

Agrobacterium tumefaciens 변이주에 의한 Coenzyme Q₁₀ 생합성시 유기, 무기질소원과 아미노산의 영향

김정근* · 원용배 · 이강문 · 구윤모¹

한국산업기술대학교 생명화학공학과, ¹인하대학교 생물공학과

Influence of Organic, Inorganic Nitrogen Sources and Amino Acids on the Biosynthesis of Coenzyme Q₁₀ by *Agrobacterium tumefaciens* Mutant

Jeong-Keun Kim*, Yong-Bae Won, Kangmoon Lee, and Yoon-Mo Koo¹

Department of Chemical Engineering & Biotechnology, Korea Polytechnic University, Siheung, 429-793, Korea.

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.

Abstract The effect of inorganic, organic nitrogen sources and amino acids on the coenzyme Q₁₀ production and coenzyme Q₁₀ component ratio was investigated. Among the nine organic nitrogen sources, CSP showed a remarkable enhancing effect on the production of coenzyme Q₁₀. But this enhancement was not observed in medium containing Bacto peptone, tryptone, casamino acid and soybean meal. These differences on the production of coenzyme Q₁₀ may be due to differences in kinds and amounts of component amino acids and peptides in the various organic nitrogen sources tested. In the addition of inorganic nitrogens, only (NH₄)₂SO₄ increase the coenzyme Q₁₀ production by 2.0 times compare to the control group. The addition of L-tyrosine to the medium containing Bacto tryptone, was also determined to be crucial for the coenzyme Q₁₀ production. But phenylalanin and tryptophan, other aromatic amino acids, had no stimulatory effect on the coenzyme Q₁₀ production. These results show that the production and components ratio of coenzyme Q₁₀ was greatly affected by the kinds and the concentration of inorganic, organic nitrogen sources as well as amino acids.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens* mutant, coenzyme Q₁₀, amino acids, tyrosine

서 론

Coenzyme Q₁₀ (ubiquinone, ubidecarenone, CoQ₁₀)은 원핵세포의 세포막 혹은 진핵세포의 미토콘드리아 내막에 결합하여 전자전달에 관여하는 지용성 물질로 최근에는 건강기능성 식품뿐만 아니라 심장혈관질환, 노화방지 등 다양한 질병의 치료에 사용되고 있다(1, 2). Coenzyme Q₁₀은 사람의 생체 내에서 합성되는 물질로 산화된 형태인 유비퀴논(ubiquinone)과 환원된 형태인 유비퀴놀(ubiquinol)로 함께 존재하면서 미토콘드리아 내막에서 전자전달계 복합

체 (complex I/II와 complex III)간의 전자를 전달하는 역할을 하여 ATP 생성에 필수적인 물질이다(3, 4, 5). 또한 유비퀴놀은 골지체 막과 세포질에서 일어나는 환원성 반응에 의해 자유라디칼 산소종의 제거제로서 작용하여 DNA, 지질, 단백질 등에 대한 산화적 손상을 막는 항산화제로서의 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(6, 7, 8).

Coenzyme Q₁₀은 benzoquinone 고리와 이 고리의 제 6 위치에 결합하고 있는 10개의 isoprenyl 단위체로 이루어진 polyprenyl로 구성되어 있다(9, 10). Quinone은 방향족 아미노산 생합성 경로인 shikimate pathway를 통하여 생합성되며(11, 12), isoprenoids는 세포 종에 따라 MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) 합성경로 또는 Mevalonate 합성 경로를 이용해서 isopentenyl pyrophosphate를 거쳐 합성된다(13, 14). 따라서 미생물에서 coenzyme Q₁₀ 생합성 시

*Corresponding author

Tel: +82-31-8041-0615, Fax: +82-31-8041-0629

e-mail: kjkim@kpu.ac.kr

아미노산, 유기질소원의 종류는 coenzyme Q₁₀ 생산과 깊은 연관성이 있다고 사료된다.

따라서 본 연구에서는 coenzyme Q₁₀ 고역가 변이주인 *Agrobacterium tumefaciens* KPU-11-03을 사용하여 유기, 무기질소원, 아미노산 첨가에 따른 coenzyme Q₁₀ 역가와 coenzyme Q₁₀ 구성비율 변화를 조사하였다. 특히, coenzyme Q₁₀ 역가가 낮은 tryptone 첨가 배지에 다양한 아미노산을 첨가하여 coenzyme Q₁₀ 역가 회복에 관여하는 전구물질 혹은 유도물질을 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 보관

본 연구에 사용된 균주는 *A. tumefaciens* ATCC4452를 모균주로 하여 자외선 및 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 처리를 하여 얻어진 돌연변이로 KPU-11-03으로 명명하였다. 균주보관은 LB plate에서 배양된 균체를 LB broth 배지 (40% glycerol (v/v) 함유) 접종한 후 -70℃에서 냉동 보관 하였다. 또한 단기 보존을 위해 LB 평판배지에 균체를 도말하여 30℃ 항온 배양기에서 약 48시간 배양한 후 4℃ 냉장고에 보관하면서 2주일마다 계대 배양하였다.

시약 및 기구

Coenzyme Q₁₀, coenzyme Q₂, coenzyme Q₄, coenzyme Q₆, coenzyme Q₉ 표준품은 Sigma (St, Louis, USA) 제품을 사용하였으며 배지성분으로서 LB, yeast extract, Bacto tryptone, Bacto peptone, casamino acid, soybean meal 등은 Difco (프랑스)제품, corn steep solid (CSS)는 Sigma (미국) 제품, corn steep powder (CSP)는 Roquette (프랑스) 제품을 사용하였고, 각종 아미노산과 그 외의 모든 시약들은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

사용배지 및 배양 조건

Coenzyme Q₁₀ 생산을 위한 종균배양 배지는 LB Broth (1.0% tryptone, 1.0% sodium chloride, 0.5% yeast extract)로 하였으며, 본 배양 배지는 4.0% sucrose, 2.0% CSP, 1.0% yeast extract, 1.0% ammonium sulfate, 0.05% calcium carbonate, 0.003% sodium molybdate를 첨가한 후 pH가 7.0이 되도록 조절하였다. 배양은 500 ml 삼각 플라스크에 배지 100 ml를 넣고 종균 4.5 ml를 접종하여 배양온도 30℃, 220 rpm에서 진탕배양기 (IS 971R, 제이오텍, 한국)를 사용하여 120시간 배양하였다.

균체량 측정

미리 항량하여 무게를 측정한 여과지 (Whatman GF/C)에

5.0 ml의 배양액을 부어 감압여과하고 증류수로 2회 세척한 후 105℃ 건조오븐에서 4시간 동안 건조시켜 균체량 (DCW)을 측정하였다.

Coenzyme Q₁₀ 추출

배양액 20 ml를 튜브에 취하여 4,000 rpm (1,650 × g)에서 10분간 원심분리하고 상등액을 분리시켜 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 증류수로 2회 세척하고 coenzyme Q₁₀ 용출 용매인 에탄올 (99.9%) 20 ml를 가하여 균체를 현탁 및 용해시켰다. 그 후 초음파 파쇄기를 작동하여 (97 Watt, 2분간 15초 작동, 10초 정지) 세포벽을 용해시키고, 250 rpm의 교반속도로 1시간 동안 처리하여 균체 내 coenzyme Q₁₀을 추출하였다. 추출액 1 ml를 1.5 ml 튜브에 넣고 10,000 rpm, 3분간 원심 분리하고 상등액 1 ml를 실린지 필터 (직경 17 mm, 공극 0.45 μm, PTFE)에 여과하여 이를 분석액으로 하였다.

Coenzyme Q₁₀ 분석

Coenzyme Q₁₀ 정량분석은 HPLC (LCQ Advantage MAX, Thermo Electron, USA)로 수행하였으며 분석조건은 다음과 같다. (15) : 검출기 PDA 검출기, 검출파장 275 nm, 분석 컬럼 Novapak[®] C-18 (15cm × 5 mm, 4.5 μm, Waters), 시료 주입량 20 μl, 유량 1.5 ml/min, 전개용매 MeOH : EtOH = 80 : 20.

Coenzyme Q₁₀ 구성비율 (%)은 coenzyme Q₂, coenzyme Q₄, coenzyme Q₆, coenzyme Q₉, Coenzyme Q₁₀ 등을 사용하여 정량적으로 비교 분석하였다. Coenzyme Q₁₀ HPLC 분석 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

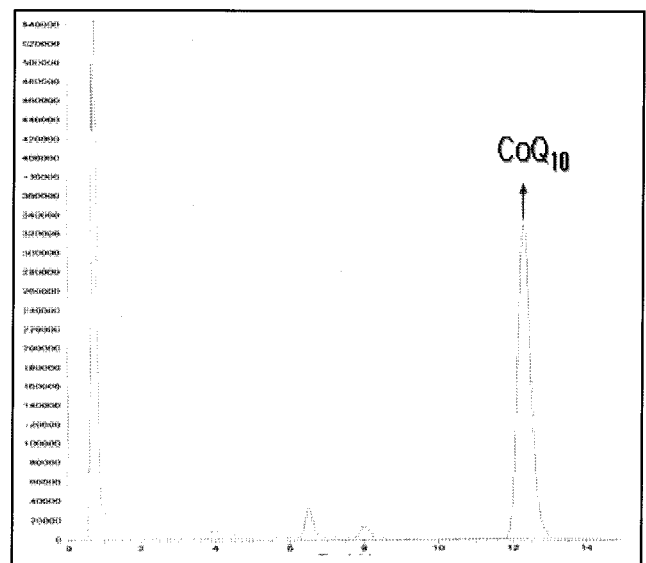


Fig. 1. Chromatogram of HPLC analysis of *A. tumefaciens* KPU-11-03 metabolite.

결과 및 고찰

유기 질소원의 영향

CSP를 비롯한 9가지의 유기 질소원을 생산배지에 첨가한 후 coenzyme Q₁₀ 역가와 coenzyme Q₁₀의 구성비율 등을 비교한 결과, 옥수수 침출물 (corn steep liquor)을 건조한 CSP와 CSS 첨가 시에 다른 유기질소원에 비해 높은 coenzyme Q₁₀ 역가 및 구성 비율을 나타내었다(Table 1). 특히, CSP 첨가 시 coenzyme Q₁₀ 역가는 212.7 mg/l, 구성 비율은 94%로 CSS 첨가시 coenzyme Q₁₀ 역가 160.2 mg/l, 구성비율 94% 보다 coenzyme Q₁₀ 역가가 약 25% 높게 나타나 옥수수 침출물 건조체 (spray-dried corn steep)의 제조사에 따라 coenzyme Q₁₀ 역가에 차이가 있음을 확인하였다. CSP와 CSS 이외의 다른 유기질소원들 중에서 yeast extract의 coenzyme Q₁₀ 역가는 126.2 mg/l, 구성비율 89%, soytone의 coenzyme Q₁₀ 역가는 114.7 mg/l, 구성비율 88% 등으로 비교적 우수하게 나타났다. 그러나 Bacto tryptone, Bacto peptone, soybean meal, casamino acid 등의 유기 질소원 첨가 시에는 극히 낮은 coenzyme Q₁₀ 역가를 나타내어 균체내의 coenzyme Q₁₀ 축적은 유기 질소원의 종류 즉 아미노산의 종류 및 량과 매우 밀접한 상관성이 있음을 추정할 수 있었다. 유기 질소원으로서 선정된 CSP를 농도별 첨가한 결과, 2% CSP 첨가 시 가장 높은 coenzyme Q₁₀ 역가를 보였고 3% CSP 첨가 시는 coenzyme Q₁₀ 구성비율은 96.3%로 가장 높게 나타났으나 coenzyme Q₁₀ 생산량은 급속히 감소하였다(Table 2). 이상의 결과로 CSP는 유기질소원으로 coenzyme Q₁₀ 역가에는 많은 영향을 미치나 coenzyme Q₁₀ 구성비율에는 약간의 영향을 주는 물질로 확인되었다. Bacto tryptone, Bacto peptone, soybean meal, casamino acid 등을 첨가할 시 coenzyme Q₁₀ 역가는 CSS 첨가시의 약 0.5-10%의 낮은 생산량을 나타내어 CSP 내의 특정 아미노산이 coenzyme Q₁₀ 전구물질 또는 유도물질로 작용하여 coenzyme Q₁₀ 생산을 증가시키고 어느 농도 이상에서는 feedback inhibition을 주는 물질로 관여하고 있다고 사료되었다.

Table 1. Effect of organic nitrogen sources on the coenzyme Q₁₀ activity

Organic nitrogen sources (2%)	pH	DCW (g/l)	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Coenzyme Q ₁₀ components ratio (%)	Relative activity (%)
No addition	7.01	4.8	3.7	45	1.7
CSP	5.76	12.1	212.7	94	100
CSS	5.65	11.3	160.2	94	75
Yeast extract	7.68	7.4	126.2	89	59.3
Bacto tryptone	6.43	5.5	16.1	87	7.6
Bacto peptone	7.30	4.4	1.5	83	0.7
Soytone	7.13	6.3	114.7	88	53.9
Soybean meal	5.27	15.7	21.7	100	10.2
Casamino acid	7.17	5.6	0.8	99	0.4

Medium : 4% sucrose, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

Table 2. Effect of corn steep solids concentration on the coenzyme Q₁₀ activity

CSP (%)	pH	DCW (g/l)	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Coenzyme Q ₁₀ components ratio (%)	Relative activity (%)
0	5.93	0.7	3.9	-	1.8
1	5.30	7.8	74.2	95.6	34.6
2	5.82	11.5	214.3	95.2	100
3	7.28	19.7	168.5	96.3	78.6
4	7.62	19.8	125.5	94.0	58.6
6	8.47	23.2	22.9	92.5	10.7
8	8.56	28.9	0.09	-	0

Medium : 4% sucrose, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

무기 질소원의 영향

8가지의 무기 질소원을 생산배지에 1% 첨가한 후 균체 량과 coenzyme Q₁₀ 역가, 구성비율 등을 비교하였다. 실험 결과, (NH₄)₂SO₄ 첨가 시의 coenzyme Q₁₀ 역가는 258.7 mg/l로 비첨가구에 비해 약 2배 증가하였고 coenzyme Q₁₀ 구성 비율도 90%로 다른 무기질소원보다 우수하게 나타났다 (Table 3). 그러나 (NH₄)₂SO₄ 농도별 첨가효과를 검토한 결과, 0.5% 첨가시는 비첨가구의 약 1.9배, 1% 첨가 시는 비첨가구의 2.1배의 coenzyme Q₁₀ 역가를 나타내었다. 그러나 1.5% 첨가 시는 1% 첨가시보다 coenzyme Q₁₀ 역가가 감소하는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources on the coenzyme Q₁₀ activity

Inorganic nitrogen sources (1%)	pH	DCW (g/l)	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Coenzyme Q ₁₀ components ratio (%)	Relative activity (%)
No addition	7.40	27.9	120.8	87	53
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.41	17.9	226.9	90	100
(NH ₄ COO) ₂	6.70	15.3	83.3	88	37
NH ₄ Cl	6.58	18.0	71.2	81	31
(NH ₄) ₂ CO ₃	9.15	9.2	0	0	0
KNO ₃	8.47	14.6	69.3	92	31
NaNO ₂	8.37	19.7	23.7	86	10
NH ₄ NO ₃	8.26	16.1	60.6	86	27
NaNO ₃	8.43	27.7	71.2	94	31

Medium : 4% sucrose, 2% CSP, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

Table 4. Effect of ammonium sulfate concentration on the coenzyme Q₁₀ activity

Ammonium sulfate (%)	pH	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Relative activity (%)
0	7.40	120.8	47
0.25	6.92	189.7	73
0.5	6.67	235.6	91
1.0	6.65	258.7	100
1.5	6.79	227.1	88
2.0	6.86	216.0	83

Medium : 4% sucrose, 2% CSP, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

아미노산의 영향

유기 질소원 첨가 실험 결과, 비교적 낮은 수준의 coenzyme Q₁₀ 역가 (16.1 mg/l)를 생성한 Bacto tryptone을 유기 질소원으로 선정 후 9가지의 아미노산을 첨가하여 coenzyme Q₁₀ 생산량이 CSP 수준으로 회복되는지 여부를 확인하였다(Table 5). 실험 결과, tyrosine 첨가구의 coenzyme Q₁₀ 역가는 99.5 mg/l로 비첨가구보다 약 8.2배 coenzyme Q₁₀ 역가가 증가하였다. 그러나 phenylalanine과 tryptophan 등의 다른 방향족 아미노산의 첨가 시에는 coenzyme Q₁₀ 역가가 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 또한 alanine 첨가구는 2.5배, lysine 첨가구도 2.5배의 coenzyme Q₁₀ 역가가 증가하였다. 따라서 coenzyme Q₁₀ 생합성 시 방향족 아미노산인 tyrosine과 alanine 그리고 lysine이 중요한 아미노산임이 밝혀졌다. 한편 CSP가 첨가된 배지에 아미노산을 각각 첨가하여 실험한 결과, tyrosine 첨가구에서 약 1.13배 coenzyme Q₁₀ 역가가 증가하였으나 다른 아미노산 첨가구는 모두 coenzyme Q₁₀ 역가가 감소하는 것으로 나타났다(Table 6).

Table 5. Effect of amino acid sources on the coenzyme Q₁₀ activity in medium containing Bacto-tryptone

Amino acid sources (0.25%)	pH	DCW (g/l)	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Relative activity (%)
No addition	7.15	7.6	12.2	12
Arginine	7.33	4.0	27.2	27
Alanine	7.55	7.7	29.5	30
Glutamic acid	7.55	6.2	16.5	17
Cysteine	7.11	6.8	13.7	14
Threonine	7.42	5.8	9.5	10
Lysine	7.24	8.8	28.5	29
Tyrosine	8.00	16.7	99.5	100
Phenylalanine	7.36	5.3	8.8	9
Tryptophan	7.40	5.0	8.2	8

Medium : 4% sucrose, 2% tryptone, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

Table 6. Effect of amino acid sources on the coenzyme Q₁₀ activity in medium containing C.S.P.

amino acid sources (0.25%)	pH	DCW (g/l)	Coenzyme Q ₁₀ activity (mg/l)	Relative activity (%)
No addition	7.27	13	120	88
Arginine	7.84	14.3	23	17
Alanine	7.75	6.6	87	64
Glutamic acid	4.96	14.4	0	-
Cysteine	7.30	14.6	74	54
Threonine	7.43	9.0	109	80
Lysine	8.04	17.9	0	-
Tyrosine	7.12	12.2	136	100
Phenylalanine	7.54	13.2	83	61
Tryptophan	7.56	15.7	61	45

Medium : 4% sucrose, 2% CSP, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% Na₂CO₃, 0.003% Na₂MoO₄.

요 약

Coenzyme Q₁₀ 고역가 변이주인 *Agrobacterium tumefaciens* KPU-11-03의 다양한 유기 질소원에 대한 coenzyme Q₁₀ 생산량과 coenzyme Q₁₀의 구성비율 등을 비교한 결과, CSP 첨가 시 coenzyme Q₁₀ 생산량은 212.7 mg/l, 구성비율은 94%로 다른 유기질소원에 비해 매우 높게 나타났다. 특히 Bacto tryptone, Bacto peptone, soybean meal, casamino acid 등의 유기 질소원 첨가 시에는 극히 낮은 coenzyme Q₁₀ 역가를 나타내어 균체내의 coenzyme Q₁₀의 축적은 유기 질소원의 종류 즉 아미노산의 종류 및 량과 상관성이 있음을 추정할 수 있었다. 또한 무기질소원에 대하여 실험한 결과, (NH₄)₂SO₄ 첨가 시에 coenzyme Q₁₀ 역가가 약 2배 증가하였고 다른 무기질소원에 사용 시에는 오히려 감소하였다. Coenzyme Q₁₀ 역가와 관련된 아미노산을 확인하기 위해 유기질소원으로 Bacto tryptone을 첨가한 배지에 9가지의 아미노산을 첨가하여 실험한 결과, 방향족 아미노산인 tyrosine 첨가 시의 coenzyme Q₁₀ 생산량은 99.5 mg/l로 비첨가구보다 약 8.2배 증가하였으나 phenylalanine과 tryptophan 등의 다른 방향족 아미노산의 첨가 시에는 coenzyme Q₁₀ 생산량이 오히려 감소하는 것으로 나타나 tyrosine의 첨가가 coenzyme Q₁₀ 역가에 매우 중요함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀 생물분리기술 연구센터의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 9월 17일, 게재승인 : 2008년 12월 15일

REFERENCES

1. Stoyanovsky, D. A., A. N. Osipov, P. J. Quinn, and V. E. Kagan (1995), Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide, *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 345-351.
2. Sarter, B. (2002), Coenzyme Q10 and cardiovascular disease : a review, *J. Cardiovasc. Nurs.* **16**, 9-20.
3. Ernster, L. and G. Dallner (1995), Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function, *Biochem. Biophys. Acta.* **1271**, 195-204.
4. Lenaz, G. (1998), Quinone specificity of complex I, *Biochem. Biophys. Acta.* **1364**, 207-221.
5. Kawamukai, M. (2002), Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone, *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 511-517.

6. Miksovská, J., M. Schiffer, D. K. Hanson, and P. Sebban (1999), Proton uptake by bacterial reaction centers: The protein complex responds in a similar manner to the reduction of either quinone acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14348-14353.
7. Nohl, H., L. Gille, and A. V. Kozlov (1999), Critical aspects of the antioxidant function of coenzyme Q in biomembranes, *Biofactors* **9**, 155-161.
8. Stocker, R., V. W. Bowry, and B. Frei (1991), Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1646-1650.
9. Jessica, L. B. and J. W. Frost (2001), Microbial synthesis of *p*-hydrobenzoic acid from glucose, *Biotechnol. Bioeng.* **76**, 376-390.
10. Herrmann, K. M. (1995), The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism, *Plant Physiol.* **107**, 7-12.
11. Olson, R. (1965), Anabolism of the coenzyme Q family and their biological activities, *Federation Proc.* **24**, 85-92.
12. Szkopinska, A. (2000), Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization, *Acta. Biochim. Pol.* **47**, 469-480.
13. Chaykin, S., J. Law, A. H. Philips, T. T. Tchen, and K. Bloch (1958), Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 998-1004.
14. Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, and H. Sahm (1993), Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, *Biochem. J.* **295**, 517-524.
15. Takahashi, S., Y. Ogiyama, H. Kusano, H. Shimada, M. Kawamukai, and K. Kadowakii (2006), Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant, *FEBS. Lett.* **580**, 955-956.