*Monascus ruber*의 액체배양을 통한 색소 생산 및 고체발효를 통한 홍국 쌀의 monacolin K 생산 특성

박윤제*

Production of Pigment by Liquid Culture and Monacolin K in Red Mold Rice by Solid State Fermentation of *Monascus ruber* Strains

Youn-Je Park*

접수: 2013년 12월 2일 / 게재승인: 2013년 12월 13일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The growth characteristics and production of color pigments by *Monascus* strains were investigated during liquid culture, and production of monacolin K in red mold rice was carried out by solid state fermentation. Four different *Monascus ruber* strains were cultured in potato dextrose yeast extract broth (PDYB) media at 25°C for 15 days. The high producing strain for red pigment was not corresponded to the strain for yellow pigment. Production of red pigment was high in the strain causing the fast pH change in culture broth. Production of monacolin K in red mold rice by solid state fermentation was influenced by a combination of wet cell weight and spore density in inoculum by liquid culture. Most strains showed the high production of monacolin K in red mold rice, when submerged fermentation was carried out for 5 days as inoculum for solid state fermentation. These results suggest that submerged fermentation period of inoculum have an effect on the production of monacolin K in red mold rice by solid state fermentation, and monacolin K in red mold rice could be increased by controlling the condition of submerged fermentation for inoculum.

Keywords: *Monascus*, Liquid culture, Red mold rice, monacolin K, Pigment

1. 서론

홍국균 (*Monascus* sp.)은 Ascomycotina 문, Plectomycetes 강, Eurotiales 목, Monascaceae 과, *Monascus* 속 (홍국균속)에 속하는 붉은 곰팡이로서 분류학적으로 자낭균류에 속하며 균사가 붉은 색을 띠고 있어 홍국균이라고 불린다 [1]. 홍국균은 쌀이나 콩 등으로 만든 누룩으로부터 분리되고 있으며, 주로 *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. pilosus* 등이 동정되어 사용되고 있다.

홍국균을 배양하면 다양한 색소 성분을 얻을 수 있는데, 이들 색소는 천연색소로서 합성색소보다 인체에 대한 안전성이 높다는 장점이 있다. 현재까지 알려진 홍국균이 생산하는 색소 성분은 10여종 이상이 알려져 왔는데, 황색 계통의 색소로는 monascin과 ankaflavin, 적색 계통의 색소로는 monascorubramine과 rubropunctamine 등이 알려져 있다 [2]. 홍국색소의 특징은 온도와 pH에 안정하고, 단백질, 펩타이드 등에 친화성이 강하여 점착성이 큰 성질을 가지고 있다는 점이다 [3]. 최근에는 홍국균이 생산하는 색소의 다양한 생리적 기능도 밝혀지고 있어 홍국 색소의 중요성이 점차 증가하고 있다 [4,5]. 홍국 색소는 홍국균의 고체발효 또는 액체배양으로 얻을 수 있으나, 최근에는 생산수율이 높고 대량생산이 가능한 액체배양을 통해 주로 생산되고 있다 [6]. 액체배양

공주대학교 식품공학과
Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea
Tel: +82-41-330-2486, Fax: +82-41-330-2489
e-mail: ypark@kongju.ac.kr

을 통한 홍국색소의 생산은 사용균주와 영양성분 및 배양조건에 따라 색소의 종류와 구성성분이 달라지는 것으로 알려져 있다 [7].

홍국균을 쌀이나 다른 곡류에 발효하면 붉은 색을 띠는 누룩을 얻을 수 있는데, 이것을 홍국(紅麴)이라고 하며, 특히 홍국균을 쌀에 발효한 것을 홍국쌀이라고 한다. 홍국쌀은 우리나라를 비롯한 동아시아 지역에서 오래전부터 전통적으로 사용되어 온 건강식품으로, 홍국쌀에 포함된 대표적인 생리활성성분은 monacolin K이다 [8]. Monacolin K의 기능성은 cholesterol 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해함으로써 혈중 콜레스테롤 수치를 저하시키는 것으로 알려져 있다 [9,10]. 그 외에도 홍국에 의한 항암 [11], 항산화 [12], 항염효과 [13] 등이 밝혀지고 있으며, 최근에는 염증반응을 줄임으로써 알콜성 간질환에 대한 예방효과와 [14] 고혈압에 대한 효과가 있다는 동물실험 결과가 제시되었다 [15].

홍국의 기능성 성분인 monacolin K의 생산은 *Monascus* sp.의 액체배양에 의해서도 이루어지고 있으나, 주로 생산성이 높은 *Aspergillus* sp.에 의해 생산되고 있다. 그러나, *Aspergillus* sp.와 달리 *Monascus* sp.를 고체발효한 홍국쌀은 건강기능식품으로 사용할 수 있어 최근에는 *Monascus* sp.의 고체발효를 통한 monacolin K의 생산성을 증가시키는 연구가 이루어져 왔다. 고체발효한 홍국쌀에는 유용성분인 monacolin K와 여러 색소들 뿐만 아니라 신독소로 작용하는 citrinin이 함께 함유되어 있는 경우가 많은데 [16], 이는 홍국이 생산하는 monacolin K와 색소들이 신독소로 작용하는 citrinin 등의 2차대사산물들과 동일한 합성경로를 거치기 때문으로 알려져 있다 [17]. 이러한 고체발효한 홍국쌀에 포함된 성분의 조성은 주로 균주의 종류와 배양조건에 의해 결정된다고 알려져 있다 [18].

고체발효를 통한 홍국으로부터 monacolin K의 생산에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔는데, 콩, 밀, 보리, 찹쌀, 백미 등의 여러가지 곡물 기질 중에서는 백미가 가장 높은 생산량을 나타내었으며 [19], 고체발효시에 발효온도를 변화시키면 생산량을 20배 이상 증가시키는 결과도 보고되었다 [20]. 또한, 액체배양에서의 균체생산량이 고체발효에서의 monacolin K의 생산에 미치는 영향과 액체배양에 대한 최적조건 연구가 진행되었으나 [21], 전배양기간이 고체발효에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

홍국균을 산업적으로 이용하는 방법은 주로 액체배양을 통한 색소 성분의 생산과 고체발효를 통한 홍국쌀에서의 monacolin K의 생산이다. 이를 위해서는 색소나 monacolin K의 생산량이 우수한 균주의 선별과 더불어 생산량 증진을 위한 배양조건의 최적화가 필요하다. 본 연구에서는 전배양에서 보고한 결과를 바탕으로 국내 35종의 *Monascus* 균주 중 액체배양에서의 균주별 배양 특성과 monacolin K 생산성 및 색소 생산성이 우수한 4종의 *Monascus ruber* 균주를 이용하여 산업적으로 활용하기 위한 기초자료를 확보하고자 하였다 [22]. 우선 이들 균주들의 액체배양을 통해 균주들의 배양 특성과

색소생산성을 확인하였고, 이를 고체발효하여 홍국쌀을 제조한 후 monacolin K의 함량과 균주별 생산 특성을 살펴보았다. 또한, 전배양으로서 액체배양 기간이 홍국쌀 고체발효에 미치는 영향을 확인하고 최적 액체배양 기간을 설정함으로써 monacolin K의 생산량을 증진시킬 수 있는 홍국쌀 고체발효 조건을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배지

실험에 사용한 홍국균은 식약청에서 건강기능식품 제조에 사용할 수 있도록 인정하고 있는 균주들을 사용하였다. 이전 실험에서 비교적 색깔이 진하게 변하고 monacolin K의 생산량이 높았던 *M. ruber* KCTC 6122, *M. ruber* KCCM 60141, *M. ruber* KCCM 60167, *M. ruber* KCCM 60394 총 4균주를 실험에 사용하였다. 각 균주는 생명공학연구원 미생물지원센터 (KCTC)와 한국미생물보존센터 (KCCM)에서 분양받아 사용하였다.

실험 균주의 고체평판배양을 위해 사용한 배지는 기본적으로 추천되고 있는 배지인 potato dextrose yeast extract agar (PDYA, Difco, USA)를 사용하였고, 액체배양을 위해서는 potato dextrose yeast extract broth (PDYB, Difco, USA)를 사용하였다. 각 균주는 고체평판배지에서 25°C에서 7일간 균체를 배양한 후 액체배양에 사용하였으며, 생리적 활성을 유지하기 위하여 1주 간격으로 계대 배양하며 실험을 진행하였다.

2.2. 액체배양에서의 생장 특성

액체배양에서의 균주별 생장특성을 파악하기 위하여 PDYB 배지에 각 균주를 접종한 후 액체배양을 하면서 pH 변화 및 색소 성분 생산량을 측정하였다. 먼저 250 mL 삼각플라스크에 50 mL 액체배지를 넣고 멸균한 다음 고체평판배지에서 배양한 균주를 11 mm 크기의 디스크로 자른 후 각각 5개를 액체배지에 접종하였다. 액체배양은 진탕배양기에서 25°C에서, 15일간 180 rpm으로 교반하며 배양하였고, 이 때 액체배양시 균체의 엉김을 방지하고 균주를 퍼지도록 위하여 Tween 80 (Sigma, USA) 0.2%를 섞어서 배양하였다. 매일 배양액을 회수하여 filter paper (No. 2, Whatman, England)를 이용하여 1시간 동안 여과하여 균체와 여과액을 분리하였다. 분리한 균체는 별도로 수득하여 균체량 (wet cell weight)을 측정하였고, 여과액에서는 현미경을 이용하여 포자수와 pH를 측정하였다.

2.3. 홍국쌀 고체발효

홍국쌀 제조를 위해 사용되는 원료로는 양질쌀로 알려져 있는 칠보를 사용하였다. 우선 쌀 50 g을 수돗물에 하룻밤 수침하여 수분을 함유하게 한 후 탈수한 다음 다시 최종 함수율이 30%가 되도록 조정하였다. 이후 함수율이 조정된 수침 쌀 50 g을 250 mL 삼각플라스크에 넣고 121°C에서 30분간 증자하였

다. 증자 후 접종 전에 다시 수분 함량을 맞추기 위해 곡물 건물량의 10%에 해당하는 멸균수를 추가로 첨가하여 쌀 배지를 준비하였다.

준비된 쌀 배지에 액체배양으로 준비된 종균을 8% (v/w)가 되도록 접종하고, 접종 후 25°C에서 10일 동안 암조건에서 고체발효를 진행하였다. 고체발효 동안 매일 하루 1 회씩 플라스크를 손으로 쳐서 교반하였고, 고체발효가 종료된 후 시료를 채취하여 홍국쌀의 변화상태와 monacolin K의 생산량을 측정하였다. 배양이 종료된 시료는 60°C에서 수분이 없어질 때까지 24시간 이상 건조하여 최종 홍국쌀을 제조한 후 밀봉하여 보관하면서 분석에 사용하였다.

2.4. 색소 성분 분석

액체배양 동안 각 균주가 생산하는 색소량은 균주를 배양한 다음 균체를 여과하여 수득한 여과액을 이용하였다. 각 균주의 배양여과액을 96 well plate에 100 µL씩 분주한 다음 spectrophotometer (Infinite M200Pro, TECAN, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 균주의 색소 생산량은 황색 색소는 385 nm에서, 적색 색소는 495 nm에서 측정된 값을 생산량으로 하였다 [23].

2.5. Monacolin K 및 citrinin 분석

홍국균이 생산하는 주요 유용성분인 monacolin K와 신장 독소로 작용하는 citrinin의 분석은 식약청에서 고시한 건강기능식품의 기준 및 규격의 시험방법 III.3.6.6 과 III.2.5.4에 따라 표준분석방법인 HPLC 방법을 사용하여 분석하였다 [24].

Monacolin K의 분석은 HPLC (Dionex ultimate3000)를 이용하여 UV detector를 이용하여 237 nm에서 측정하였다. 컬럼은 C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)을 사용하여 0.2% phosphoric acid : acetonitrile = 65:35 (v/v)로 한 용액을 이동상으로 하고 농도 변화를 주며 1 mL/min의 유속으로 주입하여 분석하였다. 표준물질은 비활성형의 경우 Sigma (USA)로부터 구입하여 표준물질 10 mg을 75% 에탄올 50 mL에 녹여 200 µg/mL 농도로 한 다음 사용하였고, 활성형은 비활성형 표준물질 용액 2 mL를 0.5 mL 0.05 N NaOH에 혼합한 후 실온에서 방치 한 후 표준용액으로 사용하였다.

Citrinin의 분석은 HPLC (Dionex ultimate3000)를 이용하여 fluorescence detector를 이용하여 측정하였다. 컬럼은 C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)을 사용하여 0.12% trifluoroacetic acid : acetonitrile = 60:40 (v/v)로 한 용액을 이동상으로 하고 1 mL/min의 유속으로 fluorescence detector를 이용하여 λ_{ex} = 335 nm, λ_{em} = 502 nm에서 측정하였다. 표준물질은 Sigma (USA)로부터 구입하여 메탄올로 녹여 사용하였다.

2.6. 고체발효 후 홍국쌀의 monacolin K 및 citrinin 분석

최종 제조된 홍국쌀에 들어있는 monacolin K와 citrinin의 함량을 측정하기 위하여 고체발효가 완료된 홍국쌀을 채취하여 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 홍국가루 1 g에 에탄올 9 mL를 첨가하여 25°C, 180 rpm에서 1시간 동안 교반하며 추출한 후 13,000 rpm에서 3 min 동안 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하고, 상층액을 회수한 다음 추출액에 포함된 monacolin과 citrinin의 함량을 HPLC로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 액체배양액의 육안관찰

액체배양 특성이 우수한 4개의 *Monascus ruber* 균주를 이용하여 액체배지인 PDYB 배지에서 25°C 조건으로 배양한 결과 4균주 모두 원활한 생장을 보여주는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 곰팡이 균주를 액체 배양할 때에는 균체의 뭉침 현상이 일어나고 이에 따라 균체 생장이 억제되는 현상이 일어나는 경우가 많으나, 4균주 모두 균체의 뭉침 현상 없이 배지에 골고루 퍼져 자라는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이는 균체의 뭉침 현상을 억제하기 위하여 배지에 첨가한 Tween 80이 균체의 엉김 현상을 막아주기 때문인 것으로 판단된다 [25].

한편 7일간 배양한 액체 종균의 배양액 상태를 균주별로 육안으로 비교해 본 결과 KCTC 6122는 매우 진한 적색을 나타냈고, KCCM 60394, KCCM 60141, KCCM 60167 순서대로 적색이 줄어드는 경향을 나타내었다. 이는 KCTC 6122 균주가 다른 균주들보다 상대적으로 많은 적색 색소를 생산하기 때문인 것으로 판단되며, 균주의 성장속도와 배양액의 색

Fig. 1. Color changes of liquid culture broths by *Monascus* strains in PDYB. (a) *M. ruber* KCTC 6122 (b) *M. ruber* KCCM 60394 (c) *M. ruber* KCCM 60141 (d) *M. ruber* KCCM 60167.

의 변화에 일정한 상관관계가 있는 것을 고려할 때 KCTC 6122 균주가 다른 균주들에 비해 상대적으로 성장속도가 빠르다는 것을 알 수 있었다 [22].

3.2. 배양시간에 따른 색소성분 변화

각 균주를 액체배지에서 배양하며 최대 15일 동안 색소 생산량의 변화를 정기적으로 살펴보았다. 각 균주의 액체 배양액에 포함된 색소의 함량을 흡광도를 이용하여 spectrophotometer로 분석한 결과 황색 색소는 KCTC 6122 균주에서 높게 나타났고 (Fig. 2(a)), 적색 색소는 KCCM 60394 균주의 배양액에서 높게 나타났다 (Fig. 2(b)). 황색의 경우는 KCTC 6122 균주가 매우 높은 함량을 나타낸 반면 KCCM 60394 균주와 KCCM 61041 균주는 중간 정도의 함량을 나타내었으며, KCCM 60167 균주는 상대적으로 낮은 색소 생산량을 나타내었다. 또한, 적색의 경우에는 KCCM 60394 균주가 매우 높은 함량을 나타내었고, KCTC 6122 균주는 중간 정도의 함량을 나타내었으며, KCCM 60141 균주와 KCCM 60167 균주는 상대적으로 낮은 색소 생산량을 나타내었다. 이러한 결과는 육안으로 관찰한 결과와 다르게 나타났는데, 육안으로는 KCTC 6122 균주가 적색이 가장 진한 것으로 나타났으나, 흡광도를 이용한 적색 색소 생산량은 KCCM 60394 균주가 가장 높게 나타나는 결과를 보여주었다. 이러한 차이의 이유로는 육안 관찰의 경우 7일 동안 배양한 배양액으로 관찰하였으나 흡광도 분석은 15일 동안 배양액의 색소 생산량을 분석하였기 때문인 것으로 판단된다. 실제로 흡광도로 측정한 적색 색소의 생산량은 15일 동안 배양한 배양액에서는 KCCM 60394 균주와 KCTC 6122 균주가 매우 큰 차이를 나타내고 있으나 7일 동안 배양한 배양액에서는 2균주간 차이가 크지 않는 것으로 나타나고 있다. 그러나, 황색 색소의 경우에는 7일 배양액에서 KCTC 6122 균주가 KCTC 60394 균주보다 월등하게 많은 색소를 생산하고 있는데, 이로 인해 육안으로 관찰할 때 KCTC 6122 균주가 오히려 더 진하게 보인 것으로 판단된다.

각 균주의 액체배양 과정 중 색소의 생산 양상을 보면 모든 균주에서 4일까지는 큰 변화를 보이지 않다가 5일째부터 색소 생산량이 증가되는 것을 보여주었다. KCTC 6122 균주의 경우 황색 색소와 적색 색소 모두 5일째부터 생산량이 증가하기 시작하여 9일째에 최대값을 나타낸 이후 일정하게 유지되는 경향을 나타내었다. 그러나, KCCM 60394 균주의 경우에는 황색과 적색 색소 모두 15일째까지 지속적으로 생산량이 증가하는 경향을 나타내었는데, 이는 각 균주의 특성과 관련된 것으로 보인다. 특히 성장속도가 비교적 빠른 KCTC 6122 균주의 경우 9일 이후에는 생장이 멈추어 색소 생산량도 증가하지 않았으나 KCCM 60394 균주의 경우에는 성장속도가 느려 15일까지 생장이 지속되면서 색소 생산도 지속적으로 증가하는 것으로 판단된다.

3.3. 액체배양시의 pH 변화

각 균주별로 액체배양 동안 pH의 변화를 살펴보았다. 액체배지로 사용한 PDYB 배지의 초기 pH를 액체배양에 가장 적합

Fig. 2. Pigment production by liquid culture of *Monascus* strains. (a) Yellow pigment was measured as absorbance at 385 nm by spectrophotometer. (b) Red pigment was measured as absorbance at 495 nm by spectrophotometer.

Fig. 3. Changes of pH in liquid culture broths by *Monascus* strains. pH of medium was adjusted to be 6.0 at inoculation time, and pH was measured during cultivation of *Monascus* strains at 25°C, 180 rpm for 15 days.

한 6.0으로 조절한 후 각각의 균주를 접종한 다음 15일 동안 균주를 배양하면서 매일 1회씩 배양액을 회수하여 pH를 측정하였다. 배양 3일째까지 모든 균주에서 pH가 4.0 가까이 낮아졌으며, 이후부터 다시 증가하기 시작하여 9일째까지 pH 7.5 내외로 증가하였다 (Fig. 3). 이후로는 대부분 pH 7.5±0.5

에서 일정하게 유지되는 경향을 나타내었는데, 이러한 pH의 변화는 균주가 성장하면서 일어나는 여러 대사물질의 분비와 2차 대사산물의 생성과 연관된 것으로 판단된다. 균주별로 pH 변화 양상을 살펴보면 KCCM 60394 균주가 다른 균주들과 다른 양상을 나타내는데 배양 3일째 이후 pH의 증가가 다른 균주들에 비해 비교적 빠르게 나타나고 있다. 이러한 현상은 KCCM 60394 균주의 적색 색소 생산량의 빠른 증가와 일치하는데, 이는 적색 색소의 생산량이 높은 균주의 경우 pH가 중성에 가깝게 높아진다는 결과와도 유사함을 알 수 있다 [26]. 이와 같은 결과를 바탕으로 볼 때 *Monascus* 균주의 액체배양을 통한 적색 색소의 생산과 pH의 변화는 매우 밀접하게 연관되어 있을 것으로 판단된다 [18].

3.4. 액체배양시의 포자량 및 균체량

액체 배양을 하면서 각 균주의 균체량과 생성되는 포자수를 측정하였다. 배양 시작 후 3일, 5일, 7일, 15일째에 각 균주별로 포자수의 변화와 균체량의 변화를 측정하여 본 결과, 날짜별로 포자수와 균체량의 증가 양상은 서로 다르게 나타났다. KCCM 60394 균주를 제외한 대부분의 균주에서 균체량은 배양 5일째에 급격하게 증가한 후 7일째와 15일째에는 약간씩 감소하거나 정체되는 경향을 보여 균체량은 배양 5일째가 최대가 되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). 또한, 균주별로 균체량

이 서로 비슷한 양으로 생성되는 것을 알 수 있었다. 그러나, 포자수의 경우에는 균주별로 생성량이 매우 다르게 나타났는데, KCTC 6122 균주가 비교적 높은 포자수를 생성한 반면, KCCM 60394 균주는 상대적으로 매우 낮은 포자수를 생성하였다. 날짜에 따른 포자수의 생성 양상도 균주별로 매우 다르게 나타났는데, KCTC 6122 균주나 KCCM 60167 균주는 시간이 지날수록 지속적으로 포자 생성량이 증가하였지만, KCCM 60141 균주는 5일째에 증가한 포자수가 7일째에 약간 감소했다가 15일째에 다시 증가하는 양상을 보였고, KCCM 60394 균주는 7일째에 포자수가 가장 많이 생성되었다가 15일째에는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 균주별로 액체배양 날짜에 따라 포자수와 균체의 생성량이 서로 다르며, 최적 생성시기도 서로 다르다는 것을 의미한다 [21].

3.5. 고체발효 홍국쌀의 monacolin K 및 citrinin 함량

액체배양액을 중국으로 이용하여 고체발효를 통한 홍국쌀 제조에 있어서 액체배양의 전배양기간이 홍국쌀 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 균주별로 각각 3, 5, 7, 15일간 액체배지에서 전배양을 한 후 이들을 이용하여 고체발효를 진행하였다. 5일간 전배양한 액체배양액을 접종하여 10일 동안 고체발효한 홍국쌀에서 모든 균주가 강한 적색을 나타내

Fig. 4. Spore density and wet cell weight of *Monascus* strains in liquid culture broths according to submerged fermentation periods. (a) *M. ruber* KCTC 6122 (b) *M. ruber* KCCM 60394 (c) *M. ruber* KCCM 60141 (d) *M. ruber* KCCM 60167.

Fig. 5. Red mold rice by solid state fermentation of *Monascus* strains for 10 days. Liquid culture broth was inoculated after submerged fermentation for 5 days. (a) *M. ruber* KCTC 6122 (b) *M. ruber* KCCM 60394 (c) *M. ruber* KCCM 60141 (d) *M. ruber* KCCM 60167.

었는데, 특히 KCCM 60141 균주를 이용하여 제조한 홍국쌀이 가장 붉은 색을 나타내었다 (Fig. 5). 이러한 현상은 액체배양시에 KCCM 60394 균주와 KCTC 6122 균주가 진한 적색을 나타낸 것과는 상이한 결과로서 균주들의 액체배양과 고체발효 결과가 서로 일치하지 않는다는 것을 의미한다. 이것은 고체발효의 배양 조건이 액체배양의 배양조건과는 달라지기 때문에 균주의 성장과 색소 생산에 영향을 주는 조건도 달라짐으로써 생리적인 대사과정도 변하게 되고 결과적으로 균주의 성장이나 색이 다르게 나타나는 것으로 판단된다 [27].

이들 홍국쌀에 포함된 monacolin K의 함량을 분석한 결과 균주별로 전배양의 기간에 따라 생성되는 monacolin K의 함량이 서로 다르게 나타났다 (Fig. 6). 대부분의 균주에서 3일 보다 5일 동안 전배양한 액체배양액을 접종하였을 때, 고체발효된 홍국쌀에 포함된 monacolin K의 함량이 급증하는 경향을 보였으나, KCCM 60394 균주는 다른 경향을 나타내었다. KCCM 60394 균주의 경우 5일 동안 전배양한 액체배양액을 접종하였을 때와 3일 동안 전배양한 액체배양액을 접종하였을 때의 monacolin K 생산량이 유사하였고, 오히려 7일

Fig. 6. Concentration of active and inactive monacolin K in red mold rice after solid state fermentation of *Monascus* strains for 10 days. Liquid culture broth was inoculated after cultivation for each submerged fermentation periods. (a) *M. ruber* KCTC 6122 (b) *M. ruber* KCCM 60394 (c) *M. ruber* KCCM 60141 (d) *M. ruber* KCCM 60167.

의 생성이 급증하는 경향을 보였다. 또한, 이 균주의 경우에는 전체적으로 생성되는 monacolin K의 함량이 다른 균주에 비해 상대적으로 낮게 나타났다. 한편, KCTC 6122 균주의 경우에는 전배양을 15일 동안 하였을 때, 고체발효한 홍국쌀에서 가장 높은 monacolin K를 생성하였으나, 전배양 기간이 너무 오래 걸려 실제로 산업 현장에서 적용하기에는 어려울 것으로 판단된다. 이와 같은 결과를 바탕으로 볼 때 *Monascus* 균주를 이용하여 홍국쌀을 고체발효 할 때의 일반적인 전배양기간은 5일이 최적인 것으로 생각된다.

한편 균주별 전배양기간에 따른 활성형 monacolin K와 비활성형 monacolin K의 비율도 각각 다르게 나타났는데, KCCM 60394 균주를 제외한 다른 균주에서는 전배양기간을 5일 동안 하였을 때 비활성형 monacolin K의 함량이 가장 높게 나타났다. 또한, 15일간 전배양한 배양액을 접종하였을 때 모든 균주에서 홍국쌀에 포함된 활성형 monacolin K의 함량이 높게 나타나는 경향을 보였다 (Fig. 6). 그러나, 홍국쌀을 생산하기 위하여 전배양을 15일 동안 하는 것은 실제로 적용하기 어렵다고 판단되며, 전체 monacolin K의 생산량과 활성형 monacolin K 생산량을 비교해 볼 때 5일 동안 전배양한 배양액을 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 전배양 기간을 5일 동안 할 경우 활성형 monacolin K의 생산량을 균주별로 비교해 보면 KCCM 60141 균주나 KCTC 6122 균주가 가장 많은 생산량을 나타내었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, *Monascus ruber* 4균주 중 KCCM 60141 균주나 KCTC 6122 균주를 5일 동안 전배양한 액체배양액을 접종하는 방법이 고체발효된 홍국쌀의 색이나 monacolin K의 생산량을 증가시키는 가장 바람직한 방법으로 판단된다.

고체발효를 통해 생산한 홍국쌀에 포함된 monacolin K의 생성에 영향을 주는 요인을 알아보기 위하여 접종액에 포함된 포자수와 균체량과의 관계를 분석하였다. 접종액의 포자수와 균체량의 함량과 최종 생산된 홍국쌀에 포함된 monacolin K의 함량이 항상 일치하는 경향을 보이지는 않았지만, 전반적으로 포자수와 균체량의 함량이 높았을 때 홍국쌀의 monacolin K의 함량도 높게 나타났다. 기본적으로 monacolin K의 생성에는 접종액에 포함된 균체량의 함량이 더 크게 영향을 미치는 것으로 보이나, 접종된 포자수도 monacolin K의 생성에 보완적인 역할을 하는 것으로 보인다. 포자수보다 균체량의 함량이 더 크게 영향을 미치는 이유는 고체발효동안 monacolin K를 생성하기 위해서는 쌀에서 균체의 생장이 필요한데 균사체로 접종되는 경우가 포자 형태로 접종되는 경우보다 고체발효시에 훨씬 더 빨리 성장하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나, 홍국쌀의 고체발효를 통한 monacolin K의 생성은 접종한 균체량이나 포자수 어느 하나의 요인에 의한 것이라기보다는 균체량과 포자수의 복합적인 영향에 의한 것으로 판단된다 [21].

한편, 고체발효를 통해 생산한 홍국쌀로부터 간 독성을 일으키는 citrinin의 함량을 측정한 결과 모든 균주에서 citrinin은 전혀 검출되지 않아 이들 균주를 이용하여 제조한 홍국쌀은 모두 식품으로 사용가능한 것으로 판단된다.

4. 결론

홍국쌀 제조에 사용되는 홍국균의 액체배지에서의 성장 특성 및 색소 생산에 대하여 조사하고 이들 균주를 이용하여 제조한 홍국쌀에 포함된 monacolin K의 함량과 전배양기간에 따른 영향에 대하여 조사하였다. 총 4개의 *Monascus ruber* 균주를 각각 PDYB 액체배지에 접종한 후 25°C에서 15일 동안 배양하였다. 배양 7일 후 육안 관찰 결과 KCTC 6122 균주에 의한 액체 배양액이 가장 진한 적색을 나타내었으나, 흡광도에 의한 측정결과 황색 색소는 KCTC 6122 균주가 가장 많이 생산하고 적색색소는 KCCM 60394 균주가 가장 많이 생산하였다. 액체배양시 pH의 변화 양상은 대부분 균주가 비슷하였는데, 배양액의 pH 변화가 빠른 균주에서 적색 색소 생산량이 높은 것으로 나타났다. 고체발효 후 생산한 홍국쌀의 monacolin K의 함량은 접종시 균주의 균체량과 포자수에 의해 복합적으로 영향을 받는 것으로 보이며, KCCM 60141 균주나 KCTC 6122 균주를 5일 동안 전배양 하는 것이 가장 바람직하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 액체배양 기간이 고체발효한 홍국쌀의 monacolin K의 함량에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었고, 전배양인 액체배양 조건을 조절함으로써 홍국쌀의 고체발효를 품질을 증진시킬 수 있을 것으로 판단된다.

감사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ90709003)의 지원에 의한 연구결과와 일부로서 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hawksworth, D. L. and J. I. Pitt (1983) A new taxonomy for *Monascus* species based on the cultural and microscopical characters. *Aust. J. Bot.* 31: 51-61.
- Martinkova, L., P. Juzlova, and D. Vesely (1995) Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 609-616.
- Shikeo, M. (1990) Function and utilization of *Monascus* sp. *Tech. J. Food Chem. Chem.* 12: 42-25.
- Su, N. W., Y. L. Lin, M. H. Lee, and C. Y. Ho (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.
- Martinkova, L., P. Pataková-Juzlova, V. Kren, Z. Kucerova, V. Havlicek, P. Olsovsky, O. Hovorka, B. Rihova, D. Vesely, D. Vesela, J. Ulrichova, and V. Prikrylova (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* 16: 15-24.
- Lee, S. M., H. S. Kim, and T. S. Yu (2003) The optimal condition

- for production of red pigment by *Monascus anka* on solid culture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 155-160.
7. Juzlova, P., L. Martinkova, and V. Kren (1996) Secondary metabolite of the fungus *Monascus*. *J. Ind. Microbiol.* 16: 163-170
8. Akihisa, T., H. Tokuda, K. Yasukawa, M. Ukiya, A. Kiyota, N. Sakamoto, T. Suzuki, N. Tanabe, and H. Nishino (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.
9. Endo, A. (1979) Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.* 32: 852-854
10. Manzoni, M. and M. Rollini (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 555-564.
11. Ho, B. Y. and T. M. Pan (2009) The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8258-8265.
12. Park, C. D., H. J. Hang, H. W. Lee, H. S. Kim, and T. S. Yu (2005) Antioxidant activity of *Monascus* pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant. *Korean J. Microbiol.* 41: 135-139.
13. Hsu, W. H., B. H. Lee, T. H. Liao, Y. W. Hsu, T. M. Pan (2012) *Monascus*-fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- γ regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem. Toxicol.* 50: 1178-1186.
14. Cheng, C. F. and T. M. Pan (2011) Protective effect of *Monascus*-fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9950-9957.
15. Lee, B. H. and T. M. Pan (2012) Benefit of *Monascus*-fermented products for hypertension prevention. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 1151-1161.
16. Kim, H. J., G. E. Ji, and I. Lee (2007) Natural occurring levels of citrinin and monacolin K in Korean *Monascus* fermentation products. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 142-145.
17. Hajjaj, H., P. J. Blanc, E. Groussac, G. Goma, J. L. Uribe Larrea, and P. Loubiere (1999) Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnol. Bioeng.* 64: 497-501.
18. Lee, C. L., H. K. Hung, J. J. Wang, and T. M. Pan (2007) Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under *Dioscorea* medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6493-6502.
19. Kwak, E. J., S. K. Cha, and S. I. Lim (2003) The optimal condition for the production and extraction of monacolin K from red-koji. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 830-833.
20. Tsukahara, M., N. Shinzato, Y. Tamaki, T. Namihira, and T. Matsui (2009) Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158: 476-482.
21. Jung, H. J. and T. S. Yu (2004) Production of cell mass and monacolin K from *Monascus* sp. on rice solid culture. *Kor. J. Microbiol.* 40: 160-166.
22. Seo, J. W., C. S. Kim, E. J. Seo, C. O. Jeon, H. K. Choi, and Y. J. Park (2012) Characteristics of growth, pigment and monacolin K production by *Monascus* strains in liquid culture. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 27: 301-307
23. Kim, S. J., J. W. Rhim, S. G. Kang, and S. T. Jung (1997) Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 60-66.
24. KFDA (2010) *Health Functional Food Code*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
25. Fargues, J., N. Smits, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier, and P. Quimby (2002) Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* 154: 127-138.
26. Lee, C. L. and T. M. Pan (2012) Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 1449-1459.
27. Babitha, S., C. R. Soccol, and A. Pandey (2007) Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *J. Basic Microbiol.* 47: 118-126.