

*Aspergillus terreus*의 발효조건이 lovastatin 생산에 미치는 영향

김 병 곤 · 전 계 택 · 정 용 섭
전북대학교 응용생물공학부 및 생물산업연구소 ¹강원대학교 생명과학부
(접수 : 2000. 9. 2., 게재승인 : 2000. 9. 27.)

Effect of Fermentation Conditions on the Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus*

Byung-Gon Kim, Gie-Taek Chun¹, and Yong-Seob Jeong[†]

Division of Biotechnology and Research Institute of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

¹Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea

(Received : 2000. 9. 2., Accepted : 2000. 9. 27.)

The biosynthesis of lovastatin, a cholesterol lowering agent formed by the filamentous fungus *Aspergillus terreus*, was examined in a 2.5 L jar fermenter. In batch bioreactor cultures conducted at various agitation rates, 400 rpm showed the best result in terms of lovastatin production. Notably, the effect of pH on lovastatin biosynthesis was found to be significant: when the pH was controlled at around 5.8 during the whole fermentation period, lovastatin concentration reached 598 mg/L, which is much higher than the amounts obtained by pH-uncontrolled and pH 7.4-controlled fermentations. In addition, both L-histidine and L-tryptophan were observed to be favorable amino acids for the enhancement of lovastatin production when 6 g/L of the respective amino acids were supplemented at the beginning of the fermentation period. By further optimization of the production media and the physical environment, lovastatin production was increased to 836 mg/L (3.5 mg/L/hr) which is approximately 10 times higher than the productivity of the basic control culture.

Key Words : lovastatin, cholesterol lowering agent, secondary metabolite, *Aspergillus terreus*.

서 론

Lovastatin은 naphthalene ring system, β -hydroxylactone 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 고지혈증 치료제이다. 고지혈증 (hyperlipidemia)은 혈관 속의 지질의 양에 이상이 생긴 상태로서, 이로 인해 혈관이 축소되거나 막혀 각종 심혈관 질환을 일으키는 현대의 주요 질병 중의 하나이다(1,2).

콜레스테롤 생합성경로의 율속단계 중 마지막 단계에 관여하는 효소인 desmosterol 환원효소에 의해 축매되는 desmosterol의 sterol로의 전환을 저해하는 triparanol 등이 콜레스테롤 저하제로서 초기에 연구되었다. 그러나 이 경우에는 mevalonate 이후의 중간대사산물들이 체내에 축적되어 부작용을 나타내는 것으로 알려졌다. 그러므로 부작용을 최소화할 수 있는 방법을 모색하였으며, 그 대안으로 콜레스테롤 생합성경로에

서 desmosterol 환원효소보다 앞선 초기의 율속단계인 HMG-CoA (hydroxymethyl-glutarylcoenzyme A) 환원효소가 관여하는 반응을 저해하는 것이 바람직하지 않은 중간대사산물의 축적없이 콜레스테롤의 생합성을 저하시킬 수 있는 최선의 방법으로 보고되었다(3,4).

Lovastatin의 작용기전은 lovastatin의 구조가 콜레스테롤 합성을 조절하는 가장 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소와 결합하는 HMG-CoA와 유사하여, HMG-CoA 대신 HMG-CoA 환원효소와 미리 결합함으로써 mevalonate의 합성을 저해하는 것이다. 그 결과 콜레스테롤 생합성 속도를 제한하여 혈관 속의 콜레스테롤 수치를 효과적으로 감소시킨다고 알려져 있다. HMG-CoA 환원효소 저해제는 기능기의 종류에 따라 4가지 (lovastatin, mevastatin, simvastatin, pravastatin)가 알려져 있으며, 이 중에서 lovastatin이 가장 강한 콜레스테롤 저하효과를 갖고 있어 고콜레스테롤혈증 환자의 치료에 선호되고 있다(5,6).

Lovastatin은 균사형성 곰팡이인 *Aspergillus terreus*에 의해 polyketide 경로를 통해 이차대사산물로 생성된다(7,8). 균사를 형성하는 미생물의 경우 액상배양시 균사체 모양과 구 모양의 펠릿 두 가지 형태로 자란다. 이와 같이 균류의 서로 다

[†]Corresponding Author : Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel : +82-63-270-2571, Fax : +82-63-270-2572
E-mail : ysjeong@moak.chonbuk.ac.kr

른 성장 형태는 이차대사산물의 생산성에 큰영향을 미치며, 대량생산하는 과정에서 다양한 문제를 유발시킨다. 예를 들면, *A. niger*나 *A. terreus*에서 생산되는 citric acid나 itaconic acid의 경우는 펠릿 형태로 성장하는 것이 더 좋은 생산성을 보이는 반면(9), *P. chrysogenum*에 의해 생산되는 penicillin(10)이나 *R. arrhizus*에 의해 생산되는 fumaric acid(11)의 경우는 균사체 형태의 성장이 생산성에 유리한 것으로 나타나 있다. 이러한 특징적인 성장형태는 균류의 종 뿐만 아니라 집종상태, 화학적인 조건으로 배지 조성, 물리적 조건으로는 pH, 배양 온도, 전단 응력 등에 의해 결정된다(12,13). 따라서 다양한 배양 조건에 따른 균류의 성장 형태의 변화를 이해하는 것이 중요하다.

아미노산은 이차대사산물의 생산을 위한 중요한 인자이며, 균주 및 생산물에 따라 다양하지만 이차대사산물의 전구물질, 이차대사산물 효소의 유도물질 및 developmental regulator로서의 역할을 한다. Matsumura 등은(14,15) DL-methionine이 *Cephalosporium acremonium*에 의한 cephalosporin C 생산에서 developmental regulator로서 작용함을 보고하였다. 또한 Lee와 Agathos는(16) L-valine이 *Tolypocladium inflatum*에 의한 cyclosporin A 생산시 관여하는 효소의 유도물질 또는 전구물질로서 작용함을 보고하였다. 그들에 의하면 이처럼 유도물질로 작용하는 아미노산은 이차대사산물의 생산량을 증가시키기 위해 지수성장기에 공급되는 것이 좋으며, 세포가 왕성하게 성장하는 시기에 아미노산을 첨가하면 이차대사에 관여하는 유전자의 전사에 영향을 미쳐 이차대사에 유리한 쪽으로 세포를 유도하기 때문이라고 언급하였다.

본 연구에서는 *A. terreus*의 펠릿 형태를 유도하여 산소제한을 해결하기 위한 방법으로 다양한 배양 조건을 실험하였고, 균체생장과 lovastatin 생산성에 미치는 영향 등의 배양 특성을 조사하였다. 그리고 호기성 미생물의 발효에서 고려해야 하는 발효조 운전조건중에서 *A. terreus*의 배양시 용존산소와 미생물의 형태에 영향을 미치는 임펠러의 교반속도 및 pH를 조절하여 최대의 lovastatin 생산량을 나타내는 발효조건을 확립 하였다. 또한 플라스크 배양에서 L-histidine과 L-tryptophan을 각각 6 g/L의 농도로 첨가한 경우 lovastatin 생산량이 상당히 증가한 결과를 토대로, 상기 두 아미노산의 첨가 시기가 lovastatin 생산에 미치는 영향을 실험하였다. 마지막으로 확립된 최적배양조건에서 회분식 생물반응기를 이용하여 발효한 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Aspergillus terreus*(ATCC 20542)

이며 -70℃에서 glycerol stock으로 보관하여 종배양시마다 새로운 stock을 사용하였다.

배지 및 배양조건

종배양을 위해 사용된 배지의 조성은 sucrose 80 g/L, trypton 40 g/L, urea 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 g/L, NaNO_3 3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L solution) 1 mL/L이었다. 종배양은 하루전 배양온도에서 활성화시킨 12 mL의 stock을 80 mL의 배지가 담긴 250 mL 삼각 플라스크에 접종하여 진탕배양기에서 27℃, 200 rpm으로 48시간 배양하였다. 발효조 배양에서 발효조는 2.5 liter 부피의 한국발효기(주)제품을 사용하였고, 조업부피는 1.5 liter로 하였다. 배양온도는 27℃, 공기유량은 1 vvm(volume of air/volume of fluid/min)로 유지하였으며, 배양시 발생하는 거품을 제거하기 위해 silicon 소포제를 사용하였다. 발효조 배양시 균주의 성장이 활발하여 배양액 상부의 발효조 벽면, 배양액 상부와 닿는 수소이온농도 측정기나 용존산소농도 측정기와 같은 측정기구의 일부분 및 방해판 등에 균체가 붙어서 자라는 경향을 보였다. 이러한 현상은 교반속도가 낮을수록 심하였으며, Rushton turbine 임펠러의 직경과 발효조의 직경의 비를 0.48에서 0.59로 증가시키고 평날의 크기도 상대적으로 증가시킨 임펠러의 사용으로 균체가 벽면에서 자라는 것을 완화시킬 수 있었다. 종배양액을 미분쇄하여 조업부피의 1%(v/v)인 15 mL를 발효조에 접종하였다. Lovastatin 생산을 위한 기본배지의 조성은 glucose 50 g/L, glycerol 50 mL/L, peptonized milk 24 g/L, yeast extract 2.5 g/L, polyethylene glycol(PEG) 2,000 2.5 g/L이었다(1). 발효조 배양시 pH는 2N NaOH와 2N HCl로 조정하였다.

분석방법

균체농도를 측정하기 위하여 균질혼합기에서 균질화 과정을 거친 배양액 시료를 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상징액을 버린 후 증류수를 넣어 와류 혼합을 하고 다시 원심분리하는 세척과정 (3번 반복)을 거친 후 105℃에서 항량을 구하여 건조균체량 (Dry Cell Weight, DCW)을 측정하였다.

Lovastatin의 분석은 Roman Kysilka와 Vladir Křen 등의 방법(17)을 참고하여 HPLC로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다. Lovastatin 표준용액으로는 순수한 lovastatin을 농도별로 methanol에 용해하여 사용하였고, mevinolinic acid (acid form) 표준용액(18)은 소량의 methanol에 Lovastatin을 녹인 후 0.1M NaOH을 가한 뒤 음파파쇄하고 1시간 동안 50℃에서 가열시킨 뒤 1M HCl로 pH를 7.7로 조정한 후 0.2 μm membrane으로 여과하여 얻었다. Lovastatin(lactone form)과

Table 1. HPLC condition for lovastatin analysis

HPLC	Shimadzu, LC-10AD
Detector	UV detector
Absorbance	238 nm
Temperature	30℃
Column	Waters, μ Bondapak C18 reverse-phase column (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Methanol : 18 mM o-phosphoric acid (77.5 : 22.5)
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	10 μl

Table 2. HPLC condition for glucose and glycerol analysis

HPLC	Spectra-Physics SP8800
Detector	RI detector (Shodex RI SE-61)
Temperature	80°C
Column	Supelco, Supelcogel Ag HPLC column (7.8 × 300 mm)
Mobile phase	Water
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 μ l

Table 3. Effect of inoculum size and morphology on the cell growth and lovastatin production

Inoculation size and type	Cell morphology after fermentation	Pellet diam. (mm)	Dry cell weight (g/L)	Lovastatin conc. (mg/L)	Specific production (mg/g cell)
0.5ml	pellet	2.0~ 3.1	24.62	226.9	9.22
1ml	pellet	1.5~ 2.3	24.75	234.4	9.47
2ml	filamentous	-	30.02	218.1	7.27
0.5ml (grinding)	filamentous	-	28.99	199.4	6.88
1ml (grinding)	filamentous	-	29.41	199.3	6.78
2ml (grinding)	filamentous	-	31.84	154.2	4.84

mevinolinic acid (acid form)를 각각 농도 30 ~ 150 mg/L의 범위에서 분석을 실시하여 검량곡선을 얻었으며, 각 농도에 따라 두 물질을 1 : 1로 혼합하여 30 ~ 150 mg/L의 범위에서 분석을 실시하여 두 물질이 공존하는 경우에 대한 검량곡선을 얻었다. 액체 배양한 균체의 생산물을 정량하기 위해 배양액을 분쇄한 후 일정량을 취하고 동량의 methanol을 가한 뒤 30°C에서 200 rpm으로 1시간동안 진탕하였다. 그 후 배양액을 Whatman사의 여과지 No.4로 여과한 뒤 다시 0.2 μ m 막으로 여과하였다. 여과액을 표준용액으로 실시한 분석조건과 같은 조건하에서 HPLC를 실행하고 이미 얻어진 검량곡선을 이용하여 생산물의 양을 계산하였다.

그리고 배양액 중에 잔류하는 glucose와 glycerol의 농도를 측정하기 위해 배양액을 Whatman사의 여과지 No.4로 여과한 뒤 다시 0.2 μ m 막으로 여과하여 균체를 제거한 발효여과액을 얻었다. 여과액을 표준용액으로 실시한 분석조건과 같은 조건하에서 HPLC를 실행하고 이미 얻어진 검량곡선을 이용하여 생산물의 양을 계산하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다.

결과 및 고찰

균체의 접종형태 및 접종량이 lovastatin 생산과 균체 성장에 미치는 영향

균사성 균류를 액상배양하면 균사체 모양 또는 펠릴 모양의 두 가지 성장형태를 나타내며 이러한 균류의 성장형태가 이차대사산물의 생산성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 사용한 균주인 *A. terreus*의 경우도 배양조건에 따라 두 가지 성장형태를 보이는 것으로 관찰되었으며 성장배지에서 큰 펠릴로 성장할 경우 그 종배양액을 생산배지로 접종할 때 균일한 양의 균체를 접종하기가 어려웠다. 따라서 커다란 펠릴로 균체가 성장한 경우는 펠릴을 미분쇄기로 분쇄하여 생산배지에 접종하는 방법에 의해 접종조건이 lovastatin 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 생산균체를 접종할 때의 seed 형태에 따른 영향을 알아보기 위해, 균주를 미분쇄기로 분쇄하여 생산배지에 접종한 경우와 균주를 펠릴형태 그대로 생산배지에 접종하여 결과를 비교하였다.

또한 접종량에 따른 생산배지에서의 성장형태와 lovastatin 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 0.5 ml (0.6% v/v), 1 ml (1.25% v/v), 2 ml(2.5% v/v)씩 다른 양으로 접종하였다.

Table 3에 나타난 바와 같이 미분쇄기로 분쇄하여 접종한 경우는 접종량에 관계 없이 점도가 높은 균사체 형태로 성장하는 것으로 나타났으며, 분쇄하지 않고 접종한 경우는 접종량이 적을 경우 (0.5 ml - 1.0 ml)는 펠릴형태로 성장했으나 접종량이 많을 경우 (2 ml)는 균사체 형태로 자라는 것으로 관찰되었다. 각 경우의 균체량과 생산량을 비교해 보면 두 가지 형태의 접종조건에서 각각의 접종량이 증가함에 따라 균체량이 함께 증가하는 것을 볼 수 있으며 균사체 형태로 자란 경우보다 펠릴형태로 자란 경우가 lovastatin의 생산성이 더 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 0.5 ml과 1 ml의 접종을 비교한 결과 일단 펠릴이 형성되면 펠릴의 크기가 작을 때 더 높은 생산성을 보이는 것으로 나타났다. 이는 다른 종류의 이차대사산물을 생산하는 균주에서와 같이 *A. terreus*의 경우도 균체의 성장형태에 의해 lovastatin의 생합성 능력이 크게 영향을 받는다는 것을 의미하는 결과이다. 일반적으로 생산균체의 배양 중의 성장형태가 배양액의 유변학적 특성에 매우 중요한 영향을 미치며, 이는 결국 생물반응기의 수행 능력에 심각한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 즉 균사체 형태로 성장할 경우 매우 높은 점도로 인해 배양액의 유변학적 특성이 비뉴턴유체 (non-Newtonian fluid)의 특성을 나타냄으로써, 배양액의 물질전달 능력 특히 산소전달계수에 매우 부정적인 영향을 미친다고 알려져 있다. 반면에 펠릴모양의 성장 또는 short mycelial fragments를 이루며 자란 경우는 배양액의 유변학적 특성이 뉴턴유체 (Newtonian fluid)의 특성을 나타내며, 낮은 점도로 인해 상기의 물질전달 능력의 감소 현상이 나타나지 않는다고 알려져 있다. 최근 Hosobuchi 등은(19) pravastatin의 전구체인 mevastatin을 생산하는 *P. citrinum*의 경우 균주가 펠릴모양으로 성장할 때 더 높은 생산성을 보인다고 보고하였는데, 이들은 균사체형태와 펠릴형태로 성장할 때의 이러한 생산성의 차이를 각각의 산소전달계수를 비교하여 그 이유를 설명하였다. 즉 배양액의 점도가 매우 높은 균사체 형태로 균주가 성장할 경우 산소전달계수

Table 4. Effects of agitation speed on the lovastatin production at pH 7.4

Agitation speed	Dry cell weight (g/L)	Lovastatin concentration (mg/L)	Specific production (mg/g-cell)	Specific growth rate (hr ⁻¹)
200 rpm	16.72	85.81	5.13	0.049
300 rpm	16.13	101.08	6.27	0.032
400 rpm	23.45	129.89	5.54	0.040

가 낮아서 mevastatin의 생산에 필수적인 산소 전달이 제한을 받게 되며 펠릴형태로 성장할 경우는 반대로 낮은 점도로 인한 높은 산소전달계수 현상때문에 산소의 전달이 용이했던 것이 mevastatin 생산성 증가의 주된 요인이라고 설명하였다.

본 실험을 통해 lovastatin의 생산성 향상을 위해서는 *A. terreus*의 성장형태가 매우 중요한 요소 중의 하나임을 확인하였으며, 이후의 발효실험에서는 펠릴의 크기를 작고 일정하게 유지하기 위하여 점중량을 1%(v/v)로 하였다.

교반속도가 lovastatin 생산에 미치는 영향

교반은 배지에서의 열과 영양물질의 전달 및 산소전달에 효과적이다. 그러나 교반기에 의해 생성된 전단응력은 세포를 손상시킬 수도 있다(20,21). 그러므로 미생물 발효시 높은 생산량을 얻으려면 발효조의 교반속도를 최적화해야 한다.

회분식 배양에서 교반속도가 미치는 영향을 조사하기 위해 Table 4에 나타난 것처럼 교반속도를 200, 300, 400 rpm으로 달리 하여 lovastatin의 생산량과 발효후 최종 건조균체량을 교하였다.

교반속도를 200 rpm으로 조절한 경우, 48시간까지는 lovastatin 생산이 나타나지 않았으며, 그 이후부터 lovastatin의 생산이 완만하게 일어나 정상상태에서 평균 lovastatin 생산량은 85.81 mg/L 였다. 비성장속도는 0.049 hr⁻¹이었다. 용존산소는 12 ~ 24 시간 사이에 급격히 감소하여 48시간에 최소를 나타내었으나, 포화농도의 25% 이상을 유지하였으며 그후 서서히 증가하였다. 즉 용존산소에 의한 제한은 없었던 것을 알 수 있다. 이 이후의 모든 실험에서도 용존산소는 200 rpm에서 수행한 것보다 높게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

교반속도를 300 rpm으로 조절한 경우에도 48시간까지는 lovastatin 생산이 나타나지 않았으며, 그 이후부터 lovastatin의 생산이 완만하게 시작되어 정상상태에서 평균 lovastatin 생산량은 200 rpm에서보다 약간 높은 101.18 mg/L 였다. 비성장속도는 0.032 hr⁻¹로 200 rpm에서 보다 낮게 나타났으나 최종 균체량은 비슷하였다.

교반속도를 400 rpm으로 조절한 경우에는 빠른 교반속도로 인해 200이나 300 rpm에서보다 전단력의 영향으로 균체량이 감소할 것으로 예상하였으나, 정상상태에서 평균 건조균체량이 25 g/L로, 200 rpm이나 300 rpm보다 높게 나타났다. lovastatin 생산에 있어서도 48시간 이후부터 lovastatin의 생산이 완만하게 시작되어 정상상태에서 평균 lovastatin 생산량은 129.89 mg/L로 나타났다. 이 생산량은 200 rpm이나 300 rpm에서 나타난 lovastatin 생산량보다 약 1.3 ~ 1.5배 정도 높게 나타난 것이며, 비성장속도는 0.040 hr⁻¹이었다.

이상의 모든 교반속도 조건에서 탄소원으로 공급된 glucose와 glycerol 중에서 glucose가 먼저 이용되었으며, glucose 소비속도도 빠르게 진행되어 교반속도가 200 rpm 또는 300 rpm 일 때는 48 시간 안에, 400 rpm일 때는 72 시간 안에 glucose

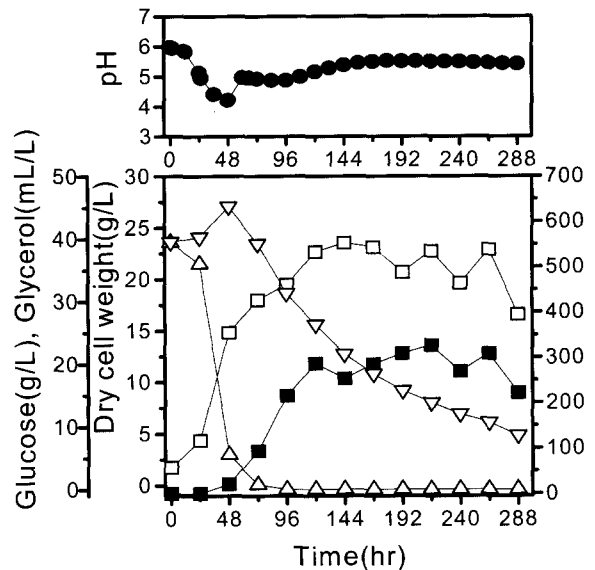


Figure 1. Time course of lovastatin fermentation in 400 rpm (pH uncontrolled).
 —□—, Dry cell weight; —■—, Lovastatin; —△—, Glucose; —▽—, Glycerol.

가 완전히 고갈되었다. 함께 공급했던 탄소원인 glycerol은 모든 조건에서 glucose가 완전히 고갈되기 전에는 소비가 되지 않았다. 이는 여러 가지 탄소원이 함께 공급되었을 때, 먼저 이용하기 쉬운 탄소원부터 이용한 후에 다음으로 이용하기 쉬운 탄소원을 이용한다는 것을 나타낸다(22). 또한 그렇기 때문에 이차대사산물의 생산시 이처럼 두 가지 이상의 탄소원을 공급하는 것이 trophophase에서는 이용되기 쉬운 탄소원이 소비되면서 균체성장이 활발히 일어나 생산물을 생산할 수 있는 균체량을 증가시키고, idiophase에서는 이차대사산물 생산에 알맞은 탄소원이 소비되면서 이차대사산물이 생산될 수 있어 효율적임을 알 수 있었다.

Gbewonyo 등은(23) lovastatin 발효시 균체의 형태와 산소 전달사이의 관계에 있어 균사체보다는 펠릴형태가 산소전달이 더 좋다는 결과를 보고하였다. 본 발효조 실험에서 사용된 균주는 펠릴형태를 나타냈으며, 펠릴 크기는 1 mm 이하이었다.

배양액의 pH가 lovastatin 생산에 미치는 영향

Lovastatin 생산에 적합한 pH 조건을 알고자 교반속도 400 rpm에서 이미 앞서 실험한 pH 7.4가 아닌 일반적인 곰팡이의 배양 pH인 5.8에서 시작하여 발효시 pH를 조절하지 않은 경우와 pH를 5.8로 계속 유지한 경우에 대하여 회분식 배양을 수행하여 결과를 비교해보았다.

Figure 1은 pH를 조절하지 않고 실험한 결과를 나타낸 것

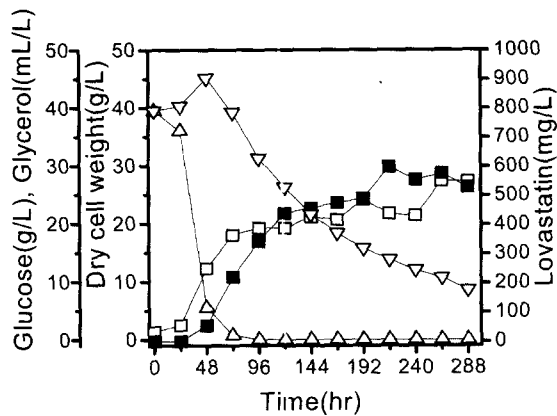


Figure 2. Time course of lovastatin fermentation in 400 rpm (pH 5.8).
 □—, Dry cell weight; ■—, Lovastatin; △—, Glucose;
 ▽—, Glycerol.

이다. glucose가 거의 소모되어 가는 48시간에 pH가 4.2까지 떨어졌다가 점점 증가하여 최종 pH는 5.4였다. 이러한 pH의 변화 경향은 Buckland 등(24)의 실험에서도 나타났는데, 이때 pH 증가는 glucose가 고갈된 후 균체가 단백질 등을 이용하면서 생기는 암모니아와 같은 대사산물 때문으로 생각된다. pH 7.4에서 같은 교반속도로 수행된 실험에서 보다 건조균체량은 약간 감소하였으나, lovastatin 생산량은 216시간에서 326 mg/L로 pH 7.4에서 수행한 실험보다 2배 이상 높게 나타났다.

pH를 5.8로 계속 유지한 경우는 Figure 2에 나타내었다. pH를 조절하지 않은 경우보다 건조균체량과 lovastatin 생산량 둘 다 증가하였다. 특히 lovastatin 생산량은 216시간에 598 mg/L로 pH 7.4에서 실험한 것보다는 약 4배, pH를 조절하지 않은 실험에서 보다 약 1.8배 향상되었다.

pH를 조절하지 않은 경우와 pH를 5.8로 계속 유지한 경우의 48시간에서의 건조균체량과 lovastatin 생산량을 비교하면, 건조균체량은 pH를 조절하지 않은 경우가 더 높지만 lovastatin 생산량은 pH를 5.8로 계속 유지한 경우가 2배 이상 높았다. 결국 pH를 5.8로 계속 유지한 경우가 발효초기부터 lovastatin 생산에 유리한 조건을 제공한다는 것을 알 수 있었다. 또한 lovastatin 생산량의 증가정도를 볼 때, 교반속도보다 pH가 lovastatin 생산에 더 많은 영향을 미침을 알 수 있었다.

발효시 발효액의 색변화는 pH를 조절하지 않은 경우에는 24시간에서 노란색을 보이다가 점점 검붉은 빛이 가해져 84시간 이후부터 벽돌색을 나타냈다. 그리고 발효말기에는 색이 더 짙어져 연두빛이 도는 검은 커피색을 나타냈다. pH 5.8에서도 24시간에서 노란색을 나타냈으며, pH를 조절하지 않은 경우보다 빠른 48시간 이후부터 벽돌색을 나타냈다. Figure 2에서 보듯이 벽돌색이 나타난 48시간부터 lovastatin의 생산이 급격히 증가하였다. 그 후 60시간부터는 검은 커피색을 나타냈으며, 발효가 진행됨에 따라 발효액의 색이 변함을 관찰할 수 있었다.

최적 pH로 결정된 pH 5.8에서 교반속도를 400 rpm 이상으로 조절하면 어떤 결과가 나오는지 실험하였다 (자료 미제시). 예상대로 500 rpm에서는 전단에 의한 영향으로 pH 5.8, 교반속도 400 rpm에서 수행된 lovastatin 생산보다 낮은 lovastatin

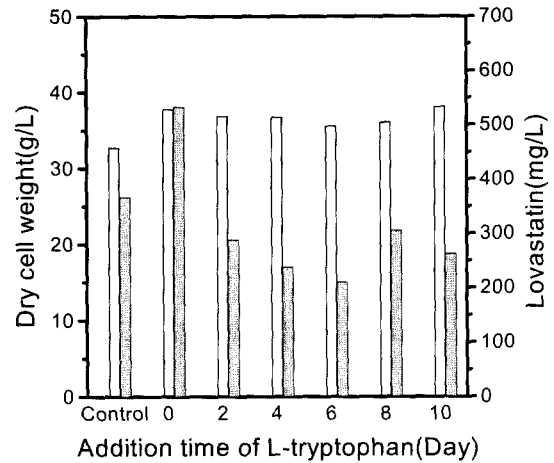


Figure 3. Effect of L-tryptophan shot on the production of lovastatin
 (□: Dry cell weight, ▨: Lovastatin concentration).

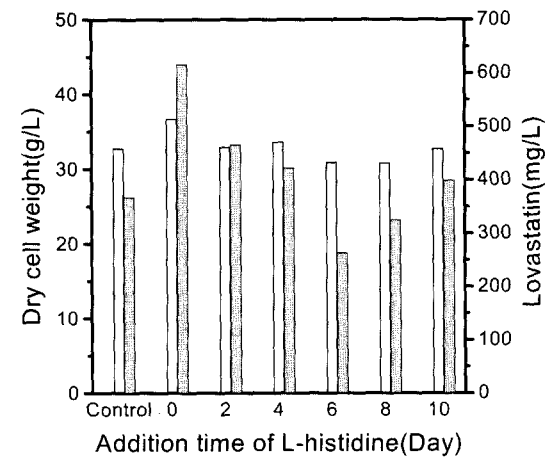


Figure 4. Effect of L-histidine shot on the production of lovastatin
 (□: Dry cell weight, ▨: Lovastatin concentration).

생산량과 건조균체량을 나타내었다. 그리고 펠릿의 형태도 구형의 규칙적인 형태에서 불규칙적인 모양을 나타내었다. 따라서 lovastatin 생산을 위한 발효초기 운전조건은 교반속도 400 rpm과 pH 5.8이 적절하다고 판단되었다.

아미노산의 첨가시기에 대한 영향

아미노산의 역할은 생산균주 및 생산물에 따라 다양하지만, 이차대사산물의 전구물질, 이차대사산물 효소의 유도물질 및 developmental regulator로서 이차대사산물의 생산을 위한 중요한 인자로 알려져있다.

Lovastatin 생산에 대한 몇가지 아미노산의 영향을 조사한 선행 연구결과(25)로부터, L-tryptophan과 L-histidine이 높은 lovastatin 생산량을 나타내었다. 본 실험에서는 glucose 50 g/L, glycerol 50 mL/L, peptonized milk 30 g/L, K₂HPO₄ 6 g/L, yeast extract 2.5 g/L, PEG 2,000 2.5 g/L로 이루어진 최적배지에 아미노산의 첨가시기를 달리하여 250 mL 삼각 플라스크에서 27°C, 200 rpm으로 12일 동안 배양하여 lovastatin 생산을 비교해보았다. Figure 3과 4에서 보듯이 L-tryptophan과 L-histidine 둘다 발효를 시작할 때부터 첨가한 것이 아미노산

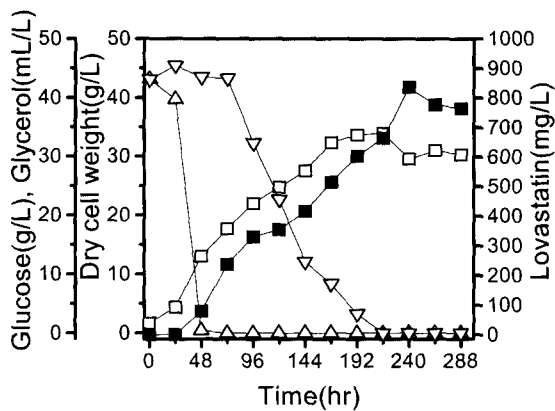


Figure 5. Time course of lovastatin fermentation with optimized medium at pH 5.8 and 400 rpm.

—□—, Dry cell weight; —■—, Lovastatin; —△—, Glucose; —▽—, Glycerol.

을 첨가하지 않은 것에 비하여 약 1.5배 이상의 lovastatin 생산량을 나타내었다. 이는 첨가된 아미노산이 이차대사에 직접 관여한다기 보다는 일차대사에 관여하여 lovastatin 생합성에 필요한 대사산물을 유도하여 lovastatin 생산을 촉진한다고 생각되었다. 때문에 발효를 시작한 후에 아미노산을 첨가하는 것보다는 처음부터 아미노산을 첨가하는 것이 더 효과적이었다. 발효를 시작하지 6일째에 아미노산을 첨가한 경우에는 lovastatin 생산량과 건조균체량 모두 가장 낮게 나타났다. 이 시기는 균체가 지수기를 지나 정체기에 다다른 시기로, 첨가된 아미노산이 일차대사는 물론 이차대사에도 좋은 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

최적 배지와 발효조 운전조건에서의 lovastatin 생산

최적 발효조 운전 조건인 교반속도 400 rpm과 pH 5.8에서, 발효초기에 L-tryptophan 6 g/L가 첨가된 최적 배지를 이용하여 회분식 발효를 수행하였으며, 그 결과를 Figure 5에 나타냈다.

이전의 발효조 실험에서 보다 균체성장이 빠르고, 균체량이 많아 발효조의 벽이나 측정기구 등에 균체가 많이 붙는 현상을 보였다. 또한 배양액의 색깔 변화도 빨리 진행되어 발효초기부터 붉은 갈색에서 36시간에 짙은 벽돌색을 나타냈으며, 60시간부터는 검은 커피색을 나타내었다. 발효말기에는 노란색이 도는 검은색을 나타내었다. 이를 볼 때 배양액의 색, lovastatin의 생산과 균체의 생리적 상태가 서로 관련이 있다고 생각되었다.

균체량의 증가뿐만 아니라 lovastatin 생산량도 매우 증가하여, 240시간에 836 mg/L의 lovastatin 생산량을 나타내었다. 이는 Table 4에 나타난 기본배지와 교반속도 200 rpm, pH 7.4에서 수행한 배양 결과보다 약 10배 정도 증가된 값이다.

요 약

고지혈증 치료제인 lovastatin을 *Aspergillus terreus*로부터 생산하기 위해 발효조 배양실험에서 교반속도와 pH에 대한 영향을 조사하였다. 최적 교반속도는 400 rpm이었고 pH는

5.8로 유지하였을 때 lovastatin 생산이 최대였으며, 교반속도 보다 pH가 lovastatin 생산에 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. L-tryptophan과 L-histidine의 첨가시기에 따른 lovastatin 생산량을 실험한 결과, 둘다 발효초기부터 첨가하여 배양하는 것이 효과적이었다. L-tryptophan을 발효초기에 첨가한 최적배지와 최적 환경조건인 교반속도 400 rpm, pH 5.8에서 회분식 배양을 수행한 결과 기본배지를 이용하여 실험한 배양 결과보다 약 10배 정도 많은 836 mg/L이었고, 생산성은 3.5 mg/L · hr였다.

감 사

본 연구의 결과는 1997년 교육부 학술연구조성비 (생물화학 Bio 97-B(1)-1) 및 1998년 학술진흥재단 과학기술기초 중점연구 (생물화학공학 1998-020-E00017) 지원에 의하여 연구 되었으므로 관계당국에 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 Hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A Reductase and a Cholesterol Lowering Agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**(7), 3957-3961.
2. Tkacz, J. S (1992), Biopharmaceutics, *In Encyclopedia of Microbiology*, Vol 1, p.331-337, Academic Press.
3. Tobert, J. A. (1987), New Developments in Lipid-lowering Therapy : the Role of Inhibitors of Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A Reductase, *Circulation*, **76**(3), 534-538.
4. Alberts A. W. (1988), Discovery, Biochemistry and Biology of Lovastatin, *Am. J. Cardiol.*, **62**, 10-15.
5. Slater E. E. and J. S. MacDonid (1988), Mechanism of Action and Biological Profile of HMG CoA Reductase Inhibitors, a New Therapeutic Alternative, *Drugs*, **36**, 72-82.
6. Finkelstein, D. B., and C. Ball(eds) (1992), *In Biotechnology of Filamentous Fungi*, pp. 194-202, Butterworth-Heinemann, London, U.K.
7. Hutchinson, C. R., and I. Fujii (1995), Polyketide Synthase Gene Manipulation: a Structure-function Approach in Engineering Novel Antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 201-238.
8. Greenspan M. D. and J. B. Yudkovitz (1985), Mevinolinic Acid Biosynthesis by *Aspergillus terreus* and its Relationship to Fatty Acid Biosynthesis, *J. Bacteriol.*, **162**(2), 704-707.
9. Clack, D. S. (1962), Surmerged Citric Acid Fermentation of Ferrocyanide Treated Beet Molasses : Morphology of Pellets of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 133-136.
10. 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.
11. Byrne, G. S., and O. P. Ward (1989), Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnol.*

- Bioeng.*, **33**, 912-914.
12. Pirt, S. J. and D. S. Callow (1959), Continuous-flow Culture of the Filamentous Mould *Penicillium chrysogenum* and the Control of its Morphology, *Nature*, **184**, 307-310.
 13. Metz, B. and N. W. F. Kossen (1977), The Growth of Moulds in the Form of Pellets-A Literature Review, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 781-799.
 14. Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida, and H. Taguchi (1978), Effect of Glucose and Methionine Consumption Rates on Cephalosporin C Production by *Cephalosporium acremonium*, *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 345-353.
 15. Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida, and H. Taguchi (1980), Regulation of Cephalosporin C Production by Endogenous Methionin in *Cephalosporium acremonium*, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 205-214.
 16. Lee, J. and S. N. Agathos (1989), Effect of Amino Acid on the Production of Cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*, *Biotechnol. Lett.*, **11**, 77-82.
 17. Kysilka, R. and V. Křen (1993), Determination of Lovastatin (Mevinolin) and Mevinolinic Acid in Fermentation Liquids, *J. Chromatography*, **630**, 415-417.
 18. Friedrich, J., M. Žužek, and M. Benčina, A. Cimerman, A. Štrancar, and I. Radež (1995), High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Mevinolin as Mevinolinic Acid in Fermentation Broths, *J. Chromatography A*, **704**, 363-367.
 19. Hosobuchi, M., K. Ogawa, , and H. Yoshikawa (1993), Morphology Study in Production of ML-236B, a Precursor of Pravastatin Sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 470-475.
 20. Doran, P. M. (1995), *Bioprocess Engineering Principles*, p.129-163, Academic Press.
 21. Hooker, B. S. and J. M. Lee (1990), Cultivation of Plant Cells in a Stirred Vessel : Effect of Impeller Design, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 226-304.
 22. Jarvis, F. M. and M. J. Johnson (1947), The Role of the Constituents of Synthetic Media for Penicillin Production, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 3010-3017.
 23. Gbewonyo, K., G. Hunt, and B. Buckland (1992), Interactions of Cell Morphology and Transport Processes in the Lovastatin Fermentation, *Bioprocess Eng.*, **8**, 1-7.
 24. Buckland, B., K. Gbewonyo, T. Hallada, L. Kaplan, and P. Masurkar (1989), Production of Lovastatin, an Inhibitor of Cholesterol Accumulation in Humans, in *Topics in Industrial Microbiology: Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, A. L. Demain, , G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera, and H. W. Rossmore Eds., p161-169, Elsevier, Amsterdam.
 25. Kim, B. G., Y. S. Jeong, G. T. Chun, Y. H. Lee (1999), Effect of Medium Components on the Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(1), 36-44.