

## HMG-CoA Reductase Inhibitor인 Pravastatin의 생산성 향상

전동수 · 배동훈  
단국대학교 식품공학과

### Improving Productivity of Pravastatin, HMG-CoA Reductase Inhibitor

Dong-Soo Jeon and Dong-Hoon Bai

Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

#### Abstract

Pravastatin sodium, competitive inhibitors of HMG-CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase, is produced from the culture broth of *Streptomyces carbophilus* KCCM 10370, The production of Pravastatin sodium was increased about 45 fold compared to wild type by UV mutation. Production of Pravastatin was also improved by continuous feeding of Compactin sodium to 24% and bioconversion ratio was also increased to 4.3% by intermittent addition. In main culture, concentration of Compactin sodium was kept less than 0.1%(w/v) under continuous feeding of Compactin sodium then product was 0.49% and bioconversion was 70%. After finishing the fermentation, Pravastatin was purified by various chromatographies such as Diaion HP20 resin column, Partition, and ODS(Octa-Decylsilyl Silicagel) resin column with a final yield of 70~72% and over 99.7% purity. The IR, UV, and NMR study of the purified Pravastatin sodium showed the same pattern as that of EP(European Pharmacopoeia).

**Key words:** *Streptomyces carbophilus*, Pravastatin, Compactin, HMG-CoA reductase inhibitor,

## 서 론

고지혈증(Hyperlipidemia)이란 혈액 중에 콜레스테롤(cholesterol), 중성지방(triglyceride), 인지질(phospholipids) 및 유리지방산(cholesterol ester) 중 하나 또는 그 이상의 성분의 농도가 높아진 상태이며 이로 인해 혈관이 축소되거나 막혀서 각종 심혈관 질환을 일으키는 질병이다(Stryer, 1995). 특히 관상동맥 심장질환(CHD)의 위험 인자로서 혈청 콜레스테롤 수치가 대략 200 mg/dL 이상으로 증가되었을 때 질환이 발생된다고 알려져 있다. 2001년에 발표된 미국 국립 콜레스테롤 교육 프로그램 성인치료 지침(The National Cholesterol Education Panel Adult Treatment Panel(NCEP ATP))에 따르면 고지혈증의 기준을 더 세분하고 강화하여 20세 이상 모든 성인의 말초세포에서 이용되는 콜레스테롤을 운반하는 저밀도 지방단백질(LDL) 콜레스테롤의 적정 기준을 100 mg/dL 미만으로 제

시하고 잉여 콜레스테롤을 혈액에서 제거하는 고밀도 지방단백질(HDL) 콜레스테롤의 경우도 40 mg/dL로 상향 조정하여 혈중 지질 관리의 중요성을 강조하였다(JAMA, 2001). 혈중 콜레스테롤이 높을 경우 동맥경화증이 유발되는 것으로 알려져 있으며, 특히 혈액 속에서 콜레스테롤 운반에 관여하는 LDL의 양은 동맥경화증 유발과 비례하고 있으며, 산화된 LDL은 동맥경화증 유발 작용이 강한 것으로 알려져 있다.

콜레스테롤은 체내에서의 생합성과 음식물로부터 흡수 공급되나 거의 대부분 담즙산 형태로 대변으로 배설된다(Dietschy et al., 1970). 따라서 인체 내 콜레스테롤을 감소시키기 위한 3가지 주요 전략은  $\beta$ -sitosterol과 같은 화합물에 의한 콜레스테롤 흡수 저해, cholestyramine과 같은 화합물에 의한 담즙산의 재흡수 저해, 콜레스테롤 생합성 저해 등이 있으며, 인체 내 콜레스테롤의 70% 이상이 생합성에 의해서 생성되므로 콜레스테롤 생합성을 저해시킴으로서 혈청 콜레스테롤 수치를 감소시킬 수 있다(Nobufusa et al., 1996). 고지혈증 환자는 우선 식사조절과 운동요법을 시행한 후 이러한 비약물요법이 효과적이지 못할 때 약물치료를 시작하게 되고 가장 많이 처방하는 지질저하제는 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase inhibitor인 스타틴(statin)계 약물과 피브리트

Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea  
Tel: +82-41-550-3562; Fax: +82-41-550-3566  
E-mail: baidh@dankook.ac.kr  
Received September 1, 2009; revised October 12, 2009; accepted October 13, 2009

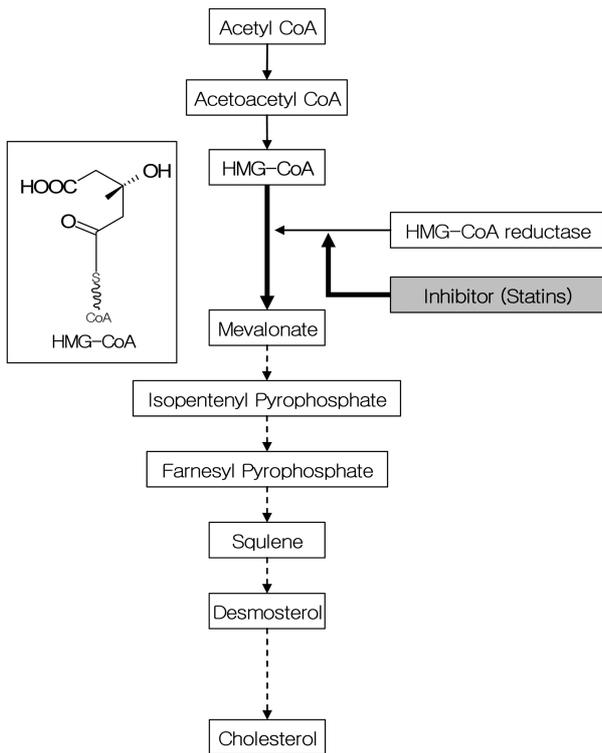


Fig. 1. Inhibition of cholesterol biosynthetic pathway

(fibrate) 유도체가 있다. 현재 산업화되어 있는 대부분의 고지혈증치료제로는 스타틴계 의약품이 대표적이며, 그 치료기전은 간에서 콜레스테롤의 생합성에 관여하고 있는 HMG-CoA 환원효소를 저해함으로써 LDL 콜레스테롤의 수치를 저하시키는 방법이다. Fig. 1과 같이 스타틴계 약물은 콜레스테롤 생합성 초기단계 및 율속단계(rate-limiting step)에 작용하여 mevalonate의 합성을 저해하여 콜레스테롤의 생산을 저해한다. 생체 내에서 콜레스테롤은 acetyl CoA를 시작으로 하여 20여개의 다른 효소반응을 거쳐 합성되어지며, 콜레스테롤 생합성 경로 중 마지막 단계에 관여하는 효소인 desmosterol 환원효소에 의해 촉매되어 생성되는 desmosterol에서 sterol로의 전환을 저해하는 triparanol 등이 콜레스테롤 저해제로서 초기에 연구되었다. 그러나 이 경우에는 mevalonate 이후의 중간대사 산물들이 체내에 축적되어 부작용을 나타내는 것으로 알려졌다. 그러므로 부작용을 최소화할 수 있는 방법으로, 콜레스테롤 생합성 경로에서 desmosterol 환원효소보다 앞선 단계로 율속(rate-limiting) 효소인 HMG-CoA 환원효소가 관여하는 반응을 저해하는 것이 중간 대사산물의 축적 없이 소수성 중간물질들의 생성이 최소한으로 저해되어 콜레스테롤의 생합성을 저해시킬 수 있는 최선의 방법으로 보고되었다 (Tobert, 1987).

HMG-CoA 환원효소 저해제는 효소의 기질인 HMG-CoA와 흡사한 구조를 지니며 지금까지 많은 연구가 보고되었다. 1975년 HMG-CoA 환원효소를 특이적으로 저해하

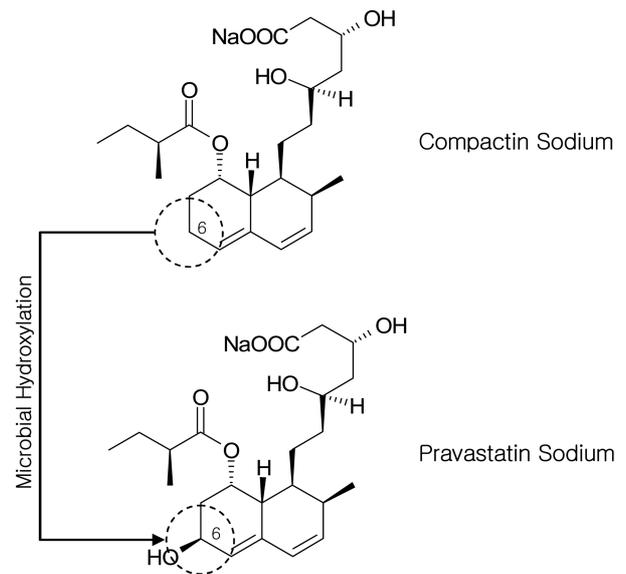


Fig. 2. Schematic diagram for bioconversion of Compactin sodium into Pravastatin sodium

는 물질인 콤팩틴(Compactin)을 *Penicillium citrinum*으로부터 최초로 발견하였다(Endo and Kuroda, 1976; Endo et al., 1976). 또한 콤팩틴의 많은 유도체를 개발하여 선별(screening)하는 과정에서 콤팩틴을 투여한 개의 뇨중 대사물로서 프라바스타틴이 동정되었으며(Hideyuki et al., 1986), 콤팩틴보다도 저해 활성이 강하며 또한 장기의 선택적 저해(tissue-selective inhibition)활성을 갖고 있기에 새로운 HMG-CoA 환원효소 저해제의 후보물질로 선정되었다(Tsujita et al., 1986). 개발초기에는 콤팩틴으로부터 화학적으로 합성을 시도하였으나 고비용과 이성체의 분리 등의 문제가 발생되어 미생물을 이용한 수산화반응(hydroxylation)을 개발하게 되었고(Serizawa et al., 1983), Fig. 2와 같이 콤팩틴의 6β 위치가 수산화되어 프라바스타틴으로 생물전환되었다. 또한 미생물을 이용한 수산화반응에 의하여 생산할 목적으로 많은 미생물들을 선별하였으며, 그 중에서 *Streptomyces carbophilus*가 강한 수산화반응 활성을 갖고 있고, 부산물이 적게 생성되었기에 공업적으로 생산이 가능하게 되었다(Masahiko et al., 1993). HMG-CoA 환원효소 저해제인 스타틴계 제제들은 본래 고지혈증 치료목적으로 사용되었으나, 최근 지질 저하 효과와는 독립적으로 스타틴 제제의 항산화 효과(Wassmann et al., 2002), 항염증 효과(Ongini et al., 2004), 항동맥경화 효과(Ni et al., 2001) 등이 밝혀지면서 스타틴 제제가 내피세포 기능부전 및 각종 염증성 질환에 효과가 있을 것으로 기대되고 있다. 스타틴계 제제들 중에서도 프라바스타틴은 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)이 있는 환자들에서 당뇨병의 발병을 감소시켰다고 알려져 있기(Freeman et al., 2001) 때문에 향후 세계시장의 규모가 점차 커질 것으

로 예상되고 있다.

바이오 의약품의 생산공정개발은 생물산업의 경쟁력을 결정하는 가장 중요한 기술로서 선진국을 비롯하여 기술개발의 노력이 매우 치열한 분야이다. 국내외에서 중국 등의 값싼 제품과 경쟁하여 이길 수 있는 방법은 선진국의 우수한 기술력을 확보하는 것은 물론이거니와 기존의 공정에 비해 혁신적인 생산공정의 개선을 통하여 생산력 향상 및 제조원가의 개선이 필수적인 사안이며, 이러한 어려움을 극복하기 위하여 바이오 의약품 제조의 특성상 미생물의 생리학적 특성을 고려한 고효율 생물전환기술 향상과 정제 공정에서 목적산물의 분리정제특성을 고려한 고순도 정제 기술의 필요성이 크다고 할 수 있다. 또한 의약품의 품질에 대한 부분은 약물의 부작용이나 독성 때문에 그 기준이 매우 까다롭고, 개발 초기의 기준이 시간이 지남에 따라 계속해서 높아지기 때문에 국제 경쟁력을 갖추기 위하여 생산성 및 품질의 향상이 반드시 수반되어야만 한다.

따라서 본 연구에서는 HMG-CoA 환원효소 저해제 중 최근 당뇨병의 예방효과가 입증된 프라바스타틴을 콤팩틴으로부터 생물전환방법을 사용하여 생산할 때 있어 전환율 향상에 의한 생산성 향상과 정제기술을 개량하여 순도를 높이는 방법을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구의 생산균주는 *S. carbophilus* KCCM 10370를 이용하였다. 시약으로 콤팩틴은 중국의 Molcan Biopharma Co., LTD (Chengdu, China)로부터 구입하여 사용하였으며, 콤팩틴 락톤(lactone)을 나트륨(sodium)으로 전환하여 생산균주 활성실험 및 전환율 실험에 사용하였다. 프라바스타틴 나트륨은 일본 Sankyo(Tokyo, Japan)사로부터 구입 사용하였고, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 생산균주의 고생산성 변이주 선별

본 연구에서는 분양받은 모균주 *S. carbophilus* KCCM 10370를 사면배지에서 5일 이상 배양하여 멸균된 생리 식염수를 첨가하여 균체를 현탁하여 10~60초간 UV 조사한 다음, 고농도의 콤팩틴 함유 배지(Table 1의 배지와 2.0% agar, 0.01% compactin, 0.5% pravastatin)에 도말하여 colony를 생성하는 1차 선별균주로 사용하였다. 50 mL 플

**Table 1. Composition of seed culture media**

Ingredients	Composition(%)
Peptone	1.0
Yeast extract	0.1
Glucose	2

pH to 7.0 and made up to 1L with D.W.

**Table 2. Composition of main culture media**

Ingredients	Composition(%)
Glucose	2.0
Yeast extract	0.6
Soy bean meal	2.0
Dry yeast	0.6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05
MgSO <sub>4</sub>	0.01
Antifoam	0.1

pH to 7.0~7.2 and made up to 1L with D.W.

라스크에 전배양 배지(Table 1)를 준비하여 1차 선별된 콜로니를 접종하여 28°C, 150 rpm으로 2일간 배양 후 500 mL 베플플라스크에 본배양 배지(Table 2)를 준비하여 전배양액을 접종물모하여 5 mL 접종하였고 배양온도 28°C, 교반속도 180 rpm으로 1일간 배양한 후 콤팩틴을 0.02%(w/v)의 농도로 첨가하여 배양하였다.

### 사용배지 및 생산조건

본 연구에서 *S. carbophilus* KCCM 10370의 생육과 프라바스타틴의 생산을 위하여 방선균 보존용 배지로는 베넷(Bennett's) 한천 배지를 사용하였으며, 전배양을 위하여는 Table 1의 조성을 가진 배지와 프라바스타틴의 생산을 위한 본배양의 배지는 Table 2의 조성을 기본으로 하여 실험에 사용하였다. 배양 및 생산조건검토를 위한 균체는 한천 평판배지 및 사면배양배지에서 28°C에서 7-10일간 배양한 균을 종균으로 사용하였다. 종균배양은 50 mL, 삼각플라스크에 5 mL분주한 것과 250 mL 베플삼각플라스크에 25 mL 분주하여 살균시킨 배지에 종균을 접종하여 28, 180 rpm으로 2일간 배양하였다. 본배양은 본배양 배지에 살균전 pH 7.0으로 보정하였고, 250 mL 베플삼각플라스크에 25 mL 분주하여 살균시킨 배지에 종균액을 접종하여 28°C에서 교반속도 180 rpm으로 하여 1일간 배양 후에 콤팩틴 나트륨을 첨가한 후 1일간 배양시킨 다음에 전환율(%)을 측정하였다. 유가식 발효에 사용되는 배지는 본배양 배지에 종균액 4%(v/v)를 접종하여 28에서 통기량 0.5 vvm, 교반속도 350 rpm으로 1일 이상 배양 후 콤팩틴 나트륨을 사용하여 4시간 간격으로 0.02%(w/v)씩 투입한 것과 연속 투입하여 배양하였다. Glucose는 초기량이 소모되어 0.5 mg/mL이하가 되는 시점부터 첨가하여 배양액에 Glucose 양이 0.5-1.0 mg/mL가 되도록 유지시켰다(Masahiko et al., 1993). 사용된 발효기는 5 L jar fermenter를 사용하였으며, 배양 진행 중 배양액을 채취하였다.

### 분석 방법

균체량 측정은 배지성분에서 고형분의 함량이 높아서 간접적인 방법인 PCV(packed cell volume)법으로 측정하였

으며, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 균체량을 백분율로 환산하였다(Hosobuchi et al., 1992). Glucose 농도 측정 은 환원당의 함량을 측정하는 방법 중 DNS (dinitrosalicylic acid) 방법으로 측정하였다(Miller, 1959). 배양액 내의 콤팩틴 나트륨 농도는 배양액을 원심분리(14,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 HPLC(Waters, Milford, USA)를 사용하여 분석하였다. 시료분석조건은 Symmetric C<sub>18</sub> (4.6×150 mm) 컬럼을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min로 하였고, UV 검출기로 238 nm에서 검출하였다. 이동상은 77% 메탄올, 0.1% 초산, 0.1% triethylamin, 22.8% 증류수이고, 크로마토그래피 보유시간(chromatography retention time)에서 6~12분 사이의 피크(peak)를 조사하였다(Masahiko et al., 1993). 배양액의 프라바스타틴 농도는 배양액을 50% 메탄올에 희석하여 원심분리(14,000 rpm, 10분)하여 얻은 상등액을 HPLC를 사용하여 분석하였다. 시료분석조건은 Symmetric C<sub>18</sub> (4.6×150 mm) 컬럼을 사용하였으며, 온도는 25°C, 유속은 1.3 mL/min로 하였고, UV 검출기로 238 nm에서 검출하였다. 이동상은 빙초산, 트리에틸아민(triethylamine), 메탄올, 증류수(1:1:450:550, v/v/v/v)의 유럽약전기준(European Pharmacopoeia, EP)으로 하였다.

#### 프라바스타틴 전환율 측정

콤팩틴 나트륨의 투입 농도에 따른 영향은 본배양 배지에 종균을 접종하여 28°C에서 180 rpm으로 각각 1일간 배양하였으며, 콤팩틴 나트륨을 각각 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2(w/v) 첨가하여 1일간 더 배양하였다. 배양액을 수거하여 균체량, 잔류 콤팩틴과 프라바스타틴량 및 전환율(%)을 확인하였다. 콤팩틴 나트륨의 투입법에 따른 발효배양 실험은 회분식 발효배양으로 5 L jar fermenter 2기에 본배양 배지를 각각 2 L 조제 후 멸균, 냉각시킨 후 전배양하여 2일 동안 배양하여 종균액을 4%(v/v)로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 콤팩틴 나트륨을 4시간 간격으로 0.02%(w/v)씩 투입하고, peristaltic pump를 사용하여 소량씩 연속투입하여 140시간까지 비교 배양하였다. 배양진행 중 배양액을 채취하여 pH, PCV, 콤팩틴 나트륨 잔량과 프라바스타틴 나트륨량을 확인하였다. 콤팩틴 나트륨의 최적 투입량 조절을 통한 배양 실험은 5 L jar fermenter에 본배양 배지를 넣고 콤팩틴 나트륨을 연속투입하여 배양 초기 낮은 농도에서 투입을 시작하여 점차적으로 고농도를 높여 배양을 실시하여 콤팩틴 나트륨 잔량이 0.01%(w/v)이하가 되도록 배양액을 채취하여 프라바스타틴

나트륨량과 잔류 콤팩틴 나트륨량, pH, PCV를 측정하였다.

#### 프라바스타틴 정제

발효가 종료된 배양액을 1 N 수산화나트륨(NaOH)으로 pH 8-9로 조절하여 여과보조제(Perlite SM771, Kyung Dong Ceratech, Seoul, Korea)를 배양액 대비 3%(v/v)를 첨가하고 30분 동안 교반한 다음 여과지(Whatman No. 4)로 입힌 감압여과기로 여과하였다. 프라바스타틴 나트륨 5 g이 함유된 여과액을 1 N 염산(HCl)로 pH를 5로 조절하여 Diaion HP20 수지가 500 mL 충전된 Vantage column(Millipore, Billerica, USA)에 20 mL/min 유속으로 흡착하고 2,500 mL 증류수를 사용하여 20 mL/min 유속으로 세척한 후 50%(v/v) methanol을 사용하여 10 mL/min 유속으로 용리하며, 각각 250 mL씩 분별(fractionation)하였다. 분별된 용리액을 감압 진공농축기로 농축한 다음 6 N 염산으로 pH 3.5로 조절 후 동량의 ethylacetate를 첨가 교반하여 프라바스타틴을 추출하고 에틸아세테이트 부피의 0.2배 증류수를 첨가하고 1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.5로 조절하여 프라바스타틴이 함유된 수용층을 회수하였다. 이 수용층 부피의 20배 acetone을 첨가하여 4°C에서 결정화하여 유럽약전(EP)규격에 적합한 순도가 될 때까지 반복하는 재결정화법과 ODS(Octa-Decylsilyl Silicagel, Daiso Co. Ltd, Osaka, Japan) 수지를 충전한 컬럼에 흡착, 증류수로 세척, 60%(v/v) methanol로 용리, 농축하여 위의 결정화법으로 결정화하는 방법을 HPLC로 분석하여 순도 및 수율을 비교하였다.

#### 물질확인

*S. carbophilus* KCCM 10370의 UV 변이주로 배양 및 정제한 프라바스타틴 나트륨의 화학 구조를 입증하기 위하여 적외분광측정법(Infrared Spectroscopy), 자외분광측정법(Ultraviolet Spectroscopy), 수소핵자기공명스펙트럼측정법(<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) 및 탄소핵자기공명스펙트럼측정법(<sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)의 기기 분석으로 확인하였다.

## 결과 및 고찰

#### 생산균주의 고생산성 변이주 선별

본 연구에서는 *S. carbophilus* KCCM 10370을 모균주로 한 UV mutant 균주 중에서 *S. carbophilus* K-212(KCCM

**Table 3. Pravastatin production of *Streptomyces carbophilus* K-212 by UV treatment.**

	Strain	PCV (%)	Pravastatin (mg/mL)
Wild type	<i>Streptomyces carbophilus</i> KCCM 10370	23	12
Mutant	<i>Streptomyces carbophilus</i> K-212	22	542



Fig 3. Scanning electron microscopy

10370)가 콤팩틴 나트륨에서 프라바스타틴 나트륨으로 우수한 전환율을 가진 균주로 선별되었으며(Witkin, 1976; Kiyoshima et al., 1987) 이는 Table 3에 보인 바와 같이 모균주에 비하여 생산량이 45배 향상된 결과를 보였다. 변이된 균주의 형상은 Fig. 3에 보인 바와 같이 형태적인 변화는 관찰되지 않았다.

프라바스타틴 전환율

콤팩틴 투입 농도에 따른 영향 실험에서 콤팩틴은 항진균성 물질이기 때문에 전구물질로 쓰이는 콤팩틴 나트륨의 농도가 높아지면 균체의 증식을 억제하며 고농도의 경우 증식된 균체를 용해(lysis)시켜 전환반응을 저해시킨다(Masahiko et al., 1993). 또한 콤팩틴 나트륨의 농도에 따른 전환율이 떨어지는 요인이 균체에 대해 유독(toxic)하기 때문에 균주의 자기방어 목적으로 수산화반응과 동시에 분해시키는 것으로 추정된다고 보고되고 있다. 따라서 변이균의 콤팩틴 나트륨 농도에 따른 전환율을 조사하였다. Table 4에 보인 바와 같이 0.01%(w/v) 콤팩틴 나트륨 농도에서 전환율이 80%로 나타나 가장 높은 것으로 나타났다. 이후의 농도에서는 전환율이 감소하였고 균체량도 감소하였다. 그리고 콤팩틴 나트륨 0.2%(w/v)에서는 전환반응이 없었으며 균체가 용해되었다. 따라서 균체의 증식을 억제

하는 반응이 일어나는 항진균성 물질로서의 반응이 일어나 균체량도 낮은 상태로 나타나게 되고 분해반응은 콤팩틴 나트륨의 소진이 발생하게 되며, 전환율을 떨어뜨리는 요인으로 작용한다. 균체에 안전한 생물전환반응인 수산화반응에 의한 전환율과 그에 따른 농도를 확인한 결과는 0.01%(w/v)이하이다.

Compactin sodium의 투입법에 따른 발효배양 실험은 콤팩틴 나트륨을 최대로 첨가할 수 있는 농도와 안정한 최대 전환율을 유지하면서 투입할 수 있는 농도를 고려하여 프라바스타틴 나트륨의 생산을 즉, 콤팩틴 나트륨의 전환율을 증가시켜서 생산성을 높이고자 첨가방법을 달리하여 비교하였다. 우선 균체량의 감소가 나타나지 않는 기질의 농도로 희분식 투입하여 프라바스타틴 나트륨의 생산량을 높일 수 있는 방법과 산업적으로 생산성면에서 유리한 연속식으로 투입하는 방법으로 본배양을 실시하였다. 5 L jar fermentor에서 본배양을 실시하였으며, 초기 배양온도는 28°C, 350 rpm, 0.5 vvm의 통기조건으로 20시간 배양하면서 글루코스 농도는 초기 농도에서 균체량(PCV)이 20%되는 시점에서 글루코스 농도를 0.5 mg/mL로 일정하게 유지시켜 140시간 배양하였다. 콤팩틴 나트륨의 잔류농도, 전

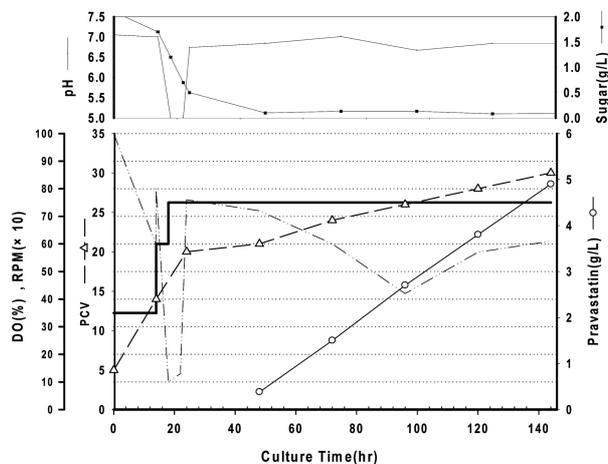


Fig. 4. Time course of main fermentation in 5L jar fermenter with *Streptomyces carbophilus* K-212

Table 4. Effect of Compactin sodium concentration on bioconversion rate by *Streptomyces carbophilus* K-212

Compactin sodium Conc.(%,w/v)	PCV (%)	Pravastatin sodium (µg/mL)	Bioconversion (%)	Residual Compactin sodium (µg/mL)
0.01	22	80	80	0
0.02	21	140	70	0
0.03	20	210	70	0
0.04	19	270	67.5	0
0.05	19	304	60.8	0
0.75	18	340	45.3	131
1.00	15	88	8.8	860
2.00	0	0	0	2000
Blank	24	0	0	0

**Table 5. Bioconversion rate by *Streptomyces carbophilus* K-212 with intermittent addition of Compactin sodium**

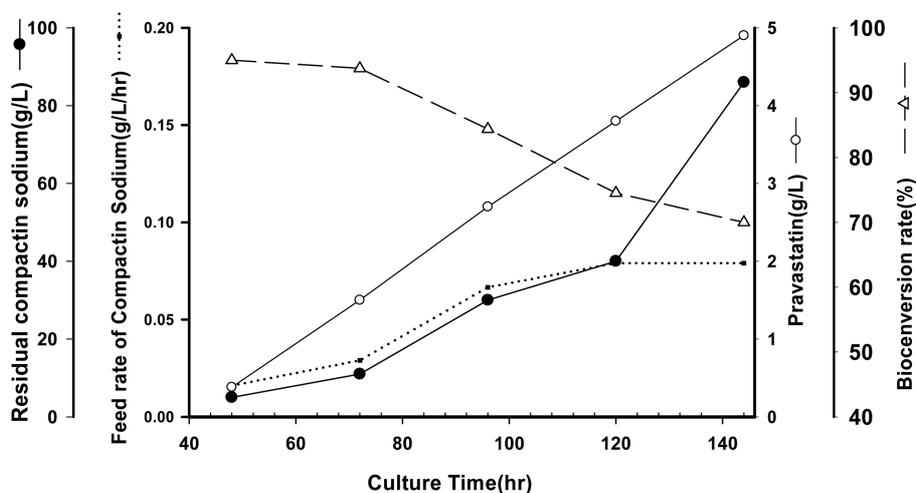
Time(hr)	pH	PCV(%)	Total 6%(w/v) Compactin sodium Added(ml)	Residual Compactin sodium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pravastatin sodium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Bioconversion(%)
0	6.82	6	0	-	-	-
30	6.48	19	400	-	-	-
44	6.69	21	1000	-	-	-
68	7.11	23	2200	50	1100	50
96	6.95	25	3600	70	1800	50
120	6.93	25	4800	90	2500	52.1
140	6.73	26	5400	100	3200	59.3

**Table 6. Bioconversion rate by *Streptomyces carbophilus* K-212 under continuous feeding of Compactin sodium**

Time (hr)	pH	PCV (%)	Total 6%(w/v) Compactin sodium Added(ml)	Residual Compactin sodium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pravastatin sodium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Bioconversion(%)
0	6.85	6	0	-	-	-
30	6.84	19	300	-	-	-
44	5.93	21	850	-	-	-
68	7.16	23	2300	8	500	21.7
96	6.96	25	4000	240	2100	52.5
120	6.67	25	5400	240	3200	59.2
140	6.13	23	6600	410	4200	63.6

환률, 균체량을 조사하였다. 그 결과 Table 5의 회분식 투입은 최종 전환율이 59.3%로 생산량은 0.32%로 나타났으며, 연속식 투입은 Table 6에서와 같이 최종 전환율이 63.6%로 생산량은 0.42%로 나타났다. 최종액량과 균체를 제거한 액량의 차이가 없었으며 전환수율은 연속식 투입이 4.3% 높았다. 콤팩틴 나트륨의 전환율과 균체의 중압(stress)에 의한 콤팩틴 나트륨의 용해를 막을 수 있는 투입 속도를 일정하게 유지하여 소량을 연속적으로 투입하는 방법이 생물학적으로 전환수율을 상승을 이룰 수 있게 하는 것으로 그에 따른 콤팩틴 나트륨의 영향에 저항성의 최대 범위를 연속투입의 속도를 조절하여 전환율과 프라바스타틴 나트륨의 생산량을 높일 수 있다.

콤팩틴 나트륨의 최적 투입량 조절을 통한 배양의 실험은 본배양 발효조에서 실시하여 초기 배양조건을 배양온도 28°C, 교반속도 350 rpm에서 통기량을 0.5 vvm으로 하여 초기 배양 1일후 균체량의 증가속도가 낮아지면 글루코스의 농도를 0.5 mg/mL로 유지되도록 하여주고 5일간 배양과정 중 콤팩틴 나트륨을 초기 투입속도 20 mg/L/hr로 하여 점차적으로 증가시켜 80 mg/L/hr로 유지시켜 잔류 콤팩틴 나트륨을 0.01%이하로 유지시켜주었다. 그 결과 배양시간에 따른 배양 패턴(Fig. 4)과 배양시간에 따른 콤팩틴 나트륨 잔량을 0.01%이하로 유지되었으며, 전환율은 초기 95%에서 140시간에서 최종 70%로 나타났다(Fig. 5). 이전의 Table 5에서의 전환율보다 6.4% 상승하였으며 프라바

**Fig. 5. Time course of bioconversion rate in 5L jar fermenter with *Streptomyces carbophilus* K-212 under continuous feeding of Compactin sodium**

**Table 7. Summary of purification step for Pravastatin sodium from culture broth**

Step	Purity (%)	Overall yield(%)
Culture broth	-	100
Filtration	60~70	89~91
Diaion HP20 resin column chromatography	92~94	85~86
Ethylacetate partition chromatography	94~95	83~84
Re-crystallization	97.5~99.8	48~49
ODS resin column chromatography	99.8~99.9	70~72

스타틴 나트륨 생산량 또한 15% 상승하는 효과를 나타냈다. 따라서 초기 배양조건에서 대수기(log phase)에서 균체 성장이 이루어진 후 전환율이 높은 안전한 첨가제의 투입은 전환율의 손실을 막아주고 균체의 성정을 더 높게 성형하여 준다. 또한 이러한 *S. carbophilus* K-212(KCCM 10370) 생산용균주의 선별과정 통하여 저항성이 높아질 경우 연속투입의 속도를 가속화가 이루어져 생산성과 전환율은 보다 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

#### 프라바스타틴 정제

프라바스타틴 나트륨의 정제는 *S. carbophilus* K-212(KCCM 10370)의 배양액으로 실험하였다. Table 7과 같이 유럽약전기준(EP)에 적합한 고순도의 프라바스타틴 나트륨을 고수율로 생산하기 위하여 재결정법은 최소한 5회 이상을 반복해야 순도가 기준(specification)에 적합하나 수율면에서 저조한 반면 ODS 수지 컬럼법은 그것을 모두 극복하는 방법으로 생산 시 가장 중요시 되는 cycle면에서도 100회 이상 진행하여도 순도나 수율면에서 문제가 없음을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 계속적으로 품질이나 생산 단가가 높아지는 것을 감안하면 ODS 수지 컬럼법이 주목받을 것으로 판단된다.

#### 물질확인

*S. carbophilus* K-212(KCCM 10370)로부터 생산한 Pravastatin sodium을 적외부스펙트럼측정법, 자외부스펙트럼측정법, 수소핵자기공명스펙트럼측정법 및 탄소핵자기공명스펙트럼측정법으로 분석한 결과 유럽약전기준(EP)과 일치하였다.

## 요 약

프라바스타틴 나트륨은 HMG-CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 환원효소 저해제로서, 콜레스테롤 생합성의 초기 율속단계(rate-limiting step)에 작용하여 메발로네이트(mevalonate)의 합성을 저해하는 광범위한 고지혈증 치료제이다. 본 연구에서는 효율적 발효와 고품질의 정제를 통한 생산성 향상을 위해 수행하였다.

프라바스타틴 나트륨의 경쟁력있는 생산성 향상을 위하여 *Streptomyces carbophilus* KCCM 10370을 UV 돌연변이 처리하여 프라바스타틴 나트륨의 생산량을 약 45배 향상시키는 *S. carbophilus* K-212(KCCM 10370) 선별하였다. 생산성을 극대화시키기 위하여 콤팩트 나트륨의 연속식 투입이 회분식 투입보다 생산량이 24%, 전환율 4.3%로 향상되었으며, 본배양에서 콤팩트 나트륨의 농도를 연속적으로 투입하여 0.1%(w/v) 이하로 유지시켜 프라바스타틴 나트륨의 생산량이 0.49%, 전환율 70%로 확인하였다. 발효가 종료된 후 배양액을 Diaion HP20 수지 컬럼, 분배(Partition), 그리고 ODS(Octa-Decylsilyl Silicagel) 수지 컬럼 크로마토그래피를 하여 유럽약전기준(EP)에 적합한 순도 99.7% 이상, 70~72%의 수율이었다. 프라바스타틴 나트륨을 적외부스펙트럼측정법, 자외부스펙트럼측정법, 수소핵자기공명스펙트럼측정법 및 탄소핵자기공명스펙트럼측정법으로 분석한 결과 유럽약전기준(EP)과 일치하였다.

## 참고문헌

- Dietschy JM, Wilson JD. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. *N. Engl. J. Med.*, 282: 1179-1183.
- Endo A, and Kuroda M. 1976. Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. *J. Antibiotics*. 29: 841-843.
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29: 1346-1348.
- Cleeman JI. 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program(NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults *JAMA*. 285(19): 2486-2497.
- Freeman DJ, Norrie J, Sitar N, Neely DG, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Gaw A. 2001. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: Evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 103: 357-362.
- Hideyuki H, Harumitsu K, Takeshi K, Akira T, Takashi N. 1986. Structure elucidation of bioactive metabolites of ML-236B(Mevastatin) isolated from dog urine. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 1459-1467.
- Hosobuchi M, Testsuya S, Masatoshi A, Jo O, Seigo I, Hiroji Y. 1992. Production of ML-236B, and inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase, by *Penicillium citrinum* : Improvements of strain and culture conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1414-1419.
- Kiyoshima K, Takada K, Yamamoto M, Kubo K, Okamoto R, Fukagaway, Ishikura T, Naganawa H, Sawa T, Takeuchi, Umekawa H. 1987. New tylosin analogs produced by mutants of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* 40: 1123-1130.
- Masahiko H, Ogawa K, Yoshikawa H. 1993. Morphology study in production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 470-475.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

- Ni W, Egashira K, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, Inoue S, Takeshima A. 2001. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitor in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circ. Res.* 89: 415-421.
- Nobufusa S, Hosobuchi N, and Yoshikawa H. 1996. Biochemical and molecular-approaches for production of Pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug. *Biotech. Ann. Rev.* 2; 373-389.
- Ongini E, Impagnatiello F, Bonazzi A, Guzzetta M, Govoni M, Monopoli A, Soldato PD, Ignarro LJ. 2004. Nitric oxide (NO)-releasing statin derivatives, a class of drugs showing enhanced antiproliferative and antiinflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 8497-8502.
- Serizawa N, Nakagawa K, Hamano K, Tsujita Y, Terahara A, Kuwano H. 1983. Microbial hydroxylation of ML-236B(compactin) and monacolin K. *J. Antibiot.* 36: 604-607.
- Stryer L. 1995. *Biochemistry* (4th ed). W.H. Freeman and Company, Virginia, USA, pp. 685-712.
- Tobert JA. 1987. New developments in lipid-lowering therapy : the role of inhibitors of hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A reductase, *Circulation*, 76(3), 534-538.
- Tsujita Y, Kuroda M, Shimada T, Tanzawa K, Arai M, Kaneko I, Tanaka M, Masuda H, Tarumi C, Watanabe Y, Fujii S. 1986. CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase : tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. *Biochim. Biophys. Acta.* 877: 50-60.
- Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G. 2002. Cellular antioxidant effects of atrovastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 300-305.
- Witkin EM. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40: 869-907.