

## *Pseudomonas* sp. MN5의 특성과 망간산화단백질 정제

이승희 · 박경량\*

한남대학교 생명나노과학대학 생명공학과

Received December 7, 2007 / Accepted January 16, 2008

**Characterization of *Pseudomonas* sp. MN5 and Purification of Manganese Oxidizing Protein.** Lee, Seung Hui and Kyeong Ryang Park\*. *Department of Biotechnology, Hannam University, 461-6 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea 305-811* - Bacterial colonies which were able to oxidize the manganese were isolated from six soil samples in Byungchon area. Among them, one bacterial strain was selected for this study based on its high manganese oxidation activity. This selected bacterial strain was identified as *Pseudomonas* sp. MN5 through physiological-biochemical test and analysis of its 16s rRNA sequence. This selected bacterial strain was able to utilize fructose and maltose, but they doesn't utilizing various carbohydrates as a sole carbon source. *Pseudomonas* sp. MN5 showed a very sensitive to antibiotics such as kanamycin, chloramphenicol, streptomycin and tetracycline, but a high resistance up to mg/ml unit to heavy metals such as lithium, manganese and barium. Optimal manganese oxidation condition of *Pseudomonas* sp. MN5 was pH 7.5 and manganese oxidation activity was inhibited by proteinase K and boiling treatment. The manganese oxidizing protein produced by *Pseudomonas* sp. MN5 was purified by ammonium sulfate precipitation, HiTrap Q FF anion exchange chromatography and G3000sw XL gel filtration chromatography. By sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, three manganese oxidizing protein with estimated molecular weights of 15 kDa, 46.7 kDa and 63.5 kDa were detected. Also, it was estimated that manganese oxidizing protein produced by *Pseudomonas* sp. MN5 were a kind of porin proteins through internal sequence and N-terminal sequence analysis.

**Key words :** Manganese oxidizing protein, porin, *Pseudomonas*, purification

### 서 론

망간은 지각구성물질의 약 0.1%를 차지하는 천연 물질로 대부분 불용성이지만, 지하나 지표에서 높은 압력이나 낮은 pH 조건과 같은 다양한 환경에 의해 용해되어 수중으로 유입된다. 일반적으로 망간은 철과 아주 유사한 상태로 수중에 존재하며, 보통 철과 함께 존재하거나 단독으로 존재한다. 그러나 망간은 철과 달리 pH 8.0 이하에서는 자연적으로 산화되지 않으므로 생물학적 과정에 의해서만 산화가 일어난다고 알려져 있다[7].

미생물에 의한 망간 산화는 1913년에 최초로 보고[4]된 이후 *Pseudomonas* [8,16,17,25], *Citrobacter* [11], *Arthrobacter* [12], *Leptothrix* [5,10,24], *Bacillus* [28] 등의 다양한 미생물이 망간 산화기작에 관여한다고 보고되고 있고, 또 이 기작은 단백질에 의한 것이라고 확인되고 있다. 특히 이들 연구 중에서 *P. fluorescens* GB-1 [25]에서 250 kDa의 MOF1과 180 kDa의 MOF2 단백질로 구성된 manganese oxidizing factor (MOF)가, *Leptothrix disciphora* [1]에서 각각 106 kDa과 110 kDa, 180 kDa과 260 kDa의 분자량을 갖는 manganese oxi-

dizing protein이 부분 정제되어 생물학적 망간산화기작은 효소가 관여하고 있음을 부분적으로 증명하기도 하였다. 그러나 아직까지 망간산화에 관련된 효소를 순수분리하고 정제한 바 없어 화학무기 영양적이나 혼합 영양적으로 망간 산화 과정 중 미생물이 에너지를 획득할 수 있다는 뚜렷한 증거는 확인되지 않고 있다.

일반적으로 토양, 담수, 해수에서 생성되는 생물학적 망간 산화물은 결정성이 약하고, 부정형이지만[26], 자연계에 결정화되어 존재하고 있는 기존의 망간산화물 보다 훨씬 다양하고 많은 양의 미량원소를 흡착 할 수 있는 능력을 가지고 있어 생물학적인 망간 산화과정은 망간의 순환뿐 아니라, 산화된 망간에 흡착되는 이들 미량원소들의 지화학적 순환[24]과 망간 단괴 형성[12]에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 생물학적 망간 산화물은 광산에서 배출되는 배출수에 함유된 독성 중금속 이온과 음용수 내에 과도하게 함유된 망간을 생물학적 방법으로 제거하는데 활용할 수 있을 뿐 아니라[3], 세균과 곰팡이의 망간 산화결과 나타나는 식물의 망간 결핍 현상을 해결하는데 이용할 수 있고, 망간이 산화될 때 발생하는 부산물인 hydrogen peroxide의 생성 및 이들의 제거를 통해 세포의 활성을 높여주는 기작[15,27]은 노화를 촉진하는 유해산소(free radical)의 제거 기술에 응용할 수 있어 생물학적 망간 산화물은 매우 다양하게 이용

\*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8770, Fax : +82-42-629-8769

E-mail : krpark@hnu.kr

될 수 있다.

본 실험은 광물자원의 활용, 농업, 생물학적정화, 음용수 처리 등에서 다양하게 이용될 수 있는 망간 산화기작에 대한 연구의 일환으로, 망간산화 기작이 우수한 균을 충청남도 병천 일원의 토양에서 분리하고 망간 산화능이 가장 우수한 것으로 선별, 동정된 *Pseudomonas* sp. MN5를 대상으로 이 균의 최적 성장 조건과 생리적인 특성을 확인하고 망간 산화 단백질을 정제하여 그 특성과 서열을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리 및 배지

충청남도 병천 일원의 6곳의 토양을 채취하여, 각각 1 g을 멸균 생리식염수 100 ml이 들어 있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 그 현탁액 100  $\mu$ l를 망간 최소배지[5]에 접종하고 2-3일 배양한 다음, 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 세균집락은 망간 최소(LD) 고체배지에 접종해서 30°C에서 배양하며 갈색 콜로니를 형성하고 생장이 가장 우수한 균주를 육안으로 확인하고, 최소배지에서 망간산화능이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 또 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 [21]와 Biochemical tests for identification of medical bacteria [23]에 의거하여 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하였고, 당 이용능과 증급속, 향생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

### 16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의 genomic DNA를 CTAB방법[29]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, USA)을 사용하여 분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search (www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 비교, 분석 하였다.

### 망간 산화능 조사

망간산화 단백질의 활성은 Okazaki의 방법[25]으로 측정하였다. 45 mM acetic acid에 0.04% leucoberbelin blue를 첨가한 반응액 1 ml에 기질로  $MnCl_2$ 를 100  $\mu$ M이 되게 첨가한 후, 시료 0.2 ml을 넣어 망간 산화능을 측정하였다. 반응액은 상온에서 10분간 반응시킨 후, 분광광도계(SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BioRad)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시료를 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였으며,  $KMnO_4$ 를 시료 대신 사용하여 망간의 산화된 정도를 비교 분석하는 표준곡선으로 사용하였다. 이때 40  $\mu$ M의  $KMnO_4$ 는 100  $\mu$ M의  $MnO_2$ 와 같은 산화 값을 갖는다. 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 7.5, pH 8, pH 9, pH 10 으로 각각 조정하여 균 배양액을 첨가한 후 망간 산화능을 조사하였다

### 망간 산화 단백질 정제

#### Ammonium sulfate 분획집전

단백질 정제 실험을 위해 LD 액체 배지 200 ml에 *Pseudomonas* SP. MN5를 접종하여 30°C에서 12시간 전 배양한 후, 2 l 배지에 접종하여 동일조건(30°C, 200 rpm)으로 24 시간동안 본 배양을 실시하였다. 균주 배양 후 원심분리를 통해 분리된 균체를 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 완충액으로 3번 세척 후 동일 완충액 100 ml로 현탁하고, 얼음에서 30초 파쇄 후 30초 쉬는 방법으로 30분간 파쇄(output watts 220 W; fisher scientific 550 sonic dismembrator) 하였다. 그 후 원심분리(10,000 $\times$  g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 얻었으며, 상등액에 포함되어 있는 망간산화물의 제거를 위해 상등액을 -20°C에서 3시간 보관 후 녹이는 과정을 3회 이상 반복하고 동일 조건으로 원심분리하여 침전물로 망간산화물을 분리하였다. 이 상등액을 40% ammonium sulfate로 침전시킨 후 4°C, 10,000 $\times$  g에서 20분동안 원심분리하여 상등액은 제거하였다. 여기서 생긴 침전물은 10 mM HEPES-NaOH 완충액 30 ml에 녹인 후, centrifugal filter 장치(3,000 millipore amicon ultra, MWCO) 를 이용(5,000 $\times$  g, 40 min, 4°C)하여 완충액을 교환하였다. 이때 완충액은 새로운 완충액으로 3회 교체하여 주었다.

#### Ion Exchange column Chromatography

Sepharose로 충전된 HiTrap Q fast flow (FF) column (5 ml)을 fast protein liquid chromatography (FPLC, Äkta purifier, GE)에 장착하여 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 완충액으로 평형화시킨 후, 완충액에 녹아 있는 시료를 0.45  $\mu$ m

millipore filter로 여과하여 5 ml을 주입하였다. 그리고 유속을 1 ml/min.로 하여 75분 동안 75 ml의 0에서 1 M까지의 NaCl-10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)완충용액을 흘려주면서 linear gradient elution을 실시하였다. 단백질의 용출은 280 nm에서 흡광도로 측정하였으며 각 분획마다 망간산화 단백질의 활성을 측정하여 활성을 갖는 분획을 모두 모아서 centrifugal filter 장치를 이용하여 200 µ로 농축 후 다음 단계에 사용하였다.

**Gel Filtration Chromatography**

Silica-type SEC (size-exclusion chromatography)으로 충전된 TSK-G3000sw XL (TOSOH BIOSIENCE LLC, USA) column (7.8 mm I.D.×30 cm)을 FPLC에 장착하여 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 완충용액으로 평형화한 후, HiTrap Q FF column에서 얻은 시료를 200 µ를 주입하였다. 유속은 0.5 ml/min로 48.5 분간 총 23.5 ml의 완충액을 흘려주었고, 각 분획마다 망간 산화 단백질의 활성을 측정하였다.

**SDS-PAGE 전기영동**

망간산화 단백질의 분자량은 Laemmli 방법[22]에 따라 12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide 전기영동장치(PROTEIN II xi cell, Bio-Rad, USA)를 이용하여 확인하였고, 이때 표준 단백질로는 BioRad사의 Precision Plus Protein™ Standard (10 to 250 KDa)를 사용하였다. 각 실험중의 단백질 정량은 Bradford 분석법[6]을 이용하였으며, 표준 용액으로는 bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다.

**단백질 서열분석**

망간 산화능이 있는 단백질을 얻기 위해 FPLC를 통해 정제한 시료를 12% SDS-PAGE에 전기영동한 후, 망간이 500 µM 첨가된 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 완충액에서 갈색으로 변하는 활성 밴드가 나타날 때 까지 염색을 하였다. 활성 밴드에서 단백질을 추출하기 위해 활성 밴드만을 분쇄하여 완충액(10 mM HEPES-NaOH, pH7.5)에서 현탁시켜 12% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 transfer buffer (20 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% methanol)를 사용하여, polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, USA)을 이용하여 transfer(25 V, 30 min)하였다. Transfer가 끝난 PVDF membrane으로부터 단백질 밴드를 잘라 상온에서 세척 및 건조한 후 액체 크로마토그래피 전기분무이온화 탠덤질량분석기(ESI-MS/MS, QTOF2 Micromass, Micromass)를 이용하여 단백질의 내부서열을 확인하였고, N-말단 단백질 서열분석기(Perkin 491A, Perkin-Elmer, USA) 를 이용하여 단백질의 N-말단의 서열을 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**망간 산화 균주의 분리, 선별, 동정 및 생리·생화학적 특성**

충청남도 천안시 병천면 일원의 6곳의 토양 현탁액을 망간 최소 평판 배지에 도말하여 집락을 형성하는 망간 산화 균주를 분리하고, 망간 최소 평판배지에서 갈색을 나타내고 100 µM MnCl<sub>2</sub>가 포함된 망간 최소 배지에서의 생장과 망간 산화능이 가장 우수한 한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다.

최종 선별된 균주는 그람음성의 무포자 호기성 간균으로 운동성이 있고, 질산염에만 양성반응을 나타낼 뿐, catalase, indole 생성, methyl red, Voges-proskauer, starch hydrolase, urease등에 음성반응을 나타냈다(Table 1). 당 이용능 조사에서 이 균주는 fructose와 maltose만 이용하고, arabinose, sorbose, ribose, cellobiose, 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 *Pseudomonas* sp. 으로 동정 되어 *Pseudomonas* sp. MN5라 명명하였다.

*Pseudomonas* sp. MN5의 항생제에 대한 내성조사 결과 이 균은 ampicillin과 spectinomycin에서 약한 내성을 나타내고, 다른 항생제에 대한 내성은 전혀 없는 것으로 확인 되었다. 또 *Pseudomonas* sp. MN5의 중금속에 대한 내성 시험 결과, Ba, Li과 Mn은 각각 3.6 mg/ml까지의 높은 내성을 나타내었고, Ni은 900 µg/ml, Co와 Cr는 450 µg/ml, Cu는 140 µg/ml의 농도까지 그리고 Cd는 10 µg/ml, Hg은 5 µg/ml까지 내성을 나타내어, 망간산화능이 있는 *Aeromonas* sp. MN44보다[20] 항생제와 중금속에 대해 비교적 높은 내성을 갖는 것으로 확인되었다(Table 3).

***Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화능**

*Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화능을 LD배지에서 균체

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. MN5

Characteristics	Characteristics
Gram	- Catalase -
Spore	- Starch -
Shape	short rod Urease -
Colony color	cream Hydrogen sulfide -
Colony Form	rod Casein -
Motility	+ Methyl red -
Indole	- Voges-Proskauer -
Citrate	- M <sub>ac</sub> Conky's -
Nitrate	+ Eosin Methylene Blue -
Gelatin	- Fluorescence -
Oxidase	-

+, positive; -, negative

Table 2. Utilization of various carbon sources in *Pseudomonas* sp. MN5

Carbon source	Utilization	Carbon source	Utilization
Arabinose	-	Maltose	+
Cellobiose	-	Mannitol	-
Fructose	+	Mannose	-
Galactose	-	Rhamnose	-
Glucose	-	Ribose	-
Glycine	-	Sorbose	-
Lactose	-	Sucrose	-
Trehalose	-	Xylose	-

+, growth; -, no growth

Table 3. Susceptibility of *Pseudomonas* sp. MN5 to various antibiotics and heavy metals

Antibiotics	MIC (µg/ml)	Heavy metals	MIC (µg/ml)
ampicillin	80	Ba	3600
chloramphenicol	≤1	Cd	10
kanamycin	≤1	Co	450
spectinomycin	12	Cr	450
streptomycin	≤1	Cu	140
tetracycline	≤1	Hg	5
Heavy metals	MIC (µg/ml)	Li	3600
Ni	900	Mn	3600

생육과 함께 주기적으로 측정해본 결과, 접종 후 6시간 후에 정지기로 접어들었으며, 망간 산화능은 배양 3시간 후부터 나타나기 시작해 배양 21시간 후에 최고치를 나타낸 후 배양 약 24시간 후부터 점차 감소하였다(Fig. 1). 이러한 망간 산화능 변화는 Okazaki [25]의 결과와 비슷한 결과이다.

망간산화 단백질이 세포내에 존재하는지 아니면 세포외에 존재하는지 파악하기 위해, 세포외로 분비되는 물질인 세포 배양액과 초음파를 이용해 세포를 파쇄시켜 얻은 세포내부 물질을 이용해 망간 산화능을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 *Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화능은 세포외 분비물질인 세포배양액에서 검출되지 않았고, 초음파로 세균을 용균시킨 시료에서 망간산화능이 검출되어 망간산화기작은 세포내부에 존재하는 단백질에 의해 이루어지는 것으로 확인되었다. 이와 같이 세포내 효소에 의해 망간산화가 진행되는 균이 *Pseudomonas* [17], *Citrobacter* [10], *Arthrobacter* [11]에서 이미 보고된 바 있다. 그러나 *Leptothrix* [1,5]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 5분 가열 처리를 한 후의 망간 산화능을 측정된 결과 proteinase

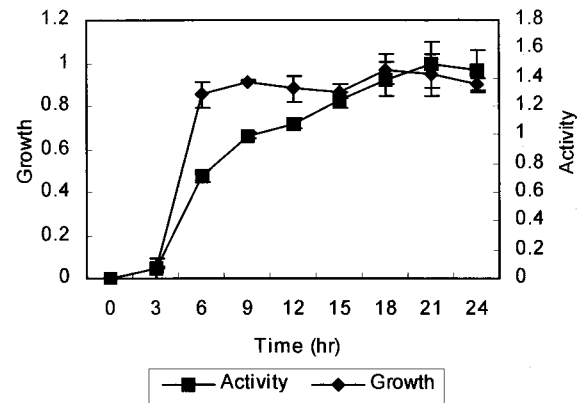


Fig. 1. Time course changes in manganese oxidizing protein and cell growth. *Pseudomonas* sp. MN5 was grown in Mn-containing LD broth at 30°C, and Mn oxidizing activity was measured using leucoberbelin blue.

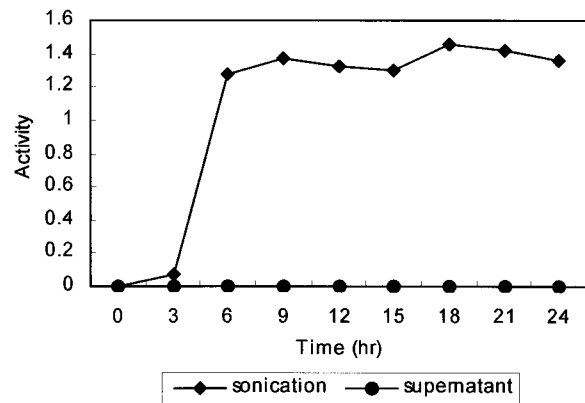


Fig. 2. Time course change of manganese oxidizing protein for supernatant and sonication. Cultures were grown in LD medium at 30°C, and Mn oxidizing activity was measured using leucoberbelin blue.

K와 가열 처리를 한 것의 망간 산화능이 처리하지 않은 것에 비해 각각 1.6%와 0.8%만 남아있어(Table 4) *Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화능은 Okazaki [25]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 7.5, pH 8, pH 9, pH 10 으로 조정하여 pH에 따른 망간 산화능을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 pH 4~6 의 산성 pH에서는 망간 산화능이 저조하였고 pH 7~10 에서 망간 산화능이 우수하여 *Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화는 중성부터 약 알칼리성에서 잘 이루어짐을 확인하였다. 이 결과는 역시 Okazaki [25]의 pH 범위와 일치되는 결과이다.

### 망간 산화 단백질의 정제

조효소액(crude extract)을 정제하기 위한 첫 번째 단계로

Table 4. Effect of inhibitor for manganese oxidizing protein

Sample	Mn oxidizing activity (OD <sub>620</sub> )	Reveal activity (%)
Standard	1.455	100
Proteinase K	0.012	1.6
Boiling	0.011	0.8

Cultures were grown in LD broth and Mn oxidizing activity was measured with leucoberbelin blue.

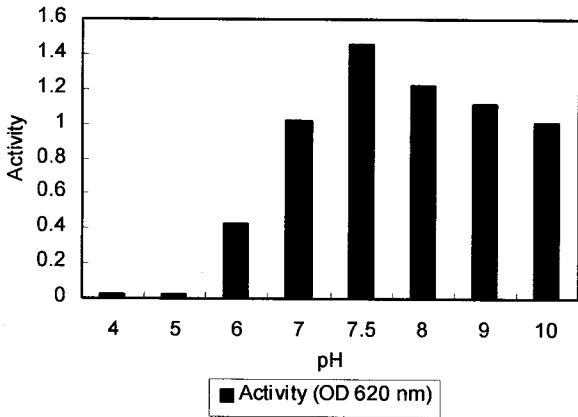


Fig. 3. Effect of pH on manganese oxidation in *Pseudomonas* sp. MN5. *Pseudomonas* sp. MN5 was buffered with 10 mM HEPES-NaOH at different pH, and Mn oxidizing activity was measured using leucoberbelin blue.

ammonium sulfate (40%)를 이용한 단백질 침전을 실시하였고, 다음 단계로 FPLC를 이용한 ion exchange chromatography를 실시하였다. 그러나 ammonium sulfate를 이용한 단백질 침전물에 다량의 망간산화물이 단백질과 함께 존재하고 있어 단백질 농도 측정과 망간 산화능 측정에 방해가 되었을 뿐만 아니라 ion exchange chromatography의 column이 막히는 결과가 나타났다. 이 문제를 해결하기 위해 시료를 얼리고 녹이는 과정(freeze & thaw)을 수차례 반복한 뒤 원심분리(10,000× g, 40 min)를 하여 망간산화물과 단백질을 분리 할 수 있었다. 이 방법을 통해 얻은 상등액을 FPLC에 장착된 HiTrap Q FF column에 통과시켜, column에 붙지 않고 한꺼번에 빠져나오는 부분을 모아서 농축을 하였고, 농축된 단백질을 FPLC에 장착된 HPLC용 TSK-G3000sw XL column을 통과하여 망간 산화 단백질을 정제하였다. 그 결과 ammonium sulfate로 침전된 것의 망간산화능은 specific

activity는 조효소액에 비해 12.9배 농축되었고, HiTrap Q FF 처리한 것은 21.9배, TSK-G3000sw XL은 37.3배 농축되었음을 확인하였다(Table 5).

각 단계에서 정제된 단백질을 12% SDS-PAGE를 전기 영동한 결과(Fig. 4) 단일 밴드가 아닌 여러 개의 밴드가 나타났고, 정제된 단백질을 native gel에 loading한 후 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>이 포함된 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 완충액에서 갈색의 활성 밴드가 나타날 때 까지 염색하여 밴드를 확인한 결과 15 kDa (MOP1), 46.7 kDa (MOP2), 63.5 kDa (MOP3) 크기를 갖는 3개의 활성 밴드가 확인 되었다. 그리고 이 밴드를 각각 잘라내어 LC/ESI-MS를 이용하여 내부서열을 분석한 결과, MOP1은 내부서열이 ADQGEGLDLEFR으로 나타났고, 이 서열을 BLAST에서 비교한 결과 MOP1은 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a의 outer membrane porin과 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A의 porin D와 각각 83%의 상동성을 나타내었다. 또 MOP3의 내부서열은 LVLALTPR로, *Geobacter sulfurreducens* PCA의 type II secretion system protein 과 *Pseudomonas putida* KT2440의 secretion protein, *Pseudomonas putida* F1의 general secretion pathway protein D와 관련이 있는 것으로 확인되었다. 그러나 DGQVML로 확인된 MOP2의 내부서열은 너무 짧아

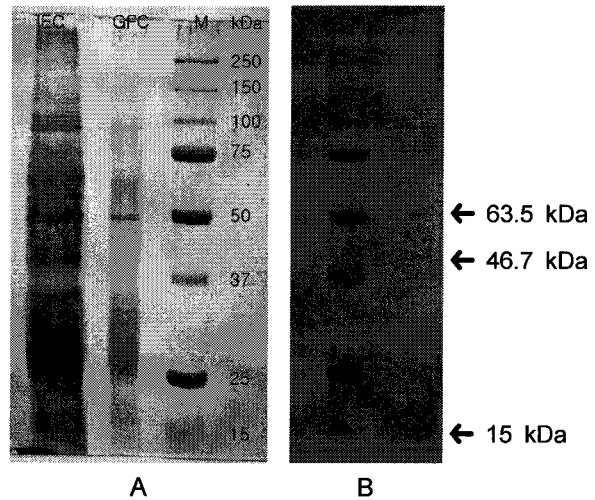


Fig. 4. Coomassie brilliant blue stained 12% SDS-polyacrylamide gel after electrophoresis of manganese oxidizing protein. A, Lanes: 1, IEC (ion exchange chromatography); 2, GFC (gel filtration); M, protein standard. B, Lanes: M, protein standard; 1, eluted active band.

Table 5. Purification of manganese oxidizing protein from *Pseudomonas* sp. MN5

Fraction	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Crude extract	30	1580.3	2998.8	1.90	100.0	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	10	234.5	5750	24.52	197.7	12.9
HiTrap Q FF	2	91.8	3818	41.61	127.3	21.9
TSK-G3000sw XL	0.4	1.6	113.4	70.84	4.5	37.3

BLAST에서 상동성을 갖는 단백질이 확인되지 않았다.

활성 밴드 중 가장 크기가 작은 MOP1을 PVDF 막에 trans-blotting 한 후 N-말단 단백질 서열분석기를 이용하여 단백질의 서열을 분석을 한 결과, 이 단백질의 서열이 SPFVG로, *Rickettsia australis*의 outer membrane protein A와 18.5 bits (identities 100%, 5/5)의 score를 나타내어 LC/ESI-MS를 이용한 내부서열 분석결과와 같이 막 단백질임을 확인하였다.

따라서 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. MN5의 망간 산화 단백질은 막 단백질과 연관이 있고, Brouwers [8]가 1999년에 보고한 것처럼 막 단백질 중 외막의 porin 단백질과 type II secretion system protein 그리고 general secretion pathway protein과 연관이 있는 것으로 추정된다. 또 균주에 따라 다양한 유전자가 망간 산화에 관련된다는 보고와 [2,9, 13,14,16], porin 단백질 중 OmpC와 OmpF가 양이온의 투과에 관여를 한다는 사실에 비추어 볼 때 [18], 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. MN5도 하나가 아닌 다양한 단백질을 세포막에 만들어 망간을 산화시키고, 또 OmpC와 OmpF 중 하나 또는 두 단백질 모두가 망간의 산화에 관여할 것이라 생각된다. 그러나 일부 연구에서 망간의 흡수 기작에 type I secretion system인 ABC transporter [19]가 관여한다는 보고도 있어, 망간 산화 균은 균주에 따라 outer membrane protein과 독자적 또는 연관성 있는 조절기작에 의해 망간을 산화시키고 에너지를 획득할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 지금까지 밝혀지지 않았던 망간산화 단백질의 서열과 그 peptide들의 기능을 일부 확인하였지만, 망간 산화에 관여하는 유전자를 찾고 그 유전자에 의해 나타나는 단백질들의 정확한 기능과 성질을 밝히기 위해 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 요 약

충청남도 병천면 일대의 6곳의 토양시료를 채취하여 망간을 산화하는 균주들을 순수분리 하고, 이 중 망간 산화능이 가장 우수한 한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 최종 선별된 균주의 생리, 생화학적 특성을 조사하고, 16S rRNA 염기 서열분석 등을 통하여 동정한 결과 최종 선별된 균주는 *Pseudomonas* sp. MN5로 확인되었다. *Pseudomonas* sp. MN5은 fructose와 maltose를 제외한 다양한 당을 이용하지 못하였으며, 항생제인 kanamycin, chloramphenicol, streptomycin 그리고 tetracycline에는 높은 감수성을 보이고, 리튬, 망간, 바륨과 같은 중금속에 대해서는 mg/ml 단위의 높은 내성을 나타냈다. 그리고 *Pseudomonas* sp. MN5의 망간산화 최적 pH는 7.5이고, 망간산화 활성이 proteinase K와 가열처리를 한 시료에서 저해되었다. *Pseudomonas* sp. MN5가 생성하는 망간산화 단백질을 ammonium sulfate precipitation, HiTrap Q FF ion exchange chromatography 그리고

G3000sw XL gel filtration chromatography를 통해서 정제한 결과, 15 kDa, 46.7 kDa 그리고 63.5 kDa의 세종류의 manganese oxidizing protein가 확인되었고, 내부서열과 N-말단 서열 분석 결과 *Pseudomonas* sp. MN5가 생성하는 망간산화 단백질은 외막의 porin 단백질인 것으로 추정되었다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

1. Adams, L. F. and W. C. Ghiorse. 1987. Characterization of extracellular Mn21-oxidizing activity and isolation of an Mn21-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.* **169**, 1279-1285.
2. Beliaev, A. S. and D. A. Saffarini. 1998. *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe (III) and Mn (IV) reduction. *J. Bacteriol.* **180**, 6292-6297.
3. Berbenni, P. A. Pollice, R. Canziani, L. Stabile, F. Nobili. 2000. Removal of iron and manganese from hydrocarbon-contaminated groundwaters. *Bioresource Technology* **74**, 109-114.
4. Beyerinck, M. W. 1913. Oxidation des Mangancarbonates durch Bacterien und Schimmelpilze. *Folia Microbiol.* **2**, 123-134.
5. Booger, F. C. and J. P. M. de Vrind. 1987. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.* **169**, 489-494.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
7. Bradley, P. M., J. E. Landmeyer and R. S. Dinicola. 1998. Anaerobic oxidation of [1,2-<sup>14</sup>C] dichloroethene under Mn (IV)-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1560-1562.
8. Brouwers, G. J., J. P. M. de Vrind, P. L. A. M. Corstjens, P. Cornelis, C. Baysse and E. W. de Vrind-de Jong. 1999. cumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1762-1768.
9. Caspi, R., B. M. Tebo and M. G. Haygood. 1998. c-Type Cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3549-3555.
10. Dickinson, W. H., F. Caccavo, JR., B. Olesen and Z. Lewandowski. 1997. Ennoblement of stainless steel by the manganese-depositing bacterium *Leptothrix discophora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2502-2506.
11. 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.

12. Ehrlich, H. L. 1968. Bacteriology of manganese nodules. II. Manganese oxidation by cell-free extract from a manganese nodule bacterium. *Appl. Microbiol.* **16**, 197-202.
13. Godfrey, B. J., L. Akileswaran and M. H. Gold. 1994. A reporter gene construct for studying the regulation of manganese peroxidase gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1353-1358.
14. Hao, Z., S. Chen and D. B. Wilson. 1999. Cloning, Expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4746-4752.
15. Harazono, K., R. Kondo and K. Sakai. 1996. Bleaching of Hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without addition of MnSO<sub>4</sub>. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 913-917.
16. Hassett, D. J., M. L. Howell, U. A. Ochsner, M. L. Vasil, Z. Johnson and G. E. Dean. 1997. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. *J. Bacteriol.* **179**, 1452-1459
17. Jung, W. K. and R. Schweisfurth. 1979. Manganese oxidation by an intracellular protein of a *Pseudomonas* species. *Z. Allg. Microbiol.* **19**, 107-115.
18. Kim, B. H. 2003. *Microbial physiology*, pp. 496-568, 3rd eds., Academy-book. Korea.
19. Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, R. A. Baker and H. F. Jenkinson. 1998. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn<sup>2+</sup> uptake. *J. Bacteriol.* **180**, 290-295.
20. Koo, J. S. and K. R. Park. 2005. A study on the manganese oxidation and characteristics of *Aeromonas* sp. MN44. *Kor. J. of Life Science* **15**, 94-99.
21. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
23. MacFaddin, J. F. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, pp. 624-731, 3rd eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
24. 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.
25. 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.
26. Post J. E. 1999. Manganese oxide minerals: crystal structures and economic and environmental significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3447-3454.
27. Rothschild, N., A. Levkowitz, Y. Hadar and C. G. Dosoretz. 1999. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 483-488.
28. 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.
29. 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.