The Korean Journal of Microbiology (2010) Vol. 46, No. 1, pp. 63-67
Copyright ⓒ 2010, The Microbiological Society of Korea

단백질분해효소를 생산하는 *Pseudoxanthomonas* sp. WD12와 WD32의 분리

조운동 · 이제관 · 임채성 · 박아름 · 오용식 · 노동현*
충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation of *Pseudoxanthomonas* sp. W12 and WD32 Producing Extracellular Protease

Woon-Dong Cho, Je-Kwan Lee, Chae-Sung Lim, A-Rum Park, Yong-Sik Oh, and Dong-Hyun Roh*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received February 10, 2010/Accepted February 26, 2010)

Proteases catalyze hydrolytic cleavage of a peptide bond between amino acids and occupy pivotal positions in application in physiological and commercial fields. During the screening for novel bacteria producing extracellular protease, two bacterial strains, WD12 and WD32, were isolated from rotten trees and they made clear zone on LB plates supplemented with 1% skim milk. The similarities of 16S rRNA gene sequence of either WD12 or WD32 to GenBank database showed the highest to *Pseuoxanthomonas mexicana* as 97.8 and 99.8%, respectively. Phylogenetic analysis showed that both isolated was located within the cluster comprising *P. mexicana* and *P. japonesis*. WD12 and WD32 were catalase- and oxidase-positive, Gram-negative rod strains. In case of WD12, it could assimilate malate, but could not assimilate D-mannose, which were different characteristics from *P. mexicana*. Both *Pseuoxanthomonas* sp. WD12 and WD32 optimally produced extracellular protease at 35-37°C, and maximal activity showed as 656 unit/ml and 267 unit/ml, respectively.

***Keywords*:** 16S rRNA gene, extracellular protease, *Pseudoxanthomonas* sp.

현대의 많은 생물공학적 처리과정은 미생물 또는 효소에 의한 화학적 반응을 이용하고 있다. 따라서 바이오산업의 발달에 따라 필연적으로 다양한 원천으로부터 효소들이 분리, 정제되어 판매되고 있다. 이러한 효소들 중 단백질 분해효소는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로, 산업적으로 판매되는 효소 중 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 이중 alkaline protease가 전세계적 판매량의 25%를 차지하며, 기타 단백질 분해효소 21%, rennins 10%, trypsin이 3%를 차지하여, 총 판매효소의 59%가 단백질 분해효소이다. 이들 단백질 분해효소 판매의 시장점유율은 유럽국가인 덴마크의 Novo Industries와 네덜란드의 Gist-Brocades가 60%를 차지하고 있으며(12) 대부분은 수입에 의존하고 있다. 단백질 분해효소의 주요 용도로는 식육의 연화, 조미료 제조, 맥주 청주의 혼탁방지, 치즈의 숙성 등 식품산업과 소화제, 소염진통제 등 제약산업, 그리고 피혁 및 세제, 환경 등 다양한 분야에서 산업적으로 그 요구도가 증가하고 있는 실정이다(4, 12).

현재 산업적으로 많이 사용되는 단백질 분해효소는 생물공학적 응용에 적합한 특성을 가진 미생물 효소가 많이 사용되며 대부분의 상업적 효소는 *Bacillus* 속의 세균으로부터 생산되는 중성 또는 알카리성 효소들이다(6). 이외에도 다양한 균주로부터 단백질 분해효소에 대한 유전자의 클로닝과 발현에 대한 보고가 있으며(12), 동해심층수로부터 분리된 *Pseudoaltermonas* 속(2)과 *Micrococcus* 속(3)의 균주들도 단백질 분해효소를 생산한다고 보고되어 있다.

본 연구에서는 신종 미생물의 분리와 더불어 새로운 단백질 분해효소원를 찾기 위하여 다양한 환경시료로부터 미생물의 분리를 시도하는 과정에서 부패한 나무로부터 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 분리하여 16S rRNA 유전자를 이용한 동정과 생리 · 생화학적 특성 및 효소의 최적생산 온도를 알아보는 연구를 수행하였다.

* For correspondence. E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr; Tel: +82-43-261-3368; Fax: +82-43-264-9600

재료 및 방법

배지 및 배양

균 분리를 위해서 R2A 한천배지(yeast extract 0.5 g, proteose peptone No.3 0.5 g, casamino acids 0.5 g, dextrose 0.5 g, soluble starch 0.5 g, sodium pyruvate 0.3 g, dipotassium phosphate 0.3 g, magnesium sulfate 0.05 g, agar 15.0 g per 1 L, Difco, USA)를 사용하였다. 분리된 균들로부터 체외분비 단백질분해효소를 생산하는 균을 선발하기 위해서는 LB 배지 (sodium chloride 0.5 g, tryptone 10.0 g, yeast extract 5.0 g, agar 15.0 g per 1 L, Duchefa biochemie)에 0.1% skim milk (Difco)를 첨가하여 만든 LBS 배지를 사용하였으며, 고체 평판배지 LBSA는 LB에 1% skim milk를 첨가하고 1.5% agar를 넣어 사용하였다.

균 분리 및 효소생산을 위한 최적 배양온도

균의 분리를 위해 충북대학교 교내에 있는 나무부패산물과 버섯류, 또는 그 주위의 토양시료들을 채취하였다. 채취된 시료 1 g을 10 ml 멸균된 증류수에 교반하여 10^{-2}-10^{-7}까지 희석하고, 희석액을 100배 희석된 R2A 평판배지에 도말하여 25°C에서 배양하였다. 배지상에 자란 독립 콜로니는 다시 삼단 획선법을 사용하여 순수한 균주를 얻었다. 분리된 미생물의 단백질 분해효소 생산 여부와 최적 배양온도를 확인하기 위하여 25°C와 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C에서 각각 48시간 배양 후 나타나는 투명환의 크기를 통해 확인하였다.

16S rRNA gene의 염기서열 결정과 계통분석

선별된 균의 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 27F와 1492R primer를 이용하여 콜로니 PCR을 수행하였다(2, 3). PCR 반응은 MJ Mini™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 사용하였고, 반응조건은 95°C에서 2분간 예비변성을 거친 후 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분 45초로 30회 반복 후 72°C에서 5분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 산물은 PCR purification kit (Real Biotech corp., Taiwan)를 사용하여 제공된 절차에 따라 정제 한 후 Solgent사 (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. WD12와 WD32의 결정된 16S rRNA 유전자의 부분적인 핵산 염기서열은 GenBank에 각각 GU908487과 GU908488로 등재하였다.

결정된 염기 서열의 상동성 검사를 GenBank의 database에 등록된 정보를 대상으로 National Center for Biotechnolgoy Information (NCBI)의 Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)으로 수행하였으며, 관련된 분류군의 16S rRNA gene 염기 서열은 GenBank database (1)에서 얻었다. Multi alignment는 CLUSTAL X program (11)으로 행해졌으며 gap은 BioEdit program (7)으로 편집하였다. 진화적인 거리는 Kimura two-parameter model (9)으로 계산하였으며 계통도는 MEGA 3 program (10)에서 neighbor-joining method (13)을 사용하여 작성하였다. Branch의 신뢰도(bootstrap 값)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다(5).

균주의 기초적인 생리 및 생화학적 특성조사

균주의 형태학적 특성을 알아보기 위해 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 제시된 절차에 따라 실행한 후, 광학현미경(Nikon, Japan) 하에서 관찰하였다. Catalase test 실험은 Hanker와 Rabin의 방법(8)을 통해 알아보았으며, oxidase는 bioMerieux 사의 kit을 사용하였다. 그리고 그 외 여러 가지 생리 생화학적인 특성들에 대한 실험은 API20NE과 API 50CH (bioMerieux, France)를 사용하여 시험하였고, 사용방법과 해석은 제조업자의 사용설명서에 따라 실행하였다.

단백질분해효소의 활성측정

단백질분해효소의 활성 측정은 37°C에서 배양된 균의 상등액을 이용하여 Cha 등(2)이 사용한 방법에 준하여 다음과 같이 효소 활성을 측정하였다. 배양개시부터 적절한 시간 간격으로 배양액을 채취하여 균의 성장을 흡광도 600 nm에서 측정하고 균체 배양액을 4°C, 8,000 rpm (Micro 17R, Hanil)에서 5분간 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 이들 조효소액 100 µl에 500 mM Tris-HCl (pH 9.0)에 녹인 0.5% (w/v) azocasein을 동량으로 첨가하여 잘 혼합한 후에 45°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 400 µl를 가하여 2분 동안 정치한 후, 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액에 525 mM NaOH 700 µl를 가한 후, 흔들어서 섞어준 후에 흡광도 442 nm에서 측정하였다. 효소의 활성단위는 흡광도 442 nm에서 측정한 수치 0.01을 1 unit/ml (EU/ml)로 정하였다. 모든 protease 활성 측정은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

단백질 분해효소를 생산하는 균주의 분리

다양한 환경시료로부터 단백질 분해효소를 생산하는 신종 미생물을 분리하기 위해 미량의 영양분만을 첨가한 배지를 이용하여 균주를 순수 분리하였다. 이들 순수분리된 균들을 대상으로 skim milk를 첨가한 배지에서 48시간 배양 이후 투명환의 크기가 2 mm 이상이 균들을 분리하였다. 이들 중 약학대학 건물 뒤 부패한 나무로부터 분리된 균주들이 콜로니 주변에 큰 투명환을 생성하였으며, 그 중 기질의 분해능이 뛰어난 두 균주를 선별하여 WD12와 WD32로 명명하였다.

분리한 균들의 형태 및 생리 · 생화학적 특성

분리된 균들을 그람 염색한 결과 WD12와 WD32는 그람 음성의 간균으로 판명되었다. 생리 · 생화학적 특성을 조사한 결과 W12와 WD32는 대부분 유사한 특성을 보여 주었다(Table 1). 여러 가지 당 또는 탄수화물의 이용 면에서 D-mannose에 대해서만 WD12는 음성을 나타내는 반면, WD32는 양성을 나타내었다. 이외에도 WD12 균주는 D-xylose, D-galactose, D-fructose, D-mannose, starch, 5-keto-gluconate의 동화면에서 비교균주인 *P. mexicana*와는 다른 특성을 보여주었다. 그 외 catalase와 malate 동화능력에서 WD12와 WD32가 양성을

Table 1. Phenotype characteristics of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32
Strains: 1, *Pseudoxanthomonas* sp. WD12; 2, *Pseudoxanthomons* sp. WD32; 3, *Pseudoxanthomonas mexicana* JCM 11524^T (15); 4, *Pseudoxanthomonas japonensis* JCM 11525^T (15).

Characteristic	1	2	3	4
Catalase	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-
Reduction of nitrate to nitrites	-	-	-	-
Reduction of nitrate to nitrogen	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Fermenation of D-glucose	-	-	-	-
L-Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+
Hydrolysis of gelatine	+	+	+	+
β-Galtactosidase	-	-	-	+
Assimilation of				
D-Glucose	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-
D-Mannose	-	+	+	-
D-Mannitol	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-
Caprate	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	-
Malate	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	-
Phenylacetate	-	-	-	-

나타내었고, β-galactosidase은 음성을 나타내어 비교균주인 *P. japonensis*와는 다른 특성을 보여주었다.

16S rRNA 유전자를 이용한 동정과 계통적 유연관계

분리된 균주들의 유전학적 특성을 이용하여 동정과 계통적 유연관계를 알아보기 위해 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하였다. 증폭생산된 1,507 bp의 16S rRNA 유전자로부터 WD12는 1,435 bp, WD32는 1,069 bp의 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 이용하여 GenBank에 등록된 서열들과 Blastn 프로그램으로 상동성을 조사하였다. WD12는 *Pseudoxanthomona mexicana*와 97.8%의 상동성을 보여주었고, WD32는 *P. mexicana*와 99.8%의 상동성을 보였으며, 각각은 97.6%의 상동성을 보여주었다. 분리균주의 계통학적 유연관계를 알아보기 *Pseudoxanthomonas* 속의 13개 type strain, *Xanthomonas* 속의 4개 type strain과 *Stenotrophomonas* 속의 6개 type strain을 택하고 Out group으로는 *Thermomonas haemolytica*를 사용하여 계통도를 작성한 결과 Fig. 1과 같았다. WD12와 WD32는 87%의 높은 bootstrap 값을 보이면서, *P. mexicana*, *P. japonensis*와 함께 cluster를 형성하였다. 이러한 결과들은 Table 1의 형태 및 생리생화학적 결과와 함께 분리 균주들이 *Pseudoxanthomonas* 속의 균주임을 알 수 있었다. 일반적으로 미생물 분류체계상 유전체의 DNA relatedness가 70% 미만이면 독립적인 균주로 인정된다(16). 그리고 16S rRNA 유전자의 상동성이 97% 미만이면 유전체의 DNA relatedness가 60% 이하인 것으로 수집된 자료들에서 증명되었다(14). 따라서 분리된 WD12의 경우 *P. mexicana*와의 상동성이 97%에 근접하여 신규 균주의 가능성이 있는 것으로 생각되며, 이에 대한 연구를 진행하고 있는 실정이다.

단백질 분해효소 생산을 위한 최적배양온도 및 효소활성

WD12와 WD32가 생산하여 분비하는 단백질 분해효소의 최적 배양온도를 알아보기 위하여, 1% skim milk가 포함된 LB plate에 2 μl씩 접종하여 25°C 및 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C에서 48시간 동안 배양 후 나타나는 투명환의 크기를 확인한 결과 Fig. 2와 같았다. 두 균주 모두 25-37°C에서 자랐지만, 40°C에서는 WD12만 자랐다. WD32의 경우에도 72시간에서 미약한 생육을 보이기 시작하였지만, 45°C의 경우에는 96시간까지 관찰하여도 두 균주 모두 생육하지 못 하였다(자료 미제시). 48시간 배양시, 생육이 확인된 온도에서 투명환의 크기를 비교했을 때 25°C, 30°C보다 35°C와 37°C에서 투명환의 크기가 더 크게 나타났다.

최대의 생육과 효소활성을 보인 37°C에서 액체배양 후 배양상등액을 이용하여 균의 생육에 따른 WD12와 WD32의 단백질 분해효소활성을 조사한 결과 Fig. 3과 같았다. WD12와 WD32는 대수증식기 후기까지 일정한 활성을 나타내었지만, 그 후부터 급격히 효소의 활성증가를 보여주어 정지기에 도달했을 때 최대의 활성을 보여주었다. WD12의 경우에는 100시간 배양시 최대 활성 656 unit/ml의 활성을 보여주었고, WD32의 경우에는 80시간대에서 최대 활성 267 unit/ml을 나타내었다. 이러한 WD12의 효소활성은 Cha 등(2, 3)이 보고한 저온성 내성균주인 *Pseudoaltermonas* 속의 균주나 중온성 균주인 *Micrococcus* 속의 균주보다 높았으나, 반응온도의 차이로 실질적인 우위는 같은 반응조건에서 비교실험이 필요한 것으로 생각된다.

Pseudoxanthomonas 속의 균주 중에 체외단백질 분해효소의 특성에 대한 연구는 많지 않으며, 단지 *P. mexicana*와 *P. japonensis*의 생리생화학적 조사에서 gelatin과 casein을 가수분해 할 수 있다는 보고만 있는 실정이다(15). 본 논문에서 보고한 WD12의 경우에는 16S RNA 유전자 서열의 상동성과 생리생화학적 특성을 볼때 신종 세균일의 가능성이 있으며, 단백질 분해효소의 활성도 비교적 높은 편으로, 새로운 단백질 분해효소원으로 차후 효소의 특성과 신규 균주로 동정에 대한 연구가 진행 중에 있다.

적요

생리 및 상업적 응용분야에서 중요한 위치를 차지하는 단백질 분해효소는 펩타이드 결합의 가수분해를 촉매한다. 단백질 분해효소를 생산하는 신규 균주를 분리하기 위하여 부패한 나무로부터 균을 분리하여 1% skim milk가 포함된 LB 배지에서 투명환의 생성 능력이 높은 두 균주 WD12와 WD32를 선발하였다. 선발균주의 동정을 위하여 16S rRNA gene의 염기서열

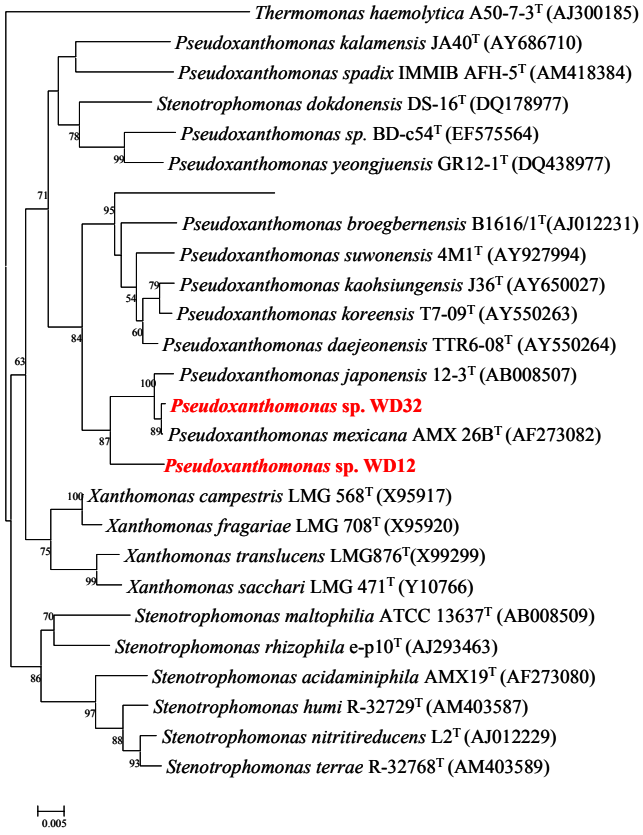

Fig. 1. Phylogenetic tree of the 16S rRNA sequences of the *Pseudoxanthomonas* sp. WD12, WD32 and related families. The tree was rooted from a neighbor-joining method with bootstrap analysis of 16S rRNA gene sequence of the WD12, WD32 and related species. Bootstrap values are shown as percentages of 1,000 replicates when greater than 50%. GenBank accession no. is shown in parentheses. *T. haemolytica*. was used as an outgroup. Bar, 0.005 chages per nucleotide position.

을 결정한 후 GenBank 상에 등록된 서열들과 상동성을 조사한 결과, WD12는 *Pseudoxanthomonas mexicana*와 97.8%, WD32는 99.8%의 상동성을 보여주었다. 계통적 유연관계를 조사한 결과 이들 균들은 *P. mexicana*와 *P. japonensis*와 cluster를 형성하였다. WD12와 WD32는 그람 음성 간균으로 catalase와 oxidase 활성을 보였다. WD12의 경우 *P. mexicanna*와 달리 malate를 동화할 수 있었으며, D-mannose를 동화할 수 없었다. 두 균주의 최적 단백질 분해효소를 생산하는 온도는 35-37°C로 나타났으며, 최대활성은 WD12가 656 unit/ml, WD32가 267 unit/ml을 나타내었다.

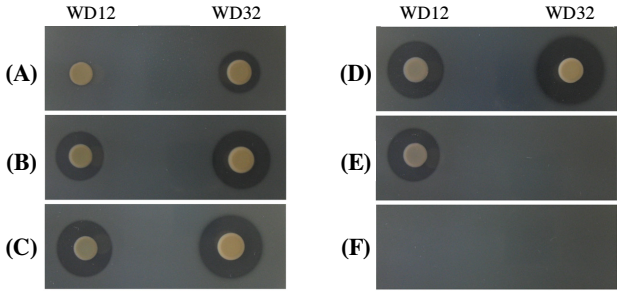

Fig. 2. The protease productions of WD12 and WD32 at various culture temperature. The isolate WD12 and WD32 were cultured at 25°C (A), 30°C (B), 35°C (C), 37°C (D), 40°C (E), and 45°C (F) for 48 h on the plate of LB plate supplemented with 1% skim milk.

감사의 말

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, and D.L. Wheeler. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue), D25-D30
2. Cha, I.T., H.J. Lim, and D.H. Roh. 2007. Isolation of *Pseudoaltermonas* sp. HJ 47 from deep sea water of East Sea and characterization of its extracellular protease. *J. Life Sci.* 17, 272-278.
3. Cha, I.T., Y.S. Oh, and D.H. Roh. 2007. Isolation of characterization of *Micrococcus* sp. HJ-19 secreting extracellular protease. *Kor. J. Microbiol.* 43, 222-226.
4. Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins, pp. 353-374. *In* T. Godfrey and S. West (eds.), Industrial enzymology-The application of enzymes in industry. The Nature Press, New York,

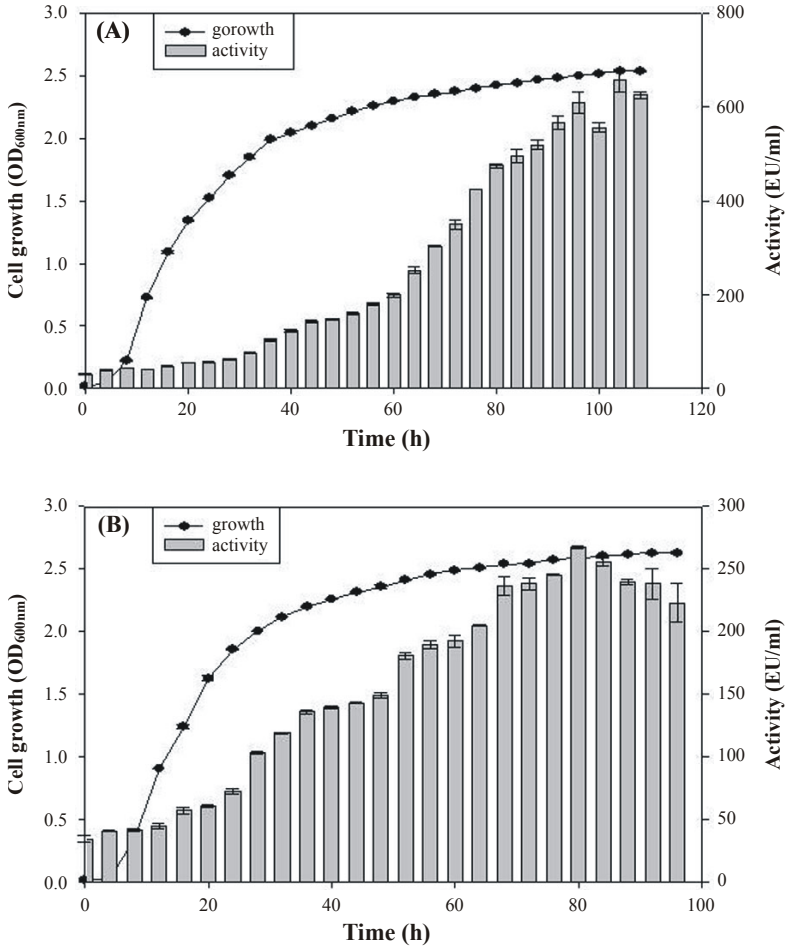

Fig. 3. Growth and protease activity of the WD12 (A) and WD32 (B). The cells were grown in LB supplemented with 0.1% skim milk at 37°C. Protease activity was determined at 45°C, pH 9.0 (0.5% azocasein) for 1 h. Standard deviation from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

N.Y., USA.

5. Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
6. Godfrey, T. and S. West. 1996. Industrial enzymology. 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York, N.Y., USA.
7. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
8. Hanker, J.S. and A.N. Rabin. 1975. Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 2, 463-464.
9. Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, UK.
10. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150-163.
11. Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
12. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
13. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
14. Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849.
15. Thierry, S., H. Macarie, T. Iizuka, W. Geissdorfer, E.A. Assih, M. Spanevello, F. Verhe, and *et al.* 2004. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2245-2255.
16. Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, and *et al.* 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464.