(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0078668
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.
C12P 7/66 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0136989
(22) 출원일자 2008년12월30일
심사청구일자 2008년12월30일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
김중균
부산광역시 해운대구 재송동 1200 더샵센텀파크 아파트 110동 1101호
공인수
부산광역시 해운대구 우1동 경남마리나아파트 101동 204호
(74) 대리인
이처영

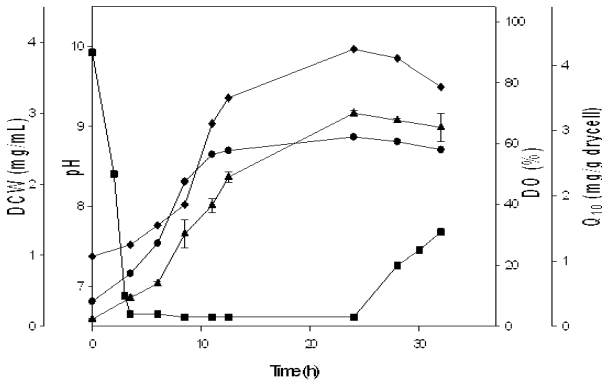
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈를 이용한 코엔자임 Q10의 대량생산 방법

(57) 요 약

본 발명은 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 이용한 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 배양배지의 초기 공기공급속도를 3vvm 내지 8vvm 으로 조절하여 상기 균주를 회분식으로 배양하는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 코엔자임 Q10의 대량생산방법은 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 이용하여 고효율 코엔자임(coenzyme) Q10을 대량생산할 수 있는 최적의 배양조건을 제공하는 바, 경제적이며 코엔자임 Q10 함유 기능성 화장품의 단가를 낮추는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 배양배지의 초기 공기공급속도를 3vvm 내지 8vvm 으로 조절하여 상기 균주를 회분식으로 배양하는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 로도박터 스페어로이즈 균주는 기탁번호 KACC 91338P 또는 KACC 91339P의 균주인 것을 특징으로 코엔자임 Q10 대량생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대수증식기의 배양배지내 용존산소량은 0.01ppm 내지 1ppm 인 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 배양배지의 pH는 9 이하로 유지되는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 회분식 배양에서 광도는 0 룩스 내지 100 룩스인 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 이용한 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 배양배지의 초기 공기공급속도를 3vvm 내지 8vvm 으로 조절하여 상기 균주를 회분식으로 배양하는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 코엔자임 Q10은 세포들이 필요로 하는 생체 에너지가 잘 생성되도록 돕는 생체 내에서 합성되는 대사물질이며, 인체의 경우, 활동을 많이 하는 기관인 심장, 폐, 간, 잇몸 등에 많이 분포되어 있다. 지용성 물질인 코엔자임 Q10은 20대 까지는 왕성하게 만들어지다가 40대부터는 점점 생산량이 줄어들어, 노화가 시작되면 코엔자임 Q10을 많이 필요로 한다. 또한, 코엔자임 Q10은 항산화 비타민 E가 기능을 할 수 있도록 도와주고, 눈 주변의 주름 등 피부 노화 억제, 미백 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 코엔자임 Q10은 처음에는 심장과 관련된 질병과 유방암 등에 많이 적용하여 사용되어 왔으나, 차차 그 응용범위가 광범위해져 고혈압, 동맥경화, 당뇨 등 대사증후군의 질환에도 사용되고 있고, 피부노화가 진행되는 것을 막아 주므로 기능성 화장품에도 널리

적용되고 있다. 웰빙시대를 맞이하여 향후 코엔자임 Q10의 경제적 수요와 가치가 증가하면, 고함량 코엔자임 Q10의 대량생산은 필수적이며, 그 산업적 가치는 매우 높을 것으로 예상된다.

[0003] 현재 코엔자임 Q10은 세계적으로 연간 350-400톤 정도 생산되고 있으며, 앞으로 그 규모는 훨씬 더 증가할 것으로 보인다. 일본은 80년대부터 코엔자임 Q10생산에 대한 기초 연구가 시작되었고, 2000년대로 들어서면 재조합 기술을 이용한 E. coli 균주의 개발 (Takahashi *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 16, 183-190, 2003) 과 효율적 코엔자임 Q10 생산을 위한 대사공학적 연구 (Takahashi *et al.*, *FEBS Lett.*, 580, 955-959, 2006) 등이 발표되었다. *Rhizobium radiobacter* 균주를 이용하여 용존산소가 코엔자임 Q10 생산에 미치는 영향에 관한 연구와 (Wu *et al.*, *World J. MIcrobiol. Biotechnol.*, 19, 925-928, 2003) *Agrobacterium tumefacient* 균주를 이용한 batch production에 관한 Shot communication 논문 (Gu, *et al. Process Biochem.*, 41, 1908-191, 2006)이 있고, 최근에는 유비퀴논 과발현 fission 효모 균주를 이용한 fed-batch 발효를 통한 유비퀴논의 생산방법 (Zhang, *et al. J. Biotechnol.*, 128, 120-131, 2007)과, 호기, 암 조건과 혐기, 빛 조건에서의 코엔자임 Q10의 생산에 관한 연구 (Yen and Chiu, *Enzyme Microb. Technol.*, 41, 600-604, 2007)가 발표된 바 있다. 국내의 연구와 기술은 개발수준 단계에 있다. 코엔자임 Q10의 생물공학적 생산과 응용에 대한 review (Choi *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 9-15, 2005)가 있었고, 2007년 관련 학술대회 (Jeaong *et al.*, 2007한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지움, PME07, p. 138, 2007)와, 2008년에는 관련 학회지에 코엔자임 Q10의 생산에 관한 연구 (Jeaong *et al.*, *J. Fish. Sci. Technol.*, 11, 172-176)가 발표되었다.

[0004] 2005년도 세계화장품 시장규모는 총 1,400억 불에 달하고 있으며, 국내 화장품 시장 규모만도 약 5조 8,000억 원에 이르고 있어 정밀화학 산업 중에는 의약품 산업 다음으로 거대한 시장을 형성하고 있다. 중국을 비롯한 동남아시아, 동유럽, 중남미 등의 화장품 시장 활성화는 기능성 화장품 시장을 더욱 확대 발전시킬 것이며 이미 서구의 다국적기업들은 중국 거점 아시아 진출을 시작하였다고 볼 수 있다. 또한, 코엔자임 Q10 은 일본에서 2년 연속 건강기능식품 1위, 미국에서 3위이었고, 한국에서도 시장이 증가되고 있다. 미국의 경우, 노화방지 시장이 증대되고 있는 상태이며 2007년 560억 달러 규모의 시장이 형성될 것으로 보이고, 향후에도 지속적으로 성장, 확대될 것으로 예측되고 있다. 우리나라에는 노령화가 서서히 진행되고 있는 상황에서 유비퀴논의 요구량은 증가될 것으로 예측된다. 따라서, 향후 국내 수요의 증가를 대비하여 생산비용을 낮출 수 있는 새로운 균주의 개발, 고함량 대량생산 기법 등의 기술적 해결방법이 필요하다.

[0005] 코엔자임 Q10은 화학적 또는 생물학적으로 그 합성이 가능한데, 화학적인 합성에 의한 코엔자임 Q10은 인간이 만들어 내는 코엔자임 Q10 합성의 시작 물질과 다른 물질로부터 합성이 시작되기 때문에, 생물학적 합성에 의한 코엔자임 Q10이 더 선호되고 있다 (Ha *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 109-116, 2007). 따라서, 생물학적 합성에 의한 코엔자임 Q10의 산업적 생산이 주목받고 있다 (Choi *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 9-15, 2005). 이를 위해 유전자 조작을 통한 미생물에 의한 Q10 합성이 시도되었으나 (Sakai *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 481-488, 2005), 공장단위에서의 생산에서는 낮은 Q10 생산수율을 보였다 (Ha *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 109-116, 2007). 최근 대사공학에 의한 재조합 E. coli for균주에 의한 Q10 생산에 있어서도 생산 수준은 그다지 높지 못하였다 (Park *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 192-196, 2005).

[0006] 광합성 세균은 독립영양미생물로서 녹색세균(Green bacteria)과 홍색세균(Purple bacteria)으로 크게 구별되며, 하천이나 호수, 해양 등에 널리 분포한다. 산소가 없는 조건에서는 식물처럼 빛을 이용하여 탄소동화작용을 할 수 있으며, 빛이 없는 경우 산소와 유기물을 이용하여 생육할 수 있는 특징을 가지고 있다. 광합성세균은 아미노산, 핵산, 유비퀴논을 비롯한 생리활성물질, 당류 등 유용한 물질을 생합성 하여 식물과 다른 토양미생물의 생육생장을 촉진시키는 역할을 한다. 또한 광합성세균은 비타민 B12, 5-aminolevulinic acid, 및 포르피린 등의 생리활성 물질을 합성하는 것으로 알려져 의학 쪽으로도 그 활용분야가 점차 확대되고 있다 (Sasaki *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 481-488, 2005). 그러나 효율적으로 광합성세균을 고농도 대량 배양하는 방법은 아직 개발되지 못하고 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 대량 생산에 적합한 고농도의 코엔자임 Q10 제조방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 이용하여 대량생산에 최적의 배양조건으로 발효를 실시하여 대규모화에 따른 수율의 저하 없이 실험실 단위에서의 수율 못지않게 고수율로 코엔자임 Q10을 대량으로 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 코엔자임 Q10 고생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*) 변이주를 이용하여 코엔자임 Q10을 대량 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 배양배지의 초기 공기공급속도를 3vvm 내지 8vvm 으로 조절하여 회분식으로 배양하는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법을 제공한다.

효 과

[0010] 본 발명에 따른 코엔자임 Q10 대량생산방법은 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 이용하여 대량생산에 최적의 배양조건으로 발효를 실시하여 대규모화에 따른 수율 저하 없이 실험실 단위에서의 수율 못지않게 고수율로 코엔자임 Q10을 대량으로 생산할 수 있어, 코엔자임(coenzyme) Q10을 대량생산할 수 있는 최적의 배양조건을 제공하는 바, 경제적이며 코엔자임 Q10 함유 기능성 화장품의 단가를 낮추는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 일 관점에서, 코엔자임 Q10 생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)를 배양배지의 초기 공기공급속도를 3vvm 내지 8vvm 으로 조절하여 회분식으로 배양하는 것을 특징으로 하는 코엔자임 Q10의 대량생산 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에 있어서, 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)는 KACC 91338P 또는 KACC 91339P 균주인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 코엔자임(coenzyme) Q10 고생성능을 가지는 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*) KACC 91338P는 본 발명자들이 분리한 신균주이고, 로도박터 스페어로이즈 KACC 91339P는 상기 KACC 91338P 균주를 L-에티오닌 및 메나디 온의 복합 화학제로 처리하여 제조한 변이주이다.

[0014] 코엔자임 Q10의 대량생산을 위한 최적 배양조건은 다음과 같다: 초기공기공급속도 3vvm 내지 8vvm; 대수성장기에서 배양배지의 용존산소량 0.01ppm 내지 1ppm 이하;광도 0 룩스 내지 100 룩스; 온도 25℃ 내지 35℃; 교반 180rpm 내지 300rpm.

[0015] 실험실 규모에서의 코엔자임 Q10을 생산하기 위한 최적의 배양조건에서 초기 공기공급속도는 0.2vvm 이었으나, 대량생산을 위한 반응기에서는 배양배지의 부피가 증가함에 따라 초기 공기공급속도가 너무 느리면 반응기내 필요한 용존산소량을 유지하기에 어려움이 있어 코엔자임 Q10의 생산 효율이 떨어진다. 반면에, 초기 공기공급속도가 10vvm 이상인 경우에도 유체흐름의 특성이 달라짐에 따라 코엔자임 Q10의 생산 효율이 떨어진다. 따라서 코엔자임 Q10 대량생산을 위해서 배양배지내 초기공급속도는 3vvm 내지 8vvm 인 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 5vvm 이다.

[0016] 코엔자임 Q10 생산 실험결과를 통해, 회분식으로 배양하는 균체의 성장이 대수증식기에 도달했을 때, 배양배지내 용존산소량이 매우 중요한 요인이라는 것을 알게 되었다. 용존산소량이 1ppm 보다 높으면 코엔자임 Q10의 생산량이 줄어들고 너무 낮으면 균체의 대사작용에 영향을 미치게 되어 배양배지내 용존산소량은 0.01ppm 내지 1ppm 이 바람직하나, 더욱 바람직하게는 0.5ppm 이다.

[0017] 코엔자임 Q10 생성에 있어서, 빛이 없는 조건에서도 코엔자임 Q10의 합성은 이루어지지만 광도 조건에서보다 생산 효율이 떨어진다. 또한, 광도가 100 룩스 이상일 때는 코엔자임 Q10 외에 부산물을 생성하게 되어 코엔자임 Q10의 생산효율이 떨어지므로 코엔자임 Q10의 생산을 위해서는 0 룩스 내지 100 룩스가 바람직하나 더욱

바람직하게는 50 룩스이다.

[0018] 배양 온도는 로도박터 스페어로이즈 성장에 영향을 주며 너무 낮거나 높으면 성장이 둔화되고 불필요한 부산물을 생성하게 되므로 배양온도는 바람직하게는 25℃ 내지 35℃이고, 더욱 바람직하게는 30℃ 이다.

[0019] 교반속도는 너무 느리면 반응기내 불균일화가 일어나고 너무 빠르면 균체에 전단응력에 의한 스트레스를 주게 된다. 코엔자임 Q10을 대량생산하기 위한 교반속도는 180rpm 내지 300 rpm 이 바람직하나, 더욱 바람직하게는 200rpm 이다.

[0020] 본 발명의 일양태에서, 코엔자임 Q10을 생산하기 위한 기초배지의 조성은 이인산칼륨(K_2HPO_4) 0.5g /ℓ,일인산칼륨(KH_2PO_4) 2.7g/ℓ, DL-말릭 산 0.8g/ℓ, 인산 암모늄 3.76g/ℓ, 엠에스지 1g/ℓ, 트립톤 2g/ℓ, 효모 엑기스 2g/ℓ, 미량 원소 2.1ml /ℓ이고, 미량 원소액의 조성은 1ℓ 당 니코틴산 0.2g, 티아민-HCl 0.4g, 니코티나민 0.2g 및 바이오틴 0.008 g 이고, 비타민 혼합액은 1ℓ 당 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3g, H_3BO_3 0.01g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g, $ZnSO_4$ 0.01g 및 에틸렌디아민 테트라 아세트산 0.5g 이다.

[0021] 아울러, 코엔자임 Q10은 다음과 같은 방법으로 회수할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다: 대수증식기 말기에 회수된 배양액을 원심분리하여 균체를 메탄올로 처리하고, 가온한 다음, 클로로포름을 첨가하고 반응시켜 코엔자임 Q10을 추출하였다. 추출액을 여과한 다음, 여기에 여과액과 0.85% 인산완충용액이 5:1 비율이 되도록 0.85% 인산완충용액을 여과액에 첨가하고 (시간이 지나면서 2개의 상으로 분리됨), 이중 상층액은 제거하고 하층액을 감압증류장치로 건조시켜 추출용매를 제거하여, 최종적으로 코엔자임 Q10을 수득하였다.

실 시 예

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0023] **실시예 1: 로도박터 스페어로이즈 KACC 91338P 및 KACC 91339P 균주의 분리**

[0024] 로도박터 스페어로이즈 KACC 91338P 및 이의 변이주인 KACC 91338P는 다음의 방법으로 분리하였다.

[0025] 낙동강 갯벌, 광합성세균 생산 공장 및 폐수처리 공장 등에서 샘플을 채취하여 30℃, 180 rpm, 50 룩스의 조건에서 한천배지 위에 도말하고 4일간 배양한 이후 독립된 균체를 얻었고, 균체 중 붉은 색깔을 띠는 균체를 선별한 후 계속적인 도말에 의해 최종적으로 순수 분리하였다. 이때 사용된 기초 배지(pH=6.8)의 조성은 다음과 같다: 0.5g K_2HPO_4; 0.5g KH_2PO_4; 2.7g DL-말릭산; 0.8g 암모니늄 포스페이트; 3.76g 엠에스지; 1g 트립톤; 2g 효모 엑기스; and 2.1ml 미량원소. 최종 8종의 순수 광합성세균이 분리되었고, 각 순수 미생물을 배양하여 코엔자임 Q10을 측정한 결과, 이 중 3종의 균주는 거의 코엔자임 Q10 함량을 나타내지 못했으며, 나머지 5종(PSB1-PSB5) 중 가장 뛰어난 코엔자임 Q10함량을 보인 균주는 PSB1으로, 동정결과 GenBank Accession Number가 AM69671인 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)로 밝혀졌다. 상기의 로도박터 스페어로이즈 균주를 본 실시예에 사용하였다. 상기의 로도박터 스페어로이즈 균주를 KACC 91338P로 기탁하였다.

[0026] 또한, 본 발명의 로도박터 스페어로이즈 변이주는 다음과 같은 과정에 의해 얻었다. 부피 ml 당 10^8~10^9 의 로도박터 스페어로이즈를 2 mg/ml 농도의 L-에티오닌 및 메나디온(1:1)의 복합 화학제를 포함하는 0.5M 트리스-말레이트 완충용액 (pH6.2)로 처리하고, 실온에서 20분 놓아둔 후, 0.85% 식염수로 두 번 수세하고, 다시 균체를 트리스-말레이트 완충용액에 부유시켰다. 부유된 균체를 10 ml 종자 배양액이 들어 있는 15 ml 튜브에 접종하여 30℃의 진탕 배양기에서 24시간 배양한 후 원심분리하고 0.85% 식염수로 수세한 후, 20 μg/ml 5-브로모-1-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토시드 (X-gal)과 10% 글로코오스를 함유한 M-배지에 도말한 후 변이가 이루어진 푸른색의 균체를 얻었다. 1리터 당 M-배지의 조성은 다음과 같다: 5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g KH_2PO_4, 0.5 g K_2HPO_4, 0.25 g $MgSO_4(7H_2O)$, 0.1 g $MnCl_2(4H_2O)$, 1 ml 미량원소액, 1 ml of 비타민 혼합액, and 20 g 한천. 상기 변이방법에 의하여 로도박터 스페어로이즈 균주를 변이시킨 결과, 코엔자임 Q10 함량이 그램 건조세포 당 2.94 mg으로 증가되었다. 상기 로도박터 스페어로이즈 변이주를 KACC 91339P로 기탁하였다.

[0027] **실시예 2: 실험실단위에서의 코엔자임 Q10 생산**

[0028] 본 실시예에서는 1L 의 반응기에서 상기 로도박터 스페어로이즈 KACC 91338P 균주와 변이주인 KACC 91339P 균주의 코엔자임 Q10의 생산능을 확인하였다.

[0029] 본 실시예에서, 로도박터 스페어로이즈 균주의 세포 속에 있는 코엔자임 Q10의 농도 측정은 코엔자임 Q10의 농도 측정법 (Matsumura, *et al., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17:85, 1983, Takahashi, *et al., Biochem. Eng. J.*, 16: 183, 2003)에 따라 수행하였다.

[0030] 코엔자임 Q10은 대수증식기 말기에 회수된 광합성세균 배양액을 원심 분리하여 얻어진 cell pellet으로부터 추출하여 얻는다. 5 ml의 배양액으로부터 얻은 cell pellet에 3.3 ml 메탄올로 처리한 후, 55℃에서 5분간 가온하고 난 다음, 6.6 ml 클로로포름을 첨가하고 30℃에서 20분간 stirring시킨다. 20분 반응 후에 와트만 No.1 여과종이를 이용하여 여과하여 튜브에 담고 여과된 액에 0.58% 식염수를 5:1 비율로 첨가해 주면, 시간이 지나면서 2개의 상이 생기고 아래층에 코엔자임 Q10이 추출된 상이 생긴다. 상층의 대부분을 버리고 난 후 25℃ 증발기를 이용하여 건조시키고, 코엔자임 Q10의 HPLC 분석을 위하여 튜브에 남아 있는 나머지를 에탄올에 녹인 후 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석에는 C18 역상 컬럼 (100 mm x 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였고, 이동상은 에탄올(flow rate: 1 ml/min)로 하여 275nm에서 측정하였다. 코엔자임 Q10의 농도는 peak area로부터의 정량곡선으로부터 구하였고, 코엔자임 Q10 농도를 건조중량으로 나누어서 얻어진 값이 단위 세포 당의 코엔자임 함량이다. 세포 건조중량은 균체를 담은 알루미늄 접시를 105℃의 오븐에서 12시간 동안 건조한 다음 세포중량만을 계산하여 구하였다.

[0031] 본 실시예에서, 코엔자임 Q10 생산을 위한 배양은 먼저 10 ml 튜브에서 기초배지를 사용하여 실시하였고, 반응시간 별 반응조건에 의한 로도박터 스페어로이즈 균주의 코엔자임 Q10 함량의 변화를 알아보기 위하여 용존산소량 및 pH를 실시간으로 측정할 수 있는 1 L 반응기를 사용하였다. 1 L반응기에 600 ml의 기초배지와 기초배지를 사용하여 30℃, 180 rpm, 50 룩스 조건의 250 ml 플라스크에서 배양한 대수증식기 말기 상태의 60 ml 배양액을 접종한 후, 같은 반응 조건에서 배양하였다. 이때, 교반속도와 공기공급속도는 각각 300 rpm과 5 vvm이었고, 반응기 내에 거품이 심하게 발생할 경우마다 10배 희석한 '안티폼 204'를 사용하였다. 용존산소량 및 pH는 실시간으로 측정하였고, 주기적으로 5 ml의 샘플을 취하여 균체량과 코엔자임 Q10의 농도를 측정하였다.

[0032] 그 결과로, 기초배지에서 배양한 로도박터 스페어로이즈 균주의 비증식속도(specific growth rate)는 0.13 h^{-1}로 나타났고, 로도박터 스페어로이즈 변이주의 비증식속도도 같은 값을 나타내었다. 각 반응조건 별 건조세포 중량 당 코엔자임 Q10 함량의 결과는 표 2와 같았고, 모든 반응에서 용존산소량은 초기 몇 시간 내에 빠르게 떨어졌고, 용존산소량이 급격하게 소모되고 난 후로는 거품이 많이 발생하여 소포제를 사용하여 제거하였다. 세포의 성장이 정지기(stationary phase) 이후에는 산소를 사용하지 않아 반응기 내의 용존산소량은 다시 빠르게 증가하는 배양 특징이 있고, pH는 용존산소량의 변화에 따라, 다른 양상을 나타내었다. 대수증식기에서 반응기 내의 용존산소량이 0.8 ppm 이하로 유지되면 배양액의 색깔이 선홍빛에서 적갈색으로 변하고, pH가 9 이상으로 증가하지 않았다. 코엔자임 Q10의 함량은 광합성세균의 세포성장 과정 중 대수증식기 중기 이후에서 대수증식기 말기 사이에 가장 높은 함량을 나타내었으며, 이후의 정지기에서는 그 함량이 줄어드는 특징이 있다.

표 2

[0033] 배양 조건에 따른 코엔자임 Q10의 균주내 함량

배양 조건(1L 반응기)	Q10 함량 (mg/g cell)
원균주 K91338P 균주, 50 룩스, 30℃, pH 7, 300 rpm & 5 vvm	1.00
원균주 K91338P 균주, 50 룩스, 30℃, pH 조절 안함, 300 rpm & 5 vvm	1.69
원균주 K91338P 균주, 50 룩스, 30℃, pH 조절 안함, 200 rpm & 0.2 vvm	2.91
원균주 K91338P 균주, 50 룩스, 30℃, pH 조절 안함, 200 rpm & DO 조정	3.88
원균주 K91338P 균주, 0 룩스, 30℃, pH 조절 안함, 200 rpm & DO 조정	3.85
변이균주 K91339P 균주, 50 룩스, 30℃, pH 조절 안함, 200 rpm & DO 조정	4.66

[0034] 이상의 여러 번의 코엔자임 Q10 생산 실험결과를 통해, 코엔자임 Q10 생산에 있어 용존산소(DO)를 결정하는 초기 공기공급속도가 매우 중요한 파라메타임을 알았고, 통기성 균주인 로도박터 스페어로이즈의 변이주는 반응 초기 많은 산소를 필요로 하면서 세포의 성장과 더불어 코엔자임 Q10을 생산하게 되지만, 정지기 이후에서는 산소를 필요하지 않는 신진대사 과정을 바꾸면서 코엔자임 Q10을 생산이 감소하는 특징을 지니고 있으며, 최적조건 하에서 1 L의 반응기에서 코엔자임 Q10을 생산하게 되면, 코엔자임 Q10 함량은 그램 건조세포 당 4.66 mg 정도까지 높여진 고함량의 코엔자임 Q10을 얻을 수 있었다.

[0035] 상기 로도박터 스페어로이즈 변이주가 생산하는 코엔자임 Q10 함량은 기존 논문에 발표된 타 미생물이 생산하는 코엔자임 Q10 함량과 비교하면, 형질 전환 기술을 도입하여 제조된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주를 사용한 코엔자임 Q10 생산 경우를 제외하면, 그 함량이 높은 편이었다(표 3).

표 3

[0036] 균주별 코엔자임 Q10의 함량

미생물명	Q10의 함량 (mg/ g cell)	원문
Rodobacter sphaeroids (굴양식장 퇴사물)	0.76	Takeno *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 88:410, 1999
Rodobacter sphaeroids (ATCC 33575)	2.54	Urakami and Yoshida, *J. Ferment. Bioeng.*, 76: 191, 1993
Rodobacter spharoids FERM-P4675	2.7	Yoshida *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44: 19, 1998
Rodobacter sphaeroids (낙동강 갯벌, 변이균주)	4.66	본 발명
Rhizobium radiobacter WSH 2601 (변이균주)	1.91	Wu *et al.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 925, 2003
E. Coli BL21/ pACDdsA (형질전환 재조합 균주)	0.29	Park *et al.*, *Appl. Microbiol. BIotechnol.*, 67: 192, 2005
형질전환 *Agrobacterium tumefaciens*	5.98	특허 10-0578282(한국), 2006

[0037] **실시예 3: 대용량 반응기에서의 코엔자임 Q10 생산**

[0038] 본 실시예에서는 150L의 반응기에서 상기 로도박터 스페어로이즈 KACC 91338P의 변이주인 KACC 91339P 균주의 코엔자임 Q10의 생산능을 확인하였다.

[0039] 150L반응기에 90L의 상기 실시예 1의 기초배지를 넣고, 10%(v/v)의 상기 로도박터 스페어로이즈 변이주의 전배양액을 접종하여 30℃, 200 rpm, 50 룩스 조건에서 발효를 시작하고, 타균에 의한 오염이 되지 않도록 공기는 멸균된 유리섬유를 충전한 필터를 통해 5 vvm 또는 10vvm 의 공기속도로 공급하였으며, 공기 배출구에도 똑같은 필터를 부착하였다. 반응기 내에 거품이 심하게 발생할 경우마다 10배 희석한 '안티폼 204'를 사용하였고, 빛은 100W의 백열전구 2개를 사용하여 반응기에 위와 아래에 부착된 2개의 유리(8cm x 35cm)를 통해 50 룩스의 광도가 되게끔 조절하여 공급하였으며, 주기적으로 30 ml의 샘플을 취하여 용존산소량 및 pH 값을 바로 측정하였고, 1 L 반응기에서의 결과를 토대로 한 대량생산 실험을 실행하기 위하여, 150 L 반응기를 사용하여 반응시간 별 로도박터 스페어로이즈 변이주가 생산하는 코엔자임 Q10 함량을 조사하였다.

[0040] 또한, 본 실시예에서는 1 L 반응기에서의 결과에 따라 코엔자임 Q10 생산에 초기 공기공급속도가 중요한 인자이므로 150L 의 반응기에서 상기 로도박터 스페어로이즈 KACC 91338P의 변이주인 KACC 91339P 균주의 초기 공기공급속도에 따른 코엔자임 Q10의 생산능을 확인하고자 초기 공기공급속도를 5vvm과 10vvm 으로 다르게 하여 그 결과를 비교하였다.

[0041] (1) 5 vvm 공기 공급속도에서 배양한 경우

[0042] 상기 150L 반응기에서, 1 L 반응기에서 얻은 최적조건에 맞게, pH는 조절하지 않은 조건에서 30 ℃, 200 rpm, 50 룩스, 및 초기 5 vvm의 공기공급을 해 주되 로도박터 스페어로이즈 변이주의 대수성장기 동안에는 반응기 내의 용존산소량이 1 ppm을 넘지 못하도록 on-off 형태의 용존산소량 조절을 통하여 배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

[0043] 반응 3시간 이전에 반응기 내의 용존산소량이 1 ppm 이하로 떨어졌고, 대수성장기 동안에는 수동적 on-off 조절에 의하여 용존산소량이 0.5 ppm 이하에서 줄곧 배양되었다. 반응 약 32시간 이후에는 공기공급을 하지 않았지만 로도박터 스페어로이즈 변이주에 의한 용존산소량 사용량이 급격하게 떨어져 반응액 중의 용존산소량은 다시 증가하였다. 용존산소량이 급격하게 소모되고 난 후로는 거품이 많이 발생하여 소포제를 사용하여 제거하였고, pH는 반응 시작과 함께 증가하여 반응 24시간 이후 최대 pH 8.7을 나타내었으나, 그 이후는 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다 (도 1). 세포 건조중량은 반응 24시간 정도에서 최대값 3.0 g/L 이었고, 이때, 코엔자임 Q10 함량은 건조세포 그램당 4.25 mg/g 로 가장 높았다.

[0044] (2) 10 vvm 공기 공급속도에서 배양한 경우

[0045] 상기 150 L 반응기에서, 1 L 반응기에서 얻은 최적조건에 맞게, pH는 조절하지 않은 조건에서 30 ℃, 200 rpm, 50 룩스 및 초기 10 vvm의 공기공급을 해 주되 로도박터 스페어로이즈 변이주의 대수성장기 동안에는 반응기 내의 용존산소량이 1 ppm을 넘지 못하도록 on-off 형태의 용존산소량 조절을 통하여 배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

[0046] 반응 3시간 이전에 반응기 내의 용존산소량이 1 ppm 이하로 빨리 떨어졌고, 반응 10시간 이후부터 대수성장기 동안에는 수동적 on-off 조절에 의하여 용존산소량이 0.5 ppm 이하에서 줄곧 배양되었다. 반응 약 32시간 이후에는 공기공급을 하지 않았지만 로도박터 스페어로이즈 변이주에 의한 용존산소량 사용량이 급격하게 떨어져 반응액 중의 용존산소량은 다시 증가하였다. 용존산소량이 급격하게 소모되고 난 후로는 거품이 많이 발생하여 소포제를 사용하여 제거하였고, pH는 반응 시작과 함께 증가하여 반응 28시간에 최대 pH 9.27를 나타내었으나, 그 이후는 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다 (도 2). 세포 건조중량은 반응 24시간에 최대 2.92 g/L이었으며, 이때, 코엔자임 Q10 함량은 건조 세포 그램당 3.98 mg/g 이었다. 초기 공기 공급속도를 5 vvm으로 조절하여 배양하였을 경우에 비하여, 세포 건조중량과 코엔자임 Q10의 함량 모두 감소하였다.

[0047] 1 L 반응기에서 얻은 코엔자임 Q10 생산 최적조건을 150L 반응기 생산에 적용한 결과, 코엔자임 Q10 함량이 건조세포 그램당 4.25 mg/g로 scale-up에 따른 코엔자임 Q10 함량 저하 문제가 거의 없었다. 일반적으로 대량생산 규모에서의 수득율이 실험실 규모에서의 수득율보다 낮아지는데 반하여, 1L 반응기에서의 결과를 토대로 분석하여 대량생산에 적용한 결과로 실험실 규모에서의 수득율을 유지할 수 있는 최적의 대량생산 방법을 완성하였다. 본발명에 따르면, 대량생산공정에서 실험실단위에서 가지는 높은 코엔자임 Q10 함량을 유지하기 위하여서는, 로도박터 스페어로이즈 변이주의 성장에 알맞은 초기 공기공급속도의 조절이 중요하였다. 본 실시예의 코엔자임 Q10 대량생산의 경우, 초기 공기공급속도를 5 vvm으로 하고 대수성장기에 on-off 방식으로 용존산소량을 조절하여 0.5 ppm 이하로 조절함으로써 scale-up 문제없이 코엔자임 Q10을 생산하는 특징을 보였다. 상기 코엔자임 Q10을 대량생산하는 방법의 특징은 실험실 규모의 1L 반응기에서의 코엔자임 Q10 생산 방법과 차이가 있으며 특히 초기 공기공급속도가 5vvm 인 경우에 1L 반응기에서 코엔자임 Q10의 생산효율은 0.2vvm 인 경우보다 낮았고, 이는 코엔자임 Q10을 대량생산하는 방법이 실험실 규모의 1L 반응기에서 코엔자임 Q10을 생산하는 방법으로부터 자명하게 도출되는 것이 아님을 의미한다.

[0048] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

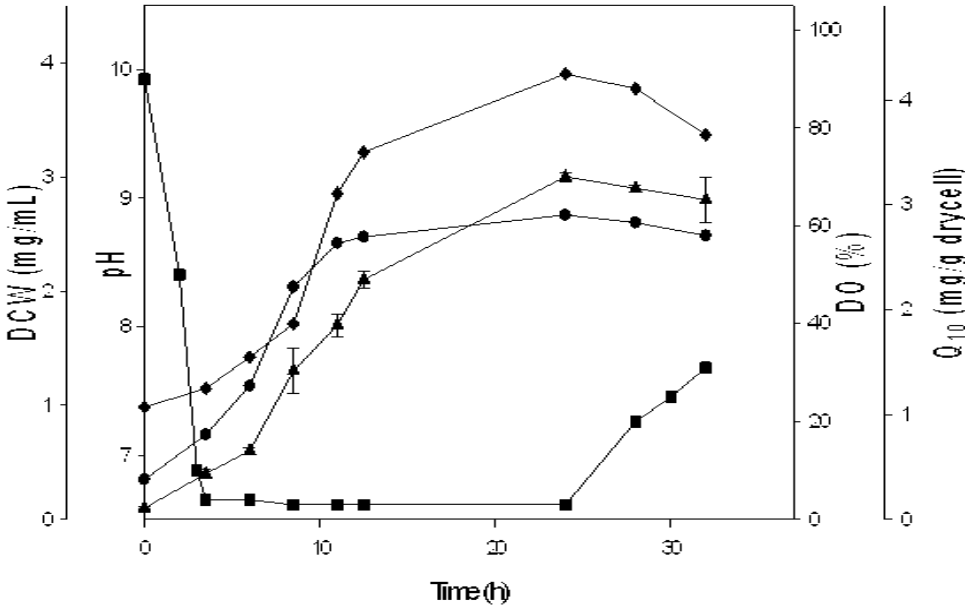
도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 150L 반응기에서 30 ℃, 200 rpm, 초기공기공급속도 5 vvm 및 수동적 on-off 방법의 공기 공급 상태에서 배양한 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)의 생육 및 코엔자임 Q_{10} 생산량을 나타낸 그래프이다(pH: -●- ; 용존산소량: -■-; 세포건조중량: -▲- ; 코엔자임 Q_{10} 생산량 : -◆-).

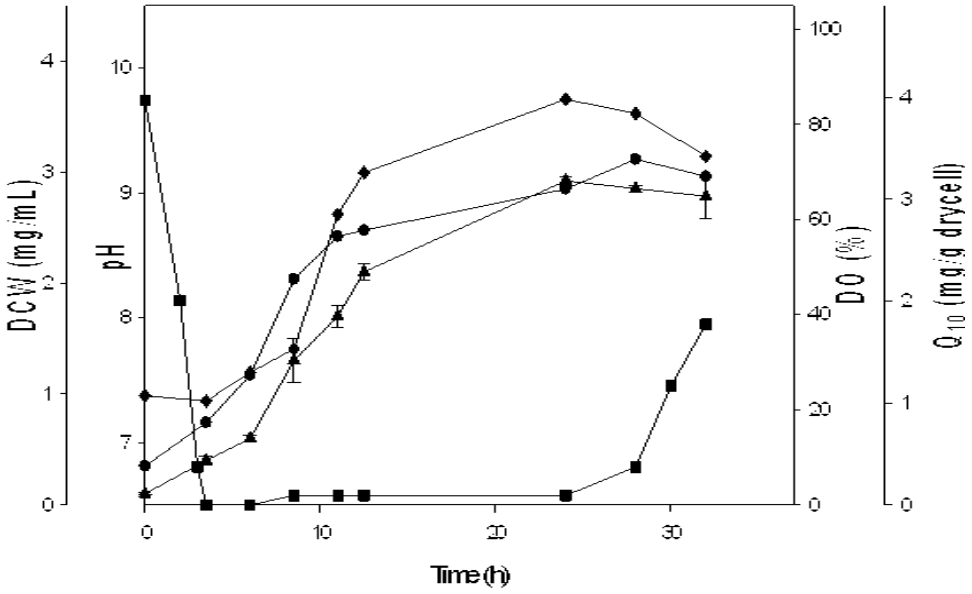
[0050] 도 2는 150L 반응기에서 30 ℃, 200 rpm, 초기공기공급속도 10 vvm 및 수동적 on-off 방법의 공기 공급 상태에서 배양한 로도박터 스페어로이즈(*Rhodobacter sphaeroids*)의 생육 및 코엔자임 Q_{10} 생산량을 나타낸 그래프이다(pH: -●- ; 용존산소량: -■-; 세포건조중량: -▲- ; 코엔자임 Q_{10} 생산량 : -◆-).

도면

도면1



도면2


DCW (mg/mL)
pH
DO (%)
Q_{10} (mg/g drycell)
Time (h)
0
10
20
30
4
3
2
1
0
10
9
8
7
100
80
60
40
20
0