

# 남북극 유래 저온성 박테리아 Culture Collection에서 저온활성 프로테아제 생산균주의 스크리닝과 효소 특성

김덕규<sup>†</sup> · 박하주<sup>†</sup> · 이영미 · 홍순규 · 이홍금 · 임정한\*

한국해양연구원 부설 극지연구소 극지바이오센터

## Screening for Cold-Active Protease-Producing Bacteria from the Culture Collection of Polar Microorganisms and Characterization of Proteolytic Activities

Dockyu Kim<sup>†</sup>, Ha Ju Park<sup>†</sup>, Yung Mi Lee, Soon Gyu Hong, Hong Kum Lee, and  
Joung Han Yim\*

Polar BioCenter, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Republic of Korea

(Received February 25, 2010/Accepted March 9, 2010)

The Korea Polar Research Institute (KOPRI) has assembled a culture collection of cold-adapted bacterial strains from both the Arctic and Antarctic. To identify excellent protease-producers among the proteolytic bacterial collection (874 strains), 78 strains were selected in advance according to their relative activities and were subsequently re-examined for their extracellular protease activity on 0.1× ZoBell plates supplemented with 1% skim milk at various temperatures. This rapid and direct screening method permitted the selection of a small group of 15 cold-adapted bacterial strains, belonging to either the genus *Pseudoalteromonas* (13 strains) or *Flavobacterium* (2 strains), that showed proteolytic activities at temperatures ranging between 5-15°C. The cold-active proteases from these strains were classified into four categories (serine protease, aspartic protease, cysteine protease, and metalloprotease) according to the extent of enzymatic inhibition by a class-specific protease inhibitor. Since highly active and/or cold-adapted proteases have the potential for industrial or commercial enzyme development, the protease-producing bacteria selected in this work will be studied as a valuable natural source of new proteases. Our results also highlight the relevance of the Antarctic for the isolation of protease-producing bacteria active at low temperatures.

**Keywords:** Antarctic, Arctic, cold-active, culture collection, protease

최근에 새로운 박테리아의 분리, 저온활성 효소 생산, 그리고 새로운 산업용 효소 개발 분야에 있어서 남극과 북극 지역에 대한 연구가 증가하고 있다(2, 8, 13). 극한 환경에 서식하는 박테리아로부터 확보한 효소(extremozymes)는 산업 생물공학(industrial biotechnology) 분야에서 유용한 생물촉매제로 개발되어 왔으며, 저온 서식지로부터 분리된 저온적응성 미생물은 잠재적으로 높은 산업적 유용성을 지닌 저온활성 효소의 천연 생물자원이다.

프로테아제는 총 산업 효소 시장의 약 60%를 차지하고 있는데(6), 세계 산업, 식품 산업, 정육 및 가축 산업, 그리고 인

간과 동물의 소화 보조제 등의 다양한 영역에 사용되는 효소이다(15). 예를 들어, 저온활성 프로테아제는 세탁온도를 낮춤으로써 에너지 소비를 감소시키기 위하여 세제첨가물로 사용되고 있으며, 식품 산업에서는 치즈 성숙, 유제품 생산, 냉장육류의 맛 개선에 사용된다(4, 7, 8).

2003년 이래로, 극지연구소(KOPRI) 극지바이오센터는 산업적으로 유용한 효소를 발굴하고 개발하기 위해 저온적응성 박테리아를 수집해 왔다. 이에 따라, 다양한 속(genus)과 종(species)으로 구성되는 6,300개 이상의 균주를 수집 및 보존하고 있다. 이 균주들은 북극(Svalbard 군도 내 Ny-Ålesund 지역, Siberia 북쪽에 위치한 북극해인 Kara Sea, 그리고 Norway와 Russia 북쪽의 북극해인 Barents Sea)과 남극(King George 섬 내에 위치한 Barton 반도와 Weaver 반도) 지역의 육지(토

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

\* For correspondence. E-mail: jhyim@kopri.re.kr; Tel: +82-32-260-6300; Fax: +82-32-260-6301

양, 담수, 빙하, 눈, 식물체 부스러기 등)와 바다(해수와 퇴적물) 샘플로부터 분리되었으며, 프로테아제, 키티나아제(chitinase), 그리고 리파아제(lipase)를 생산하는 능력을 가지는 균주가 다수 포함되어 있다. 각 균주에는 고유 번호(예, KOPRI 21717)를 부여하고, 10-20% 글리세롤에 현탁하여 -80°C에 보존하고 있다. KOPRI 보존 균주들 중에서 약 13.7%(874개 균주)는 1% skim milk가 포함된 고체배지에서 성장할 때, skim milk의 가수분해로 생기는 투명환을 형성하므로 프로테아제 생산 균주로 분류되었다. 본 논문에서는 적합한 고체배지에서 균주를 배양하면서 투명환 형성을 유도하는 간단하고 빠른 방법을 적용하여 저온활성 프로테아제 생산균주를 선발한 후, 이들이 생산하는 세포외분비 프로테아제의 최적 온도를 조사하였고, 반응특이적 화합물에 의한 효소활성 억제 정도에 따라 5개의 그룹으로 분류하였다.

## 재료 및 방법

### 박테리아 culture collection로부터 프로테아제 생산균주 선발

극지연구소에서 보존 중인 약 6,300개의 저온적응성 박테리아 균주들 중에서 프로테아제를 생산할 수 있는 874개의 균주들은 분리 초기에 개별 연구자에 의해 1% skim milk가 포함된 적당한 고체배지에서 투명환을 나타내는 활성 정도(0-4점)에 따라 이미 등급 별로 분류되어 기록되었다. 콜로니 직경보다 투명환 직경이 더 큰 경우 4점, 투명환 직경이 콜로니 반경보다 크지만 직경보다 작을 경우 3점, 뚜렷한 투명환이 관찰되나 콜로니 반경보다 투명환 직경이 작을 경우 2점, 뚜렷한 투명환이 아닐 경우 1점, 그리고 투명환을 형성하지 못할 경우에는 0점으로 기록되었다. 강한 (저온)활성의 프로테아제 생산균주를 선발하기 위해, 874균주들 중에서 상대적 활성이 높은 78개의 균주를 1차 선발하였다. 글리세롤 세포현탁액으로 보관 중이던 균주들은 1% skim milk가 포함된 0.1× ZoBell (0.5 g peptone, 0.1 g yeast extract, 0.01 g FePO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 15 g agar, 750 ml seawater, 250 ml distilled water per L) 배지(SZB)에 접종하고 20°C에서 48시간 동안 배양하였다. 세포 균체는 0.1× ZoBell 액체배지에 현탁한 후, 96-well microplate에 분주하였다. 프로테아제 생산과 활성에 대한 온도의 영향을 평가하기 위하여, 세포 현탁액을 96-well microplate로부터 96-pin replicator (VP-408B, V&P Scientific, USA)를 이용하여 SZB 고체배지에 접종한 후, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30°C에서 48시간 배양하였다. 각 온도에서의 프로테아제 활성은 콜로니 직경과 투명환의 직경의 차이 정도(0-4 점)에 따라 다음과 같이 기록 및 분류하였다. 투명환 직경이 콜로니 직경에 비해 10 mm 이상 클 경우 4점, 7-9 mm 클 경우 3점, 4-6 mm 클 경우 2점, 1-3 mm 클 경우 1점, 그리고 1 mm 이하로 크거나 투명환을 확인 할 수 없을 경우 0점으로 기록하였다.

### 박테리아 균주 동정

각 박테리아 균주를 대상으로 박테리아 universal primer인

27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 단일 콜로니로부터 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다(12). PCR 산물은 LaboPass™ PCR Purification kit (COSMO, Korea)를 이용하여 정제한 후, 시퀀싱하였다. 각 균주의 분류 및 동정을 위해, 확보한 16S rRNA 유전자의 full-length 염기서열과 EzTaxon database (5)에 등록되어 있는 박테리아 16S rRNA 염기서열과의 유사성을 비교하였고, Kimura's 2-parameter evolutionary model (11)에 의해 계산된 distance matrix를 기초로 한 neighbor-joining analysis (16) 방법을 이용하여 유연관계가 높은 균주들 사이의 계통발생적 연관성을 분석하였다.

### 효소 활성 측정

박테리아 균주를 50 ml SZB 액체배지에 접종하고 15°C에서 8일 동안 배양한 후, 배양액을 원심분리하였다(10,000×g, 30분, 4°C). 배양 상층액에 solid ammonium sulfate를 70% 포화되도록 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 12시간 교반한 후, 원심분리(10,000×g, 30분, 4°C)하여 침전물을 회수하고, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.6, standard buffer)에 현탁하였다. 효소 현탁액(0.2 ml)에 0.65% azocasein이 포함된 standard buffer (0.9 ml)를 혼합한 후, 25°C에서 1시간 반응 시켰다. 0.9 ml의 110 mM trichloroacetic acid를 첨가하여 효소와 기질반응을 종결시켰고, 원심분리(12,000×g, 1분)하여 반응종결 혼합액으로부터 침전물을 제거하였다. 반응 대조군을 준비하기 위해, azocasein이 포함된 standard buffer에 trichloroacetic acid를 첨가한 후, 효소현탁액을 첨가하였다. 반응종결 상층액(0.5 ml)에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma, 0.25 ml)과 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.25 ml)를 혼합하고 25°C에서 30분 반응 시키면서 발색 변화를 660 nm 흡광도에서 측정하였다. 효소와 기질 반응의 결과 azocasein으로부터 분해되어 유리되는 아미노산의 양은 L-tyrosine의 표준곡선과 비교함으로써 산출하였다. 프로테아제 활성 1 unit은 1 mg 효소단백질이 25°C에서 1분간 반응할 경우, 1 nmole의 아미노산을 생산할 수 있는 활성으로 정의하였다.

### 프로테아제 효소의 분류

본 실험에 사용된 균주들이 생산하는 저온활성 프로테아제는 효소 활성을 특이적으로 억제하는 화합물과 반응 후에, 프로테아제 활성의 억제 정도에 따라 아래에 기술한 대로 분류하였다. 다양한 프로테아제 활성 억제제[1 mM phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM HgCl<sub>2</sub>, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 또는 0.3 mM pepstatin A]가 포함된 standard buffer (810 μl)에 효소현탁액(200 μl)을 혼합한 후, 0°C에서 1시간 반응시켰다. 추가적으로, 금속 이온(1 mM ZnSO<sub>4</sub>)에 의한 프로테아제 활성 영향을 함께 조사하였다. 1시간 반응 후, 6.5% azocasein 용액(90 μl)을 첨가하고 25°C에서 1시간 동안 효소-기질 반응을 수행하였다. 잔존 프로테아제 활성은 억제제를 첨가하지 않은 효소의 활성(100%)과 비교하여 산출하였으며, 위에 언급한 방법에 따라 효소 활성을 측정

하였다.

## 결과 및 고찰

### 프로테아제 생산균주 선발

극지연구소 극지바이오센터에서는 2003년부터 남극과 북극의 다양한 저온 지역에서 확보한 환경시료와 1% skim milk가 포함된 적당한 고체배지를 이용하여 프로테아제를 생산하는 박테리아 균주들을 스크리닝 및 분리하였고, 지금까지 총 874개의 저온적응성 프로테아제 생산 균주를 KOPRI culture collection에 보관 중이다. 다양한 배양온도에서 고체 배지에 형성하는 투명환의 크기에 따라 효소 활성을 0-4점으로 기록하였는데, 10°C에서 3점 이상의 활성을 나타내는 78개의 균주들을 저온활성의 산업공정용 효소 개발을 위해 1차 선발하였고, 이들 선발된 균주들을 SZB 고체 배지를 이용하여 동일한 조건에서 다양한 온도(5-30°C)에 따른 활성을 재평가하였다(Fig. 1). 대부분의 균주들은 20°C 이상의 배양온도에서 가장 잘 성장함과 동시에 프로테아제를 생산하지만(자료 미제시), 5-30°C 범위에서 성장이 가능하므로 내냉성(psychrotolerant)의 특성을 나타내고 있다(3). 저온(5-15°C)에서 넓은 투명환을 형성하는 균주들을 저온적응성 균주로 판단하고, 이들이 생산하는 프로테아제를 저온활성 효소로 판단하여, 최종적으로 15개의 균주들을 저온활성 프로테아제를 생산하는 저온적응성 균주로 선정하였다(Fig. 1 and Table 1). 특히, SZB 고체 배지에서 배양한 대부분의 균주들이 생산하는 세포외분비 프로테아제는 5-10°C보다는 15-30°C에서 뚜렷한 투명환을 형성하였으나, 두 균주(KOPRI 26332와 26336)는 20°C 부근에서 가장 뚜렷한 투명환을 형성하며 30°C에서는 투명환을 형성하지 않았다.

### 박테리아 균주의 동정

북극 샘플에서 분리된 KOPRI 25467을 제외한 14개의 박테리아 균주들은 모두 남극의 토양 혹은 해양의 다양한 환경시료에서 분리되었다. 각 균주에서 확보한 16S rRNA 유전자 정보를 염기서열의 유사성과 계통 발생적 연관성에 대해 평가했을 때, 15개의 균주는 *Pseudoalteromonas* (13 균주) 속 또는 *Flavobacterium* (2 균주) 속으로 분류되었다(Fig. 2 and Table 2). *Pseudoalteromonas* 속에 포함되는 균주들은 *P. arctica*, *P. nigrifaciens*, *P. haloplanktis*, *P. antarctica* 혹은 *P. translucida*와 99.4% 이상의 높은 염기서열 유사도를 보여주었다. KOPRI 21138은 *Alteromonas fuliginea*와 밀접하게 연관되는 것으로 분석되었으나, 이전에 발표된 논문(9)에서 *A. fuliginea*는 *Pseudoalteromonas* 속에 포함되는 균주로 재분류되었음을 고려해 볼 때, KOPRI 21138은 *Pseudoalteromonas* sp.로 분류할 수 있다. KOPRI 21146과 26323은 각각 *P. arctica* A 37-1-2<sup>T</sup> (99.6%)과 *P. elyakovii* KMM 162<sup>T</sup> (99.9%)와 가장 높은 유사성을 보였는데, 염기서열의 계통 분석(phylogenetic analysis) 결과, 참고 염기서열(reference sequences) 중 특정 종과의 연관성은 명확하지 않았다. KOPRI 26332와 26336은 *Flavobacterium* 속에 속하며, *F. frigidarium* ATCC 700810<sup>T</sup>와 99.4%

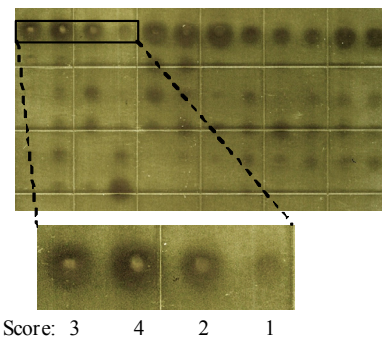
**Table 1.** Protease production by cold-adapted bacteria in the KOPRI culture collection and its relative activity at various temperatures

KOPRI number	Isolation site	Score of protease activity at					
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
21125	Barton Peninsula, Antarctic	1	2	4	4	4	4
21129	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21130	Barton Peninsula, Antarctic	1	2	4	4	4	4
21138	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21141	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21145	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21146	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21153	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21154	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
21159	Barton Peninsula, Antarctic	0	2	4	4	4	4
21717	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	4	4	4
25467	Ny-Ålesund, Arctic	1	1	2	3	3	3
26323	Barton Peninsula, Antarctic	1	3	4	3	4	4
26332	Barton Peninsula, Antarctic	1	2	3	4	2	0
26336	Barton Peninsula, Antarctic	0	1	2	2	0	0

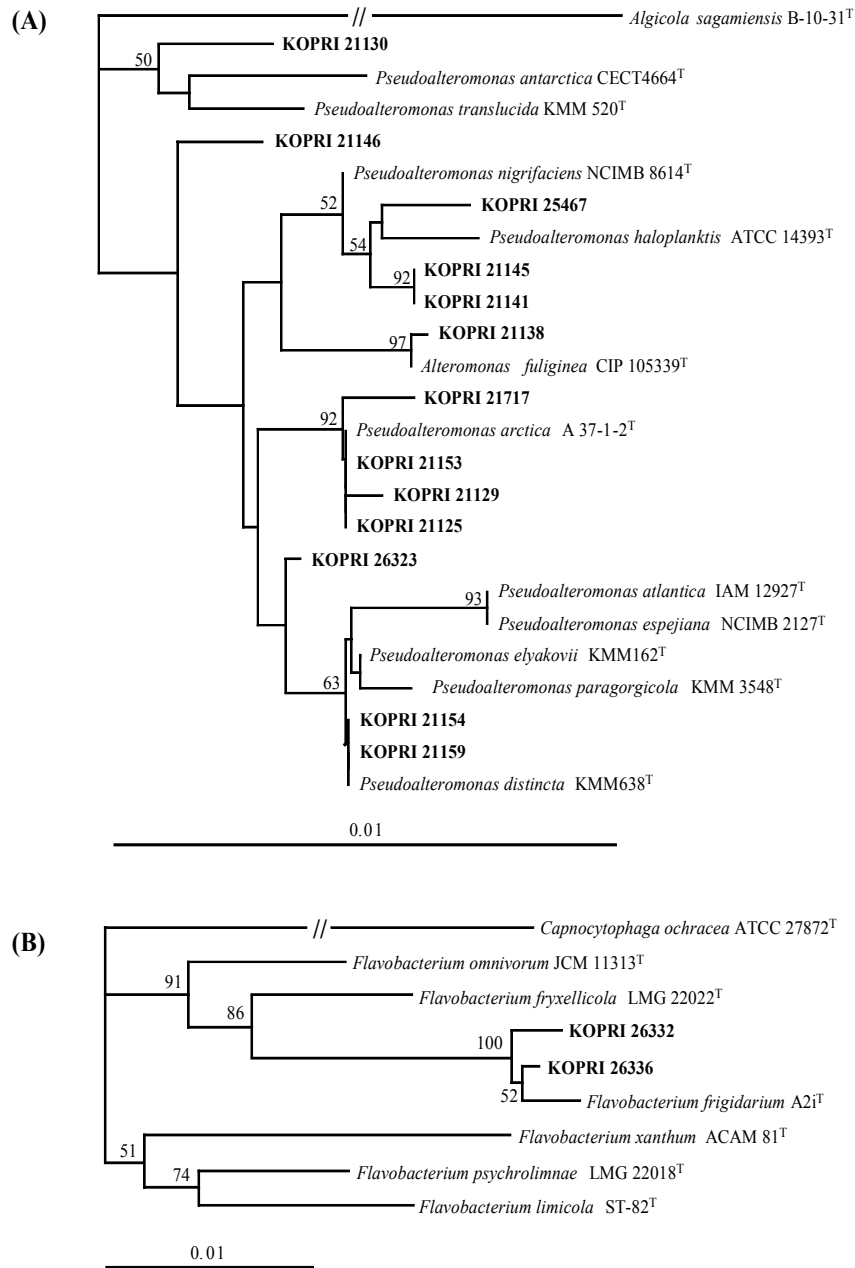
이상의 높은 유사성을 나타내었다.

### 저온활성 프로테아제의 특성

KOPRI culture collection에서 선발한 15개의 저온적응성



**Fig. 1.** The formation of a hydrolytic clear zone on a skim milk plate. The 0.1× ZoBell agar plate supplemented with 1% skim milk was inoculated and incubated at 10°C for 48 h. The magnified field shows an example of the clear zone and its activity score.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree for *Pseudoalteromonas* (A) and *Flavobacterium* (B) species based on the almost complete 16S rRNA gene sequence. The tree was reconstructed using neighbor-joining method and the bar scale represents 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) higher than 50% are shown at the branch points.

박테리아 균주들은 저온활성 프로테아제 발현으로 인해 10-20°C 저온의 배양온도에서도 고체배지 상에서 투명환을 형성할 수 있었다. 이들 프로테아제의 저온에서의 활성을 정량화하기 위해서 15°C에서 배양한 각 균주의 배양액 내에 존재하는 프로테아제의 활성을 5-30°C 범위에서 측정하였다. 5°C에서 30°C로 효소반응 온도가 증가할수록, 모든 프로테아제 활성은 서서히 증가하여 30°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 30°C 최적 반응 온도에서의 활성을 100%로 정의할 경우, 5°C에서는 상대적으로 약 30-50%의 활성을 나타내었다(Fig. 3

and Table 2). 위의 경우에는서는 비록 정제하지 않은 효소액을 이용하여 얻은 실험 결과이지만, 저온에서의 이러한 높은 상대 활성은 이미 보고된 남극 호냉성 *Colwellia* sp.이 생산하는 저온성 프로테아제의 저온활성(0°C에서 30% 상대활성)과 견줄 수 있다(20).

**프로테아제의 효소형 결정**

프로테아제 효소는 반응과 구조가 매우 다양하기 때문에, 일반적인 효소 명명법 체계에 따라 분류하기가 어렵다. 그러한

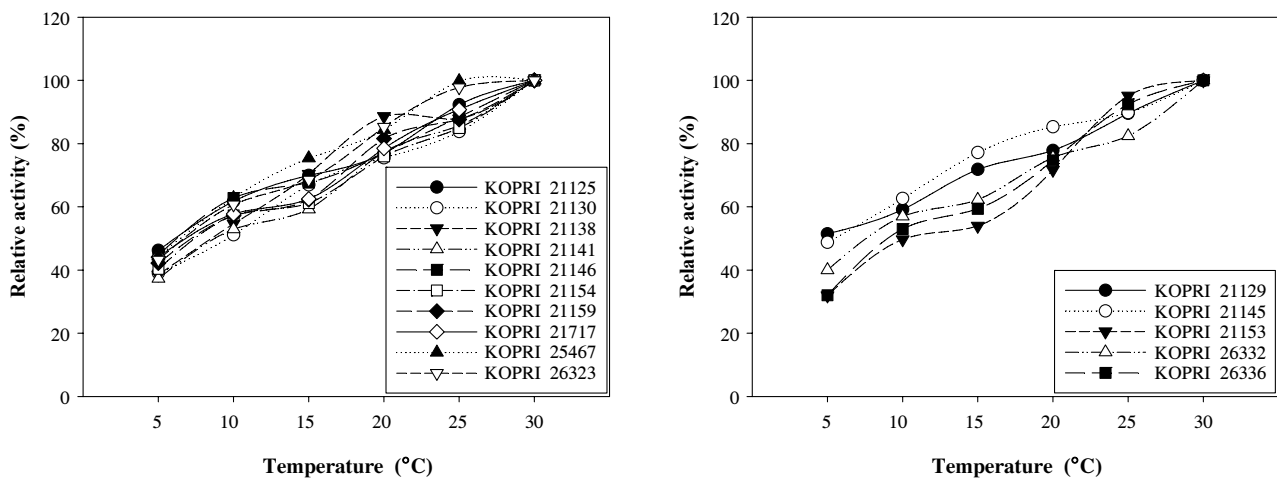
**Table 2.** Identification of cold-adapted bacteria and protease characterization

KOPRI number	Closest relative (% similarity)	Activity at 30°C (U/ml)	Relative activity at 5°C (%)	Protease type
21125	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2 <sup>T</sup> (100)	3.1	46	ND <sup>a</sup>
21129	<i>P. arctica</i> A 37-1-2 <sup>T</sup> (99.9)	4.5	51	Serine
21130	<i>P. antarctica</i> CECT4664 <sup>T</sup> (99.4)	3.6	39	ND
21138	<i>Alteromonas fuliginea</i> CIP 105339 <sup>T</sup> (100)	5.6	38	Cysteine
21141	<i>P. nigrificiens</i> NCIMB 8614 <sup>T</sup> (99.9)	4.3	37	ND
21145	<i>P. nigrificiens</i> NCIMB 8614 <sup>T</sup> (99.9)	5.0	48	ND
21146	<i>P. arctica</i> A 37-1-2 <sup>T</sup> (99.6)	3.5	44	Serine
21153	<i>P. arctica</i> A 37-1-2 <sup>T</sup> (100)	2.6	31	Serine/Metalloprotease
21154	<i>P. distincta</i> KMM638 <sup>T</sup> (100)	4.8	40	Serine
21159	<i>P. distincta</i> KMM638 <sup>T</sup> (100)	2.7	42	ND
21717	<i>P. arctica</i> A 37-1-2 <sup>T</sup> (99.9)	4.5	44	Serine
25467	<i>P. haloplanktis</i> ATCC 14393 <sup>T</sup> (99.6)	1.3	44	Serine/Metalloprotease
26323	<i>P. elyakovii</i> KMM 162 <sup>T</sup> (99.9)	4.2	43	Serine/Aspartic
26332	<i>Flavobacterium frigidarium</i> ATCC 700810 <sup>T</sup> (99.4)	3.0	39	ND
26336	<i>F. frigidarium</i> ATCC 700810 <sup>T</sup> (99.6)	1.3	32	ND

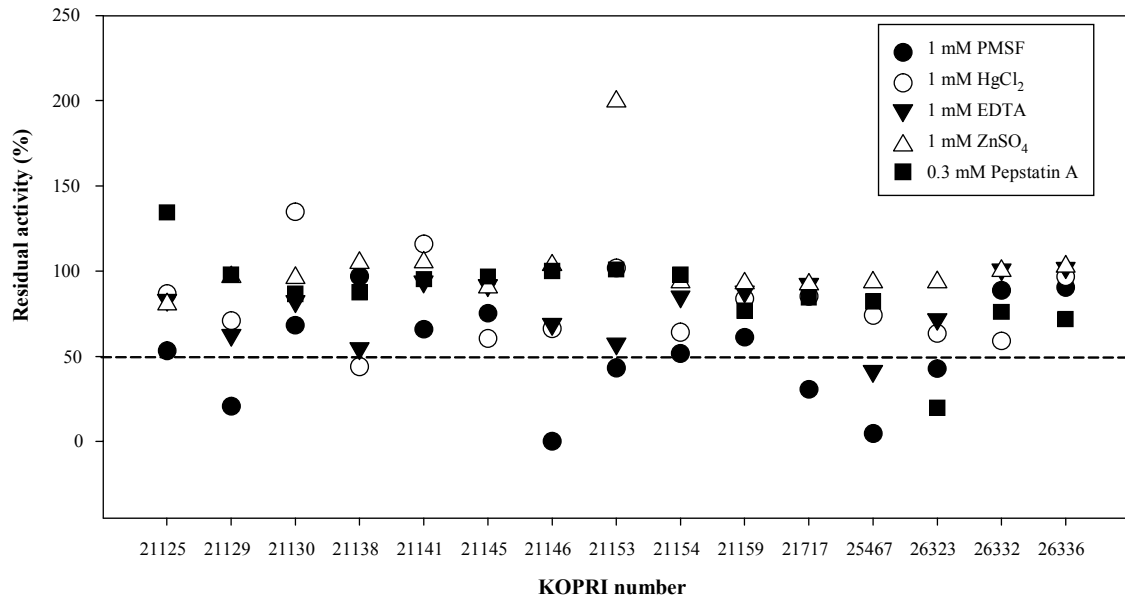
<sup>a</sup> ND, Not determined, but later could be classified into another type.

이유로 프로테아제는 효소의 촉매 부분 혹은 활성 부위에 존재하는 작용기의 화학적 성질에 따라 다음과 같이 크게 4종류의 효소형(enzyme type)으로 분류하고 있다: serine protease, aspartic protease, cysteine protease, 그리고 metalloprotease. 그러나, 위의 효소형 중 어느 하나로 분류하기 어려운 다양한 특성의 프로테아제들이 보고되고 있다. 또한 프로테아제는 반응 최적 pH에 따라 산성, 중성, 또는 염기성 프로테아제로 분류되기도 한다(15). 본 연구에서는 첫 번째의 분류체계를 따라, 각 효소형의 프로테아제 특이적 화학물에 의한 활성 억제 정도를 평가하여 15개의 저온활성 프로테아제를 분류하였다. 활성 억제제를 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하여 50% 이상의 활성이 감소되었다면 대상 프로테아제에 대한 효소활성 억제 효과가 있는 것으로 간주하였다. Fig. 4와 Table 2에서 보듯이, serine protease의 일반적 활성 억제제(PMSF)에 의해

KOPRI 21146과 25467의 효소액 활성은 강력히 억제되었기에, 이들 프로테아제는 serine protease 효소형으로 분류되었다(14). KOPRI 21129, 21153, 21154, 21717, 그리고 26323의 프로테아제의 활성은 PMSF에 의해 부분적으로 억제(>50%)되었기 때문에 serine-type 효소형으로 분류되었다. 흥미롭게도 KOPRI 25467 프로테아제는 EDTA에 의해서도 역시 부분적으로 억제되었고, KOPRI 21153 프로테아제는  $Zn^{2+}$ 에 의해 활성이 높게 증가되었기 때문에, 이 두 프로테아제는 serine-type metalloprotease로 분류될 수 있다(10, 14). KOPRI 26323은 PMSF 뿐만 아니라 pepstatin A에 의해서도 80%의 활성이 감소되었기 때문에 aspartic protease로 분류되었다(14). KOPRI 21138 프로테아제는 cysteine protease의 활성 억제제인  $Hg^{2+}$  ( $HgCl_2$ )에 의해 50%이상 활성이 억제되었다(17). 종합적으로, 15개의 프로테아제 중에서 7개가 serine protease (47%)이며,



**Fig. 3.** The temperature-dependent relative activities of the extracellular proteases produced by cold-adapted bacteria. An aliquot (200  $\mu$ l) of each culture supernatant-containing protease solution was added to 900  $\mu$ l of a 0.65% azocasein solution in standard buffer, and then incubated at different temperatures (5-30°C) for 1 h. The proteolytic activities were measured as described in the enzyme assay section.



**Fig. 4.** The effects of protease inhibitors and activators on the proteases produced by cold-adapted bacteria. The residual proteolytic activity was calculated as a relative ratio of its activity to the activity of an untreated control reaction that was taken as 100%.

이 중에서 2개는 metalloprotease의 특성도 함께 가지고 있는 것으로 확인되었다.

과거 10년 동안, 많은 저온적응 또는 저온활성 프로테아제가 남극 호냉성 박테리아에서 분리되어 그들의 분자적, 생화학적 특성이 연구되어 왔다(1, 18, 19, 20). 13개의 남극 균주에서 생산되며 효소 기능에 대해 연구가 진행된 저온활성 프로테아제들 중에서 약 54%(7개의 프로테아제)는 serine protease로, 15%(2개의 프로테아제)는 serine-type metalloprotease로 분류되었다. Rao와 공동 연구자들은 미생물 serine protease는 바이러스, 박테리아, 그리고 진핵생물 사이에서 광범위하게 많이 존재하며, 이 효소가 각 생명체의 기능유지에 중요하다고 보고하였다(15). 위에서 언급한 두 경우와 본 연구 결과는 잘 일치하고 있다.

## 결론

남북극 지역은 일반 연구자들이 쉽게 접근할 수 없기 때문에, 극지 미생물 특히 호냉성 균주에 대한 연구는 매우 한정되어 있다. 그런 이유로 극지 미생물의 culture collection이 존재한다면, 이들에 대한 생물공학적 활용 연구는 강화될 수 있을 것이다. 비록 다양한 연구기관이나 개별 연구자들이 극지 미생물을 보존하고 있으나, 극지 저온적응성 미생물에 대한 전문적인 culture collection을 보유한 기관은 현재까지 존재하지 않는다. 이러한 이유로 극지연구소는 남북극 저온적응성 미생물로 구성된 KOPRI culture collection을 운영하고 있다. 향후 산업적으로 유용한 저온활성 효소를 개발하기 위해서는 추가적인 극지 미생물의 확보와 이들이 생산하는 효소에 대한 산업적 중요성을 인식할 필요가 있다.

본 연구에서 우리는 극지 미생물의 KOPRI culture collection로부터 세포외분비 프로테아제를 생산하는 저온적응성 박테리아 균주들을 간단하고 빠른 방법을 이용하여 선발하였다. 이를 균주로부터 5-15°C 저온에서도 높은 활성을 유지하는 15종류의 저온활성 프로테아제를 확보하였으며, 이들 중에서 7종류의 프로테아제를 산업적으로 유용한 serine-type 효소 형태로 분류하였다. 의류 세탁과정에서 단백질 얼룩을 제거하기 위해서 프로테아제를 첨가하는 것은 가장 좋은 방법이며, 산업적으로 사용되는 모든 세제 첨가용 프로테아제는 박테리아 유래의 serine 프로테아제이기 때문에, 본 연구에서 확보한 저온활성 serine 프로테아제는 세탁용 세제의 효소첨가물처럼 산업적으로 유용하게 활용될 수 있으리라 기대한다.

## 적요

극지연구소(KOPRI)는 국내외적으로 유일하게 남북극 지역에서 분리한 저온적응성 박테리아 균주를 대상으로 culture collection(약 6,300균주)을 구축하여 운영하고 있다. 보유 중인 프로테아제(protease) 생산 균주들(총 874균주) 중에서 활성이 높은 프로테아제를 생산하는 78개의 균주들을 1차 선발한 후, 1% skim milk가 포함된 0.1× ZoBell 고체배지에 접종하고 다양한 온도(5-30°C)에서 배양하면서 세포외분비성 프로테아제의 활성을 비교하였다. 위의 신속하고 직접적인 균주 스크리닝 방법을 통해서, 최종적으로 저온활성 프로테아제를 생산하는 15개의 저온적응성 균주들을 선발하였다. 최종 선발된 균주들은 16S rRNA 유전자의 분석결과 *Pseudoalteromonas* (13균주)와 *Flavobacterium* (2균주) 속(genus)으로 분류되었고, 5-15°C 저온에서도 활성을 나타내는 저온성 프로테아제를 생산하였다.

15개 균주들이 생산하는 각각의 프로테아제는 특이적 화합물에 의한 효소활성 억제 정도에 따라 5개의 그룹(serine protease, aspartic protease, cysteine protease, metalloprotease, 그리고 미분류 프로테아제)으로 분류되었다. 본 실험을 통해서 선발한 남북극 유래 박테리아 균주들은 새로운 저온활성 프로테아제를 발굴하기 위한 유용한 생물자원으로서의 가치를 가지고 있다.

## 감사의 말

이 연구는 2009년도 극지연구소의 지원을 받아 연구되었음 (PE09050).

## 참고문헌

- Alam, S.I., S. Dube, G.S.N. Reddy, B.K. Bhattacharya, S. Shivaji, and L. Singh. 2005. Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 824-831.
- Antranikian, G. and K. Egorova. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology, pp. 361-406. In C. Gerday and N. Glansdorff (eds.), *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Cavicchioli, R. 2006. Cold-adapted archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 331-343.
- Cavicchioli, R., K.S. Siddiqui, D. Andrews, and K.R. Sowers. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 253-261.
- Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261.
- Dastager, S.G., A. Dayanand, W.J. Li, C.J. Kim, J.C. Lee, D.J. Park, X.P. Tian, and Q.S. Raziuddin. 2008. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Curr. Microbiol.* 57, 638-642.
- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J.P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, and *et al.* 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18, 103-107.
- Huston, A.L. 2008. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes, pp. 347-363. In R. Margesin (ed.), *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Ivanova, E.P., E.A. Kiprianova, V.V. Mikhailov, G.F. Levanova, A.D. Garagulya, N.M. Gorshkova, M.V. Vysotskii, and *et al.* 1998. Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 247-256.
- Karbalaei-Heidari, H.R., A.A. Ziaee, and M.A. Amoozegar. 2007. Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. *Extremophiles* 11, 237-243.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., London, UK.
- Nichols, D., J. Bowman, K. Sanderson, C.M. Nichols, T. Lewis, T. McMeekin, and P.D. Nichols. 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 240-246.
- Overall, C.M. and C.P. Blobel. 2007. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 245-257.
- 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.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Shin, H.H. and H.S. Choi. 1998. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1416-1418.
- Vazquez, S., L. Ruberto, and W. Mac Cormack. 2005. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. *Polar Biol.* 28, 319-325.
- Vazquez, S.C., E. Hernandez, and W.P. Mac Cormack. 2008. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. *Rev. Argent. Microbiol.* 40, 63-71.
- Wang, Q.F., J.L. Miao, Y.H. Hou, Y. Ding, G.D. Wang, and G.Y. Li. 2005. Purification and characterization of an extracellular cold-active serine protease from the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341. *Biotechnol. Lett.* 27, 1195-1198.