

## Cerulenin 저항성 *Aspergillus terreus* 변이주로부터 lovastatin 생산을 위한 회분식과 유가식 배양

문 미 경 · <sup>1</sup>전 계 택 · †정 용 섭  
전북대학교 응용생물공학부 및 생물산업연구소, <sup>1</sup>강원대학교 생명과학부  
(접수 : 2001. 2. 7., 게재승인 : 2001. 2. 15.)

## Batch and Fed-batch Fermentation for the Lovastatin Production by Cerulenin-resistant *Aspergillus terreus* Mutant

Mi-Kyung Moon, Gie-Taek Chun<sup>1</sup>, and Yong-Seob Jeong<sup>†</sup>  
Division of Biotechnology and Research Institute of Bioindustry, Chonbuk National University, Chonju,  
Chonbuk 561-756, Korea

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea  
(Received : 2001. 2. 7., Accepted : 2001. 2. 15.)

The biosynthesis of Lovastatin, a cholesterol lowering agent formed by the filamentous fungus, cerulenin-resistant *Aspergillus terreus* mutant was studied in shake flasks and bioreactors. The lovastatin production could be improved by fed-batch under the limited condition of carbon source. The relationship between the fungal morphology and the lovastatin production was also examined during the fed-batch cultures. The fed-batch studies in shake flasks were carried out to find the optimum glucose feeding method, and the pulsed feeding of glucose from 3 days onward at 24 hours intervals was found to be optimal to increase the lovastatin production and reduce the average pellet size. When the pH was controlled at around 5.8 during the whole fermentation period, the lovastatin concentration reached 384 mg/L, which is much higher than the values obtained pH-uncontrolled and pH 7.4. The optimal glucose feeding strategies was found that 30 g/L of glucose was added initially in batch mode, and then fed-batch was conducted by continuous addition of glucose solution(180 g/L) from 72 to 240 hr at a rate of 1.2 mL/hr at 28°C, pH 5.8, 400 rpm, and 1.0 vvm. The lovastatin concentration of 547 mg/L was obtained in 168 hr. It was about 1.5 times higher than the value of the batch fermentation.

**Key Words** : lovastatin, cholesterol lowering agent, secondary metabolite, fed-batch, *Aspergillus terreus*

### 서 론

Lovastatin은 균사 형성 곰팡이인 *Aspergillus terreus*에 의해 polyketide pathway를 통해서 생합성되는 이차대사산물로 naphthalene ring system,  $\beta$ -hydroxylactone 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 효과적인 고지혈증 치료제이다(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 생합성경로에서 desmosterol 환원효소보다 앞선 초기의 율속단계인 HMG-CoA(hydroxymethyl-glutarylcoenzyme A) 환원효소가 관여하는 반응을 저해하는 것이 바람직하지 않은 중간대사산물의 축적 없이 콜레스테롤의 생합성을 저하시킬 수 있는 최선의 방법으로 보고되었다. 주목할 점은 HMG-CoA reductase에 대한 lovastatin의 친화도가 원래의 기질인 HMG-CoA보다 10,000 배 이상 높아 결국 콜레스테롤의 합성을 저해한다는 점이다(3). 이러한 HMG-CoA reductase 저해제는 두 가지 기능기의 차이에 따라 4 종류(lovastatin, mevastatin, simvastatin와 pravastatin)가 알려져 있다. 이 중에서 lovastatin이 가장 강한 콜레스테롤 저하효과가 있다고 알려져 있으며, 또한 임상적 용도 충분히 되어있어 고지혈증 환자의 치료에 선호되고 있

†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

다(4).

균사 형성 균류를 액상 배양하면 균사 또는 펠릴 모양의 두 가지 형태구조를 나타낸다. 이차대사산물을 생산하는 균사형성 균류의 경우, 흔히 곰팡이의 형태구조가 이차대사산물의 생산성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 다양한 배지 조건에 따른 곰팡이의 형태구조의 변화를 이해하는 것이 이차대사산물 생산을 위해 중요하다. 특히 액상 배양에서 펠릴의 형성은 포자들 간의 상호작용, 균사체 간의 상호작용, 균사와 포자간의 상호작용, 균사와 고체 입자간의 상호작용과 펠릴간의 상호작용 등의 요인에 의하여 결정된다고 보고되었으며, 균주의 종류, 배양 초기 pH, 배지 종류와 접종량에 의하여서도 펠릴 형성에 차이가 있을 수 있음이 발표되었다(5). 예를 들면, sucrose의 농도가 증가할수록 펠릴의 크기가 감소하고, phosphate의 농도가 증가할수록 펠릴의 크기가 커진다고 보고하였다. 또한 성장 조건에 따라 펠릴 형성에 차이가 있으며 발효액의 유동성, 혼합, 물질전달과 생산성에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(6).

비성장 관련 생산물인 이차대사물질의 생산을 위해 사용되는 유가식 배양은 미생물 배양의 한 방법으로서 기질이 고농도로 사용되어 세포성장을 저해하는 경우 공급기질의 조절, 발효액의 점도조절과 고농도 세포 배양이 가능하다는 장점들이 있다. 예를 들면, 배양초기에는 고농도의 배지 공급에 의해 세포 성장을 유도하여 균체 농도를 높이고, 후기에는 이차대사산물을 유도할 수 있는 배지 또는 세포성장을 조절할 수 있는 적정량의 배지를 공급하여 이차대사산물을 생성시키는 방법의 조업이 가능하다. 또한 오염 문제, 돌연변이 문제, 플라스틱미드 불안정성 문제 등에 있어서도 연속 발효에 비해 장점이 있는 공정으로 알려져 있다(7-9). 예를 들면 Hwang과 Lee는 *Acetobacter xylinum* BRC5에 의한 셀룰로오스 생산에서 glucose를 일정한 속도로 공급한 경우, 회분 배양에서의 셀룰로오스 생산보다 2배 증가시킬 수 있었다고 보고하였다(10). 또한 Amanullah 등은 *Xanthomonas campestris*의 변이주에 의한 회분배양에서는 약 30 g/L xanthan gum을 생산하였으나, glucose를 간헐적으로 공급하였을 경우 58 g/L으로 약 2배 높은 생산이 가능하였음을 발표하였다(11).

본 실험에서는 lovastatin 생산을 위한 균사 형성 곰팡이 *Aspergillus terreus* 변이주의 탄소원 조절에 의한 유가식 배양조건을 확립하고자 하였다. 또한 곰팡이의 형태구조가 이차대사산물 생산에 중요하므로 유가식 배양에서 탄소원의 공급 배지농도, 공급 시기와 공급 속도에 따른 균체의 형태구조의 변화가 lovastatin 생산성에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

연구에 사용된 균주는 본 연구실에서 개발한 *Aspergillus terreus*(ATCC 20542)의 cerulenin 저항성 변이주이다(12).

### 배 지

포자형성을 위해 potato dextrose agar(PDA) plate에 생산 균주를 접종하여 4일간 28℃에서 배양하였으며, 0.2% glycerol이 포함된 증류수로 포자를 수거하여 여과하였다.

Table 1. HPLC condition for lovastatin analysis

HPLC	Shimadzu, LC-10AD
Dectector	UV dectector(SPD-10A)
Absorbance	238 nm
Temperature	30℃
Column	Waters, $\mu$ 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 $\mu$ L

Liquid spore stock 1 ml에는  $1.7 \times 10^8$  spores/ml가 포함되도록 조절하였으며, -70℃에서 냉동 보관하였다. 종배양을 위하여 냉동 보관된 spore liquid stock을 녹인 후 PDA배지에 3백금이를 접종하여 6일간 사면 배양하였다. 그리고 0.2% glycerol로 사면 배양한 포자를 수거하여, 종균배양을 위한 배지에 5%(v/v) 접종하여 8일간 200 rpm에서 진탕 배양하였다. Lovastatin 생산은 배양한 종균 1%(v/v)을 생산배지에 접종하여 lovastatin 생산 실험 조건에 의거 수행하였다. 배지는 당과 무기염류를 각각 분리하여 살균한 후, 무균 상태에서 혼합하여 사용하였다. 종배양을 위해 사용된 배지의 조성은 glucose 80 g/L, tryptone 40 g/L, urea 2 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 g/L,  $\text{NaNO}_3$  3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L, KCl 0.5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g/L 용액) 1 mL/L이었다(1). 그리고 lovastatin 생산을 위한 생산배지의 조성은 wild-type 균주의 최적생산배지를 근거로 cerulenin 저항성 변이주의 생산배지를 최적화한 결과를 참고하여 결정하였으며, glucose 50 g/L, cottonseed oil 50 mL/L, yeast extract 2.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6 g/L, polyethylene glycol(PEG) 2,000 2.5 g/L이었다. 발효조 배양시 pH는 2N NaOH와 2N HCl로 조정하였다(12,13).

### 분석방법

균체농도를 측정하기 위하여 균질혼합기에서 균질화 과정을 거친 배양액 시료를 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 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. 발효 배양액의 잔류당은 Dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용한 환원당 측정 방법에 의해 측정하였다(14). 배양액 중의 cottonseed oil의 함량은 solvent-extraction 방법으로 측정하였다(15). Lovastatin의 분석은 Roman Kysilka와 Vladiir Kren 등의 방법을 참고하여 HPLC로 분석하였다(16,17).

### 배양 실험 방법

균체성장, 탄소원 소비경향과 lovastatin 생산 등의 기초자료를 얻기 위하여 플라스크를 이용한 회분식 배양 실험을 하였다. 생산배지에 접종을 위한 종배양은 250 mL의 플라스크에 80 mL의 배지를 넣어 진탕배양기에서 28℃와 200 rpm으로 8일간 수행하였다. 플라스크를 이용한 lovastatin 생산은 조업부피가 80 mL이 되도록 lovastatin 생산배지에 평균 1.25

mm의 펠릿이 형성된 종배양액 1%(v/v)를 접종한 후 28℃와 200 rpm에서 9일간 진탕 배양하였으며, 3반복 실험을 수행하여 평균값을 나타내었다.

유가식 배양은 제한기질인 탄소원 공급 농도 및 시기에 따른 lovastatin 생산, 균의 성장과 펠릿 형태구조 연구를 위하여 플라스크를 이용하여 실험을 하였다. Lovastatin 생산을 위한 유가식 배양 실험은 500 mL 삼각 플라스크를 이용하였으며, 초기 배지부피는 실험조건에 따라 80과 90 mL로 조절하여 발효를 수행하였다. 최종 조업부피는 100 mL이 되도록 조절하였으며, 온도 28 ℃와 200 rpm에서 8일간 수행하였다.

실험에 사용된 발효조는 2.5 L 용량(조업부피 1.5 L)의 jar 형태 발효조(코바이오텍, Korea)로서 자동온도조절기, 교반속도조절기, 용존산소센서, pH센서와 소포제센서를 부착하고 있으며 자동으로 제어된다.

유가식 배양의 초기 배양액의 부피는 1.3 L이었으며, 배양하는 동안 연동펌프(Cole-parmer instrument company, USA)를 이용하여 발효 후 총부피가 1.5 L가 되도록 실험 계획에 의해 공급용액 적정량을 조절하여 공급하였다. 공기유량은 배양 부피에 따라 변화시켜주면서 전 발효기간 중 1 vvm이 되도록 공기의 공급속도를 조절하였다. 발효중 PPG(polypropylene glycol 2,000)를 소포제로 사용하였으며, 배양하는 동안에 배양액의 pH는 2N HCl과 2N NaOH 용액을 사용하여 조절하였다. 발효조 배양 실험을 위한 종배양은 성장 배지에서 8일간 배양하였으며, 조업부피의 1%(v/v)를 발효조에 접종하였다. 성장배지의 성분이 이차대사산물의 생합성에 미치는 영향을 방지하기 위하여 종배양액을 원심분리하여 균체만 생산 배지에 접종하였으며, 접종시 펠릿의 크기는 평균 1.25 mm 정도이었다.

**펠릿의 크기 측정**

영상해석(image analysis) 방법을 사용하여 펠릿의 크기를 측정하였다(18). Petri dish에 10-30개 정도의 펠릿이 나타나도록 발효액 시료를 회석하여 비디오 카메라와 연결된 On-air 프로그램(사람과 셋들, Korea)을 이용하여 카메라의 렌즈 위치를 고정시켜 영상을 컴퓨터로 입력하였다. 입력된 영상은 다시 Scion image(Scion corporation, USA) 프로그램을 이용하여 바탕화면과 펠릿을 구분하기 쉽게 명암을 조절한다. 인식된 펠릿의 크기는 화소(pixel)로 나타내게 되며, Excel (Microsoft, USA)의 피벗 테이블을 이용하여 같은 화소를 나타내는 펠릿의 수를 계산하였다. 정사각형(한 변의 길이 5 mm)과 펠릿이 나타내는 화소와의 관계식을 계산하여 펠릿의 직경을 구하였으며, 컴퓨터 화면에 나타난 펠릿의 영상은 Figure 1과 같다.

**결과 및 고찰**

**플라스크를 이용한 lovastatin 생산**

플라스크에서 생산배지 조성을 기본으로 하여 cerulenin 저항성 변이주의 배양 시간에 따른 균체량, lovastatin 생산, glucose와 cottonseed oil의 농도 변화량을 측정하여 Figure 2에 나타내었다.

Lovastatin 생산은 배양 24시간 이후부터 증가하여 192시간

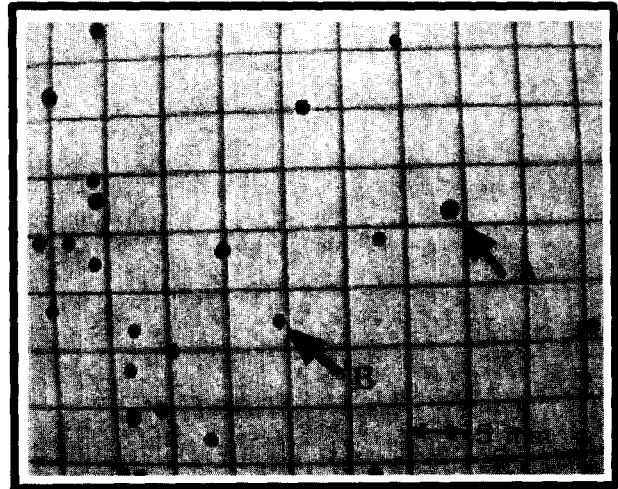


Figure 1. Image showing the pellet size of *Aspergillus terreus* (average diameter; A; 2 mm, B; 1 mm).

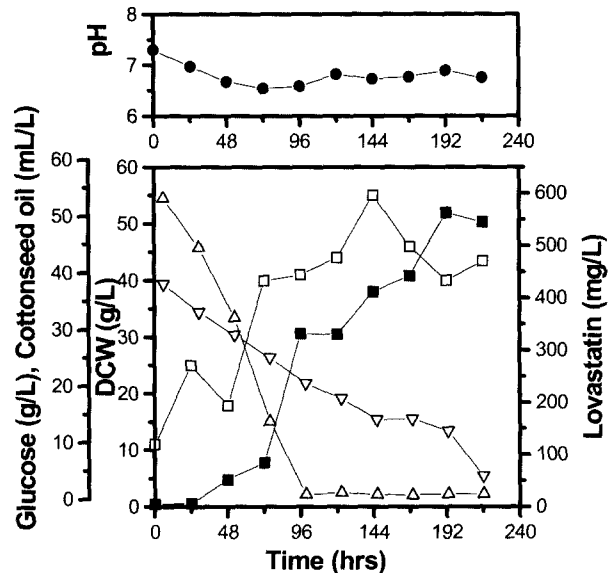


Figure 2. Profile of the cell growth and the lovastatin production, glucose and cottonseed oil consumption in 250 mL flask culture of *A. terreus*. —□—, Dry cell weight; —■—, Lovastatin; —△—, Glucose; —▽—, Cottonseed oil.

에 최대 560 mg/L이 생산되었다. 초기 균체량이 높게 측정된 것은 사용된 배지의 영향으로 판단되며, 144시간에는 최대 55 g/L를 나타내었다. 그리고, 배양 중 pH의 변화는 7.3과 6.5 사이이었으며 변화의 폭이 크지 않았다. 탄소원인 glucose와 cottonseed oil은 배양 초기부터 동시에 감소하는 경향을 보였다. 특히 glucose는 급격히 감소하는 경향을 보여주었으며 배양 96시간만에 고갈되었다. 그러나, cottonseed oil은 배양 말기까지 상대적으로 느리게 이용되는 경향을 보여주었다.

**회분식 발효조에서 pH가 lovastatin 생산에 미치는 영향**

교반속도 400 rpm의 회분식 발효조에서 pH가 cerulenin 저항성 변이주의 lovastatin 생산에 미치는 영향을 Figure 3, 4에 나타냈다. pH 5.8로 조절한 경우, lovastatin 생산은 다른 pH

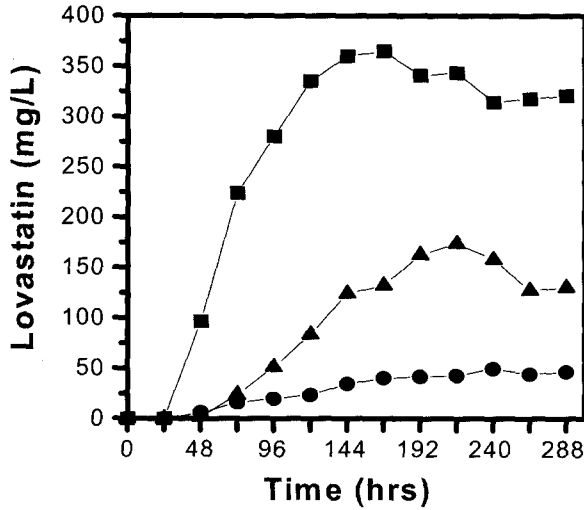


Figure 3. Comparison of the lovastatin production as a function of fermentation time at various pH(400 rpm and 1 vvm). —■—, pH 5.8; —●—, pH 7.4; —▲—, pH uncontrolled.

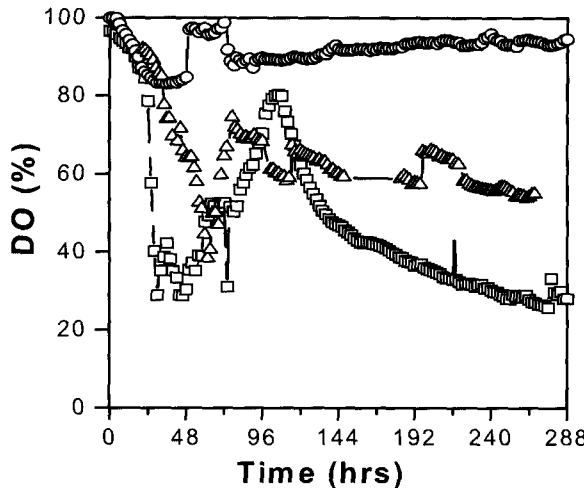


Figure 4. Comparison of the dissolved oxygen profiles as a function of fermentation time at various pH(400 rpm and 1 vvm). —□—, pH 5.8; —○—, pH 7.4; —△—, pH uncontrolled.

조건에 비하여 급격히 증가하였으며 발효 중반부에 최고 364 mg/L를 나타내었다. 플라스크에서 배양한 결과의 약 67%에 해당하는 lovastatin 생산을 보여주었다. 배양액중의 용존산소는 균체의 증가로 인한 산소 요구량이 증가되어 발효후 24시간에서 용존산소가 급격히 떨어져 포화 용존산소의 20% 수준이었으며, 균체 성장이 정상 상태에 이르렀을 때 80%까지 높아졌다가 발효 말기까지 서서히 감소하는 경향을 보여주었다. 탄소원인 glucose의 농도 변화는 균체의 빠른 성장으로 인하여 48시간에 약 12 g/L까지 감소하였으며, 특히 cottonseed oil은 플라스크 배양 결과보다 급격하게 감소하는 소비경향을 나타냈다(자료 미제시).

pH 7.4로 조절한 경우, 24시간 이후부터 lovastatin 생산이 서서히 증가하였으며, pH 5.8보다 72시간 늦은 240시간에 약 50 mg/L의 lovastatin이 생산되었다. pH 5.8에 비해 상당히 낮은 lovastatin 생산을 보여주었다. 발효 초기에 균체량의 변

화는 pH 5.8과 유사한 경향을 보였으나, 말기에는 상당히 감소하는 경향을 보여주었다. 용존 산소는 24 - 48 시간 사이에 약간 감소하는 경향을 보였지만 전체 발효 기간동안 90% 이상의 높은 값을 나타냈다. glucose의 농도는 72시간까지는 pH 5.8과 비슷한 경향을 보였으나, 발효 말기에 잔존하는 glucose 농도는 10 g/L 이상을 유지하였다.

교반속도 400 rpm과 pH를 조절하지 않은 경우의 lovastatin 생산은 48시간 이후부터 시작되었고, 발효 시작 후 216시간에 173 mg/L로 가장 높았으며 이후 감소하는 경향을 보였다. pH 5.8과 pH를 조절하지 않은 조건에서의 lovastatin 농도를 비교하면 pH를 조절하지 않은 경우가 약 2배정도 낮았다. 건조균체량은 발효시작 후 168시간에 35 g/L를 나타내었다. 탄소원인 glucose는 48시간까지 빠르게 소비되었으며, 그 이후부터 발효 말기까지 약 10 g/L를 유지하였다. 배양액중의 용존산소는 발효후 48시간에 포화 용존산소의 40%이었으며, 72시간에 80%까지 높아졌다가 발효 말기까지 유지되었다. 초기 pH는 7.4로 시작하여 발효시작 후 48시간에 pH 4.0까지 급격히 감소하였다가 다시 증가하여 발효 말기의 pH는 6.4이었다. 플라스크를 이용한 회분식 배양보다 상당히 큰 pH 변화 폭을 나타냈다. pH 5.8로 조절한 경우의 건조균체량과 비교해 보면 약 13% 정도 낮은 값을 나타냈다.

생산 배지에 평균 1.25 mm의 펠릿을 접종하였음에도 불구하고, pH 5.8과 7.4 모두 24시간 이후부터 균사체와 펠릿이 같이 자라기 시작하였으며, 72시간 이후에는 펠릿의 수보다 균사체의 함량이 더 증가하였다. 최종 펠릿의 크기는 pH 5.8인 경우는 0.8 - 1.8 mm이었고, pH 7.4인 경우는 0.8 - 2.8 mm로 분포하였다. pH 7.4로 조절한 경우가 pH 5.8로 조절한 경우보다 대체적으로 펠릿의 크기가 크고 다양하게 분포하였다. pH를 조절하지 않은 경우는 발효 시작 후 24 시간부터는 펠릿과 균사체가 배양액 중에 존재하였으며, 발효 종료 후 균사체와 펠릿의 함량을 보면 9:1의 비율로 균사체가 많았다. 그리고 펠릿 크기는 약 1.3 - 1.5 mm이었다.

Lovastatin 생산은 펠릿의 크기와 밀접한 관계가 있으며, 펠릿형태가 펠프형태보다 발효액의 점성을 크게 감소시키고 산소이동속도를 높이며 동력소모를 줄이는 결과를 가져와 lovastatin 생산에 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다(12). 그러므로 평균 1.25 mm의 작은 펠릿형태로 종배양을 하여 발효조에 접종하였으나 발효 시작 후 펠릿과 균사체가 공존하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 발효 중 균사체의 증가로 발효 말기에 균사체의 비율이 높아지는 경향을 보였다. 펠릿형태로 배양되고 있는 플라스크 배양보다 발효조에서의 lovastatin 생산이 감소하는 이유는 발효조에서의 발효 중 균사체의 증가로 인한 발효액의 점성 증가와 낮은 산소전달속도 현상으로 생각된다.

발효시 pH를 5.8로 조절한 경우 lovastatin 생산이 가장 높았으며, lovastatin 생산과 관계가 있다고 알려진 펠릿의 크기도 다른 실험조건보다 상대적으로 작게 분포하여 이후의 실험은 pH를 5.8로 조절하여 수행하였다. 이는 lovastatin 생산성이 가장 높게 나타난 펠릿의 크기가 평균 1 mm 정도이었으며, 이러한 형태적 특성이 배양액의 점도와 관련이 있고 세포성장에 중요한 산소전달계수에 심각하게 영향을 미친다는 연구결과를 토대로 결정하였다(22).

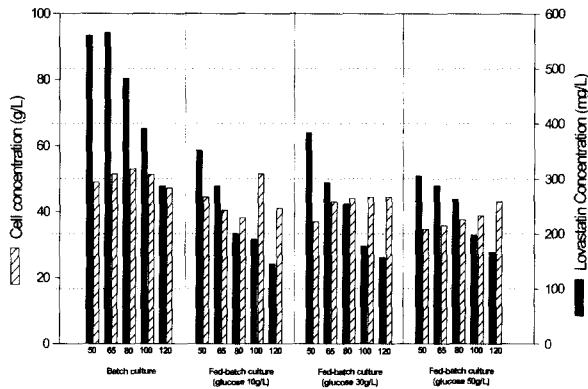


Figure 5. Effects of various sugar concentrations(10, 30 and 50 g/L) on the lovastatin production in batch and fed-batch culture of *A. terreus*(wild type).

#### Wild-type 균주와 cerulenin 저항성 균주의 배양 특성

탄소원의 대사속도는 균체성장 및 일차 또는 이차대사산물의 생산에 영향을 미친다. 다른 탄소원보다 신속하게 대사되는 glucose와 같은 탄소원은 미생물의 성장에는 매우 좋은 영양분이지만 이차대사산물의 생산성에는 부정적인 영향을 미친다고 일반적으로 알려져 있다(19-21). 이러한 현상을 이화대사억제(catabolite repression/inhibition) 현상이라고 하며, lovastatin의 생합성시에도 발견되는지 조사하였다. 이를 위해 다양한 배지 공급 조건하에서 유가식 배양을 수행함으로써 그 결과를 동일한 배지조건의 회분식 배양과 비교하여, wild-type 균주와 cerulenin 저항성 균주와의 이화대사억제 현상여부를 비교해 보고자하였다.

유가식으로 공급되는 glucose의 농도(10, 30과 50 g/L), 유가식 배양시에 사용하는 배지의 glucose 농도와 glucose의 유가식 공급 시기 등을 변화시키는 유가식 배양 방법을 사용했다. 유가식 배양에서 glucose의 총공급 농도는(배양기 내의 glucose 초기 량과 유가식 배양을 위하여 공급한 glucose 량을 농도로 환산) 50, 65, 80, 100과 120 g/L이 되도록 하였다. 유가식 배양에서 당의 공급은 timer를 사용하여 조절하였으며 timer의 on-off 기간을 0.5분과 6.5분으로 하였다. 당의 공급은 연동펌프를 이용하여 공급하였고, 배양 초반부터 당을 공급하였으며 공급되는 유속은 0.06 mL/min이 되도록 조절하여 소량씩 공급하였다.

Wild-type 균주의 유가식 배양과 회분식 배양을 비교한 결과를 Figure 5에 나타냈다. 50~120 g/L의 모든 glucose 농도를 살펴볼 때, lovastatin의 생산성이 유가식 배양보다 회분식 배양에서 2배정도 높은 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 wild-type의 경우 glucose의 농도가 증가하면, lovastatin 생산에 관련된 유전자의 발현이 저해되거나, 또는 lovastatin 생합성 효소의 활성이 감소함으로써 lovastatin의 생산이 작아지는 것을 알 수 있으며, 이러한 생합성 감소 현상은 탄소원의 유가식 공급으로도 잘 회복되지 않는 것으로 판단되었다. 그러므로 본 실험에 사용한 wild-type 균주는 glucose에 대해 이화대사억제 현상이 있는 것으로 판단되었다.

Cerulenin 저항성 균주의 유가식 배양과 회분식 배양을 비교해 보면, wild-type 균주와는 다른 경향성을 관찰할 수 있으며 결과를 Figure 6에 나타냈다. 저항성 균주의 경우에는

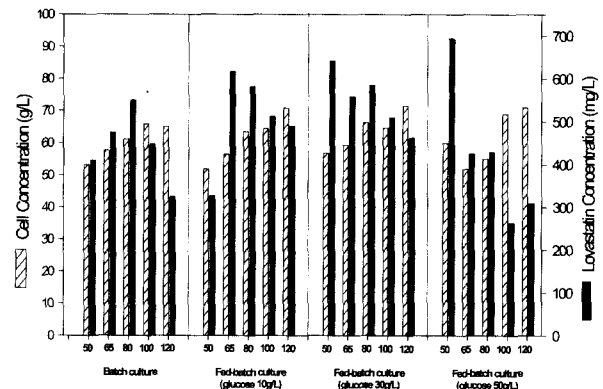


Figure 6. Effects of various sugar concentrations(10, 30 and 50 g/L) on the lovastatin production in batch and fed-batch culture of *A. terreus*(cerulenin resistant).

50~120 g/L의 모든 glucose 농도를 살펴볼 때, lovastatin의 생산성이 wild-type과는 반대로, 회분식 배양보다 유가식 배양에서 대부분 높은 lovastatin 생산성을 관찰할 수 있었다. 또한 주목할 점은 glucose의 농도가 증가할수록 lovastatin 생합성량이 감소하는 경향을 보이는 하지만 유가식 배양을 동일한 농도의 회분식 배양과 비교할 때 glucose 총공급 농도가 커짐에 따라(65 - 120 g/L), 유가식 배양의 생산성이 공급하는 glucose 농도가 50 g/L인 경우를 제외하고 회분식 배양에 비해 뚜렷하게 높게 나타난 점이다. 따라서 cerulenin 저항성 변이주가 wild-type 균주보다 탄소원에 대한 이화대사억제 현상에 덜 민감한 균주이며, 또한 유가식 배양을 통해 생산성 저해 현상을 어느 정도 극복할 수 있는 균주임을 알 수 있었다.

#### Glucose 공급에 의한 플라스크에서의 유가식 배양과 펠릿의 분포

빠르게 대사되어 미생물의 성장에는 좋은 영양분이지만, 이차대사산물의 생산성에는 이화대사억제에 의해 부정적인 영향(21)을 미친다고 알려진 glucose에 대한 플라스크에서 유가식 배양을 한 후 lovastatin 생산과 발효 후 펠릿의 크기를 측정해 보았다.

본 실험에 사용된 500 mL 플라스크의 최종 부피는 100 mL로 하였다. 초기 4.5 g/90 mL의 glucose를 공급한 조건하에서 3일간 회분 배양 후, 4일째부터 하루에 2.5 mL(5 g/10 mL)씩 공급한 결과 회분식 배양과 균체량은 비슷하였으나, 예상과는 달리 lovastatin 생산량은 상당히 낮은 220 mg/L 값을 보였다. 발효 후 펠릿의 크기는 Figure 7과 같이 0.5 mm 펠릿이 약 48%이었으며, 예상과는 달리 5.0 mm 크기까지 다양한 분포를 나타내었다. 특히 유가식 배양임에도 불구하고, lovastatin 생산이 낮은 것은 펠릿의 크기를 평균 1 mm로 조절하였을 때 lovastatin 생산이 가장 좋았다는 연구 결과(22)와 비교시 큰 펠릿의 존재가 lovastatin 생산에 나쁜 영향을 미친 것으로 판단되었다.

#### Lovastatin 유가식 배양을 위한 발효조 운전 조건 확립

플라스크에서의 회분식과 유가식 배양 결과를 토대로, 발효조에서 유가식 배양시 공급하는 glucose 농도변화가 펠릿크

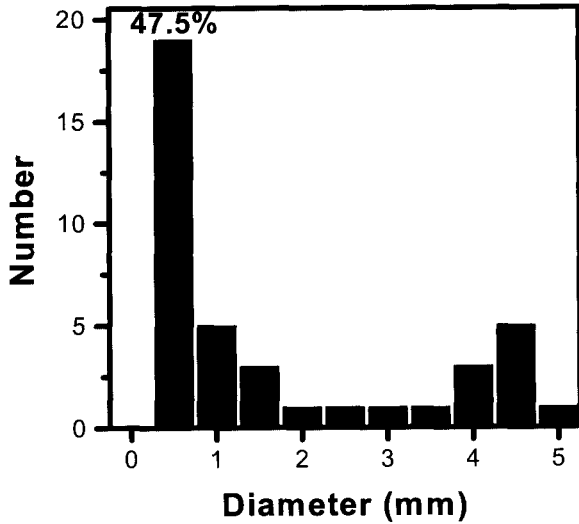


Figure 7. Distribution of the pellet size obtained by glucose feeding fed-batch in shaking flask. A half of the pellets remained close to 0.5 mm(47.5%).

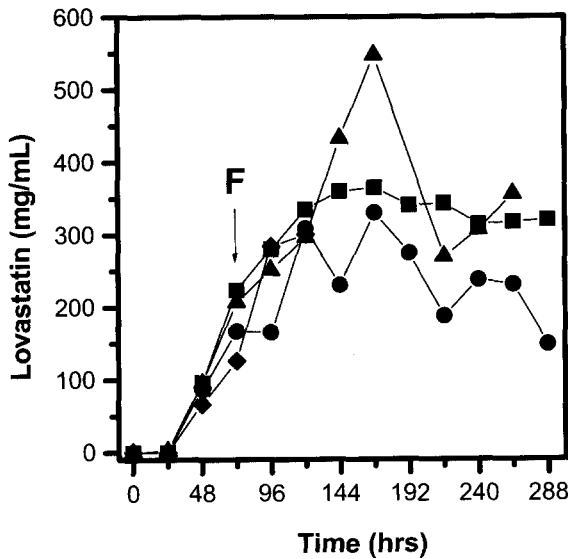


Figure 8. Comparison of the lovastatin production between batch and fed-batch at pH 5.8, 400 rpm and 1vvm. 30 g/L of glucose was added initially in batch mode, and 20(A), 180(B) and 255(C) g/L of glucose was added during the fed-batch. —■—, batch; —●—, fed-batch(A); —▲—, fed-batch(B); —◆—, fed-batch(C), F, glucose feeding started.

기와 lovastatin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 발효조 운전 조건으로 pH는 5.8, 교반속도는 400 rpm 그리고 공기유량은 배양 부피에 따라 변화시켜주면서 전 발효기간 중 1 vvm 이 되도록 조절하였다.

유가식 배양의 초기 배양부피 1.3 L와 배지 중의 glucose 농도 30 g/L에서 3일간 회분배양 후, 4일째부터 각각 20(A), 180(B)와 255(C) g/L 농도의 glucose 용액 200 mL를 1.2 mL/hr의 속도로 공급하여 최종 glucose 농도가 34, 50와 60 g/L인 유가식 발효 결과를 Figure 8 - 10에 나타냈다.

최종 glucose 농도가 50 g/L인 경우(Figure 8의 유가식 배

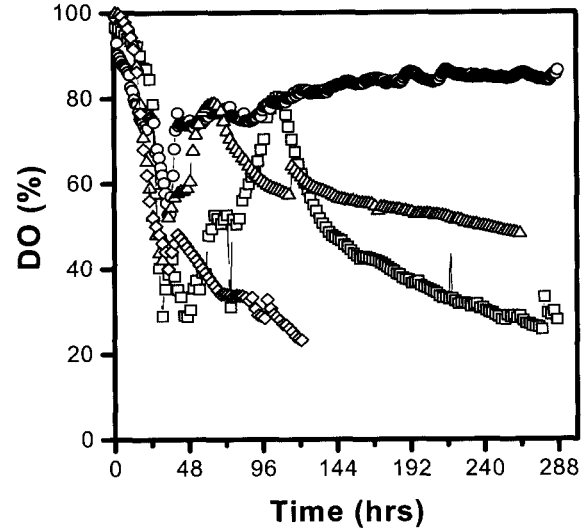
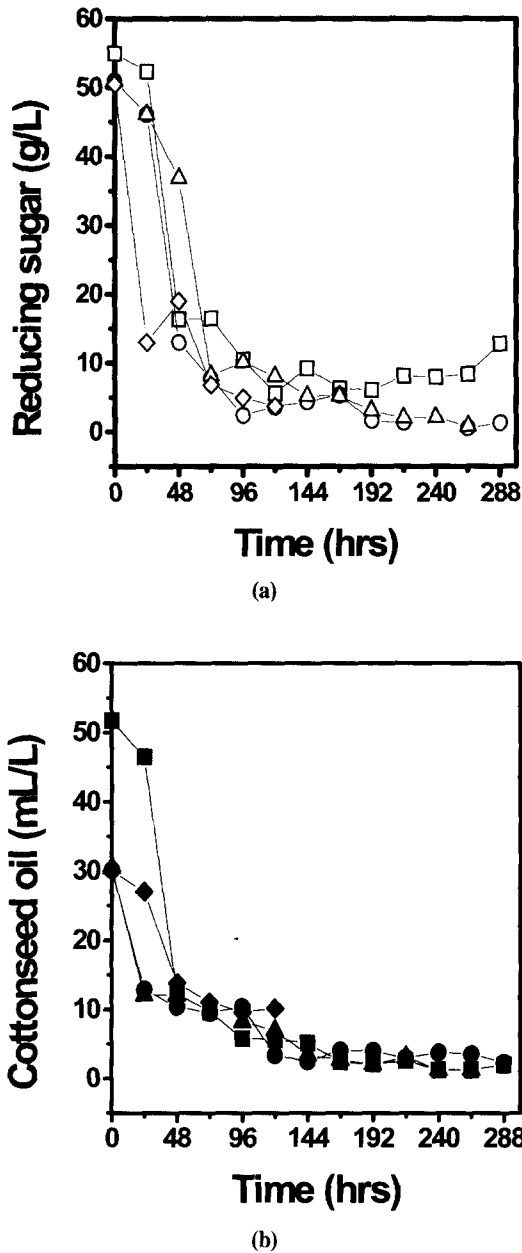


Figure 9. Comparison of the lovastatin production between batch and fed-batch at pH 5.8, 400 rpm and 1 vvm. 30 g/L of glucose was added initially in batch mode, and 20(A), 180(B) and 255(C) g/L of glucose was added during the fed-batch. —□—, batch; —○—, fed-batch(A); —△—, fed-batch(B); —◇—, fed-batch(C)

양, B) lovastatin 생산이 가장 좋았으며, lovastatin 생산은 24 시간 이후부터 생산이 증가하여 168시간에 최고 547 mg/L였다. 이때의 lovastatin 생산은 같은 조건의 회분식 배양(Figure 3의 pH 5.8)보다 약 1.5배정도 높게 나타난 것이다. 그러나 168시간이후부터 lovastatin 생산이 감소하는 경향을 보여 주었으며, lovastatin 생산의 급격한 감소 시기와 발효조 배양액의 균체량이 많이 감소하는 시기는 일치하였다. 또한 균체가 감소하는 시기와 같은 시기에 발효조 벽면에 부착되는 균체가 급격하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, lovastatin 생산이 감소하는 것을 설명할 수 있는 중요한 현상으로 판단되었다. 발효 시작 후 120시간이 지난 경우, 유가식 배양과 회분식 배양에서의 lovastatin 생산은 약 300 mg/L로서 비슷하였다. 그러나 24시간이 더 경과한 144시간에서는 유가식 배양(B)를 제외한 다른 경우는 lovastatin 생산의 증가 경향이 현저히 둔화되는 현상을 보여 주었다. 특히 유가식 배양(C)의 경우는 이미 언급된 유가식 배양(B)에서 관찰되었던 발효조 배양액 내의 균체량 감소 현상과 발효조 벽면에 균체 부착 현상이 120시간에서 발생하였다.

유가식 발효 중 발효조 벽면의 균체 부착 현상을 억제하기 위하여 교반속도(800 rpm)를 제외한 유가식 배양(A)와 같은 조건에서 유가식 발효를 수행하였다. 유가식 배양(A)과 비교하여 빠른 교반속도에 의한 전단력 영향으로 균체성장률에 영향이 있을 것으로 예상하였으나, 발효초기의 균체 성장은 120시간까지 50 g/L를 유지하였으며, 균체성장률과 lovastatin 생산은 유가식 배양 (A)와 큰 차이가 없었다. 그러나 배양초기 펠릿의 모양은 원형이었으나, 과도한 교반으로 인하여 대부분 펠릿이 깨어진 형태의 불규칙한 모양을 나타냈다. 또한, 120시간이 지난 후 균체가 상단 벽에 부착되는 현상으로 발효조 내의 균체가 급격히 감소하는 경향을 보여주었으며 발효를 중단하였다(자료 미제시).

Cerulenin 저항성 *Aspergillus terreus* 변이주로부터 lovastatin



**Figure 10.** Comparison of reducing sugar(a) and cottonseed oil(b) profiles at pH 5.8, 400 rpm and 1vvm. 30 g/L of glucose was added initially in batch mode, and 20 (A), 180 (B) and 255(C) g/L of glucose was added during the fed-batch. —■— and —□—, batch; —●— and —○—, fed-batch(A); —▲— and —△—, fed-batch(B); —◆— and —◇—, fed-batch(C).

생산을 위한 유가식 배양은 발효조 벽면에 균체가 부착되는 현상을 억제할 수 있는 방법 또는 균체의 펠릴 유지(발효 중 생성되는 균사 방지)를 위한 생산배지와 발효조건의 연구가 필요하다고 생각되었다.

회분식 배양과 시간에 따른 용존산소를 비교해 보면(Figure 4의 pH 5.8), 균체성장이 빠른 초기에는 두 발효 방법 모두 24시간 안에 용존산소가 감소하는 경향을 보이며(회분식은 약 27%, 유가식 배양은 약 40~50%), 그후 증가하였다가 다시 감소하는 경향을 보여주었다. 최종 용존산소는 회분식의

경우 23%이었으며, 유가식 배양은 공급탄소원의 농도에 따라 유가식 배양(A)는 약 80%, 유가식 배양(B)는 약 50%를 유지하였다. 고농도의 glucose를 공급한 유가식 배양(C)를 제외하고 제한기질의 조절로서 발효기간 중 용존산소를 높게 유지하는 것이 가능할 것으로 판단되었다(Figure 9).

유가식 배양(A와 B)의 경우, 발효 초기부터 탄소원으로 공급된 glucose와 cottonseed oil은 서서히 감소하였으며, 회분식 배양이 종료되는 시점 즉 72시간에 glucose는 약 7-8 g/L이었고 cottonseed oil은 9-12 g/L이었다. 72시간 이후부터 고농도의 glucose 용액이 공급되어도 서서히 감소하여 발효 말기 잔존해 있는 양은 1.3 g/L로 매우 낮았다. Cottonseed oil도 발효 말기까지 서서히 감소하였으며, 발효 말기의 농도는 약 1 g/L로 남아있는 양이 거의 없는 것으로 보아 충분히 이용된 것으로 판단되었다(Figure 10).

유가식 배양(A) 중의 펠릭크기 변화를 보면, 배양 96시간에는 1.6 mm가 전체의 50%를 차지하였으며, 144시간에 1.4~1.6 mm가 70%를 차지하였다. 그리고 288시간에는 펠릭이 약간 커져 2 mm의 펠릭도 측정되었다. 펠릭의 크기는 배양 시간에 따라 약간씩 증가하는 경향을 보였으나, 전체적으로 1.2~2.0 mm의 분포를 보였다(자료 미제시). 유가식 배양(B)의 펠릭 변화를 보면, 발효시작 후 48시간부터 2 mm 정도의 펠릭이 형성되었으며, 발효 종료 후 1.2~2.6 mm의 펠릭이 분포하였다. 유가식 배양(A)에 비하여 이른시기에 2 mm의 펠릭이 형성되었고, 전체적으로 약간 큰 펠릭이 존재하였다. 그러나 플라스크에서 유가식 배양을 수행한 결과(Figure 7)와 비교하면 발효조에서의 펠릭분포가 고르고 작다는 것을 알 수 있었다.

발효조에서 유가식 배양을 수행한 결과 pH 5.8, 400 rpm, 초기 glucose 농도를 30 g/L로 하여 3일간 회분 배양 후, 4일째부터 180 g/L의 glucose 용액을 공급하는 것이 lovastatin 생산을 위한 최적조건이었다. 회분식 발효조 배양 보다 1.5배 많은 547 mg/L의 lovastatin 생산을 나타냈으며, 생산성은 3.25 mg/L · hr이었다. 펠릭의 크기도 lovastatin 생산을 위한 최적크기로 제시된 1 mm보다(22) 약간 큰 평균 2 mm 이하로 발효 기간 중 유지할 수 있었다.

**요 약**

곰팡이 균인 *Aspergillus terreus*로서 고지혈증인 치료제인 lovastatin을 생산하기 위해 탄소원 조절에 의한 유가식 배양을 통해 lovastatin 생산 발효 조건을 확립하고자 하였다. 또한 발효시 곰팡이의 형태구조가 이차대사산물 생산에 중요하므로 유가식 배양에서의 공급배지농도와 공급속도에 따른 형태 구조의 변화가 생산성과 관련이 있는지를 구명하였다. Glucose 용액을 일정하게 또는 증가시켜 공급하는 방법을 실험하였으며 이 때 펠릭의 분포를 비교하였다. Glucose 용액을 일정하게 공급한 경우가 1 mm이하의 펠릭이 더 많이 분포하였으며, lovastatin 생산량도 높았다. Lovastatin 생산에 적절한 펠릭의 크기가 1 mm이었다는 연구 결과와 일치하였다. 또한 배양 방법 중 3일간 회분 배양 후 4일째부터 glucose를 일정하게 공급한 경우에서 높은 lovastatin 생산량을 나타내었다. 회분식 발효에서 lovastatin 생산을 위한 물리적 조건 중

교반 속도는 400 rpm으로 조절하였고 pH에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 pH 5.8로 유지하였을 때 lovastatin 생산량은 pH 7.4의 7 배 이상인 384 mg/L로서 발효 기간 중 pH 조절이 중요하다는 것을 알 수 있었다. 플라스크에서의 유가식 배양과 회분식 배양결과를 토대로 하여 발효조에서 유가식 배양시 pH 5.8, 400 rpm, 초기 glucose 농도를 30 g/L로 하여 3일간 회분 배양 후 4일째부터 180 g/L의 glucose 용액을 공급한 결과, 회분식 배양의 lovastatin 생산량보다 1.5배 많은 547 mg/L를 얻었으며, 생산성은 3.25 mg/L · hr였다.

### 감사의 글

본 연구의 결과는 1998년 학술진흥재단 과학기술기초 중점 연구(생물화학공학 1998-020-E00017) 지원에 의하여 연구되었으므로 관계당국에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Tkacz, J. S. (1992), Biopharmaceutins, *In Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 1, p 331-337. Academic Press.
2. 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.* **77**(7), 3957-3961.
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. Finkelstein, D. B., and C. Ball (1992), *In Biotechnology of Filamentous Fungi*. p 194-202, Butterworth-Heinemann, London, U. K.
5. Johanson, C. L., L. Coolen, and J. H. Hunik (1998), Influence of Morphology on Product Formation in *Aspergillus awamori* During Submerged Fermentations, *Biotechnol. Prog.* **14**, 223-240.
6. Ryoo, D. H. and C. S. Choi (1981), Surface Thermodynamic of Fungal Pellet Formation, *Manual of Methods for General Bacteriology*, p95-99. Washington, DC.
7. Lee, J. H., J. Hong, and H. C. Lim (1997), Experimental Optimization of Fed-batch Culture for Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid Production, *Biotechnol. Bioeng.* **56**(6), 697-705.
8. Hadj, S., A., L. Fauvart, A. M. Deschams, and J. M. Lebeault (1998), Fed-batch Production of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum*, *Biochemical Eng. J.* **1**, 85-90.
9. Cheng, C., Y. L. Huang, and S. Yang (1997), A Novel Feeding Strategy for Enhanced Plasmid Stability and Protein Production in Recombinant Yeast Fed-batch Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **56**(1), 23-31.
10. Hwang J. W. and C. S. Lee (1999), Production of High Concentration Cellulose by *Acetobacter xylinum* BRC5 Fed-batch Culture, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **14**(3), 284-290.
11. Amanullah, A., S. Satti, and A. W. Nienow (1998), Enhancing Xanthan Fermentation by Different Modes of Glucose Feeding, *Biotechnol. prog.* **14**, 265-269.
12. Park, S. (2000), Establishment of Screening Procedure for High Yielding Mutants of Lovastatin, and Studies on Their Fermentation Properties, M. S. thesis, Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon.
13. Kim, B., G. Chun, and Y. Jeong (2000), Effect of Fermentation Conditions on the Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus*, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **15**(5), 507-513.
14. Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic acid Reagent for Determination of Reducing Sugars, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
15. Park, Y. S., I. Momose, K. Tsunoda, and M. Okabe (1994) Enhancement of Cephamycin C Production Using Soybean Oil as the Sole Carbon Source. *Appl. Microbio. Biotechnol.* **40**, 773-779.
16. Kysilka, R. and V. Křen (1993), Determination of Lovastatin(Mevinolin) and Mevinolinic acid in Fermentation Liquids, *J. of Chromatography*, **630**, 415-417.
17. Friedrich, J., M. Žužek, M. Benčina, A. Cimerman, A. Štrancar, and I. Radež (1995), High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Mevinolin as Mevinolinic acid in Fermentation Broths, *J. of Chromatography A.* **704**, 363-367.
18. Spohr A., D. M. Carsten, M. Carlsen, and J. Nielsen (1998), On-Line Study of Fungal Morphology during Submerged Growth in a Small Flow-through Cell, *Biotechnol. Bioeng.* **59**(5), 605-611.
19. Demain, A. L., Y. Aharonowitz and J. F. Martin (1983), Metabolic Control of Secondary Biosynthetic Pathways, *In Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotica*(Vining L. C. ed.), p49-72. Addison-Wesley Reading. Massachusetts.
20. Stanbury, P. F. and A. Whitaker (1995), The Isolation, Preservation and Improvement of Industrially Important Microorganisms, *In Principles of Fermentation Technology*, p35-91, Pergamon, U. K.
21. Martin, J. F. and A. L. Demain (1980), Control of Antibiotic Biosynthesis, *Microbiol. Rev.* **44**(2), 230-251.
22. Kwon, H. (1999), The Effect of Morphology on Production of Lovastatin, Cholesterol Lowering Agent, by *Aspergillus terreus*, M. S. thesis, Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon.