

*Monascus anka*로부터 황색소 생성 변이주의 분리 및 특성

이호재* · 이형주¹

동의공업대학 식품생명과학과, ¹서울대학교 식품공학과

Isolation and characteristics of yellow-pigment producing mutants of *Monascus anka*. Lee, Ho Jae* and Hyong Joo Lee¹. Department of Food and Biotechnology, Dongeui Institute of Technology, Pusan 614-715, ¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea – To produce yellow pigment selectively, mutants were induced from *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478 (KCCM 11832 strain), and their characteristics were evaluated. Five kinds of auxotrophic mutants which required amino acids for growth and pigmentation, were isolated through a series of mutagenic treatments. Especially, asparagine auxotroph Y7 produced high ratio of yellow pigment. This mutant showed all the morphological characteristics of *Monascuaceae* but the shape of colony and the diameter of conidia. Mutant Y7 was propagated by sexual reproduction more often than asexual reproduction, which could be effective in production of pigments. Yellow pigment produced extracellularly by the mutant Y7 was more soluble in polar solvents such as ethanol and water than in nonpolar solvents. Its productivity of yellow pigment was 2.2 times higher in the mutant Y7 than in parents. In addition, its yellow pigment showed characteristics of maximum absorption at 373 nm. Moreover, the hue of pigment produced by the mutant Y7 was bright yellow, and it was stable through the subculture over 10 generations.

Key words: *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478, mutant, yellow pigment, auxotroph

미생물 자원을 이용한 색소의 생산은 계절이나 기후에 대한 제약이 없고 지역에 의한 의존성이 없으며, 생산량이나 생산 시기를 조절하는 것이 가능하여 단시간에 많은 양의 색소를 생산하는 것이 가능하고 수요량에 능동적으로 대처할 수 있으므로 매우 높은 관심이 고조되고 있는 실정이다 [1,15,21,23]. *Monascus* 속의 미생물들은 적색소 생산균으로서 오래 전부터 알려져 왔다. *Monascus* 색소는 한국, 대만, 동남아시아 등지에서 오랫동안 홍주와 홍두부 등의 착색에 사용되어 왔고 소화불량, 이질 등의 질병 치료에도 응용되어 온 물질로서 [12] 어육 등 가공식품의 착색제로서 일본과 우리나라에서 상당량이 사용되고 있는 물질이다. *Monascus* 색소는 일반적으로 quinone methide 또는 γ -pyrone methide 로 취급되는데 [7] 이들 색소에 대한 연구는 1890년경부터 시작되어 현재는 색소의 주성분인 6가지 주성분의 구조가 규명되어 있다 [2,5,14]. 일반적으로 *Monascus* 속의 wild type 균주들은 색소 이외에 amylase, protease, 및 ethanol 등의 생산성을 주로 이용하는 균주이므로 색소만을 선택적으로 생산하도록 하기 위해서 변이주의 선발에 관한 연구가 많이

진행된바 있다. Wong 등 [20]은 *M. purpureus*로부터 UV조사를 통해 적색소 생성능이 우수한 변이주 N11S 및 G1 을 분리한바 있고, Hiroi 등 [8]은 *M. anka*로부터 UV 및 NTG 처리에 의하여 변이주 UN202-13을 분리하였으며, Lin 등 [13]은 자신들이 Kaoliang liquor에서 분리한 F-2 균주로부터 UV조사 및 NTG처리에 의해 변이주 R10847을 분리하여 적색소 생성능을 개선시킨바 있다. 그러나 이들 균주가 생성하는 색소는 대부분이 황색소를 소량 포함하는 적색소가 주를 이루고 있으며, Lin 등 [13]의 경우를 제외하고는 생성된 색소가 균체 내부에 존재하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 양질의 황색소원을 확보하기 위하여 이미 적색소의 생성능이 우수함이 입증된 *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478을 대상으로 UV조사 및 NTG 처리에 의하여 수용성 황색소를 생성하는 변이주를 유도, 분리하였으며 변이주 및 색소생성 특성을 규명하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478(KCCM 11832)로서 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA) 배지에

*Corresponding author
Tel. 82-51-860-3170, Fax. 82-51-860-3331
E-mail: hjlee@dit.ac.kr

서 30°C로 계대배양하여 사용하였다.

포자현탁액의 조제

모균주를 medium-C배지[8]에 접종하고 30°C에서 7일간 배양시킨 후 20 ml 멸균중류수에 현탁시켜 제조하고 멸균중류수로 500 conidia/ml가 되도록 희석하여 변이주 선발 및 균주 보관에 이용하였다.

UV조사

모균주의 포자현탁액 15 ml을 petri-dish에 담아 30 cm 거리에서 15분 동안 UV(15W)를 조사하고 이를 PDA배지에 도말하여 황색소 생성능이 우수한 균주를 선발하였다.

NTG (*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 처리

자외선 조사에 의하여 선발된 변이주의 포자 현탁액을 액체 Czapek's 배지에 현탁하여 30°C에서 3~4일 배양한 후 glass wool filter로 영양균사를 제거한 포자현탁액 40 ml에 1.5% NTG 용액(0.2M citrate buffer, pH 5.0) 10 ml를 첨가하고 90분간 정치 시킨 후(90% 사멸율) 8000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 포자를 회수한 후 이를 멸균중류수로 2회 세척하여 PDA배지에 도말하고 생존하는 균주 중 황색소 생성능이 우수한 균주를 선발하였다.

영양요구성 분석

분리된 변이주의 영양요구성을 분석하기 위하여 이들의 포자현탁액을 조제하여 20가지 아미노산을 각각 50 µg/ml 함유한 Czapek's agar배지에 생육시켜 영양요구성을 결정하였다.

변이주의 형태적 특성 분석

균체 및 포자를 cover glass에 도말하여 hole glass 위에서 거꾸로 배양하며 위상차현미경으로 관찰하여 형태적 특성을

분석하였다.

색소의 추출 및 정량

Petri-dish에서 10일간 배양시킨 균체를 Cork-bora를 이용하여 직경 1 cm 크기로 5개씩 취하여 용매 100 ml에 담가 24시간 동안 추출하고 여과지로(Toyo No. 1) 거른 후 색소 생성능을 비교하였다. 색소의 정량은 Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정된 후 모균주의 경우 400 nm에서의 흡광도를 황색소량으로, 500 nm에서의 흡광도를 적색소량으로 하였으며 변이주는 최고 흡수대인 373 nm에서의 흡광도 값을 황색소량으로 하였다.

균체 내·외 색소의 측정

균체를 PDA배지에 접종하고 30°C에서 10일간 배양한 후 균체 부분만을 수술용 칼로 절단, 회수하여 100 ml 70% ethanol에서 1시간 동안 sonication하면서 추출하고 배지부분은 sonication 과정 없이 1시간 동안 추출하여 여과지로(Toyo No. 1) 거른 후 흡광도를 측정하여 전자를 균체 내 색소로 후자를 균체 외 색소로 하였다.

결과 및 고찰

황색소 생성 변이주 및 영양요구 특성

황색소를 생성하는 변이주를 분리해내기 위하여 UV조사, NTG처리 및 이들의 병행처리를 통하여 변이주를 분리하여 황색소 생성능과 영양요구 특성을 분석하였다. 변이주들이 생성하는 색소는 모균주에 비하여 대체적으로 황색도(Y/R)가 높았다(Table 1). UV조사 변이주인 U743은 373 nm에서 강한 흡수 특성을 보이며 이 균주로부터 NTG처리에 의해 얻은 변이주인 UN716, Y1 및 Y7은 적색을 나타내는 500 nm 흡수대가 감소하여 외관상 황색을 나타내었다. 다섯 종의 아미노산 요구변이주(Leu⁻, Cys⁻, Asp⁻, Glu⁻, Asn⁻) 중

Table 1. Pigment productivity and required amino acids of mutants derived from *M. anka* Nakazawa et Sato IFO 4478

Strain	Required Amino acid	Pigment Productivity		Y/R ¹	Treatment
		Yellow Pigment (OD ₃₇₃)	Red Pigment (OD ₅₀₀)		
IFO4478	-	20.30 ²	13.76	1.48	Parent
U609	-	23.15	10.55	2.20	UV
U743	Leu ⁻	31.13	14.24	2.19	UV
UN313	Cys ⁻	22.72	12.91	1.76	UV, NTG
UN317	Asp ⁻	33.08	11.69	2.83	UV, NTG
UN523	Glu ⁻	28.43	10.66	2.67	UV, NTG
UN545	-	30.00	15.13	1.98	UV, NTG
UN716	Cys ⁻	36.94	11.80	3.13	UV, NTG
Y1	Asn ⁻	38.65	8.75	4.42	UV, NTG
Y7	Asn ⁻	45.24	3.91	11.56	UV, NTG

¹Ratio of yellow to red pigment

²Absorbance at 400 nm

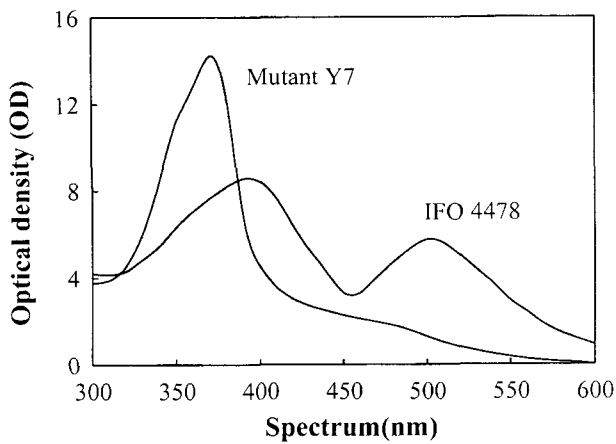


Fig. 1. Absorption spectrum of yellow pigment of mutant *Monascus anka* Y7.

특히 asparagine 요구 변이주 Y7이 생성하는 색소는 황색도가 매우 높고 373 nm에서 최대 흡광도를 나타냈다(Fig. 1). 이는 대부분의 *Monascus* sp. 들이 생성하는 색소의 경우 황색 흡수대인 400 nm와 적색 흡수대인 500 nm에서 흡광 특성을 보이는 것[8,12,13,19,20]과는 매우 다른 결과로서 황색소만을 단일 성분으로 생성하는 변이주가 분리 된 것을 의미한다. 변이주 Y7은 10대 이상의 계대 배양에 의해서도 색소 생성 특성이 안정하였으며 생성된 황색소는 약간의 형광성을 띄고 있는 밝은 색조를 지니고 있어 원색소로서의 가치가 높으며 색소 생성능도 모균주에 비하여 약 2.2배 높은 색소생성 특성을 나타냈다.

변이주의 형태학적 특성

Monascus sp.는 자웅동체로서 분생자로 생육하는 무성생식기와 포자낭과에 둘러싸인 자낭포자를 특징으로 하는 유성생식기간을 거치는 특성을 지니고 있다[16]. 변이주 Y7에 있어서 유성생식을 의미하는 증거인 조정기로부터 핵이 이송되어 이핵체를 형성하는 과정(Fig. 2a와 b)과 포자낭과와 자낭포자가 발견되었으며(Fig. 2c와 d) 무성생식 과정을 의미하는 분생포자 및 분생자의 모습 (Fig. 2e~h)이 발견되는 것으로 보아 변이주 Y7은 전형적인 *Monascuaceae*의 특징을 지니고 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 변이주 Y7은 모균주와 다르게 colony의 모양이 매끄럽고 볼록하며 황색을 띄고 있고 분생자의 균사 직경이 좁은 특징을 나타내고 있었다(Table 2). 이러한 결과는 적색소를 생성하고자 분리한 Lin 등[13]의 변이주에서도 발견된 보고가 있었다. 또한 Y7의 생육주기 동안 유성생식의 특징인 포자낭과가 모균주보다 그 크기가 작고 많은 양이 발견되었다. 이는 변이주 Y7이 무성생식보다는 유성생식에 보다 의존하여 번식하는 것을 의미하며 이는 *Monascus*색소 생성에 있어 무성생식보다는 유성생식이 유리하다는 Su[18]의 보고와 대부분의 색소들이 포자낭과 주위에 형성된다는 보고[13]를 감안하면 변이주

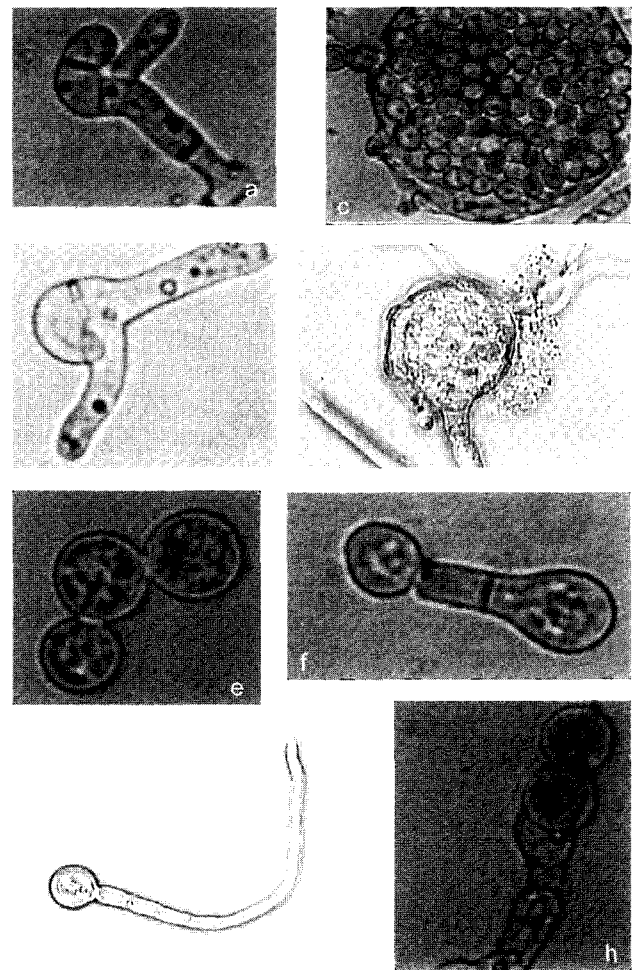


Fig. 2. Morphological characteristics of sexual (a~d) and asexual propagation (e~h) of mutant Y7.

Table 2. Morphological characteristics of Mutant Y7.

	Mutant Y7	<i>Monascus</i> sp.[9]
Shape of colony	yellow, smooth umbonate type	red, lava type
Hyphae	+	+
Septa	+	+
Ascospore	+	+
Shape	oval	oval
Diameter	4~5 μm	5.6~6.4 μm
Cleistothecium	+	+
Shape	globose	globose, subglobose
Diameter	35~39 μm	37.1~44.4 μm
Conidia	+	+
Shape	globose	globose, pyriform
Diameter	3~4 μm	9.3~11.1 μm

Y7이 색소 생성에 매우 유리한 조건을 지니고 있는 균주임을 알 수 있었다.

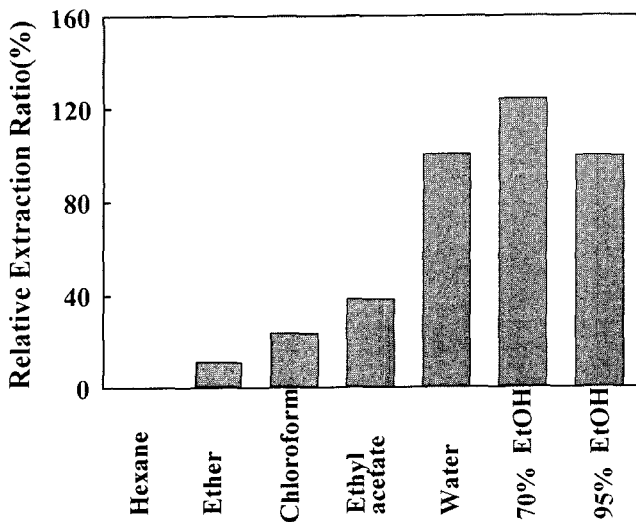


Fig. 3. Effectiveness in extracting yellow pigment in various concentration of ethanol. Extraction ratio was expressed as the optical density at 373 nm of extracted yellow pigment relative to that in water.

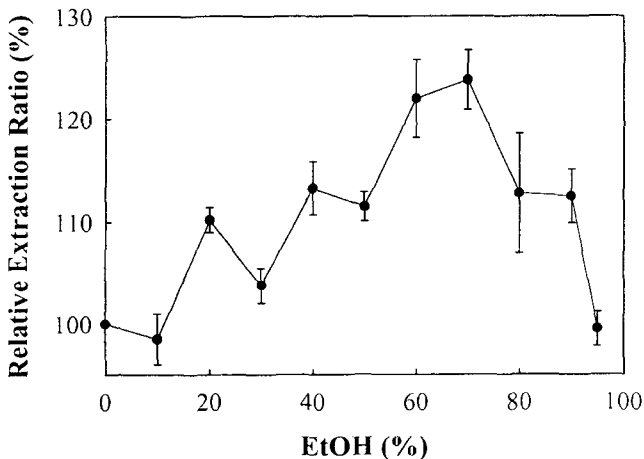


Fig. 4. Effectiveness in extracting yellow pigment in various concentrations of ethanol. Extraction ratio was expressed as the optical density at 373 of extracted yellow pigment relative to that in water.

변이주가 생성하는 색소특성

변이주가 생성하는 황색소의 추출특성을 조사하기 위하여 각종 용매에 대한 색소추출 특성을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉 변이주 Y7이 생성하는 색소는 hexane 등의 비극성 용매보다는 물이나 에탄올과 같은 극성 용매에 높은 용출율을 보였으며 특히 70% 에탄올에서 가장 높은 용출율을 나타냈다(Fig. 4). 일반적으로 *Monascus* 색소는 물에 가용성인 것과 물에 불용성이나 주정, chloroform 등에는 가용성인 것 2 종이 있고 이중 황색 분획은 비극성 용매 분획에 잘 용해된다고 알려져 있으므로[3,6,10,11,14] 본 연구 결과와는 다른 결과를 보이고 있는 것을 알 수 있다. 이 결과는 변이주

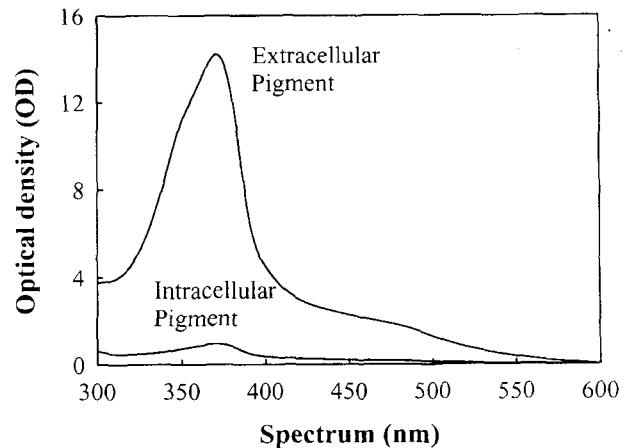


Fig. 5. Yellow pigment excretion characteristics of *Monascus anka* Y7.

가 생성하는 황색소가 변이 과정 중 대사계의 변화에 의하여 배지 및 균체 내 생성물(예를 들면 protein)과 결합하여 존재함으로써 용해도가 변화되었을 가능성 또는 색소 구조 자체의 변화가 유발되었을 가능성[17,22] 등을 추측할 수 있으나 구체적인 것은 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 변이주가 생성하는 대부분의 색소는 균체 밖으로 배출되어 모균주의 색소 특성과는 다른 경향을 나타내었다(Fig. 5). 색소의 균체 외 분비능은 색소의 대량생산 측면에서 매우 중요한 특성으로서 대부분의 *Monascus* 균주에 있어서 색소의 대부분이 균체 내에 존재하기 때문에 균체 내 색소를 균체 밖으로 배출시키기 위하여 균체를 sonication 하여 배출시키거나, 흡착성을 지닌 물질을 사용하여 흡착 분리시키거나[4] 또는 균체 외 배출 특성이 높은 변이주를 유도해내는[13] 등의 연구가 진행된 바 있다. 변이주 Y7은 약 80% 이상의 색소를 배지 밖으로 배출하고 있어 별도의 색소추출 과정이 필요하지 않아 상업적인 측면에서 매우 유리한 조건을 지닌 균주라고 사료된다.

요 약

천연 황색소 생산을 위하여 *Monascus anka* Nakazawa et Sato IFO 4478(KCCM 11832 strain) 균주를 모균주로 하여 UV 조사 및 NTG(*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*'-nitrosoguanidine)처리 및 이들 방법을 병용하는 방법을 사용하여 모균주와는 색소생성 특성이 다르게 황색소를 단일성분으로 생성하는 변이주를 분리하고 그 특성을 조사하였다. leucine, cysteine, aspartic acid, glutamic acid 와 asparagine 등 5종의 아미노산에 대한 영양요구주를 분리하였고 이중 asparagine 영양요구주 Y7은 colony 형태와 균사의 직경에서 약간의 차이를 나타내지만 전형적인 *Monascus* 균주의 특성을 지니고 있었으며 특히 유성생식에 의한 번식 특성이 강하여 색소 생성에 유리한 조건을 지니고 있었다. 그리고 Y7은 밝은 색조의

황색소를 단일 성분으로 생성하며 10대 이상의 계대배양에서도 색소 생성 특성이 안정하였고 색소 생성량이 모균주보다 약 2.2배 높은 값을 나타내고 있었다. 이때 생성된 황색소는 373 nm에서 단일 흡수 peak를 나타내고 물, 에탄올 등 극성용매에 대한 용해성이 높은 특성을 나타내며 생성된 색소의 대부분이 균체 밖으로 배출되는 특성을 지니고 있었다.

REFERENCES

1. Arima, K., J. H. Yu, and G. Tamura. 1967. Asperyllone, a new yellow pigment produced by *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger*. Part I. the isolation and properties of asperyllone produced by *Aspergillus awamori* 22-2-2. *Nippon Nongeikagaku Kaishi* **42**: 571-577.
2. Birch, A. J., A. Cassera, P. Fitton, J. S. E. Holker, H. Smith, G. A. Thompson, and W. B. Whalley. 1962. Studies in relation to biosynthesis. Part30. Rortiorin, Monascin, and Rubropunctatin. *J. Chem. Soc.* 3583-3586.
3. Carel, M. and D. Shepherd. 1975. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. *J. Bacteriol.* **122**: 288-294.
4. Evans, P. J. and H. Y. Wang. 1984. Pigment production from immobilized *Monascus* sp. utilizing polymeric resin adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1323-1326.
5. Fielding, B. C., E. J. Haws, J. S. E. Holker, A. D. G. Powell, A. Robertson, D. N. Stanway, and W. B. Whalley. 1960. Monascorubrin. *Tetrahedron Lett.* No.5: 24-27.
6. Fielding, B. C., J. S. E. Holker, D. F. Jones, A. D. G. Powell, K. W. Richmond, A. Robertson, and W. B. Whalley. 1961. The Chemistry of fungi part39. The structure of monascin. *J. Chem. Soc.* 4579-4589.
7. Hadfield, J. R., J. S. E. Holker, and D. N. Stanway. 1967. The biosynthesis of fungal metabolites part2. The β -oxo-lactone equivalents in rubropunctatin and moascorubrin. *J. Chem. Soc.* 751-755.
8. Hiroi, T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka, and O. Naga-hiro. 1979. Hyperpigment productive mutant *Monascus anka* for solid culture. *Agr. Biol. Chem.* **43**: 1975-1976.
9. Inui, T., Y. Takeda, and H. Iizuka. 1965. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2**: 1-121.
10. Kim, C. S., S. H. Ree, and I. Kim. 1977. Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by mold (*Monascus* sp.). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **9**: 277-283.
11. Kim, H. S., U. Chang, H. I. Yi, J. C. Bae, and J. H. Yu. 1980. Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2 (part2) isolation and preparation of yellow pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **8**: 167-172.
12. 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.
13. Lin, C. F. and H. Iizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 671-676.
14. Manchand, P. S., W. B. Whalley, and F. C. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. *Phytochemistry* **12**: 2531-2532.
15. Ryu, B. H., Y. E. Chi, B. G. Park, W. Y. Park, and D. G. Kim. 1990. Isolation and identification of *Streptomyces californicus* KS-89 produced bluish purple pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 443-448.
16. Su, Y. C., W. L. Chen, and H. Y. Fang. 1970. Mycological study of *Monascus anka*. *J. Chin. Agr. Chem. Soc.* **8**: 46-54.
17. Su, Y. C. and M. Katayama. 1976. Studies on the production of anka-pigment. *J. Chin. Agr. Chem. Soc.* **14**: 45-58.
18. Su, Y. C. 1983. Fermentative production of anka pigments (*Monascus*-Pigments). *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 325-337.
19. Tsukioka, M., T. Hiroi, T. Suzuki, and T. Konno. 1986. Production of red pigment by *Monascus* sp. and its mutant. *Nippon Nongeikagaku Kaishi* **60**: 451-455.
20. 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.
21. Wong, H. C. and P. E. Koehler. 1983. Production of red water soluble *Monascus* pigments. *J. Food Sci.* **48**: 1200-1203.
22. Yamaguchi, Y. 1973. Water soluble *Monascus* pigment. US Pat. 3, 765, 906.
23. Yu, J. H., G. Tamura, N. Takahashi, and K. Arima 1967. Asperyllone, a new yellow pigment of *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.* **31**: 831-836.

(Received Jan. 25, 2002/Accepted Apr. 12, 2002)