J. Fd Hyg. Safety 11(2), 123 - 127(1996)

*Monascus purpureus*에서 황색식용색소의 분리 및 화학적 특성

박영현

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과

Isolation and Chemical Characterization of Yellow Food Pigments from *Monascus Purpureus*

Young-Hyun Park

Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang Univ., Asan-si, Choongchungnam-do, 336-745 Korea

ABSTRACT — The isolation and chemical characterization of yellow food pigments from *Monascus purpureus* were studied according to the compositions of media. *Monascus* yellow pigments were isolated and purified by solvent fractionation, silicagel column chromatography, TLC and HPLC. The retention time of *Monascus* yellow pigments isolated by HPLC was respectively 5 min(I) and 9 min(II) at the yeast malt extract agar(YMA) media and was respectively 4.6 min(III), 5 min(I) 5.7 min(IV), 8.3 min(V), 9 min(II) and 10.7 min(VI) at the malt extract agar (MEA) media. The structure of monascin(I), ankaflavin(II), 6,11-dihydrorubropunctatin(III), 6,11-dihydromonascorubrin(V) and unknown compounds(IV, VI) was elucidated by EI-Mass, H^1 and C^{13} NMR, UV-visible spectrometer. Therefore, it was suggested that 6,11-dihydrorubropunctatin (III) and 6,11-dihydromonascorubrin(V) are new intermediates of *Monascus* yellow pigments.

Key words □ *Monascus purpureus*, yellow pigment, monascin, 6,11-dihydromonascorubrin

식품의 색은 기호성을 좌우하는 중요한 요인중에 하나로서 천연색을 유지하는 것이 최상의 방법이겠으나 가공 이나 유통 과정 중의 변색 및 탈색되기 쉽다. 이에 따라 합성 tar색소가 널리 사용되고 있다. 합성tar색소는 천연색소에 비하여 화학적 안정성과 저렴한 가격 등의 상당한 장점에도 불구하고 tar색소의 인체에 미치는 독성으로 식품의 안전성 문제가 심각하게 대두되면서 최근 천연색소의 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다.[1]

홍국은 적황색소를 생산하는 미생물로 공간과 시간의 제한 없이 계속 배양이 가능하기 때문에 경제적인 장점 뿐만 아니라 오래전부터 중국, 대만, 일본, 필리핀, 인도네시아에서 홍주, 육류가공, 홍두부 등의 착색에 이용되어서 인체에 무해하며, 소화불량, 타박상, 이질 등의 민간약으로도 사용되어져 왔다. 우리나라에서도 홍국 황색소와 적색소를 식품첨가물로 허용되고 있다. 홍국은 1895년 Went에 의해서 홍국에서 *Monascus purpureus*를 분리한 이래 색소 생산에 대한 균주선발, 배양 최적조건, 색소의 분리 및 이용 등의 많은 연구가 보고되고 있다.[2-10] 홍국균이 생산하는 색소들은 적색계(rubropunctatin, monascorubrin), 황색계(monascin, ankaflavin) 및 자색계(rubropunctamine, monascorubramine)의 3종이 알려져 있다. 최근 색소 뿐만 아니라 항균성 또는 콜레스테롤 합성 및 Monoamine oxidase의 저해활성을 갖는 2차대사물질인 ankalactone, monacolin, dihydromonacolin 등이 보고되고 있다.[11-15]

본 연구는 배지조성에 따라 *Monascus purpureus*에서 생산된 황색색소의 분리 및 화학적 특성에 대하여 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배 양

Monascus purpureus went DSM (1379) 균주를 Table 1의 배지조성(pH 6)에 따라 25°C에서 10일간 평판배지에 배양하였다.

조황색색소의 분리 및 정제

평판배지의 집락을 methanol로 추출하여 농축한 methanol extract를 hexane, ethylacetate, n-buthanol, 증류수 등의 순서로 용매분획하였다. Ethylacetate 분획을 slicagel (70-230 mesh) column에서 용매(hexane:ethylacetate=2:1)로

Table 1. Composition of agar medium(pH 6)

YMA medium		MEA medium	
Malt extract	20 g	Malt extract	20 g
Pepton	15 g	Pepton	15 g
Yeast extract	3 g	Agar	15 g
Glucose	20 g	Distilled water	1 L
Agar	15 g		
Distilled water	1 L		

Table 2. HPLC conditions for isolation of yellow food pigments

Column: Cosmosil C18(4.6×250 mm)
Preparative Shimpack ODS(20×250 mm)
Mobil phase: methanol/water=80/20
Flow rate: 1 ml/min
8 ml/min
Detector: 400 nm at UV-Visible

용출되는 흡광도 400 nm에서 강한 흡수력을 갖는 분획을 분리하였다. 이 분획을 조황색색소(crude yellow pigments)라고 하였다. 이 조황색색소는 HPLC(Shimadzu,LC-10A)를 이용하여 Table 2의 분석조건에 따라 분리하였다.

황색색소의 화학적 특성

HPLC에 의해 순수하게 분리 정제된 황색색소의 화학적 특성은 Mass spectrometer(E/B,JMS-AX505H), H^1 and C^{13} Nuclear Magnetic Resorance spectrometer(Bruker, AVANCE DPX 200), UV-visible spectrometer(Shimadzu, UV3101PC) 등의 각종 spectrum을 통하여 나타내었다.

결과 및 고찰

Yeast malt extract agar(YMA) 배지에서 *Monascus purpureus*를 배양하여 분리한 황색색소 분획은 HPLC pattern이 Fig. 1(A)와 같이 retention time이 5분(I)과 9분(II)인 2개의 peak로 분리되었다. Malt extract agar(MEA) 배지에서 배양한 경우에는 Fig. 1(B)와 같이 retention time이 5분(I)과 9분(II)이외에 4.6분(III)과 5.7분(IV), 8.3분(V)과 10.7분(VI) 등의 6개의 peak로 분리되었다. 배지조성의 차이는 yeast extract와 glucose로 균체성장에 중요한 질소원과 탄소원이다. 이상의 결과에서 배지조성에 따라 *Monascus purpureus*는 황색색소의 다양한 2차대사산물을 생산한다고 하겠다.

HPLC 분석용 컬럼에서 확인된 5분과 9분대의 2개 황색

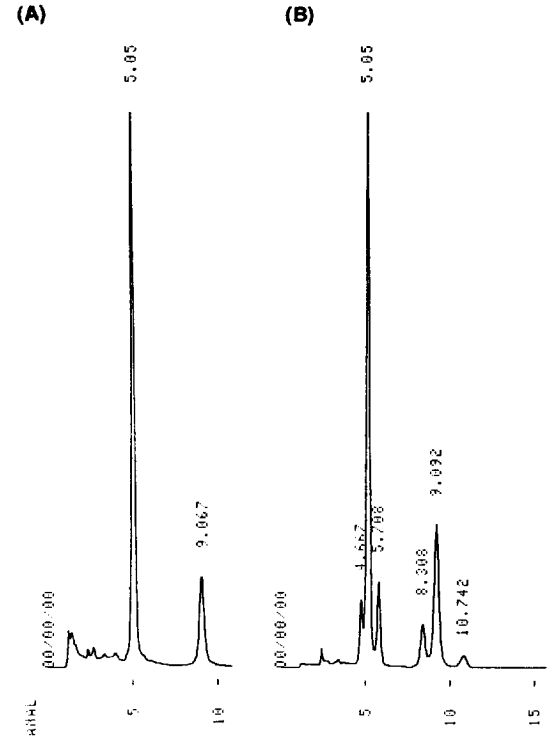

Fig. 1. HPLC chromatogram of *Monascus* yellow pigments at the /YMA media(A) and MEA media(B).

색소를 분취용 컬럼으로 정제하여 화학구조를 규명하였다. EI-MS spectrum에서 2개 황색색소는 m/e=162의 base peak와 358의 molecular ion peak(M^+) 또는 386의 molecular ion peak(M^+)를 나타냈다. Base peak는 monascin이 retro-Diels-Alder 분해반응으로 생성된 cyclohexenone으로 추정된다. 5분대의 황색색소는 분자량이 358인 monascin($C_{21}H_{26}O_5$)으로, 8분대의 황색색소는 분자량이 386인 ankaflavin($C_{23}H_{30}O_5$)으로 추정하였다. 5분과 9분대의 2개 황색색소에 대한 H^1 and C^{13} NMR spectrum의 chemical shift 값(δ)을 Table 3에 나타냈다. 이상의 결과에서 5분(I)과 9분(II)대의 2개 황색색소는 각각 monascin과 ankaflavin으로 확인하였다.

*Monascus purpureus*의 Malt extract agar(MEA) 배지에서 생산 분리한 4.6분과 8.3분대의 2개 황색색소는 EI-MS spectrum에서 m/e=162의 base peak와 356의 molecular ion peak(M^+) 또는 384의 molecular ion peak(M^+)를 나타냈다. 이것은 monascin과 ankaflavin의 기본 화학골격구조에 변화없이 proton(H) 2개 감소된 것으로 추정하였다.

Fig. 2는 5분대와 8.3분대 황색색소의 H^1 NMR spectrum

Table 3. H^1 and C^{13} NMR of *Monascus* yellow pigments

	I and II (Peaks of 5 min and 9 min)		II and V (Peaks of 4.6 min and 8.3 min)
	δ_C(ppm)	δ_H(ppm)	δ_H(ppm)
2	160.6		
3	103.3	5.43(1H, s)	5.41(1H, s)
4	114.0		
5	29.7	2.35-2.49(1H,dd,11.6,17.6Hz) 2.69-2.75(1H,dd,4.4,17.6Hz)	5.98(1H, s)
6	43.0	3.16-3.31(1H,ddd,4.4,11.6,13.2Hz)	3.84-3.89(1H,d,12.3Hz)
7	83.2		
8	189.9		
9	150.9		
10	63.9	4.69-4.74(1H,d,12.6Hz) 5.03-5.93(1H,d,12.6Hz)	7.35(1H, s)
2-1	124.4	5.87-5.93(1H,d,15.3Hz)	5.92-6.01(1H,d,15.3Hz)
2-2	135.5	6.47-6.54(1H,qd,6.9,15.3Hz)	6.44-6.58(1H,qd,6.9,15.3Hz)
2-3	18.5	1.85-1.89(3H,d,15.3Hz)	1.89-1.93(3H,d,15.3Hz)
11	54.9	3.63-3.68(1H,d,13.2Hz)	3.72-3.76(1H,d,12.3Hz)
12	169.6		
7-1	17.7	1.44(3H,s)	1.44(3H,s)
11-1	202.5		
R		$-CH_2(CH_2)_3CH_3$(Monascin) $-CH_2(CH_2)_5CH_3$(Ankaflavin)	$-CH_2(CH_2)_3CH_3$ $-CH_2(CH_2)_5CH_3$

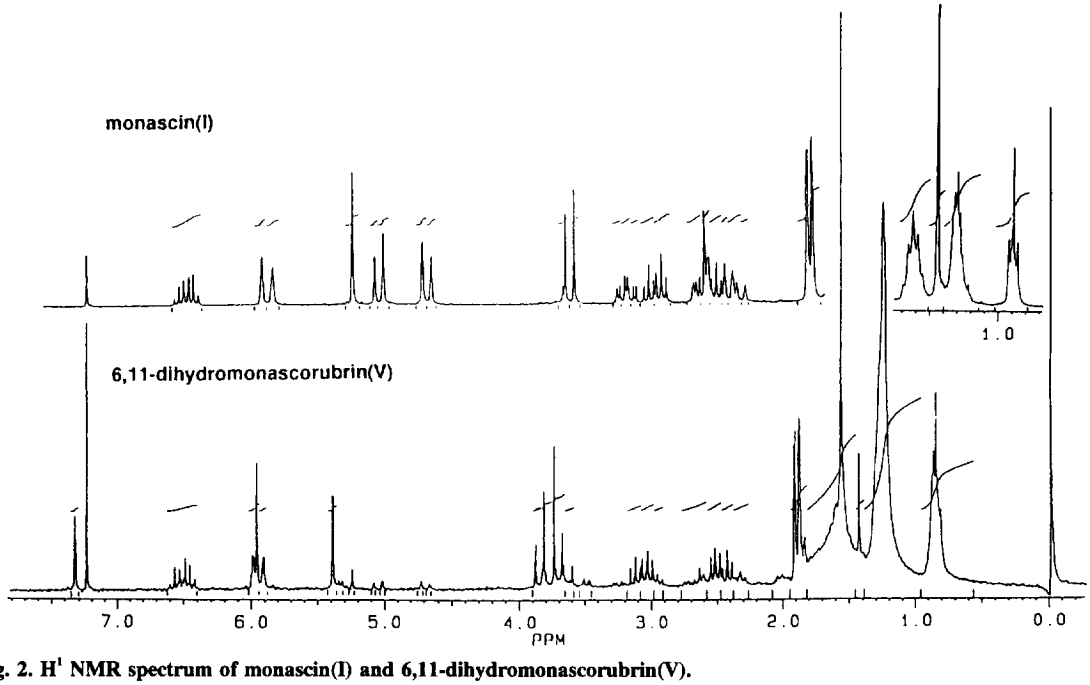

Fig. 2. H^1 NMR spectrum of monascin(I) and 6,11-dihydromonascorubrin(V).

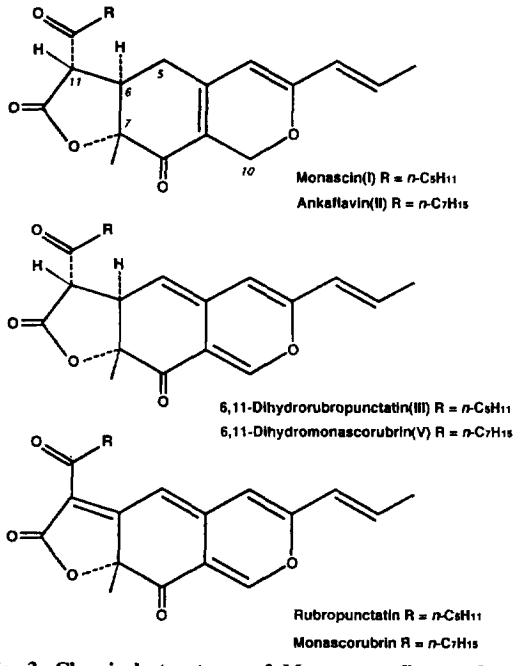

Fig. 3. Chemical structures of *Monascus* yellow and red pigments.

으로 monascin의 기본구조에 proton(H)의 chemical shift 변화를 나타내고 있다. 8.3분대 황색색소의 H^1 NMR spectrum은 monascin과 비교해서 C-5, C-6 그리고 C-10의 H값은 저자장으로 shift되고 C-5과 C-10의 H intensity는 1/2로 감소하였다. C-6과 C-11의 H는 coupling constant(J=13.2 또는 12.3Hz)가 10Hz 이상으로 서로 trans관계를 나타냈다. Alkyl기(R)에서 methyl기(CH_3-)는 δ_H 1.89 (triplet)이고, methylene(-CH_2-)기는 δ_H 1.3으로 H intensity의 비(3:5)에 의해 monascin과 ankaflavin으로 구분하였다.

Table 3은 monascin(I), ankaflavin(II), 4.6분(III) 그리고 8.3분(V) 황색색소에 대한 H^1 NMR spectrum의 chemical shift 값(δ)을 나타내고 있다. 이상의 결과로 Fig. 3에서 화학구조와 같이 4.6분대의 황색색소(III)는 monascin(I)의 C-5와 C-10에 각각 H 1개씩 감소된 구조인 6,11-dihydrorubropunctatin로 확인하였고, 8.3분대의 황색색소(V)는 ankaflavin(II)의 C-5와 C-10에 각각 H 1개씩 감소된 구조인 6,11-dihydromonascorubrin로 확인하였다.

홍국 색소의 생합성은 polyketide 경로에 의하여 생합성된다는 것이 밝혀졌고, 그 색소의 탄소 주골격은 acetate-malonate의 경로로 합성되다고 한다.[16-17] 하지만 탄소 골격에서 ether 결합 산소 원자가 어느 탄소와 biochemical connectivity, 측쇄 결합, 색소 전환 등에는 불명한 점이 많다. 본 연구에서 배지조성에 따라 생성된 황색색소 대사물질인 III과 V가 monascin과 rubropunctatin 중간 대사물질의 화학 구로로 확인되어 색소 전환과 관련하여 흥미롭다고 하겠다. 홍국황색과 홍색의 색소 전환에 대하여 monascin이 rubropunctatin의 tetrahydro derivative에서 탄소 골격의 산화환원 상태로 설명하고 있고 monascorubrin과 monascin은 동일한 polyketide 생합성경로를 통하여 발효초기에는 적색색소가 형성되고 후기에는 황색색소가 형성되어 monascorubrin이 ankaflavin으로 전환설을 주장하였다.[18] 황색색소 대사물질인 III과 V는 rubropunctatin과 monascorubrin의 dihydro derivative로 C-6과 C-11의 불포화 이중결합이 환원된 구조이다. C-5와 C-10에서도 수소로 환원된다면 tetrahydro derivative인 monascin과 ankaflavin이 생성된다. 현재까지 홍국색소의 생합성 과정에서 색소들 사이의 상호관계는 명확하게 해명되지 않고 있다. 그러나 과산화수소에 의해 적색색소가 황색색소로 전환되고, 자색색소는 amine 또는 ammonia와 비효소적 방법으로 전환된다고 한다.[19-20] 하지만 이러한 전환과정이 홍국 색소의 생합성 과정에서 일어나는지를 알기 위해서는 배지조성, 배양기간에 따라서 황색색소 대사물질인 III과 IV를 정량 분석과 V과 VI의 화학구조를 규명할 필요가 있다고 하겠다.

감사의 말씀

이 연구는 1995년도 순천향대학교 학술연구조성비 95-1907 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

배지조성에 따라 *Monascus purpureus*에서 생산된 황색색소의 분리 및 화학적 특성은 용매분획, TLC, slicagel column chromatography, HPLC에 의해 순수하게 분리 정제하여 Mass, H^1 and C^{13} NMR, UV-visible spectrometer 등의 각종 spectrum을 통하여 확인하였다. Yeast malt extract agar(YMA) 배지에서 분리한 2개 황색

색소는 HPLC의 retention time이 5분(I)과 9분(II)으로 화학구조는 monascin(I)과 ankaflavin(II)으로 확인하였다. Malt extract agar(MEA) 배지에서 분리한 6개의 황색색소는 HPLC의 retention time이 4.6분(III), 5분(I), 5.7분(IV), 8.3분(V), 9분(II), 10.7분(VI) 등으로 화학구조는 monascin(I), ankaflavin(II), 6,11-dihydrorubropunctatin(III), 6,11-dihydromonascorubrin(V), unknown compounds(IV, VI)으로 확인하였다. 그러므로, 6,11-dihydrorubropunctatin(III)과 6,11-dihydromonascorubrin(V)은 *Monascus* 황색색소의 새로운 중간대사물로 추정하였다.

참고문헌

1. 食品と開發: 天然色素の開發動向, **27**(1), 46 (1992).
2. Went, F.A.F.C.: *Monascus purpureus*, le champignon de l'Ang-Quac, une nouvelle Thelebolee, *Ann. Sci. Nat. Bot.* Ser. VIII, 1, 1-18 (1895) [*Can. J. Microbiol.*, **23**. 1360-1372 (1977)].
3. Lin, C.F. and Hzuka, H.: Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov., *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 671-676 (1982).
4. 김수언, 김정구: Monascus anka의 균주선발 및 색소생성 조건, 한국농화학회지, **33**, 239-245 (1990).
5. 고영주: *Monascus purpureus*를 이용한 식용적색색소 생산에 관한 연구. 순천향대학교 석사 학위논문 (1994).
6. Yoshimura, M., Yamanada, S., Mitsugi, K. and Hirose, Y.: Production of Monascus pigment in a submerged culture, *Agric. Biol. Chem.* **39**, 1789-1795 (1975).
7. Bau, Y.S. and Wong, H.C.: Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascus purpureus. Physiol. Plant,* **46**, 63 (1979).
8. Haws E.J., Holker, J.S.E., Powell A.D.G. and Robertson A.: The chemistry of fungi. Part 38. the structure of rubropunctatin. *J. Chem. Soc.*, 3598 (1959).
9. Fielding, B.C., Holker, J.S.E., Jones, D.F., Powell, A.D. G., Richmond, I.W. and Whalley, W.B.: The chemistry fungi. Part 39. the structure of monascin. *J. Chem. Soc.*, 4579 (1961).
10. Manchand, P.S. and Whalley, W.B.: Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka. Phytochemistry* **12**, 2531-2532 (1973).
11. Wong, H.C. and Koehler, P.E.: Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J. Food Sci.*, **46**, 589-592 (1981).
12. 류춘선: 홍국에서 분리한 *Monascus* sp. 의 항균효과. 고려대학교 석사학위논문 (1994).
13. Endo, A., Hasumi, K. and Shimada, H.: Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis. *J. Antibiot.*, **39**, 1670-1673 (1986).
14. Nakamura, T., Komagata, D., Murakawa, S., Sakai, K. and Endo, A.: Isolation and biosynthesis of 3-hydroxy-3, 5-dihydromonacolin L. *J. Antibiot.*, **153**, 1597-1600 (1990).
15. Nozaki, H., Date, S., Kondo, H., Takaoka, D., Tada, T. and Akayama, K.: Ankalactone, a new unsaturated lactone from *Monascus anka. Agric. Biol. Chem.*, **55**, 899-900 (1991).
16. Birch, A.J., Cassera, A., Fitton, D., Holker, J.S.E., Smith, H., Tomoson, G.A. and Whalley, W.B.: Studies in relation to biosynthesis. Part 3. rotiorin, monascin and rubropunctatin. *J. Chem. Soc.*, 3538 (1962).
17. Hadfield, J.R., Holker, J.S.C. and Stanway, D.N.: The biosynthesis of fungal metabolites. Part 3. the B-oxo-lactone eqivalents in rubropunctatin and monascorubrin. *J. Chem. Soc.*, 751-758 (1967).
18. Kurono, M., Nakanish, K., Shindo, K. and Tada, M.: Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin, *Chem. Pharm. Bull.*, **11**, 359-363 (1963).
19. Carels, M. and Shepherd, D.: The effect of nitrigen sources on pigment production and sporulation of species in submerged shaken culture, *Can. J. Microbial.*, **23**, 1360-1372 (1977).
20. 홍영주: *Monascus* 색소 생합성의 중간대사물. 서울대학교 석사학위논문 (1992).