

Coenzyme Q10 다량 발현 미생물을 이용한 Rumen Simulation Continuous Culture (RSCO) System 반추위 내 미생물 발효 특성에 대한 연구

배귀석²·여준모¹·장문백²·김종남^{1*}

¹한국농수산대학 대가축학과

²중앙대학교 동물생명공학전공

Fermentation Characteristics of Large-scale Coenzyme Q10 Expressing *Rhodobacter sphaeroides* in Rumen Simulated Continuous Culture (RSCC) System

G. S. Bae², J. M. Yeo¹, M. B. Chang², and J. N. Kim¹

¹Korea National College of Agriculture and Fisheries, 1515, Kongjwipatjwi-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54874, Korea

²Chung-ang University, 4726, Seodong-daero, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do, 17546, Korea

Abstract

This study was conducted to confirm the rumen fermentation characteristics of large-scale CoenzymeQ10(CoQ10) producing bacteria *R. sphaeroides* in rumen.

We conducted in vitro continuous culture test to investigate the characteristics of rumen fermentation with 5% *R. sphaeroides* as a direct fed microorganism. A rumen microbial fermentation characteristic has stability at after 12 days for 15 day of experimental period. pH value, NH₃-N, microbial protein synthesis, ADF digestibility and NDF digestibility were not shown significantly differences between control and treatment. However, UDP was significantly higher in treatment than control (p<0.05). CoQ10 concentration was 336.0mg/l with 5% *R. sphaeroides*. On the other hands, CoQ10 was not detected without *R. sphaeroides*.

Our study was shown that *R. sphaeroides* can produce CoQ10 in rumen environment without harmful effects on rumen fermentation parameter. CoQ10 in rumen may transfer into cow milk through cow metabolism. This strategy might be helpful for producing functional dairy cow milk.

Key Words : CoQ10, Rumen fermentation, Rumen simulation continuous culturesystem, Milk

1*교신저자 한국농수산대학 yorker20@korea.kr

I. 서론

Coenzyme Q10 (CoQ10)은 세포막에 결합되어 있는 전자전달계의 필수적인 지질계 화합물로 동물세포와 조직 내에서 항산화 작용 및 산소 공급의 촉진등과 같이 생화학적으로 중요한 역할을 수행하는 물질로 알려져 있다. 특히 의학적으로뿐만 아니라 물질특성을 응용한 제품 생산에 의한 산업화에 가능성이 높아 지속적으로 기능성제품 생산을 위한 천연물질로써 중요한 역할을 하고 있다 (Rohmer 등 1999; Disch 등 1998). CoQ10의 생화학적 특징은 세포 내에서 미토콘드리아의 전자전달계의 필수 조효소로 ATP 생합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 세포 내에서 DNA, 지질 그리고 단백질 등이 산화되는 것을 방지하는 지용성 항산화제로써 체내에서 중요한 생리적 대사 작용을 한다 (Zahiri 등, 2006). CoQ10은 심장의 퇴행성 병변들을 예방하거나 치료해주며, 쇠퇴하고 있는 심장의 기능을 향상시키는 특징을 가지고 있다. CoQ10의 체내에서의 효과는 CoQ10 결핍성 심장병 환자들에게 CoQ10공급 임상 실험 결과 상태가 호전된 연구 결과가 보고된 바 있다 (Sarter, 2002). 또한, CoQ10은 10년 전부터 고혈압, 당뇨병, 비만, 심장병, 노화 방지, 피부 미용 등 다양한 용도로 사용되어 왔으며, 특히 체내 CoQ10의 결핍은 심혈관계 질환, 고혈압, AIDS, 파킨슨병, 영양실조장애, 치주질환, 비만, 소뇌운동 실조 등을 앓고 있는 환자들에게서 많이 나타났다는 연구결과가 보고되어 있다 (Nakamura 등, 1973; Folkers 등, 1970; Folkers 등, 1988). 고혈압 환자의 경우, 정상 혈압인 사람보다 체내 CoQ10의 농도가 낮다고 보고되어 있으며, CoQ10을 100mg/d의 농도로 10주간 경구 투여한 결과 확장기와 수축기의 혈압이 현저하게 감소하였고, 총 cholesterol 수준은 감소와 함께 HDL-cholesterol은 증가하는 결과가 보고되어 있다 (Yamagami 등, 1974;

Yamagami 등, 1975). 또한 피부노화 방지를 위한 항산화제로 연구가 지속적으로 되어왔고, 최근 노화 억제와 주름개선작용에 대하여 보고된 바 있으며 (Hoope 등, 1999), 자외선에 노출된 피부에서 CoQ10의 농도가 노출되지 않은 부위에 비하여 높은 수치를 나타내는 결과를 나타내었다 (Rusciani 등, 1991). 최근의 연구결과에서는 CoQ10은 피부가 자외선에 노출되었을 때 우선적으로 감소되는 항산화제라는 연구결과가 보고되어 있다 (Podda 등, 1998). 이와 같은 CoQ10의 체내에서의 중요한 생리적인 작용 때문에 제약이나 화장품, 식품 보충제 등의 산업적 이용성에 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다 (Takahashi 등, 2003; Sasaki 등, 2005; Zhang 등, 2007).

동물체가 일반적인 상황에서 CoQ10을 공급받을 수 있는 식품이나 사료원은 동물성으로 계란, 정어리와 고등어 등의 등푸른 생선이 있으며, 식물성으로는 두과류, 과일, 시금치, 브로콜리 등과 같은 채소류 그리고 캐놀라유, 해조류에 포함되어 있으나 이와 같은 원료들의 체내 공급에 의해서는 필요로 하는 충분한 양을 공급받기는 어렵다 (Meganathan, 2001).

R. sphaeroides 균주는 다량의 CoQ10발현능력을 가지고 있어 현재 산업적으로 CoQ10대량 생산에 많이 이용되고 있으며, CoQ10함유 기능성 식품 및 식품 보조제 제조를 통한 산업화가 지속적으로 확장되고 있는 실정이다. 또한 천연물질을 이용한 기능성 우유 개발과 산업화가 활발히 이루어지고 있는 실정에서 새로운 기능성 우유개발의 목적으로 *R. sphaeroides* CoQ10 대량 발현 특성을 이용한 기능성 CoQ10 강화 우유 개발에 대한 관심 또한 고조되고 있다.

따라서, 본 실험에서는 반추위 내 미생물발효특성에서 CoQ10 다량 발현 미생물인 *R. sphaeroides* 균주가 반추위 내 미생물발효특성에 미치는 영향과 반추위 내용물 내 CoQ10함량 변

화를 알아보기 위하여 Rumen simulation continuous culture (RSCC) system을 이용한 시험이 실시되었다.

RSCC system (Fig. 1)을 이용하여 2처리 3반복으로 시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험설계

본 시험은 *R. sphaeroides*의 반추위 내 미생물과 배양 시 CoQ10의 발현을 알아보기 위하여

2. 시험사료의 제조

시험사료 중 농후사료 성분표는 <Table 1>과 같으며, 화학적 분석표는 <Table 2>와 같으며, 농후사료와 호밀의 비율을 3:7로 하여 기본사료로 사용하였다. 시험사료는 1-mm screen이 장착된 Wiley mill을 이용 하여 분쇄하여 60°C에서 3일간 건조 후 기질로 사용되었다.

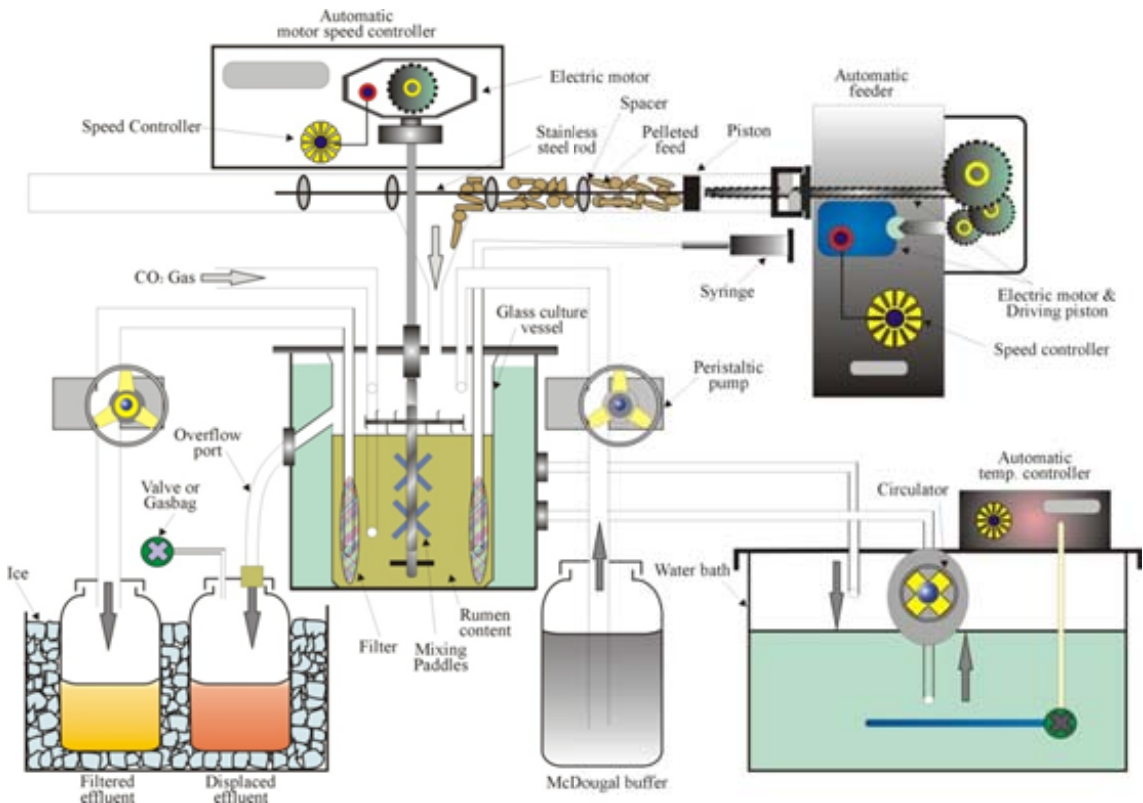


Fig. 1. Rumen simulation continuous culture system. Condition. Aerobic environment is required to maintain a mixed population of rumen microorganism (including bacteria and protozoa). pH (6.4~8.0) and temperature 39°C are controlled and stirring is carried out intermittently. Experiments can be carried out for period of at least 15 days

Table 1. Basal diet formula

Ingredient	Amount (%)
Corn	34.29
Wheat	12.00
Wheat Flour	10.00
Corn Gluten Feed	7.82
Rapeseedmeal	4.50
Perilla meal	3.00
DDGS ¹⁾	10.0
Palmkernelmeal	6.50
Fulfat soy	2.00
Limestone(fine)	1.67
DCP(L)	0.90
CaSO ₄	0.20
MgO	0.20
Salt	0.50
NaHCO ₃	0.70
Molasses	3.00
Bypass fat	0.50
Additives	1.97
Vitamins & minerals mixture ²⁾	0.25

¹⁾ DDGS: Dried Distillers Grain with Solubles

²⁾ Vitamins & minerals mixture: Vitamin A: 29,000 IU, Vitamin D3: 4,000 IU, Vitamin E: 100 IU, Mn: 80ppm, Zn: 120ppm, Fe: 70ppm, Cu: 50ppm, Co: 0.5ppm, I: 2.0ppm, Se: 1.0ppm.

Table 2. Chemical composition of basal diet

Chemical composition	Value
Dry matter, %	88.41
Crude protein, %	19.00
Undegradable protein, %/CP	35.90
Ether extract, %	3.50
Crude fiber, %	4.16
Ash, %	7.01
NFE ¹⁾ , %	54.74
NFC ²⁾ , %	49.82
ADF ³⁾ , %	8.09
NDF ⁴⁾ , %	20.67

¹⁾NFE : Nitrogen Free Extract

²⁾NFC : Non Fiber Carbohydrate

³⁾ADF : Acid Detergent Fiber

⁴⁾NDF :NeutralDetergentFiber

3. RSCC system 및 운전

도살장에서 채취한 반추위액을 8겹의 cheesecloth로 거른 후 발효조에 각 *R. sphaeroides* 미생물 접종액을 5% 농도로 접종하기 위하여 224ml 반추위액과 224ml McDougall 인공타액을 발효조에 혼합 후 자동 CO₂ 가스 공급 장치를 이용하여 지속적으로 CO₂ 가스를 주입하여 혐기상태를 유지하였으며, 동시에 시험사료는 하루에 15.6g씩 09:00과 21:00시에 2번 급여하여 주었다. 발효조는 자동온도 물순환방식의 수온조절장치가 달린 펌프를 이용하여 39°C를 유지하였다. 인공타액은 peristaltic pump를 이용하여 23.7ml/h를 공급하여 전체 dilution rate가 sampling시간 1시간을 제외한 23시간 동안 5%가 되도록 유지하였다. 발효조 내에서 배출된 반추위 내용물은 얼음이 채워진 용기 내에 갈색병에 보관될 수 있도록 하였다.

4. 시료 분석

시료의 화학적 구성성분은 A.O.A.C (1984)의 방법을 이용하여 분석하였다. ADF소화율은 Van Soest 등 (1982)의 방법을 이용하였고, NH₃-N농도는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 spectrophotometer (Spectronics 21D, Milton Roy, USA)를 이용하여 측정하였다. 미생물 단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법을 이용하여 측정하였고 VFA농도는 gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan)로 Erwin 등 (1961)의 방법에 따라 분석하였고 undegradable protien함량은 조단백질분석기 (Kjeltec 2300, FOSS, Denmark)를 이용하여 Kjeldahl (1983)의 방법에 따라 측정하였다.

5. HPLC를 이용한 CoQ10분석

반추위 내용물을 1,500rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 다시 5,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체는 고품질

1g을 30ml phosphate buffer를 이용하여 세척 후 70ml의 메탄올을 이용하여 40°C에서 5분간 방치 후 chloroform 140ml를 추가하여 30°C에서 20분 동안 교반하여 2개의 층이 형성되면 하층액을 회수하였다. 회수된 하층액은 NaCl solution (0.58%, w/v)을 5분의 1수준으로 추가한 후 다시 여과하였고 40°C에서 12시간 동안 건조기에서 건조하여 용매를 완전히 제거하여 15 또는 30ml의 에탄올을 첨가하여 완전히 용해시키고 HPLC (Varian 920-LC, Varian, Inc. USA)를 이용하여 CoQ10을 분석하였다. HPLC분석을 위한 column은 Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6mm×100mm, 5µm)을 사용하였고, 용리액은 에탄올을 사용하여 1분당 1ml의 속도로 흘려주었다. CoQ10은 peak area에 따라 측정하였으며, UV 275nm에서 3.4분대에 검출되었다.

6. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SAS package program (2009)의 GLM (General Linear Model)의 방법에 의해 배양기간 마지막 3일 동안의 표준오차를 구하였고, 분산분석 후 Duncan's multiple range test를 통하여 처리간의 평균의 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. pH 변화

RSCC system을 이용한 배양시험의 pH는 전체 배양기간 동안 6.27~7.01의 수준을 나타내었다. 대조구와 처리구 모두 다소 감소하는 경향을 나타내었으며, 배양 5일 이후부터 12일까지 처리구가 6.78~6.37 수준을 나타내었고, 대조구는 6.71~6.30의 수준을 나타내어 처리구가 대조구에 비하여 높은 수준의 pH를 나타내었다. 배양 마지막 3일 동안 처리구의 pH의 평균은 6.32로

대조구의 6.27에 비하여 약간 높았다(Fig. 2). 반추위 내 미생물에 비해 최대 9.7정도의 높은 적정 pH수준을 가지는 *R. sphaeroides*에 의해 처리구가 대조구에 비하여 pH수준이 높은 것으로 보

이며, 배양기간 동안 *R. sphaeroides*의 활력이 유지되어 전체 배양기간 동안 pH변화에서 처리구가 대조구에 비하여 지속적으로 높은 수준을 나타내는 것으로 사료된다.

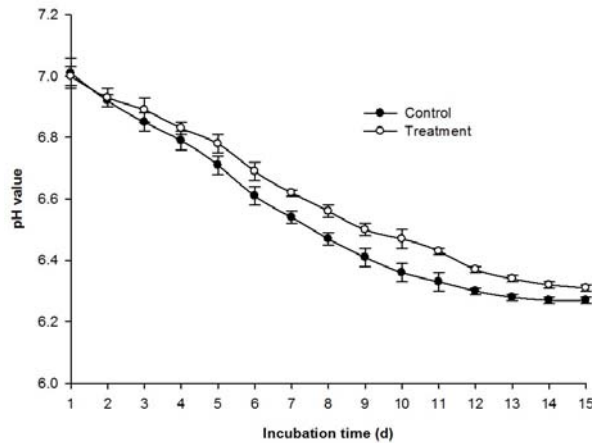


Fig. 2. Changes of pH value in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

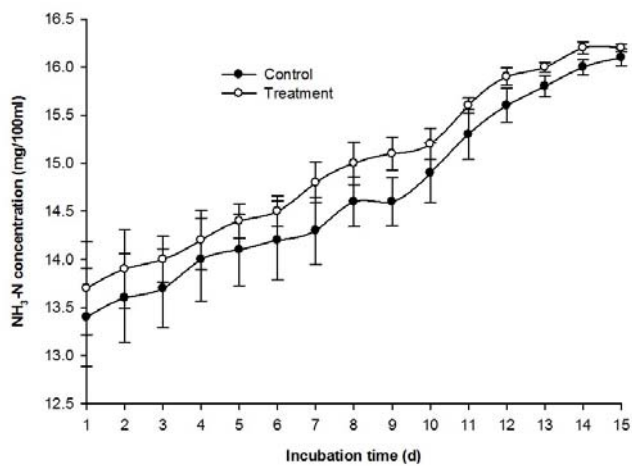


Fig. 3. Changes of NH₃-N concentration in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

2. NH₃-N함량 변화

시험기간 중 NH₃-N의 함량은 배양시간이 지나감에 따라 대조구와 처리구에서 모두 증가하는 경향을 나타내었다. 배양 6시간에서 10시간 사이에 처리구가 대조구에 비하여 NH₃-N의 함량이 높은 경향을 나타내었고, 배양 마지막 3일 동안 처리구의 평균은 16.13mg/100ml로 대조구의 15.96mg/100ml에 비하여 다소 높은 수치를 나

타내었다(Fig. 3). *R. sphaeroides*가 배양됨에 따라 ammonia를 부산물로 생산하게 되어 처리구가 대조구에 비하여 높은 수준을 유지하며 전체적인 경향이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 지속적인 영양분의 공급으로 *R. sphaeroides*의 활력이 유지되고 지속적으로 배양이 되어 대조구에 비하여 처리구에서 배양기간 동안 높은 수준을 나타낸 것으로 사료된다.

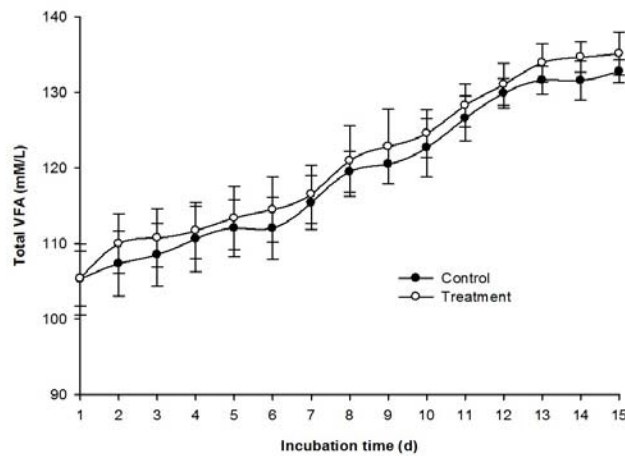


Fig. 4. Changes of total VFA concentration in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

3. VFA농도 및 acetate/propionate(A/P) ratio의 변화

배양 기간 동안 대조구와 처리구에서 모두 증가하는 경향을 나타내었고 배양 마지막 3일 동안 total VFA농도 평균은 처리구에서 132.01mM/l로 대조구의 134.59 mM/l와 유사한 수치를 나타내었다. (Fig. 4). 이와 같은 결과는 지속적으로 공급되는 사료 내 영양분으로 이용하여 *R. sphaeroides*와 함께 반추위 내 미생물의 성장이 원활하게 이루어져 총 VFA농도가 증가하는 결과가 나타난 것으로 사료된다.

A/P ratio는 배양 마지막 3일 동안 처리구에서

2.81로 대조구의 2.78와 비슷한 경향을 나타내었다 (Fig. 5). 이런 결과는 *R. sphaeroides*와 함께 반추위 내 미생물의 성장이 원활하게 이루어져 반추위 내 미생물의 발효작용에 의해 acetate의 농도가 증가하여 총 A/P ratio가 증가하는 경향을 나타내는 것으로 사료된다.

4. 반추위 내 미생물단백질 합성량 변화

반추위 내 미생물단백질 함량은 배양기간 중 2일까지의 적응기간 동안 대조구와 처리구에서 모두 차이를 보이지 않았으나, 배양시간이 증가함에 따라 미생물단백질 함량이 증가하는 경향을 나타

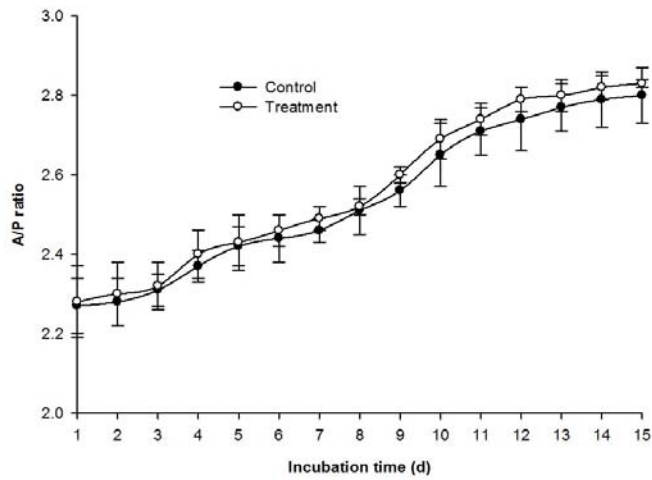


Fig. 5. Changes of A/P ratio in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

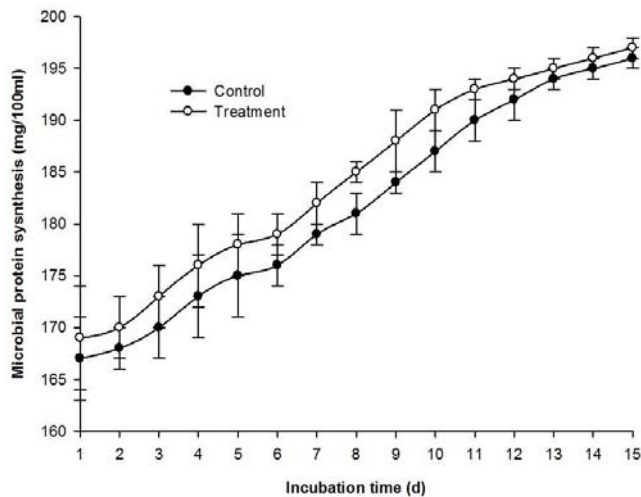


Fig. 6. Changes of rumen microbial synthesis in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

내고 있다. 배양 10일에서는 처리구는 191mg/100ml로 대조구의 187mg/100ml에 비하여 높은 수치를 나타내었으며, 배양 마지막 3일 동안에는

대조구와 처리구에서 비슷한 수치를 나타내었다 (Fig. 6). 이와 같은 결과는 처리구에서 반추위 내 미생물과 *R. sphaeroides*가 지속적으로 배양이

되어 총 미생물단백질 합성량이 증가하는 경향을 나타내는 것으로 사료된다. 또한, 처리구의 *R. sphaeroides*에 사료의 영양성분 중 질소원 및 단백질과 아미노산이 지속적으로 공급되어 처리

구의 *R. sphaeroides*의 배양이 정체되지 않고 이루어져 전체 배양기간 동안 처리구가 대조구에 비하여 높은 수준을 나타낸 것으로 사료된다.

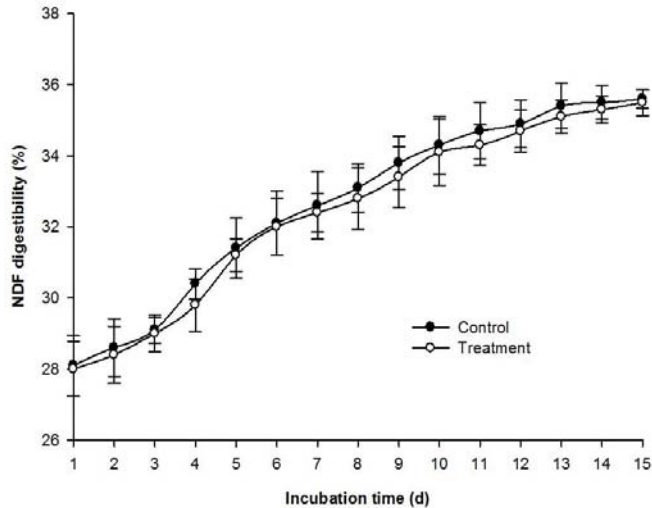


Fig. 7. Changes of NDF digestibility in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

5. Neutral Detergent Fiber(NDF), Acid Detergent Fiber(ADF) 소화율 변화

NDF 소화율은 전체 배양 기간 동안 대조구와 처리구 모두 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 배양 마지막 3일 동안의 소화율은 처리구가 35.3%로 대조구의 35.5%와 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 7). ADF 소화율은 NDF 소화율과 마찬가지로 전체적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 배양 마지막 3일 동안의 소화율에서 대조구는 58.5%로 처리구의 58.3%와 차이를 나타내지 않았다(Fig. 8). *R. sphaeroides*가 반추위 내 섬유소분해 박테리아나 섬유소분해 박테리아의 섬유소 분해 과정에 영향을 주지 않아, 대조구와 처리구에서 모두 NDF와 ADF의 소화율이 비슷한

경향을 나타내는 것으로 사료된다.

6. Undegradable Dietary Protein(UDP) 함량 변화

UDP함량은 배양 시작에서 4일까지 대조구가 평균 11.54%로 처리구의 11.60%에 비하여 낮은 수준을 나타내며 다소 차이를 보였다. 전체 배양 기간 동안 대조구가 11.60~11.16%로 처리구의 11.63~11.19%에 비하여 낮은 수준을 나타내었으며, 대조구와 처리구 모두 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 배양 마지막 3일 동안의 UDP함량은 처리구가 11.20%로 대조구의 11.16%와 비슷한 경향을 나타내었다 (Fig. 9). 이는 반추위 내 미생물과 *R. sphaeroides*에 의한

사료 내 단백질의 분해작용이 이루어지면서 *R. sphaeroides*가 성장함으로써 대조구에 비해 반추위 비분해성 단백질이 증가하는 것으로 보인다.

이는 반추위 내에서 *R. sphaeroides*가 생존할 수 있다는 간접적인 증거로 볼 수 있다.

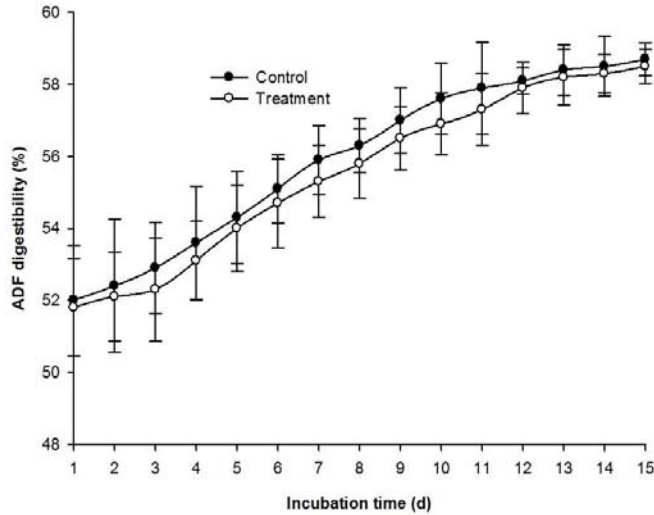


Fig. 8. Changes of ADF digestibility in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

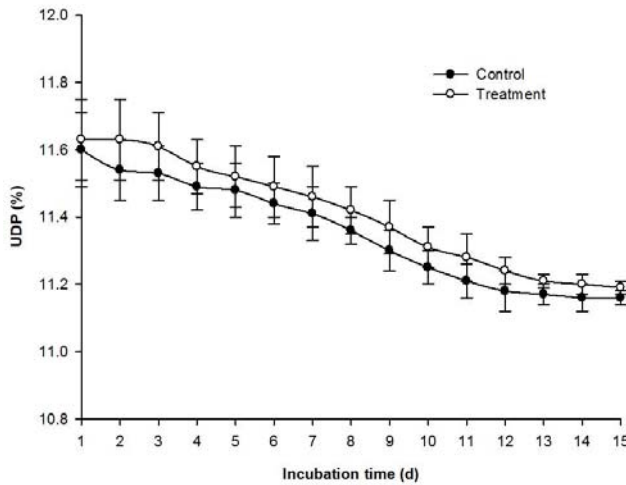


Fig. 9. Changes of UDP concentration in rumen fermentation characteristics with *R. sphaeroides* inoculated basal diet for 15 days by RSCC system. Control: normal diet. Treatment: normal diet with 5% *R. sphaeroides*

7. *Rhodobacter sphaeroides* KTCT 1434의 RSCC system시험을 통한 반추위액에서 CoQ10 발현 검정

RSCC system시험에서 반추위 내 미생물을 5%농도로 접종한 대조구에서는 HPLC를 이용하여 분석한 결과 CoQ10함량이 검출되지 않았으나,

반추위 내 미생물과 *R. sphaeroides*을 각각 5% 농도로 접종하여 분석한 처리구에서는 CoQ10함량이 336.0mg/l를 검출되어 *R. sphaeroides*를 접종하여 배양하였을 때 연속배양장치에서CoQ10가 생산되어 검출되었다(Fig. 10).

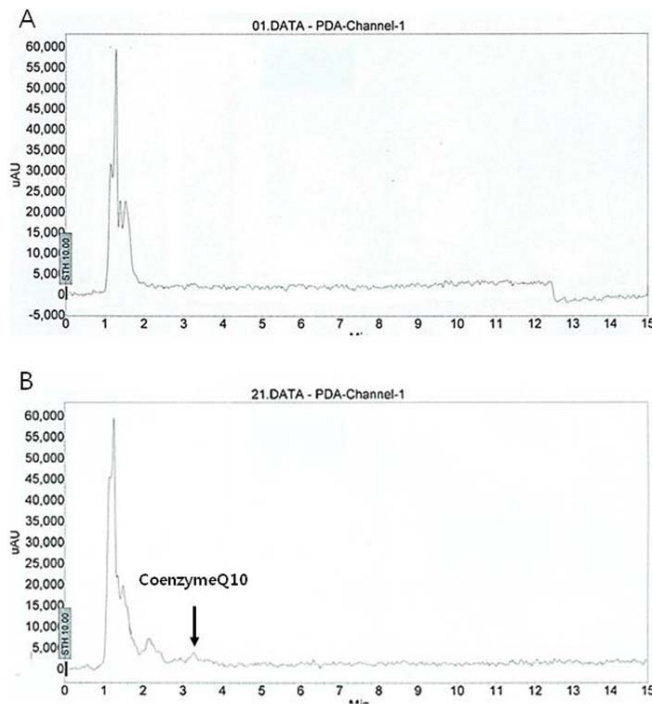


Fig. 10 HPLC chromatograms of Coenzyme Q10. (A) Control, (B) *R. sphaeroides* treatment

IV. 적요

본 연구에서는 기능성 우유의 생산을 위해 높은 항산화 효과를 가지고 심혈관계 질환 환자에게 유익한 CoQ10을 홀스타인 젖소의 우유에 전이시키기 위해 CoQ10 생산성이 높은 *R. sphaeroides*가 반추위 내에서 생존하며 반추위 환경에 적응하여 CoQ10 생산의 가능성과 반추위

발효에 미치는 영향을 판단하였다.

반추위 환경과 가장 유사한 환경을 만들 수 있는 반추위연속배양장치(RSCC)를 이용하여 CoQ10 생산과 반추 발효를 분석하였다. 전체 15일의 배양기간에서 배양이 안정되는 12일 후부터 5% *R. sphaeroides* 처리한 군과 *R. sphaeroides*를 처리하지 않은 대조구로 나누어 실험을 진행한 결과, RSCC system시험에서는 NDF, ADF, pH,

NH₃-N 그리고 미생물 단백질 합성량은 대조구와 유사한 결과를 보였으나, *R. sphaeroides*가 성장 함으로써 반추위에서 분해되지 않는 반추위 비분해성 단백질인 UDP가 대조구에 유의적으로 높게 나타났다. 특히, CoQ10은 대조구에서는 검출되지 않았으나, 처리구에서는 CoQ10 함량이 336.0 mg/l로 높게 나타났다.

이 연구를 통해서 *R. sphaeroides*는 반추위 내에서 항산화 물질인 CoQ10을 높은 농도로 생산할 수 있음을 확인하였다. 추후 젖소 착유 실험을 통한 CoQ10 우유 전이 실험을 진행하여 기능성 우유 생산을 위한 첨가제 개발에 활용할 예정이다.

V. 참고문헌

- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin Chem. 8:130
- Disch, A. and Rohmer, M. (1998). On the absence of the glyceraldehydes-3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeast. FEMS Microbiol. Lett. 168: 201-208.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., and Emery, E. M. (1961). Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44:1768-1770.
- Folkers, K., Littarru, G. P., Ho, L., Runge, T. M., Havanonda, S., and Cooley, D. (1970). Evidence for a deficiency of coenzyme Q10 in human heart disease. Int. Z. Vitaminforsch. 4(3): 380-390.
- Folkers, K., Langsjoen, P., Nara, Y., Muratsu, K., Komorowski, J., Richardson, P. C. and Smith, T. H. (1988). Biochemical deficiencies of coenzyme Q10 in HIV-infection and exploratory treatment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16: 153(2): 88-896.
- Hoope, U., Bergemann, J., Diembeck, W., Ennen, J., Mei, W., Pollet, D., Schachtschabel, D., Sauermann, G., Schreiner, V., Stab, F. and Skeckel, F. (1999). Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer. Biofactors. 9: 371-378.
- Kjeldahl, J. (1983). Determination of protein nitrogen in food products. Encyc Food Agric. 28:757-765.
- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265.
- Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 203: 131-139.
- Nakamura, R., Littarru, G. P., Folkers, K. and Wilkinson, E. G. 1973. Deficiency of coenzyme Q in gingiva of patients with periodontal disease. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 43: 84-91.
- Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L. J. and Packer, L. (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and cause oxidative damage in a model of human skin. Free Rad. Biol. And Med. 24: 55-65.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Nat. Prod. Rep. 16: 565-574.

13. Rusciani, L., Oradei, A., Lipa, S., Peresino, E., Romagnoli, A., Aureli, V. and Littarru, G. P. (1991). Coenzyme Q10 levels in human light-exposed and unexposed skin. In: Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Folkers, K., Littarru, G.P and Yamagami, T. Elsevier Sci. publishers. 125-128.
14. Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A. and N. Noparatnaraporn. (2005). Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. J. Biosci. Bioeng. 100: 481-488.
15. Sarter, B. (2002). Coenzyme Q10 and cardiovascular disease : A review. J. Cardiovasc Nurs. 16(4): 9-20
16. Takahashi, S., Nishino, T., and Koyama, T. (2003). Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for production of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*. Biochem. Eng. J. 16: 183-190.
17. Van Soest P J. (1982). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
18. Yamagami, T., Iwamoto, Y., and Folkers, K. (1974). Deficiency of activity of succinate dehydrogenase-coenzyme Q10 reductase in leucocytes from patients with essential hypertension. Int. J. Vitamin Nutr. Res. 44: 404-414.
19. Yamagami, T., Shibata, N., and Folkers, K. (1975). Bioenergetics in clinical medicine. Studies in enzyme Q10 and essential hypertension. Res. Commun Chem pathol Pharmacol. 11: 273-288.
20. Zahiri, H. S., Yoon, S. H., Keasling, J. D., Lee, S. H., Kim, S. W., Yoon, S. C. and Shin, Y. C. (2006). Coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway. Metab. Eng. 8:406-416.
21. Zhang, D., Shrestha, B., Niu, W., Tian, P. and Tan., T. (2007). Phenotypes and fed-batch fermentation of ubiquinone-overproducing fission yeast using ppt1 gene. J. Biotechnol. 128:120-131.