

홍국균 발효가 발아현미의 Monacolin K 함량과 항산화 활성에 미치는 영향

이상훈¹ · 장귀영¹ · 김민영¹ · 김신제² · 이연리³ · 이준수¹ · 정헌상¹

¹충북대학교 식품생명공학과

²(주)에프앤피 중앙연구소

³대전보건대학 식품영양과

Effect of *Monascus* Fermentation on Content of Monacolin K and Antioxidant Activities of Germinated Brown Rice

Sang Hoon Lee¹, Gwi Yeong Jang¹, Min Young Kim¹, Shinje Kim²,
Yuon Ri Lee³, Junsoo Lee¹, and Heon Sang Jeong¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

²Center for Fungi and Plant Genome Research, FnP Corp.

³Department of Food and Nutrition, Daejeon Health Science College

ABSTRACT This study was performed to investigate the changes in monacolin K content and antioxidant activities of *Monascus*-fermented brown rice with different germination temperatures and periods. Brown rice was germinated at 32, 35 and 37°C for 1~4 days, after white rice (WB), brown rice (BR), and germinated brown rice (GBR) were fermented with *M. pilosus* 305-9 at 30°C for 20 days. The redness, yellowness and *Monascus* pigments increased after germination. Total monacolin K content increased from 215.85 mg/kg of BR to 1,263.04 mg/kg of GBR (32°C/1 day), whereas monacolin K content decreased with increase in germination period. Citrinin was not detected in any of the samples. Total polyphenol (TPC) and flavonoid contents (TFC) increased with increase in germination temperature and period, whereas electron donating ability (EDA) and total antioxidant activities (TAA) decreased due to reduction of *Monascus* pigment content. The TPC and TFC showed the highest values (13.80 mg/g and 1.30 mg/g, respectively) in GBR (37°C/4 day), whereas EDA and TAA showed the highest values (22.16 mg Trolox equivalent/g and 62.27 mg ascorbic acid equivalent/g, respectively) in GBR (32°C/1 day). These results indicated that the optimal germination temperature and period for increasing monacolin K content and antioxidant activities was found to be at 32°C for 1 day. In addition, it was found that *M. pilosus* 305-9 was a useful strain for increasing monacolin K content without producing citrinin in functional foods and pharmaceutical industrial regions.

Key words: *Monascus pilosus*, *Monascus* pigment, monacolin K, citrinin, antioxidant activity

서 론

Monascus 속 곰팡이인 홍국균은 특유의 적색으로 인하여 중국과 대만을 중심으로 약 600년 전부터 발효식품의 제조뿐 아니라 천연색소나 보존제로 사용되어 왔으며(1), 백미에 배양한 홍국쌀은 항균 활성과 함께 콜레스테롤 생합성 억제(2), 혈압 강하 및 혈관 이완 효과(3) 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 특히 monacolin K는 cholesterol 생합성 경로에서 cholesterol synthetase(HMG-CoA reductase)의 저해제로 작용하여 cholesterol의 생합성을 억제하는 것으로 보고되었으며(4), 우수한 생리활성으

로 건강기능식품 소재로 활용도가 높아지고 있다. 식품의약품안전처에서는 기능성 원료로서 홍국을 활성형 monacolin K가 포함된 총 monacolin K를 500 mg/kg 이상 함유하고 citrinin은 0.05 mg/kg 이하여야 하며, 일일섭취량을 총 monacolin K로서 4~8 mg으로 규정하고 있다(5).

홍국과 관련된 연구는 발효과정 중 citrinin 생성량을 감소시킬 수 있는 균주와 배양방법을 개발하는 연구(6-8), monacolin K 생성량을 증가시키기 위한 균주 탐색, 기질의 종류 및 배양방법 최적화에 관한 연구들이 주를 이루고 있다(9-14). 또한 홍국균에 의한 monacolin K 생성량은 기질의 탄소원으로서 glucose 함량, 배양 시 홍국균과 기질이 접촉하는 비표면적과 산소의 이동성에 큰 영향을 받는 것으로 보고되었다(14).

벼의 종자는 씨눈과 배젖에 있는 비활성 상태의 DNA 유전정보와 각종 효소, 영양소 등이 외적환경 여건이 좋아지면 활성화되어 발아되는데, 일반적으로 발아가 진행됨에 따라

Received 2 June 2015; Accepted 3 August 2015

Corresponding author: Heon Sang Jeong, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Chungbuk 28644, Korea

E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2570

다양한 성분들이 증가되거나 생성되고 그에 따라 다양한 생리활성이 증가되는 경향이 있다고 보고되고 있으며, 특히 발아된 현미는 γ -oryzanol이나 arabinoxylan, γ -aminobutyric acid, 비타민 E 등의 생리활성 성분들이 증가하고 발아 중에 효소가 활성화되어 영양성분들의 체내 흡수가 용이하게 되는 것으로 알려져 있다(15-17). 특히 발아과정 중 활성화된 α -amylase와 glucoamylase로 인하여 전분의 연화와 당화가 일어나(9) 홍국균 배양 시 좋은 탄소원으로 작용하여 홍국색소와 monacolin K 생성량을 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다.

홍국균 배양 시 기질로서 백미, 현미 및 발아현미를 사용하여 홍국색소 및 monacolin K 생성량 변화를 연구한 결과가 일부 진행되었으나 균주에 의한 영향이 커서 발아에 의한 효과를 규명하기 어려우며(1,12), 발아조건을 달리하여 제조한 발아현미를 기질로 사용한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 갖는 홍국색소와 monacolin K 생성량을 증가시키기 위한 기질로서 백미, 현미 및 발아현미의 가능성을 검토하고, 발아온도와 기간을 달리하여 제조한 발아현미를 이용하여 효율적인 발아조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 발아현미 제조

본 실험에 사용한 현미는 2014년도 충북 증평에서 생산된 한국산 일반 벼 품종인 일품 벼(*Oryza sativa* L.)를 농가로부터 구매하여 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 현미를 제조하였다. 발아는 Kim 등(18)의 방법에 따라 현미를 20°C의 물로 수세하여 이물질을 제거하고 1일 2회 물갈이를 실시하며 3일간 암소에서 침지시켰다. 침지된 현미는 습도 85%로 조정된 발아기(WGC 450, Daihan Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 온도 32, 35 및 37°C, 기간 1~4일의 조건으로 발아시켰다. 발아된 현미는 50°C의 열풍건조기(WFO-459PD, EYELA, Tokyo, Japan)에서 2일간 건조시켜 사용하였다.

홍국 배양

발아온도와 기간을 달리하여 제조한 발아현미를 20°C에서 12시간 수침시킨 후 건져내어 물기를 제거하고 air filter가 부착된 멸균 polyethylene bag에 1 kg씩 입봉하고 121°C에서 120분간 멸균하였다. 미리 준비해둔 *Monascus pilosus* 305-9(KFCC 11410P) 배양액 100 mL를 접종한 후 온도 29±1°C, 습도 75±5%의 배양기에서 20일간 배양하였다. 발효물을 100°C에서 30분간 2차 살균한 후 55°C에서 수분 함량이 10% 이하가 되도록 건조하고 60 mesh 이하로 분쇄하여 홍국배양 발아현미 시료를 제조하였다.

에탄올 추출물 제조

홍국색소 및 항산화 활성 측정을 위한 에탄올 추출물은 홍국미, 홍국현미 및 홍국발아현미 분말 각 5 g에 75% 에탄올(v/v) 50 mL를 가하여 1시간씩 3회 초음파 추출한 후 여과(Whatman No. 42, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)하여 제조하였다. 여과액을 회전식 진공농축기(N-1000, EYELA)로 40°C에서 용매를 완전히 제거한 후 동결건조(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea) 하고 -18°C 냉동고에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

색도 및 홍국색소 측정

에탄올 추출물의 색변화는 색차계(CR-200, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명암도를 나타내는 L값(lightness), 적색도를 나타내는 a값(redness), 황색도를 나타내는 b값(yellowness)을 측정하였다. 이때 보정에 사용된 표준판은 L=89.12, a=-1.35, b=9.00의 값을 가진 백색판을 이용하였다. 홍국색소(*Monascus* pigment)는 에탄올 추출물 중 일부를 취하여 여과(Whatman No. 42)한 후 spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 각각 500 nm(red color group), 470 nm(orange color group) 및 400 nm(yellow color group)에서 흡광도를 측정하여 그 값으로 나타내었다(19).

Monacolin K 및 citrinin 함량 측정

Monacolin K 함량 측정을 위한 추출물 제조는 건강기능식품 시험법의 총 모나콜린 K 시험법(III.3.6.6 총 모나콜린 K)에 따라 준비하였다(5). 즉 홍국미, 홍국현미 및 발아온도와 기간별 홍국발아현미 분말 각 4 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 75% 에탄올 40 mL를 넣은 후 1시간 초음파 추출하였다. 추출물을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상등액을 50 mL로 정용하고 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하였으며, 적정농도로 희석하여 분석에 사용하였다. 표준용액은 비활성형 monacolin K(Mevinolin, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 mg을 정확히 칭량하여 75% 에탄올 50 mL에 녹여 제조하였으며, 활성형 monacolin K는 이 중 2 mL를 취하여 0.05 N 에탄올성 수산화나트륨 용액 0.5 mL를 넣고 실온에서 30분 방치하여 제조하였다. Monacolin K의 분석은 Avula 등(20)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 HPLC(Acme 9000 system, Younglin Inst., Anyang, Korea) 분석에는 Mightysil RP-18 GP column(250×4.6 mm, 5 μ m pore size, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 이동상은 acetonitrile를 A로, 0.2% phosphoric acid를 B로 하여 초기 35:65에서 20분에 75:25, 21분에 100:0, 35분에 100:0, 36분에 35:65, 45분에 35:65의 기울기용리로 하였으며 시료 20 μ L를 주입하여 1 mL/min의 유속으로 용출시키고 UV detector를 이용하여 237 nm에서 측정하였다.

Citrinin 함량 측정을 위한 추출물 제조는 건강기능식품 시험법의 시트린인 제1시험법(III.2.5.4.1 시트린인(제1법))에 따라 준비하였다(5). 즉 홍국미, 홍국현미 및 발아온도와 기간별 홍국발아현미 분말 각 2.5 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 에탄올 20 mL를 넣은 후 30분간 초음파 추출하였다. 추출물을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 농축한 후 메탄올 1 mL에 재용해시키고 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 분석에 사용하였다. 표준용액은 citrinin(Sigma-Aldrich Co.) 10 mg을 정확히 칭량하여 100% 메탄올 100 mL에 녹여 제조한 후 희석하여 사용하였다. Citrinin의 분석은 Avula 등(20)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 HPLC(Agilent 1200 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 분석에는 Mightysil RP-18 GP column을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile : 0.1% trifluoroacetic acid = 40:60으로 1 mL/min의 유속으로 용출시키고 fluorescence detector를 이용하여 여기파장 335 nm, 측정파장 502 nm에서 측정하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu phenol reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(21). 즉 10 mg/mL로 제조한 각 추출물 100 µL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 다음 3분 동안 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 가하고 30분 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. 표준물질인 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 g 중의 mg gallic acid로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Dewanto 등(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 10 mg/mL로 제조한 추출물 250 µL에 증류수 1 mL와 5% NaNO₂ 75 µL를 가한 다음 5분 후 10% AlCl₃·6H₂O 150 µL를 가하여 6분 방치하고 1 N NaOH 500 µL를 가하였다. 반응 11분 후 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질인 catechin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량은 시료 g 중의 mg catechin으로 나타내었다.

전자공여능 및 총 항산화력 측정

전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성으로 측정하였다(22). 즉 0.5 mg/mL로 제조한 에탄올 추출물 0.2 mL에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.8 mL를 가하여 실온에서 60분 동안 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mg TE/g)로 표현하였다. 총 항산화력은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) cation decolorization assay 방법(21)에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS

양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 0.5 mg/mL로 제조한 에탄올 추출물 50 µL를 가하여 흡광도의 변화를 60분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 L-ascorbic acid를 동량 첨가하였고 AEAC(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, mg AAE/g)로 표현하였다.

통계처리

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리 간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($P=0.05$). 또한 요인들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 통하여 분석하였다($P=0.05$).

결과 및 고찰

색도 및 홍국색소 변화

발아현미 홍국배양물의 색도 변화는 Table 1과 같이 적색도와 황색도는 백미보다 현미가 높았으며, 발아현미를 기질로 이용할 경우 이러한 색소 생성량을 크게 증가시켰다. *Monascus* 속 균주들은 자색에서 적색의 색을 띠며(19), 홍국색소는 황색의 monascin과 ankaflavin, 오렌지색의 rubropunctatin과 monascorubrin, 적색의 rubropunctamine과 monascorubramine 등 10여 종 이상의 색소가 복합적으로 구성되어 있다(23). 이들 색소성분들은 특이적인 UV-

Table 1. Changes in the color of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

Germination		Whiteness (L-value)	Redness (a-value)	Yellowness (b-value)
Temp. (°C)	Period (day)			
White rice (WR)		45.11±0.03 ^b	1.68±0.04 ^m	0.15±0.01 ⁿ
Brown rice (BR)		44.26±0.03 ^c	2.88±0.03 ^l	0.91±0.01 ^m
32	1	37.67±0.03 ⁿ	9.25±0.12 ^a	5.99±0.02 ^g
	2	38.88±0.04 ^m	8.33±0.04 ^b	7.25±0.02 ^c
	3	42.88±0.03 ^e	4.17±0.01 ^j	4.30±0.03 ^k
	4	43.54±0.01 ^d	3.47±0.02 ^k	4.44±0.01 ^j
35	1	41.05±0.02 ^h	5.61±0.04 ^g	7.07±0.02 ^d
	2	39.73±0.02 ⁱ	7.06±0.06 ^c	7.35±0.03 ^b
	3	41.71±0.02 ^g	5.11±0.03 ^h	5.57±0.01 ^h
	4	45.27±0.01 ^a	1.16±0.01 ⁿ	1.03±0.02 ^l
37	1	39.27±0.01 ⁱ	7.43±0.03 ^d	7.43±0.01 ^a
	2	39.83±0.01 ⁱ	6.87±0.01 ^f	6.76±0.02 ^f
	3	39.39±0.04 ^k	7.59±0.05 ^c	6.94±0.03 ^e
	4	42.04±0.01 ^f	4.82±0.04 ⁱ	5.43±0.03 ⁱ

Different letters (a-n) in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. Changes in the *Monascus* pigments of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

Germination		Red color group	Orange color group	Yellow color group
Temp. (°C)	Period (day)	(500 nm)	(470 nm)	(400 nm)
White rice (WR)		0.122±0.001 ^l	0.099±0.001 ^l	0.181±0.001 ^j
Brown rice (BR)		0.235±0.007 ^k	0.178±0.004 ^j	0.353±0.010 ⁱ
32	1	2.320±0.024 ^a	1.909±0.017 ^a	4.663±0.026 ^a
	2	1.669±0.038 ^b	1.398±0.033 ^b	3.760±0.075 ^b
	3	0.494±0.017 ⁱ	0.420±0.014 ^h	1.169±0.041 ^h
	4	0.432±0.003 ^j	0.383±0.002 ⁱ	1.225±0.010 ^h
35	1	0.936±0.004 ^f	0.815±0.004 ^f	2.178±0.010 ^f
	2	1.289±0.017 ^d	1.113±0.014 ^d	3.074±0.048 ^d
	3	0.701±0.007 ^g	0.597±0.005 ^g	1.738±0.016 ^g
	4	0.129±0.002 ^l	0.131±0.001 ^k	0.415±0.004 ⁱ
37	1	1.425±0.008 ^c	1.230±0.007 ^c	3.580±0.017 ^c
	2	1.189±0.014 ^e	1.015±0.013 ^e	2.705±0.034 ^e
	3	1.323±0.061 ^d	1.111±0.051 ^d	3.117±0.140 ^d
	4	0.664±0.009 ^h	0.577±0.007 ^g	1.744±0.022 ^g

Different letters (a-l) in the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

absorbance를 가져 집단화할 수 있으며 그 결과는 Table 2와 같다. 적색계(A_{500}), 오렌지계(A_{470}) 및 황색계(A_{400}) 모두 백미보다는 현미에서 높았으며, 발아현미에서 그 생성량이 크게 증가하였으나 발아 기간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 색차계를 이용하여 측정한 적색도와 황색도 결과와 일치하였다(Table 1). 홍국색소의 색상, 색의 강도 및 생성량은 균의 종류는 물론 생육조건에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 알려져 있다(24). Kim 등(11)은 홍국균의 생육과 색소 생성의 관계를 조사한 결과 이들 간의

높은 정의 상관관계($r=0.988$)가 있음을 밝혔으며, 본 연구 결과 발아 기간에 따라 색소 생성량이 감소하는 것은 미생물의 생육이 저하되고 있음을 의미한다. 또한 발아에 따라 활성화된 α -amylase와 glucoamylase로 인하여 glucose 함량이 증가되고 홍국균의 생육이 증가되어 발아 초기에 홍국 색소 생성량이 높았으나(9), 발아가 진행되는 과정에서 연화된 전분립이 살균과정에서 응집하여 홍국균이 생육할 수 있는 비표면적이 작아지고 통기성이 저하되어 색소 생성량이 감소하는 것으로 판단된다(11).

Monacolin K와 citrinin 함량 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 monacolin K 함량 변화는 Table 3과 같다. 총 monacolin K 함량은 현미의 경우 215.85 mg/kg으로 백미의 40.41 mg/kg보다 5.3배 높은 함량을 보였다. 32°C에서 1일간 발아시킨 발아현미는 1,263.04 mg/kg으로 무발아현미에 비해 5.9배 높은 함량 증가를 보였다. 그러나 발아 기간이 길어질수록 총 monacolin K 함량은 감소하는 경향을 보였으며, 35°C에서 4일간 발아시킨 발아현미는 24.57 mg/kg으로 가장 낮은 함량을 보였다. 홍국균 배양 시 monacolin K는 활성형인 acid form과 비활성형인 lactone form으로 공존하며 이들은 일반적으로 6:5의 함량 비율을 가져 monacolin K의 인위적인 첨가 여부를 판단하는 지표가 된다(5). 식품의약품안전처(KFDA)에서 홍국미 제조에 사용할 수 있도록 허용하고 있는 홍국균은 *Monascus anka*, *M. purpureus*, *M. pilosus* 및 *M. ruber*의 총 35종이며(5), 이들 균주는 기질의 종류와 양, 배양방법, 배양온도 및 배양시간에 따라 monacolin K 생성량과 활성형/ 비활성형 monacolin K 비율이 다양하다(13). Kwak 등(12)은 콩, 밀, 보리, 찹쌀 및 백미에

Table 3. Changes in the content of activated and non-activated monacolin K of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

Germination		Monacolin K content (mg/kg)			Citrinin content (mg/kg)
Temp. (°C)	Period (day)	Activated type (Acid form)	Non-activated type (Lactone form)	Total monacolin K	
White rice (WR)		30.22±1.24 ^j	10.19±0.12 ^j	40.41±1.19 ^k	ND
Brown rice (BR)		113.82±2.13 ^h	102.03±1.38 ^h	215.85±2.91 ^h	ND
32	1	573.53±10.46 ^a	689.51±5.28 ^a	1,263.04±15.75 ^a	ND
	2	424.89±8.81 ^b	331.55±5.27 ^c	756.44±14.07 ^b	ND
	3	72.95±1.14 ⁱ	62.35±1.21 ⁱ	135.30±2.35 ^j	ND
	4	73.56±1.21 ⁱ	108.79±5.82 ^h	182.35±7.03 ⁱ	ND
35	1	137.14±1.43 ^g	204.51±2.19 ^f	341.66±3.62 ^f	ND
	2	266.07±0.07 ^e	269.45±0.52 ^d	535.52±0.59 ^d	ND
	3	135.18±0.26 ^g	123.21±1.57 ^g	258.38±1.83 ^g	ND
	4	9.96±0.13 ^k	14.60±0.26 ^j	24.57±0.39 ^l	ND
37	1	309.32±8.29 ^d	447.02±12.25 ^b	756.33±20.54 ^b	ND
	2	204.63±2.48 ^f	198.67±2.28 ^f	403.30±4.76 ^c	ND
	3	333.67±3.10 ^c	248.84±3.13 ^e	582.51±6.23 ^c	ND
	4	116.95±0.87 ^h	128.04±0.51 ^g	244.99±1.37 ^g	ND

ND: not detected.

Different letters (a-l) in the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

M. purpureus CBS 291.34를 배양한 결과 액체배양물보다 고체배양물의 monacolin K 함량이 더 높았으며, 찹쌀과 보리의 함량은 각각 20 mg/kg과 40 mg/kg이었으나 백미는 2,890 mg/kg으로 높아 기질과 배양방법에 따라 monacolin K 생성량이 달라진다고 보고하였다. 또한 Park 등(14)은 *M. ruber* KCTC6122와 KCCM60141을 7종의 쌀품종(고아미, 고아미2, 상주찰벼, 설갱, 세계진미, 영호진미, 칠보)에 배양한 결과 상주찰벼가 각각 47.24 mg/kg과 117.03 mg/kg으로 가장 높게 나타나 균주와 쌀 품종에 따라 총 monacolin K 생성량과 활성형 monacolin K 비율이 달랐다. 홍국균 발효를 위한 기질 중 두류보다 곡류가 유리하며, 백미의 monacolin K 생성이 우수하고 총 monacolin K 함량 뿐 아니라 활성형과 비활성형 monacolin K 함량 비율도 품종에 따라 다양하였다. Monacolin K 생성량은 홍국균의 생장과 관련이 높고(11), 기질의 탄소원으로 glucose의 이용도가 높지만 sucrose와 lactose는 전혀 이용할 수 없으며(10), 배양 중 공기가 통할 수 있는 호기조건에서 생육이 원활하다고 보고되었다(12). 본 연구에서 백미와 현미보다 발아현미를 기질로 이용할 때 monacolin K 생성량이 증가한 이유는 발아에 의해 활성화된 효소들이 홍국균의 탄소원인 glucose의 생성량을 증가시켰기 때문이며, 발아가 진행됨에 따라 탄소원뿐 아니라 질소원 및 무기성분의 소비에 의해 monacolin K 생성량이 감소한 것으로 판단된다(11). 이는 Kang 등(1)이 발아 메밀의 싹길이가 증가함에 따라 monacolin K 함량이 감소한 결과와 일치하였다.

Citrinin은 홍국배양 시 색소와 함께 생성되는 mycotoxin의 일종으로 항균 효과가 있으나 여러 동물에서 신장독성을 유발한다고 알려져 있어(6) 식약처에서는 홍국제품의 citrinin 함량을 0.05 mg/kg 이하로 제한하고 있다(5). 이에 따라 발효과정 중 citrinin 생성량을 감소시킬 수 있는 균주와 배양방법을 개발하는 연구가 진행되었다(7,8). 본 연구 결과 모든 처리구에서 citrinin이 검출되지 않아(Table 3) 변이주인 *M. pilosus* 305-9(KFCC 11410P)는 citrinin을 생성하지 않고 고농도의 monacolin K를 생성하는 유용한 균주로 건강기능식품 개발에 보다 적극적으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 변화는 Table 4와 같다. 홍국배양 현미의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 3.71 mg/g 및 0.35 mg/g으로 홍국배양 백미의 0.31 mg/g 및 0.08 mg/g보다 높았다. 또한 홍국을 배양하지 않은 현미의 1.40 mg/g 및 0.19 mg/g보다 높아 홍국배양에 따라 페놀 화합물의 함량이 증가되었다(data not shown). Kim 등(25)은 9종의 국산 쌀 품종으로부터 제조한 현미와 백미의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과 현미에 대하여 각각 1.15~5.99 mg/g 및 0.12~1.62 mg/g의 범위를 보여 백미

Table 4. Changes in the total polyphenol and flavonoid contents (mg/g) of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

Germination		Total polyphenol content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)
Temp. (°C)	Period (day)		
White rice (WR)		0.31±0.01 ^m	0.08±0.00 ^m
Brown rice (BR)		3.71±0.14 ^l	0.35±0.00 ^l
32	1	4.62±0.08 ^k	0.43±0.01 ^k
	2	5.21±0.11 ^j	0.49±0.01 ^j
	3	7.32±0.09 ^h	0.69±0.01 ^h
	4	8.84±1.24 ^f	0.83±0.02 ^f
35	1	5.86±0.08 ⁱ	0.55±0.01 ⁱ
	2	7.33±0.11 ^h	0.69±0.00 ^h
	3	9.14±0.12 ^c	0.86±0.01 ^c
	4	11.53±0.08 ^b	1.08±0.01 ^b
37	1	8.26±0.14 ^e	0.78±0.00 ^e
	2	10.30±0.09 ^d	0.97±0.01 ^d
	3	10.84±0.08 ^c	1.02±0.02 ^c
	4	13.80±0.09 ^a	1.30±0.02 ^a

Different letters (a-m) in the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

의 0.12~0.35 mg/g 및 0.03~0.04 mg/g보다 높은 함량으로 본 연구 결과와 일치하였다. 이는 다양한 구조와 분자량을 가지며 거대분자와의 결합을 통해 다양한 생리활성을 나타내는 페놀 화합물이 주로 왕겨와 미강층에 존재하기 때문이라 판단된다(15). 발아 온도와 기간이 증가함에 따라 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 4.62~13.80 mg/g 및 0.43~1.30 mg/g 범위로 유의적인 증가를 보였다. Lee 등(15)은 벼가 발아함에 따라 활성화된 다양한 효소들에 의하여 결합형 페놀 화합물이 유리형으로 전환되고, 세포벽의 완화에 인하여 페놀 화합물의 추출수율이 증가한다고 보고하였다. 또한 Kim 등(16)은 벼의 왕겨층과 현미분획에서 발아에 따른 페놀 화합물 증가가 크게 나타났으며, Kim 등(17)은 발아 기간이 증가함에 따라 페놀 화합물의 함량이 증가한다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

전자공여능과 총 항산화력 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 전자공여능과 총 항산화력 변화는 Table 5와 같다. 홍국을 배양하지 않은 현미의 전자공여능과 총 항산화력은 각각 1.14 mg TE/g과 2.85 mg AAE/g이었으나(data not shown), 홍국배양 현미는 각각 3.73 mg TE/g과 10.47 mg AAE/g으로 크게 증가하였다. 또한 홍국배양 발아현미의 경우 홍국현미에 비해 항산화 활성이 증가하였으며, 특히 32°C/1일 발아시킨 현미의 경우 전자공여능과 총 항산화력이 각각 22.16 mg TE/g과 62.27 mg AAE/g으로 가장 높은 항산화 활성을 보였으나 발아 기간이 증가함에 따라 항산화 활성은 감소하는 경향을 보였다. Kim 등(25)은 현미와 백미 에탄올 추출물의 항산화 활성을 비교한 결과 DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소

Table 5. Changes in the free radical scavenging activities of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

Germination		DPPH radical scavenging activity (mg TE/g)	ABTS ⁺ radical scavenging activity (mg AAE/g)
Temp. (°C)	Period (day)		
White rice (WR)		0.56±0.01 ^m	1.56±0.03 ^m
Brown rice (BR)		3.73±0.09 ⁱ	10.47±0.13 ⁱ
32	1	22.16±0.12 ^a	62.27±0.21 ^a
	2	13.23±0.08 ^b	37.16±0.14 ^b
	3	2.31±0.08 ^k	6.49±0.11 ^k
	4	3.14±0.11 ^j	8.83±0.10 ^j
35	1	5.94±0.09 ^f	16.69±0.15 ^f
	2	9.35±0.07 ^d	26.27±0.21 ^d
	3	4.48±0.12 ^e	12.58±0.14 ^e
	4	1.37±0.14 ^l	3.03±0.09 ^l
37	1	13.24±0.17 ^b	37.21±0.12 ^b
	2	7.03±0.08 ^c	19.75±0.08 ^c
	3	10.18±0.15 ^c	28.59±0.11 ^c
	4	4.25±0.09 ^h	11.94±0.10 ^h

Different letters (a-m) in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

거 활성과 환원력이 백미보다 현미 추출물에서 현저하게 높게 나타났으며, 이는 현미 추출물의 높은 페놀 화합물 함량과 관련이 있다고 보고하였다. Lee 등(15)과 Kim 등(16)이 벼의 발아에 따라 증가된 페놀 화합물로 인하여 발아 후 벼 추출물의 항산화 활성이 크게 증가된다고 보고한 연구 결과와 일치하였다. 그러나 Kim 등(17)의 연구에서 항산화 활성이 발아 3~4일차까지 증가되다 6일차까지 감소하는 경향을 보여 발아 기간에 따라 항산화 활성이 감소한 본 연구 결과와는 다소 차이가 있었다. Park 등(26)은 용매분획법으로 홍국색소 성분을 분리한 결과 대부분 hexane(황색색소 용출)과 chloroform(적색과 오렌지색소 용출) 분획물에 분포

하였으며, 이들 분획물의 항산화 활성이 합성 항산화제인 BHT보다 높았다. 이 결과로부터 홍국색소 성분과 항산화 활성 간의 밀접한 관계가 있으며, 발아 기간에 따라 감소된 홍국색소 성분에 의하여 홍국배양 발아현미의 항산화 활성이 감소된 것으로 판단된다.

상관관계 분석

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 홍국색소 생성, 색도, monacolin K 생성과 항산화 활성 간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 6과 같다. 기질로 사용된 발아현미의 발아 온도와 홍국색소 생성량, 적색도 및 황색도는 양의 상관관계를 보였으나 발아 기간과는 음의 상관관계를 보여 발아 기간이 길어짐에 따라 홍국균의 생육을 저해하는 것으로 나타났으며, 이는 탄소원의 감소 및 통기성 불량 등이 원인인 것으로 판단된다(11). 홍국색소와 적색도, 황색도는 0.769~0.978의 높은 양의 상관관계를 보였으나($P<0.001$), 명도와는 -0.967~-0.983의 높은 음의 상관관계($P<0.001$)를 보였다. Monacolin K 생성량은 발아 기간과 음의 관계였으며, 홍국색소, 적색도 및 황색도와 높은 상관관계(0.633~0.969, $P<0.001$)를 보였고, 이는 곰팡이에서 생성되는 색소를 포함한 많은 2차 대사산물들이 공통적인 polyketide pathway를 경유해 합성되기 때문인 것으로 판단된다(12). 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 발아가 진행됨에 따라 효소의 활성화로 추출수율 및 유리형의 전환율이 높아져 발아 온도 및 기간과 높은 양의 상관관계를 보였으나(0.742~0.830, $P<0.001$), 홍국색소, 적색도, 황색도, monacolin K 생성과는 상관성을 보이지 않아 발아 기간에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 증가는 발아에 의한 영향이 큰 것으로 판단된다. 항산화 활성은 홍국색소, 색도 및 monacolin K 생성량과 높은 상관관계를 보였으나 발아 기간, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과는 음의 상관관계를 보였다. 일반적으로 페놀 화합물과 자유라디칼 소거 활성

Table 6. Correlation coefficients among *Monascus* pigments, color, monacolin K content, and antioxidant activity of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated white rice, brown rice, and germinated brown rice during different germination temperatures and periods

	A ₅₀₀	A ₄₇₀	A ₄₀₀	L	a	b	MK	TPC	TFC	EDA	TAA
Temp.	0.470 ^{**}	0.493 ^{**}	0.559 ^{***}	-0.558 ^{***}	0.525 ^{***}	0.759 ^{***}	0.325 [*]	0.742 ^{***}	0.747 ^{***}	0.336 [*]	0.333 [*]
Period	-0.193	-0.180	-0.116	0.134	-0.140	0.126	-0.289	0.830 ^{***}	0.827 ^{***}	-0.275	-0.279
A ₅₀₀	1.000	0.999 ^{***}	0.988 ^{***}	-0.967 ^{***}	0.965 ^{***}	0.769 ^{***}	0.969 ^{***}	-0.026	-0.017	0.966 ^{***}	0.967 ^{***}
A ₄₇₀		1.000	0.992 ^{***}	-0.972 ^{***}	0.968 ^{***}	0.788 ^{***}	0.963 ^{***}	-0.007	0.002	0.960 ^{***}	0.961 ^{***}
A ₄₀₀			1.000	-0.983 ^{***}	0.978 ^{***}	0.841 ^{***}	0.940 ^{***}	0.070	0.078	0.937 ^{***}	0.938 ^{***}
L				1.000	-0.996 ^{***}	-0.887 ^{***}	-0.897 ^{***}	-0.092	-0.101	-0.889 ^{***}	-0.892 ^{***}
a					1.000	0.877 ^{***}	0.899 ^{***}	0.064	0.074	0.890 ^{***}	0.893 ^{***}
b						1.000	0.633 ^{***}	0.329 [*]	0.337 [*]	0.622 ^{***}	0.625 ^{***}
MK							1.000	-0.128	-0.119	0.997 ^{***}	0.998 ^{***}
TPC								1.000	0.979 ^{***}	-0.115	-0.119
TFC									1.000	-0.106	-0.109
EDA										1.000	0.991 ^{***}

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

A₅₀₀, red color groups; A₄₇₀, orange color groups; A₄₀₀, yellow color groups; L, lightness; a, redness; b, yellowness; MK, total monacolin K content (mg/kg); TPC, total polyphenol content (mg/g); TFC, total flavonoid content (mg/g); EDA, DPPH radical scavenging activity (mg TE/g); TAA, ABTS radical scavenging activity (mg AAE/g).

은 높은 양의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으나(15-17,25), 본 연구 결과에서 음의 상관관계를 보인 것은 발아에 의해 생성된 페놀 화합물보다 홍국균 발효에 의해 생성된 홍국색소의 항산화 활성이 더 높기 때문으로 판단된다(26).

요 약

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 홍국색소, monacolin K, citrinin 및 페놀 화합물 생성량과 항산화 활성 변화를 조사하였다. 발아 기간이 증가함에 따라 명도는 증가하였으나 적색도와 황색도는 감소하였고, 적색(A₅₀₀), 오렌지색(A₄₇₀) 및 황색(A₄₀₀) 색소 생성량도 동일한 경향이 었다. 총 monacolin K는 현미(215.85 mg/kg)가 백미(40.41 mg/kg)보다 높았으며, 32°C에서 1일간 발아시킨 발아현미(1,263.04 mg/kg)에서 가장 높은 함량을 보였으나 발아 기간이 증가함에 따라 감소하였다. 곰팡이 독소인 citrinin은 모든 처리구에서 검출되지 않았다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 발아 온도와 기간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하여 37°C에서 4일간 발아시킨 발아현미에서 13.80 mg/g과 1.30 mg/g으로 가장 높았다. 전자공여능과 총 항산화력은 발아에 의해 증가되어 32°C에서 1일간 발아시킨 발아현미에서 각각 22.16 mg TE/g과 62.27 mg AAE/g으로 가장 높았으나 발아 기간이 증가함에 따라 감소하였다. 이상의 결과로부터 홍국색소와 monacolin K 생성량을 증가시키기 위한 기질로 발아현미가 유용하며, 배양에 사용된 *Monascus pilosus* 305-9는 citrinin을 생성하지 않고 monacolin K 생성량을 증가시켜 식품의 기능성 증진용 소재 및 균주로서의 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 112077-03-SB010)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kang DZ, Um JB, Lee SK, Lee JH. 2003. Content of rutin and monacolin K in the red buckwheat fermented with *Monascus ruber*. *Korean J Food Sci Technol* 35: 242-245.
- Martinková L, Jzlová P, Veselý D. 1995. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J Appl Bacteriol* 79: 609-616.
- Rhyu MR, Kim EY. 2002. The relation between antihypertensive effect and γ -aminobutyric acid, mycelial weight and pigment of *Monascus*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 737-740.
- Endo A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot* 32: 852-854.
- KFDA. 2014. *Health Functional Food Code*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. p 113.
- 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 Chromatogr A* 723: 69-75.
- Lee JY. 2002. Minimization of the citrinin produced during *Monascus* fermentation. *MS Thesis*. Yonsei University, Seoul, Korea.
- Kang HR. 2011. Reduction of citrinin formation in *Angkak* produced by *Monascus purpureus*. *MS Thesis*. Korea University, Seoul, Korea.
- Kim MJ. 1995. Analysis of the factors enhancing *Monascus* pigment production in mixed culture. *PhD Dissertation*. Yonsei University, Seoul, Korea.
- Tseng YY, Chen MT, Lin CF. 2000. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *J Appl Microbiol* 88: 31-37.
- Kim SD, Kim ID, Park HD, Park MJ. 2001. Pigment content in *meju* fermented by a *Monascus* species with different materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1047-1052.
- Kwak EJ, Cha SK, Lim SI. 2003. The optimal condition for the production and extraction of monacolin K from red-Koji. *Korean J Food Sci Technol* 35: 830-834.
- 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.
- Park JY, Han SI, Seo WD, Ra JE, Sim EY, Nam MH. 2014. Study on *Monascus* strains and characteristic for manufacturing red yeast rice with high production of monacolin K. *Korean J Crop Sci* 59: 167-173.
- Lee YR, Woo KS, Kim KJ, Son JR, Jeong HS. 2007. Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. *Food Sci Biotechnol* 16: 765-770.
- Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee JS, Jeong HS. 2011. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activity on different parts of germinated rough rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 775-780.
- Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim SJ, Lee YR, Lee J, Jeong HS. 2013. Effects of high pressure treatment on antioxidant compounds and activity of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1783-1791.
- Kim HY, Hwang IG, Joung EM, Kim TM, Kim DJ, Park DS, Lee J, Jeong HS. 2010. Antiproliferation effects of germinated-Korean rough rice extract on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 325-330.
- Johns M, Stuart D. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. *J Ind Microbiol* 8: 23-28.
- Avula B, Cohen PA, Wang YH, Sagi S, Feng W, Wang M, Zweigenbaum J, Shuangcheng M, Khan IA. 2014. Chemical profiling and quantification of monacolins and citrinin in red yeast rice commercial raw materials and dietary supplements using liquid chromatography-accurate QToF mass spectrometry: Chemometrics application. *J Pharm Biomed Anal* 100: 243-253.
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Wild D, Tóth G, Humpf HU. 2002. New *Monascus* metabo-

- lite isolated from red yeast rice (angkak, red koji). *J Agric Food Chem* 50: 3999-4002.
24. Babitha S, Soccols CR, Pandey A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresour Technol* 98: 1554-1560.
 25. Kim DJ, Oh SK, Yoon MR, Chun AR, Hong HC, Lee JS, Kim YK. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown rice and milled rice by cultivar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 467-473.
 26. Park CD, Jung HJ, Lee HW, Kim HS, Yu TS. 2005. Antioxidant activity of *Monascus* pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant. *Korean J Microbiol* 41: 135-139.