

Monascus 균사체의 소규모 배양을 통한 고생산성 균주의 대규모 선별방법 확립과 통계적 생산배지 최적화를 통한 Monacolin-K 생산성 향상

이 미 진 · ^{1,2}정 용 섭 · 김 평 현 · † ²전 계 택
강원대학교 BT특성화학부대학 분자생명과학과, 강원대학교 생명공학연구소
¹전북대학교 응용생물공학부, ²바이오식품 소재개발 및 산업화연구센터
(접수 : 2007. 10. 11., 게재승인 : 2007. 10. 23.)

Establishment of Miniaturized Cultivation Method for Large and Rapid Screening of High-yielding *Monascus* Mutants, and Enhanced Production of Monacolin-K through Statistical Optimization of Production Medium

Mi-Jin Lee, Yong-Seob Jeong¹, Pyeung-Hyeun Kim, and Gie-Taek Chunt†
School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Korea
¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Korea
²Research Center for industrial Development of Biofood Materials
(Received : 2007. 10. 11., Accepted : 2007. 10. 23.)

It is crucial to develop a miniaturized cultivation method for large and rapid screening of high-yielding mutants of monacolin-K, a powerful anti-hypercholesterolemic secondary metabolite biosynthesized by the fungal cells of *Monascus ruber*. In order to investigate as many strains as possible in a short time, a miniaturized fermentation method especially suitable for the cultivation of the filamentous *Monascus* mutants was developed using 50 mL culture-tube (7 mL of working volume) instead of the traditional 250 mL flask (50 mL of working volume). Generally, in filamentous fungal cell fermentations, morphologies in growth and production cultures should be maintained as thick filamentous and compact-pelleted (usually less than 1 mm in diameter) forms, respectively, for enhanced production of secondary metabolites in final production cultures. In this study, we intended to induce the respective optimal morphologies in the miniaturized culture system for the purpose of rapid screening of overproducers. Miniaturized growth culture system was successfully developed due to the mass production of spores in the statistically optimized solid medium. When large amounts of spores were inoculated into the growth cultures, and brown rice flour (20 g/L) was also supplemented to the growth medium, dense filamentous morphologies were successfully induced in the growth cultures performed with the 50 mL culture tubes. It was implied that the amounts of spores inoculated into the growth tube-cultures and the growth medium components should be the key factors for the induction of the filamentous forms in the growth fermentations. Furthermore, in order to statistically optimize production medium, multiple experiments based on Plackett-Burman design and response surface method (RSM) were carried out, resulting in more than 2 fold enhanced production of monacolin-K in the final production cultures with the optimized production medium. Notably, under the production culture conditions with the statistically optimized medium, optimal pellet sizes below 1 mm in diameter were reproducibly induced, in contrast to the thick and viscous filamentous morphologies observed in the previous production cultures.

Key Words : *Monascus ruber*, monacolin-K, miniaturized cultures, medium optimization, Plackett-Burman design, response surface method

서 론

Monacolin-K는 균사형성 곰팡이인 *Monascus* sp.로부터

polyketide pathway를 통해 생합성되는 2차 대사산물로 분자식은 $C_{24}H_{36}O_5$ 이고 분자량은 404.55이다(1). compactin의 메틸화된 형태인 Monacolin-K는 콜레스테롤 생합성과정의 속도제한 단계를 조절하는 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase의 작용을 저해한다(2). 콜레스테롤 생합성 과정의 결정적인 단계는 HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA로부터 mevalonic acid를 형성하는 반응인데 Monacolin-K는 HMG-CoA와 구조적으로 유사하

† Corresponding Author : School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Korea
Tel : +82-33-250-8547, Fax : +82-33-241-4627
E-mail : gtchun@kangwon.ac.kr

여 HMG-CoA의 경쟁적 저해제 역할을 하여 콜레스테롤 합성을 감소시킨다(3).

일반적으로 고생산 균주 개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주의 생산능력을 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는데 있다. 이러한 mass screening을 위해서는 많은 시간과 배양 공간, 그리고 배지가 소모되므로 소규모 배양방법의 확립이 필수적이라 할 수 있다.

이차 대사산물의 대량 생산을 위해서는 온도, 배지 성분, 배지 농도 등이 매우 중요한 배양요인으로 작용한다. 또한 균사 형성 곰팡이의 경우 액상배양 시에는 그 독특한 3 차원적인 균사체 구조로 인해 배양액의 점도가 증가함으로써 배양액내에서의 물질전달, 특히 산소전달 능력이 급속히 감소하는 특성을 갖게 되어(4, 5) 이차대사산물의 낮은 생산성을 초래하나, 여러 배양조건이 매우 양호한 경우 균주의 morphology가 1 mm 이하의 작은 pellet을 형성하게 되며, 그 결과 이차대사산물의 생산성 증가에 매우 긍정적인 효과를 주는 결과가 발표된 바 있다(6).

생산균주가 목적산물을 최대한 많은 양으로 생산하기 위한 배양조건의 최적화는 여러 가지 배양 요소와 각 요소간의 조합을 고려할 필요가 있으므로 실험에서 많은 제약이 따른다. 따라서 통계적 프로그램을 이용하여 우선 여러 요소들 가운데 생산성 향상에 영향을 미치는 중요한 요소들을 선별한 후 다양한 방법을 이용하여 최적화해야 한다(7). Plackett-Burman design은 각각의 변수를 두 수준으로 설정하여 그 사이의 상관관계를 통계학적 분석 방법을 통해 확인할 수 있는 방법이다(8). 일반적으로 변수의 교호작용이 없거나 거의 무시할 정도로 작을 경우, 또는 설정 2차 이상의 교호작용이 유의성을 보였다고 해도 그 실용성이 없기 때문에 많은 비용, 노력, 시간을 투자해서 모든 처리조합을 실험한다는 것은 비현실적이다. 특히 연구의 초기단계에서 많은 변수를 실험해서 중요한 인자를 추려내는 선별실험 (screening experiments)에서는 주 효과와 1차 교호작용에 대한 정보를 얻는 것이 중요하므로 실험의 규모를 줄이면서 많은 변수에 대한 정보를 얻을 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이 방법이 Plackett-Burman design으로 통계적 조합을 통해 적은 수의 실험을 수행함으로써 시간과 경비를 상당히 절약할 수 있으나 변수들 간의 상호작용에 대한 정보를 얻을 수 없으며, 단지 중요한 변수만을 선별하는데 중점을 두고 있다. 따라서 1차적으로 여러 변수들 중에서 효과가 탁월한 3~4개의 변수를 선택한 후 이들 중요변수들의 상호작용 여부를 조사하기 위하여 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)을 수행한다. 반응표면분석법은 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호작용에 따른 종속변수의 변화에 대하여 최대 반응치를 나타내는 최적 조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석 방법이다(9).

본 연구에서는 생산균주의 Monacolin-K 생산성을 향상시키기 위하여 균주의 mass screening이 가능하도록 하는 소규모 배양방법을 개발함으로써 대량의 균주 screening을 통해 고생산 균주를 선별하고자 하였고 선별된 균주를 이용하여 통계적 프로그램을 통해 생산배지 조성을 최적화 하

고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 Monacolin-K 생산균주로서 자낭균에 속하는 *Monascus ruber*의 돌연변이주를 모균주로 사용하였다. 포자형성배지인 PDA (potato dextrose agar) plate에 균주를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후 20% glycerol이 포함된 증류수로 spore를 수거하여 여과한 후 잔여물을 제거한 포자들로 liquid stock을 만들고 -80°C deep freezer에 보관하였다.

성장배양은 7일간 PDA에서 배양한 spore들을 20% glycerol이 포함된 증류수로 수거하여 성장배지 (glucose 30 g/l, (NH₄)₂SO₄ 10 g/l, KH₂PO₄ 0.75 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaCl₂ 0.1 g/l, trace element solution 1 ml/l) 50 ml에 접종하였으며 이를 진탕배양기에서 28°C, 120 rpm으로 5일간 배양하였다. 생산배양은 성장배지에서 자란 mycelium을 생산배지 (glycerol 60 g/l, lactose 20 g/l, yeast extract 16 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l) 30 ml에 10% (v/v)으로 접종하여 28°C, 230 rpm에서 10일간 배양하였다. 성장배양은 250 ml baffled flask를 이용하였고, 생산배양은 250 ml 일반 플라스크를 이용하였다.

통계적 배지최적화

통계적 최적화 실험은 DESIGN EXPERT 6.0 software에 따라 계획되었고 Plackett-Burman design과 반응표면분석법을 위한 각 성분과 농도는 Table 1과 같다.

Monacolin-K 추출 및 정량분석

M. ruber 배양액을 homogenizer로 균일화시킨 후 sample로 취한 10 ml에 동량의 acetone을 첨가하여 완전히 혼합한 후 12시간 동안 200 rpm, 28°C의 진탕 배양기에서 배양한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 monacolin-K를 포함하고 있는 1 ml의 상등액을 취했다. HPLC 분석을 위한 전처리 과정으로 이 상등액을 15,000 rpm에서 10분간 다시 원심분리한 후 얻은 상등액을 0.2 μm의 microfilter를 통과시켜 sample을 만들고 이를 이용하여 monacolin-K의 농도를 정량 분석하였다. Monacolin-K lactone form의 표준용액은 순수한 mevinolin을 농도별로 methanol에 용해시켜 사용하였고, acidic form인 mevinolinic acid 표준용액은 6 ml의 methanol에 4.5 mg의 lactone form mevinolin을 녹이고 0.1 M NaOH 15 ml을 가한 뒤 20분 동안 sonication하고 1시간동안 50°C에서 가열한 후 0.1 M HCl을 더하여 pH를 7.7로 조정하면서 methanol로 최종 volume이 30 ml이 되도록 하여 0.2 μm의 microfilter로 여과하여 얻었다(10). HPLC 운전조건은 다음과 같다: column은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μm) (Kanto chemical co. INC.)을 사용하였고, mobile phase는 methanol과 ortho-phosphoric acid를 77.5 대 22.5 비율로 혼합하여 사용하였으며 유속은 1.2 ml/min로 하였다. Column 온도는 40°C로 고정하였고, UV absorbance detector (Younglin

Co., Korea)를 이용하여 238 nm에서 시료 내의 monacolin-K를 검출하였다.

Table 1. Levels of ingredients used in Plackett-Burman design for (a) sporulation medium, (b) production medium, and (c) RSM for production medium

Ingredients	concentration (g/l)	
	+1	-1
glucose	10	0
glycerol	10	0
sucrose	10	0
peptone	10	0
yeast extract	5	0
PD broth	5	0
maltose	5	0
KH ₂ PO ₄	2	0
CaCl ₂	2	0
MgCl ₂	2	0
trace solution	1 ml	0

(a)

Ingredients	concentration	
	-1	+1
glycerol	30	60
glucose	10	20
lactose	10	20
dextrin	5	10
malt extract	5	10
brown rice	7	13
ammonium sulfate	5	10
yeast extract	5	16
KH ₂ PO ₄	3	6
sodium acetate	2	4
γ-butyrolactone	0.1 ml	1 ml

(b)

Ingredient	concentration (g/l)				
	-2	-1	0	1	2
glycerol	60	70	80	90	100
malt extract	9	11	13	15	17
yeast extract	7	9	11	13	15
brown rice	10	13	16	19	22

(c)

결과 및 고찰

Miniature 배양방법의 확립

고생산 균주를 선별하기 위해서는 가능한 한 많은 균주의 생산성을 테스트하여 그 가운데서 생산성이 높은 균주를 선별하는 mass screening이 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서 이용한 *Monascus*의 경우 포자나 균사체의 형성이 활발하지 않은 배양 생리적 특성으로 인하여 포자와 균사체를 충분히 확보하고자 plate에서 포자형성을 하였고 성장 배양 또한 플라스크에서 수행함으로써 배지의 양과 실험수행의 공간적인 문제 그리고 많은 실험 기자재의 확보가 선행되어야 하므로 균주의 mass screening은 사실상 불가능한 상태였다. 따라서 균주의 mass screening을 위해서는 소규모 배양방법의 확립이 필수적이라 할 수 있는데 이를 위하여 배양 초기단계인 포자형성 단계와 성장배양 단계의 조건을

다양하게 변화시켜 최적 조건을 탐색하였다.

Table 2. Plackett-Burman design of 11 variables with coded values along with observed results for spore production in petri dish

Ingredient	concentration (g/l)		Combination											
	-1	+1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
glucose	0	10	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
glycerol	0	10	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
sucrose	0	10	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
peptone	0	5	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
yeast extract	0	5	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
PD broth	0	5	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
maltose	0	5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
KH ₂ PO ₄	0	2	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
CaCl ₂	0	2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
MgCl ₂	0	2	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
trace solution	0 ml	1 ml	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
The number of spores (10 ⁷)/plate			41.7	365	9.85	819	103	2360	629	720	1540	1740	524	1280

Table 3. Main effects and P values according to trial of Plackett-Burman design

Term	Effect	Sum of Square	% Contribution
Glucose	-328.258	323261	5.3359
Glycerol	196.642	116004	1.91482
Sucrose	892.408	2.38918×10 ⁶	39.4369
Peptone	435.742	569612	9.4023
YE	422.075	534442	8.82176
PD broth	106.308	33904.4	0.559642
Maltose	-316.025	299615	4.9456
KH ₂ PO ₄	-579.025	1.00581×10 ⁶	16.6024
CaCl ₂	215.075	138772	2.29064
MgCl ₂	414.975	516613	8.52746
Trace solution	208.975	131012	2.16254

Response: # of spores
ANOVA for Selected Factorial Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	6.058E+006	11		5.507E+005	
Cor Total	6.058E+006	11			

성공적인 2차대사 산물의 생산을 위해서는 성장배양 단계에서 많은 균사체를 형성하여 filamentous 배양형태를 확립하는 것이 가장 중요하다. 이를 위해서는 성장배양 전 단계인 포자형성 단계로부터 충분히 많은 포자를 형성하여야 하는데 기존의 포자형성배지인 PDA는 충분한 양의 포자를 형성하지 못하여 slant에서의 배양이 불가능하였다. 따라서 통계적 프로그램인 Plackett-Burman design을 이용하여 포자형성 배지의 조성을 최적화하고자 하였다. 문헌조사를 통해 쌀에서 생산균주를 배양할 경우 다량의 포자를 획득할 수 있다는 결과를 토대로(11) 기본 배지 성분으로 rice powder와 agar powder를 이용하고 Plackett-Burman design에 따라 11가지 성분을 high value (+1)와 low value (-1)의 12가지 조합으로 혼합하여 첨가한 후 petri-dish에 부어 건조시키고 생산균주의 포자를 약 1 × 10⁶ spores로 접종하여 배양한 결과 각 조합에서 Table 2와 같은 결과를 확인하였다. 이를 통계프로그램을 이용해 분석한 결과 각 성분들이 생산균주의 포자형성에 미치는 영향을 나타내는 main effect와 실험의 유의성을 확인하는 P값은 Table 3과 같다. 실험 결과 대부분의 조합에서는 실험 균주가 본래 가지고 있는 포자형성 능력보다 낮거나 비슷하게 나타났지만, 6번 조합의 경우 주목할 만하게도 기존 배지에서보

다 약 200배 가량 많은 수의 포자를 형성하는 것으로 나타났다. ANOVA 분석결과 P 값이 0.05 이하로 유의성을 갖는 성분은 없었지만, 가장 포자형성이 잘 되는 6번 조합에서 main effect가 높은 성분들을 선택하여 새로운 포자형성 배지를 조성하였고, 이를 PB1 배지라고 명명하였다. 본 실험의 재현성을 확인하기 위하여 기존의 포자형성 배지인 PDA와 새로운 포자형성배지인 PB1 배지에서 생산균주의 포자형성과 성장배양 형태, 생산성에 미치는 영향을 확인한 결과 포자형성이 100배 이상 증가한 것을 관찰하였다(Fig. 1). 기존에 baffled flask에서 수행하였던 50 ml flask 성장 배양은 많은 양의 spores를 필요로 하므로 plate에서 spore seed를 배양해야 했기 때문에 배지 성분이나 접종시간의 많은 소모가 있었다. 그러나 miniature 배양방법의 확립을 위한 첫 단계로 sporulation 배지 최적화 실험을 통해 충분히 많은 수의 spores를 확보할 수 있게 되었으므로 sporulation 과정을 agar plate가 아닌 agar slant에서 수행할 수 있게 되었다(Fig. 2).

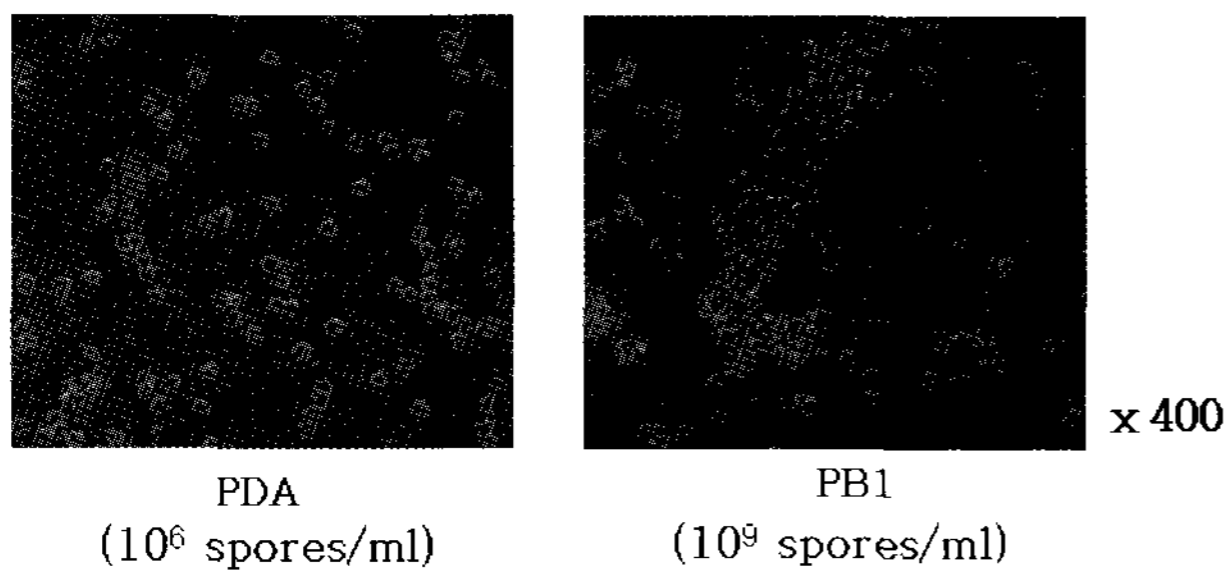


Figure 1. Micrographs for spores of *Monascus ruber* according to sporulation medium.

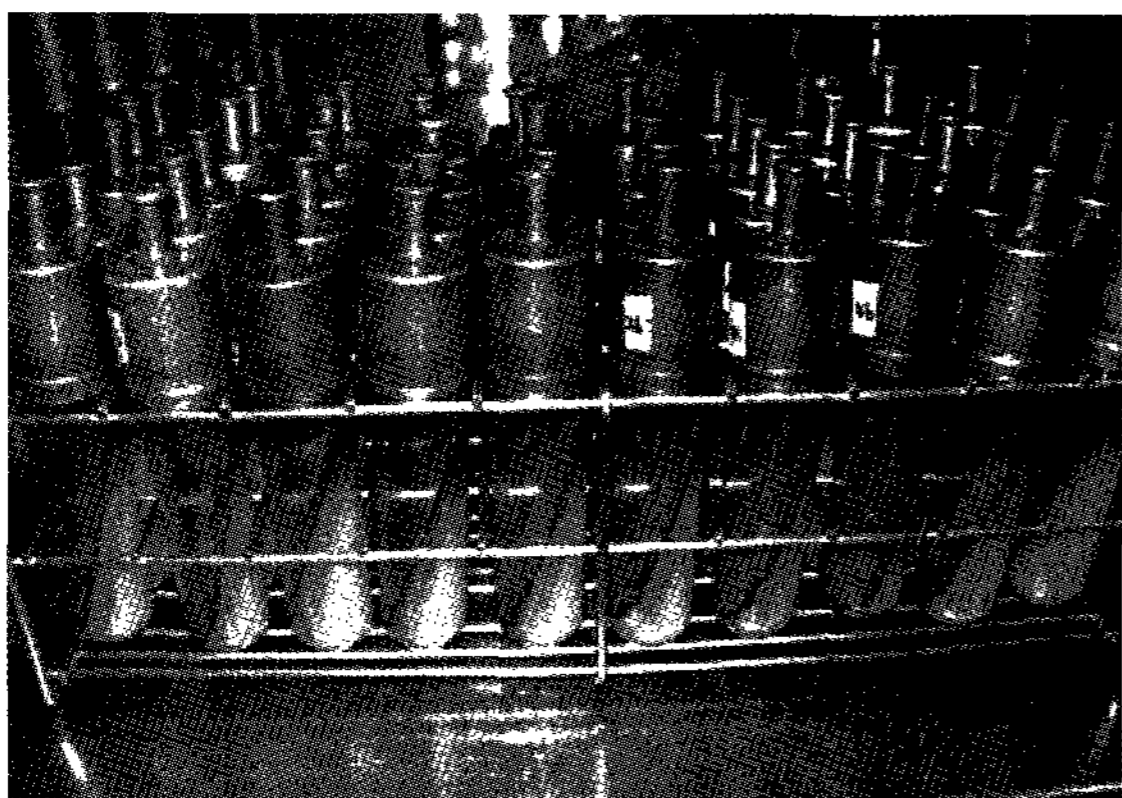


Figure 2. Photograph of agar slants for sporulation.

Sporulation 과정을 통해 형성된 포자를 성장배지에 접종하여 성장 배양 동안 filamentous 배양형태를 형성해야 다음 단계인 생산배양을 통해 compact한 pellet 배양형태를 이루어 생산 균주가 원활한 2차대사를 수행할 수 있다. 기존의 Cy 성장배지는 baffled flask에서 50 ml 부피로 성장배양을 수행하기 위한 조성으로 이루어져 있으므로 동일한 조성으로 50 ml tube에서 10 ml 부피로 성장배양을 수행할 경우 tube 배양이 flask 배양에 비해 산소 공급이 원활하지 못하기 때문에 filamentous 배양형태를 형성하지 못하고 5 mm 이상의 loose한 pellet 형태로 성장하는 것을 확인 하였

다. 따라서 tube 성장배양의 filamentous 배양형태를 확립하기 위해 곰팡이의 균사형성에 도움을 준다고 알려진 현미 (Brown rice)를 기존의 Cy 성장배지에 농도별로 첨가하고 첨가 농도에 따른 성장 배양형태, 그리고 생산배양에 접종하였을 때 생산 배양형태와 생산성을 확인하였다(Fig. 3). 결과 현미를 20 g/L 이상 첨가했을 때 filamentous 성장 배양형태와 pellet 생산 배양형태를 형성하고 비교적 안정적인 monacolin-K 생산성을 나타냈다. 따라서 소규모 성장배양을 위한 성장 배지로 Cy 배지에 현미를 20 g/L 농도로 첨가하기로 결정하고 이름을 CyB 배지로 명명하였다.

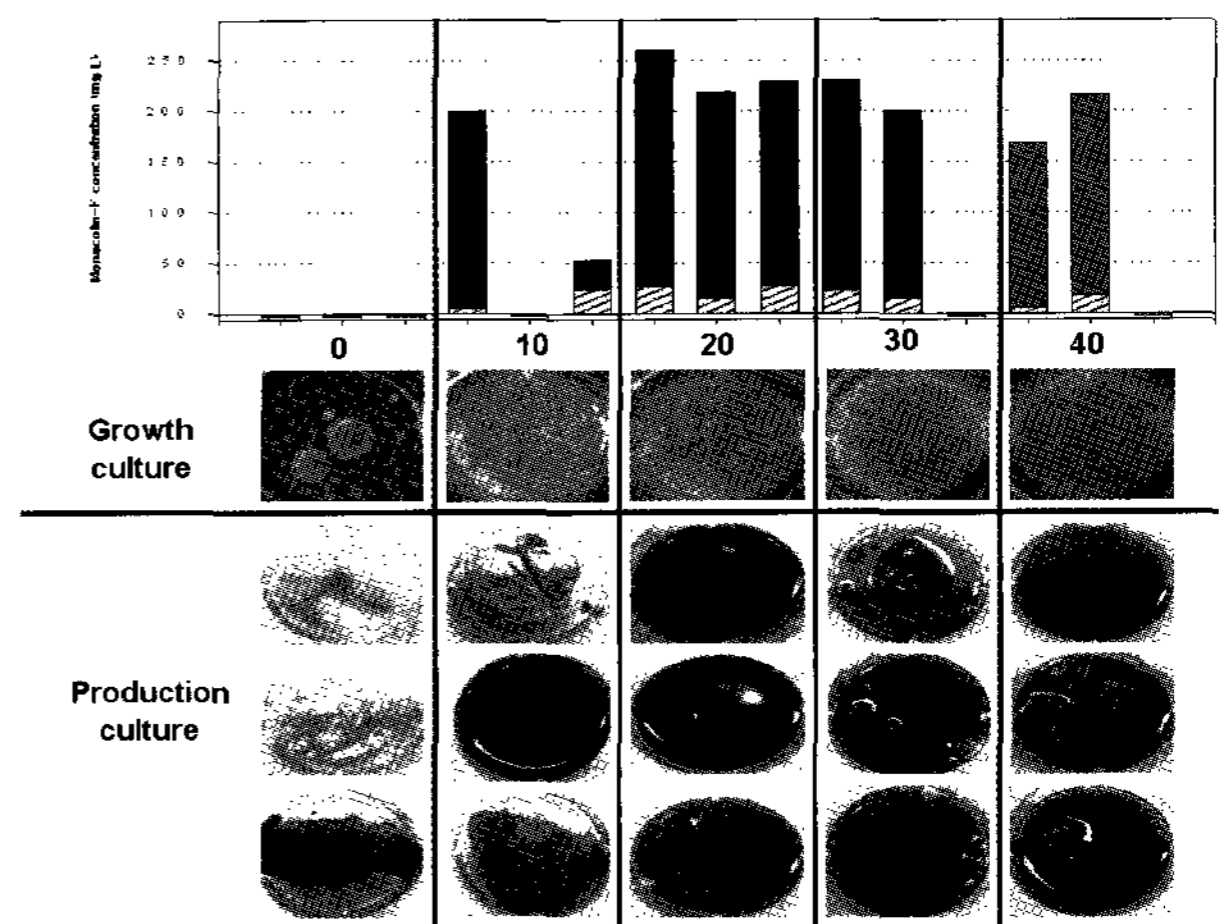


Figure 3. Monacolin-K production and morphologies in growth and production cultures according to addition of brown rice in growth medium.

포자형성 배지 확립과 성장배지에 현미를 첨가함으로써 miniature 성장배양의 가능성을 확인하였으나 균주의 특성이나 포자 접종 량의 미세한 차이에 의해 성장배양 형태나 이에 따른 monacolin-K 생산성이 다소 불안정하여 tube 성장 시 더욱더 안정적인 filamentous 배양형태를 확립하고자 포자형성 단계와 성장배양의 최적조건을 모색하였다.

생산균주의 포자형성은 agar slant에서 이루어지는데 slant의 배지 양이나 기울기에 따라 포자를 형성할 수 있는 배지의 면적이 달라질 수 있다. 또한 같은 면적에서 형성한 포자를 회수하여 성장배양에 같은 양 접종할 경우 성장배지 부피가 적을수록 포자가 농축되므로 더 많은 수의 포자를 접종한 효과를 나타낼 것으로 생각할 수 있었다. 따라서 기존에는 5 ml의 배지를 최대로 기울여 건조한 agar slant를 이용하였는데 포자형성 배지면적을 늘리고자 포자형성 배지의 부피를 7 ml, 10 ml로 증가시키고 성장배지 부피는 기존의 10 ml에서 7 ml, 5 ml로 감소시켜 각 조합에 따른 배양형태와 monacolin-K 생산성을 확인하였다(Fig. 4). 결과 성장 배양에서의 filamentous 배양형태와 생산배양의 compact pellet 배양형태는 모든 조합의 조건에서 유사하게 나타났으며 monacolin-K 생산성은 slant 7 ml, 성장배지 7 ml의 조건에서 비교적 안정적으로 가장 높게 나타났다. 따라서 배양조건을 포자형성은 7 ml agar slant, 성장배양은 7 ml로 결정하였다. 균사형성 곰팡이의 배양 시 원활한 산소공급이 2차 대사산물의 생산을 위한 중요한

배양인자라는 것이 많은 연구를 통해 알려져 있다(4). 50 ml tube 성장배양 시에는 tube 구조상 산소의 공급이 제한적일 수밖에 없으므로 생산균주의 배양이 산소제한 조건에서 이루어져 monacolin-K 생산성이 불안정하였다. 따라서 소규모 성장배양을 유지하되 같은 조건에서 산소공급을 최대한 늘리고자 성장배양 tube를 기울여 진탕배양 할 경우 shaking의 효과가 증대되어 비교적 많은 양의 산소가 배양액 내로 공급될 수 있을 것이라 판단하여 성장 배양 시 tube를 기울여 진탕배양 하였다(Fig. 5). 결과 기존의 배양방법에 비해 비교적 안정적으로 높은 생산성을 보이는 것을 확인하여(Fig. 6) miniature 성장 배양 시 tube를 기울여 shaking하기로 결정하였다.

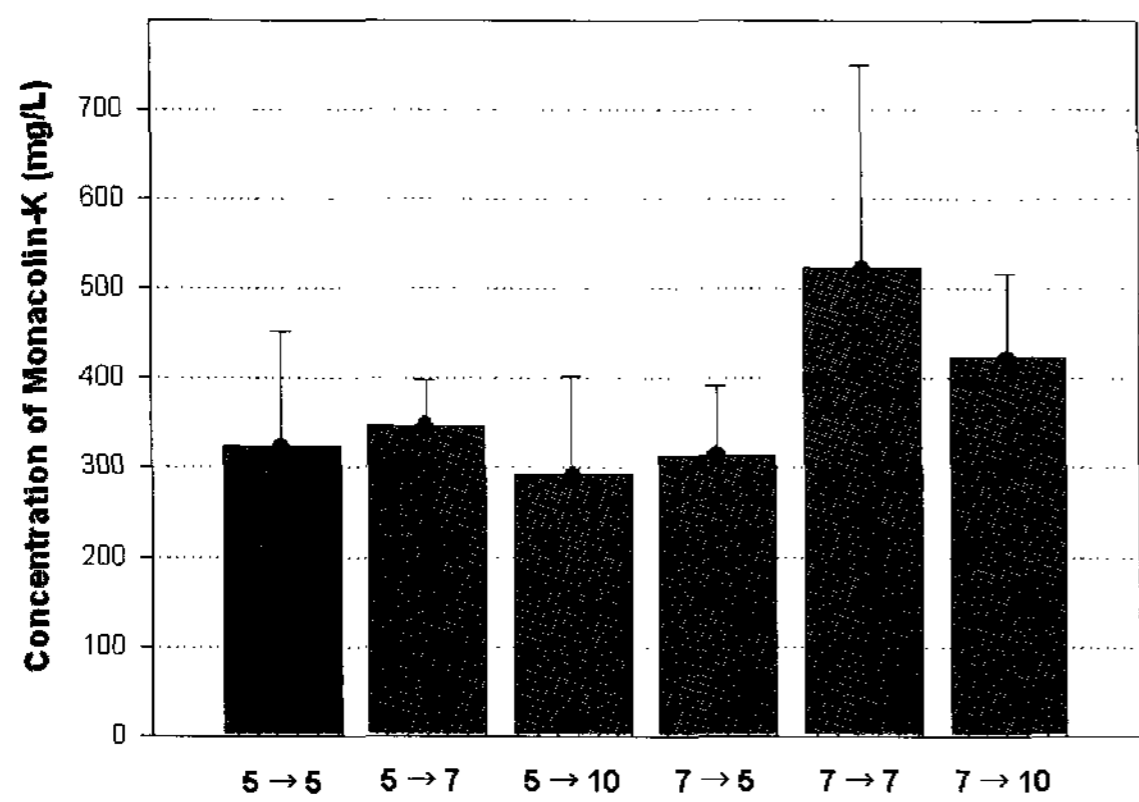


Figure 4. Monacolin-K production according to volume of sporulation and growth medium.

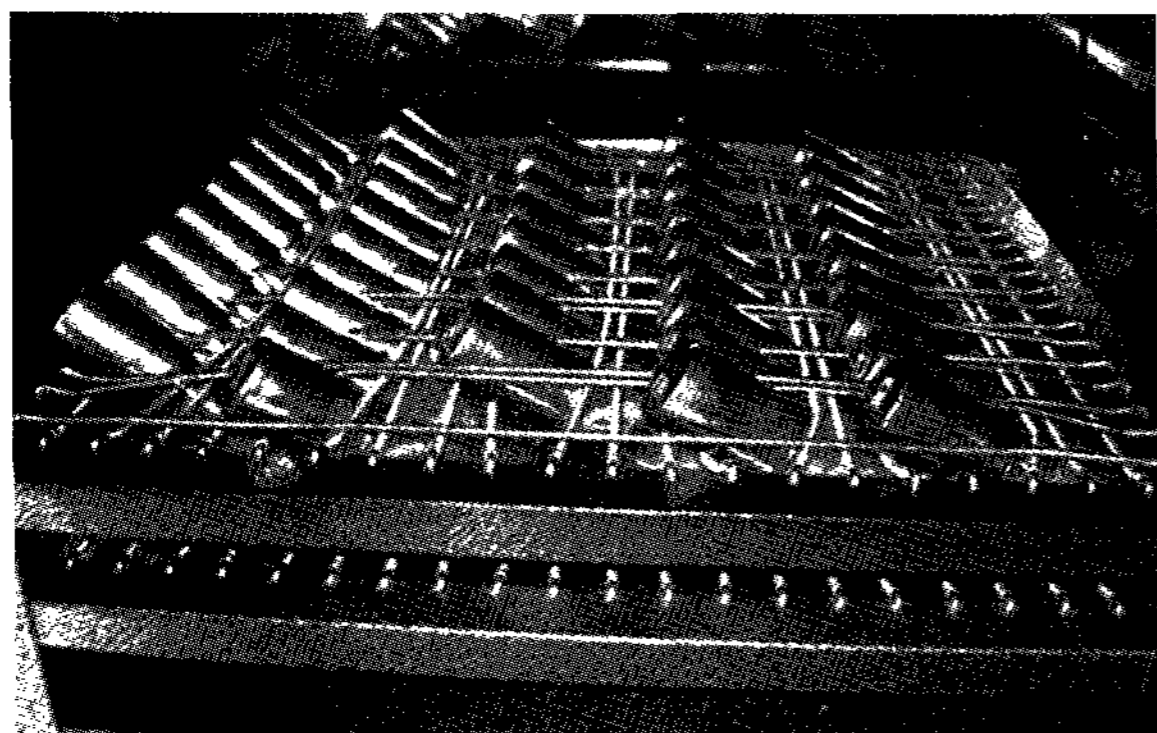


Figure 5. Photograph of tilted growth culture in 50 ml tube.

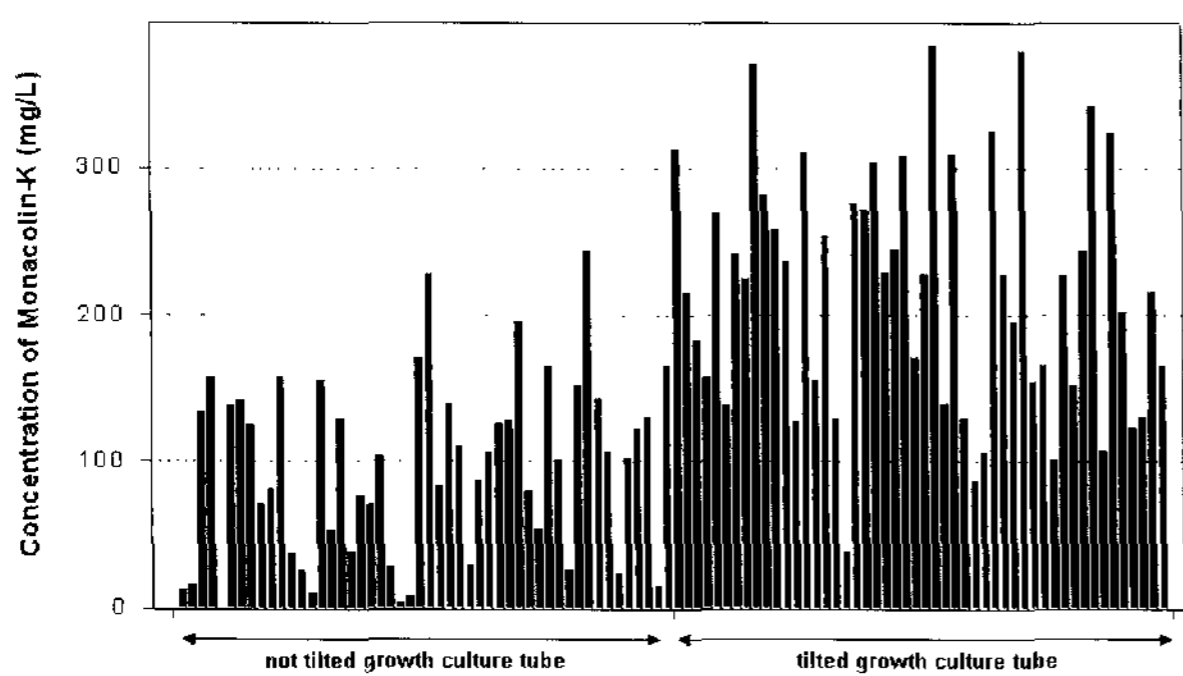
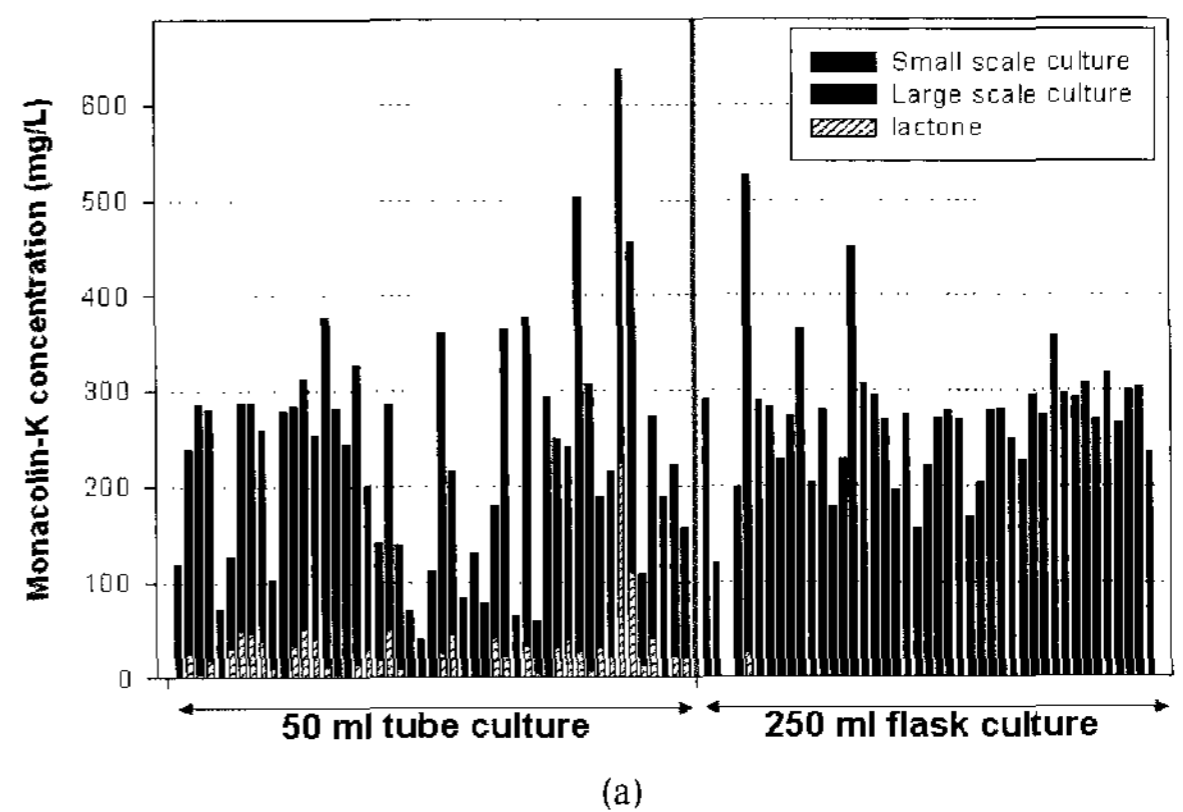
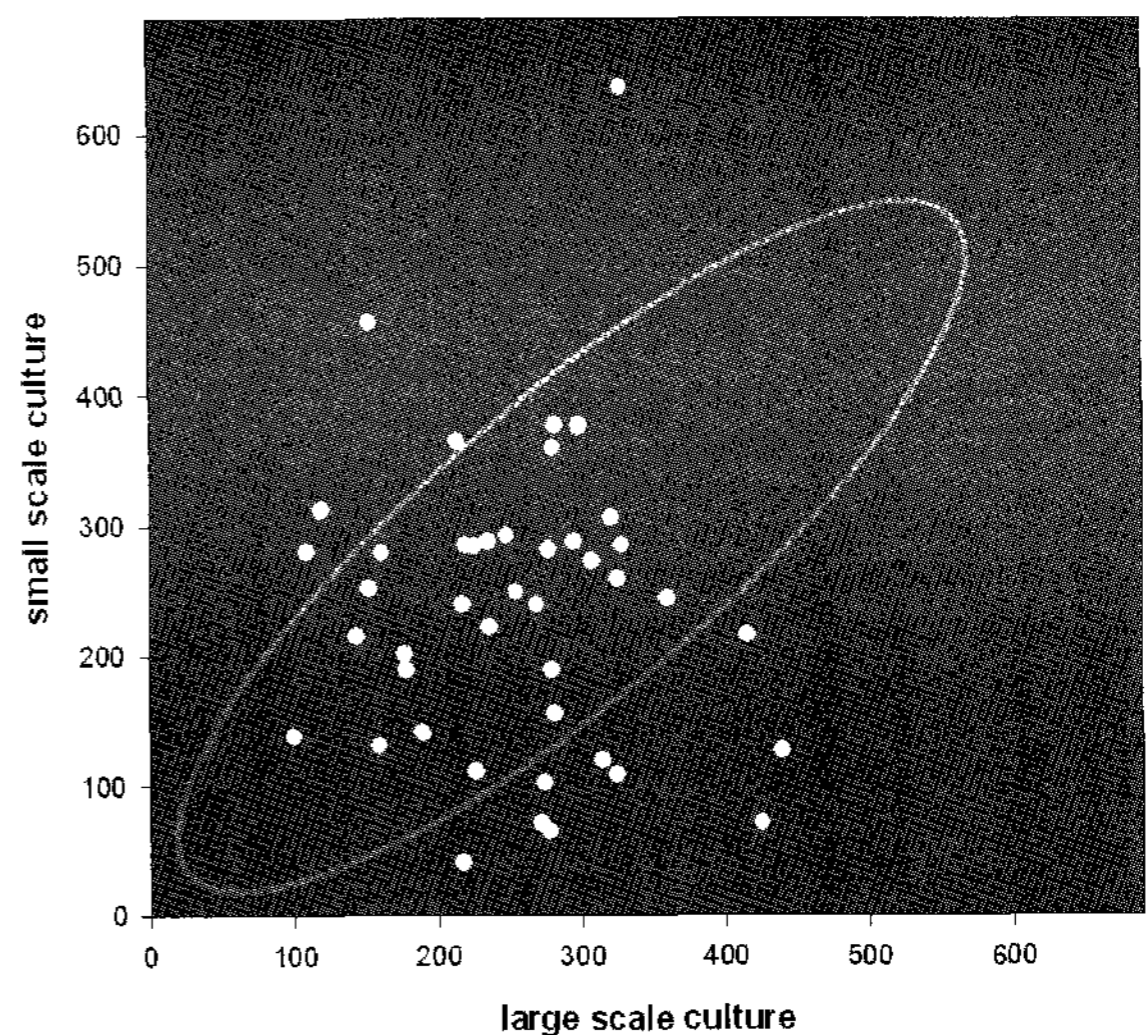


Figure 6. Comparison of Monacolin-K productivity between tilted and not-tilted growth cultures.

위와 같은 실험으로 결정된 성장배양까지의 miniature 배양방법을 모두 적용하여 생산균주의 random screening을 수행하면서 기존방법인 flask 성장배양의 경우와 비교함으로써 성장배양의 miniature 배양방법 적용의 가능성을 확인하고자 하였다. 실험 결과 miniature 배양방법의 경우 여전히 monacolin-K 생산성이 다소 불안정하기는 하지만 같은 조건에서 monacolin-K의 안정적인 형태인 lactone form이 flask 성장배양의 경우보다 많이 생산되는 것을 확인할 수 있었고 같은 균주로 miniature 배양방법과 flask 배양방법을 동시에 수행하였을 때의 monacolin-K 생산성을 비교하였을 때 대부분의 균주가 배양과정에서의 오차범위를 포함하는 최대 생산성의 $\pm 20\%$ 내에 존재하는 것을 확인하였으므로 (Fig. 7) 성장배양 단계까지의 miniature 배양이 가능하다고 볼 수 있었다. 성장배양에 이어 생산배양까지 miniature 배양방법이 확립된다면 진정한 miniature 배양이 완성되는 것이므로 생산배양의 miniature를 위해 다양한 조건에서 실험을 수행해 보았으나 일정한 조건을 확립할 수 없었고 따라서 지속적인 배양조건 탐색이 필요하다.



(a)



(b)

Figure 7. Comparison of monacolin-K production in 50 ml tube cultures and 250 ml flask cultures.

Table 4. (a) Plackett-Burman design of 11 variables with coded values along with observed results for monacolin-K production and (b) Main effects according to trial of Plackett-Burman design

ingredient	Concentration of ingredient		Combination											
	"-1" value	"+1" value	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GLYCEROL	30	60	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
GLUCOSE	10	20	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LACTOSE	10	20	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
DEXTRIN	5	10	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
MALT EX	5	10	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BROWN RICE	7	13	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
AS	5	10	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
YEAST EX	5	16	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
K ₂ HPO ₄	3	6	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
SODIUM ACETATE	2	4	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
γ-BUTYROLACTONE	0.1ml	1ml	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Productivity			46.6	74.7	109.6	6	110	271.8	0	377.7	0	184.7	111.7	227.9

(a)

Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
Intercept			
A	124.991	46868.2	37.1139
B	-53.9265	8724.22	6.90852
C	-4.00411	48.0987	0.0380884
D	-55.5624	9261.54	7.33402
E	10.1129	306.815	0.24296
F	94.413	26741.5	21.176
G	-70.3583	14850.9	11.7601
H	36.5015	3997.07	3.16519
J	-20.2007	1224.2	0.969421
K	23.275	1625.18	1.28695
L	-64.8957	12634.3	10.0049

(b)

통계적 배치최적화를 통한 생산배지 최적화

Miniature 배양방법의 확립을 위해 포자형성 과정과 성장 배양 단계의 조건을 변화시키면서 각 단계의 배지 조성을 변화시킴으로써 그 다음 단계인 생산배지에 접종 시 변화된 배지성분이 생산배지에 전달되므로 생산균주의 monacolin-K 생산성에 영향을 주어 생산성이 감소하는 결과를 관찰하였다. 따라서 miniature 배양을 위한 성장배지 조성의 변화에 따른 새로운 생산배지 조성을 확립할 필요가 있었다.

여러 문헌을 참고로 하여 monacolin-K 생산에 사용되는 배지 성분과 기존 생산배지 성분을 중점적으로 조사하였다. 기존 생산배지 성분인 glycerol, lactose, yeast extract, KH₂PO₄와 monacolin-K 생산성 증가에 효율적이라고 판단되는 brown rice, glucose, dextrin, malt extract, ammonium sulfate, 그리고 monacolin-K의 전구물질로 밝혀진 acetate와 관련된 sodium acetate, 그리고 생산균주의 분화(differentiation)에 관여할 것으로 예상되는 γ-butyrolactone을 조사하였다. 총 11가지 성분을 이용하여 Plackett-Burman design을 수행하였고 이를 통해 monacolin-K 생산에 effect를 보이는 성분을 탐색한 결과 대부분의 조합에서는 monacolin-K 생산성이 실험 균주가 본래 가지고 있는 생산성보다 낮게 나타났지만, 8번 조합의 경우 주목할 만하게도 기존 배지에서보다 생산성이 증가하여 300 mg/L의 monacolin-K가 생산되는 것으로 나타났다. 실험결과를 Design expert program에 적용시켜 각 성분의 main effect와 실험의 유의성을 확인하는 P값을 확인하였다(Table 4). ANOVA 분석결과 P값이 0.05 이하로 유의성을 갖는 성분은 비록 없었지만, 가장 생산성이 높게 나온 8번 조합에서 main effect가 높은 성분들을 선택하여 해당 농도를 중심점

으로 하는 중심합성계획법을 수행하였다.

Table 5. Experimental design and Monacolin-K production for RSM of production medium

#	point type	glycerol	malt extract	yeast extract	brown rice	monacolin-K (mg/L)
1	Fact	-1	-1	-1	-1	399.15
2	Fact	1	-1	-1	-1	443.29
3	Fact	-1	1	-1	-1	424.76
4	Fact	1	1	-1	-1	227.27
5	Fact	-1	-1	1	-1	206.92
6	Fact	1	-1	1	-1	224.43
7	Fact	-1	1	1	-1	328.36
8	Fact	1	1	1	-1	562.72
9	Fact	-1	-1	-1	1	144.34
10	Fact	1	-1	-1	1	241.59
11	Fact	-1	1	-1	1	40.09
12	Fact	1	1	-1	1	160.88
13	Fact	-1	-1	1	1	402.17
14	Fact	1	-1	1	1	456.25
15	Fact	-1	1	1	1	43.71
16	Fact	1	1	1	1	477.23
17	Axial	-2	0	0	0	200.19
18	Axial	2	0	0	0	530.53
19	Axial	0	-2	0	0	121.62
20	Axial	0	2	0	0	384.55
21	Axial	0	0	-2	0	88.10
22	Axial	0	0	2	0	188.02
23	Axial	0	0	0	-2	133.38
24	Axial	0	0	0	2	344.62
25	Center	0	0	0	0	496.54
26	Center	0	0	0	0	699.66
27	Center	0	0	0	0	533.51
28	Center	0	0	0	0	432.82
29	Center	0	0	0	0	540.63
30	Center	0	0	0	0	530.65

Plackett-Burman design을 통해 monacolin-K 생산에 있어 비교적 큰 effect를 보이는 성분으로 확인된 glycerol, malt extract, yeast extract, brown rice의 4가지 성분을 이용하여 monacolin-K의 생산을 위한 각 성분들의 최적농도를 확립하고자 반응표면분석법을 수행하였다. 선정된 4가지 성분을 이용하여 중심합성계획법에 따라 6개의 중점을 포함하는 30가지 농도조합으로 실험을 수행한 결과 각 조합의 생산성은 Table 5와 같다. DESIGN EXPERT 6.0 프로그램을 이용하여 분석한 결과 다음과 같은 반응표면 2차 회귀 모형식을 얻을 수 있었다.

$$\text{Monacolin-K (mg/L)} = 540.64 + 61.64A + 11.36B + 34.18C - 17.84D + 23.64AB + 42.17AC + 37.95AD + 31.1BC - 49.49BD + 60.28CD - 35.47A^2 - 63.54B^2 - 92.3C^2 - 67.06D^2$$

여기서 A, B, C, D 는 각각 glycerol, malt extract, yeast extract, brown rice를 나타낸다.

결과를 3차 반응표면으로 나타내면 Fig. 8과 같고 ANOVA 분석결과는 Table 6에 요약하였다. 분석결과를 바탕으로 Monacolin-K 생산을 위한 최적 배지조성은 glycerol 90 g/l, malt extract 13.6 g/l, yeast extract 12.12 g/l, brown rice 16.87 g/l로 결정되었다. 이와 같은 배지조성을 균주 screening에 이용한 결과 기존의 배지조성에 비해 생산성이 2배가량 향상된 결과를 확인할 수 있었고 배양형태 또한 기존배지에서의 filamentous 형태와 달리 compact한 pellet 형태를 보이는 것을 관찰하였다(Fig. 9). 이는 생산배지의 최적화를 통해 생산배양의 배양형태를 pellet 형태로 유도함으로써 배양액의 점도가 낮아져 배양액으로부터 세포내로의 산소전달이 용이해짐에 따라 생산균주의 monacolin-K

생산성이 향상된 것으로 볼 수 있다.

Table 6. Analysis of variance of calculated model for monacolin-K production

Results of the analysis of variance	
Regression	
Sum of squares	67380.00
df	14
Mean squares	48127.59
F ratio	2.9
P	0.0248
Residual	
Sum of squares	24920.00
df	15
Mean squares	16613.00
Correlation coefficient (R ²)	0.7300
Coefficient of variation (CV%)	38.6

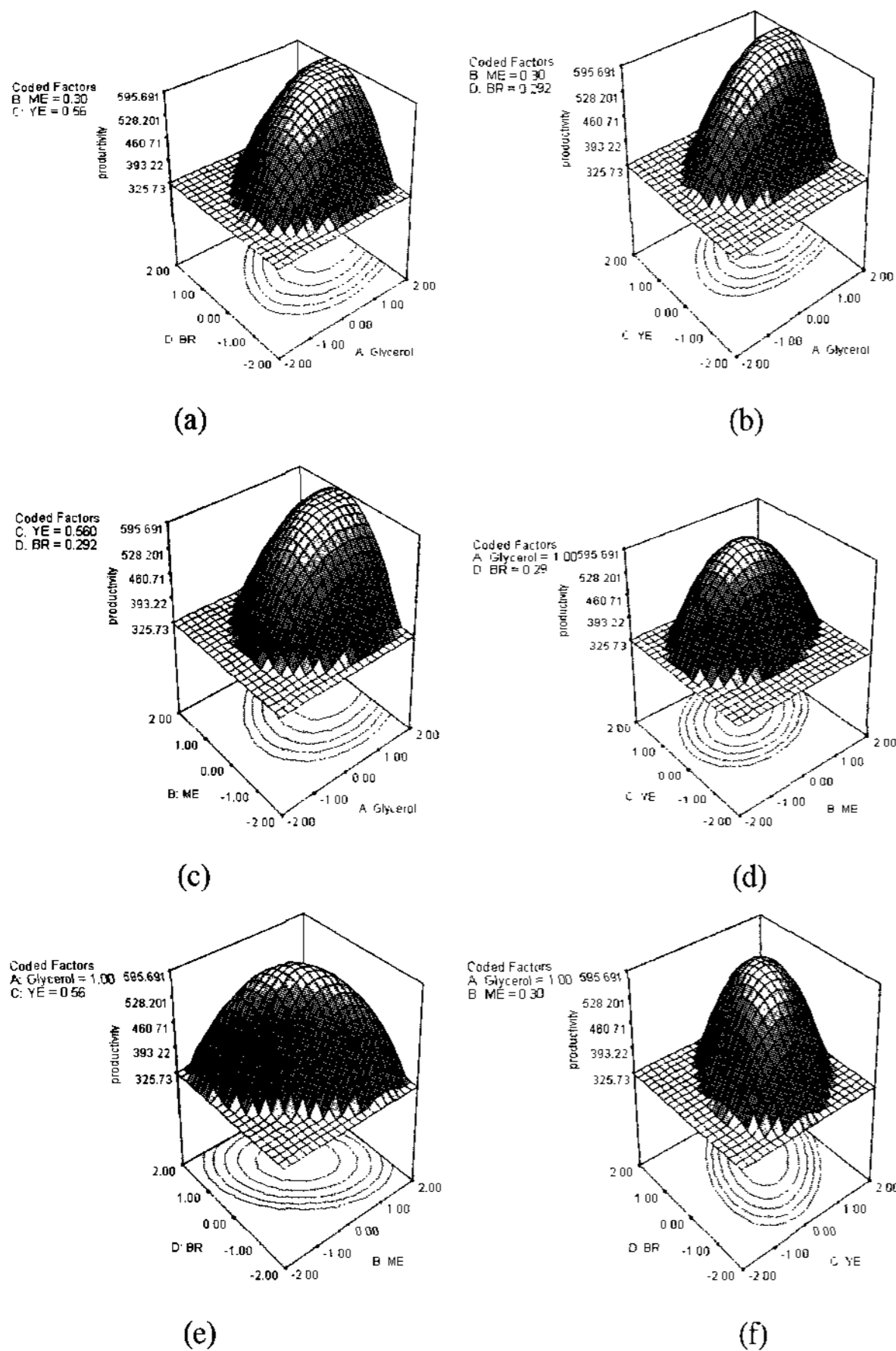
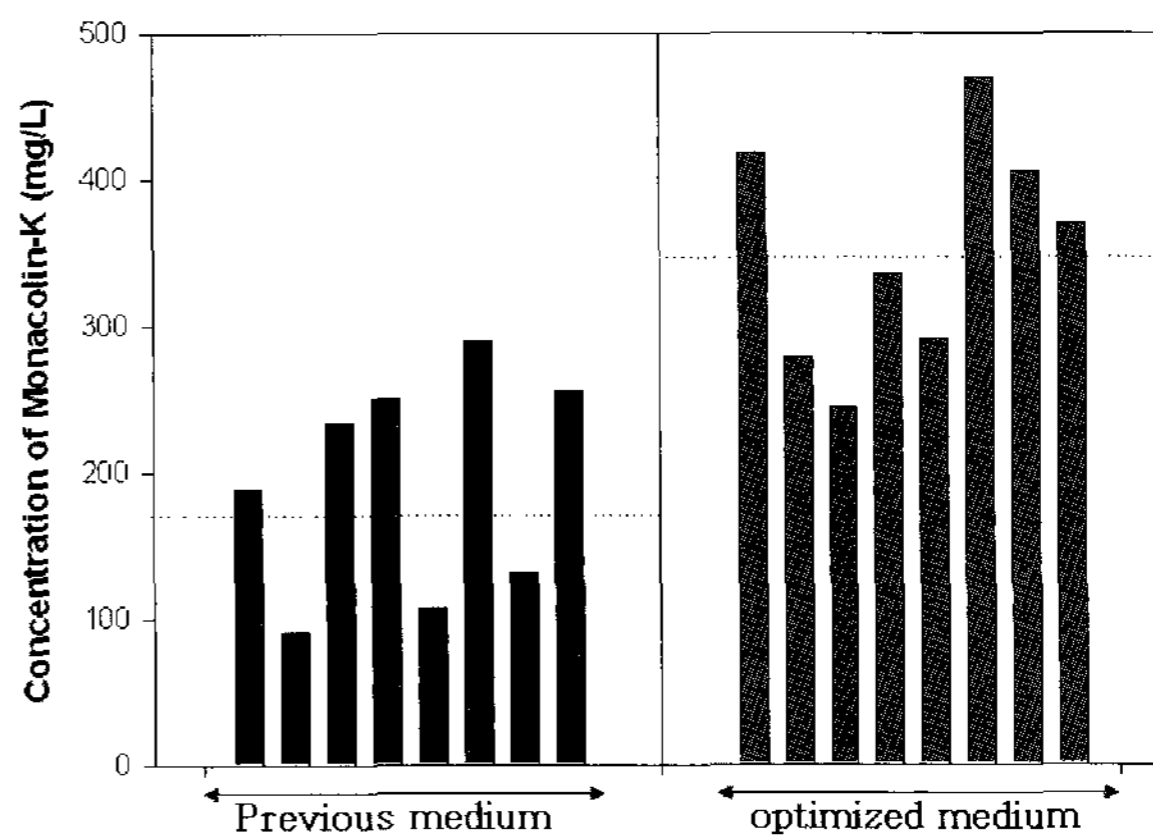


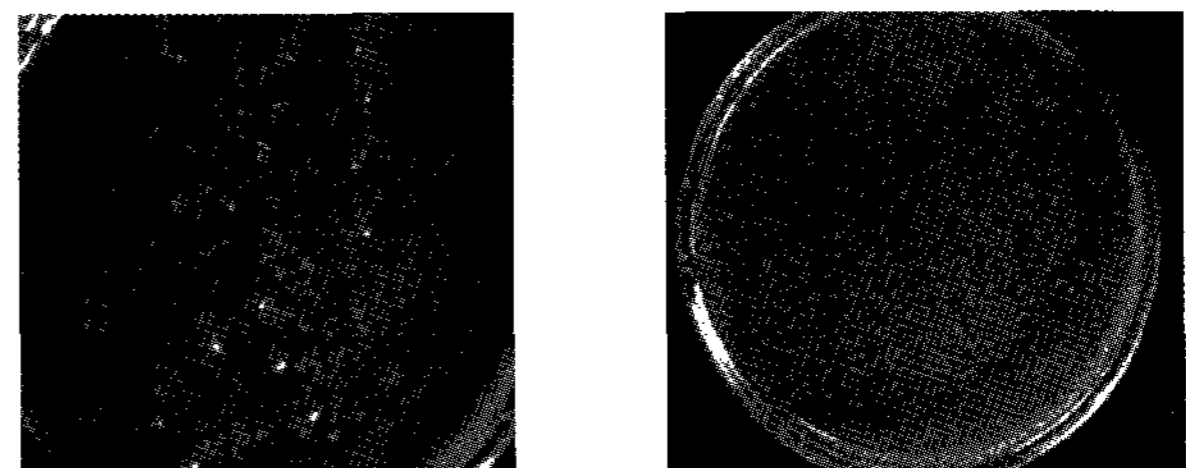
Figure 8. Response surface plot showing relative effect of two nutrient parameters on monacolin-K production while keeping others at constant level.

본 연구에서는 소규모 성장배양방법을 확립하여 사용배지와 배양 공간, 배양시간의 소모를 줄이면서 균주의 mass screening이 가능하도록 하였고 이를 이용하여 고생산 균주를 선별하였으며 통계적 방법을 이용하여 균주의 생리적 특성에 맞는 생산배지의 조성을 최적화 하였다. 그 결과 균주의 배양형태를 pellet 형태로 유도할 수 있었으며 그로 인하여 생산성을 2배가량 향상시키는 고무적인 결과를 얻

을 수 있었다.



(a)



Previous medium
(filamentous)

Optimized medium
(1mm> pellet)

(b)

Figure 9. Comparison of monacolin-K production (a) and cell morphology (b) between previous medium and optimized medium.

요 약

가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하기 위해서는 소규모 액상배양 방법의 확립이 필수적인데, 강력한 지질저해제인 monacolin-K의 생산균주인 균사형성 *Monascus*의 경우 포자나 균사체의 형성이 활발하지 않은 배양 생리적 특성으로 인해 소규모 (miniature) 액상배양이 매우 어려운 문제점이 있다. 본 연구에서는 monacolin-K 고생산성 균주개발의 효율성을 큰 폭으로 증가시키고자, 기존의 플라스크 액상배양 방법을 소규모화시킨 tube 배양 방법을 개발함으로써 단기간에 보다 많은 양의 균주를 테스트하고자 하였다. 이차대사산물인 monacolin-K의 생합성은 각각의 배양단계에서의 생산균주의 배양형태가 중요한데, 특별히 최종 생산배양에서 생산성 증가에 심각한 영향을 미치는 배양형태인 직경 1 mm 이하의 pellet 모양을 유도하기 위해서는 성장배양 시에 반드시 고농도의 균사모양이 유도되어야 하는 것으로 관찰되었다. 50 ml tube (7 ml의 조업부피)를 이용하는 소규모 액상 성장배양의 경우 solid seed 배양 단계에서의 포자형성배지의 조성을 통계적 방법을 통해 최적화하고, 또한 성장배지 성분엔 brown rice 가루 20 g/L를 첨가할 때, 원하는 균사모양의 배양형태가 유도됨을 확인할 수 있었다. 한편 7 ml의 조업부피의 tube를 이용한 소규모 성장배

양 방법의 개발로 인해, 기존의 flask 배양을 이용할 때보다 단기간에 훨씬 많은 변이주의 생산성을 조사하게 되어 균주개량 속도를 큰 폭으로 향상시킬 수는 있었으나, 선별된 개별 균주의 monacolin-K의 생산성은 오히려 전체적으로 감소하는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 소규모 배양방법을 확립하기 위해 새로이 개발한 포자형성배지와 성장배지의 조성변화로 인해 기존에 확립된 생산배지에서는 생산균주의 monacolin-K 생합성 능력이 최대로 발휘되지 않았기 때문에 발생한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구를 통해 확립된 소규모 성장배양에 적합한 최적의 생산배지 조성을 확립하고자 통계적 방법인 Plackett-Burman design을 적용하여 monacolin-K 생산성 향상에 영향을 주는 glycerol, malt extract, yeast extract, brown rice의 4가지 성분들을 최종 선별하였고, 또한 이들의 최적농도 결정을 위해 반응표면분석 실험을 수행하였다. 이와 같이 결정된 최적 생산배지를 사용하여 생산배양을 수행한 결과, monacolin-K의 생산성이 2배 이상 증가하고, 배양 형태 또한 용존산소와 영양분의 전달이 매우 용이한 직경 1mm 이하의 pellet 모양을 유지함을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소, 전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Endo, A. (1979), Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species, *J. Antibiot.* **32**, 852-854.
2. Alberts, A. W., et al. (1980), Mevinolin: A Highly Potent Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase and a Cholesterol-Lowering Agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3957-3961.
3. Fears, R. (1983), Pharmacological control of 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme reductase. In *3-Hydroxyl-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase*, ed. J.R. Sabine. pp189-208. Boca Raton: CRC Press, Inc., ISBN 0-84936551-1.
4. William, R. S. (1997), In *Biotechnology of Antibiotics*, 2nd. ed., pp779-805, Marcel Dekker, New York.
5. Dietschy, J. M. and J. D. Wilson (1970), Regulation of Cholesterol Metabolism, *N. Engl. J. Med.* **282**, 1179-1183.
6. Manfredini, R., et al. (1983), Mixing and Oxygen Transfer in Conventional Stirred Fermentors, *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 3115-3131.
7. Lewis, G. A., D. Mathieu and R. Phan-Tan-Luu (1999), Drug and pharmaceutical sciences-pharmaceutical experimental design, Vol. 92, Marcel Dekker, Inc., USA.
8. Demain, A. L. and J. E. Davies (1999), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd ed., pp81-93, ASM Press, Washington.
9. Box, G. E. P. and N. R. Draper (1987), *Empirical Model Building and Response Surfaces*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
10. Friedrich, J., et al (1995), High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Mevinolin and Mevinolinic Acid in Fermentation Broths, *J. Chromatography* **704**, 363-367.
11. Chang T. N., et al. (2002), Effect of rice-glycerol complex medium on the production of Lovastatin by *Monascus ruber*, *Folia Microbiol.(Praha)* **47**, 677-684.