CLEAN TECHNOLOGY, Vol. 17, No. 3, September 2011, pp. 280~282

단 신

*Salinibacter ruber*로부터 잔토로돕신의 분리와 in vitro에서 재구축

공민경, 임정한†, 이평천*

아주대학교 분자과학기술학과
443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5
†극지연구소 생명과학연구부
406-840 인천광역시 연수구 송도동 송도테크노파크

(2011년 7월 14일 접수; 2011년 9월 17일 수정본 접수; 2011년 9월 18일 채택)

Separation of Xanthorhodopsin from *Salinibacter ruber* and Its in vitro Reconstruction

Min Kyung Kong, Joung Han Yim†, and Pyung Cheon Lee*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, San 5, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Korea
†Division of life sciences, Korea Polar Research Institute, Songdo Techno Park, 7-50,Songdo-dong, Yeonsu-gu, Incheon 406-840, Korea

(Received for review July 14, 2011; Revision received September 17, 2011; Accepted September 18, 2011)

요 약

광에너지를 이용하여 바이오원료 및 바이오케미컬을 생산하려는 새로운 시도가 많은 관심을 받고 있다. 특히, 광합성기작을 이용한 다양한 바이오유래 물질을 생산하려는 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 광합성기작을 갖고 있는 해양 미생물인 *Salinibacter ruber*의 세포막에서 retinal과 salinixanthin의 작용으로 광전자를 흡수하는 역할을 하는 잔토로돕신을 수성이상계 계면 농축법을 이용하여 효율적으로 분리하였다. 분리된 잔토로돕신을 생물학적 세포막인 레시틴으로 리포좀을 생성하여 잔토로돕신의 광전자흡수 활성을 그대로 갖는 인위적인 잔토로돕신-레시틴 리포좀을 제작하였다.

주제어 : 잔토로돕신, 레시틴, 리포좀, 광전자 흡수, 광합성

Abstract : Capture and conversion of abundant solar energy using biotechnology will be essential for the development of sustainable and future energy. Photosynthesis is used for the production of biofuels such as biohydrogen. In this study, light-harvesting xanthorhodopsin consisting of retinal and salinixanthin was isolated from a photosynthetic microorganism *Salinibacter ruber* by aqueous two phase extraction. To stabilize the light-harvesting machine, artificial xanthorhodopsin-liposome system was reconstructed to have photoelectron absorption activity.

Keywords : Light harvesting, Solar energy, Liposome, Lecithin, Xanthorhodopsin

1. 서 론

*Salinibacter ruber*는 4 M 정도의 NaCl에서도 배양이 가능한 고도의 호염성 고세균으로 Salinixanthin이라 불리는 C40-carotenoid acyl glycoside 카로테노이드와 retinal을 포함한 양성자 펌프인 잔토로돕신(xanthorhodopsin)을 가지고 있으며 이를 이용하여 광전자를 흡수한다[1]. 카로테노이드는 안테나로서 광흡수의 효율을 증가시킨다. Retinal 만을 갖는 양성자 펌프인 박테리오로돕신(bacteriorhodopsin)과 아케아로돕신(archaerhodposin)은 카로테노이드 안테나가 결핍되어 있는데 light collection과 proton translocation을 수행할 경우에 한개의 chromophore와 한개의 단백질로 작용한다. 이에 반하여 새로운 구조의 잔토로돕신은 25 kDa의 작은 막 단백질로 retinal 외에 energy-donor 카로테노이드로인 salinixanthin을 추가로 포함하고 있다[2]. *S. ruber* 막의 흡수 파장을 보면 458 nm, 486 nm, 521 nm로 Salinixanthin의 최대 파장을 갖는 band가 나온다. Salinixanthin는 구조적으로 13개의 짝이중결합(conjugate double bond)을 갖고 있으며 β-D-glycoside가 있는 fatty acid chain을 추가적으로 가지고 있다[3].

본 연구에서는 신규로 분류된 *S. ruber*의 잔토로돕신의 광학적 특성연구를 위하여 수성이상계인 polyethylene glycol과 potassium phosphate를 사용하여 분리하였다. 잔토로돕신의 in vitro상에서의 활성유지를 위하여 polyethylene glycol의 분자량, 조성, pH와 염의 첨가 효과에 대해서 최적화를 수행하였다[4]. 또한 분리된 잔토로돕신에 대해서 레시틴을 이용하

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: pclee@ajou.ac.kr
이 논문은 한국연구재단 지정 중점연구소, 아주대학교 분자과학기술연구센터 특집으로 투고되었습니다.

여 리포좀을 제작하였다. 리포좀은 물에서 단층 혹은 다층의 비공유 결합으로 친양쪽성의 막으로 존재하며 보통의 인지질 이중층을 가지고 있는 생물학적인 막의 구조를 레시틴 리포좀을 통해 재현가능하다[5]. In vitro로 재구성된 잔토로돕신은 태양전지제작 등에 중요하게 사용되어질 수 있다[6].

2. 실 험

2.1. 배양조건

균주는 *Salinibacter ruber* strain M31 (DSM 13855)를 이용하였으며, 배양 조건은 195 g NaCl, 34.6 g $MgCl_2$, 49.5 g $MgSO_4$, 1.25 g $CaCl_2$, 5 g KCl, 0.25 g $NaHCO_3$, 0.625 g NaBr, 0.1 g yeast extract (water 1리터 기준)의 배지에서 37 ℃, 200 rpm으로 7일간 배양하였다.

2.2. 수성이상계 계면 농축을 이용한 분리

원심분리기를 이용하여 2 L로 배양된 *S. ruber* 균체를 배양액과 분리(8,000 rpm과 20분)한 후에 균체를 25% NaCl 수용액(100 mL)으로 2회 세척과정, 추가로 1회의 증류수 세척과정을 실시하였다. 70 mL 증류수로 균체를 resuspension 한 후에 0.5 mg의 DNaseI을 넣고 상온에서 8시간 교반해 주었다. DNaseI로 처리된 균체에 PEG를 최종농도 8%, KH_2PO_4를 3.7%, K_2HPO_4는 7.4%가 되도록 첨가하였다. 강한 교반후 원심분리기를 이용하여 세 개의 층으로 분리시킨 후 최상위층을 조심스럽게 제거하고 중간층을 다른 tube에 취하였다.

2.3. Thin film hydration를 이용한 리포좀 생성

Thin film hydration 방법은 용매를 휘발시킨 후, 증류수를 첨가하여 재용해시켜 multilamellar vesicles를 만들어 사용하는 방법으로 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 15 mL conical tube에 100 mg의 레시틴을 10 mL의 클로로포름으로 섞은 후에 교반을 수행하였다. 클로로포름에 녹은 레시틴을 evaporator를 이용하여 15분 동안 진공으로 말린 후 둥근 플라스크 밑면에 얇게 film을 형성시켰다. 이후 추가적으로 질소가스를 약 5분간 주입하여 잔존 클로로포름을 제거하였다. Phosphate buffer에 녹아 있는 분리된 잔토로돕신 50 mL을 film 형태로 유지된 레시틴에 첨가하였다. 첨가 후 바로 약 10초간 3회의 sonication 이용하여 잔토로돕신-레시틴 리포좀 혼합체가 형성되도록 유도하였다. 잔토로돕신-레시틴 리포좀 혼합체를 4 ℃ 냉장고에 16시간 보관 후에 안정화된 잔토로돕신-레시틴 리포좀을 제작하였다.

2.4. 분석

2.4.1. Dynamic Laser Scattery system (DLS)

Dynamic Laser Scattery system (fiber optics particle analyzer, FPAR-1000)을 이용하여 잔토로돕신-레시틴 리포좀의 크기를 측정하였다. 리포좀 크기 측정은 리포좀 생성 방법에 따라 만들어진 최종 샘플을 1/2로 희석하여 100초간 3번 이상 반복적으로 측정하였으며 온도는 20 ℃에서 실시하였다.

2.4.2. Spectrophotometer

Spectrophotomer (SPECTRAmaxPlus384, Molecular Device)를 이용하여 리포좀 생성 전과 후의 파장을 측정하여 비교하였다. 파장의 측정범위는 400 nm에서 700 nm까지 1 nm 단위로 full scan을 수행하였다.

3. 결 과

3.1. 잔토로돕신의 분리와 레시틴 리포좀 제작

기존에 여러 해양미생물로부터 박테리오로돕신의 분리에 사용된 PEG-phosphate 수성 이상계 분리법[4]은 *S. ruber*으로부터 신구조의 잔토로돕신의 분리에도 성공적으로 이용되었다. 분쇄된 *S. ruber* 균체로부터 붉은 색을 띠는 잔토로돕신이 높은 순도로 분리가 되었으며, 이는 광전자 흡수 안테나인 retinal 과 Salinixanthin가 분리과정 동안 안정적으로 단백질 내에 유지됨을 간접적으로 나타낸다. 또한 잔토로돕신이 포함 안 된 리포좀 대조군과 잔토로돕신-리포좀의 DLS결과로부터 분리된 잔토로돕신이 리포좀에 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었다. Figure 1에서와 같이, 잔토로돕신이 포함 안 된 대조군 리포좀에서는 크기 분포가 70~150 nm의 범위 내에서 측정이 되었으나, 잔토로돕신-레시틴 리포좀의 경우 100~230 nm의 범위 내에서 측정되었다. 대조군에 비해 크기가 크게 분포된 결과는 새로이 형성된 잔토로돕신-레시틴 리포좀의 구조가 레시틴 막 사이로 소수성 단백질인 잔토로돕신이 안정적으로 삽입된 것을 알려준다. 이러한 잔토로돕신-레시틴 리포좀은 4 ℃ 냉장고에서 약 3주간 동안 안정적으로 크기가 유지되었다.

3.2. 리포좀에서 잔토로돕신의 활성 측정

안정적으로 유지된 잔토로돕신-레시틴 리포좀으로부터 in vitro 활성을 확인하였다. 대조군 리포좀과 함께 잔토로돕신-레시틴 리포좀이 나타내는 파장을 spectrophotometer를 통해

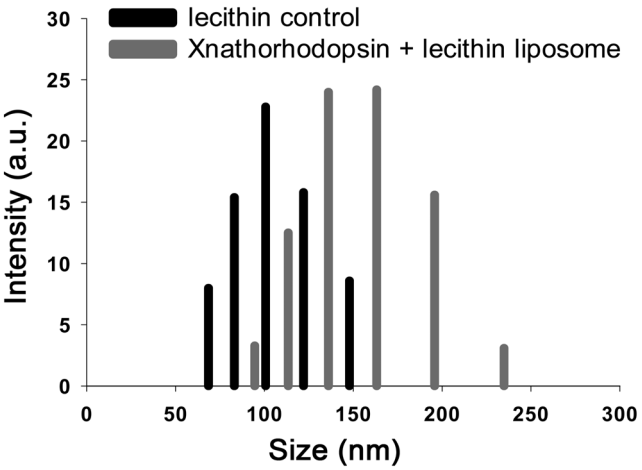

Figure 1. Size analysis of xanthorhodopsin-lecithin liposomes (black bars) and lecithin liposomes (gray bars), as a control, by using Dynamic Laser Scattery system (DLS).

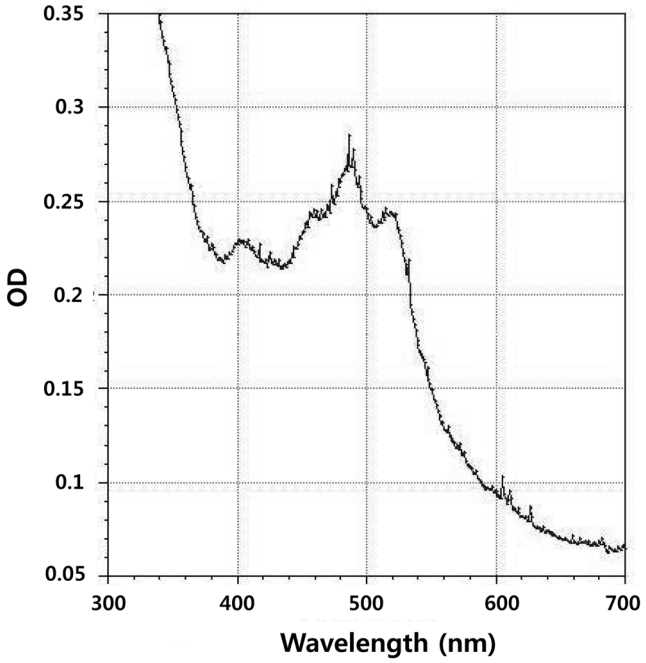

Figure 2. Absorption spectrum of xanthorhodopsin-lecithin liposome.

측정하였다. Figure 2에서 나타나는 것과 같이 잔토로돕신 고유의 파장인 458 nm, 486 nm, 521 nm에서 최고 파장 값이 측정되었다. 이는 잔토로돕신-레시틴 리포좀 생성 뒤에도 in vivo와 같이 분리된 잔토로돕신이 in vitro에서도 광흡수 활성을 유지하고 있음을 나타낸다.

4. 결 론

수성이성계 분리법을 이용하여 광전자를 고효율로 흡수하는 기능을 갖는 신종의 잔토로돕신을 *S. ruber*로부터 안정적으로 분리하였다. 또한 분리된 잔토로돕신을 이용하여 잔토로돕신-레시틴 리포좀을 안정적으로 제작한 후에 잔토로돕신의 in vitro 활성을 성공적으로 확인하였다. 앞으로의 연구에서 잔토로돕신-레시틴 리포좀을 통해 실제 잔토로돕신의 light harvesting 활성기작 연구 및 기능을 재현함으로써 에너지 전자 전달계를 연구할 수 있을 뿐만 아니라 광화학적 성질이 특이하여 biochip 등에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 남극 지의류 유래 이형당뇨치료제 실용화 연구(KOPRI project, PE10200)와 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(2011-0022978)으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lanyi, J. K., and Balashov, S. P., "Xanthorhodopsin: A Bacteriorhodopsin-like Proton Pump with a Carotenoid Antenna," *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1777**(7-8), 684-688 (2008).
2. Luecke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E. S., Wang, J. M., Balashov, S. P., and Lanyi, J. K., "Crystallographic Structure of Xanthorhodopsin, the Light-driven Proton Pump with a Dual Chromophore," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(43), 16561-16565 (2008).
3. Lutnaes, B. F., Oren, A., and Liaaen-Jensen, S., "New C40-carotenoid Acyl Glycoside as Principal Carotenoid in *Salinibacter ruber*, an Extremely Halophilic Eubacterium," *Journal of Natural Products*, **65**(9), 1340-1343 (2002).
4. Park, J.-T.,"A Study on the Efficient Separation of Bacteriorhodopsin," Master's Thesis, KAIST (1997).
5. Xi, J., Guo, R., and Guo, X., "Interactions of Hemoglobin with Lecithin Liposomes," *Colloid and Polymer Science*, **284**(10), 1139-1145 (2006).
6. Song, E.-S., Jung, H.-S., Lee, H. H., Kim, J.-D., Kim, H. Y., and Lee, Y.-W., "The Production of Protein-loaded Poly (lactide-co-glycolide) Microparticles using Supercritical Carbon Dioxide," *Clean Technology*, **12**(2), 53-61 (2006).