

Article

대한민국 울진 연안 해양에서 분리한 해양 미생물 *Ruegeria* sp. 50C-3의 동정 및 내열성 효소 생산

지원재¹ · 김종희² · 박재선³ · 홍순광^{3*}

¹국립생물자원관 유용자원분석과, ²서일대학교 식품영양과, ³명지대학교 생명과학정보학과

Identification of a new marine bacterium *Ruegeria* sp. 50C-3 isolated from seawater of Uljin in Korea and production of thermostable enzymes

Won-Jae Chi^{1†}, Jong-Hee Kim², Jae-Seon Park³, and Soon-Kwang Hong^{3*}

¹Biological and Genetic Resource Assessment Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

²Department of Food and Nutrition, Seoul University, Seoul 02192, Republic of Korea

³Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 17058, Republic of Korea

(Received August 24, 2016; Revised September 5, 2016; Accepted September 8, 2016)

ABSTRACT: A marine bacterium, designated as strain 50C-3, was isolated from a seawater sample collected from the East Sea of South Korea. The strain is a Gram-negative, aerobic, yellow colored polar-flagellated bacterium that grows at 20-50°C and pH 5.5-8.5. Optimal growth occurred at 40-50°C, at pH 6.5-7.5, and in the presence of 2% (w/v) NaCl. Based on 16S rRNA gene sequence similarity, the isolate was considered to represent a member of the genus *Ruegeria*. The result of this analysis showed that strain 50C-3 shared 99.4% and 96.98% sequence similarity with *Ruegeria intermedia* CC-GIMAT-2^T and *Ruegeria lacuscaerulensis* ITI-1157^T, respectively. Furthermore, strain 50C-3 showed clear differences from related strains in terms of several characteristics such as motility, carbon utilization, enzyme production, etc. The DNA G+C content was 66.7 mol%. Chemotaxonomic analysis indicated ubiquinone-10 (Q-10) as the predominant respiratory quinone. Based on phenotypic, chemotaxonomic, and phylogenetic characteristics, the isolate represents a novel variant of the *Ruegeria intermedia* CC-GIMAT-2^T, for which we named *Ruegeria* sp. 50C-3 (KCTC23890=DSM25519). Strain 50C-3 did not produce cellulase and agarase, but produced alkaline phosphatase, α -galactosidase, and β -galactosidase. The three enzymes showed stable activities even at 50°C and thus regarded as thermostable enzymes. Especially, the β -galactosidase activity enhanced by 1.9 times at 50°C than that at 37°C, which may be very useful for industrial application.

Key words: *Ruegeria* sp. 50C-3 KCTC23890; DSM25519, α -galactosidase, β -galactosidase

Ruegeria 속(genus)은 Uchino 등(Uchino *et al.*, 1998)에 의해 최초로 제안되었으며, 이전에 보고되었던 종인 *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *Roseobacter algicola* (Rüger and Höfle, 1992)를 각각 type species인 *Ruegeria atlantica*, *Ruegeria gelatinovorans*, *Ruegeria algicola*로 다시 명명하여 *Ruegeria* 속에 포함시켰다. 이후, *R. gelatinovorans*는 *Thalassobius gelatinovorans*로 재분류되었고(Arahal *et al.*, 2005) *R. algicola* 역시 *Marinovum algicola*로 재분류되었다

(Martens *et al.*, 2006). 대신, *Silicibacter* 속에 포함되어 있던 *Silicibacter lacuscaerulensis*와 *Silicibacter pomeroyi*는 각각 *Ruegeria lacuscaerulensis*와 *Ruegeria pomeroyi*로 재분류되었다(Yi *et al.*, 2007). 현재까지, *Ruegeria* 속에는 12개의 종인 *R. atlantica* (Uchino *et al.*, 1998), *R. lacuscaerulensis*, *R. pomeroyi* (Yi *et al.*, 2007), *R. mobilis* (Muramatsu *et al.*, 2007), *R. scottmollicae* (Vandecastelaere *et al.*, 2008), *R. marina* (Huo *et al.*, 2011), *R. faecimaris* (Oh *et al.*, 2011), *R. halocynthia* (Kim *et al.*, 2012), *R. conchae* (Lee *et al.*, 2012), *R. arenilitoris* (Park and Yoon, 2012), *R. intermedia* (Kämpfer *et al.*, 2013), *R. meonggei* (Kim *et al.*, 2014)가 보고되었다. *Ruegeria* 속은

*For correspondence. E-mail: skhong@mju.ac.kr;
Tel.: +82-31-330-6198; Fax: +82-31-335-8249

막대형(rod-shaped)의 호기성 그람-음성 비광합성 세균이며, catalase-양성, oxidase-양성, DNA G+C 함량은 55%-68% 범위에 속하는 것으로 알려져 있다(Yi *et al.*, 2007). 고온성 호수에서 분리한 *R. lacuscaerulensis*를 제외한 모든 *Ruegeria* 종은 해수 환경에서 분리되었다(Petursdottir and Kristjansson, 1997). 지금까지 *Ruegeria* 속에 관한 연구논문은 총 42편이 보고되었으며, 이 중의 절반은 미생물 분류에 대한 내용이다. 나머지 대부분은 *R. pomeroyi* 균주에 관한 논문으로, dimethylsulfoniopropionate (DMSP), polyphosphate의 대사 경로(Achbergerová and Nahálka, 2014; Brummett *et al.*, 2015), algicidal lactones 생합성(Riclea *et al.*, 2012), 유전체 및 프로테옴 분석(Christie-Oleza *et al.*, 2012) 등에 관련한 내용이다. 따라서 *Ruegeria* 속의 여러가지 생물학적 속성에 관한 연구는 전혀 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는, 대한민국 울진 해변에서 분리한 *Ruegeria* 속 미생물의 분류학적 특성과 이 균주가 생산하는 효소 생산의 특징에 관하여 기술하였다.

재료 및 방법

고온성 해양 미생물의 분리

대한민국 경상북도 울진 근해의 해수를 채취하여 멸균수에 10^{-1} – 10^{-5} 로 희석한 후 Marine Broth 2216 (MB, Difco) 평판 고체배지에 도말 하였다. 평판고체배지제작은 agar 대신에 고온에 안정한 0.8% (w/v) gelrite (Duchefa)를 첨가하여 제작하였다. 도말한 평판고체배지는 50°C에서 2일간 배양하였으며, 성장한 콜로니를 새로운 MB 평판고체배지에 연속적으로 계대배양하여 순수하게 미생물을 분리하였다. 이 중 하나의 콜로니를 50C-3으로 명명하고, 본 연구에 사용하였다.

16S rRNA 유전자 서열 해독 및 계통수 제작

균주 50C-3을 MB 액체배지에 접종하고 50°C에서 2일간 진탕 배양 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체만을 회수하였다. 회수된 균체로부터 염색체 DNA를 Genomic DNA extraction kit (DyneBio)로 추출하여 PCR 주형으로 사용하였다. 16S rRNA 유전자는 bacterial universal primer (27F와 1492R)를 사용하여 증폭하였으며(Stackebrandt and Goebel, 1994), 증폭된 DNA 단편은 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝 한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 16S rRNA 유전자 서열은 GenBank에 Q237690으로 등록하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BlastN program (Altschul *et al.*, 1997)을 사용하여 GenBank database의 정보

로부터 염기서열의 상동성 검사를 수행하였다. 또한 EzTaxon database (<http://www.eztaxon.org/>)로부터 표준 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 확보하여 계통발생적 연관성을 분석하였다(Chun *et al.*, 2007). 확보된 염기서열들 간의 Multi alignment는 ClustalW program (Thompson *et al.*, 1994)을 사용하였고 5'-과 3'-말단의 gap은 BioEdit program (Hall, 1999)으로 편집하였다. 진화적 거리(evolutionary distance matrix)는 Kimura's two-parameter evolutionary model (Kimura, 1983)에 의해 계산하였고, Neighbour-joining (NJ) 법(Saitou and Nei, 1987)으로 계통수를 제작하였다. 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새롭게 tree를 제작하여 계산하였다.

균주 50C-3의 형태적·생리적 특성 분석

균주 50C-3은 Gram stain kit (BD)를 사용하여 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 균주 50C-3의 균체 크기 및 모양 그리고 편모의 유무는 2일간 평판고체배지에서 배양된 균체를 1% phosphotungstic acid로 염색한 후 투과전자현미경(JEM1010, JEOL)으로 관찰하였다. 탄소원 사용 및 발효, 효소생산 등의 생리적 특성은 API 20NE와 API ZYM kit (bioMérieux)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 단, 제공되는 배지에 NaCl을 최종농도 2%가 되도록 첨가하여 50°C에서 24시간 배양한 후 관찰하였다. 균주 50C-3의 성장 특성은, NaCl을 최종농도 0–10% (w/v, 1% 간격)가 되도록 첨가한 MB-gelrite 평판고체배지에 균주를 접종한 후 4일간 배양하여 성장을 관찰하였다. pH 변화에 따른 균주 50C-3의 성장은, pH 5.0–pH 10.0 (pH 0.5 간격)의 평판고체배지를 만들어 균주를 접종한 후 4일간 배양하여 성장을 관찰하였다. 또한 배양온도에 따른 성장은 4, 10, 15, 20, 28, 37, 40, 45, 50, 55°C에서 각각 4일간 배양하여 성장 정도를 관찰하였다.

50C-3 균주의 생화학적 특성 분석

생화학적 특성 분석에는 균주 50C-3를 MB-gelrite 평판고체배지로 40°C에서 2일간 배양 후 회수된 균체를 사용하였다. Isoprenoid quinones은 추출 후 역상 고속 액체크로마토그래피(reverse phase High Performance Liquid Chromatography)로 분석하였다(Komagata and Suzuki, 1987). 균체의 지방산은 메틸-에스터화 시킨 fatty acid methyl esters (FAME) 혼합물을 Microbial Identification system (MIDI)의 지침에 따라 가스 크로마토그래피(gas chromatography) 분석법으로 분석하였다(Sasser, 1990). Genomic DNA의 G+C 함량은 역상 고속 액체크로마토그래피를 이용하였다(Mesbah *et al.*, 1989).

균주 50C-3의 성장 및 효소 생산능력 분석

균주 50C-3을 ASW (Artificial Sea Water)-YP [6.1 g Tris base, 12.3 g MgSO₄, 0.74 g KCl, 0.13 g (NH₄)₂HPO₄, 17.5 g NaCl, 0.14 g CaCl₂, 1% yeast extract, 0.3% bacto peptone; per L; pH 7.2] 액체배지에 접종하고 28°C, 37°C, 50°C에서 7일 동안 진탕 배양하면서(180 rpm), 일정시간 간격으로 샘플을 채취하였다. 각 샘플의 흡광도를 600 nm에서 측정(OD₆₀₀)하여 샘플의 균체 성장 정도를 측정하였고, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 샘플 상등액만을 취하여 효소 활성을 측정하였다. Agarase 효소활성은 0.2% agarose를 기질로 하고 20 mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충액을 사용하여 40°C에서 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법(Temuujin *et al.*, 2012)으로 540 nm에서 흡광도(OD₅₄₀)를 측정하였다. Galactosidase 활성은 인공발색용 기질인 *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside와 *p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside를 각각 사용하여, α -D-galactosidase 및 β -D-galactosidase 활성을 측정하였다. 반응완충액(100 mM potassium phosphate; pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄) 500 μ l에 기질 용액(*p*-nitrophenyl α/β -D-galactopyranoside, 4 mg/ml) 200 μ l를 섞어 40°C에서 5 분간 온도를 평형화 시켰다. 각 기질에 위에서 준비한 효소액 500 μ l를 섞어 37°C, 50°C에서 15분간 반응시켰다. 반응은 1 M Na₂CO₃ 용액 500 μ l를 넣어 정지시키고, 420 nm에서의 흡광도(OD₄₂₀)로 기질로부터 유리된 *p*-nitrophenol의 양을 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성은 galactosidase 활성 측정과 유사한 방법으로 측정하였다. 단, 기질은 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP), 반응완충액은 150 mM Tris-Cl (pH 8.8)을 사용하였다.

결과 및 고찰

균주 50C-3의 형태적 특징

균주 50C-3 세포는 그람-음성, 막대형이며, 극성편모를 갖고 있다(Fig. 1). 50C-3은 호기성 미생물이며, 1–4% (w/v) NaCl 존재 하에서 성장하며, 최적 NaCl 농도는 2% (w/v)이고, NaCl이 없거나 5% (w/v) 이상 농도에서는 성장할 수 없다. 50C-3은 20–50°C에서 성장할 수 있으며 최적성장 온도는 40–50°C이고, 4°C 이하 또는 55°C 이상에서는 성장할 수 없다. 또한, pH 5.5–8.5 범위에서 성장할 수 있고, 최적성장 pH는 6.5–7.5이며, pH 5.0 과 pH 9.0에서는 성장하지 않았다.

균주 50C-3의 계통발생학적 연관관계

균주 50C-3은 16S rRNA 유전자 서열분석 결과, *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T와 가장 높은 상동성(99.4%)을 보였다. 비록 비교할 수 있는 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T의 16S rRNA 유전자 서열은 총 1,334 염기로 97% 만 비교대상이 되었지만, 이중 8개 만이 다른 염기서열을 갖고 있었다. 그 외 *Ruegeria* 종들의 16S rRNA 유전자 서열은 50C-와 비교했을 때 상동성이 97% 이하 - *R. lacuscaeruleus* ITI-1157^T (96.9%), *R. atlantica* IAM 14463^T (95.9%), *R. pomeroyi* DSS-3^T (95.5%), *R. halocynthia* MA1-6^T (95.2%) - 로 나타났다. 일반적으로 16S rRNA 유전자 서열의 상동성이 기존의 표준균주와 비교 시 98.7%이하이면 신종으로 인정하고 있다(Stackebrandt and Goebel, 1994; Stackebrandt and Ebers, 2006). 따라서, 균주 50C-3은 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T와 같은 종에 속하는 변종으로 예상되었다.

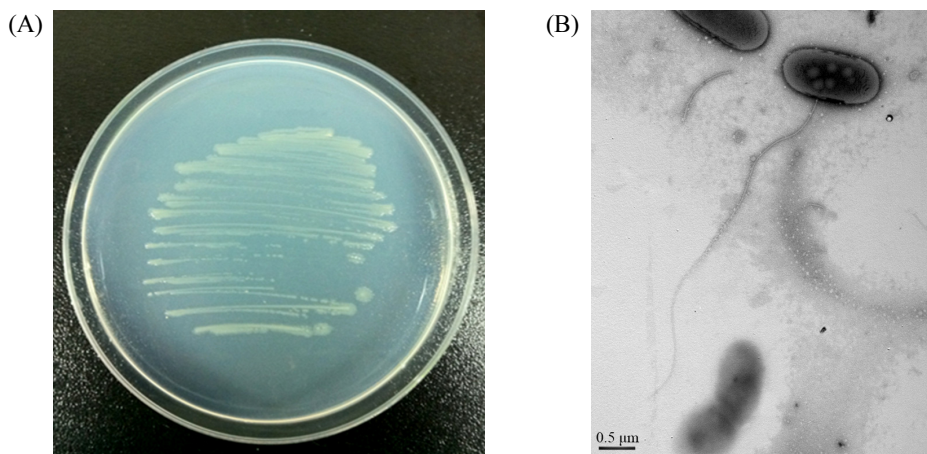


Fig. 1. Colony morphology and transmission electron microscopy (TEM) of strain 50C-3. The strain was grown on marine broth 2216-gelrite plates at 50°C for 2 days. (A) Colony morphology on the plate. (B) TEM analysis of the cell after negative staining.

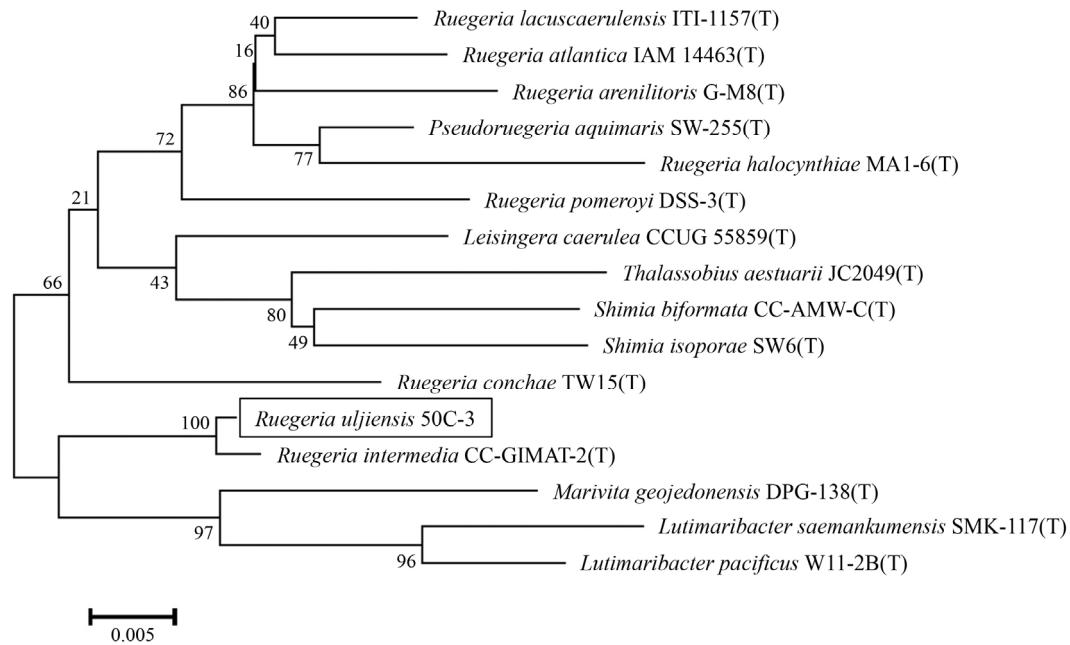


Fig. 2. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain 50C-3 and the type strains of the genus *Ruegeria*. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura's 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site.

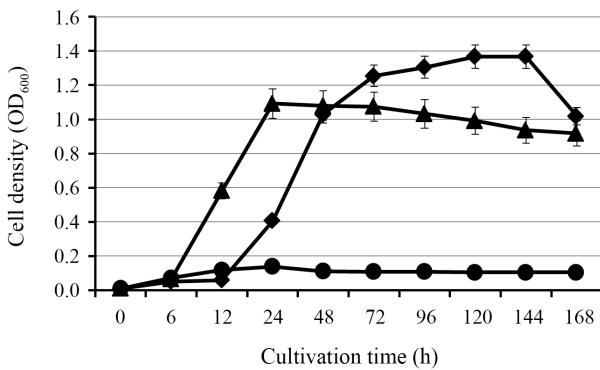


Fig. 3. Cell growth of 50C-3 in ASW (Artificial Sea Water)-YP broth depending on cultivation time at three different temperatures. All data shown are mean values ($P < 0.05$) from at least three replicate experiments. (◆) 28°C, (▲) 37°C, (●) 50°C.

16S rRNA 유전자 서열을 기초로 작성한 NJ 계통수(phylogenetic tree)에서도 50C-3과 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T가 다른 *Ruegeria* 종들과는 확실히 구분되는 진화학적 위치를 보여주었다(Fig. 2). 이들 결과로부터 우리는 50C-3 균주가 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T 표준균주의 변이 아종(subspecies)일 것으로 예상하였다.

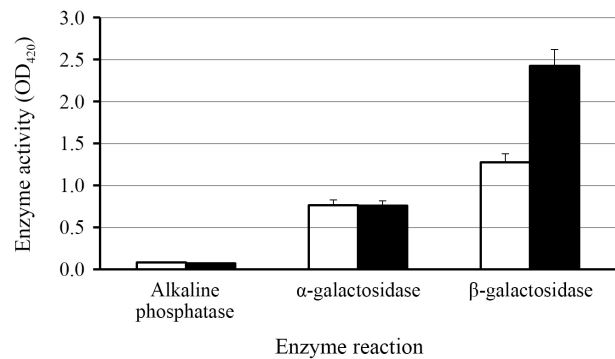


Fig. 4. Alkaline phosphatase, α -galactosidase, and β -galactosidase activities in the crude extract of culture broth of 50C-3. The 50C-3 was cultured in ASW-YP broth at 28°C for 5 days and crude enzyme was prepared by removing the cell. The enzyme activities were measured at 37°C (white bar) and 50°C (black bar). All data shown are mean values ($P < 0.05$) from at least three replicate experiments.

균주 50C-3의 생화학적 특성

Ruegeria 종의 다른 구성종과 동일하게 50C-3의 주요한 isoprenoid 퀴논은 ubiquinone-10이었다(Huo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012, 2014; Kämpfer *et al.*, 2013). *Ruegeria* 종의 주요 세포 지방산은 C_{18:1}ω7c와 11-methyl C_{18:1}ω7c로 보고되었는데(Muramatsu *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2011; Park and Yoon,

2012), 50C-3의 세포 지방산 역시 C_{18:1}ω7c (48.50%)와 11-methyl C_{18:1}ω7c (10.53%)이 주성분으로 검출되었다. 50C-3 균주의 DNA G+C 함량은 66.7%로 보고된 *Ruegeria* 종의 DNA G+C 함량 범위(55–68 mol%)에 속하였다(Uchino *et al.*, 1998; Vandecandelaere *et al.*, 2008). 특히 50C-3 균주는 16S rRNA 유전자 서열 상동성이 가장 높은 *R. intermedia*와 대부분의 형태학적 특징이 동일하였지만, 극성 편모에 의한 운동성을 갖는다는 점에서 확연한 차이를 보였다(Fig. 1B). 효소활성에서도 50C-3 균주는 α-galactosidase 및 β-galactosidase 활성을 보였고, 유일 탄소원으로 포도당을 이용하지 못한다는 점에서 *R. intermedia*와 분명한 차이점을 보였다(Table 1). 이러한 유전학적, 형태학적, 생화학적 특성 분석 결과, 50C-3 균주는 표준 균주인 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T와는 다른 아종으로 결론지었다.

균주 50C-3의 성장 특성

평판고체배지상에서 배양했을 때, 50C-3 균주는 MB 배지,

ASW-YP 배지에서는 성장하는 반면, LB (Luria Bertani), ASW 배지에서는 성장하지 못했다. 액체배양 시에는 MB 배지와 ASW-YP 배지에서 성장을 보였으며, MB 배지 보다는 ASW-YP 배지에서 더 좋은 성장을 나타냈다.

ASW-YP 배지에서 배양온도를 달리하여 배양했을 때, 28°C에서 가장 좋은 성장을 보였는데 접종 후 점차적으로 성장이 증가하여 5–6일째에 최대 성장(OD₆₀₀=1.36)을 보였다. 37°C에서 배양한 경우에는 빠르게 성장하여 배양 1일째에 최대 성장(OD₆₀₀=1.09)을 보인 후 서서히 세포 밀도가 감소하였다. 50°C에서 배양한 경우에도 빠르게 성장하여 배양 1일째에 최대 성장(OD₆₀₀=0.14)을 보인 후 서서히 감소하였다. 따라서 균주의 최대성장 온도는 28°C이지만, 배양시간을 고려한 경제적 효율성은 37°C에서 배양하는 것이 좋을 것으로 판단하였다.

균주 50C-3이 생산·분비하는 효소의 특성

균주의 배양온도에 따른 성장곡선으로부터 최대 성장을 보인 28°C, 5일 배양액으로부터 세포를 완전히 제거한 효소의

Table 1. Phenotypic and chemotaxonomic characteristics that differentiate strain 50C-3 from *Ruegeria* species. Strains: 1, strain 50C-3; 2, *Ruegeria intermedia* CC-GIMAT-2^T (Kämpfer *et al.*, 2013); 3, *Ruegeria lacuscaerulensis* ITI-1157^T (Petursdottir *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2007); 4, *Ruegeria atlantica* IAM 14463^T (Rüger and Höfle, 1992; Yoon *et al.*, 2007); 5, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3^T (Yi *et al.*, 2007). Symbols: +, positive reaction; -, negative reaction; W, weak positive

Characteristics	1	2	3	4	5
Origin	Coastal seawater	Coastal hot spring	Geothermal lake	Marine sediment	Coastal seawater
16S rRNA gene sequence similarity	100	99.4	96.98	95.99	95.5
Colony color	yellow	cream	tan	colorless	cream
Motility	+	-	-	-	+
Growth at:					
4°C	-	-	-	-	-
50°C	+	+	+	-	-
0% NaCl	-	-	-	-	-
5% NaCl	-	-	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	+	+	-
Hydrolysis of:					
Aesculin	+	+	+	+	-
Gelatin	-	-	-	-	+
Enzymatic activities					
α-Galactosidase	+	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	-	-
β-Galactosidase	+	-	-	-	-
α-Glucosidase	-	-	+	w	-
Utilization of:					
D-Glucose	-	+	-	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	+	+	-
Maltose	-	-	-	+	-

조추출액(crude-extract)을 제조하였다. 조추출액에 존재하는 여러 분해효소(hydrolytic enzymes) 활성을 측정한 결과, skim milk나 casein 분해 능력은 전혀 나타나지 않았다. 이는 50C-3 균주가 단백질 성분으로 구성된 LB 배지에서 성장하지 않은 이유를 설명해 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 cellulase, agarase 활성도 전혀 관찰되지 않았다. 하지만 약한 alkaline phosphatase 활성이 관찰되었는데, 효소활성은 50°C (OD₄₂₀=0.075) 보다 37°C (OD₄₂₀=0.084)에서 반응시켰을 때 약간 증가하였다. α-Galactosidase 활성은 비교적 강하게 나타났으며, 효소활성은 역시 50°C (OD₄₂₀=0.759) 보다 37°C (OD₄₂₀=0.766)에서 반응시켰을 때 미세하게 증가하였다. 특이한 것은 아주 강한 β-galactosidase 활성이 관찰되었으며, 효소활성은 37°C (OD₄₂₀=1.276) 보다 50°C (OD₄₂₀=2.424)에서 현저히 증가(1.9 배)하여, 이 효소는 50°C에서도 안정적으로 작용할 수 있는 내열성 효소일 것으로 판단되었다. Alkaline phosphatase와 α-galactosidase도 37°C와 50°C에서의 활성차이가 미미한 결과로부터, 이 두 효소도 내열성 효소일 가능성이 클 것으로 사료되었다.

β-Galactosidase는 대표적으로 락토오스를 갈락토오스와 포도당으로 전환시켜 미생물에게 탄소원과 에너지를 공급하는 중요한 역할을 한다. 또한, 유당불내증 환자를 위한 유당 제거우유 제조 및 기타 유제품 제조에 광범위하게 사용되는 효소이다. 이외에도, 다양한 기능을 갖는 galactooligosaccharides 제조(Sangwan *et al.*, 2015), 감미료 steviolbioside 합성(Chen *et al.*, 2016), steroidal saponins의 갈락토실화(Zhang *et al.*, 2016) 등에도 이용되며, 최근에는 인체의 노화 및 여러 병리학 적 치료법 개발의 일환으로 다양한 연구가 진행되어지고 있다(Zhou *et al.*, 2015).

Mesophile 보다는 고온성 미생물인 *Ruegeria* 종에 관한 연구가 거의 이루어지지 않은 점을 감안하면, 본 연구는 여러 가지 산업적으로 중요한 내열성 효소를 본 균주가 생산할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 따라서, 50C-3 균주가 생산하는 내열성 효소의 특성을 규명하고 활용하는 연구가 필요하다.

적 요

대한민국 동해안 울진 앞 바닷물로부터 50-C로 명명한 해양 미생물을 분리하였다. 50-C 균주는 그람-음성, 호기성 세균이며, 노란색 집락을 형성하고, 극성편모를 갖는 박테리아이다. 이 균주는 20–50°C, pH 5.5–8.5 범위에서 자라며, 비교적 고온인 40–50°C, pH 6.5–7.5, 2% (w/v) NaCl에서 최적 성장을 보인

다. 16S rRNA 유전자 서열 분석결과 50C-3 균주는 *Ruegeria* 속에 속하는 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T, *R. lacuscaerulensis* ITI-1157^T의 16S rRNA 유전자 서열과 각각 99.4%, 96.98% 상동성을 보였다. 그러나 50C-3 균주는 운동성, 탄소이용능력, 효소생산능력 등의 생리학적 특성에서 두 균주와는 명확히 다른 특성을 보였다. 50C-3 균주의 DNA G+C content는 66.7 mol%이고, 주요한 respiratory quinone은 ubiquinone-10 (Q-10) 이었다. 이와 같은 형태학적, 생리학적, 유전학적 특성을 비교하여, 50C-3 균주는 *R. intermedia* CC-GIMAT-2^T와 같은 종에 속하는 새로운 변종으로 판단되며 *Ruegeria* sp. 50C-3으로 명명하였다(KCTC23890 = DSM25519). 50C-3 균주는 cellulase, agarase 활성은 없었지만, alkaline phosphatase, α-galactosidase, β-galactosidase를 생산하였고 이들 모두 50°C에서도 활성이 좋은 내열성 효소일 것으로 판단되었다. 특히, β-galactosidase의 경우 37°C에서 보다 50°C에서의 활성이 1.9배 증가하여 산업적으로 활용성이 클 것으로 예상된다.

GenBank accession number and strain deposit

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain 50C-3 is JQ237690. The strain 50C-3 was deposited in DSM (DSM25519) and KCTC (KCTC23890).

감사의 말

본 논문은 농촌진흥청연구사업(PJ01129301)의 지원해 의해 이루어진 것임.

References

- Achbergerová, L. and Nahálka, J. 2014. Degradation of polyphosphates by polyphosphate kinases from *Ruegeria pomeroyi*. *Biotechnol. Lett.* **36**, 2029–2035.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, A., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Arahal, D.R., Macián, M.C., Garay, E., and Pujalte, M.J. 2005. *Thalassobius mediterraneus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Reugeria gelatinovorans* as *Thalassobius gelatinovorans* comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2371–2376.

- Brummett, A.E., Schnicker, N.J., Crider, A., Todd, J.D., and Dey, M. 2015. Biochemical, kinetic, and spectroscopic characterization of *Ruegeria pomeroyi* DddW - A mononuclear iron-dependent DMSO lyase. *PLoS One* **10**, e0127288.
- Chen, J.M., Ding, L., Sui, X.C., Xia, Y.M., Wan, H.D., and Lu, T. 2016. Production of a bioactive sweetener steviolbioside via specific hydrolyzing ester linkage of stevioside with a β -galactosidase. *Food Chem.* **196**, 155–160.
- Christie-Oleza, J.A., Miotello, G., and Armengaud, J. 2012. High-throughput proteogenomics of *Ruegeria pomeroyi*: seeding a better genomic annotation for the whole marine *Roseobacter* clade. *BMC Genomics* **13**, 73.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y.Y., Kim, M.J., Kim, S.I., Kim, B.K., and Lim, Y.W. 2007. ExTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2259–2261.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- Huo, Y.Y., Xu, X.W., Li, X., Liu, C., Cui, H.L., Wang, C.S., and Wu, M. 2011. *Ruegeria marina* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 347–350.
- Kämpfer, P., Arun, A.B., Rekha, P.D., Busse, H.J., Young, C.C., and Glaeser, S.P. 2013. *Ruegeria intermedia* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a coastal hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 2538–2544.
- Kim, Y.O., Park, S., Nam, B.H., Jung, Y.T., Kim, D.G., and Yoon, J.H. 2014. *Ruegeria meonggei* sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from ascidian *Halocynthia roretzi*. *Antonie van Leeuwenhoek* **105**, 551–558.
- Kim, Y.O., Park, S., Nam, B.H., Kang, S.J., Hur, Y.B., Lee, S.J., Oh, T.K., and Yoon, J.H. 2012. *Ruegeria halocynthiae* sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 925–930.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Komagata, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. *Methods Microbiol.* **19**, 161–207.
- Lee, J., Whon, T.W., Shin, N.R., Roh, S.W., Kim, J., Park, S.K., Kim, M.S., Shin, K.S., Lee, J.S., Lee, K.C., *et al.* 2012. *Reugeria conchae* sp. nov. isolated from the ark claim in the South sea of Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 2851–2857.
- Martens, T., Heidom, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B.J., and Brinkhoff, T. 2006. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.*, 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1293–1304.
- Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W.B. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 159–167.
- Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K., and Nakagawa, Y. 2007. *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the *Alphaproteobacteria* isolated in Japan and Palau. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1304–1309.
- Oh, K.H., Jung, Y.T., Oh, T.K., and Yoon, J.H. 2011. *Ruegeria faecimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 1182–1188.
- Park, S. and Yoon, J.H. 2012. *Ruegeria arenilitoris* sp. nov., isolated from the seashore sand around a seaweed farm. *Antonie van Leeuwenhoek* **102**, 581–589.
- Petersdottir, S.K. and Kristjansson, J.K. 1997. *Silicibacter lacuscaerulensis* gen. nov., sp. nov., a mesophilic moderately halophilic bacterium characteristic of the Blue Lagoon geothermal lake in Iceland. *Extremophiles* **1**, 94–99.
- Ricea, R., Gleitzmann, J., Bruns, H., Junker, C., Schulz, B., and Dickschat, J.S. 2012. Algicidal lactones from the marine *Roseobacter* clade bacterium *Ruegeria pomeroyi*. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 941–950.
- Rüger, H.J. and Höfle, M.G. 1992. Marine star-shaped-aggregate forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom., rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **42**, 133–143.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sangwan, V., Tomar, S.K., Ali, B., Singh, R.R., and Singh, A.K. 2015. Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 4206–4215.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Inc., Newark, DE, USA.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard. *Microbiol. Today* **33**, 152–155.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846–849.
- Temuujin, U., Chi, W.J., Park, J.S., Chang, Y.K., Song, J.Y., and Hong, S.K. 2012. Identification and characterization of a novel β -galactosidase from *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548, an anaerobic fecal bacterium. *J. Microbiol.* **50**, 1034–1040.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A., and Sugiyama, J. 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia*

- stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregate* sp. nov., nom. Rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Reugeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kielense* gen. nov., sp. nov., nom. Rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 201–210.
- Vandecastelaere, I., Nercissian, O., Segart, E., Achouak, W., Faimali, M., and Vandamme, P.** 2008. *Ruegeria Scottomollicae* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2726–2733.
- Yi, H., Lim, Y.W., and Chun, J.** 2007. Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* Petursdottir and Kristjansson 1999 to the genus *Ruegeria* Uchino *et al.* 1999. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 815–819.
- Zhang, J., Lu, L., Lu, L., Zhao, Y., Kang, L., Pang, X., Liu, J., Jiang, T., Xiao, M., and Ma, B.** 2016. Galactosylation of steroidal saponins by β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* L3. *Glycoconj. J.* **33**, 53–62.
- Zhou, D., Yin, D., Xiao, F., and Hao, J.** 2015. Expressions of senescence-associated β -galactosidase and senescence marker protein-30 are associated with lens epithelial cell apoptosis. *Med. Sci. Monit.* **21**, 3728–3735.