

Monascus anka를 이용한 홍국의 제조 및 특성

§방병호 · §이문수* · 김관필** · 이기원*** · †이동희***

을지대학교 식품영양학과, *한국생명공학연구원, **롯데제과, ***건국대학교 미생물공학과

Hongkuk Production and the Characteristics of Hongkuk Made from Monascus anka

§Byung-Ho Bang, §Moon-Soo Rhee*, Kwan-Pil Kim**, Ki-Won Lee*** and †Dong-Heui Yi***

Dept. of Food and Nutrition Science, Eulji University, Seongnam 461-713, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

**Lotte Confectionery Co., LTD, Seoul 150-100, Korea

***Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

In order to produce *Hongkuk-ju*, the production and characterization of *Hongkuk* (*Monascus red koji*) by *Monascus anka* KCTC 6121 were investigated. The optimum cultural conditions for the production of enzyme (α -amylase and glucoamylase) and pigment (yellow and red) from this strain on solid culture (steamed rice) were examined. The results showed that the production of α -amylase and glucoamylase reached the highest for 9 days and 8 days, respectively. Since then, the productions decreased slightly. The production of yellow and red pigments reached the highest for 8 days, decreasing slightly soon after. The optimal content of the initial moisture equally presented 30% in the enzyme and pigment production. After that, the enzyme production decreased slowly, whereas pigment production decreased sharply. The optimal temperature of the culture also showed 30°C in the production of enzyme and pigment. It was found that the initial inoculum size in enzyme and pigment production was 10% and 20%, respectively. Under these optimal conditions, the production of monacolin K and citrinin was 74.35 mg/kg and 5 mg/kg for 12 days, respectively.

Key words: *Hongkuk*, *Hongkuk-ju*, *Monascus anka*, monacolin K

서 론

우리나라 전통주는 삼한시대, 삼국시대 및 고려시대를 거쳐 다양한 양조법이 정착되었으며, 약주, 탁주, 소주 등 여러 형태의 술로 발전해 왔다. 우리 술은 전분질 원료로 사용하는 병행복발효주이므로 양조과정 중 반드시 전분질의 당화과정이 필수적이기 때문에 곰팡이를 번식시켜 효소를 이용한 누룩인 발효제가 이용되어 왔다(Baek SY 등 2012).

홍국은 양조식품에 사용되는 누룩의 일종으로 쌀 등의 곡류에 *Monascus* 속의 홍국균을 배양, 증식한 것이다. *Monascus*

속 균주는 수세기 동안 동아시아 일대에서 증미된 쌀에 배양하여 “Anka”, “Red mold rice” 그리고 홍국으로 불리며, 식품의 천연 착색제나 보존제로 이용되어 왔으며, *Rhizopus* sp. 이나 *Aspergillus* sp.을 이용한 재래방식의 국(麴)에 비하여 알코올 생성능이 좋고, 단향과 착색성이 강하여 우리나라를 비롯한 중국 등에서 홍국의 색소와 생리적 기능을 이용해 홍주(anchu), 천태주, 건창홍주, 대만홍주 등의 주류와 홍두부 및 육류와 채소 가공에 이용되어 왔다(Park 등 2003).

Monascus 속의 홍국균은 현재 약 20종, 70여종의 균주가 분리 동정되어 있으며, 균의 종류에 따라 생물활성이 차이가

† Corresponding author: Dong-Heui Yi, Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-3522, Fax: +82-2-3437-8360, E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

§ These authors contributed equally to this work.

있고 이용면에서도 다양하다. 홍국은 합성 tar계 색소를 대체할 수 있는 천연색소로 주목을 받아왔다. 홍국균은 적색계와 황색계, 자색계의 여러 종류의 색소를 생산하며, 화학구조가 규명되어 있는 주요 색소에는 anthraquinone 유도체인 monascorubin 등 6종류가 있다(Park 등 2003; Kwak 등 2004).

홍국 색소는 배양조건에 따라 각각의 색소성분의 함량비율이 달라 색조에 차이를 나타내며, 저장 중 빛에 의해 변화를 받아 황갈색으로 변한다. 홍국 색소 중 monascorubin과 ankaflavin에서 항암 효과가 있는 것으로 보고되었으며(Nan-Wei 등 2005; Toshihiro 등 2005), 황색과 적색색소 추출물이 *E. coli*와 *B. subtilis*, *Streptococcus* 및 *Pseudomonas* sp.에 대해 생육저해 및 항균활성을 가진다는 결과가 발표되었다(Wong & Bau 1997; Wang 등 2002). 그 외 홍국의 약리효과로 *M. ruber*에서 cholesterol 생합성 저해물질인 monacolin K가 발견, 분리되었으며, 이와 유사한 구조를 갖는 다른 활성물질도 분리되었다(Kwak 등 2004; Li 등 2004). 이들 물질은 독성이 낮으며, cholesterol을 길항 저해하는 특징을 갖고 있고, 혈중 cholesterol을 감소시킬 뿐만 아니라 고콜레스테롤 혈증환자에 대해서도 유효하다. 특히 LDL(low density lipoprotein cholesterol)을 우선적으로 낮추는 작용이 있다(Wei 등 2003). 본 연구에서는 *Monascus anka* KCTC 6121로 홍국을 제조하여 기능성 홍국주 제조에 필요한 효소 및 색소 생성 최적 조건을 제시하고자 실험하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양방법

본 실험에 사용한 균주는 *Monascus anka* KCTC 6121로 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며, potato dextrose agar(PDA: Difco Co., Detroy, USA) 배지에 *M. anka* KCTC 6121를 접종하여 30°C에서 7일간 배양하여 4°C에서 냉장 보관하였다. 계대배양은 PDA에 1개월 간격으로 하였다.

2. 홍국의 재조

백미 30 g을 25°C로 조절한 증류수 60 ml에 6시간 침수시킨 후 1시간 동안 쌀의 물기를 빼고 초기 수분 함량 30%로 조절한 후 300 ml 삼각 플라스크에 담아 121°C에서 15분간 증자하였다. 증자한 백미에 포자현탁액을 10%(v/w) 접종하여 30°C에서 12일간 배양하였다. 배양이 끝난 홍국은 50°C에서 24시간 동안 건조 제분하여 사용하였다. 포자현탁액은 실험균주를 PDA 배지를 사용하여 30°C에서 7일간 사면배양하여 종균 사용을 위해 멸균한 증류수 10 ml를 넣어 백금이로 포자를 분리시킨 다음 희석하여, haemocytometer로 포자수가 $2.6 \times 10^{6-7}$ spores/ml 되도록 조절하여 사용하였다.

3. 색소의 측정

건조시킨 홍국 1 g과 95% 에탄올 10 ml를 50 ml conical tube에 넣고 30°C, 150 rpm에서 3시간 동안 진탕 추출하였으며, 이를 원심분리(8,000×g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 색소 측정용 시료로 사용하였다. 색소 측정은 10 mm path glass cells을 이용하여 spectrophotometer(Amersham Bio., Ultrospec 3100 prp)로 황색과 적색색소를 390 nm와 490 nm에서 각각 흡광도를 측정하였고, 희석배율을 곱하여 OD값 1.0을 1 unit로 하여 황색과 적색 색소의 양(OD unit)을 나타내었다.

4. 홍국의 효소활성 측정

α -Amylase와 glucoamylase 활성 측정을 위해 홍국 1 g에 0.5% NaCl 용액 10 ml를 넣고 30°C에서 150 rpm으로 3시간 동안 진탕추출하였으며, 이를 원심분리(8,000×g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

α -Amylase 활성은 Fuwa 법(1954)을 변형하여 측정하였다. 즉, 1% soluble starch 용액(0.2 M sodium acetate buffer, pH 6.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 60°C에서 10분간 반응 후 1 M HCl 용액 1 ml로 반응을 중단하고 1 mM iodine 용액 0.1 ml를 넣어 발색시키고, 증류수로 10 ml 되게 희석 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 unit는 분당 1 μ M의 glucose를 생성하는 양으로 하였다.

Glucoamylase 활성은 Somogyi-Nelson 법(1944)을 변형하여 측정하였다. 즉, 1% soluble starch 용액(0.2 M sodium acetate buffer, pH 5.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 55°C에서 20분간 반응 후 Nelson's 용액 1 ml를 가하여 vortexing한 후 증류수로 25 ml 되게 희석, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 unit는 분당 1 mg의 glucose를 생성하는 양으로 하였다.

5. Monacolin K 및 citrinin 함량 측정

홍국 1 g과 75% 에탄올 10 ml를 가하여 30분간 초음파 처리 후 이를 원심분리(1,000×g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 0.2 μ m syringe filter(Whatman)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같다. 시료 중 monacolin K의 함량을 정량하기 위해 내부 표준물질과 성분 peak area에 의하여 분석하였다. 표준물질은 mevinolin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)을 사용하였다.

그리고 citrinin 함량 측정은 홍국 2.5 g에 methanol 20 ml를 가하여 30분간 초음파 처리 후, 원심분리(1,000×g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 0.2 μ m syringe filter(Whatman)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Table 2와 같다. 시료 중 citrinin의 함량을 정량하기 위해 내부 표준물질과 성분 peak area에 의하여 분석하였다. 표준물질은 citrinin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)을 사용하였다.

Table 1. Condition of monacolin K analysis using HPLC

Component	Details
Apparatus	HPLC SCL-10A, Shimadzu, Japan
Column	Symmetry C18 column (150 mm×3.9 mm, 5 μm)
Mobile phase	Acetonitrile : 0.5% phosphoric acid (65:35, v/v)
Flow rate	0.7 ml/min
Detector	UV 238 nm
Injection volume	10 μl

Table 2. Condition of citrinin analysis using HPLC

Component	Details
Apparatus	HPLC SCL-10A, Shimadzu, Japan
Column	Symmetry C18 column (150 mm×3.9 mm, 5 μm)
Mobile phase	Methanol : Water (80:20, v/v)
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	UV 254 nm
Injection volume	10 μl

결과 및 고찰

1. 배양시간의 영향

홍국의 색소 및 α -amylase와 glucoamylase 활성을 측정하기 위해 30°C 배양기에서 1~12일 동안 배양하여 최적 배양 시간을 설정하였다.

탁주 및 청주 등의 병행복발효주는 누룩에 있는 α -amylase와 glucoamylase로 전분의 당화와 병행하여 효모의 알코올 발효가 진행된다. 홍국주 제조를 위한 색소와 효소활성을 측정하였으며, 배양시간에 따른 변화는 Fig. 1과 같다. 실험균주의 황색 및 적색색소는 배양 3일째까지는 거의 색소의 생성이

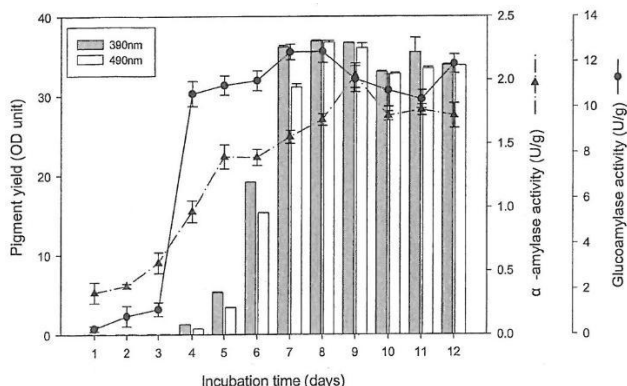


Fig. 1. Effect of incubation time on the pigment and enzyme production by solid culture of *Monascus anka*. Rice koji was cultivated at 30°C for different times from 1 day to 12 days.

없었으며, 배양 3일 이후부터 색소 생성이 시작되었다. 홍국을 8일 동안 배양하였을 때 황색색소와 적색색소의 OD는 각각 36.91 unit와 36.74 unit로 가장 높았으며, 이후 색소의 생산은 유사한 경향을 보였다. 발효기간 중 황색색소의 함량이 적색색소보다 높은 함량을 보였다. 이와 같은 색소 생성의 pattern은 Lee 등(2003)의 결과와 유사하였으며, 색소 생성 최고에 도달하는 시기는 이보다 더 빨랐다.

α -Amylase와 glucoamylase 활성은 3일째부터 상승하여 각각 9일과 8일째 최대 활성도를 보였으며, Babitha 등(2007)의 7일에서의 최대 활성도를 보인 결과와 비슷하였다.

2. 수분 함량의 영향

고체배지에 있어서 기질의 수분 함량은 미생물의 성장과 대사산물에 크게 영향을 미친다(Lee 등 2003; Pandey A 2003). 수분 함량에 따른 색소와 효소활성의 변화는 Fig. 2와 같다. 본 실험에서는 최초 백미의 수분 함량을 30%로 조정하였으며, 10% 단위로 수분 함량을 증가시키면서 12일간 배양하였다. 백미의 수분 함량이 40%에서 색소의 생산은 절반 이상 감소하였으며, 이후 유사한 색소의 함량을 보였다. 고체배양에서 수분 함량이 33~38%일 경우 색소의 생산은 가장 높다는 Babitha 등(2007), Yongsmith 등(2000)의 결과와 유사하였다. 색소 생산에 따라 효소의 활성 역시 유사한 경향을 보였다. Ellaiah 등(2002)의 α -amylase와 glucoamylase 활성이 수분 함량 70~80%일 때 가장 높다는 보고와는 다르게 수분 함량의 증가에 따라 효소의 활성은 일정하게 줄어드는 결과를 보여, 배양 재료에 따라 적합한 수분 함량은 다른 것으로 생각된다. 따라서 고체배양에서 기질의 수분 함량은 대사산물의 생산에 영향을 보였다.

3. 배양온도의 영향

실험균주의 색소와 효소의 생산에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 증자한 백미에 포자를 접종하여 25°C, 28°C, 30°C, 34°C 및 37°C로 온도를 각각 달리하여 8일간 배양하면서 색소와 효소 생성능력을 검토하였다(Fig. 3). 고체배양 시 품온은 상승하며, 증미층이 단단해져 균사의 생육에 영양을 미치게 된다. 따라서 굳어진 증미를 일정한격으로 부수어 품온을 일정하게 유지해 주면서 실험을 진행하였다. 그림에서 보는 바와 같이, 배양온도 30°C에서 색소 및 효소 생성 최대치를 나타내었다. 그리고 28°C와 34°C에서의 색소의 생성 정도는 비슷한 수치를 나타내었으나, 효소의 생성은 34°C에서 보다 낮은 수치를 보였다. 따라서 색소와 효소의 높은 생산을 위해서는 30°C에서의 배양이 가장 적합하였다. 본 결과는 Lee 등(2003)의 결과와 잘 일치하였으며, Juzlova 등(1996)의 액체배양에서의 *Monascus* 균주들의 배양온도 범위가 25~37°C

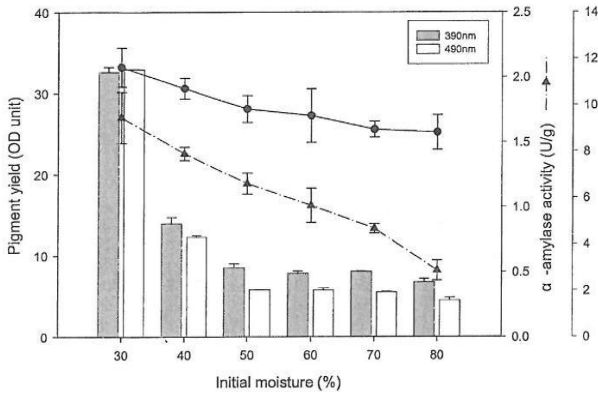


Fig. 2. Effect of initial moisture content of rice on the pigment and enzyme production by solid culture of *Monascus anka*. Rice koji was cultivated at 30°C for 12 days in different moisture content from 30% to 80%.

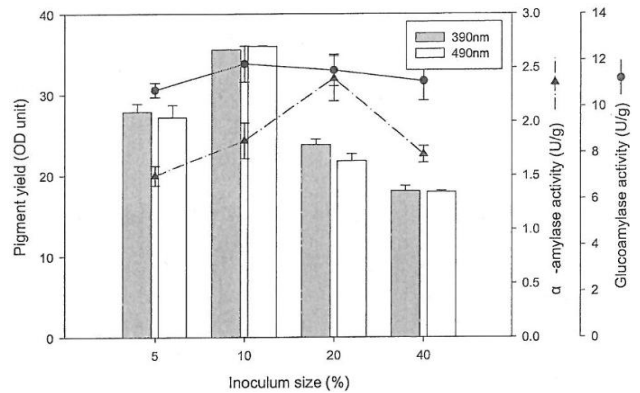


Fig. 4. Effect of inoculum size on the pigment and enzyme production by solid culture of *Monascus anka*. Rice koji was cultivated at 30°C for 12 days in moisture content 30%.

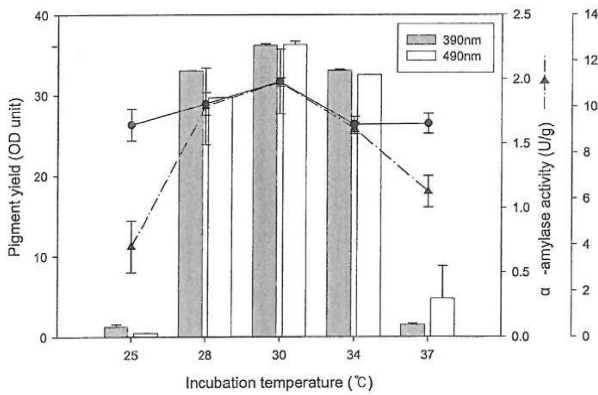


Fig. 3. Effect of incubation temperature on the pigment and enzyme production by solid culture of *Monascus anka*. Rice koji was cultivated at given temperature (25°C, 28°C, 30°C, 34°C, 37°C) for 12 days in moisture content 30%.

이며, 그 중 가장 적합한 온도가 30°C임을 밝힌 결과와 잘 일치하는 온도였다. 이상의 결과로 실험균주의 색소 생성의 최적온도는 30°C임을 알 수 있었으며, 액체배양에서 최적온도의 범위에서와 같이 고체배지에서도 그 범위를 벗어나지 않는다는 것을 알 수 있었다.

4. 포자 접종량의 영향

실험균주의 색소 및 효소 생성에 미치는 초기 포자접종량의 영향을 검토하였는데(Fig. 4), 그 결과 접종량이 10%(v/v, $2.6 \times 10^6 \sim 10^7$ spores/ml)일 때 색소의 생성은 황색 35.56 unit와 적색 36.0 unit로 가장 높았다. 효소활성은 접종량이 20%(v/v)인 경우 가장 높게 나왔다. 낮은 접종량의 경우, 효소의 생성량이 적게 나왔고, 많은 경우 색소 생성에 영향을 미치는 결

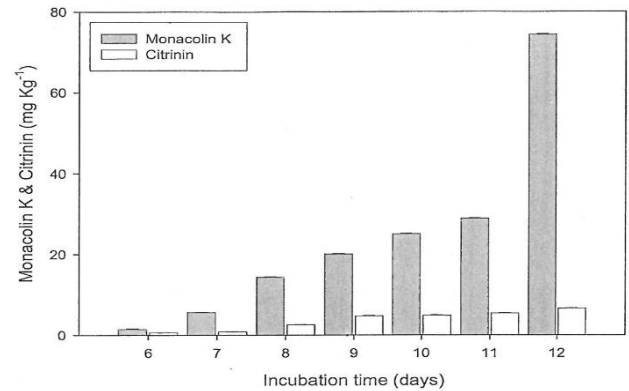


Fig. 5. Effect of incubation time on the monacolin K and citrinin production by solid culture of *Monascus anka*. Rice koji was cultivated at 30°C for 12 days in moisture content 30%.

과가 나왔다. 접종량에 따라 미생물이 기질을 영양원으로 하여 증식과 대사산물의 생성에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Pandey A 2003).

5. Monacolin K와 citrinin의 분석

Monacolin K와 citrinin은 *Monascus* sp.에서 생산되는 이차 대사산물로 기능성 측면에서 중요한 요소이다. 지금까지 조사된 최적 조건에서 즉, 초기 포자접종량 10%(v/v, $2.6 \times 10^6 \sim 10^7$ spores/ml), 배양온도 30°C 및 초기 수분 함량 30%로 하여 12일까지 배양한 후 monacolin K와 citrinin의 함량 변화를 배양 날짜별로 조사하였다(Fig. 5). 그림에서 보는 바와 같이 색소의 경우 이미 앞에서 설명한 바와 같이 8~9일에서 최대 색소 생성량을 보였으나, Monacolin K와 citrinin의 경우 8일 이후부터도 계속적인 증가를 보여 12일째 최대 생성량(74.35 mg/kg, 5 mg/kg)을 나타내어 색소의 생성과 Monacolin K와

citrinin의 생성과는 다른 경향을 나타내었다.

Wang 등(2005)은 다양한 균의 citrinin 함량을 조사하였는데, 78~480 mg/kg의 분포를 보였다고 하였으며, Wang 등(2002)은 변이시킨 *Monascus purpureus*를 균주로 사용하여 마를 기질로 하여 monacolin K 530 ± 11.31 ppm, citrinin 0.46 ± 0.001 ppm의 결과를 얻었다고 한 보고보다는 생성량이 적었으나, Lee 등(2006)의 쌀과 마를 이용하여 12일간 배양 후 Monacolin K 14~119 mg/kg의 얻었다는 결과와 본 실험의 12일째 Monacolin K 함량 74.35 mg/kg과 유사한 함량을 나타냈었다. 그러나 citrinin의 함량은 국내 식약청의 홍국 기준함량(식품공전 2005) 50 μ g/kg 이하로 규정하고 있어 본 실험의 citrinin 함량은 이를 상회하는 결과를 보였다.

요약 및 결론

가능성 홍국주를 제조하기 위하여, *Monascus anka* KCTC 6121를 이용하여 홍국을 제조하고, 그 특성을 조사하였다. 즉, 고체배지(증자한 쌀)에서 홍국의 효소(α -amylase와 glucoamylase)와 색소(황색과 적색)의 생성 최적 배양조건을 조사하였다. 그 결과, α -amylase와 glucoamylase 생성은 배양시간 9일과 8일째 각각 최고에 달하였으며, 그 후부터는 약간씩 감소하였다. 황색색소와 적색색소는 다 같이 배양 8일째 최고에 달하였다가 그 후부터 경미하게 감소하는 경향을 나타내었다. 초기 수분 함량의 영향으로는 효소와 색소 생성 모두 30%일 때가 최적으로 나타났다. 그리고 그 이상의 농도에서는 효소생성은 천천히 감소하였고, 색소 생성은 급격히 감소하는 경향을 보였다. 배양 온도 30°C에서 효소와 색소 모두 생성이 최고를 나타내었다. 포자 초기 접종 량에서 효소와 색소 생성량은 각각 20% 및 10%일 때 최고에 달하였다. 이와 같은 최적 조건에서 배양 12일째 monacolin K와 citrinin 생성량은 각각 74.35 mg/kg, 5 mg/kg으로 나타났다.

참고문헌

Babitha H, Soccol CR, Pandey A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology* 98:1554-1560

Baek SY, Kim JY, Choi JH, Choi JS, Shoi HS, Ueong ST, Yeo SH. 2012. Assessment of the quality characteristics of mixed-grain *Nuruk* made with different fungal strains. *J East Asian Soc Dietary Life* 22:103-108

Ellaiah P, Adinarayana K, Bhavani Y, Padmaja P, Srinivasula B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated

Aspergillus species. *Process Biochem* 38:615-620

Fuwa H. 1954. A new method of microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J Biochem* 41:583-603

Juzlova P, Martinkova I, Kren V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus* a review. *J Ind Microbiol* 16:163-170

Kwak EJ, Lee HM, Lim SI. 2004. Screen and identification of *Monascus* strain producing Monacolin K. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:164-169

Lee CL, Wang JJ, Kuo SL, Pan TM. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1254-1262

Lee SM, Kim HS, Yu TS. 2003. The optimal condition for production of red pigment by *Monascus anka* on solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:155-160

Li YG, Zhang F, Wang ZTHua ZB. 2004. Identification and chemical profiling of monocolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 35:1101-1112

Nan-Wei S, Yii-Lih L, Min-Hsiung L, Chen-Ying H. 2005. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J Agric Food Chem* 53:1949-1954

Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the *Somogy* method for the determination of glucose. *J Biochem* 153:375-380

Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 14:81-84

Park IB, Park BS, Jung ST. 2003. Brewing and functional characteristics of *Hongkuk Ju* prepared with various *Hongkuku*. *Korean J Food Sci Technol* 35:943-950

Toshihiro A, Harukuni T, Ken Y, Motohiko U, Ayaka K, Naoyuki S, Takashi S, Nobukazu T, Hoyoku N. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J Agric Food Chem* 53:562-565

Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL. 2002. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Micro Technol* 31:337-344

Wang YZ, Ju XL, Zhou YG. 2005. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiol* 22:145-148

Wei W, Lia C, Wang Y, Su Y, Zhu J, Kritchevsky D. 2003.

- 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
- Wong HC, Bau YS. 1997. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus* went. *Plant Physiol* 60:578-581
- Yongsmith B, Kitprechavanch V, Chitradon L, Chairsisook C, Budda N. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture. *J Mol Catal B : Enzymatic* 10:263-272
- 식품공전. 2005. 제2005-25호 건강기능식품의 기준 및 규격. 식품의약품안전청.
-
- 접 수 : 2012년 11월 13일
최종수정 : 2012년 12월 13일
채 택 : 2012년 12월 17일