

Lovastatin 고생산성 변이주의 신속 선별을 위해 통계적 방법을 적용한 Sporulation 배지 개발 및 Miniature 배양 방법 개발

안 현 정 · ^{1,2}정 용 섭 · 김 평 현 · † ²전 계 택
강원대학교 BT특성화학부대학 분자생명과학과, 강원대학교 생명공학연구소
¹전북대학교 응용생물공학부, ²바이오식품 소재개발 및 산업화연구센터
(접수 : 2007. 10. 11., 게재승인 : 2007. 10. 23.)

Mass Screening of Lovastatin High-yielding Mutants through Statistical Optimization of Sporulation Medium and Application of Miniaturized Fungal Cell Cultures

Hyun-Jung Ahn, Yong-Seob Jeong^{1,2}, Pyeung-Hyeun Kim, and Gie-Taek Chun^{2†}
School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Korea
¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Korea
²Research Center for industrial Development of Biofood Materials
(Received : 2007. 10. 11., Accepted : 2007. 10. 23.)

For large and rapid screening of high-yielding mutants of lovastatin produced by filamentous fungal cells of *Aspergillus terreus*, one of the most important stage is to test as large amounts of mutated strains as possible. For this purpose, we intended to develop a miniaturized cultivation method using 7 ml culture tube instead of traditional 250 ml flask (working volume 50 ml). For obtaining large amounts of conidiospores to be used as inoculums for miniaturized cultures, 4 components i.e., glucose, sucrose, yeast extract and KH₂PO₄ were intensively investigated, which had been observed to show positive effect on enhancement of spore production through Plackett-Burman design experiment. When optimum concentrations of these components that were determined through application of response surface method (RSM) based on central composite design (CCD) were used, maximum spore numbers amounting to 1.9 x 10¹⁰ spores/plate were obtained, resulting in approximately 190 fold increase as compared to the commonly used PDA sporulation medium. Using the miniaturized cultures, intensive strain development programs were carried out for screening of lovastatin high-yielding as well as highly reproducible mutants. It was observed that, for maximum production of lovastatin, the producers should be activated through 'PaB' adaptation process during the early solid culture stage. In addition, they should be proliferated in condensed filamentous forms in miniaturized growth cultures, so that optimum amounts of highly active cells could be transferred to the production culture-tube as reproducible inoculums. Under these highly controlled fermentation conditions, compact-pelleted morphology of optimum size (less than 1 mm in diameter) was successfully induced in the miniaturized production cultures, which proved essential for maximal utilization of the producers' physiology leading to significantly enhanced production of lovastatin. As a result of continuous screening in the miniaturized cultures, lovastatin production levels of the 81% of the daughter cells derived from the high-yielding producers turned out to be in the range of 80%~120% of the lovastatin production level of the parallel flask cultures. These results demonstrate that the miniaturized cultivation method developed in this study is efficient high throughput system for large and rapid screening of highly stable and productive strains.

Key Words : *Aspergillus terreus*, lovastatin, screening, sporulation medium, response surface method, miniaturized cultures

서 론

Lovastatin (C₂₄H₃₆O₅, M.W. 404.55)은 균사형성 곰팡이인

† Corresponding Author : School of Bioscience and
Biotechnology, Kangwon National University, Korea
Tel : +82-33-250-8547, Fax : +82-33-241-4627
E-mail : gtchun@kangwon.ac.kr

Aspergillus terreus 및 *Monascus ruber*에 의해 생합성 되는 이차 대사산물이다(1). Polyketide pathway를 통해 생합성되는 lovastatin은 naphthalen ring system, β-hydroxylacton 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 natural statin이다. Polyketide는 PKS (polyketide synthase)에 의해서 생합성 되는데 PKS는 그 구조 및 생합성 과정이 지방산 생합성에 관여하는 FAS (fatty acid synthase)와 합성 방법이 매우 유사하나

PKS의 경우, 출발물질로는 acetyl, malonyl, malonamyl, propionyl, butyryl, cyclohexyl, benzoyl, 그리고 3-hydroxy-5-amino benzoyl-CoA와 같은 매우 다양한 acyl group이 사용되며 신장물질로는 malonyl CoA 및 methylmalonyl-CoA가 이용된다. 또한, PKS system은 LNKS와 LDKS로 나뉘는데 LDKS 제거시 monacolin J가 합성된다고 보고되었다(Fig. 1)(2). Lovastatin의 β -hydroxyacid 형태는 콜레스테롤 생합성 과정의 속도 제한 단계인 HMG-CoA로부터 mevalonate의 전환에 관여하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase의 기질과 매우 유사하다(Fig. 2). 또한, HMG-CoA reductase의 기질 친화도보다 10,000배 정도 크기 때문에 HMG-CoA의 경쟁적 inhibitor로 작용하는 것으로 알려져 있다(3). 이러한 lovastatin은, LDL receptor를 증가시킴으로써 콜레스테롤로 전환될 수 있는 LDL (low-density lipoprotein)을 선택적으로 줄여 콜레스테롤의 양을 감소시킨다고 알려져 있다(4, 5).

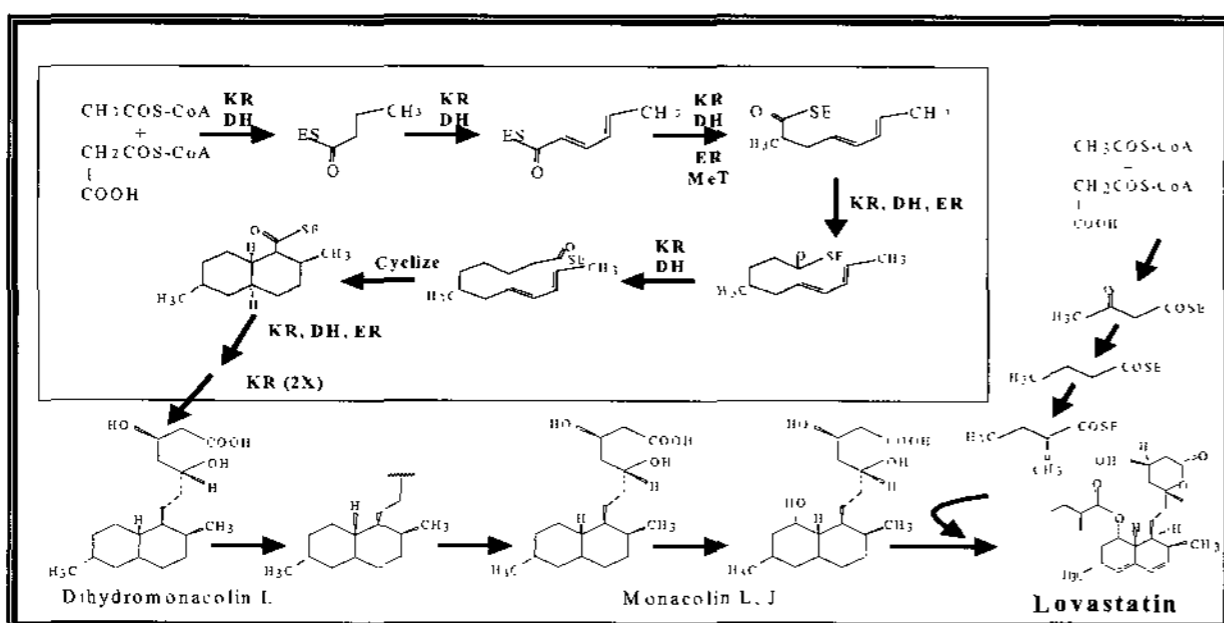


Figure 1. Lovastatin biosynthesis. The boxed region shows the set and order reactions considered to be necessary for the biosynthesis of dihydromonacolin L, the first recognized intermediate in lovastatin biosynthesis.

Lovastatin 고생산성 균주 개발에 있어서 가장 중요한 단계 중의 하나는 가능한 한 대량의 균주를 실험하여 그 가운데에서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는데 있다. 따라서 고생산성 균주의 신속한 선별을 위해 miniaturized culture를 통한 균주의 대량선별 방법을 확립해야 한다. 본 연구를 통해 개발된 miniaturized culture를 도입할 경우, 기존의 배양 방법을 사용하였을 때보다 약 10배 정도 더욱 신속하게 고생산성 균주를 선별할 수 있겠다. Miniaturized culture 조건을 최적화 하는데 있어서 중요한 요인 중 하나는 배양에 필요한 포자를 획득하는 단계이다. *Aspergillus terreus*를 고체 배지인 PDA (30 ml)에서 8일 동안 배양할 경우, 약 1.0×10^8 spores/ml을 획득할 수 있었다. 그러나 포자의 수가 이보다 많을 경우 lovastatin 생산성이 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과에 의해, 고농도의 포자를 획득할 수 있는 최적 조건의 탐색이 miniaturized culture를 통한 lovastatin 생산의 중요한 단계라고 할 수 있겠다.

미생물에서 유래된 대사산물의 생산성은 배지 성분, 균주 개발, 물리적 조건의 조절 등에 의해 향상될 수 있다. 일차원적 조사를 통한 배지 최적화는 매우 번거롭고, 시간과 비용이 많이 소모된다(6). 특히, 변수가 많아질 경우, 원하는 조건을 유지하는 것이 매우 어려운 단점을 가지고 있다. 통계학적인 배지 최적화 방법으로 배지의 성분을 조사하기 위한 Plackett-Burman design과 배지의 농도를 최적

화하기 위한 반응표면분석법 (response surface method) (RSM)이 있다. Plackett-Burman design은 $n+1$ 회의 실험을 통해, 종속변수에 영향을 미치는 n 개의 독립변수에 대해 연구하는 방법이다. 본 방법을 사용하게 되면 비교적 소량의 실험으로 다양한 변수들의 중요성을 확인하여 최적의 배지성분과 배양조건을 빠르게 결정할 수 있다(7-9). 반응표면분석법은 독립변수의 상호작용에 따른 종속변수의 변화에 대하여 최대반응치를 나타내는 최적조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석방법이다(10-12). *A. terreus*의 포자생산은 포자형성에 영향을 미치는 변수들의 수준간의 표면반응이라고 표현할 수 있다. 본 함수의 특성은 명확하진 않지만 일반적으로 2차 다항식으로 추정이 가능하다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

- Y : predicted response
- β_0 : constant
- β_i : coefficient for the linear effect
- β_{ii} : coefficient for the quadratic effect
- β_{ij} : coefficient for the interaction effect
- x_i, x_j : the coded level of variable X_i and X_j

본 연구에서는 Plackett-Burman 방법을 통해 포자 형성에 영향을 미치는 성분들을 선별하고, 반응표면분석방법을 이용하여 seed배양 배지의 성분들의 최적 농도를 결정하였다. 그리고 최종적으로 획득한 포자를 이용한 miniaturized culture를 수행하였다.

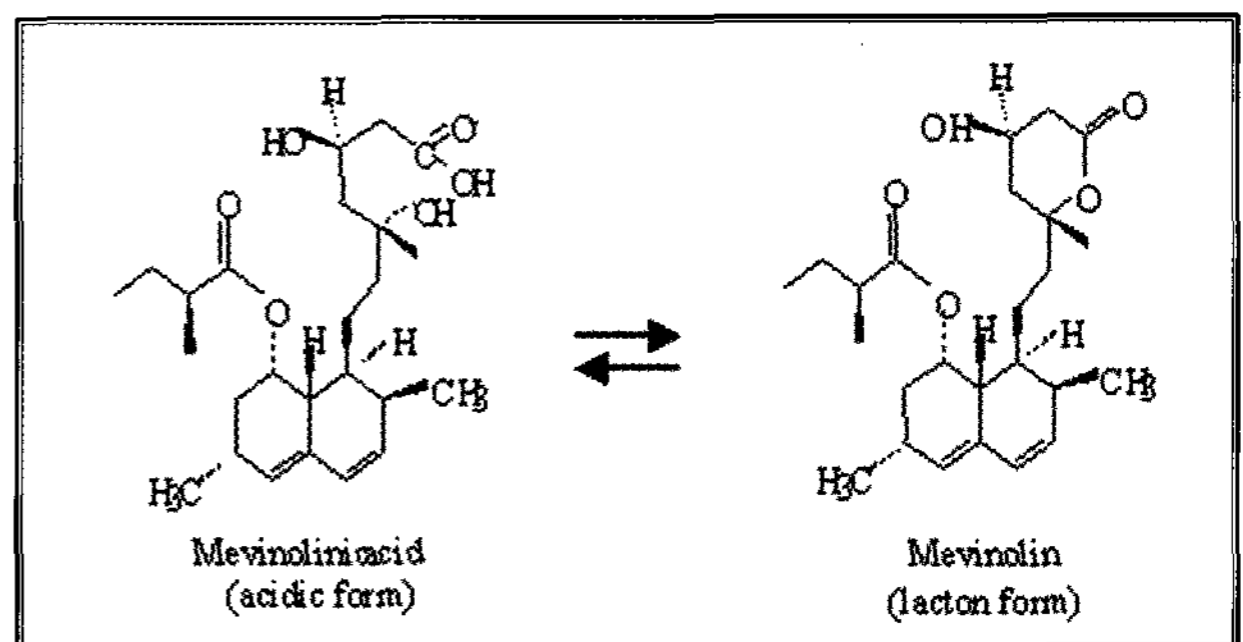
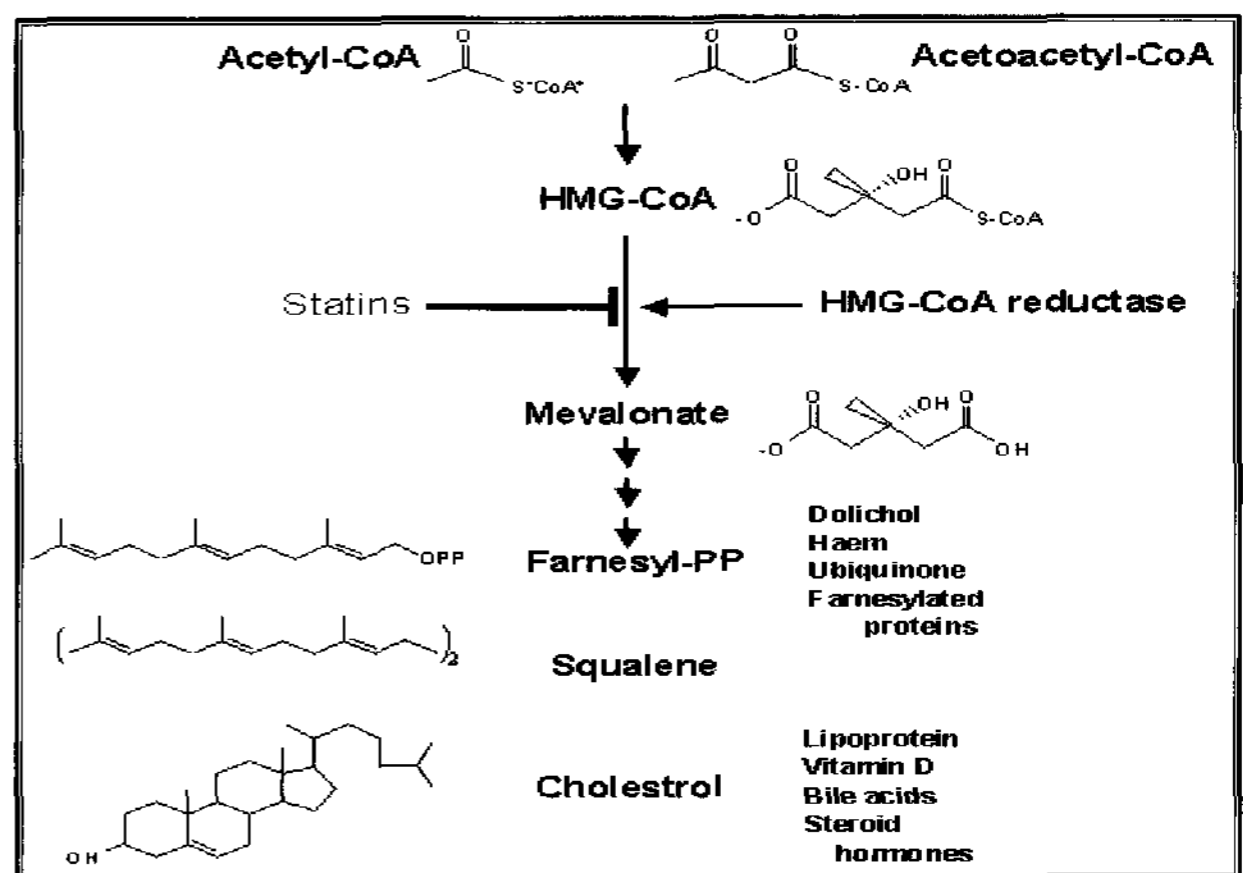


Figure 2. The cholesterol biosynthesis pathway and structure of lovastatin, a potent competitive inhibitor of HMG-CoA reductase.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 lovastatin 생산균주인 *Aspergillus terreus* (ATCC 20542)의 돌연변이주를 모균주로 사용하였다. Solid stock은 *A. terreus*를 포자형성배지인 PDA (potato dextrose agar) plate에 접종하여 28°C에서 8일간 배양한 후 4°C에 보관하여 solid stock으로 사용하였으며 또한 20% glycerol이 포함된 증류수로 spore를 수거 후 filtration을 통해 잔여물을 제거하여 liquid stock을 만들어 -80°C에 보관하였다. 다음과 같은 조성의 성장배지 7 ml을 50 ml tube에 첨가하여 진탕배양기에서 28°C, 48시간동안 배양하였다(soluble starch 14 g/l, glucose 10 g/l, soybean meal 10 g/l, soybean oil 2.5 ml/l, trace element solution 1 ml/l).

종균배양 및 생산배양 조건

종균배양은 50 ml culture tube에 7 ml의 성장배지를 첨가하여 진탕 배양기에서 28°C, 170 rpm으로 48시간 동안 배양한 후 10% (v/v)로 생산배지로 접종하였다. 생산배지의 조성은 다음과 같다(glucose 80 g/l, peptonized milk 24 g/l, yeast extract 2.5 g/l, PEG2000 2.5 g/l, K₂HPO₄ 6 g/l, cotton seed oil 0.5 ml/l, tritonX-100 1.5 ml/l). 생산배양의 경우, miniature 배양 실험은 50 ml culture tube에서 7 ml의 생산배지로 수행했으며, miniature 배양 실험과 비교하기 위하여 기존의 배양 방법인 250 ml flask에 50 ml의 생산배지로 동시에 실험을 수행하였다. 생산배양 조건은 28°C, 200 rpm으로 배양하였으며 8일간 배양한 후 lovastatin의 생산성을 확인하였다. 배지의 열 멸균 시에 발생하는 현상인 침전과 갈변 현상의 방지를 위해서 무기염류와 당을 분류하여 멸균한 후에 무균 상태에서 나머지 생산배지 용액과 혼합하여 사용하였다.

Table 1. Levels of the variables tested in Plackett-Burman design

Table 5. ANOVA for central composite design	Ingredients (g/kg rice)	
	+	-
glucose	11.9	0
glycerol	11.9	0
sucrose	11.9	0
soluble starch	11.9	0
Yeast extract	5.95	0
PD broth	5.95	0
soybean meal	5.95	0
KH ₂ PO ₄	5.95	0
CaCl ₂	2.38	0
MgCl ₂	2.38	0
Trace element	1.19 ml	0 ml

통계적 실험방법

통계적 실험방법은 *A. terreus*의 포자 생산을 최적화하기 위해 고안하였다. Plackett-Burman 방법을 통해 생산균주의 포자 형성에 영향을 미치는 성분들에 대해 조사하였다. Rice powder와 agar가 기본적으로 각각 20 g/L 첨가되었고, Table 1에 제시한 바대로 각각의 성분들을 첨가하여 배양을 수행하였다. Trace element solution은 다음과 같이 제조

되었다((g/L): EDTA 1, ZnSO₄·7H₂O 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.5, Na₂MoO₄·2H₂O 0.02, CuSO₄·5H₂O 0.02, CoCl₂·6H₂O 0.04, MnCl₂·4H₂O 0.1). EDTA는 킬레이터로 첨가하였다. 상기의 trace element solution은 1개의 성분으로 간주하여 조사되었고, phosphate, calcium 그리고 magnesium은 각기 따로 조사되었다. 또한 반응 표면 분석의 한 종류인 중심 합성 계획법 (central composite design)은 Plackett-Burman 방법을 통해 선별된 성분들의 최적 농도를 탐색하고자 이용되었다. 모든 통계적 실험법에서 통계 프로그램인 Design Expert 6.0 (Stat-Ease, Inc. USA)을 사용하였다.

Miniature 배양실험

고생산 균주의 선별에 있어서 중요한 것은 가능한 한 짧은 시간 내에 많은 균주를 선별하여 생산성을 확인하는 것이다. 일반적으로 수행하던 shake flask 배양의 경우 250 ml flask에 50 ml의 배지를 사용하는데, 이러한 방법은 배지의 양과 실험 수행의 공간적인 문제 그리고 많은 실험 기자재의 확보가 선행되어야 한다. 그러나 본 실험실에서 확립한 소규모 배양 실험의 경우 세포 성장단계와 생산단계는 50 ml의 test tube에 7 ml을 첨가하여 배양하였다. 그 결과 많은 변이주들을 선별할 수가 있었고, 이들로부터 lovastatin 고생산 변이주를 선별할 수 있었다. 단일 균주를 얻어 두 개의 포자 형성 agar slant에 접종하여 8일간 배양하여 하나의 사면배지는 stock 보관용으로 4°C에 보관하고, 다른 하나의 사면배지는 7 ml의 성장배지에 seed로 접종하여 48시간동안 배양하였다. 다시 7 ml의 생산배지에서 8일간 배양한 후 HPLC를 이용하여 고생산 변이주를 선별하였다.

Lovastatin 추출 및 정량 분석

Lovastatin을 추출하기 위하여 7 ml의 *Aspergillus terreus* 배양액에 동량의 acetone을 첨가하여 혼합한 다음, 12시간 동안 200 rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출한 후, 12,000 rpm에서 10분간 2번 원심 분리하여 lovastatin을 포함하고 있는 500 μ l의 상등액을 0.45 μ m의 microfilter에 통과 시킨 후 HPLC 정량분석을 실시하였다. Lovastatin 표준용액으로는 순수한 lovastatin을 100~1500 mg/L 농도 범위로 methanol에 용해하여 사용하였고, lovastatin의 acidic form인 mevinolinic acid 표준용액은 다음과 같이 준비하였다. 6 ml의 메탄올에 45 mg의 lovastatin (lacton form)을 녹이고 0.1 M NaOH 15 ml을 가한 뒤 20분 동안 sonication한 다음 50°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 0.1M HCl을 더하여 pH를 7.7로 맞추는 다음 최종 부피가 30ml이 되도록 methanol을 첨가한 후 0.2 μ m filter로 여과하여 최종적인 mevinolinic acid 표준용액을 제조하였다. HPLC 운전 조건은 다음과 같다. column은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μ m) (Kanto chemical Co., INC.)을 사용하였고, Mobile phase는 77.5% Methanol과 22.5% ortho-phosphoric acid로 구성된 혼합용액을 사용하였으며, 유속은 1.2 ml/min로 하였다. Column 온도는 40°C로 고정하였고, UV absorbance detector (Younglin Co., Korea)를 이용하여 238 nm에서 시료 내의 lovastatin을 검출하였다.

결과 및 고찰

Plackett-Burman 실험을 통한 포자형성의 최적 배지 성분 조사

본 연구진은 문헌 조사를 통해 쌀에서 생산균주를 배양할 경우 다량의 포자를 획득할 수 있다는 결과(13)를 토대로 하여 기본적으로 20 g/L의 rice powder와 agar를 첨가하고 Table 1에 제시한 성분들의 high value (+1)와 low value (-1) 농도를 Table 2의 조합으로 첨가하여 각 조건들의 배지를 제조하였다. 그리고 90 × 15 mm petri-dish에 30 ml 첨가한 뒤, SELI8-113/metK⁺의 포자를 약 1 × 10⁵ spores로 일정하게 접종하여 Plackett-Burman design 실험을 수행하였다. 10일간 28°C에서 배양한 뒤 각 실험 조합에서 회수한 포자의 개수를 Table 2에 제시하였다. 10번 조합의 경우 5.2 × 10⁸ spores/1 plate의 포자를 획득할 수 있었는데, 기존에 포자 형성 배지인 PDA를 이용했을 경우, 회수된 포자가 약 1 × 10⁸ spores/1 plate인 것을 감안한다면 약 5배 정도 포자 형성이 증가한 결과이다. 각 성분들의 main effect를 살펴보면 11개의 성분 중에 main effect가 양수 방향으로 높은 4 가지 성분 즉, glucose, sucrose, yeast extract, KH₂PO₄가 생산균주의 포자형성에 큰 영향을 미치는 성분이라 판단되었고, 중심 합성 계획법을 통해 이 4가지 성분들의 최적 농도를 탐색하고자 하였다.

Table 2. Plackett-Burman design of 11 variables with coded values along with observed results for spore production in petri dish (A: glucose, B: glycerol, C: sucrose, D: soluble starch, E: yeast extract, F: PD broth, G: soybean meal, H: KH₂PO₄, I: CaCl₂, J: MgCl₂, K: trace elements. ^aM indicate main effects of variables on spore production (1 × 10⁵))

Run	Ingredients											# of spores/1 plate (× 10 ⁷)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	27.6
2	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	13.4
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	11.9
4	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	21.2
5	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	27.7
6	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	12.8
7	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	33.6
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	1.28
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	29.5
10	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	52.9
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.0
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	5.1

^aM 606.4 442.9 734.9 -796.3 2402 243.2 -276.3 481.6 -608.5 2.6 -2.1

Table 3. Levels of the variables tested in the central composite design

Variable	Component	unit	a (+2)	+1	0	-1	-a (-2)
A	glucose	g/kg	29.76	23.81	15	10	5
B	sucrose	g/kg	29.76	23.81	15	10	5
C	yeast extract	g/kg	11.90	9.52	6	4	2
D	KH ₂ PO ₄	g/kg	7.73	5.95	3.5	2	0.5

중심합성 계획법을 이용한 배지 성분의 최적 농도 탐색

중심합성 계획법 (central composite design)은 이차 다항식을 fitting하는데 필요한 데이터를 얻을 수 있는 매우 유용한 실험방법이다. 4가지 변수를 위한 중심합성계획법은 2⁴-factorial design과 6개의 중심점, 그리고 6개의 축점으로

이루어진다. 본 실험의 계획은 Table 3에 제시하였다. 축점의 α value는 다음과 같은 식을 통해 계산하였다.

$$\alpha = 2^{k/4} \tag{2}$$

Table 4. Central composite design of 4 variables with coded values along with observed results for spore production in petri dish (A: glucose, B: sucrose, C: yeast extract, D: KH₂PO₄)

Run	A	B	C	D	# of spores/1 plate (1 × 10 ⁷)
1	+1	-1	+1	-1	1620.2
2	-1	-1	-1	-1	1127.5
3	0	0	0	2	594.5
4	+1	+1	-1	+1	1128.5
5	+1	+1	+1	-1	1071.8
6	0	0	0	0	1842.7
7	0	0	+2	0	203.5
8	-1	-1	+1	-1	314.5
9	0	0	0	-2	1279.2
10	-2	0	0	0	1269.0
11	+1	-1	-1	-1	1474.2
12	-1	-1	+1	+1	1012.5
13	-1	+1	+1	+1	1281.9
14	+1	+1	-1	-1	1321.7
15	0	0	0	0	1530.6
16	0	0	0	0	1674.1
17	0	0	0	0	1736.3
18	+1	+1	+1	+1	1404.5
19	-1	+1	-1	+1	230.2
20	+1	-1	+1	+1	518.0
21	0	0	-2	0	468.8
22	-1	+1	+1	-1	952.1
23	-1	-1	-1	+1	874.5
24	-1	+1	-1	-1	562.5
25	0	2	0	0	594.9
26	+1	-1	-1	+1	587.5
27	0	-2	0	0	998.7
28	+2	0	0	0	1523.5
29	0	0	0	0	1599.0
30	0	0	0	0	1295.2

Table 5. ANOVA for central composite design

source	sum of squares	DF	Mean square	F Value	prob > F	
Model	5.234 × 10 ⁶	14	3.739 × 10 ⁵	4.03	0.0056	significant
A	4.483 × 10 ⁵	1	4.483 × 10 ⁵	4.83	0.0441	significant
B	6216.21	1	6216.21	0.067	0.7994	
C	4781.32	1	4781.32	0.051	0.8236	
D	3.215 × 10 ⁵	1	3.215 × 10 ⁵	3.46	0.0825	
A ²	38096.12	1	38096.12	0.41	0.5316	
B ²	9.616 × 10 ⁵	1	9.616 × 10 ⁵	10.35	0.0058	significant
C ²	2.508 × 10 ⁶	1	2.508 × 10 ⁶	27.00	0.0001	significant
D ²	6.352 × 10 ⁵	1	6.352 × 10 ⁵	6.84	0.0195	significant
AB	66209.72	1	66209.72	0.71	0.4118	
AC	27576.75	1	27576.75	0.30	0.5938	
AD	3.275 × 10 ⁵	1	3.275 × 10 ⁵	3.53	0.0800	
BC	2.662 × 10 ⁵	1	2.662 × 10 ⁵	2.87	0.1111	
BD	1.766 × 10 ⁵	1	1.766 × 10 ⁵	1.90	0.1882	
CD	2.314 × 10 ⁵	1	2.314 × 10 ⁵	2.49	0.1353	

Plackett-Burman design을 통해 포자 형성에 영향을 미치는 4가지 성분들의 농도를 최적화하기 위해 중심합성계획법을 수행하였다. 각 성분들의 농도를 Table 3에 제시하였다. (2)식을 이용하여 계산한 α value는 2였고, 기본 배지인 rice powder 20 g/L, agar 20 g/L에 Table 4에 제시된 조합으로 배지를 제조한 뒤 SELI8-113/metK⁺의 포자를 회수하여 일정하게 접종하였다. 28°C에서 10일간 배양한 뒤 회수한 포자를 hemocytometer를 이용하여 계수하였고, 그 결과를 Table 4에 제시하였다. 결과를 살펴보면, 중심점에서의 포

자 개수는 약 $1.3\sim 1.8 \times 10^{10}$ spores/1 plate였고, 축점에서 회수된 포자의 개수는 $4.68 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^{10}$ spores/1 plate로 비교적 낮았다. 본 실험의 analysis of variance (ANOVA)를 Table 5에 제시하였다. 전체적인 실험 모델의 p value는 0.05보다 작으므로 유의성을 가졌다. 각 성분들을 살펴보면, A (glucose), B² (sucrose), C² (yeast extract) 그리고 D² (KH₂PO₄)가 유의성이 있는 것으로 나타났다. 회수한 포자 개수를 glucose, sucrose, yeast extract 그리고 KH₂PO₄의 code value에 대한 함수로써 표현하면 다음과 같다.

$$\begin{aligned} \text{Number of spores } (\times 10^7) = & \\ & 612.79 + 136.68A - 16.09B + 14.11C - 115.74D - 37.27A^2 \\ & - 187.24B^2 - 302.39C^2 - 152.17D^2 + 64.33AB - 41.52AC \\ & - 143.08AD + 128.98BC + 105.05BD + 120.27CD \quad (3) \end{aligned}$$

본 다항식을 이용하여 3차원 반응 표면을 분석하였고 그 결과를 Fig. 3에 제시하였다.

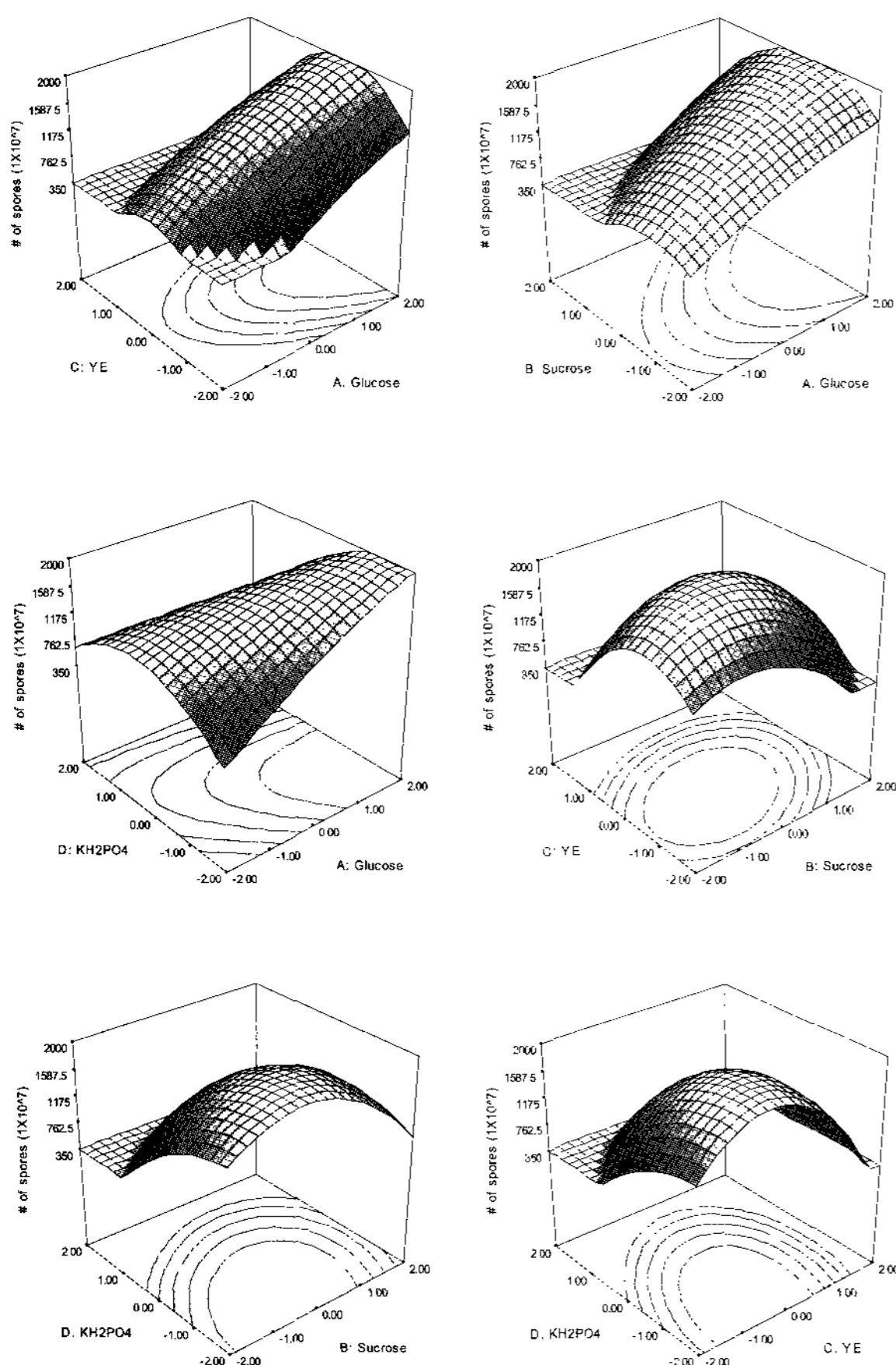


Figure 3. Theoretical response surfaces obtained from the central composite design; predicted number of spores (Z) as a function of X and Y levels in coded units at different levels of others (glucose: 1.67, sucrose: -0.22, Yeast extract: -0.53, KH₂PO₄: -1.65).

결과를 살펴보면, 최대 포자 형성량을 보이는 sucrose, yeast extract, KH₂PO₄의 최적 농도는 본 실험의 범위 내에

있는 것으로 나타났다. 한편 glucose의 농도를 증가시킬수록 포자의 형성은 증가되는 것으로 나타났으므로, glucose의 농도를 증가시키는 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다. 본 중심합성계획 실험 결과, 4가지의 성분의 최적 농도는 glucose: 1.67, sucrose: -0.22, yeast extract: -0.53, KH₂PO₄: -1.65로 확인되었고, 본 농도에서 예측된 최대 포자개수는 1.9×10^{10} spores/plate로 나타났다. 기존의 포자 형성 배지인 PDA에서 회수한 포자의 개수가 1×10^8 spores/plate인 것을 감안한다면 본 결과는 약 190배 증가한 것으로, 매우 주목할 만한 결과라 하겠다.

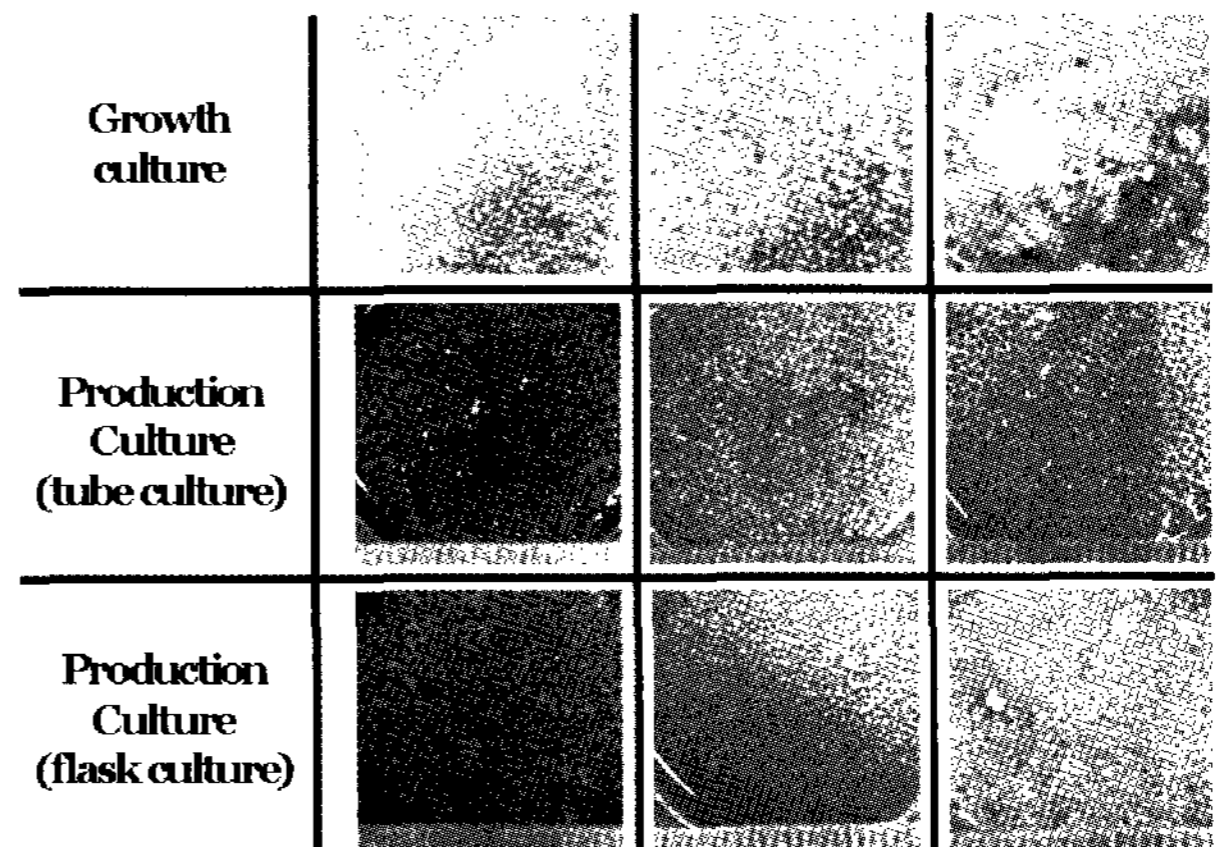


Figure 4. Comparison of morphology of the screened producers (7 ml miniaturized tube vs. 50 ml shake flask for the growth and production cultures).

소규모 배양을 통한 lovastatin 고생산 변이주 선별

Lovastatin 고생산 균주의 대량 선별을 위해 *Aspergillus terreus* ATCC 20542의 변이주를 이용해서 소규모 배양을 수행하였다. 일반적으로 고생산 균주 개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는데 있다. 따라서 고생산 변이주의 신속한 선별을 위해 miniature 실험 (10 ml tube culture)을 통한 변이주의 대량선별 방법을 확립하고자 하였다. Miniaturized culture는 기존의 실험방법을 소규모화 시킴으로써 사용되는 배지와 실험 기자재의 비용 및 실험 시간을 줄일 수 있으며, 또한 유기용매의 사용과 발효 찌꺼기를 감소시킬 수 있는 장점이 있다 (14). 일반적으로 전형적인 균주개발 시스템을 가동할 경우, 일주일에 500개의 플라스크를 배양할 수 있으며, 이러한 경우에 고생산 균주를 얻을 확률이 10⁻⁴임을 고려할 때 거의 10~20주마다 새로운 균주를 얻는다고 보고된 바 있다(15). 따라서 miniaturized culture를 통한 고생산 균주의 대량선별이 가능하다. 생산배양에서 miniaturized culture를 통한 2차 대사산물의 원활한 생산을 위해서는 1mm 이하의 compact pellet을 형성하여야 한다(16). 또한, small pellet을 형성하면 배양액의 점도가 낮아져 배양액 내의 산소전달도 원활해지게 된다(17). 1 mm 이하의 compact pellet을 형성하기 위해서는 성장배양 단계에서 많은 균사체를 형성하여 filamentous 형태를 확립하는 것이 중요하다. 성장배양 단계에서 filamentous 형태를 확립하려면 이전 단계인 포자형성 단계

에서 충분한 포자를 얻어야 한다. 따라서 통계학적 배지 최적화 방법을 통해 포자 형성 배지의 조성을 최적화하였고 최적화된 포자형성 배지에서 얻은 포자를 성장배지에 접종하였을 때 성장배양 동안 filamentous 형태를 확인할 수 있었다. 그리고 이것을 이용하여 생산배양을 수행한 결과 1 mm 이하의 compact pellet을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 균사형성 곰팡이의 배양 시 원활한 산소 공급이 2차 대사산물의 생산에 중요한 인자라고 보고되었는데(18), 50 ml tube 생산배양 시 tube의 구조상 산소 공급이 원활하지 않을 수밖에 없다. 따라서 소규모 배양에서의 산소 공급을 늘리기 위해 tube를 기울여서 shaking할 경우 비교적 많은 양의 산소가 배양액 내로 공급될 것으로 여겨 tube를 기울여서 수행하였다(Fig. 5).

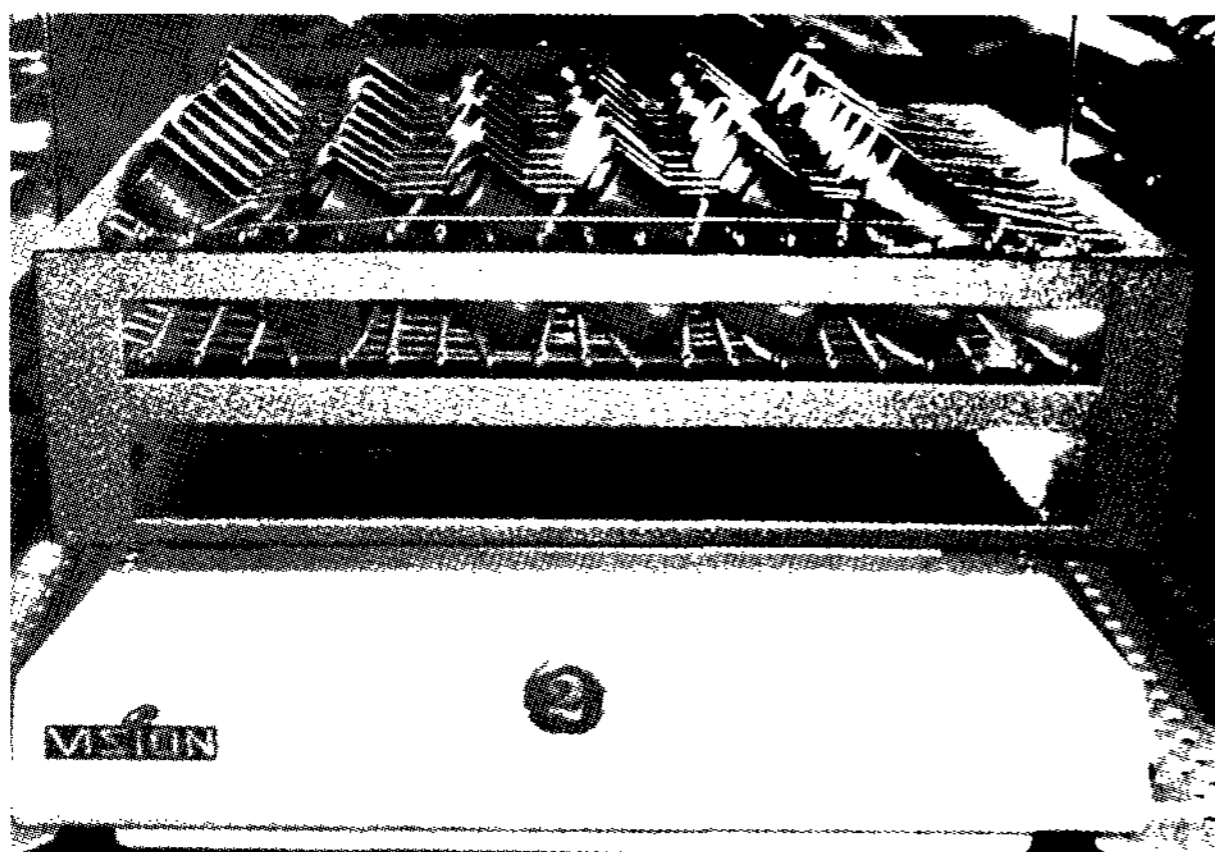


Figure 5. Photograph of tilted growth culture in 50 ml tube.

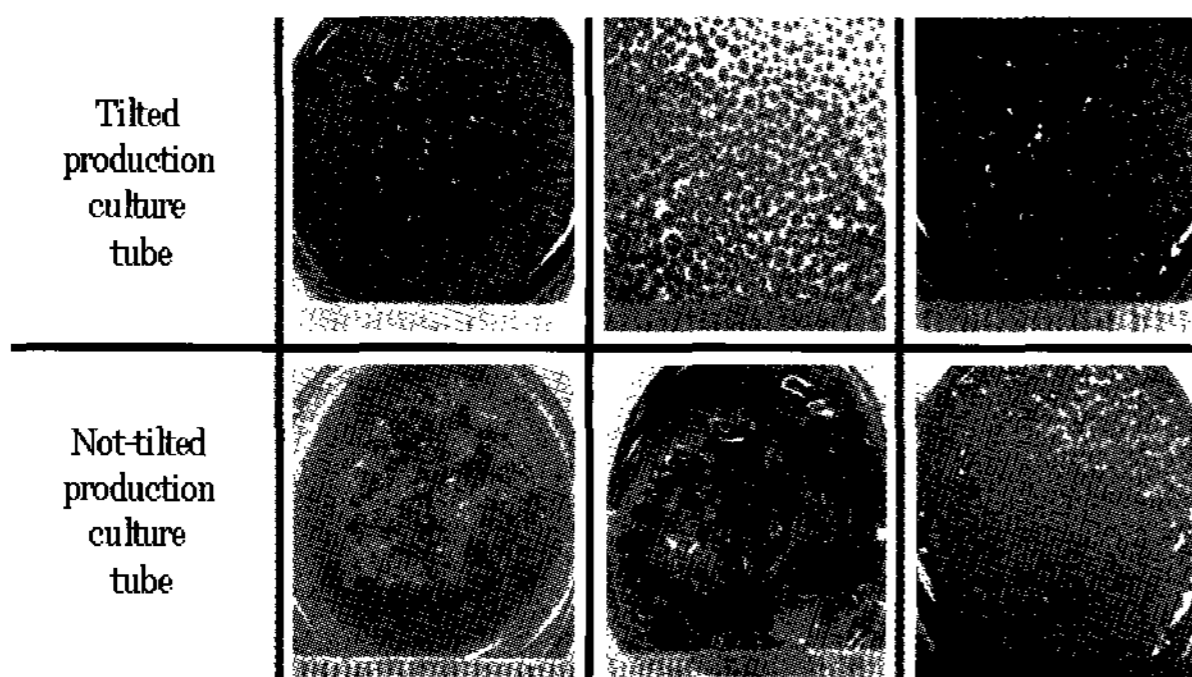


Figure 6. Comparison of morphology between tilted and not-tilted production cultures.

그 결과 기존의 배양방법에 비해 좋은 morphology를 형성하는 것을 확인하여 miniature 배양 시 기울여서 shaking하기로 결정하였다(Fig. 6). 또한, 배지의 volume을 줄여 더욱 miniature화 되게 하고 생산배양에서의 rpm을 증가시켜 배양액 내의 산소 공급을 더 원활하게 하기 위해서 miniature 배양에서의 배지 volume과 rpm을 같이 조사하였다. 본 실험실에서 앞서 성장배양의 miniaturized culture가 확립되었기 때문에 성장배지 volume과 rpm을 같이 바꿔주면서 생산배지 volume과 rpm 조사를 수행하였다. 따라서 성장배양과 생산배양에서 다양한 배지 volume과 rpm에 의한 lovastatin 생산성을 비교하였다. 그 결과 기존의 배양

조건인 성장배지와 생산배지 volume 10 ml, 170 rpm보다 더 높은 생산성을 보이면서 유사한 세 가지 조건을 얻을 수 있었다. 이 세 가지 조건 중에서 성장배양과 생산배양의 배지 volume이 각각 7 ml이고 rpm은 각각 170 rpm, 200 rpm인 조건을 선택하였다(Fig. 7).

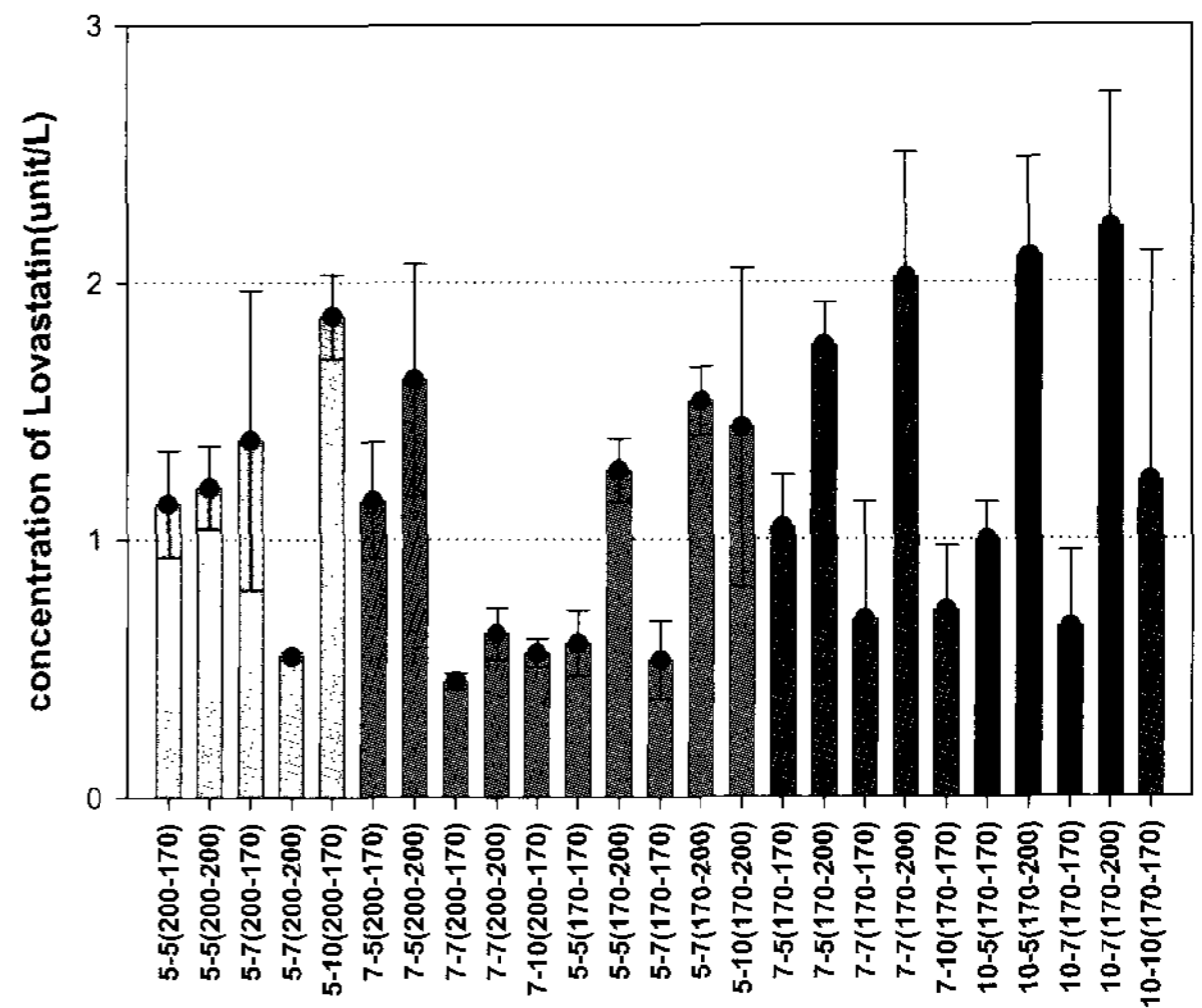


Figure 7. Lovastatin production according to volume and shaking speed of growth and production medium.

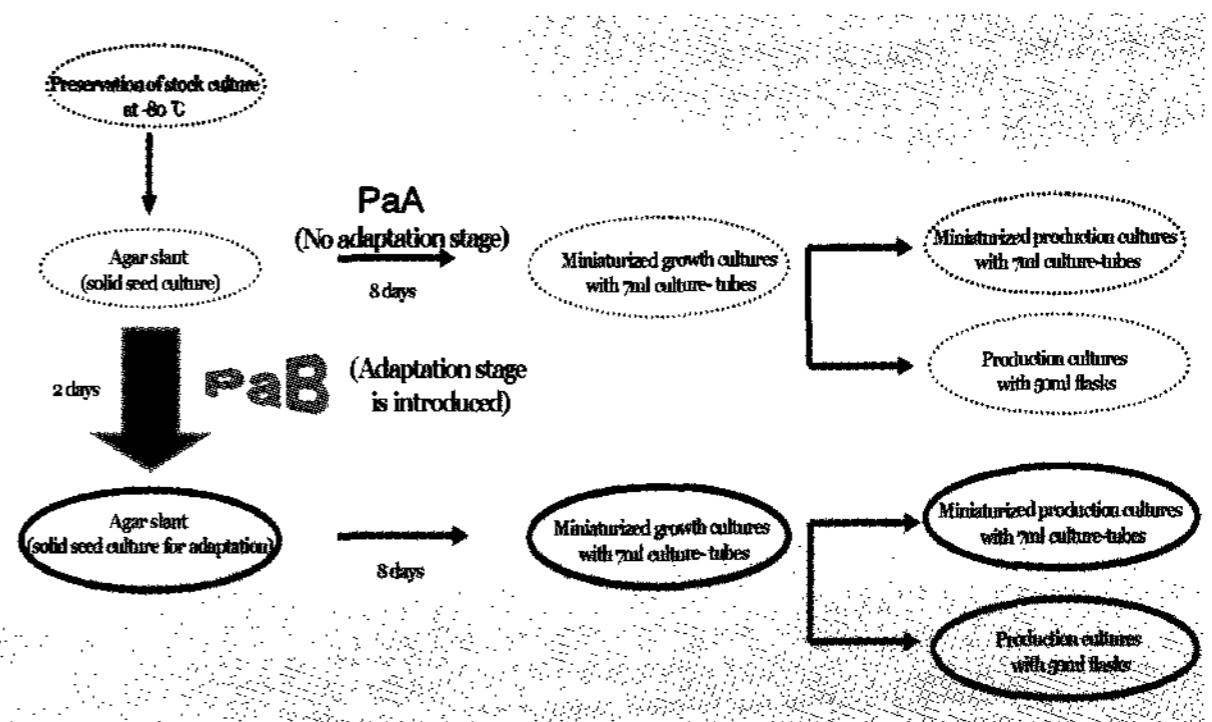


Figure 8. Comparison of the previous method (PaA pathway) and a newly developed method (PaB pathway, where adaptation stage was introduced) in the preparation of large amounts of spores, which is inoculated into the 7ml tube culture tubes for growth cultures.

생산균주의 random screening을 통해 단일 포자를 얻은 후 위와 같은 배양 조건으로 miniature 배양을 수행하였고, 기존의 생산배양과 비교하기 위하여 동일한 생산배지 50 ml이 담긴 250 ml flask에 같은 비율로 접종하고 lovastatin 생산성을 비교하여 miniature 배양의 가능성을 확인하고자 하였다. 그 결과 1차 배양의 tube 배양에서는 flask 배양에 비해 매우 낮은 생산성을 확인하였다. 2차 배양에서는 1차 배양에 비해 tube 배양에서 생산성이 약간 증가한 것을 확인할 수 있었다. 1, 2차 배양에서 miniaturized culture에 의한 lovastatin 생산성이 flask 배양에 의한 생산성에 미치지 못하였기 때문에 3차 배양으로 가면서 1, 2차 배양 과정과는 다르게 한 번의 계대 배양을 거쳤고 이것을 'PaB

(adaptation)'라고 명명하였다(Fig. 8). 계대 배양은 균주의 안정성을 증가시키기 위해 한 번만 수행하였는데 두 번 이상의 계대배양을 하게 되면 균주의 유전적 변이나 오염 가능성의 위험이 커지게 된다. 그 결과 3차 배양에서는 flask 배양과 같은 생산성을 나타내는 0을 기준으로 오차범위인 $\pm 20\%$ region 안에 드는 균주들이 32% 되는 것을 확인할 수 있었다. 이 중에서 tube 배양에서의 생산성이 4.5unit/L인 19번 균주를 선별하여 단일 포자들을 얻은 후 4차 배양을 수행하였다. 그 결과 $\pm 20\%$ region 안에 드는 균주들이 31.1%되는 것을 확인할 수 있었다.

이 중에서 tube 배양과 flask 배양에서의 생산성이 3.0 unit/L 이상인 9, 10, 42, 45번 균주들을 선별하여(Fig. 9) 이 네 균주에서 각각 단일 포자를 얻은 다음 5차 배양을 수행하였다. 그 결과 $\pm 20\%$ region 안에 드는 균주들이 81.25%되는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 10) 지금까지의 결과에 의해 생산배양의 miniaturized culture가 가능할 것으로 보였다. 현재까지 돌연변이주를 이용한 random screening으로 선별된 단일 포자를 이용해 miniaturized culture를 수행하여 이 실험의 안정성을 확인할 수 있었고 산소의존도가 낮은 고생산변이주를 선별할 수 있었다. 앞으로 또 다른 돌연변이주나 형질전환체를 얻어 miniaturized culture를 수행하면 다양한 고생산변이주의 대량 선별이 가능할 것으로 기대된다.

요 약

Lovastatin은 균사형성 균류인 *Aspergillus terreus*가 생합성하는 이차대사산물로 강력한 고지혈증 치료제로 널리 이용되는 물질이다. 본 연구에서는 lovastatin 고생산변이주를 이용하여 포자배지 최적화를 통한 miniature 배양 방법을 확립하고자 하였다. 우선 miniature 배양에 필수적인 효과적인 포자 형성 방법을 개발하고자 포자 형성 배지의 통계학적 배지 최적화를 수행하였다. Miniature 배양의 inoculum으로 이용되는 대량의 포자를 획득하기 위해 Plackett-Burman 실험법을 이용하여 포자 형성을 향상시키는 성분을 조사한 결과, glucose, sucrose, yeast extract 그리고 KH_2PO_4 가 주목할 만한 효과를 보였다. 상기 성분의 최적 농도를 확인하기 위해 반응표면분석법(RSM)을 이용한 결과, PDA 포자 형성 배지와 비교하여 볼 때, 최적 성분 농도에서 포자 형성이 약 190배 증가하였다. 최적화된 포자형성 배지를 이용하여 lovastatin 고생산성 변이주의 대량 선별을 위한 miniature 배양 방법을 확립하기 위해 기존의 실험 과정에 'PaB (adaptation)'라는 한 번의 계대배양을 더 추가한 결과 생산균주의 안정성과 재현성이 큰 폭으로 증가하는 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 단기간에 가능한 한 다량의 균주를 스크리닝하기 위해 성장배양과 생산배양 모두 조업부피가 7 ml인 tube를 이용해 miniature 배양을 반복 수행하여, lovastatin 생산성과 배양형태가 훌륭한 변이주를 선별할 수 있었는데, 이 균주는 7 ml tube배양과 250 ml flask배양 (조업부피 50 ml) 모두에서 생산성이 높은 것으로 보아 산소 의존도가 비교적 낮고 생산 안정성이 높은 균주인 것으로 판단되었다. 한편 miniature 배양을 이용해서 lovastatin 고생산성을 보이는 균주를 신속선별하기 위해서는 균주의 적절한 배양형태 유도가 매우 중요한 것으로 관찰되었다. 즉 생산배양으로의 고활성 균주의 접종을 위해서, 또한 생산배양에서 pellet의 배양형태 유도를 위해서 성장배양 시에는 반드시 고농도의 균사모양을, 생산배양 시에는 직경 1 mm 이하의 pellet모양의 배양형태를 유지해야만, 생산균주가 lovastatin을 안정적으로 고생산할 수 있는 것으로 관찰되었다. 초기에 선별된 균주를 이용하여 miniature 배양에 의해 고속 균주선별 실험을 반

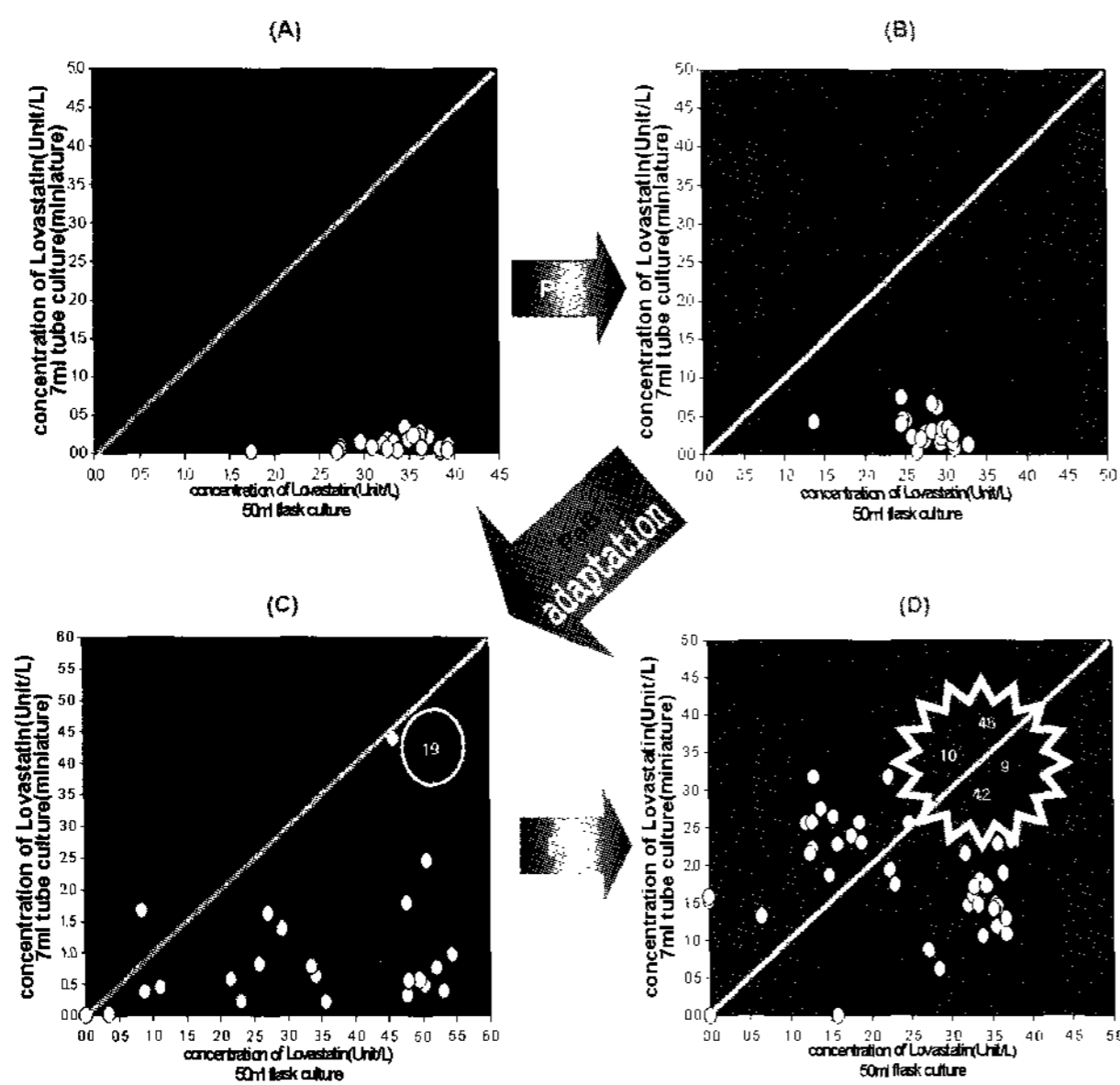


Figure 9. Comparison of lovastatin production by each of the screened producers (7 ml miniaturized tube vs. 50 ml shake flask for the production cultures) (It should be noted that, when adaptation stage was introduced for the preparation of spore inoculums as shown in the Figures of (C) and (D), lovastatin productivity of the screened mutants was significantly enhanced in the miniaturized production cultures performed with 7 ml culture tubes).

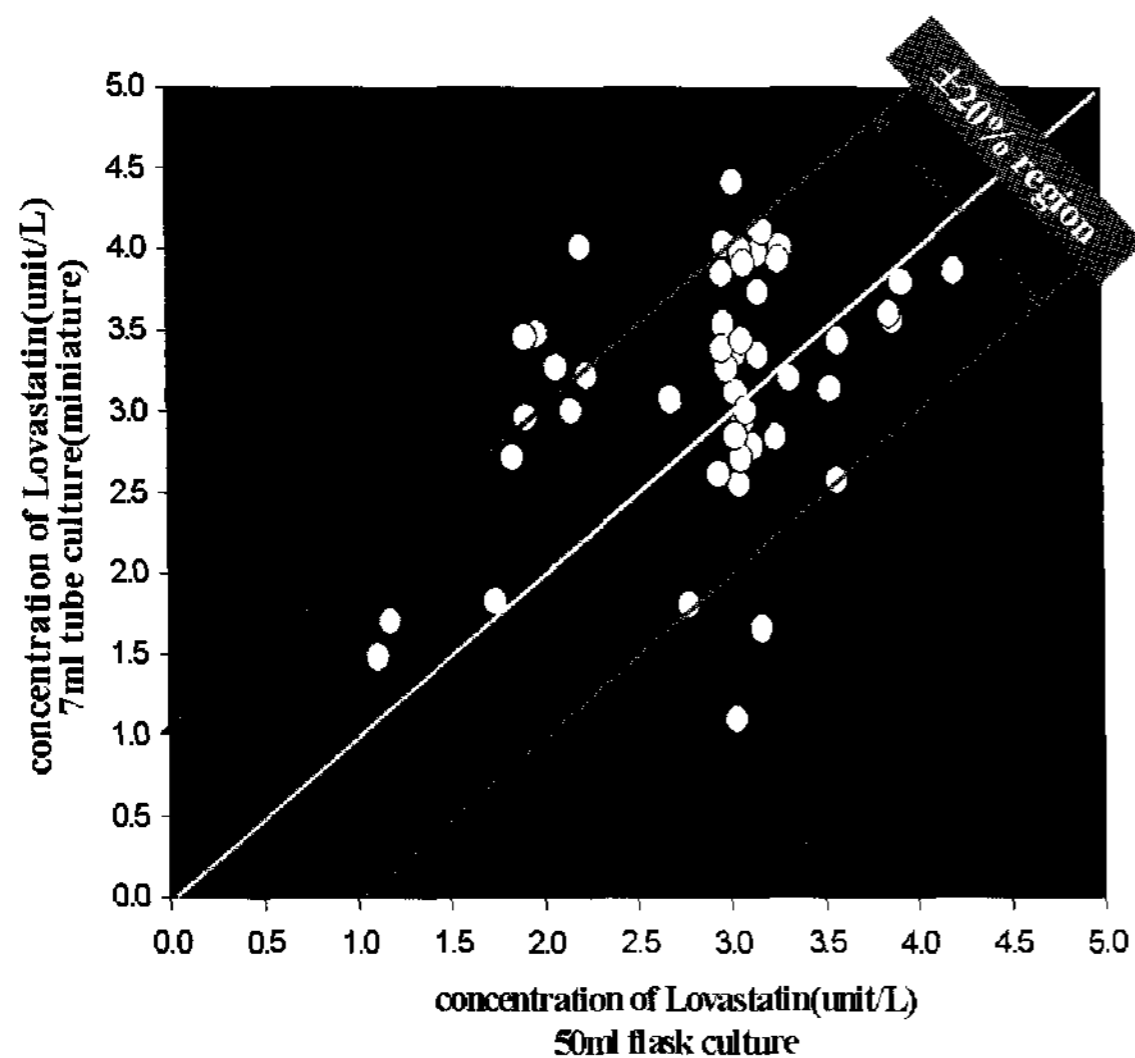


Figure 10. Comparison of lovastatin production by each of the screened producers ($\pm 20\%$ region specified) (7 ml miniaturized tube vs. 50 ml shake flask for the production cultures).

복합으로써 고생산성 균주들을 다량 선별할 수 있었는데, 이들의 lovastatin 생산성을 조사한 결과, 기존의 flask 배양 대비 오차범위가 $\pm 20\%$ 이내의 생산성을 보이는 균주가 초기 선별시의 32%에 비해 81%로 크게 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 lovastatin 고생산성, 고안정성 균주의 고속 스크리닝을 위해서 본 연구에서 개발한 tube를 이용한 miniature 배양이 기존의 flask 배양을 대체할 수 있는 훌륭한 배양방법임을 제시해 준다.

감 사

본 연구는 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소, 전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

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. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, and J. Springer (1980), Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3957-3961.
2. Christopher Walsh (2003), Antibiotics, pp175-181.
3. Manzoni, M. and M. Rollini (2002), Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**(5), 555-564.
4. Slater, Eve. E., MacDonald, and S. James (1988), Mechanism of action and biological profile of HMG CoA reductase inhibitors, A new therapeutic alternative, *Drugs* **36**, 72-82.
5. Tobert, J. A. (1987), New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase, *J. American heart association* **76**, 534-538.
6. Kennedy, M. J., S. L. Reader, and R. J. Davies (1994), The kinetics of developing fermentation media, *Process biochemistry* **29**, 529-534.
7. Srinivas, M. R. S., N. Chand, and B. K. Lonsane (1994), Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 139-144.
8. Xiao, Z. J., P. H. Liu, J. Y. Qin, and P. Xu (2006), Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**(1), 61-68.
9. Liu, C., Y. Liu, W. Liao, Z. Wen, and S. Chen (2003), Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey, *Biotechnology Letters* **25**, 877-882.
10. Lua, Wen-Kai., T. Y. Chiub, S. H. Hunga, I. L. Shihe, and Y. N. Changa (2004), Use of Response Surface Methodology to Optimize Culture Medium for Production of Poly- γ -glutamic Acid by *Bacillus licheniformis*, *Applied Science and Engineering* **1**, 49-58.
11. Ooijkaas, L. P., E. C. Wilkinson, J. Tramper, and R. M. Buitelaar (1999), Medium optimization for spore production of *coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs, *Biotechnol Bioeng.* **64**(1), 92-100.
12. Liu, G. Q. and X. L. Wang (2006), Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*, *Appl Microbiol Biotechnol.* **74**(1), 78-83.
13. Prashant M. Bapat, K. Sucharita, and P. W. Pramod (2003), An Optimized Method for *Aspergillus niger* Spore Production on Natural Carrier Substrates, *Biotechnol. Prog.* **19**, 1683-1688.
14. Stahl, S., R. Greasham, and M. Chartrain (2000), Implementation of a rapid microbial screening procedure for biotransformation activities, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 367-371.
15. Crueger and Crueger (1990), Strain development, In *Biotechnology*, 2nd. ed., pp9-58.
16. J. L. Casas L'opez, J. A. S'anchez P'erez, J. M. Fern'andez Sevilla, E. M. Rodr'iguez Porcel and Y. Chisti (2005), Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*, *J. Biotechnol.* **116**, 61-77.
17. J. C. van Suijdam, N. W. F. Kossen, and P. G. Paul (1980), An Inoculum Technique for the Production of Fungal Pellets, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 211-221.
18. Manfredini, R., V. Cavallera, L. Marini, and G. Donati (1983), Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors, *Biotechnology and Bioengineering* **25**(12), 3115-3131.