

Monascus pilosus 배양을 위한 반응표면분석법에 의한 생산배지 최적화 및 발효조건 확립

윤 상 진 · ¹신 우 식 · ^{1,2}전 계 택 · † ²정 용 섭

전북대학교 응용생물공학부, ¹강원대학교 분자생명과학과, ²바이오품소재 개발 및 산업화 연구센터

(접수 : 2007. 9. 8., 게재승인 : 2007. 10. 16.)

Optimization of Production Medium by Response Surface Method and Development of Fermentation Condition for *Monascus pilosus* Culture

Sang-Jin Yoon, Woo-Shik Shin¹, Gie-Taek Chun^{1,2}, and Yong-Seob Jeong^{2†}

Division of biotechnology, Chonbuk National University

¹Department of Molecular Bioscience, Kangwon National University

²Research Center for industrial Development of Biofood Materials, Kangwon National University

(Received : 2007. 9. 8., Accepted : 2007. 10. 16.)

Monascus pilosus (KCCM 60160) in submerged culture was optimized based on culture medium and fermentation conditions. Monacolin-K (lovastatin), one of the cholesterol lowering-agent which was produced by *Monascus pilosus* may maintain a healthy lipid level by inhibiting the biosynthesis of cholesterol. Plackett-Burman design and response surface method were employed to study the culture medium for the desirable monacolin-K production. As a result of experimental designs, optimized production medium components and concentrations (g/L) were determined on soluble starch 96, malt extract 44.5, beef extract 30.23, yeast extract 15, (NH₄)₂SO₄ 4.03, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.5, L-Histidine 3.0, KHSO₄ 1.0, respectively. Monacolin-K production was improved about 3 times in comparison with shake flask fermentation of the basic production medium. The effect of agitation speed (300, 350, 400 and 450 rpm) on the monacolin-K production were also observed in a batch fermenter. Maximum monacolin-K production with the basic production medium was 68 mg/L when agitation speed was 500 rpm. And it was found that all spherical pellets (average diameter of 1.0~1.5 mm) were dominant during fermentation. Based on the results, the maximum production of 185 mg/L of monacolin-K with the optimized production medium was obtained at pH (controlled) 6.5, agitation rate 400 rpm, aeration rate 1 vvm, and inoculum size 3%.

Key Words : *Monascus pilosus*, monacolin-K

서 론

홍국 (紅麴)은 쌀을 모나스커스 (*Monascus*)속의 붉은 곰팡이인 홍국균으로 발효시켜 만든 것으로서 특유의 붉은 색을 띄고 있으며 우리나라에서는 '홍버섯쌀'이라고도 불리고 있다. 그리고 홍국은 예로부터 된장, 간장, 청주 등의 양조식품 제조에 사용되는 곰팡이의 일종으로 오래전부터 전통발효식품 제조에 사용되어왔다. 그 중 대표적인 균이 *Monascus* 속이다. 홍국의 기능성이 알려짐으로 된장, 고추

장을 포함하여 식초, 두부, 간장, 음료수, 술, 소시지 및 빵 등의 제조에 이미 이용되고 있거나 활용을 위한 연구가 진행 중에 있다(1).

홍국의 배양시 생성되는 색소의 종류는 monacin, ankaglavin, monascarubin, rubropunctatin, monascarubramine과 rubropunctamine 등이 있으며, 이들은 독성이 없는 천연 색소로서 의약품의 제조나 식품 첨가물로서 사용되고 있다(2, 3).

최근에는 *Monascus* 속의 일종인 *Monascus pilosus*, *Monascus anak*, *Monascus ruber*와 *Monascus purpureus* 등의 배양을 통하여 모나콜린-K (monacolin-K) 및 그 유도체가 발견되었으며, 모나콜린-K는 콜레스테롤 저해제이자 고지혈증 치료제로 사용되는 lovastatin과 동일한 물질로 밝혀졌다(4, 5). 또한 *Monascus purpureus*로부터 분리된 물질인 monacidin A는 *Bacillus subtilis*에 대해 항균활성이 있는 것도 밝혀졌다(6).

† Corresponding Author : Division of biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

Tel : +82-63-270-2571, Fax : +82-63-270-2572

E-mail : ysjeong@chonbuk.ac.kr

고지혈증 (hyperlipidemia)은 혈장속 콜레스테롤이나 중성지방의 양에 이상이 생긴 질환으로 콜레스테롤과 중성지방을 운반하는 지단백의 대사가 제대로 이루어지지 않아 발생하는 것으로 알려져 있다. 현재 고지혈증은 심혈관계 질병질환의 원인 중 하나로 인식되고 있으며, 우리나라에서도 실제로 환자가 매년 증가하는 추세이다. 콜레스테롤 저하제이자 고지혈증 치료제로 사용되고 있는 lovastatin은 1987년 최초로 미국의 Merck사에 의해 발효과정을 거쳐 분리·정제되어 시판되었다. 또한 우리나라에서도 lovastatin 이라는 성분을 함유하고 있는 제제를 다양한 상품명으로 여러 회사에서 현재 판매하고 있다. Lovastatin은 균사형성 곰팡이인 *Aspergillus terreus*에 의해 생산되며, 균주개발, 배지 최적화, 발효조건 및 효능에 대한 많은 논문들이 학술지에 게재되었다. 하지만 lovastatin이라는 성분을 함유한 것은 전문의약품으로서 의사의 처방이 없이는 판매할 수 없다. 또한 이러한 미생물에 의하여 생산되는 lovastatin의 경우는 *Monascus spp.*와는 달리 발효 후 추출과 정제의 공정단계가 요구된다. 이러한 사실로부터 *Monascus spp.* 배양은 적은 초기 투자비에 의한 원가 상승 요인 등의 감소로 장점이 있는 것으로 알려지고 있다.

배양조건과 배지성분에 의하여 미생물의 증식은 물론 대사산물의 생산이 민감하게 영향을 받는다. 따라서 대사산물의 생합성과 미생물의 증식을 위하여 필요한 에너지원과 영양소를 적절하게 공급하는 것이 중요하다. *Monascus pilosus*의 배양에서 peptone, corn steep liquor와 NaNO_3 의 첨가가 모나콜린-K 생산을 높여주는 것으로 보고되었으며, 또 다른 문헌에 의하면 *Monascus sp.*에 의한 발효 시 NaNO_3 의 첨가가 모나콜린-K 생산을 높여주는 영향이 있다고 보고하였다(1, 7). *Monascus purpureus*에 의한 색소 생산에서는 yeast extract가 적합한 질소원이이며, 균체량을 높여주는 인자로 발표되었다(8, 9).

Kim 등은 *Aspergillus terreus*의 현탁배양에 의한 lovastatin 생산의 경우 K_2HPO_4 의 첨가에 의해 약 5배 높은 수율이 가능하였으며, 6 g/L 이상의 무기인산염의 첨가 시 균체량은 증가하지만 lovastatin 생산량은 감소하는 것이 확인되어 배지에 첨가하는 무기인산염의 농도를 조절하는 것이 필요함을 제시하였다. 그리고 다양한 아미노산 중에서 L-histidine과 L-methionine의 첨가가 lovastatin 생산을 7배 높여준다고 보고하였다(10). *Tolypocladium inglatum*에 의한 cyclosporin A 생산시 관여하는 효소의 유도인자와 전구물질로 L-valine 작용함이 보고되었으며(11), 또한 *Monascus anka*에 의한 이차대사산물 생산시 histidine의 첨가가 색소 생산을 높여주며, 독성물질 (citrinin) 생산을 최소화 할 수 있음이 발표되었다(12).

모나콜린-K를 함유하고 있는 *Monascus pilosus* 배양의 경우 자연발효식품의 범주에 속해 있으며, 식품으로 장기보존을 할 수 있는 장점이 있다. 또한 장에서의 지방흡수를 감소시켜 간접적으로 콜레스테롤 수치를 감소시키는 lovastatin (체내 콜레스테롤 생성의 20%)에 비해 직접적으로 간에서 콜레스테롤의 합성 (체내 콜레스테롤 생성의 80%)을 억제하므로 체내 콜레스테롤 수치 저하에 효과가 높은 것으로 알려지고 있다. 현재 중국, 일본과 대만 등에

서 홍국 발효에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 높은 수율의 모나콜린-K를 함유한 배양에 관련된 보고는 없다. 현재 국내시장에서 유통되고 있는 홍국은 전량 수입에 의존하고 있으며, 홍국의 모나콜린-K 함량은 일반적으로 0.4% (w/w) 정도이며, 일부 제품은 그 이하이거나 없는 것도 있으며, 일부 수입되는 원료 중에서는 1.4%의 것도 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 홍국의 생산 시 붉은 색소인 홍국색소는 쉽게 다량 만들어지고 있으나, 체내 콜레스테롤의 합성을 억제하는 물질로서 이차대사산물인 모나콜린-K를 과량으로 생산하기 위해서는 상당한 know-how를 요하는 연구가 이루어져야 한다.

통계적 실험계획법에 의하여 독성물질인 citrinin 생산을 최소화하고 높은 수율의 모나콜린-K를 함유할 수 있는 생산배지 최적화와 생물반응기에서 발효조건을 확립하여 홍국균의 생산 가능성을 검토하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 *Monascus pilosus* (KCCM 60160)이며, PDA (Potato Dextrose Agar) plate배지에 도말 배양한 후 27°C에서 7일간 배양하였다. 균주는 종배양을 위해 3개월마다 계대배양하여 4°C 냉장고에 보관하였으며, 종배양의 접종을 위해 사용하였다.

배양배지

배지는 고온고압 살균시 당의 카라멜화반응, 당이 암모늄이온이나 아미노산과 반응하여 나타나는 amino-carbonyl 반응과 무기물 침전을 막기 위하여 각각의 배지를 따로 용해하여, 고압증기살균한 후 무균상자 안에서 다른 배지와 혼합하여 사용하였다. 생산배지 접종을 위한 성장배지 조성은 Glucose 30 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L, KH_2PO_4 0.75 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, trace elemental solution($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, NaMoO_4 0.0025 g/L, H_2SO_4 2 mL/L) 1 mL/L과 같으며, 모나콜린-K 생산을 위한 기본생산배지의 조성은 galactose 96 g/L, malt extract 40 g/L, beef extract 30 g/L, yeast extract 15 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO_4 1.25 g/L이다(13). 기본생산배지를 이용하여 배지를 최적화한 결과는 Soluble starch 96 g/L, Malt extract 44.5 g/L, Beef extract 30.23 g/L, Yeast extract 15 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.03 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO_4 1.0 g/L이었다.

균체농도측정

균체농도는 건조균체질량 (Dry Cell Weight)으로 측정하였다. 균일한 시료를 얻기 위해 blender에서 균질화한 10 mL의 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상침액을 버린 후 증류수를 넣어 혼합하고 다시 원심분리 하였다. 이 과정을 3번 반복하여 항량을 구한 용기에 균체를

넣고 105°C에서 향량이 나올 때까지 건조하였다.

Starch

발효액의 starch는 Dubois 방법을 보완해서 측정하였다 (14). 시료를 원심 분리하여 상정액을 취하고 적당량 희석하여 시료 2 mL에 80% phenol 수용액 0.05 mL를 넣은 후 황산 5 mL를 첨가하였다. 발색시킨 후 상온에서 30분간 방치하고 분광광도계 (Shimadzu, UV-1601)를 이용하여 488 nm에서 흡광도를 측정하였다.

모나콜린-K 추출 및 정량분석

모나콜린-K의 분석은 Roman과 Vladiir의 방법을 참고하여 HPLC (Shimadzu Co. Ltd., Class-LC 10A, Japan)로 분석하였으며 분석조건은 Table 1과 같다(15). 모나콜린-K (lovastatin lactone form) 표준용액으로는 순수한 lovastatin (Sigma, USA)을 농도별로 methanol에 용해하여 사용하였다. Acidic form 표준용액은 10 mg의 lactone form을 3 mL의 methanol에 녹이고 0.1 M NaOH 8 mL을 가한 후 20분 동안 sonication하고, 1시간 동안 50°C에서 가열한 후 0.1 M HCl로 pH를 7.7로 조정하여 최종 부피가 10 mL이 되도록 맞추어 주면 acidic form 1000 mg/L (1000 ppm)가 만들어진다. 이것을 농도별로 희석하여 분석에 사용하였다. 모나콜린-K는 농도 5~300 mg/L의 범위에서 분석을 실시하여 검량선을 얻었다. 액체 배양한 균체의 생산물을 정량하기 위해 배양액을 균질화한 후 5 mL을 취하여 동량의 methanol을 가한 뒤 27°C에서 200 rpm으로 2시간동안 추출하여 여과지 (Whatman No. 4)로 여과한 뒤 여과액을 3000 rpm에서 원심분리하여 나온 상정액을 다시 12000 rpm에서 원심분리하여 나온 상정액을 HPLC로 분석하였으며, 표준용액에서 얻어진 검량선을 이용하여 생산물의 양을 계산하였다.

Table 1. HPLC condition for monacolin-K analysis

HPLC	Shimadzu (Class-LC 10)
Detector	UV detector (SPD-10A)
Wave length	238 nm
Temperature	40°C
Column	Kanto mightysil, C18 reverse-phase column (4.6 × 250mm)
Mobile phase	Methanol : 18 mM ortho-phosphoric acid = 77.5 : 22.5
Flow rate	1.2 mL/min
Injection volume	20 μ l

Citrinin 추출 및 정량분석

Citrinin의 분석은 Reingard와 Zimmerli(16)의 방법을 참고하여 HPLC로 정량분석 하였으며, mightysil C₁₈ RP column (250 × 4.6 mm, kanto, Japan), 이동상 methanol-0.25 M ortho-phosphoric acid (80 : 20, v/v), 유속 0.5 mL/min, 25°C, 검출기는 UV 250 nm 등의 조건으로 분석하였다. 액체배양한 균체의 citrinin을 정량하기 위한 배양액의 전처리는 모나콜린-K 추출과 동일한 방법으로 수행하였다. 표준용액은 순수한 citrinin (Sigma-Aldrich Co., USA)을 methanol에 용해하여 농도별로 희석하여 표준용액을 제조하였으며, 분석에 사용하였다.

진탕 플라스크 배양 방법

고체 종배양은 24시간 동안 배양온도에서 활성화시킨 1개의 agar plate에 3% peptone water 4 mL을 넣고 끓여낸 균체액 0.2 mL을 agar plate에 도말 접종하여 27°C에서 7일간 배양하였다. 액체 종배양은 1개의 agar plate에 3% peptone water 4 mL을 넣어 끓여내 균체액을 50 mL (250 mL baffle flask)의 성장배지에 모두 접종하여 27°C, 130 rpm에서 5일간 진탕배양하였다. 모나콜린-K 생산을 위해 1 mm 크기의 pellet이 형성된 액체 종배양액을 50 mL의 생산배지에 10% (v/v) 접종한 후 27°C, 200 rpm에서 10일간 진탕배양 하였다.

발효조 배양방법

발효조 (KoBio Tech Co. Ltd.)는 2.5와 5 L 부피의 제품을 사용하였고, 각각의 조업부피는 1.5와 3 L로 하였다. 배양온도는 27°C, 공기유속은 1 vvm (volume of air/ volume of fluid/ min)로 유지하였다. 발효 중 생성되는 거품을 제거하기 위해 소포제로 simethicone emulsion USP (Dow Corning Co., USA)를 사용하였다. 또한 발효 중 증발로 인한 배지의 감소를 막기 위해서 습윤기 (humidifier)를 공기 공급 라인에 설치하여, 공기의 수분함량이 포화상태로 되게 하여 발효조에 공급하였다. 종배양은 진탕 배양방법과 동일한 방법으로 배양하여 사용하였으며, 3% 혹은 10% (v/v)의 비율로 발효조에 접종하여 수행하였다. 교반속도에 따른 발효조 배양실험에서는 기본생산배지를 사용하였으며, 임펠러와 통기량의 변화에 관한 실험에서는 본 실험에서 구한 최적생산배지를 사용하였다.

자료의 통계처리

반응표면분석을 위해서 SAS (statistical analysis system, Release 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 실험 결과를 분산분석, 모수추정, 능선분석과 정준분석 등을 이용하여 처리 (독립변수)에 대한 반응 (종속변수)을 등고선 또는 삼차원 표면도로 나타내어 변수와 반응간의 함수관계를 자료로부터 추정하여 처리에 따라 반응량이 어떻게 달라지는지를 예측하고, 최적화하였다.

결과 및 고찰

탄소원이 모나콜린-K 생산에 미치는 영향

기본 배지를 중심으로 홍국 배양시 생성될 수 있는 citrinin 생성은 최소화하고, 모나콜린-K 생산을 극대화 할 수 있는 배지의 선별을 위하여, Graeco-Latin 방격법의 일부실시 실험계획법에 의하여 배지 최적화를 수행하였다. 그러나 이 계획법은 각 인자간의 교호작용이 없다는 가정을 바탕으로 한다. 위의 계획법을 수행하기 위하여 문헌과 본 실험실에서 수행한 그동안의 실험을 바탕으로 가장 높은 생산을 보인 탄소원, 인원, 아미노산원과 무기원 각각 3가지씩을 선정하여 각각의 원소에 대한 가장 좋은 배지를 선정하였으며, 선정된 배지를 통하여 농도를 최적화하였다(17, 18). Graeco-Latin 방격법에 의한 배지 최적화 결과

는 galactose 96 g/L, malt extract 40 g/L, beef extract 30 g/L, yeast extract 15 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.5 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO₄ 1.25 g/L이며, citrinin 생성은 없었으며 약 185.7 mg/L의 모나콜린-K를 생산하였다(자료 미제시, 13).

Graeco-Latin 방격법에 의한 실험은 모든 경우의 실험구에 대하여 일부만 실험한 것이기에 각 인자 간의 교호작용 및 각 인자가 미치는 영향을 정확하게 판단하기에는 무리라고 생각되었다. 그러나 배지 최적화를 하는 방법으로서 Graeco-Latin 방격법이 반응표면분석법에 비해 인자간의 교호작용과 농도를 최적화할 수 있는 점에서 미흡하지만 빠른 시간에 간편하게 배지조성을 확립할 수 있는 좋은 방법으로 인식되고 있다. 그리고 이와 같은 방법으로 일차적으로 배지를 확립한 후에 Plackett-Burman design에 의해 최종 생산물에 영향을 미치는 중요인자를 구명하고, 반응표면분석법으로 최적화를 실시하면 시간과 노력을 절약할 수 있는 좋은 전략이라 생각된다.

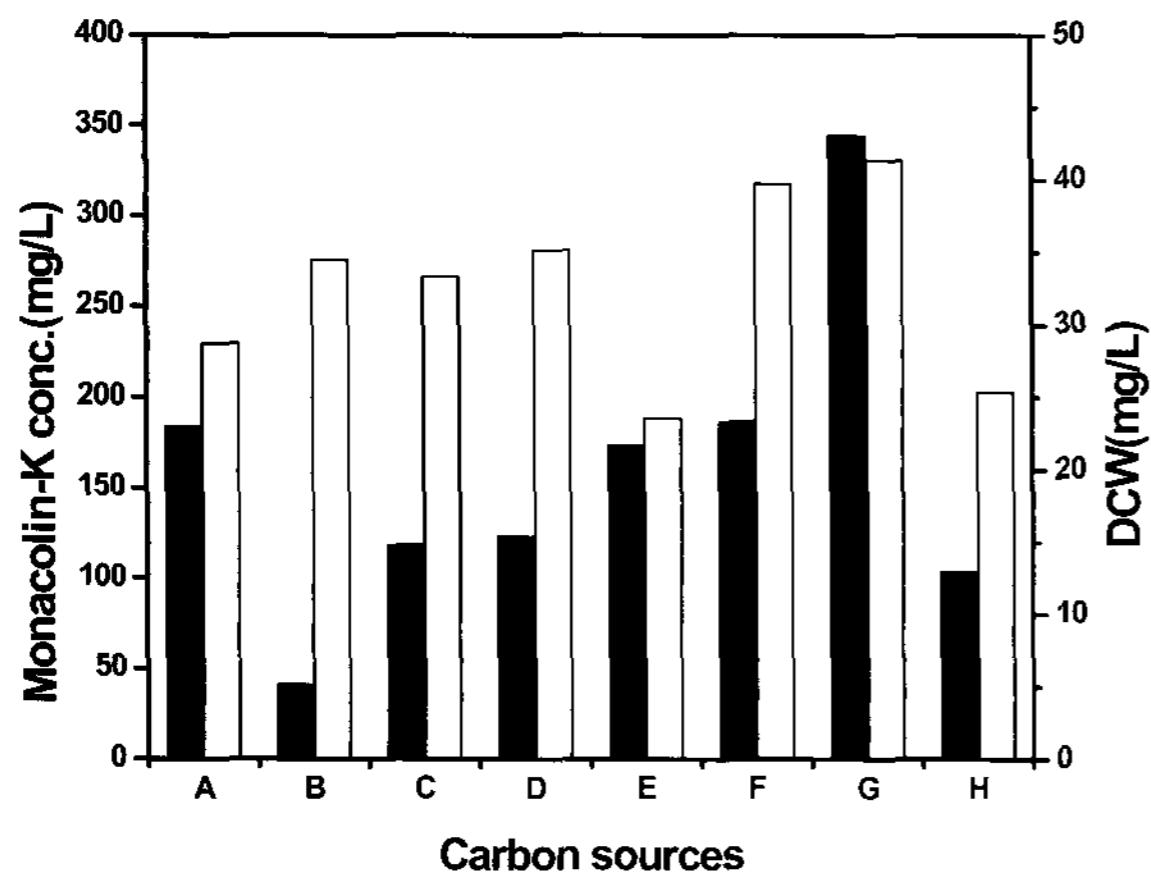


Figure 1. Effect of various carbon sources on the production of monacolin-K (A; control(galactose), B; fructose, C; glucose, D; glycerol, E; lactose, F; maltose, G; soluble starch, H; sucrose, ■; monacolin-K, □; DCW).

Graeco-Latin 방격법에 의해 선택된 생산배지는 일부분만을 실험해서 구한 배지이기에, 탄소원을 달리하여 실험한 결과 soluble starch를 탄소원으로 대체한 배지에서 galactose를 사용한 대조구에 비해 1.8배 증가한 340.0 mg/L로 가장 높은 모나콜린-K 생산을 보였으며, 균체량은 41.3 g/L로 균체량 대비 모나콜린-K 생산량도 11.1 g/L로 가장 높은 생산을 보였다(Fig. 1). 대조구로 사용된 galactose에 비해 soluble starch의 가격이 상대적으로 저렴하다는 점을 고려하면 산업용배지로서 고려해볼 가치가 있다고 판단되었다. 특히 soluble starch의 경우 이차대사산물 생산시 예상되는 catabolite repression을 해소할 수 있는 탄소원 제한에 따른 이차대사가 활발히 진행되어 모나콜린-K 생산이 높아졌다고 판단된다. 그리고 발효 후 균의 형태구조를 살펴본 결과 펠릿 형태보다 균사형태로 주로 자라는 것을 확인할 수 있었다. 균의 형태구조가 균사형태일 경우 향후 발효조 실험에서 산소전달이 원활하게 이루어지지 않는

문제가 나타날 것으로 판단되지만, 탄소원 이외의 다른 배지 종류의 확립, 균의 초기 접종량 조절과 배양초기 pH 등에 의한 균의 펠릿 형성에 영향을 주는 것으로서 보고된 요인을 바탕으로 부가적 실험을 통하여 조절이 가능할 것으로 생각된다(19).

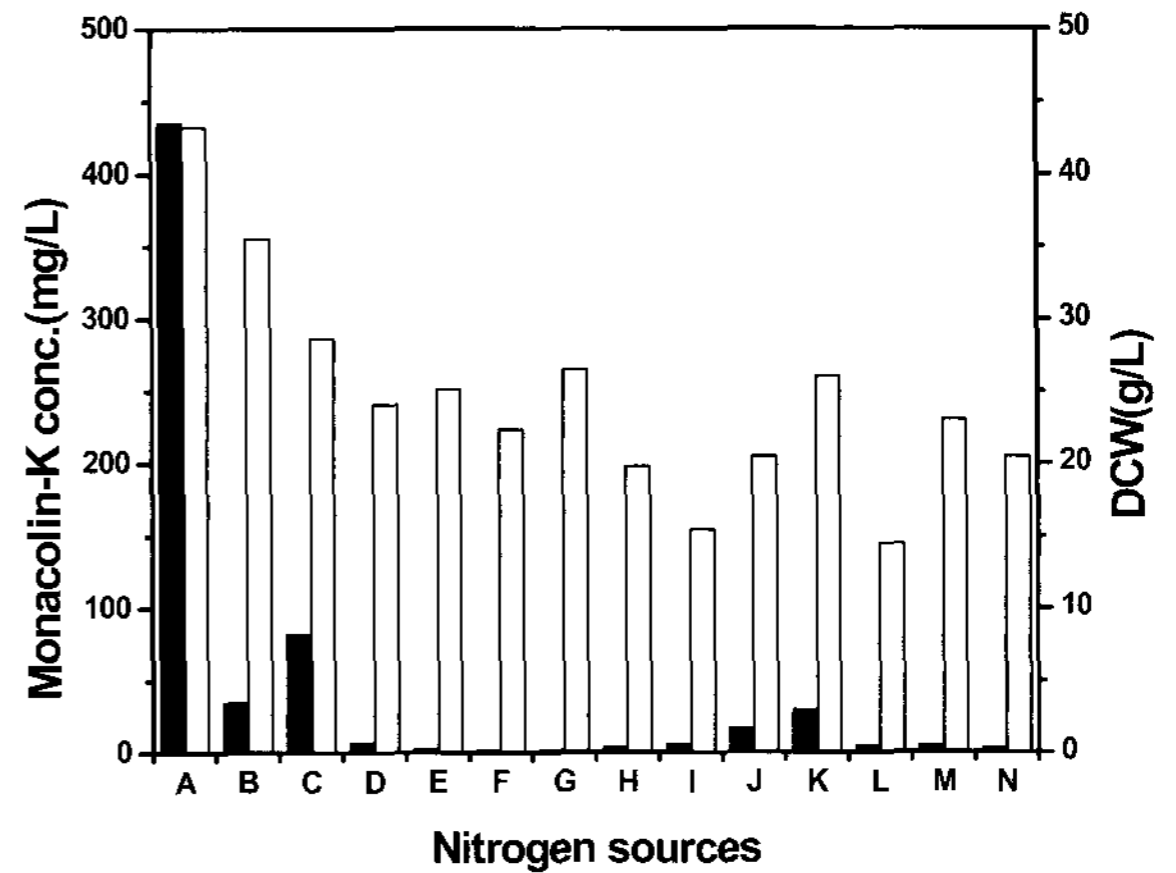


Figure 2. Effect of nitrogen sources and nitrogen concentration on the production of monacolin-K (A; control, B; without yeast extract, C; without beef extract, D; without malt extract, E; added only yeast extract 7.5 g/L, F; added only yeast extract 15 g/L, G; added only yeast extract 30 g/L, H; added only yeast extract 40 g/L, I; added only beef extract 15 g/L, J; added only beef extract 30 g/L, K; added only beef extract 40 g/L, L; added only malt extract 20 g/L, M; added only malt extract 30 g/L, N; added only malt extract 40 g/L, ■; monacolin-K, □; DCW).

질소원의 조절이 모나콜린-K 생산에 미치는 영향

대량 생산을 위한 발효시 유기질소원이 거품 생성의 원인이 되기도 하며, 현재 현재 최적배지로서 사용중인 malt extract, beef extract와 yeast extract의 경우 고가의 가격으로 인하여 산업화 배지로서 적절하지 않은 점이 있다. 3가지 질소원의 배지량을 최소화하기 위하여 단일 질소원 또는 두가지 질소원을 조합하여 모나콜린-K 생산성을 비교하여 보았다. 이때 탄소원은 A-N까지 실험구 모두 soluble starch를 사용하였다. 특히하게 대조구를 제외한 모든 실험구에서 현저하게 낮은 모나콜린-K 생산과 건조균체량을 나타냄으로서 현재 사용하는 유기질소원 세가지 모두가 모나콜린-K 생산과 균체성장에 영향을 주는 인자임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Yeast extract의 경우 *Monascus purpureus*에 의한 색소 생산에서 yeast extract를 첨가하지 않은 배지에 비해 균체량이 40% 이상 높아지는 것으로 보아 yeast extract 농도 조절을 통하여 균의 성장을 제어할 수 있다고 판단되었다(20).

세가지 유기질소원이 모나콜린-K 생산에 영향을 주는 인자임을 확실하나 사용된 농도를 어느 정도 감소할 수 있으며, 또한 균의 형태구조 조절을 위하여 무기질소원과 같이 사용하는 것도 가능한지를 모나콜린-K 생산과 균체성장을 측정하여 보았다. 유기질소원 농도를 실제 사용한 양보다 10% 줄여도 모나콜린-K 생산에 영향을 미치지 않았으며, 그리고 유기질소원 농도를 실제 사용한 양보다 10%

줄이고 무기질소원을 1% 첨가한 경우, 모든 실험구에서 모나콜린-K 생산이 감소하는 경향을 보여 주었다(Fig. 3).

Table 2. Effect of various concentrations of organic nitrogen sources with and without inorganic nitrogen sources on monacolin-K production

Organic nitrogen sources*	Inorganic nitrogen source	Monacolin-K concentration (mg/L)	DCW (g/L)	Final pH
100% (control)		381.3	29.12	6.58
90%	none	409.0	32.75	6.14
80%		288.3	32.95	5.79
70%		223.7	33.32	5.88
60%		131.0	31.38	6.47
90%			435.2	31.95
80%	ammonium sulfate (10 g/L)	389.8	31.96	5.51
70%		322.1	29.43	5.40
60%		294.1	27.17	5.50
90%		potassium nitrate (10 g/L)	273.0	29.47
80%	278.4		30.46	6.21
70%	245.8		27.33	5.88
60%	268.8		32.08	5.75

* organic nitrogen sources: malt extract 40 g/L, beef extract 30 g/L, and yeast extract 15 g/L

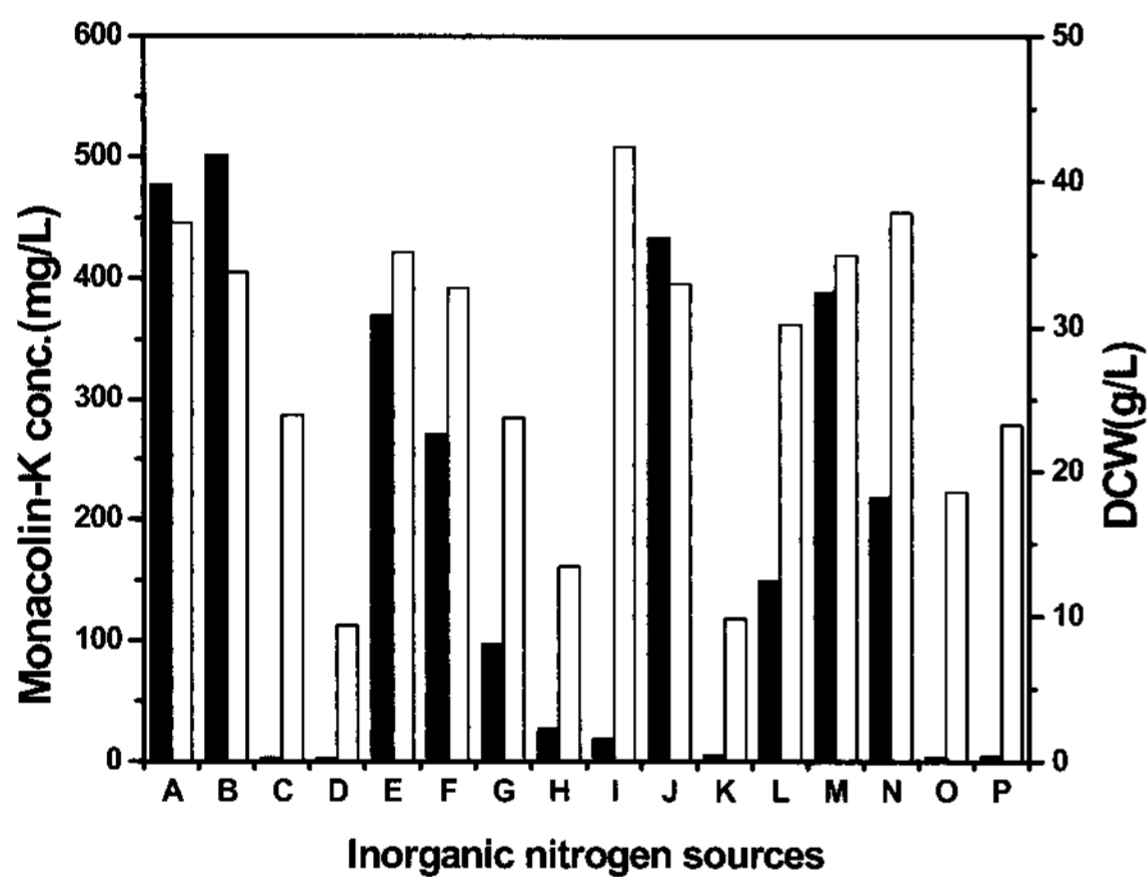


Figure 3. Effect of various inorganic nitrogen sources (10 g/L) on the production of monacolin-K (A; 100% organic nitrogen sources, B; 90% organic nitrogen sources, C; ammonium acetate, D; ammonium carbonate, E; ammonium chloride, F; ammonium citrate dibasic, G; ammonium nitrate, H; ammonium oxalate, I; ammonium phosphate dibasic, J; ammonium sulfate, K; lithium nitrate, L; magnesium nitrate, M; potassium nitrate, N; sodium nitrate, O; zinc nitrate, P; urea, ■; monacolin-K, □; DCW).

유기질소원의 농도를 10%보다 더 감소시킬 수 있는 여부 및 상기의 결과에서 대조구에 비해 모나콜린-K 생산이 비슷하거나 크게 적지 않은 ammonium sulfate와 potassium nitrate를 두개 선정하여 유기질소원의 농도에 따른 모나콜린-K과 균체량을 측정하여 Table 2에 나타냈다. 이때 탄소원은 A-P까지 실험구 모두 soluble starch를 사용하였다

대조구의 경우 모나콜린-K와 건조 균체량은 각각 381.3 mg/L와 29.1 g/L이었으며, 유기질소원의 비율을 90%로 하고 ammonium sulfate를 1% (w/v)를 첨가한 생산배지에서는

모나콜린-K와 건조균체량은 각각 435.2 mg/L와 31.9 g/L를 나타내었다. 전 실험구에서 건조균체량은 30 g/L를 크게 벗어나지 않았으며, 모나콜린-K의 생산량은 유기질소원의 농도가 낮아지면 감소하는 경향을 보여 주었다.

Potassium nitrate를 첨가한 배지의 경우 배양 4일째부터 붉은색 색소를 생산하기 시작하였고, 이를 제외한 나머지 배지에서는 5일 이후에 색소가 생산되었다. 균의 형태구조의 경우 ammonium sulfate와 potassium nitrate를 첨가한 배지에서 균사체보다는 펠릴의 형태가 많았고, new 펠릴은 1-2 mm, old 펠릴은 약 3-3.5 mm 내외로 거의 유사한 형태를 보여주었다.

유기질소원의 비율을 90%로 하고 ammonium sulfate를 10g/L 첨가한 배지에서 435.2 mg/L로서 가장 높은 생산을 보였으나, 균체량 대비 생산은 13.6 mg/g으로서 대조구의 13.1 mg/g과 비교시 거의 유사함을 알 수 있었다. Ammonium sulfate는 발효 후 최종 pH와 균의 형태구조에 영향을 주는 인자로 판단되기 때문에 향후 실험인 Plackett-Burman design에 의한 실험의 인자로 결정하여 모나콜린-K 생산에 미치는 영향을 측정하도록 결정하였다.

Table 3. The composition of selected production medium for Plackett-Burman design

component	concentration (g/L)	variables
Soluble starch	96.0	A
Malt extract	40.0	B
Beef extract	30.0	C
Yeast extract	15.0	D
Ammonium sulfate	10.0	E
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.5	F
L-Histidine	3.0	G
KHSO ₄	1.25	H
Twin 80 (dummy value)	0.5	I

Plackett-Burman design에 의한 최대 영향 배지 선택

Plackett-Burman design에 의한 배지조성과 모나콜린-K 생산 그리고 그에 따른 분석을 Table 3, 4와 5에 나타내었으며(21), 농도가 높은 A-D 변수는 농도조절을 중심값에서 20%로 조절 하였고, 농도가 낮은 나머지 변수들은 50%로 농도를 조절하였다. G는 dummy variable이며 농도는 0.5 g/L로 조절하였다. 이 때 가장 높은 생산을 보인 배지는 M2로 모나콜린-K와 건조균체량은 각각 358.38 mg/L와 31.65 g/L를 나타내었다.

모나콜린-K 생산에 대한 각 변수가 미치는 영향을 분석하여 Table 5에 나타냈다. 모나콜린-K 생산에 영향을 미치는 정도는 mean square 값으로 판단할 수 있으며, 다른 인자에 비하여 현저히 높은 값을 나타낸 3개의 높은 변수는 순서대로 beef extract, KHSO₄와 ammonium sulfate이었다. 발효 후 pH를 측정된 결과 사용된 배지의 조성에 따라 4.5에서 7.5까지 넓은 범위를 나타내어 pH 제어 실험을 수행할 필요성이 있음을 알 수 있었다.

반응표면분석법에 의한 생산배지 최적화

최종적으로 최적배지 농도를 정하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였으며, 실험계획은 중심합성계획을 적용하였다.

생산배지에서 Plackett-Burman design에 의해 선택된 독립변수로는 beef extract, ammonium sulfate와 KHSO₄이며, 독립변수들의 수준과 실험결과를 Table 6과 7에 나타내었다.

Table 4. Plackett-Burman design for nine variables(22)

Trial	Variables									Yield (mg/L)	DCW (g/L)	Final pH
	A	B	C	D	E	F	G	H	I			
M1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	266.19	34.19	4.79
M2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	358.38	31.65	5.45
M3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	38.93	25.69	7.08
M4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	295.51	27.13	6.15
M5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	16.80	21.15	7.41
M6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	7.06	17.85	7.63
M7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	239.64	32.74	6.19
M8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	30.78	24.38	5.55
M9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	314.91	30.52	5.69
M10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	293.16	32.28	5.80
M11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	155.09	27.53	7.28
M12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	18.05	23.24	7.19
M13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	131.32	30.89	4.35
M14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	125.12	24.11	6.65
M15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	330.48	29.94	7.27
M16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	177.89	26.77	5.63

A: soluble starch at a high conc. of 115.2 g/L and a low conc. of 76.8 g/L
 B: malt extract at a high conc. of 48 g/L and a low conc. 32 g/L
 C: beef extract at a high conc. of 24 g/L and a low conc. of 16 g/L
 D: yeast extract at a high conc. of 18 g/L and a low conc. of 12 g/L
 E: ammonium sulfate at a high conc. of 15 g/L and a low conc. of 5.0 g/L
 F: Na₂HPO₄ · 12H₂O at a high conc. of 0.75 g/L and a low conc. of 0.25 g/L
 G: L-histidine at a high conc. of 4.5 g/L and a low conc. of 1.5 g/L
 H: KHSO₄ at a high conc. of 1.875 g/L and a low conc. of 0.625 g/L
 I: twin 80 dummy value 0.5 g/L
 +: The high concentration of variable
 -: The low concentration of variable

Table 5. Analysis of the yields shown in Table 4

	variables									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Σ(H)	1329	1688	962	1377	1003	1362	1328	1817	1547	
Σ(L)	1469	1110	1836	1421	1796	1437	1408	981	1251	
Difference	-139	578.0	-874	-44	-793	-74	-79	835	296	
Effect	-34	144	-218	-11	-198	-18	-19	208	74	
Mean square	2439	41763	95573	244	78665	698	786	87273	10960	

Table 6. Levels of independent variables for experimental design

x _n	Independent variables (g/L)	Level				
		-a	-1	0	1	+a
x ₁	beef extract	18.97	21.43	30.0	38.57	41.03
x ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.07	1.5	3.0	4.5	4.93
x ₃	KHSO ₄	0.89	1.25	2.5	3.75	4.11

-α, -1, 0, 1과 α 다섯 단계로 부호화하였으며, 독립변수 (x_n)는 중심합성계획에 따라 16실험구로 구분하였으며, 중심점을 2실험구로 선택함으로써 α값은 1.287이었다(18, 22). 실험에 대한 분석은 SAS 프로그램을 사용하였다.

분산분석결과 R-square (결정계수)는 0.9214으로 1에 가까운 값을 나타내어 반응모형이 신뢰할 수 있음을 나타내었으며, 전체 모델의 유의확률은 0.0105으로 0.05보다 작으

므로 가정된 모형반응이 자료에 적합하다고 판단되었다. 모나콜린-K 생산 (Y)을 위한 모든 변수에 대한 2차 회귀 모델식은 다음과 같이 제시되었다.

$$Y = -718.51 + 69.15x_1 + 149.95x_2 - 100.61x_3 - 1.09x_1^2 - 2.12x_1x_2 - 9.54x_2^2 + 5.11x_1x_3 - 8.84x_2x_3 - 13.77x_3^2$$

모델식으로부터 추정 가능한 최적값 574.07을 나타내었다. 최종적으로 반응표면분석을 통하여 모나콜린-K 생산에서 가장 영향을 주는 3개 인자의 농도를 측정할 수 있었다.

Table 7. Experimental design and results of central composite design

Exp. No.	Natural value (g/L)			Monacolin-K (mg/L)	
	X ₁ [beef extract]	X ₂ [(NH ₄) ₂ SO ₄]	X ₃ [KHSO ₄]	Exp.	Pred.
1	38.57(+)	4.5(+)	3.75(+)	434.3	464.3
2	38.57(+)	4.5(+)	1.25(-)	542.3	494.6
3	38.57(+)	1.5(-)	3.75(+)	536.9	531.5
4	38.57(+)	1.5(-)	1.25(-)	476.8	495.4
5	21.43(-)	4.5(+)	3.75(+)	237.3	231.8
6	21.43(-)	4.5(+)	1.25(-)	462.6	481.1
7	21.43(-)	1.5(-)	3.75(+)	128.9	189.7
8	21.43(-)	1.5(-)	1.25(-)	389.6	372.7
9	30.0(0)	3.0(0)	2.5(0)	493.0	530.3
10	30.0(0)	3.0(0)	2.5(0)	525.1	530.3
11	18.97(-a)	3.0(0)	2.5(0)	323.6	283.9
12	41.03(+a)	3.0(0)	2.5(0)	504.4	512.5
13	30.0(0)	1.07(-a)	2.5(0)	521.4	481.6
14	30.0(0)	4.93(+a)	2.5(0)	499.9	508.1
15	30.0(0)	3.0(0)	0.89(-a)	537.4	563.3
16	30.0(0)	3.0(0)	4.11(+a)	483.7	426.1

반응표면분석에 의하여 제시된 각각의 농도 (g/L)는 beef extract 30.25, (NH₄)₂SO₄ 4.03와 KHSO₄ 1.0이었다. 최적화된 배지에 의해 플라스크 배양을 한 결과 기본생산배지보다 약 3배 증가한 558.96 mg/L의 모나콜린-K를 생산할 수 있었다. 이 값은 모델식에서 구한 최적값과 큰 차이가 없는 유사한 결과이다. 3 변수 중 하나의 변수를 고정하고 2 변수의 교호작용을 Fig. 4에 나타냈다. x₃, KHSO₄를 1.0 g/L로 고정하고 x₁, beef extract와 x₂, (NH₄)₂SO₄의 반응표면을 그림(a)에 나타냈다. 모나콜린-K 생산은 beef extract의 농도에 따라 포물선 모양을 나타냈으며, 정점을 나타내는 beef extract의 농도는 약 30 g/L이었다. 그리고 (NH₄)₂SO₄의 농도가 증가하면 모나콜린-K 생산은 완만하게 증가하는 경향을 보여 주었다. 그림(b)에는 x₂, (NH₄)₂SO₄의 농도를 4.03 g/L로 고정한 후 beef extract와 KHSO₄의 변수에 대한 모나콜린-K 생산의 반응표면을 나타냈다. beef extract는 완만하지만 (a)와 비슷한 포물선 경향을 보여주었으며, KHSO₄는 beef extract의 농도가 낮을 때에는 KHSO₄의 농도가 증가하면 모나콜린-K 생산은 감소하고, beef extract의 농도가 높을 때에는 KHSO₄의 농도 변화가 모나콜린-K 생산에 미치는 영향이 미비하였다. 그림(c)에는 x₁, beef extract 농도를 30.23 g/L로 고정한 후, (NH₄)₂SO₄와 KHSO₄의 변수에 대한 모나콜린-K 생산의 반응표면을 나타냈다. KHSO₄의 농도가 낮은 경우 (NH₄)₂SO₄의 농도가 증가하면 모나콜린-K 생산은 완만하게 증가하는 경향을 보여 주었다. 그리고

(NH₄)₂SO₄의 농도가 높을 경우, KHSO₄의 농도가 낮아지면 모나콜린-K 생산은 증가하는 경향을 보여주었다.

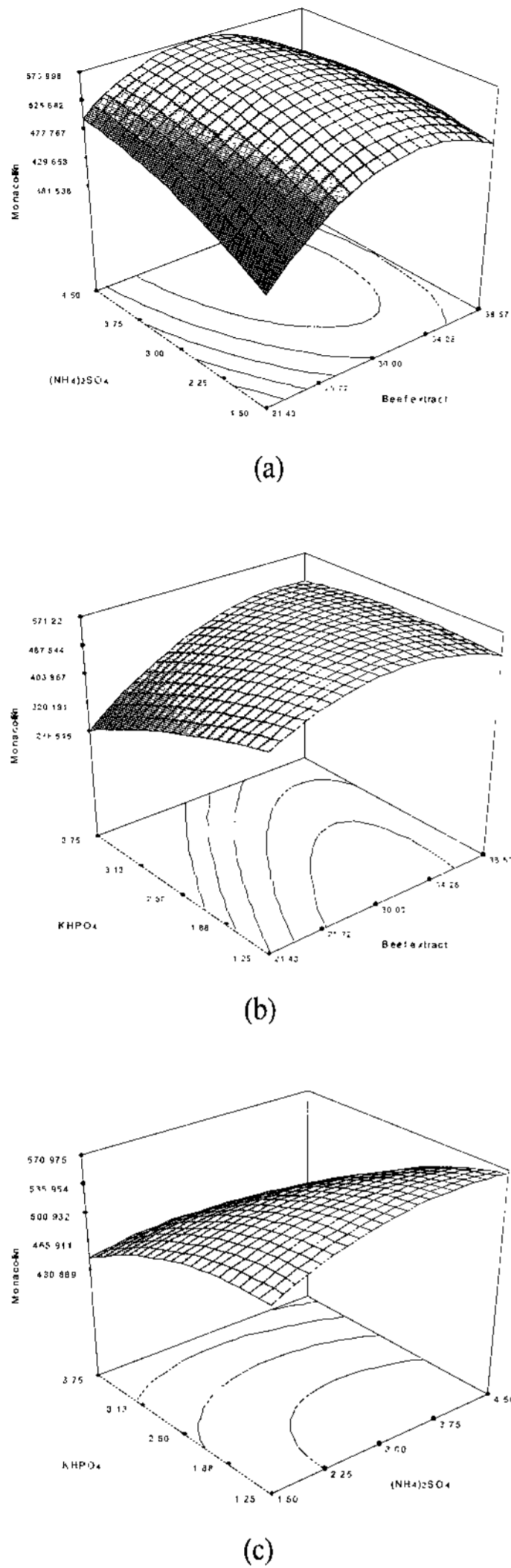


Figure 4. Response surface plot showing the interaction between (a); beef extract and (NH₄)₂SO₄ at optimum KHSO₄ concentration (1.0 g/L), (b); beef extract and KHSO₄ at optimum (NH₄)₂SO₄ concentration (4.03 g/L), and (c); (NH₄)₂SO₄ and KHSO₄ at optimum beef extract concentration (30.23 g/L).

교반속도가 모나콜린-K 생산에 미치는 영향

회분식 배양에서 교반속도가 모나콜린-K 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본생산배지에서 교반속도를 300, 350, 400과 500 rpm으로 달리하여 용존산소, pH의 변화, 균의 형태구조와 모나콜린-K 생산에 대한 영향을 비교하였다. Fig. 5에서는 각각의 교반속도에서 시간에 따른 모나콜린-K와 용존산소의 변화를 보여주고 있다. 500 rpm의 교반속도, 192시간에서 68 mg/L 생산을 보이며 이때의 건조균체량은 25 g/L였다. 나머지 교반속도에서는 유의적으로 낮은 모나콜린-K 생산을 보였다. 특히 300 rpm의 경우 모나콜린-K의 생산이 상대적으로 많이 낮았다. Fig. 6에 나타낸 건조균체량의 경우 교반속도 350 rpm에서 가장 높은 균체량을 유지

하였으며, 특히 300 rpm에서 균의 성장 및 균체량의 감소가 뚜렷하였다. 이는 300 rpm의 경우 배양 초기 40시간부터 용존산소가 급격하게 낮아지기 시작하여 균의 산소의 요구량에 충족하지 못함으로써 일차대사와 이차대사 모두가 이루어지지 않은 것으로 판단되며, 500 rpm의 경우 상대적으로 용존산소가 장시간 지속되는 것을 알 수 있었다. 즉 배양 120시간까지 DOT가 20%를 유지하는 경향을 보였다. 상기 결과를 토대로 발효 중 용존산소의 유지가 이차대사에 크게 영향을 주는 것으로 유추되었다.

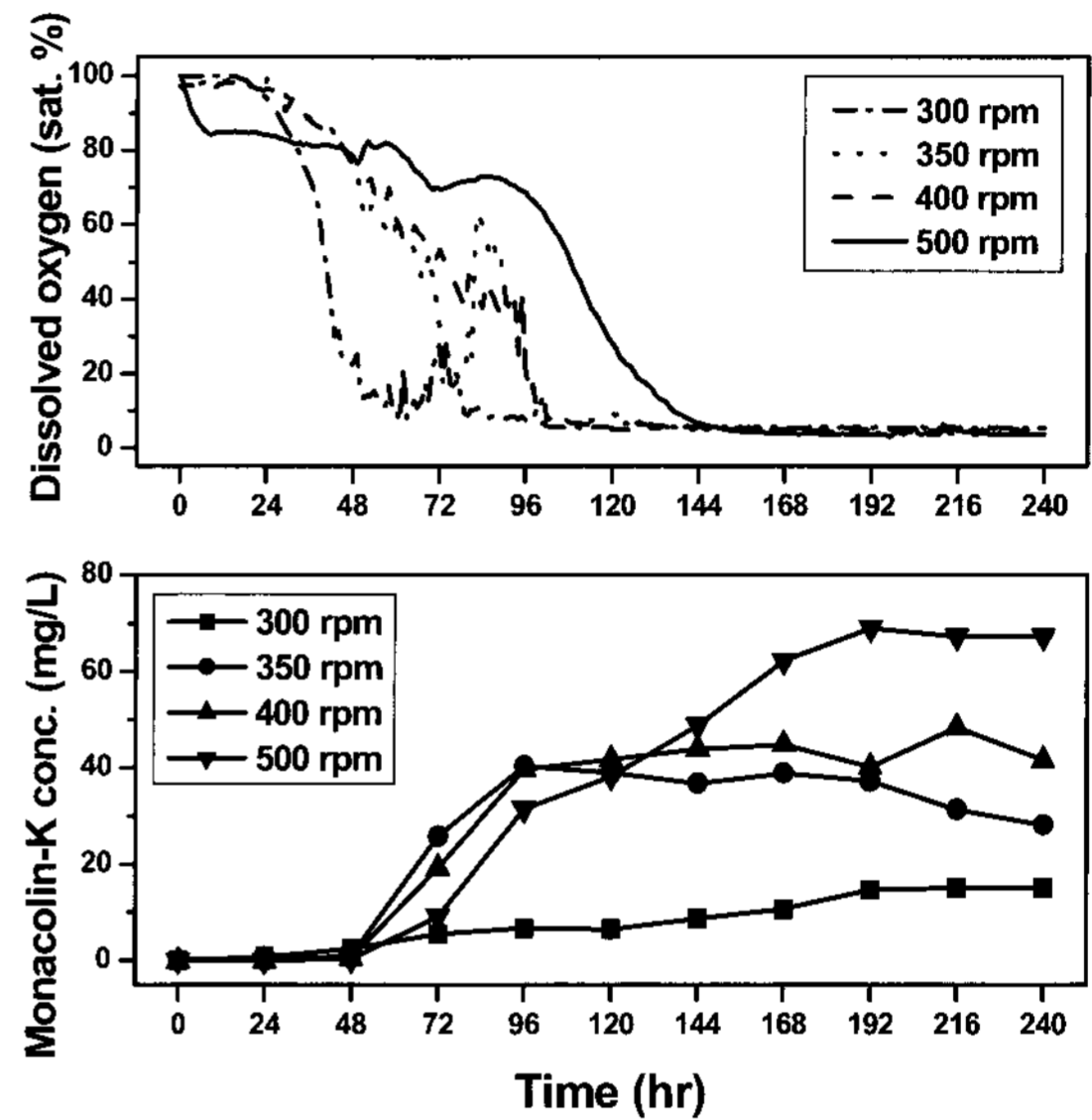


Figure 5. Effect of agitation speed (rpm) on dissolved oxygen and monacolin-K production by *Monascus pilosus* cultivated in basic production medium at 27°C, 1 vvm, inoculum 10%, and pH uncontrolled.

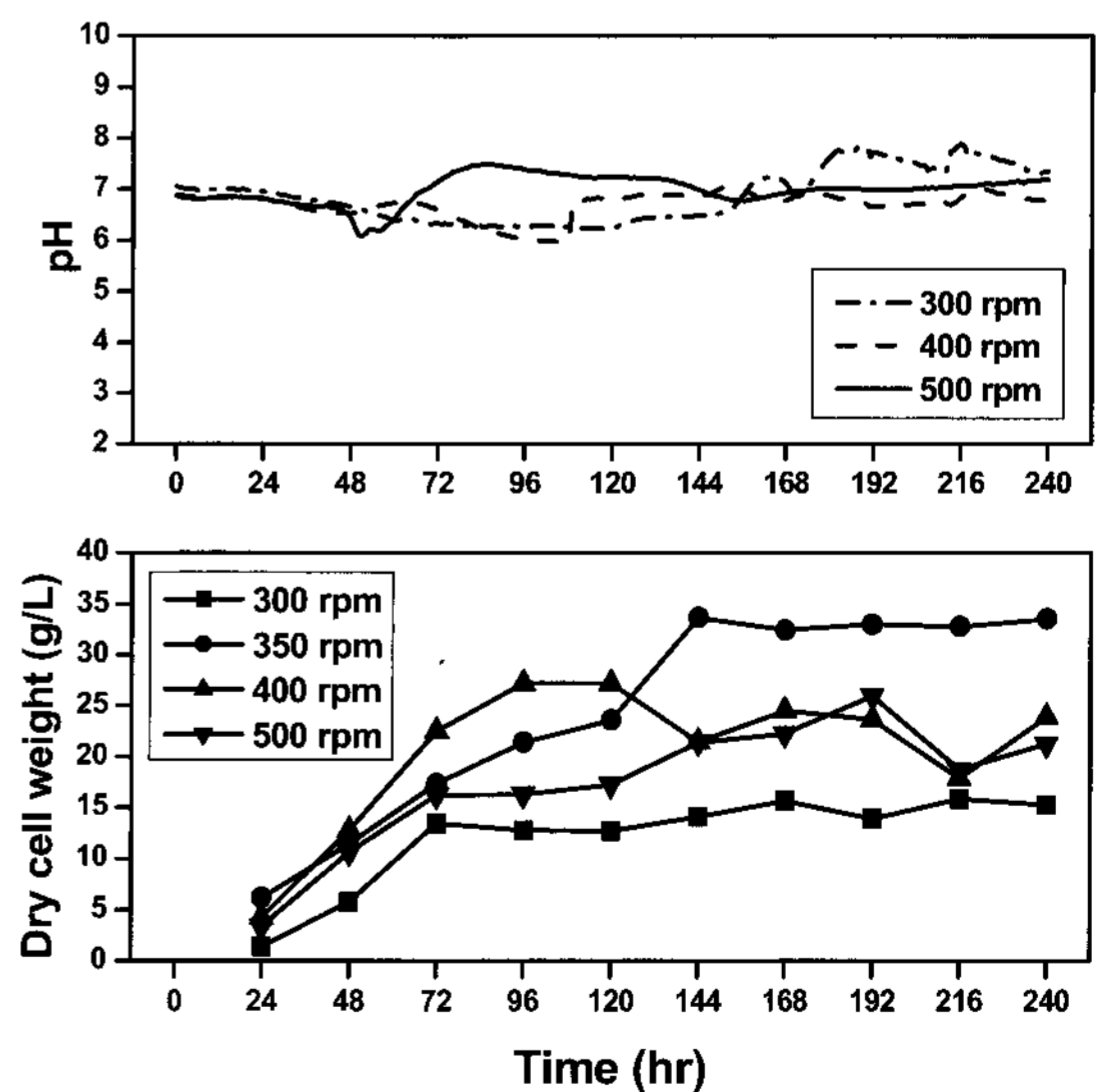


Figure 6. Effect of agitation speed (rpm) on dry cell weight and pH profile by *Monascus pilosus* cultivated in basic production medium at 27°C, 1 vvm, inoculum 10%, and pH uncontrolled.

각각의 rpm에 대한 발효 중 pH의 변화는 Fig. 6에 나타내었으며, pH가 배양 240 시간동안 큰 폭으로 변화하기 보다는 6과 8사이의 완만한 변화를 측정할 수 있었다. 각각의 교반속도에 따른 균의 형태구조를 관찰한 결과(자료 미제시), 500 rpm에서 배양시 균의 형태구조는 1-1.5 mm의 펠릿만 자라며 균사의 형태는 찾아볼 수 없었다. 그 외의 교반속도에서는 1-1.5 mm의 펠릿과 균사가 공존하여 자라는 것을 볼 수 있었다. 또한 교반속도가 낮아질수록 균이 성장할 때 발효조 벽면, 배양액 상부와 접하는 pH 전극이나 DO 센서에 균체가 붙어서 자라는 경향이 두드러졌다. 생물반응기에서의 교반은 기체의 분산, 혼합 및 물질과 열 전달을 위해 필요한 전단력을 제공한다. 즉, 균류와 같이 균사를 형성하는 미생물들은 세포가 성장하면서 배양액내의 점도가 높아지게 되는데 교반속도를 증가시켜 산소전달을 향상시킬 수 있다. 그러나 과도한 교반속도는 강한 전단력으로 인해 세포의 성장에 악 영향을 미칠 수 있다(23). 따라서 균의 형태구조에서 pellet의 형태가 생물반응기에서 용존산소의 전달과 모나콜린-K 생성에 좋은 것으로 판단되었다. 그렇지만 500 rpm의 경우 교반속도가 커서 균에 미치는 전단력의 영향을 고려할 필요가 있을 것으로 판단되며, 낮은 교반속도에서 펠릿을 형성하고 용존산소를 높여줄 수 있는 배지조성 확립, 균의 발굴과 시스템 설계가 필요하다고 생각된다.

배양기간 동안 유지되었을 것으로 판단되어 위와 같은 조건에서 통기량만 0.5 vvm으로 조절하였으나 모나콜린-K는 역시 생산되지 않았다. 상기 두 번의 실험을 수행 중 용존산소는 발효 시작 후 48시간이 지나면 급격히 감소되는 현상이 관찰되었다. 배양 중 균은 산소전달이 용이하지 못한 균사체 형태로 자라는 것을 알 수 있었다.

초기 접종량의 조절로 균의 형태구조의 변화가 가능한지 여부를 실험을 통하여 알아보았다. 초기 접종량을 10%에서 3%로 줄여서 실험한 결과 균의 형태구조는 균사체와 펠릿이 공존하여 자랐으나, 모나콜린-K는 측정되지 않았다. 접종량을 3%로 낮춘 결과 균의 형태구조를 약간 변화시킬 수는 있었지만 모나콜린-K의 생산에는 효과가 없었다(자료 미제시).

생물반응기에서 산소전달이 용이하다고 알려진 paddle type 임펠러로 대체하여 실험한 결과 용존산소는 배양 180 시간 이후에 제한이 왔다. 다른 실험조건보다 용존 산소를 장시간 유지하는 것이 가능하였으나 모나콜린-K는 생산되지 않았다.

가장 높은 모나콜린-K 생산을 보인 플라스크 실험에서 발효 후 최종 pH (6.5)를 참고하여, 400 rpm, 1 vvm, rushton 임펠러와 3% 초기 접종량에서 pH를 6.5로 조절하여 회분식 발효 실험한 결과를 나타내었다(Fig. 7). 발효 9 일째 185 mg/L의 모나콜린-K가 생산되었으며, 이 때 건조균체량은 32 g/L를 나타내었다.

결과적으로 생물반응기에서 발효를 수행하는 경우 pH의 조절, 초기 접종량과 임펠러 형태 등 복합적인 요인에 의해 모나콜린-K 생산이 좌우되는 것을 알 수 있으며, 향후 생물반응기 최적 운영을 위한 배양 조건 확립 뿐만 아니라, 초기 접종량을 통한 균의 형태구조의 조절과 임펠러의 형태 또는 공기 공급 속도나 회전수 등에 의한 용존산소 조절을 통한 실험으로서 보다 높은 수율의 모나콜린-K 생산을 가져올 수 있다고 판단된다.

요 약

콜레스테롤 저하제이자 고지혈증 치료제의 하나인 모나콜린-K (lovastatin)의 생산을 높이기 위하여 플라스크 배양에서 생산배지 최적화를 위한 실험을 수행하였다. 기본생산배지에 탄소원, 무기인산염, 아미노산원과 무기원에 대한 영향을 조사하였다. 각각의 원소에 대해 모나콜린-K를 가장 많이 생산한 순서대로 3가지를 선별하여 Graeco-Latin square design에 의해 생산배지의 종류와 농도를 결정하였다. 하지만 상기 실험은 각 배지간의 교호작용을 검출할 수 없어서 모나콜린-K 생산에 대한 재현성이 떨어졌다. 따라서 탄소원, 질소원과 질소원의 농도에 대한 실험을 보완하였다. 통계학적 실험계획법인 Plackett-Burman design에 의해 배지 중 beef extract, (NH₄)₂H₂SO₄와 KHSO₄가 모나콜린-K 생산에 가장 영향력 있는 인자로 분석되었으며, 영향력이 있는 3가지 배지에 대해 배지 사이의 교호작용까지 분석할 수 있는 실험계획법인 중심합성계획법과 반응표면 분석법을 이용하여 생산배지를 최적화 하였다. 모나콜린-K

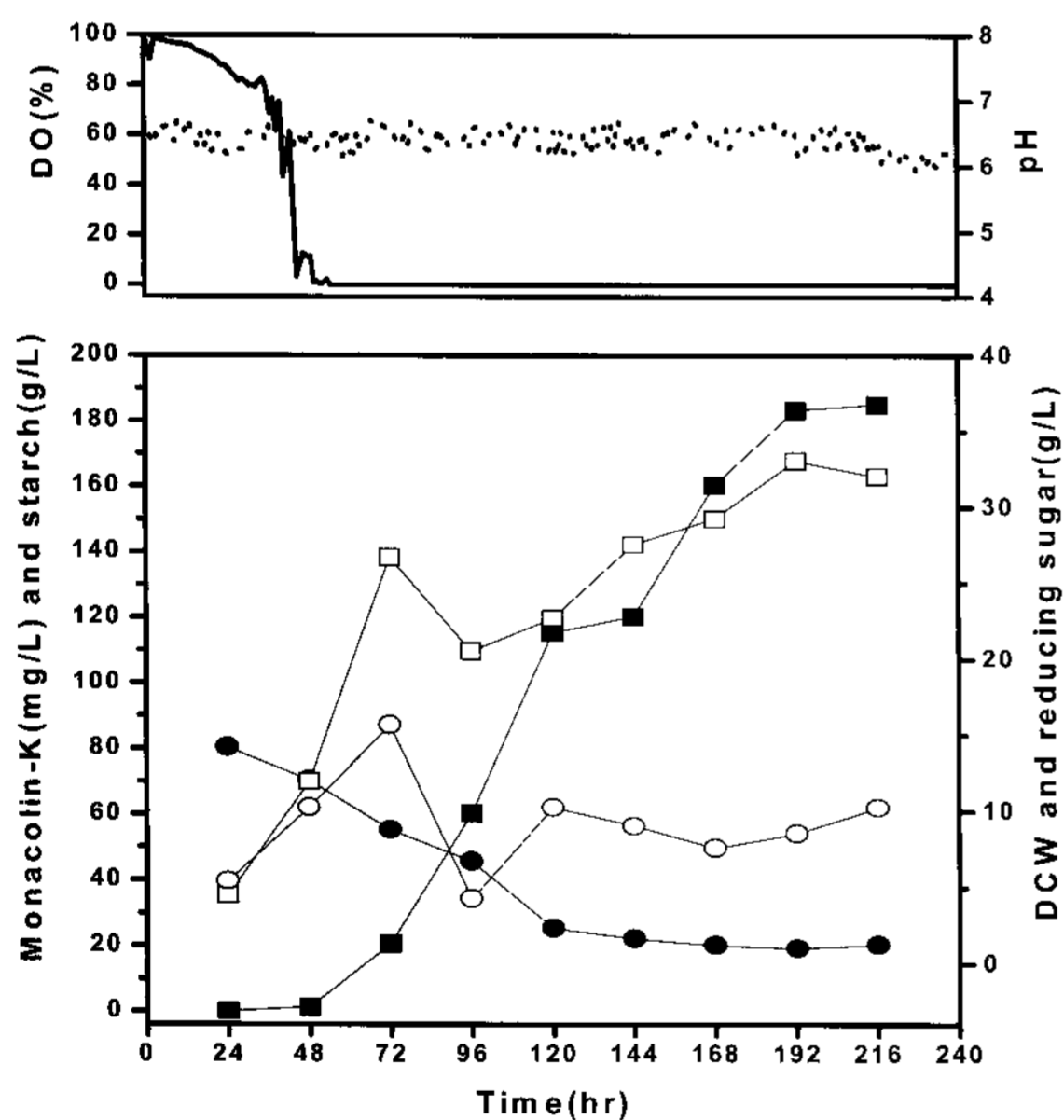


Figure 7. Time course of monacolin-K production, dry cell weight, and dissolved oxygen by *Monascus pilosus* cultivated in optimum production medium at 400 rpm, 27°C, 1 vvm, pH 6.5, and inoculum 3% (■: monacolin-K, □: DCW, ●: starch, -: DO (dissolved oxygen), ...: pH).

임펠러 형태, 통기량의 변화, 초기 접종량과 pH 조절이 모나콜린-K 생산에 미치는 영향

최적생산배지에서 400 rpm, 1 vvm, 10% 접종량과 rushton 임펠러의 경우 모나콜린-K는 생산되지 않았으며, 플라스크 배양의 경우 생물반응기보다 낮은 용존산소가

고생산을 위한 배지와 최적화된 농도 (g/L)는 soluble starch 96, malt extract 44.5, beef extract 30.23, yeast extract 15, (NH₄)₂SO₄ 4.03, Na₂HPO₄·12H₂O 0.5, L-Histidine 3.0과 KHSO₄ 1.0이며, 기본생산배지에서의 생산량보다 약 3배 증가한 558.96 mg/L의 생산을 보였다. 생물반응기에서 교반속도가 모나콜린-K 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본생산배지를 이용하여 300, 350, 400과 500 rpm에서 실험을 수행하였다. 교반속도 500 rpm에서 68 mg/L로 가장 높은 생산을 보였으며, 이 때 균의 형태구조는 300, 350과 400 rpm에서 펠릿과 균사체가 공존하는 것과는 다르게 펠릿 형태로만 자라는 것이 확인 되었으며, 생물반응기를 이용하여 발효 시 펠릿 형태가 모나콜린-K 생산에 가장 좋은 형태구조임을 알 수 있었다. 확립된 최적생산배지를 이용하여 400 rpm, 1 vvm과 3% 초기 접종량에서 pH를 6.5로 조절한 경우 185 mg/L의 가장 높은 모나콜린-K가 생산 되었으며, 이때 균체량은 32 g/L를 나타내었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 지원 바이오식품 소재개발 및 산업화 연구센터와 전북대학교 지원에 의해 수행되었으며, 표면분석 반응법 실험자료 처리에 도움을 주신 미국 University of California, Irvine에 재직하시는 Henry C. Lim 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Ryu, B. H., M. K. Ahn, and J. O. Park (1995), Production of cholesterol inhibitor, Monacolin Produced from *Monascus pilosus* M-15, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**(1), 92-97.
- Chen, M. H. and M. R. Johns (1994), Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*, *Enz. Microb. Technol.* **16**, 584-590.
- Mak, N. K., W. F. Fong, and Y. L. Wong-Leung (1990), Improved fermentative production of *Monascus* pigments in roller bottle culture, *Enz. Microb. Technol.* **12**, 965-968.
- Endo, A. (1979), Monacolin K, a new hypocholesteremic agent produced by a *Monascus* species, *J. Antibiotics.* **32**(6), 852-854.
- Endo, A., and H. Yamashita (1985), Microbial phosphorylation of compactin(ML-236B) and related compounds, *J. Antibiotics.* **38**(3), 328-332.
- Mah, J. H., and H. J. Whang (1996), Screening of *Monascus* strains for antimicrobial activity and effect of change of nutrients and incubation conditions on antimicrobial activity, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**(6), 1080-1086.
- Su, Y. C., J. J. Wang, and T. T. Lin (2003), Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin-K by *Monascus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 41-46.
- Broder, C. U. and P. E. Koehler (1980), Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity, *J. Food Sci.* **45**, 567-569.
- Pereira, D. G. and B. V. Kilikian (2001), Effect of yeast extract on growth kinetics of *Monascus purpureus*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91/93**, 311-316.
- Kim, B. G., Y. S. Jeong, G. T. Chun, and Y. H. Lee (1999), Effect of medium components on the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(1), 36-44.
- Lee, J. and S. N. Agathos (1989), Effect of amino acid on the production of Cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*, *Biotechnol. Lett.* **11**, 77-82.
- Philippe, J. B., M. O. Loret, and G. A. Goma (2001), Control of the production of metabolites by *Monascus* in submerged culture, 11th World Congress of Food Science and Technology 2001, Seoul, Tu04-2, pp28.
- Yoon, S. J. (2004), Optimization of production medium and development of fermentation condition for *Monascus pilosus* production, M. S. Thesis, Chonbuk National University.
- Dubios, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colotimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- Kysilka, R. and V. Kren (1993), Determination of Lovastatin (mevilolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids, *J. Chromatogr.* **630**, 414-417.
- Reinhard, H. and B. Zimmerli (1999), Reversed-phase liquid chromatographic behavior of mycotoxins citrinin and ochratoxin A, *J. Chromatogr.* **862**, 147-159.
- Zhang, M. L., C. X. Peng, and Y. F. Zhou (2000), US Patent, 6, 046002
- Box, George E. P., William G. Hunter, and Stuart J. Hunter (1978), *Statistics for Experimenters*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Johanson, C. L., L. Coolen, and J. H. Hunik (1998), Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations, *Biotechnol. Pro.* **14**, 223-240.
- Swift, R. J., A. Karandikar, A. M. Griffen, P. J. Punt, C. A. Hondel, G. D. Robson, A. P. J. Trinci, and M. G. Wiebe (2000), The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture, *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 125-133
- Plackett, R. L. and J. P. Burman (1946), The design of multifactorial experiments, *Biometrika*, **33**, 302-325.
- Lekha, P. K., Nagin Chand and B. K. Losane (1994), Computerized study of interactions among factors and their optimization response surface methodology for the production of tannin acyl hydrolase by *Aspergillus niger* PKL 104 under solid state fermentation, *Biopro. Eng.* **11**, 7-15.
- Amanullah, A., B. Tuttiett, and A. W. Nienow (1998), Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 198-210.