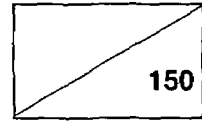


GA0120-9911

GOVP 12007929



# *Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성식품 제조 기술 개발

Development of the hypotensive-food supplements  
by use of red rice fermented with *Monascus*

연 구 기 관  
한국식품개발연구원

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성식품 제조 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 31.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 류 미 라

연 구 원 : 안 병 학

연 구 원 : 김 동 만

연 구 원 : 김 은 영

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 홍 억 기

위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 김 덕 경

위탁연구기관명 : 삼성생명과학연구소

위탁연구책임자 : 한 진 수

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

*Monascus*속 산물의 생리활성을 이용한 기능성식품 제조 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

*Monascus*속 사상균을 번식시켜 제조되는 홍국(紅麴)은 그 자체로 홍색을 띠는 곰팡이로 600년 이상 전부터 중국, 대만을 중심으로 널리 이용되어 왔으며 근년 홍국에 함유된 다양한 약리효과가 확인되고 있다. 특히 최근 일본, 미국을 중심으로 홍국의 약리효능을 적극적으로 활용한 식품 및 dietary supplement가 시판되는 등 기능성 식품 소재로서의 인식도가 커지고 있다. 그럼에도 불구하고 홍국의 약리효과에 대한 체계적 연구는 극히 드물며 특히 홍국의 혈압강하효과에 대해서는 현상적 고찰이 이루어져 있을 뿐 작용 mechanism이 구명되지 못하고 있다.

한편 고혈압은 대표적인 성인병의 하나로 우리나라 뿐 아니라 세계적으로 사망 원인 중 상당히 우위를 나타내는 것으로 예방 및 치료를 위한 관리 방안이 필요시 되고 있다.

본 연구는 *Monascus*속 사상균 즉, 홍국균의 대사산물에 존재하는 혈압강하작용 mechanism을 구명하고 홍국을 이용하여 고혈압의 예방 및 경증 환자의 치료에 적극적으로 활용될 수 있는 혈압강하기능성식품 소재의 개발을 목적으로 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 목적달성을 위하여 주관연구기관인 한국식품개발연구원에서는 홍국의 고체배양 및 액체배양 홍국 대사산물의 혈압강하 작용기작에 관해 연구하였으며 동시에 홍국을 이용한 혈압강하식품을 개발하고 개발된 식품의 고혈압동물에 대한 혈압강하효과를 입증하였다. 협동연구기관인 강원대학교에서는 액체배양을 통한 고기능성 홍국 제조 및 생리활성물질 생

산공정 개발에 대해 연구하였으며 위탁연구기관인 삼성생명과학연구소에서는 고품질의 고혈압 모델동물을 번식, 유지 시키므로써 고체배양 홍국 및 홍국식품의 혈압강하효과를 확인할 수 있는 고혈압모델동물을 제공하였다. 한편 1차 년도 연구결과 홍국의 혈관운동성에 미치는 효과가 관찰됨에 따라 2차, 3차 년도에는 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원에서 홍국의 혈관 평활근세포 성장조절작용 구명에 대해 위탁연구를 수행하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

○ 37종의 홍국균을 수집하고 각각의 특성을 살펴보았다. 홍국의 색도 및 균체량은 균주에 따라 매우 다양하게 나타났으며, 홍국 색소의 추출율은 70% ethanol 에서 가장 높았다. Protease 활성은 산성 protease 활성이 중성 protease 활성보다 높았고, 산성 protease 활성이 높은 균주일수록 중성 protease의 활성도 높았다. 그러나 amylase의 활성은  $\alpha$ 와  $\beta$ -amylase가 균주에 따라 서로 다르게 나타났다.

○ 홍국의 유리아미노산 함량은 균종과 균주에 따른 차이가 비교적 뚜렷이 나타났으며 *M. anka*, *M. kaoliang*, *M. purpureus*에서의 생산량이 많았고, *M. pilosus*, *M. ruber*는 적었다. 특히 GABA의 함량은 *M. anka*, *M. kaoliang*, *M. purpureus*에서 많았고, *M. ruber*, *M. pilosus*에서 적었다.

○ 홍국의 SHR에 대한 혈압강하 효과는 ethanol 추출물 및 WP 분획물 각 10 mg/kg, 2 mg/kg을 경구 투여 1시간 후부터 지속적으로 나타났으며 투여 24시간후에는 정상혈압으로 회복되는 것으로 나타났다. 또한 홍국의 혈압강하효과는 홍국균의 특정 균주에서만 나타나는 특성이 아니라 대부분의 홍

국균에서 나타나는 특성으로 확인되었으며 혈압강화성분은 : 색소물질과는 무관하며 물, ethanol에 용해되나 ethylacetate, n-butanol에는 불용성임을 알 수 있었다.

○ 된장제조시 사용되는 국의 10, 20, 30%를 홍국으로 대체하여 제조한 홍국된장의이화학적 특성은 일반된장과 차이를 나타내지 않았으며 홍국된장을 사료에 3.7% 첨가하여 생후 5 주령의 SHR에 7 주간 투여한 결과 투여 2 주 후부터 혈압상승이 유의적으로 억제되었으며 일반사료로 전환시 혈압상승 억제현상은 나타나지 않았다.

○ 본 연구를 통하여 홍국 혈압강화 기작의 하나로 내피세포의존적 혈관이완작용이 처음 확인되었으며 이 혈관이완작용은 GABA나 acetylcholine에 의해 일어나는 것이 아니며 현재 중요한 혈관내피의존적 혈관이완 인자의 하나로 지목되고 있는 nitric oxide에 의해 유발되는 것으로 확인 되었다.

○ *Monascus sp.*의 액체배양을 위한 최적의 배지 조성은 carbon source로는 glucose를, nitrogen source로는 yeast extract에 일정량의 peptone (2:1)을 첨가하는 것이었으며, 이때 C/N ratio는 8, mineral source로는 0.01% CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였다.

○ *M. ruber* IFO 32318균주를 이용하여 flask에서 수용성 적색색소를 생성하기 위한 최적의 초기 pH는 7이었고, 1 g/L의 sodium acetate를 배양 2일째 첨가하는 경우 적색소의 생성량이 증가하였다. 생물배양기를 이용한 회분배양시 최적의 교반속도와 통기량은 600 rpm, 1.0 vvm으로 나타났다.

○ *M. ruber* IFO 32318 균주로 제조한 홍국은 농도에 비례한 평활근세포 성장억제 작용을 나타내며 이 작용은 DNA와 RNA 합성 저해에 유래되는 것으로 평활근세포의 괴사나 고사에 의해 이루어지는 것이 아님이 확인되었다.

○ 홍국의 혈관내피세포 의존성 혈관이완반응의 기전을 구명하기 위하여 내피세포를 배양하여 생성되는 nitrite의 총량으로 NO의 생성을 정량한 결과 홍국 30  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 control의 약 1.6배의 NO를 생성하였고 이는 NO의 생합성 억제제인 L-NNA 처리시 저해되었다.

○ Charles River Japan에서 들여온 SHR을 엄격한 생육조건하에서 생산된 개체 중 수축기혈압이 190 mmHg 이상을 나타나는 개체만을 선별하고 나머지는 도태를 시키는 방법으로 육종하므로써 190 mmHg 이상의 혈압을 유지하는 개체가 80%에 달하는 고순도의 SHR colony를 유지할 수 있었다. 또한 2차성 고혈압 모델동물 중 Goldblatt의 시술방법을 개선하여 시술 후 고혈압 발생율을 80 %에서 100 %까지 높일 수 있었다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구 결과 홍국의 혈압강화작용 기작의 하나는 혈관 내피세포에서 생성되는 nitric oxide에 의해 일어나는 혈관이완작용으로 이 결과에 대해서는 “홍국을 이용한 일산화질소 생성제 조성물 및 이를 이용한 약품 조성물”이라는 발명의 명칭으로 기 특허 출원되었으며 (출원번호 99-46913) 해외 유명잡지에 투고 게재확정되었다 (J.Ethnopharmacology 1999). Nitric oxide 생성 소재는 현재 의학 분야의 뜨거운 쟁점이 되고 있는 분야로써 홍국을 심혈관계 질환의 치료제 조성물 또는 기능성식품소재로 적극 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 이에 관해서는 현재 기업체에서도 상당한 관



심을 보이고 있으나 본 기술의 이전시 3 차년에 걸쳐 투입된 “정부출연연구비 전액 부담”이 기업체 입장에서는 상당히 부담이 되고 있다. 본 기술이 대기업에 이전될 시에도 본 과제에 투입된 연구비 전액이 아니라 이전되는 기술개발에 투여된 연구비만 부담할 수 있도록 개선한다면 기술의 이전 및 실용화 가능성이 더욱 높아질 것으로 사료되며 이를 적극 건의하는 바이다.

여 백

## SUMMARY

The fungal genus *Monascus* is used to prepare red fermented rice as a natural food colorant and preservative, and has been used as a traditional medicine in oriental countries for centuries. The components isolated from the fungus exert several biological actions and produce hypocholesterolemic, antitoxic and antitumoural effects. Recently, it has been shown that the aqueous extract of the fungus decreased blood pressure *in vivo* without affecting electrolyte metabolism or the activity of angiotensin I-converting enzyme. It has been suggested, therefore, that the hypotensive effect of the fungus may be due to a direct inhibition of vascular smooth muscle tension. However, little information is available about the actions of the fungus on blood vessels.

The present study was carried out to characterize the properties of *Monascus* and to examine the hypotensive effects of red rice and food which were fermented with *Monascus*. Also we examined the effects of the aqueous extract of red rice fermented with *Monascus* on the vasomotor tone of the aortic rings, and its possible mechanism of action.

The properties of color, enzyme activity and the contents of glucosamine, GABA and free amino acids were characterized in 37 strains of *Monascus*.

The extract of red fermented rice with *Monascus* reduced initial blood pressure in 1, 3, 5, 7 hrs after an oral administration on SHR and initial blood pressure was recovered 24 hrs. after administration. In the

relation between *Monascus* species and hypotensive activity, we could conclude that the fungi of genus *Monascus* produce a hypotensive activity not a specific *Monascus* strain do.

The hypotensive compounds of red fermented rice were not related to the pigment and they were extractable in ethyl alcohol and water, not in ethyl acetate and butanol.

*M · Doenjang* soy paste which fermented with 30% *Monascus* was successfully developed. And the chronic dietary administration for 7 weeks of the diet which contained 3.7% of *M · Doenjang* significantly suppressed the elevation of blood pressure of SHR.

Vasodilatory effects of aqueous extract of red rice fermented with *Monascus ruber* IFO 32318 were examined on the isolated rat aorta. The water phase of fermented rice with *Monascus* (WP/FRM) caused a transient relaxation of the endothelium-intact rat aorta precontracted with norepinephrine. The WP/FRM-induced relaxation was abolished by removal of endothelium or in the presence of  $N^G$ -nitro-L-arginine, a nitric oxide (NO) synthase inhibitor. Neither atropine, a muscarinic receptor antagonist, nor indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, altered the WP/FRM-induced endothelium-dependent relaxation. In addition, WP/FRM increased the production of NO in primary cultured endothelial cells from human umbilical vein. In conclusion, WP/FRM induces relaxation of rat aorta by releasing NO from endothelium. There seem to be some unknown factor(s) other than acetylcholine and GABA, in the aqueous extract of red rice, which stimulate vascular endothelial cells to produce and/or release NO leading to endothelium-dependent

relaxation by WP/FRM.

Collectively, the red rice fermented with the fungal genus *Monascus* could be an useful material of physiologically functional food and dietary supplements for hypertension.

여 백

## Contents

Introduction .....	23
Chapter 1. Characteristics of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	33
1. Introduction .....	33
2. Materials and methods .....	34
1) Materials .....	34
2) Measurement of color .....	34
3) Measurement of mycelial weight .....	34
4) Measurement of enzyme activity .....	35
5) Measurement of free amino acid content .....	36
3. Result and discussion .....	37
1) Color of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	37
2) Mycelial weight of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	43
3) Enzyme activity of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	46
4) Free amino acid content of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	49
Chapter 2. Hypotensive activity of red rice fermented with <i>Monascus</i> and <i>Monascus Doenjang</i> .....	57
1. Introduction .....	57
2. Materials and methods .....	58
1) Extraction and fractionation of hypotensive components .....	58
2) Preparation of <i>Monascus Doenjang</i> .....	60
3) Measurement of water content, pH and titratable acidity of	

<i>Monascus Doenjang</i> .....	60
4) Color of <i>Monascus Doenjang</i> .....	60
5) Measurement of amino nitrogen of <i>Monascus Doenjang</i> .....	62
6) Measurement of reducing sugar of <i>Monascus Doenjang</i> .....	62
7) Measurement of free amino acid of <i>Monascus Doenjang</i> .....	62
8) Measurement of peptide of <i>Monascus Doenjang</i> .....	63
9) Measurement of enzyme activity of <i>Monascus Doenjang</i> .....	63
10) Measurement of tail systolic blood pressure .....	63
11) Statistical analysis .....	64
3. Result and discussion .....	66
1) Hypotensive activity of red rice fermented with <i>Monascus</i> ...	66
2) Characteristics and hypotensive activity of <i>Monascus Doenjang</i> .....	72
 Chapter 3. The mechanism of hypotensive activity of red rice fermented with <i>Monascus</i> .....	 91
1. Introduction .....	91
2. Materials and methods .....	92
1) Extraction and fractionation of hypotensive components .....	92
2) Measurement of vasodilation .....	92
3) Reagents .....	92
4) Statistical analysis .....	93
3. Results and discussion .....	94
1) The effect of hypotensive materials from red rice fermented with <i>Monascus</i> on rat thoracic aorta .....	 94
2) The mechanism and characteristics of vasodilatory materials .....	99



## 목 차

### 세부연구과제 : 홍국대사산물의 혈압강하작용 기작구명

서 론 .....	23
제 1장 홍국의 특성 .....	33
제 1절 서설 .....	33
제 2절 실험재료 및 방법 .....	34
1. 홍국균주 및 홍국의 제조 .....	34
2. 홍국의 색도 측정 .....	34
3. 홍국의 균체량 측정 .....	34
4. 홍국의 효소활성도 측정 .....	35
5. 홍국의 유리아미노산 함량 측정 .....	36
제 3절 결과 및 고찰 .....	37
1. 홍국의 색도 .....	37
2. 홍국의 균체량 .....	43
3. 홍국의 효소활성도 .....	46
4. 홍국의 유리아미노산 함량 .....	49
제 2장 홍국 및 홍국식품의 혈압강하효과 .....	57
제 1절 서설 .....	57
제 2절 실험재료 및 방법 .....	58
1. 홍국의 혈압강하물질 추출 및 분획 .....	58
2. 홍국된장의 제조 .....	60
3. 수분, pH 및 적정산도 .....	60

4. 색도 .....	60
5. 아미노태질소 함량 측정 .....	62
6. 환원당 함량 측정 .....	62
7. 유리아미노산 함량 측정 .....	62
8. peptide 함량 측정 .....	63
9. 효소활성도 측정 .....	63
10. 실험동물의 사육 및 혈압측정 .....	63
11. 통계분석 .....	64
제 3절 실험결과 및 고찰 .....	66
1. 홍국의 혈압강하효과 .....	66
2. 홍국된장의 특성 및 혈압강하효과 .....	72
제 3장 홍국의 혈압강하 기작구명 .....	91
제 1절 서설 .....	91
제 2절 실험재료 및 방법 .....	92
1. 홍국의 혈압강하물질의 추출 및 분획 .....	92
2. 혈관운동성의 측정 .....	92
3. 시약 .....	92
4. 통계분석 .....	93
제 3절 결과 및 고찰 .....	94
1. 홍국대사산물이 혈관운동성에 미치는 영향9 .....	94
2. 혈관이완물질의 특성 및 작용기작 .....	99
참고문헌 .....	104

## 협동연구과제 : 고기능성 홍국제조 및 생리활성물질 생산공정개발

1. 서론 .....	111
2. 실험 재료 및 방법 .....	116
1) 균주 및 보존 .....	116
2) 배지 .....	116
3) 접종원 준비 .....	117
4) 배양 조건 .....	117
5) 발효 장치 .....	118
6) 분석 방법 .....	118
가) 균체량 분석 .....	118
나) Glucose 분석 .....	119
다) 색소 정량 .....	119
3. 결과 및 고찰 .....	120
1) 액체배양을 위한 안정성 검토 및 문제점 분석 .....	121
2) 균체성장을 위한 액체배양 배지 개발 .....	121
가) Carbon 및 Nitrogen source의 선택 .....	122
나) Carbon 및 Nitrogen 농도에 따른 C/N ratio의 선택 .....	123
다) mineral source 선택 .....	124
3) 최적 균주 선발 .....	124
4) 최적 균체성장을 위한 C/N ratio 재조성 .....	126
5) 균체성장을 위한 환경인자 영향 검토 .....	127
6) 세포성장 촉진 및 저해요인 검토 .....	128
가) 최적 성장조건에서의 경시변화 .....	128
나) 최적 glucose 농도의 검토 .....	129
다) 최적 초기 pH의 검토 .....	130
7) 교반속도 및 통기량의 영향 검토 .....	131
8) 생리활성물질 생산 촉진요인 검토 .....	132
가) 최적 glutamate 농도 및 첨가시간의 검토 .....	132

나) 최적 acetate 농도 및 첨가시간의 검토 .....	133
다) Glutamate와 acetate의 첨가 검토 .....	135
9) 세포 성장속도와 생산물 생산속도와의 연관관계 확립 .....	136
10) pH의 영향 .....	136
11) Acetate의 첨가 .....	138
4. 결론 .....	169
5. 참고문헌 .....	171

## 위탁연구과제 : 홍국의 혈관평활근 세포 성장조절작용 구명

연구방법 및 결과 .....	177
가. 홍국이 혈관평활근세포 성장에 미치는 영향 .....	177
1) 혈관평활근세포 (VSMC) 일차 배양 .....	177
2) 홍국이 serum에 의한 VSMC의 성장에 미치는 영향 .....	178
3) 세포괴사 및 세포고사에 미치는 영향 규명 .....	178
나. 홍국의 혈관확장작용의 기전 규명 .....	179
1) 혈관내피세포 일차배양 .....	180
2) Nitric oxide(NO)의 산화물인 nitrite, nitrate의 측정법 확립 .....	180
3) 혈관내피세포에서의 홍국에 의한 NO 생산 연구 .....	181
결론 .....	182

## 위탁연구과제 : 고혈압 모델동물을 이용한 혈압강하효과 확인

제 1 장 서 론 .....	191
제 2 장 SHR colony의 번식과 유지 .....	193
제 3 장 일차성 고혈압 모델에 대한 홍국대사산물 및 혈압강하 식품의 in vivo 실험모델의 확립 .....	195
제 4 장 이차성 고혈압 모델의 수립과 혈압강하효과 평가 .....	196
제1절 서 설 .....	196
제2절 이차성 고혈압 모델의 수립 .....	196
1. DOCA salt형 고혈압 모델 수립 .....	196
2. Goldblatt 형 고혈압 모델 수립 .....	198
제3절 홍국대사산물을투여한 이차성 고혈압 모델에서의 혈압강하 효과 확인 .....	199
1.홍국대사산물을 투여한 DOCA salt형 모델에서의 혈압강하 효과 확인 .....	199
2.홍국대사산물을 투여한 Goldblatt 형 모델에서의 혈압강하 효과 확인 .....	200
제 5 장 기타 .....	202
제1절 일차성 고혈압 모델인 SHR의 고혈압 지속에 따른 병변 관찰과 SHR의 sub-strain 분리 및 합병증 모델 수립 ..	202
제 2절 기술 지원과 교육 .....	202
제 6 장 본 과제의 의의 .....	204

**세부연구과제명 :**

**홍국대사산물의 혈압강하작용 기작구명**

**주관연구기관 : 한국식품개발연구원**

**연구책임자 : 류미라**

여 백



## 서론

서구의 식생활에 있어서 맥아의 효소력이 중요한 역할을 하고 있는 것같이 습도가 높은 아시아에서는 국(麴-koji, 곰팡이)이 같은 역할을 담당하고 있어 각 지역에 따라 술·간장·된장·식초 등과 같은 기호품이나 조미료 등의 전통적 발효 음식, 식품이 존재한다. 麴(koji)은, 사상균을 쌀·보리·대두 등 곡류에 번식시켜 그 생산하는 효소력(당화·단백분해 등)으로 양조를 하거나 각지에서 주로 이용된 균주는 황국균(*Aspergillus oryzae*)으로 황국은 번식이 왕성하며 양조한 식품의 맛·향 등의 품질도 아시아인의 기호에 잘 맞아 비교적 널리 이용되어 왔다. 한편 황국균 외에 일본의 남부지역인 카고시마·오끼나와지방에서는 겨울철에도 온도가 높아 잡균오염으로 인해 양질의 麴이 만들어지지 않아, 구연산을 생산하여 pH에 의한 제균효과가 있는 흑국균(*Asp. niger*)이 이용되기도 하였다. 또한 중국대륙과 대만에서는 홍색을 띄는 홍국균(*Monascus*속)이 600년 이상 전부터 이용되어 왔으며 지금까지 홍국균으로부터 발암성을 비롯한 유해물질이 분리되지 않고 있는 등 발효식품으로서는 특이한 것으로 보고되고 있다(Endo, 1985).

*Monascus*속의 홍국균은 분류학상 반자낭균과(Hemiascomycetaceae) 중의 홍국균속(Monascaceae)에 속하는 것으로 현재 약 20종, 균주로서 약 70종이 분리 동정되어 있다. 홍국(紅麴)은 이름에서도 알 수 있듯이 그 자체로 홍색(적갈색)을 띄는 koji로 옛부터 식품으로써 뿐 아니라 식품재료에 붉은색이 적어 천연 착색료로도 이용되어 왔으며, 알콜생산능이 뛰어나 주로 중국·대만등지에서 양조용 koji 및 착색착향료로서 술(紅酒, 老紅酒, 紅露酒 등), 홍유부(紅乳腐), 고기 및 야채의 절임 등의 제조에 이용되어 왔다. 일본에서도 오끼나와(紅麴よう·赤飯·홍국ム-チ 등), 니이가따(축제시에 애용되는 홍국으로 양조한 술) 등의 일부지방에서 홍국으로 제조한 식품이 이용되어 오고 있다(Endo 1985, Tarui 1993, 布谷 등 1988).

## 1. 홍국색소

식품의 착색료에는 tar계의 합성착색료와 천연착색료가 있으나 합성착색료는 식품첨가물의 안전성면에서 발암성이 문제시 되고 있으며 천연착색료는 원료 대부분이 주로 동식물성 천연물로써 원료 공급이 불안정한 동시에 고가여서 그 사용이 활발하지 못하였다. 천연색소의 식품에의 사용은 일본의 경우 총 색소 사용량의 94 %를 차지하고 있으나 국내에서는 총색소 사용량의 10 %에도 이르지 못하고 있는 실정이다. 천연착색료의 안정적 품질, 가격, 제품공급을 위해 미생물이용, 즉 홍국균을 이용한 색소제조에 관한 연구는 1890년대부터 비롯되었으며 진탕배양에서 얻어지는 결합형, 수용성의 색소가 일본에서 이미 상품화 되어 있다. YAEGAKI 醱酵技研 (株) 등을 중심으로 한 일본의 기업에서는 색소제조를 목적으로 고체배양법에 비해 색소제조율이 좋고 단기간에 배양가능하며 배양 후의 추출이 용이하고 효율이 좋은 액체배양법을 개발하였다. 즉, glucose, dextrin 등의 탄소원과 polypeptone, 탈지대두등의 질소원을 포함하는 배지에 물을 넣은 후 멸균시킨 배지에 홍국균 (주로 *Monascus anka*)을 접종하여 배양하는 방법으로 약 7일이 소요된다 (布谷 등 1988). 일본에서는 천연색소로서는 카라멜색소를 제외한다면 홍국색소가 가장 많이 이용되는 것으로 1994년 초 현재 일본 국내시장 규모로 5백-6백톤 (20억엔)에 이르고 있으며 더욱 성장할 것으로 예상되고 있다. 현재 홍국색소는 주로 수산연제품, 잼, 토마토케찹, 조미료, 식육 등의 착색에 널리 이용되고 있으며 국내에서의 사용량은 연간 약 25톤 (1994년 초 현재)으로 전량 일본에서의 수입에 의존하고 있으며 일본에 비해 사용량은 미미한 실정이나 천연첨가물을 선호하는 사회의 흐름에 맞추어 수요가 급증할 것으로 예상된다.

홍국균이 생성하는 색소는 적색계, 황색계, 자색계가 있으며 시판제품은 이들의 혼합물이다. 색소성분 중 현재 화학구조식이 판명되어 있는 것은

6종으로 적색색소, rubropunctatin, monascorubrin, 황색색소, monascin, ankaflavin, 자색색소로 rubropunctamine, monascorubramine이 있다. 홍국균이 생성하는 색소는 배양조건에 따라 적색·황색·자색색소 각각의 색소성분의 함유비율이 다르므로 색조에도 차이를 나타내며 저장 중 빛에 의해 변화를 받아 점차 퇴색하여 황갈색으로 변색한다. 이것이 *Monascus* 속 색소의 특징이기도하며 결점이기도 하다 (布谷 등 1988).

## 2. 홍국의 생리활성 물질

홍국색소를 천연색소로 이용하려는 연구는 오래 전부터 이루어져 이미 일본에서는 상품화 되어 시판되고 있다. 그러나 최근 홍국에 대한 관심이 되살아나고 있는 것은 홍국이 나타내는 항균, 항암, 콜레스테롤생합성억제, 혈당상승억제, 혈압강하 등의 다양한 약리효과가 과학적으로 연구 보고되고 있기 때문으로 홍국의 약리성 (기능성)에 대해서는 중국에서의 옛부터의 사용법이나 고문헌의 기록에서도 예측해 볼 수 있다.

중국 명시대의 宋應星의 저서 「天工開物」下卷에는 「魚肉은 가장 부패하기 쉬운 것이나 홍국을 얇게 발라놓으면 한여름에도 그 질을 유지할 수 있다. 10일이 지나도 모기나 파리가 가까이 하지 않으며 색이나 맛은 원래 그대로니 신기한 약이다」와 같이 기록되어 있어 홍국에 살균작용 또는 정균작용이 있어 어육의 잡균오염에 의한 변패를 방지하는 효과가 있음을 나타낸다. 결국 항균활성을 갖는 물질이 포함되어 있음을 시사한다. 홍국을 식품의 보존에 이용하는 습관은 현재에도 이어져 대만에서는 돼지고기·닭고기·어육 등을 담구어 보존하는데, 특히 '설'에는 일반가정에서도 쉽게 볼 수 있다. 최근 연구에 의하면 *M.purpureus*가 *Bacillus*, *Streptococcus* 및 *Pseudomonas*의 각 속에 항균활성을 갖는 물질을 생산한다고 보고 되어 있다. 활성성분의 적어도 일부는 색소 (착색물질)로 보인다 (Wong 1981).

또한 홍국은 옛부터 koji 중 유일하게 한방약으로서도 이용되어 왔으며 중국 淸朝초기의 李時珍의 저서 「本草綱目」에는 「消食活血·健脾燥胃」(소화를 도와 피의 흐름을 좋게 함. 내장을 강하게하여 위를 시원하게 함) 등의 효능을 갖는 것으로 기재되어 있으며, 중국·대만에서는 지금도 일반적인 보건의약, 특히 여성용 대중 보건의약으로서 널리 애용되고 있다 (布谷 등 1988). 근년에는 홍국의 약리효과 중 순환기계와 관련된 성분으로 cholesterol 생합성 억제효과를 갖는 Monacolin K가 홍국대사산물 중에서 발견되어 보고되어 있다. Endo 등 (Endo 1979, Endo 1980)은 1979년에 *Monascus ruber*로부터 강력한 cholesterol 생합성 저해제 Monacolin K를 발견 하였으며 Monacolin K와 유사한 구조를 갖는 다른 활성 물질도 같은 균주에서 분리하였다 (Endo 1985). 이들 물질은 모두 독성이 극히 낮으며 동시에 강한 cholesterol 저하 작용을 갖는 것으로 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA) reductase를 길항 저해하는 것이 특징이다. Monacolin K에 대해서는 특히 연구가 진행되어 소량투여로 각종 동물 (토끼, 개, 원숭이 등)의 혈중 cholesterol을 저하시킬 뿐 아니라 중증의 고 cholesterol 혈증환자에 대해서도 극히 유효한 것으로 보고 되고 있다 (Kroon et al. 1982, Kovanen et al. 1981, Bilheimer et al. 1983, Endo 1984). 특히 동맥경화 중에서도 가장 나쁜 것으로 되어 있는 LDL (low density lipoprotein) -cholesterol을 우선적으로 낮추는 작용이 있는 것이 큰 특징이다.

또한 최근 水浸시킨 후 물기를 뺀 정백미에 홍국균 (*Monascus pilosus* IFO 4520)을 접종하고 8일간 호기적으로 정치배양하여 얻은 홍국의 건조분말을 사료에 3% 첨가하여 SHR에 3주간 섭취시킨 실험에서 황국 (*Aspergillus oryzae* IFO 30104)에 비해 현저한 혈압상승 억제 효과를 나타내는 것으로 확인 되었으며 (Tsuji et al. 1992a) 이후의 실험에서 홍국은

사료 중의 함유량 0.3%만으로도 SHR에 대해 강압효과를 나타내는 것으로 확인 되었다 (Tsuji et al. 1992b). 또한 일본 GUNJE (株)에서는 홍국을 첨가하여 제조한 빵, 된장, 간장, 국수를 SHR에 15일간 투여한 후 혈압에 미치는 영향을 검토하였다. 5% 비율로 홍국을 첨가한 홍국식빵의 건조분말은 혈압상승을 억제하였으며, Koji 사용량의 1/4을 홍국으로 하여 양조한 홍국, 된장 및 홍국간장의 분무건조물도 혈압상승을 억제하였다. 국수원료의 3%를 홍국으로하여 제조한 홍국국수는 혈압강하작용을 나타내었으나 물에 끓인 것은 그 효과가 반으로 줄어들어 이는 수용성인 혈압강하 성분의 용출에 의한 것으로 고찰되었다 (Tsuji et al. 1992c). K. TSUJI 등은 홍국의 혈압강하작용물질과 작용기작을 해명하는 연구의 일환으로 균체량과 강압효과와의 관계를 조사한 결과 균체량이 많을수록 강압효과가 강한 경향을 나타내었다. 홍국의 강압효과는 121℃ 20분 가열로 다소 약해지는 경향을 보였으나 90℃ 20분 가열에는 전혀 변화하지않아 열에 비교적 안정한 것으로 나타났다 (Tsuji et al. 1992d). 원료가 쌀이 아닌 소맥에 *Monascus pilosus* IFO 4520을 접종하여 30℃ 에서 2일, 25℃에서 4일, 계 6일간 호기적으로 배양하여 제조한 소맥홍국의 강압효과는 쌀홍국 보다 강한 것으로 나타났다 (Tsuji et al. 1992d).

쌀홍국의 혈압강하성분은 물, ethanol에 가용성이며, n-butanol, ethylacetate 등에 불용성이었으며 현재 혈압강하 성분으로는, 이미 사람에게 혈압강하작용이 있다는 사실이 알려진  $\gamma$ -aminobutyric acid와 acetylcholine chloride가 분리, 동정되었으나 (Tsuji et al. 1992d) acetylcholine은 극히 불안정한 물질로 작용이 일과성이므로 acetylcholin이 홍국의 강압작용에 중요한 작용을 하고 있다고 생각되기 어렵다. GABA는 사람에게 혈압강하 작용이 있다는 사실이 잘 알려져 있어 주요 성분으로 추측되고 있으나 홍국 중에 함유된 GABA함량 만으로는 홍국의 혈압강하

효과가 설명되지 않고 있어 GABA는 홍국에 함유된 혈압강하 물질 중의 하나이며 그외에도 수용성의 어떤 성분이 존재한다는 사실이 시사되고 있다 (Tsuji et al. 1992b).

홍국의 혈압강하 mechanism에 대해서는 현재 Na/K ion 교환에 의한 Na 배설촉진 작용과 관련된 것이 아니며 (Tsuji et al. 1992a), Renin-angiotensin system에 관련된 angiotensin converting enzyme 저해에 의한 것도 아닌 것으로만 밝혀져 있을 뿐 (Tsuji et al. 1992b) 명확히 알려져 있지 않다.

그외에도 홍국의 주요 색소성분인 monascorubrin이 강한 암예방 효과를 나타내는 것으로 보고 되었으며 *Monascus*속의 일부는 혈당치의 상승을 억제하는 물질을 생산하는 것이 밝혀져있다

### 3. 홍국을 이용한 기능성 식품의 제조

대두발효식품의 하나인 된장은 저장성, 영양적 가치 뿐 아니라 독특한 향미로 인해 오랜동안 우리 민족의 전통식품으로 위치해 왔다. 된장에 대해서는 1980년대 말까지 주로 대체원료의 개발, 국균과 숙성균의 효율적인 생산 관리 및 숙성 중의 미생물 분포와 이화학적 특성, 효소활성의 변화, 그리고 보존성 등에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다.

이 등 (1996)에 의하면 한국 재래식 메주 된장숙성중 호기성세균은 숙성 60일까지 큰 변화가 없었고, 혐기성 세균은 숙성기간 동안  $10^7 \sim 18^7$  /g, 효모는 된장 숙성 15일까지 급격히 증가한 후 변화가 없었다고 하였다. 또한 산성과 중성 protease 활성은 가을 메주로 제조한 된장에서는 숙성초기 15일~30일 사이에 최대활성을 나타낸후 점차 감소하였으나 봄 메주로 제조한 된장에서는 초기에 약간 증가가 보여지기는 하였으나 숙성기간동안

거의 비슷한 수준을 유지하였고  $\alpha$ -amylase 활성과  $\beta$ -amylase 활성은 가을메주 된장에서 더 높았으며, 가을메주된장에서는  $\alpha$ -amylase 활성은 숙성기간 동안 감소하는 경향이었고  $\beta$ -amylase 활성은 비슷한 수준으로 유지되었으나, 봄메주 된장에서는 두가지 amylase 활성이 모두 숙성기간동안 비슷한 수준으로 유지되었다고 하였다.

최 등 (1997)에 의하면 전통식으로 제조한 된장에서 pH는 120일간의 숙성시 숙성기간동안 계속적으로 감소한다고 하였고, 금 등 (1997)은 전분질 재료를 달리하여 제조시 된장의 숙성중 적정산도는 숙성이 진행되는 동안 유기산의 축적으로 인해 증가하는 경향을 나타낸다고 하였다.

그 외에 된장에 대한 연구로는 숙성중 향기성분의 분석 (최 등, 1997), 시판 콩된장중의 유리 아미노산과 유기산 및 isoflavone의 함량에 관한 연구 (정 등, 1998) 등이 있다.

또한, 홍국을 이용한 장류의 제조에 관한 연구는 이 등 (1997)의 *Monascus sp.*를 이용한 간장의 제조, 강 등 (1997), 정 등 (1999)에 의한 고추장의 제조 등이 있다. 이들은 모두 홍국을 첨가하여 간장이나 고추장의 제조시 성분에 큰 변화는 없었으며, 또한 고추장의 제조시에는 고춧가루의 첨가량을 변화시키면서 매운맛이 다른 다양한 종류의 고추장 제조가 가능하다고 하여 홍국을 이용한 발효식품의 제조 가능성을 시사하였다.

#### 4. 고혈압과 혈관의 운동성

고혈압은 40세 이후 인구의 20~40%가 앓고 있을 만큼 순환기 질환 중 가장 흔한 질환이다. 고혈압의 95% 이상은 뚜렷한 원인을 밝히기 어려우며 이를 본태성 고혈압이라 부른다. 나머지 5% 정도는 뚜렷한 원인이 있을 수 있으며 이를 2차성 고혈압이라고 한다.

고혈압은 혈압 조절 작용의 이상에 의하여 일어나며 고혈압의 발생기

전에 대해서는 renin-angiotensin system에 대한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. 혈압 조절에는 혈관, 심장, 신장, 신경계, 내분비계 등이 복합적으로 상호 작용하여 혈압의 항상성을 유지하며 vasoactive substance를 포함한 많은 생화학적 물질들이 혈압 조절작용에 관여하게 된다. 최근들어 이들 vasoactive substance 들의 유전자가 cloning되고 분자생물학적인 작용기전이 알려짐에 따라 고혈압의 기전을 이해하는데 도움이 되고 있다.

고혈압이 발생하면 일단 혈관벽에 2차적인 구조적 재형성이 일어난다. 혈관벽은 혈관 내피 세포와 혈관 평활근 세포로 이루어져 있다. 내피세포는 혈관의 가장 내벽을 이루는 단층의 세포로서 혈액과 직접 접촉하게되는 혈관벽세포이다. 과거에 내피세포는 혈관벽의 단순한 기계적 방어막 (mechanical barrier)으로만 인식되어 왔으나 실제로는 혈관의 병태생리에 영향을 미치는 여러 가지 물질들을 생산함이 알려졌다. 내피세포는 여러 가지 혈관작용 물질 (vasoactive substance)들을 분비하는 우리 몸에서 가장 큰 내분비기관이며, 혈관벽의 선택적인 대사산물의 투과 및 이동을 조절하고, 세포표면에 glycocalyx와 같은 단백을 발현하여 혈액이 원활하게 흘러가도록 하고, 세포표면에 세포접착인자를 발현하여 백혈구와 혈소판의 부착을 조절한다. 평활근세포는 혈관중막 (media)의 여러개의 세포층을 구성하고 있다. 평활근세포의 가장 큰 특징은 서로 다른 두 가지의 표현형질로 바뀔 수 있다는 것이고 환경이나 자극에 의하여 세포의 형질이 바뀌는 것을 형질조절 (phenotypic modulation)이라 한다. 평활근 세포의 성장 및 비대에는 여러 가지 성장인자들이 관여하게 되는데 세포의 비대를 일으키는 대표적인 물질은 angiotensin이며 세포의 증식에 관여하는 대표적인 물질은 PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )이다. 이외에도 TNF (tumor necrosis factor), thrombin, IGF-1 (insulin-like growth factor-1), IL-6



(interleukin-6) 등이 세포의 성장에 관여하며 이들은 혈관벽이 손상을 받게 되면 평활근세포 그 자체 또는 인접한 혈소판, 내피세포, 백혈구 등에서 분비된다 (Kim).

혈관의 이완이 일어나려면 호르몬, 신경전달물질 또는 여러 종류의 약리작용을 갖고 있는 혈관활성물질 (vasoactive substance)들이 혈관의 내피세포를 자극하여 EDRF (endothelium-derived relaxing factor)를 유리시키고, 이 유리된 EDRF는 내피세포로부터 혈관이완 시그널을 인접한 평활근으로 전달하게 된다. 이 과정에서 혈관세포내의 cyclic GMP가 증가하여 혈관의 이완이 일어나며 이때 EDRF는 내피세포 의존성 혈관이완의 중요한 인자가 된다 (Chang, 1995). EDRF의 방출에 의한 내피세포 의존성 혈관이완은 대동맥 뿐만 아니라 저항혈관들에서도 일어나며 일반적으로 정맥보다는 동맥에서 더 확연하게 나타난다. EDRF는 또한 혈소판의 응집과 응집된 혈소판이 혈관벽에 부착되는 것을 저해하기도 한다 (Furchgott and Vanhoutte, 1989). 내피세포에서 분비되는 혈관확장인자로는 NO (nitric oxide), prostacyclin (prostaglandin I<sub>2</sub>), EDHF (endothelium-derived hyperpolarization factor), CNP (C-type natriuretic factor) 등이 있다.

nitric oxide (NO)는 free-radical로써 매우 불안정하며 반응성이 강한 화학 물질이다. 또한 간단한 구조로 인하여 생체내에서 흔히 볼 수 있는 구조특이성을 가질 수 없을 것으로 생각되어 80년대 초반까지 주목을 받지 못하였다 (Kwon 1995). 그러나 acetylcholine에 의한 혈관확장을 유발시킬 수 있는 EDRF가 NO와 생리적인 작용이 같을 뿐만 아니라 화학적인 성질이 NO와 구분할 수 없는 물질이라고 알려진 후에, NO는 심혈관계의 중요한 조절인자로 여겨지고 있다. 또한 NO는 중추신경계와 말초신경계에서 neurotransmitter로 작용한다는 여러 증거들이 제시되고 있으며, hormone 분비에도 관여하고 있어서 광범위한 분야에서 매우 다양한 작용을 나타내

고 있다 (Franklin and Epstein, 1993).

### 3. 연구의 목적

홍국은 약 600년 전부터 중국, 대만을 중심으로 식품 및 의약적 소재로 이용되어 왔으며 최근 홍국의 약리효과가 과학적으로 구명되고 있다. 특히 홍국은 극히 소량으로써 대표적 성인병의 하나인 고혈압의 예방 및 치료제로서의 사용 가능성이 보고되고 있다.

본 연구는 홍국의 전반적인 특성과 홍국 및 홍국된장의 혈압강하 효과, 홍국의 혈압강하기작구명을 위하여 수행하였다.

# 1장 홍국의 특성

## 제 1절 서 설

홍국균은 중국대륙과 대만을 중심으로 600년 전부터 이용되어 왔고, 건강에 대한 관심이 급증하면서 합성색소를 대체하기 위한 천연색소 생성 물질로 주목을 받고 있다 (Taruii, 1993). 또한 최근들어 홍국이 항균, 항암, 콜레스테롤생합성억제, 혈당상승억제, 혈압강하 등의 다양한 약리효과가 과학적으로 연구 보고 되고 있다. *Monascus* 속의 홍국균은 반자낭균과 (hemiascomycetaceae)중의 홍국균속 (Monascaceae)에 속하는 것으로 현재 약 20종, 균주로서 약 70종이 분리 동정되어 있다.

현재까지 우리나라에서는 홍국균 중 예전부터 일반적으로 사용되어온 균주로부터의 색소생성이나, 다량의 색소를 생성하기 위한 균주의 개량, 배양법 등 색소에 대한 연구에 초점이 맞추어져 왔고, 또, 이를 이용한 고추장의 제조 등에 관한 연구들이 일부 진행되었을 뿐 홍국균 전반에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 장에서는 홍국균에 대한 기초적인 자료를 제공하기 위하여 홍국을 균종별로 수집하여 각각의 균의 특성에 대한 연구를 수행하였다.

## 제 2절. 실험재료 및 방법

### 1. 홍국균주 및 홍국의 제조

실험에 사용한 홍국균주는 총 37종으로 *M. anka* 3종류, *M. araneosus* 1종류, *M. kaoliang* 5종류, *M. pilosus* 7종류, *M. purpureus* 12종류, *M. ruber* 6종류, *M. vitreus* 1종류, 그외 2종이었다.

홍국을 제조하기 위하여 이들 균주들을 각각 수침시킨후 물기를 뺀 뒤 autoclave한 정백미에 접종하고 30℃에서 2일, 25℃에서 6일, 계 8일간 호기적으로 정치배양하였다. 이를 90℃에서 20분간 가열하고 다시 50℃에서 수분함량이 10 %이하가 되도록 건조한 후 mixer (Food Mixer FM-707T, Hanil)로 분쇄하여 각각의 홍국분말을 얻었다. 각 홍국 분말의 ethanol extract는 분말의 4배량의 ethanol을 가하여 3회 반복추출하여 얻었다.

### 2. 홍국의 색도 측정

홍국분말의 색도는 색도계 (MINOLTA Chroma meter CR-200, Japan)로 측정하였으며, ethanol extract의 색도는 "Hunter Lab Universal Software Color QUEST II Spere System"으로 측정하였다. 색도는 명도 (lightness)를 나타내는 L값, 적색도 (redness)인 a값, 황색도 (yellowness)인 b값, 채도를 나타내는 Chroma값, 붉은색의 정도를 나타낼 수 있는 hue angle value (H)로 표기하였다.

### 3. 홍국의 균체량 측정

홍국의 균체량은 Sakurai et al. (1977)의 방법으로 세포벽 성분인 chitin을 구성하고 있는 glucosamine함량을 측정하여 홍국 1g당 Glc-NH<sub>2</sub>의

량으로 나타내었다. 즉, 홍국분말 0.5g에 60% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 ml을 넣고 25℃에서 가끔씩 교반하면서 24시간 방치한 후 1 N이 되도록 물로 희석하고 121℃, 1.5 atm으로 1시간 autoclave하여 NaOH로 중화한후 50 ml로 mass up하여 시료용액으로 사용하였다. 용액내에 유리된 Glc-NH<sub>2</sub>의 양은 BLIX 법 (G. Brix, 1948)으로 정량하였다. 즉, 시료용액 0.5 ml에 acetylacetone시약 0.5 ml을 가한 후 90℃에서 1시간 가열하고 96% ethanol 5 ml과 EHRlich 시약 0.5 ml을 첨가하여 1시간 정치시킨후 530 nm에서 비색정량하였다.

#### 4. 홍국의 효소활성도 측정

홍국의 효소활성도는 일본 장류시험법에 따라 측정하였다. 즉, 홍국분말에 5배량의 NaCl 용액을 첨가하여 실온에서 3시간 stirring하면서 추출하여 원심분리한후 (8,500 rpm, 20분) 이를 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 투석하여 정량한 용액을 효소활성 측정용 시료 용액으로 사용하였다.

산성과 중성 protease 활성은 각각 pH 3.0 McIlvaine buffer와 pH 6.0 sodium phosphate buffer에 녹인 casein 용액 1.5 ml과 각 buffer 1 ml을 혼합한 후 40℃에서 효소용액 1 ml을 첨가하여 60분간 반응시킨 뒤 0.4 M TCA 용액으로 반응을 정지시켜 filtration 한 후 다시 이 용액 1 ml에 0.4 M sodium carbonate 5 ml, phenol solution 1 ml을 첨가하여 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tyrosine을 이용하여 작성하였고, 효소활성은 40℃에서 60분간 반응하여 tyrosine 1 mg을 생성하는 양을 1 unit으로 계산하였다.

$\alpha$ -amylase의 활성은 pH 5.0 sodium phosphate buffer 0.4 ml에 1% 전분용액 0.5 ml을 혼합한 후 25℃에서 효소용액을 첨가하여 10분간 반응

시킨 뒤 0.1 M HCl로 반응을 정지한 후, 용액 0.5 ml에 iodine solution 5 ml을 첨가하여 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 1 unit는 25℃, pH 5.9에서 10분동안 1 mg의 전분을 분해하는 효소의 양으로 나타내었다.

$\beta$ -amylase 활성은 DNS법 (Miller G.L. 1959)으로 환원당의 양을 측정하여 이를 효소 활성도로 환산하였다. 즉, DNS solution 0.3 ml에 시료용액 0.1 ml을 첨가한 후 이를 끓는물에서 3분간 반응시킨 뒤 냉각한 후 증류수 1.6 ml을 첨가하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 glucose를 이용하여 작성하였고, 3분 동안 glucose 1 mg을 생성하는 양을 효소 활성 1 unit으로 정의하였다.

#### 5. 홍국의 유리아미노산 함량의 측정

홍국 분말을 4배량의 ethanol로 80℃에서 3회 반복 추출하여 감압건고한 뒤 이를 ethylacetate, n-butanol, 물로 순차적으로 분획한 후 이중 물획분을 다시 감압건고하고 0.02 N HCl로 정량 하여 이를 유리아미노산 분석용 시료 용액으로 사용하였다. 시료 용액내의 유리아미노산 함량과  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)의 양은 아미노산자동분석기 (amino acid analyzer L-8500A, Hitachi, Japan)를 이용하여 분석하였다.

### 제 3절. 결과 및 고찰

#### 1. 홍국의 색도

홍국의 색도는 균주에 따라 다양한 색을 나타내어  $H$  값을 기준으로 비교시 짙은 붉은색인 24.47에서부터 거의 색이 없는 88.35까지 매우 광범위하게 분포되었다 (Table 1). 본 실험에 사용한 균주들을 편의에 따라  $H$  값을 기준으로 짙은 붉은색 (적자색)을 띄는 A group (30 이하), pink 계열의 B group (40~45), 옅은 미색계열인 C (50~55), 및 거의 색을 띄지 않는 D (60 이상) group의 4 group으로 분류할 수 있었다. A group에 속하는 균주는 *M. araneosus* KFRI 00371, *M. kaoliang* ATCC 46597, *M. pilosus* IFO 4520, IFO 4521, IFO 8201, ATCC 16368, *M. purpureus* IFO 4482, ATCC 16436, *M. ruber* IFO 9203, IFO 32318, *M. sp.* ATCC 16437의 11종이었고, B group에 속하는 균주는 *M. kaoliang* ATCC 46596, *M. pilosus* IFO 4480, IFO 4525, *M. ruber* IFO 32317의 4종, C group은 *M. anka* IFO 6540, *M. purpureus* IFO 4513, IFO 32228, ATCC 6405, ATCC 36114, ATCC 48162, *M. vitreus* IFO 4532의 7종, 그리고 나머지 15종이 D group에 속했다. 균종별로 색도를 비교하였을때는 *M. anka*와 *M. purpureus*는 *M. purpureus* IFO 4482와 ATCC 16436을 제외한 나머지가 모두 거의 색을 띄지 않는 C 및 D group에 속하는 것으로 나타났고, *M. pilosus*는 IFO 4487 한 균주만을 제외하고 A group이 3종, B group이 2종으로 분홍색에서 짙은 붉은색을 나타내어 색소를 많이 생성하는 것으로 보였다. 그러나 *M. kaoliang*과 *M. ruber*는 같은 균종내에서도 균주에 따라 색도가 짙은 붉은색에서 거의 색을 띄지 않는 것까지 다양하게 관찰되어서

균주에 따라 색도 특성이 다름을 나타내었다. Endo (1985)에 의하면 *Monascus*속중에서 *M. kaoliang*이 가장 붉은색의 색소를 생성하고 *M. anka*와 *M. purpureus*가 붉은색을 띄며, *M. ruber*와 *M. pilosus*는 pink계열, *M. vitreus*는 brown-gray계열의 색소를 생성한다고 하였고, Tarui (1993)도 역시 *M. anka*와 *M. purpureus* 균주들이 색소생성능력이 강하다고 하였다. 그러나 본 연구의 결과 이들 보고와 일치하는 균주는 *M. kaoliang* ATCC 46597, *M. pilosus* IFO 4480, IFO 4525, *M. purpureus* IFO 4482, ATCC 16436, *M. ruber* IFO 32317의 6균주 뿐이었다. 이러한 차이는 첫째, 균종이 같다 하더라도 각 균주간에 차이가 있을 수 있으며 이는 본 연구에서도 각 균종내에서도 균주들간에 색도의 차이가 매우 큰 것으로 미루어 짐작해 볼 수 있다. 둘째로는 고체배양시의 색소생성에 관한 연구결과 홍국균은 같은 균주라 할 지라도 사용한 쌀의 원산지에 따라, autoclaving time 같은 배양조건에 따라서도 색소의 생성이 달라지는 것으로 보고되고 있어 (Schumacher et al.,1996) 본 연구의 배양조건에 적합한 균주들이 많은 색소를 생성하고 적합하지 않은 균주들은 비록 예전부터 색소를 많이 생성한다고 알려져 있었더라도 색소의 생성이 적었을것으로 추측된다. 그러나 이에 대해서는 좀더 지속적으로 많은 연구가 이루어져야 확인이 가능할 것으로 보인다.



Table. 1. The color of fermented rice with *Monascus*

sample	L	a	b	Chroma	H
1. <i>M. anka</i> (IFO 4478)	79.07±4.65	7.31±1.60	18.62±3.15	20.05±3.15	68.47±4.60
2. <i>M. anka</i> (IFO 6540)	74.07±4.95	12.90±1.83	17.36±2.91	21.67±3.10	53.22±4.06
3. <i>M. anka</i> (IFO 30873)	72.81±5.40	11.55±1.62	20.90±2.72	23.89±3.03	61.32±1.66
4. <i>M. ara</i> (KFRI 00371)	49.14±7.76	25.58±3.44	15.31±2.16	29.85±3.71	20.96±3.25
5. <i>M. kao</i> .(ATCC 46592)	79.07±6.06	6.78±2.75	18.95±3.61	20.19±4.10	70.71±5.44
6. <i>M. kao</i> .(ATCC 46595)	77.41±5.09	6.56±1.76	20.74±3.19	21.77±3.51	72.66±2.70
7. <i>M. kao</i> .(ATCC 46596)	68.84±0.88	17.92±1.53	17.12±2.79	24.81±2.97	43.51±2.60
8. <i>M. kao</i> (ATCC 46597)	51.89±8.17	24.15±5.64	14.34±3.15	28.10±6.39	30.77±2.10
9. <i>M. kao</i> (ATCC 46598)	83.16±2.67	2.96±0.66	21.55±4.00	21.76±4.05	82.20±0.52
10. <i>M. pilo</i> .(IFO 4480)	70.43±3.91	16.46±1.23	14.11±0.87	21.69±1.34	40.64±1.82
11. <i>M. pilo</i> .(IFO 4487)	86.04±3.21	0.45±0.68	14.24±1.26	14.26±1.28	88.35±2.74
12. <i>M. pilo</i> .(IFO 4520)	56.97±1.94	24.28±1.21	14.27±0.68	28.16±1.32	30.45±0.87
13. <i>M. pilo</i> .(IFO 4521)	45.43±2.01	27.55±1.01	15.02±1.10	31.38±1.39	28.58±1.02
14. <i>M. pilo</i> .(IFO 4525)	75.98±1.85	13.50±1.67	11.27±0.85	17.62±1.47	39.98±3.73
15. <i>M. pilo</i> .(IFO 8201)	57.87±2.79	20.72±1.19	10.64±0.67	23.30±1.26	27.18±1.31
16. <i>M. pilo</i> .(ATCC 16368)	57.56±4.17	19.96±1.87	12.64±2.15	23.64±2.68	32.23±2.29
17. <i>M. pur</i> .(IFO 4482)	56.25±5.39	24.64±2.58	13.95±2.22	28.32±3.32	29.38±1.68
18. <i>M. pur</i> .(IFO 4484)	80.36±2.96	2.85±1.30	22.59±2.76	22.81±2.61	82.53±4.08
19. <i>M. pur</i> .(IFO 4485)	80.52±5.03	5.66±0.97	20.12±3.79	20.91±3.87	74.19±1.50
20. <i>M. pur</i> .(IFO 4486)	83.68±1.74	1.05±0.26	23.35±2.53	23.37±2.53	87.42±0.63
21. <i>M. pur</i> .(IFO 4513)	73.01±3.25	13.50±2.00	17.79±3.29	22.33±3.83	52.68±1.18
22. <i>M. pur</i> .(IFO 32228)	72.34±2.77	13.76±1.98	17.77±2.37	22.61±0.94	52.09±7.39
23. <i>M. pur</i> .(IFO 32316)	81.09±6.45	5.33±1.53	16.26±2.36	17.13±2.67	72.11±2.91
24. <i>M. pur</i> .(ATCC 6405)	72.78±3.60	12.98±1.38	18.52±2.14	22.65±2.10	54.88±3.63
25. <i>M. pur</i> .(ATCC 16427)	78.45±5.73	7.14±2.74	21.77±4.88	23.03±4.91	71.65±6.34
26. <i>M. pur</i> .(ATCC 16436)	58.86±2.68	21.47±0.81	10.21±1.15	23.79±1.00	25.41±2.36
27. <i>M. pur</i> .(ATCC 36114)	67.60±2.51	15.79±2.91	20.70±2.27	26.15±2.39	52.74±5.98
28. <i>M. pur</i> .(ATCC 48162)	71.36±4.16	13.77±2.50	23.00±1.85	26.91±1.51	59.09±5.68
29. <i>M. ruber</i> (IFO 4492)	83.90±2.54	1.18±0.69	21.36±2.87	20.90±2.77	86.89±1.41
30. <i>M. ruber</i> (IFO 7437)	75.03±1.75	4.73±0.67	14.90±2.02	15.63±2.12	72.41±0.65
31. <i>M. ruber</i> (IFO 9203)	55.18±3.82	14.92±1.21	8.46±0.22	17.16±1.15	29.62±1.52
32. <i>M. ruber</i> (IFO 31842)	72.07±4.25	3.35±0.46	11.69±0.77	12.17±0.67	76.46±6.72
33. <i>M. ruber</i> (IFO 32317)	59.43±4.62	11.79±2.14	10.29±2.13	15.66±3.01	40.99±1.34
34. <i>M. ruber</i> (IFO 32318)	43.77±5.25	23.81±2.05	10.88±1.75	26.20±2.48	24.47±2.30
35. <i>M. sp</i> .(ATCC 16435)	78.69±4.89	8.22±1.61	16.02±2.15	18.01±2.61	63.01±2.11
36. <i>M. sp</i> .(ATCC 16437)	49.43±5.83	25.33±3.12	15.20±1.66	29.57±3.17	31.05±3.02
37. <i>M. vit</i> .(IFO 4532)	65.73±1.16	9.75±1.12	11.94±2.14	15.44±2.17	50.49±4.05
blank	88.59±1.39	0.36±0.38	13.51±1.71	13.52±1.71	88.55±1.66

37종 각 홍국의 ethanol extract의 색도는 분말의 색도와 유사하여 분말의  $H$  값이 낮을수록 추출물의  $H$  값도 낮게 나타났다. 그러나 *M. pilosus* IFO 4480, IFO 4525, IFO 8201, *M. purpureus* ATCC16436, *M. ruber* IFO 32317 균주는 분말에서는  $H$  값이 각각 40.64, 39.98, 27.18, 25.41, 40.99이었던 것에 반해 100 % ethanol로 추출시는 72.11, 77.87, 62.75, 62.11, 77.79로 모두 30이상 높아져서 100 % ethanol에 의한 색소 추출율이 매우 낮은 것으로 나타났다. 반면에 *M. purpureus* IFO 4484균주는 분말  $H$  값은 82.53이었으나 추출물의  $H$  값은 66.12로 더 낮아졌다. 그러나 추출물의 색도는 분말의 색도와는 달리 균종에 따라 그 특성을 분류하기는 어려웠고, 또한 균주에 따라서 분말 색도와 차이의 정도가 매우 다양하여 홍국 색소를 구성하는 색소성분은 비록 분말의  $H$  값이 비슷한 균주라 할 지라도 서로 다른 색소물질로 구성되어 있는 가능성이 높은 것으로 추정되었다.

따라서, 홍국의 색소의 특성을 조사하기 위하여 홍국색소의 ethanol 농도에 따른 추출율을 측정하였다. 분말의  $H$  값이 낮은, 즉 붉은 색도가 짙은 9균주 (*M. araneosus* KFRI 00371, *M. kaoliang* ATCC46597, *M. pilosus* IFO 4521, IFO8201, *M. purpureus* IFO 4482, ATCC 16436, *M. ruber* IFO 7537, IFO 32318, *M. sp.* ATCC 16437)로 제조한 홍국분말을 ethanol 농도를 30, 50, 70, 100 %로 달리하여 각각의 색소를 추출하였다. 각 분말의  $H$  값은 모두 30내외로 짙은 붉은색을 띄었고, 추출물의 색도는 70 % ethanol로 추출시 가장  $H$  값이 낮았으며 모든 균주에서 30 %~70 % ethanol로 추출시는 ethanol의 농도가 높아질수록  $H$  값이 감소하여 색소 추출율이 높아졌으나 100 % ethanol로 추출시는  $H$  값이 현저히 증가하여 색소 추출율이 낮아짐을 알 수 있었다 (Table 3). 또한 100 % ethanol로 추출시 추출율이 낮아지는 경향은 다 같았으나, 정도는 균주에 따라 다르게 나타나 *M. pilosus* IFO 8201, *M. purpureus* IFO 4482, ATCC 16436균주

가 특히 100 % ethanol로 추출시 색소추출율이 현저히 감소하여 용매에 따른 색소 추출을 또한 균주에 따라서 차이가 나타남을 알 수 있었다

Table. 2. The color of ethanol extract of fermented rice with *Monascus*

Sample	H	Sample	H
1. <i>M.anka</i> (IFO 4478)	105.46	20. <i>M.purpureus</i> (IFO 4486)	103.05
2. <i>M.anka</i> (IFO 6540)	94.68	21. <i>M.purpureus</i> (IFO 4513)	82.30
3. <i>M.anka</i> (IFO 30873)	93.12	22. <i>M.purpureus</i> (IFO 32228)	67.23
4. <i>M.araneosus</i> (KFRI 00371)	22.94	23. <i>M.purpureus</i> (IFO 32316)	81.93
5. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46592)	105.65	24. <i>M.purpureus</i> (ATCC 6405)	81.90
6. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46595)	84.87	25. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16427)	72.89
7. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46596)	52.34	26. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16436)	62.11
8. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46597)	18.62	27. <i>M.purpureus</i> (ATCC 36114)	62.91
9. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46598)	102.50	28. <i>M.purpureus</i> (ATCC 48162)	74.36
10. <i>M.pilosus</i> (IFO 4480)	72.11	29. <i>M.ruber</i> (IFO 4492)	102.39
11. <i>M.pilosus</i> (IFO 4487)	101.09	30. <i>M.ruber</i> (IFO 7537)	94.62
12. <i>M.pilosus</i> (IFO 4520)	59.75	31. <i>M.ruber</i> (IFO 9203)	54.86
13. <i>M.pilosus</i> (IFO 4521)	24.09	32. <i>M.ruber</i> (IFO 31842)	109.25
14. <i>M.pilosus</i> (IFO 4525)	77.87	33. <i>M.ruber</i> (IFO 32317)	77.79
15. <i>M.pilosus</i> (IFO 8201)	62.75	34. <i>M.ruber</i> (IFO 32318)	16.34
16. <i>M.pilosus</i> (ATCC 16368)	41.99	35. <i>M.sp.</i> (ATCC 16435)	78.06
17. <i>M.purpureus</i> (IFO 4482)	41.21	36. <i>M.sp.</i> (ATCC 16437)	48.17
18. <i>M.purpureus</i> (IFO 4484)	66.12	37. <i>M.vitreus</i> (IFO 4532)	59.14
19. <i>M.purpureus</i> (IFO 4485)	98.00		

Table 3. Color of ethanol extract of fermented rice with *Monascus* extracted using different concentration of ethanol

<i>Monascus</i> strain	ethanol concentration	분말 <i>H</i>	extract <i>H</i>
4. <i>M. araneosus</i> (KFRI 00371)	EtOH 30%	35.22	44.45
	EtOH 50%		33.39
	EtOH 70%		26.65
	EtOH 100%		67.83
8. <i>M. kaoliang</i> (ATCC 46397)	EtOH 30%	33.94	49.81
	EtOH 50%		33.21
	EtOH 70%		26.89
	EtOH 100%		69.70
13. <i>M. pilosus</i> (IFO 4521)	EtOH 30%	27.92	26.59
	EtOH 50%		19.74
	EtOH 70%		18.38
	EtOH 100%		38.00
15. <i>M. pilosus</i> (IFO 8201)	EtOH 30%	28.97	64.86
	EtOH 50%		45.58
	EtOH 70%		39.34
	EtOH 100%		88.33
17. <i>M. purpureus</i> (IFO 4482)	EtOH 30%	29.73	51.03
	EtOH 50%		42.67
	EtOH 70%		34.72
	EtOH 100%		85.36
26. <i>M. purpureus</i> (ATCC 16436)	EtOH 30%	25.81	56.17
	EtOH 50%		42.10
	EtOH 70%		39.28
	EtOH 100%		80.38
31. <i>M. ruber</i> (IFO 7537)	EtOH 30%	28.28	63.24
	EtOH 50%		54.42
	EtOH 70%		49.27
	EtOH 100%		84.63
34. <i>M. ruber</i> (IFO 32318)	EtOH 30%	26.94	26.30
	EtOH 50%		18.96
	EtOH 70%		17.57
	EtOH 100%		30.00
36. <i>M. sp</i> (ATCC 16437)	EtOH 30%	35.49	35.30
	EtOH 50%		24.79
	EtOH 70%		21.04
	EtOH 100%		42.20

## 2. 홍국의 균체량

홍국의 성장률을 나타내는 균체량은 균주에 따라 매우 다양하게 나타났다. 균종별로 비교시에 *M. purpureus*종은 IFO 4513, ATCC 16436을 제외하고는 모두 양이 많은 편에 속했고, *M. pilosus*는 균체량이 균주에 따라 1~6 mg/g 홍국으로 매우 다양하게 나타나 균종에 따른 특성이 확실치 않았으며 *M. ruber*에서는 IFO 4492, IFO 32317을 제외하고는 모두 균체량이 적은편이었다 (Table 4). 또 *M. anka*와 *M. araneosus*, *M. kaoliang*은 *M. ruber*보다는 많고 *M. purpureus* 보다는 적으면서 균체량이 비슷하여 홍국분말의 H 값이 서로 달랐던 결과와 비교시 홍국 균주의 성장과 색소 물질의 생성이 관련이 없음을 나타내었다. *M. sp.*와 *M. vitreus*는 *M. purpureus*의 균체량이 가장 많은 4균주 보다 많지는 않았지만 그 다음으로 많은 group에 속하여 균종에 따른 차이가 색도에서처럼 뚜렷하지는 않았다.

균종내에서 균주에 따른 균체량의 차이를 보면 *M. purpureus*종의 ATCC 16436 균주는 분말의 H 값은 25.41로 A group에 속하는 균이었으나 추출물의 H 값이 높고, 균체량도 적었다. *M. ruber*종에서는 IFO 4492 균주가 분말과 ethanol 추출물의 H 값이 가장 높았으나 균체량은 가장 많아서 다른 균주들과 구분되었고, 이 균주는 많이 자라기는 하나 색소성분이 아닌 다른 대사물질들을 많이 생성하는 것으로 생각된다.

균주별로 비교시는 *M. pilosus* IFO 4487이 균체량이 가장 적었고, *M. purpureus* IFO 4484가 가장 많았다. 이중 *M. pilosus* IFO 4487은 분말과 ethanol 추출물의 H 값이 가장 높았고 균체량 역시 가장 적어서 다른 균주들에 비해 균주의 성장이 적고 그로 인해 색소물질의 생성 또한 적은 것으로 나타났다. 균체량이 가장 많은 *M. purpureus* IFO 4484는 분말의 색도로 분류 시는 H 값이 가장 높은 D group에 속했으나 추출물의 H 값이 가장 많이 증가되었던 균주였다. 따라서 이 균주는 매우 잘 성장하나, 색소는

많이 생성하지는 않는 것으로 추정된다

Tsuji 등 (1992)이 *M. pilosus* IFO 4520 균주로 제조한 소맥홍국과 백미홍국의 균체량은 각각 1 g 홍국당 15.7 mg, 3.9 mg 으로 보고하였으며, 이는 본연구에서 동일균주로 제조한 백미홍국의 glucosamin 함량 3.8 mg과 일치하는 것으로 나타났다.

Table 4. The glucosamine content of fermented rice with *Monascus*

Sample	glucosamine (mg/g koji)	Sample	glucosamine (mg/g koji)
1. <i>M.anka</i> (IFO 4478)	3.90	20. <i>M.purpureus</i> (IFO 4486)	12.05
2. <i>M.anka</i> (IFO 6540)	4.52	21. <i>M.purpureus</i> (IFO 4513)	3.18
3. <i>M.anka</i> (IFO 30873)	5.63	22. <i>M.purpureus</i> (IFO 32228)	6.25
4. <i>M.araneosus</i> (KFRI 00371)	4.21	23. <i>M.purpureus</i> (IFO 32316)	10.91
5. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46592)	3.21	24. <i>M.purpureus</i> (ATCC 6405)	11.87
6. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46595)	3.66	25. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16427)	5.45
7. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46596)	3.69	26. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16436)	1.87
8. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46597)	4.83	27. <i>M.purpureus</i> (ATCC 36114)	8.53
9. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46598)	2.83	28. <i>M.purpureus</i> (ATCC 48162)	4.07
10. <i>M.pilosus</i> (IFO 4480)	4.45	29. <i>M.ruber</i> (IFO 4492)	4.32
11. <i>M.pilosus</i> (IFO 4487)	1.31	30. <i>M.ruber</i> (IFO 7537)	2.25
12. <i>M.pilosus</i> (IFO 4520)	3.80	31. <i>M.ruber</i> (IFO 9203)	2.00
13. <i>M.pilosus</i> (IFO 4521)	3.25	32. <i>M.ruber</i> (IFO 31842)	2.69
14. <i>M.pilosus</i> (IFO 4525)	1.97	33. <i>M.ruber</i> (IFO 32317)	4.04
15. <i>M.pilosus</i> (IFO 8201)	1.52	34. <i>M.ruber</i> (IFO 32318)	2.35
16. <i>M.pilosus</i> (ATCC 16368)	6.32	35. <i>M.sp.</i> (ATCC 16435)	6.35
17. <i>M.purpureus</i> (IFO 4482)	5.83	36. <i>M.sp.</i> (ATCC 16437)	6.66
18. <i>M.purpureus</i> (IFO 4484)	14.26	37. <i>M.vitreus</i> (IFO 4532)	8.87
19. <i>M.purpureus</i> (IFO 4485)	6.32	blank	0.52

### 3. 홍국의 효소활성도

麴의 효소활성은 양조식품 제조 시 상당히 중요한 지표이며, 식품이 발효되는 동안 효소의 작용에 의해 식품에 맛과 향미를 부여해주는 물질이 생성된다. 홍국의 protease 활성은 모든 균주에서 산성 protease의 활성이 중성 protease의 활성보다 높았으나 amylase의 경우는  $\alpha$ 와  $\beta$ -amylase가 서로 관계없이 각각의 특성으로 나타났다.

protease 활성은 균종에 따른 차이는 뚜렷이 나타나지 않았고 색도와도 확실한 연관성이 없었다. 따라서 균주별로 비교해보면 *M. pilosus* IFO 4480, IFO 4520, IFO 4521, *M. vitreus* IFO 4532의 4균주가 산성과 중성 protease에서 모두 다른 균주들의 활성의 2배에서 많게는 100배이상 매우 높은 활성을 나타내었다 (Table 5). 이들 4균주는 색도와 균체량에서 각기 다른 특성을 나타내었던 균주이므로 균주의 특성상 protease활성이 높은 것으로 보여진다. *M. pilosus* IFO 4487 균주는 홍국분말과 추출물의 H 값이 가장 높았고 균체량은 가장 적었던 균주로 산성 protease활성은 또한 가장 낮았고, 중성 protease 활성은 낮은 group에 속했다.

$\alpha$ -amylase 활성은 *M. purpureus*종은 ATCC 16436을 제외하고는 높았고, *M. anka*에서 IFO 30873은 활성이 높았으나 IFO 4478과 IFO 6540은 낮았다. 그외 *M. kaoliang*, *M. pilosus*, *M. ruber*는 각 균주에 따라 활성의 높고 낮음이 다양하게 나타났고, *M. vitreus*는 높아서 protease 활성과 달리 균종에 따른 차이가 약간은 관찰되었다. 이결과는 Taruii (1993)가 *M. anka*와 *M. purpureus*의 amylase 활성이 다른 균종에 비해 매우 높다고 한 결과와 어느정도 유사하였으나, 다른 균종들의 균이 비슷한 amylase 활성을 가진다고 한 결과와는 차이가 있어 효소활성도 역시 균의 배양조건에 의해 차이가 있을것으로 추측된다. 균주별로 비교시 *M. purpureus* IFO 4484, IFO 4486이 다른 균에 비해 2배 이상 높은 활성을 보였고,



Table 5. Enzyme activity of fermented rice with *Monascus* (unit/g koji)

Sample	acidic protease	neutral protease	$\alpha$ -amylase	$\beta$ -amylase
1. <i>M.anka</i> (IFO 4478)	8.17	0.06	-	2.43
2. <i>M.anka</i> (IFO 6540)	5.76	0.19	0.82	1.44
3. <i>M.anka</i> (IFO 30873)	11.23	0.42	1.56	1.50
4. <i>M.araneosus</i> (KFRI 00371)	6.85	0.08	2.05	1.53
5. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46592)	14.42	0.45	0.74	1.47
6. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46595)	16.76	1.19	1.89	1.50
7. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46596)	5.73	0.22	1.56	1.35
8. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46597)	7.36	0.15	2.88	3.26
9. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46598)	17.69	0.70	1.72	2.33
10. <i>M.pilosus</i> (IFO 4480)	119.40	4.87	3.28	1.53
11. <i>M.pilosus</i> (IFO 4487)	0.69	0.36	0.25	1.81
12. <i>M.pilosus</i> (IFO 4520)	68.94	2.52	0.82	1.59
13. <i>M.pilosus</i> (IFO 4521)	100.93	3.19	4.02	1.19
14. <i>M.pilosus</i> (IFO 4525)	2.99	0.84	0.90	1.13
15. <i>M.pilosus</i> (IFO 8201)	3.34	0.24	1.07	2.18
16. <i>M.pilosus</i> (ATCC 16368)	40.55	1.50	0.90	1.13
17. <i>M.purpureus</i> (IFO 4482)	7.90	0.47	1.81	1.13
18. <i>M.purpureus</i> (IFO 4484)	30.04	1.02	5.91	2.76
19. <i>M.purpureus</i> (IFO 4485)	30.28	0.87	2.05	2.39
20. <i>M.purpureus</i> (IFO 4486)	30.16	1.08	6.40	2.98
21. <i>M.purpureus</i> (IFO 4513)	13.10	0.53	1.56	1.84
22. <i>M.purpureus</i> (IFO 32228)	15.44	0.44	2.63	2.89
23. <i>M.purpureus</i> (IFO 32316)	17.02	0.50	1.40	1.99
24. <i>M.purpureus</i> (ATCC 6405)	12.98	0.38	1.48	2.21
25. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16427)	14.66	0.73	2.05	2.64
26. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16436)	2.11	0.22	0.74	6.97
27. <i>M.purpureus</i> (ATCC 36114)	8.51	0.41	1.40	1.93
28. <i>M.purpureus</i> (ATCC 48162)	13.88	1.21	3.20	1.87
29. <i>M.ruber</i> (IFO 4492)	24.99	1.01	1.48	1.87
30. <i>M.ruber</i> (IFO 7537)	2.86	0.36	0.99	1.78
31. <i>M.ruber</i> (IFO 9203)	0.69	0.13	0.82	2.46
32. <i>M.ruber</i> (IFO 31842)	2.11	0.58	0.82	9.10
33. <i>M.ruber</i> (IFO 32317)	34.12	1.88	1.64	2.03
34. <i>M.ruber</i> (IFO 32318)	3.49	0.38	2.13	1.69
35. <i>M.sp.</i> (ATCC 16435)	6.03	0.36	2.05	3.75
36. <i>M.sp.</i> (ATCC 16437)	15.39	0.23	1.82	3.38
37. <i>M.vitreus</i> (IFO 4532)	117.15	3.65	3.28	2.24
blank	-	-	0.08	2.76

*M. pilosus* IFO 4487이 산성 protease활성과 마찬가지로 가장 낮았다.

$\beta$ -amylase 활성은 다른 효소 활성과는 달리 blank 쌀의 활성이 매우 높아서, *M. kaoliang* ATCC 46598, *M. purpureus* IFO 4486, IFO 32228, ATCC 16436, *M. ruber* IFO 31842, *M. sp.* ATCC 16435, ATCC 16437의 7균주만이 blank쌀보다 높은 활성을 보였다. 색도, 균체량 및 다른 효소활성도와도 관련이 보여지지 않았으며 균중에 따라서도 큰 차이가 나타나지 않았다. 균주별로 비교시 *M. purpureus* ATCC 16436, *M. ruber* IFO 31842 균주가 다른 균주들에 비해  $\beta$ -amylase의 활성이 매우 높았다. 이 두 균주는 균체량이 적고, 산성 protease 활성도와  $\alpha$ -amylase 활성도는 모두 낮았으며, 분말의 색도는 서로 달라 *M. purpureus* ATCC 16436은 A group에 속하고 *M. ruber* IFO 31842는 D group에 속하는 균이었다. 따라서 이 두 균주는 색소성분 이외의 다른 대사산물들의 생성이나 활성이 매우 유사한 것으로 생각된다. *M. pilosus* IFO 4487 균주는 분말과 추출물의 *H* 값은 모두 높았고, 균체량은 적었으며, protease 활성과  $\alpha$ -amylase 활성은 매우 낮았으나,  $\beta$ -amylase 활성은 높아서 다른 특성들과는 다른 이 균주의 특이적인 특성으로 나타났다.

#### 4. 홍국의 유리아미노산 함량

홍국중의  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)는 Kohama et al. (1997)에 의해 홍국의 혈압강하효과를 나타내는 물질중의 하나로 동정되었고, Tsuji et al. (1992b)에 의해 식이중에 첨가시 고혈압자연발증 쥐에서 혈압을 저하시키는 물질의 하나로 보고되었다. 각 균주의 GABA 생산능은 홍국의 다른 특성들과 마찬가지로 매우 다양한 양상을 나타내었다. 특히 *M. kaoliang* ATCC 46592 균주에서 가장 많이 생성되었고, *M. pilosus* IFO 4480과 *M. ruber* IFO 31842 균주에서는 거의 생성되지 않았다 (Table 6). 1 g 홍국당 10  $\mu$ g 이상의 GABA를 생산하는 균주는 *M. araneosus* KFRI 00371, *M. kaoliang* ATCC 46592, *M. kaoliang* ATCC 46596, *M. kaoliang* ATCC 46597, *M. pilosus* ATCC 16368, *M. purpureus* IFO 4484, *M. purpureus* IFO 4485, *M. purpureus* IFO 4486, *M. purpureus* IFO 32228, *M. purpureus* IFO 32316, *M. purpureus* ATCC 6405, *M. purpureus* ATCC 36114, *M. purpureus* ATCC 48162 이었고, *M. purpureus* IFO 4487, *M. purpureus* IFO 4525, *M. purpureus* IFO 8201, *M. purpureus* ATCC 16436, *M. ruber* IFO 7537, *M. ruber* IFO 9203, *M. ruber* IFO 31842, *M. ruber* IFO 32318 균주들은 홍국 1 g당 1  $\mu$ g 이하로 소량 생성하는 균주였다. GABA의 함량이 홍국 g당 1  $\mu$ g이하인 균주들은 모두 glucosamine 함량, 산성 protease활성도 적은편에 속하는 균주들이었다. 균종별로 나누어 볼 때 다른 특성들과 마찬가지로 *M. ruber*에서는 IFO 4492 균주만을 제외하고는 GABA 함량이 적었고, *M. purpureus*에서는 ATCC 16436 균주를 제외하고는 GABA의 함량이 많았다. *M. pilosus* 중에서는 IFO 4487 균주는 다른 특성들과 마찬가지로 GABA 함량 역시 가장 적었고, IFO 4480, IFO 4520, IFO 4521, ATCC 16368 균주는 다른 *pilosus* 균주들보다 많았으나, 이들 4균주는 색도는 H 값이 낮았고 (A or B group), 산성, 중성

protease 활성이 제일 높고,  $\beta$ -amylase 활성은 낮은 균주들이었다. 결과적으로 이 균주들은 protease 활성이 높아 GABA의 함량도 많은 것으로 사료된다.

홍국의 다른 유리아미노산의 함량은 총 유리아미노산의 양으로 비교 시 다른 특성들과는 달리 몇몇 균주들을 제외하고는 균종에 따른 특성이 어느정도 관찰되었다. 즉 *M. anka*와 *M. kaoliang*, *M. purpureus*가 *M. pilosus*에 비해 총 유리아미노산의 함량이 약 2.4배~38배 까지 많았고, *M. ruber*에 비해서는 약 10~200까지 많게 나타났다. 각 균종내에서도 균주에 따른 차이가 나타났으며 특히 *M. kaoliang*의 경우 ATCC 46597균주가 다른 균주들에 비해 약 1/4~1/7 정도로 적었고 (Table 7-1), *M. pilosus*의 경우는 IFO 4487의 경우가 다른 특성들에서와 마찬가지로 가장 적었다 (Table 7-2). 또, *M. purpureus*에서는 IFO 4482와 ATCC 16436 균주가 다른 균주의 약 1/7, 1/96정도로 적게 나타났고 (Table 7-3), *M. ruber*에서는 IFO 4492균주가 다른 균주들에 비해 약 85배까지 많게 나타났다 (Table 7-4). 전반적으로 *M. anka*가 Thr, Glu, Cys, cysthi, Ile, Tyr, His을 제외한 다른 모든 아미노산의 함량이 균주들간에 큰 차이 없이 일정하게 가장 높은 함량을 보였다. *M. anka*는 IFO 4478 균주가 Glu을 제외한 모든 유리아미노산의 함량이 다른 두 균주보다 약 2배 가량 높았고, IFO 30873은 다른 두 균주와는 달리 Glu을 생성하는 특징을 보였다. *M. kaoliang*은 Thr, Ile, Trp, Lys, Arg이 다른 균주들에 비해 많았고, Glu, Cys, cysthi의 함량이 가장 적었다. *M. kaoliang*에서는 특히 ATCC 46597 균주가 Ala, Lys, His, Arg을 제외한 나머지 모든 유리아미노산의 함량에서 다른 균주들과는 매우 달랐고, 특히 Cys은 이 균주만이 생성하여서 그 균종 내에서 다른 특성을 지닌 균으로 보여졌다. ATCC 46592 균주는 Ala, Cys, Met, cysthi을 생성하지 않는 특징이 있었고, ATCC 46596균주는 Ser을 생성하지 않는 것이

특징이었다. *M. araneosus*는 *M. kaoliang* ATCC 46597균주와 Cys, Phe, His함량만을 제외한 나머지 유리아미노산의 함량이 거의 유사하였다. *M. pilosus*는 모든 유리아미노산의 함량이 제일 적은편에 속했고, *M. purpureus*는 많은편에 속했지만 이 두 균종의 균들은 특히 균종내에서 균주들간에 차이가 심하게 나타났다. *M. pilosus*중에서는 IFO 4487균주가 총 유리아미노산의 함량이 가장 적어서 다른 모든 특성들과 같은 결과를 보였다. 특히 *M. purpureus*는 *M. kaoliang* ATCC 46597과 *M. pilosus* IFO 4525를 제외한 다른 모든 균주에서 생성하지 않는 Cys을 IFO 4482와 ATCC 16436 균주를 제외하고는 모두 생성하여 다른 균종들과 특이적으로 구분되었다. *M. ruber*도 유리아미노산의 함량이 IFO 4492 균주만을 제외하고 가장 적은편에 속했다.

유리아미노산중 특히 쌀에는 존재하지 않는 Pro, Val 및 Phe의 경우 홍국균을 접종시 몇몇 균주들을 제외하고는 상당량 생성됨을 알 수 있었다. 이중 Phe의 경우 다른 균종에서는 한두 균주만을 제외하고는 모두 생성되었는데 반해 *purpureus*균종에서는 IFO 4482균주를 제외하고는 생성되지 않아 다른 균종들과 특이적으로 구별되었다. 각 균종들내에서 다른 균주들과 구분되도록 적은 양의 유리 아미노산을 함유하는 균주들은 *M. kaoliang* ATCC 46597, *M. pilosus* IFO 8201, *M. purpureus* ATCC 16436, *M. ruber* IFO 31842 등으로 *M. ruber* IFO 31842를 제외하고는 모두 *H* 값이 30이하에 속하는 균주들이었다.

이 결과들을 종합해 볼 때 *Monascus* 균주들은 각 균주에 따라 서로 다른 특성을 나타내지만 색소 생성이 많은 균주에서 다른 모든 특성 물질들이 적어 대사과정중 색소를 많이 생성하는 경우 다른 대사산물들이 적게 만들어지는 것으로 추정되며 이에 대해서는 좀더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 6. GABA content of fermented rice with *Monascus* ( $\mu\text{g/g}$  koji)

Sample	GABA	Sample	GABA
1. <i>M.anka</i> (IFO4478)	9.71	20. <i>M.purpureus</i> (IFO4486)	39.99
2. <i>M.anka</i> (IFO6540)	5.62	21. <i>M.purpureus</i> (IFO4513)	7.52
3. <i>M.anka</i> (IFO30873)	8.96	22. <i>M.purpureus</i> (IFO32228)	13.34
4. <i>M.araneosus</i> (KFRI00371)	10.17	23. <i>M.purpureus</i> (IFO32316)	20.39
5. <i>M.kaoliang</i> (ATCC46592)	44.62	24. <i>M.purpureus</i> (ATCC6405)	11.44
6. <i>M.kaoliang</i> (ATCC46595)	8.39	25. <i>M.purpureus</i> (ATCC16427)	7.28
7. <i>M.kaoliang</i> (ATCC46596)	10.22	26. <i>M.purpureus</i> (ATCC16436)	0.22
8. <i>M.kaoliang</i> (ATCC46597)	11.98	27. <i>M.purpureus</i> (ATCC36114)	10.57
9. <i>M.kaoliang</i> (ATCC46598)	6.76	28. <i>M.purpureus</i> (ATCC48162)	10.80
10. <i>M.pilosus</i> (IFO4480)	5.13	29. <i>M.ruber</i> (IFO4492)	3.55
11. <i>M.pilosus</i> (IFO4487)	0.12	30. <i>M.ruber</i> (IFO7537)	0.08
12. <i>M.pilosus</i> (IFO4520)	2.60	31. <i>M.ruber</i> (IFO9203)	0.28
13. <i>M.pilosus</i> (IFO4521)	5.50	32. <i>M.ruber</i> (IFO31842)	-
14. <i>M.pilosus</i> (IFO4525)	0.88	33. <i>M.ruber</i> (IFO32317)	1.27
15. <i>M.pilosus</i> (IFO8201)	0.39	34. <i>M.ruber</i> (IFO32318)	0.41
16. <i>M.pilosus</i> (ATCC16368)	12.70	35. <i>M.sp.</i> (ATCC16435)	2.26
17. <i>M.purpureus</i> (IFO4482)	3.55	36. <i>M.sp.</i> (ATCC16437)	5.34
18. <i>M.purpureus</i> (IFO4484)	10.27	37. <i>M.vitreus</i> (IFO4532)	1.69
19. <i>M.purpureus</i> (IFO4485)	41.85	blank	0.11

Table 7-1. The Free amino acid content of fermented rice with *Monascus*

	<i>M. anka</i>			<i>M.</i>	<i>M. kaoliang</i>				
	IFO 4478	IFO 6540	IFO 30873	<i>arane- osus</i> KFRI 00371	ATCC 46592	ATCC 46595	ATCC 46596	ATCC 46597	ATCC 46598
Asp	310.2	254.7	176.4	13.3	153.1	229.6	247.7	15.0	188.4
Thr	339.5	163.8	210.8	34.5	224.5	251.3	283.5	32.5	272.3
Ser	392.6	212.1	207.1	30.6	248.0	313.4	-	29.1	301.3
Glu	-	-	109.0	-	-	-	-	-	-
Pro	605.1	326.4	468.0	29.5	341.8	435.4	520.8	34.7	402.3
Gly	301.7	155.9	177.9	16.7	106.3	210.7	244.3	18.3	212.9
Ala	1,485.5	790.4	827.8	210.8	-	860.5	1,198.8	219.5	868.4
Val	599.5	258.9	346.8	47.6	272.2	409.0	506.9	44.4	437.9
Cys	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-
Met	114.4	42.2	33.0	0.9	-	72.6	96.2	1.0	63.2
cysthi	-	-	-	-	-	0.6	0.6	-	-
Ile	367.7	168.7	269.2	30.7	224.2	244.4	285.9	25.6	269.9
Leu	995.8	423.0	475.7	80.3	452.0	598.4	832.1	75.8	706.6
Tyr	263.4	124.6	141.0	20.3	128.5	181.3	220.8	19.3	203.0
Phe	315.6	135.5	137.8	-	112.0	187.2	264.2	22.4	-
GABA	89.4	52.4	82.3	87.1	404.1	73.4	94.1	97.2	60.9
Trp	34.2	12.4	22.5	-	19.8	17.2	22.6	-	27.7
Lys	18.4	8.2	12.8	11.0	12.2	15.2	19.0	8.6	13.9
His	-	-	-	-	20.9	16.5	16.7	6.4	16.3
Arg	47.5	30.9	22.8	33.5	23.4	35.5	37.8	23.7	28.5
total	6,280.5	3,159.9	3,721.2	646.8	2,743.8	4,152.1	4,891.9	674.0	4,073.4

Table 7-2. The Free amino acid content of fermented rice with *Monascus*

	<i>M. pilosus</i>						ATCC 16368
	IFO 4480	IFO 4487	IFO 4520	IFO 4521	IFO 4525	IFO 8201	
Asp	-	-	-	0.7	-	2.1	4.2
Thr	4.7	-	5.0	9.0	-	3.8	51.7
Ser	61.0	5.0	29.2	53.1	2.7	4.6	42.4
Glu	-	-	-	-	15.7	6.2	13.3
Pro	-	-	-	12.7	-	106.4	14.4
Gly	1.4	-	1.6	14.0	-	20.5	25.7
Ala	-	-	16.7	258.7	10.2	-	283.8
Val	-	9.5	35.8	62.8	0.7	5.9	41.2
Cys	-	-	-	-	15.2	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-
cysthi	-	-	-	-	-	-	1.2
Ile	32.1	3.8	20.7	39.4	14.1	3.6	25.2
Leu	56.7	6.7	40.3	81.8	23.5	8.0	50.1
Tyr	-	4.6	12.7	22.8	111.2	1.9	21.8
Phe	20.3	-	12.8	-	7.3	1.7	18.9
GABA	35.9	-	21.1	53.2	7.0	3.1	106.1
Trp	-	-	-	-	-	-	1.5
Lys	2.6	-	2.5	6.3	1.2	-	9.7
His	9.6	1.0	4.4	9.8	-	0.9	-
Arg	4.8	-	2.1	2.7	0.9	-	31.7
total	229.1	30.6	205.0	626.8	209.7	168.6	742.8



Table 7-3. The Free amino acid content of fermented rice with *Monascus*

	<i>M. purpureus</i>								
	IFO	IFO	IFO	IFO	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
	4482	4513	32228	32316	6405	16427	16436	36114	48162
Asp	3.6	287.4	-	-	125.7	395.3	1.0	-	613.1
Thr	12.2	251.0	272.5	75.1	86.1	322.7	3.4	273.0	368.3
Ser	11.4	303.9	315.6	74.6	113.0	444.5	2.6	351.6	520.4
Glu	13.3	193.3	209.3	44.5	66.3	258.7	4.3	243.3	302.2
Pro	12.1	629.6	1,066.9	219.5	307.8	1,192.1	-	1,137.1	735.2
Gly	6.4	222.0	182.6	49.9	45.9	328.7	2.0	206.0	386.2
Ala	70.0	854.7	1,108.0	515.3	504.2	1,181.8	19.5	1,389.4	1,360.8
Val	16.7	369.2	378.2	137.7	145.0	532.3	6.8	397.7	604.9
Cys	-	54.6	30.0	16.4	9.1	74.0	-	22.1	83.0
Met	-	-	1.6	-	-	1.2	-	-	-
cysthi	-	202.9	265.4	93.4	110.5	-	3.0	262.5	2.3
Ile	11.0	-	-	-	-	-	5.7	-	-
Leu	28.9	-	-	72.4	59.7	-	1.7	-	-
Tyr	7.5	215.5	148.2	72.8	68.4	296.6	1.9	-	-
Phe	9.4	-	-	-	-	-	-	-	-
GABA	29.2	75.5	134.0	204.8	114.9	73.1	2.3	106.1	108.5
Trp	-	20.7	8.1	5.8	-	32.9	-	-	39.0
Lys	3.3	13.3	8.6	5.3	6.4	28.3	-	14.2	14.0
His	2.9	23.6	7.0	6.4	6.7	40.2	-	13.6	-
Arg	6.8	41.5	18.7	10.2	11.1	-	-	36.6	49.6
total	244.7	3,758.7	4,145.7	1,604.1	1,780.9	5,202.5	54.1	4,453.2	5,187.5

Table 7-4. The Free amino acid content of fermented rice with *Monascus*

	<i>M. ruber</i>					<i>M. vitreus</i>		blank
	IFO	IFO	IFO	IFO	IFO	IFO		
	4492	7537	9203	31842	32317	32318	4532	
Asp	226.2	2.7	1.6	-	2.2	1.4	9.8	1.4
Thr	136.3	11.8	1.8	1.2	11.3	5.3	39.3	1.6
Ser	169.2	11.5	2.5	1.8	8.8	5.1	34.2	43.9
Glu	-	8.3	3.8	1.2	8.7	2.1	21.4	1.5
Pro	329.8	-	-	-	-	-	29.6	-
Gly	124.9	9.4	2.5	1.5	4.9	2.2	18.3	3.9
Ala	851.6	30.0	18.1	10.6	75.0	34.8	172.4	8.7
Val	244.6	21.1	4.8	4.0	16.8	6.4	60.4	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
Met	38.1	-	-	-	-	-	-	-
cysthi	0.7	-	-	-	-	-	-	-
Ile	134.6	9.0	1.7	1.4	9.1	2.5	39.2	4.2
Leu	-	15.5	3.7	2.9	17.3	4.6	66.6	5.1
Tyr	-	8.3	1.2	4.7	4.7	1.9	17.3	7.0
Phe	111.3	6.3	1.5	-	6.4	0.9	24.7	-
GABA	35.6	0.8	2.9	-	12.8	4.1	17.0	1.1
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	10.4	-	-	-	1.3	-	4.0	-
His	10.2	2.4	-	-	-	0.6	6.5	-
Arg	28.4	-	-	-	2.8	2.0	7.2	3.1
total	2,451.8	137.2	46.1	29.3	182.2	73.9	567.9	81.6

## 제 2장 홍국 및 홍국식품의 혈압강하효과

### 제 1절. 서설

홍국은 중국대륙과 대만에서 600년 이상 전부터 사용되어 왔으며 발암성을 비롯한 유해물질이 분리되지 않는 등 발효식품으로는 특이한 것으로 보고되고 있다 (Endo, 1985). 근년에는 홍국이 색소성분 외에도 여러 가지 생리활성물질들을 생성하는 것으로 보고되고 있어 홍국의 활용에 새로운 관심이 높아지고 있다. 홍국이 나타내는 생리활성으로는 cholesterol생합성 억제작용 (Endo 1979, 1980, David et al. 1999), 항균작용 (Ober and Kunz 1989, Wong and Koehler 1981) 및 일부 암에 대해서도 약하기는 하나 종양발생을 저해하는 작용을 갖는 것으로 보고되고 있다 (Ken et al. 1994, 1996). 또한 최근들어 홍국이 SHR의 혈압상승을 억제하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있으나 (Kiyoshi et al. 1995, Tsuji et al. 1992a, 1992b, 1993, 1994) 그 작용 기작이나 성분은 밝혀지지 않고 있다.

본 실험에서는 홍국의 혈압강하효과가 특정 홍국균에서만 나타나는 것인지 아니면 모든 홍국균에서 공통적으로 나타나는 현상인지를 조사하였으며 동시에 홍국의 혈압강하효과와 색소와의 연관성을 조사하였다. 또한 37종의 홍국균중 색소생성속도가 다른 균주에 비해 빠르면서 홍국제조시의 H 값의 재현성이 뛰어난 *M. ruber* IFO 32318 균주를 이용하여 홍국된장을 제조하고 홍국된장의 혈압강하효과를 측정 하였다.

## 제 2절. 실험재료 및 방법

### 1. 홍국의 혈압강하물질의 추출 및 분획

홍국의 혈압강하효과를 조사하기 위해 혈압강하성분의 추출은 Kohama et al. (1987)의 방법을 따랐다. 즉, 홍국 1 kg에 4배량의 ethanol을 가하여 80℃에서 1시간씩 3회 반복 추출하였다. 이 추출물 (5.21 g)을 감압 건조하여 1차로 홍국의 혈압강하 효과 확인에 사용하였다. 이 추출물을 다시 증류수에 현탁시킨 후 ethylacetate로 5회 반복 추출하고, 다시 n-butanol로 5회 반복 추출하여 각각의 용매획분과 물획분을 분리하였고 (Fig. 1), 이중 물획분 (1.54 g, water phase/fermented rice with *Monascus* :WP/FRM)을 동결건조하여 실험에 사용하였다.

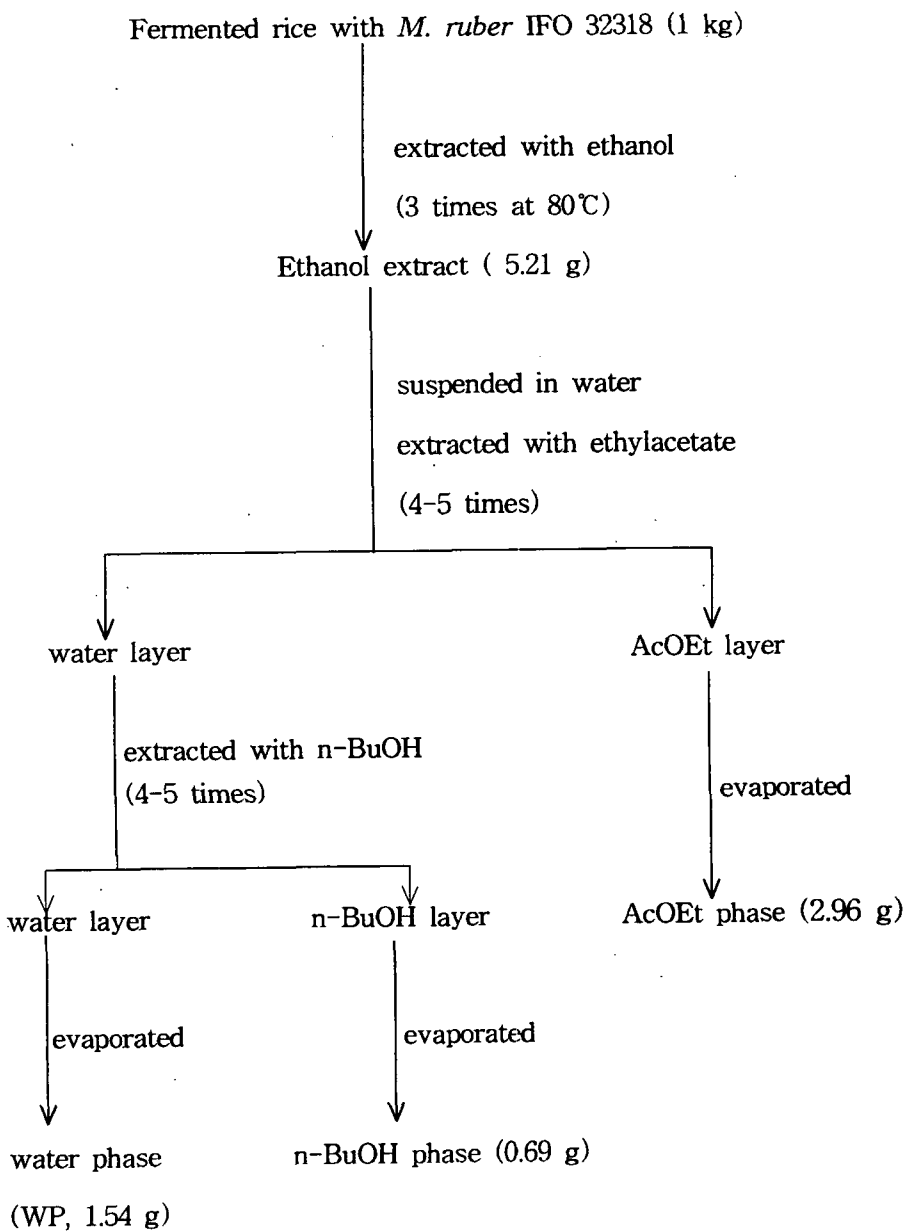


Fig. 1. Extraction procedure from fermented rice with *Monascus*

## 2. 홍국된장의 제조

된장제조시 국의 일부를 *M. ruber* IFO 32318로 대체하여 제조한 홍국된장과 대조구로는 홍국을 첨가하지 않고 제조한 된장을 사용하였다. 된장 제조시의 배합비는 Table 8과 같고, 재료는 (주) 대상식품의 순창공장에서 사용하는 재료를 이용하여 제조하였다. 제조한 각 된장은 30℃ incubator에서 60일간 숙성시켰는데, 숙성 초기부터 30까지는 5일 간격으로 그 이후에는 15일 간격으로 sample을 취하여 분석하였다.

## 3. 수분, pH 및 적정산도

각 된장의 수분은 A.O.A.C 법에 따라 상압가열건조법에 의하여 측정하였다. pH는 된장 1 g에 증류수 20 ml을 가하여 1분간 homogenize 하여 균질화한 후 pH meter (pH meter 520, Orion co. USA)로 측정하였다. 적정산도는 여기에 0.1 N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 적정한 후 적정에 사용된 NaOH ml수로 표시하였다.

## 4. 색도

각 시료 된장의 색도는 색도계 (Chroma meter CR-200, Minolta, Japan)를 사용하여 측정하였다.

Table 8. Composition of raw materials for the preparation of *Doenjang*

material	content (%)			
	<i>doenjang</i>	10% <i>M. doenjang</i>	20% <i>M. doenjang</i>	30% <i>M. doenjang</i>
soy bean	20.74	20.74	20.74	20.74
meju	10.56	10.56	10.56	10.56
wheat koji	12.72	11.45	10.18	8.90
<i>M. koji</i> <sup>1)</sup>	-	1.27	2.54	3.82
salt	10	10	10	10
alcohol	3	3	3	3
water	42.98	42.98	42.98	42.98
total	100	100	100	100

<sup>1)</sup> *Monascus* koji

## 5. 아미노태 질소

아미노태 질소는 홀몰적정법 (식품공전, 1995)에 따라 측정하였다. 즉, 100 ml 비이커에 된장 1 g과 증류수 50 ml을 넣고 1분간 균질화한 후 이를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정한 후 formalin용액 10 ml을 가한 다음 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하였다. 별도의 바탕시험을 실시하여 다음 식에 따라 아미노태 질소함량을 구하였다.

$$\text{아미노태질소(\%)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times F \times 100}{\text{시료량 (g)}}$$

A : 0.1N NaOH의 시료용액 적정량 (ml)

B : 0.1N NaOH의 blank 시험 적정량 (ml)

F : 0.1N NaOH의 농도계수

## 6. 환원당 함량 측정

시료 된장의 환원당 함량은 된장 1 g에 증류수 20 ml을 가하여 1분간 균질화한 후 이를 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 filtration (Toyo filter paper No.1)후 상등액을 시료용액으로 이용하여 DNS법 (Miller, 1959)으로 측정하였다.

## 7. 유리아미노산 함량 측정

시료 된장의 유리아미노산 함량은 Lie의 방법 (1973)으로 측정하였다. 된장 1 g에 증류수 20 ml을 가하여 1분간 균질화 한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 filtration (Toyo filter paper No.1)하여 시료용액으로 사용하였다. 시료 용액 1 ml에 color reagent 1 ml을 가한 후 일정하게 끓는



boiling water bath에서 16분간 가열 하고 20℃ water bath에서 20분간 냉각시킨 후 potassium iodate용액 2.5 ml을 첨가하여 혼합한 뒤 30분 이후에 570 nm에서 비색정량하였다.

#### 8. peptide 함량 측정

시료 된장의 peptide 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법으로 측정하였다. 즉, 된장 1 g에 증류수 20 ml을 가하여 1분간 균질화 한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 filtration (Toyo filter paper No.1)한 용액에 최종 농도 5%가 되도록 TCA를 첨가하여 제단백 후 상등액을 시료용액으로 사용하였다. 시료용액을 銅 존재하에서 발색한 peptide + Tyr + Phe값에서 銅 비존재하에서 발색한, Tyr + Phe 유래의 값을 뺀 값을 peptide량으로 하였고 peptide의 함량은 Bovine serum albumin (BSA) 등량으로 환산하였다.

#### 9. 효소활성도의 측정

시료 된장의 효소활성도는 제 1장, 2절, 4의 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

#### 10. 실험동물사육 및 혈압측정

##### 1) 실험동물의 사육

자연발증고혈압쥐 (spontaneously hypertensive rat, SHR)는 Charles River Breeding Laboratories, Inc. (in Japan)에서 구입하여 삼성생명과학연구소 실험동물연구실의 SPF (specific pathogen-free animals) system에서 사육하면서 실험에 사용하였다. 실험동물실의 전반적인 운영은 미국 NIH 동물실험의 가이드라인인 "Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals” 및 “Institutional Administrator’s Manual for Laboratory Animal Care and Use”에 준하였다.

## 2) 혈압강하물질의 투여 및 혈압측정

경구투여시 시료는 Oral Zonde를 이용하여 투여하였으며, SHR은 12주령 이상으로 수축기 혈압이 200 mmHg이상인 수컷을 선별하여 사용하였다. 대조군에는 saline을 같은량 투여하였다. 초기혈압은 투여 전일과 당일 투여직전, 2회 측정된 평균치로 하였고, 시료 투여 후 1, 3, 5, 7시간에 각각의 혈압을 측정하였다.

홍국된장의 장기투여 실험에는 4주령의 SHR을 실험실에서 1주간 식이적용 시킨 후 각 군당 8마리씩 random하게 나누어 사용하였다. 식이내의 식염농도가 1 %가 되도록 30 % 홍국된장과 일반된장을 사료에 혼합하고, 대조군으로는 일반사료에 식염을 1 % 첨가하여 사용하였고, 각 실험식이를 5주령째부터 7주간 섭취시킨 후 다시 2주간은 일반사료로 식이를 전환하였으며 실험기간동안 매 1주일마다 1회씩 같은 시간에 혈압과 체중을 측정하였다.

혈압측정은 외부로부터의 전자파에 의한 측정장애를 원천적으로 차단하기 위하여 RF Shield room내에서 실시하였다. SHR을 37℃로 조절된 항온조에 넣어 약 15분간 안정화 시킨 다음 꼬리동맥으로부터 미동맥혈압 측정장치 (Muromachi Kikai MK-1000, Japan)를 사용하여 수축기혈압 (systolic blood pressure)을 측정하였다. 측정은 3회 반복 실시하여 그 평균값을 측정치로 하였다.

## 11. 통계분석

동물실험은 모두 6회 이상의 측정치를 평균하여 비교하였고, SAS

program을 이용하여 통계처리 하였다. 경구 투여한 실험에서는 초기에 대해 투여후 각 시간별로 paired t-test를 수행하였고, 장기투여시의 체중 및 혈압은 분산분석 (ANOVA)을 하였다. 분산분석에 의해 차이가 유의적인 경우는 Student Newman Keul의 다중비교법에 의하여  $\alpha=0.05$  수준에서 검정하였다.

### 제 3절. 결과 및 고찰

#### 1. 홍국의 혈압강하효과

##### 1) 홍국의 균종에 따른 혈압강하효과

홍국의 혈압강하효과가 특정 홍국 균주에서 특징적으로 나타나는 것인지, *Monascus* 속 홍국균의 특성인지는 확인하기 위하여 홍국 균종별로 제조한 7종의 홍국의 ethanol 추출물을 SHR 체중 1 kg당 10 mg을 경구투여하고 혈압의 변화를 측정하였다 (Table 9).

실험결과 서로 다른 7가지 균종의 균주로 제조한 홍국 추출물을 투여한 모든 실험군에서 투여 1시간 후부터 7시간까지 투여전과 비교하여 지속적으로 유의적인 혈압강하 효과가 관찰되었으며 saline을 투여한 대조군에서는 시간경과에 관계없이 혈압의 변화가 없었던 것으로 나타났다. 지금까지 혈압강하 효과가 보고된 홍국은 *M. pilosus*와 *M. anka*로 제조한 홍국에 국한되어 있었으나 (Kiyoshi et al. 1995, Tsuji et al. 1993, Tsuji et al. 1992a, 1992b, 1992c, 1992d, 1992e, Kohama et al. 1987) 홍국의 혈압강하효과는 특정의 *Monascus* 균주에서만 발현되는 작용이 아니라 *Monascus*속의 균주 모두가 나타내는 특성임을 알 수 있었다.

Table 9. Changes of the systolic blood pressure in SHR after an oral administration of Fermented rice with 7 different speceis *Monascus*

sample	age (wks)	body weight(g)	time after administration				
			0hr	1hr	3hr	5hr	7hr
control	20	331±23	209±5 <sup>1)</sup>	210±7	211±7	209±4	207±5
2. <i>M.anka</i> IFO6540	22	345±19	228±4	213±4 <sup>2)</sup>	215±2*	206±2*	206±5*
4. <i>M.araneosus</i> KFRI00371	16	277±20	219±2	207±4*	205±4*	204±4*	205±4*
7. <i>M.kaoliang</i> ATCC46596	23	331±22	229±2	213±3*	215±3*	218±4*	216±2*
12. <i>M.pilosus</i> IFO 4520	14	278±11	216±4	207±5	203±3*	195±4*	199±3*
27. <i>M.purpureus</i> ATCC36114	22	356±12	222±1	218±2	214±3	206±4*	203±3*
31. <i>M.ruber</i> IFO9203	25	350±17	218±2	200±2*	197±3*	197±3*	201±2*
36. <i>M.sp.</i> ATCC16437	17	303±15	217±1	200±1*	202±3*	199±3*	200±3*

<sup>1)</sup> mean±SEM

<sup>2)</sup> significantly different at  $\alpha=0.05$

2) 홍국의 색도와 혈압강하효과

홍국의 색소와 혈압강하효과와의 관계를 조사하기 위하여 거의 색을 띠지 않는 즉, H 값이 큰 시료중 *M. pilosus* IFO 4487로 제조한 홍국의 ethanol extract를 SHR에 경구투여하여 투여 1, 3, 5, 7시간 후의 혈압변화를 관찰하였다 (Table 10).

색소가 거의 형성되지 않는 홍국에서도 SHR의 혈압을 약 10 mmHg에서 최고 20 mmHg까지 저하시키는 효과가 나타났으며 그 효과는 본 실험에서 측정된 시간범위내에서, 즉 1시간에서 7시간에 이르기까지 지속적으로 나타났다. saline을 투여한 대조군에서는 시간경과에 따른 혈압의 변화가 관찰되지 않았다.

Table. 10. Changes of the systolic blood pressure in SHR after an oral administration of fermented rice with *M.pilosus* IFO 4487

sample	age (wks)	body weight(g)	time after administration				
			0hr	1hr	3hr	5hr	7hr
saline	20	331±23	209±5 <sup>1)</sup>	210±7	211±7	209±4	207±5
11. <i>M.pilosus</i> (IFO4487)	17	294±22	229±1	214±3 <sup>*2)</sup>	219±4	215±3*	209±5*

<sup>1)</sup> mean±SEM

<sup>2)</sup> significantly different at  $\alpha=0.05$

### 3) 홍국의 혈압강하 성분

홍국의 혈압강하효과가 균종에 따른 특성이 아닌 *Monascus* 속 균주 모두의 특성이고 색소와도 관련없는 물질임이 밝혀졌다. 따라서 홍국의 혈압강하 성분의 특성을 구명하기 위하여 *M. ruber* IFO 32318 균주를 선택하여 홍국을 제조하고 혈압강하성분을 물, ethylacetate, n-butanol로 Fig. 2-1과 같은 방법으로 분획하였다. 분획한 각 획분을 감압건고한 후 saline에 녹여 SHR의 체중 kg당 2 mg씩 경구투여하고 투여 1, 3, 5, 7시간후에 혈압의 변화를 측정하였다. 세 가지 획분중 물획분만이 경구투여후 시간경과에 따른 혈압강하효과를 나타내었고, ethylacetate와 n-butanol획분에서는 혈압강하효과가 나타나지 않았다 (Table 11). 따라서 홍국의 혈압강하효과 성분은 ethanol에 의해서 추출되며 물에는 녹으나 ethylacetate나 n-butanol에 녹지않는 물질이라는 것을 알 수 있었다.

Table 11. Hypotensive activity in water fraction of fermented rice with *Monascus*

sample	age (wks)	body weight(g)	time after administration				
			0hr	1hr	3hr	5hr	7hr
water	21	313±11	215±1 <sup>1)</sup>	207±2 <sup>*2)</sup>	206±2*	204±3*	198±2*
AcOEt	22	326±20	212±3	208±4	214±5	208±2	206±5
BuOH	21	322±20	212±3	209±3	205±4	209±4	204±5

1) mean±SEM

2) significantly different at  $\alpha=0.05$

#### 4) 홍국의 혈압강화성분의 중량

홍국의 70 %와 100 % ethanol 추출물을 분획하여 얻어진 WP의 중량은 모든 균주에서 70 % ethanol로 추출한 경우에 100 % ethanol로 추출시보다 더 많았다. 그러나 그 차이는 균주마다 달라서 *M. anka* IFO4478은 70 %와 100 % ethanol 추출시의 중량이 거의 유사하였으나 *M. pilosus* IFO8201은 70 % ethanol로 추출시 100 % ethanol로 추출시의 70배의 WP가 생성되었다 (Table 12). 이는 물에 녹는 성분의 양의 차이에 의한 것으로 추정된다.

WP의 중량역시 몇몇 균주를 제외하고는 *M. kaoliang*, *M. purpureus*는 많았고, *M. pilosus*, *M. ruber*는 적어서 1장의 다른 특성들과 유사하였다. *M. anka*는 70 % ethanol로 추출시는 3균주가 모두 다른 함량을 나타내었으나, 100 % ethanol로 추출시에는 *M. anka* IFO4478과 IFO30873은 유사하였고 IFO6540은 두 균주의 약 절반의 양을 보였다. 70 % ethanol로 추출시의 WP의 양은 *M. ruber* IFO7537이 가장 적었고, *M. purpureus* ATCC48162가 가장 많았으나, 100 % ethanol로 추출시에는 가장 많은 균주는 70 % ethanol 추출시와 같았지만 가장 적은 균주는 *M. pilosus* IFO8201로 나타나 차이를 보였다. 따라서 균주마다 물에 녹는 성분의 함량과 ethanol농도에 따른 추출율에 차이가 있는 것으로 생각되며 이는 1장의 Table 3의 결과와 일치하는 것이다.



Table 12. Content of water phase/fermented with *Monascus*(WP/FRM)

Sample	70% EtOH/WP	100% EtOH/WP
1. <i>M.anka</i> (IFO 4478)	0.3603	0.3232
2. <i>M.anka</i> (IFO 6540)	0.9123	0.1734
3. <i>M.anka</i> (IFO 30873)	1.2559	0.3896
4. <i>M.araneosus</i> (KFRI 00371)	0.2663	0.0386
5. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46592)	0.8208	0.2166
6. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46595)	1.1011	0.4122
7. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46596)	0.8625	0.4039
8. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46597)	0.2243	0.0431
9. <i>M.kaoliang</i> (ATCC 46598)	0.9945	0.2444
10. <i>M.pilosus</i> (IFO 4480)	0.1316	0.0244
11. <i>M.pilosus</i> (IFO 4487)	0.0247	0.0031
12. <i>M.pilosus</i> (IFO 4520)	0.1928	0.0084
13. <i>M.pilosus</i> (IFO 4521)	0.0939	0.0159
14. <i>M.pilosus</i> (IFO 4525)	0.1130	0.0033
15. <i>M.pilosus</i> (IFO 8201)	0.0630	0.0009
16. <i>M.pilosus</i> (ATCC 16368)	0.1982	0.0218
17. <i>M.purpureus</i> (IFO 4482)	0.1683	0.0138
18. <i>M.purpureus</i> (IFO 4484)	0.6303	0.2706
19. <i>M.purpureus</i> (IFO 4485)	0.8360	0.1624
20. <i>M.purpureus</i> (IFO 4486)	0.8659	0.2270
21. <i>M.purpureus</i> (IFO 4513)	0.7761	0.1381
22. <i>M.purpureus</i> (IFO 32228)	0.8728	0.1809
23. <i>M.purpureus</i> (IFO 32316)	0.5180	0.3324
24. <i>M.purpureus</i> (ATCC 6405)	0.5343	0.1425
25. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16427)	1.0258	0.6290
26. <i>M.purpureus</i> (ATCC 16436)	0.0468	0.0037
27. <i>M.purpureus</i> (ATCC 36114)	0.3464	0.1333
28. <i>M.purpureus</i> (ATCC 48162)	1.3275	0.6599
29. <i>M.ruber</i> (IFO 4492)	1.0850	0.1155
30. <i>M.ruber</i> (IFO 7537)	0.0367	0.0072
31. <i>M.ruber</i> (IFO 9203)	0.0461	0.0059
32. <i>M.ruber</i> (IFO 31842)	0.0430	0.0060
33. <i>M.ruber</i> (IFO 32317)	0.1110	0.0059
34. <i>M.ruber</i> (IFO 32318)	0.0795	0.0293
35. <i>M.sp.</i> (ATCC 16435)	0.3343	0.1464
36. <i>M.sp.</i> (ATCC 16437)	1.0072	0.0357
37. <i>M.vitreus</i> (IFO 4532)	0.3989	0.1070

## 2. 홍국식품(된장)의 특성 및 혈압강하효과

37종의 홍국균주중 색소생성능력이 매우 뛰어나고 다른 균주들에 비해 색소생성속도가 빠른 것으로 나타난 *M. ruber* IFO 32318로 제조한 홍국을 이용하여 된장을 제조하였으며 제조한 홍국된장의 이화학적 특성 및 혈압강하 기능을 조사하였다.

### 1) 홍국식품의 숙성중 이화학적 성분변화

#### (1) 수분, pH 및 적정산도

숙성과정중 수분의 함량은 약 50-55 %로 시료 된장들간에 큰 차이가 나타나지 않았고 (Table 13) pH는 숙성에 따라 전반적으로 낮아지는 경향을 나타내었으며 각 구간에는 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 적정산도는 숙성과정 중 유기산의 축적으로 인하여 점차 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3).

Table. 13. Changes in water, pH, titratable acidity during *doenjang* fermentation

	Sample	water(%)	pH	titratable acidity(ml)
D+1	control	51.09±0.08	6.28±0.03	1.14±0.04
	10 %	51.04±0.52	6.35±0.02	1.00±0.00
	20 %	51.44±0.10	6.38±0.01	0.96±0.01
	30 %	51.21±0.21	6.37±0.01	0.93±0.05
D+5	control	50.99±0.40	6.08±0.03	1.72±0.07
	10 %	52.24±0.17	6.09±0.12	1.65±0.09
	20 %	52.49±0.37	6.03±0.07	1.70±0.02
	30 %	52.78±0.30	5.95±0.03	1.75±0.00
D+10	control	48.00±0.47	5.95±0.03	2.24±0.04
	10 %	49.99±0.75	5.87±0.04	2.14±0.04
	20 %	51.68±1.76	5.93±0.03	2.04±0.04
	30 %	50.50±0.49	5.98±0.06	1.93±0.05
D+15	control	49.44±0.46	6.10±0.01	2.19±0.02
	10 %	50.26±0.13	6.11±0.04	2.09±0.01
	20 %	52.23±2.34	6.13±0.04	2.03±0.03
	30 %	50.52±0.09	6.17±0.02	1.90±0.04
D+20	control	51.48±0.26	5.91±0.04	2.56±0.05
	10 %	52.23±0.16	6.07±0.04	2.32±0.06
	20 %	52.69±11.45	6.09±0.02	2.23±0.06
	30 %	53.10±0.07	6.05±0.03	2.19±0.02
D+25	control	50.87±0.34	5.93±0.03	2.55±0.05
	10 %	52.77±0.09	6.05±0.01	2.33±0.05
	20 %	53.09±0.22	6.02±0.05	2.29±0.02
	30 %	53.38±0.15	6.06±0.03	2.22±0.07
D+30	control	52.61±0.29	6.07±0.03	2.21±0.06
	10 %	53.28±0.11	6.11±0.05	2.15±0.11
	20 %	53.49±0.24	6.03±0.02	2.17±0.02
	30 %	54.06±0.11	5.93±0.12	2.15±0.06
D+45	control	53.44±0.39	5.75±0.02	2.55±0.06
	10 %	53.79±0.22	5.85±0.07	2.36±0.07
	20 %	54.81±0.26	5.86±0.02	2.36±0.07
	30 %	54.46±0.21	5.78±0.11	2.33±0.05
D+60	control	52.67±8.40	5.47±0.05	3.00±0.10
	10 %	53.81±0.22	5.42±0.04	2.97±0.06
	20 %	54.74±0.43	5.65±0.03	2.72±0.06
	30 %	55.26±0.52	5.28±0.07	2.93±0.05

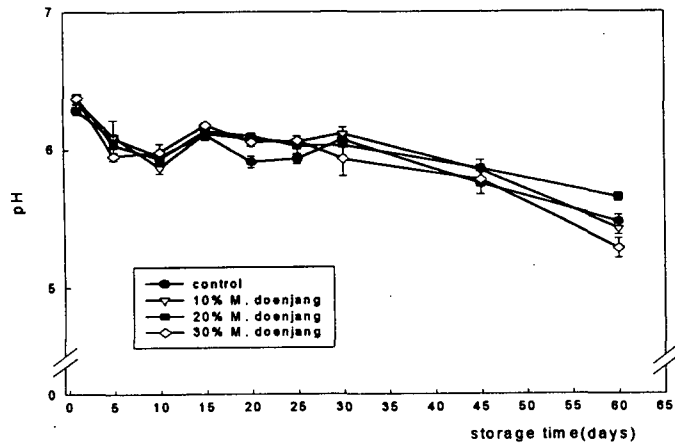


Fig. 2. Changes in pH during *doenjang* fermentation

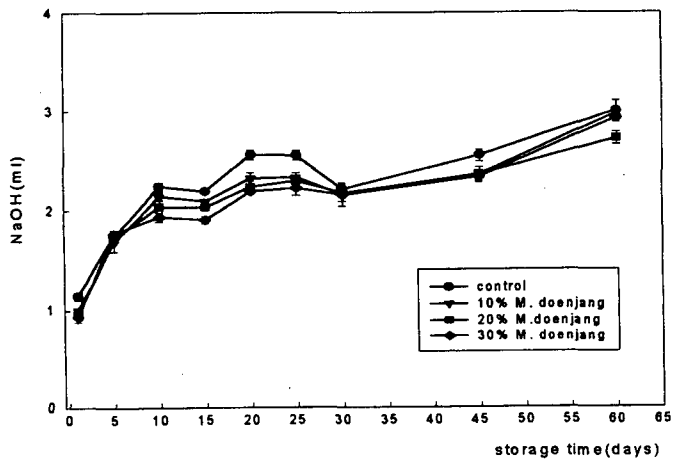


Fig. 3. Changes in titratable acidity during *doenjang* fermentation

## (2) 된장 숙성중 색도의 변화

색도 중 L값은 숙성기간 전반에 걸쳐 계속 감소하는 경향 (Fig. 4)을 나타내었고, 실험구간에 차이는 관찰되지 않았다. 숙성기간이 경과할수록 a 값은 전반적으로 계속 증가하고 (Fig. 5), b값은 30일까지는 증가하다가 30일이 지나면서 약간 감소하거나 일정하게 유지되는 경향을 나타내었다 (Fig. 6). Chroma 값은 숙성 중 감소하였고 (Fig. 7), H 값은 감소하는 경향을 보였는데, 특히 H 값은 숙성 30일까지는 홍국을 많이 첨가할수록 값이 낮은 경향을 보여 홍국의 붉은 색소에 기인한 차이가 나타나다가 30일이 지나면서 대조구에서 H 값이 급격히 감소하여 홍국을 첨가한 된장과 차이가 거의 없어졌다 (Fig. 8). 대조구에서 H 값이 감소하는 것은 된장숙성 중 일어나는 Maillard reaction, enzymatic browning reaction에 기인한 색상의 변화에 의한 것으로 생각되나, 홍국을 첨가한 경우 그 감소가 덜한 원인에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 14. Changes of color value during *doenjang* fermentation

Sample		L	a	b	Chroma	H
D+1	control	57.17±0.58	4.52±0.12	21.63±0.53	26.15±0.55	78.20±0.39
	10 %	55.91±0.36	5.01±0.13	20.15±1.16	25.16±1.24	76.03±0.62
	20 %	54.96±0.29	6.08±0.30	20.63±0.71	26.71±0.44	73.56±1.30
	30 %	55.05±1.08	6.20±0.59	20.52±1.55	26.72±0.97	73.09±2.61
D+5	control	53.01±0.28	5.41±0.13	22.59±0.64	28.00±0.70	76.52±0.37
	10 %	52.17±0.95	6.22±0.12	21.08±0.53	27.30±0.45	73.55±0.65
	20 %	51.83±0.15	7.11±0.21	21.29±0.33	28.40±0.20	71.54±0.74
	30 %	51.16±0.55	8.46±0.15	20.40±0.42	28.86±0.34	67.48±0.70
D+10	control	51.48±1.03	4.85±0.04	20.19±0.84	25.05±0.88	76.47±0.44
	10 %	51.77±1.28	5.18±0.14	19.37±1.01	24.55±0.91	75.01±1.07
	20 %	50.91±0.32	6.51±0.12	20.04±0.10	26.54±0.07	72.01±0.37
	30 %	51.06±0.79	6.69±0.50	19.80±0.25	26.49±0.74	71.34±1.08
D+15	control	50.30±0.22	5.29±0.18	21.37±0.22	26.66±0.31	76.11±0.44
	10 %	50.28±0.61	6.26±0.27	21.00±0.37	27.27±0.63	73.40±0.41
	20 %	50.69±0.16	7.00±0.23	20.58±0.77	27.59±0.59	71.19±1.16
	30 %	49.80±0.54	8.72±0.58	19.64±0.92	28.36±0.46	66.01±2.32
D+20	control	48.73±1.10	6.61±0.20	21.59±1.35	28.20±1.51	75.79±0.73
	10 %	49.36±0.27	7.16±0.18	20.52±0.86	27.68±1.00	73.52±0.52
	20 %	48.61±0.34	8.42±0.18	20.60±0.29	29.02±0.19	70.40±0.70
	30 %	48.53±0.10	9.04±0.49	19.59±0.90	28.64±1.39	67.77±0.23
D+25	control	47.41±0.10	6.99±0.16	20.67±0.67	27.67±0.84	74.08±0.17
	10 %	48.04±0.28	7.96±0.48	21.59±0.37	29.55±0.69	72.48±1.10
	20 %	47.05±0.62	9.46±0.50	20.45±0.85	29.91±1.04	67.70±1.38
	30 %	46.60±0.49	9.70±0.27	19.93±0.77	29.63±0.63	64.03±1.34
D30	control	47.75±0.39	7.55±0.14	22.05±0.38	29.60±0.49	71.11±0.19
	10 %	48.42±0.09	7.98±0.25	21.61±0.20	29.58±0.28	69.74±0.63
	20 %	47.37±0.96	9.07±0.78	20.83±0.80	29.90±0.47	66.44±2.48
	30 %	47.03±0.83	10.17±0.50	19.83±0.44	30.00±0.15	62.84±1.63
D+45	control	44.60±0.33	9.73±0.35	20.66±0.97	30.39±1.32	64.78±0.28
	10 %	45.73±0.31	10.34±0.53	21.74±0.53	32.08±1.06	64.58±0.61
	20 %	45.96±0.37	11.20±0.42	22.14±0.47	33.35±0.85	63.17±0.57
	30 %	46.08±0.03	10.97±0.30	21.46±0.15	32.43±0.44	62.92±0.49
D+60	control	42.27±0.34	11.95±0.13	21.24±1.02	33.20±1.13	60.61±0.97
	10 %	42.68±1.02	11.25±0.64	19.94±1.16	31.18±1.79	60.57±0.12
	20 %	42.79±0.14	12.24±0.13	21.02±0.46	33.26±0.58	59.79±0.33
	30 %	44.60±0.59	13.33±0.71	22.61±0.61	35.94±0.64	59.47±1.81

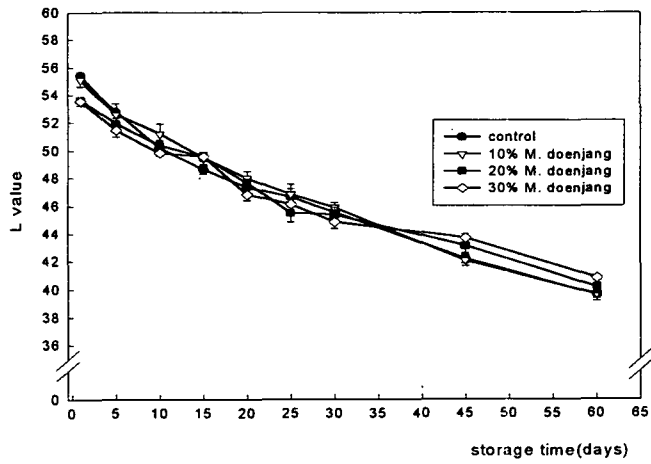


Fig. 4. Changes in color(L value) during *doenjang* fermentation

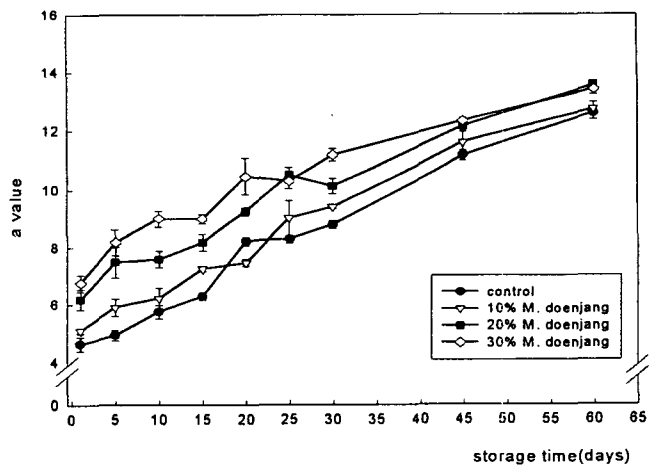


Fig. 5. Change in color(a value) during *doenjang* fermentation

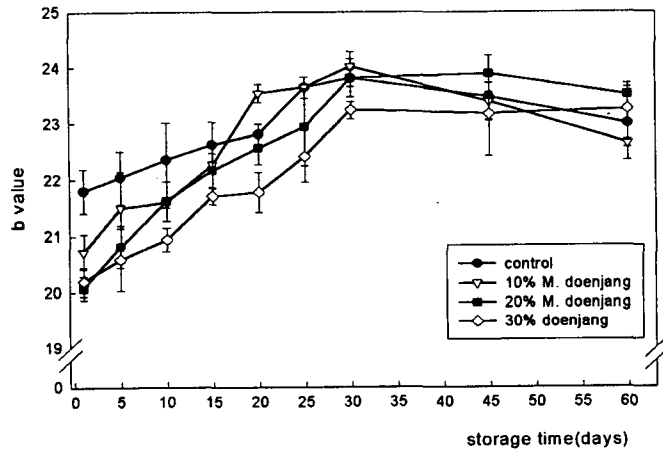


Fig. 6. Changes in color (b value) during *doenjang* fermentation

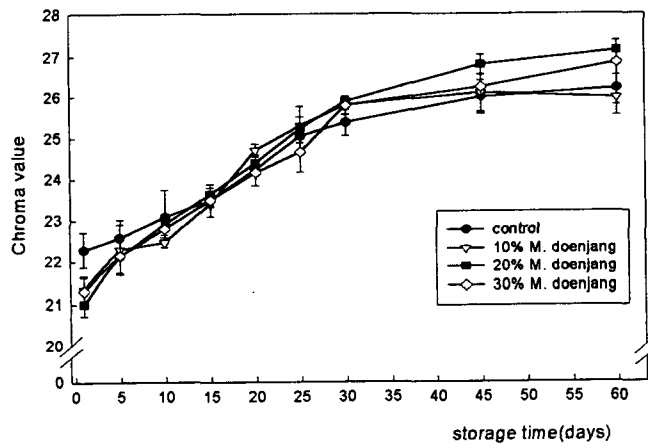


Fig. 7. Changes in color(Chroma value) during *doenjang* fermentation



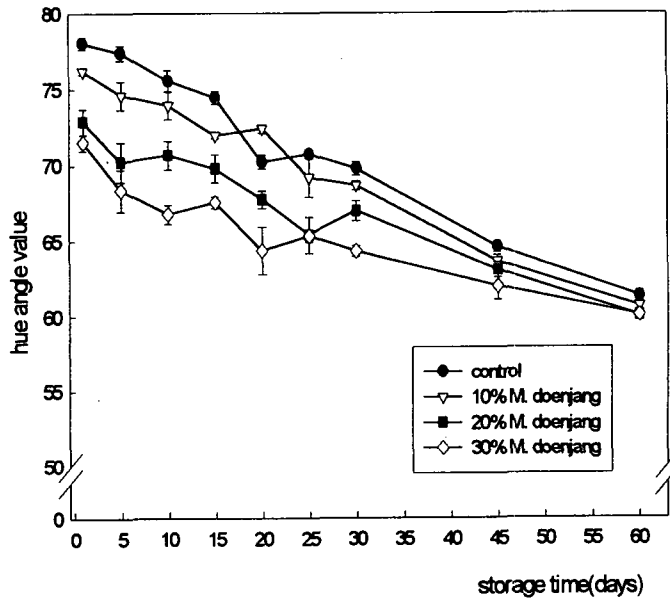


Fig. 8. Changes in color(hue angle value) during doerjang fermentation

### (3) 아미노태 질소의 변화

된장이나 고추장의 숙성중 구수한 맛을 나타내는 아미노태질소함량은 숙성중 단백질의 분해에 의해 생성되는 성분으로 이를 측정함으로써 숙성 정도를 가늠할 수 있다 (Chung et al., 1999). 각 된장의 아미노태질소는 숙성기간 전반에 걸쳐 지속적인 증가를 보이거나 특히 0 - 10일 사이에 가장 급격히 증가하고 그 이후에는 점차 증가세가 완만해졌다 (Table 15, Fig. 9). 각 실험군에 따른 차이는 관찰되지 않아서 된장 제조시 홍국을 첨가해도 숙성도에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

### (4) 환원당 함량의 변화

된장숙성중 나타나는 단맛은 glucose, fructose, maltose 등의 당류에 의해 나타나며, 이러한 당류의 전체적인 함량을 환원당으로 측정하여서 된장의 품질특성 중의 하나를 쉽게 파악할 수 있다. 숙성중 환원당의 함량은 0 - 5일 사이에 가장 급격히 증가한 후 아주 완만한 증가세를 보이다가 숙성 25일에 최고약 12 %의 함량을 나타내고 25 - 30일에 급격하게 감소하여 거의 초기수준으로 낮아진후 큰 변화가 없었다 (Table 15, Fig. 10). 각 군간에도 큰 차이를 보이지 않아 홍국의 첨가시 된장숙성중 당류의 생성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각할 수 있다.

### (5) 유리아미노산 및 peptide의 함량의 변화

된장 저장중 유리 아미노산 및 peptide의 함량변화는 숙성 30일까지는 계속적으로 증가하다가 30일 이후에는 일정하게 유지되었다 (Table 15, Fig. 11, 12). 아미노태 질소함량 역시 초기에 증가하다가 후반기에는 증가가 완만해진 결과와 비교시 숙성초기의 protease의 활성이 더 왕성하다고 볼 수 있다. 다른 특성들과 마찬가지로 peptide와 유리 아미노산의 함량 역

시 각 시료간의 차이는 크게 나타나지 않는 것을 알 수 있었다.

(6) 된장 숙성중 효소활성도의 변화

산성 및 중성 protease의 활성은 된장의 숙성기간동안 초기에만 약간 증가하였다가 큰 변화없이 숙성 60일까지 활성이 지속되었고, 숙성기간동안 내내 산성 protease의 활성이 중성 protease활성에 비해서 높게 나타났다 (Table 16, Fig. 13, 14). 각 된장시료간의 차이는 크게 나타나지 않았으나 30% 홍국된장군이 대조구 된장에 비해 전 숙성기간동안 계속적으로 낮은 활성을 나타내었다.

Table 15. Changes of chemical properties during doenjang fermentation

Sample	Amino N.	reducing sugar (mg/g doenjang)	Free a.a. (mg/g doenjang)	peptide (g%)	
D+1	control	241.62±11.31	76.97±1.87	1.57±0.04	1.33±0.05
	10 %	197.28±14.65	77.17±0.99	1.43±0.06	1.25±0.00
	20 %	187.53±6.09	76.84±0.92	1.45±0.05	1.27±0.05
	30 %	187.53±2.30	65.97±1.35	1.38±0.02	1.27±0.03
D+5	control	444.22±26.70	110.61±1.18	2.97±0.04	1.53±0.02
	10 %	413.63±14.81	107.85±2.36	2.76±0.05	1.46±0.07
	20 %	424.27±9.31	100.95±1.28	2.86±0.01	1.47±0.04
	30 %	417.62±7.52	95.48±0.44	2.73±0.03	1.46±0.03
D+10	control	603.82±3.76	111.06±7.51	2.94±0.03	1.65±0.04
	10 %	574.12±4.28	104.88±3.03	2.94±0.11	1.51±0.05
	20 %	570.57±2.30	102.88±1.67	2.96±0.04	1.47±0.14
	30 %	547.07±6.56	101.31±2.63	2.99±0.20	1.51±0.05
D+15	control	662.34±18.81	114.00±2.75	3.52±0.09	1.69±0.04
	10 %	641.06±10.56	102.81±4.17	3.35±0.12	1.54±0.02
	20 %	632.19±11.62	102.94±4.75	3.31±0.04	1.55±0.09
	30 %	601.16±18.48	102.75±4.98	3.23±0.05	1.53±0.15
D+20	control	735.05±8.55	112.11±4.67	4.39±0.09	1.68±0.05
	10 %	719.09±6.14	109.81±8.27	4.46±0.02	1.57±0.04
	20 %	692.49±6.14	106.48±3.40	4.41±0.05	1.56±0.07
	30 %	681.40±6.69	103.89±3.32	4.16±0.03	1.56±0.07
D+25	control	771.40±11.59	119.00±4.29	4.54±0.11	1.72±0.05
	10 %	743.91±8.13	112.93±1.22	4.52±0.01	1.62±0.07
	20 %	734.16±8.09	110.85±3.81	4.36±0.02	1.59±0.06
	30 %	714.21±7.04	114.19±5.00	4.27±0.03	1.61±0.03
D+30	control	773.17±7.68	82.08±1.44	4.53±0.01	1.83±0.07
	10 %	735.05±16.95	73.97±4.15	4.40±0.05	1.72±0.02
	20 %	732.83±9.21	73.35±2.60	4.65±0.04	1.70±0.05
	30 %	725.29±18.06	73.28±5.85	4.34±0.07	1.71±0.07
D+45	control	813.96±1.33	61.33±0.86	4.55±0.22	1.81±0.08
	10 %	801.99±9.31	53.64±5.36	4.70±0.05	1.72±0.04
	20 %	796.23±5.38	53.91±15.06	4.60±0.09	1.62±0.02
	30 %	801.99±6.65	54.79±6.30	4.54±0.43	1.63±0.04
D+60	control	868.05±13.05	71.31±2.65	4.57±0.10	1.74±0.11
	10 %	876.47±16.18	59.87±4.79	4.69±0.04	1.59±0.02
	20 %	832.14±27.94	47.68±5.18	4.70±0.06	1.50±0.10
	30 %	846.32±11.99	73.26±12.39	4.55±0.09	1.57±0.05

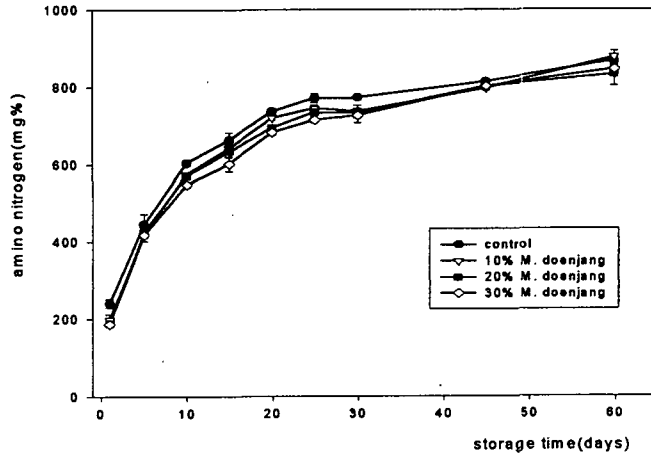


Fig. 9. Changes in amino nitrogen content during *doenjang* fermentation

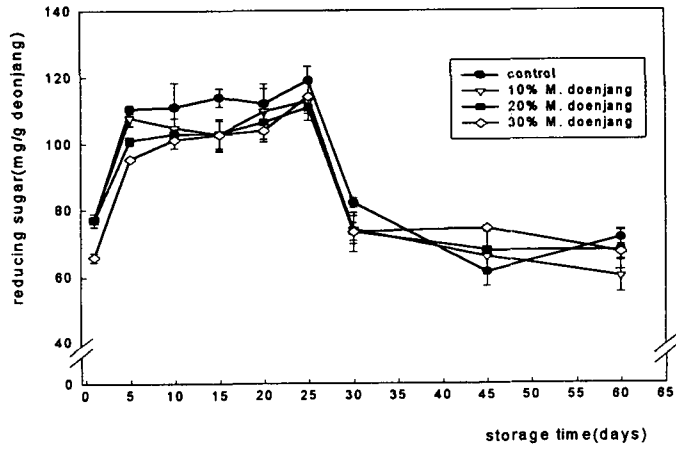


Fig. 10 Changes in reducing sugar during *doenjang* fermentation

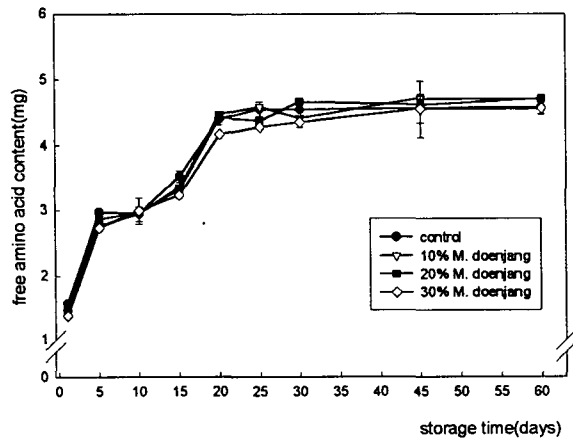


Fig. 11. Changes in free amino acid content during *doerjang* fermentation

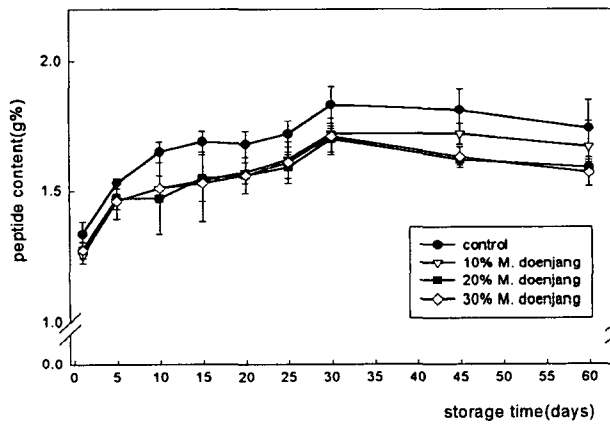


Fig. 12. Changes in peptide content during *doerjang* fermentation

Table 16. Changes of protease activity during doenjang fermentation

Sample		acidic protease (unit/g doenjang)	neutral protease (unit/g doenjang)
D+1	control	2.27±0.11	1.93±0.08
	10 %	2.22±0.09	1.90±0.03
	20 %	2.11±0.15	1.77±0.21
	30 %	2.16±0.11	1.77±0.04
D+5	control	2.47±0.23	1.95±0.14
	10 %	2.28±0.10	1.86±0.13
	20 %	2.27±0.16	1.78±0.08
	30 %	2.18±0.10	1.62±0.01
D+10	control	2.62±0.14	2.03±0.06
	10 %	2.17±0.05	1.70±0.07
	20 %	2.05±0.10	1.62±0.06
	30 %	2.01±0.04	1.45±0.04
D+15	control	2.37±0.07	1.76±0.07
	10 %	2.27±0.20	1.76±0.03
	20 %	1.93±0.18	1.44±0.06
	30 %	2.00±0.26	1.49±0.13
D+20	control	2.32±0.25	1.75±0.10
	10 %	2.31±0.28	1.73±0.18
	20 %	2.20±0.25	1.65±0.10
	30 %	2.02±0.21	1.45±0.12
D+25	control	2.37±0.15	1.76±0.07
	10 %	2.28±0.29	1.70±0.16
	20 %	2.08±0.26	1.56±0.12
	30 %	2.02±0.21	1.42±0.11
D+30	control	2.47±0.26	1.81±0.09
	10 %	2.28±0.24	1.68±0.11
	20 %	2.08±0.21	1.50±0.11
	30 %	2.09±0.17	1.47±0.07
D+45	control	2.28±0.22	1.63±0.09
	10 %	2.12±0.18	1.55±0.06
	20 %	1.96±0.11	1.38±0.13
	30 %	1.92±0.10	1.30±0.05
D+60	control	2.31±0.11	1.65±0.04
	10 %	2.19±0.09	1.50±0.02
	20 %	2.10±0.13	1.48±0.02
	30 %	1.94±0.15	1.31±0.04

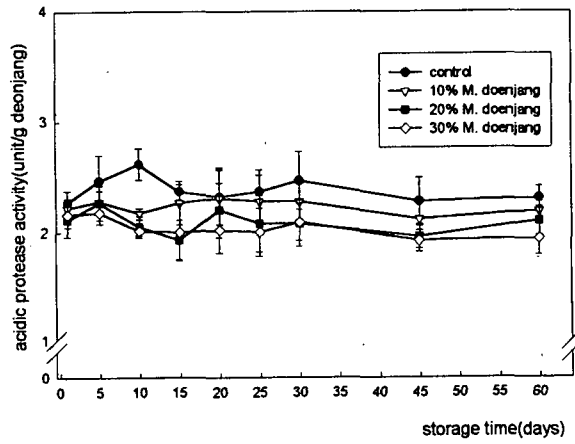


Fig. 13. Changes in acidic protease activity during *doenjang* fermentation

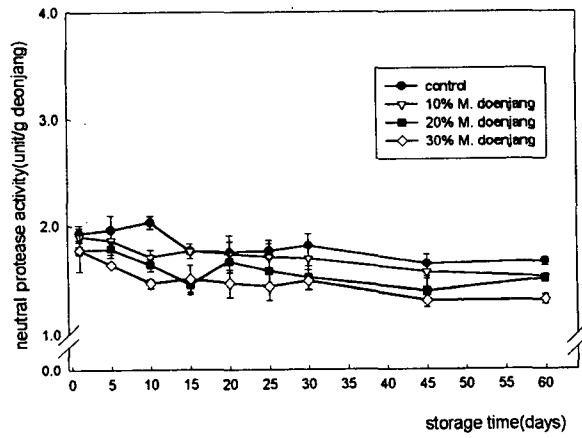


Fig. 14. Changes in neutral protease activity during *doenjang* fermentation



## 2) 홍국된장의 혈압강하효과

### (1) 홍국된장 투여시 체중의 변화

실험기간동안 각 군별로 체중에서 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 모든 군에서 계속적으로 체중의 증가가 유지되었다 (Table 17, Fig. 15). 즉, 식이중에 된장을 투여시 실험동물의 성장에 아무런 영향을 미치지 않았고, 홍국된장을 식이로 섭취하는데에 문제가 없었다.

### (2) 홍국된장 투여시 혈압의 변화

SHR은 출생 후 약 12주까지 혈압이 계속적으로 상승되나 12주가 지나면 200 mmHg으로 유지된다. 본 실험에서는 혈압의 측정이 가능한 가장 어린 4주령의 SHR을 분양받아 혈압의 상승이 완료되는 12주령까지 실험식이를 투여하였다. 식이에 된장을 혼합하기 전에는 대조군과 30 % 홍국된장군 사이에는 혈압에 차이가 없었고, 실험기간 동안 계속적으로 3군 모두 혈압이 상승하였으나, NaCl 대조군과 일반된장군에 비해 30 % 홍국된장을 투여한 군에서는 혈압의 상승이 억제되어 대조군, 일반된장군과 유의적인 차이를 나타내었다 (Table 18, Fig. 16). 이 차이는 실험식이를 투여하는 기간동안 계속되다가 다시 일반사료로 전환시 바로 다른 2군과 같은수준으로 혈압의 증가가 나타났다. 따라서 홍국된장 투여군에서 성장중 혈압의 증가가 억제된 것이 홍국의 혈압강하효과에 의한것이라는 것을 추정할 수 있었다. 이 결과는 Tsuji et al. (1992b)이 홍국식품의 투여로 SHR의 혈압이 저하된다는 결과와도 일치하며, 홍국이 혈압강하효과를 가지고 있고 이를 식품에 적용시에도 이효과는 소멸되는 것이 아니라 계속 유지된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 홍국을 이용하여 혈압강하 효과를 갖는 기능성 식품의 제조가 얼마든지 가능할 것으로 보이며 이에 대해 계속적으로 많은 연구가

이루어져야 된다고 사료된다.

Table 17. Changes of body weight during experimental period

	initial	1wk	2wks	3wks	4wks	5wks	6wks	7wks	p-1wk <sup>1)</sup>	p-2wks
control	93±3 <sup>2)</sup>	127±5	143±5	197±8	218±11	242±16	252±17	263±20	273±22	286±22
Doenjang	90±8	124±7	139±9	186±12	212±11	233±12	245±10	256±10	267±9	278±12
M- Doenjang	90±6	126±5	142±6	187±13	211±14	225±13	235±13	246±14	258±12	269±11

1) post experimental diet

2) mean±SEM

Table 18 Changes of systolic blood pressure during experimental period

	initial	1wk	2wks	3wks	4wks	5wks	6wks	7wks	p-1wk <sup>1)</sup>	p-2wks
control	123±1 <sup>2)</sup> a	139±4 <sup>a</sup>	158±6 <sup>a</sup>	172±6 <sup>a</sup>	182±6 <sup>a</sup>	194±12 <sup>a</sup>	204±9 <sup>a</sup>	223±10 <sup>a</sup>	225±13 <sup>a</sup>	216±13 <sup>a</sup>
Deonjang	110±3 <sup>b**3)</sup>	133±4 <sup>a</sup>	154±7 <sup>a</sup>	165±5 <sup>a</sup>	178±9 <sup>a</sup>	195±12 <sup>a</sup>	208±12 <sup>a</sup>	219±8 <sup>a</sup>	214±5 <sup>a</sup>	224±14 <sup>a</sup>
M- Deonjang	120±3 <sup>a</sup>	137±5 <sup>a</sup>	145±6 <sup>b</sup>	154±5 <sup>b***</sup>	162±7 <sup>b***</sup>	173±12 <sup>b*</sup>	184±10 <sup>b**</sup>	194±6 <sup>b***</sup>	212±11 <sup>a</sup>	217±7 <sup>a</sup>

1) post experimental diet

2) mean±SEM

3) \*, \*\*\*, different at  $\alpha=0.05$ , 0.001, respectively

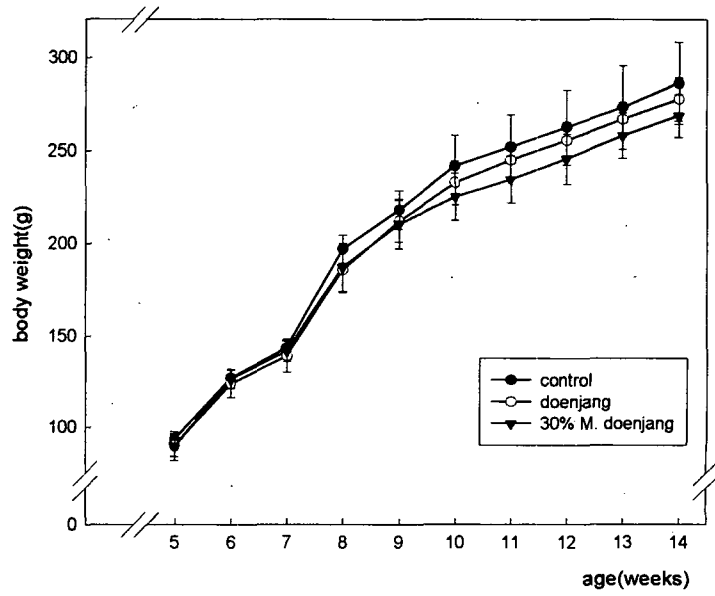


Fig. 15. Changes of body weight in SHR fed experimental diet for 7 weeks

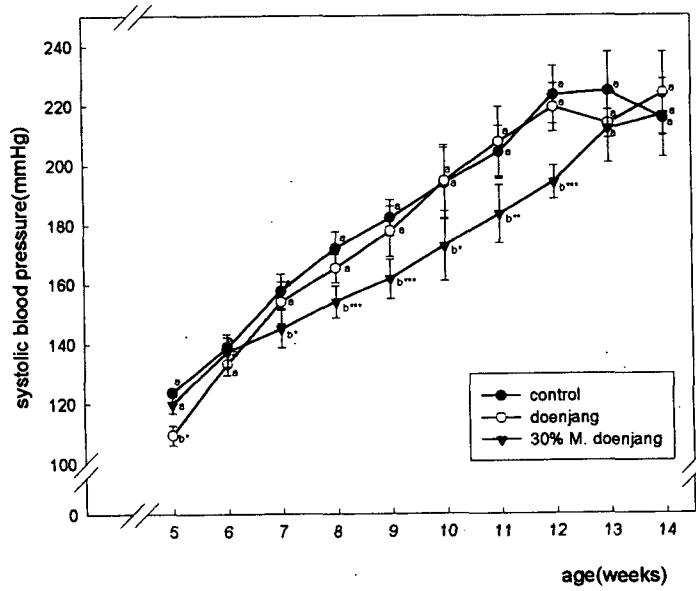


Fig. 16. Changes of systolic blood pressure in SHR fed experimental diet for 7 weeks

## 제 3장 홍국의 혈압강하 기작구명

### 제 1절 서설

홍국이 혈압강하효과를 갖는다는 것은 여러 연구들에서 증명되었다. 본 실험에서도 제 2장에서 홍국이 혈압강하작용을 가지며, 이효과는 균주에 의한 특성이 아니라 *Monascus*속 균주들 모두의 특성이며, 색도와도 관계가 없다는 것을 밝혔고, 홍국의 추출물중 물획분에 의해서 나타난다는 결과를 얻었다. 또한 홍국을 이용하여 식품을 제조하여 실험동물에 투여시에도 혈압강하효과가 있음을 밝혀서, 이를 이용한 기능성 식품의 제조가 가능할 것이라는 것을 알 수 있었다.

현재까지는 홍국이 혈압강하효과를 갖는다는 사실이 SHR에의 경구투여 실험을 통해서만 증명되어졌고, 그 기작이 단지 ACE (angiotensin converting enzyme)의 저해제가 아니라는 것만 밝혀져 있다. 또, 혈압강하효과를 갖는 물질로 *M. pilosus* IFO 4520 균주에서 GABA와 acetylcholine만이 분리 확인되었을 뿐, 아직까지 정확한 기전이나 물질에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 제 3장에서는 제 2장에서 사용한 *M. ruber* IFO 32318 균주에서 추출한 혈압강하효과물질이 어떠한 경로로 혈압을 강하시키는지를 알아보기 위하여 SHR을 이용한 경구투여 실험이 아닌 in vitro 실험으로 혈관의 운동성에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다.

## 제 2절. 실험재료 및 방법

### 1. 혈압강하 물질의 추출 및 분획.

제 2장의 Fig. 1과 같은 방법으로 수행하였다.

### 2. 혈관이완작용의 측정

Rat은 수컷 Sprague-Dawley rats (200-250 g)을 사용하여 기절시킨 후 즉시 방혈하고 하행흉부대동맥 (thoracic aorta)을 분리하여 길이 약 2-3mm의 ring형태로 잘랐으며 일부 실험에서는 physiological salt solution (PSS) 용액에 담근 솜을 사용하여 혈관의 내부를 부드럽게 문질러서 내피를 제거한 후 사용하였다. 잘라낸 혈관은 4 ml의 PSS를 포함하는 organ bath에 현수시켰다. 혈관을 bath에 현수시킨 후 1 g의 장력으로 60분간 평형화 시킨후 70 mM KCl 용액에 반응이 안정화될때까지 반복적으로 노출시켰다. 실험에 사용한 PSS의 조성은 NaCl 136.9, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 23.8, glucose 5.5, 그리고 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.01 mM이었다. 고농도의 K<sup>+</sup> 용액은 NaCl을 동일한 농도의 KCl로 대체하였다. tissue bath의 용액은 37°C, pH 7.5, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture 통기상태로 유지시켰다. 혈관의 장력은 force-displacement transducer (FT-03, Grass, RI, USA)가 연결된 polygraph system (RPS212, Grass, RI, USA)과 computer analyser (Power Lab 400, MacLab system, Castle Hill, Australia)로 측정하였다.

### 3 시약

실험에 사용한 norepinephrine, indomethacin, atropin, GABA 및

LNNA는 Sigma Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, 그외의 시약은 특급을 사용하였다.

#### 4. 통계분석

모든 실험은 4회이상 반복수행하였고, 결과는 SAS program을 이용하여  $\alpha=0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 홍국 대사산물이 혈관운동성에 미치는 영향

#### 1) 내피세포와 혈관이완작용

혈관의 내피세포를 제거한 경우와 제거하지 않은 경우에서 모두 WP/FRM은 혈관에 대해 tension을 발생시키지 않았다 (data was not shown). 내피세포가 존재하는 혈관에서는 300 nM NE로 수축시킨 후 WP/FRM 1 mg/ml을 첨가시 약 3분 후에 거의 100 %의 이완작용이 나타났으며 혈관평활근은 다시 수축되었으나 이 수축 역시 시간의 경과에 따라 이완되었다. 그러나 내피세포를 제거한 혈관에서는 이러한 일과성이완 (phasic relaxation)은 관찰되지 않았다 (Fig. 17). 따라서 이후의 실험은 내피세포가 손상되지 않은 혈관을 주로 사용하였다. 내피세포를 제거하지 않은 혈관에 WP/FRM을 농도별로 투여시의 결과는 Fig. 18에 나타내었다. 투여한 WP/FRM의 농도를 0.1, 0.3, 1 mg으로 증가시키지는 농도에 비례적으로 혈관의 이완율이 증가 되었으나 1 mg과 3 mg 투여시에는 차이가 관찰되지 않았다. 이는 1 mg 투여시에 이미 거의 100 %의 혈관이완을 나타내었기 때문으로 생각되며, 따라서 WP/FRM은 투여 농도에 의존적으로 혈관의 이완을 일으킴을 알 수 있었다.



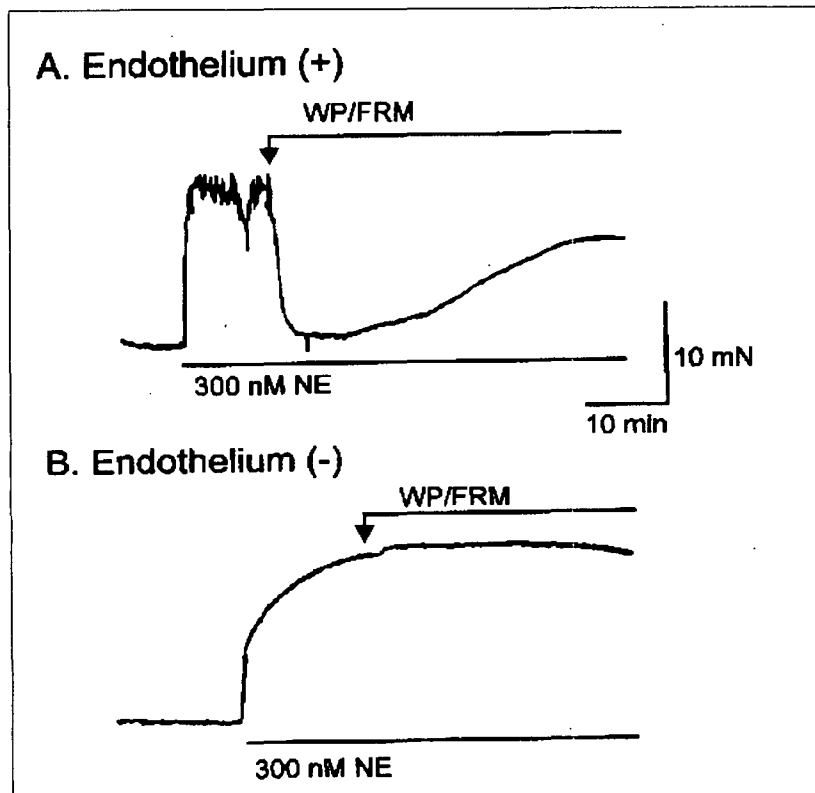


Fig. 17. The vasodilatory effect of WP/FRM (1 mg/ml) in endothelium-denuded (A) and intact (B) rat aorta pre-contracted with  $3 \times 10^{-7}$  norepinephrine (NE)

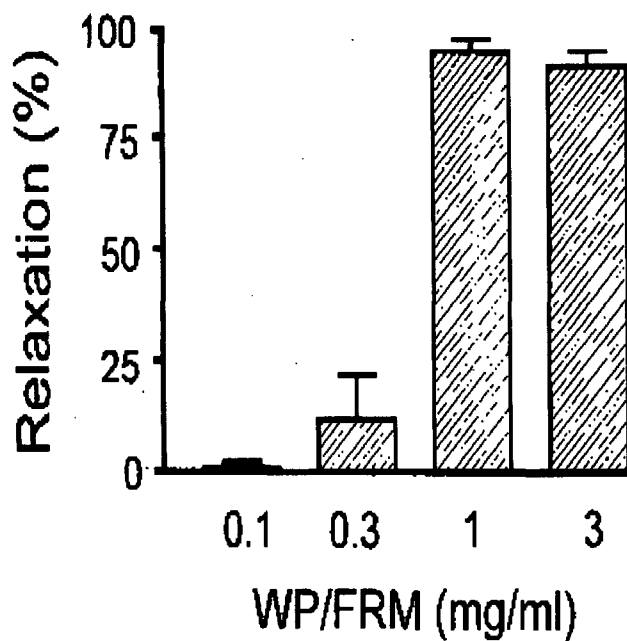


Fig. 18. The concentration-dependency of WP/FRM-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to WP/FRM, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml were expressed as a percentage of the NE-induced tension.

## 2) Ca channel과 흥국의 혈관이완작용

혈관수축은 평활근 세포내의  $Ca^{2+}$  농도가 증가함으로써 일어난다. 세포내의  $Ca^{2+}$  농도의 지속적인 증가는 세포외의  $Ca^{2+}$ 의 유입에 의하여 유지된다. 이 과정은 Ca channel 즉, 수용체의 작용에 의하여 좌우되는 이온통로(receptro-operated  $Ca^{2+}$  channel ; ROC)와 막전압에 의해 좌우되는 이온통로 (voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ; VDC)에 의하여 일어나며 이 Ca channel을 blocking함으로써 수축된 혈관의 이완을 유도할 수 있다. 임상적으로 널리 이용되는 calcium antagonist인 verapamil, diltiazem, nifedifine 등은 VDC를 억제하여 혈관확장 작용을 나타낸다.

흥국이 혈관평활근에 직접작용하여 유발되는 long term relaxation의 작용기작을 조사하기 위하여 내피세포가 제거된 혈관에 KCl을 투여하여 VDC에 의한 수축을 유도하고 WP/FRM을 투여하였다. Ca channel blocker는 고농도 KCl의 농도에 따라 그 억제정도에 차이가 나타남에 따라 70 mM KCl 및 40 mM KCl로 수축을 유도하였다. WP/FRM은 70 mM KCl 수축에서 이완반응을 나타내지 않았으며 70 mM 보다 Ca channel을 활성화하는 정도가 적을 것으로 예상되는 40 mM KCl 수축에서도 70 mM KCl에서와 마찬가지로 평활근의 수축을 이완시키지 못하였다 (Fig. 19). 이상의 결과로부터 WP/FRM은 혈관평활근의 Ca channel을 억제하나 VDC를 억제하는 것은 아닌 것을 알 수 있었다.

또한 흥국은 고농도 KCl에 의한 수축은 억제하지 않았으나 NE에 의한 수축은 내피유무에 관계없이 억제하였다. 이와같은 결과는 WP/FRM이 VDC를 억제하는 것은 아닌 NE 의존성 수축발생제 즉, receptor operated Ca channel blocker, alpha receptor antagonistic effect 또는 그 이외의 기전으로 이완을 일으키는 것으로 예측할 수 있다. 그러나 정확한 작용기작에 대해서는 추가실험이 필요하다.

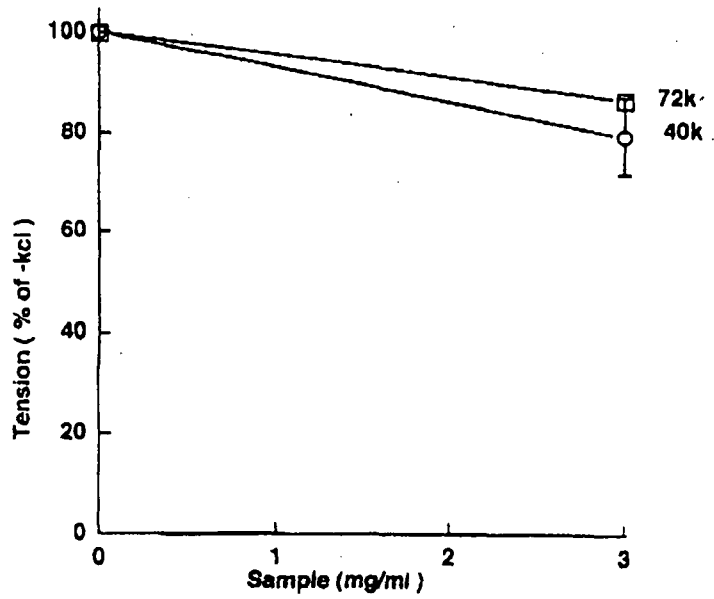


Fig. 19. The effect of WP/FRM on the KCl-induced contraction in endothelium-denuded rat aorta

## 2. 혈관이완물질의 특성 및 작용기작

### 1) GABA와 홍국의 혈관이완작용

Kohama et al. (1987)은 홍국으로부터 혈압강하물질로 GABA와 acetylcholin chloride를 분리 동정하였으며, 기존의 다수의 보고가 홍국의 혈압강하성분의 하나로 GABA의 역할을 강조하고 있다. 따라서 홍국의 혈관이완작용에 미치는 GABA의 효과를 확인하기 위하여 내피가 손상되지 않도록 준비한 혈관에 NE로 최대 수축시킨 후 350 nM의 GABA를 투여하였다. 그 결과 GABA에 의한 내피세포의존적 및 비의존적 혈관이완작용은 나타나지 않았으며 따라서 홍국에 함유된 GABA는 적어도 혈관의 이완을 일으키는 성분은 아닌 것으로 추정된다 (Fig. 20). 그러나 GABA가 사람에게 대해 혈압강하작용이 있는 것으로 잘 알려진 물질이므로 홍국섭취시 종합적 혈압강하작용에의 기여를 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

### 2) acetylcholine과 홍국의 혈관이완작용

acetylcholine은 혈관내피세포를 자극함으로써 EDRF인 nitric oxide를 유리시켜 혈관이완을 일으키는 혈관활성물질 (vasoactive substance)의 하나로 알려져 있으며 Kohame et al. (1987)에 의하여 홍국의 hypotensive material의 하나로 분리 보고되었다. 따라서 홍국의 혈관이완작용 즉, 내피세포의존적인 phasic relaxation이 홍국내의 acetylcholine에 의한 작용인지를 알아보기 위하여 내피세포가 손상되지 않은 혈관에 acetylcholin의 작용 blocker인 atropin을 1  $\mu$ M 투여하고 20분 경과후 300 nM NE로 최대수축을 유발시킨 후 WP/FRM 3 mg/ml을 투여하였다. 그 결과 atropin을 전처리한 혈관과 처리하지 않은 혈관에서 동일하게 내피세포의존적 이완작용 및 비의존적 이완작용이 관찰되었으며 (Fig. 21) 따라서 홍국에는

acetylcholin 이외의 혈관이완물질이 존재하는 것으로 추정되었다.

### 3) 홍국의 혈관이완작용 기작구명

홍국의 WP/FRM이 내피세포의존적 혈관이완물질로 보여지기 때문에 다음 단계로 이 물질이 어떤 기전에 의해 혈관이완을 일으키는지를 확인하기 위하여 대표적인 EDRF인 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase 저해제인 L-NNA와 indomethacin이 WP/FRM에 의한 혈관이완작용에 미치는 영향을 실험하였다.

10  $\mu$ M의 L-NNA와 indomethacin을 내피세포 존재하에 organ bath에 현수시킨 혈관에 투여하고 30분 경과후 300 nM NE로 최대수축을 일으킨 후 3 mg/ml의 WP/FRM을 각각 투여하였다. 그 결과 L-NNA 투여시에는 혈관의 phasic relaxation이 완전히 저해되었으나 (Fig. 22), indomethacin을 투여한 혈관에서는 WP/FRM에 의한 혈관이완작용이 영향을 받지 않았다 (data was not shown). 따라서 홍국에 존재하는 혈관이완물질중 phasic relaxation을 일으키는 물질은 prostaglandin이 아니라 NO의 생성에 관여하는 것임을 알 수 있었다.

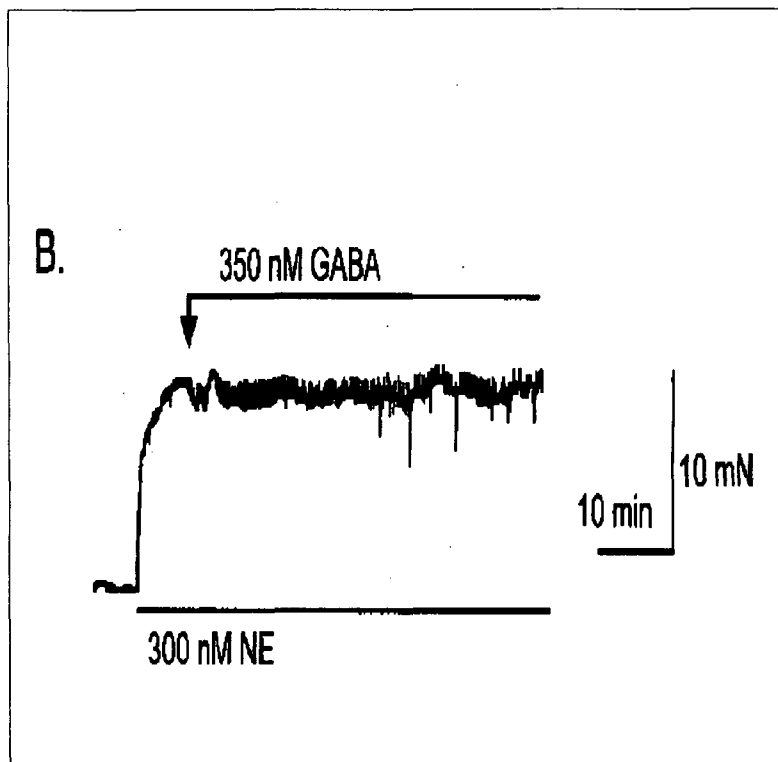


Fig. 20 The effect of GABA on the norepinephrine-induced contraction in rat aorta

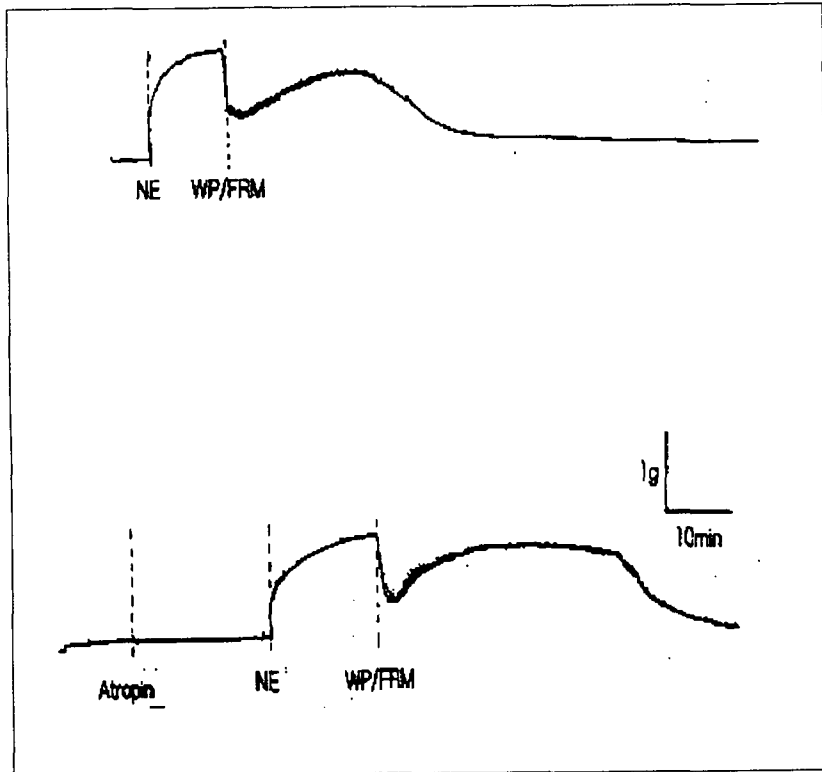


Fig. 21 The effect of atropin on the norepinephrine-induced contraction in rat aorta



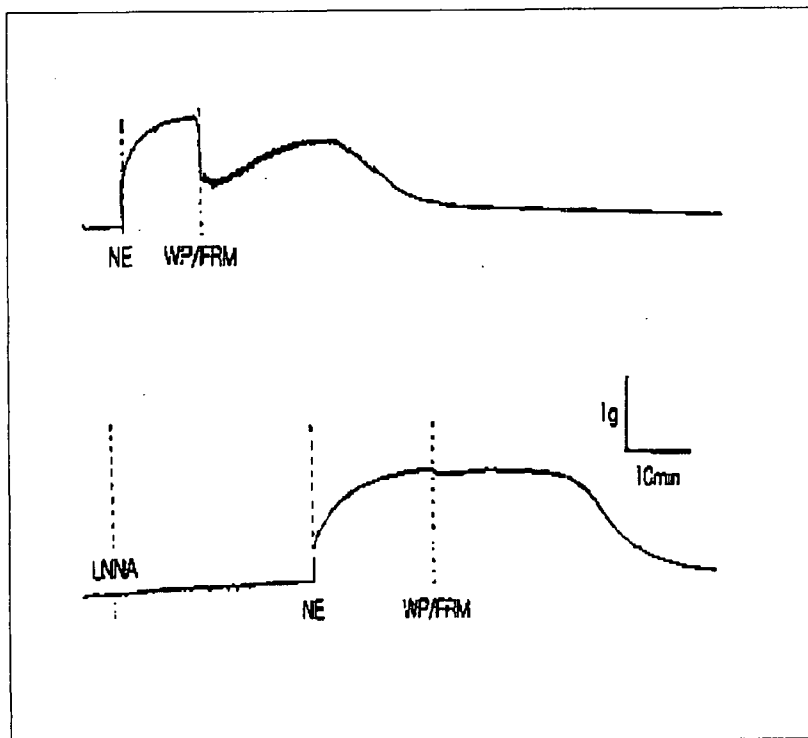


Fig. 22 Effect of NO synthase inhibitor on WP/FRM-induced endothelium-dependent relaxation

## 참고문헌

- 布谷 昭, 志水數史, 八木和幸, 天飯勝則, 氷兵廣子, 1988. Food processing by using "Monascus". 食品と開發 23, 51-55
- A. Endo, 1985. 醱酵と工業 43(6):544-552
- A. Endo, 1980. Monacolin K, A New hypochlesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A Reductase. J. Antibiotics 3, 334-336
- Akira Endo, 1979. Monacolin A New hypochlesterolemic agent produced by A Monascus species. J. Antibiotics 3, 852-854
- David Heber, Jan Yip, Judith M ashley, David A Elashoff, Robert M Elashoff and Vay Liang W Go., 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. Am J Clin Nutr 69, 231-236
- Dong-Hwa Shin, Dong-Han Kim, Ung Choi, Mi-Sun Lim and Eun-Young An, 1997. Physicochemical characteristics of Traditional Kochujang prepared with various raw materials. Korean J. Food Sci. Technol 29, 907-912
- Duk-Kyoung Kim. Molecular and Cellular Biology of Cardiovascular Disease p1-18
- Gunnar Blix, 1948. The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. ACTA Chemi. Scand 2467-473
- Hin-chung wong, Philip E. Koehler, 1981. Production and Isolation of an Antibiotic from Monascus purpureus and its Relationship to Pigment Production. J. Food Science 46, 589-592

- Jae-Hong Jeong, Jong-Saeng Kim, Sang-Duck Lee, Seong-Hyun Choi and Man-Jin Oh, 1998. Studies on the contents of free amino acids, organic acids and isoflavones in commercial soybean paste. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr 27, 10-15
- Jens D. Schumacher, Benno Kunz and Kwang-Eui Byounm, 1996. A Study of natural pigment production with *monascus purpureus* by solid state fermentation model systems. Adv. Food Sci 18, 113-120
- Jong-Soo Lee, Soo-Jin Kwon, Sung-Won Chung, Young-Jun Choi, Jin-Young Yoo and Dong-Hyo Chung, 1996. Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of korean traditional Doenjang Kochujang. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol 24, 247-253
- Jun-Seok Kum and Ouk Han. 1997. Changes in physicochemical properties of Kochujang and Doenjang prepared with extrudated wheat flour during fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr 26, 601-605
- Keisuke Tsuji, 1994. Antihypertensive effects of Beni-koji. 醸協 89, 207-211
- Keisuke Tsuji, Yasue Nakagawa and Tomio Ichikawa, 1993. Effects of Beni-koji extracts and pigment produced by *Monascus* spp. on blood pressure, mineral balance and cholesterol levels in spontaneously hypertensive rats. 日本家政學會誌 44, 109-114
- Keisuke Tsuji, Tomio Ichikawa, Nobukazu Tanabe, Shirou Abe, and Yasue Nakagawa, 1992a. Effects of two kinds of Koji on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Nippon Nogeikagaku

Kaishi 66, 1241-1246

- Keisuke Tsuji, Tomio Ichikawa, Nobukazu Tanabe, Shirou abc, Shouichi Tarui and Yasue Nakagawa. 1992b. Antihypertensive activities of beni-koji extracts and  $\gamma$ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. Jpn. J. Nutr 50, 285-291
- Keisuke Tsuji, Tomio Ichikawa, Nobukazu Tanabe, Shirou Abe, shouichi Tarui and Yasue Nakagawa, 1992c. Effects of Beni-koji Foods on Blood Pressure in spontaneously Hypertensive Rats. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 39, 919-924
- Keisuke Tsuji, Tomio Ichikawa, Nobukazu Tanabe, Hiroshi Obata, sjorpi Abe. Sjpiocjo Tario and Uasie Malagawa, 1992d. Effect of Mycelial Weight on Hypotensive Activity of Beni-koji in Spontaneously Hypertensive Rats. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 39, 790-795.
- Keisuke Tsuji, Tomio Ichikawa, Nobukazu Tanabe, Hiroshi Obata, Sjorpi Abe, Sjpiocjo Tarui, 1992e. Extraction of hypotensive substance from wheat beni-koji. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 39, 913-918
- Ken Yasukawa, Masanao Takahashi, Sakae Yamanouchi, Michio Takido, 1996. Inhibitory Effect of Oral Administration of Monascus Pigment on Tumor Promotion in Two-Stage Carcinogenesis in Mouse Skin. Oncology 53, 247-249
- Ken Yasukawa, Masanao Takahashi, Shinsaku Natori, Ken-ichi Kawai, Mikio Yamazaki, Mieko Takeuchi, Michio Takido, 1994. Azaphilones Inhibit Tumor Promotion by 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate in Two-Stage Carcinogenesis in Mice. Oncology 51:108-112
- Kentaro Kaneko, Kyoko Tsuji, Chon-Ho Kim, Chikao Otoguro, Takeshi

- Sumino, Kuniko Aida, Ko Sahara and Takahashi Kaneda, 1994. Contents and Compositions of free sugars, organic acids, free amino acids and oligopeptides in Soy Sauce and Soy Paste produced in Korea and Japan. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41, 148-156
- Ki-Cheul Chang, 1995. 심혈관계에서 산화질소의 병태생리학적 역할. 심혈관질환의 기초의학 심포지움 I 46-48
- Kiyoshi Inoue, Yoshio Mukaiyama, Keisuke Tsuji, Nobukazu Tanabe, Sjiocjo Tario. Sjiocpi Abe and Makoto Takahashi, 1995. Effect of Beni-koji extracts on Blood Pressure in Primary Hypertensive Volunteers. *Jpn. J. Nutr* 53, 263-271
- Lie S, 1973. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *J. Inst. Brew*, 79, 37-41
- Mi-Kyung Choi, Kyung-Hee Sohn and Hyeong-Ju Jeon, 1997. Changes in odor characteristics of Doenjang with different preparing methods and ripening periods. *Korean J. Diet. Culture* 12, 265-274
- Miller G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* 31, 426
- Nyun-Su Kwon, 1995 산화질소 생성의 생화학. 심혈관질환의 기초의학 심포지움 I 41-45
- Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrougil A. Lewis Farr and Rose J. Randall, 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. 265-276
- Robert F. Furchgott and Paul M. Vanhoutte, 1989. Endothelium-derived relaxing and contraction factors. *FASEB J* 3, 2007-2018
- Salvador Moncada and Annie Higgs, 1993. Mechanisms of disease, The

- L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng. J. Med* 329, 2002-2012
- Seong Gook Kang, In Bae Park, Soon-Teck Jung, 1997. Characteristics of Fermented Hot Pepper Soybean Paste(*Kochujang*) Prepared by Liquid Beni-koji. *Korean J. Food Sci. Technol* 29, 82-89
- Seung-Cheol Lee, Su-Kyoung Kim, Suk-Gi Lee and Yong-Il Hwang, 1997. Production of Soy Sauce with *Monascus* sp. *Agric. Chem. and Biotech* 40, 361-363
- Soo-Hyun Chung, Hyung-Joo Suh, Jae-Hoon Hong, Hyo-Ku Lee and Won-Dae Cho, 1999. Characteristics of *Kochujang* prepared by *Monascus anka* koji. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 28, 61-66
- Tarui Shoichi, 1994. *Shokuhin To Kaihatsu* 100-106
- Tarui Shoichi, 1993a.
- Tarui Shoichi, 1993b. *Shokuhin To Kaihatsu* 28(1):47-50
- W. Bauer, 1989. Wirkung von Stoffwechselferzeugendes *Monascus purpureus* auf Bakterien. *Fleischwirtsch* 69, 123-125
- Yasuhiro Kohama, Shigeru Matsumoto, Tsutomu Mimura, Nobukazu Tanabe, Akira Inada and Tsutomu Nakanishi, 1987. Isolation and Identification of Hypotensive Principles in Red-Mold Rice. *Chem. Pharm. Bull* 35, 2484-2489
- Yonekichi Sakurai, Tae Ho Lee and Hideo Shiota, 1977. On the convenient method for glucosamine estimation in koji. *Agric. Biol. Chem* 41, 619-624
- 식품공전. 1995. 한국식품공업협회 p.647

**협동연구과제명 :**  
**고기능성 홍국제조 및 생리활성물질**  
**생산공정 개발**

**협동연구기관 : 강원대학교**  
**협동연구책임자 : 홍억기**

여 백



# 1. 서론

최근에 들어와서 생활 수준이 향상됨에 따라 유기합성으로 생산되었던 식품첨가제는 혐오제품으로 인식되어가고 있다. 이에 반하여 점차적으로 천연적 생산 제품이 식품첨가제로서 각광받고 있고 인간이 섭취하는 식품으로 사용되는 모든 것들은 천연제품으로 교체될 가능성이 크다. 이러한 논리는 식품첨가제중 하나인 색소물질에도 마찬가지로이다.

*Monascus* sp.는 여러 색소물질을 생산하는 미생물로서 이와같은 목적에 적합하게 사용될 수 있다. *Monascus* sp.는 *Ascomycota*군에 속하는 filamentous fungi이고 동부 Asia에서 전통적으로 고체배양을 통하여 red rice wine, kaoliang brendy, soy been cheese, 식품 착색제(food colorant) 등의 제조에 사용되어 왔다.

다른 filamentous fungi와 마찬가지로 *Monascus* sp.는 이차대사산물(secondary metabolites)의 일종인 polyketides를 다량으로 생산한다. *Monascus* sp.가 생산하는 대표적인 polyketides로는 식품 착색제(food colorant)로서 사용되는 색소이외에 2개의 polyketide chain으로 구성된 항고혈압제(antihypercholesterolemic agents)인 mevinolin을 생산하여 약리적으로 이용이 가능하고 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*에 대하여 저해효과(inhibitory effect)를 나타내는 ankalacton이 있다.

*Monascus* sp.가 생산하는 색소 물질로는 크게 세가지로 나눌 수 있다. 먼저 황색소로 monascin, ankaflavin이 있고, 홍색소로는 rubropunctatin, monascorubrin이 있으며, 이외에도 rubropunctamine과 monascorubramine이라는 적색소가 *Monascus* sp.에 의하여 생산된다. 이들은 모두 polyketide synthase가 관여하여 acetyl unit의 head-to-tail condensation에 의하여 생합성되는 polyketides의 일종이다. 수용성 형태의 적색소를 얻어

내기 위하여 여러방법이 사용되었고 균주개발의 측면에서는 NTG(*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*- nitrosoguanidine)와 같은 돌연변이원 (mutagene)을 사용함과 동시에 자외선에 노출시키는 등 돌연변이 (mutation)를 유발하여 수용성이며 더욱 강력한 적색소를 생산하는 균주를 먼저 screening하는 과정을 시행하기도 하였다. Polyketide synthase가 관여하여 생합성에 의하여 rubropunctatin과 monascorubrin 같은 홍색소가 먼저 생산되고 oxygen 잔기가 nitrogen 잔기로 전환되는 과정을 통하여 rubropunctamine이나 monascorubramine과 같은 적색소가 생성된다. 이때 전환이 쉽게 일어날 수 있는 조건은 pH 7 정도의 높은 pH 상태와 적당한 질소원이다. 일반적으로 곰팡이를 배양할 경우 배양액은 산성조건으로 변화하게 되는데 대부분의 *Monascus* sp.가 생산하는 색소는 산성조건에서 불용성이다. 따라서 세포의 색소를 얻기위하여 먼저 높은 pH 조건으로 조절하여 배양할 필요가 있다. 그리고 질소원으로써 primary amino group을 포함하는 성분을 사용하여 반합성을 유도하므로써 수용성의 적색소를 생산할 수 있다. 질소원으로 사용되는 amino acids 중 수용성의 적색소를 생산하는데 있어서 glutamate, 특히 monosodium glutamate(MSG)는 가장 좋은 것으로 보고되어진다. 이처럼 질소원으로써 glutamate를 사용할 경우 세포 외 색소의 생산 및 분비를 촉진하였고 pigment-glutamic acid complex(electron donor-acceptor complex)를 형성하여 강력한 빛깔을 나타냄과 동시에 안정성이 증가된 적색소를 얻어낼 수 있었다. 종합적으로 acetyl-CoA는 cytosol내에서 polyketide synthase (multi-enzyme complex)가 관여하여 홍색소를 생산하고 이러한 홍색소는 primary amino groups를 가지는 성분들과 높은 친화력을 나타내는 구조인 aminophiles를 포함하고 있어서 primary amino group을 포함하는 glutamate의 존재하에서 반합성을 통하여 더욱 강력한 수용성의 적색소를 생산하게 된다.

이러한 천연 색소물질들은 합성 색소와는 다르게 다양한 기능성을 가진다. *Monascus* sp.가 생산하는 적색소도 기능성을 가지는데 대표적으로 구운 고기나 물고기에 많이 포함되어 있는 Trp-P-2(NaOH)<sup>a</sup>에 의한 돌연변이 유발력(mutagenicity)을 제한하는 효과를 나타내는 것으로 밝혀진다. 따라서 이러한 *Monascus* sp.가 생산하는 색소는 돌연변이 유발물질에 의한 암발생을 억제할 수 있으므로 경구투여를 하므로써 암에 대한 무독성의 화학예방제(chemopreventive agents)로 사용이 가능하다.

*Monascus* sp.와 같은 filamentous fungi를 통하여 polyketides인 색소물질을 액체배양에 의하여 생산하고자 할 경우 탄소원, 질소원, 통기량(aeration), 교반속도(agitation)는 대사(metabolism)와 형태(morphology)에 관여하여 이러한 이차대사산물(secondary metabolites)의 생성에 영향을 주게 된다. 액체배양을 통하여 수용성의 적색소를 생산하기 위한 탄소원으로 glucose가 주로 사용된다. 그러나 산소공급과 함께하는 액체배양을 할 경우 고농도의 glucose 양은 호기적 발효대사(respirofermentative metabolism)를 유도하여 결과적으로 ethanol을 발생시키고 낮은 성장수율을 초래하게 된다. 이런 경우 polyketide pathway에 의하여 색소 합성을 위한 전구체인 acetyl-CoA와 malonyl-CoA의 양이 감소하고 이로 인하여 ethanol 형성과 함께 짧은 배양기간내에 색소의 높은 생산수율을 얻을 수 없게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 배양초기에 낮은 농도의 glucose를 첨가한 후 glucose 공급을 조절하여 feeding하는 방법인 유가식 배양을 수행하므로써 대사에 사용되는 탄소원과 energy에 이용되는 기질을 천천히 소모하게하여 ethanol 형성이나 glucose regulation 효과를 최소화할 수 있고 적색소의 생산을 높게 유지할 수 있다.

생물반응기(bioreactor)를 이용하여 곰팡이를 배양할 경우 일반적으로 산소 공급은 매우 중요하다. 이러한 산소는 fungal metabolism에 있어서 일

차적으로 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에서 최종 전자 수용체 (final electron acceptor)로써 사용되고 이차대사산물(secondary metabolites)의 생산에 중요한 역할을 하는 oxygenases를 위한 기질로써 작용하게 된다. 특히 산소 분자는 polyketides의 생합성을 위한 기본적인 물질(molecules)로써 *Monascus* 색소 생산에 중요한 역할을 한다. 따라서 *Monascus* sp.를 액체배양하여 색소와 같은 polyketides를 생산하고자 할 경우 충분한 산소의 공급은 반드시 필요하다. 그러나 고농도의 용존 산소량을 유지하면서 액체배양을 시도할 경우 생육에 관여하는 기본 효소의 활성이 제한되고 hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals와 같은 radicals와 반응합성물(reactive compounds)이 생산되며 세포내에서 일어나는 산화 환원 평형(redox equilibrium)의 변형을 초래할 수 있으므로 적당한 산소량을 주입하여야 한다. 그리고 액체배양시 대사산물로써 이산화탄소가 생산되는데 이러한 이산화탄소는 pyruvate carboxylase와 phosphoenolpyruvate carboxylase 같은 효소가 작용하는 TCA cycle에서 중간대사산물을 합성하는데 필요하다. 그러나 너무 많은 이산화탄소의 축적은 곰팡이의 형태적인 변화를 유발하고 이차대사산물(secondary metabolites)의 생산을 억제하므로 이의 조절 또한 중요하다.

곰팡이의 액체배양에 있어서 기계적인 요소인 교반속도의 역할 또한 중요하게 작용하는데 낮은 교반속도는 용존산소(dissolved oxygen)량을 적게하고 충분한 산소 공급이 어려우며 높은 교반속도는 세포에 손상을 주어 낮은 성장속도를 나타내므로 최적의 교반속도를 유지하여야 한다.

본 연구는 *Monascus* sp.의 액체배양을 통하여 수용성 적색소의 생산을 높이고자 하였다. 우선적으로 STRS(stirred tank reactor system)를 이용하여 filamentous fungi를 배양하기 위한 기본적인 설계 및 조건을 설립하고자 하였다. *Monascus* 유래 색소는 pH 조건에 따라서 종류와 생산량

이 크게 변화할 수 있는데 pH 조절이 용이한 생물반응기(bioreactor) system 내에서 이를 쉽게 조절하여 단기간에 높은 양의 수용성 적색소를 얻고자 하였다.

Monosodium glutamate(MSG)는 더욱 강력한 수용성 적색소의 생산을 위한 질소원으로 주로 사용되어 왔는데 균체성장에는 좋지 않은 결과를 보여주었다. 따라서 균체성장을 함께 고려하여 질소원으로써 yeast extract를 첨가하여 배양을 시작한 후 배양중에 최적 농도의 monosodium glutamate(MSG)를 첨가하므로써 균체성장과 동시에 강력한 수용성 적색소를 생산하고자 하였다. Acetate는 polyketides를 생산하는데 있어서 기본 골격인 acetyl unit의 형성에 도움을 주는 전구물질(precursor)이다. 따라서 액체배양중에 적정농도의 sodium acetate를 첨가하여 수용성 적색소의 생산량을 높이고자 하였다.

이와같은 전략을 사용하여 STRS(stirred tank reactor system)에서 최적의 통기량(aeration)과 교반속도(agitation)와 함께 최적농도의 glutamate나 acetate를 최적시간에 첨가하고 pH 조건을 색소생산에 최적으로 조절하므로써 고농도의 균체량과 수용성 적색소의 생산성을 최대화하기 위한 최적 운전 전략을 확립하고자 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 1) 균주 및 보존

35종의 균주중에서 선발하여 *Monascus* sp.의 최적 균체 성장을 위한 조건 검토에서는 *Monascus purpureus* IFO4485가 사용되었고, 그 이후의 최적 색소 생산을 위한 연구에서는 유사한 균체 성장을 나타내는 *Monascus ruber* IFO32318을 사용하였다.

전배양의 활성(activity) 변화를 최소화하기 위하여 균체 성장을 위한 배지에서 2일 동안 배양한 후 5 mL을 취하여 glycerol(Junsei Chemical Co., 6K2164) 2 mL과 증류수 1 mL이 혼합되어있는 20 mL 유리병(vial)에서 잘 혼합한 후 -70 °C에서 냉동보관하였다. 이처럼 보관된 균주는 본배양을 위한 전배양의 준비에 사용되었다.

### 2) 배지

*Monascus* sp.의 액체배양을 위한 배지조성은 Lin's 배지를 바탕으로 균체성장 및 산물생산에 적합하도록 변화시켜 사용되었다. 균체 성장을 위한 배지조성은 탄소원으로 glucose 80 g/L의 고농도와 질소원으로써 yeast extract 7 g/L, bacto-peptone (Difco Laboratories Co.) 3 g/L가 포함된 복합 배지이다. 이와같은 균체 성장을 위한 배지는 균주 보존(stock culture)의 준비와 glucose가 기본이 되는 배지에 균주의 적응 및 본배양(main culture)의 접종에 이용될 전배양(seed culture)에 사용되었다. 산물 생산을 위한 배지조성은 균체 성장을 위한 배지조성에서 glucose의 농도를 40 g/L로 하고 bacto-peptone (Difco Laboratories Co.)을 NaNO<sub>3</sub> (Yakuri Pure Chemicals Co.)로 변화시킨 복합 배지로써 수용성 적색소를 생산하기 위한

flask 및 생물반응기(Korea Fermenter Co., KF-5L)를 이용한 배양에 사용되었다.

*Monascus* sp.의 고체배양은 40 g/L의 potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories Co.) plate에서 이루어졌고 이로부터 균주 보존(stock culture)의 제조를 위하여 사용되었다.

### 3) 접종원 준비

플라스크 및 생물반응기(Korea Fermenter Co., KF-5L)에서의 액체배양에 사용된 접종원(seed)의 준비를 위하여 보존(stock culture)된 균주를 균체 성장을 위한 배지가 포함되어 있는 250 mL 플라스크 (working volume 50 mL)에 접종하여 4일 동안 배양하였다. 유화기(homogenizer, Heidolph Co., DIAX 600)를 이용하여 배양액을 균질화 (homogenization)한 후 500  $\mu$ L를 취하여 같은 방법으로 플라스크에 접종하였다. 이를 2일 동안 배양한 다음 균질화하여 본배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 플라스크 배양을 위한 접종량은 1 %(v/v)이고 생물반응기를 이용한 배양에는 5 %(v/v)의 접종량이 사용되었다.

### 4) 배양 조건

플라스크 배양은 250 mL 플라스크(working volume 50 mL)에서 shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)를 이용하여 30  $^{\circ}$ C, 200 rpm, 초기 pH 7로 조절하여 배양하였다. 회분배양은 5 L 생물반응기 (Korea Fermenter Co., KF-5L)에서 working volume 3 L로 하여 30  $^{\circ}$ C, 600 rpm, 1 vvm으로 5일 동안 실시하였다. 이때 pH는 2 N HCl (Duksan

Pure Chemical Co.)과 2 N NaOH (Duksan Pure Chemical Co.)를 사용하여 조절하였다.

## 5) 발효 장치

회분배양은 bottom driven 형식의 5 L jar-fermenter (Korea Fermenter Co., KF-5L)를 변형하여 사용하였다. 교반은 tip impeller 2 개를 사용하여 이루어졌으며 impeller 중 하나는 공기가 방출되는 부위의 바로 윗부분에 설치하여 충분한 산소 공급을 유도하였고 다른 하나는 원활한 교반을 할 수 있는 위치에 설치하여 공급된 산소 및 배지성분 등이 세포로 충분히 전달되도록 하고자 하였다. 교반시 일어나는 와류(vortex)를 방지하기 위하여 설치된 방해판(baffle)은 filamentous fungi를 배양하므로써 유발되는 wall growth를 최소화하기 위하여 생물반응기 내부벽면에서 10 mm 정도 간격을 두어 설치하였다. 이로 인하여 교반시 baffle 주변에서 발생하는 난류를 최소화하여 원활한 교반의 유도 및 wall growth를 줄이고자 하였다. 공기를 직접 생물반응기 내에 공급하게 되면 압축기(compressor)에서 물어나오는 기름이 함께 주입될 수 있으며 장기간 배양시 액체 배지가 건조되면서 working volume이 현저하게 줄어들어 wall growth를 유발하는 원인을 제공하는데 이를 해결하기 위하여 공기 주입전에 공기 가습장치(air humidifier)를 설치하여 통과하도록 하였다.

## 6) 분석 방법

### 가) 균체량 분석

균체량 측정은 건조균체량을 이용하여 행하였다. 건조균체량은 배양액을 filter paper (Whatman #2)를 사용하여 진공하에서 여과한 후 2회 세척



하여 80 ℃에서 12~24 시간 향량이 될 때까지 건조(Chang Shin Scientific Co., C-DH)시켜 무게(Mettler Toledo Co., AG245)를 측정하였다.

#### 나) Glucose 분석

배양액중의 glucose 농도는 배양여액을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리(Hanil Co., MICRO-12)하여 얻은 상등액을 glucose kit(Sigma Chemical Co, 510-A)을 사용하여 측정하였다. 분석범위는 0.25~3.0 g/L로 하여 배양여액을 이 범위에 들어가도록 희석하여 사용하였고 낮은 농도 (0.25 g/L 이하)에 대해서는 분석 절차상 20배 희석을 생략하였다. 반응은 37 ℃에서 30분간 행하였으며 반응이 끝난 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Glucose (g/L)} = \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{standard}}} \times 100$$

#### 다) 색소 정량

세포의 수용성 색소는 배양여액을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리(Hanil Co., MICRO-12)하여 얻은 상등액을 분광광도계(Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 측정하였다. 배양여액을 흡광도 값의 범위가 0.1~0.8에서 측정될 수 있도록 희석하여 사용하였고 scanning한 결과를 바탕으로 적색소는 490 nm에서 황색소는 410 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

*Monascus* sp.는 filamentous fungi로서 전통적으로 일본, 중국, 동남아시아 등지에서 고체배양을 통하여 식품 착색제 및 red wine 제조에 이용되어 왔다. 이러한 *Monascus* sp.는 항암 및 항균작용을 하는 여러 생리활성 물질을 생산하는 것으로 보고되어지는데 이 중에서 이차대사산물로서 혈압강하물질을 생산하여 이를 식품첨가제로 활용하고자 하는 계획아래에서 먼저 액체배양 기술을 개발하고 최적 성장조건을 확립하고자 하였다.

최근 들어와서 고체배양을 이용해왔던 *Monascus* sp.를 액체배양하여 색소를 생산하고자 하는 연구가 계속 진행되고 있다. 여기에서 색소생산을 위하여 최초로 사용되었던 Lin's media를 기본으로 하여 균체 성장에 좋은 carbon, nitrogen 및 mineral source를 검토하고자 하였다. 그리고 fungi의 균체성장 및 대사산물생산에 기본적으로 중요한 역할을 하는 C/N ratio를 검토하고, 여기에 색소의 생산 정도와 균체성장을 비교하여 여러 종의 *Monascus* sp. 중에서 하나의 균주를 선발하고자 하였다. 이때, *Monascus* sp.가 생산하는 색소로는 적색소와 황색소가 있고, 이는 filamentous fungi가 생산하는 이차대사산물 중에서 polyketides의 일종으로 이와 같은 색소, 특히 적색소가 많이 생산되는 경우에서 좋은 혈압강하효과가 검증되어 우선 이를 이차대사산물 생산의 지표로 삼아 균주선발에 이용하고자 하였다. 최종적으로 선발된 균주는 *M. ruber* IFO32318이고, 이를 이용하여 다시 C/N ratio를 재검토하며, 균체 성장에 영향을 주는 대표적인 환경인자인 초기 pH와 적정 배양온도를 검토하여 액체배양을 위한 최적 성장조건을 확립하고자 하였다.

## 1) 액체배양을 위한 안정성 검토 및 문제점 분석

한국식품개발연구원에서 받은 *Monascus* sp. 균주를 먼저 보관하기 위하여 PDA(potato dextrose agar) plate에 접종하여 30℃에서 배양하였다. 대부분의 균체는 배양시작후 3일 만에 균체가 거의 자라며 5일이 지나면 적색소가 형성되어 plate 전체에 붉은 색을 띄었다. 이를 다시 potato dextrose broth 24 g/L로 구성되어 있는 액체 배지에 접종하여 30℃, 200rpm에서 배양한 결과, 균체량이 적으며 pellet size 또한 10mm 정도로 컸다. 이러한 현상은 배지조성이 균체성장에 적당하지 않은데서 비롯된 결과로서 특히 nitrogen source의 결핍으로 인한 현상으로 추정되었다. 그리고 이와같은 배지조성에서 본 균주를 배양할 경우 종종 aggregation이 심하게 일어났다. 이러한 문제점은 적당한 carbon 및 nitrogen source를 선택하고, 균체 성장에 영향을 미치는 C/N ratio 및 mineral source를 첨가하여 주므로써 해결될 수 있었다.

## 2) 균체 성장을 위한 액체배양 배지 개발

*Monascus* sp.의 액체배양을 최적화하기 위하여 균체 성장에 적당한 carbon, nitrogen 및 mineral source를 살펴보고, fungi의 액체배양에 있어서 growth나 production에 중요한 영향을 미치는 C/N ratio에 따른 균체량을 조사하였다. 그리고 이때 사용한 strain은 *Monascus purpureus* (IFO4485)이었다.

### 가) Carbon 및 nitrogen source의 선택

본 배양에서 처음 이용한 배지로는 pigment production에 주로 사용되는 Lin's media를 근거로 한 modified medium으로서 배지 조성은 Table 1에 나타내었다.

먼저 carbon source로는 pigment production에 있어서 주로 사용되는 soluble starch의 주요성분인 dextrin과 이당류인 sucrose, 단당류인 glucose, 그리고 potato dextrose broth를 사용하여 이에 따른 균체량 비교·검토하였다(Figure 1).

Figure 1과 같이 potato dextrose broth를 사용한 경우 균체량이 10.5 g/L 정도로서 가장 좋은 carbon source임을 알 수 있었다. 이에 못지 않게 glucose를 사용한 경우 8.5 g/L 정도로 좋은 결과를 나타냈는데 이는 단당류로서 세포막 투과성의 차이에 의하여 기인한 결과이다. 여기에 potato extract를 첨가하게 되면 potato내에 있는 glucose이외의 다른 성분들이 균주의 성장을 도와주어 potato dextrose broth에서 배양한 결과 더 많은 균체량을 얻을 수 있었다. 그러나 액체배양시 균체 pellet의 크기, 배양 시간, 배지의 가격적인 면에서의 경제성 등을 비교하여 고려할 경우 glucose가 더 좋은 carbon source라고 결론을 내렸다.

Nitrogen source의 선택에 있어서 사용된 것은 균체성장에 좋은 yeast extract와 peptone이었다. Pigment production에 있어서  $\text{NaNO}_3$ 가 주로 nitrogen source로서 사용되는데 이를 사용하여 액체배양을 할 경우 pigment production에는 좋으나 균체량은 매우 낮고 aggregation이 심하게 일어나 균체 성장을 위한 최적 배지를 찾는데 있어서 삭제되었다. 그리고 fungi의 액체배양에 있어서 두 종류의 nitrogen source를 사용할 경우 서로 상호보완에 의하여 균체 성장에 좋은 영향을 미치므로 yeast extract에 일정량의 peptone을 첨가한 경우, peptone에 일정량의 yeast extract를 첨가한

경우, 그리고 yeast extract나 peptone에 일정량의  $\text{NaNO}_3$ 를 첨가한 경우를 살펴보았다. 그리고 이러한 nitrogen source에 따른 균체량의 비교는 Figure 2와 같다.

Figure 2에서 보면 먼저 균체량이 3 g/L 미만으로 매우 적게 나타났는데 이는 carbon source로서 sucrose를 사용한 결과이다. 결과적으로 nitrogen source로서 yeast extract에 일정량의 peptone을 첨가한 경우 2.5 g/L 정도로서 가장 많은 균체량을 보였고,  $\text{NaNO}_3$ 를 첨가한 경우에는 aggregation이 심하게 나타났다.

이러한 결과를 가지고 균체 성장에 가장 좋은 carbon source로는 glucose, nitrogen source로는 yeast extract에 일정량의 peptone을 첨가(2 : 1)한 것을 선택하였다.

#### 나) Carbon 및 nitrogen 농도에 따른 C/N ratio의 선택

본 배양에서 사용한 배지는 carbon source 및 nitrogen source의 선택에 의하여 만들어진 modified medium으로서 배지 조성은 Table 2에 나타내었다. 먼저 nitrogen concentration을 각각 달리하여 C/N ratio에 변화를 주어 균체량을 살펴보았다(Figure 3). Figure 3에서 보면 C/N ratio 3에서 14 g/L 정도의 최대 균체량을 얻을 수 있었다. 이때 carbon source로서 glucose 30 g/L였으며 nitrogen concentration은 yeast extract 7 g/L와 peptone 3 g/L 이었다. 이때의 nitrogen concentration을 기준으로 carbon concentration을 각각 달리하여 C/N ratio에 변화를 주어 균체량을 살펴보았다(Figure 4). Figure 4에서 보면 C/N ratio 8에서 균체량 18 g/L 정도로서 가장 많이 자란 것을 알 수 있었으며 이때 glucose concentration은 80 g/L이었다.

#### 다) mineral source의 선택

본 배양에서 사용한 배지는 전 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 modified된 medium으로서 배지 조성은 Table 3에 나타내었다.

이 배지에 fungi의 배양에서 일반적으로 많이 쓰이는 mineral source와 이외의 nitrogen source를 각각 한 종류씩 첨가하여 균체량을 조사하였다. 여기에 첨가한 것으로는  $K_2HPO_4$  0.1%,  $CaCl_2$  0.01%, KCl 0.05%, Urea 0.2%,  $NaNO_3$  0.3%,  $FeSO_4$  0.01%이었다. 첨가한 각각의 mineral source에 따른 균체량의 비교는 Figure 5에 나타내었다.

Figure 5에서 보면 첨가한 mineral source에 따른 균체량이 거의 비슷하게 나타난 것을 알 수 있었고, 특히  $CaCl_2$  0.01%를 첨가한 경우에 19.5g/L 정도의 균체량으로 다른 mineral source들을 첨가한 것에 비하여 좀 더 많은 균체량을 얻을 수 있었다. 따라서 본 배양에서 사용된 배지에  $CaCl_2$ 를 첨가하여 최종적으로 균체 성장을 위한 최적 배지로 선택하였고, 이때의 modified medium은 Table 4에 나타내었다.

### 3) 최적 균주 선발

본 배양에서 사용된 배지는 전 실험에서 얻어진 modified medium(Table 4)을 사용하였다. 선발을 위하여 사용된 균주는 한국식품개발연구원에서 받아들인 *M. anka* (IFO4478, IFO6540, IFO30873), *M. araneosus* (KFRI00371), *M. kaoliang* (ATCC46592, ATCC46595, ATCC46596, ATCC46597, ATCC46598), *M. pilosus* (IFO4480, IFO4487, IFO4520, IFO4521, IFO8201, ATCC16368), *M. purpureus* (IFO4484, IFO4485, IFO4486, IFO4513, IFO32228, IFO32316, ATCC6405, ATCC16427, ATCC16436, ATCC36114, ATCC48162), *M. ruber* (IFO4492, IFO7537

IFO9203, IFO31842, IFO32317, IFO32318), *M. vitreus* (IFO4532), *Monascus* sp. (ATCC16435, ATCC16437)로서 총 35종의 균주이었다. 이러한 조건에서 균체 성장과 이차대사산물 생산의 지표물질인 적색소의 생산정도를 비교하여 균주를 선발하였다. 각각의 균주에 따른 균체량과 적색소 생산량의 비교는 Table 5에 나타내었다. 여기에서 대표적인 이차대사산물로서 적색소를 선택한 이유는 *in vivo* 실험을 통하여 검색한 결과 적색소의 양이 많을수록 혈압강하효과가 좋다는 결론을 근거로 목적산물인 혈압강하물질의 생성방식이 적색소의 생성방식과 유사하다고 추정하여 균주선발의 한 지표로 사용하였다.

Table 5에서 보면 *M. araneosus* (KFRI00371), *M. pilosus* (IFO4520, IFO4521, IFO8201), *M. purpureus* (IFO4485), *M. ruber* (IFO9203, IFO32318)이 20 g/L 정도의 균체량을 나타내었고, 특히 *M. pilosus* (IFO8201)은 23g/L 정도로 가장 많은 균체량을 나타내었다. 이처럼 균체량을 많이 나타낸 7개의 strains 중 다시 적색소 생산량을 검토하여보면 *M. pilosus* (IFO4521)이 OD<sub>490</sub>에서 2.568로서 가장 높은 absorbance값을 나타내었다.

균체량이 높게 나타난 7개의 strains 중 OD<sub>490</sub>이 2.568을 나타낸 *M. pilosus* (IFO4521)을 제외하고 6개는 모두 적색소 생산량이 적게 나타났다. 반면에 *M. anka* (IFO6540)과 *M. purpureus* (ATCC16436)이 각각 5.252와 10.336으로 상대적으로 매우 높은 absorbance 값을 나타내었다. 그리고 이때의 균체량은 *M. anka* (IFO6540)이 15g/L로 나타났고, *M. purpureus* (ATCC16436)이 12g/L 정도로 나타났다. 이는 적색소가 이차대사산물로서 non-growth associated production 방식으로 생성되거나 배지조성이 이 두 종류의 균체 성장에는 알맞지 않았다고 판단되었다. 이에 따라 균체성장이 초기에 stationary phase에 도달하게 되어 적색소의 생산이 다른 균주들에

비해 빨리 시작된 것으로 추정되었다. 따라서 비록 균체성장은 좋지 않았으나 같은 배양시간에 더 많은 양의 적색소를 생산한 것으로 판단되었다. 따라서 성장이 좋았던 균주들 중에서 적색소를 많이 생산한 *M. pilosus* (IFO4521)과 적색소를 많이 생산한 균주인 *M. anka* (IFO6540)과 *M. purpureus* (ATCC16436)을 이용하여 C/N ratio 및 배양기간, 그리고 carbon source와 nitrogen source를 색소 생산에 적절하게 조절하여 주면 더 많은 적색소를 얻을 수 있을 것으로 추정되어 검토할 필요가 있을 것으로 생각된다.

반면에 고체배양의 경우 가장 빨리 그리고 가장 많은 양의 적색소를 나타낸 균주는 *M. ruber* (IFO32318) 이었다. 비록 flask를 통한 액체배양을 한 결과 많은 양의 적색소를 생산하지는 않았지만 이는 배지조성 및 배양조건을 최적화하면 균체성장을 높게 유지하면서 적색소를 더 많이 생산할 수 있을 것으로 추정한다.

#### 4) 최적 균체성장을 위한 C/N ratio 재조성.

본 배양에서 사용된 배지는 modified medium(Table 4)으로서, 이 배지 조성을 기본으로하여 carbon concentration을 각각 달리하여 C/N ratio에 변화를 주어 균체량 및 색소생산량 그리고 최종 pH에 대한 영향을 살펴보았다(Figure 6).

Figure 6에서 보면 C/N ratio 8에서 균체량이 17 g/L 정도로서 가장 많이 자란 것을 알 수 있었다. 그러나 대표적인 이차대사산물인 적색소와 황색소는 C/N ratio 2에서 각각 1.9와 2.7정도의 optical density(OD) 값으로 가장 높게 나타났다. 이때 최종 pH는 7 정도이었다. 이러한 결과는 fungi의 액체배양에 있어서 균체가 성장함에 따라서 pH 값이 낮아지는 반



면에 균체가 모두 자란 후 주변환경의 pH가 다시 높아져 색소가 세포외부로 쉽게 빠져나갈 수 있었던 것으로 판단되었다.

따라서 *M. ruber* (IFO32318)의 균체성장을 위한 최적 C/N ratio는 8이고, 식물반응기를 이용하여 액체배양을 수행 할 경우 고농도 균체배양을 이룬 후 C/N ratio를 낮추거나 pH를 조절하여배양을 하면 색소 또는 목적산물의 생산성을 극대화할 수 있을 것으로 사료된다.

## 5) 균체성장을 위한 환경인자 영향 검토.

본 배양에서 사용된 배지는 modified medium(Table4)을 사용하였다. 초기 pH를 각각 달리하여 배양 후 균체량, 색소 생산량 및 최종 pH를 검토하였다(Figure 7). Figure 7에서 보면 초기 pH 5.5와 pH 6.0에서 18 g/L 정도로 가장 많은 균체량을 나타내는 것을 알 수 있었고, 또한 초기 pH 6.0의 경우에는 대표적인 이차대사산물인 색소의 양이 가장 많이 나타난 것을 알 수 있었다. 특히 적색소는 초기 pH 6.0에서 배양한 경우에 1.59의 가장 높은 absorbance 값을 나타내었고, 이 때의 최종 pH는 4.0 정도이었다.

그리고 배양온도(26℃~35℃)를 달리하여 에서 액체 배양을 시도하여 균체량, 색소 생산량 및 최종 pH를 측정하였는다(Figure 8). Figure 8에서 보면 배양온도 30℃에서 17 g/L 정도로서 가장 많은 균체량을 나타내었고, 또한 여기에서 가장 높은 색소 생산량을 나타냈으며, 이 때의 최종 pH는 3.5이었다. 결과적으로 *M. ruber* (IFO32318)의 균체 성장을 위한 최적의 초기 pH와 배양온도는 각각 pH 6.0과 30℃인 것을 알 수 있었다.

## 6) 세포성장 촉진 및 저해요인 검토

### 가) 최적 성장조건에서의 경시변화

본 연구는 시간의 변화에 따른 균체량, glucose 소모량, 목적산물 생성 지표물질(적색소) 생산량 및 pH의 변화를 관찰하고자 하였고, 본 배양에서 사용된 배지는 전 실험에서 얻어진 균체성장을 위한 최적 배지(Table 6)를 사용하였다.

Figure 9에서 보면 배양 4일째 균체량은 대략 20 g/L 정도로써 stationary 기간에 도달하기 시작하였다. 공급된 glucose 농도 또한 배양 4일째 모두 소모되었고, 이때부터 적색소(목적산물 생성 지표물질)의 생산이 시작되어 3 이상의 absorbance 값을 나타내었다. 이러한 경시변화를 통하여 적색소는 non-growth associated 형태의 이차대사산물임을 알 수 있었다. 전 *in vivo* 실험을 통하여 목적산물인 혈압강하물질이 이차대사산물로써 색소생성과 유사한 방식으로 생성된다는 결론을 토대로 목적산물 또한 non-growth associated 형태의 산물임을 추정할 수 있었다.

pH의 경시변화는 균체가 성장하면서 점차적으로 떨어져 4 이하까지 도달한 후 다시 7 이상까지 증가하는 것을 보였다. 이 때 pH가 증가하면서 적색소의 생산이 시작되었고 pH 5에서 7 까지 증가할 때 급속한 적색소 생산량의 증가를 볼 수 있었다. 이처럼 pH의 변화는 이차대사산물의 생산에 중요한 effect로써 작용을 하는 것을 알 수 있었고, 이를 생물반응기 운전전략에 이용할 경우 더욱 많은 양의 이차대사산물을 얻을 수 있을 것으로 추정하였다.

#### 나) 최적 glucose 농도의 검토

전 연구에서 균체성장을 위한 최적의 glucose 농도는 80 g/L이었다. 그러나 이러한 농도는 매우 많은 양으로써 대량생산의 경우 원료단가에 있어서 문제를 발생시킬 수 있다. 또한 이처럼 높은 농도의 glucose 양을 배양 초기에 첨가할 경우 이차대사산물의 생산이 억제될 수도 있다.

본 연구는 이와같은 문제점들을 해결하기 위하여 각각의 glucose 농도에 따른 균체성장 및 이차대사산물 생산에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 전 연구에서 pH가 이차대사산물 생산에 중요한 effect로 작용할 수 있다는 것을 보았다. 따라서 pH를 각각 5와 6으로 다르게하여 glucose 농도 10에서 90 g/L까지 변화를 주어 4일동안 배양하였다.

Figure 10와 11을 보면 초기 pH 5나 6에서 비슷하게 균체성장이 이루어졌다. 초기에 첨가된 glucose 농도가 10에서 40 g/L까지는 커다란 균체량의 차이를 나타내어 40 g/L의 glucose 농도에서 배양한 결과 15 g/L 이상의 균체량을 얻을 수 있었다. 그러나 그 보다 높은 농도의 glucose를 첨가한 배양에서는 균체량에 있어서 약간씩의 증가만을 보여주었다. 이 때 목적산물 생성 지표물질인 적색소의 생산량을 관찰하여 보면 초기 pH 5에서 배양한 경우 초기에 첨가된 glucose 농도가 20 g/L일 때 대략 1.8의 absorbance 값으로 가장 많은 양을 생산하였고, 초기 pH 6인 경우에는 30 g/L의 glucose 농도에서 2 이상의 absorbance 값을 나타내었다. 그리고 그 이상의 glucose 농도 첨가시 매우 낮은 양의 적색소를 생산하였는데 이는 초기에 많은 양의 glucose 첨가로 인하여 respirofermentative metabolism이 작용하므로써 polyketides에 속하는 이차대사산물이 억제되고 *Monascus* sp가 생산하는 대표적 by-product인 ethanol이 축적된 결과로 생각된다. 이와같은 결과로 인하여 이차대사산물을 생산하기 위한 glucose 농도는 20에서 40 g/L의 범위가 적당하고, 균체성장을 고려할 경우 glucose

농도는 40 g/L, 초기 pH는 6이 최적임을 알 수 있었다.

#### 다) 최적 초기 pH의 검토

전 연구에서 pH는 이차대사산물 생산에 중요한 요소로써 작용하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 초기 pH를 3에서 8까지 변화를 주어 4일 동안 배양한 후 균체성장 및 이차대사산물 생산에 미치는 영향을 관찰하였다.

Figure 12에서 보면 4일 배양 후 균체량은 초기 pH에 의하여 커다란 영향을 받지 않고 대략 15 g/L 정도를 유지하였다. 그러나 이차대사산물의 경우 초기 pH 3부터 5에서는 매우 적은 양이 생산되었고 이보다 높은 초기 pH에서는 더욱 더 생산량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 초기 pH 5에서 8까지의 경시변화를 관찰할 필요가 있었고 이에 대한 결과는 figure 13, 14, 15, 16에 나타내었다.

Figure 13, 14, 15, 16을 보면 glucose 농도가 배양 2일째 모두 소모되면서 균체성장은 exponential 말기에 들어갔고 이차대사산물을 생산하기 시작하였다. 균체성장은 glucose가 모두 소모된 이후에도 계속 이루어져 배양 4일째 대략 15 g/L 정도의 균체량을 얻을 수 있었다. 그리고 균체 성장이 이루어지는 형태를 볼 경우 초기 pH 5에서 가장 안정적으로 성장하는 것을 관찰할 수 있었다. 이차대사산물은 배양 2일째 생산되기 시작하여 배양 시작 후 3일부터 5일 사이에 급속도로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이때 pH의 변화를 보면 pH 5에서 7로 증가하고 있음을 알 수 있었다. 이처럼 pH의 변화는 이차대사산물 생산에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 pH를 다루기 쉬운 생물반응기를 이용한 배양의 경우 pH를 임의적으로 일정한 시간에 조절하므로써 많은 양의 이차대사산물을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 최종적으로 Figure 17를 보면 목적산물 생성 지표물질(적색소)

은 초기 pH 7일 경우 배양 5일째 absorbance 값 6.5 정도로써 가장 높은 양을 나타내었고 그 이후에도 계속 증가하여 배양 8일째 8 정도의 absorbance 값을 나타내었다.

## 7) 교반속도 및 통기량의 영향 검토

Filamentous fungi를 생물반응기에서 배양할 경우 균체가 성장하면서 배양액 중의 점도는 상당히 높아져 교반의 문제를 야기시킨다. 따라서 균체성장을 위한 최적의 교반속도를 설정하여야 한다. 그리고 이처럼 점도가 높게 유지되는 filamentous fungi를 배양할 경우 심한 wall growth를 초래하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 높은 점도를 초래하는 질소원인 peptone은 색소생산에 주로 사용되었던 무기질소원인  $\text{NaNO}_3$ 로 교체하였고 이차대사산물 생산을 위한 최적 배지(Table 7)로 사용하였다. 본 연구는 5 L jar-fermenter를 사용하였고, working volume 3 L로 하여 배양하였다.

Figure 18, 19, 20를 보면 500 rpm, 1.0 vvm의 조건에서 배양할 경우 균체량과 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산량이 모두 적게 나타난 것을 알 수 있었다. 이는 낮은 교반속도로 인하여 균체성장이 exponential 말기쯤에 도달할 경우 배양액의 점성으로 인해 원활한 교반이 이루어지지 않아서 물질전달의 문제를 야기시켜 일어나는 현상으로 추정된다. 그리고 polyketides와 같은 이차대사산물은 산소의 존재하에서 원활하게 생산되는데 용존산소량(DO) 값이 0까지 떨어지는 것을 알 수 있었고 이로인하여 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산량 또한 적은 것을 보여주고 있다. 교반속도를 600 rpm으로하여 배양할 경우 원활한 교반과 물질전달로 인하여 균체량은 2일째 대략 18 g/L 이상을 얻을 수 있었다. 그러나 통기량을 1.5

vvm으로 배양할 경우 많은 양의 산소가 공급되어 polyketides 생산에 역효과를 미쳐 적은 양의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산하였다. Figure 19을 보면 배양 2일째 18 g/L 이상의 균체량과 4 이상의 목적산물생성 지표물질(적색소)의 absorbance 값을 얻을 수 있었고 이리인하여 *Monascus* sp.를 이용하여 생물반응기에서 이차대사산물을 생산하고자 할 경우 600 rpm의 교반속도와 1.0 vvm의 통기량이 최적임을 알 수 있었다. 이러한 기본조건에 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산에 중요한 영향을 미치는 pH를 인위적으로 조절하여 배양하거나 유가식 배양공정을 사용할 경우 균체량 및 이차대사산물 생산에 있어서 더욱 많은 양을 얻을 수 있을 것으로 추정한다.

## 8) 생리활성물질 생산 촉진요인 검토

### 가) 최적 glutamate 농도 및 첨가시간의 검토

*Monascus* sp.를 이용하여 water-soluble 적색소를 생산하고자 할 경우 primary amino group을 포함하는 질소원을 사용하여 얻고자 하는 시도가 이루어져 왔고 이 중에서 glutamate는 가장 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고되어지고 있다. 더욱이 glutamate는 *Monascus* sp.가 생산하는 혈압강하물질로 보고되는  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)의 전구물질로써 이를 배양액 중에 첨가할 경우 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산과 동시에 GABA의 생산량 또한 높일 수 있을것으로 추정하고 있다. 그러나 이러한 glutamate를 질소원으로써 직접 사용할 경우 water-soluble 적색소의 생산에는 좋은 영향을 나타내나 매우 적은 양의 균체량을 보여주었다. 따라서 균체량을 고려하여 주요 질소원인 yeast extract를 그대로 유지하고 *Monascus* 색소 생산에 주로 사용되는 질소원인 monosodium

glutamate(MSG)의 적당한 농도를 배양중에 첨가하는 방식으로 목적산물 지표물질(적색소)의 생산량을 높이고자 하였다.

Glutamate의 첨가시간을 검토하기 전에 적당한 농도를 살펴보기 위하여 배양초기에 glutamate 농도를 0에서 10 g/L까지 변화를 주어 첨가하여 배양하였다. Figure 21을 보면 glutamate 농도가 2 g/L일 경우 대략 5의 absorbance 값으로 가장 많은 양의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산하였고 8 g/L의 고농도가 첨가될 경우 오히려 역효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 결정된 2 g/L의 glutamate 농도를 이용하여 배양중의 첨가시간에 대한 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산을 figure 22, 23, 24, 25, 26에 나타내었다. 균체량은 glutamate를 첨가하지 않은 경우와 마찬가지로 15 g/L 정도를 모두 유지할 수 있었다. 그러나 glutamate를 배양중에 첨가한 경우에는 첨가하지 않을 때보다 균체성장이 불안정하게 이루어지는 것을 알 수 있었다. 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산의 경우에는 배양 1일째 glutamate를 첨가한 경우 가장 많은 양을 생산하였는데 이는 균체성장이 왕성하게 일어날 경우에 glutamate를 첨가하여 주므로써 목적산물 지표물질(적색소)의 생산을 유도함과 동시에 질소원으로써도 이용할 수 있으므로 나타난 결과로 생각된다. 결과적으로 glutamate 2 g/L를 배양중에 첨가하므로써 15 g/L 이상의 균체량을 유지함과 동시에 figure 22를 보면 glutamate를 배양 1일째 첨가할 경우 배양 5일째 가장 높은 absorbance 값 5.5 정도의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산할 수 있었다. 배양 1일째는 exponential 초기로써 생물반응기를 이용하여 배양할 경우 exponential 초기에 glutamate를 적당한 양 첨가하는 방법으로 더욱 많은 양의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 나) 최적 acetate 농도 및 첨가시간의 검토

*Monascus* sp.는 다양한 polyketides를 생산하고 이러한 polyketides는

acetate의 축합에 의하여 생성된다. *Monascus* sp.가 생산하는 대표적인 polyketides로는 antihypercholesterolemic agent인 mevinolin이 있고 혈압강하물질 또한 polyketides일 것으로 추정하고 있다. 실질적으로 *in vivo* 실험을 한 경우 목적산물생성 지표물질(적색소)이 생산되는 시기에 혈압강하 효과가 나타나는 것으로 검토되었다. 따라서 배양중에 acetate를 적당량 첨가함으로써 이러한 polyketides의 생산을 유도하고 생물반응기를 이용할 경우 배양조건을 변화시킴으로써 많은 양의 혈압강하물질을 생산할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 적당량의 sodium acetate를 배양중에 첨가함으로써 이와같은 이차대사산물의 생산을 증진시키고자 하였다. acetate의 첨가시간을 검토하기 전에 적당량의 농도를 살펴보기 위하여 배양초기에 acetate 농도를 0에서 5 g/L까지 변화를 주어 첨가하여 배양하였다. Figure 20을 보면 acetate의 농도가 1 g/L일 때 absorbance 값이 대략 4.5 정도로 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산하였고 4 g/L의 고농도에서는 역효과를 나타내었다. 결정된 1 g/L의 acetate 농도를 이용하여 배양기간 중의 적절한 첨가시간을 살펴보고자 하였고 이에대한 결과는 figure 29, 30, 31, 32에 나타내었다. 균체성장은 glucose가 모두 소모되면서 배양 3일 정도에서 stationary 기간에 도달하였고 대략 15 g/L 미만의 균체량을 얻을 수 있었다. 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산은 균체성장이 exponential 말기에 들어서면서 배양 2일부터 생산되기 시작하였다. 배양 2일째 acetate를 첨가한 경우 가장 많은 양의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산하였는데 이는 polyketides가 생산되는 시기와 acetate가 첨가되는 시기가 적합하게 이루어진 결과로 추정된다.

결과적으로 figure 33를 보면 1 g/L의 acetate를 배양 2일째에 첨가한 경우 대략 7 미만의 absorbance 값을 나타내면서 목적산물생성 지표물질



(적색소)이 가장 많이 생산되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 생물반응기에서의 배양에 응용하고자 할 경우 exponential 말기에 적당량의 acetate를 첨가하여 주므로써 더욱 많은 양의 이차대사산물을 생산할 수 있을것으로 생각된다.

#### 다) Glutamate와 acetate의 첨가 검토

Figure 34은 glutamate와 acetate를 적정시간에 모두 첨가한 경우의 결과이다. 균체성장은 glucose가 모두 소모되면서 배양 3일째에 stationary 기간에 들어갔고 대략 15 g/L 미만의 균체량을 얻을 수 있었다. 이때에 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산이 점진적으로 이루어져 배양 5일에는 최대 4 정도의 absorbance 값을 나타내었다. 그러나 figure 35을 보면 glutamate나 acetate만을 첨가하였을 때보다 적은양이 생산된 것을 알 수 있었다. 이는 glutamate와 acetate를 모두 첨가하므로써 농도가 높음으로 인하여 기인한 결과로 추정된다. 따라서 glutamate와 acetate의 농도를 각각 1.0 g/L와 0.5 g/L로 낮추어 첨가할 경우 더욱 많은 양의 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산할 수 있을것으로 사료된다. 결과적으로 acetate만을 배양 2일째 첨가할 경우 absorbance 값 7 정도의 가장 많은 목적산물생성 지표물질(적색소)을 생산함을 알 수 있었다.

## 9) 세포 성장속도와 생산물 생산속도와의 연관관계 확립

생물반응기에서 *Monascus* sp.를 배양한 결과(Figure 25)를 보면 목적산물생성 지표물질(적색소)은 mixed-growth associated 형태로 생산되는 것을 알 수 있었다. 이는 연구 시작시 non-growth associated 형태로 생산(Figure 9)되던 것을 조금더 빠르게 생산할 수 있도록 설계한데서 기인한 결과이다. Glucose가 배양 2일째 모두 소모되면서 균체성장은 stationary 기간에 들어갔고 목적산물생성 지표물질(적색소)은 exponential 말기에서부터 생산되었다. 그 이후 균체성장은 점차적으로 약해지고 활성을 잃어가면서 배양 4일째 목적산물생성 지표물질(적색소)의 생산은 멈추었다. pH 경로를 살펴보면 5.5 정도까지 떨어지다가 균체성장이 모두 이루어지면서 급속하게 증가하여 8 이상까지 상승하는 것을 알 수 있었다. 이러한 pH 변화를 인위적으로 조절하여 주고 exponential 초기(배양 12시간 후)에 glutamate를 첨가하고 exponential 말기(배양 36시간 후)에 acetate를 적당량 첨가하므로써 목적산물생성 지표물질(적색소)과 같은 이차대사산물을 다량으로 생산할 수 있을것으로 생각된다.

## 10) pH의 영향

수용성 적색소와 같은 polyketides의 생산에 있어서 pH의 조절은 매우 중요하다. *Monascus* sp.를 배양할 경우 산성조건에서는 홍색소를 생산하고 중성조건에서는 적색소를 생산하는 것으로 보고되어지고 있다. 특히 pH를 일정한 값으로 조절하여 배양하는 것보다 pH를 조절하지 않고 배양

할 경우에 수용성 적색소는 다량으로 생산되는 것으로 알려져있다. 그러나 산성조건의 pH에서 배양할 경우 적색소의 전구 물질인 홍색소를 먼저 다량으로 생산하고 배양중에 중성조건으로 변화시켜 주므로써 더욱 많은 양의 수용성 적색소를 생산할 것으로 추정하였다. 그리고 플라스크 배양의 결과에서 보면 초기 pH 5에서 *Monascus* sp.를 배양한 경우(Figure 13) 더욱 안정적인 세포성장을 보여주어 이처럼 배양초기에 pH 5로 조절할 경우 균체량 또한 많이 얻을 수 있을 것으로 생각하였다. 따라서 본 연구에서는 pH를 배양중에 변화시켜 주므로써 고농도의 균체량 및 더욱 많은 양의 수용성 적색소를 생산하고자 하였다.

Figure 38는 pH를 일정하게 5로 조절하여 배양한 결과이다. 이처럼 pH 5로 조절하여 배양한 경우 수용성 적색소는 대략 0.5정도의 흡광도 값으로 매우 적은 양이 생산되었다. 그러나 균체 성장은 안정하게 이루어져 급속도로 성장하면서 배양 1.5일에는 17 g/L 이상의 균체량을 얻을 수 있었다. 따라서 배양초기에는 pH 5로 조절하여 균체성장을 이룬 다음 배양 1.5일과 2일에 중성 pH로 변화시켜 주므로써 더욱 많은 양의 수용성 적색소를 생산하고자 하였다. Figure 40과 41은 배양 1.5일과 2일째 각각 pH 7.5로 변화시켜 *Monascus* sp.를 배양한 결과이다. Figure 40과 41을 보면 배양 2일에 중성조건으로 변화시켜준 경우보다 배양 1.5일에 pH를 변화시킬 때 2배 이상의 수용성 적색소를 생산하는 것을 알 수 있었다. 배양 1.5일과 2일의 시점에서 균체 성장을 비교하여 보면 배양 1.5일의 경우에는 배양액 내의 glucose도 고갈되지 않고 남아있으면서 균체의 활성 또한 유지되어있는 상태였다. 이러한 결과로 인하여 pH의 변화가 수용성 적색소의 생산에 중요한 영향을 미치나 세포의 활성과 함께 할 경우 더욱 많은 양을 생산할 수 있을 것으로 추정하였다. 따라서 세포 활성이 왕성한 exponential 기간인 배양 1일부터 12시간마다 단계적으로 pH를 0.5씩 증가시키면서

*Monascus* sp.를 배양하였고 그 결과를 Figure 42에 나타내었다. Figure 42에서 보면 배양 1일부터 pH를 증가시켜 줌에 따라 수용성 적색소의 생산이 점진적으로 이루어져 배양 3.5일째에는 4 이상의 흡광도 값으로 수용성 적색소를 생산하였다.

## 11) Acetate의 첨가

플라스크 배양에서 1 g/L의 sodium acetate를 배양 2일에 첨가한 경우 가장 많은 양의 수용성 적색소를 생산하였다(Figure 33과 Figure 35). 이때의 세포 성장형태를 보면 대수기(exponential phase)에서 세포 활성이 왕성한 경우로써 생물반응기를 이용한 배양과 비교할 경우 배양 1.5 일의 시점과 유사한 것을 알 수 있었다(Figure 31과 Figure 42). 따라서 본 연구는 세포의 활성이 왕성한 배양 1.5일에 1 g/L의 sodium acetate를 첨가하여 주므로써 더욱 많은 양의 수용성 적색소를 생산하고자 하였고 그 결과를 Figure 43에 나타내었다. Figure 43에서 보면 배양 2일에 17 g/L 정도의 균체량을 얻을 수 있음과 동시에 최적 농도의 sodium acetate의 첨가와 함께 수용성 적색소의 생산이 급진적으로 이루어지는 것을 알 수 있었다. 이로 인하여 배양 3일만에 4.5 이상의 흡광도 값으로 대량의 수용성 적색소를 얻을 수 있었다. 그러나 이는 플라스크 배양의 경우(Figure 33)와 비교하여 보면 낮은 생산량으로 생각되나 배양기간의 단축으로 인하여 생산성을 높일 수 있었다.

**Table 1. Compositions of the modified medium used for the selection of carbon and nitrogen source.**

<b>Component</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Sucrose	30.0
Yeast extract	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0

**Table 2. Compositions of modified medium used for the selection of C/N ratio.**

<b>Component</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Glucose	30.0
Yeast extract	2.0
Peptone	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0

**Table 3. Compositions of the modified medium used for the selection of mineral source.**

<b>Component</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Glucose	80.0
Yeast extract	7.0
Peptone	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0

**Table 4. Compositions of the modified medium.**

<b>Component</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Glucose	80.0
Yeast extract	7.0
Peptone	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub>	0.1

Table 5. The comparison of dry cell weight and pigment production of *Monascus* sp

Strains	Dry cell weight (g/L)	Red pigment production (OD <sub>490</sub> )
<i>M. anka</i> (IFO4478)	15.556	2.308
(IFO6540)	14.975	5.252
(IFO30873)	15.809	3.556
<i>M. araneosus</i> (KFRI00371)	21.566	0.576
<i>M. kaoliang</i> (ATCC46592)	15.027	.
(ATCC46595)	15.644	1.297
(ATCC46596)	9.823	0.558
(ATCC46597)	11.484	3.384
(ATCC46598)	15.475	1.071
<i>M. pilosus</i> (IFO4480)	15.378	no pigment
(IFO4487)	16.209	no pigment
(IFO4520)	19.508	0.456
(IFO4521)	20.154	2.568
(IFO8201)	23.258	0.744
(ATCC16368)	15.766	no pigment
<i>M. purpureus</i> (IFO4484)	12.174	.
(IFO4485)	19.288	0.461
(IFO4486)	14.484	0.604
(IFO4513)	16.084	1.598
(IFO32228)	14.697	1.040
(IFO32316)	16.916	.
(ATCC6405)	13.029	.
(ATCC16427)	13.253	0.883
(ATCC16436)	12.306	10.336
(ATCC36114)	13.004	.
(ATCC48162)	14.167	.
<i>M. ruber</i> (IFO4492)	12.258	.
(IFO7537)	12.924	no pigment
(IFO9203)	19.665	1.144
(IFO31842)	14.701	no pigment
(IFO32317)	17.909	0.412
(IFO32318)	19.216	0.604
<i>M. vitreus</i> (IFO4532)	18.646	no pigment
<i>Monascus</i> sp. (ATCC16435)	14.470	.
(ATCC16437)	14.792	.

Table 6. Composition of the modified medium for optimum cell growth.

Component	Concentration (g/L)
Glucose	80.0
Yeast extract	7.0
Peptone	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1

Table 7. Composition of the modified medium for production.

Component	Concentration (g/L)
Glucose	40.0
Yeast extract	7.0
NaNO <sub>3</sub>	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1





Figure 1. The comparison of dry cell weight to different carbon source.

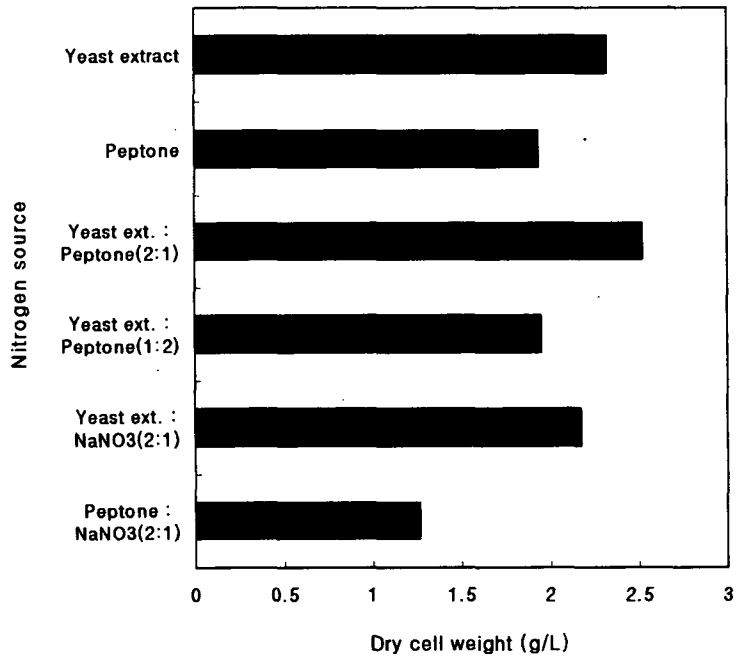


Figure 2. The comparison of dry cellweight to different nitrogen source

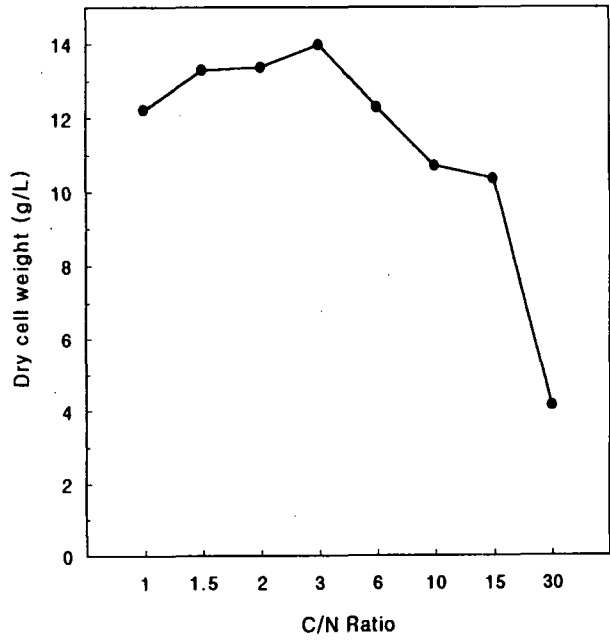


Figure 3. The comparison of dry cell weight to different C/N ratio with variable nitrogen concentration.

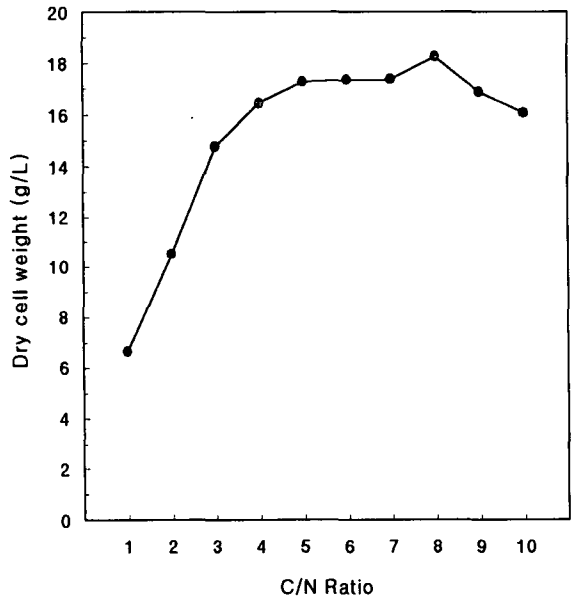


Figure 4. The comparison of dry cell weight to different C/N ratio with variable carbon concentration.

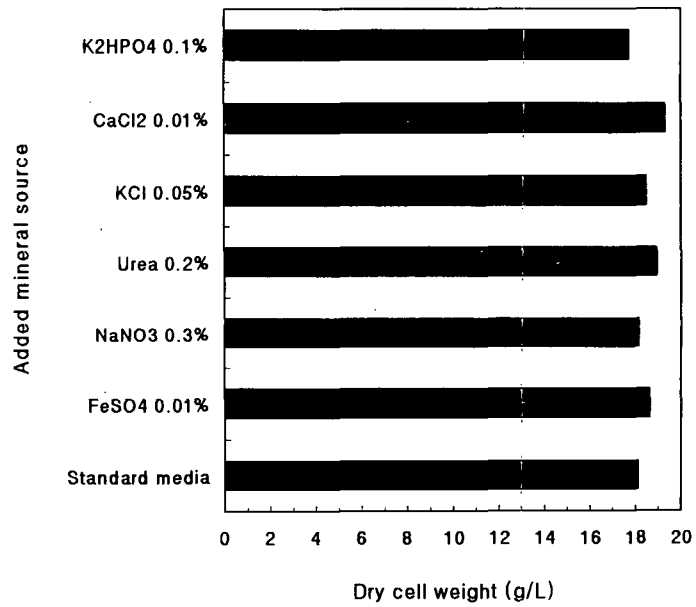


Figure 5. The comparison of dry cell weight to addition of different mineral source.

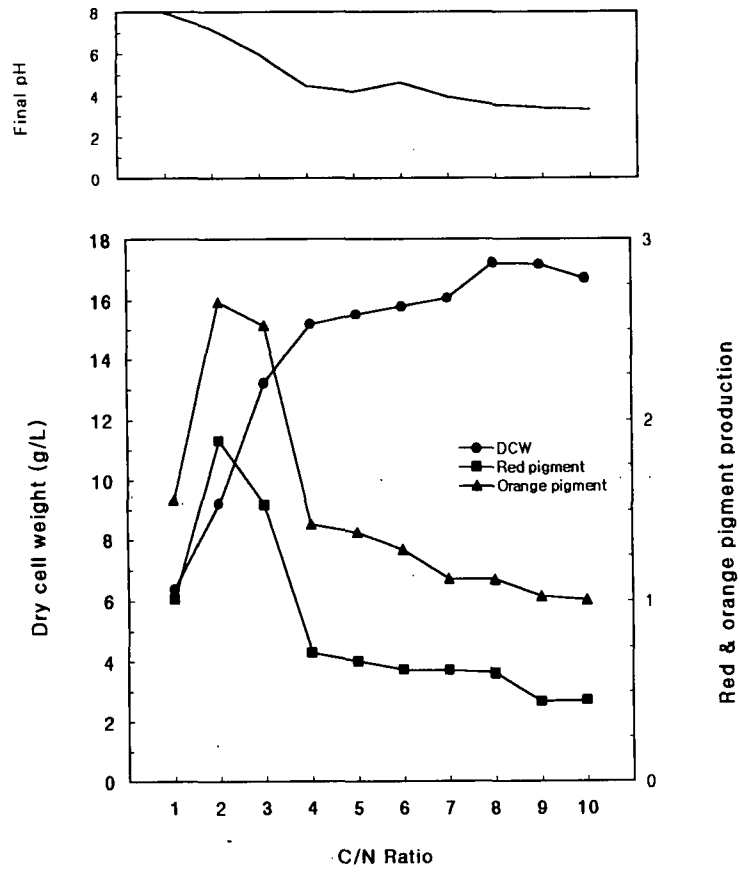


Figure 6. The comparisons of dry cell weight, red & orange pigment production and final pH to different C/N ratio with variable carbon concentration

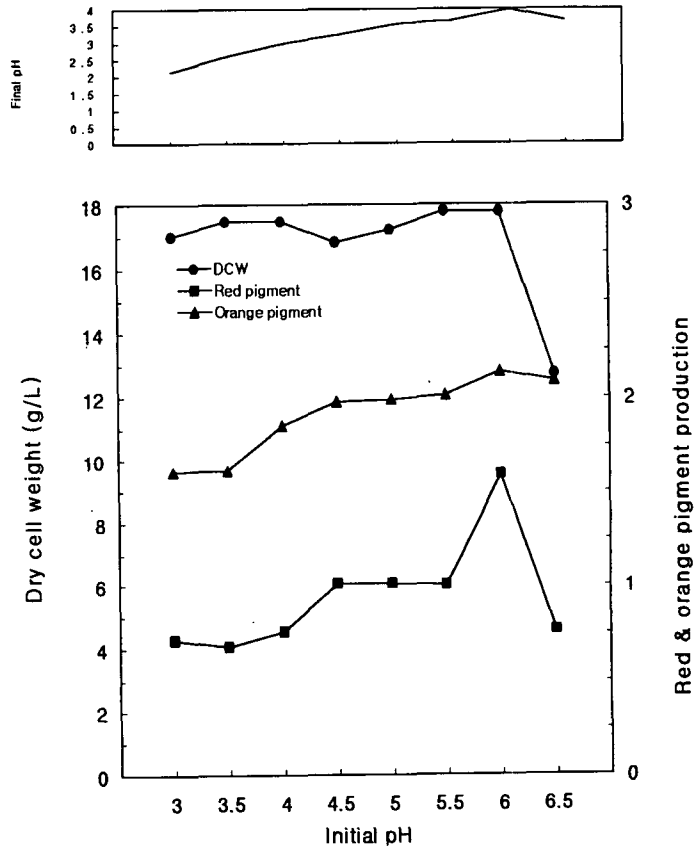


Figure 7. The comparisons of dry cell weight, red & orange pigment production and final pH with variable initial pH

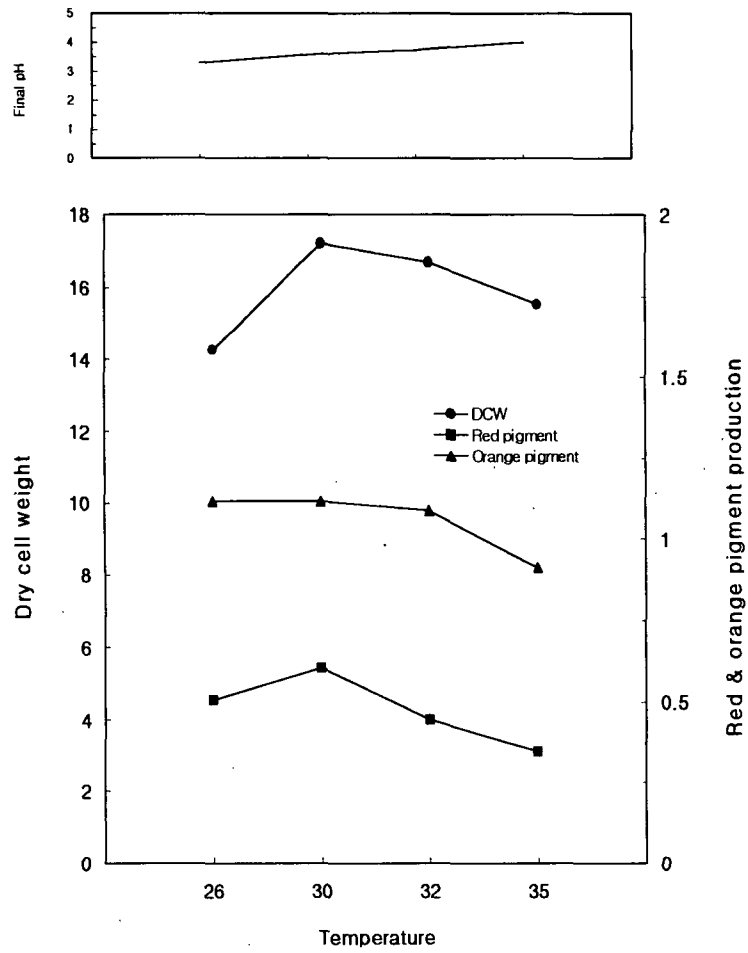


Figure 8. The comparisons of dry cell weight red & orange pigment production and final pH with variable temperature



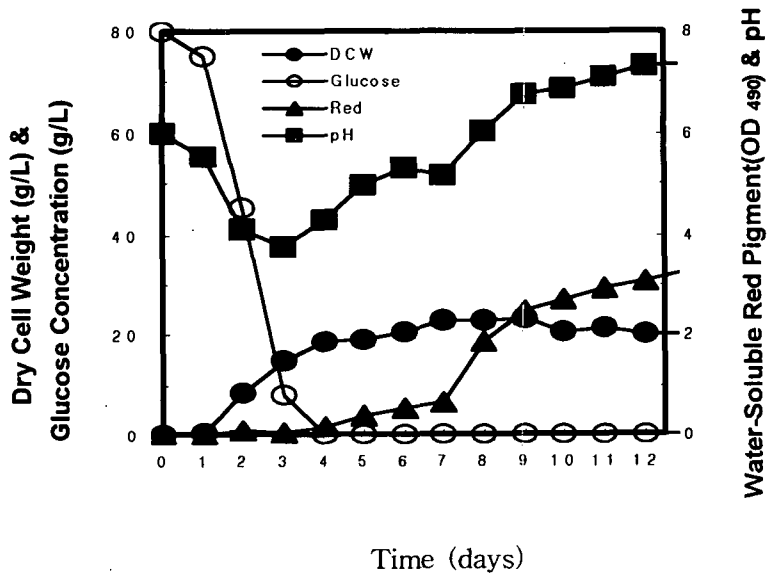


Fig. 9. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, water-soluble red pigment and pH

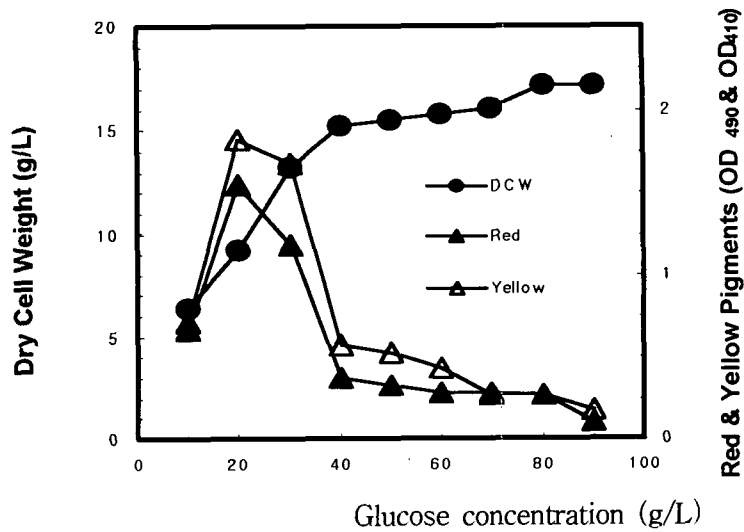


Fig. 10. effect of various glucose concentration on cell growth and red & yellow pigments production at initial pH 5

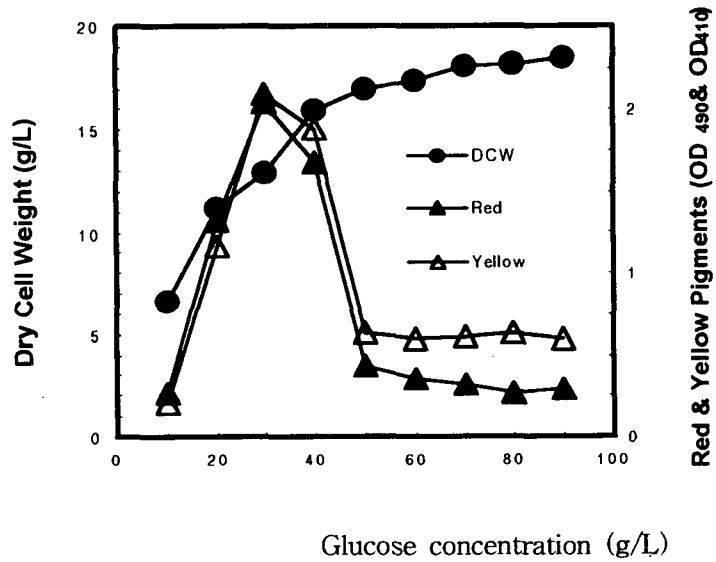


Fig. 11. Effect of various glucose concentration on cell growth and red & yellow pigments production at initial pH 6

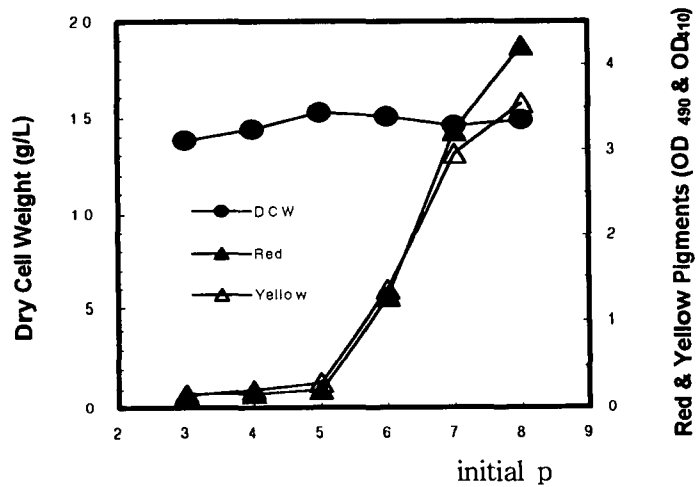


Fig. 12. Effect of various initial pH on cell growth and red & yellow pigments production

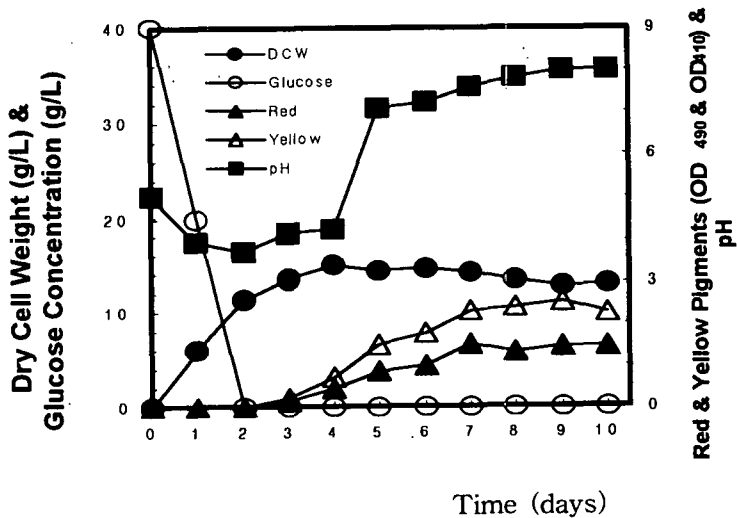


Fig. 13. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH at initial pH 5

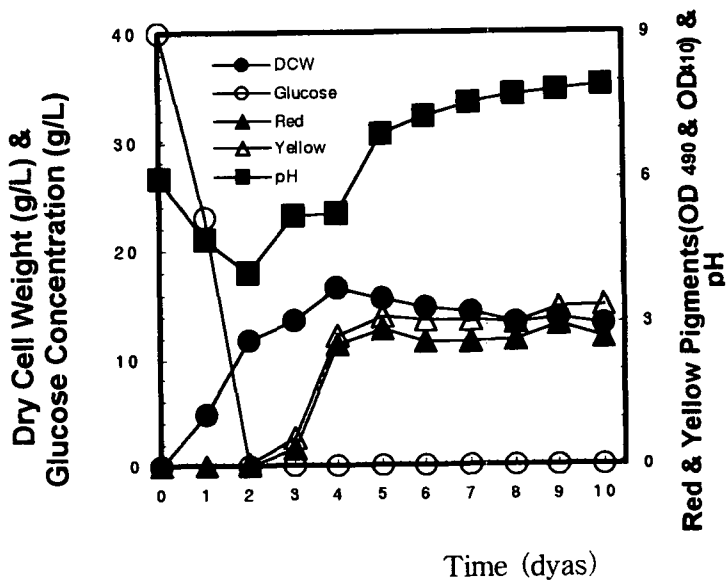


Fig. 14. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH at initial pH 6

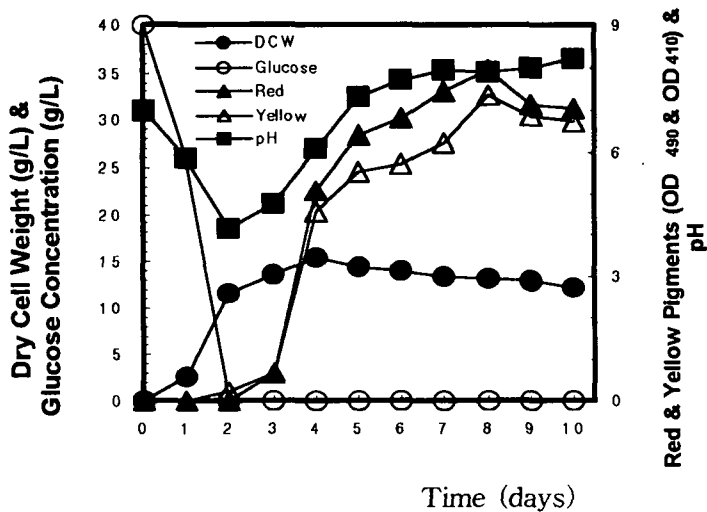


Fig. 15. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH at initial pH 7

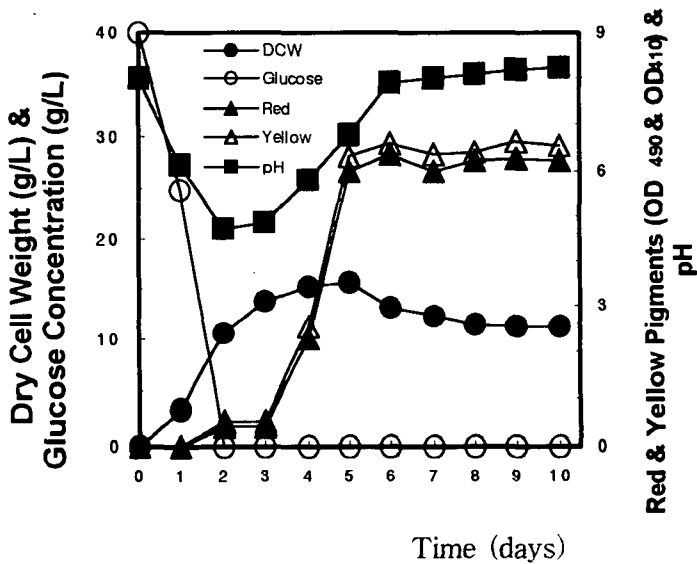


Fig. 16. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH at initial pH 8

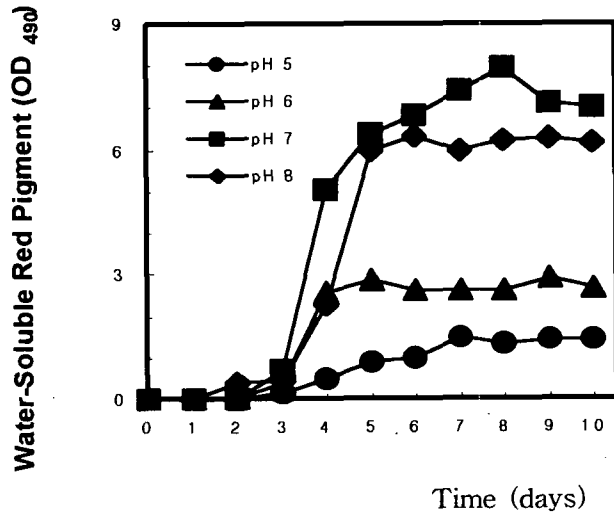


Fig. 17. Profiles of water-soluble red pigment at various initial pH

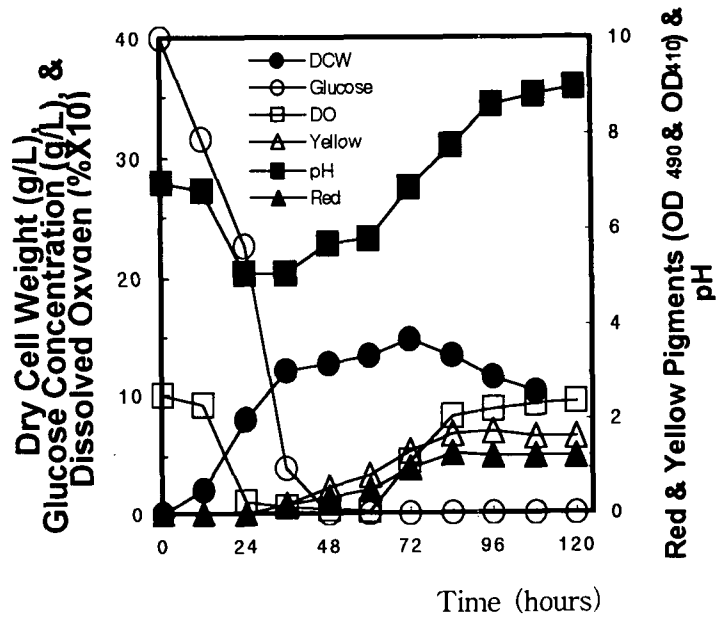


Fig. 18. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 500 rpm, 1.0 vvm

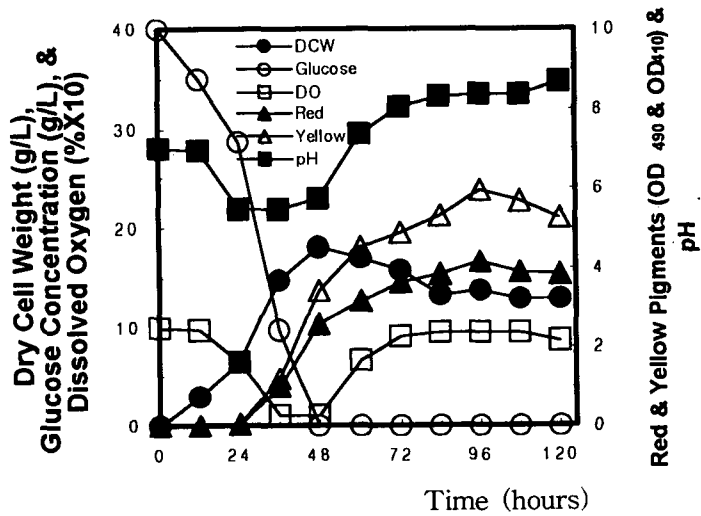


Fig. 19. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 600 rpm, 1.0 vvm

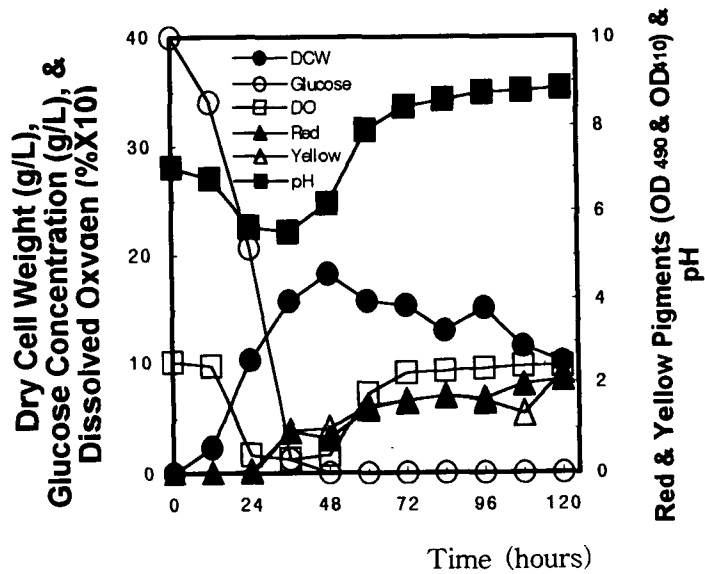


Fig. 20. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 600 rpm, 1.5 vvm

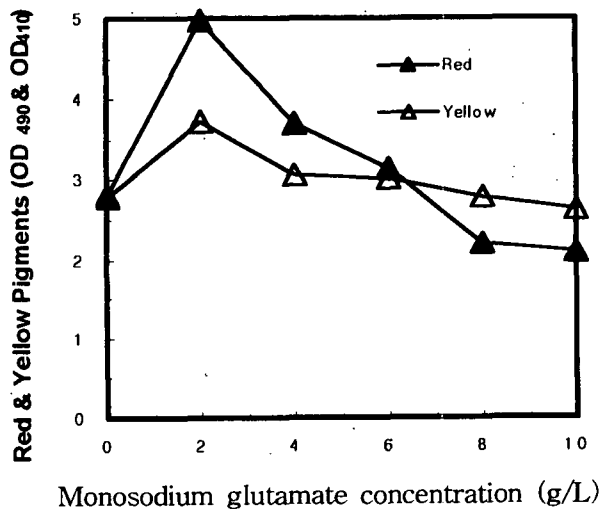


Fig. 21. Effect of monosodium glutamate (MSG) with different concentration

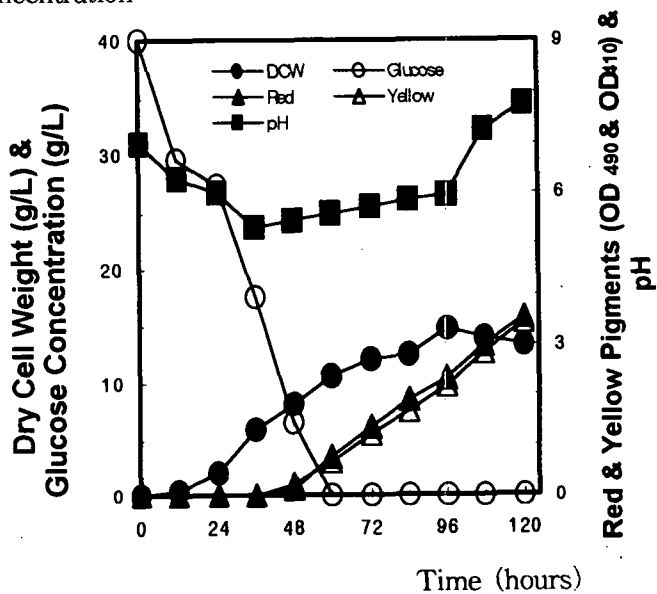


Fig. 22. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH

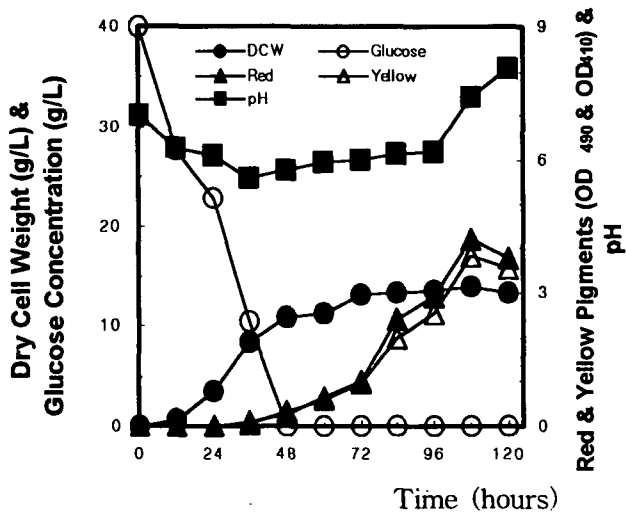


Fig. 23. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 2 g/L of MSG at the start of cultivation

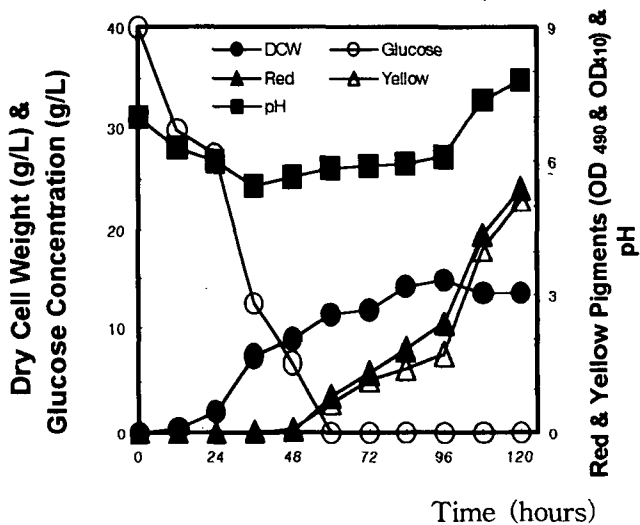


Fig. 24. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 2 g/L MSG at 1 day



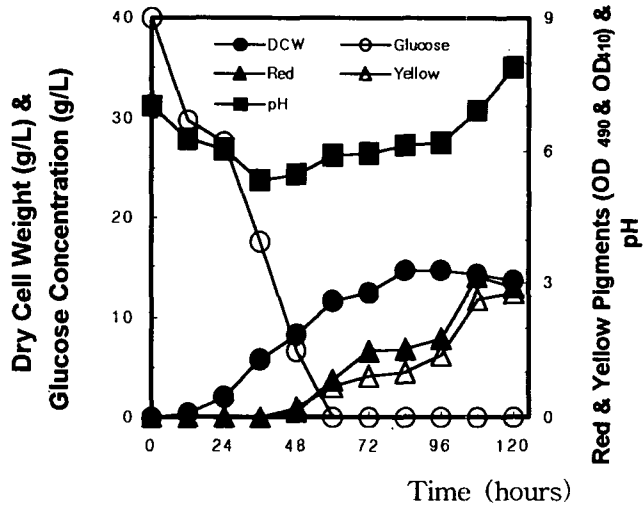


Fig. 25. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 2 g/L of MSG at 2 days

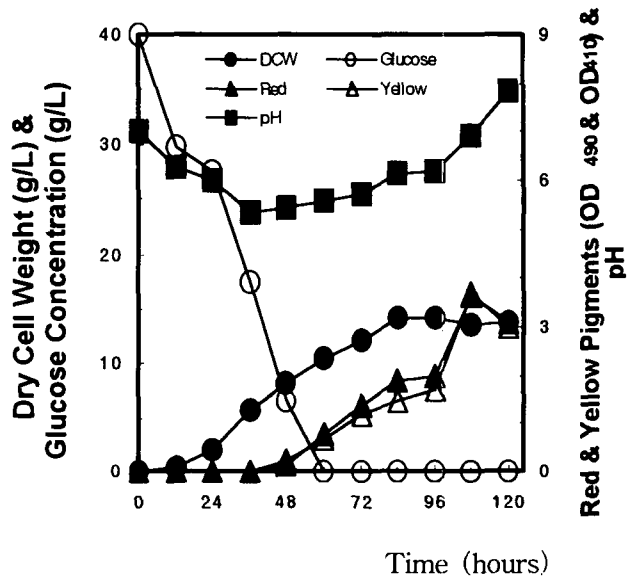


Fig. 26. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 2 g/L of MSG at 3 days

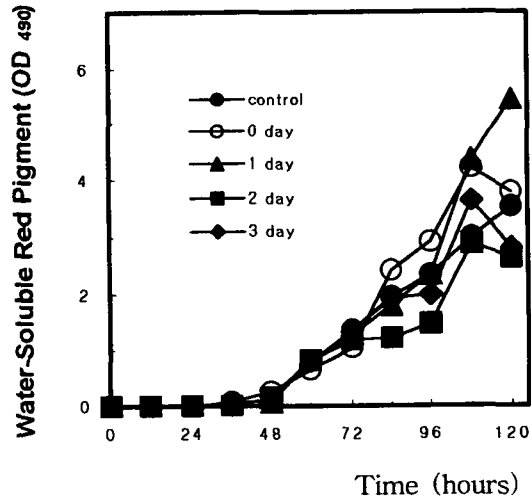


Fig. 27. Profiles of water-soluble red pigment with adding 2 g/L of MSG at each day

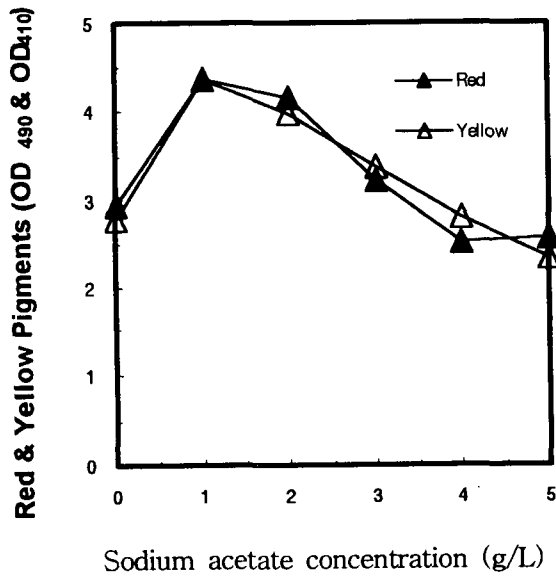


Fig. 28. The effect of sodium acetate(SA) with different concentration on the pigment production

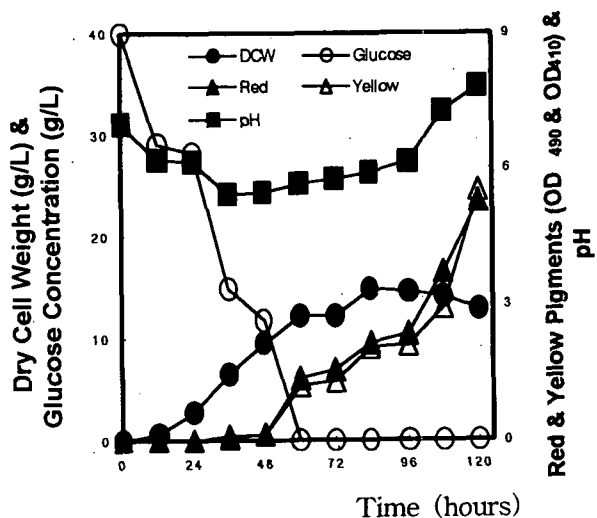


Fig. 29. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 1 g/L of SA at the start of the cultivation

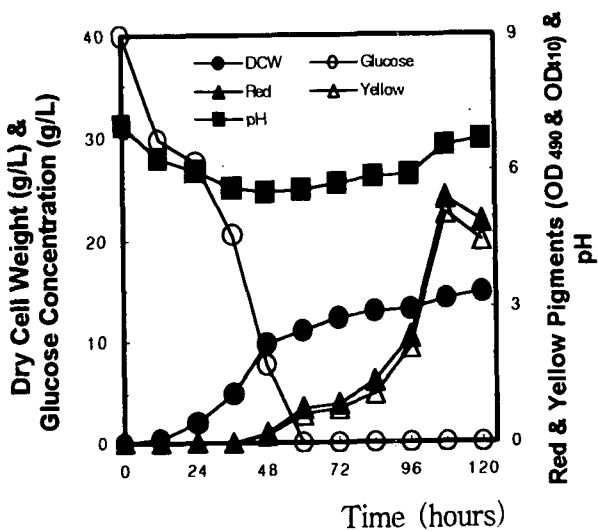


Fig. 30. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 1 g/L of SA at 1 days

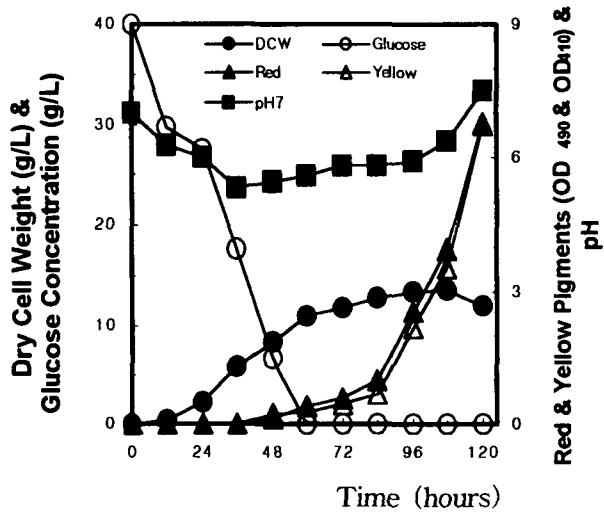


Fig. 31. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH with adding 1 g/L of SA at 2 days

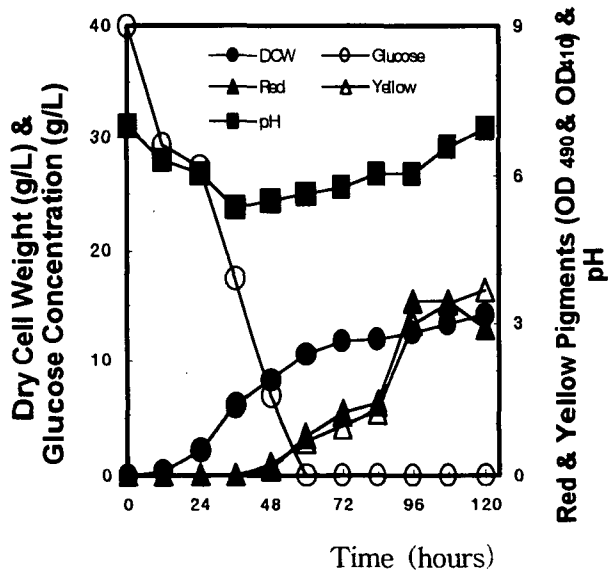


Fig. 32. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and pH with adding 1 g/L of SA at 3 days

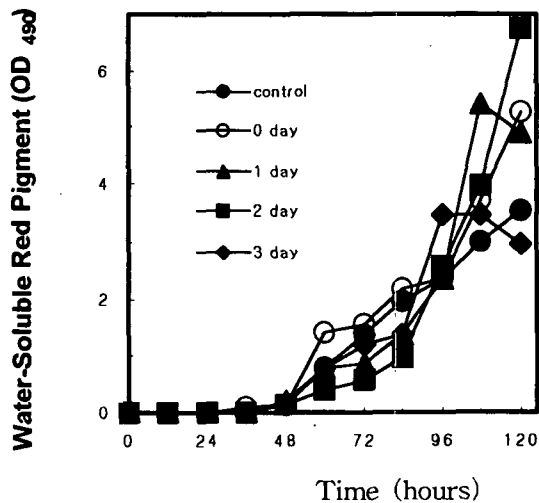


Fig. 33. Profiles of water-soluble red pigment with adding 1 g/L of SA at each day

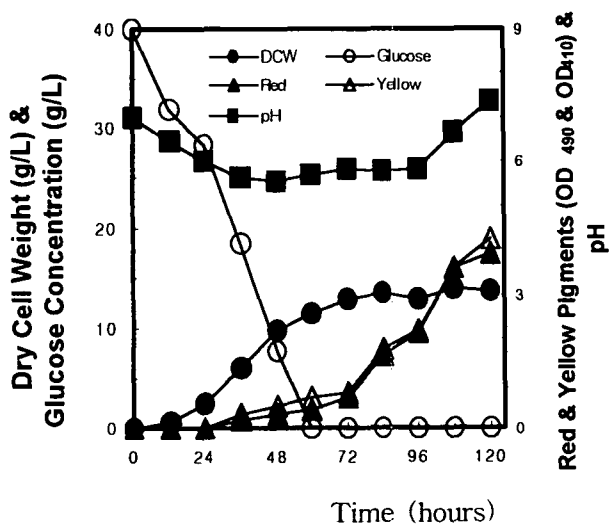


Fig. 34. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments and pH with adding 2 g/L of MSG at 1 day and 1 g/L of SA at 2 day

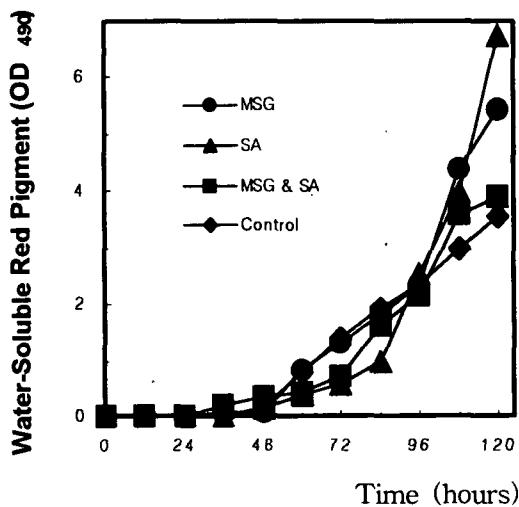


Fig. 35. Profiles of water-soluble red pigment with adding of MSG (2 g/L), SA (1 g/L) and both (MSG 2 g/L & SA 1 g/L)

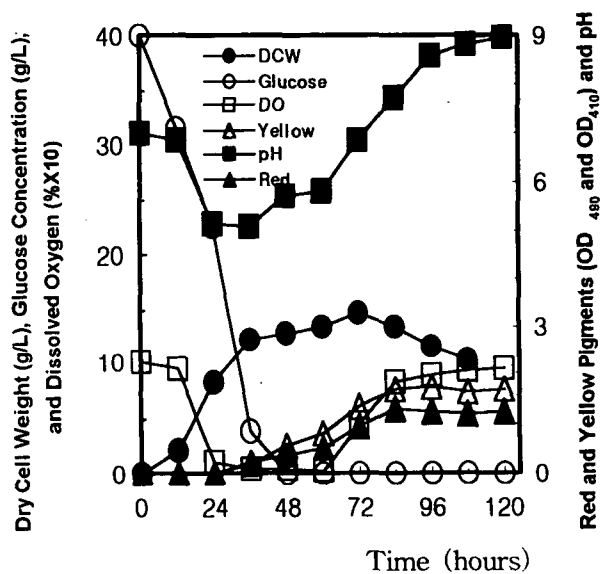


Fig. 36. Fermentation profiles of dry cell weight, glucose concentration red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 500 rpm, 1.0vvm

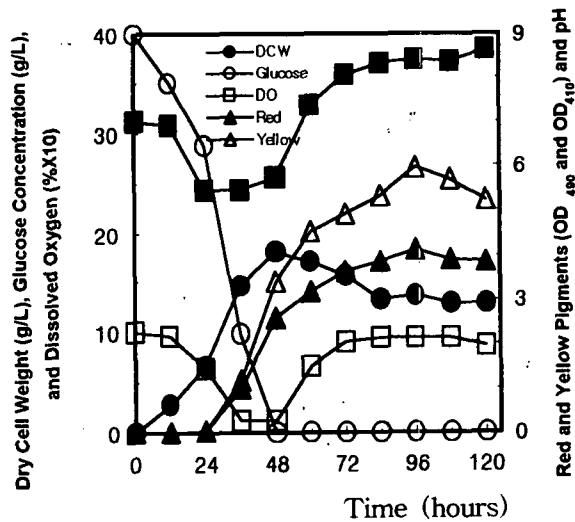


Fig. 37. Fermentation profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 600 rpm, 1.0vvm

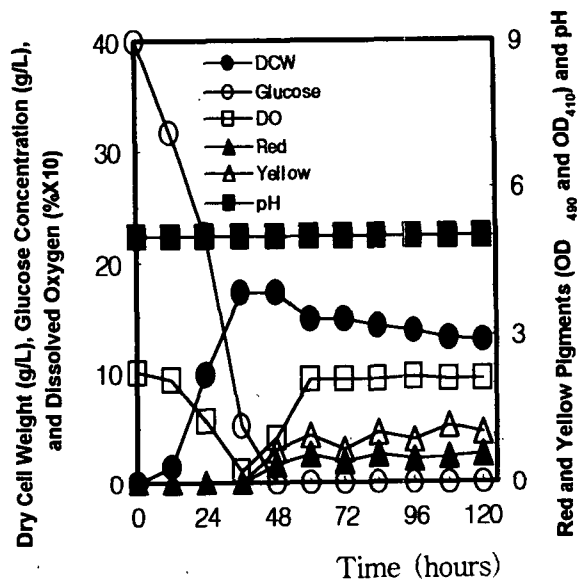


Fig. 38. Fermentation profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, dissolved oxygen, and pH with 600 rpm, 1.5vvm

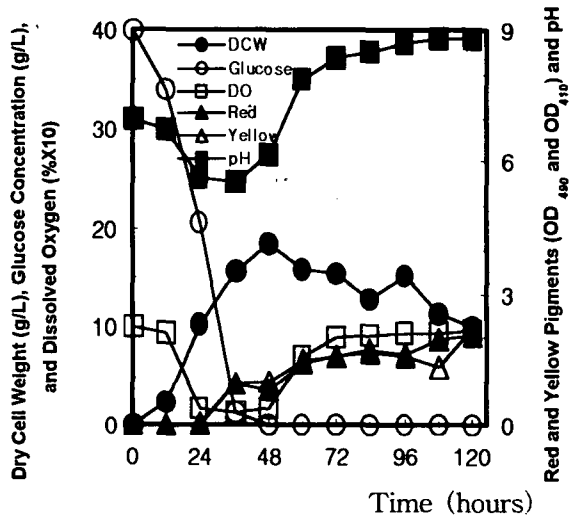


Fig. 39. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and dissolved oxygen with controlling at pH 5

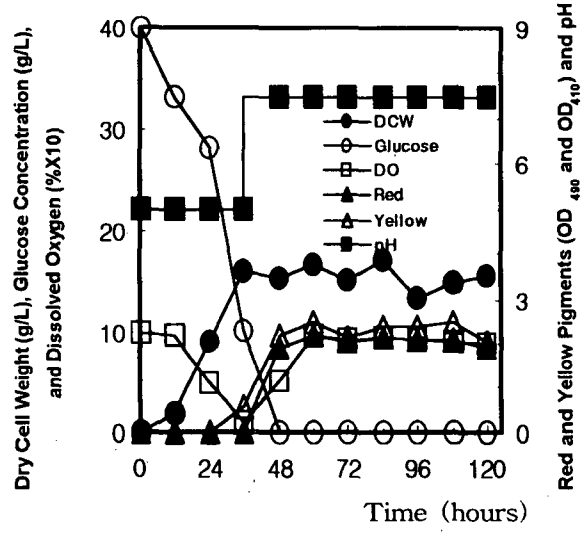


Fig. 40. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and dissolved oxygen with the shift from pH 5 to pH 7.5 at 36 hours of the cultivation



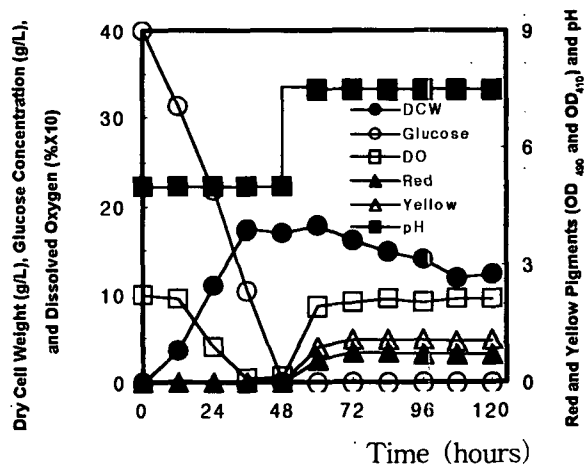


Fig. 41. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and dissolved oxygen with the shift from pH 5 to pH 7.5 at 48 hours of cultivation

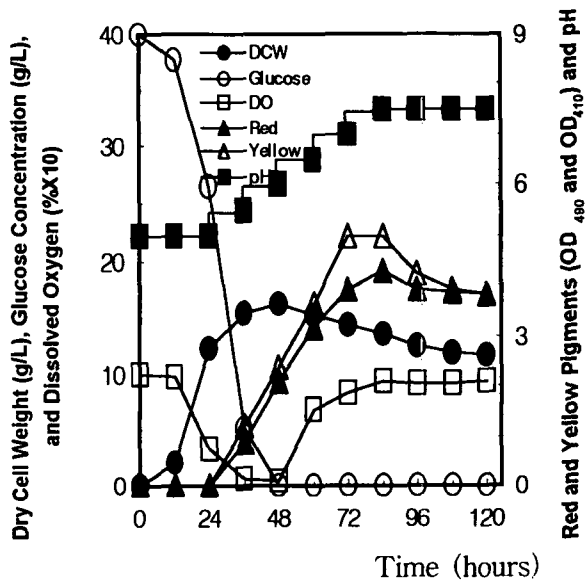


Fig. 42. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and dissolved oxygen with the modified pH control

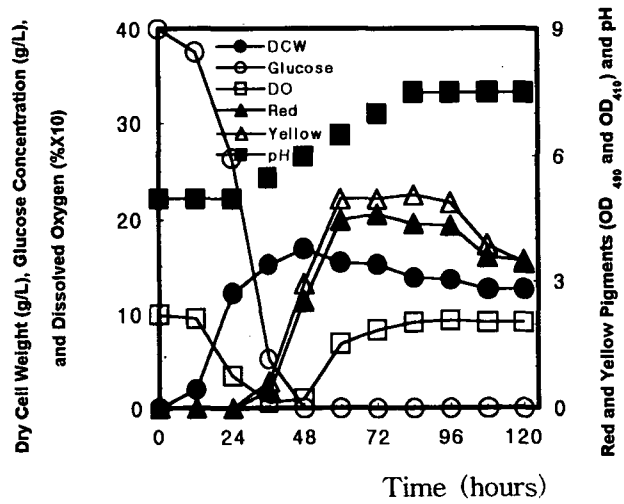


Fig. 43. Profiles of dry cell weight, glucose concentration, red & yellow pigments, and dissolved oxygen with the modified pH control and adding 1 g/L of acetate at 1.5 days of the cultivation

## 4. 결론

균체 성장을 위한 배지에서 35종의 균주들을 4일 동안 배양한 결과 20 g/L 이상의 고농도의 균체량을 나타내는 균주들을 찾아낼 수 있었다. 그리고 수용성 적색소의 생산에 사용되었던 균주인 *Monascus ruber* IFO32318에 적용한 경우에도 20 g/L 정도의 균체량을 얻을 수 있었다.

플라스크 배양에서 수용성 적색소를 생산하기 위한 최적의 초기 pH는 7로 결정되었고 이를 색소 생산을 위한 최적 배지에 적용한 결과 배양 5일에 3.5 정도의 흡광도 값으로 수용성 적색소를 생산하였다. 최적 농도인 2 g/L의 monosodium glutamate를 배양 1일째에 첨가한 경우 배양 5일에 5.5 정도의 흡광도 값으로 수용성 적색소를 생산할 수 있었으며 sodium acetate의 최적 농도인 1 g/L를 배양 2일째 첨가한 경우에는 배양 5일에 2배에 달하는 흡광도 값인 7 정도의 수용성 적색소를 생산하게 되었다. Monosodium glutamate와 sodium acetate를 모두 첨가하여 배양한 경우에는 배양 5일에 4 정도의 흡광도 값으로 glutamate나 sodium acetate만을 첨가하여 배양한 경우 보다는 적은 양의 수용성 적색소를 생산하였다. 따라서 수용성 적색소의 생산을 위하여 1 g/L의 sodium acetate를 세포 성장이 exponential 시기인 배양 2일째에 첨가하는 것이 가장 최적임을 알 수 있었다.

생물반응기를 이용한 회분 배양에서 수용성의 적색소를 생산하기 위한 최적의 교반속도와 통기량은 600 rpm과 1.0 vvm이었다. pH를 5로 일정하게 조절하여 *Monascus* sp.를 배양할 경우 0.6 정도의 흡광도 값으로 매우 적은 양의 수용성 적색소를 생산하였는데 오히려 pH를 조절하지 않고 배양한 경우에는 배양 4일에 4 정도의 흡광도 값으로 수용성 적색소를 생산하였다. 그러나 세포 활성을 고려하여 인위적으로 pH를 조절하면서 배양함과

동시에 sodium acetate의 최적 농도인 1 g/L를 exponential 시기인 배양 1.5일째에 첨가한 결과 급속도로 수용성 적색소의 생산이 이루어져 3일만에 4.5 이상의 흡광도 값으로 많은 양의 수용성 적색소를 생산할 수 있었다. 이는 플라스크 배양과 비교할 경우 비록 적은 양을 생산한 것이지만 수용성 적색소를 생산하기 위한 배양기간을 단축시키는 결과를 초래하여 생산성을 높일 수 있었다. 그리고 이 때 균체량 또한 배양 2일에 18 g/L 정도의 고농도를 생산할 수 있었다.

1. S. Izawa, N. Harada, T. Watanabe, N. Kotokawa, A. Yamamoto, H. Hayatsu, and A. K Sakae, "Inhibitory effects of food-coloring agents derived from *Monascus* on the mutagenicity of heterocyclic amines" (1997), *J. Agric. Food. Chem.*, 45(10), 3980-3984
2. Y.-C. Su and J.-H. Huang, "Fermentative production of anka-pigment (*Monascus*-pigments)" (1980), *Proc. Natl. Sci. Council ROC*, 4(2), 201-215
3. C.-S. Kim, S.-H. Rhee, and I. Kim, "Studies on production and characteristics of edible red color pigment produced by mold (*Monascus* sp.)" (1977), *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 9(4), 277-283
4. C. J. Alexopoulos, C. W. Mims, and M. Blackwell, 4th ed., (1996), *Introductory Mycology*, 294-322, John Wiley & Sons, Inc.
5. M. J. Carlile and S. C. Watkinson, (1994), *The Fungi*, 39-51, Academic Press, Inc.
6. P. Juzlova, L. Martinkova, and V. Kren, "Secondary metabolites of the fungui *Monascus*: a review" (1996), *J. Ind. Microbiol.*, 16, 163-170
7. 김수언, 김정구, "*Monascus anka*의 균주선발 및 색소생성 조건"(1990), *한국농화학회지*, 3(3), 239-246
8. H. S. Kim, U. Chang, C. H. Son, J. C. Bae, and J. H. Yu, "Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2 (Part 3, Safety test of yellow pigment)" (1981), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 9(3), 117-121
9. H. S. Kim, H. S. Kwak, H. S. Yang, Y. R. Pyun, and J. H. Yu, "Studies on the red pigment produced by *Monascus* sp. in submerged

- culture (Part II, Production of crude pigment, physical and physiological characteristics)" (1979), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 7(1), 31-36
10. C.-F. Lin, "Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture" (1973), *J. Ferment. Technol.*, 51(6), 407-414
  11. P. J. Evans and H. Y. Wang, "Pigment production from immobilized *Monascus* sp. utilizing polymeric resin adsorption" (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(6), 1323-1326
  12. L. Pastrana, P. J. Blanc, A. L. Santerre, M. O. Loret and G. Goma, "Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source" (1995), *Process Biochemistry*, 30(4), 333-341
  13. T. F. Lin, K. Yakushijin, G. H. Buchi, and A. L. Demain, "Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic process" (1992), *J. Ind. Microbiol.*, 9, 173-179
  14. H.-C. Wong and P. E. Koehler, "Production of red water-soluble *Monascus* pigments" (1983), *J. Food Sci.*, 48, 1200-1203
  15. C.-F. Lin and H. Iizuka, "Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov." (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(3), 671-676
  16. T. F. Lin and A. L. Demain, "Resting cell studies on formation of water-soluble red pigments by *Monascus* sp." (1993), *J. Ind. Microbiol.*, 12, 361-367
  17. N. K. Mak, W. F. Fong, and Y. L. Wong-Leung, "Improved

- fermentative production of *Monascus* pigments; in roller bottle culture" (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 965-968
18. T. F. Lin and A. L. Demain, "Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments" (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 70-75
  19. M. R. Johns and D. M. Stuart, "Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture" (1991), *J. Ind. Microbiol.*, 8, 23-28
  20. T. F. Lin and A. L. Demain, "Negative effect of ammonium nitrate as nitrogen source on the production of water-soluble red pigments by *Monascus* sp." (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 701-705
  21. N. Lotong and P. Suwanarit, "Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content" (1990), *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 565-570
  22. Y.-K. Lee, D.-C. Chen, S. Chauvatcharin, T. Seki, and T. Yoshida, "Production of *Monascus* pigments by solid-liquid state culture method" (1995), *J. Ferment. Bioeng.*, 79(5), 516-518
  23. O. Han and R. C. Mudgett, "Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations" (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 5-10
  24. Y. Q. Cui, R. G. J. M. van der Lans, and K. Ch. A. M. Luyben, "Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation" (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 57(4), 409-419
  25. A. Singh and O. P. Ward, "Production of high yields of arachidonic

- acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222" (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 1-5
26. M.-H. Chen and M. R. Johns, "Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*" (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 584-590
27. K. Inoue, Y. Mukaiyama, K. Tsuiji, N. Tanabe, S. Tarui, S. Abe, and M. Takahashi, "Effect of beni-koji extracts on blood pressure in ary hypertensive volunteers" (1995), *Jpn. J. Nutr.*, 53(4), 263-271



위탁연구과제명 :

홍국의 혈관평활근세포 성장 조절작용 구명

위탁연구기관 : 성균관대학교 의과대학

위탁연구책임자 : 김덕경

여 백

## 흥국의 혈관평활근세포 성장 조절작용 규명

### 연구방법 및 결과

#### 가. 흥국이 혈관평활근세포 성장에 미치는 영향

##### 1) 혈관평활근세포 (VSMC) 일차 배양

Male sprague-Dawley rat (160-180 g, 4-6 wks old)으로 부터 흉부 대동맥을 사용하였다. 대동맥혈관주위의 loose connective tissue를 제거한 후 enzyme mixture (1 mg/ml type2 collagenase, 0.25 mg/ml elastase, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2 mg/ml bovine serum albumin)에 담아 37°C에서 10분간 반응시켜 혈관내피세포를 제거하고 adventitia와 media의 박리를 용이하게 하였다. Dissecting microscopy하에서 adventitia를 박리한 후 media를 2-3 mm로 자른 후 이를 enzyme dissociation mixture에 담아 37°C에서 60분간 shaking하였다. VSMC이 분리되면 fetal bovine serum (FBS)의 최종농도가 20%되도록 첨가하여 enzyme을 비활성화 시킨 후 1000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 세포배양액 (DMEM/F12+10% FBS)에 재부유시켜 T25 cm<sup>2</sup> flask에서 배양하였다. 세포들을 1:3의 비율로 passage후 passage 4-12의 세포를 실험에 사용하였다. 배양된 세포가 VSMC임을 확인하기 위하여 면역조직화학적 방법으로 alpha-actin양성임을 확인하였다.

## 2) 홍국이 serum에 의한 VSMC의 성장에 미치는 영향

일차 배양된 세포를 24 well plate에  $10^5$ /well 되도록 분주하였다. 세포들이 confluence상태에 도달하면 defined serum free media (DMEM/F12+0.2% BSA)로 교환한 후 48h동안 배양하여 quiescent상태로 만들었다. 홍국에 의한 VSMC의 성장억제작용의 보다 정확한 규명을 위하여 serum에 의한 VSMC의 성장을 가장 정확히 분석할 수 있는 최적 실험 조건을 구하고자 하였다. Serum의 농도와 시간을 달리하여 VSMC에 처리한 후방사선 동위원소로 표지된  $^3\text{H}$ -thymidine과  $^3\text{H}$ -uridine을 각각 5 uCi 씩 넣고 4h동안 표지 시킨 후  $\beta$ -counter로 측정하였다. 실험결과 VSMC의 DNA 합성은 FBS의 농도에 비례하여 20-24h 사이에 가장 많이 증가하였다. 이 실험결과를 바탕으로 최적조건으로 생각되는 5% serum에 홍국 농도를 각각 0.3 ug/ml, 3 ug/ml, 30 ug/ml, 300 ug/ml으로 24h 동안 처리한 후 DNA합성과 RNA합성을 측정하였다. 실험결과 No.34 균주의 홍국은 농도에 비례하여 평활근세포의 DNA합성과 RNA합성을 억제하였다 (Fig.1),(Fig.2).

## 3) 세포괴사 및 세포고사에 미치는 영향 규명

일차 배양된 평활근세포를 6 well plate에  $3 \times 10^5$ /well 되도록 분주한 후, 위와 동일한 조건으로 세포를 배양하여 홍국을 세포에 처리하였다. inverted microscopy로 세포의 형태를 관찰하였다. 홍국 No.34 균주를 각각 0.3ug/ml, 3 ug/ml, 30 ug/ml, 300 ug/ml으로 처리하였을 때 세포 내의 vacuole의 증가나, cytoplasm의 수축은 관찰되지 않았으며, 세포는 건강하게 보였다.

홍국의 세포성장 억제 작용이 세포괴사 또는 세포고사에 의한 것인지를

알아보기 위하여 다음의 실험들을 수행하였다. 홍국이 평활근세포의 괴사를 유도하는지 알아보기 위하여 세포 부유액을 모아서 LDH assay를 수행하여 cytotoxic effect가 있는지를 실험하였다. 실험결과, 홍국 No.34의 균주는 negative control에 비해 최고농도 300 ug/ml 에서도 LDH의 양이 단지 1.43배의 증가하여 cytotoxicity를 보이지 않았다 ( $p > 0.05$  vs control).

**(Fig.3)**

홍국이 평활근세포의 고사를 유도하는지 알아보기 위하여 세포에서 DNA를 분리하여 DNA ladder assay를 수행한 결과 홍국 No.34 균주를 처리한 평활근세포에서 세포고사의 특징적인 소견인 DNA fragmentation에 의한 ladder를 관찰할 수는 없었다 (Fig.4).

따라서 위의 실험결과를 종합해 보면 홍국 No.34 균주에 의한 평활근세포 성장억제 기전은 세포괴사나 세포고사는 아닌 것으로 생각된다.

나. 홍국의 혈관확장작용의 기전 규명

Acetylcholine, bradykinin, histamine 등의 혈관활성물질들은 혈관내피세포를 자극함으로써 EDRF (endothelium derived relaxing factor)인 NO를 유리시키고 이 유리된 NO는 혈관이완 시그널을 혈관내피세포로부터 인접한 VSMC로 전달하여 혈관확장을 일으킨다. 이 과정에서 VSMC 내에는 cyclic GMP가 증가하여 혈관확장이 일어나며 이때 NO는 혈관내피세포에 의존하는 혈관확장(endothelium-dependent relaxation)의 중요한 인자가 된다. NO는 NO synthase에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변환되는 과정에서 생성되며 이 과정에서 NADPH와 산소가 필요하다. NO synthase (NOS)는 두 가지 형태가 존재하는데 그 하나는 주로 혈관내피 내에 존재하며 결합된  $Ca^{2+}$ /calmodulin이 자극되어 수용체를 통해 단시간 내에 NO를

방출시키는 cNOS (constitutive NOS) 효소와, 다른 하나는 VSMC, 대식세포 등에서 cytokine에 의해 활성화되면서 유도되는 형태로, 주로 장시간에 걸쳐 NO를 생성시키는 iNOS (inducible NOS) 효소가 알려져 있다.

홍국에 의한 내피의존성 혈관확장작용의 기전을 규명하기 위하여 본 연구진은 홍국이 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)에서 NO를 생성하는지를 실험하였다.

#### 1) 혈관내피세포 일차배양

산모로부터 적출한 umbilical cord의 vein에 0.2% glucose/PBS를 주입하여 세척하고, 0.2% collagenase 로 5-7분간 반응하여 혈관내피세포가 분리되도록 한 후, 정맥내 cord buffer를 주입하여 분리된 세포를 모았다. 이때 FBS의 최종농도가 20%되도록 첨가하여 enzyme을 비활성화 시킨 후 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세척하였다. 세포배양액 (M199, 20% FBS, 50 ug/ml ECGS, 15 u/ml heparin)에 재부유시켜 T25 cm<sup>2</sup> flask에 3x10<sup>5</sup>/ml 농도로 plating하여 배양하였다. 배양된 세포가 혈관내피세포임을 확인하기 위하여 면역조직화학적 방법으로 vWF 양성임을 확인하였다.

#### 2) Nitric oxide(NO)의 산화물인 nitrite, nitrate의 측정법 확립

혈관내피세포에서 분비되는 NO는 빠른 속도로 배양액의 산소라디칼과 반응하여 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)가 되고, nitrite는 계속 산화되어 nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)가 된다. 따라서 NO의 반감기는 수초로서 매우 짧으며, NO를 정량하기 위하여 NO 대신에 그 산화물인 nitrite와 nitrate의 총량을 측정하는 것이 일반적으로 널리 쓰이는 Griess reaction 방법이다. 시간 경과에 따라 nitrite

는 nitrate로 산화되어 두 가지 물질의 총량은 일정하나 각각의 농도는 변하므로 nitrate를 nitrite로 산화시켜 nitrite의 총량을 측정하였다. NO를 정량하기 위하여 세포부유액에 환원효소인 nitrate reductase와 기질로 작용하는 NADPH를 넣고 37°C에서 90분간 반응시켜 산화된 nitrate를 nitrite로 환원시켰다. 여기에 sulfanilic acid를 넣고 10분간 반응시킨 후 NED로 발색하여 ELISA reader로 정량 하였다.

실험조건을 확립하기 위하여 일차 배양된 혈관내피세포에 NO를 생산한다고 알려진 혈관확장제인 histamine 100 uM을 각각 10 min, 1 hr, 4 hrs, 12 hrs 동안 처리하여 시간에 따른 NO의 방출량을 정량 하였다. 또한 NOS 억제제인 L-NMMA 1 mM을 위의 조건에 함께 투여하여 histamine에 의한 NO의 방출이 억제되는지를 실험하였다 (Fig.5). 실험결과 4시간까지는 control에 비하여 histamine에 의한 NO의 생산이 증가되지 않았다. 또한 histamine에 의한 NO의 생성은 NOS 억제제인 L-NMMA에 의하여 억제되어 NO의 산화물인 nitrite와 nitrate를 모두 정량 하는 방법이 정확한 측정법임을 확인할 수 있었다. 이 결과로 미루어 혈관내피세포에서 NO의 방출은 짧은 시간 내에 이루어짐을 알 수 있었고 향후 실험은 흉국을 10 min간 처리 후 NO의 생성을 측정하였다.

### 3) 혈관내피세포에서의 흉국에 의한 NO 생산 연구

NO 측정법을 확립한 후 흉국의 혈관내피세포-의존성 혈관확장 반응이 NO의 생산에 의한 것인지를 실험하였다. 혈관내피세포로부터 No. 34 균주의 흉국에 의한 NO의 생산은 30 ug/ml의 농도에서 8.1 uM로서 control의 약 1.6배의 NO를 생성하였으며 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6), 이러한 NO생성은 NO 합성 억제제인 L-NNA (10 uM)에 의해서 억제되어 흉국이 혈관내피

세포로부터 NO의 생성을 유도함을 알 수 있었다.

## 결론

이상의 실험 결과로 홍국 (34번 균주)은 첫째, 혈관평활근세포의 성장을 억제하였으며, 둘째, 이는 세포고사나 세포괴사에 의한 것이 아니며, 셋째, 혈관내피세포의 NO의 생성을 유도하였다. 따라서 홍국은 혈관평활근세포의 성장 억제 및 혈관확장을 일으키는 물질로서, 심혈관질환의 치료 및 예방에 유용한 물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.



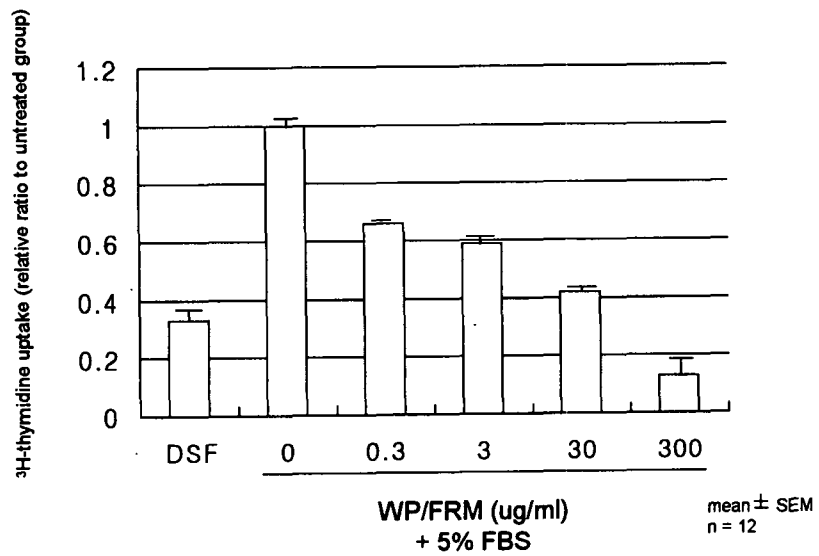


Figure 1. Inhibition of DNA synthesis of VSMC by WP/FRM ( $p < 0.05$  by ANOVA)

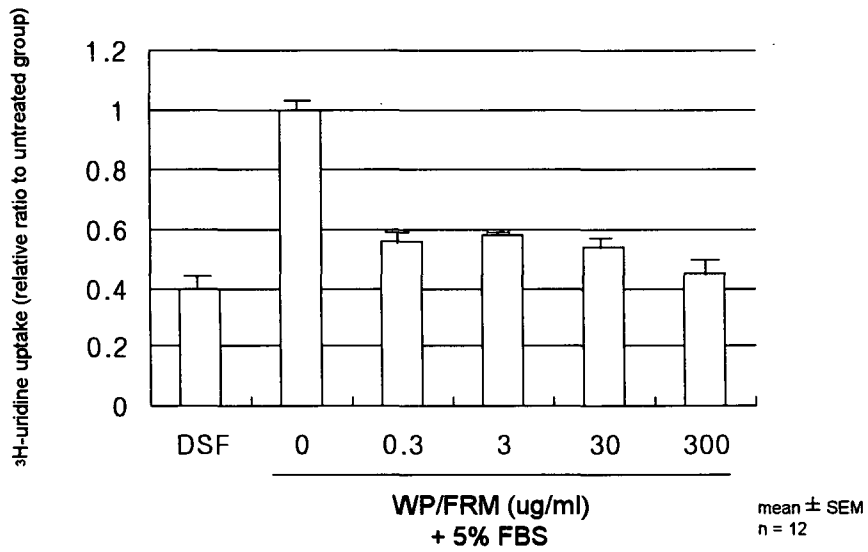


Figure 2. Inhibition of RNA synthesis of VSMC by WP/FRM ( $p < 0.05$  by ANOVA)

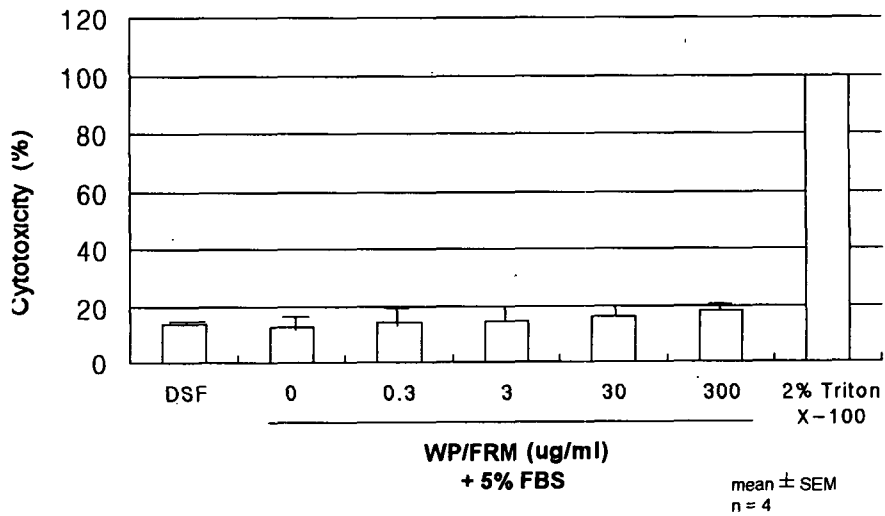


Figure 3. Measurement of cytotoxicity of WP/FRM by LDH assay

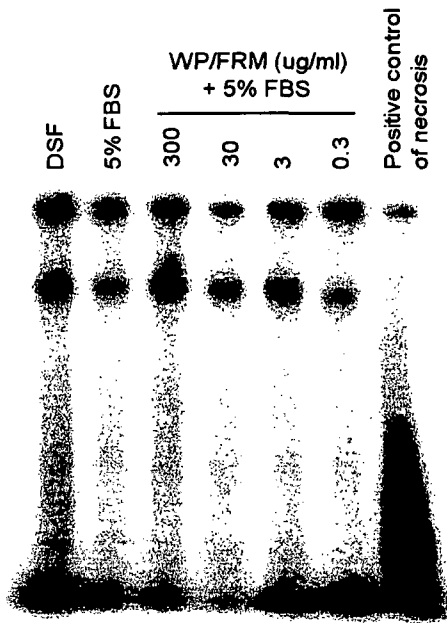


Figure 4. DNA ladder assay of genomic DNA extracted from VSMC treated with WP/FRM

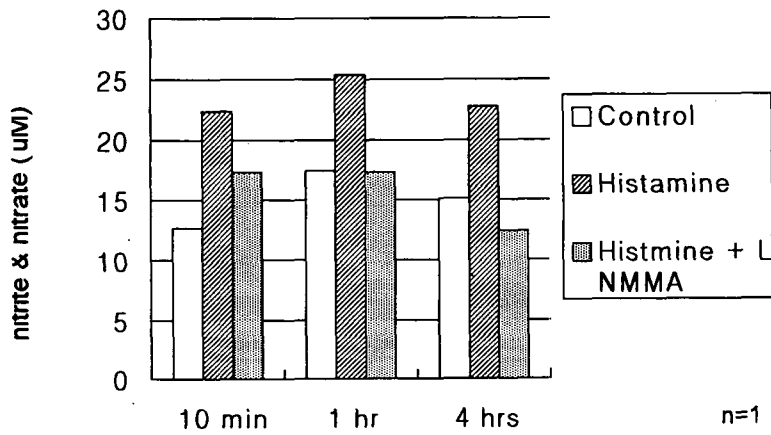


Figure 5. Production of NO (nitrite and nitrate) in endothelium from human umbilical vein

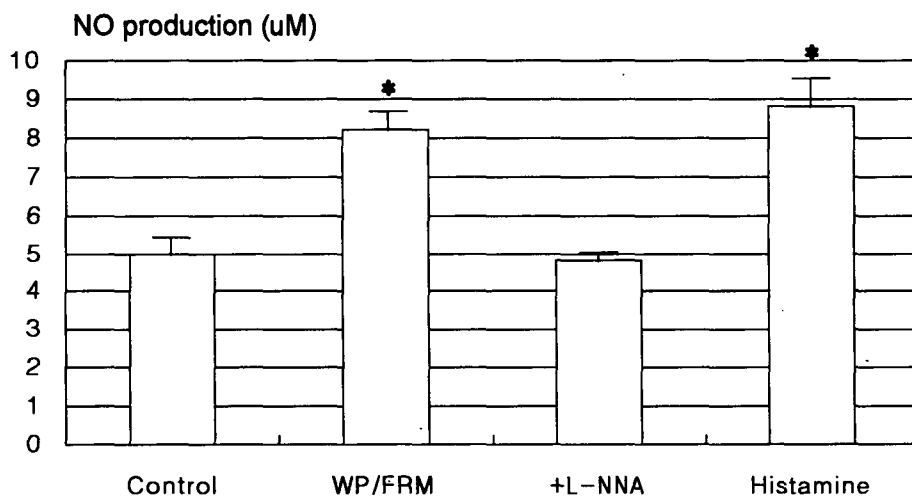


Figure 6. WP/FRM-induced NO production in endothelium from human umbilical vein (\*;  $p < 0.05$  vs control)

**위탁연구과제명 : 고혈압 모델동물을  
이용한 혈압강하효과 확인**

**위탁연구기관 : 삼성생명과학연구소**

**위탁연구책임자 : 한진수**

여 백



## 제 1 장 서 론

본 과제는 한국식품 개발연구원에서 추출한 홍국의 대사산물을 그 배치별로 스크리닝하는 것을 일차목표로 하여 다음과 같은 연구를 하였다.

1) 스크리닝에 사용되는 SHR (Spontaneous Hypertension Rat)을 적정 수준의 고혈압을 유지하도록 육종하여 최적의 실험군을 유지하였다.

2) 일차성 고혈압 모델인 SHR에 경구투여하여 혈압강하에 적절한 효과를 보인 대사산물을 스크리닝하였다.

3) 이와 같은 결과가 이차성 고혈압에도 동일한 혈압강하효과를 보이는가에 대해 외과적, 화학적으로 작출한 이차성 고혈압 모델에 응용하여 혈압강하효과를 알아보았다.

그리하여 본 위탁과제는 다음과 같은 연도별 목표와 세부목표를 정하였다.

표 1. 연구세부목표

연차	연도 목표	세부 목표
1차년도	SHR 혈압강하 검색 기술 확립	SHR의 고혈압 특성을 유지할 수 있는 실험동물의 생육조건 확립 SHR의 혈압강하 효과 측정
2차년도	고혈압모델동물을 이용한 혈압강하효과 확인  SHR colony 유지	홍국대사산물 및 혈압강하식품의 in vivo 새 실험모델 확립 이차성 고혈압 모델 Goldblatt 형과 DOCA salt 유발모델 수립 일차성 고혈압 모델인 SHR의 고혈압 지속에 따른 병변관찰 SHR의 sub-strain 분리 및 합병증 모델 수립
3차년도	고혈압모델동물을 이용한 혈압강하효과 확인  국제수준의 SHR colony 유지	이차성 고혈압모델의 유지 및 개량 홍국대사산물의 in vivo 실험

## 제 2 장 국제 수준의 SHR colony 유지와 번식

SHR의 고혈압 특성을 유지할 수 있도록 생육 조건을 유지하고 NIH guideline에 의거한 운영으로 동물실험 및 그 결과에 대한 합리적인 뒷받침을 한다.

환경적으로 국내 최고품질의 고혈압 질환모델의 quality를 유지하기 위해서, 또한 SHR의 고혈압 지속성 병변을 관찰하기 위해, 1차년도에 확립한 온도, 습도, 기압, 환기, 조명, 취기, 소음의 생육조건을 유지하는데 만전을 기하고 있고, 3개월마다 한번씩 낙하균 검사, 배양 및 혈청 검사, 병리조직학적 검사, 사료와 깔짚 검사를 통해 모니터링을 하고 있다.

동물자체에 대해서는 본 연구소에서 유지해오던 SHR(Spontaneous Hypertension Rat)을 지속적인 실험 수행을 위하여 번식시켰다. 번식방법은 일반적인 설치류의 번식법인 한시 동거법으로 암수를 한 케이지에 동거시킨 후 vaginal plug를 확인하면 그날을 임신 제1일로 잡아 번식 계획을 잡는 것이다. 태어난 동물은 생후 2일내에 암수를 확인하여 실험에 쓰이는 수컷과 번식용의 일부의 암컷만을 사육하였으며, 수컷과 암컷 모두 생후 6주에 혈압측정기(MK-1000, Muromachi, Japan)를 이용하여 미근부에서 혈압을 측정하여 수축기 혈압 200mgHg가 넘는 것들만 선발하여 실험과 번식에 사용하였다.

본 과제를 수행하는 전 기간동안 홍콩대사산물의 혈압강하효과를 밝혀내는 주실험대상인 SHR은 수축기혈압 190mmHg이상의 데이터가 나오는 국내 최고품질로 생산되어지고 있다. SHR의 번식이 필요한 이유는 실험에 필요한 적정 혈압을 유지할 수 있는 주령이 16주까지로 제한되어 있어 17주령 이상의 랫드를 사용할 경우 실험 데이터로의 유의성이 없는 것으로

평가되기 때문이다.

장기적 콜로니 유지로 인하여 실험도중 나타난 SHR의 기생충감염 발생 시 가장 빠르고 효과적인 방안을 구상하여 기생충을 완전히 구제하였고 그 결과는 한국 실험동물 학회지에 게재되었다. 또한, SHR의 번식면에서 7월부터 번식률이 떨어지는 현상이 발생하였다. 처음에 들어 온 SHR이 번식용 seed animal이 아니고 고혈압 발현이라는 기능적 면에 초점을 두어 번식하였으며, 또한 inbred strain의 한계가 있기도 하였지만 그러한 유전적 strain자체에 대한 보정과 동시에 사육 환경에 중점을 두어 기존 일차년도에 확립한 생육조건을 유지하는 가운데, 사육사의 부주의에서 오는 소음을 없애고 filter-cap을 케이지마다 씌워서 현재 식살과 번식률의 감소가 회복되었다.

표 2. SHR의 번식 관련 성적

	개선 전	개선 후
mating 후 임신성공빈도	5/13	13/21
출산율	2/5	13/13
자용성비 (수:암)	1:3	1:1.45

그외에 동물들 외에도 본 과제 수행에 없어서는 안될 혈압측정기를 정기적으로 점검하던 중 6월에는 혈압측정기의 accessory인 cuff-liner가 국내 대리점에서 취급을 하지 않는 관계로 직접 일본 본사에서 구매, 결과적으로 총 20만원의 연구비 절감을 하였다. 또한 동일제품의 국산화를 모색하였다.

### 제 3장. 일차성 고혈압 모델에 대한 홍콩대사 산물 및 혈압강하 식품의 *in vivo* 실험모델의 확립

1장에서 계속적으로 생산되는 SHR을 이용하여 주관과제 수행기관인 한국식품개발 연구원에서 추출한 홍콩대사산물을 그 lot마다 각기 혈압강하 효과를 알아보아 가장 혈압강하효과가 좋은 군을 검출하였다 (주관과제 결과 참조). 이를 통하여 홍콩이 혈압강하효과를 나타낸다는 *in vivo* 상의 결과를 확증할 수 있는 계기를 제공하였다.

엄격한 생육조건하에서 생산된 SHR을 가지고 수축기혈압이 190mmHg 이상을 나타나는 개체만을 선별하고 나머지는 도태를 시키는 방법으로 Charles River Japan에서 들여온 SHR을 연구소내에서 육종하여 그 태어난 개체들 중 2차년도에 60%가 190mmHg 이상의 혈압을 유지하였다. 이러한 결과로, 2차년도 후반기부터 실시한 선별을 통한 교배에서 태어난 개체들 중 80%이상이 190mmHg 이상의 고혈압을 나타내어 한층 더 높은 순도의 SHR colony를 유지할 수 있었고, 그동안 삼성서울병원 순환기내과, 강원대학교 수의학과 약리면역학 교실, 전남대학교 의과대학 생리학교실에 공여하였다.

고혈압의 1차적 모델인 SHR(Spontaneous Hypertensive Rat)을 사용한 홍콩의 혈압강하 효과실험에서 홍콩 대사산물의 혈압강하 효과를 실험하였다. 3차년도에서도 지속적으로 한국식품개발연구원에서 추출물이 나오는데로 SHR colony를 유지하면서 혈압강하효과 실험을 실시하였다 (실험결과는 주관연구과제 결과 참조).

## 제 4 장. 이차성 고혈압 모델의 수립과 평가

### 제 1절 서설

원발성 고혈압 모델 동물인 SHR에 대한 실험과 별도로 홍국대사산물이 이차성 고혈압에 효과가 있는가를 알아보기 위하여 다음과 같은 2가지의 모델을 랫드에서 작출하였다. 첫째는 신장성 고혈압 모델동물인 Goldblatt형이고 둘째는 순환기성 고혈압 모델인 DOCA salt 모델이다. 이들 모델을 minor surgery와 chemical 투여로 위의 모델을 4주간에 걸쳐 작출하고 혈압측정기 (MK-1000, Muromachi, Japan)를 이용하여 미근부에서 혈압을 측정하여 수축기 혈압 200mgHg가 넘는 것들만 선발하였다 (각 모델 별 24마리). 위의 두 모델을 각기 2주간의 실험기간을 1세트로 하여 홍국대사산물을 투여한 후 혈압을 측정하여 이차성 모델에 대한 혈압강하효과를 알아본 결과 홍국대사산물은 이차성 고혈압에는 통계적으로 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다.

### 제 2절 이차성 고혈압 모델의 수립

#### 1. DOCA/salt 형 고혈압 모델 수립

하루를 금식시킨 200g 미만의 수컷 SD(Splague-Dawley) 랫드를 에테르 전마취 후 35mg/kg pentobarbital 복강내주사로 마취시킨다. 마취된 랫드

를 옆으로 누이고 좌측 늑골아래 상복부를 면도 및 소독하고 1-2cm 가량 피부와 복막을 절개하여 좌측신장이 드러나면 신문(hilus)부분에서 신경, 신관, 동.정맥을 silk로 결찰한 후 한쪽 신장을 제거한다(uninephrectomy).

DOCA(deoxycorticosterone acetate Sigma D7000)와 실리콘(한국 신에츠)을 1:2의 비율로 섞어 유리판으로 눌러 굳힌다.

Uninephrectomy를 하고 일주일 후 다시 에테르 마취하에서 DOCA-silicone 600mg/kg(최종 DOCA 농도 200mg/kg)의 비율로 실리콘을 잘라 왼쪽 어깨 피하에 삽입한 후 봉합한다(이차 수술). 이차 수술을 한 날부터 쥐들에게 10% NaCl, 1% KCl R/O수를 먹이며 일주일 후 혈압을 재어 수축기 혈압 190mmHg가 넘는 개체를 선발한다.

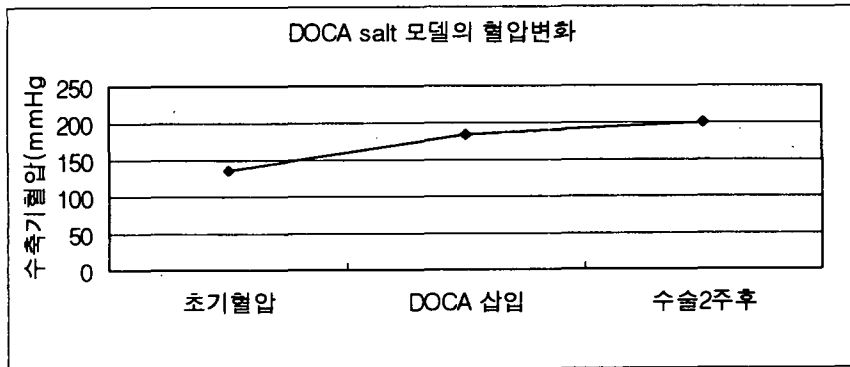


표 3. DOCA salt 모델의 혈압변화

## 2. Goldblatt 형 고혈압 모델 수립

하루를 금식시킨 200g 미만의 수컷 SD(Splague-Dawley) 랫드를 에테르 전 마취 후 35mg/kg pentobarbital 복강내주사로 마취시킨다. 마취된 랫드를 옆으로 누이고 좌측 늑골아래 상복부를 면도 및 소독하고 1-2cm 가량 피부와 복막을 절개하여 좌측 신장이 드러나면 신문(hilus)부분에서 신관, 신동맥, 신정맥에서 신동맥만을 소독된 면봉을 이용하여 박리, 역시 소독된 silver clip을 신동맥에 끼운 후 봉합한다. 수술후 4주가 지나면 혈압을 재서 수축기혈압 190mmHg가 넘는 개체를 선발한다.

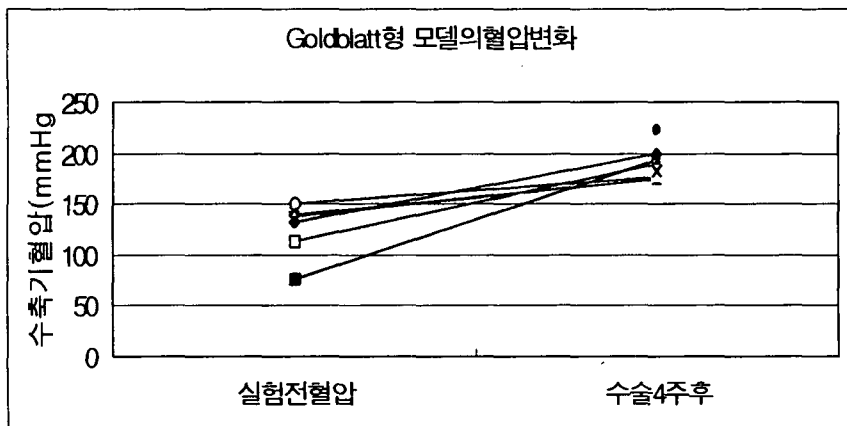


표4. Goldblatt 모델의 혈압 변화



### 제 3절. 홍국대사산물을 투여한이차성 고혈압 모델에 서의 혈압강하 효과확인

#### 1. 홍국대사산물을 투여한 DOCA salt 모델에서의 혈압강하 효과확인

표 3. 에서와 같이 고혈압이 확인이 된 개체에 홍국대사산물을 투여하기 전과 투여한 후 1, 3, 5, 7, 24시간 후에 혈압을 측정하였다(표 5). 그러나, 홍국이 실험에 사용된 SD rat의 혈압을 통계적으로 유의성있게 강하시킨다고 볼 수 없어서 작출한 모델을 폐기하였다. 즉, 작출된 모델의 고혈압 생성 메카니즘과 홍국대사산물의 혈압강하 메카니즘이 일치하지 않는다는 결론을 내릴 수 있었다. DOCA salt 모델은 쥐에 adrenal hyperplasia를 유발하여 고혈압을 나타내는데, 이는 사람의 adrenocortical dysfunction에 의한 고혈압과 유사하다. 그러나 본 실험에 사용한 홍국대사산물은 코르티코이드성 고혈압에는 혈압강하효과가 없는 것으로 추정되었다. 이것을 증명하기 위해서는 동물 모델링보다는 *in vitro* 실험이 선행되어야 할 것으로 사료되어 본 연구에서는 이 부분의 연구를 재고하기로 하였다.

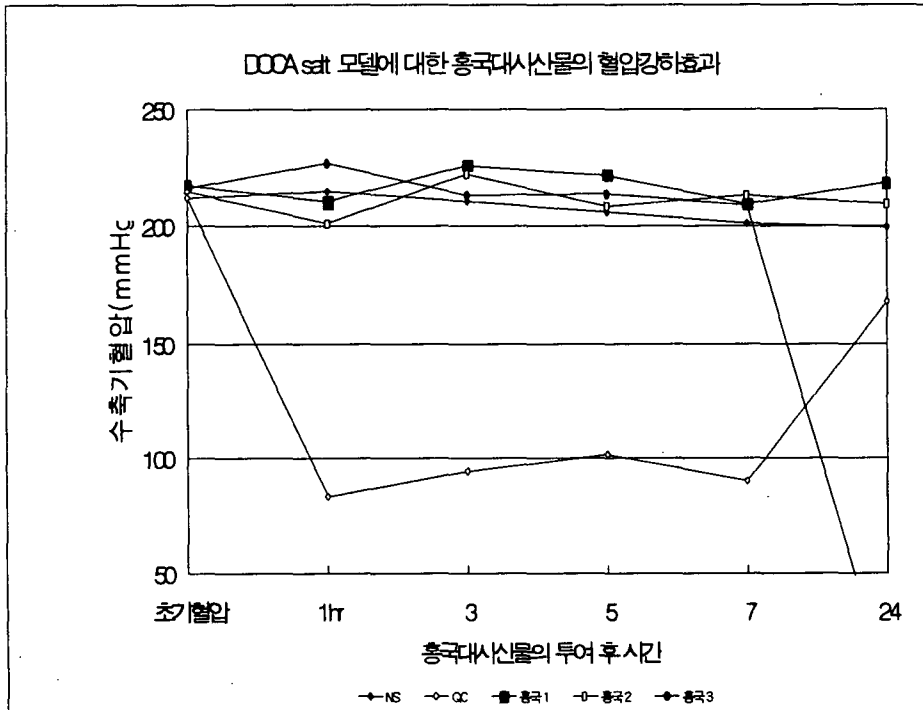


표 5. 홍국대사산물의 DOCA salt 모델에 대한 혈압강하효과

## 2. 홍국대사산물을 투여한 Goldblatt 모델에서의 혈압강하 효과확인

제2절과 같은 방법으로 Goldblatt 모델을 작출하여 표4.와 같이 고혈압을 유발시켰으나 Goldblatt 모델을 사용하여 홍국대사산물을 투여한 후 그 혈압의 변화를 측정하였다. 그러나, 실험한 결과로 볼 때 대조군과의 차이가 나타나지 않고 개체별 차이가 커서 유의성이 있다고 볼 수 없어 이차성 모델을 폐기하였다.

그러나, 실험기술의 개발면에서는 전년도 80%의 성공률을 보인 Goldblatt형 고혈압모델의 고혈압 유발 성공률을 다음과 같은 방법으로 높

었다. 종래의 방법은 수술시야가 동물의 복측이 시술자에게 정면으로 두어 동물의 신장을 찾는다는 편했으나 내부장기와 동물의 신혈관 중 clipping 할 신동맥이 정맥보다 적게 노출되어 clipping시 숙련자가 하지 않을 경우 혈관이 파열되는 경우가 많았으나 동물의 배측을 시술자의 정면에 두어 주변장기에 의한 수술야를 가리는 일이나 clipping시 혈관파열이 일어나는 일이 없어졌으며 신동맥 부위도 일정한 위치에 시술이 가능하여 이러한 방법으로 시술한 동물들은 고혈압의 유발이 100% 나타났고 초심자도 쉽게 배울 수 있었다. 이로 인해 동물과 고가인 순은의 낭비가 줄었다.

## 제5장 기타

### 제 1절 일차성 고혈압 모델인 SHR의 고혈압 지속에 따른 병변 관찰과 SHR의 sub-strain 분리 및 합병증 모델 수립

이차년도의 연구목표로 두었던 일차성 고혈압 모델인 SHR의 고혈압 지속에 따른 병변 관찰과 SHR의 sub-strain 분리 및 합병증 모델 수립은 지속적으로 SHR colony를 유지 번식하면서 3년간이 장기간 사육과 다세대간 번식으로 인해 나타날 수 있는 회전, 반복, 섭취 이상 등의 특이행동이 나타나면 해당동물을 부검하여 고혈압지속과 관련된 병변이 있는가를 확인하고 둘째로 SHR에서 분리된 뇌졸중 질환모델인 SHR-sp의 국내 수립을 통한 질환모델의 국산화를 목표로 두어 사육기간 중 관찰하였으나 특이행동이 관찰되지 않았다.

### 제 2절 기술 지원과 교육

본 위탁과제의 목표에는 명시화 되지 않았으나 일차성 고혈압 in vivo 모델인 SHR을 확립하고 노하우가 축적되면서 주관과제 수행기관인 한국식품개발연구원 및 삼성서울병원 순환기 내과, 고려대학교 생명과학원에 혈압측정기술 및 고난이도의 zonde를 이용한 설치류 경구투여법을 기술 지원 및 교육하였는데, 이를 통하여 정보기술의 공유를 이룩하였다.

또한, 3차년도에 주관연구과제 수행기관에서 실시한 2차에 걸친 홍국함유 된장 분말사료 투여실험에서 사료의 공급과 기계를 사용한 고른 배합 및 사육관리를 지원하였다.

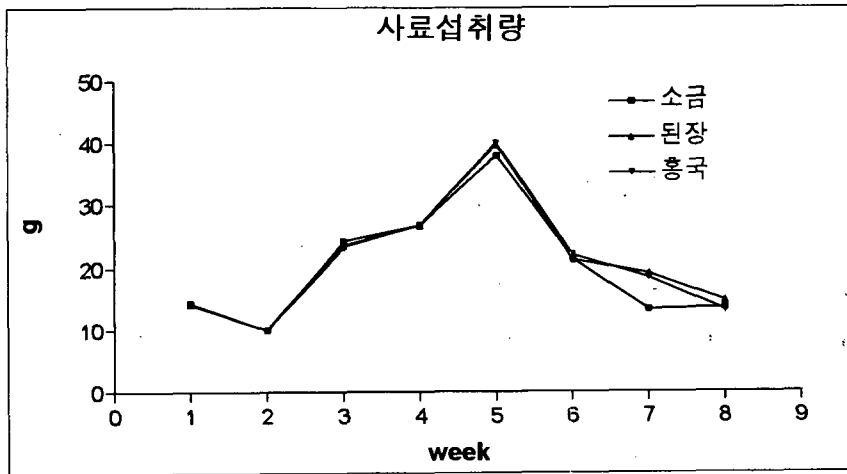


표6. 4주령 SHR에 실시한 홍국함유 된장사료의 군별 평균섭취량

## 제 6장. 본 과제의 의의

본 위탁과제를 수행하면서 본 기관은 우리나라 최고수준의 SHR을 유지군으로 3년간 육종하고 유지하여 주관과제에서 생산한 홍국대사산물을 스크리닝하는 기초적 목적 외에도 낮은 수태율과 높은 식살의 빈도로 인하여 번식이 까다로운 질환모델 동물을 번식시키는 노하우를 축적하였으며 이를 토대로 다른 질환모델 strain에서의 colony 유지시에 그 유지 기간을 단축시키는 효과를 얻을 수 있었다. 이를 통해, 사회적 기여면에서 삼성생명과학연구소에서 육종한 SHR을 전남대학교와 강원대학교 수의학과 면역약리학 교실 등 기타 연구소에 공여함으로써 새로운 실험적 고혈압 모델을 국내에 공급하는 성과를 올렸다. 그외에 고려대학교 생명과학원에 본 연구소의 경험을 바탕으로 혈압측정의 컨설팅과 교육을 하였다.

연구기술을 지원하며 국내 동물실험 결과의 국제적 신뢰성을 제고한다는 목표면에서 일맥상통하는 면으로 이차성 고혈압 모델 2종을 작출하였는데 비록 홍국대사산물의 혈압강하 메카니즘과는 유의성있는 상관관계를 알 수 없었으나 국내에 이차성 고혈압 모델 작출법을 set up하는 계기가 되었다. 기술적으로는 각종 고혈압 질환 모델의 확립과 기존 모델 및 신규 확립 모델과의 비교 검증을 통해 국내 실험동물 실험결과의 국제적 신뢰성을 제고하고, 경제산업적 측면으로는 고혈압 모델을 국내에서 공급하는 국산화로 실험고유비용을 감소시키는데 일조하며 이를 통해 수입대체효과 및 고부가가치 산업을 육성하는데 의의가 있다.

이를 통해 국내 생명과학 기술 수준을 높이는 기반기술을 제공하고 현대인에게 늘어가는 각종 고혈압의 치료, 연구 사업에 대한 기술 지원 및 고혈압 관련 약제들의 효능을 스크리닝하는 기본 테크닉을 확립하는 계기가 되었다.