

단백질 분해효소를 분비하는 *Micrococcus* sp. HJ19의 분리 및 특성

차인태 · 오용식 · 노동현*
충북대학교 자연과학대학 미생물학과

단백질 분해효소는 아미노산 간에 존재하는 peptide 결합을 절단하는 효소로 산업적으로 많이 사용된다. 이러한 단백질 분해효소의 새로운 공급원을 찾기 위하여 채외 단백질 분해효소를 생산하는 세균을 동해 심층수로부터 집식배양으로 분리하였다. 이들 중 빠른 성장과 skim milk를 첨가한 배지에서 가장 큰 투명환을 보여준 균주를 HJ19로 명명하였다. 분리균의 형태학적, 생리생화학적 특성과 16S rRNA gene의 염기서열을 조사한 결과 *Micrococcus* sp.에 속하는 것으로 나타났다. 분리된 *Micrococcus* sp. HJ19는 10°C에서는 자라지 못하였으며 20°C부터 생육과 효소활성을 보여주었다. 최적 생육 온도는 37°C였으며, 효소 활성은 30°C에서 약 480 unit/ml의 활성을 보여 주었다.

Key words □ extracellular protease, growth characterization, *Micrococcus* sp., 16S rRNA gene

해양심층수는 전체 해수량의 95%를 차지하고 태양광선이 도달하지 않는 수심 200 m 이상의 깊은 바닷물을 말한다. 이러한 해양심층수는 표층수에 비해 영양염(N, P, Si)의 농도가 높으며 영양염 사이의 농도비가 일정하게 유지되어 생물이 이용할 수 있는 영양적 균형을 이루고 있다(1). 이러한 심층수에 존재하는 미생물의 수는 표층수보다는 10배 적은 ml 당 10⁴이상으로 존재하고 있다(13, 27). 심층수의 세균군집 특성은 소수의 종이 우점을 하고 있지만 적은 수의 집단에 의해 계통학적 다양성을 형성하고, 이런 소수 집단들은 유용한 생물학적, 유전학적 자원이 될 수 있다(27).

단백질 분해효소는 다른 단백질의 아미노산간 peptide 결합을 가수분해하는 효소이며 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60%를 차지하고 있다(22). 단백질 구조와 기능 예측 등의 기초연구 분야 뿐만 아니라 조미료 제조, 식육의 연화, 주류의 혼탁방지, 치즈숙성, 제빵 등의 식품산업, 소화제 등의 제약산업, 세제, 피혁, 환경에 관련된 각종 산업분야에서 그 요구도가 증가하고 있는 실정이다(5, 22). 현재 산업적으로 사용되는 대부분의 단백질 분해효소는 생물 공학적 응용에 필요한 모든 특성을 만족시켜 주는 미생물 유래의 효소가 많이 사용되며(10) 대부분의 상업적 단백질 분해효소는 *Bacillus* sp.의 세균으로부터 생산되는 중성 또는 알칼리성 효소들이다. 미생물 유래의 알칼리성 효소들은 세제산업에 이용되어 최적온도가 60°C로 높은 반면, 중성효소들은 낮은 열안정성과 반응속도가 빠르지 않아 단백질의 가수분해정도를 조절할 수 있고, 가수분해시 쓴맛을 적게 내어 식품공업에서 많이 이용되고 있다(22). *Bacillus* sp. 외에도 *Vibrio* (6, 14),

Serratia (17), *Pseudomonas* (9), *Pseudoaltermonas* (3, 18), *Streptomyces* (11), *Brevibacterium* (23), *Kocuria* sp. (12)의 균주들과 치즈류에서도 채외 단백질 분해효소를 분비하는 *Micrococcus* sp. (8, 21)의 균주가 분리보고 되었다.

본 연구는 새로운 자원으로 관심을 가지는 동해 심층수로부터 생육조건이 까다롭지 않으면서 세포외부 단백질 분해효소를 분비하는 세균을 분리하여 이중 가장 높은 효소활성을 보인 균주의 동정과 단백질 분해효소의 생산 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

채외 단백질 분해효소를 생산하는 균주 분리 및 보관

균주 분리를 위한 시료는 2005년 7월~2006년 3월에 수심 200~500 m에 해당하는 동해 심층수로 강원도 고성군에 소재한 한국 해양심층수연구센터로부터 제공받아 사용하였다. 무균적으로 채취된 심층수 0.1 ml을 0.5× marine broth (Difco, USA)에 0.01% skim milk (Difco, USA)를 첨가한 MBS 배지에 1.5% agar를 첨가하여 만든 평판배지에 도말 한 후 25°C에서 30시간 이상 배양하여 콜로니 주변에 투명환(clear zone)을 형성하는 독립 콜로니를 3회 이상 희석법으로 계대하여 순수분리 하였다. 순수분리균의 보관은 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 -80°C에서 동결 보관하였다.

배양 온도와 시간에 따른 균체 생육과 효소활성 측정

배양온도에 따른 생육을 보기위해 25°C에서 48시간 동안 종배양한 균을 1%가 되도록 MBS 배지에 접종하여 10°C와 20°C에서는 6시간 간격, 30°C와 37°C에서는 2시간 간격으로 spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, England)를 이용하여 흡광도를 600 nm 에서 측정하였다. 세대시간은 대수기인 흡광도 600

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-3368, Fax: 82-43-264-9600
E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr

nm 값이 0.1 이상에서 1.0 이하를 나타내는 구간의 값을 최소 5 개 이상 선택하여 보정된 일차함수의 기울기를 구한 다음, 0.301/기울기로 표시하였다(19).

체의 단백질 분해효소 활성측정은 0.5%(w/v) azocasein (Sigma, USA)을 효소기질로 사용하여 균체배양 상등액을 사용하여 측정하였다(3). 효소활성의 단위는 30°C에서 1시간 지난 후 흡광도 440 nm의 0.01 증가를 1 unit/ml으로 정하였으며(25) 효소의 활성은 3회 측정의 평균값과 표준편차로 표시하였다.

균주의 형태 및 생화학특성

선별된 균주를 MBS 배지에 배양하여 위상차 현미경(Eclipse 80i, Nikon, Japan)을 이용하여 형태와 크기를 관찰하였다. 그람 염색은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 실험하였으며 이외에도 Buck가 기술한 비염색 방법을 사용하였다(4). Oxidase 및 여러 가지 균주의 생리생화학특성은 bioMerieux 사의 kit (bioMerieux, France)를 사용하여 제조사의 지시대로 사용하여 판단하였으며, catalase 활성은 3% H₂O₂를 사용하였다. 다른 생체고분자 chitin, starch, xylan의 분해 특성은 skim milk 대신에 이들 기질을 고체평판배지에 1%로 넣어 조사하였다.

16S rRNA gene의 염기서열 결정과 계통분석

분리균의 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 27F와 1492R primer을 이용하여 콜로니 PCR로 증폭하였다(20). PCR 반응은 MJ Mini™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하였고, 반응 조건은 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초로 35회 반복 후 72°C에서 10분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 산물은 PCR purification kit (Real Biotech Corp., Taiwan)을 사용하여 정제한 후 Solgent 사(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

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 rRNA gene 염기서열 정보와 MEGA 프로그램을 이용하여 neighbor-joining method (24)에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogentic tree를 얻었다. Branch의 신뢰도(bootstrap 값)는 500회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다(7).

결과 및 고찰

균주의 분리

동해의 심층수로부터 체외 단백질 분해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 skim milk를 첨가한 한천평판배지에 심층수를 도말하여 배양하였다. 배양에 따라 투명환을 형성하는 콜로니들을 선별하였고, 이 중 체외 단백질 분해효소 활성이 가장 높은 균주를 순수분리하여 HJ19라고 명명하였다.

분리균주의 형태 및 생리생화학특성

분리된 HJ19는 그람 염색 및 비염색 방법 모두에서 그람 양성균의 특성을 나타냈으며(결과 미제시) 한 세포의 직경이 약 1 µm 정도로 구성된 사련구균(tetrad) 형태가 다수를 차지하였으며 운동성은 없었다. MBS 평판배지 상에서 노란색의 콜로니를 형성하고 30°C에서 3일간 배양시 직경이 약 3 mm에 달하였다. Catalase와 oxidase, urease 활성은 보유하고 있으나 arginine dihydrolase 활성은 없었으며 포도당을 혐기적으로 발효하지 못하였다. 이러한 특성들은 *Micrococccaceae*과에 속하는 *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* sp.의 균주들과 구분되는 *Micrococcus* sp.의 특성과 일치하였다(15). 이 외의 *Micrococcus* sp.에 속한 몇 종과 비교한 특성은 Table 1과 같았다. Skim milk와 gelatine을 가수분해 하는 반면 생체 고분자인 chitin과 starch는 가수분해를 하지 못하였다.

16S rRNA gene의 염기서열 분석 및 계통적 유연관계

분리된 균주 HJ19의 유전학적 특성에 따른 동정과 계통적 유연관계를 알아보기 위하여 PCR로 증폭 생산된 1,507 bp의 16S rRNA gene으로부터 954 bp의 부분 염기서열을 결정하여 분석을 시도하였다(28). 먼저 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Blastn 검색을 통해 16S rRNA gene의 유사도를 조사한 결과 분리균 HJ19는 *Micrococcus luteus*와 99%의 상동성을 보여주었다. 이러한 결과는 Table 1에서의 생리·생화학특성과 일치하는 결과를 보여주고 있다(15). 상기의 형태 및 생리생화학적 결과와 16S rRNA gene의 염기서열 비교의 결과로 미루어 HJ19는 *Micrococcus* sp.의 한 종에 속하며, 결정된 염기서열과 *Micrococcus* sp.의 type strain들과의 유연관계를 조

Table 1. Characteristics of the strain HJ19 with the species of the genus *Micrococcus*

Characteristics	HJ19	<i>M. luteus</i> ^a	<i>M. lylae</i> ^a	<i>Kocuria roseus</i> ^a
Major pigment	Y	Y	CW	PR, OR
Aerobic acid from				
Glucose	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	-	-	-	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	-
Urease	+	D	-	-
Growth on nutrient agar with 10% NaCl	+	D	D	-
Esculin hydrolysis	-	-	-	-

^aData from (16, 26)

Symbols: D, different reactions in different taxa (species of a genus or genera of a family); Y, yellow; CW, cream-white; PR, pastel red; OR, orange red; +, positive reaction; -, negative reaction

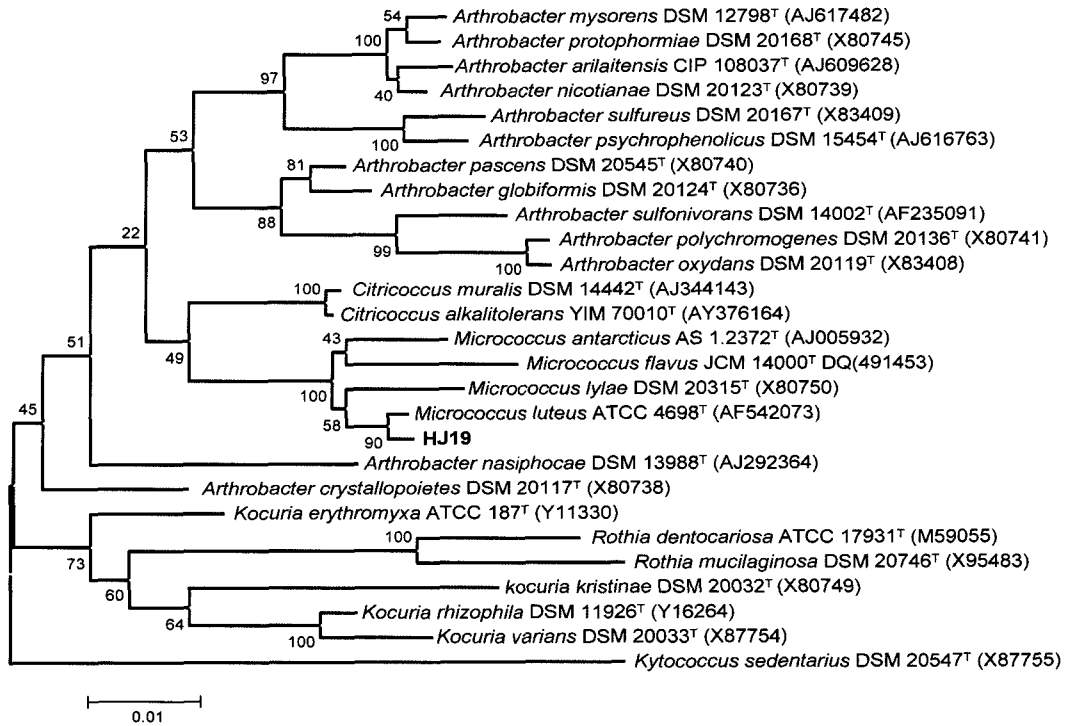


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain HJ19. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter calculation model (24). The numbers represent the confidence levels from 500 replication bootstrap sampling. Genbank accession number is shown in parentheses.

사한 결과 *Micrococcus* sp. HJ19는 *Micrococcus luteus*와 가장 가까운 관계를 보여주었다(Fig. 1).

온도에 따른 균주배양 특성과 체외 단백질 분해효소 합성

고체배지상에서 두 가지의 다른 배양온도를 사용하여 HJ19의 체외 단백질 분해효소 생산에 대한 영향을 본 결과 Fig. 2와 같다. 체외 단백질 분해효소를 생산하지 않는 대조구에 비해 HJ19는 30°C에서 16시간 배양으로 투명환을 만들기 시작한 반면 20°C에서 배양했을 경우 40시간 배양 후부터 투명환을 생성하기 시작하였다. 투명환을 보인 이후 100시간까지 관찰한 결과 두 배양온도 모두에서 적하한 균의 집락 크기 증가는 없는 반면 투명환의 크기는 점점 증가하였다(결과 미제시). 37°C에서 균의 생육환 증가가 관찰된 *Bacillus* sp.와는 다른 양상을 보여주었다(2).

기존에 분리된 다른 균주와의 생육양상과 효소활성을 비교하기 위해 액체배지상에서 생육특성과 효소활성을 측정하였다(Fig. 3). 분리된 *Micrococcus* sp. HJ19는 10°C에서는 거의 생육하지 못해 대장균과 같은 중온균의 특성을 보여주었다(20). 이러한 특성은 기존에 분리된 저온내성을 가진 *Pseudoalteromonas* sp. HJ47과는 다른 양상을 보여주었다(3). 배양온도를 20°C로 올렸을 때 세대시간은 300여분을 보여주다가 30°C로 상승시키면 101분, 37°C에서는 84분을 보여주어 37°C까지는 온도상승과 생육이 비례함을 알 수 있었다. 생육 배양온도별 분리된 단백질 분해효소의 활성을 측정한 결과 HJ19는 20°C에서는 24시간 후부터 체외

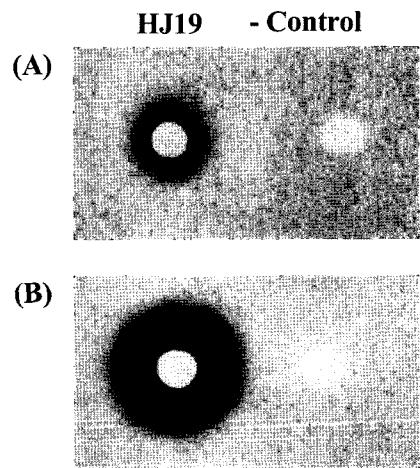


Fig. 2. The protease activities of HJ19 at two cultural temperature. The isolate HJ19 and a negative control strain were cultured at 20°C (A) and 30°C (B) for 49 hr on the plate of 0.5x marine broth supplemented with 1% skim milk and 1.5% agar.

단백질 분해효소의 활성을 나타내었고 30°C와 37°C에서는 배양 6시간에서 급격한 효소활성을 나타내면서 10시간 배양시에 약 480 unit/ml의 최고 활성을 보여주었다(3). 저온내성균인 *Pseudoalteromonas* sp.은 30°C와 37°C에서 생육은 왕성하였지만 체외 단백질 분해효소의 활성은 아주 낮았다. 이와같이 체외 단

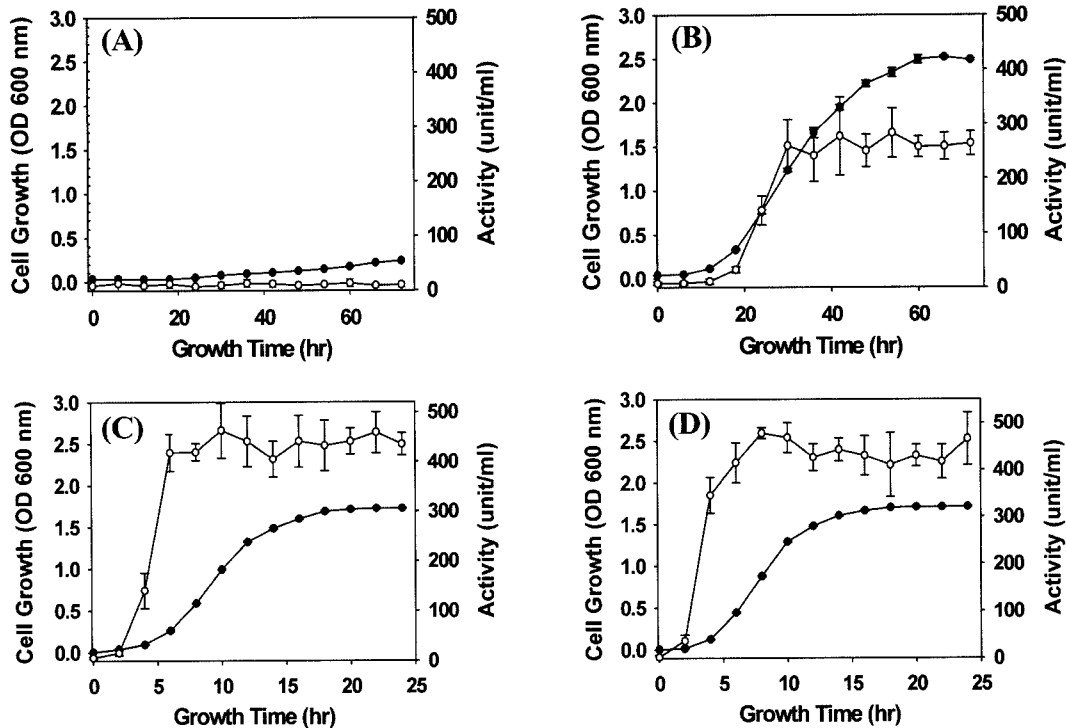


Fig. 3. Growth and extracellular protease activity of *Micrococcus* sp. HJ19. The cells were cultured at 10°C (A), 20°C (B), 30°C (C), and 37°C (D) by shaking at 150 rpm in the medium of 0.5× marine broth supplemented with 0.01% skim milk. The enzyme activity was determined at 30°C for 1 hr. Open circle (○ - ○) and closed circle (● - ●) represent protease activity and cell growth of HJ19, respectively. Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

백질 분해효소를 생산하는 미생물의 경우 효소의 생산과 미생물 배양온도와 비례하지 않는 것으로 보고되어 있는 반면(3, 25) 분리된 *Micrococcus* sp. HJ19는 성장과 비례적으로 단백질분해효소를 분비하는 특성을 보여주었다. 그리고 30°C와 37°C에서 체외 단백질 분해효소의 합성은 대수성장기 초기에 급격히 시작되어 대수성장기 동안 최대활성을 보여 대수성장기와 대수성장 말기에 단백질 분해활성을 보여 준 미생물들과 다른 특성을 보여주었다(3, 25). 이러한 배양초기의 높은 효소생산은 산업적 효소생산 면에서 중요한 요소가 될 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 본 균주의 분리된 단백질 분해효소의 특성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 균주를 분리한 임형준 군과 분자미생물공학실원에게 감사드립니다.

참고문헌

- 문덕수, 정동호, 김현주, 신필권. 2004. 해양심층수와 지하염수 자원의 특성. 한국해양환경공학회지 7, 42-46.
- 옥민, 김민석, 서원석, 차재영, 조영수. 2000. 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. WRD-1이 생산하는 extracellular protease의 특성. 한국산업미생물학회지 28, 329-333.
- 차인태, 임형준, 노동현. 2007. 동해 심층수로부터 *Pseudoaltermonas* sp. HJ47의 분리 및 체외 단백질분해효소 특성. 한국생명과학회지 17, 272-278.
- Buck, J.D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 992-993.
- Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins, pp. 353-374. In T. Godfrey and S. West (ed.), *Industrial enzymology-The application of enzymes in industry*. The Nature Press, New York, USA.
- Denkin, S.M. and D.R. Nelson. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3555-3560.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fernandez, J.A., F. Mohedano, M.J. Polanco, M. Medina, and M. Nunez. 1996. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J. Appl. Microbiol.* 81, 27-34.
- Fukushima, J., S. Yamamoto, K. Morihara, Y. Atsumi, H. Takeuchi, S. Kawamoto, and K. Okuda. 1989. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.* 171, 1698-1704.
- Godfrey, T. and S. West. 1996. *Industrial enzymology*, 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York, USA.
- Henderson, G., P. Krygsmann, C.J. Liu, C.C. Davey, and L.T.

- Malek. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 169, 3778-3784.
12. Hinrichsen, L.L., M.C. Montel, and R. Talon. 1994. Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp. (168) isolated from danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.* 22, 115-126.
13. Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
14. Kothary, M.H. and A.S. Kreger. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 50, 534-540.
15. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
16. Kloos, W.E., T.G. Tornabene, and K.H. Schleifer. 1974. Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species.; *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 24, 79-101.
17. Kwon, Y.-T., H.-H. Lee, and H.-M. Rho. 1993. Cloning, expression and sequencing of the minor protease encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC 21074. *Gene* 125, 75-80.
18. Lee, S.O., J. Kato, K. Nakashima, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1366-1369.
19. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. 2003. *Brock biology of microorganisms*, 10th ed., p. 142-145. Prentice Hall. Pearson Education, Inc., New Jersey, USA.
20. Park, J.W., Y.S. Oh, J.Y. Lim, and D.H. Roh. 2006. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing β -galactosidase. *J. Microbiol.* 44, 396-402.
21. Prasad, R., R.K. Malik, and D.K. Mathur. 1986. Purification and characterization of an extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* sp. MCC-315 isolated from cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 69, 633-642.
22. 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.
23. Rattray, F.P., W. Bockelmann, and P.F. Fox. 1995. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3454-3456.
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. Secades, P. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3969-3975.
26. Schleifer, K.H., W.E. Kloos, and M. Kocur. 1981. The genus *Micrococcus*, pp. 1539-1547. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, Springer-Verlag, New York, USA.
27. Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, D.M. Welch, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta, and G.J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 12115-12120.
28. Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.

(Received August 16, 2007/Accepted September 6, 2007)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of *Micrococcus* sp. HJ-19 Secreting Extracellular Protease In-Tae Cha, Yong-Sik Oh, and Dong-Hyun Roh* (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Proteases are degradative enzymes which hydrolyze a peptide bond between amino acids and they are abundantly applied to commercial field. In order to screen new source of protease, bacteria secreting extracellular protease were isolated by enrichment culture from deep sea water samples of East Sea, Korea. A bacterium, named as HJ19, showed the best growth and the largest clear zone in plates supplemented skim milk at 30°C. The partial DNA sequence analysis of the 16S rRNA gene, phenotypic tests and morphology identified that this strain was in genus *Micrococcus*. The strain HJ19 could not grow at 10°C but it started growth and showed protease activity at 20°C. The optimal growth was at 37°C and the maximal protease activity at 30°C was about 480 unit/ml.