

액체배양에 의한 홍국색소 생산의 최적배양조건

서영은 · 정혁준¹ · 홍순명 · 유대식^{1,*}

울산대학교 식품영양학과, ¹계명대학교 미생물학과

홍국 색소의 액체배양에 의한 대량생산조건을 개발하기 위하여 *Monascus* sp. KM 1001 변이주를 대상으로 균체 생산 및 색소생성에 미치는 최적배양조건을 비교 · 검토하였다. 실험균주의 색소생성을 위한 액체배지의 최적화학적 조성은 4% rice powder, 0.15% Bacto-peptone, 0.1% glycine, 0.01% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25% KH_2PO_4 , pH 4.5였다. 실험균주의 2.0×10^6 spores/ml의 포자현탁액을 액체배지 50 ml에 접종하여 배양온도 30 °C에서 150 rpm으로 5일간 배양하였을 때, 10.00 g/L의 균체생산과 세포외 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 각각 3.25 unit, 1.59 unit, 0.88 unit를 생성하였으며, 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 84.96 unit, 78.84 unit, 91.80 unit의 색소를 생산할 수 있었다.

Key words □ *Monascus* pigment, *Monascus purpureus*, optimal conditions, pigment overproducing mutant

홍국균은 우리나라의 전통 누룩으로부터도 분리되며, *Monascus purpureus*, *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. kaoliang* 등이 동정되어 알려져 있다(6). 홍국균이 생산하는 색소는 적색색소, 황색색소와 오렌지색소 등이 알려져 있으며(15, 16, 22, 23), 최근 새로운 황색색소로서 xanthomonasin A와 B가 발견되기도 하였다(21). 이들 색소는 독성이 없어 천연색소 및 식품 첨가제로 각광을 받고 있다.

홍국균이 생산하는 가장 대표적인 생리활성물질로서 monacolin K (lovastatin)가 잘 알려져 있으며 이 물질은 cholesterol 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하여 혈중 cholesterol 저하작용을 갖는 것으로 알려져 있다(4, 14, 17, 19).

Monascus 균주를 이용한 천연색소 및 그 밖의 이차대사산물 생산은 현재 쌀을 이용한 고체배양이 일반화되어 있으며(11, 12, 13, 24), 액체배양에 의해 생산된 색소는 용혈반응에서 음성으로 나타나 유해성이 없음이 확인되었으며(7), 홍국색소생산과 균사체 생산성에 관한 연구는 아직 미진한 상태에 있다(1, 23, 24).

사상균을 다량 배양할 때 일반적으로 포자접종법을 사용하는 것이 일반적이지만 홍국균은 포자형성능력이 약하여 포자접종방법으로 홍국균을 대량 배양하는 것은 매우 어려우므로 홍국균을 액체배지에 배양하여 홍국균의 균사체를 직접 접종하는 균사체 접종법이 유리하다.

본 연구에서는 *M. purpureus*로부터 NTG 처리에 의해 분리된 색소생산능력이 우수한 KM 1001 변이주(5)를 대상으로 홍국균의 균사체접종법에 사용할 수 있는 균체의 생산성과 색소생산성을 동시에 검토하기 위하여 액체배지의 배지조성 및 배양조건

등을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용시약

실험에 사용된 배지인 Potato Dextrose Agar (PDA)는 Difco (Difco, Detroit, USA)제품을 사용하였으며, NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 및 기타 시약들은 Sigma (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

실험균주

본 실험에 사용한 실험균주는 *M. purpureus* KCCM 60016으로부터 NTG로 변이 처리하여 분리한 변이주로부터 색소생성이 매우 우수한 *Monascus* sp. KM 1001 변이주를 실험균주로 사용하였다.

포자현탁액 제조

실험균주를 PDA배지에서 30°C, 7일간 배양한 plate에 멸균증류수 또는 0.08% Tween-80 용액을 가하여 멸균된 백금이틀 이용하여 포자 및 균사체를 현탁한 후, cotton filter로 여과하여 포자현탁액(2.0×10^6 spores/ml)을 제조하였다.

색소생산을 위한 배지 및 생육조건

색소생성을 위한 최적배양조건을 알아보기 위하여 색소생산 배지로 널리 사용되는 Lin 배지를 사용하였다(10). 색소생산을 위하여 3% rice powder, 0.25% KH_2PO_4 , 0.15% NaNO_3 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 6.0의 기본배지를 50 ml씩 분주하여 121°C에서 15분간 멸균시키고, 선별균주의 포자현탁액 100 μl (2.0×10^6 spores/ml)를 무균적으로 접종하여 30°C에서 5일간 150 rpm으로

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164

E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

진탕 배양하였다.

건조균체량의 측정

건조균체량의 측정은 액체배양한 균체를 filter paper (Whatman No. 4)로 여과하여 모아진 균체를 증류수로 세척한 다음, 80°C에서 일정한 항량이 될 때까지 건조하여 filter paper의 무게를 뺀 값을 건조균체량으로 하였다.

홍국색소 측정

세포의 색소의 양은 배양액을 filter paper (Whatman No. 4)로 여과한 다음 여과액을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액의 흡광도로 측정하였으며, 세포내 색소는 각각의 건조균체 0.05 g에 80% 에탄올을 10 ml씩 첨가한 후, 150 rpm, 30°C에서 1시간 진탕시켜서 색소를 추출하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 분광광도계(TECHNE Co. Specgene, England)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

색소의 정량은 추출한 색소를 적정배수로 희석한 후, 황색색소 생성능은 400 nm에서, 오렌지색소 생성능은 470 nm에서, 적색색소 생성능은 500 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였으며 세포내 색소의 경우 각각의 균체량에 대한 세포내 색소단위로 환산하여 표시하였다. 색소 1 unit는 각각의 흡광도에서의 흡광도 1을 1 unit로 정의하였다.

탄소원 및 질소원의 영향

KM 1001 변이주의 색소생성 및 균체생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 Table 1에 나타난 각각의 탄소원을 3% 되게 첨가한 기본배지에 배양하여 생산된 균체량 및 세포내·외

Table 1. Effect of carbon sources on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Carbon sources (3%)	Dry cell weight (g/L)	Pigments (unit)					
		Yellow		Orange		Red	
		Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra
Rice powder	7.33	3.96	34.83	0.70	37.78	0.44	36.25
Corn starch	4.11	1.18	8.07	0.61	6.53	0.50	8.92
Potato starch	0.78	0.33	0.77	0.40	0.53	0.40	0.74
Wheat starch	6.22	0.98	9.88	0.30	6.88	0.20	9.56
Rice starch	4.56	1.80	13.01	2.36	11.73	1.94	14.61
Glucose	0.56	0.30	0.40	0.37	0.41	0.33	0.46
Sucrose	0.11	0.06	0.01	0.14	0	0.16	0
Maltose	0.11	0.13	0.02	0.24	0.01	0.23	0.02
Lactose	0.00	0.01	0	0.03	0	0.03	0
Fructose	0.33	0.13	0.04	0.22	0.03	0.19	0.04
Glycerol	0.11	0.04	0.01	0.10	0	0.12	0.01
Dextrin	0.67	0.55	0.11	0.55	0.07	0.58	0.10

The inoculated media containing various carbon sources were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 6.0).

색소 생산량을 측정하여 가장 양호한 탄소원을 결정하였다. 색소생성 및 균체생산에 미치는 탄소원의 최적농도를 알아보기 위하여 최적탄소원의 양을 0.5%, 1-5%되게 첨가하여 포자현탁액을 접종시킨 후, 30°C에서 5일간 150 rpm으로 진탕 배양하여 색소생성에 미치는 최적 탄소원의 농도를 결정하였다.

질소원의 영향은 최적 탄소원을 첨가한 기본배지에 Table 3에 나타난 각각의 질소원을 0.15%되게 첨가하여 실험균주를 배양한 후, 색소생성 및 균체생산이 가장 양호한 질소원을 결정하였다. 질소원의 농도의 결정은 최적 탄소원을 첨가한 기본배지에 색소 및 균체생산이 가장 양호한 질소원을 각각 0-1%되게 첨가하여 포자현탁액을 접종한 후, 30°C에서 5일간 150 rpm으로 진탕 배양하여 색소생성 및 균체생산이 가장 양호한 질소원의 농도를 결정하였다.

균체생성 및 색소생성에 미치는 pH 및 온도의 영향

실험균주의 균체생산 및 색소생성에 미치는 pH의 영향을 알아

Table 2. Effect of concentrations of rice powder on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Rice powder (%)	Dry cell weight (g/L)	Intracellular pigments (unit)		
		Yellow	Orange	Red
0.5	1.78	4.46	2.34	3.65
1	3.00	10.83	6.31	9.14
2	6.00	27.86	26.96	26.40
3	7.20	34.82	37.87	36.54
4	8.78	38.52	39.53	37.45
5	9.78	34.74	34.64	33.48

The inoculated media containing various concentrations of rice powder were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 6.0).

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Nitrogen sources (0.15%)	Dry cell weight (g/L)	Intracellular pigments (unit)		
		Yellow	Orange	Red
NaNO ₃	8.90	38.66	37.42	35.85
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.78	37.43	48.36	40.38
NH ₄ NO ₃	6.67	11.59	13.49	13.13
KNO ₃	5.00	11.11	10.21	10.91
Yeast extract	6.56	11.82	9.98	11.02
Malt extract	5.56	12.44	14.82	14.32
Bacto-peptone	12.01	43.03	34.00	32.31
Bacto-soytone	11.67	32.82	36.94	32.91
Bacto-tryptone	5.44	8.43	7.02	7.57
MSG	7.67	20.46	18.05	21.24

The inoculated media containing 4% rice powder and various nitrogen sources (0.15%) were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 6.0).

Table 4. Effect of pH on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

pH	Dry cell weight (g/L)	Intracellular pigments (unit)		
		Yellow	Orange	Red
3.0	9.56	37.60	45.75	42.21
3.5	10.00	42.28	37.44	42.92
4.0	10.22	46.91	21.90	22.00
4.5	11.48	43.81	38.05	47.43
5.0	10.44	45.72	17.11	17.79
5.5	10.11	35.67	33.12	45.14
6.0	11.78	41.02	33.96	33.46
6.5	10.00	34.20	27.72	38.52
7.0	10.78	44.15	16.02	17.82

The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days.

Table 5. Effect of metal salts on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Metal salts (0.01%)	Dry cell weight (g/L)	Intracellular pigments (unit)		
		Yellow	Orange	Red
CaCl ₂	9.56	60.89	55.73	65.02
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10.00	64.08	59.76	67.68
FeCl ₃ ·6H ₂ O	9.44	38.76	28.22	33.32
FeSO ₄ ·7H ₂ O	12.11	79.79	73.25	83.71
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10.33	57.66	58.03	62.12
MnSO ₄ ·H ₂ O	9.89	54.11	52.33	59.81
MgCl ₂	10.67	58.75	60.67	61.06
ZnCl ₂	10.22	67.71	74.70	77.28
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9.33	54.77	52.42	58.80

The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 4.5).

보기 위하여, 최적 탄소원 및 질소원을 첨가한 기본배지의 pH를 3.0-7.0의 범위로 조절한 배지에 포자현탁액을 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양한 후, 균체생산 및 색소생성이 가장 양호한 최적 pH를 결정하였다.

배양온도의 영향을 알아보기 위하여 최적배지 50 ml에 2.0×10⁶ spores/ml의 포자현탁액을 0.1 ml 씩 접종하여 150 rpm으로 20-40°C로 배양온도를 달리하여 5일간 배양하면서 균체생산 및 색소생산량을 측정하였다.

진탕속도의 영향

실험균주의 색소생성에 미치는 진탕 속도의 영향을 알아보기 위하여 최적배지에 포자현탁액을 접종하여 30°C에서 진탕 속도를 0-180 rpm으로 달리하여 5일간 배양한 후, 건조균체량을 측정하여 균체생산 및 색소생성이 가장 양호한 최적 회전속도를

rpm으로 결정하였다.

계면활성제 및 금속이온의 영향

실험균주의 색소생성에 미치는 계면활성제의 영향을 알아보기 위하여, 계면활성제인 Tween 20, Tween 80과 Triton-X 100을 Table 6에 표기된 농도로 첨가한 최적배지에 실험균주를 접종하여 배양한 후, 그 결과를 조사하였다.

최적배지에 0.01%의 금속이온을 각각 첨가하여 30°C에서 150 rpm으로 5일간 배양한 후 금속이온이 색소 및 균체 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

균체생성 및 색소생성에 미치는 아미노산의 영향

여러 종류의 아미노산을 첨가한 최적배지에 포자현탁액을 0.1 ml 씩 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 5일간 배양하여 균체 및 색소생성에 미치는 아미노산의 영향에 대하여 조사하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

균체생산 및 색소생성에 미치는 탄소원의 영향은 Table 1에 나타난 바와 같이, 색소생성을 위한 탄소원으로 rice powder가 가장 양호하였다. 특히, rice powder의 경우 7.33 g/L로 가장 높은 건조균체량을 나타내었으며, KM 1001 변이주가 생성하는 세포외 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 3.96 unit, 0.70 unit, 0.44 unit를 생성하였으며, 세포내 황색색소는 34.83 unit, 오렌지색소는 37.78 unit, 그리고 적색색소는 36.25 unit의 색소를 생성할 수 있었다. 그러나 lactose는 탄소원으로 전혀 이용할 수 없었으며, 건조균체량과 색소도 거의 생성하지 않았다. Tseng 등(20)은 *Monascus purpureus*의 경우 탄소원으로 sucrose나 lactose를 사용하였을 때 색소생성이 저해된다는 보고와 같은 결과를 나타내었다.

균체생산과 색소생성에 양호한 탄소원인 rice powder의 최적농도는 Table 2에 나타난 바와 같이, 5%의 rice powder에서 실험균주의 균체생산은 최고값에 도달했으며, 9.78 g/L의 균체가 생산되었다. 그러나 4%의 rice powder의 농도에서는 8.78 g/L의 균체를 생산하여 약간의 감소를 나타내었으나, 색소생성은 4%의 rice powder의 농도에서 가장 높게 나타났다. Rice powder 4%를 첨가한 기본배지에서 실험균주가 생성하는 세포외 황색색소는 38.52 unit, 오렌지색소는 39.53 unit, 그리고 적색색소는 37.45 unit를 생성하였다.

이상의 결과로 실험균주는 탄소원으로 4% rice powder가 균체생산 및 색소생성에 가장 양호한 탄소원인 것으로 나타났다.

질소원의 영향

균체생산 및 색소생성에 미치는 질소원의 영향은 Table 3에 나타난 바와 같이, 유기질소원인 Bacto-peptone을 첨가하였을 때 가장 많은 12.01 g/L의 균체가 생산되었으며, 무기질소원인 KNO₃에서는 가장 낮은 5.00 g/L의 균체가 생산되었다. Bacto-

peptone이 0.15% 함유된 배지에서 실험균주가 생성하는 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 각각 43.03 unit, 34.00 unit, 32.31 unit의 색소를 생산할 수 있었다.

균체생산 및 색소생성에 미치는 Bacto-peptone의 최적농도는 0.15%였으며, 0.50%이상의 Bacto-peptone의 농도에서는 균체생산과 색소생성이 감소되었다(결과 미제시).

Kim 등(7)의 황색색소의 연구에서는 yeast extract와 peptone을 사용하였을 때 균체생산량이 높은 반면 색소생성량은 오히려 좋지 않았으며 무기질소원인 NaNO_3 가 가장 높은 색소생성을 나타내었으며, Carels 등(1)은 *Monascus* 속의 색소생산 배지에서 ammonium nitrate를 사용하였을 때 오렌지색으로 되고 yeast extract나 질산염이 함유된 배지에서는 적색색소가 많이 생성된다는 결과가 보고되어 있다. 위의 결과와 본 연구 결과를 비교하면 실험균주에 따라 질소원의 요구성이 다르게 나타났으며 무기질소원 보다 유기질소원이 균체생산과 색소생성에 유리하다는 것은 동일한 결과였다.

pH의 영향

실험균주의 균체생산 및 색소생성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이, 균체생산은 pH 6.0에서 11.78 g/L로 가장 높은 균체생산을 나타내었으나, 색소생성은 pH 4.5의 배지 조건에서 높은 값을 나타내었다. pH 4.5의 배지에서 실험균주의 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 43.81 unit, 38.05 unit, 그리고 47.43 unit의 색소를 생산하였다. 이상의 결과로 실험균주의 액체배지의 pH는 6.0에서 균체생산에 최적의 조건이며, 색소생성의 최적 pH는 4.5였다. Chang 등(2)은 *Monascus* sp. CS-2균주에 의한 최적 황색색소의 생성 pH는 pH 4.5부근이었으며, 반면에 Park 등(18)은 *Monascus* sp. KS2균주에 의한 최적 색소생성 pH는 6.0으로 나타내었다. 위의 결과와 본인들의 결과와 비교하면 색소생성은 Chang 등(2)의 결과와 동일했으며, 본 실험에 사용한 균주의 균체생산의 최적 pH는 황색색소생성의 최적 pH인 6.0인 Park 등(18)의 결과와 동일하였다.

배양온도의 영향

실험균주의 액체배지에서의 균체생산 및 색소생성에 미치는 배양온도의 영향을 검토한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 실험균주의 균체생산과 색소생성은 배양 온도 30°C에서 가장 양호한 결과를 나타내었다.

실험균주는 30°C에서 11.53 g/L의 가장 많은 균체가 생산되었으며, 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 43.31 unit, 38.06 unit와 47.90 unit의 색소를 생산할 수 있었다. 이 결과는 Juzlova 등(6)의 액체배양에서 *Monascus* 속 균주들의 배양온도 범위가 25°C-37°C이며, 그 중 가장 적합한 온도가 30°C임을 밝힌 결과와 유사한 결과였다.

진탕속도의 영향

실험균주의 액체배지에서의 균체생산 및 색소생성에 미치는 진탕 속도의 영향을 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험균

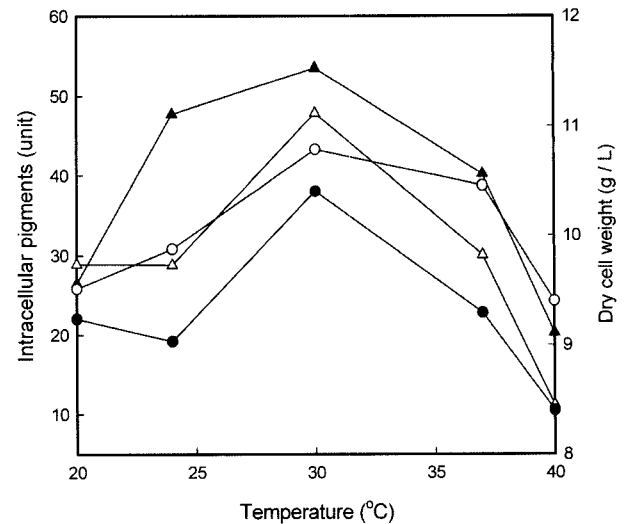


Fig. 1. Effect of temperature on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001. The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 150 rpm rotary shaker at 20, 24, 30, 37, 40°C for 5 days (pH 4.5). Symbols ○, yellow; ●, orange; △, red; ▲, dry cell weight.

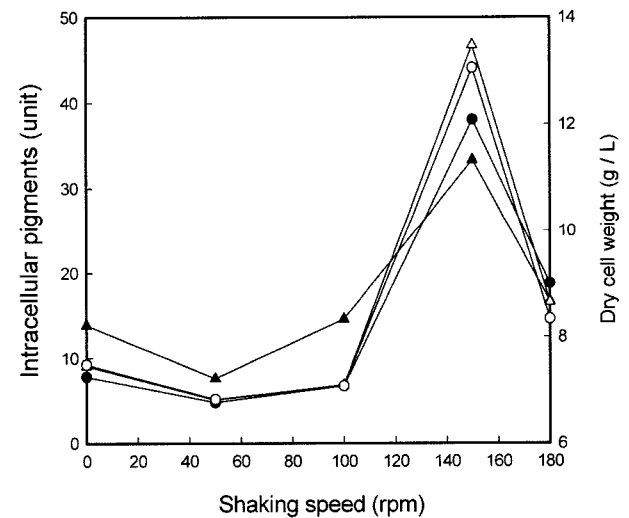


Fig. 2. Effect of shaking speed on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001. The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 0, 50, 100, 150, 180 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 4.5). Symbols ○, yellow; ●, orange; △, red; ▲, dry cell weight.

주의 균체생산과 색소생성은 100 rpm 이하의 진탕속도에서는 균체생산과 색소생성이 불량하였으나, 150 rpm에서 가장 양호한 결과를 나타내어 11.33 g/L의 가장 높은 균체를 생산할 수 있었으며, 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 각각 44.11 unit, 38.04 unit와 46.76 unit의 색소를 생산할 수 있었다. 그러나 150 rpm 이상의 진탕속도에서는 오히려 균체생산과 색소생성이 감소하였다.

금속염의 영향

금속이온은 조효소로 작용하여 효소의 반응을 촉매할 뿐만 아니라 효소의 열안정성에도 기여하는 것으로 알려져 있으나, 일반적으로 색소의 안정성에 있어서는 금속이온 중 철, 아연, 주석 및 알루미늄 등은 환원제로 작용하여 색소의 퇴색 및 변색을 유발하는 것으로 알려져 있다(3).

실험균주의 액체배지에서의 균체생산 및 색소생성에 미치는 금속염의 영향을 검토한 결과를 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타난 바와 같이, 실험균주의 균체생산과 색소생성은 ferrous sulfate($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)를 첨가한 배지에서 가장 양호했으며, 이 조건에서 12.11 g/L의 균체를 생산할 수 있었으며 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 각각 79.79 unit, 73.25 unit와 83.71 unit의 색소를 생산할 수 있었다.

*Monascus anka*의 경우, $MnSO_4$ 를 첨가하였을 때 색소생성이 가장 높게 나타난 Kim 등(9)의 보고와는 일치하지 않았으나, *Monascus purpureus* ATCC 16365의 경우 Fe^{2+} 에 의해 적색색소 생산이 촉진된다는 Lee 등(10)의 보고와는 같은 결과를 나타내었다. 이들 금속이온은 미량으로 효소의 활성화 및 일부분으로 작용하며 다른 대사산물의 필수적인 요소로 작용하는 것으로 사료된다(9).

계면활성제의 영향

계면활성제는 양친매성 물질로서 표면장력을 감소시키며, 서로 다른 두 상간의 계면장력을 감소시킴으로써 유화 분산을 촉진시키는 물질이다(8). 따라서 계면활성제의 첨가가 실험균주의 균체 및 세포내 색소생산, 그리고 세포내 지용성 색소의 세포외로의 투과에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 6에 나타내었다. Table 6에 나타난 바와 같이, 실험균주의 균체생산과 색소생성은 0.1% Tween 80의 첨가로 균체생산이 13.11 g/L로써 가장 높게 나타났으며, 실험균주가 생성하는 세포외 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 4.60 unit, 2.60 unit, 1.40 unit로 각각 생성하였으며, 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 57.80 unit, 53.02 unit와 56.39 unit로 가장 높은 색소를 생성하였다. 그러나 Tween 20과 Triton-X 100은 Tween 80에 비해 균체생산과 세포내 색소생성에서 불량한 결과를 나타내었다.

비이온계 계면활성제인 Triton-X 100의 첨가로 실험균주의 세포외 황색색소, 오렌지색소와 적색색소를 5.35 unit, 3.24 unit, 2.04 unit를 나타내는 결과는 앞의 결과에서 나타나지 않던 높은 세포외 색소생성을 나타내어 계면활성제에 의하여 세포내 색소가 세포외로의 투과를 촉진한다고 추측할 수 있었다.

아미노산의 영향

실험균주의 액체배지에서의 균체생산 및 색소생성에 미치는 아미노산의 영향을 알아보기 위하여 여러 아미노산을 첨가한 최적배지에 실험균주의 포자현탁액을 0.1 ml 씩 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 5일간 배양한 결과를 Table 7에 나타내었다.

Table 7에 나타난 바와 같이, L-lysine을 첨가한 배지에서 균체생산이 12.00 g/L로써 가장 높게 나타났으나, 색소생성은 glycine

Table 6. Effect of surfactants on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Surfactant (%)	Dry cell weight (g/L)	Pigments (unit)					
		Yellow		Orange		Red	
		Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra
None	10.89	1.90	44.06	0.69	37.90	0.60	46.02
Tween 20 (0.10)	11.56	4.28	49.92	2.26	47.42	1.19	50.75
(0.30)	11.56	3.08	44.93	1.50	50.34	0.87	48.67
Tween 80 (0.10)	13.11	4.60	57.80	2.60	53.02	1.40	56.39
(0.30)	13.67	3.73	40.84	2.13	38.87	1.26	36.19
Triton-X 100 (0.10)	10.22	4.61	40.96	2.35	35.03	1.34	36.91
(0.30)	9.89	5.35	28.08	3.24	22.70	2.04	27.00

The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 4.5).

Table 7. Effect of amino acids on the production of pigment from *Monascus* sp. KM 1001

Amino acids (0.1%)	Dry cell weight (g/L)	Intracellular pigments (unit)		
		Yellow	Orange	Red
L-Arginine	11.22	69.49	46.86	61.00
L-Asparagine	10.67	55.30	33.79	53.38
L-Aspartic acid	10.56	50.54	33.44	46.74
L-Alanine	9.89	55.54	38.80	51.98
Cystine	9.11	25.39	33.09	28.35
L-Glutamic acid	9.56	85.31	78.09	88.06
Glycine	10.00	84.96	78.84	91.80
L-Leucine	8.89	16.80	15.33	16.13
L-Lysine	12.00	10.24	7.34	7.82
DL-Methionine	8.33	24.00	28.89	26.94
Nicotinic acid	10.11	50.20	47.32	51.32
DL-Tryptophan	10.00	18.72	22.50	20.45
L-Tyrosine	10.00	57.02	62.64	58.32
DL-Valine	9.67	30.52	39.60	35.39

The inoculated media containing 4% rice powder and 0.15% Bacto-peptone were incubated on 150 rpm rotary shaker at 30°C for 5 days (pH 4.5).

과 L-glutamic acid를 첨가한 배지에서 높게 나타났다. 실험균주가 glycine을 첨가한 배지에서 생성하는 세포내 황색색소, 오렌지색소와 적색색소는 각각 84.96 unit, 78.84 unit, 그리고 91.80 unit의 색소를 생산하였다. 이상의 결과로 실험균주인 KM 1001 변이주의 액체배양을 위한 균체생산용 배지에는 lysine이 양호했으며 색소생성에는 glycine과 glutamic acid를 첨가한 배지에서 양호하였다. Kim 등(7)의 연구에서는 glutamic acid와 arginine을 첨가한 배지가 홍국색소생성이 효과적인 것으로 보고되어 본인

들의 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 신진연구자 연수지원사업(M02-2004-000-10695-0)으로 수행한 연구결과물이며, 한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화연구센터에서 연구를 수행하도록 허락해주셔서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged. *Can. J. Microbiol.* 23, 1360-1372.
2. Chang, U., H.S. Kim., C.H. Son., J.C. Bae, and J.C. Yu. 1980. Studies on the yellow pigment produced by *Monascus* sp. CS-2. *Korean J. Microbiol. Bioeng.* 8, 119-123.
3. Chung, M.S. and M.S. Lee. 1995. Stability of naphthoquinone pigments isolated from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* by various temperatures and metal ions. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 27, 97-100.
4. Friedrich, J., M. Zuzek, M. Bencina, A. Cimerman, A. Strancar, and I. Radez. 1995. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolic acid in fermentation broths. *J. Chromatogr. A.* 704, 363-367.
5. Jung, H.J. and T.S. Yu. 2004. Production of mycelium and *Monacolin K* from *Monascus* sp. on rice solid culture. *J. Microbiol.* 40, 160-166.
6. Juzlova, P., L. Martinkova, and V. Krent. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*. *J. Ind. Microbiol.* 16, 163-170.
7. Kim, H.S., D.H. Kim., H.S. Yang., Y.R. Pyun, and J.H. Yu. 1979. Studies on the red pigment produced by *Monascus* sp. in submerged culture. *Korean J. Microbiol. Bioeng.* 7, 23-30.
8. Kim, J.S., H.S. Song., N.H. Chung, and W.G. Bang. 2005. Optimization of production conditions of biosurfactant from *Bacillus* sp. and its purification. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48, 109-114.
9. Kim, M.H., T.K. Lee, and H.C. Yang. 1992. Red pigment production from *Monascus anka albidus*. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 24, 451-455.
10. Lee, B.K., N.H. Park, H.Y. Pyao, and W.J. Chung. 2001. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 341-346.
11. Lee, Y.K., D.C. Chen, S. Chauvatcharin, T. Seki, and T. Yoshida. 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 516-518.
12. Li, C., Y. Zhu, Y. Wang, J.-S. Zhu, J. Chang, and D. Kritchevsky. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (Red Yeast Rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutri. Res.* 18, 71-81.
13. Lotong, N. and P. Suwanarit. 1990. Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 565-570.
14. Manzoni, M. and M. Rollini. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 555-564.
15. Martinkova, L., P. Juzlova, and D. Vesely. 1995. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 609-616.
16. Martinkova, L., P. Juzlova, V. Krent, Z. Kucerova, V. Havlicek, P. Olsovsky, O. Hovorka, and B. Rihova. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* 16, 15-24.
17. Morovjan, G., G. Szakacs, and J. Fekete. 1997. Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 763, 165-172.
18. Park, H.E., C.H. Kim, and K.H. Min. 1991. Isolation of pigment-producing mutants from *Monascus* sp. KS2 and optimization of cultural conditions. *Kor. J. Mycol.* 19, 120-127.
19. Strode, J.T.B., L.T. Taylor, A.L. Howard, and D. Ip. 1999. Feasibility of lovastatin analysis by packed column supercritical fluid chromatography with ultraviolet detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 137-143.
20. Tseng, Y.Y., M.T. Chen, and C.F. Lin. 2000. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrate, polyphosphate and various sugars. *J. Appl. Microbiol.* 88, 31-37.
21. Watanabe, T., A. Yamamoto, S. Nagai, and S. Terabe. 1997. Separation and determination of *Monascus* yellow pigments for food by micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Sci.* 13, 571-575.
22. Wild, D., G. Toth, and H. Humpf. 2002. New *Monascus* metabolite isolated from red yeast rice. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3999-4002.
23. Wu, W.T., P.M. Wang, Y.Y. Chang, T.K. Huang, and Y.H. Chien. 2000. Suspended rice particles for cultivation of *Monascus purpureus* in a tower-type bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 542-544.
24. Yongsmith, B., S. Krairak, and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* 78, 223-228.

(Received November 10, 2006/Accepted March 27, 2007)

ABSTRACT: Optimization of Production of Pigment from *Monascus* sp. in Liquid Culture

Young-Eun Seo, Hyuck-Jun Jung¹, Soon-Myung Hong, and Tae Shick Yu^{1,*} (Department of Food and Nutrition, Ulsan University, Ulsan 680-765, Korea, ¹Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea)

The optimal conditions for *Monascus* pigments production of *Monascus* sp. KM 1001, pigment overproducing mutant, in submerged culture was investigated. The optimal medium for the production of pigment from KM 1001 mutant is determined to be composed of 4% rice powder, 0.15% Bacto-peptone, 0.1% glycine, 0.01% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25% KH_2PO_4 , pH 4.5. On optimal conditions, 10.0 g/L of the cell mass was obtained at 30°C for 5 days. Yellow, orange and red pigment of *Monascus* sp. KM 1001 were produced 3.25 units, 1.59 units and 0.88 units in extracellular part, and 84.96 units, 78.84 units and 91.80 units in intracellular part, respectively.