

고체 배양법에 의한 Lovastatin 생산

김현수[†] · 박지현

계명대학교 미생물학과

Production of Lovastatin in Solid Culture

Hyun-Soo Kim[†] and Ji-Hyun Park

Dept. of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Cultivation conditions for overproduction of lovastatins were investigated from the lovastatin producing strain N-03 which was obtained with NTG (N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine) treatment from *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Produced lactone and acid form of lovastatin were detected, and analyzed by HPLC method. In liquid culture, medium No. 2 containing soy protein produced higher amounts of the lovastatins than medium No. 1 (contained rapeseed oil). In solid culture, maximum production was obtained at 28°C for 15 days cultivation using cooked wheat bran. For the overproduction of lovastatin from this strain, solid culture method using plastic bag is more superior than liquid culture.

Key words: *Aspergillus terreus*, HMG-Co A reductase, lovastatin

서 론

혈중 cholesterol 농도를 저해시키는 약제인 lovastatin (C₂₄H₃₆O₅, Mevinolin, Monacolin K, mevacorTM)은 cholesterol생합성 율속효소인 HMG-Co A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase를 경쟁적으로 저해하는 작용을 한다(1,2). Lovastatin은 2차대사산물로서 생산되며 지금까지 연구된 생산균으로는 *Penicillin* sp.(3), *Monascus ruber*(4,5) 그리고 *Aspergillus terreus*(1)가 알려져 있다.

이들 생산균 중 *A. terreus*가 lovastatin의 생산균으로 일반적으로 연구가 수행되어 있으며(6-10) 발효에 의해 생산된 lovastatin은 강력한 반합성 statin인 simvastatin의 전구체로도 이용된다(11).

최근 cholesterol 생산저해물질로 알려진 균주의 검색결과 주로 곰팡이 유래인 *Aspergillus terreus*, *Monascus* sp.에서 lovastatin, mevastatin, pravastatin의 생산이 보고되고 있으며, 이들 균주가 항암효과로서 세포의 G1/S transition을 저해한다는 연구가 계속 수행되고 있다(12,13).

Lovastatin의 생산은 일반적으로 복합배지에서 회분배양에 의한 생산과 28°C, pH 5.8~6.3에서 10일 이상 유가식 배양에 의한 생산성 증대(6)의 보고도 있다. 또한 발효생산과 함께 배지의 성분이 lovastatin의 생산성과 생산속도에 영향을 미치므로 생산 배지의 최적화 연구가 수행되어 있다(14). 최근 lovastatin의 생합성은 탄소원과 질소원의 종류에 의존하

며 C:N의 비율에 따라 *A. terreus*의 생육과 lovastatin생산에 미치는 영향에 관한 보고도 있다(15).

본 연구는 전통누룩미생물(16)인 *A. terreus*로부터 lovastatin을 생산하는 배양 코지(koji)를 제조하여 다양한 분야의 응용을 목표로 하였다. 전통누룩은 자연에 존재하는 각종 미생물이 생육하여 주류제조에 당화제 및 발효제로서 특유의 기능을 하고 있다(1,2,4-6). 곰팡이를 비롯한 이들 미생물은 다양한 생리기능 물질을 생산하며 산업 미생물로서의 이용 면이 우수하다. 누룩 곰팡이 중 *Aspergillus* 속은 한국 고유의 식품 및 발효공업 등에 중요한 역할을 하는 속으로 토양, 식품 및 공업제품 등에 대단히 넓게 분포한다. 또한 이 속은 amylase와 protease 활성이 강하여 예로부터 우리나라를 비롯한 동양 각국에서 주류, 발효 등의 양조에 이용하였으며 현재에는 diastase, glucoamylase, protease와 같은 효소제 및 의약품의 생산에 이용되고 있다.

지금까지 *A. terreus*로부터 lovastatin 생산은 회분(또는 유가식)배양법을 통하여 대부분 생산을 하고 있으나 György 등(17)이 미량원소를 첨가하여 고체배양한 결과 lovastatin의 생산 가능성을 보고하였다.

본 연구는 공시균인 *A. terreus* 변이주로부터 lovastatin의 생산에 영향을 미치는 탄소원 및 질소원을 이용하는 다양한 액체배양법과 비교하여 고체배양법(koji제조)을 통하여 산업적으로 유용한 lovastatin의 대량생산조건을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

[†]Corresponding author. E-mail: hskim@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-6447

재료 및 방법

사용 균주

공시균은 *Aspergillus terreus* ATCC 20542를 NTG 처리하여 얻은 변이주(미공개)를 사용하였고, 시험균은 gram 양성세균으로 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, gram 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, 곰팡이는 *Aspergillus fumigatus* KCTC 6145, 효모는 *Candida albicans* KCTC 7965를 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

공시균의 액체배양은 탄소원과 질소원을 고려하여 포자 접종법으로 No. 1 배지(lactose 40 g, rapeseed oil 3 g, KNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g/L, pH 5)에 spore 용액(10⁸ spore/mL)을 100 µL씩 접종하여 28°C, 220 rpm에서 5, 7, 13일간 배양하였다. No. 2배지는 균사체 접종법으로 전배양 배지(glucose 20 g, malt extract 20 g, bacto-peptone 3 g/L, pH 6.8) 25 mL에 spore용액을 250 µL접종하여 28°C, 220 rpm에서 24시간 전배양하고, 본배양 배지(lactose 60 g, yeast extract 10 g, soy protein 2 g, KCl 2 g, KH₂PO₄ 0.8 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g, betaine 0.6 g, PEG 1500 2 mL/L, pH 6.8)에 3%되게 접종하여 No. 1 배지와 같은 조건으로 배양하였다.

고체배양에 사용된 분쇄밀 및 쌀의 경우 호화전분은 autoclave로 가압 멸균(121°C, 1기압, 20분)하여 사용하였으며 생전분(분쇄밀)은 ethylene oxide gas로 멸균(실온 24 hr)하여 사용하였다. 각각 멸균한 호화전분 및 생전분 10 g을 삼각 flask에 공시균의 spore용액 100 µL씩 접종하고 28°C, 36°C에서 6, 9, 15, 30일간 배양하였다.

시험균주의 배양은 세균의 경우 LB배지(peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0)에 1~2일 배양하여 4°C에서 보존하여 사용하였고, 곰팡이는 GPM배지(glucose 2%, peptone 0.1%, malt extract 0.1%, agar 2%, pH 6.5)에 접종하여 28°C에서 5~7일간 배양한 다음, spore용액을 제조하여 4°C에서 보존하여 사용하였다. 효모류는 YGP배지(yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2%, pH 6.0)에 28°C 5~7일 배양하여 4°C에 보존하여 사용하였다.

Lovastatin standard(lactone form, acid form)제조

공시균이 생산한 lovastatin을 정량하기 위하여 lactone form 및 acid form을 제조하여 표준 곡선을 작성하여 정량하였다. Lactone form의 제조는 1:1의 비율로 CH₃CN과 H₂O를 제조 후 1 N HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하여 lactone form lovastatin(Sigma Co.)을 첨가하여 20분간 sonication한 후 filtration하고 5 µg/mL로 희석하여 제조하였다. Acid form은 lactone form lovastatin(Sigma Co.) 250 µL(1 mg/mL-MeOH)를 dry한 후 lovastatin 250 µg에 0.1 N NaOH 150 µL를 첨가한 후 1 N HCl을 사용하여 pH 7.7로 조정하였

다. H₂O를 첨가하여 250 µL로 채운 후 CH₃CN을 첨가하여 최종 농도가 250 µg/500 µL(H₂O+CH₃CN)이 되게 하였다.

Lovastatin의 추출

액체 배양액으로부터 lovastatin의 추출은 배양일수별로 채취한 각각의 배양액 2 mL에 CH₃CN 2 mL와 100 µL의 conc. H₃PO₄를 첨가하여 1시간 동안 흔들여 주고 10분간 원심분리하여 상등액을 여과한 후 분석하였다.

고체배양체로부터 lovastatin의 추출은 배양체 0.5 g에 15 mL CH₃CN를 첨가하고 5분간 sonication한 후, 120 rpm으로 1시간 동안 shaking하고 10분간 원심분리한 후 상등액 4 mL에 멸균수 4 mL과 conc. H₃PO₄ 100 µL를 첨가하였다.

Lovastatin HPLC 분석

Lovastatin 표준물 및 추출물은 C₁₈ column을 이용한 HPLC(Shimadzu LC 10-A, Japan)에서 flow rate는 1.0 mL/min, UV 237 nm의 조건에서 10 µL씩 주입하여 0.1% H₃PO₄가 포함된 60% CH₃CN으로서 용출시켜 분석하였다. Peak의 면적은 Shimadzu Co.의 integrator를 사용하여 분석하였다.

항균성 물질의 in vitro 역가 검정

고체 배양체(koji)에 생산된 항균성 물질의 확인은 agar diffusion법을 사용하였다. 배양체의 CH₃CN 추출물 40 µL를 paper disc(φ 6 mm, Advantec Co.)에 첨가하여 건조한 후 시험균이 함유된 평판 배지 위에 얹고 효모와 곰팡이는 28°C, 세균은 37°C에서 1~2일간 배양하여 생성된 clear zone의 유무 및 크기로서 판단하였다.

Lovastatin의 대량생산조건

공시균을 대상으로 고체배지를 이용하여 lovastatin의 생산조건을 검토한 결과에 따라 lovastatin의 대량 생산 조건을 확립하였다. 생산용기는 통기량 조절을 위해 cap을 부착하는 plastic bag을 사용하였으며 분쇄밀의 양에 따라 수분량을 달리하여 배양하였다. Cap의 사용은 한 방향 또는 양방향으로 각각 실행하였으며 lovastatin의 생산은 HPLC로 확인하였다.

결과 및 고찰

표준 lovastatin의 HPLC에 의한 정량

고체 및 액체 배양시 생산되는 lovastatin의 양을 정량하기 위하여 표준 lovastatin의 acid form 및 lactone form을 농도별로 CH₃CN에 용해시킨 다음 HPLC를 이용하여 peak의 면적비로서 정량하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 표준 lovastatin의 정량을 통하여 배양체가 생산한 lovastatin의 양은 이 결과를 면적으로서 산출하였다.

액체배양법에 의한 lovastatin의 생산 조건 검토

공시균주의 액체 및 고체배양법을 통한 lovastatin생산 조건을 검토하기 위하여 먼저 지금까지 *A. terreus*로부터 lo-

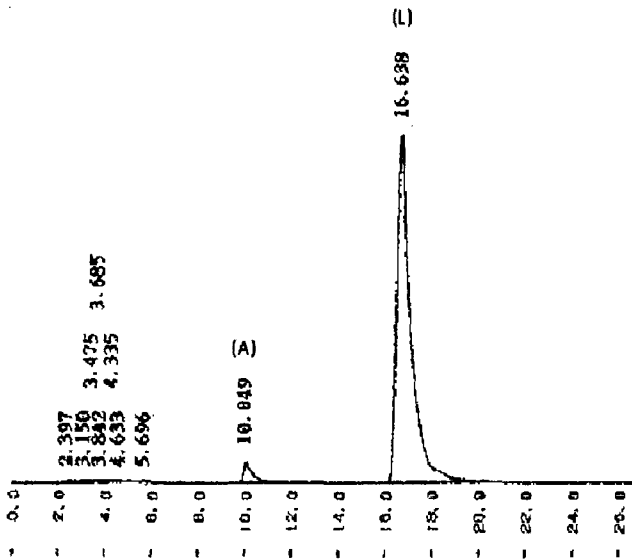


Fig. 1. HPLC patterns of standard lovastatins. (A) Acid form (L) Lactone form.

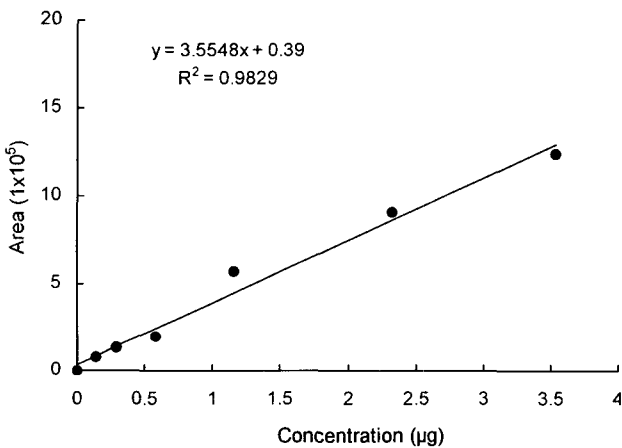


Fig. 2. Standard curve of lactone form lovastatin from HPLC.

vastatin생산은 액체배양법을 이용하는 결과(6,10,13)로부터 액체배양에 의한 lovastatin생산을 검토하였다.

액체 배지 No. 1 및 No. 2를 사용한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 균사체 접종법인 No. 2배지에 배양한 경우가 No. 1배지를 사용한 경우보다 lovastatin 생산이 우수하였다. 이 결과에서 공시균주는 탄소원보다 질소원이 lovastatin의 생산에 영향을 미친다고 판단되었으며, 배양 13일째에 lactone form이 가장 많은 양을 생산하기 때문에 액체배지에 의한 lovastatin의 대량 생산은 No. 2배지가 적합한 것으로 사료되었다. 이 결과는 lovastatin생산은 배양 15일 이후에 최대에 도달한다는 보고(10)와 일치하였다.

고체배양법에 의한 lovastatins 생산 조건 검토

앞에서 실험한 공시균의 액체배양을 통한 lovastatin생산성과 산업적 응용을 위해 고체배양(koji)에 의한 lovastatin생산을 검토하였다. 고체배양 시료는 분쇄밀과 쌀을 이용하였으며 배양체(koji) 제조용으로 호화 및 생전분(분쇄밀)을

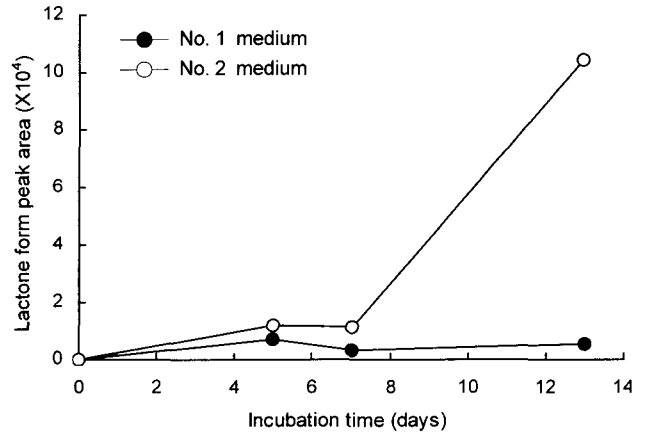


Fig. 3. Liquid culture for the production of lactone form lovastatin.

대상으로 중온(28°C)과 고온(36°C)에서의 생산성을 비교하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 28°C 배양이 36°C에 배양한 것보다 lovastatin의 생산성이 더 우수하였다. 이는 *Aspergillus terreus*가 lovastatin을 생산하는 최적 온도는 28°C임을 나타내는 Domsch와 Gams의 결과와 일치하였다(9). 배양체 종류에 따른 생산성은 호화시킨 분쇄밀이 가장 우수한 결과를 나타내었다. 또한 Fig. 5에서 보는 바와 같이 lovastatin의 안정성 시험에서 분쇄밀의 생전분 및 호화전분과 쌀 배양체의 30일째에 생산된 lovastatin의 경우 분쇄밀의 호화전분에서 생산된 lovastatin이 생전분의 1.5배, 쌀의 2배정도로 안정하였다. 따라서 이 결과에서 고체배양법에 의한 lovastatin의 대량생산은 분쇄밀의 호화전분으로 28°C에서, 15일간 배양하는 것이 가장 우수한 생산성을 보인다고 사료되었다.

항균성 물질 생산능 검토

*A. terreus*가 생산하는 acid form인 β-hydroxy acid은 수용성이며 항진균활성을 가진다(18). 따라서 공시균이 생산

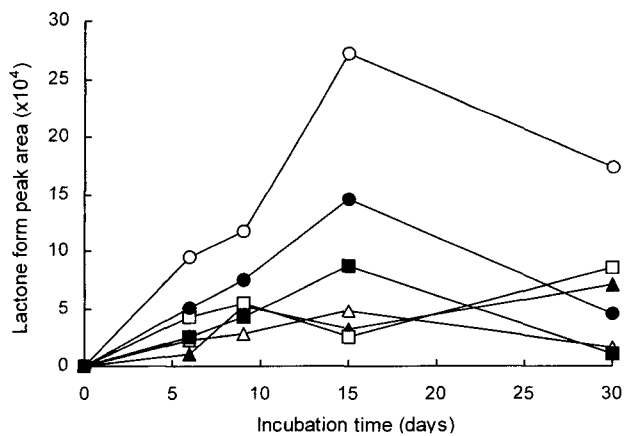


Fig. 4. Solid culture for the production of lactone form lovastatin. Rice koji 28°C —△—, 36°C —▲—. Raw wheat bran 28°C —□—, 36°C —■—. Cooked wheat bran 28°C —○—, 36°C —●—.

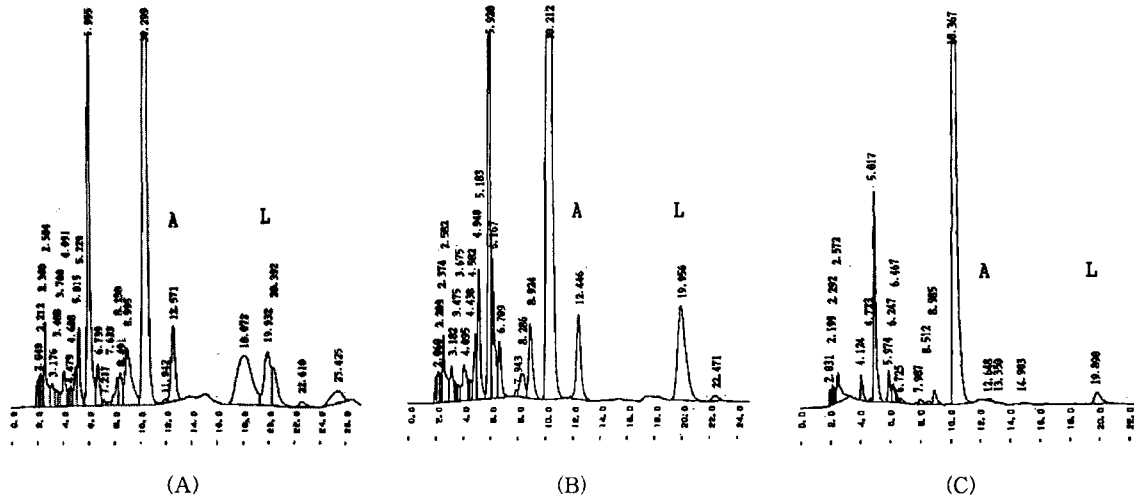


Fig. 5. Produced lovastatins from wheat bran and rice koji after 30 days. (A): Raw wheat bran, (B): Cooked wheat bran, (C): Rice koji, A: Acid form, L: Lactone form.

한 항균성 물질 생산의 항균효과를 세균과 진균을 대상으로 검토하였다. 각 배양체(koji)추출물의 항균 효과는 Table 1에서 보는 바와 같이 항균성 물질이 배양 6일째부터 생산되었으며, 배양일수별에 따라 항균성 물질이 큰 차이를 나타내지 않았으나, 배양 30일째 추출물이 *A. fumigatus*에서 대해 가장 우수한 항진균 효과를 나타내었다.

이들 결과는 고체배양을 통해서 acid form을 비롯한 항균성 물질이 생산되는 점에서 lovastatin 생산에 분쇄 및 호화 전분이 우수한 배양체라고 사료되었다.

Lovastatin의 대량생산

공시균을 대상으로 고체 배양하여 lovastatin의 생산조건을 검토한 결과 분쇄밀의 호화전분을 이용한 고체 배양법에서도 lovastatin의 대량생산성이 우수함을 확인하였다. 또한 공시균은 액체배양과 달리 미량 무기염류의 첨가 시 생산성

Table 1. Antimicrobial activity of extracted materials from various koji

Koji	Incubation time (days)	Inhibitory zone (ϕmm)			
		6	9	15	30
<i>E. coli</i>	RW ¹⁾	(12) ⁴⁾	(7)	12	13
	CW ²⁾	13	14	13	13
	R ³⁾	12	13	11	12
<i>S. aureus</i>	RW	(7)	(7)	13	12
	CW	10	14	13	13
	R	(13)	(13)	11	14
<i>C. albicans</i>	RW	(10)	(9)	(9)	(12)
	CW	(14)	(13)	(13)	(16)
	R	(11)	(12)	(10)	(9)
<i>Asp. fumigatus</i>	RW	14	20	24	34
	CW	26	26	26	37
	R	24	24	20	18

¹⁾RW: Raw wheat bran. ²⁾CW: Cooked wheat bran. ³⁾R: Rice koji. ⁴⁾Unclear zone.

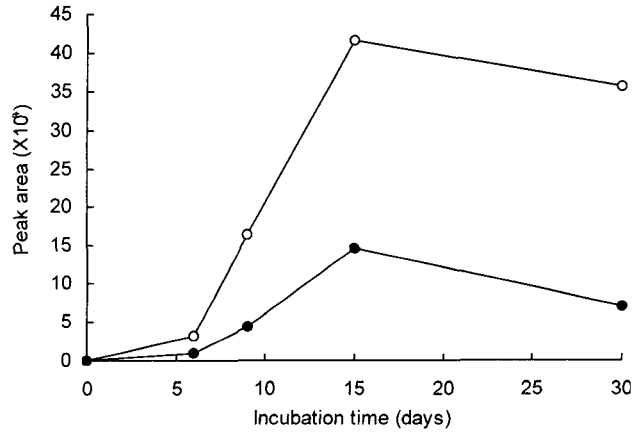


Fig. 6. Mass production condition of lovastatin from cooked wheat bran. Used cap site both —○—, one side —●—.

이 매우 낮은 결과를 나타내었으며(결과 미제재), koji 단독 배양 시 생산성이 우수하였다. 이들의 결과로부터 고체 배양의 방법에 따른 lovastatin 대량생산의 조건을 검토하였다. 배양용기로는 flask배양보다 통기량이 우수한 내열성 plastic bag을 사용하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 통기량을 조절하기 위해 cap을 두 방향으로 부착 후 배양한 결과 한 방향으로 부착한 경우보다 lovastatin 생산량이 월등히 높았으며 수분으로 인한 분쇄밀의 부패도 막을 수 있었다. 따라서 양방향 plastic bag에 분쇄밀 200 g과 멸균수 70 mL를 첨가하여 배양 시 배양 15일째 lovastatin의 생산량이 최대로 나타났다.

요 약

공시균인 *A. terreus* mutant로부터 lovastatin의 생산성을 극대화할 수 있는 조건을 확립하고자 액체배양법 및 고체 배양법을 이용하여 HPLC를 통해 분석하였다. Lovastatin의

생산을 위해 액체 배양에서는 균사체 접종법인 No. 2배지를 사용한 전배양 및 본배양법이 포자접종법인 No. 1배지를 사용한 경우보다 lovastatin의 생산이 더 우수하였다. 고체 배양법에서는 분쇄밀의 호화전분을 사용하여 28°C, 15일간 배양시 lovastatin의 생산이 가장 우수하였으며 대량배양을 위해 배양용기를 달리하여 배양하였으며 cap을 부착하는 내열성 plastic bag을 이용하여 배양한 결과 두 방향으로 cap을 부착하여 통기량을 조절한 배양에서 lovastatin의 생산이 가장 우수하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 일부 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Slater EE, Macdonald JS. 1988. Mechanism of action and biological profile of HMG CoA reductase inhibitors. A new therapeutic alternative. *Drugs* 36: 72-82.
- Finkelstein DB, Ball C. 1992. *Biotechnology of filamentous fungi*. Butterworth-Heinemann, London, UK. p 241-251.
- Michael HD, Peter L, Jim XS, Gale P, Edward W, Arnold S, Robert N, Lawrence F. 2002. A multiple-dose pharmacodynamic, safety, and pharmacokinetic comparison of extended and immediate-release formulations of lovastatin. *Clinical Therapeutics* 24: 112-125.
- Hubert S, Renana S, Hedi G, Markus N, Heinrich W, Winfried M. 2001. Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 62: 1545-1555.
- Brown MS, Faust JR, Goldsten JL, Kaneko I, Endo A. 1978. Induction of 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem* 253: 1121-1128.
- Endo A, Kuroda M, Tarazawa K. 1976. Competitive inhibitor of 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase by MC-230A and ML-236 B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72: 323-326.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Alberts-Schonbert G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Leish J, Springer J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci* 77: 3957-3961.
- Endo A. 1985. Compactin (ML-236B) and related compound as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J Med Chem* 28: 401-405.
- Domsch KH, Gams W. 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic press, London. Vol 1, p 114-117.
- Endo A, Negishi Y, Iwashita T, Mizukawa K, Hiramama M. 1985. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. *J Antibiot* 38: 444-448.
- Tobert JA. 1988. Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *J American Cardiology* 62: 28-34.
- Matilde M, Silvia B, Manuela R, Valeria C. 1999. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology* 21: 253-257.
- Soheil N, Rune B, June M, Erlend BS, Bjørn E, Kaare RN, Heidi KB. 1999. Lovastatin inhibits G1/S transition of normal human B-lymphocytes independent of apoptosis. *Experimental Cell Research* 252: 144-153.
- Srinivasu MK, Narasa RA, Om RG. 2002. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 715-721.
- Casas Lopez JL, Sanchez Perez JA, Fernandez Sevilla JM, Acien Fernandez FG, Molina Grima E, Chisti Y. 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 270-277.
- Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. 1998. Bibliographical study on microorganism of traditional Korea nuruk (since 1945). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 789-799.
- György Szakács, György Morovjan, Robert PT. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Lett* 20: 411-415.
- Kumar MS, Kumar PM, Sarnaik HM, Sadhukhan AK. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *J Microbiological Methods* 40: 99-104.

(2003년 10월 8일 접수; 2004년 2월 26일 채택)