

홍곡곰팡이를 이용한 식용적색 색소의 제조 및 이의 성상에 관한 연구

金昌湜·李淑熙*·金一
東國大學校 食品工學科, *釜山大學校 食品營養學科
(1977년 8월 31일 수리)

Studies on Production and Characteristics of Edible Red Color Pigment Produced by Mold(*Monascus* sp.)

by

Chang-Sik Kim, Sook-Hee Rhee* and IL Kim

Dong-guk University, Seoul and *Busan National University, Busan, Korea

(Received August 31, 1977)

Abstract

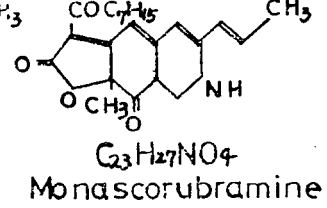
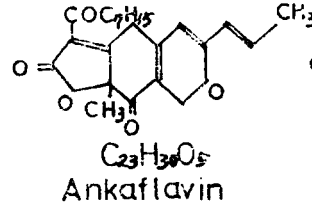
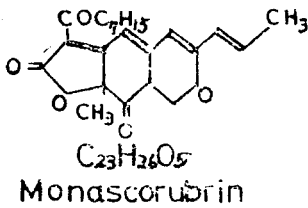
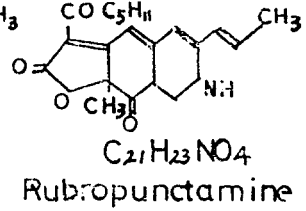
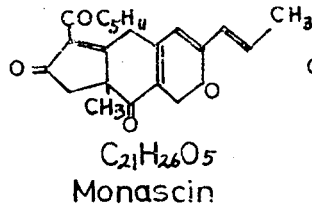
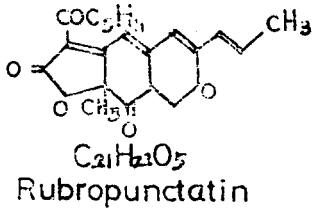
- 1) Higher yield of red color was observed by the isolated strain (*Monascus* D-7) than the type cultures in steamed rice medium.
- 2) In a case of *Monascus purbigerus* IAM 8004, best yield of color was obtained at Lin's submerged culture medium containing 1% wheat bran, 2% starch and 3% corn meal instead of rice powder as carbon source. However, in a case of isolated strain (M. D-7), good result was shown at 1% rice bran and 2% starch as a source of carbon in Lin's medium.
- 3) Good yields were obtained from both strains in Nishikawa's medium which was added with 3% defatted soybean flour.
- 4) There were no significant differences in pigment extractability among solvents. Extracted pigment was stable in wide range of pH and heat, whereas relatively unstable in sunlight.
- 5) Toxicological study of extracted pigment determined LD₅₀ at 0.2539g/20g, when injected in mouse. When injected in to mouse in 25% ethanol solution: considering the toxicity of ethanol, the toxicity of pigment itself is believed to be none.

서 론

홍곡곰팡이는(*Monascus* sp.)는 赤色色素를 生成하므로 中國에서는 古來로 홍곡(Ang-Khak)을 紅酒, 육류가공, 홍두부, 기타 음식물의 착색에 이용하여 왔다.^(1,2)

따라서 이에 관한 연구도 일찍부터 시작되어 1896년 Boorsma⁽³⁾는 석유에테르로서 탈지한 홍곡분말로 부터 에테르를 써서 색소를 추출하였으며 萩原⁽⁴⁾는 홍곡균의 색소생성에는 소량의 Sb, Zn, As 등의 금속염류가 유효하다는 것을 밝혔다. 日比野⁽⁵⁾는 홍곡균의 색소는 물에 可溶인 것과 물에는 不溶이나, 주정, Chloroform에는

가용성인 것의 2종이 있다고 보고 했고, 西川⁽⁶⁾는 홍곡으로부터 적색 및 황색의 색소를 처음으로 結晶化하였다. Salmon⁽⁷⁾ 등은 홍곡으로부터 황색결정 색소를 분리하여 Monascin이라 命名하고 分子式 $C_{24}H_{50}O_8$ 을 부여하였으며, 동시에 그 성질과 유도체 등에 관하여 기술하였다. 西川⁽⁸⁾는 다시 Monascorubrin과 Monascoflavin을 單離하였다. 홍곡균이 생성하는 색소의 색깔은 赤, 黃, 紫色이며 현재까지 알려진 색소의 종류는⁽⁸⁻¹¹⁾ Monascorubrin, Rubropunctatin, Monascin, Rubropunctamine, Ankaflavin, Monascorubramine등이고, 그 구조는 다음과 같다.



색소의 구조

식품의 착색에 사용되고 있는 인공색소에 대하여 논란이 많은 昨今, 무해한 천연색소의 개발이 주목되어 오던 중 일본에서는 홍곡균으로부터 적색색소를 생산하여 이미 시판도 되고 있다.

필자도 이에 관심을 갖고 菌株를 분리 또는 수집하여

固體와 液體法으로 천연적색색소의 제조 및 이의 性狀에 관한 실험을 하였기에 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

1. 供試 미생물

固一定된 균주는 토오코대학 응용미생물연구소 및 이와대학 응용미생물학교실에서 분양받은 것이고 대조용으로 사용한 菌株는 국내산 재래식 목자에서 분리한 것이다. 분리용 培地는 Table 1과 같은 것을 사용하였다.

供試菌株의 종류는 Table 2와 같다.

모든 균주는 Potato-glucose agar slants에서 보존 하였다.

2. 배양방법

Potato-glucose agar slants에서 보존한 균주는 Pfeffer agar slants에서 30°C, 7일간 배양후 색소 생산용 배양으로 옮겼다.

Table 1. Composition of medium for the isolation of *Monascus* sp.

NaCl.....	3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄	0.1g
CaCl ₂	0.1g
yeast extract	1g
agar powder.....	15-20g
distilled water	1,000ml

Table 2. Examined mold strains.

Strains	Origin of strains
<i>Monascus araneosus</i>	IAM 8083 Institute of applied microbiology, Tokyo Univ.
<i>Monascus pilosus</i>	IAM 8003 Institute of applied microbiology, Tokyo Univ.
<i>Monascus vitreus</i>	IAM 8007 Institute of applied microbiology, Tokyo Univ.
<i>Monascus ank avar. rubellus</i>	IAM 8081 Institute of applied microbiology, Tokyo Univ.
<i>Monascus purbigerus</i>	IAM 8004 Institute of applied microbiology, Tokyo Univ.
<i>Monascus anka</i>	ATCC 16360 Iwate University
<i>Monascus purpureus</i>	IAM 8086 Tokyo University
<i>Monascus rubigenosus</i>	IAM 12155 Tokyo University
<i>Monascus D-7</i>	Isolated from Korean Kokja

1) 고체배양

고체배지는 백미를 사용하였다. 백미 30g을 실온에서 3시간 전후 水浸하여 충분히 팽윤(膨潤)시킨다음 대형 Petri dish에 담아 121°C에서 20분간 蒸煎한 것에 이식하여 30°C에서 10일간 배양하였다.

2) 액체배양

(1) Lin¹¹¹의 배지(Table 3) Lin의 배지와 Lin의 배지성분 중C급원인 Rice powder를 (2)Wheat bran 1%, Starch 2%, (3) Corn meal 3%, (4) Rice bran 1%, Starch 2%로 대체(代替)한 것을 사용하여 30°C의 Rotary shaker (1600 rpm)에서 4일간 진탕배양하였다.

(5) 西川氏 배지¹⁰⁾(Table 4)

西川氏배지 및 西川氏배지에 N급원으로서 3%의 탈지대두분을 첨가한 것을 사용하였으며, 30°C에서 10~14일간 진탕배양하여 적색 菌蓋를 형성시켰다.

3. 생성된 색소의 추출과 측정

1) 용 매

추출용매로서는 에틸알코올, propylene glycol, 아세트산, 물(N/10 Michaelis buffer solution)등을 사용하였다.

2) 색소의 추출과 측정

에틸알코올의 경우 25%용액으로 배양물을 추출한 색소액의 흡광도는 500nm에서 흡수극대를 나타냈기 때문에 (Fig. 1) 주로 96%에틸 알코올 50ml+증류수 100ml

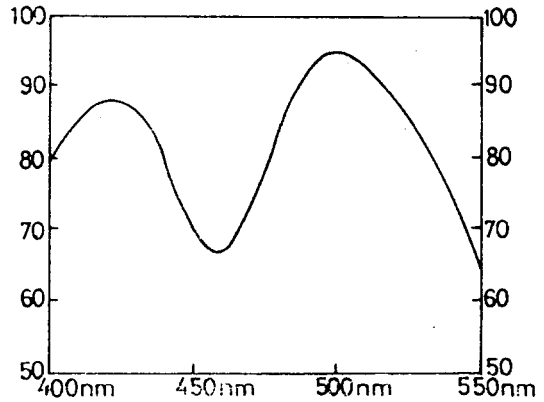


Fig. 1. Optical density of extracted pigment solutions

에 시료 50 ml(g)를 가하여 Rotary shaker(실온)에서 1시간 진탕, 추출한 것을 여과한 여과액으로 색소의 O.D를 측정하였다. (Schimadzu double beam spectrophotometer UV-200)

4. 색소의 性狀

西川氏배지에 3%의 탈지대두분을 첨가한 것에 D-7을 배양하여 형성된 적색균개를 분디, 세척후 Oven에서 100°C, 20분간 가열살균한 다음 60°C에서 건조분말화한 것을 냉암소에서 보관하면서 필요시마다 분말 2g씩을 25%에틸알코올 200ml에 녹여 다음 실험에 사용하였다.

적색 균개의 성분은 AOAC법에 의하여 분석하였다.

1) pH와 색조의 변화

HCl과 NaOH용액으로 25% 알코올추출색소액의 pH를 조절하여 색깔의 변화 유무를보았다.

2) 색소의 추출성

70%의 에틸알코올을 100%로 했을 때의 냉수, 온수, 80% Propylene glycol, 36%의 아세트산등에 의한 추출율을 보았다. 이때 균개분말 0.5g를 각 용매 50ml로 추출한 것이다.

3) 내광성

25% 알코올추출액을 시험관에 일정량을 分注한 것에 태양광선 및 자외선을 조사하여 經時的으로 색도를 측정하였다.

4) 열안정성

2조의 색소액을 각각 NaOH와 HCl로서 pH를 달리한 후 한 조는 100°C에서 1시간 가열하고 다른 조는 120°C에서 1시간 가열한 후 각조의 pH별로 O.D를 측정하였다.

5) 안전성

Table 3. Composition of the Lin's pigment-producing medium(pH 6)

Rice powder	3g
NaNO ₃	0.15g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.25g
Tap water	100ml

Table 4. Nishikawa's medium

Sucrose	100g
As ₂ O ₃	0.5g
Peptone	10g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.0g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.1g
KNO ₃	2.0g
Tartaric acid	3.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Distilled water	1000ml

Reed-muench¹²⁾법에 의하여 균개분말을 量別로 25% 에틸알코올 추출액을 만들어 각 10마리의 Mouse(체중 20g)복강에 투여하여 96시간후에 죽은 수를 보아 LD₅₀을 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 蒸米배양에서의 색소생성력

증미에 배양한 것을 전기한 에틸알코올 액으로 추출한 색소액의 O.D는 Table 5와 같다.

증미배양에서는 분리株와 *M. anka* (ATCC)가 월등하게 색소의 생성량이 많았음을 알 수 있었다.

Table 5. The pigment productivity of various type cultures and isolate on steamed rice

Strains	Pigment produced (O.D500 nm of broth)	Origin of strains
<i>M. anka</i> ATCC 16360	8.3	ATCC
<i>M. anka var. rubellus</i> IAM8081	0.47	IAM
<i>M. araneosus</i> IAM 8083	0.7	IAM
<i>M. purbigerus</i> IAM 8004	0.22	IAM
<i>M. D-7</i>	16.5	Korean Kokja

Table 6. Pigment productivity of type cultures and isolate in Lin's submerged culture medium

* medium No.	strains	initial pH	final pH	pigment produced (O.D 500 _{nm})
1	IAM	6.0	5.8	2.8
2	8083	6.0	5.8	1.0
3		6.0	5.8	3.4
4		6.0	5.8	2.7
1	IAM	6.0	6.2	0.4
2		6.0	6.2	0.3
3	8003	6.0	6.2	2.0
4		6.0	6.2	1.8
1	IAM	6.0	6.2	0.26
2		6.0	6.2	0.3
3	8007	6.0	6.2	0.4
4		6.0	6.2	2.95
1	IAM	6.0	6.2	0.75
2		6.0	6.2	1.05
3	8081	6.0	6.4	2.1
4		6.0	6.4	2.0
1	IAM	6.0	6.0	2.2
2		6.0	6.8	6.5
3	8004	6.0	6.8	7.1
4		6.0	6.8	6.5
1	ATCC	6.0	6.4	4.0
2		6.0	6.4	2.1
3	16360	6.0	6.4	2.75
4		6.0	6.4	1.25
1	D-7	6.0	6.4	4.95
2		6.0	6.4	4.7
3		6.0	6.4	4.15
4		6.0	6.4	14.8

Medium

* No. 1 C source : Rice powder 3%

3 C source : Corn meal 3%

2 C source : Wheat bran 1%, starch 2%

4 C source : Rice bran 1%, starch 2%

Table 7. Pigment productivity of the molds in Nishikawa's culture medium

*medium No.	strains	initial pH	final pH	cell yields (g)/100ml		Pigment produced from wet cells (O.D. _{500nm})
				wet cells	dry cells	
1	IAM	4.0	2.8	4.865	1.685	2.3
2	8083	4.0	4.0	5.355	1.797	5.0
1	IAM	4.0	3.0	5.63	1.73	1.9
2	8003	4.0	6.8	8.80	2.137	5.8
1	IAM	4.0	4.0	7.870	2.790	0.65
2	8007	4.0	7.4	4.762	1.238	3.75
1	IAM	4.0	3.0	4.177	1.834	2.4
2	8081	4.0	6.0	5.310	1.801	6.6
1	IAM	4.0	4.0	5.105	1.404	10.5
2	8004	4.0	5.6	9.230	3.025	12.9
1	ATCC	4.0	3.0	4.014	1.830	7.95
2	16360	4.0	6.8	5.796	1.870	13.4
1	D-7	4.0	3.8	1.350	0.433	11.5
2		4.0	7.4	4.924	1.495	15.8
2	IAM 8086	4.0		5.8	3.788	11.3
2	IAM 12155	4.0	6.3		2.500	6.5

*medium No. 1 : Nishikawa's medium

No. 2 : 3% of nonfat soybean powder added to above medium

2. 액체배양

1) Lin의 배지에서는 C급원의 종류[(2), (3), (4)]에 관계없이 균주에 따라 D-7, IAM 8004, ATCC (*M. Anka*) 등이 O.D가 높았다(Table 6)

2) 西川氏배지

西川氏 배지에서는 생성된 균계의 추출색소액은 대체로 균주에 관계없이 3%의 탈지대두분 첨가가가 높은 O.D를 나타냈다. 균주별로는 D-7, ATCC 16360, IAM 8004, IAM 8086등이 높았다(Table 7).

3. 색소의 性状

탈지대두분을 첨가한 西川氏 배지에서 형성시킨 균계의 건조분말을 분석한 결과는 Table 8 과 같이 Protein과 Niacine의 함량이 많았다.

1) pH변화에 따른 색조의 변화

Table 9에서 보듯이 색소의 색조는 pH에 안정한 편이며 pH 11에서 겨우 적색에서 등색으로 변화했다.

2) 색소의 추출성

균계의 분말로부터 각종 용매를 써서 색소의 추출성을 시험한 결과는(Table 10) 70%의 에틸알코올을 100

%로 했을때 pH 7에서는 80%의 Propylene glycol이 가장 좋았고 산성에서는 熱水(N/ 10 Michaelis buffer)

Table 8. Composition of the powdered dry cells (pericle)

Components	Percentage
water	3.7%
protein	35.2%
ash	5.1%
crude cellulose	14.0%
crude fat	9.2%
carbohydrates	32.8%
vitamine B ₁	0.6mg%
vitamine B ₂	3.2mg%
niacine	12.0mg%

Table 9. pH dependence of color of the pigment

pH	2.8	5.6	7	9	11
color	red	red	red	red	orange

Table 10. Extractability of the pigment

Solvent pH	5	7	8
*Water (15°C)	67% (0.6)	222% (2)	789% (7.1)
*Hot water(90°C)	100% (0.9)	133% (1.2)	200% (1.8)
80% Propylene glycol(90°C)	—	361% (3.25)	—
** 70% EtOH	—	100% (0.9)	—
36% Acetic acid	—	122% (1.1)	—

*...N/10 michaelis buffer solution
 **... Standard(100%)
 ()... O.D

로 했을때 pH 7에서는 80%의 Propylene glycol이 가장 좋았고 산성에서는 熱水가 좋았으며 일반적으로 각종 용매로서 잘 추출된다는 것을 알았다.

3) 내광성

빛에 대한 안정성 시험은 자외선에 대해서는 비교적 안정하나 태양광선에서는 상당한 색도의 저하를 보였다.

Fig. 2는 매시간 또는 매일 측정할 O.D를 -log로 표시한 것이다.

4) 열안정성

100°C까지의 가열에 대해서는 안정한 편이나, 120°C 이상의 가열에 대해서는 HCl로 pH를 조절했을 경우pH5 이하에서 급격한 퇴색을 보였다.

5) 안전성

동물시험결과는 Table 11, 12와 같다.

Table 11, 12로부터 LD₅₀을 유도하면

$$\frac{72.22-50}{72.22-32.29} = 0.60$$

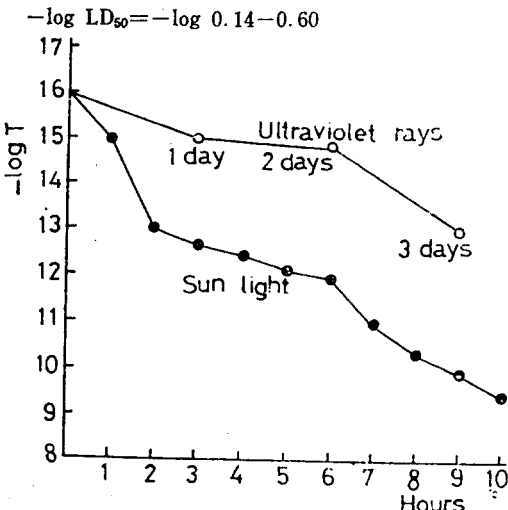


Fig. 2. Photostability of the pigment

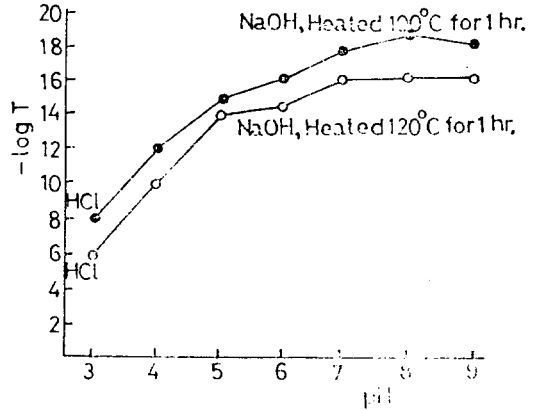


Fig. 3. Heat stability of the pigment.

$$\log LD_{50} = \log 0.14 + 0.60$$

$$\log \frac{14}{100} = \log 14 - 2 + 0.60$$

$$= \log 2 + \log 7 + 0.60 - 2$$

$$= 0.3010 + 0.8451 + 0.60 - 2 = 0.2539$$

$$\therefore LD_{50} = 0.2539g/20g$$

Table 11. LD₅₀ Titer by Reed-Muench method

amounts of sample	mortality ratio	died	survived
0.70g	7/10	8	2
0.14g	7/10	7	3
0.028g	4/10	4	6
0.056g	2/10	2	8
0.0011g	0/10	0	10

Table 12. Accumulated values

amounts of sample	died	survived	mortality	
			ratio	percent
0.70g	21	2	21/23	91.30
0.14g	13	5	13/18	72.22
0.028g	6	11	6/17	35.29
0.056g	2	19	2/21	9.52
0.0011g	0	29	0/29	0

즉 균개분말색소의 LD₅₀은 mouse의 체중 20g당 0.2539g으로서 아주 적은 편이다. 더구나 색소는 25% 에틸 알코올로 추출하여 투여하였기 때문에 에틸알코올의 독성을 감안할때 홍곡균의 적색색소의 독성은 거의 없는 것으로 생각된다.

요 약

1. 증미(고체) 배양에서는 배양주(Type cultures)보다 분리주가 월등하게 많은 량의 색소를 생성하였다.

2. Lin氏의 Submerged culture에서는 IAM 8004 (*Monascus purbigerus*)의 경우 carbon source로서 Rice powder 대신에 Wheat bran 1%, Starch 2%와 Corn meal 3%의 것이 색소의 생성량이 많았고, 분리주는 Carbon source를 Rice bran 1%, Starch 2%로 한 것이 가장 좋았다.

3. 西川氏 배지에서는 3%의 탈지대두분을 첨가했을 때 대체적으로 자 균주모두가 더 많은 색소의 생성을 보였다.

4. 추출한 색소액은 pH, 열처리등에 모두 안정하고 각종용매에 대한 추출성도 좋아서 많은 종류의 식품착색에이용될 수 있을 것으로 생각되나 내광성이 약한것 이큰결점으로 보인다.

5. 본색소의 안전성은 Mouse의 경우 LD₅₀이 체중20g 당 0.2359g으로서 안전한 편이며 더구나 시료를 25%의 에틸알코올 추출액으로 두여했기 때문에 에틸알코올의 독성을 감안한다면 색소자체는 극히 안전한 것으로 사려된다. 본연구는 산학협동재단의 학술연구비로 서 이루어진 것이다.

참 고 문 헌

1) 宮路憲二：應用黴菌學，岩波書店，東京，上卷 p.

183—184(1951).

2) Frazier, W.C. : Food Microbiology, McGraw-Hill Book Co., New York, p. 23, 411 (1967).

3) Boorsma : *Chem. Zenter.*, 1, 1130 (1896).

4) 萩原：臺灣總督府中央研究所 工業部報告, 5, 57 (1924).

5) Hibino : *Proceed. Koninkl. Akad. v. Wetenschapp. te Amsterdam.*, 28, No. 2, 182(1925).

6) 西川：日本農化誌, 2, 688(1926).

7) Salmon, H., Karrer, P. : *Helv. Chim. Acta*, 15, 18(1931).

8) Su, Y.C., Chen, W.L., Fang, M.Y. : *J. Chinese Chem. Soc.* 8, 46 (1970).

9) Chen, F.C., Manchard, P.S., whalley, W.B. : *J. Chem, Soc.* (c), 3577(1971).

10) Chen, F.C., Manchard, P.S., Whalley, W.B. : *Chemical Communications(The chemical Society)*, 131, Burlington House, London (1969).

11) Lin, C.F., : *J. Ferment. Technol.*, 51, No. 6, 407—414(1973).

12) Melnick, J.L. : *Review of Medical Microbiology*, Lange medical publications, Los altos. Calf., p. 266—268(1962).