

보 문

새로운 *Psychrobacter* sp. ArcL13 유래 저온활성 지질분해효소 : 유전자 분리동정, 대장균에서의 발현, refolding 및 특성 연구

구본훈^{1*} · 문병현² · 신종서³ · 임정한⁴

¹연세대학교 생명시스템연구원, ²주셀텍, ³강원대학교 동물생명과학대학 동물자원과학부, ⁴극지연구소 극지생명과학연구부

A novel cold-active lipase from *Psychrobacter* sp. ArcL13: gene identification, expression in *E. coli*, refolding, and characterization

Bon-Hun Koo^{1*}, Byung-Hern Moon², Jong-Suh Shin³, and Joung-Han Yim⁴

¹Institute of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 03722, Republic of Korea

²CellTech Co., Ltd., Chungbuk 27622, Republic of Korea

³Division of Animal Resource Science, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

⁴Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

(Received May 19, 2016; Revised June 15, 2016; Accepted June 15, 2016)

ABSTRACT: Recently, *Psychrobacter* sp. ArcL13 strain showing the extracellular lipase activity was isolated from the Chuckchi Sea of the Arctic Ocean. However, due to the low expression levels of the enzyme in the natural strain, the production of recombinant lipase is crucial for various applications. Identification of the gene for the enzyme is prerequisite for the production of the recombinant protein. Therefore, in the present study, a novel lipase gene (ArcL13-Lip) was isolated from *Psychrobacter* sp. ArcL13 strain by gene prospecting using PCR, and its complete nucleotide sequence was determined. Sequence analysis showed that ArcL13-Lip has high amino acid sequence similarity to lipases from bacteria of some *Psychrobacter* genus (84-90%) despite low nucleotide sequence similarity. The lipase gene was cloned into the bacterial expression plasmid and expressed in *E. coli*. SDS-PAGE analysis of the cells showed that ArcL13-Lip was expressed as inclusion bodies with a molecular mass of about 35 kDa. Refolding was achieved by diluting the unfolded protein into refolding buffers containing various additives, and the highest refolding efficiency was seen in the glucose-containing buffer. Refolded ArcL13-Lip showed high hydrolytic activity toward *p*-nitrophenyl caprylate and *p*-nitrophenyl decanoate among different *p*-nitrophenyl esters. Recombinant ArcL13-Lip displayed maximal activity at 40°C and pH 8.0 with *p*-nitrophenyl caprylate as a substrate. Activity assays performed at various temperatures showed that ArcL13-Lip is a cold-active lipase with about 40% and 73% of enzymatic activity at 10°C and 20°C, respectively, compared to its maximal activity at 40°C.

Key words: *Psychrobacter* sp. ArcL13, cold-active lipase, gene prospecting, refolding

지질분해효소(EC 3.1.1.3)는 동식물, 곰팡이, 박테리아 등에서 지질에 특이적으로 작용해 가수분해를 유도하는 촉매 역할을 한다(Cardenas *et al.*, 2001; Salameh and Wiegel, 2007; Sarkar *et al.*, 2012). 이 중 박테리아 유래 지질분해효소는 탁월한 안정성, 기질 특이성, 입체선택성 등을 보이기 때문에 세탁

세제, 세정제와 같은 산업용뿐 아니라 식품용, 의약품용, 축산용, 화장품용 등으로 다양한 활용 가능성을 갖고 있다(Jaeger *et al.*, 1994, 1999).

저온환경에서 박테리아, 효모, 지의류, 곰팡이 등은 다양한 방법으로 저온에 적응하며 살아오고 있다(Gerday *et al.*, 2000). 특히, 저온에 적응한 미생물들은 유용한 저온활성 효소들의 원천이기 때문에 산업적으로 중요한 자원으로 간주되고 있다(Jaeger *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2008). 중

*For correspondence. E-mail: k4119@yonsei.ac.kr;

Tel.: +82-2-2123-2566; Fax: +82-2-312-6027

온성 효소에 비해 저온활성 지질분해효소를 포함한 대부분의 저온활성 효소들은 일반적으로 매우 높은 촉매활성도와 열불안정성의 특징을 나타낸다(Gerday *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2008; Feller, 2013). 저온에서 기질들의 낮은 운동에너지에 기인하는 효소반응의 저하는 단백질 구조의 일부를 변화시킬 수 있는 유연한 구조를 유지함으로써 상쇄된다(Smalås *et al.*, 2000). 예로 active site에서의 높은 유연성은 낮은 활성화 에너지와 높은 specific activity를 띠게 한다. 반면, 구조의 유연성 증가는 열에 대한 안정성을 떨어뜨리게 한다(Smalås *et al.*, 2000). 저온에서의 높은 활성도는 가열공정의 생략으로 인한 비용절감과 수율의 증대, 그리고 고온에서 잘 생기는 원치 않는 반응들을 최소화하는 이점이 있다. 또한 열불안정성은 연속처리공정에서 다음 단계로의 전환 시, 효소의 열에 의한 불활성화를 유도하여 빠르고 쉽게 공정을 진행시킬 수 있다. 더 나아가 구조분석을 통해 얻은 효소들의 저온적용기작의 규명은 보다 더 낮은 온도에서의 활성도 유지나 증가, 높은 활성도를 유지하면서도 열안정성을 증가시킬 수 있는 효소들의 제조를 위한 단백질공학에 필요한 정보를 제공해 줄 수 있다.

지금까지 다양한 저온환경에서 저온활성 지질분해효소를 생산하는 미생물들이 동정되었으며, 그 미생물로부터 분리된 지질분해효소의 특성이 연구되었다(Gerday *et al.*, 2000). 최근 북극해의 축치해(Chuckchi Sea)로부터 저온지질분해효소 활성을 보이는 균주들이 분리되었으며, 그 중 *Psychrobacter* sp. ArcL13에서 가장 높은 효소활성이 확인되었다(Kim *et al.*, 2015). 그러나, 직접 이 균주를 사용하여 산업화에 필요한 효소를 경제적으로 대량생산하기 어려운 문제점이 있었기 때문에, 이 균주로부터 지질분해효소 유전자를 분리 동정하고 다른 발현 숙주에서 대량으로 생산하는 기술 개발이 필요하였다. 특히, *Psychrobacter* sp. ArcL13의 게놈 서열은 밝혀져 있지 않았기 때문에, 유전자의 분리 동정은 어려운 과정이었다. 따라서, 본 연구자들은 게놈 서열에 대한 정보가 없었음에도 PCR을 이용한 gene prospecting 방법을 활용하여 *Psychrobacter* sp. ArcL13로부터 저온활성 지질분해효소 유전자를 분리 동정하고, 발현백터를 제작하여 대장균에서 발현시켜 지질분해효소를 대량생산하는 기술을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 배지

저온활성 지질분해효소활성을 보이는 *Psychrobacter* sp. ArcL13 (KCTC 12498BP)는 한국극지연구소로부터 제공받

았다. 배양 배지는 Marine broth (BD Biosciences)를 사용하였고, 25°C에서 배양하였다. DNA 클로닝을 위해 DH-5α를, 단백질 발현을 위해 BL21 (DE3)를 사용하였다.

PCR & DNA 클로닝

Psychrobacter sp. ArcL13을 48시간 배양한 후, 원심분리하여 cell pellet을 회수하였다. 그 다음 Genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology)를 이용하여 cell pellet으로부터 genomic DNA를 분리하고, PCR 주형으로 사용하였다. i-pfu DNA polymerase (Intron Biotechnology)를 사용하여 사이클 당 95°C에서 30초, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분, 총 25사이클의 반응 조건으로 PCR을 수행하였다. Signal peptide 부위를 제외한 저온활성 지질분해효소(ArcL13-Lip으로 명명) 전체 유전자는 Forward: 5'-GTACATATGGCAGGGCAGTACTATAAT-3'(밑줄부분; *NdeI* site)와 Reverse: 5'-ATACTCGAGTTAAAGGTTAGCGTTTTTAAG-3' (밑줄부분; *XhoI* site와 stop codon) primer 쌍을 사용하여 genomic DNA로부터 PCR로 증폭시켰다. 그 다음 PCR 산물을 *NdeI/XhoI* 제한효소(New England Biolabs)로 37°C에서 2시간 처리하고 Gel Extraction kit (Intron Biotechnology)로 정제한 후, 미리 같은 효소들로 처리한 pET-28a (+) vector (Invitrogen)에 클로닝하여 발현백터를 제작하였다. 제작한 발현백터 안의 ArcL13-Lip 전체 염기 서열은 양방향에서 읽어 검증하였다(Cosmogenetech).

대장균에서 ArcL13-Lip 발현 및 단백질 봉입체 분리

ArcL13-Lip 발현백터로 BL21 (DE3) cell을 형질전환시킨 후, LB 배지에서 A600 nm = 0.6까지 배양하였다. ArcL13-Lip 발현 유도를 위해 0.2 mM IPTG를 처리하고 4시간 더 배양한 후, 발현 정도를 확인하기 위해 배양액을 SDS-PAGE로 분석하였다. 또한 발현된 ArcL13-Lip이 단백질 봉입체 형태로 발현되는지 확인하기 위해 초음파로 파쇄한 대장균을 원심분리한 후, 상층액과 침전물을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다. 단백질 봉입체 분리를 위해 대장균 배양액을 20분 동안 5,000 rpm으로 원심분리한 후, 상층액은 제거하고 대장균만을 취하였다. 초음파로 파쇄한 대장균을 30분 동안 5,000 rpm에서 원심분리를 수행한 후 상층액은 제거하였고, 세포 잔여물 등을 제거하기 위해 침전물을 1% Triton X-100로 현탁한 후 원심분리를 수행하고, 침전물만 회수하였다. 이 과정을 1회 더 반복하였으며, 마지막으로 증류수로 침전물을 현탁한 후 원심분리하여, 잔존해 있는 Triton X-100를 제거하였다.

단백질 봉입체의 refolding

우선 단백질 봉입체의 unfolding 조건 확립을 위해 다양한 urea 농도와 pH 조건하에서 unfolding 실험을 수행하였다. 단백질 봉입체를 20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11), urea (2 M, 4 M, 6 M, 8 M), 10 mM β -mercaptoethanol 용액에 첨가한 후 상온에서 1시간 교반시켰으며, unfolding 상태는 A595 nm에서 흡광도 측정을 통해 혼탁 정도로 확인하였다. Refolding을 위한 최적의 조건을 확립하기 위해 refolding 용액으로 arginine, Tween 80, glycerol, propylene glycol, glucose, PEG 6000 등과 10 mM cysteine/1 mM cystine을 첨가한 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 사용하였다. Refolding을 위해 10배 부피의 refolding 용액을 unfolding 시킨 시료와 바로 섞은 후 4°C에서 3일간 반응시켰다. Refolding 정도를 확인하기 위해 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용하여 효소 반응을 시킨 후, A405 nm에서 흡광도 증가 정도를 측정하여 효소활성을 확인하였다.

ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성 규명

효소활성은 다양한 p-nitrophenyl ester [pNP-butyrate (C4), pNP-caprylate (C8), pNP-decanoate (C10), pNP-dodecanoate (C12), pNP-palmitate (C16)] (최종농도; 0.1 mM)와 10 μ l 효소를 1 ml의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 첨가하고, 25°C에서 2분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. ArcL13-Lip 활성의 pH 의존성을 확인하기 위해, pH 6.0–10.0 범위에서 p-nitrophenyl caprylate에 대한 효소활성을 2분간 측정하였다. 사용한 완충용액은 phosphate-buffered saline (PBS; pH 6.0–7.5), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5–9.0), 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0–10.0)이었다. ArcL13-Lip 활성의 온도 의존성을 확인하기 위해, 5–70°C 범위에서 p-nitrophenyl caprylate에 대한 효소활성을 2분간 측정하였다. 다양한 금속이온 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+})과 효소 저해제(PMSF, EDTA)의 ArcL13-Lip 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 1 mM의 각 첨가물이 포함된 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 10 μ l의 ArcL13-Lip 시료를 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용하여 효소활성을 측정하였다.

통계분석

결과는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고, 실험 결과는 3회 반복 실시하여 unpaired Student's t-test로 분석하였다. 0.05 이하의 P값은 통계적으로 유의성이

있는 것으로 간주된다.

결 과

ArcL13-Lip 유전자 분리 및 동정

Psychrobacter sp. ArcL13의 게놈 서열은 알려져 있지 않았기 때문에, 이 균주로부터 지질분해효소 유전자를 분리 동정하기 위해 PCR을 이용한 gene prospecting 방법을 활용하였다 (Bell et al., 2002). 대부분의 박테리아 유래 지질분해효소들은 oxyanion hole 부위와 active site 부위에서 염기 서열이 서로 다름에도 불구하고 아미노산 서열들이 비교적 잘 보존되어 있기 때문에, 이 보존된 아미노산 서열들을 코딩하는 degenerate primer들을 이용하였다(Table 1). Oxyanion hole로부터 active site 사이의 염기 서열(약 200–250 염기쌍)을 찾기 위해 다양하게 조합시킨 primer 쌍들(oxf1 + acr1, oxf1 + acr2, oxf1 + acr3, oxf1 + acr4, oxf2 + acr1, oxf2 + acr2, oxf2 + acr3, oxf2 + acr4, oxf3 + acr1, oxf3 + acr2, oxf3 + acr3, oxf3 + acr4)과 *Psychrobacter* sp. ArcL13 균주로부터 분리한 genomic DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응액을 agarose gel에서 분석한 결과, oxf1 + acr2 (lane 2), oxf1 + acr4 (lane 4), oxf2 + acr3 (lane 7), oxf3 + acr3 (lane 11) primer 쌍에서 200–250 염기쌍의 PCR 산물들이 확인되었다(Fig. 1A). 각 PCR 산물들의 염기 서열을 분석한 결과, oxf1 + acr2과 oxf1 + acr4 primer 쌍으로부터 얻은 PCR 산물에서 189개의 동일한 염기 서열이 확인되었다(Fig. 1B). 그러나, oxf2 + acr3와 oxf3 + acr3 primer 쌍을 통해 얻은 PCR 산물들에서는 염기 서열이 일치하지 않았다. Basic Local alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 사용하여 이 염기 서열과 유사한 서열을 갖는 유전자들을 찾고자 하였지만, 유사성이 있는 유전자가 확인되지 않았다. 확인된 염기 서열을 DNA

Table 1. Degenerate primers for Fig. 1

Primer	Region	Sequence
OXF1	Lipase-oxyanion hole	CCYGTGKTSYNTNGTNCATGG
OXF2	Lipase-oxyanion hole	CCRATMRTWYNTNGTNCAYGG
OXF3	Lipase-oxyanion hole	CCKYTWGTYNTNATHCAYGG
ACR1	Lipase-active site	AGGCCNCCCAKNGARTGNSC
ACR2	Lipase-active site	AGRCCNCCCAKRCRTRTGNSC
ACR3	Lipase-active site	AGGCCRCNTGNGATRGNSC
ACR4	Lipase-active site	AGGCCNCNTGRCTRTRTGNSC

R:A,G Y:C,T W:A,C S:C,G K:G,T N:A,C,G,T H:A,T,C

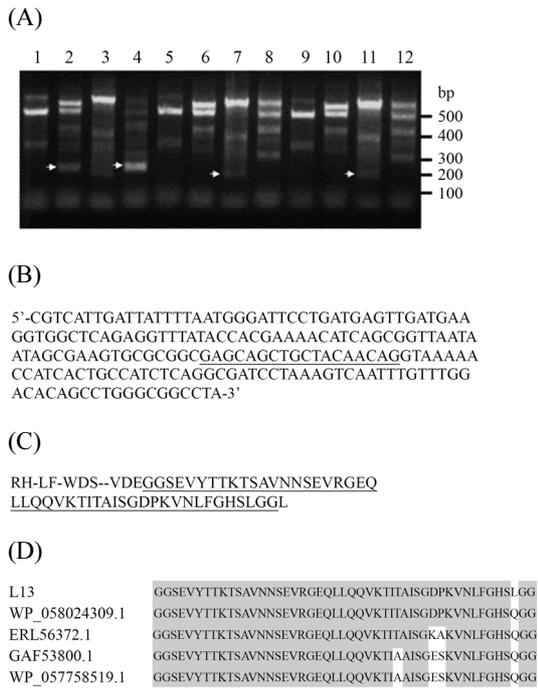


Fig. 1. PCR using lipase-prospecting primers. (A) PCR was performed using genomic DNA from *Psychrobacter* sp. ArcL13 as a template and various pairs of primers. Lanes: 1, OXF1+ACR1; 2, OXF1+ACR2; 3, OXF1+ACR3; 4, OXF1+ACR4; 5, OXF2+ACR1; 6, OXF2+ACR2; 7, OXF2+ACR3; 8, OXF2+ACR4; 9, OXF3+ACR1; 10, OXF3+ACR2; 11, OXF3+ACR3; 12, OXF3+ACR4. Arrows indicate predicted PCR products for lipase gene fragments. (B) Nucleotide sequence for PCR products from PCR using pairs of primers (OXF1+ACR2 or OXF1+ACR4). (C) Translated amino acid sequence from the nucleotide sequence in (B). (D) Alignment of the deduced amino acid sequence with sequences of other lipases: L13, *Psychrobacter* sp. ArcL13; WP_058024309.1, *Psychrobacter piscatorii*; ERL56372.1, *Psychrobacter aquaticus* CMS 56; GAF53800.1, *Psychrobacter* sp. JCM 18900; WP_057758519.1, *Psychrobacter* sp. P11G3.

translation program (<http://web.expasy.org/translate/>)을 사용하여 아미노산 서열로 번역시킨 후(Fig. 1C), 다시 Basic Local alignment Search Tool을 사용하여 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 찾은 결과 일부 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 지질분해효소들과 유사성을 보였다(Fig. 1C, underlined and

Table 2. PCR primers for Fig. 2

Primer	Region	Sequence
L13-internal-F	ArcL13-Lip internal	GAGCAGCTGCTACAACAG
L13-internal-R	ArcL13-Lip internal	CTGTTGTAGCAGCTGCTC
Psychro-1-F	<i>Psychrobacter piscatorii</i> α/β hydrolase N-terminal	ATGACGCTAAAATCTTCCTCT
Psychro-2-F	<i>psychrobacter aquaticus</i> CMA56 lipase precursor N-terminal	ATGACGCTTTCTTTGTACAT
Psychro-3-F	<i>psychrobacter</i> sp. JCM 18900 lipase precursor N-terminal	ATGACKCTAAARWCYTYYYYT
Psychro-R	<i>Psychrobacter</i> C-terminal	TTAWAGGTTTRGCGTTTTTMA

R:A,G Y:C,T W:A,C K:G,T N:A,C

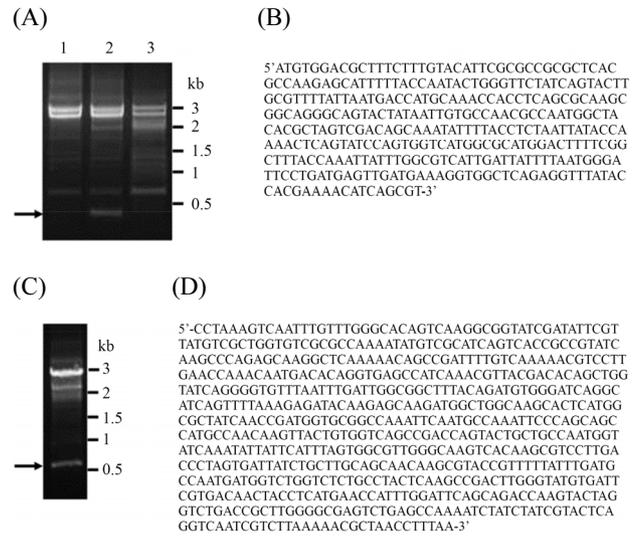


Fig. 2. PCR using primers encoding N- and C-terminal amino acid sequences of *Psychrobacter* genus lipases described in Fig. 1D and primers for ArcL13-Lip internal sequence. (A) PCR was performed using the genomic DNA as a template and various pairs of primers. Lanes: 1, Psychro-1-F+L13-internal-R; 2, Psychro-2-F+L13-internal-R; 3, Psychro-3-F+L13-internal-R. Arrow indicates predicted PCR product for a lipase gene fragment. (B) Nucleotide sequence for the PCR product from PCR using a pair of primers (Psychro-2-F+L13-internal-R). (C) PCR was undertaken using the genomic DNA as a template and a pair of primers (L13 internal-F+Psychro-R). Arrow indicates predicted PCR product for a lipase gene fragment. (D) Nucleotide sequence for the PCR product from PCR using a pair of primers (L13 internal-F+Psychro-R).

1D). 따라서, 이 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 지질분해효소들의 N-말단과 C-말단 부위의 아미노산들을 코딩할 수 있는 degenerate primer들과 이미 확인된 ArcL13-Lip 염기 서열(Fig. 1B, underlined)을 기초로 고안한 primer들(Table 2)을 다양하게 조합해 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행한 후, agarose gel로 분석하였다. 분석 결과, Psychro-2-F+L13-internal-R와 L13 internal-F+Psychro-R primer 쌍으로부터 약 300 염기쌍(Fig. 2A)과 약 700 염기쌍(Fig. 2C)의 PCR 산물들이 각각 확인되었다. 이 PCR 산물들의 염기 서열 분석을 수행한 후(Fig. 2B and D), 염기 서열을 Basic Local alignment

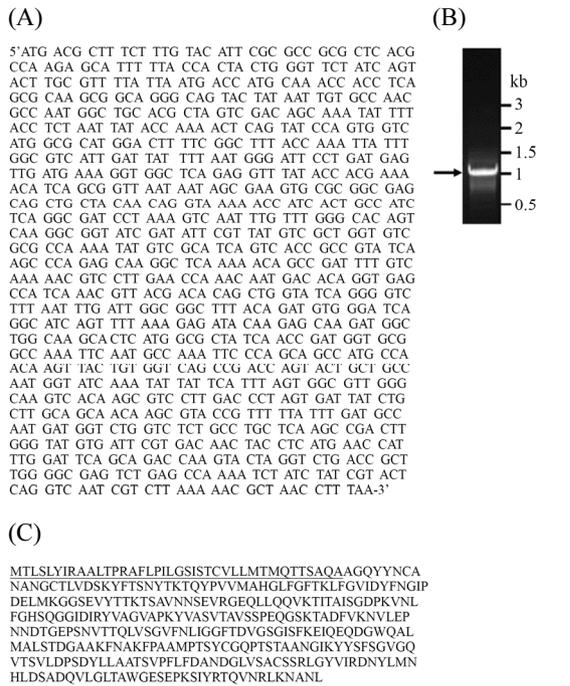


Fig. 3. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ArcL13-Lip. (A) Complete nucleotide sequence of ArcL13-Lip. (B) PCR was performed using the genomic DNA as a template and a pair of primers designed to amplify the entire gene. (C) Deduced amino acid sequence of ArcL13-Lip. The putative signal peptide region is underlined.

Search Tool을 사용하여 분석한 결과 유사성은 낮지만 *Psychrobacter* sp. JCM 18903 lipase의 염기 서열과 비교되는 결과를 얻었다. 이 결과들을 바탕으로 N-말단 부위를 코딩하는 337개의 염기 서열(Fig. 2B)과 C-말단 부위를 코딩하는 669개의 염기 서열(Fig. 2D)을 확인할 수 있었다. 이 두 염기 서열들을 결합함으로써 1,074개의 전체 ArcL13-Lip 유전자 염기 서열을 얻을 수 있었다(Fig. 3A). ArcL13-Lip 유전자에 대한 5'-말단과 3'-말단 primer 쌍, genomic DNA를 사용하여 PCR를 수행한 결과 약 1 kb의 PCR 산물을 확인할 수 있었고(Fig. 3B), PCR 산물의 염기 서열 분석 결과 이미 확인된 ArcL13-Lip 유전자 전체 염기 서열과 일치하였다. DNA translation program을 사용하여 ArcL13-Lip 유전자의 염기 서열을 번역한 결과, ArcL13-Lip 단백질은 358개의 아미노산으로 구성됨을 알 수 있었다(Fig. 3C).

ArcL13-Lip의 아미노산 서열 분석

ArcL13-Lip 단백질의 전체 아미노산 서열을 Basic Local alignment Search Tool을 사용하여 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 확인한 결과, ArcL13-Lip은 일부 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 84-90%의 유사성을 보

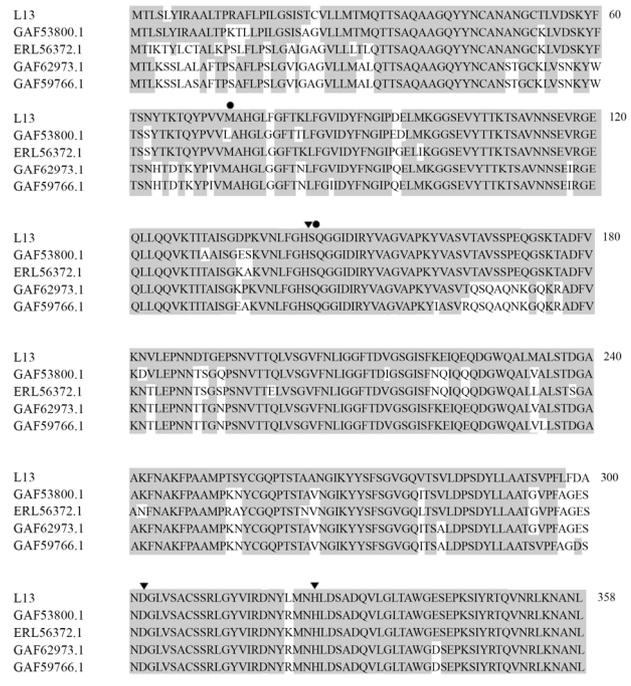


Fig. 4. Alignment of ArcL13-Lip amino acid sequence with sequences of other lipases: L13, *Psychrobacter* sp. ArcL13; GAF53800.1, *Psychrobacter* sp. JCM 18900; ERL56372.1, *Psychrobacter aquaticus* CMS 56; GAF62973.1, *Psychrobacter* sp. JCM 18903; GAF59766.1, *Psychrobacter* sp. JCM 18902. Amino acid residues belonging to the catalytic triad are indicated by (▼) and to the oxyanion hole are indicated by (●).

였다(Fig. 4). 다른 지질분해효소들과의 유사성을 기초로, ArcL13-Lip의 catalytic triad는 144번째 serine (Ser144), 302번째 aspartate (Asp302), 324번째 histidine (His324)로 구성되며, oxyanion hole은 73번째 methionine (Met73)과 145번째 glutamine (Gln145)로 형성됨을 추론하였다(Fig. 4). SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 이용하여 signal peptide 유무를 분석한 결과, ArcL13-Lip은 39개의 아미노산으로 구성된 signal peptide를 갖고 있음이 확인되었다(Fig. 3C, underlined).

ArcL13-Lip 유전자 클로닝 및 대장균에서의 발현

Signal peptide 부위를 제외한 ArcL13-Lip 전체 유전자(Fig. 3)를 genomic DNA로부터 PCR로 증폭시킨 후, pET-28a (+) 벡터에 클로닝하여 발현벡터를 제작하였다. 이 발현벡터를 BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 후, LB 배지에서 배양하며 IPTG로 ArcL13-Lip 단백질의 발현을 유도시켰다. 배양액을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 발현을 유도시킨 세포에서만 약 35 kDa의 분자량을 갖는 ArcL13-Lip이 과발현됨을 확인하였다(Fig. 5A). ArcL13-Lip을 과발현시킨 세포들을 초음파로 파

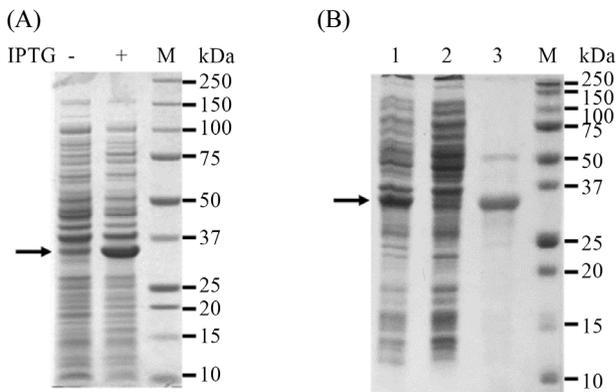


Fig. 5. SDS PAGE analysis showing ArcL13-Lip expression in transformed BL21(DE3) cells. (A) SDS-PAGE analysis of uninduced and induced cells. Arrow indicates ArcL13-Lip. (B) SDS-PAGE analysis of supernatant and precipitate after centrifugation of sonicated cells. Lanes: 1, total cell lysate; 2, supernatant; 3, precipitate; M, molecular markers (Bio-Rad). Arrow indicates ArcL13-Lip.

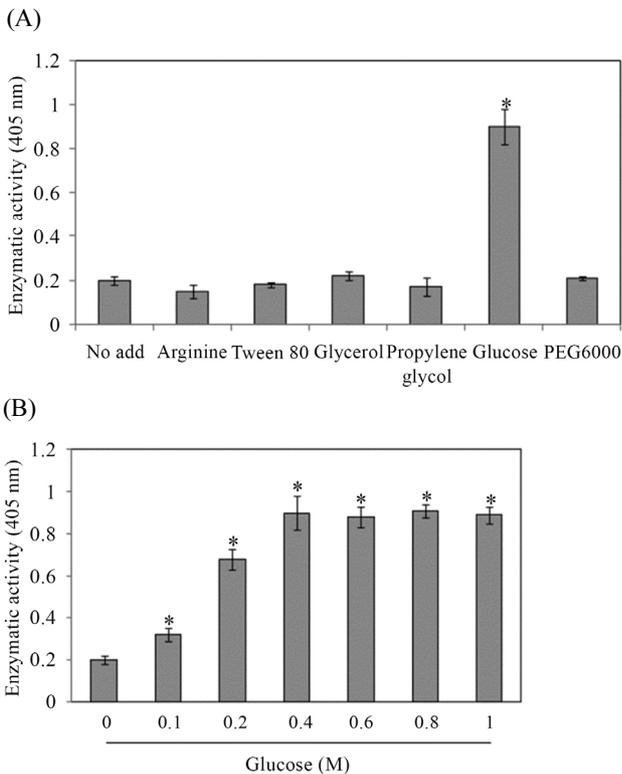


Fig. 6. Effect of various additives on refolding of ArcL13-Lip. (A) Refolding of ArcL13-Lip was performed in buffers containing 0.5 M arginine, 0.1% Tween 80, 5% glycerol, 5% propylene glycol, 0.5 M glucose, or 1 mg/ml PEG 6000. Enzymatic activity of refolded ArcL13-Lip was assessed by measuring hydrolysis of *p*-nitrophenyl caprylate at 405 nm. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. * $P < 0.05$ versus control. (B) Refolding of ArcL13-Lip in buffers containing different concentrations of glucose. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. * $P < 0.05$ versus control.

쇄한 후 원심분리를 수행하였으며, 상층액과 침전물을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다. 분석 결과 ArcL13-Lip의 발현은 오직 침전물에서만 관찰되었으며, 이것은 ArcL13-Lip 유전자를 대장균에서 발현시킬 경우 단백질 봉입체 형태로 발현됨을 의미 한다(Fig. 5B).

ArcL13-Lip의 refolding

발현시킨 단백질 봉입체 형태의 ArcL13-Lip은 불활성 상태이기 때문에, 활성형으로 전환시키기 위해서는 단백질 봉입체의 unfolding과 refolding 과정이 필수적이다. 우선 대장균 으로부터 고순도의 단백질 봉입체를 분리하기 위해, 파쇄한 세포들을 비이온 계면활성제가 포함된 완충용액으로 수 차례 세척하였다. 단백질 봉입체의 unfolding 조건 확립을 위해 다양한 urea 농도와 pH 조건하에서 unfolding을 수행하였다. 실험 결과 8 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM β -mercaptoethanol 용액에서 단백질 봉입체의 unfolding 효율이 가장 높았다. Refolding 조건의 최적화를 위해 unfolding시킨 ArcL13-Lip을 다양한 첨가물이 포함된 완충용액에 희석시키고, 4°C에서 반응시켰다. 3일 후 각 반응액에서 ArcL13-Lip의 refolding 정도를 확인하기 위해 지질분해효소활성 분석을 수행하였다. 활성 분석 결과, glucose에 의해서만 ArcL13-Lip의 refolding 수율이 크게 증가하였다(Fig. 6A). Glucose 농도에 따른 ArcL13-Lip의 refolding 수율을 확인하기 위해 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 M glucose을 포함하는 완충용액에 ArcL13-Lip을 refolding 시킨 후, 효소활성을 측정하였다. 측정 결과 0.4 M에서 refolding 효율이 정점을 나타내었고, 더 이상의 농도에서는 refolding 효율이 증가하지 않았다(Fig. 6B).

재조합 ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성

다양한 분야에서의 적용을 위해, ArcL13-Lip의 기질 특이성, pH 및 온도 의존성, 금속이온들과 효소저해제들에 의한 영향 등을 조사하였다. 기질 특이성은 탄소 수가 서로 다른 *p*-nitrophenyl ester에 대한 효소활성을 측정하여 확인하였다. 활성 측정 결과 ArcL13-Lip은 *p*-nitrophenyl caprylate (C8), 그 다음으로 *p*-nitrophenyl decanoate (C10)에 대해 최고의 활성을 나타내었다(Fig. 7A). 반면, 탄소 수가 더 적거나 더 많은 기질에 대해서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다(C4, 60%; C12, 50%; C16, 45%). 기질로 *p*-nitrophenyl caprylate를 사용하여 반응액의 pH에 따른 효소활성을 조사한 결과, ArcL13-Lip은 pH 8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였다(Fig. 7B). 효소활성을 다양한 온도에서 측정한 결과 ArcL13-Lip은 40°C에서 최고

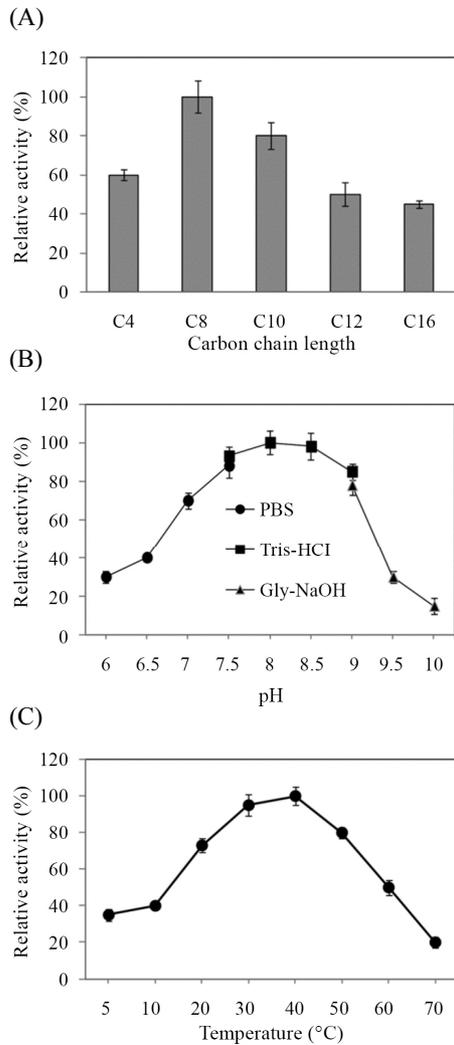


Fig. 7. Effects of substrates, pH, and temperature on the lipase activity of ArcL13-Lip. (A) Substrate specificity of ArcL13-Lip. Hydrolytic activity of ArcL13-Lip toward *p*-nitrophenyl esters with various chain lengths (C4, C8, C10, C12, and C16) were measured at 405 nm. Activity towards *p*-nitrophenyl caprylate was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. (B) Effect of pH on the ArcL13-Lip activity. Lipase activity was assayed in different pH buffers [●, PBS (pH 6.0–7.5); ■, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5–9.0); ▲, 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0–10.0)]. Activity obtained at pH 8.0 was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. (C) Effect of temperature on the ArcL13-Lip activity. The enzyme activity was assayed at different temperatures for 2 min. Activity obtained at 40°C was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments.

의 활성을 나타내었고, 10°C와 20°C에서 각각 최고 활성 대비 약 40%와 73%의 효소활성을 나타내었다(Fig. 7C). 이와 같이 저온에서의 높은 효소활성은 전형적인 저온활성 효소의 특징을 보여주는 것이다(Joseph et al., 2008). 그 다음 금속이온들과 효소저해제들의 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. 실

Table 3. Effect of various metal ions and additives on ArcL13-Lip activity

Reagents (1 mM)	Relative activity (%) ^a
None	100
CaCl ₂	98 ± 5
MgCl ₂	100 ± 3
MnCl ₂	99 ± 2
CuCl ₂	53 ± 3*
CoCl ₂	97 ± 4
NiCl ₂	96 ± 2
ZnSO ₂	56 ± 1*
EDTA	95 ± 3
PMSF	99 ± 2

Data are given as means ± SD, n = 3. *P < 0.05 versus control.

^aArcL13-Lip was incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing each compound for 10 min. Remaining activity was determined using 0.1 mM *p*-nitrophenyl caprylate at 25°C.

험 결과 ArcL13-Lip의 효소활성은 CoCl₂, NiCl₂, EDTA 등에 의해 미약하게 억제되었지만, CuCl₂와 ZnSO₄에 의해서는 약 50% 억제되었다. CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, PMSF는 ArcL13-Lip의 효소활성에 영향을 주지 않았다(Table 3).

고찰

본 연구의 내용을 간략히 요약하면 첫째, *Psychrobacter* sp. ArcL13 균주로부터 PCR을 이용한 gene prospecting 방법으로 새로운 지질분해효소 유전자인 ArcL13-Lip을 분리·동정하였다. 둘째, ArcL13-Lip은 일부 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 염기 서열의 유사성은 낮지만, 84–90%의 아미노산 서열 유사성을 보였다. 셋째, ArcL13-Lip 유전자를 대장균에서 발현 시, 약 35 kDa의 분자량을 보였으며 단백질 봉입체 형태로 발현되었다. 넷째, glucose에 의해서 ArcL13-Lip의 refolding 수율이 크게 증가하였다. 다섯째, 다양한 탄소 수를 갖는 *p*-nitrophenyl ester에 대해 효소활성을 나타내었으며, 저온활성을 보였다.

같은 계열의 유전자들 사이에서 전체 아미노산 서열의 유사성이 낮더라도, 기능이나 구조에 중요한 역할을 하는 도메인의 경우 유사한 아미노산 서열로 구성된다. 그러나, 이 도메인들의 아미노산 서열이 잘 보존되어 있다 하더라도, 이 아미노산들을 코딩하는 염기 서열은 서로 다를 수 있다. 따라서, 이 아미노산들을 모두 코딩할 수 있는 염기들로 구성된 degenerate primer들을 사용하여 PCR을 수행하게 되면, 원하는 유전자를 찾을 수 있는 확률이 높아진다. 이와 같은 방법을 gene prospecting이라 하며, 지금까지 지질분해효소 유전자를 포함한 다양한

유전자들을 발굴하는데 이용되어왔다(Bell *et al.*, 2002; Sunna and Bergquist, 2003; Shandilya *et al.*, 2004; Finnegan *et al.*, 2005). 현재까지 *Psychrobacter* sp. ArcL13의 게놈 서열은 밝혀져 있지 않기 때문에, 이 균주로부터 원하는 유전자를 발굴하기는 쉽지 않다. 그러나, 게놈 서열을 모르더라도 gene prospecting 방법을 사용할 경우, 좀더 경제적으로 원하는 유전자를 발굴하기 용이해진다. 따라서, gene prospecting 방법은 다양한 환경으로부터 스크리닝 과정을 통해 발굴된 유용한 활성을 갖는 다양한 균주로부터 게놈 서열의 규명 없이도 원하는 유전자를 발굴하는데 유용하게 쓰일 것이라 기대된다.

ArcL13-Lip이 *Psychrobacter* sp. ArcL13의 지질분해효소 활성(Kim *et al.*, 2015)을 대표한다는 근거는 다음과 같다. 첫째, 둘 다 저온활성을 보였다. 둘째, *p*-nitrophenyl caprylate와 그 다음으로 *p*-nitrophenyl decanoate에 대해 최고의 활성을 보였다. 셋째, 미세한 차이는 존재하지만, 둘 다 pH 8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였다. 넷째, 10-70°C 범위에서 온도에 따른 효소활성이 거의 유사하였다.

Basic Local alignment Search Tool을 사용하여 ArcL13-Lip과 일부 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 지질분해효소들의 아미노산 서열 유사성이 확인되었지만, 이들 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 지질분해효소들에 대한 연구가 전무한 상황이다. 따라서, 이들 유전자들이 지질분해효소로서의 역할을 수행하는지에 대해서는 추후의 연구가 필요하다. 그러나, ArcL13-Lip이 진정한 지질분해효소임을 몇 가지 이유로 설명할 수 있다. 첫째, 지질분해효소활성에 대한 스크리닝 과정을 통해 *Psychrobacter* sp. ArcL13을 분리하였다(Kim *et al.*, 2015). 둘째, 지질분해효소의 기질들에 대해 활성을 나타내었다. 셋째, 아미노산 서열에 전형적인 지질분해효소의 특징인 catalytic triad와 oxyanion hole을 구성하는 아미노산들을 갖고 있다(Jaeger *et al.*, 1994, 1999). 결론적으로 ArcL13-Lip과 아미노산 서열이 유사한 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 지질분해효소들은 지질분해효소로서의 가능성만 제시되었을 뿐 실제 지질분해효소로서의 기능과 특성을 규명한 것은 ArcL13-Lip이 처음이다.

알려진 대부분의 저온활성 지질분해효소는 *Psychrobacter* 속 박테리아를 포함한 호냉성(psychrophilic)과 내냉성(psychrotolerant) 미생물에서 분리되었다(Zhang *et al.*, 2007, 2009; Chen *et al.*, 2011). 특히, 시베리아 저온 염수호 유래 *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T로부터 저온활성 지질분해효소 유전자가 분리되었으며, 그 특성이 규명되었다(Bakermans *et al.*, 2006; Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2012, 2013a, 2013b). ArcL13-Lip과 *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T 지질분해효소는 저온

에서 서식하는 같은 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래 저온활성 효소라는 공통점이 있다. 반면, 차이점은 첫째, *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T 지질분해효소는 ArcL13-Lip에 비해 탄소 수가 많은 기질에 대해 높은 효소활성을 보인다(Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2013a). 둘째, ArcL13-Lip은 다른 저온활성 지질분해효소와 비슷하게 40°C 근처에서 최고의 활성을 보이지만(Suzuki *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2009), *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T 지질분해효소는 25°C에서 최고의 활성을 보인다(Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2013a). 셋째, *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T 지질분해효소를 포함한 대부분의 저온활성 지질분해효소는 EDTA에 의해 활성을 잃지만(Kulakova *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2013a), ArcL13-Lip 활성은 EDTA 영향을 거의 받지 않는다. 이것은 ArcL13-Lip의 활성에는 금속이온이 필요 없지만, 대부분의 저온활성 지질분해효소의 활성을 위해서는 금속이온이 필수적임을 의미한다.

대부분의 이종 단백질은 대장균에서 불활성 상태인 단백질 봉입체 형태로 발견된다. 단백질 봉입체 형태로 발견되는 것의 장점은 단백질을 과발현시킬 수 있고, 세포 파쇄 후 단백질 봉입체의 세척 과정만으로 고순도의 단백질을 얻을 수 있기 때문에 정제 과정이 복잡하지 않다는 것이다. 반면, 단백질 봉입체는 불활성 상태이기 때문에 활성 형태로 전환시키기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요하다. *In vivo*에서 단백질 folding 과정에는 chaperone이 관여하여, folding intermediate들의 aggregation을 방지함으로써 단백질 folding을 촉진한다(Hartl *et al.*, 2011). *In vitro*에서는 단백질 folding 효율성을 높이기 위해 folding intermediate들의 aggregation을 방지하는 다양한 첨가제들(예: arginine, 계면활성제, glycerol, sucrose, glucose, polyethylene glycol)이 사용된다(Vallejo and Rinas, 2004). 특히, glucose는 *in vitro*에서 단백질 안정화에 기여한다는 다양한 보고가 있다. 예로, glucose는 높은 온도에서 native 상태를 유지할 수 있도록 효소들을 안정화시키는 역할을 한다(Hottiger *et al.*, 1994). Glucose는 효과는 작지만 변성된 rhodanese의 aggregation을 억제한다는 보고도 있다(Singer and Lindquist, 1998). 또한, S450-650 (SARS-coronavirus spike protein의 450-650 polypeptide fragment)을 대장균에 발현시켜 얻은 단백질 봉입체의 refolding 과정에서 glucose는 aggregation을 방지해 refolding 효율을 높인다(Zhao *et al.*, 2005). Glucose, lactose, sucrose 등과 같은 당들은 물과 단백질 사이의 접촉 면적을 최소화해 단백질의 고유한 구조와 변성된 구조 사이의 평형 상태를 고유한 구조 쪽으로 유리하게 함으로써, 단백질의 고유한 구조를 안정화시키는 역할을 한다(Lee and Timasheff,

1981; Arakawa and Timasheff, 1982). 따라서 glucose에 의한 ArcL13-Lip의 refolding 효율의 증가는 glucose가 refolding 과정에서 aggregation 방지를 통해 refolding 효율을 증가시키는 것으로 설명할 수 있다.

저온활성 지질분해효소는 세제 혹은 토양과 폐수 정화에 첨가제로 다양하게 사용될 수 있기 때문에 특히 주목을 받고 있다. 본 연구를 통해 이루어진 ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성 규명, 발현 균주, 최적의 refolding 방법을 바탕으로 ArcL13-Lip의 산업적 응용을 위해서는 우선 대량생산 기술 개발이 필요하다. 그 다음 필드에서의 테스트를 통해 다양한 분야로의 적용 가능성을 검증하는 것이 뒤따라야 할 것이다.

적 요

최근 북극해의 축치해(Chuckchi Sea)로부터 저온지질분해 효소활성을 보이는 *Psychrobacter* sp. ArcL13 균주가 분리되었다. 그러나 낮은 발현 양 때문에, 이 효소의 다양한 분야에서의 활용에 제약을 받아왔다. 따라서 유전자 재조합 기술을 이용하여, 이 효소를 대량생산하는 기술개발이 필요하였다. 재조합 지질분해효소를 만들기 위해서는 우선 해당 유전자의 동정이 필요하였기 때문에, *Psychrobacter* sp. ArcL13 균주로부터 PCR을 이용한 gene prospecting 방법으로 새로운 지질분해효소 유전자인 ArcL13-Lip을 분리하고 전체 염기 서열을 규명하였다. 염기 서열 분석결과 ArcL13-Lip은 일부 *Psychrobacter* 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 염기 서열의 유사성은 낮지만, 84-90%의 아미노산 서열 유사성을 보였다. ArcL13-Lip 전체 유전자를 대장균에서 발현시키고 전기영동으로 분석한 결과, 재조합 ArcL13-Lip은 약 35 kDa의 분자량을 보였으며 단백질 봉입체 형태로 발현되었다. Unfolding된 ArcL13-Lip을 다양한 첨가물이 포함된 완충용액에서 refolding 시킨 결과, glucose에 의해서 refolding 효율이 가장 크게 증가하였다. Refolding된 재조합 ArcL13-Lip은 다양한 *p*-nitrophenyl ester 중 *p*-nitrophenyl caprylate와 *p*-nitrophenyl decanoate에 대해 가장 높은 효소활성을 보였다. 온도에 따른 효소활성을 조사한 결과 ArcL13-Lip은 40°C에서 최고의 활성을 나타내었고, 10°C와 20°C에서 각각 최고 활성 대비 약 40%와 73%의 효소활성을 나타내었다. 이와 같이 ArcL13-Lip은 전형적인 저온활성 효소의 특징을 보여주었다.

감사의 말

본 연구는 해양수산부(과제번호: PM15050)와 극지연구소(과제번호: PE16350) 지원으로 수행되었으며, 연구 수행에 많은 조언을 해주신 연세대학교 생화학과 김두식 교수님에게 감사드립니다.

References

- Arakawa, T. and Timasheff, S.N. 1982. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* **21**, 6536-6544.
- Bakermans, C., Ayala-del-rio, H.L., Ponder, M.A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., and Tiedje, J.M. 2006. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1285-1291.
- Bell, P.J., Sunna, A., Gibbs, M.D., Curach, N.C., Nevalainen, H., and Bergquist, P.L. 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology* **148**, 2283-2291.
- Cardenas, F., de Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W., and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 145-154.
- Chen, R.P., Guo, L.Z., and Dang, H.Y. 2011. Gene cloning, expression and characterization of a cold-adapted lipase from a psychrophilic deep-sea bacterium *Psychrobacter* sp. C18. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 431-441.
- Feller, G. 2013. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica* **2013**, 512840.
- Finnegan, P.M., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, H., and Bergquist, P.L. 2005. Diverse dextranase genes from *Paenibacillus* species. *Arch. Microbiol.* **183**, 140-147.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georgette, D., et al. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**, 103-107.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., and Wiemken, A. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **219**, 187-193.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., and Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315-351.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Vanheuver, M.,

- and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29–63.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., and Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* **26**, 457–470.
- Kim, S., Wi, A.R., Park, H.J., Kim, D., Kim, H.W., Yim, J.H., and Han, S.J. 2015. Enhancing extracellular lipolytic enzyme production in an arctic bacterium, *Psychrobacter* sp. ArcL13, by using statistical optimization and fed-batch fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **45**, 348–364.
- Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., and Esaki, N. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly → Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta.* **1696**, 59–65.
- Lee, J.C. and Timasheff, S.N. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* **256**, 7193–7201.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. 2013a. Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. *Protein Expr. Purif.* **91**, 96–103.
- Novototskaya-Vlasova, K.A., Petrovskaya, L.E., Rivkina, E.M., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. 2013b. Characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T and its deletion mutants. *Biochemistry (Mosc)* **78**, 385–394.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. 2012. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg. *FEMS Microbiol. Ecol.* **82**, 367–375.
- Park, I.H., Kim, S.H., Lee, Y.S., Lee, S.C., Zhou, Y., Kim, C.M., Ahn, S.C., and Choi, Y.L. 2009. Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 128–135.
- Salameh, M.A. and Wiegel, J. 2007. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7725–7731.
- Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A., and Bag, P.K. 2012. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. *Process Biochem.* **47**, 858–866.
- Shandilya, H., Griffiths, K., Flynn, E.K., Astatke, M., Shih, P.J., Lee, J.E., Gerard, G.F., Gibbs, M.D., and Bergquist, P.L. 2004. Thermophilic bacterial DNA polymerases with reverse-transcriptase activity. *Extremophiles* **8**, 243–251.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell* **1**, 639–648.
- Smalás, A.O., Leiros, H.K., Os, V., and Willassen, N.P. 2000. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**, 1–57.
- Sunna, A. and Bergquist, P.L. 2003. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. *Extremophiles* **7**, 63–70.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., and Esaki, N. 2002. Primary structure and catalytic properties of a cold-active esterase from a psychrotroph, *Acinetobacter* sp. strain no. 6. isolated from Siberian soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1682–1690.
- Vallejo, L.F. and Rinas, U. 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* **3**, 11.
- Zhang, A.J., Gao, R.J., Diao, N.B., Xie, G.Q., Gao, G., and Cao, S.G. 2009. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **56**, 78–84.
- Zhang, J., Lin, S., and Zeng, R.Y. 2007. Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp. 7195. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 604–610.
- Zhao, J.C., Zhao, Z.D., Wang, W., and Gao, X.M. 2005. Prokaryotic expression, refolding, and purification of fragment 450-650 of the spike protein of SARS-coronavirus. *Protein Expr. Purif.* **39**, 169–174.