

콜레스테롤합성저해제 lovastatin을 생산하는 곰팡이 균주의 탐색

방인영 · 황승환¹ · 김정완¹ · 김상용² · 박천석*

경희대학교 생명과학부 식품공학과, ¹인천대학교 생물학과, ²(주)바이오엔진

Screening of Fungal Strains Producing Lovastatin, an Antihypercholesterolemic Agent

In-Young Bang, Seung-Whan Whang¹, Jung-Wan Kim¹,
Sang-Yong Kim² and Cheon-Seok Park*

Department of Food Science and Technology, Kyunghee University

¹University of Incheon, Department of Biology

²BioNgene Co., Ltd.

Over two hundred fungal strains from Korean soil were tested for the production of cholesterol-lowering agent, lovastatin. Each fungal strain was cultivated in the rapeseedmeal production medium (RPM). After growing for 7 days, the presence of lovastatin in the culture was examined by TLC analysis and HPLC. Nine different fungal strains were determined to produce detectable amounts of lovastatin, among which one fungal strain isolated from barnyard manure of Kanghwa island produced 25.58 mg/L of lovastatin in the production medium. The morphological observation combined with the determination of 18S-rRNA sequence suggested that the selected strain belongs to a member of *Aspergillus* sp..

Key words: lovastatin, *Aspergillus*, cholesterol

서 론

생활수준의 향상은 한국의 식생활 양상과 질병 구조에 많은 변화를 가져왔다. 특히 심혈관계 질환인 심장병, 동맥경화증 및 고혈압 등은 서구 여러 나라에 비해 10여년전까지만 해도 중요한 사망원인으로 취급되지 않았으나 최근 서구화된 식생활의 변화로 지방식이의 섭취량이 증가되면서 매우 중요한 사망원인으로 대두되고 있다⁽¹⁾. 특히 심혈관계 질환의 경우 혈중 콜레스테롤(cholesterol: C₂₇H₄₅OH) 양이 발병에 많은 영향을 미치고 있다. 이러한 콜레스테롤은 인지질과 함께 생체막의 중요한 구성성분으로써 포유동물의 근육, 뇌, 신경조직, 담즙, 혈액 및 지방질에 널리 분포되어 있으며, 막의 유동성 조절에 관여하고 있으며, 스테로이드 계 호르몬과 담즙산 및 적혈구의 파괴를 보호하는 등 포유동물의 생리기능에 매우 중요한 영향을 미치고 있다⁽²⁾. 또한 성인의 경우 매일 약 1,000 mg 정도의 콜레스테롤을 신체의 거의 모든 세포에서 생산하며 이와 더불어 약 300 mg 정도를 음식물로부터 섭취한다. 특히 지방식의 과잉 섭취는 생체 내의 총 콜레

스테롤 수치를 증가시켜 고지혈증을 일으키게 된다⁽³⁾. 고지혈증은 혈관 내 지질 양의 증가로 인하여 혈관이 축소되거나 막히고, 나아가 각종 심혈관 질환을 일으키는 현대의 주요 질병 중 하나이다.

이러한 고지혈증의 치료제로써 최근 가장 많이 사용되어지고 있는 것이 statin 계통의 물질이다. Statin 계통의 물질은 생체 내에서 콜레스테롤의 합성을 저해하여 결과적으로 콜레스테롤 양을 저하시킨다⁽⁴⁾. 콜레스테롤 합성반응은 acetyl CoA를 시작으로 하여 20여개의 효소반응을 거치게 된다. 초기 연구에서는 콜레스테롤의 생합성을 억제하기 위하여 생합성 마지막 경로에 관여하는 desmosterol 환원효소에 의해 촉매 생성되는 sterol로의 전환을 저해하는 trilaranol 등이 연구되어졌으나, 이 경우 중간 대사산물들에 의한 문제가 나타나게 되었다. 그러한 대안에 대한 연구로 새로이 모색되어진 것이 생합성 경로 중 desmosterol 환원 효소보다 앞선 단계인 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) 환원효소가 관여하는 반응을 저해하는 것이었고, 중간 대사산물의 문제를 해결할 수 있는 방안으로 대두되었다⁽⁵⁾.

HMG-CoA 환원 효소 저해제는 일반적으로 4가지(Lovastatin, Compactin, Simvastatin, Pravastatin)가 많이 알려져 있다. 1976년 Endo 등에 의해서 곰팡이 *Penicillium citrinum*의 이차대사 산물로 생기는 compactin이 최초로 콜레스테롤의 합성을 저해하는 물질로 처음 발견되었다^(6,7). 이러한 자연계에

*Corresponding author : Cheon-Seok Park, Department of Food Science & Technology, Kyunghee University, Yongin 449-701, Korea
Tel: 82-31-201-2631
Fax: 82-31-204-8116
E-mail: cspark@khu.ac.kr

서의 콜레스테롤 합성 저해제의 탐색은 약 10년 이상을 이어오면서 새롭고, 강력한 효과를 가진 물질들을 발견하였다⁽⁸⁾. 특히 *Monascus ruber*와 *Aspergillus terreus* 등에서 발견되어진 lovastatin은 현재까지 가장 보편적인 콜레스테롤의 합성을 저해하는 물질로 사용되어오고 있다. 또한 최근에는 이러한 lovastatin이 버섯 종류인 *Pleurotus*에서도 생성된다는 보고가 있다⁽⁹⁾.

본 연구에서는 대표적 콜레스테롤 저해제인 lovastatin을 생산하는 곰팡이 균주를 처음으로 한국의 여러 토양시료로부터 탐색, 선별하였고 나아가 탐색 균주의 lovastatin 생산량을 측정함으로써 국내 곰팡이에서 lovastatin 생산 균주의 분포 정도를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

균주 채취 및 순수 분리

토양시료는 인천광역시외의 고잔동, 남촌, 도림동, 논현동, 강화도(상동암리, 삼성리), 제주도, 완도 등에서 수집하였고, 수집 대상은 토양, 퇴비, 밭주변(오이밭, 깨밭, 가지밭, 고추밭, 콩밭 등), 벌집주변, 가축의 변 등이었다. 시료를 채취하여 적당한 희석배율로 증류수에 현탁한 후 PDA(Potato 200 g, glucose 20 g, agar 15 g; Difco, Maryland, USA)고체배지에 도말하여 생성된 곰팡이를 순수분리하여 저장하고, 필요시에 PDA 고체 배지에 접종한 후 30°C에서 배양하여 사용하였다.

배지 및 배양 조건

순수분리한 곰팡이균주를 PDA 배지에서 일주일 배양한 후 tween80/saline(tween 80 stock 25 mL, NaCl 8 g, water 1 L; tween 80 stock solution은 tween 80 10 mL에 증류수를 최종부피 1 L가 되게 첨가)을 10 mL 넣고 조심스럽게 포자를 회수하여 포자액을 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. Lovastatin 생산 배지인 RPM 액체배지⁽¹⁰⁾ 50 mL에 냉장고에 보관된 순수 분리한 곰팡이균주의 포자액 1 mL를 접종한 다음 일주일동안 30°C, 260 rpm으로 7일간 진탕배양하여 곰팡이에서의 lovastatin 생산을 확인하였다.

곰팡이균주의 현미경 검정

포자를 잘 관찰하기 위해 포자 염색법을 이용하였다⁽¹¹⁾. 우선 슬라이드 글라스 위에 멸균수를 한 방울 떨어뜨리고 균주를 잘 도말한 다음 lactophenol cotton blue 염색 용액(phenol crystals 20 g, lactic acid 20 mL, glycerol 40 mL, cotton blue 0.05 g/L)을 떨어뜨리고 약 30분동안 실온에서 염색하였다. 슬라이드 글라스 위에 멸균수를 한 방울 떨어뜨린 다음 멸균수 위에 활성화시킨 곰팡이균주를 백금으로 균체를 긁어낸 것을 넣은 다음 잘 섞어주었다. 기포가 생기지 않도록 커버글라스를 덮은 후 현미경(Axioplan 2, Carl Zeiss, Swiss)을 이용해 저배율에서 고배율로 바꾸어가며 현미경으로 균주를 검정하였다.

Lovastatin의 추출

배양된 배지에 진한 염산을 이용하여 pH 2.0-3.0으로 적정하고, 그 중 5 mL의 배양액을 취하였다. 취한 sample 부피에

1:1 비율의 ethyl acetate를 넣고 2시간 동안 진탕혼합한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 층을 분리하였다. 유기용매층을 1.5 mL tube에 옮겨 담은 다음 건조하였다. 건조된 시료에 50 µL의 메탄올을 넣고 잘 녹여주어 TLC 및 HPLC의 시료로 사용하였다.

TLC를 이용한 lovastatin의 생산 유무의 확인

Activation시킨 TLC plate(KC18F silica gel; Merck, Germany)에 10 µL의 시료를 spotting 하였다. Spotting한 TLC plate를 1분정도 상온에서 자연 건조한 다음 전개용매(MeOH: 0.1% phosphoric acid = 9:1)가 들어있는 TLC chamber에서 전개시킨 후 건조시켰다. 건조한 TLC plate를 발색용액(phosphomolibdic acid 25 g in methanol 250 mL)으로 처리한 후에 가열하여 TLC plate를 발색시켰다. Lovastatin은 노랑바탕에 남색 spot이 발색되었다. 비교시료로는 0.1% lovastatin을 사용하였다.

HPLC를 이용한 lovastatin의 정량

시료는 filtering kit [Nylon 66 syringe filter(13 mm, 0.45 µm), Whatman, USA]를 이용해 추출액 속의 불순물을 제거하여 사용하였다. 준비된 시료는 HPLC에 10 µL를 injection 하였다. 시료의 분리 및 lovastatin의 정량은 HPLC LC-10AT (Shimadzu, Japan) system을 사용하여 UV-VIS detector SPD-10A(Shimadzu, Japan)에서 역상 column [Luna 7 µm C₁₈; 250 mm×4.6 mm ODS]을 이용하여 수행하였다. 이동 용매로는 60% acetonitrile을 사용하였고 flow rate는 2 mL/min으로 하였다. 순수한 lovastatin을 여러 가지 농도별로 희석하여 HPLC를 통해 분리하고, 분리되어 나온 peak의 면적을 이용해 lovastatin 표준 곡선을 그린 다음 각 시료에서 얻어진 면적을 대입하여 lovastatin을 정량하였다.

결과 및 고찰

Lovastatin 생산 곰팡이 균주 탐색

토양시료는 인천광역시외의 일대와 강화도, 백령도, 제주도 등의 밭과 야산의 토양샘플에서 채취하였다. 시료로부터 순수 분리된 200여개의 곰팡이 균주를 실험실에 포자상태로 저장하였고 저장된 곰팡이 포자를 PDA 고체배지에서 활성화시킨 후에 실험에 사용하였다. PDA 고체배지에서 활성화시킨 곰팡이 균주는 tween 80/saline 용액으로 포자액을 만들고, 기존에 lovastatin 생산균주로 알려진 *Aspergillus terreus*에서 lovastatin 생산용 배지로 사용된 RPM(rapeseedmeal production medium)⁽¹⁰⁾에 포자액을 1 mL씩 접종하여 30°C, 250 rpm으로 일주일동안 진탕 배양하였다. 일반적으로 곰팡이들이 1-2일 후에 작은 pellet을 형성하면서 자랐으나 경우에 따라서는 한 덩어리의 큰 pellet을 형성하는 경우도 있었다. 배지의 색깔은 일정한 경향이 없었고 특이적으로 노란색을 띄는 경우가 종종 관찰되었으나 lovastatin의 생산과는 관련성이 없었다. 특이한 점으로 본 실험에서 lovastatin을 생산하는 곰팡이로 알려진 균주들은 모두 PDA 고체배지 상에서 갈색 계통의 색을 띄었다.

본 실험에서 사용한 TLC 조건으로 lovastatin을 분리한 결

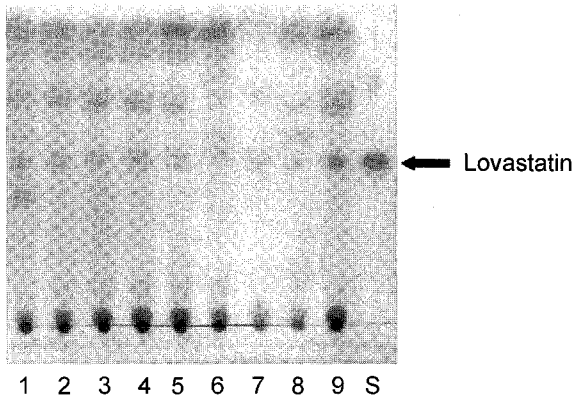


Fig. 1. Detection of lovastatin by TLC analysis.

Line1, Whan-Do; Line2, Cheju-do 3-2-a; Line3, Incheon a; Line4, Cheju-do 3-2-b; Line5, Incheon 1-3-b; Line6, Incheon 1-3-a; Line7, Incheon 5; Line8, Kanghwa-do 4; Line9, Samsung-Ri(ISR); LineS, Lovastatin standard

Table 1. Lovastatin producers isolated from Korean natural samples

Fungi	Source
ISR (Samsung-Ri)	Barnyard manure
ISS (Incheon a)	Soil
IWD (Whan-Do)	Soil
IDP-1(Incheon 1-3-a)	Soil
IDP-2Incheon 1-3-b)	Soil
INC(Incheon 5)	Cucumber leaf
ICS-1(Cheju-do 3-2-a)	Soil
ICS-2(Cheju-do 3-2-b)	Soil
IGH(Kanghwa-do)	Honey comb

과 여러 곰팡이에서 생산되는 다른 이차대사산물들과 확연히 구분됨을 관찰할 수 있었다. lovastatin의 경우 Rf value가 약 0.5-0.6 사이에서 뚜렷한 밴드를 형성하였고 다른 이차 대사산물들은 이보다 높은 Rf value에서 관찰되었다. 현재까지의 lovastatin 확인방법으로는 HPLC가 가장 많이 사용되었고 최근에는 lovastatin의 항진균 활성을 이용한 agar plug 방법을 이용하기도 하였다⁽¹²⁾. 본 실험에서 사용한 TLC 방법은 간단하게 lovastatin을 배양액으로부터 확인하는데 사용될 수 있으므로 다량의 시료를 사용하여 짧은 시간 내에 lovastatin의 존재유무를 확인하는 실험에 이용이 가능할 것으로 생각되어진다. TLC를 이용한 lovastatin의 정성적 확인은 약 20 ng정도의 소량도 가능한 것으로 확인되었다.

TLC와 HPLC를 이용한 lovastatin 생산균주의 선발

일차적으로 lovastatin 생산 유무를 TLC 상으로 확인해본 결과 200여개의 곰팡이 균주에서 9개의 균주만이 TLC 상으로 Lovastatin의 생산여부를 확인할 수 있었다(Fig. 1, Table 1). 이는 4.5% 정도의 비교적 높은 비율로 lovastatin 생성균주가 국내토양에 분포하고 있다는 것을 의미한다. TLC방법으로 확인된 9개 균주의 추출액 속에 lovastatin이 존재하는지를 HPLC를 이용하여 재확인하였다. 기준시료로 순수한 lovastatin을 사용하여 HPLC분석을 한 결과 retention time이 약 10분대에서 peak를 관찰할 수 있었고, 이는 9개의 균주에

Table 2. Production of lovastatin by 9 fungal isolates

Fungi	Lovastatin (mg/L)
Whan-Do	14.94
Cheju-do 3-2-a	12.14
Incheon a	2.36
Cheju-do 3-2-b	19.42
Incheon 1-3-b	2.58
Incheon 1-3-a	15.86
Incheon 5	11.94
Kanghwa-do 4	11.34
Samsung-Ri 1	25.58

서도 모두 같은 retention time에서 peak를 관찰할 수가 있었다. 또한 wavelength 200-275 nm 사이에서의 UV spectrum을 관찰한 결과 9개 곰팡이 시료에는 lovastatin과 같은 metabolite를 함유하고 있음을 알았다. 따라서 일차 선발된 9균주가 모두 lovastatin을 생산함을 확인하였다. 각 균주들의 lovastatin 생산량을 HPLC를 사용하여 정량하였다. 정량결과 삼성리 퇴비에서 분리한 ISR균주가 다른 8개의 균주에 비하여 1.5배에서 최대 10배 정도 높은 생산을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 2). 본 실험의 결과 ISR 균주의 경우 25.58 mg/L의 lovastatin을 생산함을 알 수 있었다. 이는 기존에 보고된 *Aspergillus terreus*에서의 생산량(400 mg/L) 보다 약 15.6배 정도 낮은 것이다⁽¹⁰⁾. 하지만 본 실험에서는 한정된 지역에서 적은 양의 균주를 대상으로 lovastatin 생산균주를 탐색하였으므로 좀 더 적극적인 탐색 program에 의해서 좀 더 많은 양의 lovastatin을 생산하는 균주를 선발할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 선발된 균주를 사용하여 최적화된 조건의 배지를 사용하면 같은 균주로도 좀 더 많은 양의 lovastatin을 생산할 수 있다.

탐색 균주의 동정

삼성리 퇴비 균주(ISR)는 PDA 고체배지에서 30°C로 일주일 동안 배양했을 때 황갈색을 띠는 균주였다. *Aspergillus terreus*와 고체배지 상으로 비교했을 때는 약한 열은 갈색이었다. ISR균주를 현미경으로 검경한 결과 포자의 모양은 약간 타원형이었으며 균사의 모양은 격막이 있었으며, 확실한 분생포자(conidiospore)의 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 진균은 분생자(conidia)가 형성된 방법과 분생자의 모양에 의해 동정 분류된다⁽¹²⁻¹⁴⁾. Conidia는 크게 분아형과 엽상형 두 가지로 나뉘어지는데 현미경 검경 결과 얻어진 소병자포자의 모양은 플라스크 혹은 작은 병모양의 소병자(경자, phialide)로부터 생산되는 분아형 분생자를 가지는 것을 알 수 있었다. 이것은 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Wangiella*속 곰팡이가 지니는 특징이다. 일반적으로 *Aspergillus*는 유격벽 균사를 갖는 곰팡이로써 phialoconidia를 가진다. 분생자병(conidiophore)이 팽창된 정낭을 갖는 것이 특징이며 정낭위에 1-2층의 phialides가 있다. 반면 *Penicillium*은 정낭없이 기저편자(metulae)가 phialides로 가지를 치면서 솔(brush)모양을 가지는 것이 특징으로 알려져 있다. 따라서 형태학적인 특징으로 미루어 보아 ISR균주는 *Aspergillus* sp.로 추정되어진다. ISR 균주의 DNA를 분리하고 18S ribosomal RNA 유전자를

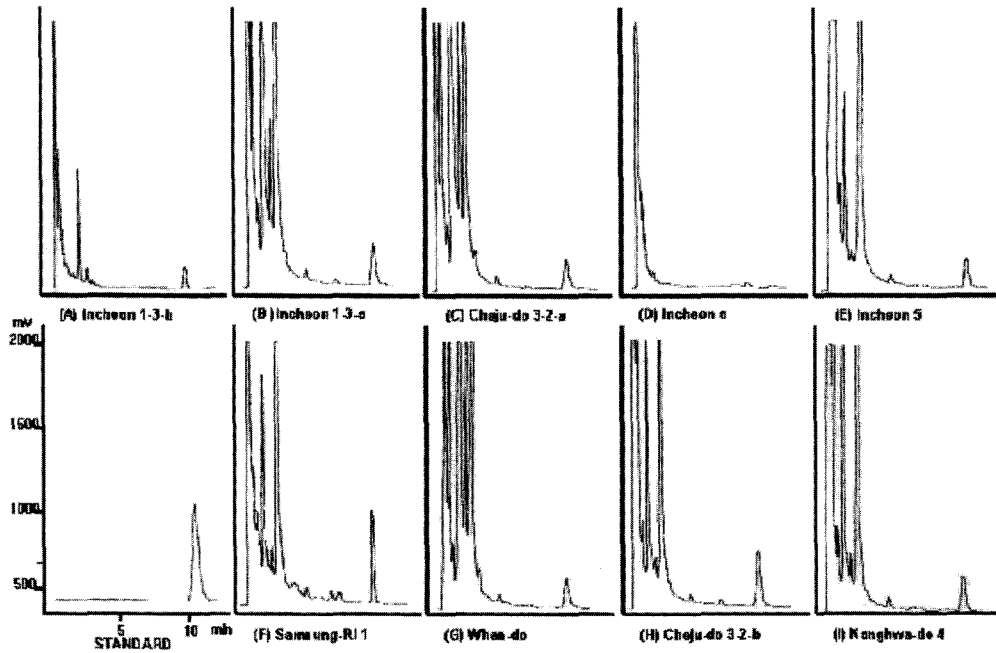


Fig. 2. HPLC analysis of lovastatin production by nine lovastatin producing fungi screened from Korean soil.

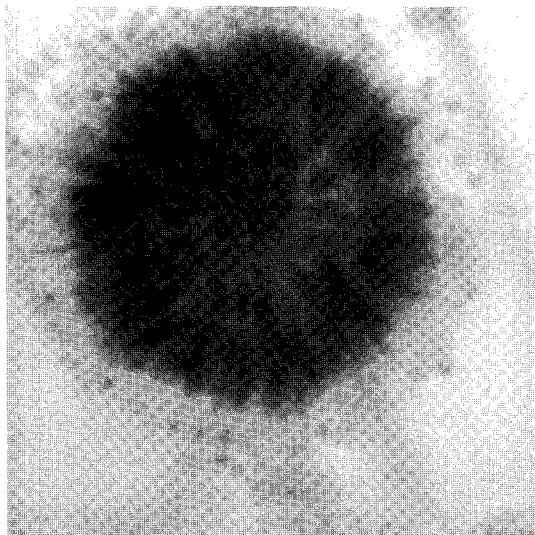


Fig. 3. The morphology of conidiospore (x1000) in *Aspergillus* sp. (ISR).

Spore staining of conidiospore was performed using lactophenol cotton blue.

PCR로 증폭하여 유전자 염기서열을 비교한 결과도 *Aspergillus* 계통의 곰팡이들이 갖고 있는 18S ribosomal RNA 유전자의 염기서열과 가장 높은 상동성(99%)을 보여주었다(data not shown). 위 결과를 바탕으로 ISR균주는 *Aspergillus* 속에 속하는 곰팡이로 동정하였다. 하지만 좀더 세부적인 종까지 알아보기 위해서는 좀더 자세한 균주 동정이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

인천광역시 일대와 강화도, 백령도, 제주도 등 한국 토

양으로부터 순수분리된 200여 종의 곰팡이 균주에서 콜레스테롤 합성 저해제인 lovastatin의 생산 여부를 확인하였다. Lovastatin 생산은 rapeseed meal이 함유된 RPM 배지를 사용하였고 TLC와 HPLC를 사용하여 lovastatin의 생산을 조사하였다. 결과 200여 균주 중 9개의 균주만이 lovastatin을 생산하였고, HPLC로 확인한 결과 삼성리 퇴비 균주(ISR)에서 25.52 mg/L의 생산량을 보였다. 포자의 형태학적 구조와 18S rRNA 유전자의 염기서열 결과 삼성리 퇴비 균주는 *Aspergillus* sp.로 확인되었다.

감사의 글

본 연구내용은 2002년도 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (01-PJ1-PG3-21100-0002) 연구비 지원에 의하여 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. National Statistical Office. Annual Report on the Cause of Death Statistics. National Statistical Office, Korea (1996)
2. Sehna, F. Hormonal role of ecdysteroids in insect larva and during metamorphosis, pp. 271-278. In: Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action. Koolman, J. (ed.). Thieme Medical Publishers, New York, USA (1989)
3. Grover, S.A., Coupal, L. and Hu, X.P. Identifying adults at increased risk of coronary disease. J. Am. Med. Assoc. 274: 801-806 (1995)
4. Stryer, L. Biochemistry, 4th ed. pp. 685-712. W.H. Freeman & Company, New York, USA (1995)
5. Tobert, J.A. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A reductase Circulation 76: 534-538 (1987)
6. Endo, A., Kuroda, M. and Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. J. Antibiot. 29: 1346-1348 (1976)

7. Endo, A., Kuroda, M. and Tanzawa, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites, having hypercholesterolemic activity. FEBS Lett. 72: 323-326 (1976)
8. Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H.M., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Alberts-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. and Springer, J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3957-3961 (1980)
9. Nina, G.C., Jozica, F., Alesksa, C. and Neda, B. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Lett. 111: 203-206 (1993)
10. Gyorgy, S., Gyorgy, M. and Robert, P.T. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. Biotechnol. Lett. 20: 411-415 (1998)
11. Sutton, D.A., Fothergill, A.W and Rinaldi, M.G. Guide to Clinically Significant Fungi. Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1998)
12. Sitaram Kumar, M., Pallapothu, M.K., Hemant M.S and Sadhukhan, A.K. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. J. Microbiol. Methods 40: 99-104 (2000)
13. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A, Tenover, F.C and Tenover, R.H. Manual of Clinical Microbiology. pp. 699-854. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA (1995)
14. St-Germain, G. and Summerbell, R. Identifying Filamentous Fungi. Star Publishing Company, Belmont (1996)

(2003년 4월 17일 접수; 2003년 5월 16일 채택)