

## 기능성 원료를 기질로 이용하는 Monacolin-K 고함유 모나스커스 균주의 생산배지 최적화

이 선 규 · <sup>1,3</sup>전 계 택 · † <sup>2,3</sup>정 용 섭  
경인지방식품의약품안전청, <sup>1</sup>강원대학교 분자생명과학과, <sup>2</sup>전북대학교 응용생물공학부,  
<sup>3</sup>바이오품소재 개발 및 산업화 연구센터  
(접수 : 2008. 10. 9., 게재승인 : 2008. 12. 1.)

## Production Medium Optimization for *Monascus* Biomass Containing High Content of Monacolin-K by Using Soybean Flour Substrates

Sun-Kyu Lee, Gie-Taek Chun<sup>1,3</sup>, and Yong-Seob Jeong<sup>2,3†</sup>

Kyeongin Korea Food & Drug Administration, <sup>1</sup>School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University  
<sup>2</sup>Division of biotechnology, Chonbuk National University, <sup>3</sup>Research Center for Industrial Development of Biofood Materials

(Received : 2008. 10. 9., Accepted : 2008. 12. 1.)

During the last decade, monacolin-K biosynthesized by fermentation of red yeast rice (*Monascus* strains) was proved to have an efficient cholesterol lowering capability, leading to rapid increase in the market demand for the functional red yeast rice. In this study, the production medium composition and components were optimized on a shake flask scale for monacolin-K production by *Monascus pilosus* (KCCM 60160). The effect of three different soybean flours on the monacolin-K production were studied in order to replace the nitrogen sources of basic production medium (yeast extract, malt extract and beef extract). Among the several experiments, the production medium with dietary soybean flour to replace a half of yeast extract was very good for monacolin-K production. Plackett-Burman experimental design was used to determine the key factors which are critical to produce the biological products in the fermentation. According to the result of Plackett-Burman experimental design, a second order response surface design was applied using yeast extract, beef extract and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as factors. Applying this model, the optimum concentration of the three variables was obtained. The maximum monacolin-K production (369.6 mg/L) predicted by model agrees well with the experimental value (418 mg/L) obtained from the experimental verification at the optimal medium. The yield of monacolin-K was increased by 67% as compared to that obtained with basic production medium in shake flasks.

**Key Words** : monacolin-K, *Monascus* biomass, soybean flour, medium optimization

### 서 론

홍국(紅麴)은 쌀을 모나스커스(*Monascus*)속의 붉은 곰팡이인 홍국균으로 발효시켜 만든 것으로서 특유의 붉은색을 띄고 있으며 우리나라에서는 '홍비섯쌀'이라고도 불리고 있다. 홍국균은 곰팡이의 일종으로 오래전부터 중국, 대만, 일본, 말레이시아 등지에서 주류, 두부, 육류 등의 식품과 혈행촉진제 등의 약제

로서 널리 이용되어 왔다. 이 곰팡이는 홍색계의 색소를 다량 생산하기 때문에 그 국이 심홍색을 띄게 되며, *Monascus* 속을 일반적으로 홍국균이라고 부르는 것도 이러한 이유에서 유래한 것이다. 중국에서는 14세기경부터 이미 발효건강식품으로 사용되어 왔으며, 중국 의학의 기초가 되고 있는 『본초강목』에서도 심장혈관 계통의 건강을 증진시키는데 이 홍국의 사용을 권장하는 내용이 있다.

콩은 세계 각지에서 대량으로 재배되어지고 있는 주요 곡물 중의 하나로서, 특히 한국, 일본, 중국 등지에서는 대두 그 자체로서의 식품이용 뿐만 아니라 된장, 두부, 간장 등의 대두가 공식품으로서 대량소비 되어지고 있다(1). 콩은 인류와 오랜 인연을 맺었고, 많은 사람들에게 양질의 단백질과 식물성 기름을 제공

† 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 : ysjjeong@chonbuk.ac.kr

하여 건강을 유지하는데 실로 커다란 기여를 하였다. 특히 식단이 식물성 위주인 동양인에게 결핍하기 쉬운 양질의 아미노산을 공급하고, 영양 균형면에서 중대한 역할을 하였다(2).

특히, 콩 속에 들어있는 생리활성 물질인 isoflavone이 각종 암의 발생 빈도를 낮추고 여성의 폐경기 증후군을 폭넓게 완화하는 사실이 밝혀지면서 인기 있는 건강식품으로 부각되고 있다(3). Isoflavone은 식물체에 들어있는 색소의 한 종류인 페놀계 화합물의 배당체로 콩 속의 함량은 genistein이 0.15%, daidzein이 0.007%로 보고되었으나, 이 함량은 콩의 품종, 수확연도, 산지에 따라 큰 차이를 보이고 있다(4, 5). 또한 콩 식품의 경우 조리가공 과정에서 isoflavone의 함량 및 형태가 변화하는 것으로 보고되었다(6). 미국 FDA는 1999년 10월 단백질의 health claim을 인정하면서 콩 관련 제품의 판매고가 2000년 27.7억불에서 2002년에는 35억불로 증가하였고 2005년까지 매년 10~11% 성장할 것으로 판단하고 있다(7).

최근의 연구결과를 종합하여 볼 때 우리나라를 중심으로 한 동남아 지역에서 주로 이용되는 콩 발효 제품은 장류와 같이 조미 식품으로서의 역할, 발효과정에서 생성되는 식품으로서의 역할과 함께 발효과정에서 생성되는 각종 peptide와 생리 기능성 물질들이 다양한 질병 예방 혹은 발병 지연 역할을 한다는 것이 밝혀지면서 콩 발효 식품은 식품의 차원보다는 기능성 식품의 역할이 확대되고 있는 상황이 되었다(2).

본 실험에서는 홍국균 배양의 영양원으로 콩을 사용하기 위해서 예비실험으로 생산배지에서 탄소원과 질소원으로 콩 분말의 사용 가능여부를 조사했으며, Plackett-Burman Design(8)을 이용하여 배지원 중 중요변수를 3가지 선정한 후, 중심합성계획법으로 실험설계를 하고, 실험결과를 이용하여 반응표면분석으로 콩을 배지로한 홍국균의 최적생산배지농도를 확립하고자 하였다(9).

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 연구에 사용된 균주는 *Monascus pilosus* (KCCM 60160)이며, PDA (Potato Dextrose Agar, Difco Corp., USA) 고체평판배지에 접종한 후 온도 27°C의 배양기내에 7일간 배양하였으며 종배양을 위해 4°C의 냉장고에 보관하고 3개월마다 계대 배양하여 사용하였다.

### 배양배지조성 및 처리조건

배지는 고온고압 살균 시 카라멜화 반응, 당이 암모늄이온이나 아미노산과 반응하여 나타나는 amino-carbonyl 반응과 무기물 침전을 막기 위하여 각각의 배지를 따로 용해하여 고압증기살균(121°C, 15분)한 후 무균상자에서 다른 배지와 혼합하여 사용하였다. 생산배지 접종을 위한 성장배지 조성은 Glucose 30 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, trace elemental solution (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.4 g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.18 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5 g/L, NaMoO<sub>4</sub> 0.0025 g/L, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mL/L) 1 mL/L과 같으며, 모나콜린-K 생산을 위한 기본 생산배지의 조성은 soluble starch 96 g/L, malt extract 40 g/L, beef extract 30 g/L, yeast extract 15 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.5 g/L,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO<sub>4</sub> 1.25 g/L이다.

### 사용시약

본 실험을 위해 SCC (Soybean flour, CJ Co.), DSM (Dietary Soybean flour, Traditional market), DSS (Defatted Soybean flour, Sigma Chemical Co., USA), Glucose, Agar powder, Sucrose, Soluble starch (Duksan Pure Chemical Co., LTD), PDA, Malt Extract, Yeast Extract, Beef Extract (Difco, USA), Peptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Sigma Chemical Co., USA), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaMoO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Junsei Chemical Co.), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Showa Chemicals INC., Korea) 등을 시약으로 사용하였다.

### 배양 방법

고체 종배양은 24시간 전에 배양온도에서 활성화시킨 1개의 agar plate에 멸균된 증류수 4 mL을 넣고 끓여낸 균체액 0.2 mL을 potato dextrose agar (PDA) 고체평판배지에 도말 접종하여 27°C에서 7일간 배양하였다. 액체 종배양은 24시간 전에 배양온도에서 활성화시킨 agar plate에 멸균된 증류수 4 mL을 넣어 끓여낸 균체액을 50 mL (300 mL baffled flask)의 성장배지에 모두 접종하여 27°C, 130 rpm에서 5일간 진탕배양 하였다.

생산배양은 액체 종배양액을 교반하면서 50 mL (250 mL 삼각 플라스크)의 생산배지에 5 mL 접종한 후 27°C, 200 rpm으로 호기적 조건에서 10일간 진탕배양 (Shaking incubator, Vision Co. Ltd., Korea)하였다.

### Monacolin-K 추출 및 정량분석

Monacolin-K의 분석은 Roman Kysilka와 Vladir Kren 등의 방법을 참고하여 HPLC (Shimadzu Class-LC 10, Japan)로 분석하였으며 분석조건은 Table 1과 같다(10). Monacolin-K (mevinolin lactone form) 표준용액으로는 순수한 mevinolin (Sigma, USA)을 농도별로 methanol에 용해하여 사용하였다. Acidic form 표준용액은 3 mL의 methanol에 10 mg의 mevinolin lactone form을 녹이고 0.1 M NaOH 8 mL을 가한 후 20분 정도 sonication 하고, 50°C에서 1시간 정도 가열하여 0.1 M HCl로 pH 7.7로 조정하여 최종부피가 10 mL 되도록 맞추어 주면 acidic form 1 g/L (1000 ppm)가 만들어진다. 이것을 농도별로 희석하여 사용하였다. Citrinine 표준용액 또한 순수한 citrinine (Sigma, USA)을 농도별로 methanol에 용해하여 사용하였다. Monacolin-K는 농도 25~300 mg/L의 범위에서 분석하여 검량선을 작성하여 monacolin-K 검량선으로 활용하였다.

Table 1. HPLC conditions for monacolin-K analysis

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

**Table 2.** The composition of the production medium using three different kinds of soybean flour instead of original nitrogen source

(Unit : g/L)

Nitrogen source	1	2-4	5-7	8-10	11-13	14-16	17-19	20-22	23-25	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40	41-43
SCC/DSS/DSM	0	15	7.5	40	20	30	15	45	27.5	35	17.5	70	35	85	42.5
Malt extract	40	40	40	0	20	40	40	0	20	40	40	0	20	0	20
Yeast extract	15	0	7.5	15	15	15	15	0	7.5	0	7.5	15	15	0	7.5
Beef extract	30	30	30	30	30	0	15	30	30	0	15	0	15	0	15

생산된 배양액의 monacolin-K 함량을 측정하기 위해서 배양액을 균질화 이후에 5 mL을 취하여 동량의 methanol을 가한 뒤 27°C에서 200 rpm으로 2시간동안 교반하면서 추출하였다. Filter paper (No. 4, Whatman, England)로 여과한 뒤 여과액을 3,000 rpm (Centrifugal separator, Hanil Scientific Corp., Korea)에서 원심분리하여 상정액을 다시 10,000 rpm (Centrifugal separator, Beckman, Germany)에서 20분 동안 원심분리를 시킨 후 상정액 2 mL 다시 취하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 표준용액에서 얻어진 검량선을 이용하여 생산물의 양을 계산하였다.

#### 균체농도 측정

균체농도는 건조균체질량 (Dry Cell Weight)으로 측정하였다. 균질화시킨 시료 5 mL에 일정량의 증류수를 희석하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 버린 후 증류수를 넣어 혼합하고 다시 원심분리하였다. 이 과정을 3번 반복하여 항량을 구한 용기에 넣고 105°C에서 항량이 얻어질 때까지 건조하였다.

#### pH 측정

배양이 완료된 액체 배지는 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하여 pH를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 콩 분말을 생산배지에서 탄소원으로 활용

콩 분말을 생산배지에서 탄소원으로 활용 가능성을 확인하기 위하여 soluble starch를 대조구로 하고 세 종류의 콩 분말을 soluble starch 대신에 100% 또는 50% 변경하여 실험하였다. Monacolin-K 생산은 100% 콩 분말을 사용한 실험구 모두 monacolin-K가 1 mg/L 이하로 거의 생성되지 않았고, 콩 분말을 50% 사용한 실험구 또한 monacolin-K 생산이 각각 38 mg/L 이하로 대조구보다 현저하게 낮음을 확인하였다(자료 미제시). 따라서, 본 실험에서 사용 중인 탄소원 (soluble starch) 대신에 콩 분말 대체사용은 3 종류 모두 적합하지 않은 것으로 결론을 내렸다.

#### 생산배지의 탄소원 변경

생물반응기 배양 시 균의 성장이 활발한 대수기부터 용존 산소가 급격하게 떨어져 배양 96시간 전후에 거의 0%가 되고 monacolin-K 생산이 낮게 나오는 것을 Yun(11)의 실험을 통해서 추정할 수 있었다. 이는 배지성분 중 가장 많은 부분을 차지하는 soluble starch가 미치는 영향으로 판단하고 탄소원을 sucrose로 변경하여 실험을 실시하였다. 탄소원으로 soluble starch를 사용한 실험구의 monacolin-K와 DCW의 생산량은 각각 228 mg/L

와 30.2 g/L 이었고, sucrose를 사용한 실험구에서는 262 mg/L, 31.6 g/L이었다. 탄소원으로 sucrose를 사용했을 때 균체량은 큰 차이가 없었으나, monacolin-K 함량이 44 mg/L 만큼 많이 생산되었다. 또한, sucrose를 사용한 실험구는 펠릿 형성이 soluble starch를 사용한 실험구 보다 작고 균일한 형태를 보여 주었다. 곰팡이의 액상배양에서 균사형태가 균체량 및 대사산물의 생산에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 대규모 발효 시 곰팡이의 성장은 펠릿이나 펠릿과 균사체의 복합형태로 자라는 것이 바람직하다고 보고되어있다(12). 상기 결과는 탄소원으로 sucrose의 사용이 soluble starch를 사용했을 때 보다 배지의 점성이 감소하여 교반 시 산소의 공급이 원활하기 때문으로 생각한다(13). 즉 탄소원으로 soluble starch 대신에 sucrose를 사용함으로써 생물반응기 내의 배양액의 점성을 감소시켜 효과적으로 산소전달이 이루어진 것으로 판단되었다(14). 따라서 이후의 실험에서는 탄소원으로 sucrose를 사용하였다.

#### 콩 분말을 생산배지에서 질소원으로 활용

콩 분말을 생산배지에서 질소원으로 활용 가능성을 확인하기 위하여 탄소원으로 sucrose (96 g/L)를 사용하고, 질소원으로 yeast extract (15 g/L), malt extract (40 g/L)와 beef extract (30 g/L)을 사용한 것을 대조구(Table 2의 1번)로하고, 3 종류의 콩 분말의 첨가량을 위의 세 가지 질소원 대신에 100% 또는 50%로 변경하여 실험(Table 2의 2-19번)하였다. 질소원 두 종류(Table 4의 23-37번) 또한 세 종류(Table 2의 38-43번)의 콩 분말로 100% 또는 50%를 변경하여 실험하였고, monacolin-K와 균체 생산량을 측정하여 질소원으로 콩 분말의 사용 가능성을 살펴보았다. 그 결과 monacolin-K가 대조구에서 262 mg/L가 생산되었고, yeast extract 50%를 DSM 콩 분말로 대체한 실험구(7번)에서 monacolin-K가 215 mg/L 생산되었다. 그 다음으로 malt extract 50%를 DSM 콩 분말로 대체한 실험구에서 201 mg/L이 생산되었다. Beef extract 대신에 콩 분말을 전량 또는 50%를 변경한 실험구에서는 monacolin-K가 전혀 생산되지 않았다(Fig. 1). 따라서 beef extract는 *Monascus pilosus* 홍국균을 이용한 monacolin-K 생산에 중요한 배지원임을 확인할 수 있었다. 그리고 yeast extract와 malt extract의 경우는 50%를 콩 분말로 대체한 실험구를 제외한 실험구간에서는 monacolin-K가 대조구의 50% 미만으로 생산되거나 전혀 생산되지 않았다.

따라서, 생산배지의 질소원으로 콩 분말 활용은 대조구의 monacolin-K 생산과 유사한 결과를 나타낸 질소원 중 yeast extract를 dietary soybean flour (DSM)로 50% 대체한 것을 선정하였다. 그리고 이후의 실험은 질소원 중 yeast extract 50% DSM으로 대체한 생산배지를 이용하여 실험계획법에 의해 최적배지 선정 실험을 수행하였다.

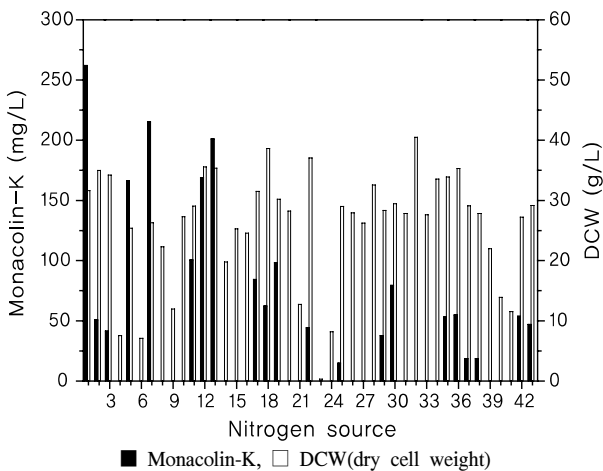


Figure 1. The effect of production medium using three different kinds of soybean flour instead of original nitrogen source (yeast extract, malt extract, beef extract) on *Monascus pilosus*. (refer to Table 4).

**Plackett-Burman design에 의한 중요변수의 선정**

Plackett-Burman design에 의한 실험은 적은 실험횟수로 각 요인이 최종결과에 미치는 영향을 얻을 수 있으므로 시간과 경비를 절약할 수 있는 장점이 있다. 그러나 적은 숫자는 그 만큼의 희생을 요구하는데 이 경우 변수들 간의 상호작용에 대한 정보를 얻을 수가 없게 된다. 따라서 Plackett-Burman design에서는 단지 중요한 변수만을 선별하는데 중점을 두고 있다(15).

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

Components	Concentration (g/L)	Variables
Sucrose	96	A
DSM	7.5	B
Yeast extract	7.5	C
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	D
Malt extract	40	E
Beef extract	30	F
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	G
L-Histidine	3	H
KHSO <sub>4</sub>	1.25	I
Antifoam	0.5	J

본 실험은 질소원으로 yeast extract 50%를 콩 분말 (DSM)으로 대체한 실험의 결과를 토대로 진행하였다. Table 3의 배지 성분의 농도가 30% 이상으로 높은 A, E, F 변수의 경우 농도 조절을 중심값에서 ±20%로 하였고, 나머지 변수들의 경우는 그 농도를 중심값에서 ±50%로 조정하여 실험을 진행하였다. Dummy value로는 생물반응기에서 곰팡이 배양 시 생성되는 거품을 제거하기 위해서 사용되는 소포제 (Antifoam 204, Sigma, USA)를 사용하였다. 대조구와 소포제만을 첨가한 대조구의 경우 monacolin-K가 각각 192.8 mg/L과 173.7 mg/L로 소포제 첨가에 의해서 monacolin-K 함량이 10% 감소하였고 건조균체량은 각각 22.59 g/L과 23.27 g/L으로 비슷하였다. Monacolin-K 생산이 감소한 이유는 대부분의 소포제들이 산소이동 속도를 저하시키기 때문으로 판단된다(16, 17). 따라서 발효 중에 소포제를 최소한으로 사용하는 것이 바람직하겠다.

Table 4. Plackett-Burman design for ten variables

Trial	Variables										Moncolin-K (mg/L)	DCW (g/L)	pH
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J			
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	33.3	18.10	7.49
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	80.9	15.29	5.43
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	158.1	27.30	5.82
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	203.1	26.90	6.22
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	144.8	20.40	7.92
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	260.3	24.62	6.75
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	133.9	19.03	7.56
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	171.1	22.72	6.83
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	178.0	21.80	6.64
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	109.6	19.80	8.00
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	198.6	24.04	6.50
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	71.5	19.18	6.42
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	59.8	12.96	7.14
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	211.3	19.92	7.03
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	91.8	15.28	6.21
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118.7	15.37	5.45
Control											192.8	22.59	6.99
Control (added the antiform)											173.7	23.27	6.88

A : Sucrose at a high conc. of 115.2 g/L and a low conc. of 76.8 g/L.  
 B : DSM at a high conc. of 11.25 g/L and a low conc. 3.75 g/L.  
 C : Yeast extract at a high conc. of 11.25 g/L and a low conc. of 3.75 g/L.  
 D : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a high conc. of 15 g/L and a low conc. of 5 g/L.  
 E : Malt extract at a high conc. of 48 g/L and a low conc. of 32 g/L.  
 F : Beef extract at a high conc. of 36 g/L and a low conc. of 24 g/L.  
 G : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O at a high conc. of 0.75 g/L and a low conc. of 0.25 g/L.  
 H : L-histidine at a high con. of 4.5 g/L and a low conc. of 1.5 g/L.  
 I : KHSO<sub>4</sub> at a high conc. of 1.875 g/L and a low conc. of 0.625 g/L.  
 J : Antiform at a high conc. of 0.75 g/L and a low conc. of 0.25 g/L.  
 + : The high concentration of variable.  
 - : The low concentration of variable.

Table 4의 실험결과로 부터 monacolin-K가 33~260 mg/L, DCW 15~27 g/L 그리고 pH의 경우 5.4~8.0 범위에서 측정되었다. 가장 좋은 결과를 나타낸 것은 6번 실험구로 monacolin-K와 DCW가 각각 260.3 mg/L과 24.62 g/L을 나타냈다.

Table 5. Analysis of the yields shown in Table 4

	Variables									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Σ (H)	1156	1068	1457	1282	984	1294	1125	1045	1028	1031
Σ (L)	1068	1157	768	943	1241	931	1099	1179	1197	1194
Difference	88	-88	689	339	-256	363	26	-134	-169	-164
Effect	22	-22	172	85	-64	91	6	-34	-42	-41
Mean square	966	975	59358	14369	8207	16463	84	2251	3570	3342
F test	0.3	0.3	17.8	4.3	2.5	4.9	0.0	0.7	1.1	1.0

Monacolin-K 생성에 영향을 미치는 정도가 큰 것은 mean square가 높은 순으로 yeast extract, beef extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, malt extract, KHSO<sub>4</sub> 등의 순으로 나타났고 그 결과는 Table 5에 나타내었다(18). 기능성 원료로 관심을 가진 콩과 첨가량이 가장 많은 탄소원인 sucrose의 경우 monacolin-K의 생성에 미치는 영향은 아주 적었다.

Plackett-Burman design 실험계획법을 통해서 monacolin-K 생성에 미치는 영향이 큰 변수인 yeast extract, beef extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3가지에 대하여 중심합성계획법과 반응표면분석법을 통하여 monacolin-K 생산을 위한 최적 배지를 확립하고자 하였다.

**중심합성계획을 이용한 반응표면분석법**

실험계획법을 이용한 최적배지 농도를 정하기 위하여 본 실험에서는 RSM (response surface methodology)을 사용하였으며, 이 때 실험계획은 중심합성계획을 적용하였다. 생산배지에서 Plackett-Burman design에 의해 선택된 독립변수로는 ammonium sulfate, yeast extract, beef extract 이며, 이들은 - $\alpha$ , -1, 0, 1과  $\alpha$  다섯 단계로 부호화 하였다(Table 6). 또한 독립변수 (X<sub>n</sub>)는 중심합성계획에 따라 16실험구로 구분하였으며(19), 중심점을 2실험구로 선택함으로써  $\alpha$ 값은 1.287이었다(9). 따라서 총 실험회수는 2반복을 통하여 32개 실험구가 수행되었다(Table 7). 독립변수에 영향을 받는 종속변수 (Y)는 monacolin-K와 건조균체 함량으로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델식의 예측에는 SAS program 이 사용되었다(20, Release 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

분산분석결과 R-square (결정계수)는 0.8739로 1에 가까운 값을 나타내어 반응모형이 신뢰할 수 있음을 나타내었으며, 전체 모델의 유의확률은 0.0381로 0.05보다 작으므로 가정된 모형 반응이 자료에 적합하였다. 모수추정에 관한 결과에서 선형, 순수이차와 교차곱의 유의확률은 모두 0.05이상으로 분석되어 수식 전체를 사용해야 했다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$Y = -3134.88 + 119.55X_1 + 419.07X_2 + 78.53X_3 - 4.67X_1^2 + 2.85X_1X_2 - 24.49X_2^2 - 1.29X_1X_3 - 1.66X_2X_3 - 0.91X_3^2$$

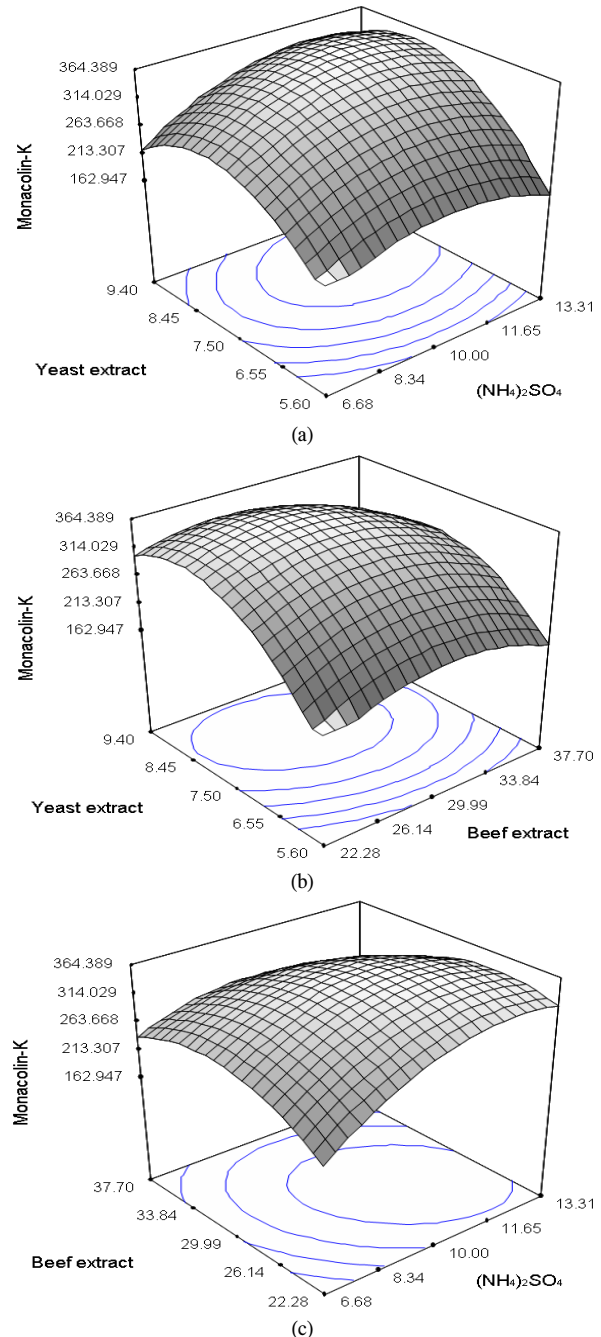
**Table 6.** Levels of independent variables for experimental design (RSM)

X <sub>n</sub>	Independent variables(g/L)	Level				
		-a	-1	0	1	a
X <sub>1</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.426	8	10	12	12.574
X <sub>2</sub>	yeast extract	5.6	6	7.5	9	9.4
X <sub>3</sub>	beef extract	22.278	24	30	36	37.722

**Table 7.** Experimental design and results of central composite design

Exp No.	Culture conditions(g/L)			Monacolin-K (mg/L)	DCW (g/L)	pH
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	yeast extract	beef extract			
1	8.000(-1)	6.000(-1)	36.000(+1)	225.0	24.3	7.48
2	8.000(-1)	6.000(-1)	24.000(-1)	183.0	21.5	8.09
3	8.000(-1)	9.000(+1)	36.000(+1)	247.8	28.2	7.17
4	8.000(-1)	9.000(+1)	24.000(-1)	258.1	19.8	8.02
5	12.000(+1)	6.000(-1)	36.000(+1)	200.6	20.2	7.01
6	12.000(+1)	6.000(-1)	24.000(-1)	213.1	18.1	7.81
7	12.000(+1)	9.000(+1)	36.000(+1)	250.2	20.7	6.74
8	12.000(+1)	9.000(+1)	24.000(-1)	329.9	19.3	7.77
9	10.000(0)	7.500(0)	30.000(0)	358.0	21.9	7.44
10	10.000(0)	7.500(0)	30.000(0)	314.0	21.6	7.84
11	7.426(- $\alpha$ )	7.500(0)	30.000(0)	280.9	20.7	7.63
12	12.574(+ $\alpha$ )	7.500(0)	30.000(0)	373.8	23.7	7.77
13	10.000(0)	5.600(- $\alpha$ )	30.000(0)	172.1	21.6	7.89
14	10.000(0)	9.400(+ $\alpha$ )	30.000(0)	368.3	26.4	7.94
15	10.000(0)	7.500(0)	22.278(- $\alpha$ )	319.0	18.3	8.04
16	10.000(0)	7.500(0)	37.722(+ $\alpha$ )	289.0	27.1	6.99

Monacolin-K의 최대 생산 예상량은 369.9 mg/L을 나타내어 Yun(11)의 최대 생산 예상량인 574.07 mg/L보다 다소 낮게 생산될 것으로 결과가 예측되었다. 질소원으로 yeast extract 대신 콩분말 사용이 상당한 영향을 미친것으로 판단된다. 콩이 장점이 있는 물질이긴 하지만 *Monascus* 배양을 위해서는 신중하게 고려해볼 필요가 있을 것으로 생각된다.



**Figure 2.** Response surface plot showing the interaction between (a); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and yeast extract at optimum beef extract concentration (26.7 g/L), (b); beef extract and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at optimum yeast extract concentration (8.4 g/L), and (c); yeast extract and beef extract at optimum (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (12.0 g/L).

주어진 데이터에 대한 정확한 최적점을 찾기 위하여 모수추정에 의한 2차회귀식을 바탕으로 능선분석을 하였으며, 최종적

으로 반응표면분석을 통하여 monacolin-K 생산에서 가장 영향을 주는 3개 인자의 농도를 찾을 수 있었으며 각각의 농도 (g/L)는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.0, yeast extract 8.4, beef extract 26.7로 분석되었다. 결과적으로 선택된 최적배지는 sucrose 96 g/L, DSM 7.5 g/L, yeast extract 8.4 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.0 g/L, malt extract 40 g/L, beef extract 26.7 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO<sub>4</sub> 1.25 g/L이다.

Monacolin-K의 생산에 각 변수가 미치는 영향을 쉽게 확인하기 위하여 세 개의 변수 중 한 개를 최적점에 고정시킨 후 나머지 두개의 변수를 이용하여 삼차원 형태로 교호작용을 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Beef extract 26.7 g/L로 고정하고, yeast extract와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 반응표면 그림(a)에 나타내었다. Monacolin-K 생산은 yeast extract 농도가 6.0 g/L~9.4 g/L 범위에서 농도에 비례하여 증가한 후 정점을 나타내는 8.4 g/L 이후에는 조금씩 감소하는 경향을 나타내고, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 8.0 g/L~12.6 g/L 범위에서 농도에 비례하여 증가한 후 정점 12.0 g/L 이후에는 약간 감소하면서 포물선 형태를 나타냈다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 또는 yeast extract를 고정한 그림 (b), 그림 (c)에서도 증감의 정도는 다르지만 마찬가지로 실험한 농도 범위에서 포물선 형태를 나타내었다.

또한, 건조균체량에 대한 자료를 반응표면분석법으로 확인을 한 결과 분산분석결과 R-square (결정계수는) 0.6862, 전체 모델의 유의확률은 0.3331로 신뢰할 수 없었다. 그러나 beef extract와 yeast extract는 실험범위 내에서 첨가량이 증가할수록 균체량이 증가한 반면 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 첨가량이 증가할수록 균체량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 균체량 증가에 특히 beef extract의 영향이 중요하다고 판단되었다.

### 최적배지에서 배양 결과

Monacolin-K 최대생산을 위해 통계학적인 실험계획법으로 선정된 최적생산배지에 홍국균을 접종하여 monacolin-K 및 균체의 생산량을 플라스크배양을 통해서 확인하였다.

콩분말을 생산배지에서 질소원으로 활용하기위한 실험결과와 최적배지의 monacolin-K, 건조균체량, pH 등의 배양결과를 비교하였다(Fig. 3). 최적생산배지에서 홍국균을 27℃와 200 rpm 조건으로 플라스크 배양 한 결과 monacolin-K와 건조균체 생산량은 각각 418 mg/L과 27.1 g/L이었다. 최적화하기 전의 생산배지에서 monacolin-K와 건조균체 생산량은 각각 215 mg/L과 26.6 g/L이었다. 따라서 최적화에 의해서 monacolin-K 및 건조균체량이 각각 203 mg/L과 0.5 g/L 향상되었다.

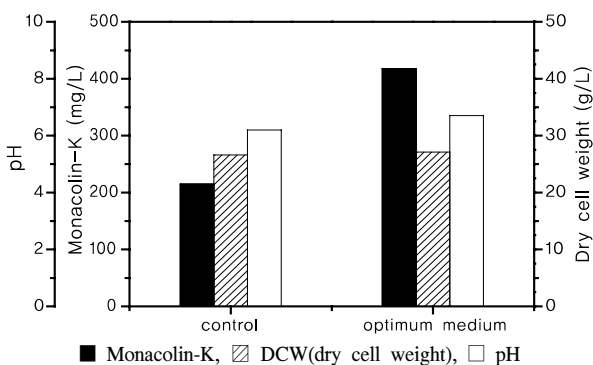


Figure 3. Production of monacolin-K and DCW (dry cell weight) in the optimum production medium by *Monascus pilosus*.

## 요 약

본 연구에서는 홍국균 (*Monascus pilosus*)을 이용하여 이차대사 산물인 monacolin-K를 대량생산하기 위하여 탄소원 또는 질소원으로 콩 분말을 기질로 하여 배지를 최적화하고자 하였다. 생산배지에서 탄소원으로 콩 분말을 적용한 실험에서는 soluble starch 대신에 콩 분말을 전량 또는 50% 대체하였을 경우 전 실험구간에서 monacolin-K 생산량이 대조구의 50% 미만으로 생산되거나 전혀 생산되지 않았다. Soluble starch 대신에 sucrose를 사용한 실험의 경우 monacolin-K와 건조균체량은 각각 262 mg/L, 31.6 g/L로 대조구의 218 mg/L, 30.2 g/L보다 생산량이 증가하였다. 따라서 생산배지의 탄소원으로 sucrose를 변경하였다. 생산배지의 질소원으로 사용하는 yeast extract (15 g/L), malt extract (40 g/L), beef extract (30 g/L) 대신에 3종류의 콩 분말로 대체 실험을 한 결과, 대조구에서 monacolin-K는 262 mg/L를 생산되었고, yeast extract 50% 대신에 DSM 콩 분말을 사용한 실험구에서는 monacolin-K를 215 mg/L을 생산되어 가장 좋은 결과를 냈다. 따라서 생산배지에 yeast extract 50% 대신에 DSM 콩 분말을 적용하기로 하였다. Plackett-Burman Design 실험계획법에 의한 실험결과 monacolin-K의 생산에 영향을 미치는 인자는 yeast extract, beef extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 순으로 영향을 주는 것으로 나타났다. Monacolin-K 생산에 영향을 미치는 주요인자 3가지로 중심합성계획에 의한 반응표면분석을 수행한 결과 최적배지 조성은 sucrose 96 g/L, DSM 7.5 g/L, yeast extract 8.4 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.0 g/L, malt extract 40 g/L, beef extract 26.7 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, L-Histidine 3.0 g/L, KHSO<sub>4</sub> 1.25 g/L 이고, monacolin-K 생산 예상량은 369.9 mg/L 이었다. 최적배지를 이용하여 홍국균을 27℃, 200 rpm 조건에서 플라스크 배양 한 결과 monacolin-K 생산량과 건조균체량은 각각 418 mg/L, 27.1 g/L이었다. 결과적으로 monacolin-K 생산과 균체량의 감소 없이 콩 분말을 이용한 배지성분의 변화는 어느 정도 가능함을 알 수 있었다. 현재 알려진 고가의 질소원을 대체하기 위해서는 초기부터 균의 형태구조에 영향을 미치는 배지와 발효환경을 고려하여야 할 것으로 판단되었다.

## 감 사

본 연구는 지식경제부 지원 바이오식품 소재개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## REFERENCES

1. Cha, Bae Cheon (1994), Comparison of Lipid Constituents in Soybean and Beanpaste, *Kor. J. Pharmacogn.* **25**(4), 342-347.
2. Jong-Wook Kim, Young-Suk Kim, Pyeong-Hwa Jeong, Hyung-Eum Kim, and Dong-Hwa Shin (2006), Physicochemical Characteristics of Traditional Fermented Soybean Products Manufactured in Folk Villages of Sunchang Region, *J. Fd. Hyg. Safety* **21**(4), 223-230.
3. Kim, Jung-Soo and Sun Yoon (1999), Isoflavone contents and  $\beta$ -Glucosidase activities of soybean, Meju, and Doenjang, *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**(6), 1405-1409.
4. Choi, Yeon Bae and Heon Soo Sohn (1998), Isoflavone content

- in Korean Fermented and Unfermented Soybean Foods, *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**(4), 745-780.
5. Hui, Y. H. (1992), Encyclopedia of Food Science and Technology 4, 2391. In Soybeans, A Wiley-Interscience Publication, New York.
  6. Wang, H. J. and Murphy, P. A. (1994), Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1674-1677.
  7. Uzzan, M. and Labuza, T. P. (2004), Critical issues in R & D of soy isoflavone-enriched foods and dietary supplements. *J. Food Sci.* **69**(3), 77-86.
  8. Plackett, R. L. and Burman, J. P. (1946), The design of multifactorial experiments, *Biometrika* **33**, 302-325.
  9. Sung Whyoun Park (2001), Modern Experimental Design, pp521-571, Minyeongsa, Seoul.
  10. Kysilka, R. and V. Kren (1993), Determination of Lovastatin (mevilolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids, *J. Chromatography* **630**, 414-417.
  11. Sang-jin Yun (2004), Optimization of production medium and development of fermentation condition for *Monascus pilosus* production, M. S. Thesis, Dept. of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Jeonju.
  12. M. Pazouki and T. Panda (2000), Understanding the morphology of fungi, *Bioengineering* **22**, 127-143.
  13. Youn Jeung Cho, Hye Jin Hwang, Sang Woo Kim, Chi Hyun Song, and Jong Won Yun (2002), Effect of carbon source and aeration rate of broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor, *J. of Biotechnology* **95**, 13-23.
  14. Young-Seob Jeong, Dong-Il Kim, Ik-whyan Kim, Jae-Gouan Lee, Gie-Keak Chun, Youn-Ho Jeong, Gyu-Hyun Cho, Jeong-Woo Choi, and Oc-Gi Hong (2001), Bioprocessing Engineering (theory and practice), pp230-265, World Science Co., Seoul.
  15. Hee-Chan Lee and Byoung-Gi Kim (1997), Optimization of Bio-processing(II-1): Optimization of medium composition using the statistical method, The Korea Society for Microbiology and Biotechnology, *Biological Industry* **10**(1), 10-14.
  16. Wei-Young KIM, Myung-Gyou Sae, Chi-Whyun Song, Jong-Wyoun Wun, Gun-Buk Lee, and Hong-Gi Jeon (1999), Microbiology Engineering, pp192-204, Wunmundang, Seoul.
  17. Jae-Gyu Ban (1997), Optimization of Bio-processing(II-11): Analysis on microbiological physiology and metabolism for fermentation optimization, The Korea Society for Microbiology and Biotechnology, *Biological Industry* **10**(1), 15-22.
  18. Stanbury, P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall (1995), Principles of Fermentation Technology, 2nd ed., pp159-197, Pergamon Press, New York.
  19. Yaw-Nan Chang, Jen-Chang Huang, Hhih-Chen Lee, Ing-Lung Shih, and Yew-Min Tzeng (2002), Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*, *Enzyme and Microbial Technology* **30**(7), 889-894.
  20. Nae-Gyoung Sung (1993), SAS explanation, The sixth volume, pp219-261, Free academy, Seoul.