

Lovastatin Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus terreus* and Its Application for Animal Feed Additive

Jiyong Yoon and Kyuboem Han

Hanson Biotech Co., Ltd, IACRI 201, Hannam University, 133 Ojung-dong, Daeduk-gu,
Deajeon 306-791, Korea

TEL: +82-42-628-7095, FAX: +82-042-628-7096

Abstract

Solid-state fermentation of lovastatin by *Aspergillus terreus* was investigated using commercially available 1.2 L polypropylene bottle designed for mushroom cultivation. Moist solid raw materials such as corn, rice, and soy bean were tested and corn was found to be most suitable for an economical production of lovastatin. 50% or higher water addition prior to the sterilization of corn was effective for the maximal lovastatin production. About 0.5% (w/w) lovastatin content in dried cells and corn mass was obtained after 20 days of solid-state fermentation at 30°C. For safety concerns, aflatoxin B1 and citrinin levels after fermentation were assayed but they were not detected. Lovastatin containing cells and corn residue after fermentation were autoclaved, dried, crushed, and fed to chicken for a period of 3 weeks. Approximately 20% reduction of blood cholesterol level of chicken was observed.

서 론

고상배양 (solid-state fermentation) 방법은 오래전부터 전통 발효식품이나 효소를 만드는데 이용되어 왔다. 서구에서는 프로세스 컨트롤 문제 등으로 인해 진균류 발효 방법을 액상배양 (submerged fermentation) 방법으로 오래 전에 바꾸었었으나, 근래 고상배양의 장점들 때문에 다시 관심을 기울이고 있는 추세이다(1, 2).

콜레스테롤합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase와 결합하여 콜레스테롤 전구체인 mevalonic acid 합성을 억제하는 lovastatin은 체내 콜레스테롤 축적을 저해하여 성인병중 하나인 고지혈증을 치료하는데 쓰이고 있다 (3-5). Monacolin-K라고도 불리우는 lovastatin은 황국균 *Aspergillus terreus*, 홍국균 *Monascus sp.* 등의 진균류에서 만들어지며, polykeptide 생합성 경로를 통해 이차대사산물로 lovastatin을

생성하는 것으로 알려져 있다(6, 7). 쌀을 이용한 고상배양법이 보편화된 홍국균 *Monascus*에 비해 황국균 *Aspergillus*는 액상배양법에 의해 lovastatin이 생산되어 왔는데 (8), 본 연구에서는 기존 버섯재배용 플라스틱 통과 값싼 곡물을 주 배양 원료로 이용한 황국균 고상배양 방법을 통해 경제적으로 lovastatin을 생산할 수 있는지와 lovastatin 함유 고상배양물을 이용한 저 콜레스테롤 육류생산 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험에는 *Aspergillus terreus* ATCC20542를 돌연변이시킨 균주를 이용하였고, 종균은 peptone 5 g/L, 대두분 20 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, NaCl 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, glucose 200 g/L이 첨가된 배지에서 30°C, 150 rpm으로 설정된 인큐베이터에서 7 일 동안 액상 배양 후 사용하였다. 실험에 사용한 옥수수, 쌀, 콩은 시중에서 구입하였으며, 실험조건에 따라 600 g씩 1.2 L 버섯재배용 통에 다양한 양의 물과 혼합하여 넣고 121°C에서 1시간 멸균하고 식힌 후 사용하였다 (Fig 1). 준비된 종균 5%를 통 상부에 접종한 후(30 mL/통) 항온실에서 정치 배양하였으며, 총 20일 동안 배양을 실시하였다. 고상배양이 끝난 곡물은 121°C에서 1시간 멸균한 후 70°C 건조기에서 48시간 동안 함수율이 5%이하가 되도록 건조하였다. 건조물은 분쇄 후 lovastatin 뿐만 아니라 aflatoxin B1과 citrinin 함량도 분석하였다.

Lovastatin이 함유된 배양물은 산란계에 투여되는 lovastatin 양에 따라 대조군, 1.25, 2.5, 12.5, 125, 250, 500 mg/일/마리 군으로 나누고 1 군당 5마리의 닭을 배정하여 매일 급여한 후 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플은 닭의 혈액을 투여 전, 3일 후, 7일 후 세 번에 걸쳐서 채취하여 콜레스테롤 수치를 측정하였다.

Lovastatin 함량분석은 TLC와 HPLC법을 이용하였다. TLC조건은 건조 시료 0.1 g에 ethyl acetate 2.4 mL과 증류수 1.6 mL로 하고 2시간 진탕하여 lovastatin을 추출하였다. 추출 후 상등액 층에서 15 μL 취하여 박판에 loading하였으며, 전개액으로는 ethyl acetate와 hexane을 2:1로 혼합해 사용하였고, staining solution으로 phosphomolybdic acid 10 g, sulfuric acid 5 mL, acetic acid 5 mL, ethyl alcohol 200 mL를 혼합하여 사용하였다. Staining 후 100°C의 가열판으로 구워 나타나는 띠의 생성유무를 확인하였고, 샘플 띠의 강도를 lovastatin standard의 띠와 대비해 샘플의 lovastatin 함량을 계산하였다. HPLC는 TLC법으로 정량된 시료를 재확인하는데 사용하였는데, 조건은 컬럼으로 Microsorb-MV C18 10 μm 을 사용하였고 이동상으로 methanol 800 mL와 증류수 200 mL 그리고 acetic acid 1.2 mL를 혼합해 사용하

였으며 이동상 유량은 1 ml/min으로 하였고, injection 양은 standard 및 시료 모두 0.1 mL로 하였다. Aflatoxin B1의 함량 분석은 부경대 사료영양연구소에 의뢰하여 검출유무를 확인하였으며, citrinin의 함량분석은 순수 citrinin(Sigma)을 표준시료로 하여 HPLC를 이용해 분석하였다. 산란계의 혈액 콜레스테롤 측정은 병원 혈액 검사에서 사용하는 콜레스테롤 진단 키트를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

버섯배양용 통을 이용하여 옥수수, 쌀, 콩을 주원료로 50% 수분, 30°C 온도조건에서 20일간 고상 배양하였을 때, 세포성장은 콩에서 가장 왕성하였으나 건조 후 lovastatin 함량은 큰 차이를 나타내지는 않았다. 가격이 저렴한 옥수수를 주원료로 glucose를 여러 농도로 첨가하였을 때 20일 배양 후 0.5% (w/w) 정도의 lovastatin이 생성되었음을 TLC 법으로 확인할 수 있었고, glucose 첨가량에 따른 lovastatin 함량 변화는 그다지 크지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2). 옥수수와 물 이외에 아무 것도 첨가되지 않은 배지에 20일 간 배양한 시료를 건조 후 유기용매 추출하여 HPLC로 정량한 결과 0.57%(w/w)의 lovastatin이 생성된 것으로 확인되었다. 이는 1.2 L 버섯 배양통 1개당 약 300 g의 발효건조분말이 얻어지는 것을 고려할 때 1개 배양통 당 약 1.5 g의 lovastatin을 얻을 수 있음을 의미하며, 충분히 경제적으로 lovastatin을 고상배양을 통해 생산할 수 있음을 보여주는 것이다.

옥수수 무게 대비 첨가된 수분함량의 변화가 lovastatin 생산성에 미치는 영향을 알아본 결과 50% 이상에서 lovastatin 함량이 제일 높았고, 30%에서는 lovastatin 함량이 줄어든 것으로 보아 적당량의 수분은 lovastatin 고상배양에 반드시 필요한 것으로 판단된다(Fig 3). 한편, 수분 50% 함량에서 배양온도 25°C와 30°C 비교시험 결과 30°C에서 lovastatin 함량이 더 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Lovastatin 함유 발효배양물에서는 인체에 유해한 aflatoxin B1 및 citrinin이 전혀 측정되지 않았으며, 산란계에게 여러 농도로 급이 한 결과 마리 당 lovastatin 2.5 mg/일 투여한 군부터 7일 후 혈 중 콜레스테롤 수치가 약 20% 정도 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이는 lovastatin 함유 발효배양물을 가축에게 일정기간 급이 시 콜레스테롤이 낮은 육류를 생산할 수 있는 가능성을 보여주는 결과라고 생각된다.

References

1. Pandey A., Selvakumar P., Soccol C. R., Nigam P. (1999), Solid state fermentation

- for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* **77**: 149-162.
2. Pandey A, Soccol C. R., Mitchell D. (2000), New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochem.* **35**: 1153-1169.
 3. Stryer, L. (1995), In *Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman & Company, New York, pp 685-712.
 4. Tobert, J. A. (1987), New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation* **76**: 534-538.
 5. Tobert, J. A. (1988), Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *Am. J. Cardiol.* **62**: 28J-34J.
 6. Manzoni M, Rollini M (2002), Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 555-564.
 7. Kennedy J, Auclair K, Kendrew S. G., Park C., Vederas J. C., Hutchinson C. R. (1999), Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**: 1368-1372.
 8. Buckland B., Gbewonyo K., Hallada T., Kaplan L., Masurekar P. (1989), Production of lovastatin, an inhibitor of cholesterol accumulation in humans. In: Demain A. L., Somkuti G. A., Hunter-Cevera J. C., Rossmore H. W. (eds), *Novel microbial products for medicine and agriculture*. Elsevier, Amsterdam, pp 161-169.

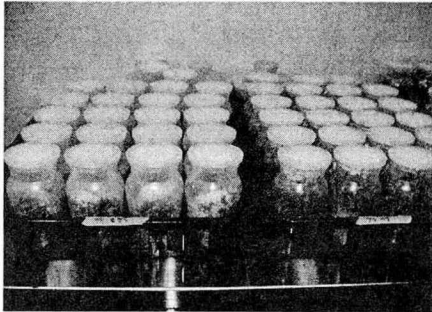
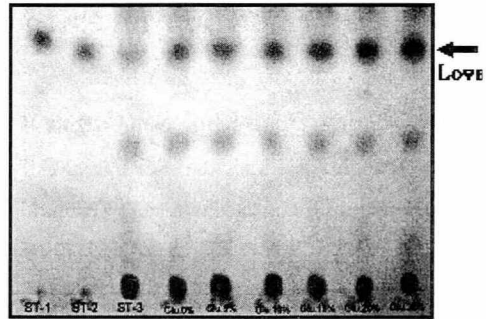


Fig. 1 버섯재배용 플라스틱 통을 이용한 Lovastatin 고상배양



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 2 Effect of glucose concentration on the production of lovastatin in solid-state fermentation using corn (1: 0.5% lovastatin std, 2: 0.4% lovastatin std, 3: 0.3% lovastatin std, 4: w/o glucose addition, 5: 5% glucose, 6: 10% glucose, 7: 15% glucose, 8: 20% glucose, 9: 30% glucose addition)

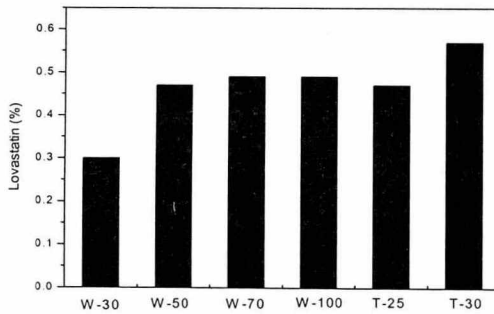


Fig. 3 Effect of water content on the lovastatin production (W-30: 30% water addition, W-50: 50% water addition, W-70: 70% water addition, W-100: 100% water addition, T-25: 50% water addition in solid-state fermentation at 25°C, T-30: 50% water addition in solid-state fermentation at 30°C)

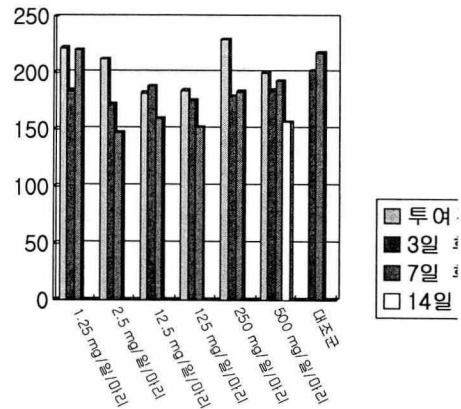


Fig. 4 Lovastatin 함유 발효배양물 급여 후 산란계의 혈 중 콜레스테롤 함량 변화