

Aspergillus terreus에 의한 Lovastatin 생산에 배지성분이 미치는 영향

김 병 곤 · †정 용 섭 · ¹전 계 택 · ²이 영 행
전북대학교 응용생물공학부, ¹강원대학교 생명과학부, ²원광대학교 화학과
(접수 : 1998. 8. 27., 게재승인 : 1999. 1. 5.)

Effect of Medium Components on the Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus*

Byung-Gon Kim, Yong-Seob Jeong†, Gie-Taek Chun¹, and Young-Haeng Lee²
Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756 Korea
¹Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea
²Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea
(Received : 1998 8 27.. Accepted : 1999. 1. 5)

The biosynthesis of Lovastatin, a cholesterol lowering agent formed by the filamentous fungus *Aspergillus terreus*, was investigated in shaking flask. The effects of essential elements in the experimental medium such as carbon, nitrogen, phosphate sources, and amino acids were examined to increase Lovastatin productivity. Lovastatin production in shaking flasks was 68 mg/L in the used medium. Effect of carbon source on Lovastatin production was performed. As a carbon source in the medium, 45 mL/L of glycerol increased the Lovastatin production up to 256 mg/L, which was found to be improved almost 35 times in comparison with that in common medium. The optimum concentration of peptonized milk as nitrogen source was obtained 30g/L on Lovastatin production. The severe inhibition of the cell growth and the Lovastatin production were observed in shaking flasks conducted at the medium contained ammonium carbonate as a nitrogen source. Lovastatin production at various concentrations of several phosphate compounds was also examined. The addition of either potassium phosphate dibasic or sodium phosphate dibasic increased the Lovastatin production and the optimal level of potassium phosphate dibasic was 6 g/L. Even though Lovastatin contain methionine-derived methyl group, L-methionine and DL-methionine tend to diminish the Lovastatin production. Among the amino acids, L-histidine and L-tryptophan had a remarkable enhancing effect on the Lovastatin production. The optimal concentration of L-histidine and L-tryptophan was 6g/L.

Key Words Lovastatin, cholesterol lowering agent, secondary metabolite, *Aspergillus terreus*

서 론

Lovastatin은 naphthalene ring system, β -hydroxylactone 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 고지혈증 치료제이다(1, 2). 고지혈증(hyperlipidemia)은 혈관 속의 지질의 양에 이상이 생긴 상태로서, 이로 인해 혈관이 축소되거나 딱딱 각종 심혈관 질환을 일으키는 현대의 주요 질병 중의 하나이다(3). 지질의 이상은 콜레스테롤 또는 중성지방의 양이 적정치 이상으로 존재하는 것을 말하며, 고콜레스테롤혈증으로도 알려져 있다. 체내의 총 콜레스테롤의 약 1/3은 음식을 통해서, 나머지 2/3는 주로 간과 장에서 합성된다. 따라서 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해서는 식이와 함께 체내에서 생성되는 콜레스테롤을 감소시키는

것이 중요하다.

콜레스테롤 생합성경로의 율속단계중 마지막 단계에 관여하는 효소인 desmosterol 환원효소에 의해 촉매되는 desmosterol의 sterol로의 전환을 저해하는 triparanol 등이 콜레스테롤 지해제로서 초기에 연구되었다. 그러나 이 경우에는 mevalonate 이후의 중간대사산물들이 체내에 축적되어 부작용을 나타내는 것으로 알려졌다. 그러므로 부작용을 최소화할 수 있는 방법을 모색하였으며, 그 대안으로 Figure 1과 같이 콜레스테롤 생합성경로에서 desmosterol 환원효소보다 앞선 초기의 율속단계인 HMG-CoA 환원효소가 관여하는 반응을 저해하는 것이 바람직하지 않은 중간대사산물의 축적없이 콜레스테롤의 생합성을 저하시킬 수 있는 최선의 방법으로 보고되었다(4)

Lovastatin의 작용기전은 Lovastatin의 구조가 콜레스테롤 합성을 조절하는 가장 중요한 효소인 HMG-CoA(hydroxymethylglutarylcoenzyme A) 환원효소의 결합하는 HMG-CoA와 유사하여, HMG-CoA 대신 HMG-CoA 환원효소와 미리 결합함으로써 mevalonate의 합성을 저해한다. 그 결과 콜레스테롤 생합성 속도를 제한하여 혈관 속의 콜레스테롤 수치를 효과적으로

† Corresponding Author ; Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel : 0652-270-2571, Fax : 0652-270-2572
e-mail : ysjeong@moak.chonbuk.ac.kr

감소시킨다고 알려져 있다. HMG-CoA 환원효소 저해제는 기능의 종류에 따라 4가지(Lovastatin, Mevastatin, Simvastatin, Pravastatin)로 알려져 있으며, 이중에서 Lovastatin이 가장 강한 콜레스테롤 저하효과를 갖고 있어 고콜레스테롤혈증 환자의 치료에 선호되고 있다(5).

Lovastatin은 Figure 2와 같이 균사형성 곰팡이인 *Aspergillus*

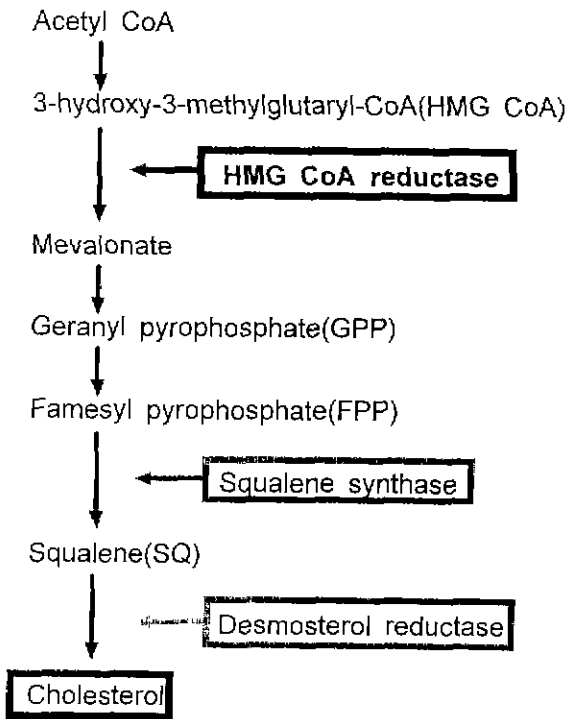


Figure 1. Cholesterol biosynthetic pathway.

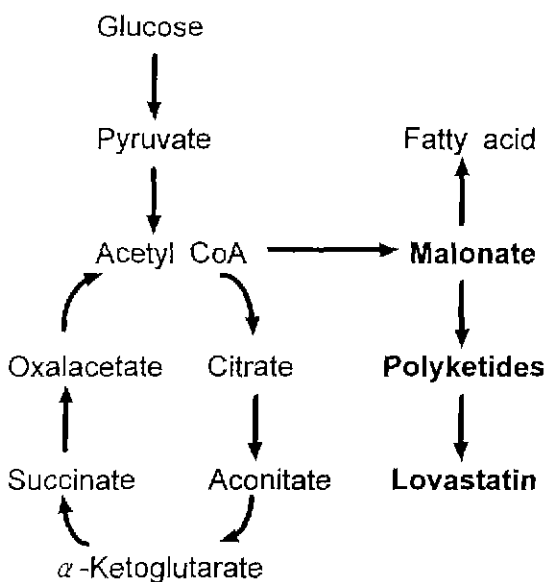


Figure 2. Lovastatin biosynthetic pathway.

*terreus*에 의해 polyketide 생합성 경로를 통해 이차대사산물로 생성된다(6). 거의 모든 미생물에서 일차대사는 세포의 성장과 증식에 중요한 생합성 경로와 밀접한 관계가 있으며, 생합성 중간 물질과 에너지를 공급한다. 이와 달리 이차대사는 소수의 미생물에서만 이루어지는 것으로 세포의 성장이나 증식에 중요하지 않은 생합성 경로이다(7). 이차대사산물은 일차대사산물과 구별되는 특이한 화학구조를 가진 화합물로, 이차 대사산물의 생합성을 조절하는 것은 일차 대사산물의 조절과 상당히 다르다. 대수적으로 미생물이 성장하는 단계를 “trophophase”라 하고, 그 뒤에 이어지는 단계를 “idiophase”라 하는데, 일반적으로 trophophase에서는 일차대사가 일어나고 idiophase에서는 이차대사가 일어난다(8). 그러나 이차대사는 생산 균주의 유전적 변형이나 배양 조건의 변화에 의해 다른 양상을 보이므로, 배지의 성분을 달리하거나 배양조건을 변화시키면 성장이 일어나는 일차대사와 생산단계인 이차대사가 동시에 일어날 수도 있다(9).

배지성분은 균체량과 대사산물 생산을 위한 기본 조건을 만족시켜야 하며 생합성과 세포 유지를 위해 충분한 에너지를 공급해야 한다. 그러나 이차대사산물 생산균주의 생리학적 특성은 배양액 내에 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이나 질소원 등이 적정농도 이상으로 존재할 경우 일차대사에 의한 세포 성장은 매우 활발한 반면 이차대사산물 생합성 경로는 심하게 저해받는 경향이 있다. 이와 같이 일반적으로 이용되는 배지성분이 가해졌을 때 이화대사경로의 핵심적인 효소가 억제(repression), 저해(inhibition) 또는 비활성화(inactivation)되는 조절기작을 이화 대사물질 조절이라 한다(10).

탄소원은 이차대사산물을 생산하는 미생물의 세포유지를 위해 필요한 탄수화물, 지질과 nucleotides내의 당을 생합성하는데 이용되며 에너지를 공급하는 역할을 한다. 신속하게 대사되는 포도당과 같은 당은 미생물의 성장에 좋은 탄소원이지만 이차대사산물의 생산을 저해한다. 이러한 것을 탄소원에 의한 이화 대사산물 억제라 하며 많은 예들에서 이같은 사실이 증명되었다(9, 11). 이 문제를 해결하는 방법은 쉽게 이용되는 탄소원을 느리게 이용되는 탄소원으로 대체하여 이차대사산물의 생산을 증진시키거나, 쉽게 이용되는 탄소원과 그렇지 않은 탄소원을 동시에 공급하여 균체의 성장 조절로 인한 이차대사산물의 생산이 증가되도록 할 수 있다(12). 그 외 방법으로는 돌연변이 유도과 같은 미생물의 유전적 변형을 유도해서 탄소원에 의한 이화 대사산물 억제를 극복하는 방법이 있다(13).

이차대사산물의 화학적 구조 중에 질소가 포함되어 있지 않더라도 이차대사는 질소원자가 참여하는 일차대사에 의해 유도되기 때문에 이차대사에 있어 질소원은 중요한 역할을 한다(14). 탄소원의 경우처럼 NH₄⁺나 NO₃⁻같은 빠르게 이용되는 질소원은 이차대사를 저해하는데 반해 느리게 이용되는 질소원은 이차대사산물의 생합성에 적합하다(13). 이차대사산물의 형성은 질소원이 고갈된 후에 시작되며, 이차대사산물의 생산은 배지내에 존재하는 질소원의 종류와 농도에 의해 영향을 받는다(15). 그러므로 이차대사 산물의 생산을 위해서는 질소원을 반드시 고려해야 한다.

미생물의 성장을 위해서는 0.3~300 mM 농도범위의 무기인산염(P_i)이 필요하다. 그러므로 훨씬 낮은 농도의 인산염에서는 이차대사뿐만 아니라 일차대사가 원활히 일어나지 않는다. 또한 높은 농도의 인산염은 일차대사에는 좋지만 이차대사산물의 생

산을 저해한다. 인산염 조절 메카니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 인산염이 이차대사산물이 형성되는 단계보다 앞선 대사경로를 조절하고 이차대사산물의 생합성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(10). 또는 이차대사에 관여하는 유전자(gene)나 효소를 저해한다고 알려지고 있다(16).

아미노산은 이차대사산물의 생산을 위한 중요한 인자이다. 아미노산의 역할은 생산균주 및 생산물에 따라 다양하지만 이차대사산물의 전구물질, 이차대사에 관여하는 효소의 유도물질 및 developmental regulator로서 중요한 작용을 한다. Lee와 Agathos(17)는 L-valine이 *Tolypocladium inflatum*에 의한 cyclosporin A 생산시 관여하는 효소의 유도물질이나 전구물질로서 작용함을 보고하였다. 그들은 이처럼 유도물질로 작용하는 아미노산은 이차대사산물의 생산량을 증가시키기 위해 지수성장기에 공급되는 것이 좋으며, 세포가 왕성하게 성장하는 시기에 아미노산을 첨가하면 이차대사에 관여하는 유전자의 전사에 영향을 미쳐 이차대사에 유리한 쪽으로 세포를 유도하기 때문이라고 언급했다(17).

본 연구에서는 *Aspergillus terreus*에 의한 이차대사산물인 Lovastatin 생산을 위해 배지성분 중의 중요한 탄소원, 질소원, 인산염 및 아미노산이 콜레스테롤 저해제인 Lovastatin 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Aspergillus terreus*(ATCC 20542)이며 -70°C에서 glycerol stock으로 보관하여 증배양시 마다 새로운 stock을 사용하였다.

배지 및 배양조건

증배양을 위해 사용된 배지의 조성은 sucrose 80 g/L, trypton 40 g/L, urea 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 g/L, NaNO_3 3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L solution) 1 mL/L이었다. 증배양은 하루전 배양온도에서 활성화시킨 4 mL의 보존 배양종을 80 mL의 배지를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하여 진탕 배양기에서 27°C, 200 rpm으로 90시간 배양하였다. 본 배양을 위해 증배양액을 과채하여 균질화 시킨 후 80 mL의 Lovastatin 생산배지에 2 mL씩 접종한 후 27°C, 200 rpm으로 8일간 진탕 배양하였다. 실험의 오차를 감안하여 플라스크 배양시 한 요인에 대하여 3 반복의 실험을 실시하여 평균값을 나타냈다. Lovastatin 생산배지의 조성은 포도당 45 g/L, peptonized milk 24 g/L, yeast extract 2.5 g/L, polyethylene glycol 2,000 2.5 g/L이었으며, 살균후 pH가 7.4가 되도록 하였다(1).

분석방법

균체농도를 측정하기는 위하여 blender에서 균질화 과정을 거친 배양액 시료를 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버린 후 증류수를 넣어 좌워 혼합을 하고 다시 원심분리하는 세척과정을 3번 거친 후 105°C에서 항량을 구하여 건조균체량(Dry Cell Weight, DCW)을 측정하였다.

Lovastatin의 분석은 Kysilka와 Křen의 방법(18)을 참고하여

Table 1. HPLC condition for Lovastatin analysis.

HPLC	Shimadzu LC-10AD
Detector	UV detector
Absorbance	238 nm
Temperature	30°C
Column	Waters, μ Bondapak C18 reverse-phase column (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	methanol 18 mM α -phosphoric acid(77.5 : 22.5)
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	10 μ l

HPLC로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

Lovastatin 표준용액으로는 순수한 Lovastatin을 농도별로 methanol에 용해하여 사용하였고, mevinoinic acid(acid form) 표준용액(19)은 소량의 methanol에 Lovastatin을 녹인 후 0.1M NaOH을 가한 뒤 음과과채하고 1시간 동안 50°C에서 가열시킨 뒤 1M HCl로 pH를 7.7로 조정하면 후 0.2 μ m 막으로 여과하여 얻었다. Lovastatin(lactone form)과 mevinoinic acid(acid form)를 각각 농도 30 ~ 150 mg/L의 범위에서 분석을 실시하여 검량곡선을 얻었으며, 각 농도에 따라 두 물질을 1 : 1로 혼합하여 30 ~ 150 mg/L의 범위에서 분석을 실시하여 두 물질이 공존하는 경우에 대한 검량곡선을 얻었다. 액체 배양한 균체의 생산물을 정량하기 위해 배양액을 과채한 후 일정량을 취하고 동량의 methanol을 가한 뒤 30°C에서 200 rpm으로 1시간동안 진탕하였다. 그 후 배양액을 Whatman사의 이파지 No.4로 여과한 뒤 다시 0.2 μ m 막으로 여과하였다. 여과액을 표준용액으로 실시한 분석조건과 같은 조건하에서 HPLC를 실행하고 이미 얻어진 검량곡선을 이용하여 생산물의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

Polyethylene glycol이 Lovastatin 생산에 미치는 영향

발효시 생성되는 거품제거 및 균체 펠릿 형성 효능이 있다고 알려진(20) polyethylene glycol(PEG)의 분자량이 다른 PEG 600, PEG 1,000 및 PEG 2,000을 각각 1 g/L, 2.5 g/L, 5 g/L 씩 배지에 공급하였다. 그 결과로서 PEG 종류 및 사용량에 따라 Lovastatin 생산에 영향을 미치는 것과 특히 PEG 처리의 경우가 PEG 무처리 경우보다 발효 중에 거품 형성이 적은 것을 알 수 있었다. 또한 사용된 PEG 종류에 따라 Lovastatin 생산과 관계가 있는 균체 펠릿의 뚜렷한 크기 차이를 육안으로 구별할 수 없었다. 영상 해석 장치를 이용한 연구가 이 부분에서 필요하다고 판단된다. 사용된 모든 PEG는 배양 중 발생하는 거품을 최소화하는 소포제 역할을 하기에 충분하였다. 특히 Table 2에서 보여준 것과 같이 여러 종류의 PEG 중에서 농도 2.5 g/L의 PEG 2,000을 사용한 경우가 Lovastatin 생산에 영향을 크게 미쳤다.

탄소원의 종류 및 농도가 Lovastatin 생산에 미치는 영향

Lovastatin 생산성이 높은 생산 배지를 선정하기 위하여 기준 탄소원인 포도당 45 g/L대신 100 g/L와 120 g/L의 포도당, 일 반적으로 널리 탄소원으로 이용되는 과당, 맥아당, 유당, 자당 각 45 g/L 및 글리세롤(95%) 45 mL를 단일 탄소원으로 검토

Table 2. Effect of polyethylene glycol(PEG) on the production of lovastatin

		Lovastatin(mg/L)	Dry cell weight(g/L)
PEG	0 g/L	35.83	18.12
PEG 600	1 g/L	33.14	13.95
PEG 600	2.5 g/L	23.60	14.13
PEG 600	5 g/L	43.55	15.47
PEG 1000	1 g/L	32.08	15.46
PEG 1000	2.5 g/L	28.45	15.28
PEG 1000	5 g/L	67.00	18.83
PEG 2000	1 g/L	45.77	19.47
PEG 2000	2.5 g/L	68.20	16.46
PEG 2000	5 g/L	52.34	18.04

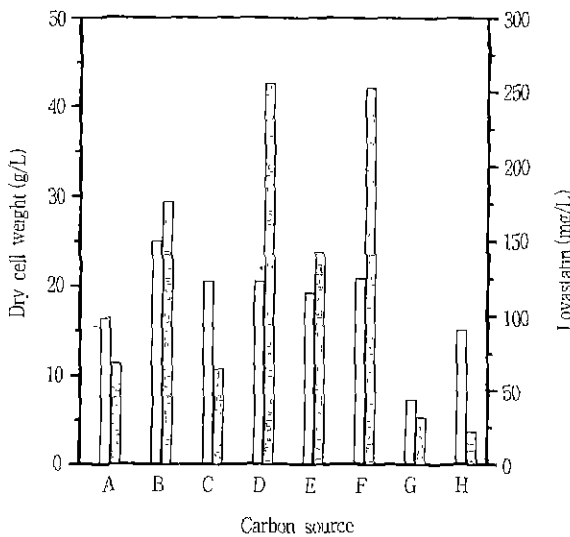


Figure 3. Effect of various carbon sources on the production of lovastatin(□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration).

A: glucose 45 g/L; B: glucose 100 g/L; C: glucose 120 g/L; D: glycerol 45 mL/L; E: fructose 45 g/L; F: maltose 45 g/L; G: lactose 45 g/L; H: sucrose 45 g/L

한 결과를 Figure 3에 나타냈다. 이때 탄소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 '배지 및 배양조건'에서 기술한 바와 같다. Lovastatin 생산량이 68 mg/L인 포도당 45 g/L와 비교하여 글리세롤 45 mL/L와 맥아당 45 g/L의 Lovastatin 생산량은 각각 256 mg/L와 253 mg/L로 약 3.5배 이상 높은 Lovastatin 생산량을 나타내었다.

글리세롤이 맥아당에 비하여 저렴하므로 글리세롤을 탄소원으로 공급하는 것이 Lovastatin 생산에 더 효과적이라고 판단하였다. 단일 탄소원으로서 글리세롤이 높은 Lovastatin 생산량을 나타낸 것은 글리세롤이 포도당과 같이 일차대사에 이용되기 쉬운 탄소원이 아니므로, 이차대사에 대한 탄소원에 의한 이화 대

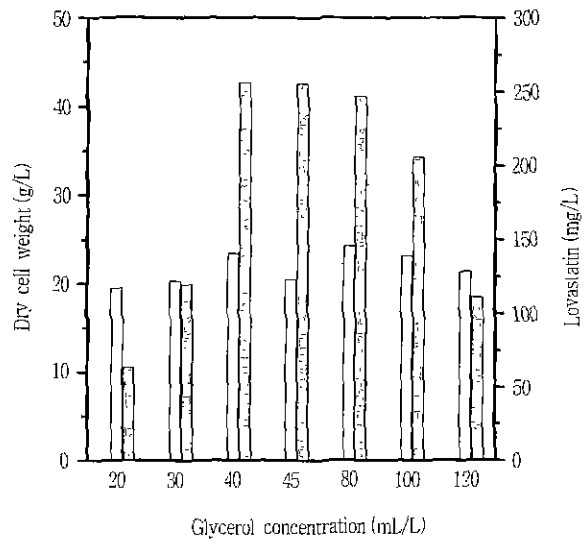


Figure 4. Effect of glycerol concentration on the production of lovastatin(□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration).

사 산물 억제제가 나타나지 않았기 때문이라고 생각된다. 이런 이유로 45 mL/L의 글리세롤 이외에 20, 30, 40, 80, 100, 120 mL/L의 글리세롤을 단일 탄소원으로 가하여 글리세롤의 농도가 Lovastatin 생산량에 미치는 영향을 Figure 4에 나타냈다. 글리세롤 40 mL/L와 45 mL/L는 Lovastatin 생산량이 256 mg/L였으며, 이보다 농도가 낮은 글리세롤 20 mL/L와 30 mL/L에서는 50%이하의 낮은 Lovastatin 생산량을 나타내었다. 하지만 이때 건조균체량의 큰 변화는 없는 것으로 보아 낮은 농도에서는 일차대사 외에 이차대사에 이용할 탄소원이 부족하였던 것으로 생각된다. 또한 배지 중의 글리세롤의 농도가 120 mL/L인 경우 건조균체량은 뚜렷한 차이가 없었으나, 글리세롤 40 mL/L와 45 mL/L와 비교하여 낮은 Lovastatin 생산량을 나타내었다. 이는 높은 탄소원 농도로 인한 저해로 이차대사가 원활히 이루어지지 않은 이유라고 생각된다.

Figure 2에서 이미 제시된 것처럼 공급된 탄소원은 malonate로 전환되어 지방산의 생합성에 이용되거나 polyketide 경로를 따라 이용된다. Lovastatin 생산이 효율적으로 되기 위해서는 malonate가 지방산 생합성에 이용되는 것을 막고 polyketide 경로로 이용되도록 유도하는 것이 바람직하다. 이런 관점에서 배지 중의 탄소원을 기름 종류로 대체하여 배양하여 결과를 Figure 5에 나타냈다. 그 결과 모든 기름에 대하여 Lovastatin 생산량이 200 mg/L 이상이었으며, 글리세롤을 탄소원으로 사용한 경우보다 Lovastatin 생산량은 사용한 기름의 종류에 따라 비슷하거나 약간 적었다. 탄소원으로 기름 종류를 사용한 모든 배양의 경우 Figure 5에 나타낸 것과 같이 건조균체량이 38~43 g/L로 비교적 높게 측정되었다. 이는 기름의 열량이 9 kcal/g로, 4 kcal/g 열량의 포도당이나 2 kcal/g 열량의 글리세롤보다 높은 열량을 기름이 제공하기 때문에 일차대사가 활발하게 일어난 것으로 판단된다. 기름 종류 중 Lovastatin 생산량이 가장 높은 것은 약자 기름이었으나, 가격이 저렴하고, Lovastatin 생산성이 양호한 옥수수 기름을 선택하여 다양한 농도에서 실험을 실시하여 Figure 6에 나타냈다. 옥수수 기름의 농도가 증가함에 따라 균

체의 농도가 증가하였으며, 옥수수 기름 60 mL/L에서 건조균체량이 약 48.3 g/L로 측정되었다 그러나 Lovastatin 생산은 옥수수 기름 45 mL/L의 농도에서 약 242.4 mg/L로 가장 높았다.

단일 탄소원을 사용한 경우 Figure 3-6에 나타낸바와 같이 글리세롤 45 mL/L 농도에서 가장 높은 Lovastatin 생산량을 보여주었다. 또한 Lovastatin 비생산성(specific productivity)도 Table 3에 보어진 것과 같이 상기 농도에서 12.5 mg Lovastatin/ g cell로 가장 높은 값을 나타내었다. 이를 바탕으로 적절한 균체성장을 위한 탄소원과 이차대사에 좋은 탄소원을 같이 공급함으로써 Lovastatin 생산량을 높이고자, 포도당, 글리세롤과 옥수수 기름을 혼합한 복합 탄소원을 매지 성분으로 공급하였으며, 그 결과를 Figure 7에 나타냈다 옥수수 기름이 탄

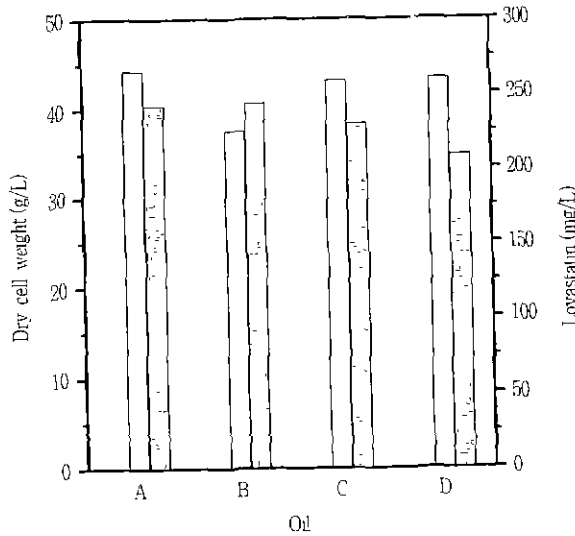


Figure 5 Effect of various oils on the production of lovastatin(□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration) A. corn oil 45 mL/L; B. coconut oil 45 mL/L; C. sunflower seed oil 45 mL/L; D. soybean oil 45 mL/L

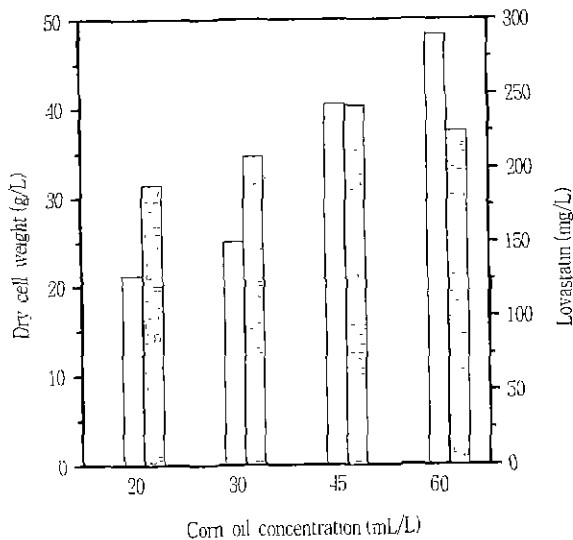


Figure 6 Effect of corn oil concentration on the production of lovastatin(□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration)

소원으로 사용된 경우 공급되지 않은 것에 비하여 32 g/L 이상의 높은 건조균체량을 나타내었으나, 글리세롤과 포도당을 혼합한 탄소원의 경우는 건조균체량이 27~28 g/L이었다. 대규모 배

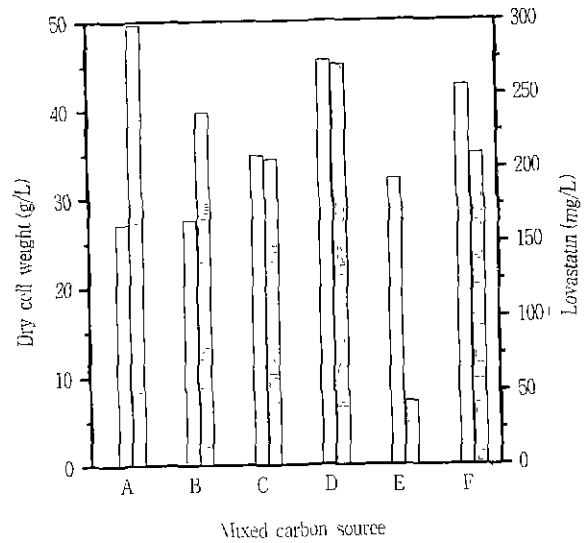


Figure 7 Effect of mixed carbon sources on the production of lovastatin(□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration)

A. glucose 50 g/L + glyccrol 50 mL/L; B. glucose 100 g/L + glycerol 30 mL/L; C. glycerol 50 mL/L + corn oil 20 mL/L; D. glycerol 50 mL/L + corn oil 50 mL/L; E. glycerol 100 mL/L + corn oil 20 mL; F. glucose 50 g/L + corn oil 50 mL/L

Table 3 Comparison of specific production in production medium using various carbon source

Carbon source(L)	$Y_{p/x}$ (mg Lovastatin/g-cell)
glucose 45 g	41
glucose 100 g	7.1
glucose 120 g	3.1
fructose 45 g	7.4
maltose 45 g	12.1
lactose 45 g	44
sucrose 45 g	15
peptonized milk	
glycerol 20 mL	3.2
glycerol 30 mL	5.9
yeast extract	
24 (g/L) glycerol 40 mL	10.9
2.5 (g/L) glycerol 45 mL	12.5
glycerol 80 mL	10.2
PEG 2,000	
: 25 (g/L) glycerol 100 mL	8.9
glycerol 120 mL	5.2
coconut oil 45 mL	6.5
sunflower seed oil 45 mL	5.3
soybean oil 45 mL	4.8
corn oil 20 mL	8.9
corn oil 30 mL	8.3
corn oil 45 mL	6.0
corn oil 60 mL	4.7

양시 균체량이 높으면 교반 및 산소전달의 문제가 발생할 수 있다 그러므로 반응기내에 적절한 균체량을 유지하는 것이 이차 대사 생산물 생산에 중요하다. 포도당 50 g/L와 글리세롤 50 mL/L을 혼합한 배지에서 Lovastatin 생산량이 298 mg/L로 최고치를 보여주었다. 이 결과는 포도당 45 g/L인 기본 배지를 이용한 Lovastatin 생산량보다 약 4배 이상 증가한 것이다

다양한 탄소원을 한 가지인 또는 두 종류를 혼합하여 배지로 사용한 결과로부터, 사용된 탄소원에 따라 Lovastatin 생산량이 다양함을 알 수 있었다. 같은 탄소원의 경우 일반적으로 탄소원의 농도가 증가함에 따라 건조균체량은 증가하였으나, 이에 비례하여 Lovastatin 생산량이 증가하지는 않았다 이는 이차대사 산물은 일차대사산물과 달리 균체 성장에 필수적인 영양분의 고갈이나 탄소원을 이용하기 어려울 때 이차대사산물이 생성되기 때문이다. 적절한 균체성장을 위한 탄소원인 포도당과 이차대사에 좋은 탄소원인 글리세롤을 같이 공급할 경우 두 성분 사이의 비는 Lovastatin 생산량을 높이기 위해 더 연구해야할 부분으로 생각된다

질소원의 종류 및 농도가 Lovastatin 생산에 미치는 영향

탄소원 실험에서 가장 Lovastatin 생산량이 높았던 포도당 50 g/L와 글리세롤 50 mL/L를 탄소원으로 하여 무기 질소원 8가지와 유기 질소원 4가지가 Lovastatin 생산량에 미치는 영향을 조사하여 Figure 8에 나타냈다. 탄소원과 질소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 '배지 및 배양조건'에서 기술한 바와 같고, 각 질소원의 농도는 24 g/L였다

Lovastatin 생산량이 133 mg/L인 ammonium citrate를 제외한 나머지 7가지 무기 질소원은 72 mg/L 이하의 낮은

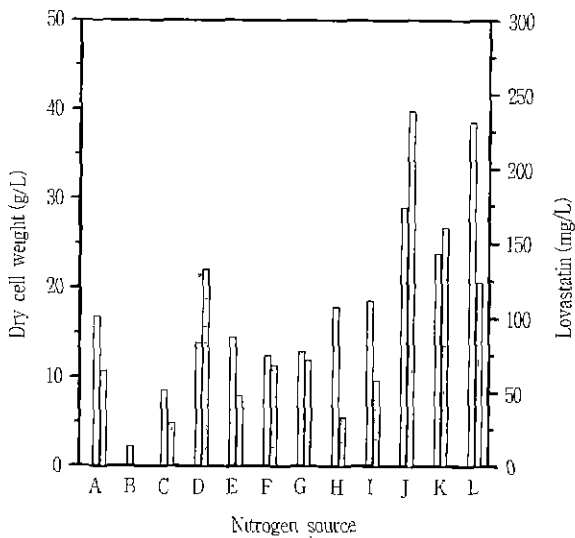


Figure 8. Effect of various nitrogen sources on the production of lovastatin(□□□□ □□□□ : Dry cell weight, □□□□ : Lovastatin concentration)

A: ammonium acetate; B: ammonium carbonate; C: ammonium chloride; D: ammonium citrate citbasic; E: ammonium nitrate; F: ammonium phosphate monobasic; G: ammonium phosphate dibasic; H: ammonium sulfate; I: pep-tone; J: peptonized milk; K: tryptone; L: yeast extract

Lovastatin 생산량을 나타내었고, Lovastatin 생산량이 38 mg/L인 peptone을 제외한 나머지 유기 질소원은 124 mg/L 이상의 Lovastatin 생산량을 나타내었다. Martin과 McDaniel (21)은 복합질소원(complex nitrogen source)이 idrophase에서의 항생물질생산이 유리하도록 trophophase의 생리적인 조건을 만든다고 보고한 바 있다. 또한 penicillin과 같은 항생물질의 발효에 있어서도 복합질소원이 무기질소원보다 더 유리하다고 알려져있다(13) 여러 질소 원 중에서 peptonized milk 24 g/L인 배지가 239 mg/L로 가장 높은 Lovastatin 생산량을 나타내었으며, 이때 건조균체량은 29 g/L였다. 그러나 같은 조건의 배지를 사용한 이전 실험의 Lovastatin 생산량이 298 mg/L이고 건조균체량이 27 g/L이었던 것에 비하면 Lovastatin 생산량은 약간 감소하고 건조균체량은 2 g/L 정도 증가한 값이다 이러한 오차의 원인은 실험에 사용한 균주가 wild type의 균주라는 점과 이차대사 산물 생산 시 있을 수 있는 실험오차 때문이라고 생각된다. 질소원 실험에서 주목할 만한 사실은 ammonium carbonate를 공급한 배지에서는 Lovastatin 생산량을 측정할 수 없을 정도로 적었으나, peptonized milk를 공급한 배지에서는 Lovastatin 생산량이 239 mg/L로 질소원에 따라 Lovastatin 생산량이 크게 영향을 받는다는 것이다. 그러므로 질소원의 공급을 조절함으로써 이차대사산물인 Lovastatin의 생산량 조절이 가능할 것으로 판단된다.

peptonized milk의 최적 농도를 알기 위해 24 g/L 이외에 12, 18, 30, 36 g/L로 농도를 달리하여 실험하여 결과를 Figure 9에 나타냈다 peptonized milk 12 g/L에서 30 g/L까지는 농도가 증가함에 따라 Lovastatin 생산량이 증가하였으나, 36 g/L의 peptonized milk에서는 Lovastatin 생산량이 감소하였다 건조균체량은 peptonized milk의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보여주었다 이상의 결과로부터 peptonized milk의 최적농도로서 Lovastatin 생산량이 가장 높은 30 g/L를 선정하였다.

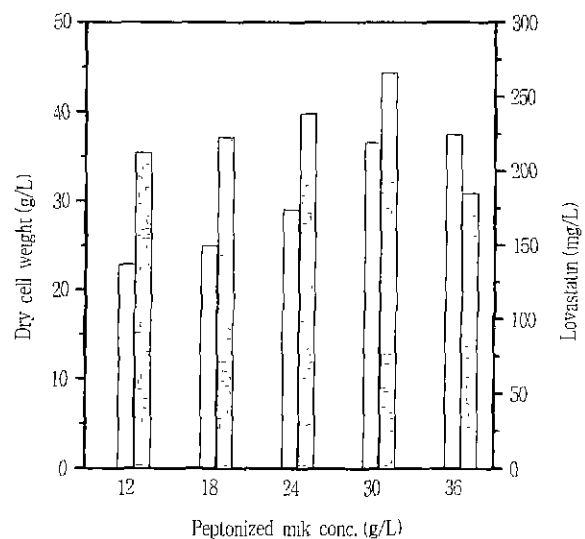


Figure 9 Effect of peptonized milk concentration on the production of lovastatin(□□□□ □□□□ : Dry cell weight, □□□□ : Lovastatin concentration)

인산염의 종류 및 농도가 Lovastatin 생산에 미치는 영향

미생물의 성장을 위해 필요한 인산염이 이차대사에 영향을 미친다는 문헌(10, 13, 22)을 참고로 포도당 50 g/L와 글리세롤 50 mL/L을 탄소원으로, peptonized milk 30 g/L를 질소원으로 정하고 나머지는 '배지 및 배양조건'에서 기술한 바와 같이 준비한 후에 여러 가지 인산염을 2 g/L씩 첨가하여 결과를 Figure 10에 나타냈다

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 첨가한 경우에는 Lovastatin 생산량이 감소하였으나, 그 나머지는 Lovastatin 생산량이 비슷하거나 증가되었다. 이러한 결과는 전적으로 인산염의 영향이라고는 말할 수 없으며, 함께 가하여진 ammonium이나 K 및 Na의 영향이라고도 할 수 있다 그러나 얻어진 결과로만 판단할 때

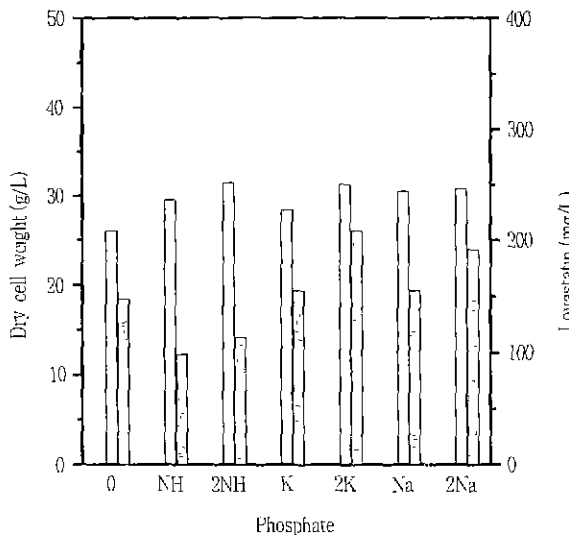


Figure 10. Effect of phosphates on the production of lovastatin (□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration) O: no phosphate, NH: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2NH: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K: KH_2PO_4 , 2K: K_2HPO_4 ; Na: NaH_2PO_4 , 2Na: Na_2HPO_4

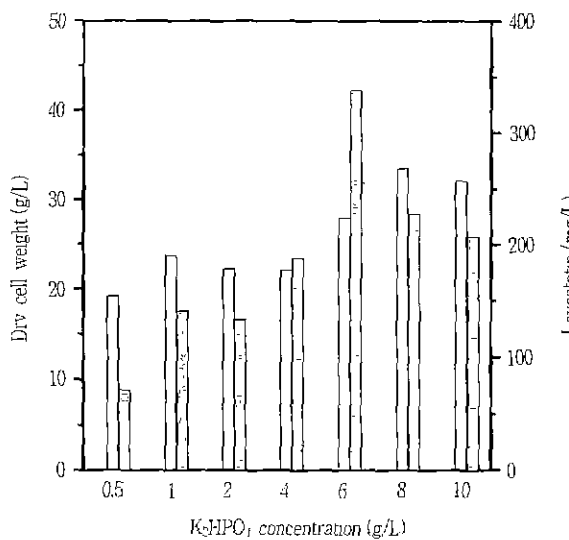


Figure 11. Effect of K_2HPO_4 concentration on the production of lovastatin (□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration).

K_2HPO_4 2 g/L를 첨가한 배지에서 Lovastatin이 가장 높았다.

가장 좋은 Lovastatin 생산량을 보인 K_2HPO_4 의 농도에 의한 Lovastatin 생산에 미치는 영향을 조사하여 Figure 11에 나타냈다. K_2HPO_4 6 g/L의 첨가시 기본배지의 Lovastatin 생산량에 비해 약 5배 증가한 Lovastatin 생산량을 보여주었다. K_2HPO_4 의 농도가 6 g/L보다 높은 경우에 균체량은 증가하나 Lovastatin 생산량이 감소하였다. 이는 Cephalosporin 생산 시 최대의 균체량을 나타내는 인산염 농도에서 Cephalosporin 생산량이 저해된다는 것과 일치한다(16). 영양성분이 고농도로 존재하는 경우에는 trophophase에서 idiophase로의 전환이 이루어지지 않아 균체 성장은 계속되고 이차대사산물의 생산은 억제되는 것으로 생각된다

각종 아미노산이 Lovastatin 생산에 미치는 영향

이차대사에서 아미노산은 전구물질로서 중요한 영향을 미치며, 질소원으로도 이용될 수 있다(15). 이를 바탕으로, 포도당 50 g/L, 글리세롤 50 mL/L, peptonized milk 30 g/L, K_2HPO_4 6 g/L, yeast extract 2.5 g/L, PEG 2,000 2.5 g/L로 구성된 배지에 14가지의 아미노산을 6 g/L씩 첨가하여 아미노산이 Lovastatin 생산에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과를 Figure 12에 나타냈다

가장 Lovastatin 생산이 좋은 것은 L-histidine이었으며 그 다음은 L-tryptophan이었다. L-histidine(Figure 12의 K)과 L-tryptophan(Figure 12의 F)은 아미노산 무치리구(Figure 12의 A)와 비교하여 건조 균체량은 비슷하였으나 2배 이상의 Lovastatin 생산량을 나타내었다 L-histidine과 L-tryptophan의 구조에 있어 공통점은 이미노기를 갖는 5원자고리환을 갖고 있다는 것이다

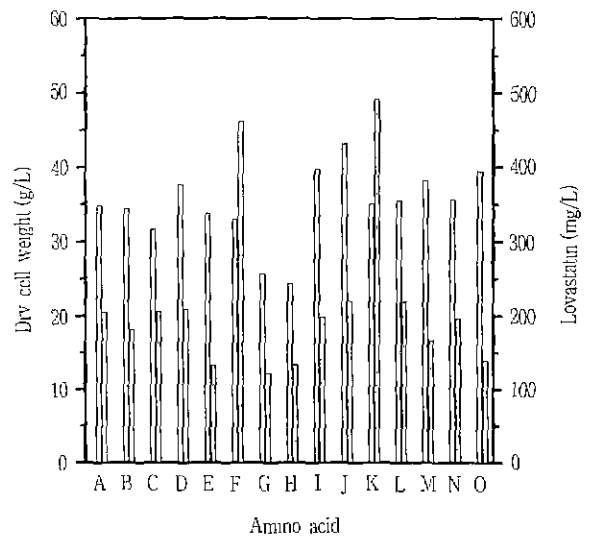


Figure 12 Effect of various amino acids on the production of lovastatin (□ : Dry cell weight, ▨ : Lovastatin concentration).

A: control; B: L-alanine; C: DL-valine; D: L-leucine; E: L-tyrosine; F: L-tryptophan; G: L-methionine; H: DL-methionine; I: L-lysine; J: L-arginine; K: L-histidine; L: DL-serine; M: L-threonine; N: L-glutamic acid; O: L-asparagine

Lovastatin 합성의 methyl donor로서 관여한다고 알려진 methionine(10)은 예상과 달리 L-methionine과 DL-methionine 둘 다 Lovastatin 생산이 아미노산 무처리구의 약 60%로 매우 낮았으며 건조 균체량도 낮았다. 이와 같은 결과는 methionine에 의한 methylation 과정이 필요한 Cyclosporin A의 생산에서도 나타났다. Lee와 Agathos(17)에 의하면 상기현상은 생산물의 농도가 낮을 때는 메틸화 과정이 율속단계가 아니지만, 거대한 methionine pool이 형성되면 메틸화 과정이 병목현상을 일으켜 어느 수준 이상은 생산물의 농도가 증가되지 않기 때문에 일어난 결과로 이해된다.

L-histidine과 L-tryptophan의 농도에 따른 영향을 각각 조사하여 Figure 13과 Figure 14에 나타냈다. 아미노산은 어느 일정범위의 농도에서는 이차대사산물의 전구물질, 이차대사관의 효

소의 유도물질 및 developmental regulator로서의 역할을 수행하지만, 그 일정범위 이상이나 이하에서는 이차대사산물의 생산을 오히려 저해할 수도 있다 그러나 본 실험에서는 뚜렷한 Lovastatin 생산의 저해를 관찰하지 못했다. L-histidine과 L-tryptophan을 6 g/L의 농도로 첨가한 각각의 경우, Lovastatin 생산량은 532 mg/L와 516 mg/L로 둘 다 6 g/L에서 Lovastatin 생산량이 기본배지보다 약 7배 이상 높게 나타났다.

요 약

고지혈증 치료제인 Lovastatin을 *Aspergillus terreus*로부터 생산하기 위해 최적의 탄소원, 질소원, 인산염 및 아미노산을 선정하였다. 단일 탄소원에서는 글리세롤 45 mL/L가 Lovastatin 256 mg/L로 포도당 45 g/L의 기본배지보다 약 3.5배 이상의 높은 Lovastatin 생산량을 나타내었다. 탄소원이 지방산 합성에 이용되는 것을 차단하고 Lovastatin으로의 합성을 촉진하기 위해 기름 증류를 탄소원으로 이용한 결과, 높은 Lovastatin 생산량과 균체량을 나타내었으나, 글리세롤 45 mL/L보다는 Lovastatin 생산량이 낮았다. 포도당 50 g/L와 글리세롤 50 mL/L를 혼합한 복합 탄소원이 Lovastatin 298 mg/L로 기본배지에 비해 약 4배 이상의 가장 높은 Lovastatin 생산량을 나타내었다. 질소원의 영향은 뚜렷하여 질소원에 따라 Lovastatin 생산량이 큰 차이를 나타내었으며, 그 중에서 peptonized milk가 가장 Lovastatin 생산량이 높았다. 인산염 중에서는 K₂HPO₄가 가장 높은 Lovastatin 생산량을 나타내었다. 이상에서 얻어진 최적 배지에 각종 아미노산을 첨가한 결과, L-histidine과 L-tryptophan이 가장 효과적이었으며, 최적 농도는 둘 다 6 g/L였다.

감 사

본 연구의 결과는 한국과학재단 후원 의학자원 연구센터(MRRC-96A-16-06-03-2)의 지원 및 1997년도 교육부 학술연구구조성비(생물화학 Bio 97-B(1)-1)에 의하여 연구되었으므로 관계당국에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1 Alberts, A. W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, and J. Springer(1980), Mevinolin : A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77(7), 3957-3961.
- 2 Tkacz, J. S(1992), Biopharmaceutins, *In Encyclopedia of Microbiology*, Vol 1, pp. 331-337.
- 3 Stryer, L(1995), *In Biochemistry*, 4th ed., pp. 685-712. W. H. Freeman & Company. New York.
- 4 Tobert, J. A(1987), New developments in lipid-lowering therapy : the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase, *Circulation*, 76(3), 534-538.

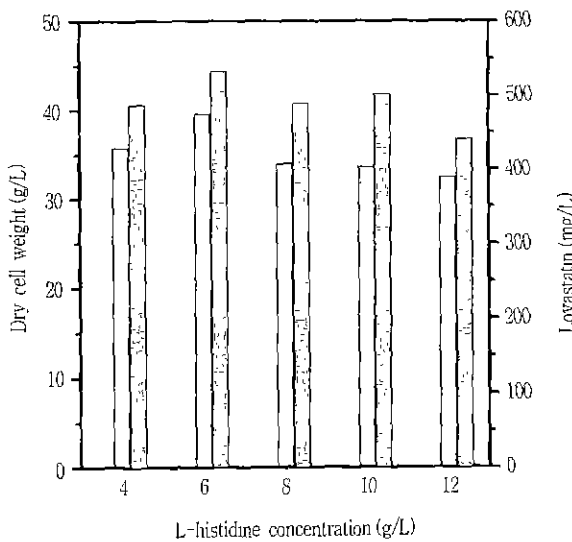


Figure 13. Effect of L-histidine concentration on the production of lovastatin(: Dry cell weight, : Lovastatin concentration).

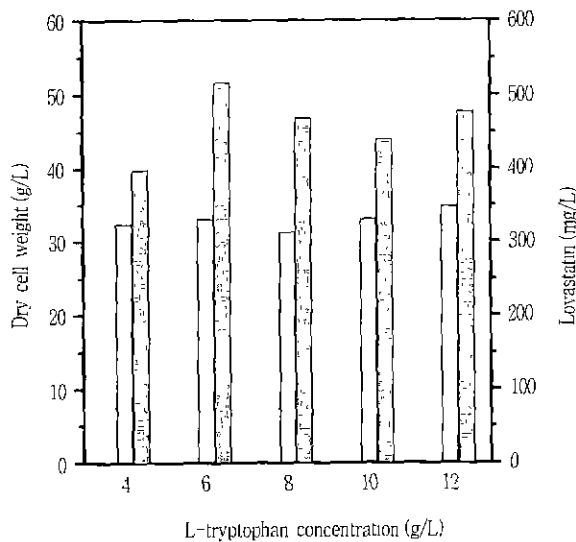


Figure 14. Effect of L-tryptophan concentration on the production of lovastatin(: Dry cell weight, : Lovastatin concentration).

5. Finkelstein, D. B., and C. Ball(eds)(1992). *In Biotechnology of Filamentous Fungi*, pp 194-202, Butterworth-Heinemann, London, U.K.
6. Hutchinson, C. R., and I. Fujii(1995). Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics, *Annu Rev Microbiol* 49, 201-238.
7. Demain, A. L., Y. Aharonowitz, and J.-F. Martin(1983), Metabolic Control of Secondary Biosynthetic Pathways, *In Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important antibiotics*(L. C. Vining ed), pp 49-72, Addison-Wesley Reading, Massachusetts
8. Bu'Lock, J. D., and A. J. Powell(1965), Secondary metabolism: an explanation in terms of induced enzyme mechanisms, *Experientia* 21, 55-56
9. Aharonowitz, Y., and A. L. Demain(1978), Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14, 159-164.
10. Cruger, W., and A. Cruger(1990), *In Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology*, pp 1-58, Science Tech Publishers
11. Martin, J. F. and A. L. Demain (1980), Control of antibiotic biosynthesis, *Microbiol Rev*, 44, 230-251
12. Jarvis, F. M. and M. J. Johnson (1947), The role of the constituents of synthetic media for penicillin production, *J Am Chem. Soc.*, 69, 3010-3017
13. Stanbury, P. F., and A. Whitaker(1995), Media for industrial fermentations. *In Principle of Fermentation Technology*, pp 93-122, Pergamon Press, New York.
14. Aharonowitz, Y.(1980), nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis *Ann. Rev. Microbiol* 34, 209-233.
15. Cimburková, E., J. Zima, J. Novák, and Z. Vaněk(1988), Nitrogen regulation of avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermectilis* in a chemically defined medium, *J Basic Microbiol.*, 28(8), 491-499.
16. Aharonowitz, Y. and A. L. Demain(1972), Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*, *Arch. Microbiol.*, 115, 169-173.
17. Lee, J. and S. N. Agathos(1989), Effect of amino acid on the production of Cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*, *Biotechnol Lett.*, 11, 77-82.
18. Kvsilka, R., and V. Křen(1993), Determination of Lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids, *Journal of Chromatography*, 630, 415-417.
19. Friedrich, J., M. Žužek, M. Benčina, A. Cimerman, A. Štrancar, and I. Radež(1995), High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths, *Journal of Chromatography A* 704, 363-367
20. Rhodes, P. M., and P. F. Stanbury(eds)(1997), *In Applied Microbial Physiology, A Practical Approach*, pp. 62-63, IRL press
21. Martin, J. F. and L. E. McDaniell(1977), Production of polyene macrolide antibiotics. *Adv Appl Microbiol* 21, 1-52.
22. Jennings, D. H.(1989), Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi. *In Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi*(Lynne Boddy, R. Marchant and D. J. Read eds.), pp. 1-32, Cambridge University Press, Cambridge