

새로운 저온 내성세균의 동정과 β -Galactosidase 생산

박정운 · 유재수¹ · 노동현*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부 및 바이오연구소, ¹충북대학교 전기전자 컴퓨터공학부

우유에 풍부하게 존재하는 유당은 galactose와 포도당의 $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic 결합으로 구성되어 있고, 인간에서 이를 가수분해하는 효소는 lactase, 세균에서는 β -galactosidase로 알려져 있다. Lactase의 활성이 낮은 사람이 우유를 섭취했을 경우 일시적인 설사를 일으키고 때로는 만성적인 대장의 염증으로 인한 만성설사의 원인이 되기도 한다. 겨울철에 젖소를 사육하는 축사 주변에서 저온에서 생육하는 세균 AS-20을 분리하여 β -galactosidase 활성을 갖는 균주를 선별하고 온도별로 분리균의 성장을 조사하였다. 그 결과 대장균이 자라지 못하는 10°C에서도 분리된 AS-20은 생육이 가능하였고 생육 최적온도는 30°C이었으며 이 온도에서 세대시간은 60 여분이었다. AS-20의 생화학적 특성을 bioMerieux Vitek Gram negative identification card (GNI+)로 조사한 결과 포도당을 발효, 산화시켰으며 유당, maltose, mannitol, xylose, L-arabinose 등을 이용하여 97% *Hafnia alvei*, 2% *Escherichia coli*로 동정되었다. Polymerase chain reaction으로 16S rRNA 유전자를 증폭하여 1,426 bp의 염기서열을 결정하여 기존에 보고된 유전자들과의 유사도를 조사한 결과 분리된 균주 AS-20은 *Hafnia alvei*와 99%의 염기서열상동성을 보였다. 이러한 결과는 BioMerieux Vitek Gram negative identification card 키트로 동정한 결과와 일치하였다. AS-20을 10°C, 20°C, 30°C에서 배양하면서 β -galactosidase 활성을 조사한 결과 저온인 10°C와 20°C에서 배양하였을 때 배양 최적 온도인 30°C에서 배양했을 때 보다 1.5 배 정도 높은 효소활성을 보여주었으며, 30°C에서 배양된 대장균 보다 6 배 이상의 효소활성을 보여 주어 저온조건에서 분리균의 효소생산이 비교적 높은 것으로 판단되었다.

Key words □ β -galactosidase, growth characterization, *Hafnia*, lactose, psychrotolerant strain

인간이 살아가는 환경과 비교하여 아주 높거나 낮은 극한의 온도, 압력, pH, 염농도 등에서 생육가능한 생물을 극한생물(extremophiles)이라고 하며 이러한 비정상적인 환경에서 자라는 극한생물의 대부분을 미생물들이 차지한다. 미생물은 자라는 온도에 따라 저온균(psychrophile, 15~20°C 이하), 중온균(mesophile, 20~45°C), 고온균(thermophile, 45°C 이상)으로 분류되어지며 온화한 환경에서 자라는 대부분의 중온균을 제외한 저온균과 고온균은 극한생물에 속하게 된다.

현재까지 대부분의 극한생물에 관한 연구는 고온에서 자라는 미생물들이었으며(12) 이로부터 polymerase chain reaction (PCR)의 기본재료인 *Taq* DNA polymerase (23)를 비롯하여, 내열성 α -amylase (16)와 cellulase (4) 등과 같은 많은 유용한 산업적 산물들을 생산하여 사용하고 있다. 하지만 고산, 동굴, 심해, 극지 등 지구상의 상당부분은 저온지역이며 이러한 환경에 적응하여 생활하는 미생물들은 저온에서 생육하기 위해 최적으로 적응된 세포과정을 가지고 있어야만 한다. 저온에서 자라는 미생물은 다시 저온 내성균(psychrotolerant strain) 또는 저온균(psychrophile)으로 구분된다. 저온 내성균은 빙점에 가까운 온도에서 생육할 수 있지만 20°C 이상에서 최적의 성장을 보이는 균

을 말하며 저온균은 15°C 이하의 온도에서 최대의 성장을 보이며 20°C 이상에서는 생육하지 못하는 균을 말한다(5).

저온에서 생활하는 미생물들도 경제적, 생태학적인 관점에서 많은 장점을 가지고 생물공학적으로 이용 가능한 잠재성을 가지는 다양한 효소를 분비한다고 보고되어 있다(5, 22). 저온미생물이 실제 환경온도와 가까운 저온에서 오일 탄화수소를 분해할 수 있어 생물복원과 오염된 환경을 복구 할 수 있다는 보고가 많이 있다(1, 18, 29). 이러한 저온균 또는 저온 내성균에서 생산되는 저온적응성 효소는 1990년 후반부터 X-ray crystallography, 단백질 공학 및 생물물리학적 방법의 연구를 통하여 그 구조가 밝혀지고 있다. 이러한 저온적응성 효소는 단백질 전체구조 또는 일부의 영역(domain)에서 신축성(flexibility)을 나타내어 저온에서도 상대적으로 높은 turnover number (Kcat) 또는 생리적 효율성(Kcat/Km)이 높아 빠른 반응을 나타내는 장점을 가진다. 반면에 열안정성이 낮아 쉽게 중온 또는 고온에서 변성되는 단점을 가지고 있다고 보고되어 있다(9).

포유류의 젖 성분에 많이 존재하는 유당은 galactose와 포도당이 $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic 결합으로 형성된 이당류이며, 이를 가수분해하는 효소는 인간에서는 lactase, 세균에서는 β -galactosidase로 알려져 있다. Lactase의 활성이 낮은 사람이 우유를 마셨을 때 우유 중에 풍부하게 존재하는 유당이 섭취되지 않고 소장의 내장에 축적됨에 따라 삼투압 상승을 일으켜 일시적인 설사 또는 대장의 만성염증을 유발하여 만성설사를 일으킨다. 이것을 유당

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-261-3368, Fax: 043-264-9600
E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr

불내증(lactose intolerance)이라 하고, 경우에 따라 만성적인 염증은 잠재적으로 결장암의 유발과 관련되어 있다는 보고가 있다(6).

Gutshall 등(13)에 의해 저온성 *Arthrobacter* 속에서 β -galactosidase을 코딩하는 유전자가 보고된 이래, *Carnobacterium* 속(8), *Planococcus* 속(27), *Pseudoalteromonas* 속(14)에서도 이 유전자가 보고 되어져 있고 Coker 등(7)은 *Arthrobacter* 속의 유전자를 대장균 발현시켜 그 효소를 정제하여 특성을 조사하였다. β -Galactosidase는 유당이 소량 함유되어 달콤한 우유제품 생산하거나 유당 불내증 환자가 마실 수 있는 우유를 생산하는 데 사용된다. 이외에도 치즈나 요구르트 제조시 제품화 기간을 단축시킬 수 있으며 원하는 pH를 빨리 낮추어 저장기간을 늘릴 수 있다. 이외에도 lactose에 의한 결정형성을 방지하여 아이스크림 제조 및 환경문제를 야기하는 유청의 재활용에 사용될 수 있다(28).

국한에서 자라는 미생물 중 고온균으로부터는 유용한 효소들이 다양하게 연구개발되어 산업적으로 생산되고 이용되고 있는데 반하여, 저온균으로부터는 산업적으로 유용한 효소의 생산 및 이용에 관한 보고가 많지 않은 실정이다. 이에 본 연구에서는 낙농 목장 토양과 축사 주변에서 β -galactosidase 활성을 나타내는 저온 내성균을 분리하여 동정하고, 분리된 균주들의 β -galactosidase 생산특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 배지

균의 분리에는 L broth (1%(w/v) tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% lactose, pH 7.2) 배지를 사용하였으며, 고체평판 배지(LBL)는 L broth에 유당을 0.2% 농도로 첨가하고 Bacto agar (Difco)를 1.5%가 되도록 첨가하여 사용하였다. β -Galactosidase 활성을 갖는 균의 선별시에는 LBL 한천평판 배지에 32 μ g/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal; Duchefa Biochemie, Holland)를 첨가하여 만든 X-gal-LBL을 사용하였으며 유당의 발효이용 여부는 MacConkey agar 배지 (Difco, USA)를 사용하였다.

β -Galactosidase를 생산하는 균 분리 및 생육 특성조사

β -Galactosidase 활성을 가지는 저온균 또는 저온 내성균을 분리하기 위하여 2004년 12월에서 익년 2월 중에 경북 의성군 얼음골, 충북 영동군 금강 상류, 충북 청원군, 충남 아산, 당진, 서산 지역의 젖소를 키우는 축사나 주변토양, 냉장고에 장기간 방치된 개봉우유와 음식물 등으로부터 시료를 채취하였다. 채취된 시료 1g 을 9ml 의 0.85% (w/v) NaCl 용액에 넣고 10^0 에서 10^4 까지 희석하여 LBL agar에 도말봉을 이용하여 평판 도말한 후 10°C 에서 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 희석법으로 다시 분리하고 β -galactosidase 활성을 가지는 균주의 최종선별은 X-gal을 첨가한 LBL 한천평판 배지에서 청색을 나타내는 콜로니를 선별하거나 MacConkey agar에 접종하여 유당 발효 여부를 확인하였다.

세대주기 측정을 위하여 10°C 에서 36시간 동안 증배양한 선별균 1% 를 100 ml의 L broth 에 접종하였다. 균체성장은 10°C , 20°C , 30°C , 37°C 에의 각 온도조건에서 배양된 액을 spectrophotometer (Biochrom, Libra S22, England)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

β -Galactosidase 활성측정

β -Galactosidase 활성은 10°C 에서 36시간 동안 증배양한 균을 100 ml의 L broth 에 1% 접종하고 10°C 및 20°C , 30°C 에서 각각 배양된 균들을 Miller 방법(25)에 따라 다음과 같이 효소활성을 측정하였다. 성장에 따라 적절한 시간간격으로 배양액을 채취하여 균의 성장을 흡광도 600 nm에서 측정하고 균체 배양액 1 ml을 4°C , 8,000 g에서 2 분간 원심집균 하였다. 집균체에 100 mM phosphate buffer 1 ml을 넣어 2 회 세척하고 상등액을 완전히 제거한 다음 같은 buffer에 1 ml에 재현탁시켰다. 균체 현탁액 0.1 ml를 취하여 Z buffer (60 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0) 0.9 ml와 chloroform 20 μ l, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 μ l를 시험관에 넣고 혼합하여 10 초간 vortex mixer로 교반한 다음 15°C 에서 10 분간 정지한 후 발색 기질인 10 mM 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 0.2 ml를 가하여 15°C 에서 10 분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 이 반응액에 1 M Na_2CO_3 0.5 ml을 첨가하고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성단위는 Miller Unit으로 환산하여 표시하였다.

균주의 형태 및 생화학적 특성조사

선별된 균주를 L broth 배지에 배양하여 대수기와 정지기의 균주를 위상차 현미경(Nikon 80i, Japan)을 이용하여 형태를 관찰하였다. 생화학적 특성은 BioMerieux Vitek Gram negative identification card (GNI+) 를 사용하였다. 판독은 그람 음성균 동정 카드, software 버전 R09.01 (bioMerieux, USA)을 사용하여 4 시간 경과 후 자동적으로 동정하였으며 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2(15)에 따라 확인하였다.

16S rDNA의 PCR 증폭 및 염기서열 결정

선별된 균의 16S rDNA을 증폭하기 위하여 먼저 다음과 같이 bead beating 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. 10°C 에서 30 시간 동안 L broth 배지에서 배양한 균 1 ml을 원심집균 한 후 0.3 ml lysis buffer (500 mM Tris-HCl, 10% SDS, 100 mM NaCl, pH 8.0)에 현탁시켰다. 여기에 0.5 g의 0.1 μ m Zirconia glass bead (Biospec, USA)를 가하여 vortex mixer로 3 분간 격렬하게 교반하면서 균체를 파괴하였다. 균체 용균액을 원심분리하여 상등액에 냉에탄올을 2 배 (v/v) 첨가한 후 genomic DNA를 침전시켰다. 이 용액을 원심분리하여 침강한 침전물을 70% 에탄올로 1 회 세척하고 건조시켜 적당량의 TE 완충액에 현탁시킨 후 최종농도가 20 μ g/ml이 되도록 ribonuclease A를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 반응시켰다. 이에 동량의 25:24:1 비율로 만

들어진 phenol:chloroform:isoamyl alcohol 용액으로 처리하여 단백질을 변성제거하고 수용액 성분을 회수한 후 0.1 배 (v/v)의 3 M sodium acetate와 2 배의 냉에탄올을 첨가하여 침전시키고 상기와 같이 70% 에탄올로 세척하고 건조시켜 TE 완충액에 현탁시킨 후 PCR의 주형으로 사용하였다.

16S rDNA 유전자를 증폭하기 위해 사용한 primer는 27F (*E. coli*; 5'-AGA GIT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (*E. coli*; 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 을 사용하였다. PCR 반응은 1X 반응용액(20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol, pH 8.0)에 2.5 mM dNTP, 각 primer 2 pmol, 추출된 genomic DNA 50 ng, TaKaRa Ex Taq DNA polymerase (Takara Biomedicals, Japan) 1.25 unit을 첨가하여 최종 50 μ l 로 반응 혼합액을 만들었다. PCR 반응은 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, USA)을 이용하였고 반응 조건은 94°C에서 5 분 동안 DNA를 변성시키고, 94°C에서 30 초, 50°C에서 30 초, 72°C에서 1 분 20 초로 30 cycle을 시행한 후 72°C에서 10 분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 산물은 PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 사용하여 정제한 후 SolGent 사(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA의 부분적인 핵산 염기서열은 GenBank에 DQ412565로 등록되었다.

16S rDNA의 염기서열을 이용한 계통분석

결정된 염기서열의 상동성 검사는 GenBank의 database에 등록된 정보를 대상으로 Blast 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)으로 수행하였다. 계통분석은 Clustal X의 multi-alignment program을 이용하여 정렬하였다. Genbank에 등록된 다른 균주들의 16S rDNA 염기서열 정보와 MEGA 프로그램을 이용하여 neighbor-joining method(24)에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogentic tree를 얻었다. Branch의 신뢰도(bootstrap 값)는 1,000 회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다(10).

결과 및 고찰

균주의 분리 및 배양학적 특성

저온효소는 식품의 유통과정에 유리한 저온에서 활성을 나타내어 유통 중에 효소처리가 가능하고, 열처리로 쉽게 불활성화되어 식품공정상에서 장점을 가진다. 저온균 또는 저온내성균 으로부터는 산업적으로 유용한 효소의 생산 및 이용에 관한 보고가 많지 않아, 젓소사육 농장의 축사 주변에서 β -galactosidase를 생산하는 균주를 분리하였다. 사용균주의 분리 및 선별은 저온에서 X-gal을 포함한 LBL 배지를 이용하였고, MacConkey agar 배지에서 유당의 발효를 재확인하여 저온에서 많은 양의 β -galactosidase를 생산하는 균주를 최종 AS-20으로 명명하였다.

분리된 균의 생육온도를 알아본 결과 Fig. 1에서와 같이 AS-20 균주는 대장균이 자라지 못하는 10°C에서도 비교적 잘 자랐

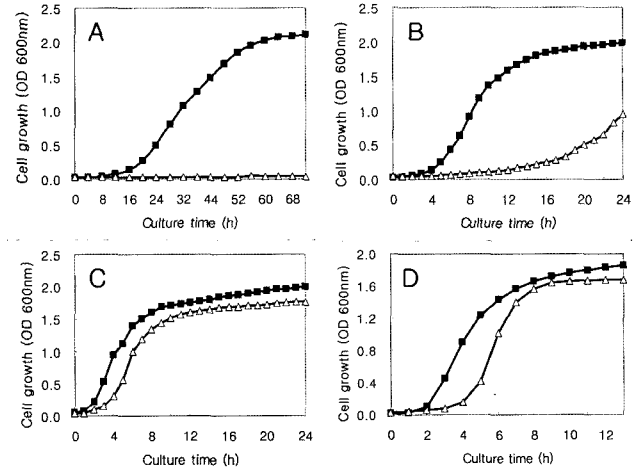


Fig. 1. Growth curve of the isolated bacterial strain, AS-20. The cells were grown in L broth at (A) 10°C, (B) 20°C, (C) 30°C and (D) 37°C by shaking at 150 rpm. Closed square (■ - ■) and open triangle (△ - △) represent AS-20 and control strain *E. coli* DH5 α , respectively.

으며, Table 1에서 보는 바와 같이 30°C에서 세대시간이 약 60여 분으로 가장 빠르게 증식하였다. Mesophile로 사용된 대조균인 대장균이 가장 잘 자라는 37°C에서 분리된 AS-20은 대수시간은 100 여분 이상으로 증가하는 특성을 보였다. 이러한 균의 온도에 따른 생육 특성을 볼 때 분리된 균은 저온균이기 보다는 저온 저항성을 가진 것으로 생각되었다.

분리균주의 형태 및 생화학적 특성

분리된 균을 그람염색한 결과 그람 음성균으로 판명되었으며 (데이터 미제시) 위상차 현미경을 사용하여 관찰한 결과 대수기에서는 간균의 형태를 보여 주는 반면 정지기에서는 단간균 또는 구균과 유사한 형태를 보여주었다 (자료 미제시). 이러한 결과는 Nakagawa 등이 분리한 저온균인 *Arthrobacter psychrolactophilus*와 유사한 형태특성을 보여주었다(20).

분리균주의 생화학적 특성은 Table 2와 같았으며 포도당을 발효시키고 산화시켰으며 유당, maltose, mannitol, xylose, L-arabinose, rhamnose을 발효하여 산을 생성하였다. 이에 반하여 raffinose, sorbitol, sucrose, inositol, adonitol 같은 당이나 당알코올 등은 발효시키지 못하였다. Lysine, ornithine 에 대하여 decarboxylase의 반응을 일으켜 양성 반응을 보인 반면 arginine dihydrolase와 bile-esculin test은 음성반응을 보였다. ONPG 시험에서는 양성반응을 보여 β -galactosidase를 생산함을 알 수 있었으며 oxidase는 음성반응을 보였다. 이러한 생화학적 결과를 토

Table 1. Generation times of the isolated bacteria at different cultivation temperatures

Culture temp (°C)	10	20	30	37
Growth rate (OD 600 nm/Time)	0.06	0.117	0.295	0.175
Generation time (min)	303	154	61	103

Table 2. Biochemical properties of the isolated bacterium

Medium Abbreviation	Principal component	AS-20
DP3	2,2,4'-Trichloro-2'-Hydroxydiphenylether	-
OFG	glucose	+
GC	Tryptophan	+
ACE	Acetamide	-
ESC	Esculin	-
PLI	Indoxyl-β-D-Glucoside	-
URE	Urea	-
CIT	Citrate	-
MAL	Malonate	-
TDA	Tryptophan	-
PXB	Polymyxin B	-
LAC	Lactose	+
MLT	Maltose	+
MAN	Mannitol	+
XYL	Xylose	+
RAF	Raffinose	-
SOR	Sorbitol	-
SUC	Sucrose	-
INO	Inositol	-
ADO	Adonitol	-
COU	p-coumaric	-
H2S	Sodium Thiosulfate, Lactate, Ferrous Sulfate	-
ONP	O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	+
RHA	Rhamanose	+
ARA	L-Arabinose	+
GLU	glucose	+
ARG	Arginine	-
LYS	Lysine	+
ORN	Ornithine	+
OXI	Oxidase	-

대로 균을 동정한 결과 97%는 *Hafnia alvei*, 2%는 *Escherichia coli*로 동정되었다. 일반적으로 *Hafnia* 속은 *Enterobacteriaceae*의 그람 음성 속으로 대부분의 균주가 25~30°C에서 운동성을 가지고 35°C에서는 운동성이 없으며 인간, 동물, 조류, 토양, 오수, 물에서 분리된다. 그리고 유당을 이용하지 못한다고 알려져 있으나 경우에 따라 플라스미드에 의해 유당을 이용하는 것도 있다고 보고되어 있어(15) 분리된 AS-20은 플라스미드에 의해 유당을 분해하는 것으로 생각된다.

16S rDNA의 염기서열 분석 및 계통적 유연관계

PCR로 증폭생산된 1,507 bp의 16S rDNA 를 이용하여 선별 균주의 동정을 위하여 염기서열분석 한 결과 1,426 bp의 염기서열을 결정하였으며 이를 이용하여 다음과 같이 염기서열분석을 시도하였다. 먼저 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Blast 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 선별균주 AS-20는 *H. alvei*와 99% (1,413/1,421)의 높은 염기서열 상동성을 보여 상기의 생화학적 방법과 동일한 결과를 보여줌을 확인하였다. 결정된 염기서열과 유사한 type strain들과의 유연관계를

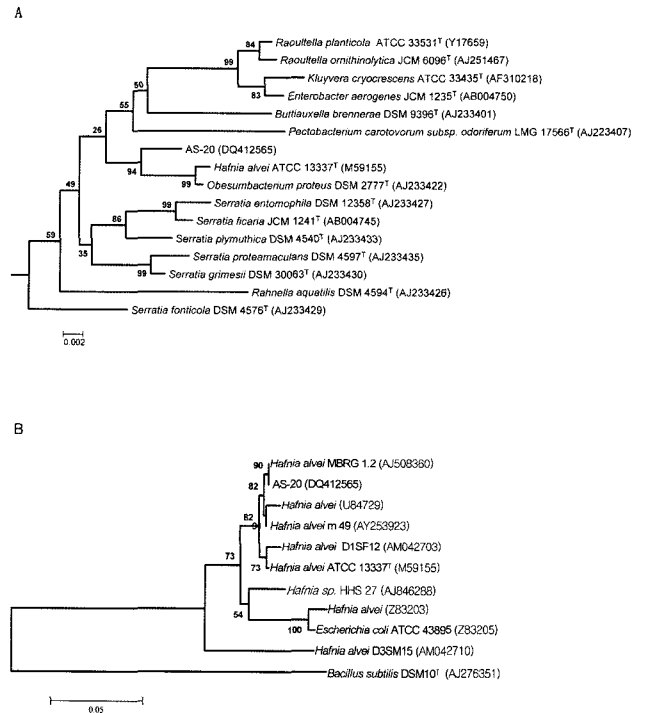


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram of the 16S rDNA sequences of AS-20, *Hafnia* spp. and *E. coli*. Tree (A) shows the position of AS-20 in phylogenetic tree of *Enterobacteriaceae* family. Tree (B) represents the closest strain of AS-20 among *Hafnia* spp. The tree was rooted from a neighbor-joining method with bootstrap analysis (1000 replications) of 16S rDNA sequences from AS-20 and related species published in GenBank. *Bacillus subtilis* was used as an outgroup and Genbank accession numbers were shown in parentheses.

조사한 결과 Fig. 2(A)와 같았다. Brenner(3)에 의하면 동일한 정도의 진화학적 거리를 가지는 *Obesumbacterium proteus*는 *H. alvei*와 99.5%의 16S rDNA 상동성을 가지는 동일 type strain으로 보고되어 있으며 이에 대한 결정은 더 많은 정보를 필요로 한다. *H. alvei*에 속하는 비교적 긴 16S rDNA 유전자의 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석에서 AS-20는 Fig. 2(B)와 같았으며 NCBI의 데이터베이스에 등록된 염기서열 중 가정의 싱크대 유출구에 형성된 biofilm에서 분리된 균주 *H. alvei* MBRG 1.2와 높은 유연관계를 보여주었다(19).

균의 응용적인 측면에서 고려할 때 병원성이 없는 것이 유익하다. 최근의 연구에서 *H. alvei*는 enterohemorrhagic (장내출혈성) 또는 enteropathogenic (장내병원균) 대장균과 같이 독성관련 유전자 *eaeA* (EPEC attaching and effacing) 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(2, 11, 17, 21, 26). 독성 유전자 *eaeA*가 존재하는 균과 없는 균의 16S rDNA의 염기서열이 독특한 것을 이용하여 분리된 *H. alvei* AS-20의 병원성 유무를 알아보기 위하여 이들 독성 유전자를 가진 균의 16S rDNA의 염기서열을 정렬하여 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같았으며 AS-20은 병원성을 가지지 않은 것과 동일하여 병원성이 없는 것으로 추정할

E. coli EPEC (247359)	ATGCAAGTGC AACGGTAAACA GGAACACGCT TGCTGCTFTG CTGACGAGTG GCGGACGGGT
E. coli EHEC (283205)GA.....T.....
H. alvei eaeA ⁺ (247360)T..C.....
H. alvei eaeA ⁻ (M59155)G.....CTC.G.G.....C.....
AS 20G.....CA.G.G.....CTC.G.G.....C.....
E. coli EPEC (247359)	GAGTAATGTC TGGGAAACTG CCTGATGGAG GGGGATAACT ACTGGAAACG GTAGCTAATA
E. coli EHEC (283205)C.....
H. alvei eaeA ⁺ (247360)C.....
H. alvei eaeA ⁻ (M59155)C.....
AS 20C.....
E. coli EPEC (247359)	CGCATATACG TCGCAAGACC AAGAGGGGG ACCTTGGGSC CTCTGCCAT CGGATGTGCC
E. coli EHEC (283205)A.....
H. alvei eaeA ⁺ (247360)A.....
H. alvei eaeA ⁻ (M59155)G.Y. TTCC.....T.....AC.....A.....
AS 20G.....TTCC.....T.....AC.....A.....
E. coli EPEC (247359)	CAGATGGGAT TAGCTAGTAG GTGGGTAAC GGCTCACCTA GCGCAGCATC CCTAGC-290
E. coli EHEC (283205)T.....A.....
H. alvei eaeA ⁺ (247360)T.....T.....
H. alvei eaeA ⁻ (M59155)T.....T.....
AS 20T.....T.....

Fig. 3. Alignment of the partial 16S rDNA genes of *E. coli* EPEC, EHEC, *eaeA* positive and negative strains and isolated strain AS-20. GenBank accession numbers were shown in parentheses and numbering was the same as (20).

수 있었다. 실제의 응용을 위해서 비병원성 인지의 유무는 직접적으로 *eaeA* 유전자의 검출 및 독성시험이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

배양온도 및 시간에 따른 β-Galactosidase 효소활성

대조구로서 대장균을 사용하여 분리된 균을 10°C, 20°C, 30°C에서 배양하면서 β-galactosidase 활성을 조사한 결과 Fig. 4와 같았다. 생육 가능한 30°C에서 12시간 배양하여 β-galactosidase 활성을 15°C에서 10 분간 반응시켜 측정하였을 때 대장균은 40 unit을 나타내었다 (Fig. 4C). 이에 반해 생육 최적온도에서 자란 AS-20은 6시간 배양시 270 unit을 나타내어 대장균보다 6.7 배의 높은 효소활성을 보여주었다. 10°C에서 배양하였을 경우 대수기 후기에서 정지기에 도달하였을 때 410 unit을 나타내어 30°C에서 배양한 것 보다 1.5배의 활성을 보여 주었다(Fig. 4, A, C). 20°C에서는 12시간 배양시 최고활성을 보인 후 배양후기에는 약간 낮은 효소활성을 보여주었다(Fig. 4B).

이러한 결과를 볼 때 분리된 AS-20은 생육최적온도인 30°C보다는 저온에서 많은 양의 β-galactosidase를 생산하여 높은 효소활성을 나타내는 것으로 생각되며 앞으로 이 균주로부터 β-galactosidase를 코딩하는 유전자를 클로닝하고 단백질질을 정제하여 효소의 특성을 연구하여 산업적 이용가능성을 알아보아야 될 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학 육성사업의 지원에 의하여 연구되었으며 일부는 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 실험에 도움을 준 오용식 군을 비롯한 충북대학교 미생물학과 구성원들과 충북대학교 병원에 근무하시는 김원식 남에게 감사드립니다. 논문작성과 교정에 큰 도움을 준 이영남, 이성근 교수님께 감사드립니다.

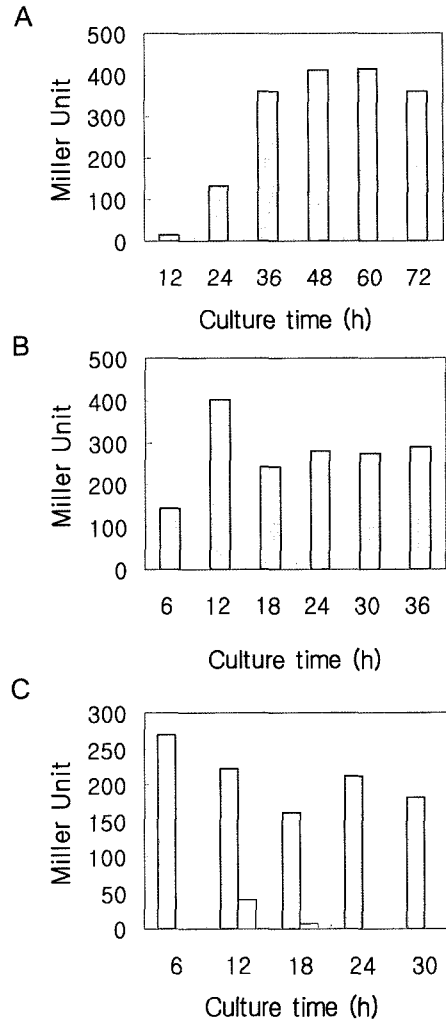


Fig. 4. Activities of β-galactosidase for AS-20 at different temperatures. The strains were grown in L broth with at 10°C(A), 20°C(B) and 30°C(C) and enzyme activity was determined at 15°C for 10 min. In (C), β-galactosidase activity of *E. coli* was shown as control.

참고문헌

1. Aislabie, J.M., M.R. Balks, J.M. Foght, and E.J. Waterhouse. 2004. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1265-1274.
2. Albert, M.J., S.M. Faruque, M. Ansaruzzaman, M.M. Islam, K. Haider, K. Alam, I. Kabir, and R. Robins-Browne. 1992. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* 37, 10-14.
3. Brenner, D.J. 1991. Additional genera of the *Enterobacteriaceae*. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications* 2nd ed. p. 2922-2937. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.
4. Bronnenmeier, K., A. Kern, W. Liebl, and W.L. Staudenbauer. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,

- 1399-1407.
5. Cavicchioli, R., K.S. Siddiqui, D. Andrews, and K.R. Sowers. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 253-261.
 6. Chung, C.-W. 1999. Potential correlation between lactose intolerance and cancer occurrence. *J. of Korean Ass. Cancer Prevention* 4, 52-60.
 7. Coker, J.A., P.P. Sheridan, J. Loveland-Curtze, K.R. Gutshall, A. J. Auman, and J. E. Brenchley. 2003. Biochemical characterization of a β -galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic *Arthrobacter* isolate. *J. Bacteriol.* 185, 5473-5482.
 8. Coombs, J.M., and J.E. Brenchley. 1999. Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active β -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5443-5450.
 9. D'Amico, S., P. Claverie, T. Collins, D. Georgette, E. Gratia, A. Hoyoux, M. A. Meuwis, G. Feller, and C. Gerday. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 917-925.
 10. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolutin* 39, 783-791.
 11. Frankel, G, D.C. Candy, P. Everest, and G. Dougan. 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62, 1835-42.
 12. Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 518-525.
 13. Gutshall, K.R., D.E. Trimbir, J.J. Kasmir, and J.E. Brenchley. 1995. Analysis of a novel gene and β -galactosidase isozyme from a psychrotrophic *Arthrobacter* isolate. *J. Bacteriol.* 177, 1981-1988.
 14. Hoyoux, A., I. Jennes, P. Dubois, S. Genicot, F. Dubail, J. M. Francois, E. Baise, G. Feller, and C. Gerday. 2001. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1529-1535.
 15. Krieg N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore
 16. Laderman, K.A., B.R. Davis, H.C. Krutzsch, M.S. Lewis, Y.V. Griko, P.L. Privalov, and C.B. Anfinsen. 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 268, 24394-24401.
 17. Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 152-73.
 18. Margesin, R., and F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 650-663.
 19. McBain, A.J., R. G Bartolo, C.E. Catrenich, D. Charbonneau, R. G Ledder, A.H. Rickard, S.A. Symmons, and P. Gilbert. 2003. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 177-85.
 20. Nakagawa, T., Y. Fujimoto, M. Uchino, T. Miyaji, K. Takano, and N. Tomizuka. 2003. Isolation and characterization of psychrophiles producing cold-active β -galactosidase. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 154-157.
 21. Ridell, J., A. Siitonen, L. Paulin, L. Mattila, H. Korkeala, and M. J. Albert. 1994. *Hafnia alvei* in stool specimens from patients with diarrhea and healthy controls. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2335-7.
 22. Russell, N. J. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* 4, 83-90.
 23. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
 24. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 25. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 26. Schauer, D.B., and S. Falkow. 1993. The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 61, 4654-61.
 27. Sheridan, P.P. and J.E. Brenchley. 2000. Characterization of a salt-tolerant family 42 β -galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2438-2444.
 28. Triveni, P. S. 1975. β -Galactosidase technology: a solution to the lactose problem. *Crit. Rev. Food Technol.* 5, 323-354.
 29. Yumoto, I., A. Nakamura, H. Iwata, K. Kojima, K. Kusumoto, Y. Nodasaka, and H. Matsuyama. 2002. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 85-90.

(Received December 16, 2005/Accepted February 28, 2006)

ABSTRACT : Identification of Novel Psychrotolerant Bacterial Strain and Production of β -Galactosidase

Jeong-Woon Park, Jae-Soo Yoo¹ and Dong-Hyun Roh* (Division of Life Sciences, College of Natural Sciences and Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ¹School of Electrical and Computer Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Galactose joined to glucose by a $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic bond makes lactose and this disaccharide is rich in milk. It is known that lactose is hydrolyzed to each monomeric sugar by either lactase in human or β -galactosidase in bacteria. Ingestion of milk by lactase-deficient persons causes a temporary diarrhea and subsequent chronic

diarrhea results in colitis with chronic inflammation. We isolated a β -galactosidase producing psychrotolerant strain AS-20 from near cattle shed and investigated the growth at various temperature conditions. Whereas *Escherichia coli* strains did not grow at 10°C, the AS-20 strain could grow well at this low temperature and showed optimal growth at 30°C. The isolated strain was identified as 97% *Hafnia alvei* by biochemical properties. This strain could ferment glucose, lactose, maltose, mannitol, xylose, ONPG, rhamnose and L-arabinose, and decarboxylate lysin and ornithine. To confirm the identity of isolated strain we amplified 16S rDNA by PCR and searched similarity of the 1426 bp DNA sequence with Genbank database. The strain AS-20 showed 99% similarity with *Hafnia alvei*. The activity of β -galactosidase was 1.5 times higher when the cell was grown at 10 or 20°C than at 30°C. The highest enzyme activity of AS-20 was also much higher than that of *E. coli*, which was grown at 30°C.