

Penicillium sp. Y-8515에 의한 Compactin 생산

박주웅¹ · 이주경¹ · 권태종 · 박용일² · 강상모*

¹영진약품공업(주)중앙연구소, 건국대학교 미생물공학과, ²생명공학연구소 (KRIBB)

Production of Compactin from *Penicillium* sp. Y-8515. Park, Joo-Woong¹, Joo-Kyung Lee¹, Tae-Jong Kwon, Yong-II Park², and Sang-Mo Kang*. *Biotechnology Lab., Yungjin Research Center, Yungjin Pharmaceutical Co. Ltd., Pyungtaek-si 451-860, Korea, Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea – Environmental Bioresources Lab., KRIBB, Yusong, Taejon 305-333, Korea* - A strain producing high levels of compactin was isolated from soil and identified as *Penicillium* sp. Y-8515 based on the morphological characteristics and ribosomal RNA sequence analysis. Optimization of several different carbon and nitrogen sources for the effective production of compactin was performed resulting in the medium compositions containing 5%(w/v) glucose, 1.0% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃. The fixed concentration of glucose (5%, w/v) and relatively lower concentrations (less than 2.5%, w/v) of soybean meal stimulated the transformation of the growth morphology from filamentous to pellet form. Comparing to that by filamentous form, the production of compactin by pellet form increased up to 1.5 folds. In a fed-batch fermentation, continuous feeding of the mixture of glucose and nitrogen source at the ratio of 10:1 showed 3.5-fold more production yield of compactin comparing to the batch mode.

Key words: *Penicillium* sp. Y-8515, compactin production, fed-batch fermentation

Compactin은 고지혈증치료제인 pravastatin을 생산하기 위한 전구체로 매우 중요한 물질이나, 이에 관련된 연구는 매우 적어 지금까지 Brown 등[2] 제외하고 Endo 등[6,8,9]과 Sankyo사에서 발표한 4편의 논문(임상논문 제외)이 전부이다[12-14,20]. Brown 등[2]은 *Penicillium brevicompactum*으로부터 ML-236B를 발견하였는데, 이 물질은 항진균 항생물질로써 compactin이라 명명하였다. Endo 등[6,8,9]은 *Penicillium citrinum*으로부터 ML-236A, ML-236B, ML-236C를 발견하였는데, 그들은 이들 3가지 물질들을 상세히 연구하여 콜레스테롤 합성 대사 경로 중 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA) reductase 효소를 경쟁적으로 저해하는 것을 밝혔으며, ML-236B가 HMG-CoA reductase를 가장 강하게 저해시키는 물질임을 밝혔다[1, 23]. 여기서 ML-236B는 compactin 구조와 동일하였으며, 1976년 일본의 Sankyo사가 혈중 콜레스테롤을 낮추는 저해제로 개발하여 크게 부각되었다.

이러한 연구는 새로운 콜레스테롤 합성저해 물질을 탐색하게 되는 계기가 되어서 compactin을 미생물적인 수산화 반응을 시켜 pravastatin을 얻었으며[21], *Aspergillus terreus*가 생산하는 lovastatin과 lovastatin을 화학적 변형으로 simvastatin[11] 등의 compactin 유사체들을 개발하였고, 최근

에도 화학합성으로 statin류인 fluvastatin, atorvastatin, cerivastatin등을 개발하였다[10].

공지된 compactin 생산 균주들은 *P. citrinum* SANK 18767, *P. brevicompactum*[2], *Paecilomyces* sp. *T. pseudokoningi*, *T. longibrachiatum*, *Hyphomyces chrysospermus*, *Eupenicillium* sp. 등이 있지만 생산성이 매우 낮았다[9].

본 연구에서는 고지혈증 치료제를 개발하고자 자연계에서 compactin 생산성이 우수한 균주를 순수분리하여 동정하였으며, compactin의 생산성에 대한 배양방법을 검토하였다.

재료 및 방법

균주분리

균주 분리를 위하여 채취한 토양을 potato dextrose agar(PDA)배지를 사용하여 3,000여 균주를 순수분리하였다[7]. 이 순수분리한 균주를 5일간 액체배양하여 배양액을 Knauss 등의 방법[16]에 준하여 mevalonic acid 생합성을 저해하는 물질을 생산하는 균주를 1차로 screening하였으며 2차로 HPLC로 compactin 표준물질과 같은 retention time (RT)를 갖는 배양물질을 분리하여 물질규명에 의해 최종적으로 compactin 생산성이 우수한 균주를 1종 선별하였다.

균주동정

Joseph 등[15]과 Domsch 등[5]의 방법에 따라서 compactin 생산성을 나타내는 균주를 PDA와 malt extract agar 배지

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517

E-mail: kangsm@kkucc.ac.kr

에서 배양하면서 colony의 형태 변화를 조사하고 전자현미경을 이용하여 균사와 포자의 형태를 관찰하였다.

또한 White 등[25]의 곱팡이 ribosomal RNA 유전자를 direct sequencing 하는 방법으로 분자 계통학적으로 동정하였다. PCR 산물을 위해서 primer는 ITS5와 ITS4를 사용하였다.

ITS5 : 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

배지 및 배양조건

균주보관용 및 계대용배지는 PDA 배지를 사용하여 분리균주 Y-8515를 25°C에서 10일간 배양하여 활성화시킨 후, 20% glycerol 용액에 10⁸가량의 포자 용액을 조제하여 -70°C에서 보관하면서 사용하였다. 종균배지의 조성은 CSL 2%, maltose syrup 4%(삼양제맥스, 포도당 당량DE: 40이상), (NH₄)₂SO₄ 0.5%, MgSO₄ 7H₂O 0.1%, soybean oil 0.05%을 함유하였으며, 25°C에서 1일간 배양 후 종균액으로 사용하였다.

회분식 발효에 사용된 배지조성은 10% glucose, 1.0% soybean meal, 0.5% yeast-extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃이며 살균전에 pH를 7.0으로 보정하였다. 배양은 종균액을 5%(v/v) 접종하여 25°C, 통기량 0.5 vvm, 용존산소량을 20%로 자동조절하여 6~7일간 하였다.

유기식 발효에 사용된 배지조성은 초기배지로써 5% glucose, 0.5% soybean meal, 0.25% yeast-extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃이며 살균전 pH를 7.0으로 보정하였다. 배양은 25°C, pH를 5.0~5.5로 조절하면서 3일간 배양한 후 당이 고갈되지 않도록 일정한 농도(0.2~0.5 mg/mL)로 공급하여 6~8일간 배양하였다. 본 연구에 사용된 발효기는 5L jar fermentor (New Brunswick Scientific, U.S.A.)를 사용하였다.

분석방법

환원당 정량: 배지내의 환원당 함량을 dinitrosalicylic acid 방법으로 측정하였다[18].

균체량 측정: 균체량 측정은 공업용 배지를 사용하는 경우 고품질의 함량이 높아서 간접적인 방법인 PCV(packed cell volume)로 측정하였으며, 1500×g에서 10분간 원심분리하여 균체량을 백분율로 환산하였다[12]. 건조균체량 측정은 배양액 10 mL을 여과지 (Toyo filtration paper No. 2, Φ90 mm)에 여과 후 증류수로 수 차례 세척한 다음에 105°C에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 desiccator에서 실온까지 냉방시킨 후 측정하였다.

Compactin 정량: Masahiko 등[12]의 방법을 변형하여 발효액중의 compactin 농도를 측정하였다. 발효액 전량을 0.2N NaOH로써 5배로 희석하여 1시간동안 교반 후 원심분리시켰다. 얻어진 상등액을 70% methanol로 10배 희석

시킨후 HPLC (waters, U.S.A.)를 사용하여 분석하였다. 시료분석 조건은 Symetric C18 (3.9×150 mm, waters) column을 사용하였으며, 유속 1.0mL/min, 이동상 77% methanol, 0.1% acetic acid, 0.1% triethylamine, 22.8% water이며, 238 nm의 UV detector로 검출하였다.

Compactin의 정제

배양액 10L(compactin량:25 g)을 6N NaOH로 pH 12로 조정하고 실온에서 1-2시간 교반 후에 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액을 비이온성 수지인 Daion HP-20 (삼양사 제품) column에 흡착시켰다. HP-20 column을 증류수로 2 volume이상 세척하고, compactin을 함유하는 분획을 50%(v/v) acetone으로 용리한 후에 용출액을 감압 하에서 증발, 농축하였다. 농축액을 6N HCl로써 pH 4.0으로 조정한 후에 동량의 ethylacetate를 첨가하고, 혼합물을 교반하여 compactin을 추출하였다. 회수한 유기층에 0.2 volume의 증류수를 첨가하고 2N-NaOH로써 pH를 8.0으로 조정하여 compactin이 함유된 수용층을 회수하였다. 회수한 수용층을 HPLC(Waters)를 이용하여 최종 정제하였다. 이때 사용한 column은 Kromasil-C₁₈ (20×250 mm, 5 μm, Eka chemical, Sweden) column이었으며 시료 1 mL을 column에 주입하였다. 용출은 35%(v/v) ethanol을 사용하여 배분 20 mL의 속도로 용출하였으며 compactin은 UV detector 238 nm에서 검출되는 peak를 토대로 하여 체류시간이 7-14 분인 분획을 모았다. Compactin 분획을 감압 농축한 후에 냉동건조하여 흰 분말상의 compactin을 최종적으로 16 g을 얻었다.

결과 및 고찰

분리균주의 특성 및 동정

1)형태학적 특성

분리균주 Y-8515의 형태학적 특성을 조사한 결과, PDA 배지상에서 25°C에서 7일간 배양시 균체의 직경이 2.2 cm 정도이었다. 표면색은 연회색 내지 흰색이었고 표면은 부드러운 짧은 솜털형모양의 기균사로 덮여있었다. 후면색은 연노랑색 내지는 살색이었고 좁은 주름모양이 관찰되었으며 가용성 색소는 생성되지 않았다. Malt-extract agar 배지상의 균체는 25°C에서 7일동안 배양시 직경이 1.7cm이었다. 표면색은 흰색이었고 부드럽고 매끄러운 모양이었다. 후면색은 연살색 내지는 연갈색이었고 넓은 주름모양이었으며 가용성 색소는 생성되지 않았다.

Fig. 1는 PDA배지에서 배양하여 전자현미경으로 찍은 사진이다. Conidiospore의 표면은 거칠고 돌기가 생성되어 있으며 가지본이 없는 단일 직립체이고, monovercillata인 특징을 가지고 있다. Penicillus는 약간 거친 표면이 있는 긴 원통형이었다. Sterigmata는 단지모양이었다. Conidia는

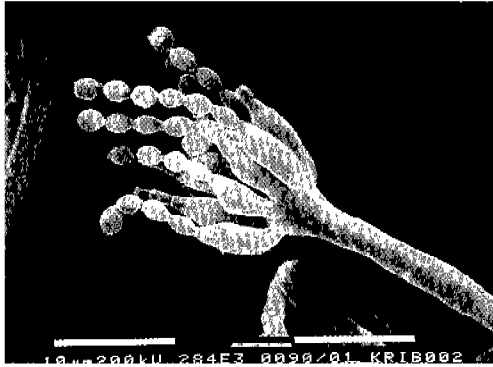


Fig. 1. Scanning Electron Micrography of *Penicillium* sp. Y-8515 grown on potato dextrose agar plate for 10days at 25°C.

2.0~2.5 μm 직경의 계란모양의 타원형이고 표면은 매우 거칠며 불규칙한 집합체로 서로 엉겨 붙은 모양을 형성하고 있다. 이상의 형태학적인 특성을 분석하여 보면 *Penicillium* 속의 곰팡이로 추정된다.

2) ITS와 28S rRNA 유전자의 부분적 염기서열 분석에 의한 동정

분리균주 Y-8515의 형태학적 특성으로 속을 동정하였으며, 종을 알아보기 위해서 분자계통학적 동정을 하였다. 분자계통학적 분류 및 동정을 위해서 ITS(Internal Transcribed Spacer)의 염기서열을 곰팡이의 분류 및 동정에 이용하며, ITS 염기서열은 같은 속에 있어서 매우 밀접하게 관련된 종들의 계통학적 분류 방법으로 이용하고 있다[18]. ITS와 28S rRNA 유전자의 부분적 염기서열 분석을 이용하여 compactin 생산균주 Y-8515를 동정하였다. rRNA 유전자인 rDNA에서 ITS 영역을 specific primers를 이용하여 PCR로 증폭시킨 결과, PCR 산물은 Fig. 2와 같으며 ITS 1영역의 크기는 183bp, ITS 2영역의 크기는 171bp였으며, 5.8S rRNA의 크기는 157bp, 28S rRNA의 크기는 624bp이었다. 결정된 염기서열은 Fig. 3과 같이 염기서열의 개수는 1160bp였다. ITS, 28rRNA 유전자의 부분적 염기서열 구조에 관한 Genebank의 database을 이용하여 similarity를 분석한 결과 *Penicillium*에 속하는 종으로 *P. thomii*(100%)와 *P. lapidosum*(100%)과 일치하였지만 유전자의 부분적 염기서열로서 완벽하게 구분할 수는 없었다. 따라서 분리균

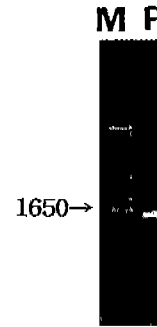


Fig. 2. PCR product after PCR amplification of ITS regions. Lane M: 1kb ladder, Lane P: PCR product

주 Y-8515의 형태학적 및 ITS와 28S rRNA 유전자의 부분적 염기서열 분석을 참조하여 동정한 결과 *Penicillium*속 에 속함으로 *Penicillium* sp. Y-8515라 명명하였다.

Compactin 생산확인

분리균주 Y-8515가 생산하는 물질이 compactin과 동일한 물질인가를 확인하기 위해서 재료 및 방법에 기재된 정제방법에 따라 얻어진 compactin의 물리화학적 특성을 조사하였다. Compactin에 대하여 형상, 분자량, 분자구조, 자외선 흡광도, 적외선 흡광도를 측정한 결과는 Table 1와 같다. 또한 ¹³C-NMR spectrum은 내부 표준물질로 TMS (tetramethylsilane)을 사용하여 DMSO 중에서 200MHz NMR spectrometer(Varian Gemini 200)으로 측정한 결과 δ175.4의 1번, δ176.8의 20번과 decaline 구조의 δ68.77의 10번, δ36.42의 4번 탄소 그리고 CH₃와 결합된 δ13.49의 23번, δ16.60의 24번 탄소의 peak는 compactin과 일치하였다(Fig. 4). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 Endo 등[8]과 Brown 등 [2]의 보고와 일치하므로 *Penicillium* sp. Y-8515가 생산하는 물질이 compactin임을 확인하였다.

Compactin 생산 최적 배양 조건 확립

분리균주 *Penicillium* sp. Y-8515에 의한 compactin 생산 최적 조건을 확립하기 위해 탄소원, 질소원, pellet 유도 및 회분식발효와 유기식발효에 대해서 조사하였다.

탄소원 영향: 탄소원 실험에 사용된 기본 배지의 조성은 1.0% soybean meal, 0.5% yeast-extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄,

Table 1. The physicochemical properties of compactin-Na

Properties	Description
Nature	White powder
Molecular weight	430.5
Molecular formula	C ₂₃ H ₃₅ O ₆ Na
Solubility	Soluble : water, methanol, ethanol Insoluble : acetone, ethylacetate, chloroform
UV λ _{max} (MeOH, nm)	230, 237, 245
IR(cm ⁻¹)	3427, 2963, 2933, 2877, 1725, 1403, 1266, 1182, 1157, 1081, 1031

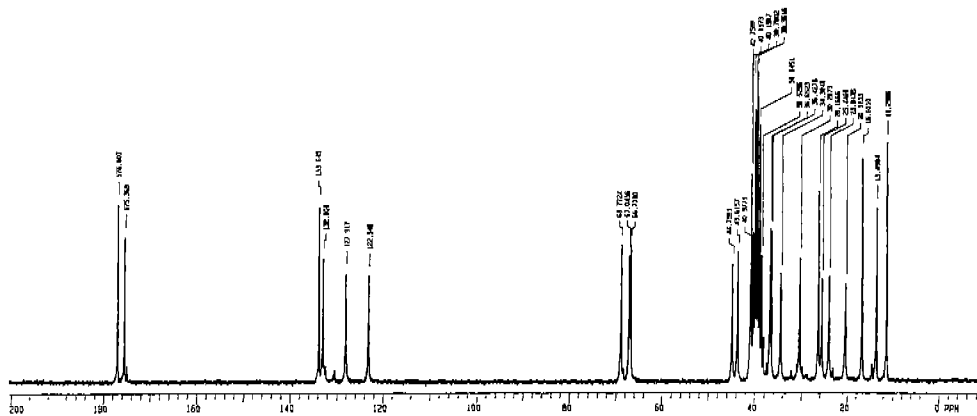


Fig. 4. ¹³C NMR spectrum of the compactin-Na.

Base count : 264 A, 296 C, 345 G, 255 T

1 AAGGTTCCG TAGGTGAACC TGCGG AAGGA TCATTACTGA GTGAGGGCCC TCTGGTCCA
 61 ACCTCCCACC CGTGTTTATT GTACCTTGTG GCTTCGGTGC GCCCGCCTCA CGGCCGCCGG
 121 GGGGCTTCTG CCCCOCGGTC CGCGCGCACC GGAGACACCA TTGAACCTCG TCTGAAGATT

181 GCAGTCTGAG CATAAACTAA ATAAGTTA AA ACITTTCAACA ACGGATCTCT TGGTTCGGC
 241 ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAA CTAATGTGAA TTGCAGAATT CAGTGAATCA
 301 TCGAGTCTTT GAACGCACAT TGCGCCCOCT GGTATTCCGG GGGGCATGCC TGTCCGAGCG

361 TCATT GCTGC COTCAAGCAC GGCTTGTGTG TTGGGCTCCG TCCOCCOOGGG GAOCGGTCCG
 421 AAAGGCAGCG CGCGCACCGA GTCCGCTCCT CGAGCGTATG GGGCTTTGTC ACCCGCTCTG

481 TAGGCCCGGC CGCGGCCAGC CGACAACQAA TCATCCTTTT TTCAGGTTGA CCTCGG ATCA
 541 GGTAGGGATA CCCGCTGAAC TTAAGCATAT CAATAAGCGG AGGAAAAGAA ACCAACAGGG
 601 ATTGCCTCAG TAACGGCGAG TGAAGCGCA AGAGCTCAMA TTTGAAAGCT GGCTCCTTCG
 661 GGGTCCGCAT TGAATTTGC AGAGGATGTT TCGGGAGCAG CCCCACCTA AGTGTCCCTGG
 721 AACGGACCGT CATAGAGGGT GAGAATCCC TATGGGATGG GGTGTCTGCG CCCATGTGAA
 781 ACTCCTTGA CGAGTCGAGT TGTTTGGGAA TGCAGCTCTA AATGGGTGGT AAATTTTCATC
 841 TAAAGCTAAA TATTGGCCGG AGACCGATAG CGCACAAAGTA GAGTGATCGA AAGATGAAAA
 901 GCACITTTGAA AAGAGAGTTA AAAAGCACGT GAAATTTTGG AAAGGGAAAGC GCTTGCATC
 961 AGACTCGCCT TGGGGGTTCA GCCGGCATTG GTGCCGGTGT ACTTCCOCCA GGGCGGGCCA
 1021 GCGTCGGTIT GGGTGGCTGG TCAAAGGCC TTGGAATGTA ACGOCTCTCG GGGCGTCTTA
 1081 TAGCCAAGGG TGCCATGACG CCTACCTGGA CCGAGGAACG CGCTTCGGCT CGGACGCTGG

1141 CATAATGGTC GTAAGCGACC

ITS 1 26 - 208, 5 BS rRNA 209 - 365
 ITS 2 366 - 536 28S rRNA 537 - 1160

Fig. 3. DNA partial sequence of ITS and 28S rRNA.

0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃이며, 각종 탄소원을 첨가하여 500 mL flask에 배지 100 mL을 넣고 121°C에서 15분간 살균후 포자현탁액을 1 mL씩 접종하여 25°C, 200 rpm에서 7일간 배양한 결과는 Table 2과 같다. *Penicillium* sp. Y-8515의 경우 glucose, maltose syrup등이 좋았다. 복합탄소원에서는 glucose보다 생산성이 좋았으며, maltose syrup의 경우는 균체량이 다량 증식하면서 compactin량이 증가함을 볼 수 있었다. 이는 Hosobuchi 등[12]의 *P. citrinum*의 경우 compactin 생산성은 fructose가 가장 좋았으며 복합탄소원에서 생산성이 향상되는 결과와 비슷하였다..

본 실험에서도 복합탄소원이 단일탄소원 특히 단당류보다 compactin 생산성이 높은 것으로 볼 때, 탄소원 이용률

Table 2. Eddffects of carbon sources on compactin production

Carbon source	Concentration (%)	PCV (ml/10ml)	Compactin (mg/L)
Glucose	5.0	4.8	600
Glycerol	5.0	4.4	570
Fructose	5.0	4.6	540
Maltose	5.0	4.5	576
Sucrose	5.0	4.8	564
Maltose Syrup	5.0	8.6	630
Lactose	5.0	3.6	432
Glycerol-Glucose	2.5/2.5	4.8	804
Glycerol-Maltose	2.5/2.5	5.5	690
Maltose Syrup-Glycerol	2.5/2.5	6.3	756
Maltose Syrup-Glucose	2.5/2.5	6.5	828

이 빠른 단당류보다는 복합탄소원이 compactin 생산에 더 좋았다. 이것은 복합탄소원 사용으로 균체가 탄소원을 비교적 시간차를 두고 이용할 수 있었기 때문으로 생각된다.

질소원의 영향: 기본배지로는 5.0% glucose, 각종 질소원 0.5~2.0%, 0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃를 사용하였으며, 탄소원 조사시와 같은 방법으로 배양하였다. 질소원 종류에 대한 compactin 생산에 미치는 효과를 조사하였다. *Penicillium* sp. Y-8515에 있어서 tryptone, polypeptone, soybean meal 등을 사용하였을 때, 질소원 무첨가 배지보다 compactin 생산이 각각 4.94배, 5.08배, 4.9배로 좋았으며, 무기질소원인 (NH₄)₂SO₄에서도 2.25배로 비교적 좋았다(Table 3). *P. citrinum*에서는 gluten meal에서 2.76배로 가장 좋았으며 peptone, soybean meal, NaNO₃에서 compactin 생산이 좋았다[12]. *Penicillium* sp. Y-8515는 무기질소원 (NH₄)₂SO₄에서 증식이 잘되며 compactin 생산도 좋은 것으로 보아 독립영양균으로 생각된다.

Pellet 형성 유도: *A. terreus*에 의한 itaconic acid 생산

Table 3. Effect of nitrogen sources on compactin production

Nitrogen source concentration (%)	DCW (g/L)	compactin (mg/L)
Peptone (1.0)	14.5	404
yeast-ext (1.0)	14.5	343
Soytone (1.0)	13.2	380
Tryptone (1.0)	17.9	494
Corn steep solid (1.0)	ND	371
Polypeptone (1.0)	16.7	508
Polypeptone-S (1.0)	16.1	388
Beef-extract(1.0)	9.5	193
Bonito-extract(1.0)	10.1	265
Soybean meal(1.0)	ND	490
NaNO ₃ (0.5)	4.71	68
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5)	9.11	225
NH ₄ Cl (0.5)	3.53	22
None	6.40	100

DCW: Dry cell weight, N.D.: Not detected

시 pellet 형태에서 좋았으며[24], *A. oryzae*에 의한 α -amylase 생산시 filamentous 형태에서 좋았다[19]. 그리고 *P. chrysogenum*에 의한 penicillin 생산에서는 pellet와 filamentous의 2가지 형태로 배양하여 생산했다[4,22]. 이와 같이 곰팡이를 이용한 발효에 있어서 형태학적 제어방법은 최종산물의 생산성과 중요한 관계가 있으며, 형태학적인 변화에 영향을 미치는 인자 및 제어방법에 대한 연구가 보고되어 있으며, 형태학적 제어 방법중 pellet을 형성시키므로 filamentous보다 배지 농도 조절이 용이하고 발효조내의 운전이 양호하며 용존산소 공급 및 정제가 편리해진다.

그러므로 pellet 형성 유도는 compactin의 생산성을 향상시킬 수 있으며, 안정적인 발효 공정으로 유도할 수 있다고 생각된다. 따라서 pellet을 유도하기 위해서 glucose와 soybean meal만을 이용하여 *Penicillium* sp. Y-8515을 500 mL flask에 배지 100 mL을 넣고 살균 후 포자현탁액을 1 mL씩 접종하여 25°C, 200rpm에서 배양중의 형태적인 영향을 조사한 결과는 Table 4과 같다. Pellet 형성은 glucose 농도의 영향보다는 soybean meal의 농도가 2.5%이상 이 되

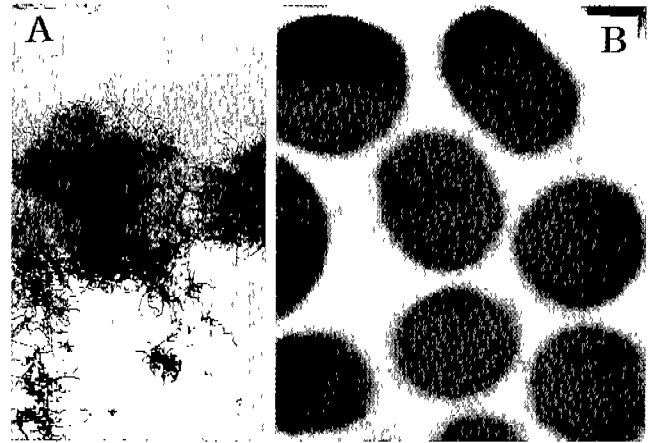


Fig. 5. Photography of filamentous (A) and pellet (B) morphology of the batch fermentation broth(Magnification, ×100).

면 filamentous 형태의 균체가 되고 compactin 생산성이 낮아지는 현상을 보였다. Pellet의 경우 크기가 50-150 μ m 인 경우에 생산이 좋았으며, soybean meal 1%와 glucose 5%에서 pellet 형태가 유도되면서 compactin 생산이 가장 좋았다. 이런 결과는 compactin 생산에 있어서 morphology가 큰 영향을 미친다는 Hosobuchi 등[13,14]의 보고와 같았다.

회분발효

Table 4에 의하면 compactin 생산은 pellet 형성에 의존하는 것을 알 수 있다. 그런데 pellet 형성에 영향을 주는 인자에서 기계적교반, 배지, pH, 산소공급, 접종량 등이 있으며, 이 중에서 일반적으로 배지 조성이 가장 중요함으로 [10,14], 회분식 발효에서도 배지의 영향을 검토하였다. Pellet형성에 가장 영향을 주는 배지는 탄소원과 질소원이었으며, 그 중에서도 질소원이 pellet 형성에 영향을 미치는 주요인 이었다. 따라서 5L 발효조에서 compactin 생산을 실험한 결과, 회분식 발효 배지 중에서 soybean meal 농도를 2.5% 사용한 경우 filamentous 형성이 되었으며(Fig. 5A), 1.0% 사용할 때에 pellet형성이 되었으며(Fig. 5B), Fig. 6과 같이 compactin 생산이 1.5배 이상 증가하였다.

Table 4. Effect of soybean meal and glucose concentration on growth morphology

Medium			Mycelium analysis	
Soybean meal concen. (%)	Glucose concen. (%)	Compactin (mg/L)	Growth morphology	pellet size (μ m)
10.0	5.0	361	Filamentous	-
5.0	5.0	466	Filamentous	-
2.5	5.0	492	Pelleted	50-150
1.0	5.0	620	Pelleted	50-150
0.5	5.0	337	Pelleted	100-300
1.0	10.0	519	Pelleted	50-150
1.0	2.5	392	Pelleted	100-300
1.0	1.0	255	Pelleted	100-300
1.0	0.5	169	Pelleted	100-300

Table 5. Effect of nutrient feeding on compactin production

Nutrient	cultivation time (hr)	compactin concentration (mg/L)	compactin productivity (mg/L.hr)	Morphology
Glucose	180	1500	8.33	pellet
Glucose+YE	186	1900	10.22	pellet
Glucose+SBM	186	2800	15.05	pellet
Glucose+SBM+YE	186	3500	18.82	pellet
Batch fermentation	160	1000	6.25	pellet

Abbreviations were as follows : YE, yeast-extract ; SBM, soybean meal.

유기식 발효

회분식 발효에서는 compactin 생산성을 향상시키는데 한 정적이 여기에 유기식 발효에 의한 compactin 생산 조건을 조사하였으며, 유기식 발효에 대한 보고로는 *P. citrinum*에서의 유기식발효시 glycerol을 간헐적 첨가보다는 연속적 첨가가 compactin 생산성을 20~30% 향상시켰으며[12], *Aspergillus terreus*로부터 lovastatin 생산에 있어서 glucose 연속첨가시 20%, glycerol 연속첨가시 50%가 향상되었다[3]. 본 실험에서는 배양 2-3일이 경과하여 탄소원이 고갈되는 시점에서 glucose만 연속적 첨가하는 방법과 glucose와 질소원의 복합배지(multi-nutrient)를 첨가하여 당농도를 0.2~0.5 mg/mL로 유지시키면서 6-8일간 배양하여 compactin 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 5). Pellet 형성을 유도하고자 초기배지 성분중 질소원의 농도를 0.5%로 낮추어 배양을 시도하였으며, 연속 첨가할 복합배지 조성은 탄소원과 질소원의 비율을 10:1로 하였으며, 총 연속 첨가량은 발효 초기량의 20-30%정도로 조절하여 첨가하였다.

유기식발효시에 탄소원과 질소원의 복합배지를 사용할 경우 compactin 생산성이 단일 탄소원(glucose)만 사용하였을 경우보다 2.3배 증가하였으며 회분식발효시보다 3.5배 이상 증가하였다. 질소원 중에서 yeast extract보다도 soybean meal를 사용하였을 때 compactin 생산성이 대략 1.5배 증가하였다. 따라서 soybean meal이 compactin 생산성을 향상시키는데 중요하다는 것을 확인하였으며, 연속적인 첨가로써 형태적 변화가 거의 없이 pellet형태를 유지함으로써 생산성을 향상시킬 수 있었다. 그 이유는 용존산소농도를 용이하게 조절함으로써 compactin 생산을 증가시킬 수 있었으며, 또한 2차 대사산물인 compactin은 stationary phase에서 최대 생성되므로 유기식배양에 의해서 stationary phase를 연장시킴으로써 compactin 생산성을 향상시킬 수 있었다고 생각된다. 따라서 분리균주 *Penicillium* sp. Y-8515를 산업적으로 이용 가능할 것으로 사료되어진다.

요 약

Pravastatin의 전구체인 compactin 생산을 위하여 토양으로부터 생산성이 우수한 균주를 분리 및 동정한 결과, 분리 균주 Y-8515의 형태학적인 특징으로는 conidiospore는 가

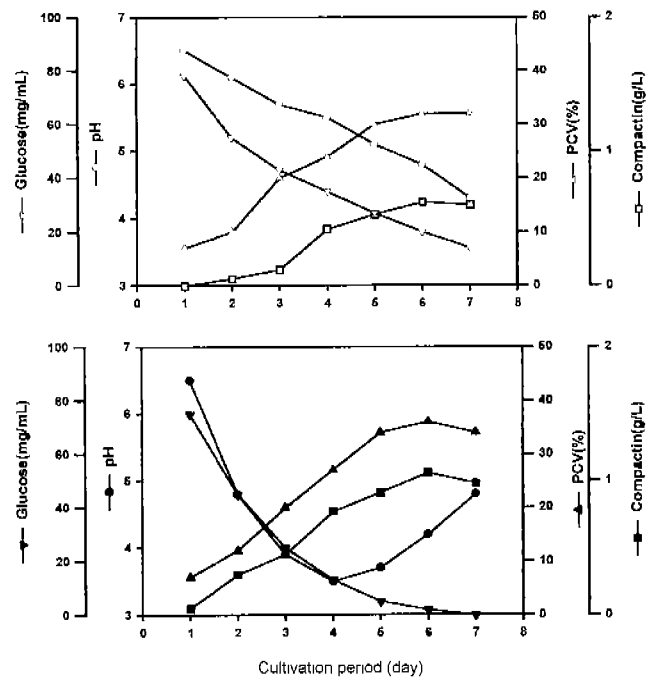


Fig. 6. Comparison of filamentous type (A) with pellet type (B) on compactin production in batch fermentation using *Penicillium* sp. Y-8515.

지분이 없는 단일 직립체이고 monovercillata의 특징을 가지고 있기에 일반적으로 알려진 *Penicillium*속의 형태와는 약간의 차이가 있었으나, ITS와 28S rRNA 유전자의 부분적 염기서열 분석에 의해 동정을 했을 경우, *Penicillium*속에 속함으로 *Penicillium* sp. Y-8515이라 명명하였다. 최적 배지조건으로는 5% glucose과 1.0% soybean meal, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.25% NaH₂PO₄, 0.25% CaCO₃에서 compactin 생산성이 좋았다. 발효시 균체의 형태학적인 변화와 compactin 생산성을 비교해본 결과, filamentous 형태보다는 pellet 형태가 1.5배이상의 compactin 생산성이 높았다. 발효시 pellet 형성을 유도하기 위해서 5.0% glucose과 0.5% soybean meal 사용하였으며, 유기식발효시 복합배지 (multi-nutrient)을 연속적으로 첨가시켜 발효액 내에 당농도를 0.2-0.5 mg/ml로 일정하게 유지시킴으로써 회분식 발효보다 3.5 배이상 증가된 결과를 얻을 수 있었다. 정제된 compactin의 물질 확인을 위하여 물리화학적 특성을 조사한 결과 동일

한 물질임을 확인하였다.

REFERENCES

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. Albersschonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, and J. Springer. 1980. Mevinolin: A high potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**: 3957–3961.
2. Brown, A. G., T. C. Samale, R. H. King, and R. H. Thompson. 1976. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactin*. *J. Chem. Soc. perkinl* **1976**: 1165–1170.
3. Buckland, B., K. Gbewonyo, T. Hallada, L. Kaplan, and P. Masurekar. 1989. in Topics in Industrial Microbiology: Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture (Demain, A., Somkuti, G., Hunger-Cevera, J., and Rossmoore, H.W., eds), pp.161–169, Elsevier, Amsterdam.
4. Burghard, K. and K. Schugerl. 1982. Strategies for penicillin fermentation in Tower loop reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 259–280.
5. Domsch, K. H., W. Gams, and T. H. Anderson. 1980. The Compendium of Soil Fungi. pp. 370–374. Academic press, Germany.
6. Endo, A., M. Kuroda, and Y. Tsujita. 1976. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **29**: 1346–1348.
7. Endo, A., and M. Kuroda. 1976. Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. *J. Antibiot.* **29**: 841–843.
8. Endo, A. N. Yoshinori, I. Takashi, M. Kosei, and H. Masahiro. 1985. Biosynthesis of ML-236B(compactin) and Monacolin K. *J. Antibiot.* **38**: 444–448.
9. Endo, A., H. Keiji, Y. Akira, S. Rika, and T. Hiroshi. 1986. The synthesis of compactin(ML-236B) and monacolin K in fungi. *J. Antibiot.* **39**: 1609–1610.
10. Endo, A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Reseach* **33**: 1569–1582.
11. Hoffmen, W. F., A. W. Alberts, P. S. Anderson, J. S. Chen, R. L. Smith, and A. K. Willard. 1986. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. 4' side chain ester derivatives of mevinolin. *J. Med. Chem.* **29**: 849–852.
12. Hosobuchi, M., S. Testsuya, O. J., A. Masatoshi, I. Seigo, and Y. Hiroji. 1992. Production of ML-236B, and inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase, by *Penicillium citrinum*: Improvements of strain and culture conditions. *Bio-sci. Biotech. Biochem.* **57**: 1414–1419.
13. Hosobuchi, M., F. Fukui, H. Matsukawa, T. Suzuki, and H. Yoshikawa. 1993. Morphology control of preculture during production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 476–481.
14. Hosobuchi, M., F. Fukui, H. Matsukawa, T. Suzuki, and H. Yoshikawa. 1993. Morphology control of preculture during production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 470–475.
15. Joseph C. Gilman. 1957. A manual of Soil fungi (2nd). pp. 288–292 The Iowa State University Press, Iowa.
16. Kanuss, H. J., J. W. Rorter, and G. Wasson. 1959. The biosynthesis of mevalonic acid from 1-¹⁴C -acetate by rat liver enzyme system. *J. Bio. Chem.* **234**: 2835–2840.
17. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
18. Moncalvo, J. M., H. H. Wang, and R.S. Hseu. 1995. Phylogenetic relationships in Ganoderma inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223–238.
19. Morten, C., A. B. Spohr, J. Nielsen, and J. Villadsen. 1996. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1011–1023.
20. Masahiko, H., F. Fukui, T. Suzuki, and H. Yoshikawa. 1993. Fuzzy control in microbial production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 482–486.
21. Nobufusa, S., N. Keiko, H. Kiyoshio, T. Yoshio, T. Akira, and K. Harumitsu. 1983. Microbial hydroxylation of ML-236B(compactin) and monacolin A(MB-530B). *J. Antibiot.* **36**: 604–607.
22. Smith, J. J., M. D. Lilly, and R. I. Fox. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1011–1023.
23. Tsujita, Y., K. Tanzawa, N. Kitano, and A. Endo. 1979. Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Atherosclerosis* **32**: 307–313.
24. Ward, O. P. and G. S. Byrne. 1989. Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotech. Bioeng.* **33**: 912–914.
25. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and application. Innis, M.S., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White(eds.) pp. 315–322. Academic Press Inc., San Diego.

(Received August 1, 2000)