

Aeromonas sp. MN44의 특성과 망간 산화에 관한 연구

구종서 · 박경량*

한남대학교 이과대학 미생물학과

Received January 3, 2005 / Accepted January 31, 2005

A Study on the Manganese Oxidation and Characteristics of *Aeromonas* sp. MN44. Jong Seo Koo and Kyeong Ryang Park¹. Department. of Microbiology, Hannam University, 133 Ojung-Dong, Daeduk-Ku, Daejeon, Korea 306-791 - Sixty four bacterial colonies which were able to oxidize the manganese were isolated from soil samples in Mokcheon and Ochang area. Among them, one bacterial strain was selected for this study based on its higher manganese oxidation, and this selected bacterial strain was identified as *Aeromonas* sp. MN44 through physiological-biochemical test and analysis of its 16s rRNA sequence. *Aeromonas* sp. MN44 was able to utilize lactose but did not utilize various carbohydrates as a sole carbon source. *Aeromonas* sp. MN44 showed a very sensitive to antibiotics such as kanamycin, chloramphenicol, ampicillin, tetracycline and spectinomycin, and heavy metal such as cadmium. But this strain showed a high resistance up to mg/ml unit to heavy metals such as lithium and manganese. Optimal manganese oxidation condition of *Aeromonas* sp. MN44 was pH 7.4 and manganese oxidation activity was inhibited by proteinase K and boiling treatment. So, we concluded that this factor was protein. The manganese oxidizing factor produced by *Aeromonas* sp. MN44 was partial purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography and Sephadex gel filtration chromatography. Its molecular mass was about 113 kDa.

Key words – *Aeromonas*, manganese oxidation, partial purification

산업의 발달로 망간, 니켈, 구리 코발트 등 금속의 수요는 지속적으로 증가하는 반면 이들의 부존량은 한정되어 있어 얼마 후 이들 자원이 고갈될 것으로 전망되고 있다. 이중 망간은 지각에 대략 0.1%를 차지하고 있지만 대부분 불용성으로 지하나 지표에서 여러 반응에 의해 용해되어 수중으로 유입된다. 일반적으로 망간은 철과 아주 유사한 상태로 수중에 존재하며 보통 철과 공존 또는 단독으로 존재하지만 철과 달리 pH 8.0이하에서는 자연적으로 산화되지 않기 때문에 생물학적 과정에 의해서만 산화가 일어난다.

따라서 생물학적 망간산화에 대한 최초의 보고[2] 이후 *Pseudomonas*[7], *Citrobacter*[5], *Arthrobacter*[6], *Leptothrix*[13], *Bacillus*[4] 등의 연구에서 망간 산화기작이 단백질과 관련된 촉매작용에 의해 일어난다는 것이 보고되었고, 특히 *P. fluorescens* GB-1[15]에 대한 연구에서 250 kDa의 MOF1과 180 kDa의 MOF2 단백질로 구성된 manganese oxidizing factor (MOF)가 부분정제 되어 생물학적 망간산화기작은 효소가 관여하고 있음을 부분적으로 증명하기도 하였다. 그러나 아직까지 어떤 연구에서도 망간산화에 관련된 효소를 순수분리하고 정제한 바 없어 망간 산화 과정으로 미생물이 에너지를 획득할 수 있다는 뚜렷한 증거는 확인되지 않고 있다.

일반적으로 토양, 담수, 해수에서 생성되는 생물학적 망간산화물은 비록 결정성이 약하고 부정형이지만 자연계에 결

정화되어 존재하고 있는 기존의 망간산화물 보다 훨씬 다양한 여러 종류의 미량원소를 흡착 할 수 있고[17,18], 망간의 지화학적 순환[14]과 망간 단괴 형성에도 관여한다[6]. 따라서 생물학적으로 산화되는 망간산화물은 광산에서 배출되는 배출수에 함유된 독성 중금속 이온을 제거하는데 이용할 수 있고[12], 음용수 내에 함유된 망간을 화학적 방법이 아닌 생물학적 방법으로 제거하는데 사용될 수 있다[13]. 또 세균과 곰팡이의 망간 산화 결과 나타나는 토양 식물의 망간 결핍현상[11]을 해결하는데 이용될 수 있고, 망간이 산화될 때 발생하는 부산물인 hydrogen peroxide의 생성기작 파악 및 제거를 통해 노화를 촉진하는 유해산소(free radical) 제거에 응용할 수 있어 생물학적 망간산화물은 매우 다양하게 이용될 수 있다.

본 실험은 광물자원의 활용, bioremediation, 음용수 처리 등에서 다양하게 이용될 수 있는 망간 산화기작에 대한 연구의 일환으로 자연계에서 분리한 망간산화능이 우수한 균인 *Aeromonas* sp. MN44를 대상으로 이 균의 최적 성장 조건과 특성을 조사하고 망간 산화 factor를 부분 정제하여 이 단백질이 망간산화기작을 갖고 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배지

충청남도과 충청북도 목천과 오창 일원의 논 토양을 채취하여, 각각의 토양 1 g을 멸균 생리식염수 100 ml이 들어 있

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-7626, Fax : +82-42-629-8355

E-mail : krpark@hannam.ac.kr

는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 그 현탁액 100 μ l를 망간 최소배지(0.05% yeast extract, 0.05% casamino acid, 0.0901% glucose, 0.2603% HEPES, 0.007% CaCl_2 , 0.014% MgSO_4 , 0.0001% FeCl_3 , 0.002% MnCl_2 , 1 ml trace element solution, pH 7.0)에 접종하고 2~3일 배양한 다음, 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 세균집락은 망간 최소 고체배지에 접종해서 30°C에서 배양하며 갈색 콜로니를 형성하고 생장이 가장 우수한 균주를 육안으로 확인하여 1차 선별하였고, 1차 선별된 균주 중 최소배지에서 생장이 가장 우수하고, 망간산화능이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 당 이용능은 bushnell-hass 최소배지 (0.02% magnesium sulfate, 0.002% calcium chloride, 0.1% monopotassium phosphate, 0.1% ammonium phosphate dibasic, 0.1% potassium nitrate, 0.005% ferric chloride, pH 7.0)에 1%의 당을 단일 탄소원으로 첨가하여 조사하였고, 영양배지로는 nutrient broth (NB, 0.3% beef extract, 0.5% peptone, pH 7.0)를 사용하였다.

생리, 생화학적 특성 조사

최종 선별된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology[8]와 LWW's Organism Central[16] 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria[10]에 의거하여 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하였고, 당 이용능과 중금속과 항생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의 genomic DNA를 CTAB방법[19]으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기 서열을 조사하였다. 이때 선별 균주의 16S rDNA를 증폭하기 위해 forward primer 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'(27F)와 reverse primer 5'-GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT-3'(1492R)를 사용하고(BIONEX), 염기서열은 ABI model 310(Applied Biosystem, U.S.A)을 사용하여 분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search (www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 비교, 분석 하였다.

망간 산화능 조사

Aeromonas sp. MN44의 망간산화능과 관련된 factor가 세포내부에 있는 물질인지 아니면 세포밖으로 분비되는 물질인지 확인하기 위해 세포의 분비물질은 배양 상등액으로, 그리고 세포내 물질은 세포를 초음파로 파쇄하여 용균 시킨 것으로 망간 산화능을 측정하였다.

100 μ M MnCl_2 가 함유된 NB 영양배지에 균을 접종하여 30°C 배양기에서 배양하며 시간별로 일정량을 취하여 실온

에서 10,000 \times g로 5분간 원심분리 하여 얻은 상등액은 세포의 분비물질 시료로, 그리고 침전된 균액은 300 μ l의 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충액으로 현탁 시킨 후 15초 동안 얼음에서 파쇄하고 15초 쉬는 것을 6번 반복해서 3분간 파쇄 (output watts 14W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-CellTM, U.S.A.)하고 4°C에서 10,000 \times g로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 세포내 물질 시료로 사용하였다. 각 시료의 망간 산화능은 45 mM acetic acid에 0.04% Leukoberbelin blue를 첨가한 반응액 1 ml에 기질로 MnCl_2 를 100 μ M이 되게 첨가하고 시료 0.2 ml을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 시킨 후, 분광광도계를 이용하여 620 nm에서 흡광도로 조사하였고 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였다 [15]. 표준곡선은 KMnO_4 를 시료 대신 사용하여 망간의 산화된 정도를 비교 분석하였으며 이때 40 μ M의 KMnO_4 는 100 μ M의 MnO_2 와 같은 산화 값을 갖고, 망간 산화 활성은 1분 동안 1 nmol의 망간이 산화하는데 관여하는 양을 1 unit로 환산하였다.

또 완충액의 pH가 망간 산화능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10 mM HEPES-NaOH 완충액을 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 7.4, pH 8, pH 9, pH 10으로 각각 조정하여 균 배양액을 첨가한 후 망간 산화능을 조사하였다

망간 산화 factor의 정제

최종선별균주가 생성하는 망간산화 factor의 분리를 위해 NB 배지 1 l에 균을 배양한 후, 배양액을 4°C에서 10분간 6,000 \times g로 원심 분리하여 상등액을 제거하고 균체를 얻었다. 이 균체를 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충액으로 3번 세척 후 동일 완충액 100 ml로 현탁 시켜 얼음에서 sonication (output watts 14W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-CellTM, U.S.A)후 원심분리(10,000 \times g, 20분, 4°C)하여 상등액을 얻었다. 이렇게 얻어진 상등액은 10%~35% ammonium sulfate로 침전시킨 후 4°C, 10,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하고 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충액 3 ml에 녹인 후, 같은 완충액으로 4°C에서 24시간 Spectrum Medical Industries, Inc., MWCO: 12-14,000(VWR Scientific, USA) 투석막을 이용하여 투석하였다. 투석된 시료는 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충액으로 평형화된 DEAE-toyopearl 650 M으로 충전된 column (2.5 \times 20 cm)에 0.0 M-1.0 M NaCl로 농도경사를 유지하며 유속을 2 ml/min로 하여 1200분 동안 완충액을 흘려주면서 단백질을 용출하고, 이중 망간 산화능이 있는 분획을 모아 동결건조한 후 0.5 ml의 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)완충액에 다시 녹여 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충용액으로 평형화한 Sephadex G-200(Pharmacia, USA)으로 충전된 column (1 \times 90 cm)에 주입하여 0.25 ml/min 속도로 800분간 총 200 ml의 동일 완충액을 흘려주어 망간활성능이 있는 분획을 모아 동결건조 후 동일 완충액에

녹여 전기영동 하였다. 이때 망간산화 factor의 분자량은 Laemmli 방법[9]에 따라 12% SDS polyacrylamide 전기영동장치(Mighty Small™ SE245, Hoefer)를 이용하여 확인하였고, 표준 단백질로는 Bio-Rad사의 myosin (209 kDa), β-galactosidase (124 kDa), bovine serum albumin (BSA, 80 kDa), ovalbumin (49.1 kDa), carbonic anhydrase (34.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), lysozyme (20.6 kDa), aprotinin (7.1 kDa)를 사용하였다. 또 정제된 factor의 망간산화능은 native gel을 이용하여 전기영동한 gel을 망간 최소배지에 부착하여 24시간 반응시킨후 나타난 band를 12% SDS polyacrylamide gel과 비교하여 조사하였다.

결과 및 고찰

망간 산화 균주의 분리, 선별, 동정 및 생리·생화학적 특성

충청남도 목천과 충청북도 오창 일원의 토양을 망간 최소 평판 배지에 도말하여 집락을 형성하는 64개의 망간산화 균주를 분리하였다. 이 중 망간 최소 평판배지에서 갈색을 형성하고 생장이 우수한 3균주를 1차 선별하고, 그 중 100 μM MnCl₂가 포함된 망간 최소 배지에서의 생장이 우수하고, 망간산화능이 우수한 한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 일반적으로 망간산화가 일어나면 배지내의 +2가의 망간이 +3가나 +4가의 망간으로 산화하여 갈색 집락을 형성한다. 본 실험에 최종 선별되어 사용된 균주도 망간이 함유된 배지에서 배양했을 경우 갈색 집락을 형성하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

최종 선별된 균주는 그람음성의 무포자 호기성 간균으로 운동성이 없고, oxidase에만 양성반응을 나타낼 뿐, catalase, indole 생성, methyl red, Voges-proskauer, starch hydrolase, urease 등에 음성반응을 나타냈다(Table 1). 당 이용능 조사에서 이 균주는 lactose만 이용하고, fructose, arabinose, sorbose,

ribose, cellobiose, maltose, glucose, rhamnose, mannose, sucrose 등을 모두 이용하지 못하는 것으로 확인되었다(Table 2). 그리고 이러한 형태, 생리·생화학적 특성과 16s rRNA 염기 서열 분석 결과, 최종 선별된 균주는 *Aeromonas* sp. 으로 동정 되어 *Aeromonas* sp. MN44라 명명하였다.

Aeromonas sp. MN44의 항생제에 대한 내성조사 결과 이 균은 ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, spectinomycin, tetracycline 등 조사한 모든 항생제에서 성장하지 않아 이들 항생제에 대한 내성이 전혀 없는 것으로 확인 되었다. 또 *Aeromonas* sp. MN44의 중금속에 대한 내성 시험 결과, Li와 Mn은 각각 3.2 mg/ml과 1.6 mg/ml 까지의 높은 내성을 나타내었고, Rb는 800 μg/ml, Br은 600 μg/ml, Pb는 400 μg/ml, Cu는 150 μg/ml, Co는 100 μg/ml 의 농도까지 그리고 Zn은 25 μg/ml, Hg은 10 μg/ml까지 내성을 나타내었다. 그러나 Cd에 대해서는 전혀 내성을 갖지 않은 것으로 확인되었다(Table 3).

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the *Aeromonas* sp. MN44

Characteristics	
Gram stain	-
cell shape	rod
spore	-
motility	-
catalase	-
indole production	-
methyl red	-
Voges-proskauer	-
starch hydrolysis	-
urease	-
oxidase	+

Table 2. Utilization of various carbohydrate by *Aeromonas* sp. MN44

Carbohydrate utilization	Carbohydrate utilization
fructose -	glucose -
arabinose -	rhamnose -
sorbose -	mannose -
ribose -	lactose +
cellobios -	sucrose -
maltose -	

Table 3. Susceptibility of *Aeromonas* sp. MN44 to various heavy metals

Heavy Metals	MIC (μg/ml)	Heavy Metals	MIC (μg/ml)
Ba	600	Mn	1,600
Cd	-	Ni	50
Co	100	Pb	400
Cu	150	Rb	800
Hg	10	Zn	25
Li	3,200		

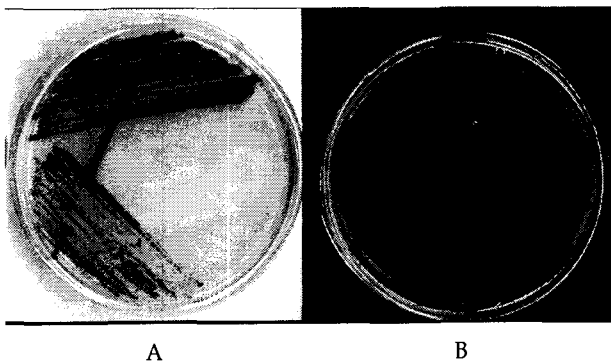


Fig. 1. Manganese oxidation showed brown color in NB plate containing 100 μM MnCl₂. The plate was incubated at 30°C for 3 days. Brown colonies indicate Mn precipitation. A, Nutrient agar plate containing 100 μM MnCl₂; B, Nutrient agar plate

Aeromonas sp. MN44의 망간 산화능

*Aeromonas sp. MN44*의 망간 산화능을 영양 복합배지에서 균체 생육과 함께 주기적으로 측정해본 결과, 접종 후 27시간 후에 정지기로 접어들었으며, 망간 산화능은 배양 3시간 후부터 나타나기 시작해 배양 15시간 후에 최고치를 나타낸 후 배양 약 21시간 후부터 점차 감소하였다(Fig. 2). 이러한 망간 산화능 변화는 Okazaki[15]의 보고와 비슷한 결과이다.

망간산화와 관련된 factor를 조사하기 위해 세포외로 분비되는 물질인 세포배양액과 초음파로 파쇄시켜 얻은 세포내 부물질을 이용해 망간 산화능을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 *Aeromonas sp. MN44*의 망간 산화능은 세포의 분비물질인 세포배양액에서는 검출되지 않았고, 초음파로 세균을 용균시킨 시료에서 망간산화능이 검출되어 망간산화기작은 세포내부에 존재하는 factor에 의해 이루어지는 것으로 확인되었다. 이와 같이 세포내 효소에 의해 망간산화가 진행되는 균이 *Pseudomonas*[7], *Citrobacter*[5], *Arthrobacter*[6]에서 이미 보고된 바 있다. 그러나 *Leptothrix*[1,3]가 생성하는 망간산화물은 세포외 분비효소에 의해서 만들어진다고 밝혀져 있어 미생물에 따라 망간산화에 관련된 물질이 다양하게 존재하는 것으로 추정된다.

망간을 산화하는 물질이 단백질인지를 확인하기 위해 단백질 분해효소인 proteinase K를 처리한 것과 100°C로 10분 가열 처리를 한 후의 망간 산화능을 측정한 결과 proteinase K와 가열 처리를 한 것의 망간 산화능이 처리하지 않은 것에 비해 각각 1.6%와 0.8%만이 남아있어(Table 4) *Aeromonas sp. MN44*의 망간 산화능은 Okazaki[15]의 결과와 유사하게 단백질에 의해 나타난 것임을 확인 하였다.

또 완충액의 pH가 망간 산화능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10 mM HEPES-NaOH 완충액을 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 7.4, pH 8, pH 9, pH 10 으로 조정하여 pH에 따른 망간 산화능을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 pH 4~6 의

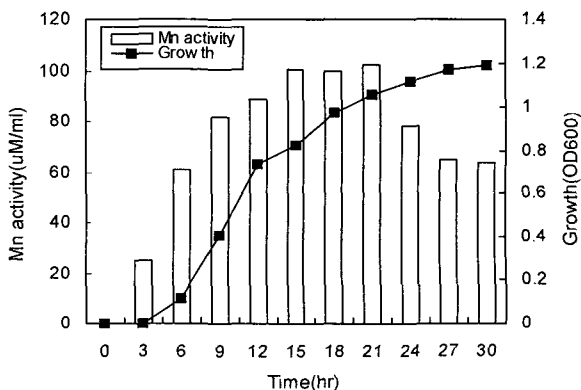


Fig. 2. Time course of manganese oxidation. *Aeromonas sp. MN44* was grown in nutrient broth containing 100 μM MnCl₂ at 30°C, and Mn oxidizing activity was measured using Leukoberbelin blue.

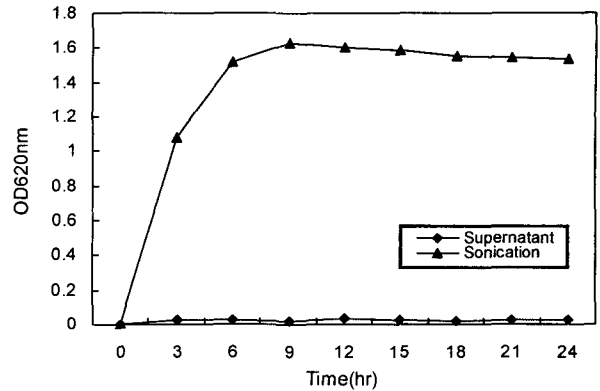


Fig. 3. Time course of manganese oxidation for supernatant and sonication treatment. Cultures were grown in nutrient broth containing 100 μM MnCl₂ at 30°C, and Mn oxidizing activity was measured using Leukoberbelin blue.

Table 4. Effect of proteinase K and boiling on manganese oxidation of *Aeromonas sp. MN44*

Treatment	Mn oxidizing activity (nmol of Mn ²⁺ /min)	Relative activity (%)
standard	1.431	100
proteinase K	0.024	1.6
boiling	0.012	0.8

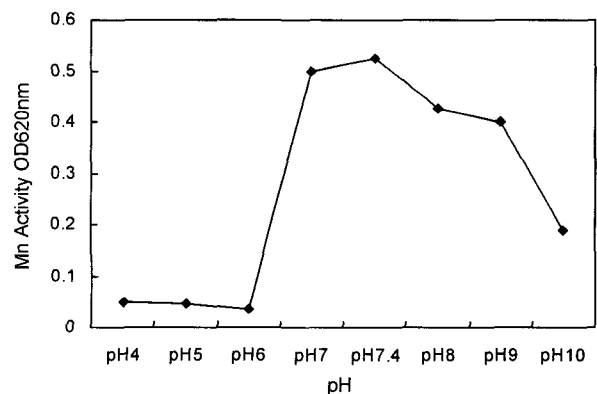


Fig. 4. Effect of pH on manganese oxidation by *Aeromonas sp. MN44*. Spent culture media buffered with 10 mM HEPES-NaOH at different pH, and Mn oxidizing activity was measured using Leukoberbelin blue.

산성 pH에서는 망간 산화능이 저조하였고 pH 7~9 에서 망간 산화능이 우수하여 *Aeromonas sp. MN44*의 망간 산화는 중성부터 약 알칼리성에서 잘 이루어짐을 확인하였다. 이 결과는 Okazaki[15]의 pH 범위와 일치되는 결과이다.

망간 산화 factor의 부분 정제

NB 배지 1 l에 *Aeromonas sp. MN44*를 18시간 배양한 후, 배양액을 4°C에서 6,000×g로 10분간 원심 분리하여 상등액

을 제거하고 균체를 수확하였다. 이 균체는 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 완충액으로 3번 세척 후 동일 완충액 소량으로 현탁시켜 얼음에서 30초 파쇄 후 40초 쉬는 방법으로 7분간 파쇄를 5번 반복(output watts 14W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-Cell™, USA) 하고 원심분리(10,000×g, 20분, 4℃)하여 상등액을 조효소액(crude extract)으로 사용하였다. 수확한 조효소액은 10~35% 사이의 ammonium sulfate로 침전시켜, 이 침전물을 가지고 단백질 농도 및 망간 산화능을 측정하였다. 그 결과 ammonium sulfate로 침전된 것의 망간 산화능은 4,790 unit로 조효소액에 비해 2.21배 농축되었으며 회수율은 20.7%임을 확인하였다. 또 10~35% ammonium sulfate로 침전시킨 시료를 DEAE-toyopearl 650 M 으로 충전시킨 column으로 ion exchange chromatography (Fig. 5)를 수행한 결과 망간 산화능이 539 unit로 조효소액에 비해 5배 농축되었고 회수율은 11.3%로 나타났다(Table. 5). 그리고 Sephadex G-200으로 충전한 column으로 gel filtration (Fig. 6)한 물질의 망간 산화능은 12.88배 농축되었고, 회수율은 2.87%이었다(Table 5). 각 단계에서 정제된 단백질을 12% SDS polyacrylamide gel로 전기 영동한 결과(Fig. 7) 단

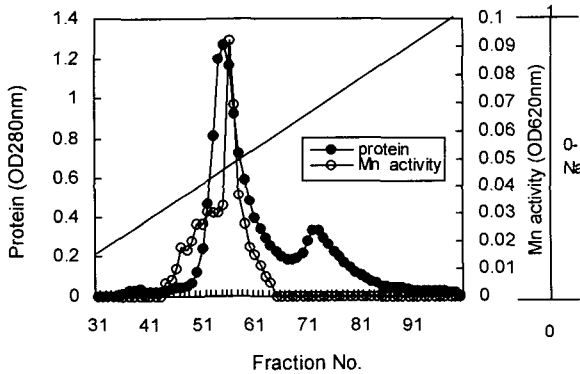


Fig. 5. Column chromatographic purification of manganese oxidizing factor from *Aeromonas* sp. MN44. Wet cells were suspended in 100 ml of buffer A (10 mM HEPES-NaOH buffer, pH 7.4) and disrupted with sonicator (output watts 14 W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-Cell™). The supernatant was subjected to 10~35% ammonium sulfate precipitation and dialyzed against buffer A. The manganese oxidizing factor solution was applied to a DEAE-Toyopearl 650M column (2.5 by 20 cm) and eluted with a 0 M to 1.0 M NaCl gradient at a flow rate of 2 ml/min for 1200 min.

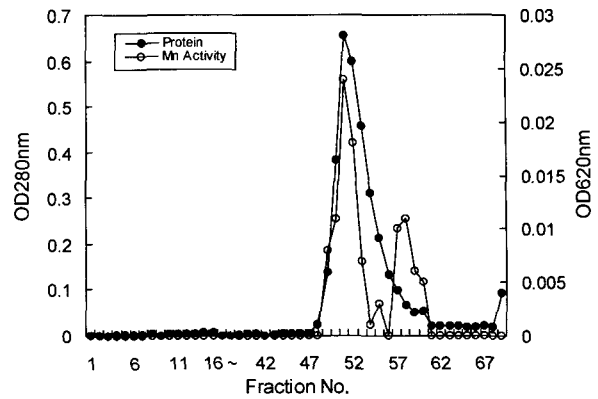


Fig. 6. Chromatography of pooled manganese oxidizing factor fractions from DEAE-Toyopearl 650 M on Sephadex G-200 column. Manganese oxidizing factor was eluted in a 200 ml 10 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.4).

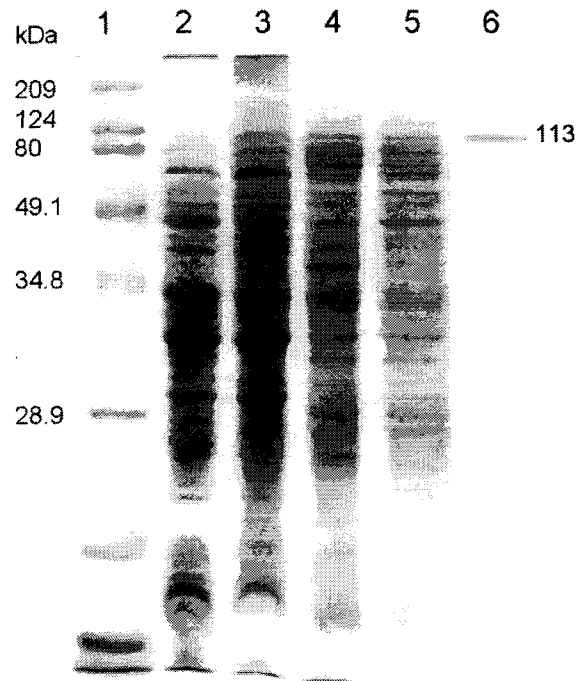


Fig. 7. Coomassie blue stained 12% SDS polyacrylamide gel after electrophoresis of manganese oxidizing factor. Lanes: 1, marker proteins; 2, crude extract; 3, $(NH_4)_2SO_4$ precipitated protein; 4, preparation after DEAE-toyopearyl 650M chromatography; 5, preparation after Sephadex G-200 chromatography; 6, native gel attached to medium containing 100 μM $MnCl_2$ for 24 hr.

Table 5. Purification of the manganese oxidizing factor from *Aeromonas* sp. MN44

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification Fold
crude extract	869	4790	5.5	100.0	1
$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	81.44	992	12.18	20.7	2.21
DEAE-Toyopearl 650M	19.6	539	27.5	11.3	5
Sephadex G-200	1.6	113.35	70.84	2.87	12.88

일 band가 아닌 여러 band가 나타났고, 망간 산화능을 갖는 단백질을 native gel에서 망간이 함유된 배지에 접촉시켜 갈색의 band를 나타내는 부위를 확인한 결과, *Aeromonas* sp. MN44가 생성하는 망간 산화 factor는 약 113 kDa의 분자량을 갖는 단백질인 것으로 추정된다. 이는 망간산화와 관련되어 지금까지 부분 정제되어 밝혀진 Okazaki[15]의 망간산화 factor 180 kDa과 250 kDa보다는 작은 단백질로 추후 이 단백질을 정제하여 망간 산화효소에 대한 특성을 밝힌다면 다양한 분야에 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

충청남도 목천과 충청북도 오창 근교의 토양으로부터 망간을 산화하는 64 집락을 분리하고 이 중 망간 산화능이 가장 우수한 한 균주를 최종 선별하여 생리, 생화학적 특성을 조사하고, 16S rRNA 염기 서열분석 등을 통하여 동정한 결과 최종 선별된 균주는 *Aeromonas* sp. MN44로 확인되었다. 최종 선별된 *Aeromonas* sp. MN44는 lactose를 제외한 여러 당들은 이용하지 못하였으며, 중금속내성은 lithium과 manganese에 대해서는 mg/ml 단위의 높은 농도까지 중금속 내성을 가지고 있었지만 cadmium에는 전혀 내성을 나타내지 않았다. 또 kanamycin, chloramphenicol, ampicillin, tetracycline, spectinomycin 등 조사한 모든 항생제에 대해 전혀 내성을 갖지 않았다. *Aeromonas* sp. MN44가 생성하는 망간산화물질의 최적 pH는 pH 7.4로 확인되었으며, 이 균이 생성하는 망간 산화 factor는 proteinase K와 가열처리에 의해 저해되는 단백질이고, ammonium sulfate 침전과 ion exchange chromatography 그리고 gel filtration의 단계를 통해 부분 정제한 망간 산화 factor의 분자량은 약 113 kDa로 확인되었다.

참 고 문 헌

- Adams, L. F., and W. C. Ghiorse. 1987. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.* 169, 1279-1285.
- Beyerinck, M. W. 1913. Oxidation des Mangancarbonates durch Bacterien und Schimmelpilze. *Folia Microbiol.* 2, 123-134.
- Boogerd, F. C., and J. P. M. de Vrind. 1987. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.* 169, 489-494.
- de Vrind, J. P. M., E. W. de Vrind-de Jong, J. W. H. de Voogt, P. Westbroek, F. C. Boogerd, and R. A. Rosson. 1986. Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1096-1100.
- Douka, C. E. 1980. Kinetics of manganese oxidation by cell-free extracts of bacteria isolated from manganese concretions from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 74-80.
- Ehrlich, H. L. 1968. Bacteriology of manganese nodules. II. Manganese oxidation by cell-free extracts from a manganese nodule bacterium. *Appl. Microbiol.* 16, 197-202.
- Jung, W. K., and R. Schweisfurth. 1979. Manganese oxidation by an intracellular protein of a *Pseudomonas* species. *Z. Allg. Mikrobiol.* 19, 107-115.
- Krieg, N. R., and J. G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- MacFaddin, J. F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2nd ed. Williams & Wilkins CoMiget, R. J., C. H. Oppenheimer, H. I. Kator, and D. A. La. Rock. 1969. Microbial degradation of normal paraffin hydrocarbon in crude oil. In proceedings of the joint conference on prevention and control of oil spills, A. D. O. F. W. P. C. A. American Petroleum Institute, New York. 327-331.
- Mann, P. J. G., and J. H. Quastel. 1946. Manganese metabolism in soils. *Nature* 158, 154-156.
- Mathur, A. K., and K. K. Dwivedy. 1988. Biogenic approach to the treatment of uranium mill effluents. *Uranium* 4, 385-394.
- Mouchet, P. 1992. From conventional to biological removal of iron and manganese in France. *Am. Water Works Assoc. J.* 84, 158-167.
- Nelson, Y. M., L. W. Lion, W. C. Ghiorse, and M. L. Shuler. 1999. Production of biogenic Mn Oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 175-180.
- Okazaki, M., T. Sugita, M. Shimizu, Y. Ohode, K. Iwamoto, E. W. de Vrind, de Jong, J. P. M. de Vrind, and P. L. A. M. Corstjens. 1997. Partial purification and characterization of manganese oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4793-4799.
- Organism central. 2001. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. Baltimore, New York.
- Tebo, B. M., K. H. Nealson, S. Emerson, and L. Jacobs. 1984. Microbial mediation of Mn(II) and Co(II) precipitation at the O₂/H₂S interfaces in two anoxic fjords. *Limnol. Oceanogr.* 29, 1247-1258.
- Tebo, B. M. 1991. Manganese(II) oxidation in the suboxic zone of the Black Sea. *Deep Sea Res.* 38(Suppl. 2), S883-S905.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghai-Marooof, S. M. Williams, B. P. Dancik, and R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc Natl. Acad. Sci.* 84, 2097-2100.