(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044613
(43) 공개일자 2011년04월29일

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0101384
(22) 출원일자 2009년10월23일
심사청구일자 2009년10월23일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
김현수
대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역 e편한세상 102동 2007호
육영민
대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 강창하이츠 101동 1702호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인명문

전체 청구항 수 : 총 8 항

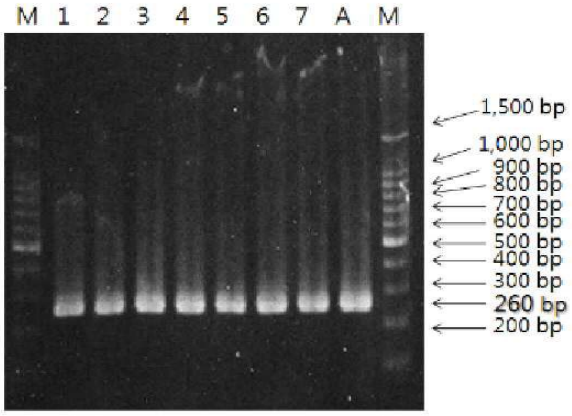
(54) 로바스타틴 생산균주 탐색을 위한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 탐색방법

(57) 요 약

본 발명은 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 고지혈증의 치료제로 이용되는 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머 발굴 및 이를 이용한 탐색방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 로바스타틴 생산균주의 탐색방법은 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 PCR 프라이머를 이용하면, PCR을 통하여 로바스타틴 생산균주를 신속하고, 효과적으로 탐색할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

고희선

대구광역시 달성군 다사읍 서재리 화진금봉타운 103동 1402호

김수정

대구광역시 달서구 송현2동 1922-24번지

강동희

대구광역시 달서구 이곡2동 서한2차 104동 1401호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 폴리케타이드 생합성 유전자의 증폭을 위한 것임을 특징으로 하는 프라이머.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 디케타이드 생합성 유전자의 증폭을 위한 것임을 특징으로 하는 프라이머.

청구항 4

서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 폴리케타이드 생합성 유전자의 증폭을 위한 것임을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 디케타이드 생합성 유전자의 증폭을 위한 것임을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법.

청구항 7

(a) 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및

(b) 상기 중합연쇄반응에서 증폭된 산물 및 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법.

청구항 8

제7항에 의해 탐색된 로바스타틴 생산균주를 배양한 다음, 배양액으로부터 로바스타틴을 회수하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 고지혈증의 치료제로 이용되는 로바스타틴 생산균주의 탐색을 위한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 탐색방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대 서구 국가뿐만 아니라 선진화된 아시아에서 심장 관상 동맥 질환과 진행성 동맥 경화는 가장 큰 사망 원인 중 하나인데 이를 유발시키는 가장 큰 원인은 고지혈증이다. 고지혈증(hyperlipidemia)은 혈관 속 지질의 양에 이상이 생긴 상태로서 이로 인해 혈관이 축소되거나 막혀서 심혈관 질환을 일으키는 질병 중 하나이다. 최근 고지혈증 치료제로써 statin 계열의 물질이 가장 많이 사용되고 있으며, Statin 계열의 물질은 생체 내에서 콜레스테롤의 합성을 저해하여 결과적으로 콜레스테롤의 양을 저하시킨다. statin 계열의 물질은 콜레스테롤 생합성의 20여개 효소반응 중 desmosterol reductase 보다 앞선 단계인 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase가 관여하는 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganism, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463, 1999; In Biochemistry, W. H. Freeman & Company, New York. Vol. 4, p 685-712, 1995; Efficacy and Long-term adverse effect pattern of lovastatin, *J. American Cardiology.* **62**, 28-34, 1988).

[0003] HMG-CoA reductase 저해제로는 compactin을 미생물에 의해 수산화반응을 시킨 pravastatin, *Aspergillus terreus*가 생산하는 lovastatin과 lovastatin의 화학적 변형으로 개발된 반합성 저해제인 simvastatin이 있으며, 그 외의 화학적 합성법으로 제조된 fluvastatin, atrovastatin, cerivastatin 등이 있다. 이들은 콜레스테롤에 대한 영향은 유사하지만 생물학적 특성과 효능이 다르다. 이 중 대표적 콜레스테롤 저해제인 lovastatin($C_{24}H_{36}O_5$)은 균사 형성 곰팡이인 *Asp. terreus*, *Monascus* sp., *Penicillium* sp. 등에 의해 생산되며, polyketide 경로를 통해서 생합성되는 이차대사산물로 napthalene ring system, β-hydroxylactone 및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 natural statin이다. Lovastatin을 포함한 대부분의 statin은 lactone과 β-hydroxyacid form의 혼합 형태로 생산된다. β-hydroxyacid form은 물에 용해성과 anti-fungal의 특성을 지니고 있으며, lactone ring은 in vivo 상태에서 β-hydroxyacid form으로 전환되어 약효를 나타낸다 (Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowing agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3957-3961, 1980; Aspect of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases, *Antonie Van Leewenhoek*. 78, 287-295, 2000).

[0004] 최근 *Asp. terreus*의 lovastatin 생합성과 관련된 유전자에 대한 연구가 Reeve, McAda 등에 의해 최초로 시도되었고, kennedy 등의 연구에 의해 18개의 잠재적인 lovastatin 생합성 및 저항성 유전자가 chromosomal DNA의 일부분에 클러스팅되어 있는 것으로 밝혀졌다(Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis, *Science* 284, 1368-1372, 1999; Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 201-238, 1995).

[0005] Lovastatin의 생합성 과정은 *Asp. terreus*에 의해 ^{13}C-, ^{2}H-, ^{18}O- labeled 전구체가 lovastatin으로 결합되는 양상을 통해서 알 수 있다. Lovastatin의 주요 부분이 methionine으로부터 유도된 methyl group과 9개의 acetate unit을 갖는 polyketide chain으로 이루어져 있고 β-methylbutyryl side chain 또한 methionine에서 유래한 methyl group과 2개의 acetate unit으로부터 만들어진다(Mevinolin acid biosynthesis by *Aspergillus terreus* and its relationship to fatty acid biosynthesis, *J. Bacteriol.*. 162, 704-707, 1985).

[0006] Lovastatin 생합성에 중요한 관련효소 중 하나는 *lovB* 유전자 산물인 lovastatin nonaketide synthase(LNKS)로써, 여섯 개의 active site(ketosynthase, acyltransferase, dehydratase, enoylreductase, ketoreductase, acyl carrier protein)를 포함하고 있어, 하나의 효소가 여러 가지 활성을 갖는 domain을 포함

하는 type I iterative polyketide synthase(PKS)인 것으로 밝혀졌다. 또 다른 필수 효소인 lovastatin diketide synthase(LDKS)는 *lovF* 유전자의 산물로써, 효소의 활성이 반복되지 않는 non-iterative PKS이다. PKS는 lovastatin의 side chain인 (2R)-2-methylbutyric acid를 합성하는 것으로 알려져 있다. 상기 효소 이외에도 *lovA*, *lovC*, *lovD*, *lovG* 등의 유전자 산물 또한 lovastatin 생합성에 필수적인 것으로 밝혀졌다.

[0007] 현재, 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위하여 *Neurospora crassa*를 이용한 bioassay법이 이용되고 있다. 하지만 이는 균주를 탐색하는데 많은 시간과 노동력이 소요되는 문제점이 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 미지의 균주를 대상으로 polyketide 또는 diketide 생합성 유전자를 특정 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭할 경우, 로바스타틴 등의 스타틴(statin) 계열 물질 생성능을 가지는 균주를 더욱 신속히 탐색할 수 있다는 사실을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 로바스타틴 생산균주를 신속하고 효과적으로 탐색할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 신규의 로바스타틴 생산균주 및 이로부터 생산된 로바스타틴 제조방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및 (b) 상기 중합연쇄반응에서 증폭된 산물 및 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법 을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 로바스타틴을 생산하는 *Penicillium* sp.을 배양한 다음, 배양된 미생물로부터 로바스타틴을 회수하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴의 제조방법을 제공한다.

효 과

[0015] 본 발명에 따른 PCR 프라이머를 이용하면, PCR을 통하여 로바스타틴 생산균주를 신속하고, 효과적으로 탐색할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 기존의 로바스타틴 탐색법으로 알려진 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)를 이용한 bioassay법 대신에 미지의 균주를 대상으로 polyketide 또는 diketide 생합성 유전자를 특정 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭할 경우, 로바스타틴 생성능을 가지는 균주를 탐색할 수 있을 것으로 예측하였다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서는 *Asp. terreus* ATCC 20542의 lovastatin 생합성에 중요한 역할을 하는 lovastatin diketide synthase 유전자를 코딩하는 단백질(LDKS)의 아미노산 배열을 기반으로 하여 500bp 크기의 양 말단에 *Bam*H I site를 포함하도록 특이적인 프라이머를 제작하고, 미지의 균주로부터 추출한 DNA 주형과 함께 PCR을 수행한 후, lovastatin diketide synthase 유전자를 가지는 균주를 선별하였다. 그런 후, 선별된

균주를 배양시키고, 배양액을 HPLC로 측정한 결과, 균주의 배양액은 로바스타틴을 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 로바스타틴 생산균주를 탐색하기 위한 PCR 프라이머에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 폴리케타이드 생합성 유전자(PKS)의 증폭을 위한 것이고, 상기 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머는 디케타이드 생합성 유전자(LDKS)의 증폭을 위한 것이다.

[0020] 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 로바스타틴 생산균주의 탐색은 서열번호 1과 2의 프라이머를 이용하거나 서열번호 3과 4의 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응을 수행한 후, 증폭된 유전자 확인을 통하여 수행할 수 있으나, 서열번호 3과 4의 프라이머를 이용하는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명에서는 로바스타틴 생산균주의 탐색을 위하여 상기 서열번호 1과 2 또는 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머를 각각 이용하여 중합연쇄반응을 수행할 수 있다. 한편, 먼저 서열번호 1과 2를 이용하여 중합연쇄반응을 수행한 후, 증폭된 산물이 확인된 균주로부터 추출한 genome DNA를 주형으로 서열번호 3과 4의 프라이머를 이용하여 다시 중합연쇄반응을 수행할 수도 있다.

[0023] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 서열번호 1과 2의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머 및 시험 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및 (b) 상기 중합연쇄반응에서 증폭된 산물이 확인된 균주를 대상으로 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드로 표시되는 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 증폭된 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴 생산균주의 탐색방법에 관한 것이다.

[0024] 한편, 본 발명의 일 실시예에서는 토양 및 나뭇잎에서 채취한 시료로부터 다양한 균주를 선별한 후, 균주로부터 DNA를 추출하고, 본 발명에 따른 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행하여 로바스타틴 생산량이 우수한 균주(SJ-2)를 선발하였다.

[0025]

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는 중합연쇄반응(PCR)을 수행하여 선별한 상기 *Penicillium* sp. SJ-2를 고체배양 또는 액체배양을 수행한 후, 배양액으로부터 다량의 로바스타틴을 회수하였다.

[0027] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 로바스타틴을 생산하는 것으로 확인된 로바스타틴 생산균주를 배양한 다음, 배양액으로부터 로바스타틴을 회수하는 것을 특징으로 하는 로바스타틴의 제조방법에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에 있어서, 로바스타틴 생산균주의 배양은 특별한 제한없이, 고체배양 또는 액체배양으로 수행될 수 있다. 액체배양의 경우는 MGP 배지에 SJ-2 균주의 포자현탁액을 접종하여 28℃에서 진탕배양하는 방법이 있으며, 고체배양의 경우에는 고온가압 멸균 처리한 미강에 증류수를 일정량 첨가하여 SJ-2 균주의 포자현탁액을 접종하여, 28℃에서 배양하는 방법이 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예로서, 고체배양물 또는 액체배양액으로부터 로바스타틴을 추출하는 방법으로는 유기용매(아세토니트릴)에 적용하여 혼합, 교반하고 원심분리하여 회수한 상등액에 인산(H_3PO_4) 및 물을 첨가하여 제조하는 방법이 있다. 이때, 고체배양의 경우에는 배양체가 유기용매와 교반되기 전 초음파 처리가 미리 행해지는 것이 바람직하다.

실 시 예

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식

을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0031] **실시예 1: 로바스타틴 생산균주 탐색**

[0032] **1-1: 사용균주 및 배양**

[0033] 로바스타틴 생산균주 탐색을 위하여, 계명대학교 인근 토양 및 나뭇잎을 채취하여 시료 1 g을 증류수 9 ㎖에 현탁시키고, 10^2~10^3으로 희석한 후 Czapek-Dox agar배지(sucrose 30 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_47H_20$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $NaNO_3$ 2 g, $FeSO_47H_2O$ 0.01 g, agar 20 g/L, pH 5.6)에 100 ㎕를 도말하여 28℃에서 5~7일간 배양하였다. 배양 후, 도말한 평판배지에서 600여개의 곰팡이류를 선별하고, PDA 사면배지(potato starch 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g/L, pH 5.6)에 순수 분리하고, 4℃에 보관하면서 사용하였다. 공시균인 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주는 lovastatin 생산 배지인 MGP 배지(malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 3 g, agar 20 g/L)에 접종하여 28℃에서 5일간 배양한 다음 포자현탁액을 조제하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다.

[0034] **1-2: 시험 균주의 chromosomal DNA 추출**

[0035] PDA 배지에 배양한 분리균과 MGP 배지에 배양한 공시균을 회수하여 washing buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA2Na, 0.05 M NaCl, pH 8.0)로 세척한 후 균체 3 g을 -80℃에서 동결시켜 액체 질소를 첨가하면서 파쇄하였다. 파쇄 후 lysis buffer(25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA2Na, 1% SDS, pH 8.0) 10~20 ㎖를 첨가하여 균체를 용해시킨 다음, 동량의 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA2Na, pH 8.0) 포화 phenol을 첨가하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액에 동량의 sevag 용액(chloroform : iso-amylalcohol = 24 : 1)을 첨가한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 2배량의 cold 100% ethanol을 넣고 가볍게 흔들어 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA를 70% ethanol 2 ㎖로 세척한 다음 TE buffer 5 ㎖를 첨가하여 DNA를 용해시켜 RNase A(USB Co.) 50 ㎍/㎖를 첨가하여 37℃에서 1시간 처리시킨 후 다시 TE 포화 phenol과 sevag처리를 한 다음 2배량의 cold 100% ethanol로 DNA를 회수하여 70% ethanol, 100% ethanol로 세척한 후 건조하였다. TE buffer 1 ㎖를 첨가하여 분리한 genomic DNA를 용해시켜 -30℃에 보관하면서 사용하였다.

[0036] **1-3: Polymerase chain reaction (PCR)**

[0037] *Asp. terreus* ATCC 20542의 lovastatin 생합성 유전자 중 중요한 역할을 하는 polyketide synthase(PKS) 유전자 단백질의 아미노산 배열을 토대로 하여 양 말단에 *Bam*H I site와 *Eco*R I site를 포함하는 특이적인 프라이머(서열번호 1 및 2)와 diketide synthase(LDKS) 유전자 단백질의 아미노산 배열을 토대로 하여 양 말단에 *Bam*H I site를 포함하는 특이적인 프라이머(서열번호 3 및 4)를 제작하였다.

[0038] [표 1]

[0039]

구분	서열(5' → 3')	증폭 size
서열번호 1 (LovP-F)	ACGGATCCGCGCAGGAAATCTATCATAC	260bp
서열번호 2 (LovP-R)	ACGAATTCTTCACACTCTGCTAGTCACG	
서열번호 3 (LovF-F)	ATGGGATCCTAYGCNTGGATGCARAARCA	500bp
서열번호 4 (LovF-R)	GTTGGATCCAAYTCCATNACYTTRTGCCA	

[0040] 먼저, 1-2에서 추출한 분리균 및 공시균(*Asp. terreus* ATCC 20542)의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 표 2의 조건으로 PCR(GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, USA)을 수행하였다.

[0041] 전기영동 완충용액으로는 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였으며, 2%의 agarose

수평 gel을 사용하여 PCR 산물을 100 V에서 전기영동 하였다.

[0042] [표 2]

[0043]

PCR composition		PCR condition	
Genomic DNA(200 ng/㎕)	1 ㎕	94 ℃ 5 min	
LovP-F(10 pmol/㎕)	1 ㎕	94 ℃ 30 sec	30 cycles
LovP-R(10 pmol/㎕)	1 ㎕	55 ℃ 50 sec	
Go Taq master mix[1)].	5 ㎕	72 ℃ 1 min	
dH_2O	2 ㎕	4 ℃ ∞	
Total	10 ㎕		

[0044] [1)] Go Taq Master Mix(Promega Co.): *Taq* DNA polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ 및 reaction buffers 포함

[0045] 표 2의 조건으로 PCR을 수행하고, 전기영동을 수행한 결과, 거의 모든 균주에서 예상되는 크기인 약 260 bp의 PCR 산물들을 획득하였다(도 1). 이로부터 대다수의 곰팡이가 PKS 유전자를 지니고 있다는 것을 추정할 수 있었다. PCR을 수행한 후 목적 PCR 산물을 명확히 생산한 7균주(SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-5, SJ-6, SJ-7)를 1차적으로 선발하여 lovastatin diketide synthase 유전자를 이용한 생산 균주 검색에 이용하였다.

[0046] 선발된 7균주로부터 추출한 DNA를 이용하여, 표 3의 조건으로 PCR을 수행하였고, 증폭 산물을 동일한 방법으로 전기영동 하였다.

[0047] [표 3]

[0048]

PCR composition		PCR condition	
Genomic DNA(200 ng/㎕)	1 ㎕	94 ℃ 5 min	
LovF-F(10 pmol/㎕)	1 ㎕	94 ℃ 30 sec	35 cycles
LovF-R(10 pmol/㎕)	1 ㎕	55 ℃ 1 min	
Go Taq master mix.	5 ㎕	72 ℃ 1 min	
dH_2O	2 ㎕	72 ℃ 7 min	
Total	10 ㎕	4 ℃ ∞	

[0049] 그 결과, 6균주(SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-6, SJ-7)가 예상되는 크기인 약 500 bp의 목적 PCR 산물(LDKS 유전자)을 생산하는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0050] **1-4: 선별균주의 형태학적 특성**

[0051] 선별균주의 형태학적 특성은 slide culture를 통하여 확인하였다. Czapek-Dox agar배지를 이용하여 28℃에서 배양하면서 광학현미경으로 관찰하였다.

[0052] 관찰 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-6, SJ-7는 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주와 유사한 *Aspergillus* sp.으로 추정되었으며, SJ-1은 *Rhizopus* sp., SJ-2는 *Penicillium* sp.으로 추정되었다.

[0053] **실시예 2: 로바스타틴 생산 및 활성 평가**

[0054] **2-1: 액체배양 및 로바스타틴 추출**

[0055] 1-3에서 선별된 균주(SJ-1, SJ-2) 및 공시균(*Asp. terreus* ATCC 20542 변이주)을 액체배양시켰다.

[0056] 액체배양은 MGP 배지 100 ㎖에 균주의 포자현탁액을 100 ㎕(1.0×10^8 spores/㎖)씩 접종하여 28℃에서 150rpm으로 3, 6, 9, 12일간 배양하였다. 액체배양액으로부터 로바스타틴의 추출은 배양 일수별로 채취한 배양액 2 ㎖, CH_3CN(Merck Co.) 2 ㎖에 conc. H_3PO_4 100 ㎕를 첨가하여 1시간동안 교반시킨 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 상등액을 여과하여 제조하였다.

[0057] **2-2: 로바스타틴의 HPLC 분석**

[0058] 생산된 lovastatin은 C_{18} reverse phase column을 이용하여 HPLC(Shimadzu Co., Ltd.)로 flow rate 1.0 ㎖/min, UV 237 nm의 조건에서 20 ㎕씩 injection하여 0.1% H_3PO_4가 포함된 60% CH_3CN으로 용출시켜 분석하였다.

[0059] 균주(SJ-1, SJ-2)를 3, 6, 9, 12일간 액체배양하였고, 배양액에서 추출한 로바스타틴의 HPLC 분석결과, SJ-1은 로바스타틴 생산이 미약하였으나(결과 미게재), SJ-2는 도 4에 나타난 바와 같이 로바스타틴의 acid form과 lactone form이 존재하는 것을 확인하였다. 콜레스테롤 생합성 과정의 mevalonate의 합성을 저해하는 lactone form은 배양 6일째에 가장 많이 생산되었다.

[0060] **2-3: 고체배양 및 로바스타틴 추출**

[0061] 액체배양을 통하여 로바스타틴 생산이 확인된 SJ-2 균주의 대량생산을 위하여 Park 등의 방법(Production of lovastatin in solid culture, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 566-570, 2004.)에 따라 미강을 이용하여 고체배양을 수행하였다. 고체배양은 미강 200 g을 고온가압 멸균 처리하고, 멸균 증류수 70 ㎖를 첨가한 후, SJ-2 균주의 포자현탁액 200 ㎕(1.0×10^8 spores/㎖)을 접종시키고, 28℃에서 6, 9, 12, 15, 30일간 배양하였다.

[0062] 고체배양체로부터 lovastatin의 추출은 배양체 0.5 g과 CH_3CN 15 ㎖를 혼합하고 5분간 초음파 처리를 한 다음, 1시간동안 교반시키고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 상등액 4 ㎖에 멸균수 4 ㎖, conc. H_3PO_4 100 ㎕를 첨가한 후 여과하여 제조하였다.

[0063] **2-4: 로바스타틴의 HPLC 분석**

[0064] SJ-2 균주를 6, 9, 12, 15, 30일간 고체배양하여 회수한 배양물에서 추출한 로바스타틴을 2-2와 동일한 방법으로 HPLC 분석하였다.

[0065] HPLC 분석결과, 도 5에 나타난 바와 같이 배양 15일째 로바스타틴의 생산량이 가장 우수하였으며, 고체배양 시 액체배양 시보다 2배 이상의 lactone form 로바스타틴이 생산된 것을 확인하였다.

[0066] **2-5: Lovastatin의 TLC 분석**

[0067] SJ-2 균주 및 공시균인 *Asp. terreus* ATCC 20542에서 생산된 로바스타틴을 TLC(Thin layer chromatography)를 이용하여 비교, 분석하였다

[0068] TLC plate(Silica gel 60 F_{254}, Merck Co.)에 lovastatin 표준용액(acid form 및 lactone form)과 시료 10 ㎕를 spotting하였다. Spotting한 TLC plate는 건조한 후 전개용매(CH_2Cl_2 : $C_6H_{10}O_3$: CH_3OH = 8 : 1 : 1)가 들어있는 TLC chamber에서 전개시키고, UV(254 nm)에서 결과를 확인하였다.

[0069] TLC 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, SJ-2 균주에서 생산된 로바스타틴은 로바스타틴 표준시료(acid form 및 lactone form) 및 *Asp. terreus* ATCC 20542가 생산한 로바스타틴과 동일하게 acid form은 R_f value 0.38,

lactone form은 R_f value 0.78에서 뚜렷하게 검출되는 것을 확인하였다.

[0070] **실시예 3: 로바스타틴 생산균주(SJ-2)의 대량배양**

[0071] 로바스타틴 생산용 seed culture의 대량제조를 위해, 로바스타틴 생산균주로 확인된 SJ-2 균주를 공시균주인 *Asp. terreus*의 배양조건(Development of seed culture using soybean for mass production of lovastatin with *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mutant, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 666-670, 2008.)에 따라 대두를 사용하여 전배양한 후 미강에 본배양하였다.

[0072] 대량생산을 위한 전배양은 대두 20개에 균주 10 ㎖(1.0×10^8 spores/㎖)를 접종하고, 28℃에서 48시간 배양하였으며, 본배양은 미강 200 g을 고온가압멸균 처리하고, 멸균 증류수 70 ㎖를 첨가한 후, 전배양한 대두(대두-포자체) 3개를 접종하여 28℃에서 6, 9, 12, 15, 30일간 배양하였다. 이때 대두-포자체는 열처리 하지 않은 것과 30℃에서 1시간동안 열처리시킨 것을 각각 사용하였다.

[0073] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 포자접종법(도 5)에 의한 전배양보다 대두를 이용한 전배양체를 미강에 배양하였을 때, 3.42배 더 많은 lovastatin이 생산되는 것을 확인하였다.

[0074] 또한 대두를 이용하여 본배양시 열처리를 하지 않은 대두-포자체를 이용하는 것보다 30℃에서 1시간동안 열처리시킨 대두-포자체를 이용할 경우 열처리에 따른 포자발아의 촉진효과에 의하여 로바스타틴 생산량이 1.26배 증가된 것을 확인하였다. 이로부터, 곰팡이를 이용한 로바스타틴의 대량생산에 대두를 이용한 전배양법 및 열처리에 의한 발아촉진법이 효과적이라는 사실을 확인할 수 있었다.

[0075] **실험예 1: HMG-CoA reductase에 대한 저해활성 검토**

[0076] 실시예 3에서 SJ-2의 열처리하지 않은 대두-포자체와 열처리한 대두-포자체를 미강고체에 접종하여 배양한 다음 각 배양 추출물에서의 HMG-CoA reductase에 대한 저해 활성을 측정하기 위하여 Hucher 및 oleson 등의 분광분석 측정법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다 (Hucher F. H. and W. H. Oleson, Simplified spectrophotometrin for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A, *J. Lipid Res.* 14, 625-631, 1973; Screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor in vitro and its applicarion to pullets, *Korean J. Food and Nutr.* 15, 307-313, 2002; Screening of edible mushrooms for the production of lovastatin and its HMG-CoA reductase inhibitory activity, *Kor. J. Microbiol.* 42, 83-88, 2006.).

[0077] microsomal protein 1 mg, HMG-CoA 150 nmoles, NADP 2 μmoles, glucose-6-phosphate 3 μmoles, glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 unit, 시료(10 mg/㎖) 100 ㎕를 첨가하여 최종 부피가 1 ㎖이 되도록 반응액을 제조한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 10 mM sodium arsenite solution 20 ㎕를 첨가하고 1분 뒤 3% sodium tungstate를 함유한 2 M citrate buffer(pH 3.5) 0.1 ㎖를 가하여 37℃에서 10분간 정치하여 반응을 정지하였다. 정지한 반응액의 protein을 제거하기 위해 4℃, 15,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 상등액 1 ㎖를 취한 후 2 M Tris buffer(pH 10.6) 0.2 ㎖와 2 M Tris buffer(pH 8.0) 0.1 ㎖를 첨가하여 반응액의 pH를 8.0으로 조절하였다. 그런 후, CoA-SH의 생성을 위해 0.4 M sodium arsenite 50 ㎕를 첨가하고 5분간 반응시켰다. 다음으로 반응액 1 ㎖를 취하여 3 mM DTNB 20 ㎕를 첨가한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. CoA-SH의 생산량은 하기 식에 준하여 산출하였다.

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

[0078]

[0079] 상기 식에서 1.43은 희석배수이며 0.0136은 CoA-SH의 molar extinction coefficient이다. 반응 중에 NADPH를 공급하기 위해 glucose-6-phosphate와 glucose-6- phosphate dehydrogenase를 사용하였고 대조구로는 기질인 NADP를 첨가하지 않았다. HMG-CoA reductase에 대한 저해율은 시료를 넣지 않은 것의 CoA-SH 생산량에 대한 저

해의 정도를 백분율로 환산하고, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[0080] [표 4]

[0081]

Test samples	Specific activity (CoA-SH pmoles/min/mg protein)	Degree of inhibition(%)
Control	353.9	0
Lova-A	294.4	16.8
Lova-L	21	94
Koji extract 1	105	70.3
Koji extract 2	88	75.1

[0082] Koji extract 1: Non-heat treatment; Koji extract 2: Heat shock treatment at 30℃ for 1 hr.

[0083] 표 4에 나타난 바와 같이, SJ-2의 대두-포자체를 30℃에서 1시간동안 열처리하여 미강고체배지에 접종하여 생산된 Koji extract 2는 열처리하지 않은 SJ-2의 대두-포자체를 접종하여 생산된 Koji extract 1보다 HMG-CoA reductase에 대한 저해능이 다소 우수해진다는 것을 알 수 있었다. 한편, 공시균주인 *Asp. terreus*의 정제표품으로서의 Lova-A와 Lova-L 중 HMG-CoA reductase 활성은 Lova-L이 월등히 우수한데, 이와 비교시 열처리한 SJ-2의 대두-포자체를 배양하여 얻은 배양추출물인 Koji extract 2의 활성 또한 양호한 것이라 할 수 있는 결과였다.

[0084] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머(LovP-F 및 LovP-R)를 이용하여 곰팡이에서 추출한 DNA를 PCR 증폭 후, gel 전기영동을 수행한 사진이다 (M: 100 bp DNA ladder; 1: Strain SJ-1; 2: Strain SJ-2; 3: Strain SJ-3; 4: Strain SJ-4; 5: Strain SJ-5; 6: Strain SJ-6; 7: Strain SJ-7; A: *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant).

[0086] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머(LovF-F 및 LovF-R)를 이용하여 곰팡이에서 추출한 DNA를 PCR 증폭 후, gel 전기영동을 수행한 사진이다 (M: 100 bp DNA ladder; 1: Strain SJ-1; 2: Strain SJ-2; 3: Strain SJ-3; 4: Strain SJ-4; 5: Strain SJ-5; 6: Strain SJ-6; 7: Strain SJ-7; A: *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant).

[0087] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별된 로바스타틴 생산균주의 슬라이드 컬쳐를 통한 현미경 사진이다 (배율:×400, A:*Asp. terreus* ATCC 20542 mutant; B:Stain SJ-1; C:Stain SJ-2)

[0088] 도 4는 SJ-2 균주의 액체배양을 통하여 생성된 로바스타틴을 나타낸 그래프이다 (A: Lovastatin acid form; B: Lovastatin lactone form).

[0089] 도 5는 SJ-2 균주의 고체배양을 통하여 생성된 로바스타틴을 나타낸 그래프이다 (A: Lovastatin acid form; B: Lovastatin lactone form).

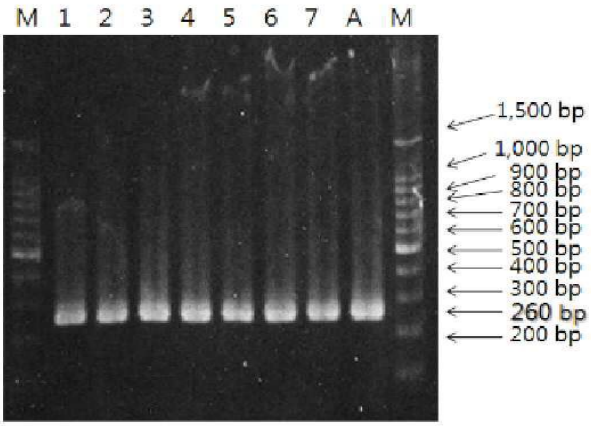
[0090] 도 6은 TLC 분석을 통한 로바스타틴의 검출을 확인한 사진이다(A: Lovastatin acid form(10 ㎍/㎖); L: Lovastatin lactone form (10 ㎍/㎖); AT: *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant(100 ㎍/㎖-extract); SJ: SJ-2 (100 ㎍/㎖-extract).

[0091] 도 7은 대두를 이용한 고체배양을 통하여 SJ-2 균주로부터 생성된 로바스타틴을 나타낸 그래프이다 (A: Lovastatin acid form; B: Lovastatin lactone form; : ○: Non-heat treatment; ●: Heat shock at 30℃ for

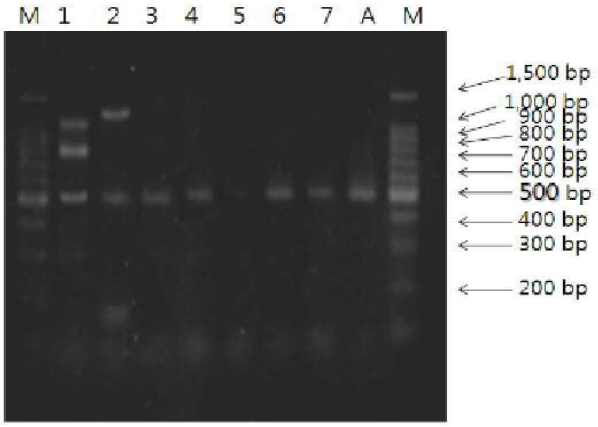
1 hr).

도면

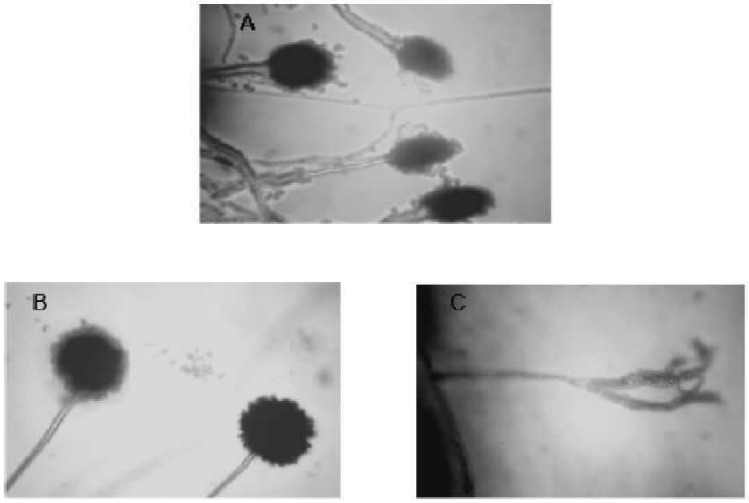
도면1



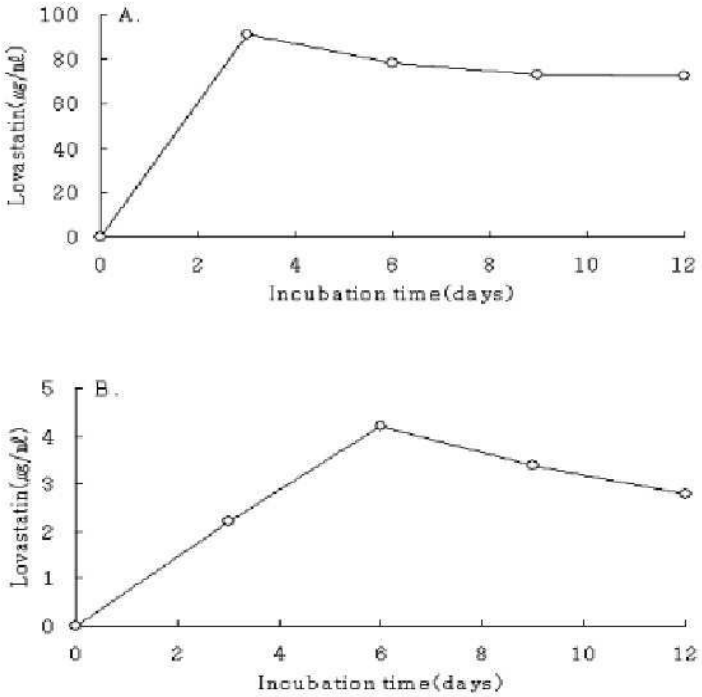
도면2



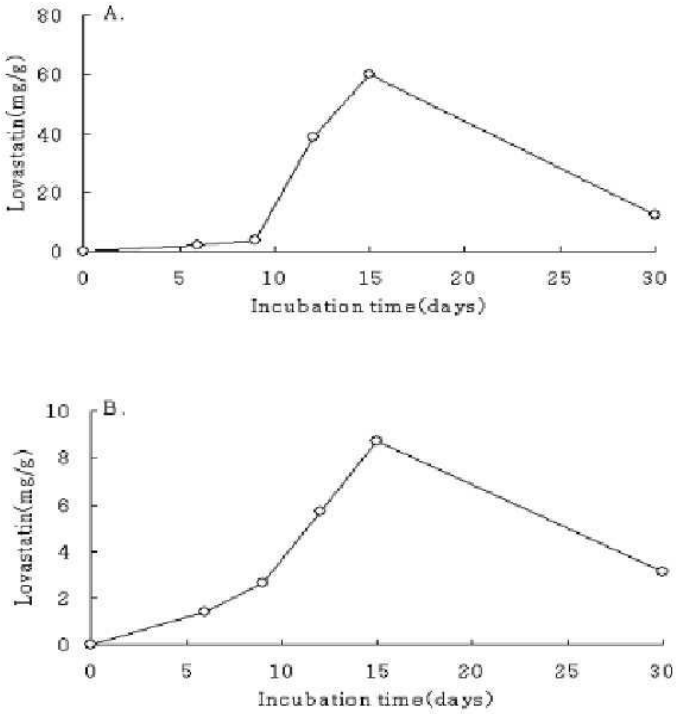
도면3


A
B
C

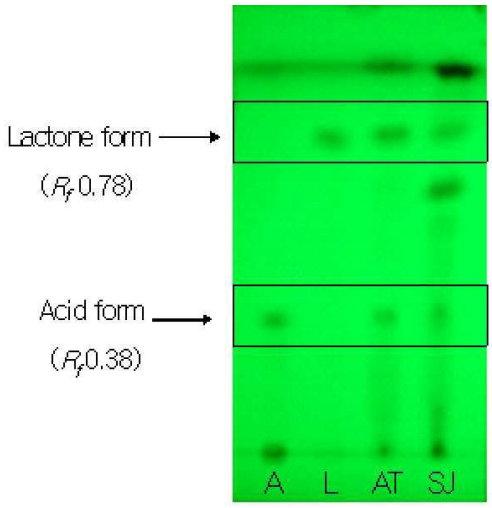
도면4


A.
Lovastatin(μg/mℓ)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
Incubation time(days)
B.
Lovastatin(μg/mℓ)
5
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
12
Incubation time(days)

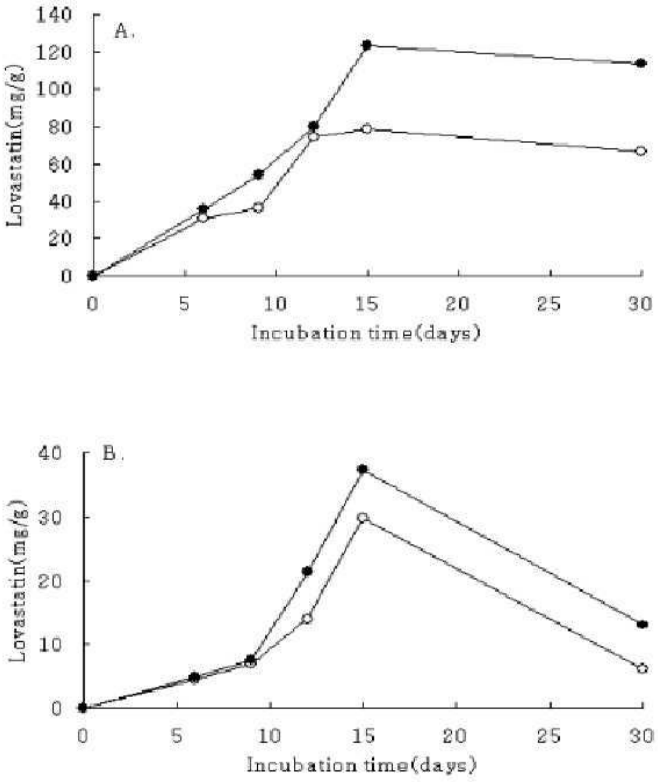
도면5


A.
Lovastatin(mg/g)
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Incubation time(days)
B.
Lovastatin(mg/g)
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
25
30
Incubation time(days)

도면6


Lactone form
(R_f 0.78)
Acid form
(R_f 0.38)
A
L
AT
SJ

도면7


A.
Lovastatin(mg/g)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Incubation time(days)
B.
Lovastatin(mg/g)
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
Incubation time(days)