

배지 성분이 *Streptomyces toxytricini*에서의 lipstatin 발효에 미치는 영향

임미옥¹ · 인웬수이¹ · 이지선¹ · 유연수² · 김상달² · 남두현¹

¹영남대학교 약학부, ²생명공학부

*Streptomyces toxytricini*로부터 lipstatin 생산을 최적화하기 위해, 배지 성분이 lipstatin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 tryptic soy broth (TSB) 배지를 기본 배지로 하여 28°C, 200 rpm으로 3일간 배양하여 종 배양액 (seed culture)을 만들고, 여기에 다양한 탄소원, 질소원, 지질 및 지방산 등을 함유한 TSB 배지에 2% 접종한 후 60 시간 동안 주 발효를 실시한 후, 배지 중의 lipstatin 양을 측정하였다. 탄소원 중에서 glucose와 glycerol을 첨가한 배지에서 균체가 가장 잘 성장하였지만, lipstatin 생산에는 lactose나 sucrose가 가장 우수한 것으로 나타났다. 한편, 질소원으로는 yeast extract가 균체 성장에 가장 좋았지만, 1.7% casitone과 0.3% soytone으로 구성된 TSB 배지에서 lipstatin 생산량이 가장 높게 나타났다. 또한 lipstatin 생산을 증가시키기 위해 triolein을 발효 배지에 첨가한 결과, 균체 성장은 증가하였지만 lipstatin의 생산은 현저히 감소하는 경향을 보였다. 한편, lipstatin의 생합성 원료로 추정되는 지방산들을 발효 배지에 0.5% 첨가하여 발효를 실시한 결과, 불포화 지방산인 linoleic acid나 oleic acid를 첨가한 경우 *S. toxytricini*의 성장이 억제되었으나, 포화 지방산인 stearic acid를 첨가한 경우에는 균체 성장 뿐만 아니라 lipstatin 생산량도 증가하였다.

Keywords □ fermentation, lipstatin, *Streptomyces toxytricini*

방선균에서 생산되는 2차 대사산물의 생합성은 여러 조절 유전자의 지배를 받고 있으므로, 배지 조성이나 외부에 직접 관여하는 환경 변화에 따라 많은 영향을 받는다. 방선균에서의 2차 대사산물 생산이 조절되는 대표적인 현상으로 포도당과 같이 이용되기 쉬운 탄소원이나 질소원이 존재하면 미생물의 성장은 증가하나 2차 대사산물의 생산량이 감소하는 catabolite repression 현상을 들 수 있다(1, 2, 3, 10).

본 연구에서는 *Streptomyces toxytricini*를 대상으로 배지 성분이 2차 대사산물인 lipstatin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Lipstatin은 *S. toxytricini*에서 생산되는 췌장 lipase 저해제로(6, 11), 장내에서 지방 분해를 억제함으로써 장내 흡수를 방해하는 물질이다. 현재 임상적으로는 이를 촉매 환원한 tetrahydrolipstatin (orlistat)이 비만 억제제로 사용되고 있다(7, 12).

본 논문에서는 lipstatin 생산을 위한 *S. toxytricini*의 주 발효 배지에 다양한 탄소원, 질소원, 지질 및 지방산 등을 첨가하여 배지 성분이 lipstatin 생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 lipstatin 생산 균주로 *S. toxytricini* NRRL15,443을 Northern Regional Research Laboratory (IL, USA)로부터 분

양받아, L 당 soluble starch 10 g, casamino acid 0.3 g, KNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 50 mg, CaCO₃ 20 mg, 10 mg FeSO₄ · 7H₂O (pH 7.4)인 배지에서 3일 동안 배양한 후 25% glycerol stock을 만들어 -70°C에서 보관하였다. *S. toxytricini* 배양의 기본 배지로 tryptic soy broth (TSB) (1.7% casitone, 0.3% soytone, 0.5% NaCl, 0.25% K₂HPO₄)를 사용하였다.

배양 및 발효

125 ml 삼각 플라스크에 TSB 배지 25 ml을 넣고, *S. toxytricini*의 glycerol stock을 2% 되게 접종한 후, 28°C에서 200 rpm으로 교반하면서 3일간 배양하여 종 배양액(seed culture)을 만들었다. 이 종 배양액은 TSB 배지를 기본 배지(basal medium)로 하여 다양한 탄소원, 질소원, 지질 및 지방산 등을 첨가한 발효 배지에 2% (v/v) 씩 접종한 후 동일한 배양 조건에서 60시간 진탕 배양하여 발효를 실시하였다.

발효액의 분석

발효가 종료되면 발효액 5 ml을 3,000 × g로 20분간 원심분리하여 상등액과 균체 부분으로 분리하고, 균체 부분은 건조 균체량(dry cell weight) 측정에, 상등액은 pH 측정에 이용하였다. 건조 균체량은 배양액 5 ml을 원심분리하여 얻은 균체를 증류수로 1회 세척한 후 60°C 건조기에서 하룻밤 건조시켜 측정하였다. 또한 배양액 3 ml에 3배량의 ethyl acetate를 가하고 5시간 이상 rotator 상에서 교반하여 발효 생산된 lipstatin을 추출한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 ethyl acetate 층을 회수하였다. 회수한 ethyl acetate 층은 증발 건조시킨 후, 500 µl ethanol

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-53-810-2825, Fax: 82-53-810-4654
E-mail: dhnam@ynu.ac.kr

에 용해하여 시료를 만든 후, lipase 저해 활성을 측정하여 lipstatin 생산량을 구하였다. 모든 실험 결과는 3회 반복 실험하여 얻어진 결과의 평균치를 구하여 나타내었다.

Lipstatin의 정량

Lipstatin 양을 정량하기 위해서 4-methylumbelliferyl oleate (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 기질로 분해 생산되는 4-methylumbelliferon의 형광을 측정함으로써 lipase 활성을 측정하는 형광분석법(8, 9)을 사용하였다. 이 방법에서는 200 μ l reaction buffer (25 μ M 4-methylumbelliferyl oleate, 25 μ g/ml bovine serum albumin (BSA), 2.5 mM CaCl_2 , 0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 췌장 lipase (43,000 unit/mg, Elastin Products Co., MO, USA) 액을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 3 ml의 stop solution (0.1 M sodium acetate, pH 5.0, 5 mM EDTA)을 가하여 반응을 종결시켰다. 반응액은 335 nm의 excitation, 445 nm의 emission 파장에서 형광분석기(모델명 RF-5301PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 형광을 측정하였다.

Lipstatin 정량을 위한 표준품으로 orlistat (tetrahydrolipstatin)을 함유하는 Xenical® (Hoffman-La Roche, Switzerland)을 구입하여 ethanol로 추출한 것을 사용하였다. Lipstatin 활성 측정에는 상기 췌장 lipase 반응액에 33.6 unit/ml의 췌장 lipase액과 0~400 ng/ml의 orlistat의 ethanol액을 첨가하여 반응시키고, lipstatin에 의한 lipase 활성의 억제 정도를 형광분석기로 측정하여 표준검량곡선을 구하였다. 이 표준검량곡선을 이용하여 *S. toxytricini* 배양액의 ethyl acetate 추출액 중의 lipstatin 양을 측정하였으며, 경우에 따라 lipstatin의 ethanol 용액을 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

형광분석법을 이용한 lipstatin의 정량

Lipstatin은 췌장 lipase 활성을 저해하는 화합물이기 때문에, 이의 정량 방법으로는 lipase의 기질로 triolate를 사용하여 생산되는 fatty acid 량을 pH 변화를 통해 측정하는 방법이 사용되어 왔다(11). 그러나 이 방법은 pH 변화를 측정하는데 상당한 어려움이 있었기 때문에, 유사한 성질을 가진 esterastin 정량에 이용되었던 방법으로 4-methylumbelliferyl oleate를 기질로 하여 생산되는 4-methylumbelliferon의 형광을 측정하는 형광분석법(8, 9)으로 췌장 lipase 활성을 측정하기로 하였다. 기질인 4-methylumbelliferyl oleate 농도를 25 μ M로 고정시킨 후, 췌장 lipase의 양을 0~5 μ g/ml로 증가시키면서, 반응액의 형광을 측정하여 가수분해 정도를 관찰한 결과, lipase의 양이 증가함에 따라 형광이 증가하였지만, 2.4 μ g/ml 이상에서는 반응이 포화되었다(Fig. 1A). 따라서, 포화 직전 농도인 2.0 μ g/ml의 췌장 lipase를 lipstatin 정량에 사용하기로 하고, lipstatin에 의한 췌장 lipase 효소 활성 저해 정도를 측정하였다. 이 때 lipstatin의 표준품으로 ethanol로 추출한 orlistat (tetrahydrolipstatin)을 6.25~400 ng/ml의 농도로 희석하여 1% 용량을 사용하였다. 그 결과, orlistat의 농도가 높아질수록 췌장 lipase에 의한 4-methylumbelliferyl oleate

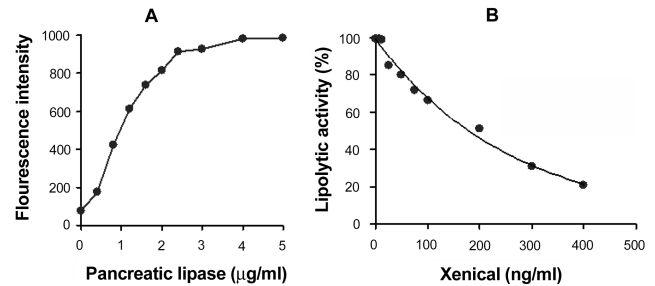


Fig. 1. Quantitative analysis of the activities of pancreatic lipase (A) and its inhibitor, orlistat (B), by fluorescence spectrophotometer. (A) Pancreatic lipase activity was assayed with 4-methylumbelliferyl oleate as substrate. After reaction for 20 min at 37°C, the fluorescence was measured using a fluorescence spectrophotometer with excitation wavelength at 335 nm and emission at 445 nm. (B) Orlistat, which was extracted from Xenical® tablet with ethanol and diluted to appropriate concentration, was added as 1% to pancreatic lipase reaction buffer. The 4-methylumbelliferon released from the substrate after reaction was measured with a fluorescence spectrophotometer. The calibration curve showed an exponential inhibition curve of $y=99.3e^{-0.0038x}$ and a regression coefficient $R^2=0.9923$.

의 가수분해가 저해되어 형광이 낮아짐을 관찰할 수 있었으며, 췌장 lipase의 활성 저해 정도가 orlistat에 의해 농도 의존적으로 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

탄소원의 영향

S. toxytricini 배양에서 탄소원이 lipstatin 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, glucose가 없는 TSB 배지를 기본 배지로 하고 여기에 다당류로 starch, 이당류로 lactose, sucrose, 단당류로 glucose, 당 분해물인 glycerol 등의 여러 탄소원을 2% 씩 첨가한 배지에서 발효를 실시하였다. 그 결과 탄소원을 공급하지 않은 TSB 배지와 비교하여 균체 성장과 lipstatin 생산량이 모두 증가하였다(Table 1). 특히 단당류인 glucose와 당 분해물인 glycerol이 균체 성장에 가장 좋은 탄소원으로 밝혀졌으며, 이당류인 lactose나 sucrose를 공급한 배지에서 균체당 lipstatin 생산량이 가장 높았다. 이러한 결과는 미생물에서의 이차 대사산물

Table 1. Effect of carbon sources on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Carbon source	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
			(µg/ml broth)	(µg/mg cell)
Control	8.84	1.57±0.18	0.98±0.12	0.59±0.09
Glycerol	7.78	8.62±0.43	1.00±0.15	0.12±0.04
Glucose	6.61	7.33±0.52	3.72±0.30	0.51±0.08
Lactose	8.73	1.73±0.20	3.48±0.22	2.01±0.12
Sucrose	8.76	1.98±0.12	3.13±0.36	1.58±0.11
Soluble starch	8.80	2.10±0.33	2.77±0.25	1.32±0.15

2% carbon sources were supplemented in TSB media (without glucose). Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C with initial pH 7.4.

Table 2. Effect of lactose concentration on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Lactose (%)	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
			($\mu\text{g/ml}$ broth)	($\mu\text{g/mg}$ cell)
0.0	8.80	1.57 \pm 0.12	2.00 \pm 0.05	1.27 \pm 0.11
0.5	8.82	1.52 \pm 0.18	2.70 \pm 0.12	1.77 \pm 0.15
1.0	8.71	1.68 \pm 0.15	2.69 \pm 0.16	1.60 \pm 0.12
2.0	8.76	1.72 \pm 0.10	3.43 \pm 0.09	1.99 \pm 0.10
3.0	8.71	1.68 \pm 0.25	2.39 \pm 0.25	1.42 \pm 0.18
4.0	8.65	1.86 \pm 0.12	2.57 \pm 0.15	1.38 \pm 0.16
5.0	8.62	1.77 \pm 0.18	0.91 \pm 0.13	0.07 \pm 0.02

Different concentration of lactose was supplemented in TSB media (without glucose). Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C with initial pH 7.4.

발효에서 성장에 좋은 탄소원이 2차 대사산물 생산을 억제하는 carbon catabolite repression 현상을 잘 보여주고 있다.

탄소원으로써 lactose의 최적 농도를 알아보기 위하여, TSB 배지에 여러 농도의 lactose를 첨가하고 배양한 결과, 2% 이상의 농도에서는 균체 성장이 더 이상 증가하지 않았을 뿐만 아니라 lipstatin 생산량이 오히려 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 이상의 결과로부터 균체 성장과 lipstatin 생산에 있어 가장 좋은 탄소원으로 2% lactose를 선정하였다.

질소원의 영향

*S. toxytricini*의 lipstatin 발효에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위해 2% lactose와 0.25% K_2HPO_4 그리고 0.5% NaCl로 구성된 배지를 기본 배지로 하여, 질소원으로써 casitone, peptone, soytone, tryptone, yeast extract와 같은 복합질소원, urea와 같은 유기 질소원, 그리고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 나 KNO_3 와 같은 무기 질소원을 배지에 각각 2% (w/v) 씩 첨가하여 발효시켰다. 그 결과 1.7% casitone과 0.3% soytone으로 구성된 TSB 배지에서, lipstatin 생산이 가장 높게 나타났고 yeast extract와 soytone을 첨가한 배지에서 균체 성장이 가장 좋았다(Table 3). 특히 yeast extract는 균체 성장에는 좋은 질소원이었으나 이를 첨가한 배지에서의 lipstatin 생산량은 그다지 높지 않았고, urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 등 유기 질소원이나, 무기 질소원을 공급한 배지와 질소원을 전혀 공급하지 않은 배지에서는 미생물이 거의 성장하지

Table 3. Effect of nitrogen sources on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Nitrogen sources	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
			($\mu\text{g/ml}$ broth)	($\mu\text{g/mg}$ cell)
Control	6.39	0.06 \pm 0.02	1.28 \pm 0.15	NS
Casitone	8.79	1.85 \pm 0.15	1.83 \pm 0.12	0.99 \pm 0.20
Peptone	8.48	0.81 \pm 0.05	0.97 \pm 0.10	1.19 \pm 0.15
Soytone	8.82	2.74 \pm 0.25	1.61 \pm 0.18	0.56 \pm 0.10
TSB	8.85	2.11 \pm 0.21	2.56 \pm 0.25	1.37 \pm 0.08
Tryptone	8.78	2.22 \pm 0.18	0.29 \pm 0.05	0.13 \pm 0.02
Yeast extract	9.02	3.92 \pm 0.38	1.26 \pm 0.13	0.32 \pm 0.05
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.78	0.10 \pm 0.05	0.94 \pm 0.06	NS
Urea	8.65	0.03 \pm 0.01	1.34 \pm 0.14	NS
KNO_3	6.36	0.05 \pm 0.02	1.30 \pm 0.09	NS

2% nitrogen sources were supplemented to basal media containing 2% lactose, 0.25% K_2HPO_4 and 0.5% NaCl. Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C in shake flask culture. NS; nonsense data because of extremely poor bacterial growth.

않았다. 따라서 TSB를 lipstatin 생산을 위한 최적 질소원으로 선정하고, 이를 구성하고 있는 casitone과 soytone의 농도를 변화시키면서 최적 농도를 조사한 결과, 1.7% casitone과 0.3% soytone 농도에서 lipstatin이 가장 많이 생산되었다(Table 4). 유기 질소원 중 soytone 배지에서의 lipstatin 생산량이 높은 것은 다른 유기 질소원보다 soytone 내에 식물성 지방이 많이 함유되어 있어서 이로부터 분해된 지방산이 lipstatin 생산의 원료로 이용되어지기 때문인 것 같다.

Triolein의 영향

발효배지에 지질을 넣어주었을 때 lipstatin 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, 2% lactose와 2% TSB로 구성된 배지에 여러 농도의 triolein을 첨가하고, *S. toxytricini*를 60시간 동안 진탕 배양한 후 생성된 lipstatin 양을 측정하였다(Table 5). 그러나 배양액을 ethyl acetate로 추출할 때 배지에 남아있던 triolein이 함께 추출되어, 추출 lipase 효소 반응액이 뿌옇게 흐려져서 lipstatin을 정량하기가 어려웠다. 특히 이러한 현상 정도는 배지에 첨가한 triolein의 농도가 높을수록 더 심해졌다. 그럼에도 불구하고, 배지에 첨가한 triolein의 양이 증가할수록 균체량은 증가하였지만 lipstatin 생산은 억제되는 경향을 관찰할 수 있었다. 이는

Table 4. Effect of casitone-soytone ratio as nitrogen on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Casitone (%)	Soytone (%)	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
				($\mu\text{g/ml}$ broth)	($\mu\text{g/mg}$ cell)
0.0	2.0	9.06	2.46 \pm 0.25	1.76 \pm 0.15	0.65 \pm 0.06
0.5	1.5	9.05	2.74 \pm 0.18	2.12 \pm 0.21	0.80 \pm 0.10
1.0	1.0	9.00	2.60 \pm 0.22	2.52 \pm 0.18	0.97 \pm 0.14
1.5	0.5	8.91	2.00 \pm 0.13	2.57 \pm 0.12	1.29 \pm 0.10
1.7	0.3	8.87	1.99 \pm 0.10	2.57 \pm 0.16	1.29 \pm 0.12
2.0	0.0	8.88	1.78 \pm 0.16	2.04 \pm 0.12	1.14 \pm 0.08

Different ratio of casitone and soytone was added to basal medium composed of 2% lactose, 0.25% K_2HPO_4 and 0.5% NaCl. Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C in shake flask culture.

Table 5. Effect of triolein concentration on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Triolein (%)	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
			($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/mg}$)
Control	8.89	1.99 \pm 0.15	2.57 \pm 0.23	1.29 \pm 0.12
0.25	8.90	2.35 \pm 0.22	2.42 \pm 0.18	1.03 \pm 0.15
0.50	8.90	3.07 \pm 0.25	2.17 \pm 0.15	0.71 \pm 0.10
0.75	8.91	3.23 \pm 0.33	2.13 \pm 0.20	0.66 \pm 0.08
1.00	8.95	3.51 \pm 0.28	2.02 \pm 0.16	0.58 \pm 0.09

Different concentration of triolein was added to basal medium containing 2% lactose and 2% TSB. Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C in shake flask culture.

Table 6. Effect of fatty acids on the lipstatin production by *Streptomyces toxytricini*

Fatty acid (0.5%)	Final pH	Dry cell weight (mg/ml)	Lipstatin production	
			($\mu\text{g/ml}$ broth)	($\mu\text{g/mg}$ cell)
Control	9.13	2.73 \pm 0.22	2.19 \pm 0.31	0.80 \pm 0.12
Linoleic acid	7.02	1.10 \pm 0.12	1.91 \pm 0.15	1.74 \pm 0.11
Oleic acid	7.27	0.38 \pm 0.10	4.58 \pm 0.62	NS
Palmitic acid	9.05	1.71 \pm 0.15	2.25 \pm 0.34	1.34 \pm 0.15
Stearic acid	8.94	2.02 \pm 0.14	5.88 \pm 0.47	2.91 \pm 0.23

0.5% fatty acid was supplemented to basal medium composed of 2% lactose and 2% TSB. Fermentation was carried out for 60 hr at 28°C in shake flask culture. NS ; nonsense data because of extremely poor bacterial growth.

아마도 triolein의 첨가로 *S. toxytricini*의 lipase 생산이 증가하면서, 이를 저해할 수 있는 lipstatin의 생산을 억제하기 때문인 것으로 추정된다.

지방산의 영향

Lipstatin의 생합성 경로 연구에서 linoleic acid 등 불포화지방산을 원료로 하여 생산됨이 보고되었기(4, 5) 때문에, 여러 지방산을 발효 배지에 첨가하고 lipstatin 생산량의 변화를 조사하였다. 이 때 사용한 지방산은 불포화 지방산인 linoleic acid 및 oleic acid, 포화지방산인 stearic acid 및 palmitic acid 이었다. 특히 lipstatin의 3-hydroxytetradeca-5,8-dienoic acid 부위가 linoleic acid로부터 합성이 된다는 가설(4)을 바탕으로 linoleic acid나 oleic acid와 같은 불포화지방산이 lipstatin 생산량을 증가시킬 것으로 기대하였지만, 이러한 불포화 지방산을 공급한 배지에서는 균체 성장이 좋지 않았고 lipstatin 생산량도 비교적 낮게 나타났다. 오히려 포화지방산인 stearic acid를 공급한 배지에서 lipstatin 생산량이 아주 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Table 6). 이는 아마도 *S. toxytricini*에서 포화 지방산과 불포화 지방산의 막 수송에서의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. 따라서 lipstatin에 포함된 이중결합은 포화지방산을 섭취한 후 fatty acid desaturase

등에 의해 균체 내에서 만들어질 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구비 지원(과제번호: R01-2003-000-10387-0)으로 이루어졌기에 이에 감사드립니다. 또한 이지선은 교육인적자원부의 2단계 BK21에 의해 신진연구인력지원비를 수혜받았기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 남두현. 1992. 방선균을 이용한 항생물질 발효. 미생물과 산업 18, 63-68.
- Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 209-233.
- Demain, A.L., Y.M. Kennel, and Y. Aharonowitz. 1979. Carbon catabolite regulation of secondary metabolism, p.163-185. In A.T. Bull, D.C. Ellwood, and C. Ratledge (ed.) *Microbial technology: current state, future prospects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Eisenreich, W., E. Kupfer, W. Weber, and A. Bacher. 1997. Tracer studies with crude U-¹³C-lipid mixtures. Biosynthesis of the lipase inhibitor lipstatin. *J. Biol. Chem.* 272, 867-874.
- Goese, M., W. Eisenreich, E. Kupfer, W. Weber, and A. Bacher. 2000. Biosynthetic origin of hydrogen atoms in the lipase inhibitor lipstatin. *J. Biol. Chem.* 275, 21192-21196.
- Hochuli, E., E. Kupfer, R. Maurer, W. Meister, Y. Mercadal, and K. Schmidt. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. *J. Antibiot.* 40, 1086-1091.
- Hollander, P.A., S.C. Elbein, I.B. Hirsch, D. Kelley, J. McGill, T. Taylor, S.R. Weiss, S.E. Crockett, R.A. Kaplan, J. Comstock, C.P. Lucas, P.A. Lodewick, W. Canovatchel, J. Chung, and I. Hauptman. 1998. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21, 1288-1294.
- Imanaka, T., Y. Moriyama, G.G. Ecsedi, T. Aoyagi, K. Amanumamoto, S. Ohkuma, and T. Takano. 1983. Esterastin: A potent inhibitor of lysosomal acid lipase. *J. Biochem.* 94, 1017-1020.
- Imanaka, T., K. Moto, S. Ohkuma, and T. Takano. 1981. Purification and properties of rabbit liver acid lipase (4-methylumbelliferyl oleate hydrolase). *Biochim. Biophys. Acta.* 665, 322-330.
- Martin, J.F. and A.L. Demain 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44, 230-251.
- Weibel, E.K., P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, and H. Lengsfeld. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* 40, 1081-1085.
- Zhi, J., A.T. Melia, C. Funk, A. Viger-Chougnet, G. Hopfgartner, and B. Lausacker. 1996. Metabolic profiles of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 1006-1011.

(Received May 22, 2006/Accepted July 28, 2006)

ABSTRACT : Effect of Medium Components on the Lipstatin Production by *Streptomyces toxytricini*
Mi-Ok Lim¹, Wencui Yin¹, Ji-Seon Lee¹, Yeon-Su Yu², and Sang-Dal Kim², and Doo-Hyun Nam^{1,*} (¹Faculty of Pharmacy, ²Faculty of Biotechnology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

In order to increase the productivity of lipstatin by *Streptomyces toxytricini*, the effect of medium components on the lipstatin production was investigated. Using TSB medium as a basal medium, a variety of carbon sources, nitrogen sources, lipid and fatty acids was supplemented into a fermentation medium. The seed culture of *S. toxytricini* grown in 25 ml TSB medium at 28°C for 3 days with agitation at 200 rpm was inoculated in the size of 2% in fermentation media containing different components and fermented at 28°C for 60 more hrs. In the examination of the effect of carbon sources, the best cell growth was observed in fermentation media supplemented with glucose or glycerol, but the lipstatin productivity was the highest in media containing lactose or sucrose. Among complex nitrogen sources, yeast extract was the best one for cell growth, but the highest lipstatin production was found in TSB media composed of 1.7% casitone and 0.3% soytone. The increased concentration of triolein as a lipid caused the promotion of cell growth but the significant suppression of lipstatin production. When 0.5% fatty acids were supplemented to fermentation medium, unsaturated fatty acids like linoleic or oleic acid suppressed cell growth as well as lipstatin production, but 2 times higher lipstatin production was achieved by stearic acid, a saturated fatty acid, differently from expectation.