

## *Monascus anka*로부터 유기배양에 의한 적색소의 대량생산

김희구 · 박근태\* · 손홍주\*\*

부산대학교 미생물학과, \*조아제약, \*\*밀양대학교 생물공학과

### Red Pigment Overproduction by Fed-Batch Culture of *Monascus anka*

Hee-Goo Kim, Geun-Tae Park\* and Hong-Joo Son\*\*

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*Cho-A Pharm. Co. Ltd., Haman-Kun 637-810, Korea

\*\*Dept. of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

#### Abstract

The production of red pigment from glucose by fed-batch culture of *Monascus anka* was investigated. In batch culture using fermentor, 200 rpm of agitation speed, 1vvm of aeration volume, and 10%(v/v) of inoculum size were optimal, respectively. The red pigment production was increased by removal of wall-attached mycelium. In an intermittent feeding fed-batch culture, dry cell weight increased to 30 g/l, and the red pigment content reached 350 of absorbance at 495nm. In a continuous feeding fed-batch culture, dry cell weight increased to 22g/l, and the red pigment content reached 190 of absorbance at 495nm.

Key words : *Monascus anka*, fed-batch culture, red pigment, overproduction.

#### 서 론

식품의 색조는 식품의 가치와 기호성을 높이는 데 큰 역할을 하며, 주로 적색이나 황색이 많이 사용된다. 지금까지 식품공업에서는 주로 합성색소가 많이 사용되어 왔으나 안정성 등이 문제가 되어 식품을 포함한 다양한 산업에서 점차 천연색소의 사용량이 증가되고 있다. 천연색소는 대부분 동, 식물로부터 직접 추출하여 사용되어 왔기 때문에 가격이 비싸고 생육 조건 및 자연환경에 따라 품질의 변화가 심한 단점을 지니고 있다<sup>1)</sup>.

이와 같은 문제점을 극복하기 위한 가장 좋은 재료는 미생물이다<sup>2)</sup>. 미생물 발효에 의한 색소생산은 품질적으로 안정된 제품을 생산할 수 있고, 무엇보다 자연환경에 영향을 받지 않으므로 대량생산이 가능하다. 또한 대부분 인체에 대한 안정성이 확인되어 있다<sup>3-5)</sup>.

홍국균(*Monascus* spp.)은 동남아시아권에서 홍주, 홍두부 등의 발효식품 제조에 이용되어 왔으며<sup>6)</sup>, 착색제 뿐만 아니라 타박상, 소화불량 등의 의약품으로도 이용되어 왔다<sup>7)</sup>. 홍국균이 생산하는 홍국색소는 적색을 나타내는 rubropunctatin과 monascorubrin 및 황색을 나타내는 monascin과 ankaflavin 등이 대표적으로<sup>8,9)</sup>, 안정성도 확인되어 천연 식용색소원으로 이용하기 위한 연구가 활발하다<sup>10)</sup>. Wong과 Koehler<sup>2)</sup>는 *M. purpureus*로부터 적색소를 분리하여 항균작용이 있다고 하였으며, 수용성 적색소 생산을 위한 회분배양조건을 확립하였다. Han과 Mudgett<sup>11)</sup>는 *Monascus* sp.의 생육과 적색소 생산은 산소분압 0.5atm, 이산화탄소분압 0.02atm에서 최대였다고 보고하였다. Ju 등<sup>12)</sup>은 *Monascus* sp. J101에 의한 적색소 생산의 동력학적 분석을 실시하였다. 이와 같이 아직까지 적색소의 대량생산을 위한 발효조 조건과 유기배양에 대한 연구는 거의 없다.

Corresponding author : Hong-Joo Son

따라서 본 연구에서는 기보고된 홍국균의 색소생산 최적조건<sup>13)</sup>을 기초로 하여 유기배양에 의한 적색소의 대량생산에 관하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배지

균주는 한국중균협회로부터 분양받은 *Monascus anka* KFCC 4478을 사용하였다. 색소생성을 위한 최적배지의 조성은 glucose 4.0%, NaNO<sub>3</sub> 0.15%, peptone 4.0%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25%, thiamin-HCl 10μg/l 및 nicotinic acid 10μg/l이었으며, pH 7.0, 30℃에서 배양하였다<sup>13)</sup>.

### 2. 발효조 배양조건의 검토

발효조 배양을 위하여 플라스크 배양에서 결정된 최적 배양조건<sup>13)</sup>을 기초로 하여 최적 교반속도, 최적 통기량, 최적 종균 접종량 및 부착성 균사체의 제거 등에 대하여 조사하였다. 이때 사용한 발효조는 5l 용량의 한국 발효기 제품이었다. 배양액의 pH는 2N HCl과 2N NaOH를 사용하여 자동적으로 7.0이 유지되도록 하였다. 또한 배양액의 거품을 제거하기 위한 소포제는 10% 실리콘 오일을 사용하였다.

### 3. 유기배양

균주를 색소생성 최적배지에 접종하여 30℃에서 5일간 전배양한 후, 탄소원으로 glucose 4.0%가 첨가된 본배지 2l에 10%(v/v) 접종하였다. 탄소원 부족과 배양액의 산성화에 기인한 색소생성능의 감소를 방지하기 위하여 발효조에 농축된 탄소원 용액을 추가적으로 공급하는 intermittent feeding fed-batch culture와 continuous feeding fed-batch culture를 실시하였다. Intermittent feeding fed-batch culture의 경우 배양액중 glucose의 농도가 5.0g/l 이하가 되었을 때마다 600g/l의 glucose stock solution을 glucose 농도 30~50g/l가 되도록 일시에 첨가하였으며, continuous feeding fed-batch culture의 경우 배양액중 glucose의 농도가 5.0g/l 이하가 되었을 때 400g/l의 glucose stock solution을 1.5ml/min의 속도로 공급하였다. 이때 배양조건은 30℃, 200rpm, 1vvm이었으며, pH는 7.0으로 자동적으로 조절되도록 하였다.

### 4. 분석방법

균체량은 배양액을 12,000rpm에서 5분간 원심분

리하여 cell pellet을 회수한 후, 105℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 건조중량으로 나타내었다. 본 연구에서 조사한 색소는 *Monascus anka*의 적색소였다. 적색소의 생성력은 상기의 배양 상정액을 증류수로 단계적으로 희석한 후, 분광광도계(HP 8452A, Hewlett Packard Co., USA)로 495nm에서 흡광도를 측정하여 이것을 적색소의 양으로 나타내었다<sup>12)</sup>. 글루코오스 농도는 dinitrosalicylic acid method<sup>14)</sup>에 준하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 교반속도의 영향

교반속도는 oxygen transfer rate에 영향을 미칠 뿐만 아니라 물질생산, 균체의 분산 및 기질의 혼합에도 큰 영향을 미친다<sup>15)</sup>. 따라서 교반속도에 따른 색소 생성력을 검토한 결과(Fig. 1), 교반속도가 증가함에 따라 색소 생성력도 향상되었으나 200rpm 이상에서는 색소 생성력이 감소하였다. 이것은 교반속도의 증가로 균사체가 배양조의 벽면에 부착되는 wall effect를 나타내는데 기인하는 것으로 판단된다. Su<sup>16)</sup>는 *Monascus anka* V-204의 색소 생성력을 검토한 결과 200~300rpm이 적당하다고 하였는데, 이것은 본 연구의 결과와 잘 일치하였다. 따라서 최적 색소 생성력을 나타낸 200rpm에서 이후의 실험을 실시하였다.

### 2. 통기량의 영향

물에 대한 산소의 용해도는 8ppm으로서, 호기성 미생물의 대량배양시 제한인자로 작용하며, 각종 물

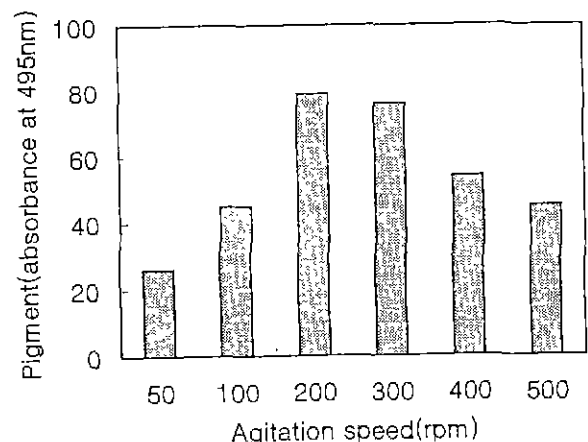


Fig. 1. Effect of agitation speed on the production of red pigment.

질 생산력에도 영향을 미친다<sup>17)</sup>. 따라서 색소 생성력에 대한 최적 통기량을 조사한 결과(Fig. 2), 1vvm에서 가장 우수한 색소 생성력을 나타내었으며, 그 이상의 통기량에서는 색소 생성력이 급속하게 감소하였다. 이것으로 보아 본 균주는 높은 초기 산소농도에서 색소 생성력이 저해됨을 알 수 있었다. 즉 균체의 대량생산과 색소 생성력은 산소에 대한 감수성이 서로 다르므로 색소를 대량으로 얻기 위해서는 발효공정을 엄격하게 조절할 필요가 있는 것으로 나타났다.

3. 종균접종량의 영향

발효조내의 균체량의 증가는 종배양액의 균체량에 비례하지만 종배양액을 적당량 이상 접종하면 배지내의 영양원이 희석될 뿐만 아니라, 종배양액내에 축적된 노폐물이 많이 혼입됨으로써 세포의 노화를 촉진하게 된다<sup>18)</sup>. 따라서 색소 생성력에 대한 최적 종균접종량을 조사한 결과(Fig. 3), 10~15%(v/v)의 종균을 접종하였을 때 유도기가 관찰되지 않고 곧 바로 대수증식기로 이행되었다. 15% 이상의 종균을 접종하였을 경우 색소 생성력이 감소하였는데, 이것은 종균 접종량이 많아짐으로서 배양초기에 glucose를 비롯한 각종 영양원이 빨리 소비된 것에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 최적 종균 접종량은 10% (v/v)로 결정하였다.

4. 부착성 균사체의 제거

배양이 진행됨에 따라 배양조의 벽면에 균사체가 부착되는 현상이 관찰되었다. 따라서 단위배지당 균체량과 색소 생성량을 증가시키기 위하여 일정시간

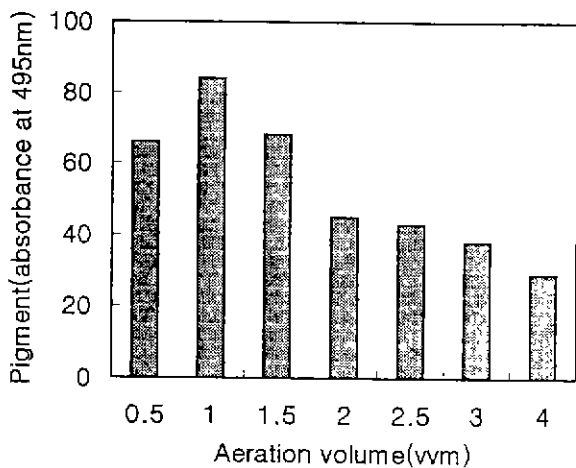


Fig. 2. Effect of aeration volume on the production of red pigment.

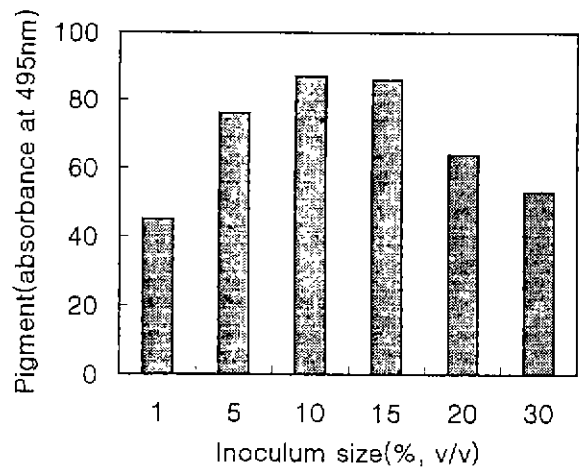


Fig. 3. Effect of inoculum size on the production of red pigment.

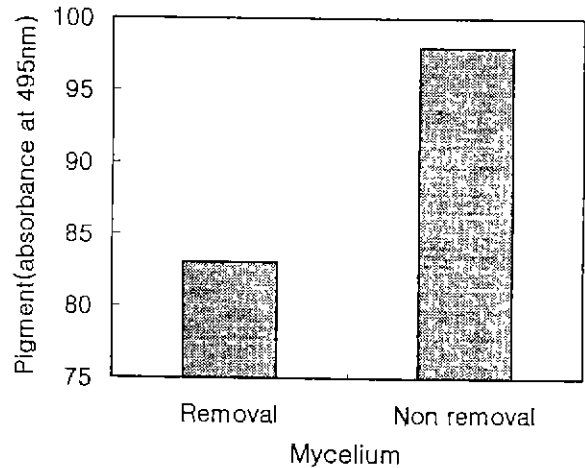


Fig. 4. Effect of mycelium removal on the production of red pigment.

간격으로 벽면에 부착된 균사체를 배양액속으로 재접종하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 벽면에 부착된 균사체를 재접종함으로써 색소 생성량이 크게 향상된 것으로 나타났다.

5. 유기배양

*Monascus anka*의 색소 생성력을 향상시키기 위하여 두 가지 방법의 유기배양을 실시하였다. 먼저 글루코오스가 고갈될 때마다 고농도의 글루코오스를 간헐적으로 첨가하는 intermittent feeding fed-batch culture한 결과는 Fig. 5와 같이 배양 9일만에 30g/l의 건조균체와 350(A<sub>495</sub>)의 색소가 생성되었다. 또한 일정한 속도로 고농도의 글루코오스를 공급

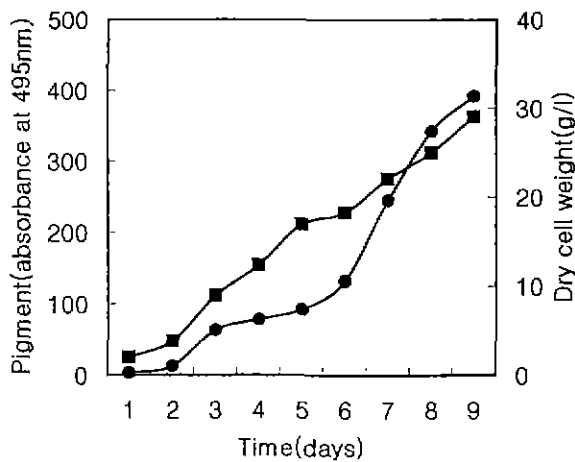


Fig. 5. Time course of intermittent feeding fed-batch culture of *Monascus anka* in jar fermentor. ●-, dry cell weight; ■-, pigment production.

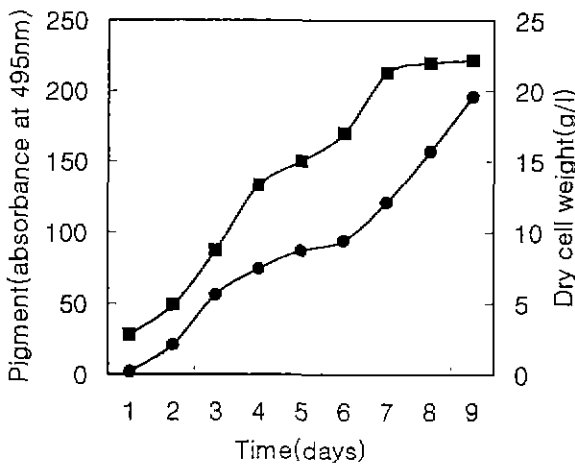


Fig. 6. Time course of continuous feeding fed-batch culture of *Monascus anka* in jar fermentor. ●-, dry cell weight; ■-, pigment production.

하는 continuous feeding fed-batch culture 결과는 Fig. 6과 같이 배양 9일만에 22g/l의 건조균체와 190(A<sub>495</sub>)의 색소가 얻어졌다. 이것은 본 균주의 회분배양에 의한 균체생육(12.6 g/l)과 색소 생성량(78, A<sub>495</sub>)<sup>13)</sup>보다 각각 1.5~2배, 2~4배에 해당하는 것이다. 따라서 *Monascus anka*를 이용한 적색소의 생산은 유기배양이 훨씬 효율적임을 알 수 있었다. 한편, continuous feeding fed-batch culture의 경우, 글루코오스의 소비속도를 정확하게 산출할 수 없

어 peristaltic pump를 이용한 정밀한 조절이 불가능하였다. 따라서 정확한 글루코오스 소비속도를 계산하고 이에 따른 색소 생성물의 변화를 산출하여 정확하게 글루코오스 농도를 조절한다면 색소 생성물의 증가가 있을 것으로 추정된다.

## 요 약

*Monascus anka* KFCC 4478의 적색소 생산력을 증가시키기 위하여 발효조 배양조건을 검토한 후, 탄소원을 연속적 또는 간헐적으로 공급하는 유기배양을 하였다. 5l 용량의 발효조를 이용하여 배양시 교반속도 200rpm, 통기량 1vvm 및 종균 접종량 10% (v/v)일 때 색소 생성량이 최대였다. 또한 벽면에 부착된 균사체를 제접종함으로써 색소 생성력이 향상되었다. Intermittent feeding fed-batch culture에 의하여 배양 9일만에 30g/l의 건조균체와 350(A<sub>495</sub>)의 색소가 생성되었으며, continuous feeding fed-batch culture에 의하여 22g/l의 건조균체와 190(A<sub>495</sub>)의 색소가 얻어졌다. 따라서 본 균주에 의해서 적색소를 생산코자 할 경우는 회분배양보다 유기배양이 더 우수한 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Kim, J. Y. and Kim, K. H. : Isolation and characterization of *Bacillus* sp. PY123 producing water-soluble yellow pigment, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 454-458 (1997).
- Wong, H. C. and Koehler, P. E. : Production of red water-soluble *Monascus* pigments, *J. Food Sci.*, 48, 1200-1203 (1983).
- Kim, C. H., Kim, S. H. and Hong, S. I. : Isolation and characterization of pedigiosin-like red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 283-289 (1998).
- Kim, C. H., Kim, S. H. and Hong, S. I. : Production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95 and its cultural properties, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 13, 431-437 (1998).
- Takatoshi, K., Takahito, I., Minoru, Y., Yoshie, N. and Jiro, S. : Production of *Perilla* pigment in cell culture of *Perilla frutescens*, *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, 39, 839-844 (1992).
- Frazier, W. C. : *Food Microbiology*, McGraw-Hill Book Co., New York (1967).
- Wong, H. C. and Koehler, P. E. : Production and isolation of an antibiotics from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production, *J. Food*

- Sci.*, 46, 589-592 (1981).
8. Lin, T. F. : The identification and practical classification of *Monascus* sp., *Spec. Top. Sci. Technol. Alc. Bevs.*, 5, 104-113 (1983).
  9. Kumasaki, S., Nakanishi, K., Nishikawa, E. and Ohashi, M. : Structure of monascorubrin, *Tetrahedron*, 18, 1171-1176 (1962).
  10. Su, Y. C. and Wang, W. H. : *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Marcel Dekker, New York (1983).
  11. Han, O. and Mudgett, R. E. : Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations, *Biotechnol. Prog.*, 8, 5-10 (1992).
  12. Ju, J. Y., Nam, H. W., Yoon, J. C. and Shin, C. S. : Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 85-91 (1994).
  13. Kim, H. G., Park, G. T. and Son, H. J. : Production of red pigment of from *Monascus anka*, *Kor. J. Food Nut.*, submitted (1998).
  14. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate analysis, IRL Press, Washington D.C. (1986).
  15. Kole, M. M., Draper, I. and Gerson, D. F. : Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 404-408 (1988).
  16. Su, Y. C. : Fermentative production of *Monascus anka* pigments, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 325-337 (1983).
  17. Thomson, B. G. and Walter, T. L. : Effect of dissolved oxygen on growth and production of exopolysaccharide by *Rhizobium trifolii*, *J. Ferment. Technol.*, 66, 335-338 (1986).
  18. Pirt, S. J. : *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, John Wiley & Sons, New York (1975).

---

(1998년 9월 23일 접수)