TSPE15070-007-3

저온 활성 프로티아제 생산 극지 미생물의 대사 연구

Metabolism of Polar Bacteria Producing Cold-active Protease

KOPRI
극지연구소

2015. 12. 31

전남대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 고유 생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴” 과제의 위탁연구 “저온활성 프로티아제 생산 극지 미생물 대사 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 1.

(본과제) 총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 : 전남대학교

위탁연구책임자 : 최 종 일

위탁참여연구원 : 김 현 도

위탁참여연구원 : 김 수 미

보고서 초록

위탁연구과제명	저온 활성 프로티아 생산 극지 미생물의 대사 연구				
위탁연구책임자	최 종일	해당단계 참여연구원수	3	해당단계 연구비	40,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 생물공학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		

요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)	보고서 면수	

○ 신규 극지 미생물 확보
- 2015년 8월 다산 기지를 방문하여 폐광산과 인근의 토양지역의 시료 채취 완료
- 채취된 초양 시료로부터 프로티아제 생산 미생물의 분리 작업을 진행 중
- 극지연구소에서 분양 받은 미생물에서 유래한 프로티아제 정제 및 특성 연구

○ 극지 미생물의 단백체 분석
- 프로티아제 활성의 차이에 따른 미생물의 단백체 비교 분석
- 배양 온도 차이에 따른 단백체 비교 분석

○ 염색체 서열 분석 미생물 선정
- 활용성이 높은 극지 미생물을 선정하여 NGS를 이용한 염기서열 분석 진행

KOPRI 극지연구소

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지 미생물, 프로티아제, 대사 분석
	영 어	Polar bacteria, protease, metabolism

요 약 문

Ⅰ. 제 목

저온활성 프로티아제 생산 극지 미생물의 대사 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 남극 미생물 유래 저온활성 유용 단백질 프로티아제의 특성 연구

○ 남극 고유생물의 생명정보 확보를 위한 저온활성 유용 단백질의 유전자원 확보

○ 남극 고유생물의 저온적응 기작 해석 및 활용가치 규명을 위한 저온활성 단백질의 발현 기작 및 대사 연구

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

○ 신규 극지 미생물의 확보

○ 극지 미생물의 단백체 분석

○ 염색체 서열 분석 미생물 선정

Ⅳ. 연구개발결과

○ 2015년 8월 다산 기지를 방문하여 신규 미생물 확보를 위한 인근 폐광산이나 빙하 주변의 토양 시료 채취함

○ 극지연구소에서 분양 받은 *Janthinobacterium* sp. (PAMC 25641)로 부터 얻어진 프로티아제 정제

○ 프로티아제 활성의 차이에 따른 단백체 비교

○ 극지 미생물 *Arthrobacter* sp. (PAMC 25486)과 *Planococcus* sp. (PAMC 21323)의 전체 염기 서열 분석 진행

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

○ 저온활성 프로티아제 특성 연구와 발현 기작 규명을 통한 본과제의 목표인 극지 생명체의 저온적응 기작에 관한 학문적 자료 제공

○ 극지 미생물의 유전체, 단백체 분석 결과 제시를 통한 관련 학문 분야의 연구 자료 제공과 극지연구소의 관련 데이터베이스 구축에 기여

○ 산업적 활용가능성이 높은 저온 활성 프로티아제 생산 균주 개발 및 관련 특허 확보, 향후 기술 이전을 통한 산업화 기여

KOPRI 극지연구소

S U M M A R Y
(영 문 요 약 문)

Ⅰ. Title

Metabolism of Polar Bacteria Producing Cold-active Protease

Ⅱ. Purpose and Necessity of R&D

○ Characterization of cold-adaptive protease from Antactic bacteria

○ Genomic information of cold-adaptive protease for understanding metabolism of Antactic bacteria

○ Investigation of cold-adaptive metabolism of Antactic bacteria and its application

Ⅲ. Contents and Extent of R&D

○ Isolation of new protease producing bacteria

○ Purification and characterization of cold-adaptive protease

○ Comparison of protein expression level by 2-dimensional electrophoresis

Ⅳ. R&D Results

○ Collection of soil sample near Dasan Station and isolation of new protease producting bacteria

○ Development of purification procedure of cold-adaptive protease

○ Characterization of cold-adaptive protease

○ Analysis of protein expression level by 2-dimensional electrophoresis and identification of highly expressed proteins

○ Comparison of protein expression level of bacteria between differently protease producing condition

Ⅴ. Application Plans of R&D Results

○ Contribution for investigating the metabolism of Antactic bacteria

○ Suppliment of genomic and proteomic information of Antactic bacteria producing cold-adaptive protease

○ Application of cold-adaptive protease for industry

KOPRI 극지연구소

목　　차

제 1장 서론·····6

제 2장 국내외 기술개발 현황·····9

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과·····12

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도·····51

제 5장 연구개발결과의 활용계획·····52

KOPRI
극지연구소

제 1 장 서론

○ 남극 미생물 유래 저온활성 유용 단백질 프로티아제의 특성 연구 ○ 남극 고유생물의 생명정보 확보를 위한 저온활성 유용 단백질의 유전자원 확보 ○ 남극 고유생물의 저온적응 기작 해석 및 활용가치 규명을 위한 저온활성 단백질의 발현 기작 및 대사 연구

○ 다양한 화학물질의 생산에서 고효율적, 선택적, 그리고 친환경적인 공정이 요구됨에 따라 기존의 화학적 촉매를 대체할 수 있는 친환경 효소의 개발이 진행되고 있으며, 특히 저온에서 활성을 갖고 있는 **저온활성 효소의 사회적 수요가 증가**하고 있음.

○ 저온활성 효소의 활용 가능성과 산업적 관심에도 불구하고 관련 연구의 대부분은 극지에 서식하는 미생물 또는 동식물로부터 특이적 저온활성 효소를 추출하는 연구임.

- 대표적인 저온 환경인 극지는 접근성이 어려워 생물자원 확보를 위한 다양한 기술적 노하우 및 인프라가 요구됨. 국내에서는 극지연구소를 중심으로 시료의 확보와 신규 효소의 스크리닝이 진행되고 있음.
- 이러한 저온활성 효소를 확보하기 위한 스크리닝 법은 한천 배지 상에서 원하는 산물이 나타날 경우 발색단을 띠거나 투명환이 나타나는 것을 이용하여 효소 활성을 나타내는 균주를 검색하는 방법임.

KOPRI 극지연구소

○ 극지의 생물은 낮은 성장 속도와 특이적인 배양 환경으로 고농도 고생산성으로 효소를 생산하는 것이 어려움.

- 이러한 극지미생물 유래 효소의 고농도 생산을 위하여 효소 유전자를 클로닝하여 대장균과 같은 중온성 생물의 발현시스템을 이용하여 발현하는 연구가 진행되었음.

○ 극지미생물에서 유래한 단백질을 대장균에서 효율적으로 발현시키기 위하여 codon usage를 조절하는 방법이 사용되었으나, 이러한 codon usage의 최적화에도 불구하고 저온활성 효소의 대부분은 대장균과 같은 중온선 박테리아에서 발현이 되지 않는 경우가 많음.

○ 일부 저온활성 효소의 경우, 대장균 발현 시스템을 이용할 경우 중온의 배양온도로 인하여 효소 발현 및 안전성이 영향을 받을 수 있음.

○ 저온활성 효소의 발현을 위하여 배양온도를 낮출 경우 대장균에서 세포생장 및 단백질 합성이 중지되는 cold-shock을 받게 되므로 대장균을 이용하여 저온에서 저온활성 효소를 안정적으로 발현시키기는 거의 불가능하였음.

○ 효과적인 저온활성 효소의 발현을 위하여 대장균에서 샤페론을 이용하여 번역을 증진

시키는 연구가 수행되었음.

- psychophilic bacteria에서 유래한 샤페론을 이용하여 대장균에서 온도 민감성 esterase를 이용한 연구가 2004년 처음으로 보고되었으나, 아직까지 관련 연구는 미흡한 실정임. 2004년의 연구에서는 대장균을 4℃에서 배양하여 esterase의 활성을 측정한 것으로 이처럼 낮은 온도에서 대장균을 이용한 배양은 저온성 모균주를 이용하여 효소를 추출하는 방법과 비교하여 발현량의 차이는 없음.
- 하지만, **선행연구 결과로부터 저온성 샤페론을 이용한 저온활성 단백질의 효율적인 발현 가능성이 확인**이 되었으며, 보다 심층적인 연구가 진행된다면 15℃이상의 중온에서 대장균을 이용한 고생산성 고효율 저온활성 효소의 생산이 가능할 것임.

○ 극지 미생물의 omics 연구가 진행됨에 따라 다양한 샤페론 유전자들이 밝혀지고 있으나, 이들 샤페론의 역할과 구조에 관해서는 연구가 미비함. 이러한 극지미생물 유래 샤페론을 이용한 발현시스템을 개발하기 위해서는 저온성 샤페론의 작용기작과 구조가 규명되어야함.

- 극지미생물의 유전체와 단백체 분석으로부터 다양한 샤페론 단백질이 보고되었으나, 저온활성 효소의 발현에 관여하는 기작과 주요 역할에 관해서는 연구가 필요한 실정임.
- 이러한 저온성 샤페론의 작용기작과 구조의 규명을 위해서는 다른 활성을 갖는 다양한 구조의 돌연변이 저온성 샤페론 library의 확보가 필요함.
- 돌연변이 샤페론 library로부터 기질 단백질과 샤페론의 interaction을 예측할 수 있음.

○ 또한, 유전체 해독 기술의 개발로 다양한 극지미생물의 유전자 서열이 밝혀지면서 신규 유전자의 특성에 관한 연구가 필요하지만, 대부분의 유전자가 대장균을 이용한 기존의 발현시스템에서는 난발현이기 때문에 난발현 극지 미생물 유래 유전자의 특성 연구를 위한 발현 시스템의 개발이 필요함.

- 메타지놈 해독 기술의 개발로 늘어나 신규 유전자원의 확인과 동정을 위해서는 난발현 저온성 미생물 유래 단백질을 효과적으로 발현할 수 있는 시스템의 개발이 시급한 실정임.
- 저온성 샤페론은 난발현 단백질의 발현과 안정화에 key-role을 할 것으로 예측됨.
- 저온성 샤페론을 이용한 발현 시스템의 개발을 통하여 극지미생물 유래 유전자의 발현을 통한 특성 연구가 이루어진다면 극지 생물의 적응기작과 진화 규명에 대한 결정적인 단서를 제공할 수 있음.

○ 극지미생물의 유전체와 단백체 정보가 대규모로 얻어지고 있으나, 이를 활용한 연구 인프라는 부족한 실정이며, 특히 저온성 샤페론의 활용 연구는 극지유래 유용 소재의 개발을 위하여 매우 필요함.

- 극지 미생물의 온도반응 단백체 분석과 저온성 샤페론의 활용 기술은 향후 극지 유

KOPRI 극지연구소

전자원의 확보와 활용에 매우 중요한 역할을 할 것임.

○ 이러한 저온활성 효소의 대규모 경제적 생산을 위하여 대장균과 같은 heterologous expression host를 활용하려는 연구가 이루어졌으나, 저온성 미생물(psychrophiles)에서 유래한 유전자의 발현에 어려움이 있음.

- 미생물 종에 따라 상이한 codon usage의 문제점보다는 저온성 미생물의 특이적인 refolding에 관여하는 샤페론 등의 단백질이 발현에 많은 영향을 미침.

○ 저온활성 프로티아제(protease)를 분비하는 저온성 미생물의 온도에 따른 단백체 분석과 유전체 분석을 통하여 단백질 발현에 관여하는 저온성 샤페론을 탐색.

○ 샤페론 단백질의 아미노산 서열 및 분자 구조의 변화를 통하여 저온성 샤페론의 단백질 folding 기작을 분석하고, 다양한 저온활성 단백질을 상온에서 고함량 생산할 수 있는 발현시스템을 개발하고자 함.

○ 저온활성 프로티아제의 생산을 위한 저온성 샤페론의 최적 공발현 시스템과 고농도 고생산성 배양기술을 개발함.

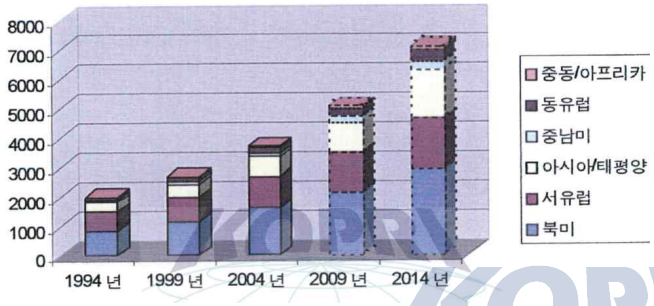
○ 또한, 이러한 저온성 미생물의 단백질 발현과 저온성 샤페론 역할에 관한 연구로부터 저온 미생물의 저온적응 기작을 규명하고, 향 후 극한 환경에서 확보된 미생물들의 유전정보 분석을 위하여 난발현성 유전자의 기능이해와 생산에 활용함.

KOPRI
극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 최근 환경문제가 대두됨에 따라 화학물질의 생산공정을 고효율, 정밀성, 선택성을 가지는 친환경 효소로 대체하려는 연구가 지속적으로 진행되고 있음.

- 효소는 특이성, 정밀성, 선택성 및 효율성을 가지고 산화환원, 가수분해, 전이, 이탈, 부가, 이성화, 합성 등의 거의 모든 화학 반응을 촉매할 수 있음.
- 현재 산업적으로 상용화되고 있는 효소는 60여종으로 식품, 음료, 제지, 농업, 세제, 화장품, 섬유 등의 산업에 이용되고 있으며, 에너지 절감과 환경친화적인 공정의 요구에 따라 유용 효소의 사회적 수요가 증가하고 있음.
- 효소시장에 대한 전 세계 수요액은 매년 6.5%의 성장률을 기록하고 있으며 2014년에는 약 71억 달러에 이를 것으로 전망됨.



<그림. 세계 효소 시장 성장 추이 및 전망, from "World Enzyme to 2009" >

○ 세계적으로 이용되는 산업용 효소의 상당수는 상온이나 고온성 미생물에서 유래하여 효소반응의 최적화를 위하여서는 중온 이상의 온도가 필요함. 하지만 이러한 중온 이상의 온도를 유지하기 위하여서는 높은 에너지가 필요하게 되어 이에 대한 해결책이 필요한 실정임.

- 또한, 세제와 발효 식품에 사용되는 가정용 효소의 수요가 증가함에 따라 상온 이하의 온도에서 활성을 갖는 저온효소의 생산이 관심을 끌고 있음. 특히 식품가공의 경우 중온 이상의 효소반응 온도에서는 미생물의 오염이 발생하기 때문에 저온보관 과정에서 활성을 갖는 식품 효소에 대한 수요가 요구됨.
- 이러한 문제의 해결하기 위한 방법으로 저온성 미생물로부터 저온활성을 갖는 효소를 개발하고 있음.

○ 대표적인 저온 환경인 극한지 서식 생물로부터 분리한 효소는 고압, 유기 용매 등의 특수한 반응 조건에서도 촉매반응이 가능하여 기존의 화학반응에 응용하거나, 화학공정을 개선하고 고효율의 정밀화학제품의 생산을 가능하게 하여 신규 산업소재로서 관심의 대상이 되고 있음.

- 저온환경에 적응한 생물로부터 획득된 저온활성 효소는 중온성 생물(mesophile)에서 추출한 효소와 비교하여 효소의 안정성, 효율성, 경제성 측면에서 우월함.
- 저온활성 효소는 중온활성 효소와 다르게 효소 단백질 구조의 일부를 변화시킬 수

있는 유연성을 갖추고 있으며, 낮은 반응온도에서 높은 효소촉매 효율을 가지고 있음.

○ 저온활성 효소는 상온효소들보다 구조적 유연성이 높은 것으로 보고됨.

- 상온활성 효소는 온도가 내려갈수록 구조적으로 조밀도가 증가하여 촉매반응이 불가능해짐. 여러 상온 단백질을 이용한 연구결과, 상온활성 효소는 상온에서는 다양한 형태가 함께 존재하다가 온도가 낮아질수록 최소에너지로 유지 가능한 비활성의 단일구조로 바뀌어 간다는 사실이 확인됨.

○ 저온활성 효소는 세정제, 식품산업의 첨가제, 환경오염 제거 및 분자생물학적 응용 등 산업적 응용성이 매우 크며 세계 효소시장의 10%인 약 2.5억 달러 (3천억)을 차지하고 있음.

- 남극에서 분리한 *Candida antarctica*가 생산하는 지방분해효소 lipase B는 세계적인 효소회사인 덴마크의 Novozyme사에서 Novozym 435라는 이름으로 생산되고 있음.
- *Humicola lanuginosa*에서 분리한 저온성 리파아제는 세탁용 세제 첨가물로부터 피부의 지방 노폐물 제거에 이르기까지 다양한 용도로 사용됨.

○ 우리나라에서는 저온활성 효소와 저온성 미생물에 관한 연구는 극지연구소를 중심으로 진행되고 있음. 극지연구소에서는 “남극하계연구사업”과 “북극해 해양조사 연구”를 통하여 저온활성 효소 생산 저온성 극지미생물 500 균주 이상을 확보하고 있음.

- 남극세종기지 주변 해수로부터 키틴분해효소를 분리하여 N-acetylglucosamine의 생산공정에 활용하는 연구를 진행하였음.
- 남극에서 분리한 저온미생물 아스로박터로부터 베타-갈락토시다제를 이용하여 락토오즈로 분해하는 연구를 수행함.
- 대부분의 극지 유래 저온활성 효소들은 저온에서 높은 효소 활성을 보임. 4~10℃ 근처에서 효소 활성이 같은 기질을 사용하는 상온 효소에 비해 10배까지 높게 나타남.

○ 극지미생물 중 *Psychrobacter* sp.와 *Exiguobacterium* sp. 미생물 2종의 유전체 분석이 완료되었으며, 이 유전체 분석 결과를 토대로 microchip을 제작하여 저온 환경에서만 발현이 증가하거나 감소하는 저온 적응 관련 유전자의 선별이 시도되고 있음.

- 저온, 고압에서 생존율을 향상시키기 위한 cold-shock protein이 *Listeria monocytogenese* LO28에서 보고되었으며, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TCA125가 최초로 남극균주로서 형질전환 단백질의 생산을 위한 숙주(host)로의 사용이 보고되었음.

<표 1. 저온활성 효소, from 극지연구소 기획연구 자료 2007>

KOPRI 극지연구소

효소	생산 미생물
α-amlyase	남극 박테리아
Lipase B	*Candida antarctica*
Subtilisin BPN	*Bacillus* sp.
Aspartic proteinase	*Mucor pusillus*
Euphauserase	남극 크릴
Citrate synthase	*Arthrobacter* DS2-3R

○ 하지만, 생물공정에 활용될 수 있는 산업용 저온활성 효소의 개발은 아직 초기단계에 머물러 있음.

- 저온활성 효소를 분리할 수 있는 균주의 확보가 어렵고, 일반적인 배양조건에서 성장이 늦거나 어렵기 때문에 이를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있음.
- 유전체 해석 기술이 발달함에 따라 저온활성 효소 유전자의 확보와 이를 이용한 재조합 균주를 이용한 대량 생산 연구가 최근 활발히 진행되고 있으나 저온활성 효소의 발현이 어려운 경우가 많음.

○ 저온활성 미생물로부터 얻어진 저온활성 효소의 발현을 위하여 codon usage의 최적화, 배양 온도의 저온화 등의 방법이 활용되었지만, 몇몇의 경우에만 한정이 되어있음.

- 재조합 균주의 배양온도를 저온화하여 발현하는 방법의 경우 재조합 균주의 성장에서 문제를 야기함.

○ 저온성 미생물의 온도변화에 대한 반응기작 연구에서 샤페론의 기능이 중요하다는 결과가 보고되면서 샤페론과의 공발현을 통한 온도 민감성 효소의 발현이 연구되었지만, 이러한 선행연구에서는 4℃에서 배양이 진행되어 낮은 효소 생산수율이 얻어져서, 그 가능성만이 확인이 되었음.

KOPRI 극지연구소

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

○ 극지 미생물은 극한 자연환경에서 오랜 기간 동안의 진화과정을 거쳐 생리, 생화학적인 적응에 성공하였으며, 다른 지역의 생물들에 비해 매우 특이하고 다양한 유용 단백질을 보유하고 있음.

- 새로운 부가가치의 창출을 위하여 극지 미생물에서 단백질 추출과 이들을 생산하는 생물소재의 개발을 위해 많은 연구투자가 이루어지고 있음.

○ 낮은 온도에서 성장하는 미생물은 저온성균에서 생산된 저온 효소의 경우 중온효소와 비교하여 효소의 구조적 안전성, 효율성, 경제적 측면에서 우월하며 산업화 공정효소 개발에 유리한 특성을 지니고 있음.

- 산업용 저온효소에 대한 개발연구는 아직 초기단계에 머물러 있으나, 최근 열처리를 필요로 하지 않고 고온에서 발생할 수 있는 기질, 생성물의 변형을 최소화 시킬 수 있는 저온효소를 산업적으로 이용하려는 관심일 증가함에 따라 저온효소에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있고 이 후 저온 효소를 활용한 산업 공정 개선이 활발하게 이루어질 전망임.

○ 본 위탁과제에서는 저온성 남극 미생물로부터 식품, 제약, 환경 분야에서 널리 사용되고 있는 단백질인 아밀라아제 (amylase)의 산업적 활용 및 대량 생산을 위한 핵심 기술을 제공하여 본 과제의 목표인 남극 고유 생물의 활용가치를 발굴하고자 함.

○ 또한, 선진국에 비하여 부족한 남극 고유 생물의 유전체 분석과 단백질 발현 기작의 단백체를 연구하여 분자적 기제를 통한 남극생물의 저온 지작의 규명에 기여하고자 함.

KOPRI 극지연구소

○ 극지 미생물 유래 아밀라아제 확보

- 극지연구소(PAMC)에서 기존에 채집된 미생물 분양을 통한 균주 확보
- 분양된 미생물의 온도에 따른 실험실 배양 조건 확립

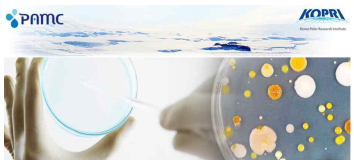


그림. 극지미생물 분양기관 PAMC

○ 극지 유래 미생물의 아밀라아제 활성 평가

- 아밀라아제 활성 측정을 위한 고체 배지에서의 screening 방법 확립
- 아밀라아제 생산 미생물의 온도, 성장 단계에 따라 생산된 아밀라아제 활성의 정량적 측정 방법 확립
- Thin layer chromatography를 통한 아밀라아제 생산 미생물의 기질 반응 후 생산된 생성물 탐색

○ 극지 유래 미생물의 아밀라아제 특성 확립

- 다른 온도 조건(10 - 70℃)에서 각각 아밀라아제 활성, 안정성을 정량적으로 측정하여 최대 아밀라아제 활성 및 안정성을 갖는 온도 조건 확립
- 다른 pH 조건(pH 2.0 - 10.0)에서 각각 아밀라아제 활성, 안정성을 정량적으로 측정하여 최대 아밀라아제 활성 및 안정성을 갖는 pH 조건 확립
- 다양한 산화, 환원제 및 계면활성제에 대한 아밀라아제 활성의 영향 평가를 통한 아밀라아제의 억제제 탐색

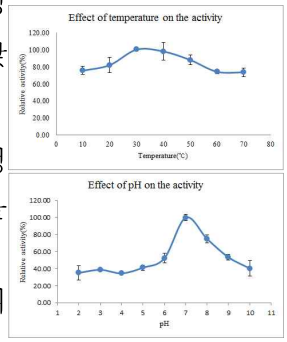


그림. 온도, pH 조건에서 아밀라아제 활성 측정 결과

○ 아밀라아제 과발현 생산 균주 클로닝, 발현

- PAMC 27388에서 유래한 α-아밀라아제 유전자 클로닝 및 대장균에 형질전환을 통한 아밀라아제 과발현 생산 균주 구축
- 재조합된 미생물에서 생산된 아밀라아제 발현 확인 및 최적 발현을 위한 발현 유도 시간, 온도 및 IPTG 농도 조건 확립

KOPRI 극지연구소

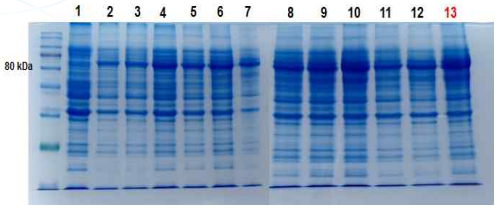


그림. 최적 발현 조건 확립

○ 재조합된 미생물에서 아밀라아제 정제 및 정제된 아밀라아제 특성 확립

- 재조합된 미생물에서 생산된 아밀라아제 단백질 정제 방법 및 투석 방법 확립
- Thin layer chromatography를 통한 아밀라아제 생산 미생물의 기질 반응 후 생산된 생성물 탐색
- 다른 온도 조건(10 - 70℃)에서 각각 아밀라아제 활성, 안정성을 정량적으로 측정하여 최대 아밀라아제 활성 및 안정성을 갖는 온도 조건 확립
- 다른 pH 조건(pH 2.0 - 10.0)에서 각각 아밀라아제 활성, 안정성을 정량적으로 측정하여 최대 아밀라아제 활성 및 안정성을 갖는 pH 조건 확립

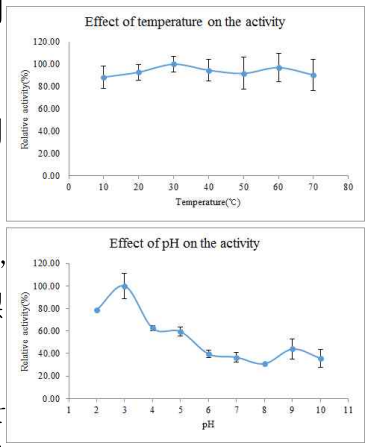


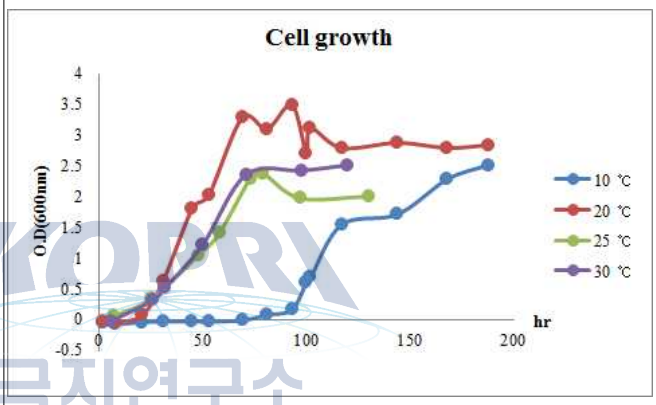
그림. 온도, pH 조건에서 재조합된 아밀라아제 활성 측정 결과

- 다양한 산화, 환원제 및 계면활성제에 대한 아밀라아제 활성의 영향 평가를 통한 아밀라아제의 억제제 탐색

KOPRI
극지연구소

□ 극지미생물 유래 아밀라아제 확보

○ 저온활성 아밀라아제 생산 균주 성장 속도 측정

연 구 내 용	연 구 결 과
온도(10, 20, 25, 30℃) 및 시간에 따른 PAMC 27388 cell growth 측정	- 미생물들은 전배양 한천 배지에 접종하여 20℃에서 7일간 배양하여 사용하였으며, 액체 배양은 50 ml씩 250 ml triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 각각 10, 20, 25, 30℃에서 150 rpm으로 교반하여 배양 - 각 온도 조건에서 미생물의 성장률은 UV/vis spectrophotometer (Mecasys Co, Optizen POP, Republic of Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도 측정  - 10, 20, 25, 30℃에서 미생물의 최적생장 온도를 비교한 결과, PAMC 27388은 20℃에서 93시간에 가장 정점(O.D600=3.496)에 도달한 후 성장이 점점 감소하면서 그 후, 약 O.D600=2.700으로 유지

KOPRI 극지연구소

○ 미생물 및 배양 배지

실험에서 사용된 PAMC 27388 미생물은 극지연구소 (Korea Polar Research Institute, Incheon, South Korea) 로부터 분양 받았다. 이들 미생물은 PAMC 등록정보에 amylase 활성을 갖는 것으로 확인이 되어있다. PAMC 27388의 성장 배지는 Nutrient agar (Becton, Dickinson and Company, USA), Nutrient broth (Becton)에 0.5% soluble starch가 첨가된 배지를 사용하였다.

○ 배양 조건

각각의 미생물들은 전배양 한천 배지에 접종하여 20℃에서 7일간 배양하여 사용하였으며, 액체 배양은 50 mL씩 250 mL triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 각각 10, 20, 25, 30℃에서 150 rpm으로 교반하여 3일간 배양하였다.

○ 성장률 측정

각각의 미생물들의 성장률은 UV/vis spectrophotometer (Mecasys Co, Seoul, South Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멸균된 각각의 액체 배지를 blank로 사용하였다.

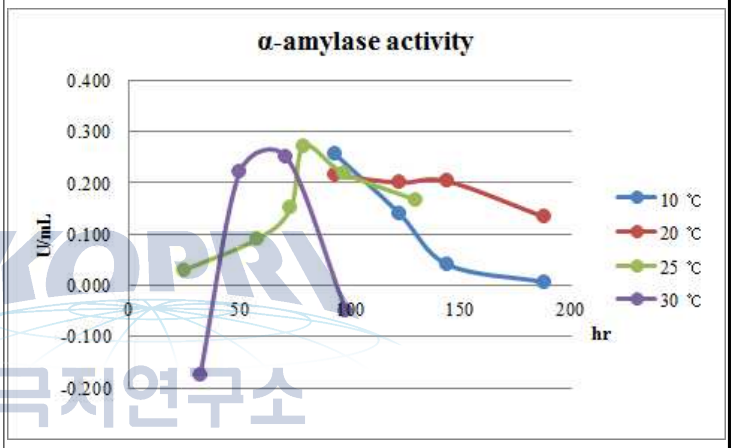
KOPRI 극지연구소

○ 성장률 확인

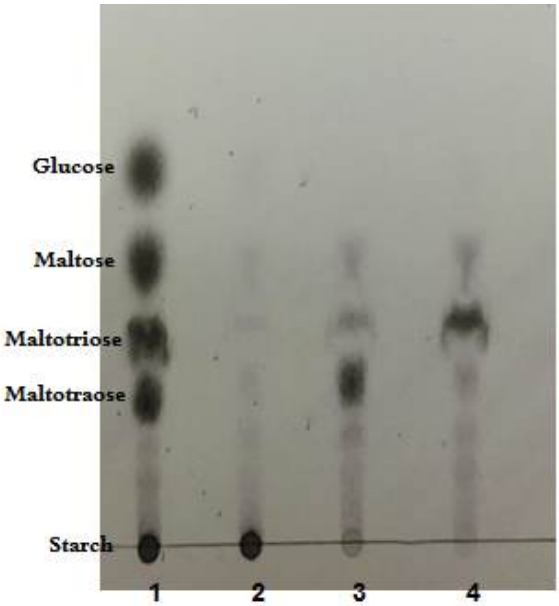
본 연구에서는 각 미생물들의 최적생장 온도를 확인하기 위하여 다양한 온도 (10℃, 20℃, 25℃, 30℃) 에서 3일간 생장을 비교하였다.

PAMC 27388은 10 ~ 30℃에서 성장이 가능하였으며, 20 ~ 30℃에서 초기 성장 속도가 빠르고 10℃에서 다른 온도 조건보다 느린 속도로 성장하였다. 특히 20℃에서 가장 잘 성장하였다. 일반적으로 낮은 온도에서 성장하는 극지 미생물은 저온성균 (psychrophile)과 내냉성균 (psychrotolerant)로 나뉘는데, 위의 결과에 따르면 본 연구에서 사용된 미생물은 내냉성의 특성을 지니고 있다. 이것은 대부분의 극지 미생물들이 지닌 특성으로 극지의 극한 환경, 특히 저온의 환경에서 적응, 진화해온 극지 미생물들의 고유한 특징이다. 이전에 발표된 논문들에서도 극지 미생물들에 대한 growth temperature에 대하여 연구가 많이 보고되었다.

○ 저온활성 아밀라아제 활성 평가

연 구 내 용	연 구 결 과
온도(10, 20, 25, 30℃) 및 시간에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정	- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 500 ul에 1% soluble starch가 첨가된 50 mM Tris-HCl pH 7.0 buffer 500 µL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응 - 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)를 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용  - 25℃, 79시간에 아밀라아제 최대 활성이 0.27 U/ml로 나타났지만 20℃가 다른 온도 조건보다 일정한 아밀라아제 활성 값을 유지
amylase와 기질 반응 후 분해된 생성물 확인	- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 ul을 사용하였고 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200 ul를 기질로 사용하여 25℃에서 24 hr 동안 반응 - Thin layer chromatography를 수행하기 위해 전개용매로 n-butanol, acetic acid, water가 4:8:1로 혼합된 용액을 사용하여 chamber에 filter paper를 넣어 전개 후 TLC plate에 반응 시킨 샘플 1 uL를 spotting - TLC chamber에서 전개 후 10% sulfuric acid로

KOPRI 극지연구소

	발색하여 오븐에서 10분간 구워 spot 확인  1. Standard 2. PAMC 27388 + 1% starch 3. PAMC 27388 + 1% maltotetraose 4. PAMC 27388 + 1% maltotriose

KOPRI 극지연구소

○ Amylase 활성 측정

Amylase 활성 측정은 다른 온도와 시간 조건에서 배양된 각각의 배양액을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 회수하여 기질인 2% soluble starch가 포함된 50 mM Tris HCl (pH 7.0) (Daejung Chemical & metal Co., Sheung, South Korea) 200 μL에 배양 상등액 200μL을 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)를 반응액과 1대 1로 첨가하여 100℃에서 5분간 끓인 후 식혀주었다. 그 후 UV/vis spectrophotometer 를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 starch 가수분해 후 방출된 환원당의 양을 계산하여 amylase 활성을 측정하였다. 효소만 제외된 혼합액을 blank로 사용하였다.

Amylase 활성 1 unit은 위의 반응 조건에서 분당 1μmol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였다.

○ Amylase 활성 확인

본 연구에서는 저온 활성 효소들 중에 현재 산업적으로 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 효소 중 하나인 amylase에 관하여 관심을 가지고 연구를 진행하였다.

본 연구에서 실험한 미생물의 Amylase activity maximum값은 25℃, 79시간에서 나타났으며 이 값을 Unit으로 환산하면 0.27 U/mL이다. 그러나 20℃의 온도 조건이 다른 온도 조건보다 시간에 따른 amylase 활성이 일정하게 유지되었다.

본 연구에 의해 극지방에서 채취된 amylase 생산 균주를 확인하였고, 각 온도 조건(10, 20, 25, 30℃)에서의 성장률과 amylase 활성을 확인하였다. 이에 따라 효소 산업에서 큰 부분을 차지하고 있는 amylase 중 저온에서 활용 가능한 저온 활성 amylase를 제약, 식품, 환경, 제지 등 다양한 산업 분야에서 유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

○ Thin layer chromatography를 통한 amylase 생산균주의 활성 탐색

Amylase에 의해 생산된 생성물 분석은 20℃에서 3일간 배양한 배양액을 4℃에서 원심분리 (14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200μL를 사용하였고 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200μL를 기질로 사용하여 25℃에서 24시간동안 기질과 반응시켰다.

그 후 thin layer chromatography를 수행하기 위해 전개용매로 n-butanol, acetic acid, water를 4 : 8 : 1로 혼합된 용액과 filter paper를 chamber에 filter paper를 넣어 전개용매를 chamber에 완전히 포화시켰다. TLC plate에 각 반응시킨 샘플들 1μL를 spotting하였고 건조시킨 후 포화된 chamber에 넣어 전개시켰다. 전개 후, TLC plate를 건조시켰고 10% sulfuric acid로 발색하여 110℃ 오븐에서 10분간 구워 spot을 확인하였다.

KOPRI 극지연구소

○ Amylase에 의해 생산된 생성물 확인

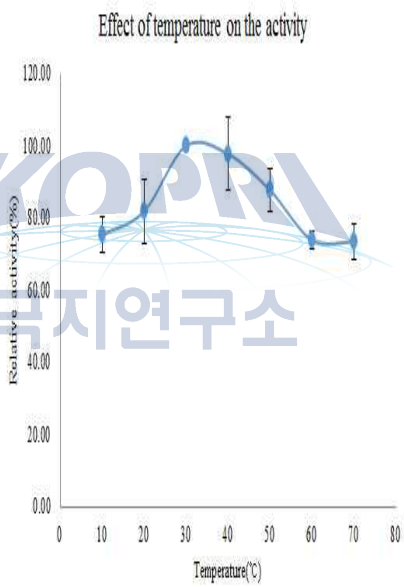
본 연구에서는 저온 활성 amylase의 기질반응에 의해 생산된 생성물이 무엇인지 확인하는 실험을 진행하였다.

본 연구에서 실험한 amylase는 soluble starch, maltotetraose, maltoriose와 기질반응 후 최종 산물로 모두 maltose를 생산하였다.

또한 흥미로운 점은 maltotetraose와 maltotriose와의 기질반응에서 maltotetroase와 여러 가지 당 중합체가 생성되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 amylase가 고분자 화합물을 분해할 뿐만 아니라 저분자의 당 화합물을 중합시키는 역할도 한다는 것이 확인되었다.

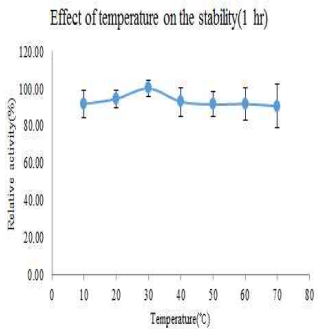
KOPRI
극지연구소

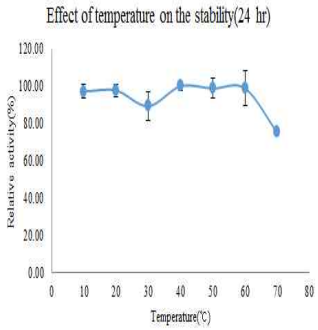
○ 저온활성 아밀라아제 활성 최적화

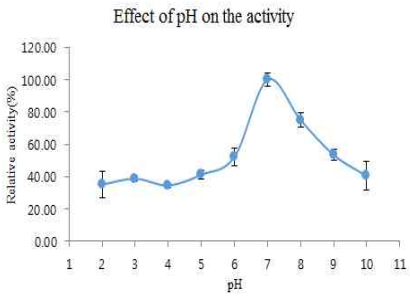
<table>
<tr><th>연 구 내 용</th><th>연 구 결 과</th></tr>
<tr><td>온도에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정</td><td>- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 10분간 반응
- 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용
 

<table>
<tr><th>Temperature(℃)</th><th>Activity</th><th>Relative activity</th></tr>
<tr><td>10</td><td>0.72</td><td>75.32</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.79</td><td>81.84</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0.96</td><td>100.00</td></tr>
<tr><td>40</td><td>0.94</td><td>97.83</td></tr>
<tr><td>50</td><td>0.84</td><td>87.82</td></tr>
<tr><td>60</td><td>0.71</td><td>74.01</td></tr>
<tr><td>70</td><td>0.70</td><td>73.36</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>온도에 따른 PAMC 27388 amylase stability 측정</td><td>- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 incubation
- incubation한 각각의 샘플에 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일</td></tr>
</table>

KOPRI 극지연구소

<table>
<tr>
<td></td>
<td>


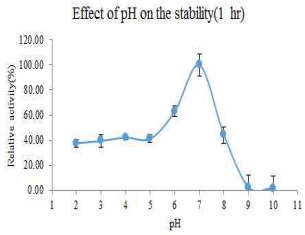


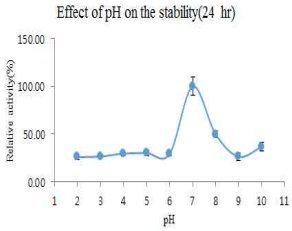
<table>
<tr><th rowspan="2">Temperature(℃)</th><th colspan="2">1 hr</th><th colspan="2">24 hr</th></tr>
<tr><th>Activity</th><th>Relative activity</th><th>Activity</th><th>Relative activity</th></tr>
<tr><td>0.24</td><td>0.19</td><td>91.66</td><td>0.87</td><td>97.19</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.20</td><td>94.44</td><td>0.87</td><td>97.75</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0.21</td><td>100.00</td><td>0.80</td><td>89.33</td></tr>
<tr><td>40</td><td>0.19</td><td>92.93</td><td>0.89</td><td>100.00</td></tr>
<tr><td>50</td><td>0.19</td><td>91.41</td><td>0.88</td><td>98.88</td></tr>
<tr><td>60</td><td>0.19</td><td>91.66</td><td>0.88</td><td>98.88</td></tr>
<tr><td>70</td><td>0.19</td><td>90.53</td><td>0.67</td><td>75.28</td></tr>
</table>
</td>
</tr>
<tr>
<td>pH에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정</td>
<td>- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 ul에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용


<table>
<tr><th>pH</th><th>Activity</th><th>Relative activity</th></tr>
<tr><td>2</td><td>0.39</td><td>35.19</td></tr>
<tr><td>3</td><td>0.42</td><td>38.72</td></tr>
<tr><td>4</td><td>0.38</td><td>34.62</td></tr>
<tr><td>5</td><td>0.45</td><td>41.20</td></tr>
<tr><td>6</td><td>0.57</td><td>52.28</td></tr>
<tr><td>7</td><td>1.09</td><td>100</td></tr>
<tr><td>8</td><td>0.82</td><td>74.99</td></tr>
<tr><td>9</td><td>0.58</td><td>53.42</td></tr>
<tr><td>10</td><td>0.44</td><td>40.25</td></tr>
</table>
</td>
</tr>
<tr>
<td>pH에 따른 PAMC 27388 amylase stability 측정</td>
<td>- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 1, 24 hr동안 각 pH 조건(2.0 - 10.0)에서 incubation</td>
</tr>
</table>

KOPRI 극지연구소

- incubation한 각각의 샘플의 pH를 7.0으로 맞추고 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일





Temperature(℃)	1 hr		24 hr	
	Activity	Relative activity	Activity	Relative activity
2	0.26	37.59	0.27	25.89
3	0.27	39.40	0.27	26.50
4	0.29	42.12	0.30	29.55
5	0.28	41.21	0.31	30.06
6	0.44	62.97	0.30	29.25
7	0.69	100.00	1.03	100.00
8	0.30	44.08	0.51	49.78
9	0.02	2.42	0.27	26.28
10	0.01	1.60	0.38	36.57

다양한 시약에 대한 PAMC 27388 amylase activity 영향 평가

- 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액 200 ul와 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 다양한 시약이 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일

Reagent	Concentration	Relative enzyme activity(%)
Tris-HCl (control)	None	100±0.21
Metal ions		
Ca	5 mM	43.34±0.01
Mg	5 mM	152.44±0.04
Fe	5 mM	252.50±0.09
Zn	5 mM	115.67±0.08
Na	5 mM	60.82±0.07
K	5 mM	68.66±0.19
Oxidizing agent		
Ammonium persulfate	5 mM	17.42±0.02
Reducing agent		
β-mercaptoethanol	5 mM	100±0.20
Chelating agent		
EDTA	5 mM	80.11±0.17
Detergents		
SDS	10%	104.52±0.20
Triton X-100	10%	107.84±0.08
Additive		
Urea	2%	29.48±0.01
Inhibitor		
PMSF	5 mM	64.44±0.09

KORRI 극지연구소

○ 온도에 따른 amylase activity, stability 측정

본 연구에서는 amylase activity와 stability에 대한 온도의 영향을 분석하기 위하여 10 - 70℃ 온도 조건에서 amylase activity와 stability를 측정하였다.

온도에 따른 amylase activity 측정은 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 μL에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 10분간 반응시켰다.

온도에 따른 amylase stability 측정은 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 incubation한 후 incubation한 각각의 샘플에 200 μL에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다.

DNS 반응을 위해 온도에 따른 amylase activity와 stability의 모든 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 starch 가수분해 후 방출된 환원당의 양을 계산하여 amylase 활성을 측정하였다. 효소만 제외된 혼합액을 blank로 사용하였다.

Amylase 활성 1 unit은 위의 반응 조건에서 분당 1μmol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였으며 오차값을 그래프에 나타내었다.

KOPRI 극지연구소

○ 온도에 따른 amylase activity, stability 확인

Amylase activity에 대한 최적 온도는 30℃이고 20 - 50℃에서 80% 이상의 활성을 가지고 있어 넓은 온도 범위에서 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한 amylase stability는 1시간 반응 조건에서는 30℃, 24시간 반응 조건에서는 40℃에서 최대 안정성을 나타내었다. 따라서 이 amylase가 저온에서 최대 활성을 보이고 높은 안정성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

○ pH에 따른 amylase activity, stability 측정

본 연구에서는 amylase activity와 stability에 대한 온도의 영향을 분석하기 위하여 pH 2.0 - 10.0 조건에서 amylase activity와 stability를 측정하였다.

pH에 따른 amylase activity 측정은 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 μL에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 각 pH 조건에서 10분간 반응시켰다. 사용한 pH 버퍼는 각각 다음과 같다.(pH 2, 3; 50mM glycine-HCl, pH 4, 5; 50mM sodium acetate-acetic acid, pH 6-8; 50mM potassium phosphate, pH 9; 50mM

tris-HCl, pH 10; 50mM carbonate)

pH에 따른 amylase stability 측정은 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 1, 24 hr동안 각 pH 조건에서 incubation한 후 incubation한 각각의 샘플의 pH를 7.0으로 맞추고 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다.

DNS 반응을 위해 pH에 따른 amylase activity와 stability의 모든 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 starch 가수분해 후 방출된 환원당의 양을 계산하여 amylase 활성을 측정하였다. 효소만 제외된 혼합액을 blank로 사용하였다.

Amylase 활성 1 unit은 위의 반응 조건에서 분당 1μmol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였으며 오차값을 그래프에 나타내었다.

○ **pH에 따른 amylase activity, stability 확인**

Amylase activity에 대한 최적 pH는 7.0이고 염기성에서는 amylase activity가 급격하게 감소하였다. 또한 amylase stability는 1과 24시간 반응 조건 모두 pH 7.0에서 최대 안정성을 나타내었다. 그리고 산성조건에서는 일정하게 활성이 유지되었지만 염기성 조건에서 활성과 안정성 모두 급격하게 감소하였다. 따라서 이 amylase가 중성 pH 조건에서 최대 활성을 보이고 높은 안정성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

KOPRI 극지연구소

○ **다양한 시약에 대한 amylase activity 영향 평가**

본 연구에서는 amylase activity에 대한 다양한 시약들의 작용을 조사하였다. 사용한 시약은 metal ions (5 mM Ca, Mg, Fe, Zn, Na, k), oxidizing agent (5mM ammonium persulfate), reducing agent (5 mM β-mercaptoethanol), chelating agent (5 mM EDTA), detergents (10% SDS, Triton X-100)와 그 외 2% urea, 5 mM PMSF를 사용하였다.

20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 μL에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 각 시약이 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다. control은 위의 buffer에서 시약을 제외한 용액을 사용하였다.

DNS 반응은 위의 amylase activity, stability 측정과 동일하다.

○ **다양한 시약에 대한 amylase activity 영향 확인**

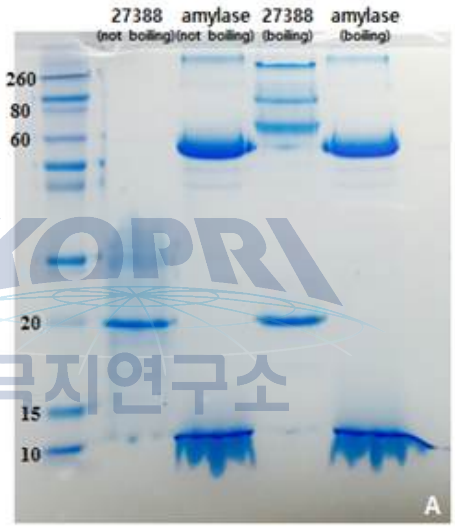
본 연구에서는 amylase activity에 대한 다양한 시약들의 작용을 확인하고 어떠한

시약이 inhibitor 또는 enhancer로 작용하는지 확인하였다. 실험 결과, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}가 amylase에 강력한 enhancer로 작용하였으며 Ca^{2+}, urea가 inhibitor로 작용하였다.

일반적으로 아밀라아제는 Ca^{2}을 구성금속으로 갖고 있는 metaloenzyme이나 이 저온 유래 미생물에서 생산된 아밀라아제는 대부분의 α-amylase와 다른 특성을 갖는 것으로 확인되었다.

KOPRI
극지연구소

○ SDS-PAGE 분석

연 구 내 용	연 구 결 과
PAMC 27388 배양 상등액을 이용한 SDS-PAGE 분석	- MB broth 43 ml을 250 ml triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 20℃에서 150 rpm으로 교반하여 3일 동안 배양한 후 배양액을 원심분리하여 상등액 10 ml을 사용 - 상등액에 Trichloroacetic acid(TCA)을 첨가하여 단백질을 침전시켰고 침전된 단백질에 한 sample은 rehydration buffer 100 ul를 첨가하여 5 min동안 반응시켰고 다른 sample은 5분 동안 boiling함 - 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue로 염색 

KOPRI 극지연구소

○ PAMC 27388이 분비한 extracellular protein 준비

MB broth 43 mL을 250 ml triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 20℃에서 150 rpm으로 교반하여 3일 동안 배양한 후 배양액을 원심분리하여 상등액 10 mL을 사용하였다. 상등액에 있는 단백질을 사용하기 위하여 상등액에 100% Trichloroacetic acid(TCA)을 첨가하여 단백질을 침전시켰고 침전된 단백질에 한 sample은 rehydration buffer 100 μL를 첨가하여 5 min동안 반응시킨 후 5X loading dye를 첨가하였고 다른 sample은 5X loading dye를 첨가한 후 5분 동안 boiling을 하였다.

○ SDS-PAGE 전기영동 준비

SDS-PAGE 전기영동을 위해 12% polyacrylamide gel을 제조하였고 준비된 extracellular protein을 SDS-PAGE에 15 μL를 삽입하여 125V에서 약 90분 동안 전기영동을 진행하였다. 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue로 염색하였고 destaining은 acetic acid, methanol과 water을 1 : 1: 8로 혼합한 용액을 이용하였다.

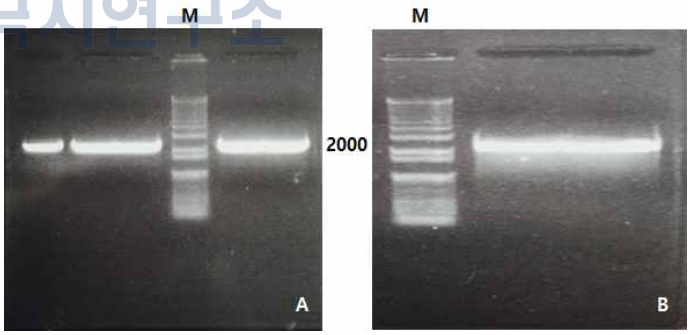
○ PAMC 27388이 분비한 extracellular protein 확인

SDS-PAGE 결과 rehydration buffer로 5분간 반응시킨 샘플과 5분간 boiling한 샘플의 extracellular protein 패턴이 다르다는 것을 확인하였다. 그러나 약 20 kDa 크기에서 동일한 밴드를 확인할 수 있었다. 이 결과는 extracellular protein의 결합을 풀어주는데 rehydration buffer와 boiling이 각각 다르게 작용하였기 때문이다.

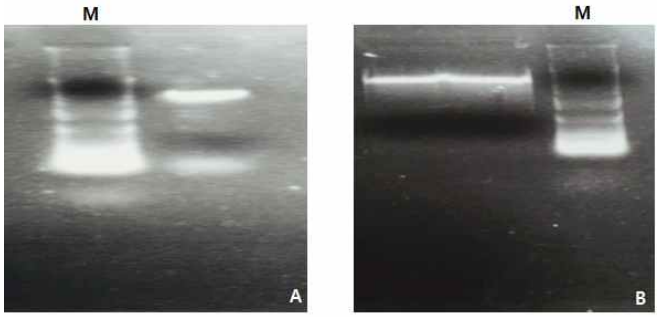
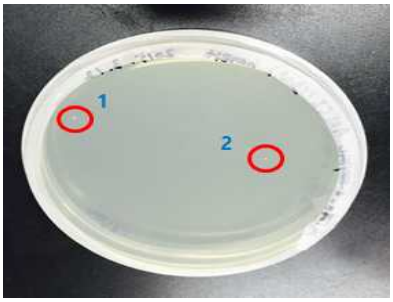
KOPRI 극지연구소

□ 아밀라아제 과발현 생산균주 클로닝과 아밀라아제 정제

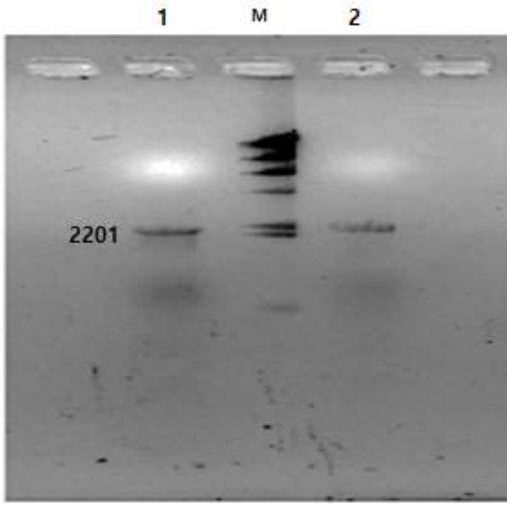
○ 아밀라아제 과발현 생산균주 클로닝

연 구 내 용	연 구 결 과
아밀라아제 유전자를 포함한 insert 준비	- 27388의 genomic DNA를 추출하기 위해 genomic DNA mini kit(Invitrogen Co, California, USA)를 사용 - NdeI과 HindIII 제한효소 자리를 포함한 forward primer (AAA CAT ATG GTG ACC ACC ACT ACG)와 reverse primer (AAA AAG CTT TCA CCG GAG CCG TC)를 이용하여 27388의 genomic DNA에서 α-amylase로 알려진 sequence(size : 2163 bp)를 Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler(Life Technologies, Carlsbad, USA)로 증폭(PCR 조건 ; denaturation 95℃ for 20 sec, annealing 58℃ for 40 sec, extension 72℃ for 1 min 20 sec, 28 cycles) - PCR product를 NdeI과 HindIII를 이용하여 enzyme restriction을 수행(벡터에 삽입할 insert를 준비)  FIG. Preparation of a 2163 bp insert (α-amylase). (A) polymerase chain reaction of α-amylase, (B) Restriction enzyme treatment
insert 삽입을 위한 벡터 준비	- pET28a plamsid를 plasmid DNA purification kit(iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 정제한 후 NdeI과 HindIII 제한효소 처리

KOPRI 극지연구소

	 FIG. Preparation of a vector. (A) pET28a plasmid DNA purification, (B) Restriction enzyme treatment
Ligation & transformation	- NdeI과 HindIII로 처리한 insert인 α-amylase 유전자와 pET28a 벡터를 16℃에서 3시간 30분 ligation 반응 - 그 후 DH5α competent cell에 ligation product를 10 ul 주입 후 30분간 ice에서 incubation 한 후 42℃에서 1분 동안 heat shock을 진행하였고 다음으로 2분간 ice에 incubation하여 LB broth 700 ul를 주입하여 37℃에서 1시간동안 shaking incubation한 후, LB+kanamycin(30 ug/ml) 한천 배지에 접종하여 overnight - 다음 날 한천 배지를 확인한 결과 두 개의 콜로니 생성 
Transformation한 cell의 DNA 염기서열 확인	- 두 개의 콜로니의 크기를 확인하기 위하여 forward primer (AAA CAT ATG GTG ACC ACC ACT ACG)와 reverse primer (AAA AAG CTT TCA CCG GAG CCG TC)를 이용하여 Colony PCR을 실시(Colony PCR 조건; denaturation 95℃ for 20 sec, annealing 58℃ for 40 sec, extension 72℃ for 1 min 20 sec, 28 cycles) - 전기영동으로 결과를 확인하였을 때, 밴드가 α

KOPRI 극지연구소

	-amylse size인 약 2000 bp에 존재하여 ㈜ 마크로젠 (Seoul, South Korea)에 의뢰하여 recombinant의 sequence를 확인 - 그 결과 1번 콜로니가 α-amylse sequence로 확인되었고 다음 실험은 1번 콜로니로 진행  - recombinant plasmid를 plasmid DNA purification kit(iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 정제한 후, BL21 compentent cell에 GenePulser Xcell(Bio-Rad, California, USA)을 사용하여 transformation 진행

○ 균주 및 배양 조건

PAMC 27388의 DNA를 추출하기 위하여 MB 배지가 *Arthrobacter* agilis. PAMC 27388을 배양하기 위하여 사용되었고 *Arthrobacter* agilis. PAMC 27388의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. 50ml MB 배지에 마린 아가 플레이트 (Marine agar plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20℃에서 3일 동안 배양하였다.

E. coli DH5α가 유전자 클로닝 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21(DE3) 및 플라스미드 pET-28a(+)는 유전자 발현을 위해 사용되었다.

E. coli 균주는 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지를 이용하여 37℃에서 배양되었고, pET-28a(+)에 카나마이신 저항성 유전자가 포함되어 있어 카나마이신이 최종농도 30 ug/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

○ DNA 조작 및 서열분석

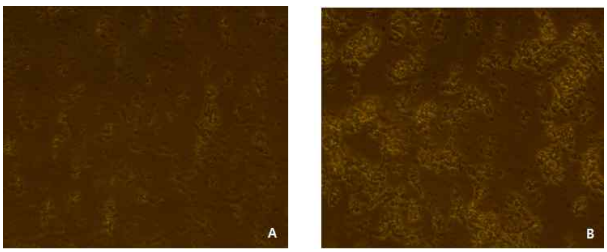
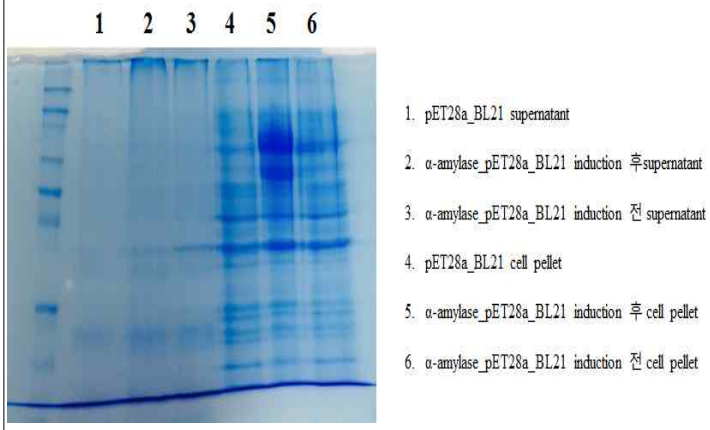
DNA 조작은 샘브록 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 진행하였다. PAMC 27388의 게놈 DNA는 genomic DNA mini kit (Invitrogen Co, California, USA)를 이용하여 추출하였다. 제한효소는 NEB (Ipswich, Massachusetts)에서 구입하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 추출은 플라스미드 정제 키트 (iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 진행하였다.

KOPRI 극지연구소

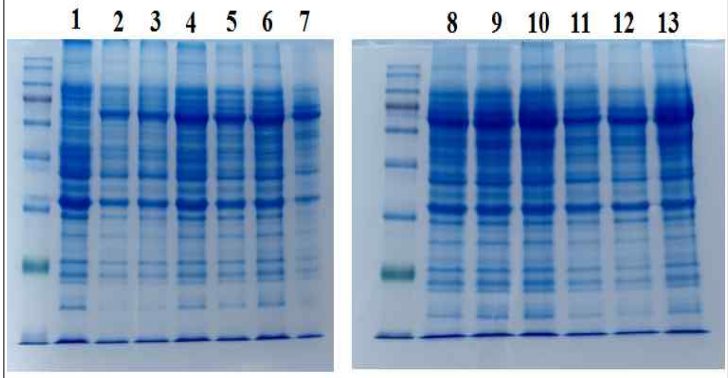
○ α-Amylase 암호화 유전자의 클로닝

PAMC 27388의 게놈 DNA에서 α-amylase 서열은 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-AAA <u>CAT ATG</u> GTG ACC ACC ACT ACG-3'] 및 안티센스 [5'-AAA <u>AAG CTT</u> TCA CCG GAG CCG TC-3'] ; 상기 센스 프라이머 안에 밑줄 친 서열은 *Nde*I 인식 자리이고, 안티센스 프라이머 안에 밑줄 킨 서열은 *Hind*III 인식 자리이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭된 서열은 *Nde*I과 *Hind*III로 절단되었고, *Nde*I/*Hind*III로 절단된 pET-28a(+)에 연결되었다. 연결된 재조합 DNA는 *E. coli* DH5α에 형질전환 되었다. 콜로니 PCR과 서열 분석 후 발현을 위하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환되었다.

○ isopropyl 1-thio-β-D-galactoside (IPTG) induction 조건 설정

연 구 내 용	연 구 결 과
1 mM IPTG induction	- 전배양한 α-amylase 생산 균주를 37℃, LB+kanamycin 15 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 30℃에서 3시간 30분 동안 1 mM IPTG inductin 진행 - Induction 전과 후 cell을 현미경으로 관찰  FIG. Comparison of α-amylase expression before and after 1 mM IPTG induction. (A) Before 1 mM IPTG induction, (B) After 1 mM IPTG induction - induction을 한 cell에서 inclusion body 많이 생성 - 1ml을 14000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 cell pellet에 lysis solution(50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lysozyme)을 100 ul 첨가하여 ice에서 3분간 반응시키고 즉시 42℃ heat block에서 1분 동안 incubation(4번 반복), 14000 rpm에서 5분 동안 원심분리 - SDS-PAGE(12% polyacrylamide)를 통해 아밀라아제 발현 확인 및 분석 

KOPRI 극지연구소

Induction 시간 IPTG 농도에 따른 IPTG induction 조건 설정	- 아밀라아제 발현의 최적 조건을 설정하기 위하여 IPTG 농도(0, 0.01, 0.1, 1 mM), induction 시간(1, 2, 3 hr)을 달리하여 발현된 아밀라아제 양을 SDS-PAGE(12% polyacrylamide)를 통해 분석  1. pET28a 2. α-amylase non - IPTG induction 1 hr 3. α-amylase non - IPTG induction 2 hr 4. α-amylase non - IPTG induction 3 hr 5. α-amylase 0.01 mM IPTG induction 1 hr 6. α-amylase 0.01 mM IPTG induction 2 hr 7. α-amylase 0.01 mM IPTG induction 3 hr 8. α-amylase 0.1 mM IPTG induction 1 hr 9. α-amylase 0.1 mM IPTG induction 2 hr 10. α-amylase 0.1 mM IPTG induction 3 hr 11. α-amylase 1 mM IPTG induction 1 hr 12. α-amylase 1 mM IPTG induction 2 hr 13. α-amylase 1 mM IPTG induction 3 hr

KOPRI 극지연구소

○ 대장균에서 α-Amylase 유전자 발현

유전자의 발현은 전배양한 α-amylase 생산 균주를 37℃, LB+kanamycin 15 mL 액체 배지 접종하여 $O.D_{600}$ = 0.5 - 0.6에 도달하였을 때, isopropyl 1-thio-β-D-galactoside (IPTG)를 1mM 첨가하고 30℃에서 3시간 30분 동안 배양함으로써 유도되었다. Induction 전, 후의 cell을 현미경으로 관찰하였다.

○ α-Amylase 유전자 발현 전, 후 비교

1 mM IPTG로 발현을 유도하였을 때, 발현 전과 후의 cell과 단백질 양을 비교하였다. 먼저 induction 전과 후의 cell을 현미경으로 관찰하였을 때, induction을 한 cell에서 빛나는 형태인 inclusion body가 많이 생성이 되었다는 확인하였다.

또한 induction 전과 후의 cell 1 mL을 14000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 cell pellet에 lysis solution (50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/mL lysozyme)을 100 μL 첨가하였다. 그 후 ice에서 3분간 반응시키고 즉시 42℃ heat block에서 1분 동안 incubation을 4번 반복하면서 cell을 lysis시켰다. lysis한 cell을 14000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액과 cell pellet을 SDS-PAGE (12% polyacrylamide)를 통해 발현된 단백질을 확인하였다.

확인 결과, induction 후 cell pellet에 약 80 kDa의 아밀라아제 단백질들이 과발현되었다는 것을 확인하였다.

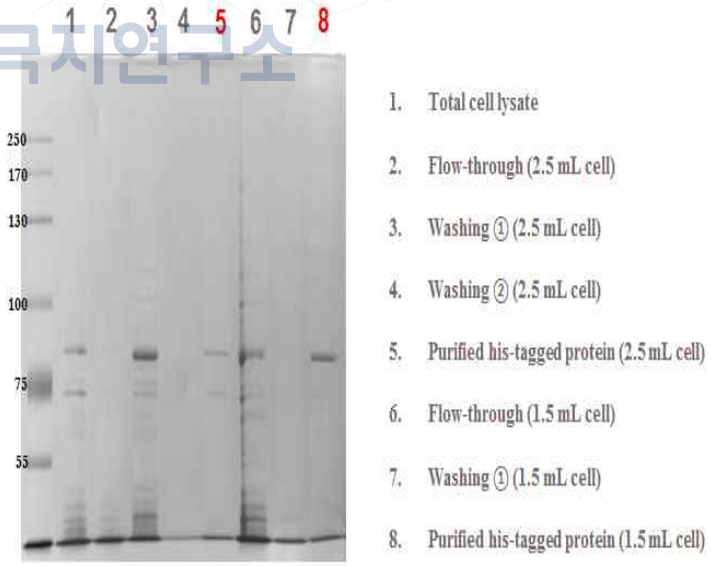
KOPRI 극지연구소

○ IPTG induction 조건 설정

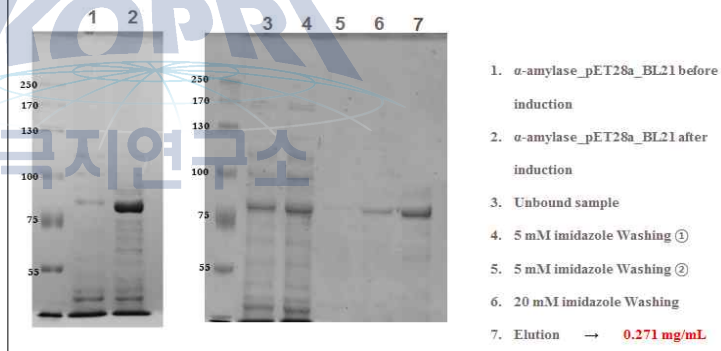
아밀라아제 과발현의 최적 조건을 설정하기 위하여 IPTG 농도 (0, 0.01, 0.1, 1 mM), induction 시간(1, 2, 3 hr)을 달리하여 발현된 아밀라아제 양을 SDS-PAGE(12% polyacrylamide)를 통해 분석하였다. 다른 조건들은 대장균에서 α-amylase 유전자 발현 조건과 동일하다.

실험 결과, IPTG 농도가 1 mM이고 induction 시간이 증가할수록 많은 양의 아밀라아제 단백질이 발현된다는 것을 확인하였다. 따라서 다음 실험 단계인 아밀라아제 정제에서는 1 mM IPTG를 이용하여 4시간동안 induction을 진행한 후 단백질 정제 실험을 진행하였다.

○ 아밀라아제 생산 재조합 균주로부터 생산된 아밀라아제 정제

연 구 내 용	연 구 결 과
Small scale His-tagged protein purification	- 아밀라아제 유전자 앞부분에 6 X Histidine이 붙어 있어 이를 이용해 His-tagged protein purification을 진행 - His-tagged protein purification kit는 PRO·Hunt His • Bind Purification Kit, spin-type을 사용 - 1 mM IPTG induction한 1.5 ml cell pellet에 denaturing lysis/binding buffer(8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 8.0) 240 ul를 이용하여 resuspension후 spin column에 주입, 7000 rpm에서 3분 동안 원심분리 후 denaturing washing buffer(8 M Uea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 6.3) 500 ul를 첨가하여 7000 rpm에서 3분 동안 원심분리(Washing 과정 2번 반복), 새로운 튜브에 column을 삽입하고 denaturing elution buffer(8M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 5.9) 100 ul로 elution - SDS-PAGE(8% polyacrylamide)를 통해 정제 확인 
Large scale His-tagged protein purification	- 전배양한 α-amylase 생산 균주를 37℃, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30℃에서 1 mM IPTG induction한 1.5 ml cell pellet에 denaturing lysis buffer(8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 8.0) 4 ml,

KOPRI 극지연구소

	lysozyme(50 mg/mL) 5 ul를 첨가하여 resuspension후 20분간 상온에서 incubation, 그후 100 mM PMSF 3 ul를 첨가하여 4℃, 1400 rpm에서 10분 동안 원심분리 - column에 Ni-NTA agarose을 2.5 ml 넣은 후 증류수로 washing하고 binding buffer(8 M Urea, 50 mM Na_2HPO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole)로 equilibration, 위의 상등액을 column에 넣어 resuspension 후 1시간동안 4℃에서 shaking incubation, Unbound material이 내려가고 binding buffer로 1차 washing 후 washing buffer(8 M Urea, 50 mM Na_2HPO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole)로 2차 washing을 두 번 반복, Elution buffer(8 M Urea, 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 400 mM Imidazole) 4 ml로 elution - Bradford assay를 이용하여 단백질 정량 후 SDS-PAGE(8% polyacrylamide)를 통해 정제 확인  - 정제된 샘플을 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 50 mM Tris pH 8.0 buffer에 2시간 간격으로 Urea 농도를 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0 M로 낮추면서 투석

KOPRI 극지연구소

○ Small scale His-tagged protein purification

아밀라아제 유전자 앞부분에 6X Histidine이 붙어있어 이를 이용해 His-tagged protein purification을 진행하였다. Large scale His-tagged protein purification을 진행하기 전에 먼저 small scale로 정제를 진행하여 단백질들이 용출되는지 확인하였다. 정제에 사용된 kit는 PRO·Hunt His • Bind Purification Kit, spin-type이다.

1 mM IPTG induction한 1.5 mL cell pellet에 denaturing lysis/binding buffer(8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 8.0) 240 μL를 이용하여 resuspension하였다. urea는 cell내에 생성된 inclusion body를 풀어주는 역할을 한다. 그 후 spin column에 resuspension된 샘플을 주입하고 7000 rpm에서 3분 동안 원심분리 후 denaturing washing buffer(8 M Uea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 6.3) 500 μL를 첨가하여 7000 rpm에서 3분 동안 원심분리(Washing 과정 2번 반복)하였다. 새로운 튜브에 column을 삽입하고 denaturing elution buffer(8M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4, 0.01 M Tris-Cl pH 5.9) 100 μL로 elution을 하여 아밀라아제 단백질을 얻었다. 각 단계의 단백질을 비교 분석을 위해 정제 후 SDS-PAGE (8% polyacrylamide)를 통해 확인하였다.

SDS-PAGE 확인 결과, 재조합된 아밀라아제 생산 균주를 induction하였을 때 약 80 kDa의 과발현된 단백질인 아밀라아제가 있다는 것을 확인하였고 그 후, small scale protein purification을 수행하여 elution하였을 때 약 80 kDa의 아밀라아제 단백질이 정제되었다는 것을 확인하였다.

KOPRI 극지연구소

○ Large scale His-tagged protein purification

발현된 재조합 단백질이 세포내에 효소적 활성이 없는 inclusion body 형태로 생성이 되었기 때문에 발현된 재조합 단백질의 효소적 활성을 회복시키기 위하여 8 M urea를 이용하여 용해시켰고 Ni^{2+}-NTA affinity chromatography를 이용하여 재조합 단백질을 용출한 후, 재조합 단백질이 본래의 구조를 가질 수 있도록 urea를 서서히 제거하는 투석과정을 진행하였다.

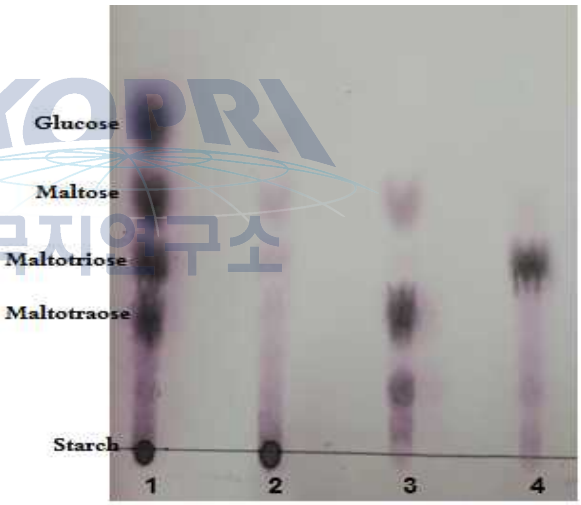
세포는 원심분리(4℃, 20 min, 4,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 8M 유레아, 0.1M 제일인산나트륨, 0.01M 트리스-Cl pH 8.0 및 라이소자임을 포함하는 라이시스 완충용액을 이용하여 재현탁 후 20분 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 샘플은 원심분리 (4℃, 15 min, 14,000 x g)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 8M 유레아, 0.02M 트리스-HCl pH 8.0, 0.5M 염화나트륨 및 0.005M 이마다졸에 의해 평형화된 Ni^{2+}-NTA 친화성 레진의 컬럼에 처리되었고, 8M 유레아, 0.02M 트리스-HCl pH 8.0, 0.5M 염화나트륨 및 0.02M 이미다졸로 세척되었다. α-amylase는 완충용액내의 400mM 이미다졸을 이용하여 용출되었다. 정제된 샘플을 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 50 mM Tris pH 8.0 buffer에 2시간 간격으로 Urea 농도를 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0 M로 낮추면서 투석을 진행하였다.

단백질 농도는 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준방법으로 수행되어진 소디움 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해 확인되었다.

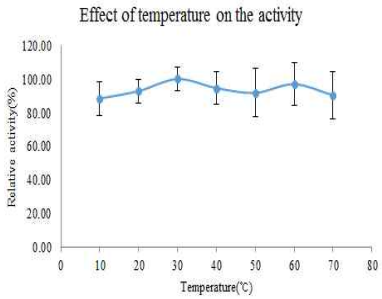
SDS-PAGE 확인결과, 분리된 아밀라아제 밴드는 His6-태그를 포함하는 아미노산 서열로부터 추정된 80 kDa 크기에서 관찰되었다.

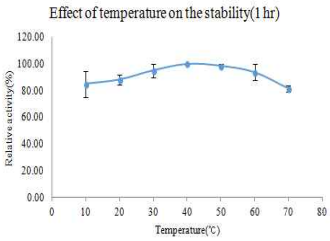
KOPRI
극지연구소

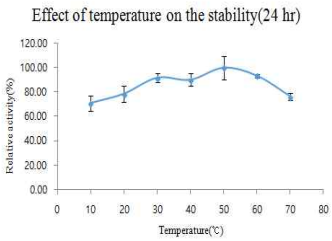
○ 정제된 아밀라아제 특성 분석 및 characterization

연 구 내 용	연 구 결 과
amylase와 기질 반응 후 분해된 생성물 확인	- 투석한 샘플 200 ul을 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200 ul를 기질로 사용하여 25℃에서 24 hr 동안 반응 - Thin layer chromatography를 수행하기 위해 전개용매로 n-butanol, acetic acid, water가 4:8:1로 혼합된 용액을 사용하여 chamber에 filter paper를 넣어 전개 후 TLC plate에 반응 시킨 샘플 1 ul를 spotting - TLC chamber에서 전개 후 10% sulfuric acid로 발색하여 오븐에서 10분간 구워 spot 확인  1. Standard 2. α-amylase + 1% starch 3. α-amylase + 1% maltotetraose 4. α-amylase + 1% maltotriose
온도에 따른 α-amylase activity 측정	- 투석한 샘플 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 10분간 반응 - 반응액에 DNS 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling

KOPRI 극지연구소

<table>
<tr><td></td><td>하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 최종 투석 buffer 혼합액을 blank로 사용
 

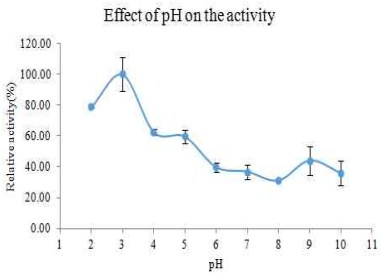
<table>
<tr><th>Temperature(℃)</th><th>Activity</th><th>Relative activity</th></tr>
<tr><td>10</td><td>0.52</td><td>88.39</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.54</td><td>92.85</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0.58</td><td>100.00</td></tr>
<tr><td>40</td><td>0.55</td><td>94.64</td></tr>
<tr><td>50</td><td>0.54</td><td>91.78</td></tr>
<tr><td>60</td><td>0.57</td><td>96.96</td></tr>
<tr><td>70</td><td>0.53</td><td>90.35</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>온도에 따른 α-amylase stability 측정</td><td>- 투석한 샘플 200 ul을 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 incubation
- incubation한 각각의 샘플에 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- 반응액에 운 DNS 용액을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 기질이 첨가된 buffer에 최종 투석 buffer 혼합액을 blank로 사용
 



<table>
<tr><th rowspan="2">Temperature(℃)</th><th colspan="2">1 h</th><th colspan="2">24 h</th></tr>
<tr><th>Activity</th><th>Relative activity</th><th>Activity</th><th>Relative activity</th></tr>
<tr><td>10</td><td>0.51</td><td>85.06</td><td>0.40</td><td>70.70</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.53</td><td>88.19</td><td>0.44</td><td>78.44</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0.57</td><td>95.14</td><td>0.52</td><td>91.71</td></tr>
<tr><td>40</td><td>0.60</td><td>100.00</td><td>0.51</td><td>90.05</td></tr>
<tr><td>50</td><td>0.59</td><td>98.61</td><td>0.57</td><td>100.00</td></tr>
<tr><td>60</td><td>0.56</td><td>93.75</td><td>0.53</td><td>93.37</td></tr>
<tr><td>70</td><td>0.49</td><td>81.49</td><td>0.43</td><td>76.23</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>pH에 따른 α-amylase activity 측정</td><td>- 투석한 샘플 200 ul에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis</td></tr>
</table>

KOPRI 극지연구소

spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용

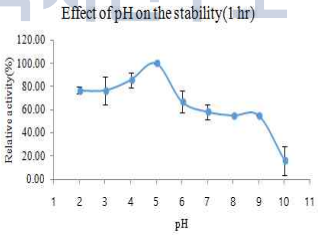


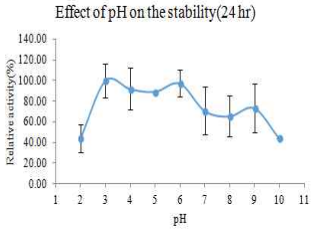
pH	Activity	Relative activity
2	0.30	78.79
3	0.38	100
4	0.24	62.47
5	0.23	59.48
6	0.15	39.62
7	0.14	36.63
8	0.12	30.92
9	0.17	43.98
10	0.14	35.82

pH에 따른 α-amylase stability 측정

- 투석한 샘플을 1, 24 hr동안 각 pH 조건(2.0 - 10.0)에서 incubation
- incubation한 각각의 샘플의 pH를 7.0으로 맞추고 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일

KOPRI 극지연구소





Temperature(℃)	1 hr		24 hr	
	Activity	Relative activity	Activity	Relative activity
2	0.13	76.58	0.07	44.15
3	0.13	76.58	0.16	100
4	0.15	85.46	0.14	92.02
5	0.17	100	0.14	89.36
6	0.11	66.88	0.15	97.34
7	0.10	58.00	0.11	70.74
8	0.09	54.77	0.10	65.43
9	0.09	54.77	0.11	73.40
10	0.03	15.99	0.07	44.15

다양한 시약에 대한 PAMC 27388 amylase activity 영향 평가

- 투석한 샘플 200 ul와 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 다양한 시약이 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일

Reagent	Concentration	Relative enzyme activity(%)

	Tris-HCl (control)	None	100±0.08
	Metal ions		
	Ca	1 mM	92.93±0.09
	Co	1 mM	36.84±0.03
	Mg	1 mM	77.63±0.04
	Fe	1 mM	252.26±0.04
	Zn	1 mM	64.24±0.05
	Na	1 mM	114.60±0.07
	K	1 mM	110.13±0.12
	Oxidizing agent		
	Ammonium persulfate	5 mM	45.89±0.08
	Reducing agent		
	β-mercaptoethanol	5 mM	191.20±0.13
	Chelating agent		
	EDTA	5 mM	58.64±0.07
	Detergents		
	SDS	10%	61.19±0.06
	Triton X-100	10%	55.45±0.08
	Additive		
	Urea	1%	35.56±0.04
	Inhibitor		
	PMSF	1 mM	112.05±0.10

KOPRI
극지연구소

○ Thin layer chromatography를 통한 재조합 α-amylase 생산균주의 활성 탐색

본 연구에서는 α-amylase의 효소적 가수분해에 의해 생성된 최종 산물의 분석하였다. 분석을 위해 실리카 겔 코팅된 TLC 플레이트를 사용하였으며 상승 기술로서 수정된 thin layer chromatography에 의해 수행되었다.

전배양한 α-amylase 생산 균주를 37℃, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30℃에서 1 mM IPTG induction한 후 Large scale protein purification과 투석을 진행하여 활성이 있는 아밀라아제 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질 용액 200μL를 사용하였고 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200μL를 기질로 사용하여 25℃에서 24시간동안 기질과 반응시켰다.

그 후 thin layer chromatography를 수행하기 위해 전개용매로 n-butanol, acetic acid, water를 4 : 8 : 1로 혼합된 용액과 filter paper를 chamber에 filter paper를 넣어 전개용매를 chamber에 완전히 포화시켰다. TLC plate에 각 반응시킨 샘플들 1μL를 spotting하였고 건조시킨 후 포화된 chamber에 넣어 전개시켰다. 전개 후, TLC plate를 건조시켰고 10% sulfuric acid로 발색하여 110℃ 오븐에서 10분간 구워 spot을 확인하였다.

○ 재조합 α-Amylase에 의해 생산된 생성물 확인

본 연구에서는 재조합된 α-amylase의 기질반응에 의해 생산된 생성물이 무엇인지 확인하는 실험을 진행하였다.

본 연구에서 실험한 amylase는 soluble starch, maltotetraose, maltoriose와 기질반응 후 최종 산물로 모두 maltose를 생산하였다.

또한 흥미로운 점은 PAMC 27388 균주에서 생산된 amylase와 비슷하게 maltotetraose와 maltotriose와의 기질반응에서 maltotetroase와 여러 가지 당 중합체가 생성되었다. 따라서 본 연구에서 사용한 재조합 α-amylase가 고분자 화합물을 분해할 뿐만 아니라 저분자의 당 화합물을 중합시키는 역할도 한다는 것이 확인되었다.

KOPRI 극지연구소

○ 온도에 따른 α-amylase activity, stability 측정

본 연구에서는 재조합된 α-amylase의 activity와 stability에 대한 온도의 영향을 분석하기 위하여 10 - 70℃ 온도 조건에서 α-amylase activity와 stability를 측정하였다.

온도에 따른 α-amylase activity 측정에서 사용한 효소는 전배양한 α-amylase 생산 균주를 37℃, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30℃에서 1 mM IPTG induction한 후 Large scale protein purification과 투석을 진행하여 얻어진 활성이 있는 아밀라아제 단백질이다.

얻어진 단백질 용액 200μL에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 10분간 반응시켰다.

온도에 따른 α-amylase stability 측정은 α-amylase activity와 동일하게 정제된 아밀라아제 단백질을 사용하였고 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 incubation한 후 incubation한 각각의 샘플에 200 μL에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다.

DNS 반응을 위해 온도에 따른 α-amylase activity와 stability의 모든 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 starch 가수분해 후 방출된 환원당의 양을 계산하여 α-amylase 활성을 측정하였다. 효소만 제외된 혼합액을 blank로 사용하였다.

α-Amylase 활성 1 unit은 위의 반응 조건에서 분당 1μmol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였으며 오차값을 그래프에 나타내었다.

○ 온도에 따른 α-amylase activity, stability 확인

α-Amylase activity에 대한 최적 온도는 30℃이고 20 - 60℃에서 90% 이상의 활성을 가지고 있어 넓은 온도 범위에서 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한 α-amylase stability는 1시간 반응 조건에서는 40℃, 24시간 반응 조건에서는 50℃에서 최대 안정성을 나타내었다. 따라서 이 α-amylase가 저온에서 최대 활성을 보이고 높은 안정성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

○ pH에 따른 α-amylase activity, stability 측정

본 연구에서는 재조합된 α-amylase activity와 stability에 대한 온도의 영향을 분석하기 위하여 pH 2.0 - 10.0 조건에서 α-amylase activity와 stability를 측정하였다.

pH에 따른 α-amylase activity 측정에서 사용한 효소는 전배양한 α-amylase 생산 균

주를 37℃, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30℃에서 1 mM IPTG induction한 후 Large scale protein purification과 투석을 진행하여 얻어진 활성이 있는 아밀라아제 단백질이다.

얻어진 단백질 용액 200μL에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 각 pH 조건에서 10분간 반응시켰다. 사용한 pH 버퍼는 각각 다음과 같다.(pH 2, 3; 50mM glycine-HCl, pH 4, 5; 50mM sodium acetate-acetic acid, pH 6-8; 50mM potassium phosphate, pH 9; 50mM tris-HCl, pH 10; 50mM carbonate)

pH에 따른 α-amylase stability 측정은 α-amylase activity와 동일하게 정제된 아밀라아제 단백질을 사용하였고 1, 24 hr동안 각 pH 조건에서 incubation한 후 incubation한 각각의 샘플의 pH를 7.0으로 맞추고 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다.

DNS 반응을 위해 pH에 따른 α-amylase activity와 stability의 모든 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 starch 가수분해 후 방출된 환원당의 양을 계산하여 α-amylase 활성을 측정하였다. 효소만 제외된 혼합액을 blank로 사용하였다.

α-Amylase 활성 1 unit은 위의 반응 조건에서 분당 1μmol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였으며 오차값을 그래프에 나타내었다.

KOPRI 극지연구소

○ **pH에 따른 α-amylase activity, stability 확인**

α-Amylase activity에 대한 최적 pH는 3.0이고 염기성에서는 α-amylase activity가 급격하게 감소하였다. 이 결과는 activity에 대한 최적 pH가 7.0인 PAMC 27388에서 생산된 amylase와는 다른 결과이지만 염기성에서 activity가 감소한다는 동일한 특징은 가지고 있다. 또한 α-amylase stability는 1시간 반응 조건에서는 pH 5.0, 24시간 반응 조건에서는 pH 3.0에서 최대 안정성을 나타내었다. 또한 염기성 조건에서 안정성이 급격하게 감소하였다. 따라서 이 α-amylase가 산성 pH 조건에서 최대 활성을 보이고 높은 안정성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

○ **다양한 시약에 대한 α-amylase activity 영향 평가**

본 연구에서는 재조합된 α-amylase activity에 대한 다양한 시약들의 작용을 조사하였다. 사용한 시약은 metal ions (1 mM Ca, Mg, Fe, Zn, Na, k), oxidizing agent (5mM ammonium persulfate), reducing agent (5 mM β-mercaptoethanol), chelating agent (5 mM EDTA), detergents (10% SDS, Triton X-100)와 그 외 1%

urea, 1 mM PMSF를 사용하였다.

정제후 투석된 200 μL와 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 각 시약이 첨가된 buffer 200 μL를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시켰다. control은 위의 buffer에서 시약을 제외한 용액을 사용하였다.

DNS 반응은 위의 α-amylase activity, stability 측정과 동일하다.

○ **다양한 시약에 대한 α-amylase activity 영향 확인**

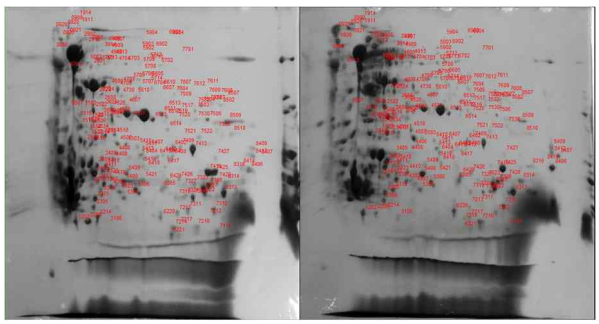
본 연구에서는 α-amylase activity에 대한 다양한 시약들의 작용을 확인하고 어떠한 시약이 inhibitor 또는 enhancer로 작용하는지 확인하였다. 실험 결과, Fe^{2+}, Na^{2+}가 α-amylase에 강력한 enhancer로 작용하였으며 Co^{2+}, ammonium persulfate, urea가 inhibitor로 작용하였다.

재조합된 미생물에서 생산된 α-amylase의 경우, PAMC 27388에서 생산된 amylase와 달리 Ca^{2+}가 inhibitor로 작용하지 않는다는 것이 확인되었다.

KOPRI
극지연구소

□ 저온활성 아밀라아제 생산 균주 Proteomic analysis

○ 다른 온도 조건에서 배양된 PAMC 27388 단백질 비교 분석

연 구 내 용	연 구 결 과
2D-Electrophoresis를 통한 20, 30℃에서 배양한 PAMC 27388 단백질 비교	- 20, 30℃에서 3일간 배양한 cell 50 ml을 각각 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 20 min)한 후 cell pellet에서 cell lysis buffer(D.W 1.26 ml, 10 N NaOH 0.31 ml, β- mercaptoethanol 0.13 ml)를 첨가하여 4℃에서 incubation하면서 30분 간격으로 vortexing(overnight) - Cell을 lysis한 각 샘플에 TCA 800 ul를 첨가하여 2시간 동안 4℃에서 incubation하며 30분 간격으로 vortexing후 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 30 min), 침전물을 cold acetone으로 washing후 rehydration buffer(8M Urea, 2%(w.v) CHAPS, 0.002%(w/v) Bromophenol blue) 첨가하여 4℃에서 vortexing(overnight) - 각 샘플을 4℃에서 원심분리(17,000 rpm, 10min)한 후 Bradford protein assay를 이용하여 단백질 정량(1 mg/mL) - 각 샘플에 IPG buffer(pH 3 - 10 NL) 7 ul 첨가  20℃ 30℃ 하고 이것을 strip(18 cm, pH 3 - 10 NL)와 swelling(overnight) - Swelling된 strip으로 1D(1Step and Hold 500 V, 2Gradient 1000 V, 3a Gradient 8000 V, 4a Step and Hold 8000 V, 3b Gradient 10000 V, 4b Step and Hold 10000 V) 진행 후 2D(30% polyacrylamide) 진행

KOPRI 극지연구소

○ 온도에 따른 미생물 배양 조건

온도에 따른 미생물 성장률 비교에서 20℃에서 최적 성장률을 보였다. 따라서 본 연구에서는 20℃보다 낮은 온도인 10℃와 높은 온도인 30℃에서의 단백질 발현 패턴을 비교 및 분석하기 위해 10, 20, 30℃에서 PAMC 27388을 배양하였고 intracellular proteins을 비교하였다.

PAMC 27388은 전배양 한천 배지에 접종하여 20℃에서 7일간 배양하여 사용하였으며, 액체 배양은 50 mL씩 250 mL triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 각각 20, 30℃에서 150 rpm으로 교반하여 3일간 배양하였다.

○ Intracellular proteins 추출

20, 30℃에서 3일간 배양한 cell 50 mL을 각각 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 20 min)한 후 cell pellet에서 cell lysis buffer (D.W 1.26 mL, 10 N NaOH 0.31 mL, β-mercaptoethanol 0.13 mL)를 첨가하여 4℃에서 incubation하면서 30분 간격으로 vortexing하여 overnight으로 lysis를 진행하였다.

Cell을 lysis한 각 샘플에 TCA 800 μL를 첨가하여 2시간 동안 4℃에서 incubation하며 30분 간격으로 vortexing후 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 30 min)하였다. 침전물을 cold acetone으로 3번 washing후 rehydration buffer(8M Urea, 2%(w.v) CHAPS, 0.002%(w/v) Bromophenol blue) 첨가하여 4℃에서 overnight으로 vortexing을 진행하였다.

각 샘플을 4℃에서 원심분리(17,000 rpm, 10min)한 후 Bradford protein assay를 이용하여 단백질을 정량 하였다. 20, 30℃ 모두 단백질 농도를 1.5 mg/mL로 맞추어 다음 실험을 진행하였다.

○ 2D-electrophoresis

1.5 mg/mL로 정량된 각 단백질 샘플에 IPG buffer(pH 3 - 10 NL) 7 ul 첨가하고 이것을 strip(18 cm, pH 3 - 10 NL)에 흡수시켜 overnight으로 swelling을 진행하였다.

Swelling된 strip으로 1D(1Step and Hold 500 V, 2Gradient 1000 V, 3a Gradient 8000 V, 4a Step and Hold 8000 V, 3b Gradient 10000 V, 4b Step and Hold 10000 V) 진행 후 2D(30% polyacrylamide)를 진행하였다.

○ 온도에 따른 intracellular proteins 비교

20, 30℃에서 온도에 따른 intracellular proteins의 발현 패턴을 비교 분석하였을 때, 20℃를 기준으로 30℃에서 up regulated proteins이 42 spots, down regulated proteins이 18 spots으로 확인되었다.

또한 추후 실험에서는 10, 20℃에서 온도에 따른 intracellular proteins을 비교하여

저온성 미생물인 PAMC 27388이 10, 20, 30℃의 온도 조건에서 어떻게 적응하는지 proteomic analysis를 진행할 예정이다.

KOPRI
극지연구소

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
극지미생물 유래 프로티아제 확보	1-1	신규 극지 미생물의 확보	- 2015년 8월 다산 기지를 방문하여 폐광산과 인근의 토양지역의 시료 채취 완료 - 채취된 초양 시료로부터 프로티아제 생산 미생물의 분리 작업을 진행 중 - 극지연구소에서 분양 받은 미생물에서 유래한 프로티아제 정제 및 특성 연구	100 %
	1-2	극지 미생물의 단백체 분석	- 극지연구소에서 분양 받은 *Janthinobacterium* sp. (PAMC 25641)로부터 얻어진 프로티아제 정제 · 음이온 교환체인 DAEA를 이용한 fractionation 정제 수행 · 온도, pH에 따른 프로티아제 활성 영향 평가 · 황산암모늄을 이용하여 30~80%의 포화도에서 프로티아제를 석출 - 프로티아제 활성의 차이에 따른 미생물의 단백체 비교 분석 - 배양 온도 차이에 따른 단백체 비교 분석 · 프로티아제 활성량의 차이에 따른 세포 내부의 단백질 발현 수준을 비교한 결과, 총 170개 이상의 단백질 중에서 67개가 발현 수준의 증가, 48개가 감소함을 확인함. · 확연하게 차이를 보이는 36개의 단백질을 온도 차이에 따른 변화 조건에서 동일한 경향을 보이는 단백질을 확인한 결과, 각각 2개, 4개의 단백질이 동일한 경향을 보이는 것을 확인함.	100%
	1-3	염색체 서열 분석 미생물 선정	- 활용성이 높은 극지 미생물을 선정하여 NGS를 이용한 염기서열 분석 진행	100%

KOPRI 극지연구소

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 활용방안

○ 극지생물 유래 신기능 생물소재 개발을 위한 유용 단백질의 기능성 및 특성을 분석하기 위한 핵심기술로 활용

○ 난발현성 저온활성 효소의 효율적인 발현시스템의 확립은 극지 유용 단백질의 신규 발굴 및 단백질 응용연구를 효율적으로 추진할 수 있는 기반이 됨. 또한 극지 유래 저온활성 효소 및 일반 효소의 이용성 향상에도 기여할 것임.

○ 저온성 샤페론 단백질의 기작 및 구조에 관한 연구 결과들은 극지 생명체의 저온 적응 기작을 규명할 수 있는 중요한 단서가 될 수 있음.

○ 난발현성 저온성 미생물 유전자의 특성 규명을 위한 단백질 발현 및 정제 기술에 활용

○ 저온활성 효소의 대규모 생산을 통하여 기존의 화학공정 시설을 친환경적인 촉매 공정으로 대체할 수 있음.

○ 본 연구를 통하여 얻어지는 신규 극지 미생물의 게놈 분석 결과는 신규 유전자 및 효소 확보에 활용

○ 개발된 발현 및 배양기술의 기술이전을 통하여 저온활성 프로티아제를 이용한 세제 제품 활용

○ 고부가가치 난발현성 저온활성 효소의 발현기술 개발 및 산업체 기술이전의 적극적인 추진

KOPRI 극지연구소

나. 기대효과

○ 관련연구 기관 및 산업체와의 협력을 통하여 향 후 저온활성 효소의 산업적 이용 및 기술 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대되며, 아직까지 상대적으로 산업화가 진행되지 않은 저온활성 효소의 성공적인 상업화를 통한 세계 시장에서 주도적인 위치를 확보할 수 있음.

○ 기존의 화학반응에 기초한 화학공정을 저온활성 효소 반응으로 교체함으로써 생산물의 안정화와 공정비용의 절감이 가능함.

○ 생물공학, 생물학 그리고 극지 과학이 융합된 높은 수준의 과학을 수행할 수 있는 인재 양성

○ 극지생물은 극한환경에서 생존하기 위한 특이한 적응 메카니즘을 보유하고 있어, 다른 지역에서 서식하는 생물들과는 구별되는 신규 유전자원과 신소재 개발의 가능성이 매우 높기 때문에 본 연구 결과는 이러한 유전자원의 확인과 특성연구에 기여할 수 있음.

○ 극지미생물 유래 유용유전자원의 발현을 통하여 극지 생물자원을 이용한 생체분자공학, 생체촉매 설계, 생물반응기, 생체저분자 의약활성물질, 생물학적 환경복원 등의 생물산업에 미치는 직접적인 영향도 증대될 것임.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

KOPRI 극지연구소