

지구온난화에 따른 북극 극지 미생물의 지방산 변화  
관측을 통한 membrane fluidity 변화 연구

The study of membrane fluidity change in Arctic bacterial  
by global warming through microbial phospholipid fatty acid analysis



건국대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “국내 학·연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)”에 관한 연구 “지구온난화에 따른 북극 극지 미생물의 지방산 변화 관측을 통한 membrane fluidity 변화 연구” 과제의 최종보고서 (평가 후 출판 보고서)로 제출합니다.



연구기관명 : 건국대학교

연구책임자 : 양 영 헌

참여연구원 : 최 태 림

“ : 박 예 림

“ : 이 혜 수

“ : 이 선 미

“ : 박 솔 이

“ : 송 현 석

# 요 약 문

## I. 제 목

지구온난화에 따른 북극 극지 미생물의 지방산 변화 관측을 통한 membrane fluidity 변화 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제는 지구온난화에 따른 북극 극지 미생물의 지방산 변화 관측을 통한 membrane fluidity 변화 연구를 목표로 하며, 이를 통한 지구온난화에 따른 북극 미생물의 환경, 영양과의 상호작용 연구를 진행하였음.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

2종 이상의 북극 유래 균주 (Gram positive, Gram negative)의 온도에 따른 (1) 지방산 기반 membrane fluidity 변화 분석, (2) transcriptome 변화 분석, (3) 대사체 분석을 통한 지구 온난화에 따른 온난화 북극 미생물 내의 변화와 환경 변화에 미치는 영향 연구를 수행하였음.

- (1) 지방산 기반 membrane fluidity 변화 분석
  - Psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별
  - 극지 미생물 성장 조건 영향 연구
  - 지방산 기반 membrane fluidity 분석
- (2) Transcriptome 변화 분석
  - Transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정
  - Transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석
  - 온난화 관련 주요 유전자 발굴
- (3) 대사체 분석을 통한 지구 온난화에 따른 온난화 북극 미생물 내의 변화와 환경 변화에 미치는 영향 연구
  - 세포 내 대사체 분석
  - 세포 외 대사체 분석
  - 영양 환경에 따른 영향 연구

## IV. 연구개발 결과

- (1) Psychrophile / mesophile 성격을 가진 미생물 선별
  - 연구 대상 극지 미생물 연구를 통하여 42종의 북극 토양 유래 Gram +/- 발굴
  - Psychrophile의 특성 이외의 Hydrolase나 carbon storage molecule 생산능 등 특성 파악
- (2) 극지 미생물 성장 조건 영향 연구
  - 우수한 성장을 나타내는 성장 조건 검색
  - media, 온도 차이에 따른 성장 패턴을 연구
- (3) 지방산 기반 membrane fluidity 분석
  - PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석 및 온도별 연구하여 극지 미생물에 적용하여 Gram negative 박테리아의 경우 분석 방법, Membrane fluidity, Hydrophobicity 측정법 setup 완료
- (4) Transcriptome 비교를 위한 균주, 성장 조건, 유전자 정보 획득 (2종)
  - 균주 선정 및 균주 배양 조건, 게놈 시퀀싱을 통한 후보군 도출
  - 온도 특이적인 현상 관측 및 관련 유전자군 확인
- (5) Transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석 (1종)
  - 온도에 따른 타겟 선정후 후보군 선정- RT PCR을 통한 시간에 따른 영향 분석
  - 온도/시간 관련 변화군 관측
- (6) 온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악
  - 온도 변화와 관련한 유전자 선별
  - 항생제 내성 관련 유전자군 (CM/KM 내성과의 상관관계)
  - Cold shock 관련 유전자군 확인 (Mesophile의 응용가능성)
  - CFA 유전자의 활용
- (7) 세포 내외 대사체 분석
  - 대사체 분석을 위한 균주의 성장 조건 설정
  - 온도 차이에 의한 세포 내 대사체 비교를 통해 온도조건이 해당 미생물에 대해 미치는 영향 연구
- (8) 대사체 분석을 위한 균주의 성장 조건 설정
  - 온도 변화에 따른 세포 내 대사체 비교를 통해 온도조건이 미생물에 대해 미치는 영향 연구
  - 온도 조건을 포함한 탄소원의 종류 및 농도, 질소원 등 다양한 영양 환경의 변화에 따라 변화하는 미생물의 물질 생산량과 대응 파악 연구

## V. 연구개발결과의 활용계획

- (1) 학문적으로는 온도 변화에 따라 작용하는 membrane fluidity와 관련된 주요 유전자들을 타겟으로 한 심화 연구를 통하여 균주 robustness 증대 연구가 가능하며 외부에서 공급되는 영양성분에 따라서 변화하는 미생물의 phenotype에 대한 연구를 통한 기후변화에 따른 미생물 변화 예측 연구가 가능함.
- (2) 실용적으로는 주요 유전자, 지방산 구성분에 대한 정보와 미생물의 외부 스트레스와 영양성분 변화에 대한 반응 연구 방법은 균주 개량 tool로써 사용이 가능함.
- (3) Genome 정보를 통하여 유전자 정보 활용 (Cold shock protein, PHA 합성 유전자 등), 내성 극복 전략 / 강인성 증대 전략, 기존 균주들과 유사도가 낮은 균주들에 대한 특성 연구 진행 중.



# 목 차

## 제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

제 2 절 연구의 필요성

제 3 절 연구의 범위 및 연구체계

제 4 절 성과지표

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련 기술 현황

제 2 절 연구진의 선행연구의 내용 및 결과

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 이론적·실험적 접근방법

제 2 절 개발 목표에 따른 연구수행 내용

제 3 절 개발 연차별 연구수행 세부 내용

## 제 4장 연구 개발 목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연도별 연구목표

제 2 절 관련분야 기여도

## 제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획

## 제 6 장 참고문헌

# S U M M A R Y

## (영 문 요약 문)

### I. Title

The study of membrane fluidity change in Arctic bacterial by global warming through microbial phospholipid fatty acid analysis

### II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to monitor the temperature dependent change of membrane fluidity by analyzing phospholipid fatty acid using Gas chromatography- Mass spectrometry. Through this study, we will find the interaction of microbes with environment and nutrients. It will give an information on the impact of polar microbes by global warming.

### III. Contents and Extent of R&D

- Analysis of membrane fluidity and phospholipid fatty acid
- Genomic study and comparison of transcriptomic change
- Analysis of metabolites and the impact of nutrient on polar microbes

### IV. R&D Results

- Selection of Psychrophiles from polar soils
- Study of growth conditions for polar microbes
- Study of membrane fluidity by PLFA analysis
- Analysis of transcriptome of Pseudomonas sp. 14-6
- Selection of gene target related to temperature change
- Analysis of metabolites
- Effect on robustness and resistances of polar microbes

### V. Application Plans of R&D Results

- Finding of various temperature dependent target genes can be used to

improve the robustness of microbes for further applications.

- Information on fatty acid composition, stress related genes, carbon storage molecule related genes can be applied to practical area.
- More studies on membrane fluidity change by temperature related genes, exopolysaccharide from polar bacteria and low similarity isolates will be studied more.





# C O N T E N T S

## (영 문 목 차)

### Chapter 1 Introduction

1. The purpose
2. The necessity
3. Extent of R&D
4. Evaluation criteria

### Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations

1. Current R&D status
2. Previous studies of our group

### Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results

1. The theoretical and experimental access method
2. Research contents by topics
3. and research results by research year

### Chapter 4 Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute

1. Annual target of research
2. R&D goal achievement

### Chapter 5 Application Plans of R&D Results

### Chapter 6 References

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구의 목적

### 가. 과제의 목표

온도 상승에 따른 극지 미생물의 반응 변화를 목적으로, 북극 극지 미생물의 지방산 변화 관측 및 membrane fluidity 변화 연구를 통한 외부 환경 (nutrient, stress 등)과의 상호작용 연구를 목표로 한다.

○이를 통하여 학문적으로는

- (1) 온도 변화가 외부의 영양분 변화를 일으키고, 이것이 미생물 membrane 구성 성분에 영향을 미쳐 membrane fluidity에 어느 정도의 영향을 주는지
- (2) 온도의 변화가 직접적인 phospholipid에 영향을 미쳐 이것이 membrane fluidity에 영향을 주고, 그 결과로 외부의 영양분 변화 및 환경 변화가 발생하는지에 대한 연구가 가능할 것으로 보임.

○유형적인 결과들로 온도 관련 지방산 표지 인자, 외부 stress에 대한 반응 변화, 온도 관련 주요 유전자 및 주요 대사체의 검색이 가능할 것으로 보임.



○이를 위하여 2종 이상의 북극 유래 균주 (Gram positive, Gram negative)의 온도에 의하여 발생하는

- (1) 지방산 기반 membrane fluidity 변화
- (2) Transcriptome 변화
- (3) 대사체 변화

세 가지 부분에 대한 분석을 통하여 지구 온난화에 따른 온난화 북극 미생물 내의 변화와 환경 변화에 미치는 영향 연구를 수행할 예정임.

○PLFA를 통하여 얻어진 온난화 지표와 관련된 지방산을 중심으로, transcription 데이터를 해석하여 관련한 유전자를 찾고자 하며, 또한 온난화와 관련된 지방산 생성과 관련한 대사체의 변화를 monitoring함으로써 PLFA의 변화와 transcription, metabolite의 영향을 다각적으로 해석할 예정임.

나. 정성적 목표

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	2018	psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별	Gram +/- 연구 대상 극지 미생물 선별
		극지 미생물 성장 조건 영향 연구	우수한 성장을 나타내는 성장 조건 (온도, 배지, pH)검색
		지방산 기반 membrane fluidity 분석	PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석 및 온도별 비교 연구
2차년도	2019	transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정	transcriptome 비교를 위한 균주, 성장 조건, 유전자 정보 획득
		transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석	온도/시간에 따른 변화 transcriptome 분석
		온난화 관련 주요 유전자 발굴	온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악
3차년도	2020	세포내 대사체 분석	대사체 분석을 통한 세포내 대사물질 분석 및 온도에 따른 대사체 비교
		세포외 대사체 분석	대사체 분석을 통한 세포내 대사물질 분석 및 온도에 따른 대사체 비교
		영양 환경에 따른 영향 연구	영양 환경에 따른 미생물의 변화 연구

다. 정량적 목표

구분	국외논문(편)				국내논문(편)				특허출원(건)	
	SCI		SCIE		SCI		SCIE		국외	국내
	주저자	공저자	주저자	공저자	주저자	공저자	주저자	공저자		
1차년도	2									
2차년도	3	1								1
3차년도	2	1								1

## 제 2 절 연구의 필요성

### 가. 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- 지구 온난화로 인한 여러 영향 중 미생물에 미치는 영향에 대한 연구는 많지 않았음. 보통의 온대 열대지역의 경우 활발한 외부 균주들이 유입되어, 온도에 따른 각기 다른 최적 미생물들이 존재하고 있어 특정 미생물의 온도 변화에 따른 변화에 대한 연구보다 균집 구성상의 우점종의 변화에 대한 관심이 컸음.
- 이에 비하여 극지 환경은 외부 균주의 유입이 상대적으로 적은 closed system 으로서 본래 존재하는 극지 미생물들 간 population dynamics 영향이 큰 환경임. 따라서, 특정 미생물들이 주변 환경 요소에 따라 달라지는 cellular physiology를 여러 실험적 접근 방법으로 monitoring하는 연구는 매우 중요하며, 이 연구에서 극지 환경은 좋은 모델이 될 수 있음.

### 나. 관련 연구동향 및 독창성(창의성)

- 국내의 경우 극지미생물의 지방산 기반 membrane fluidity 연구 보고가 없음.
- 국외의 경우 미생물에 작용하는 stress (solvent, heat 등)나 cold adaptation과 관련한 다양한 연구들이 진행되고 있으며, membrane engineering 개념으로 미생물의 tolerance 증가를 통한 우수 생산 균주 개량을 위한 목적으로 연구되고 있음.
- Phospholipid는 membrane의 주 구성 성분으로 membrane fluidity에 매우 중요한 영향을 미치며, 온도, 영양분의 상태에 따라 cell membrane 조성 및 membrane을 통한 물질 운반 등 cellular physiology가 dynamic 하게 변화하는 성분임.
- 본 연구는 미생물이 온도 등과 같은 외부 스트레스에 대한 저항성의 최전선인 membrane 연구를 통하여 저온 내성 기작과 고온으로의 변화 시에 일어나게 될 현상들을 monitoring 하고자 함. 이를 통하여 온도 변화로 인하여 발생하게 되는 영양분의 변화가 membrane에 미치는 영향과 역으로 온도 변화로 인한 membrane 구성 변화가 영향분에 미치는 영향 등에 대한 연구를 수행 함.

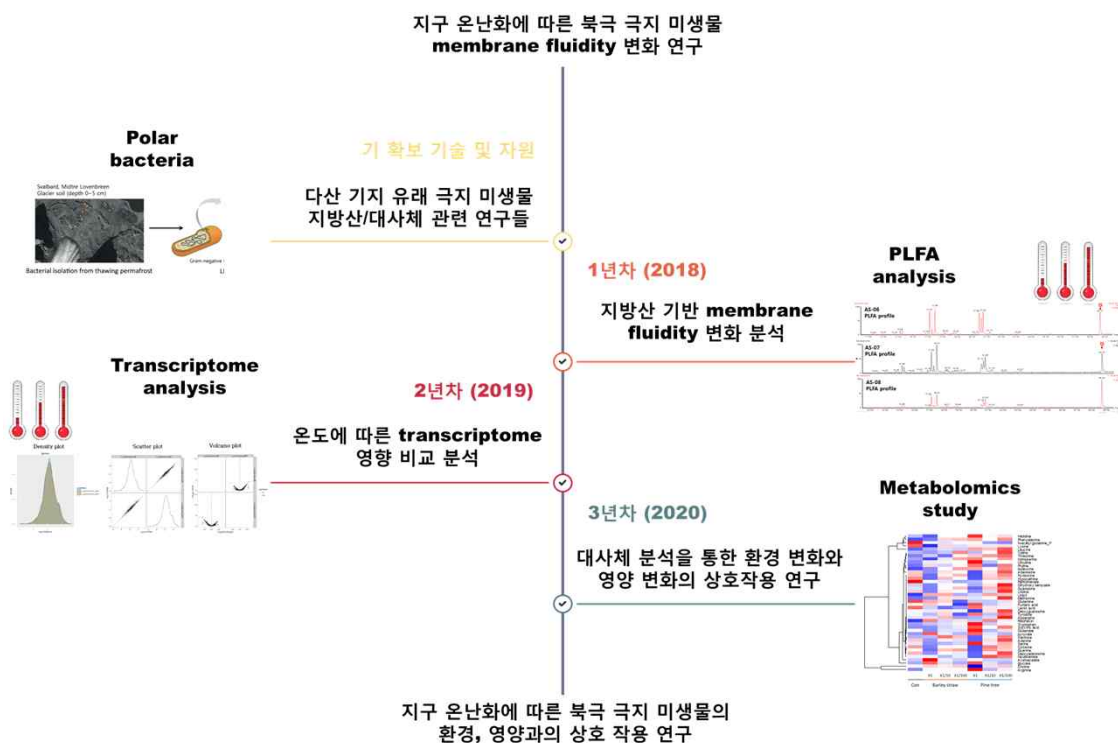
### 다. 연구과제의 중요성

- 조류의 경우, 달걀의 두께가 여러 환경적인 요인으로 인하여 변화하게 되어 종의 번식률이나 개체 수에 영향을 미치는 것과 마찬가지로 온도로 인한 극지 미생물의 membrane 변화는 극지 미생물의 외부 스트레스에 대한 대응 기작에 변화를 줄 것임.
- 미생물의 저온 내성 기작과 고온으로의 변화 시 미생물 환경 적응 및 변이 메커니즘에 대한 분석이 가능하여, 미생물의 스트레스 대응 기작에 대한 이해를 높일 수 있을 것으로 기대함.
- 미생물의 온도와 영양분과의 상호작용에 대한 이해는 자연 환경 내에 서식지인

토양의 상태에 미치는 영향까지 이해할 수 있어 기후변화에 따른 토양 상태 변화 예측에 토대가 되는 연구가 될 것임.

- 온도-영양분-미생물로 통상 이해되는 영향을 미치는 관계 뿐 만 아니라, 온도-미생물-영양요구도-영양분 사이의 새로운 가설에 대한 이해도 예상됨.
- 온도에 따른 미생물의 스트레스에 대한 적응 메커니즘 규명이 가능하며, 이후 많은 데이터가 축적된다면 지구 온난화로 인한 멸종 미생물 예측까지도 가능할 것으로 기대함.

### 제 3 절 연구의 범위 및 연구체계



#### 가. 연구의 범위

##### 1. 지방산 기반 membrane fluidity 변화 분석

- psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별
- 극지 미생물 성장 조건 영향 연구
- 지방산 기반 membrane fluidity 분석

##### 2. 유전체 변화 분석

- 유전체 비교를 위한 기초 조건 설정
- 유전체 분석을 통한 온도 영향 분석
- 온난화 관련 주요 유전자 발굴

##### 3. 대사체 분석을 통한 지구 온난화에 따른 온난화 북극 미생물 내의 변화와 환경 변화에 미치는 영향 연구

- 세포내 대사체 분석

- 세포외 대사체 분석
- 영양 환경에 따른 영향 연구

이를 통한 지구온난화에 따른 북극 미생물의 환경, 영양과의 상호작용 연구를 진행할 예정입니다.

나. 추진체계

- 극지 연구소로부터 다양한 극지 유래의 토양을 제공받거나 PAMC로부터 균주를 얻어 PLFA 분석 등을 실시할 예정이며, 극지 유래 토양으로부터 신규 미생물을 찾게 되면 PAMC에 다시 기탁을 할 예정입니다.



다. 연차별 연구목표

연차	연구 목표	연구 내용
1차 연도 (2018)	psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별	신규 미생물 발굴 및 특성 분석
	극저 미생물 성장 조건 영향 연구	우수한 성장 조건 검색
	지방산 기반 membrane fluidity 분석	PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석
2차 연도 (2019)	transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정	transcriptome 비교를 위한 균주, 성장 조건, 유전자 정보 획득
	transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석	온도/시간에 따른 변화 transcriptome 분석
	온난화 관련 주요 유전자 발굴	온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악 온도 관련 유전자의 활용
3차 연도 (2020)	온난화 관련 주요 유전자 발굴	온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악 온도 관련 유전자의 활용
	세포 외 대사체 분석	대사체 추출 및 분석 적용 방법과 결과에 따른 대사체 분석
	영양 환경에 따른 영향 연구	5. 영양 환경에 따른 membrane, PHA, EPS 분석

## 제 4 절 성과지표

### 가. 정성적 성과

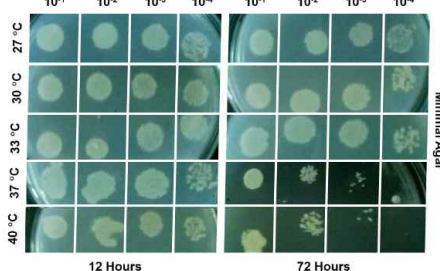
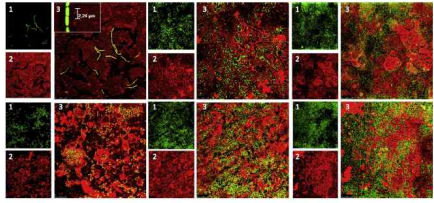
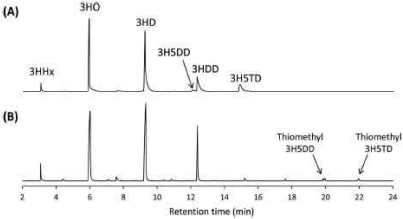
구분	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용*
2018년도	psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별	신규 미생물 발굴 및 특성 분석	- 극지 토양 유래 미생물을 영양최소 배지에 검색 - hydrolase, NaCl 등 관련한 특성 자 파악
	극지 미생물 성장 조건 영향 연구	우수한 성장 조건 검색	- 차년도 실험을 위하여 complex media 상에서의 성장 연구 - 온도 차이에 따른 성장 패턴을 연구
	지방산 기반 membrane fluidity 분석	PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석	- 지방산 추출을 통하여 neutral, glyco fatty acid를 제외한 PLFA 추출법 적용 - PLFA 추출 방법 적용 후 LC-MS를 사용하여 지방산 membrane 분석 - 극지미생물을 활용하여 Membrane fluidity, Hydrophobicity 측정법 setup 완료
2019년도	transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정	transcriptome 비교를 위한 균주, 성장 조건, 유전자 정보 획득	- 균주 선정 및 균주 배양 조건, 계능 시퀀싱을 통한 후보군 도출 - 온도에 따라 차이를 보이는 주요 현상들 (PLFA, total lipid, PHA, 항생제 내성, EPS 생산 등)을 미리 발굴하여 추후 transcriptome 분석과 연계하여 활용하려고 하였음.
	transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석	온도/시간에 따른 transcriptome 변화 분석	- 온도에 따른 타겟 선정 후 후보군에 대한 RT PCR을 통한 시간에 따른 영향 분석 - 기초조건 설정시에 나왔던 현상들과 관련한 mRNA expression data들을 모았으며,

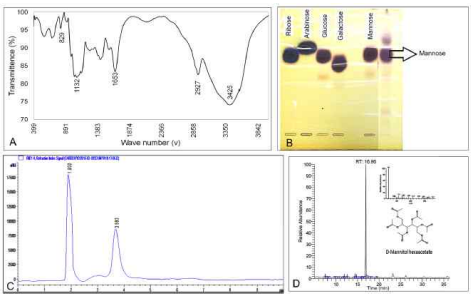
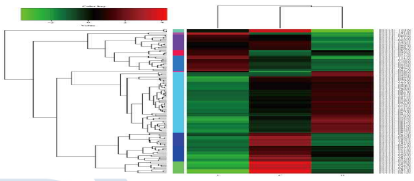
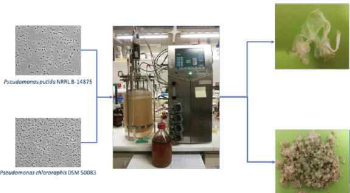


			RT PCR을 위한 RNA 추출법 등을 확립하였음.
	온난화 관련 주요 유전자 발굴	온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악 온도 관련 유전자의 활용	- 10도 25도의 온도 변화와 시간에 따른 지속적인 감소, 혹은 증가하는 유전자 군들을 선별하였으며, 이를 통한 다른 특이적인 현상과 연결하여 이유를 규명하려고 함. - 온도와 관련하여 나온 항생제 내성 주제나 CFA 활용 주제 등에 대한 확대 적용을 시도할 수 있음.
2020년도	세포 내 대사체 분석	대사체 추출 및 분석 적용 방법과 결과에 따른 대사체 분석	- LC/MS-MS 이용 대사체 생산 비교
	세포 외 대사체 분석	대사체 추출 및 분석 적용 방법과 결과에 따른 대사체 분석	- LC/MS-MS 이용 대사체 생산 비교
	영양 환경에 따른 영향 연구	5. 영양 환경에 따른 membrane, PHA, EPS 분석	- GC/MS를 이용한 methyl ester화된 PHA를 포함한 지방산 분석 - GC/MS를 이용한 TMS 유도체화된 다당류 분석

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련 기술 현황

연구수행 기관	연구개발 논문	연구개발 내용																								
Department of Microbiology, Stamford University Bangladesh	Influence of temperature on the growth of <i>Pseudomonas putida</i>	 <p>Minimal Agar</p> <p>12 Hours 72 Hours</p> <p>- 온도 변화에 따른 <i>Pseudomonas putida</i>의 성장 변화 규명</p>																								
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avda, Campus Curauma, Chile	Phenotypic and genotypic characterization of a novel multiantibiotic-resistant, alginate hyperproducing strain of <i>Pseudomonas mandelii</i> isolated in Antarctica	<p>Table 4 Alginate production of the <i>Pseudomonas</i> sp. 6A1 strain</p> <table border="1" data-bbox="874 987 1345 1070"> <thead> <tr> <th>Alginate production in µg/ml of uronic acid</th> <th>4 °C</th> <th>15 °C</th> <th>25 °C</th> <th>30 °C</th> <th>37 °C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Pseudomonas</i> sp. 6A1</td> <td>38.49 ± 6.87</td> <td>5.19 ± 1.06</td> <td>2.83 ± 0.79</td> <td>2.01 ± 0.63</td> <td>NG</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas fluorescens</i> AS96</td> <td>4.83 ± 1.81</td> <td>1.28 ± 0.12</td> <td>1.03 ± 0.33</td> <td>0.96 ± 0.14</td> <td>0.91 ± 0.07</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAOI-V</td> <td>NG</td> <td>1.32 ± 0.15</td> <td>0.98 ± 0.04</td> <td>1.02 ± 0.02</td> <td>1.72 ± 0.85</td> </tr> </tbody> </table> <p>NG: no growth</p> <p>- 극지에서 분리된 <i>Pseudomonas mandelii</i> 균주의 항생제 저항성 규명 및 alginate의 생산 연구</p>	Alginate production in µg/ml of uronic acid	4 °C	15 °C	25 °C	30 °C	37 °C	<i>Pseudomonas</i> sp. 6A1	38.49 ± 6.87	5.19 ± 1.06	2.83 ± 0.79	2.01 ± 0.63	NG	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AS96	4.83 ± 1.81	1.28 ± 0.12	1.03 ± 0.33	0.96 ± 0.14	0.91 ± 0.07	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAOI-V	NG	1.32 ± 0.15	0.98 ± 0.04	1.02 ± 0.02	1.72 ± 0.85
Alginate production in µg/ml of uronic acid	4 °C	15 °C	25 °C	30 °C	37 °C																					
<i>Pseudomonas</i> sp. 6A1	38.49 ± 6.87	5.19 ± 1.06	2.83 ± 0.79	2.01 ± 0.63	NG																					
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AS96	4.83 ± 1.81	1.28 ± 0.12	1.03 ± 0.33	0.96 ± 0.14	0.91 ± 0.07																					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAOI-V	NG	1.32 ± 0.15	0.98 ± 0.04	1.02 ± 0.02	1.72 ± 0.85																					
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avda, Campus Curauma, Chile	Alginate overproduction and biofilm formation by psychrotolerant <i>Pseudomonas mandelii</i> depend on temperature in Antarctic marine sediments	 <p>72h 96h</p> <p>- 저온 <i>Pseudomonas mandelii</i> 균주의 alginate 및 바이오필름 생성 연구</p>																								
Department of Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology	Gas chromatography-mass spectrometry-based monomer composition analysis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesized by <i>Pseudomonas</i> spp	 <p>(A) 3HHx 3HO 3HD 3HSD 3HDD 3HSTD</p> <p>(B) Thiomethyl 3HSD Thiomethyl 3HSTD</p> <p>Retention time (min)</p> <p>- GC-MS를 이용한 <i>Pseudomonas</i> 속 균주의 mcl-PHA 생산과 분석</p>																								

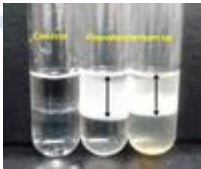

<p>Plant Biotechnology Laboratory, Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Kharagpur</p>	<p>Sphingobactan, a new <math>\alpha</math>-mannan exopolysaccharide from Arctic <i>Sphingobacterium</i> sp. TKGP-BTPF3 capable of biological response modification</p>	 <p>- 독특한 형태의 exopolysaccharide를 생산하는 미생물과 구조의 분석</p>
<p>Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, State Oceanic Administration, China</p>	<p>Transcriptome analysis of the Antarctic psychrotrophic bacterium <i>Psychrobacter</i> sp. G in response to temperature stress</p>	 <p>- 저온 미생물 Psychrobacter에 대한 온도 조건에 따른 발현 변화 연구</p>
<p>Department of Food and Nutritional Sciences, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, UK</p>	<p>Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by <i>Pseudomonas</i> strains valorizing crude glycerol by-product</p>	 <p>- <i>Pseudomonas</i> 속 미생물을 이용한 PHA 및 bioemulsifier 동시생산</p>

## 제 2 절 연구진의 선행연구의 내용 및 결과

### 가. 선행 극지 관련 과제들

과 제 명	연구기간	연구비 (천원)	연구책임자	연구 내용
○극지 미생물의 환경적응 기작 연구를 위한 정량적 대사체 프로파일링 기술 개발 (PAP 과제)	2014.06.10~2015.05.31	160,000	김 윤 곤 (송실대) / 양 영 현 (공동연구자)	○유전체 분석이 완료된 극지미생물 대사산물 연구를 위한 모델 균주 선정 및 대사체 프로파일링 기술 확립
○북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석 (위탁 과제)	2014.02.01.~2016.12.31	150,000	양영현	○토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화 ○지방산 및 탄소 저장 물질 분석 기술 수립을 통한 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역 토양 표지 인자 비교 분석

### 나. 선행 극지 관련 연구 내용들

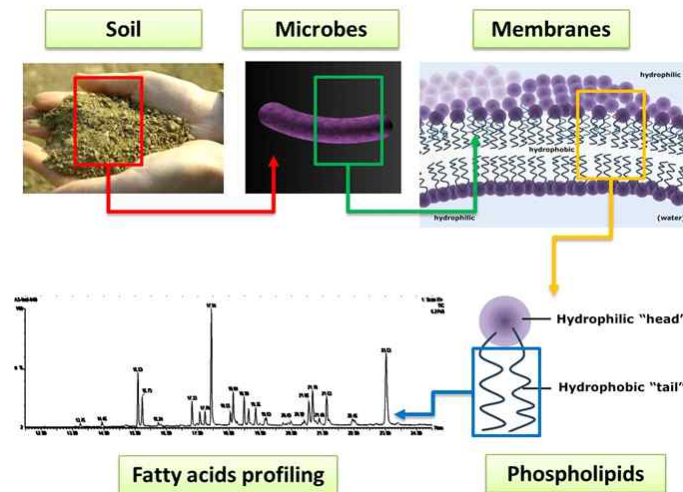
연구수행 기관	연구개발 논문	연구개발 내용
건국대	Exopolysaccharide from psychrotrophic Arctic glacier soil bacterium <i>Flavobacterium</i> sp. ASB 3-3 and its potential applications, RSC advances, 2015,5,84492	 -EPS를 생산하는 북극 유래 미생물 보고.
건국대	Metal removal and reduction potential of novel exopolysaccharide produced by Arctic glacier soil bacterium <i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28620, RSC Adv., 2016. 6. 96870-96881	 -EPS와 Dye를 생산하는 북극미생물 보고
건국대	Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer	-PHA를 생산하는 북극미생물 보고

	<p>from Arctic psychrotrophic bacterium <i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28620.</p> <p>International Journal of Biological Macromolecules 2017 Jan 17;97:710-720.</p>	
<p>건국대 / 숭실대</p>	<p>Chemical structure of the lipid A component of <i>Pseudomonas</i> sp. strain PAMC 28618 from thawing permafrost in relation to pathogenic activity.</p> <p>Scientific Report 7: 2168 (2017)</p>	<p>-잠재적 식물의 병원균으로 작용하는 극지유래 북극미생물 보고</p>
<p>건국대</p>	<p>Sensitive change of iso-branched fatty acid (iso-15:0) in <i>Bacillus pumilus</i> PAMC 23174 in response to environmental changes</p> <p>Bioprocess Biosyst Eng. 2016 , 39:159-167</p>	<p>-환경변화에 따라 변화를 나타내는 fatty acid 및 북극 미생물 보고</p>

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 : 이론적·실험적 접근방법

#### 가. Phospholipid fatty acid analysis 방법



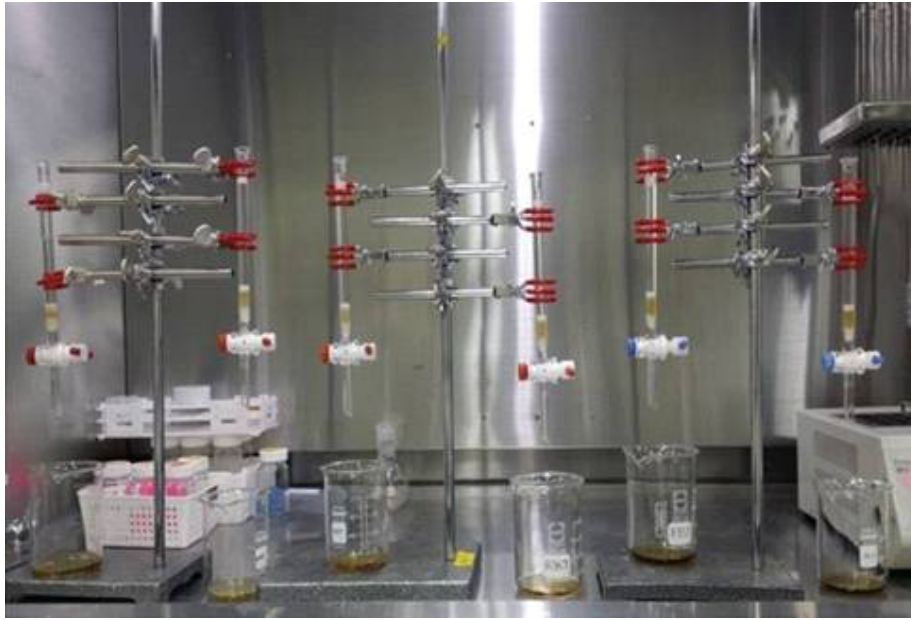
<PLFA 분석법 scheme>

- 미생물 배양 시료를 얻어 멸균된 튜브에 담고 여기에 메탄올 20 ml, 클로로폼 10 ml, phosphate buffer 10 ml을 차례로 넣은 후 밀봉하여, 2분간 vortexing을 한 후 15분 동안 sonication을 하여 토양 내 lipid를 solvent로 용출시킨 원심분리(3000 rpm, 10분)를 행하여 유리 피펫으로 상층 액을 빨아들인 후 아래층(chloroform층)을 옮김.<sup>1)</sup>
- 지질 추출법 확립 후 추출된 지질을 silicic acid 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 3가지 class(Neutral lipid, glycolipid and phospholipid)로 분리하여 분리된 지질 중 미생물 군집분포를 분석하는 데에는 미생물 막의 구성성분인 phospholipid를 이용함<sup>2)3)</sup>

1) Paul EA, Clark FE.. 1989. In Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, CA.

2) Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, Soil Biology & Biochemistry 43:1621-1625

3) Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, Geoderma 150:171 - 178.



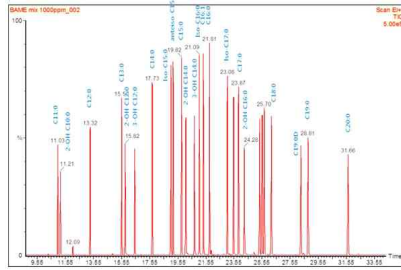
<fum 후드 안에서 컬럼 크로마토그래피 적용 사진>

- 분리된 3종의 지질 (Neutral lipid, glycolipid and phospholipid)을 strong 또는 mild derivatization하여 GC-FID로 지방산 측정을 위하여 저온(37 °C), 알칼리 조건인 mild reaction 적용
- PLFA 지방산 라이브러리 구축을 위하여 미생물의 PLFA의 정성 및 정량 분석을 위하여 FAME standard(BAME mix, Supelco 47080)의 측정 및 standard calibration하여 지방산 분석법 적용<sup>4)</sup>
- Internal standard (C21:0, Methyl heneicosanoate)를 이용하여 GC-MS의 적분 결과로부터 PLFA를 정량하는 방법을 구축<sup>5)</sup>하여 이를 PLFA 분석에 적용<sup>6)</sup>

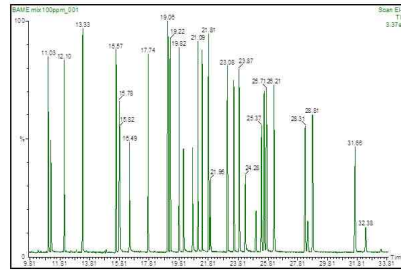
4) Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. Hydrogeo. J 8:126-141.

5) Drenovsky, R. E., Elliott, G. N., Graham, K. J., & Scow, K. M. (2004). Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry, 36(11), 1793-1800.

6) Fernandes, M. F., Saxena, J., & Dick, R. P. (2013). Comparison of whole-cell fatty acid (MIDI) or phospholipid fatty acid (PLFA) extractants as biomarkers to profile soil microbial communities. Microbial ecology, 66(1), 145-157.



BAME Standard (1000 ppm)



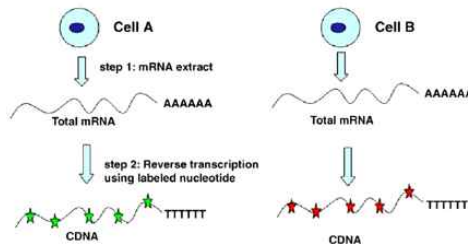
BAME Standard (100 ppm)

<PLFA 정성, 정량 분석을 위한 FAME standard 샘플의 농도별 준비 및 GC-MS를 이용한 분석 크로마토그램 예>

- 다양한 극지 토양 또는 PAMC로부터 얻은 균주를 활용하여 온도에 따른 PLFA의 변화를 관측할 것이며, 이를 통하여 단순한 패턴, 온도에 따른 신규 phospholipid가 생성되는 것, 영양분과 연결하기 용이한 지방산, 종 수준에서 비슷한 균주가 mesophile로 존재하는 균주 등에 대한 다각적인 검토와 많은 균주들의 분석을 통하여 2년차에 심화연구를 진행할 균주를 선정할 예정임.

나. 온도에 따른 transcriptome 분석

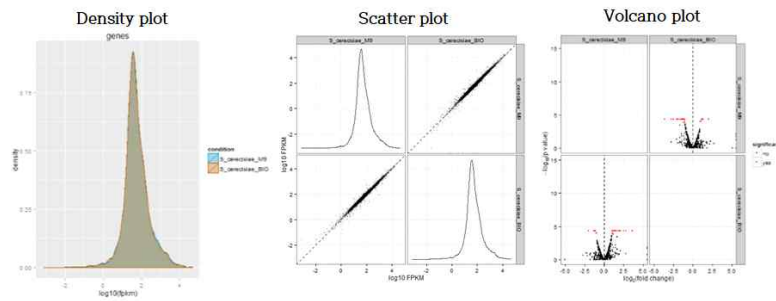
- 북극 지방의 평균 여름 온도 4-10도와 한국의 여름 평균 온도 23-28도를 고려하여 10도와 25도에서의 변화를 가장 기본이 되는 온도로 설정하여 실험들을 진행할 예정임.



<온도에 따른 transcriptome 분석법 예>

- 각각의 최적화된 극지 미생물 배양 조건에서 온도를 달리한 샘플들을 준비하여 mRNA level에 따라 특이적으로 발현되는 유전자를 검색할 수 있음. 이를 위하여 RT, DNA chip 혹은 RNA seq 등의 방법들을 활용 할 수 있음.



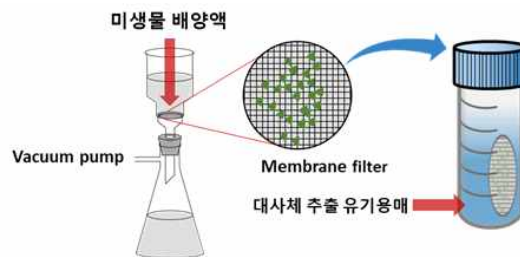


<온도에 따른 mRNA 발현 연구 예>

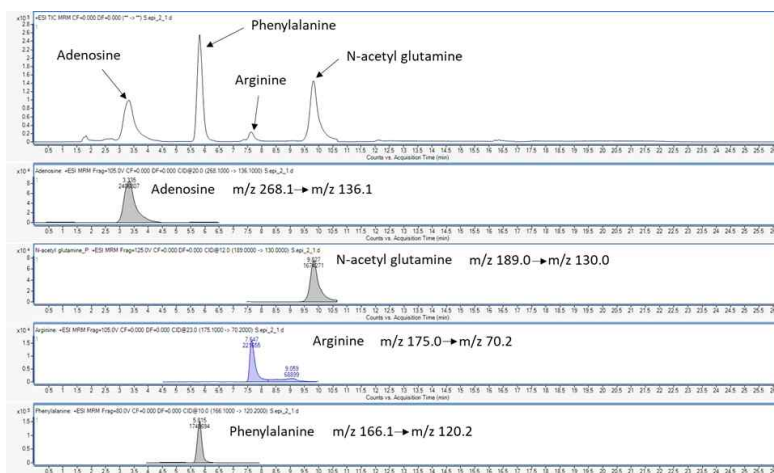
- log10(FPKM) 값(대조군과 비교군 사이에서 같은 유전자가 어떠한 샘플에서 많이 발현되었는지 비교하는 값)의 분포도를 비교하고 log2(fold change) 값과 (up/down) FDR이 어느 정도 이하/이상인 유전자를 비교할 것임.
- 이를 통하여 온도에 반응하는 유전자들을 발굴할 수 있으며, 이를 통한 transcriptome level에서의 해석이 가능할 것임.<sup>7)</sup>

다. 대사체 연구 방법

- 미생물의 대사는 동물세포와는 다르게 성장의 배가 시간 (doubling time)이 매우 빨라 샘플링 중의 환경 변화에 영향을 받기 쉽기 때문에 연구의 내용이나 목적에 따라 수 십초 사이에 대사체의 정량적 변화가 발생할 수 있기 때문에 배지와 미생물의 빠른 분리 및 미생물의 대사활동을 멈추는 quenching 방법이 대사체 분석의 정량적 재현성에 매우 큰 영향을 미침.



7) Kondakova, T., & Cronan, J. E. (2019). Transcriptional regulation of fatty acid cis-trans isomerization in the solvent tolerant soil bacterium, *Pseudomonas putida* F1. *Environmental microbiology*, 21(5), 1659-1676.



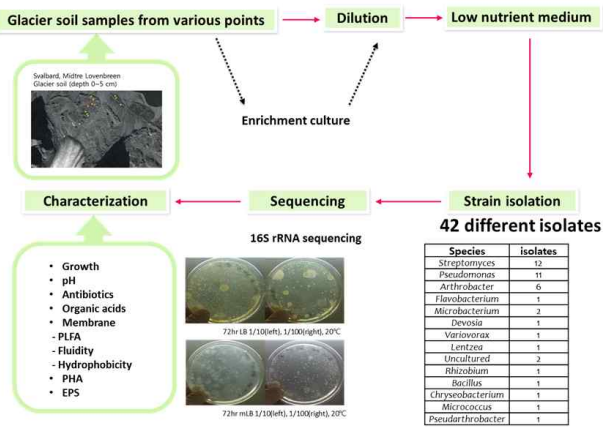
<Fast-filtration 기반의 대사체 추출법 및 표준 대사체의 전체 이온 크로마토그램과 MRM 크로마토그램>

- 진공 펌프와 pore size 0.45  $\mu\text{m}$ 의 filter를 이용한 fast filtration 방법으로 배지와 미생물을 약 15초 이내로 분리하고 유기용매를 이용한 quenching과 대사체 추출을 수행함.
- 대사체분석을 위한 표준 시료를 활용한 MRM 방법을 적용하고 온도에 따른 대사체들의 변화를 관측할 수 있음.

극지연구소

## 제 2절 개발 목표에 따른 연구수행 내용

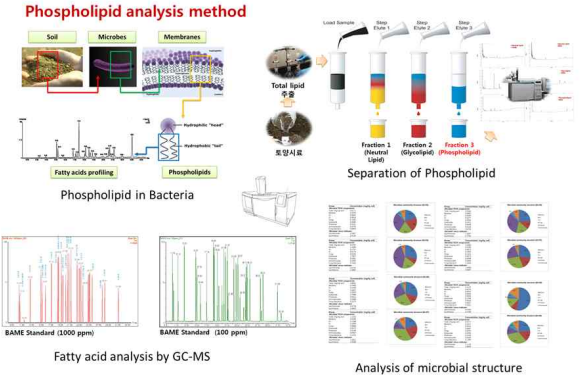
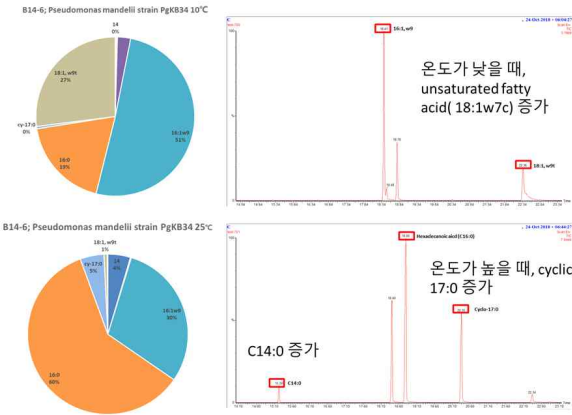
○연구개발목표 1-1: Psychrophile / mesophile 성격을 가진 미생물 선별

연구 내용	연구 결과(우수성)																																																																																																																																													
<p>Psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별</p>	<p>- 연구 대상 극지 미생물 선별을 위한 미생물 연구를 위하여 북극 토양 유래 미생물 선별</p>  <p>- Midtre Lovenbreen 유래의 토양으로부터 미생물 screening</p> <p>⇒ 지방산 연구를 위한 47종 (기존 5종 + 신규 42종)의 극지 유래 미생물 확보</p>																																																																																																																																													
<p>Psychrophile의 특성이외의 Hydrolase나 carbon storage molecule 생산능 등 특성 파악</p>	<table border="1" data-bbox="721 1326 1356 1556"> <thead> <tr> <th rowspan="2">No.</th> <th rowspan="2">Strain name from BLAST</th> <th rowspan="2">Gram stain</th> <th colspan="4">Hydrolase test</th> <th colspan="6">Growth</th> </tr> <tr> <th>Amylase</th> <th>Protease</th> <th>Lipase</th> <th>chitinase</th> <th>LB</th> <th>TSB</th> <th>TB</th> <th>MB</th> <th>Salinity</th> <th>PHA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>B14-1</td> <td>Streptomyces sp. ST28</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>(+)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>+</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B14-2</td> <td>Chryseobacterium sp. CC8C</td> <td>-</td> <td>(+)</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>-</td> <td>1%</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>B14-3</td> <td>Streptomyces sp. TTHQ-DM-4</td> <td>+</td> <td>(+)</td> <td>(+)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>++</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B14-4</td> <td>Streptomycesnojiriensis strain 173378</td> <td>+</td> <td>(+)</td> <td>(+)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B14-5</td> <td>Chryseobacterium sp. NX12</td> <td>-</td> <td>(+)</td> <td>++</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>-</td> <td>1%</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>B14-6</td> <td>Pseudomonas mandelii strain PgK834</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td></td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>B14-7</td> <td>Uncultured bacterium clone ncd93b10c1</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>15%</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>B14-8-1</td> <td>Pseudomonas sp. strain MH52</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td>++</td> <td></td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>B14-9</td> <td>Bacillus infantis strain MP-7</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>(+)</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>+</td> <td>4%</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>- 기초 특성 분석 연구를 통하여 지방산 연구를 위한 10종을 선별하여 이와 관련한 PLFA 연구를 수행함.</p> <p>⇒ 특징적인 product 생산이 있는 균주, 높은 salinity 환경에서도 성장할 수 있는 미생물, 특이한 EPS를 생산해 내는 미생물, gram negative, positive 박테리아 등 여러 특징적인 모습을 나타내는 미생물들을 선별하였음</p>	No.	Strain name from BLAST	Gram stain	Hydrolase test				Growth						Amylase	Protease	Lipase	chitinase	LB	TSB	TB	MB	Salinity	PHA	B14-1	Streptomyces sp. ST28	+	+	(+)	-	-	+	++	++	+				B14-2	Chryseobacterium sp. CC8C	-	(+)	+	-	-	+	++	++	-	1%	-	B14-3	Streptomyces sp. TTHQ-DM-4	+	(+)	(+)	-	-	+	++	++				B14-4	Streptomycesnojiriensis strain 173378	+	(+)	(+)	-	-							B14-5	Chryseobacterium sp. NX12	-	(+)	++	-	-	+	++	++	-	1%	-	B14-6	Pseudomonas mandelii strain PgK834	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-	B14-7	Uncultured bacterium clone ncd93b10c1	+	+	-	+	-	++	++	++	++	15%	-	B14-8-1	Pseudomonas sp. strain MH52	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-	B14-9	Bacillus infantis strain MP-7	+	+	+	-	-	(+)	+	++	+	4%	-
No.	Strain name from BLAST				Gram stain	Hydrolase test				Growth																																																																																																																																				
		Amylase	Protease	Lipase		chitinase	LB	TSB	TB	MB	Salinity	PHA																																																																																																																																		
B14-1	Streptomyces sp. ST28	+	+	(+)	-	-	+	++	++	+																																																																																																																																				
B14-2	Chryseobacterium sp. CC8C	-	(+)	+	-	-	+	++	++	-	1%	-																																																																																																																																		
B14-3	Streptomyces sp. TTHQ-DM-4	+	(+)	(+)	-	-	+	++	++																																																																																																																																					
B14-4	Streptomycesnojiriensis strain 173378	+	(+)	(+)	-	-																																																																																																																																								
B14-5	Chryseobacterium sp. NX12	-	(+)	++	-	-	+	++	++	-	1%	-																																																																																																																																		
B14-6	Pseudomonas mandelii strain PgK834	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-																																																																																																																																		
B14-7	Uncultured bacterium clone ncd93b10c1	+	+	-	+	-	++	++	++	++	15%	-																																																																																																																																		
B14-8-1	Pseudomonas sp. strain MH52	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-																																																																																																																																		
B14-9	Bacillus infantis strain MP-7	+	+	+	-	-	(+)	+	++	+	4%	-																																																																																																																																		

○연구개발목표 1-2: 극지 미생물 성장 조건 영향 연구

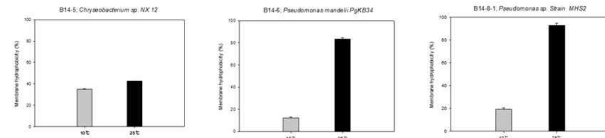
연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>극지 미생물 연구를 위한 온도 범위 비교</p>	<p>- 우수한 성장을 나타내는 성장 조건 탐색을 위하여 다양한 complex media에서의 성장을 연구</p> <p>- 4종 이상의 배지 (LB, TSB, TB, MB)를 비교하였을 때, TB가 general하게 사용될 수 있음을 발견하였으며, 저온인 10도에서 생장이 좋지 않은 미생물도 나타남</p> <p>⇒ 이후 극지 미생물 실험을 위한 배양 시 사용할 적절한 배지 및 온도조건 설정 완료</p>

○연구개발목표 1-3: 지방산 기반 membrane fluidity 분석

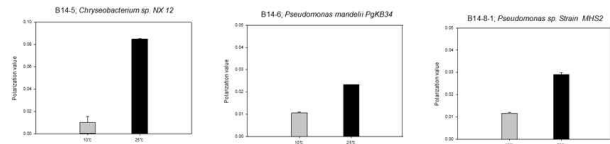
<p>PLFA 분석 방법 setup</p>	<p>- PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석 및 온도별 연구를 진행하여 극지 미생물에 적용함으로써 gram-negative 박테리아의 분석 방법 setup</p>  <p>- 확립된 PLFA법을 이용한 토양시료 분석</p>
<p>PLFA 방법과 세포막 분석법 적용을 통한 gram-negative 극지 미생물 분석</p>	<p>- PLFA 방법을 적용하여 membrane의 지방산에 대한 온도별 변화 분석</p>  <p>- 지방산의 추출을 위한 최적 온도 및 시간과 파악 (25도, 2시간) 하였으며, <i>Pseudomonas</i> 균주에 대한 지방산 패턴 변화 확인 완료</p> <p>⇒ PLFA 분석을 위한 조건들의 확립과 실제 적용하였을 때 그람 음성균들이 온도조건에 따라 지방산 패턴이 변화하는 것 관찰</p>

PLFA 방법과 세포막 분석법  
적용을 통한 gram-negative 극지  
미생물 분석

- 극지 미생물을 대상으로 membrane fluidity  
및 hydrophobicity 측정법 구축



>Membrane hydrophobicity 측정 실험; 온도가 낮을수록 미생물 표면의 소수성이 감소하는 결과 확인



>Membrane fluidity 측정 실험; 온도가 낮으면 유동성 증가 (unsaturated, branched, cycle form 증가)와 강한 소수성 결합물질인 DPH와 membrane fatty acid 분자들의 acyl group간의 결합이 어려워져 형광 값이 감소하는 결과 확인

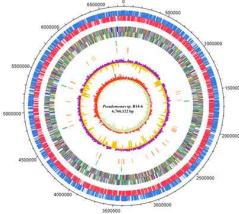
- 확립된 세포막 소수성 측정 방법들을 통하  
여 얻은 극지 분리 균주의 온도에 따른 변  
화 분석

- 저온 환경에서 미생물은 세포막 소수성을  
감소시키고 결과적으로 낮은 membrane  
hydrophobicity 값과 낮은 polarization  
value 값을 나타냄

- 소수성 및 유동성 실험을 통하여 온도로 인  
한 미생물 세포막의 구조 변화에 대한 관  
측이 가능하며 이는 PLFA 결과와 상관관  
계가 존재함

⇒ 온도 저하에 따른 적응으로 불포화지방산  
증가가 PLFA 결과로써 관찰되며 이는 또한  
세포막 구성의 변화로 세포막 소수성 및 유  
동성 실험 결과에 차이를 보임

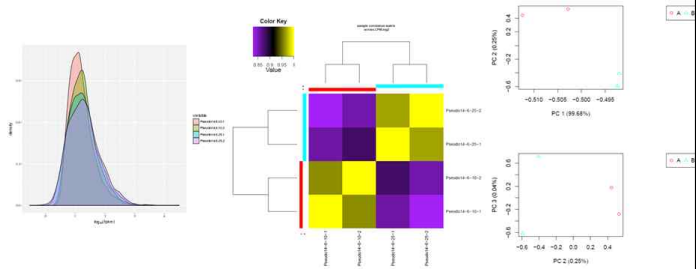
○연구개발목표 2-1: Transcriptome 분석

연구 내용	연구 결과 (우수성)																																																																																																																								
<p>Transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정</p>	<p>- 1년차에 선별한 미생물들 중 온도에 따른 PLFA 변화, EPS 생산, PHA 생산 변화 등의 특성이 두드러진 <i>Pseudomonas</i> sp. B14-6 균주를 선정하여 분석을 진행</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  <table border="1" data-bbox="1077 593 1276 817"> <caption><i>Pseudomonas</i> sp. B14-6,</caption> <thead> <tr> <th>Attribute</th> <th>Values</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Genome size (bp)</td> <td>6,766,122</td> </tr> <tr> <td>GC content (%)</td> <td>59.14</td> </tr> <tr> <td>rRNA genes</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>tRNA genes</td> <td>67</td> </tr> <tr> <td>Gene</td> <td>6326</td> </tr> <tr> <td>Gene length (bp)</td> <td>5,831,520</td> </tr> <tr> <td>Gene length/genome (%)</td> <td>86.19</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>- <i>Pseudomonas</i> sp. B14-6 균주에 대한 whole genome sequencing을 진행하였으며 해당 균주가 가진 다양한 유전자들을 정리함</p> <table border="1" data-bbox="718 1052 1324 1131"> <thead> <tr> <th>SeqName</th> <th>Description</th> <th>Length</th> <th>GO Names</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>orf06133_contig11.cir</td> <td>class i sam-dependent methyltransferase</td> <td>1185</td> <td>F:cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase activity; Pilipid biosynthetic process; P-methylation</td> </tr> </tbody> </table> <p>항생제 내성 관련 유전자 -33 genes</p> <table border="1" data-bbox="718 1198 1324 1456"> <tbody> <tr><td>orf00065_contig1.cir</td><td>class c beta-lactamase</td><td>1167</td><td></td></tr> <tr><td>orf01240_contig1.cir</td><td>4-deoxy-4-formamido-l-arabinose-phosphoundecaproyl deformylase</td><td>891</td><td></td></tr> <tr><td>orf01242_contig1.cir</td><td>bifunctional udg-gluconic acid oxidase udg-4-oxo-4-deoxy-l-arabinose formyltransferase</td><td>2007</td><td></td></tr> <tr><td>orf01243_contig1.cir</td><td>undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-l-arabinose transferase</td><td>1020</td><td></td></tr> <tr><td>orf01700_contig1.cir</td><td>undecaprenyl-diphosphate phosphatase</td><td>867</td><td></td></tr> <tr><td>orf01761_contig1.cir</td><td>carboxylester hydrolase</td><td>1368</td><td></td></tr> <tr><td>orf01801_contig1.cir</td><td>Acyase</td><td>2346</td><td></td></tr> <tr><td>orf03005_contig1.cir</td><td>undecaprenyl-diphosphate phosphatase</td><td>834</td><td></td></tr> <tr><td>orf04249_contig1.cir</td><td>glycosyl transferase family 51</td><td>3117</td><td></td></tr> <tr><td>orf04486_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein 2</td><td>1743</td><td></td></tr> <tr><td>orf04490_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein activator</td><td>1812</td><td></td></tr> <tr><td>orf04464_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein 1b</td><td>2226</td><td></td></tr> <tr><td>orf04466_contig1.cir</td><td>aminoglycoside phosphotransferase</td><td>1557</td><td></td></tr> <tr><td>orf05016_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein 2</td><td>1896</td><td></td></tr> <tr><td>orf05258_contig1.cir</td><td>aminoglycoside phosphotransferase</td><td>843</td><td></td></tr> <tr><td>orf05705_contig1.cir</td><td>penicillin acylase family protein</td><td>2487</td><td></td></tr> <tr><td>orf05860_contig1.cir</td><td>nitrogen regulatory protein p-ii 2</td><td>339</td><td></td></tr> <tr><td>orf06687_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein</td><td>615</td><td></td></tr> <tr><td>orf06784_contig1.cir</td><td>Peptidase</td><td>2550</td><td></td></tr> <tr><td>orf07440_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein activator</td><td>519</td><td></td></tr> <tr><td>orf08211_contig1.cir</td><td>penicillin acylase family protein</td><td>2451</td><td></td></tr> <tr><td>orf09108_contig1.cir</td><td>penicillin-binding protein 2</td><td>1893</td><td></td></tr> <tr><td>orf09163_contig1.cir</td><td>Aminotransferase</td><td>1281</td><td></td></tr> <tr><td>orf09170_contig1.cir</td><td>macrolide abc transporter permease atp-binding protein</td><td>1974</td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>- <i>Pseudomonas</i> sp. B14-6 균주에서 cyclic form fatty acid를 만드는 유전자는 1개가 검색되었으며 항생제 내성과 관련된 유전자들이 다수 발견되었음</p>	Attribute	Values	Genome size (bp)	6,766,122	GC content (%)	59.14	rRNA genes	19	tRNA genes	67	Gene	6326	Gene length (bp)	5,831,520	Gene length/genome (%)	86.19	SeqName	Description	Length	GO Names	orf06133_contig11.cir	class i sam-dependent methyltransferase	1185	F:cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase activity; Pilipid biosynthetic process; P-methylation	orf00065_contig1.cir	class c beta-lactamase	1167		orf01240_contig1.cir	4-deoxy-4-formamido-l-arabinose-phosphoundecaproyl deformylase	891		orf01242_contig1.cir	bifunctional udg-gluconic acid oxidase udg-4-oxo-4-deoxy-l-arabinose formyltransferase	2007		orf01243_contig1.cir	undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-l-arabinose transferase	1020		orf01700_contig1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	867		orf01761_contig1.cir	carboxylester hydrolase	1368		orf01801_contig1.cir	Acyase	2346		orf03005_contig1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	834		orf04249_contig1.cir	glycosyl transferase family 51	3117		orf04486_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1743		orf04490_contig1.cir	penicillin-binding protein activator	1812		orf04464_contig1.cir	penicillin-binding protein 1b	2226		orf04466_contig1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	1557		orf05016_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1896		orf05258_contig1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	843		orf05705_contig1.cir	penicillin acylase family protein	2487		orf05860_contig1.cir	nitrogen regulatory protein p-ii 2	339		orf06687_contig1.cir	penicillin-binding protein	615		orf06784_contig1.cir	Peptidase	2550		orf07440_contig1.cir	penicillin-binding protein activator	519		orf08211_contig1.cir	penicillin acylase family protein	2451		orf09108_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1893		orf09163_contig1.cir	Aminotransferase	1281		orf09170_contig1.cir	macrolide abc transporter permease atp-binding protein	1974	
	Attribute	Values																																																																																																																							
Genome size (bp)	6,766,122																																																																																																																								
GC content (%)	59.14																																																																																																																								
rRNA genes	19																																																																																																																								
tRNA genes	67																																																																																																																								
Gene	6326																																																																																																																								
Gene length (bp)	5,831,520																																																																																																																								
Gene length/genome (%)	86.19																																																																																																																								
SeqName	Description	Length	GO Names																																																																																																																						
orf06133_contig11.cir	class i sam-dependent methyltransferase	1185	F:cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase activity; Pilipid biosynthetic process; P-methylation																																																																																																																						
orf00065_contig1.cir	class c beta-lactamase	1167																																																																																																																							
orf01240_contig1.cir	4-deoxy-4-formamido-l-arabinose-phosphoundecaproyl deformylase	891																																																																																																																							
orf01242_contig1.cir	bifunctional udg-gluconic acid oxidase udg-4-oxo-4-deoxy-l-arabinose formyltransferase	2007																																																																																																																							
orf01243_contig1.cir	undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-l-arabinose transferase	1020																																																																																																																							
orf01700_contig1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	867																																																																																																																							
orf01761_contig1.cir	carboxylester hydrolase	1368																																																																																																																							
orf01801_contig1.cir	Acyase	2346																																																																																																																							
orf03005_contig1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	834																																																																																																																							
orf04249_contig1.cir	glycosyl transferase family 51	3117																																																																																																																							
orf04486_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1743																																																																																																																							
orf04490_contig1.cir	penicillin-binding protein activator	1812																																																																																																																							
orf04464_contig1.cir	penicillin-binding protein 1b	2226																																																																																																																							
orf04466_contig1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	1557																																																																																																																							
orf05016_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1896																																																																																																																							
orf05258_contig1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	843																																																																																																																							
orf05705_contig1.cir	penicillin acylase family protein	2487																																																																																																																							
orf05860_contig1.cir	nitrogen regulatory protein p-ii 2	339																																																																																																																							
orf06687_contig1.cir	penicillin-binding protein	615																																																																																																																							
orf06784_contig1.cir	Peptidase	2550																																																																																																																							
orf07440_contig1.cir	penicillin-binding protein activator	519																																																																																																																							
orf08211_contig1.cir	penicillin acylase family protein	2451																																																																																																																							
orf09108_contig1.cir	penicillin-binding protein 2	1893																																																																																																																							
orf09163_contig1.cir	Aminotransferase	1281																																																																																																																							
orf09170_contig1.cir	macrolide abc transporter permease atp-binding protein	1974																																																																																																																							

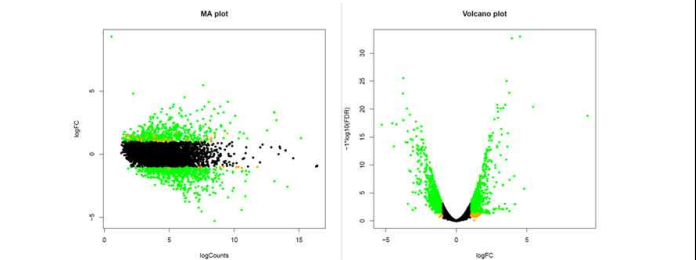




Transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석



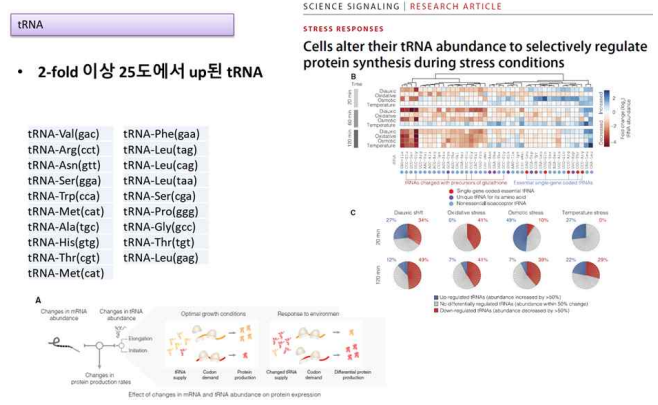
- *Pseudomonas* sp. B14-6 균주를 사용하여 10도 및 25도 성장 환경에서 72시간 배양 시의 duplicated RAN sequencing을 진행하였음



• 전체 6300여 유전자 중 2-fold 이상 up or down된 유전자 1415개

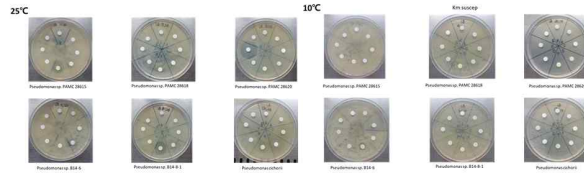
25도에서 up-regulated 된 유전자들		10도 에서 up-regulated 된 유전자들	
-4.246138 gtaB_2	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	3.15363	phaB Acetoacetyl-CoA reductase
-3.489086 wcaJ	UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferase	3.541956	hag Flagellin
-3.285559 galE_2	UDP-glucose 4-epimerase	4.517874	chiD Chitinase D

- RNA seq 결과 6300여개의 유전자 중 1415개 정도의 유전자가 온도에 따라 차이를 나타내는 것을 발견



- 25도와 10도에서 각각 많이 up된 tRNA가 존재. 기존 보고와 같이 stress 상황에서 필요한 단백질 합성에 유리한 tRNA가 만들어져 온도와 관련하여 tRNA가 역할을 하고 있음을 알려주는 사례이다

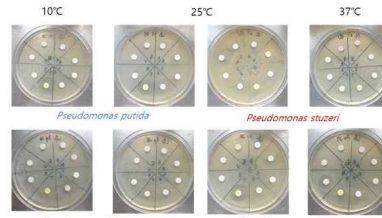
- 탄소원 종류 및 농도에 따른 *Bacillus pumilus*의 성장 확인



균주	온도	Km	Cl
<i>Pseudomonas</i>	10	○ (live)	○
PAMC28615	25	× (dead)	○
<i>Pseudomonas</i>	10	○	○
PAMC 28618	25	×	○
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-6	10	○	×
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-8-1	10	○	○
	25	×	○
<i>Pseudomonas cichorii</i>	10	○	○
	25	×	○

- Mfs transporter, Macrolide export 10도 up
- Aminoglycoside phosphotransferase 25도 up
- CspA: 10도 up
- Cold shock CspD: 25도 up
- 대체로 Psychrophile에서 Kanamycin 내성이 25도에서 감소하는 경향성을 보임

- 항생제 내성과 온도의 관련성에 대한 연구를 통해 항생제에 영향을 미치는 온도와 관련된 인자에 대한 연구 진행



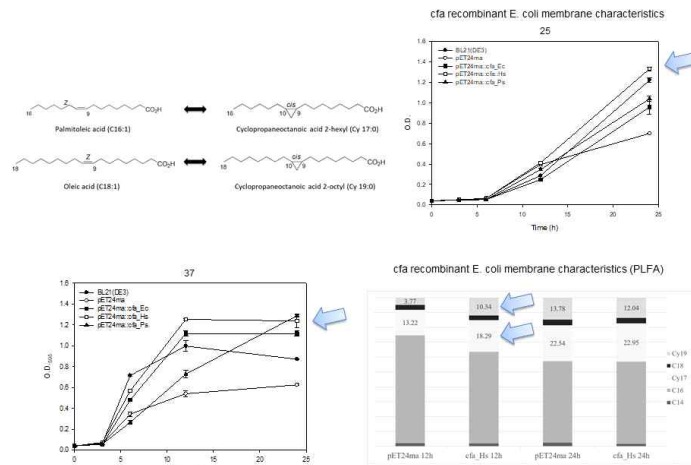
균주	온도	<i>Pseudomonas fluorescence</i>				<i>Pseudomonas resinovorans</i>			
		Km	Cm	Amp	Spec	Tet	Oxa	Van	Ery
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-6	10	○ (live)	×	○	○	○	○	○	○
	25	×	(dead)	○	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas putida</i>	10	○	○	○	○	○	○	○	×
	25	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas fluorescence</i>	10	×	○	○	○	×	○	○	×
	25	○	×	○	○	×	○	○	○
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	25	○	○	○	○	○	○	○	○
	37	×	○	×	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	25	○	○	×	○	×	○	○	○
	37	○	○	○	○	○	○	○	○

- Psychrophile들은 온도 상승 시 kanamycin 내성이 감소하는 경향을 보임

⇒ 미생물이 온도에 따라 상당히 다른 내성 패턴을 보인다는 부분은 향후 온난화와 관련한 미생물의 성장과 내성, 활용 부분에서 고려해야 할 부분이 있다는 것을 보여줌

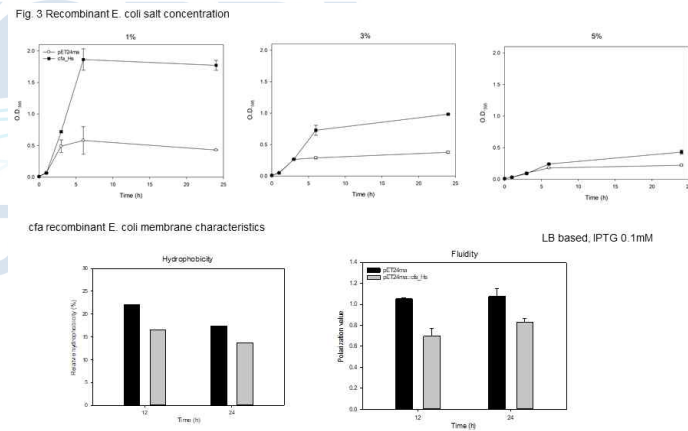
온난화 관련 주요 유전자 발굴

- Membrane 구성에 영향을 미치는 유전자를 찾아 기능을 밝히는 연구를 수행하였음



- 세포막 지방산 구성에 영향을 미치는 유전자 중, cyclic form 지방산의 생합성에 관련된 *cfa* 유전자에 대한 영향 연구

온난화 관련 주요 유전자 발굴

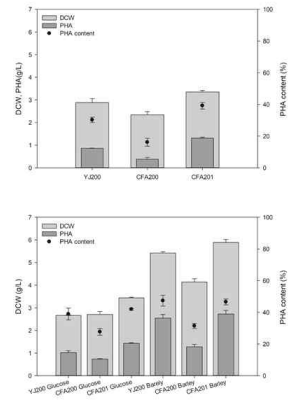
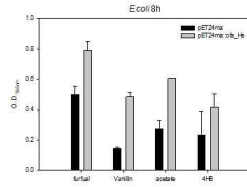


- *Pseudomonas* sp. B14-6, *Halmonas socia*, *Escherichia coli* 균주의 *cfa* 유전자를 클로닝하여 대장균에서 과발현하였을 때 생장의 변화 및 지방산 패턴의 변화 관찰

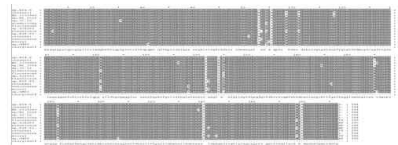
온난화 관련 주요 유전자 발굴

Fig. 6

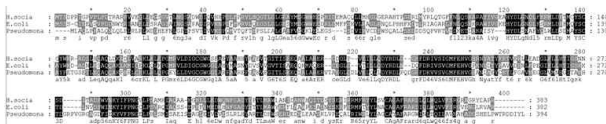
cfa recombinant growth presence of inhibitors



- *H. socia* 유래 *cfa* 유전자가 과발현된 대장균에서 목질 섬유소 유래 성장 저해물질의 존재에 대한 저항성 증대를 보이며, PHA 생산 미생물에 형질전환하였을 때 증가한 미생물양과 PHA 함유량을 얻을 수 있었음



• CFA alignment (*E. coli*, *H. socia*, *Pseudomonas* sp. B14-6)

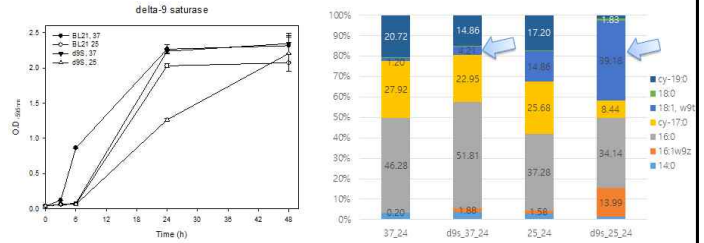


- 균 간 *cfa* 유전자의 서열 분석을 진행하였을 때, 동일한 종 내에서는 서열의 일치도가 상당히 높음을 알 수 있었으며 종이 다르더라도 동일하게 관찰되는 서열을 발견할 수 있었음

⇒ 온도에 따라 세포막 지방산 구성에 영향을 주는 유전자인 *cfa* 유전자를 발견하고 해당 유전자가 미생물의 성장과 저해물질에 대한 저항성 증대, 그리고 특정 생산물의 생산 증대 등의 효과를 보일 수 있음을 보여줌

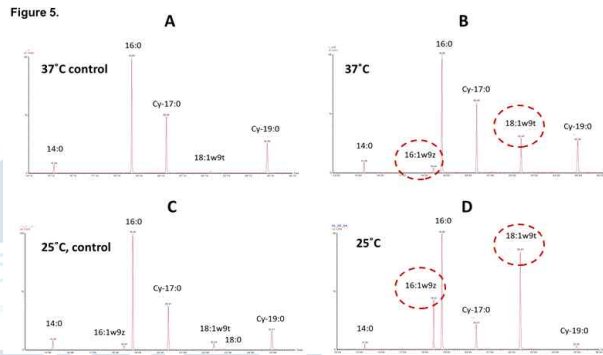
온난화 관련 주요 유전자 발굴

- PLFA와 관련한 유전자들 중 포화/불포화 지방산 생산에 관여하는 유전자를 확보하였음



- 대장균에 대한 저온(25도) 및 적정 온도(37도) 환경 하에서 delta-9 desaturase (*desA*) 발현 영향 관찰

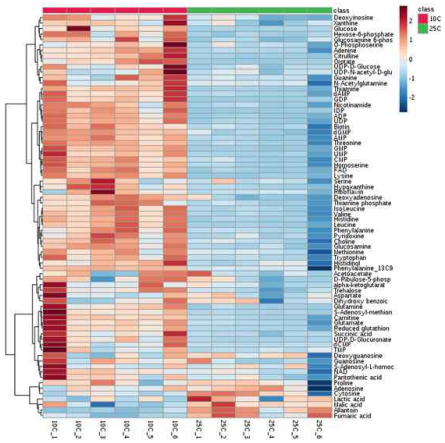
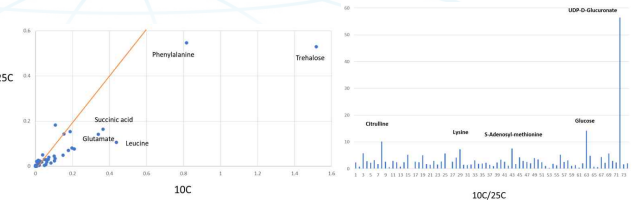
- 성장 및 세포막 인지질 구성에서의 차이가 발견됨



- 저온 환경에서 이중 결합을 가진 탄소 18개의 지방산, 올레산의 함량이 높아지는 것을 관찰할 수 있었으며, 이는 형질전환된 대장균에서 그 상승폭이 더 큰 것을 알 수 있음

⇒ *desA* 유전자가 이중 결합 지방산 생산에 관여하는 것을 알 수 있었으며 해당 유전자의 과발현을 통해 세포막 지방산 조성의 변화와 이에 따르는 세포막 유동성 등의 변화로 균의 성장에 변화를 꾀할 수 있다는 결과를 얻었음

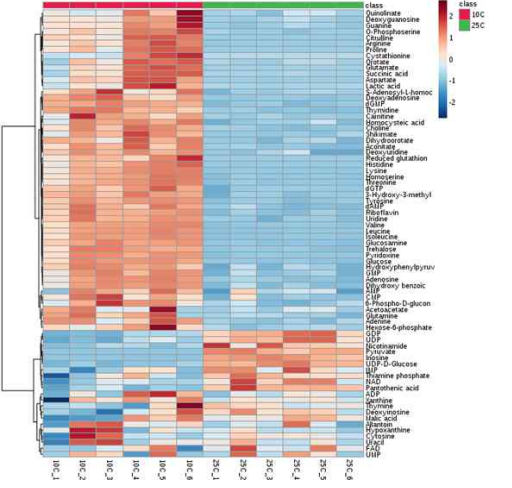
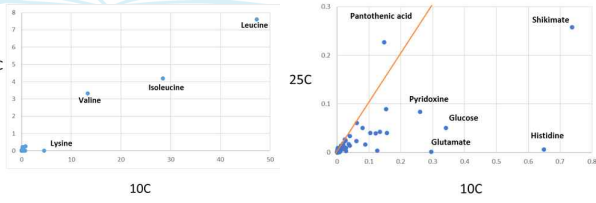
○연구개발목표 3-1: 세포 내 대사체 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>세포 내 대사체 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 미생물의 대사체 분석을 위한 조건 setup 을 위하여 <i>Pseudomonas</i> sp. B14-6 균주를 이용하였음</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 샘플의 적절한 전처리를 통하여 LC-MS/MS를 통한 세포 내 미생물 주요 대사체의 MRM 분석을 실시</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10도와 25도에서 분석한 물질의 detection된 signal을 기준으로 비교해 보았을 때 10도에서 trehalose, phenylalanine, Leucin, Glutamate, Succinate 들이 높은 시그널로 나타남.</li> <li>- 특히 trehalose의 경우 동결 보존물질로 많이 사용되는 바 저온과 상관있는 물질로 추정</li> <li>- 10도와 25도의 signal을 비교하여 볼 때 특히 많이 나온 물질들은 아미노산 종류로는 citrulline, lysine이 많이 검출되며, EPS 등에 관여하는 UDP-D-Glucuronate의 양의 변화가 매우 크게 나옴</li> <li>- 아울러 체내의 stress나 methylation에 관여하는 S-Adenosyl-methionine의 양의 변화도 검출됨</li> </ul>

- 25도의 경우 Nucleic acid의 base에 해당하는 Adenosine, Cytosine, Deoxyguanosine, Allantoin (purine derivative) 등의 변화가 크며 이 결과는 예전의 mRNA expression 데이터에서 볼 수 있듯이 nucleic acid의 온도에 따른 변화와 상관이 있음
- 유기산의 변화도 크게 나와서 fumaric acid, malic acid, lactic acid 등이 검출되고 있어 온도에 따라 TCA의 변화가 상당히 있어 보임.
- 세포외 대사체의 경우도 세포내 대사체의 결과와 유사하게 10도에서 많은 대사체들이 up된 것을 발견할 수 있으나, 세포내에 비하여 25도에서 up된 대사체의 개수가 더 있음.
- GDP, UDP 그리고 UDP-D-Glucose 등 대사체에서 25도 샘플이 더 높은 농도를 가지는 결과가 보임.

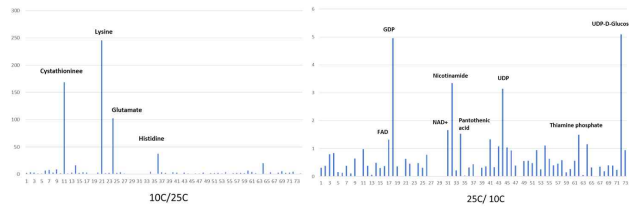
KOPRI  
극지연구소

○연구개발목표 3-2: 세포 외 대사체 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>세포 외 대사체 분석</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 샘플의 적절한 전처리를 통하여 LC-MS/MS를 통한 세포 외 미생물 주요 대사체의 MRM 분석을 실시</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포외 대사체 중에 총량만으로 볼 때 branched chain들의 signal이 매우 크며 이러한 대사체들은 leucine (iso C15:0, iso C17:0), valine (iso C14:0, iso C16:0), isoleucine (anteiso C15:0, anteiso C17:0)들로 각각의 fatty acid 합성에 영향을 받을 수 있음.</li> <li>- 특히 total lipid에서 ai-15:0의 경우 10도에서 11.6%, 25도에서 4.3%, ai-17:0의 경우 2.0%에서 0.34%로 감소되는 바, 10도에서 isoleucine 대사가 더욱 활발하다는 것을 예상할 수 있음.</li> <li>- major로 나왔던 4개를 제외하고 들여다 보면 cofactor precursor인 pyridoxine, glutamate, histidine, phenolic amino acid의 precursor인 shikimate의 양이 많이 나오는 것을 볼 수 있</li> </ul>

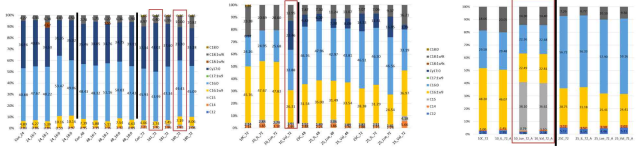


고, 25도의 경우 CoA precursor인 pantothenic acid의 양이 25도에서 더 많음.



- 10도와 25도의 signal을 비교하여 볼 때 특히 10도에서 많이 나온 것으로 (fold change), 아미노산 류인 Lysine, glutamate, histidine 등의 변화가 크고, cysteine의 전구체인 cystathionine도 변화가 많음.
- 25도에서 변화가 큰 것으로는 GDP, UDP 등의 nucleotide들과 UPD-D-glucose, 등이 있고, 전자전달에 관여하는 FAD, NAD, Nicotinamide가 변화가 크고, 이외에 cofactor와 성장에 관여하는 pantothenic acid, thiamine phosphate가 변화가 있었음.
- 이상의 대사체의 결과를 볼 때, fatty acid synthesis에 관여하는 branched amino acid 들의 변화, nucleotide 들의 변화, EPS 생합성에 관여하는 UDP-sugar들의 변화, 전자전달 관여 대사체 등의 차이가 특징적이라 할 수 있음.
- 특징적인 차이들 중에 fatty acid synthesis 변화와 UDP-sugar와 관련된 EPS의 변화와 관련해서는 Pseudomonas sp. 14-6에서 심화 study를 실시하였음.

○연구개발목표 3-3: 영양 환경에 따른 영양 연구

연구 내용	연구 결과(우수성)
영양 환경에 따른 영양 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대사체 분석 결과에 따른 branched chain fatty acid과 아미노산 사이 영향 연구</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1mM의 지방산 첨가, branched chain amino acid에 따른 PLFA(첫번째, 두 번째)와 total lipid 변화</li> <li>- CFA의 기질이 되는 C16:1, C18:1을 투입하였을 때 C16:1의 경우 Cy17:0의 증가가 확인이됨</li> <li>- 특히 배양 시간이 긴 경우에 C16:1의 경우 Cy17:0의 증가가 눈에 띄며, C16:0을 투입한 경우 장시간인 경우에도 C16:0이 많은 부분을 차지하고 있음</li> <li>- 유전자들 중 fatty acid desaturase와 cyclopropane-fatty acid synthase 등의 경쟁적 작용이 관찰되며, 기질 C16:1을 C18:1보다 선호함을 알 수 있음.</li> <li>- 저온 (10도) 환경에서 valine을 투입한 샘플에서 매우 높은 cyclic form의 지방산 비율과 상대적으로 매우 낮은 palmitoleic acid 비율을 나타냈으며, 중온 환경에선 해당 결과와 완전히 반대되는 결과인 매우 낮은 cyclic form 지방산과 높은 palmitoleic acid 비율이 나타남.</li> <li>- branched-chain amino acid가 지방산 생합성에 관련이 있지만, valine의 경우 알려진 것이 leucine 혹은 isoleucine에 비해 적기 때문에 해당 결과에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보임.</li> <li>- Leucine 및 valine을 첨가한 저온 성장 샘플에서 매우 높은 홀수 fatty acid인 C15:0(pentadecanoic acid) 비율과 낮은 palmitoleic acid 비율이 관찰됨.</li> </ul>

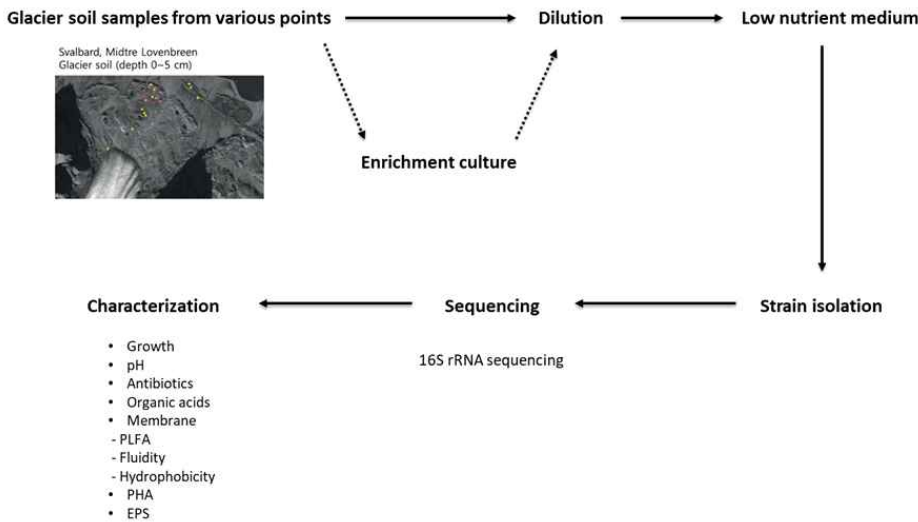
	<p>- leucine의 경우 pentadecanoic acid 합성에 관한 전구체로서 알려져 있으나 valine의 경우 branched-chain amino acid 라는 공통점은 있으나 지방산 합성 전구체로서 알려진 것이 상대적으로 적기 때문에 추가적인 연구가 필요할 것으로 보임.</p>
--	---



### 제 3 절 개발 연차별 연구수행 세부 내용

가. 1년차 연구내용

- Psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별
- 연구 대상 극지 미생물 선별을 위한 미생물 연구를 위하여 북극 토양 유래 미생물을 선별 8)



<Midtre Lovenbreen 유래의 토양으로부터 미생물 screening 과정>

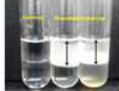
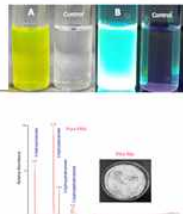
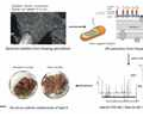
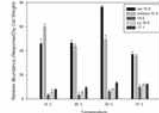
- B14-1 Streptomyces sp. ST28
- B14-2 Chryseobacterium sp. CC8C
- B14-3 Streptomyces sp. TTHQ-DM-4
- B14-4 Streptomycesnojriensis strain 173378
- B14-6 Pseudomonas mandelii strain PgKB34
- B14-7 Uncultured bacterium clone ncd93b10c1
- B14-8-1 Pseudomonas sp. strain MH52
- B14-9 Bacillus infantis strain MP-7
- 1 Arthrobacter sp. MD12-14
- 2 Streptomycesnojriensis strain 173378
- 3 Pseudomonas sp. strain KP-12-3
- 4 Streptomyces sp. Ats18
- 6 Pseudomonas sp. HC3-13
- 8 Variovorax sp. Abs3
- 9 Lentzea violacea strain 173540
- 10 Streptomyces sp. strain M5\_8
- 11 Streptomycesavidinii strain IHBA 9319
- 14 Flavobacterium sp. Dra32
- 15 Pseudomonas sp. EnF53
- 16 Rhizobium sp. MW6-12
- 17 Pseudomonas sp. TSBY-66
- 23 Arthrobacter sp. strain IHBB 9579
- 24-2 Arthrobacter sp. MT-A-57
- 25 Arthrobacter oxydans strain IHBB 11124
- 27 Arthrobacter sp. strain IHBB 9579
- 29 Uncultured bacterium clone ncd460e02c1
- 31 Microbacterium maritipicum strain 28
- 32-1 Micrococcus luteus strain FC1737
- 33 Microbacterium sp. Rs52
- 34 Streptomyces sp. strain NSC30
- 35 Streptomyces microflavus strain 173339
- 36 Streptomyces sp. strain zw17
- ex3 Streptomyces sp. Es11
- ex4 Pseudomonas sp. TSBY-66
- ex6 Pseudomonas mandelii strain AB16
- ex7 Pseudomonas sp. B12(2012)
- B14-A Streptomyces sp. JK 3-2
- B14-C Arthrobacter sp. RK56-4
- B14-D Devosia sp. Aza12
- B14-F Pseudarthrobacter sulfonivorans strain 253-HNR16
- B14-m2 Pseudomonas mandelii strain H1
- B14-m4 Pseudomonas sp. JA1

Species	isolates
<i>Streptomyces</i>	12
<i>Pseudomonas</i>	11
<i>Arthrobacter</i>	6
<i>Flavobacterium</i>	1
<i>Microbacterium</i>	2
<i>Devosia</i>	1
<i>Variovorax</i>	1
<i>Lentzea</i>	1
<i>Uncultured</i>	2
<i>Rhizobium</i>	1
<i>Bacillus</i>	1
<i>Chryseobacterium</i>	1
<i>Micrococcus</i>	1
<i>Pseudarthrobacter</i>	1

42 different isolates

8) Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, Geoderma 150:171 - 178.

• 기존 균주들 활용

균주	연구개발 논문	연구개발 내용	대표 그림
<i>Flavobacterium</i> ASB 3-3	<u>Exopolysaccharide</u> from psychrotrophic Arctic glacier soil bacterium <i>Flavobacterium</i> sp. ASB 3-3 and its potential applications. <b>RSC advances, 2015,5,84492</b>	EPS를 생산하는 북극 유래 미생물 보고.	
<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28620	Metal removal and reduction potential of <u>novel exopolysaccharide</u> produced by Arctic glacier soil bacterium <i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28620. <b>RSC Adv., 2016. 6. 96870</b> Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer from Arctic <u>psychrotrophic bacterium</u> <i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28620. <b>International Journal of Biological Macromolecules 2017, 97:710</b>	EPS와 Dye를 생산하는 북극미생물 보고  PHA를 생산하는 북극 미생물 보고	
<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 28618	Chemical structure of the lipid A component of <i>Pseudomonas</i> sp. strain PAMC 28618 from thawing permafrost in relation to pathogenic activity. <b>Scientific Report 7: 2168 (2017)</b>	잠재적 식물의 병원균으로 작용하는 극지유래 북극미생물 보고	
<i>Bacillus pumilus</i> PAMC 23714	<u>Sensitive change</u> of iso-branched fatty acid (iso-15:0) in <i>Bacillus pumilus</i> PAMC 23714 in response to environmental changes <b>Bioprocess Biosyst Eng. 2016 , 39:159-167</b>	환경변화에 따라 변화를 나타내는 fatty acid 및 북극 미생물 보고	
<i>Pseudomonas</i> sp. 8-6	논문 보고 없음.		

<Midtre Lovenbreen 유래의 신규 균주 리스트 및 기존에 연구 중인 균주>

-이러한 결과를 통하여 지방산 연구를 위한 47종 (기존 5종 + 신규 42종)의 극지 유래(북극) 미생물 확보

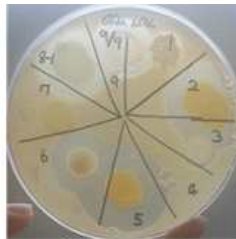
○ Psychrophile의 특성 이외의 Hydrolase나 carbon storage molecule 생산능 등 특성 파악



**Starch agar**

Yeast extract 3g/L  
Peptone 5g/L  
Soluble starch 2g/L  
Agar 15g/L

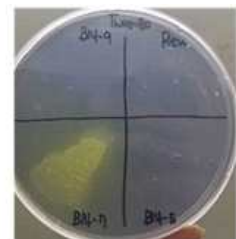
30°C



**Skim milk**

Skim milk 28g/L  
Tryptone 5g/L  
Yeast extract 2.5g/L  
Glucose 1g/L  
Agar 15g/L

30°C



**Tween80**

Tween80 200ul/L  
Bromocresol purple 0.01g/L  
Yeast extract 0.5g/L  
Agar 15g/L

30°C

< 신규 균주의 초기 특성 (hydrolases)을 찾기 위한 배양 방법>

No.	Strain name from BLAST	Gram stain	Hydrolase test				Growth				Salinity	PHA
			Amylase	Protease	Lipase	chitinase	LB	TSB	TB	MB		
B14-1	Streptomyces sp. ST28	+	+	(+)	-	-	+	++	++	+		
B14-2	Chryseobacterium sp. CC8C	-	(+)	+	-	-	+	++	++	-	1%	-
B14-3	Streptomyces sp. TTHQ-DM-4	+	(+)	(+)	-	-						
B14-4	Streptomycesnojiriensis strain 173378	+	(+)	(+)	-	-						
B14-5	Chryseobacterium sp. NX12	-	(+)	++	-	-	+	++	++	-	1%	-
B14-6	Pseudomonas mandelii strain PgKB34	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-
B14-7	Uncultured bacterium clone ncd93b10c1	+	+	-	+	-	++	++	++	++	15%	-
B14-8-1	Pseudomonas sp. strain MHS2	-	-	+	-	-	++	++	++	++		-
B14-9	Bacillus infantis strain MP-7	+	+	+	-	-	(+)	+	++	+	4%	-

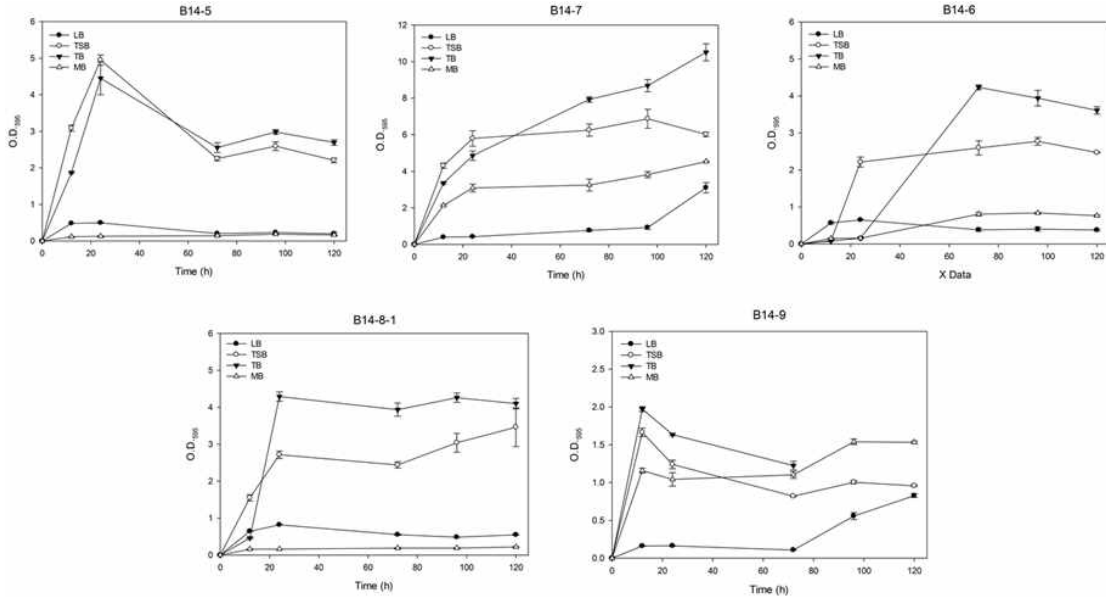
< 신규 균주의 초기 특성 연구 결과 >

-기초 특성 분석 연구를 통하여 지방산 연구를 위한 10종을 선별하여 이와 관련한 PLFA 연구를 수행함.

-균주들은 *Flavobacterium* ASB 3-3, *Pseudomonas* sp. PAMC 28620, *Pseudomonas* sp. PAMC 28618, *Bacillus pumilus* . PAMC 23714, *Pseudomonas* sp. 8-6, B14-5; *Chryseobacterium* sp. CC8C, B14-6; *Pseudomonas mandelii* PgKB34, B14-7; *Brachybacterium* sp.B14-8-1; *Pseudomonas* sp. Strain MHS2, B14-9; *Bacillus infantis* MP-7 들로 특징적인 product 생산이 있는 균주, 높은 salinity 환경에서도 살수 있는 미생물, 특이한 EPS를 생산해 내는 미생물, Gram negative, positive 박테리아 등의 여러 특징적인 모습을 나타내는 미생물들을 선별

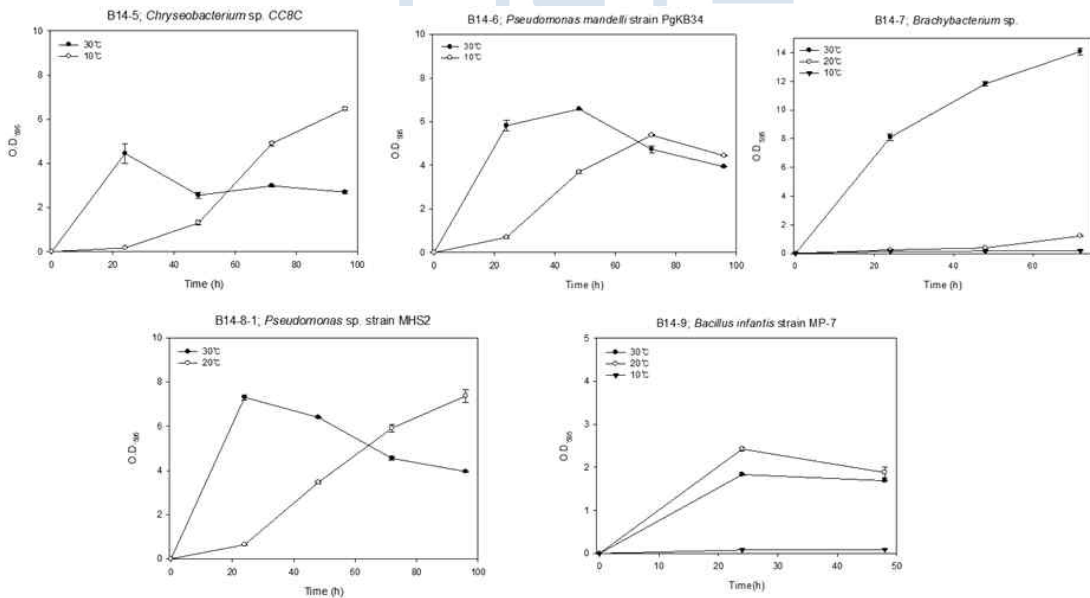
○극지 미생물 성장 조건 영향 연구

-우수한 성장을 나타내는 성장 조건 검색을 위하여 complex media들에서의 성장을 연구 중



< 극지 미생물 연구를 위한 배지 성능 비교 >

-4종이상의 배지 (LB, TSB, TB, MB)를 비교한 결과 TB가 general하게 사용되어 질 수 있음을 알 수 있음.

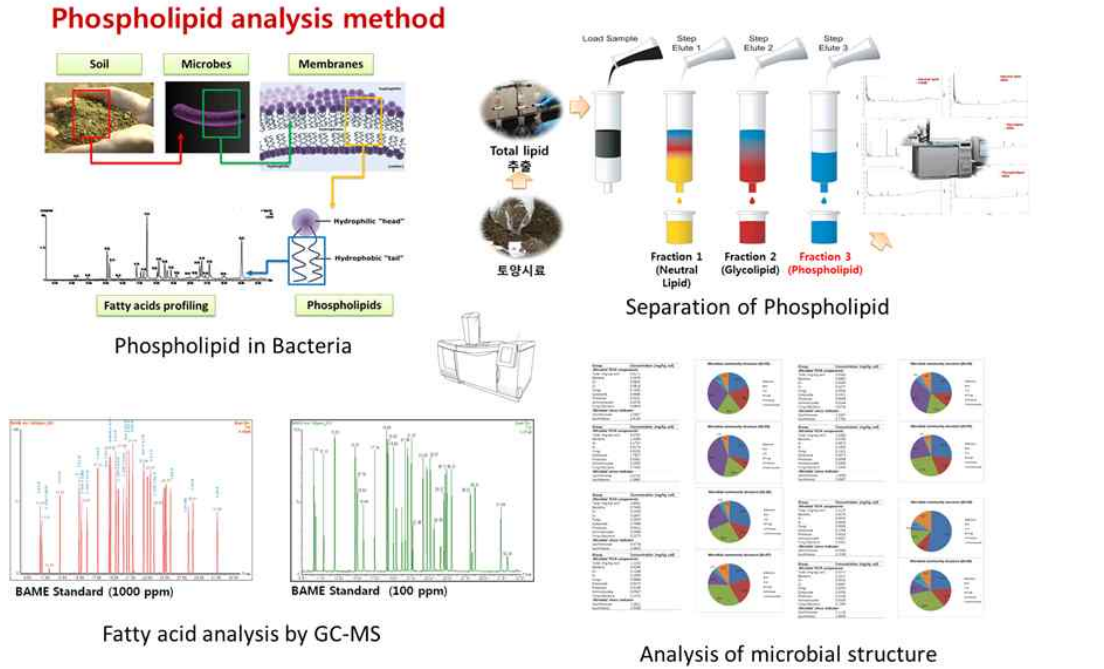


< 극지 미생물 연구를 위한 온도 범위 비교 >

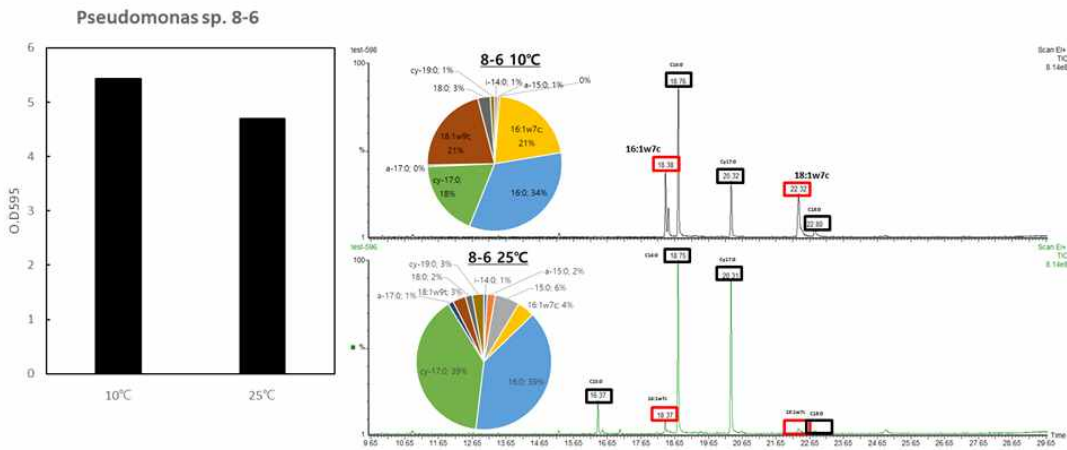
-미생물에 따라 10도에서 생장이 좋지 않은 미생물도 나타남 (5일 기준)

○ 지방산 기반 membrane fluidity 분석

- PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석 및 온도별 연구하여 극지 미생물에 적용하여 Gram negative 박테리아의 경우 분석 방법 setup 완료



< PLFA 분석 방법 및 가능 데이터 예시 >



온도가 낮을 때, unsaturated fatty acid(16:1w7c, 18:1w7c) 증가  
 온도가 높을 때, cyclic 17:0, C15:0 증가

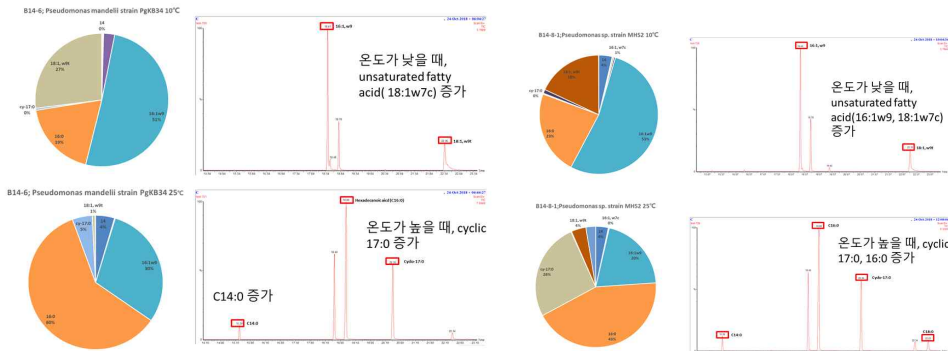
< Pseudomonas sp. 8-6을 사용한 PLFA 분석 적용 결과 >

- PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석 및 온도별 연구하여 극지 미생물에 적용하여 Gram negative 균주의 경우 최적 추출 온도 및 시간 파악<sup>9)</sup> (25도,

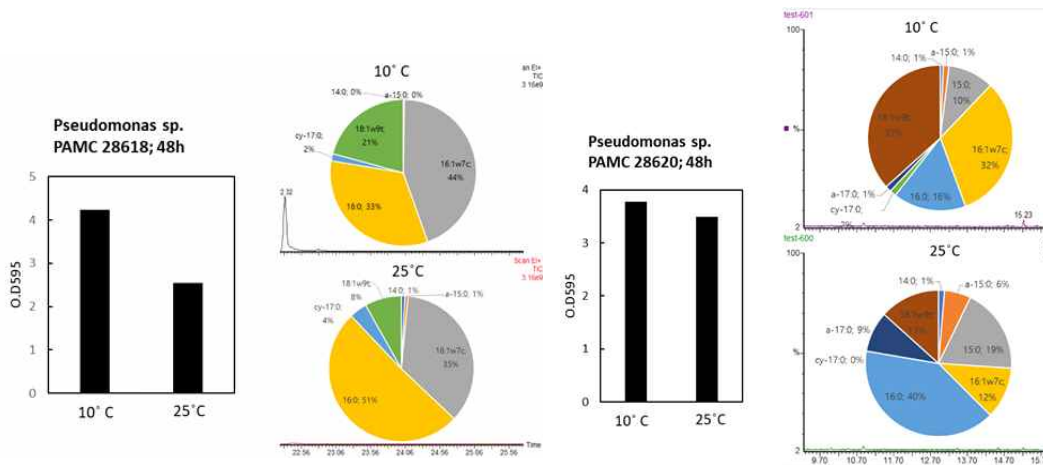
9) Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R, Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. Current Sci. 89:1103-1112.



2시간). *Pseudomonas sp.* 8-6의 경우 온도가 낮을 때, unsaturated fatty acid(16:1w7c, 18:1w7c) 증가 확인

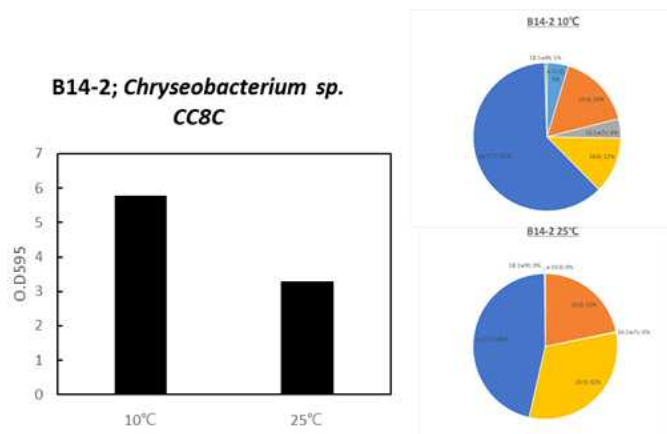


< *Pseudomonas mandelii* Pgk834, *Pseudomonas sp.* MHS2을 사용한 PLFA 분석 적용 결과>



< *Pseudomonas sp* PAMC 28618과 28620을 사용한 PLFA 분석 적용 결과>

-극지 *Pseudomonas* 경우, 온도가 낮을 때, unsaturated fatty acid (16:1w7c, 18:1w7c) 증가, 온도가 높을 때, saturated fatty acid (C14:0, C15:0), Cy17:0 증가

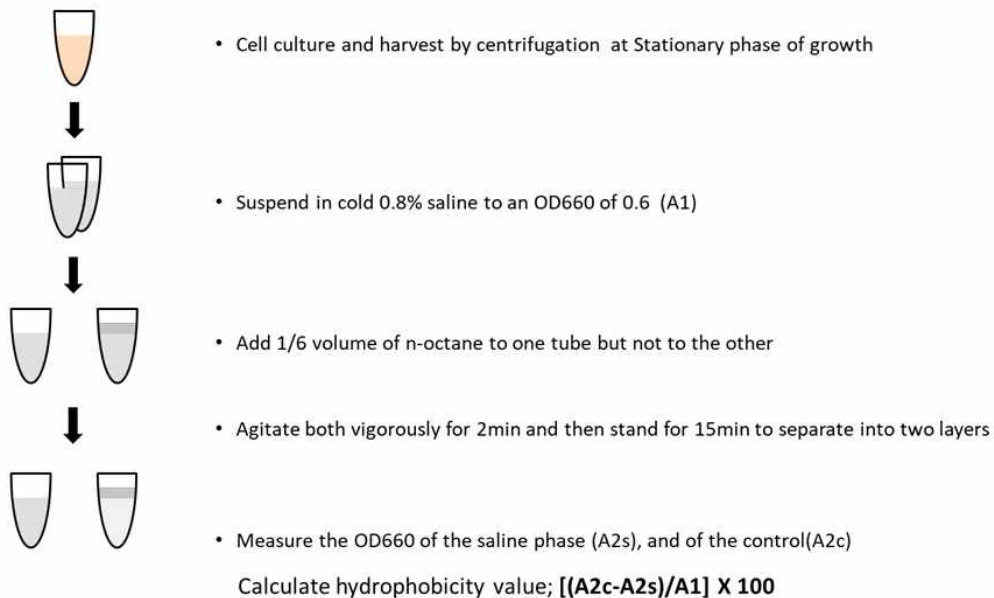


< *Chryseobacterium sp.* CC8C을 사용한 PLFA 분석 적용 결과 >

-극지 *Chryseobacterium sp.* 경우, 온도가 낮을 때, unsaturate17:1,w10, 16:1,w7c, anteiso-c15:0, 온도가 높을 때 saturated fatty acid 증가), Cy17:0 가 능은 다소 모호함.

-극지 미생물을 활용하여 Membrane fluidity, Hydrophobicity 측정법 구축<sup>10)</sup>

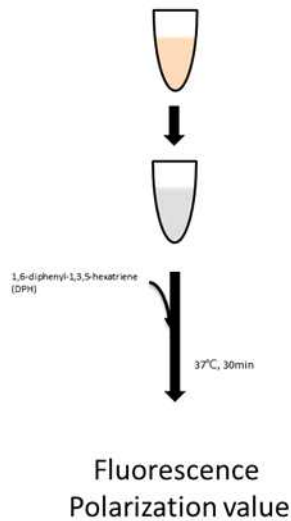
• **Membrane Hydrophobicity study**



< Membrane hydrophobicity 분석 방법 >

10) Aono, R., & Kobayashi, H. (1997). Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3637-3642.

## • Membrane fluidity study

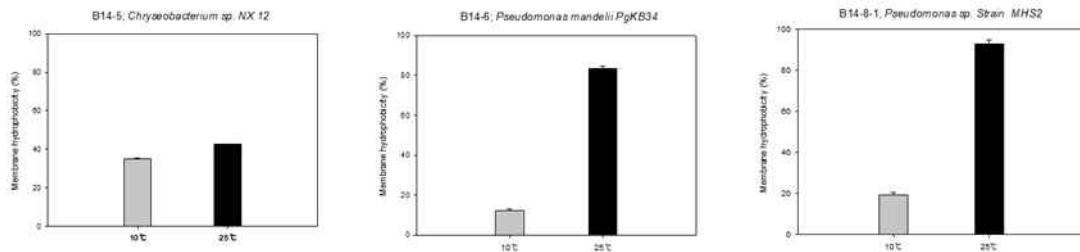


- Cell culture and harvest by centrifugation at Stationary phase of growth
  - washed twice in PBS, pH=7.0 and resuspend to OD600 of 0.6
  - incubated at 37°C for 30min with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) at a concentration 0.2uM (0.2mM stock in tetrahydrofuran)
  - Measure fluorescence polarization values with microplate reader using sterile black-bottom nunclon delta surface 96-well plate
    - 360/40nm fluorescence excitation filter
    - 460/40nm fluorescence emission filter
    - excitation polarized filter was set in the vertical position(lvv)
    - emission polarized filter either set in the vertical or horizontal position(lvh)
- G is the grating factor, assumed to be 1
- Polarization value P = (lvv-lvhG)/(lvv+lvhG)**

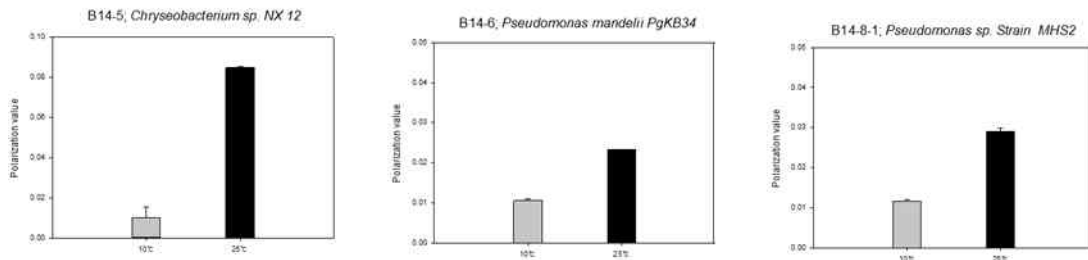
### < Membrane fluidity 분석 방법 >

-온도 변화에 따른 미생물 세포막 조성 변화가 발생하므로, 소수성 물질인 n-octane 및 DPH과의 상호작용에 차이가 발생하는 정도를 측정하고 해당 값들은 소수성 증가 시 상승, 감소 시 하락함.<sup>11)</sup>

11) Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., & Jarboe, L. R. (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on Escherichia coli membranes. Applied microbiology and biotechnology, 97(18), 8317-8327.



>Membrane hydrophobicity 측정 실험; 온도가 낮을수록 미생물 표면의 소수성이 감소하는 결과 확인



>Membrane fluidity 측정 실험; 온도가 낮으면 유동성 증가(unsaturated, branched, cycle form 증가)와 강한 소수성 형광물질인 DPH와 membrane fatty acid 분자들의 acyl group간의 결합이 어려워져 형광값이 감소하는 결과 확인

< Membrane hydrophobicity와 Membrane fluidity 방법을 통하여 *Chryseobacterium* sp. NX12, *Pseudomonas mandelii* Pgk834, *Pseudomonas* sp. MHS2을 사용한 분석 적용 결과>

-저온 환경에서 미생물은 세포막의 소수성을 감소시키고 이는 곧 n-octane과의 상호작용의 감소로 이어져 상대적 membrane hydrophobicity값이 감소함. 마찬가지로 소수성 형광물질인 DPH와의 상호작용 또한 감소하여 발생하는 형광값도 낮아지게 되어 형광수치(polarization value)가 감소하여 나타남.

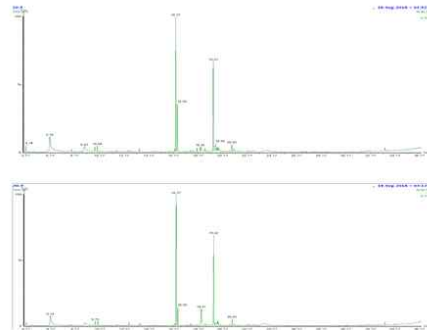
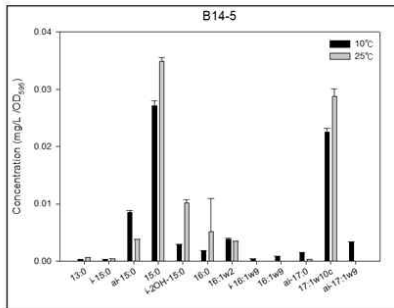
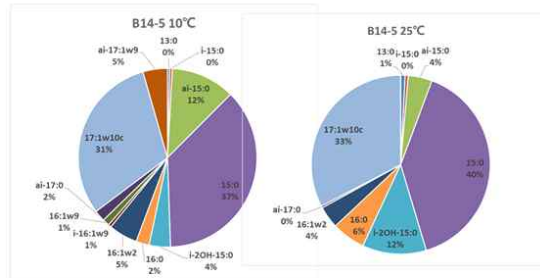
-소수성 및 유동성 실험을 통해 온도에 인한 미생물 세포막의 구조 변화를 관측이 가능하며, 대체로 PLFA 결과와 상관 관계가 있음.<sup>12)</sup>

12) Männistö, M. K., & Puhakka, J. A. (2001). Temperature- and growth-phase-regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater Proteobacteria. Archives of microbiology, 177(1), 41-46.

○ 극지 미생물을 활용하여 total fatty acid 분석 및 PLFA 분석법 비교

**Total fatty acid 분석**

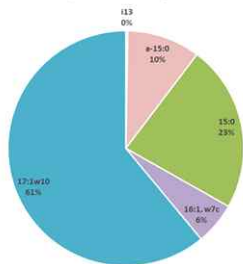
B14-5		
Total fatty acid	10°C	25°C
13:0	0.43 %	0.80 %
i-15:0	0.44 %	0.54 %
ai-15:0	11.59 %	4.33 %
15:0	37.00 %	39.71 %
i-20H-15:0	3.86 %	11.57 %
16:0	2.40 %	6.06 %
16:1w2	5.22 %	3.98 %
i-16:1w9	0.55 %	0.00 %
16:1w9	1.24 %	0.00 %
ai-17:0	2.01 %	0.34 %
17:1w10c	30.82 %	32.68 %
ai-17:1w9	4.45 %	0.00 %



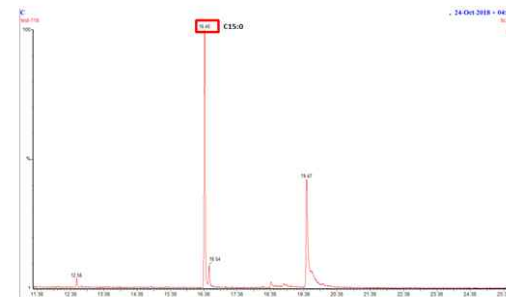
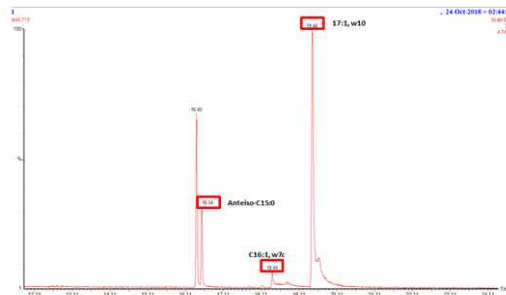
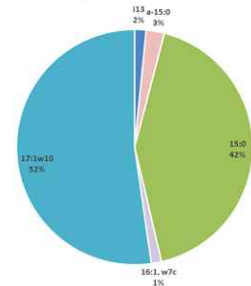
< *Chryseobacterium sp.* 의 total fatty acid 분석 결과 >

**PLFA result**

B14-5; *Chryseobacterium sp.* NX12 10°C



B14-5; *Chryseobacterium sp.* NX12 25°C



< *Chryseobacterium sp.* 의 total fatty acid 분석 결과 >

-PLFA 분석보다 쉬운 Total lipid 분석을 통하여 온도에 따른 영향을 볼 수 있으나, 상대적으로 PLFA 분석법이 간단하고 온도에 따른 영향을 쉽게 볼 수 있어, total fatty acid 분석 방법을 보조적으로 활용하는 것이 필요함.<sup>13)</sup>

○결론

-북극 유래 토양에서 다수의 미생물을 분리 및 동정

-분리 미생물들이 가지는 hydrolytic enzyme들을 관찰하여, 활성이 좋거나, 특이한 효소를 가지고 있는 미생물 발견

-지방산 실험을 위한 초기 배지 및 온도 조건 확인

-온도 변화에 따른 세포 인지질 구성의 변화 관찰

-Gram (-) 박테리아의 PLFA의 방법 확립

-온도 저하에 따른 적응으로 불포화지방산 증가가 PLFA 결과로써 관찰되며 불포화지방산 증가 정도에는 차이가 있는 것을 확인할 수 있음

-Gram (-)이며 저온 및 상온에서 좋은 생장을 보이며, 특히 저온에서 EPS 생산이 크게 증대되는 것으로 보이는 B14-6; *Pseudomonse mandelli* Pkg834 균주와 Gram (+)로서 높은 염도에서 생장이 가능하며 흥미로운 hydrolase 활성을 가진 B14-7; *Brachybacterium sp.* 등을 대상으로 하여 추가적인 실험을 진행할 계획임

---

13) Pratt B, Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. *Microb Ecol* 64:680 - 691

나. 2년차 연구내용

○ Transcriptome 분석을 위한 균주 및 분석을 위한 조건 확립

• Midtre Lovenbreen 토양으로부터 미생물 선별

B14-1	Streptomyces sp. ST28
B14-2	Chryseobacterium sp. CC8C
B14-3	Streptomyces sp. TTHQ-DM-4
B14-4	Streptomycesnojiriensis strain 173378
B14-6	Pseudomonas mandelii strain PgKB34
B14-7	Uncultured bacterium clone ncd93b10c1
B14-8-1	Pseudomonas sp. strain MHS2
B14-9	Bacillus infantis strain MP-7
1	Arthrobacter sp. MD72-14
2	Streptomycesnojiriensis strain 173378
3	Pseudomonas sp. strain KP-12-3
4	Streptomyces sp. Ats18
6	Pseudomonas sp. HC3-13
8	Variovorax sp. Abs3
9	Lentzea violacea strain 173540
10	Streptomyces sp. strain M5_8
11	Streptomyces avidinii strain IHBA 9319
14	Flavobacterium sp. Dra32
15	Pseudomonas sp. Enf53
16	Rhizobium sp. MN6-12
17	Pseudomonas sp. TSBY-66
23	Arthrobacter sp. strain IHBB 9579
24-2	Arthrobacter sp. MT-A-57
25	Arthrobacter oxydans strain IHBB 11124
27	Arthrobacter sp. strain IHBB 9579
29	Uncultured bacterium clone ncd460e02c1
31	Microbacterium maritipicum strain 28
32-1	Micrococcus luteus strain FC1737
33	Microbacterium sp. Rs52
34	Streptomyces sp. strain NSC30
35	Streptomyces microflavus strain 173339
36	Streptomyces sp. strain zw17
ex3	Streptomyces sp. Es11
ex4	Pseudomonas sp. TSBY-66
ex6	Pseudomonas mandelii strain AB16
ex7	Pseudomonas sp. B12(2012)
B14-A	Streptomyces sp. JK 3-2
B14-C	Arthrobacter sp. RKS6-4
B14-D	Devosia sp. Aza12
B14-F	Pseudarthrobacter sulfonivorans strain 253-HNR16
B14-m2	Pseudomonas mandelii strain H1
B14-m4	Pseudomonas sp. JA1

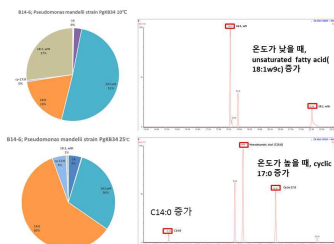
Species	isolates
Streptomyces	12
Pseudomonas	11
Arthrobacter	6
Flavobacterium	1
Microbacterium	2
Devosia	1
Variovorax	1
Lentzea	1
Uncultured	2
Rhizobium	1
Bacillus	1
Chryseobacterium	1
Micrococcus	1
Pseudarthrobacter	1

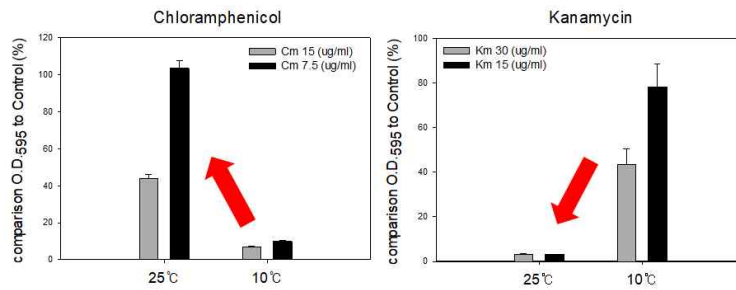
42 different isolates

Pseudomonas sp. B14-6의 선별

<1년차에 분리한 균주 리스트 및 Pseudomonas sp. B14-6의 선별>

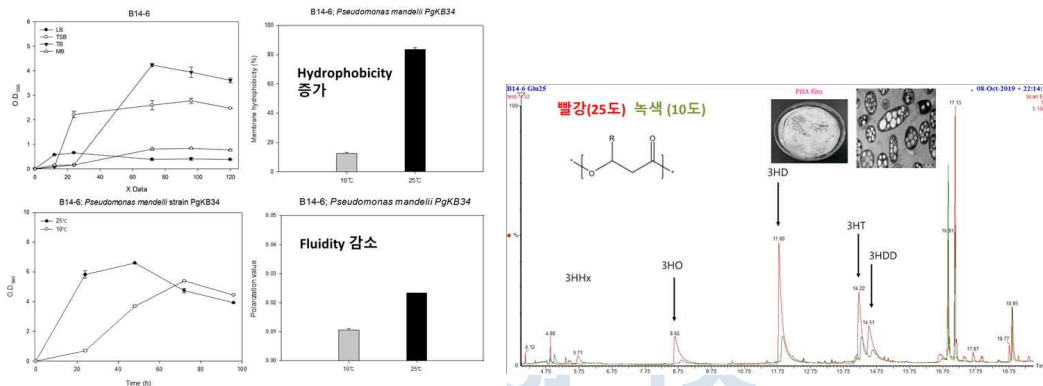
-1년차에 선별한 미생물중에 Pseudomonas는 11종 정도였으며, 그 중 온도에 따른 PLFA변화, 내성 변화, EPS 생산, PHA 생산 변화가 두드러진 Pseudomonas sp. B14-6를 선정후 다양한 연구를 지속





<Pseudomonas sp. B14-6의 온도에 따른 PLFA 분석 결과 및 항생제 내성 변화>

-Pseudomonas sp. B14-6의 저온에서의 cyclic 17:0의 증가 현상과 25도 상승시의 Chloramphenicol 내성 향상, Kanamycin 내성 감소 현상이 있음.



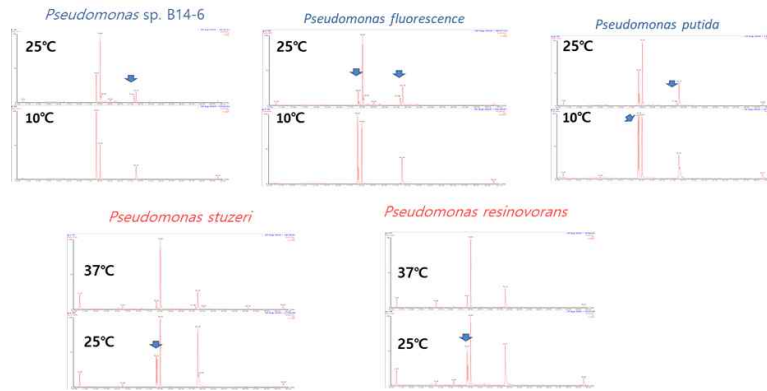
<Pseudomonas sp. B14-6의 온도에 따른 PLFA 분석 결과 및 항생제 내성, PHA 생산 변화>

-Pseudomonas sp. B14-6의 성장 조건 및 온도와 시간에 따른 성장, 온도 상승에 따른 membrane의 hydrophobicity 증가, fluidity 감소 현상을 발견

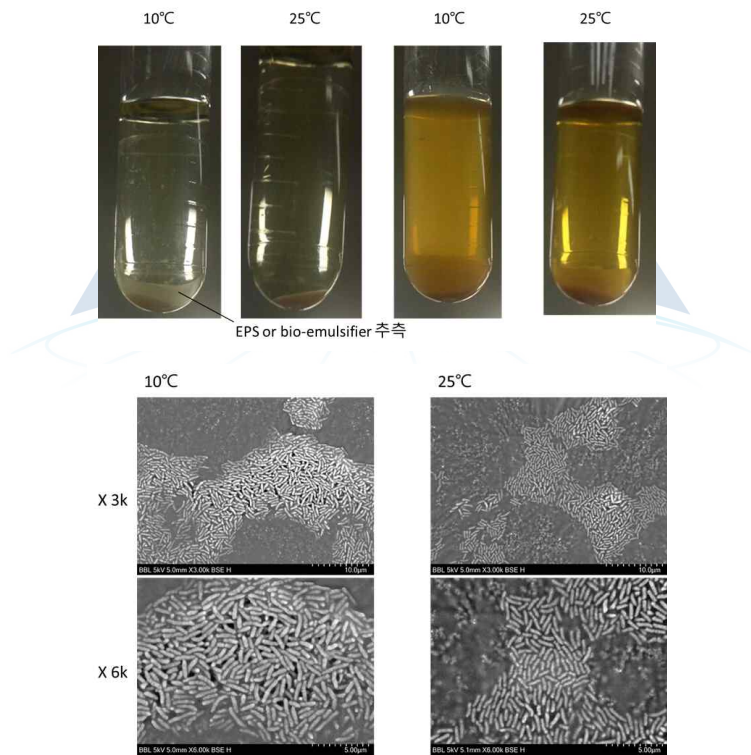
-미생물의 Carbon storage molecule로 사용되고 있는 polyhydroxyalkanoate (PHA)의 온도에 따른 생산 형태를 GC-MS로 관측하였고, 25도에서 상대적으로 PHA의 생산량이 높은 것을 알 수 있음<sup>14)</sup>.

14) Kourmentza, C., Araujo, D., Sevrin, C., Roma-Rodrigues, C., Ferreira, J. L., Freitas, F., ... & Reis, M. A. (2019). Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by Pseudomonas strains valorizing crude glycerol by-product. Bioresource technology, 281, 31-40.



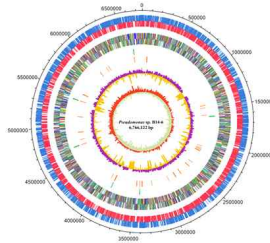


<*Pseudomonas sp. B14-6*의 온도에 따른 PHA 생산>



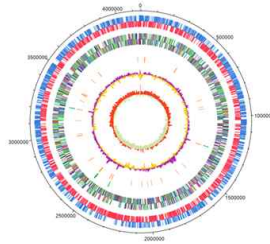
<*Pseudomonas sp. B14-6*의 온도에 따른 EPS 생산과 SEM image>

- 10도에서 많이 생산되던 EPS물질이 25도에서는 생산이 감소됨
- SEM결과 상으로는 온도에 따른 morphology나 이외의 특이점이 발견되지는 않았음.



***Pseudomonas sp. B14-6,***

Attribute	Values
Genome size (bp)	6,766,122
GC content (%)	59.14
rRNA genes	19
tRNA genes	67
Gene	6326
Gene length (bp)	5,831,520
Gene length/genome (%)	86.19



***Pseudomonas sp. PAMC 28620***

Attribute	Values
Genome size (bp)	4,148,661
GC content (%)	35.99
rRNA genes	15
tRNA genes	52
Gene	3,911
Gene length (bp)	3,700,395
Gene length/genome (%)	89

<*Pseudomonas sp. B14-6*과 *Pseudomonas sp. PAMC28620* genome sequencing 결과>

- B14-6과 함께 이전에 EPS와 PHA의 생산을 보고하였던 PAMC 28620에 대한 genome sequencing을 진행하였음.
- B14-6의 경우 6.7Mbp 정도 보통의 *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* 기준)의 size를 가지고 있는 반면 PAMC28620의 경우 4.1Mbp로 매우 작은 genome을 가지고 있음.
- GC contents의 경우도 보통은 60%이상인 경우가 많으나 두 균주다 상대적으로 GC contents가 낮음.

Cfa- 1 gene

SeqName	Description	Length	GO Names
orf06133_contig.1.cir	class i sam-dependent methyltransferase	1185	F:cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase activity; P:lipid biosynthetic process; P:methylation

항생제 내성 관련 유전자 -33 genes

orf00065_contig.1.cir	class c beta-lactamase	1167
orf01240_contig.1.cir	4-deoxy-4-formamido-l-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase	891
orf01242_contig.1.cir	bifunctional udp-glucuronic acid oxidase udp-4-amino-4-deoxy-l-arabinose formyltransferase	2007
orf01243_contig.1.cir	undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-l-arabinose transferase	1020
orf01700_contig.1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	867
orf01761_contig.1.cir	carboxylic ester hydrolase	1368
orf01801_contig.1.cir	Acylase	2346
orf03005_contig.1.cir	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	834
orf04249_contig.1.cir	glycosyl transferase family 51	3117
orf04486_contig.1.cir	penicillin-binding protein 2	1743
orf04493_contig.1.cir	penicillin-binding protein activator	1812
orf04664_contig.1.cir	penicillin-binding protein 1b	2226
orf04666_contig.1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	1557
orf05016_contig.1.cir	penicillin-binding protein 2	1896
orf05258_contig.1.cir	aminoglycoside phosphotransferase	843
orf05705_contig.1.cir	penicillin acylase family protein	2487
orf05869_contig.1.cir	nitrogen regulatory protein p-ii 2	339
orf06687_contig.1.cir	penicillin-binding protein	615
orf06784_contig.1.cir	Peptidase	2550
orf07440_contig.1.cir	penicillin-binding protein activator	519
orf08211_contig.1.cir	penicillin acylase family protein	2451
orf09108_contig.1.cir	penicillin-binding protein 2	1893
orf09163_contig.1.cir	Aminotransferase	1281
orf09170_contig.1.cir	macrolide abc transporter permease atp-binding protein	1974

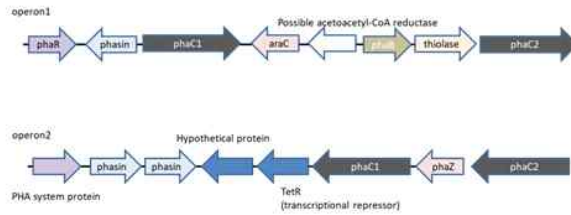
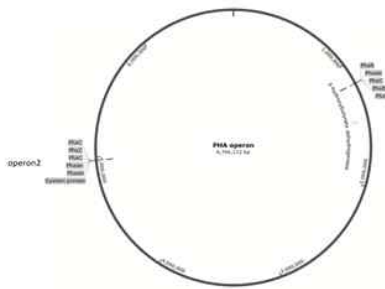
<Pseudomonas sp. B14-6에서 발견된 *cfa* 유전자와 항생제 내성 관련 유전자 일부>

-B14-6에서 cyclic form의 fatty acid를 만드는 유전자는 1개가 검색되었고, 항생제 내성 관련된 유전자들이 다수 검색됨.

-Kanamycin의 경우 2개의 유전자, chloramphenicol 내성 유전자로 annotation된 것은 나오지는 않아 추후 BLAST등의 search 진행 예정

### PHA 관련 유전자 - 12 genes

orf01537_contig.1.cir	polyhydroxyalkanoate synthesis repressor phaR	513	20	9.47508E-111	97.75		
orf01541_contig.1.cir	poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase Class? phaC	2469	20	0.0	93.2		contatin unknown function domain, class III phaC domain
orf01546_contig.1.cir	beta-ketoacyl-acyl reductase phaB	747	20	0.0	98.2	4	C:cytoplasm; P:poly-hydroxybutyrate biosynthetic process; P:oxidation-reduction process; F:acetoacetyl-CoA reductase activity
orf01550_contig.1.cir	class I poly-hydroxyalkanoic acid synthase ClassI phaC	1704	20	0.0	97.0	3	F:transferase activity, transferring acyl groups; C:cytoplasm; P:poly-hydroxybutyrate biosynthetic process
orf06757_contig.1.cir	polyhydroxyalkanoic acid system protein	276	20	2.32979E-57	98.05		putative polyhydroxyalkanoic acid system protein
orf06759_contig.1.cir	poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein phasin	423	20	5.18929E-93	97.55		
orf06760_contig.1.cir	poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein phasin	882	20	3.67883E-71	99.75		
orf06764_contig.1.cir	class II poly-hydroxyalkanoic acid synthase ClassII phaC	1683	20	0.0	98.35	2	F:transferase activity, transferring acyl groups; P:poly-hydroxybutyrate biosynthetic process
orf06766_contig.1.cir	poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase phaZ	855	20	0.0	99.35		
orf06769_contig.1.cir	class II poly-hydroxyalkanoic acid synthase ClassII phaC	1680	20	0.0	98.15	2	F:transferase activity, transferring acyl groups; P:poly-hydroxybutyrate biosynthetic process
orf01539_contig.1.cir	phasin	558	20	2.24041E-113	97.7		
orf01937_contig.1.cir	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	774	20	0.0	98.2	3	F:3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity; P:oxidation-reduction process; P:cellular ketone body metabolic process



### EPS 관련 - 40 개 유전자

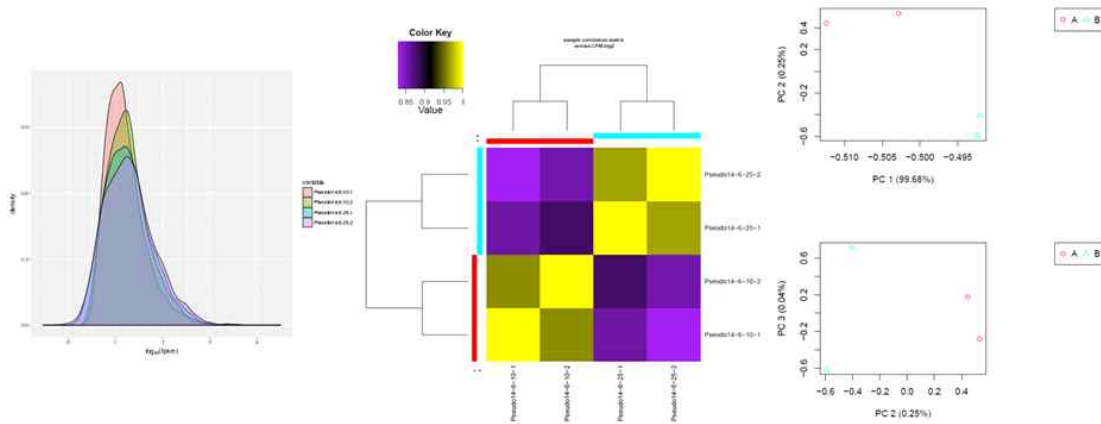
orf08469_contig.1.cir	glycosyltransferase	918	20	1.21845E-179	95.15	2
orf08874_contig.1.cir	glycosyltransferase	1008	20	0.0	76.7	2
orf08875_contig.1.cir	udp-glucose 4-epimerase	1041	20	0.0	96.55	4
orf08877_contig.1.cir	udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)	1131	20	0.0	96.15	
orf08878_contig.1.cir	glycosyltransferase	1221	20	0.0	87.75	
orf08879_contig.1.cir	sugar transferase	597	20	1.59369E-128	94.0	
orf08883_contig.1.cir	glycosyl transferase	1107	20	0.0	83.9	4
orf08884_contig.1.cir	polysaccharide biosynthesis protein	1767	20	0.0	97.3	1
orf01233_contig.1.cir	glycosyltransferase	1581	20	0.0	90.5	2
orf01235_contig.1.cir	udp-glucose gdp-mannose dehydrogenase family protein	1380	20	0.0	97.5	7
orf01236_contig.1.cir	n	402	20	6.78196E-48	94.1	5
orf01237_contig.1.cir	4-amino-4-deoxy-l-arabinose-phospho-udp flippase	345	20	4.74668E-46	94.45	5
orf01245_contig.1.cir	udp-4-amino-4-deoxy-l-arabinose aminotransferase	1278	20	0.0	96.05	6
orf01246_contig.1.cir	integrase	891	20	0.0	97.75	3
orf02369_contig.1.cir	nad-dependent epimerase	915	20	0.0	90.45	4
orf02378_contig.1.cir	udp-glucose 6-dehydrogenase	1257	20	0.0	94.05	7
orf02380_contig.1.cir	glycosyltransferase	705	20	9.65262E-172	91.95	2
orf02382_contig.1.cir	glycosyltransferase	1083	20	0.0	88.85	2
orf02383_contig.1.cir	glycosyltransferase	1113	20	0.0	92.85	2
orf02386_contig.1.cir	glycosyltransferase family 2 protein	903	20	0.0	95.1	2
orf02387_contig.1.cir	polysaccharide biosynthesis protein	1419	20	0.0	93.2	2
orf02389_contig.1.cir	udp-glucose 4-epimerase	1056	20	0.0	94.3	4
orf02390_contig.1.cir	glycoside hydrolase	1473	20	0.0	89.95	2
orf02391_contig.1.cir	MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudomonas]	126	20	1.32113E-20	83.45	
orf02392_contig.1.cir	acyltransferase	1050	20	0.0	91.25	3
orf02394_contig.1.cir	maltose alpha-d-glucosyltransferase	2067	20	0.0	97.65	3

<Pseudomonas sp. B14-6에서 발견된 PHA 합성 유전자와 EPS 합성 관련 유전자 일부>

-B14-6에서 Carbon storage 물질로 알려진 PHA 합성 유전자가 12개 정도 발견되며 2개의 gene cluster를 이루고 있음.

-EPS 생산과 관련된 UDP-glucose 합성 유전자들이 다수 발견

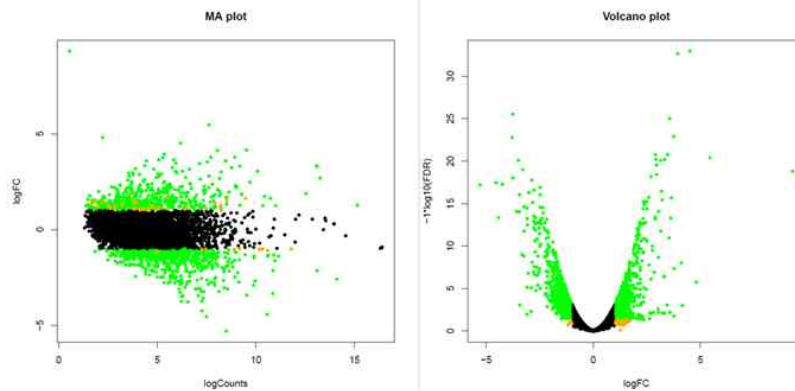
○ Transcriptome 분석을 통한 온도 영향 분석



- 분석 회사: DNAlink
- 분석 샘플: 10도, 25도, 72시간, Duplicate
- 분석 시간: 2019.06.20 – 2019.09.04 (10주)

<Pseudomonas sp. B14-6을 활용한 transcriptome 분석결과>

- B14-6을 사용하여 10도 25도 72시간에 대하여 duplicate RNAsequencing을 실시함
- 시간에 따른 차이도 함께 보는 경우도 있으나 너무 다량의 데이터의 처리로 오는 어려움이 많아 온도에 따른 현저한 차이를 보이는 유전자에 대하여 RT를 통하여 다시 확인하는 작업을 진행함
- 2개의 샘플 중에 duplicate간에 차가 크지 않음을 확인하는 실험을 통하여 온도 영향으로 인한 변화들이 샘플간의 차이와 다르게 묶일 수 있음을 알 수 있음.



• 전체 6300여 유전자 중 2-fold 이상 up or down된 유전자 1415개

25도에서 up-regulated 된 유전자들

-4.246138	gtaB_2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
-3.489086	wcaJ	UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferase
-3.285559	galE_2	UDP-glucose 4-epimerase

10도 에서 up-regulated 된 유전자들

3.15363	phaB	Acetoacetyl-CoA reductase
3.541956	hag	Flagellin
4.517874	chiD	Chitinase D

<Pseudomonas sp. B14-6을 10도와 25도 차이를 나타내는 유전자 비교>

-RNAseq 결과 6300여 유전자 중 1415개 정도가 차이를 나타내었으며, 특히 큰 차이를 나타낸 것들 중에 UDP관련 유전자나, PhaB, flagellin 등이 나타남.

tRNA

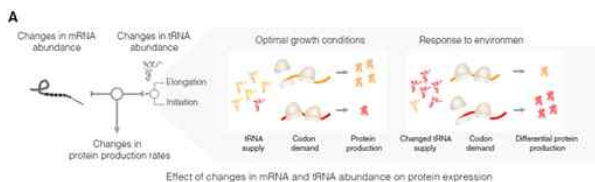
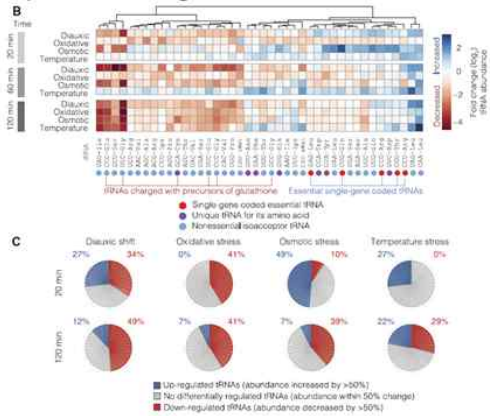
• 2-fold 이상 25도에서 up된 tRNA

tRNA-Val(gac)	tRNA-Phe(gaa)
tRNA-Arg(cct)	tRNA-Leu(tag)
tRNA-Asn(gtt)	tRNA-Leu(cag)
tRNA-Ser(gga)	tRNA-Leu(taa)
tRNA-Trp(cca)	tRNA-Ser(cga)
tRNA-Met(cat)	tRNA-Pro(ggg)
tRNA-Ala(tgc)	tRNA-Gly(gcc)
tRNA-His(gtg)	tRNA-Thr(tgt)
tRNA-Thr(cgt)	tRNA-Leu(gag)
tRNA-Met(cat)	

SCIENCE SIGNALING | RESEARCH ARTICLE

STRESS RESPONSES

Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions



<2-fold 이상 25도에서 up된 tRNA들>

-25도와 10도에서 tRNA가 매우 많이 up된 것들이 존재하는 것을 알 수 있었으

며, 이는 기존 보고와 같이 stress 상황에서 필요한 단백질 합성에 유리한 tRNA가 많이 만들어 지는 원리와 비슷하다고 할 수 있으며, 온도와 관련해서 tRNA가 어떤 역할을 하고 있음을 알 수 있는 사례임.

Housekeeping	glycosyltransferase (hypothetical protein)	-0.000190991
	mfs transporter(hypothetical protein)	-0.000160601
Cold shock	Cold shock-like protein CspD	1.680642266
	Cold shock protein CapB	2.482827716
	Major cold shock protein CspA	-0.066422927
	cold-shock protein	-1.137400234
	Major cold shock protein CspA	1.203778401
	Cold shock protein CapB	0.838585983
	ATP-dependent RNA helicase DeaD	-0.729136091

#### <housekeeping 유전자와 cold shock 유전자 결과>

-housekeeping 유전자로 활용되거나 활용될 수 있는 유전자들을 검색할 수 있고, cold shock 관련 다양한 유전자중 10도에서 발견되는 *cspD*, *capB*, *cspA* 등이 있고, 오히려 25도에서 발견이 많이 되는 cold-shock protein들도 알 수 있었음.



#### • 10도에서 up된 것 (+), 25도에서 up된 것 (-)

Gene cluster	Gene name	Fold change(LogFC)
PHA	polyhydroxyalkanoate synthesis repressor	0.317442641
	phasin	2.173342262
	poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase	0.395741261
	Acetoacetyl-CoA reductase	3.153630438
	Acetyl-CoA acetyltransferase	2.585892031
	Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase subunit PhaC	1.87381749
	polyhydroxyalkanoic acid system protein	0.513241062
	poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein	0.58440066
	poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein	1.433706458
	class ii poly -hydroxyalkanoic acid synthase	0.510553873
	poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase	-0.413514891
	class ii poly -hydroxyalkanoic acid synthase	-0.600517813
	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	0.790005565
	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	-0.600167791
	CFA	Cyclopropane-fatty acid synthase

#### <PHA와 CFA mRNA expression 결과>

-Carbon storage molecule로 사용되는 PHA 유전자들의 패턴을 보면 25도에서 대부분 up이 될 것으로 예상되었으나, 합성 관련 유전자들은 오히려 10도에서 up이 되었고, 25도에서 depolymerase들이 up이 되는 현상이 발견

-아울러 CFA 유전자의 경우 크게 변화를 보인 것은 아니나 10도에서 더 up이 되었음.

• 10도에서 up된 것 (+), 25도에서 up 된 것 (-)

Antibiotic (Aminoglycoside)	aminoglycoside phosphotransferase(putative protein)	-1.424096736
	aminoglycoside phosphotransferase(N-acetylmuramate/N-acetylglucosamine kinase)	-0.626968259
Antibiotic (penicillin)	class c beta-lactamase	0.262136284
	aminotransferase(Isopenicillin N epimerase)	-2.468658011
	aminotransferase class v-fold plp-dependent enzyme (Isopenicillin N epimerase)	-1.103298428
	glycosyl transferase family 51 (hypothetical protein)	0.816435096
	carboxylic ester hydrolase(putative protein)	-0.1191566
	nitrogen regulatory protein p-ii 2 (glnK)	-0.168733447
Antibiotic (polymyxin)	(putative 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase ArnD)	-0.833544802
	polymyxin & cationic antimicrobial peptide(Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA)	-0.66481923
	polymyxin & cationic antimicrobial peptide(Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase)	-0.435466754
Antibiotic (macrolide)	efflux rnd transporter periplasmic adaptor subunit(Macrolide export protein MacA)	1.001310278
	rnd transporter(Toluene efflux pump outer membrane protein TtgF)	-2.85535169
	macrolide abc transporter permease atp-binding protein(Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB)	-2.480550796
	efflux rnd transporter periplasmic adaptor subunit(Macrolide export protein MacA)	-3.08346262
	multidrug rnd transporter(Toluene efflux pump outer membrane protein TtgF)	-1.499816282
	family multidrug efflux transporter periplasmic adaptor subunit(Multidrug export protein EmrA)	-1.223821101
	mfs transporter(Multidrug export protein EmrB)	0.019768587

<항생제 내성 관련 유전자들>

-Aminoglycoside와 관련된 2개의 유전자의 경우 25도에서 up이 되어 고온에서 내성을 잃는 현상과는 반대의 결과가 나왔음.

-이것은 항생제의 내성이 유전자 level에서 차이를 보인다는 것보다 다른 수준 (membrane 등)에서 차이가 있음을 의미한다고 할 수 있음.

Class	Possible protein	logFC	length
Housekeeping	glycosyltransferase (hypothetical protein)	-0.00019	1293
	mfs transporter(hypothetical protein)	-0.00016	1206
Antibiotic (Aminoglycoside)	aminoglycoside phosphotransferase(putative protein)	-1.4241	1557
Antibiotic (penicillin)	aminotransferase(Isopenicillin N epimerase)	-2.46866	1182
	aminotransferase class v-fold plp-dependent enzyme (Isopenicillin N epimerase)	-1.1033	1182
Antibiotic (macrolide)	efflux rnd transporter periplasmic adaptor subunit(Macrolide export protein MacA)	1.00131	1068
	rnd transporter(Toluene efflux pump outer membrane protein TtgF)	-2.85535	1395
	macrolide abc transporter permease atp-binding protein(Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB)	-2.48055	1974
	efflux rnd transporter periplasmic adaptor subunit(Macrolide export protein MacA)	-3.08346	1173
	multidrug rnd transporter(Toluene efflux pump outer membrane protein TtgF)	-1.49982	1470
	family multidrug efflux transporter periplasmic adaptor subunit(Multidrug export protein EmrA)	-1.22382	1203
Antibiotic (multidrug)	efflux transporter periplasmic adaptor subunit(Efflux pump periplasmic linker BepF)	-1.47711	1254
	efflux rnd transporter periplasmic adaptor subunit(Multidrug/solvent efflux pump periplasmic linker protein MepA)	-1.10231	1158
	mfs transporter(Multidrug resistance protein Stp)	1.935488	1539
	family drug resistance transporter	-1.61339	270
	family drug resistance transporter(Multidrug export protein EmrB)	-1.34347	1359
Cold shock	Cold shock-like protein CspD	1.680642	282
	Cold shock protein CapB	2.482828	213
	cold-shock protein	-1.1374	603
	Major cold shock protein CspA	1.203778	210
Heat shock	Small heat shock protein lbpA	-2.78061	444
	heat-shock protein	1.407595	129

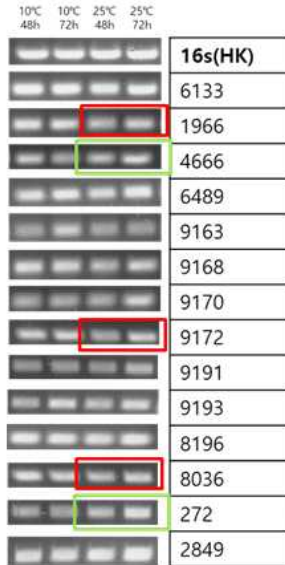
<RT-target들>

-이상의 결과들로부터 up이 확실한 것들을 target으로 다시 semi-RT-PCR을 실시



○ 온난화 관련 주요 유전자 발굴

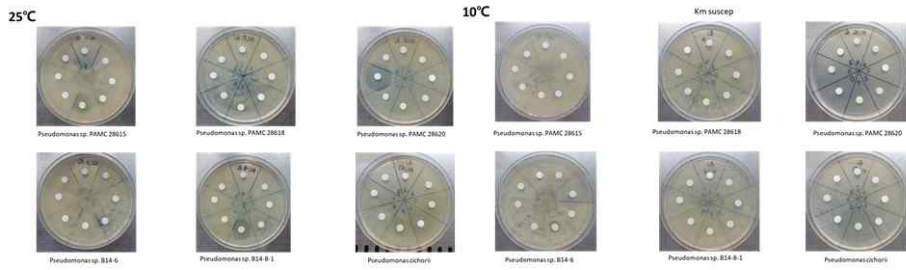
RT-PCR 추출 QC / 결과들



Orf no.	Name
Null	16s rRNA
6133	cfa
1966	mfs transporter
4666	Aminoglycoside phosphotransferase
6489	Macrolide export protein MacA_1
9163	aminotransferase
9168	Toluene efflux pump outer membrane protein TtgF
9170	Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB
9172	Macrolide export protein MacA_2
9191	family drug resistance transporter
9193	family drug resistance transporter
8196	cold-shock protein Cold shock protein CapB_2
8036	Major cold shock protein CspA
272	dna-binding protein Cold shock-like protein CspD
2849	cold-shock protein Cold shock protein CapB_1

<semi RT-PCR 결과>

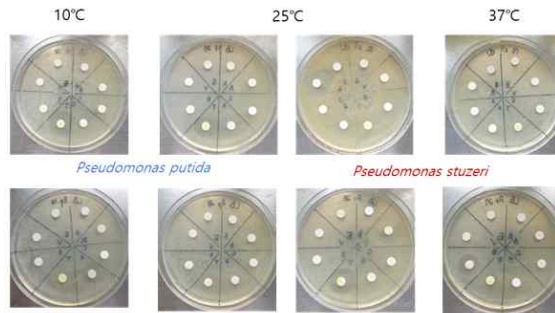
- RNAseq의 결과를 토대로 타겟들을 선별하여 시간에 따른 semi-reverse transcrption PCR을 실시 하였음.
- RNAseq 데이터와 RT-PCR 데이터의 차이가 상당히 존재했으며, 온도와 시간에 따라 명확하게 다르게 보이는 타겟들로 1966, 8036, 9172 (붉은색), 272,4666 (연두색) 등이 10도에서 up되거나, 25도에서 up이 되어 온도/시간에 따라 변화를 보이는 것으로 보임.
- 추후 이러한 target들을 더 발굴하여 현상과 연결지어 온도 상승이 미치는 현상과 관련한 연구를 진행할 예정임.
- 타겟은 지방산 생산, 대사체 등이 될 수 있으며, 이를 통하여 현상-지방산-유전체-대사체 등의 연결 고리들로 현상들을 설명할 수 있을 것임.



균주	온도	Km	CI
<i>Pseudomonas</i> PAMC28615	10	○ (live)	○
	25	× (dead)	○
<i>Pseudomonas</i> PAMC 28618	10	○	○
	25	×	○
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-6	10	○	×
	25	×	○
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-8-1	10	○	○
	25	×	○
<i>Pseudomonas cichorii</i>	10	○	○
	25	×	○

- Mfs transporter, Macrolide export 10도 up
- Aminoglycoside phosphotransferase 25도 up
- CspA: 10도 up
- Cold shock CspD: 25도 up
- 대체로 Psychrophile에서 Kanamycin 내성이 25도에서 감소하는 경향성을 보임

<Psychrophile들의 온도에 따른 항생제 내성 결과>

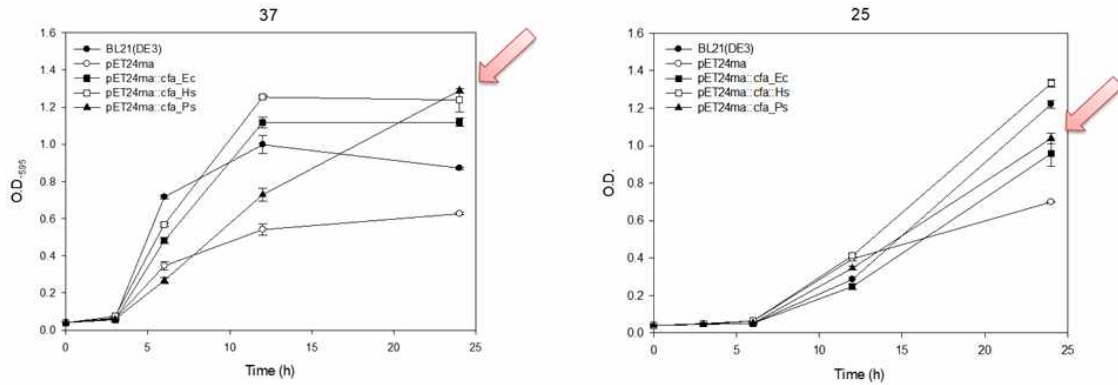


균주	온도	<i>Pseudomonas fluorescense</i>				<i>Pseudomonas resinovorans</i>				
		Km	Cm	Amp	Spec	Tet	Oxa	Van	Ery	
<i>Pseudomonas</i> sp. B14-6	10	○ (live)	×	○	○	○	○	○	○	○
	25	×	(dead)	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas putida</i>	10	○	○	○	○	○	○	○	○	×
	25	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	10	×	○	○	○	×	○	○	○	×
	25	○	×	○	○	×	○	○	○	○
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	25	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	37	×	○	×	○	○	○	○	○	○
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	25	○	○	×	○	×	○	○	○	○
	37	○	○	○	○	○	○	○	○	○

<Mesophile과의 온도에 따른 항생제 내성 결과 비교>

- 항생제 내성과 온도와의 관련성에 대한 연구를 통하여 항생제에 영향을 미치는 온도와 관련된 인자에 대한 연구를 진행하고 있음
- Psychrophile들의 경우 kanamycin 내성이 온도가 상승하면 감소하는 경향이 있음
- 그러나 항생제 내성은 균주 specific한 부분이 있어 균주별 study가 필요한 부분이 있음-미생물이 온도에 따라 상당히 다른 내성 패턴을 보인다는 부분은 향후

온난화와 관련한 미생물의 성장과 내성, 활용 부분에서 많은 고려해야 될 부분이 있다는 사실임.

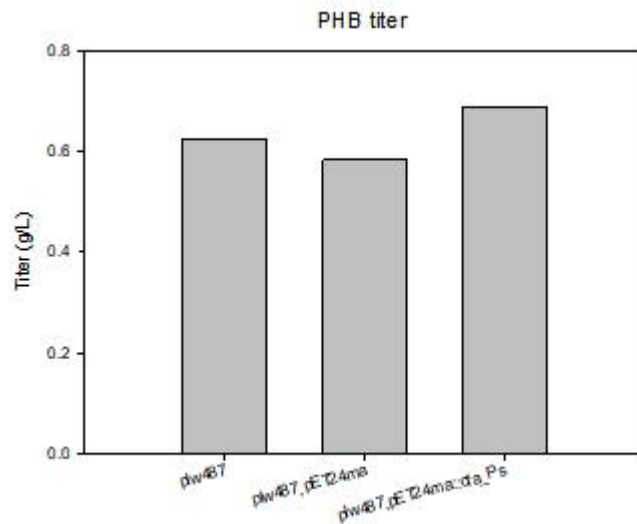


<유래가 다른 CFA를 대장균에서 발현시에 성장에 미치는 효과 비교>

-유전자 발현 수준에서는 크게 차이를 보이지 않았으나, CFA유전자의 경우 성장에 미치는 효과가 있어서<sup>15)</sup> 다양한 유래별 CFA를 대장균에 발현하여 그 효과를 비교하였음.

-*E. coli* 유래 (Ec), 내염 박테리아인 *Halomonas socia* 유래 (Hs), 극지 미생물 *Pseudomonas* 유래 (Ps)를 대장균에 발현하였을 때 *Halomonas* 유래의 CFA가 가장 좋으나, 극지 유래 CFA인 Ps도 공vector만 들어 있는 control(pET24ma)과 아무 vector도 들어 있지 않은 BL21보다 좋은 성장을 보여주고 있어 향후 미생물 생산에 적용될 수 있음.

15) Amiri Moghaddam, J., Dávila-Céspedes, A., Kehraus, S., Crüsemann, M., Köse, M., Müller, C. E., & König, G. M. (2018). Cyclopropane-containing fatty acids from the marine bacterium *Labrenzia* sp. 011 with antimicrobial and GPR84 activity. *Marine drugs*, 16(10), 369.



< CFA를 대장균에서 발현하여 PHA를 생산하는 균주에 미치는 효과 비교 >

- 하나의 예로 극지 유래 CFA를 사용하여 *E. coli*에서 PHA를 생산하는 유전자를 가진 균주에 넣었을 때 생산량이 증가하는 현상을 관찰
- 이것은 대개의 PHA 생산이 생장에 비례하는 바, CFA를 통해 세포의 생장을 증대시켜서 그 결과로 세포내에 존재하는 PHA의 생산량을 늘린 사례로 극지 유전 자원의 활용을 보여 주는 예임.

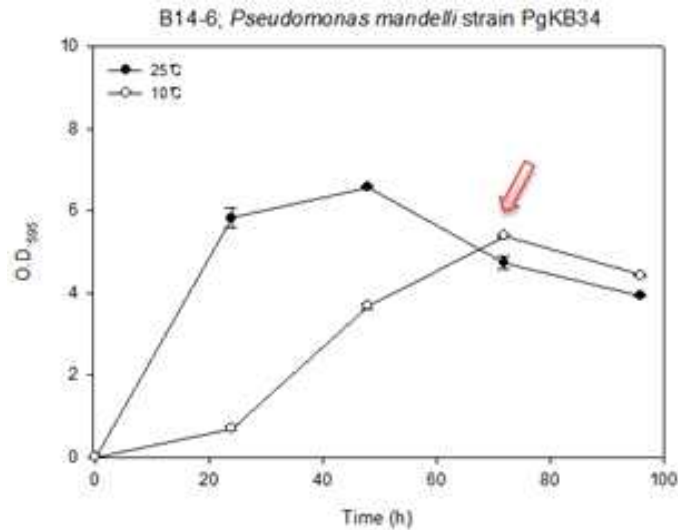
다. 3년차 연구내용

○ 세포 내외의 대사체 분석

- 극지 미생물의 대사체 분석을 위한 조건을 setup

(1) 분석을 위한 성장 조건

*Pseudomonas* sp. 14-6을 사용하여 intracellular 및 extracellular metabolite를 분석하였으며 분석을 위한 샘플 준비로써 terrific broth (12g/L tryptone, 24g/L yeast extract, 9.4g/L dipotassium phosphate, 2.2g/L monopotassium phosphate, 4ml/L glycerol)에 10도 및 25도 조건으로 72시간 동안 배양한 미생물을 사용하였다.



<대사체 분석을 위한 미생물 harvest 시점>

(2) 분석 샘플 전처리

(2)-1. Intracellular metabolite 샘플의 전처리

배양된 미생물 1ml을 4°C, 4000xg에서 4분간 원심분리하여 상등액을 전부 분리하였다. 침전된 미생물은 5ml 0.9% 식염수로 두 번 세척해 잔류한 배지 성분을 제거하였다.

추출용매로써 acetonitrile/methanol/water=40:40:20+0.1M formic acid 및 내부표준물질로 1µg/mL of L-Phenylalanine-13C9, 15N (Sigma Aldrich, MO, USA)를 사용하였다.

300µL의 추출용매를 준비된 미생물 시료에 투입하여 대사를 멈추고 충분히 강하게 섞어 모든 세포가 파괴되도록 하여 1.5ml 튜브에 옮겨담고 -80도에서 15분간 방치하였다. 이후 13,200 rpm, 4도 조건에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 따로 모아담은 뒤 200µL의 추출용매를 추가하여 앞선 과정을 반복하고, 이는 두 번 진행하였다. 총 세 번의 추출 과정으로 모인 700µL의 추출용매를 vacuum concentrator를 이용하여 농축한 뒤, 추출된 물질을 150µL의 50% 메탄올에 녹여준 뒤, 0.22 µm PVDF 필터를 이용하여 필터링하여 샘플을 준비하였다.

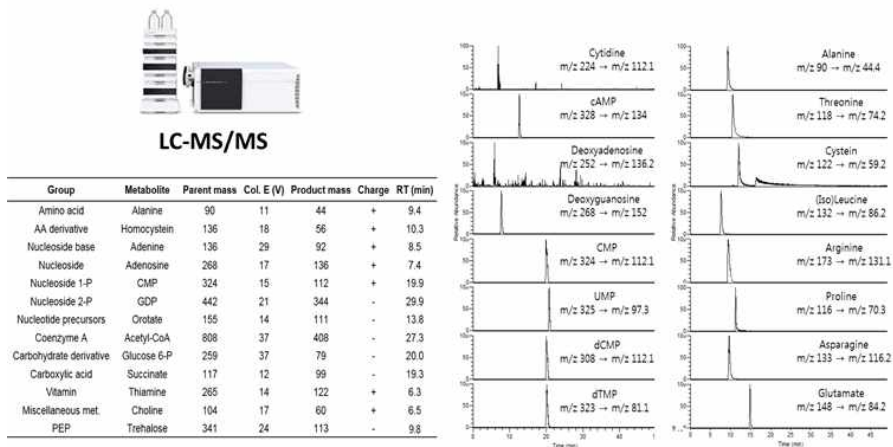
(2)-2. Extracellular metabolite 샘플의 전처리

배양된 미생물 1ml을 4°C, 4000xg에서 4분간 원심분리하여 상등액을 전부 분리하였으며 해당 상등액을 대상으로 대사물질 추출 과정을 진행하였다.

2ml 튜브에 400µL의 상등액을 옮겨 담고, 800µL의 클로로포름 및 10µg/ml L-Phenylalanine-13C9, 15N가 포함된 400µL의 메탄올을 첨가하여 3분간 강하게 섞어준 뒤 13,200rpm 조건에서 3분간 원심분리 하여 층분리를 유도한다. 이후 친수성 용매 층으로써 상층액 400µL을 조심스럽게 1.5ml 튜브에 옮겨 담는다. 이후 0.22µm PVDF 필터를 이용하여 필터링하여 샘플을 준비하였다.

(3) 분석 방법

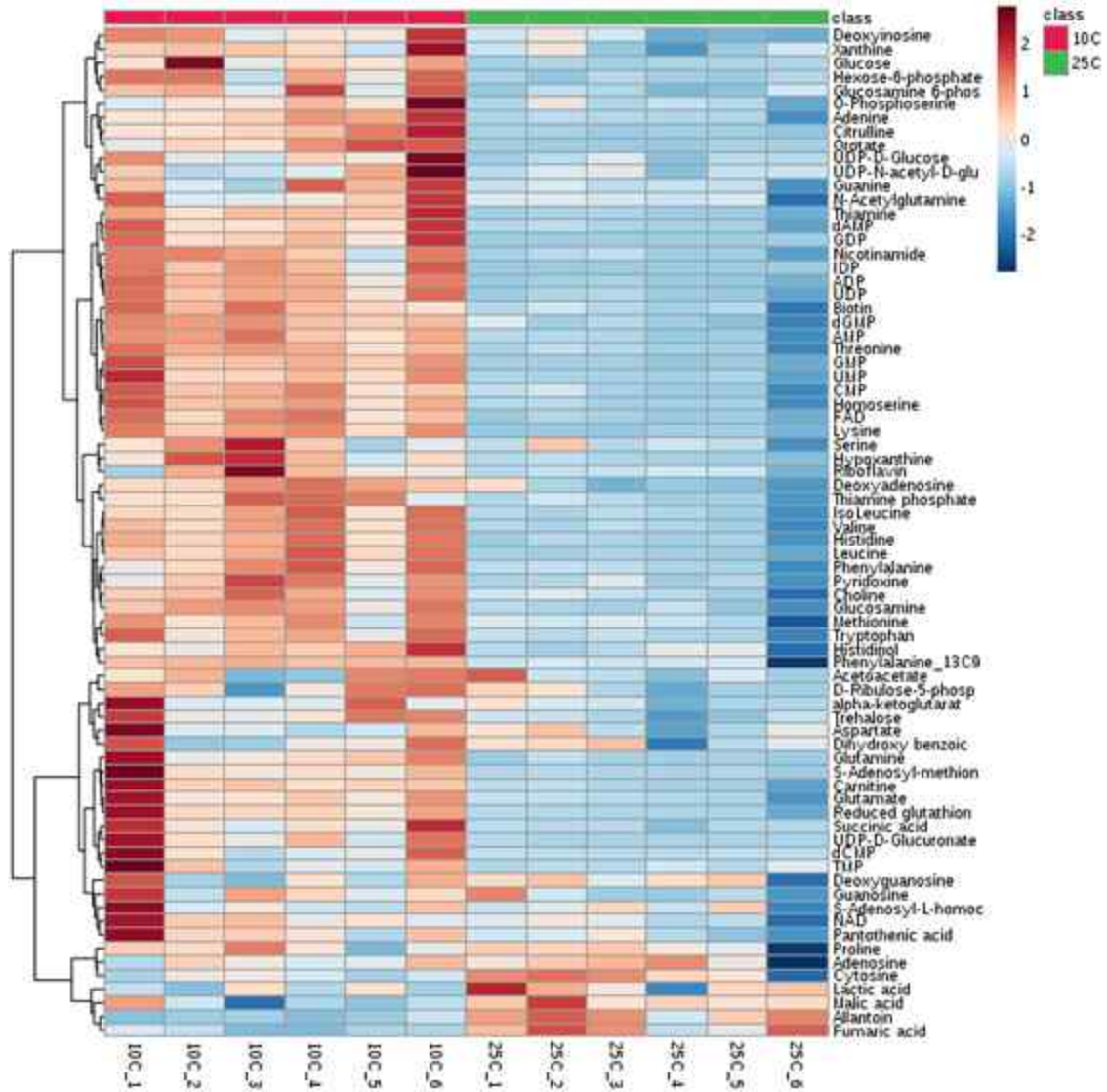
- 숭실대 화학공학과 김윤곤 교수님 팀의 도움을 받아 LC-MS/MS를 통하여 세포내외의 미생물 주요 대사체 중 친수성 대사체 MRM 분석을 실시함.
- 10 $\mu$ L의 대사체 샘플 용액을 컬럼으로 Luna NH2 column (Phenomenex, CA, USA)가 장착된 LC-MS/MS에 주입하였다. 용매 A로 20mM ammonium acetate+ 20mM ammonium hydroxide in 95:5 water:acetonitrile가 사용하였으며 용매 B로 100% acetonitrile이 사용하였다. 이동상에 대한 설정으로 150 $\mu$ L/min 의 flow rate 및 LC의 gradient method 로써 t=0 min, 85% solvent B; t=15min, 0% solvent B; t=38min, 0% solvent B; t=40min, 85% solvent B; t=50min 85% solvent B로 진행하였다.



<LC-MS/MS를 사용한 대사체 분석 예시>

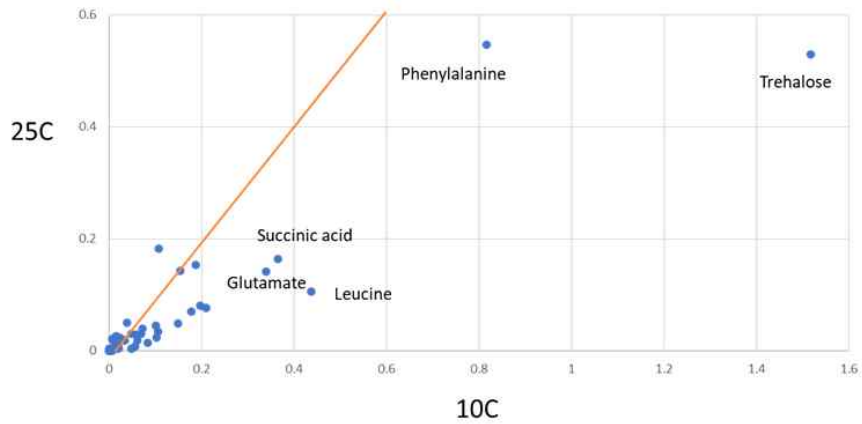
- 130여개의 친수성 대사체에 대한 정보를 활용하여 standard가 존재하는 물질에 대한 Targeted analysis를 진행하였으며 데이터의 신뢰성을 위해 온도마다 6개의 샘플을 사용하여 분석하였음.

(4) 분석 결과



<세포 내 대사체 분석 결과>

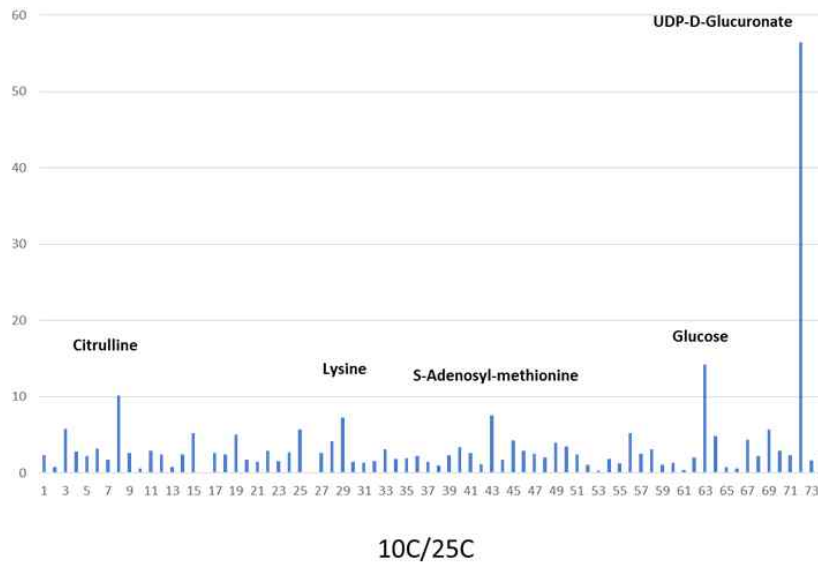
- 10도 배양 샘플에서 세포 내 대사체 분석 결과에서 다수의 대사체들이 더 높은 농도로 존재하는 결과를 얻을 수 있었으며, 따라서 동일 시점 배양 시, 10도의 미생물이 더 활발한 대사를 가진다고 추정할 수 있음
- 예상과 달리 온도에 따른 대사체의 변화의 차이가 매우 확연하여, 지방산 관련 된 특정 물질들의 차이를 확인할 수는 없었음.
- 25도의 세포내에 유기산(Malic acid, Fumaric acid 등)과 Cytosine, adenosine 등의 base들이 상대적으로 많이 존재하고 있음



<10도와 25도에서 분석한 세포내 대사체의 signal 비교>

-10도와 25도에서 분석한 물질의 detection된 signal을 기준으로 비교해 보았을 때 10도에서 trehalose, phenylalanine, Leucin, Glutamate, Succinate 들이 높은 시그널로 나타남.

-특히 trehalose의 경우 동결 보존물질로 많이 사용되는 바 저온과 상관있는 물질로 추정

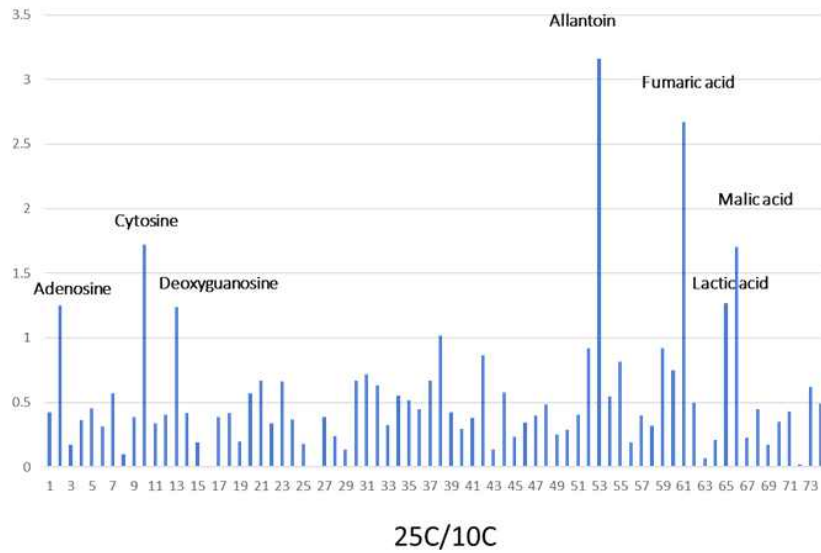


<25도와 비교하였을 때 10도에서 많이 존재하는 세포내 대사체>

-10도와 25도의 signal을 비교하여 볼 때 특히 많이 나온 물질들은 아미노산 종류로는 citrulline, lysine이 많이 검출되며, EPS 등에 관여하는 UDP-D-Glucuronate의 양의 변화가 매우 크게 나옴

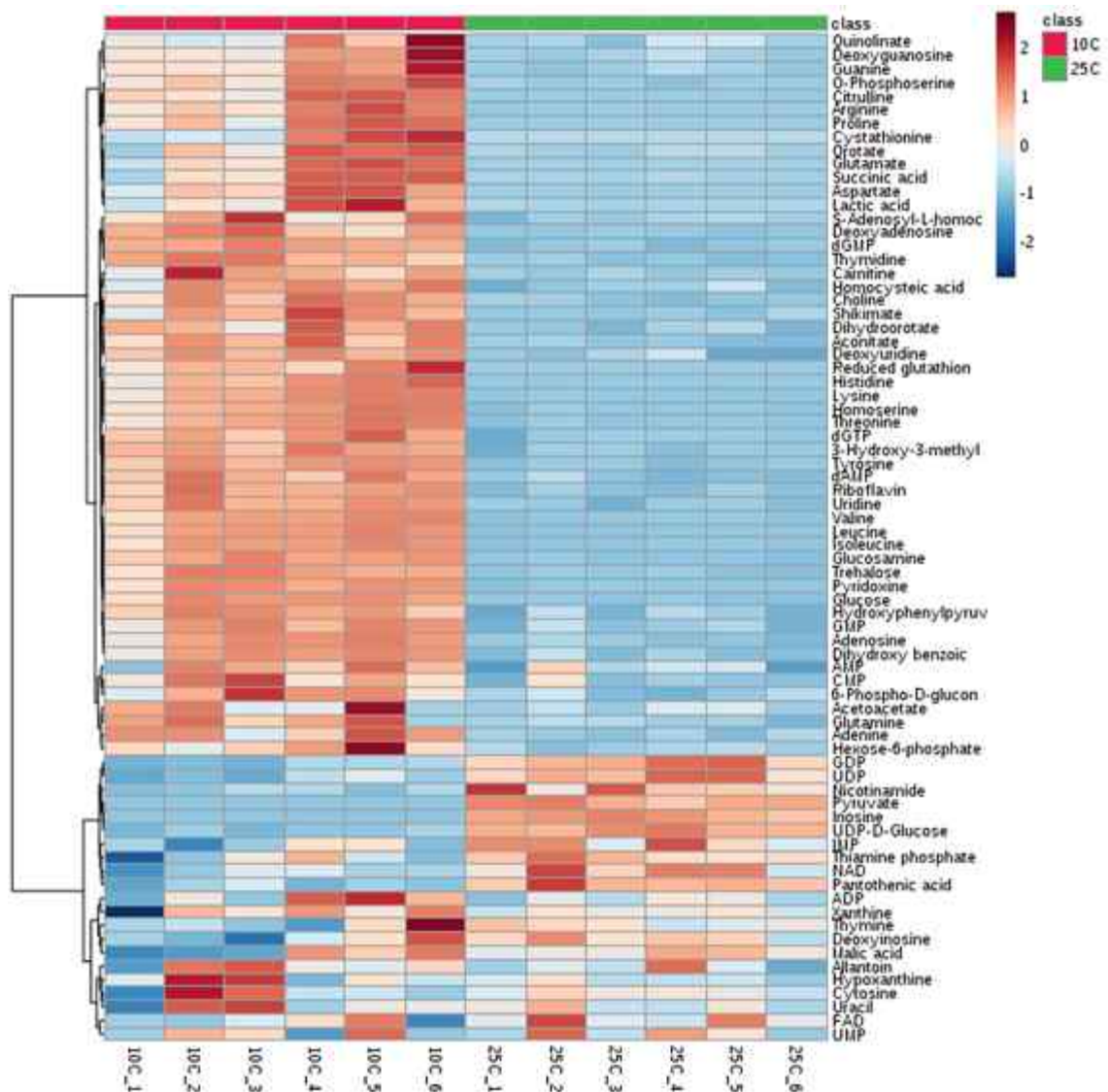
-아울러 체내의 stress나 methylation에 관여하는 S-Adenosyl-methionine의 양의 변화도 검출됨





<10도와 비교하였을 때 25도에서 많이 존재하는 세포내 대사체>

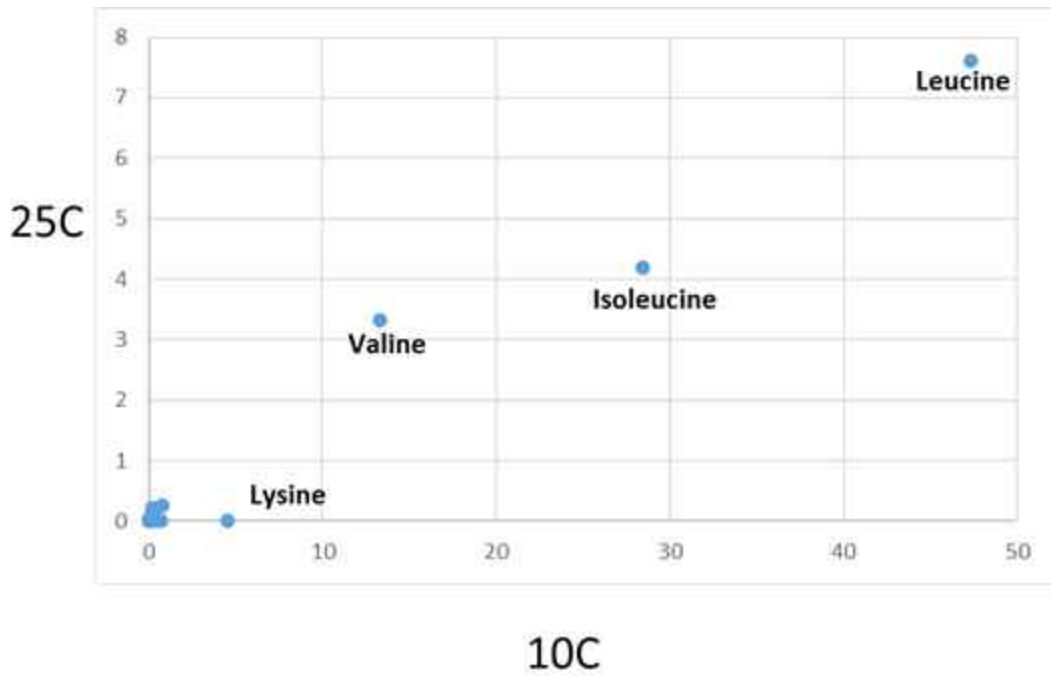
- 25도의 경우 Nucleic acid의 base에 해당하는 Adenosine, Cytosine, Deoxyguanosine, Allantoin (purine derivative) 등의 변화가 크며 이 결과는 예전의 mRNA expression 데이터에서 볼 수 있듯이 nucleic acid의 온도에 따른 변화와 상관이 있음
- 유기산의 변화도 크게 나와서 fumaric acid, malic acid, lactic acid 등이 검출되고 있어 온도에 따라 TCA의 변화가 상당히 있어 보임.



<세포 외 대사체 분석 결과>

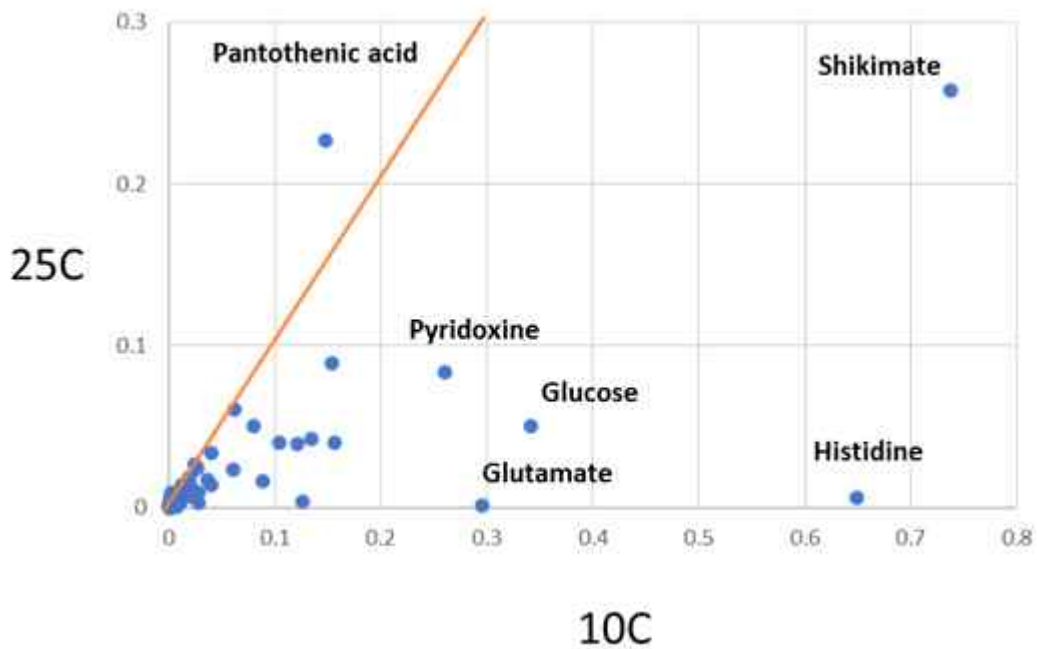
-세포외 대사체의 경우도 세포내 대사체의 결과 유사하게 10도에서 많은 대사체들이 up된 것을 발견할 수 있으나, 세포내에 비하여 25도에서 up된 대사체의 개수가 더 있음.

-GDP, UDP 그리고 UDP-D-Glucose 등 대사체에서 25도 샘플이 더 높은 농도를 가지는 결과가 보임.



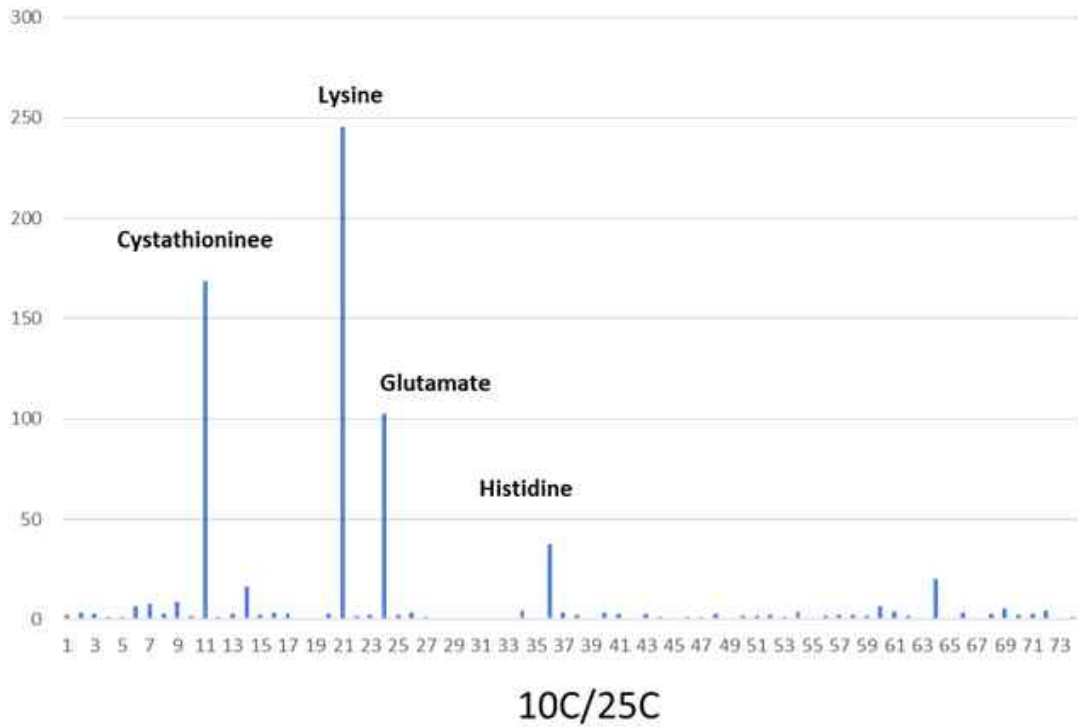
<10도와 25도에서 분석한 세포의 대사체의 signal 비교>

- 세포의 대사체 중에 총량만으로 볼 때 branched chain들의 signal이 매우 크며 이러한 대사체들은 leucine (iso C15:0, iso C17:0), valine (iso-C14:0, iso-C16:0), isoleucine (anteiso-C15:0, anteiso-C17:0)들로 각각의 fatty acid 합성에 영향을 받을 수 있음.
- 특히 total lipid에서 ai-15:0의 경우 10도에서 11.6%, 25도에서 4.3%, ai-17:0의 경우 2.0%에서 0.34%로 감소되는 바, 10도에서 isoleucine 대사가 더욱 활발하다는 것을 예상할 수 있음.



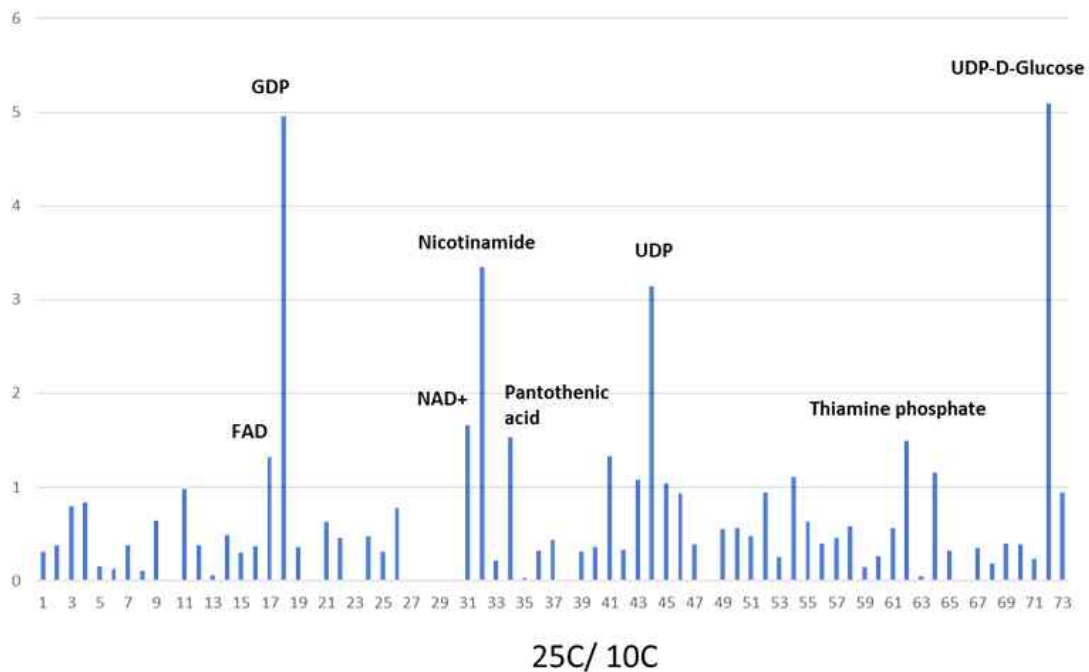
<10도와 25도에서 분석한 major 대사체 4개 제외후 세포의 대사체의 signal 비교>

-major로 나왔던 4개를 제외하고 들여다 보면 cofactor precursor인 pyridoxine, glutamate, histidine, phenolic amino acid의 precursor인 shikimate의 양이 많이 나오는 것을 볼 수 있고, 25도의 경우 CoA precursor인 pantothenic acid의 양이 25도에서 더 많음.



<25도와 비교하였을 때 10도에서 많이 존재하는 세포의 대사체>

-10도와 25도의 signal을 비교하여 볼 때 특히 10도에서 많이 나온 것으로 (fold change), 아미노산 류인 Lysine, glutamate, histidine 등의 변화가 크고, cysteine의 전구체인 cystathionine도 변화가 많음.



<10도와 비교하였을 때 25도에서 많이 존재하는 세포의 대사체>

-25도에서 변화가 큰 것으로는 GDP, UDP 등의 nucleotide들과 UDP-D-glucose, 등이 있고, 전자전달에 관여하는 FAD, NAD, Nicotinamide가 변화가 크고, 이외에 cofactor와 성장에 관여하는 pantothenic acid, thiamine phosphate가 변화가 있었음.

-이상의 대사체의 결과를 볼 때, fatty acid synthesis에 관여하는 branched amino acid 들의 변화, nucleotide 들의 변화, EPS 생합성에 관여하는 UDP-sugar들의 변화, 전자전달 관여 대사체 등의 차이가 특징적이라 할 수 있음.

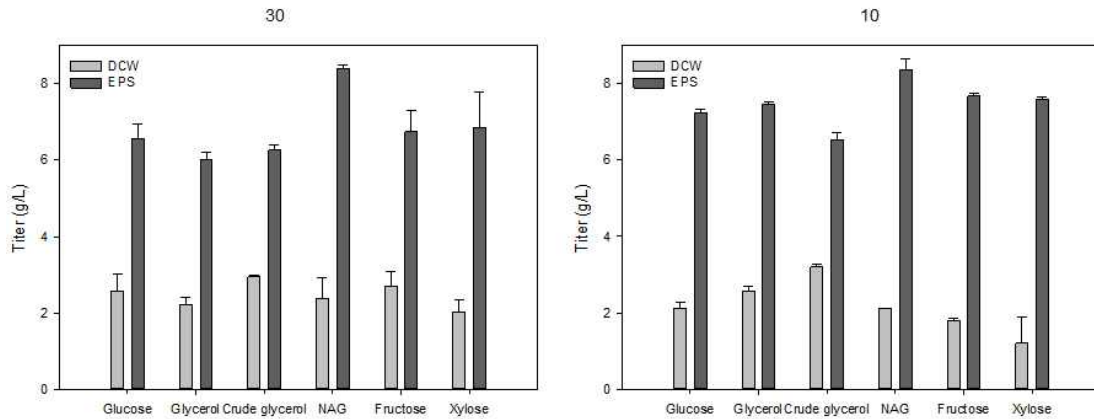
-특징적인 차이들 중에 fatty acid synthesis 변화와 UDP-sugar와 관련된 EPS의 변화와 관련해서는 Pseudomonas sp. 14-6에서 심화 study를 실시하였음.

○Pseudomonas sp. 14-6에서 EPS 관련 연구

-대사체 결과 EPS 관련 대사체들의 변화가 보이고, 과거 mRNA 결과에도 UDP-sugar 관련 유전자들이 많이 있었던 바<sup>16)</sup>, Pseudomonas sp. 14-6에서 생산되는 EPS에 관한 관련 연구를 진행

16) Kourmentza, C., Araujo, D., Sevrin, C., Roma-Rodrigues, C., Ferreira, J. L., Freitas, F., ... & Reis, M. A. (2019). Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by Pseudomonas strains valorizing crude glycerol by-product. *Bioresource technology*, 281, 31-40.

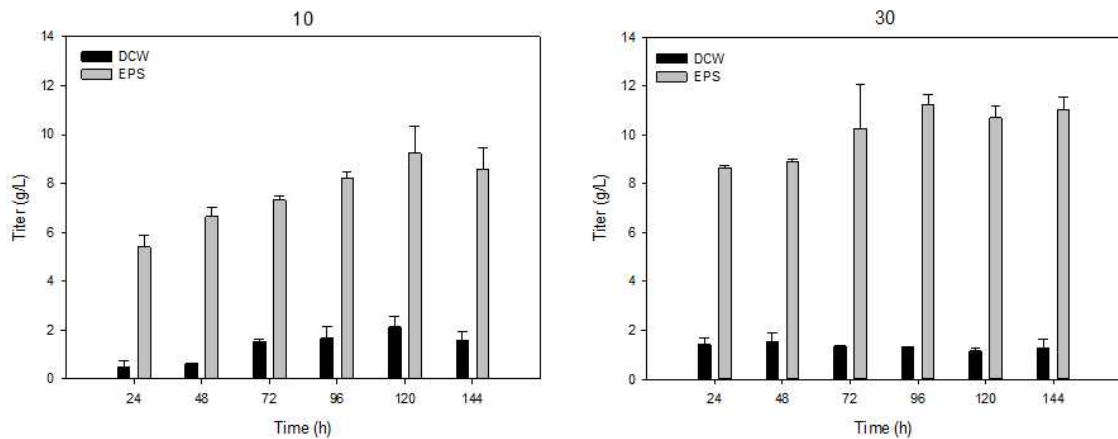
-EPS는 세포를 외부환경으로부터 보호하는 역할들을 수행할 뿐만 아니라 산업적으로도 천연 계면활성제로도 사용되는 바 관련 연구를 수행함.



<각종 탄소원 및 온도 하에서 Pseudomonas sp. B14-6의 성장과 EPS 생산 관찰>

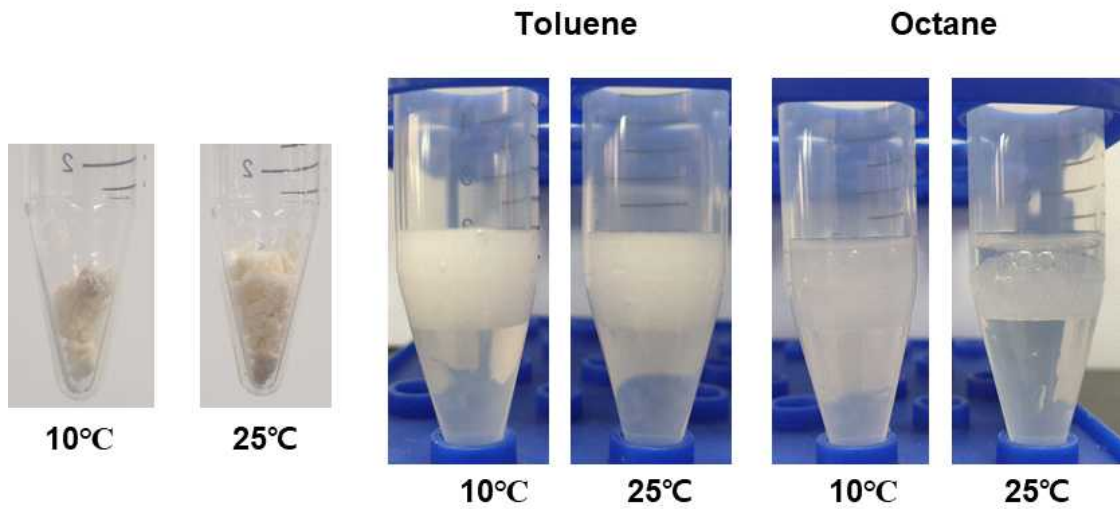
-고체배지 상 배양 시 또는 액체배지 배양 시, EPS 생산과 관련된 모습들이 관찰되었기 때문에 다양한 탄소원 기반에서 EPS 생산량을 측정하였음.

-저온 및 고온 환경 중 일반적으로 저온 환경에서 생장은 상대적으로 떨어지더라도 더 높은 EPS 생산량이 관찰되었으며, N-acetylglucosamine을 탄소원으로 이용한 실험군에서 가장 높은 EPS 생산량이 관찰되었음.



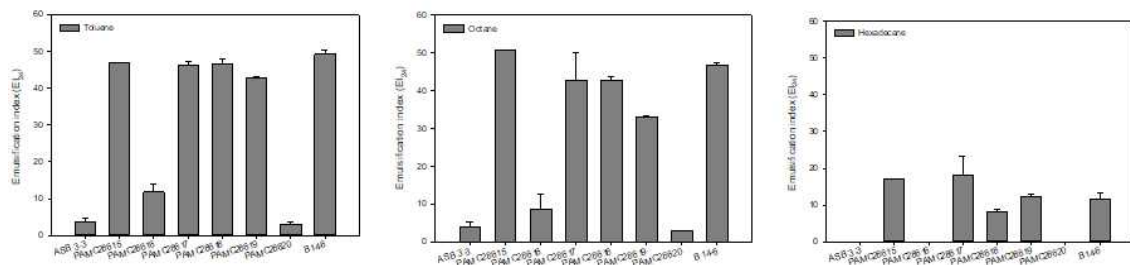
<N-acetyl glucosamine을 주 탄소원으로 저온 및 중온에서 시간 별 성장과 EPS 생산량>

-단일 탄소원으로 N-acetylglucosamine을 이용하였을 때 저온인 10도 배양 환경에서는 배양 시간에 따라 EPS가 증가하여 120시간 지점에서 생산량이 최고가 되는 모습을 볼 수 있었으며 중온인 30도에선 96시간 지점에 최고점에 도달한 뒤 유지되는 모습을 관찰할 수 있었음.



<추출한 EPS의 형태 및 solvent에 대한 emulsion 형성 능력 실험 결과 사진>

-에탄올 침전법을 이용하여 추출한 EPS의 형태 및 해당 EPS를 유화제로서 사용하여 다양한 solvent와 물 사이 유화층 형성에 대한 실험을 진행하였다. 특히 toluene에서 유화층 형성이 큰 것을 관찰할 수 있었음<sup>17)</sup>.

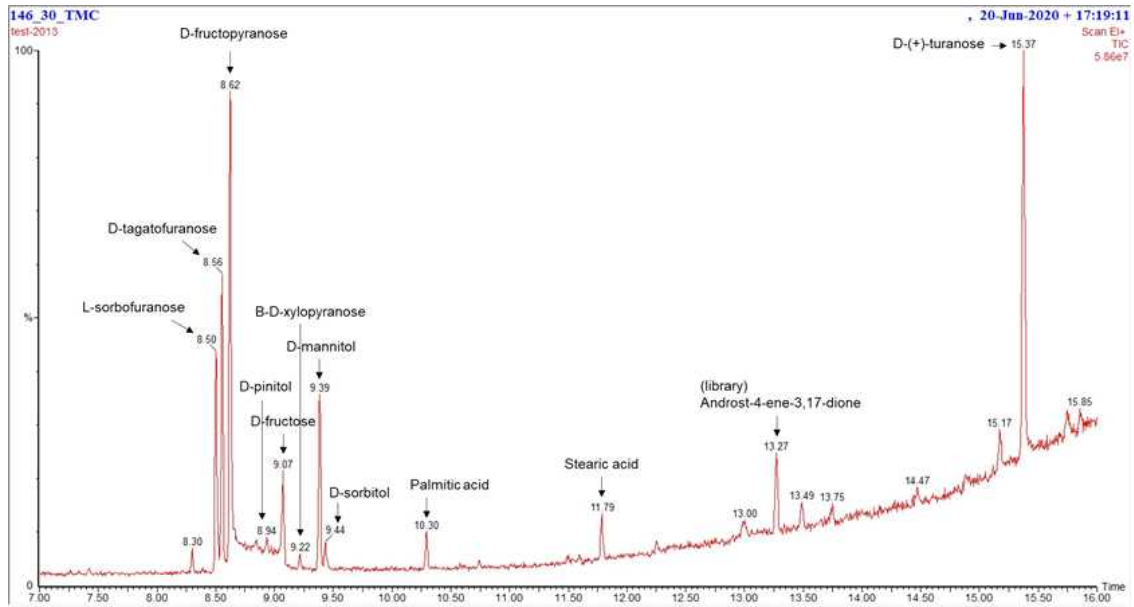


<각종 극지 균주 유래 EPS를 이용한 세 중 solvent emulsification 실험의 결과>

-각종 균주 유래 EPS를 사용하여 다양한 solvent에 대한 유화층 형성 실험 결과이다. 유화 측면에서 효과가 좋은 균주들이 몇 있었으나, 실험 균주인 Pseudomonas sp. B14-6에서 분리해낸 EPS 사용 시 좋은 결과를 얻을 수 있었음.

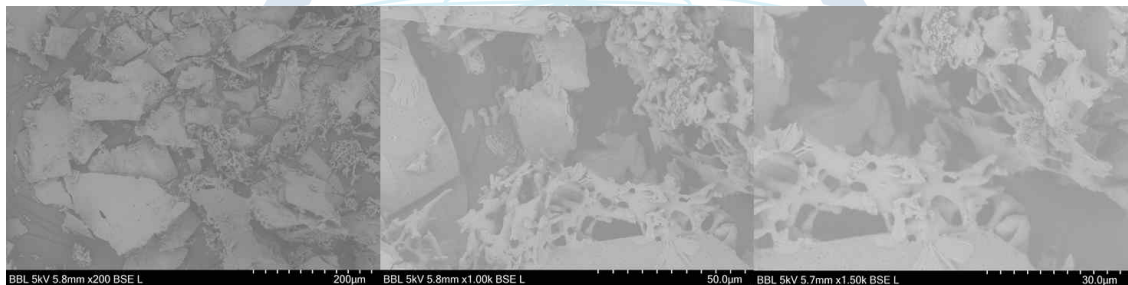
17) Kourmentza, C., Araujo, D., Sevrin, C., Roma-Rodrigues, C., Ferreira, J. L., Freitas, F., ... & Reis, M. A. (2019). Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by Pseudomonas strains valorizing crude glycerol by-product. Bioresource technology, 281, 31-40.





<추출한 EPS의 조성 분석을 위한 GC-MS를 이용한 분석 크로마토그램>

-EPS 조성 분석을 위한 hydrolysis 및 유도체화를 통한 GC-MS 분석 결과 크로마토그램으로, 다양한 단당류가 관찰되었음.



<추출한 EPS의 SEM 사진>

-추출되어 동결건조 진행된 EPS를 전자현미경을 이용하여 관찰할 수 있었음.

○영양 환경에 따른 영향연구

(1) 대사체 분석 결과에 따른 Branched chain acid 아미노산의 지방산 영향 연구

Leucine, Isoleucine, Valine의 10도/25도 에서의 lipid 변화  
-growth curve, total lipid

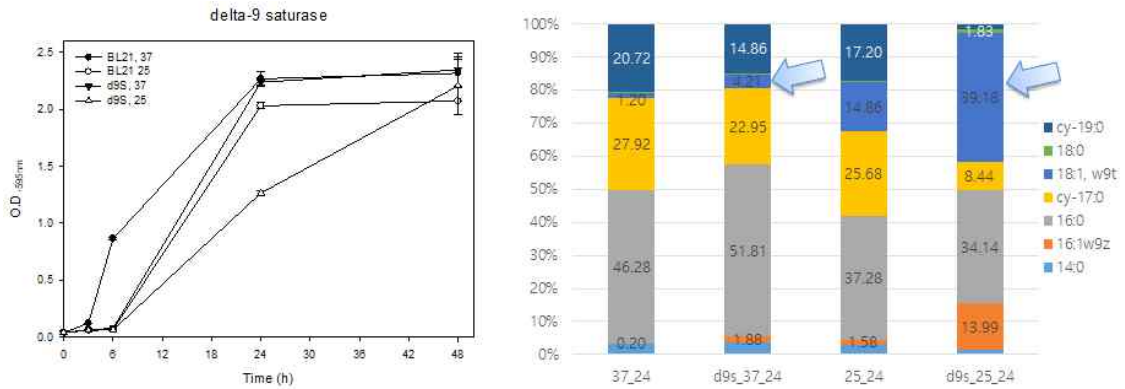
(2) 18:1, 16:1

투입에 따른 PLFA 변화

-이상의 차이를 일으키는 관련 유전자들을 찾아 기능을 심화연구함.

### (3) Membrane 관련 유전자 연구

-2년차에 PLFA와 관련한 유전자들 중 saturate/unsaturated fatty acid에 관여하는 유전자 정보를 확보하여 그 기능을 알아보기 위하여 대장균에 발현하여 실험을 진행함.

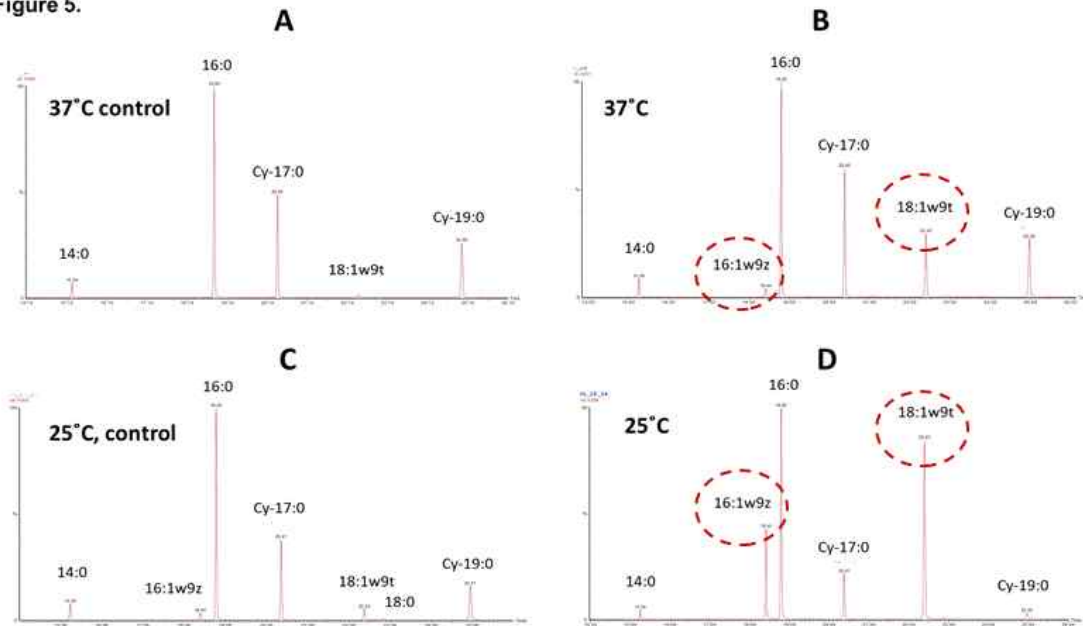


<대장균에 대한 저온(25도) 및 적정 온도(37도) 환경 하에서 delta-9 desaturase 발현 영향>

-세포막 구성 중 불포화 지방산 비율에 관여하는 유전자인 delta-9 fatty acid desaturase 유전자가 형질전환 및 과발현된 대장균과 일반 대조군 대장균이 저온 환경 (25도) 및 적정 환경 (37도)에서 배양되었을 때의 성장과 세포막 인지질 구성의 차이를 나타내었음.

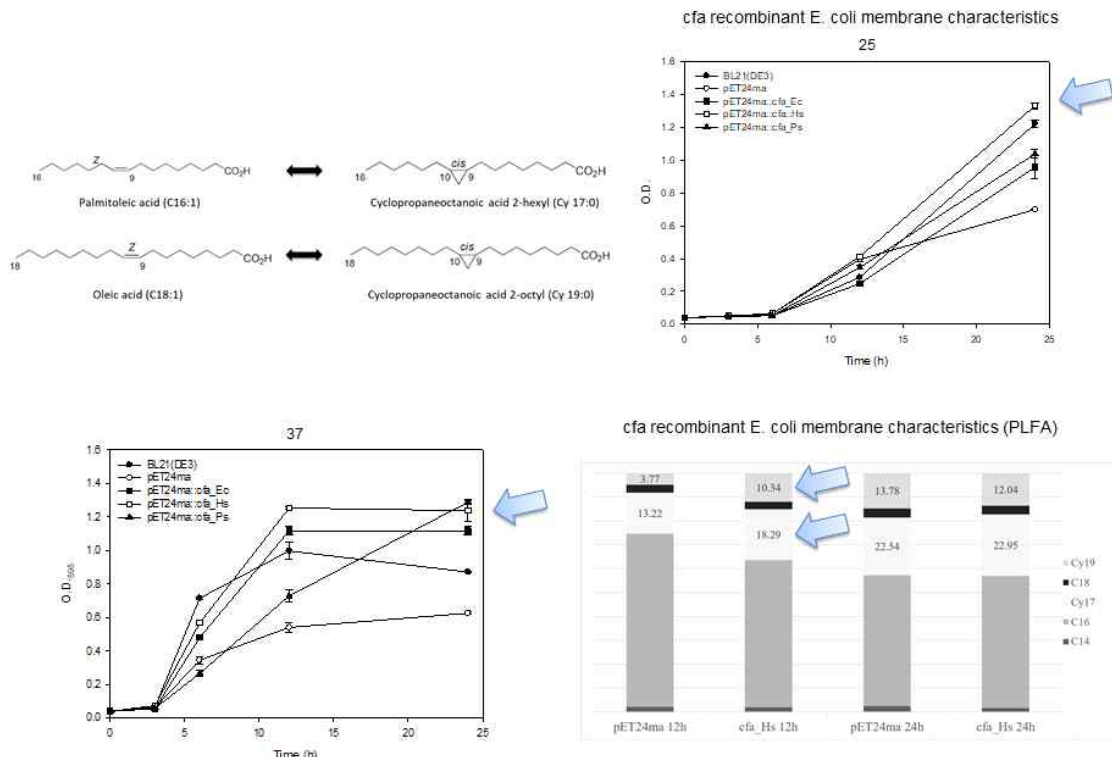
-저온 환경에서 이중 결합을 가진 탄소 18개의 지방산, 올레산의 함량이 높아지는 것을 관찰할 수 있었으며, 이는 형질전환된 대장균에서 그 상승폭이 더 큰 것을 알 수 있음.

Figure 5.



<Delta-9 desaturase(*desA*) 과발현 대장균과 일반 대장균의 저온 및 적정온도 배양 시 PLFA 크로마토그램>

- 동일한 온도에서 *desA* 과발현 대장균이 인지질에서 훨씬 높은 불포화 지방산 함유량을 보이는 것을 알 수 있었으며, 이러한 불포화 지방산의 함유량 증가는 저온인 25도 배양 환경에서 더 크게 관찰되었음.
- desA* 유전자가 이중 결합 지방산 생산에 관여하는 것을 확실하게 알 수 있었으며 해당 유전자의 과발현을 통해 세포막 지방산 조성의 변화와 이에 따르는 세포막 유동성 등의 변화로 균의 생장에 변화를 꾀할 수 있다는 결과를 얻었음.



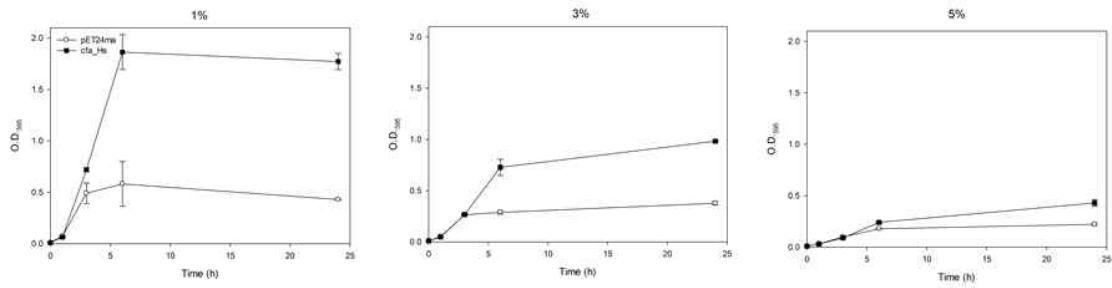
<세포막 지방 구성 중 Cyclic form 지방산 생산에 관여하는 cfa 유전자 관련 실험>

-다른 membrane의 구조에 영향을 미치는 유전자를 찾아 기능을 밝히는 연구를 수행하여 미생물 인지질에 포함되는 지방산 조성 중, cyclic 형태를 가진 지방산 생산에 관여하는 유전자 기능을 밝힘.

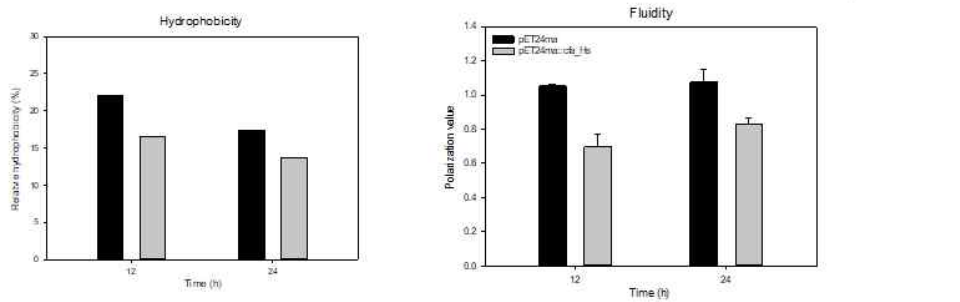
-해당 유전자는 다양한 미생물에서 발견할 수 있었으며 이에 *Halomonas socia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. B14-6 세 종의 균주에서 해당 cfa 유전자를 클로닝하여 대장균에서 과발현시켜 온도 변화에 따른 생장의 변화와 지방산 조성 변화를 관찰하였음.

-*H. socia* 균주의 cfa 유전자를 과발현한 대장균에서 생장의 상승이 관찰되었으며 12시간의 성장 지점에서 cyclic form 지방산의 증가가 높은 것이 관찰되어 성장 등에 영향을 끼쳤음을 확인할 수 있었음.

Fig. 3 Recombinant E. coli salt concentration



cfa recombinant E. coli membrane characteristics

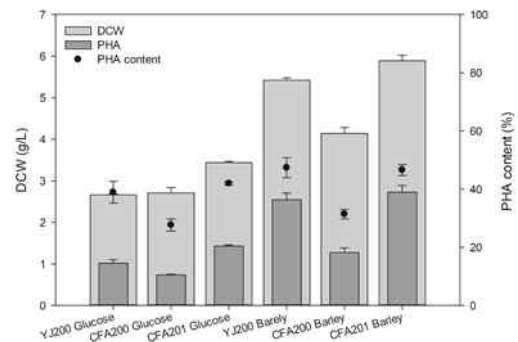
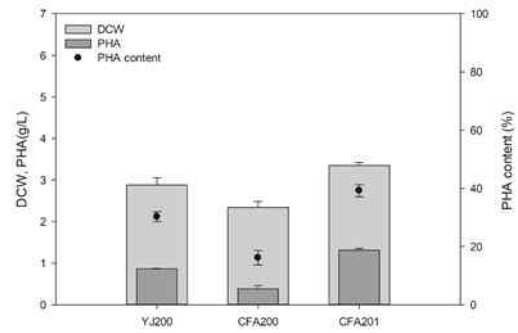
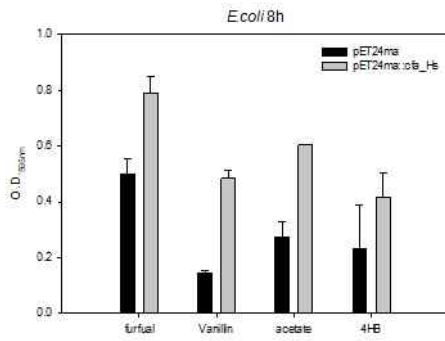


<Halomonas socia 유래 cfa 유전자 과발현 시 대장균에서의 염분 내성 변화와 세포막 특성 변화>

-cfa 유전자의 과발현에 따른 지방산 조성 변화와 이에 따른 미생물의 성장 특성, 그 중에서도 염도 등에 대한 저항성이 증가함을 확인하기 위한 실험에서, *H. socia* 유래 cfa 유전자를 과발현한 대장균이 대조군에 비하여 염도 존재 하에서 생장이 증가함을 알 수 있었다. 또한, 세포막의 소수성과 유동성 측면에서 cfa 유전자 과발현 균주가 소수성의 감소 및 유동성의 증가가 이루어졌음을 알 수 있었음.

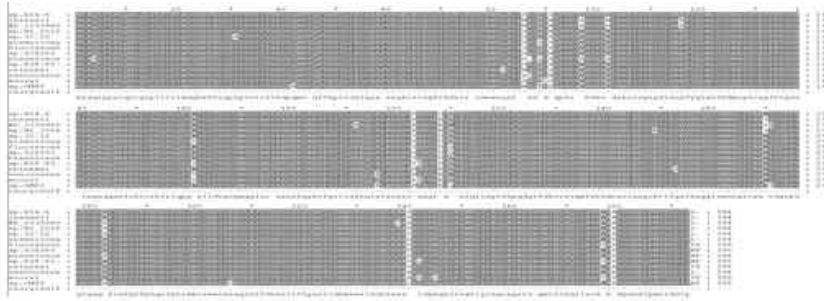
Fig. 6

*cfa* recombinant growth presence of inhibitors

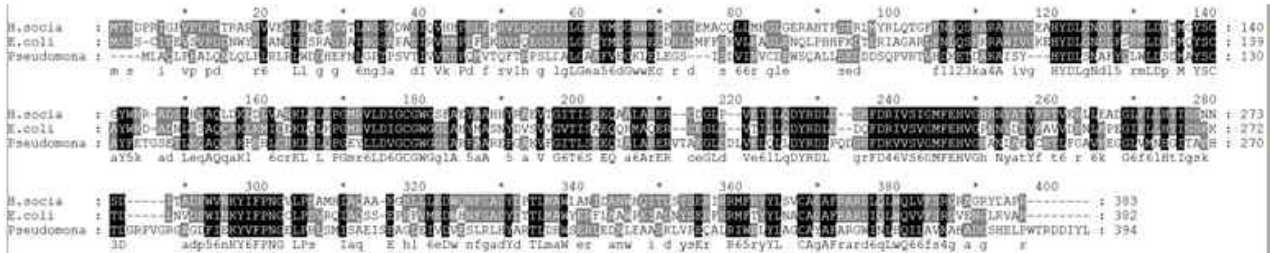


<Halomonas socia 유래 *cfa* 유전자 도입 시 성장 저해물질 저항성 변화와 PHA 생산의 변화>

-*H. socia* 유래 *cfa* 유전자를 과발현한 대장균에서 목질 섬유소 유래 성장 저해 물질 존재에 따른 성장 변화를 확인하였을 때, 상당한 저항성의 증대를 보이는 것을 알 수 있었다. 따라서 해당 유전자를 PHA 생산 대장균에 형질전환하여 다양한 목질 처리 유래 당 존재 하에서 배양하였을 때 증가한 미생물양과 PHA 함유량을 얻을 수 있었음.



• **CFA alignment ( *E. coli*, *H. socia*, *Pseudomonas* sp. B14-6)**



<같은 종 내 *cfa* 유전자의 서열비교 및 다른 종 간 *cfa* 유전자의 서열 비교>

-균 간 *cfa* 유전자 서열 분석을 진행하여 동일한 종 (*Halomonas*) 내에서는 서열이 상당히 일치함을 알 수 있었으며, 종이 다르더라도 동일하게 관찰되는 서열을 관찰할 수 있었고 이는 *cfa* 유전자가 다양한 미생물에서 하나씩은 존재하는 것이 관찰된 것과 연관이 있는 것으로 보임.

극지연구소

## 제 4 장 연구 개발 목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표

연구개발 목표		연구수행방법	달성 주요내용	달성도(%)
1-1	Psychrophile/mesophile 성격을 가진 미생물 선별	신규 미생물 발굴 및 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 토양 유래 미생물을 최소영양배지에 도말하여 검색</li> <li>- Hydrolase, NaCl 등 균과 관련된 특성을 파악</li> </ul>	100%
1-2	극지 미생물 성장 조건 영향 연구	우수한 성장 조건 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 차년도 실험 결과를 위하여 complex media 상에서의 성장 연구</li> <li>- 온도 차이에 따른 성장 패턴을 연구</li> </ul>	100%
1-3	지방산 기반 membrane fluidity 분석	PLFA 방법을 적용한 지방산 membrane 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지방산 추출을 통하여 neutral, glyco fatty acid를 제외한 PLFA 추출법 적용</li> <li>- PLFA 추출 방법 적용 후 GC-MS를 사용하여 지방산 membrane 분석</li> <li>- 극지미생물을 활용하여 membrane fluidity, hydrophobicity 측정법 setup 완료</li> </ul>	



2-1	Transcriptome 비교를 위한 기초 조건 설정	Transtriptome 비교를 위한 균주, 성장 조건, 유전자 정보 획득	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 균주 선정 및 균주 배양 조건, 계놈 시퀀싱을 통한 후보군 도출</li> <li>- 온도에 따라 차이를 보이는 주요 현상들 (PLF, total fatty lipid, PHA, 항생제 내성, EPS 생산 등)을 미리 발굴하여 추후 transcriptome 분석과 연계하여 활용하고자 하였음</li> </ul>	
2-2	Transtriptome 분석을 통한 온도 영향 분석	온도 및 시간에 따라 변화하는 transcriptome 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 온도에 따른 타겟 선정 후, 후보군에 대한 RT PCR을 통하여 시간에 따른 영향 분석</li> <li>- 기초조건 설정 시에 발견되었던 현상들과 관련한 mRNA expression data들을 모았으며, RT PCR을 위한 추출법 등을 확립하였음</li> </ul>	
2-3	온난화 관련 주요 유전자 발굴	온도 관련 target 유전자 선별 및 특성 파악과 온도 관련 유전자의 활용	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10도 및 25도의 온도 변화와 시간에 따른 지속적인 감소 혹은 증가를 보이는 유전자군을 선별하였으며, 이를 통한 다른 특이적인 현상과 연결하여 이유를 규명하고자 함</li> <li>- 온도와 관련하여 나온 항생제 내성 주제나 CFA 활용 주제 등에 대한 확대 적용을 시도할 수 있음</li> </ul>	
3-1	세포 내 대사체 분석	대사체 추출 및 분석 적용 방법과 결과에 따른 대사체 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LC/MS-MS 이용 대사체 생산 비교</li> </ul>	

3-2	세포 외 대사체 분석	대사체 추출 및 분석 적용 방법과 결과에 따른 대사체 분석	- LC/MS-MS 이용 대사체 생산 비교	
3-3	영양 환경에 따른 영향 연구	영양 환경에 따른 membrane, PHA, EPS 분석	- GC/MS를 이용한 methyl ester화된 PHA를 포함한 지방산 분석 - GC/MS를 이용한 TMS 유도체화된 다당류 분석	

## 제 2 절 관련분야 기여도

가. 정량적 성과 (3년)

Article Title	Source Title	Publication Year	Start Page	관련 연구내용
Enhanced tolerance to inhibitors of Escherichia coli by heterologous expression of cyclopropane-fatty acid-acyl-phospholipid synthase (cfa) from Halomonas socialis	BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING	2020	909	극지 해양 미생물 유래 CFA 연구
Production of gamma-aminobutyric acid from monosodium glutamate using Escherichia coli whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis KCTC 3498	KOREAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING	2020		미생물을 통한 GABA 생산
Fructose based hyperproduction of poly-3-hydroxybutyrate from Halomonas sp.	INTERNATIONAL JOURNAL OF	2020	929	해양유래 PHB 생산 미생물 발굴

YLGW01 and impact of carbon sources on bacteria morphologies	BIOLOGICAL MACROMOLECULES			
Production of L-Theanine Using Escherichia coli Whole-Cell Overexpressing gamma-Glutamylmethylamide Synthetase with Baker's Yeast	JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	2020	785	미생물을 이용한 L-theanine 생산
Selective extraction of glutaric acid from biological production systems using n-butanol	JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY	2020	98	미생물을 활용한 glutaric acid 생산 및 추출
Decreased Growth and Antibiotic Production in Streptomyces coelicolor A3(2) by Deletion of a Highly Conserved DeoR Family Regulator, SCO1463	BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING	2019	613	미생물의 주요 regulator 발굴
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered Ralstonia eutropha	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2019	370	미생물을 사용한 PHA 생산
Increased Tolerance to Furfural by Introduction of Polyhydroxybutyrate Synthetic Genes to Escherichia coli	JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	2019	776	미생물의 내성 강화 방법
Discarded Egg Yolk as an Alternate Source of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate)	JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	2019	382	미생물을 활용한 PHA 생산

Chitin biomass powered microbial fuel cell for electricity production using halophilic <i>Bacillus circulans</i> BBLO3 isolated from sea salt harvesting area	BIOELECTROCHEMISTRY	2019	107329	해양유래 신규 전기 생산 미생물 발굴
One-pot exploitation of chitin biomass for simultaneous production of electricity, n-acetylglucosamine and polyhydroxyalkanoates in microbial fuel cell using novel marine bacterium <i>Arenibacter palladensis</i> YHY2	JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION	2019	324	해양유래 신규 전기 생산, PHA 생산 미생물 발굴
Effect of synthetic and food waste-derived volatile fatty acids on lipid accumulation in <i>Rhodococcus</i> sp. YHY01 and the properties of produced biodiesel	ENERGY CONVERSION AND MANAGEMENT	2019	385	미생물을 활용한 biodiesel 생산
Treatment of furazolidone contaminated water using banana pseudostem biochar engineered with facile synthesized magnetic nanocomposites	BIORESOURCE TECHNOLOGY	2020	122472	미생물을 사용한 furazolidone 분해
Production of blue-colored polyhydroxybutyrate (PHB) by one-pot production and coextraction of indigo and PHB from recombinant <i>Escherichia</i>	DYES AND PIGMENTS	2020	107889	미생물을 사용한 indigo-PHB 생산

coli				
Bioconversion of barley straw lignin into biodiesel using Rhodococcus sp. YHY01	BIORESOUR C E TECHNOLO GY	2019	121704	미생물을 사용한 barley straw lignin 으 로 부 터 diesel 생산
A clean and green approach for odd chain fatty acids production in Rhodococcus sp. YHY01 by medium engineering	BIORESOUR C E TECHNOLO GY	2019	121383	미생물을 사용한 odd chain fatty acid 생산
Production of glutaric acid from 5-aminovaleric acid by robust whole-cell immobilized with polyvinyl alcohol and polyethylene glycol	E N Z Y M E A N D MICROBIAL TECHNOLO GY	2019	72	미생물과 고정화 기술을 사용한 glutaric acid 생산
Enhanced production of cadaverine by the addition of hexadecyl trimethyl ammonium bromide to whole cell system with regeneration of pyridoxal-5'-phosphate and ATP	E N Z Y M E A N D MICROBIAL TECHNOLO GY	2019	58	미생물을 이용한 Cadaverine 생산
Production of glutaric acid from 5-aminovaleric acid using Escherichia coli whole cell bio-catalyst overexpressing GabTD from Bacillus subtilis	E N Z Y M E A N D MICROBIAL TECHNOLO GY	2018	57	미생물을 이용한 glutaric acid 생산
W h o l e - c e l l Immobilization of Engineered Escherichia coli JY001 with Barium-alginate for Itaconic Acid Production	BIOTECHNO LOGY AND BIOPROCESS ENGINEERIN G	2018	442	미생물과 고정화를 이용한 itaconic acid 생산

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production from engineered <i>Ralstonia eutropha</i> using synthetic and anaerobically digested food waste derived volatile fatty acids	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2019	1	미생물을 활용한 음식물쓰레기 유래 유기산을 사용한 PHB 생산
Polyhydroxybutyrate production in halophilic marine bacteria <i>Vibrio proteolyticus</i> isolated from the Korean peninsula	BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING	2019	603	PHB 생산 해양 미생물 발굴
Lipase mediated functionalization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with ascorbic acid into an antioxidant active biomaterial	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2019	117	PHB modification
Carbon dioxide capture and bioenergy production using biological system - A review	RENEWABLE & SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS	2019	143	생물시스템을 통한 이산화탄소 포집
Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges	BIORESOURCING TECHNOLOGY	2020	122724	리그노셀룰로스 biomass를 활용한 pretreatment 방법 개발
Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using <i>Ralstonia eutropha</i> 5119	BIORESOURCING TECHNOLOGY	2019	306	Plant biomass hydrolysate를 사용한 PHB 생산
Biowaste-to-bioenergy	E N E R G Y	2018	640	생물학적인 방

using biological methods - A mini-review	CONVERSION AND MANAGEMENT			법을 활용한 biowaste-to bioenergy 연구
Utilization of different lignocellulosic hydrolysates as carbon source for electricity generation using novel Shewanella marisflavi BBL25	JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION	2020	124084	해양 유래 미 생물을 사용한 전기 생산
Enhancement of piperolic acid production by the expression of multiple lysine cyclodeaminase in the Escherichia coli whole-cell system	ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY	2020	109643	미생물을 사용 한 piperolic acid 생산
Combination Therapy Using Low-Concentration Oxacillin with Palmitic Acid and Span85 to Control Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus	ANTIBIOTIC S-BASEL	2020	682	MRSA 제어 방법

## 제 5 절 연구개발결과의 활용계획

### 가. 활용방안

- 학문적으로는 온도 변화에 따라 작용하는 membrane fluidity와 관련된 주요 유전자들을 타겟으로 한 심화 연구를 통한 균주 robustness 연구가 가능함.
- 실용적으로는 주요 유전자, 지방산 구성분에 대한 정보와 미생물의 외부 스트레스에 대한 연구 방법은 균주 개량 tool로써 사용이 가능함.

### 나. 기대효과

- 극지 연구에 대한 연구를 통하여 미생물 외부 환경 적응 및 변이 메커니즘 규명이나 지구 온난화에 의한 극지 미생물 군집 변화 예측 모델 제시가 가능할 것임.
- 기술적인 면에서도 GC-MS, LC-MS 기반 대사체 monitoring 기술의 미생물 공학적 적용이 가능함.
- 산업 균주 연구에 있어서도 극지 미생물 연구 방법에서 얻어진 온도 및 stress 인자들에 대한 관련 정보 및 연구 방법 적용 가능
- 이러한 연구들을 통하여 미래의 특정 종의 멸종 가능성 유무 예측, 온난화 이후 항생제 내성 영향, 미생물 내스트레스 증진 전략, 온난화에 따른 미생물 대응기작 연구, 미생물 robustness 향상 연구가 가능할 것으로 보임.
- Genome 정보를 통하여 유전자 정보 활용 (Cold shock protein, PHA 합성 유전자 등), 내성 극복 전략 / 강인성 증대 전략, 기존 균주들과 유사도가 낮은 균주들에 대한 특성 연구 진행도 가능할 것으로 보임.



## 제 6 장 참고문헌

Frostegård A, Tunlid A. Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, *Soil Biology & Biochemistry* 43:1621-1625

Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J* 8:126-141.

Drenovsky, R. E., Elliott, G. N., Graham, K. J., & Scow, K. M. (2004). Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1793-1800.

Fernandes, M. F., Saxena, J., & Dick, R. P. (2013). Comparison of whole-cell fatty acid (MIDI) or phospholipid fatty acid (PLFA) extractants as biomarkers to profile soil microbial communities. *Microbial ecology*, 66(1), 145-157.

Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., & Jarboe, L. R. (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(18), 8317-8327.

Aono, R., & Kobayashi, H. (1997). Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3637-3642.

Pulschen, A. A., Bendia, A. G., Fricker, A. D., Pellizari, V. H., Galante, D., & Rodrigues, F. (2017). Isolation of uncultured bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutritional media. *Frontiers in microbiology*, 8, 1346.

Kondakova, T., & Cronan, J. E. (2019). Transcriptional regulation of fatty acid cis - trans isomerization in the solvent tolerant soil bacterium, *Pseudomonas putida* F1. *Environmental microbiology*, 21(5), 1659-1676.

Kourmentza, C., Araujo, D., Sevrin, C., Roma-Rodrigues, C., Ferreira, J. L., Freitas, F., ... & Reis, M. A. (2019). Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas* strains valorizing crude glycerol by-product. *Bioresource technology*, 281, 31-40.

Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, *Geoderma* 150:171 - 178.

Pratt B, Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. *Microb Ecol* 64:680 - 691

Paul EA, Clark FE.. 1989. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.

Li, M., Chen, X., Che, X., Zhang, H., Wu, L. P., Du, H., & Chen, G. Q. (2019). Engineering *Pseudomonas entomophila* for synthesis of copolymers with defined fractions of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Metabolic engineering*, 52, 253-262.

Amiri Moghaddam, J., Dávila-Céspedes, A., Kehraus, S., Crüsemann, M., Köse, M., Müller, C. E., & König, G. M. (2018). Cyclopropane-containing fatty acids from the marine bacterium *Labrenzia* sp. 011 with antimicrobial and GPR84 activity. *Marine drugs*, 16(10), 369.

Männistö, M. K., & Puhakka, J. A. (2001). Temperature- and growth-phase-regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater Proteobacteria. *Archives of microbiology*, 177(1), 41-46.

## 주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 PAP사업 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 PAP 사업으로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.