

제분 및 양조용 Monacolin K 대량 생산
균주 탐색 및 응용연구

Screening and application for mass
production of Monacolin K for milling
and brewing

연구 기관
한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “제분 및 양조용 Monacolin K 대량 생산 균주 탐색 및 응용연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003. 8. 27.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 차 성 관

세부연구책임자 : 임 성 일

세부연구책임자 : 최 신 양

연 구 원 : 김 성 수

연 구 원 : 곽 은 정

연 구 원 : 이 효 민

연 구 원 : 이 장 은

요 약 문

I. 제목

제분 및 양조용 Monacolin K 대량 생산 균주 탐색 및 응용연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

Monascus sp.에서 분비되는 색소는 monascarubin, monascarub ramin, rubropunctatin, rubropunctamine moscasin의 구조를 가지고 있으며 이는 독성이 없는 성분으로 알려져 천연 적색색소로서 의약품의 제조나 식품에 필요한 색소로서 각광을 받고 있다. 근년에 와서는 *Monascus* 속의 일종인 *Monascus pilosus*, *Monascus ruber*, *Monascus pubigerus* 등에서 강력한 콜레스테롤의 합성저해제인 monacolin이 발견되었고 또 monacolin과 유사한 생리활성물질이 분리된 바 있다. 이러한 성분은 콜레스테롤 합성계의 효소인 HMG-CoA(3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하는 특성이 있으며 쥐, 고양이, 개를 대상으로 동물실험한 결과 소량 투여로 혈중 콜레스테롤이 저하되고 임상실험 한 결과에서는 중증의 고콜레스테롤 환자에 대하여 유효하며 동맥경화를 유발시키는 low density lipoprotein 콜레스테롤을 우선적으로 저하시키는 특징이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 중국과 대만 및 일본에서는 홍국균을 이용한 약리 및 생리활성물질에 대한 연구가 진행되어 건강보조식품 및 고혈압 치료약의 개발을 서두르고 있다.

그러나 우리나라에서는 *Monascus* 속에 의한 색소의 생산에 대하여 약간의 연구보고가 있을 뿐, monacolin K(MK)의 구체적인 함량분석 및 대량생산에 관한 연구를 찾아 볼 수 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기능성이 우수한 MK를 대량으로 생산 가능한 균주를 탐색하고 우수균주를 대상으로 최적 배양조건을 설정하며 또한 MK의 최적 추출조건, 정제법을 확립하고자 하며 최종적으로 *Monascus* 균주를 활용한 제품을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. MK 생성 균주의 선발

한국식품개발연구원에 보유하고 있는 *Monascus* 속 균주를 분양받아 PDA 배지를 이용하여 30℃에서 5일간 배양 후 쌀배지를 이용하여 배양한 다음, MK를 추출하여 HPLC로 분석 MK 생산용 균주로 선발한다.

2. 배양조건 확립

- 액체배양법 확립 : peptone 또는 감자, 콩을 주원료로 선발 균주의 최적배양조건 설정
- 고체배양법 확립 : 쌀의 침지시간별, 배양온도 및 배양시간별 최적 조건 설정

3. MK 추출공정 확립

추출 용매별, 물리적 처리조건별(파쇄, sonicator)로 MK를 추출하여 HPLC를 이용하여 최적 추출조건 설정

4. *Monascus* 속 균주 배양물의 안전성 검사

Monascus 속 균주에 의해 생성되는 mycotoxin 물질로 알려진 citrinin의 생성 유무 검사

5. MK의 대량 분리법 확립

Neutral aluminum oxide를 80% ethanol로 washing 한 다음 open column에 packing 한 후 chromatography에 의한 MK의 분리

6. 배양물을 이용한 제품 개발

- 액체배양물과 고체배양물을 혼합한 제분 제조

- 고체배양물을 이용한 곡주의 제조
- 선발균주를 이용한 장류의 제조

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

총 29종의 *Monascus* 속 균주를 PDA, 액체배지, 쌀에 배양하여 MK 최대 생산 균주를 선발한 결과 29번 균주의 적색소 및 MK의 생산량이 최대였으며 29번 균주를 동정한 결과 *Monascus purpureus* CBS 281.34로 판정되었다. 이 *Monascus* 속 균주는 백미에서 MK 및 적색소의 생산이 최대였으며 최적 액체배지의 조성은 라이스 파우더(3%), sodium nitrate (0.15%), magnesium sulfate(0.1%), potassium dihydrogen phosphate (0.25%)이었다. 쌀 배양물의 최적 건조조건은 80℃에서 60분간으로서 MK가 비교적 안정하게 유지되었다. MK의 최적 추출방법은 종전의 sonication 처리와 장시간을 요하는 추출시간을 획기적으로 간소화할 수 있는 방법을 확립하였다. MK 및 적색소의 안정성을 조사한 결과, MK는 중성 및 산성에서 비교적 안정하고 pH 10의 알칼리성 영역에서는 분해율이 상당히 높았으며 초산의 존재하에서는 상당히 불안정하였다. 열에 대한 안정성은 10℃ 이하의 온도에서 비교적 안정하여 식품제조를 위해서는 95% 알콜 농도의 주정으로 *Monascus* 속 균주의 쌀배양물(홍국)의 알콜 추출물을 제조하여 저장하고 물로 희석하여 사용할 경우는 10℃이하의 저온저장이 바람직한 것으로 나타났다.

Neutral aluminum oxide를 수지로 사용하여 open column chromatography에 의해 정제한 결과 MK의 정제효율은 70% 이상이었다. *Monascus* 균주가 생성하는 것으로 알려진 mycotoxin인 citrinin의 생성유무를 분석한 결과 *Monascus purpureus* CBS 281.34 균주를 배양한 홍국에서는 생성되지 않거나 검출이 되지 않을 정도의 극 미량이 생성되는 것으로 사료된다.

홍국의 기능성을 조사하기 위해 rat를 대상으로 혈중 GOP, GTP, 총 cholesterol, LDL, HDL, triglyceride를 분석한 결과, GOP, GTP는 lard를 첨가한 사료 섭취군 보다 다소 낮았으며 총 콜레스테롤은 일반대조군 보다 오히려 낮게 측정되었다. LDL 및 triglyceride는 총 콜레스테롤과 유사한 경향이였다. 홍국 ethanol 추출물의 항산화능을 in-vitro에서 측정한 결과 hydroxy radical 소거능은 α -tocopherol에 비해 2배 이상 높았으며 과산화물 생성억제능은 α -tocopherol과 유사한 억제능이 있는 것으로 나타났다.

홍국을 첨가한 식품으로서 면, 식빵, 국수, 음료를 제조하여 기호도를 조사한 결과, 홍국을 3% 첨가한 제품에서 색상의 기호성이 매우 우수하여 종합적인 기호도가 무첨가구에 비해 훨씬 높게 평가되었다. 홍국을 이용한 술의 제조에서는 주정으로 홍국추출물을 제조한 후 증류수로 희석하여 알콜농도를 15%로 조절한 다음 청주향을 첨가한 경우 기호도가 적당한 것으로 평가되었다. 한편, 고추장의 경우는 홍국을 1.5% 첨가한 경우 종합적인 기호도가 가장 높게 평가되었고 HMG-CoA reductase 저해활성을 조사한 결과, 90% 이상의 저해활성이 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 홍국은 기능성이 우수하고 천연색소로서의 활용가능성이 매우 높은 것으로 평가된다.

상기결과의 일부를 학회에 2건의 투고(Monacolin K 대량생산 *Monascus* 균주의 탐색 및 동정, 홍국으로부터의 Monacolin K 생성 및 추출 최적화)를 하였으며 특히 1건(홍국 쌀 추출물을 유효성분으로 포함하는 음료)을 출원하였다. 현재 기술이전을 모색 중에 있다.

SUMMARY

I. Title

Screening and application for mass production of monacolin K for milling and brewing

II. Objectives and importance

The secreted pigment from *Monascus* sp. is consisted of monascarubin, monascarubramin, rubropunctatin and rubropunctamine moscasin and non-toxic. This natural red pigment is welcome for manufacturing of medicine or foods. Recently monacolin, which is a cholesterol-synthesizing inhibitor, was found in *Monascus pilosus*, *Monascus ruber* and *Monascus pubigerus* and a bioactive material, which is similar to monacolin, has been purified. It has been known that the components inhibit the activity of HMG-CoA(3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase, which is involved in an enzyme system for cholesterol synthesizing. A small injection to animals such as mice, cats, and dogs showed cholesterol-lowering effect and it has been known that the material is very effective in high cholesterol patients in a clinical test and in lowering preferentially low density lipoprotein cholesterol which induces sclerosis of the arteries. The research on medical and bioactive materials from *Monascus* sp. and the development of health foods and hypertension drugs are in progress in China, Taiwan, and Japan.

However, there are only a few reports about pigment production from *Monascus* sp. and few researches have been carried out about

component analysis or mass production of monacolin K(MK) in Korea.

Therefore, this research is focused on strain screening for mass production of high functional MK, finding the optimized condition of culture, extraction and purification and finally developing products using *Monascus* sp.

III. The scope and contents of research

1. Selection of the strain producing MK

The strains of *Monascus* sp. were from Korea Food Research Institute, were cultured on PDA agar media at 30°C for 5 days and were cultured in rice media. MK was extracted and was confirmed by HPLC and strains for MK production were selected.

2. Establishment of culture condition

- Establishment of liquid culture method : establishment of the optimized culture condition of the selected strains using peptone, potato, or soybean
- Establishment of solid culture method : establishment of the optimized condition of the selected strains according to rice soaking time, culture temperature and culture time

3. Establishment of extraction process of Monacolin K

MK was extracted according to solvent or physical treatment by sonicator and the optimized extraction condition was decided by HPLC.

4. Safety test of the culture of *Monascus* sp.
Presence test of citrinin known as a toxic material produced by *Monascus* sp.
5. Establishment of mass separation method of MK
Mass extraction of MK using an open column packed with neutral aluminum oxide
6. Product development using the culture
 - Manufacturing flour of liquid and solid culture mixture
 - Manufacturing grain wine using solid culture
 - Manufacturing fermented soybean product using the selected strains

IV. Results and recommendation

29 strains of *Monascus* sp. were cultured on PDA agar medium, in a liquid medium or in rice medium and the strain producing the maximum MK was No. 29, its production of red pigment was the maximum and it was identified as *Monascus purpureus* CBS 281.34. The maximum amount of MK and red pigment was produced in the culture of rice medium. The liquid culture medium was consisted of rice powder (3%), sodium nitrate (0.15%), magnesium sulfate (0.1%) and potassium dihydrogen phosphate (0.25%). The optimum drying condition of the rice culture was at 80°C for 60 min and MK was stable at this condition. The optimized extraction method was established using a sonicator and the processing time was reduced. MK and the pigment were stable under neutral or acidic condition, were resolved highly under alkaline condition at pH 10 and were unstable in the presence of HCl. They were stable at below 10°C and can be extracted using 100%

alcohol and stored at below 10°C for water dilution. The purification yield of MK was over 70% when batch purification was carried out using an open column packed with neutral aluminum oxide. The analysis of citrinin, which is a mycotoxin produced by *Monascus* sp., showed that citrinin was not produced by *Monascus purpureus* CBS 281.34 or extremely small quantities which is very difficult to analyze might be produced.

GOP, GTP, total cholesterol, LDL, HDL and triglyceride in the blood of rat were analyzed for functional investigation of red yeast rice. GOP and GTP in the mice ingested feed with red yeast rice were lower than those in the mice ingested feed with lard. Total cholesterol in the mice ingested feed with red yeast rice was lower than in control mice. The results of LDL and triglyceride were similar to those of total cholesterol. The antioxidant property of the ethanol extract of red yeast rice was measured *in vitro* and the ability of elimination of hydroxy radical of the extract was 2 times higher than that of α -tocopherol and the inhibition effect of peroxides production of the extract was the same as that of α -tocopherol.

Noddle, bread and drink were manufactured and the preference test were undertaken. The color preference in the products in which red yeast rice (3%) was added was good and the total preference was higher than un-treated controls. The extract of red yeast rice was used for manufacturing grain wine (the alcohol content was 15-25%) and the preference was good when *sake* flavor was added. Addition of red yeast rice (1.5%) to red pepper paste showed the greatest value in total preference and showed more than 90% inhibition activity against HMG-CoA reductase.

Therefore, it is evaluated that the functional properties of monacolin

K are good and the usefulness of red yeast rice is high.

The results were in publication (Screening and identification of *Monascus* sp. for mass production of monacolin K, Production and extraction optimization of monacolin K from *Monascus* sp.), one patent (Manufacturing beverage containing red yeast rice extract) was applied and technology transference is going to be performed.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	15
Section 1. Introduction and background -----	15
Section 2. Objectives and importance of the research -----	17
Section 3. Scope and contents of the research -----	20
Chapter 2. Strain screening and identification for mass production of monacolin K -----	21
Section 1. Materials and Methods -----	21
Section 2. Results and Discussion -----	24
Chapter 3. Culture condition of the strains producing monacolin K -----	35
Section 1. Materials and Methods -----	35
Section 2. Results and Discussion -----	37
Chapter 4. Drying condition of the culture of <i>Monascus</i> sp. and monacolin K extraction condition -----	42
Section 1. Materials and Methods -----	42
Section 2. Results and Discussion -----	45
Chapter 5. Purification, characterization and safety test of monacolin K -----	49
Section 1. Materials and Methods -----	50
Section 2. Results and Discussion -----	52

Chapter 6. Functional study of red yeast rice culture and product development -----	67
Section 1. Materials and Methods -----	67
Section 2. Results and Discussion -----	75
Chapter 7. References -----	91

목 차

제 1 장	서론	15
제 1절	서론 및 배경	15
제 2절	연구개발의 목적 및 필요성	17
제 3절	연구 내용 및 범위	20
제 2장	Monacolin K의 대량 생산 균수 탐색 및 동정	21
제 1절	실험재료 및 방법	21
제 2절	결과 및 고찰	24
제 3장	Monacolin K 생성균주의 배양조건	35
제 1절	실험재료 및 방법	35
제 2절	결과 및 고찰	37
제 4장	홍국균 배양물의 건조 및 Monacolin K 추출조건	42
제 1절	실험재료 및 방법	42
제 2절	결과 및 고찰	45
제 5장	Monacolin K의 정제·특성 및 안전성	49
제 1절	실험재료 및 방법	50
제 2절	결과 및 고찰	52
제 6장	홍국배양물의 기능성 및 제품 개발	67
제 1절	실험재료 및 방법	67
제 2절	결과 및 고찰	75

제 1 장 서 론

제 1 절 서론 및 배경

紅麴(홍국)이란 붉은색을 띠는 곰팡이인 홍국균(*Monascus* sp.)을 주로 쌀에 배양시켜 건조시킨 것으로 중국, 대만, 일본 등지에서는 오래 전부터 착색, 양조, 방부 등을 목적으로 식품뿐 아니라 한약재로도 사용되어 온 *koji*이기도 하다. 중국의 고서인 본초강목(本草綱目) 중에는 소식활혈(消食活血) 이나 건비조위(健脾燥胃)의 기능이 있는 것으로 기록되어 있기도 하지만 그밖에도 홍국에는 cholesterol합성을 억제하거나, 혈압강하, 혈관이완 및 합압효과 등 다양한 약리 효능을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 기능은 홍국균의 대사산물 중 monacolin K(mevinolin 혹은 lovastatin)에 의한 것으로 알려져 있다. 서구와 일본에서는 이미 홍국을 분말이나 홍국으로부터의 추출물을 엑기스 형태로 하여 건강식품소재로서 판매하고 있으며, 최근 우리나라에서도 이를 이용한 건강식품개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

국내에서의 홍국균 대사산물의 이용은 주로 색소 중심으로 이루어져 있는데, 홍국의 적색색소를 고추장, 된장, 김치, 두부에 첨가해 기호성과 기능성의 증가에 관한 연구가 보고되었고, 시중 유통중의 맛살과 소시지에도 인공색소를 대신해 홍국 색소가 첨가된 것이 확인되었다. 한편 유효성분인 monacolin K(MK)에 관한 연구로서는 임상효과, 측정조건, 생성경로, 국내 각지의 토양에서 MK를 생산해내는 균주 탐색 등에 대해 보고되어 왔다. 또한 류 등은 MK의 대량생산을 목적으로 수종의 홍국균의 선별작업을 행하고 선별된 홍국균의 MK의 최적 생산 조건을 검토하였으나, MK의 기능성을 살린 건강식품의 개발을 위해서는 최우선적으로 보다 많은 양의 MK를 생성하는 균주를 탐색하여 이의 생산 효율성을 높일 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 MK의 생산 효율성을 높이고자 29종의 홍국균을 수집하여

MK를 대량생산하는 균주를 탐색하고 미동정된 1종의 홍국균은 동정하며 *Monascus* 균주를 활용한 식품제조를 위해 균주의 최적 배양조건, 홍국추출물의 MK 및 적색소의 안정성, mycotoxin인 citrinin의 생성유무, MK의 최적 추출 및 정제조건을 조사하고 이러한 결과를 바탕으로 면류, 장류, 주류, 음료류를 제조하여 관능검사를 실시하였다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

Monascus sp.에서 분비되는 색소는 monascarubin, monascarubramin, rubropunctatin, rubropunctamine moscasin의 구조를 가지고 있으며 이는 독성이 없는 성분으로 알려져 천연 적색색소로서 의약품의 제조나 식품에 필요한 색소로서 각광을 받고 있다. 근년에 와서는 *Monascus* 속의 일종인 *Monascus pilosus*, *Monascus ruber*, *Monascus pubigerus* 등에서 강력한 콜레스테롤의 합성저해제인 monacolin이 발견되었고 또 monacolin과 유사한 생리활성물질이 분리된 바 있다. 이러한 성분은 콜레스테롤 합성계의 효소로서 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하는 특성이 있다. Monacolin에 대한 연구가 진행되어 각종 동물(쥐, 고양이, 개 등)에 소량 투여하여 혈중 콜레스테롤이 저하되고 중증의 고콜레스테롤 환자에 대하여 유효하다고 보고된 바 있으며 동맥경화를 유발시키는 low density lipoprotein 콜레스테롤을 우선적으로 저하시키는 특징이 있다.

이와 같이 중국과 대만 및 일본에서는 홍국균을 이용한 약리 및 생리활성물질에 대한 연구가 진행되어 건강보조식품 및 고혈압 치료약의 개발을 서두르고 있다.

그러나 우리나라에서는 *Monascus* 속에 의한 색소의 생산에 대하여 약간의 연구보고가 있을 뿐, MK의 구체적인 함량분석 및 대량생산에 관한 연구를 찾아 볼 수 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 현재 국제적으로 인정받아 대량 판매되고 있는 중국산 제품을 비교 대상으로 이와 동일, 또는 그 이상의 MK를 생산할 수 있는 균주를 개발하고 균주의 배양조건과 MK의 분석, 정제법을 정립하고, 이를 이용한 식품소재 및 의약품 소재로서 개발하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

현재 우리나라는 MK를 중국(쌀을 이용한 제품) 및 일본(액체배양물의 분말)으로부터 전량 수입되고 있으며 MK의 국내 가격은 kg당 700,000원이며 한 제약에서 연간 1,200 kg (약 8억원) 상당을 사용하고 있는 것으로 나타나 그 밖의 제약회사를 상대로 조사한다면 상당량이 수입되어 국내에 유통되고 있는 것으로 사료된다.

일본의 경우는 청주, 식초 등의 양조식품이나 과자, 빵, 건강식품 등으로 이용되고 있지만 양조식품에서는 홍국 그 자체를 이용하는 경우가 많고 그 밖의 식품은 분말, 건강식품에서는 분말 및 엑기스분으로 이용하는 경우가 많다.

일본 군제회사의 작년 수요량은 약 30-35톤으로 2001년에는 증산체제를 갖출 예정에 있으며 丸善製藥에서는 홍균을 액체배양하고 균체를 분리·제거한 후 정제한 홍국분말을 판매하고 있다.

고체배양 분말의 국내 유통가격은 약 7만원이고 MK를 정제한 부분 정제물의 경우는 약 70만원으로 국내에서 MK 대량생산체계가 갖추어 진다면 엄청난 외화 손실을 방지할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 사회·문화적 측면

현대 의학의 발전으로 평균수명이 계속적으로 증가하고 있는 반면 혈중 콜레스테롤에 의한 고혈압과 같은 성인병이 대두되고 있다. 한국은 2000년 평균수명이 73세를 돌파하고 65세 이상 노인이 전체 인구의 7.1%를 차지할 것으로 통계청은 추정하고 있어 본격적인 고령화 시대를 맞이해 노인 건강대책이 요구되는 시점이다. 또한 식생활 패턴이 서구화되고 스트레스로 인한 성인병, 노인성 질환 등이 계속적으로 증가하는 추세에서 이러한 질환의 예방과 치료차원에서 생리활성 물질을 다량 함유한 기능성 식품에 대한 관심과 수요의 잠재력이 매우 높다고 할 수 있다.

그러나 건강 지향적 기능성 식품의 수요증가에 따라 과학적 근거가 없이 건강보조 식품 및 특수영양 식품이 범람하고 있어 오히려 국민의 건강을 해칠 우려가 있으므로 정확한 생리활성을 기반으로 하는 기능성식품의 개발이 절실히 요구된다고 할 수 있다.

소비자들의 식품을 선택하는 기준은 시대의 변화와 더불어 달라졌는데 최근에는 맛, 색 그리고 향기와 같은 관능적 특성 못지 않게 식품의 기능성을 중요시하는 경향으로 바뀌고 있다.

이러한 시대적 변화에 부흥하여 MK의 대량 생산체제가 갖추어진다면 저가의 제품을 안전적으로 공급함으로써 소비자의 건강에 기여할 뿐만 아니라 식품 전반에 걸쳐 상당한 파급효과가 있을 것으로 사료된다.

제 3 절 연구 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Monacolin K 생성 우수균주의 선발 ○ 배양물의 MK 추출조건 설정 ○ MK 생성 균주의 배양 기술 확립 ○ 배양물의 안전성 	<ul style="list-style-type: none"> - MK 생산 균주의 스크리닝 <ul style="list-style-type: none"> · <i>Monascus</i> 속 균주들의 PDA 배양 · 쌀배양물의 HPLC를 이용한 MK 함량 분석 - 균주 배양물의 추출 조건별 MK 함량 측정 <ul style="list-style-type: none"> · 용매별 추출 · Sonicator를 이용한 추출 - 액체 및 고체배양 최적 조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> · 배양온도, 배양시간, 배지조성별 MK 함량분석 - Citrinin 측정
2차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ MK의 대량 분리 방법 확립 ○ 배양물의 건조조건 확립 ○ 배양물을 이용한 제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 산화알미늄 충전 open column을 이용한 MK의 대량 분리법 확립 <ul style="list-style-type: none"> · 대량분리법 확립 · MK와 색소물질동일성 검증 · 독성물질인 citrinin 생성유무 검증 - 배양물의 살균을 위한 온도조건 확립 - MK의 온도에 대한 안정성 조사 - 제분용 분말 및 곡주의 제조 <ul style="list-style-type: none"> · 제품개발 및 소재적성 검토 - 대량 추출한 MK의 캡슐화

제 2 장 Monacolin K의 대량 생산 균주 탐색 및 동정

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 공시균주

동정된 균주 28종과 미동정 균주 1종을 한식연으로부터 분양받았다.

2. *Monascus* sp.의 배양

가. 종균배양

분양받은 *Monascus* 속 균주는 potato dextrose agar(PDA배지; Difco)를 이용하여 30℃에서 4일간 배양하여 사용하였다.

나. 쌀을 이용한 고체배양

고체 배양은 먼저 쌀을 일야 침지시킨 다음 30분간 물 빼기를 하고 200 g을 1 L의 삼각플라스크에 넣고 121℃에서 20분간 autoclave하고 실온에서 냉각시킨 후 PDA 배지로 배양한 균주를 접종하여 30℃에서 11일간 배양하였다. 이때 배양 2일째부터는 쌀 배양물을 하루에 한번씩 뒤집기하였다. 배양물의 건조는 80℃에서 20분간 송풍건조한 후 체분하여 실험에 사용하였다.

3. 색도측정

건조 홍국쌀을 80% 에탄올(메탄올), 또는 증류수로 10배 희석하여 20°C 에서 1시간 교반하여 색소를 추출한 다음 적정농도로 희석하고 filtering(0.45 μ m)한 후 500 nm의 흡광도(Hewlett Packard spectrophotometer, model 8753, Germany)를 측정하였다.

4. MK의 추출방법

홍국 분말 1 g에 methanol 9 mL을 가해 초음파기(Sonic & Materials Inc. USA)를 사용하여 7분간 균체를 파쇄하고 24 시간 방치 후 여과하여 (Wattman No. 2) 얻은 상등액을 MK 측정에 사용하였다.

5. MK의 함량분석

홍국 분말 ethanol 추출물을 0.45 μ m의 필터로 여과하고 여과액을 HPLC(JASCO UV 875, Column C18)를 이용하여 acetonitrile : 0.1% H₃PO₄ = 65 : 35인 running buffer로 1 mL/min의 유속으로 wave length 238 nm에서 MK의 함량을 정량하였다. MK의 산출은 검량선으로부터 산출하였는데 표준물질은 mevinolin(sigma M2147)을 사용하였으며 표준 검량선은 mevinolin을 0-0.1%의 농도범위로 methanol에 용해시켜 HPLC의 peak area로 작성하였다.

6. 미동정 균주의 동정

미동정 홍국균은 (주) 마이크로아우디에 의뢰하여 ITS(Internal transcribed spacer) 및 28S ribosomal RNA 부분 염기서열을 분석하여 동

정하였다. 먼저 ITS 및 28S rDNA 각 유전자를 PCR(GenAmpTM PCR system 9700, Perkin-Elmer, Boston, USA)에 의해 증폭시켰다. PCR을 위한 반응액의 구성은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 40 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, 3 mM MgSO₄, 200 μM deoxynucleotide triphosphate, 10 ng DNA 주형, 1U *Taq* polymerase 및 0.5 μM primer set로 총 부피는 50 μL로 하였다. 사용된 primer와 probe는 각각 ITS의 경우 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')와 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATATGC-3'), 28S rDNA의 경우 NL 26(5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3')과 NL660(5'-CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')을 사용하여 행하였다. PCR 반응은 predenaturation(94°C, 3분), denaturartion (64°C, 30초), annealing(50°C, 30초), elongation(94°C, 3분), extention (72°C, 10분)을 30회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Prep DNA purification system(Promega, USA)를 이용하여 정제하였고, 염기 서열 분석은 BigDyeTM terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer)를 사용하여 PCR로 반응(96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분)시킨 후 genetic analyzer(ABI PrismTM 310, Perkin-Elmer)로 하였다. 얻어진 염기서열의 상동성은 NCBI (National Ceter for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)의 Blast program으로 분석하였다.

또한 PDA(Difco)와 MEA(malt extract agar; Difco)배지 상에서의 번식 형태 및 광학현미경[Microphot-TXA(자낭포자 관찰), Eclipse E600(분생포자 관찰), Nikon, Japan]을 사용하여 형태학적 관찰을 행하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 균주수집 및 배양

MK를 대량 생산하는 *Monascus* 균주를 선별하기 위해 수집한 29종(표 1)을 PDA 배지에 배양한 다음 쌀로 배양한 후 80℃에서 20분간 송풍 건조하여 배양물을 준비하였다. MK를 추출하기 위해 99.9% methanol을 쌀 배양물의 9배 량이 되도록 첨가하여 1절에서와 같은 방법으로 MK를 추출하여 함량을 분석하였다.

표 1. 한국식품개발연구원으로부터 분양 받은 균주

No.	Strain	Address	No.	Strain	Address
1	<i>M. anka</i>	IFO 4478	16	"	IFO 32317
2	"	IFO 30873	17	"	IFO 7537
3	<i>M. pilosus</i>	IFO 4520	18	<i>M. araneosus</i>	
4	"	IFO 4480	19	<i>M. fuliginosus</i>	IFO 4483
5	"	IFO 8201	20	<i>M. kaoliang</i>	ATCC 46592
6	"	IFO 4521	21	"	ATCC 46595
7	<i>M. purpureus</i>	ATCC 6405	22	"	ATCC 46596
8	"	ATCC 16427	23	<i>M. ruber</i>	IFO 32318
9	"	ATCC 16436	24	<i>M. kaling</i>	ATCC 46598
10	"	ATCC 48162	25	<i>Monascus sp.</i>	ATCC 16437
11	"	IFO 4489	26	"	ATCC 16435
12	"	IFO 32316	27	<i>M. vitreus</i>	IFO 4532
13	"	IFO 32228	28	<i>M. purpureua</i>	IFO 4482
14	<i>M. ruber</i>	IFO 9203	29	<i>Monascus sp.</i>	미동정
15	"	IFO 4492			

2. PDA 배양

분양 받은 균주의 PDA배지에서 생육 상태를 조사한 결과 그림 1과 같다. 비교적 적색도가 강한 것은 1, 2, 12, 13, 20, 21, 22, 24, 29(미동정)인 것으로 나타났다.

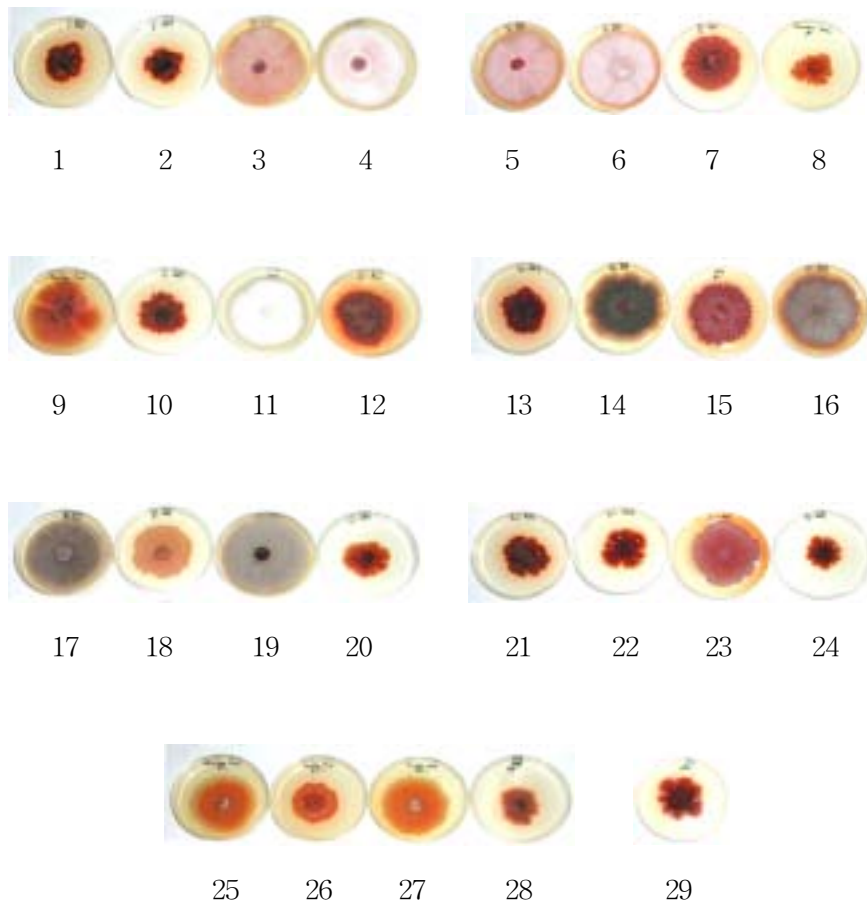


그림 1. PDA배지로 배양한 균주
1-29, strain number

3. 쌀을 이용한 배양

먼저 PDA배지의 *Monascus* 균주를 쌀에 접종하여 30℃에서 10일간 배양한 다음 80℃에서 20분간 건조한 쌀 배양물의 사진은 그림 2와 같다. 적색도는 1, 2, 8, 10, 12, 13, 21, 22, 24, 29(미동정)의 배양물이 비교적 높은 것으로 나타났다.



그림 2. 건조 쌀배양물의 사진

1-29, strain number

4. 추출 용매별 색도

건조배양물로부터 ethanol, methanol 및 증류수 추출물을 제조하여 500 nm에서 색도를 측정한 결과는 표 2와 같이 적색도가 10 이상인 쌀배양물은 29> 21> 8> 13> 22> 24의 순으로 높았으며 용매 중에서는 methanol이 색소 추출율이 가장 높았고 물의 추출율은 매우 낮았다.

5. 쌀배양물 중의 MK 함량

쌀배양물의 MK 함량을 측정하여 우수 균주를 탐색하고자 하였다. 그림 3은 표준물질의 검량선을 나타낸 것이고 표준물질과 쌀배양물의 chromatography pattern은 그림 4와 같다. 표준물질은 retention time 약 6분에서 검출되었으며 쌀배양물 추출물에서도 동일하게 6분에서 peak가 검출되었다.

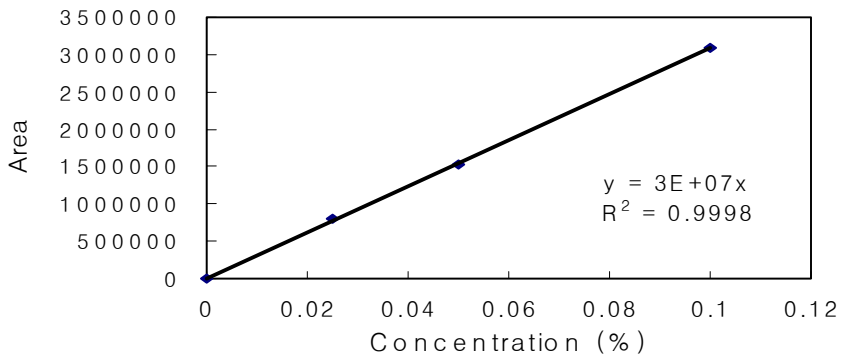


그림 3. Monacolin K 검량선

표 2. *Monascus* 속 균주를 이용한 쌀배양물의 색도(O.D. 500 nm)

균주번호	균 명	80% 에탄올	80% 메탄올	증류수
1	<i>M. anka</i>	5.60	5.58	0.36
2	"	7.30	7.49	0.42
3	<i>M. pilosus</i>	0.01		
4	"	0.01		
5	"	0		
6	"	0		
7	<i>M. purpureus</i>	11.60	15.90	0.57
8	"	25.70	26.13	0.74
9	"	0.02		
10	"	10.20	12.03	0.65
11	"	0.01		
12	"	17.10	19.07	0.55
13	"	20.40	20.92	0.68
14	<i>M. ruber</i>	0.02		
15	"	0.32		
16	"	0.01		
17	"	0.01		
18	<i>M. araneosus</i>	0.07		
19	<i>M. fuliginosus</i>	0.01		
20	<i>M. kaoliang</i>	1.20	1.46	0.12
21	"	31.10	30.08	0.74
22	"	16.20	17.86	0.52
23	<i>M. ruber</i>	0.04		
24	<i>M. kaoliang</i>	15.90	19.74	0.66
25	<i>Monascus sp.</i>	0.06		
26	"	10.00	11.57	0.70
27	<i>M. vitreus</i>	0.04		
28	<i>M. purpureua</i>	0.03		
29	미동정	39.30	41.02	0.65

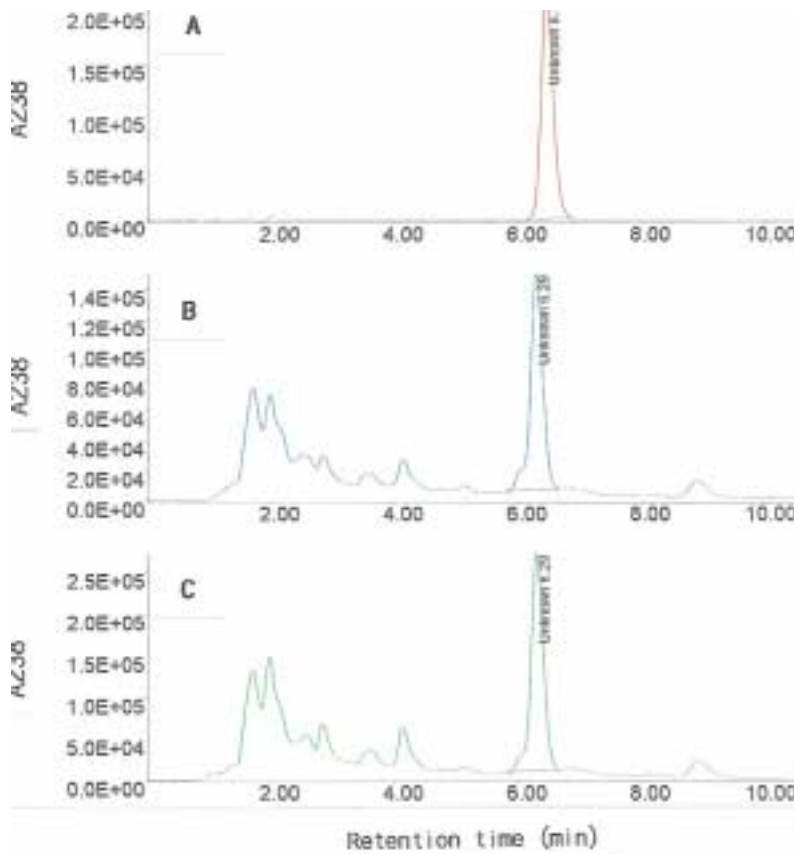


그림 4. 표준물질과 싼배양물의 HPLC chromatogram
 A; mevinolin standard 물질, B; 12번 배양물, C; 29번 배양물

쌀배양물의 적색도가 높은 14 종의 쌀배양물을 선발하여 MK를 추출하고 그 함량을 측정하였다. 이때 배양조건은 균주의 접종방법에 따라 두가지 방법으로 배양하였다. 한 방법은 PDA 배지로 배양한 균주를 쌀배지에 접종하고 다른 방법은 액체배양물 5%(v/w)을 쌀배지에 접종하여 배양하였다.

PDA배지에 각 균주를 배양한 다음 쌀 배지에 접종한 것과 라이스 파우더 (3%), sodium nitrate (0.15%), magnesium sulfate (0.1%), potassium dihydrogen phosphate (0.25%)의 조성으로 제조한 액체배지에 균주를 30℃에서 72시간 shaking incubation 시킨 것으로 쌀 배지에 5%량 접종하여 배양하여 MK의 함량을 분석한 결과, 표 3에서와 같이 전자로 배양한 것은 29번, 12번균주의 MK 함량이 각각 1.213, 0.532%로 높게 평가되었으며 후자의 배양조건에서는 29번의 균주에서 1.252%의 MK가 검출되었다. 이러한 결과로부터 MK의 대량생산용 우수 균주로서 29번 균주를 최종 선발할 수 있었다.

표 3. 선발균주의 MK 함량

시 료	MK 함량 ¹⁾ (%)	MK 함량 ²⁾ (%)
1	0.050	-
2	0.068	-
7	0.074	-
8	0.253	0.662
10	0.220	-
12	0.532	0.126
13	0.220	0.128
20	0.007	-
21	0.146	0.003
22	0.209	0.434
24	0.107	0.164
26	0.098	-
29	1.213	1.252

1) 쌀 배지에 PDA배양 균주를 접종한 것

2) 쌀 배지에 액체배양한 균주를 5%(v/w) 접종

6. 29번 균주의 동정

29종의 홍국균 중 미동정 29번 홍국균이 MK의 대량생산에 가장 적합한 것으로 판정되었기에 이 균주의 동정을 실시하였다. 표 4와 5에서와 같이 ITS와 28S rRNA의 염기서열의 유사성을 비교 시 29번 홍국균의 염기서열과 100%의 높은 유사성을 갖는 균주는 각각 3종인 것으로 나타났다. 그러나 28S rRNA의 염기서열에서는 100%의 유사성을 나타낸 *M. ruber*와 *M. pilosus*가 ITS의 염기서열의 유사성은 동일하게 99.58%인데 비해서, *M. purpureus*는 ITS와 28S rRNA에서 유사성이 모두 100%로 나타난 결과로부터 29번 홍국균은 *M. purpureus* CBS 281.34(accession No.: AF222496, 유사성; 100%)인 것으로 동정되었다.

형태학적 관찰 결과 중 MEA와 PDA 배지상에서의 번식형태를 보면, 그림 5에서와 같이 7일간 배양한 균체 모두 뿌리형의 형태로 번식하였으며, MEA배지에서보다는 PDA배지에서 더 잘 배양되었다. 또한 *M. purpureus*는 자낭균속에 속하는 곰팡이로 자낭포자와 분생포자뿐만 아니라 후막포자도 생성한다(24). 그러나 *M. purpureus* CBS 281.34는 분생포자보다 자낭포자의 생산이 현저하게 많았고(그림 6), 다량의 후막포자도 번식 초기에 관찰되어 전형적인 *M. purpureus*와는 다소 다른 형태를 나타내었다(data not shown).

한편 *M. anka* Nakazawa et Sato IFO 4478의 변이주인 UN 5504-4의 적색색소 생산량(A500)은 친주인 IFO 4478보다 21배나 높은 것으로 보고되었다(25). 29번 홍국균도 염기서열상으로는 동정이 되었으나 형태학적 차이와 색소나 monacolin K와 같은 대사산물의 현저한 생성력과 같은 특성으로부터 29번 홍국균이 변종일 가능성도 시사되었다.

표 4. 29번 균주와 다른 *Monascus* 균주와의 ITS(Internal transcribed spacer) 유사성

Strain	Accession No.	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>M. araneosus</i> IAM 12152	AF458471	100	0/478
<i>M. kaoliang</i> ATCC 46596	AF451859	100	0/477
<i>M. purpureus</i>	U18356	100	0/493
<i>M. ruber</i> ATCC 22080	AF458470	99.58	2/478
<i>M. pilosus</i> ATCC 16364	AF451856	99.58	2/478
<i>Penicillium brocae</i> NRRL 31485	AF484399	87.84	58/477

표 5. 29번 균주와 다른 *Monascus* 균주와의 28S rRNA 유전자 유사성

Strain	Accession No.	Similarity (%)	Nucleotide differences
<i>M. purpureus</i> CBS 281.34	AF222496	100	0/540
<i>M. ruber</i> ATCC 96218	AF364984	100	0/540
<i>M. pilosus</i> ATCC 62949	AF364976	100	0/540
<i>M. eremophilus</i> ATCC 62925	AF365023	99.81	1/540
<i>M. pilosus</i> ATCC 16369	AF365003	99.81	1/540
<i>M. barkeri</i> ATCC 16966	AF364983	99.81	1/540

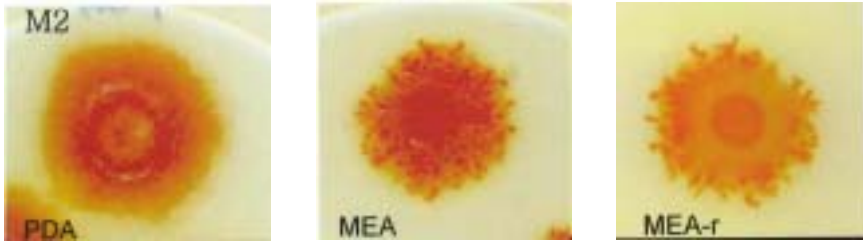


그림 5. *M. purpureus* CBS 281.34 균주의 배지별 사진

PDA; potato dextrose agar, MEA; malt extract agar,
 MEA-r; malt extract agar로 배양된 plate의 뒷면

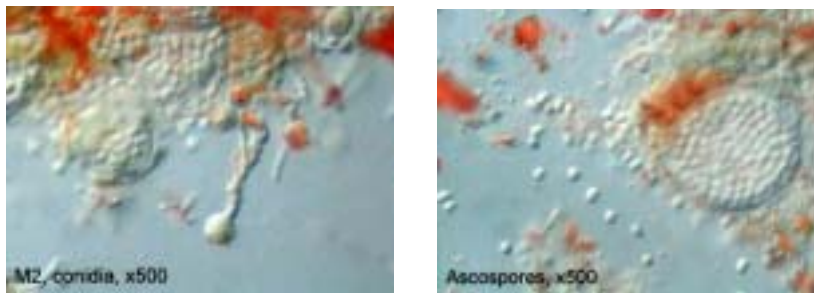


그림 6. *M. purpureus* CBS 281.34 균주의 light micrographs

제 3 장 Monacolin K 생성균주의 배양조건

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 고체배양

제 2 장에서 MK 생성량이 최대인 *M. purpureus* CBS 281.34 균주를 PDA에 배양한 다음 콩, 밀, 보리, 찹쌀, 쌀을 고체배지로 배양하였다. 배양은 먼저 곡류를 12시간 침지시킨 다음 30분간 물빼기하고 200 g을 1 L의 삼각플라스크에 넣고 121℃에서 20분간 멸균하고 균주를 일정량 접종하여 30℃에서 11일간 배양하였다. 이때 배양 2일째부터는 쌀배양물을 하루에 한번씩 뒤집기하였다. 배양물은 80℃에서 20분간 송풍건조한 후 제분하여 실험에 사용하였다.

2. 액체배양

- 1) 배지 1 (RP) : 라이스 파우더 (1, 2, 3%)
- 2) 배지 2 (RP-1) : 라이스 파우더 (3%), sodium nitrate (0.15%), magnesium sulfate (0.1%), potassium dihydrogen phosphate (0.25%)
- 3) 배지 3 (GYN 배지) : Glucose (4%), yeast extract (0.7%), Sodium nitrate (0.3%), KH_2PO_4 (0.025%), magnesium sulfate(0.1%), CaCl_2 (0.01%)
- 4) 배지 4 (GSP 배지) : Glycerin (5%), glucose (3%), soybean (3%), peptone (0.8%), sodium nitrate (0.2%), magnesium sulfate (0.1%)
- 5) 배지 5 (PDB) : Potato dextrose broth (Difco 사)

이상과 같은 5종의 배지를 이용하여 분리한 균주를 1백금이 접종한 후, 30℃에서 72시간 shaking incubator를 이용하여 배양하였다. 최적 배지는 균체량의 가시적인 양으로 측정하여 선발하였다.

3. 색도 측정

제 2 장 제 1 절 3과 같이 색도를 측정하였다.

4. MK의 추출

제 2 장 제 1 절 4와 같이 MK를 추출하였다.

5. MK의 함량분석

제 2 장 제 1 절 5와 같이 MK를 정량하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 액체배양 조건 설정

가. 배양물의 균체량

실험방법 상의 5종의 배지를 이용하여 30℃에서 72시간 shaking incubator를 이용하여 배양한 결과, 표 6에서와 같이 RP-1배지와 GSP 배지에서 균체량이 가장 많은 것으로 나타났다.

표 6. 배지 별 시각적인 균체량

	RP	RP-1	GYN	PDB	GSP
균체량	+	++++	++++	+	++++

나. 액체배양물의 색도

균체량이 가장 많이 생성된 RP-1배지의 조성인 라이스파우더(3%), sodium nitrate(0.15%), magnesium sulfate(0.1%), potassium dihydrogen phosphate(0.25%) 혼합배양액 50 mL에 PDA배지로 배양한 균주를 1 백금이 접종하여 30℃에서 4일간 shaking incubator를 이용하여 배양한 다음, filtration 한 다음 가시적인 색도를 조사한 결과 그림 7과 같이 21, 15, 29번 균주의 액체배양물의 적색감이 다른 균주보다 비교 우위에 있는 것으로 나타났으며 500 nm에서의 흡광도로 적색도를 측정된 결과 표 7에서와 같이 흡광도가 1.5이상인 균주의 흡광도는 15> 21> 1> 26> 7> 20> 10> 9> 29>

16의 순으로 높게 나타났다.

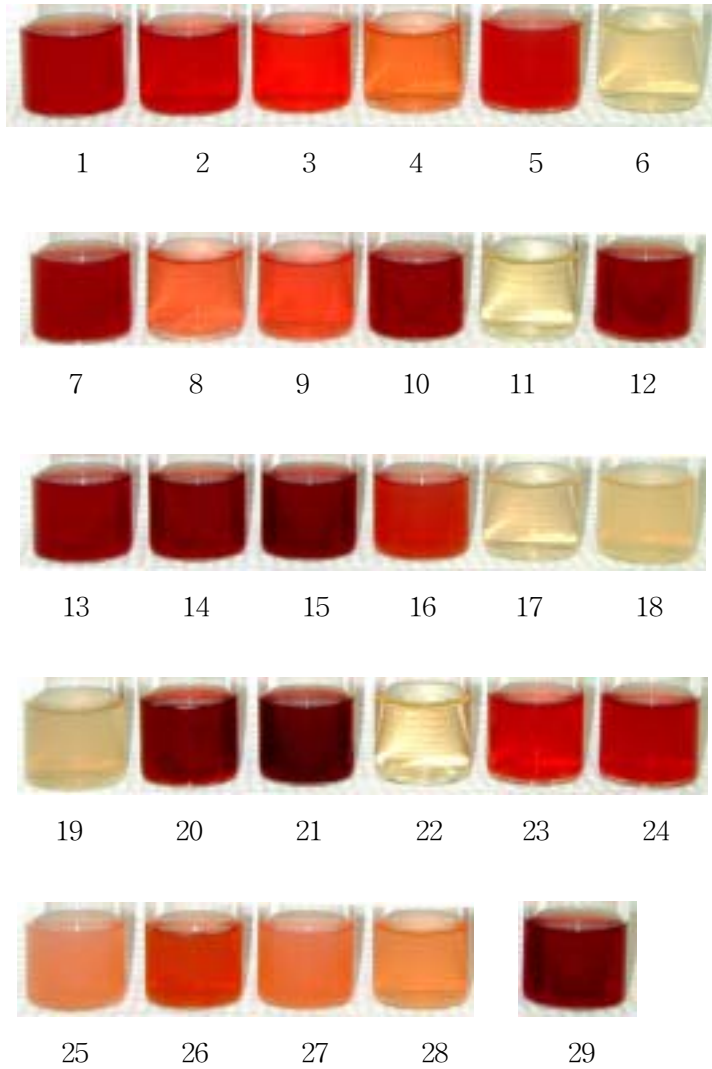


그림 7. 액체배양물의 사진

표 7. 액체 배양물의 색도(O.D. 500 nm)

균주번호	균 명	색 도
1	<i>M. anka</i>	2.421
2	"	1.358
3	<i>M. pilosus</i>	0.439
4	"	0.412
5	"	0.890
6	"	0.060
7	<i>M. purpureus</i>	2.291
8	"	0.221
9	"	2.029
10	"	2.187
11	"	-
12	"	1.171
13	"	1.264
14	<i>M. ruber</i>	1.427
15	"	2.782
16	"	1.525
17	"	0.053
18	<i>M. araneosus</i>	0.110
19	<i>M. fuliginosus</i>	0.178
20	<i>M. kaoliang</i>	2.205
21	"	2.426
22	"	-
23	<i>M. ruber</i>	0.207
24	<i>M. kaoliang</i>	1.113
25	<i>Monascus sp.</i>	0.558
26	"	2.366
27	<i>M. vitreus</i>	0.785
28	<i>M. purpureua</i>	0.705
29	<i>Monascus sp.</i>	1.755

2. 곡류를 이용한 고체배양

콩, 밀, 보리, 찹쌀, 쌀을 배지로 12, 29번 균주를 액체배양물 첨가 및 PDA 배양물 첨가에 따른 MK의 함량을 분석하였다. 그 결과 표 8과 9에 서와 같이 PDA 배양배지의 첨가시 상대적으로 높은 MK가 검출되었으며 곡류별 MK의 함량은 쌀> 찹쌀> 밀> 보리 순으로 높았다. 콩의 경우는 MK가 검출되지 않았다. 이러한 결과로부터 쌀, 찹쌀 또는 밀을 이용한 제품인 제분과 고추장 및 곡주의 제조 가능성을 제안할 수 있었다.

표 8. 12, 29번 균주의 액체배양물 5%(v/w, 곡류)를 각종 곡류에 접종·배양한 배양물의 MK의 함량

접종조건	곡류	균주	Peak Area	MK 함량(%)
액체배양물 5%(v/w)	콩	29	0	0.000
		12	0	0.000
액체배양물 5%(v/w)	밀	29	9,926,125	0.049
		12	6,976,409	0.035
액체배양물 5%(v/w)	보리	29	1,042,426	0.005
		12	1,111,297	0.006
액체배양물 5%(v/w)	찹쌀	29	481,294	0.002
		12	142,813	0.001
액체배양물 5%(v/w)	쌀	29	46,918,630	0.235
		12	9107,855	0.001

표 9. PDA에 배지에 12, 29번 균주를 배양한 후 각종 곡류에 접종·배양한 배양물의 MK의 함량

접종조건	곡류	균주	Peak Area	MK 함량(%)
고체배양물	콩	29	0	0.000
		12	0	0.000
고체배양물	밀	29	1,445,576	0.007
		12	2,020,469	0.010
고체배양물	보리	29	826,430	0.004
		12	1,362,746	0.007
고체배양물	찹쌀	29	12,210,077	0.061
		12	2,103,068	0.011
고체배양물	쌀	29	137,222,580	0.686
		12	83,946,687	0.419

한편, 국내 A사와 일본의 B사의 제품을 대상으로 MK의 함량을 비교·평가한 결과 표 10에서와 같이, A사의 MK의 함량은 매우 낮은 수준이었으며 B사의 약 0.3%가 검출되었다. 이 결과로부터 본 연구에서 선발한 균주와 비교해 볼 때 29번 균주의 MK의 생산능(표 9의 쌀배양물, 0.686%)은 일본의 B사 제품보다 월등히 우수한 것으로 평가되었다.

표 10. 흥국 제품의 MK의 함량 비교

시료	Peak Area	MK 함량 (%)
A사 제품	1,554,696	0.008
B사 제품	59,555,210	0.298

제 4 장 홍국균 배양물의 건조 및 monacolin K의 추출조건

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 건조온도와 시간의 영향

백미에 홍국균을 배양하여 제조한 홍국(이하 홍국)을 dry oven을 이용하여 80℃와 100℃에서 20, 40, 60분간 건조하였다. MK 측정에는 홍국 분말 1 g에 ethanol 9 mL을 가해 1분간 흔들어 추출한 상등액이 사용되었다. 대조구로는 배양 직후 건조하지 않은 홍국을 사용하였다. 또한 건조온도와 시간을 달리하여 제조한 홍국 분말을 PDA배지에 도말하여 30℃에서 4일간 배양한 후 건조온도와 시간에 따른 홍국균의 사멸 정도를 알아보았다.

2. 추출용매의 영향

홍국 분말 1 g에 ethanol, methanol, ethylacetate, water 9 mL을 각각 가해 1분간 흔들어 추출한 후 상등액을 취해 MK 함량을 측정하였다.

3. MK의 추출

제 2 장 제 1 절 4와 같이 MK를 추출하였다.

4. Ethanol 농도의 영향

홍국 분말 1 g에 0, 20, 40, 60, 80, 100% ethanol 9 mL을 가해 1분간

흔들어 추출한 후 상등액을 취해 MK 함량을 측정하였다.

5. 홍국분말과 ethanol간 비율의 영향

홍국 분말 1, 0.5, 0.25 g에 80% ethanol 9, 9.5, 9.75 mL을 각각 가해 홍국 분말과 ethanol 간의 비율을 각각 10, 20, 40배로 하여 1분간 흔들어 추출한 후 상등액을 취해 MK 함량을 측정하였다.

6. MK의 함량분석

제 2 장 제 1 절 5와 같이 MK를 추출하였다.

7. 색도 측정

홍국 분말에 0, 20, 40, 60, 80, 100% ethanol을 가해 색소를 추출하고 제 2 장 제 1 절 3과 같이 색도를 측정하였다.

8. 효소활성 측정

가. Protease 활성 측정

Protease 활성은 Hagihara의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.2) 1 mL를 가한 다음, 기질용액(0.6% Hammarstein casein, pH 6.2)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 10 mL와 1 mL의 1 N Folin & ciocalteus' reagent 용액을

넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. β -amylase 활성

400 μ L의 Potassium phosphate buffer solution(pH5.9)에 1% Soluble starch 500 μ L를 잘 혼합한 후 sample solution (enzyme)100 μ L를 넣어 25°C water bath에서 10분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 여기에 0.1 N HCl 100 μ L를 더하여 반응을 정지시킨다. 이 반응용액 0.1 mL을 취하여 여기에 DNS시약 0.3 mL을 넣어5분간 boiling 시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정한다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 건조조건별 효소활성 및 monacolin K의 함량변화

가. 효소활성 및 균의 생육정도

홍국분말은 효소가공식품으로 분류되어 있어 protease 및 amylase의 활성이 검출되어야 하며 제품원료로 사용할 경우 살균처리가 이루어져야 한다. MK 생산량이 가장 우수한 29번 균주를 대상으로 건조조건별 효소활성과 수분함량, 균의 생육정도를 측정하였다. Protease 활성을 Anson-Hagihara법에 준하여 660 nm의 흡광도로 측정한 결과 표 11에서와 같이 쌀배양물이 0.217이었으며 100℃에서 60분간 건조한 것을 제외하고는 protease 활성이 검출되었다. 일반적으로 protease가 50℃ 이하에서 비교적 안정한 것과 비교해 볼 때 80℃와 100℃에서도 활성이 검출된 것은 시료를 각 조건에서 건조 후 채취함에 따른 건조물량의 차이에 기인된 결과라고 판단된다. 그리고 β -amylase 활성을 dinitrosalicylic acid법에 준하여 550 nm의 흡광도를 측정한 결과 전 건조조건에서 활성이 검출되었다. 한편, 29번 *Monascus* 균주의 쌀배양물의 건조조건별 균주 생육정도를 조사하기 위해 각 조건별로 건조한 쌀을 파쇄 후 멸균수로 희석하여 PDA plate에 접종하여 2일간 배양한 다음 균수를 측정한 결과 표 11에서와 같이 80℃ 60분, 100℃에서 건조한 쌀배양물에서는 colony가 검출되지 않았다. 이러한 결과로부터 최적 건조조건은 80℃에서 60분간인 것으로 나타났다.

표 11. 송풍건조 조건별 수분함량, 효소활성 및 균주 생육정도

온도	시간 (min)	수분함량 (%)	Protease activity (OD 660 nm)	Amylase activity		균주 생육
				α -(660nm)	β -(550nm)	
Control (쌀배양물)		58.22	0.217	0.055	1.498	+++
50°C	20	52.06	0.145	0.061	1.343	+++
	40	51.24	0.197	0.077	1.440	+++
	60	46.27	0.317	0.082	1.220	+++
80°C	20	37.13	0.197	0.023	1.463	++
	40	22.60	0.379	0.022	1.214	+
	60	10.94	0.194	0.010	1.204	-
100°C	20	21.57	0.237	-	1.213	-
	40	9.38	0.124	-	0.874	-
	60	4.54	-	-	0.559	-

나. MK의 함량

홍국으로부터 균체 내·외의 모든 MK를 추출하기 위해 용매를 달리하여 분말·건조 쌀 배양물에 가한 후 sonication 처리(또는 무처리)후 일야 방치하고 filtration한 다음 MK의 함량을 분석한 결과 표 12와 13에서와 같이 물 추출을 제외하고는 유기용매별 및 sonication 처리유무에 따른 함량의 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며 메탄올 추출시간별로 MK함량을 분석한 결과, 추출시간별 MK의 함량변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 *M. purpureus* CBS 281.34 균주에 의해 생성되는 MK는 균체 성분이 아닌 분비성 성분인 것을 알 수 있었으며 MK의 추출방법은 기존의 추출방법인 메탄올을 가하고 sonication한 다음 일야 방치 후 여과하는 방법에 따른 인력과 시간을 최소화할 수 있을 것으로 사료되었다.

최적 ethanol 첨가량을 조사하기 ethanol의 농도를 달리하여 상기와 같은 방법으로 홍국으로부터 추출물을 제조하고 MK의 함량을 분석한 결과 그림 8에서와 같이 ethanol 20% 이하에서는 MK가 전혀 추출되지 않았고 40%의 농도에서는 약 5.4%만이 추출되었으며 60% 이상에서는 거의 대부분의 MK가 추출되는 것으로 나타나 홍국으로부터 MK를 추출하기 위한 ethanol의 농도를 80%로 결정하였다.

표 12. 배양물을 용매별로 추출한 직후 sonication 처리 유무에 따른 MK 함량변화

용 매	Sonication	Peak area	MK 함량(%)
Methanol	처리	137,222,580	0.686
	무처리	128,082,680	0.640
Ethanol	처리	137,261,520	0.683
	무처리	139,399,040	0.697
EtOAc	처리	135,946,470	0.680
	무처리	131,773,730	0.659
Water	처리	35,131,360	0.176
	무처리	0	0.000

표 13. MK의 methanol 추출시간별 함량변화

추출시간(hr)	Peak area	MK 함량(%)
0	129,285,200	0.646
3	129,420,940	0.647
6	144,860,650	0.724
12	121,530,860	0.608
18	137,222,580	0.686

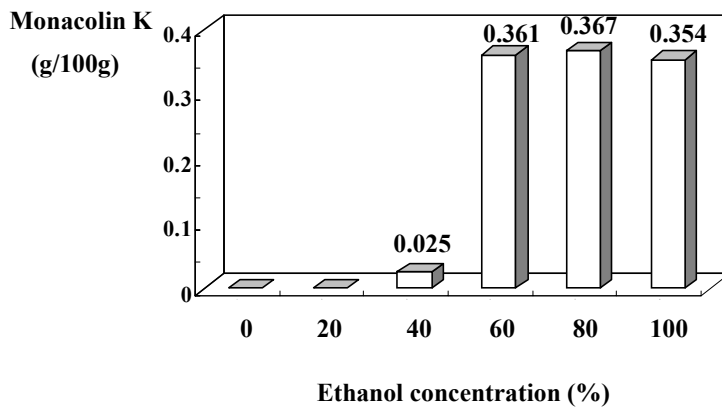


그림 8. Ethanol 농도별 MK의 추출 함량

홍국 1 g과 각 농도의 ethanol을 혼합한 후 1분간 교반하여 MK 추출

제 5 장 Monacolin K의 정제 · 특성 및 안전성

홍국균이 생성해 내는 대사산물에 관해서는 1926년 일부 색소가 분리된 이래로 주로 이들 색소를 대량 생산해 내는 균주 탐색과 배양조건을 중심으로 한 연구가 행해져 왔으나, 비색소성 화합물은 관심을 끌지 못했다. 그러나 최근 홍국균의 대사산물 중 MK가 cholesterol 합성억제, 혈중 지질 저하, 항암 효과 등의 기능성을 갖는 것이 보고된 이후 이를 이용한 건강 식품의 개발에 관한 관심이 높아지고 있다. Monacolin에는 K형 이외에, hydroxy acid K형, dihydromonacolin K, dehydromonacolin K, monacolin L 및 J형 등 수종의 유도체가 존재하며, 이 중 MK가 최대량을 점유하는 것으로 밝혀져 있다. MK는 균체내에서 polyketide pathway를 통해 acetate와 methione이 결합해 생성된 2종의 C-18과 C-14 polyketide chain을 기반으로 하여 형성된 화합물이다. 또한 rubropunctamin, monascorubramin 및 monascin 등의 색소, mycotoxin의 일종인 citrinin 등의 2차 대사산물들도 동일한 pathway를 경유하여 합성되는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 기능성 성분인 MK에 관해서는 임상효과, 측정조건, 생성경로, MK 생산 균주의 탐색 등에 관해 연구되었다. 그러나 MK를 이용한 제품 개발을 위해서는 색소를 포함한 많은 대사산물의 혼합물로부터 MK를 정제할 필요성이 있고 가공 공정 중의 MK의 안정성에 대해서도 검토해야 할 것으로 사료되었다. 이에 본 연구에서는 *Monascus* 균주의 쌀 배양물로부터 MK를 정제하고 가열, pH, 초산 및 수용액 중 저장에 따른 MK의 안정성을 알아보았다.

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 재료 및 시약

백미는 시중 재래시장에서 구입하여 사용하였다. MK 추출용 에탄올과 증류수는 HPLC분석용(Fisher)을 사용하였다. 표준품 MK (mevinolin)는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 홍국제조

홍국균 *Monascus purpureus* CBS 281.34는 PDA배지를 사용하여 30℃에서 4일간 균체를 배양한 후, 배지 중량의 10%에 상당하는 멸균수를 배지에 첨가하고 분쇄하여 백미(일야 수침하여 탈수한 후 스테인레스체에 담아 120℃에서 20분간 증자하였다)에 5%가 되도록 접종하였다. 다음 1.5 kg을 아크릴재질의 상자(30×30×10 cm³)에 담아 2겹의 거즈로 덮은 후 인큐베이터(48×45×50 cm³)에 2상자씩을 넣었다. 이들을 30℃에서 10일간 배양한 후 45℃에서 2시간 건조하고 제분하여 실험에 사용하였다.

3. 시험액 조제

홍국 1 g에 80% ethanol 9 mL을 가해 추출한 후 1분간 흔들여 MK와 색소를 추출한 후 10℃의 저온실과 20℃의 실온에서 4주간, 40℃의 항온기에서 5일간, 60℃의 항온기에서 24시간, 80℃의 항온기에서 12시간 저장하였다. 그리고 동일하게 조제한 시료액에 3 N HCl을 가해 pH 2(소비량: 45.0 μL/10 mL)와 pH 4(10.5 μL/10 mL)로, 3 N NaOH를 가해 pH 8(20.5 μL/10 mL)과 pH 10(50.0 μL/10 mL)으로 조정한 후 20℃에서 5일간 저장하였다. 또한 동일하게 조제한 시료액을 80% 에탄올을 사용하여 5배로 다시 희석한 후 희석액 10 mL에 초산을 0.5 mL가하여 20℃에서 40

시간동안 저장하였다. 마지막으로 홍국 분말 1 g에 99.9% 에탄올 9 mL을 가해 동일하게 MK를 추출한 후 증류수를 첨가해 수분율이 0, 20, 40, 60, 80, 100%가 되도록 조제한 후 20℃에서 4주간 저장하였다.

4. MK의 정제

홍국으로부터의 MK의 정제는 neutral aluminum oxide(Sigma) 수지를 80%의 ethanol로 전처리하여 open column에 충전시킨 다음 chromatography를 행하여 분리하였다. Column은 2×30 cm의 크기로, 수지용량은 60 mL이 되도록 하였으며, 용리액은 80% 에탄올을 사용하여, 수지에 6 mL(홍국 분말 1 g에 80% 에탄올 9 mL을 가해 1분간 흔들어 추출한 용액)을 부하하였으며, 5 mL씩 분획하고 510 nm에서의 흡광도(Hewlett Packard spectrophotometer, model 8753, Germany)와 각 분획 중의 MK 함량을 측정하였다.

5. MK의 함량분석

제 2 장 제 1 절 5와 같이 MK를 정량하였다.

6. 색도 측정

제 2 장 제 1 절 3과 같이 색도를 측정하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. MK 및 적색소의 pH 및 초산에 대한 안정성

홍국균이 생산하는 MK 및 색소를 원료로 한 다양한 식품을 제조하기 위해서는 MK 및 색소의 안정성을 검토하여야만 한다.

pH에 대한 안정성을 알아보기 위해 80% ethanol 추출액을 3 N HCl로 pH 2와 4, 3 N NaOH로 pH 8과 10으로 pH를 조정한 후 20℃에서 5일간 저장하면서 MK의 함량을 측정된 결과 표 14에서와 같이 5일간 저장 시 pH 2와 4에서는 16.2%, pH 8에서는 10.8%, pH 10에서는 45.9%의 MK가 분해되는 것으로 나타나, MK는 중성 및 산성에서는 비교적 안정하였으나 강알칼리성에서는 상당히 불안정한 결과를 얻었다.

한편, 초산에서의 안정성은 조사하기 위해 80% ethanol 추출액을 80% 에탄올으로 5배 희석한 후 희석액 10 mL에 초산을 0.5 mL가하여 20℃에서 40시간동안 저장한 결과 그림 9에서와 같이 시간이 경과함에 따라 MK가 분해되어 40일이 경과했을 때는 32.1%가 분해되어 초산에서는 매우 불안정한 것으로 나타났다.

초산에 대한 불안정성은 홍국을 이용한 양조식초 제조에서도 동일한 결과로 나타났다. 즉, 홍국 100 g을 주정 95% 252 mL를 넣어 교반한 후 1일 동안 정체시켜 홍국 추출물을 제조하고 8 L의 Yeomans Cavitater의 구조를 가진 식초생성 발효조(주식회사, 세기 정공)에 밀초(식초균, *Acetobacter acetic* ATCC 15073, 산도 6.5, 1.75 L)와 홍국 추출물 252 mL, yeast extract 35 g, 포도당 70 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.175 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14 g, NH_4NO_3 0.14 g, k-citrate 0.21 g을 혼합하여 발효온도 $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 공기량 $40 \text{ m}^3/\text{hr}$, 초기 pH 3.47의 조건으로 발효시켰다. 일반적인 양조식초 및 사과식초의 경우 약 72-96 시간에 발효가 종료되나, 홍국 식초의 발효는 이상적으로 발효시간이 길었으며 이는 초기 균체 증식에 시간이 매우 길어짐에 따라 발효의 시간이 길어졌으며 관찰되는 사항으로는 색깔이 매

우 진하였을 경우, 즉 그림 10에서와 같이 48시간까지의 발효초기에는 산도가 일정하게 유지되다가 색이 연하여 진 때부터 산도가 증가하기 시작하였다. 그리고 산도 6.32의 최종 양조식초의 MK함량을 측정한 결과 MK는 검출되지 않았다. 따라서 홍국 추출물에 존재하는 대사산물 즉 색소와 MK는 초산균의 생육을 억제하고 밀초에 함유된 초산에 의해 분해가 일어났다고 할 수 있다.

따라서 양조식초의 실예에서와 같이 MK는 초산에 대해 상당히 불안정하여 MK를 유효성분으로 하는 양조식초의 제조는 불가능한 것으로 판단된다.

표 14. MK의 pH 안정성

(g/100 g)

pH	Storage time (day)			
	0	1	3	5
2	0.37(0.0) ¹⁾	0.35(5.4)	0.32(13.5)	0.31(16.2)
4	0.37(0.0)	0.34(8.1)	0.31(16.2)	0.31(16.2)
8	0.35(5.4)	0.34(8.1)	0.34(8.1)	0.33(10.8)
10	0.33(10.8)	0.31(16.2)	0.30(18.9)	0.20(45.9)

¹⁾대조구[홍국 1 g에 ethanol(99.9%) 9 mL을 가하여 조제한 혼합액]에 대한 MK의 분해율(%)

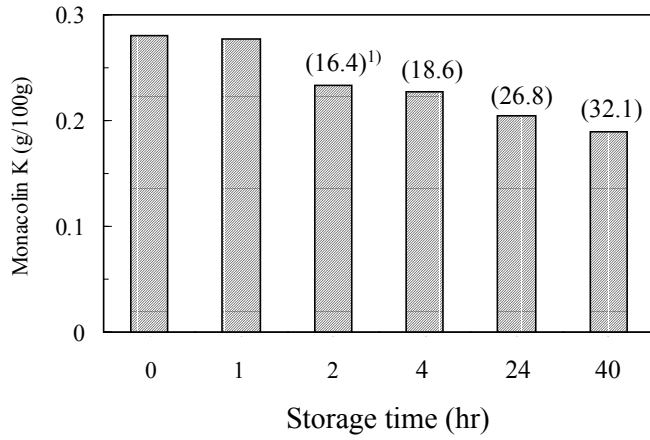


그림 9. MK의 acetic acid에 대한 안정성

¹⁾대조구[홍국 1 g에 ethanol(99.9%) 9 mL을 가하여
조제한 혼합액]에 대한 MK의 분해율(%)

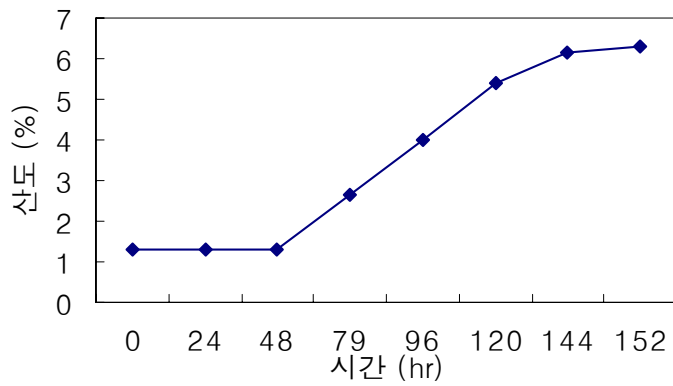


그림 10. 식초발효 시간별 산도의 변화

한편, 10일간 pH 변화에 따른 적색소의 안정성을 조사한 결과 표 15에
 서와 같이 MK의 pH 안정성의 결과와 마찬가지로 강알칼리성에서 색소가
 가장 불안정하여 10일이 경과한 시점에서 24.4%의 색소가 분해되었으며
 중성에서 비교적 안정하지만 약 15% 만이 분해되는 것으로 나타났다. 최
 종농도 5%의 acetic acid 존재하의 실온에서 색소의 안정성을 조사한 결과
 그림 11에서와 같이 2시간 이후 서서히 감소하기 시작해서 40시간이 경과
 한 후에는 약 18%의 적색소가 분해되는 것으로 나타났다. 이 결과는 표
 15의 pH 2에 대한 색소 안정성과 유사한 경향이었다.

표 15. 색소의 pH 안정성

(A500)

pH	Storage time (day)				
	0	1	3	5	10
2	272.10	238.97(12.2) ¹⁾	225.65(17.1)	225.65(17.1)	212.42(21.9)
4	272.10	252.20(7.3)	252.20(7.3)	245.63(9.7)	225.65(17.1)
8	272.10	252.20(7.3)	245.63(9.7)	225.65(17.1)	232.31(14.6)
10	272.10	258.86(4.9)	245.63(9.4)	225.65(17.1)	205.76(24.4)

¹⁾대조구(홍국 1 g에 80% ethanol 9 mL을 가하고 3 N HCl 또는 3 N NaOH로 pH를 조정된 조제 직후의 시험액)에 대한 색소의 분해율(%).

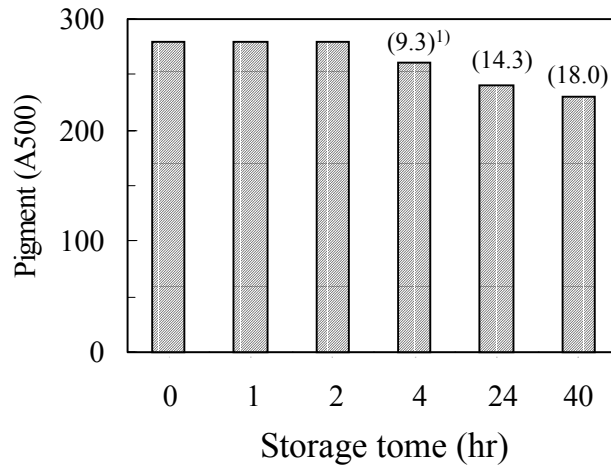


그림 11. 적색소의 acetic acid 하에서의 안정성

¹⁾대조구(조제직후의 시험액)에 대한 색소의 분해율(%).

2. MK 및 적색소의 열안정성

80%의 ethanol로 추출한 홍국추출물을 10℃와 20℃, 40℃, 60℃, 80℃에 저장시켜 MK 및 적색소의 열안정성을 조사하였다. MK의 안정성은 결과 그림 12에서와 같이 10℃에서 4주간 저장 시는 MK가 거의 분해되지 않았으나 20℃에서는 4주간 저장 시 25.2%가, 40℃에서 5일간 저장 시는 3일까지 서서히 감소하여 30.2%가, 60℃에서 4 시간까지 급격히 감소하여 22.7%가, 80℃에서는 계속 감소하여 12시간 경과 시 50.7%의 MK가 분해되는 것으로 나타나, 40℃ 이상의 온도에서는 비교적 불안정한 것으로 나타났다. 적색소의 안정성은 그림 13에서와 같이 10℃에서 4주간 저장 시 10% 이내

로 분해되어 저온에서는 상당히 안정한 것으로 나타났으며 온도가 높을수록 분해가 빨라지는 경향으로 나타났는데 60℃에서 24시간 저장 시 약 23%가 분해되었으며 80℃에서 12시간 저장시 약 30.4%가 분해되었다. 이와 같은 적색소의 온도에 대한 분해 패턴은 MK의 열 안정성과 유사한 경향인 것으로 나타났다.

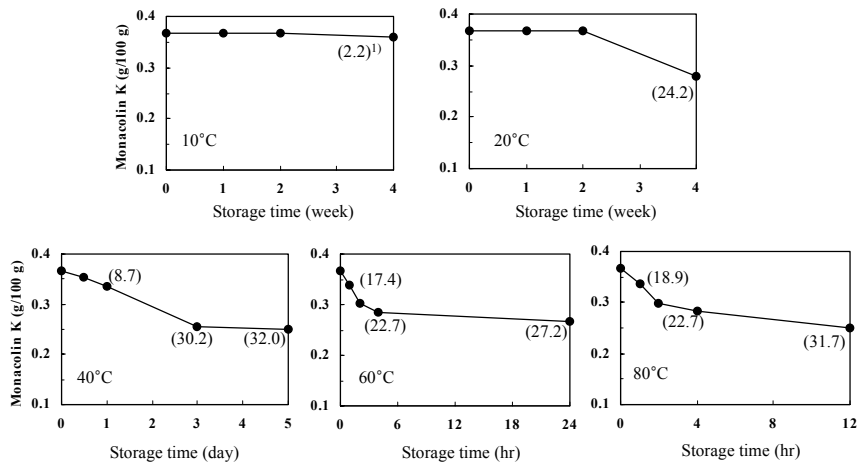


그림 12. Monacolin K의 열안정성

¹⁾대조구[홍국 1 g에 ethanol(99.9%) 9 mL을 가하여 조제한 혼합액]에 대한 MK의 분해율(%)

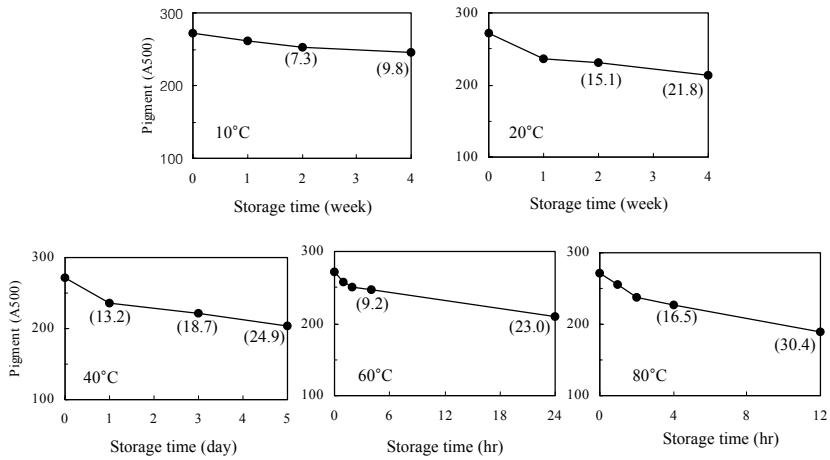


Fig. 13. 색소의 열안정성

¹⁾대조구(홍국 1 g에 80% ethanol 9 mL을 가하여 조제한 조제직후의 시험액)에 대한 색소의 분해율(%).

3. MK 및 적색소의 물에서의 안정성

가. MK의 물에 대한 안정성

홍국균이 생산하는 MK의 물에 대한 안정성을 조사하기 위해 홍국에 9 배량의 99.9% ethanol를 가해 추출액을 제조하고 여기에 증류수를 첨가해 수분율이 0, 20, 40, 60, 80%가 되도록 조제한 후 20°C와 10°C에서 4주간 저장하면서 MK의 함량변화를 조사하였다. 20°C에서 저장한 결과 그림 14에서와 같이 약 99.9%의 ethanol 농도에서는 4주간 저장하여도 8.6%의

MK 만이 분해되어 매우 안정한 것으로 나타났으며 80% 이하의 ethanol 농도에서는 비슷한 양상으로 MK가 분해되었는데 4주간 경과시에는 약 50% 이상의 MK가 분해되는 것으로 나타났다.

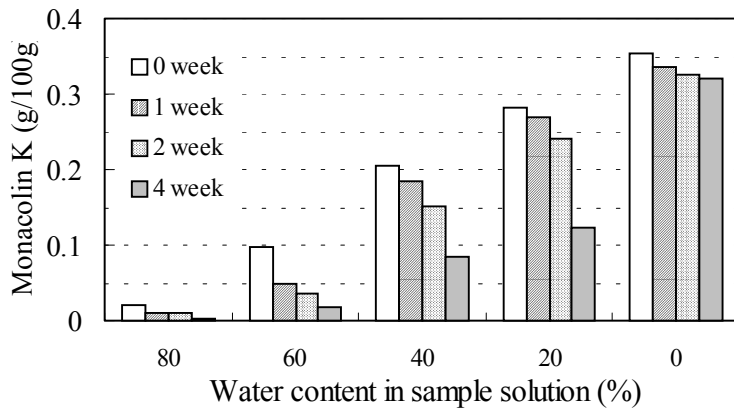


그림 14. 20°C에서의 증류수 농도별 MK의 안정성

10°C에서 저장한 경우는 그림 15에서와 같이 20°C에서의 MK의 안정성의 결과와 큰 차이는 보이지 않았으나 전반적으로 10°C에서 저장 시 20°C에서 저장하였을 때보다 MK의 분해속도는 비교적 느린 것으로 나타났다. 그러나 수분함량이 20%와 40%인 경우의 4주째의 MK의 분해정도가 20°C보다 높은 것으로 나타났다.

따라서 홍국추출물을 활용한 식품의 제조 시에 추출조건은 주정 100%를 사용하여 추출하여 저장하는 것이 바람직하며 물로 희석할 필요가 있을 때에는 10°C 이하의 저온에서 저장하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

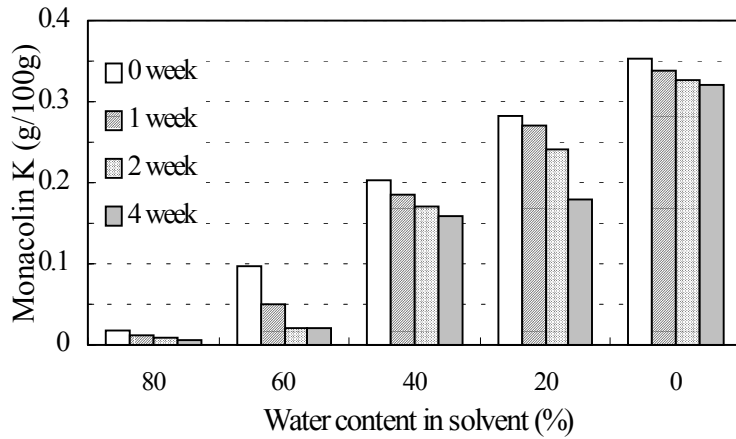


그림 15. 10℃에서의 증류수 농도별 MK의 안정성

나. 색소의 물에 대한 안정성

홍국 유래의 색소를 산업적으로 이용하기 위해서는 최적 추출 알콜농도를 결정해야 한다. 따라서 알콜 농도별로 색소를 추출하여 최적 알콜농도를 설정하고자 하였다. 홍국에 ethanol 농도를 0-100%로 조절하여 10분간 교반한 후 500 nm의 흡광도를 측정하였다. 그 결과 그림 16에서와 같이 80%의 ethanol 농도에서 색소추출량이 최대였으며 ethanol 농도가 낮을수록 추출율이 낮아져 물 100%로 추출한 경우 80% ethanol로 추출 시의 색소량 대비 6.8%에 불과하였다.

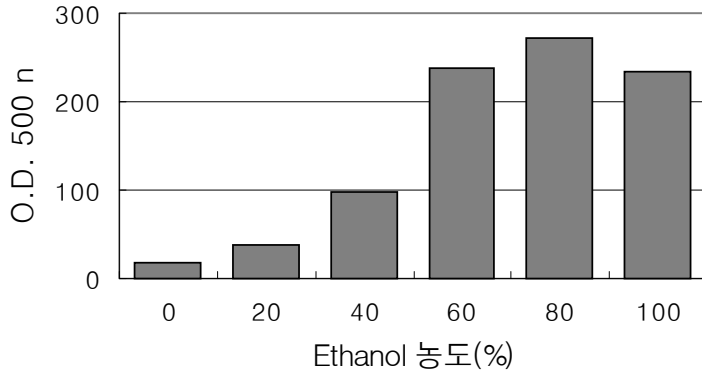


그림 16. Ethanol 농도별 색소 추출함량

한편 홍국균이 생산하는 색소의 물에 대한 안정성을 조사하였다. 홍국에 9 배량의 99.9% ethanol를 가해 추출액을 제조하고 여기에 증류수를 첨가해 수분율이 0, 20, 40, 60, 80%가 되도록 조제한 후 10℃와 20℃에서 4주간 저장하면서 색소의 함량변화를 조사하였다. 그 결과 표 16에서와 같이 물을 전혀 첨가되지 않은 경우 4주간 저장 시 10℃에서보다 20℃에서 2 배량의 색소가 감소하였으나 감소율은 3.8%로 물에 대해 매우 안정한 것으로 나타났다. 색소의 감소율이 가장 큰 물의 농도는 20%로서 4주간 저장시 20℃에서 약 79%가 감소하였으며 물의 함량이 증가할수록 오히려 색소가 안정한 것으로 나타나 80%의 물을 첨가하였을 때 감소율은 10℃에서 16.1%가 감소하였으며 20℃에서는 54.7%가 감소하는 것으로 나타났다.

이러한 결과로부터 홍국색소를 이용한 각종 제품의 개발 시 추출물을 물로 희석하여 사용할 경우 10℃ 이하의 저온에서 저장하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

표 16. 물 농도별 색소의 함량변화

(A500)

Water		Storage time (week)			
		0	1	2	4
(%)					
0	10℃	233.50 ¹⁾	233.30(0.1)	228.54(2.1)	224.62(3.8)
	20℃	233.50	233.30(0.1)	228.54(2.1)	215.60(7.7)
20 ²⁾	10℃	198.88	142.58(28.3)	115.11(42.1)	86.13(56.7)
	20℃	198.88	101.51(49.0)	83.25(58.1)	42.45(78.7)
40	10℃	155.61	109.03(30.0)	107.06(31.2)	94.65(39.2)
	20℃	155.61	89.07(42.7)	87.19(44.0)	77.48(50.2)
60	10℃	70.03	55.04(21.4)	53.86(23.1)	53.18(24.1)
	20℃	70.03	45.33(35.3)	44.97(35.8)	44.90(35.9)
80	10℃	38.95	37.44(3.9)	33.18(8.8)	32.45(16.1)
	20℃	38.95	27.79(28.7)	23.74(28.6)	17.64(54.7)

¹⁾대조구(조제직후의 시험액)에 대한 색소량(%).

²⁾홍국 1 g에 ethanol(99.9%) 9 mL을 가하여 조제한 혼합액의 상등액에 증류수를 20, 40, 60, 80%가 되도록 첨가하였다.

4. MK의 대량 정제

80% ethanol로 washing 한 Neutral aluminum oxide 수지를 이용하여 open column chromatography를 행하여 MK를 분리하였다. 그 결과 그림 17에서와 같이 적색소의 peak는 3개(fraction No. 5-15, 20-50, 70-85)가 검출되었으며 MK는 황색을 띠며 10-18번 fraction에서 검출되었으며 적색소

5-15번 fraction과 겹쳐서 분획되었다. 이때 MK의 회수율은 70%로서 1차 정제로 비교적 우수한 정제도를 나타내었다.

10-18번의 fraction을 모두 혼합하여 HPLC로 분석한 결과 그림 18에 서와 같이 홍국 중의 MK는 1 차례의 neutral aluminum oxide 수지 통과 로 90%이상 분리·정제되었음을 알 수 있었다.

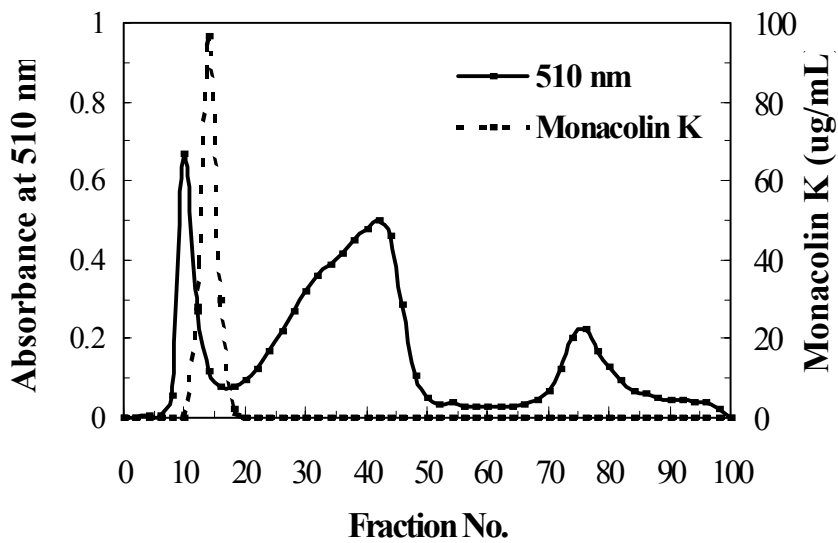


그림 17. Neutral aluminum oxide 수지를 사용한 open column chromatography

column size; 2×30 cm, 수지 volume; 60 mL,

elution 용액; 80% 에탄올, fraction volume; 10 mL

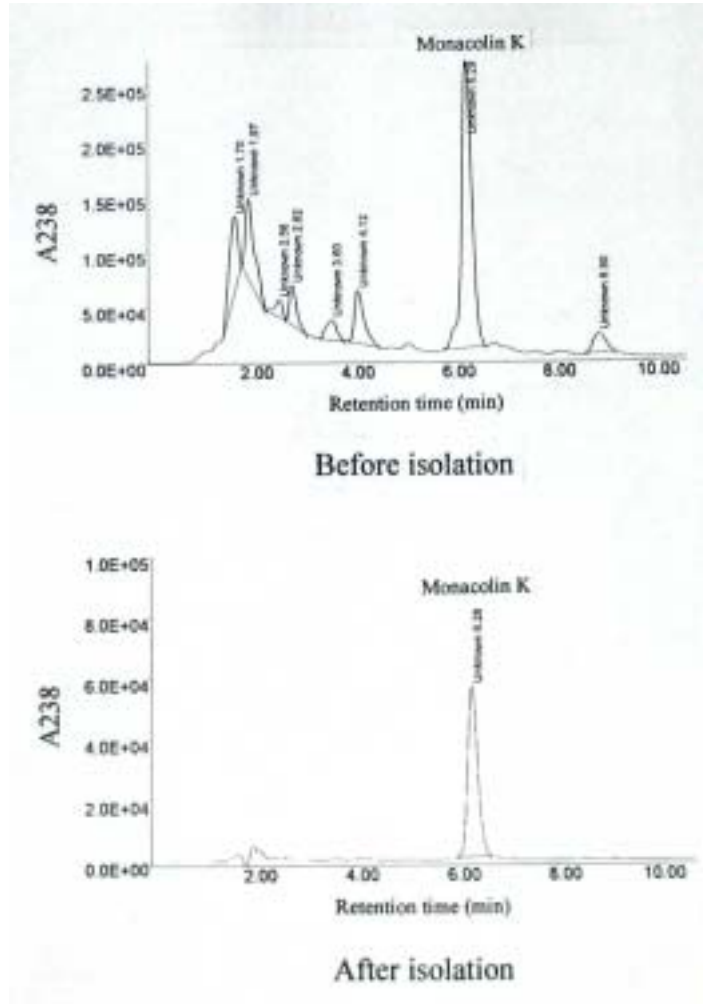


그림 18. Open column chromatography에 의한 홍국 80% ethanol 추출물로부터의 MK 분리전후의 HPLC chromatogram

홍국균은 일반적으로 mycotoxin으로 citrinin을 생성하는 것으로 알려져 있으며 그림 19에서와 같이 methanol에서 λ_{max} 가 224, 250, 314인 것으로 밝혀진바 있다. 본 연구에서는 citrinin의 중간 흡수과장이면서 MK의 최대 흡수과장인 238 nm에서 citrinin을 측정하였다. 그 결과 그림 20에서와 같이 citrinin은 2.95 분에서 검출되었으며 *Monascus purpureus* CBS 281.34 균주로 생산한 홍국의 ethanol 추출물은 2.95분에서 피크가 검출되지 않는 것으로 보아 *Monascus purpureus* CBS 281.34 균주 쌀 배양물인 홍국에서는 citrinin이 생성되지 않거나 238 nm에서 검출되지 않을 정도의 극 미량이 생성될 가능성이 있는 것으로 판단된다.

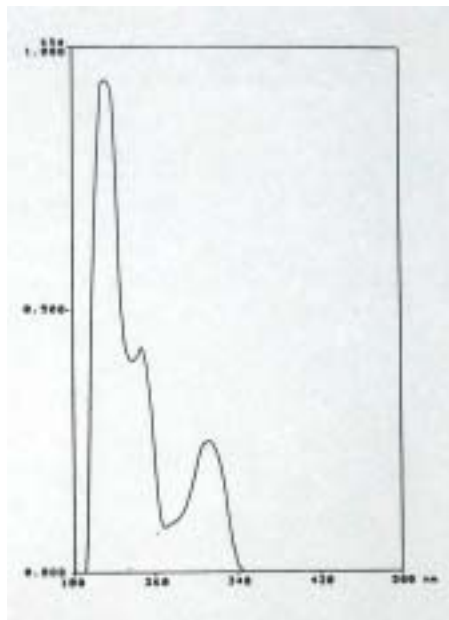
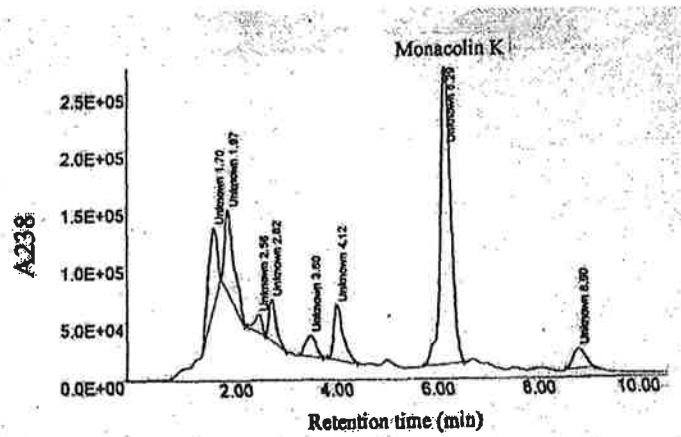
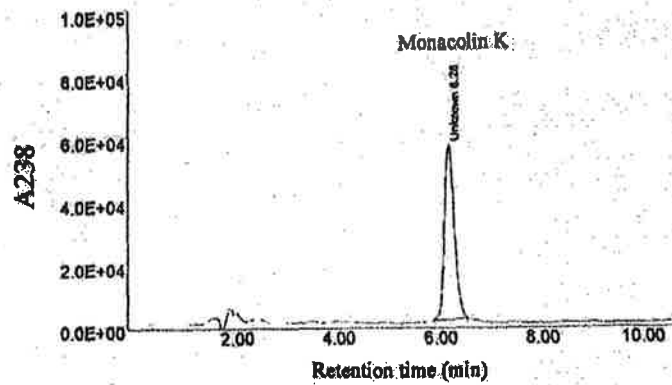


그림 19. Citrinin의 UV spectrum



Before isolation



After isolation

그림 18. Open column chromatography에 의한 홍국 80% ethanol 추출물로부터의 MK 분리전후의 HPLC chromatogram

제 6 장 흥국의 기능성 및 제품개발

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 항산화활성

가. Benzioc acid 수산화 반응에 의한 hydroxyl radical 소거능

Fenton 반응으로 생성된 $\cdot\text{OH}$ 에 의하여 benzene 고리의 C₃ 또는 C₄ 위치에 수산화 반응이 일어나는 것을 이용한 Chung 등의 방법에 따라 행하였다. 시험관에 0.1 mM Fe²⁺/EDTA 용액 200 μL , 10 mM sodium benzoic acid 200 μL , 시료액 200 μL 와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 1800 μL 가 되게 한 다음, 10 mM H₂O₂ 200 μL 를 가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA) 2 mL을 가하여 형광광도계를 이용하여 305 nm 들뜸파장과 405 nm 형광파장에서 형광도를 측정하였다. 시료의 $\cdot\text{OH}$ 소거능(%)은 아래와 같이 계산하였다.

$$\cdot\text{OH scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{F.I.s - F.I.o}{F.I.c - F.I.o}\right) \times 100$$

F.I.o: Fluorescence intensity of no treatment at Ex 305 nm and Em 405 nm

F.I.s: Fluorescence intensity of sample treatment at Ex 305 nm and Em 405 nm

F.I.c: Fluorescence intensity of control at Ex 305 nm and Em 405 nm

나. Ferric thiocyanate(TCA)법에 의한 항산화성 시험

Nakatani 등의 방법에 따라 80% 에탄올에 녹인 시료액 120 μ L, 2.51% linoleic acid 2.88 mL, 40 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 incubation하였다. 경시적으로 시료액 100 μ L를 75% 에탄올 9.7 mL 에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate 용액 100 μ L를 가하고 3분 후 20 mM $FeCl_2$ /3.5% HCl 100 μ L씩을 가하여 강하게 진탕시킨 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하여 생성되는 과산화물량을 대조구와 비교하였다. 항산화능은 대조구의 흡광도에서 시료구의 흡광도를 제한 값을 대조구의 흡광도로 나누어 백분율로 나타내었다.

$$\text{Lipid oeroxidation Inhibition (\%)} = \frac{(Abc - Abs)}{Abc} \times 100$$

Abc : Absorbance of treated control at 500nm

Abs : Absorbance of treated sample at 500nm

2. 동물실험

가. 사료

동물실험용 사료는 A군(일반사료), B군(일반사료 90%+돈지 10%), C군(일반사료 88.5%+돈지 10%+홍국 1.5%), D군(일반사료 87%+돈지 10%+홍국 3.0%)으로 나누어 군 당 10 마리의 rat(평균 체중, 200 g)에 섭취시켰으며 혈청분석은 3주간 각 개체별로 혈액을 채취하여 사용하였으며 장기 무게는 5주가 경과한 후의 무게를 측정하였다.

나. 혈청 SGOT의 측정

검체 중의 GOT 작용으로 aspartic acid와 alpha-ketoglutaric acid는 oxalacetic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 oxalacetic acid는 조효소 NADH의 존재 하에 MDH작용으로 malate가 생성되고 NADH가 NAD⁺로 산화될 때, 파장 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

다. 혈청 SGPT의 측정

검체 중의 GPT 작용으로 L-alanine과 alpha-ketoglutaric acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvic acid는 조효소 NADH의 존재 하에 LDH 작용으로 lactate가 생성되고 NADH가 NAD⁺로 산화될 때, 파장 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

라. Cholesterol의 측정

분석 원리는 cholesterol esters가 cholesterol esterase의 작용으로 cholesterol + fatty acids가 생성되고 cholesterol은 산소 존재하에서 cholesterol oxidase의 작용으로 cholest-4-en-3-one + H₂O₂로 전환된다. 생성된 2H₂O₂에 4-aminoantipyrine과 phenol 존재하에서 PO의 작용으로 적색의 키논형 색소가 형성되는 원리를 이용하여 측정하였다. R208 영동 cholesterol-R 시약(영동제약, 한국)과 Hitachi 747을 이용하여 측정하였다.

마. HDL-cholesterol의 측정

HDL-cholesterol이 H₂O 존재하에서 PEG-cholesterol esterase의 작용을 받아 cholesterol + RCOOH가 생성되고 cholesterol은 산소 존재 하에서 PEG-cholesterol esterase의 작용을 받아 cholesterol과 H₂O₂가 생성되며

생성된 $2\text{H}_2\text{O}_2$ 와 4-aminophenazone과 EMSE, $\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ 존재 하에 peroxidase의 작용으로 quinone imine dye와 $5\text{H}_2\text{O}$ 가 생성되는 원리를 이용하여 측정하였다. HDL-C, Bohringer mannheim, 독일 시약과 Hitachi 7150을 이용하여 측정하였다.

바. LDL-cholesterol의 측정

측정원리는 lipoprotein 중 cholesterol을 cholesterol esterase 및 cholesterol oxidase를 이용하여 특수구조를 가진 비이온계 계면활성제를 이용, LDL 이외의 lipoprotein 중의 cholesterol 반응을 촉진시켜 색소의 비존재하에 효소를 작용시켜 cholesterol를 소거한 후, 색소의 존재하에 통상 사용되는 비이온계 계면활성제에 의해 LDL 중의 cholesterol을 효소의 작용에 의해 선택적으로 측정되는 원리를 이용하여 측정하였다. 사용시약은 LDL-cholesterol kit(Daichi사, Japan), 측정기기는 생화학 분석기인 Hitachi 7150을 사용하였다.

사. Triglyceride의 측정

측정원리는 triglycerides에 3H_2 존재 시 lipase의 작용으로 glycerol과 3RCOOH 가 생성되고 생성된 glycerol이 ATP 존재 하에서 GK의 작용으로 glycerol-3-phosphate와 H_2O_2 가 생성되고 생성된 glycerol-3-phosphate는 dihydroxyacetone phosphate와 H_2O_2 로 전환되며 생성된 H_2O_2 은 4-aminophenazone와 4-chlorophenol 존재 하에서 deoxidase의 작용으로 4-(p-benzoquinone-mono-imino)-phenazone- $2\text{H}_2\text{O}$ 와 HCL이 생성되는 원리를 이용하여 측정하였다. 검사시약은 TG(Boehringer Mannheim, Germany)를 검사기기는 Hitachi 747을 사용하여 측정하였다.

3. 홍국을 소재로 한 제품개발

가. 홍국 분말의 제조

적색소와 MK의 생산성이 높은 *Monascus purpureus* (CBS 281.34)를 식품제조용 우수균주로 선발하여 제 4 장 제 1 절과 같은 방법으로 홍국분말을 제조하였다.

나. 면의 제조

혼합분(강력분과 중력분을 1:1로 혼합) 300 g에 홍국을 0, 1, 2, 3%씩 첨가하여 혼합한 후 소금 7.4 g과 물 135 g을 섞어 Kitchen Aid Mixer(Model K5SS, USA)를 사용하여 반죽하였다. 제조한 반죽을 Noodle Machine (A-RYUK)을 사용하여 반죽을 높이 2 mm 정도의 두께가 되도록 밀고 높이 2 mm, 넓이 5 mm가 되도록 자른 후 끓는 물에 약 10분 정도 끓여 국수 면을 제조하였다.

다. 식빵의 제조

식빵 제조 분말(백설표)에 0, 1, 2, 3, 4, 5% 홍국을 각각 첨가하여 물 210 g과 효모를 넣어 혼합한 후 Kaiser 식빵제조기(UBM-610/611)를 이용하여 3시간 30분 동안 구워 식빵을 제조하였다.

라. 음료의 제조

적색소와 MK의 생산성이 높은 *Monascus purpureus* (CBS 281.34)를 음료 제조용 우수균주로 선발하여 홍국균 쌀 배양물을 제조하고 건조·분

말 20%를 60%의 알콜을 함유하고 있는 주정 80%에 혼합하여 1시간 동안 교반한 후 여과하여 음료 제조를 위한 원료로 사용하였다. 음료제조를 위한 원료는 표 17에서와 같이 약 음용수 60%에 홍삼추출물, 진피추출물, 메밀추출물, 대두추출물, 녹차추출물, 구연산, 비타민 C, 비타민 E, 나이아신, 폴리텍스트로스, 올리고당, 고과당, 식류향을 첨가하여 잘 혼합한 후 홍국 주정 추출물을 넣고 음용수로 정용하여 홍국 추출물이 함유된 음료를 제조하였다.

마. 술의 제조

홍국에 60%, 80%, 95%의 알콜을 함유하고 있는 주정으로 3종의 추출물을 제조하고 각 추출물에 증류수를 첨가하여 알콜 농도를 15%와 25%로 조절하여 총 6종의 침출주 제조를 위한 시료를 준비하였다. 술의 풍미를 개선하기 위해 청주향 0.001%와 구연산 0.15%, 올리고당 5%를 첨가하여 술을 제조하여 기호도를 조사하였다.

바. 홍국 고추장의 제조 및 기능성

1) 고추장의 제조

Monascus purpureus CBS 281.34를 이용하여 홍국을 제조하여 고추장을 제조하였다. 고추장의 원료 조성은 표 17과 같다. 홍국첨가량은 고추장을 100에 대해 1.5%, 3.0%를 첨가하였으며 이때 메주의 첨가량은 홍국분말 첨가량을 고려하여 첨가하였다.

표 17. 음료 조성물의 배합비

원 료	조성(중량%)
주정 추출물	1.0
홍삼추출물(72bx)	0.15
진피추출물(60bx)	0.005
메밀추출물(60bx)	0.8
대두추출물(60bx)	0.1
녹차추출물(60bx)	0.01
구연산	0.05
비타민 C	0.1
비타민 E	0.1
나이아신	0.1
폴리텍스트로스	0.2
올리고당	8.0
고과당	6.0
석류향	0.1
음용수	83.285

2) 실험방법

조지방 분석은 Soxhlet 추출법으로, 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법으로, 조섬유는 AOAC법으로 측정하였으며 색도는 색차계(Chromameter CR 200, Minolta Japan)을 사용하여 Hunter scale에 의해 L(lightness),

a(redness), b(yellowness) 값으로 표시하였다. HMG-CoA 저해 활성 측정
은 Hulcher 및 Oleson들의 spectrophotometric method를 변형하여 측정하
였다.

사. 관능검사

관능검사 요원은 한국식품개발연구원의 훈련된 20명(남 10명, 녀 10명)
을 대상으로 9점법으로 측정하였다. 검사결과는 SAS 통계 program을 이
용하여 Duncan의 다중비교법으로 분석하였다.

표 18. 홍국을 첨가한 고추장의 원료조성비

(g)

홍국첨가량	찹쌀가루	메주 ¹⁾	고춧가루	물 엷	소 금	물
0	258	85.83	258	85.83	80	404.2
15 (1.5%)	243	85.83	258	85.83	80	404.2
30 (3.0%)	228	85.83	258	85.83	80	404.2

¹⁾*Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*로 각각 콩알메주를 만들어
건조·분말화한 다음 1 : 1로 혼합하여 메주로 사용함

제 2 절 결과 및 고찰

1. 홍국의 기능성

가. 항산화성

홍국으로부터 100% 및 60% ethanol 추출물을 제조하여 hydroxy radical 소거능을 조사한 결과 표 19에서와 같이 100% ethanol로 추출한 원액의 경우 α -tocopherol와 BHA에 비해 각각 약 2배, 1.5배의 hydroxy radical 소거능이 있는 것으로 나타났다. 한편 60%의 ethanol로 추출한 경우는 100% ethanol로 추출한 추출물에 비해 hydroxy radical 소거능이 다소 낮았으나 원액 또는 10배 희석한 시료의 소거능은 α -tocopherol이나 BHA에 비해 높은 것으로 나타났다.

홍국의 과산화물 생성 저해능을 조사한 결과 표 20에서와 같이 100% ethanol로 추출한 추출물이 60% ethanol로 추출한 추출물 보다 다소 저해능이 높게 나타났으며, 100% ethanol 추출물 원액의 경우 α -tocopherol이나 BHA에 비해 저해능은 다소 낮게 측정되었으나 비교적 항산화효과가 강한 것으로 나타났다.

표 19. Benzoic acid hydroxylation method에 의한 홍국추출물의 hydroxyl radical 소거능

	Concentration	Inhibition(%)
100% ethanol extract	원액	95.4±2.7
	10배 희석	90.6±3.2
	100배 희석	37.8±2.9
60% ethanol extract	원액	81.5±2.5
	10배 희석	70.4±1.8
	100배 희석	35.5±5.4
α-tocopherol	1 mg/mL	47.6±5.4
BHA	1 mg/mL	65.4±3.3

표 20. Ferric thiocyanate method에 의한 홍국추출물의 lipid peroxidation 저해활성

	Concentration	Inhibition(%)
100% ethanol extract	원액	60.4±3.3
	10배 희석	46.7±3.4
	100배 희석	19.6±4.1
60% ethanol extract	원액	55.4±1.5
	10배 희석	50.4±2.3
	100배 희석	20.5±2.9
α-tocopherol	1 mg/mL	78.7±2.4
BHA	1 mg/mL	85.9±4.3

나. 동물실험

홍국분말을 실험방법에서와 같이 사료에 1.5%, 3.0% 각각 첨가하여 사료를 제조하여 rat에 3주간 섭취시키면서 0, 1, 3주의 혈액을 채취하여 GOT, GPT, 총 cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride의 함량을 분석하였다. 그 결과 그림 21에서와 같이 GOT 값은 3%의 홍국을 섭취시킨 rat에서 약간 낮은 수치를 나타내었으며, GPT의 경우는 홍국을 첨가하지 않은 B 군에 비해 약간 낮게 나타났다. 그리고 총 cholesterol의 경우는 일반사료를 섭취시킨 A 군보다도 오히려 낮게 나타났으며 HDL은 3주간 사육시 홍국첨가량에 증가할수록 약간 높게 함유되었으나 LDL은 B, C, D 모두 유사한 경향이였다. Triglyceride의 함량은 총 cholesterol과 유사한 경향이였다.

홍국이 각종 장기에 미치는 영향을 알아보기 위해 5주간 사육 후 간, 비장, 신장의 무게를 rat 체중 100 g으로 환산하여 측정한 결과, 그림 22에서와 같이 간, 비장, 신장 모두에서 A, B, C, D 군간에 큰 차이는 없으므로 나타나 홍국이 각종 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.

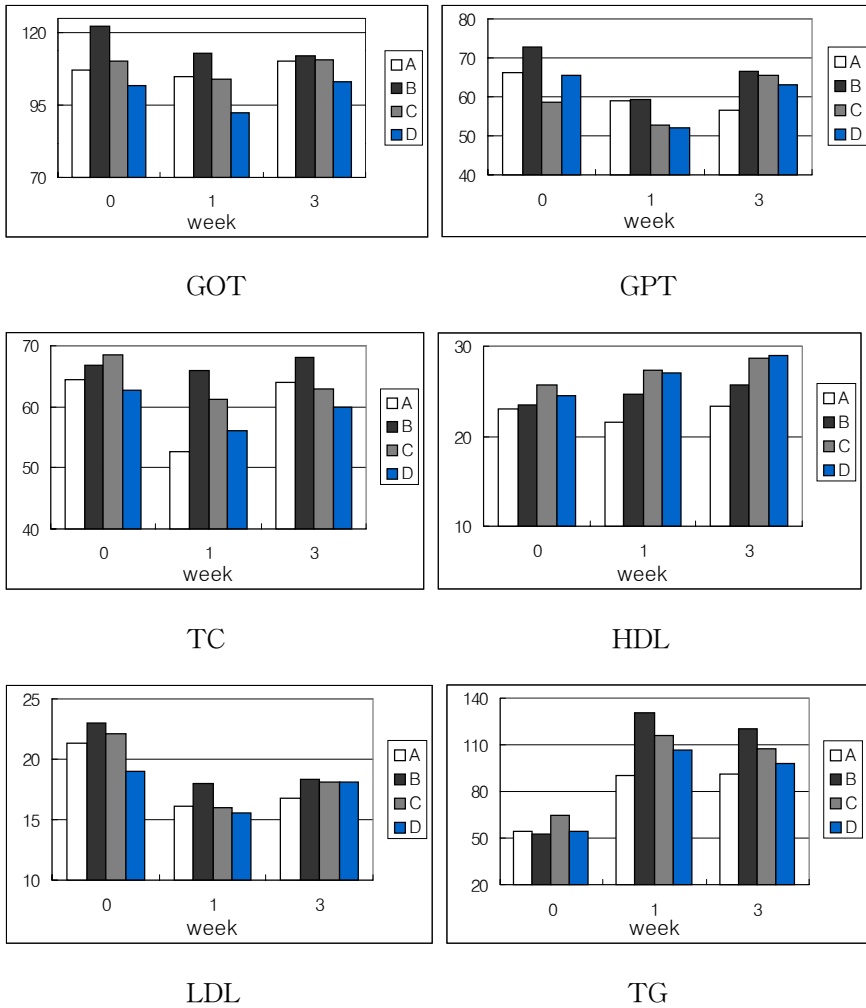
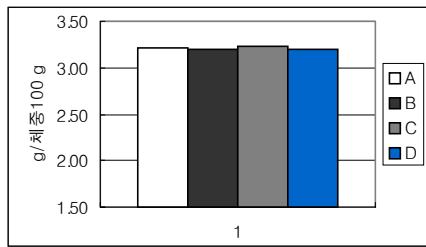


그림 21. 홍국 섭취 rat의 혈 중 GOT, GPT, total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride의 변화

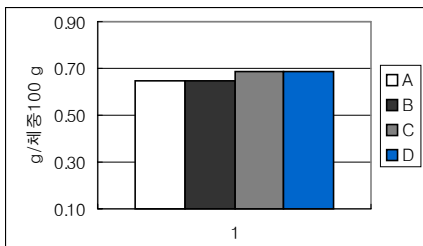
A; 일반사료섭취 rat, B; 돈지방 첨가사료 섭취 rat

C, 돈지방과 1.5%의 홍국 첨가사료 섭취 rat

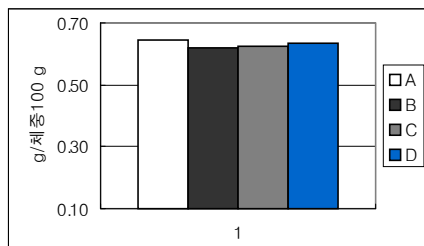
D; 돈지방과 3.0%의 홍국 첨가사료 섭취 rat



간



비장



신장

그림 22. 홍국을 5주간 섭취시킨 rat의 장기 무게

- A; 일반사료섭취 rat, B; 돈지방 첨가사료 섭취 rat
- C, 돈지방과 1.5%의 홍국 첨가사료 섭취 rat
- D; 돈지방과 3.0%의 홍국 첨가사료 섭취 rat

3. 면류의 제조

홍국분말을 0%-5%가 되도록 밀가루에 첨가하여 반죽 후 색상을 비교한 결과 그림 23에서와 같이 홍국의 첨가량에 비례하여 적색도가 증가하는 것으로 나타났으며, 홍국분말을 3%까지 첨가하여 면을 제조한 결과 그림

23에서와 같이 홍국을 1%가 되게 첨가한 경우 분홍색을 띄고 2%와 3%를 첨가한 경우 적색도가 강하게 나타났다.

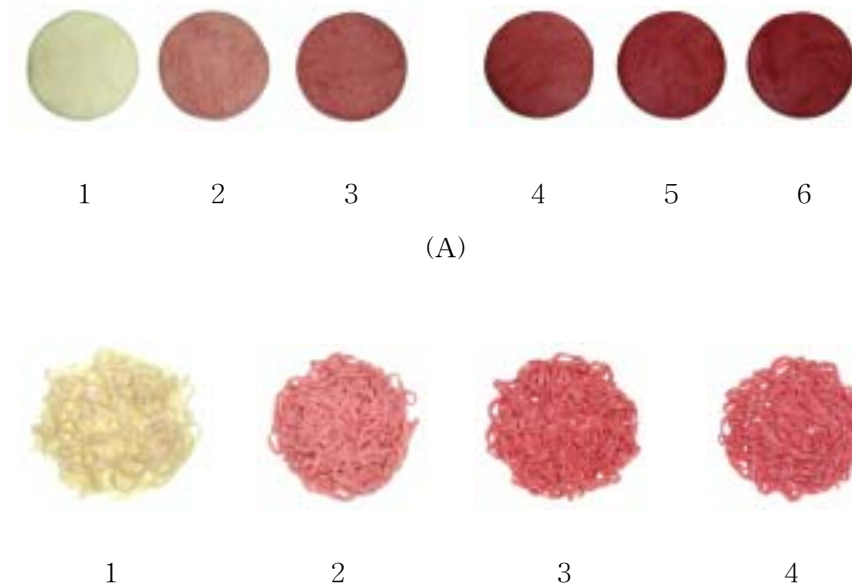


그림 23. 홍국분말 첨가량별 밀가루 반죽(A) 및 면(B)의 색상

1; 홍국분말 0%, 2; 홍국분말 1%, 3; 홍국분말 2%,
4; 홍국분말 3%, 5; 홍국분말 4%, 6; 홍국분말 5%

제조한 면에 대해 관능평가를 실시한 결과 표 21에서와 같이 식감의 경우 홍국 무첨가구인 control이 6.0점이었으나 홍국 1%첨가구가 6.6이고 3%첨가구가 6.8점으로 control에 비해 높게 평가되었으며 외관의 경우 control에 비해 3% 첨가구가 7.2로 매우 높게 나타났다. 특히 색의 기호성을 조사한 결과에서는 control이 5.0점으로 보통으로 평가하였으나 3%의 홍국을

첨가한 구에서는 7.2점으로 매우 높게 평가되어 면의 제조시 홍국분말의 첨가는 기호성을 크게 향상시키는 결과를 얻었다.

표 21. 홍국 첨가량별 면의 관능적 특성

항목 홍국첨가량	식감	외관	색
0%	6.00±1.16 ^{a1)}	5.50±1.27 ^b	5.00±1.76 ^c
1%	6.60±0.70 ^a	5.80±1.14 ^b	4.70±1.06 ^d
2%	6.40±0.84 ^a	7.10±0.74 ^b	6.70±1.42 ^b
3%	6.80±0.79 ^a	7.20±1.23 ^b	7.20±1.75 ^a

¹⁾Mean values within a column with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test(p <0.05)

4. 식빵의 제조

Kaiser 제빵기를 이용하여 식빵 제조용 분말에 홍국분말을 5%까지 첨가하여 식빵을 제조한 결과 성상은 그림 24에서와 같이 면에서와 마찬가지로 1%의 홍국분말을 첨가시 분홍색의 성상을 띄고 있었으며 홍국분말의 첨가량이 증가할수록 적색도가 증가하는 것으로 나타났다.

23에서와 같이 홍국을 1%가 되게 첨가한 경우 분홍색을 띄고 2%와 3%를 첨가한 경우 적색도가 강하게 나타났다.

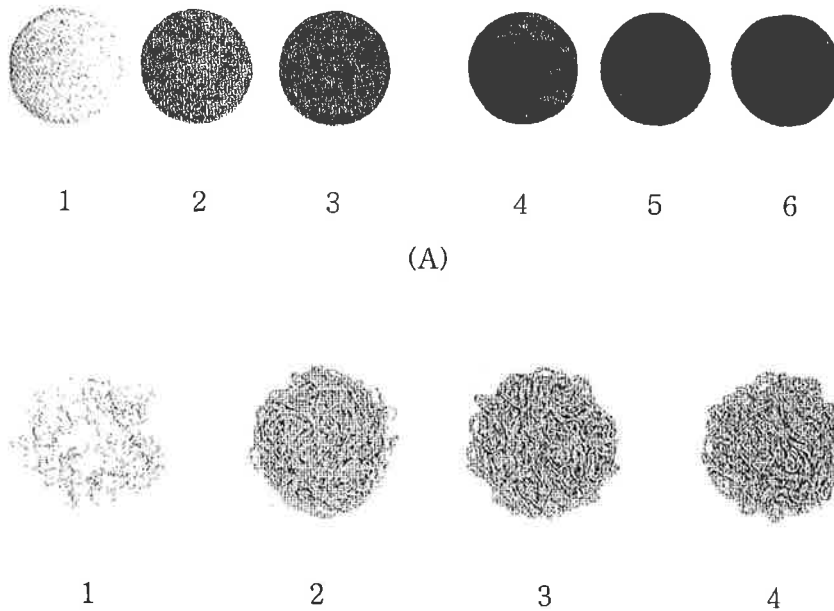


그림 23. 홍국분말 첨가량별 밀가루 반죽(A) 및 면(B)의 색상

1; 홍국분말 0%, 2; 홍국분말 1%, 3; 홍국분말 2%,
4; 홍국분말 3%, 5; 홍국분말 4%, 6; 홍국분말 5%

제조한 면에 대해 관능평가를 실시한 결과 표 21에서와 같이 식감의 경우 홍국 무첨가구인 control이 6.0점이었으나 홍국 1%첨가구가 6.6이고 3%첨가구가 6.8점으로 control에 비해 높게 평가되었으며 외관의 경우 control에 비해 3% 첨가구가 7.2로 매우 높게 나타났다. 특히 색의 기호성을 조사한 결과에서는 control이 5.0점으로 보통으로 평가하였으나 3%의 홍국을

이러한 결과로부터 홍국은 제빵산업에 있어서도 유용한 원료로 사용할 수 있는 가능성이 기대된다.

표 22. 홍국분말 첨가량별 식빵의 관능평가

항목 홍국첨가량	색	향	맛	조 직 감	종합적 기호도
0	5.50±1.43 ^{b1)}	6.10±1.79 ^a	6.40±1.43 ^a	6.90±0.99 ^a	6.50±1.08 ^a
1%	5.30±1.42 ^b	6.40±1.35 ^a	6.70±1.34 ^a	7.30±0.82 ^a	6.80±0.92 ^a
2%	7.00±1.49 ^a	6.80±1.32 ^a	6.50±1.35 ^a	6.40±1.58 ^{ab}	7.00±1.05 ^a
3%	6.30±1.49 ^{ab}	6.60±1.65 ^a	6.20±1.62 ^a	6.50±1.18 ^{ab}	6.00±1.33 ^{ab}
4%	5.30±1.83 ^b	6.00±1.83 ^a	6.00±2.11 ^a	6.80±1.81 ^a	5.70±1.95 ^{ab}
5%	3.40±2.40 ^c	5.30±1.89 ^a	5.10±1.66 ^a	5.20±1.99 ^b	4.70±1.95 ^b

¹⁾표 19와 상동

5. 음료의 제조

음료의 제조방법에 준하여 제조한 음료는 pH가 3.1이고 Bx는 10이었다.

홍국 추출물을 첨가한 음료의 사진은 그림 25과 같다.

음료는 홍국 추출물을 1% 첨가한 구와 무첨가로 2 종류를 제조하여 색 감, 풍미, 맛 및 종합적인 기호도를 조사하여 표 21에 나타내었다.

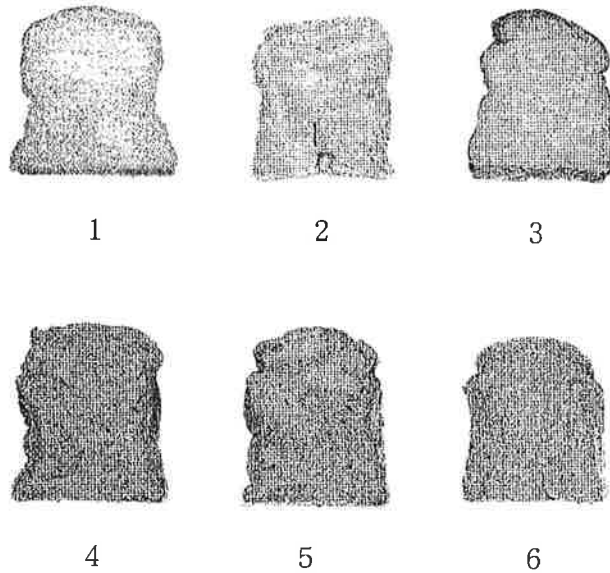


그림 . 홍국분말 첨가량별 식빵의 색상

- 1, 홍국분말 0%; 2, 홍국분말 1%; 3, 홍국분말 2%;
 4, 홍국분말 3%; 5, 홍국분말 4%; 6, 홍국분말 5%

6종의 제조 식빵에 대해 관능평가한 결과 표 22에서와 같이 색상의 경우 홍국 무첨가구가 5.5점으로 평가되었으나 2% 첨가구는 7.0을 높게 평가되었다. 조직감과 맛에 대한 기호도는 홍국 무첨가와 2% 첨가구 간에 차이는 없는 것으로 나타났으나 종합적인 기호도에서는 홍국 무첨가구가 6.5점인데 반해 2% 첨가구는 7.0점으로 높게 평가되었다.

이러한 결과로부터 적색소를 띄는 홍국의 첨가는 밀가루 반죽의 조직감과 향, 맛에는 거의 영향을 미치지 않으나 밀가루의 적색도를 높여 소비자가 접하지 못한 새로운 특징의 분말을 제조할 수 있었으며 또한 그러한 특징이 기호성을 향상시킨다는 결과를 얻었다.

표 23. 홍국 추출을 첨가한 음료의 관능평가

항목	홍국 첨가량	0%	1%
색감		5.14±1.07 ^{b1)}	7.57±0.53 ^a
풍미		6.14±1.21 ^a	7.00±0.82 ^a
맛		6.57±0.98 ^a	6.07±1.62 ^b
종합적 기호도		6.71±1.07 ^a	6.73±0.95 ^b

¹⁾표 19와 상동

6. 술의 제조

술 제조를 위해 먼저 관능적으로 우수한 색소의 추출조건을 조사하기 위해 홍국에 60%, 80%, 95%의 알콜을 함유하고 있는 주정으로 3종의 추출물을 제조하고 각 추출물에 증류수를 첨가하여 알콜 농도를 15%와 25%로 조절하여 총 6종의 샘플을 제조하여 색도 및 투명도를 측정된 결과 표 24에서와 같이 적색도와 탁도는 60% 알콜농도로 추출물이 가장 높게 나타났으며 술 전문가가 제시한 술 제조 시 가장 적합한 시료로서 선발된 B-1 시료에 구연산과 올리고당을 첨가한 제품의 경우 올리고당을 5% 정도 첨가함에 따라 적색도와 탁도가 원액에 비해 낮게 측정되었다. 한편 0.45 μ m 필터로 여과한 경우 적색도와 탁도가 제품원액보다 낮게 측정되었으며 탁도가 매우 낮은 것으로 나타났다.

각 알콜 농도별로 추출한 추출물의 색도는 그림 26과 같으며 제품의 색도는 그림 27과 같다.

술 전문가에게 80% 알콜로 홍국을 추출한 후 알콜농도를 15%로 조절된 샘플에 대한 기호도를 조사·의뢰한 결과 쓴맛이 약간 있으며 무미, 무

취하여 맛과 향을 마스킹할 필요성이 있는 것으로 평가되었으며 구연산 0.15%, 올리고당 5.0%, 청주향 0.001%를 첨가한 결과, 제품의 품질이 크게 향상되어 신맛과 단맛의 조화가 적당한 평가를 받았다. 따라서 적색감이 뛰어난 홍국추출물을 이용한 술 제조 가능성은 매우 높은 것으로 평가되었다.

표 24. 알콜 농도를 달리한 주정추출물을 15% 또는 25% 알콜농도로 조절 한 시료의 적색도 및 탁도

	A	A-1	B	B-1	C	C-1	제품 원액	제품 여과
적색도 (500nm)	10.57	5.97	9.42	4.83	7.27	4.23	3.72	0.75
탁도 (600nm)	3.15	1.43	3.15	1.11	2.58	1.37	2.30	0.08

A; 60%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 25% 조절

A-1; 60%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 15% 조절

B; 80%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 25% 조절

B-1; 80%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 15% 조절

C; 95%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 25% 조절

C-1; 95%알콜로 추출한 후 증류수로 알콜농도를 15% 조절

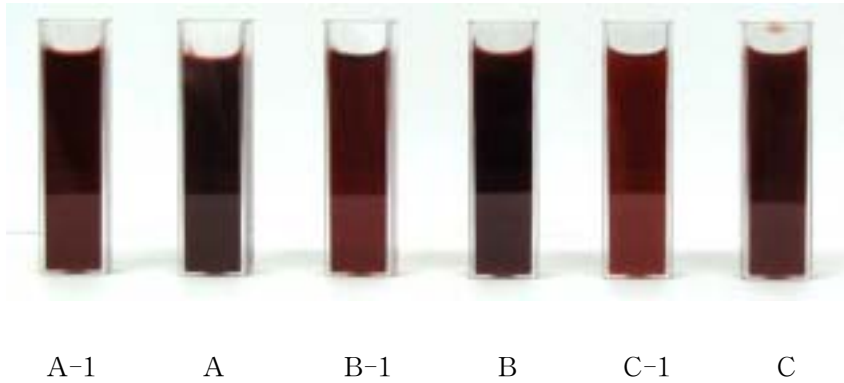


그림 26. 알콜 농도별로 홍국추출물을 제조하고 추출물의 알콜농도를 조절한 시료의 사진

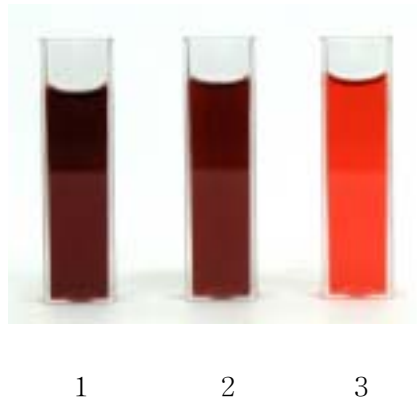


그림 27. 그림 27의 B-1의 시료에 구연산과 올리고당을 첨가한 시료의 사진

1; B-1 시료, 2; B-1에 구연산과 올리고당을 첨가,
3; 2 시료를 0.45 μm 필터로 여과한 시료

7. 고추장의 제조

고추장 발효중의 조지방, 조단백, 식이섬유 함량을 측정한 결과 표 25에서와 같이 홍국 첨가구와 대조구에서 큰 차이를 보여주지 않았다. 색도는 표 26에서와 같이 홍국 첨가구가 대조구에 비해 밝기, 적색도, 황색도에서 낮은 값을 보였으나 관능검사 결과, 표 27에서와 같이 홍국 1.5% 첨가구가 종합적인 품질에서 높은 관능적 특성을 보였다. cholesterol 합성 저해 효과를 보기 위하여 HMG-CoA reductase저해활성을 측정한 결과, 표 28에서와 같이 물추출물의 경우 대조구는 HMGR 저해활성이 50-60%이었으나 홍국 첨가구는 발효 40일째에 90%로 가장 높은 저해활성을 보였다. 한편 methanol 추출물에서 대조구는 전혀 저해활성이 없었으며, 홍국 첨가구에서는 발효초기에서 말기까지 90%의 저해활성을 보여 홍국첨가 고추장의 기능성을 확인하였다.

표 25. 홍국을 첨가한 고추장의 성분분석

고추장	숙성시간 (일)	조지방	조단백질	조섬유
홍국 무첨가	0	3.39	6.25	4.09
	20	3.24	5.52	4.48
	40	3.78	5.80	4.23
	60	4.73	5.64	4.16
홍국 1.5%	0	3.30	5.80	4.38
	20	4.00	5.70	4.42
	40	3.63	5.63	4.21
	60	4.39	5.72	4.28
홍국 3.0%	0	3.64	6.30	4.31
	20	3.82	5.47	4.57
	40	5.19	5.77	4.32
	60	3.46	5.81	4.66

표 26. 숙성기간별 홍국 첨가 고추장의 색도

고추장	0일	20일	40일	60일
0%	L 40.76 a+26.67 b+30.72	L 41.67 a+25.74 b+26.80	L 40.76 a+24.56 b+26.68	L 39.69 a+22.01 b+23.68
1.5%	L 33.95 a+25.98 b+20.82	L 36.45 a+25.23 b+17.46	L 36.72 a+24.78 b+17.86	L 37.18 a+23.31 b+17.12
3.0%	L 27.97 a+19.54 b+10.96	L 31.06 a+18.63 b+ 9.31	L 31.06 a+19.35 b+10.30	L31.92 a+18.47 b+ 9.60

표 27. 60일 숙성시킨 홍국고추장의 관능적 특성

	Control	홍국 1.5% 첨가	홍국 3.0% 첨가
색	3.63±1.07 ^{b1)}	6.58±1.22 ^a	6.26±2.16 ^a
냄새	4.84±1.39 ^b	5.53±2.09 ^{ab}	5.90±1.91 ^a
점성	4.00±1.20 ^b	5.68±1.67 ^a	5.90±2.11 ^a
단맛	4.21±1.62 ^a	4.74±1.73 ^a	4.74±2.28 ^a
메운맛	5.58±1.87 ^{ab}	5.11±1.66 ^b	6.42±1.71 ^a
맛	4.73±1.88 ^a	4.95±1.35 ^a	4.58±2.39 ^a
종합적 기호도	4.32±1.82 ^b	5.16±1.64 ^a	4.58±2.39 ^b

¹⁾ 표 19와 상동

표 28. 숙성 기간별 홍국 첨가 고추장의 HMG-CoA reductase
저해활성

고추장	숙성 (일)	추출율(%)		HMGR 저해율(%)	
		D.W.	MeOH	D.W.	MeOH
Control	0	62	39	50	0
	20	69	42	50	0
	40	65	48	54	0
	60	70	45	60	0
홍국 1.5% 첨가	0	67	43	7	89
	20	68	40	63	90
	40	68	50	90	92
	60	63	54	10	80
홍국 3.0% 첨가	0	60	42	75	90
	20	70	43	79	90
	40	70	51	88	89
	60	62	52	50	88

제 7 장 참고문헌

Wild D, Tóth G, Humpf H-U. 2002. New *Monascus* metabolite isolated from red yeast rice (ankak, red koji). *J. Agric Food Chem.* 50: 3999-4002

Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International J. Food Microbiol.* 27: 201-213

Robinson JA. 1991. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 332: 107-114

Martinkova L, Juzlova P, Vesely D. 1995. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 609-616

Endo A, Monacolin K. 1995. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* sp.. *J. Antibiol.* 32: 852-854

Endo A, Monacolin K. 1980. A new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *J. Antibiol.* 33: 334-336

Yu TS, Kim HH, Yoon CG. 2003. Hepatic oxygen free radical

metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 244-249

Korea food research institute. 2000. Isolation of lovastatin producing strain, culture and analysis of its content, p. 10.

Kang SG, Jung ST. 1995. Pigment production and color difference of liquid beni-koji under submerged cultural conditions. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 23: 472-478

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

Kim EY, Rhyu MR. 2000. The chemical properties of doenjang prepared by *Monascus* koji. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1114-1121.

食品と開発 編集部. 2000. 食品素材としての有用菌の開発・利用動向. 食品と開発 35(2): 44-48.

Bang IY, Whang SH, Kim JW, Kim SY, Park CS. 2003. Screening of fungal strains producing lovastatin, an Antihypercholesterolemic agent. *Korean J Food Sci Technol* 35: 442-446.

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.

Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48: 5220-5225.

Yu TS, Kim HH, Yoon CG. 2003. Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 244-249.

Chung SH, Suh HJ, Hong JH, Lee HK, Cho WD. 1999. Characteristics of kochujang prepared by *Monascus anka koji*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 61-66.

Kim EY, Rhyu MR. 2000. The chemical properties of doenjang prepared by *Monascus koji*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1114-1121.

Kim SD, Kim ID, Park MJ. 2001. Effect of *Monascus koji* on the fermentation and quality of *kimchi*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 826-823.

Hwang TI, Kim SK, Park YS, Byoun KE. 2001. Studies on the storage of functional red soybean curd. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1115-1119.

Lee TS, Lee YJ, Kwon YK, Park JS, Ko HS, Sim KC, Lee JY, Shin JW, Song JW, Lee CW. 2001. Studies on the determination method of *Monascus* pigments in foods. *Korean J Food Sci Technol* 33: 641-644.

Kysilka R, Kren V. 1993. Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *J Chromatogr* 630: 415-417.

Friedrich J, Zuzek M, Bencina M, Cimerman A 1995. Strancar, A. and Radez, I. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. *J Chromatogr A* 704: 363-367.

Morovján G, Szakács G, Fekete J. 1997. Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 763: 165-172.

Vinci VA, Hoerner TD, Coffman AD, Schimmel TG, Dabora RL, Kirpekar AC, Ruby CL, Stieber RW. 1991. Mutants of lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. *J Ind Microbiol* 8: 113-120.

Hajjaj H, Blanc PJ, Groussac E, Goma G, Uribe Larrea JL, Loubiere P. 1999. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnol Bioeng* 64: 497-501.

Ryu BH, Ahn MK, Park JO. 1995. Production of cholesterol inhibitor, monacolin produced from *Monasces pilosus* M-15. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 92-97.

Dams E, Hendriks L, Van de Peer Y, Neefs J-M, Smits G, Vandembemt I, De Wachter R. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 16(Sup.): r87-r173.

Kim MH, Lee TK, Yang HC. 1992. Red pigment production from *Monascus anka albidus*. *Korean J Food Sci Technol* 24: 451-455.

Park MJ, Yoon EK, Kim SD. 2002. Stability of pigment produced by *Monascus pilosus*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 541-545.

Kim SJ, Rhim JW, Kang SG, Jung ST. 1997. Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 60-66.

Broder CU, Koehler PE. 1980. pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. *J Food Sci* 45: 567-569.

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.

민경찬, 정희종, 정수열, 김재근, 손규목, 김도영. 2003. 식품미생물학. 광문각, 서울. p 68.

Tsukioka M, Hiroi T, Suzuki T, Konno T. 1986. Pigment production by mutants of *Monascus anka* (Studies on alcoholic beverage production using genus *Monascus*. Part I). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 60: 451-455.

Hakihara, B. Method of enzyme vol.II (1956)

Kumasaki, S., Nakanishi, K., Nishikawa, E. and Ohashi, M. Structure of

monascorubrin. *Tetrahedron*. 18: 1171-1184 (1962)

Kim, H.S., Kwak, H.S., Yang, H.S., Ryang Y.R. and Yu, J.H. Studies on the red pigment produced by *Monascus* sp. *Korean J. Food Sci. Technol.* 9: 31-36 (1977)

Kim, C.S., Rhee, S.H. and Kim I. Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by mold (*Monascus* Sp.). *Korean J. Food Sci. Technol.* 9: 277-283 (1977)

The editorial department. Useful microbe as health food material. *Food and development*. 35: 44-48 (2000)

Vinci, V.A., Hoerner, T.D., Coffman, A.D., Schimmel, T.G., Dabora, R.L., Kirpekar, A.C., Ruby, C.L. and Stieber, R.W. Mutants of lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of a sulochrin. *J. Ind. Microbiol.* 8: 113-120 (1991)

Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R. and Chang M. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric Food Chem.* 48: 5220-5225 (2000)

Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard(*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 118-123

Nakatani N, Kikuzaki H. 1987. A new antioxidative glucoside isolated oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2727 -2734

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.