

Monascus purpureus 에 의한 세포외 적색색소 생산성 증가에 대한
배지내 pH 조절의 영향

(Effect of medium pH on the extracellular production of red pigments
using *Monascus purpureus*)

박노환, 오영숙, 정옥진
명지대학교 환경생물공학과
전화(031)321-3773, FAX(031)337-2902

Abstract

The effect of pH on red pigment production by *Monascus purpureus* ATCC 16365 has been studied in pH-controlled batch fermenter culture. A maximum of yellow and red pigments were detected using UV-Vis spectrophotometer at 385nm and 495nm, respectively. Fungal growth and pigment production were favoured at low pH(pH 4.0-5.5). Especially extracellular formation rate of orange to yellow pigment was decreased compared with that of orange to red pigment at pH 7.0. In addition, the enhancement of ratio of extracellular to intracellular pigment and the red pigment production in pH 7.0-controlled batch fermenter was observed. However, the pH 7.0-controlled batch cultures depressed the total production of pigments. The pH change from 4.0 to 7.0 during batch fermenter cultivations sharply increased both red pigment production and the extracellular composition.

서론

최근 합성색소 및 화학합성 보존료 등의 사용이 식용시 안전성에 대한 문제점과 천연색소에 대한 시장의 선호도가 급격히 증가되어 합성색소를 대체할 미생물 유래 천연색소 및 보존제 개발이 시급히 요구되고 있다. 특히, 천연색소 중 *Monascus* 적색소는 천년이상 중국과 동남아시아 등에서 식용으로 사용되어 안전함이 입증되어 왔고, 빛이나 온도에 안정적이므로 음료 및 육가공 제품 같은 식품 첨가물로서 사용이 급격히 증가되고 있으나 이에 대한 국내기술 개발이 미흡한 실정이다.

*Monascus sp.*가 생산하는 색소는 6종으로 적색소(rubropunctamine, monascorubramine), 황색소(monascin, ankaflavin) 및 홍색소(rubropunctatin, monascorubrin) 등이 보고되고 있으며, 이 이차대사물은 polyketide pathway를 거쳐 생합성되며, 전구물질인 홍색소가 생산된 후 환원과정에 의하여 황색소가 생산되는 경로 및 홍색소에서 에테르결합의 산소가 암모니아나 아민기에 의하여 질소원자로 치환되어 적

색소로 생산된다고 보고되었다. 본 실험에서는 황색소보다 적색소로의 생산과정인 이차대사과정을 촉진시켜 적색소 생산수율을 증대시키는 실험과 생산된 적색소가 세포외로 유출되는 배양 적정조건을 규명하고자 실험을 수행하였다. 특히, 발효조에서 배양조건중 배지용액의 pH를 4.0에서 8.0사이에서 고정하거나 배양중 pH를 변화시켜 세포 외로 생산되는 적색소 생산량과 세포 성장속도 간의 관계도 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 실험에서 사용된 균주는 ATCC에서 구입한 균주인 *Monascus purpureus* ATCC 16365로서 30g/L Glucose, 1.5g/L Monosodium Glutamate(MSG), 2.5g/L KH_2PO_4 , 2.5g/L K_2HPO_4 , 1.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20% agar를 함유하는 YM고체 배지에 접종하여 30°C에서 1주일 배양한 후, 이 균주를 50ml 배지용액이 담긴 250ml flask에 접종하여 30°C에서 4일간 배양한 후 Homogenizer를 이용하여 균질화된 곰팡이 균주를 발효조 접종균주로 사용하였다. 균주는 10% glycerol이 함유된 배지에 균주를 -70°C에서액체 보관하였다.

배양기 발효조건

YM 액체배지에서 배양된 균주 5%(농도 1.8g/L)를 발효조 접종원으로 사용하였으며 3L 발효조 배양 배지로서 색소생산을 촉진시키는 수정된 Lin's 배지(30g/L Glucose, 1.5g/L Monosodium Glutamate(MSG), 2.5g/L KH_2PO_4 , 2.5g/L K_2HPO_4 , 1.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)를 사용하였으며, 30°C에서 4일간 배양하였다. 사용된 발효조는 3-liter NBS-Bioflo III (working volume 1.5L)로써 통기속도 1-2 vvm, 1N NaOH와 HCl을 사용하여 pH 4.0-8.0으로 조절하였으며, DO를 80에서 조절하여 배양하였다. 균주 성장속도를 측정하기 위하여 균주를 여과하여 여과지에 모인 잔사를 증류수로 2회 이상 세척하여 80°C에서 24시간 건조 후 건조 균체량을 측정하였다.

색소 추출 및 분석

Homogenizer로 균질화한 배양액 20ml에 95% ethanol을 20ml로 1:1 (v/v) 되게 혼합한 후, 24시간 동안 진탕시킨 후 추출액을 Whatman No.4로 여과시켜 균주를 제거한후 원심분리한 여과액을 UV/VIS spectrophotometer(HP 8890)를 이용하여 흡수 극대치인 385(yellow pigment), 495nm(red pigment)에서 흡광도 값을 측정하여 황색소 및 적색소량을 측정하였다.

결과 및 고찰

그림1, 2에서 배양액 pH를 4.0에서 8.5로 변화시킨 결과, 산성조건(pH5.5)하에서의 최대 건조 세포균체양이 중성조건(pH 7.0)보다 2배이상 증가하여으며 황색소 및 적색소를 포함한 총 색소생산양도 OD 값으로 4배정도 증가하였다. 중성조건(pH 7.0)

하에서는 적색/황색 비율이 1.3, 적색소의 세포의 비율은 20%로 나타났다. 그러나, 산성조건하(pH5.5)에서는 적색/황색 비율이 1.2, 적색소의 세포의 비율은 10%로 나타났다. 즉, 배지내 중성조건은 적색소의 이차대사과정 및 형성된 적색소의 세포외로의 유출기작과정을 촉진시키는 현상을 나타내었으며 이러한 현상은 다른 보고서와도 일치되었다. 본 실험에서는 세포성장속도에 유리한 산성조건을 초기에 배양후 40시간에 배지를 중성조건으로 변경하여 실험하여 적색소 생산량 변화 및 세포외로 생산되는 색소양을 측정하여 생산성을 최대로 하는 적정 pH조건을 발견하고자 실험을 수행하였다.

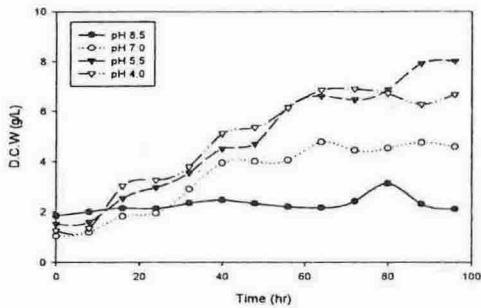


Fig 1. Time course of biomass formation by controlling the pH values

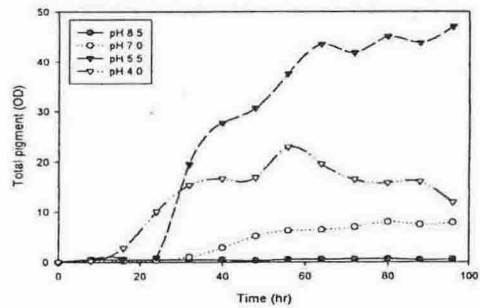


Fig 2. Time course of total pigment formation by controlling the pH values

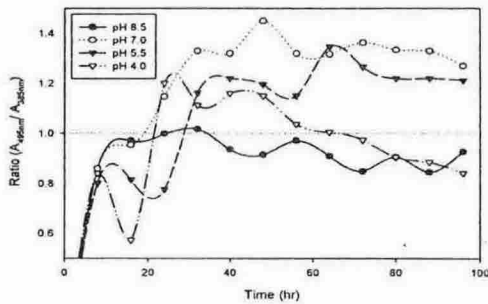


Fig 3. Ratio of red to yellow pigment absorbance by controlling the pH values

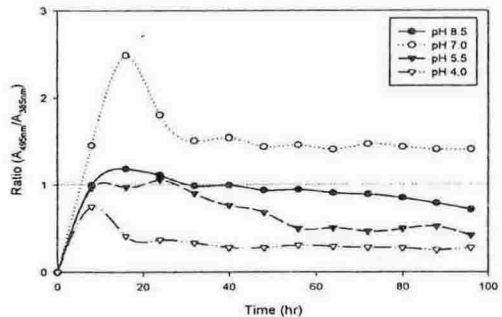


Fig 4. Ratio of extracellular red to yellow pigment absorbance by controlling the pH values

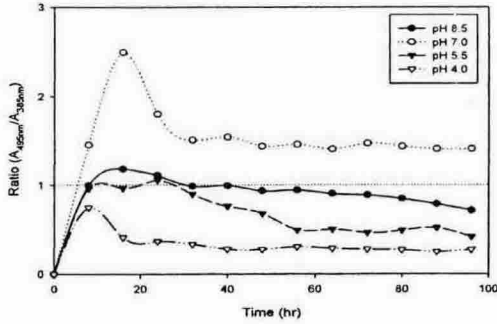


Fig 5. Time course of total extracellular pigment composition depending on different medium pH

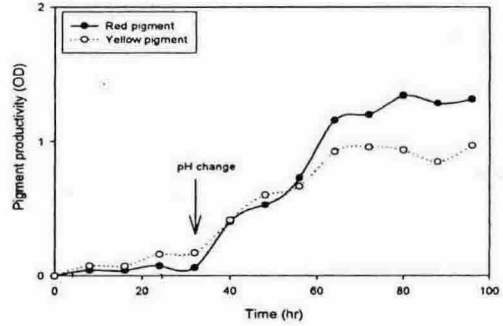


Fig 6. Time course of extracellular pigments formation pH 4.0 change to 7.0 during the cultivation

요약

Monascus purpureus ATCC 16365에 의한 5-liter 배양기에서 pH 조절을 통하여 세포외로 이차대사물인 수용성 적색소의 생산 증가 현상 와 황색소 보다 적색소로의 대사과정을 촉진시켜 적색소의 생산성을 향상시킬수 있는지의 가능성에 대하여 실험을 수행하였다. 황색소와 적색소의 분석은 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 각각 385nm 와 495nm에서 측정하였다. 실험결과 곰팡이의 최대균체량과 황·적색소를 포함한 총 색소 생산량은 pH 8보다 pH 4.0-5.5인 산성조건에서 2배 및 4 배정도 증가하였다. 적색소 및 황색소의 전구물질인 홍색소는 pH 4.0에서 많이 생성되며 또한 홍색소에서 적색소로의 대사과정도 산성 조건 하에서 촉진된다고 보고 되었다. 본 실험에서도 같은 경향을 보였으며 또한, 산성 조건 하에서 특히 수용성 적색소가 곰팡이 세포 외로 유출되는 양이 증가하는 경향을 나타내었다.

참고문헌

1. Ming-Ho Chen, Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*(1993), Appl microbiol Biotechnol, 40, 132-138.
2. P Juzlova, Secondary metabolites of the fungus *Monascus*(1996), Journal of industrial Microbiology, 16, 163-170.
3. T. F. Lin, Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes(1992), 9, 173-179.
4. B. Yongsmith, Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus sp. KB 10* grown on cassava medium(1993), World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 85-90.
5. T. F. Lin, Resting cell studies on formation of water-soluble red pigments by *Monascus sp.* Journal of Industrial Microbiology(1993), 12, 361-367.
6. L.Martinkova, Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*(1995), Journal of Applied Bacteriology, 79, 609-616.