

극지 미생물들의 배양온도에 따른 성장률 및 protease activity 영향 연구

김현도, 최종일*
전남대학교 생물공학과

Received: July 10, 2014 / Revised: August 5, 2014 / Accepted: August 6, 2014

Effect of Temperature on Growth Rate and Protease Activity of Antarctic Microorganisms

Hyun-do Kim and Jong-il Choi*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

This study was conducted to investigate the effect of culture temperature on the growth rate and protease activity of Antarctic microorganisms. The Antarctic microorganisms PAMC 25641, 25614, 25719 and 25617 were obtained from the Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC) at the Korea Polar Research Institute. These microorganisms were confirmed for the excretion of protease on a plate with skim milk. The identification of microorganisms was carried out using the 16S rDNA sequencing method. PAMC 25641 showed the highest protease activity among the subjects tested, and PAMC 25617 exhibited the highest growth rate. The growth rates of the microorganisms were not affected by temperature, except for PAMC 25617. However, protease activities were increased for all strains in a temperature dependent fashion. These results suggest the possible application of Antarctic microorganisms for the efficient production of low temperature proteases.

Keywords: Protease, growth rate, Antarctic microorganisms, culture temperature

산업적인 효소의 생산은 새로운 다양한 효소들과 더욱 활성이 좋은 효소들의 발견에 의하여 급격히 증가하였다[5]. 최근에는 저온 활성 효소의 발견 및 새로운 효소 개발이 이루어지면서 극지방에서 유래한 효소의 연구가 활발히 진행되고 있다[1, 11, 16].

극지 환경과 같은 특수한 환경에서 성장하는 많은 미생물들은 다양한 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 극지미생물들은 낮은 온도에서도 생장이 가능하며, 저온에서 활성을 갖는 효소를 생산하기 때문에 활용공정의 생산비용에 절감을 가져옴에 따라 식품, 섬유산업 및 의약품 산업 등에 이용 가치가 클 것으로 예상된다. 또한, 저온 활성 효소는 저온 및 중온에서 높은 활성을 가지며 온도를 높이면 쉽게 반응을 중지시킬 수 있다. 이러한 속성은 여러 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있으며 획기적인 것이다[9].

Protease는 peptide bond의 가수분해에 촉매 작용을 하는 효소로써 미생물에서부터 동·식물에 이르기까지 모든 환경에 널리 분포되어 있는 효소이다. 3000종이 넘는 효소들 가운데 약 60%의 산업효소시장을 차지하고 있는 protease는 넓은 범위의 산업적 프로세스에의 응용에 중심적인 역할을 하고 있으며, 그 범위는 제빵공업, 화학공업, 제지공업, 주류의 혼탁방지, 세제산업, 소화제, 가축가공, 환경정화, 의약품 산업 등에 이르기까지 다양하다[5-7, 10]. 현재 미생물로부터 생산되어 산업적으로 이용되고 있는 protease는 alkaline, neutral protease가 대부분이며 작용 pH에 따라 분류한 것이다[4, 8]. 저온 활성 protease는 세제첨가물에 사용하여 세탁수의 온도를 감소시킴으로써 효과는 동일하지만 이전보다 에너지 소비에 따른 비용을 절감시킬 수 있으며, 유제품 가공 및 치즈 숙성과 같은 식품 산업에서 맛의 개선 및 비용의 절감을 가져올 수 있다[2, 9, 11, 17].

본 논문에서는 저온 활성 효소들 중에 현재 산업적으로 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 protease에 관하여 관심을 가지고 연구를 진행하였으며, 극지방에서 채취된 미생물들 가

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1846, Fax: +82-62-530-1949

E-mail: choiji01@chonnam.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

운데 protease 생산력이 우수한 미생물을 확인하고 여러 protease 이용산업에 활용 가능성을 알아보려 그들이 생산하는 protease의 기초적인 온도조건에 관한 실험에서 얻은 결과들을 보고하고자 작성되었다.

미생물 및 배양 배지

실험에서 사용된 PAMC 25641, 25614, 25719, 25617의 미생물들은 극지연구소(Korea Polar Research Institute, Incheon, South Korea)로부터 분양받았다. 이들 미생물은 PAMC 등록정보에 protease 활성을 갖는 것으로 확인이 되어있다. PAMC 25641, 25614는 Nutrient agar (Becton, Dickinson and Company, USA), Nutrient broth (Becton)을 사용하였고, PAMC 25719는 R2A 배지를 이용하였다. 또한, PAMC 25617은 YM 배지를 사용하였다.

미생물 동정

각각의 미생물들은 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')과 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3')를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다[13]. PCR 결과물은 QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)를 이용하여 정제한 후 (주)마크로젠(Seoul, South Korea)에 의뢰하여 16S rDNA 염기서열을 확인한 후 NCBI blast를 통하여 동정하였다.

배양 조건

각각의 미생물들은 전배양 한천 배지에 접종하여 15°C에서 7일간 배양하여 사용하였으며, 액체 배양은 50 ml씩 250 ml triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 각각 5, 10, 15, 20°C에서 150 rpm으로 교반하여 4일간 배양하였다.

성장률 측정

각각의 미생물들의 성장률은 UV/Vis spectrophotometer (Mecasys Co., Seoul, South Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액을 200 µl 취하여 멸균된 각각의 액체 배지 800 µl에 넣어 5배 희석하여 흡광도를 측정하였고, 멸균된 각각의 액체 배지를 blank로 사용하였다.

Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 배양액을 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 회수하여 50 mM sodium phosphate (Daejung Chemical & Metal Co., Sheung, South Korea) 200 µl에 배양 상등액 100 µl, 기질인 10 mM AAPF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 µl, 증류수

690 µl를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 60°C에서 20분간 불활성하여 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질대신 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용하였다.

Protease의 unit은 extinction coefficient = 8,800으로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{unit } (\mu\text{mole/min})/\text{L} = \frac{(\text{net OD}_{410}) \times (\text{반응액 부피, L}) \times 10^6}{\epsilon \times (\text{반응시간, min}) \times (\text{반응에 사용된 배양액, L})}$$

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였다.

미생물 동정 결과

Protease 생산 균주들의 16S rDNA 유전자 정보의 염기서열을 확인한 후, NCBI blast를 통하여 동정해본 결과 PAMC 25641은 *Janthinobacterium* sp. HC1-2 (GenBank: JF312914.1) 등과 97% 유사성을 보였다. PAMC 25614은 *Pseudomonas* sp. B-AS-24 (GenBank: JF901704.1) 등과 99%의 유사성 보였다. 또한, PAMC 25719는 *Janthinobacterium* sp. RHLS19 (GenBank: JX949460.1)와 PAMC 25617은 *Rahnella* sp. Pv5 (GenBank: JQ522978.1)와 각각 98%의 유사성을 보였다. 정확히 어떤 특정 종과의 연관성은 명확하지 않았다(Table 1).

성장률 확인

본 연구에서는 각 미생물들의 최적성장 온도를 확인하기 위하여 다양한 온도(5°C, 10°C, 15°C, 20°C)에서 4일간 생장을 비교하였다. 다른 균주들과 다르게 PAMC 25617은 다른 온도 조건에서는 평이한 성장을 보였으나, 20°C에서 급격한 성장률 증가 및 maximum growth도 크게 높아진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

위의 미생물들은 모두 5-20°C에서 성장이 가능하였으며, 대부분 20°C에서 가장 잘 성장하였다. 이러한 결과를 볼 때 본 연구에서 사용된 미생물들은 모두 내냉성(psychrotolerant)의

Table 1. Identification of strains obtained from PAMC 25641, 25614, 25719, 25617 by 16s rDNA sequencing.

PAMC number	Closest relative	Similarity (%)
25641	<i>Janthinobacterium</i> sp. HC1-2	97
25614	<i>Pseudomonas</i> sp. B-AS-24	99
25719	<i>Janthinobacterium</i> sp. RHLS19	98
25617	<i>Rahnella</i> sp. Pv5	98

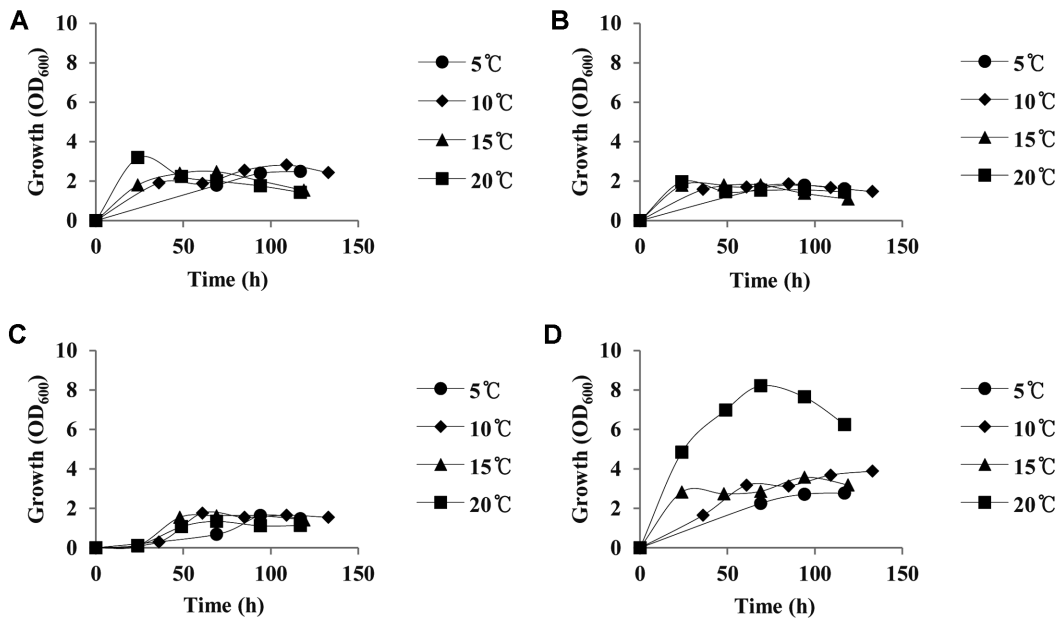


Fig. 1. Effect of temperature on growth of Antarctic microorganisms. (A) PAMC 25641, (B) PAMC 25614, (C) PAMC 25719, (D) PAMC 25617.

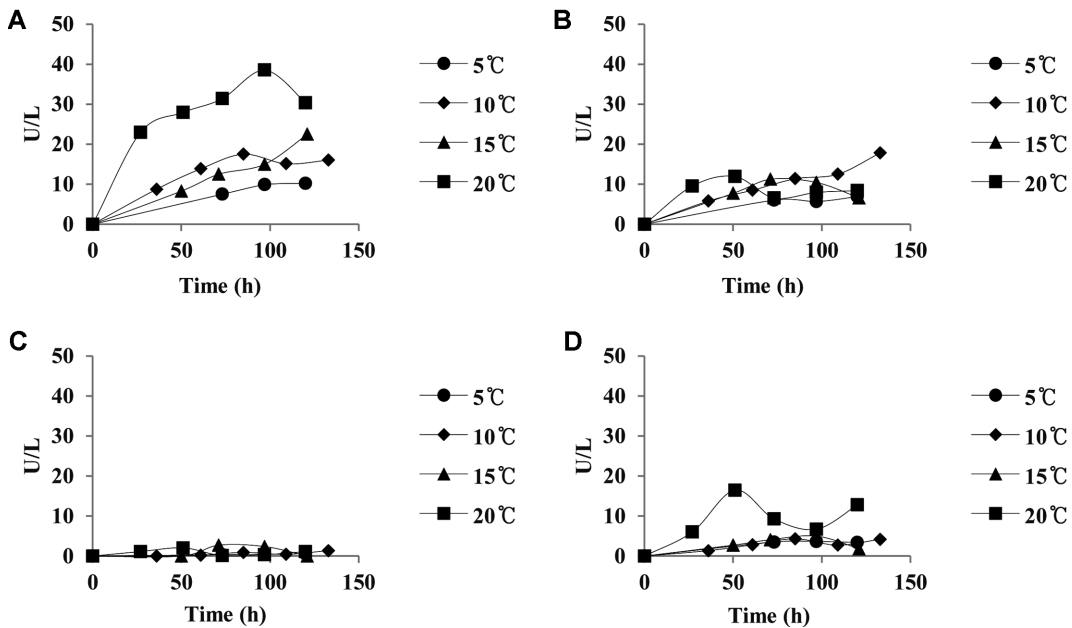


Fig. 2. Effect of temperature on protease activity of Antarctic microorganisms. (A) PAMC 25641, (B) PAMC 25614, (C) PAMC 25719, (D) PAMC 25617.

특성을 지니고 있는 것을 알 수 있다[3]. 이것은 대부분의 극지 미생물들이 지닌 특성으로 극지의 극한 환경, 특히 저온의 환경에서 적응, 진화해온 극지 미생물들의 고유한 특징이다 [1, 11, 16]. 이전에 발표된 논문들에서도 극지 미생물들에 대한 growth temperature에 대하여 연구가 많이 보고되었다.

*Janthinobacterium*은 30°C의 온도에서 maximum growth를 갖는 것이 확인되었으며, *Pseudomonas* 역시 30°C에서 가장 잘 성장하는 것으로 확인되었다. 또한, 두 미생물은 5°C에서도 성장이 가능한 저온적응성 미생물이라는 것 역시 보고되었다[14, 15]. 그 이외에도 여러 종의 극지미생물들이 연구

되고 있으며, 대부분의 극지미생물들은 5-30°C의 다양한 온도에서 성장이 가능한 것으로 확인되고 있다[12].

Protease 활성 확인

본 연구에서는 저온 활성 효소들 중에 현재 산업적으로 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 protease에 관하여 관심을 가지고 연구를 진행하였다.

본 연구에서의 각 미생물들의 protease activity maximum 값을 Unit으로 환산하면 25641, 25617은 38.523 U/L, 16.477 U/L의 값을 가졌으며, 25719는 2.727 U/L, 25614는 17.841 U/L의 maximum 값을 보였다(Fig. 2).

본 연구에 의해 극지방에서 채취된 4종의 protease 생산 균주들을 확인하였고, 그중 높은 활성을 가지며, 효소 활성이 안정적인 균주를 확인하였다. 이에 따라 효소 산업에서 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 protease 중 가장 큰 이슈가 되고 있는 저온 활성 protease를 산업적으로 다양한 분야에서 유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

요약

본 논문에서는 극지미생물의 저온 활성 protease 생산에 관한 연구를 수행하였다. 먼저 protease를 생산하는 극지미생물인 PAMC 25641, 25614, 25719, 25617을 16s rDNA 염기서열 분석을 이용하여 동정하였다. 그 후, 다양한 온도(5°C, 10°C, 15°C, 20°C)에서의 성장률 및 protease activity, specific activity를 확인하였다. 각 미생물의 온도별 성장률은 대체로 비슷한 경향을 보였으나 25617은 20°C에서 급격한 성장률 증가를 확인할 수 있었다. 또한, specific activity는 25641이 5, 15, 20°C에서 가장 높은 specific activity를 갖는 것을 확인하였다.

Acknowledgments

This research was supported by Golden Seed Project, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Service (KFS), by the research supporting program by Chonnam National University, 2013.

References

1. Antranikian G, Egorova K. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology, pp. 361-406. *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press. Washington, D.C.
2. Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. 2002. Low-temperature extremophiles and their application. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 253-261.
3. Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 331-343.
4. Chun DS, Kang DK, Kim HK. 2002. Isolation and enzyme production of a neutral protease-strain, *Bacillus* sp. DS-1. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 346-351.
5. Dastager SG, Dayanand A, Li WJ, Kim CJ, Lee JC, Park DJ. *et al.* 2008. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Curr. Microbiol.* **57**: 638-642.
6. Decedue CJ, Broussard EA, Larson AD, Braymer HD. 1979. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **569**: 293-301.
7. Fox PE. 1982. Proteolysis in milk and dairy products. *Biochemical Society Transactions* **10**: 282.
8. Fujii M, Takagi M, Imanaka T, Aiba S. 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **154**: 831-837.
9. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T. *et al.* 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends. Biotechnol.* **18**: 103-107.
10. Gusek TW, Grimmont F. 1978. Properties and potential applications of a unique heat-stable protease. *Food Tech.* **42**: 102.
11. Huston AL. 2008. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes, pp. 347-363. *In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer. Berlin. Heidelberg.
12. Kim DK, Park HJ, Lee YM, Hong SG, Lee HK, Yim JH. 2010. Screening for cold-active protease-producing bacteria from the culture collection of polar microorganisms and characterization of proteolytic activities. *Korean J. Microbiol.* **46**: 73-79.
13. Lane DJ. 1991. 16S-23S rRNA sequencing, pp. 115-175. *In Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
14. Lee HJ, Rho JK, Yoon SC. 2004. Growth temperature-dependent conversion of de novo-synthesized unsaturated fatty acids into polyhydroxyalkanoic acid and membrane cyclopropane fatty acids in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BM07. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1217-1226.
15. Lee YM, Kim SY, Jung J, Kim EH, Cho KH, Schinner F. *et al.* 2011. Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite. *J. Microbiol.* **49**: 355-362.
16. Nichols D, Bowman J, Sanderson K, Nichols CM, Lewis T, McMeekin T. *et al.* 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 240-246.
17. Peng Y, Yang X, Zhang Y. 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 126-132.