

Ubiquinone 생성 광합성 세균 *Rhodobacter* sp. N-2의 분리

이 은 숙[†] · 이 준 우*

경산대학교 한의예과, *경북전문대학 식품가공과

Isolation of Ubiquinone Formation Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter* sp. N-2

Eun-Sook Lee[†] and June Woo Lee*

Department of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University

*Department of Food Science and Technology, Kyungbuk College

Abstract

A strain of non-sulfur photosynthetic bacteria possessing large amount of ubiquinone-10 in the cell mass, was isolated from waste water collected from the Nakdong River.

It was identified as *Rhodobacter* sp. N-2 by a series of studies on its morphological, cultural and physiological characteristics.

The organism appeared to get higher cell mass under circumstances of anaerobic growth conditions than under photosynthetic aerobic cultures.

Biotin and thiamin and niacin could be used as good growth factors.

Key words : ubiquinone, photosynthetic bacteria, *Rhodobacter* sp.

서 론

광합성 세균은 모두 *Rhodospirillales*에 속하는 세균인데 gram음성이며 운동성이 있는 것은 극모성 편모를 가진다.

광합성 세균의 대부분이 절대혐기성 세균으로서 빛의 존재와 무산소 상태가 중요한 생장요인이다¹⁾. 광합성 세균은 태양의 광에너지를 이용하여 이산화탄소를 유기물로 전환시키고 유기 폐자원으로부터 수소를 생성, 고갈되어 가고 있는 석유 energy에 대체하고 있다. 식품공업분야에서는 고농도의 유기폐수를 폭기시키지 않는 상태에서 효율적으로 처리하여, 이때 생성되는 균체는 단세포 단백질의 형태로 고영양 식품이나 사료로 이용하고 있다²⁾.

광합성 세균은 ubiquinone을 생성하는 특징이 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 강심제로 사용되는 ubiquinone과 빈혈증 치료제인 vitamin B₁₂함량이 다른 생물조직에 비하여 윌

등히 높기 때문에 광합성 세균의 유용성이 증가되고 있다³⁾.

Ubiquinone은 호흡활성이 높은 조직에 많이 분포되어 있으며 mitochondria에 고농도로 존재하는 것은 ubiquinone이 mitochondria에서 호흡 연쇄반응의 산화 환원계에 참여함으로 전자 전달체로서 중요한 역할을 하기 때문으로 생각된다⁴⁾.

Ubiquinone은 vitamin E가 결핍되어 일어난 근육 조직 중의 높은 lysosome 효소활성을 부활시켜 근무력증 치료제로도 쓰이며 불안정화된 적혈구 막을 정상화시켜 악성빈혈, 소아빈혈 치료제로도 매우 유용한 물질이다^{5,6)}.

동식물에서 ubiquinone-10 추출은 함량이 낮을 뿐 아니라 대량 사육의 난점 때문에 미생물에 의한 대량 배양이 효과적이다⁷⁾.

본 실험은 자연계에서 분리한 여러 광합성 세균 중 ubiquinone을 생성하는 균주를 선정, 동정하였다.

[†] Corresponding author : Eun-Sook Lee

재료 및 방법

1. 광합성 세균의 분리

경상북도 대구 근교의 강, 논, 호수 등의 유기물이 부식된 양지바른 수계 혐기층에서 토양을 채취하여 분리하였다.

채취된 시료를 멸균 생리 식염수로 희석하여 30°C에서 200W의 백열등이 쪼이는 곳에 48시간 정치배양 후 Table 1과 같은 조성을 한 Ormerod의 photosynthetic non-sulfur bacteria 분리용 배지를 넣은 cap tube에 1 loopful씩 접종하고 같은 조건에서 1주일간 배양하여 광합성 세균을 분리하였다.

그 후 붉은색 또는 갈색의 색소를 형성하는 균층을 취하여 다시 새로운 배지에 옮겨 배양하였으며 이러한 조작을 3~4회 반복하여 광합성 세균은 증식시키고 비광합성 세균은 도태시키는 enrichment culture를 한 후 Roux culture bottle 또는 rolling tube상의 배지에 균일하게 접종하였다^{8,9)}.

그 후 배양기나 tube를 진공상태로 한 다음 질소나 아르곤으로 공기를 치환시키고 30°C에서 200W 백열등이 쪼이는 곳에 1주일간 배양하여 광합성 색소를 형성하는 single colony를 고체배지에서 순수 분리하였다¹⁰⁾. 취득된 colony를 agar 0.2% 함유한 Ormerod의 반유동 고체배지에 stab culture한 후 30°C 백열등 아

Table 1. Medium composition for isolation of photosynthetic non-sulfur bacteria

MgSO ₄ · 7H ₂ O	200 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	75 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	12 mg
EDTA	20 mg
K ₂ HPO ₄	900 mg
KH ₂ PO ₄	600 mg
Lactic acid	30 mM
Glutamic acid	7 mM
Yeast extract	300 mg
* Mineral soln.	1 ml
H ₂ O	1 ml
* Mineral solution(g/l)	pH(NaOH) 6.8
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.1
H ₃ BO ₃	2.8
Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	0.04
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.24
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.75

래에서 1주일 배양한 후 4°C에 보존하였다.

2. Ubiquinone-10 생성균주의 선별

Table 2와 같은 조성의 배지 500ml를 Roux culture bottle에 넣고 분리된 광합성 세균을 접종하여 30°C, 혐기적 및 광조건에서 5일간 배양한 후 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 취하였다(Hitachi 20PR-52 Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge, Japan).

원심분리된 균체를 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, ethyl ether-ethanol (3:1)로 ubiquinone을 solvent extraction한 후 감압 농축하여 얻은 syrup 상태의 시료를 n-Hexane에 녹여 TLC법에 의해 benzene을 전개용매로 하여 실온 상승법으로 전개한 후 표준 ubiquinone-10과 같은 R_f치를 나타내는 균주를 1차 선정하였다.

Whatman No. 1 filter paper를 liquid paraffin 5% (v/v)를 함유한 light petroleum용액속에 적신후 공기 중에서 건조하여 1차 선정된 균주의 solvent extraction된 부분을 일정량 취하여 전개시키는 reverse phase paper chromatography법을 사용하여 균주를 2차 선정하였다. 이동상은 N,N'-dimethyl formamide-H₂O (39:1, v/v)을 사용하여 전개시킨 후 UV chamber속에서 ubiquinone-10의 위치를 확인한 후 ubiquinone-10 부분을 오려내어 hot EtOH로 용출한 다음 275nm에서 O.D를 측정하여 ubiquinone-10의 생성량이 가장 많은 균주를 최종 선정하였다(Fig. 1).

Table 2. Medium composition for ubiquinone-10 formation by the isolated photosynthetic bacteria

	5	g/l
Na-Malate	5	g/l
KH ₂ PO ₄	0.5	
K ₂ HPO ₄	0.5	
(NH ₄) ₂ · HPO ₄	0.8	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.004	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005	
Na-Glutamate	2.0	
Yeast extract	1.8	
pH	7.4	

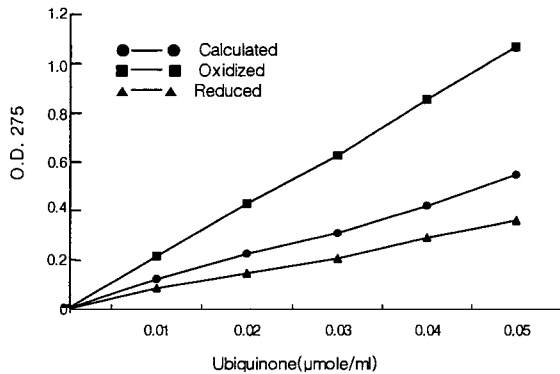


Fig 1. Standard curve for ubiquinone estimation by spectrophotometric analysis.

3. 광합성 세균의 동정

균의 형태적, 생리적, 배양적 성질은 Handbook of Microbiology¹¹⁾에 따라 실험하였고 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(9th ed.)¹²⁾에 준하여 동정하였다.

광합성 세균은 빛을 고정하기 위한 색소를 갖고 있으며 이 색소는 carotenoid로서 그 종류에 따라 광합성 세균의 분류에 중요한 기준이 된다¹³⁾. Carotenoid의 추출을 위하여 균체를 냉동건조시켰다. 건조균체 0.1g에 benzene-diethyl ether(7:3) 30ml을 넣고 30분간 진탕하고 원심분리 및 감압 농축한 후 소량의 benzene에 용해시켜 TCL 시료로 사용하였다. TCL는 Kiesel gel G(Merk)를 사용하였으며, n-hexane-diethyl ether-acetone(8:2:11) 혼합용제를 전개용매로 사용하였고 분리되는 band는 acetone에 용출시킨 후 Spectrophotometer로 scanning하여 표준 carotenoid와 비교하였다.

Bacteriochlorophyll은 균체를 원심분리하여 회수한 다음 10mM 인산 완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후 60% sucrose 용액에 현탁하여 Spectrophotometer(Shimadzu UV-260)로 scanning하였다¹⁴⁾.

4. 균주의 배양 및 균체의 회수

Table 2의 ubiquinone 생성배지 200ml을 culture bottle에 넣고 선정된 광합성 세균을 접종, 30°C 혐기적 및 광조건 상태에서 48시간 배양한 후 이것을 seed로 하여 inoculum size 5%로 접종, 혐기적 및 광조건 하에서 5일간 배양하였다.

배양이 끝난 배양액을 660nm에서 O.D 측정으로 균 성장측정후, 원심분리하여 균체를 회수하고 생리식염수로 2~3회 세척한 다음 균체를 동결 건조하여 O.D에 따른 건조균체량(DryCellWeight: D. C. W)을 결

정하였다.

결과 및 고찰

1. Ubiquinone-10생성 광합성 세균의 분리 및 선정 경상북도 대구 근교의 강, 논, 호수의 수계협기층에서 시료를 임의로 총 50점을 채취하여 Table 1의 배지에서 enrichment culture를 하여 광합성 세균으로 추측되는 균주 총 130주를 분리하였다.

분리된 균주를 Table 2의 배지 1 l에 5일간 혐기적 광조건 배양한 후 원심분리하여 균체를 취한 다음, 용매로 추출하여 얻어진 syrup을 reversed phase paper chromatography 및 TLC법에 의하여 ubiquinone을 분리, 비교하여 그중 ubiquinone의 함량이 가장 높은 N-2는 낙동강 유역의 폐수에서 채취한 시료에서 분리된 것이다.

2. 균주의 동정

1) 형태적 및 배양상의 특성

광학현미경으로 관찰하여 본 결과는 단간균(0.6~1.4×1.5~2.0 μm)으로 binary fission으로 증식하였으며 운동성이 있었다.

Gram 음성으로 광합성 세균의 일반적 특성을 가지고 있었다. 혐기적 조건에서 가장 잘 성장하였다.

혐기적 조건에서는 light에서 진한 갈색 내지 붉은색을 띄었고 dark에서는 연한 분홍색을 띄었다.

Gelatine을 액화시키지 못하였으며 starch와 casein은 분해시켰다.

Catalase는 positive이었으며 nitrate 환원력이 있었고 cysteine에서 H₂S를 발생하였다.

균체를 원심분리한 후 60% sucrose용액에 suspension시켜 spectrophotometer에서 scanning 하였을 때 390.5, 595, 870, 890 nm에서 최대흡광도를 나타내어 bacterio-chlorophyll a가 생성됨을 알았다.

이상의 결과를 정리하면 Table 3, 4와 같다.

2) 생육인자의 요구성

Table 2배지에서 yeast extract를 빼고 대신에 vitamin free의 casamino acid를 첨가하였을 때 분리균 H-2는 거의 성장하지 않았다.

따라서 이 균은 growth factor를 요구하는 것으로 판단하고 yeast extract 대신 다른 Vitamin을 첨가하였으며 이때의 결과는 Table 5와 같다.

Yeast extract를 첨가하였을 때 성장이 왕성한 것은

Table 3. Major characteristics of the selected strain of photosynthetic bacteria *Rhodobacter* sp. N-2

Morphology	
size	0.6~1.4×1.5~2.0 μm
shape	ovoid
motility	motile
mode of division	binary fission
Growth and color	
anaerobic, light	good growth dark brown to purple
anaerobic, dark	poor growth pale pink
aerobic, light	poor growth pale pink
aerobic, dark	very poor growth pale pink
Gram staining	negative
Gelatin liquefaction	negative
Starch hydrolysis	positive
Casein utilization	positive
Catalase	positive
Nitrate reduction	positive
H ₂ S formation	positive
Bacteriochlorophyll	a (390.5, 595, 870, 890nm)
Growth factor requirement	positive
Reduced sulfur compound utilization	negative

복합적인 영양분때문인 것으로 보이며 biotin, thiamin, niacin에서 대조군에 비하여 많은 성장을 나타내며 3가지를 모두 첨가하였을 때는 yeast extract와 대등한 성장을 나타내었다.

따라서 분리군 N-2의 growth factor는 biotin, thiamin, niacin 중 하나로 볼 수 있으나 3가지를 동시에 첨가하였을 때가 완전한 생육을 나타낸다고 볼 수 있다.

Table 4. Identification of carotenoids of *Rhodobacter* sp. N-2

R _f value	Absorption maxima(nm)			Content	Identification
0.62	487	446	428	++++	Spheroidene
0.52	516	470	462	++	Rhodovibrin
0.32	433	482	570	+	Demethylated spheroidene

Table 5. Effect of vitamins on the growth of the selected strain N-2

Vitamin	Concentration	Cell growth (O.D. 660)
Control	Vitamin free	0.07
Yeast ext.	300 mg/ l	2.16
Thiamin	1 mg/ l	0.92
Biotin	10 μg/ l	0.71
Cyanocobalamin	300 μg/ l	0.18
Niacin	100 μg/ l	0.52
Thiamin + Biotin		0.91
Biotin + Niacin		0.81
p-Aminobenzoic acid	200 μg/ l	0.14
Thiamin + Biotin + Niacin		2.60

3) 유허화합물에 대한 생장시험

Yeast extract를 첨가한 Ormerod 배지에 환원된 유허 화합물을 첨가하여 배양하였을 때 균의 성장도를 본 결과는 Table 6과 같다.

즉 유허화합물을 소량 첨가하였을 때 매우 적은 농도의 H₂S에 의하여 성장이 저해됨을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 본 균주는 유기물 존재하에서는 광합성 색소를 형성하여 왕성히 성장하나 유허화합물을 첨가하였을 때 이용하지 못하고 균의 형태가 avoid이고 binary fission으로 증식하므로 *Rhodobacter* sp.로 분류되어야 한다.

Table 6. Utilization of reduced sulfur compounds by the selected strain N-2

Sulfur Compound	Concentration(%)	Cell growth (O.D. 660)
Control	No sulfur	3.05
Sulfide	0.02	0.04
Thiosulfate	0.05	0.07
Thioglycolate	0.05	0.06

요 약

Ubiquinone-10생성 광합성 세균을 선정하기 위하여 경상북도 대구 근교의 강, 논, 호수 등의 수계함기 층에서 토양시료를 채취하거나 유기 폐수 중에서 시료를 채취하였으며, 총 50점의 시료에서 130주의 광합성 세균을 분리하였으며 이 중에서 ubiquinone-10의 생성이 가장 많은 균주번호 N-2를 최종 선정하였다.

선정된 균주의 미생물학적 특성을 규명한 결과 *Rhodobacter* sp.와 거의 일치하였으며 이 균주는 이와 동일한 균주이거나 유사한 근연의 균으로 판단하여 본 분리균주 N-2를 *Rhodobacter* sp. N-2로 명명하였다.

본 균주는 anaerobic light로 배양할 때가 aerobic dark일 때보다 훨씬 생육이 양호하였다.

분리균 N-2의 growth factor는 biotin, thiamin, niacin 중 하나이며, 3가지를 동시에 첨가하였을 때 완전한 생육을 나타낸다.

유황화합물 H₂S를 첨가하였을 때 매우 적은 농도에서 본 균주의 성장이 저해되었다.

참고문헌

1. Paula S. Duggan, Simon D. Parker, and Mary K. Phillips-Jones : Characterisation of a *Rhodobacter sphaeroides* gene that encodes a product resembling *Escherichia coli* cytochrome b561 and *R. Sphaeroides* cytochrome b₅₆₂. *Fems Microbiology Letters*. 189. (2000).
- 2.金森正雄: 光合成細菌の菌體成分. 醱酵と工業, 日醱酵工協會., 36, 934 (1978).
3. Simon P. Gough, Bent O. Petersen and Jens Ø. Duus. : Anaerobic chlorophyll isocyclic ring formation in *Rhodobacter capsulatus* requires a cobalamin cofactor. *PNAS*. vol. 97, 12. 6909 (June 6, 2000).
4. Crane, F. L. : Quinones in Lipoprotein Electron Transport Systems. *Biochem.*, 1, 510 (1962).
5. Alaupovic, P. and B. Connor Johnson : Relationship between Coenzyme Q and α -Tocopherol Metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 247 (1959).
6. Jack L. Smith., J. Scholler, Harold W. Moore, Thomas M. Farley and K. Folkers : Studies on the Mechanism of Vitamin-like Activity of Coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 129 (1966).
7. 森本活 : ユビキノソ. 蛋白質核酸酵素., 16, 183 (1971)
8. Hungate, R. E. : A Roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology.*, 3B, 117 (1969).
9. Ueki, A., Minato, H., Azuma, R. and Suto, T. : Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids : Enumeration of sulfatereducers by the anaerobic roll tube method. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 26, 25 (1980).
10. Pfenning, N. : *Rhodopseudomonas acidophila*, Sp. N., a New species of the Budding purple nonsulfur Bacteria. *J. Bacteriol.*, 99, 597 (1969).
11. Lechvlier, L. : Handbook of Microbiology, Vol. 1, CRC press (1974).
12. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.), The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1994).
13. Jensen, S. L. : "Biochemistry of Chloroplasts" Vol. 1. ed. by Goodwin, T. W., Academic press Inc. London and New York, P.437 (1966).
14. Johammes, F. I. and Hans, G. T. : The procaryotes Vol. III. second edition. p. 2141~2153 (1992).

(2000년 12월 3일 접수)