

CoQ10 생성 세균의 선별 및 발효조건 최적화

정근일¹ · 강원화¹ · 이정아¹ · 신동하³ · 배경숙² · 박호용^{2,3} · 박희문^{1*}

¹충남대학교 미생물학과, ²한국생명공학연구원, ³주인섹트바이오텍

Optimization of Fermentation Conditions for CoQ10 Production Using Selected Bacterial Strains

Keun-Il Jeong¹, Won-Hwa Kang¹, Jung-Ah Lee¹, Dong-Ha Shin³, Kyung Sook Bae²,
Ho-Young Park^{2,3}, and Hee-Moon Park^{1*}

¹Department of Microbiology and Molecular Biology, College of Biological Sciences and Biotechnology,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

²Biological Resources Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Republic of Korea

³Insect Biotech Co. Ltd, Daejeon 305-811, Republic of Korea

(Received December 8, 2009/Accepted December 16, 2009)

Coenzyme Q10 (CoQ10) is an essential lipid-soluble component of membrane-bound electron transport chains. CoQ10 is involved in several aspects of cellular metabolism and is increasingly being used in therapeutic applications for several diseases. Despite the recent accomplishments in metabolic engineering of *Escherichia coli* for CoQ10 production, the production levels are not yet competitive with those by fermentation or isolation. So we tested several microorganisms obtained from the KCTC of Biological Resource Center to find novel sources of strain-development for CoQ10-production. Then we selected two strains, *Paracoccus denitrificans* (KCTC 2530) and *Asaia siamensis* (KCTC 12914), and tested to optimize the CoQ10 production conditions. Among the carbon sources tested, CoQ10 production was the highest when fructose was supplied about 4% concentration. Yeast extract produced the highest CoQ10 production about 2% concentration. The highest CoQ10 production was obtained at pH 6.0 for *P. denitrificans* and pH 8.0 for *A. siamensis*. And two strains showed the highest CoQ10 production at 30°C, but the highest DCW was obtained at 37°C. In the fed-batch culture, *P. denitrificans* yielded 14.34±0.473 mg and *A. siamensis* yielded 12.53±0.231 mg of final CoQ10 production.

Keywords: *A. siamensis*, bacteria, coenzyme Q10, *P. denitrificans*

Coenzyme Q10 (CoQ10)은 보통 ‘도처에 널리 퍼져있다’는 뜻의 라틴어 “ubiquitous”에서 유래되어 “유비퀴논(ubiquinone)”이라 불리며 ubi-decarenone, ubi-quinone, ubi-decaprenone, ubi-quinone10 등의 다양한 명칭으로도 불린다. 또한 CoQ10은 비타민과 같은 기능을 하지만 비타민의 정의인 “미량의 영양소로 생체 내에서 생합성 되지 않는 것”에는 해당되지 않아 “비타민 유사 작용인자”라고 불리기도 한다. 이러한 이유로 CoQ10은 “비타민 Q”라는 별명을 가지고 있기도 하다. CoQ10은 황색 또는 오렌지색의 결정성 쿼논 화합물로 냄새나 맛은 없고, 지용성 비타민 E나 K와 비슷한 화학구조를 가진 지용성 물질로 녹는점은 약 50°C이며, 물에 거의 녹지 않는다(3).

CoQ에는 Q6-Q10 등이 있으며, 동물, 식물 등에 존재하는데, 사람의 경우 대부분이 CoQ10을 갖는다. 기본구조는 quinone

head group과 소수성의 isoprenoid tail이 공통으로 존재하며, CoQ10의 숫자 ‘10’은 isoprene 단위의 개수를 의미한다(3, 5). CoQ10은 진핵세포의 미토콘드리아 내막과 원핵세포의 원형질막에 주로 존재하며(6), quinone head group이 산화형(ubiquinone)과 환원형(ubiquinol)으로 가역적으로 변환되며 전자전달자(electron carrier)의 역할을 한다(10). 이러한 특성 때문에 자유라디칼에 의해 유도되는 산화적 충격으로부터 인지질이나 리포단백질 및 DNA를 보호하기도 하며(8), 세포 내에서 ATP의 증가 혹은 비축작용과 같은 에너지 합성에 중요한 기능을 담당한다. 또한 인체 세포와 조직의 항산화 기능을 강화시키며, 조직에 산소공급을 촉진함으로써 심혈관계질환 개선, 항암 작용, 노화 지연 효과 등을 나타내기 때문에 의학 및 산업적 유용성이 매우 높은 물질로 알려져 있다(1, 4, 13).

CoQ10은 생체 내 조직을 구성하는 모든 세포의 소포체 내에서 합성되고, 에너지를 많이 필요로 하는 심장, 간, 신장, 췌

* For correspondence. E-mail: hmpark@cnu.ac.kr; Tel: +82-42-821-6417; Fax: +82-42-822-7367

장 등의 기관에 상대적으로 높은 농도로 존재하여(12), 생체막과 세포질에 상주하는 리포단백질의 lipid peroxidation을 예방하는 기능을 가지고 있다(11). 특히 심장에 다량 함유되어 있는 CoQ10은 심근의 기능을 돕는 작용, 부정맥을 예방하고 협심증 발작의 빈도를 저하시키는 작용을 하므로 CoQ10이 결핍되면 심장에 나쁜 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 이외에 CoQ10의 결핍은 뇌, 신장, 폐, 췌장, 치주 조직 및 면역계 등의 기관에도 악영향을 미치기 때문에(4), 심혈관질환, 당뇨, 유방암, 면역성질환 및 알츠하이머증 등과 같은 질환의 병증 완화제로 사용되기도 한다(2). 육류, 생선 등 음식을 통해서도 소량의 CoQ10 (서구식 식사를 통해 하루 평균 3-5 mg)을 섭취할 수 있지만 대부분 체내에서 합성된다(2). 그러나 인간 체내의 CoQ10 생산량은 20세 때 최고치를 보이다 나이가 들면서 점차 감소하여, 40대에 이르면 생산량이 20대보다 30% 이상 떨어진다. 또한, 심장병, 파킨슨병, 암, 당뇨병 등 만성 질환에 걸린 경우에도 체내에서 이 성분의 합성이 감소하는 것으로 알려져 있다(7).

화학합성된 CoQ10은 starting materials이 생물에 의해 합성된 것과 달리 인간질환 치료제 및 건강보조제용 CoQ10은 생물체에서 유래된 것이 선호되므로, 광합성 세균이나 효모류로부터 CoQ10을 얻으려는 시도가 많이 이루어지고 있다(2). 지금까지 보고된 바에 의하면, *Agrobacterium tumefaciens*와 *Rhodobacter sphaeroides*, 또는 *Paracoccus denitrificans* 등의 세균이 CoQ10 생산량이 많은 균주로 알려져 있다(1, 2, 12). 또한, 미생물을 이용한 CoQ10 생산시, 일반적으로 이 세균주에 chemical mutagen을 처리하여 고생산능 균주를 개발하거나(12), 대장균이나 효모 등에 CoQ10 생산균의 유전자를 발현시킨 재조합균주를 개발하는 연구가 진행되고 있으나(5, 9, 13) 아직 경제성 있는 충분한 양의 CoQ10을 얻지 못하고 있는 실정이다(9). 따라서, CoQ10 생성능이 있는 새로운 미생물의 발굴은 돌연변이 유발에 의한 생산균주개발 및 재조합균주 개발용 유전자원으로도 활용될 수 있다.

본 연구는 미생물 동정을 위한 quinone 분석 결과, CoQ10을 함유하는 것으로 동정된 미생물 중 지금까지 CoQ10 생산균주로 사용된 예가 없는 사상균, 효모 및 세균류 8종을 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)로부터 분양 받아, 균체 생성률을 비롯한 배양 특성과 CoQ10 생산율을 1차 비교·분석하여, 상대적으로 CoQ10의 대량생산에 유리한 배양특성을 갖는 균주로 세균류인 *P. denitrificans* KCTC 2530과 *A. siamensis* KCTC 12914를 선별하였다. 이들 균주를 다양한 조건에서 플라스크로 배양하고 CoQ10 생산량을 측정하여 최적 배양조건을 확립하고, 이를 바탕으로 Fed-batch culture를 수행하여 생산량 등을 분석함으로써 새로운 CoQ10 생산용 균주개발용 유전자원을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

CoQ10을 quinone으로 갖는 미생물로 세균류인 *P. denitri-*

ficans KCTC 2530, *A. siamensis* KCTC 12914, 효모류인 *Buller globispora* KCTC 17304, *Dioszegia hungarica* KCTC 7206, 사상균류인 *Petromyces alliaceus* KCTC 6612를 사용하였다. 예비실험용 배지로 세균류는 LB 배지를 효모류 및 사상균류는 YPD (Yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, Glucose 2%)를 사용하였다. 1차 선별된 세균류의 최적 탄소원과 질소원을 알아보기 위해 각각의 탄소원과 질소원을 넣은 100 ml의 M81 배지(Table 1)에 5 ml의 LB 배지에서 12시간 키운 세균을 초기 OD₆₀₀=0.1로 접종한 뒤, 37°C, 180 rpm에서 배양하였다. 배양시간은 합성된 CoQ10양이 가장 시기인 정제기에 들어가는 11시간으로 정하였다.

탄소원의 종류와 농도 및 질소원을 선정한 후, 다른 최적배양조건을 알아보기 위하여, 온도는 25°C, 30°C, 32°C, 37°C로 변화를 주었으며, 배지의 pH는 pH 6.0, 6.8, 7.0 8.0으로 변화를 주면서, 초기 OD₆₀₀=0.1로 접종한 뒤, 정제기에 들어가는 11시간 동안 배양하였다.

Coenzyme Q10의 추출

세포막에 붙어있는 소수성 성분인 CoQ10을 분리하기 위해 세포를 파쇄한 후 휘발성 유기용매에 녹여 분리하였다(2). 100 ml의 배지에 초기 OD₆₀₀=0.1로 접종한 세포를 각 조건 별로 키운 후, 15분간 원심분리하여[한일과학사 제조 원심분리기 (Combi-514R)의 S500 4B rotor] 세포를 수득하였다. 수득한 세포에 glass-bead, *n*-hexane을 세포와 동일 부피로 넣어 준 후, 5000 rpm, 1분씩 총 10회 bead beater를 처리하여 세포를 파쇄 하였다. 파쇄 후 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여, 상등액만 eppendorf tube에 옮겼다. 상등액을 옮기고 남은 세포 파쇄물에 *n*-Hexane을 500 µl 넣은 후 5,000 rpm, 1분간 총 3회 bead beater를 다시 처리하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액을 eppendorf tube에 옮겼다. Eppendorf tube에 모은 상등액을 각각 speed vac으로 말린 후, 건조된 시료를 충분한 양의 *n*-hexane에 녹여 하나의 tube에 모아 100 µl로 농축시켰다.

Fed-batch culture

Flask culture를 통해 CoQ10 합성에 필요한 최적배양조건을

Table 1. Composition M81 medium^a

| Minimal medium | | Trace element solution (SL-6) | |
|---|--------|---|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 2.30 g | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.10 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 2.90 g | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.03 g |
| NH ₄ Cl | 1.00 g | H ₃ BO ₃ | 0.30 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.50 g | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.20 g |
| NaHCO ₃ | 0.50 g | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0.01 g |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.01 g | NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0.02 g |
| Fe(NH ₄) citrate | 0.05 g | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.03 g |
| Trace element solution (SL-6) | 5 ml | DW | 1000 ml |
| DW | 980 ml | | |
| Agar (when required) | 15.0 g | | |

^a Source: www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm000065.html

조사한 후, 이를 근거로 fed-batch culture를 수행하였다. Fructose 4%, yeast extract 2%인 M81 배지 2 L에 두 균주를 초기 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 접종한 후 pH 6.0과 8.0, 30°C, 2 vvm, rotor speed 180 조건에서 fed-batch를 수행하여, 배지 내 탄소원의 양과 세균의 성장양상, pH의 변화를 1시간 마다 측정하였다. 배지 내 남아있는 탄소원의 양을 알아보기 위하여 Fructose Assay kit (Sigma®, USA)을 사용하였으며, 탄소원이 고갈된 시점에 40% fructose 용액 200 ml을 첨가하였다.

HPLC를 이용한 CoQ10 정량

세포로부터 분리한 CoQ10을 정량하기 위해 YMC-pack ODS-AM (5 µm, 4.6 mm×250 mm) C18 column (Agilent Technologies, USA)을 사용하여 HPLC를 수행하였다. HPLC 이동상은 methanol과 ethanol을 13:7의 비율로 섞어 사용하였다(2, 11). Speed vac으로 용매를 모두 건조시킨 시료에 n-hexane 400 µl를 넣고 2분간 vortexing한 후, 다시 HPLC 이동상 600 µl를 넣고 vortexing하여, 총 부피가 1 ml이 되게 하였다. 이 혼합액을 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 상등액 100 µl를 취하여 새 eppendorf tube에 옮겼다. 여기에 HPLC 이동상 900 µl를 넣고 충분히 교반하여 10배로 희석함과 동시에 최종 부피가 1 ml이 되게 하였다. 이 용액을 2 µm의 nylon filter를 이용하여 여과한 후 20 µl를 주입하고 1.0 ml/min 속도로 HPLC를 수행하여 275 nm에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

CoQ10 생산용 미생물의 1차 선별

실험에 사용한 세 종류의 미생물군(세균, 효모, 및 사상균)의 성장양상, 균체생성량 및 CoQ10 생성량 등을 비교해 보았다. 실험 결과 세균과 효모는 각각 비슷한 시간대에서 대수기에 들어갔으며, 세균류는 LB 배지에서 14.5시간, M81 배지에서 11시간, 효모류는 YPD 배지에서 24시간, 진균류는 72시간에 정체가 들어갔다(자료 미제시). 한편, 전반적으로 균체생성량은 효모류가 세균류보다 많았지만 CoQ10 생합성능은 세균에 비해 훨씬 낮았다. 물론 효모류(*B. globispora*)의 경우 균체생성량이 많아 생합성된 총 CoQ10의 양은 비슷할 것으로 보이나, 효모류 배양용 배지의 특성상 배양 중 거품이 과다하게 발생하는 단점이 있어, 발효조를 이용한 대량배양에는 빠른 속도로 자라는 세균류가 유리하다고 판단되었다. 한편, LB 대신 탄소원으로 2% glucose를 첨가한 M81 배지를 사용한 경우 성장속도와 균체생성량이 두 배 가량 증가하였으며(Fig. 1), *P. denitrificans*와는 달리 *A. siamensis*는 CoQ10 생산용 균주로 사용된 전례가 없어 이들 두 균주를 대상으로 CoQ10 생성을 위한 최적배양조건을 조사하기로 하였다.

탄소원 종류 및 농도에 따른 CoQ10 생성량

기존의 LB 배지와 달리 M81 배지에서 세균을 배양하였을 때 세포양 및 생장이 빠른 것을 관찰하여(Fig. 1), 배양배지는 M81로 선정하였다. 균체생장 및 CoQ10 생산에 미치는 탄소

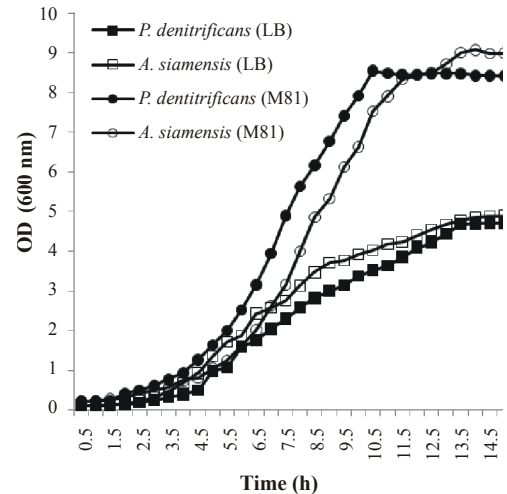


Fig. 1. Effect of culture medium and culture time on cell growth and CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of medium to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at 37°C, 180 rpm. Cells were grown in on M81 (minimal medium) or LB (rich medium).

원의 영향을 알아보기 위해 glucose와 fructose, sucrose를 각각 2% 넣은 M81 배지에, *P. denitrificans*와 *A. siamensis*를 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 접종하여 37°C, 180 rpm 조건에서 정체가 들어가는 시간(11시간)까지 교반기로 배양하여 생합성되는 CoQ10의 양을 HPLC로 분석·정량하였다. HPLC 결과 sucrose를 탄소원으로 사용하였을 때, 가장 많은 CoQ10이 합성되는 것을 알 수 있었지만(Fig. 2A), 후에 탄소원의 농도를 변화시켜 주었을 때와 탄소원 농도 결정 후 질소원을 첨가했을 때 fructose와 sucrose를 비교해 보면 fructose를 넣은 배지에서 가장 많은 CoQ10이 생합성되었던 점을 고려하여(자료 미제시) fructose로 실험을 진행하였다. 배지 내 fructose의 농도를 1%, 2%, 4%, 6%로 변화시켜 배양한 세포를 HPLC로 분석해 보면 *P. denitrificans*와 *A. siamensis* 모두 4% fructose에서 가장 많은 CoQ10이 생성되었고(Fig. 2B), 6% 이상에선 자라지 못하였다. 따라서 최적 탄소원으로는 fructose, 최적 탄소원 농도는 4%로 결정하였다.

질소원 및 탄소원/질소원 비율에 따른 CoQ10 생성량

Fructose 4%를 넣은 M81 배지에 yeast extract, casamino acid, tryptone, peptone, malt extract를 각각 2% 넣어 37°C, 180 rpm에서 11시간 교반기로 배양하여 생합성 되는 CoQ10을 분석하였다. 분석 결과 질소원의 종류에 따라 세포 중량 당 CoQ10의 생성량은 큰 차이를 보이지 아니하였으나, 총 세포 생성량 및 배지 당에서 생합성된 CoQ10양은 yeast extract를 사용한 배지에서 가장 많았다(Fig. 3A), yeast extract를 최적 질소원으로 결정하였다. Fructose 4%에 yeast extract를 각기 다른 비율로 첨가한 M81 배지에 37°C, 180 rpm에서 11시간 세균들을 배양한 후 HPLC로 CoQ10 생합성량을 분석해 본 결과, *P. denitrificans*와 *A. siamensis* 모두 탄소원과 질소원의 비율이 2 : 1일 때 가장 높은 생성률을 보였다(Fig. 3B).

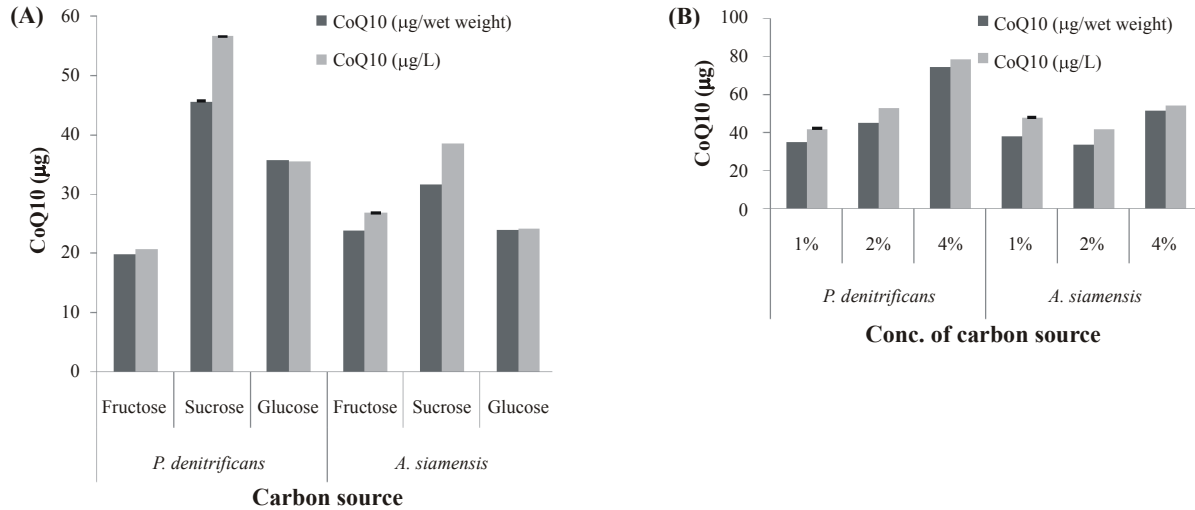


Fig. 2. Effect of carbon source and concentration on CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of M81 medium to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at 37°C, pH 6.8, 180 rpm. (A) Effect of carbon sources on CoQ10 production. (B) Effect of the concentration of carbon source on CoQ10 production.

배양온도에 따른 CoQ10 생성량

한국생물자원센터(KCTC)의 DB에서 확인한 두 세균의 성장온도인 30°C 외에 더 정확한 성장온도를 확인하기 위해 fructose 4%, yeast extract 2%를 넣은 M81 배지에 두 균주를 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 접종하여 25°C, 30°C, 32°C, 37°C로 온도를 변화시켜 180 rpm에서 배양하였다. 두 세균 모두 25°C 이하에서 생장이 급격히 저하되는 것을 확인하였으며, 30°C보다 37°C에서 배양했을 때, 더 많은 양의 균체가 생성됨을 확인하였다(Fig. 4). 30°C에서 배양한 경우 37°C에서 배양한 경우보다 균체량은 적지만, 단위 무게 당 CoQ10 양과 동일 용량의 배지에서 CoQ10이 생합성되는 양이 37°C에서 배양했을 때 보다 더 많은 것으로 관찰되어(Fig. 4), 최적 온도는 30°C로 결정하였다.

배지 산성도에 따른 CoQ10 생성량

세균의 성장과 CoQ10의 생성에 미치는 배지 pH의 영향을 조사하기 위하여 fructose 4%, yeast extract 2%를 넣은 M81 배지를 pH가 다르게(pH 6.0, 6.8, 7, 8) 제조하였다. 두 균주를 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 접종한 후 30°C, 180 rpm에서 배양하여 CoQ10의 생성량을 조사하여 보았다. 그 결과 배지의 pH에 따른 생성량의 변화가 현저하지는 않았으나, *P. denitrificans*은 pH 6.0, *A. siamensis*는 pH 8.0에서 가장 높은 생성량을 보였다(Fig. 5).

교반속도에 따른 CoQ10 생성량

*P. denitrificans*과 *A. siamensis* 모두 호기성 세균이므로 산소의 농도에 따라 생장이 차이가 나는지 확인하기 위하여 교반

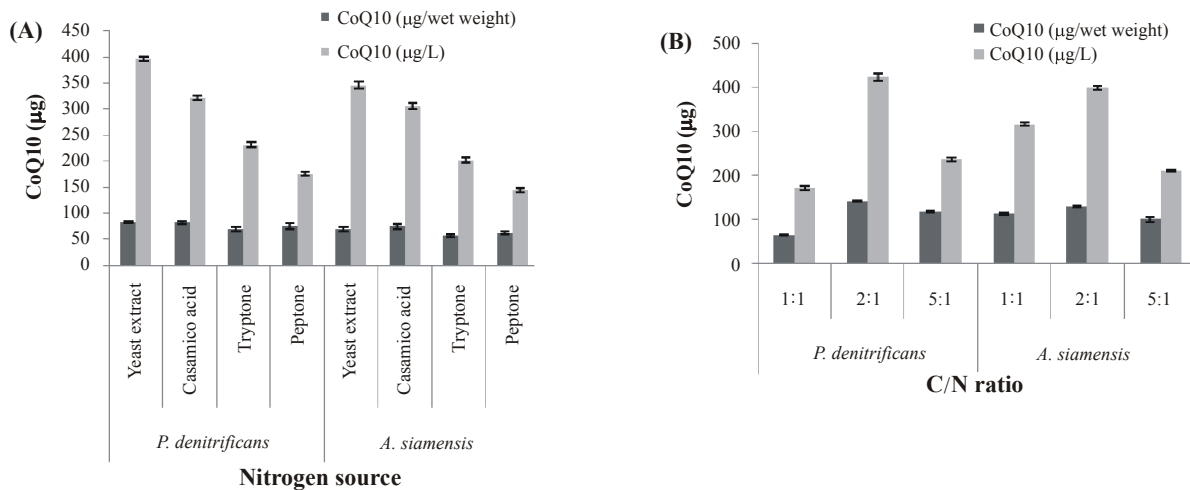


Fig. 3. Effect of nitrogen source and C/N ratio on CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of M81 medium supplement with fructose (4% in final) to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at 37°C, pH 6.8, 180 rpm, for 11 h. (A) Effect of nitrogen sources on CoQ10 production. (B) Effect of C/N ratio on CoQ10 production.

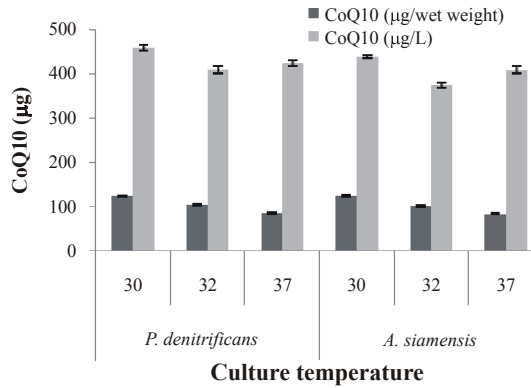


Fig. 4. Effect of culture temperature on CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of M81 medium supplement with fructose (4% in final) and yeast extract (2% in final) to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at pH 6.8, 180 rpm, for 11h.

속도를 달리하여 배양하여 보았다. Fructose 4%, yeast extract 2%를 넣은 M81 배지에 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 집중하여 30°C, pH 6.0(혹은 8.0)에서 각 11시간 배양 후, HPLC를 이용하여 CoQ10 양을 분석하였다. 두 세균 모두 단위 균체량 당 CoQ10 생성량은 120 rpm에서 가장 높았지만, 동일 용량의 배지에서 CoQ10이 생합성 되는 양은 *P. denitrificans*의 경우 거의 차이가 없었다. 하지만 *A. siamensis*의 경우 120 rpm에서 가장 많이 생합성 되었다(Fig. 6). 따라서 두 균주 모두 과량의 산소보다 다소 적은 양의 산소가 존재할 때, CoQ10이 더 많이 생성되는 것으로 판단되었다.

Fed-batch culture에 의한 균체 및 CoQ10 생산량

Fructose 4%, yeast extract 2%가 첨가된 M81배지에 각 세균을 초기 OD₆₀₀값이 0.1이 되게 집중한 후 *P. denitrificans*은 pH 6.0, *A. siamensis*는 pH 8.0, 30°C, 2 vvm, rotor speed 180 조건에서 fed-batch를 수행하여, 배지 내 탄소원의 양과 세균의 성장양상, pH의 변화를 30분 단위로 측정된 결과 flask culture와 달리 더 빠른 시간인 2시간 30분 만에 대수기에 들

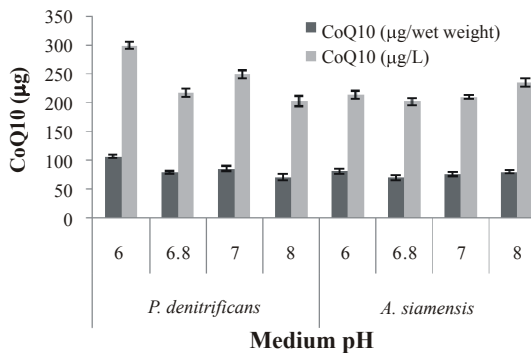


Fig. 5. Effect medium pH on CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of M81 medium supplement with fructose (4% in final) and yeast extract (2% in final) to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at 30°C, 180 rpm, for 11 h.

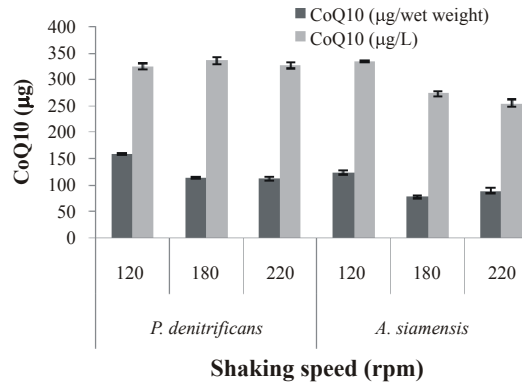


Fig. 6. Effect of shaking speed on CoQ10 production. For flask culture, 5 ml of the culture broth was transferred to a 500 ml baffled flask containing 100 ml of M81 medium supplement with fructose (4% in final) and yeast extract (2% in final) to give ca. OD₆₀₀=0.1 and incubated at 30°C, pH 6.0 (*P. denitrificans*) or pH 8.0 (*A. siamensis*), for 11 h.

어가는 것을 확인하였다(Fig. 7). *A. siamensis*는 배양 시작 후 7시간 30분 만에 배지 내 모든 탄소원이 고갈되는 것을 확인 하였으며(Fig. 7), 탄소원이 고갈되었을 때 80 g의 fructose를 200 ml의 증류수에 녹여 반복·공급하였는데, 또 다시 10시간, 13시간 반에 탄소원이 고갈되었으며, 배양 시작 후 17시간이 지나면 탄소원은 점진적으로 고갈이 되어도 균체 및 OD₆₀₀은 변하지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 7). 같은 방법으로 *P. denitrificans*도 실험하여(자료 미제시), 최종적으로 배지 1 L 당 *P. denitrificans*는 14.34±0.473 mg을, *A. siamensis*는 12.53±0.231 mg의 CoQ10이 생합성 되는 것을 알 수 있었다.

P. denitrificans KCTC 2530 균주가 실제 산업용 생산균주인 *P. denitrificans* ATCC 19367과 비교하여 어느 정도 수준의 CoQ10 생성량을 보이는지 객관적으로 판단할 자료는 없으나, 본 실험에서 함께 사용한 *P. denitrificans* KCTC 2530의

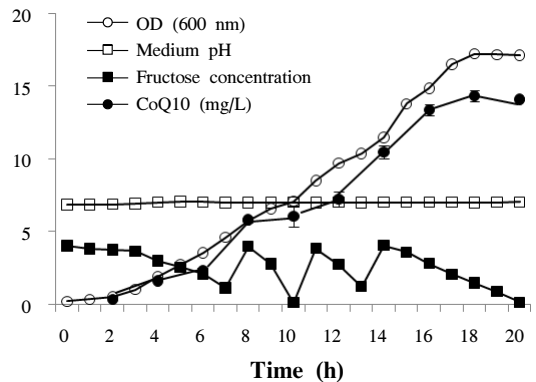


Fig. 7. Coenzyme Q10 production by batch or fed-batch culture. For batch or fed-batch culture, 100 ml of the culture broth, which was obtained from the 500 ml baffled flask after 12 h cultivation, was transferred to a 5 L jar fermenter containing a working volume of 2 L M81 medium containing with fructose (4%) and yeast extract (2%). Temperature, agitation speed, and pH during the culture were 30°C, 200 rpm, and pH 8.0, respectively. When the fructose in the culture broth was depleted, the feeding solution of 200 ml was added intermittently three times.

CoQ10 생성량(14.34 mg/L)의 87%에 수준(12.53 mg/L)에 달하는 것으로 분석되었다. 따라서, 본 실험에서 사용한 *A. siamensis* KCTC 12914는 CoQ10 생산용 균주로 특허 등록되거나 생산용으로 사용된 예가 없는 균주이므로, CoQ10 생산용 균주개발을 위한 모균주 또는 재조합생산균주 개발을 위한 유전자원으로 사용할 수 있는 것으로 판단된다.

적요

Coenzyme Q10 (CoQ10)은 전자전달계에 필수적인 요소로 질병치료 및 완화에 도움이 되어 산업·의학적으로 그 활용도가 넓어지고 있다. 본 연구에서는 새로운 CoQ10 생산균주를 선별하기 위하여 quinone 분석 결과 CoQ10을 함유하는 것으로 확인된 8종 미생물의 성장특성과 CoQ10 생산능을 1차 조사하여, 세균류인 *Paracoccus denitrificans* KCTC 2530과 *Asaia siamensis* KCTC 12914를 대량배양을 통한 CoQ10 생산에 유리한 특성을 갖는 균주로 선별하였다. 이들 세균류의 성장 및 CoQ10 생산의 최적조건을 플라스크배양으로 조사한 결과, M81 배지를 기반으로 하여 탄소원으로는 4% fructose, 질소원으로는 2% yeast extract가 가장 좋은 것으로 조사되었으며, 배양온도는 30°C, 배지의 최적 pH는 *P. denitrificans* KCTC 2530의 경우 pH 6.0, *A. siamensis* KCTC 12914의 경우 pH 8.0으로 조사되었다. 이를 바탕으로 2 L fed-batch culture를 수행한 결과, *P. denitrificans* KCTC 2530은 1 L 당 14.34±0.473 mg, *A. siamensis* KCTC 12914는 12.53±0.231 mg의 CoQ10을 생산하였다.

감사의 말

본 연구는 ‘충남대학교 대덕밸리바이오산업인력양성사업’의 ‘산업체 요구과제 연구개발비’의 지원을 받아 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Choi, J.H., Y.W. Ryu, and J.H. Seo. 2005. Biotechnological production and applications of Coenzyme Q10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 9-15.
2. Ha, S.J., S.Y. Kim, J.H. Seo, H.J. Moon, K.M. Lee, and J.K. Lee.

2007. Controlling the sucrose concentration increases Coenzyme Q10 production in fed-batch culture of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 109-116.
3. Krishna, H.B., N. Madhuri, J.A. Kim, B.K. Yoo, J.S. Woo, and C.S. Yong. 2007. Preparation, characterization and evaluation of Coenzyme Q10 binary solid dispersions for enhanced solubility and dissolution. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1171-1176.
4. Modi, K., D.D. Santani, R.K. Goyal, and P.A. Bhatt. 2006. Effect of coenzyme Q10 on catalase activity and other antioxidant parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 109, 25-34.
5. Park, Y.C., S.J. Kim, J.H. Choi, W.H. Lee, K.M. Park, M. Kawamukai, Y.W. Ryu, and J.H. Seo. 2005. Batch and fed-batch production of coenzyme Q10 in recombinant *E. coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 192-196.
6. Saiki, R., A. Nagata, N. Uchida, T. Kainou, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 2003. Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure. *Eur. J. Biochem.* 270, 4113-4121.
7. Singh, R.B., G.S. Wander, A. Rastogi, P.K. Shukla, A. Mittal, J.P. Sharma, S.K. Mehrotra, R. Kapoor, and R.K. Chopra. 1998. Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in patients with acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 12, 347-353.
8. Szkopińska, A. 2000. Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim. Pol.* 47, 469-480.
9. Takahashi, S., T. Nishino, and T. Koyama. 2003. Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for production of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 16, 183-190.
10. Tang, P.H., M.V. Miles, L. Miles, J. Quinlan, B. Wong, A. Wenisch, and K. Bove. 2004. Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q9 and coenzyme Q10 levels in mouse tissues by HPLC with coulometric detection. *Clin. Chim. Acta* 341, 173-184.
11. Tang, P.H., M.V. Miles, P. Steele, B.S. Davidson, S.R. Geraghty, and A.L. Morrow. 2006. Determination of coenzyme Q10 in human breast milk by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 20, 1336-1343.
12. Yoshida, H., Y. Katani, K. Ochiai, and K. Araki. 1998. Production of ubiquinone-10 using bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 19-26.
13. Zhang, D., B. Shrestha, W. Niu, P. Tian, and T. Tan. 2007. Phenotypes and fed-batch fermentation of ubiquinone-overproducing fission yeast using *ppt1* gene. *J. Biotechnol.* 128, 120-131.