

최 종  
연구보고서

## 심해생물자원 확보 및 이용기술 개발

Development of technologies for collection  
and utilization of deep-sea bioresources

2007. 5.

한국해양연구원

해양수산부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “심해생물자원 확보 및 이용기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 10일

주관연구기관명 : 한국해양연구원

연구책임자 : 김상진

연구원 :

이정현, 권개경, 강성균, 우정희,  
서해접, 양성현, 임재규, 배승섭,  
전정호, 유지선, 정홍배, 김윤재,  
김준태, 강지현, 이희순, 황영옥,  
박상이

위탁기관명 : (주)엔지켄

위탁연구책임자 : 나현섭

# 요 약 문

## I. 제 목

심해생물자원 확보 및 이용기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

바다는 지구 표면의 70% 이상을 차지하고 그 중 60% 정도는 수심이 2,000 m가 넘는 심해로 구성되어 있다. 오랫동안 심해는 생물상이 빈곤한 지역으로 알려졌으나, 현재는 미생물을 포함한 다양한 생물이 풍부하게 서식하고 있는 열대 다우림과 같은 지역으로 인식되고 있다. 해양생물 다양성은 종의 수가 1,000 만 종을 상회하는 것으로 추정되며 그 중 60%는 새로운 종으로 여겨지고, 이러한 생물체는 대부분이 신규의 유기조직체로 활용 가능한 자원으로 평가되고 있다. 육상 유래의 생물체들은 놀라운 종 다양성을 보여준 반면, 해양유래의 생물들은 거대한 계통학적인 생물 다양성 (진핵생물류, 세균류, 원시세균류와 같은 도메인수준)을 보여 주고 있어, 지구상의 식물, 동물, 미생물의 주요한 분류군들이 해양에 우점적으로 서식하고 있다. 따라서 해양생물은 새로운 유전학적인 정보와 기능을 이용할 수 있는 유용생물소재의 발견 확률이 매우 높다고 할 수 있다.

현재 우리 나라의 심해생물자원 확보 및 이용기술 관한 연구는 국제적인 지구생태환경에 대한 보호 및 생물다양성 협약에 대처하기 위하여 해양생물자원의 지속적 이용 및 적극적 활용에 대한 국가적 전략이 요구되며, 생물자원의 지속적 확보방안은 선진국의 생물자원 패권주의에 대응하는 수단으로 인식되어야 한다. 우리나라는 협소한 국토를 가지고 있으나 삼면이 바다로 둘러싸여 있어 해양자원의 활용을 극대화해야 할 필요성이 있으며, 심해생물 자원은 마지막 남은 지구자원으로 지속이용 가능한 자원으로 활용되어야 하며, 생명공학의 소재 개발이라는 측면에서 높은 가치가 있다.

심해 생물자원은 다음과 같은 다양한 생물공학적 활용이 가능하다.

- 신규 혹은 개선된 생촉매, 화학물질
- 빈영양환경내 생물체의 고흡착성 촉매 혹은 리간드
- 고온성 혹은 용매에 안정한 생물촉매, 호염성 생물촉매, 저온성 생물촉매
- Surfactants, 생물동결방지제
- 신규 생리활성물질 (신호전달, 방어기작)
- 신규 대사산물
- 생물정화
- 혐기적 생물전환

따라서 본 연구에서는 ‘심해 생물 및 유전자 다양성 확보와 유용 생체기능 소재 개발’이라는 최종 목표로 심해생물 자원을 대상으로 유전적 다양성을 확보하고 기능성 소재로의 유용성 평가 기법을 이용하여 유용생체기능 소재를 개발하며, 이를 통한 심해 생물자원의 생명공학소재로서

지속 가능한 이용 및 산업화 기반을 구축하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 심해환경 시료 확보 및 미생물 다양성 분석
  - 심해 환경의 다양한 퇴적물시료 확보
  - 심해 미생물 다양성 분석
2. 심해미생물 자원의 분리 및 유용성 평가
  - 심해 저온성 미생물의 분리 및 분류
  - 지질분해효소 생산 균주 탐색
  - 심해 미생물의 생리·생화학적 특성 분석
3. 심해 미생물 유전체 자원 확보
  - 유전체 확보 방법 및 분석 대상 선정
4. 심해생물자원 이용 기술 개발
  - 심해미생물 자원 분석 및 활용
  - 산업적 유용 Chiral compound의 효소탐색용 유도체 합성 및 안정적 공급
  - 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색 및 분석
  - 효소 유전자 클로닝, 발현, 특성 분석
  - 효소 대량생산 및 지적재산권 확보
  - 기존 databank을 이용한 효소탐색 및 분석

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 본 연구로부터 확보된 미생물 및 유전자원은 보존체계를 마련하고 향후
- 저온성 미생물로부터 저온활성 효소의 탐색
  - 극한환경내의 난배양성 미생물 유전자원을 획득하기 위한 메타게놈라이브러리 구축 및 활용
  - 다양한 심해 미생물자원의 지속적 확보 및 다양성 분석
  - 심해미생물 보존을 통하여 자원을 관리하고 관련 연구팀에 배포하여 연구저변 확대 및 연구성과 극대화 계획
  - 유용기능 미생물의 유전체와 단백질체 분석을 위한 후보 자원 선발
  - 광학특이적 전환효소 탐색
  - 광학특이적 전환효소의 생물공정 적용

등의 검색을 실시하여 유용한 생물소재 개발 연구에 활용할 것이다.

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Title

Development of technologies for collection and utilization of deep-sea bioresources

### II. Objective and Significance

The oceans constitute more than 70% of the earth's surface, of which about 60% is covered by water more than 2,000 m deep. In the estimation of macrofaunal species richness of the deep sea, the diversity could exceed 10 million species. Deep-sea environments are usually considered as extreme environments. The microbial communities living there are enormously diverse. The mechanisms involved in adaptation to these conditions represent a variety of research topics. The properties of extreme conditions may represent novel sources of valuable molecules or bioprocesses. But the access to these deep-sea is difficult, expensive, and limited to a small number of investigators. Much efforts in the research, accompanied by improved accessibility of microorganism collections in both academic institutions and industry, are the key in the future.

- Novel and improved biocatalysts and chemicals
- High-affinity catalysts and ligands
- Thermostable and solvent-stable biocatalysts; halotolerant and psychrophilic biocatalysts
- Surfactants, bioantifreeze
- Novel bioactive chemicals; sensing, signaling, and defense chemicals; consortia for enhanced turnover rates
- Novel metabolites
- Bioremediation
- Anaerobic biotransformation

The aims of this study are the establishment of collection system for microorganisms from deep-sea environment and the development of technologies for utilization of the bioresources. For this, we will assess and access the microbial diversity in deep-sea environments and develop screening system for useful bioactive and biocatalytic properties of marine microorganisms.

### III. Contents and Scope

1. Access and microbial diversity of deep-sea sediment samples
  - Obtaining of deep-sea sediment samples of Western Pacific area

- Analysis of microbial diversity in deep-sea sediments
2. Isolation and assessment for usefulness of deep-sea microbial resources
    - Isolation and classification of deep-sea psychrophilic microorganisms
    - Screening of lipase-producing bacteria
    - Physiological and biochemical characterization of deep-sea microorganisms
  3. Genomics of deep-sea microbes
    - Selection of candidate for microbial genomics
1. Isolation and assessment for usefulness of deep-sea microbial resources
    - Isolation and classification of deep-sea psychrophilic microorganisms
    - Screening of lipase-producing bacteria
    - Physiological and biochemical characterization of deep-sea microorganisms
  2. Synthesis of chiral compound
  3. Screening chiral compound converting enzyme
  4. Cloning and Characterization of the enzyme
  5. Mass production and patenting
  6. Searching for chiral compound converting enzyme using bioinformatic tools.

#### IV. Application of this Research

We will develop the storage system for obtained deep-sea samples and microorganisms during this study, and screening system for bioactive properties from isolated strains. Microbiological resources will be investigated continually for the comprehensive analysis of biotechnological potential in the following area:

- Access and analysis of diverse microbial diversity in deep-sea environment
- Distribution and application of deep-sea microbiological resources
- Screening enantioselective converting enzymes
- Genomics and proteomics of useful microorganisms
- Application of the enantioselective enzymes to bioprocess

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Summary in Korean .....	2
Summary .....	4
Contents .....	6
Contents in Korean .....	8
<b>Chapter 1. Aim and scope of the study .....</b>	<b>18</b>
Section 1. Aim of the study .....	8
Section 2. Necessity of the study .....	8
Section 3. Scope of the study .....	3
<b>Chapter 2. State of the art report .....</b>	<b>36</b>
Section 1. Foreign country .....	3
Ssection 2. Within the countries .....	8
<b>Chapter 3. Research contents and results .....</b>	<b>39</b>
Section 1. Methods .....	3
1. Sampling .....	39
2. Isolation of psychrophiles in deep-sea sediments .....	44
3. Extraction of environmental DNA .....	45
4. T-RFLP .....	45
5. PCR and Cloning .....	46
6. RFLP typing .....	46
7. Sequencing of 16S rDNA and molecular classification .....	47
8. Characterization of isolated microorganisms .....	47
9. Extraction of genomic DNA from deep-sea sediments .....	94
10. Collection of deepsea bioresources .....	05
11. Screening chiral converting enzyme .....	5
12. Cloning and characterization of epoxide hydrolase .....	5
13. Cloning and characterization of esterase .....	7

14. Screening useful enzymes using bioinformatic tools .....	8
Section 2. Results .....	9
1. Diversity of archaea in deep-sea sediments .....	95
2. Isolation of psychrophiles in deep-sea sediments .....	56
3. Characterization of isolated microorganisms .....	7
4. Collection of genomic DNA from deep-sea sediments .....	18
5. Collection of deepsea bioresources .....	8
6. Screening chiral converting enzyme .....	9
7. Cloning and characterization of epoxide hydrolase .....	13
8. Cloning and characterization of esterase .....	13
9. Screening useful enzymes using bioinformatic tools .....	11
<b>Chapter 4. Achivement and its contribution .....</b>	<b>142</b>
Section 1. Object and scope of research .....	12
Section 2. Achivement .....	145
<b>Chapter 5. Suggestion for the application of the results .....</b>	<b>146</b>
<b>Chapter 6. References .....</b>	<b>147</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>148</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>161</b>



# 목 차

Summary in Korean .....	2
Summary .....	4
Contents .....	6
Contents in Korean .....	8
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	18
1절. 목적 .....	18
2절. 필요성 .....	18
3절. 범위 .....	35
제 2 장. 국내의 기술개발현황 .....	36
1절. 국외기술현황 .....	36
2절. 국내기술현황 .....	38
제3장. 연구개발수행내용 및 결과 .....	39
1절. 연구수행방법 .....	39
1. 시료채취 .....	39
2. 심해 저온성 미생물 분리 .....	44
3. 환경 DNA 추출 .....	45
4. T-RFLP .....	45
5. PCR 및 Cloning .....	46
6. RFLP typing .....	46
7. 염기서열 결정 및 분자분류 .....	47
8. 균주 특성 .....	47
9. 심해퇴적물의 유전체 추출 .....	49
10. 심해미생물/해양환경유전체 자원 분석 및 활용 .....	50
11. 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색 .....	51
12. 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소 클로닝과 발현 및 특성분석 .....	56
13. 광학선택성 esterase 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석 57	57
14. 정보 databank을 이용한 효소 탐색 및 분석 .....	58
2절. 연구수행결과 .....	59

1. 심해 고세균류 다양성 .....	59
2. 심해 저온성 미생물 분리 .....	65
3. 분리된 미생물의 특성평가 .....	77
4. 심해 유전체 자원 확보 .....	81
5. 해양미생물/해양환경유전체 자원 분석 및 활용 .....	84
6. 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색 .....	91
7. 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소 클로닝과 발현 및 특성분석 .....	105
8. 광학선택성 esterase 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 .....	113
9. 정보 databank을 이용한 효소 탐색 및 분석 .....	141
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	142
1절. 목표달성도 .....	142
2절. 기여도 .....	145
제5장. 연구개발결과 활용계획 .....	146
제6장. 해외과학기술정보 .....	147
제7장. 참고문헌 .....	148
Appendix .....	161

## List of figures

Figure 3-1. Stations of deep-sea sediments for this study .....	04
Figure 3-2. Manned submarine 'Shinkai 6500' and sterile sediment sampler (50 ml). .....	41
Figure 3-3. Stations of deep-sea sediments for this study. ....	24
Figure 3-4. Deep-sea clams bed of Edison Seamount and TV Grab sampler during Sonne 166 Cruise. ....	48
Figure 3-5. Profile of T-RFLP analysis on the deep-sea sediments (#621, #624, and #626). ....	06
Figure 3-6. Profile of T-RFLP/Rsa I analysis on the deep-sea sediments (#621, #624 and #626). ....	16
Figure 3-7. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data for archaeal clone from the deep-sea sediment (#621, 624, and #626). ....	46
Figure 3-8. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data of the isolated alpha subdivision of the Proteobacteria (LT3, KM12, and KM23). ....	66
Figure 3-9. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data of the isolated gamma subdivision of the Proteobacteria (LT2, LT5, LT6, LT17, KM1, KM2, KM4, KM7 and KM9). ....	67
Figure 3-10. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data of the isolated Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes phylum (LT1 and KM26). ....	96
Figure 3-11. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data of the isolated gram-positive bacteria (KM21 and KM22). ....	07

Figure 3-12. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data for anaerobically isolated psychrophilic strain (NB001). .....	37
Figure 3-13. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence data of the isolated lipase-producing strains (SL013, SL025, SL027, and SL035) from the deep-sea sediment (Edison Seamount). .....	67
Figure 3-14. Determination of optimum growth temperature for the strain LT 17. ....	79
Figure 3-15. Effect of high barometric pressure (50 MPa) on the strain LT17. ....	80
Figure 3-16. Lipolytic activity of the isolated lipase-producing psychrophilic strains from the deep-sea sediment (Edison Seamount). .....	38
Figure 3-17. Phylogenetic positions of the lipase producing isolates. ....	58
Figure 3-18. deep sea sediment에서 분리된 HDase 활성을 보이는 균주의 분리.	19
Figure 3-19. Determination of HDase activity for conversion of hydantoin to N-carbamoylglycine (NCG) by screening bacteria. ....	9
Figure 3-20. Screening on starch-hydrolyzing activity of strains isolated from deep-sea sediment. ....	9
Figure 3-21. Determination of CD-forming activity of CGTase study. ....	49
Figure 3-22. Epoxide hydrolase 생산 균주의 탐색을 위한 sampling site. ....	59
Figure 3-23. Epoxide hydrolase 생산 균주의 탐색방법. ....	69
Figure 3-24. 1차 분리균주의 diol assay를 통한 epoxide hydrolase활성 균주 검색.	

.....	98
Figure 3-25. 최종 선정된 JCS358균주의 styrene oxide의 광학특이적 분해. ....	99
Figure 3-26. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strains HTCC2594 and JCS358. ....	0
Figure 3-27. 최종 선정된 JCS358균주의 enantioselective epoxide hydrolase 활성. ....	101
Figure 3-28. Epoxide substrates used in this study. ....	0
Figure 3-29. Sequence alignment of EHase. ....	0
Figure 3-30. Sequence alignment of EHase. ....	0
Figure 3-31. Phylogenetic analysis of EHase. ....	0
Figure 3-32. Purification of three EHases from <i>E. litoralis</i> HTCC2594 (the purified rEEH1 (A), rEEH2 and rEEH3 (B)). ....	0
Figure 3-33. Effects of pH and temperature on the purified rEEH1, rEEH2 and rEEH3 activity. ....	110
Figure 3-34. The schematic representation of the hydrolysis activity of enantioselective EHases (rEEH1, rEEH2 and rEEH3) toward racemic styrene oxide with GC analysis. ....	111
Figure 3-35. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of strain SL13 <sup>T</sup> and related taxa based on 16S rRNA gene sequences. ....	11
Figure 3-36. Temperature-dependent growth of SL13 <sup>T</sup> . ....	11

Figure 3–37. Mini library screening. ....	15
Figure 3–38. Analysis of plasmid DNA by restriction enzyme digestion. ....	16
Figure 3–39. Nucleotide sequence and amino acid sequence of <i>Photobacterium frigidiphilum</i> SL13 lipase gene. ....	117
Figure 3–40. Schematic representation of <i>Photobacterium frigidiphilum</i> SL13 lipase expression. ....	119
Figure 3–41. PNPO assay from esterase–producing microorganisms (151 strains). .....	121
Figure 3–42. Screening of ofloxacin ester–enantioselective esterase. ....	221
Figure 3–43. Construction of a genomic library. ....	18
Figure 3–44. Genomic library screening. ....	18
Figure 3–45. Analysis of plasmid DNA (pJTL180) by restriction enzyme digestion. ....	124
Figure 3–46. Nucleotide sequence and amino acid sequence of <i>Y. lipolytica</i> CL180 esterase gene. ....	15
Figure 3–47. Multiple sequence alignment of <i>Y. lipolytica</i> CL180 esterase and other related proteins. ....	17
Figure 3–48. Schematic representation for overexpression of <i>Y. lipolytica</i> CL180 esterase. ....	128
Figure 3–49. SDS–PAGE analysis (a) and lipolytic activity (b) on an agar plates of purified esterase. ....	129

Figure 3-50. Substrate specificity of purified esterase. ....	11
Figure 3-51. Effects of temperature and pH on esterase activity of <i>Y. lipolytica</i> CL180. ....	131
Figure 3-52. Construction of a genomic library. ....	13
Figure 3-53. Analysis of esterase from GMD509 strain. ....	3
Figure 3-54. Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of esterase gene. ....	135
Figure 3-55. Phylogenetic tree of ester hydrolase family homologous between Vlip509 and putative proteins. ....	137
Figure 3-56. Amino acid sequences conserved in the deduced amino acid sequence of Vlip509 and homologous other enzymes. ....	18
Figure 3-57. Effects of temperature and pH on enzyme activity. ....	9
Figure 3-58. HPLC analysis of ofloxacin ester-enantioselective esterase and enantioselective hydrolysis rate of racemic ofloxacin propyl ester by purified Vlip509. ....	140
Figure 3-59 .EH activity of Rh, Nono and Sp against styrene oxide by using gas chromatography. ....	141
Figure 6-1. Moore Foundation에서 추진하고 있는 미생물 genomic sequencing projet. ....	147

## List of tables

Table 1-1. Defining conditions of deep-sea habitat and the implication for biotechnology. ....	19
Table 1-2. Industrial applications of enzymes isolated from extremophiles. ....	32
Table 1-3. Investigations of the effects of high-pressure on piezophile microorganisms. ....	26
Table 1-4. Biocatalytically relevant extremozymes. ....	82
Table 3-1. Sequences of primers used in this study. ....	84
Table 3-2. Description of representative clone based on RFLP/HaeIII typing of the archaeal clones from the deep-sea sediment (#621, #624, and #626). ....	36
Table 3-3. Analysis of 16S rDNA sequences for the psychrophilic strains from the deep-sea sediment (Edison Seamount). ....	17
Table 3-4. Analysis for 16S rDNA sequences of the lipase producing strains from the deep-sea sediment (Edison Seamount). ....	57
Table 3-5. Growth temperature of the isolated psychrophilic strains from the deep-sea sediments (Ayu Trough and JAMSTEC). ....	8
Table 3-6. Comparison of fatty acid composition of LT17 and <i>Shewanella</i> species. ....	2
Table 3-7. 16S rDNA similarity values for isolates and related reference strains .....	86



Table 3–8. DNA relatedness between SL13, SL62 isolates and reference strains, <i>Photobacterium</i> sp. ....	87
Table 3–9. Characteristics of the strains SL13, SL62, and reference strains, <i>Photobacterium</i> sp. ....	88
Table 3–10. Cellular fatty acid compositions of strain SL13, SL62, and reference strains, <i>Photobacterium</i> sp. ....	9
Table 3–11. Screening marine microorganisms producing an enantioselective EHase and the sequence analysis of 16S rRNA gene of the isolated microorganisms. ....	9
Table 3–12. Enantioselective EHase activities of <i>Erythrobacter</i> spp. toward various epoxide substrates. ....	10
Table 3–13. Summary of the isolation of marine microorganisms and the screening of an ofloxacin ester–enantioselective esterase from various marine environments. ....	104
Table 3–14. Enantioselective EHase activity of the rEEH1, rEEH2, and rEEH3 toward various epoxide substrates. ....	112
Table 3–15. BlastX search of <i>Photobacterium frigidophilum</i> SL13 lipase gene sequence. ....	118

## List of appendix

Appendix 1. The 16S rRNA sequences of isolated strains from this study 161

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 목적

심해생물자원 확보 및 이용기술개발

(해양 미생물로부터 chiral compound 전환효소 발굴 및 상용화 기반 구축)

## 제 2 절 필요성

### 1. 심해 환경의 특성

해양의 60%는 수심이 2,000 미터가 넘는 심해 영역이며 특히, 수심 6,000 미터 이상이 되는 해양을 초심해라고 부른다. 심해환경은 높은 수압 (마리아나 해구의 경우 110 MPa)과 경우에 따라 375℃ 이상까지 온도가 올라가는 열수구 (hydrothermal vent)를 제외하고는 대부분 1-2℃에 불과한 낮은 온도, 빛이 없고 극빈 영양조건을 가진 극한 환경이다. 열대, 온대 지방의 해수표면을 제외한 대부분의 해양 환경 (전체 부피의 90% 이상)은 5℃ 이하의 저온권에 속하고 있다. 개방 시스템인 해양에서는 대류를 통해 전체적인 해수의 온도가 일정하게 유지되고 있는 것도 특징이라고 할 수 있다. 특히 저위도 지역의 수온은 2-3℃정도에 불과하며 극지방의 경우는 거의 0℃에 가깝다 (Baross and Morita 1978). 일반적으로 해양에서의 광합성은 95% 가 해수표면에서 일어나며 여기서 생산된 유기물질은 수심 100-300 미터 사이에서만 순환이 되고 심해의 저층부로는 불과 1% 가량만이 전달된다 (Jannasch and Taylor, 1984). 그러므로 심해에서 발견되는 생물은 적은 양의 유기탄소를 공급받고 또 그것을 소모하는 매우 효과적인 생체기작을 가지고 있다고 볼 수 있다.

### 2. 심해 생물과 생물공학

심해영역은 그동안 생물학적 사막으로 간주되어 왔으나, 수심 2,200 미터 이상이 되는 깊이의 심해저, 냉용수, 그리고 열수구에서 새로운 생물군집이 발견됨에 따라 최근에는 생물학적 '사막'에서 다양한 생명공학적인 개발의 가능성을 가지고 있는 '열대우림'으로 그 인식이 달라졌다. 육상 유래의 생물체들은 매우 다양한 종 다양성을 보이는 반면, 해양 유래의 생물들은 거대한 계통학적인 생물 다양성(도메인 수준)을 보여 주고 있다. 이는 다시 말해 지구상의 식물, 동물, 그리고 미생물의 주요한 분류군들이 우세하게 혹은 절대적으로 해양에서 나타나며, 해양생물에서 원시 생물체의 기원을 알 수 있을 뿐 아니라 새로운 유전학적인 정보

와 기능을 이용할 수 있는 유용생물자원이 발견될 확률이 가장 높다고 할 수 있다.

해양환경관련 저서의 생물 종 다양성 평가에서 종의 수가 1000만 종을 상회하는 것으로 추정하고 있으며, 그 중 60%는 새로운 종으로 여겨지고 이러한 생물체는 대부분이 신규의 유기적 조직체로 활용 가능한 자원이 될 수 있다. 심해에서 얻은 생물자원의 생물공학적 활용 가능성을 살펴보면, 우선은 신규 혹은 개선된 생촉매로의 이용을 들 수 있다. 이의 예로는 저온성 생촉매나 고온성, 호염성 생촉매 또는 용매에 안정한 생물촉매 같은 경우가 대표적이며, 생물정화, 동결방지제, 빈영양환경 내 생물체의 고흡착성 촉매 또는 리간드로의 이용도 가능하다. 그리고 신규 생리활성물질 (신호전달, 방어기작) 또는 대사산물을 얻을 수도 있으며, 생물정화 및 생물전환, 혐기적 생물전환에도 이용이 가능하다 (Table 1-1; Deming, 1998).

**Table 1-1. Defining conditions of deep-sea habitat and the implication for biotechnology.**

Habitat	Defining condition	Bioprospecting opportunities
Ocean trenches	High pressure	Novel and improved biocatalysts and chemistry
deep-seas, polar seas, cold seeps	Low temperature	Cold-active biocatalysts; bioremediation; surfactants; bioantifreeze
Seawater	Low nutrient concentration	High-affinity catalysts and ligands
Hydrothermal vents	High temperature, metals	Thermostable and solvent-stable biocatalysts; biohydrometallurgy
Sediments, epibioses, and symbioses	High nutrient concentration; defense mechanisms	Novel bioactive chemicals; sensing, signaling, and defense chemicals; consortia for enhanced turnover rates
Saturated brines	High salinity	Halotolerant biocatalysts; novel metabolites
Hydrocarbon	Hydrocarbons	Bioremediation, biotransformations
Deep sub-sea floor sediments	Anaerobic	Anaerobic biotransformations

### 3. 심해 냉용수지역과 미생물 다양성

지구 표면의 60% 이상은 일차 생산이 일어나는 대양 표면에서 유래한 바이오매스 입자들의 지속적인 침전과 분해과정을 통해 형성된 심해 퇴적물로 덮여 있다. 대양의 퇴적물에 들어있는 많은 유기물들은 유익한 미생물 군집의 활성화에 의해 재순환된다 (Aller, *et al.*, 1998). 최근 연구에서는 연안 저서환경에서 탄소와 황의 순환과 관련된 미생물 군집의 특징에 초점을 맞추고 있지만 (Devereux *et al.*, 1994; Gray and Herwig, 1996; Llobet-Brossa *et al.*, 1998; Munson *et al.*, 1997; Teske *et al.*, 1996), 심해 퇴적물에서의 미생물 군집구조와 기능에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다. 심해환경 중 심해저, 열수구, 냉용수의 미생물군집은 생리적, 대사적, 분류학적으로 특이하다고 알려져 있다. 광합성이 아닌 화학적 독립영양대사에 기초를 둔 해저 열수구 (hydrothermal vents)의 발견은 심해에 대한 새로운 생물 현상을 해석하기 위한 출발점으로 주목을 받고 있으며, 인간이 지구의 생물학적 다양성에 대해 피상적인 지식만을 가지고 있다는 것을 일깨워 준다. 대륙의 가장자리를 따라 발견된 냉용수 지역에는 심해저의 저온환경에서 성장하기에 적합한 유기체의 유사한 군집들이 포함되어 있으며, 이는 자연의 생태계에서 공생관계의 중요성에 대한 새로운 발견이 되고 있다. 'Cold seep' (냉용수)이라는 용어는 높은 온도의 열수구에서 유래한 군집과 구분하여 사용되고 있는데, 유동성, 흐름 속도, 환원된 화합물 등으로 인해 생물학적 군집의 조성이 다양하다. 높은 농도의 메탄, 탄화수소 또는 황이 냉용수에 존재할 수 있으며, 해수의 흐름 속도, 농도는 그 부근의 독립영양미생물 군집의 구성에 큰 영향을 줄 수 있다. 여기서 주된 에너지원은 메탄과 황이다. 이와 같은 환원화합물들은 산소 (또는 질소) 존재 하에서 박테리아에 의해 산화될 수 있고 이들 기질의 농도는 아주 다양할 수 있다. 그러므로 냉용수 지역은 fluid sources와 지질학적 변천사의 관점에서 볼 때 아주 다양할 수 있다. 일반적으로 박테리아와 진핵세포사이의 독특한 공생 관계뿐만 아니라 독립영양적 1차 생산으로 특징화되어 있는 높은 생물자원 군집이 입증된 열수구와는 온도라는 환경을 제외하고 여러 가지 면에서 유사성을 보이는 것으로 나타났다. 냉용수에서 유동적으로 분출되는 환원된 화학물질들의 산화는 무기탄소의 환원과 연료의 생합성 활성화에 필요한 에너지를 공급한다. 냉용수 지역은 화석의 증거에서 나타난 것처럼 (Olu *et al.*, 1996) 대륙의 가장자리에 해당하는 지역을 따라 넓게 분포되어 있다. 또한 그 지역의 생지화학적 (biogeochemical) 예측에 유의적으로 영향을 미칠 수 있다. 게다가, 냉용수에서는 폭넓은 공생관계가 독립영양균과 다양한 진핵생물의 세포사이에 존재한다. 이것은 생태학적 측면에서 아주 높은 학문적 관심을 유발시킨다 (Barry *et al.*, 1997).

### 4. 심해 유전체자원

자연계에 존재하는 모든 미생물을 배양하기에 기존의 배양기술로 불가능하다는 것이 분자 생태학적 연구에 의해 최근 알려져 있다. 특히, 미생물 다양성의 경우, 해수에는 1ml 당

160종, 토양에는 1g 당 6400-38000종 정도가 존재한다고 예상된다 (Curtis *et al.*, 2002). 그러나 대부분의 미생물은 현재의 배양기술로는 분리배양이 불가능한 것이 현실이다 (Bull *et al.*, 2000). 현재 배양이 가능한 미생물로 동정이 되어 있는 경우는 전체 미생물의 1% 이하일 것으로 추측되며, 대부분의 미생물은 장막에 가려진 채 지구상에 존재한다 (Griffiths *et al.*, 1996; Torsvik *et al.*, 1990; Whitman *et al.*, 1998). 그러나 분자생물학 기술의 발전으로 배양이 되지 않는 미생물 군집의 DNA (메타게놈)를 추출하여 이용하려는 시도가 시작되었다 (Kim *et al.*, 1992; Shizuya *et al.*, 1992). 이러한 시도에 힘입어 메타게놈 라이브러리 제작과 그에 관련한 연구가 현재 활발하게 진행되고 있다. Fosmid는 cosmid에 plasmid F factor를 이용하여 클론된 유전자의 안정화를 꾀한 일종의 cosmid vector이다 (Kim *et al.*, 1992). 이를 이용하여 해양 환경의 메타게놈의 연구를 수행한 연구결과들은 주로 미생물 생태학적인 관점에서 이루어져 왔다 (Vergin *et al.*, 1998; Stein, *et al.*, 1996). 극지방의 해수 시료에서 분리한 메타게놈을 가지고 만든 fosmid library 탐색 결과 얻어진 고세균 (Archaeobacteria로 불렸으나 현재는 Archaea라 함) 유전자를 대상으로 비교 유전체학적인 연구도 수행되고 있다 (Beja, *et al.*, 2000).

## 5. 극한 미생물산업적응용

새로운 극한 미생물과 이들 효소의 발견은 생물촉매 (biocatalysis) 분야에서 큰 의미를 가진다. 그 이유는 기존의 공정상 polymer intermediates, pharmaceuticals(의약품), specialty chemicals(특수 화학물), agrochemicals(농화학물)의 화학 합성시 낮은 선택성과 부산물 등의 경제적 손실이 있었으며, 중온성 미생물에서 유래한 효소는 열 안정성 부족으로 공업적인 공정에서 요구되는 혹독한 반응 조건에 적합하지 않았기 때문이다. 이러한 이유로 인하여, 과거에는 유기반응의 생물촉매제 이용은 유용한 산업시장의 단지 작은 부분에 국한되어 있었다 (Demirjian *et al.*, 2001). 극한 미생물은 다양한 극한 환경에서 존재하는 미생물이며, thermophiles(호열성 미생물), acidophiles(호산성 미생물), alkalophiles(호염기성 미생물), psychrophiles(저온성 미생물), barophiles (piezophiles)(호압성 미생물) 그리고 기타 다른 종류의 미생물이 포함되어 있다 (Table 1-2). 이들은 심해 열수구 그리고 냉용수 지역과 같은 특수환경에서 생존하기에 적합한 미생물이며 (Ladenstein and Antranikian, 1998; Niehaus, *et al.*, 1999), 중온성 미생물이 생존하지 못하는 극한환경에서 작용할 수 있는 독특한 생물촉매제를 생산한다. 따라서 부가적인 공업적 공정의 개발을 가능하게 할 수 있는 것이다.

10년전, 극한 미생물은 전세계를 통해 몇몇 연구팀에서만 연구되어지던 색다른 생물체였다. 그러나 현재에는 효소를 발견하고 개발하는 회사를 비롯하여 다양한 연구자들이 새로운 효소를 탐색하기 위한 대상으로 연구되고 있다 (Ladenstein and Antranikian, 1998; Niehaus, *et al.*, 1999; Adams and Kelly, 1998; Hough and Danson, 1998; Robb and Maeder, 1998; Stetter, 1999). Table 1-2는 극한 미생물의 종류, 환경 특성, 극한 효소의 중

류 및 이용분야에 관한 요약이다. 극한 미생물 중에서도 특히 호열성 미생물이 최근에 다양한 분야에서 활용이 시도되고 있는 것을 알 수 있다.

저온의 환경에서 성장할 수 있는 psychrophiles(저온성 미생물)와 psychrotrophs(저온발육성 미생물)에 의해 생산되는 저온성 효소들은 생명공학 산업, 예를 들어 세제와 식품산업과 정밀화학제품의 생산 환경에서, 저온에 적응된 높은 촉매활성을 나타낸다 (Gerday, *et al.*, 2000).

Table 1–2. Industrial applications of enzymes isolated from extremophiles.

Extremophile	Habitat	Enzymes	Representative applications
Thermophile	High temperature	Amylases	Glucose, fructose for sweeteners
	Moderate (45–65 °C)	Xylanases	Paper bleaching
	Thermophiles (65–85 °C)	Proteases	Baking, brewing, detergents
	Hyperthermophiles (<85 °C)	DNA polymerases	Genetic engineering
Psychrophile	Low temperature	Proteases	Cheese maturation, dairy production
		Dehydrogenases	Biosensors
		Amylases	Polymer degradation in detergents
Acidophile	Low pH	Sulfur oxidation	Desulfurization of coal
		Chalcopyrite concentrate	Valuable metals recovery
Alkalophile	High pH	Cellulases	Polymer degradation in detergents
Halophile	High salt concentration		Ion exchange resin regenerant disposal, producing poly ( $\gamma$ -glutamic and) (PGA) and poly ( $\beta$ -hydroxy -butyric acid) (PHB)
Piezophile	High pressure	Whole microorganism	Formation of gels and starch granules
Metalophile	High metal concentration	Whole microorganism	Ore-bioleaching, bioremediation, biomineralization
Radiophile	High radiation	Whole microorganism	Bioremediation of radionuclide contaminated sites
Microaerophile	Growth in <21% O <sub>2</sub>		

호염성 효소에 대한 공업적인 시도는 호염성 미생물(halophiles)의 유전자 연구를 진행하면서 그 활용 가능성이 증가되고 있다. 또한 염 적응성에 대한 유전자 연구를 통해 많은 새로운 사실이 밝혀지고 있으나 그 기작은 우리가 알고 있던 것보다 더욱 복잡하다는 것이 밝혀지고 있다 (Ventosa, *et al.*, 1998).

호산성 미생물은 전형적으로 호열성, 호염성 또는 중금속 저항성과 같은 극한 미생물의 환경적인 성질을 나타내고 있으며, 미네랄의 생물공정단계에서 그 적용 범위가 확인되고 있



다 (Norris, *et al.*, 2000).

호염기성 미생물은 알칼리성 환경에서 생존할 수 있는 미생물로서 그 특성을 산업적으로 활용하고 있으며, 바이오 세제로 사용되는 alkaline proteases와 cellulase 같은 것을 예로 들 수 있다 (Horikoshi, 1999). 최근에 초점의 대상이 되고 있는 호염기성 미생물은 혐기성 호열염기성 미생물(anaerobic alkalithermophiles)이며 이 그룹의 가장 흥미로운 특징은 doubling time이 짧다는 것이다 (Wiegel, 1998).

심해 호압성 미생물에 대한 연구는 압력에 의해 조절되는 오페론(operon)의 확인에 초점이 맞추어져 있으며 (Horikoshi, 1998), 호압성 미생물의 생물공학적인 적용 가능성이 시도되고 있다 (Abe and Horikoshi, 2001). 높은 농도의 중금속에 대한 적응력은 중금속에 대한 항상성의 기반위에서 이해되고 있으며 (Nies, 1999), bioremediation과 biomining 분야에서도 새로운 합성물의 생합성에 적용되고 있다 (Klaus-Joerger *et al.*, 2001).

Radiophiles(호방사능 미생물)는 연구가 미흡한 극한 미생물의 대표적인 종류지만 기아, 산화적 스트레스, 많은 DNA 손상의 환경에서도 생존할 수 있는 능력 때문에 최근 들어 많이 연구되고 있다 (Daly, 2000). *Deinococcus radiodurans*는 최고의 방사능 저항성 생물체인 것으로 알려져 있으며, 이러한 성질을 이용한 방사능 폐기물 처리 등을 위한 연구가 진행되고 있다 (Brim *et al.*, 2000).

마지막으로 호기적 조건에서의 생존을 위해서는 유독한 산소 유도체를 제거하기 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase, 그리고 peroxidase와 같은 항산화 효소의 존재가 필요하다. Microaerophiles (미호기성 미생물)은 이러한 항산화 효소가 부족하지만, 새로운 종류의 항산화 시스템이 낮은 산소 농도에서도 성장할 수 있도록 존재하고 있다. 이러한 대체 항산화 시스템의 존재는 이런 종류의 미생물 또는 극한 미생물에게 산소 저항성을 부여하는 것으로 증명되어 있다 (Yamamoto *et al.*, 2000).

## 6. 호압성 미생물산업적응용

대양에서 가장 깊은 곳으로 알려져 있는 Mariana Trench 밑바닥의 압력은 110 MPa에 이른다. 지구 생물권의 많은 부분이 높은 압력하의 환경이라는 사실에도 불구하고 심해 호압성 미생물에 대해서는 알려진 것이 많지 않다. 심해의 일반적인 온도는 1-3°C 이내인 한편 고압, 고온 환경을 특징으로 하는 심해 열수구도 알려짐으로써 해양 미생물은 1-300°C 온도와 0.1-110 MPa 압력과 같은 넓은 범위의 환경에 노출되어 살고 있는 것이다 (Abe and Koki, 2001).

'Barophile'이라는 말은 ZoBell과 Johnson이 처음 사용하였으며 (최근에는 'piezophile') ZoBell과 Morita는 심해에서 유래한 미생물의 배양액에서 호압성 미생물 성장의 증거를 확인하였다. 압력에 적응된 미생물의 최초 분리는 1979년 Yahanos 등에 의해 보고되었다 (Yahanos *et al.*, 1979). 이후 연속적으로 다양한 최적 성장압력을 갖고 있는 많은 저온성 호압성 미생물이 분리되었고, 이 균주들의 생리적, 유전적 특성이 연구되었다. 고온성 호압성

미생물에 대한 많은 생리적 실험도 진행되어 왔다. 따라서 미생물에 압력이 미치는 영향에 관한 연구는 주로 두가지 종류인 저온성 호압성 미생물과 고온성 호압성 미생물을 이용해서 수행되었다. 여기에 속하는 몇 종류 미생물의 적정성장 온도와 압력을 Table 1-3에 나타냈다.

호압성과 내압성 미생물들은 생물산업에서 유용하게 이용할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 식품가공과정에서 향미와 색을 변화시키지 않고 식품 재료를 살균할 수 있는 방법으로 현재 사용하고 있는 높은 온도 대신 높은 압력을 이용할 수 있을 것이다 (Hayashi, 1996). 식품가공 과정에서, 열에서 압력으로의 대체는 열에 의한 부작용인 젤의 형성, 전분 과립의 형성, 단백질의 변성과 응고 또는 지질의 상 전이를 어느 정도 줄일 수 있을 것이다.

Table 1–3. Investigations of the effects of high–pressure on piezophile microorganisms.

Organisms	Optimal growth conditions	Investigations
<b>Psychrophilic piezophiles</b>		
<i>Colwellia hadaliensis</i> BNL–1	75–94 MPa at 2°C	Physiology
<i>Moritella japonica</i> DSK1	50 MPa at 15°C	Physiology
<i>Moritella yayanosii</i> DB21MT–5	80 MPa at 10°C	Membrane lipids
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	28 MPa at 2°C	Gene expression, membrane protein, membrane fatty acid
<i>Photobacterium profundum</i> DSJ4	10 MPa at 10°C	Physiology
<i>Shewanella benthica</i> strains	50–70 MPa at 10–15°C	Physiology, gene expression membrane fatty acid
<i>Shewanella violacea</i> DSS12	30 MPa at 8°C	Gene expression respiratory system
Other unidentified strains	41–62 MPa at 3°C	Physiology
<b>Thermophilic piezophiles</b>		
<i>Methanococcus igneus</i>	51 MPa at 90°C	Pressure stabilization of hydrogenase
<i>Methanococcus jannaschii</i>	75 MPa at 86 – 90°C,	Pressure stabilization of hydrogenase
	51 MPa at 90°C	Methanogenesis
<i>Palaeococcus ferrophilus</i> DMJ	30 MPa at 84°C	Physiology
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	20–40 MPa at 73–112°C	Protein synthesis
<i>Pyrococcus furiosus</i>	45 MPa at 107.5°C	Pressure stabilization of GDH and DNA polymerase
<i>Pyrococcus</i> sp. ES4	45 MPa at 111°C	Pressure stabilization of DNA polymerases
<i>Pyrococcus</i> sp. GB–D	20 MPa at 103°C	Physiology
<i>Thermococcus aggregans</i> TY	20 MPa at 75°C	Physiology
<i>Thermococcus barophilus</i> MP	40 MPa at 85°C	Physiology
<i>Thermococcus guymasensis</i> TYS	20 – 35 MPa at 85°C	Physiology
<i>Thermococcus peptonophilus</i>	45 MPa at 90 – 95°C	Physiology
OG1	22 MPa at 91°C,	Physiology
<i>Thermococcus</i> sp. ES1	22 MPa at 100°C	
	20 MPa at 73°C	Physiology
<i>Thermosipho japonicus</i> IHB1	51 MPa at 95°C	Pressure stabilization of GAPDH
<i>Thermotoga maritima</i>	45 MPa at 100°C	Pressure stabilization of DNA polymerase
<i>Thermus aquaticus</i>		
<b>Mesophilic piezophiles</b>		
<i>Desulfovibrio profundus</i> 500–1	15 MPa at 30°C	Sulfate reducing activity
<i>Pseudomonas</i> sp. BT1	10 MPa at 30°C,	Membrane fatty acid
	20 MPa at 37°C	
<i>Pseudomonas</i> sp. MS300	60 MPa at 25°C	Production of $\alpha$ -maltotetrahydrolase

## 7. 저온성 미생물산업적응용

### 가. 저온성 효소

극한 미생물에서 유래하는 극한 효소 (extremozyme)의 탐색 작업은 다양한 공정에 필요한 생물촉매제로 사용하기 위해 이루어지고 있다. Table 1-4는 극한 환경에서 활성이 있거나 안정한 성질을 가지고 있어 공업적 생물전환에 이용하기 적합한 효소를 요약한 것이다. 이와같은 종류에는 esterases/lipases, glycosidases, aldolases, nitrilases/amidases, phosphatases, racemases가 포함되어 있다 (Demirjian, *et al.*, 2001).

저온성 미생물은 물의 어는점과 가까운 온도 환경에서도 성장할 수 있는 놀라운 능력을 갖고 있다 (Price, *et al.*, 2000). 생화학 반응의 온도 의존성은 효소학에서 매우 중요한 점이다. 예를 들어, 반응액 온도가 37°C에서 0°C로 낮아진다면 반응 속도는 30-80배 감소될 수 있다. 이러한 효소의 강한 온도 의존적인 반응 속도를 극복하기 위해, 저온성 미생물은 저온에서 높은 특이적 활성과 효율을 가질 수 있는 열에 대한 유연성을 가지는 효소를 합성한다 (Low *et al.*, 1973; Johnston *et al.*, 1975; Privalov *et al.*, 1979). 따라서 이들 효소는 저온에서 높은 촉매 효율을 가지는 특성을 보이지만 열에 변하기 쉽다. 이들 미생물에서 유래하는 효소는 30°C이하의 온도에서의 높은 특이적 활성과 빠른 불활성화로 인해, 생물공학 분야의 적용 면에서 매우 가능성이 높은 것으로 인식되고 있다 (Feller *et al.*, 1996).

1984년 Kobori 등에 의해 발표된 남극의 미생물에서 열민감성 alkaline phosphatase를 분리하여 발표한 논문은, 저온성 미생물에 의해 생산되는 효소의 분자적 특징에 관련된 것이었다 (Kobori *et al.*, 1984). 이 논문에서 저자는 “저온성” 효소의 두 가지 주요 성질을 저온에서의 높은 특이적 활성, 중온에서의 빠른 불활성화로 설명하였다 (Kobori *et al.*, 1984). 그리고, 중온에서의 빠른 불활성화를 필요로 하는 새로운 기법의 생물공학에 적용할 수 있다는 것을 저온성 효소의 이용 가능성 중 하나로 강조하였다 (Kobori *et al.*, 1984).

위의 특성을 나타내는 저온성 효소들 중 lipases도 저온성 세균에 의해 생산되는 것이 확인되었고, 그 특성 또한 조사되어 있다 (Feller *et al.*, 1991; Feller *et al.*, 1991; Arpigny *et al.*, 1993; Arpigny *et al.*, 1995). 저온성 lipases는 3°C의 낮은 온도에서도 지질가수분해 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다.

Table 1–4. Biocatalytically relevant extremozymes.

Enzyme	Organism	Host/induction	Stability /activity
Hyperthermophilic esterase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>E. coli</i> /heterologous (own promoter)	T <sub>opt</sub> = 100°C
Thermophilic esterase	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	T <sub>opt</sub> = 45°C
Thermophilic esterase	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>E. coli</i>	Active at 70°C
Thermophilic lipase	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	<i>E. coli</i>	Active at 70°C
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>E. coli</i> /IPTG	T <sub>opt</sub> = 68°C
Thermophilic lipase			
Psychrophilic lipase	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	<i>E. coli</i> DH5α/pUC18	T <sub>opt</sub> = 60–70°C
	<i>Moraxella</i> TA144	<i>E. coli</i> /pULG	T <sub>opt</sub> = 35°C
Psychrophilic lipase			
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11–1	<i>E. coli</i> /pUC118,IPTG	T <sub>opt</sub> = 45°C
Hyperthermophilic pullulanase			
	<i>Thermococcus aggregans</i>	<i>E. coli</i>	T <sub>opt</sub> = 95°C
Thermophilic pullulanase			
	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	
Thermophilic and acidophilic α-amylase	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	<i>E. coli</i>	Opt. Act. at 75°C, pH=3
Halophilic β-galactosidase			
Halophilic class I fructose aldolase	<i>Haloferax alicantei</i>	<i>Haloferax alicantei</i>	Act. only 4 M NaCl
	<i>Haloarcula vallismortis</i>	<i>Haloarcula vallismortis</i>	Opt. activity at 2.5 M KCl
Hyperthermophilic fructose aldolase (Type II)	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YT–1	
Hyperthermophilic fructose aldolase (Type I)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Stable at 97°C for 1.6 hr, T <sub>opt</sub> = 37°C
Thermophilic 2–keto–3–deoxygluconate aldolase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>E. coli</i> JM109/pREC7	
Psychrophilic protease			
	nalidixic acid		
Halophilic protease	<i>Bacillus</i> TA39	<i>Bacillus</i> TA39	Low temp. opt.
Thermophilic nitrile hydratase–amidase (whole cell)	<i>Halobacterium halobium</i>	<i>Halobacterium halobium</i>	Max act. at 4 M NaCl
	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	opt. growth at 65°C
Thermophilic nitrile hydratase			
Hyperthermophilic alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus pallidus</i>	<i>Bacillus pallidus</i>	Thermostable(≤55°C)
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	
Barophilic glutamate dehydrogenase	<i>Pyrococcus furiosus</i>		
Psychrophilic phosphatase			
Psychrophilic alanineracemase	<i>Shewanella</i> sp.	<i>E. coli</i>	Low temp. opt.
	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	<i>E. coli</i> /pYOK3	Low temp. opt. (0°C)

## 나. 지질가수분해효소

### (1) 세제류 (Detergents)

전 세계 효소시장 규모는 1995년에 3억 달러인 것으로 보고되었지만, 2005년에는 그 규모가 2배에 이를 것으로 기대되고 있다. 전체 효소시장의 75%는 가수분해 효소가 차지하고 있으며 그 중 90%가 미생물에 의해 생산되는 효소이다. 미생물에서 생산된 lipases의 가수분해 활성을 이용하는 중요한 상업적 분야로는 세제류를 들 수 있다. 이들 세제는 가정용과 공업용 세탁시 사용되며, 가정용 식기세척기에도 사용되고 있다. Lipase를 이 분야에 적용하기 시작한 것은 1994년 덴마크의 NOVO Co.에서 Lipolase<sup>TM</sup>를 생산한 것이 처음이다. 이 제품에 첨가된 lipase는 곰팡이인 *Thermomyces lanuginosus*에서 유래한 extracellular lipase로써 host 균주로 *Aspergillus niger*를 이용하여 공업적 규모로 생산되었다 (Jaeger, et al., 1994). 그 뒤를 이어 *Pseudomonas mendocina*에서 나온 Lumafast<sup>TM</sup>와 *Pseudomonas alcaligenes*에서 유래한 Lipomax<sup>TM</sup>이 Genencor International (Jaeger and Reetz, 1998)에 의해 상업화되었다. 그리고 현재 Novo Co.에서는 Lipolase<sup>TM</sup>보다 저온에서 지방 분해력이 향상된 LipolaseUltra<sup>TM</sup>, LipoPrime<sup>TM</sup> 이라는 lipase 세제류가 제품화되어 있으며, 세계적인 세제 회사인 Procter & Gamble과 Unilever Co.에서 이 제품들을 이용하고 있다. *Pseudomonas alcaligenes* M-1에서 생산된 알칼리성 lipase (Gerritse, et al., 1998)와 특허로 등록된 여러 미생물 유래 lipases가 세제로 이용하기 적당한 효소라고 보고되어 있다 (Bycroft and Byng, 1992).

### (2) 새로운 바이오폴리머 합성 (New biopolymeric synthesis)

Polyphenol, polysaccharides, polyesters와 같은 중합체 (biopolymers)는 상당한 다양성과 복잡성을 보인다. 더욱이, 이 화합물들은 생분해될 수 있고 천연의 자원으로부터 새롭게 재 생성되어 생산될 수 있기 때문에 이들을 활용하기 위한 연구가 늘고 있다. Lipases와 esterases는 mild reaction에서 높은 특이성 즉 입체 특이성 (stereo selectivity), 위치 특이성 (regioselectivity), 화학 특이성 (chemoselectivity)을 나타내는 이점을 가지고 있어 폴리머 합성을 위한 촉매제로 널리 이용되고 있으며 (Gross, et al., 2001), 결합 방법이 새로운 polyesters를 분리하기 위해 사용되고 있다 (Kim and Dordick, 2001). 구조적으로 다기능성 반응기를 가지는 복합 monomers는 상업화된 lipases를 이용하여 많은 양을 효소적 촉매방법으로 폴리머화 될 수 있다. Lipases의 폴리머 libraries를 촉매하는 반응은 diester 또는 diol monomers와 다양한 분야에서 free combination, 반응 상태, 이용성을 보이고 있다. 그리고 96 deep-well plates를 이용한 polyester libraries 탐색 방법은 시간의 단축과 시스템화를 가능하게 했으며, macromolecules의 transesterification, transacylation, lactones와 cyclic carbonates의 ring-opening polymerisation의 가능성도 보고되어 있다 (Kim and Dordick,

2001).

### (3) 바이오디젤 (Biodiesel)

운송수단의 대체 에너지를 소위 바이오디젤 (biodiesel)이라 부르며, 여러 식물에서 유래한 기름 (rapeseed)을 이용하여 화학적으로 생산된다. 바이오디젤 연료는 천연 자원에서 유래하는 재생가능한 에너지원으로써 에너지고갈 문제가 없으며, 동시에 연료의 사용시 발생할 수 있는 CO<sub>2</sub>의 양과 sulfur oxide 양을 1/3로 감소시킬 수 있다. 그리고 독성이 적고, 높은 생분해도를 가지기 때문에 사고로 인한 유류의 유출시 환경오염이 크게 문제되는 선박의 연료로도 활용할 수 있다는 장점을 가지고 있다 (Korbitz, 1998).

경제성에서 바이오디젤은 경유와 비교하여 생산단가가 3배 정도 높지만 경유를 사용할 때 부담하여야 하는 환경정화비용을 생각하면 경제성이 있다는 평가를 받고 있다. 2002년 미국의 농업연구청 항해연구센터는 B20 (바이오디젤 20%와 보통 디젤 80%로 구성된 혼합유)을 전국적으로 군사 및 민간 지역에 150만 갤런 이상을 공급하기로 계약한 것이 보고되었다. 오스트리아와 독일의 경우는 100% 바이오디젤유를 수상운송수단에 공급하고 있으며 프랑스도 5% 바이오디젤유를 혼합한 경유를 판매하고 있다. 전세계 생산량은 1991년 기준 111,000톤에 불과하였으나 1997년에는 1,286,000톤으로 약 11배 증가하였으며 1998년에는 약 1,360,000톤이 생산된 것으로 보고되었다 (이진석, 2000). 전 세계적으로 21개국에서 생산되고 있으며 상용 규모 공장은 서부유럽 44개소, 동부유럽 29개소, 북미 8개소 그리고 기타 지역 4개소 등이 있다. 생산단가를 줄이기 위해 값싼 원료 물질인 폐식용유로부터 바이오디젤을 생산해내는 공정이 진행되어 일부 소규모 상용화되었다.

위의 내용에서 보는 것처럼 바이오디젤은 미국과 유럽 등지에서 식물성 기름을 이용하여 화학적 방법으로 생산된 바이오디젤이 상용화되어 있지만, 화학적 방법은 촉매제 제거와 반응과정 동안 많은 양의 에너지를 요구한다는 단점을 가지고 있다. 이러한 화학적 방법의 단점을 해결하기 위해 lipases를 이용한 효소적 방법이 여러 과학자들에 의해 연구되고 있다 (Iso *et al.*, 2001). 즉, 식물성 기름의 methyl- 또는 short-chain alcohol ester로의 전환은 유기용매상에서 lipases를 이용할 경우 한번의 transesterification 반응으로 촉매될 수 있다. 그러나 공업적인 규모로의 생산은 생체 촉매제인 효소의 높은 가격으로 인하여 적용되지 못하고 있다. 최근 이 문제를 해결하기 위한 적당한 방법으로 효소의 재사용이 가능한 효소 고정화법 개발이 활발히 진행되고 있다. 관련된 연구에서, 고정화된 *Pseudomonas fluorescens* lipase를 이용하여 triglycerides와 alcohol의 transesterification을 진행했을 때, 사용한 고정화 효소를 반복하여 이용하여도 활성에는 큰 변화가 없었다는 결과가 보고되어 있다 (Iso *et al.*, 2001).

#### (4) 정밀화학제품 (Fine chemicals)

의약품, 농화합물 그리고 향기 화합물의 합성에 있어서 열쇠가 되는 중간 생성물은 보통 복합체이거나 또는 키랄 화합물이다. 전 세계 키랄 약물의 판매가 2000년에 처음으로 1 조 미국달러를 넘어섰다. 이러한 키랄약물의 수요는 세포 표면의 수용체 자체가 키랄구조를 가지는 생체분자이기 때문에 약물 분자의 약효는 수용체와 비대칭이 되어야 한다 (Jaeger, et al., 2001). 이것은 인체 내에서 작용하는 효소들이 대부분 R 또는 S 이성질체에만 선택적으로 반응한다는 것을 의미한다. 즉, 같은 분자식을 갖는 물질이라도 S 이성질체가 항생제 역할을 하는 반면에 R 이성질체는 독성을 띄는 경우가 허다하다. 그 반대의 경우도 가능한 일이다.

예를 들면, 비스테로이드계열 항염증성 약물 중 aryl propionic 종류의 광학이성질체는 약물학적 성질과 독성을 함께 나타내는 약물이다. 이 약물의 라세미 혼합물에서 나타나는 치료제 활성은 대부분 (S)-이성질체에 의한 것이다 (Shen, 1972). 그러므로 원하는 성질을 가진 순수한 이성질체만을 사용자에게 투여하는 것이 소량을 복용하고도 치료효과를 낼 수 있으며, 더 안정할 수 있다. 그러나 이들을 화학적 방법으로 합성하는 경우에는 두개의 이성질체가 혼합되어 있는 라세미 혼합물 상태로 되어있어 순수한 이성질체를 얻기 힘들다. 따라서 순수한 이성질체를 얻는 합성방법은 높은 수율, 간단한 공정, 낮은 생산 단가를 만족해야 한다. 일반적으로 판매되는 약물들 중에 R, S 이성질체가 반반씩 섞여있는 라세미 혼합물과 그 중 하나만 분리해서 시판되는 약물의 가격을 비교해보면, 분리되어진 약물의 값이 작게는 10배에서 크게는 100배 이상의 가격차이가 나는 것을 볼 수 있다. 그만큼 라세미 혼합물을 분리하는데 어려움이 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 제약산업에서는 광학적으로 순수한 약물의 골격 구조를 합성하는 것이 중요한 작업이다 (Patel, 2001).

순수한 키랄 화합물 합성은 키랄 화합물의 구조에 에스테르 결합이 존재한다면, 기존의 화학 합성법이 아니라 생체 촉매제인 lipases를 이용한 효소 합성법으로 합성할 경우 순수한 키랄 화합물을 얻을 수 있다. 그러므로 위의 경우는 산업화 발전 최전방에 있는 lipases가 생체촉매제로 이용될 수 있는 주요 항목이다 (Liese *et al.*, 2000).

#### (5) Therapeutics

지난 몇 년 동안, 생리적인 활성을 가지는 최종약물 혹은 약물의 중간체 합성 과 분해를 통하여 새로운 약물을 합성하는 화학합성 분야가 빠르게 성장해 왔으며, 다양한 질병 치료에 이용되고 있는 키랄 약물 합성기술도 약물학적 연구에서 의미 있는 성장을 거듭하고 있다 (Richards *et al.*, 1997). 유기용매상에서 효소를 이용한 광학이성체 합성이 성공적으로 적용되었으며 (Klibanov, 1990), 합성 효소 가운데 lipases가 합성반응에 알맞은 효소라는 것이 확인되었다.

*Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* 그리고 다른 종에서 유래한



lipases가 naproxen (Tsai and Wei, 1994), ibuprofen (Mustranta, 1992; Tsai *et al.*, 1997), suprofen (Mertoli *et al.*, 1996; Tsai and Huang, 1999)과 같은 항염증 활성을 가지는 광학 이성질체를 합성하는데 이용된다. 또한 *Candida rugosa*와 *Mucor javanicus*에서 생산된 lipases에서는 항염증 활성이 가장 높다고 알려져 있는 flurbiprofen을 합성하는 것이 보고되었다 (Bhandarkar and Neau, 2000).

광학이성질체를 필요로 하는 대표적인 항생제로는  $\beta$ -lactam계를 들 수 있다. 이  $\beta$ -lactam계열의 penem (Panipenem, Sankyo Co.; Meropenem, Sumitomo Co.; Fropenem, Suntory Co.), carbapenem (Merck Co.) 구조의 합성에는 초기 물질로 광학활성 알콜을 이용하므로 이를 생산하기 위해서 lipase를 이용한 반응이 필요하다. *Pseudomonas* AK lipase는 항암제로써의 가능성을 가지고 있는 epothilone A 4를 합성하는 반응 중에서 키랄 중간체 2를 합성하는데 이용된다 (Zhu and Panek, 2001). *Candida rugosa* lipase는 항미생물 화합물인 (S)- and (R)-elvirool과 이들의 유도체 (S)-(+)- 와 (R)-(-)-curcuphenol의 효소 분해를 촉매한다. 여기서 (R)-(-)- curcuphenol 8은 *Staphylococcus aureus*와 *Vibrio anguillarum*에 대해 항박테리아 활성을 보이지만, (S)-(+)-enantiomer는 gastric H/K-ATPase를 나타낸다고 보고되어 있다 (Ono *et al.*, 2001).

## (6) Agrochemicals

Lipases는 벼 농작에서 잡초의 제거에 이용할 수 있는 새로운 제초제인 enantiopure (S)-indanofan을 효율적으로 생산하는데 이용된다 (Tanaka *et al.*, 2002). 그 이유는 (S)-enantiomer만이 제초제로써의 활성을 나타내기 때문이며, 이 화합물은 현재 lipase에 의한 효소적 촉매반응과 화학반응이 결합된 방법으로 생산되고 있다. 4-hydroxyproline의 diastereomers는 몇 가지 농화학제재와 의약품 생산을 위한 중요한 골격구조 역할을 한다 (Jaeger and Thorsten, 2002).

## (7) Flavors

낮은 분자량의 에스테르는 향기의 주요 구성 성분중 하나이며, 이들 중 대부분은 많은 식품과 향수의 과일 향과 관련이 있다. Lipase의 촉매작용으로 합성되는 향기와 관련된 화합물에는 가장 중요한 화합물인 (-)-menthol을 포함한 몇 가지가 보고되어 있다. (-)-menthol은 peppermint oil의 성분 중 한가지이며, 공업적인 규모로 (±)-menthol이 생산되고 있다. 그러나 (-)-menthol과 (-)-mentholester가 (±)-menthol보다 더 중요한 위치를 차지하고 있다. 이는 (-)-menthol이 cooling과 refreshing 효과를 가지고 있기 때문이다. *Pseudomonas cepacia* lipase (Lipase- PS)를 생물촉매제로 이용하여 (±)-menthol을 transesterification한 결과 (-)-menthol의 methacrylate ester를 합성했다는 보고가 있다 (Athawale, *et al.*, 2001). 또한 순수한 광학이성질체 (-)-menthol ester를 분리하기 위한 방

법으로 *Burkholderia cepacia* lipase를 이용한 (±)-menthol의 transesterification 단계가 포함되어 있다 (Athawale *et al.*, 2001). 최종 산물인 menthyl methacrylate 16은 sustained release perfume로 이용될 수 있도록 연속적으로 중합되어진다. 향수 성분을 구성하는 또 다른 중요한 물질인 (-)-menthyl jasmonate은 키랄의 열쇠가 되는 중간매개체인 (+)-(6S)-methyl 7-epicucurbate을 생성할 수 있는 상업용 효소, Lipase P (Amano)를 이용하여 효소 촉매반응으로 합성될 수 있다 (Kiyota *et al.*, 2001). 또한 (z)-3-hexen-1-yl acetate는 flavor esters 모델의 대표적인 의미를 가지기 때문에 특히 관심의 대상이 되고 있다 (Bourg-Garros, *et al.*, 1998). 이 물질은 *Candida antarctica* lipase에 의한 효소적 합성 반응으로 생성되는 것이 연구되고 있다 (Bourg-Garros, *et al.*, 1998). short-chain fatty acids의 isoamyl esters는 식품공업에서 첨가제로 이용되는 중요한 aroma 성분이다. 이들 성분의 합성에 미생물에서 생산된 lipase를 이용하는 연구가 진행되고 있다. 그 예로는, *Pseudomonas pseudomallei* strain 12Sm lipase를 이용하여 isoamylactate를 합성한 것 (Kanwar and Goswami, 2002)과 *Rhizomucor miehei*과 *Mucor miehei*에서 생산된 lipase로 isoamyl alcohol과 butyric acid의 esterification을 촉매하여 isoamylbutyrate를 생성한 보고가 있다 (Krishna and Karanth, 2001).

## (8) Cosmetics

Lipase는 대량생산을 하는 제조공정에 적용하기에 가격이 너무 높은 상태이지만, 소수의 특별한 에스테르를 합성하는 공정에 lipase가 이용되는 것이 알려져 있다. Unichem international Co.는 스킨, 선-텐 크림, bath oil 등 개인용 제품의 연화제로 이용되는 isopropyl myristate, isopropyl palmitate, 2-ethylhexylpalmitate를 생산하는데, 에스테르화에는 *Rhizomucor miehei*에서 유래한 lipase를 고정화하여 생물촉매제로 이용하였다. 보편적으로 산성 촉매제를 이용하는 공정에 lipase를 이용한 경우 품질 향상, downstream의 최소화라는 장점이 있다고 보고하였다. Wax esters도 위와 유사한 개인용 제품에 이용되는 물질로 *Candida cylindracea*에서 생산된 lipase를 이용한 제조방법이 이용되고 있다 (Croda Universal Co.). 제조자에 따르면 효소를 이용한 방법의 전체 생산단가가 화학적 방법보다 조금 높은 것은 사실이나 생산단가의 차이는 최종 생성물의 품질향상으로 정당화 될 수 있다는 의견이다. 또한 *Rhizopus niveous*에서 생산된 lipase를 cellulose biomass 지지대에 고정된 상태로 wax ester 합성 반응에 적용시켜 촉매 효율을 높인 연구도 보고되어 있다 (Chen and Wang, 1997).

## 8. 필요성

- 세계 각국은 생물다양성협약(CBD), 생물다양성정보기구(GBIF), OECD 생물자원센터네트

워크 등 국제협약을 통해 생물자원 전략화와 생명공학기술의 산업화 진전에 따른 유전자 정보의 중요성이 증대하여 바이오산업 성장동력의 필수소재로서 국가간 생물자원 활용 및 확보 방안 강화로 유용 유전자 정보 선점이 응용 연구개발과 산업화의 주도권 확보임을 인식하고 있음

- 해양생물은 육상생물에 앞서 10억년 이상의 역사를 가지고 있고, 생명의 탄생과 진화가 해양환경에서 유래되었다는 주장이 있으며, 생물종의 대부분이 해양유래이며, 특히 지금까지 발견된 동물종의 33 개의 문(phylum) 수준의 분류군에서 하나를 제외하고 모두가 해양환경에 존재하나 육상생태계에는 15개의 문만이 존재하는 것으로 알려져 해양은 생물자원의 보고임(해양생물센서스보고서)

- 바다는 지구 표면의 70% 이상을 차지하고 그 중 60% 정도는 수심이 2,000 m가 넘는 심해로 구성되어 있다. 오랫동안 심해는 생물상이 빈곤한 지역으로 알려졌으나, 현재는 미생물을 포함한 다양한 생물이 풍부하게 서식하고 있는 열대 다우림과 같은 지역으로 인식되고 있다. 해양생물 다양성은 종의 수가 1,000 만 종을 상회하는 것으로 추정되며 그 중 60%는 새로운 종으로 여겨지고, 이러한 생물체는 대부분이 신규의 유기조직체로 활용 가능한 자원으로 평가

심해 생물자원은 다음과 같은 다양한 생물공학적 활용이 가능하다.

- 신규 혹은 개선된 생촉매, 화학물질
- 빈영양환경내 생물체의 고흡착성 촉매 혹은 리간드
- 고온성 혹은 용매에 안정한 생물촉매, 호염성 생물촉매, 저온성 생물촉매
- Surfactants, 생물동결방지제
- 신규 생리활성물질 (신호전달, 방어기작)
- 신규 대사산물
- 생물정화
- 혐기적 생물전환

따라서 본 연구에서는 ‘심해 생물 및 유전자 다양성 확보와 유용 생체기능 소재 개발’이라는 최종 목표로 심해생물 자원을 대상으로 유전적 다양성을 확보하고 기능성 소재로의 유용성 평가 기법을 이용하여 유용생체기능 소재를 개발하며, 이를 통한 심해 생물자원의 생명공학소재로서 지속 가능한 이용 및 산업화 기반을 구축하고자 함.

## 제 3 절 범위

1. 심해환경 시료 확보 및 미생물 다양성 분석
  - 심해 환경의 다양한 퇴적물시료 확보
  - 심해 미생물 다양성 분석
  
2. 심해미생물 자원의 분리 및 유용성 평가
  - 심해 저온성 미생물의 분리 및 분류
  - 지질분해효소 생산 균주 탐색
  - 심해 미생물의 생리·생화학적 특성 분석
  
3. 심해 미생물 유전체 자원 확보
  - 유전체 확보 방법 및 분석 대상 선정
  
4. 심해생물자원을 이용 기술 개발
  - 심해미생물 자원 분석 및 활용
  - 산업적 유용 Chiral compound의 효소탐색용 유도체 합성 및 안정적 공급
  - 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색 및 분석
  - 효소 유전자 클로닝, 발현, 특성 분석
  - 효소 대량생산 및 지적재산권 확보
  - 기존 databank을 이용한 효소탐색 및 분석 실시

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 기술개발 현황

심해 연구의 역사는 영국 전함 첼린저호에 의해 1872-1876년 사이에 시도된 지구규모의 생태학적 조사로 시작되었다. 심해저, 열수구, 그리고 냉용수의 미생물군집은 생리적으로, 대사적으로 그리고 분류학적으로 특이하며 그들은 온도의 급격한 변화, 높은 수압, 그리고 높은 농도의 중금속이 존재하는 극한 환경에 적응되어 있다. 이러한 이유로 해양의 심해영역에 존재하는 생물상은 생물공학적 응용에 있어 큰 잠재력을 내포하고 있어 세계적으로 심해 유용생물자원 및 유전자자원의 확보 및 산업화기술을 위한 연구가 진행되고 있으며 미국, 일본 그리고 유럽 등 선진국가가 주도하고 있다.

미국은 1966년부터 해양개발 10개년 계획을 수립하여 상무성 산하 국가해양대기청(NOAA; National Ocean and Atmospheric Administration)이 주도하는 Sea Grant College Program 및 Marine Biotechnology Program 등 다양한 경로를 통해 해양 환경의 생물 및 미생물로부터 분리한 유용물질의 산업화에 대한 지속적인 투자를 하였다. 1977년 갈라파고스 제도 주변의 해저에서 열수구의 특이 생태계를 발견한 이래 해양의 지구조, 지화학, 생물 및 생태환경분야에 대한 기반연구가 집중적으로 이루어졌으며, 현재는 해양생물유래 일부 유용한 물질들에 대한 산업화가 시작되고 있다. 1996년에 해양생명공학관련 연구비는 830만 불이며, 이중 약 400만 불이 열수미생물 연구를 포함하는 분자유전학 및 천연물분야에 투입되었다. 최근에는 새로운 극한생명체 연구(Life in Extreme Environment; LExEn) 프로그램을 통해 1) 극한환경내 미생물과 생태요인, 2) 극한환경내 미생물의 분리 및 배양기술, 3) 극한환경내 미생물의 분자 및 생태적 수준에서의 적응기작, 4) 원시생명체와 고해양환경, 그리고 5) 극한지 환경과 미생물의 상호작용을 조절하는 과정의 모니터링에 대한 연구가 진행 중이며, 이와 관련하여 2000년에는 약 1,200만 불의 연구비가 지원되었다. 지금까지 해양생물을 이용한 산업폐수처리, 고분자물질 등의 신규 생리활성물질 개발, 어류의 신규 육종기술, 어병진단 기술 등을 실용화 시켰으며, 해양천연물분야에서도 신규의 물질이 개발되고 있다. 미국 에너지성(DOE)에서도 해양 미생물 및 극한 미생물 분리와 연구에 대대적인 투자를 하고 있으며, 현재 세 종의 호열성 해양 미생물(*Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermotoga maritima*)의 전체 genome sequence가 이미 밝혀졌으며 수십 종의 미생물 게놈분석 연구를 지원하고 있다.

1994년에는 Diversa (www.diversa.com)라고 하는 극한유전자활용 생촉매 개발 벤처회사가 설립되어 다양한 생태환경에서 미배양된 미생물의 유전물질을 라이브러리 형태로 보존하고 있으며, 현재 미생물 100 만종 이상에 상당하는 유전체 자원을 확보한 것으로 추정되고 있다. 이들은 유전자 자원으로부터 유용성 검색 및 활용을 위한 고속검색기법,

direct-evolution 기법, 생물공정개발기법 등을 보유하고 있어 유전자 발굴 및 활용 분야의 주목받는 회사로 자리매김하고 있다.

일본은 전통적으로 해양국가임을 내세우며 강력한 해양선진국임을 자처하고 있다. 최근 20 여년 동안에는 해양생명공학분야에 대한 투자규모가 미국을 능가할 정도가 되었다. 해양생명공학연구소(MBI)와 일본해양과학기술센터(JAMSTEC)를 중심으로 해양생명공학연구를 주요 전략산업으로 수행하고 있다. 특히 JAMSTEC은 1990년 10월부터 DEEPSTAR (Deep-Sea Environment Exploration Program Suboceanic Terrene Animalcule Retrieval) 라는 프론티어 사업을 예산 2.4억 엔으로 시작하여 1991년에는 6.4억 엔으로 점차 예산이 증가하였다. 현재까지 전용건물 신축을 위해 30억 엔, 순수연구비를 위해 연평균 4억 엔의 예산을 투자하여 2000년 현재 합계 70억 엔 이상에 이른다. 이 예산에는 유인잠수정 및 선박 운영에 관련된 비용은 포함되지 않았다. 총 계획기간은 1단계 8년, 2단계 7년, 총 15년으로 현재 2단계 중반이 진행 중이다. 그동안 중점적으로 개발된 기술분야는 아래와 같다.

- o Cultivation and morphology of deep-sea organisms
- o Metabolism and physiology of deep-sea organisms
- o Gene and protein of deep-sea organisms
- o Support services
  - Deep-Sea microorganisms collecting and cultivating systems (DMCCS)
  - Management of Deep-Sea microorganism specimens
  - 심해잠수정, 잠수정모함관리 및 운영

프론티어 사업 1단계 기간 중 심해의 호압/호열성 미생물 분리 및 배양시설 (DEEP BATH; Deep-sea Baro/Thermophiles Collecting and Cultivating System)을 완비하여 본격적인 심해 미생물 연구를 위한 핵심 기반시설을 갖추고 있으며, 이를 바탕으로 극한 미생물 분리와 배양에 대한 연구를 수행하여 많은 미생물 종을 확보하고 있다. 북태평양 광섬 인근의 마리아나 해구 챌린저 해연에서 180종의 심해 극한 미생물을 분리하였으며, 열수로부터 초호열성 미생물 중의 하나인 *Pyrococcus sp.*외 다양한 균주를 분리하여 생리적 연구가 진행되고 있다. 사업의 제 2단계에서는 연구범위가 심해 저서생물로까지 확대되었으며, 1) 심해환경에 대한 생물 반응, 2) 심해환경에 대한 대사작용 및 적응기작 연구, 그리고 3) 심해생물의 유전자 분석 연구를 진행하고 있다. 특히, 1995년에는 무인탐사정 카이코가 세계에서 가장 깊은 챌린저 심연(10,911 미터)의 퇴적물을 채취하여 많은 미생물을 분리하기도 하였다. 특히 2단계에서는 호알칼리성 미생물인 *Bacillus halodurans* C-125의 전체 게놈의 염기서열을 해독하였고 이를 통해 생리, 생화학, 유전학적 특성을 밝히고 있다. 현재의 주된 사업 내용은 극한환경내 생물반응기작 및 유전자 해독사업을 통한 유용물질 분리와 산업화를 추진 중에 있다.

이외에도 1962년에 정부, 과학기술심의 위원회, 국립대학 연구소 협의회 심의를 거쳐 동

경대학내에 해양연구소 (ORI; Ocean Research Institute, University of Tokyo)를 만들어 해양에 대한 기초연구를 하였으며, 이 연구소의 생물생태부문은 심해저서생물을 전공으로 하는 연구부문으로 최근 15년간은 심해저서생물 중 열수분출공 및 냉용수지역 생물군집의 분류 및 생리적, 분자생물학적 연구를 수행하고 있다.

프랑스, 독일, 영국 등의 유럽국가들은 최근에 들어서야 이 분야에 대한 투자를 시작하였다. 이들은 EU BIOTECH-Program을 출범시켜 호염성, 산성, 알칼리성, 고온성 환경의 극한생물연구를 위해 유럽국가 39개의 연구팀이 참여하는 1단계 연구(1994년부터 3년간 8백만 불 투자) 이후, 2 단계(1997년부터 3년간 1,200만 불을 투자)에서는 61 개의 실험실이 참여하여 산업화에 초점을 맞추고 있다. 그리고 해양학자, 물리학자, 지질학자, 그리고 생물학자가 학제간으로 참여하는 국제 공동 연구 프로그램인 ODP (Ocean Drilling Project), Inter-Ridge Program 및 여러 EU 공동협력 프로그램 (European AMORES, Marflux/ATJ Project)을 통해 심해 및 열수의 환경연구를 수행중이며, 극한 미생물의 유전자 분석 등의 분야에서 미국, 일본수준의 요소기술을 확보하고 있다. 프랑스 해양연구소(IFREMER)는 6,000 m 급 잠수정인 Nautille을 보유하여 유럽 국가중 심해연구에서 가장 앞선 시설투자가 이루어져 있으며 많은 극한 미생물을 보유하고 있다. Proteus ([www.proteus.fr](http://www.proteus.fr))는 1998년 유럽에서 설립된 유전자 발굴 및 개발을 위한 최초 벤처회사로 많은 연구팀과 공동연구형태로 다양한 극한미생물 자원확보(심해열수구, 열대지방, 호염성등)에 주력하고 유용유전자 및 그 산물을 개발하고자 HT functional screening 시스템, direct evolution 기법 등을 보유하고 있다.

## 제 2 절 국내 기술개발 현황

심해환경 생물에 대한 생태학적 연구가 일부 연구자에 의해 수행되었으나 이는 국외에서 국내 연구자가 참여자로 연구를 진행한 것으로 국내에서 자체적인 연구과제로 수행된 실적이 거의 없는 형편이다. 한국해양연구원은 1994년부터 심해저자원연구센터 중심으로 태평양 심해 망간자원 탐사를 위한 연구를 수행 중이며 망간자원탐사 및 채굴에 관련된 상용화 연구 및 이에 따른 환경영향 평가연구에 집중되어 있다. 심해자원탐사연구를 통해 부분적으로 수행된 생태학적 연구 결과가 있고, 심해탐사 기술이 어느 정도 축적되어 있다고 할 수 있다. 또한 연구원 기관고유사업으로 동해의 지질학적, 물리학적 연구가 진행되면서 단편적으로 생물학적 연구가 수행되었으나, 생물자원을 이용 또는 활용하기 위한 주도적인 연구 단계까지 발전하지 못했다. 그러나 생명공학 분야의 저변확대를 통해 일반 해양 생물의 확보 및 이용 기술은 확보되어 있다고 할 수 있다.

일부 대학(포항공대, 성균관대)과 연구소(KIST, KRIBB)에서 극한미생물의 생리적, 분자생물학적 연구 및 대량배양을 시도하고 있으나 생물종은 외국에서 가치가 적은 것을 분양받아 연구함으로써 기대효과가 높지 않고 현재 무엇보다 다양한 시료확보가 절실한 형편이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구 수행 방법

#### 1. 시료 채취

##### 가. 일본과의 공동 연구를 통한 시료 확보

2001년, 2002년 두 차례의 일본해양과학기술센터(JAMSTEC) 탐사를 통하여 수심 6,000미터의 일본해구, 수심 3,000미터의 동해(일본 홋카이도 연안)지역의 심해 퇴적물을 확보하였다(Figure 3-1). 퇴적물 시료 채취에는 잠수정 신카이 6500을 이용하였다. 시료채취는 무균조작이 가능한 채취기를 통해 확보하였다(Figure 3-2). 채취된 시료는 멸균된 15 ml 튜브에 분주한 후 미생물 분리 작업을 즉시 진행하였고, 남은 시료는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 1차년도에 확보한 심해퇴적물 시료를 이용하여 중온성 미생물 및 저온성 미생물 분리작업을 수행하였고, 동일한 심해 퇴적물 시료를 이용하여 세균류 및 고세균류의 군집구조 분석을 수행하였다.

##### 나. ‘서태평양 종합 대양 연구’ 사업을 통한 시료 확보

2002년 해양연구원 기관고유사업인 ‘서태평양 종합 대양 연구’사업과 연계하여 다양한 심해 퇴적물과 생물 시료를 확보하였다. 독일 연구선의 Sonne 166 크루즈로부터 파푸아뉴기니 해역의 Lihir 섬 남쪽의 수심 1,500 미터 Edison 해산지역에서 TV가 설치된 Grab 채취기(GTVA)를 이용하여 clam beds의 퇴적물 시료를 얻었다(Figure 3-3, 3-4). 여기서 확보한 심해퇴적물 시료는 저온성 미생물 및 저온성 지질분해효소 생성 균주를 분리하는데 이용하였다.



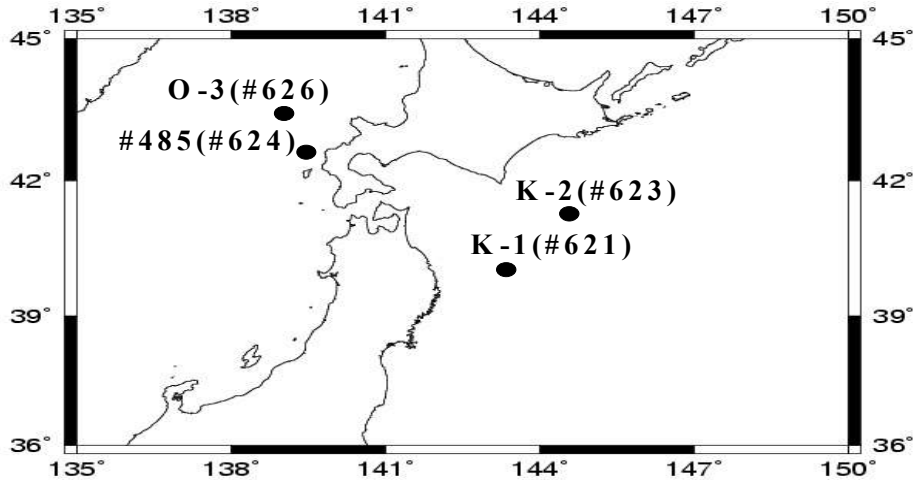


Figure 3-1. Stations of deep-sea sediments for this study.



Figure 3-2. Manned submarine 'Shinkai 6500' and sterile sediment sampler (50 ml).

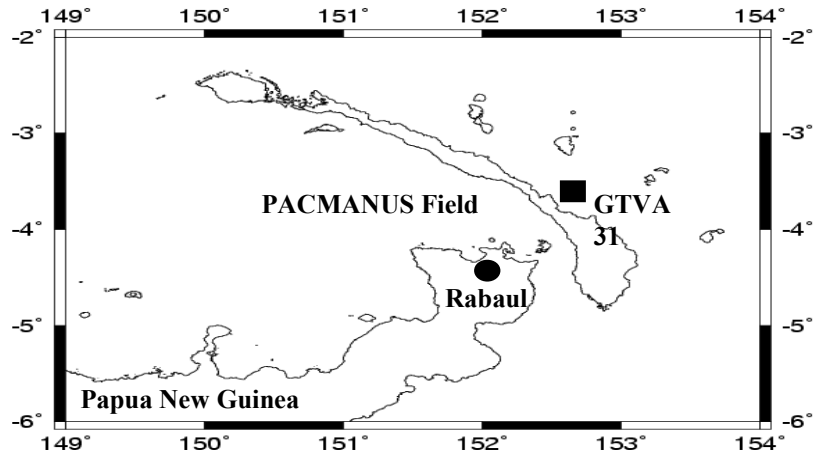


Figure 3–3. Stations of deep–sea sediments for this study.

(A)



(B)



Figure 3-4. Deep-sea clams bed of Edison Seamount and TV Grab sampler during Sonne 166 Cruise.

## 2. 심해 저온성 미생물 분리

### 가. 호기성 미생물

호기성 저온 미생물을 분리하기 위한 배지로 ZoBell 2216e 한천배지 (peptone 0.5%, yeast extract 0.1%,  $\text{FePO}_4$  10 mg/l, agar 1.5% in seawater/distilled water (3:1), pH 7.5) 를 사용하였다. 멸균된 해수 10 ml에 1 g의 퇴적물 시료를 현탁한 후 평판배지에 100  $\mu\text{l}$ 를 도말하여 4°C에서 배양한 후 형성된 집락의 형태와 색깔에 따라 선택하여 같은 배지를 이용, 단일 균주로 판단 될 때까지 계대 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 미생물은 10% glycerol을 이용하여 -70°C에서 보관하였다.

### 나. 혐기성 미생물

독일 연구선의 Sonne 166 크루즈를 통해 확보된 Edison 해저 화산의 조개(*Calyptogena*) 군집 지역의 퇴적물 시료를 채취 선상에서 즉시 혐기성배지 YPS (Holden *et al.*, 2001)가 20 ml 들어있는 밀폐된 serum vial (head space:  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  혼합가스)에 접종한 후 곧 환원제 Sodium sulfide (5%, w/v,  $\text{Na}_2\text{S}$ )를 최종 농도 0.05%로 처리하여 4°C로 배양하였다. 15-30 일간 육안으로 증식여부를 확인 후 실험실에서 저온성 균주의 분리 실험을 하기 위하여 -20°C 에 보관하였다.

Serum vial 혹은 Hungate tube에 황을 1% (w/v)농도가 되게 넣고 100°C에서 30분간 스티ptomycetes를 3일에 걸쳐 세 번 반복하여 준비하였다. 여기에 별도로 준비한 액체배지를 20 ml 씩 분주하였다. 액체배지는  $\text{NaCl}$  19.6 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  3.3 g,  $\text{KCl}$  0.5 g,  $\text{KBr}$  0.05 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.02 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  8.8 g을 3차 증류수 970 ml에 녹인 다음 100× Trace element solution ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.005 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g,  $\text{KBr}$ ; 0.05 g,  $\text{KI}$ ; 0.05 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.1 g,  $\text{NaF}$ ; 0.05 g,  $\text{LiCl}$ ; 0.05 g,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ; 0.05 g,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01 g,  $\text{VOSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.005 g,  $\text{H}_2\text{WO}_4$ ; 0.005 g,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ; 0.005 g,  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.005 g,  $\text{BaCl}_2$ ; 0.005 g per liter) 10 ml, 200× 1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5 ml, 100× N-P 혼합액 10 ml, 500× Fe EDTA 2 ml, 0.1% resazurin (1000×) 1 ml를 첨가하여 만들었다. 멸균된 황이 포함된 serum vial에 액체배지를 20 ml 분주한 다음에는 질소가스로 혐기적 상태로 만든 후 밀봉하고 환원제 (5%  $\text{Na}_2\text{S}$ )를 0.1 ml 씩 주사기로 넣어주어 산소를 완전히 제거하였다.

### 다. Lipase 생산 미생물

Edison 해저 화산 지역에서 채토된 심해 퇴적물 0.3 g을 멸균 해수 1 ml과 혼합하여 멸균된 막자사발에서 마쇄한 후, 1% hydrocarbons이 포함된 ZoBell 2216e 액체 배지에 현탁하여 10°C에서 7일간 배양하였다. 배양액을 serial dilution 하여 100  $\mu$ l를 1% tributyrin이 함유된 ZoBell 2216e plate에 도말한 후, 동일 온도에서 배양하여 저온성 lipases 생산 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 1% hydrocarbon이 포함된 ZoBell 2216e plate를 이용하여 순수 분리하였다. 분리된 미생물은 1% tributyrin이 포함된 ZoBell 2216e 한천배지에 접종하여 clear zone을 확인하여 우수 균주를 선발하였다.

### 3. 환경 DNA 추출

시험관에 퇴적물 시료 500 mg씩 넣은 후 0.1M phosphate buffer를 이용하여 수초간 분산시키고 상층액은 제거하였다. 이 시험관에 2×TENS 용액 (100 mM Tris (pH8.0), 40 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 200 mM NaCl, 2% SDS) 1 ml에 퇴적물 시료를 분산시키고, 멸균된 glass bead (150 ~ 212 $\mu$ m, Sigma) 500 mg을 넣은 후 3분간 bead-beating (BioSpec Products, Inc.; 3110BX, USA)을 실시하였다. 핵산이 포함된 파쇄액을 12,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 용액을 넣어주고 튜브를 뒤집으며 섞어준 다음 15,000 × g에서 20분간 원심 분리하여 층을 분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 튜브에 넣어준 후 3M sodium acetate (pH 5.2) 0.1 volume 과 100% isopropanol 1 volume을 넣고 -20°C에서 2시간 이상 방치하여 전체 핵산을 침전시켰다. 갈색의 핵산 물질은 PVPP (Polyvinylpyrrolidone; Sigma Chem. Cp., St. Louis, MO) microspin column을 이용하여 정제, 회수하였다(Lee *et al.*, 1999)

### 4. T-RFLP

16S rDNA 증폭을 위해 27F와 1522R을 사용하였고 27F primer는 5' 말단에 phosphoramidite dye인 5-hexachlorfluorescein으로 표지된 HEX-521F를 제작하여 사용하였다(PE Applied Biosystems, USA).

PCR 반응 후 PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 5 unit의 4 염기서열을 인지하는 제한효소(*Hha*I; GC'GC)와 1× restriction buffer 그리고 deionized water로 최종 부피 50  $\mu$ l로 하여 37°C로 4시간 반응 후 다시 2unit의 제한효소를 넣고 2시간 더 반응시켰다. 제한효소 반응 후 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 4.6)와 2.5 volume의 95% ethanol로 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하여 상온에서 말린 다음 생성된 말단 제한절편 (TRF; terminal restriction fragment)의 크기를 자동염기서열장치 (모델 377; Applied Biosystems Instrument, Foster City, CA, USA)를 사용하여 정확히 측정하였다.

각각의 말단 제한절편에 loading 용액 (deionized formamide:loading dye:DNA standard = 20:2:1) 3  $\mu$ l를 섞어준다. DNA standard (ROX 2500;ABI)의 길이는 각각 37, 94, 109, 116, 172, 186, 222, 233, 238, 269, 286, 361, 470, 490, 536, 827, 1,115, 1,181, 1,722, 2,008, 2,162, 2,465, 2,481, 2,860, 4,529, 5,099, 14,079 bp이다. 이 혼합액을 잘 섞어 준 후 95°C에서 2 분간 증탕하여 변성시키고 즉시 얼음 위에 놓는다. 이 혼합액 중 2  $\mu$ l를 36 cm 4.5% 폴리아크릴 아마이드 젤에 loading 하고 GS Run 36D-2400 옵션에 4시간 전개시킨 후 형광물질로 표시된 5' 말단 제한절편의 크기를 GeneScan 프로그램 (version 3.1)을 이용하여 local southern method 방식으로 green peak 80, red peak 50 이상인 피크의 크기를 비교하여 결정하였다.

## 5. PCR 및 Cloning

퇴적물 시료에서 직접 추출한 전체 DNA를 주형으로 하여 고세균류의 16S rDNA 부분을 증폭하였다. 분리된 균주의 경우, 순수배양된 단일균락을 50  $\mu$ l TE buffer에 현탁시킨 후 -70°C에서 2분, 80°C에서 2분씩 반응을 3회 반복하여 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 16S rDNA 유전자 증폭에는 27F/1522R primer set와 Arch 21F/Arch 958R primer set를 이용하였다. PCR 조건은 1× Buffer (MgCl<sub>2</sub> 포함), 0.2 mM dNTPs, 5% DMSO, 0.1% BSA, primer 0.2  $\mu$ M, *Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo Co., LTD, Shinga, Japan) 0.5 U, Template 약 100-10 ng으로 하였다. 반응 부피 50  $\mu$ l 용량으로 핵산 증폭기 모델 2400 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA)을 이용하여 95°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 35회 반복 반응시킨 후 72°C에서 7분간 더 반응 시켰다. PCR 산물을 분석하기 위해 0.8% 아가로스 젤에 PCR 반응액 5  $\mu$ l를 전기영동 (TAE 완충용액, 100V/cm)하여, EtBr (0.5  $\mu$ g/ml)에 10분간 염색하고 15분간 탈색 시킨 후 UV Illuminator (Vilber Lourmat, Cedex, France)로 관찰하였다.

전기영동하여 확인한 PCR 산물을 PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., St. Woods Hollow, Madison, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA를 pGEM-T Easy Vector (Promega Corp., USA)에 ligation 한 후 *E.coli* JM109에 형질 전환시켜 형질 전환체를 얻었다. 각각의 형질 전환된 *E.coli* JM109의 단일 균락을 직접 주형으로 하여 T7/SP6 vector primer를 이용하여 900bp 크기의 절편이 vector 내에 존재하는지의 여부를 확인하였다.

## 6. RFLP typing

분리된 균주 및 16S rDNA 클론의 16S rDNA 염기서열을 결정하기 전 같은 균주 및 클론을 RFLP typing을 통하여 선별하였다. PCR 반응액 5  $\mu$ l에 4염기를 인식 절단하는 제한 효소 (*Hae*III; GG'CC) 0.2 U를 넣고, 10× 완충용액을 1  $\mu$ l을 넣어 총 반응 부피 10  $\mu$ l로 하

여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 분석하기 위하여 2% 아가로스 MS (Boehinger Mannheim, GmbH, Germany) 젤에 제한효소 처리액 10  $\mu$ l를 50 V/cm에서 1시간 30분간 전기영동(0.5× TAE 완충용액)하고 EtBr(0.5  $\mu$ g/ml)에 10분간 염색, 15분간 탈색하여 사진 촬영을 하고 같은 양상을 보이는 균주별로 그룹을 결정하였다.

## 7. 염기서열 결정 및 분자분류

제한절편 다형성 분석(RFLP)을 통하여 균주 및 클론에 대한 형태를 결정하고, 각 형태에 대한 대표 균주 및 클론에 대해 염기서열을 분석, 비교하였다. 염기서열을 분석하기 위하여 위에서 얻은 PCR 산물을 PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp.)을 이용하여 정제하였고 최종부피는 50  $\mu$ l로 하였다. 정제된 PCR 산물을 이 반응의 주형으로 이용하였다. 염기서열분석에 이용한 primer는 표 3-1에 정리하였다. 염기서열 분석을 하기 위한 PCR 반응의 조건은 DNA sequencing kit (PE Applied Biosystem)를 이용하여 제조사의 방법대로 수행하였다. 반응이 끝난 후 3차 증류수로 최종 부피 50  $\mu$ l가 되도록 맞추어 3 M sodium acetate (pH 4.6) 0.1 volume과 95% 에탄올 2.5 volume을 첨가하고 -20℃에 10분간 방치하여 DNA를 침전시켰다. 이 후 70% 에탄올 500  $\mu$ l로 세척하고 건조하였다. Loading 용액 10  $\mu$ l를 잘 섞어 주고 95℃에서 2분간 변성 시키고 즉시 얼음 위에서 냉각시켰다. 분석은 자동 염기서열 결정장치(ABI 3100 ; Applied Biosystems Instrument, USA)를 사용하였고, 36 cm capillary 로 전개 후 16S rDNA 유전자의 염기서열을 결정하였다.

결정된 균주의 SSU RNA 염기서열은 일본의 유전자 데이터베이스인 DDBJ ([www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp))에서 Similarity-Rank 분석을 수행하였다. 또한 염기서열 정렬 프로그램인 PHYDIT (developed by Dr. J. S. Chun, version 3.2)을 이용하여 pairwise alignment 하고 Juke and Cantor distance method와 Neighbor-joining algorithm을 이용하여 계통수를 그렸다.

## 8. 균주 특성

모든 생리학적 테스트는 RFLP 분석결과를 통해 결정된 서로 다른 타입 중 각 타입을 대표하는 균주를 선별하여 수행하였다.

### 가. 온도 및 pH

적정 성장 온도 측정은 대표적으로 선별된 균주를 ZoBell 2216e broth로 10℃에서 배양하여 660 nm에서 흡광도 값이 0.01이 되도록 멸균수로 희석한 후 5ml의 ZoBell 2216e broth에 다시 접종하고, 12시간 간격으로 성장을 측정하였다. 최종 72시간째에 측정한 OD값으



로 적정 온도를 결정하였다.

최적 pH의 측정은 ZoBell 2216e 액체배지 제조 시 각 pH에 해당하는 buffer를 이용하여(최종 농도, 20 mM; pH5 ~ pH6; MES, pH6.5 ~ pH7.0; PIPES, pH7.5 ~ pH8.0; HEPES, pH8.5 ~ pH9; AMPSO [3-(1, 1 dimethyl-2 hydroxyethyl)- amino-2-hydroxy propanesulfonic acid]) 만들고 온도 측정 때와 마찬가지로 초기 접종량을 0.01로 일정하게 맞추어 주었다. 10℃에서 5일간 배양한 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Table 3-1. Sequences of primers used in this study.**

Primer	Specificity	Sequence ( 5`-3` )	Site	Reference
27F	Bacteria	5`-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3`	8-27	Giovannoi, 1991
357F	Bacteria	5`-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG-3`	337-357	Amann et al., 1990 Stahl et al., 1989
802F	Bacteria	5`-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3`	785-802	Lee et al., 1993 Woese, 1987
1241F	Bacteria	5`-ACA CAC GTG MTA CAA TGG-3`	1225-1241	Kato et al., 1997
518R	Universal	5`-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3`	534-518	Kato et al., 1997
1055R	Bacteria	5`-CAC GAG CTG ACG ACA GCC AGT-3`	1074-1055	Lee et al., 1993 Woese, 1987
1088R	Bacteria	5`-GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC-3`	1171-1088	Lee et al., 1993 Woese, 1987
1522R	Bacteria	5`-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3`	1541-1522	Giovannoi, 1991

**F; Forward, R; Reverse**

**M = C:A , W = A:T, R = A:G, N = A:C:G:T**

#### 나. 압력의 영향

압력에 대한 영향을 측정하기 위하여 3일간 Zobell 2216e 액체배지에서 배양한 균주를 초저온용 튜브 (2 ml 용량)에 배양액이 약간 넘치도록 넣은 후 파라필름으로 공기방울이 들어가지 않도록 막아주고 압력 배양 용기에 넣어 원하는 압력으로 조절하여 10℃에서 5일간

배양하였다. 5일 후 배양액을 회수하여 세포모양 변화를 주사 전자현미경 상에서 관찰하였다. 주사 전자현미경 사진촬영을 위한 시료의 준비는 고정, 탈수, 건조, 금박코팅의 과정을 거쳤으며 전자현미경은 JSM-5410LV (JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 고정화 단계에서 1% OsO<sub>4</sub>를 이용하는 기존 방법보다 조금 더 높은 농도인 4% OsO<sub>4</sub>를 이용함으로써 세포손상을 최소화하였다. 또한 탈수 과정에서의 세포 유실을 방지하기 위하여 polycarbonate membrane filter (pore size; 0.22 μm)에 부착시켜 탈수를 진행하였다.

#### 다. 인지질 지방산 분석

인지질 지방산 분석을 위하여 먼저, 균주 배양액 10 ml을 원심 분리한 다음, 침전물을 PBS (pH 7.0)완충용액으로 2번 세척하였다. 세척한 침전물을 1 ml의 증류수를 첨가하여 현탁시킨 후 5 ml의 메탄올과 10 ml의 클로로포름을 가하여 혼합한 다음 1시간 이상 암실에 방치하였다. glass filter를 이용하여 위의 반응액을 여과하고 여과된 액을 메탄올층과 클로로포름층의 분리를 위해 4℃ 암실에서 12시간동안 방치하였다. 분리된 클로로포름층을 취하여 회전 진공농축기를 이용하여 용매를 제거한 다음 1 ml의 클로로포름으로 총지질을 녹였다. 이렇게 추출된 총지질은 클로로포름으로 평형화되어 있는 실리카 칼럼에 흡착시키고, 클로로포름 30 ml과 아세톤 30 ml로 인지질외의 지질을 용출시킨 다음 메탄올 30 ml을 이용하여 인지질을 분리하였다. 분리된 인지질에 내부표준물질 (C19:0) 50 ug을 첨가하여 용매를 제거한 다음 0.5 ml 벤젠으로 녹여서 지방산 시료로 이용하였다. 0.5 ml 벤젠에 녹아있는 지방산 시료에 1.5% NaOH-MeOH을 0.5 ml 첨가하여 60℃에서 20분간 반응시키고 1.5% HCl-MeOH 0.5 ml을 첨가하여 60℃에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 핵산 1 ml과 증류수 0.5 ml을 첨가하여 30 분간 방치한 다음 핵산층을 취하여 지방산 분석시료로 이용하였다. 지방산 분석시료는 GC (Hewlett-Packard GC 5890 series II)를 이용하여 분석하였고, 분리온도는 비극성인 SPB-1 column과 극성인 HP-20M column 사용시 각각 200℃와 210℃로 하였으며 주입부와 검출부 온도는 250℃였다. 지방산은 세균 MEFA standard (Supelco Inc., USA)와 equivalent chain length (Atrasky et al., 1992)를 이용하여 동정하였다.

#### 라. Lipase activity 측정

Lipase activity는 1% tributyrin이 포함된 ZoBell 2216e 한천배지에 순수 분리된 저온성 미생물과 활성 대조 미생물 (*Aeromonas* sp. LPB#4)을 접종한 후, 활성 확인 온도인 4℃, 10℃, 25℃에서 7일간 배양하여 clear zone 생성 확인으로 lipase 활성을 확인하였다.

#### 9. 심해퇴적물의 유전체 추출

심해 퇴적물로부터 DNA의 추출은 Zhou (Zhou, et al., 1996)의 방법을 이용하였다. 먼저 DNA를 추출하기위해 퇴적물 시료 5g에 0.1 M Na-phosphate buffer(pH 8.0) 25ml을 첨가하여 혼합한 다음 4℃에서 원심분리 (7,600 x g, 10 min)하여 침전물만 회수하였다. 회수된 침전물에 추출용 완충용액 13.5 ml을 첨가하여 혼합시킨 다음 lysozyme 70 mg을 첨가한 후 37℃에서 1시간 진탕 반응하였다. 반응액에 20% SDS 용액 1.5ml을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 후 60℃에서 12시간동안 반응시켰다. 반응액을 실온에서 15분간 원심분리 (2800×g)하여 상등액을 회수한 다음, 침전물에 추출용 완충용액 4.5 ml과 20% SDS 용액 0.5 ml 첨가하여 원심분리하여 상등액을 회수하는 과정을 2회 반복하였다. 원심분리로 회수된 상등액에 동일한 용량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (Phe:Chl:Iaa = 25:24:1)을 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 원심분리 (12000rpm, 상온, 15분)하여 상등액만을 모은 후 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 1시간동안 방치하였다. 혼합액을 원심분리 (12000rpm, 상온, 15분)하여 상등액을 제거한 다음 동량의 70% ethanol로 세척한 후 DNA를 공기 중에서 건조시켰다.

## 10. 심해미생물/해양환경유전체 자원 분석 및 활용

### 가. Sampling site

해안 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태종대(depth, ~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), Edison Sea Mount 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 90' N, 130° 48' E), 남극, 오오츠크해 해역등으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집계(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다.

### 나. 심해 퇴적물로부터 저온의 지질 가수분해효소를 생산하는 미생물 분리

심해 퇴적물을 저온 (10℃)에서 농후 배양하였다. TCN plate에서 clear zone을 형성하는 균주를 지질 가수분해효소 활성이 있는 미생물로 1차 선별하였다. 지질 가수분해효소 활성이 확인된 미생물을 10℃에서 순수 분리한 결과 90여 균주를 분리하였다. 진정 저온성 균주이며, cold-adapted extracellular 지질 가수분해효소를 생산하는 저온성 균주를 RFLP typing 방법으로 선별하였다. 선별된 저온성 균주를 16S rDNA 분석을 통해 분류적 위치 결정하였다.

### 다. 균주 분리 및 보관

균주들은 ZoBell 2216e 액체배지에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 25°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두번 세척 한 다음 생축매로 사용하였다. DH5a 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 박테리아 세포(Stratagene, LaJolla, CA)는 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 37°C Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다. 배양된 세포는 glycerol 40% (v/v)로 -70°C에서 보관하였다.

## 11. 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색

### 가. Hydantoinase (HDase, 광학활성 아미노산 생성효소) 탐색

#### (1) 대상 시료 준비

해안 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37o 51' N, 129o 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38o 00' N, 131o 27' E), 태종대(depth, ~20m; 35o 14' N, 129o 45' E), 시화(Yellow Sea, Korea) 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31o 90' N, 130o 48' E)으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집게(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다.

#### (2) 균주 분리

라세믹 hydantoin을 기질로 이용하여 pH 지시약으로 사용되는 Phenol red가 들어간 hydantoin agar plate에 시료를 도말하였다. 25°C에서 배양하면서 도말한 주변이 붉은 색에서 노란 색으로 바뀐 곳에서 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 HDase 활성이 있는 미생물로 선별하였다. 최종적으로 순수 분리된 균주를 HDase 활성 미생물로 선정하였다.

#### (3) Hydantoin 분해 반응조건과 spectrophotometric assay

Hydantoin 가수분해효소 활성을 측정하기 위한 hydantoin 기질에 대한 가수분해 반응, 10% dimethylaminobenzaldehyde (in 6 M HCl)를 이용하여 hydantoin 의 분해산물인 N-carbamoylglycine (NCG)를 분석하는 방법을 실시하였다. 우선, 750  $\mu$ l의 1% hydantoin을 55°C에서 전반응을 한다. 전반응 산물에 10  $\mu$ l의 미생물 (10-100mg)을 넣고 55°C에서 반응 시켰다. 반응 종결은 250  $\mu$ l의 10% dimethylaminobenzaldehyde (in 6 M HCl)의 첨가

했다. 반응액내 현탁되어 있는 세포는 원심 분리하여 제거시키고, 상등액을 취한 후 440 nm에서 흡광도를 측정함으로써 분해산물인 N-carbamoylglycine (NCG)의 생성시는 흡광도의 값이 증가하게 되어 hydantoin 분해 활성을 분석할 수 있었다.

#### 나. CGTase (CD 합성효소) 탐색

##### (1) 대상 시료 준비

해안 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태종대(depth, ~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), 시화(Yellow Sea, Korea) 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 90' N, 130° 48' E)으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집게(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다. 구체적으로, 상기 대상 시료 중 0.3g의 차가운 퇴적물을 반죽한 후 영양 풍부 배양액에 배양하여 균주를 분리하였다.

##### (2) 균주 분리

영양 풍부 배지는 2%의 starch (전분)을 1리터의 해수인 미네랄 염 배지(MM2)에 혼합하여 제조하였다 (Ferrara-Guerrero, et al., Handbook of methods in microbial ecology. Lewis Publishers, Florida, p9-19, 1993). 25°C에서 7일간 배양하여 클론들을 분리하였다. 또한, 연속적인 접종 및 25°C의 전분 ZoBell 아가(agar)에 접종하여 상기에서 분리된 클론들로부터 전분 plate에서 clear zone을 형성하는 균주를 전분 분해 활성이 있는 미생물로 일차 선별하였다. 최종적으로 순수분리를 완료하였다.

##### (3) CD 합성 분석조건과 spectrophotometric assay

Phenolphthalein을 이용하여 CD 합성효소 (CGTase) 생산미생물 탐색하였다. 먼저, 전분 분해 미생물로 확인 된 균주를 5 ml 씩 배양하여 원심분리 후 얻어진 상등액을 조효소로 분석에 사용하였다. 분석조건은 2%의 soluble starch 기질 용액 (50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.75 ml에 조효소액 0.2 ml를 가하여 55°C에서 30 분간 반응한 후, 반응액에 0.375 ml의 0.2 M NaOH를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응정지 후 0.02%의 Phenolphthalein 용액을 5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>에 녹여 550 nm에서의 흡광도를 측정하고 Blank와 비교하여 흡광도의 감소를 효소활성을 갖는 균주로 선별하였다.

## 다. Epoxide hydrolase (EHase, 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소) 탐색

### (1) 대상 시료 준비

해안 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태종대(depth, ~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), 시화(Yellow Sea, Korea) 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 90' N, 130° 48' E)으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집게(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다. 구체적으로, 상기 대상 시료 중 0.3g의 차가운 퇴적물을 반죽한 후 영양 풍부 배양액에 배양하여 균주를 분리하였다.

### (2) 균주 분리

영양 풍부 배지는 1%의 styrene oxide 또는 알칸 혼합물(nC8, C10, nC12, nC13, nC14, nC15, nC16, C17, nC18, 및 사이클로헥산, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 1 리터의 해수인 미네랄 염 배지(MM2)에 혼합하여 제조하였다. 25°C에서 7일간 배양하여 클론들을 분리하였다. 또한, 연속적인 접종 및 25°C의 ZoBell 아가(agar)에 접종하여 상기에서 분리된 클론들로부터 균주를 분리하여 이용하였다.

### (3) 미생물 균주 및 배양 조건

균주들은 ZoBell 2216e 액체배지에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 25°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한 다음 생축매로 사용하였다. DH5a 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 박테리아 세포(Stratagene, LaJolla, CA)는 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 37°C Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다.

### (4) Epoxide 분해 반응조건과 spectrophotometric assay

Epoxide 가수분해효소 활성을 측정하기 위한 epoxide 기질에 대한 가수분해 반응, NaIO<sub>4</sub>를 이용한 phenyl-1,2-ethanediol의 산화반응 및 자외선 분광기를 이용한 분석은 다음과 같이 실시하였다. 우선, 미생물 세포 (10 mg/ml)와 반응액의 10 % (v/v)에 해당하는 200 μl의 dimethylformamide (DMF)를 첨가한 1,800 μl의 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)

에 정해진 농도의 epoxide를 첨가하고 전체 반응 부피를 1,920  $\mu\text{l}$ 로 한 다음, 진탕배양기를 이용하여 교반속도 250rpm, 온도 30°C에서 15분간 반응시켰다. 위의 반응액에 80 $\mu\text{l}$ 의 sodium metaperiodate 용액(stock solution: 100 mM NaIO<sub>4</sub> in DMF)을 첨가하고 약 2분간 vortexing함으로써 반응액내 생성된 diol과의 산화반응을 실시하였다. 반응액내 현탁되어 있는 세포는 원심 분리하여 제거시키고, 상등액을 취한 후 희석하여 290 nm에서 흡광도를 측정함으로써 epoxide 분해 활성을 분석하였다.

#### (5) *Erythrobacter* 속의 세포 유래의 epoxide 가수분해효소 활성을 이용한 다양한 에폭사이드 기질의 입체선택적 가수분해 반응

다양한 에폭사이드 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응은 *Erythrobacter* 속 whole cell (200 mg/ml)과 2 mM의 라세믹 에폭사이드 기질을 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 다음, shaking incubator(30°C, 200 rpm)에서 교반하면서 반응을 진행하였다. 에폭사이드 가수분해 반응에 대한 GC 분석을 위하여 일정간격으로 얻은 샘플에 존재하는 에폭사이드를 헥산으로 추출하고, 이 유기용매층을 chiral GC로 분석하여 광학순도(enantiomeric excess)와 수율 등을 결정하였다.

$$\text{광학순도} = \frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$$

#### (6) GC 분석

Epoxide 가수분해효소 활성에 의하여 분해되는 epoxide와 생성되는 diol의 일치성을 비교, 평가하기 위하여 sodium metaperiodate (NaIO<sub>4</sub>)를 첨가하기 전 반응액을 취하여 hexane으로 남은 epoxide를 추출한 후 유기용매층을 GC로 분석하였다. 검출기로는 FID를, 분석용 column으로는 Gamma cyclodextrin Trifluoroacetyl (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 $\mu\text{m}$  film thickness; Astec, USA)을 사용하였다. 이동가스로 헬륨을 사용하였으며 injector, 그리고 detector의 온도는 각각 180, 180°C였으며, column 온도는 각 기질에 맞게 Astec회사의 가이드를 참고하여 결정하였다.

### 라. 광학특이적 lipase 탐색

#### (1) 대상 시료 준비

해안 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태종대(depth,

~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), 시화(Yellow Sea, Korea) 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 90' N, 130° 48' E)으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집게(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다. 구체적으로, 상기 대상 시료 중 0.3g의 차가운 퇴적물을 반죽한 후 영양 풍부 배양액에 배양하여 균주를 분리하였다.

## (2) 균주 분리 및 탐색

다양한 국내외 해양으로부터 채취된 시료를 멸균 해수에 넣어 현탁한 후, 기본배지 (3% Sea Salts)에 1% tributyrin (C4) emulsion이 첨가된 TBN agar plate에 도말하였다. TBN agar plate는 1% TBN을 0.1% Bacto yeast extract, 0.5% Bacto tryptone, 0.001% FePO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 3% sea salt가 혼합된 배지 1 L와 혼합하여 초음파 분쇄기를 이용해서 emulsion 한 후, 1.5% Bacto agar를 첨가하여 만들었다. 도말한 plate는 25°C에서 24시간 동안 배양하였고, tributyrin (C4)를 분해하여 투명환을 형성하는 균주를 1차 선택하였다. 마지막으로 16S rDNA분석을 통하여 리파아제 생산 균주를 최종 확인하였고, 이 균주들은 p-Nitrophenyl ofloxacin 가수분해를 위한 2차 탐색에 사용되었다.

## (3) 미생물 균주 및 배양 조건

균주들은 ZoBell 2216e 액체배지에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 25°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 한 다음 생축매로 사용하였다. DH5α 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 박테리아 세포(Stratagene, LaJolla, CA)는 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 37°C Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다.

## (4) p-Nitrophenyl ofloxacin (PNPO) 가수분해 활성 조사

Ofloxacin ester를 가수분해 하는 리파아제 활성은 합성 기질인 p-Nitrophenyl ofloxacin (PNPO)을 사용함으로써 조사되었다. 리파아제 활성은 PNPO로부터 분해되는 p-nitrophenol의 양으로 측정 되었다. 리파아제 생산 균주를 30°C에서 24시간 배양하여 cell을 얻은 후, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 washing하였다. 리파아제 활성을 측정하기 위하여 cell (1 g)은 반응액 (0.01 ml of 10 mM PNPO in acetonitrile, 0.04 ml of ethanol, and 0.95 ml of 50 mM Tris-HCl buffer [pH 8.0])과 혼합하여 10분 동안 반응시키면서 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.



## (5) Ofloxacin ester에 대하여 광학선택적인 균주의 탐색

2차 탐색을 통하여 선별된 균주를 30°C 에서 24시간 동안 배양한 후, 전체 cell (10 g)을 얻었다. 효소 반응을 위해서 0.1M 인산완충용액을 제조하였으며 기질로는 (R),(S)-ofloxacin propyl ester를 사용하였다. 인산완충용액 10 ml에 10 mM의 ofloxacin propyl ester를 첨가한 뒤 20분간 초음파 분쇄하여 유화시켜 반응에 사용하였으며 전체 cell (10 g)을 넣어 효소 반응을 개시하였다. 효소 반응은 30°C에서

48시간 동안 수행한 후, 100°C 끓는 물에 10분간 정치하여 효소의 반응을 정지시키고 동량의 methanol을 첨가한 뒤 vortexing하였으며 원심 분리하여 그 상등액을 회수하여 levofloxacin 분석에 사용하였다. 분석은 Hewlett Packard-Model 1050 HPLC system을 사용하여 330 nm에서 측정하였으며 고정상으로 Shiseido사의 CAPCELL PAK C18 (250 mm x 4.6 mm) column을 사용하였다. 그리고 이동상은 증류수와 methanol을 85:15로 혼합하여 9 mM의 L-isoleucine과 3 mM의 copper(II) sulfate pentahydrate를 첨가한 뒤 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다.

## 12. 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석

### 가. *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 에폭사이드 가수분해효소 유전자의 클로닝

PCR primer는 NCBI상의 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 hypothetical protein을 기준으로 디자인 하였다. pET 24a vector에 클로닝하기 쉽게 primer 양 끝에는 enzyme *Nde* I, *Xho* I 을 붙였다. 사용한 벡터는 pET24a vector (Novagen)이고 *Escherichia coli* DH5a, *Escherichia coli* BL21를 이용하여 클로닝을 하였다. Genomic DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다. PCR product를 얻은 다음 효소 부분을 자른 후 pET24a vector에 삽입시킨다. 그리고 DH5a로 transformation시켜 준다. 클로닝이 잘 되었는지 sequencer를 이용하여 염기서열을 확인한다. 확인 후 DH5a에 있는 유전자를 발현할 수 있도록 BL21으로 transformation 시켜준다.

### 나. 단백질 정제

BL21을 3ml 키운 후 다음날 1L에 옮겨 600nm에서 흡광도가 0.4-0.6이 되면 최종농도가 1mM이 되게 IPTG를 넣어준 후 3시간 더 37°C에서 배양한다. 배양된 cell을 centrifuge 하여 상등액은 제거한 후 cell은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 녹인 후 sonication 해준다. 다시 centrifuge하여 상등액(soluble)에 활성이 있으면 His-tag affinity column으로 정제한 후 투석막을 이용하여 Tris-HCl (pH 6.5), 0.5M KCl, 10% glycerol buffer로 투석한다. 그리고

SDS-PAGE에 단백질의 위치와 양을 확인한다.

#### 다. 에폭사이드 가수분해효소의 최적 pH, 온도

최적온도와 pH는 colorimetric assay로 측정하였다. 최적온도 실험은 10-60℃ 까지 5℃ 씩 상승시켜서 측정하였다. pH는 sodium acetate (pH 4.5-5.5), MES (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.0-9.0), glycine (pH 9.0-10)으로 네 가지의 buffer를 사용하였다.

#### 라. 기질 선택성

EEH1의 단백질의 기질선택성을 알아보기 위해 30 $\mu$ g의 분리된 epoxide hydrolase를 1ml 의 100mM MES (pH 6.5)이 함유된 10ml의 vial내에 다양한 기질과 혼합하였고, 40℃의 200rpm에서 흔들어 배양하였다. 반응물은 2ml의 헥산으로 추출하였고, 각각의 기질에 대한 최대 광학순도[ee; ee= 100 X (S-R)/(S+R)]는 키랄텍스 감마-사이클로텍스트린 트리플루오로아세틸(G-TA) 모세관 GC 컬럼을 이용하여 분석하였다.

### 13. 광학선택성 esterase 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석

#### 가. 유전자의 클로닝

PCR primer는 pET 24a vector에 클로닝하기 쉽게 primer 양 끝에는 enzyme *Nde* I, *Xho* I 을 붙였다. 사용한 벡터는 pET24a vector (Novagen)이고 *Escherichia coli* DH5a, *Escherichia coli* BL21를 이용하여 클로닝을 하였다. Genomic DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다. PCR product를 얻은 다음 효소 부분을 자른 후 pET24a vector에 삽입시킨다. 그리고 DH5a로 transformation시켜 준다. 클로닝이 잘 되었는지 sequencer를 이용하여 염기서열을 확인한다. 확인 후 DH5a에 있는 유전자를 발현할 수 있도록 BL21으로 transformation 시켜준다.

#### 나. 단백질 정제

BL21을 3ml 키운 후 다음날 1L에 옮겨 600nm에서 흡광도가 0.4-0.6이 되면 최종농도가 1mM이 되게 IPTG를 넣어준 후 3시간 더 37℃에서 배양한다. 배양된 cell을 centrifuge 하

여 상층액은 제거한 후 cell은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 녹인 후 sonication 해준다. 다시 centrifuge하여 상등액(soluble)에 활성이 있으면 His-tag affinity column으로 정제한 후 투석막을 이용하여 Tris-HCl (pH 6.5), 0.5M KCl, 10% glycerol buffer로 투석한다. 그리고 SDS-PAGE에 단백질의 위치와 양을 확인한다.

#### 다. 가수분해효소의 최적 pH, 온도

최적온도와 pH는 colorimetric assay로 측정하였다. 최적온도 실험은 10-60°C 까지 5°C 씩 상승시켜서 측정하였다. pH는 sodium acetate (pH 4.5-5.5), MES (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.0-9.0), glycine (pH 9.0-10)으로 네 가지의 buffer를 사용하였다.

### 14. 정보 databank을 이용한 효소 탐색 및 분석

#### 가. 정보분석

Moore foundation과 NCBI nr DB를 이용하여 기존의 효소를 phylogeny 분석을 통한 classification과 conserved motif를 유추하고, 형성된 conserved motif 정보를 이용하여 protein finder와 blast, psi-blast등 분석 실시.

#### 나. 유전체 대상미생물 확보 및 배양 조건

균주들은 ZoBell 2216e 액체배지에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 25°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 한 다음 생축매로 사용하였다. DH5a 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 박테리아 세포(Stratagene, LaJolla, CA)는 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 37°C Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다.

#### 다. Epoxide 분해 반응조건과 spectrophotometric assay

0.2g의 whole cell을 50mM MES (pH6.5)가 함유된 10ml vial에 2mM syrene oxide와 혼합하여 25°C에서 14시간 동안 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 2ml의 hexane으로 추출한 후 이 추출물을 capillary column (Supelco, BETADEx™ 120, 30m×0.25mm×0.25μm)이 장착된 Gas chromatography로 분석하였다.

## 제 2 절 연구 수행 결과

### 1. 심해 고세균류 다양성

지금까지 생태계에서 미생물의 다양성에 관한 연구는 세균류에 초점을 맞추어 진행되었는데 이것은 고세균류가 일반적인 환경보다는 매우 특수한 환경이나 극한 환경에서 분리되고 있는 사실에 기인하는 것으로 알려져 있다 (Bintrim *et al.* 1997). 이에 본 연구에서는 동해 및 일본연안 태평양 심해저 퇴적물 내에 존재하는 고세균류 군집의 다양성을 분석하고 분포를 파악함으로써 심해 환경에 대한 이해를 돕고자 다음과 같이 연구를 수행하였다.

동해 및 일본연안 태평양 심해저 퇴적물로부터 전체 핵산을 추출하고 고세균류의 16S rDNA 도메인 수준의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 약 900 bp의 고세균류 16S rDNA를 증폭한 후, 16S rDNA 클론을 얻었으며 제한효소를 이용하여 말단 제한 절편 다형성 분석을 수행하였다 (Figure 3-5, 3-6). 그림 3-5는 제한효소 *Hha*I (GCG'C)으로 처리하였을 경우 각 지역에서 나타나는 말단 제한절편 다형성을 분석한 결과이다. #621 (일본해구), #624 (동해) 지역에서는 약 326 base (peak 1, 2)에서 단일 주피크 (main peak)가 나타났으며, #626 (동해 화산활동지역) 지역에서는 326, 353, 201, 198 base (peak 3, 4, 5, 6)의 피크가 주요피크로 나타났다. 326 base 정도의 같은 크기 절편이 피크 1, 2, 3으로 세 지역에서 공통적으로 관찰되는 것으로 보아 같은 미생물 군집이 세 지역에 존재하고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 #626 (동해 화산활동지역) 지역에서는 #621 (일본해구)이나 #624 (동해)에서는 관찰되지 않은 종류의 다른 주 피크가 보였다. 이러한 경향은 다른 제한효소인 *Rsa*I (GT'AC)으로 처리하여 얻은 말단 제한 절편 다형성 분석에서도 나타나고 있다 (Figure 3-6). 그림 3-6에서 보는 바와 같이 #621 (일본해구), #624 (동해) 지역에서는 262 base (peak 1, 2)의 단일 피크가 관찰되었고 #626 (동해 화산활동지역) 지역에서는 262, 321, 247 base (peak 3, 4, 5) 피크가 관찰되었다. 이것은 #626 (동해 화산활동지역) 지역이 #621 (일본해구), #624 (동해) 지역보다 조금 더 다양한 고세균류 군집이 존재할 가능성을 보여주었다.

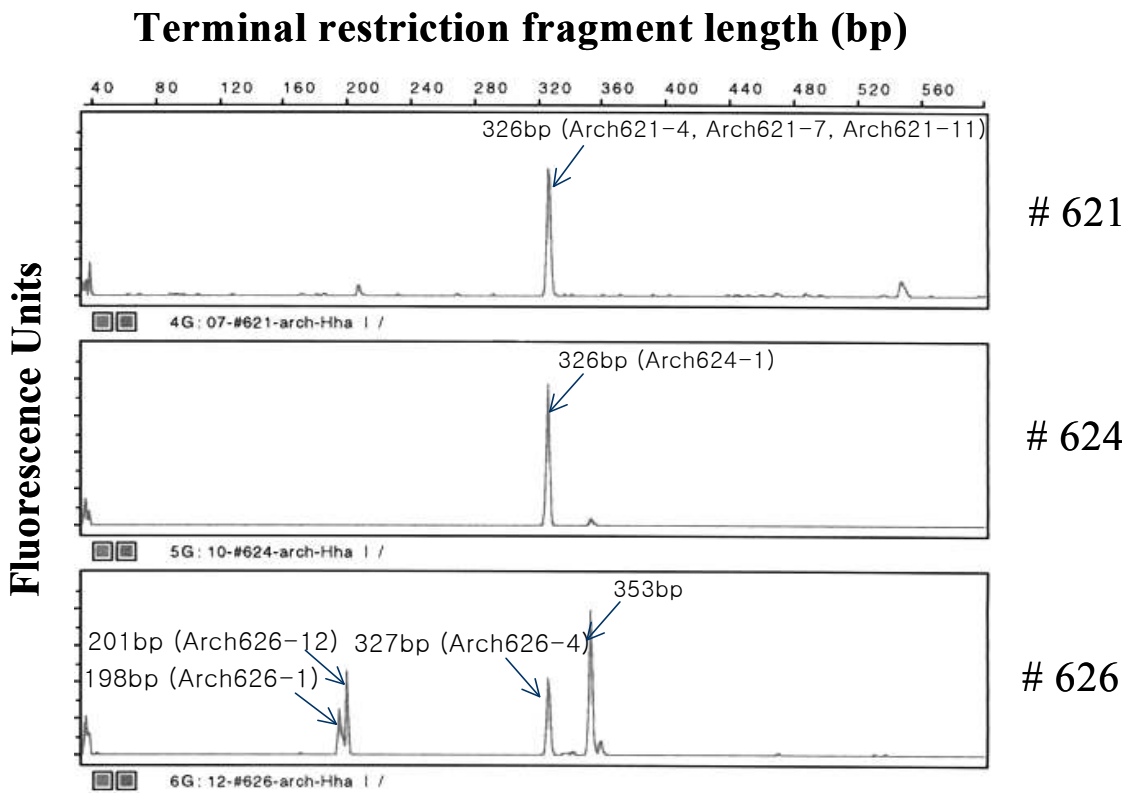


Figure 3-5. Profile of T-RFLP/*Hha*I analysis on the deep-sea sediments (#621, #624, and #626).

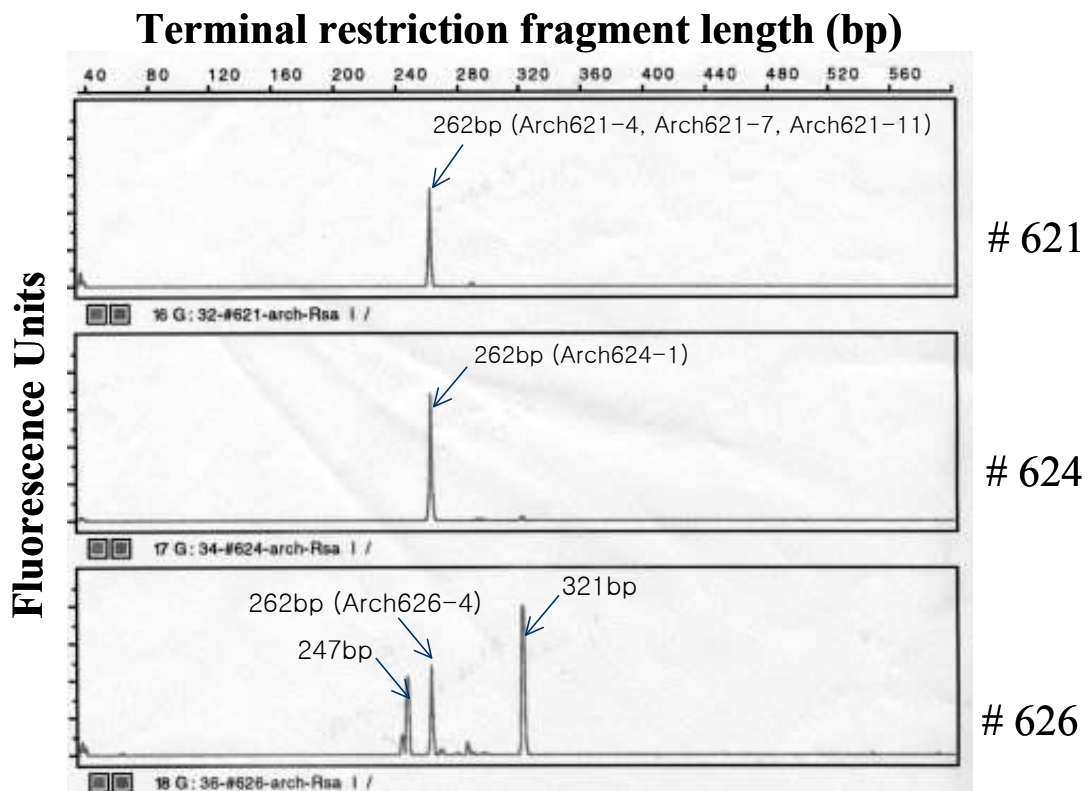


Figure 3-6. Profile of T-RFLP/*Rsa*I analysis on the deep-sea sediments (#621, #624 and #626).

T-RFLP 분석을 통하여 얻은 주요 피크를 검정하고 확인하기 위하여 고세균류의 16S rDNA 클론을 확보하여 분석하였다. #621 (일본해구), #624 (동해), #626 (동해 화산활동지역) 지역에서 임의의 고세균류 16S rDNA 유전자 클론 41개를 확보하였다. 이들 클론의 RFLP 패턴을 먼저 조사하여 같은 양상을 보이는 클론은 염기서열 결정 대상에서 제외시켰다. 각 지역별로 대표 클론을 선별하여 약 900 bp의 염기서열을 결정하고 16S rDNA에 근거한 분자분류학적 위치를 결정하였다. 이들의 분자분류학적 위치결정에 앞서 일본의 유전자 데이터베이스인 DDBJ를 비롯한 RDP (Ribosomal Database Project), NCBI (National Center for Biotechnology Information) 등과 같은 기존의 데이터베이스에서 염기서열 유사도 검색을 수행하였다. 검색한 결과 각 type별 클론의 염기서열 유사도는 79.96 ~ 98.70%로 다양하게 나타났다. 또한 제한효소를 처리하였을 때 예상되는 말단 제한 절편의 길이를 계산하여 앞서 보았던 T-RFLP 결과의 주요피크를 확인하였다 (Table 3-2). 표 3-2에서 보는 바와 같이 분리한 클론의 대부분은 T-RFLP 결과와 일치하는 말단제한 절편을 가지는 것을 알 수 있다. #621 (일본해구), #624 (동해) 지역에서 얻은 클론의 예상 말단제한절편의 크기는 326 bp로 T-RFLP 분석에서 주요 피크로 검출되었던 크기와 일치하였으며, #626 (동해 화산활동지역) 지역에서 얻은 클론의 예상말단제한절편 크기는 T-RFLP 분석에서 주요피크로 검출된 198 bp, 201 bp, 327 bp의 크기를 가지는 것을 확인하였다.

각 지역에서 얻은 클론들에 대하여 16S rDNA 염기서열에 근거한 분자분류학적 위치는 그림 3-7에 나타내었다. 분리한 클론들은 모두 고세균류 그룹인 *Crenarchaeota* 그룹과 *Euryarchaeota* 그룹의 일원인 것을 알 수 있으며, #621 (일본해구) 지역에서 얻은 클론인 Arch 621-4, Arch 621-7, Arch 621-11는 MG I (Marine Group I)에 속하는 것을 확인하였다. 분리한 클론들이 속하는 *Crenarchaeota* 그룹은 지구 해양환경에서 가장 빈번하게 발견되는 것으로 알려져 있으며 (Fuhrman *et al.*, 1992; Delong *et al.*, 1994; Mcinerney *et al.*, 1997), 모두 thermophiles에 속하는 특징을 가지고 있다. 또한 고세균류 그룹의 다른 축을 이루는 *Euryarchaeota* 그룹은 extreme halophiles, sulfur reducers, sulfate reducers, theromphilic heterotrophs, methanogens 등을 포함하는 비교적 다양한 대사능을 가진 고세균류를 포함하는 것으로 알려져있다 (Bintrim *et al.*, 1997).

Table 3–2. Description of representative clone based on RFLP/*Hae*III typing of the archaeal clones from the deep-sea sediment (#621, #624, and #626).

Site	RFLP typing	Clone no.	Representative clone	T-RFs / <i>Hha</i> I	T-RFs / <i>Rsa</i> I	T-RFs / <i>Hae</i> III
<b>#621</b>	I	9	Arch621-11	326	262	214
	II	2	Arch621-5	63	289	241
	III	2	Arch621-7	326	262	214
	IV	1	Arch621-1	326	262	214
	V	1	Arch621-4	326	262	214
	VI	1	Arch621-8	355	291	237
<b>#624</b>	I	9	Arch624-8	326	262	214
	II	2	Arch624-1	326	262	71
	III	2	Arch624-11	321	297	249
<b>#626</b>	I	6	Arch626-4	327	609	70
	III	1	Arch626-10	196	612	70
	VII	4	Arch626-2	198	244	317
	VIII	2	Arch626-1	198	244	317
	IX	2	Arch626-12	201	230	220



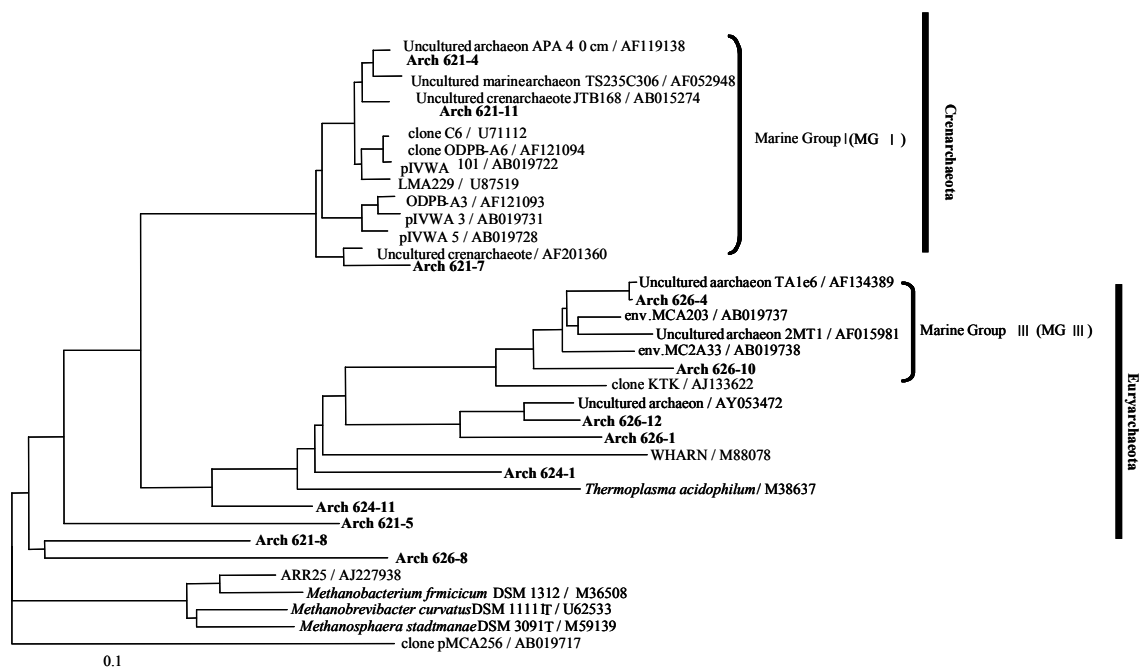


Figure 3-7. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of archaeal clones from the deep-sea sediment (#621, 624, and #626).

## 2. 심해 저온성 미생물 분리

### 가. 호기성 미생물

1차년도에 일본해구, 동해 지역에서 확보한 퇴적물 (#621, #624, #626)과 남서태평양지역 (Ayu Trough)에서 분리한 저온성 미생물 51균주 중에서 서로 다른 RFLP type을 보이는 16균주에 대하여 분자분류학적 위치 결정을 하였다. 이들은 크게 *Proteobacteria*의 alpha 와 gamma subdivison, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes* (CFB) groups, gram-positive bacteria 등 4개의 계통학적 그룹에 속하는 것을 알 수 있었다.

$\alpha$ -*Proteobacteria*에 속하는 것으로 나타난 LT3, KM12, KM23은 *Sulfitobacteria* 와 미동정된 해양세균과 염기서열 유사도가 약 97.15% ~ 99.10%로 비교적 높은 편이었다. 그림 3-8은 이들 분리균주의  $\alpha$ -*Proteobacteria* 그룹 내 분자분류학적 위치를 보여주고 있다. 해양환경에서 주로 분리되고 있는  $\alpha$ -*Proteobacteria*는 대사적으로 매우 다양한 양상을 보여주고 있으며 크게 bacteriochlorophyll a를 포함하는 phototrophic bacteria와 non phototrophic bacteria로 구분할 수 있다. 분리된 균주와 16S rDNA 염기서열 비교 분석 결과 높은 유사성을 보인 *Sulfitobacter* sp.는 호기적인 조건에서 주로 sulfide를 산화하는 역할을 하는 미생물로 보고되고 있다(Gonzalez *et al.* 1997).

약 56%에 해당하는 9개의 균주가  $\gamma$ -*Proteobacteria* 에 속하는 것으로 나타났다. 이 그룹의 미생물들이 전체 미생물의 계통학적 그룹에서 차지하는 비중이 매우 크고 대사능 또한 다른 그룹에 속하는 미생물보다 다양한 사실에 비추어 볼 때 심해에서도 매우 다양한 미생물들이 존재하고 있음을 추정할 수 있다. 또한 이 그룹에 속하는 9균주 모두가 *Halomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Shewanella* sp. 와 cluster를 이루고 있음을 알 수 있다 (Figure 3-9). 특히 분리된 LT17은 심해에서 분리, 보고된 *Shewanella* sp.와 95%의 16S rDNA 염기서열 유사도를 나타내고 있었다. *Shewanella* sp.는 대표적인 심해균주로서 저온성 균주이며 성장 시 높은 압력 조건을 요구하거나 높은 압력에서도 정상적인 성장을 보이는 호압성 미생물의 대표적인 예로 알려져 있다 (Nuria Bozal *et al.*, 2002). 이 외에도  $\gamma$ -*Proteobacteria* 그룹에 속하는 다른 순수 분리 균주인 KM2, KM4, LT5, LT6도 해양에서 많이 발견되고 있는 *Alteromonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp.와 계통학적으로 매우 가까이 위치하고 있는 것을 알 수 있었다. 16S rDNA 염기서열에 근거한 계통분석을 통해 KM4는 *Alteromonas macleodii*와 가까운 cluster에 포함되는 것을 알 수 있다. *Alteromonas* sp.는 주로 수중에 많이 서식하며 주요 분리원은 해수로 알려져 있다 (Ivanova *et al.*, 1998). 반면에 KM2, LT5, LT6은 이와는 조금 떨어진 *Pseudoalteromonas* 그룹 안에서 서로 유연관계를 가지는 것을 확인 할 수 있다. 특히 *Pseudoalteromonas*속은 *Alteromonas*속에 포함되는 것으로 초기에 이해되었지만 비교적 근래에 들어서 새로운 속(genus)으로 독립하게 되었다. *Pseudoalteromonas* sp.의 주요 분리원은 다양한 해양환경 (해수, 해양성 조류, 해양성 동물)에서 찾아 볼 수 있다 (Gauthier *et al.* 1995).

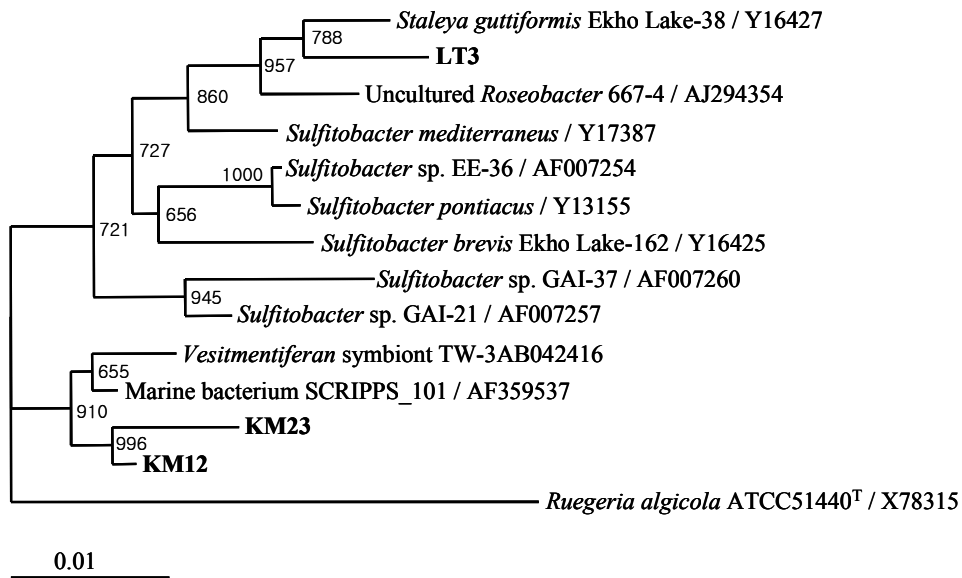


Figure 3–8. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the alpha subdivision members of the *Proteobacteria* (LT3, KM12, and KM23).

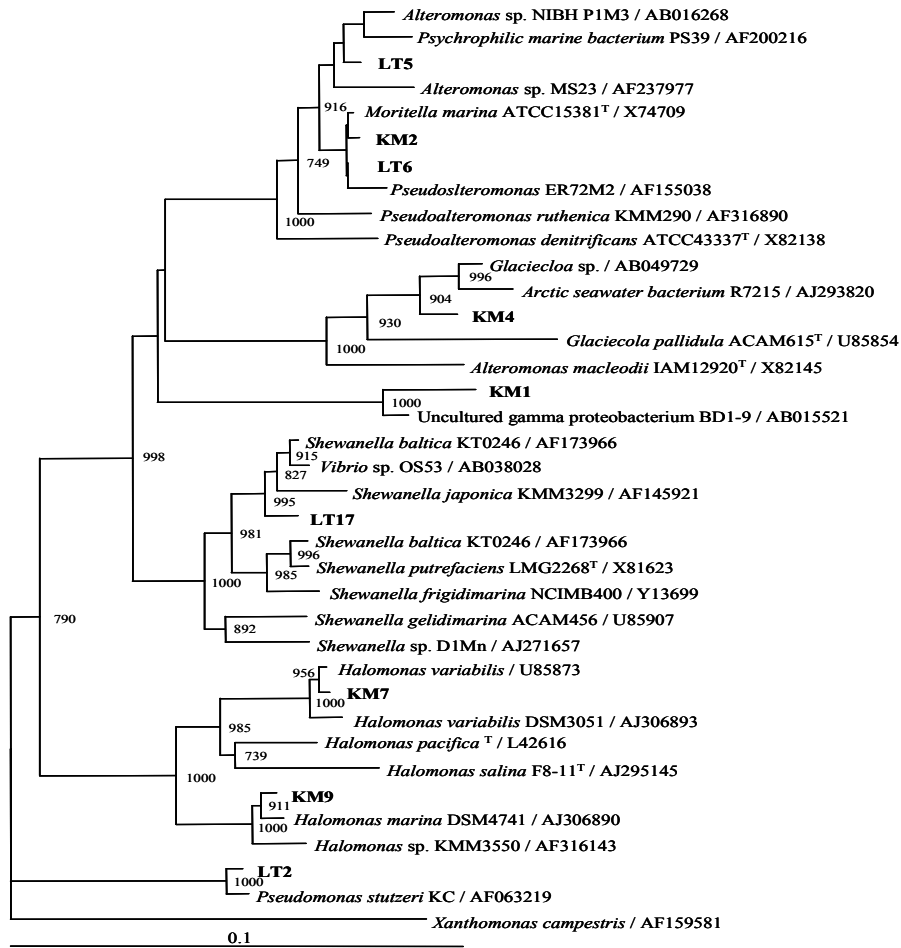


Figure 3–9. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the gamma subdivision members of the *Proteobacteria* (LT2, LT5, LT6, LT17, KM1, KM2, KM4, KM7 and KM9).

그리고 *Cytophaga* 속이 포함된 CFB (*Cytophaga-Flexibacteria-Bacterioids*) 그룹에는 LT1과 KM26이 속하였다(Figure 3-10), KM21과 KM22는 *Planococcus*, *Arthrobacter* 속이 포함되어 있는 그람 양성 세균 그룹에 속하는 것을 확인하였다 (Figure 3-11). KM21이 속하는 것으로 나타난 *Planococcus* 속은 low G+C mol%를 지니는 그람 양성 세균이며, KM22가 속하는 것으로 나타난 *Arthrobacter* 속은 high G+C mol%를 지니는 그람 양성 세균이다. 일반적으로 그람양성 세균 중에서도 high G+C mol% 그람 양성 세균은 매우 뛰어난 radiotolerant로 알려져 있다 (Kausar *et al.* 1997).

2차년도에 Edison 해산지역에서 확보한 퇴적물을 ZoBell 2216e 한천배지에 직접 도말하여 10°C에서 배양하면서 다양한 콜로니를 얻었다. 이를 각기 서로 다른 형태와 색깔에 따라 순수분리하고 10°C에서 2~3일 내에 성장을 하는 저온성 균주만을 최종 확보하였다. 이렇게 얻은 균주는 총 14균주이며 이들을 RFLP typing을 통하여 서로 다른 5개의 type을 얻었다. 각 type 마다 대표 균주를 한 개씩 선별하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였다(Table 3-3). PNP004의 경우는 심해 저온성 균주로 알려진 *Shewanella gelidimarina* ACAM456과 16S rDNA 염기서열의 유사도가 99%로 매우 높게 나타났으나 PNP001, PNP002, PNP005-1은 일반적으로 토양이나 자연환경에 널리 분포하는 *Pseudomonas* sp.와 16S rDNA 염기서열 유사도가 99% ~ 100%로 나타났다. 흥미로운 점은 심해저온성 균주와 염기서열 유사도가 높게 나타난 분리 균주의 경우 lipase activity를 확인할 수 없었던 반면, *Pseudomonas* sp.와 유사도가 있는 분리 균주의 경우는 높은 lipase의 활성이 나타났다.

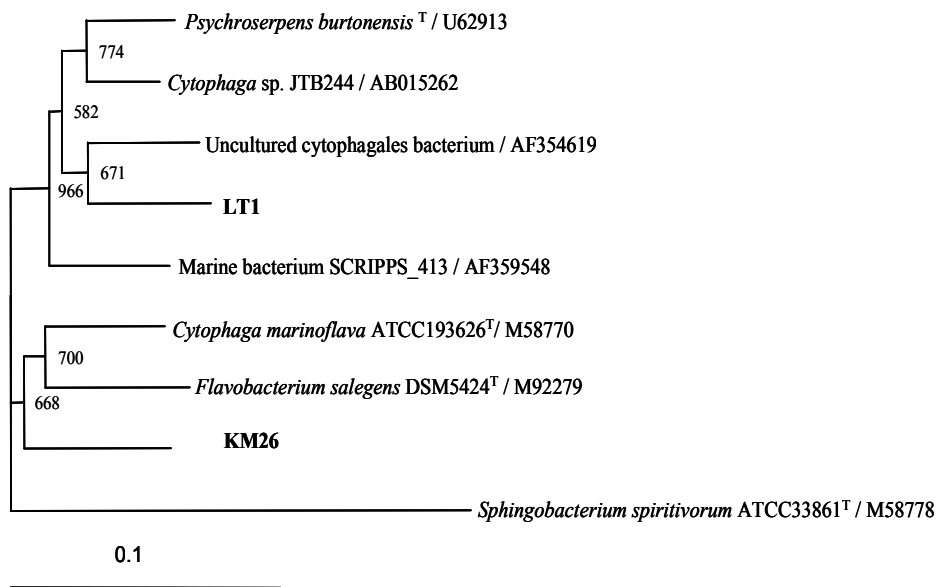


Figure 3–10. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes* phylum members (LT1 and KM26).

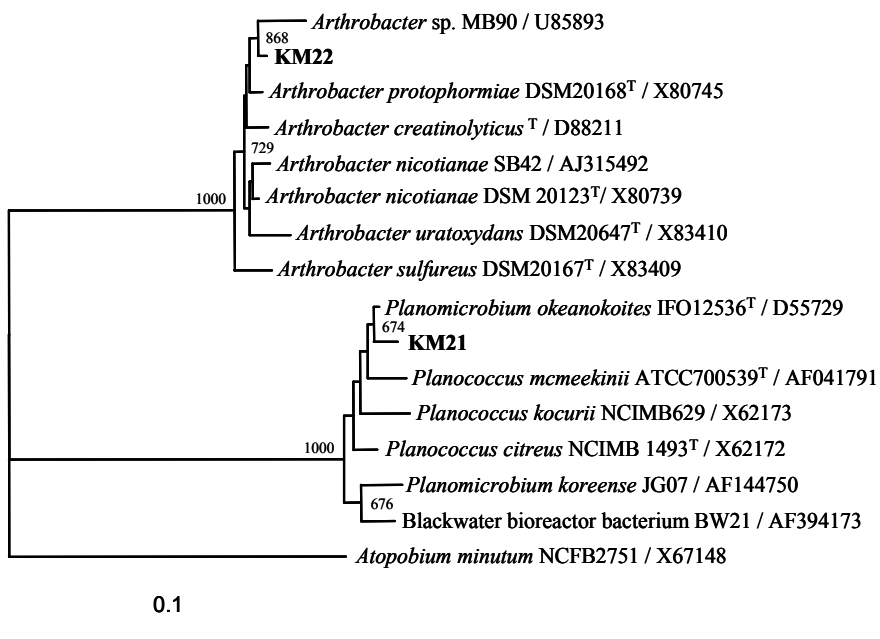


Figure 3–11. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the gram–positive bacteria members (KM21 and KM22).

Table 3–3. Analysis of 16S rDNA sequences for the psychrophilic strains from the deep–sea sediment (Edison Seamount).

Strain	Nearest Phylogenetic Neighbor	Similarity (%)
PNP001	Swine manure bacterim (AV167969)	99.078
PNP002	Unidentified gamma proteobacterium (AB015557)	99.745
PNP004	<i>Psychrobacter fozii</i> LMG21280 (AJ312213)	98.420
PNP005–1	<i>Pseudomonas</i> sp. 16S rDNA (AB013843)	99.623
PNP005–2	<i>Shewanella gelidimarina</i> ACAM456 (U85907)	99.377



## 나 .혐기성 미생물

심해의 냉용수 지역은 환원된 물질 즉 황화수소를 이용하여 바이오매스로 전환시키는 화학합성 원핵생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. 황화수소가 포함된 배지에서 성장할 수 있는 혐기성 저온 미생물 분리를 시도하였다. 혐기성 배지인 YPS배지에 퇴적물을 접종하여 4℃에서 배양하였고, 실험실에서 같은 혐기성 배지를 이용하여 계대배양을 하였다. 수차례의 계대배양을 통하여 순수 분리된 혐기성 저온 미생물을 NB001이라 명명하고 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. 분석 결과, *Fusobacteria* 속내에 현재까지 분류가 명확하게 되지 않은 그룹 내에 속하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3-12).

이 그룹은 대표적으로 *Clostridium rectum*, *Fusobacteria bacterium* Ko711, cf. *Propionigenium* sp. MGP-13AN과 uncultured *Fusobacteria bacterium*이 포함되어있으며 이중 NB001이 최근에 열수구에서 분리되어 현재까지 발표가 되지 않은 *Fusobacteria bacterium* Ko711, uncultured *Fusobacteria bacterium*과 16Sr DNA 염기서열 상동성이 99.82, 99.28%로 높은 상동성을 갖는 것으로 분석되었다. 또한 계통학적 분석을 통해 만들어진 계통도에서도 NB001이 *Fusobacteria bacterium* Ko711, uncultured *Fusobacteria bacterium*과 하나의 그룹으로 묶이는 것으로 확인되었다. 이와 같은 16S rDNA 염기서열 상동성과 계통학적 분석결과를 토대로 분리된 NB001이 현재 분류 체계가 명확하게 되어있는 *Fusobacteria* 그룹 내에 새로운 종임을 추정할 수 있었으며 신종임을 동정하기 위해서는 다각적 분류방법을 통하여 더 많은 분석을 수행해야 할 것이다.

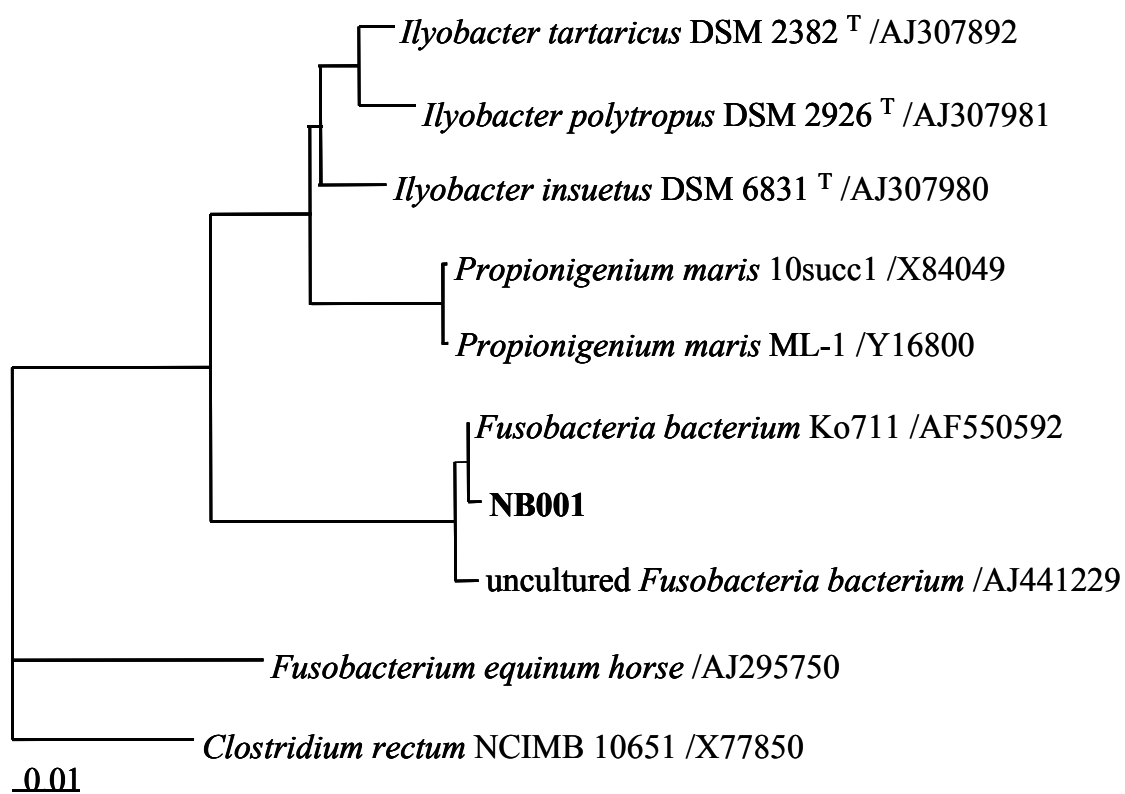


Figure 3–12. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of an anaerobic isolate (NB001).

#### 다. Lipase 생산 미생물

Edison 해산지역의 심해 퇴적물로부터 순수 분리된 지질분해효소 생산 균주는 70균주였으며, 분리된 균주 중에서 RFLP/*Hae*III typing을 통하여 서로 다른 패턴을 보이는 8개의 균주를 선별하였다. 이들 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 가장 상동성이 높은 균주와의 상동성을 표 3-4에 나타내었다.

그리고 이들 중 SL013, SL025, SL027, SL035의 계통도를 나타낸 것이 그림 3-13이다. 위의 4가지 균주 (SL013, SL025, SL027, SL035)는 *Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1, *Hyphomicrobium indicum* MBIC3157과 16S rDNA 염기서열 상동성이 99.0-99.5%로 매우 높은 것으로 확인되었다. 또한 계통학적 분석을 통해 만들어진 계통도에서도 4가지 균주가 다른 대조균주와는 달리 *Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1, *Hyphomicrobium indicum* MBIC3157 참고균주와 하나의 그룹으로 묶이는 것으로 보여졌다 (Figure 3-13). 이들 대조균주 중 *Hyphomicrobium indicum* MBIC3157은 *Hyphomicrobium*속과는 달리 분류학적 위치가 *Photobacterium*속과 계통학적으로 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 확인되었으며 여러 가지 기본적인 표현형특성이 *Photobacterium*과 매우 동일한 것으로 알려졌다 (Johnson and Weisrock, 1969).

또한 Radjasa 등 (2001)에 의해 최근에 심해퇴적물에서 분리된 *Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1 참고균주에 대해서도 *Photobacterium*과 계통학적으로 매우 유사한 것으로 언급되어 있다. 이와 같이 *Photobacterium*은 진화적으로 *Vibrio*와 매우 밀접한 관계를 이루고 있으며 *Vibrionaceae* 내에 구성되어 있지만 (Ruimy *et al.*, 1994) *Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1, *Hyphomicrobium indicum* MBIC3157은 아직까지도 명확하게 분류학적 위치가 결정된 것은 아니다. 따라서 분리된 4가지 균주는 현재 분류가 명확하게 되어있지 않는 *Vibrionaceae*과 내에 포함되어 분류학적 위치가 결정되지 않은 *Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1, *Hyphomicrobium indicum* MBIC3157과 매우 높은 염기서열 상동성 및 매우 밀접한 분류학적 관계를 가지므로 분리된 4가지 균주가 *Photobacterium*속내에 포함되며 lipase를 생산하는 새로운 종임을 동정하기 위해서는 더 많은 다각적 분류방법을 이용하여 분석을 수행해야 할 것이다.

Table 3–4. Analysis for 16S rDNA sequences of the lipase producing strains from the deep–sea sediment (Edison Seamount).

Strain	Nearest Phylogenetic Neighbor	Similarity (%)
SL12	<i>Psychrobacter glacialis</i> strain DD43	99
SL13	<i>Hyphomicrobium</i> sp. Ddeep–1	98
SL17	<i>Marine psychrotrophic bacterium</i> MstK25	98
SL22	<i>Psychrobacter glacialis</i>	100
SL25	<i>Hyphomicrobium indicum</i> MBIC3157	98
SL27	<i>Vibrio</i> sp. strain NIBH P2K5	96
SL29	<i>Marine psychrotrophic bacterium</i> MstK25	99
SL35	<i>Hyphomicrobium</i> sp. Ddeep–1	98

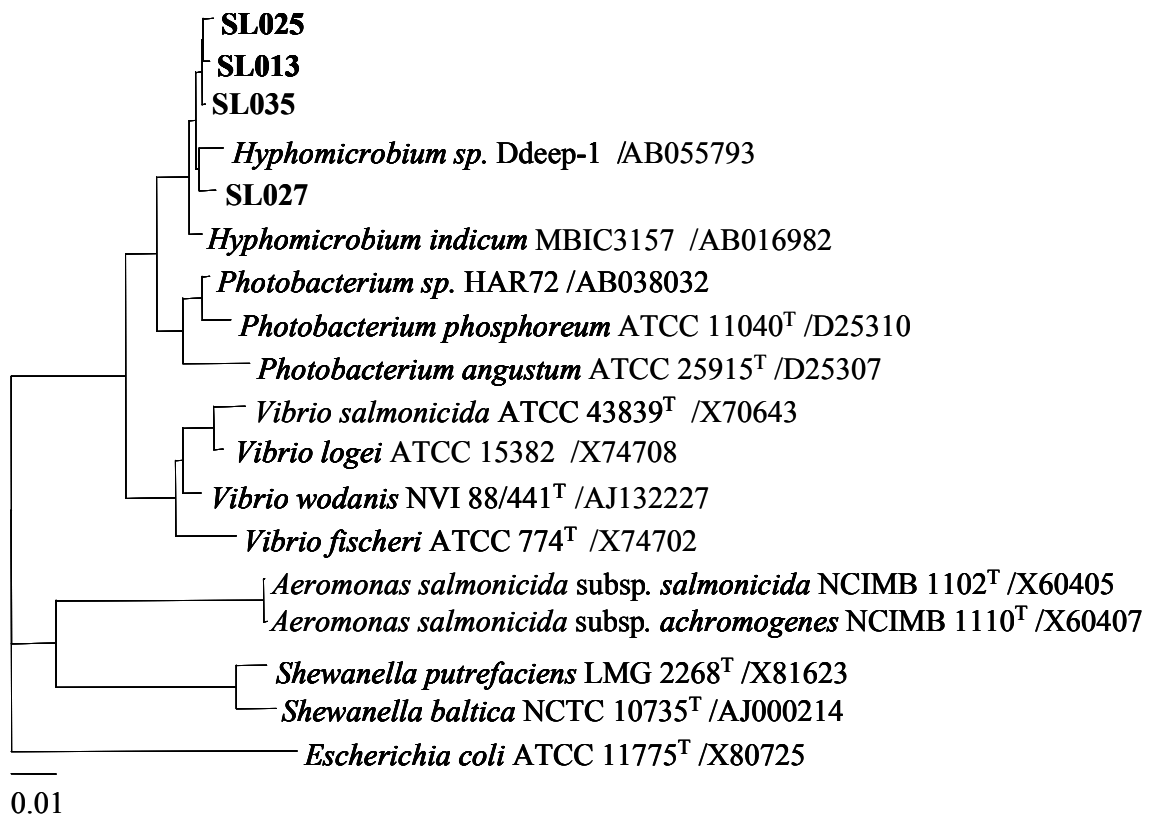


Figure 3-13. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the lipase-producing strains (SL013, SL025, SL027, and SL035) from the deep-sea sediment (Edison Seamount).

### 3. 분리된 미생물의 특성평가

#### 가. 온도 및 pH

저온성 미생물은 일반적으로 20℃ 이하의 온도에서 정상적인 생육을 보이는 균주로 정의되어 있다. 본 연구에서는 저온성 미생물을 선택적으로 분리하기 위하여 4℃와 10℃에서 분리작업을 수행하였다. 1차년도 기 확보된 대표균주 16개 균주를 대상으로 최적 성장온도를 측정된 결과는 표 3-5에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 분리된 저온성 균주 중 5균주인 KM7, LT3, LT5, LT6, LT17만이 진정 저온성 미생물임을 확인 할 수 있었다. 특히 심해 고유 균주인 *Shewanella* sp.와 염기서열 유사도가 가장 높았던 LT17은 15℃에서 최대 성장을 보였다 (Figure 3-14).

#### 나. 세포의 형태에 대한 압력의 영향

전형적인 심해미생물인 *Shewanella* 속에 포함되는 균주 LT17에 대하여 압력의 영향을 주사전자현미경상에서 관찰하였다. 일반적으로 *Shewanella* 속 미생물의 형태학적 특징은 상압 조건에서는 간균의 형태이면서 배양시간이 길어짐에 따라 여러 개의 세포가 길게 filamentous 형태를 나타낸다. LT17 역시 대기압 (0.1MPa)에서 배양한 세포 모양은 간균의 형태임을 확인 할 수 있었다(Figure 3-15, A). 그러나 50MPa의 압력을 주었을 때는 LT17의 모양이 조금 짧아진 간균형태로 관찰되었다(Figure 3-15, B).

#### 다. 인지질 지방산 조성

미생물 세포막 구성성분인 인지질 지방산은 미생물마다 특이한 조성을 가지고 있으며 그 조성 비율 역시 미생물마다 각기 다르므로, 미생물 동정 시 인지질 지방산 조성 분석이 중요하게 이용되고 있다. 일반적으로 저온성 미생물은 세포막 구성 인지질 지방산 중에 불포화 지방산이 차지하는 비중이 높다. 세포막에 불포화 지방산이 많은 비중을 차지하고 있는 만큼 저온에서도 세포막의 유연성을 유지 할 수 있는 것으로 보여지고 있다. 심해에서 분리, 보고된 저온성이면서 호압성인 미생물들에서 공통으로 관찰 할 수 있는 특징 중에 하나가 세포막 인지질 지방산의 조성 중에서 불포화 지방산의 비중이 높다는 사실에서 알 수 있듯이 세포막 구성 인지질 지방산 중에 불포화 지방산의 비중은 미생물의 저온에 대한 적응뿐만 아니라 압력에 대한 적응을 이해하는데 도움이 될 수 있다. 이에 본 연구에서는 LT17에 대하여 인지질 지방산 조성을 조사하여 기존에 보고된 다른 *Shewanella* sp.들의 인지질 지방산 조성과의 비교했다.

Table 3–5. Growth temperature of the isolated psychrophilic strains  
from the deep–sea sediments. (Ayu Trough and JAMSTEC)

Strain	5℃	10℃	25℃	35℃
KM 1	–	+	+++	+
KM 2	–	++	+	–
KM 4	–	–	–	–
KM 7	–	+	–	–
KM 9	–	++	+++	+
KM 12	–	+	+	–
KM 21	–	+	+	–
KM 22	–	++	+++	–
KM 23	–	+	+	–
KM 26	–	++	+	+
LT 1	–	++	+	–
LT 2	–	+	–	–
LT 3	–	+	–	–
LT 5	–	++	–	–
LT 6	–	++	–	–
LT 17	+	+++	–	–

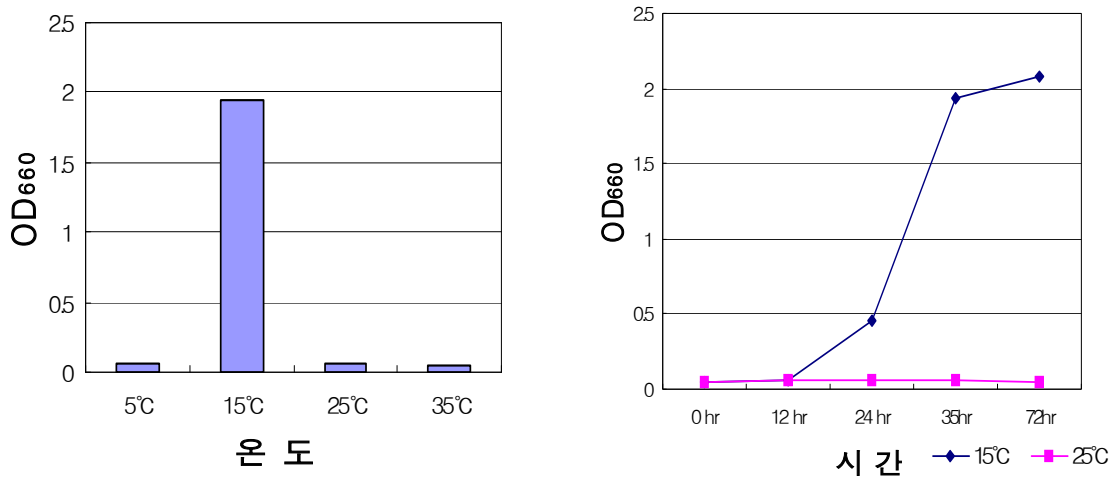
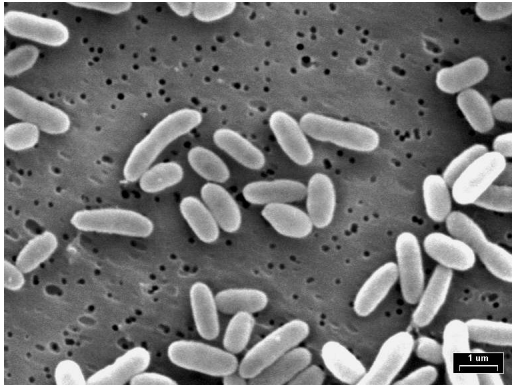


Figure 3-14. Determination of optimum growth temperature for strain LT 17.



**A. Atmospheric pressure (0.1 Mpa)**



**B. High barometric pressure (50 MPa)**

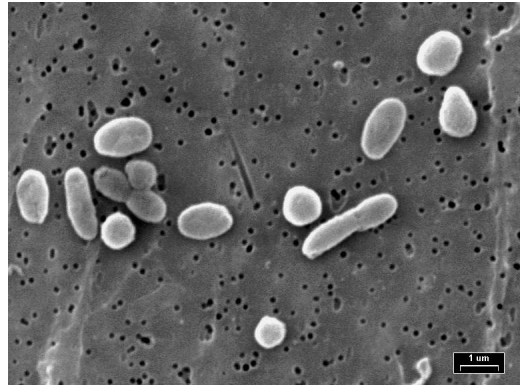


Figure 3–15. Effect of high barometric pressure (50 MPa) on the strain LT17.

Table 3-6의 결과를 보면, 분리된 균주 LT17의 인지질 지방산 성분 중에 불포화지방산인 palmitoleic acid (16:1 $\omega$ 7)가 전체 인지질 지방산 성분의 약 20%를 차지하는 것을 확인할 수 있다. 기존의 보고된 *Shewanella* sp.중에서도 저온성과 호압성을 모두 지닌 *S. frigidimarina*와 *S. gelidimarina*의 경우는 palmitoleic acid (16:1 $\omega$ 7)의 비중이 37%에서 많게는 55%까지 나타나는 것을 볼 수 있다. 반면에 *Shewanella* sp.중에서 중온성인 *S.alga*의 경우는 이 불포화지방산이 검출되지 않았음을 알 수 있다. 그리고 LT17의 인지질 지방산 분석에서 또 하나 흥미로운 사실은 *Flexibacter*, *Vibrio*, *Shewanella* 속과 같은 해양성 미생물에서 제한적으로 생산된다고 알려진 eicosapentaenoic acid (20:5 $\omega$ 3; EPA)가 다른 *Shewanella* 속 심해 호압성 균주에서 검출되는 것으로 확인 되었다는 것이다.

#### 라. Lipase activity

심해환경의 특징인 저온성에 초점을 맞추어 저온에서 활성을 가지는 유용효소의 개발을 위해 산업적으로 응용성이 높은 지질분해효소를 목적유용물질로 선정하였다. 이에 본 연구에서는 농후배양법을 통하여 저온에서 활성이 우수한 지질분해효소 생산 균주를 분리하였다. 그리고 1% tributyrin plate 법으로 4 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하면서 온도에 대한 특성과 lipase 생산능을 측정한 결과 SL13, SL25, SL27, SL35균주가 저온성 균주이며 lipase 생산성도 높은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3-16). 또한 대량의 균주에 대한 lipase 생산성을 검색하기 위해 PNPP (p-nitrophenylpalmitate)를 이용한 microplate 분석법을 구축하였다.

#### 4. 심해 유전체 자원 확보

다양한 지역의 심해로부터 확보한 퇴적물의 유전체 자원을 효율적으로 확보하기 위해 DNA 추출 및 클로닝 기술을 정립하였다. 심해 퇴적물로부터 DNA를 추출하여 23 kbp이상의 DNA를 얻었다. 추출된 DNA는 fosmid를 이용하여 유전체 라이브러리를 구축하고 있다.

Table 3–6. Comparison of fatty acid composition of LT17 and *Shewanella* species.

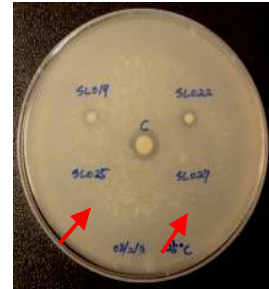
Strain	% composition					
	14:0	16:0	i13:0	i15:0	16:1 $\omega$ 7	20:5 $\omega$ 3
LT17	7.11	17.19	12.54	9.92	19.57	11.27
<i>S. frigidimarina</i>	2.7-4.1	4.5-16.9	3.1-8.3	5.6-10.7	37.6-55.1	1.7-6.8
<i>S. gelidimarina</i>	3.8-4.4	6.4-11.1	5.4-15.8	8.3-11.6	27.4-37.0	11.7-16.0
<i>S. benthica</i>	11.0-11.9	10.6-11.6	2.8-8.9	4.4-6.2	24.0-43.9	15.8-18.5
<i>S. hanedai</i>	7.6-10.1	12.2-15.0	5.1-7.7	7.9-8.2	25.0-33.1	19.2-22.2
<i>S. putrefaciens</i>	1.5-5.9	27.9-31.0	1.0-3.6	8.8-24.2	25.2-31.4	-
<i>S. alga</i>	0.7	13.3	0.5	17.8	-	-



4°C



10°C



25°C



Figure 3-16. Lipolytic activity of the lipase-producing psychrophilic strains from the deep-sea sediment (Edison Seamount).

## 5. 해양미생물/해양환경유전체 자원 분석 및 활용

후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태중대(depth, ~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), Edison Sea Mount 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 90' N, 130° 48' E), 남극, 오오츠크해 해역등으로부터 sampling을 통해 확보한 시료로부터 아래에 명기된 다양한 chiral compound 전환효소를 탐색하기 미생물을 확보하였고, 균주들은 ZoBell 2216e 액체배지에서 균 접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반 속도 250 rpm, 온도 25°C에서 2일간 배양하여 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 한 다음 생축매로 사용하였다. 또한 확보된 미생물은 이후 활용을 위해 -70°C에서 보관하였다.

또한 확보된 미생물의 다양성을 확인하기 위해 16S rRNA 유전자의 서열을 분석하고, phylip 프로그램을 이용하여 군집분석과 부분동정을 실시하였다 (Figure 3-17).

Edison 해산지역의 심해 퇴적물로부터 지질분해효소 생산 균주를 분리하기 위하여 1% hydrocarbone을 첨가시킨 ZoBell 2216e broth에 직접 퇴적물을 갈아넣고 10°C 농후배양 시켰다. 2~3주간 농후배양 시킨 배양액을 1% tributyrin 이 포함된 ZoBell 2216e 한천배지에 다시 접종하여 4°C와 10°C에 배양하면서 clear zone을 형성하는 균주를 형태 및 색깔에 따라 선택하고 순수 분리 하였다. 이렇게 분리된 균주는 모두 70 균주이며 RFLP/HaeIII typing을 통하여 서로 다른 패턴을 보이는 6개의 균주를 선별하였다. 이 균주들은 *Photobacterium* 속으로 포함되는 특징이 나타나고 있다. *Photobacterium* 속은 이전에 *Vibrio* 속으로 분류되었다가 최근에 다시 분류되고 있는 분류군이다.

분리된 6종의 균주들에 대해 16S rDNA 염기서열분석 결과 분리된 균주들이 표준균주들과 97.1~87.9%의 염기서열 상동성을 나타내었다 (Table 3-7). 이와 같은 결과로 분리된 저온성균주들이 신종임을 추정 할 수 있었다. 이 중 SL13 균주 등을 생화학적 test를 통해 신종으로 판명하였다.

G+C content와 DNA-DNA hybridization 분석에서 계통학적으로 유사도가 높은 균주들과의 관련성이 70%이하 (7~20%)로 *Photobacterium*속에 위치하는 신종인 것을 확인하였다 (Table 3-8). 분리된 균주들은 최적배양온도(14°C) 분석에서 진정 저온성균주로 확인되었고, 다양한 기질을 이용하는 것으로 나타났다 (Table 3-9).

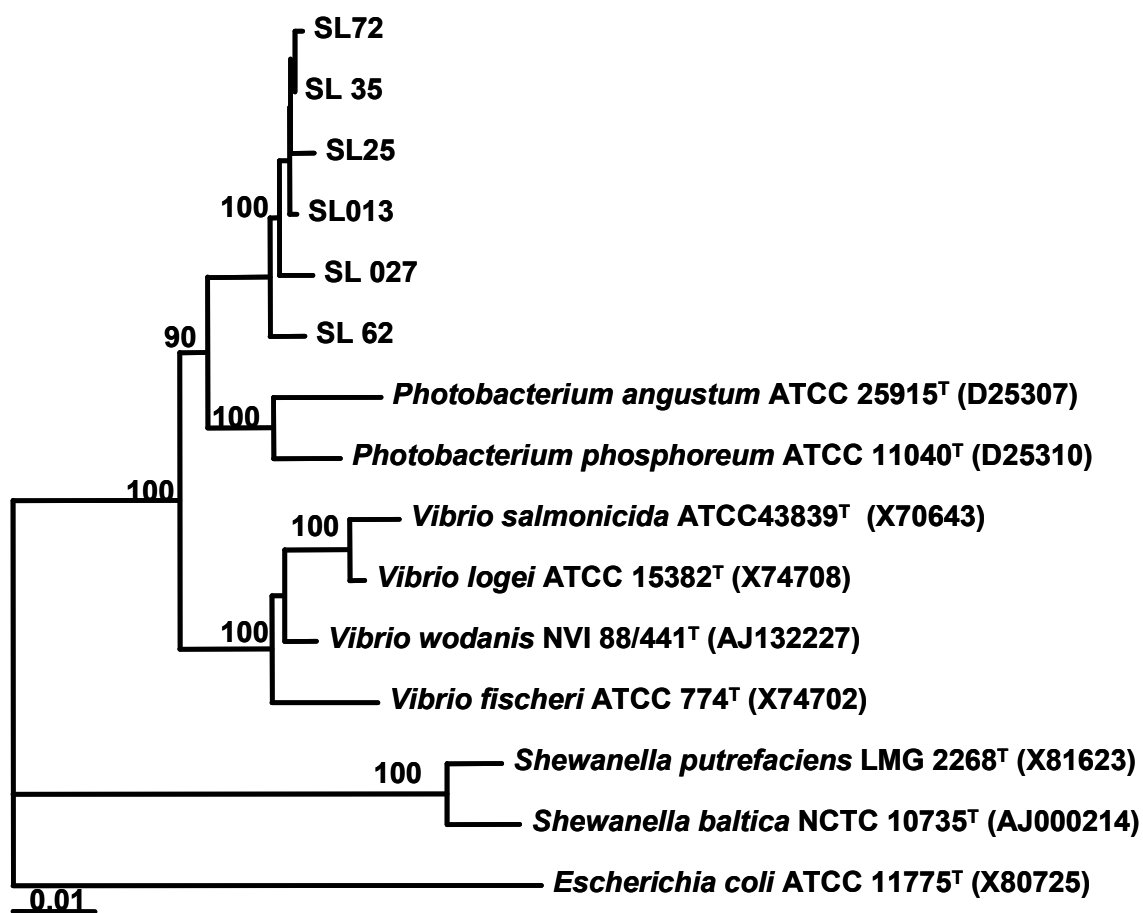


Figure 3–17. Phylogenetic positions of the lipase producing isolates. Bootstrap values (expressed as percentage of 1000 replications) are shown at branch points; values greater than 85% were considered significant. The bar indicates the Juke–cantor distance.

Table 3–7. 16S rDNA similarity values for isolates and related reference strains

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.SL72	–														
2.SL27	99.2	–													
3.SL62	99.1	98.7	–												
4.SL35	99.9	99.3	99.2	–											
5.SL13	99.7	99.2	99.0	99.6	–										
6.SL25	99.6	99.1	98.8	89.7	99.6	–									
7. <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup>	89.7	90.0	90.0	90.8	89.7	89.5	–								
8. <i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 2268 <sup>T</sup>	90.8	91.0	90.1	90.7	90.7	90.7	87.9	–							
9. <i>Shewanella baltica</i> NCTC 10735 <sup>T</sup>	90.8	90.1	90.1	90.7	90.7	90.6	88.1	98.5	–						
10. <i>Vibrio wodanis</i> NVI 88/441 <sup>T</sup>	97.1	96.5	97.2	97.0	96.7	96.8	89.8	89.9	89.7	–					
11. <i>Vibrio fischeri</i> ATCC 774 <sup>T</sup>	95.8	95.6	95.7	95.8	95.8	95.6	90.0	90.5	90.1	98.1	–				
12. <i>Vibrio salmonicida</i> ATCC 43839 <sup>T</sup>	95.6	95.2	96.0	95.7	95.7	95.5	89.9	89.1	89.9	98.1	97.1	–			
13. <i>Vibrio logei</i> ATCC 15382 <sup>T</sup>	96.2	95.9	95.8	96.2	96.3	96.1	89.7	89.5	89.5	98.7	97.7	99.1	–		
14. <i>Photobacterium angustum</i> ATCC 25915 <sup>T</sup>	96.5	97.0	96.7	96.6	96.0	96.5	89.7	90.3	89.7	95.3	94.7	94.6	95.0	–	
15. <i>Photobacterium phosphoreum</i> ATCC 11040 <sup>T</sup>	97.1	97.1	97.3	97.3	97.1	97.0	89.5	90.6	90.1	95.5	95.3	94.9	95.4	97.8	–

Table 3–8. DNA relatedness between SL13, SL62 isolates and reference strains, *Photobacterium* sp.

Strain	G+C content (mol%)	Hybridization (%) with labelled DNA from	
		SL13	SL62
SL13	43.8	100	71
SL62	43.9	71	100
<i>P. angustum</i> ATCC 25915	36.9	23.7	15.8
<i>P. phosphoreium</i> ATCC 11040	39.1	21.3	7.4



Table 3–9. Characteristics of the strains SL13, SL62, and reference strains, *Photobacterium* sp.

Characteristics	SL13	SL62	<i>P. angustum</i> ATCC 25915	<i>P. phosphoreum</i> ATCC 11040
Optimal growth temperature (°C)	14	14–17	25	18
Optimal growth pH	6	7		
Optimal growth NaCl (%)	2	2		
Catalase	+	+	–	+
Oxidase	+	+	–	+
Nitrate reduction	+	+	–	+
Indole production	+	+	–	–
Acid from glucose	–	–	+	+
Protease	+	+	+	–
Lipase	+	+	–	–
Utilization of :				
N–acetyl–D–galactosamine	–	+	+	–
D–galactose	+	+	+	–
D–mannitol	+	+	–	–
Sucrose	+	+	+	–
D–trehalose	+	+	–	–
Turanose	–	–	+	–
Glycerol	+	+	+	–

+, Positive; –, negative.

Test positive for all strains or species: arginine dihydrolase,  $\beta$ –glucosidase,  $\beta$ –galactosidase, utilization of glycogen, N–acetyl–D–glucosamine, D–fructose,  $\alpha$ –D–glucose, maltose, D–mannose, D–glucuronic acid.

Test negative for all strains of species: gram stain, urease, and utilization of adonitol, L–arabinose,  $\alpha$ –D–lactose, D–raffinose, L–rhamnose, D–sorbitol.

인지질 지방산 분석을 위하여 먼저, 균주 배양액 10 ml을 원심 분리한 다음, 침전물을 PBS (pH 7.0)완충용액으로 2번 세척하였다. 세척한 침전물을 1 ml의 증류수를 첨가하여 현탁시킨 후 5 ml의 메탄올과 10 ml의 클로로포름을 가하여 혼합한 다음 1시간 이상 암실에 방치하였다. glass filter를 이용하여 위의 반응액을 여과하고 여과된 액을 메탄올층과 클로로포름층의 분리를 위해 4℃ 암실에서 12시간동안 방치하였다. 분리된 클로로포름층을 취하여 회전 진공농축기를 이용하여 용매를 제거한 다음 1 ml의 클로로포름으로 총지질을 녹였다. 이렇게 추출된 총지질은 클로로포름으로 평형화되어 있는 실리카 칼럼에 흡착시키고, 클로로포름 30 ml과 아세톤 30 ml로 인지질외의 지질을 용출시킨 다음 메탄올 30 ml을 이용하여 인지질을 분리하였다. 분리된 인지질에 내부표준물질 (C19:0) 50 ug을 첨가하여 용매를 제거한 다음 0.5 ml 벤젠으로 녹여서 지방산 시료로 이용하였다. 0.5 ml 벤젠에 녹아있는 지방산 시료에 1.5% NaOH-MeOH을 0.5 ml 첨가하여 60℃에서 20분간 반응시키고 1.5% HCl-MeOH 0.5 ml을 첨가하여 60℃에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 hexan 1 ml과 증류수 0.5 ml을 첨가하여 30 분간 방치한 다음 hexan층을 취하여 지방산 분석시료로 이용하였다. 지방산 분석시료는 GC (Hewlett-Packard GC 5890 series II)를 이용하여 분석하였고, 분리온도는 비극성인 SPB-1 column과 극성인 HP-20M column 사용시 각각 200℃와 210℃로 하였으며 주입부와 검출부 온도는 250℃였다. 지방산은 세균 MEFA standard (Supelco Inc., USA)와 equivalent chain length (Atransky et al., 1992)를 이용하여 동정하였다. 지방산 분석결과 주요 지방산 조성은 *Photobacterium*속의 균주들과 유사하였으나 고도 불포화 지방산인 EPA (20:5w3, 6-8%)가 확인되어 저온성 해양 미생물의 특징을 확인하였다 (Table 3-10).

Table 3-10. Cellular fatty acid compositions of strain SL13, SL62, and reference strains, *Photobacterium* sp.

Fatty acid	Fatty acid composition (%)			
	SL13	SL62	<i>P. angustum</i> ATCC 25915	<i>P. phosphorium</i> ATCC 11040
12:0		5.30		
13:0	4.85	1.23	6	6
3-OH-12:0	1.50			
iso-14:0	0.28	0.28	8	9
14:0	4.48	4.60		
14:1			3	11
3-OH-14:0			1	1
anteiso-15:0		0.47	3	3
15:1	0.30	0.34		
15:0	0.53	0.48		
16:4w1	0.72	0.58	2	
i-16:0	1.36	2.68		
16:1	37.18	35.76		
16:0	23.08	20.11	36	40
17:1			19	25
iso-17:0	0.84	0.15	1	
anteiso-17:0		0.80		
cyc-17:0	0.96	0.89		
17:0	0.46	0.50		
18:2	0.45	0.62	3	
18:1	11.95	11.15		
18:0	2.94	4.18	17	3
cyc-19:0	0.6	0.49	2	1
20:5w3	6.17	8.25		

## 6. 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색

### 가. HDase의 탐색

Phenol red가 들어간 hydantoin plate에 시료를 screening 한 결과 HDase 활성을 측정하여 (균주 주변이 붉은 색에서 노란 색으로 변함) 균주를 총 95종 확보하였다 (Figure 3-18).

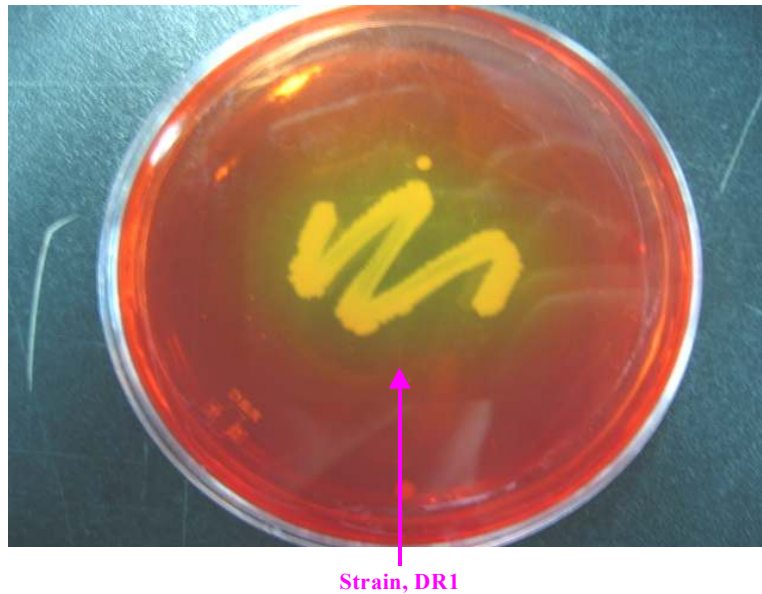


Figure 3-18. deep sea sediment에서 분리된 HDase 활성을 보이는 균주의 분리.

또한 hydantoin plate에서 HDase 활성을 보인 균주 95종의 whole cell을 이용하여 hydantoin에서 N-carbamoylglycine (NCG) 으로 전환되는 HDase 효소 활성을 측정 한 결과 95종 모두 HDase 활성이 확인할 수 있었다 (Figure 3-19).

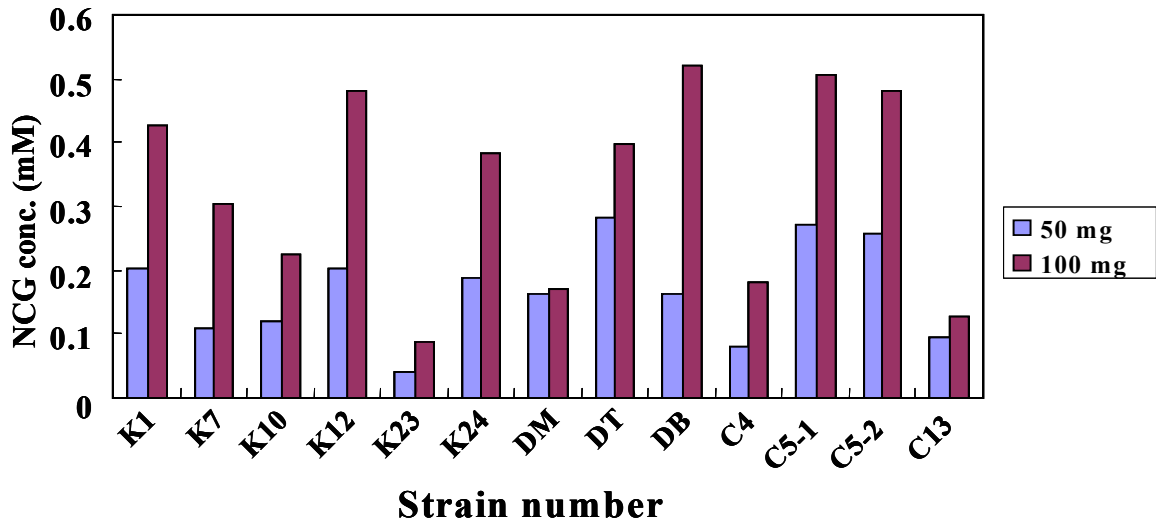


Figure 3-19. Determination of HDase activity for conversion of hydantoin to N-carbamoylglycine (NCG) by screening bacteria.

나. starch hydrolyzing activity 및 CGTase 활성을 보이는 균주 탐색 및 분리

전분 plate에서 clear zone을 형성하는 전분 분해 활성 미생물을 순수 분리한 결과 40여 균주 확보하였다 (Figure 3-20).

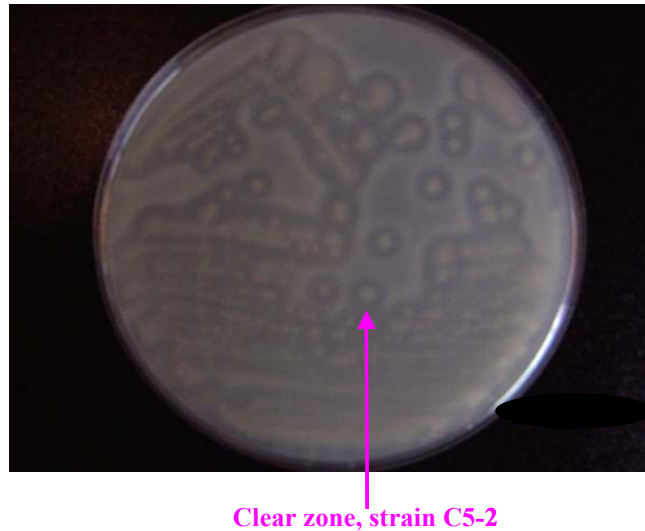


Figure 3-20. Screening on starch-hydrolyzing activity of strains isolated from deep-sea sediment.

전분 분해 활성을 갖고 있는 40여 균주를 대상으로 CGTase 활성을 측정한 결과 배양 상등액에서 CGTase 활성 균주 총 16종 확보하였다 (Figure 3-21).

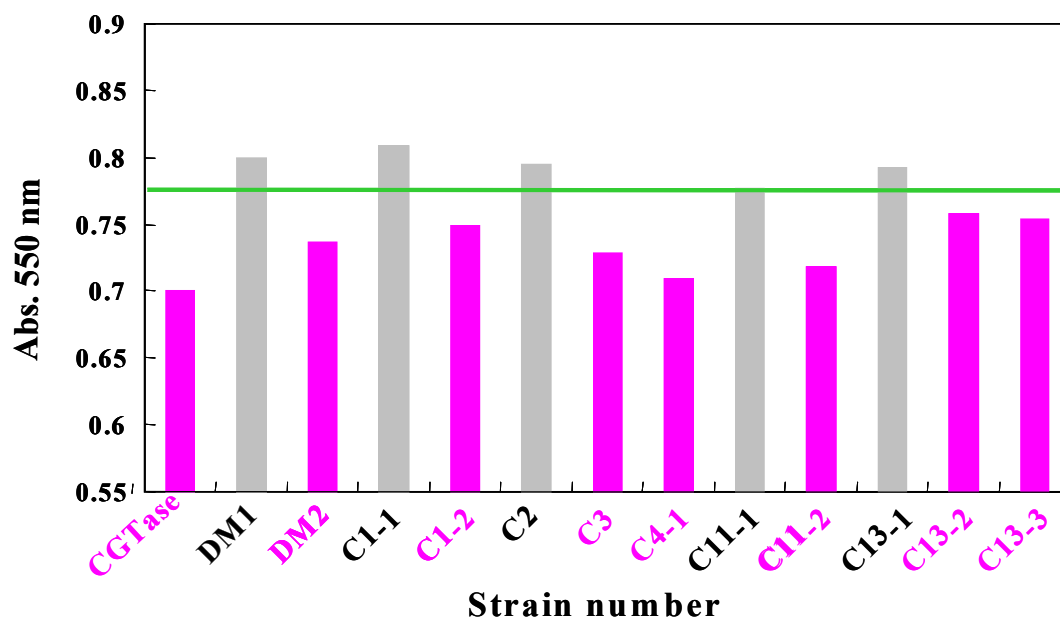


Figure 3-21. Determination of CD-forming activity of CGTase study. Pink line means negative control (blank) line. CGTase *Paenibacillus macerans* CGTase (positive control).

다. Epoxide hydrolase 활성을 보이는 균주의 탐색 및 분리

아래 그림과 같이 한국연근해와 일본, 남극등의 다양한 지역에서 샘플을 확보하여 Epoxide hydrolase 활성을 보이는 균주의 탐색 및 분리하였다 (Figure 3-22).

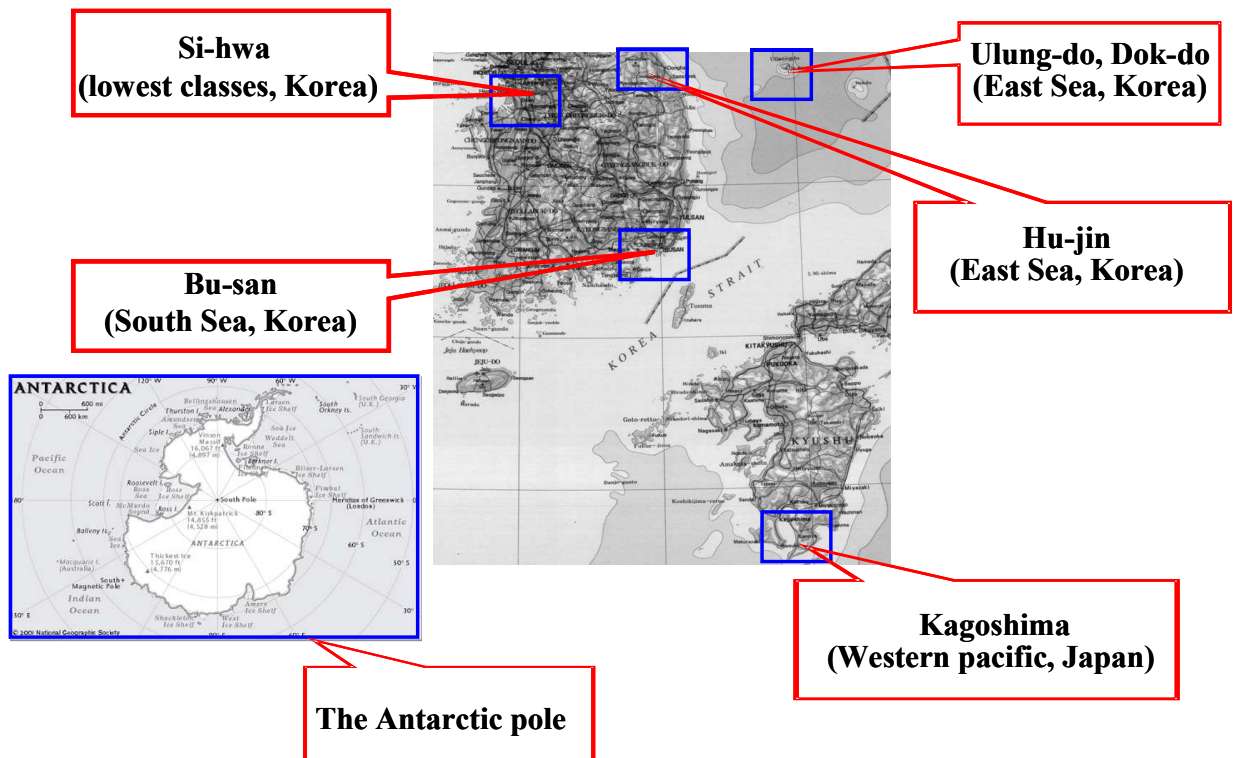


Figure 3-22. Epoxide hydrolase 생산 균주의 탐색을 위한 sampling site.



다양한 지역에서 샘플을 확보하여 기질을 넣은 MM2 배지에 접종하여 배양한 후 zobell 배지를 이용하여 순수 분리하였고 순수 분리된 균주들을 대상으로 spectrophotometer를 이용하여 1차적으로 epoxide hydrolase 활성을 가지고 있다고 예상되는 균주를 1차로 선발한다. 선발된 1차 균주들을 대상으로 gas chromatography (GC)를 이용하여 광학활성 입체 선택성의 여부를 확인한다 (Figure 3-23).

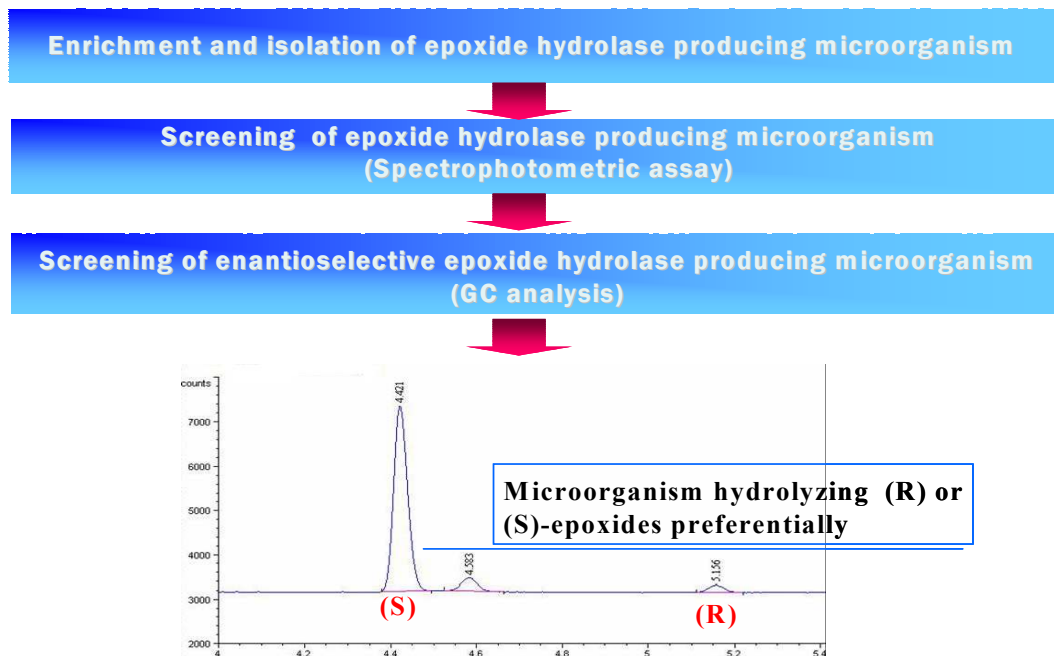


Figure 3-23. Epoxide hydrolase 생산 균주의 탐색방법

다양한 지역에서 순수 분리된 균주 181종중에 1차 스크리닝 방법인 spectrophotometric assay (diol assay)로 31종이 활성을 보였고 31종을 대상으로 GC assay를 수행한 결과 최종 1종이 광학활성 입체 선택성이 있었다 (Table 3-11).

Table 3-11. Screening marine microorganisms producing an enantioselective EHase and the sequence analysis of 16S rRNA gene of the isolated microorganisms.

Sampling site	Strains	The phylogenetic grouping of the strains (number/%)	Screening	
			Diol assay	GC analysis
Hujin	64	(-pro <sup>a</sup> : 4 (6.25%) (-pro <sup>b</sup> : 47 (73.4%) G.P. <sup>c</sup> : 4 (6.25%) CFB <sup>d</sup> : 9 (14.1%)	18	0
Uleungdo	9	(-pro: 3 (33.3%) G.P.: 6 (66.7%)	3	0
Dokdo	9	(-pro: 3 (33.3%) (-pro: 2 (22.2%) G.P.: 3 (33.3%) CFB: 1 (11.1%)	2	0
Taejongdae	18	(-pro: 8 (44.4%) (-pro: 6 (33.3%) G.P.: 2 (11.1%) CFB: 2 (11.1%)	8	0
Sihwa	15	(-pro: 3 (20%) (-pro: 8 (53.3%) G.P.: 2 (13.3%) CFB: 2 (13.3%)	0	0
Kagoshima, Japan	66	(-pro: 26 (39.4%) (-pro: 13 (19.7%) G.P.: 21 (31.8%) CFB: 6 (9.1%)	-	1
<b>Total</b>	<b>181</b>	<b>(-pro: 44 (24.4%)</b> <b>(-pro: 79 (43.6%)</b> <b>G.P.: 38 (21.0%)</b> <b>CFB: 20 (11.0%)</b>	<b>31</b>	<b>1</b>

<sup>a</sup> α-pro: α-proteobacteria; <sup>b</sup> β-pro: β-proteobacteria; <sup>c</sup> G.P: Gram positive; <sup>d</sup> CFB: Cytophaga -Flavobacteria-Bacteroides

Enrichment 배양에서 181 균주가 순수 분리되었고 이 중에서 whole cell을 이용하여 EHas e 효소 활성을 측정 한 결과에 따르면 positive control의 *Rhodotolura glutinis* EHase 보다 높은 활성을 보이는 균주를 31 종 확보하였다 (Figure 3-24). (Spectrophotometric assay)

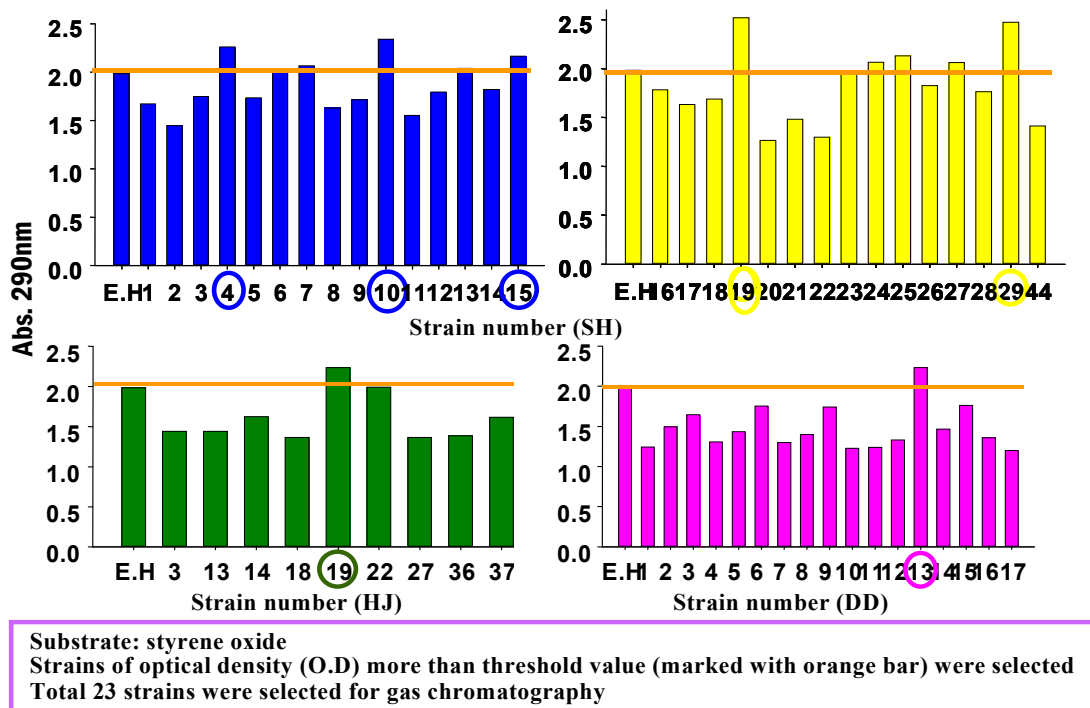
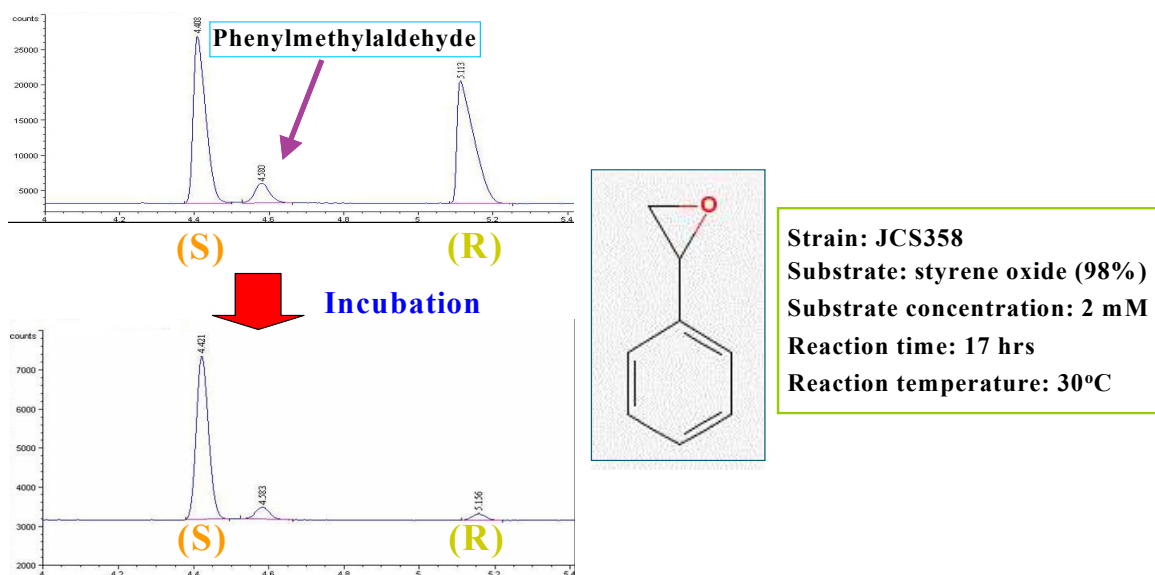


Figure 3-24. 1차 분리균주의 diol assay를 통한 epoxide hydrolase활성 균주 검색.

Spectrophotometric assay에서 활성을 보인 31종을 대상으로 chiral 칼럼을 사용하여 광학활성 입체 선택성을 GC로 분석한 결과 JCS358이 활성을 보였다 (Figure 3-25).



**Fig. 8. JCS358 enantioselective EH activity against styrene oxide by using gas chromatography (GC) (maximum ee: 98%, ee; enantiomeric excess:  $(S-R)/(S+R) \times 100$ )**

Figure 3-25. 최종 선정된 JCS358균주의 styrene oxide의 광학특이적 분해.

JCS358균주는 *Erythrobacter*속으로 동정되었으며 앞의 결과에 따라 *Erythrobacter*속 균주들이 입체선택성 에폭사이드 가수분해활성을 보이는 것이 확인되었다. 그래서 본 연구실에서는 whole genomics가 끝난 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 균주를 대상으로 연구를 진행하였다 (Figure 3-26).

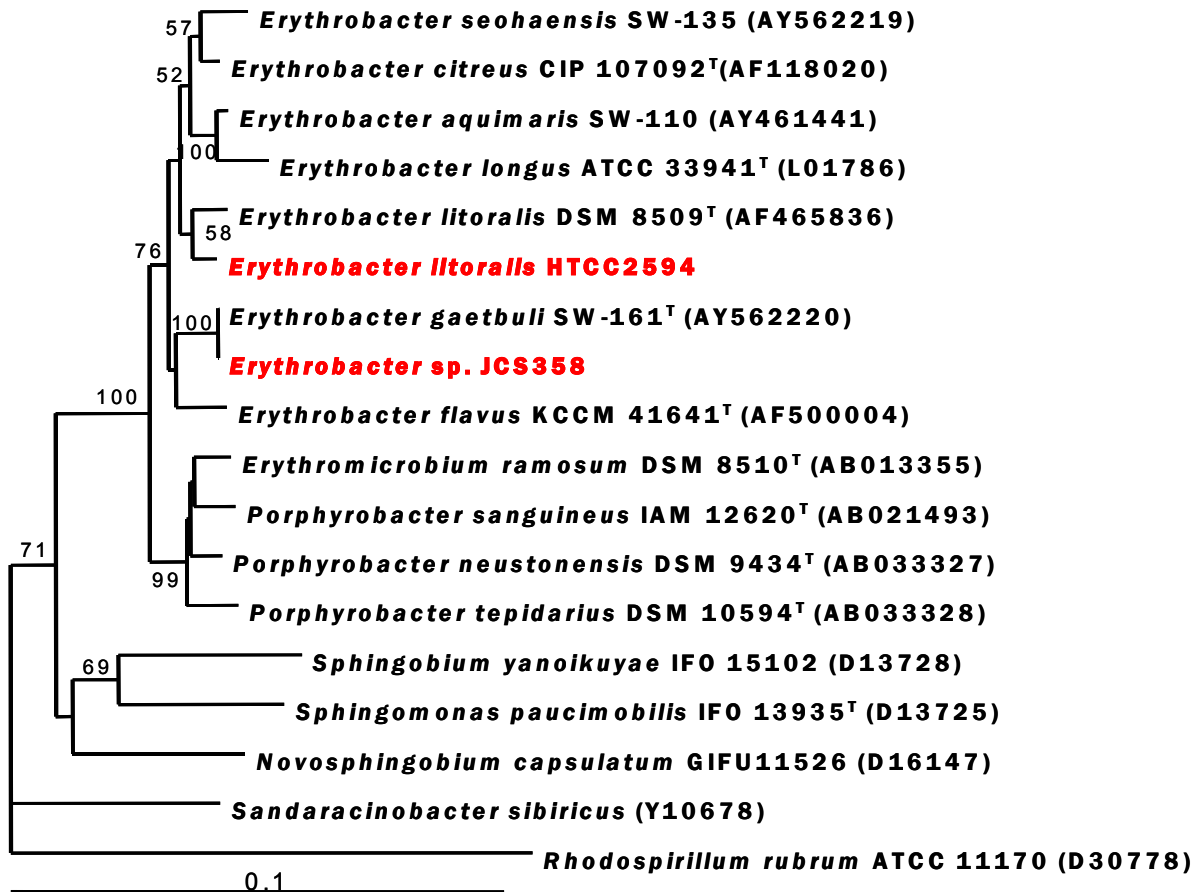


Figure 3-26. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strains HTCC2594 and JCS358.

라세믹 에폭사이드인 styrene oxide를 JCS358균주와 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 균주를 시간별로 테스트를 해본 결과 14hr 반응 후 부터 98%이상의 광학 선택성을 가지는 것으로 확인하였다 (Figure 3-27).

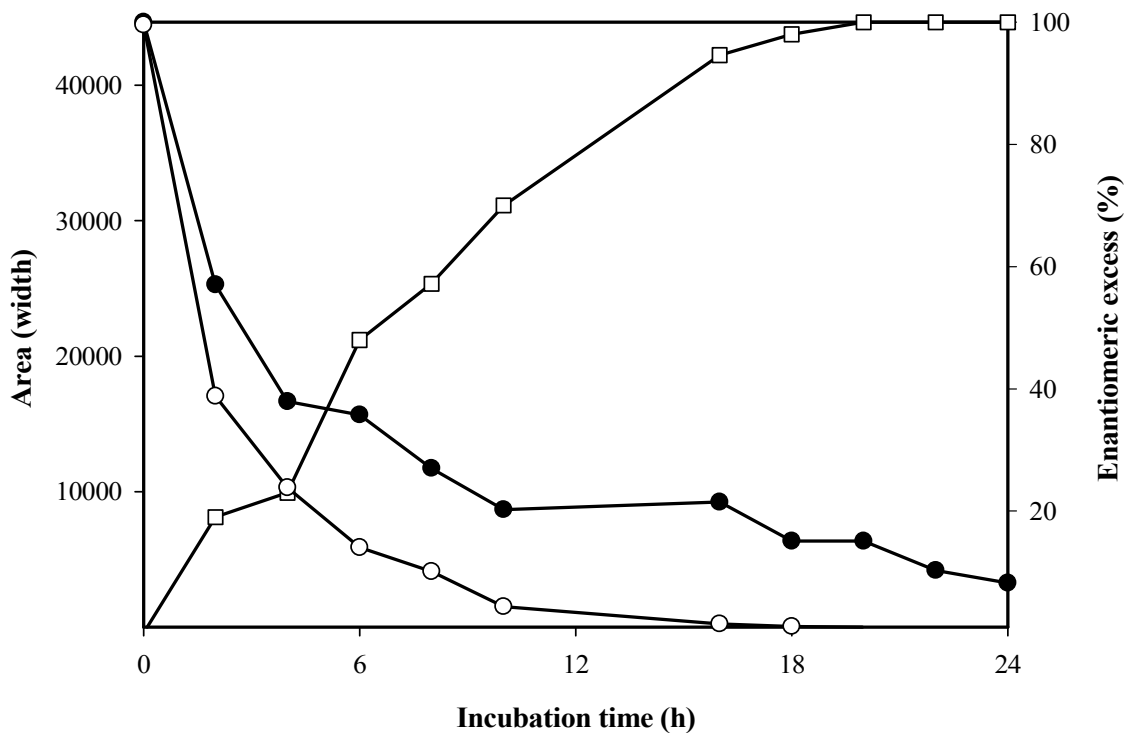


Figure 3-27. 최종 선정된 JCS358균주의 enantioselective epoxide hydrolase 활성.

JCS358 균주를 바탕으로 기존에 다양한 지역에서 순수분리된 *Erythrobacter*속의 다양한 균주들의 epoxide substrate 분해능을 알아보기 위해 다양한 epoxide 물질을 이용하여 테스트 하였다 (Figure 3-28).

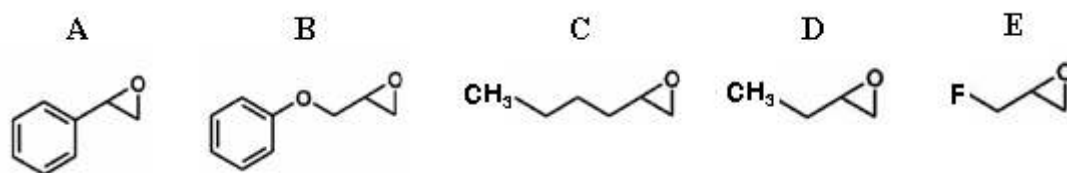


Figure 3-28. Epoxide substrates used in this study. A, styrene oxide (SO); B, glycidyl phenyl ether (GPE); C, 1,2-epoxyhexane (EX); D, 1,2-epoxybutane (EB); E, epifluorohydrin (EF).

그 결과 다양한 해양환경으로부터 연구팀에서 확보한 10종의 *Erythrobacter* 균주가 대부분 광학특이적인 epoxide hydrolase 활성을 보이는 것을 Table 3-12를 통하여 확인하였다.

**Table 3-12. Enantioselective EHase activities of *Erythrobacter* spp. toward various epoxide substrates.**

Strain name	Best-matched neighbor	Similarity (%)	ee <sup>a</sup> (%) / abs. conf. <sup>b</sup>			
			SO	GPE	EX	EB
AKS 329	<i>Erythrobacter</i> sp. 2216.25.25	99	96.4/S	99/R	47.5/ S	19.6/R
JCS 325	<i>Erythrobacter</i> <i>aquimaris</i> SW-110	99	99/S	8.15/RAD <sub>c</sub>	64.8/S	37.2/R
JCS 340	<i>Erythrobacter</i> <i>gaetbuli</i>	99	80.9/S	62.2/RAD	81.3/S	23.8/R
JCS 350	<i>Alterierythrobacter</i> <i>epoxidivorans</i>	97	80.6/S	99/R AD	99/S	11.5/R
JCS 358	<i>Erythrobacter</i> <i>gaetbuli</i>	98	99/S	81.7/R	72.5/S	5.5/R
JCS 360	<i>Erythrobacter</i> <i>aquimaris</i> SW-110	99	99/S	99/R AD	28.0/S AD	20.6/R
JCS 364	<i>Erythrobacter</i> <i>aquimaris</i> SW-110	99	99/S	99/R AD	37.4/S AD	34.6/R
JCS 368	<i>Erythrobacter</i> <i>luteolus</i> SW-109	99	2.8/S X <sup>d</sup>	5.5/ S	26.0/S	14.2/R
HJ 239	<i>Erythrobacter</i> sp. MBIC 3031	99	0.09/S X	X	2.7/S X	ND <sup>e</sup>
DokDo 15	<i>Erythrobacter longus</i>	99	5.0/S X	12.4/R	13.3/S	7.98/R

<sup>a</sup> ee (%) represents enantiomeric excess.

<sup>b</sup> abs. Conf represents absolute configuration, meaning remaining epoxide after incubation.

<sup>c</sup> AD, both (*S*) and (*R*)-enantiomers were hydrolyzed.

<sup>d</sup> X, an EHase activity was not detected.

<sup>e</sup> ND, not determined.



라. Lipase활성균주 탐색 및 분리 Ofloxacin ester에 대하여 광학 선택적인 리파아제 활성의 탐색

다양한 해양환경에서 분리한 시료로부터 ofloxacin ester를 분해하여 levofloxacin을 생성하는 미생물을 분리한 결과 전체 151종의 lipase활성을 보이는 균주를 확보하였고, 이중 최종 1종에서 levofloxacin 생성균주를 확인하였다 (Table 3-13).

Table 3-13. Summary of the isolation of marine microorganisms and the screening of an ofloxacin ester-enantioselective esterase from various marine environments.

Sampling sites	Samples	No. of total isolates	No. of isolates showing a clear zone on TBN plate		No. of PNPO <sup>a</sup> -hydrolyzing isolates	No. of enantioselective ofloxacin ester-hydrolyzing isolates
			No.	in total isolates		
Edison Seamount, Papua New Guinea	Sediments	ND <sup>b</sup>	30	ND		
Barents Sea, Russia (Barents)	Sediments	199	14	7	1	
Ulleungdo, Korea	Sediments	105	9	8.6		
Gwangyang Bay, Korea	Sediments	ND	19	ND		
Geomundo, Korea	Sponges seaweeds	439	44	10	1	
Yongjongdo, Korea	Sponges seaweeds	ND	1	ND		
Hujin, Korea	Sponges seaweeds	245	29	11.8		
Panweol, Korea	Oil field sludge	ND	5	ND	1	1

<sup>a</sup> PNPO, *p*-nitrophenyl ofloxacin.

<sup>b</sup> ND, not determined.

## 7. 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석

선택된 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 균주로 부터 에폭사이드 가수분해효소를 cloning 과 발현 특성분석을 실시하였다. *Erythrobacter litoralis* HTCC2594는 Moore foundation에서 유전체가 진행되고 있는 균주로서 전체 유전체의 정보 분석 결과 기존에 알려진 epoxide hydrolase와 유사하였고 epoxide hydrolase의 기능을 가질 수 있는 3종(EEH1, EEH2, EEH3)의 ORF를 발견 이를 분석하여 상동성은 낮지만 EEH1은 microsomal epoxide hydrolase와 EEH2, EEH3은 soluble epoxide hydrolase와 유사한 것으로 나타났다 (Figure 3-29, 3-30, 3-31).

```

EEH1 -----MSEIRRFVLDVPKADL 16
EPH1 -----MAT--HTFAS---P-PTRFTVDIPOSLEL 22
hy11 -----MSAPFAKFPSSASISPNPFTVS IPDEQL 28
Eph1 -----MTS----AN----IPTPFQVSFAQQDV 19
EPHX1 MWLEILLTSLVGFALYWFISRDKEETLPLEDGGWGPGRSAAREDDSIAPFKVETSDEEI 60
Ephx1 MWLELVLASLLGFVIYWFVSRDKKEETLPLEDGGWGPGRSAAREDESIRPFKVETSDEEI 60
      * : . . . :

EEH1 DRLHR--KLLDTRWPEKEPVDDWS-----QGTPL-AALQDLAA--YWRDGYDWRAGEAK 65
EPH1 DELHS--RLDKTRWPATEIVPEDGTDDEPTAFGLGAGPTLP LMKELARGWREDFWKAQDH 80
hy11 DDLKTLVRLSKIAPPYTESLQADG-----RFGITS-EWLTTRMRE--KWLSEFDWRPFPEAR 80
Eph1 DRMMA--KIRDRTRLEPTAPIVPGAS-----WDYGI DL-DWLTLELHK--YWANESWWEETEKR 70
EPHX1 HDLHQ--RIDKFRFTPLLEDSCFH-----YGFNS-NYLKKNVIS--YWRNEFDWRKQVEI 109
Ephx1 KDLHQ--RIDRFRASPLEGSRFH-----YGFNS-NYMKKVVV--YWRNEFDWRKQVEI 109
      . : . : . * : : : . : * .

EEH1 LNALGQFITEIDGLDIHF LHVR----SKCDDALPLI LTHGWPGSVREFFDVIPLLLEPQ- 120
EPH1 LNTFEHYMVEIEDLSIHF LHHR----STRPNAVPLI LCHGWPGHFGFELNVIPLLLEPQSD 136
hy11 LNSFPQFTEIEGLTIHFAALF-----SEREDAVPIAL LHWGPGSFVEFYPIQLLFREYET 136
Eph1 INKYPHFRVDIEEISLHFVHLK----SKQPDALPLI LSHGWPGSFLEFWEVIDELVDPTK 126
EPHX1 LNRYPHFKTKIEGLDIHF IHVKKPPQLPAGHTPKPLMVHGWPGSFYEFYKIIPLLTDPKN 169
Ephx1 LNQYPHFKTKIEGLDIHF IHVKKPPQLPAGHTPKPLMVHGWPGSFYEFYKIIPLLTDPKS 169
      : * : . . * : : * * . . * * : : :

EEH1 ----DGMAFHVVAPSLPGFGSGKPNMTG-WGVDKIATAWATLMQRLGYTE-WVAQGGDW 174
EPH1 ----PSAQAFHVVPSPMGYAWS LPPSSK--WNMEDTARVFDKIMTGLGYEK-YMAQGGDW 191
hy11 ----PETLFFHLVVPSPMGYTFSSGPPDLKDFGLMDNARVVDQ LMKDLGFGSGYLIQGGDI 193
Eph1 ----AGQPAFHVVIPSPMGYTFSSGPPQRKG-WTVVDARVYNSLMVNLGYKTYTCGAGDW 182
EPHX1 HGLSDEHVFEVICPSIPGYGFS EAS SKKG-FNSVATARIFYKLMRLRGLQFE-FYIQGGDW 227
Ephx1 HGLSDEHVFEVICPSIPGYGFS EAS SKKG-LNSVATARIFYKLMRLRGLQFE-FYIQGGDW 227
      * . : * * * : * . * * : . : . * *

EEH1 GSAVTTAIGAQAPEGCKGIHVNMPIGRGPDMDANP-----GPDE----- 214
EPH1 GSIAARCLGSLHKDHCKAVHLNFLPVFPPVPMWLNPHNT----LLAWAPREL V----- 240
hy11 GSFVGRLLG-VGFDACKAVHLNLCAMRAPPEGSPSIES-----LSAAE----- 234
Eph1 GSWITAQILVDYSEFAVVAHFTMIKASVPI LNP IYS LPI----LLGKIPFVPGVARWLQ 238
EPHX1 GSLLICTNMAQLVPSHVKG LHLNMAFVLSNFS T LLLGQRFGRFLGLTERDV----- 279
Ephx1 GSLLICTNMAQMVPHNVKGLHLNMAFVLSRFSYMTPLLLGQRFGRFLGLTERDKI----- 279
      * * : . * . . * . . :

EEH1 -----LKALKALKFY-QDWD SGY SKQOSTRPTQITIGYSLVDS PVGLACWIEKMFFTWD 266
EPH1 -----PEKQARMKRGLAYLEKGSAYYVMQQLTPTPAYGLTDS PVGLLAWIGEKFEPTIQ 296
hy11 -----KEGIARMEK---FMTDGLAYAMEHSTRPTSTIGHVLS SSPIALLAWIGEKYQLQVVD 286
Eph1 SLVYTEARINGLERTDKFWKGLGYQKIQSGKPMTLGALALFDS PVGILSWIGEKYHGWSD 298
EPHX1 -----ELLYPVKKEVYVSLMRESGYLHIQATKPDVTGICALNDS PVGLAAYILKFSWTWN 334
Ephx1 -----ELLYPVKKEVYVSLMRESGYLHIQATKPDVTGICALNDS PVGLAAYILKFSWTWK 334
      * * : * * . * * . * . * * . : * * *

EEH1 -----NGGSPFDTLSMDALDNIMLYLWLPETGASAAARLYWESFAR-----FGEG-- 310
EPH1 EAS-----KQAQPTLTRDELVYFCS LYWFTRSIGTSFLPYSLN-----PHFTTFLTDSK 345
hy11 KP-----LPSETILEMVS LYWLTESFPRAIHTYRETTPTASAPNGATMLQKEL 334
Eph1 PRA-----PSAPSQVTENHIVT VTA LYFLTGS IHTSFLPYKEYT-----LSPMVAVAV 345
EPHX1 TEFRYLEDGGLERKFS LDDLLTNVMLYWTGTI ISSQRYKENLGGQ----WMTQKHERM 390
Ephx1 SETRELEDGGLERKFS LDDLLVNIIMYWTGTI VSSQRYKENLGGQ----IMVHKHEGM 390
      . . : : * * . : : *

EEH1 TVAIPAGVSAPFPEIIPAPRKAERRYADLVYWNCEKGGHFAAWEQPELFAELRACFS 370
EPH1 YHLFNFALS LYPGEIYCPAERDAKRTG-NLWIKDAPBEGGHFAALEKRPDVFVEHLREAFG 404
hy11 YIHKPFGFSFFPKD LCPVPRSWIATG-NLVFFRDHABGGHFAALERPRELKTDLTAFVE 393
Eph1 GKRRPIGLSIFPAEITQYPRSWVAS SC-KLVNYKVHARGGHFAAVDNPGAYVEDLRETIG 404
EPHX1 KVVVPTGFSAPFPELHHTPEKVVRFKYPKLISSYMYVRGGHFAAEEPELLAQDIRKFLS 450
Ephx1 KVVVPTGFSAPFPELHHAPEKVVRFKYPKLISSYMYVRGGHFAAEEPEKLLAQDIRKFLS 450
      . * * : : . . * * . * * * * * : * . : .

EEH1 LMR--- 373
EPH1 VMWEK-- 409
hy11 QVMQK-- 398
Eph1 KNVHSEL 411
EPHX1 VLERQ-- 455
Ephx1 LAELQ-- 455

```

Figure 3–29. Sequence alignment of EHase. The protein accession numbers are: *Rhodotorula glutinis* (EPH1), AAF64646 *Rattus norvegicus* (Ephx1), P07687; *Homo sapiens* (EPHX1), AAH08291; *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Eph1), AAF18956; *Aspergillus niger* (hy11), CAB59813; *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 (EEH1).

```

EHPX2      YVTVKPRVRLHFVELGSG--PAVCLCHGFPESWYSWRQIPALAAQAGYRVLAMD MKGYGE 298
Ephx2      YVTVKPGRIRLHFVEMGSG--PAICLCHGFPESWFSWRQIPALAAQAGFRVLAIDMKGYGD 296
pEHSt      MVAVN-GLNMHIAELGQG--PTILFIHGFPPELWYSWRHQMVYLAERGYRAVAPDLRGYGD 64
sEHGm      TVEVN-GLKMHVAEKGE--PVVLFHGFPELWYSWRHQI LSLSLSLGYRAVAPDLRGYGD 89
ephA       TIKAN-GISLNVAEQKGG--PMVLLCHGFPPEGWYSWRHQLEALAAAGYHAVAPDMRGYK 64
EEH3       RVPAN-GLFEFVAMAGEGD-HLALMLHGFPPELHFSWRHQMPLLAEMGYRVWAPNMRGYGE 69
EEH2       QHFAYDGLQIAFWTGGKPDARPLLVLHGYP TASWDWHRVWETLGSK-YHLVAPDMIIGGL 72
          . : . . * . : **:* :*: * . : : * :*: *

EHPX2      SSAPPE--IEEYCMELVCKEMVTFLDKLG--LSQAVFIGHDWGGMLVWYMA LFYPERVRA 354
Ephx2      SSSPPE--IEEYAMELLCEEMVTFLNKLG--IPQAVFIGHDWAGVLVWNMALFHPERVRA 352
pEHSt      TTGAPINDPSKFSIFHLVGDVVALLEAIPNEDKVFVVAHDWGALIAWHLC LFRPDKVKA 124
sEHGm      TEAPPS--ISSYNCFHIVGDLVALIDSLG--VQQVFLVAHDWGALIGWYLCMFRPDKVKA 145
ephA       SDRPEA--IDQYTI LHMVGD LVGVLD AFE--VKDAVI VGHDWGATIAWHTARLRDRFRA 120
EEH3       TTRPTE--VRDYALDHLTQDVAALIDASG--ATKVTLIAHDWGAI IAWYFAI LKLRPLER 125
EEH2       SDKPRS---GYSIHRQADMHVVALDLHLG--IGAFDA LVHDDYGVSVGQELLARRAERSAA 126
          : . : : . : : : : **:* :

EHPX2      VASLNTPIFIPANPNMSPLESIKANP-VFDYQLYFQEPGVAEAELEQNLSRTFKSLFRASD 413
Ephx2      VASLNTPLMPPNPEVSPMEVIRSIP-VFNYQLYFQEPGVAEAELEKNMSRTFKSFFRTSD 411
pEHSt      LVNLSVHYHPRNSNMNPIELGLKALYGEDYVICRFQVPGEIEAEFAPIGAKSVLKKMLT-- 182
sEHGm      YVCLSVPLLRDPNIRITVDGMRALYGGDDYVCRFRQPGEMEAQMAEVGTEYVLKNIILT-- 203
ephA       AAILSVPYRPR-SEARPTS VMPQTADAQFYQLYFQEPGVAEAEFERD-PRATLGAMLYGG 178
EEH3       LVIMNVP---HPKVLQRELRWEQIKKSWYVFFFLQPLWLP EKRI GADSGKRIG----- 175
EEH2       QGLGQTVFLNGGIFPDQHRPRPIQKLGTSPLGFLVGLLTNREKFGRSFSEVFG----- 179
          .. : : : : :

EHPX2      ES-VLSMHKVC-----EAGGLFVNSPEEPSLSRMVTEEEIQFYVQQFKKSGFR 460
Ephx2      DMGLLTVNKAT-----EMGGILVGTPEDPKVKSKITTEEEIEYIQQFKKSGFR 459
pEHSt      YRDPAPFFYP-----KKGLEAIADAPIVLSTWLSSEELDYANKFQTGFT 229
sEHGm      TRNPGPPI LP-----KGR-FQFNPEMPTLPSWLTEEDLAYVYVKFKTGT 249
ephA       SGEGAAAIRASAEERAGRTVGVGMVSRKDGMLPKVQVPLPSWLSATDLDYSAEFARSGFR 238
EEH3       -----ELFAQTSNCNPERFGPDVKAVYAAGAARPGAPR 207
EEH2       -----PDTQPGAQELDEFWDLVSHNGGNRIM 205

EHPX2      GPLNWYRNERNWCKWACKSLGRKILIPALMVTAEKDFVLVPQ-----MSQHMEDWIPHL 514
Ephx2      GPLNWYRNTERNWCKWACKALGRKILVPALMVTAEKDILVLRPE-----MSKNMENWIPFL 513
pEHSt      GAINYYRALSINSELTAPWTGAQVNVPTKFI VGEFDLAYHMRGAKEYIHNGGFKKYVPL 289
sEHGm      GPLNYRNFNLNWE LTA PWTGGQIKVPVKYITGELDMVYNSLNLKEYIHGGGFKQDVNPL 309
ephA       GPLNYRNI DRNWELMGA FEGVKKVVSPLFIAGDHDVIAFPGA AEHLAN--MKQFVPL 296
EEH3       AMVNYRAAMRHRDITDPGD-FRVDVPTLLVWGEEDVALNIR-----CTEGTEQWVPDI 260
EEH2       HKLLHYIADRKEHAERWFDALRIAQQDIGLINGALDPVSGRH-----AYEAWRERLPDA 259
          : * . : : * . : : *

EHPX2      KRGHIED-CGHWTQMDKPEVNVQILIKWLDSDARNPPVVS KM 555
Ephx2      KRGHIED-CGHWTQIEKPAEVNQILIKWLKTEIQNPSVTSKI 554
pEHSt      EEVVVLEGAHFVNQERPEHISKHIYDFIQKF----- 321
sEHGm      EQVIVQKGVAFHNNQEA AEIEDNYIYDFINKF----- 341
ephA       REIKILPGCGHWTQQERPEVNAIIVEFLRSLPG----- 330
EEH3       TVKRLFN-VSHVVQQDAPDEVNAILREWLKPPAPAS----- 295
EEH2       RHHLIPT-VGHYPQVEDPQTVSRVTLDWLAR----- 289
          : .*: : : . : : :

```

Figure 3–30. Sequence alignment of EHase. The protein accession numbers are: *Homo sapiens* (EHPX2, Human sEH), AAH11628; *Rattus norvegicus* (Ephx2, Rat sEH), CAA46211; *Solanum tuberosum*(pEHSt, potato; sEH), AAA81890; *Glycine max* (sEHGm, soybean sEH), CAA55293; *Bradyrhizobium japonicum* (ephA), BAC46379); *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 (EEH2, this paper) *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 (EEH3, this paper).

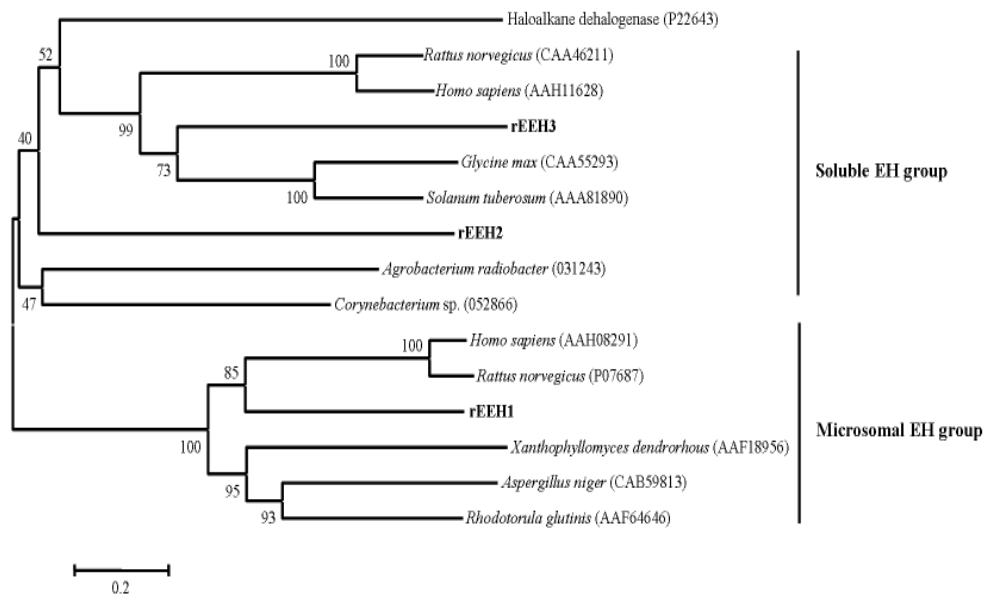


Figure 3–31. Phylogenetic analysis of EHase. Sequence alignment on the desired amino acid sequence was performed using the Clustal W software package. *Rhodotorula glutinis* (AAF64646), *Rattus norvegicus* (P07687), *Homo sapiens* (AAH08291), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (AAF18956), *Aspergillus niger* (CAB59813), *Homo sapiens* (AAH11628), *Rattus norvegicus* (CAA46211), *Solanum tuberosum* (AAA81890), *Glycine max* (CAA55293), *Agrobacterium radiobacter* sEH (O31243), *Corynebacterium* sp. sEH (O52866), and Haloalkane dehalogenase (P22643).

3종의 ORF를 *E. coli* expression vector인 pET24a에 cloning하고 발현하여, His-tag affinity column을 이용하여 순수분리를 진행, 아래 그림과 같이 순수분리단백질을 얻을 수 있었다 (Figure 3-32).

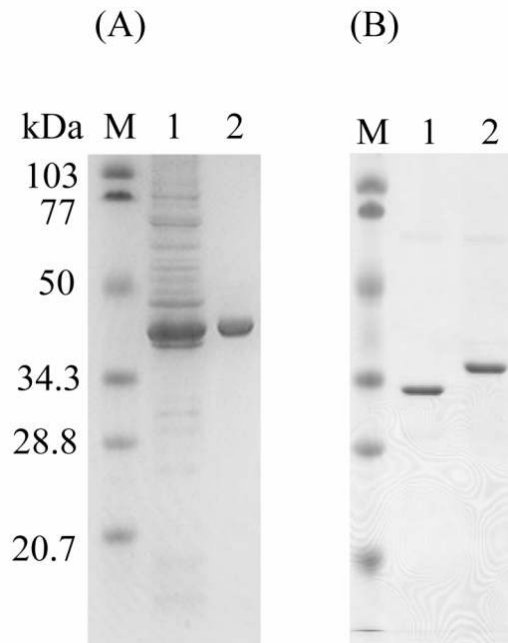


Figure 3-32. Purification of three EHases from *E. litoralis* HTCC2594 (the purified rEEH1 (A), rEEH2 and rEEH3 (B)). EHases were purified from recombinant *E. coli* cell by His-tag affinity column. (A) Lane M, the protein size standard; lane 1, the soluble cell lysate; lane 2, the purified rEEH1. (B) Lane M, the protein size standard; lane 1, the purified rEEH2. ; lane 2, the purified rEEH3.

순수 분리된 EEH1, EEH2, EEH3의 단백질의 크기는 각각 41kDa, 33.4kDa 및 34.5 kDa으로 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다.

분리된 3종의 단백질 (EEH1, EEH2, EEH3)를 특성 분석한 결과 EEH1, EEH2, 그리고 EEH3는 최적온도 50℃, 55℃ 및 45℃이고 최적 pH는 6.5, 7.5 및 8.0으로 효소마다 각각 다른 특성을 나타냈다 (Figure 3-33).

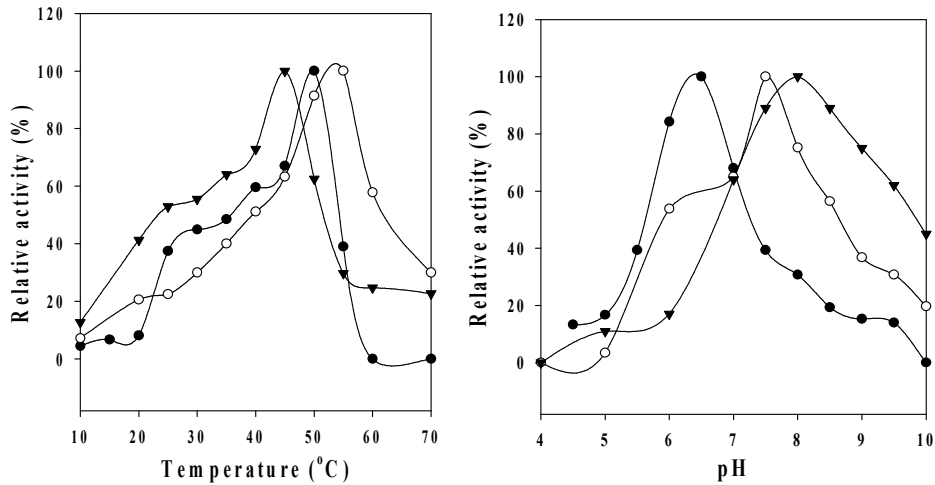


Figure 3-33. Effects of pH and temperature on the purified rEEH1, rEEH2 and rEEH3 activity. (A) Enzyme activity was determined towards 2 mM styrene oxide in 50 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 4.0 to 6.0), 50 mM MES buffer (pH 6.0 to 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 9.0), and 50 mM Glycine buffer (pH 9.0 and 10.0). (B) Enzyme activity was between 10 and 70°C determined in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). ●, rEEH1; ○, rEEH2; ▼, rEEH3.

분리된 3종의 단백질 (EEH1, EEH2, EEH3)의 광학특이성조사 결과 EEH1은 (*R*)-styrene oxide를 잘 분해하는 반면 EEH3는 (*S*)-styrene oxide를 잘 분해하였고, EEH2는 동등하게 분해하였다. 이러한 분해경향은 기질분해속도에 의해 확인되었다 (Figure 3-34).

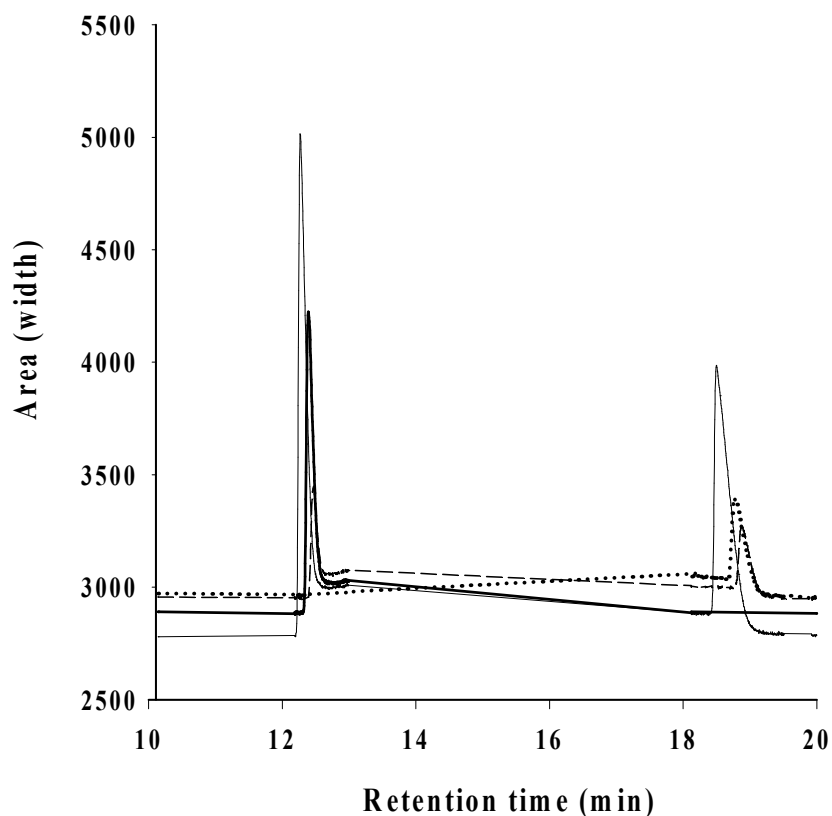


Figure 3-34. The schematic representation of the hydrolysis activity of enantioselective EHases (rEEH1, rEEH2 and rEEH3) toward racemic styrene oxide with GC analysis. Analysis method described in Material and Method. Solid line, SO; Bold solid line, SO incubated with rEEH1; Long dashed line, SO incubated with rEEH2; Dotted line, RSO incubated with rEEH3.



EEH1는 C-1 부위에 있는 부피가 큰 링을 가진 단일치환된 에폭사이드에 대해 광학선택적으로 가수분해시키는 반면, 지방족 사슬을 가진 (R)- 및 (S)-단일치환된 에폭사이드 양쪽에서는 유사한 비율로 가수분해시킴을 알 수 있다. 반면, EEH3는 C-1 부위 및 스티렌옥사이드에서 광학선택적으로 지방족 에폭사이드를 가수분해시켰으나, 광학선택적 다양성은 보이지 않았다 (Table 3-14).

Table 3-14. Enantioselective EHase activity of the rEEH1, rEEH2, and rEEH3 toward various epoxide substrates.

Enzyme	hydrolysis rate ( $\times 10^{-2}$ )mg/min											
	SO		GPE		EX		EB		ECH		EF	
	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)
EEH1	9.00	28.0	20.0	11.0	8.00	7.00	15.0	15.0	N.D	N.D	15.0	4.0
EEH2	0.06	0.05	0.07	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.23	0.23	N.D	N.D
EEH3	0.14	0.10	0.10	0.10	0.09	0.07	0.11	0.08	0.28	0.26	N.D	N.D

8. 광학선택성 esterase 가수분해효소 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석 & 대량생산 및 상용화구축

가. SL13으로부터 lipase 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석

SL13 균주에 대해 16S rDNA 염기서열 분석 결과, 표준 균주들과 97.1-87.9%의 염기서열 상동성을 나타내어 신종 균주임을 확인하였다 (Figure 3-35).

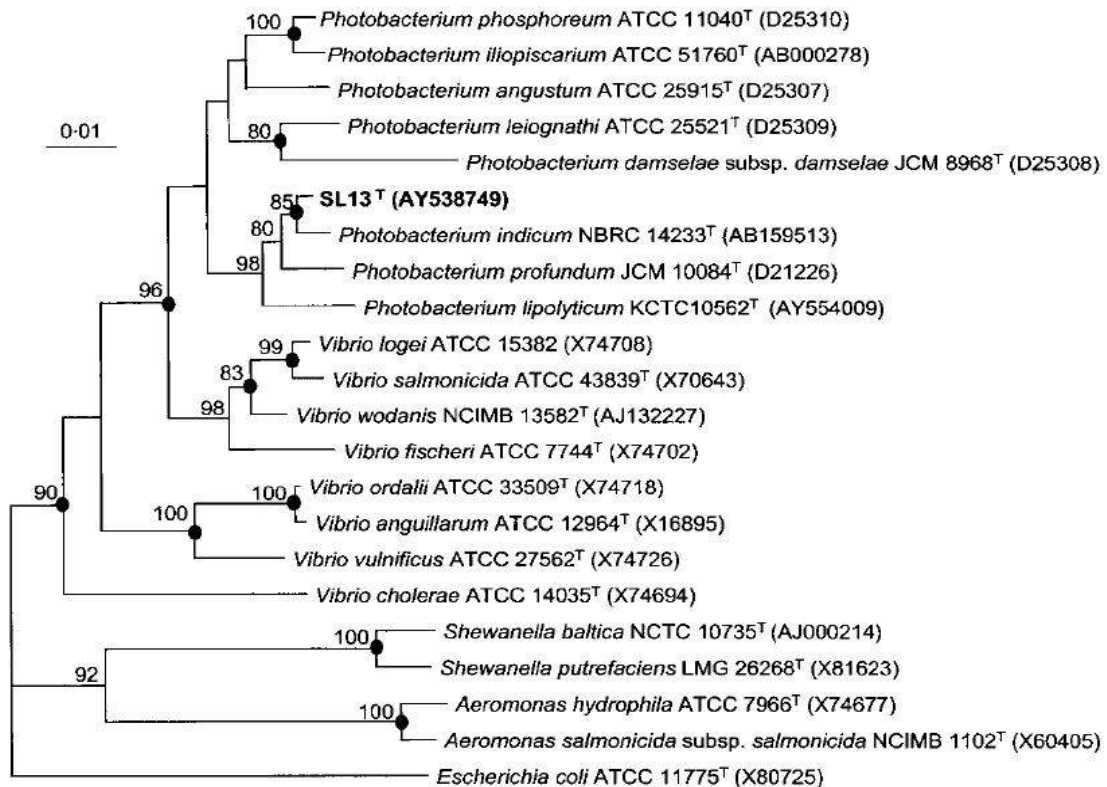


Figure 3-35. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of strain SL13<sup>T</sup> and related taxa based on 16S rRNA gene sequences. (Seo *et al.*, 2005)

SL13 균주의 최적 생장온도는 14도로써, 저온성 균주임을 확인하였다 (Figure 3-36).

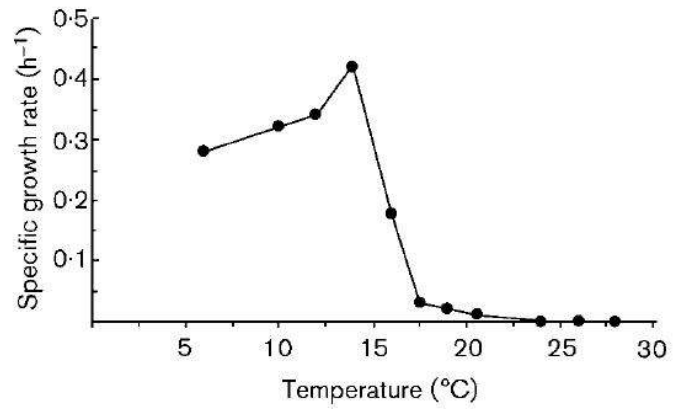


Figure 3-36. Temperature-dependent growth of SL13<sup>T</sup>. (Seo *et al.*, 2005)

SL13 균주의 5 ml 배양액을 원심 분리하여 cell을 얻은 뒤, 0.5 mm 사이즈의 glass beads 를 포함하는 lysis buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS) 와 혼합하여 vortexing을 2 분간 수행하였다. 300 ul의 상등액을 회수하여 275 ul의 7 M ammonium acetate (pH 7.0)를 첨가하였다. 65°C에서 5분간 방치한 후, 그 시료는 다시 얼 음에 5분간 방치하였다. 500 ul의 chloroform을 첨가하여 원심 분리 후, DNA를 포함한 500 ul의 상등액은 1 ml의 isopropanol과 함께 -20°C에서 침전되었다. 그 pellet을 70% (v/v) ethanol을 이용하여 washing 하였고, 건조 후에 50ul TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])에 현탁되었다. 추출된 DNA는 0.5% TAE gel을 이용하여 확 인하였다. SL13 균주의 genomic 라이브러리는 Fosmid vector에 의하여 구축되었고, TBN plate를 이용하여 에스터라제 유전자를 포함하는 positive clone를 선별하였다 (Figure 3-37).



Figure 3-37. Mini library screening. (Detection of lipase activity on TBN plate)

선별된 clone으로부터 pBluescript SK(-) vector를 이용하여 sub-cloning을 수행, 최종적으로 4개(13-1, 14-10, 14-11, 16-9)의 positive clone을 획득하였다 (Figure 3-38).

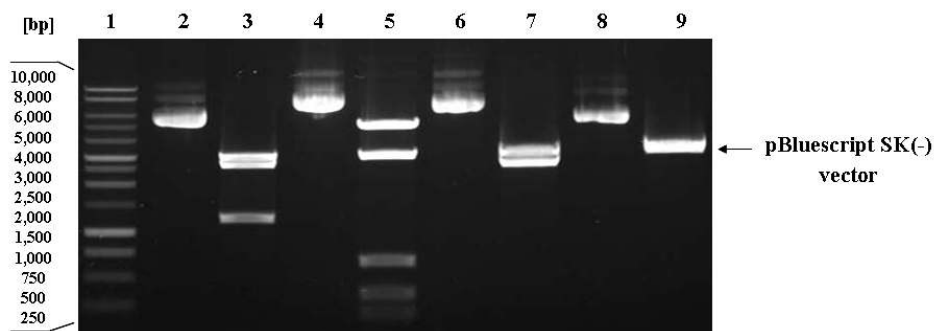


Figure 3-38. Analysis of plasmid DNA by restriction enzyme digestion. Lanes : 1, size marker (1 kb DNA ladder); 2, 4, 6, 8, uncut plasmid DNA; 3, 5, 7, 9, linearized plasmid DNA with *Bam*H I / *Hind*III.

선별된 4개의 클론(13-1, 14-10, 14-11, 16-9)을 가지고 제한효소 *Bam*H I / *Hind*III 처리를 한 결과, 각각의 삽입 DNA 크기는 약 3.7 kb, 6.3 kb, 5.5 kb, 3 kb라는 것을 확인하였다. 이 중 16-9 클론의 플라스미드 DNA를 추출하여 3 kb 크기에 삽입 DNA의 염기서열을 결정하였다.

DNA 시퀀싱을 위하여 3.5 kb의 DNA fragment는 template로 사용되었다. nucleotide 시퀀스는 Big Dye V.3.1 kit를 사용하여 dideoxy chain termination 방법으로 결정하였다. Nucleotide 시퀀싱은 ABI 3100 genetic analyzer를 이용하여 수행하였다. 3.5 kb의 DNA fragment 시퀀스는 클로닝 벡터인 pBluescript의 sequencing 용 primer인 T7 primer와 SP6 primer을 이용하여 primer walking 방법으로 확인되었다. 시퀀싱 data 분석은 Vector NTI sequence analysis software package (base-calling, sequencing assembly, and finishing editing software)가 사용되었고, Deduced amino acid sequence는 protein homology와 domain composition 분석을 위하여 complete nonredundant protein sequence database (NCBI)를 이용하였다. Protein sequences의 비교는 CLUSTALW program을 이용하였다.

얻어진 3 kb의 염기서열 분석 결과 921 bp로 구성된 ORF를 확인하였다. 분석결과 예측된 ORF는 306 아미노산으로 구성된 34 kDa의 단백질에 대한 정보를 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 프로모터 부위와 (TATA box) 리보솜 binding site (RBS)는 밑줄로 표시되었으며, 활성화에 필수적인 Ser, Asp, His를 circle로 표시하였고, 활성 active site를 box로 표기하였다 (Figure 3-39).

```

TTTTAAACTGACAAGATACGGTTCATATTTCTATATGAATATGACTCAGTATATCTAAAAACAAATGCTATAAGAATGACTAGCAATTATAAAGCCATTTTTTACATAAAATGACCAT 960
TGTTTACGTTTATGTAATTCGAAATATAAAACGTCATATCAAAATGTTACTATAATGAATAACGTTAAAAACACTGTATAATACACTTTAACCGATTTATGCCATCACCCAAAGGAA 1080
TATA box RBS
CCTTTGATGCCAAGGCTATTTGACATGTTATGCTTTTTTTGTGCTTATATTTACCTTTTCAGGCTGTGAAATTTGTTAAATGGAAGCCACACAAAGACGGAGAGTCATTAGTCAATGCT 1200
M P R L F R H V M L F F V L I F T L S G C E I V K W K A T Q D G E S L V N A 38
GGTACTCTGAGCAATTTCTGCCCTTAAAAAGAGGTGGCAGCATGAAAGTCTGGGTGGCGGTACGGGTAACCCATTATTGTTACTTCATGGCTTTGGTGGCACTGCAATGCCACATGG 1320
G V S E Q F L P L K E G G S M K F W V G G T G K P L L L L H G F G G T A M S T W 78
AAAAAAGAAATGATGGTCTAAGCCAAGACTATCAAGTTATCCGACCTGATCTTGCTTGGTTGGCGATTCTCACAGTAAAGGTCTACCCGATTTAACCCCAAAACAAATGCCATTTGG 1440
K K E M M V L S Q D V Q V I A P D L A W F G D S H S K G L P D L T T Q T N A I W 118
CAACTTATGGATCATTAAAAATAGACAAAGTAAATGTGCTGGCATCTCTATGGCGGATTGTAACTACAACATGATGACCAACACTGAACGCAATTGATAAATCGATCATCATTGCC 1560
Q L M D H L K I D K V N V A G I S V G G F V T Y N M M T T P E R I D K S I I I A 158
AGCCCTGGTCCGTTATTTCTCAGAGAAAGATCTTGACBATTATGCCTACGGCAGGTGTTGATAAACCCGAGAATTTATTTGTGCCTCAAAACAGTGAAGTAAGGCGATTATTGAC 1680
S P G P L F S E K D L D D L C L R A G V D K P E N L F V P Q N S D E V R R L F D 198
AACGTTTTTTATGAAAAAGAAATACATGCCBACTTCATAGCCBACAAATTTACCCAGCTACTTCTCGCCTTGGCAAGCAGAAAGACGTCATTAATTCAAACACTCATCAAAGATAGA 1800
N V F V E K K Y M P D F I A D Q I V T S Y F S P W Q A E R T S L I Q T L I K D R 238
GATCGTATTCAGAAATCCCGCCTAACAACTACCCAATAGCATGGTGATTGGGGAGACAGTCAAAATCTTCCCGCTAAAAAGTGGCATTTCAGCTCAGTAGGTATTTGAAATGCCCGG 1920
D R I A E F P P N N L P N S M V I W G D S D Q I F P L K S G I Q L S R V L N A P 278
ATTGTGTTATTCCTGAGACTGGTCATGGGGTCACGAACGAGCAACCTGAAGTTGTGTTAAATGATAAAATCATTCTTGTCTTAAATCAATAGATTACATTTGTTGCTAAAAATAATT 2040
I V V I P E T G H G V T N E Q P E V V V K L I K S F L S * 306

```

Figure 3-39. Nucleotide sequence and amino acid sequence of *Photobacterium frigidophilum* SL13 lipase gene.

BlastX search 결과 계놈 전체 염기서열 분석이 완료된 *P. profundum* SS9 균주의 hypothetical protein PBPRB0984과 가장 유사도가 높은 것을 확인하였다 (Table 3-15).

Table 3-15. BlastX search of *Photobacterium frigidophilum* SL13 lipase gene sequence.

Protein	Source	Identities (%)	Positives (%)	Score(bits) /E-value
Hypothetical protein PBPRB0984	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	292/306 (95)	302/306 (98)	605 / e-172
Putative hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	101/318 (31)	165/318 (51)	133 / 6e-30
Putative hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96/286 (33)	145/286 (50)	130 / 6e-29
Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87/276 (31)	146/276 (52)	126 / 7e-28
Putative hydrolase	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	88/269 (32)	135/269 (50)	122 / 2e-26

Lipase 유전자의 ORF를 포함한 pBPL13을 이용하여 PCR을 수행하였다. 발현 벡터인 pET24a(+)에 ligation한 후, *E. coli* DH5α에 형질전환 하여 candidate를 얻었다. 이로부터 플라스미드 DNA (pEPE13)를 추출하여 염기서열을 결정하고 mutation이나, frame shift가 일어나지 않은 완전한 DNA가 cloning 되었음을 확인하였다. 이후 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환 하여 overexpression하는데 성공하였다 (Figure 3-40).

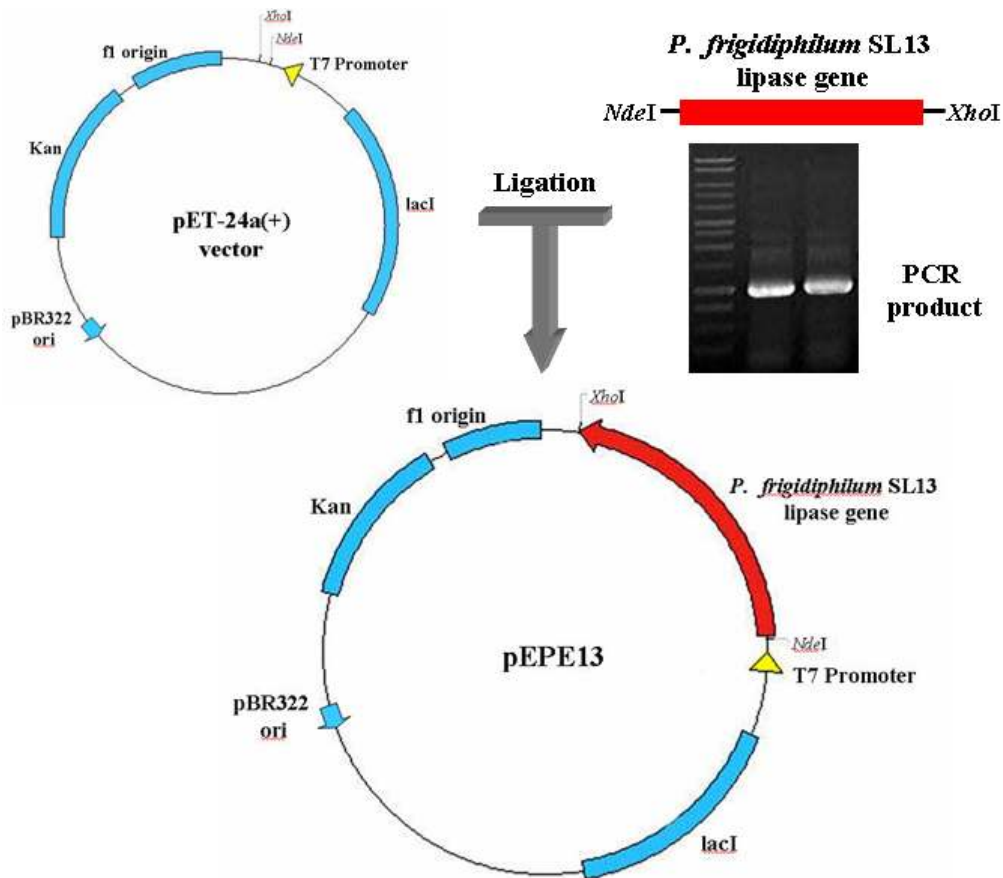


Figure 3-40. Schematic representation of *Photobacterium frigidiphilum* SL13 lipase expression.



나. *Y. lipolytica* CL180으로부터 lipase 유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석

다양한 국내외 해양으로부터 채취된 시료를 멸균 해수에 넣어 현탁 한 후, 기본배지 (3% Sea Salts)에 1% tributyrin (C4) 에멀전이 첨가된 TBN agar plate에 도말하였다. TBN 아가 플레이트는 1% TBN을 0.1% Bacto yeast extract, 0.5% Bacto tryptone, 0.001% FePO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 3% sea salt가 혼합된 배지 1 L와 혼합하여 초음파 분쇄기를 이용해서 emulsion 한 후, 1.5% Bacto agar를 첨가하여 만들었다. 도말한 plate는 25°C에서 24시간 동안 배양하였고, tributyrin (C4)를 분해하여 투명한 환을 형성하는 균주를 1차 선택하였다. 마지막으로 16S rDNA분석을 통하여 리파아제 생산 균주를 최종 확인하였고, 이 균주들은 *p*-Nitrophenyl 오플록사신 가수분해를 위한 2차 탐색에 사용되었으며 이들 151개 균주를 다음 표에 나타냈다. 오플록사신 에스테르를 가수분해 하는 리파아제 활성은 합성 기질인 *p*-Nitrophenyl 오플록사신 (PNPO)을 사용함으로써 조사되었다. 리파아제 활성은 PNPO로부터 분해되는 *p*-nitrophenol 의 양으로 측정 되었다. 상기 1차로 선택된 151개의 리파아제 생산 균주를 modified ZoBell liquid medium에서 30°C에서 24시간 배양하여 세포를 얻은 후, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 washing하였다. 리파아제 활성을 측정하기 위하여 cell (1 g)은 반응액 (0.01 ml of 10 mM PNPO in acetonitrile, 0.04 ml of ethanol, and 0.95 ml of 50 mM Tris-HCl buffer [pH 8.0])과 혼합하여 10분 동안 반응시키면서 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다 (Figure 3-41).

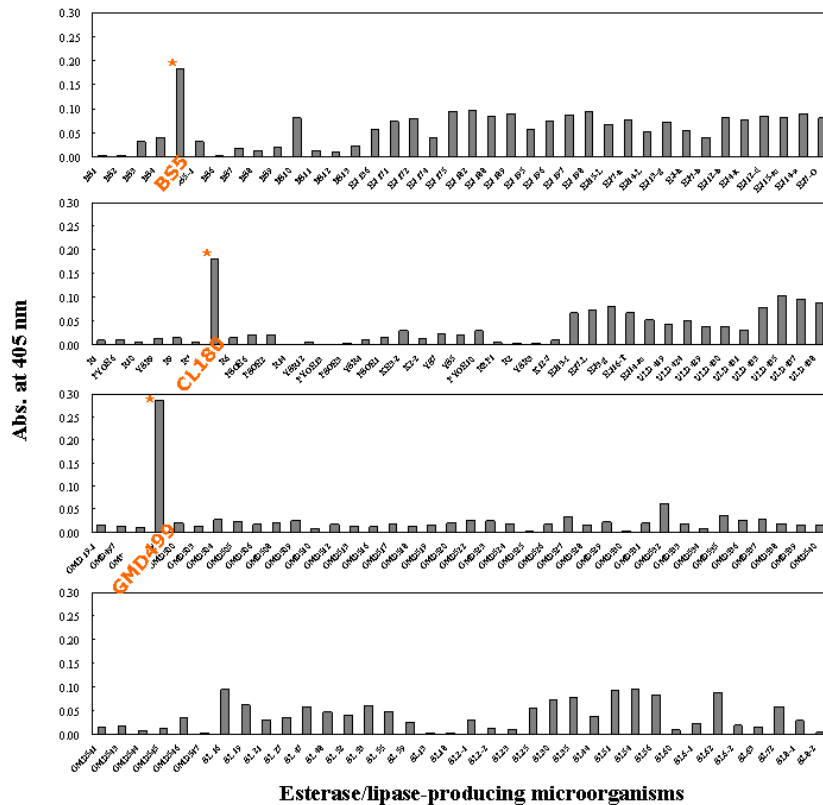


Figure 3-41. PNPO assay from esterase-producing microorganisms (151 strains).

상기 PNPO의 분해능을 확인한 결과, 3종의 균주(strain BS5, 180, GMD499)를 선택하였다. 2차 탐색을 통하여 선별된 세가지 균주를 modified ZoBell liquid medium에서 30°C 에서 24시간 동안 배양한 후, 전체 cell (10 g)을 얻었다. 효소 반응을 위해서 0.1M 인산완충 용액을 제조하였으며 기질로는 (R),(S)-ofloxacin 프로필 에스테르를 사용하였다. 인산완충 용액 10 ml에 10 mM의 ofloxacin 프로필 에스테르를 첨가한 뒤 20분간 초음파 분쇄하여 유화시켜 반응에 사용하였으며 전체 cell (10 g)을 넣어 효소 반응을 개시하였다. 효소 반응은 30°C 에서 48시간 동안 수행한 후, 100°C 끓는 물에 10분간 정치하여 효소의 반응을 정지시키고 동량의 methanol을 첨가한 뒤 vortexing하였으며 원심 분리하여 그 상등액을 회수하여 레보플록사신분석에 사용하였다. 분석은 Hewlett Packard-Model 1050 HPLC system 을 사용하여 330 nm에서 측정하였으며 고정상으로 Shiseido사의 CAPCELL PAK C18 (250 mm x 4.6 mm) column을 사용하였다. 그리고 이동상은 증류수와 methanol을 85:15로 혼합하여 9 mM의 L-isoleucine과 3 mM의 copper(II) sulfate pentahydrate를 첨가한 뒤 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다. 선택된 3개의 균주를 이용하여 (R),(S)-오플록사신 프로필 에스테르중 (S)-오플록사신 프로필 에스테르만을 선택적으로 분해하는 enantioselectivity 능력을 test하기 위해 modified Zobell liquid로 배양하고 얻어진 균체를 이용하여 HPLC 분석

을 통해 enantioselectivity를 측정하였다 (Figure 3-42).

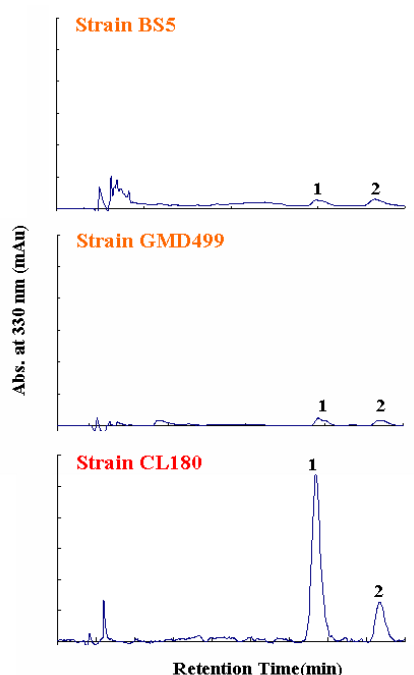


Figure 3-42. Screening of ofloxacin ester-enantioselective esterase.

Peaks : 1 = (*S*)-ofloxacin (levofloxacin) ; 2 = (*R*)-ofloxacin.

PNPO assay를 통하여 선별된 3 균주 (BS5, GMD499, CL180)를 ofloxacin-propyl ester를 기질로하여 광학 선택성을 테스트 하였다. HPLC 분석 결과, CL180 균주 (*Y. lipolytica* CL180)에서 광학 선택성을 확인하였다.

*Yarrowia lipolytica* CL 180균주로부터 enantioselective하게 (*S*)-오픈록사신 에스테르를 특이적으로 분해하여 (*S*)-오픈록사신 (레보오픈록사신)을 생성하는 리파제 활성을 확인하였고, 그 단백질의 특성을 연구하고자 해당 유전자를 cloning하고자 하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180을 90 ml 배양하여 게놈 DNA 58.8 ug를 획득하였다. *Y.lipolytica* CL 180로부터 게놈 DNA의 추출은 Breeden lab에 묘사된 방법에 의해 수행하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180의 5 ml 배양액을 원심 분리하여 cell을 얻은 뒤, 0.5 mm 사이즈의 glass beads를 포함하는 lysis buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS)와 혼합하여 vortexing을 2 분간 수행하였다. 300 ul의 상등액을 회수하여 275 ul의 7 M ammonium acetate (pH 7.0)를 첨가하였다. 65°C에서 5분간 방치한 후, 그 시료는 다시 얼음에 5분간 방치하였다. 500 ul의 chloroform을 첨가하여 원심 분리 후, DNA를 포함한 500 ul의 상등액은 1 ml의 isopropanol과 함께 -20°C에서 침전되었다. 그 pellet을 70% (v/v) ethanol을 이용하여 washing 하였고, 건조 후에 50 ul TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH

8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])에 현탁되었다. 추출된 DNA는 0.5% TAE gel을 이용하여 확인하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180의 게놈 라이브러리는 pUC118 (HincII/BAP treated) 벡터에 의하여 구축되었다. *Yarrowia lipolytica* CL 180으로부터 게놈 DNA를 분리하여 nebulization으로 shearing한 후 2~5kb 크기의 DNA절편을 클로닝 벡터인 pUC118에 삽입한 후, *E. coli* DH5a competent cell에 heat shock 처리하여 형질전환하였다. 추출된 게놈 DNA를 이용하여 게놈 라이브러리탐색 방법을 이용하여 cloning 하고자 하였으며, nebulizer를 사용하여 게놈 DNA를 무작위적으로 잘라서 약 2-5 kb의 크기의 DNA 단편들을 low melting temperature agarose gel로 분리하였다. 분리된 단편을 end-repairing 하여 blunt end로 만들었고, 만들어진 blunt-ended DNA는 pUC118의 HincII site에 ligation 하였다. 결과적으로 얻어진 플라스미드를 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 게놈 라이브러리를 구축하였다 (Figure 3-43, 3-44).

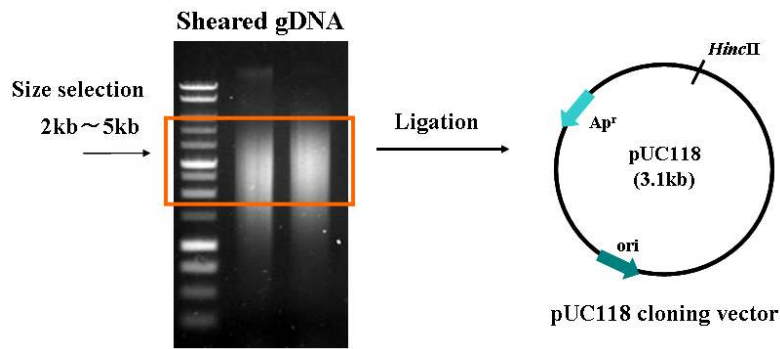


Figure 3-43. Construction of a genomic library.

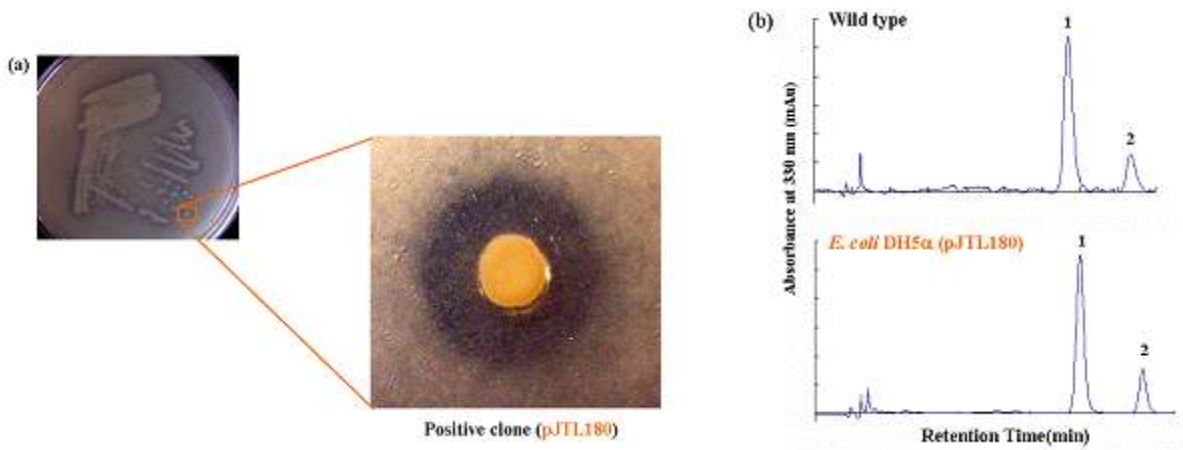


Figure 3-44. Genomic library screening.

*E. coli* DH5a 형질전환체를 LB-TBN 고체배지에 도말하여 37도에서 48시간 동안 배양한 후, 투명환을 생성하는 콜로니를 선별하였다. TBN 플레이트상의 esterase 활성을 (a)에 나타냈으며, 콜로니 주변에 할로를 형성한 것으로부터 상기 형질전환체가 esterase 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 선별된 클론을 LB 배지에서 24 시간 배양한 후, 원심 분리하여 전체 cell을 얻었다. 이 cell을 기질인 ofloxacin propyl ester와 반응시킨 후에 HPLC방법으로 최종적으로 ofloxacin propyl ester의 (S)-enantiomer를 광학 선택적으로 가수분해 할 수 있는지 확인하였다. HPLC 분석 결과를 (b)에 나타냈으며, *E. coli* DH5a (pJTL180)는 wild type과 마찬가지로 (S)-ofloxacin propyl ester를 광학선택적으로 분해하였다. Peaks : 1 = (S)-ofloxacin (levofloxacin) ; 2 = (R)-ofloxacin. 상기에서 선택된 pJTL180 플라스미드를 특성분석을 위해 분리하였고, 제한효소로 처리하여 약 3.5 kb 크기의 절편을 획득하였으며 제한효소를 처리하여 얻어진 pJTL180 플라스미드의 단편의 전기영동 사진을 나타내며, 레인1은 크기마커로서 1kb DNA ladder이고, 레인 2는 절단되지 않은 플라스미드 pJTL180의 DNA이고, 레인 3은 BamH1 /Hind III를 처리하여 선형화된 pJTL180의 DNA를 나타낸다 (Figure 3-45).

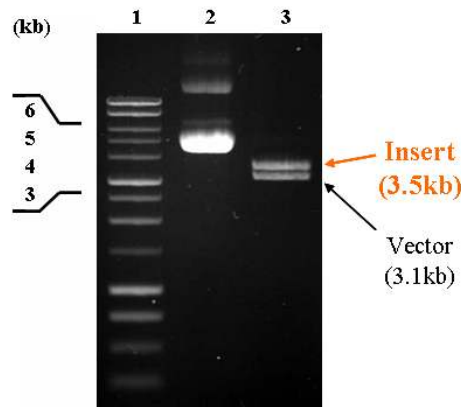


Figure 3-45. Analysis of plasmid DNA (pJTL180) by restriction enzyme digestion. Lanes : 1, size marker (1 kb DNA ladder); 2, uncut plasmid DNA (pJTL180); 3, linearized plasmid DNA (pJTL180) with *Bam*H I / *Hind*III.

DNA 시퀀싱을 위하여 3.5 kb의 DNA fragment는 template로 사용되었다. nucleotide 시퀀스는 Big Dye V.3.1 kit를 사용하여 dideoxy chain termination 방법으로 결정하였다. Nucleotide 시퀀싱은 ABI 3100 genetic analyzer를 이용하여 수행하였다. 3.5 kb의 DNA fragment 시퀀스는 클로닝 벡터인 pUC118의 sequencing 용 primer인 M13R primer와 M13F primer을 이용하여 primer walking 방법으로 확인되었다. 시퀀싱 data 분석은 Vector NTI sequence analysis software package (base-calling, sequencing assembly, and finishing editing software)가 사용되었고, Deduced amino acid sequence는 protein homology와 domain composition 분석을 위하여 complete nonredundant protein sequence database (NCBI)를 이용하였다. Potential signal peptides는 SignalP 3.0 program을 이용하였고, Transmembrane segment search는 TmPred at ISREC web site를 이용하였다. Protein sequences의 비교는 CLUSTALW program을 이용하였다 (Figure 3-46).

```

GTGGTCTCAATTCDDCCCTAAAGTGCACATATCTCTTTGATCCGTCAACGTCGCGAAGTAACTCTCGGCTAGCTCACTAACGCCGAAGCTAAGGTCGTTTGGATTTATTAGCGCATCT 1920
GGGCTGCATGACCAAGGGAACTCAACTGATGACGGATATATATAATCACCCAGTGACTTGGAGTGTCAACCCATCAGAACTCCAACATCACAAATCACACACACACACACTGACTACA 2040
TATA box RBS
ATTAACCTCGAAGCACTCAATGGCTCTTTTGGGGAGTCCDCATTTGGGAGAACCATCCAGTGGAAAGACGTTCTGTACGCCGATGTCAAGCACCGGTTTGCTCCTCTATCTCAAGACT 2160
I N S K A A L N G S F E G V P I G E T I Q W K N V L V A D V K H R F A P P I L K T 43
GACTTTGAGGGAAAGACDCACTGACTGTACCGAAGACGGATACGATTTGTCCCGAGTGCDDCAACAACAGCATATGCACGATGGCGAGTACAAGAGCGACGAGCTTCTGTGCACCAACCTG 2280
D F E G K T I D C T E D G V D C P Q L P N K H D M H D G E V K S D E L L C T N L 83
CGGATCGTGAAGCCCAAGGGGACTTCAAGCACCCDCTCCCGTCTACTTGTACATCCACGGAGGTGCCAAGTGGTTGGAAACATTTACAGCAAGCGAACCGATCCTACTCCGTTTGTG 2400
R I V K P K G D F K H P L P V V L V I H G G A N L V G N I V S K R T D P T P F V 123
GAGCACTCTGCTGCAATCGGCAAGCCTGTCACTGGTGTGATGATCGACTCGGTATGCTTGGTACTCCACCTCCAAGGATGGAAAGGTAAGTGGGCTCTGGGACCGAGTGG 2520
E H S A A I G K P V I M V V I E V R L G M L G V S T S K D G K G N W G L R D Q W 163
ACTTCAGTCAAGTGGTTAACAAGTTCATTGGTGAATTTGGAGGAGACTCTCAGCGAGTGAAGTGTGAGGAGACTCTCTGCTCAATTTGGTGTCCACGCTTGTGTGAAGCGGC 2640
T S V Q W V N K F I G E F G G D S Q R V T V G G E S S I G V H A L V L K D G 203
CTGACGACCAATGGCGTTATCAGCCGAGCCTTCAATGTCTTCGAGTCTCTGGGCTGTTTCCCTCCTCTCCGCTTCTTATCTTGATCTTACCGAGCCAAAGGCTGCTAAGGACTTGGT 2760
L E H H G V I S R A F M S S G S L G C F P P L P V A V L D T V R A K A A K E L G 243
GTTGAAGAGGGCGATCTCGATGACCTACCAAGGTCCCTCCCTACGCTCTCGTCAAGCCGAGTTCAGATCGAATACCCCTTTGGCTTCTATGCTACGATGACTTTTGGCTGACAC 2880
V E E A D L D D P T K V P P V A L V T A G F K I E V P F G F V A V D D F L P D N 283
CTGCTCAAGCCATTCDCAGCTCAGAACCGCTCTTGTCTCGACACGACTATGAGGGTCTCTATTTGTGAAGCGAGTGGTGCACCTGCCAGATCGAACCTCTCTCACTCCTCC 3000
L L Q A I P K L R T A L V S D N D V E G S L F V K R V V P P A E I E P L L N S S 323
GAGACCGAAGAAAGGTCAAGGATATCTACAGCATCTTGACCGGTGCCAGGTGTGCAAGTTCGAGGAGATAGTTTCTTGTGCTGTCTAACCGAGAGCTACTCGGCCAAGTGGAAAAG 3120
E T G K K V K D I V S I L T G A E V C K F R G D S F F V V S N A E L L G Q L E K 363
GGAGGTGTGACGCTACCGCAGTCTCTCGACCAAGTGTGATCCCTTTGACCCCTCTCTTAGGGCCGCTCAGTGTGATCTGTCTTCAATGTGGAATGTCTTCCCAACCTCCCTGAG 3240
G G V D V V R Q F F D Q V D P P D P S L R A R H A V D L V F M W K C L P N L P E 403
TGGGCCATCGAAGTGGCCAAAGTACCAAGCCAACTGATCAAGTTCGCTACGATGAGTCTCCCTGGCCCTCCGATGAGGTTGCCCTTGTGGAAACAAGACCATCAAGTACGGTCAT 3360
W A I E L A N K V Q T N L I K F V Y D E S P W P S D E V A L V G N K T I K V G H 443
TACAAACCTCGAAGCTGGCAGAGAAAGCTGCTTGAACCTCGACCTCAAGGAGATTGAAAGCTTGGAGAGGATCTCACTCCTGCTGGAGAGTGGGCTATGTAGACTTATTTAATTAAG 3480
V N P R K L A E K L L D L D L K E I R K L G E D L T P A G E W A M + 476
ACATTGAC 3488

```

Figure 3-46. Nucleotide sequence and amino acid sequence of *Y. lipolytica* CL180 esterase gene.

얻어진 3.5 kb의 염기서열 분석 결과 1,431 bp로 구성된 ORF를 확인하였다. 분석결과 예측된 ORF는 476 아미노산으로 구성된 52 kDa의 단백질에 대한 정보를 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 프로모터 부위와 (TATA box) 리보솜 binding site (RBS)는 밑줄로 표시되었으며, 활성에 필수적인 Ser, Asp, His를 circle로 표시하였고, 활성 active site를 box로 표기하였다.

함유된 단백질 정보의 분석결과 type B1 carboxylesterase/lipase family에 속하고, 기능이 알려지지 않고, 단백질에 대한 정보를 함유할 것으로 추정된 새로운 유전자인 *Y. lipolytica* CLIB99의 hypothetical protein과 99% 유사성을 나타내었다. 하지만 기존의 알려진 *Y. lipolytica* 의 lipase Lip1 (32.73% identity), *Y. lipolytica* 의 lipase Lip3 (30.24% identity)와 낮은 상동성을 보여 신종 esterase로서 확정하였다. Conserved active site와 oxyanion holes는 밑줄로 표시되었고, 활성에 필수적인 catalytic triad는 triangles로 표기되었다 (Figure 3-47).

```

CL180_Ester : MTTINSAKLNCSSEEC--VPIGETIQWGNVLYADVKHREAFKILKIDFEKTIIDTEDCVD : 58
YAR_HP-1 : MTTINSAKLNCSSEEC--VPIGETIQWGNVLYADVKHREAFKILKIDFEKTIIDTEDCVD : 58
YAR_HP-2 : MTTIHSKLNCSSEEC--TETDGLVLEWGNISQYATITKRYDVIIVKIDYQKVVVDLTKDCPI : 58
YAR_Lip1 : --MSVTLSLNCTENGC--I SEDGIEIFSGIKYANIPYRWAYAERTDDYDNGVDFDQECMA : 57
YAR_Lip3 : --MPLELPSLNASTVGNVTVQNGAVEQFLNIRYADIPGKFEKQVLRNDWNDAEIDAKKVCV : 59

CL180_Ester : CFC-----LPNKHDMHDC--EYKSDDELICTNLRIVKPKGD-FKHFLPVVLYIHGGAN : 107
YAR_HP-1 : CFC-----LPNKHDMHDC--EYKSDDELICTNLRIVKPKGD-FKHFLPVVLYIHGGAN : 107
YAR_HP-2 : CFC-----IANRYDAHDC--DWSDELICTNLRISKPKSA-IGKKLPVFAFIHGGAN : 107
YAR_Lip1 : CFCV-----LFFDYNLEKSP--KEMPTDFECSNLMITRPGC--ATNLPVVFVVIHGGAN : 107
YAR_Lip3 : CFCVPRTPFPNFFSVPDFLWEKVNVDYDQGLGDNLIVTRPKGVSANARLFTVWVVIHGGAN : 119

CL180_Ester : LVGNLYSKRTDPTFEVHESAAIGKPVIMVVI EYRLQMLGCSISKDDK---GNWGLRDCW : 163
YAR_HP-1 : LVGNLYSKRTDPTFEVHESAAIGKPVIMVVI EYRLQMLGCSISKDDK---GNWGLRDCW : 163
YAR_HP-2 : MFGSLVGD--NIVVEVKQSETLGGKPIVVGTEYRLQMLGCSISKDDK---ANWGLRDCW : 161
YAR_Lip1 : LAGNGVCSDHNFVVEVKISIVAGKRPVLIIV EYRLSAPGCLLAVLDTNGNWV---GNWGLRDCW : 167
YAR_Lip3 : IEGSLVNLIIYEQPFLVAESVRVGGKIVHVI EYRLQMLGCSISKDDK---GNWGLRDCW : 174

CL180_Ester : IISVQWVNFKFCIFGGDSQRVIVCGSSGSI EIVIAVLKGLGIEHHG--VISRAPMSGSLG : 221
YAR_HP-1 : IISVQWVNFKFCIFGGDSQRVIVCGSSGSI EIVIAVLKGLGIEHHG--VISRAPMSGSLG : 221
YAR_HP-2 : AAAEVIQHIFCIFGGDTDMIIVCGSSAGM TSYLSRRRAMEGTN--LVNQVFMSSGSGV : 219
YAR_Lip1 : IIALWVLSKHIVIFGGDPSQIIVCGSSAGSI ELLIALLMVHESMKPKKECI IHNVLSSGTM : 227
YAR_Lip3 : IGGVWNRHIIQIFGGDPLNVILTGSAGS VAVINMLIKESMNGRK--LFRNAVMSGTL : 232

CL180_Ester : CFFLPLVAYLDTYRAKAAKRELQVEEADLDDPTKVPPYA VTAGERIEYPPCFYAYDDEL : 280
YAR_HP-1 : CFFLPLVAYLDTYRAKAAKRELQVEEADLDDPTKVPPYA VTAGERIEYPPCFYAYDDEL : 280
YAR_HP-2 : CFFLQTVVEHLNIFRDLAAKREKCKEEDLDDPTKVSADQLDLAGTKIGYPHCFYAYDQWF : 278
YAR_Lip1 : RMGGTIS--ENAFKPIYDG--IKTLVGLINTCSADELLEAQKAGLDFYFLGDF : 281
YAR_Lip3 : TITLQPPKWHARLEEKVAVITG--KEVADLASLSDKELLDAAQLKLNVAVCMTGDDGDF : 289

CL180_Ester : PDNLLQAIP--KLRITALVSDNDYEGSLVVKRVVPE--PAEIEPLNNSSETGKKVKDIYSIL : 336
YAR_HP-1 : PDNLLQAIP--KLRITALVSDNDYEGSLVVKRVVPE--PAEIEPLNNSSETGKKVKDIYSIL : 336
YAR_HP-2 : KEGIEDAVP--QVEAALISDNGFEGVITKTKVHC--DDKVEEVLNKTNLGRAVKKLYNLK : 334
YAR_Lip1 : PPDWRNVRF--KVSRLVSDVI VDCYNKKNKIN--AVRVTP--ENDFDHKVPKLYNLIS : 334
YAR_Lip3 : EPGWKQHLTPDWLDKLITSDCKDECMLYFLPVNAQDDELLAKVAKSPVRETSELYGILK : 349

CL180_Ester : TG-----AEVCKRRTDSEFVVSNAFLGQIERG--GVDVYRQFEDQVDFDPSLR : 384
YAR_HP-1 : TG-----AEVCKRRTDSEFVVSNAFLGQIERG--GVDVYRQFEDQVDFDPSLR : 384
YAR_HP-2 : SN-----ADVCKRVDQMLVLPKVTDAEKLKKA--GAKVRRQFEDQVDFDPSLR : 382
YAR_Lip1 : TEDTWEDYHYKMMLEKDEETIRGNQCELELFEQIE--NIVVRRQLEQVDFDPSLR : 389
YAR_Lip3 : EGG--DIKSACLDLKTLAT--NYFNHLFKKMEARNNGS--SRVYGLAVDFPNQHNQDR : 406

CL180_Ester : ARIAYDLVFMWKLCPNLPDWAIELANKYQTNIEKEVYDES--PWSDEVALVGN---KT : 438
YAR_HP-1 : ARIAYDLVFMWKLCPNLPDWAIELANKYQTNIEKEVYDES--PWSDEVALVGN---KT : 438
YAR_HP-2 : ARIAYDIFFMVHDNTDIDSENDAKKYQTNIEKEVYKEA--WEEGEVCIWHD--HK : 436
YAR_Lip1 : CRIAYDLYMVDN--WEMFDKHAVARQVQDTETKRYVGGQD--WEVDKLIHYVHDNQPEILDK : 448
YAR_Lip3 : ARIAYDVLVMFNS--TKFNDIGDKISRLPQSHFLRLAVGLEPWHHRNPFVYRNGGYQQLPL : 465

CL180_Ester : IKYCHYNRKLAEKLDLDELKDIRKKG--EDLTPACEWAM : 476
YAR_HP-1 : IKYCHYNRKLAEKLDLDELKDIRKKG--ENLTPACEWAM : 476
YAR_HP-2 : IEYKFNRRQQCELEIKYKRSVRFELATDLGFDLAFGGNLI : 478
YAR_Lip1 : SQFQDFRNVPALKFLGFSAEELGELT--KKYVGECHYTL : 486
YAR_Lip3 : SELNKVREVERYEALSKMDFGQVGRIS--NAISRL : 498

```

Figure 3-47. Multiple sequence alignment of *Y. lipolytica* CL180 esterase and other related proteins. Highly conserved residues are in black, and less strongly conserved residues are in gray. Proteins : CL180\_Ester, esterase from *Y. lipolytica* CL180 ; YAR\_HP-1, hypothetical protein (99% identity) from *Y. lipolytica* CLIB99; YAR\_HP-2, hypothetical protein (49% identity) from *Y. lipolytica* CLIB99; YAR\_Lip1, lipase Lip1 (32.73% identity) from *Y. lipolytica* CLIB99 ; YAR\_Lip3, lipase Lip3 (30.24% identity) from *Y. lipolytica* CLIB99.



pET24a의 NdeI, SalI site에 NdeI, SalI site를 포함하는 primer를 제작 (Forward : 5'-CGACCCGGCATATGACTACAATTA ACTCGAAAGCACTCAATG-3', Reverse : 5'-CTCCACATGTCGACCATAGCCCCTCTCCAGCAGGAGT-3')하고, 리파제 유전자의 ORF를 포함한 pJTL180을 이용하여 Ex-taq polymerase (Takara, Co.)를 이용하여 PCR을 수행하였다. Ligation한 후, DH5a에 transformation 하여 candidate를 얻고, 이로부터 DNA plasmid prep하여 이를 sequencing하여 mutation이나, frame shift가 일어나지 않은 완전한 DNA가 cloning되었음을 확인한다. 이후 BL21(DE3)RP 균주에 transformation 하여 expression 하였다 (Figure 3-48).

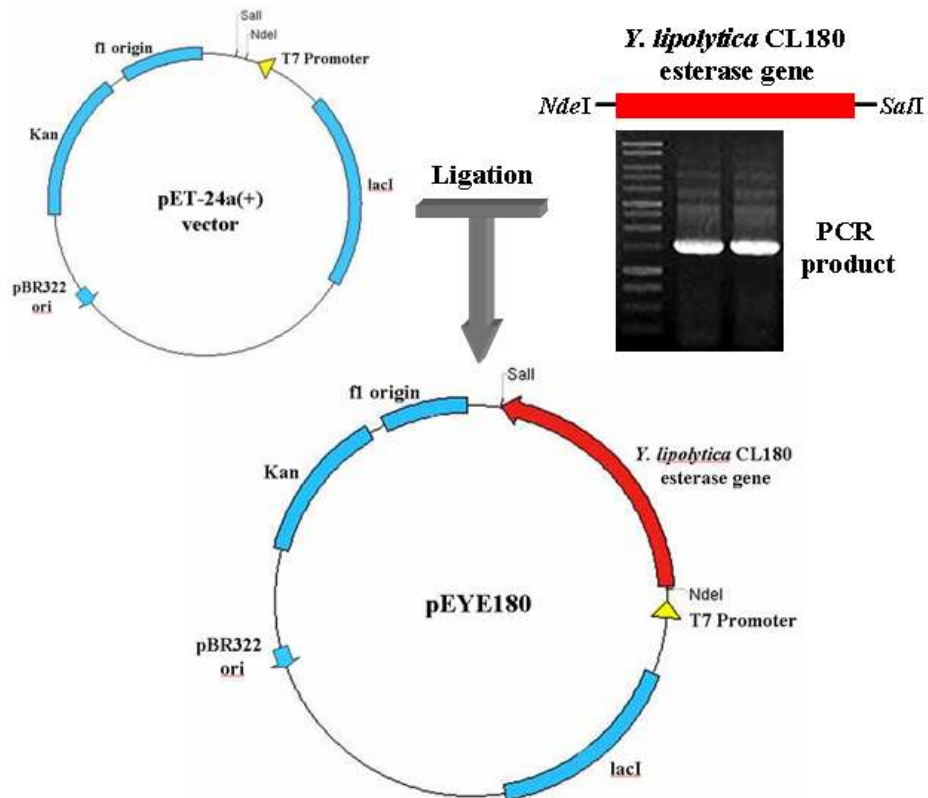


Figure 3-48. Schematic representation for overexpression of *Y. lipolytica* CL180 esterase.

pET24a에 cloning된 리파제 유전자의 expression을 위해 LB medium에 Kanamycin (50 ug/ml)이 첨가된 medium에서 seed culture 한 후 동일한 main medium에 1% 접종하여 3시간 배양 후 IPTG를 최종 1mM의 농도로 첨가하여 발현하였다. 발현 정도와 시기를 분석하기 위해 1시간 마다 sampling하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 발현이 확인된 colony를 대량 배양하여 재조합 단백질을 분리하기 전, soluble fraction, inclusion body, periplasmic region 중의 어느곳으로 생산되는 지를 확인하였고 이는 pET system의 protocol에 따랐다. 다량의 리파제를 분리하기 위하여 E. coli에서의 expression system을 이용하였다. 순수분리의 용이를 위해 His-Tag이라는 oligopeptide를 접합시켰고, Histag 분리는 Talon resin (Clontech, Co.)를 이용하여 분리하였다 (Figure 3-49).

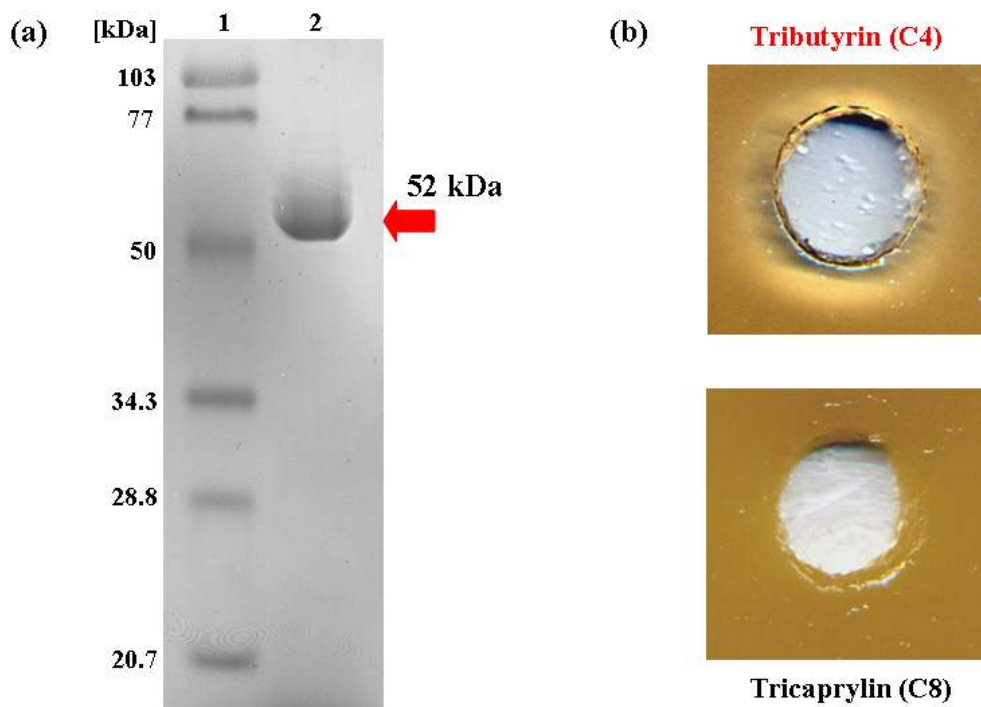


Figure 3-49. SDS-PAGE analysis (a) and lipolytic activity (b) on an agar plates of purified esterase. (a) Lanes: 1, marker proteins; 2, purified esterase (52 kDa). (b) The agar plates contained 1% substrate and were incubated for 3 hr. Lipolytic activity is visualized by a halo zone.

정제된 esterase는 tributyrin plate (C4)에서는 투명환을 형성하여 활성을 보인 반면, tricaprilyn plate (C8)에서는 활성을 나타내지 않았다 (b).

정제된 esterase는 *p*-nitrophenyl esters (C2-C18)를 기질로 이용한 분석 결과, 긴 chain (C12-C18)에서는 활성을 나타내지 않았고, *p*-nitrophenyl butyrate (C4)에서 최대 활성을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 3-50).

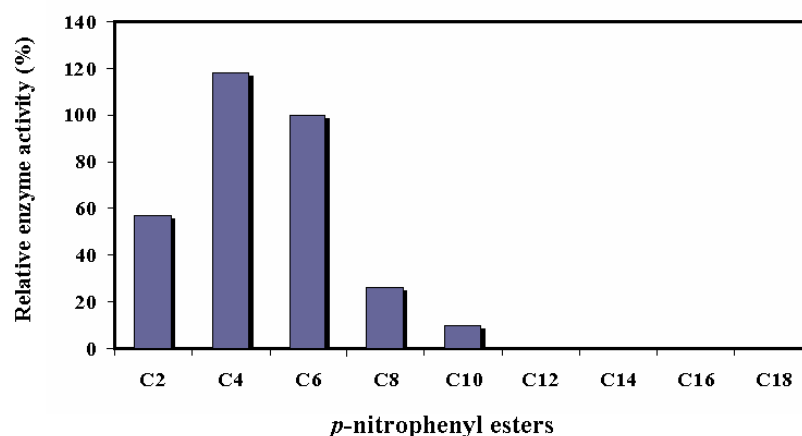


Figure 3-50. Substrate specificity of purified esterase. Activity was assayed by adding the purified enzyme into the substrate solution consisting of 10 mM substrate in acetonitrile, ethanol, and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at the volume ratio of 1:4:93. Relative activity was calculated by assuming the activity obtained with *p*-nitrophenyl hexanoate as 100%.

정제된 *Y. lipolytica* CL180 esterase의 최적 온도는 35도, 최적 pH는 pH 7.5라는 것을 확인하였다 (Figure 3-51).

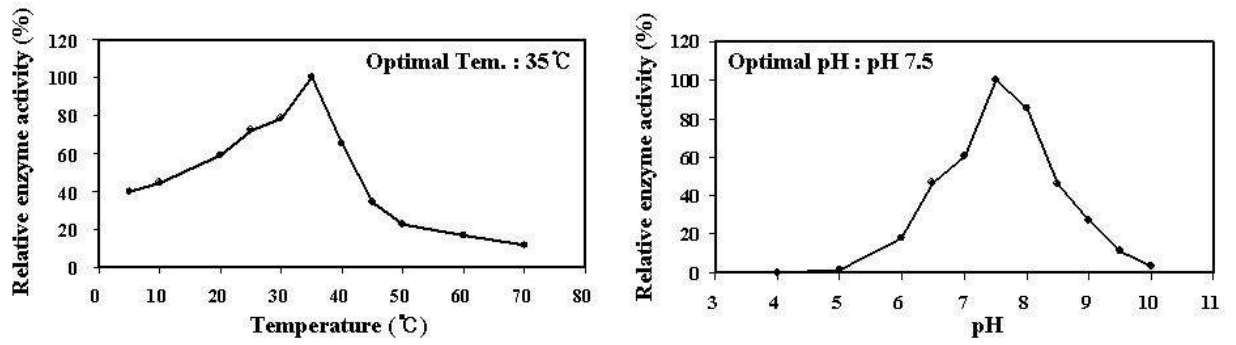


Figure 3-51. Effects of temperature and pH on esterase activity of *Y. lipolytica* CL180.

다. *Vibrio* sp. GMD509균주로부터 ofloxacin ester분해 활성 lipase의 cloning

해양 균소의 알로부터 분리된 GMD509균주는 ofloxacin ester의 분해활성을 보여 분해활성을 나타내는 lipase를 cloning하고 특성분석을 실시하고자 하였다 (Figure 3-52).

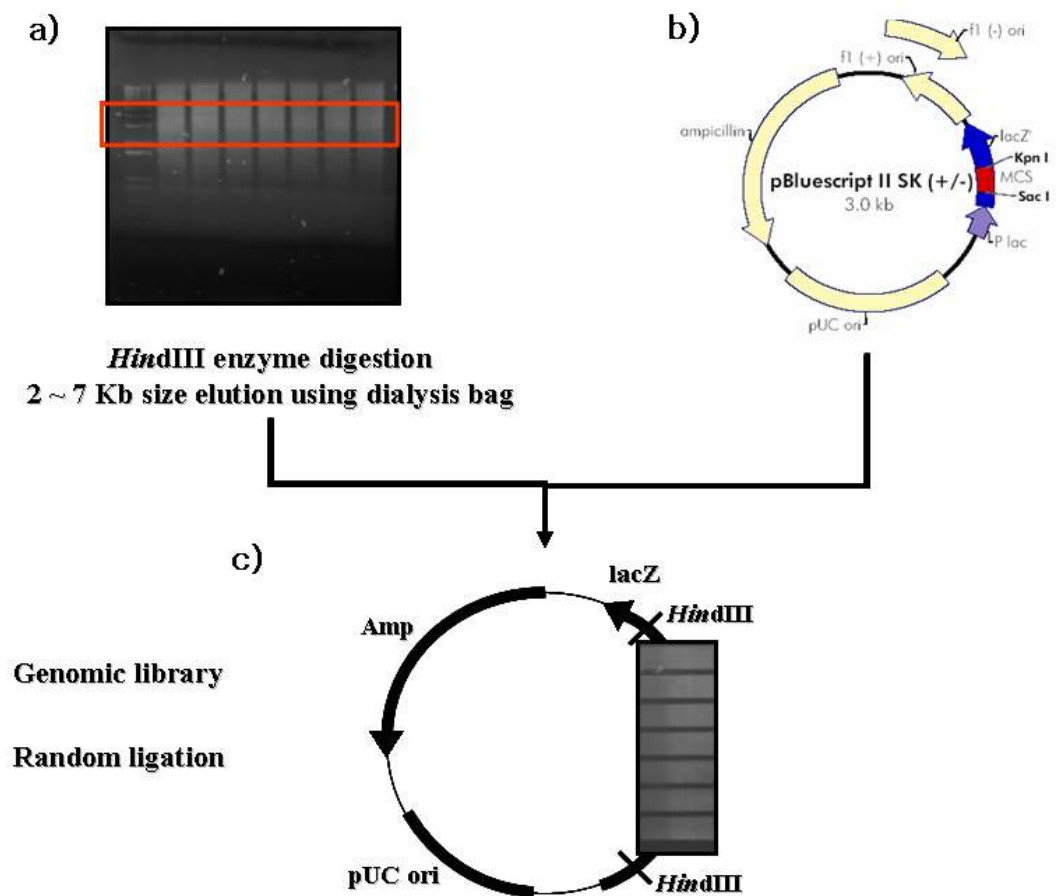


Figure 3-52. Construction of a genomic library. (a) Genomic library by restriction enzyme digestion (*Hind*III) (b) pBluescript sk (+) II cloning vector (c) Recombinant plasmid vector map containing GMD 509 esterase gene.

*V. tasmaniensis* GMD 509 균주로부터 genomic DNA를 추출하였으며, 추출한 DNA를 대상으로 genomic 라이브러리는 pBluescript sk II (+) vector에 의하여 구축되었다. *V. tasmaniensis* GMD 509로부터 genomic DNA를 분리하여 제한 효소인 HindIII로 full digestion 시킨 후 2~7 kb 크기의 DNA절편을 클로닝 벡터인 pBluescript sk (+) II에 삽입한 후 기질인 tributyrin(TBN) plate에서 lipolytic 활성을 보이는 clone을 최종 선택하였다. GMD509균주로부터 유래한 lipase를 cloning하고 순수분리하여 최종 37kDa의 순수분리된 lipase를 획득하였다 (Figure 3-53).

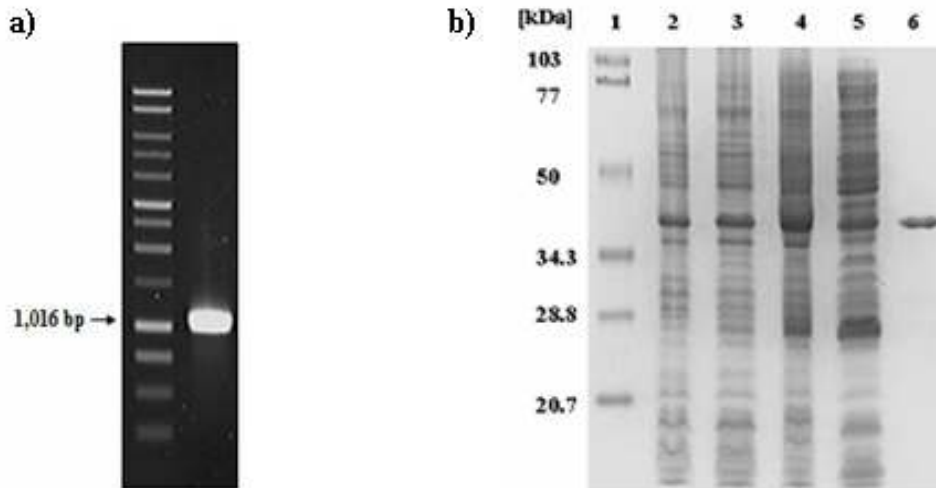


Figure 3-53. Analysis of esterase from GMD509 strain. a) analysis of esterase DNA (vlip509) gene. Lanes : 1, size marker (1 kb DNA ladder); 2, vlip509 . b) SDS-PAGE of Vlip509. Lanes : 1, SDS-PAGE standards; 2, *E. coli* BL21 cell extracts, 3 uninduced cell extracts; 4, induced cell extracts; 5, soluble fraction; 6, purified enzyme.

에스터라아제 ORF로 추정되는 부분만을 expression vector인 pET24a(+)에 클로닝 하기 위하여 pET24a(+)의 NdeI, XhoI site에 NdeI, XhoI site를 포함하는 primer를 제작 (Forward : 5'- CGACCCGGCATATGAATTGGACACATTTACTGTTTCATACCTC - 3', Reverse : 5' - CTCCACATCTCGAGTCGATTTAGAAAAGTCAACAATGTCATTCAATATC - 3') 하고, 에스터라아제 유전자의 ORF를 template로 하여 Ex-taq polymerase (Takara, Co.)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 얻은 product를 vector와 ligation한 후, DH5a에 transformation 하여 candidate를 얻고, 이로부터 DNA plasmid prep하여 이를 sequencing하여 mutation이나, frame shift가 일어나지 않은 완전한 DNA가 클로닝 되었음을 확인하였다. 이후 BL21(DE3) 균주에 transformation 하여 발현 하였다. pET24a(+)에 클로닝된 에스터라아제 유전자의 발현을 위해 LB medium에 kanamycin (100 ug/ml)이 첨가된 medium에서 seed culture 한 후 동일한 main medium에 1 % 접종하여 3 시간 배양 후 IPTG를 최종 1 mM의 농도로 첨가하여 18 °C에서 18 시간동안 서서히 발현시켰다. 다량의 재조합 단백질의 분리를 위하여 E. coli에서의 발현 system을 이용하였다. 순수분리의 용이를 위해 His-Tag이라는 oligopeptide를 접합시켰고, His-tag 분리는 His-bind purification kit (Novagene, Co.)를 이용하여 분리하였다. 1,016 bp의 ORF를 PCR을 통해 획득하였으며, His-tag을 이용한 순수분리 정제를 통해 최종 37,088Da (약 37 KDa)의 에스터라아제 단백질을 분리하였다. 분리된 lipase의 서열을 분석해 보면 GX SXG의 nucleophilic serine과 catalytic triad를 확인할 수 있었다 (Figure 3-54).

CITGATGCTGAACCAACAAGACCAGCACAGGCTCTGCAGTTGCACTGATTCAGTTCTTTAGCATGATTTGTGGCTCGCTAGCCATGGT	90
CTTGETTTCAATCCGACCAGACTCGCTGATTGAAAACCTTGGCTTTATCCAATTATCCGTCGGCATCCTAGCCGGCTTGATGTGGTAAT	180
GGTCAGAAACAAAGAGTATGTGACCACCAAGCTGAATTAAGGTTATTCAAAATAGCTAATCCAGTACTTAACACGATTGAGGGGCTCCT	270
CGATCGTGTTCAGGCTCTCGTGATACCTAGCCCTTAGCCGATATTAAGTCCAATCACCTCAATTGGAGTTAACACCAATCAATTGGACACAT	360
	M N W T H 5
TTACTGTTTCATACCTCTACTTCTTCTTTGCAATTCGCGTCCGCTTCGATGTGCGATTCACTCAAGTCACCTTAACTGACAACCCCTAAT	450
L L F I P L L L L L C N S A Y A F D V G F T Q V T L T D N P N	35
CGCCCGCTAAATGCTGCCATTTGGTACCCACATCAGATAAATCAGACACAACCTTTAATTGGCGATAACCCCGCTTCATCGTACTCAA	540
R P L N A A I W Y P T S D K S D T T L I G D N P A F I G T Q	65
GTCATCAAAGATGCACAGATTCAGTCAGGCCTTTTCCAGTAATACTGCTATCCGACGGCTATCCAGCAAACCTGGCGAAAACAAAACCTGG	630
V I K D A Q I Q S G T F P V I L L S H G Y R G N W R N Q N W	95
TTAGCCACTAAACTTGGCAGTCGGCTACATCGCTCGCTGCCGCTGATCATCCGGCAACCACCTCTTTCCAGCAGTCCCAGAACCAAGCA	720
L A T K L A S R G Y I Y A A A D H P G T T S F D Q S P E Q A	125
GAAAAGTGGTGGAAAAGGCCACGAGATGATCGCGTATGCTGGACTATTTATTATCCGAAAACCTCGTGAAGCAGTCTGCTAACCGTGAA	810
E K W W E R P R D V S R M L D Y L L S E T S W K Q S A N A E	155
AATGTTACCCGATCCGGCATTTCATTGGCTGCTGACTGTCATGCAATTGCGGGACCGAAAATAGATAGAGCAACGTTTAAATCCGAA	900
N Y T A I G H S L G G W T Y M Q L A G A K I D R A T F K S E	185
TGTAAGCAATATAACAATCCGACAACCTTGTCCGCTTACTCAACAGCTAGCCCTATCCAAAAGTCCAACTACAGAACCAACAATAAAGAT	990
C K Q Y N N P R T C G L T E E L G L S K Y Q A T E P N N K D	215
CITTCAGATCCAAGAGTTCAACCTGCCGTCAGTCTTGATTTAGGGCTTGCCTAGCTTTTCAGTCCGCAGCTTAAATGGCATTACAGTG	1080
L S D P R V Q R A V S L D L G L A R S F S V G S L N G I T V	245
CCAACITTAATACTGGCTGCTGGGATCGATATAGCAGATCTTCTCAGGCATTAGAGTCTGGCTATATTGCCGAGCATGCCACTGAGC	1170
P T L I L A A G I D I G D L P Q A L E S G Y I A E H M P L S	275
TCAAGACGCTACAGGCTCTATGAAAACGCCACGCATTTACGCTTCATTCAAGGCTGTAAACCAGGTGCTATAGCAATGCTTCAAGAAGAA	1260
S R R Y K V Y E N A T H F S F I Q G C K P G A I A M L E E E	305
GTGCCAGCCGATGTTATTTGTAAGATGGCTTAGCAGCTTACCCGGCAAACTACATCAATTGATATTGAATGACATTGTTGACTTT	1350
Y P G D G I I C K D G L G A S R G K L H Q L I L N D I V D F	335
CTAAATCGATAAACTGAAAAGTAAACAGCTCAGTCTAACGCTTATGGCAAGCTCCGATACTCACTCGGAGTTTGGCCAGTGATTCTCGA	1440
L N R *	338
AAACTCCCTATTGAAGTTAGACTTGGTCTGAAAGCCTCAACTGAAGAAGATCTCAGTTATCCCTTCATCAGTTTGCCTTAGCAGAGTCTT	1530
AGCGTGCCTCAACCCGATAAAGTGTAAATCACCTTTGAA	1567

Figure 3–54. Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of esterase gene. Active site is revealed blue and catalytic triad is revealed green colors. The putative oxyanion hole site is indicated purple. Asterisk denoted stop codon.



Nucleotide sequence와 amino acid sequence를 분석하기 위하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI) ORF finder를 사용하여 분석하였으며, protein homology와 domain composition 분석을 위하여 complete nonredundant protein sequence database (NCBI)의 Blastp를 이용하였다. Potential signal peptides는 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) program을 이용하였고, Protein sequences의 비교는 CLUSTALW program을 이용하였다.

염기서열 분석 결과 에스터라아제 유전자라고 추정 되는 부분에서 1,016 bp로 구성된 open reading frame (ORF)를 포함하고 있으며 338 개의 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한, 약 20 번째 부분에 AFD의 signal sequence 부분도 확인하였다. 시작 codon은 ATG였고, TAA로 stop되었다. A potential ribosome binding site (TTGGAGT)가 시작 ATG codon으로부터 17 bp 앞쪽에서 발견되었다. SignalP 분석결과 20번째 아미노산인 AFD부분으로 확인되었다.

함유된 단백질 정보의 분석결과 보통 알려진 에스터라아제의 active site에 일반적으로 conserve 되어 있는 GHS162LG motif (Gly-X1-Ser-X2-Gly)가 발견되었다. 또한, 에스터라아제 활성화에 필수적인 the triad가 단백질 서열로부터 분석되었다 (S162, D263, H294). 기존의 알려진 단백질과 연관성을 살펴보기 위해 BLAST homology search를 실시한 결과, 이미 알려진 에스터라아제 이외에 기능이 알려지지 않고, 단백질에 대한 정보를 함유할 것으로 추정된 새로운 유전자와 유사성을 나타내었다. BLASTP를 이용한 아미노산 서열 분석의 결과, E. coli의  $\alpha/\beta$  superfamily hydrolase (28% identity), Pyrococcus furiosus lysophospholipase (22% identity), Streptomyces sp. triacylglycerol acylhydrolase (16% identity), Prochlorococcus marinus Esterase/lipase/thioesterase active site (17% identity)의 낮은 상동성을 확인하였다. 하지만 기존의 lipase/esterase에 대한 상동성이 20%이하에 그쳐 새로운 종의 lipase로 확인되었으며, 대부분의 상동성이 있는 유전자가 hypothetical protein으로 확인되었다 (Figure 3-55).

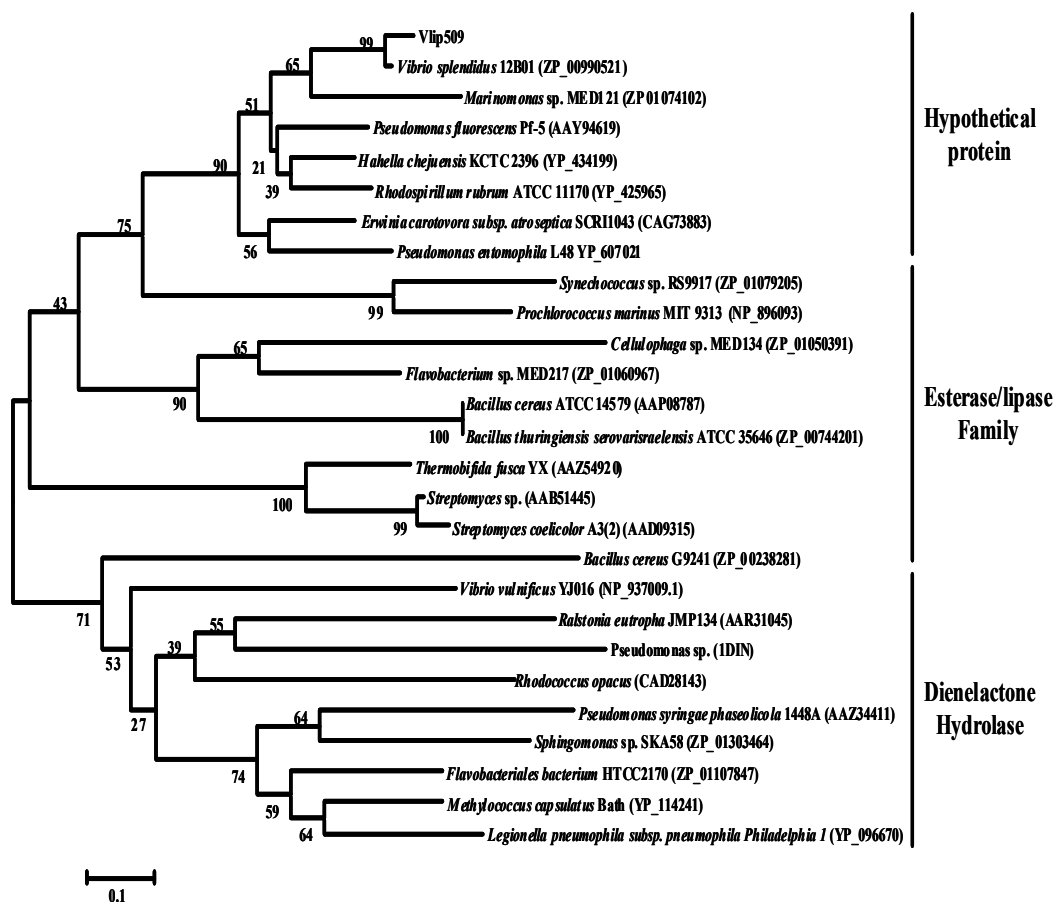


Figure 3–55. Phylogenetic tree of ester hydrolase family homologous between Vlip509 and putative proteins. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor–joining method with MEGA, version 3.1, software.



분리된 Vlip509 lipase활성은 30도, pH 9.0에서 최적을 나타내었다 (Figure 3-57).

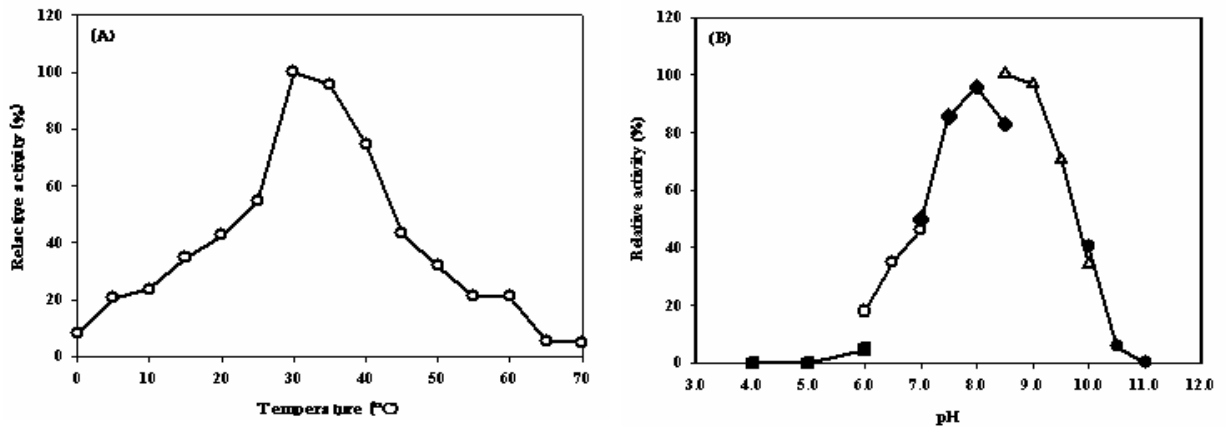
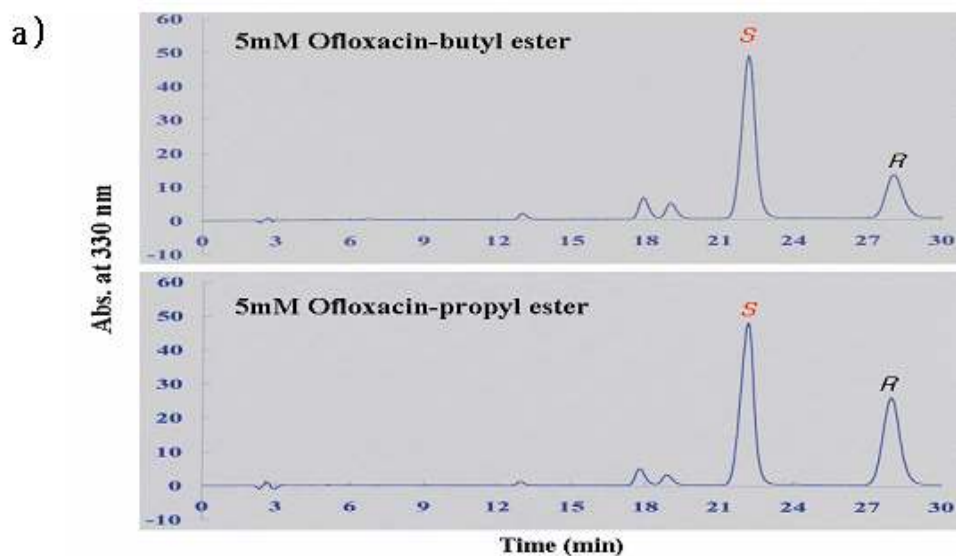


Figure 3-57. Effects of temperature and pH on enzyme activity. (a) is represented temperature. The enzyme activity was determined at pH 7.5 by using p-nitrophenyl caproate as the substrate. (b) is represented pH. The enzyme activity was determined at 30°C by using p-nitrophenyl caproate as the substrate. Buffers: 50 mM sodium acetate buffer (open boxes pH 4.0 to 6.0), sodium phosphate buffer (open circles; pH 6.0 to 7.0), Tris-HCl buffer (closed diamonds; pH 7.0 to 8.5), and CAPS buffer (open triangles pH 8.5 to 10.0), CHES buffer (closed circles; pH 10.0 to 11.0).

Optimum temperature를 측정하기 위하여 정제된 효소 10 ul과 기질인 10mM p-nitrophenyl caproate (C6) 10 ul, 50 mM Tris-HCl 980 ul를 섞은 후 각 온도(5~70 °C)에서 5분간 반응 후 405 nm에서 흡광을 측정하였다. 정제된 효소 10 ul과 기질인 10 mM p-nitrophenyl caproate (C6) 10 ul, 50 mM의 여러 가지 범위의 buffer (pH 4~11) 980 ul를 섞은 후 30 °C에서 5 분간 반응 후 405 nm에서 흡광을 측정한다. 사용한 buffer는 sodium acetate (pH 4~6), sodium phosphate (pH 6~7), Tris-HCl (pH 7~8.5), CHES (=2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid; pH 8.5~10), CAPS (=3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid; pH 10~11)를 각각의 pH에 맞도록 조정하여 사용하였다.

정제된 효소의 최적 반응 온도를 알아보기 위하여, 효소 반응 온도를 5~70°C 범위로 조정하여 각 온도에서의 활성을 측정하였다. 측정 결과, 30°C에서 최적 활성을 보였고, 5°C에서는 20 %, 40 °C에서는 74 %로 40도 이후에는 효소 활성이 큰 폭으로 떨어지는 것을 확인하였다. 대부분 균주의 생장 온도 보다 약 10~15 °C 정도 높은 온도에서 최적 활성을 보이는 반면, GMD 509의 경우, 생장 온도가 25°C인 반면 비슷한 온도에서 최적 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 에스테라아제 활성에 미치는 반응 용액의 pH의 영향을 조사한 결과, pH 8.5

에서 최적의 활성을 보였으며 pH 9.0에서는 96%, pH 9.5에서는 70%의 활성을 보였으며 pH 10에서는 34%로 급감하는 성향을 보였다. pH 8.0 ~ 9.5 사이의 범위에서 활성을 보이는 약 알칼리성 에스테라아제임을 확인하였다. 순수분리된 Vlip509 lipase를 이용하여 ofloxacin ester의 광학특이적분해 활성을 측정한 결과 그림과 같이 40% ee 값으로 분해활성을 나타내었다 (Figure 3-58).



b)

Time (h)	Conversion, $c$ (%)	Enantiomeric excess, $ee_p$ (%)	Enantiomeric ratio, $E$
6	1.1	30.78	2.23
12	1.7	42.9	2.52
24	3.4	41.0	2.43
36	4.1	40.74	2.42

Figure 3-58. HPLC analysis of ofloxacin ester-enantioselective esterase and enantioselective hydrolysis rate of racemic ofloxacin propyl ester by purified Vlip509. Peaks : S = (S)-ofloxacin (levofloxacin) ; R = (R)-ofloxacin.

## 9. 정보 databank를 이용한 효소 탐색 및 분석

유전체가 진행되고 있는 해양미생물균주로부터 광학선택성 에폭사이드 가수분해효소 탐색을 위해 Whole cell을 이용한 screening 결과에서 *Rhodobacteriales bacterium* HTCC2654 (Rh)는 substrate인 styrene oxide의 (R)-enantioselective를 나타냈고 *Novosphingobium aromaticivorans* (Novo)는 동일한 반응시간에서 다른 두 균주보다 높은 활성을 나타내었으며 *Sphingopyxis alaskensis* (Sp)는 비교적 미미한 활성을 보였다 (Figure 3-59).

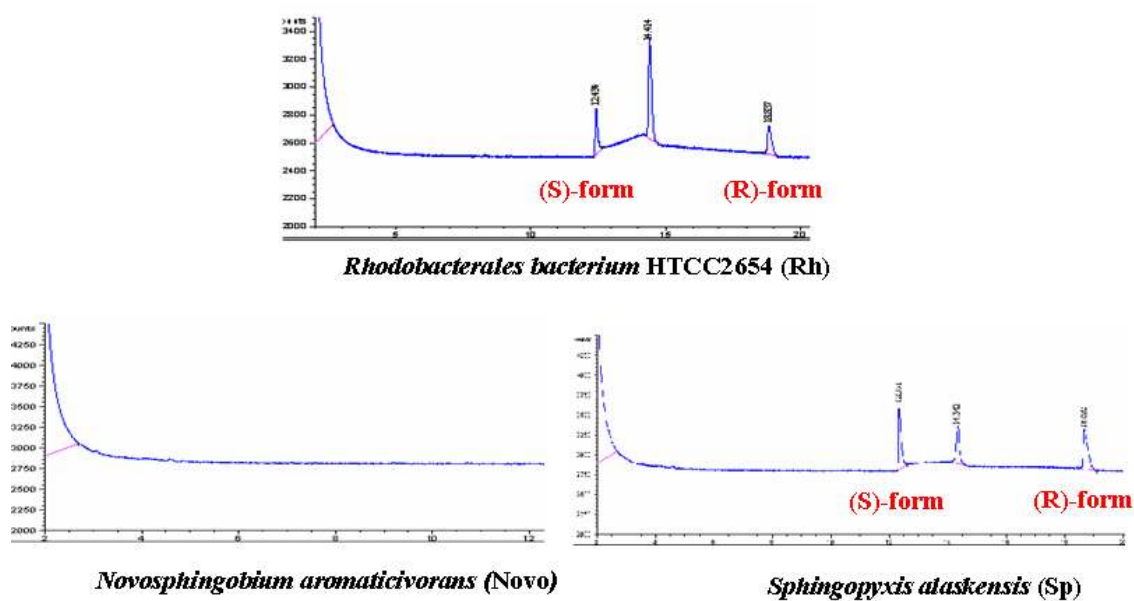


Figure 3-59 .EH activity of Rh, Nono and Sp against styrene oxide by using gas chromatography.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발목표 달성도

평가의 착안점	달성도 (%)	자 체 평 가
심해 환경시료 확보 및 미생물분리	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 심해환경 퇴적물 시료의 확보</li> <li>·Edison seamount(냉용수지역, 조개군집고밀)</li> <li>·PACMANUS field(열수구지역)</li> <li>·Mariana Trench(지구에서 가장 깊은 심연)</li> <li>·Rabaul 온천수 및 퇴적물</li> <li>- 2001년도에 일본 JAMSTEC 탐사로부터 확보한 심해 퇴적물내 미생물 다양성을 구체적으로 분석하였음</li> <li>·퇴적물(일본해구, 일본연안동해)내 세균군집 및 고세균류 군집의 비교 분석</li> </ul>
심해 미생물의 생리적 특성조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2001년도에 분리한 저온성 세균의 계통학적 분석 완성</li> <li>- 분리된 균주의 생육온도범위 측정하여 진정 저온성세균 여부를 판단</li> <li>- LT17 균주가 호압성 여부를 판단하기위해 고압(50MPa)과 상압(0.1MPa)조건에서 배양한 결과 형태적 변화가 유도됨이 관찰됨</li> </ul>
심해환경 미생물 유전체 자원확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2001년에 분리된 RT17(중온성), LT17(저온성)은 심해균주로 잘 알려진 바 있는 <i>Shewanella</i> 속에 포함되고 EPA 생성세균으로 집중연구대상 균주로 선정</li> <li>- 2002년도에 Edison seamount (수심 1,500 미터)의 조개군집이 농후하게 존재하는 지역에서 혐기성 저온세균 분리에 성공하여 생리적 특성조사의 연구대상임</li> </ul>

평가의 착안점	달성 도 (%)	자 체 평 가
◦심해미생물/해양환경유전체 자원 분석 및 활용	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 심해 난배양성 미생물 균집의 다양성을 비교 분석한 결과 JMB (SCI)에 게재</li> <li>- Edison Sea Mount 심해퇴적물에서 lipase 활성을 갖는 저온성 균주 6종을 분리하였다. 분리된 6종의 균주들에 대해 16S rDNA 염기서열분석 결과 분리된 균주들이 표준균주들과 97.1-87.9%의 염기서열 상동성 확인. 이와 같은 결과로 분리된 저온성균주들이 신종임을 확인.</li> </ul>
◦산업적 유용 Chiral compound 조사 및 효소탐색용 유도체 합성	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허가 만료되었거나 3-5년 이내에 물질특허가 만료되는 화합물을 대상으로 조사한 결과 4종의 화합물에 대한 효소전환의 도입이 가능한 효소군 선별.</li> <li>- Lipase, Esterase, Hydantoinase, CGTase의 효소반응을 이용하여 생물학적 효소공정의 도입이 가능한 기질 6종을 합성하여 활성균주 탐색에 활용.</li> </ul>
- 해양미생물로부터 chiral compound 전환효소 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydantoinase 활성균주 총 95종 확보</li> <li>- CGTase 활성 균주 총 16종 확보</li> <li>- Epoxide hydrolase를 이용하는 chiral compound 분해활성: 분리균주 122 균주 중 활성균주 23종 확보하였고 그 중 GC 분석에 의해 입체선택성 에폭사이드 가수분해 활성을 보이는 JCS358 균주를 찾았다.</li> <li>- 입체선택성 에폭사이드 가수분해 활성을 보이는 보전된 <i>Erythrobacter</i> 속한 균주가 10균주 확보</li> </ul>
- 대량생산 및 상용화 기반 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 탐색된 SL13, GMD509, CL180으로부터 유래한 신규 ofloxacin에 대하여 광학 선택성을 가지는 신규한 esterase를 대량분리를 실시 11에 1-5mg의 yield로 순수분리성공</li> <li>- <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594로 부터 신규 3종의 대량생산성공</li> <li>- 국내특허출원 및 PCT 출원</li> </ul>
- 정보 databank을 이용한 효소 탐색 및 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moore foundation에서 진행중인 해양미생물 유전체분석을 통해 3종의 미생물을 확보하고, 해당 ORF cloning</li> </ul>



<p>- 효소유전자의 클로닝과 발현 및 특성분석</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 입체선택성 에폭사이드 가수분해 활성을 보이고 whole genomics가 끝난 <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594 균주를 선별</li> <li>- <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594로 부터 신규 3종의 에폭사이드 가수분해 효소 유전자 클로닝, 발현, 정제 그리고 특성 분석</li> <li>- 이중 한 균주가 생화학적 test 등 각종 시험결과로 신종이었으며 이내용은 IJSEM (SCI)에 게재</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- SL13 균주가 생화학적 test 등 각종 시험결과로 신종이었으며 이내용은 IJSEM (SCI)에 게재</li> <li>- 최종 선발된 신종의 SL13 균주로부터 지질 가수분해효소 유전자 클로닝, 발현 및 특성 분석</li> <li>- GMD509 균주로부터 지질 가수분해효소 유전자 클로닝, 발현 및 특성 분석</li> <li>- 키랄화합물인 ofloxacin에 대하여 광학 선택성을 가지는 신규한 esterase로 탐색</li> <li>- 신규한 esterase의 유전자의 클로닝, 발현, 정제 및 특성분석 확인</li> </ul>

## 2. 관련분야 기술발전예의 기여도

심해환경에 존재하는 미생물을 연구하는데 있어서 가장 큰 문제는 연구소재의 확보에 어려움이 있기 때문이다. 초기에 비용과 시간이 많이 투자되어야 하고, 미생물의 활용을 위해서는 배양기법, 분류, 동정, 유용효소 탐색 등의 연구도 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 접근하기 어려운 다양한 해양의 심해 생물시료를 확보하고 산업적으로 이용가치가 예상되는 유용효소 탐색 및 특성 분석 등의 후속적인 연구를 위한 기반 조성에 있다. 본 연구과제에서는 다양한 장소에서 심해 퇴적물 시료를 확보하였고 확보된 시료에서 다양한 종의 미생물을 분리하였으며, 특히 산업적인 가치가 있을 것으로 기대되는 광학활성 chiral compound 전환효소를 생산하는 균주 확보와 각각의 효소 정제와 특성분석 등을 목표로 하였다.

현재까지 광학활성 chiral compound 전환효소를 생산하는 균주및 효소 등의 특성분석을 통해 다양한 자원을 확보한 것으로 큰 의미가 있다. 그 이유는 생물공학의 결과는 다양한 생물소재를 이용하여 유용성 검색으로부터 시작되기 때문이다. 따라서 본 연구의 지속적인 추진을 통하여 관련 연구분야의 활성을 도모함으로써 산업적으로 유용한 신규의 생물 소재 (의약품 및 정밀화학 제품의 중간체)를 개발하는데 기여할 수 있을 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 심해미생물의 연구기반을 확립하고 관련된 전문가에게 확보된 생물소재를 제공하여 해양생명공학연구를 활성화시키며 해양생물유래 신규 물질개발 가능성을 높이는데 활용이 될 것이다. 이러한 목적을 이루기 위해 다음과 같은 내용을 중점적으로 수행할 계획이다.

- 심해생태계 연구 동향의 수집 및 동향분석
- 심해미생물 자원의 정보 체계화 : 확보된 심해시료와 미생물자원을 보존 관리하여 효율적 활용시스템 구축
- 생물자원 및 유전자원의 정보를 체계화 및 응용 연구 : 국내 연구진과 유기적 관계를 구축하여 확보된 생물자원활용 극대화
- 저온환경내 미생물의 적응 및 저온성 생촉매의 개발
- 고압환경내 미생물의 적응기작 규명 및 고압생물공정 개발
- 유전체, 단백질체 연구의 소재 제공
- 유전체 분석 핵심기술의 개발
- 학제간 해양과학기술 발전 도모
- 핵심기술 개발로 벤처산업화 및 기술이전을 통한 로얄티 확보
- 독자기술의 확보로 차세대 해양바이오산업 경쟁력 제고

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2004년부터 무어재단 (Moore Foundation; <http://www.moore.org/microgenome/>)은 수억 달러를 들여 해양 원핵생물 130 종의 유전체에 대해 염기서열을 결정하는 거대한 해양미생물 유전체 프로젝트를 시작하였고 다양한 생태환경에 존재하는 해양미생물 종에 대한 종합적인 유전체 해독을 진행하여 해양미생물이 바다의 건강과 생산성을 유지하는데 어떠한 핵심적인 기능을 담당하고 있는지를 규명하기 위함 (Figure 6-1).

### Microbial Genome Sequencing Project


PART OF OUR  
**Marine** More  
**Microbiology**  
Initiative

#### Overview

- The Foundation's Microbial Genome Sequencing Project was launched in April, 2004 after the [American Society for Limnology and Oceanography](#) meeting in Honolulu, Hawaii.
- The Foundation was encouraged by scientists to increase the number of genome sequences of ecologically-relevant microorganisms.
- Over 200 microorganisms were nominated for sequencing-86 candidates were selected by a committee of preeminent marine microbiologists based on five [selection criteria](#).
- Phase one of the project was initiated in the Fall, 2004 with a grant to the Institute of Biological Energy Alternatives (now the [J. Craig Venter Institute](#)).
- Auto-annotated genome sequences will be deposited in [GenBank](#).
- This website serves as a portal; consult [GenBank](#) and the PI website for further information.

**Browse Strains by:**

**Maps**



**Phylogenetic Trees**

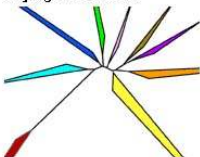


Figure 6-1. Moore Foundation에서 추진하고 있는 미생물 genomic sequencing project (<http://www.moore.org/microgenome/>).

## 제 7 장 참고문헌

- Abe, F. and K. Horikoshi 2001. The biotechnological potential of piezophiles. *TRENDS in Biotechnol.*, 19, 102–108.
- Adams, M. W., and R. M. Kelly 1998. Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol.*, 16, 329–332.
- Aller, R.C., P. O. J. Hall, P. D. Rude, and J. Y. Aller 1998. Biogeochemical heterogeneity and suboxic diagenesis in hemipelagic sediments of the Panama Basin. *Deep-Sea Res.*, 45, 133–165.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Arahira, M., V. H. Nong, K. Udaka, and C. Fukazawa. 2000. Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Eur. J. Biochem.* 267:2649–2657.
- Arand, M., H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, R. Furstoss, and F. Oesch. 1999. Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. *Biochem. J.* 344:273–280.
- Arand, M., H. Wagner, and F. Oesch. 1996. Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 271:4223–4229.
- Archelas, A., and R. Furstoss. 1997. Synthesis of enantiopure epoxides through biocatalytic approaches. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:491–525.
- Archelas, A., and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:112–119.
- Ariens, E. J., E. W., Wuis, and E. J. Veringa 1988. Stereoselective of bioactive xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 9–18.
- Arpigny, J. L., G. Feller, and Ch. Gerday 1993. Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochim. Biophys. Acta*, 1171, 331–333.
- Arpigny, J. L., G. Feller, and Ch. Gerday 1995. Corrigendum to cloning, sequence and structural features of a lipase from the Antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10". *Biochim. Biophys. Acta*, 1263, 103.
- Athawale, V., N. Manjrekar, and M. Athawale 2001. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by pseudomonas cepacia lipase catalysed resolution of ( $\pm$ )-menthol. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 16, 169–173.

- Athawale, V., N. Manjrekar, and M. Athawale 2001. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of ( $\pm$ )-menthol. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 16, 169–173.
- Baross, J. A., R. Y. Morita 1978. Microbial life at low temperatures: ecological aspects. In: Kushner DJ(ed) *Microbial life in extreme environments*. Academic Press. London. 9–71.
- Barry, J. P., R. E. Kochevar, and C. H. Baxter 1997. The influence of pore-water chemistry and physiology on the distribution of vesicomyid clams at cold seeps in Monterey Bay: Implications for patterns of chemosynthetic community organization. *Limnology and Oceanography*, 42-2, 318–328.
- Barth G., Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19:219237
- Beetham, J.K., D. Grant, M. Arand, J. Garbarino, T. Kiyosue, F. Pinot, F. Oesch, W. R. Belknap, K. Shinozaki, and B. D. Hammock. 1995. Gene evolution of epoxide hydrolase and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 14:61–71
- Beja, O., M. T. Suzuki, E. V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L. P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Garrigues, S. B. Jovanovich, R. A. Feldman, and E. F. DeLong 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.*, 2, 516–529.
- Bhandarkar, S. V. and S. H. Neau 2000. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of flurbiprofen with n-butanol. *Electronic J. Biotech.*, 3, 195–201.
- Bhatnagar, T., K. M. Manoj, and J. C. Baratti. 2001. A spectrophotometric method to assay epoxide hydrolase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50:1–13.
- Bintrim, S. B., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts, and R. M. Goodman. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:277–282
- Blow D (1990) More of the catalytic triad. *Nature* 351:694695
- Bourg-Garros, S., N. Razafindramboa, and A. A. Pavia 1998. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technol.*, 22, 240–245.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248254
- Brim, H., S. C. McFarlan, J. K. Fredrickson, K. W. Minton, M. Zhai, L. P. Wackett, and M. J. Daly 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.*, 18, 85–90.
- Bull, A. T., A. C. Ward, and M. Goodfellow 2000. Search and discovery strategies for

- biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 573–606.
- Bycroft, N. L. and G. S. Byng 1992. European patent application, 0468102A1.
- Cao, L., J. Lee, W. Chen, and T. K. Wood. 2006. Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter*AD1 epoxide hydrolases. *Biotechnol. Bioeng.* 94:522–529.
- Chen CS, Fujimoto Y, Girdaukas G, Sih CJ (1982) Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J Am Chem Soc* 104:72947299
- Chen, J. P. and J. B. Wang 1997. Wax ester synthesis by lipase-catalyzed esterification with fungal cells immobilized on cellulose biomass support particles. *Enzyme and Microb. Tech.*, 20, 615–622.
- Choupina A, Gonzalez F, Morin M, Burguillo F, Ferminan E, Dominguez A (1999) The lipase system of *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 35:297
- Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. W. Scannell 2002. From the cover: Estimation prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 10494–10499.
- Daly, M. J. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Curr Opin. Biotechnol.*, 11, 280–285.
- DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prezelin and R. V. M. Jovine. 1994. High abundance of archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature.* 371:695–697.
- Deming, J. W. 1998. Deep ocean environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 283–287.
- Demirjian, D. C., F. Moris-Varas, and C. S. Cassidy 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5, 144–151.
- Devereux, R., and G. W. Munder 1994. A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3437–3439.
- Dujon B, SHERMAN DJ, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, deMontigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeuland L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boiramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, deDarovar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztaand S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennene D, Tekaiia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004)

- Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:3544
- Eliopoulos GM, Wennersten CB, Moellering RC (1996) Comparative in vitro activity of levofloxacin and ofloxacin against Gram-positive bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 25:3541
- Falany, C. N., P. McQuiddy, and C. B. Kasper. 1987. Structure and organization of the microsomal xenobiotic epoxide hydrolase gene. *J. Biol. Chem.* 262:5924–5930.
- Feller, G., E. Narinx, J. L. Arpigny, M. Aittaleb, E. Baise, S. Genicot, and C. Gerday 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microb. Rev.*, 18, 189–202.
- Feller, G., M. Thiry, and Ch. Gerday 1991. Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph *Moraxella TA144* and site specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell. Biol.*, 10, 381–388.
- Fickers P, Fudalej F, Le Dall MT, Casaregola S, Gaillardin C, Thonart P, Nicaud JM (2005) Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol* 42:264274
- Fuhrman, J. A., K. McCallum and A. A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*. 356:148–149
- Fujimoto T, Mitsuhashi S (1990) In vitro antibacterial activity of DR-3355, the *S*-(2)-isomer of ofloxacin. *Chemotherapy (Tokyo)* 36:268276
- Fullbrook PD (1996) Practical applied kinetics. In: *Industrial Enzymology* (edited by Godfrey T West S). London: Macmillan Press Ltd. pp 483–501
- Gauthier, G., M. Gauthier, and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:755–761
- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J. P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, and D. Georgette 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 18, 103–107.
- Gerritse, G., R. W. Hommes, and W. J. Quax 1998. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2644–2651.
- Giovannoni, S. J., and U. Stingl. 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437:343–348.
- Gonzalez F (1996) Ph.D. thesis. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
- Gonzalez, J. M. and M. A. Moran. 1997. Numerical Dominance of a group of marine



- bacteria in the  $\alpha$ -subclass of the class Proteobacteria in Coastal Seawater. *Appl. Env. Microbiol.* 63:4237–4242
- Gray, J. P., and R. P. Herwig 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4049–4059.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, and L. A. Glover 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: Application of the community DNA hybridization technique. *Microb. Ecol.*, 31, 269–280.
- Gross, R. A., B. Kalra, and A. Kumar 2001. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 655–660.
- Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K, Furukawa M (1986) Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 29:163164
- Hayashi, R. 1996. Use of high pressure in bioscience and biotechnology. In *High Pressure Bioscience and Biotechnology* (Hayashi, R. and Balny, C. eds) pp 1–6, Elsevier.
- Heslot H (1990) Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 43:4373
- Holden, J. F., F. K. Takai, M. Summit, S. Bolton, Zyskowski, J. A. Baross. 2001. Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea Thermococcus species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:51–60
- Horikoshi, K. 1998. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 291–295.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 735–750.
- Hough, D. W., and M. J. Danson 1998. Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 39–46.
- Hwang, Y.-O., S. G. Kang, J.-H. Woo, K. K. Kwon, E. Y. Lee, M. S. Han, and S.-J. Kim. The Potential of Marine Microorganisms: Screening Enantioselective Epoxide Hydrolase from Marine Microorganisms. Submitted.
- Iso, M., B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, and S. Shrestha 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 16, 53–58.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315351
- Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13:390397

- Jaeger KE, Reetz MT (2000) Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 4:6873
- Jaeger, K. E. and T. M. Reetz 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396–403.
- Jaeger, K. E., B. Schneidinger, F. Rosenau, M. Werner, D. Lang, B. W. Dijkstra, K. Schimossek, A. Zonta, and M. T. Reetz 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. Molecular Catalysis B*, 3, 3–12.
- Jaeger, K.-E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. Heuvel, and O. Misset 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microb. Rev.*, 15, 29–63.
- Jannasch, H. W. and C. D. Taylor 1984. Deep-sea microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 38, 487–514.
- Janssen, D. B., F. Pries, J. van der Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra, and B. Witholt. 1989. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *J. Bacteriol.* 171:6791–6799.
- Johnson, R. M. and W. P. Weisrock 1969. *Hyphomicrobium* sp nov. (Hyphomicrobiaceae Douglas). *Int.J. Syst. Bactriol.*, 19, 295–307.
- Johnston, I. A., N. J. Walesby, W. Davison, and G. Goldspink 1975. Temperature adaptation in myosin of Antarctic fish. *Nature*, 254, 74–75.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, and S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9:189–197.
- Kanwar, L. and P. Goswami 2002. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microb. Tech.*, 31, 727–735.
- Kausar, J., Y. Ohyama, H. Terato, H. Ide, and O. Yamamoto. 1997. 16S rDNA gene sequence of *Rubrobacter radiotolerans* and its phylogenetic alignment with members of the genus *Arthrobacter*, gram-positive bacteria, and members of the family *Deinococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:684–686
- Kim TH, Lee JH, Oh YS, Bae KS, Kim SJ (1999) Identification and characterization of an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J Microbiol* 37:128135
- Kim TH, Oh YS, Kim SJ (2000) The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J Microbiol Biotechnol* 10:333337
- Kim, U. J., H. Shizuya, P. J. de Jong, B. Birren, and M. I. Simon 1992. Stable

- propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1083–1085.
- Kiyota, H., E. Higashi, T. Koike, and T. Oritani 2001. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 1035–1038.
- Klaus-Joerger, T., R. Joerger, E. Olsson, and C.-G. Granqvist 2001. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol.*, 19, 15–20.
- Knehr, M., H. Thomas, M. Arand, T. Gebel, H. D. Zeller, and F. Oesch. 1993. Isolation and characterization of a cDNA encoding rat liver cytosolic epoxide hydrolase and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:17623–17627.
- Kobori, H., C. W. Sullivan, and H. Shizuya 1984. Heat labile alkaline phosphatase from antarctic bacteria: rapid 5' end labeling of nucleic acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81, 6691–6695.
- Korbitz, W. 1998. From the field to the fast lane—Biodiesel. *Renewable Energy World*, 1, 32–37.
- Korbitz, W. 1999. Biodiesel production in Europe and North America, an encouraging prospect. *Renewable Energy*, 16, 1078–1083.
- Krishna, S. H. and N. G. Karanth 2001. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 262–267.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150–163.
- Ladenstein, R., G. Antranikian 1998. Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 61, 37–85.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680685
- Li ZJ, Grant DJW (1997) Relationship between physical properties and crystal structures of chiral drugs. *J Pharm Sci* 86:10731078
- Liese, A., K. Seelbach, and C. Wandrey 2000. *Industrial biotransformations*. Weinheim: Wiley–VCH.
- Liobet-Brossa, E. R., Rossello-Mora, and R. Amann 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2691–2696.
- Lombard, M., D. Touati, M. Fontecave, and V. Nivière Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*. *J.*

- Biol. Chem., 275, 27021–27026.
- Lonhienne, T., C. Gerday, and G. Feller 2000. Psychrophilic enzymes : revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim. Biophys. Acta*, 1543, 1–10.
- Low, P. S., J. L. Bada, and G. N. Somero 1973. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 430–432.
- Margolin AL (1993) Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb Technol* 15:266280
- Mcinerney, J. O., M. Mullarkey, M. E. Wernecke and R. Powell. 1997. Phylogenetic analysis of group I marine archaeal rRNA sequences emphasizes the hidden diversity within the primary group archaea. *Proc. R. Soc. Lond.* 264:1663–1669
- Misawa, E., C. K. Chan Kwo Chion, I. V. Archer, M. P. Woodland, N. Y. Zhou, S. F. Carter, D. A. Widdowson, and D. J. Leak. 1998. Characterisation of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp. *Eur. J. Biochem.* 253:173–183.
- Morisseau, C., J. K. Beetham, F. Pinot, S. Debernard, J. W. Newman, and B. D. Hammock. 2000. Cress and potato soluble epoxide hydrolases: purification, biochemical characterization, and comparison to mammalian enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 378:321–332.
- Munson, M. A., D. B. Nedwell, and T. M. Embley 1997. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4729–4733.
- Nardini M, Dijkstra BW (1999) / Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9:732737
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler, and G. Antranikian 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 711–729.
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 730–750.
- Norris, P. R., N. P. Burton, and N. A. Foulis 2000. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles*, 4, 71–76.
- Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschueren, and A. Goldman. 1992. The / hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197–211.
- Olu, K., A. Duperret, M. Sibuet, J.-P. Foucher, and A. Fiala-Medioni 1996. Structure and distribution of cold seep communities along the Peruvian active margin: relationship to geological and fluid patterns. *Marine Ecology Progress Series*, 132, 109–125.

- Ono, M., K. Suzuki, S. Tanikawa, and H. Akita 2001. First synthesis of (+)- and (-)-elvirol based on an enzymatic function. *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 2597–2604.
- Oppenheimer, C. H., and C. E. ZoBell. 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.* 11:1018.
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol UT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119131
- Patel, R. N. 2001. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv. Synth. Catal.*, 343, 527–546.
- Pignède G, Wang HJ, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM (2000) Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182:28022810
- Price, B. 2000. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97, 1247–1251.
- Privalov, P. L., E. I. Tiktopulo, and V. M. Tischenko 1979. Stability and mobility of the collagen structure. *J. Mol. Biol.*, 203–216.
- Radjasa, O. K., H. Urakawa, K. K. Tsukamoto, and K. Ohwada 2001. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. *Mar. Biotechnol.*, 3, 454–462.
- Richards, A. and R. McCague 1997. The impact of chiral technology on the pharmaceutical industry. *Chem. and Indust.*, 422–425.
- Rink, R., and D. B. Janssen. 1998. Kinetic mechanism of the enantioselective conversion of styrene oxide by epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *Biochemistry* 37:18119–18127.
- Rink, R., J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra, and D. B. Janssen. 1999. Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 121:7417–7418.
- Rink, R., J. Kingma, J. H. Lutje Spelberg, and D. B. Janssen. 2000. Tyrosine residues serve as proton donor in the catalytic mechanism of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. *Biochemistry* 39:5600–5613.
- Rink, R., M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, and D. B. Janssen. 1997. Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *J. Biol. Chem.* 272:14650–14657.
- Robb, F. T., and D. L. Maeder 1998. Novel evolutionary histories and adaptive features of proteins from hyperthermophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 288–291.
- Rui, L., L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon, and T. K. Wood. 2005. Protein engineering of

- epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 for enhanced activity and enantioselective production of (R)-1-phenylethane-1,2-diol. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3995-4003.
- Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier, and R. Christen 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 416-426.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol. 2, p. 8.65-8.71. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schaeffer AJ (2002) The expanding role of fluoroquinolones. *Am J Med* 113:4554
- Schmid RD, Verger R (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 37:16081633
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627662
- Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8794-8797.
- Stapleton, A., J. K. Beetham, F. Pinot, J. E. Garbarino, D. R. Rockhold, M. Friedman, B. D. Hammock, and W. R. Belknap. 1994. Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *Plant J.* 6:251-258.
- Stein, J. L., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuya, and E. F. DeLong 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* 178, 591-599.
- Stetter, K. O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.*, 452, 22-25.
- Stinson, S. C. 2001. Chiral pharmaceuticals. *Chem. Eng. News*, 79, 79-97.
- Strausberg, R. L., E.A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altschul, B. Zeeberg, K. H. Buetow, C. F. Schaefer, N. K. Bhat, R. F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S. I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A. A. Farmer, G. M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, M. J. Brownstein, T. B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S. S. Raha, N. A. Loquellano, G. J. Peters, R. D. Abramson, S. J. Mullahy, S. A. Bosak, P. J. McEwan, K. J. McKernan, J. A. Malek, P. H. Gunaratne, S. Richards, K.C. Worley, S. Hale, A.

- M. Garcia, L. J. Gay, S. W. Hulyk, D. K. Villalon, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, X. Lu, R. A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Ketteman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. Madan, A. C. Young, Y. Shevchenko, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, J. W. Touchman, E. D. Green, M. C. Dickson, A. C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, Y. S. Butterfield, M. I. Krzywinski, U. Skalska, D. E. Smailus, A. Schnerch, J. E. Schein, S. J. Jones, and M. A. Marra. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:16899–16903.
- Tanaka, K., K. Yoshida, C. Sasaki, and Y. T. Osano 2002. Practical asymmetric synthesis of the herbicide (S)-indanofan via lipase-catalyzed kinetic resolution of a diol and stereoselective acid-catalyzed hydrolysis of a chiral epoxide. *J. Org. Chem.*, 67, 3131–3133.
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer, and N. B. Ramsing 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1405–1415.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Thompson, J. D., D. G. Higgin, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22:4673–4680.
- Tokunaga, M., J. F. Larrow, F. Kakiuchi, and E. N. Jacobsen. 1997. Asymmetric catalysis with water: efficient kinetic resolution of terminal epoxides by means of catalytic hydrolysis. *Science* 277:936-938.
- Torsvik, V., K. Salte, R. Sorheim, and J. Goksoyr 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 776–781.
- Tsai, S. W. and C. M. Huang 1999. Enantioselective synthesis of (S)-suprofen ester prodrugs by lipase in cyclohexane. *Enzyme and Microbial Technol.*, 25, 682–688.
- Tsai, S. W. and H. J. Wei 1994. Enantioselective esterification of racemic naproxen in organic solvent. *Enzyme and Microb. Technol.*, 16, 328–333.
- Tsai, S. W., J. J. Lin, C. S. Chang, and J. P. Chen 1997. Enzymatic synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug from racemic ibuprofen by lipase in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, 13, 82–88.

- Une T, Fujimoto T, Sato K, Osada Y (1988) In vitro activity of DR-3355, an optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1336-1340
- Urakawa, H., K. K. Tsukamoto, and K. Ohwada 1999. Restriction fragment length polymorphism analysis of psychrophilic and psychrotrophic *Vibrio* and *Photobacterium* from the northwestern Pacific Ocean and Otsuchi bay, Japan. *Can. J. Microbiol.*, 45, 67-76.
- van Loo, B., J. H. L. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts, and D. B. Janssen. 2004. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem. Biol.* 11:981-990.
- van Loo, B., J. Kingma, M. Arand, M. G. Wubbolts, and D. B. Janssen. 2006. Diversity and biocatalytic potential of epoxide hydrolases identified by genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2905-2917.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:6674
- Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 504-544.
- Vergin, K. L., E. Urbach, J. L. Stein, E. F. DeLong, B. D. Lanoil, and S. J. Giovannoni 1998. Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3075-3078.
- Visser, H., S. Vreugdenhil, J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes. 2000. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase-encoding gene from *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:415-419.
- Visser, H., J. A. de Bont, and J. C. Verdoes. 1999. Isolation and characterization of the epoxide hydrolase-encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5459-5463.
- Wang CS, Hartsuck JA (1993) Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1166:1-19
- Weigel, J. 1998. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles*, 2, 257-267.
- Weijers, Carel A. G. M., and Jan A. M. de Bont. 1999. Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6:199-214.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe 1998. Prokaryotes: the unseen



- majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6578–6583.
- Yamada, T., C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson, and B. D. Hammock. 2000. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase. J. Biol. Chem. 275:23082–23088.
- Yamamoto, Y., M. Higuchi, L. B. Poole, and Y. Kamio 2000. Role of the dpr product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol., 182, 3740–3747.
- Yayanos, A. A. *et al.* 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. Science, 205, 808–810.
- Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol., 62, 316–322.
- Zhu, B. and J. S. Panek 2001. Methodology based on chiral silanes in the synthesis of polypropionate-derived natural products—total synthesis of epothilone A. Eur. J. Org. Chem., 001, 1701–1714.
- Zou, J., B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray, and T. A. Jones. 2000. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. Structure 15:111–122.
- 이진석 2000. 자동차연료로서 바이오디젤유의 생산 및 이용 현황, ETIS 분석지, 1–10.

## 부 록

### Appendix 1. The 16S rRNA sequences of isolated strains from this study

0001 UGCUCAGAAU GAACGCUGGC GGCAGGCCUA CCAUGCAAGU CGAGCGGUAG AGAGAAGCUU  
0061 GCUUCUCUUG AGAGCGGCGG ACGGGUGAGU AAUGCCUAGG AAUCUGCCUG GUAGUGGGGG  
0121 AUAACGUUCG GAAACGGACG CUAUACCGC AUACGUCCUA CGGGAGAAAG CAGGGGACCU  
0181 UCGGGCCUUG CGCUAUCAGA UGAGCCUAGG UCGGAUUAGC UAGUUGGUGG GGUAAUGGCU  
0241 CACCAAGGCG ACGAUCCGUA ACUGGUCUGA GAGGAUGAUC AGUCACACUG GAACUGAGAC  
0301 ACGGUCCAGA CUCCUACGGG AGGCAGCAGU GGGGAAUAUU GGACAAUGGG CGAAAGCCUG  
0361 AUCCAGCCAU GCCGCGUGUG UGAAGAAGGU CUUCGGAUUG UAAAGCACUU UAAGUUGGGA  
0421 GGAAGGGCAG UAAAUUAAUA CUUUGCUGUU UUGACGUUAC CGACAGAAUA AGCACCGGCU  
0481 AACUCUGUGC CAGCAGCCGC GGUAUACAG AGGGUGCAAG CGUUAUCGG AAUUAUCGGG  
0541 CGUAAAGCGC GCGUAGGUGG UUAGUUAAGU UGGAUGUGAA AAUCCCGGG CUCAACCUGG  
0601 GAACUGCAUU CAAAACUGAC UGACUAGAGU AUGGUAGAGG GUGGUGGAAU UUCCUGUGUA  
0661 GCGGUGAAAU GCGUAGAUAU AGGAAGGAAC ACCAGUGGCG AAGGCACCA CCUGGACUGA  
0721 UACUGACACU GAGGUGCGAU AAGCGUGGGG AGCAAACAGG AUUAGACUAC CCUGGUAGUC  
0781 CACGCCGUA ACGAUGUCAC UAGCCGUUGG GAGCCUUGAG CUCUUAUGUG CGCAGCUAAC  
0841 GCAUUAAGUU GACCGCCUGG GGAGUACGGC CGCAAGGUUA AAACUCAAU GAAUUGACGG  
0901 GGGCCCGCAC AAGCGGUGGA GCAUGUGGUU UAAUUCGAAG CAACGCGAAG AACCUUACCA  
0961 GGCCUUGACA UCCAAUGAAC UUUCUAGAGA UAGAUUGGUG CCUUCGGGAA CAUUGAGACA  
1201 GGUGCUGCAU GGCUGUCGUC AGCUCGUGUC GUGAGAUGUU GGGUUAAGUC CCGUAACGAG  
1261 CGCAACCCUU GUCCUAGUU ACCAGCACGU AAUGGUGGGC ACUCUAAGGA GACUGCCGGU  
1321 GACAAACCGG AGGAAGGUGG GGAUGACGUC AAGUCAUCAU GGCCCUACG GCCUGGGCUA  
1381 CACACGUGCU ACAAUGGUCG GUACAGAGGG UUGCCAAGCC GCGAGGUGGA GCUAAUCCCA  
1441 CAAAACCGAU CGUAGUCCGG AUCGCAGUCU GCAACUCGAC UGCGUGAAGU CGGAAUCGCU  
1501 AGUAAUCGCG AAUCAGAAUG UCGCGGUGAA UACGUUCCCG GGCCUUGUAC ACACCGCCCG  
1561 UCACACCAUG GGAGUGGGUU GCACCAGAAG UAGCUAGUCU AACCUUCGGG AGGACGGUUA  
1621 CCACGGUGUG AUUCAUGACU GGGGUGAAGU CGUAACAAGG UAGCCGUAGG GGAACCUGCG  
1681 GUGGAUCACC UCCUUA

16S rRNA sequence of PNP001

0001 AGAGUUUGAC CCGGCUCAGA UUGAACGCUG GCGGCAGGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG  
0061 GUAGAGAGAA GCUUGCUUCU CUUGAGAGCG GCGGACGGGU GAGUAAAGCC UAGGAAUCUG  
0121 CCUGGUAGUG GGGGAUAACG UUCGGAAACG GACGCUAAUA CCGCAUACGU CCUACGGGAG  
0181 AAAGCAGGGG ACCUUCGGGC CUUGCUCUAU CAGAUGAGCC UAGGUCGGAU UAGCUAGUUG  
0241 GUGAGGUAU GGCUCACCAA GCGACGAUC CGUAACUGGU CUGAGAGGAU GAUCAGUCAC  
0301 ACUGGAACUG AGACACGGUC CAGACUCCUA CGGGAGGCAG CAGUGGGGAA UAUUGGACAA  
0361 UGGGCGAAAG CCUGAUCCAG CCAUGCCGCG UGUGUGAAGA AGGUCUUCGG AUUGUAAAGC  
0421 ACUUUAAGUU GGGAGGAAGG GCAUUAACCU AAUACGUUAG UGUUUUGACG UUACCGACAG  
0481 AAUAAGCACC GGCUAACUCU GUGCCAGCAG CCGCGGUAU ACAGAGGGUG CAAGCGUUA  
0541 UCGAAUAC UGGGCGUAAA GCGCGCUAG GUGGUUUUU AAGUUGGAUG UGAAAUCCCC  
0601 GGGCUAACC UGGGAACUGC AUUCAAACU GACUGACUAG AGUAUGGUAG AGGGUGGUGG  
0661 AAUUUCCUGU GUAGCGGUGA AAUGCGUAGA UAUAGGAAGG AACACCAGUG GCGAAGGCGA  
0721 CCACCUGGAC UAAUACUGAC ACUGAGGUGC GAAAGCGUGG GGAGCAAACA GGAUUAGUA  
0781 CC

16S rRNA sequence of PNP002

0001 AGAGUUUGNU UCCCNNGCUC AGAUUGAACG CUGGCGGCAG GCUU AACACA UGCAAGUCGA  
 0061 GCGGAAACGA UGAUAGCUUG CUAUCAGGCG UCGAGCGGCG GACGGGUGAG JAAUACUUAG  
 0121 GAAUCUACCU AGUAGUGGGG GAUAGCACGG GGAAACUCGU AUUAAUACCG CAUACGACCU  
 0181 ACGGGAGAAA GGGGGCAGUU UACUGCUCUC GCUAUUAGAU GAGCCUAAGU CGGAUUAGCU  
 0241 AGAUGGUGGG GUAAAGGCCU ACCAUGGCCA CGAUCUGUAG CUGGUCUGAG AGGAUGAUCA  
 0301 GCCACACCGG GACUGAGACA CGGCCCGGAC UCCUACGGGA GGCAGCAGUG GGGAAUAUUG  
 0361 GACAAUGGGG GAAACCCUGA UCCAGCCAUG CCGCGUGUGU GAAGAAGGCC UUUUGGUUGU  
 0421 AAAGCACUUU AAGCAGUGAA GAAGACUCUU CGGUUAAUAC CCGGAGACGA UGACAUUAGC  
 0481 UGCAGAAUAA GCACCGGCUA ACUCUGUGCC AGCAGCCGCG GUAAUACAGA GGGUGCAAGC  
 0541 GUUAAUCGGA AUUACUGGGC GUAAAGGGAG CGUAGGUGGC UCGAUUAGUC AGAUGUGAAA  
 0601 UCCCCGGGCU CAACCUUGGA ACUGCAUCUG AUACUGUUGA GCUAGAGUUAU GUGAGAGGAA  
 0661 GGUAGAAUUC CAGGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAGAUUC GGAGGAAUAC CGAUGGCCAA  
 0721 GGCAGCCUUC UGGCAAUAU ACUGACACUG AGGCUCGAAA AGCGUGGGUA GCAAACAGGA  
 0781 UUAGAUACCC UGGUAGUCCC ACGCCGGUAA ACGAUGUCUA CUAGUCGUUG GGUCCUUGA  
 0841 GGACUUAGUG ACGCAGCUAA CGCAAUAAGU AGACCGCCUG GGGAGUACGG CCGCAAGGUU  
 0901 AAAACUCAAA UGAAUUGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGUGG AGCAUGUGGU UAAAUUCGAU  
 0961 GCAACGCGAA GAACCUUACC UGGUCUUGAC AUAUCUAGAA UCCUGCAGAG AUGCGGGAGU  
 1201 GCCUUCGGGA AUUAGAAUAC AGGUGCUGCA UGGCUGUCGU CAGCUCGUGU CGUGAGAUGU  
 1261 UGGGUUAAGU CCCGCAACGA GCGCAACCCU UGUCCUAGU UACCAGCGGG UUAAGCCGGG  
 1321 AACUCUAAGG AUACUGCCAG UGACAAACUG GAGGAAGGCG GGGACGACGU CAAGUCAUCA  
 1381 UGGCCCUUAC GACCAGGGCU ACACACGUGC UACAAUGGUA GGUACAGAGG GCAGCUACAC  
 1441 AGCGAUGUGA UGCGAAUCUC AAAAAGCCUA UCGUAGUCCA GAUUGGAGUC UGCAACUCGA  
 1501 CUCCAUGAAG UAGGAAUCGC UAGUAAUCGC GGAUCAGAAU GCCGCGGUGA AUACGUUCCC  
 1561 GGGCCUUGUA CACACCGCCC GUCACACCAU GGGAGUUGAU UGCACCAGAA GUGGAUAGCU  
 1621 UAACCUUCGG GGGAGCGUUC ACCACGGUGU GGUUGAUGAC UGGGGUGAAG UCGUAACAAG  
 1681 GUAGCCGUAG GGAACCCUGC GGNUGGAUCA CCUCCUUA

16S rRNA sequence of PNP004

0001 AGAGUUUGAU UCNUUGCUCU GAUUGAACGC UGGCGGCAGG CUAACACAU GCAAGUCGAG  
0061 CGGUAGAGAG AAGCUUGCUU CUCUUGAGAG CGGCGGACGG GUGAGUAAUG CCUAGGAAUC  
0121 UGCCUGGUAG UGGGGGAUAA CGUUCGGAAA CGGACGCUAA UACCGCAUAC GUCCUACGGG  
0181 AGAAAGCAGG GGACCUUCGG GCCUUGCVCU AUCAGAUGAG CCUAGGUCGG AUUAGCUAGU  
0241 UGGUGGGGUA AUGGCUCACC AAGGCGACGA UCCGUAACUG GUCUGAGAGG AUGAUCAGUC  
0301 ACACUGGAAC UGAGACACGG UCCAGACUCC UACGGGAGGC AGCAGUGGGG AAUAUUGGAC  
0361 AAUGGGCGAA AGCCUGAUCC AGCCAUGCCG CGUGUGUGAA GAAGGUCUUC GGAUUGUAAA  
0421 GCACUUUAAG UUGGGAGGAA GGGCAGUAAA UUAUACUUU GCUGUUUUGA CGUUACCGAC  
0481 AGAAUAAGCA CCGGCUAACU CUGUGCCAGC AGCCGCGGUA AUACAGAGGG UGCAAGCGUU  
0541 AAUCGGAAU ACUGGGCGUA AAGCGCGCGU AGGUGGUUAG UUAAGUUGGA UGUGAAAUC  
0601 CCCGGGCUCA ACCUGGGAAC UGCAUUCAAA ACUGACUGAC UAGAGUAUGG UAGAGGGUGG  
0661 UGAAUUUCC UGUGUAGCGG UGAAAUGCGU AGAUUAGGA AGGAACACCA GUGGCGAAGG  
0721 CGACCACCUG GACUGAUACU GACACUGAGG UGCGAAAGCG UGGGGAGCAA ACAGGAUUAG  
0781 AUACCCUGGU AGUCCACGCC GUAAACGAUG UCAACUAGCC GUUGGGAGCC UUGAGCUCUU  
0841 AGUGGCGCAG CUAACGCAU AAGUUGACCG CCUGGGGAGU ACGGCCGCAA GGUUAAAACU  
0901 CAAAUGAAU GACGGGGGCC CGCACAAGCG GUGGAGCAUG UGGUUUAAU CGAAGCAACG  
0961 CGAAGAACCU UACCAGGCCU UGACAUCCAA UGAACUUUCU AGAGAUAGAU UGGUGCCUUC  
1201 GGGAACAUUG AGACAGGUGC UGCAUGGCUG UCGUCAGCUC G

16S rRNA sequence of PNP005-1

0001 AACACAAGGG AGCUUGCUCU UGAGGUGUCG AGCGGCGGAC GGGUGAGUAA UACCUAGGUA  
 0061 UCUGCCCAAU CGUGGGGGAU AACAGUUGGA AACGACUGCU AAUACCGCAU ACGCCCUACG  
 0121 GGGGAAAGGA GGGGACCUUC GGGCCUUCG CGAUUGGAUG AACCUAGGCG GGAUUAGCUA  
 0181 GUUGGUGAGG UAAUGGCUCA CCAAGGCGAC GAUCCCUAGC UGGUCUGAGA GGAUGAUCAG  
 0241 CCACACUGGA ACUGAGACAC GGUCCAGACU CCUACGGGAG GCAGCAGUGG GGAUAUUGC  
 0301 ACAAUGGGCG AAAGCCUGAU GCAGCCAUGC CGCGUGUAUG AAGAAGGCCU UCGGGUUGUA  
 0361 AAGUACUUUC AGCGAGGAGG AAAGCUCAAG CGUUAUAGC GAUUGGGUGU GACGUUACUC  
 0421 GCAGAAGAAG CACCGGCUAA CUUCGUGCCA GCAGCCGCGG UAAUACGAGG GGUGCAAGCG  
 0481 UUAUUCGAA UUACUGGGCG UAAAGCGUAC GCAGGCGGUU UGUUAAGCGA GAUGUGAAAG  
 0541 CCCCgggCUC AACCUGGGAA CUGCAUUUCG AACUGGCAA CUAGAGUCUU GUAGAGGGGG  
 0601 GUAGAAUUUC AGGUGUAGCG GUGAAAUGCG UAGAGAUCUG AAGGAAUACC GGUGGCGAAG  
 0661 GCGGCCCCCU GGACAAAGAC UGACGCUCAU GUACGAAAGC GUGGGGAGCA AACAGGAUUA  
 0721 GAUACCCUGG UAGUCCACGC CGUAAACGAU GUCUACUCGG AAUUUGGUGU CUUGAACACU  
 0781 GGGUUCUCAA GCUAACGCAU UAAGUAGACC GCCUGGGGAG UACGGCCGCA AGGUUAAAAC  
 0841 UCAAAUGAAU UGACGGGGGC CCGCACAAGC GGUGGAGCAU GUGGUUUAAU UCGAUGCAAC  
 0901 GCGAAGAACC UUACCUACUC UUGACAUCCA CAGAAUUUUC CAGAGAUGGA UUAGUGCCUU  
 0961 CGGGAACUGU GAGACAGGUG CUGCAUGGCU GUCGUCAGCU CGUGUUGUGA AAUGUUGGU  
 1201 UAAGUCCCGC AACGAGCGCA ACCCUUAUCC UUAUUUGCCA GCACGUAAG GUGGGAACUU  
 1261 UAGGGAGACU GCCGGUGAUA AACCGGAGGA AGGUGGGGAC GACGUCAAGU CAUCAUGGCC  
 1321 CUUACGAGUA GGGCUACACA CGUGCUACAA UGGUCGGUAC AGAGGGUCGC AAAGCCGCGA  
 1381 GGUGUAGCUA AUCUCACAAA GCCGGUCGUA GUCCGGAUCG GAGUCUGCAA CUCGACUCCG  
 1441 UGAAGUCGGA AUCGCUAGUA AUCGUGAAUC AGAAUGUCAC GGUGAAUACG UUCCCGGGCC  
 1501 UUGUACACAC CGCCCGUCAC ACCAUGGGAG UGGGUCGCAC CAGAAGUAGA UAGCUUAACC  
 1561 UUCGGGAGGG CGUUUACCAC GGUGUGGUUC AUGACUGGGG UGAAGUCGUA ACAAGGUAGC  
 1621 CCUAGGGGAA CCUGCGGCUG GAUCACCUCC UUA

16S rRNA sequence of PNP005-2

0001 AGAGUUUGAU CCUGGUUCAG AUUGAAACGU GGGGCAGGCC UAACACAUGC AAGUCGAGCG  
0061 UAACAGGAAU UAGCUUGCUA AUUUCGCUGC GAGCGGCGGA CGGGUGAGUA AUCCUGGGAA  
0121 UAUGCCUAG UGUGGGGGAU AACUAUUGGA AACGAUAGCU AAUACCGCAU AAGUCUUCGG  
0181 ACCAAAGAGG GGGACCUUCG GGCCUCUCGC GCUAAGAUUA GCCCAGGUGG GAUUAGGCUA  
0241 GUUGGUGAGG UAAAGGCUCA CCAAGGCAAC GAUCCCUAGC UGGUCUGAGA GGAUGAUCAG  
0301 CCACACUGGA ACUGAGACAC GGUCCAGACU CCUACGGGAG GCAGCAGUGG GGAAUAUUGC  
0361 ACA AUGGGG AAACCCUGAU GCAGCCAUGC CGCGUGUAUG AAGAAGCCU UCGGGUUGUA  
0421 AAGUACUUUC AGUCGUGAGG AAGGGUGUGU AGUUAUAGC UGCAUCCUUG ACGUAGCGAC  
0481 AGAAGAAGCA CCGGCUAACU CCGUGCCAGC AGCCGCGGUA AUACGGAGGG UGCAGCGUU  
0541 AAUCGGAAU ACUGGGCGUA AAGCGCAUGC AGGCGGUCUG UUAAGCAAGA UGUGAAAGCC  
0601 CGGGGCUCAA CCUCGGAACC GCAUUUUGAA CUGGCAGACU AGAGUCUUGU AGAGGGGGGU  
0661 AGAAUUUCAG GUGUAGCGGU GAAUUGCGUA GAGAUCUGAA GGAAUACCGG UGGCGAAGGC  
0721 GGCCCCUGG ACAAGACUG ACGCUCAGAU GCGAAAGCGU GGGGAGCAA CAGGAUUAGA  
0781 UACCCUGGUA GUCCACGCCG UAAACGAUGU CUACUUGAAG GUUGUGGCCU UGAGCCGUGG  
0841 CUUUCGGGAG CUAACGCGUU AAGUAGACCG CCUGGGGAGU ACGGUCGCAA GAUUAACU  
0901 CAAAUGAAU GACGGGGGCC UGCACAAGCG GUGGAGCAUG UGGUUAAU CGAUGCAACG  
0961 CGAAGAACCU UACCU

16S rRNA sequence of SL013

0001 AAUUAGCUUG CUAUUUCGCU GCACGAGCGG CGGAGCGGGU GAGUAAUGCC ACGGGAAUUAU  
 0061 GCCUUAGUGU GGGGGUAUAC UAUUGGAAAC GAUAGCGUAA UUGACCGCAU AAGGUCUUCG  
 0121 UGACCAAAGA GGGGGACCUU CGGGCCUCUC GCGUCUAGA UUAGCCCAUG GUAGGGUUAU  
 0181 UAGCUGAGUU GGUGAGGUAA AGGCUCACCA AGGCAACGAU CCCUAGCUGG UCUGAGAGGA  
 0241 UGAUCAGCCA CACUGGAACU GAGACACGGU CCAGACUCCU ACGGGAGGCA GCAGUGGGGA  
 0301 AUAUUGCACA AUGGGGGAAA CCCUGAUGCA GCCAUGCCGC GUGUAUGAAG AAGGCCUUCG  
 0361 GGUUGUAAAAG UACUUUCAGU CGUGAGGAAG GGUGUGUAGU UAAUAGCUGC AUACCUUGAC  
 0421 GUUAGCGACA GAAGAAGCAC CGGCUAACUC CGUGCCAGCA GCCGCGGUAU UACGGAGGGU  
 0481 GCGAGCGUUA AUCGGAAUUA CUGGGCGUAA AGCGCAUGCA GCGGUCUGU UAAGCAAGAU  
 0541 GUGAAAGCCC GGGGCUCAAC CUCGGAACCG CAUUUUGAAC UGGCAGACUA GAGUCUUGUA  
 0601 GAGGGGGGUA GAAUUUCAGG UGUAGCGGUG AAAUGCGUAG AGAUCUGAAG GAAUACCGGU  
 0661 GGCGAAGGCG GCCCCCUGGA CAAAGACUGA CGCUCAGAUG CGAAAGCGUG GGGAGCAAAC  
 0721 AGGAUUAGAU ACCCUGGUAG UCCACGCCGU AAACGAUGUC UACUUGAAGG UUGUGCCUU  
 0781 GAGCCGUGGC UUUCGGAGCU AACCGUUAU GUAGACCGCC UGGGGAGUAC GGUCGCAAGA  
 0841 UUAAAACUCA AAUGAAUUGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGU GGAGCAUGUG GUUUAAUUCG  
 0901 AUGCAACGCG AAGAACCUUA CCUACUCUUG ACAUCCAGAG AAUUCGCUAG AGAUAGCUUA  
 0961 GUGCCUUCGG GAACUCUGAG ACAGGUGCUG CAUGGCUGUC GUCAGCUCGU GUUGUGAAAU  
 1201 GUUGGGUUAU GUCCCGCAAC GAGCGCAACC CUUAUCCUUG UUUGCCAGCA CGUAAUGGUG  
 1261 GGAACUCCAG GGAGACUGCC GGUGAUAAAC CGGAGGAAGG UGGGGACGAC GUCAAGUCAU  
 1321 CAUGGCCUUU ACGAGUAGGG CUACACACGU GCUACAAUGG CGUAUACAGA GGGCUGCCAA  
 1381 CCAGCGAUGG UGAGCGAAUC CCACAAAGUA CGUCGUAGUC CGGAUCGGAG UCUGCAACUC  
 1441 GACUCCGUGA AGUCGGAAUC GCUAGUAAUC GUGAAUCAGA AUGUCACGGU GAAUACGUUC  
 1501 CCGGGCCUUG UACACACCGC CCGUCACACC AUGGGAGUGG GCUGCACCAG AAGUAGAUAG  
 1561 CUUAACCUUC GGGAGGGCGU UUACCACGGU GUGGUUCAUG ACUGGGAGUG JACAGUACGU  
 1621 AGGACUAAGG UAGCCCUAAG GGAACCUUC GGUGGAUCAC CUCCUUA

16S rRNA sequence of SL025



0001 AGAGUUUGAU CCCUGCUCAG AUUGAACGCU GCGGGCAGGC CUAACACAUG CAAGUCGAGC  
 0061 GGUAACACGA GUUAGCUUGC UAAUUAGUGA CGAGCGGCGG ACGGGUGAGU AAUGCCUGGG  
 0121 AAUAUGCCUU AUCUGUGGGG GAUAACUAUU GGAAACGAUA GCUAAUACCG CAUACGUCUU  
 0181 CGGACCAAAG AGGGGGACCU UCGGGCCUCU CGCGCUARGA UUAGCCCAGG GGGAUUAGCU  
 0241 AGUUGGUGAG GUAAAGGCUC ACCAAGGCAC GAUCCCUAGC UGGUCUGAGA GGAUGAUCAG  
 0301 CCACACUGGA ACUGAGACAC GGUCCAGACU CCUACGGGAG GCAGCAGUGG GGAAUAUUGC  
 0361 ACAAUGGGGG AAACCUGAUG CAGCCAUGCC GCGUGUAUGA AGAAGGCCUU CGGGUUGUAA  
 0421 AGUACUUUCA GUAGGAGGAA GGUGUGUAGU UAAUAGCUGC AUGCCUUGAC GUUAGCACAG  
 0481 AAGAAGCACC GGCUAACUCC GUGCCAGCAG CCGCGGUAAU ACGGAGGGUG CGAGCGUUA  
 0541 UCGGAAUAC UGGGCGUAAA GCGCAUGCAG GCGGUCUGUU AAGCAAGAUG UGAAAGCCCCG  
 0601 GGGCUCAACC UCGGAACCGC AUUUUGAACU GGCAGACUAG AGUCUUGUAG AGGGGGGUAG  
 0661 AAUUUCAGGU GUAGCGGUGA AAUGCGUAGA GAUCUGAAGG AAUACCGGUG GCGAAGGCGG  
 0721 CCCCUGGAC AAAGACUGAC GCUCAGAUGC GAAAGCGUGG GGAGCAAACA GGAUUAGUA  
 0781 CCCUGGUAGU CCACGCCGUA AACGAUGUCU ACUUGAAGGU UGUGGCCUUG AGCCGUGGCU  
 0841 UUCGGAGCUA ACGCGUUAAG UAGACCGCCU GGGGAGUACG GUCGCAAGAU UAAAAUCAA  
 0901 AUGAAUUGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGUG GAGCAUGUGG UUUAAUUCGA UGCAACGCGA  
 0961 AGAACCUUAC CUACUCUUGA CAUCCAGAGA AUUCUCUAGA GAUGGAUUAG UGCCUUCGGG  
 1201 AACUCUGAGA CAGGUGCUGC AUGGCUGUCG UCAGCUCGUG UUGUGAAAUG UUGGGUUAAG  
 1261 UCCCGCAACG AGCGCAACCC UUAUCCUUGU UUGCCAGCAC GUAAUGGUGG GAACUCCAGG  
 1321 GAGACUGCCG GUGAUAAACC GGAGGAAGGU GGGGACGACG UCAAGUCAUC AUGGCCCUUA  
 1381 CGAGUAGGGC UACACACGUG CUACAAUGGU GUAUACAGAG GGCUGCCAAC CAGCGAUGGU  
 1441 GGAGCGAAUC CCACAAAGUA CGUCGUAGUC CGGAUCGGAG UCUGCAACUC GACUCCGUGA  
 1501 AGUCGGAAUC GCUAGUAAUC GUGAAUCAGA AUGUCACGGU GAAUACGUUC CCGGGCCUUG  
 1561 UACACACCGC CCGUCACACC AUGGGAGUGG GCUGCACCAG AAGUAGAUAG CUUAACCUUC  
 1621 GGGAGGGCGU UUACCACGGU GUGGUUCAUG ACUGGGGUGA AGUCGUAACA AGGUAGCCCU  
 1681 AGGGGAACCU GCGGCUGGAA UCACCUCCUU A

16S rRNA sequence of SL027

0001 AGAGUUUGAU CCUGGCUCAG AUUGAAACGC UGGCGGCAGG CCUAACACAU GCAAGUCGAG  
 0061 CGGUAACAGG AAUUAGCUUG CUAUUUCGCU GACGAGCGGC GGACGGGUGA GUAAUGCCUG  
 0121 GGAAU AUGCC UUAGUGUGG GGAAUACU AUUGAAACGAU AGCUAAUACC GCAUAAGUCU  
 0181 UCGGACAAA GAGGGGGACC UUCGGGCCUC UCGCGCUAAG AUUAGCCCAG GUGGGAUUAG  
 0241 CUAGUUGGUG AGGUAAAGGC UCACCAAGGC AACGAUCCU AGCUGGUCUG GAGGAUGAUC  
 0301 AGCCACACUG GAACUGAGAC ACGGUCCAGA CUCCUACGGG AGGCAGCAAG UGGGGAAU AU  
 0361 UGCACAAUGG GGGAAACCCU GAUGCAGCCA UGCCGCGUGU AUGAAGAAGG CCUUCGGGUU  
 0421 GUAAAGUACU UUCAGUCGUG AGGAAGGGUA UGUAGUAAU AGCUGCAUAC CUUGACGUUA  
 0481 GCGACAGAAG AAGCACCGGC UAACUCCGUG CCAGCAGCCG CGGUAAUACG GAGGGUGCGA  
 0541 GCGUUAUCG GAAUUAUCUG GCGUAAAGCG CAUGCAGGCG GUCUGUUAAG CCAAGAUGUG  
 0601 AAAGCCCGGG GCUCAACCUC GGAACCGCWU UUUGAACUGG CAGACUAGAG UCUUGUAGAG  
 0661 GGGGUAGAA UUUCAGGUGU AGCGGUGAAA UGCGUAGAGA UCUGAAGGAA UACCGGUGGC  
 0721 GAAGGCGGCC CCCUGGACAA AGACUGACGC UCAGAUGCGA AAGCGUGGGG AGCAAACAGG  
 0781 AUUAGAUACC CUGGUAGUCC ACGCCGUAAA CGAUGUCUAC UUGAAGGUUG UGGCCUUGAG  
 0841 CCGUGGCUUU CGGAGCUAAC GCGUUAAGUA GACCGCCUGG GGAGUACGGU CGCAAGAUUA  
 0901 AAACUCAAU GAAUUGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGUGGA GCAUGUGGUU UAAUUCGAUG  
 0961 CAACGCGAAG AACCUUACCU ACUCUUGACA UCCAGAGAAU UCGCUAGAGA UAGCUUAGUG  
 1201 CCUUCGGGAA CUCUGAGACA GGUGCUGCAU GGCUGUCGUC AGCUCGUGU GUGAAAUGUU  
 1261 GGGUUAAGUC CCGCAACGAG CGCAACCCU AUCCUUGUUU GCCAGCACGU AAUGGUGGGA  
 1321 ACUCCAGGGA GACUGCCGGU GAUAAACCGG AGGAAGGUGG GGACGACGUC AAGUCAUCAU  
 1381 GGCCCUUACG AGUAGGGCUA CACACGUGCU ACAAUGGCGU AUACAGAGGG CUGCCAACCA  
 1441 GCGAUGGUGA GCGAAUCCCA CAAAGUACGU CGUAGUCCG AUCGGAGUCU GCAACUCGAC  
 1501 UCCGUGAAGU CGGAAUCGCU AGUAAUCGUG AAUCAGAAUG UCACGGUGAA UACGUUCCCG  
 1561 GGCCUUGUAC ACACCGCCG UCACACCAUG GGAGUGGGCU GCACCAGAAG UAGAUAGCUU  
 1621 AACCUUCGGG AGGGCGUUUA CCACGGUGUG GUUCAUGACU GGGGUGAAGU CGUAACAAGG  
 1681 UAGCCCUAGG GGAACCUGCG GAUGGAUCAC CUCCUUA

16S rRNA sequence of SL035

## 주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 해양수산연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 해양수산연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.