

Lovastatin biosynthesis enhanced by thiamine in *Aspergillus terreus*

안우석, 한규범

LGCI 생명과학기술연구원 바이오텍연구소

전화 (042) 866-2067, FAX (042) 862-0331

Abstract

Lovastatin is a cholesterol-lowering agent, which plays a role of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA). When thiamine was supplemented in 3L batch fermentation, the production of lovastatin was improved. At the same time, the levels of pyruvic acid and NAD(P)H were estimated in the course of the fermentation of *A. terreus*. For the high level production of lovastatin, semi fed-batch fermentation was performed. And the thiamine level was maintained to a concentration of 20 mg/L and glucose was supplied. The final dry cell weight was lowered by 30 % and final lovastatin concentration was increased by 33 %. Final lovastatin concentration of 3.3 g/L was achieved in 8 days.

서론

로바스타틴은 콜레스테롤 생합성경로에 있는 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소의 저해제로서 고지혈증치료제로 이용되고 있다. *Aspergillus terreus* 에서 로바스타틴이 발견되었으며 *Monascus ruber* 에서도 만들어지는 것으로 알려져 있다 (1). 최근에는 로바스타틴 polyketide 합성에 관련된 효소의 기능과 유전자 서열이 알려져서 재조합 균주를 이용한 생산이 가능해졌다 (2). 본 연구진은 *A. terreus* 를 이용하여 좀 더 로바스타틴 생산성을 높이기 위한 다양한 시도를 하였으며 그 중 thiamine 을 공급한 경우 균체의 성장은 억제하고 로바스타틴의 합성을 증가시키는 효과를 얻을 수 있었다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 방법 사용된 균주는 lovastatin 생산 향상을 위하여 chemical mutation 방법으로 자체 개발한 mutant *A. terreus* 로서 본 실험에 주로 사용 되었으며 비교 실험을 위하여 사용된 균주는 wild-type *A. terreus* (ATCC 20542)이다. 플라스크 배양 시에는 1% (v/v)를 접종하여 26°C 에서 220rpm 으로 rotary shaker 에서 배양하였다. 배지는 glucose, peptone, soy bean powder 와 salt 를 첨가하여 만들었다.

발효 5L 소형발효기에 배지 부피 2.7L 에 0.3L 의 중간배양액을 접종한 후 실시하였다. 배양온도는 26°C 를 유지하였으며 교반속도는 400 rpm 을 유지 (figure 1) 하였다. Thiamine 은 20 g/L stock 용액을 만든 후 filtering 한 후 초기에 발효 배지에 20 mg/L 와 100 mg/L 가 되도록 첨가하여 주었으며 control 의 경우는 첨가하지 않았다.

분석방법 Lovastatin 의 농도 분석은 HPLC (Agilent HPLC 2100 series)를 하였고 칼럼은 Microsorb-MV C18 직경 10 μ m 를 사용하였다. Pyruvate 를 측정하기 위한 방법과 재료는 Sigma diagnostics kit 을 참조하여 사용하였다. NAD(P)H 를 측정하기 위하여 fluorescencemeter 를 이용하였으며 조건은 emission/excitation 이 340nm/460nm 가 되게

하여 값을 측정한다.

결과 및 고찰

Wild *A. terreus* 와 mutant *A. terreus* 의 thiamine 효과에 대한 비교실험 mutant *A. terreus* 와 wild *A. terreus* 에 대하여 각각 thiamine 을 no addition (control), 100 mg/L 되게 첨가하고 또한 공기유량을 1 vvm 과 0.3 vvm 으로 각각 바꾸어서 총 8 batch 를 실시하였다. Mutant *A. terreus* 에 대한 결과는 Figure 1 (A)에 나타내었고 wild *A. terreus* 에 대한 것은 Figure 1 (B)에 표시하였다.

Figure 1 (A)와 (B)에서 볼 수 있듯이 1 vvm 의 공기공급을 하였을 경우에 mutant 와 wild 균주 모두 thiamine (100mg/L)을 첨가한 경우가 그렇지 않은 경우에 비하여 로바스타틴 함량이 30% 이상 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로부터 mutation 에 상관없이 thiamine 이 로바스타틴의 합성을 촉진시킴을 알 수 있었다. 또한 동시에 0.3 vvm 으로 공기의 공급을 줄인 회분식배양을 각각 실시하였다. 이 경우에 thiamine 을 넣은 경우와 그렇지 않은 경우를 비교하여 보면 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. Wild 균주에서는 이 경우에 thiamine 을 넣은 경우가 1 vvm 인 경우와 마찬가지로 control (thiamine 첨가없음)에 비하여 로바스타틴의 함량이 높게 나왔지만 mutant 균주에서는 오히려 로바스타틴 함량이 적거나 비슷한 정도임을 알 수 있었다. 이로부터 wild *A. terreus* 와는 다르게 mutant *A. terreus* 에 있어서 로바스타틴을 생산할 경우에 thiamine 뿐만 아니라 산소공급이 bottle neck 임을 알 수 있었다. 이 mutant 균주를 가지고 로바스타틴 생산성을 높이하고자 한다면 thiamine 공급 뿐만 아니라 산소의 공급이 매우 중요함을 이 실험으로부터 알 수 있었다.

Pyruvate 와 NAD(P)H 농도의 시간에 따르는 변화

Figure 2 는 시간에 따르는 pyruvate 의 양의 변화를 나타낸 것으로서 5 일간 배양 내내 thiamine 이 첨가되지 않은 경우가 thiamine 이 첨가된 경우에 비하여 높은 농도의 pyruvate level 을 유지하였으며 최대 45% 까지 차이를 보였다. 또한 시간에 따르는 NAD(P)H 양의 변화를 측정하여 figure 3 에 나타내었다. NAD(P)H 의 양의 변화에 있어서도 pyruvate 의 변화와 유사하게 3 일 이후부터 thiamine 을 넣지 않은 경우가 더 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Thiamine 을 보족으로 사용하는 효소인 pyruvate dehydrogenase 와 transketolase 의 활성을 간접적으로 예측하여 보기 위하여 pyruvate 와 NAD(P)H 의 농도를 배양 동안 측정하여 보았다. 그 결과 (figure 2 와 3) control 에 비하여 thiamine 을 첨가한 경우가 모두 낮은 수준의 농도로 나왔다. Pyruvate 를 측정한 경우 (figure 2)를 참고하여 보면 thiamine 을 넣은 경우는 결과적으로 acetyl CoA 와 NADH 를 만들어내는 pyruvate dehydrogenase 의 활성이 커지기 때문에 pyruvate 의 level 이 상대적으로 낮아졌다고 예측할 수 있었다 (3). NAD(P)H 의 경우도 thiamine 을 넣은 경우 상대적으로 낮은 NAD(P)H 의 농도를 얻을 수 있었다. 이 경우는 thiamine 을 넣음으로써 pyruvate dehydrogenase 에 의해 NADH 의 증가와 transketolase 에 의한 NADPH 의 증가로 인해 NAD(P)H 의 총 level 이 증가할 것이라고 예측하였으나 결과적으로는 오히려 thiamine 을 넣은 경우가 오히려 낮게 나왔다. 흥미로운 사실은 pyruvate level 의 경우

는 control 과 thiamine 을 넣은 경우의 차이가 발효 내내 차이를 보여 주었으나 NAD(P)H level 의 경우는 3 일 이후부터 차이를 보여 주기 시작하였다. 이로부터 추측하여 볼 수 있는 것은 일반적으로 발효 중반 내지 중반부터 2 차 대사 산물이 만들어지기 시작하는데 lovastatin 생산 level 의 차이와 NAD(P)H 의 차이를 보여주기 시작하는 시점도 이 시기와 유사한 것으로 보인다. 이는 thiamine 을 넣은 경우가 무슨 이유인지 알 수 없지만 lovastatin 을 합성하면서 NAD(P)H 의 level 이 상대적으로 control 에 비하여 낮아진다는 것을 알 수 있다.

이 실험을 통하여 배양 동안에 pyruvate level 을 측정하여 본 결과 thiamine 이 pyruvate 의 level 을 낮추는 역할을 하였고 이는 해당과정을 통하여 만들어진 pyruvate pool 이 더욱 잘 사용되어진 것으로 예측할 수 있었다. NAD(P)H level 에 있어서 차이를 보여주었지만 이 차이가 thiamine 에 의한 관련 효소의 활성 증가로 NAD(P)H 의 level 이 변하였는지 아니면 lovastatin 의 합성에 이용되어져서 변하였는지 이 실험 만으로는 예측하기 어려웠다. 하지만 이 실험을 통하여 thiamine 이 간접적으로 polyketide 합성을 촉진시키는 역할을 하고 그에 따라 세포 내의 에너지 대사 또는 metabolites 들의 변화가 크게 이루어짐을 알 수 있었다.

유가식 배양을 통한 생산성 증대 *Mutan A. terreus* 를 이용하여 Thiamine 농도가 20 mg/L 가 되게 배양도중 총 4 회 공급한 배양과 thiamine 을 공급하지 않는 배양을 동일한 종류의 발효기를 이용하여 동시에 실시하였으며 두 발효기 모두 500 g/L 농도의 glucose 용액 500 mL 을 배양 도중 각각 3 회 씩 공급하였다 (Figure 4). 그 결과 전반적으로 회분식 배양에 비하여 유가식 배양 시 2 배 가까이 로바스타틴 함량을 증가시킬 수 있었고 또한 thiamine 을 공급한 것은 8 일간 배양하였을 때 균체중량이 83 g/L 로서 control 에 비해서 30 % 가량 낮았지만 로바스타틴 농도는 3.3 g/L 로서 33 % 가량 control 에 비하여 증가하였다 (Figure 4). 균체중량에 대한 로바스타틴 함량(%w/w) 기준으로 하였을 경우에도 thiamine 을 첨가한 것이 최고 2 배 가량 증가한 것을 알 수 있다.

앞서의 실험을 통하여 thiamine 을 공급함으로써 로바스타틴 합성으로 가는 대사 과정을 증대시켜서 로바스타틴의 생산성을 증대 시킴을 알 수 있었고 동시에 산소공급 및 기질의 지속적인 공급이 로바스타틴의 생산에 있어서 중요함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Negishi S, Cai-Huang Z, Hasumi K, Murakawa S, Endo A, (1986) (in Japanese), *Hakko Kogaku Kaishi* 64, 509-512
2. Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC, Hutchinson CR, "Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis" (1999), *Science*, 284, 1368-1372
3. Qiang H, Minako A, Yohko K, Kazuyuki S, "Effects of glucose, vitamins, and DO concentrations on pyruvate fermentation using *Torulopsis glabrata* IFO 0005 with metabolic flux analysis", (2001), *Biotechnol. Prog.* 17, 62-68

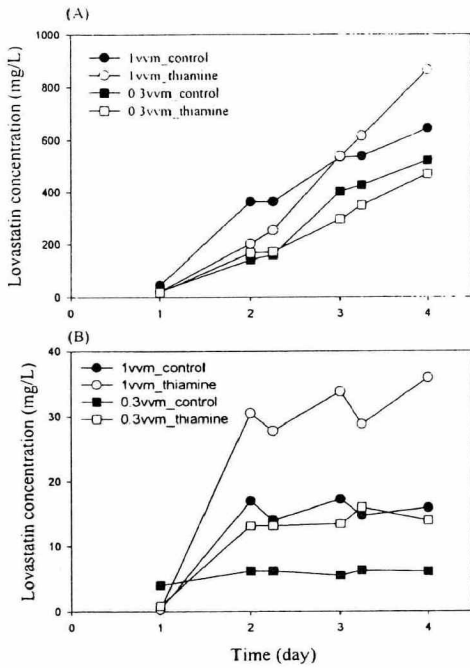


Figure 1. The time profiles of lovastatin concentration in the batch cultivation of mutant *A. terreus* (A) and wild *A. terreus* (B). Circles : the aeration of 1 vvm, quadrangles 0.3 vvm, Open symbols : no addition of thiamine (control), and Filled symbols : an addition of thiamine to 100 mg/L

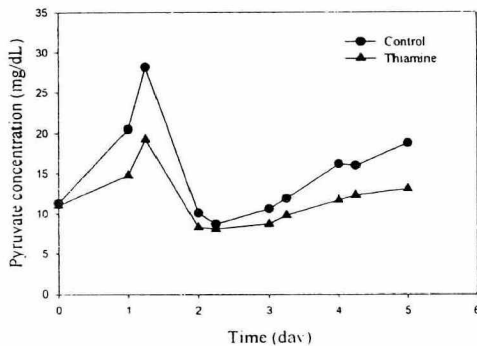


Figure 2. The time profiles of pyruvate concentration in the cultivation of mutant *A. terreus*.

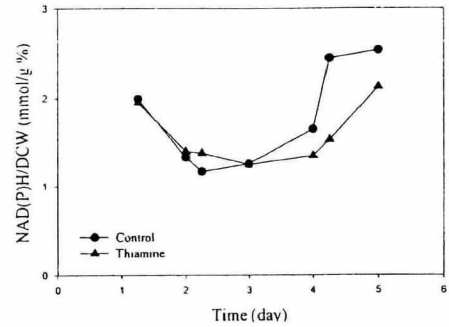


Figure 3. The time profiles of NAD(P)H concentration in the cultivation of mutant *A. terreus*.

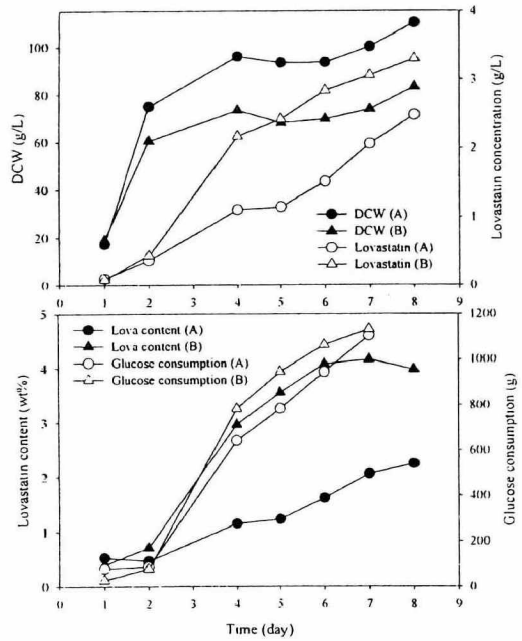


Figure 4. The time profiles of DCW, lovastatin concentration, lovastatin content, and total glucose consumption. (A) : control (No supplemented), (B) : thiamine supplemented to a 20 mg/L of concentration 4 times