

홍국균(*Monascus* sp.) 발효공의 mevinolin 생산 조건

표영희*

한국식품연구원, 전통식품연구본부

Optimum Conditions for Production of Mevinolin from the Soybean Fermented with *Monascus* sp.

Young-Hee Pyo*

Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute

Abstract Soybeans were fermented with *Monascus* sp. to select strain with highest mevinolin production through solid-state fermentation. *Monascus pilosus* IFO 480 showed highest yield of 2.2 mg mevinolin per g dry weight without citrinin, toxic fungal secondary metabolite, as byproduct. Nutrient broth used for soybean fermentation with *Monascus* sp. was composed of 3.4 rice powder, 1.1 peptone, 2.6 glycine, 12.9 glucose, initial pH 6.0 (% w/v). Mevinolin was present in fermentation substrate largely as hydroxy carboxylate form (open lactone, 91.8-96.8%), which is used as hypocholesterolemic agent. Production of mevinolin continued up to 50 days fermentation time at 30°C.

Key words: *Monascus* sp., mevinolin, hypocholesterolemic agent, soybean fermentation, citrinin

서론

홍국(red yeast rice, red koji)은 붉은 색의 사상균인 *Monascus* 속의 균을 곡류에 접종하여 제조한 것으로, 중국을 중심으로 동아시아의 여러 지역에서 천연의 식품 착색제나 가공품 및 소화 촉진과 혈류개선의 소재로써 오랜 동안 사용되어 왔다(1-3). 근래에는 홍국균이 생성하는 2차 대사산물인 mevinolin(혹은 lovastatin, monacolin K, mevacor, C₂₄H₃₆O₅)이 콜레스테롤 생합성 효소, HMG-CoA(3-hydroxy-methyl-3-glutaryl-coenzyme) 환원효소를 강력하게 저해하여 혈중지질 농도와 콜레스테롤합성 저하에 따른 각종 기능성이 보고되어(3-6) 주목을 받고 있다. 그러나 *Monascus* 속 균주는 대사산물로서 mevinolin 이외에도 monascorubramin이나 monascin등의 색소성분(7,8)과 함께, 신장과 간장독 성분으로 알려진 citrinin 등의 mycotoxin을 생산하므로(9,10) *Monascus*속의 광범위한 활용에 안전성 문제가 제기될 수 있다. 즉 이들 2차 대사산물의 생산은, 균체내에서 acetyl-coA와 malonyl-coA로 개시되는 polyketide pathway를 동일하게 경유하여 생합성(11,12)되기 때문이다. 최근 Wang 등(10)은 여러 종의 *Monascus*의 배양물에 함유된 citrinin의 양을 측정할 결과, 조사된 모든 시료에서 최고 480 mg/L에서 최저 65 mg/L의 citrinin이 검출되어, *Monascus* 균주를 이용한 모든 제품에 대한 안전성 평가의 필요성을 제기하였다.

한편, *Monascus* 배양물에 존재하는 mevinolin 화합물은 Fig. 1과 같이 분자구조에 따라 크게 lactone형과 hydroxy acid형으로

구분한다(13,14). Pro-drug 형태의 lactone형은, 가수분해에 의해 생리적 활성형의 β-hydroxy acid로 고리가 열리면서 생체내 약리학적 효능을 나타내는 활성물질(drug)로 전환된다(15). Lactone형의 mevinolin은 순수한 methanol 용액에서 매우 안정한 형태를 유지하나, 수분이 함유된 기질에서는 쉽게 활성형의 hydroxycarboxylate(open lactone)의 형태로 전환되어 두 구조간에 평형상태를 유지하는 것으로 알려졌다(13). 따라서 수분함유가 불가피한 *Monascus* 발효물은 주로 β-hydroxy acid 형태의 mevinolin이 주성분인 것으로 보고되었다(13,14). 그러나 이러한 홍국 배양물의 제조는 대부분 액상배양의 심부발효법(submerged fermentation)을 이용한 것으로, 주로 색소 성분을 얻기 위한 최적의 발효조건(7,8) 및 균주 탐색(16), 홍국을 첨가한 기능성 제품의 제조 등(17,18)이 연구되어 왔다. 고상 발효법(solid-state fermentation) 역시, 색소를 비롯한 일부 기능성 성분을 얻기 위한 수단으로 시도되었지만(19), 사용된 배지의 주요 곡물은 쌀(1-3)이 대부분이고 그 밖에 보리(19)와 밀(20)이 사용되었으며, 콩은 홍국균의 발효에 적합하지 않은 곡물로 알려져 왔다.

본 연구에서는 지금까지 시도되지 않은 콩을 대상으로, *Monascus* 속 균주를 이용하여 항 콜레스테롤합성 성분인 mevinolin과 곰팡이 독소성분인 citrinin의 생산 가능성을 탐색하기 위해 홍국균 발효를 수행하였다. 먼저 20여종의 *Monascus* sp.의 균주를 대상으로 홍국균 발효에 적합하면서도 기능성 대사산물인 mevinolin을 가장 많이 생산하는 우량균주를 선발하였다. 다음 단계로, 영양 배지인 종배양액의 조성에 따라 홍국균 발효물의 2차 대사산물의 생산량을 평가하였으며, 동시에 citrinin이 검출되지 않는 안전한 발효조건을 탐색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

강원도 평창에서 2004년에 수확한 백태를 구입하여 시료로 사

*Corresponding author: Young-Hee Pyo, Traditional Food Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1 Backhyun-dong Bundang-gu Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-746, Republic of Korea
Tel: 82-31-780-9305
Fax: 82-31-780-9234

E-mail: rosapyo@hotmail.com

Received October 4, 2005; accepted January 24, 2006

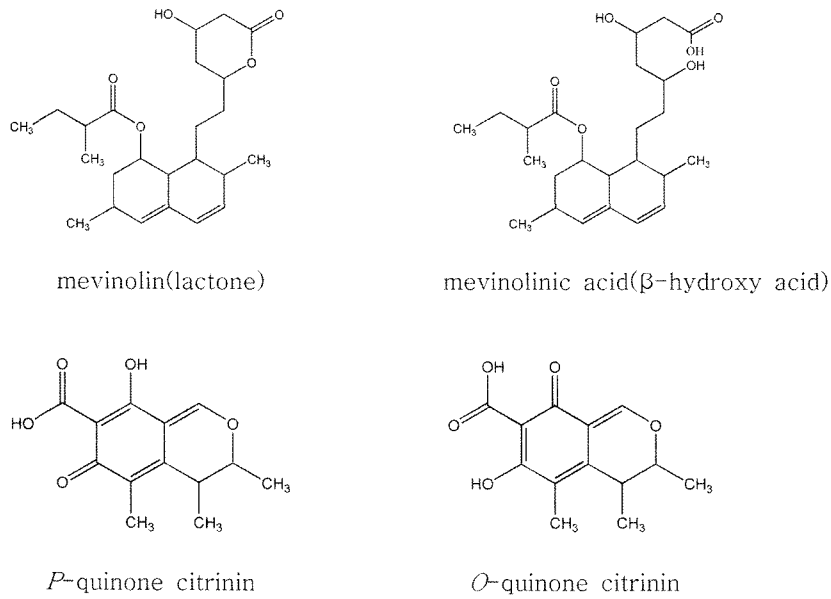


Fig. 1. Chemical structures of mevinolin and citrinin (14, 28).

용하였다. mevinolin 화합물을 추출하기 위한 ethanol 등의 모든 용매는 HPLC용(Fisher Co., USA)을 사용하였다. 표준품 mevinolin (lactone form)과 citrinin은 Sigma사(St. Louis, Mo., USA)로 부터 구입하여 사용하였으며, acid형의 mevinolin (이하 mevinolinic acid)은 Friedrich 등(13)의 알칼리 가수분해법을 일부 변경하여 제조하였다. 즉, 표준품의 mevinolin에 0.1 M의 NaOH를 가하여 1 시간동안 50°C에서 가온한 뒤, 1 M HCl를 사용하여 pH 7.7로 보정한 후 여과(0.22 μm, Millipore Co., Bedford, MA, USA)하여 HPLC(JASCO PU-987 pump, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 표준품의 mevinolin과 mevinolinic acid의 분리는 UV spectra(λ_{max})와 retention time(t_R)으로 확인하였다.

사용균주 및 배지

동정된 *Monascus*속의 균주 20종을 한국식품연구원(Korea Food Research Institute)으로 부터 분양받아 우량균주 선발에 활용하였다. 먼저 모든 균주들은 potato dextrose agar(PDA배지; Difco, MI, USA)를 이용하여 30°C에서 4일간 배양한 다음, 포자의 현탁액을 균질화하여 시료에 접종하거나 증배양액에 직접 접종하였다.

증배양액의 조제

고상발효를 위한 영양배지로 광범위하게 사용되어 왔던 Lin 배지 등(7,21)의 다양한 영양배지액을 Table 1과 같이 변형하여 4가지 유형으로 조제하였다. 1차 배양에서 분리한 각 각의 균주를 각 유형의 조제액에 1백금이 접종한 후, 30°C의 shaking incubator에서 4일간 배양한 다음 본 발효에 사용하였다.

고상 발효

콩을 12시간 이상 침지한 다음, 물빼기를 한 시료 100 g(수분 함량 62-65%)을 500 mL의 삼각플라스크에 넣고 지전으로 밀봉한 뒤, 121°C에서 30분간 멸균하였다. PDA배지로 배양한 균주의 일정량에 5배의 멸균수를 혼합하여 균질화한 뒤, 시료 중량의 5%(v/w)를 취하여 고체배지에 무균적으로 접종하였다. 또한 액체 배지로 배양한 각 유형의 균주액을 시료 중량의 10%(v/w)를 취하여 콩시료의 고체배지에 무균적으로 접종하였다. 접종한 시료

Table 1. Medium compositions used in determining the effects of soybean fermentation by *Monascus* sp.

¹⁾ Nutrients/ ²⁾ Type	A	B	C	D
Rice powder	3.0	3.4	3.4	-
Soy powder	-	-	-	3.4
Glucose	-	12.9	12.9	12.9
Peptone	-	1.1	1.1	1.1
Glycine	-	2.6	2.6	2.6
Sodium nitrate	0.1	-	0.2	0.2
Magnesium sulfate	0.1	-	0.1	0.1

¹⁾weight/volume (%).

²⁾liquid medium type.

는 30°C의 배양기에서 60일간 발효하면서, 일정량을 경시적으로 채취하여 홍국균의 2차 대사산물의 변화를 관찰하였다. 이 때 모든 배양물은 배양 3일째부터 하루에 한 번씩 뒤집기 하였으며, 채취한 시료는 동결건조 후 분말화하여 사용할 때까지 냉동고에 보관하였다.

색도 측정

홍국 발효공의 분말에 70% ethanol을 가하여 상온에서 1시간 교반한 후, 적정농도(O.D. = 2.0 이하)로 희석하여 시료의 색도를 측정하였다(7). 즉, 0.45 μm의 필터로 여과한 다음 500 nm에서 흡광도(Hewlett packard spectrophotometer, model 8753, Germany)를 측정하여 발효물의 색도를 평가하였다.

Mevinolin, Mevinolinic acid, Citrinin의 추출 및 정량

홍국 발효공의 분말 0.1 g에 methanol, 70% ethanol, 0.1% H₃PO₄ acetonitrile의 용매를 각 각 1.0 mL씩 가해, 초음파기(sonic & materials Inc. USA)를 사용하여 50°C에서 2시간 균체를 파쇄하고 원심분리(12,000 × g, 10 min)하였다. 상등액을 여과(0.45 μm)한 다음 HPLC를 이용하여 2차 대사산물의 함량을 측정하였으며, Capcell Pak C₁₈ UG120 column(250 × 4.6 mm, Shiseido Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이동상의 용매는 acetonitrile과 0.1%

H₃PO₄을 65:35(v/v)의 비율, 그리고 0.8 mL/min의 유속으로 용출하였다. 세 가지 화합물의 검색은 각 화합물의 최대파장 224, 237, 247, 260의 중간 파장인 238 nm에서 동시에 측정하였다(13-15, 22). Mevinolin과 mevinolinic acid, 그리고 citrinin의 함량은 각 화합물의 표준물질을 사용하여 작성한 검량선을 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

우량 균주의 선별

*Monascus*속의 균주 20종을 각 각 PDA배지에 배양한 뒤, 일정량의 배양물에 5배의 멸균수를 혼합하여 균질화한 후, 시료 중량의 5%(v/w)를 취하고 고체배지인 콩에 무균적으로 접종하여 15일간 발효시킨 결과는 Table 2와 같다. *Monascus* 균주의 종류에 따른 정상발효의 여부와 2차 대사산물의 생성량을 검토한 결과, *M. purpureus* ATCC 162를 비롯한 *M. purpureus* ATCC 228, *M. ruber* IFO 203, *M. ruber* IFO 317, 그리고 *M. species* ATCC 435 등의 균주들은 콩배지에서의 정상발효의 가능성이 희박하여 결과처리에서 제외하였다. 한편, 신장과 간장독의 성분으로 알려진 citrinin(Fig. 1)의 검출량은 균체의 색도가 높을수록, 즉 적색의 색소 대사산물이 많이 생성될수록 높게 평가되었다(data not shown). Citrinin의 검출량이 미량이거나 검출되지 않은 균체배양물의 색은 색도값(O.D._{500nm})이 0.98 이하로서, 육안으로 나타나는 색깔은 황색이나 회갈색이 대부분이었다. 이와 같은 결과는 시판되는 *Monascus* 균주 23종을 대상으로 YES(yeast extract sucrose) 배지에서 배양한 결과, citrinin의 생산은 배양물의 색소와 상관없

Table 2. Screening of the best strain for mevinolin without citrinin production from soybean fermented with *Monascus* sp. at 30°C for 15 days

Strains	O.D. ₅₀₀	Mevinolins (%) ¹⁾	Citrinin (µg/g)
<i>M. anka</i> IFO 478	1.55	0.052	21.5
<i>M. anka</i> IFO 873	0.98	0.019	ND
<i>M. pilosus</i> IFO 520	0.12	0.015	ND
<i>M. pilosus</i> IFO 480	0.23	0.072	ND
<i>M. purpureus</i> ATCC 162	-	²⁾	-
<i>M. purpureus</i> ATCC 489	1.61	0.051	12.1
<i>M. purpureus</i> ATCC 228	-	-	-
<i>M. purpurea</i> IFO 482	0.32	0.045	ND
<i>M. ruber</i> IFO 203	-	-	-
<i>M. ruber</i> IFO 492	0.20	0.031	ND
<i>M. ruber</i> IFO 317	-	-	-
<i>M. araneosus</i> IFO 483	1.45	0.032	19.3
<i>M. kaoliang</i> ATCC 592	0.51	0.017	ND
<i>M. kaoliang</i> ATCC 595	1.27	0.064	31.2
<i>M. kaling</i> ATCC 598	0.37	0.013	ND
<i>M. sp.</i> ATCC 435	-	-	-
<i>M. sp.</i> ATCC 437	0.95	0.041	15.8
<i>M. sp.</i> IFO 301	0.31	0.019	ND
<i>M. sp.</i> IFO 280	0.25	0.016	ND
<i>M. vitreus</i> IFO 532	0.78	0.027	17.6

ND: not detected.

¹⁾Mevinolins (%) = mevinolin (%) + mevinolinic acid (%).

²⁾Fermentation failure.

The detection limit of mevinolins and citrinin is approximately 100 ng and 550 ng/g respectively.

All data are expressed as mean (n = 3).

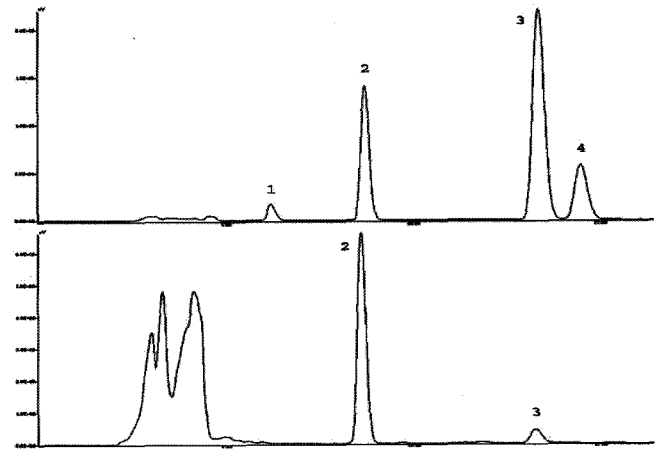


Fig. 2. HPLC chromatogram of citrinin, mevinolinic acid, and mevinolin in 70% EtOH extract from soybean fermented with *Monascus pilosus* IFO 480 at 30°C for 20 days. 1: citrinin, 2: mevinolinic acid, 3: mevinolin, 4: methyl ester of mevinolinic acid. Top: reference, bottom: sample.

이 모든 시료에서 검출되었다고 보고한 Wang 등(10)과는 차이가 있었다. 그러나 이 실험의 균주배양은 본 실험의 PDA배지와는 다른 MEA(powdered malt extract, 20 g; peptone, 1.0 g; glucose, 20 g; agar, 15 g; distilled water to 1 L)의 사면배지를 사용하였으며, 액체 배양물을 제조하기 위해 YES배지를 사용한 것은 뚜렷한 차이점으로 비교되었다. 따라서 *Monascus* 균주의 배양에 사용되는 배양물의 조성과 농도는 대사산물의 종류와 생산에 가장 큰 영향을 주는 중요한 요소로 평가할 수 있다. 한편 홍국콩의 정상적인 발효와 함께, 유용한 대사산물인 mevinolin의 생성량이 0.04% 이상이면서 독성성분인 citrinin의 검출량이 50 µg/g 이하로 낮은 균주는, *M. anka* IFO 478(0.052%), *M. purpureus* ATCC 489(0.051%), *M. pilosus* IFO 480(0.072%), 그리고 *M. kaoliang* ATCC 595(0.064%) 균주들로 선발되었다. 특히 *M. pilosus* IFO 480 균주의 mevinolin의 함량은 0.072%로, 나머지 균주들 보다 1.4배에서 5.5배로 높게 나타나 유용한 대사산물을 가장 많이 생성하면서도 독성성분인 citrinin은 생산하지 않는 홍국콩 발효에 가장 적합한 우량 균주로 확인되었다. 또한 Fig. 2에서 보듯이 홍국콩 발효물에 존재하는 mevinolin의 형태는 비활성형의 lactone 형이 아니라, 활성형의 hydroxycarboxylate인 mevinolinic acid 화합물이 주요 성분인 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 Li 등(14)의 보고와 일치하는 것으로, 홍국쌀 발효물의 주성분 역시 monacolin K의 acid형으로 밝혀졌다. Monacolin K의 비활성형(lactone form)은, 1979년 미국의 Merck사가 누룩곰팡이(*Aspergillus terreus*)에서 발견하여 고지혈증 치료제로 출시한 스타틴 약물(lovastatin)의 기능물질(mevinolin)과 그 분자구조가 동일한 비활성물질(pro-drug)이다(15). 스타틴 약물은, 전체 콜레스테롤의 80%에 해당하는 내인성 콜레스테롤의 생합성을 직접 억제하는 매우 강력한 물질이지만, 가수분해 효소(carboxyesterase)에 의해 분자구조의 고리가 열리는 활성화의 과정은 간과 신장의 손상은 물론 근질환(myopathy) 등의 부작용(23)을 나타내므로, 의사의 처방전이 있어야만 판매하는 전문 의약품으로 분류하고 있다. 특히 carboxyesterase의 활성은 개인차가 심하여서 활성화가 불가능한 사람들도 많은 것으로 알려져 있다(24). 그러나 본 실험에서 순수 고체발효시킨 홍국콩 발효물에 함유된 기능성 물질의 91.8% 이상은, 이미 가수분해된 활성형의 mevinolinic acid가 주성분으로 나타나,

Table 3. Effects of submerged medium type on the production of secondary metabolites in soybean fermented with *Monascus pilosus* IFO 480 at 30°C for 15 days

Type	Mevinolin (%)	Mevinolinic acid (%)	Citrinin (µg/g)
A	-	0.017 ± 0.008	ND
B	0.011 ± 0.003	0.134 ± 0.005	ND
C	0.017 ± 0.004	0.126 ± 0.001	ND
D	-	0.101 ± 0.006	71.5

All data are expressed as mean ± SD (n = 3).

생체효율성이 높은 안전한 기능성 물질로 평가될 가능성이 매우 높게 나타났다. 그러나 전체 mevinolin의 총 수율은 발효물의 건조시료 중량을 기준으로 0.7 mg/g 이하로 나타나, 보통 액체배양을 통해 얻는 최대 수율량인 400 mg/L보다 상대적으로 낮은 수준으로 비교되었다(25). 현재 국내의 홍국발효 제품에 대한 식약청의 기준고시 규격안은, 홍국발효 제품이 건강 기능성식품으로 활용되기 위해서는 mevinolin과 citrinin의 함량이 각각 0.05% 이상과 50 ppb 이하의 기준안에 부합될 것을 제시하였다. 따라서 이후의 보다 강화된 홍국 발효공의 최적 생산조건을 탐색하기 위해, 우량 균주로 선정된 *Monascus pilosus* 480을 종균배양한 뒤, Table 1과 같이 4가지 유형으로 조제된 액체배지에서 2차 배양하여 각 균주의 성장과 증식을 강화시켰다. 액체 배양물의 일정량(10%, v/w)을 다시 고체시료인 콩에 접종하여 일정 기간 발효하면서 대사산물의 생성량을 평가하였다.

종배양액 조성의 영향

콩시료를 기질로 하여, 4가지 유형의 액체 배양물을 접종한 후 15일간 발효한 다음 2차 대사산물의 생성량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 즉, Type B는 총 mevinolin의 함량이 0.145%로 나타나, 액체의 영양배지를 사용하기 전보다 그 수율이 약 2배로 향상되었다. Citrinin의 생성은, 쌀가루 대신 콩가루를 액체 배지의 영양원으로 사용한 Type D에서 71.5 µg/g 검출되었고, 나머지 유형의 액체배지 발효물에서는 검출되지 않았다. 특히 Type B는 Type C와 함께 mevinolin의 총 생성량이 각각 0.145%와 0.143%로 나타났으며, 두가지 유형에서 모두 citrinin은 검출되지 않아 콩의 고상발효에 가장 적합한 액체 배양물로 평가되었다. 특히 A형과 D형의 배양물로 접종한 홍국 발효공은 2차 대사산물의 생성량이 미량으로 나타나, *Monascus*균주에 의한 콩발효는 액체 배양물의 영양원이 중요한 조건으로 시사되었다. Lopez 등(26)은 액체배지의 C원과 N원의 변화에 따라 mevinolin의 생산량이 다르다 하여 최대의 수율을 얻기 위한 조건을 제시하였다. 즉 C원으로 lactose, 그리고 N원으로 soy meal이나 yeast extract을 사용할 경우의 최적 C:N의 비율은 40 mg/g이라고 보고하였다. 또한 Hajjaj 등(21) 역시 lovastatin 등의 2차 대사산물의 생산은, 각기 다른 배지와 배양조건에 따라 유의적으로 변한다고 하여 균주배양 조건의 중요성을 강조하였다. Table 1에서와 같이 B형의 액체 배양물은, C형의 조성에서 sodium nitrate와 magnesium sulfate를 제외한 나머지 성분인 rice powder, glucose, peptone, glycine 등은 동일하였다. 따라서 C형에 포함된 미량의 무기질 성분을 보충하지 않아도, 홍국 발효공의 기능성 대사산물의 생성량은 매우 양호한 것으로 나타나, 이후의 고상 발효에 쓰이는 액체 배양물은 B형으로 조제하여 실험하였다. Type B의 조성은, 조제액의 양을 기준으로 rice powder 3.4, peptone 1.1, glycine 2.6, glucose 12.9의 농도(w/v, %)로 조제되었으며, 30°C에서 4일간 shaking

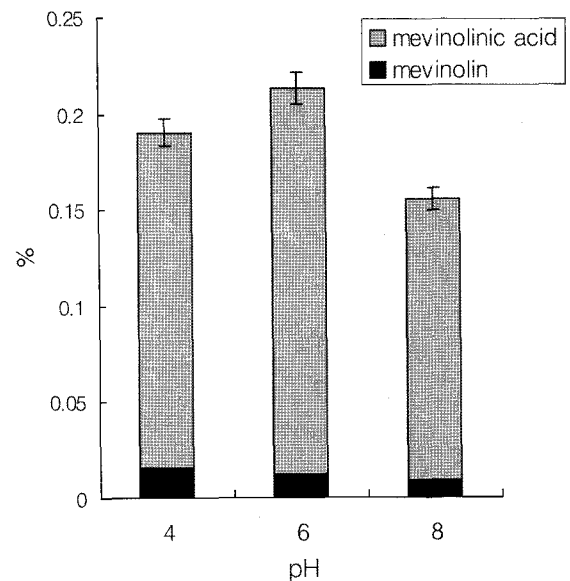


Fig. 3. Effects of initial pH of submerged medium on the production of mevinolin from soybean fermented with *Monascus pilosus* IFO 480 at 30°C for 50 days. All data are expressed as mean (n = 3). Values are stated as percentages (wt %/dry wt soybean fermented).

incubator로 배양한 다음, 홍국 발효공을 얻기 위한 배양액으로 사용하였다.

종배양액 pH의 영향

PDA배지에서 1차 배양한 *M. pilosus* IFO 480을 B형의 액체 배양물에 1백금이 접종한 후, 30°C에서 shaking incubator를 이용하여 4일간 배양한 다음 콩 중량의 10%(v/w)를 접종하여 30°C에서 발효하였다. 이때 액체 배지의 초기 pH를 0.1N의 HCl과 NaOH를 사용하여 각각 4, 6, 8로 조정한 다음, 121°C의 온도에서 15분간 멸균하였다. 액체 배양물의 pH에 따른 홍국 발효공의 2차 대사산물의 함량은 Fig. 3과 같았다. pH 6의 배양물로 접종한 시료의 발효물에 함유된 mevinolin의 양은 0.213%로, pH 4의 0.190%, 그리고 pH 8의 0.155%에 비해 가장 많이 생산되었으며 (p < 0.05), 역시 citrinin은 검출되지 않았다. 이같은 결과는 보리를 이용한 고상발효에서 초기 pH를 6으로 조절할 때, 균사의 성장과 색소발현 능력이 가장 우수하였다는 Cho 등(19)의 실험결과와 유사하였다. 보통 균주 배양액의 pH는 사상균의 세포성장은 물론 2차 대사산물의 생산에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 즉, mevinolin의 생산과정에 참여하는 특정 효소의 활성화 조건은, 기질의 산도에 따라 유의적인 영향을 받을 수 있기 때문이다(25,27). 따라서 이후의 종배양액의 배지는 pH 6으로 조정하여 사용하였다.

발효시간의 영향

콩시료의 고체배지에 액체배양물(Type B, pH 6, *M. pilosus* IFO 480)을 시료 중량의 10%(v/w)로 접종한 다음, 30°C의 배양기에서 60일간 발효시킨 결과는 Fig. 4와 같았다. 전체적으로 발효시간이 경과할수록 mevinolin의 생성량은 증가하는 경향으로 나타났다. 발효 28일경에 mevinolin의 생산량은 0.12%로 측정되었고, 50일경에 0.22%까지 증가하다가 그 이후에는 서서히 감소하였지만, 발효가 종료될 때까지 생산이 멈추지는 않았다. 일반적으로 mevinolin의 생합성은 사용 균주(16)와 성장 및 번식조건

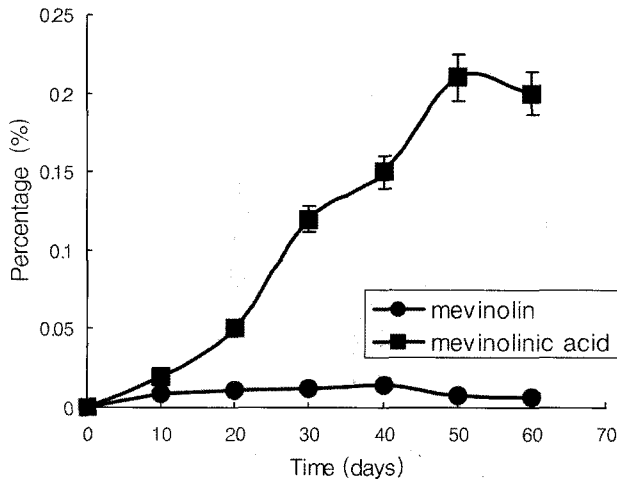


Fig. 4. Time profile of mevinolin production from soybean fermented with *Monascus pilosus* IFO 480 at 30°C.

(20,21)에 따라 그 생산량이 좌우되는 것으로 알려져 왔다. 즉, 기질에 대한 균주의 최대성장이 발휘되는 시점에서 대사산물의 최대 생성량도 관찰되었다. 기대했던 대로, 홍국 발효공에 함유된 mevinolin의 주성분은 acid형의 mevinolinic acid가 전체의 91.8-96.8%를 차지하였으며, lactone형의 mevinolin은 3.2-8.2%에 불과하였다. 이 같은 결과는 홍국 발효실에서 얻은 mevinolin 화합물의 양상(13,14)과 비슷한 것으로, 향후 홍국균을 이용한 고상 발효물의 기능성 물질의 검색시에는, acid형의 mevinolin 화합물이 기준물질로 사용되어야 함을 시사하였다. Mevinolin과 mevinolinic acid, 그리고 이들의 methyl, ethyl, propyl 등의 에스터는 일반적으로 알코올의 완충용매에서 대부분 잘 분리되는 것으로 보고되어 왔다(13). 본 실험의 콩발효실에서 검출된 mevinolin화합물은 acid형이 물-알코올의 용매조건에서 lactone형보다 더 안정한 형태로 관찰되었으며, Fig. 2에서 처럼 mevinolinic acid와 lactone형의 mevinolin 화합물만 발견되었다. 따라서 *Monascus pilosus* IFO 480을 이용한 홍국 발효공은, 내인성 콜레스테롤의 합성효소(HMG-CoA reductase)의 저해성분 즉, 약리학적 활성형의 acid형인 mevinolin(monacolin K, lovastatin)이 주성분으로 확인되었다.

홍국 발효공의 citrinin 함량

Citrinin은 1931년에 밝혀진 곰팡이의 대사산물로서, 신장과 간장의 기능에 영향을 주는 곰팡이 독소성분으로 알려져 왔다(28,29). 특히 *Penicillium citrinum*에서 분리하여 citrinin으로 명명되었으나(30), 이후에 *Aspergillus*나 *Monascus*속 곰팡이의 대사산물에서도 그 존재량이 0.065-0.480 mg/mL로 알려졌다(9,10,28). 본 연구에서는 *Monascus*속 균주의 콩에 대한 고상발효에서, 생체활성의 2차 대사 산물인 mevinolin과 함께 citrinin의 생산이 균주에 따라 어떻게 다른지를 검토하였다. Table 2에서와 같이 20여종의 *Monascus*균주 중에서 *M. anka*, *M. purpureus*, *M. araneosus*, *M. kaoliang*과 *M. vitreus*의 일부를 제외한 대부분의 균주에서 citrinin의 생산은 확인되지 않았다. 발견된 균주들의 citrinin 생산량도 12.1-31.2 µg/g 정도의 매우 미량으로 나타났다. Blanc 등(9) 역시 *M. ruber*를 배양하기 위한 합성배지의 조성에서 C원으로 glucose, ethanol, acetate 등을 사용할 때는 citrinin이 생성되지 않았으나, wild type의 *M. ruber*를 사용시는 배지의 종류에 따라 citrinin의 생산량이 확인되었다고 보고하였다. 이같은 결과는 *Monascus*균주에 의한 citrinin의 생산여부가 균주의 종류와 배양조건에 따라

좌우됨을 의미한다. 특히 기질의 수분활성도가 0.8 이하거나(30) 통기가 부족할 때(28) citrinin의 생산이 억제되었다는 보고는 균주의 성장조건이 가장 큰 영향요인임을 시사하였다. 따라서 본 실험에서 우량균주로 선발된 *M. pilosus* IFO 480을 이용한 홍국 발효공은, 곰팡이 독소성분 citrinin을 함유하지 않은 안전한 발효물로 평가되었다.

요 약

20여종의 *Monascus*속의 균주로부터 mevinolin의 생산능이 우수하면서도 곰팡이 독소성분 citrinin을 생산하지 않는 우량균주를 선발하였으며, 콩시료에 대한 고상발효를 최적화하기 위한 영양배지의 조성물이 검토되었다. 선발된 *M. pilosus* IFO 480으로 발효시킨 홍국콩 발효물에 함유된 mevinolin의 주요 화합물은, 약리학적 활성형(drug)의 mevinolinic acid로 밝혀졌다(91.8%). 따라서 홍국 발효공은 생체활성형의 항 콜레스테롤 성분을 최대 0.22%까지 함유하는, 안전한 건강 기능성식품 소재로서의 활용가능성이 높은 것으로 평가할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단지원을 받아 수행된 연구의 일부로 감사드립니다 (R03-2004-000-10025-0).

문 헌

- Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. Constituents of red yeast rice, a traditional chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5220-5225 (2000)
- Wild D, Toch G, Humpf HU. New *Monascus* metabolite isolated from red yeast rice (Ankak, Red koji). *J. Agric. Food Chem.* 50: 3999-4002 (2002)
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Chen PC, Lin JK. Hypotriglyceridemic effect of Ankak (fermented rice product of *Monascus* sp.) in rat. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3183-3189 (2000)
- Endo A, Hasumi K, Negishi S. Monacolins J and L new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J. Antibiot.* 38: 420-422 (1985)
- Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 555-564 (2002)
- Wei W, Li C, Wang Y, Su H, Zhu J, Kritchevsky D. Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term cholestin (*Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 14: 314-318 (2003)
- Lin CF. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* 51: 407-414 (1973)
- Lin TF, Demain AL. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 70-75 (1991)
- Blanc PJ, Loret MO, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.* 17: 291-294 (1995)
- Wang YZ, Ju XL, Zhou YG. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiol.* 22: 145-148 (2005)
- Hendrickson L, Davis CR, Roach C, Nguyen DK, Aldrich T, McAca PC, Reeves CD. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* 6: 429-439 (1999)
- Shinizu T, Kinoshita H, Ishihara S, Sakai K, Nihira T. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus*

- purpureus*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3453-3457 (2005)
13. Friedrich J, Zuzek M, Bencina M, Cimerman A, Strancar A, Radez I. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. J. Chromatogr. A 704: 363-367 (1995)
 14. Li YG, Zhang F, Wang ZT, Hu ZB. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. J. Pharmacol. Biomed. Anal. 35: 1101-1112 (2004)
 15. Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. Biotechnol. Lett. 21: 253-257 (1999)
 16. Bang IY, Whang SW, Kim JW, Kim SY, Park CS. Screening of fungal strains producing lovastatin, an antihypercholesterolemic agent. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 442-446 (2003)
 17. Park SY, Mah JH, Choi YI, Kim DH, Hwang HJ. Optimization of red pigmentation and effect of the metabolites produced by *Monascus* strains on microbial inhibition and colorization in processed ham. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 172-178 (1999)
 18. Kim HJ, Hwang Bo MH, Lee HJ, Yu TS, Lee IS. Antibacterial and anticancer effects of Kimchi extracts prepared with *Monascus purpureus* Koji paste. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 618-623 (2005)
 19. Cho CH, Seo DJ, Woo GJ, Kang DK. Functional red pigment production in solid-state fermentation of barley by *Monascus* sp. EBF1. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 30: 253-257 (2002)
 20. Kwak EJ, Cha SK, Lim SI. The optimal condition for the production and extraction of monacolin K from red-Koji. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 830-834 (2003)
 21. Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2596-2602 (2001)
 22. Reinhard H, Zimmerli B. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. J. Chromatogr. A 862: 147-159 (1999)
 23. Thomson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. JAMA. 289: 1681-1690 (2003)
 24. Paoletti R, Corsini A, Bellosta S. Pharmacological interaction of statins. Atherosclerosis 3: 35-40 (2002)
 25. Lai LST, Tsai TH, Wang TC, Cheng TY. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. Enz. Microbiol. Technol. 36: 737-748 (2005)
 26. Lopez JLC, Sanchez perez JA, Fernandez Sevilla JM. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. Enz. Microbiol. Technol. 33: 270-277 (2003)
 27. Sanchez S, Demain AL. Metabolic regulation of fermentation processes. Enz. Microbiol. Technol. 31: 895-906 (2002)
 28. Sabater-Vilar M, Maas RFM, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutat. Res. 444: 7-16 (1999)
 29. Bilgrami KS, Sinha SP, Jeswal P. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of citrinin in mice. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B54: 35-37 (1988)
 30. Comerio R, Virginia E, Pinto F, Vaamonde C. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. Int. J. Food Microbiol. 42: 219-223 (1998)