

Note

Q₁₀ 함유 광합성세균의 분리 및 동정

정수경 · 김중균*

부경대학교 식품생명공학부

Isolation and Identification of a Photosynthetic Bacterium Containing Q₁₀.Soo Kyoung Jeong and Joong Kyun Kim*. *Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Abstract A Q₁₀-producing photosynthetic bacterium was isolated from the silt at Nakdong river. The isolate had 1.55 mg of Q₁₀ per gram of dry cell. By the 16s-rDNA sequence analysis, the isolate was found to be *Rhodobacter sphaeroids* with 100% similarity (Genbank Accession No.= AM696701).

Key words : Photosynthetic bacterium, ubiquinone(Q₁₀), *Rhodobacter sphaeroids*

유비퀴논(Ubiquinone)은 생체 내의 산화환원반응에 관여하는 전자전달물질의 하나로서 세포들이 필요로 하는 생체 에너지(ATP)가 잘 생성되도록 돕는 생물체에 상존하는 보조효소이며 coenzyme Q라고도 한다. Coenzyme Q는 CH₃O기를 2,3-위치에 가지는 벤조퀴논 유도체로서, 세포의 미토콘드리아에 다량으로 함유되어 있다 [2,8]. 인체의 경우 coenzyme Q 중 Q₁₀이 대부분을 차지하며, 활동을 많이 하는 기관인 심장, 폐, 간, 잇몸 등에 많이 분포되어 있다 [6]. 지용성 물질인 coenzyme Q는 20대까지는 왕성하게 만들어지다가 40대부터는 점점 생산량이 적어지고 노화가 시작되면서 coenzyme Q를 많이 필요로 한다. 또한, Q₁₀은 항산화 비타민 E가 기능을 할 수 있도록 도와주고, 눈 주변의 주름 등 피부 노화 억제, 미백 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다 [4]. Coenzyme Q는 처음에는 심장과 관련된 질병과 유방암 등에 많이 적용하여 사용되어 왔으나, 지금은 응용범위가 광범위해져 고혈압, 동맥경화, 당뇨 등 대사증후군의 질환에도 사용되고 피부노화가 진행되는 것을 막아 주므로 기능성 화장품에도 널리 적용되고 있는 생체 내에서 합성되는 대사 물질이다. 향후 웰빙시대를 맞이하여 Q₁₀의 경제적 수요와 가치

가 증가하면 고품량 Q₁₀의 대량생산은 필수적이며, 그 산업적 가치는 매우 높을 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 Q₁₀ 함유량이 비교적 높은 것으로 알려진 광합성세균 [5-7]을 순수 분리하여 HPLC를 통해 Q₁₀ 함유량을 분석해 보았고, 가장 함유량이 높은 균주에 대하여 동정하였다.

광합성 세균을 분리하기 위한 샘플링은 낙동강하구 갯벌, 양어장 및 광합성세균 생산 공장에서 행하였다. 채취한 샘플을 30°C, 180 rpm, 50 lux의 조건에서 배양한 후 한천 배지 위에 streaking 하여 독립된 colony를 얻었고, colony 중 붉은 색깔을 띠는 colony를 선별한 후 계속적인 streaking과 현미경 관찰에 의해 최종적으로 순수 분리하였다. 이때 사용된 배지(pH=6.8)의 조성은 다음과 같다: 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄; 2.7 g DL-malic acid; 0.8 g ammonium phosphate; 3.76 g MSG; 1 g tryptone; 2 g yeast extract; 2.1 ml trace element; 및 1.5% agar. 각 순수 분리된 균주로부터의 Q₁₀ 생산을 위한 배양은 먼저 10 mL 튜브에서 agar를 뺀 위의 액체배지를 사용하여 실시되었고, 30°C, 180 rpm, 50 lux의 조건에서 2일간 배양하였다.

각 균주의 Q₁₀ 함량을 확인하기 위해서 2일간 배양

* Corresponding author

Phone: +82-629-5866, Fax: +82-629-5863

E-mail: jkkim@pknu.ac.kr

된 5 ml의 배양액으로부터 얻은 cell pellet에 3.3 ml methanol로 처리한 후, 55°C에서 5분간 heating시키고 난 다음, 6.6 ml chloroform을 첨가하고 30°C에서 20분간 혼합시켰다. 20분 반응 후에 Whatman No.1 filter paper를 이용하여 여과하여 튜브에 담고 여과된 액에 0.58% saline을 5:1 비율로 첨가하면 2개의 상이 생기는데 아래층에 Q₁₀이 추출된 상이 존재한다. 상층의 대부분을 버리고 난 후 25°C evaporator를 이용하여 건조시키고, Q₁₀의 HPLC 분석을 위하여 튜브에 남아 있는 나머지를 1 ml의 ethanol에 녹인 후 HPLC로 분석하였다 [5,9]. HPLC 분석에는 C18 reverse-phase column을 사용하였고, 이동상은 ethanol(flow rate: 1 ml/min)로 하여 275 nm에서 측정하였다 [1].

가장 Q₁₀의 함량이 높은 균주를 선별하여 16S rDNA sequencing을 통해 동정하였다. 균주의 염색체 DNA는 AccuPrep 염색체 DNA 추출 kit를 사용하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 주형으로 하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 및 1429R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하여 PCR을 사용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 단편은 전기영동하여 agarose gel 상에서 AccuPrep SV gel 및 PCR Clean-up 시스템을 이용하여 분리하였고, pGEM T-easy 벡터에 삽입하여, *E. coli* DH5α에 형질 전환시켰다. 위의 형질전환체를 배양하여, AccPrep 플라스미드 추출 kit를 사용하여 플라스미드를 분리하고, M13 프라이머를 이용하여 3'말단과 5'말단의 서열을 결정하였다. 결정된 부분 서열을 GenBank의 Advanced BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 상동성 검색을 수행하였다. BioEdit Sequence Alignment Editor를 이용하여 그 배열을 확인하였고, PHYLIP (ver. 3.5c)의 DNAdist 프로그램을 이용하여 거리측정 전에 gap을 가지는 모든 위치를 제거하였다 [3].

한천배지 위에 형성된 붉은 색깔을 띠는 colony 중 최종 순수 분리된 균주는 3종이었으며, SK 1, SK 2 및 SK 3로 명명하였다. 각 균주별 Q₁₀ 추출 과정 후 HPLC 분석을 통해 얻어진 함량의 결과는 Table 1과 같으며, 세 균주 중 SK 1만이 상대적으로 높은 1.55 mg/g dry cell의 값을 가졌다. Urakami and Yoshida (1993) [6]의 연구 결과, *Rhodospseudomonas palustris*는 0.21-1.51 mg/g dry cell의 값을 *Rhodobacter capsulatus*는 2.45-4.61 mg/g dry cell의 값을, *Rhodobacter*

Table 1. The result of specific growth rate and produced Q₁₀ concentration for each cell

Microorganisms	Content of Q ₁₀ (mg/g dry cell)
SK 1	1.55
SK 2	0.40
SK 3	0.18

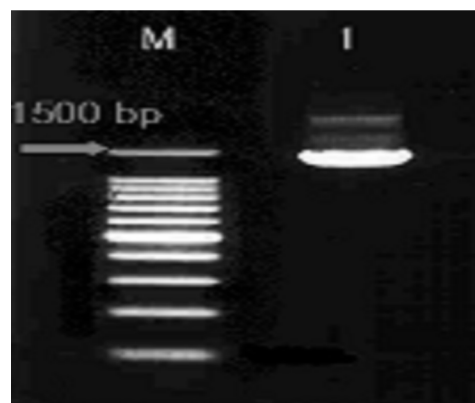


Fig. 1. Result of electrophoresis after PCR for 16S-rDNA genes. Lanes: 1, SK. 1; M, a 100bp size marker.

*sphaeroids*는 0.82-2.54 mg/g dry cell의 값을, 그리고 *Rhodobacter sulfidophilus*는 3.68-3.80 mg/g dry cell의 값을 가지는 것으로 보고하고 있다. 또한, *Rhodobacter sulfidophilus* 균주를 사용한 Sakato et al. (1992) [5] 및 Yen and Chiu (2007) [7]의 연구에서는 반응기내의 환경조건 및 배양 방법 등에 따라 Q₁₀의 함량을 많이 증가시킬 수 있음을 보고하였다. 따라서, Q₁₀의 함량은 미생물 종에 따라 차이가 나며, 본 연구에서 순수 분리한 광합성세균의 Q₁₀의 함량은 평균정도인 것으로 나타났다. 앞으로 반응기 내의 환경조건 및 배양 방법 등을 통한 Q₁₀의 함량 증가 실험이 필요한 것으로 판단된다.

Q₁₀ 함량이 가장 높은 SK 1는 1-1.5 μm 길이를 가진 막대형 균이며 16s rDNA sequencing을 통해 동정한 결과, 100%의 유사성으로 1355 bp 단편의 16S-rRNA (Fig. 1)를 가지는 *Rhodobacter sphaeroids*(Genbank Accession No.= AM696701)로 밝혀졌다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양 바이오프로세스연구단 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Karpińska, J., Mikołuc, B., Motkowski, R. and Piotrowska-Jastrzębska J. 2006. HPLC method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *J. Pharm. Biomed Ana.* **42**, 232-236.
2. Kawamukai, M. 2002. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 51-57.
3. Lee, W. Y., Brune, D. C., Lobrutto, R. and Blankenship, R. E. 1995. Isolation, characterization, and primary structure of rubredoxin from the photosynthetic bacterium, *Heliobacillus mobilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 80-88.
4. Muzzarelli, R., Littarru, G., Muzzarelli, C. and Tosi, G. 2003. Selective reactivity of biochemically relevant quinones towards chitosans. *Carbohydr. Polymer.* **53**, 109-113.
5. Sakato, K., Tanaka, H., Shibata, S. and Kuratsu, T. 1992. Agitation-aeration studies on coenzyme Q10 production using *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **16**, 19-28.
6. Urakami, T. and Yoshida, T. 1993. Production of ubiquinone and bacteriochlorophyll a by *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter sulfidophilus*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 191-194.
7. Yen, H.-W. and Chiu, C.-H. 2007. The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on CoQ10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter. **41**, 600-604.
8. Yoshida, H., Kotani, Y., Ochiai, K. and Araki, K. 1998. Production of ubiquinone-10 using bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 19-26.
9. Zhang, D. and Shrestha, B. 2007. Phenotypes and fed-batch fermentation of ubiquinone-overproducing fission yeast using ppt1 gene. *J. Biotechnol.* **128**, 120-131.