

Monascus sp. J101을 이용한 적색색소의 Extractive Fermentation

주재영 · 남학우¹ · 윤주천¹ · 신철수*

연세대학교 공과대학 식품생물공학과, ¹동양나이론(주) 중앙연구소

Extractive Fermentation of Red Pigment Using *Monascus* sp. J101

Ju, Jae-Yeong, Hak-Woo Nam¹, Joo-Chun Yoon¹ and Chul-Soo Shin*

Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Central Research Institute of Tong Yang Nylon Co., LTD., Kyunggi-Do 430-080, Korea

Abstract — The characteristics of monascus fermentation using a hyperpigment-producing mutant, *Monascus* sp. J101, were analyzed, and the extractive fermentations employing permeabilizing agents and resin were carried out to increase the productivity of red pigment. And the kinetic analysis was also carried out in case of the monascus fermentation using Amberlite XAD-7. The extracellular content of the red pigment produced by *Monascus* sp. J101 was about 17% of the total, and the production of pigment was regulated by its own product. The cell growth reached a stationary phase at 48 hours after inoculation, whereas the pigment production continued up to 110 hours, which showed the pattern of a mixed growth-associated type. During the fermentation, various permeabilizing agents were added to the culture medium and their effects on pigment production were examined. By adding 0.05% Triton X-100 at 48 hours of cultivation, about an 18% increase in pigment production was accomplished as compared to the control, 12% for 0.25% ethyl acetate and 15% for 0.05% deoxycholate, respectively. When a nonionic adsorbent, Amberlite XAD-7 was added to the culture medium at a concentration of 12.0% at 48 hours of cultivation, the pigment production was enhanced by about 48.9% as compared to the control.

홍국균(*Monascus* 속)이 생산하는 홍국색소는 내열성이 강하고 사용가능한 pH 범위도 광범위하며 염착성이 양호한 천연색소로 알려져 있으며(1,2), 전통적으로 중국, 대만 등에서 술(紅酒, 老紅酒, 紅露酒), 홍두부, 고기 및 야채의 가공에 이용되어져 왔다(3). 홍국색소는 10여종 이상의 색소성분의 혼합물로 이루어져 있는데(4) 그 중 화학구조식이 밝혀진 것은 6종으로, monascin(5)과 ankaflavin(6)은 황색색소로, monascorubrin(7)과 rubropunctatin(5)은 적색색소로, monascorubramine(8)과 rubropunctamine(9)은 자색색소로 알려져 있다.

이들 색소는 주로 적색 착색료로 통칭되고 있는데, 사용균주, 영양기질, 배양조건에 의해 생산되는 구성색소의 비가 달라지기 때문에 외관상 색조의 차이가 나는 것으로 알려져 있다(10). Carels 등(3)과 堀井 등

(11)은 배지성분과 pH의 조절등으로 적색색소와 황색색소의 생성량이 달라짐을 보고하였고, 장 등(12)은 배양조건에 따라 황색색소의 생성량에 차이가 있음을 보고하였다. 또한 핵산, 단백질, 아미노산 등과 결합한 수용성 색소의 함량에 의해서도 색조의 차이가 나는 것으로 알려져 있다(10).

홍국색소는 홍국균을 고체배양 또는 액체배양하여 얻을 수 있으며, 1970년대 이후 대량생산이 가능하고 생산수율이 높은 액체배양 방법에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다. Lin(13)은 *Monascus* sp. F-2의, Yoshimura 등(14)은 *Monascus* sp. No.2의 액체배양조건에 대해 검토하였으며, Bau 등(15)은 *Monascus purpureus*의 색소생성과 항균성에 미치는 Zn^{2+} 의 영향을 연구하였고, Wong 등(16)은 *Monascus purpureus*의 색소생성에 미치는 glucose 대 ammonium nitrate의 농도비의 영향을 조사하였다. 또한 Su(17)는 *Monascus anka* V-204의 색소생성에 대한 최적 조건을 검토하고 대량생산의 process를 제시하였다.

본 연구에서는 홍국균의 색소생성에 있어 발효특

Key words: *Monascus* pigment, extractive fermentation, product regulation, permeabilization, Amberlite XAD-7

*Corresponding Author

성을 분석하고 생성제어를 받는 지의 여부를 검토하였고, 이러한 제어를 줄이기 위해 발효중 permeabilizing agents를 이용한 균체내 색소의 균체외로의 유리와 nonionic adsorbent인 Amberlite XAD-7에 의한 색소의 흡착을 통해 색소의 생산성을 증진시키고자 하였고 이에 대한 동력학적 분석을 행하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Monascus* sp.를 자외선 처리하여 얻은 적색색소의 생산성이 높은 *Monascus* sp. J101이다.

배지조성 및 시약

본 연구에서 이용된 사면배지는 Hiroi 등(18)이 사용한 Medium C 였으며, 전 배양배지는 Mizutani medium(19)이었고, 색소생성용 배지는 Lin's medium (14)을 변형하여 사용하였다. 배지의 조성은 Medium C의 경우 sucrose 10.0%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaNO_3 0.2%, KCl 0.05%, FeSO_4 0.001%, yeast extract 0.3%, casamino acid 0.5%, agar 2.0% 이었고, 전배양 배지는 glucose 5.0%, peptone 2.0%, KH_2PO_4 0.8%, CH_3COOK 0.2%, NaCl 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%이었으며, 색소생성용 배지는 rice powder 5.0%, NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.25%이었고 pH는 모두 6.6으로 고정하였다.

일반적인 시약은 덕산, Sigma, Junsei, Difco, Yakuri 등의 특급 또는 시약급을 사용하였다. Rice powder는 시중에서 식용으로 구입한 일반미를 100 mesh로 분쇄하여 사용하였다. Amberlite XAD-7 resin은 Sigma로부터 구입하였다.

균주의 배양

포자 현탁액의 제조는 Medium C 사면배지에 포자현탁액을 접종한 후 30°C 에서 7일간 배양하여 충분히 포자가 형성되도록 하였다. 여기에 0.7% 생리식염수를 첨가하고 유리막대로 표면을 긁어 포자를 균체에서 분리시킨 후, 포자의 수가 10^5 CFU/ml이 되게 조정하였다.

전 배양은 500 ml Sakaguchi flask에 전 배양 배지를 75 ml씩 분주하여 121°C 에서 15분간 멸균한 후 여기에 사면배양에서 얻은 포자현탁액 5 ml를 접종하였다. 배양은 30°C 에서 120 rpm으로 48시간 왕복진탕배양하였다.

본 배양은 500 ml baffled flask에 배지를 75 ml씩

분주하여 전 배양배지와 같이 멸균한 후 여기에 전 배양 배지를 5% 되게 접종하였다. 배양은 30°C 에서 180 rpm으로 96시간 회전 진탕배양하였다.

색소의 추출 및 정량

색소의 추출은 본 배양액 10 ml와 동량의 95% ethanol 용액을 250 ml 삼각 flask에 넣고 30°C 의 reciprocal shaker에서 180 rpm으로 1시간 동안 교반 추출하였으며 추출 후 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 균체를 제거하였다.

배양액에 resin이 첨가된 경우는 50 ml volume의 disposable syringe에 glass wool을 packing한 후 broth sample 20 ml를 분주하고 여기에 95% ethanol로 elution하여 추출액이 상대적으로 무색이 될 때까지 추출하였다.

색소의 정량은 추출액을 95% ethanol로 적정배수로 희석한 후 spectrophotometer(Shimazu Co., UV-120-02)로 510 nm에서 흡광도를 측정하여 이를 적색색소의 양으로 나타내었다. 균체외 색소의 정량은 본 배양액을 원심분리(6,000 rpm, 15분)하여 그 상등액을 얻어 증류수로 희석하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 균체의 색소의 양으로 나타내었다.

균체 중량의 측정

Toyo filter paper(5B)를 105°C dry oven에서 12시간 건조시킨 후 paper의 무게를 측정하고 여기에 배양액 10 ml를 분주하고 vacuum 하에서 filtration한 후, salt 등을 제거하기 위해 증류수로 2회 washing하고 이를 80°C dry oven에서 12시간 건조한 후 paper의 무게와 원래의 paper 무게의 차이를 균체 중량으로 나타내었다.

조색소의 생산

균체 배양액에 동량의 95% ethanol를 첨가하여 rotary shaker에서(30°C, 1시간) 추출하고, 원심분리하여(6,000 rpm, 15분) 균체를 제거하였다. 이때 얻은 상등액을 4°C 에서 하루밤 정치하여 변성된 당류 및 단백질 침전시키고(1), 이를 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 rotary vacuum evaporator로 기화시켜 ethanol을 제거하였다. 여기에 동량의 hexane을 넣어 hexane phase로 lipid를 제거하고, water phase를 취하여 건조시켜(80°C, overnight) 수용성 조색소의 powder를 얻었다. 이러한 색소의 powder로부터 색소의 농도 대 O.D.unit에 대한 표준검량곡선을 구하여 실험에 응용하였다.

결과 및 고찰

홍국색소의 발효특성 및 조절기작

홍국색소 생산을 위한 발효중의 균체중식과 적색 색소 생산의 양상을 살펴보기 위하여 5l jar fermentor에서 배양을 실시하여 Fig.1과 같은 결과를 얻었다. 균체의 최종농도는 약 17.5 g/l였으며, 적색색소의 생산은 최종농도 110.5 O.D.unit가 얻어졌는데 생산된 색소의 대부분은 균체내에 존재하였으며 균체외에는 18.5 O.D.unit로 대략 17%가 존재하였다. 균체의 생육은 48시간 이후부터 정지기(stationary phase)에 도달하였으나 색소의 생산은 그 이후에도 계속되어 80-90시간까지 증가되었다. 이와같이 색소가 생산되는 양상은 growth-associated와 nongrowth-associated의 중간형태인 mixed 형태를 나타내었다.

이차대사산물은 일반적으로 생산된 최종 산물에 의하여 feedback regulation을 받아 생산속도가 감소되어 발효가 종료되는 경우가 많으며, 이러한 경우 제어를 제거해 주면 발효생산 속도가 높게 유지되는 기간이 연장되어 생산성을 높일 수 있다(20). 본 연구에서는 그러한 생성제어가 monascus 색소의 발효

중에도 일어나는지를 확인하기 위하여 배양초기에 미리 제조한 조색소 농축액을 농도별로 각각 첨가하여 색소 생산에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 2). 초기에 색소의 첨가량이 증가할 수록 색소 생산량은 감소하였으며, 이로부터 홍국색소의 발효생산은 최종산물인 색소에 의해 조절됨을 간접적으로 추측할 수 있었다.

Permeabilizing agents를 이용한 extractive fermentation

이미 앞에서 밝혀진 것과 같이 생성되는 색소의 대부분은 균체내에 존재하며, 이러한 경우 생성제어를 받아 높은 생산성을 기대하기 어렵다. 이를 해결하는 방법의 하나로 permeabilizing agent를 발효중에 첨가하여 product를 균체외로 유출시키므로써 생성제어를 줄일 수 있으며, 결과적으로 생성반응을 촉진시켜 높은 생산성을 기대할 수 있을 것이다. 균체내에 축적된 색소를 균체외로의 유리를 유도하는 화합물로는 chelating agent, solvent, detergent, chaotropic agent 등이 있으며(21), 본 연구에서는 이러한 화합물들을 발효중에 첨가하여 생산성을 높이고자 하였다.

이들 화합물들의 색소 유리 효과를 분석하기 위하여 균체중식과 색소생성이 충분히 이루어진 시기인 발효종료 6시간 전에 각각의 발효액에 최종농도가 1.0,

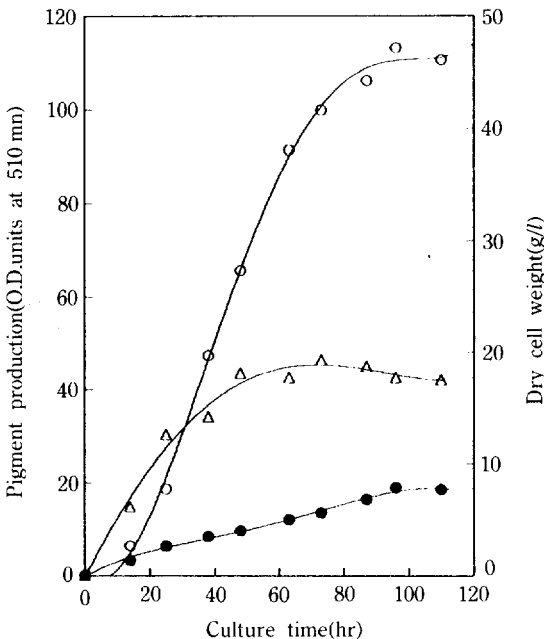


Fig. 1. Patterns of cell growth and pigment production in a fermentation using *Monascus* sp. J101.
*Fermentation was carried out in a 5L jar fermentor.
○: total pigment content, ●: extracellular pigment content, △: dry cell weight

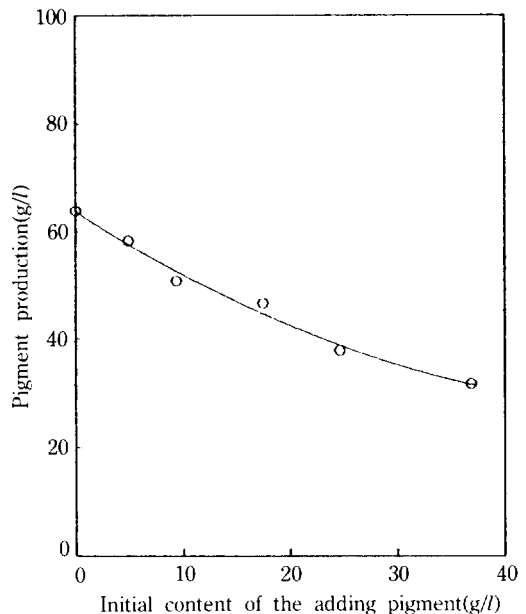


Fig. 2. Pigment production depending on the initial content of the adding pigment.
*Pigment was externally added into the fermentation media at the beginning of cultivation.

Table 1. Effects of permeabilizing agents on pigment production

Permeabilizing agents	Adding conc.(%,v/v)		Pigment production(O.D.units)	
	1.0	2.0	Total	Extra
Ethanol	153.9	29.7	126.6	16.6
Ethyl acetate	71.9	12.2	69.7	8.4
Magnesium sulfate	106.4	30.4	113.9	18.9
Dimethyl sulfoxide	156.3	38.6	130.7	16.9
Tween 80	148.4	41.7	114.1	67.1
Triton X-100	151.0	53.2	122.2	34.7
None	169.8	28.3	150.3	15.2

*Each compound was added at 90 hours after inoculation.

Table 2. Pigment production depending on the concentration of added Tween 80

Tween 80 conc.(%,v/v)	Pigment production(O.D.units)	
	Total	Extra
0.0	152.4	27.3
0.5	157.3	37.9
1.0	153.0	40.3
2.0	170.1	34.5
5.0	162.0	44.1

*Tween 80 was added at 48 hours after inoculation.

2.0%가 되게 permeabilizing agents를 첨가하여 생산되는 총 색소량과 균체의 색소량을 측정하여 색소 생산성을 높일 수 있는 화합물들을 우선적으로 선별하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 detergent인 Tween 80, Triton X-100를 첨가한 경우 총 색소 생산량은 첨가되지 않은 control에 비하여 약간 감소하였으나 균체의 색소량은 최고 100% 이상으로 상당히 증가하였으며, 첨가시기 및 첨가농도를 조절하면 색소 생성량을 증가시킬 수 있을 것으로 기대되었다.

균체중식은 약 48시간 이후부터 정지기(stationary phase)에 도달하므로 Tween 80 및 Triton X-100을 배양 48시간에 농도별로 첨가하여 생성되는 색소량을 측정하였다(Table 2 and 3). Table 2에서 보는 바와 같이 Tween 80을 첨가한 경우 2.0%에서 색소생산이 최대를 보였고 총 색소량은 control에 비해 12%가 증가되었으며, Triton X-100의 경우 0.05%가 첨가되었을 때 control에 비하여 총 색소 생성량이 약 18% 증가하였다(Table 3).

한편, 0.05% Triton X-100의 첨가시기를 변화시켜

Table 3. Pigment production depending on the concentration of added Triton X-100

Triton X-100 conc. (%,v/v)	Pigment production(O.D.units)	
	Total	Extra
0.00	152.4	27.3
0.05	180.5	--
0.10	160.3	--
0.25	149.0	--
0.50	140.6	42.1
1.00	112.1	90.4
2.00	103.1	101.5
5.00	94.2	102.0

*Triton X-100 was added at 48 hours after inoculation.

Table 4. Effect of various permeabilizing agents on pigment production

Compounds	Pigment production(O.D.units)			
	Adding conc.(%,v/v)			
	0.0	0.05	0.10	0.25
Toluene	166.6	164.3	156.0	99.5
Ethyl acetate	149.3	138.1	152.3	168.2
Benzene	149.3	137.1	133.3	151.6
Dimethyl sulfoxide	149.3	143.1	149.9	161.1
Ether	168.9	152.7	160.6	144.7
SDS ^a	168.9	--	100.5	97.8
Deoxycholate	168.9	194.5	168.4	138.5
Tween 80	149.3	139.4	143.1	154.8
EDTA ^b	68.9	132.1	141.6	81.9
Urea	168.9	--	131.2	101.3
TCA ^c	168.9	174.7	168.1	112.7
Perchlorate	149.3	--	--	50.6
Sodium thiosulfate	168.9	164.5	169.5	161.3
Ethanol	149.3	142.1	157.5	167.3
Propylene glycol	149.3	133.9	147.8	168.4

*Each compound was added at 48 hours after inoculation.

^aSodium dodecyl sulfate

^bEthylenediaminetetraacetic acid

^cTrichloroacetic acid

생성되는 색소량을 측정한 결과, 배양시작 48시간에 첨가했을 때 가장 높은 색소의 생성량을 보였으며, 이후의 실험에서는 여러가지 화합물들을 48시간 경과 후 첨가하여 결과를 분석하였다.

또한, Triton X-100 이외에 다른 화합물들의 농도를 0.5% 이하로 하여 48시간에 첨가한 결과, ethyl acetate를 0.25% 첨가했을 때 색소생성량이 control에 비해 약 12% 증가하였으며, deoxycholate 0.05%인

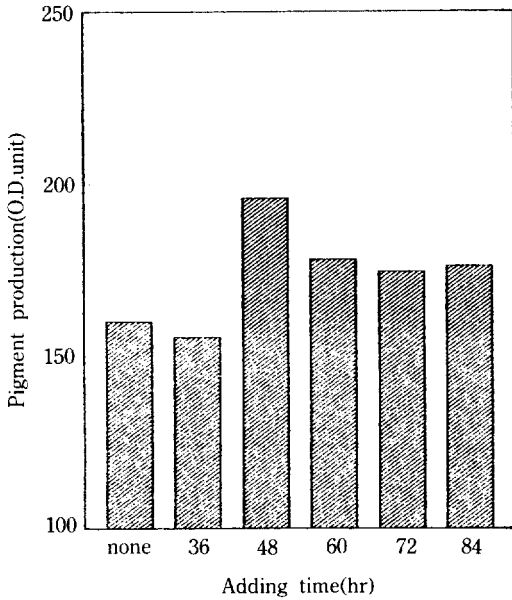


Fig. 3. Pigment production depending on the adding time of Amberlite XAD-7.
*Amberlite XAD-7 was added with the concentration of 8.0%.

경우 약 15% 증가하였다(Table 4). 이상의 결과로부터, 발효중 생성되는 색소는 단순히 균체를 permeabilization 시키는 것만으로는 균체외부로 쉽게 유리되지 않음을 알 수 있었고, 이러한 현상은 배양중에 색소가 균체의 특정한 부위와 결합하고 있기 때문인 것으로 추측되었다(17).

Resin을 이용한 extractive fermentation

색소 생산성을 증진시키는 방법으로 resin을 발효액 중에 첨가하여 균체외로 유출되는 색소를 흡착시켜 배양액 중의 색소농도를 낮게 유지시키므로써 product regulation을 줄이는 방법을 생각할 수 있다. 본 연구에서는 색소를 효과적으로 흡착하는 nonionic resin인 Amberlite XAD-7을 우선적으로 선별하였으며 이 물질을 발효중에 첨가하여 생성되는 색소량을 비교하였다.

우선적으로 최적 첨가시기를 결정하기 위하여 Amberlite XAD-7의 첨가농도를 8.0%로 고정하고 첨가 시간을 달리하여 생성되는 색소량을 측정된 결과, Fig. 3에서 나타난 바와 같이 48시간에 첨가한 경우가 첨가하지 않은 control에 비해 약 22.4%의 증가를 보였으며, 첨가시간을 48시간으로 고정하고 첨가되는 resin의 양을 달리하여 색소생성량을 측정된 결과 전체적으로 색소의 생성량이 증가하였으며, 특히 re-

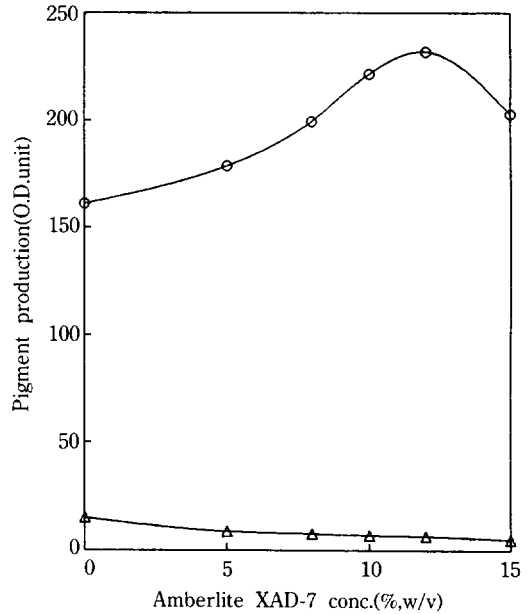


Fig. 4. Pigment production depending on Amberlite XAD-7 concentration.

*Amberlite XAD-7 was added at 48 hours after inoculation.
○: total pigment content, △: extracellular content

sin의 첨가량이 12.0%일 때 control에 비해 약 48.9%의 증가를 보였다(Fig. 4).

색소생산의 동력학적 분석

홍국색소의 발효중 일어나는 균체의 증식, 색소의 생산, 생성제어, 및 resin의 첨가효과 등을 나타내는 모델식을 설정하여 동력학적으로 분석하였다. 균체증식에 대한 모델식으로는 logistic 모델식을 이용하여 1식과 같이 나타내었고(22), 색소생산에 대한 식은 생성제어를 고려하여 2식과 같이 표시하였다(22, 23).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \tag{1}$$

$$\frac{dP_i}{dt} = v X \left(1 - \frac{P_i}{P_m} \right) \tag{2}$$

한편, resin이 첨가된 경우는 48시간 이후 resin이 첨가되므로 이 시기부터 resin에 색소가 흡착되는 속도를 3식과 같이 표현하고, 총 색소생산에 대한 model식은 2식의 control에 대한 식과 3식의 resin에 대한 식을 parameter를 달리하여 결합한 4식을 이용하였다.

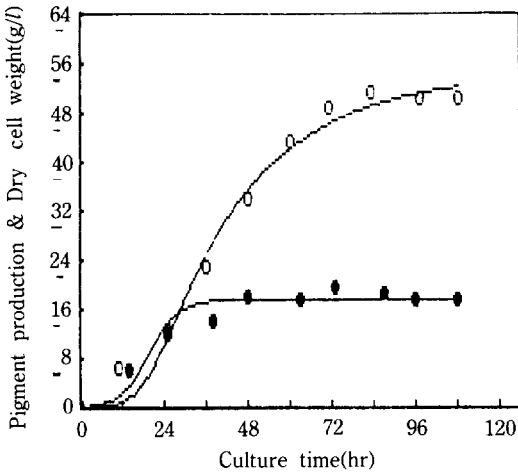


Fig. 5. Cell growth & pigment production depending on culture time.

*Fermentation was carried out in a 500 ml baffled flask.
○: total pigment content, ●: dry cell weight

$$\frac{dP_r}{dt} = k_r \left(1 - \frac{P_r}{P_{r_m}} \right) \quad (3)$$

$$\frac{dP_t}{dt} = v_2 X \left(1 - \frac{P_t - P_r}{P_{bf}} \right) + k_r \left(1 - \frac{P_r}{P_{r_m}} \right) \quad (4)$$

여기서 X와 P_t 는 각각 균체와 총색소농도(g/l)를 나타내며 P_r 은 resin이 첨가된 경우에 resin에 흡착된 색소의 농도(g/l)를 나타낸다. 또한 μ 는 균체의 비증식속도(h^{-1}), v_1 은 control의 경우의 색소의 비생산성(h^{-1}), X_m 과 P_{r_m} 은 각각 균체의 최대농도 및 control의 최대농도(g/l)를 나타내고 k_r , v_2 는 각각 resin에 대한 색소의 비흡착속도($g/l \cdot h$) 및 resin 첨가시의 색소의 비생산성(h^{-1})을 나타낸다. 또한 $P_t - P_r$ 와 P_{bf} 및 P_{r_m} 은 각각 resin이 첨가된 경우에 broth에 존재하는 색소의 농도와 최종농도 및 resin에 흡착된 색소의 최대농도를 나타낸다.

시간에 따른 균체 및 색소의 농도(X, P, P_r , P_t)를 각각 측정하고(Fig.5 and 6) Marquardt nonlinear regression 방법을 이용하여 모델식에 적용한 결과 parameter들을 각각 구하여 Table 5에 나타내었다. Fig. 5와 Fig. 6에서 marker는 실제 실험치를 나타내는 것이며 실선은 regression되어 계산된 결과이다.

실험치와 모델식이 잘 일치하는 결과로부터, 발효중 생성된 균체내 색소에 의해 product regulation되어 색소의 생성속도가 감소되며, resin을 첨가할 때 색소는 resin에 흡착되어 균체내 색소농도는 감소되어 product regulation이 줄어들며 이로부터 색소의 생

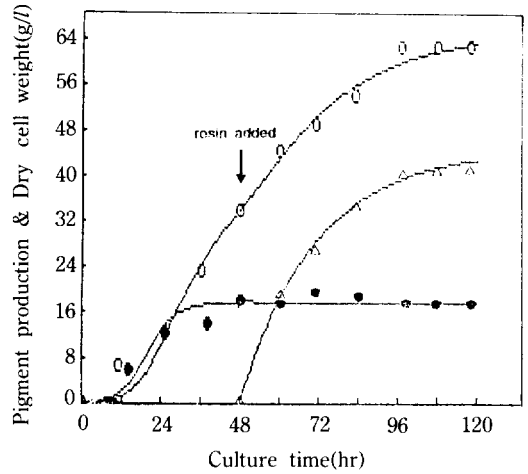


Fig. 6. Cell growth & pigment production in case of the addition of Amberlite XAD-7 depending on culture time.

*Fermentation was carried out in a 500 ml baffled flask.
*Amberlite XAD-7 (12.0%) was added at 48 hours after inoculation, and cell mass and pigment concentration were measured.

○: total pigment content, ●: dry cell weight, △: pigment content adsorbed at Amberlite XAD-7

Table 5. Estimated values of the kinetic parameters

Parameters	Estimated values
μ (h^{-1})	0.2393
v_1 (h^{-1})	0.1174
X_m (g/l)	17.5783
P_{r_m} (g/l)	54.2472
k_r ($g/l \cdot h$)	1.9589
P_{r_m} (g/l)	44.6130
v_2 (h^{-1})	0.1037
P_{bf} (g/l)	20.2717

* μ : specific growth rate
 v_1 : specific productivity in case of control
 v_2 : specific productivity in case of the addition of resin
X : cell mass
 P_t : total pigment concentration
 k_r : adsorption rate of pigment to resin
 P_r : pigment concentration adsorbed on resin
 P_{bf} : pigment concentration in broth in case of the addition of resin

산이 증진되는 것을 재확인할 수 있었다.

요 약

Monascus sp.의 변이주인 색소생성능이 높은 *Mo-*

nascus sp. J101을 이용한 적색색소 생산의 발효특성을 분석하고 extractive fermentation을 시도하여 색소의 생산성을 높이고자 하였으며 Amberlite XAD-7 resin을 첨가한 경우에 대한 동력학적 분석을 수행하였다.

Monascus sp. J101이 생산하는 적색색소는 균체의 색소의 생산량이 총 색소생산량의 약 17%에 해당하였으며, 색소의 생산은 product에 의해 regulation되는 것을 확인하였다. 한편, 균체의 생육은 48시간부터 정지기에 도달하였으나 색소의 생산은 그 이후에도 계속되어 mixed growth-associated의 양상을 보였다.

균체의 배양중에 permeabilizing agents를 첨가하여 extractive fermentation을 수행한 결과, 배양 48시간에 Triton X-100 0.05%를 첨가했을 때 약 18%의 색소생산의 증가를 보였으며, ethyl acetate를 0.25% 첨가한 경우는 약 12%, deoxycholate 0.05%인 경우는 약 15% 증가하였다.

균체의 배양중에 nonionic adsorbent인 Amberlite XAD-7을 첨가하고 extractive fermentation을 행한 결과, 배양 48시간에 Amberlite XAD-7을 12.0% 첨가하였을 때 첨가하지 않은 control에 비해 색소의 생산이 약 48.9%가 증가하였다.

참고문헌

1. 최기봉. 1983. 홍국균이 생산하는 식용색소에 관한 연구. 석사학위논문. 중앙대학교 대학원.
2. 김창식, 이숙희, 김일. 1977. 홍국곰팡이를 이용한 식용적색색소의 제조 및 이의 성상에 관한 연구. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **9**: 277-283.
3. Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* sp. in submerged, shaken culture. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1360-1372.
4. 김정구. 1990. 색소생성 능력이 높은 *Monascus anka* 돌연변이주의 개발 및 색소생성 조건의 최적화. 석사학위논문. 서울대학교 대학원.
5. Hadfield, J.R., J.S.E. Holker, and D.N. Stanway. 1967. The biosynthesis of fungal metabolites. Part II. *J. Chem. Soc. C*. 751-755.
6. Manchand, P.S., W.B. Whelley, and F.C. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin. *Phytochem.* **12**: 2531-2534.
7. Kurono, M., K. Nakanishi, K. Shindo, and M. Tada. 1963. Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo.* **11**: 359-362.
8. Hiroi, T., T. Shima, A. Isobe, and S. Kimura. 1975. Studies on the structure of two pigments obtained from *Monascus* sp.. *J. Jap. Soc. Food & Nutri.* **28**: 497-502.
9. Fowell, A.D.G., A. Robertson, and W.B. Whelley. 1956. Monascorubramine. *J. Chem. Soc. Special Publ.* **5**: 27-32.
10. 谷村顯雄. 1979. 天然着色料 handbook. Pp.445-458. 光琳. 東京.
11. 堀井和男. 1975. モナスカス 黄色素の 製造法. 日本公開特許公報. 昭50-140526.
12. 장옥, 김현수, 손충홍, 배종찬, 유주현. 1980. *Monascus* sp.가 생산하는 황색색소에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **8**: 119-123.
13. Lin, C.F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* **51**: 407-414.
14. Yoshimura, M., S. Yamanaka, K. Mitsugi, and Y. Hirose. 1975. Production of *Monascus*-pigment in a submerged culture. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1789-1795.
15. Bau, Y.S. and H.C. Wang. 1979. Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascus purpureus*. *Physiol. Plant* **46**: 63-67.
16. Wong, H.C., Y.C. Lin, and P.E. Koehler. 1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. *Mycologia* **73**: 649-654.
17. Su, Y.C. 1983. Fermentative production of Anka-pigments. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 325-337.
18. Hiroi, T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka, and O. Nagahiro. 1979. Hyperpigment-productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. *Agr. Biol. Chem.* **43**: 1975-1976.
19. 水谷信一, 田村至, 牛腸忍, 失島泉. 1981. 水溶性 モナスカス色素の 製造 日本公開特許公報. 昭56-65049.
20. 신철수, 한상헌, 이상한. 1983. Effect of mineral salts on the improvements of sisomicin yield. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 247-251.
21. Naglak, T.J., D.J. Hetter, and H.Y. Wang. 1990. *Separation Process in Biotechnology*. Pp.177-205. Marcel Dekker, New York.
22. Mcneil, B. and L.M. Harvey. 1990. *Fermentation Practical Approach*. Pp.65-112. IRL Press, England.
23. Moser, A. 1988. *Bioprocess Technology-kinetics and Reactors*. Pp.138-192. Springer-Verlag, New York.

(Received November 19, 1993)