

대두를 이용한 Lovastatin 대량생산용 Seed Culture의 제조기술

김수정 · 고희선 · 김현수[†]
계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Development of Seed Culture Using Soybean for Mass Production of Lovastatin with *Aspergillus terreus* ATCC 20542 Mutant

Soo-Jung Kim, Hee-Sun Ko, and Hyun-Soo Kim[†]

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

Abstract

Lovastatin (Mevinolin, Monacolin K) is a well-known drug for the therapy of hypercholesterolemia. It is an important fungal secondary metabolite as it inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase, EC 1.1.1.34) which catalyzes a major rate-limiting step in the biosynthesis of cholesterol. Both soybeans and black soybeans with *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mutant were used as the seed culture for the mass production of lovastatin. The production of lovastatin in soybean seed culture of *Asp. terreus* was twofold compared to that of black soybean seed culture. The effect of two different vessels (petri dish and Erlenmeyer flask) on lovastatin production was also studied. The production of lovastatin on petri dish was tenfold to that of Erlenmeyer flask. Furthermore, the most lovastatin production on rice bran was achieved when the soybean seed culture was treated by heat shock at 30°C for 1 hour, representing 82% of HMG-CoA reductase inhibition in the koji extract. We estimated that the heat treated soybean seed culture could be a new method for the mass production of lovastatin.

Key words: *Aspergillus terreus*, HMG-CoA reductase, lovastatin, soybean seed culture

서 론

현대 한국인의 식생활 습관은 서구화 및 환경적 변화로 인하여 성인의 콜레스테롤 수치가 서구의 평균치에 근접해 가고 있으며 인스턴트식품의 섭취로 인하여 지방질의 섭취가 늘어남에 따라 동맥경화, 심장병, 고혈압과 같은 성인병이 증가하고 있다. 이러한 콜레스테롤은 인지질과 함께 생체막의 중요한 구성성분으로 포유동물의 근육, 뇌, 신경조직, 담즙, 혈액과 지방질에 분포되어 있으며, 막의 유동성 조절, 스테로이드계 호르몬과 담즙산 및 적혈구의 파괴를 보호하는 등 포유동물의 생리기능에 중요한 영향을 미치고 있다.

생체 내에서 생산되는 콜레스테롤의 양을 감소시키면 혈장 내의 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있으며(1-3), 이러한 고지혈증 치료제는 1976년 *Penicillium citrinum*에서 분리한 mevastatin의 개발을 시작으로 하여, 1987년 lovastatin이 최초의 상용 statin으로 개발되었으며 이후 simvastatin, pravastatin, atorvastatin, rosuvastatin 등의 다양한 statin 계열물질이 사용되고 있다. 이들의 특성은 콜레스테롤에 대한 영향은 유사하면서 생물학적 특성과 효능이 다른 것이다(4-7).

Lovastatin(C₂₄H₃₆O₅)은 균사 형성 곰팡이인 *Aspergillus terreus*, *Monascus* sp., *Penicillium* sp. 등에 의해 생산되며, polyketide 경로를 통해서 생합성되는 이차대사산물로서 naphthalene ring system, β-hydroxylactone 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 natural statin이다.

Lovastatin의 작용기작은 lovastatin lactone형의 구조가 콜레스테롤 합성 저해효소 HMG-CoA reductase(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, EC 1.1.1.34)의 기질이 되는 HMG-CoA와 매우 유사하면서, HMG-CoA reductase에 대한 친화도는 10,000배 이상 크기 때문에 lovastatin이 HMG-CoA 대신 HMG-CoA reductase와 미리 결합하게 되는 것으로서 mevalonate의 합성을 저해시킨다. 그 결과 콜레스테롤 생합성 속도가 제한되면서 혈관속 콜레스테롤 수치는 감소되는 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다(8-10).

Lovastatin 생산균 중 가장 일반적으로 알려진 *Asp. terreus*는 전통누룩미생물로서 한국 고유의 식품 및 발효공업 등에 중요한 역할을 하는 *Aspergillus* 속으로 amylase, glucoamylase와 protease 활성이 강하여 예로부터 우리나라를 비롯하여 주류, 발효 등의 양조, 효소제 및 의약품 생산에

[†]Corresponding author. E-mail: hskim@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-5509

이용되고 있다.

지금까지 *Asp. terreus*를 이용한 lovastatin의 생산은 일반적으로 복합배지에서 회분배양에 의한 생산과 28°C, pH 5.8~6.3에서 10일 이상 유가식 배양에 의한 생산성 증대 및 탄소원과 질소원의 비율에 따라 *Asp. terreus*의 생육과 lovastatin 생산에 미치는 영향 등 다수의 연구가 진행되어 왔으며 최근에는 *Asp. terreus* 뿐만 아니라 *Asp. flavipes*에 의해 액체배양이 아닌 고체배양에서도 lovastatin이 생산된다는 연구도 보고되었다(11-15).

따라서 본 연구에서는 lovastatin의 산업적으로 유용하고 다양한 분야로의 응용을 위해 고체배양체의 대량생산을 목표로 연구를 수행하였으며, 선행연구(13)에 사용한 lovastatin 대량생산 균주인 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주로부터 lovastatin 고체배양체의 대량생산을 위한 seed culture의 대량제조기술의 개발을 하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 방법

본 연구는 *Aspergillus terreus* ATCC 20542 변이주를 공시균주로 사용하였으며 lovastatin 생산 배지인 MGP 배지(malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 3 g, agar 20 g/L)에 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 다음 포자현탁액(1.0×10^8 spores/mL)을 조제하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. 대량생산을 위한 고체배양은 고온가압 멸균한 국산 대두 20개에 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주 포자현탁액(1.0×10^8 spores/mL) 10 mL를 접종하여 28°C에서 2일간 전배양하였다. 미강 200 g(한국이엠산업(EM Korea), Gyeongbuk, Korea)에 고온가압 멸균한 후 증류수 70 mL를 첨가한 다음 전배양체인 대두 3개를 접종하여 28°C에서 6, 9, 12, 15, 30일간 배양하였다.

Seed culture용 배양체 분석

Lovastatin 생산용 seed culture의 대량제조를 위한 배양체는 공시균주인 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주를 접종한 대두와 흑대두를 대상으로 하여 동물의 사료첨가제 개발 및 균주의 효소생산을 1차 목표로 α -amylase, glucoamylase 생산 및 lovastatin 생산 분석을 통하여 생산능이 우수한 전배양체를 선정하였다.

조효소액의 조제는 배양체 2 g을 4 mM sodium acetate buffer(pH 5.0) 10 mL에 현탁하여 25°C에서 1시간 동안 진탕한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다. α -Amylase 역가는 조효소액 0.1 mL에 기질(1% soluble starch in 40 mM acetate buffer, pH 5.0) 2 mL를 첨가하여 40°C에서 20분 반응한 후 반응액 0.1 mL에 2.5 mN KI가 첨가된 0.25 mN iodine 용액 10 mL를 첨가하여 670 nm에서 투과도를 측정하였다. 효소의 활성도는 Wohlgemuth value

에 준한 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{Units (U/mL)} = \frac{12.75(T_{20} - T_0)}{20}$$

Glucoamylase의 역가는 dinitrosalicylic acid assay (DNS)법에 따라 측정하였다. DNS 용액은 DNS 0.5 g, sodium potassium tartrate(Rochelle salt) 30 g을 2 M NaOH 50 mL에 용해한 후 100 mL되게 조제하였다. 조효소액 0.1 mL에 기질(0.5% soluble starch in 200 mM acetate buffer, pH 5.0) 1 mL를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응한 후 반응액 0.2 mL에 DNS 용액 0.4 mL를 첨가하여 100°C에서 5분간 열처리를 하였다. 열음 위에서 급히 냉각시킨 후 증류수 2.4 mL를 첨가하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucoamylase의 1 unit는 1분 동안 glucose 1 μ g을 생성하는 효소량으로 정의하였다.

Lovastatin의 추출

고체배양체로부터 lovastatin의 추출은 배양체 0.5 g과 CH₃CN 15 mL를 혼합한 후 5분간 sonication(Ultrasonic cleaner, Branson UL Trasonics corporation, USA)한 다음 1시간 동안 진탕한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 상등액 4 mL, 멸균수 4 mL와 conc. H₃PO₄ 100 μ L를 첨가한 후 여과하여 제조하였다.

Lovastatin 분석

Lovastatin standard(acid form, lactone form) 및 추출시료는 C₁₈ reverse phase column을 이용한 HPLC(High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu LC 10-A)로 flow rate 1.0 mL/min, UV 237 nm의 조건에서 20 μ L씩 injection하여 0.1% H₃PO₄가 포함된 60% CH₃CN으로 용출시켜 분석하였다.

Seed culture용 배양 용기

선정된 대두를 대상으로 통기량에 따른 lovastatin 생산량을 검토하기 위하여 petri dish(ϕ 150×20 mm)와 250 mL의 Erlenmeyer flask에 배양하여 각 배양체로부터 lovastatin 생산성을 검토한 후 최적 배양용기를 선정하였다.

Lovastatin seed culture의 대량생산을 위한 배양 조건

Lovastatin함유 고체 배양체의 대량생산을 위한 수단으로 전배양체의 포자 발아를 촉진시키기 위한 열처리 효과를 검토하였다. 공시균주를 접종한 대두는 각 30°C에서 30분, 30°C에서 1시간, 35°C에서 30분, 35°C에서 1시간 동안 열처리하여 28°C에서 48시간 전배양한 후 미강에 본 배양하였다. 각 배양체로부터 lovastatin의 생산량을 검토하여 lovastatin seed culture의 최적 배양조건을 확인하였다.

HMG-CoA reductase에 대한 저해 활성 검토

Lovastatin의 기능인 HMG-CoA reductase에 대한 저해

활성을 측정하기 위하여 Hucher와 Oleson(16,17)의 분광분석 측정법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 반응액의 조성은 microsomal protein 1 mg, HMG-CoA 150 nmoles, NADP 2 μ moles, glucose-6-phosphate 3 μ moles, glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 unit, 시료(10 mg/mL) 100 μ L를 첨가하여 최종 부피가 1 mL되게 하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 반응액에 10 mM sodium arsenite solution 20 μ L를 첨가하고 1분 뒤 3% sodium tungstate를 함유한 2 M citrate buffer(pH 3.5) 0.1 mL를 가하여 37°C에서 10분간 정치하여 반응을 정지하였다. 정지시킨 반응액의 protein을 제거하기 위해 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액 1 mL를 취하여 2 M Tris buffer(pH 10.6) 0.2 mL와 2 M Tris buffer(pH 8.0) 0.1 mL를 첨가하여 반응액의 pH를 8.0으로 조절하였다. CoA-SH의 생성을 위해 0.4 M sodium arsenite 50 μ L를 첨가하여 5분간 반응시켰다. 반응액 1 mL를 취하여 3 mM DTNB 20 μ L를 첨가한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. CoA-SH의 생산량은 아래의 식에 준하여 산출하였다.

$$\text{nmoles/min} = \frac{A(\text{reaction}) - A_0(\text{control})}{0.0136 \times \text{reaction time}} \times 1.43$$

위 식에서 1.43은 회색배수이며 0.0136은 CoA-SH의 molar extinction coefficient이다. 반응 중에 NADPH를 공급하기 위해 glucose-6-phosphate와 glucose-6-phosphate dehydrogenase(Sigma, USA)를 사용하였고, 대조구로는 기질인 NADP를 첨가하지 않았다. HMG-CoA reductase에 대한 저해율은 시료를 넣지 않은 것의 CoA-SH 생산량에 대한 저해의 정도를 백분율로 환산하였다.

결과 및 고찰

Seed culture용 배양체 선정을 위한 효소 측정

Lovastatin을 대량생산하기 위한 seed culture용 배양체를 선정하기 위해 대두와 흑대두를 대상으로 배양체를 분석하였다. 대두와 흑대두에 공시균을 접종하여 α -amylase, glucoamylase의 생산량을 검토하였다. α -Amylase와 glucoamylase는 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같이 흑대두에 배양한 것보다 대두에 배양하였을 때 약 2배 정도 더 많은 효소를 생산하였고 특히 배양 15일째 효소의 생산량이 가장 우수하였으며 이는 Park과 Kim(13)의 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다. *Asp. terreus*를 접종한 대두가 α -amylase

Table 1. α -Amylase activity from soybean and black soybean medium

Test samples	Incubation time (day)		
	9	15	30
Soybean	113 ¹⁾	235	128
Black soybean	71	229	64

¹⁾Units/mL.

Table 2. Glucoamylase activity from soybean and black soybean medium

Test samples	Incubation time (day)		
	9	15	30
Soybean	178 ¹⁾	542	269
Black soybean	74	420	113

¹⁾Units/mL.

Table 3. Lovastatin production from soybean and black soybean medium

Test samples		Incubation time (day)			
		6	9	15	30
Acid form	soybean	7.9 ¹⁾	10.2	11.0	8.7
	black soybean	3.2	4.3	8.0	7.3
Lactone form	soybean	15.9	41.5	73.4	22.2
	black soybean	9.6	23.9	54.8	12.5

¹⁾The amount of lovastatin (mg/g).

와 glucoamylase를 더 많이 생산하는 하는 것으로 보아 seed culture용 배양체로 대두가 적절하다고 사료된다.

Seed culture용 배양체 제조를 위한 lovastatin 생산 확인

배양체에 따른 lovastatin 생산량을 검토하기 위하여 대두와 흑대두를 대상으로 공시균을 접종하여 lovastatin의 생산량을 검토하였다. Lovastatin의 acid form과 lactone form 생산량은 Table 3에서 보는 바와 같이 *Asp. terreus*를 접종한 흑대두보다 대두에서 더 많은 lovastatin을 생산하였고 특히 배양 15일째 lovastatin의 생산량이 가장 우수하였다. 이들 결과(Table 1~3)로 보아 대두가 lovastatin 대량생산을 위한 seed culture용의 우수한 배양체라고 사료된다.

Seed culture용 배양용기 선정

선정된 대두를 대상으로 배양용기에 따른 lovastatin 고생산량을 검토하기 위하여 petri dish와 Erlenmeyer flask에 배양하여 각 배양체로부터 lovastatin 생산량을 검토하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 lovastatin acid form과 lactone form의 생산은 Erlenmeyer flask에 배양하였을 때와 비교해 petri dish에 배양하였을 때 10배량의 lovastatin을 생산하였고, 특히 배양 15일째 lovastatin의 생산량이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 통기량에 의한 효과라고 사료되며, Park과 Kim(13)의 연구에 의해서도 양방향으로 부착된 plastic bag을 사용한 경우에 lovastatin 생산량이 우수하다는 결과와 일치하였다.

Lovastatin seed culture의 대량생산을 위한 배양조건 확립

Lovastatin의 대량생산을 위한 수단으로 전배양체의 포자 발아를 촉진시키기 위한 열처리 효과를 검토하였다. 공시균주를 접종한 대두는 각 30°C에서 30분과 1시간, 35°C에서 30분과 1시간씩 열처리한 후 28°C에서 48시간 전배양한 후 미강에 본배양하였다. 각 열처리한 배양체로부터 lovastatin

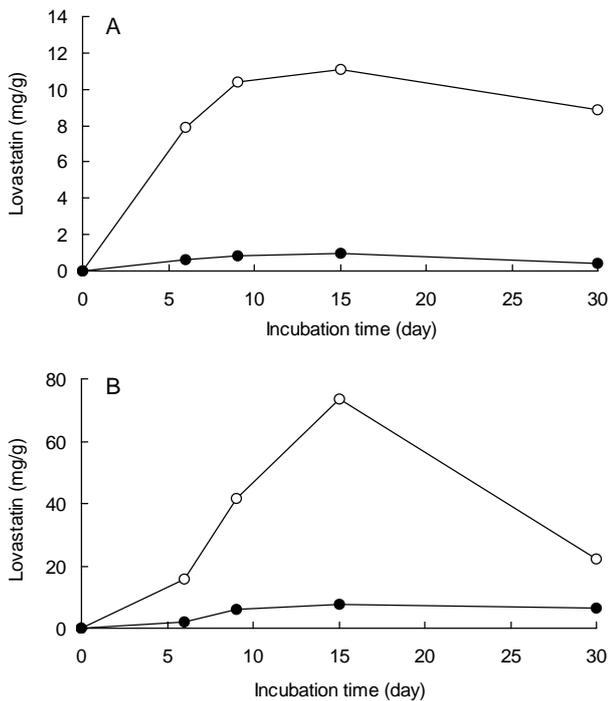


Fig. 1. Effect of lovastatin production using various cultivation vessels.
A: Lovastatin acid form production, B: Lovastatin lactone form production. ○ Petri dish, ● Erlenmeyer flask.

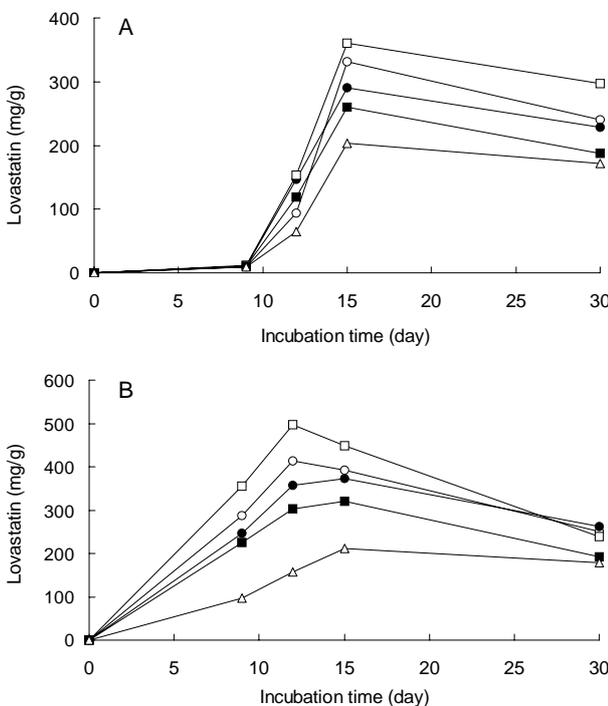


Fig. 2. Mass production of lovastatin from koji by heat treatment of soybean.
A: Lovastatin acid form production, B: Lovastatin lactone form production. ○ Non-heat treatment, ● Heat shock treatment at 30°C for 30 minutes, □ Heat shock treatment at 30°C for 1 hour, ■ Heat shock treatment at 35°C for 30 minutes, △ Heat shock treatment at 35°C for 1 hour.

Table 4. Inhibition rate against HMG-CoA reductase activity

Test samples	Specific activity (CoA-SH pmoles/min/mg protein)	Inhibition (%)
Control	353.9	0
Lova-A	294.4	16.8
Lova-L	21	94
Koji extract 1	70	80.2
Koji extract 2	119.2	66.3
Koji extract 3	63.1	82.2
Koji extract 4	150.7	57.4
Koji extract 5	182	51.43

Lova-A: Lovastatin acid form, Lova-B: Lovastatin lactone form, Koji extract 1: Non-heat treatment, Koji extract 2: Heat shock treatment at 30°C for 30 minutes, Koji extract 3: Heat shock treatment at 30°C for 1 hour, Koji extract 4: Heat shock treatment at 35°C for 30 minutes, Koji extract 5: Heat shock treatment at 35°C for 1 hour.

의 생산량을 검토한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 열처리를 하지 않은 전배양체보다 30°C에서 1시간 열처리한 후 전배양하여 본배양한 배양체가 배양 15일째 lovastatin의 생산량이 가장 우수하였다. 이 같은 결과로 열처리에 의해 포자발아가 촉진되었다고 사료된다.

HMG-CoA reductase에 대한 저해활성 확인

전배양의 대량생산을 위해 확립한 조건을 토대로 하여 각 sample들을 대상으로 생산된 lovastatin의 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 측정하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 30°C에서 1시간 동안 열처리한 배양체가 82.2%로 가장 우수한 저해활성을 보였으며 선행연구(18)로 수행한 포자현탁액 접종법에 따른 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성인 75%보다 더 높은 저해활성을 확인할 수 있었다. 이 결과는 lovastatin의 생산량이 30°C에서 1시간 동안 열처리한 전배양체의 포자발아가 우수한 결과(Fig. 2)와 일치하였다.

요 약

본 연구는 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주로부터 lovastatin 생산용 seed culture의 대량제조를 위한 방법을 개발한 것이다. 배양체의 선발, 분석 및 최적 배양용기를 검토한 결과 대두를 이용하여 petri dish (φ 150×20 mm)에 배양하였을 때 lovastatin의 생산성이 우수하였다. 포자의 발아 촉진을 위하여 대두에 *Asp. terreus*를 접종한 다음 열처리를 달리하여, 각 전배양체를 미강에 본배양하였다. 본배양액을 추출한 후 HPLC를 이용하여 lovastatin 생산량을 검토한 결과 30°C에서 1시간 동안 열처리한 전배양체가 본배양 12일째에 가장 높은 lovastatin 생산성을 보이며, in vitro assay 결과, 대두를 30°C에서 1시간 열처리하여 본배양하였을 경우에 HMG-CoA reductase가 82% 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 기존의 포자현탁액 접종법보다 대두를 이용한

방법이 더욱 높은 HMG-CoA reductase 저해활성 및 배양시 간의 단축성을 보여 산업화에 유리한 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화연구센터(TMR)의 일부 지원에 의해 수행되었음에 감사드리며, 연구를 수행함에 있어 미강을 제공하여 주신 한국이엠산업(주)에도 감사드립니다.

문헌

- Bang IY, Whang SW, Kim JW, Kim SY, Park CS. 2003. Screening of fungal strains producing lovastatin, an anti-hyper-cholesterolemic agent. *Korean J Food Sci Technol* 35: 442-446.
- Demain AL. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganism. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 455-463.
- Stryer L. 1995. Biosynthesis of membrane lipids and steroids. In *Biochemistry*. W. H. Freeman & Company, New York. Vol 4, p 685-712.
- Ha TY, Cho IJ, Lee SH. 1998. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity of ethanol and methanol extract from cereals and legumes. *Korean J Food Sci Technol* 30: 224-229.
- Slater E, Macdonald E, James S. 1888. Mechanism of action and biological profile of HMG-CoA reductase inhibitors. *Drugs* 36: 72-82.
- Finkelstein DB, Ball C. 1992. *Biotechnology of filamentous fungi*. Butterworth-Heinemann, London, UK. p 241-251.
- Michael H. 2002. A multiple-dose pharmacodynamic, safety, and pharmacokinetic comparison of extended and immediate-release formulations of lovastatin. *Clinical Therapeutics* 24: 112-125.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Hairris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Alberts-Schonberg G, Hensens O, Hirshchfield J, Hoogsteen K, Springer J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-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 agent that inhibit HMG-CoA reductase. *J Med Chem* 28: 401-405.
- Tobert JA. 1988. Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *J American Cardiology* 62: 28-34.
- Endo A, Kuroda M, Tarazawa K. 1976. Competitive inhibitor of 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase by MC-230A and ML-236B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72: 323-326.
- Srinivasu MK, Narasa RA, Om RG. 2002. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. *J Pharm Biomed Anal* 29: 715-721.
- Park JH, Kim HS. 2004. Production of lovastatin in solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 566-570.
- Pyo YH. 2006. Optimum conditions for production of mevinolin from the soybean fermented with *Monascus* sp.. *Korean J Food Sci Technol* 38: 256-261.
- Valera HR, Gomes J, Lakshmi S, Guruaja R, Suryanarayan S, Kumar D. 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme Microb Tecchnol* 37: 521-526.
- Hucher FH, Oleson WH. 1973. Simplified spectrophotometric for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J Lipid Res* 14: 625-631.
- Moon YJ, Yeum KH, Sung CK. 2002. Screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor in vitro and its application to pullets. *Korean J Food Nutr* 15: 307-313.
- Park JH. 2006. A study of mass production and industrialization of lovastatin from *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mutant. *PhD Dissertations*. Keimyung University, Daegu. p 58.
- Lee JW, Lee SM, Gwak KS, Lee JY, Choi IG. 2006. Screening of edible mushrooms for the production of lovastatin and its HMG-CoA reductase inhibitory activity. *Korean J Microbiol* 42: 83-88.

(2008년 2월 12일 접수; 2008년 5월 1일 채택)