

## Jar Fermenter에 의한 홍국의 배양, 색소특성 및 안정성

김선재 · 임종환 · 강성국 · 정순택<sup>†</sup>

목포대학교 식품공학과

### Characteristics and Stability of Pigments Produced by *Monascus anka* in a Jar Fermenter

Seon-Jae Kim, Jong-Whan Rhim, Seong-Gook Kang and Soon-Teck Jung<sup>†</sup>

Dept. of Food Engineering, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

#### Abstract

The characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter were examined. The pigments produced by the mold were fractionated into four pigments, i.e., extracellular red pigment(ERP), extracellular yellow pigment(EYP), intracellular red pigment(IRP) and intracellular yellow pigment(IYP) by the solvent fractionation method. These pigments showed characteristic absorption spectrum indicating that they were composed of different components of pigments. Each of these four pigments separated from *Monascus anka* were stable under ultraviolet light, fluorescent light, and in dark conditions, but their color was faded rapidly under sun light. They were also very stable against temperature below 80°C, above which temperature the stability of the pigments was decreased rapidly. Among the eight organic acids tested, tartaric and citric acids were found to be detrimental against the *Monascus anka* pigments. And Cu<sup>2+</sup> ion showed the most deleterious effect on the color change of the pigments.

**Key words:** *Monascus anka* pigments, natural food colorant, color characteristics, color stability

#### 서 론

천연 식용 색소는 주로 동물이나 식물 또는 미생물로부터 얻고 있는데, 일반적으로 동물이나 식물로부터 천연 식용 색소를 생산하는 방법은 원료인 대상 동식물의 종류와 품종 뿐만 아니라 이들의 생산이나 재배 조건 또는 계절 등에 크게 영향을 받게 된다. 이에 반해 미생물에 의한 식용색소의 생산 방법은 계절에 관계없이 일정한 방법으로 색소를 생산할 수 있는 장점이 있어 미생물을 사용하여 천연 식용 색소를 생산하는 방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1).

식용 색소를 생산하는 미생물로서 홍국균(*Monascus anka*)은 황색계인 monascin과 ankaflavin, 적색계인 rubropunctatin과 monascorubrin 및 자색계인 rubropunctamine과 monascorubramine의 6종의 색소를 생산하는 것으로 알려져 있다(2-4).

홍국균 색소의 생산은 주로 쌀이나 빵을 사용하는 고체 배양 방법에 의해 이루어져 왔으나, 액체 배양 방

법이 개발되면서 더욱 활기를 띠게 되었고 지금까지 색소의 생산을 위한 최적 배양 조건과 배지 성분에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다(5-10). 홍국색소의 산업화를 위해서는 홍국색소의 대량 생산 방법의 개발이 필요한데 fermenter를 사용하여 홍국색소를 배양한 보고는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산업화의 기초연구로서 jar fermenter를 사용하여 홍국을 배양하였다. 그리고 배양된 홍국을 균체내 색소와 균체외 색소로 분리하고 다시 균체내외의 적색색소와 황색색소를 분리하여 색소의 특성과 색소의 안정화에 미치는 인자들에 대하여 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 한국중균협회 부설 미생물 보존센터(KCCM)에서 분양받은 *Monascus anka* KCCM

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

11832를 사용하였으며 배지는 강과 정(11)이 동일 균주를 사용하여 진탕 배양 조건에서 균체 생산 및 색소 생산을 위한 최적의 배지라고 보고한 rice powder 2%, peptone 0.05%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.15%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25% 를 초기 pH 6.0으로 조절하여 사용하였다.

**배양**

30°C에서 4일간 전배양한 배양액을 본배양액 4L에 대하여 2%(80ml)를 접종하여 발효조에서 배양하였다. 5L 발효조(BIOFLO III, New Brunswick Scientifics, USA)에서 배양온도 30°C, 초기 pH 6.0, 교반속도 300rpm, 통기량 0.25 vvm의 조건으로하여 5일간 배양하였다.

**추출 및 용매분획**

배양이 종결된 *Monascus anka* 배양액과 균체로부터 Fig. 1에 표시한 방법에 따라 각각의 색소를 추출하고 분리하였다.

*Monascus anka* 배양액 4L를 원심분리기(Beckman Z2-21M/E, USA)로 7,000rpm, 15분 동안 원심분리하였다. 상등액은 Whatman No 2 여과지를 사용하여 여과한 후 얻어진 여액을 감압농축기(Buchi RE 111, Switzerland)로 농축하였다. 농축액을 petroleum ether와 70% ethanol로 분획하여 70% ethanol에 용해되는 균체의 적색색소 획분(Extracellular Red Pigment, ERP)과 petroleum ether에 용해되는 균체의 황색색소 획분(Extracellular Yellow Pigment, EYP)으로 분리하였다. 균체내의 색소를 원심분리하여 얻어진 균체를 증류수로 세척한 후 동결건조기(Beta 1-8K, B. Braun, Germany)로 24시간 동결 건조하여 70% ethanol을 용매로 하여 5시

간 동안 3회 sonication한 후 Whatman No 2 여과지를 사용하여 여과하였다. 얻어진 여액에 대해 petroleum ether로 분획하여 70% ethanol에 용해되는 균체내 적색색소 획분(Intracellular Red Pigment, IRP)과 petroleum ether에 용해되는 균체내 황색색소 획분(Intracellular Yellow Pigment, IYP)으로 분리하였다.

각 색소 획분은 spectrophotometer(8452A, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하고 색소의 특성을 조사하였다. 증류수로 세척한 균체를 105°C로 건조한 후 균체량을 구하였다.

**광의 영향**

용매 분획하여 얻은 ERP와 IRP는 70% EtOH로, EYP와 IYP는 petroleum ether를 용매로 하여 각각 200ml로 정용하고 100배 희석액을 사용하여 암조건, 자외선, 형광, 일광조건하에 보관하면서 각 색소액의 최대흡수 파장인 494nm, 506nm, 380nm, 388nm에서 흡광도를 측정하고 색소의 변화를 조사하였다.

**pH의 영향**

ERP, EYP, IRP, IYP를 70% EtOH에 용해시킨 후 0.1N NaOH 또는 HCl을 사용하여 pH를 2.0~12.0으로 조절하여 각 용액의 흡광도를 측정하였다.

**온도의 영향**

ERP, EYP, IRP, IYP를 70% ethanol에 용해시키고 각 용액을 60°C, 80°C, 100°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C에 보관하면서 각 용액의 흡광도 변화를 측정하였다.

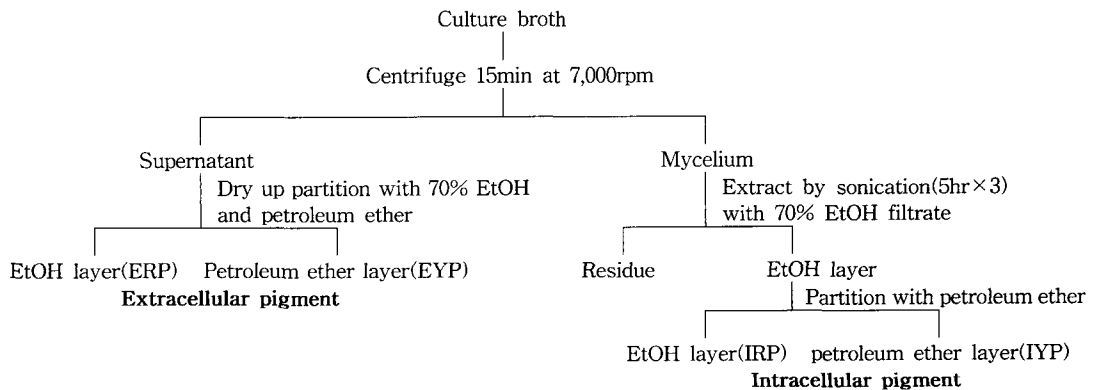


Fig. 1. Extraction and isolation of pigment from *Monascus anka* and culture broth. ERP: extracellular red pigment, EYP: extracellular yellow pigment, IRP: intracellular red pigment, IYP: intracellular yellow pigment

### 유기산의 영향

ERP, EYP, IRP, IYP를 70% ethanol에 용해시키고 각 용액에 대해 formic acid, acetic acid, propionic acid, *n*-butyric acid, malic acid, malonic acid, tartaric acid, citric acid 등을 사용하여 이들 유기산의 최종 농도가 2.0M이 되도록 색소 용액에 가하여 실온에 보관하면서 색소의 변화를 조사하였다.

### 금속의 영향

ERP, EYP, IRP, IYP를 70% ethanol에 용해시키고 각 용액에 대해 금속이온  $Hg^{2+}$  ( $HgCl_2$ ),  $Ag^{2+}$  ( $AgNO_3$ ),  $Fe^{2+}$  ( $Fe_2(SO_4)_3$ ),  $Cd^{2+}$  ( $CdCl_2$ ),  $Mn^{2+}$  ( $MnSO_4$ ),  $Al^{3+}$  ( $Al_2(SO_4)_3$ ),  $Zn^{2+}$  ( $ZnSO_4$ ),  $Cu^{2+}$  ( $CuSO_4$ ) 등을 사용하여 이들의 농도가 0.001M, 0.01M이 되도록 색소용액에 가하여 냉장온도에서 48시간 동안 보관한 후 색소의 변화를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 색소의 특성 및 함량

발효조에서 *Monascus anka*의 배양이 종결된 후 균체내에 색소가 형성되어 균체는 짙은 적색을 띠었으며, 또한 균체외로 색소를 배출하여 배지가 적색을 나타내는 것을 보아 본 연구에서 사용한 홍국균은 균체내 색소와 균체외 색소를 동시에 생산함을 알 수 있었다. 각 색소분획에 대한 분광학적 특성은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 균체외 적색색소(ERP)는 494nm에서, 균체외 황색색소(EYP)는 380nm에서, 균체내 적색색소(IRP)는 506nm에서, 균체내 황색색소(IYP)는 388nm에서 최대 흡수파장을 나타냈다.

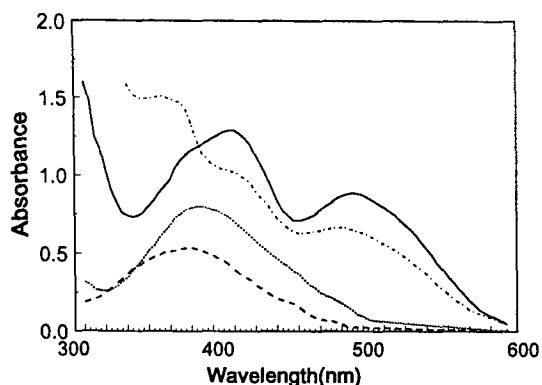


Fig. 2. Absorption spectra of the pigments of *Monascus anka*.

---: ERP, - · - ·: EYP, —: IRP, ·····: IYP

분리된 색소액을 일정량 취하여 각각 감압농축한 후 감압건조기에서 용매를 완전히 제거한 후 색소 무게를 칭량한 결과, 배양액 4L당 ERP는 4.008g EYP는 96mg 그리고 IRP는 5.432g, IYP는 1.580g을 얻었으며 균체량은 16.345g이었다.

Percy와 Whalley(12)는 *Monascus anka*의 mycelia에서 황색색소인 ankaflavin과 적색색소인 rubropunctatin과 monascorubrin을 TLC, MS, IR, NMR 등으로 분리하였다. 이러한 사실로부터 본 연구에서 분리된 균체내 및 균체외 적색색소도 유사한 종류로 분포되었을 것으로 생각되며, 앞으로 이에 대한 확인이 필요할 것으로 사료된다. 김 등(13)은 액침 진탕 배양액에 대해 60% ethanol로 추출하여 적색색소의 spectrum 양상이 495~500nm에서 최대 흡수 극대를 나타냈으며 적색색소 및 황색색소 함량은 배양액 100ml로부터 각각 약 400mg, 80mg을 생산한다고 보고하였는데, 본 연구에서는 총 적색색소 및 황색색소의 함량은 액침 진탕 배양액에서 생산되는 홍국색소의 약 1/2 수준인 배양액 1L당 2.36g, 0.419g이었다. 또한 분리된 홍국색소인 ERP, EYP, IRP, 그리고 IYP의 함량은 배양액 1L당 각각 1.002g, 1.358g, 0.024g 그리고 0.395g이었다. 액침 진탕 배양에 비해 발효조를 이용한 홍국색소의 수율은 상대적으로 낮게 나타났으나 발효조를 이용한 *Monascus anka* 색소 생산에 관한 연구는 별로 이루어지지 않아 이에 대한 원인 규명이 어려운 형편이다.

장 등(14)과 김 등(15)은 홍국 배양액 중에 황색색소는 394~403nm에서 흡수 극대를 나타내었고 thin layer chromatography상에서 대부분의 황색색소는 Monascin과 pale yellow인 Monacidin A 그리고 미지의 색소가 함유되어 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 균체외 황색색소는 388nm, 균체내 황색색소는 380nm에서 흡수 극대를 나타내었는데 이는 사용한 용매계가 서로 다르기 때문으로 생각된다.

본 연구에서 나타난 각각의 색소가 특징적인 spectrum을 나타내는 것으로 보아 같은 적색 또는 황색색소라 할지라도 균체내 색소와 균체외 색소가 서로 다른 분광학적 특성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

### 홍국색소의 안정성

분리된 각 색소의 광에 대한 영향은 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 암조건하에서 가장 안정하였고 자외선 및 형광하에서도 비교적 안정하였으나 일광하에서는 색소가 급격히 퇴색되는 경향을 나타냈다. 10일 동안 각각의 조건으로 홍국색소를 경시적으로 측정하여 잔존한 색소의 양은 암 조건, 자외선 조건, 형광 조건, 일광

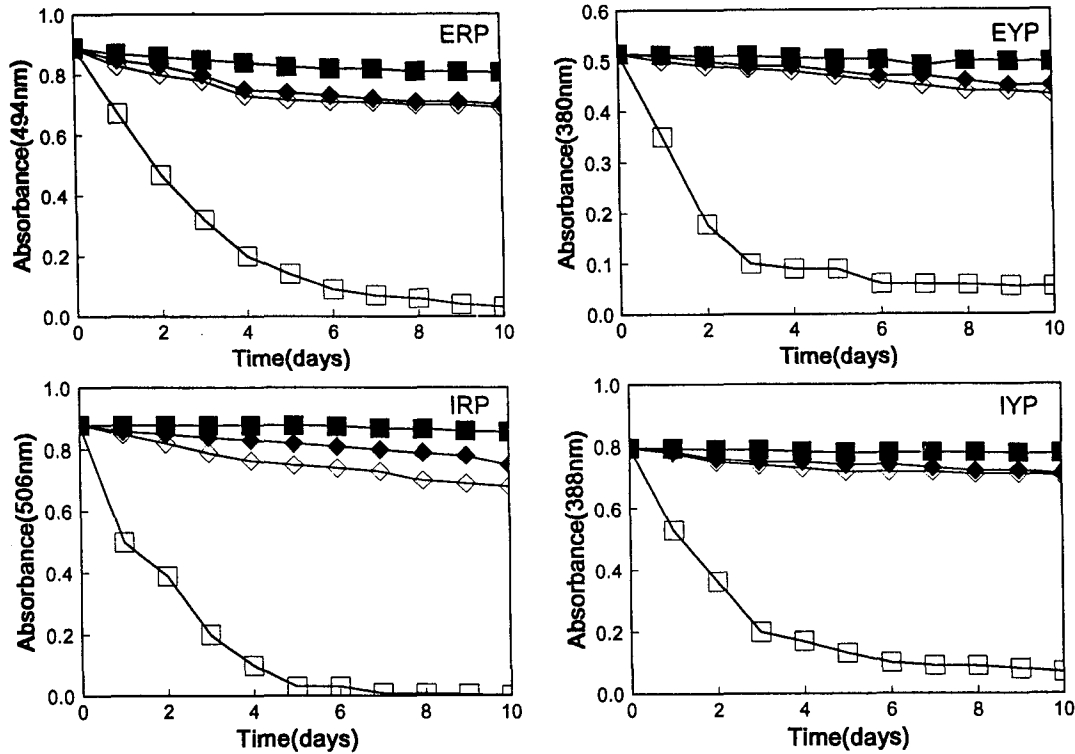


Fig. 3. Effect of light on the pigments of *Monascus anka*.

□-□: sunlight, ◆-◆: ultraviolet, ◇-◇: fluorescence, ■-■: dark

조건이 각각 ERP는 90.7%, 78.7%, 77.6%, 3.6%, EYP는 99.3%, 90.0%, 86.4%, 10.9% IRP는 97.4%, 85.3%, 77.3%, 0.2% 그리고 IYP는 97.5%, 89.2%, 88.4%, 8.7%로 나타났다. 김 등(16)은 *Monascus* 속을 이용한 식용 적색 색소의 제조에 있어서 자외선에 대해서는 비교적 안정하였지만 일광에서는 상당한 색도의 저하를 보였다고 하여 본 연구의 결과와 잘 일치하고 있다. 따라서 홍국 색소는 일광에 대해서 안정성이 현저히 떨어지므로 보관시 태양 광선을 차단할 수 있는 용기를 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

홍국색소의 pH 안정성은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 분리된 각 색소의 최대 흡수파장에서 흡광도값은 pH의 변화에 따라 크게 변하지 않아 pH 2.0~pH 12.0까지 비교적 안정한 것으로 나타났다. 김 등(13)은 액침 진탕 배양에 의한 *Monascus* 속이 생산하는 적색색소의 pH 안정성은 pH 3.0~9.0에서 비교적 안정하고 강산 및 강알카리에서는 안정성이 떨어진다고 보고하였으며, 김 등(16)은 홍국색소는 pH에 대해 안정한 편이며 pH 11에서 적색에서 등색으로 변했다고 보고하였는데 본 연구에서 사용한 *Monascus anka*가 생산하는 균체내 및 균체의 색소는 pH에 대해 광범위한 안정성을 나타냈다.

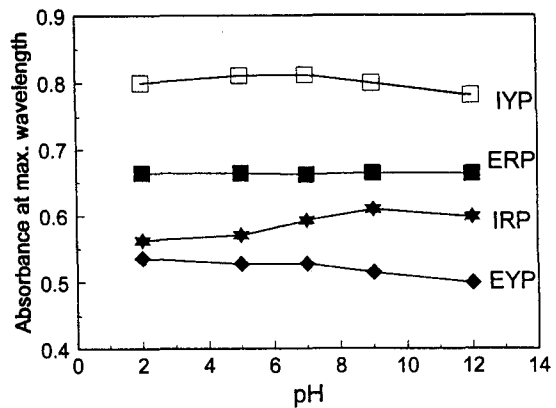


Fig. 4. Effect of pH on the pigments of *Monascus anka*.

홍국색소의 온도에 대한 영향은 Fig. 5에 나타났다. 분리된 각 색소는 60~80°C에서는 안정하였으며 이보다 온도가 증가할수록 색소의 열안정성은 급격하게 감소하였다. 60°C, 80°C, 100°C에서 10시간, 120°C에서 6시간, 130°C에서 5시간, 140°C에서 4시간, 150°C에서 3시간 동안 처리한 홍국색소의 잔존량은 각각 ERP는

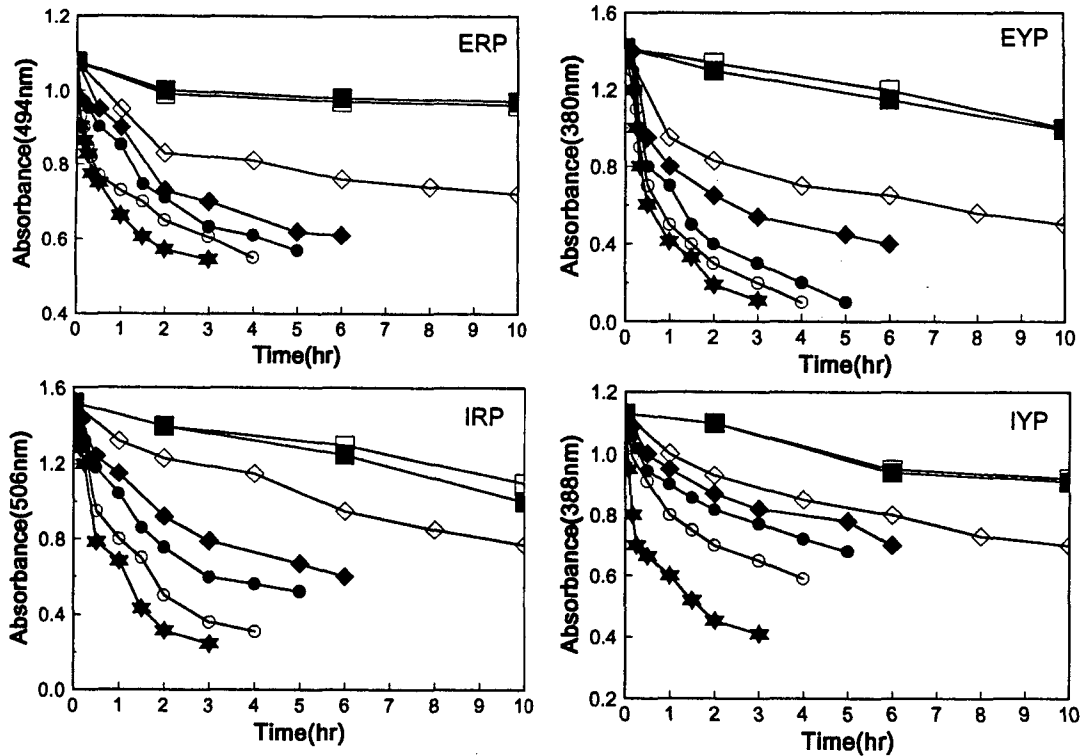


Fig. 5. Effect of temperature on the pigments of *Monascus anka*.

□-□: 60°C, ■-■: 80°C, ◇-◇: 100°C, ◆-◆: 120°C, ●-●: 130°C, ○-○: 140°C, ★-★: 150°C

89.1%, 88.5%, 66.8%, 56.6%, 52.9%, 51.1%, 50.7% EYP는 70.6%, 69.9%, 35.3%, 28.2%, 7.1%, 7.1%, 7.2%, IRP는 72.4%, 65.8%, 50.6%, 39.5%, 34.2%, 20.4%, 16.0% 그리고 IYP는 81.4%, 80.5%, 61.9%, 61.9%, 60.2%, 52.2%, 36.3%로 나타났다. Percy와 Whalley(12) 및 김 등(16)은 *Monascus* 속이 생산하는 색소가 100°C까지는 안정하였고 그 이상의 온도에서는 급속히 퇴색한다고 보고하였으며 민(17)도 70% ethanol에 용해되는 균체내 적색색소 및 황색색소가 60~100°C에서 1시간 동안 안정하다고 보고하였는데 본 연구에서 나타난 결과와 일치하였다.

홍국색소의 유기산에 대한 영향은 Fig. 6에 나타난 바와 같이 사용한 유기산 중에 propionic, formic, acetic, butyric, malonic, malic acid 첨가구는 20시간 동안 홍국색소의 잔존량이 ERP는 69.4~80.3%, EYP는 62.9~83.4%, IRP는 54.6~70.8% 그리고 IYP는 63.0~87.3%로 비교적 안정하였으나 tartaric acid, citric acid 첨가구는 색소가 급격히 감소하여 ERP는 23.1%, 36.5%, EYP는 11.4%, 35.1%, IRP는 12.6%, 21.1% 그리고 16.8%, 42.1%로 나타났다. 홍국색소의 안정화를 저해하는 화학물질 중 citric acid가 색소의 퇴색에 영향이 있다는

보고(17)와 본 연구결과는 잘 일치하였다. 또한 tartaric acid가 citric acid 보다 색소의 안정성의 저해에 지대한 영향을 미침을 알 수 있었다.

한편 홍국색소의 금속이온에 대한 영향은 Table 1에 나타낸 바와 같이 분리된 홍국색소는  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 특히 불안정하고 다른 금속이온에 대해서는 비교적 안정하였다. 홍국색소 용액에 각각의 0.001M의 금속이온을 첨가하여 냉장온도에서 48시간 동안 보관한 후 분리된 색소의 잔존량은  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 대해 ERP는 82%, EYP는 74%, IRP는 80% 그리고 IYP는 75%로 나타났으며 다른 금속이온에 대한 홍국색소의 잔존량은 91~97%이었다. 0.01M의  $\text{Cu}^{2+}$  이온 첨가시 색소의 잔존량은 ERP는 63%, EYP는 54%, IRP는 70% 그리고 IYP는 68%로 나타났으며 다른 금속이온에 대한 홍국색소의 잔존량은 89~97%로 나타났다. 금속이온에 대한 영향은  $\text{Fe}^{2+}$ 만이 비교적 안정하고 나머지  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  등은 홍국색소의 안정성을 저해한다고 보고(17,18)하였는데 본 연구에서도 금속이온 중  $\text{Cu}^{2+}$  이온이 홍국 적색소 및 황색소의 안정성을 저해하는 결과와 잘 일치하였다.

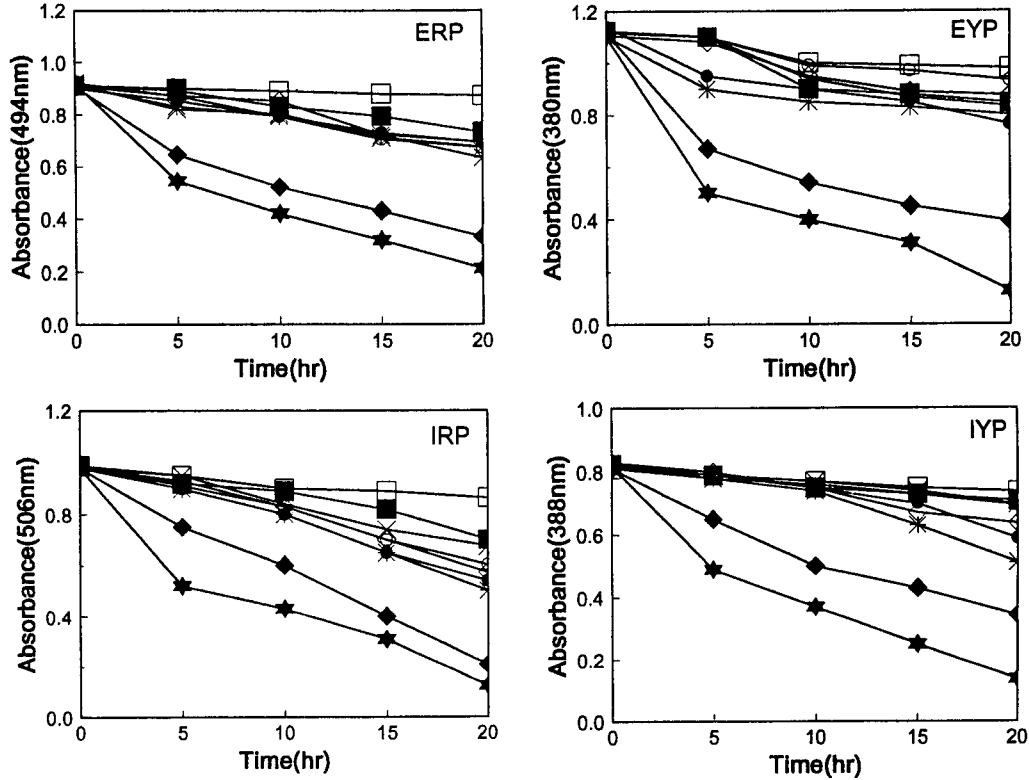


Fig. 6. Effect of organic acid on the pigments of *Monascus anka*.

□-□: control, ■-■: propionic, ◇-◇: formic, ○-○: acetic, ×-×: butyric, \*-\*: malonic, ★-★: tartaric, ●-●: malic, ◆-◆: citric

Table 1. Effect of metal ions on the of *Monascus anka*.

Pigment	Residual pigment(%)																
	Control	Hg <sup>2+</sup>		Ag <sup>2+</sup>		Fe <sup>2+</sup>		Cd <sup>2+</sup>		Mn <sup>2+</sup>		Al <sup>3+</sup>		Zn <sup>2+</sup>		Cu <sup>2+</sup>	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ERP	98	96	94	96	94	95	91	95	95	93	90	91	89	97	94	82	63
EYP	97	94	93	95	94	96	94	96	94	96	94	94	94	94	90	74	54
IRP	98	96	96	95	93	95	90	94	90	95	90	95	90	93	91	80	70
ITP	99	97	97	96	90	95	95	94	92	94	92	96	95	94	94	75	68

ERP: Extracellular red pigment, EYP: Extracellular yellow pigment, IRP: Intracellular red pigment, IYP: Intracellular yellow pigment

A: 0.001M of metal ions, B: 0.01M of metal ions

요 약

*Monascus anka*가 생산하는 색소는 균체외 적색색소(ERP)와 황색색소(EYP) 그리고 균체내 적색색소(IRP)와 황색색소(IYP)로 분리되었고 각각의 색소는 특징적인 absorption spectrum을 나타냈다. 분리된 4종의 색소의 안정성을 검토한 결과, 암조건, 자외선 그리고 형광하에서는 비교적 안정하였지만 일광하에서는 색소가 급격히 퇴색하는 경향을 나타내 저장시 광차단이

필요함을 알 수 있었다. pH에 대해서는 각 색소가 pH 2.0~12.0 범위에서 비교적 안정하였다. 온도의 영향은 60~80°C에서는 비교적 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 안정성이 떨어지는 것으로 나타났다. 8종의 유기산 중에 tartaric acid와 citric acid가 홍국색소의 안정성을 저해하는 것으로 나타났고 propionic, formic, acetic, butyric, malonic, malic acid는 비교적 안정하였다. 홍국색소의 변색에 가장 큰 영향을 미치는 금속이온은 Cu<sup>2+</sup>이었다.

### 감사의 글

본 연구는 '서남권 식품가공연구 및 기술지원센터'의 지역협력연구과제(식가연센터 95-1-1-5) 연구비에 의해 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. 山口宗助 : 天然色素의 市場動向. 冷菓・清涼飲料への天然色素利用の最新技術. *フードケミカル*, **4**, 41(1988)
2. Carles, M. and Shepherd, D. : The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* sp. in submerged-shaken culture. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 1360(1977)
3. Kim, C. S., Rhee, S. H. and Kim, I. : Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by mold(*Monascus* sp.). *Korea J. Food Sci. Technol.*, **9**, 277(1977)
4. Bau, Y. S. and Wong, H. C. : Zinc effects on the growth, pigmentation and antibacterial activity of *M. purpureus*. *Physiologia Plantarum*, **46**, 63(1979)
5. Hiroi, T., Shima, T., Suzuki, T., Tsukioka, M. and Ogasawara, N. : Hyperpigment-productive mutant of *M. anka* for solid culture. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1975(1979)
6. Broder, C. U. and Koehler, P. E. : Pigments produced by *M. purpureus* with regard to quality and quantity. *J. Food Sci.*, **45**, 567(1980)
7. Su, Y. C. : Fermentative production of anka pigments. *Korea J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 325(1983)
8. Ju, J. Y., Nam, H. W., Yoon, J. C. and Shin, C. S. : Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Korea J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 85(1994)
9. 김명희, 이태경, 양한철 : *Monascus anka albidus*의 적색색소 생산. *한국식품과학회지*, **24**, 451(1992)
10. 박명희 : *Monascus* sp.로부터 색소생성변이주의 분리 및 배양조건의 최적화. 숙명여자대학교 석사학위논문(1989)
11. 강성국, 정순택 : 액체홍국의 배양조건에 따른 색소생산과 색조의 변화. *한국산업미생물학회지*, **23**, 472(1995)
12. Percy, S. M. and Whalley, W. B. : Isolation and structure of ankaflavin, A new pigment from *Monascus anka*. *Phytochemistry*, **12**, 2531(1973)
13. 김현수, 정효성, 양호석, 변용호, 유주현 : 액침 진탕, 배양에 의한 *Monascus* sp.가 생산하는 적색색소에 관한 연구. 제2보 적색색소의 생산과 물리적 성질 및 생리적 성질. *한국산업미생물학회지*, **7**, 31(1979)
14. 장욱, 김현수, 손충홍, 배종찬, 유주현 : *Monascus* sp.가 생산하는 황색 색소에 관한 연구. 제 1 보 황색색소 생산의 배양조건. *한국산업미생물학회지*, **8**, 119(1980)
15. 김현수, 장욱, 이희인, 배종찬, 유주현 : *Monascus* sp.가 생산하는 황색 색소에 관한 연구. 제 2 보 황색색소의 분리 및 정제. *한국산업미생물학회지*, **8**, 167(1980)
16. 김창식, 이숙희, 김일 : 홍국곰팡이를 이용한 식용적색색소의 제조 및 이의 성장에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **9**, 277(1977)
17. 민경희 : 천연식용적색색소의 발효적생산. *한국음식문화연구원논문집*, p.759(1992)
18. 尾上旦, 片山誠 : 微生物係 赤色天然色素 モナスカ라의 諸性質と利用技術. *食品工業*, **8**, 52(1977)

(1996년 10월 28일 접수)