



# Optimization of bioactive isorhamnetin 3-*O*-glucoside production in *Escherichia coli*

Bong-Gyu Kim<sup>1</sup>

## 대장균에서 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생합성 최적화

김봉규<sup>1</sup>

Received: 7 October 2019 / Accepted: 21 October 2019 / Published Online: 31 December 2019  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

**Abstract** Isorhamnetin 3-*O*-glucoside, a member of the flavonol group, has been reported to be effective for inflammatory and ulcer, as well as to alleviate diabetic complications such as neuropathy, nephropathy and retinopathy. Isorhamnetin 3-*O*-glucoside has been extracted from several plants. Biotransformation is a valuable tool, which is used to produce value-added chemicals with inexpensive compounds. To synthesis isorhamnetin 3-*O*-glucoside from quercetin, two genes (*PGT E82L* and *ROMT-9*) were introduced into *Escherichia coli*, respectively. In order to synthesis isorhamnetin 3-*O*-glucoside from quercetin, a co-culture fermentation system was developed by optimizing the medium and temperature for biotransformation, the cell mix ratio, Isopropyl-β-D-thiogalactoside induction time, and quercetin feed concentration. Finally, isorhamnetin 3-*O*-glucoside was biosynthesized up to 181.2 mg/L under the optimized biotransformation condition, which was higher 4.7 times than previously reported (39.6 mg/L).

**Keywords** Biotransformation · Co-culture · Flavonoids · *O*-Methyltransferase · UDP-glycosyltransferase

Bong-Gyu Kim (✉)  
E-mail: dkimbk@gntech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Forest Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Jinju 52725, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

플라보노이드는 C6-C3-C6 기본골격을 가진 화합물을 통칭하는 파이토케미컬로서 페닐프로파노이드 생합성경로를 통해서 합성된다[1]. 나린제닌은 다양한 플라보노이드 합성의 전구체로 사용되는 물질로 *p*-coumaroyl-CoA 한분자와 malonyl-CoA 세분자가 chalcone synthase와 chalcone isomerase의 연속적인 반응으로 합성된다[2]. 플라보노이드는 C링의 이중결합, 산화, 수산화기의 차이, B링과 C링의 연결 위치의 차이에 따라 flavones, flavanones, flavanols, flavan-3-ols, isoflavones, anthocyanidins 등과 같이 6개의 그룹으로 분류한다[3]. 플라보노이드는 6가지 기본골격을 바탕으로 methylation, hydroxylation, prenylation, glycosylation 등을 통하여 다양한 유도체들로 합성되며, 지금까지 약 9,000여 종 이상이 자연계에서 발견된다[4]. 이들 중 glycosylation과 methylation은 플라보노이드 구조변형에 많은 역할을 담당하고 있다[5,6].

플라보노이드는 식물 뿐만 아니라 동물에도 다양한 생리학적 역할을 한다. 플라보노이드는 병원성 곰팡이나 박테리아의 공격으로부터 식물을 보호할 뿐만 아니라 자외선과 같은 비생물학적 요소에 대한 저항성에도 관여한다[7]. 또한, 식물 광합성에 있어 전자전달 및 식물호르몬의 이동에도 영향을 미친다. 사람에게 있어 플라보노이드는 폐암, 류마티스관절염, 항바이러스, 심장병, 당뇨병, 뇌졸중, 천식, 백내장 등과 같은 다양한 질환에 효과를 보인다[8]. 일반적으로 사람이 섭취하는 플라보노이드 대부분은 야채와 과일 등으로부터 공급하지만, 때로는 커피, 와인, 녹차 등과 같이 식물로부터 추출을 통해 섭취하기도 한다[9]. 플라보노이드는 알칼로이드나 테페노이드 등과 달리 약한 독성을 보이기 때문에 이를 이용한 화장품 및 식·의약 소재를 개발하기 위한 다양한 연구들이 이루어지고 있다[9-12]. 하지만, 이들 물질의 공급은 대부분 식물로부터 직접 추출하거나 화학적 합성법으로 이루어졌다. 플라보노이드의 화학적 합성법은 축

매제로 독성물질이 사용되고, 합성과정과 분리정제과정이 복잡한 어려운 면을 가지고 있다[13]. 현재, 플라보노이드의 대부분은 식물에서 추출하여 사용하고 있다. 하지만, 식물에 존재하는 플라보노이드의 함량이 낮고 복잡한 분리·정제과정을 필요로 하며, 식물을 재배하기 위한 공간적 시간적 제약이 따르는 어려운 점이 있다[14,15]. 따라서, 플라보노이드의 다양한 생리활성에도 불구하고 이들의 안정적인 공급에는 많은 어려움을 가지고 있다. 최근 이러한 문제를 극복하기 위해 식물세포 뿐만 아니라 효모, 바실러스, 스트렙토마이세스, 대장균 등과 같은 미생물을 이용한 플라보노이드의 대체생산법 등이 개발되고 있다. 특히, 대장균은 배양과 형질전환이 쉬울 뿐만 아니라 대장균 내의 생합성과정이 잘 알려져 있고 대사 조절이 가능하기 때문에 플라보노이드 생산 균주로 많이 이용한다[16-18].

Isorhamnetin 3-O-glucoside는 flavonol 그룹에 속하는 화합물로 항염, 항궤양 효과 및 aldose reductase 저해제로 작용하여 신경장해, 신장병증, 망막증과 같은 당뇨병병증의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[19,20]. 다양한 생리적 활성에도 불구하고 isorhamnetin 3-O-glucoside는 *Tetraena aegyptia*, *Salsola oppositifolia*, *Salicornia herbacea*, *Sambucus ebulus*와 같은 식물로부터 추출하여 사용하기 때문에 이물질의 안정적으로 공급하기 어려운 면이 있다[19,20]. 따라서, isorhamnetin 3-O-glucoside를 안정적으로 공급할 수 있는 대체생산법이 개발 필요하며, 이를 바탕으로 isorhamnetin 3-O-glucoside의 또 다른 생리활성을 탐색하는 데 사용 가능할 것이다.

본 연구에서는 *Populus deltoides*에서 분리한 flavonol UDP-glycosyltransferase (PGT-3)의 82번 아미노산을 glutamate에서 Leucine으로 치환한 돌연변이체(PGT-3 Glu82Leu)와 벼에서 분리한 O-methyltransferase-9 (ROMT-9)을 대장균에 도입하여 quercetin 으로부터 isorhamnetin 3-O-glucoside를 생산하는 방법을 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 대장균 균주, 벡터 및 배양 배지

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  균주는 유전자 클로닝 및 플라스미드를 증폭에 사용하였다. *E. coli* BL21 (DE3) 균주는 isorhamnetin 3-O-glucoside 생산을 위한 생물전환 호스트로 사용하였다. pGEX 5X-3 벡터는 PGT-3 E82L 또는 ROMT-9 클로닝에 사용하였다. Andw's Magic Media (AAM) [21]와 Difco사의 LB, M9, YPD, TB배지는 대장균 배양 및 생물전환용 배지로 사용하였다. 배지내 탄소원은 다른 언급이 없으면 글리세롤을 20 g/L의 농도로 첨가하였다. Quercetin은 sigma사로부터, isorhamnetin, isorhamnetin 3-O-glucoside는 INDOFINE사로부터 구매하였다.

### 생물전환

PGT-3 E82L 또는 ROMT-9를 담고 있는 각각의 대장균 단일클로니를 ampicillin (100  $\mu$ g/L)을 담고 있는 2 mL LB액체 배지에 접종하여 37°C 배양기에서 200 rpm의 조건으로 밤새도록 배양하였다. 다음날 각각 250 mL 플라스크에 ampicillin (100  $\mu$ g/L)이 첨가된 25 mL의 새로운 LB에 전날 배양액 250  $\mu$ L를 접종하여 37°C 인큐베이터에서 배양하였으며, 세포 밀도가

OD600 nm에서 0.6이 되었을 때 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)의 최종농도가 0.1 mM이 되게 첨가하였다. 그 후 플라스크를 25°C 인큐베이터로 옮겨 24시간 동안 재조합 단백질을 유도하였다. 각각의 대장균 세포는 원심분리를 이용하여 회수하고 10 mL AAM 배지로 간단히 씻고, ampicillin (100  $\mu$ g/L), 0.1 mM IPTG, quercetin 200 M을 첨가한 AAM배지 25 mL에 각각의 세포 밀도가 2.0이 되게 현탁 하여 30°C에서 생물전환을 하였다. 반응물은 배양 12시간 후 배양액 500  $\mu$ L를 회수하여 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 2회 반복 추출하여 진공 건조기로 완전히 건조하였다. 건조한 반응 산물은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 Varian high performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용하였다.

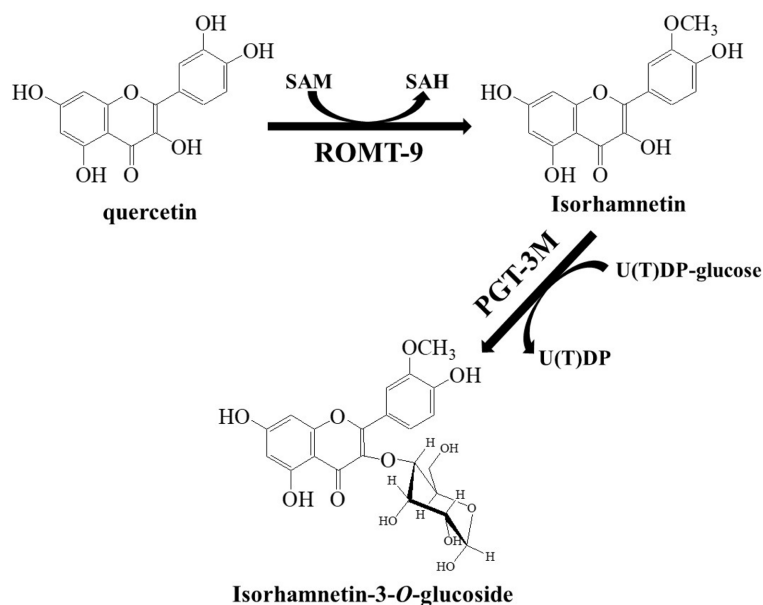
### HPLC분석

생물전환으로 얻은 반응물은 분석은 HPLC 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하였다. 반응물의 분리와 검출은 Polaris 5 C18-A column (250 mm $\times$ 4.6 mm, Agilent Technologies)과 photodiode array를 이용하였다. HPLC 분석은 A버퍼(0.1% formic acid가 첨가된 3차 증류수)와, B버퍼(0.1% formic acid가 첨가된 acetonitrile)를 사용하였다. HPLC분석프로그램은 0분에 20% B버퍼, 8분에 45% B버퍼, 15분에 70% B버퍼, 17분에 20분까지 90% B버퍼, 20.1분에 12 B버퍼, 25분에 20% B버퍼의 조건을 이용하였다.

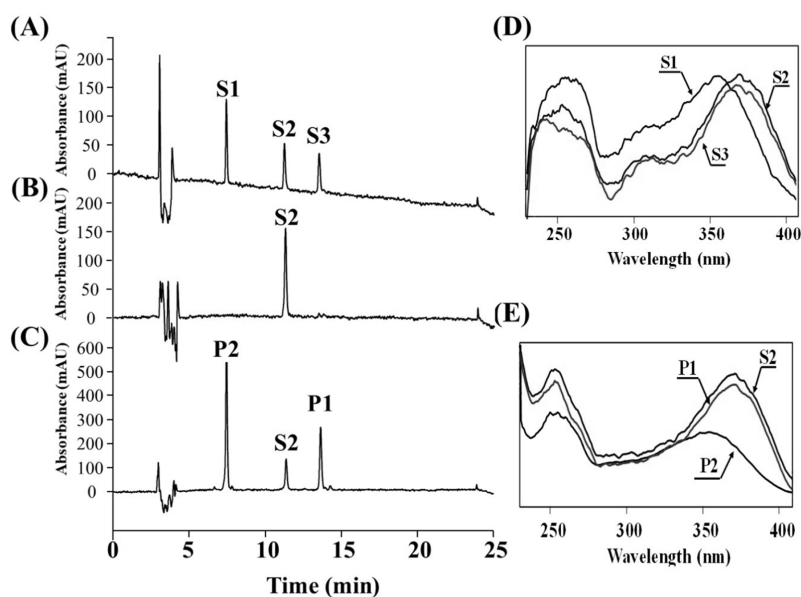
## 결과 및 고찰

### Quercetin으로부터 isorhamnetin 3-O-glucoside생합성

Isorhamnetin 3-O-glucoside는 *Tetraena aegyptia*, *Salsola oppositifolia*, *Salicornia herbacea*, *Sambucus ebulus*로부터 추출되며 항염, 항궤양, 2형 당뇨병병증 등의 생리효과를 가지는 flavonol 그룹에 속하는 물질이다. Quercetin으로부터 isorhamnetin 3-O-glucoside를 생합성 하기 위해서는 flavonoid O-methyltransferase와 isorhamnetin 3-O-glycosyltransferase가 필요하다(Fig. 1). 이전의 연구결과에 의하면, flavonol의 3번 위치에 특이적으로 당을 붙이는 당전이 유전자들이 많이 보고되었다[6,22]. 하지만, 당전이 유전자 대부분은 quercetin과 isorhamnetin 양쪽 모두에 당을 부착하는 특성을 보이지만, 대부분의 flavonoid OMT는 당이 부착된 물질을 기질로 사용하지 못하는 특성을 보였다[6]. 따라서 quercetin을 isorhamnetin 3-O-glucoside로 생물전환하기 위해서는 quercetin의 3' 위치에 methylation이 되어 isorhamnetin이 생성되고 다시 이 물질의 3번 위치에 순차적으로 glycosylation이 일어나야 한다. 이전의 연구에 의하면 포플러에서 분리한 당전이 유전자의 돌연변이체가 isorhamnetin의 3번 위치에 특이적으로 당을 부착하는 것으로 보고되었다[23]. 따라서 본 연구에서는 벼에서 분리한 ROMT-9와 포플러 당전이 유전자의 돌연변이체 PGT-3M (PGT-3 Glu82Leu)를 quercetin에서 isorhamnetin 3-O-glucoside의 생합성에 사용하였다(Fig. 1). 각 유전자가 도입된 균주를 BL-OMT, BL-PGTM으로 명명하였다. BL-OMT, BL-PGTM균주를 이용하여 quercetin으로부터 isorhamnetin 3-O-glucoside의 생합성 가능성을 알아보기 위해 2 mL LB배지에 각각의 균주를 배양하여 25°C에서 20시간 동안 각각의 재조합



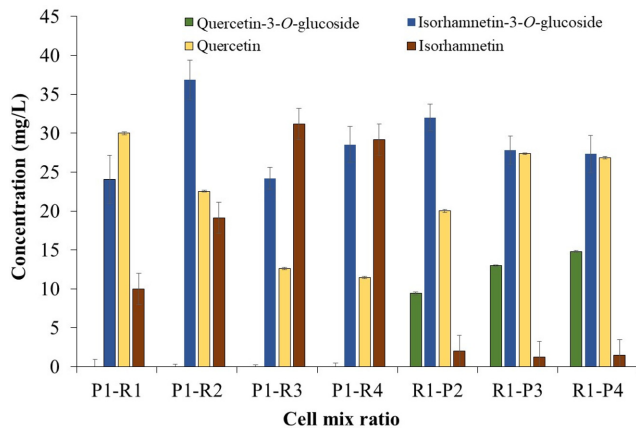
**Fig. 1** Biosynthetic pathway of isorhamnetin 3-O-glucoside from quercetin. ROMT-9, O-methyltransferase-9 from *Oryza sativa*; PGT-3M, flavonol glycosyltransferase Glu82Leu mutant from *Populus deltoids*; SAM, S-adenosyl-L-methionine; SAH, S-adenosyl-L-homocysteine; U(T)DP-glucose, uridine(thymidine) diphosphate glucose



**Fig. 2** HPLC analysis of biosynthesis of isorhamnetin 3-O-glucoside from quercetin. (A) HPLC chromatogram of authentic compounds, isorhamnetin 3-O-glucoside(S1), quercetin (S2), and isorhamnetin (S3); (B) HPLC chromatogram of *E. coli* BL21 (DE3) containing pGEX 5X-3 vector only; (C) HPLC chromatogram of the reaction products. P1 was identified to be isorhamnetin by comparing with retention time and UV spectra to standard isorhamnetin. P2 was identified to be isorhamnetin 3-O-glucoside by comparing retention time and UV spectra with standard isorhamnetin 3-O-glucoside; (D) UV spectra of standard isorhamnetin 3-O-glucoside (S1), quercetin (S2), and isorhamnetin (S3); (E) UV spectra of reaction products, P1 and P2 and quercetin(S2)

단백질을 유도하였다. 그 후 각 균주의 밀도를 동일하게 AMM 배지에 현탁 하여 30 °C 배양기에서 생물전환을 하였다. 배양 12시간 후에 반응액을 에칠아세테이트로 추출하여 HPLC분석을 하였다. 대조구로 사용된 균주의 생물전환 결과(Fig. 2B)와 달리 기질로 공급한 quercetin (11.2분)을 제외한 새로운 2개의

peak이 생성되었다(Fig. 2C). P1 (13.5분)은 표준물질 isorhamnetin과 동일한 시간대(13.5분)와 UV 흡광도를 가지고 있었다(Fig. 2D, E). 따라서 P1은 isorhamnetin임을 알 수 있다. P2 (7.4분)는 isorhamnetin 3-O-glucoside의 표준물질과 같은 시간대를 가지고 있었다(Fig. 2). Isorhamnetin의 band I UV 최대 흡광도

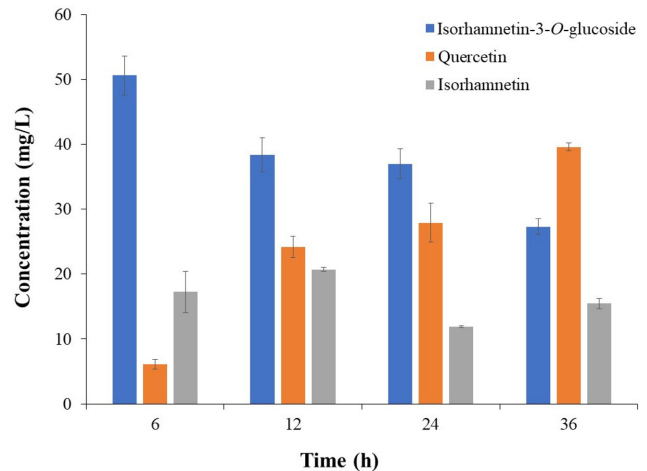


**Fig. 3** Effect of biotransformation ratio on isorhamnetin 3-*O*-glucose production by *E. coli* co-culture. AMM supplemented with 2% glycerol was used as fermentation medium and 200  $\mu$ M quercetin was fed into the fermentation medium. Biotransformation was performed at 30 °C and the reaction products were quantified by HPLC. Error bar represent mean  $\pm$  standard deviation from the three replicates

가 365 nm인데 비해 P2의 band I UV 최대 흡광도는 353 nm로 이동한 것을 보였다(Fig. 2D, E). 이와 같은 band I UV 최대 흡광도의 이동은 isorhamnetin 3번 탄소에 부착된 하이드록실 그룹의 구조변화 때문에 발생하는 전형적인 hypsochromic shift 현상이다[24]. 이상의 결과는 BL-OMT와 BL-PGTM 균주를 이용하여 quercetin으로부터 성공적으로 isorhamnetin 3-*O*-glucoside를 생성할 수 있다는 것을 의미한다.

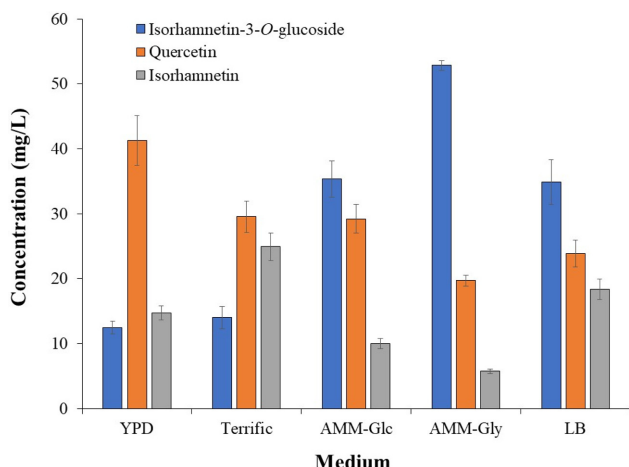
### Isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생합성 최적화

Isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생합성 최적화 방법을 탐색하기 위해 BL-OMT와 BL-PGTM 균주를 동일한 비율로 섞어 25, 30, 37 °C에서 각각 생물전환 12시간 후 샘플을 회수하여 분석하였다. 생물전환 온도 25 °C에서 20.9 mg의 isorhamnetin과 38 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생합성 되어 가장 높은 생물전환을 보였다(Fig. S1). 다음으로 30 °C로 26.6 mg의 isorhamnetin과 33.15 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생산되었다. 그에 반에 37 °C에서 가장 낮은 21.68 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생산되었지만, 다른 온도에 비해 isorhamnetin의 생산량(31.65 mg)이 가장 높았다(Fig. S1). 이러한 결과는 다른 온도에 비해 37 °C의 생물전환 온도에서 PGT-3M의 활성이 낮은 결과에 의한 것으로 보인다. 세포 밀도가 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생물전환에 미치는 영향을 알아보기 위하여 AMM-glucose 배지를 기본으로 세포 비율을 OD600 nm에서 BL-PGTM와 BL-OMT의 비율을 2.0:2.0, 2.0:3.0, 2.0:4.0, 2.0:5.0과 BL-OMT와 BL-PGTM의 비율을 2.0:3.0, 2.0:4.0, 2.0:5.0으로 맞추어 테스트 하였다. 최적의 조합은 BL-OMT와 BL-PGTM의 세포 비율을 2.0:3.0으로 섞었을 때였으며, 이 조건에서 약 36.85 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생합성되었다(Fig. 3). BL-PGTM의 세포보다 BL-OMT의 세포 밀도가 높아지면 isorhamnetin의 생합성이 증가하는 경향을 보였다. 하지만, BL-PGTM의 세포 밀도를 높게 하였을 때, 이전에 관찰되지 않은 새로운 물질이 관찰되었다(Fig. S2). HPLC 분석에서 이 물질은 표준물질

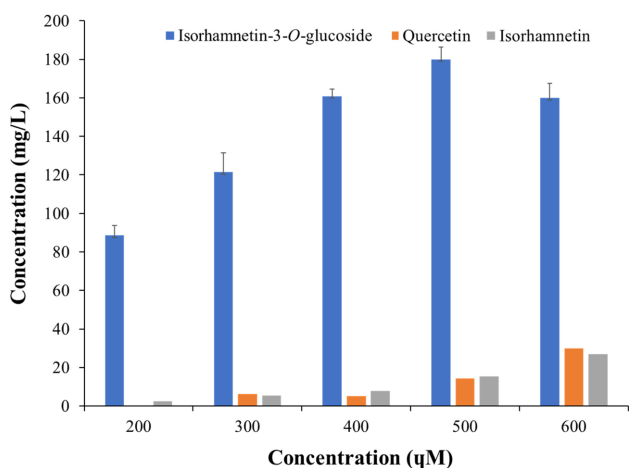


**Fig. 4** Effect of IPTG induction time on isorhamnetin 3-*O*-glucose production by *E. coli* co-culture. The cells for recombinant protein expression were cultured for 6, 12, 24, and 36 hours after IPTG addition at 25 °C. The cells for biotransformation were collected at each time point by centrifugation. AMM supplemented with 2% glycerol was used as fermentation medium and 200  $\mu$ M quercetin was fed into the fermentation medium. Biotransformation was performed at 30 °C and the reaction products were quantified by HPLC. Error bar represent mean  $\pm$  standard deviation from the three replicates

quercetin 3-*O*-glucoside와 동일한 분석시간대(6.7분)와 동일한 흡광도를 하고 있어 quercetin 3-*O*-glucoside로 추정되었다(Fig. S2). 이러한 결과는 BL-PGTM이 isorhamnetin보다 낮지만, quercetin에 대해서도 기질 특이성을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 이상의 결과로 보아 PGTM의 세포보다 ROMT-9의 세포 비율이 높아야 한다는 것을 의미한다. 재조합 단백질의 유도시간이 isorhamnetin 3-*O*-glucoside에 미치는 영향을 알아보기 위하여, IPTG추가 후 6, 12, 24, 36시간 후에 생물전환을 하였다. 6시간 단백질을 유도한 후 생물전환을 하였을 때 가장 높은 50.6 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생산되었다. 다음으로 12, 24시간으로 각각 38.3, 36.9 mg이었고, 36시간동안 단백질을 유도한 후 생물전환을 하였을 때 27.3 mg으로 가장 낮은 생합성을 보였다(Fig. 4). 재조합 단백질의 유도시간이 길어지면 재조합 단백질의 inclusion body 형성이 높아져 생물전환율이 줄어드는 것으로 보인다. Quercetin으로부터 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생물전환에 미치는 배지의 영향을 알아보기 위하여 5개의 배지(YPD, TB, AAM-glucose, AAM-glycerol, LB)를 테스트하였다. AAM-glycerol배지를 사용하였을 때 가장 높은 52.8 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생합성되었다. 다음으로 AMM-glucose (35.3 mg), LB (34.8 mg)이었고 YPD배지에서 12.4 mg으로 생합성이 가장 낮았다(Fig. 5). Quercetin의 공급농도가 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, AMM-glycerol배지에 BL-OMT와 BL-PGTM의 세포 밀도를 OD600 nm에서 2.0:3.0으로 맞춘 후 서로 다른 5개의 농도(200, 300, 400, 500, 600  $\mu$ M)의 quercetin을 공급하였다. 500  $\mu$ M의 quercetin을 공급하였을 때 가장 많은 양의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside (180 mg)가 생산됐지만, 600  $\mu$ M 이상의 농도에서는 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생산량이 감소하



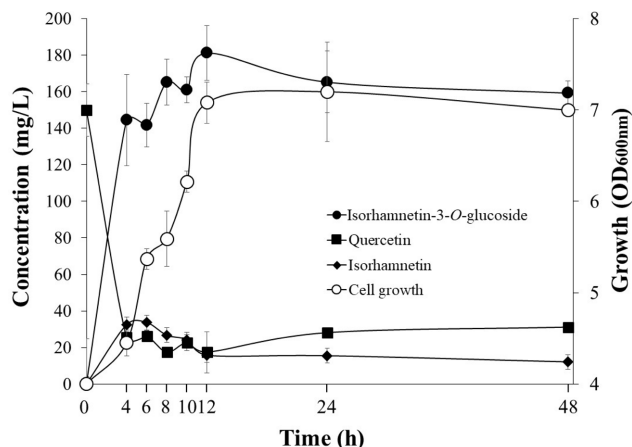
**Fig. 5** Effect of biotransformation medium on isorhamnetin 3-*O*-glucose production by *E. coli* co-culture. The cells were induced at 25 °C for 6 hours. Biotransformation was performed at 30 °C and the reaction products were quantified by HPLC. Error bar represent mean ± standard deviation from the three replicates



**Fig. 6** Effect of quercetin feed concentration on isorhamnetin 3-*O*-glucose production by *E. coli* co-culture. The cells were induced at 25 °C for 6 hours. Biotransformation was performed at 30 °C and the reaction products were quantified by HPLC. Error bar represent mean ± standard deviation from the three replicates

는 경향을 보였다(Fig. 6). 이러한 결과는 quercetin이 가지는 항균효과에 의해 기인하는 현상으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면 quercetin으로부터 isorhamnetin을 생합성 하기 위한 최적의 조건은 AAM-glycero배지, 재조합 단백질 유도시간은 6시간, BL-OMT와 BL-PGTM의 세포밀도는 OD600 nm에서 2.0:3.0의 비율, quercetin 500 μM, 25 °C의 생물 전환 온도였다. 이상의 조건으로 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생산을 48시간 동안 관찰하였다. 배양 후 4시간에 32.5 mg의 isorhamnetin과 144.4 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생산됐지만, quercetin은 약 25.4 mg이 남아 있었다. 배양의 12시간 후 가장 많은 181.2 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside이 생산되었고, 그 이후 isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생산량이 점



**Fig. 7** Production of isorhamnetin 3-*O*-glucose production by *E. coli* co-culture. AMM supplemented with 2% glycerol was used as fermentation medium. A total of 500 μM quercetin was feed after induction at 25 °C for 6 hours. Biotransformation was performed at 30 °C and the reaction products were periodically quantified by HPLC. Error bar represent mean ± standard deviation from the three replicates

차 줄어드는 현상을 보였다(Fig. 7).

플라보노이드는 다양한 생리활성을 가지고 있어서 많은 연구자의 관심을 받고 있다. 최근 플라보노이드를 미생물에서 간단한 탄소원으로부터 합성하려는 연구들이 많이 시도되고 있다 [2,25]. 하지만, 생리활성물질을 전 합성하기 위해서는 많은 수의 유전자를 대장균에 도입해야 한다. 또한, 반응에 필요한 다양한 종류의 cofactor를 안정적으로 공급해야 하고, 대사정체현상을 최소화해야 한다. 이러한 문제들 때문에 생리활성물질의 생산량을 증가시키는데 많은 어려움을 가지고 있다[26]. 이러한 문제들을 극복하기 위해 최근에 공조배양(co-culture)시스템을 이용하여 생리활성물질을 생산하는 연구가 수행되고 있다[27,28]. 공조배양은 생합성에 관여하는 유전자들의 균주별로 분리함으로써 생합성 경로의 대사정체(metabolic burden)현상과 부산물의 생산을 줄일 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서 *O*-methyltransferase (ROMT-9)와 flavonol glycosyltransferase (PGTM)을 가진 대장균 균주를 이용한 공조배양시스템으로 isorhamnetin 3-*O*-glucoside 생합성 방법을 확립하였다. 확립된 공조배양시스템으로 500 μM의 quercetin으로부터 생물 전환 12시간 후 181.2 mg의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside를 생합성 할 수 있었으며, 이는 기존 대장균에서 isorhamnetin 3-*O*-glucoside 생산한 연구(39.6 mg)보다 약 4.7배 높았다. Isorhamnetin 3-*O*-glucoside의 생산성을 높이기 위해서는 당의 공여체인 UDP-glucose와 메칠 공여체인 *S*-adenosyl methionine (SAM)의 생합성을 증가시키는 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

## 초 록

Isorhamnetin 3-*O*-glucoside는 플라보놀 그룹에 속하는 물질로서 염증이나 케양에 효과가 있을 뿐만 아니라 신경장해, 신장병증, 망막증과 같은 당뇨합병증을 완화하는 것으로 보고되었다.

Isorhamnetin 3-*O*-glucoside는 *Tetraena aegyptia*, *Salsola oppositifolia*, *Salicornia herbacea*, *Sambucus ebulus*와 같은 몇몇 식물에서 발견된다. 생물전환은 저렴한 화학물로부터 고부가가치 물질을 생산할 수 있는 유용한 방법이다. 본 연구에서 생물전환을 통해 quercetin으로부터 isorhamnetin 3-*O*-glucoside를 생합성 하기 위해 두 개의 유전자(*PGT E82L*과, *ROMT-9*)를 각각의 대장균에 도입하였다. 대장균의 공조배양시스템을 이용하여 isorhamnetin 3-*O*-glucoside 생산 배양법의 최적화를 위해 생물전환배지, 배양온도, 세포의 혼합비율, 재조합 단백질 유도시간, 기질 공급농도 등을 테스트하였다. 최적화된 생물전환 조건하에서 생물전환을 실시하였으며, 배양의 12시간 후 181.2 mg/L의 isorhamnetin 3-*O*-glucoside가 생합성 되었다. 이는 이전의 연구에서 보고된 isorhamnetin 3-*O*-glucoside (39.6 mg/L)의 생합성보다 4.7배 높았다.

**Keywords** 공조배양 · 당전이 유전자 · 생물전환 · 플라보노이드 · *O*-메틸전이효소

**감사의 글** 이 논문은 경남과학기술대학교 2018-2019년도 대학회계 연구비에 의하여 연구되었으며, 실험에 도움을 준 산림생물공학실험실 임정현, 노혜령 학생에게 감사를 드립니다.

## References

1. Terao J, Kawai Y, Murota (2008) Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 17: 291–293
2. Kim MJ, Kim BG, Ahn JH (2013) Biosynthesis of bioactive *O*-methylated flavonoids in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 7195–7204
3. Peterson J, Dwyer J (1998) Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* 98: 677–682
4. Wang Y, Chen S, Yu O (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 949–956
5. Kim BG, Sung SH, Chong Y, Lim Y, Ahn JH (2010) Plant flavonoid *O*-methyltransferase: substrate specificity and application. *J Plant Biol* 53: 321–329
6. Wang X (2009) Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Lett* 583: 3303–3309
7. María L. Falcone Ferreyra, Sebastián P. Rius, Paula Casati (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 3(222): 1–15
8. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB (2005) Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 8: 281–290
9. José Justino (2017) Flavonoids: From biosynthesis of human health. *InTechOpen* 371–391
10. Schmidt AW, Reddy KR, Knölker HJ (2012) Occurrence, biogenesis, and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem Rev*: 112: 3193–3328
11. Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, de Sousa JP, Rocha EM, Bastos JK, Cunha WR, Veneziani RC, Ambrósio SR (2011) Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res* 25: 215–220
12. Xiao J, Ni X, Kai G, Chen X (2013) A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53: 497–506
13. Stachulski AV, Meng X (2013) Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Nat Prod Rep* 30: 806–848
14. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352
15. Xingfeng G, Daijie W, Wenjuan D, Jinhua D, Xiao W (2010) Preparative isolation and purification of four flavonoids from the petals of *Nelumbo nucifera* by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem Anal* 21: 268–272
16. Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90: 1229–1239
17. Kim BG (2019) Biosynthesis bioactive isokaempferide from naringenin in *Escherichia coli*. *J Appl Biol* 62: 1–6
18. Han SH, Kim BG, Yoon JA, Chong Y, Ahn JH (2014) Synthesis of flavonoid *O*-pentosides by *Escherichia coli* through engineering of nucleotide sugar pathways and glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol* 80: 2754–2762
19. . Zaki AA, Xu X, Wang Y, Shie PH, Qiu L (2019) A new anti-inflammatory flavonoid glycoside from *Tetraena aegyptia*. *Nat Prod Res*. doi: 10.1080/14786419.2019.1650356
20. Yesilada E, Gürbüz I, Toker G (2014) Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J Ethnopharmacol*. 153: 478–483.
21. Jones JA, Vernacchio VR, Lachance DM, Lebovich M1, Fu L, Shirke AN, Schultz VL, Cress B, Linhardt RJ, Koffas MA (2015) ePathOptimize: A combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways. *Sci Rep* 5: 11301
22. Owens DK, McIntosh CA (2009) Identification, recombinant expression, and biochemical characterization of a flavonol 3-*O*-glucosyltransferase clone from *Citrus paradisi*. *Phytochemistry* 70: 1382–1391
23. Kim BG, Sung SH, Jung NR, Chong Y, Ahn JH (2010) Biological synthesis of isorhamnetin 3-*O*-glucoside using engineered glucosyltransferase. *J Mol Catal B Enzym* 63:194–199
24. Kim JH, Kim BG, Park Y, Ko JH, Lim CE, Lim J, Lim Y, Ahn JH (2007) Characterization of flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1471–1477
25. Cress BF, Leitz QD, Kim DC, Amore TD, Suzuki JY, Linhardt RJ, Koffas MAG (2017) CRISPR-mediated metabolic engineering of *E. coli* for *O*-methylated anthocyanin production. *Microb Cell Fact* 16: 1–14
26. Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003) Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 69: 2699–2706
27. Akdemir H, Silva A, Zha J, Zagorevski DV, Koffas MAG (2019) Production of pyranoanthocyanins using *Escherichia coli* co-cultures. *Metab Eng* 55: 290–298
28. Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, Collins SM, Ibrahim MHA, Lachance DM, Hahn J, Koffas MAG (2016) Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng* 35: 55–63