

LOVASTATIN 고생산성 균주 개발 및 반응표면분석법 (RSM)에 의한 생산배지 최적화

김제경, 김경희, 김현숙, 이상종¹, 장용근², 정연호³, 정용섭⁴, 전계택.

강원대학교 생명과학부, 생명공학부³. (주)에스티알바이오텍¹.

KAIST 생명화학공학과². 전북대학교 응용생물공학부⁴.

Abstract

Lovastatin produced by *Aspergillus terreus* via polyketide pathway is a secondary metabolite with high anti-hypercholesterolemic activity. In this paper we are going to present effective strain development strategies for lovastatin production by comparing the productivity of the mutants obtained through traditional rational screening process and protoplast fusion method. Mutants resistant against various antibiotics and/or antimetabolites showed significantly higher lovastatin productivity than the corresponding mother strains, demonstrating that rational screening method was very efficient in selecting high yielding producers. Recombinant fusants obtained using protoplast fusion between high producers were observed to have very different morphology and physiology as represented by the production and secretion of lovastatin, as well as cell growth pattern. In parallel with the strain development, optimization process for the production medium was carried out in order to find optimal concentrations of the medium components using such a powerful statistical method as response surface method (RSM). It was concluded that not only the optimum production medium but also good morphological characteristics of the high-yielding producers led to higher lovastatin production.

서론

Lovastatin은 균사 형성 곰팡이인 *A. terreus*로 부터 polyketide pathway를 통해 생합성되는 이차대사 산물로서 콜레스테롤 생합성 속도를 저해하여 혈관 속의 콜레스테롤 수치를 효과적으로 감소시키는 고지혈증 치료제이다. 고생산성 변이주를 선별했던 현재까지의 실험결과, Lovastatin 고생산성 변이주를 유도했을 지라도, 생산성이 어느 정도 이상이 되면 그 증가하는 폭이 점차 작아지는 결과를 확인했다. 따라서 유전적으로 안정하며 Lovastatin의 고생산성 특성을 지속적으로 유지 가능한 균주를 얻고자 원

형질체융합 방법을 확립하였으며, 전통적인 돌연변이 방법과 고생산성의 원형질 융합체의 Lovastatin 생산성을 비교 분석하여 보다 효율적인 균주 개발 전략을 제시하고자 하였다. 그리고 상기의 방법에 의해 선별된 균주를 최적화된 생산배지에서 배양하고자 통계학적 최적화방법인 반응표면분석법(RSM)을 수행하였다. 최적의 생산배지 조건에서 수행한 결과를 기존의 배지조건에서 배양한 것과 비교한 결과, 동일한 고생산성 균주라 할지라도 최적의 배지조건에서 더 훌륭한 배양 형태적 특성이 관찰되었으며 Lovastatin의 생합성 능력도 향상된 실험결과를 본 연구에서 제시하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건 본 연구에서는 본래의 *A. terreus*에서 Lovastatin 생산성이 큰폭으로 향상된 mutant를 스크리닝하여 사용하였다. 일반적으로 spore를 성장배지(GM II)에 10%(v/v)의 부피로 접종하였으며 이를 진탕 배양기에서 28°C, 230rpm으로 2일간 배양하였다. 생산배양은 생산배지(PM I)에 성장배양에서 얻은 mycelium을 10%(v/v)의 부피로 접종한 다음 28°C, 200rpm으로 8일간 배양하였다(250ml flask 배양). Protoplast 형성 시 필요한 mycelium은 최소배지를 이용해 얻었다. 즉 고체 최소배지에서 37°C, 2일간 배양 후 최소배지에 접종하여 flask 배양을 통해 많은 양의 mycelium을 얻을 수 있었다. 배양 조건은 37°C에서, 36시간 동안 배양하여 사용하였다.

실험방법 생산성이 보다 향상된 균주를 선별하기 위해 double 저항성 균주를 선별하였다. double 저항성 고생산성 균주는 최소배지에 두 종류의 antimetabolite를 동시에 첨가한 후 저항성을 보이는 colony를 배양하여 생산성을 확인하는 방법을 통해 선별되었다. 또 다른 균주개발 방법인 원형질체 형성을 위해 액상배지에서 키운 mycelium을 filtration을 통해 수거한 후 0.6M MgSO₄로 균체를 washing한 다음 30°C에서 2~4시간 정도 효소와 반응시켰다. 불순물이 포함된 원형질체를 protoplast trapping buffer에 첨가한 후 원심분리하여 protoplast만을 회수하였다. 회수한 protoplast를 세척 후 1×10⁶ protoplasts/ml로 희석하여 섞은 후, 원심분리하여 상등액을 제거하고 fusion을 위해 fusoin solution 1ml을 첨가하여 반응시켰다. 그 후 삼투압안정제가 첨가된 agar plate에 pour plating하여 fusant를 선별하였다. 배지 최적화 실험을 위해 기존의 배지 농도를 중심으로 정하였으며 (RSM의 한 방법인) 중심합성계획법에 따라 중심점의 수를 (제한이 없으므로) 4개로 설정하였다. 그리고 요인 실험점으로는 반응 조건이 4개이므로 24개, 축점의 수는 2k개, 즉 8개를 축점으로 설정하였다. 실험인자 변화는 각각 0.25배 간격으로 결정하였으며 각각의 농도에 대해 -2, -1, 0, +1, +2로 5단계로 부호화하였다(Table 1). 각각의 농도에 대해 플라스크 배양을 수행한 후 실험 결과를

분석하여 반응표면 2차회귀모형식에 의한 반응표면도를 작성함으로써 배지농도에 따른 Lovastatin 생산성을 추정할 수 있었다. 최대 Lovastatin 생산성을 주는 stationary point 가 반응표면도의 중앙에 위치하도록 생산배지 농도를 조정하며 실험을 반복수행하였다.

분석방법 Lovastatin 농도 분석은 HPLC에 의해 수행되었으며, Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μ m)(Kanto chemical co. INC.) column을 사용하여 Wave length 238nm 하에서 수행하였다.

결과 및 고찰

전통적인 돌연변이 방법에 의해 선별된 고생산성 변이주 N60-15와 CAA100-8은 친주(mother strain)에 비해 생산성이 매우 향상되었으나 그 증가하는 폭이 점차 작아지는 결과를 확인했다. 따라서 전통적인 돌연변이 방법에 의해 얻은 double 저항성 균주와, 고생산성 변이주간의 세포융합에 의해 얻은 (유전함량의 증가된) 원형질융합체의 Lovastatin 생산성을 비교하였다. 원형질 융합체 선별시 융합율을 높이기 위한 방법으로, (융합균주의 선별을 위한 selective marker의 특징을 이용하지 않고) 형성된 원형질체를 치사율이 약 99% 되도록 NTG를 처리한 후 융합을 시도한 결과 selective marker 없이도 random screening을 통해 다량의 융합체를 선별 할 수 있었다(Figure 1). 그러나 원형질체가 돌연변이된 후 재생되는 과정에서 morphology 변화나 생리적 특성의 심각한 변화가 관찰되었다. 그 결과 생산균주의 Lovastatin 생산성과 secretion percent {(supernatant의 생산성/cell broth의 생산성) \times 100}가 급격히 변화하였으며, 생산성이 증가하기보다는 오히려 감소하는 경향이 있는 것으로 나타났다(Figure 2). 또한 상기의 방법으로 선별된 균주를 최적화된 생산배지에서 배양하고자 반응표면분석법(RSM)을 수행한 결과, 가장 높은 생산성을 나타내는 최적의 생산배지 조성을 결정할 수 있었다(C: 80 \rightarrow 127.44, N-1: 24 \rightarrow 20.55, N-2: 2.5 \rightarrow 1.87, P: 6 g/L)(Figure 3). 기존의 생산배지 조성에서 배양한 것과 비교한 결과 동일한 고생산성 균주라고 할지라도, 최적의 배지조건에서 훌륭한 배양 형태적 특성이 관찰되었다. 이로부터 최적의 배지성분이 제공해 주는 훌륭한 배양 형태적 특성도 이차대사산물인 Lovastatin의 합성을 향상시키는데 상당 부분 기여했다고 결론지을 수 있었다.

참고문헌

1. Cruger, W. and Cruger, A. (1990) *In Biotechnology : A textbook of Industrial Microbiology*, pp. 1-58, Science Tech Publishers.

2. Victor, A. V. and Graham, B. (1998) *In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 103-113, American Society for Microbiology Washington, D.C.
3. P. Rama Mohan Reddy, Gopal Reddy (1999) Production of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogens* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrients levels using response surface methodology, *Bioprocess eng.* 497-503

Table 1. Levels of production medium in experimental design (g/L)

	-2	-1	0	+1	+2
C	45	60	80	100	125
N-1	13.5	18	24	30	37.5
N-2	1.40	1.87	2.5	3.12	3.90
P	3.37	4.5	6	7.5	9.37

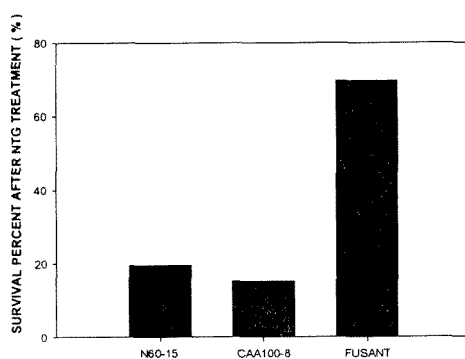
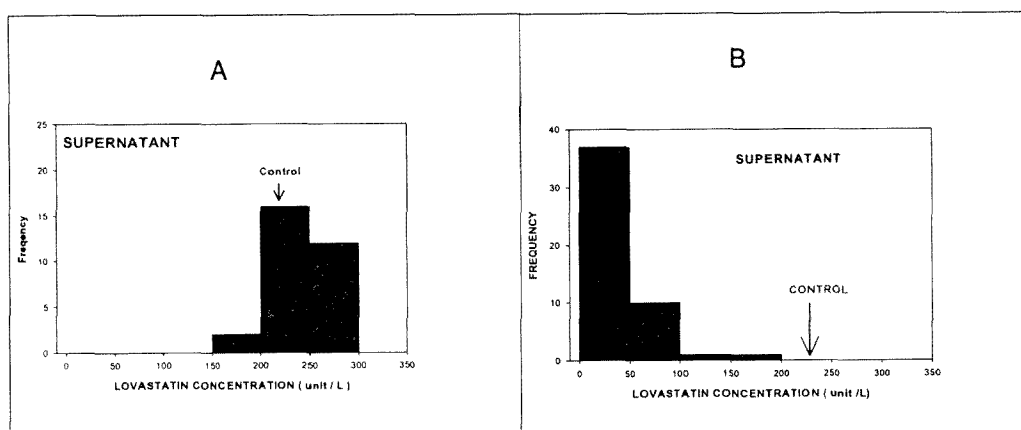


Figure 1. Effect of NTG treatment on the survival of non-fusants and protoplast recombinants.



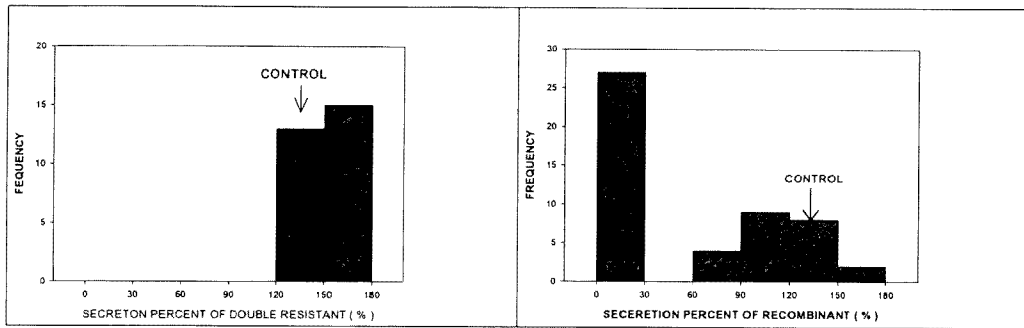


Figure 2. Comparison of Lovastatin production and secretion percent between (A)double resistants and (B)protoplast fusants obtained by protoplast mutation method.

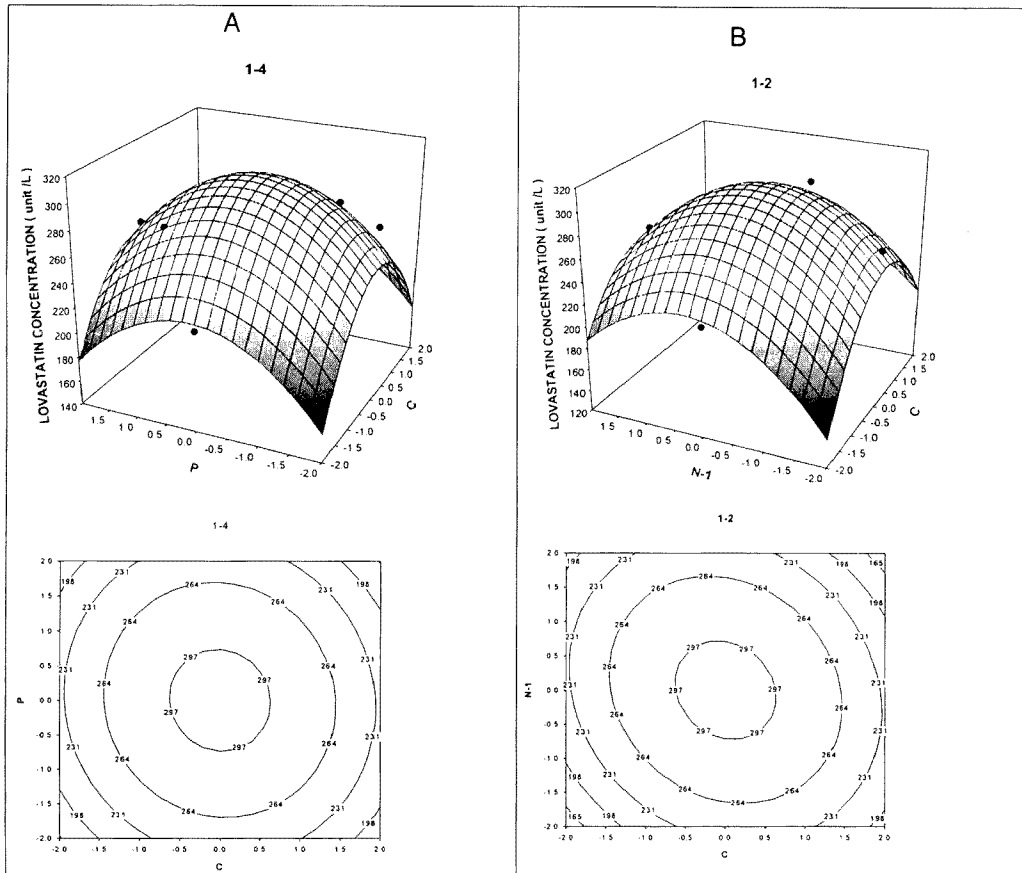


Figure 3. 3-D response surface and contour plot of Lovastatin production as a function of (A)carbon source and phosphate source and (B)carbon source and nitrogen source-1