

TSPE16070-023-3

저온 활성 프로티아제 생산 극지 미생물의
대사 연구

Metabolism of Polar Bacteria Producing Cold-active
Protease



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.



2017. 1.

(본과제) 총괄연구책임자	:	박 현
위탁연구기관명	:	전남대학교
위탁연구책임자	:	최 종 일
위탁참여연구원	:	김 현 도
“	:	김 수 미

보고서 초록

위탁연구과제명	저온 활성 프로티아 생산 극지 미생물의 대사 연구				
위탁연구책임자	최 종일	해당단계 참여연구원 수	7	해당단계 연구비	120,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 생물공학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고 서면 수	
<p>○ 극지 유래 미생물의 프로티아제 활성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 극지연구소에서 분양받은 미생물에서 유래한 프로티아제 정제 및 특성 연구 - 프로티아제 분비 미생물의 선별 방법 및 활성측정방법 확립 - 반응표면분석법을 이용한 배지 최적화 <p>○ 신규 극지 미생물 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015년 8월 다산 기지, 2016년 1월 세종기지를 방문하여 토양지역의 시료 채취 - 채취된 초양 시료로부터 프로티아제 생산 미생물의 분리 - 극지연구소에서 분양 받은 미생물에서 유래한 프로티아제 정제 및 특성 연구 <p>○ 극지 미생물의 단백질 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 프로티아제 활성의 차이에 따른 미생물의 단백질 비교 분석 - 배양 온도 차이에 따른 단백질 비교 분석 <p>○ 염색체 서열 분석 미생물 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활용성이 높은 극지 미생물을 선정하여 NGS를 이용한 염기서열 분석 완료 <p>○ 프로티아제 생합성 유전자의 발현</p> <ul style="list-style-type: none"> - 저온활성 프로티아제 유전자의 대장균 cloning과 재조합 프로티아제의 발현 및 정제 					
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

- 극지연구소에서 균주 분양
- 저온활성 프로티아제 활성 평가
- 프로티아제 생산 미생물의 배양 최적화
- 신규 극지 미생물의 확보
- 극지 미생물의 단백질 분석
- 유용 극지미생물의 염기서열 분석

IV. 연구개발결과

- 극지연구소 분양기관인 PAMC에서 프로티아제 생산 미생물 4종 분양 완료
- 분양된 미생물의 실험실 배양 조건 확립
- 프로티아제 활성 측정을 위한 고체배지에서의 screening 방법 및 정량적 활성 측정 방법 확립
- 프로티아제 생산 배지의 최적화
- 다산 기지와 세종 기지를 방문하여 신규 미생물 확보를 위한 토양 시료 채취
- 극지연구소에서 분양 받은 *Janthinobacterium* sp. (PAMC 25641)로 부터 얻어진 프로티아제 정제
- 프로티아제 활성의 차이에 따른 미생물의 단백질 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, 단백질 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

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 Antartic bacteria
- Genomic information of cold-adaptive protease for understanding metabolism of Antartic bacteria
- Investigation of cold-adaptive metabolism of Antartic bacteria and its application

III. Contents and Extent of R&D

- Aquisition of Antartic bacteria producing protease from PAMC
- Evaluation of cold-adaptive protease activity
- Optimization of cold-adaptive protease production
- Isolation of new protease producing bacteria
- Purification and characterization of cold-adaptive protease
- Comparison of protein expression level by 2-dimensional electrophoresis
- Full genome sequencing of new strain dor industrial application

IV. R&D Results

- Development of cultivation condition of cold-adaptive protease producing bacteria
- Screening of protease producing bacteria on media plate
- Establishment of method for pretease activity
- Optimization of protease production using Response Surface Methodology
- Collection of soil sample near Dasan Station and isolation of new protease producing 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 Antartic bacteria
- Supplement of genomic and proteomic information of Antartic bacteria producing cold-adaptive protease
- Application of cold-adaptive protease for industry



목 차

제 1 장 서론.....	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	14
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도.....	74
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	77



제 1 장 서론

- 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.
- 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 중온성 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 증진시키는 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°C에서 배양하여 esterase의 활성을 측정하는 것으로 이처럼 낮은 온도에서 대장균을 이용한 배양은 저온성 모균주를 이용하여 효소를 추출하는 방법과 비교하여 발현량의 차이는 없음.

○ 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 단백질체 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 단백질체 정보가 대규모로 얻어지고 있으나, 이를 활

용한 연구 인프라는 부족한 실정이며, 특히 저온성 샤페론의 활용 연구는 극지유래 유용 소재의 개발을 위하여 매우 필요함.

- 극지 미생물의 온도반응 단백질 분석과 저온성 샤페론의 활용 기술은 향후 극지 유전자원의 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 단백질 분석과 유전체 분석을 통하여 단백질 발현에 관여하는 저온성 샤페론을 탐색.

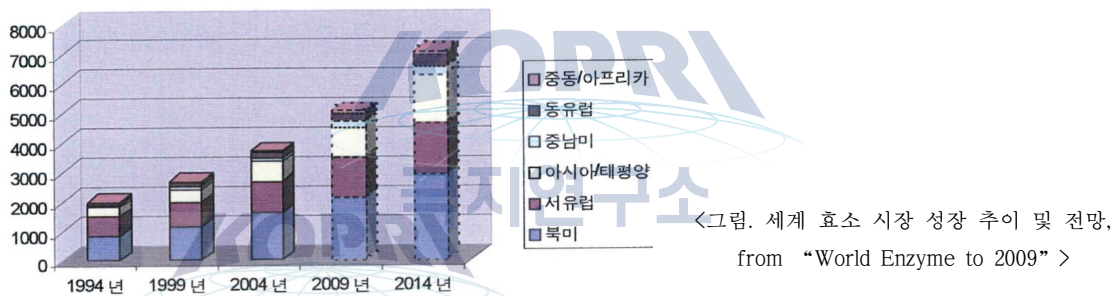
○ 샤페론 단백질의 아미노산 서열 및 분자 구조의 변화를 통하여 저온성 샤페론의 단백질 folding 기작을 분석하고, 다양한 저온활성 단백질을 상온에서 고품량 생산할 수 있는 발현시스템을 개발하고자 함.

○ 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, 향후 극한 환경에서 확보된 미생물들의 유전정보 분석을 위하여 난발현성 유전자의 기능이 해와 생산에 활용함.

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.



- 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 촉매 반응이 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 500균주 이상을 확보하고 있음.
 - 남극세종기지 주변 해수로부터 키틴분해효소를 분리하여 N-acetylglucosamine의 생산공정에 활용하는 연구를 진행하였음.
 - 남극에서 분리한 저온미생물 아스로박터로부터 베타-갈락토시다제를 이용하여 락토오스로 분해하는 연구를 수행함.
 - 대부분의 극지 유래 저온활성 효소들은 저온에서 높은 효소 활성을 보임.

4~10℃ 근처에서 효소 활성이 같은 기질을 사용하는 상온 효소에 비해 10 배까지 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>

효소	생산 미생물
α-amylase	남극 박테리아
Lipase B	<i>Candida antarctica</i>
Subtilisin BPN	<i>Bacillus</i> sp.
Aspartic proteinase	<i>Mucor pusillus</i>
Euphauserase	남극 크릴
Citrate synthase	<i>Arthrobacter</i> 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 한정되어 있음.
 - 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.



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 전망이다.
- 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.



□ 1차년도

- 극지 유래 미생물의 확보
 - 극지연구소(PAMC)에서 기존에 채집된 미생물 분양을 통한 균주 확보

- 분양된 미생물의 실험실 배양 조건 확립

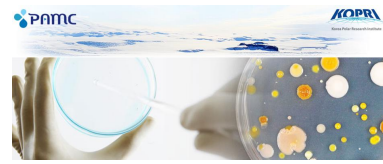


그림. 극지미생물 분양기관 PAMC

○ 극지 유래 미생물의 프로티아제 활성 평가

- 프로티아제 활성 측정을 위한 고체 배지에서의 screening 방법 확립
- 프로티아제 생산 미생물의 온도, 배지 조성, 성장 단계에 따른 프로티아제 생산 영향의 평가를 위한 정량적 프로티아제 활성 측정방법 확립

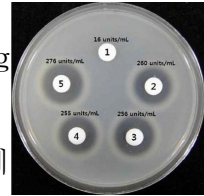


그림. plate를 이용한 프로티아제 활성 측정

○ 프로티아제 생산 미생물의 배양 최적화

- 반응표면분석법(Response Surface Analysis)을 이용한 프로티아제 생산 배지의 최적화 연구

선형 모델(first-order model)

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \epsilon$$

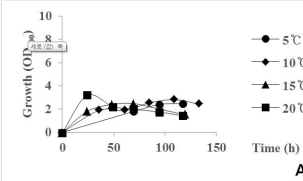
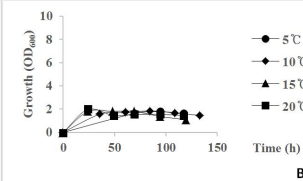
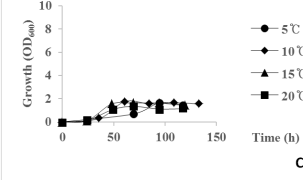
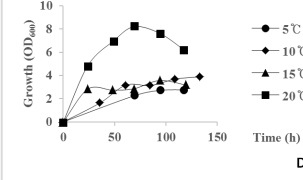
곡선 모델(second-order model)

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$



그림. RSM 분석 결과

○ 세부목표 1-1: 극지연구소에서 균주 분양

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>극지미생물 분양기관에서 4종의 프로티아제 생산 미생물 분양</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 극지연구소 미생물 분양기관 PAMC (Polar and Alpine Microbial Collection)에서 보관 중인 극지미생물 중에서 프로티아제 생산 균주 탐색 - 탐색된 프로티아제 생산 균주들 중에서 배양 온도에 따라 민감한 성장을 갖는 균주, 프로티아제 생산량이 배양온도에 민감한 균주와 민감하지 않은 균주 등을 선별하고 최종적으로 4종의 프로티아제 생산 균주를 분양받아서 확보 · PAMC 25641, 25614, 25719, 25617
<p>극지연구소 분양 미생물의 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 16s rDNA 염기서열 분석을 통한 분양받은 균주의 동정 · PAMC 25641은 <i>Janthinobacterium</i> sp. HC1-2 (GenBank: JF312914.1)과 97% 유사성 · PAMC 25614은 <i>Pseudomonas</i> sp. B-AS-24 (GenBank: JF901704.1)과 99%의 유사성 · PAMC 25719는 <i>Janthinobacterium</i> sp. RHLS19 (GenBank: JX949460.1)과 유사성 · PAMC 25617은 <i>Rahnella</i> sp. Pv5 (GenBank: JQ522978.1)과 유사성
<p>분양된 미생물의 실험실 배양 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 각 균주별 배지의 종류, 배양 온도에 따른 성장 속도 측정 - 배양 기간에 따른 미생물의 성장 속도 측정 · PAMC 25617은 다른 온도 조건에서는 평이한 성장을 보였으나, 20℃에서 급격한 성장을 증가 및 maximum growth도 크게 높아진 것을 확인 <div style="display: flex; flex-wrap: wrap; justify-content: space-around;">     </div>

○ 미생물 및 배양 배지

실험에서 사용된 PAMC 25641, 25614, 25719, 25617의 미생물들은 극지연구소 (Korea Polar Research Institute, Incheon, South Korea) 로부터 분양 받았다. 이들 미생물은 PAMC 등록정보에 protease 활성을 갖는 것으로 확인이 되어있다. PAMC 25641, 25614는 Nutrient agar (Becton, Dickinson and Company, USA), Nutrient broth (Becton)을 사용하였고, PAMC 25719는 R2A 배지를 이용하였다. 또한, PAMC 25617은 YM 배지를 사용하였다.

○ 미생물 동정

각각의 미생물들은 universal primer인 1492R (5' - CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT - 3') 과 27F (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') 를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다[13]. PCR 결과물은 QIAquick®PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)를 이용하여 정제한 후 (주)마크로젠 (Seoul, South Korea) 에 의뢰하여 16S rDNA 염기서열을 확인한 후 NCBI blast를 통하여 동정하였다.

○ 배양 조건

각각의 미생물들은 전배양 한천 배지에 접종하여 15℃에서 7일간 배양하여 사용하였으며, 액체 배양은 50 mL씩 250 mL triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 각각 5, 10, 15, 20℃에서 150 rpm으로 교반하여 4일간 배양하였다.

○ 성장률 측정

각각의 미생물들의 성장률은 UV/vis spectrophotometer (Mecasys Co, Seoul, South Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액을 200 μL 취하여 멸균된 각각의 액체 배지 800 μL에 넣어 5배 희석하여 흡광도를 측정하였고, 멸균된 각각의 액체 배지를 blank로 사용하였다.

○ 미생물 동정 결과

Protease 생산 균주들의 16S rDNA 유전자 정보의 염기서열을 확인한 후, NCBI blast를 통하여 동정해본 결과 PAMC 25641은 *Janthinobacterium* sp.

HC1-2 (GenBank: JF312914.1)등과 97% 유사성을 보였다. PAMC 25614은 *Pseudomonas* sp. B-AS-24 (GenBank: JF901704.1)등과 99%의 유사성 보였다. 또한, PAMC 25719는 *Janthinobacterium* sp. RHLS19 (GenBank: JX949460.1) 와 PAMC 25617은 *Rahnella* sp. Pv5 (GenBank: JQ522978.1) 와 각각 98%의 유사성을 보였다. 정확히 어떤 특정 종과의 연관성은 명확하지 않았다.

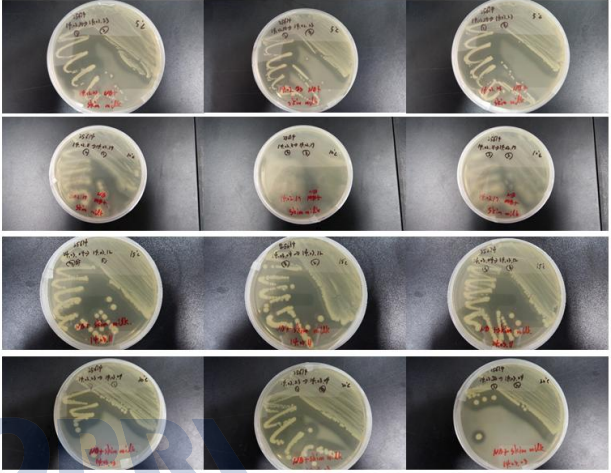
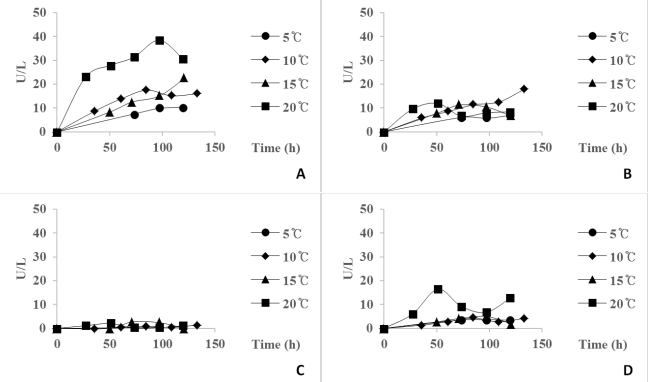
○ 성장률 확인

본 연구에서는 각 미생물들의 최적성장 온도를 확인하기 위하여 다양한 온도 (5°C, 10°C, 15°C, 20°C) 에서 4일간 성장을 비교하였다. 다른 균주들과 다르게 PAMC 25617은 다른 온도 조건에서는 평이한 성장을 보였으나, 20°C에서 급격한 성장률 증가 및 maximum growth도 크게 높아진 것을 확인할 수 있었다.

위의 미생물들은 모두 5~20°C에서 성장이 가능하였으며, 대부분 20°C에서 가장 잘 성장하였다. 이러한 결과를 볼 때 본 연구에서 사용된 미생물들은 모두 내냉성 (psychrotolerant)의 특성을 지니고 있는 것을 알 수 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.

Janthinobacterium 은 30°C의 온도에서 maximum growth를 갖는 것이 확인되었으며, *Pseudomonas* 역시 30°C에서 가장 잘 성장하는 것으로 확인되었다. 또한, 두 미생물은 5°C 에서도 성장이 가능한 저온적응성 미생물이라는 것 역시 보고되었다. 그 이외에도 여러 종의 극지미생물들이 연구되고 있으며, 대부분의 극지미생물들은 5~30°C의 다양한 온도에서 성장이 가능한 것으로 확인되고 있다.

○ 세부목표 1-2: 저온활성 프로티아제 활성 평가

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>프로티아제 활성 측정을 위한 고체배지에서의 screening 방법 확립</p>	<p>- 분양받은 각각의 미생물을 여러 배양 온도에서 skim milk 가 첨가된 nutrient broth를 이용하여 환의 크기에 따른 프로티아제 활성의 일차적 평가</p> 
<p>프로티아제 정량적 활성 측정 방법 확립</p>	<p>- 배양액을 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 회수하여 50 mM sodium phosphate 200 μL에 배양 상등액 100μL, 기질인 10mM AAPF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10μL, 증류수 690 μL를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 60°C에서 20분간 불활성하여 UV/vis spectrophotometer 를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정</p> <p>- 분양받은 각각의 균주에서의 배양온도 및 배양 시간에 따른 프로티아제 활성 측정</p> 

○ Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 배양액을 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 회수하여 50 mM sodium phosphate (Daejung Chemical & metal Co., Sheung, South Korea) 200 μL에 배양 상등액 100μL, 기질인 10mM AAPF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10μL, 증류수 690 μL를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 60°C에서 20분간 불활성하여 UV/vis spectrophotometer 를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질대신 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용하였다.

Protease의 unit은 extinction coefficient = 8,800으로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{unit } (\mu\text{mole}/\text{min})/\text{L} = \frac{(\text{net OD}_{410}) \times (\text{반응액 부피, L}) \times 10^6}{\epsilon \times (\text{반응시간, min}) \times (\text{반응에 사용된 배양액, L})}$$

배양 및 활성 실험은 3차례 반복하여 평균값으로 표시하였다.

○ Protease 활성 확인

본 연구에서는 저온 활성 효소들 중에 현재 산업적으로 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 protease에 관하여 관심을 가지고 연구를 진행하였다.

본 연구에서의 각 미생물들의 Protease activity maximum값을 Unit으로 환산하면 25641, 25617은 38.523 U/L, 16.477 U/L 의 값을 가졌으며, 25719는 2.727 U/L, 25614는 17.841 U/L 의 maximum값을 보였다(Fig. 2).

본 연구에 의해 극지방에서 채취된 4종의 protease 생산 균주들을 확인하였고, 그중 높은 활성을 가지며, 효소 활성이 안정적인 균주를 확인하였다. 이에 따라 효소 산업에서 가장 넓은 범위에 이용되고 있는 protease 중 가장 큰 이슈가 되고 있는 저온 활성 protease를 산업적으로 다양한 분야에서 유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 세부목표 1-3: 프로티아제 생산 미생물의 배양 최적화

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>프로티아제 생산 배지의 최적화</p>	<p>- 프로티아제 생산에서 영향을 미치는 탄소원, 질소원, 무기이온의 구성 요소 들 중에서 중요한 인자를 one-factor-at-a-time의 방법으로 선별하고, 선별된 인자를 인수설계와 회귀분석을 이용하여 변수를 최적화함</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>- 이러한 반응표면분석의 최적화를 통하여 프로티아제 생산을 2배 이상 증가시킴</p>

○ 실험 설계 및 반응표면분석

이 연구에서는 One-factor-at-a-time 방법을 이용하여 protease 생산에 영향을 미치는 주요인자를 분석하기 위하여 한가지 인자를 변화시키고 다른 인자들은 고정시켜서 protease 생산량을 확인하였다. 확인된 주요인자는 Minitab 16(Minitab Inc, State College, Pennsylvania, USA)을 통한 중심합성계획법을 설계한 후, 배지조성이 각기 다른 16개의 실험군을 각각 3번의 반복실험을 거쳐 평균적인 protease 생산량을 확인하였으며 이에 따른 모델식은 다음과 같다(식 1).

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 \quad (1)$$

○ 주요인자분석

One-factor-at-a-time 방법을 통한 주요인자분석을 진행하여 각각의 인자들이 미생물의 성장 및 protease 생산에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 먼저, 질소원을 변화하여 미생물의 성장 및 protease 생산량을 확인한 결과 yeast extract가 protease 생산에 있어서 더 많은 영향을 주는 질소원으로 작용한다는 것을 확인하였다. 탄소원을 변화시켰을 경우에는 YM 배지의 기본조성인 glucose가 protease 생산에 가장 영향력있는 탄소원으로 작용하는 것을 확인하였다. Protease 생산에 관한 계면활성제의 영향은 Triton X - 100을 첨가하였을 때가 다른 계면활성제를 첨가하였을 때보다 더 높은 protease 생산량을 보였다. 본 연구에서는 접종 후 72시간을 배양기준으로 잡고 배지의 최적화를 진행하였다.

○ 반응표면분석법

확인된 주요인자인 yeast extract, Triton X - 100과 물리적인 환경 요인으로 pH를 변수로 하여 Minitab 16을 통한 중심합성계획법을 설계한 후, 배지조성이 각기 다른 16개의 실험군을 각각 3번의 반복실험을 거쳐 평균적인 protease 생산량을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Central Composite Design (CCD) for screening of important variables for protease production.

Code Levels			Real variables			Theoretical values	Experimental values
X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ Yeast extract (g/L)	X ₂ TritonX -100 (g/L)	X ₃ pH	Y Protease production (U/L)	Y Protease production (U/L)
1.633	0	0	9.0825	0.1	6.2	6.27	6.29
1	1	1	7.5	0.15	7.2	6.69	7.35
1	1	-1	7.5	0.15	5.2	5.61	6.21
1	-1	1	7.5	0.05	7.2	8.87	9.55
1	-1	-1	7.5	0.05	5.2	6.75	5.15
0	1.633	0	5	0.18165	6.2	7.25	6.36
0	0	1.633	5	0.1	7.833	6.37	5.38
0	0	0	5	0.1	6.2	8.33	7.20
0	0	0	5	0.1	6.2	8.33	9.55
0	0	-1.633	5	0.1	4.567	4.53	6.29
0	-1.633	0	5	0.01835	6.2	8.94	10.60
-1	1	1	2.5	0.15	7.2	3.79	5.30
-1	1	-1	2.5	0.15	5.2	3.66	2.88
-1	-1	1	2.5	0.05	7.2	4.72	4.02
-1	-1	-1	2.5	0.05	5.2	3.55	2.80
-1.633	0	0	0.9175	0.1	6.2	1.29	2.05

실험 결과 5 g/L peptone, 3 g/L malt extract, 10 g/L C₆H₁₂O₆, 5 g/L yeast extract, 0.1 g/L Triton X - 100의 농도에 pH6.8의 조건에서 미생물을 배양하였을 경우, protease를 가장 많이 생산하는 것을 확인하였으며(10.61 U/L), 5 g/L peptone, 3 g/L malt extract, 10 g/L C₆H₁₂O₆, 0.9175 g/L yeast extract, 0.1 g/L Triton X - 100의 농도에 pH6.8의 조건에서 미생물을 배양하였을 경우, protease의 생산량이 가장 낮은 것을 확인하였다(2.05 U/L).

이 실험 결과를 토대로 다음과 같은 모델식을 얻을 수 있었다.

$$Y = -47.4 + 3X_1 + 41.6X_2 + 14X_3 - 2.5X_1X_2 + 0.095X_1X_3 - 5.2X_2X_3 - 0.273X_1^2 - 36X_2^2 - 1.08X_3^2$$

Y는 protease의 생산량을 나타내며, X_1 , X_2 , X_3 은 각각 yeast extract, TritonX - 100과 pH를 나타낸다. 분석결과 결정계수(R^2)는 0.797으로 계산되었다. R^2 값은 항상 0과 1사이에 존재하며, R^2 값이 0.797이라 함은 실험설계 한 protease생산성 설계와 79.7%의 적합성을 보였음을 의미한다. P value는 각 계수의 중요성을 확인하는 도구로 유의 확률을 확인하는 지표가 된다. F value는 모형의 적합성을 판단하는 지표로 사용되며, 모형의 noise가 생길 확률을 확인할 수 있다. 결정계수와 결정계수조정은 위 모형의 유효성과 정확성을 암시하는 것으로 적합성을 판단할 수 있다(**Table 2**).

Table 2. Analysis of variance of the experimental results of the ANOVA.

	DF	Adj Sum of squares	Adj Mean square	F value	P value
Regression	9	70.1531	7.7948	2.35	0.180
X_1	1	7.1515	7.1515	2.15	0.202
X_2	1	0.4438	0.4438	0.13	0.730
X_3	1	9.0167	9.0167	2.72	0.160
$X_1 * X_1$	1	22.7016	22.7016	6.84	0.047
$X_2 * X_2$	1	0.0031	0.0031	0.00	0.977
$X_3 * X_3$	1	8.6766	8.6766	2.61	0.167
$X_1 * X_2$	1	0.7813	0.7813	0.24	0.648
$X_2 * X_2$	1	0.4513	0.4513	0.14	0.727
$X_2 * X_3$	1	0.5304	0.5304	0.16	0.706
Residual error	6	18.457	3.076		
Lack-of-fit	5	16.5994	3.3199	1.14	0.609
Pure error	1	2.761	2.761		
Total	15	91.004			

○ 주요 인자들 간의 상관관계

각 주요 인자들간의 정확한 상관관계는 확인되지 않았으나, TritonX-100과 pH는 yeast extract의 함량이 증가할수록 더 많은 protease생산성을 나타내는 것으로 확인되었다. 반면에 pH와 TritonX-100의 관계는 비교적 각자에게 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

○ RSM 결과에 따른 protease 최대 생산량 확인

반응표면분석을 통하여 예측된 protease를 최대로 생산하는 배지의 조성은 5 g/L peptone, 3 g/L malt extract, 10 g/L $C_6H_{12}O_6$, 6.690g/L yeast extract, 0.018g/L TritonX - 100의 농도에 pH 6.677의 조건이었으며, 이때 예상되는 protease의 생산량은 10.049 U/L으로 확인되었다. 이에 따른 확인 실험을 수행한 결과 8.03 U/L의 protease생산량을 보였다. 이와 같은 결과는 최적화되지 않은 YM 배지에서의 생산량과 비교했을 때 158%의 증가된 protease생산량을 보였다.



□ 2차년도

○ 극지 미생물 유래 아밀라아제 확보

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

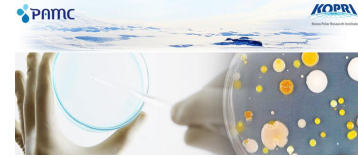


그림. 극지미생물 분양기관 PAMC

○ 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

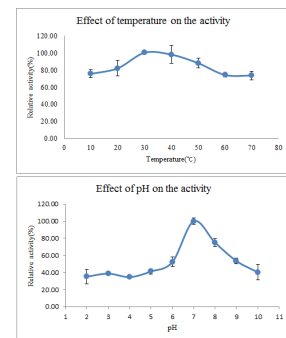
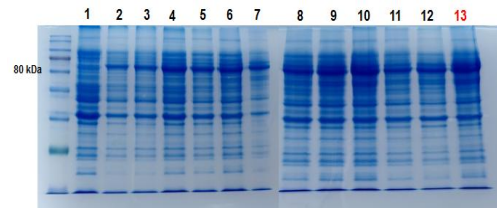


그림. 온도, pH 조건에서 아밀라아제 활성 측정 결과

○ 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

○ 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

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

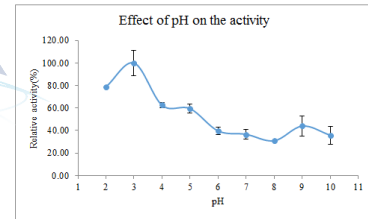
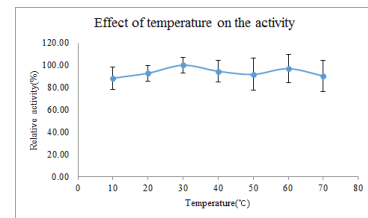


그림. 온도, pH 조건에서 재조합된 아밀라아제 활성 측정 결과

□ 극지미생물 유래 아밀라아제 확보

○ 저온활성 아밀라아제 생산 균주 성장 속도 측정

연구 내용	연구 결과																																																							
<p>온도(10, 20, 25, 30℃) 및 시간에 따른 PAMC 27388 cell growth 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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 <div data-bbox="683 920 1332 1310" style="text-align: center;"> <p>Cell growth</p> <table border="1"> <caption>Approximate data from Cell growth graph</caption> <thead> <tr> <th>Time (hr)</th> <th>10 °C</th> <th>20 °C</th> <th>25 °C</th> <th>30 °C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>25</td><td>0.0</td><td>0.5</td><td>0.2</td><td>0.1</td></tr> <tr><td>50</td><td>0.0</td><td>1.8</td><td>1.2</td><td>0.8</td></tr> <tr><td>75</td><td>0.0</td><td>3.2</td><td>2.5</td><td>2.4</td></tr> <tr><td>93</td><td>0.0</td><td>3.5</td><td>2.2</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>110</td><td>0.5</td><td>2.8</td><td>2.0</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>130</td><td>1.5</td><td>2.8</td><td>2.0</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>150</td><td>1.7</td><td>2.9</td><td>2.0</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>175</td><td>2.3</td><td>2.8</td><td>2.0</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>200</td><td>2.5</td><td>2.8</td><td>2.0</td><td>2.5</td></tr> </tbody> </table> </div> <ul style="list-style-type: none"> - 10, 20, 25, 30℃에서 미생물의 최적성장 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 	Time (hr)	10 °C	20 °C	25 °C	30 °C	0	0.0	0.0	0.0	0.0	25	0.0	0.5	0.2	0.1	50	0.0	1.8	1.2	0.8	75	0.0	3.2	2.5	2.4	93	0.0	3.5	2.2	2.5	110	0.5	2.8	2.0	2.5	130	1.5	2.8	2.0	2.5	150	1.7	2.9	2.0	2.5	175	2.3	2.8	2.0	2.5	200	2.5	2.8	2.0	2.5
Time (hr)	10 °C	20 °C	25 °C	30 °C																																																				
0	0.0	0.0	0.0	0.0																																																				
25	0.0	0.5	0.2	0.1																																																				
50	0.0	1.8	1.2	0.8																																																				
75	0.0	3.2	2.5	2.4																																																				
93	0.0	3.5	2.2	2.5																																																				
110	0.5	2.8	2.0	2.5																																																				
130	1.5	2.8	2.0	2.5																																																				
150	1.7	2.9	2.0	2.5																																																				
175	2.3	2.8	2.0	2.5																																																				
200	2.5	2.8	2.0	2.5																																																				

○ 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.

○ 성장률 확인

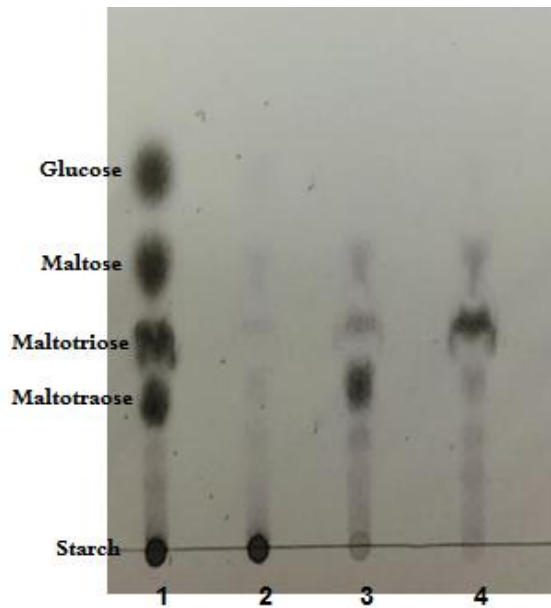
본 연구에서는 각 미생물들의 최적성장 온도를 확인하기 위하여 다양한 온도 (10℃, 20℃, 25℃, 30℃) 에서 3일간 생장을 비교하였다.

PAMC 27388은 10 ~ 30℃에서 생장이 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

연구 내용	연구 결과																																			
<p>온도(10, 20, 25, 30℃) 및 시간에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정</p>	<p>- 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</p> <p>- 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</p> <div data-bbox="678 869 1377 1294" style="text-align: center;"> <p>α-amylase activity</p> <table border="1"> <caption>Estimated data from the α-amylase activity graph</caption> <thead> <tr> <th>Time (hr)</th> <th>10 °C (U/ml)</th> <th>20 °C (U/ml)</th> <th>25 °C (U/ml)</th> <th>30 °C (U/ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0.00</td><td>0.00</td><td>0.00</td><td>0.00</td></tr> <tr><td>50</td><td>0.05</td><td>0.10</td><td>0.15</td><td>0.20</td></tr> <tr><td>79</td><td>0.10</td><td>0.15</td><td>0.27</td><td>0.25</td></tr> <tr><td>100</td><td>0.15</td><td>0.20</td><td>0.20</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>150</td><td>0.05</td><td>0.22</td><td>0.15</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>200</td><td>0.00</td><td>0.15</td><td>0.10</td><td>0.05</td></tr> </tbody> </table> </div> <p>- 25℃, 79시간에 아밀라아제 최대 활성이 0.27 U/ml로 나타났지만 20℃가 다른 온도 조건보다 일정한 아밀라아제 활성 값을 유지</p>	Time (hr)	10 °C (U/ml)	20 °C (U/ml)	25 °C (U/ml)	30 °C (U/ml)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	50	0.05	0.10	0.15	0.20	79	0.10	0.15	0.27	0.25	100	0.15	0.20	0.20	0.15	150	0.05	0.22	0.15	0.10	200	0.00	0.15	0.10	0.05
Time (hr)	10 °C (U/ml)	20 °C (U/ml)	25 °C (U/ml)	30 °C (U/ml)																																
0	0.00	0.00	0.00	0.00																																
50	0.05	0.10	0.15	0.20																																
79	0.10	0.15	0.27	0.25																																
100	0.15	0.20	0.20	0.15																																
150	0.05	0.22	0.15	0.10																																
200	0.00	0.15	0.10	0.05																																
<p>amylase와 기질 반응 후 분해된 생성물 확인</p>	<p>- 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</p> <p>- 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</p>																																			

- TLC chamber에서 전개 후 10% sulfuric acid로
발색하여 오븐에서 10분간 구워 spot 확인



1. Standard

2. PAMC 27388 + 1% starch

3. PAMC 27388 + 1% maltotetraose

4. PAMC 27388 + 1% maltotriose

○ Amylase 활성 측정

Amylase 활성 측정은 다른 온도와 시간 조건에서 배양된 각각의 배양액을 4°C에서 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 μ L에 배양 상등액 200 μ L을 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)를 반응액과 1대 1로 첨가하여 100°C에서 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 1 μ mol의 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°C, 79시간에서 나타났으며 이 값을 Unit으로 환산하면 0.27 U/mL이다. 그러나 20°C의 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°C)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°C에서 3일간 배양한 배양액을 4°C에서 원심분리 (14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 μ L를 사용하였고 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200 μ L를 기질로 사용하여 25°C에서

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 1 μ L를 spotting하였고 건조시킨 후 포화된 chamber에 넣어 전개시켰다. 전개 후, TLC plate를 건조시켰고 10% sulfuric acid로 발색하여 110 $^{\circ}$ C 오븐에서 10분간 구워 spot을 확인하였다.

○ Amylase에 의해 생산된 생성물 확인

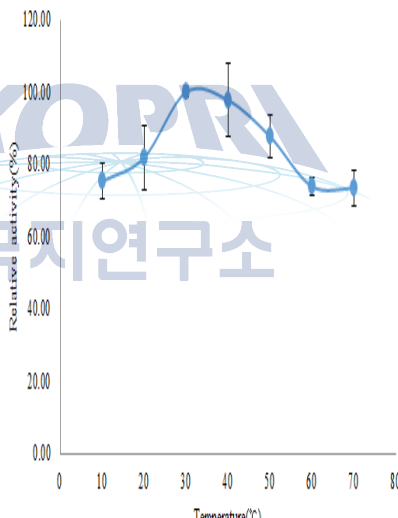
본 연구에서는 저온 활성 amylase의 기질반응에 의해 생산된 생성물이 무엇인지 확인하는 실험을 진행하였다.

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

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

극지연구소

○ 저온활성 아밀라아제 활성 최적화

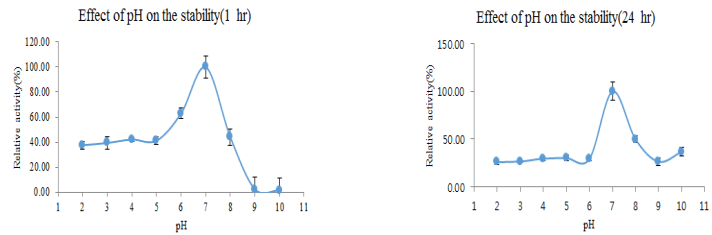
연구 내용	연구 결과																								
<p>온도에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 20℃에서 3일간 배양한 cell을 4℃에서 원심분리 (14,000 rpm, 10 min)한 후 상등액 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70℃)에서 10분간 반응 - 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용 <div style="text-align: center;"> <p>Effect of temperature on the activity</p>  <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Temperature(°C)</th> <th>Activity</th> <th>Relative activity</th> </tr> </thead> <tbody> <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> </tbody> </table> </div>	Temperature(°C)	Activity	Relative activity	10	0.72	75.32	20	0.79	81.84	30	0.96	100.00	40	0.94	97.83	50	0.84	87.82	60	0.71	74.01	70	0.70	73.36
Temperature(°C)	Activity	Relative activity																							
10	0.72	75.32																							
20	0.79	81.84																							
30	0.96	100.00																							
40	0.94	97.83																							
50	0.84	87.82																							
60	0.71	74.01																							
70	0.70	73.36																							
<p>온도에 따른 PAMC 27388 amylase stability 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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 																								

	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="678 291 989 627"> <p>Effect of temperature on the stability(1 hr)</p> </div> <div data-bbox="1005 291 1380 627"> <p>Effect of temperature on the stability(24 hr)</p> </div> </div> <table border="1" style="margin: 10px auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Temperature(°C)</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> </thead> <tbody> <tr><td>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> </tbody> </table>	Temperature(°C)	1 hr		24 hr		Activity	Relative activity	Activity	Relative activity	24	0.19	91.66	0.87	97.19	20	0.20	94.44	0.87	97.75	30	0.21	100.00	0.80	89.33	40	0.19	92.93	0.89	100.00	50	0.19	91.41	0.88	98.88	60	0.19	91.66	0.88	98.88	70	0.19	90.53	0.67	75.28
Temperature(°C)	1 hr		24 hr																																										
	Activity	Relative activity	Activity	Relative activity																																									
24	0.19	91.66	0.87	97.19																																									
20	0.20	94.44	0.87	97.75																																									
30	0.21	100.00	0.80	89.33																																									
40	0.19	92.93	0.89	100.00																																									
50	0.19	91.41	0.88	98.88																																									
60	0.19	91.66	0.88	98.88																																									
70	0.19	90.53	0.67	75.28																																									
<p>pH에 따른 PAMC 27388 amylase activity 측정</p>	<p>- 20°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 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°C에서 10분간 반응</p> <p>- 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="678 1579 1093 1881"> <p>Effect of pH on the activity</p> </div> <div data-bbox="1125 1512 1388 1926"> <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>pH</th> <th>Activity</th> <th>Relative activity</th> </tr> </thead> <tbody> <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> </tbody> </table> </div> </div>	pH	Activity	Relative activity	2	0.39	35.19	3	0.42	38.72	4	0.38	34.62	5	0.45	41.20	6	0.57	52.28	7	1.09	100	8	0.82	74.99	9	0.58	53.42	10	0.44	40.25														
pH	Activity	Relative activity																																											
2	0.39	35.19																																											
3	0.42	38.72																																											
4	0.38	34.62																																											
5	0.45	41.20																																											
6	0.57	52.28																																											
7	1.09	100																																											
8	0.82	74.99																																											
9	0.58	53.42																																											
10	0.44	40.25																																											
<p>pH에 따른 PAMC 27388</p>	<p>- 20°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 원심분리</p>																																												

amylase stability 측정

(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 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°C에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일



Temperature(°C)	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

20°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 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°C에서 10분간 반응

- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일

다양한 시약에 대한 PAMC 27388 amylase activity 영향 평가

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



○ 온도에 따른 amylase activity, stability 측정

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

온도에 따른 amylase activity 측정은 20°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 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°C)에서 10분간 반응시켰다.

온도에 따른 amylase stability 측정은 20°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 10 min)한 상등액을 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70°C)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°C에서 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.

○ 온도에 따른 amylase activity, stability 확인

Amylase activity에 대한 최적 온도는 30°C이고 20 - 50°C에서 80% 이상의 활성을 가지고 있어 넓은 온도 범위에서 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한 amylase stability는 1시간 반응 조건에서는 30°C, 24시간 반응 조건에서는 40°C에서 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°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 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°C에서 3일간 배양한 cell을 4°C에서 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°C에서 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.

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

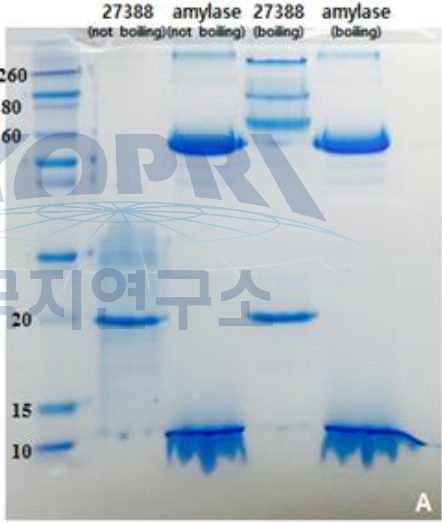
DNS 반응은 위의 amylase activity, stability 측정과 동일하다.

○ 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 metalloenzyme이나 이 저온 유래 미생물에서 생산된 아밀라아제는 대부분의 α -amylase와 다른 특성을 갖는 것으로 확인되었다.

○ SDS-PAGE 분석

연구 내용	연구 결과
<p>PAMC 27388 배양 상등액을 이용한 SDS-PAGE 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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 

○ PAMC 27388이 분비한 extracellular protein 준비

MB broth 43 mL을 250 ml triangular flask에 넣고 멸균한 후 미생물을 접종하여 20°C에서 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 μ L를 첨가하여 5 min동안 반응시킨 후 5X loading dye를 첨가하였고 다른 sample은 5X loading dye를 첨가한 후 5분 동안 boiling을 하였다.

○ SDS-PAGE 전기영동 준비

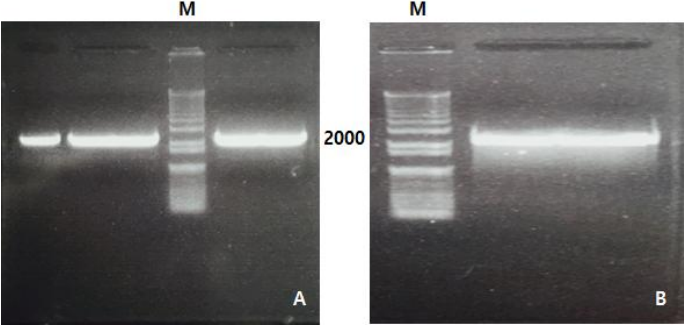
SDS-PAGE 전기영동을 위해 12% polyacrylamide gel을 제조하였고 준비된 extracellular protein을 SDS-PAGE에 15 μ L를 삽입하여 125V에서 약 90분 동안 전기영동을 진행하였다. 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue로 염색하였고 destaining은 acetic acid, methanol과 water을 1 : 1: 8로 혼합한 용액을 이용하였다.

○ 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.

□ 아밀라아제 과발현 생산균주 클로닝과 아밀라아제 정제

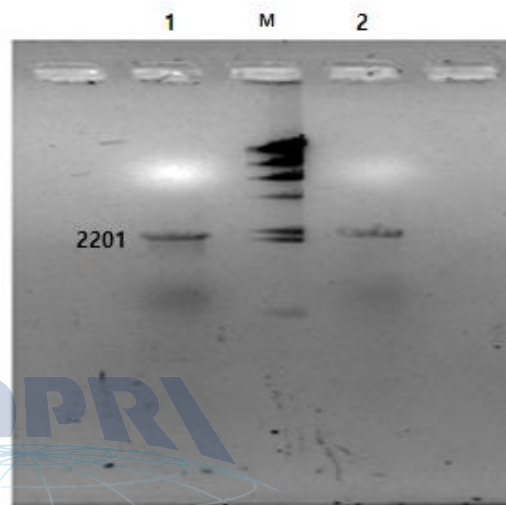
○ 아밀라아제 과발현 생산균주 클로닝

연구 내용	연구 결과
<p>아밀라아제 유전자를 포함한 insert 준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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°C for 20 sec, annealing 58°C for 40 sec, extension 72°C for 1 min 20 sec, 28 cycles) - PCR product를 NdeI과 HindIII를 이용하여 enzyme restriction을 수행(벡터에 삽입할 insert를 준비) <div style="text-align: center;">  </div> <p>FIG. Preparation of a 2163 bp insert (α-amylase). (A) polymerase chain reaction of α-amylase, (B) Restriction enzyme treatment</p>
<p>insert 삽입을 위한 벡터 준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> - pET28a plasmid를 plasmid DNA purification kit(iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 정제한 후 NdeI과 HindIII 제한효소 처리

	 <p>FIG. Preparation of a vector. (A) pET28a plasmid DNA purification, (B) Restriction enzyme treatment</p>
Ligation & transformation	<ul style="list-style-type: none"> - NdeI과 HindIII로 처리한 insert인 α-amylase 유전자와 pET28a 벡터를 16°C에서 3시간 30분 ligation 반응 - 그 후 DH5a competent cell에 ligation product를 10 ul 주입 후 30분간 ice에서 incubation 한 후 42°C에서 1분 동안 heat shock을 진행하였고 다음으로 2분간 ice에 incubation하여 LB broth 700 ul를 주입하여 37°C에서 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	<ul style="list-style-type: none"> - 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°C for 20 sec, annealing 58°C for

40 sec, extension 72°C for 1 min 20 sec, 28 cycles)

- 전기영동으로 결과를 확인하였을 때, 밴드가 α -amylase size인 약 2000 bp에 존재하여 (주) 마크로젠 (Seoul, South Korea)에 의뢰하여 recombinant의 sequence를 확인
- 그 결과 1번 콜로니가 α -amylase sequence로 확인되었고 다음 실험은 1번 콜로니로 진행



- recombinant plasmid를 plasmid DNA purification kit(iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 정제한 후, BL21 competent 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°C에서 3일 동안 배양하였다.

E. coli DH5a가 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°C에서 배양되었고, pET-28a(+)에 카나마이신 저항성 유전자가 포함되어 있어 카나마이신이 최종농도 30 ug/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

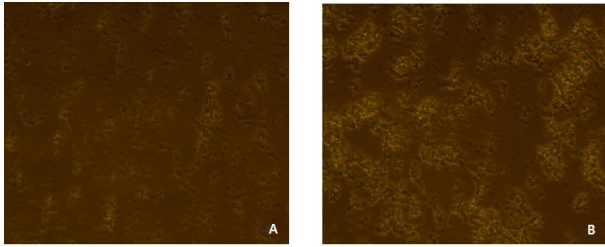
○ DNA 조작 및 서열분석

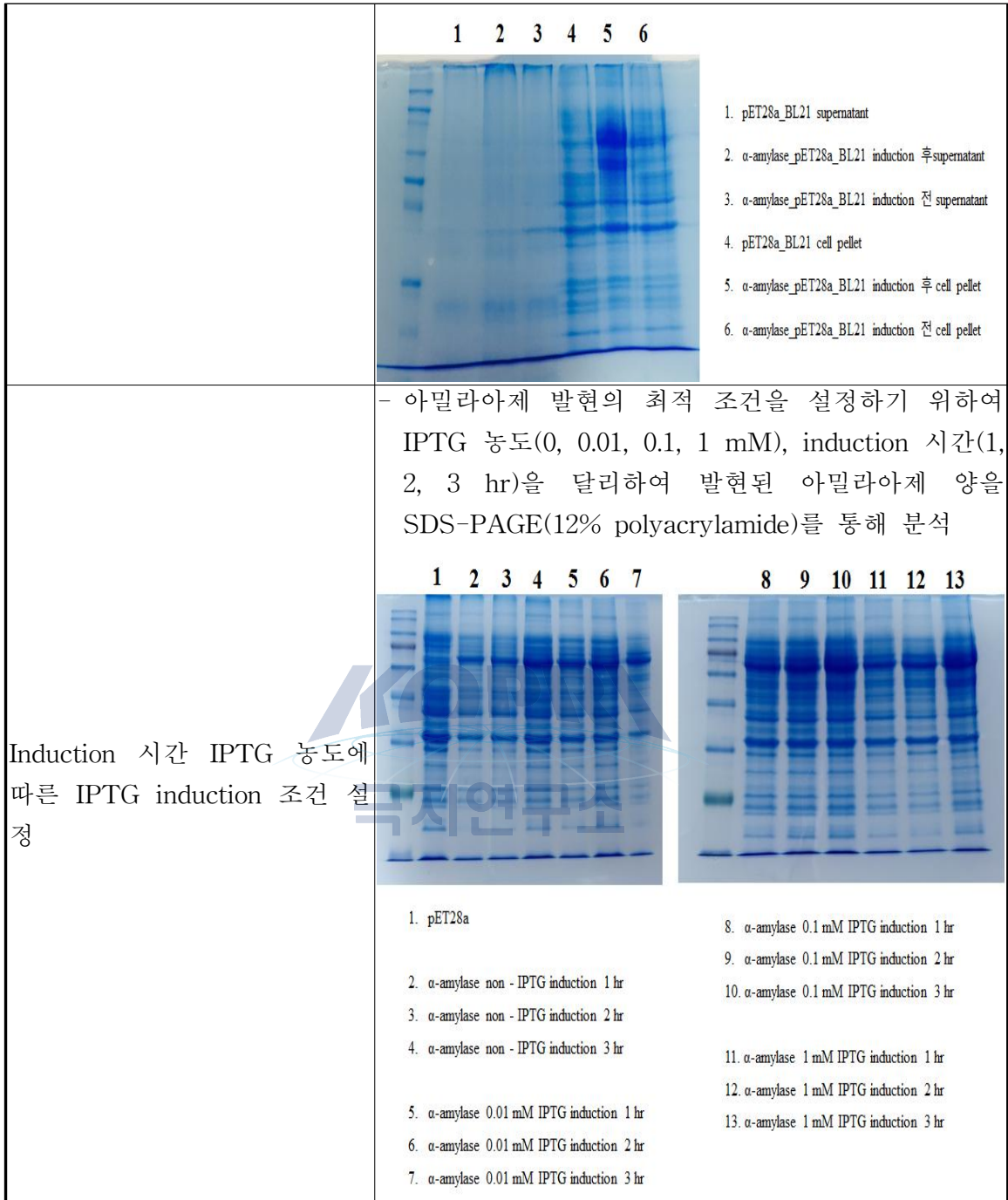
DNA 조작은 샘브록 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 진행하였다. PAMC 27388의 게놈 DNA는 genomic DNA mini kit (Invitrogen Co, California, USA)를 이용하여 추출하였다. 제한효소는 NEB (Ipswich, Massachusetts)에서 구입하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 추출은 플라스미드 정제 키트 (iNtRON Biotechnology, Sungnam, South Korea)를 이용하여 진행하였다.

○ α -Amylase 암호화 유전자의 클로닝

PAMC 27388의 게놈 DNA에서 α -amylase 서열은 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-AAA CAT ATG GTG ACC ACC ACT ACG-3'] 및 안티센스 [5'-AAA AAG CTT TCA CCG GAG CCG TC-3'] ; 상기 센스 프라이머 안에 밑줄 친 서열은 *NdeI* 인식 자리이고, 안티센스 프라이머 안에 밑줄 친 서열은 *HindIII* 인식 자리이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭된 서열은 *NdeI*과 *HindIII*로 절단되었고, *NdeI/HindIII*로 절단된 pET-28a(+)에 연결되었다. 연결된 재조합 DNA는 *E. coli* DH5a에 형질전환되었다. 콜로니 PCR과 서열 분석 후 발현을 위하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환되었다.

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

연구 내용	연구 결과
1 mM IPTG induction	<ul style="list-style-type: none"> - 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 induction 진행 - Induction 전과 후 cell을 현미경으로 관찰 <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">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</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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



○ 대장균에서 α -Amylase 유전자 발현

유전자의 발현은 전배양한 α -amylase 생산 균주를 37°C, LB+kanamycin 15 mL 액체 배지 접종하여 O.D₆₀₀ = 0.5 - 0.6에 도달하였을 때, isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG)를 1mM 첨가하고 30°C에서 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 μ L 첨가하였다. 그 후 ice에서 3분간 반응시키고 즉시 42°C 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.

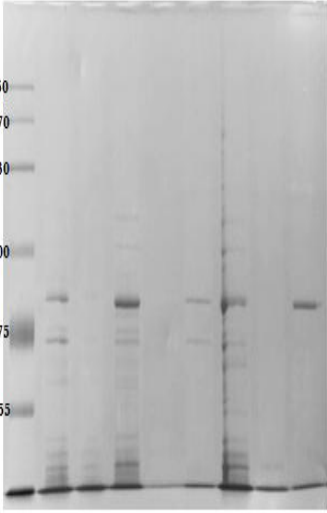
확인 결과, induction 후 cell pellet에 약 80 kDa의 아밀라아제 단백질들이 과발현되었다는 것을 확인하였다.

○ 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.

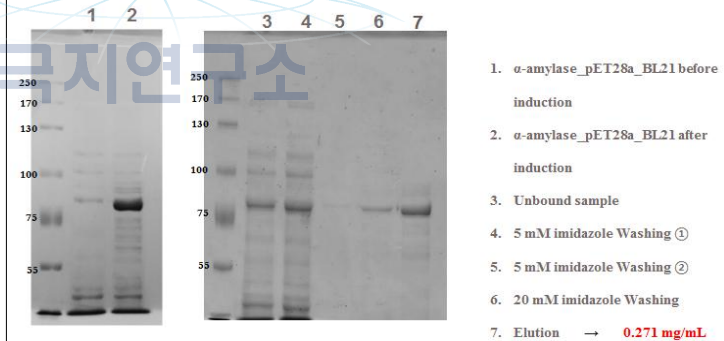
실험 결과, IPTG 농도가 1 mM이고 induction 시간이 증가할수록 많은 양의 아밀라아제 단백질이 발현된다는 것을 확인하였다. 따라서 다음 실험 단계인 아밀라아제 정제에서는 1 mM IPTG를 이용하여 4시간동안 induction을 진행한 후 단백질 정제 실험을 진행하였다.

○ 아밀라아제 생산 재조합 균주로부터 생산된 아밀라아제 정제

연구 내용	연구 결과
<p>Small scale His-tagged protein purification</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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 NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl pH 5.9) 100 ul로 elution - SDS-PAGE(8% polyacrylamide)를 통해 정제 확인 <div style="text-align: center;"> <p>1 2 3 4 5 6 7 8</p>  </div>
<p>Large scale His-tagged protein purification</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전배양한 α-amylase 생산 균주를 37°C, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30°C에서 1 mM IPTG induction한 1.5 ml cell pellet에

denaturing lysis buffer(8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl pH 8.0) 4 ml, lysozyme(50 mg/mL) 5 ul를 첨가하여 resuspension 후 20분간 상온에서 incubation, 그 후 100 mM PMSF 3 ul를 첨가하여 4°C, 1400 rpm에서 10분 동안 원심분리

- column에 Ni-NTA agarose을 2.5 ml 넣은 후 증류수로 washing하고 binding buffer(8 M Urea, 50 mM Na₂HPO₄ pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole)로 equilibration, 위의 상등액을 column에 넣어 resuspension 후 1시간동안 4°C에서 shaking incubation, Unbound material이 내려가고 binding buffer로 1차 washing 후 washing buffer(8 M Urea, 50 mM Na₂HPO₄ 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

○ 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 NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 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.

○ 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 Ni²⁺-NTA affinity chromatography를 이용하여 재조합 단백질을 용출한 후, 재조합 단백질이 본래의 구조를 가질 수 있도록 urea를 서서히 제거하는 투석과정을 진행하였다.

세포는 원심분리(4°C, 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°C, 15 min, 14,000 x g)에 의해서

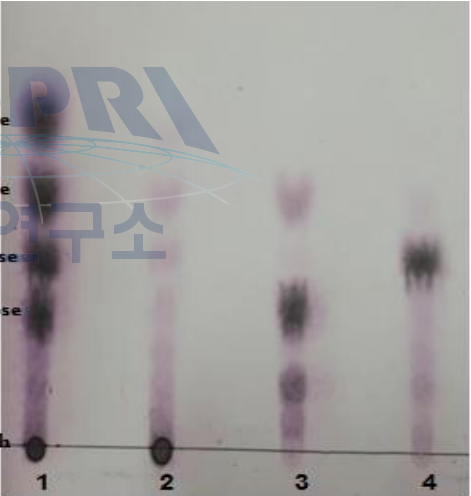
분리되었다. 얻어진 상등액은 8M 유레아, 0.02M 트리스-HCl pH 8.0, 0.5M 염화나트륨 및 0.005M 이마다졸에 의해 평형화된 Ni^{2+} -NTA 친화성 레진의 컬럼에 처리되었고, 8M 유레아, 0.02M 트리스-HCl pH 8.0, 0.5M 염화나트륨 및 0.02M 이마다졸로 세척되었다. α -amylase는 완충용액내의 400mM 이마다졸을 이용하여 용출되었다. 정제된 샘플을 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 50 mM Tris pH 8.0 buffer에 2시간 간격으로 Urea 농도를 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0 M로 낮추면서 투석을 진행하였다.

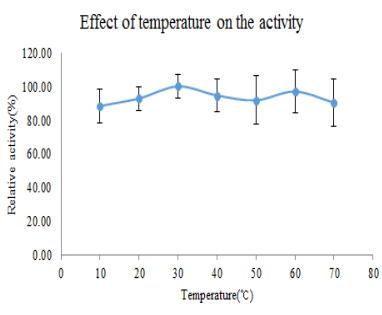
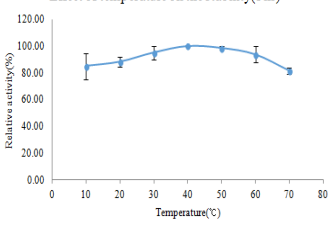
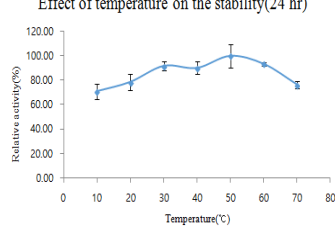
단백질 농도는 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준방법으로 수행되어진 소디움 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해 확인되었다.

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

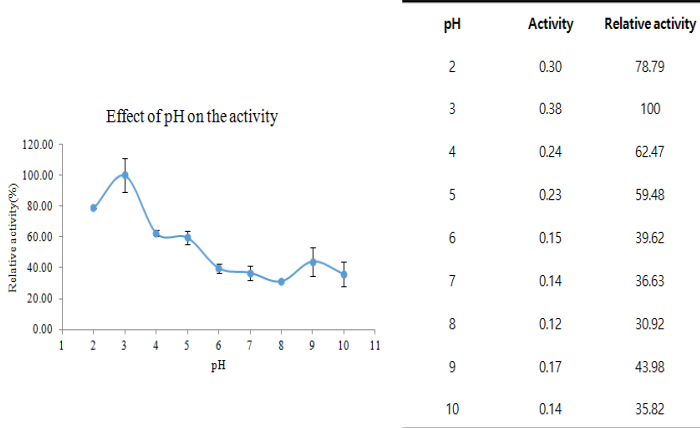


○ 정제된 아밀라아제 특성 분석 및 characterization

연구 내용	연구 결과
<p>amylase와 기질 반응 후 분해된 생성물 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 투석한 샘플 200 ul을 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200 ul를 기질로 사용하여 25°C에서 24 hr 동안 반응 - Thin layer chromatography를 수행하기 위해 전개 용매로 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 <div style="text-align: center;">  <p style="margin-top: 10px;"> 1. Standard 2. α-amylase + 1% starch 3. α-amylase + 1% maltotetraose 4. α-amylase + 1% maltotriose </p> </div>
<p>온도에 따른 α-amylase activity 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 투석한 샘플 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70°C)에서 10분간 반응 - 반응액에 DNS 시약을 1 대 1로 첨가한 후 boiling

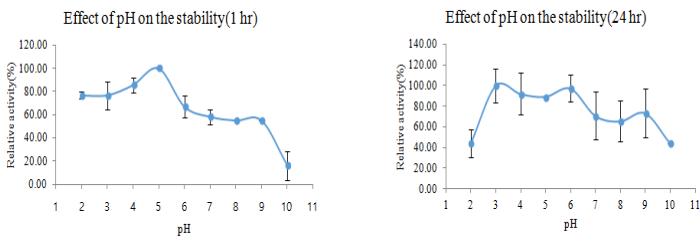
	<p>하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 최종 투석 buffer 혼합액을 blank로 사용</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Temperature(°C)</th> <th>Activity</th> <th>Relative activity</th> </tr> </thead> <tbody> <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> </tbody> </table> </div>	Temperature(°C)	Activity	Relative activity	10	0.52	88.39	20	0.54	92.85	30	0.58	100.00	40	0.55	94.64	50	0.54	91.78	60	0.57	96.96	70	0.53	90.35																				
Temperature(°C)	Activity	Relative activity																																											
10	0.52	88.39																																											
20	0.54	92.85																																											
30	0.58	100.00																																											
40	0.55	94.64																																											
50	0.54	91.78																																											
60	0.57	96.96																																											
70	0.53	90.35																																											
<p>온도에 따른 α-amylase stability 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 투석한 샘플 200 ul을 1, 24 hr동안 각 온도 조건(10 - 70°C)에서 incubation - incubation한 각각의 샘플에 200 ul에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응 - 반응액에 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 <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Effect of temperature on the stability(1 hr)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Effect of temperature on the stability(24 hr)</p>  </div> </div> <table border="1" style="margin: 20px auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Temperature(°C)</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> </thead> <tbody> <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> </tbody> </table>	Temperature(°C)	1 h		24 h		Activity	Relative activity	Activity	Relative activity	10	0.51	85.06	0.40	70.70	20	0.53	88.19	0.44	78.44	30	0.57	95.14	0.52	91.71	40	0.60	100.00	0.51	90.05	50	0.59	98.61	0.57	100.00	60	0.56	93.75	0.53	93.37	70	0.49	81.49	0.43	76.23
Temperature(°C)	1 h		24 h																																										
	Activity	Relative activity	Activity	Relative activity																																									
10	0.51	85.06	0.40	70.70																																									
20	0.53	88.19	0.44	78.44																																									
30	0.57	95.14	0.52	91.71																																									
40	0.60	100.00	0.51	90.05																																									
50	0.59	98.61	0.57	100.00																																									
60	0.56	93.75	0.53	93.37																																									
70	0.49	81.49	0.43	76.23																																									
<p>pH에 따른 α-amylase activity 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 투석한 샘플 200 ul에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 ul를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응 - 반응액에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 1 																																												

대 1로 첨가한 후 boiling하여 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기질이 첨가된 buffer에 증류수를 첨가한 혼합액을 blank로 사용



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°C에서 10분간 반응
- DNS 반응은 amylase activity 측정과 동일



Temperature(°C)	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 - 투석한 샘플 200 ul와 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 다양한 시약이 첨가된 buffer

평가

200 ul를 혼합하여 25°C에서 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		
A m m o n i u m 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

○ 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°C, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30°C에서 1 mM IPTG induction한 후 Large scale protein purification과 투석을 진행하여 활성이 있는 아밀라아제 단백질을 얻었다.

얻어진 단백질 용액 200 μ L를 사용하였고 50 mM Tris-HCl에 2% soluble starch, 2% maltotetraose, 2% maltotriose가 각각 포함된 용액 200 μ L를 기질로 사용하여 25°C에서 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 1 μ L를 spotting하였고 건조시킨 후 포화된 chamber에 넣어 전개시켰다. 전개 후, TLC plate를 건조시켰고 10% sulfuric acid로 발색하여 110°C 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, maltotriose와 기질반응 후 최종 산물로 모두 maltose를 생산하였다.

또한 흥미로운 점은 PAMC 27388 균주에서 생산된 amylase와 비슷하게 maltotetraose와 maltotriose와의 기질반응에서 maltotetraose와 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.

○ 온도에 따른 α -amylase activity, stability 측정

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

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

얻어진 단백질 용액 200 μ L에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μ L를 혼합하여 각 온도 조건(10 - 70°C)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°C)에서 incubation한 후 incubation한 각각의 샘플에 200 μ L에 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μ L를 혼합하여 25°C에서 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 1 μ mol의 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°C이고 20 - 60°C에서 90% 이상의 활성을 가지고 있어 넓은 온도 범위에서 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한 α -amylase stability는 1시간 반응 조건에서는 40°C, 24시간 반응 조건에서는 50°C에서 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 균주를 37°C, LB+kanamycin(30 ug/ml) 100 ml 액체 배지에서 O.D600 = 0.5까지 키운 후 4시간 동안 30°C에서 1 mM IPTG induction한 후 Large scale protein purification과 투석을 진행하여 얻어진 활성이 있는 아밀라아제 단백질이다.

얻어진 단백질 용액 200 μ L에 pH 2.0 - 10.0 범위의 50 mM 용액에 2% soluble starch가 첨가된 buffer 200 μ L를 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 μ L를 혼합하여 25°C에서 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 1 μ mol의 글루코오스가 방출되기 위해 필요한 효소의 양으로 정의된다.

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

○ pH에 따른 α -amylase activity, stability 확인

α -Amylase activity에 대한 최적 pH는 3.0이고 혐기성에서는 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 μ L와 50 mM Tris-HCl pH 7.0 에 2% soluble starch와 각 시약이 첨가된 buffer 200 μ L를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. control은 위의 buffer에서 시약을 제외한 용액을 사용하였다.

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

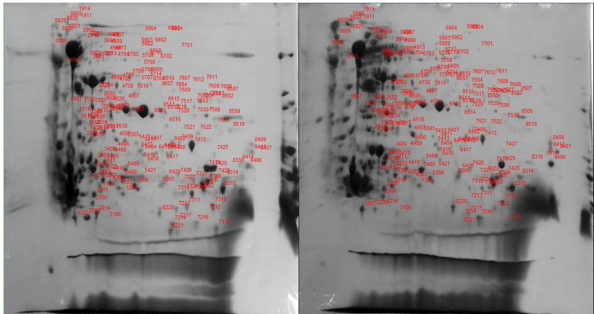
○ 다양한 시약에 대한 α -amylase activity 영향 확인

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.

□ 저온활성 아밀라아제 생산 균주 Proteomic analysis

○ 다른 온도 조건에서 배양된 PAMC 27388 단백질 비교 분석

연구 내용	연구 결과
<p>2D-Electrophoresis를 통한 20, 30°C에서 배양한 PAMC 27388 단백질 비교</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 20, 30°C에서 3일간 배양한 cell 50 ml을 각각 4°C에서 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°C에서 incubation하면서 30분 간격으로 vortexing(overnight) - Cell을 lysis한 각 샘플에 TCA 800 ul를 첨가하여 2시간 동안 4°C에서 incubation하며 30분 간격으로 vortexing후 4°C에서 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°C에서 vortexing(overnight) 각 샘플을 4°C에서 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 <div style="text-align: center;">  </div> <p>하고 이것을 strip(18 cm, pH 3 - 10 NL)와 swelling(overnight)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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

○ 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 μ L를 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 μ l 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.



□ 3차년도

- 프로티아제 생산 극지 미생물의 염색체 서열 분석
 - 454 + Illumina combined assembly을 이용한 염색체 서열 분석 (Next Generation Sequencing)
 - gap filling 이전 단계의 scaffold 또는 contig 수준에서의 서열 분석 결과 확보
- 프로티아제 생합성 유전자의 cloning
 - 염색체 서열 분석 후 얻어진 프로티아제 생합성 유전자를 발현 vector에 cloning 하여 외래 host를 이용한 프로티아제 발현 연구
- 극지 미생물 유전체의 기능성 분석을 위한 프로티아제 생산 돌연변이체 확보
 - 물리적(방사선), 화학적(EMS) 등의 돌연변이원을 이용한 프로티아제 생산 저해 돌연변이주 또는 프로티아제생산 고효율 돌연변이주의 탐색
 - 단백질 분석을 이용한 돌연변이체의 특성 파악



그림. NGS 분석장비



○ 게놈 시퀀싱과 어셈블리

Planococcus sp. PAMC 21323의 게놈은 hybrid strategy를 기반으로 염기서열을 읽었다. 454 파이로시퀀싱의 8 kb paired-end library와 일루미나의 150 bp paired-end library에 의해 각각 238,440번과 58,949,907번을 읽었다. 얻어진 게놈 시퀀싱의 데이터는 CLCbio CLC genomics Workbench 6.5와 Roche gsAssembler 2.6을 이용하여 어셈블리를 진행하여 2개의 scaffold와 18개의 contig가 만들어졌다. contig들 사이의 빈 공간은 PCR과 생거 시퀀싱을 이용해 제거 하였고, 그 결과 3,199,864 bp의 게놈 사이즈를 얻었다. 이렇게 찾은 *Planococcus* sp. PAMC 21323의 게놈 시퀀싱을 Genbank database에 게재했다 (CP009129).

○ 게놈 어노테이션

염기서열이 모두 밝혀진 게놈에서 전사해석틀(ORF)를 Glimmer 3.02와 Rapid annotation using Subsystem Technology(RAST) 서버를 이용하여 예측하였다. BLASTP 분석과 InterProScan, Pfam, TIGRFam 데이터베이스를 이용하여 ORF의 기능들을 파악했다. tRNA와 rRNA는 tRNAscan-SE와 HMMER를 이용하여 알아내고, 프로파지 인자와 유전자 섬 (GI)은 PHAST와, SIGL_HMM와 IslandPath-DIMOB 알고리즘을 기반으로 한 island-veiwew를 이용하여 확인하였다. 다른 다양한 인자들의 특징은 TMHMM과 SignalP를 이용하여 예측했다.

○ 게놈의 특성

Planococcus sp. PAMC 21323은 3,196,500 bp의 염색체 DNA와 3,364 bp의 플라스미드 DNA를 가져 총 3,199,864 bp의 게놈을 가지고 있으며 GC 비율은 39.3%이며 3,196,500 bp의 염색체 DNA에는 60개의 tRNA와 24개의 rRNA가 포함된 3,107개의 ORF를 지니고 있다. 염색체의 경우 전체 유전자의 86.3%가 단백질을 코딩하고 있는 유전자이며 단백질을 코딩하는 유전자의 85.2%는 기능을 예측할 수 있지만, 남은 455개의 유전자의 단백질은 가정을 하였다. 그리고 2,676개의 ORF는 최소한 하나나 여러 개의 Pfam domain을 포함하고 있다. *Planococcus* sp. PAMC 21323의 게놈에 대한 요약과 COG의 카테고리는 표 3, 4에 정리되어 있다. 현재 NCBI에 등록된 *Planococcus* 속 중에 특성들이 밝혀진 18개의 균주 중에 10개의 균주의 게놈 염기서열을 이용하여 다른 종의 염기서열과의 관계를 분석하기위해

JSpecies의 평균 뉴클레오타이드 유사성 (average nucleotide identity, ANI)와 genome to genome distance calculator(GGDC)를 이용했다. 분석 결과는 표 6에 나타나있으며, 낮은 DNA-DNA 상동성 값(< 60%)과 ANI(<96%)를 통해 기존에 보고된 균주들과 다른 종의 균주임이 밝혀졌다. 하지만 89.5%의 단백질을 코딩하는 염기서열이 *P. antarcticus*나 *P. donghaensis*와 높은 유사성을 보였다. 또한 상호 BLASTP 분석을 통해 최소 2,700개의 공통적인 유전자인 ORF를 서로 가지고 있다고 나타났다. 이와 같은 유전적 낮은 다양성은 비교한 균주들의 지역적 환경이 비슷하기 때문이다.

Table. Genome statistics of PAMC21323

Attribute	Value	% of total ^a
Genome size (bp)	3,199,864	100.00
DNA coding region (bp)	2,761,854	86.31
DNA G+C content	1,258,557	39.33
Number of replicons	2	-
Total genes	3171	100.00
RNA genes	84	2.65
rRNA genes	24	0.76
tRNA genes	60	1.89
Protein coding genes	3,087	97.35
Gene with predicted function	2,632	83.00
Genes in paralog clusters	2,130	67.17
Genes assigned to COGs	2,294	72.34
Genes assigned Pfam domains	2,676	84.39
Genes with signal peptides	128	4.04
Genes with transmembrane helices	840	26.49
CRISPR repeats	1	-

a) The total is based on either the size of the genome in base pairs or the total number of protein coding genes in the annotated genome.

Table. Number of genes associated with general COG functional categories

Code	Value	% age	Description
J	164	6.40	Translation
A	0	0.00	RNA processing and modification
K	169	6.60	Transcription
L	118	4.61	Replication, recombination and repair
B	1	0.04	Chromatin structure and dynamics
D	33	1.29	Cell cycle control, mitosis and meiosis
Y	0	0.00	Nuclear structure
V	41	1.60	Defense mechanisms
T	103	4.02	Signal transduction mechanisms
M	129	5.04	Cell wall/membrane biogenesis
N	40	1.56	Cell motility
Z	0	0.00	Cytoskeleton
W	0	0.00	Extracellular structures
U	44	1.72	Intracellular trafficking and secretion
O	85	3.32	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	129	5.04	Energy production and conversion
G	166	6.48	Carbohydrate transport and metabolism
E	254	9.92	Amino acid transport and metabolism
F	82	3.20	Nucleotide transport and metabolism
H	105	4.10	Coenzyme transport and metabolism
I	120	4.69	Lipid transport and metabolism
P	141	5.51	Inorganic ion transport and metabolism
Q	61	2.38	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	339	13.24	General function prediction only
S	237	9.25	Function unknown
-	877	27.66	Not in COGs

○ 계놈 염기서열에 대한 고찰

- 다양한 전이 인자

PAMC 21323의 계놈은 전이 인자로 추정되는 15개의 인자를 가지고 있으며, PHAST을 이용하여 11개의 불완전한 프로파지 구역을 찾아냈다. 11개의 불완전한 프로파지 구역에서 ORF로 추정된 103개의 ORF가 있었지만, PAMC 21323에서 찾은 것과 부합하는 파아지는 찾지 못했다. 찾은 전이 인자 중 9개의 유전자는 islandviewer 3.0을 통해 확인된 GI에 있었다. PAMC 21323의 계놈에서 GI로 추정된 3개의 구역은 전체 염색체의 1.6%를 차지하고 52개의 단백질 코딩 염기서열을 가지고 있으며 그 중 일부는 방어 시스템에 이용되는 단백질로, 외부 DNA를 인식하고 제거하는 제한수식계(R/M system)에 이용되는 단백질도 포함되어 있다. R/M system의 upstream에서 영양분 고갈이나 온도 스트레스와 같이 다른 종류의 스트

레스독소-항독소 인자를 찾았다. 뿐만 아니라 세포벽의 안정성과 삼투압적 스트레스에 대해 견딜수 있게 해주는 세포 벽 변형 효소도 포함되어 있었다.

- 스트레스 반응 시스템

박테리아는 추운 환경에 적응하기 위해 다양한 적응 방법들을 가지게 되는데 그 중 하나는 다른 시그마 인자를 이용하는 것으로 *Planococcus* sp. PAMC 21323은 13개의 다른 시그마 인자를 가지고 있다. 그 중 SigB(Plano_0442)는 일반적인 스트레스 단백질로 그람 양성균의 주된 대안적인 시그마 인자이다. PAMC 21323은 SigB 오페론을 가지고 있으며, 이 오페론은 stressosome에 의해 조절이 되는데, stressosome은 영양 고갈과 환경적 스트레스에 대해 반응하는 인산가수분해효소를 활성화시킨다. PAMC 21323의 게놈에는 RsbTU(Plano_0438-0439)와 RsbPQ(Plano_2968-2969), 이 2가지의 스트레스에 대해 반응하는 인산가수분해효소 시스템이 있으며, 이 시스템들은 RsbV의 anti-anti sigma factor 인산화를 통해 SigB를 조절한다. RsbP 인산화효소는 영양분과 같은 에너지 스트레스에 대해 주로 반응하며, RsbU 인산화효소는 RsbT 키나아제의 활성화에 의해 자극이 된다. 외부 환경적 스트레스에 의해 반응하는 stressosome은 RsbT와 RsbR, RsbS로 이루어져 있으며, 이 중 RsbT은 stressosome의 주된 요소이다.

Table. Summary of known general stress, cold stress and osmotic stress response protein found in the PAMC21323 genome

Function	COG	Gene	Locus_tag
<i>General stress</i>			
RNA polymerase sigma 70	COG0568	rpoD	Plano_1287
alternative sigma factor	COG1191		Plano_0145, Plano_0442, Plano_1401, Plano_2064, Plano_2219,
	COG1595		Plano_0015, Plano_0089, Plano_0602, Plano_0977, Plano_1811, Plano_2905, Plano_2484, Plano_1540
Universal stress protein	COG0589	uspA	Plano_0387, Plano_0595, Plano_0841, Plano_1089, Plano_1095, Plano_2895
carbon starvation protein A	COG1966	cstA	Plano_0277, Plano_2948
molecular chaperone	COG0484	DnaJ	Plano_1268
	COG0576	GrpE	Plano_1266
	COG0443	DnaK	Plano_1267
	COG0234	GroS	Plano_0455
	COG0459	GroL	Plano_0456
	COG1281	Hsp33	Plano_2540, Plano_3081
<i>Cold stress</i>			
cold shock protein	COG1278	csp	Plano_0326, Plano_1603, Plano_1604, Plano_1643
cold shock dead-box protein A	COG0513	deaD	Plano_0429
ribosome-binding factorA	COG0858	rbfA	Plano_1880
polynucleotide phosphorylase	COG1185	pnp	Plano_1876
	COG0532	IF-2	Plano_1882
translation initiation factors	COG0361	IF-1	Plano_0062
	COG0290	IF-3	Plano_1127
transcription termination factor factor	COG0195	NusB	Plano_1885
	COG0781	NusA	Plano_1349

이 밖에도 PAMC 21323의 게놈을 분석한 결과 64개의 방어와 스트레스 반응과 관련된 것으로 추정되는 유전자들이 발견됐다. 그 중 12개는 저온 스트레스에 관한 유전자이고, 25개의 삼투압 스트레스와 관련된 유전자, 27개의 산화적 스트레스와 관련된 유전자를 발견했다.

Table. Summary of known general stress, cold stress and osmotic stress response protein found in the PAMC21323 genome (Cont')

Function	COG	Gene	Locus_tag
<i>osmotic stress</i>			
proline:sodium symporter	COG0591	putP	Plano_0349
glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein	COG2113	ProX	Plano_2654
glycine betaine ABC transporter permease	COG4176	ProW	Plano_2655
glycine betaine ABC transporter ATP-binding protein	COG4175	ProV	Plano_2656
glycine betaine/L-proline ABC transporter, substrate-binding protein	COG1732	OpuC	Plano_0364
glycine betaine/L-proline ABC transporter, permease	COG1174	OpuB	Plano_0363
glycine betaine/L-proline ABC transporter, ATP-binding protein	COG1125	OpuA	Plano_0362
choline-glycine betaine transporter	COG1292	BetT	Plano_0270, Plano_0350, Plano_0460, Plano_0920, Plano_1470, Plano_2839
glycerol uptake facilitator	COG0580	GlpF	Plano_2245
<i>Carotenoid</i>			
Phytoene desaturase	COG1233		Plano_2714, Plano_2717, Plano_2718, Plano_0493, Plano_0604, Plano_2354
phytoene synthase	COG1562		Plano_2716, Plano_0409
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	COG0204		Plano_1628, Plano_1798, Plano_2712

저온의 환경에서 박테리아가 성장하기 위한 또 다른 전략으로 mRNA의 번역과 변성을 조절하는 핵산 결합 단백질인 저온 충격 단백질 (CSP)를 만드는 것으로 PAMC 21323도 CSP를 만들어 낸다. 그리고 저온 환경에서 적응할 수 있게 해주는 단백질로 알려진 리보솜 결합 인자 A(rbfA)와 polynucleotide phosphorylase, 2개의 번역 개시 인자(InfA, InfB), 전사 신장 인자(nusA)가 PAMC 21323의 게놈에 코딩되어 있는 것을 발견했다.

또한 다른 호냉성 미생물과 같이 PAMC 21323도 카로티노이드 생합성과 관련된 것으로 추정되는 유전자 집단을 발견할 수 있었다. 카로티노이드 생합성은 추위와 산화적 스트레스에 대해서 세포가 저항할 수 있게 해주고, 중금속에 대한 세포 독성을 줄여준다. *Planococcus* sp. PAMC 21323의 게놈에서 적합 용질(compatible solute)을 받아들이는 시스템인 프롤린 운반체

(ProVWX), 글라이신 베타인 ABC 운반체(OpuABC), 콜린-글라이신 베타인 운반체(BetT)를 가지고 있었다. 세포내에서 적합 용질의 축적은 저온과 삼투압적 스트레스에서 세포를 보호할 수 있게 해준다. 하지만 트리할로스와 베타인과 같은 적합 용질의 생합성과 관련된 유전자는 볼 수 없었다.

활성 산소(ROS)에 대한 방어 시스템은 낮은 온도에서 세포내 자유라이칼이 많이 생성되어 생장하기 위해 필수적이다. 슈퍼옥사이드 라디칼을 제거하기 위해 PAMC 21323은 두 개의 다른 종류의 SOD를 가지고 있다 (Mn/Fe superoxide dismutase, Cu/Zn superoxide dismutase). 이 효소들은 슈퍼옥사이드의 불균화 반응을 촉진하여 산소와 과산화수소를 만들며 이 반응은 박테리아 세포가 산소에 노출되었을 때 주요 방어 기작이다. 생성된 과산화수소는 페록시레독신족 효소와 글루타치온 퍼옥사이드와 같은 카탈라아제에 의해 물과 산소로 분해가 된다. PAMC 21323에서 8 개의 페록시레독신족 효소를 찾았다(표 6). 그 중 hydroperoxide reductase를 코딩하고 있는 2-Cys Prx는 낮은 수준의 과산화수소에서 카탈라아제보다 훨씬 효과적으로 제거를 한다. 1-Cys Prx의 보존된 모티프들은 각각 싸이올 퍼옥시데이즈와 PrxQ와 유사했다. 페록시레독신과 유사한 효소들은 일반적인 페록시레독신 효소가 지닌 CxxC 모티프를 가진다. 이 효소들은 과산화물과 일산화질소를 제거할 수 있는 능력을 지닌 것으로 보였다. AhpC를 제외하고 산화된 페록시레독신은 세포 내에 존재하는 싸이올레독신이나 글루타레독신과 같은 싸이올 분자에 의해 환원된 상태로 돌아간다. AhpC의 경우, NADH가 있는 상태에서 플라보단백질과 함께 작용하며 이황화 산화환원효소 활성을 갖는다. 산화환원 균형을 맞추기 위해 PAMC 21323은 하나의 글루타레독신과 8개의 싸이올레독신, 3개의 싸이올레독신 환원효소를 지니고 있다.

추가적인 trx 시스템으로 PAMC 21323은 싸이올-산화환원 버퍼 시스템과 같은 방어기작을 가지고 있다. 일반적으로 *Firmicutes*는 바실리싸이올을 가지고, *Actionmycetes*는 마이코싸이올을 생산한다. 하지만 PAMC 21323의 게놈 분석 결과, 활성산소에 의한 단백질의 싸이올 변형을 막기 위해 글루타치온 산화환원 버퍼 시스템을 지니고 있고 이 시스템은 주로 그람 음성균이 사용하는 시스템으로 일부 그람 양성균에서 쓰인다. PAMC 21323의 글루타치온은 이작용기 글루타치온 합성효소를 통해 생성된다. 페로독신레독신과 유사하게 글루타치온은 글루타치온 과산화효소를 이용해 환원인 상태에서 단백질 싸이올을 유지한다. NADPH 의존적 글루타치온 환원효소는 글루타치온의 산화/환원 비율을 유지하기 위해 글루타치온을 환원된 상태를

유지하게 해준다.

- 생물학적 교정을 위한 유전적 특징

스트레스 저항성의 독극적 메커니즘은 오염물질을 대사하기 위해 옥시게나아제 종류의 효소를 생산하는 미생물에 필수적이고, 오염물질의 생물학적 교정은 미생물의 촉매 경로에 의해 영향을 받는다. 일부 *Planococcus*는 방향족 탄화수소를 변성시키고 할로겐화된 부산물을 만드는 효소를 생산한다. 때문에 독성을 띤 방향족 오염물질을 해독하는 효소를 조사 하였다. PAMC 21323의 게놈을 분석한 결과, 13개의 단일 또는 2 옥시게네이즈 유전자를 가지며 이는 이 균주가 방향족 탄화수소의 생물학적 교정을 위해 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 2개의 에스트라디올 2 옥시게네이즈는 FMN 환원효소와 같은 클러스터에 위치한다. FMN 환원효소는 단일 옥시게네이즈의 구성요소로 FMN, FAD, 플라빈을 환원시키는 능력이 있다. 이와 같은 물질들은 환원된 형태로 단일 옥시게네이즈와 작용하여 페놀이나 스타이렌, 나이트릴로트라이아세트산과 같은 오염물질들을 산화시킨다. 2,6-디클로로-p-히드로퀴논 1,2-디옥시게네이즈의 보존된 도메인은 3-나이트로페놀과 같은 방향족 물질을 쪼갤 수 있는 능력을 가진다. 2,6-디클로로-p-히드로퀴논 1,2-디옥시게네이즈는 펜타클로로페놀-4-단일 옥시게네이즈와 함께 고열과 경련을 야기하는 독성물질로 알려진 펜타클로로페놀을 변성시킬 수 있다. 페놀 물질의 가수분해를 촉진하는 카테콜-2,3-디옥시게네이즈의 도메인을 포함하는 Plano_0315는 나이트로프로판 디옥시게네이즈와 함께 위치해있다. PAMC 21323은 2개의 추가적인 나이트로프로판 디옥시게네이즈와 3개의 나이트로환원효소, 1개의 아조환원효소를 지닌다. 이 효소들은 일반적으로 산업 오염물질에 의해 오염된 토양에서 발견된 박테리아에서 발견이 되므로, 이를 통해 PAMC 21323 또한 독성물질을 변성시킬 수 있는 능력이 있다고 볼 수 있다. 또한 PAMC 21323은 텔루르석 저항성과 관련된 2개의 유전자를 지니며, 4개의 비산염 환원효소와 하나의 수은이온 환원효소를 지닌다. TelA는 텔루르석 저항성을 결정짓는데 중요한 역할을 하며, TehB의 메틸화 작용은 텔루르석의 해독작용과 직접적으로 연관되어있다. 수은이온 환원효소는 비산염 환원효소와 같이 위치해 있으며 ArsR족 전사 조절인자에 의해 조절되는 ABC 종류의 운반체 단위와 함께 클러스터를 형성한다 (그림4). 게다가 3개의 추가적인 비산염 환원효소를 PAMC 21323의 게놈에서 찾을 수 있었고, 이들은 LMWP족과 ArsC족으로 분류할 수 있다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
극지미생물 유래 프로티아제 확보	1-1	극지연구소에서 균주 분양	<ul style="list-style-type: none"> - 극지연구소 분양기관인 PAMC에서 프로티아제 생산 미생물 4종 분양 완료 · 온도에 따른 성장 및 프로티아제 감수성이 높은 미생물, 프로티아제 생산온도의 범위가 넓은 미생물 등 특징적인 미생물 4종을 선별 - 극지연구소 분양 미생물의 동정 <ul style="list-style-type: none"> · 16s rDNA 염기서열 분석을 이용한 분양 균주의 동정 수행 - 분양된 미생물의 실험실 배양 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> · 배지성분, 첨가제 유무, 배양 온도와 pH, 배양시간에 따른 성장 영향평가 완료 	100%
	1-2	저온활성 프로티아제 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 프로티아제 활성 측정을 위한 고체배지에서의 screening 방법 확립 · skim milk를 이용하여 고체배지에서 균주 선별을 위한 프로티아제 일차적 활성 측정 - 프로티아제 정량적 활성 측정 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> · AAPF를 지질로 이용한 정량적 프로티아제 활성 측정 · 분양 균주별, 배양 조건별, 배양 기간에 따른 프로티아제 활성 측정 	100%
	1-3	프로티아제 생산 미생물의 배양 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 프로티아제 생산 배지의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> · 탄소원, 질소원, 첨가제의 종류에 따른 배양 및 프로티아제 생산 영향 평가 · 반응표면분석법을 이용한 각 균주에 대한 프로티아제 생산 배지의 최적화 · 반응표면분석을 이용한 최적 배지에서의 예측값에 대한 실측값의 비교를 통한 모델의 적합성 평가 완료 	100%

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도 (%)
극지미생물 유래 프로티아제 확보	2-1	신규 극지 미생물의 확보	<ul style="list-style-type: none"> - 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 %
	2-2	극지 미생물의 단백질 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 극지연구소에서 분양 받은 <i>Janthinobacterium</i> sp. (PAMC 25641)로부터 얻어진 프로티아제 정제 <ul style="list-style-type: none"> · 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 단백질 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 배양 온도 차이에 따른 단백질 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 %
	2-3	염색체 서열 분석 미생물 선정	<ul style="list-style-type: none"> - 활용성이 높은 극지 미생물을 선정하여 NGS를 이용한 염기서열 분석 진행 	100 %

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도 (%)
극지미생물 유래 프로티아제 확보	3-1	프로티아제 생산 극지 미생물의 염색체 서열 분석	<ul style="list-style-type: none"> - NGS을 이용한 PAMC21323의 전체 염기서열 sequencing - 얻어진 염기서열의 어셈블리화 게놈의 어노테이션 수행 - PAMC21323의 게놈 특성 분석 	100 %
	3-2	프로티아제 생합성 유전자의 cloning	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Janthinobacterium</i> sp. (PAMC 25641) 유래 프로티아제 유전자의 cloning - 대장균을 이용한 <i>Janthinobacterium</i> sp. (PAMC 25641) 유래 프로티아제 유전자의 발현 - 발현된 프로티아제 유전자의 활성 확인 	100 %
	3-3	프로티아제 생산 돌연변이체 확보	<ul style="list-style-type: none"> - EMS와 UV를 이용한 프로티아제 생산 돌연변이 유도 	100 %

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

나. 기대효과

- 관련연구 기관 및 산업체와의 협력을 통하여 향후 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 메커니즘을 보유하고 있어, 다른 지역에서 서식하는 생물들과는 구별되는 신규 유전자원과 신소

재 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 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.