient gelatinization. The optical density of the red pigments under the optimized conditions was 120 at 500 nm per gram of barley. In addition, the metabolites from the fermented barley with *Monascus* sp. showed antibacterial effects against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Barley was shown to be one of the best grain sources for solid-state fermentation with *Monascus* sp., for obtaining natural pigments and also functional food materials.

Key words: *Monascus*, red pigments, barley, solid-state fermentation

빨강누룩곰팡이로도 알려져 있는 *Monascus*속 곰팡이인 홍국균(紅麴菌)은 반자낭균과(*Hemiascomycetaceae*) 중의 홍국균속(*Monascaceae*)으로서 균사가 붉은색을 띠기 때문에 홍국균이라고 불리워진다. 홍국(beni-koji)는 예로부터 쌀을 원료로 하여 홍국균을 접종, 발효하여 제조해 왔는데, 중국을 포함한 동남아에서는 홍유부, 고기나 야채의 절임 식품 재료 등의 천연 착색제, 보존제로서 뿐만 아니라, 알콜생산 능력이 뛰어나기 때문에 술(紅酒) 제조용의 양조용균으로도 이용되어 왔다[2, 9].

국내에서는 1970년대 말부터 액체배양을 통한 홍국색소의 대량생산에 관한 연구가 시작되었다[6]. 홍국색소의 대량 생산은 주로 균주개량[7, 8] 및 액체배양조건의 적정화[6, 13, 15]를 중심으로 연구되어 왔으며, 박 등[12]은 육제품에 사용되는 아질산염의 대체물로서 *Monascus* 유래의 적색색소의 적용에 대한 연구를 보고한 바 있다.

한편, 홍국배양물은 천연색소로서의 기능 뿐만 아니라, 배양중에 생성되는 다양한 이차대사산물이 유용한 생리활성효과가 있는 것으로 알려지고 있는데, 대사산물중의 하나인 Monacolin K는 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈압강화작용, 혈당저하작용, 항암효과 등이 있음이 보고되고 있다[3].

최근 들어 소비자들의 건강에 관한 관심의 증가와 더불어

홍국의 기능성이 부각되면서, 홍국쌀의 대규모 고상배양 기술 개발 및 상업화가 연구기관 및 기업체를 중심으로 활발해지고 있다. 한편, 보리는 쌀보다 가격이 저렴하면서도 영양적으로 우수할 뿐만 아니라, 보리쌀에 들어있는 높은 함량의 베타 글루칸은 변비에방 및 콜레스테롤 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 보리는 쌀에 비해 농약을 거의 사용하지 않을 뿐만 아니라 전세계적으로 보리가 재배되는 지역이 우리나라를 포함하여 몇몇 지역에 한정되어 있기 때문에 쌀 및 보리시장이 개방되더라도 국제경쟁력을 갖출 수 있다는 장점을 가지고 있다.

이러한 보리의 장점을 활용한 홍국의 대규모 고상배양 시스템이 아직 국내외적으로 확립되어 있지 않기 때문에, 본 연구에서는 국내산 보리를 원료로 한 홍국의 고체발효에 관한 연구결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용 균주

국내외에서 수집한 홍국으로부터 분리하여 (주)이지바이오시스템 생물자원연구소에서 보관중인 균주 10여종 중에서 색소생산능력이 우수하고 citrinin 독소를 생산하지 않는 *Monascus* sp. EBF1 균주를 1차 선별하였고, 자외선 돌연변이를 통해 적색색소 생산능이 개선된 균주를 2차 선별하여 본 실험에 사용하였다.

배지 조성 및 전배양

*Corresponding author

Tel. 82-31-454-2884, Fax. 82-31-451-2774

E-mail: daekyung@easybio.co.kr

전배양용 액상배지의 조성은 soluble starch 2.5%, rice powder 2.0%, NaNO₃ 0.15%, MgSO₄ 0.55%, KH₂PO₄ 0.1% 이며(초기 pH 6.0), 멸균한 액상배지가 든 Erlenmeyer flask에 *Monascus* sp. 포자액 1%(v/v)를 접종한 후에 30°C에서 150 rpm으로 3일간 왕복 진탕배양하였다.

본 배양

1 M/T 규모의 고상발효기에 batch당 500 kg의 국내산 보리를 투입하여 각 조건별로 침지, 증자한 후에 전배양한 액상종균을 투입하고 고상발효실험을 진행하였다. 고상발효기의 기본교반횟수는 분당 10회, 배지의 초기수분은 40~42%, 초기배양온도를 28°C로 설정하였으며, 배양 3일후부터는 배양온도를 33°C로 고정하고 상대습도 70~80도를 유지하면서 증자조건, 공기투입량 및 접종량 등에 따른 적색색소의 생산량의 변화를 관찰하였다.

색소의 추출 및 정량

고상발효물 10 g과 동량의 ethanol 용액을 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C의 reciprocal shaker에서 150 rpm으로 2시간동안 교반하여 색소를 추출하였다. 이를 5,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후, membrane filter (cellulose nitrate, pore size 0.45 μm, diameter 25 mm)로 여과하여 색소추정에 사용하였다. 여과한 액을 500 nm에서 흡광도(UV-PC1601 Spectrophotometer, Shimadzu Co, Japan)를 측정하여 적색색소의 양으로 나타내었다[4]. 색소의 발현 시점은 적색색소를 기준으로 하였으며, 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 흡광도 0.1 이상일 경우를 색소발현 시점으로 설정하였다.

잔류당 분석

Monascus sp.를 접종하여 고상발효한 홍국보리를 배양시간별로 취한 후, 60°C에서 수분 10% 이하가 될 때까지 건조시키고 60 mesh 이하로 분쇄하였다. 분쇄한 시료 적정량을 취한 후, DNS법에 의해 환원당의 함량을 측정하였다[10].

항균력 측정

멸균 펩톤수(0.1%, pH 7)에 지시균 배양액(1%, w/w)과 함께 발효가 완료된 홍국보리를 1%(w/w) 첨가하고, 37°C에서 배양하면서 배양시간별로 시료를 취한 후 LB plate에 도말하여 지시균의 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

종균의 접종량에 따른 고체배양물의 색소발현 시점

종균의 접종형태로는 고상형태 또는 액상형태의 접종이 있으나, 본 실험에서는 균일한 접종이 가능하고 배양이 용이한 액상형태의 접종을 실시하였다. 종균의 최소 접종량을 결정

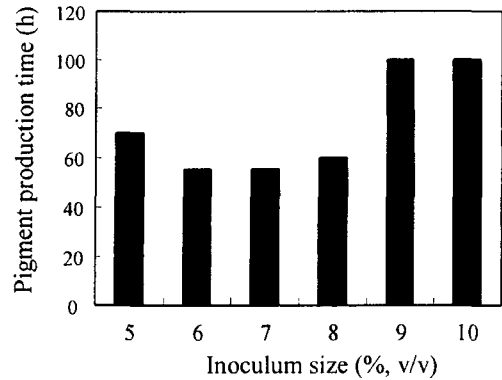


Fig. 1. Effect of inoculum size on red pigments production time in solid-state fermentor.

하기 위하여, 종균의 접종량에 따른 색소 생산량에 대하여 알아보았다. 28°C에서 3일간 배양한 액상종균을 고상배지의 종량대비 5~10%까지 접종하여 7일 동안 배양한 후에 색소 생산량의 차이를 관찰하였다. 색소의 발현은 적색색소를 기준으로 하였으며, 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 흡광도 0.1 이상일 경우를 색소발현 시점으로 설정하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 종균의 접종량이 6~8% 사이일 경우에는 배양후 55~60시간만에 색소 생산이 시작되었다. 접종량이 5% 이하일 경우에는 색소생산 시작시점이 70시간 이후로 늦어지는 것으로 나타났는데, 이는 접종균이 적정 수준으로 성장하는데 시간이 소요되기 때문인 것으로 추정된다[11]. 한편, 9% 이상 접종시에는 오히려 색소발현 시점이 90시간 이후로 늦어졌는데, 이는 과도한 초기균체량이 색소 생산에 필요한 기질을 소모했기 때문인 것으로 추정된다[11].

증자조건 최적화

증자(steaming)는 침지한 고상배지에 증기를 가해서, 배지의 살균효과와 더불어 배지원료의 소화도를 증가시킴으로써 접종균의 원활한 성장 및 효소분비작용을 돕기 때문에, 적정 증자조건을 설정하는 것이 중요하다. 고상배지 원료인 보리를 상온에서 1시간동안 침지하고 105°C에서 10분 간격으로 60분까지 증자한 후, *Monascus* sp. 배양액을 6% 접종하여 배양하면서 색소발현 시점을 확인하였다. 색소발현 시점은 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 흡광도 0.1 이상일 경우를 색소발현 시점으로 설정하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 증자시간이 20분 이하일 경우에는 색소발현 시점이 60시간 이후였는데, 이는 보리가 충분히 소화되지 못함으로써 배지 내부로 균사침투가 완전히 이루어지지 않았기 때문인 것으로 추정된다. 증자시간이 30~40분 사이일 경우에는 색소발현 시점이 45시간 내외로 빨라졌다. 그러나, 50분 이상 증자하였을 경우에는 오히려 색소생산 시점이 늦어졌는데, 이는 지나친 증자로 인하여 원료의 영김 현상이 발생하여 고상배양시 산소가 원활히 공급되지 않음으로써 균일한 미생물 성장을 저해하기 때문인 것

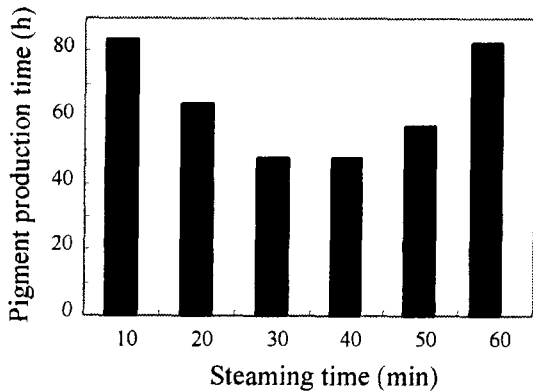


Fig. 2. Effect of steaming time of barley on red pigments production time in solid-state fermentor.

으로 판단되었다.

공기공급량에 따른 색소생산능 비교

고상발효에서 고려해야 할 주요 변수중의 하나는 공기공급량이다. 액상발효시는 교반과 멸균공기의 투입으로 충분한 통기량을 확보할 수 있으나, 고상발효시는 원료배지 자체의 무게와 증자한 배지의 점착성으로 인해 대량배양시에 내부까지 공기전달이 어려운 문제점이 있다. 특히, 균사를 형성하는 곰팡이 발효시에는 대사에 의해 발생하는 CO₂ 및 발효열을 효과적으로 치환할 수 있어야만 집중한 균의 활발한 성장 뿐만 아니라 색소를 포함한 각종 대사산물의 생산이 원활해질 수 있다. 본 실험에서는 증자한 보리를 원료로 한 고상배지에 *Monascus* sp. 종균을 접종한 후에 7일간 배양하여 색소 생산량을 측정하였다. 색소 생산량은, 적색 색소를 기준으로 분광광도계를 이용하여 500 nm에서의 흡광도로써 나타내었다. 통기 조건에 있어서, 고상배지의 무게에 대한 투입 공기량의 부피를 기준으로 각각 0.2~1.0 vvm(air volume / medium volume / min)까지 투입하였다.

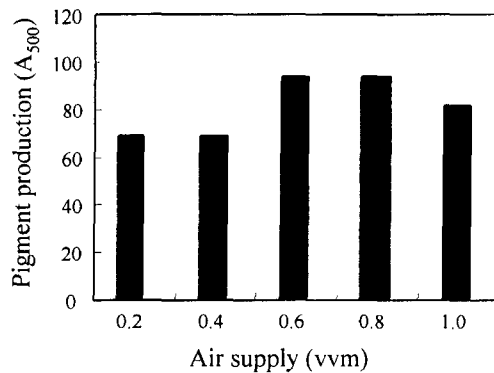


Fig. 3. Effect of supplied air volume on red pigments production in solid-state fermentor. Red pigment content was calculated after fermentation for 7 days. vvm:air volume/medium volume/min.

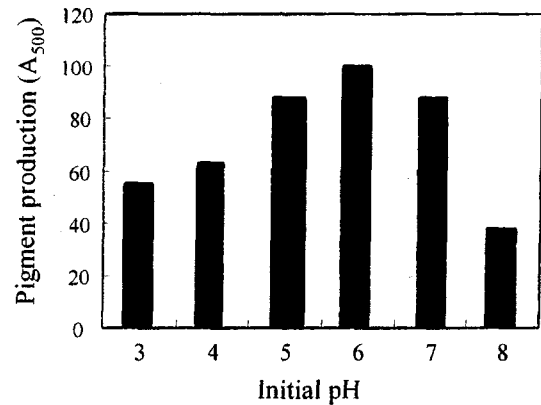


Fig. 4. Effect of initial pH on red pigments production in solid-state fermentor. Red pigment content was measured after fermentation for 7 days.

그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 공기 공급량이 0.6~0.8 vvm 정도가 색소의 생산에 유리함을 알 수 있었다. 한편, 공기공급량이 0.4 vvm 이하일 경우에는 배지 내부로의 산소공급이 원활하지 않기 때문에 색소 생산이 지연되는 것으로 추정되었으며, 공기공급량이 1.0 vvm 이상일 경우에는, 오히려 발효온도 및 배지의 수분 유지가 어려운 문제점이 발생하기 때문에 색소생산에 역효과를 줄 수 있음을 알 수 있었다.

고상배지의 초기 pH에 따른 홍국균의 성장 패턴

Monascus sp.에 의한 색소생산은 배지의 조성이나 초기 pH에 의해 영향을 받는다고 보고되고 있다[2]. 특히, 배지의 초기 pH는 균주의 성장에 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 오염균의 번식에도 영향을 줄 수 있다. 본 실험에서도 고상배지인 보리의 초기 pH가 *Monascus* sp.의 색소생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 침지단계에서 0.1N lactic acid 또는 0.1N NaOH 용액으로 배지의 pH를 3~8의 범위로 조정하였다. *Monascus* sp. 액상배양액을 동일량씩 접종한 후에 배양하면서, 적색색소의 생산량을 분광광도계를 사용하여 500 nm에서의 흡광도로써 비교하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 고상배지의 초기 pH를 6으로 조절하였을 때 균사 성장과 색소발현능력이 가장 우수하였으며, pH 5 이하 또는 pH 7 이상에서는 상대적으로 집중균의 생장이 억제되면서 색소의 발현 시점도 지연되었다. 이 결과는 액상배지에서의 초기 pH의 효과를 조사한 강 등[5], 박 등[12]의 보고와 유사하였다.

고상배양 시간에 따른 색소량과 환원당의 변화

앞의 실험을 통하여 적정화된 조건에서 고상발효실험을 실시하면서 배지의 환원당 및 색소발현량의 변화패턴을 비교하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 환원당은 배양초기의 4% 수준에서 배양 3일후부터 집중균의 성장과 더불어 급격

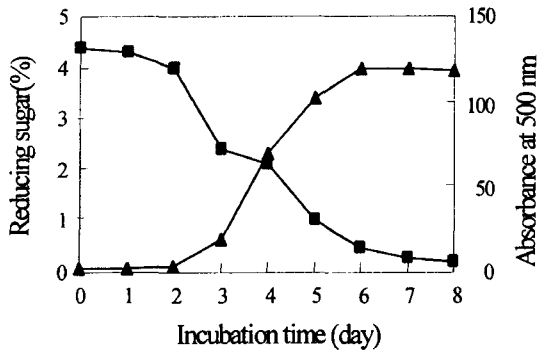


Fig. 5. Changes in the contents of reducing sugar and red pigments content during solid-state fermentation. ■ : reducing sugar, ▲ : red pigments.

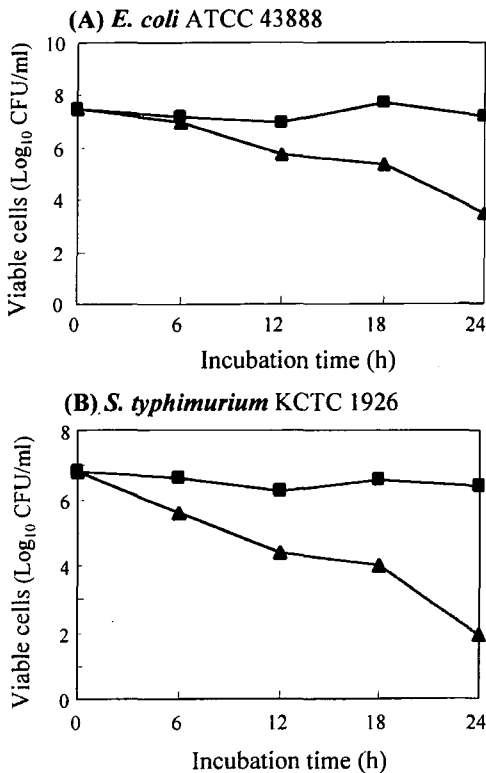


Fig. 6. Inhibitory effect of red barley fermented by *Monascus* sp. against *E. coli* ATCC 43888. (A) *S. typhimurium* KCTC 1926, (B) ■ : control, ▲ : red barley.

히 소모되기 시작하였으며, 적색색소의 생산량도 환원당이 50% 이상 소모되는 배양 3일후부터 급격히 증가하기 시작하였다. 적색색소의 최대생산량은 O.D₅₀₀ 기준으로 125로 이미 보고된 소규모 액상배양실험 결과 [5, 12]와 비교하여 매우 높은 수준이었다.

항균력 시험

홍국 균주와 색조에 따라서 다양한 항균성물질이 생산되는 것으로 알려져 있기 때문에, 위에서 언급한 제조공정에 따라 고상발효한 홍국보리를 이용하여 *Escherichia coli*,

*Salmonella typhimurium*에 대한 항균효과 유무를 관찰하였다. 멸균 펩톤수(0.1%, pH 7)에 지시균 배양액 1%(w/w)과 함께 발효가 완료된 홍국보리를 1%(w/w) 첨가하고, 37°C에서 배양하면서 지시균의 성장여부를 측정된 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 지시균으로 사용한 *E. coli*, *S. typhimurium* 모두 발효한 홍국보리에 의해 생장이 저해됨을 확인하였다.

*Monascus*가 생산하는 monascorubin과 rubropunctatin가 *E. coli*와 *B. subtilis*의 생육을 저해하는 항균작용의 기능성 물질로 보고된 바 있으며[14], 또 균주에 따라 배양중에 생성되는 citrinin 독소에 의한 효과도 알려져 있으나[1], 본 실험에서 사용한 균주의 배양물에서는 citrinin이 검출되지 않았기 때문에 항균효과를 주는 물질에 대한 규명실험이 진행 중이다.

요 약

쌀대신에 보리를 이용한 *Monascus* 고상배양의 기본적인 발효 특성을 연구함을 통하여, 대규모 고상배양 시스템을 통한 천연 적색색소의 생산 가능성을 검토하고자 하였다. 색소의 생산은 고상배양 3일후부터 6일까지 꾸준한 증가추세를 나타내었다. 종균의 접종량이 6~8% 사이일 경우에는 배양후 60시간만에 색소생산이 시작되었으며, 접종량이 5%이하일 경우에는 색소생산이 70시간 이후로 늦어지는 것으로 나타났다. 보리 배지를 30~40분 동안 증자할 경우에는 색소 발현 시점이 45시간 내외로 단축되었으며, 증자시간이 20분 이하일 경우에는 배지의 불충분한 호화로 인하여 색소생산 시점이 길어졌다. 공기공급량이 0.6~0.8 vvm 사이에서 홍국균의 성장 및 색소의 생산이 활발히 일어났고, 고상배지의 초기 pH를 6으로 조절했을 때 균사성장과 색소발현 능력이 가장 우수하였다. 한편 고상배양으로 7일동안 발효한 홍국보리를 사용하여 식중독미생물에 대한 항균여부를 확인한 결과, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*의 성장을 저해함을 확인하였다. 이상과 같이, 보리를 원료로 한 대규모 고상발효 시스템을 활용함으로써 *Monascus* sp. 유래의 천연색소 및 대사산물의 대량생산 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 중소기업청 중소기업 기술혁신과제 연구사업비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Blanc, P. J., J. P. Laussac, J. Le Bars, M. O. Loret, A. Pareilleux, D. Prome, J. C. Prome, S. L. Santerre, and G. Goma. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Internat. J. Food Microbiol.* 27: 201.

2. Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* sp. in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1360-1372.
3. Endo A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. of Antibiotics (Tokyo)*. **32**:852-854.
4. Ju, J.-H., H.-W. Nam, J.-C. Yoon, and C.-S. Shin. 1994. Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 85-91.
5. Kang, S.-K. and S.-T. Jung. 1995. Pigment production and color difference of liquid beni-koji under submerged cultural conditions. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 472-478.
6. Kim, H. S., D. H. Kim, H. S. Yang, Y. R. Pyun, and J. H. Yu. 1979. Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. in submerged culture. Part I. Isolation of strain and cultural conditions of pigment produced. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **7**: 23-30.
7. Kim, J.-S., K.-H. Choi, J.-Y. Choi, Y.-S. Lee, Y.-Y. Chang, and I.-K. Kwon. 1993. Induction of a mutant, *Monascus anka* 732Y3 from *Monascus anka* KFCC 11832 and its morphological observations. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 134-138.
8. Lee H. J. and H. J. Lee. 2002. Isolation and characteristics of yellow-pigment producing mutants of *Monascus anka*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 111-115.
9. Lin, C. F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* **51**: 407-414.
10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
11. Mudgett, R. E. and A. J. Paradis. 1985. Solid-state fermentation of natural birch lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Technol.* **7**: 150-154.
12. Park, S.-Y., J.-H. Mah, Y.-I. Choi, D.-H. Kim, and H.-J. Hwang. 1999. Optimization of red pigmentation and effect of the metabolites produced by *Monascus* strains on microbial inhibition and colorization in processed meat. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 172-178.
13. Shin C. S., H. J. Kim, M. J. Kim, and J. Y. Ju. 1998. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 576-582.
14. Wong, H. C. and Y. S. Bau. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus* Went. *Plant Physiol.* **60**: 578-581.
15. Yoshimura, M., S. Yamanaka, S. Mitsugi, and K. Hirose. 1975. Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1789-1795.

(Received May 30, 2002/Accepted Sep. 2, 2002)