

## ***Candida utilis*에 의한 Cytidine 5'-diphosphate Choline의 발효생산**

이인선 · 조정일\* · 조규선\*\*

계명대학교 식품가공학과 · 오리엔트식품 주식회사\* · 해태식품 주식회사\*\*

## **Fermentative Production of Cytidine 5'-diphosphate Choline by *Candida utilis***

**In-Seon Lee, Jung-Il Cho\* and Gu-Sun Cho\*\***

*Department of Food Science and Technology, Keimyung University*

*Orient Food Co., Ltd.\**

*Hae-Tai Food Co., Ltd.\*\**

### **ABSTRACT**

CDP-choline is known as an intermediate of lecithin biosynthesis, and as an important drug for nervous diseases of the brain. For the bioconversion of CMP and choline to CDP-choline, ATP is required as an energy source. In these studies, the biosynthetic reaction of CDP-choline was coupled with ATP regenerating system by glycolysis. As a microorganism containing the highest conversion activity of CMP and choline to CDP-choline, *Candida utilis* ATCC 42416 was selected. The optimum reaction condition were 50mM choline chloride, 20mM CMP, 100mM potassium phosphate (pH8.0), 300mM glucose, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10% dried cells with shaking incubation at 30°C. The reaction was thus performed for 10 hours under the above optimum conditions. The concentration of CDP-choline was 16mM (80% in conversion ratio).

Key words: Cytidine 5'-diphosphate choline, *Candida utilis*.

### **I. 서 론**

CDP-choline(cytidine 5'-diphosphate-choline)은 뇌손상에 의한 의식장애, 뇌졸중 및 뇌대사 이상

으로 인한 각종 장애의 치료에 사용되는 의약품이다<sup>1-2)</sup>. Kariya<sup>3)</sup> 등은 CDP-choline이 lecithine 생합성의 전구체임을 밝혔고, Geiger<sup>2)</sup> 등은 고양이를 이용한 실험에서 뇌의 활동과 인지질 함량과의 관계를 보고하였다. 현재 CDP-choline은 화학합성법으

로 생산되고 있으나 보다 효율적인 방법으로 미생물에 의한 생산방법이 주목되고 있다. 즉, CMP(cytidine 5'-monophosphate), choline과 ATP로 부터 CDP-choline을 미생물 효소를 이용하여 합성하는 것으로 이 방법은 비교적 값싼 기질인 CMP와 choline을 이용할 수 있지만 고가의 시약인 ATP가 요구된다<sup>3-5)</sup>.

ATP는 인산기의 가수분해로 energy를 방출하며, 이 energy는 수많은 종류의 생화학 반응에 소모되므로 CDP-choline을 효율적으로 생산하기 위해서는 ATP 공급 문제의 해결이 필요하다. 지금까지 알려진 ATP 생산 및 재생 방법에는 동물이나 미생물에서의 추출법, 화학합성법<sup>6)</sup>, 미생물이나 효소에 의한 생산법 등이 있는데, 미생물에 의한 생산법은 Laufer<sup>7)</sup> 등에 의해 효모의 glycolysis와 공역하여 AMP 또는 adenosine이 ATP로 인산화되는 것이 발견된 이후 활발히 연구되고 있다<sup>8-10)</sup>.

본 연구는 ATP 재생계를 도입한 CMP와 choline으로부터 CDP-choline의 효소적 전환에 관한 것으로 CDP-choline 합성능이 높은 균주를 선정하여 균체처리 조건과 CDP-choline생산을 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용 미생물

CDP-choline 합성능이 우수한 균주를 선발하기 위해서 *Candida utilis* ATCC 42416, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 42949, *Penicillium citrinum* IFO 6352, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872, *Escherichia coli* ATCC 11246 등 6종류의 균주를 사용하였다.

### 2. 시 약

CDP-choline, choline chloride, CMP, ATP, NAD, Dowex 1×2 등은 Sigma사(U.S.A.)에서, 배지로 사용한 yeast extract, peptone 등은 Difco사에서 구입하여 사용하였다.

### 3. 배지 및 배양

효모의 배양을 위한 배지로는 glucose 5%, pep-

tone 0.3%, yeast extract 0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%,  $\text{NH}_4 \cdot 2\text{HPO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%를 사용하여 28℃에서 18시간 진탕배양하였다. 곰팡이 배양용 배지는 maltose 1.275%, dextrin 0.275%, glycerol 0.235%, peptone 0.078%로서 28℃에서 7일간 진탕배양하였다. 세균용 배지는 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%로 37℃에서 18시간 진탕배양하였다. 단, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872는 30℃에서 배양하였다.

### 4. 균체제조

배양액을 원심분리(효모와 곰팡이는 3,000×g, 세균은 8,000×g에서 5분간)하여 균체를 모은 후 3회 세척하였다. Air dried균체제조<sup>(8)</sup>는 균체 1g(wet, wt)를 증류수 1ml에 현탁시킨 후 상온에서 약 60% 송풍 건조한 후 진공 건조기에서 24시간 완전히 건조하였다. 동결건조 균체는 1g(wet, wt)의 균체를 동결건조기로 24시간 동결건조한(-70℃, 7.5mmHg) 후 -20℃에서 보관하여 사용하였다. Acetone과 toluene 처리 후 동결건조한 균체제조는 Tochikura와 Fujio<sup>(11)</sup> 등의 방법을 약간 변형하여 사용하였다.

### 5. CDP-choline 발효조건 선정

각각의 균주를 배양하여 균체처리 최적조건하에서 균체를 제조하여 표준 반응용액 중의 각 성분의 농도를 변화시키면서 각 성분의 최적 농도를 결정하여, 결과적으로 최적화 반응액을 얻었다. Kariya 등<sup>(12)</sup>이 *Hansenula jadinii* IFO 0987에 대하여 최적화 시킨 반응액(Table 1)을 2ml씩 사용하여 30℃에서 6시간 진탕 반응시킨 후, 상징액을 분석하여 CMP와 choline의 CDP-choline으로의 전환율이 높은 균주를 선별하였다.

### 6. CDP-choline 분석<sup>(1)</sup>

반응액 5μl를 chromatography 용지(Whatman No. 1)에 점적하여 95% ethanol-1M ammonium acetate (2:1)를 전개 용매로 하여 2.5~3시간 전개시켰다. 용지를 건조시킨 후 254nm의 자외선 등을 비추어 흑자색의 점을 확인하고 0.01N HCl 5ml를

가하여 37℃에서 18시간 추출하였다. 추출액은 280nm에서의 흡광도를 측정하고, 표준곡선을 이용하여 농도를 계산하였다.

**Table 1.** Standard reaction mixture

Ingredient	Concentration(mM)
CMP · Na <sub>2</sub>	10~50
Choline chloride	50~150
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	50~150
Glucose	200~500
MgSO <sub>4</sub>	30~80
Dried cell	10%
pH	6.0~9.0

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\* : Potassium phosphate buffer(pH 8. 0)

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. CDP-choline 생성능이 우수한 균주의 선별

CDP-choline 생산능이 우수한 균주를 선별하기 위해 곰팡이, 효모, 그리고 세균 등 6종류의 미생물에 대하여 CDP-choline의 생산능을 조사한 결과, 생성능이 가장 우수한 균주는 *Candida utilis* ATCC 42416 이었다(Table 2).

**Table 2.** CDP-choline forming activity in different microorganisms

Strains	CDP-choline forming(mM)*
<i>Candida utilis</i> ATCC 42416	9.22
<i>Sacchromyces cereviase</i> ATCC 42942	3.65
<i>Penicillium citrinum</i> IFO 6352	0.24
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	0.00
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6872	0.13
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11246	0.00

\* in standard reaction conditions(Table 1)

**Table 3.** Comparison on relative conversion ratio of various cell preparation

Cell preparation	Relative conversion ratio(%)*
Air dry	120
Toluene treated freeze dry	50
Acetone treated freeze dry	50
Freeze dry	630

\* Conversion ratio(%) =  $\frac{\text{CDP-choline produced}}{\text{CMP added}} \times 100$

#### 2. 전처리가 CDP-choline 생산에 미치는 영향

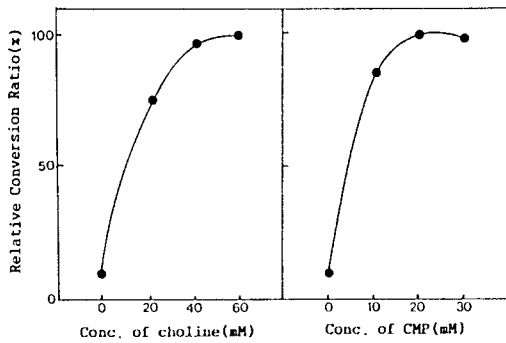
CDP-choline과 같은 핵산관련물질은 세포막의 투과성이 낮기 때문에 생성된 CDP-choline이 세포 밖으로 빠져나오지 못한다. 따라서 균체를 물리적, 화학적으로 처리하여 세포막의 투과성을 증가시키기 위한 연구가 진행되고 있다<sup>13)</sup>.

본 연구에서는 최적화된 배지 및 배양조건에서 *Candida utilis* ATCC 42416을 18시간 배양한 후, 집균한 균체를 전처리하여 효소원으로 사용하였을 때 CDP-choline 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Toluene과 acetone을 처리한 뒤 동결건조하였을 때의 전환율은 air dry한 경우에 비해, 50%로 매우 낮았으나 전처리 없이 동결건조하였을 때는 약 5배의 높은 효과를 나타내었다(Table 3).

#### 3. CDP-choline 발효 반응조건 선정

##### 1) Choline 및 CMP 농도의 영향

효소원으로 동결건조균체를 10%로 사용하였을 때 기질인 choline과 CMP의 농도에 따른 CDP-choline로의 상대적 전환율을 측정하였다(Fig. 1).

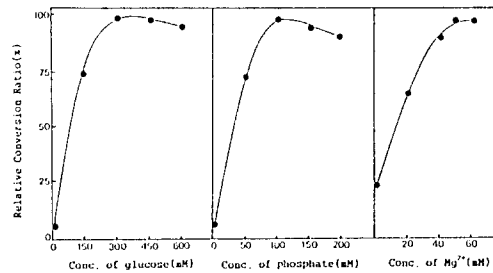


**Fig. 1.** Effect of choline and CMP concentration on CDP-choline formation. The reaction mixture was contained 100mM potassium phosphate (pH 8.0) 300mM glucose, 50mM  $MgSO_4$ , 10% dried cells, incubation at 30°C with shaking.

Choline의 농도를 0-60mM까지 변화시키면서 상대적인 전환율을 측정 한 결과 50mM일때 최대의 전환율을 나타내었다. CDP-choline 생산에 있어서 또 다른 기질인 CMP의 농도는 20mM까지 최대의 생산을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 생산성이 증가하지 않았다.

## 2) Glucose, 무기인산, $Mg^{2+}$ 의 효과

CMP와 choline에서 CDP-choline으로 발효시에 에너지원으로 사용되는 glucose와 인산 공여체로서 쓰이는 무기인산 및  $Mg^{2+}$ 의 효과에 대하여 조사하였다(Fig. 2). 해당체를 이용한 ATP 재생계에서 에너지원으로 쓰이는 glucose의 농도를 0mM-600mM의 범위에서 각 농도에 따른 CDP-choline 생산성은 300mM일때 가장 좋은 효과를 나타내었다. 또한 glucose의 농도가 300mM이상일 때에는 완만하게 감소하였다. 무기인산은 CDP-choline 생산시 인산공여체로 쓰이는 무기인산의 농도에 따른 영향을 조사한 결과 각 농도에 따른 ATP 생산성은 100mM일때 가장 좋은 결과를 나타내었다. 또한  $Mg^{2+}$ 은 glucose를 에너지원으로 한 ATP의 생합성에 관여하는 여러가지 효소들과 choline의 인산화 반응의 보조제로서 작용한다. 일반적으로  $Mg^{2+}$ 은 여러가지 음이온과 결합하여 수용성염을 형성하는

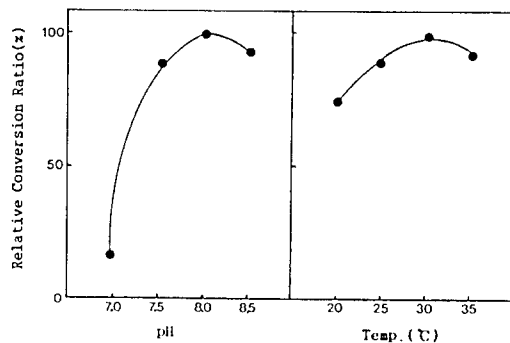


**Fig. 2.** Effect of glucose, phosphate and  $Mg^{2+}$  concentration on CDP-choline formation. The reaction mixture contained 50mM choline chloride, 20mM CMP, 10% dried cells, incubation at 30°C with shaking.

성질이 알려져 있으며, 이러한  $Mg^{2+}$ 의 농도에 따른 CDP-choline의 생산성을 조사하였다. 본 연구에서는 50mM에서 가장 좋은 효과를 나타내었고 그 이상의 농도에서  $Mg^{2+}$ 은 반응액의 수용성 인산을 불가용형태로의 침전으로 CDP-choline 생산을 간접적으로 침해하기 때문이라 사료된다.

## 3) pH 및 온도의 효과

CDP-choline 발효에 있어서 pH와 온도에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7.0~8.5의 범위에서 각 pH에 따른 ATP 생산성은

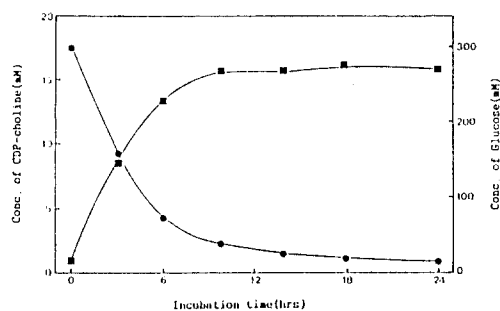


**Fig. 3.** Effect of pH and temperature on CDP-choline formation. The reaction mixture was contained 50mM choline chloride, 20mM CMP, 100mM potassium phosphate, 300mM glucose, 50mM  $MgSO_4$ , 10% dried cells.

pH 8.0에서 가장 좋은 효과를 나타내었다. pH 8.0 이하에서는 CDP-choline 생산에 관여하는 효소의 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 온도의 영향은 그림에서와 같이 각 온도에 따른 CDP-choline 생산성은 30℃부근에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

#### 4. 최적 발효조건에서 CDP-choline의 발효생산

이상의 실험결과 선정된 최적조건은 50mM choline chloride, 20mM CMP, 100mM potassium phosphate(pH 8.0), 300mM glucose, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10% 동결건조 균체로 나타났으며, glucose 소비와 CDP-choline의 발효생산 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Glucose은 발효 초기에 다른 화합물로 왕성하게 대사되거나 빠르게 소비되는 것으로 보아 해당체를 통하여 ATP가 생성되며 생성된 ATP가 CDP-choline 합성에 이용될 것으로 생각된다. 이와 같이 최적화된 반응계에서 24시간 발효시킨 결과 10시간 경과 후 20mM CMP의 초기 기질이 16mM CDP-choline 반응생산물을 생산하였으며 80%의 수율을 나타내었다. 따라서, choline과 CMP로부터 CDP-choline생산시 고가의 ATP를 첨가하지 않고 에너지원으로 glucose의 이용이 가능하며 고정화 균체를 통하여 연속생산할 수 있을 것으로 생각된다.



**Fig. 4.** CDP-choline production by freeze dried *Candida utilis* ATCC 42416. The reaction mixture contained 50mM choline chloride, 20mM CMP, 100mM potassium phosphate (pH 8.0), 300mM glucose, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10% dried cells, incubation at 30℃ with shaking. CDP-choline: ■ — — — ■, glucose: ● — — — ●.

## IV. 요약

CMP와 choline으로부터 미생물 효소를 이용하여 CDP-choline를 생산하려면 ATP의 지속적인 공급이 필요하다. 본 연구에서는 ATP의 연속적인 공급을 위해서 glucose의 해당과정을 도입하였으며, 고정화 균체를 이용하여 CDP-choline을 생산하였다. 전환 활성이 가장 높은 균주는 *Candida utilis* ATCC 42416을 선발하였으며, 18시간 배양에서 가장 활성이 높았다. 이 균주를 최적담체로 선정된 polyacrylamide에 고정화하여 CDP-choline을 생산하기 위한 최적조건은 50mM choline chloride, 20mM CMP, 100mM potassium phosphate(pH 8.0), 300mM glucose, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10% 동결건조 균체를 함유하는 반응액을 사용하여 30℃에서 진탕배양한다. 최적조건하에서 10시간 반응 후 생성된 CDP-choline의 농도는 16mM로서 80%의 전환율을 보였다.

## V. 참고문헌

- Ogata, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. and Aida K.: Cytidine Derivatives, in Microbial Production of Nucleic acid-related Substances, edited by the Association of Amino acid and Nucleic acid, 289, Kodansha Ltd., Tokyo, 1976.
- Geiger, A.: Metabolism of the Nervous System, 245, Pergamon Press, 1957.
- Kariya, Y., Kimura, A. and Tochikura, T.: CDP-choline Production from CMP and Choline by Yeasts, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 53, 546, 1975.
- Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Tachiki, T. and Gotan, T.: The Fermentative Production of CDP-choline by Yeasts, J. Ferment. Technol., 48(12), 769, 1970.
- Tochikura, T., Kariya, Y. and Kimura, A.: CDP-choline Production from CMP and

- Choline by Yeasts, *J. Ferment. Technol.*, 52(9), 637, 1974.
6. Smith, M. and Khorana, H. G.: Nucleoside Polyphosphates. VI., An Improved and General Method for the Synthesis of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 1141, 1977.
  7. Laufer, L. and Guteho, S.: 1964. Preparation of 5'-Polyphosphate Nucleotides, U. S. Patent 3,138, 1964.
  8. Tochikura, T., Kuwahara, M., Yagi, S., Okimoto, H., Taminasa, Y., Tano, T. and Ogato, K.: Fermentation and Metabolism of Nucleic Acid Relative Component in Yeast, *J. Ferment. Technol.* 45, 511, 1977.
  9. Nemet, M. I., Solomon, B. A., Langer, R. S. and Colton, C. K.: Enzymatic Regeneration of ATP from AMP and ADP: Kinetic Studies with the Coupled Enzyme System, in *Enzyme Engineering*, edited by Pye, E. K. and Weetall, H. H., Plenum press, 3, 85, 1978.
  10. McCarty, R. E.: Preparation and Properties of Phosphorylating Subchloroplast Particles, *Meth. Enzymol.* 23, 302, 1971.
  11. Fujio, T. and Furuya, A.: Production of ATP from Adenine by *B. ammoniagenes*, *J. Ferment. Technol.*, 61(3), 261, 1983.
  12. Kariya, Y., Aisaka, K., Kaji, Y., Kimura, A. and Tochikura, T.: Fermentative Production of CDP-choline Analogues by *Hansenula jandinii*, *J. Ferment. Technol.*, 53(8), 599, 1975.
  13. Kimura, A. and Morita, M., Fermentative Formation of CDP-choline by Intact Cells of a Yeast *Saccharomyces carlsbergensis*(IFO 0641) Treated with a Detergent Triton X-100, *Agri. Biol. Chem.*, 39(7), 1469, 1975.