

최 중
연구보고서

eDNA를 이용한 농업환경 스트레스 유전자
선발 및 다양성 분석

Isolation of Agriculture Environment Stress
Genes and Diversity Analysis from eDNA

연구기관

농업생명공학연구원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “eDNA를 이용한 농업환경 스트레스 유전자 선발 및 다양성 분석”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07월 14일

주관연구기관명 : 농업생명공학연구원

총괄연구책임자 : 구 본 성

연 구 원 : 윤 상 홍

연 구 원 : 여 윤 수

연 구 원 : 박 인 칠

연 구 원 : 김 수 진

연 구 원 : 윤 상 순

연 구 원 : 이 미 혜

연 구 원 : 윤 준 희

연 구 원 : 안 정 순

세부연구책임자 : 김 병 용

연 구 원 : 권 순 우

연 구 원 : 홍 승 범

연 구 원 : 고 승 주

협동연구기관명 : 한경대학교

협동연구책임자 : 강 희 완

연 구 원 : 정 유 진

연 구 원 : 이 대 성

연 구 원 : 김 종 균

요 약 문

I. 제 목

eDNA를 이용한 농업환경 스트레스 유전자 선발 및 다양성 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

미생물은 지구상의 생물다양성의 절반이상을 차지하며, 미생물 유래의 다양한 유용 효소, 항생제, 생리활성 물질 등이 산업, 농업 및 의학 분야에서 다양하게 사용되고 있다. 이러한 미생물 생산 유용 물질 개발을 위하여 일차적으로 미생물을 분리하고 배양하여 물질 활성 탐색을 하는 것이 필수적인 과정이다. 그러나 이미 많은 유용물질의 발견으로 인하여 기존방법에 의한 물질탐색은 기지물질의 재발견에 의한 시간, 노력 비용이 가중되고 있으며 우수한 신규 물질의 발견은 감소되고 있다. 지구상에서 배양할 수 있는 미생물종은 극히 일부분인 1%에 지나지 않으며 나머지 99%의 미생물은 아직까지 미 발견된 상태로 자연 상에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 최근, 난 배양성 미생물을 포함한 다양한 환경시료로부터 추출한 유전체로 구축한 library를 이용한 metagenome 기술이 개발되어 신규성 항생제 및 유용 효소에 연관된 유전자 탐색이 높은 효율로 가능하게 되었다. 특히, 생촉매제인 lipase/esterase, protease, amylase, cellulase 등 신규구조의 유전자들이 metagenome library로부터 분리 되고 있으며 자연환경내의 난 배양미생물들의 유전체 DNA를 이용하여 발현되는 단백질을 탐색할 수 있게 되었다. 또한 16S rDNA를 이용하여 미생물의 다양성 분석도 가능하게 되어 기존보다 많은 유용 미생물의 활용과 다양한 효소개발에 박차를 가할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 본 연구에서는 다양한 환경토양 DNA로부터 구축된 metagenome library로부터 Abiotic 과 Biotic 관련 metagenome clone을 이용하여 관련 유전자를 분리하고 분자구조를 해석하여 유전자 발현 활성영역의 발현과 특성을 분자생물학과 생화학적 기술로 구명하고 선발한 유전자의 기능성 효율을 증진하고자 하는 것을 목적으로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 토양 거대 DNA의 분리법 확립 및 메타제놈은행 구축
 - 토양 시료의 채취 및 특성 검정
 - 토양 거대 DNA 분리법 확립
 - 메타제놈 은행 구축

2. 메타제놈 은행으로부터 biotic 및 abiotic stress 관련 유전자 선발
 - 식물 병원균 세포벽 분해 관련 chitinase 유전자 선발 및 활성영역 동정
 - 식물 병원균 세포벽 분해 관련 cellulase 및 β -glucosidase 생산 관련 유전자 선발 및 활성 영역 동정
 - 내염성 관련 유전자 선발
 - Biosurfactant 생산 관련 유전자 분리 및 활성영역 동정

3. 선발 유전자의 발현 증진을 위한 시스템 개발
 - High-throughput screening을 위한 선발 유전자의 bacterial cell surface 디스플레이
 - 선발 유전자의 *in-vitro* 분자 진화에 의한 기능성 효율 증진
 - Mutator cell을 이용한 BglA의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발
 - Error-prone PCR을 이용한 BglA의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발

4. 토양 DNA의 세균 다양성 및 분포해석
 - 토양 내에 서식하는 다양한 세균의 분리, 동정 및 보존
 - 비 배양 방법을 통한 토양세균의 다양성 분석 및 우점종 확인
 - 선발된 신규 미생물의 다상적 계통분류 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

가. 토양 거대 DNA의 분리법 확립 및 메타제놈은행 구축

○ 토양 시료의 채취 및 특성 검정

국내 농경지 오염 토양으로 전라북도 임실군 소재의 고추탄저병 발 토양, 생태계 보존지역으로 경상남도 창녕에 있는 우포늪과 경상남도 정족산 산정산 부근에 위치한 무제치늪 그리고 염류 집적지 토양으로 서해안의 대부도와 제부도 등지에서 토양을 채취하였다. 또한 유조선으로부터 유출된 기름으로 오염되었던 경상북도 포항시 대보항, 호미곶 일원, 울산광역시 간절곶 일원 등지 그리고 미군기지에서 유출된 기름으로 오염되었던 강원도 원주의 절골마을 인근 농수로 옆 논토양과 원주천 하천 토양을 각각 채취하였다.

○ 토양 거대 DNA 분리법 확립

전처리한 토양시료를 하루 밤 동결건조한 것과 동결건조하지 않은 것 각각 5 g씩에 완충용액을 넣고 proteinase K와 SDS를 첨가하여 lysis한 후 토양 DNA를 추출한 결과 CHEF로 분리된 DNA의 크기를 비교하였을 때, 동결건조하지 않은 토양으로부터 분리한 DNA는 23 kb이하가 많은 반면 동결건조한 토양으로부터의 DNA는 90 kb 이상인 것들이 많았다. Bead-beating을 이용한 추출방법은 DNA shearing이 적게 일어나 40~70 kb의 크기로 분포하고 다른 방법에 비해서 많은 양의 DNA가 추출되는 것을 알 수 있었다. Bead-beating 속도는 vortex 속도 3 (1,400 rpm)에서 심각한 shearing 없이 50~90 kb 크기의 DNA를 얻을 수 있었다. 따라서 추출 DNA의 사용 동결건조한 토양을 Bead-beating-SDS 방법을 사용하여 vortex 속도 4로 하여 DNA를 extraction하는 방법이 DNA의 양, 크기, 순도 그리고 다양성을 높이는 데 좋은 것으로 확인되었다.

○ 메타제놈 은행 구축

대부도의 fosmid library의 경우 이미 DNA 정제 단계에서 40 kb 이하의 크기로 shearing이 발생했으며 100,000개 정도의 clone을 얻을 수 있었다. 우포늪 library의 경우 다른 토양에서보다 많은 클론 수를 나타내었고 cosmid library도 110,000개의 클론 수를 나타내었고 λZAP library의 경우 1,250,000개 정도의 클론을 얻었다. 제작된 메타제놈 은행의 다양성과 제작 효율을 보기 위하여 무작위로 선발한 다수의 클론을 제한효소로 절단 하여 전기영동 한 결과 cosmid와 fosmid library의 경우 약 90%

이상이 약 20-40 kb 정도의 삽입된 단편의 크기를 나타내었고 서로 중복되는 클론이 없이 양질의 library가 만들어진 것을 확인하였다. λZAP library의 경우 13 kb 정도의 크기들 이외에 5 kb 이하의 단편들도 상당수 들어간 것으로 보였고 이는 비교적 작은 단백질 크기를 나타내는 효소 등을 암호화하는 유전자들을 검색하는 데에 무리가 없을 것으로 사료되었다.

나. 메타제놈 은행으로부터 biotic 및 abiotic stress 관련 유전자 선발

○ 식물 병원균 세포벽 분해 관련 chitinase 유전자 선발 및 활성영역 동정

Chitinase 활성 eDNA활성 유전자를 분리하기 위하여 MUF-diNAG 기질이 이용되어 신속하고 다량의 eDNA clone을 스크린 할 수 있었으며 최종 3개의 강한 chitinase활성의 eDNA clone인 pF33, pHF4, pHF1을 얻을 수 있었다. 이들 fosmid로부터 chitinase 활성영역을 transposon mutagenesis방법으로 확인하고, *Sau3A*로 partial digestion하고 pUC18 /*Bam*H1에 subcloning하여 pUCH33, pUCH4, pUCH1의 subclone을 얻을 수 있었으며 chitinase의 높은 활성을 나타내었다. 식물병원균에 대한 길항성 실험에서 pUCH33, pUCH4, pUCH1는 보리붉은곰팡이 병원균인 *Fusarium graminearum*에 균사억제 효과가 있었다. 이들 clone의 염기서열분석결과 pUCH33에서 1,003 bp의 ORF와 pUCH4에서는 680 bp의 ORF가 동정 되었다. 비록 이 pUCH33과 pUCH4의 ORF는 *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 and *Flavobacteriales bacterium* HTCC2170의 N-acetyl-beta-hexosaminidase와 각각 44% and 48% 상동성이 있었으나 신규 chitinase로서 확인 할 수 있었다. pUCH33, pUCH4, pUCH1를 *E. coli*에서 발현시킨결과 periplasmic fraction과 배양여액으로 분비 되는 chitinase의 특성을 보였으며 모두 endochitinase의 특성을 나타내는 것으로 사료 되었다. 또한, 본 연구에서 분리한 chitinase는 pH 8.0에서 비교적 안정한 활성을 보였으며 40°C에서 50°C에서 안정된 활성을 나타내었다.

○ 식물 병원균 세포벽 분해 관련 cellulase 및 β-glucosidase 생산 관련 유전자 선발 및 활성 영역 동정

- Cellulase 생산 관련 유전자 선발 및 분자구조 비교 분석

대부분도 fosmid library에서 오렌지색 clear zone을 형성하는 CM2 clone을 선발하였다. 이 클론의 insert 크기는 약 30 kb 정도로 추정되었고 cellulase 유전자를 암호화하는 ORF를 분리하기 위하여 shot-gun library를 제조하였다. 이 library를 carboxy methyl cellulose 선택배지에서 오렌지색 clear zone을 형성하는 clone들을 선발하고 활성을 가장 크게 가지고 4 kb insert를 가지는 clone을 선발하여 pUCM2라 명명하였다. pUCM2 클론을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 4,024 bp 였으며

서로 같은 방향의 2개의 ORF를 포함하고 있었다. 두 번째 ORF (*celA*)는 1,998 bp로 구성되어 665 amino acid를 암호화하며 추정되는 분자량은 73.5 kDa이었다. *celA*를 BLASTX search 한 결과, *Paenibacillus lautus*의 endoglucanase (cellulase)와 38%의 identity를 보였고 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*의 endoglucanase A와 33%의 identity를 보였다.

- β -Glucosidase 생산 관련 유전자 선발 및 분자 구조와 생화학적 특성 분석
4-Methylumbelliferyl-cellobioside를 기질로 하여 96 well plate에서 clone들을 배양하여 UV하에서 형광을 나타내는 클론들 중 활성이 높은 6개의 클론(Ce15, Ce65, Ce83, Ce92, Ce94, Ce105)을 선발하였다. 특히 Ce92의 경우 다른 선발 클론 보다 높은 형광을 나타내어 β -glucosidase 유전자를 암호화하는 ORF를 분리하기 위하여 shot-gun library를 제조하였다. 이 library를 MUF-cellobioside 기질을 이용하여 다시 형광을 나타내는 clone들을 선발하고 활성을 가장 크게 가지고 2.75 kb insert를 가지는 clone을 선발하여 pUGLU92라 명명하였다. pUGLU92 클론을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 2,750 bp였으며 한개의 ORF를 포함하고 있었다. ORF (*bglA*)는 1,455 bp로 구성되어 484 amino acid를 암호화하며 추정되는 분자량은 53.5 kDa이었다. *bglA*의 deduced primary sequence를 SWISS PROT database에서 상동성분석한 결과, *Clostridium thermocellum*와 *Thermotoga maritima*의 BglA과 48%의 identity를 나타내었고 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*의 BglA과 46%의 identity를 나타내었다. BglA sequence는 conserved residues인 glycosyl hydrolase의 catalytic active nucleophile인 glutamate 387과 acid-base catalyst인 glutamate 203이 존재하였다. pNP-glucose를 기질로 한 이 효소의 최적 온도는 55°C 부근이었으며 최적 pH는 6.5 근방이었고 Mn^{2+} 와 Mg^{2+} 존재 하에서 활성이 더 높게 나타났다. 또한 TLC와 HPLC 분석을 통해서 β -glucosidase가 major ginsenoside인 Rb₁을 minor ginsenoside인 Rd로 전환하는 것을 확인하였다.

○ 내염성 관련 유전자 선발

80,000여 eDNA clone을 스크리닝하여 얻어진 2개의 eDNA clone이 5%의 NaCl 배지에서 선발 되었으나, subcloning 하는 과정에서 동일 배지에서 성장 하는 clone을 발견 하지 못하여 그 유전자의 활성영역을 분리 하는데 실패 하였다. proline 과 발현 eDNA를 분리하기 위하여 L-proline의 analog compound인 L-azetidine 2-carboxylic acid 20 mM상에서 80,000여 eDNA clone 중에 선발 하고 자 하였으나 분리 하지 못하여 기존에 보고된 다양한 proline 유전자 영역으로부터 8 쌍의 primer를 제작하고 이를 이용한 eDNA soil DNA를 PCR증폭한 결과 PCR산물을 얻을 수 있었다.

○ **Biosurfactant 생산 관련 유전자 분리 및 활성영역 동정**

Biosurfactant 생산 관련 유전자를 분리하기 위하여 drop collapse method, hemolytic activity assay, sequence-based method 등의 방법을 사용하여 몇 가지 클론들을 선발하였으나 transposon mutagenesis와 염기서열 분석을 통한 실험에서 biosurfactant 관련 어떤 상동성도 나타나지 않았다. Tributyrin 선택 배지를 사용한 방법을 통해서 원주와 우포 library로부터 총 22개의 clone (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L32, L33)을 선발하였다. 염기서열을 결정하기 위하여 이들 클론의 Tn-mutant와 shot-gun library를 제조하여 총 17개의 ORF (*est1, est2, est3, est4, est5, est6, est7, est8, est9, est10, est11, est12, est13, est14, est15, est16, est17*)를 BLASTX search를 하여 homology를 분석하였다. 대부분이 carboxylesterase로써 주로 lipase와 esterase에 identity를 가졌고 *est13*의 경우 hypothetical protein과도 상동성을 가지고 있었으며, 기존의 단백질과는 많게는 54%, 적게는 28%의 identity를 나타냄으로써 신규의 단백질일 가능성이 많은 것으로 판단되었다.

원주의 기름이 유출되어 오염된 농경지의 토양으로부터 분리한 균주들을 drop-collapse 방법으로 검색하였다. 총 3개의 균주 (2B, 3B, 5B)를 선발하여 이를 16S rDNA로 homology search를 하였더니 *Pseudomonas* sp.으로 나타났다. 또한 기존에 알려진 biosurfactant 유전자로부터 PCR을 수행한 결과, primer 1, 2 (*Bacillus subtilis, sfp*)을 사용하였을 때에는 약 0.6 kb와 2 kb의 PCR product가 검출되었다. 또한 primer 3 (*Pseudomonas aeruginosa, rhlC*)을 사용하였을 때 1.1 kb 위치의 PCR product를 관찰할 수 있었다. 염기서열의 분석을 분석한 결과 hypothetical protein등과 homology를 가지는 것으로 추후 염기서열 및 ORF 분석을 통해 유전자 발현을 통해 확인해야 할 것으로 사료되었다

다. 선발 유전자의 발현 증진을 위한 시스템 개발

○ **High-throughput screening을 위한 선발 유전자의 bacterial cell surface 디스플레이**

- Bacterial cell surface display를 위한 *bglA* 유전자의 pGF101 vector로의 cloning

세포 표면 발현 기술을 이용하여 β -glucosidase의 기능이 향상된 돌연변이들을 선택적으로 탐색하는데 용이하게 하기 위하여 *bglA* 유전자를 ice nucleation protein (Inp) 유전자에 결합시킨 pGF101 vector에 연결시켜 fusion 단백질을 합성하여 bacteria 세포 표면에 발현시켰다. pGF101 vector 만 형질전환한 TG1 cell의 pNPG

분해 활성은 거의 나타나지 않았으며 *bglA* 유전자가 들어간 pGLUN과 pGLUX에서는 pNPG 분해 활성이 일어나 노랗게 나타났으며 412 nm에서도 수치가 올라갔다. 이렇게 만들어진 pGLUN과 pGLUX clone은 INP surface display 되어 타겟 단백질이 표면에 있기 때문에 외부에서 넣어 준 기질과 쉽게 결합하고 반응할 수 있게 된 것을 확인하였다.

○ 선발 유전자의 *in-vitro* 분자 진화에 의한 기능성 효율 증진

- Mutator cell을 이용한 *BglA*의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발

*BglA*의 활성을 증가시키기 위해 mutator cell (XL1-RED)을 이용한 *in-vitro* evolution을 수행하였다. 1일과 2일째로 기간을 달리하여 배양 시킨 mutant cell로부터 plasmid를 분리하고 EPI cell에 transformation 하여 mutant library (D1, D2)를 작성하였다. 만들어진 mutant library들 중 무작위로 18개의 클론을 선택하여 plasmid를 분리하고 제한효소 절단 양상을 관찰한 결과, 모두 약 1.4 kb의 insert를 가지는 것으로 보아 만들어진 mutant library (D1, D2)는 전부 pGGLU92에서 유래한 DNA로 판단되었다. MUF-cellobioside 시약을 첨가하여 형광 활성을 보는 방법으로 D1과 D2 library 각각의 약 2,000개의 mutant 들을 96 well plate에 접종하여 관찰한 결과 *bglA* 유전자가 들어간 원래 pGGLU92 보다 형광을 더 강하게 나타내는 균주들을 각각 D1 library에서 43 클론, D2 library에서 34 클론을 선발하였다. 이들 중 형광활성을 강하게 나타내는 pGGLUM12, pGGLUM33, pGGLUM36, pGGLUM4, pGGLUM16, pGGLUM20 클론을 선발하였다. 이들은 모두 *bglA* 유전자가 들어간 원래 pGGLU92보다 강한 형광을 나타내었고 이들의 plasmid를 분리하여 제한 효소 처리한 결과 1.4 kb의 insert를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

- Error-prone PCR을 이용한 *BglA*의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발

bglA 유전자를 주형으로 display용 vector인 pGF101에 *bglA* 유전자가 삽입된 plasmid인 pGGLU92를 사용하여 PCR을 수행하였다. 보통 mutation frequency를 증가시키기 위해 MgCl₂의 농도를 증가시키거나 MnCl₂를 다른 농도로 첨가하거나 dCTP와 dTTP의 농도를 올려주고, 또는 Taq polymerase의 양을 달리해 주는 PCR 조건 변형을 이용한다. 본 연구에서는 mutagenesis 효율이 PCR 수행시 kb 당 1내지 7 base의 mutation이 발생하는 것으로 알려져 있으며 주로 GC-rich region에 좀 더 많은 돌연변이가 일어나는 것으로 알려진 Genemorph kit을 사용하여 mutagenesis를 수행하여 원하는 크기의 PCR product가 증폭된 것을 볼 수 있었다. PCR의 annealing temperature를 달리 하였을 때 55°C에서 가장 PCR product가 잘 증폭되었다. 이것을 제한효소로 절단하여 bacterial display vector인 pGF101에 ligation하여

TG1 cell에 형질전환하여 활성이 증가된 β -glucosidase를 검색하였다. 이들 중 가장 높은 활성을 나타내는 클론을 선발하여 재현성을 확인한 후 염기서열을 결정할 예정이다.

라. 토양 DNA의 세균 다양성 및 분포해석

○ 토양 내에 서식하는 다양한 세균의 분리, 동정 및 보존

국내 생태계보존지역인 우포늪, 무제치늪, 해양 갯벌 토양, 고추 재배지 등 국내 농경지에서 104개 시료, 총 2,770주의 세균을 분리 배양하였다. 각각의 시료를 분석할 결과, 우포늪에서 분리한 미생물중에는 각각 *Bacillus* (32.4%), *Kocuria* (9.4%), *Arthrobacter* (8.6%) 등이 다수를 차지하였다. 무제치늪에서 분리한 미생물중에서는 *Bacillus* (34.8%), *Burkholderia* (6.1%), *Arthrobacter* (5.3%) 등이 다수를 차지하였다. 서해안 갯벌 대부분 토양에서 분리한 미생물을 분석할 결과 *Mesorhizobium* (20.0%), *Bacillus* (14%) 등이 다수를 차지하였다. 포항연안지에서 분리한 미생물의 결과는 *Erythrobacter* 속에 해당하는 균주가 28균주로 20.6%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, 그 다음으로 *Paracoccus*속에 해당하는 균주가 19균주로 14.0%로 그 다음으로 많은 분포를 차지했다. 원주 농경지에서 분리한 미생물 중에는 *Pseudomonas*속에 해당하는 균주가 43균주로 29.5%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, 그 다음으로 *Arthrobacter*속에 해당하는 균주가 40균주로 27.4%로 그 다음으로 많은 분포를 차지했다.

○ 비 배양 방법을 통한 토양세균의 다양성 분석 및 우점종 확인

우포늪에서 배양을 통하지 않고 토양 DNA를 직접 분석한 결과 *Acidobacteria* (40%), β -*proteobacteria* (22.9%) 등이 높은 것으로 확인되었다. 무제치늪에서 토양DNA를 조사한 경우는 α -*proteobacteria* (23.3%)에 속하는 미생물과 *Acidobacteria* (23.3%)에 속하는 미생물이 다수 분포함을 확인하였다. 고추재배지의 병 건전지와 병 발생지의 미생물다양성을 조사하여 본 결과 두 근권토양 모두 *Pseudomonas*가 배양방법으로 조사할 때 다수의 미생물임을 보였고 특히 병 발생지에서는 50%로 매우 높게 나타난 반면 이병토양은 22%로 나타나 이들 토양간에 미생물분포의 차이가 있음을 확인하였다. 고추재배지의 병 건전지와 병 발생지의 토양DNA 분석을 통한 미생물다양성을 조사하여 본 결과 건전지 토양에서는 *Acidobacteria*가 우점종을 형성하였고, 병 발생지에서는 α -*Proteobacteria*가 우점종을 형성하였다. 또한 건전지 토양에서 보다 다양한 미생물분포를 보여 두 지역간의 미생물 분포차이를 확인하였

다.

대부도 토양 DNA에서는 α -*Proteobacteria*군에 속하는 미생물이 30.0%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, 포항연안지에서는 *Proteobacteria*군에 속하는 토양 DNA가 절대다수를 차지하였으며 특히 γ -*Proteobacteria*에 속하는 세균 DNA가 53.0%를 보였다. 또한 원주 토양 DNA에서는 *Acidobacteria*군에 속하는 미생물이 33.7%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, β -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 17.3 %를 차지해 그다음으로 많은 분포를 보였다

○ 선발된 신규 미생물의 다상적 계통분류 연구

앞선 연구에서 분리된 균주를 분석하여 총 43균주의 신종 후보균을 확보하여 1주의 신속과 5종의 신종을 분류하였으며, 국제 미생물분류학회지(Int.J.Sys.Evol.Micro.)에 4종이(*Pseudomonas pohangensis* sp. nov., *Idiomarina homiensis* sp. nov., *Loktanella koreensis* sp. nov., *Marinobacter koreensis* sp. nov.) 등록 완료 되었고, 현재 2종이 논문에 투고(*Exiguobacterium homiense* sp. nov., *Arenimonas donghaensis* gen. nov. sp. nov.)되어 있는 상태이다. 이들 신종 미생물은 16S rRNA 염기서열에서 기존의 미생물과 다를 뿐만 아니라 생화학적 특성분석, 세포벽 성분등의 화학적 분석에서도 기존에 알려진 미생물과는 매우 상이해서 새로운 미생물로 제안할 만한 충분한 근거를 가지고 있다

2. 활용에 대한 건의

최근에 개발된 미배양 미생물 유전체 확보기술, 유전체연구, microarray, proteomics, structural genomics 등의 새로운 기술을 적용하여 새로운 도약을 할 수 있는 여건이 조성되고 있음. 따라서 한시라도 빨리 이들 연구분야에 적극적으로 참여하여 선진국형 생물산업을 일으키는 발판으로 삼아야 한다. 또한 세계적인 미생물 산업 국가로서의 위상을 확보하기 위해서는 신규 효소, 항생제, 생리활성 물질, 향장소재 등의 고속 대량 탐색이 필수이다.

- Metagenome 연구의 한계점인 대장균에서 발견되지 않는 유전자를 선발하기 위한 형질전환체계 확립연구의 장려가 요망된다
- 병 저항성 유전자 개발 소재활용에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.
- 신규 항균물질 관여 유전자 개발 및 기능개선과 재설계된 고부가 고기능의 효소, 활성 물질 및 형질전환 미생물의 원천특허 확보가 요망된다.

SUMMARY

I. Project title

Isolation of agriculture environment stress genes and diversity analysis from eDNA

II. Research background

Environmental samples such as soil and sediment are important sources of useful enzymes and other products. Numerous researchers have pointed out that the majority of the bacteria in environmental samples cannot be isolated or cultured using only traditional cultivation techniques. Only a very small proportion of the total microbial community can be isolated. Only an estimated 0.001-0.1% of the total population of bacteria in natural habitats can be isolated through conventional methods that rely on the cultivation of microorganisms on laboratory media isolate only an estimated 0.001-0.1% of the total population of bacteria in natural habitats. Isolation and screening of environmental DNA without cultivation is A recent approach to detect and monitor microorganisms in complex environmental samples involves the isolation and screening of environmental DNA without cultivation. Metagenomic libraries containing DNA extracted directly from environmental sample provide genomic sequences, and phylogenetic and functional information. Systematical analysis of soil metagenomes from various locations can find novel and potentially useful natural products, making these observations more valuable. This study is to analyze active regions of genes related to abiotic and biotic stress from metagenome. The soil DNA library that was constructed by using fosmid and cosmid vector were screened to find eDNA clones related to salt tolerance and biosurfactant as abiotic stress genes and those to chitinase and cellulase activity as biotic stress gene.

III. Research Contents and scope of the project

Part I. Evaluation of high-molecule DNA recovery and construction of metagenomic libraries

- Soil collection and characterization
- Evaluation of high-molecule DNA recovery from soil samples
- Construction and characterization of metagenomic libraries

Part II. Isolation of biotic & abiotic related genes from metagenomic libraries

- Screening and identification of active region from chitinase eDNA clone
- Screening and identification of active regions from cellulase and β-glucosidase producing eDNA clones
- Selection and assay of salt tolerance eDNA clones and eDNA selection of proline-overproduction
- Screening and selection of biosurfactant-related metagenomic clones

Part III. Development of enhanced expression systems from isolated genes.

- Evaluation of expression efficiency for high-throughput screening
- Evolution of an isolated gene for enhancement of activities

Part IV. Diversity analysis of bacteria and soil DNA

- Isolation, identification and preservation of diverse bacteria from soil
- Diversity analysis of soil DNA by culture-independent methods
- Classification of selected bacteria by polyphasic approach

IV. Summary of research results and propositions for their applications

1. Result summaries

1-1. Evaluation of high-molecule DNA recovery and construction of metagenomic libraries

○ Soil collection and characterization

Several environmental samples were used: Upo wetland (Changyong), Mujechi bog (Yongsan), Daebudo sandbar (Seohae), crop soil (Wonju), Homi cape (Ulsan) and Daebo cape (Pohang) in Korea. Samples were obtained between 5 and 30 cm in depth. Soil samples were, air-dried, weighed, and used for soil characterization.

○ Evaluation of high-molecule DNA recovery from soil samples

Four soil and sediment samples with various contents of organic matter (0.6% to 43%) were used to evaluate extraction and purification methods of DNA. Three methods of DNA extraction were compared: Method I, the SDS method; Method II, the freezing-thawing-SDS method; Method III, the bead-beating-SDS method. In the view of DNA yields, Method III was gave better DNA yield than the method I and II. Also, to obtain much more quantities of high-molecular-weight DNA, it was founded that the optimal bead-beating speed of the method I was about 1,400 rpm although its DNA yield was slightly lower than that with those obtained using of the other bead-beating speed. In addition, we combined several purification procedures were combined to evaluate DNA purity for enzyme digestion and PCR amplification. The gel-plus-column method gave very pure DNA, while the gel-plus-centricon method gave the highest recovery. This work presents a choice of extraction and purification methods on the goal of the study.

○ Construction and characterization of metagenomic libraries

SJ2 (fosmid library from Daebudo) consists of 1.0×10^5 clones arrayed 384 well microtiter plates. SJ3 (λ ZAP library from Upo wetland) consists of 1.25×10^6

clones.SJ5 (cosmid library from Upo wetland) consists of 1.1×10^5 clones. We examined randomly selected 20 clones from cosmid and fosmid libraries for inserts: 90% contained insert DNA, with insert size of 30–40 kb. We also examined randomly selected 10 clones from λZAP library: 80% contained insert DNA, with insert size 2–13 kb.

1-2. Isolation of biotic & abiotic related genes from metagenomic libraries

- Screening and identification of active region from chitinase eDNA clone

Thirteen eDNA clones that have chitinase activity were obtained from eDNA libraries by using substrate MUF-diNAG. Of them, clones pF33, pHF4 and pHF1 showed the highest activity to MUF-diNAG. They showed slightly mycelial inhibition against phytopathogenic fungi, *Fusarium graminearum*. Fosmid pF33, pHF4 and pHF1 was partially digested with *Sau3AI* and subcloned into pUC18/BamHI, yielding pUCH33, pUCH4 and pUCH1. Fosmids, pFCH1, pFCH4 and pFCH33 showing chitinase activity was partially digested with *Sau3A* and subcloned into pUC18/BamHI, yielding pUCH1, pUCH4 and pUCH33. ORFs with 1,003 bp and 680 bp were identified in nucleotide sequences of pUCH33 and pUCH4. pUCH33 showed homology of 44% and 48% identity to N-acetyl-beta-hexosaminidase of *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 and *Flavobacteriales bacterium* HTCC2170. The plasmids, pUCH1, pUCH4 and pUCH33 were expressed on periplasmic fraction and culture filtrate of *E. coli*. The periplasmic proteins of pUCH1, pUCH4 and pUCH33 did degrade MUF-diNAG and MUF-triNAG, but not MUF-NAG, indicating these chitinases is not exochitinase. Periplasmic proteins from pUCH1, pUCH4 and pUCH33 was stable on pH8 and temperature from 40°C to 50°C. In conclusion, three novel chitinase genes were isolated from eDNA libraries constructed from soil DNA samples and their active gene regions and expression patterns were determined.

- Screening and identification of cellulase and β-glucosidase producing eDNA clones

- Isolation and identification of cellulase related clone.

One clone (CM2) from fosmid library of Daebudo produced an activity that

showed orange clear-zone on CMC agar plate. CM2 clone contains an insert of approximately 30 kb in size, as estimated by restriction digestion followed by agarose gel analysis. One shot-gun clone (pUCM2) from CM2 clone was located in two potential ORF. Second ORF (*celA*) identified a potential gene of 1,998 bp encoding a protein of 665 amino acids. BLASTX search analysis showed that *celA* gene is 38% identity with the endoglucanase (cellulase) of *Paenibacillus lautus* and 33% identity with the endoglucanase A of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

- Screening and identification of β -glucosidase producing clones

Six clones (Ce15, Ce65, Ce83, Ce92, Ce94, Ce105) that have β -glucosidase activity were obtained from fosmid libraries by using substrate MUF-cellobioside on 96 well plates. One clone (Ce92) of them showed the highest activity to MUF-cellobioside. One shot-gun clone (pUGLU92) from Ce92 clone was isolated. Sequence analysis of the 2.75 kb cloned insert showed one ORF (*bglA*) predicted to encode 1,455 bp, and 484 amino acid protein. BglA ORF shared 48% identity with the BglA of *Clostridium thermocellum* and *Thermotoga maritima*, and 46% identity with the BglA of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Two conserved glutamate residues (Glu387 and Glu203) were shown to be important for BglA activity. The purified BglA enzyme hydrolyzed sophrose, pNP-glucopyranoside and pNP-fucopyranoside. It exhibited maximal activity at pH 6.5 and 55°C, and its activity was enhanced in the presence of Mn^{2+} and Mg^{2+} . The molecular weight of the enzyme was estimated to be 53 kDa. The purified BglA enzyme converted the major ginsenoside, Rb₁ to the minor ginsenoside, Rd by the TLC and HPLC assays.

o Selection and assay of salt tolerance eDNA clones and eDNA selection of proline-overproduction

eDNA fosmid clones related salt tolerance were isolated, but so their activity was weak, that further study was not processed. eDNA clones with proline overexpression was not isolated from fosmid eDNA libraries. Therefore, 8 PCR primers were designed from proline conserved sequence of proline AB gene regions and amplified the soil DNA samples. PCR bands were produced by the primers.

- Screening and selection of biosurfactant-related metagenomic clones

Several eDNA clones related biosurfactant were isolated by drop collapse method, hemolytic activity assay and sequence-based method. Using transposon mutagenesis and sequence analysis, these clones did not show homology to other biosurfactant. On the tributyrin agar plates, twenty-two clones (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L32, L33) are screened from Wonju and Upo libraries. To identify the selected clones, we constructed shot-gun libraries and transposon mutant libraries. BLASTX search analysis showed that seventeen potential ORFs (*est1*, *est2*, *est3*, *est4*, *est5*, *est6*, *est7*, *est8*, *est9*, *est10*, *est11*, *est12*, *est13*, *est14*, *est15*, *est16*, *est17*). These ORFs shared 28-54% identity of carboxylesterase containing esterases and lipases. By the drop-collapse method, we isolated three strains (2B, 3B, 5B) from the soil of Wonju. 16S rDNA analysis showed that these strains were identified as *Pseudomonas* sp.. To isolate biosurfactant related gene from each isolated strains, it was found that conserved regions in several biosurfactant genes including *Bacillus subtilis*, *sfp* and *Pseudomonas aeruginosa*, *rhlC*. PCR was performed using degenerated primers. The 0.6, 1.1, 2.0 kb fragments were amplified and showed the similarity to the hypothetical protein.

Part III. Development of enhanced expression system from isolated genes.

- Bacterial cell surface display of a BglA for high-throughput screening

The bacterial surface display method was used to selectively screen for improved variants of β -glucosidase. *bglA* gene was fused to the ice nucleation protein (InP0 gene so that the resulting fusion proteins would be displayed on the bacterial cell surface. TG1 cells displaying the pGF101 vector did not hydrolyze pNP-glucopyranoside. In contrast, TG1 cells displaying *bglA* gene (pGLUN and pGLUX) showed pNP-glucopyranoside-hydrolyzing activities.

- Evolution of an isolated gene for enhancement of activities
 - *In-vitro* mutagenesis by mutator cell and screening of improved BglA variants

We have used laboratory evolution methods to enhance the activity of BglA. A strategy of mutator cell was used to generate mutant libraries, which were screened to identify enzymes that acquired greater activity. we used a XL1-RED cell. The mutant library was constructed from the plasmid DNA of the culture. The purified plasmid DNA were transformed to EPI competent cell. We examined randomly selected 18 clones from mutant libraries for inserts: 100% contained insert DNA, with insert size of 1.4 kb. Total 4,000 clones were inoculated to 96 well plates and screened by using substrate MUF-cellobioside. We isolated 43 clones from mutant library, D1 and 34 clones from mutant library, D2. Six clones of them (pGGLUM12, pGGLUM33, pGGLUM36, pGGLUM4, pGGLUM16, pGGLUM20) showed the highest activity to MUF-cellobioside. These clones had higher activity than original pGGLU92 clone.

- *In-vitro* mutagenesis by error-prone PCR and screening of improved BglA variants

We have used laboratory evolution methods to enhance the activity of the β -glucosidase. A strategy of error-prone PCR mutagenesis was used to generate mutant libraries, which were screened to identify enzymes that acquired greater activity. We constructed a mutant library using Genemorph kit that shows mutations on GC-rich regions and produces mutations of 1-7 base per kb. The amplified PCR product were dependent on annealing temperature of PCR conditions. The best PCR detection were observed at 55°C. This fragment were digested with restriction enzymes and cloned to pGF101 vector for bacterial display. The ligation mixture was transformed TG1 cells for screening of the enhanced β -glucosidase activity.

Part IV. Diversity analysis of bacteria and soil DNA

- o Isolation, identification and preservation of diverse bacteria from soil

We have isolated 2,770 strains from 104 samples of soil in diverse area such as Woopo, Mujechi, getbol, seashore sand and crop soil etc. In Woopo, there are many genus and among them, *Bacillus* (32.4%), *Kocuria* (9.4%) and *Arthrobacter* (8.6%) were dominant. In Mujechi, *Bacillus* (34.8%), *Burkholderia* (6.1%) and *Arthrobacter* (5.3%) were abundant genus. In getboul soil, *Mesorhizobium*

(20.0%) and, *Bacillus* (14%) were predominant genus in all strains. In sea shore sand, the genus of *Erythrobacter* was major as 20.6% of all. and then the genus, *Paracoccus* had a major part in all by 14.0%. In cropsoil in wonju, we have found the *Pseudomonas* was a major genus from all isolates by 25% and then *Arthrobacter* was also major genus as 27.4%.

○ Diversity analysis of soil DNA by culture-independent methods

The analysis of soil DNA by culture-independent method (cloning) showed that the real major strains which habitate in soil are different from the result of culture-dependent methods. We used cultivation-dependant and independent method to compare the diversity of Phytophthora-infected hot peppers rhizosphere with healthy rhizosphere. In culture-based method, the number of *Pseudomonas* isolates from healthy sample was more than that from diseased sample. In 16S rDNA clone analysis, microbial community of healthy rhizosphere was more diverse than infested rhizosphere. *Acidobacteria* was also predominant in healthy rhizosphere, however α -*Proteobacteria* was predominant in infested rhizosphere. Rhizosphere bacterial community structure may serve as an indicator of changes in biological condition and also as a parameter of the crop soil quality. Meanwhile, In woopo, *Acidobacteria* (40 %) and β -*proteobacteria* (22.9 %) were major phylum in soil. In mujechi, α -*proteobacteria* (23.3 %) and *Acidobacteria* (23.3%) were also major there.

○ Classification of selected bacteria by polyphasic approach

We have isolated total 43 isolates which show the possibility of the novel species in previous study. Among them, our study have classified 6 strains into novel species by polyphasic approach. The four strains- *Pseudomonas pohangensis* sp. nov, *Idiomarina homiensis* sp. nov., *Loktanella koreensis* sp. nov., *Marinobacter koreensis* sp. nov.- were approved by publication. The other 2 strains - *Exiguobacterium homiense* sp. nov., *Arenimonas donghaensis* gen. nov. sp. nov.- were now submitted. These isolates were different from close other type strains by not only phylogenetical analysis but also biochemical properties.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	28
Section 1. Research background and objectives	28
1. Objectives of the research	28
2. Background of the research	28
Section 2. Contents and scope of research	30
1. Purpose of the research	30
2. Contents and range of research	31
Chapter 2. Current status of domestic and overseas technical information on the research	32
1. Current status of domestic technical information	32
2. Current status of overseas technical information	32
3. Future prospects	33
Chapter 3. Contents and results of the research	34
Section 1. Evaluation of high-molecule DNA recovery and construction of metagenomic libraries	34
1. Soil collection and characterization	34
1) Contents and methods of experiment	34
2) Results	35
2. Evaluation of high-molecule DNA recovery from soil samples	38
1) Contents and methods of experiment	38
2) Results	41
3. Construction and characterization of metagenomic libraries	51

1) Contents and methods of experiment	51
2) Results	53
Section 2. Isolation of biotic & abiotic related genes from metagenomic libraries	56
1. Screening and identification of active region from chitinase eDNA clone	56
1) Contents and methods of experiment	56
2) Results	61
2. Screening and identification of active regions from cellulase and β - glucosidase producing eDNA clones	81
1) Contents and methods of experiment	81
2) Results	84
3. Selection and assay of salt tolerance eDNA clones and eDNA selection of proline-overproduction	103
1) Contents and methods of experiment	103
2) Results	104
4. Screening and selection of biosurfactant-related metagenomic clones	113
1) Contents and methods of experiment	113
2) Results	116
Section 3. Development of enhanced expression systems from isolated genes	127
1. Evaluation of expression efficiency for high-throughput screening	127
1) Contents and methods of experiment	127
2) Results	129
2. Evolution of an isolated gene for enhancement of activities	134
1) Contents and methods of experiment	134
2) Results	137

Section 4. Diversity analysis of bacteria and soil DNA	145
1. Isolation, identification and preservation of diverse bacteria from soil	145
1) Contents and methods of experiment	145
2) Results	149
2. Diversity analysis of soil DNA by culture-independent methods	157
1) Contents and methods of experiment	157
2) Results	161
3. Classification of selected bacteria by polyphasic approach.....	168
1) Contents and methods of experiment	168
2) Results	170
 Chapter 4. Research achievements and contribution	 186
Section 1. Research achievements	186
Section 2. Contribution to the related studies	187
1. Expected impacts on technical development	187
2. Economical and industrial contribution	187
 Chapter 5. Technical application	 188
 Chapter 6. Overseas technical information acquired in the course of the research	 190
 Chapter 7. References	 191

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	28
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	28
1. 연구개발의 목적	28
2. 연구개발의 필요성	28
제2절 연구개발의 내용 및 범위	30
1. 연구개발의 목표	30
2. 연구개발의 내용 및 범위	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	32
1. 국외의 기술개발 현황	32
2. 국내의 기술개발 현황	32
3. 앞으로의 전망	33
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	34
제1절 토양 거대 DNA의 분리법 확립 및 메타제놈은행 구축	34
1. 토양 시료의 채취 및 특성 검정	34
가. 연구수행 내용 및 방법	34
가) 토양 시료의 채취	34
나) 토양 시료의 특성 검정	35
나. 연구 결과	35
1) 토양시료 채취 결과	35
2) 토양시료 분석 결과	35
2. 토양 거대 DNA 분리법 확립	38
가. 연구수행 내용 및 방법	38
가) 토양시료로부터 균체집적 및 전처리	38

나) 토양시료의 동결건조 여부에 따른 DNA 추출	38
다) 토양 DNA 추출법 비교	39
라) 토양 DNA 정제법 비교	39
마) 분리한 토양 DNA의 정제도 측정	40
나. 연구 결과	41
1) 토양 DNA 추출	41
가) 토양시료의 동결건조 여부에 따른 DNA 추출	41
나) 추출 방법에 따른 DNA 분리 비교	43
다) 정제 방법에 따른 DNA 분리 비교	47
3. 메타제놈 은행 구축	51
가. 연구수행 내용 및 방법	51
가) 메타제놈 은행 제작	51
나. 연구 결과	53
1) 메타제놈 은행 제작	53
제2절 메타제놈 은행으로부터 biotic 및 abiotic stress 관련 유전자 선발	56
1. 식물 병원균 세포벽 분해 관련 chitinase 유전자 선발	56
가. 연구수행 내용 및 방법	56
가) 식물병원균에 대한 항균효소 chitinase 생성 clone 탐색	56
나. 연구결과	61
1) Chitinase활성 eDNA 탐색 및 활성영역 구명	61
가) Chitinase 생산 클론의 선발	61
나) Chitinase 활성영역의 분리	65
다) Chitinase 활성 eDNA clone의 식물병원진균에 대한 길항성	69
라) Chitinase 활성영역의 분자구조 분석	71
마) eDNA 유래 chitinase 유전자의 발현분석	77
2. 식물 병원균 세포벽 분해 관련 cellulase 및 β -glucosidase 생산 관련 유전자 선발	81
가. 연구수행 내용 및 방법	81
가) 식물병원균에 대한 항균효소 cellulase 및 β -glucosidase 생성 clone 탐색	81
나) 선발 클론의 shot-gun library 제조 및 재탐색	81

다) DNA 염기서열 및 상동성 분석	82
라) 유전자의 과발현 및 정제	82
마) 효소 활성 측정	82
바) 유전자 산물의 확인	83
사) Thin layer chromatography (TLC) analysis	83
아) HPLC analysis	83
나. 연구결과	84
1) Cellulase 유전자의 분리 및 활성영역 동정	84
가) Cellulase 생산 클론의 선발	84
나) Cellulase 생산 유전자의 염기서열 분석 및 상동성 조사	87
2) β -Glucosidase 유전자 분리 및 활성영역 동정	90
가) β -Glucosidase 생산 클론의 선발	90
나) β -Glucosidase 생산 클론의 유전자의 염기서열 분석 및 상동성 조사	93
다) BglA 정제와 생화학적 특성	95
라) BglA의 ginsenoside 전환	100
3. 내염성 관련 유전자 분리	103
가. 연구수행 내용 및 방법	103
가) 내염성 eDNA clone 선발	103
나) Proline-overproduction eDNA clone의 screening	103
나. 연구결과	104
1) 내염성 eDNA clone 선발 및 분석	104
2) Proline-overproduction eDNA clone 선발	107
가) eDNA library 으로부터의 pro-overproduction clone 분리	107
나) PCR증폭에 의한 Metagenome DNA로부터 proAB 유전자 분리	108
4. Biosurfactant 생산 관련 유전자 분리 및 활성영역 동정	113
가. 연구수행 내용 및 방법	113
가) Biosurfactant 생산 관련 유전자 탐색	113
나) 선발 클론의 활성 negative Tn 돌연변이체의 선발	115
다) 선발 클론의 shot-gun library 제조 및 재탐색	115
라) DNA 염기서열 및 상동성 분석	116
나. 연구결과	116
1) Biosurfactant 생산 클론의 선발	116
가) Drop collapse method를 이용한 검색	116

나) Blood agar lysis를 이용한 검색	117
다) Tributyrin 첨가배지를 이용한 검색	119
라) 토양에서 분리한 균주로부터 biosurfactant 생산 균주 검색	125
제3절 선발 유전자의 발현 증진을 위한 시스템 개발	127
1. High-throughput screening을 위한 선발 유전자의 bacterial cell surface display	127
가. 연구수행 내용 및 방법	127
가) Bacterial strain, plasmid 및 배지	128
나) 유전자 cloning	128
다) <i>E. coli</i> 에서의 BglA 표면 발현 및 활성 측정	128
나. 연구결과	129
1) Bacterial cell surface display를 위한 <i>bglA</i> 유전자의 pGF101 vector로의 cloning	129
2. 선발 유전자의 <i>in-vitro</i> 분자 진화에 의한 기능성 효율 증진	134
가. 연구수행 내용 및 방법	134
가) Mutator cell에 의한 random-mutagenesis	135
나) Error-prone PCR을 이용한 random mutagenesis	136
다) 선발한 클론들의 β -glucosidase 활성 측정	136
나. 연구결과	137
1) Mutator cell을 이용한 BglA의 <i>in-vitro</i> mutagenesis 및 mutant 선발	137
2) Error-prone PCR을 이용한 BglA의 <i>in-vitro</i> mutagenesis 및 mutant 선발	141
제4절 토양 DNA의 세균 다양성 및 분포해석	145
1. 토양 내 다양한 세균의 분리, 동정 및 보존	145
가. 연구수행 내용 및 방법	145
가) 저영양배지를 이용한 배양 가능한 세균의 분리 최대화	145
나) 분리된 세균의 16S rRNA를 이용한 분류	147
다) 특성에 따른 배양 가능한 세균의 분포 해석	148
라) 세균의 다양성 확보에 의한 미생물 자원의 보전	148
나. 연구결과	149

1) 저영양배지를 이용한 세균의 분리 최대화	149
2) 분리된 세균의 지방산 분석을 이용한 분류 및 분포해석	150
3) 16S rRNA를 이용한 토양 세균의 분류 및 분포해석	153
2. 비 배양 방법을 통한 토양세균의 다양성 분석 및 우점종 확인	157
가. 연구수행 내용 및 방법	157
가) 다양한 토양의 DNA 추출	157
나) 16S rRNA를 이용한 토양세균의 다양성 분석	157
다) 배양 불가능한 미생물의 분류, 우점종 확인 및 분포 해석비교	157
나. 연구결과	161
1) 생태계 보존지역의 토양 DNA 분포해석	161
2) 고추재배 국내 농경지의 토양DNA 분포해석	163
3) 서해안 갯벌(대부도) 시료에서 추출한 토양 DNA의 미생물 다양성 분석	165
4) 포항연안지에서 추출한 토양DNA의 미생물 다양성 분석	166
5) 원주 토양에서 추출한 토양DNA의 미생물 다양성 분석	167
3. 선발된 신규 미생물의 다상적 계통분류 연구	168
가. 연구수행 내용 및 방법	168
가) 선발된 균주의 16S rRNA분석	168
나) 형태적 특성 조사	168
다) 생리학적 특성조사	168
라) G+C 함량 측정	169
마) 지방산(fatty acid) 분석	169
바) Quinone분석	169
사) Phylogenetics	169
나. 연구결과	170
1) <i>Pseudomonas pohangensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	174
2) <i>Idiomarina homiensis</i> sp. nov., isolated from seashore sand in Korea	176
3) <i>Loktanella koreensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	178
4) <i>Exiguobacterium homiense</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	180
5) <i>Marinobacter koreensis</i> sp. nov., isolated from sea sand in Korea	181
6) <i>Arenimonas donghaensis</i> gen. nov. sp. nov., isolated from seashore sand	183

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	186
제1절 연구개발 목표 달성도	186
제2절 관련분야 기술발전예의 기여도	187
1. 기술적 측면	187
2. 경제 · 산업적 측면	187
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	188
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	190
제 7 장 참고문헌	191

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

미생물은 지구상의 생물다양성의 절반이상을 차지하며, 미생물 유래의 다양한 유용 효소, 항생제, 생리활성 물질 등이 산업, 농업 및 의학 분야에서 다양하게 사용되고 있다. 이러한 미생물 생산 유용 물질 개발을 위하여 일차적으로 미생물을 분리하고 배양하여 물질 활성 탐색을 하는 것이 필수적인 과정이다. 그러나 이미 많은 유용물질의 발견으로 인하여 기존방법에 의한 물질탐색은 기지물질의 재 발견에 의한 시간, 노력 비용이 가중되고 있으며 우수한 신규 물질의 발견은 감소되고 있다. 지구상에서 배양할 수 있는 미생물종은 극히 일부분인 1%에 지나지 않으며 나머지 99%의 미생물은 아직까지 미 발견된 상태로 자연상에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 최근, 난 배양성 미생물을 포함한 다양한 환경시료로부터 추출한 유전체로 구축한 library를 이용한 metagenome 기술이 개발되어 신규성 항생제 및 유용 효소에 연관된 유전자 탐색이 높은 효율로 가능하게 되었다. 특히, 생촉매제인 lipase/esterase, protease, amylase, cellulase 등 신규구조의 유전자들이 metagenome library로부터 분리 되고 있으며 자연환경내의 난 배양미생물들의 유전체 DNA를 이용하여 발현되는 단백질을 탐색할 수 있게 되었다. 또한 16S rDNA를 이용하여 미생물의 다양성 분석도 가능하게 되어 기존보다 많은 유용 미생물의 활용과 다양한 효소개발에 박차를 가할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

본 연구에서는 다양한 환경토양 DNA로부터 구축된 metagenome library로부터 Abiotic 과 biotic 관련 metagenome clone을 이용하여 관련 유전자를 분리하고 분자구조를 해석하여 유전자 발현 활성영역의 발현과 특성을 분자생물학과 생화학적 기술로 구명하고 선발한 유전자의 기능성 효율을 증진하고자 하는 것을 목적으로 하였다.

2. 연구개발의 필요성

생명공학은 인류생활을 깨끗한 환경에서 풍요로운 삶을 영위하기 위하여 식량, 보건의료, 환경, 에너지 등에 직접, 간접으로 작용하여 왔다. 일찍부터 동식물에 의한 농업생산에서 근년에 이르러 미생물을 이용한 발효산업에 이르기까지 항생물질과 같은 의약품, 장류, 주류, 효소, 아미노산, 핵산, 비타민 등과 같은 발효공업이 발달되었

고 최근에는 유전공학기술의 발달에 의해 생명공학이 고부가가치 산업으로써 비약적인 발전을 거듭하고 있다.

발효공업에서는 자연계에서 유용한 미생물이나 세포주를 분리하여 돌연변이나 유전자조작에 의한 분자생물학적 수단을 이용하여 육종하기도 하고 공정개량 등에 의한 생산기술을 발달시키기도 한다. 이러한 유용한 물질을 생산하거나 생물반응에 이용되는 미생물 균주 및 세포주는 끊임없이 자연계에서 탐색, 분리하거나 개량 육종한 후 사용하거나 보존하면서 활용하여야 한다. 그러나 아직도 자연계에는 탐색되지 않은 생물자원이 무진장 존재하는데 새로운 탐색계를 개발하여 이러한 유용자원을 찾아야 할 필요성이 기하급수적으로 증가하고 있다.

원핵세균 (Prokaryotes)과는 다른 고세균 (Archaea) 미생물 군집이 있다는 보고이후 특수한 환경내에서 서식하는 미생물군집들은 대부분의 선발배지를 이용하여 인공적으로 배양하기 어렵다는 것을 알게 되었다. 이에 따라서 지금까지 많은 배양기술들이 개발되었지만 현재의 기술로 배양가능한 미생물은 겨우 1% 미만에 지나지 않는다. 나머지 99%에 해당하는 난 배양 미생물 군집은 생태학적으로나 산업적으로 더욱 중요하리라고 생각되며 이에 대한 돌파구로서 현재 개발·추진되고 있는 분자생태학적 기술들은 자연계에 존재하는 수많은 미생물들을 직접 배양하지 않으면서도, 배양이 불가능하였던 희귀 미생물의 존재 및 다양성에 대한 연구를 가능케 하였다.

1998년 위스콘신 대학의 Handelsman에 의해 배양기술을 이용하지 않은 미생물 군집 구조 분석방법인 metagenome 법이 개발되기에 이르렀고 이 metagenome 방법을 이용하면 토양속의 모든 난 배양미생물들의 염색체 DNA를 100 kb 이상이 되게 추출하여 BAC vector에 클로닝 한 후 발현되는 단백질들을 screening할 수 있게 되었으며 또한 16S rDNA를 이용하여 미생물 다양성 (diversity) 분석도 가능하게 되었다. 또한 생물다양성 생성기술이 진보함에 따라 빠른 속도로 우리가 원하는 효소의 역가 (activity), 안정성 (stability), 생산성 (availability)이 개량된 클론을 찾는 방법을 확립하는 것이 중요한 문제가 되었으나 이러한 문제들도 *in vitro* evolution 방법으로 해결할 수가 있게 되었다

가. 기술적 측면

- 미생물은 지구상의 생물다양성 절반이상을 차지하며, 현재 사용하고 있는 의약품의 대부분이 미생물이 생산하는 물질에서 유래한 것임.
- 세계적인 미생물 산업 국가로서의 위상을 확보하기 위해서는 신규 효소, 항생제, 생리활성 물질, 향장 소재 등의 고속 대량 탐색이 필수적임.
- 국내 미생물 산업 분야는 그 동안 선진국의 기술개발에 크게 의존하는 후진성을

면치 못하여 왔으나, 최근에 개발된 난배양 미생물 유전자 확보기술, 거대 유전자를 클로닝 할 수 있는 BAC vector 이용 등의 기술을 적용하여 새로운 도약을 할 수 있는 여건이 조성되고 있음.

○ 화학적으로 합성된 농약, 비료와 정화시설 등을 환경 친화적인 생물학적 방법으로 대체하려는 것이 전 세계적인 추세임.

나. 경제·산업적 측면

○ 국내의 의약, 식품, 농업, 축산업, 환경 등의 시장에서 사용 중인 생리활성물질은 대부분 거액의 기술 사용료를 지불하고 있는 상태임.

○ 특히 미생물의 다양한 기능에 관여된 신물질 탐색 연구의 과급 효과는 단지 탐색으로 그치는 것이 아니라 생물화학, 분자생물학, 세포생물학, 약리학 등의 기초학문 및 의약업, 농업, 환경, 식품, 화학공업 등의 응용 분야로의 과급 효과가 지대함

○ 1994년도의 조사에 의하면 전 세계의 surfactant 시장 규모만 연간 94억 달러이며, 20세기의 막바지에는 수요가 35% 증가할 것으로 예상되었음.

다. 사회·문화적 측면

○ 현재 미생물 관련 산업은 모두 배양이 가능한 미생물로부터 나온 산물 또는 미생물 자체를 이용한 것으로 아직까지 발굴되지 않은 99%의 미생물 자원을 확보하고 활용할 수 있는 연구가 시급한 실정임.

○ 미생물을 이용한 산업은 고부가가치의 환경 친화적 산업으로 우리나라와 같이 자원 빈약국에 적합한 사업임.

제2절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 목표

- DNA library 구축, 분석 및 이용
- 난배양성 미생물 자원을 확보하여 이들로부터 신규 유용유전자 발굴
- 고생산성 재조합 유전자 발현 시스템의 개발
- 토양 eDNA의 세균 다양성 및 분포 해석

2. 연구개발의 내용 및 범위

목 표	연구 개발 내용 및 범위
1. eDNA을 이용한 유전자 탐색 및 발현 효율 증진	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 농경지 오염토양 및 염류 집적지 토양시료 채취 ○ eDNA 대상 균체집적 및 DNA 분리법 확립 ○ eDNA library 구축기술 확립 ○ High Throughput Screening system개발 ○ Biotic & abiotic 스트레스 유전자 선발 ○ Biotic & abiotic 유전자의 분자구조 해석 동정 ○ 발현증진을 위한 host system 개발 ○ 발현에 따른 기능성 효율증진 여부 조사 ○ 발현산물에 대한 기능성 역가 검정
2. 토양 DNA의 세균 다양성 및 분포해석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 농경지 오염토양 및 염류 집적지 토양시료 채취 ○ 저영양배지(PYGV 등)를 이용한 배양 가능한 세균의 분리 최대화 ○ 세균의 다양성확보에 의한 미생물 자원의 보전 ○ 16S rRNA를 이용한 토양세균의 다양성 분석 ○ 16S rRNA에 의한 계통학적인 위치분석 ○ 분자생물학적인 방법으로 토양 우점종의 분석 ○ 배양 가능한 세균과의 비교분석 ○ 특이기능을 가진 토양 DNA clone의 16S rRNA를 이용한 계통발생학적 위치 규명 ○ 16S rRNA이외의 gene을 이용한 계통발생학적 위치 해석 ○ 선발된 clone의 분류학적 위치 해석
3. 유전자 기능 활성 영역 분리 동정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항균성 효소 유전자 분리 및 분자구조 비교분석 ○ Biotic & abiotic stress관련 eDNA clone의 유전자 활성영역 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> transposon mutagenesis법에 의한 mutant pool 제작 - Tn 삽입 clone의 생물검정 - 활성 negative Tn mutant 선발 및 유전자 확인 - target-기능관련 유전자 영역 cloning ○ Biotic & Abiotic 유전자의 분자구조 해석 동정 ○ 유전자 활성영역의 재조합체 구축 및 발현양상 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외의 기술개발 현황

- 생물다양성보전협약 발효 등으로 국가간의 생물자원 및 유전자원의 확보경쟁은 더욱 치열해지고 있으며, 선진국의 경우 체계적인 협동연구를 통한 연구활동이 매우 활발히 진행중임.
- 자연계의 미생물 중 약 99% 이상을 차지하는 배양 불가능한 미생물에 대한 산업적 연구는 아직은 전세계적으로 미진한 단계임. 외국의 경우 미국의 DIVERSA사 등이 전세계의 토양 등을 대상으로 난배양 미생물 유전자 탐색을 통한 산업화를 추진중이며, 이중 일부 유전자 (예, phytase)는 이미 상업화를 한 상태임. 난배양 미생물의 유전체를 확보하는 기술로 2000년에 미국의 위스콘신대 연구팀이 개발한 bacterial artificial chromosome을 이용하는 방법이 있으나, 전세계적으로 아직 초보단계임.
- 1995년에 미국의 유전체연구소 (TIGR)에 의해 생물체로서는 최초로 세균의 일종인 *Haemophilus influenzae* 유전체의 분석이 완료된 이후에 현재까지 42개 미생물 유전체 분석이 완료되었고, 현재 연구가 진행중인 것은 158 종류에 이르고 있음. 선두주자인 미국이외에도 유럽, 일본 등의 선진국과 중국, 브라질 등의 후발 국가도 미생물 유전체 연구분야에 앞 다투어 진출하고 있음.

2. 국내의 기술개발 현황

- Non-ribosomal peptides 생합성 대사의 주요소인 peptide synthetase의 다양한 인위적 변환기술을 통한 비천연 신기능 펩타이드의 창출 연구를 명지대에서 수행하고 있음.
- 선진국의 경우 미생물 유전체를 중점적으로 분석하는 기관을 중심으로 대규모의 연구가 진행 중임. 미국의 TIGR, 워싱턴대 유전체센터, 에너지부 유전체센터 등이 대표적이며 이들 유전체 센터와 학계, 산업계 사이의 연계를 통한 활발한 연구가 진행 중임. 에너지부의 경우 단 1달 만에 15개의 미생물 유전체를 분석하는 대규모의 연구를 진행 중임. 우리나라의 경우 미생물 유전체를 위한 전문 기관이 전무한 상태임.
- 국내의 경우 유전체학을 기반으로 한 미생물의 유전체 발현연구 (microarray) 및 프로테옴 연구 등은 전무한 상황으로 2002년 생명공학연구원 주도로 메타제놈을 이용한 유용유전체 뉴프린티어 연구사업을 시작하였음.
- 농촌진흥청 산하 농업생명공학연구원에서는 2002년부터 난 배양미생물의 신규 유전자를 분리하기 위하여 전국의 시험포장 중 작물병 발생이 심하였던 토양을 중심으

로 샘플을 채취하여 55개 토양 및 작물 근권으로부터 4,571 균주를 분리하여 보존하고 있으며 이중 강력한 항균력을 가진 균주 260여 균주도 이미 선발하여 특성검정을 마친 상태이고 농업 오염토양에서 채취한 토양으로부터 직접 난 배양미생물의 거대 DNA 분리에도 성공, fosmid library를 2.8×10^5 제작하여 보존하고 있음.

3. 앞으로의 전망

○ 전세계적으로 균주특허, 배양특허, 물질특허, 공정특허 등의 특허를 통하여 자국 및 자사의 기술에 대하여 보호정책을 펴고 있고, 특히 미생물의 배양 및 제제화 기술은 특허에 의한 법적보호와 know-how에 의한 기술보호 중에서 유리한 방법을 선택할 정도로 신중을 기하고 있음.

○ 외국에서 도입된 유용미생물들은 우리나라의 환경에 정착하는데 많은 문제점이 있음. 따라서 그 효과가 뚜렷한 토착미생물을 이용한 미생물제제의 개발이 보다 실용적이고 경제적인.

○ 1%미만의 인공배양이 되는 미생물 자원으로부터 신 기능성 유전자 및 물질 탐색에는 많은 한계가 있음

○ 현재 세계시장에서 미생물 제품으로 citric acid (40만톤 14억불), MSG (100만톤 13억불), 라이신 (60 만톤 9 억불) 등이 생산되고 있으며, 290억불의 항생제 시장에서 cephalosporins 계만 약 93억불의 시장을 형성하고 있음. 유전자 재조합 미생물 발현 시스템을 이용한 대표적인 제품으로 EPO (29억불), 인간 성장호르몬 (11억불), 인터페론 (10억불) 등이 있음. 이외에 전세계 효소 시장은 연간 약 1조 6천억원 규모이며 이중 상당수가 미생물로부터 유래된 것임. 국내의 효소 시장의 경우 대부분 외국의 기업에 지배되고 있으며 세제용 프로테아제의 경우 국내 시장만 100억원을 상 회하는 실정임.

○ 2010년 생명공학산업의 세계시장규모가 약 2,000억\$로 추정되며 그중 상당 부분이 미생물 관련 제품 일 것으로 예상됨. 미생물 분야는 선진국과의 기술 격차가 크지 않고, 그 자원이 우리나라 고유의 것으로 외국의 원천 기술 특허를 피하고 세계적인 경쟁에서 충분히 살아남을 수 있는 가능성이 있음.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 토양 거대 DNA의 분리법 확립 및 메타제놈은행 구축

1. 토양 시료의 채취 및 특성 검정

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

생태계가 비교적 잘 보존되어 있어 높은 생물다양성을 가지는 우포늪과 무제치늪 그리고 환경정화능력을 가진 서해안 갯벌, 유류오염 지역을 대상으로 미생물과 토양 DNA의 다양성을 분석하고 메타제놈 은행을 구축, 새로운 biotic과 abiotic 스트레스 관련 유전자를 포함한 토양 DNA와 특별한 기능을 가진 다양한 미생물 확보를 위하여 토양 시료 채취하고 그 특성을 검정하였다.

2) 연구방법

가) 토양 시료의 채취

(1) 국내 농경지 오염 토양, 생태계 보존지역 및 염류 집적지 토양시료 채취

경상남도 창녕에 있는 우포늪에서 최상층의 토양을 제거하고 표면으로부터 5 cm의 깊이에 있는 토양을 채취하였으며 경상남도 정족산 정산 부근에 위치한 무제치늪에서 10 cm 깊이의 토양을 채취하였다. 또한 서해안 대부도의 갯벌과 전라북도 임실군 소재의 고추밭 토양을 채취하였다. 모든 토양은 같은 지역 내에서 반복수를 두어 3~6개의 시료를 채취하여 혼합하였다. 채취된 시료는 냉장상태를 유지하여 최대한 빠른 시간 내에 처리하였다.

(2) 유류 유출 오염 토양 시료 채취

유조선으로부터 유출된 기름으로 오염되었던 경상북도 포항시 대보항, 호미곶 일원, 울산광역시 간절곶 일원 등지에서 표면으로부터 10~30 cm의 깊이에 있는 토양을 500 g 이상 채취하였다. 또한 미군기지에서 유출된 기름으로 오염되었던 강원도 원주의 절골마을 인근 농수로 옆 논토양과 원주천 하천 토양을 각각 표면으로부터 10~30 cm의 깊이에 있는 토양을 각각 500 g 이상 채취하였다. 모든 토양은 같은 지역 내에서 반복수를 두어 3~6개의 시료를 채취하여 혼합하였다. 채취된 시료는 냉장상태를 유지하여 최대한 빠른 시간 내에 처리하였다.

나) 토양 시료의 특성 검정

각각의 토양 pH 측정은 풍건세토 10 g을 100 ml의 비커에 취하고 증류수 50 ml를 가하여 30분간 진탕 후 pH meter로 pH를 측정하였다. 토성분석의 경우 토양시료를 분리하여 모래, 미사, 점토의 함량을 구하고, 그 함량비에 따른 토성 (soil textural class)명을 결정하는 방법으로 미국농무성법에 따라서 토성을 결정하였다. 전체 질소함량측정은 토양 시료를 취하여 Kjeldahl tube에 넣고 분해 촉진제와 진한 황산을 넣은 후 380°C에서 가열한 후 Kjeldahl 증류 적정장치 (Kjeldahl Auto 1030 Analyzer)를 이용하여 측정하였다. 유기물 분석은 도가니에 토양을 넣고 회화로에서 600°C로 가열하여 유기물함량을 측정하는 Weight Loss-On-Ignition (회화법)방법으로 분석하였다. 또한 대부도 시료와 원주 농경지 토양은 토양의 화학성 분석을 위해 60°C건조기에서 48시간 건조하여 각각의 pH, 전기전도도(EC), 유기물함량, 전체 질소량과 인산량, 양이온 분석을 수행하였다.

나. 연구 결과

1) 토양시료 채취 결과

국내 농경지 오염 토양으로 전라북도 임실군 소재의 고추탄저병 발 토양, 생태계 보존지역으로 경상남도 창녕에 있는 우포늪과 경상남도 정족산 정상 부근에 위치한 무제치늪 그리고 염류 집적지 토양으로 서해안의 대부도와 제부도 등지에서 토양을 채취하였다. 또한 유조선으로부터 유출된 기름으로 오염되었던 경상북도 포항시 대보항, 호미곶 일원, 울산광역시 간절곶 일원 등지 그리고 미군기지에서 유출된 기름으로 오염되었던 강원도 원주의 절골마을 인근 농수로 옆 논토양과 원주천 하천 토양을 각각 채취하였고 이들 토양은 같은 지역 내에서 반복수를 두어 3~6개의 시료를 채취하여 혼합하였다. 채취된 시료는 냉장상태를 유지하여 최대한 빠른 시간 내에 처리하였다. 채취한 토양의 위치와 특성은 Table 1-1에 나타내었다.

2) 토양시료 분석 결과

고추탄저병 발 토양의 경우 토성은 사질 식양토로서 pH는 중성이며 우리나라 일반 밭 토양의 유기물 함량 2-3%보다 많은 편으로 일반적인 밭 토양의 성질을 갖고 있다. 대부도 토양은 갯벌토양으로서 토성은 양토이지만 일반적인 비옥한 양토의 성질이 아니고 유기물 함량이 극히 적고 조개껍질 등의 석회성분으로 약 알칼리성을 나타내었다. 우포와 무제치 토양은 우리나라 대표적 늪 토양으로서 토성 분류에 따라서 우포는 식양토, 무제치는 식토이며 pH는 유기물이 부식화 되면서 생성되는 humic acid와 fulvic acid 등의 영향과 부식물의 카르복실기 (-COOH), 수산기 (-OH)등의 영향으로 우포는 약산성, 무제치는 강산성을 나타내며, 특히 무제치는 습

윤한 기후 하에 배수 불량한 지대에서 유기물을 모재로 하여 발달한 이탄토의 성질을 나타내었다 (Table 1-2).

또한 동해안 유류 오염 해안지의 경우는 굵은 모래 토양으로 구성되어 있어 유기물 함량이나 양이온 함량이 극히 적어 토양화학 분석에 적절치 않다고 판단되어 토양 화학 분석에는 사용하지 않았다.

서해안 갯벌 토양 (대부도 시료)의 경우는 대체적으로 입자가 매우 작은 점토 토양으로 되어 있어 전기전도도 (EC) 수치와 유기물 함량, 전체 질소와 인산양, 양이온 보유함량에서 내륙 농경지인 원주시료에 비해 월등히 그 수치가 높음을 보였다. pH에서도 갯벌 토양이 주로 알칼리성인데 비해 내륙 농경지는 산성에 가까웠다 (Table 1-3).

Table 1-1. Characteristics of soils sampled

Sources	Location	Depth	Properties
우포늪	경상남도 창원시	5~10 cm	생태계보존
무제치늪	경상남도 정족산 정상 부근	5~10 cm	생태계보존
고추밭 토양	전라남도 임실군	5~10 cm	탄저균오염
서해안 갯벌	경기도 안산시 대부도동	15~30 cm	염류집적지
대보항, 호미곶	경상북도 포항시 남구 대보면	10~20 cm	기름유출 (환경정화)
간절곶	경상남도 울산시	10~20 cm	기름유출 (환경정화)
원주 농경지	강원도 원주시 태장2동 농경지	15~20 cm	기름유출 (환경정화)

Table 1-2. Chemical and physical characteristics of soils (group I)

samples	pH	sand	clay	silt	soil texture	T-N	유기물분 석
			%			%	%
Crop soil (Hot pepper)	6.48	50.7	26.3	23.0	sandy clay loam	0.06	5.25
Upo wetland	5.41	34.3	27.6	38.1	clay loam	0.10	6.33
Daebudo	7.95	36.5	14.8	48.7	loam	0.01	0.64
Mujechi bog	3.62	9.5	61.0	29.5	clay	0.14	43.00

Table 1-3. Chemical and physical characteristics of soils (group II)

Samples	pH	EC	유기물 (g/kg)	T-N (%)	P2O5 (mg/kg)	K Ca Mg Na			
						(cmol/kg)			
대부도 1	8.73	3.87	9.40	0.06	100.2	1.47	2.81	2.68	7.97
대부도 2	7.18	9.88	7.40	0.05	87.7	1.19	2.99	10.54	23.32
대부도 3	8.59	4.17	8.50	0.07	114.9	1.69	3.55	2.23	11.26
대부도 4	8.61	3.89	15.30	0.12	29.9	0.88	5.39	5.37	5.95
대부도 5	7.25	3.50	26.90	0.19	42.9	1.90	10.96	12.81	19.38
원주 1	5.64	1.34	0.35	0.07	32.08	0.57	3.81	0.36	0.27
원주 2	5.61	2.00	0.75	0.15	38.07	0.55	5.13	0.48	0.25
원주 3	6.38	1.11	0.06	0.01	43.16	0.52	1.16	0.06	0.18

2. 토양 거대 DNA 분리법 확립

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

양질의 메타제놈 은행을 구축, 새로운 biotic과 abiotic 스트레스 관련 유전자를 포함한 다양한 토양 DNA를 확보하기 위하여서는 각각의 토양 시료의 특성에 맞는 분리법 확립이 중요하다. 무엇보다도 humic compound를 포함한 유기물 성분의 제거와 다양한 미생물 유전자가 포함될 수 있는 추출법, 그리고 유용한 유전자를 모두 발굴해 낼 수 있는 충분한 크기의 DNA가 확보되어야 한다. 본 실험은 이런 모든 요건을 충족하는 토양 거대 DNA를 다양한 특성을 가지는 토양 시료로부터 추출, 정제하는 방법을 확립하기 위하여 수행되었다.

2) 연구방법

가) 토양시료로부터 균체집적 및 전처리

채취한 토양시료 5 g을 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)로 현탁한 후 거르로 한번 걸러주어서 큰 불순물을 제거하고 1,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 염류나 기타 다른 불순물 등을 제거하기 위하여 이를 13,000 rpm에서 30분간 원심분리, 침전물을 100 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)으로 현탁한 후 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 침전물을 얻었다.

나) 토양시료의 동결건조 여부에 따른 DNA 추출

위에서 전처리한 토양시료를 하룻밤 동결건조한 것과 동결건조하지 않은 것 각각 5 g씩에 13.5 ml의 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM sodium phosphate, pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide [CTAB])을 넣고 현탁한 후 proteinase K (10 mg ml^{-1}) 100 μl 를 첨가하여 37°C 회전배양기에서 30분 동안 반응한 다음 20% SDS 1.5 ml를 첨가하여 65°C에서 2시간 동안 교반하면서 lysis시켰다. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 모아서 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1, v/v)을 첨가하여 혼합한 후에 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하고 0.6배의 isopropanol을 넣어 1시간 동안 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 상등액은 버리고 70% ethanol로 DNA를 세척한 후 500 μl 의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하여 실험에 사용하였다.

다) 토양 DNA 추출법 비교

효율적인 lysis 과정을 통한 gram-positive bacteria와 fungi 등을 포함하는 다양한 토양 미생물의 DNA를 얻기 위하여 우포늪 토양을 사용하여 3가지의 lysis 방법을 비교하는 실험을 수행하였다.

(1) SDS 방법 (Method I)

5 g의 토양 시료를 13.5 ml의 완충용액 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide [CTAB])에 넣고 현탁한 후 proteinase K(10 mg ml⁻¹) 100 µl를 첨가하여 37°C 배양기에서 30분 동안 shaking한 다음 20% SDS 1.5 ml를 첨가하여 65°C에서 2시간동안 교반하면서 lysis시켰다. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 모아서 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1, v/v)을 첨가하여 혼합한 후에 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하고 0.6배의 isopropanol을 넣어 1시간 동안 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 상등액은 버리고 70% ethanol로 DNA를 세척한 후 500 µl의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하여 실험에 사용하였다.

(2) Freezing-thawing-SDS 방법 (Method II)

토양 시료를 -70°C에서 10분간 동결시킨 다음 다시 전자레인지에서 살짝 끓을 때까지 열을 가하는 과정을 3번 반복하였다. 그런 다음 위의 SDS 방법에서와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다.

(3) Bead-beating-SDS 방법 (Method III)

토양 시료를 glass and ceramic bead (Mobio Laboratory Inc., Solana beach, CA, USA) 15 g이 포함된 extraction 용액에 첨가하였다. 이를 Genies vortex (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) 위에서 2,300 rpm의 속도로 10분간 상온에서 반응시킨 후 다시 위의 SDS 방법에서와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다.

(4) Bead-beating 속도에 따른 DNA의 추출 효과

우포 토양을 Genies vortex (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) 위에서 0, 800, 1400, 2300 그리고 3200 rpm의 속도로 각각 추출하였다.

라) 토양 DNA 정제법 비교

메타제놈 은행 구축이나 유전자 다양성 분석을 저해하는 humic compound 등의 물질을 제거하기 위하여 추출된 DNA를 정제하는 5가지 방법들을 비교 실험하였다.

5 g의 토양으로부터 추출한 crude DNA를 다섯 등분으로 나누어 각각의 방법들에 적용하였고 최종 부피는 원래의 부피와 동일하게 되도록 한 후 비교하였다.

(1) Single column 방법- 추출한 crude DNA를 extraction resin이 포함된 Quiagen minicolumn (Quiagen Inc., Valencia, CA, USA)에 통과시켰다.

(2) Double column 방법- single column을 통과한 1차 용출액을 다시 새 resin이 포함된 minicolumn에 통과시켰다.

(3) Gel plus column 방법- 추출한 crude DNA를 agarose gel에 전기영동한 다음 DNA band 부분을 잘라내어 녹인 후 Quiagen minicolumn에 통과시켰다.

(4) Gel plus centricon 방법- 추출한 crude DNA를 agarose gel에 전기영동한 다음 DNA band 부분을 잘라내어 녹인 후 Gelase (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)로 처리하였다. 그런 다음 DNA를 Centricon-100 (Amicon Corp., Beverly, MA, USA)으로 농축하였다.

(5) Gel plus gel plus centricon 방법- 추출한 crude DNA를 agarose gel에 전기영동한 다음 DNA band 부분을 잘라낸 조각을 다시 agarose gel에 전기영동하였다. DNA band 부분을 다시 잘라내어 gelase로 처리한 다음 DNA를 Centricon-100으로 농축하였다.

마) 분리한 토양 DNA의 정제도 측정

(1) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 분석

분리한 DNA 용액을 1% SeaPlaque GTG agarose gel (Cambrex Inc. USA) 상에서 loading한 후 CHEF-DR[®] III apparatus (Bio-Rad, USA) pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)로 6 V/cm, 16°C, 5 to 15 s의 interval time으로 0.5×TBE buffer에서 16시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 30분간 염색한 후 UV illuminator 상에서 관찰하였다.

(2) 제한 효소 처리

KpnI, *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* 그리고 *XbaI* 등의 제한효소를 0.2 µg의 정제한 DNA에 처리하여 14시간 동안 반응 시킨 후 1% agarose gel에 전기영동하였다.

(3) 16S rRNA gene의 증폭

Universal primers (fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and rP2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하여 16S rRNA gene을 증폭하였다. 각 PCR tube에 총 50 μ l의 양이 되도록 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM MgCl₂, and 0.01% gelatin, 10 mM dNTPs, 2.5 U Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan)과 1 μ M primer 및 4 ng과 40 ng DNA를 혼합하였다. PCR은 PTC 225 thermocycler (MJ Research inc., Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, PCR 반응조건은 최초 94°C에서 4분, 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 2분간 총 35회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 8분간 반응 시킨 후 반응액을 5 μ l를 취하여 1.5%의 agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide에 20분간 염색하고 UV illuminator상에서 관찰하였다.

나. 연구 결과

1) 토양 DNA 추출

가) 토양시료의 동결건조 여부에 따른 DNA 추출

전처리한 토양시료를 하룻밤 동결건조한 것과 동결건조하지 않은 것 각각 5 g씩에 완충용액을 넣고 proteinase K와 SDS를 첨가하여 lysis한 후 토양 DNA를 추출한 결과 CHEF로 분리된 DNA의 크기를 비교하였을 때, 동결건조하지 않은 토양으로부터 분리한 DNA는 23 kb이하가 많은 반면 동결건조한 토양으로부터의 DNA는 90 kb 이상인 것들이 많았다 (Fig. 1-1). 이는 냉장온도나 실온에서 DNase 등에 의해 다양한 미생물의 chromosomal DNA들이 시간이 지남에 따라 분해가 일어나 작은 크기의 DNA로 변화되는 것으로 사료되었다. 특히 냉장온도에서 생기는 수분에 의해 DNA가 더 많이 분해되는 것으로 판단되었다. 따라서 토양시료 채취하여 3주 이상 보관하지 않고 바로 전처리를 실시한 후 -70°C에서 동결건조를 하여 수분을 모두 제거한 후 DNA를 추출, 분리하는 것이 메타제놈 은행 제작에 적합한 것으로 나타났다.

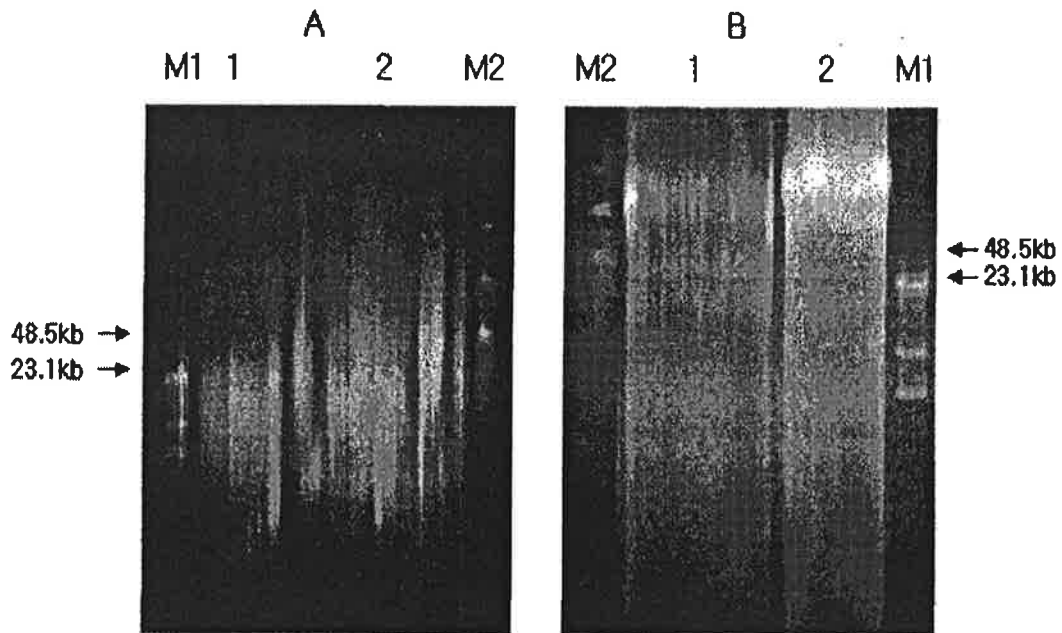


Fig.1-1. Comparison of size of crude DNA subjected to different treatment. A, crude eDNA extracted from non-treated soils; B, crude eDNA extracted from freeze-dried soils; M1, *HindIII*-cut bacteriophage lambda molecular size marker; M2, low range PFG marker: 1, Daebudo; 2, Upo.

나) 추출 방법에 따른 DNA 분리 비교

Humic compound는 미생물 DNA를 포함하는 토양에서 같이 추출되어 회색하지 않은 추출물의 1 μ l에 의해서도 DNA의 효소반응을 저해할 수 있다. 특히 토양에서 추출되는 DNA와 비교하였을 때 size와 charge 특징이 유사하고 갈색을 나타낸다. 이런 성질 때문에 humic compound가 덜 오염된 crude DNA분리 방법이 metagenome library를 만드는데 필수적이다. 또한 일반적인 방법으로는 잘 분리되지 않는 gram positive bacteria에서도 DNA가 효과적으로 분리될 수 있도록 하기 위하여 여러 가지 lysis 방법을 수행하였다. 위에서 언급한 CTAB, SDS 및 proteinase K가 포함된 extraction buffer를 사용하는 chemical lysis 방법과 ceramic & silica bead를 이용하여 lysis 시키는 방법, 마지막으로 freezing-thaw를 접목 시키는 방법을 사용하여 humic compound의 오염도와 purity 등을 비교하였다.

Humic compound는 230 nm와 260 nm에서 흡광도를 나타내기 때문에 260/230 ratio를 조사함으로써 오염도를 알 수 있다. 높은 260/230 ratio (>2)는 pure DNA를, 낮은 ratio는 humic acid 오염을 나타낸다. 그리고 높은 260/280 ratio (>1.7)는 pure DNA를, 낮은 ratio는 protein 오염을 나타낸다. DNA extraction method를 비교하였을 때 (Table 1-4), bead beating-SDS method로 추출한 DNA가 높은 260/230ratio와 260/280 ratio를 나타내어 humic compound의 오염이 가장 적은 것으로 나타났다. Freezing-thaw의 경우 microwave에서의 약한 가열과 65°C에서 SDS에서 처리하는 과정에서 humic compound의 추출이 많이 일어나는 것으로 판단되었다.

추출된 DNA의 크기 분포와 수율에 대하여 pulsed field electrophoresis로 전기영동하여 DNA extraction 방법을 비교한 결과 (Fig. 1-2), Bead-beating을 이용한 추출방법은 DNA shearing이 적게 일어나 40~70 kb의 크기로 분포하고 다른 방법에 비해서 많은 양의 DNA가 추출되는 것을 알 수 있었다. 반면 freezing-thaw-SDS method의 경우 같은 5 g 토양에서 가장 적은 양의 DNA가 분리되었고 크기도 15~25 kb 정도로 분포하여 DNA의 shearing (깨어지는 현상)도 가장 많이 일어난 것을 볼 수 있었다. Smalla 등 (1993)에 의하면 bead-beating을 약하게 하더라도 freeze-thawing 방법과 SDS만을 사용한 chemical 방법보다는 bead-beating 방법의 한 수율이 가장 높다고 보고하였고 본 실험의 결과와 일치하였다. Van Elsas 등 (1997)의 보고에 의하면 강한 bead-beater 처리가 더 많은 DNA shearing을 일으키지만 DNA 추출 수율은 가장 높고 이렇게 생긴 작은 DNA 조각들이 검출 감도에 영향을 주어 polymerase chain reaction amplification을 가능하지 못하게 한다고 하였다. 그러나 우리의 결과는 bead-beating-SDS 방법으로 큰 분자의 DNA를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

이는 bead-beating 속도에 따라 달라질 수 있는 것으로 사료되어 bead beating-SDS method을 사용하여 DNA shearing을 보다 더 줄이기 위해

bead-beating 속도를 달리하여 비교 실험하였다 (Fig. 1-3). 각각의 우포늪 토양 5 g 으로부터 Genie사의 vortex를 사용하여 속도별로 처리하여 DNA를 추출한 결과 최대속도 (3,200 rpm)에서는 가장 높은 DNA 수율을 얻을 수 있었지만 20~40 kb 정도의 DNA로 shearing이 일어나는 것을 볼 수 있었다. 반면에 vortex 속도 3 (1,400 rpm)에서 심각한 shearing 없이 50~90 kb 크기의 DNA를 얻을 수 있었다.

따라서 추출 DNA의 사용 동결건조한 토양을 Bead-beating-SDS 방법을 사용하여 vortex 속도 4로 하여 DNA를 extraction하는 방법이 DNA의 양, 크기, 순도 그리고 다양성을 높이는 데 좋은 것으로 사료되었다.

Table 1-4. Comparison of purity of the crude DNA extracted from Upo wetland soil using various extraction procedures

Lysis Method	A_{260}/A_{230} Ratio*	A_{260}/A_{280} Ratio*
SDS (Method I)	1.10	1.20
Freezing-thaw-SDS (Method II)	0.81	1.13
Bead beating-SDS (Method III)	1.47	1.32

*The ratios were calculated based on spectrophotometric measurements.

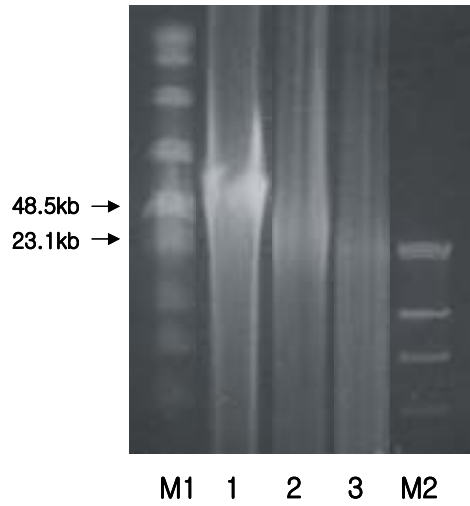


Fig. 1-2. Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from Upo wetland soil by different lysis methods. Lanes: M1, Low range PFG marker; 1, DNA extracted by Bead+SDS; 2, DNA extracted with SDS; 3, DNA extracted by freezing+SDS; M2, *Hind*III-cut bacteriophage lambda molecular size marker.

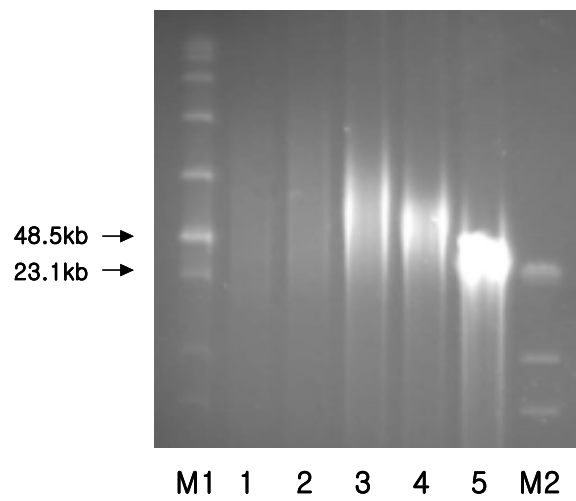


Fig. 1-3. Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from Upo wetland soil by different bead beating speed. Lanes: M1,Low range PFG marker; 1,beating speed of 0; 2,beating speed of 2; 3,beating speed of 4; 4,beating speed of 7; 5,beating speed of maximum; M2,*Hind*III-cut bacteriophage lambda molecular ize marker.

다) 정제 방법에 따른 DNA 분리 비교

Cesium chloride (CsCl) density gradient ultracentrifugation, chromatography, electrophoresis, dialysis, filtration 등의 여러 가지 정제 방법에 관한 연구가 진행되어 왔지만 한 가지 정제 단계로는 토양에 존재하는 모든 오염물질을 완전히 제거하기 어렵다. 따라서 본 실험에서는 제한효소 절단과 PCR 증폭 등에 효과적인 DNA가 되도록 순도를 높이기 위한 몇 가지 정제단계를 혼합한 방법들을 비교 실험 하였다. 시료는 우포늪 토양으로부터 추출한 crude DNA를 사용하였으며 다섯 가지 정제 방법에 대하여 제한효소 절단 양상과 PCR 증폭 양상을 관찰하였다.

Table 1-5에서 보는 바와 같이 사용된 모든 제한효소는 crude DNA를 절단하지 못하였고, single column 과정을 거친 DNA는 *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*에 의해서만 부분적으로 절단되는 양상을 나타내었으며 double column 과정을 거친 DNA는 *KpnI*, *HindIII*, *EcoRI*에 의해서는 부분적으로 절단, *BamHI*과 *XbaI*에 의해서는 완전히 절단되었다. Gel-plus-centricon 정제 방법과 gel-plus-gel-plus-centricon 정제 방법의 경우 *HindIII*와 *XbaI*에 의해서는 부분적으로 절단 되었고 나머지 효소에 의해서는 완전히 절단되었다. 모든 제한효소에 의해 완전히 절단되는 양상으로 보아 가장 순도가 높은 DNA는 gel-plus-column 방법에 의해 정제되는 것을 알 수 있었다.

다섯 가지 정제방법에 의한 DNA 회수율에 대한 비교는 Fig. 1-4에 나타내었다. Single column 하나를 사용한 것 보다는 두개를 사용하면 DNA의 회수가 줄어들었고, 가장 높은 회수율과 DNA shearing이 최소한으로 일어난 방법은 gel-plus-centricon에 의한 것으로 나타났다. Gel-plus-column 방법은 gel-plus-centricon 방법보다는 회수율이 좀 더 낮은 것으로 나타났다. 이런 결과는 Zhou 등에 의한 gel-plus-column 방법으로 순수한 DNA를 얻을 수 있고 gel-plus-centricon 방법으로는 가장 많은 DNA를 회수율을 나타낸다는 보고와 일치하였다. 따라서 gel-plus-gel-plus-centricon 정제 방법이 많은 노력과 시간이 소모되므로, 제한효소 절단과 PCR 증폭 등에 효과적인 DNA를 얻기 위하여는 gel-plus-column 정제 방법이 가장 적합할 것으로 사료되었다.

정제한 DNA에 대한 16S rRNA gene의 PCR 증폭은 다섯 가지 방법에 의해 모두 가능한 것으로 나타났지만 crude DNA 자체는 PCR 증폭 결과가 나타나지 않았다. Kuske 등 (1998)은 정제된 DNA의 양이 PCR 검출 감도에 가장 높은 영향을 나타낸다고 보고하였다. 그러나 우리의 결과는 DNA의 양은 PCR에 크게 영향을 미치지 않고 humic compound와 다른 오염물질이 충분히 제거되어야 하는 것으로 나타났다. 또한 다양한 유기물 성분을 포함하는 4개의 토양 시료를 gel-plus-column 방법으로 정제하여 PCR 증폭 양상을 분석하였다. 그 결과 (Fig. 1-5) 43%의 유기물 성분을 포함한 무제치 늪지에서 분리한 DNA를 제외하고는 모든 시료에서 PCR 증폭이 일어났다. 무제치 늪지의 토양은 고분자의 검은 humic acid가 많이 포함되어있고 그것

의 크기와 전하의 특성이 DNA와 유사하기 때문에 정제단계에서 humic compound 가 같이 정제되며 이런 물질들은 gel-plus-column 정제 방법으로도 모두 제거되지 못하는 것으로 판단되었다. 따라서 humic acid 제거를 위한 반복적인 단계를 거치는 등의 추가된 정제 방법이 필요할 것으로 사료되었다.

Table 1-5. The patterns of enzyme digestion from the Upo wetland by different purification methods

Purification method	Digestion by:				
	<i>KpnI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>XbaI</i>
Crude DNA	- ^a	-	-	-	-
Single column	-	-	±	±	±
Double column	± ^b	±	±	+	+
Gel+Column	+ ^c	+	+	+	+
Gel+Centricon	+	±	+	+	±
Gel+Gel+centricon	+	±	+	+	±

^aEnzyme digestion not possible.

^bDNA was only partially digested by enzyme.

^cDNA was completely digested by enzyme.

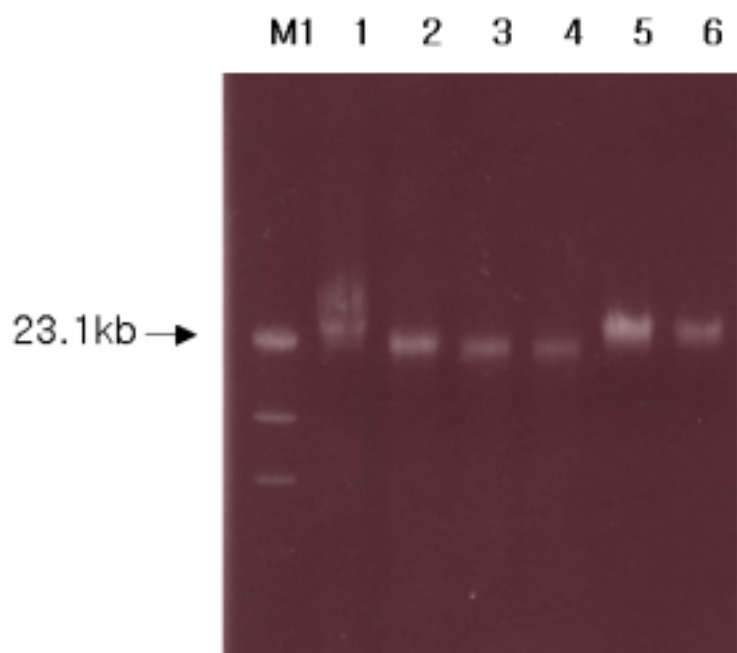


Fig. 1-4. Agarose gel electrophoresis of total DNA from Upo soil by different purification methods. Lanes: M1, *Hind*III-cut bacteriophage lambda molecular size marker; 1, crude DNA; 2, DNA purified with single column; 3, DNA purified with double column; 4, DNA purified with gel-plus-column; 5, DNA purified with gel-plus-centricon; 6, DNA purified with gel-plus-gel-plus-centricon.

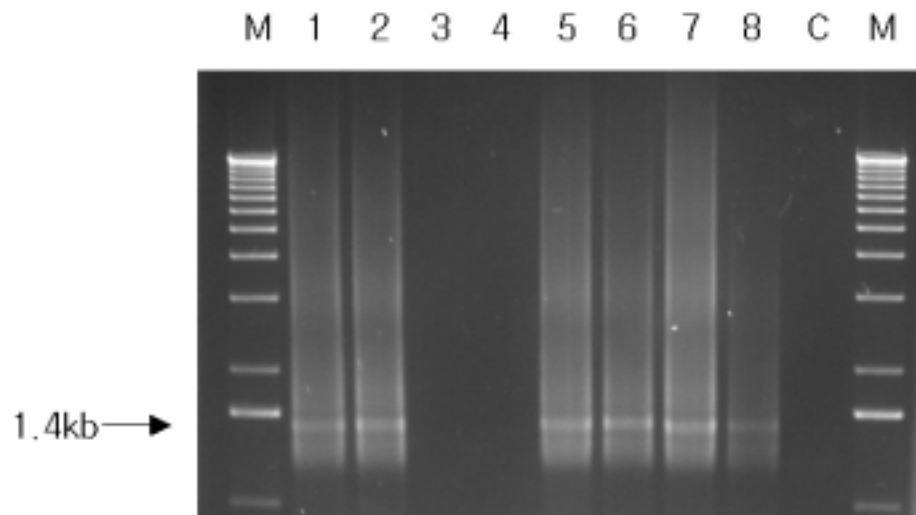


Fig. 1-5. Agarose gel electrophoresis of 16S rRNA amplification products from DNA samples of four soils purified by gel-plus-column procedure. Lanes: M, 1 kb ladder; 1 and 2, 40 μ g and 4 ng DNA purified from Upo wetland; 3 and 4, 40 μ g and 4 ng DNA purified from Mujechi bog; 5 and 6, 40 μ g and 4 ng DNA purified from Daebudo; 7 and 8, 40 μ g and 4 ng DNA purified from crop soil; C, reaction mixture only without DNA template.

3. 메타제놈 은행 구축

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

생물다양성을 가지는 환경보존지역과 유류오염지역 등 여러 시료로부터 토양 DNA의 다양성을 분석하고 새로운 biotic과 abiotic 스트레스 관련 유전자를 분리하기 위하여 다양한 메타제놈 은행 작성 방법들을 이용하였다. 이용된 주된 메타제놈 은행 작성용 운반체는 cosmid, fosmid, λZAP 등으로 다양한 토양시료에 대하여 각각의 운반체를 사용하여 메타제놈 은행을 작성하였다. 그리고 작성된 메타제놈 은행의 효율과 다양성을 조사하기 위하여 일부 클론들을 선발하여 제한효소 절단하여 그 양상을 분석하였다.

2) 연구방법

가) 메타제놈 은행 제작

(1) Cosmid library 제작

토양 시료로부터 정제한 DNA는 적당량의 *Sau3AI* 제한효소를 사용하여 부분절단하여 사용하였다. 동량의 DNA와 반응완충액이 담긴 1.5 ml tube들을 만든 다음 *Sau3AI*을 첫 tube에 10 unit 첨가한 후, 1/2배수로 점차 희석시켜 일련의 반응용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 각각의 절단된 DNA를 0.8% agarose gel에 100 voltage에서 40분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV illuminator 상에서 확인하고 40 kb 이상의 DNA를 포함하는 agarose block 만을 자른 다음 agarase 효소를 넣어 1시간동안 반응시킨 후 70°C에서 10분간 agarase를 비활성화시켰다. 여기에 ethanol로 침전, 세척하여 순수한 DNA를 분리하여 준비하였다. SuperCos 1 vector는 *XbaI*/*CIAP*/*BamHI* 제한 효소로 자른후 *Sau3AI*으로 부분절단된 DNA와 16°C에서 16시간 ligation 반응시켰다.

(2) Fosmid library 제작

토양 시료로부터 정제한 DNA 25 µl (5 µg)에 5 unit의 T4 polymerase (Takara Co.)와 2 unit T4 polynucleotide kinase (Takara Co.) 그리고 6 units의 Klenow fragment (Takara Co.)를 가한 후 반응액량을 50 µl로 조절한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 DNA의 말단을 평활화하였다. 반응이 끝난 후 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 섞은 다음 10분간 원심분리하고 상등액을 모아서 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v)을 첨가하

여 혼합한 후에 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 만을 취하고 2.5배의 100% ethanol을 넣어 1시간 동안 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 상등액은 버리고 70% ethanol로 DNA를 세척하여 DNA를 준비하였다. EpiFOS fosmid vector (Epicentre, USA)에 end-repaired DNA를 첨가하여 16°C에서 16시간 ligation 반응시켰다.

(3) λZAP library 제작

토양 시료로부터 정제한 DNA는 적당량의 *Sau3AI* 제한효소를 사용하여 부분 절단하여 사용하였다. 동량의 DNA와 반응완충액이 담긴 1.5 ml tube들을 만든 다음 *Sau3AI*을 첫 tube에 10 unit 첨가한 후, 1/2배수로 점차 희석시켜 일련의 반응용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 각각의 절단된 DNA를 0.8% agarose gel에 100 voltage에서 40분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV illuminator 상에서 확인하고 2~13 kb의 DNA를 포함하는 agarose block 만을 자른 다음 Qiagen gel elution kit (Qiagen사)를 이용하여 분리하였다. λZAP express vector에 *Sau3AI*으로 부분 절단된 DNA와 16°C에서 16시간 ligation 반응시켰다.

(4) *In vitro* packaging

16°C에서 16시간 반응한 시료들을 70°C에서 10분간 열처리하여 ligase 효소를 불활성화시켰다. Ligation한 반응액 7.5 μl에 MAX lambda packaging extracts kit (Epicentre, USA)의 extracts 25 μl를 넣어 pipette을 사용해 공기방울이 생기지 않게 조심스레 섞어 준 다음 30°C에서 1시간 30분간 반응시켰다. 여기에 다시 extracts 25 μl를 넣어 pipette을 사용해 공기방울이 생기지 않게 조심스레 섞어 준 다음 30°C에서 1시간 30분간 반응시켜 *in vitro* packaging을 수행하였다. SM 완충용액을 1 ml 첨가하여 위아래로 잘 섞어 준 다음 여기에 25 μl의 chloroform을 넣어 다시 packaging 되지 않은 물질들을 불활성화 시켰다. 원심분리를 조심스럽게 하여 정지한 다음 4°C에 보관하였고 상등액을 대장균에 형질전환하여 library로 사용하였다.

(5) 대장균 형질전환 및 메타제놈은행의 효율 검정

형질전환용 대장균은 cosmid의 경우 MR, fosmid의 경우 Epi100, λZAP의 경우 MRF'를 이용하였다. Cosmid와 fosmid의 경우에는 위에서 만들어진 각종의 library 10 μl를 미리 제조한 형질전환용 대장균에 40 μl에 첨가하고 실온에서 30분간 정치한 다음 LB 1ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 shaking하여 배양하였다. 이를 kanamycin (50 μg ml⁻¹)이나 ampicillin (50 μg ml⁻¹)이 들어간 LB 고체 배지에 도말하여 재조합된 colony 만을 이용하였다. λZAP의 경우 제조한 library 5 μl를 MRF' 200 μl에 넣어 37°C에서 15분간 반응 시킨 다음 NZY soft agar에 첨가하여 NZY 고체 배지위에

증층하고 형성된 plaque를 이용하였다.

그리고 작성된 library가 제대로 만들어 졌는지 확인하기 위하여 제작된 library 중 10개씩의 clone을 무작위로 선발하여 plasmid를 추출하고, 이 중 5 μ l의 DNA를 제한효소로 처리하여 37°C에서 2시간 반응 처리하였고, 이를 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 절단 양상을 관찰하였다.

나. 연구 결과

1) 메타제놈 은행 제작

많은 미생물이 생산하는 유용물질이나 이차대사 산물의 경우 관련된 유전자와 생산 유전자가 30 kb 이상의 cluster를 형성하는 등의 대단히 큰 크기를 나타낸다. 이는 메타제놈 연구를 하는데 있어 100 kb 이상의 큰 insert까지 포함할 수 있는 vector가 필요하다는 것을 나타낸다 (Handelsman 등, 1998). 대개의 경우 BAC (bacterial artificial chromosomes) vector를 이용하는데 위의 실험결과에서와 같이 일단 DNA가 물에 녹거나 유전자 조작을 거치게 되면 40 kb이하의 크기로 분해가 되는 것을 알 수 있다. 이런 경우 본 연구의 시료와 같이 humic acid가 많이 포함된 우포나 무제치늪처럼 정제 시 많은 처리 단계가 필요한 경우 BAC vector를 사용하기에는 무리가 있다. 또한 BAC vector의 경우 copy number의 수도 적기 때문에 유용한 물질을 검색하기에 적합하지 않은 것으로 사료되었다. 또한 유용한 산업용 효소나 산물 등은 대장균에서의 발현이 상당히 어려운 것으로 보고되어있다. 따라서 본 연구에서는 40 kb 정도의 insert 크기를 요구하고 BAC vector에 비하여 copy number가 많은 cosmid 와 fosmid vector를 이용하였고, plaque 등의 형성으로 대장균을 파괴하여 유용물질의 검출이 가능한 λ ZAP vector도 이용하여 메타제놈 은행을 제작하였다.

우포늪 library의 경우 다른 토양에서보다 많은 클론 수를 나타내었고 cosmid library도 110,000개의 클론 수를 나타내었다 (Table 1-6). 이런 결과는 다양한 생물종을 포함하는 우포 토양에서 분리한 DNA가 다른 토양 보다 많은 양으로 분리될 수 있고 또한 큰 DNA가 분리되는 것에 기인하는 것으로 판단되었다. 대부도에서 분리한 토양 DNA의 metagenomic library는 1,100,000개 정도의 클론을 가지고 있지만 이중 대부분이 λ ZAP library이다. 이는 적은 DNA 양이라도 2-13 kb 정도의 크기로 줄어들게 되면 library를 만들 수 있는 적당한 양이 될 수 있으며 그만큼 효율이 늘어나게 된다. 그러나 대부도의 fosmid library의 경우 이미 DNA 정제 단계에서 40 kb 이하의 크기로 shearing이 발생했으며 대부도 갯벌토양의 특성상 염농도가 높아 분리되는 양이 적기 때문에 100,000개 정도의 clone을 얻을 수 있었다. 이런 현상은 울산의 호미곶의 바닷가 토양과 비슷한 library 효율을 나타내었으며 무제치 토양의

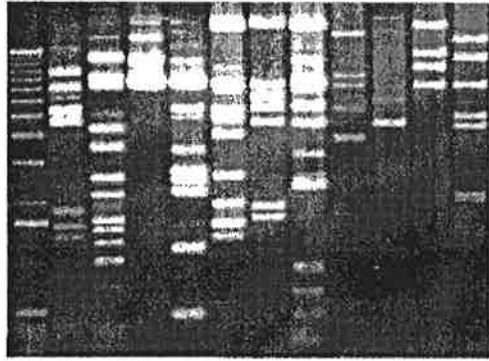
경우 많은 humic compound 등의 유기물 함량으로 인해 순수한 DNA 분리에 어려운 점이 있어 cosmid library 제조에는 어려움이 있었으며 fosmid library의 경우 400,000개의 효율을 나타내었다.

제작된 메타제놈 은행의 다양성과 제작 효율을 보기 위하여 무작위로 선발한 다수의 클론을 제한효소로 절단 하여 전기영동 한 결과 cosmid와 fosmid library의 경우 대부분이 약 40 kb 정도의 삽입된 단편의 크기를 나타내었고 서로 중복되는 클론이 없이 양질의 library가 만들어진 것을 확인하였다 (Fig. 1-6). λ ZAP library의 경우 13 kb 정도의 크기들 이외에 5 kb 이하의 단편들도 상당수 들어간 것으로 보였고 이는 비교적 작은 단백질 크기를 나타내는 효소 등을 암호화하는 유전자들을 검색하는 데에 무리가 없을 것으로 사료되었다.

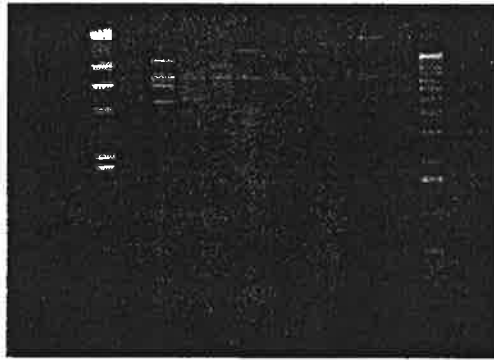
Table 1-6. Molecular characteristics of the libraries constructed from soils

Library	Source	Vector	Insert size	Bacterial host	Efficiency
SJ1	Daebudo	λ ZAP	2-13 kb	<i>E.coli</i> (MRF')	1.0×10^6
SJ2	Daebudo	fosmid	30-40 kb	<i>E.coli</i> (EPI)	1.0×10^5
SJ3	Upo wetland	λ ZAP	2-13 kb	<i>E.coli</i> (MRF')	1.25×10^6
SJ4	Upo wetland	fosmid	20-40 kb	<i>E.coli</i> (EPI)	1.0×10^6
SJ5	Upo wetland	cosmid	>40 kb	<i>E.coli</i> (MR)	1.1×10^5
SJ6	Mujechi bog	fosmid	>20kb	<i>E.coli</i> (EPI)	4.0×10^5
SJ7	Wonju	fosmid	>20kb	<i>E.coli</i> (EPI)	1.25×10^5
SJ8	Homi cape	fosmid	>20kb	<i>E.coli</i> (EPI)	1.5×10^5
SJ9	Crop soil	cosmid	>40kb	<i>E.coli</i> (MR)	1.5×10^5

A



B



C

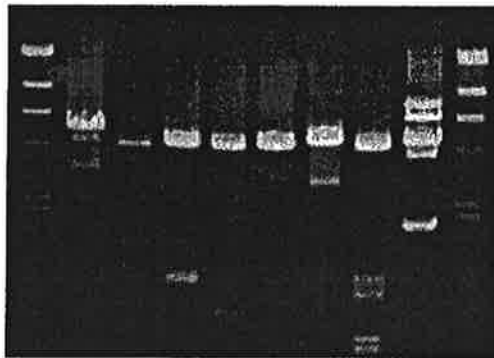


Fig. 1-6. Restriction profile of random clones of metagenomic library constructed A, Cosmid library; B, fosmid library; C, λ ZAP library.

제2절 메타제놈 은행으로부터 biotic 및 abiotic stress 관련 유전자 선발

1. 식물 병원균 세포벽 분해 관련 chitinase 유전자 선발

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

Biotic 스트레스는 생물체에 의한 스트레스로써 일반적으로 병원균 및 해충에 대한 자극에 의한 스트레스를 말할 수 있다. 농업에서는 병해충에 대한 피해가 농작물 피해의 절반이상을 차지하고 이를 대처하기위한 많은 농약, 저항성 작물개발, 경종적 체제 개선 등 많은 방제방법을 연구 하게 되었다. Chitinase, glucanase 는 곰팡이 세포벽 분해효소로서 그 유전자들이 분리 되고 병 저항성 작물개발을 위한 유전자로서 이용된 바 있다. 따라서 곰팡이에 대해 용균효과가 있는 것으로 보고된 바 있는 chitinase를 여러 가지 high-throughput 시스템을 이용한 다양한 방법으로 metagenome library를 검색하였다.

2) 연구방법

가) 식물병원균에 대한 항균효소 chitinase 생성 clone 탐색

(1) Colloidal chitin 배지를 이용한 검색

Fosmid library와 cosmid library는 384well plate에 chloramphenicol ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)과 ampicillin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 각각 첨가된 freezing-LB 액체배지 (6.3 g K_2HPO_4 , 1.8 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.9 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 44 ml glycerol, 25 g LB, 1 L 증류수)를 분주하고 작성된 유전자 은행의 clone들을 접종하였다. 37°C에서 하루 배양한 후 이를 -80°C에 넣어 보관하였고 필요시에 꺼내어 37°C에서 활성화시킨 후 검색에 이용하였다. Chitinase 검색은 96 well replica pin을 이용하여 1% (w/v) wet colloidal chitin을 기질로 첨가한 고체 LB배지에 재접종한 후 28°C에서 5일 이상 배양하여 clear zone을 형성하는 clone을 검색하였다. 습윤한 상태의 colloidal chitin의 조제는 Lockwood 방법을 변형하여 조제하였다. Chitin (Sigma, St. Louis, USA) 40 g을 진한 염산 400 ml을 가하여 50°C에서 2시간 교반시킨 다음 4°C의 증류수 1 liter를 첨가한 후 침전물을 pH가 5가 될 때 까지 증류수로 세척하여 사용하였다.

(2) MUF-chitin analogue substrate를 이용한 검색

Chitin analogue인 MUF-NAG(4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide), MUF-diNAG (4-methyl umbelliferyl β-D-N,N'-diacetylchitobioside), MUF-triNAG (4-methylumbelliferyl β-D-N,N'-diacetylchitotrioside) 중에 exochitinase, endochitinase, chitobiosidase가 모두 분해 가능한 MUF-diNAG를 기질로 하여 metagenomic library를 검색하는 방법을 선택하였다 (Table 2-1). 또한 *E. coli* 숙주에서의 MUF-chitin analogue에 대한 발현정도를 선행 실험하였다. MR, EPI, DH5α, AG1, NM554 균주를 각각 96 well plate에서 배양시킨 후 MUF-diNAG를 50 μM을 첨가하여 28°C에서 하루 배양 후 형광여부를 관찰하였다.

Fosmid library는 chloramphenicol (12.5 μg ml⁻¹)이 첨가된 액체 LB배지 120 μl에 접종하여 37°C에서 16시간 정치 배양 후 각각의 cell 용액 30 ul를 취하여 LB배지 90 ul가 들어있는 96 well plate에 분주하고 37°C에서 16시간 동안 정치 배양한다. 그 후 100 mM sodium phosphate buffer로 MUF-diNAG를 희석하여 10 mM로 만들어 총 140 μl의 볼륨에 50 μM로 만들어 28°C에서 3~4일간 반응시켜 활성여부를 판단하였다. 그 후 강한 활성을 나타내는 클론을 선발해 다시 chloramphenicol (12.5 μg ml⁻¹)이 첨가된 freezing-LB 50 ml를 28°C, 37°C의 두 실험 군으로 배양하고, 10% ammonium sulfate를 배양액에 첨가하여 잘 섞어준 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 단백질을 회수하여 dH₂O로 희석한 후 같은 방법으로 MUF-diNAG을 이용해 활성을 확인하였다.

(3) Fosmid DNA 추출

Chloramphenicol (12.5 μg ml⁻¹)이 첨가된 LB 500 ml에 클론을 37°C에서 16시간 배양 후 Large Construct Kit (Cat. No. 12462, QIAGEN)을 이용해 추출한 후 TE buffer를 이용해 DNA를 희석하였다. 그 후 LE Agarose Gel (BMA)에 전기 영동하여 DNA의 질과 농도를 확인하였다.

(4) Transposon 삽입 변이체 제작

선발된 Fosmid Library에 대해 chitinase 활성 유전자 영역을 찾아내기 위하여, Target DNA 0.2 μg으로 하여 *in vitro*에서 transposon (EZ::TNTM <KAN-2>Insertion Kit, EPICENTRE Tech.)을 삽입시켰다 (Fig. 2-1). 그 후 Competent Cell을 이용해 Electroporator (Voltage 1,250V, Resistor 125 Ω, Electrocell Manipulator, BTX)을 사용하여 형질 전환하여 kanamycin (50 μg ml⁻¹)이 첨가된 LB배지에 도말하여 16시간동안 배양하여 colony를 얻어 MUF-diNAG 로 반응시

켜 발색반응이 일어나지 않는 클론을 선발하였다.

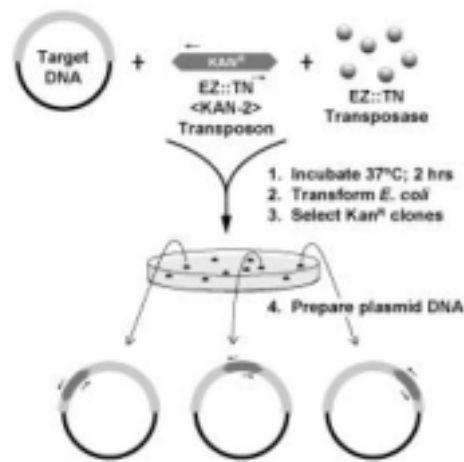


Fig. 2-1. Method of EZ::TN<KAN-2>Transposon insertion

(5) TAIL-PCR

TAIL-PCR을 실행하기 위한 primer는 KANF-seq-1 (5'-AATC ACCAACTGGTCCACCT-3')을 사용하였고, PCR 반응 용액은 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Gelatin, 100 ng prime, 50 ng Template DNA, 200 μm dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 및 2.5 unit Taq polymerase (Promega)를 사용하고 전체 반응 volume은 50 μl로 하였다. PTC-200 (MJ. Research) PCR 기기를 이용하였고, DNA 변성을 위하여 94°C에서 5분, 그 후 DNA 변성은 94°C에서 15초, annealing 온도는 55°C에서 15초, 30초 동안 DNA를 합성하여 30 Cycle 을 실행하고, 94°C에서 15초, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초를 다시 30 Cycle 마지막으로 94°C에서 15초, 55°C에서 15초 72°C에서 2분을 30 Cycle 실행 후 8°C에서 보관하였고, sequencing 을 위한 primer 로는 KAN-2FP(5'-ACCTACAACAAAG CTCTCATCAACC-3')을 사용하였다.

(6) 길항력 검정 (BIO-Assay)

분리된 chitinase 활성의 metagenome clone의 식물병원진균에 대한 균사억제 능을 조사하기 위하여 고추탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 키다리병균 (*Fusarium moniliforme*), 붉은 곰팡이병 (*Fusarium graminearum*), 도열병균 (*Magnaporthe*

grisea)을 농업과학기술원 식물병리과 에서 분양받아 사용하였다. 위 곰팡이를 chlorempenicol $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 를 포함하는 PDA (Potato Dextrose, DIFCO)배지 중앙에 접종하여 25°C 에서 직경 3 cm까지 균사를 성장시켰다. Chitinase 활성을 보유한 *E. coli* clone을 28°C 에서 액체배양 하여 배양된 세포현탁액을 paper disk (ADVANTEC)에 흡수 하여 곰팡이 균사 말단에 일정한 간격으로 올려 28°C 에서 배양하여 균사생장여부를 확인 하였다.

(7) Chitinase 영역의 subcloning

*Sau3A1*을 10% glycerol로 희석하여 $0.1 \text{ unit } \mu\text{l}^{-1}$, $0.2 \text{ unit } \mu\text{l}^{-1}$, $0.3 \text{ unit } \mu\text{l}^{-1}$, $0.4 \text{ unit } \mu\text{l}^{-1}$ 으로 37°C 에서 10분간 partial digestion 후 가장 적당히 처리된 농도를 선택해 9~6, 6~4 kb의 부분을 추출 (QIAGEN Qia quick gel extraction kit cat. no. 28704)하여 pUC18BamHI/BAP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)에 ligation 후 EPI100TM-T1^RPhage T1-resistant *E.coli* plating strain (EPICENTRE)을 competent Cell(EPI)로 하여 형질전환한 후 X-Gal (50 mg ml^{-1} , Promega)을 포함한 LB ampicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) 배지에 도말한 후 16시간 동안 37°C 에서 배양하였다. 그 후 생성된 클론을 MUF-diNAG로 확인 한 후 선발된 클론을 LB ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 5 ml에 16시간동안 37°C , 250rpm에서 16시간동안 진탕 배양하여 plasmid를 추출 (Wizard Plus SV Minipreps. DNA Purification System, Promega)해 TE Buffer로 DNA를 희석한 후 LE Agarose Gel (BMA)에 영동하여 DNA의 질과 농도를 확인하였다.

(8) 염기서열분석

Deletion mutant 제작에서 형성된 colony내의 삽입 DNA의 deletion 여부를 확인하기 위하여 M13 M4 (GTTTTCCAGTCAC GAC) 와 M13 RV (CAGGAAACAGCTATGAC)를 사용하여 PCR (polymerase Chain Reaction) 증폭하고 agarose gel에 전기 영동하였다. 전기 영동상에서 다양한 크기의 DNA절편을 비교확인 하여 크기 구별로 deletion mutant를 선발 하였다. PCR 반응 용액은 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin, 100 ng primer, 50 ng Template DNA, 200 μM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 및 2.5 unit Taq polymerase (Promega)를 사용하고 전체 반응 volume은 50 μl 로 하였다. PTC-200 (MJ. Research)의 PCR 기기를 이용하였고, DNA변성을 위하여 94°C 에서

4분간, 그 후 DNA 변성은 94°C에서 1분, annealing 온도는 60°C에서 1분, DNA 합성은 72°C에서 3분을 30 Cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분 동안 하였다.

Deletion mutant들의 염기서열분석은 각 deletion clone을 DNA sequencing kit인 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems)로 반응하여 ABI3700 automated sequencer (PE Applied Biosystems)로 염기서열 분석을 실시하였다. 각 deletion mutant의 염기서열 정보의 contig연결은 DNA star의 Seqman을 사용하였다. 염기서열의 상동성 비교는 인터넷에서 제공하는 Blast 유전자 상동성 검색을 사용하여 실시하였다.

(9) *E. coli*에서의 유전자 발현 및 세포구획별 단백질 분리, 분석

pUCH33, pUCH4, pUCH1 plasmid를 보유하는 *E. coli*를 50 ml의 LB 액체배지에서 37°C에서 overnight culture 하였다. 각각의 세균세포를 6000 rpm에서 원심분리하였다. 배양여액을 수거 하여 membrane filter로 걸러 세균을 완전히 제거 하여 단백질 분리 시료로 사용 하였다. 한편, 침전된 세균세포로부터 periplasmic 단백질을 분리 하기 위하여 각각의 세균세포를 5 ml의 추출 buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 20% sucrose)로 잘 현탁하고 lysozyme (0.2 mg ml⁻¹)를 첨가 후 28°C에서 30분동안 방치 한 후 12,000 rpm에서 원심 분리 하였다. 원심분리 상등액을 취하여 periplasmic 단백질 분리를 위하여 사용 하였다. 배양여액과 periplasmic 구획용액으로부터 단백질을 침전하기 위하여 최종 40%로 Ammonium sulfate를 첨가하고 10분 동안 실온에 방치 하고 15,000 rpm으로 원심분리 하였다. 원심튜브에 침전물을 PBS pH 6.0 buffer에 녹여 시료로 사용 하였다. *E. coli*에서 각각 준비된 단백질을 분석하기 위하여 dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 실시하였으며 전기영동 후에 coomassie brilliant blue (CBB)에 염색하여 단백질 밴드를 관찰 하였다.

나. 연구결과

1) Chitinase활성 eDNA 탐색 및 활성영역 구명

가) Chitinase 생산 클론의 선발

Chitinase 생산 클론을 검색하기 위하여 몇가지 검색 방법으로 접근하였다. Colloidal chitin 배지를 이용한 검색에 있어서 clear zone의 형성은 배지로의 chitinase의 분비와 확산을 요구 (Matthew 등, 1999)하기 때문에 90%이상이 unculturable bacteria에서 유래한 gene으로 이루어진 메타제놈 유전자가 숙주로 *E. coli*를 사용함으로써 인한 분비체계와 맞지 않는 것으로 사료된다. 실제로 colloidal chitin 선택배지에서는 어떤 clone도 검색되지 않았다. Microtiter well을 이용한 검색 방법은 fluorescing compound가 확산으로 제거되는 것 없이 축적되어 수일동안 유지되는 장점이 있어 검색에 더 용이한 것으로 생각된다. 본 연구에서는 형광을 관찰하는 microtiter well plate 방법에서 chitin oligomer를 분해하는 클론들을 선발할 수 있었다.

Chitin analogue에는 MUF-NAG (4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide), MUF-diNAG (4-Methylumbelliferyl β -D-N, N'-diacetylchitobioside hydrate, MUF-triNAG (4-Methylumbelliferyl β -D-N, N'-diacetylchitotrioside)가 있고 각각 2당류, 3당류, 4당류의 chitin 유도체로서 4-methylumbelliferyl기가 결합되어 있는 구조를 가진다. MUF-NAG을 이용한 chitinase 탐색법은 Chitinolytic 효소가 GlcNAc saccharide부터 4-methylumbelliferone을 분해함으로써 형광을 발휘하게 됨으로 매우 신속하고 고 감도로 검출 할 수 있는 유용성이 있다. metagenome library 구축 vector인 Fosmid 경우에는 single copy의 유전자를 발현 시킴으로서 고 감도의 발현 screening법이 매우 유용하다. Chitinase는 크게 exochitinase, endochitinase, chitobiosidase로 나눌 수 있는데, 각각의 chitin analogue에 대해 다른 기질 분해 양상을 보인다 (Table 2-1). MUF-NAG에는 exochitinase만이 분해하고, exochitinase, endochitinase는 MUF-triNAG를 분해하였고, MUF-diNAG는 3가지 효소를 모두 분해하였다. 따라서 세가지 종류의 chitinolytic 효소에서 모두 분해 가능한 MUF-diNAG를 기질로 하여 metagenomic library를 검색하는 방법을 선택하였다. 또한 *E. coli* 숙주에서의 MUF-chitin analogue에 대한 발현정도를 선행 실험하였는데 그 결과 (Fig. 2-2) MR, DH5 α , AG1, NM554에서는 MUF-diNAG에 대해 형광을 나타내었고 EPI에서는 발현되지 않았다. 따라서 microtiter plate assay로 검색을 하기 위해서 EPI를 host cell로 하여 제작한 fosmid library를 주로 하여 선발하였다.

Table 2-1. MUF-substrate hydrolyzing pattern of chitinase

	Exochitinase	Endochitinase	chitobiosidase
MUF-NAG	+	-	-
MUF-diNAG	+	+	+
MUF-triNAG	+	+	-

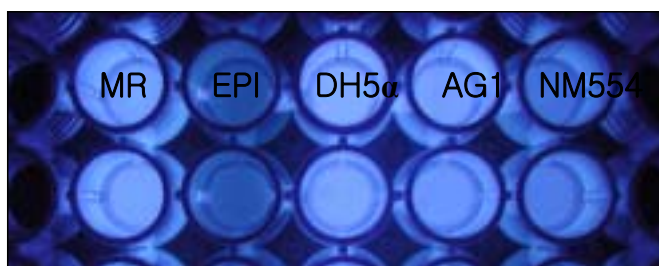


Fig. 2-2. MUF-substrate hydrolyzing pattern of host cells.

Metagenome으로부터 구축된 Table 2-2의 80,640 fosmid clone을 대상으로 MUF-diNAG 처리 결과 13 clone이 chitinase 활성이 있는 것으로 나타났다 (Table. 2-2).

Table 2-3는 chitinase 활성을 보인 metagenome clone의 MUF-diNAG에 대한 활성을 다시 정밀하게 조사한 것으로서 pF33, pHF1, pHF4 가 다른 clone에 비하여 chitinase 활성이 높은 것으로 나타나 이 3 clone을 이용한 연구가 수행 되었다.

Fig. 2-3은 여러 chitinase clone의 활성 정도를 알아보기 위하여 MUF-diNAG와 반응 24간 후에 UV lamp하에서 형광발휘의 강약에 의하여 활성 정도를 조사한 것으로서 *Serratia marcescens* 유래의 chitinase gene을 포함하는 pCH1-1 (pUC18에 Cloning)과 비교할 때, pF33의 경우에는 single copy인 fosmid 임에도 불구하고 아주 강한 활성의 chitinase 유전자를 보유하고 있을 것으로 추정되었다.

Table 2-2. Isolation of chitinase clones from different metagenome libraries

Source	Vector	Bacterial host	Screened clones	No. of clones
Daebudo	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	19,200	6
Upo wetland	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	49,920	3
Mujechi bog	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	11,520	4

Table 2-3. Degree of chitinase activity of Fosmid clone

Clone	Library source	degree of activity MUF-diNAG
pF5	Fosmid	+/-
pF9	Fosmid	+/-
pF12	Fosmid	-
pF17	Fosmid	+/-
pF32	Fosmid	+/-
pF33	Fosmid	S+++
pF51	Fosmid	+/-
pF59	Fosmid	++
pF66	Fosmid	+/-
pF77	Fosmid	+/-
pF78	Fosmid	+/-
pHF1	Fosmid	S+++
pHF4	Fosmid	S+++

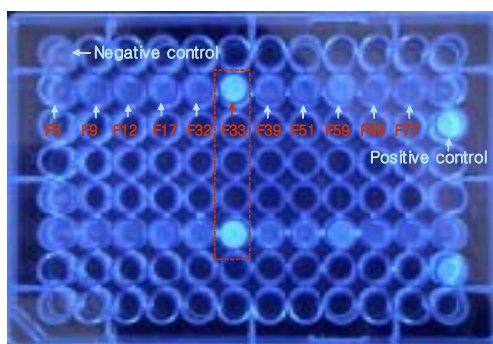


Fig. 2-3. Chitinase assay of eDNA clones by MUF-diNAG. Negative control : Fosmid vector transformed in EPI cell Positive control : Chitinase gene come from *Serratia marcescens*.

나) Chitinase 활성영역의 분리

F33은 전체 40 kb이상의 삽입 DNA절편을 포함하고 있으며 이 DNA절편 내에 chitinase 유전자가 존재할 것으로 추정되었다. 또한 진정으로 chitinase 유전자의 존재여부를 알기 위하여 transposon을 이용한 활성영역의 tagging을 실시하였다.

Transposon (KAN-2)을 pF33 plasmid에 *in vitro* 반응에 의하여 무작위 삽입시켜 *E.coli* cell에 형질 전환하여 kanamycin에서 성장하는 colony를 transposon mutant로서 선발 하였다 (Fig. 2-4).



Fig. 2-4. F33-Transposon mutants grown on kanamycin media.

선발된 transposon mutant를 MUF-diNAG가 첨가된 배양액에서 배양하여 UV lamp에서 형광발현을 하지 못하는 clone을 Chitinase 유전자영역에 Transposon이 삽입되어 불활성화 되었음을 판단하였으며 최종 MUF-diNAG를 분해하지 못하는 11개의 돌연변이체를 선발 하였다. 어떠한 유전자에 Transposon 삽입되었는지를 알아보기 위하여 TAIL-PCR을 실시하였다. 이 TAIL-PCR 산물의 염기서열은 Transposon 말단의 염기서열 primer를 이용하여 Transposon 과 인접하는 염기서열을 결정한 바 Chitobiase의 특성을 나타내는 N-acetyl -beta-hexosaminidase 유전자와 32%의 상동성을 가지고 있었다 (Fig. 2-5.). 따라서 Chitin 분해에 연관된 Chitobiase 유전자의 가능성을 시사하여 주었다.

Chitinase 유전자영역만을 분리하기 위하여 pF33 fosmid plasmid로부터 subcloning을 실시하였다. 삽입 DNA 절편을 확보하기 위하여 0.1 unit μl^{-1} , 0.2 unit μl^{-1} , 0.3 unit μl^{-1} , 0.4 unit μl^{-1} 의 *Sau3A1* 농도를 조정하여 pF33 fosmid plasmid의 partial digestion 조건을 조사하였다. 그 결과 0.4 unit μl^{-1} 가 가장 적당한 크기의 단편이 만들어 지는 것을 확인하였다 (Fig. 2-6). 그 후 9~6 kb, 6~4 kb 부분을 gel elution 하여 pUC18/BamHI/BAP 에 cloning 하여 얻어진 colony들은 MUF-diNAG와 반응하여 활성 clone을 선발 하였다. 작은 삽입 DNA 상에서 MUF-diNAG 활성을 나타내는 pUCH33, p2A8을 선발해 염기서열분석을 위한 clone으로 이용 하였다. Metagenome의 pHF1과 pHF4도 같은 과정으로 *Sau3A1* 부분절단 DNA를 agarose gel에 전기영동 한 후 gel elution하여 3에서 4 kb의 DNA 절편을 pUC18 cloning vector의 *BamHI* 부위에 삽입하고 *E. coli*에 형질전환하여 형성된 colony들은 MUF-diNAG와 반응하여 활성 clone을 선발 하여 MUF-diNAG에 대하여 강한 형광 반응을 보인 pUCH1 (pHF1으로부터 유래)과 pUCH4 (pHF1으로부터 유래)를 선발 할 수 있었다 (Fig. 2-7).

```

>gi|46190631|ref|ZP_00121291.2|
COG3525: N-acetyl-beta-hexosaminidase [Bifidobacterium longum
DJ010A]
Length = 680

Score = 46.6 bits (109), Expect = 2e-04
Identities = 26/79 (32%), Positives = 41/79 (51%), Gaps = 2/79 (2%)
Frame = +3

Query: 6  GHIERWLKHARYVHHLAECPDGFELPWG—GHSPATTLNPLDPGSIELMASLYDELLPHFT 179
          GH  L+  +  LE P+  + P+          TLN  +P S +  + L +E P F
Sbjct: 236 GHMYMNLRTREHRGLGEFPEDADRPFSFIERMEHHTLNAANPKSHDFASRLIEEYAPLFR 295

Query: 180 SKLLNVGGDEPWELGKGKS 236
           S+  N+GGDE ++LG+G+S
Sbjct: 296 SRSFNIGGDETFDLGRGRS 314

```

Fig. 2-5. Sequencing comparison between GenBank and tail PCR product.

M 1 2 3 4



Fig. 2-6. Partial digestion using the *Sau3AI*. (M, λ HindIII size marker; 1, 0.1 unit μl^{-1} ; 2, 0.2 unit μl^{-1} ; 3, 0.3 unit μl^{-1} ; 4, 0.4 unit μl^{-1}).

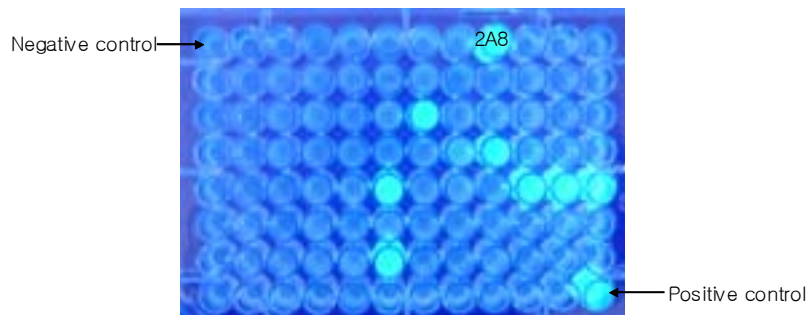


Fig. 2-7. Subcloning of metagenome clones by MUF-diNAG assay. Clone (pCH1-1) containing chitinase gene that was derived from *Serratia marcescens* was used as positive control. *E. coli* cell containing pUC18 vector was used as negative control.

Fig. 2-8은 fosmid vector (pFCH4, pFCH33, pFCH1)와 pUC18에 subcloning 된 pUCH1, pUCH4을 반응시간별로 chitinase 발현 활성을 조사한 것으로서 pUCH1과 pUCH4는 반응 6시간부터 형광발현이 시작되어 12시간 만에 뚜렷한 반응 발광을 관찰 할 수 있었다. 그러나 fosmid vector에 있는 chitinase의 경우는 32시간 후부터 발광활성이 보이 면서 48시간 후에야 뚜렷한 발광활성을 보였다. 한편 pFCH33은 fosmid에도 불구하고 24시간부터 활성 반응을 보여 다른 chitinase 유전자보다 그 활성이 높은 것으로 나타났다. 본 실험의 결과로 fosmid가 single copy로서 발현활성이 낮으나 pUC18에 subcloning된 chitinase는 다수복제로서 다량의 chitinase가 높게 발현 됨을 알 수 있었다.

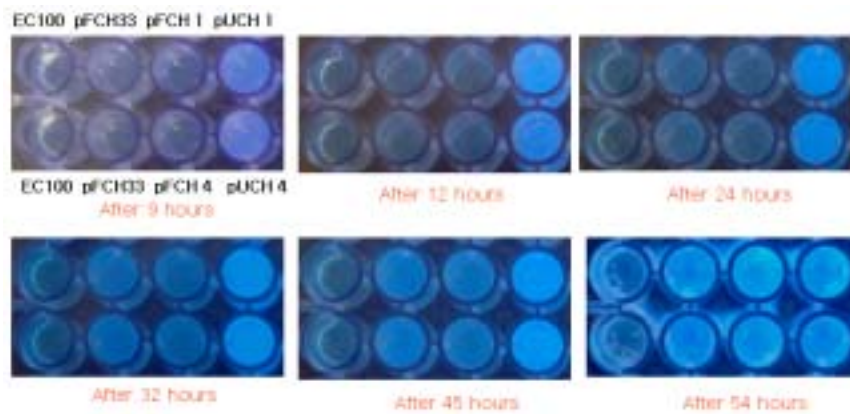


Fig. 2-8 Enzyme activity of chitinase genes cloned in different vector.

다) Chitinase 활성 eDNA clone의 식물병원진균에 대한 길항성

곰팡이는 세포벽 구성 물질로서 Chitin을 함유하는 것으로 알려져 있다(George N. Agrios Plant pathology Fourth Edition.). 따라서 본 실험에서는 Metagenome의 fosmid로부터 pUC18에 subcloning하여 발현이 향상된 pUCH33, pUCH4, pUCH1을 이용하여 식물병원진균 군사생장억제에 관여 할지를 조사하기 위하여 고추탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 키다리병균 (*Fusarium moniliforme*), 붉은 곰팡이병(*Fusarium graminearum*), 도열병균 (*Magnaporthe grisea*)을 대상으로 실험을 실시하였다 (Table 2-4).

pUCH33, pUCH4, pUCH1 모두는 *Fusarium graminearum*에 대하여 군사 억제력을 보였으나 다른 곰팡이에는 뚜렷한 군사억제력을 보이지 않았다. 그러나 pUCH33은 도열병 균에 대하여 약한 군사억제 능력을 보였다 (Fig. 2-9).

Serratia marcescens 로부터 chitinase를 분리, 동정 (Jonathan 등)하였으며 그 chitinase 유전자를 *E. coli* 에 도입하여 도열병에 대한 길항성을 조사하였으나 *E.coli*에서의 chitinase의 유전자 재조합체의 길항효과에 어려움이 있는 것으로 보고 하였다. 그러나 *Enterobacter agglomerans* 로부터 endochitinase를 code하는 *chiA*를 분리하여 염기서열을 분석하고, 염기서열을 근거로 하여 Primer로 *chiA* 유전자를 증폭하여 *E.coli*에서 과 발현시킨 결과 군사생장을 억제하는 것으로 보고하여 *E.coli* 시스템에서의 chitinase 발현가능성을 제시하였다 (Leonid, S. C., 1997). 본 연구에서는 pUC18을 사용하여 다수 copy의 plasmid를 사용하므로 발현량이 양호할 것으로 예상 되었으나 그렇지 못한 결과를 얻었다. 따라서, 본 연구의 chitinase 유전자 구조에서 promoter의 활성에서 과 발현 Vector에 비하여 단백질생산량이 낮게 발현될 가능성과 chitinase자체의 특성상 곰팡이 군사 억제를 위한 chitin 분해 특이성 결여 등을 생각해 볼 수 있었다.

Table 2-4. Antifungal activity of eDNA clones to phytopathogenic fungi

Fungal species	Antifungal activity of eDNA clones		
	pUCH33	pUCH4	pUCH1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	++	+	+
<i>Magnaporthe grisea</i>	+	±	-

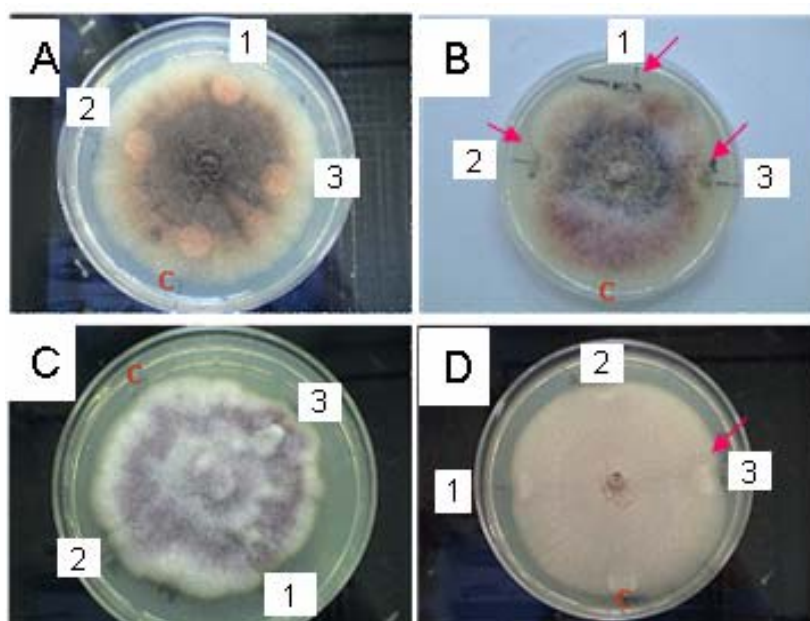


Fig. 2-9. Antifungal activity of chitinase clones to plant pathogenic fungi. A. *Colletotrichum gloeosporioides* B. *Fusarium graminearum* C. *Fusarium moniliforme* D. *Magnaporthe grisea*, 1: pUCH1, 2: pUCH4, 3:pUCH33.

라) Chitinase 활성영역의 분자구조 분석

pUCH33, pUCH4, pUCH1의 염기서열 분석을 실시 하여 chitinase 유전자 구명과 분자 구조를 조사하기 위하여 염기서열 분석을 실시하였던 결과 1927 bp의 염기서열에서 336 amino acid를 encoding 하는 1,003 bp의 Open reading frame이 검출되었다 (Fig. 2-10). PUCH33의 amino acid에 대한 상동성을 Blast 탐색으로 조사한 결과 Fig 2-11와 같이 공생균주인 배양불능세균인 *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 (Ueda 등, 2004)의 N-acetyl-beta-hexosaminidase와 44%의 상동성을 보여 주었다. pUCH33 chitinase와 보고된 chitinase 간의 상동성 비교를 실시한 결과 보통세균류에서 보고되었던 ChA, B, C, D chitinase와는 다른 계열의 chitinase와 연관 되어 있는 것으로 나타났다 (Fig. 2-12). 따라서, PUCH33 chitinase는 신규성 chitinase로서 동정 할 수 있었다.

```

1  attaccactggtcccatttcggggatccactgtgcatccgatcgatatcggtagtgttac
61  gacatcataagtcgttgcgctgcttttagctgccgccaccatgccttggcctctttgg
121 tattgaccgctatcggctttcacaaccacggtgacgcccgttccaagcagcaatc
181 gaaacctctgcgtggcaagcgcgtttggcaacaacacgctgacatgtccaatttgcac
241 ctttcaacatcatgtgtaatcgggtgtagcgttctgtactttccactcctcagcaaaaa
301 gttgcagacgctcagcgttcataatcgcaaacagccactaaatcgggctccgtgctgctga
361 catacccctttgctgagccttccctaccccgagtcggataatgcctgcgccaattgggt
421 cgctatctatgattcgaccttctgatgtgattttgataaaaatgggcgtcaattgggtcc
481 tataatgagtctatagctcatctgacctgaccatgtgaccatacccgtccaatttatgattgt
541 acgtcttctcagcacaagctataatattaccagatagatacggctctccattttgtca
601 accaactattcagcatalcttctgactatgcgaatatcgacctgcaggttgaagctgct
661 ttgatgcggcaaacgctaagtatttcttaattaatcgaccgtttcgaaggtattcatg
M
721 gattcgccccagttgctgctccccgttctcgcgaatttattgctgtccgaatctgtttat
1  D S P Q L L L P V P R N L L L S E S V Y
781 gcattgccatcgcaggcgtgctgttatcagccattccagcctcctctttgaagccaa
21  A L P S Q A L L V I S H S S L L F E A Q
841 tcgctccaatcggcaatctccaatttgccaatttaactgggacattgtggctggcaca
41  S L Q S A I S Q F A N L N W D I V A G T
901 aactatcctaataatcggagttgagcttgcacttgacgacagccaaacgcaccccgaaggc
61  N Y P N I G V E L R L D D S Q T H P E G
961 tatcaactcagcatcacttcgagtggcattaccggttaccgccaacaagccagcggcatt

```


81 Y Q L S I T S S G I T V T A K Q A S G I
102 ttctatggcgtttcaccctaaatcaactgctacagcagtatcaaacacagcttcctgt
101 F Y G V C T L N Q L L Q Q Y Q T Q L P C
108 ttgacgattgacgactggccgattttccagcgcgcggtgtcatgttgacatcagccg
121 L T I D D W P D F P A R G V M L D I S R
114 gacaaagtccaacgctgcaaacattctggacttagttgaaaagctgccacactcaaa
141 D K V P T L Q T I L D L V E K L A T L K
120 gtcaaccagcttcaactctacatggagcacaccttgcctatcgcaatcacctgatgc
161 V N Q L Q L Y M E H T F A Y R N H P D V
126 tgggcggaagccacgcccttcacaggtgaagacattcttaaactggacgctactgccgt
181 W A E A T P F T G E D I L K L D A Y C R
132 cagaatggtgctgagcttgtgcccaaccagaacagtttaggtcataccgaacgctggcta
201 Q N G V E L V P N Q N S L G H T E R W L
138 aaacatgcccgttactcatttggccgaatgccccgatggcttgaattaccttggggcgc
221 K H A R Y S F G R M P R W L R I T L G G
144 catagccctccaccacctcaatccgctcgacccggcagcatcgaactcatggcgatg
241 H S P P P P S I R S T P A A S N S W R C
150 ctttatgatgaactgctccctcatttcaccagcaagttgttgaatgtaggtggcgatgaa
261 L Y D E L L P H F T S K L L N V G G D E
156 ccttgggaactcggcaaaggcaaaagtaaatctgaggtggaagcgcgtggcgggagatt
281 P W E L G K G K S K S E V E A R G G R V
162 tatctcgaactacatcaccaactgcaccgtgaagttacggcacgcccataagatgcag
301 Y L D Y I T K L H R E V T A R G H K M Q
168 ttctggggtgatattatcggtcattatccagacttggttcccgaactgcctaaagatgtt
321 F W G D I I V H Y P D L V P E L P K D V
174 accgcatgctctggggctatgcaagacgtacaatcataaattggacgggtatggtcaca
341 T A M L W G Y A R R T I I N W T G M V T
180 tggtcagttgtgactcatagctatgataagaagactatactgaacgcccttttctc
361 W S V V T S * 366
186 aatcacatcaaaaagtcgaatcatggacacgttcaactgcgcgagcttatcgatatcgg

Fig. 2-10. Nucleotide sequence of pUCH33. Underline sequence indicates ribosomal binding sequence.

```

pUCH33 18 ESVYALPSQALLVI--SHSLLFEAQLQSAISQFA---MLNWDIVAGTNYPNIGVELRL 72
+ LP +V+ SH LL Q QSA ++ +L V + ++ V+ +
STH304 43 DQTVTLPETLWVVVLGSHDLLLPTLQRFQSAARAGITVHLTASPVGLSGELHVTVDYQ- 101

pUCH33 73 DDSQTHPEGYQLSITSSGITVTAQASGIFYGVCTInqllqyyqtqlpalcIDDWPDFPA 132
D TH +GY+L+++ GIT+ A+ +G YG+ TL QLL + I DWPDF
STH304 102 DPGITHLQGYRLTVSPDGITIGARAPAGAAYGLATLKQLLSGGREVPVAVT-IADWPDFRR 160

pUCH33 133 RGVELDISRDKVPTLQITLDLVEKLATLEVNQLQLYMENTFAYRNMPDVMAEATPFTGED 192
RGVELDISR KVPT++++ V+ LA LK+N+ QLY EHTFAYR H +VM +P TGE+
STH304 161 RGVELDISRDKVPTNESLYRFVDLLADLKINEFQLYTEHTFAYREHREVVMQAYSPTGEE 220

pUCH33 193 ILKLDAYCRQNGVELVFNQNSLGHATERMLKHARYS-FGRNPRWLRITLGGHSPPPPSIR- 250
I+ LD YCR+ ++LVPNQNS GH WL H+RY P + GG P S+
STH304 221 INLLDRYCRERFIDLVPNQNSFGHNTPLIHSRYKHMNAEAPDGFELPBGGRRNEPFLSLS 280

pUCH33 251 STPAASNSWRCLYDELLPHFTSKLLNVGGDEPVELGKGSKSEVEARG-GRUYLDYITKL 309
+ P+ + LYDELLPHFTS+ NVG DE W++G+G+S V RG VYL+ + K+
STH304 281 AEPVISIFLAGLYDELLPHFTSQYFNVGCDETWDVGGQGRSARAVAERGEHEVYLEQLLKI 340

pUCH33 310 HREVTARGHKHQFNGDIIIVHYPDLVPELPEKDVTAHLWGY 348
HR V R HQFNGDII+ YP+ V LPEKV A+ WGY
STH304 341 HRLVAERRRTHQFNGDIIIKYPEAVARLPEKDVIALEWGY 379

```

Fig. 2-11. Homology comparison between pUCH33 protein and chitinase gene of *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863.

Sequence	820	830	840	850
<i>Bacillus thuringiensis serovar sotto</i>	NDFAKSTN-PTD	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>chi D (Burkholderia gladioli)</i>	---	---	---	---
<i>chi C (Serratia marcescens)</i>	LDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>chi D (Bacillus circulans)</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>chi A (Xanthomonas sp. AK)</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>Clostridium perfringens</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
pUCH33	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>Streptomyces coelicolor A3</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	VDG	DAIDVTTRKSYVYS	ELV	LDG

Sequence	860	870	880	890	900
<i>Bacillus thuringiensis serovar sotto</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>chi D (Burkholderia gladioli)</i>	---	---	---	---	---
<i>chi C (Serratia marcescens)</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>chi D (Bacillus circulans)</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>chi A (Xanthomonas sp. AK)</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>Clostridium perfringens</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	SK	IK	IK	IK	IK
pUCH33	SK	IK	IK	IK	IK
<i>Streptomyces coelicolor A3</i>	SK	IK	IK	IK	IK
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	SK	IK	IK	IK	IK

Sequence	920	930	940	950
<i>Bacillus thuringiensis serovar sotto</i>	SL	SL	SL	SL
<i>chi D (Burkholderia gladioli)</i>	---	---	---	---
<i>chi C (Serratia marcescens)</i>	SL	SL	SL	SL
<i>chi D (Bacillus circulans)</i>	SL	SL	SL	SL
<i>chi A (Xanthomonas sp. AK)</i>	SL	SL	SL	SL
<i>Clostridium perfringens</i>	SL	SL	SL	SL
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	SL	SL	SL	SL
pUCH33	SL	SL	SL	SL
<i>Streptomyces coelicolor A3</i>	SL	SL	SL	SL
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	SL	SL	SL	SL

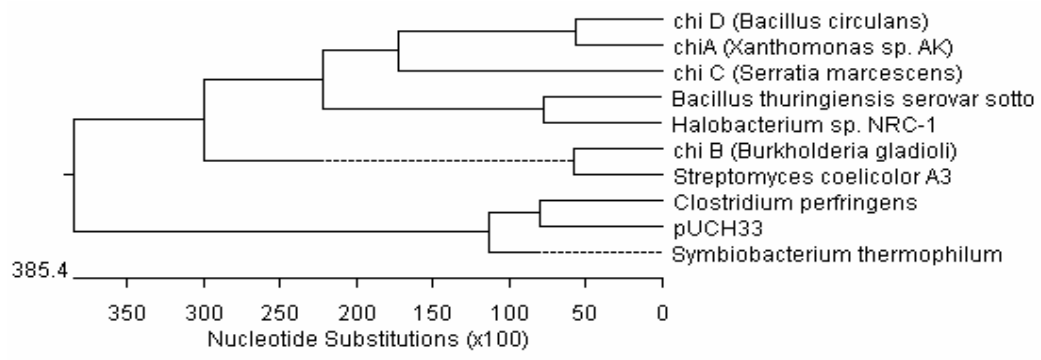


Fig. 2-12. Homology relatedness between bacterial chitinases and pUCH33 protein.

pUCH4는 3.5kb의 삽입 DNA를 포함하고 있으며 염기서열결과 3,540 bp의 염기서열이 결정 되었다. chitinase 영역을 가진 ORF는 680bp로서 226 개의 amino acid를 encoding 하고 있었다 (Fig. 2-13). pUCH4의 amino acid에 대한 상동성을 Blast 탐색으로 조사한 결과, Fig. 2-14와 같이 Flavobacteriales bacterium HTCC2170의 beta-N-acetylhexosaminidase 와 48%의 상동성을 보였으나 다른 chitinase에 대해서는 20% 이하의 낮은 상동성보임으로서, pUCH4 chitinase는 신규성 chitinase로서 동정 할 수 있었다.

```

1 acagcttgaagcgcgaatcagattgggccaatgatgaagcctatgtaattacaatcaatcc
61 cctaccaaataaatattcatgcaccaaccaaccagaggtgcattttaatgccgggcagac
121 actggtgcaactgataccctttcaaaatccaactgaatcggttaccatcctacagggcat
181 catacgtgatgcgccacttttgcctggcgcggagcgcgatgctggatgtggcccgtcattt
241 cttttctgtggaagatgtaaagcgttacatcgacctgctcagttattacaaaatcaatgt
301 gttgcatttgcacctgacggatgatcagggttggcgcattgaaatcaagtcatggcccaa
361 cctggccattcatggtggaagcattgaagtgggaggggtcaaggcggttactatacaca
421 agaacaatacaaggatattgtcgttacgcagccagtcgttttattaccatagtaccgga
481 gattgacatgcccggtccaccaatgcagcgccttcttntatggcgcagttgaatggaggc
541 accattgtgcaaaaagaaggcatggtgatcactgataatcccatactggatggcaaagca
      M V I T D N P I L D G K A
601 aagcctacctctttgtataagggaattgaagtaggatggagcactttaagattagaaaaa
      K P T S L Y K G I E V G W S T L R L E K
661 gaagccacctcagatttgcacaagacgtgctcacggagttggcggccatgacgcccggc
      E A T F R F V K D V L T E L A A M T P G
701 ccttacctacacattggaggcgcgatgaagcagaagtgaccaggaaggaagactacattgtg
      P Y L H I G G D E A E V T R K E D Y I V
761 ttatcaatcgttttaacaaatcgtgaactcattgggcaagcaaatgattggctgggaa
      F I N R F K Q I V N S L G K Q M I G W E
821 gaaatcagtcaggcggatctcaacgaaacgatatcgctcaattgtggcggaccgcggt
      E I S Q A D L N E N D I A Q L W R T A G
881 catgccgaaaaagctgcagagaaagggagccgtatcatcatgtcacctcaaccaaagta
      H A E K A A E K G S R I I M S P S T K V
841 tacctggacatgaagtacgattcgacaaccgaactaggattggattgggcccaccatt
      Y L D M K Y D S T T E L G L D W A A T I
901 gaagtagattcttctacttgtgggatcctgcaaatttgggaattaatcctgaaaacata
      E V D S S Y L W D P A N F G I N P E N I

```

961 ataggggtggaggcacctttgtggtcagagaccatcaccaacatgaatgagttggagtac
 I G V E A P L W S E T I T N M N E L E Y
 1001 ctggctttcccgcgcattattgctatatctgaagtagcatggaggcctgcgcaatcaagg
 L A F P R I I A I S E V A W R P A Q S R
 1061 acatgggatgaattcaaagtacggttgggaaatcatgcgccaaggttgaagccttgat
 T W D E F K V R L G N H A P R L K A L D
 1121 gtaaactattatgtttctcccaccgtaccgtggaagaataattgtttaactatcgcgta
 V N Y Y V S P T V P W K E * L F N Y R V
 1181 atggtaacgatgactctccgcggaatggtttgccatcgcgtgtcattccttcaacggt
 M V T Y D S P R N G L P S R V I P S T

Fig. 2-13. Nucleotide sequence of pUCH33. Underline sequence indicates ribosomal binding sequence.

PUCH4 19
 PILDGGKAKPTSLYKGIEVGSWTLRLEKEATFRFVKDVLTELAAMTPGPYLHIGGDEAEVT 198
 P L+G K LY+G VG+ST K+ + F+ DV+ E++ +TPGPY HIGGDE+ VT
 Fb 287 PFLNGNGKTPKLYEGTHVGFSTFDARKDTVYAFIDDVREISEITPGPYFHIGGDESHVT
 346
 PUCH4 199 RKEDYIVFINRFKQIVNSLQKQIMIGWEEISQADLNENDIAQLWRTAGHAEKAAEKGSRII
 378
 +K DYI F+ + ++IV GKQIMIGW+E++ A+++ + I+Q W +A+KA ++G ++I
 Fb 347
 KKS DYIHFVEKVEKIVQKHGKQIMIGWDEVASANIDSSISQYWSNGKNAQKAVDRGMKVI 406
 PUCH4 379
 MSPSTKVYLDMMKYDSTTELGLDWAATIEVDSSYLWDPANF-GINPENIIGVEAPLWSETI 555
 +SP+ K YLDMKYDS T+LGL WAA I VDS+Y+W P + GI ENI+GVEAPLWSETI
 Fb 407
 LSPA KAYLDMKYDSLTKLGLTWAAYIPVDSAYVWTPPEEYEGIPMENILGVEAPLWSETI 466
 PUCH4 556
 TNMNELEYLAFPRIIAISEVAWRPAQSRTWDEFKVR LGNHAPRLKALDVNYYVSPTVPWK 735
 +N+++ELE LAFPR+I SE++W ++R W++++ +L + AP L ++V YY SP + WK
 Fb 467
 SNIDELEQLAFPRVIGYSELSWSIKENRDWEKYREKLADQAPFLDYMNVKYYASPLIDWK 526
 PUCH4 736 E*LFNYRVMV 765
 + + Y+ ++
 Fb 527 KSKYTYKEII 536

Fig. 2-14. Homology comparison between pUCH33 protein and chitinase gene of *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863.

마) eDNA 유래 chitinase 유전자의 발현분석

pUCH33, pUCH4, pUCH1을 보유한 *E. coli*를 50 ml를 overnight로 포화 상태로 세균세포를 배양하고 재료 및 방법에 의하여 배양여액과 periplasmic fraction을 분획하고 ammonium sulfate로 단백질 침전을 실시 각 세포 구획물로부터 단백질을 분리하여 500 μ l에 단백질 산물을 녹여 그 중 15 μ l를 취하여 SDS-PAGE분석을 실시하였다. Fig. 2-15은 그 결과로서 pUCH1은 periplasmic fraction에 60 kDa에서 발현 단백질이 나타났으며 pUCH33은 65 kDa에서 periplasmic fraction과 배양여액에서 발현 단백질이 검출 되었다. 그러나 pUCH4는 SDS-PAGE상에서 관련된 단백질을 발견 할 수 없었다. Chen 등은 *Bacillus circulans* 의 chitinase A1은 *E. coli*에서 periplasmic fraction에 발현 됨을 보고 했으며, Woo와 Park은 배양여액에 분비되는 *Bacillus* sp. 의 extracellular chitinase을 보고 한 바 있다. 그 밖에 많은 연구에서 chitinase는 extracellular protein으로서 periplasm과 세포 밖으로 분비되는 것이 일반적인 특성으로 보고되고 있어 본 연구의 metagenome chitinase의 경우도 그 특징과 일치 하는 것으로 사료 되었다.

각의 세포 구획물을 사용하여 실제적으로 chitinase 활성이 있는지를 확인하기 위하여 pUCH4, pUCH1, pUCH33의 periplasmic protein과 culture filtrate protein을 사용하여 MUF-diNAG반응을 실시하였다. Fig. 2-16은 그 결과로서 반응 후 12시간에 관찰한 것이다. pUCH1과 pUCH33은 500 μ l 배양여액과 periplasmic protein중 2-15 μ l 반응 양에서 모두 chitinase 활성을 보였으나, pUCH4의 경우에는 2-5 μ l에서는 반응이 보이지 않다가 10-15 μ l의 적용 양에서만 periplasmic protein에서 chitinase 활성을 보였다. 따라서, pUCH1, pUCH33이 chitinase활성과 발현위치에 있어 같은 기능을 가지고 있으나 pUCH4는 chitinase 활성이 낮게 작용하며 주로 periplasmic에만 발현 하는 것으로 나타났다.

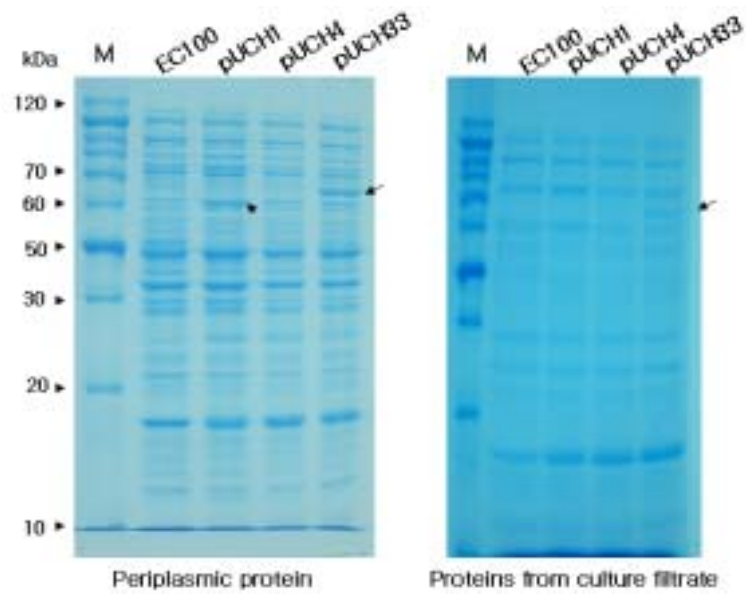


Fig. 2-15. Cellular localization of chitinase gene products in *E. coli*.

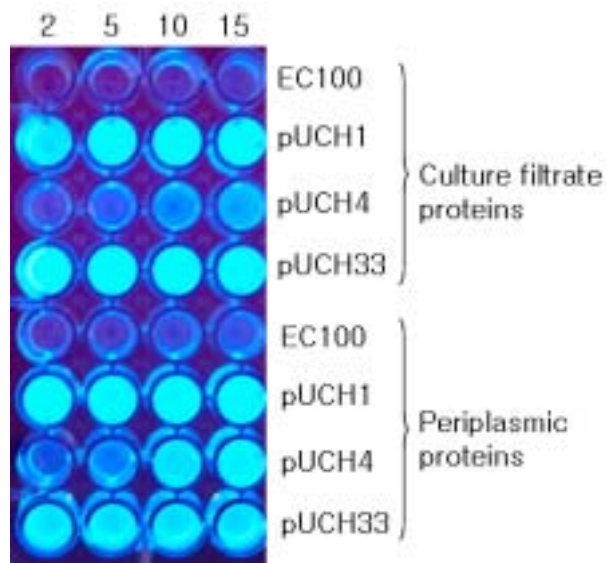


Fig. 2-16. Chitinase activity on MUF-diNAG of cellular proteins from metagenome clones.

Chitinase는 크게 Exochitinase, endochitinase, chitobiosidase로 구별될 수 있다. 이에 본 연구의 metagenome에서 분리한 chitinase 가 위의 어떠한 특성이 있는지를 조사 하기 위하여 MUF-NAG, MUF-diNAG, MUF-triNAG의 기질을 이용하여 MUF 활성을 조사한 결과 MUF-NAG에서는 모두 활성이 없었으며 MUF-diNAG와 MUF-triNAG에서 활성을 보였다 (Fig. 2-17). 그리고, MUF-diNAG에 대한 활성을 100으로 볼때에 MUF-triNAG에서는 60으로 반응활성이 약하게 나타났다. 만약에 MUF-NAG에서 활성을 보았다면 chitin을 N-acetylglucosamine monomer 단위로 분해함으로 exochitinase의 특성으로 볼 수 있으나, 위 결과로 본 연구의 pUCH33, pUCH4, pUCH1은 MUF-NAG에 반응 하지 않고 MUF-diNAG와 MUF-triNAG에 모두 활성을 보여 endochitinase 특성이 있는 것으로 사료 되었다. 따라서, colloidal chitin을 기질로 하여 각각의 pUCH33, pUCH4, pUCH1의 periplasmic 단백질을 filter paper에 적시어 chitin 분해력을 조사 한 결과 모두 분해능이 없었으나 positive control로 사용된 *Serratia marcescens*에서 순화 분리하여 시판되고 있는 chitinase (Sigma)에서는 chitin 분해 존을 형성 하면서 분해능이 관찰 되었다. 따라서 추 후 연구에서 metagenome chitinase를 순화하여 적용함으로서의 그 활성을 재검토할 필요가 있을 것으로 사료 되었다.

온도별 pH 별 pUCH33, pUCH4, pUCH1의 chitinase 활성을 알아 보기 위하여 기질을 p-nitrophenyl-di-N-acetyl-β-chitobiose [(pNP-(GlcNAc)₂]로 하여 조사 하였다 (Fig. 2-18). pH의 경우 대부분 pH 8에서 가장 양호한 반응을 보였으며 40°C에서 50°C사이에서 높은 활성이 나타났다. 한편, *Serratia marcescens*로부터 유래한 chitinase의 경우는 55°C이성까지 고온에서 안정한 활성을 보여 본 연구의 chitinase는 50°C이상의 고온에 활성이 급격히 떨어지는 현상이 관찰 되어 비교적 온도에 민감한 것으로 사료되었다.

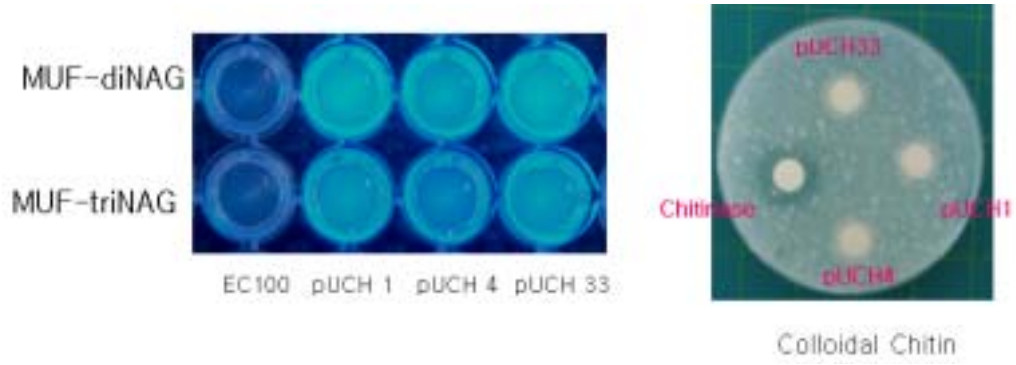


Fig. 2-17. Enzyme activity of chitinase clones to different chitinase substrates.

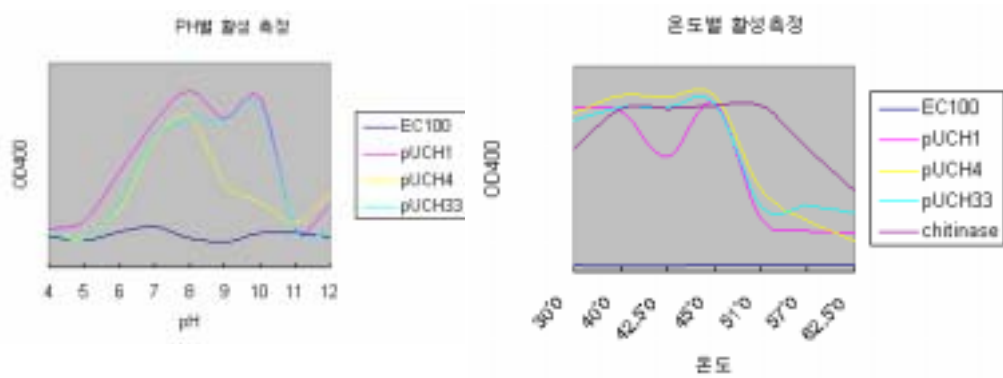


Fig. 2-18. Effect of pH and temperature on the relative activity of chitinase.

2. 식물 병원균 세포벽 분해 관련 cellulase 및 β -glucosidase 생산 관련 유전자 선발

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

Chitin과 더불어 β -glucan은 곰팡이의 세포벽 구성분 중 주요소의 하나로서 다양한 곰팡이의 세포벽으로부터 분리되고 있다. 용균성 효소 생성 세균에 의한 곰팡이의 길항 작용에 관한 연구는 역사가 깊고 많은 관심을 받아 왔는데 병원균의 침입시 식물체 내에서 발현되는 방어 단백질의 존재가 입증되면서 이러한 방어 단백질류에 속하는 것으로 추정되는 β -1,3-glucanase를 포함하는 cellulase 및 β -glucosidase를 생산하는 클론을 선발하기 위하여 여러 가지 high-throughput 시스템을 이용한 다양한 방법으로 metagenome library를 검색하였다.

2) 연구방법

가) 식물병원균에 대한 항균효소 cellulase 및 β -glucosidase 생성 clone 탐색

모든 cosmid library와 fosmid library를 96well plate에 접종한 후 carboxy methyl cellulose가 1% 첨가된 고체배지에 replica pin을 이용하여 접종하고 28°C에서 7일간 배양하여 0.1% congo red로 염색후 1 M NaCl로 세척하여 clear zone이 형성하는지 관찰하였다. 또한 CelloMix™ kit (RNA사)의 cellomix가 첨가된 고체배지에 replica pin을 이용하여 접종하고 28°C에서 2-10일간 clear zone이 나타날 때 까지 관찰하였다.

Fosmid library는 chloramphenicol ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 첨가된 액체 LB배지 120 μl 에 접종하여 이들을 37°C에서 16시간 정치 배양 후 각각의 cell 용액 30 μl 를 취하여 LB배지 90 μl 가 들어있는 96 well plate에 분주하고 cellulose의 analogue인 MUF-cellobiose (10 μM) 20 μl 를 첨가한 다음 28°C에서 2-5일 동안 매일 UV하에서 관찰하여 형광을 발하는 clone들을 선발하였다.

나) 선발 클론의 shot-gun library 제조 및 재탐색

선발한 클론의 DNA 20 μg (100 μl)을 Sonicator (Fisher550-CM110 Sonicator)를 이용하여 무작위 절단하였다. Sonication 3.5 강도의 출력으로 고정 1초로 처리한 후 DNA 절단 부위의 말단을 평활화하기 위하여 절단된 DNA 용액중 25 μl (5 μg 의 DNA)를 취하여 5 unit의 T4 polymerase (Takara Co.)와 2 unit T4 polynucleotide kinase (Takara Co.) 그리고 6 units의 Klenow fragment (Takara Co.)를 가한 후 반응액량을 50 μl 로 조절한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 DNA를 0.8%

agarose gel에 100 voltage에서 40분간 전기영동하고 2-5 kb의 DNA를 절단하여 Qiagen extraction kit로 분리하였다. End-repaired DNA 100 ng을 pUC118-HincII/BAP (Takara co.) 운반체 25 ng, T4 DNA ligase (350 units μl^{-1} , Takara Co.) 1 μl , 10X완충액에 1 μl 을 첨가하고 최종 반응액량을 10 μl 로 하여 16°C에서 16시간 ligation 하였다. 만들어진 library는 MUF-cellobioside를 함유한 LB배지에 다시 접종하여 형광을 나타내는 clone을 선발하였다.

다) DNA 염기서열 및 상동성 분석

선발한 shot-gun clone의 염기서열 분석은 ABI 3700 (PerkinElmer, Co. Germany)을 이용하였다. 염기서열 분석용으로 준비된 clone을 template vector내부에 포함된 상보적인 염기서열과 상보적인 서열을 갖는 primer를 제작한 다음 BigDye 2 μl , 5X 완충액 1 μl , primer (10 pmol μl^{-1}) 1 μl , template (250-500 ng) 6 μl 를 PCR tube에 넣고 혼합한 후 PCR 하였다. PCR 조건은 95°C 10 min, denaturation 96°C 10 sec, annealing 50°C 5 sec, extension 60°C 4 min을 25 cycles, termination 72°C 10 min로 하였고 이를 정제하여 automatic DNA Sequencer로 염기서열을 결정하였다. Vector NTI program과 BLAST network를 통하여 상동성 및 유전자 비교 분석등을 수행하였다.

라) 유전자의 과발현 및 정제

분리한 유전자는 5'말단에 *Bam*HI을 포함하는 primer, 5'-TCGGATCCATGCCAGCCGGCCTGCTGATC-3', 3'말단에 *Hind*III을 포함하는 primer, 5'-GCAAGCTTGAATAGCGGGCGCGGCTAGCCC-3'를 사용하여 증폭하였다. 증폭한 DNA는 5'말단에 hexahistidine tag이 포함되어 있으며 이를 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단한 pET32a(+) (Novagen, Madison, Wis.) 운반체에 ligation하여 *E. coli* strain BL21(DE3) (Novagen)에 형질전환하였다. 형질전환한 세포는 37°C에서 600 rpm에서 O.D치가 0.6에서 0.8이 될 때까지 배양시킨 다음 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 final 농도 0.5 mM이 되게 첨가하여 30°C에서 5시간 배양하였다. 배양한 세포는 8,000 X g, 4°C에서 10분간 원심분리하고 상등액은 버리고 세포는 -20°C에 보관하였다. 열린 세포는 lysis buffer (pH 8.0) [50mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole]을 첨가하여 sonication한 후 12,000 X g, 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 수용액 상태의 recombinant enzyme은 Ni-NTA (Ni-nitrilotriacetic agarose) resin (Qiagen)에 loading하고 20 mM imidazole로 washing 후 elution buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, and 250 mM imidazole)로 용출하였다.

마) 효소 활성 측정

β -Glucosidase는 p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG)를 기질로 하여 활성

을 측정하였다. 모든 분석조건은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 55°C에서 행하였다. 5 mM pNPG와 효소를 섞은 후 55°C에서 15분간 반응 후 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 정지 시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 반응의 최적 온도와 최적 pH 측정은 정제한 효소를 사용하였으며, pH 범위는 pH 4.0-9.0에서 온도의 범위는 30-80°C에서 측정하였다. 또한 효소의 온도 안정성은 각각의 온도에서 4시간 정치시킨 후 잔존하는 활성을 측정하였으며, 효소의 pH에 대한 안정성은 각각의 pH에서 24시간 정치시킨 후 잔존하는 활성을 측정하였다. 단백질 농도는 BSA fraction V를 standard로 사용하여 Bradford 방법으로 측정하였다. 효소활성 1 unit는 1분에 1 μmole의 p-nitrophenol이 효소에 의해 생성되는 양으로 하였다.

바) 유전자 산물의 확인

Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis는 Bio-Rad Mini-PROTEIN 3 Cell electrophoresis unit (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. Separating gel은 8%로 하여 사용하였으며 시료는 native sample buffer (Bio-Rad)를 사용하여 1: 2 로 희석하여 사용하였다. Dye가 gel의 바닥으로 내려올 때까지 4°C에서 50 V로 전기영동한 후 PA gel을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 두 번 세척하였다. 효소활성을 측정하기 위하여 gel을 0.5 mM MUF-cellobioside 기질로 37°C에서 30분간 반응 후 buffer로 세척하여 UV illuminator하에서 형광을 나타내는 band를 관찰하였다. SDS-PAGE는 Laemmli 방법에 의해 수행하였으며 시료는 Tris-HCl loading buffer [1% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol and 2% (v/v) 2-mercaptoethanol]로 1:1로 희석하고 7분간 끓여 사용하였다. Molecular mass standards는 Bio-Rad사의 것을 사용하였고 전기영동한 gel은 1% (w/v) Coomassie Brilliant blue R 250로 염색한 후 methanol/acetic acid/water (50:10:40, v/v)로 탈색하였다.

사) Thin layer chromatography (TLC) analysis

β-Glucosidase 1 unit와 1 mM ginsenoside Rb₁을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 1.5 ml에서 50°C, 24시간 동안 반응시켰다. 이것을 silica gel 60 F₂₅₄ plate에 점적한 후 plate를 TLC chamber에 놓고 CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, vol/vol/vol, lower phase) 유기용매로 전개시켰다. 이것을 완전히 건조시킨 후 5% H₂SO₄에 담근 후 110°C에서 5분간 가열하여 관찰하였다.

아) HPLC analysis

TLC 분석과 동일한 시료를 Alltech Prevail Carbohydrate ES column (4.6X250 nm)를 사용하여 acetonitrile-water-isopropanol (80:5:15, vol/vol/vol) (solvent A)와 acetonitrile-water-isopropanol (80:20:15, vol/vol/vol) (solvent B)로 gradient 조건하에

서 분석하였다. Solvent A/solvent B의 비율을 70/30, 0/100, 0/100, 70/30, running time을 각각 0, 20, 50, 60 분으로 하고 0.8 ml min⁻¹의 flow rate으로 ELSD detector를 사용하여 분석하였다.

나. 연구결과

1) Cellulase 유전자의 분리 및 활성영역 동정

가) Cellulase 생산 클론의 선발

근권 토양이나 생태계특별보호구역인 우포늪지 등에서 분리한 토양, 그리고 대부분도 갯벌 등으로부터 작성한 metagenomic library 들로부터 cellulase 생산 관련 clone을 탐색하였다. Cellulase생산 균주를 탐색하는 방법은 오래전부터 다양한 방법을 사용하여 왔으나 Tsuchiyoshi 등 (1989)이 사용한 일반적인 carboxy methyl cellulose (CMC)을 기질로 하여 염색한 후 오렌지색 환을 관찰하는 방법들이 대부분이었다. 본 연구에서도 대량의 메타제놈 클론을 CMC를 사용하여 검색하였다. 그 외의 방법으로 CelloMix를 사용하여 파란색 배지에서 균을 접종하여 clear zone을 형성하는 클론을 검색하기도 하였다. 그러나 이 방법으로는 균을 선발할 수 없었는데 cellulase를 생산하는 클론이 없어서 인지 아니면 감도가 떨어져서 detection할 수 없었는지는 알 수 없었다. 실제로 fosmid library와 cosmid library를 carboxy methyl cellulose가 1% 첨가된 고체배지에 접종 후 배양하고 염색후 관찰한 결과, 대부분도 fosmid library에서 오렌지색 clear zone을 형성하는 CM2 clone을 선발하였다 (Fig. 2-16, Table 2-5). 이 클론의 insert 크기는 약 30 kb 정도로 추정되었고 cellulase 유전자를 암호화하는 ORF를 분리하기 위하여 선발한 CM2 clone을 다시 sonication하여 2-5 kb 크기의 insert를 pUC118에 ligation하여 shot-gun library를 제조하였다 (Fig. 2-17). 이 library를 carboxy methyl cellulose 선택배지에서 오렌지색 clear zone을 형성하는 clone들을 선발하고 활성을 가장 크게 가지고 4 kb insert를 가지는 clone을 선발하여 pUCM2라 명명하였다 (Fig. 2-18).

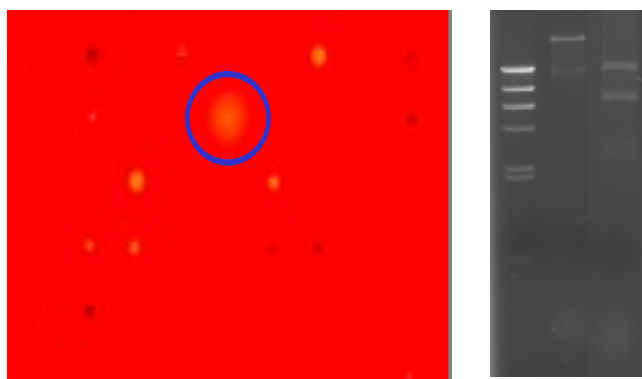


Fig. 2-19. Halo formation of the cellulase producing CM2 clone and DNA of selected clone. Lane 1, DNA; lane 2, BamHI digestion pattern.

Table. Characteristics of CM2 clone from metagenomic library

Clone	Source	Vector	Insert size	Bacterial host
CM2	Daebudo	Fosmid	30 kb	<i>E. coli</i> (EPI)

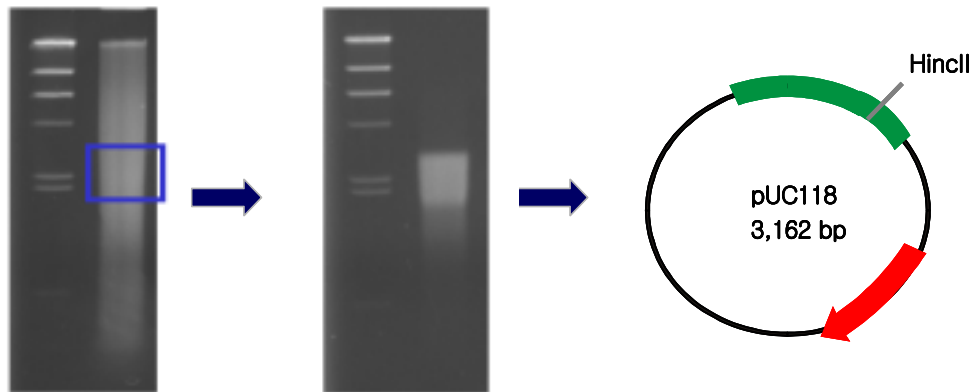


Fig. 2-20. Shot-gun library construction by sonication using pUC118 vector.

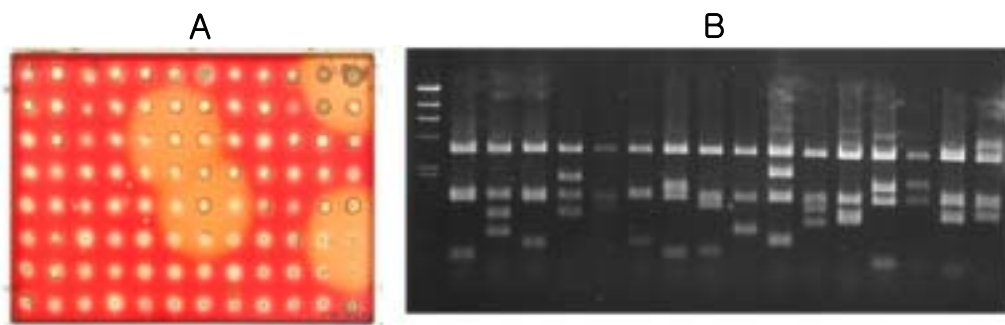


Fig. 2-21. Halo formation of the cellulase producing shot-gun clones and characteristics of the selected clones including pUCM2 clone. B, the patterns of BamHI/HindIII digestion.

나) Cellulase 생산 유전자의 염기서열 분석 및 상동성 조사

pUCM2 클론을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 4,024 bp였으며 서로 같은 방향의 2개의 ORF를 포함하고 있었다 (Fig. 2-19).

앞부분에 위치하고 있는 첫 번째 ORF (*xlnA*)는 681 bp로 구성되어 276 amino acid를 암호화하며 추정되는 분자량은 30.5 kDa이었다 (Fig. 2-20). *xlnA*를 BLASTX search 한 결과, *Geobacillus stearothermophilus*의 endo-xylanase A와 66%의 identity를 보였고, *Bacillus subtilis*의 xylanase A와 64%, *Streptomyces lividans*의 xylanase B와 56%의 identity를 보였다. 또한 *xlnA*는 일반적으로 가지고 있는 conserved domain을 포함하고 있었다 (Fig. 2-21).

두 번째 ORF (*celA*)는 1,998 bp로 구성되어 665 amino acid를 암호화하며 추정되는 분자량은 73.5 kDa이었다. *celA*를 BLASTX search 한 결과, *Paenibacillus lautus*의 endoglucanase (cellulase)와 38%의 identity를 보였고 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*의 endoglucanase A와 33%의 identity를 보였다 (Table 2-6).



Fig. 2-22. Physical map of pUCM2 clone carrying *xlnA* and *celA* genes. The start of ORFs are shown by arrows. pUCM2 was constructed by cloning a 4 kb fragment of fosmid DNA (CM2) into the pUC118 vector.

Table 2-6. Similarity of ORFs from the *cel* genes to known proteins present in the NCBI data bank

ORF	Protein	Organisms	Identities(%)
<i>xlnA</i>	endo-xylanase A	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	121/182(66%)
<i>celA</i>	endoglucanase (cellulase)	<i>Paenibacillus lautus</i>	108/282(38%)


```

TTTTCTGAGCAACAGCCGATGAAACCGTTTGGCAAGCCAGCABCACCTACTGCCCCGATAAATCCGCCBTEC 72
TGAAGAGAGGCGTGGCTGATTCGCCATTTTTCATCCATAACCGGGGATTACATTAGCGATATTAAATGTTTT 145
GTTAGTACTAAACAAATCTACTACAAATGTAGCCGACCAAGGAATATGTAGATTCTCAAGCGGGAAAAATCAACG 218
AAGCTCAAACTTCACTCGGCCTCGGTGGCGGCGCAGAAATCCAGACACACATGGGCGCAGACTACTCTTC 269
CCGGTCGATTTCTGTCACGCTCAGTATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 361
GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 432
AGTTGGCGATGAAAGGAGCTCAGGATGGAACTGAAAAACTATCCAGAAAGGACGGCTACTCGTAGTCTGT 505
MELKELKELSRKGRLLLVVL 16
CCBTTTSTTTTTCAGTAACTGATCAACAGCCGCAACCATATGCAACCCCTGABACTGBCACCAACAAAC 579
SVLLLFVSVTLQSSNAQTICNPOTGSTNN 41
GGCTTCTTCTATTCGTTTTGAAAGGACACCGGGTCAAGCTGATGACTTTGGGCCTGCTGGCAATTACGATGT 653
GFFVSSFVKDITGSSACMTLSSABNYDV 86
AAGTCGAAATCTGGGTTCCGGGAAATGTTGTCGGCAAGGCTGGAGTACCGATCATCAACCAAGAACTACTA 705
SFWNLGSGNMVCGKQWSTGSSSTRVLL 90
GGCTACAAAGCGGGCATCTGGCAGCCGCTCGGCAATGCTATTTAGCTCTCTATGGTGGAGAGAAACCCAC 799
GYNAGIYVFPSSNAYLALYQWTRNRP 114
TSATGAAATATTACTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 873
LIEYVYVWVTFRPPPGGTALGQSVN 139
AGTGATGGTGGTACTACGACCTATATCGGGCCAGCGATTCAACGCCCTTCCATTGATGGCACTCAGACTTT 947
SDGGBSTYDLYRHAGHFNAPRSIDBSTQTF 184
CTTTCAGTACTGGAGTGTCCGGAGGACGAAGAGAGGACCGCGGAGGAGCCAGCAGATCACTTTTCCAGCAC 1020
FDYWSVVRRTKRAATGSSNGTITFAFH 188
GTTACAGCGGTGGAGGAATAGGCTTGAATCTGGGGAGTAGTTTTGCTTACAGATCATGGCAACCGAGGGGTT 1094
VNAWRNVVGLNLBSSFPAYDIMATEBF 213
TCAAGCAGCGBSAGATCCAACTGACGGTGTGCAACAGTAACCTAACCTGTTGTAAAGGAGCCCTCCATT 167
GSSGGSNLTVWQO 226
AAGCGATAGGCAAGCTGATCCACAGCAGCAGGAGGCGTGAAGAAATGAGATTCGACCCCTTTCCAATGGTAT 1239
AAGCTTGTCAATCTGGGCGCACACAGAAAGTCCGCCCTAAGCTGGAAAGCTGTCGAAGCBACTTAAAGCAAC 1310
GCCTGGTTCGCCCATGTTGATTTGATTTGCTCATCCGGTTTCTGATAGATAGSCCTTCGGCATGATCCCTCA 1383
CCAGTCTGCTGTGAAGTGTGACACAAACCGGACTCCGGCTGAGGCGCAATTTTCGTTACAAACCTTGAAT 1455
ACACCTTGTGGTAAATAGGAAAGGAAATATCTCATGGGCTGCCGTGTAATCTCTCTGTCATCGCTGTT 1529
VQKMERKYLMOCEKVKKFFCAIVC 22
TTTCACTTATCCCAATAGCTGGTCTACGCACAAACCTTCAGTCAACCATCAGTGTGAACCGCAATGCGG 1602
FSLIANTLVVAONPSTVTISVNAANA 47
CCGCCATCCCATCAACCGCGGGTTTACGGGCTGGCCATGCAACGACCGCAACGCTGGCCGATCTCAATGT 1674
RHPIRNPVYGLAVATTATLADLNV 71
TCCCTGCAACCGCTATGCGCGCAACAAATACGATGCTACTACACTGCAACTCAATGCCGACAATCGCGCC 1746
PLHRVYGSNRTSRYNWDLNADNRGA 95
CGACTGATTTTCCAGAGCATTGAGAGCGAGCAGCCTGGCCGAGAGCGCGGCACTTTTATGTCCAA 1818
DWFYFESIGEATSSVAQERBDTFIAN 119
CAGCAGCCCGTGGCGCGCAACCATGATTCCAACTCCAGCTCGCTGGTCCGCGCGCTCGCGCCA 1889
SQAAGAGADAMITIPITIGWVARLGA 142
ATCGCTCGAAACTGCGGAGTGTTCGATTGCCAAATACGCGCGCAGAGCGCAGCAATGATTGCGASTGTTCC 1982
NRSKLAFLAKYGAQSSNDWQWFP 167
AGACCGCGGCAATGCGCTGCTGACAGCGCGCAGAAATGTCAGCGCAATATCCAGCGATGCCCAACCGCT 2034
LAVGNDANNTL 191
GGTCACTTCACTGATGCTGACAGGCGCTGGCGCAGCAGCTGCTGACCAATGCGCGCAGCGCGCG 2106
VDSSTFGWAGHLLVSGWGTAAAGS 214
GTTTGGCTTATTAATCTCGATAACGAGCGAGCATCGTTTTCGACGCAACCGCGATGTTTATCCGCTCGC 2179
GLRHYVILLDNEPSIWFSTHVDVHPVG 229
CCGACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2291
PTMDEIRDKMLDYGAKIKTVDFSA 253
CTCAGCTCGCGCCCGAGAGAGTGGCGCTGAGCGCTTATACGCTCAAGCGGATGACCGCAATATGCGCG 2322
LTVGNDANNTL 191
CCTGCGCGCTGAGAGCTTTATGCTGACCGCAACATCACGCGCTGCGGATTATGCTGCGCTGCTGCG 2394
LHGWSFMPDRNHHGSGWDTLPLWLLD 311
CCAGCTTCCGCAAGAAATTTGAGTACCGCGCGCGCTGCTGATGCTTCAAGCTTCAATTAATGCGCAA 2467
QLRHONNLSTGRRLLDVFSVHVYPO 395
GBCGCGAATTTGCGCAACBACACATCTTCCGCGATGCAACTCAGCGCGCAACCGCTGACCGCGCTGTTG 2538
GGEFGNDTSSAMGLRHRNRSSTRSLW 359
GGATCGAATTCATGACGAAACTGGATCAATGACAGGTGCAACTGATCCCGGCTTAAAACTGGGT 2610
DPNWIHNDVQLLPRLNWV 264
GASCATCTACTATCCGCGACBCTBACBCTACCCBAATACAAGTGGCGCGCGAGAGCCAGATCAACB 2681
STYVPLTVAITEYNWGAESHIN 405
GCGCAACCGCAGGCGGATACTTGGCATCTCGGTCGCGAAGGATTGGATATGGCCGCGCGTGGACA 2752
GATGADILGIFGRGLDMAAARWT 430
ACBCCGCGACCGCGCGCGCACTTATAAAGCATCAAGATGTACCGCAATTACGATGGCAACAAATCCGCC 2824
TPDTATPTWYKALIKMVRNVDGNKSA 454
TTGGCGACACAGCGTACCGCGACAGCAGCAACCGGATAGCTGTGCGCTTTTGGCGAGTGGCGCTC 2895
FGBTSSVATAAPNPDNVSAFAAVRS 478
TTCCGATGCGCACTCACGGTATGATTAACAAATCTBAGCGCGCAATACCGCGCGCACBACBACACT 2987
SDDOALTVMVINKYLSGNTPTATINL 502
GTGGAATTCACCGCGCAAGCTCAGGCACAGGTGCGGACTGCGGCTAACACGATCAACACCTCTC 3029
SNFTAGADAGAGVWQLTAANTINHL 528
AAACSTAACTBAGCGCGCGCGCTGACCGCTGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 3110
NVGSLSGSSDLSLTLPLAQSVTLLVIL 549
CCGCTTCCAGAGCGGAAATGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 2179
PASTAANAPPTAVATATPTGT 572
CBCTGCTGCTGCGCTGCGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 3250
PLAVAVAGRSSSDSDGTITAYAVWN 596
TTGGCGGATGGGCTATCGCTTCAAGCGCGGACCAAGCACTTACGCAATGCGCGGAACTATACGGCA 3322
FGDAGIASGATSNHTYVNASTYTA 620
ACTCTGAGGTAAGCAATATGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 3394
TLTVDNAGATASKSLTITVNPAP 544
GTTGATCAACGCGGAGTATCTGACCGCAAGCAATGCTGCGCGCAACCGTCAACCGTCAATGACT 3452
VTVINAPSNLTASNAASRTVTLR 695

```

Fig. 2-23. Nucleotide sequence of the *cel* genes and the flanking regions. The deduced amino acid sequences for each ORF are placed below the nucleotide of corresponding codon. Putative Shine-Dalgarno sequences for ribosomal binding sites (RBS) are underlined. The presumptive TATA box is boxed. -35 region and -10 region are bolded. Translation codon is indicated by an asterisk.

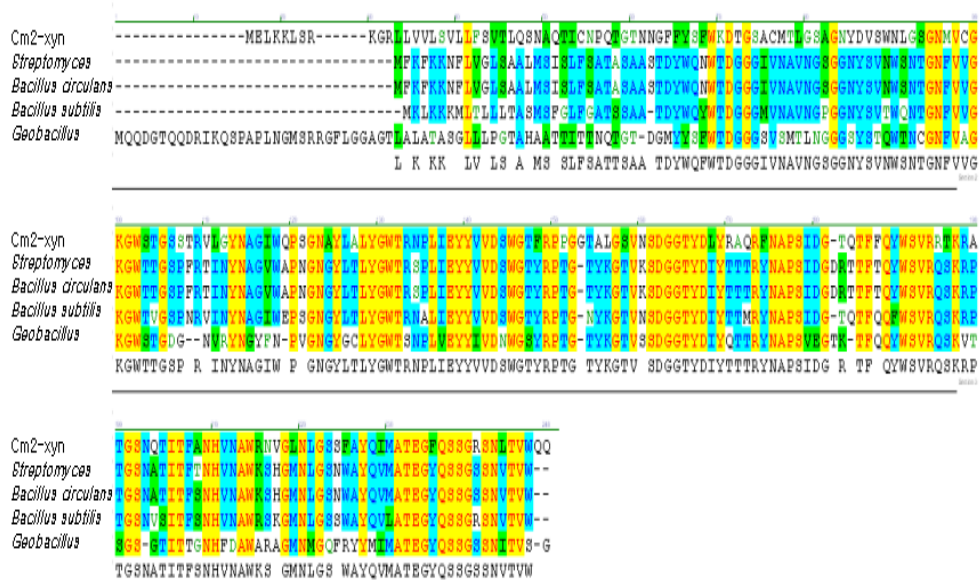


Fig. 2-24. Alignment of xylanase gene from pUCM2 clone. Sequences were deduced from the following accession number :*Streptomyces lividans* (P26220); *Bacillus circulans* (P09850); *Bacillus subtilis* (P18429); *Geobacillus stearothermophilus* (P45705).

2) β -Glucosidase 유전자 분리 및 활성영역 동정

가) β -Glucosidase 생산 클론의 선발

Cellulose가 분해되어 발생하는 이탄당을 절단하는 β -glucosidase는 곰팡이의 세포벽을 분해하는 용균성 효소에 속할 뿐만 아니라 병원균의 침입시 식물체 내에서 발현되는 방어 단백질로 작용한다. 근권 토양이나 우포늪지 등에서 분리한 토양, 그리고 대부도 갯벌 등으로부터 작성한 metagenomic library 들로부터 high throughput 시스템으로 대량의 클론들을 빠른 시간내에 탐색하기 위하여 4-methylumbelliferyl-cellobioside를 기질로 하여 96 well plate에서 clone들을 배양하여 UV하에서 형광을 나타내는 것을 1차 선발하였다. 약 300개의 clone들을 1차 선발하여 다시 96 well plate 상에서 접종 후, 기질을 넣고 형광을 발하는 재현성 있는 클론들 중 활성이 높은 6개의 클론 (Ce15, Ce65, Ce83, Ce92, Ce94, Ce105)을 2차 선발하였다 (Fig. 2-22A). 이들 클론은 모두 control인 fosmid vector만 가지고 있는 EPI균주보다는 높은 형광을 나타내었다. 또한 이 클론들의 plasmid를 분리하여 *Bam*HI 절단양상을 관찰한 결과, 서로 다른 메타제놈 유전자가 삽입되어 있는 것을 알 수 있었고 모두 30 kb 이상의 insert 크기를 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 2-22B, Table 2-7). 이 중 특히 Ce92의 경우 다른 선발 클론 보다 높은 형광을 나타내어 β -glucosidase 유전자를 암호화하는 ORF를 분리하기 위하여 선발한 Ce92 clone을 다시 sonication하여 2-5 kb 크기의 insert를 pUC118에 ligation하여 shot-gun library를 제조하였다. 이 library를 MUF-cellobioside 기질을 이용하여 다시 형광을 나타내는 clone들을 선발하고 활성을 가장 크게 가지고 2.75 kb insert를 가지는 clone을 선발하여 pUGLU92라 명명하였다. β -Glucosidase는 여러 가지 chromogenic substrate를 사용하여 petri dish 상에서 자란 *Escherichia coli* colony로 assay 할 수 있고 본 연구에서 사용한 MUF-cellobioside 기질을 이용하면 다른 효소보다도 메타제놈 은행을 검색하는데 매우 용이하다. 따라서 이런 용이한 high-throughput 시스템을 사용하여 새로운 기능을 갖거나 활성을 증가시키는 directed evolution에도 쉽게 접근 가능할 것으로 사료되었고 실제로 본 연구의 유전자 효율 증진 연구에도 적용하였다.

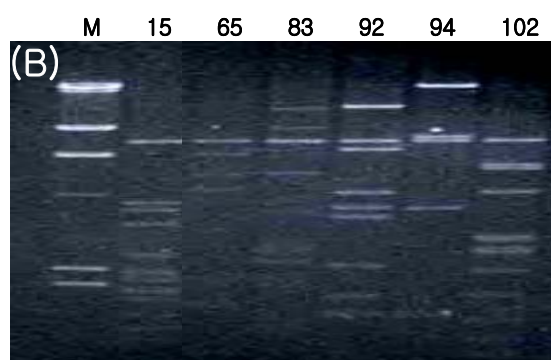
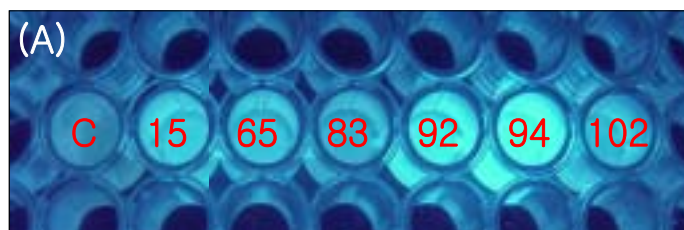


Fig. 2-25. Isolation of MUF-cellobioside hydrolyzing clones from metagenomic library and the patterns of *Bam*HI digestion. C, fosmid vector in EPI; 15, Ce15; 65, Ce65; 83, Ce83; 92, Ce92; 94, Ce94; 102, Ce102; M, λ *Hind*III marker

Table 2-7. Characteristics of MUF-cellobioside hydrolyzing clones from metagenomic library

Clone	Source	Vector	Insert size	Relative activity
Ce15 6-B-6C	Daebudo	Fosmid	30-40 kb	+
Ce65 10-A-4B	Mujechi bog	Fosmid	30-40 kb	+
Ce83 10-D-1E	Upo wetland	Fosmid	30-40 kb	+
Ce92 8-B-9G	Upo wetland	Fosmid	30-40 kb	++
Ce94 6-D-1D	Upo wetland	Fosmid	30-40 kb	++
Ce105 2-C-1E	Upo wetland	Fosmid	30-40 kb	+

나) β -Glucosidase 생산 클론의 유전자의 염기서열 분석 및 상동성 조사

pUGLU92 클론을 DNA 염기분석한 결과 전체 크기가 2,750 bp이었으며 한 개의 ORF를 포함하고 있었다 (Fig. 2-24). ORF (*bglA*)는 1,455 bp로 구성되어 484 amino acid를 암호화하며 추정되는 분자량은 53.5 kDa이었다. *bglA*의 deduced primary sequence를 SWISS PROT database에서 상동성분석한 결과, Henrissat이 정의한 glycosyl hydrolase family 1의 *Clostridium thermocellum*와 *Thermotoga maritima*의 BglA과 48%의 identity를 나타내었고 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*의 BglA과 46%의 identity를 나타내었다 (Fig. 2-23). BglA sequence를 vector NTI program을 이용하여 glycosyl hydrolase family 1 group과 alignment한 결과, conserved residues인 glutamate 387과 glutamate 203이 존재하였다. Voorhorst 등 (1995년)에 의하면 glutamate 387은 glycosyl hydrolase의 catalytic active nucleophile이고 반면에 glutamate 203은 acid-base catalyst이다.



Fig. 2-26. Alignment of β -glucosidase from pUGLU92 clone with other members of family 1 of glycosyl hydrolases. Sequences were deduced from the following accession number: *Paenibacillus polymyxa* (P22505); *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (P10482); *Clostridium thermocellum* (P26208); *Bacillus circulans* (Q03506); *Thermotoga maritima* (Q08638); *Agrobacterium* sp. (P12614); *Thermobispora bispora* (P38645). The arrows above the sequence indicate the conserved glutamate residues that have been identified as acid-base catalyst and active site nucleophile.

```

CBA CBA CCC A C C C A C C C T T C A C C T A C T B C C C C C C B T A G C C C A B B B C B G C B C C C T B C T T G C C 67
C C T B G C C A G C C T C C C C B C G A B C C G T C G A G C T B A T C G A D G T B C C G A T C T T B C G A G C T B G A T B G T C 135
G C A T G G C C G A G G G C G A C A G A C C G G C G T C T T T A A D G C A A C C G G G C C T G A G C A G C C G A T C C C A T C C A 204
B G G C G T C T G T B A G G C C T G C A A G B G G C T T A G C G G B A G C A D G C G C B C T T C B T C T B G G T T G A C G A B A G C 276
T T T C T G C T C A A G C A A G A C G T C A A G C C A T G G A G C G A G C T T C G G C T C T G G G T C G C G G C C A G T C A A A C C C T 347
G A G T A T A C T G C T T T G C D A G C A T C A G C G C G C C A A G B G G A T C G C T G C C G G G C T G G G C T T C G G C C A C T T 416
C T C B A A A C C A T C C A B B A C A C S C T C G C C T G B B A T B C C A B C C C B C C T B C T B A T C T C B A G C G C C B G C T B B 489
M P A G L L I S B A G L 72
B C T C C C C G C C B A B C B A B C A B C C C T B C T B C A B B C C T B A A C A T C T A T C A A B A A B B C C A C C A A T B 557
G G P P B A K Q P C C R P G T B I K K G H D M 35
A C T G A A C A T G A G C T T C A G C C C T T C C C A A G G G C T T T C T G T G G G G C G T G C C A C A T C G T C A T A C C A G A T C 626
T E H E L D P F F P K G F L W G A A T S S Y Q I 58
B A B B B B C C T B B A A C B A B B A T B B C A A B B B C B A B T C B A T C T B B G A T C B T T T A C B C B A T C C C C B C A 893
E G A W N E D G K G E S I W D R F T R I P G 80
A A A T C A A A A C B B C B A T A B C B C B A T B T C B C G T B T B A C C A C T A T C A T C B C T A T B A B C A B A T C T T G A C C 783
K I K M G D B G D V A C D H Y H R Y E D D L D 103
T G A T G G C C C A G C T T G G C T C A A G A C C T A T C G C T T E T G A T C G C C T G G G C G G C A T C C A G C C C G A T A G C 931
L M R D L G L K T Y R F S I A W A R I Q P D S 126
T C G C G C C A G A T C A A T C A G C G C G G C T C B A T T T T A C C G C C G C T G B T G A A G G G C T G C A C A A G C G B A 989
B R Q I N Q R G L D F Y R R L V E G L H K R D 148
T A T C C T C C A T B B C C A C B C T C T A T C A C T B B B A T C T S C C C A G T B B B T T B A B B A C S A B B B C B B C T B B C 867
I L P M A T L Y H W D L P Q W V E D E G Q W 171
T G A G C C G C A G A G G C C A G C C G C T T T G C G A A T A C A C C A A G C G C T G T A G C C G C B C T T G G C G A C C A 1034
L S R E S A S R F A E Y T H A L V A A L G D Q 184
G A T C C C G C T C T G G B T S A D S A T A A C S A B C C C A T S G T C A C C G T C T G G G C C G C T A T C A C A T G G G C C T C T 1182
I P L W Y T H N E P M V Y T V W A G Y H M S L 210
T T S C C C T B B B C T C A A B A C C C C A C B C T B B B T B B C C S C B T B B C S C A C C A T C T G C T B C T C T C B C A C B B 1176
F A P D L K D P T L G D R V A H H L L L S H G 239
C D A G G C G C T G C A G G C C T T C G G G C G C T A T C C C A G C C G G C A G C C A G A T G G G C A T C A G C T C A A T T T C 1235
D A L D A F R A L B P A G B B M G I T L N F 281
A A C A C C A T C T A T C C C G T A G C G C C G A G C C C G C T G A T G T T G A G G C C G C C C G G C G C A T G C A C A G C T T T C A 1303
N T I Y P V B A E P A D V E A A R R N H S F Q 294
B A A T B A G C T C T T C C T B A B C B C T T A T A C C B B C C A S T A C A C C A B B C C A C B C T C A T B B C T A C C C C A A 1372
N E L F L E P L I R G Q V N D A T L M A Y P M 307
C C T B C C T B A G T T A T C B C C C C B A B A T A T G C A G A C C A T C A G C B C C C B A T C S A C T T C C T B B G C B T C A 1640
L P E F I A P E D M O T I S A P I D F L G V 328
A C T A C T A C A A C C G A T G C G C G T C A A S A G C A G C C C G C A G C C G C C T G G C A T C G A G G T C G T C C A G G T G G A 1509
M Y Y R P M R V K B S P Q P P G I E V V Q V E 352
B A G C C C C B T C A C C B C T A T B B B C T B B A B A T C B C C C C T B A B B C C C T A T B A C C T B C T B A T B B B A T T 1574
B P V T A M G W E I A P E G L Y D L L M G I 374
A C C C C A C C A T B B C A A G C T B C C B A T C A T A T A C A C T S A A A A C B B C B C B G C C T T C B A C B A C C A B C C C B A T 1644
T R T Y G K L P I Y I T E M G A A F D D Q P D 397
C A G A G C G G T C A G B T A A C B A C C C S C A G C G G T G G G C T A C T T C A G G G G C A T A T T G G G C C G C G C G C 1711
Q S G Q V M D P Q R V G Y F Q G H I G A A R 419
B C B C G C T C C C C A C B A B T C B A T C T B C B C B C T A T A C S C C T B G T C T C T B C T T G A T A C T T T G A B T B B B 1779
R A L A D B V D L R B Y Y A W S L L D N F E W 442
C C S A B B B C T A T A B C A A G C G C T T T B G T A T C A T T A T B T C B A C T T C B A B A C C C A B C A B C B C A C G C T C A A B C A 1648
A E G Y S K R F B I I Y V D F E T Q Q R T L K Q 459
G A G C G C G A S T G S T A T G C G A C G T A A T T G C G C G A A C S G G C T A G C C G G C C C G C T A T T T G A G A A T G T A G 1819
B A Q W Y R D V I A R N B L A A P A I * 495
T A G B T G C G G C C T T C T C G C C A A T C T T A A T G A T C A T A C C G C G G T C A C C A G B T C C G A G A G A T C G C G C C G G A 1991
T T S T C C B B B C B A G A C A T C B B B B B C C T B C T C C T B C A B A T C G C B G T T B B T G A T B C B A C B A T B C T C B G T C A A 2861

```

Fig. 2-27. Nucleotide sequence of the *bglA* genes and the flanking regions. The deduced amino acid sequences for the ORF are placed below the nucleotide of corresponding codon. Putative Shine-Dalgarno sequences for ribosomal binding sites (RBS) are underlined. The presumptive TATA box is boxed. Translation codon is indicated by an asterisk.

다) BglA 정제와 생화학적 특성

BglA의 발현을 위하여 5'말단에 *Bam*HI을 포함하는 primer, 5'-TCGGATCCATGCCAGCCGGCCTGCTGATC-3', 3'말단에 *Hind*III을 포함하는 primer, 5'-GCAAGCTTGAATAGCGGGCGCGGCTAGCCC-3'를 사용하여 증폭하였다. 증폭한 DNA는 5'말단에 hexahistidine tag이 포함되어 있으며 pET32a(+)에 cloning (pEGLU92)하여 *E. coli* strain BL21(DE3)에서 발현시켰다. 발현한 단백질을 정제하여 PAGE로 single band를 확인하였다 (Fig. 2-25). 원래 BglA는 약 53 kDa이나 pET32a(+)의 N-말단의 start codon까지 his-tag을 포함한 약 20 kDa의 단백질이 더 포함되어있어 PAGE 결과를 보면 약 70 kDa의 위치에서 band를 확인 할 수 있었다. 실제로 N-말단쪽의 additive sequence가 활성에 별다른 영향을 주지 않는 것을 확인하고 효소의 특성을 검정하는데 이 정제된 단백질을 그대로 사용하였다. 정제된 BglA를 PAGE 한 다음 pNP-glucopyranoside 기질에 염색하였더니 Fig. 2-26에서 보는 바와 같이 정제된 효소가 있는 자리에 형광을 발하는 것을 확인할 수 있었다. pNP-glucopyranoside를 기질로 한 이 효소의 최적 온도는 55°C 부근이었으며 최적 pH는 6.5 근방이었다. 일반적으로 미생물이 분비하는 효소는 대부분 pH 6과 6.5 근방에서 활성이 높은 경향이 있다 (Fig. 2-27). 따라서 우리가 분리한 BglA도 미생물에서 유래한 효소일 가능성이 높을 것으로 생각되었고 실제로 상동성 비교 분석에서도 같은 결과를 알 수 있었다. 또한 최적 온도가 55°C인 것은 상당히 높은 온도 활성을 가지는 효소라는 것을 알 수 있었는데 이런 결과도 상동성 비교 분석에서 *Thermotoga maritima*나 *Bacillus* 등에 유사성을 가지고 있다는 점과 일치하였다. 반면 효소의 pH stability는 pH 8.0 부근에서 가장 높았으며, 온도 stability는 50°C에서 약 1시간이 지나도 잔존활성이 그대로 유지되는 것을 볼 수 있었다. 기질 특이성은 Table 2-8에서 보는 바와 같이 β -1,4 결합을 하는 기질들을 주로 분해하는 것을 알 수 있었고 α -결합은 거의 분해하지 못하는 것을 알 수 있었다. 또한 β -1,2 결합을 가진 sophorose는 분해하였지만 β -1,6 결합을 가진 gentiobiose에는 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 특히 pNP- β -glucopyranoside 보다 pNP- β -fucopyranoside에 오히려 활성이 더 높게 나타났는데 이는 일반적인 β -glucosidase가 β -fucosidase의 활성을 나타내는 이전의 Chantragan 등 (1996년)의 연구결과 보다 훨씬 높은 β -fucosidase의 활성을 나타내었다. 그리고 여러 가지 2가 이온에 효소를 방치한 후 효소의 활성을 측정한 결과 Table 2-9에서 보는 바와 같이 Mn^{2+} 에서 가장 높은 잔존활성을 나타내었다.

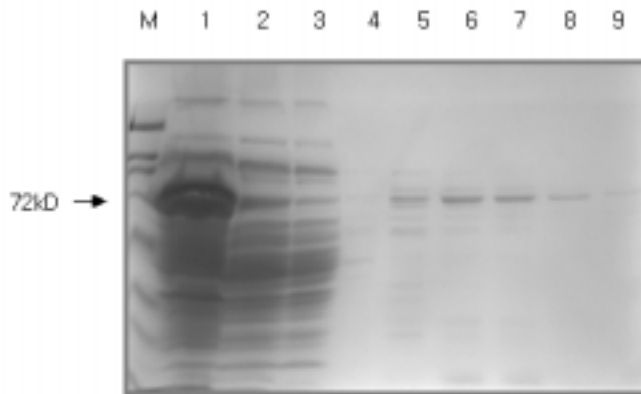


Fig. 2-28. SDS-PAGE Analysis of native purification method of BglA. M, broad range marker; 1, native lysate in 20 mM imidazole solution; 2, supernatant; 3, flowthrough; 4, washing with 50 mM imidazole solution; 5, eluates in 100 mM imidazole solution; 6, eluates in 200 mM imidazole solution; 7, eluates in 250 mM imidazole solution; 8, eluates in 300 mM imidazole solution; 9, eluates in 500 mM imidazole solution.

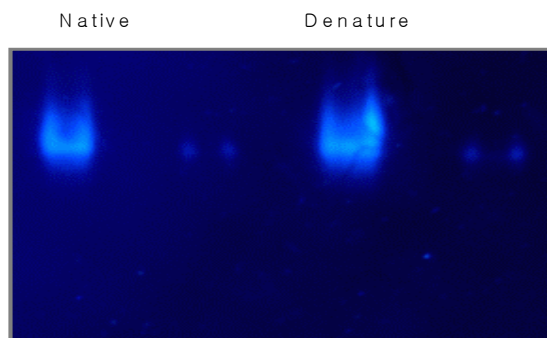


Fig. β -glucosidase의 활성 확인 .

Fig. 2-29. Detection of BglA activity of the purified BglA. β -Glucosidase activity was detected using 4-methylumbelliferyl-cellobioside as substrate.

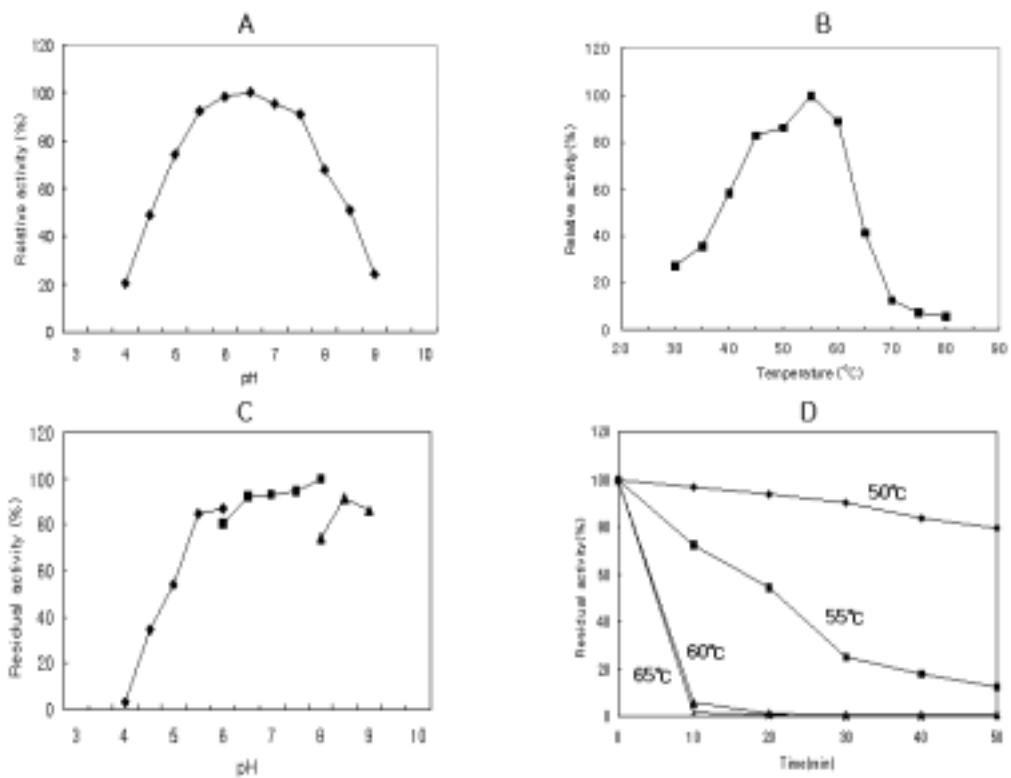


Fig. 2-30. Effect of pH, temperature, pH stability, and thermal stability. A, Effect of pH on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at 55°C for 15 min in sodium phosphate buffers of indicated pH; B, Effect of temperature on the relative activity of BglA. Enzyme activity was assayed at pH 6.5 for 15 min at the indicated temperature; C, Stability of pH on the residual activity of BglA; D, Stability of temperature on the residual activity.

Table. 2-8. Substrate specificity of BglA using pNP-glycosides. The purified BglA was assayed for its activity using different pNP-glycosides (1 mM) in Na-phosphate buffer (50 mM, pH 6.5). The activities measured by the standard assay method were compared with the hydrolysis of pNP- β -D-glucopyranoside (100%). All values were the mean of three times assays

Substrates	Relative activity (%)
Saccharides (1 mM)	
Cellobiose [β (1,4)Glc]	100
Cellotriose [β (1,4)Glc]	103
Cellotetraose [β (1,4)Glc]	105
Cellopentaose [β (1,4)Glc]	102
Gentiobiose [β (1,6)Glc]	17
Sophorose [β (1,2)Glc]	97
Salicin	33
Arbutin	11
Aryl-glycosides (1 mM)	
<i>p</i> -NP- β -D-glucoside	100
<i>p</i> -NP- β -D-fucoside	220
<i>p</i> -NP- α -D-glucoside	0
<i>p</i> -NP- α -L-fucoside	0
<i>p</i> -NP- β -D-cellobioside	26.2
<i>p</i> -NP- α -D-cellobioside	5.3
<i>p</i> -NP- β -D-galactoside	30
<i>p</i> -NP- α -D-galactoside	0
<i>p</i> -NP- β -D-lactoside	13.3
<i>p</i> -NP- β -D-D-mannoside	3
<i>p</i> -NP- α -D-mannoside	0
<i>p</i> -NP- β -D-xyloside	2
<i>p</i> -NP- β -D-glucuronide	0
<i>p</i> -NP- α -L-arabinoside	0
<i>p</i> -NP- α -L-rhamnoside	0
<i>p</i> -NP-N-acetyl- β -D-glucosamine	0
<i>p</i> -NP-N-acetyl- β -D-galactosamine	0

Table 2-9. Effect of metal ions on BglA. The β -glucosidase was exposed for 30 min at room temperature to 5 mM concentrations of metal ions and then measured under standard conditions. The activities measured by the standard assay method were compared with the hydrolysis of pNP- β -D-glucopyranoside (100%) without added ion

Cation (5 mM)	Relative Activity (%) ^a
Mn ²⁺	223
Mg ²⁺	122
Cu ²⁺	85
Zn ²⁺	24
Ca ²⁺	23
Fe ²⁺	3
Co ²⁺	0

라) BglA의 ginsenoside 전환

인삼 뿌리의 다양한 약리학적 성분들은 ginsenoside를 포함한 polyacetylenes, polyphenolic compounds 그리고 acidic polysaccharides등이 있다. 인삼 추출물 중 ginsenosides 가 가장 약리적인 효과가 가장 뛰어나며 현재까지 약 38개의 ginsenoside가 인삼뿌리로부터 분리되었다. 그 중에서 다섯가지 주요 ginsenosides (ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Re 그리고 Rg₁)가 전체 ginsenoside의 80%를 차지한다 (Kim 등, 1987). 최근 연구에서는 Rd, Rg₂, Rh₂, ginsenoside K와 같은 minor ginsenoside의 약리학적인 활성에 초점을 맞추고 있다. 이들 minor ginsenoside는 오직 인삼에만 존재하기 때문에 major ginsenoside의 sugar moiety의 분해에 의해서만이 생산될 수 있다. 따라서 major ginsenoside를 minor ginsenoside로 전환하는 연구들이 주로 진행되고 있다. 특히 가열이나 산처리가 아닌 미생물 유래의 효소를 이용하여 Rg₃, Rh₂, ginsenoside K의 생산을 유도하는 연구가 진행되고 있다. Minor ginsenoside인 Rd는 모든 ginsenoside의 23%나 차지하는 Rb₁으로부터 전환시킬 수 있다. Minor ginsenoside인 Rd는 신경 줄기세포의 분화를 증가시키고 (Shi 등, 2005) NO 과생산으로 인한 neurotoxicity에 대해 방어 한다고 알려져 있다 (Choe 등, 2003). 본 연구에서는 메타제놈에서 분리한 미생물 유래의 β -glucosidase가 major ginsenoside인 Rb₁을 minor ginsenoside인 Rd로 전환하는 능력을 가지는지 test해 보았다. 먼저 정제한 BglA를 ginsenoside, Rb₁과 반응시켜 TLC상으로 확인해 보았다. Fig. 2-28에서 보는 바와 같이 메타제놈에서 분리한 BglA는 55°C에서 24시간 반응시켰을 때 Rb₁을 모두 Rd로 전환시키는 것을 볼 수 있었다. 또한 HPLC 분석을 통해서 ginsenosides Rb₁의 전환을 다시 한번 확인하였다 (Fig. 2-29). 따라서 본 연구에서 사용한 메타제놈 유래의 β -glucosidase는 우리고유의 유전자로써 약리적으로 활성이 좋은 ginsenoside를 생산하는데 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

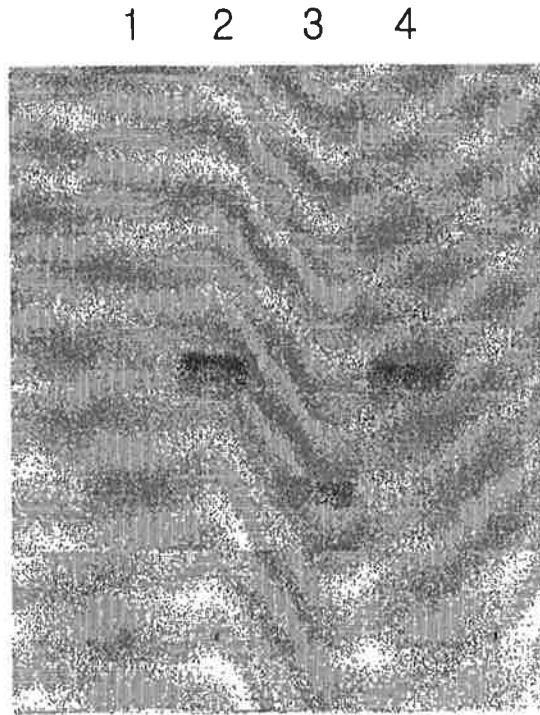


Fig. 2-31. Conversion of Rb₁ to Rd using β -glucosidase. 1, Rb₁; 2, Rd; 3, initial reaction mixture; 4, 1 day reaction mixture. β -glucosidase and 1 mM of ginsenoside Rb₁ were dissolved in 1.5 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0). The reaction mixture was incubated at 50°C for 24 h. Prepared samples were spotted on silica gel 60 F₂₅₄ plate; the plate was placed in a TLC chamber containing a solvent mixture of CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, vol/vol/vol, lower phase) and developed at room temperature. The plate was dried completely and dipped rapidly into 5% H₂SO₄ and heated at 110°C for 5 min.

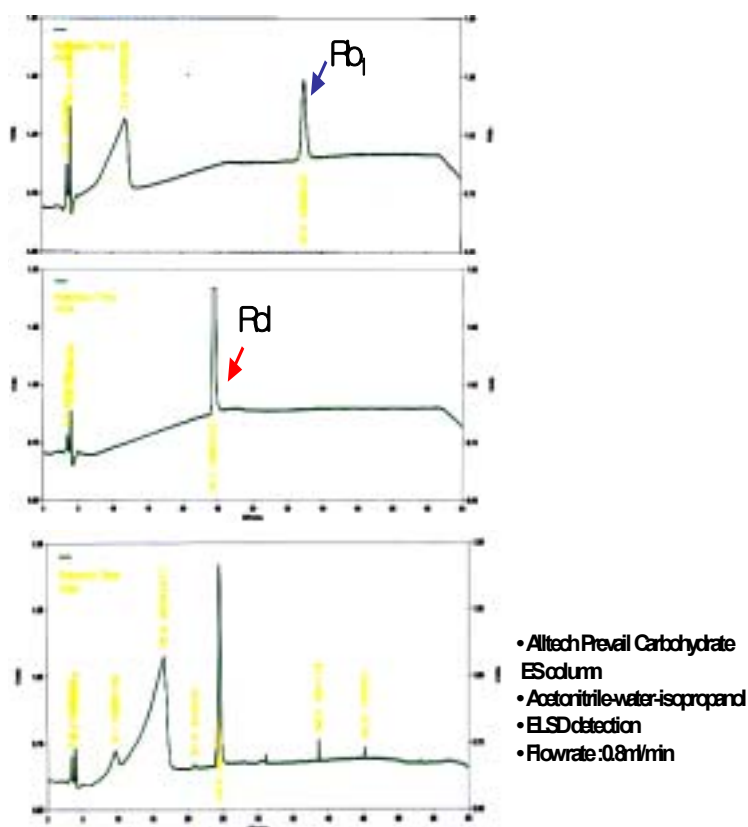


Fig. 2-32. HPLC analysis of Rb₁ to Rd using β -glucosidase. A, Rb₁; B, Rd; C, 1 day reaction mixture. The reaction mixture prepared for TLC analysis was separated by HPLC, using an Alltech Prevail Carbohydrate ES column (4.6×250 mm), using gradient conditions with acetonitrile–water–isopropanol (80:5:15, vol/vol/vol) (solvent A) and acetonitrile–water–isopropanol (80:20:15, vol/vol/vol) (solvent B). The ratios of solvent A/solvent B were 70/30, 0/100, 0/100 and 70/30, at running times of 0, 20, 50 and 60 min, respectively, at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹, and with ELSD detection.

2. 내염성 관련 유전자 분리

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

식물이 가뭄이나 염해(鹽害), 고온, 건조 등의 환경 스트레스에 노출되게 되면, 세포 내에 osmotic imbalance 와 ion imbalance가 일어나게 되는데 이를 abiotic stress (비생물 스트레스)라고 한다. 미생물은 이러한 유해 환경 stress에 대응하여 살아남기 위하여 여러 가지 방법을 구사하며 세포내의 osmotic 및 ionic balance를 항상 일정하게 유지하고 있다. 본 연구에서는 다양한 환경토양 DNA로부터 구축된 metagenome library로부터 abiotic stress 관련 유전자로 내염성과 proline 과발현 유전자를 분리하고 분자구조를 해석하여 유전자 발현 활성영역의 발현과 특성을 분자생물학과 생화학적 기술로 구명하였다.

2) 연구방법

가) 내염성 eDNA clone 선발

내염성 metagenome clone선발을 위하여 대부분 갯벌토양, 우포 늪, 무척추동물 토양으로 제작된 metagenome library를 이용하였다. 각각의 library의 clone을 Freezing 배지를 포함하는 384 plate에 이쑤시게로 옮겨 접종원을 확보하고 -80°C 에 보관하였다. 384 pin으로 된 replica로 각각의 384 접종원으로부터 clone을 취하여 5%의 NaCl과 chloramphenicol (12.5 ug ml^{-1})을 포함하는 LB 고체 배지에 접종하고 37°C 에서 2틀 동안 방치 하였다.

나) Proline-overproduction eDNA clone의 screening

Proline-overproduction 합성여부를 확인 할 수 있는 배지로서 L-Azetidine 2-carboxylic acid (AZ, L-Proline의 analog compound) 20 mM를 포함하는 LB 배지를 사용 하였다. AZ는 proline을 합성하지 못하는 clone에는 독성을 나타내어 생존할 수 없게 되며 proline을 합성하여 축적 하는 clone은 Az에 대한 독소 저항성을 나타내므로 생존하여 colony를 형성 할 수 있다. 이러한 positive clone을 선발하기 위하여 metagenome clone을 Az 배지에 접종하고 저항성 clone screening에 이용 되었다.

Soil DNA를 이용한 proline 합성 유전자의 PCR cloning을 위하여 다양한 미생물의 proline 유전자 염기서열의 보존영역을 primer로 작성하고 PCR 증폭을 실시하였다. PCR반응 용액은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂,

0.01% gelatin, 100 ng primer, 50 ng template DNA, 200 μ m dNTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP), 및 2.5 unit *Taq* polymerase (Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였다. PTC-100 (MJ. Reasearch사)의 PCR기기를 이용하여 처음 DNA변성을 위하여 94°C에서 5분간, 그 후 cycle에서 DNA변성은 94°C에서 1분, annealing은 45-55°C에서 1분 및 DNA합성은 72°C에서 2분으로 총 36 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 5분으로 하였다. PCR 특이 밴드를 cloning 하기위하여 PCR밴드를 agarose gel로부터 도려낸 후 Gel extraction Kit (Q.BIO 사)에 의하여 DNA를 추출 하였다. 추출된 DNA절편을 pGEM-T vector (Promega 사 제공)에 14°C에서 overnight하여 ligation 용액 2 μ l를 *E. coli* (DH5) cell에 형질전환 하였다. Ampicillium (50 ug ml⁻¹)과 X-gal 이 함유하는 LB plate에 형질전환 균을 도말하여 37°C에서 16시간 방치한 후 재조합체라고 생각되는 흰색의 colony를 선발 하여 5 ml의 LB broth에 overnight 배양하고 Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega)으로 plasmid를 정제하고 DNA절편이 삽입 되었는지 여부를 EcoRI 제한 효소를 처리 하여 조사 하였다. Sequencing 반응은 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reation kit (Perkin-Elmer Co.)를 이용하였다. 염기서열 결정은 ABI 3700 automatic sequencer (Perkin-Elmer Co.)로 명지대학교의 그린진바이오텍에 의뢰하여 수행 되었다. PCR산물의전기영동: 증폭된 PCR산물은 Agarose gel과 Polyacrylamide gel분석 방법을 병행하여 실시 하였다. Agarose gel분석은 PCR반응용액 (15 μ l)를 TBE 완충액 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA pH 8.0) 에 녹인 1.5%의 agarose gel에 loading한후 5 vol cm⁻¹로 전기영동 하였으며, ethidium bromide용액에 염색 하여 UV lamp하에서 DNA밴드를 확인 하였다.

나. 연구결과

1) 내염성 eDNA clone 선발 및 분석

내염성 eDNA clone을 선발하기 위하여 대부도 갯벌, 우포늪, 무제치 늪 등의 토양으로부터 분리한 토양 DNA에서 약 40 kb의 삽입 DNA가 포함되게 구축된 fosmid (EPINCENTRI) library를 이용하여 총 80,640의 eDNA clone을 384 plate에 stock하여 384 replica pin으로 NaCl 5% 농도를 포함하는 chroramphenicol (12.5 ug ml⁻¹)이 첨가된 LB 에 접종하고 2틀 후에 colony 형성 여부를 관찰 하였다 (Table 2-10). 그러나 내염성 clone으로 인정 할 수 있는 clone이 사용된 배지에서 형성 되지 않았다. 따라서, 방법을 달리하여 원주 토양에서 제작된 *in vitro* packaging fosmid를 *E.coli* (EPI)에 직접 감염시켜 5% NaCl 농도가 포함하는 배지에 도말 2틀 후에 clone의 형성 여부를 관찰 하였다. 그림 2 A는 5% NaCl 배지에서 형성된 colony를 나타낸 것

으로 48시간이후에 colony형성이 관찰 되었다. 형성된 20여개의 colony를 분리하여 5% NaCl액체배지에 접종하고 2틀 후에 포자현탁액의 농도를 관찰한 결과 20여개의 colony 중에서 1-6과 1-22균주가 다른균주와 비교하여 5% NaCl 배지에서세포 현탁정도가 가장 높은 것으로 나타났다. Fig. 2-30B는 1-22와 1-6균주를 대조구인 F33과 비교한 것으로 F33균주는 사용한 tip 부분에 엉켜 응어리로 존재하고 5% NaCl 배지에서 세포가 용해되어 성장하지 못하였으나 1-6과 1-22의 경우에는 배지 전체에 골고루 현탁되어 용해되지 않고 정상적으로 성장함을 관찰 할 수 있었다. 세포 수에 있어서도 대조구의 1.4×10^3 에 비하여 1-6균주와 1-24균주는 1.2×10^8 정도로 높은 농도로 관찰 되었다.

1-6과 1-22균주가 fosmid를 가지고 있는 metagenome 유래 clone인지여부를 조사하기 위하여 fosmid를 분리하고 전기 영동하여 확인 한 바 Fig. 2-30과 같이 fosmid라고 인정되는 고분자량의 fosmid가 관찰 되었다.

위의 fosmid상에 존재하는 내염관련 유전자 활성 영역을 분리하기위하여 pUC18에 subcloning을 실시하여 *E. coli*에 형질전환하고 5% NaCl LB plate에 도말하여 colony분리를 시도 하였으나, 얻지 못하였다. 이는 내 염성관련 유전자가 1개의 유전자에 의해서 지배를 받는 것이 아니라 유전자 cluster또는 regulation 하는 유전자 등 이 연관 되어 있을 수 있을 것으로 사료 되었다. 기존의 새로운 품종 육성은 순계육종(pure line breeding), 선발 및 교잡육종이 주된 방식이다. 생물공학적 접근은 세포나 조직배양, 원형질체 융합 그리고 최근에 진일보한 발전을 보이고 있는 재조합 DNA기술이라 할 수 있다. 본문에서는 재조합 DNA기술에 의한 내염성 품종 육성에 대해 기술한다.

염성식물은 외부 삼투압의 변화에 따라 세포내의 삼투압을 유지하기 위한 특별한 화합물, 즉 양립용질 (compatible solute)을 합성하는 기작을 가지고 있다. 이것에는 양성화합물로서 글리신 (glycine), 베타인 (betaine), 프롤린 (proline)이 있으며, 다당류로서 피니톨 (pinitol), 소비톨 (sorbitol), 만니톨 (mannitol) 등이 있다. 이러한 화합물은 저분자·고수용성이며, 대사되기 어렵고 대사에 영향을 끼치지 않아 삼투조절에 적합하다. 이러한 양립용질은 대부분 미생물에서 동정되어 얻어졌다.

93년 Tarczynski 등은 박테리아에서 분리한 만니톨 합성유전자를 분리하여 담배세포에 삽입시킨 다음 재분화시켜 새로운 계통을 만들었는데, 이 식물체는 염화나트륨 250 mM에서도 정상생장이 가능함을 보여주었다. 최근에는 대장균 등에서 분리한 Bet A 유전자, cod A 유전자, Mlt D 유전자, HVA I 유전자 등 복합 유전자를 식물체에 삽입시켜 내염성 및 내건성 품종을 육성하고 있다. 대장균으로부터 내염성 유전자로 알려진 Bet A 및 Bet B 유전자를 분리하여 식물 형질전환용 벡터 (운반체)를 개발하였으며, 현재 현사시에 삽입시켜 내염성 능력을 지닌 현사시의 육성을 시도하고 있다. 이밖에도 담배에서 분리한 내염성 유전자인 OLP, 기타 미생물에서

분리한 Mlt D 유전자를 식물 형질전환용 벡터로 개발하였고 포플러류에 삽입 후 내염성을 높이는 실험을 실시하고 있다.

Table 2-10. Screening of Salt-Resistant clones using metagenome libraries

Source	Vector	Bacterial host	Scened clones	Salt-Resistant clones
Daebudo	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	19,200	No
Upo wetland	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	49,920	No
Mujechi bog	fosmid	<i>E.coli</i> (EPI)	11,520	No

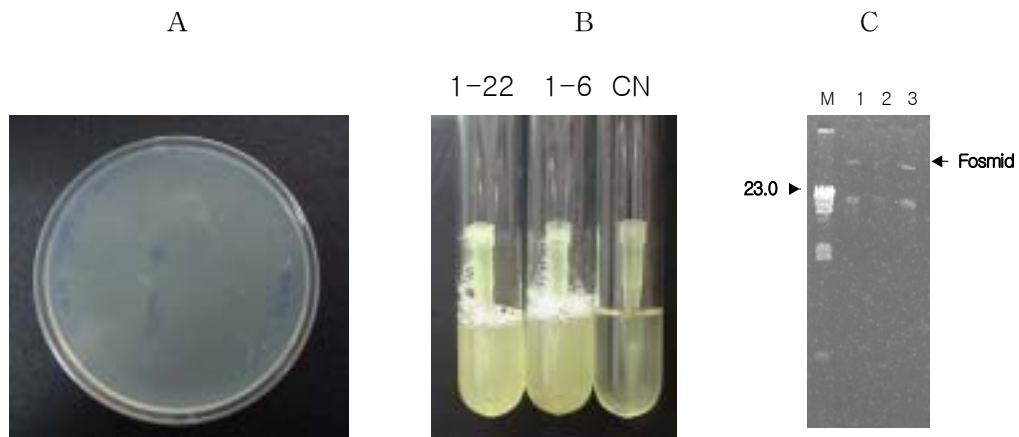


Fig. 2-33. Screening of salt-tolerance metagenome clones on 5% NaCl LB plate. (A) metagenome clones formed on 7% NaCl LB plate, (B) Growth of metagenome clones 1-22 and 1-6 on LB liquid media containing 5% NaCl, CN: metagenome clone F33 used as negative control, (C) Isolation of fosmids from lanes 1-3; 1-22, 1-6, CN.

2) Proline-overproduction eDNA clone 선발

진핵과 원핵생물에 있어서 proline 축적은 탄소, 질소원공급과 삼투조절기능이 있으며 최근의 보고에 의하면 병원세균에 있어서 잠재적인 virulence factor로서의 기능도 있는 것으로 알려져 있다. Proline이 식물체에 축적되면 내염, 내건성, 내한성을 보이는 것으로 알려져 있어 Abiotic stress에 연관됨이 보고되고 있다 (Delauney 등 1993; Xin 등 1998; Maggio 등 2002; Fabro 등 2004). 고등식물에서는 Proline이 glutamate나 ornithin으로부터 합성되며 pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)에 의하여 glutamyl-5-semialdehyde (G5SA)로 전환되며 pyrroline-carboxylate reductase (P5CR)에 의하여 Proline이 합성 되어 나간다. Arabidopsis의 경우는 salt와 drought stress를 받게 되면 2개의 연관된 P5CS 유전자가 활성화됨을 관찰 하였다. 세균의 경우에도 glutamate로부터 proline을 합성하며 proB 유전자산물인 glutamyl kinase (GK), proA 유전자 산물인 glutamyl-phosphate reductase (GPR)와 proC 유전자 산물인 pyrroline-5-carboxylate reductase (P5C) 등의 효소가 관여한다. 대다수의 세균종은 proAB가 operon으로 구성 되어 있으며 proC는 다른 염색체 영역에서 관여 한다. 본 연구는 Proline의 다기능과 Abiotic stress 유전자로서의 활용성을 증시하여 metagenome으로부터 proline 합성관련 유전자의 분리를 시도 하였다.

가) eDNA library 으로부터의 prolin-overproduction clone 분리

본 연구에 사용되는 eDNA library의 기주는 *E. coli* EC100 (Epicentre)이며 proAB 유전자를 모두 포함하고 있어 L-Azetidine 2-carboxylic acid (AZ)에 대하여 toxic 저항성 가능성을 내포 하고 있다. 먼저 AZ에 대한 *E. coli* EC100의 toxic 저항성을 농도별로 조사 하였다. *E. coli*는 20 mM의 Az에서부터 세균성장 억제를 나타나고 있었으며 30 mM에서 성장이 되지 않았다. Fig. 2-31은 30 mM의 AZ농도에서 fosmid를 포함한 *E. coli* EC100 (F33)와 강력한 Az 독소 저항성 세균균주 B13과 B15 (미동정 세균)을 액체배양하여 비교 한 것이다. 30 mM의 Az농도에서 F33의 세균성장이 거의 억제 됨을 관찰 할 수 있었다. 따라서, Az농도를 30 mM로 정하여 screening을 실시하였다. 80,640의 eDNA clone을 30 mM Az LB 배지에 접종하고 성장 여부를 관찰 하였으나 Az 독소 저항성 clone이 발견되지 않았다.

F33 B13 B15

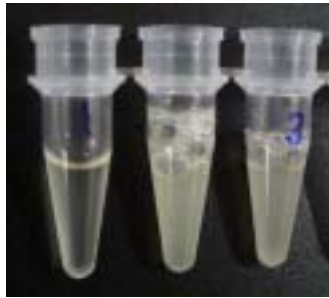
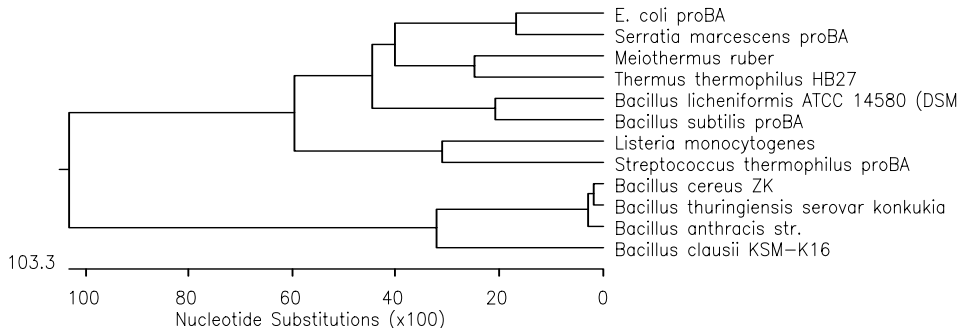


Fig. 2-34. Growth inhibition of Bacterial cell on Az 30 mM.

나) PCR증폭에 의한 Metagenome DNA로부터 proAB 유전자 분리

Metagenome library의 삽입 Soil DNA를 이용하여 PCR에 의한 proAB 유전자를 분리하고자 시도하였다. Soil DNA내에 proline 합성 유전자의 존재 여부를 알아보기 위하여 유전자 은행에서 지금까지 보고된 12 세균종으로부터의 proAB 유전자 정보를 추출하고 DNA star를 활용하여 conserve 된 영역을 조사한 후 primer로서 고안하여 본 실험에 이용되었다. 그림 4는 NCBI에 등록된 12 세균종의 proAB 염기서열을 이용하여 세균종간의 유사성을 나타낸 것이다. Bacillus group는 64에서 98%의 염기서열 상동성을 보였으나 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*는 별도의 group에 속하여 다른 *Bacillus* 종에 매우 낮은 염기서열 상동성을 보였으며 오히려 Gram negative bacteria인 *E. coli*, *Serratia* sp.에 더욱 높은 상동성을 보이고 있다 (fig. 2-32). 따라서 세균 종에 따라서 proABdb전자는 다양한 염기배열 구조를 가지는 것으로 확인되었다.



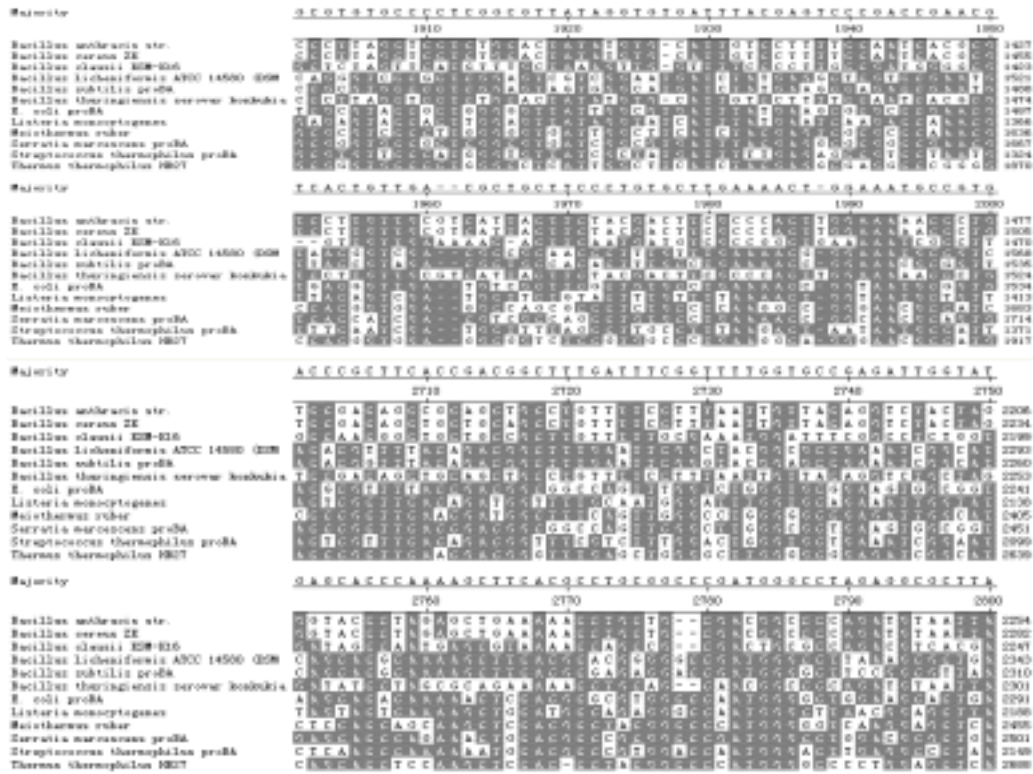


Fig. 2-35. Multiple alignment of proAB sequences from 12 bacterial species.

본 연구에서는 Total soil DNA를 template DNA로 사용함으로 인하여 매우 낮은 copy로서 proAB 유전자가 존재함을 가정 할 수 있었다. 따라서, PCR 증폭으로 인한 proAB 유전자 영역 증폭을 시도 하였으며 이를 위하여 대부분 세균종이 보유하는 conserve proAB 영역을 이용한 primer 제작 및 적용이 중요 하게 생각 되었다. 그림 5는 12세균종간에 proAB 염기서열간의 상동성을 DNA star의 align program을 사용하여 conserve 영역을 확인한 그림이다. proAB의 conserve 영역을 근거로 하여 primer를 8쌍 작성 하였으며 그 결과는 Table 2-11에 나타나 있다.

Table 2-11. Primers derived from sequences from proAB genes of various bacterial species

Primers	sequence (5 '-3')	Origin
primer1-F	CCA TTT CCA CGA AAT GAC	<i>Bacillus anthracis</i> proBA
primer1-R	TGC GTG CTG ATG CCG TCT	
primer2-F	CTG ATG CCA ATC TCA GCT	<i>Bacillus subtilis</i> proBA
primer2-R	CCG AAT TCA AAG CCG TCT	
primer3-F	GCA GCA ATA TAT GGA CCA	<i>Bacillus licheniformis</i> proBA
primer3-R	GTT GTT AAT TAC ATC TGG	
primer4-F	AAG GTC GGC ACC GGC GGA	<i>E. coli</i> proBA
primer4-R	TAG TAG ACC TGT AAC AAT	
primer5-F	TGG TGG TAA AAC TCG GCA	<i>Listeria monocytogenes</i> proBA
primer5-R	ATC CAC TTG TAA GTG GTC	
primer6-F	CGT CTG AAC CGT GCC CAT	<i>Serratia marcescens</i> proBA
primer6-R	TCC AGC CCC ATT GGG CCA	
primer7-F	ACC ATC GCC TCG AAA CAA	<i>Streptococcus thermophilus</i> proBA
primer7-R	CCC ATT GGG CCT CTG GCA	
primer8-F	ATG CTG CTG ACC CGT GCT	<i>E. coli</i> proA region
primer8-R	AAC TGG CCG CCG TCG GTG	

다양한 지역에서 분리한 Soil DNA를 Template DNA로 하여 Table 2-11의 primer를 적용하였다. 먼저 primer의 특이성결여를 감안하여 annealing 온도를 45°C, 50°C 및 55°C를 구분하여 PCR 증폭을 실시하였으며 낮은 copy 수를 고려하여 Template DNA는 약 500 ng 정도가 사용 되었다. Fig. 2-34는 본 연구에 사용된 Soil DNA의 상태를 나타낸 것이다.

Fig. 2-33은 Table 2-11의 primer 8쌍을 혼합하여 soil DNA를 PCR 증폭한 것이다. 45°C에서 B13, B15균주와 *E. coli* 균주에서 밴드가 검출 되었으며 50°C에서는 PCR 밴드가 검출 되지 않다가 55°C에서는 B13균주만이 밴드를 형성 하였다. B13, B15와 *E. coli*는 proline합성 유전자를 보유하고 Az에 독소 저항성을 보였던 것이다.

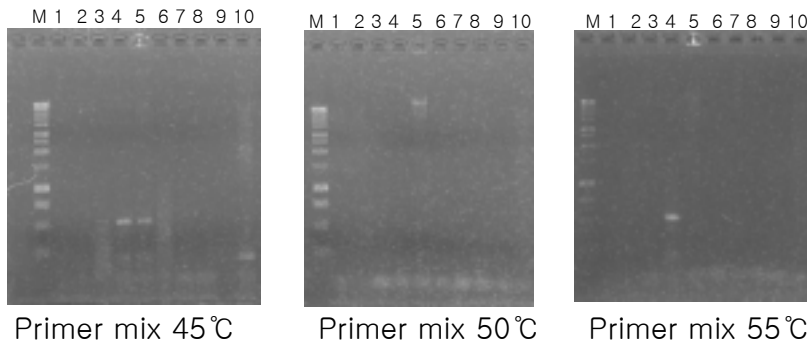


Fig. 2-36. PCR amplification of Soil DNA using proAB primer mix

1:Soil DNA from wonju 1, 2:Soil DNA from wonju 2, 3:Soil DNA from Daebudo, 4:bacterial strain B-13, 5:bacterial strain B-15, 6:Soil DNA from Chonan 1, 7:Soil DNA from Chonan 1, 8:Soil DNA from Chonan 1, 9:Soil DNA from Yangsung,10: E. coli (EC100).

그러나, soil DNA에서는 어떠한 PCR밴드도 검출 되지 않았다. 이는 Soil DNA에 proAB 유전자가 매우 낮은 copy 수로 존재함으로 첫 PCR에서는 검출 될 수 없을 가능성을 생각할 수 있으며 혼합된 primer를 적용할 경우에 primer 간의 dimer 형성 등 PCR 반응 시 방해 요인으로 작용 할 수 있으며 soil DNA내의 불순물로 인한 PCR 저해 현상을 예측 할 수 있었다. 따라서 8쌍의 proAB primer를 각각 사용하고 annealing 온도를 달리하여 다시 PCR 증폭을 실시하였다. Fig. 2-34는 45°C에서 각각의 primer 별로 PCR 증폭한 것으로서 primer 4 (*E. coli* proBA 유래), primer 5 (*Listeria monocytogenes* proBA 유래), primer 6 (*Serratia marcescens* proBA 유래)에서 각각의 2 kb PCR 밴드가 *E. coli* DNA 샘플에서 검출되었으며 primer 8 (*E. coli* proA region 유래)은 B13, B15 및 *E. coli* DNA 샘플에서 PCR 밴드를 생산 하였다. primer 6는 Chonan 지역의 포도재배 토양에서 분리한 토양 DNA인 성거2 성거3에서 1.7 kb와 0.8 kb 부근에서 PCR 밴드를 형성 하였다. Fig. 2-34은 annealing 온도를 55°C로 높여서 Table 2-11의 8쌍의 primer를 이용하여 PCR 증폭을 실시한 그림이다. primer 4, 5, 6, 8에서 *E. coli* 상에서 PCR 밴드를 형성 하였다. 특히 primer 6(*Serratia marcescens* proBA 유래)는 45°C에서 토양 DNA에서 밴드를 나타내 보였으나 *E. coli* 이외에는 PCR 밴드를 검출하지 못하였다. 이는 primer 6는 낮은 annealing 온도일때는 primer와 template DNA간의 고 특이성이 결여됨으로 형성된 것으로 사료 된다. 향후에는 proAB 유전자영역의 conserve 영역을 재조사하고 primer를 재구성 하여 PCR조건을 고 민감성 검출로 새롭게 설정하여 PCR을 실시할 예정이다. 또한 토양 DNA로부터 증폭된 PCR산물을 cloning하여 염기서열 구조를

확인하고 다양한 토양샘플을 채취하여 DNA를 분리하고 proAB 유전자 존재가능성을 PCR로 확인하여 proAB 합성 결핍균주인 CHS1균주에 library를 구축하고 screening 할 계획이다.

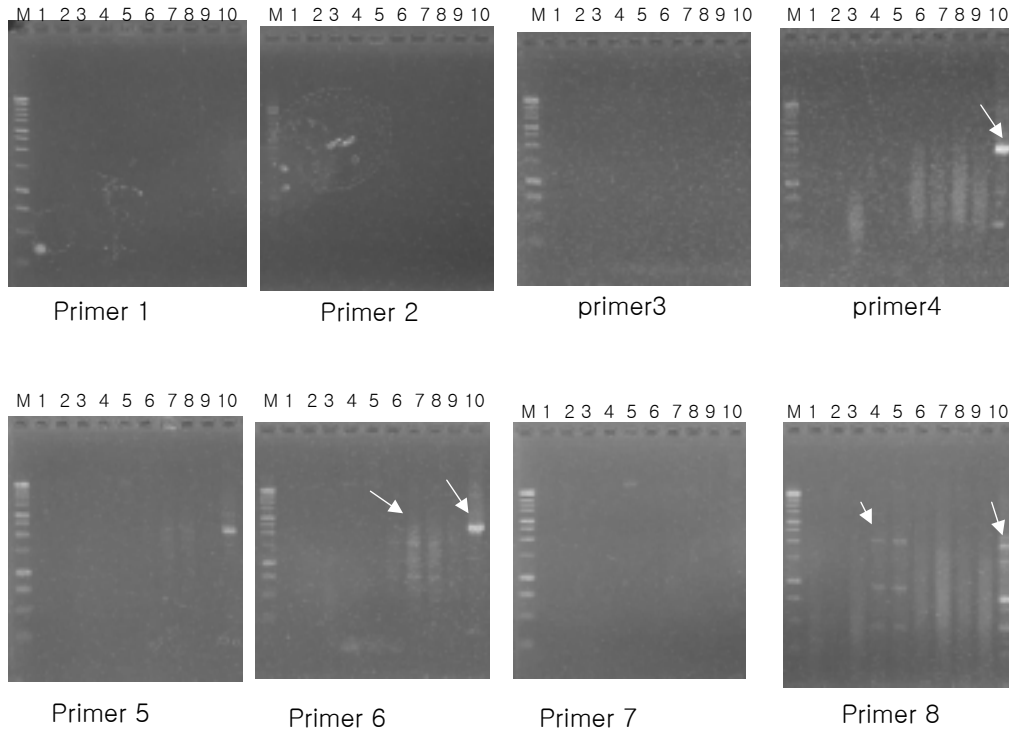


Fig. 2-37. PCR amplification of various soil DNA using proAB-primer sets (Table 2-11). 1:Soil DNA from wonju 1, 2:Soil DNA from wonju 2, 3:Soil DNA from Daebudo, 4:bacterial strain B-13, 5:bacterial strain B-15, 6:Soil DNA from Chonan 1, 7:Soil DNA from Chonan 1, 8:Soil DNA from Chonan 1, 9:Soil DNA from Yangsung,10: E. coli (EC100).

3. Biosurfactant 생산 관련 유전자 분리 및 활성영역 동정

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

Biosurfactant는 미생물이 생산하는 양친매성 물질로서 다양한 산업분야에서 이용 가능성을 갖고 있다. 화학합성 surfactant와 비교하여 생분해가 가능하며, 극한의 온도나 pH에서도 활성을 유지하고, 독성도 낮다는 장점을 가지고 있어 환경정화, 미생물 유류회수 촉진, 의료분야, 농업, 화장품, 식품 분야 등에 광범위하게 사용되고 있는 물질이다. 따라서 본 연구에서는 이런 유용한 biosurfactant를 메타제놈 은행에서 검색하여 찾고자 하였다.

2) 연구방법

가) Biosurfactant 생산 관련 유전자 탐색

미생물이 생산하는 biosurfactant 관련 유전자를 선별하기 위해서 oil에 배양액을 떨어뜨려 표면장력이 파괴되는 것으로 관찰하는 방법과 hemolytic activity로 판별하는 방법, tributyrin이 첨가된 배지에서 clearing zone을 관찰하는 방법, 지시약이 첨가된 배지에서의 판별법 등을 이용하여 수행하였다.

(1) Drop collapse method를 이용한 검색

Fosmid와 cosmid library는 384 well plate에 chloramphenicol ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)과 ampicillin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 각각 첨가된 LB 액체배지를 분주하고 작성된 유전자 은행의 clone들을 접종한 후, 96 well replica pin을 이용하여 LB 배지에 재접종한 후 28°C 에서 5일 이상 배양하였다.

96 well plate의 lid는 hot water로 세 번 세척 한 후 75% ethanol로 한번, hot distilled water로 다시 한번 세척, air dry 시켰다. 10W-40 Pennzoil 2 μl 를 각각 well에 coating하여 oil이 균일하게 되도록 24시간 동안 equilibration 시킨 후, 96 well plate에서 배양한 균액 5 μl 를 각각 96 well lid 중앙에 놓고 1분 이상 drop 모양이 파괴되는지를 관찰하였다.

(2) Blood agar lysis를 이용한 검색

Fosmid와 cosmid library는 384 well plate에 chloramphenicol ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)과 ampicillin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 각각 첨가된 LB 액체배지를 분주하고 작성된 유전자 은행의 clone들을 접종하였다. Sheep blood를 37°C 에 미리 예운하고 LB agar는

autoclave한 다음 55℃에서 2 시간 동안 정치시켰다. 예온한 sheep blood를 첨가하여 거품이 나지 않게 잘 섞어준 다음 plate에 분주하였다. Metagenome library의 clone 들을 96 well plate pin을 이용하여 접종한 다음 28℃에서 5일 이상 배양한 후 hemolytic activity를 관찰 하였다.

(3) Tributyrin 첨가배지를 이용한 검색

유지분해 효소를 생산하는 균주를 선발할 때 사용하는 tributyrin을 사용하여 1차 스크리닝을 수행하였다. 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ 와 5% (w/v) gum arabic solution이 포함된 45 ml solution에 tributyrin 5ml을 첨가하여 waring blender로 2 분간 mixing한 다음 LB agar 배지 450 ml 에 섞어 TBN-LB plate를 제조하였다. 만들어진 plate에 metagenome library를 접종하고 28℃에서 5일 이상 배양하여 clear zone을 형성하는 것을 선발하였다.

(4) Colorimetric method를 사용한 검색

Pseudomonas. species가 생산하는 rhamnolipid를 detection하는 방법으로 colorimetric 방법을 사용하여 biosurfactant 검색을 수행하였다. LB 배지에 0.0005% methylene blue, 0.02% cetyltrimethylammonium bromide를 첨가하여 agar plate를 만들어 metagenome library를 접종하여 28℃에서 5일 이상 배양하였다. 원주와 호미 곳, 우포 등의 library에서 1차 스크리닝을 수행하였다.

(5) Primer를 사용한 검색

Surfactin production genetic locus (*sfp*)는 lipopeptide biosurfactant인 surfactin을 생산하는 *Bacillus* species에 존재하기 때문에 이 유전자로부터 2가지 다른 종류의 기존에 만들어진 primer (Table 2-12)를 사용하여 PCR 수행 하였다. 또한 rhamnolipid를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa*의 rhamnosyltransferase 2를 coding하는 *rhlC* gene으로부터 작성한 primer를 사용한 PCR도 수행하였다. 주형으로는 원주 토양으로부터 분리한 DNA를 사용하였다.

(6) Biosurfactant 생산균주로부터 유전자 분리

메타게놈이 아닌 특수서식지의 미생물로부터 biosurfactant 관련 유전자를 분리하기 위하여 원주오염토양으로부터 분리한 균주들을 분양받아 drop collapse method를 사용하여 biosurfactant를 생산하는 균주를 선발하였다.

Table 2-12. List of the primers

Primer	Target genes	Size	Sequence(5'→3')
P1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>sfp</i>	675 bp	sfp-f ATGAAGATTTACGGAATTTA
			sfp-r TTATAAAAGCTCTTCGTACG
P2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>sfp</i>	2 kb	SF-1 GGGGATCCTGGCCCCATCGACTTTG
			SF-2 CCAC
			GGGAATTCCTGAATATGGTGCTCA
P3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>rhlC</i>	1.1 kb	RTII-UP TTGGTG
			RTII-down GATGAATTCACCTACGGGAGAAGA
			ACGA
			ATTGGATCCGGCGATTTCGTTCTAC
			TTC

나) 선발 클론의 활성 negative Tn 돌연변이체의 선발

Hemolytic activity를 나타내는 클론과 유지분해 클론의 활성영역을 확인하기 위하여 Tn mutagenesis를 수행하였다. Target cosmid DNA를 Quiagen Large plasmid kit를 이용하여 genomic DNA가 혼합되지 않도록 분리 한다. Chloramphenicol 저항성 유전자를 포함하는 transposon을 target DNA에 transposase와 혼합하여 30℃, 1 시간 반응하고 *E. coli*의 competent cell에 transformation하여 chloramphenicol과 kanamycin 저항성을 동시에 가지는 colony를 다시 96 well plate에 접종한 다음 hemolytic activity가 없어진 클론들을 분리하였다.

다) 선발 클론의 shot-gun library 제조 및 재탐색

선발한 클론의 DNA 20 µg (100 µl)을 Sonicator (Fisher 550-CM110 Sonicator)를 이용하여 무작위 절단하였다. Sonication 3.5 강도의 출력으로 고정 1초로 처리한 후 DNA 절단 부위의 말단을 평활화 하기 위하여 절단된 DNA 용액중 25 µl (5 µg의 DNA)를 취하여 5 unit의 T4 polymerase (Takara Co.)와 2 unit T4 polynucleotide kinase (Takara Co.) 그리고 6 units의 Klenow fragment (Takara Co.)를 가한 후 반응액량을 50 µl로 조절한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 DNA를 0.8% agarose gel에 100 voltage에서 40분간 전기영동하고 2-5 kb의 DNA를 절단하여 Qiagen extraction kit로 분리하였다. End-repaired DNA 100 ng을 pUC118-*HincII*/BAP (Takara co.) 운반체 25 ng, T4 DNA ligase (350 units µl⁻¹, Takara Co.) 1 µl, 10X완충액에 1 µl을 첨가하고 최종 반응액량을 10 µl로 하여 16℃에서 16시간 ligation 하였다. 만들어진 library는 MUF-cellobioside를 함유한 LB배지에

다시 접종하여 형광을 나타내는 clone을 선발하였다.

라) DNA 염기서열 및 상동성 분석

선발한 shot-gun clone의 염기서열 분석은 ABI 3700 (PerkinElmer, Co. Germany)을 이용하였다. 염기서열 분석용으로 준비된 clone을 template vector내부에 포함된 상보적인 염기서열과 상보적인 서열을 갖는 primer를 제작한 다음 BigDye 2 μl , 5X 완충액 1 μl , primer (10 pmol μl^{-1}) 1 μl , template (250-500 ng) 6 μl 를 PCR tube에 넣고 혼합한 후 PCR 하였다. PCR 조건은 95°C 10 min, denaturation 96°C 10 sec, annealing 50°C 5 sec, extension 60°C 4min을 25 cycles, termination 72°C 10 min으로 하였고 이를 정제하여 automatic DNA Sequencer로 염기서열을 결정하였다. Vector NTI program과 BLAST network를 통하여 상동성 및 유전자 비교 분석 등을 수행하였다.

나. 연구결과

1) Biosurfactant 생산 클론의 선발

가) Drop collapse method를 이용한 검색

Biosurfactant의 표면 활성을 직접적으로 측정하는 방법은 glass-slide test, axisymmetric drop shape analysis profile, oil spreading technique 등 여러 가지가 있으나 대부분이 시간 소모가 많고 많은 수의 metagenome library를 스크리닝 하는데 있어 어려움이 있다 (Bodour and Miller-Maier, 1998). Bodour 등에 의하면 여 Nouy ring method 방법처럼 표면활성을 측정하는 일반적인 방법 보다 몇가지 장점이 있다는 것을 발표하였다. Drop collapse 방법은 oil의 표면에 떨어뜨렸을 때 biosurfactant를 포함하고 있는 액체의 drop이 파괴되어 완전히 퍼져버리는 것으로 판별하기 때문에 특별한 장비가 필요 없고 쉽고 많은 수를 스크리닝 하는데 유용한 것으로 보고되었다. 또한 mineral oil 이나 다른 oil 보다 Pennzoil oil이 적은 양의 biosurfactant로도 쉽게 표면장력 파괴 양상을 관찰 할 수 있다는 것을 보고하였다. Fig. 2-35는 biosurfactant 생산 클론을 검색할 수 있는 high-throughput 시스템을 개발하기 위하여 예비실험을 한 것으로, positive control인 미생물로부터 분리한 biosurfactant로 96 well plate의 lid에서 표면장력이 파괴되는지의 양상을 관찰하였다. 먼저 plate를 oil로 시간대를 달리하여 코팅한 다음 negative control과 positive control의 양을 5 μl 와 10 μl 를 떨어뜨린 결과, 5 μl 의 적은 양으로도 충분히 표면장력이 파괴되는 것을 볼 수 있었고 코팅시간에는 크게 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 메타제놈 은행으로부터 클론을 접종하여 배양한 다음 배양액을 5 μl 씩 96 well plate lid에 떨어뜨려 검색하는 방법을 사용하였다. 주로 유류 오염이 발생한 토

양으로부터 작성한 메타제놈과 생태계가 보존된 우포나 무제치 늪으로 부터 작성한 메타제놈 은행을 모두 검색하였으나 뚜렷이 표면장력을 파괴하는 클론을 선발할 수 없었다. 이는 주로 rhamnolipid 계열과 surfactin 계열의 biosurfactant를 생산하는 균주가 *Pseudomonas*와 *Bacillus* 등임을 감안할 때 *E. coli*에서 발현정도를 검출하기에 어려움이 있는 것으로 사료되었다.



Fig. 2-38. 10W-40 Penzoil 에 coating 된 96well plate에서의 drop collapse 양상. C; negative control (LB broth), S; positive control.

나) Blood agar lysis를 이용한 검색

Biosurfactant의 hemolytic activity는 surfactin (Moran 등, 2002)과 rhamnolipids (Johnson 등, 1980)가 나타내는 것으로 보고 된 바있고 Carrillo 등 (1996)은 hemolytic activity 와 surfactant 생산과의 관계를 밝혀 biosurfactant 활성을 스크리닝 하는데 1차 방법으로 blood agar lysis method를 사용한 바 있다. Table 2-13은 metagenome library로부터 1차 선발된 hemolytic activity positive clone들이다 (Fig. 2-36). 그러나 hemolytic activity를 나타내는 균주의 단지 13.5% 만이 표면장력을 낮추는 것으로 알려져 있고 virulence factor 같은 다른 미생물이 생산하는 물질도 blood agar를 lysis시키고 또한 약하게 확산하는 biosurfactant는 blood cell을 lysis 시키지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 이들 선발된 clone들이 biosurfactant 인지를 확인하기 위해 transposon mutagenesis를 수행하였다. Tn 돌연변이체의 각각 단일 colony를 blood agar plate에 접종하여 hemolytic activity가 소실된 negative clone을 모두 분리하였다 (Fig. 2-37). 이들을 transposon에 있는 primer 부위를 사용하여 염기서열을 분석

하였다. 또한 이들 클론을 drop collapse 방법으로 Pennzoil oil이 코팅된 plate lid에 떨어뜨려 보았으나 어떤 표면장력 파괴현상도 관찰하지 못하였다. 그리고 염기서열 분석을 통해서도 biosurfactant 관련의 상동성이 나타나지 않았다.

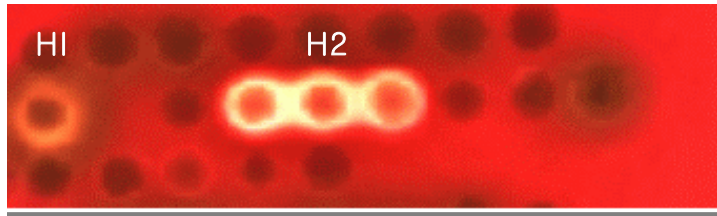


Fig. 2-39. The clones of hemolytic activity.

Table 2-13. Results from the metagenome library

Clone	Source	Vector	Size	
H1	245D-6D	rhizosphere soil	cosmid	30 kb
H2	92B-12G	rhizosphere soil	cosmid	30 kb

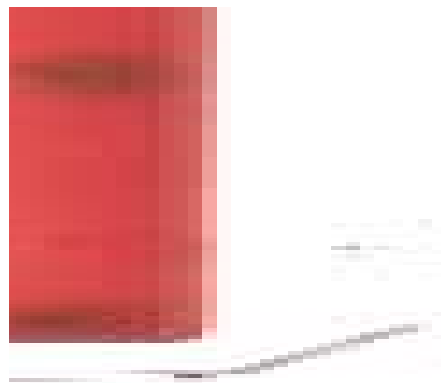


Fig. 2-40. Screening of hemolytic negative clones.

다) Tributyrin 첨가배지를 이용한 검색

Cooper 등 (1987)은 *Mycobacterium*이나 *Corynebacterium* 이 surface active한 lipase를 생산하는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 유지분해 효소를 생산하는 균주를 선발할 때 사용하는 tributyrin을 사용하여 1차 스크리닝을 수행하였다. Tributyrin 선택 배지에서 메타제놈 클론이 환을 생성하는 검색한 결과 (Table 2-14), 원주와 우포 library로부터 총 22개의 clone (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L32, L33)을 선발하였다. 선발한 클론들은 원주와 호미꽃, 우포 등 기름 유출 토양과 다양한 생물환경을 나타내는 토양에서 주로 분리되었다. Tributyrin을 분해하는 물질을 암호화하는 유전자를 분리하기 위하여 선발한 클론들의 DNA를 다시 sonication하여 2-5 kb 크기의 insert를 pUC118에 ligation하여 shot-gun library를 제조하였다. 이 library를 tributyrin 기질을 이용하여 다시 환을 나타내는 clone들을 선발하였다 (Fig. 2-38A). 또 다른 방법으로 염기서열을 결정하기 위하여 Tn mutagenesis를 수행하여 활성을 상실한 클론들을 선발하였다 (Fig. 2-38B). Fig. 2-39는 선발한 클론 중 대표적으로 L6 클론의 shot-gun 클론인 pUE15의 physical map과 염기서열 분석에 대한 결과이다. 이렇게 다시 선발한 클론들의 염기서열을 결정하였고 ORF (*est1*, *est2*, *est3*, *est4*, *est5*, *est6*, *est7*, *est8*, *est9*, *est10*, *est11*, *est12*, *est13*, *est14*, *est15*, *est16*, *est17*)를 BLASTX search를 하여 homology를 분석하였다. 분석한 결과는 Table 2-15에 나타내었는데 대부분이 carboxylesterase로써 주로 lipase와 esterase에 identity를 가졌고 *est13*의 경우 hypothetical protein과도 상동성을 가지고 있었으며, 기존의 단백질과는 많게는 54%, 적게는 28%의 identity를 나타냄으로써 신규의 단백질일 가능성이 많은 것으로 판단되었다. 이는 갯벌이나 바닷가 모래 토양등의 unculturable bacteria로부터 유전자가 많이 분리되어 기존의 밝혀지지 않은 것일 가능성이 있다. 크기는 246 amino acids부터 464 amino acids까지 다양하게 나타났으며 서로간의 상동성도 떨어지는 것으로 나타났다 (data not shown). 그 중 대표적으로 pUE15 클론의 염기서열을 결정하여 Fig. 2-40에 나타내었다. 그러나 이들 클론이 biosurfactant기능을 가지는지는 단백질을 overexpression하여 활성을 test해보아야 할 것으로 보인다. *E. coli* 시스템에서 biosurfactant 기능을 가지는 외부 유전자가 제대로 발현하더라도 표면장력을 파괴하는 등의 활성을 측정하는 데는 매우 적은양이기 때문이다.

Table 2-14. Characterization of lipolytic clones from metagenomic library

	Clone	Library source	Soil	Relative activity
L1	7-1-C-8B	fosmid	원주	+
L2	7-1-C-3D	fosmid	원주	+
L3	f-8-C-1H	fosmid	원주	+
L4	C-26-D-8-F	cosmid	우포	+
L5	C-27-B-5H	cosmid	우포	+
L6	A222-2	cosmid	사철나무	+++
L7	5-C-7E	cosmid	호미곶	+++
L12	2-A-6A	fosmid	호미곶	+++
L13	2-B-3D	fosmid	호미곶	++
L14	34-A-9A	fosmid	원주	+
L15	4-B-5F	fosmid	원주	++
L16	3-C-12C	fosmid	호미곶	+++
L17	16-D-11C	fosmid	호미곶	+++
L18	22-C-9C	fosmid	호미곶	+++
L19	20-C-6F	fosmid	호미곶	+++
L20	20-C-9F	fosmid	호미곶	+
L21	17-B-12A	fosmid	호미곶	+
L22	18-C-12F	fosmid	호미곶	+
L23	18-C-10F	fosmid	호미곶	+++
L24	20-B-8B	fosmid	호미곶	+
L25	57-D-3C	fosmid	호미곶	+
L26	44-B-7F	fosmid	호미곶	++
L27	19-B-10D	fosmid	호미곶	+
L28	11-B-1H	cosmid	우포	++
L29	241-D-8G	cosmid	사철나무	++
L30	231-A-9B	cosmid	사철나무	+++
L31	11-C-6F	cosmid	우포	++
L32	230-C-3B	cosmid	사철나무	+++
L33	230-C-11H	cosmid	사철나무	+++

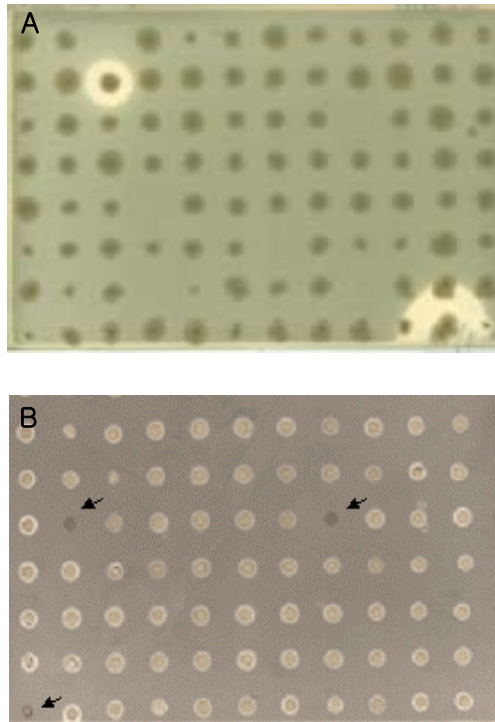


Fig. 2-41. Selection of subclone conferring lipolytic activity. A, shotgun clone on tributyrin agar plate; B, Tn mutant of negative activity.

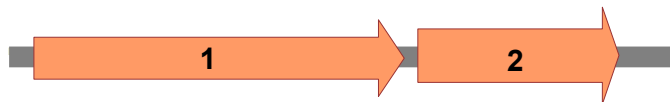


Fig. 2-42. Physical map of pUE15 clone. pUE15 was constructed by cloning a 4 kb fragment of fosmid DNA (L16) into the pUC118 vector.

Table 2-15. Similarity of ORFs from the pUE15 genes to known proteins present in the NCBI data bank

ORF	Protein	Organisms	Identities(%)
1	Secreted protein	<i>Caulobacter crescentus</i>	177/390 (45%)
2	Extracellular GDSL-like lipase/acyl hydrolase	<i>Aspergillus</i>	144/402 (35%)

```

TCGGCTCTCCGGAGCCGCCCTGGCCCTATGTGGTGGAGACCACCGGTGATCTGGTGGGTACCA 1944
F Q P S G A P L A A V V V E T T G D L V G T N
CGCGGCATGGCAGAATATCTCTACCAACGTGACCGACGCCGACGGCGAATTCCTGTACTGGATGAAA 2012
A A W D N I S T N V T D A D G E F L Y L D E
CATCAACCGAAGATCTGAAGTCTACCGCACACAAACCGCTTTAAGGAAAGGATGGCATCATGATGAGCA 2091
I S T E D L K F Y R E G P L * M M S
CAACCCGCCCTCACTCCAGATCCCGTTTCACGCTGGCCGTCGCBCTGATGGCATCGCTGGTGGCTGC 2149
T T R L T R R R S R P T L A V A L M A S L V A V
CAGCAGACAGCCACTGCCAGGAAGGCCATTGCGTCACTGCCCTGGGCTGCCGGCCCGCAGTTGACCG 2217
O Q T A T A G E G H W V T A W G C S P G L T
AAGATCGTAATCTTCGCGCCGCTGCTCCGTCGCGACAGCACGTTGGCGGCAATACGTGCATGCCAGTCAAG 2295
E D R N L P P V S L S H S T L R G Y V H A S Q
AGGCGACGATGGTCCGGGTACGCTTTTGGAAACGATACGGCACCGAGCCGGTGGCCGATCGTCCGCCG 2352
E G S M V R V R F S N A V G T E P V P I V A A
GCATATCGCATGTCCGGCCGGGAGCGGCASTGCCGGAAACCGGTAATCGATCCGGATAACGATACCC 2429
H I A M S A G S G S A S T G E I D P D T D T
CBCTCTCTTCCGGCCGGCCGCCGGAAACGCTCATACCTCCCGCGCAAGTGGTCTATTCCGATCCGCTC 2488
P L S F S G A P G T V I P F G E V V Y S D P V
AAATTCAGCTCCGCCCCACCGCGGAGTGGCCATCGACCTTTCTGGCGAGTGGATGCGAAAGCCGT 2556
K F S L P P T A E V A I S T P L G E V S E S V
GGTCAACGGTCACTCCGGCCGGCCGGCCCAATGCATACATTGTATCCGGCAATGAGTATCGCGGCCA 2624
V N G H P G G R A N A V I V S G N E V S A
GCATGCCCTCCGGTGCAGAAACCCGGCACTGGTACTACATCACCGGCATCGAGGTCATGGCCCCCTG 2692
S M P S G A K T R H W Y V I T O I E V M A P L
ACCTGCCACAGGTTGGTTTCGGGGACTCGATCACCGACGGCTACGGCACCTTCGACGGCAACAA 2760
T C H T V V V V F G D S I T D G V G T F D G N N
CCCTGGCCCGACTTCCGGCCGGCCGGCCGATGACCGATCCATCGACGGAGCACGCTCCGTTGGCG 2827
R W P D P L A R R L S T D P S T E H V S V A
AACATGGGAATCGCGCAATGGCGTATTCGGCCGCTCGGGCCCGCAGGACGGGACCCTTCGACC 2894
N M G I G G N A V F G G L O P A G R D R F D
GCGACGTCCTCTTCAGAACGGGGCCAAATGGGCGATCAGCTTCATCGGGTCAACGACATCGGCASC 2962
R D V L S G N G A S W A I P F I G V H D I G S
TCCGGCAGTCCGACCTGGCCGAGACATCAGCAGGATTCACCCTTCGCGAACAAAGCGCATGCG 3030
S G S P T L A G N I I S E F T T F A N K A H A
GAGAACTACTCATCTATGGCGCCAGGATCACCGCTTCCGGCGGCAACGGCTATTACTCGACGGAGC 3098
K N L L I Y G A T I T P F G G N G Y V S T E
ACGAAAGCGCGCGCCAGACGTCACAGCTGATGATCGCACCAATGAGCTGTTCCATGCGGTCATGAT 3166
H E A A R G O T V N S W I R T N E L F D A V I D
CTTGTATCGCATCCCGATCCCGCAATCCGTTTATATCTTCCGGCCTACAGCAATGACAACTTCC 3236
L D V A I H D P G N F L V I L P A Y N N D N L
ATCCAGATCGCCCGTTACGAAGCCCGCCAAATGCCCTGGACCTGACCTGATTTTCACCTGTAAGAC 3305
H P N I A G Y E A L A N A V D L T L F A P *
CGGCAGCCAGCAACCGGCACTTGGCTTACCTGATGGCCACTCCGATTCATCTAACGGAGGCTTCT 3374
CGGCTGCATCTGGATCCGACTTCAGCAGCGGAAACCTCCGTTTACATGCCGCCCTGTATCCAGTT 3443
CCGGGATACCCGCTATGGCTGCCAGGGCAGGCATGTGGTACGGCTGAGGCCGAGGGCGCTGGGA 3510

```

Fig. 2-43. Nucleotide sequence of the trybutyrin hydrolyzing gene and the flanking regions. The deduced amino acid sequences for each ORF are placed below the nucleotide of corresponding codon. Putative Shine-Dalgarno sequences for ribosomal binding sites (RBS) are underlined. -35 region and -10 region are bolded. Translation codon is indicated by an asterisk.

Table 2-16. Similarity of ORFs from the *cel* genes to known proteins present in the NCBI data bank

	BLASTX search	Organisms	Identities	a.a
E1	carboxylesterase	<i>Erwinia carotovora</i>	44%, 104/234	246
E2	esterase (acetyl)	<i>Microbulbifer degradans</i>	35%, 78/218	247
E3	esterase	<i>Thermus thermophilus</i>	30%, 38/125	252
E4	hydrolase	<i>Dehalococcoides</i>	28%, 89/314	291
E5	lipase	<i>Uncultured bacterium</i>	54%, 152/279	293
E6	lipase/esterase	<i>Pelobacter propionicus</i>	48%, 125/257	301
E7	lipase	<i>Uncultured bacterium</i>	42%, 124/289	310
E8	esterase	<i>Erythrobacter litoralis</i>	37%, 100/266	322
E9	phospholipase	<i>Burkholderia mallei</i>	30%	325
E10	hydrolase	<i>Brady rhizobium</i>	50%, 142/283	330
E11	esterase A	<i>Streptomyces anulatus</i>	45%, 172/374	368
E12	putative esterase	<i>Thermus thermophilus</i>	31%, 54/174	372
E13	hypothetical protein	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	35%, 79/222	391
E14	esterase A	<i>Streptococcus anulatus</i>	43%, 168/384	391
E15	lipase	<i>Aspergillus</i>	35%, 144/402	410
E16	lipase/esterase	<i>Uncultured bacterium</i>	43%, 168/384	427
E17	lipase	<i>Pseudomonas syringae</i>	35%, 58/163	464

라) 토양에서 분리한 균주로부터 biosurfactant 생산 균주 검색

메타제놈이 아닌 특수서식지의 미생물로부터 biosurfactant 관련 유전자를 분리하기 위하여 원주의 기름이 유출되어 오염된 농경지의 토양으로부터 분리한 균주들을 검색하였다. 각각의 균주들을 96 well plate에 접종하여 배양한 다음 10W-40 Penzoi oil이 코팅되어 있는 96 well plate lid에 떨어뜨려 배양액이 뭉치지 않고 퍼져나가는 3개의 균주를 선발하였다 (Fig. 2-41). 각각의 균주를 2B, 3B, 5B라고 명명하였고 이를 16S rDNA로 homology search를 하였더니 *Pseudomonas* sp.으로 나타났다. 따라서 이들 균주가 따로 분리되었으나 실제로 같은 균주일 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 선발한 균주들의 biosurfactant의 유전자를 분리하기 위하여 chromosomal DNA를 분리하여 *sau3AI*을 serial 처리하여 CHEF 전기영동하여 40kb 이상의 fragment를 주로 하는 분획으로 cosmid library를 작성하였다. 작성된 library의 clone들을 96 well LB broth에 접종하여 28°C에서 5일 이상 배양 후 10W-40 Penzoi 이 coating된 96 well plate lid에 배양액을 떨어뜨렸다. 그러나 표면장력이 파괴되는 clone들이 관찰되지 않는 것으로 보아 이 균이 *Pseudomonas*의 일종으로 *E. coli*에서의 발현이 어려워 drop collapse 방법으로는 detection이 어려운 것으로 사료되었다.

Biosurfactin 유전자를 분리하기 위하여 기존에 알려진 유전자로부터 PCR을 수행하여 염기서열을 분석하였다. Surfactin production genetic locus (*sfp*)는 lipopeptide biosurfactant인 surfactin을 생산하는 *Bacillus* species가 암호화하는 유전자이다. Hsieh 등 (2004)은 PCR 방법을 사용하여 surfactin을 생산하는 *Bacillus subtilis*를 빨리 detection할 수 있는 primer를 고안하였다. Rahim 등 (2001)도 *Pseudomonas aeruginosa*의 rhamnosyltransferase 2를 암호화하는 *rhlC* 유전자 검출할 수 있는 primer를 고안하였다. 따라서 본 연구에서도 *Bacillus subtilis*의 *sfp* 유전자로부터 만들어진 2가지 다른 종류의 primer와 rhamnolipid를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa*의 rhamnosyltransferase 2를 coding하는 *rhlC* gene으로부터 작성한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 2-42). Primer 1을 사용하였을 때에는 약 0.6 kb의 PCR product가 검출되었고 primer 2를 사용하였을 때 약 2 kb의 PCR product가 검출되었다. 또한 primer 3을 사용하였을 때 아주 약하게 1.1 kb 위치의 PCR product를 관찰할 수 있었다.

PCR로 얻은 산물들의 염기서열의 분석한 결과, Table 2-17에서 보는 바와 같이 biosurfactant 관련 유전자는 찾을 수 없었지만 hypothetical protein과 homology를 가지는 것은 추후 염기서열 및 ORF 분석을 통해 유전자 발현을 통해 확인해야 할 것으로 사료되었다.

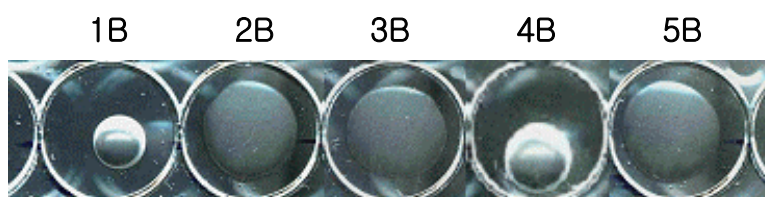


Fig. 2-44. Screening of biosurfactant producing microorganisms by drop collapse method.

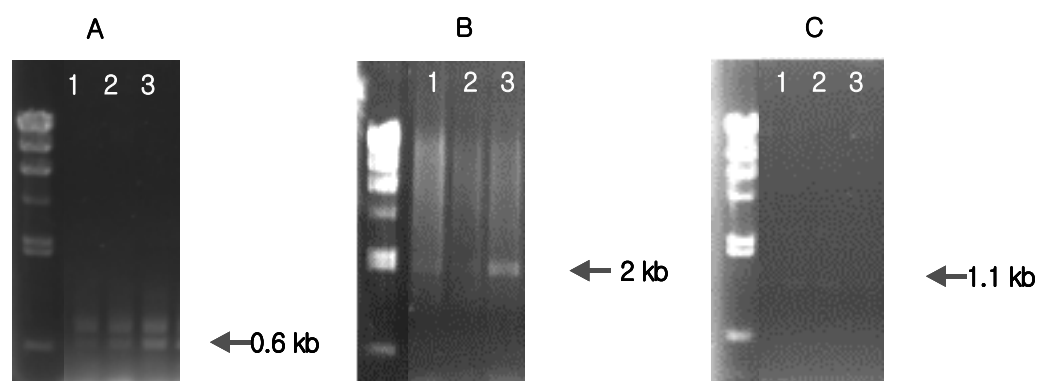


Fig. 2-45. PCR amplification of 2B, 3B, 5B. A, P1 primer(sfp); B, P2 primer(SF); C, P3 primer (RTII); lane 1, 2B strain; lane 2, 3B strain; lane 3, 5B strain.

Table 2-17. Homology search of PCR product from 2B, 3B and 5B

PCR product	BLASTX search	Microorganisms	identity
2B(3B)-SF-1	Hypothetical protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	88%, 150/170
2B-sfp-1	SocE	<i>Myxococcus xanthus</i>	50%, 60/119
3B-sfp-1	Rhs family protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57%, 98/169
2B-SF-2	pilus protein	<i>Pseudomonase sp.</i>	48%, 56/115

제3절 선발 유전자의 발현 증진을 위한 시스템 개발

1. High-throughput screening을 위한 선발 유전자의 bacterial cell surface display

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

메타제놈으로부터 다양한 효소 등의 유용 유전자를 검색하는 데에는 아주 많은 시료를 빠른 시간 안에 찾아야 하는 문제점이 있다. 다양성 생성기술이 진보함에 따라 빠른 속도로 우리가 원하는 클론을 찾는 방법을 확립하는 것이 현대 연구에서 중요해진 문제가 되었다. 빠른 스크리닝 방법이 찾을 수 있는 효소의 성질을 결정하는 가장 중요한 요인이 된다. 최근 스크리닝 방법이 많이 고안되었다. 성장 및 성장 속도의 차이에 의한 스크리닝 방법은 숙주세포의 증식과 생존에 의존하여 탐색될 수 있도록 하는 특징이 있다. 또한 다양한 display 기술이 개발되었는데 공유결합 디스플레이 기술, mRNA-ribosome-nascent polypeptide (RRP) complex를 분리하여 단백질의 phenotype과 genotype을 결합시키는 기술인 polysome display (Gregory 등, 2001), puromycin-peptide-RNA 융합 display, 그리고 transcription/translation 반응을 마치 하나의 세포내에서 이루어지듯이 water-in-oil emulsion에서 수행하여 마치 인공세포와 같은 환경을 제공하는 이멀션 시스템 등이 있다. 또한 다양한 cell display 기술이 선발된 효소나 물질생산에 관련된 유전자의 directed evolution에 있어서 high-throughput screening (HTS) 환경을 제공한다. Cell display에는 yeast display가 있는데 Wittrup 등은 *Saccharomyces cerevisiae*를 숙주로 하여 GPI(glycosyl phosphatidyl inositol)-anchor 단백질인 α -agglutinin 등을 이용하였다. Bacterial display 기술도 많은 연구가 이루어 졌는데 세포의 표면에는 세포 최외각막 단백질을 비롯하여 지질 단백질, 분비단백질, flagellar, pili 등 많은 단백질들이 존재하는데 이들이 주로 사용된다. 본 연구에서는 Pan 등에 의해서 *Pseudomonas syringae* 유래의 병핵 활성 단백질을 이용한 세포 표면 발현 기술을 이용하여 메타제놈 유래 *bglA* 유전자를 발현시켰다. β -Glucosidase는 미생물 유래의 유전자를 이용한 형질전환 식물의 개발 등으로 식물병 방제에 적용할 수 있으며 isoflavone인 genistin에 작용하여 genistein으로 전환할 수 있는 효소로써 골다공증 억제 및 항암 활성을 가지는 isoflavone의 활성화에 기여할 수 있다. 또한 β -glucosidase는 올리브나 과일의 쓴 맛을 내는 글루코사이드 (glucoside)를 파괴하여 영양 품질을 개선하는 기능을 가지며 인삼의 주요 성분을 항암활성등을 갖는 유용한 물질로 전환시킬 수 있기에 이후에 유전자 개량을 위한 빠른 검색에 이용할 수 있도록 하기 위하여 cell display 기술을 적용하였다 .

2) 연구방법

가) Bacterial strain, plasmid 및 배지

사용한 *E. coli*는 DH5a와 TG1 (*supE hsd 5thi* $\Delta(lac-proAB)/F'$ *traD36 proAB lacIq lacZ* Δ M15) 등이 사용되었으며 vector는 surface display vector인 pGF101 (Genofocus, co)를 사용하였다. 재조합 *E. coli*는 ampicillin이 $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하였다. 유전자는 메타제놈에서 분리한 *bglA*를 이용하였다.

나) 유전자 cloning

주형으로 pUGLU92를 사용하여 BglA를 암호화하고 있는 DNA fragment를 PCR로 증폭하였다. 유전자 *inaKnc*에 linker가 포함되어 발현시키기 위하여 forward primer로써 5'-GTGCTAGCATGCCAGCCGGCCTGCTGAT-3'과 reverse primer로 5'-GCAAGCTTAATAGCGGGCGCGGCTAGC-3'를 사용하였고, linker를 없이 발현시키기 위해 forward primer로써 5'-TTCCCGGGATGCCAGCCGGCCTGCTGAT-3'와 reverse primer로 GCAAGCTTAATAGCGGGCGCGGCTAGC-3'를 사용하였다. PCR product를 각각 *NheI*와 *HindIII*, *XmaI*과 *HindIII*로 절단하고 같은 효소로 절단한 pGF101에 ligation 시켰다. 16°C에서 16시간 ligation한 액을 *E. coli* DH5a와 TG1에 형질전환 시켰다.

다) *E. coli*에서의 BglA 표면 발현 및 활성 측정

형질전환한 세포는 37°C에서 600 nm에서 O.D 치가 0.6에서 0.8이 될 때까지 배양시킨 다음 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 final 농도 0.5 mM이 되게 첨가하여 30°C에서 5시간 배양하였다. β -glucosidase는 p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG)를 기질로 하여 활성을 측정하였다. 모든 분석조건은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 55°C에서 행하였다. 5 mM pNPG와 효소를 섞은 후 55°C에서 15분간 반응 후 1 M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 정지 시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 연구결과

1) Bacterial cell surface display를 위한 *bglA* 유전자의 pGF101 vector로의 cloning

세포 표면 발현 기술은 원하는 단백질을 세포 표면 발현 모체와 결합시켜 살아 있는 세포 표면에 발현시키는 기술을 말한다. 박테리아 세포 표면 발현 기술은 그람 음성 세균인 *E. coli*에서 LamB에 polio virus epitope를 융합시켜서 세포 표면에 발현된다는 것을 처음 밝힌 이후, 매우 다양한 표면 발현 모체들이 개발, 연구되어 왔다. 본 연구에서는 반채구 등에 의해서 *Pseudomonas syringae* 유래의 빙핵 활성 단백질을 이용한 세포 표면 발현 기술을 이용하였다. 빙핵 활성 단백질은 세포 최외막 단백질로 많은 양이 발현될 수 있고 휴지기에도 안정하게 유지, 세포 표면에 돌출되어 있다. 빙핵 단백질 display의 또 하나의 장점은 세포 표면과의 거리를 임의로 조정할 수 있다. pGF102는 *inaK*의 full ORF가 들어가 있는 vector이고 pFG101은 *inaK*의 mutant 유전자로 대체되어 있다 (Fig. 3-2). *bglA* 유전자를 pUE15를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 *NheI/HindIII*와 *XmaI/HindIII*의 두 set의 제한효소로 절단하고 pGF101 vector도 같은 효소로 절단하여 ligation시켰다. Fig. 3-3에서 보는 바와 같이 두가지 종류의 subclone이 제작되었다. 이들 subclone들이 세포표면에 발현되었는지 알아보기 위해 클론을 배양하여 세포자체의 활성을 test해 보았다 (Fig. 3-4). pGF101 vector 만 형질전환한 TG1 cell의 pNPG 분해 활성은 거의 나타나지 않았으며 *bglA* 유전자가 들어간 pGLUN과 pGLUX에서는 pNPG 분해 활성이 일어나 노랗게 나타났으며 412 nm에서도 수치가 올라갔다. *XmaI*으로 절단하여 linker가 없던지 있던지 간에 모두 활성이 나타나 어느 클론을 사용하여 evolution을 진행하여도 크게 무리가 없을 것으로 사료되었다. 이렇게 만들어진 pGLUN과 pGLUX clone은 INP surface display 되어 타겟 단백질이 표면에 있기 때문에 외부에서 넣어준 기질과 쉽게 결합하고 반응할 수 있게 된다. Jung 등 (2003)은 lipase 유전자를 pGF102 vector를 이용하여 세포 발현시켜 활성을 나타낸 것을 보고한 바있다.

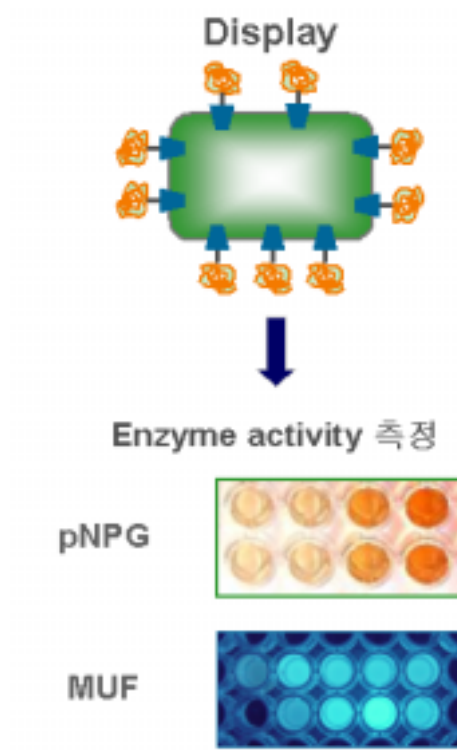


Fig. 3-1. Scheme of the expression of BglA using the bacterial cell display.

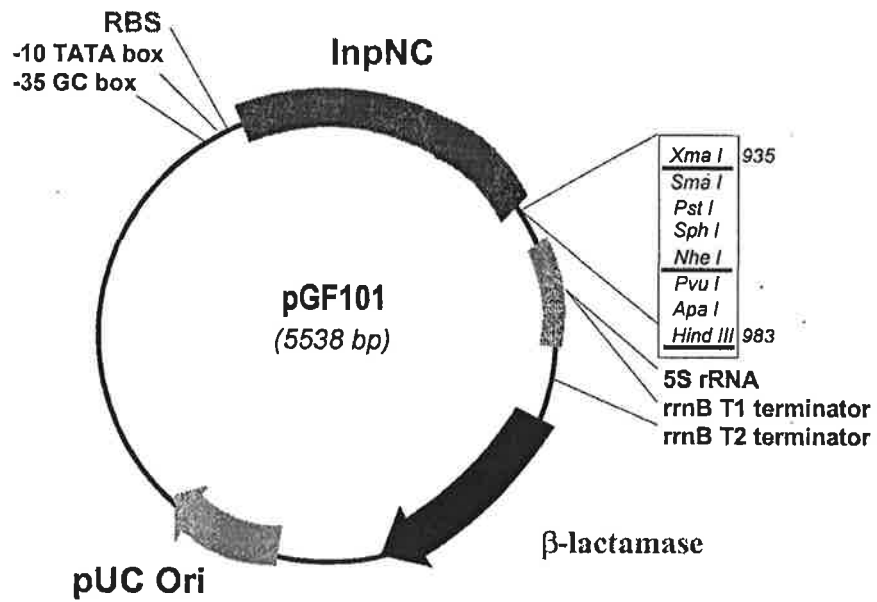


Fig. 3-2. The map of the pGF101 vector.

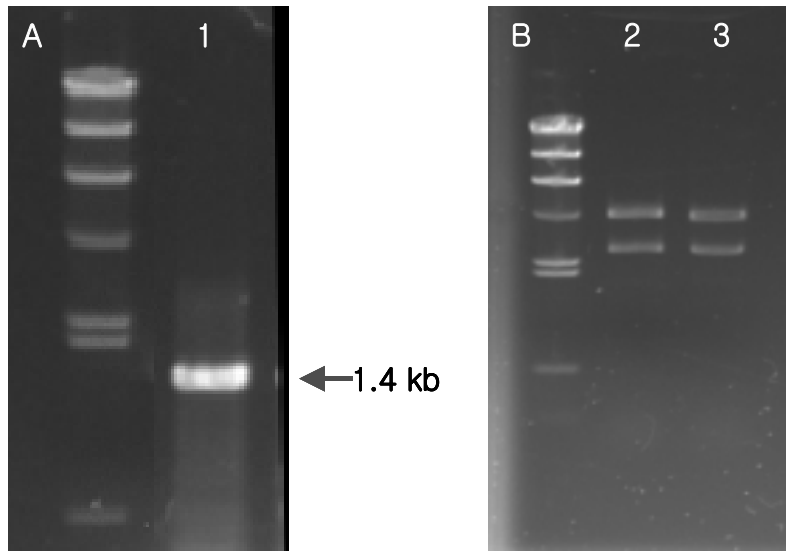


Fig. 3-3. Cloning of *bglA* gene to pGF101. A, PCR amplification of *bglA* gene; B, patterns of subclones by *Bam*HI/*Hind*III digestion. Lane 1, PCR product; lane 2, pGLUN; lane 3, pGLUX.

8



8

. 1	0 . 0 5
1 5	0 . 0 8
0 1	0 . 0 1

Fig. 3-4. Whole-cell β -glucosidase activities on 96 well culture plate. Whole-cell β -glucosidase activities were measured with chromogenic substrate, pNPG (A) and are shown in absorbance of reaction mixture at 412 nm (B). 1, 1X culture cell; 2, 0.5X culture cell; 3, 0.25X culture cell; 4, 0.125X culture cell; 5, culture cell; 6, 0.0625X culture cell; 7, 0.03125X culture cell; 8, 0.0156X culture cell.

2. 선발 유전자의 *in-vitro* 분자 진화에 의한 기능성 효율 증진

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

생명체내에 존재하는 효소들은 생명유지에 필요한 방향으로 진화해 왔고 다양한 기능을 갖는 수많은 효소가 만들어지게 된다. 효소의 자연 진화과정은 여러 효소가 만들어지고 생물체의 유지에 필요한 효소만이 선택되어지는 과정이라 볼 수 있다. 이런 것을 모사하여 기존에 존재하는 효소에 인위적인 돌연변이를 유도, 다양한 효소 library를 창출하고 이로부터 목적에 맞는 효소를 선택하는 과정을 반복하는 기술을 *in-vitro* molecular evolution, 또는 directed evolution이라고 한다. 생명체내에 존재하는 수 천 종의 효소는 생물체의 기능을 유지하도록 진화되어 왔기 때문에 이를 실제 산업적으로 활용하기 위해서는 목적에 맞게 효소의 기능이나 특성을 개량하여야 한다. 효소의 유전자에 돌연변이를 가하여 다양한 mutant library를 제조하는 방법에 따라 효소의 진화 속도가 결정되며 이는 곧 개량된 효소를 얼마나 빠르게 얻을 수 있는가와 직결된다. 또한 많은 mutant로부터 원하는 방향으로 기능이 변화한 효소를 선별하는 방법도 효소의 directed evolution의 효율을 결정하는 주요한 원인이 된다. 현재 유전자의 mutant library를 구축하는데 가장 효율적인 방법으로 이용되는 것이 Stemmer (1994)에 의해 개발된 DNA shuffling 기술이다. DNA shuffling은 염기서열이 비슷한 유전자들 또는 mutation에 의해 발생한 유전자들로부터 다양한 조합을 만들어 library를 구축한다. 염기서열이 비슷한 유전자들을 DNase I에 의해 자르고 이 조각들도 다시 PCR을 수행하여 reassemble 시킨 다음 다시 PCR을 통해 전체 원래 길이를 갖는 새로운 유전자를 만들어 내는 기술이다. 이외에도 nucleotide에 damage를 주는 methylsulfonateethyl ester, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine 등의 chemical을 이용한 mutagenesis, 특정 아미노산을 가능한 모든 아미노산으로 치환하여 변이를 유발시키는 saturation mutagenesis (site-directed mutagenesis), cassette mutagenesis 등이 있다. 본 연구에서는 repair 기작에 변형이 생긴 E. coli mutator strain을 이용한 방법과 돌연변이 발생빈도를 증가시키는 PCR을 수행하여 돌연변이를 유발하는 error-prone PCR 방법을 이용하였다. β -Glucosidase의 directed evolution에 관한 연구는 Gracia 등 (2000)에 의해 시도되었는데, 그들은 *Paenibacillus polymyxa*로부터 분리한 β -glucosidase로부터 random mutagenesis를 통해 얻은 thermal resistance를 가지는 mutant를 확보하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 메타제놈 으로부터 분리한 β -glucosidase 유전자를 온도나 기타 조건에서의 기능 변화가 아닌 다양한 방법으로 mutagenesis 시켜 활성이 현저히 향상된 mutant를 얻고자 하였다.

2) 연구방법

가) Mutator cell에 의한 random-mutagenesis

(1) *bglA* 유전자의 Mutator cell로의 형질전환

XL1-RED (Stratagene) competent cell을 얼음 위에서 녹여 손으로 tapping한 후 100 μ l 씩 15 ml tube에 분주하고 β -mercaptoethanol 1.7 μ l를 첨가하여 섞어 주었다. 얼음에서 10분간 방치하면서 2분마다 섞어 주었다. *bglA* 유전자가 들어간 pEGLU92 DNA 38 ng (1 μ l)를 첨가하여 tapping 후 얼음위에서 30분간 방치하고 42°C에서 45초간 heat shock을 준 다음 얼음위에서 2분간 놓아 둔 후 SOC medium을 900 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간동안 진탕배양하였다. 이중 200 μ l를 ampicillin이 첨가된 LB plate에 spreading하였다.

(2) 날짜별 plasmid 분리

200 colony 이상씩을 긁어서 ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 첨가된 5 ml의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 1일이 지난 후 1.5 ml를 따로 취하여 plasmid를 분리하고 나머지 배양액은 LB 배지를 더 첨가하여 10 ml이 되도록 한 후 다시 1일 동안 배양하였다. 2일째 다시 1.5 ml를 취하여 plasmid를 분리하였다.

(3) 분리한 plasmid의 형질전환

1일째와 2일째 분리한 각각의 plasmid를 다시 EPI cell에 형질전환하였다. EPI (Invitrogen) competent cell을 얼음 위에서 녹여 손으로 tapping한 후 100 μ l 씩 15 ml tube에 분주하고 1일째와 2일째 plasmid DNA를 첨가하여 tapping 후 얼음위에서 30분간 방치하고 42°C에서 45초간 heat shock을 준 다음 얼음위에서 2분간 놓아 둔 후 SOC medium을 900 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간동안 진탕배양하였다. 이중 200 μ l를 ampicillin이 첨가된 LB plate에 spreading하였다.

(4) 작성된 mutant library의 검색

Mutant library는 ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)이 첨가된 액체 LB배지 120 μ l에 접종하여 이들을 37°C에서 16시간 정지 배양 후 각각의 cell 용액 30 μ l를 취하여 LB배지 90 μ l가 들어있는 96 well plate에 분주하고 cellulose의 analogue인 MUF-cellobioside ($10 \mu\text{M}$) 20 μ l를 첨가한 다음 28°C에서 2-5일 동안 매일 UV하에서 관찰하여 형광을 발하는 clone들을 선별하였다.

나) Error-prone PCR을 이용한 random mutagenesis

(1) *bglA*의 error-prone PCR

1.45 kb의 *bglA* 유전자를 error-prone PCR을 사용하여 돌연변이 시켰다. 주형은 display용 vector인 pGF101에 *bglA* 유전자가 삽입된 plasmid인 pGGLU92를 사용하였다. PCR은 Genemorph kit (Stratagene)을 사용하여 50 ng DNA, 40 mM dNTP 1 μ l, Mutazyme II DNA polymerase 1 μ l을 PCR tube에 첨가한 후 총 50 μ l의 양이 되도록 하였다. 증폭에 사용한 oligonucleotide sequence는 upstream primer로 5'-GATATTGTCGATAAACCCGACGAG-3' 과 downstream primer로 5'-GATTTAATCTGTATCAGGCTGAAA-3'을 사용하였다. PCR은 PTC 225 thermocycler (MJ Research inc., Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, PCR 반응조건은 최초 94°C에서 5분, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초로 총 25회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 8분간 반응 시켰다. 증폭된 DNA중 5 μ l를 취하여 0.7%의 agarose gel에 전기 영동하여 ethidium bromide에 20분간 염색하고 UV illuminator상에서 관찰하였다. 증폭된 DNA는 *Xma*I과 *Hind*III로 절단하여 같은 효소로 절단한 pGF101에 ligation하여 *E. coli* DH5 α cell에 transformation하였다.

(2) Mutant 검색

bglA mutant library인 *E. coli* DH5 α 로부터 plasmid DNA를 분리하여 검색을 용이하게 하기 위하여 *E. coli* TG1에 형질전환하였다. Mutant library의 클론들을 37°C에서 16시간 배양한 다음 새로운 LB 배지로 옮겨 다시 37°C에서 12시간 배양한 다음 배양액을 연속적으로 희석하여 96 well plate에 분주하고 MUF-cellobioside (10 μ M) 20 μ l를 첨가한 다음 28°C에서 2-5일 동안 매일 UV하에서 관찰하여 형광을 발하는 clone들을 선발하였다. 선발한 클론들은 LB 배지에서 배양하여 whole-cell β -glucosidase 활성을 측정하였다.

다) 선발한 클론들의 β -glucosidase 활성 측정

β -glucosidase는 p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG)를 기질로 하여 활성을 측정하였다. 모든 분석조건은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 55°C에서 행하였다. 5 mM pNPG와 recombinant cell을 섞어 55°C에서 15분간 반응 시켰다. 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 정지 시킨 후 β -glucosidase 활성을 420 nm에서 흡광도 측정하였다. 효소활성 1 unit는 1분에 1 μ mole의 p-nitrophenol이 효소에 의해 생성되는 양으로 하였다.

나. 연구결과

1) Mutator cell을 이용한 BglA의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발

Bornscheuer 등은 XL1-RED mutator strain을 사용하여 *Pseudomonas fluorescens*의 esterase (PFE)의 mutant를 만들었다고 보고하였다. XL1-RED cell은 *mutD*, *mutS*, *mutT*의 특성을 나타내는 것으로 DNA Pol III의 3'-5' exonuclease activity가 상실되어 있고, DNA mismatch repair가 일어나 transitions과 transversions을 일으키며 mismatch된 dGTP의 분해를 막아 AT-GC transversion을 일으킨다. 배양시 30 세대마다 1 kb 당 0.5의 mutation 비율을 나타내기 때문에 1일과 2일째로 기간을 달리하여 배양 시킨 mutant cell로부터 plasmid를 분리하여 mutant library를 작성하였다. 앞서 실험에서 언급한 것과 같이 MUF-cellobioside 시약을 첨가하여 형광 활성을 보는 방법은 host로 EPI cell을 써야하기 때문에 각각의 mutant plasmid를 분리하여 EPI cell에 transformation 하였다. 본 실험의 scheme은 Fig. 과 같다. 만들어진 mutant library (D1, D2)들 중 무작위로 18개의 클론을 선택하여 plasmid를 분리하고 제한효소 절단 양상을 관찰한 결과 (Fig. 3-6)와 같다. 모두 약 1.4 kb의 insert를 가지는 것으로 보아 만들어진 mutant library는 전부 pGGLU92에서 유래한 DNA로 판단되었다. D1과 D2 각각의 약 2,000개의 mutant 들을 96 well plate에 접종하여 관찰한 결과 *bglA* 유전자가 들어간 원래 pGGLU92 보다 형광을 더 강하게 나타내는 균주들을 각각 D1 library에서 43 클론, D2 library에서 34 클론을 선발하였다 (Fig. 3-7, 3-8). 이들을 다시 재현성 실험을 실시하여 1일째 클론들 중 형광활성을 강하게 나타내는 pGGLUM12, pGGLUM33, pGGLUM36 클론을 선발하였고, 2일째 클론들 중 형광활성을 강하게 나타내는 pGGLUM4, pGGLUM16, pGGLUM20 클론을 선발하였다. 이들은 모두 *bglA* 유전자가 들어간 원래 pGGLU92보다 강한 형광을 나타내었고 이들의 plasmid를 분리하여 제한 효소 처리한 결과 1.4 kb의 insert를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

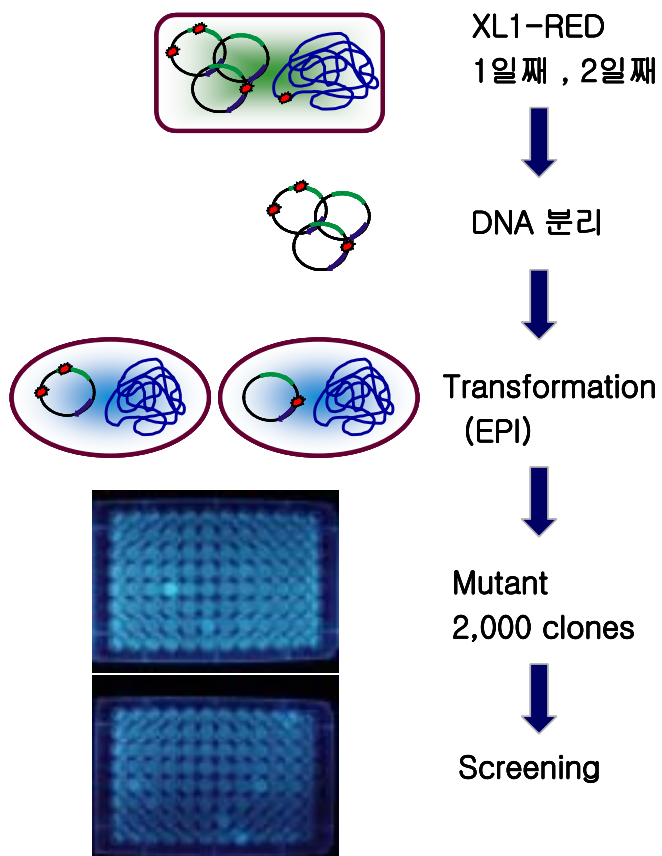


Fig. 3-5. Scheme of the mutagenesis by the mutator cell.

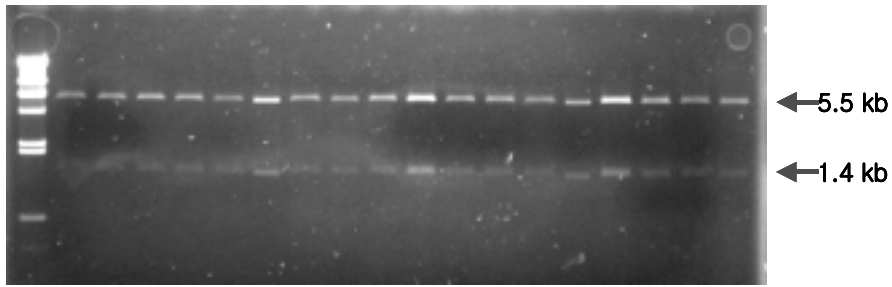


Fig. 3-6. Restriction profile of random clones from the mutant library by mutator cell.

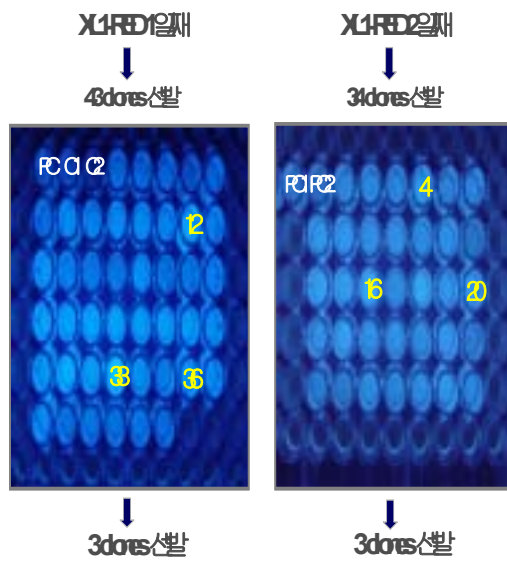
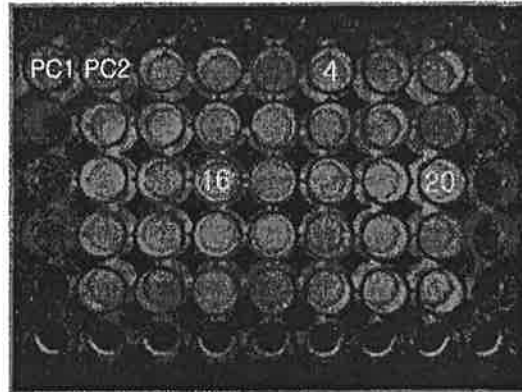


Fig. 3-7. Selection of isolated mutant clones from mutagenesis library (D1) after 1 day culture. PC, GGLU92; C1 (C2), EPI cell; 12, pGGLUM12; 33, pGGLUM33; 36, pGGLUM36.

XL1-RED 2일째



34 clones 선발



3 clones 선발

Fig. 3-8. Selection of isolated mutant clones from mutagenesis library (D2) after 2 days culture. PC1 (PC2), pGGLU92; 4, pGGLUM4; 16, pGGLUM16; 20, pGGLUM20.

2) Error-prone PCR을 이용한 BglA의 *in-vitro* mutagenesis 및 mutant 선발

bglA 유전자를 주형으로 display용 vector인 pGF101에 *bglA* 유전자가 삽입된 plasmid인 pGGLU92를 사용하여 PCR을 수행하였다. 보통 mutation frequency를 증가시키기 위해 MgCl₂의 농도를 증가시키거나 MnCl₂를 다른 농도로 첨가하거나 dCTP와 dTTP의 농도를 올려주고, 또는 Taq polymerase의 양을 달리해 주는 PCR 조건 변형을 이용한다. PCR 수행조건을 다르게 하면 mutation rate의 조절이 가능하다. 본 연구에서는 Genemorph kit을 사용하였는데 mutagenesis 효율이 PCR 수행시 kb 당 1내지 7 base의 mutation이 발생하는 것으로 알려져 있으며 주로 GC-rich region에 좀 더 많은 돌연변이가 일어나는 것으로 나타났다. Fig. 3-9에서 보는 바와 같이 원하는 크기의 PCR product가 증폭된 것을 볼 수 있었다. PCR의 annealing temperature를 달리 하였을 때 55°C에서 가장 PCR product가 잘 증폭되었다. 이것을 제한효소로 절단하여 bacterial display vector인 pGF101에 ligation하여 (Fig. 3-10) EPI100 cell에 형질전환하여 활성이 증가된 β-glucosidase를 검색하였다. 이들 중 pGGLU92 보다 높은 활성을 나타내는 클론을 35개 선발하였다 (Fig. 3-11). 이들 클론들의 plasmid를 분리하여 *Bam*HI/*Hind*III 제한효소를 사용하여 insert 유무를 확인한 결과 (Fig. 3-12), 이중 25개 클론을 재선발하였다.

그러나 error-prone PCR 방법은 자체가 processibility를 가지고 있어서 평균크기의 유전자를 돌연변이 시키기에 충분하지 못하고 짧은 길이의 유전자 부위 안에서 돌연변이가 일어날 빈도가 낮아서 효소의 활성 부위 안에 많은 돌연변이를 유발시킬 수 없으며 발생하는 mutation이 완전히 random하지 않기 때문에 기능이 나빠진 mutant의 비율이 높아져서 선별이 힘들어지는 단점이 있다. Zang 등 (1997)은 galactosidase를 DNA shuffling 방법에 의해서 fucosidase의 기능을 가지는 효소로 evolution하는 등 여러 효소들이 DNA shuffling과 유사 기술에 의해서 진화되고 있다. 따라서 이렇게 error-prone PCR로 선발한 mutant와 앞서 실험한 mutator strain을 이용해서 선발한 mutant를 합쳐서 shuffling 등을 통한 mutation을 일으킨다면 활성이 높아진 mutant의 비율을 높을 수 있을 것으로 사료되었다.

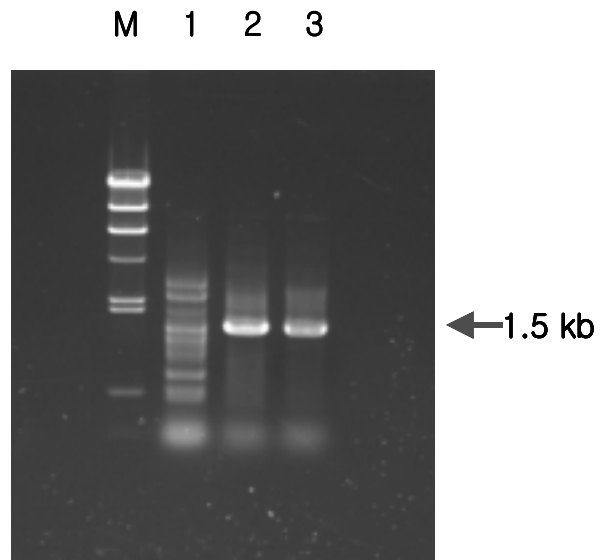


Fig. 3-9. PCR amplification of *bglA* gene by error-prone PCR mutagenesis. 1, annealing temperature 52°C; 2, annealing temperature 58°C; 3, annealing temperature 62°C.

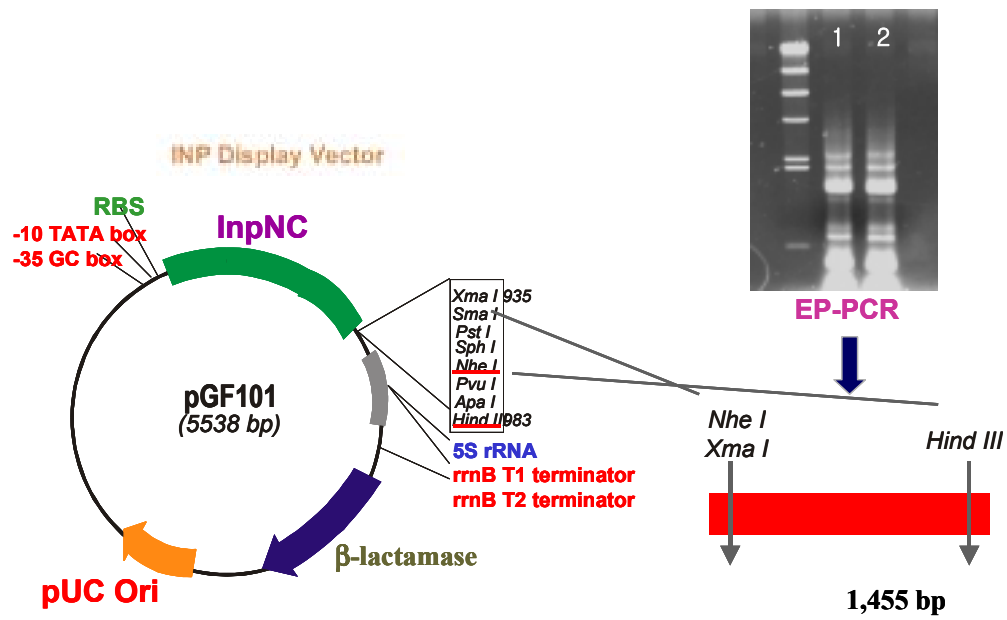


Fig. 3-10. Cloning of error-prone PCR product from β -glucosidase. 1, *bglA* PCR product (primer containing *XmaI/HindIII* sites); 2, *bglA* PCR product (primer containing *NheI/HindIII* sites)

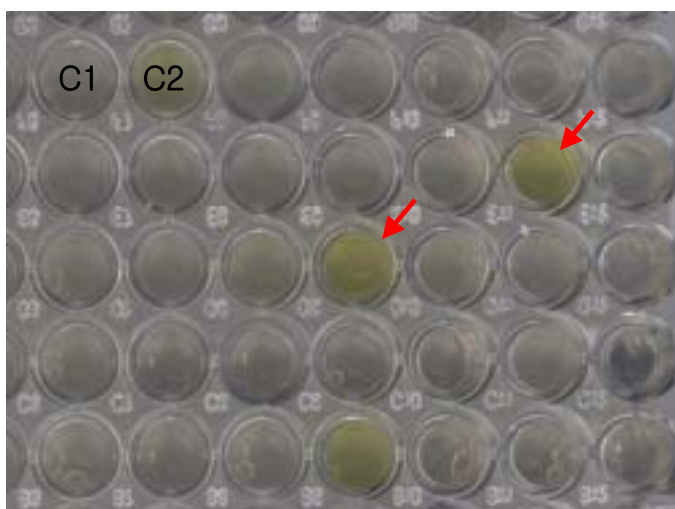


Fig. 3-11. Whole-cell β -glucosidase activities of error-prone PCR mutant on 96 well culture plate. Whole-cell β -glucosidase activities were measured with chromogenic substrate, pNPG. C1, EPI100 with pGF101 vector; C2, EPI100 with β -glucosidase.



Fig. 3-12. Restriction profile of random clones from the mutant library by error-prone PCR.

제 4절 토양 DNA의 세균 다양성 및 분포해석

1. 토양 내 다양한 세균의 분리, 동정 및 보존

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

각각의 미생물이 가지는 생리특성 및 기능성 효소 등은 경제적 및 학문적 가치가 높기 때문에 선진국을 비롯한 세계 각국에서는 수년전부터 다양한 서식환경으로부터 미생물자원을 확보하고, 그 기능을 밝히기 위한 생화학적, 유전학적 연구를 수행하고 있다. 이들 국가에서는 확보된 이들 미생물자원을 이용하여 에너지 및 식량자원 확보, 신기능 생물소재 개발, 환경생태계 보전을 위한 연구소재로 활용하고 있다.

본 연구에서도 신기능 유전자원의 농업적 활용을 위해 생태계 보전지역, 농경지, 해안 연안 및 간척지 등지의 토양시료를 대상으로 저영양세균을 비롯한 다양한 세균을 분리, 동정하였으며 기능성 활용을 위한 screening의 소재로 활용하였다. 생태계 보전지역은 오랜 기간 동안 생태계 환경이 인간의 활동으로부터 제한된 지역으로 토양의 건강성과 작물의 성장에 유용한 미생물자원이 많을 것으로 판단되어 지며, 농경지는 작물과 직접적으로 생장활동을 함께하는 미생물들을 분리하여 그것들의 농업적 활용도를 제고하기 위해 최대한 다양한 미생물을 분리하였다. 해안의 연안지 및 간척지는 기존의 육지환경과는 다른 미생물들이 서식할 것으로 예상되어 이들 토양으로부터도 다양한 미생물자원을 분리하였다.

2) 연구방법

가) 저영양배지를 이용한 배양 가능한 세균의 분리 최대화

- 배지 : PYGV배지, TSA 100배 희석 평판배지, R2A배지, Marine Agar배지 (Table 4-1)
- 희석 : 토양시료 5 g을 멸균수로 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 배까지 희석하여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 배 희석시료에서 각각 희석액 250 ul를 취하여 평판배지에 도말하였다.
- 배양 : 희석된 평판배지에서 5일간 배양후에 생성된 colony를 관찰하였다.
- 균주분리 : 콜로니형태가 다른 균주들을 최대한 분리하여 각각 따로 계대 배양하였다. 또한 분리된 균주는 -70°C 초저온 냉동고에서 장기간 보존하여 후 분류 동정 실험재료에 사용하였다.

Table 4-1. 저영양 세균을 분리하기 위한 배지조성

번호	배지명	조 성
1	PYGV media	Mineral salt sol. ("Hutner/Cohen-Bazire") 20.00 ml Peptone (Bacto) 0.25 g Yeast extract (Bacto) 0.25 g Agar (Bacto) 15.00 g Distilled water 965.00 ml Glucose sol. (2.5%, sterile-filtered) 10.00 ml Vitamin sol. (double conc.) 5.00 ml
		Mineral salt solution: Nitrilotriacetic acid (NTA) 10.00 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 29.70 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 3.34 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 12.67 mg FeSO ₄ x 7 H ₂ O 99.00 mg Metall salt sol. "44" (see medium 590) 50.00 ml Distilled water 900.00 ml
		Vitamin solution (double conc.): Biotin 4.00 mg Folic acid 4.00 mg Pyridoxine-HCl 20.00 mg Riboflavine 10.00 mg Thiamine-HCl x 2 H ₂ O 10.00 mg Nicotinamide 10.00 mg D-Ca-pantothenate 10.00 mg Vitamin B12 0.20 mg p-Aminobenzoic acid 10.00 mg Distilled water 1000.00 ml
2	TSA media	Trypticase soy broth 30.0g Agar 15.0g Distilled water 1.0 L
3	R2A media	Yeast extract 0.50 g Proteose Peptone (Difco no. 3) 0.50 g Casamino acids 0.50 g Glucose 0.50g Soluble starch 0.50g Na-pyruvate 0.30g K ₂ HPO ₄ 0.30 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0.05 g Agar 15.00g Distilled water 1000.00 ml
4	Marine Agar	Bacto Peptone 5g, Bacto Yeast extract 1g, Agar 15 g. "Synthetic sea water" 1000 ml

--	--	--

나) 분리된 세균의 16S rRNA를 이용한 분류

(1) 세균 DNA의 분리

배양한 미생물을 5 ml broth배지에 2일 정도 배양후에 그중 2 ml을 채취하여 세포를 원심분리하여 세포를 농축, 회수하였다. 농축된 세균은 DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제조사의 방법대로 DNA를 추출하여 PCR용 template DNA로 사용하였다.

(2) 16S rRNA PCR반응

분리된 세균의 분류 및 동정을 위하여 분리한 DNA에서 16S rRNA에 해당하는 영역에 대한 것만 PCR로 증폭하여 그것에 대한 염기서열을 분석하였다. forward primer로 fD1 primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')을 사용하였고, reverse primer로 rP2 primer (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다.

16S rRNA 증폭을 위한 PCR 혼합액은 10X PCR buffer액 5 ul, 2.5 mM MgCl₂ 4 ul, 10 mM dNTP 1 ul, 10 pmol oligonucleotide primer 1 ul, 그리고 1 U의 Taq polymerase (solgent, Korea)를 넣은 후, 여기에 100 ng의 template DNA를 첨가하고 증류수로 최종반응 부피를 50 ul로 맞추었다. PCR 증폭은 thermal cycler (MJ Research, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭과정은 전 변성 과정으로 94°C에서 4분간 수행하였고, 94°C에서 1분간 변성, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 증폭을 총 35회 반복하였고, 72°C에서 총 7분간 최종반응시켰다.

증폭된 PCR산물은 1.2% agarose gel (SeaKem LE, FMC) 에서 전기영동후 EtBr (0.5ug/ml)로 염색하여 Geldoc (Koabio, Korea)기에서 1.5kb에 해당하는 DNA밴드를 확인하였다.

(3) Sequencing PCR 반응

증폭된 PCR product는 PCR purification kit (Bioneer, Korea)로 제조사의 방법대로 DNA를 순수 정제한 다음 510r Primer (5'-TATTACCGCGGCTGCTGGCA-3')를 사용하여 PCR기기 (MJ research, USA)를 통하여 부분 증폭하였다. 이때 PCR 수행 조건은 96°C에서 30초, 50°C 15초, 60°C 4분의 반응을 25회 반복하였다.

증폭된 PCR산물을 염기서열분석기(ABI sequencer 3100, USA)를 통하여 유전자 염기서열을 분석하였다. 이때 전체 16S rRNA의 염기서열 분석이 필요할 때는 510r primer이외에도 Table 4-2의 primer를 추가로 사용해 sequencing PCR을 수행하고, Seqman program (Lasergene, USA)을 통해 연결시켜 Phylogenetic tree를 작성하였다.

Table 4-2. Sequencing PCR 에 사용되는 primer들의 염기서열

Primer	Annealing region (number in 16S rRNA of E.coli)	Sequunce (5'-3')
p364f	345-364	GGC AGC AGT GGG GAA TAT TG
p435f	413-431	CCT TCG GGT TGT AAA CCT C
p510r	510-494	TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA
P783f	764-783	TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC
p901f	860-879	CTG GGG AGT ACG GCC GCA AG
p1037f	1037-1056	TCG TCA GCT CGT GTC GTG AG

(4) 계통수 (Phylogenetic tree) 작성

분리 균주들의 16S rRNA의 염기서열을 NCBI의 BLAST search를 통해 얻어진 다른 균주들과의 염기서열과 Ribosomal Database Project (RDP) database이 표준균주의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 얻어진 sequence는 DNASTAR (Lasiergene사)와 MEGA3 program을 사용하여 Neighbor Joining방법을 사용하여 계통도를 작성하였다.

다) 특성에 따른 배양 가능한 세균의 분포 해석

각각의 토양시료로부터 다양한 배지를 통해 많은 미생물을 분리하였으며, 일차적으로 형태나 성장속도가 다른 미생물을 분리하였다. 16S rRNA의 부분 염기서열 분석을 통해 전체 분리 균주를 부분 동정하였으며 이를 통해 배양 가능한 세균의 우점종과 그 분포를 조사하였다.

라)세균의 다양성확보에 의한 미생물 자원의 보전

16S rRNA의 부분 염기서열 분석을 통해 부분 동정된 미생물은 대수증식기 (log phase) 상태에서 15% glycerol에 현탁하여 -70℃에 장기보존하여 본 연구과제의 신

기능 유전자 screening에 사용되었고 그 중 특이 기능을 갖거나 계통 분류학적으로 새로운 종 (novel species)의 가능성이 있는 균주는 따로 동결건조 앰플로 제작해서 장기보존한 후에 추가적으로 계통분류학적 연구를 진행하였다. 계통분류 연구가 끝난 후에는 농촌진흥청 산하 한국농업미생물자원센터 (KACC)에 기탁하였다.

나. 연구결과

1) 저영양배지를 이용한 세균의 분리 최대화

토양속에는 보통 g당 $10^8 \sim 10^{10}$ 개의 세균이 존재한다. 대부분의 미생물은 영양분의 부족, 삼투압, pH변화, 온도변화 등 여러 가지 척박한 환경에 적응하면서 생존하므로 고영양의 지보다는 저영양의 배지에서 좀더 다양하게 배양되는 것을 볼 수 있다. 본 연구에서는 최대한 많은 다양한 미생물의 확보를 위해서 저양양의 배지를 분리배지로 사용하였다. (Table 4-3)

토양시료 5 g을 50 ml의 멸균 증류수에 섞은 후 30분간 흔들어서 토양내의 세균이 토양입자와 잘 분리가 되도록 혼합하였다. 시료를 멸균증류수를 사용하여 차례로 10^{-8} 까지 희석한 다음 그중 -4~-7배의 시료에서 100 ul를 취해 PYGV, R2A, 1/100 희석 TSA에 도말하여 28°C에서 1주간 배양한 후, colony를 계수하고 무작위로 순수 분리하였다. 각각의 배지에서 순수분리한 세균은 15% Glycerol을 이용하여 -80°C deep freezer에 보존하였다. 보존한 미생물을 추후 재생하여 분류,동정에 이용하였다.

Table 4-3. 토양으로부터 다양한 미생물의 분리와 보존

번호	수집지역	시료수	분리 균주수	분리배지	보존방법	KACC등록
1	우포늪	52	1514	dilution TSA	-80°C 동결보존	WP0001-WP1514
2	무제치늪	30	706	dilution TSA	-80°C 동결보존	MJ001-MJ706
3	고추재배지 (건전지역)	4	83	PYGV	-80°C 동결보존	GC001-GC083
4	고추재배지 (이병지역)	4	85	PYGV	-80°C 동결보존	GC101-GC185
5	대부도 갯벌	5	100	Marine agar	-80°C 동결보존	DA001-DA100
6	포항연안지	6	136	R2A	-80°C 동결보존	HO001-HO136
7	원주농경지	3	146	dilution TSA	-80°C 동결보존	WO001-WO146
합 계		90	2,388			

2) 분리된 세균의 지방산 분석을 이용한 분류 및 분포해석

각각의 배지에서 순수분리한 세균은 지방산 분석을 통해 동정하였다. -80℃에 보존되어 있는 균주를 TSA (Trypticase Soy Agar)배지에서 재생하여 30℃에서 24시간 배양한 후 50~100mg의 균체를 tube에 모아 사용하였다.

NaOH/Methanol 용액으로 saponification, methylation 시킨 후, 최종적으로 hexane용액으로 지방산을 추출하였다. GC-MIDI (HP 5890II) 기기를 이용하여 추출된 지방산을 분석하여 균주를 동정하였다. 무작위 표본을 추출하여 동정 시험을 수행한 후에 각각의 시료에 존재하는 배양가능한 세균의 분포를 결정하였다.

가) 생태계 보존 지역에서 분리한 토양 미생물 다양성

(1) 우포늪 지역에서의 분리한 미생물의 분류, 동정

우포늪에서 분리된 균주중 무작위로 표본 추출된 139 균주를 동정하였고, 각각의 점유율을 계산하였다. *Bacillus* 속에 해당하는 균주가 45균주로 32.4%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, *Kocuria*속에 해당하는 균주가 13균주로 동정되어 그 다음으로 많은 9.4% 분포를 차지했다. 한편, 동정되지 않은 균주는 40균주로 28.8%에 해당하는 분포를 보였다.

Table 4-4. 우포늪에서 분리한 세균의 동정과 분포율

번호	속명	균주수	점유율(%)
1	<i>Bacillus</i>	45	32.4
2	<i>Kocuria</i>	13	9.4
3	<i>Arthrobacter</i>	12	8.6
4	<i>Pseudomonas</i>	10	7.2
5	<i>Brevibacillus</i>	7	5.0
6	<i>Micrococcus</i>	3	2.2
7	<i>Corynebacterium</i>	2	1.4
8	<i>Deinococcus</i>	2	1.4
9	<i>Staphylococcus</i>	2	1.4
10	<i>Acinetobacter</i>	1	0.7
11	<i>Janthinobacterium</i>	1	0.7
12	<i>Paenibacillus</i>	1	0.7
13	Unknown	40	28.8
합계		139	100.0



(2) 무제치늪 지역에서 분리한 미생물의 분류, 동정

무제치늪에서 분리된 균주중 무작위로 표본추출된 132 균주를 동정하였고, 각각의 점유율을 계산하였다. *Bacillus* 속에 해당하는 균주가 46균주로 34.8%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, 그 다음으로 *Burkholderia*속에 해당하는 균주가 8균주로 6.1%로 그 다음으로 많은 분포를 차지했다. 동정되지 않은 균주는 47균주로 35.6%에 해당하는 많은 분포를 보였다.

Table 4-5. 무제치늪에서 분리한 세균의 동정과 분포율

번호	속 명	균주수	점유율(%)
1	<i>Bacillus</i>	46	34.8
2	<i>Burkholderia</i>	8	6.1
3	<i>Arthrobacter</i>	7	5.3
4	<i>Pseudomonas</i>	7	5.3
5	<i>Paenibacillus</i>	6	4.5
6	<i>Kocuria</i>	3	2.3
7	<i>Micrococcus</i>	2	1.5
8	<i>Brevibacillus</i>	1	0.8
9	<i>Curtobacterium</i>	1	0.8
10	<i>Janthinobacterium</i>	1	0.8
11	<i>Nocardia</i>	1	0.8
12	<i>Serratia</i>	1	0.8
13	<i>Sphingomonas</i>	1	0.8
14	Unknown	47	35.6
합 계		132	100.0

나) 고추재배지에서 분리한 미생물의 분류, 동정

고추재배지에서 식물병이 발생된 지역과 비 발생지역에서 분리된 균주중 무작위로 표본 추출된 168 균주를 분리, 동정하였고, 각각의 점유율을 계산하여 발생지역간의 차이를 비교하였다. 병 발생지역과 비발생지역 모두 *Pseudomonas*가 가장 많은 분포를 보였고 특히 병 건진지의 비율 (50%)이 병 발생지 (22%)보다 월등히 높은 경향을 보였다. 동정되지 않은 균주는 각각 13균주와 31균주로 전체적으로 26.2%에 해당하는 분포를 보였다.

Table 4-6. 고추 재배지에서 분리한 세균의 동정과 분포율

번호	속명	균주수		합계	점유율(%)
		병 건진지	병 발생지		
1	<i>Agrobacterium</i>	5	4	9	5.4
2	<i>Arthrobacter</i>	2	1	3	1.8
3	<i>Bacillus</i>	2	2	4	2.4
4	<i>Bergeyella</i>	-	2	2	1.2
5	<i>Brevundimonas</i>	-	1	1	0.6
6	<i>Cellulomonas</i>	1	-	1	0.6
7	<i>Chryseobacterium</i>	1	2	3	1.8
8	<i>Comamonas</i>	-	2	2	1.2
9	<i>Flavobacterium</i>	10	5	15	8.9
10	<i>Janthinobacterium</i>	-	2	2	1.2
11	<i>Microbacterium</i>	4	1	5	3.0
12	<i>Nocardioides</i>	-	1	1	0.6
13	<i>Paenibacillus</i>	-	3	3	1.8
14	<i>Paracoccus</i>	-	1	1	0.6
15	<i>pedobacter</i>	-	1	1	0.6
16	<i>Pseudomonas</i>	41	19	60	35.7
17	<i>Stenotrophomonas</i>	-	5	5	3.0
18	<i>Variovorax</i>	4	1	5	3.0
19	<i>Virgibacillus</i>	-	1	1	0.6
20	Unknown	13	31	44	26.2
합계		83	85	168	100.0

3) 16S rRNA를 이용한 토양 세균의 분류 및 분포해석

기존에 사용되던 GC-MIDI를 이용한 균주의 간이 동정은 신속하고 편리한 장점은 있으나 분자생물학적 방법에 비해 정확성과 신뢰도가 떨어지는 단점이 있다. 본 실험에서는 균주의 정확한 동정과 향후 신종 미생물의 탐색을 위해 폭넓게 이용되고 있는 미생물의 16S rRNA 유전자를 PCR을 통해 증폭한 후 부분 염기서열로 분석하여 균주를 부분 동정하였다.

가) 서해안 갯벌 시료에서 배양 분리한 균주의 동정과 분포

서해안 갯벌인 대부도 토양에서 분리된 균주중 무작위로 표본 추출된 100 균주에 동정하였고, 각각의 점유율을 퍼센트로 계산하였다. 이 중 *Mesorhizobium* 속에 해당하는 균주가 20균주로 20.0%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, *Bacillus* 속에 해당하는 균주가 14균주로 동정되어 그 다음으로 많은 14% 분포를 차지했다. 한편, 전체적으로는 22속에 해당되는 균주로 동정되었다 (Table 4-7).

나) 포항연안지에서 분리한 세균의 동정 및 분포율

포항연안지(대도항, 호미곶, 간절곶)에서 분리된 균주중 무작위로 표본추출된 136 균주를 동정하였고, 각각의 점유율을 계산하였다. *Erythrobacter* 속에 해당하는 균주가 28균주로 20.6%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, 그 다음으로 *Paracoccus*속에 해당하는 균주가 19균주로 14.0%로 그 다음으로 많은 분포를 차지했다. 전체적으로는 45속에 해당하는 것으로 나타났다(Table 4-8).

다) 원주 토양에서 분리한 세균의 동정 및 분포율

원주 농경지에서 분리된 균주중 무작위로 표본추출된 146 균주를 동정하였고, 각각의 점유율을 계산하였다. *Pseudomonas*속에 해당하는 균주가 43균주로 29.5%의 점유율로 가장 많은 분포를 차지했고, 그 다음으로 *Arthrobacter*속에 해당하는 균주가 40균주로 27.4%로 그 다음으로 많은 분포를 차지했다. 전체적으로는 18속에 해당하는 균주를 분리 동정하였다.

Table 4-7. 대부도 갯벌 시료에서 분리한 세균의 동정과 분포율

번호	균주속 (Genus)	균주수	점유율(%)
1	<i>Mesorhizobium</i>	20	20
2	<i>Bacillus</i>	14	14
3	<i>Agrobacterium</i>	8	8
4	<i>Pseudomonas</i>	7	7
5	<i>Rhodobacter</i>	7	7
6	<i>Sphingopyxis</i>	7	7
7	<i>Nocardioides</i>	6	6
8	<i>Arthrobacter</i>	5	5
9	<i>Cellulomonas</i>	3	3
10	<i>Novosphingobium</i>	3	3
11	<i>Psychrobacter</i>	3	3
12	<i>Sphingomonas</i>	3	3
13	<i>Frateuria</i>	2	2
14	<i>Fulvimarina</i>	2	2
15	<i>Loktanella</i>	2	2
16	<i>Paracoccus</i>	2	2
17	<i>Agromyces</i>	1	1
18	<i>Dyemonas</i>	1	1
19	<i>Erythrobacter</i>	1	1
20	<i>Plantibacter</i>	1	1
21	<i>Rhizobium</i>	1	1
22	<i>Sanguibacter</i>	1	1
	합 계	100	100

Table 4-8. 포항 연안지에서 분리한 세균의 동정 및 분포

번호	균주속 (Genus)	균주수	분포율
1	<i>Agrobacterium</i>	1	0.7
2	<i>Agrococcus</i>	3	2.2
3	<i>Amaricoccus</i>	2	1.5
4	<i>Arenibacter</i>	1	0.7
5	<i>Arthobacter</i>	1	0.7
6	<i>Bacillus</i>	15	11.0
7	<i>Brevundimonas</i>	1	0.7
8	<i>Calefactosor</i>	2	1.5
9	<i>Catellatospora</i>	1	0.7
10	<i>Devosia</i>	1	0.7
11	<i>Erythrobacter</i>	28	20.6
12	<i>Exiguobacterium</i>	2	1.5
13	<i>Filibacter</i>	2	1.5
14	<i>Flavobacterium</i>	1	0.7
15	<i>Flexibacter</i>	3	2.2
16	<i>Halobacillus</i>	1	0.7
17	<i>Jannaschia</i>	1	0.7
18	<i>Kangiella</i>	2	1.5
19	<i>Ketogulonogenium</i>	1	0.7
20	<i>Lutibacterium</i>	1	0.7
21	<i>Lysobacter</i>	1	0.7
22	<i>Marinobacter</i>	1	0.7
23	<i>Microbacterium</i>	3	2.2
24	<i>Nocardioides</i>	3	2.2
25	<i>Octadecabacter</i>	1	0.7
26	<i>Paenibacillus</i>	1	0.7
27	<i>Paracoccus</i>	19	14.0
28	<i>Pedobacter</i>	4	2.9
29	<i>Pseudomonas</i>	3	2.2
30	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	0.7
31	<i>Psychroflexus</i>	1	0.7
32	<i>Rhodobacter</i>	3	2.2
33	<i>Roseivivax</i>	1	0.7
34	<i>Roseobacter</i>	2	1.5
35	<i>Roseomonas</i>	1	0.7
36	<i>Sphingomonas</i>	1	0.7
37	<i>Sphingopyxis</i>	1	0.7
38	<i>Sporosarcina</i>	1	0.7
39	<i>Stappia</i>	1	0.7
40	<i>Stenotrophomonas</i>	3	2.2
41	<i>Sulfitobacter</i>	8	5.9
42	<i>Tetrasphaera</i>	1	0.7
43	<i>Thermomonas</i>	1	0.7
44	<i>Ureibacillus</i>	1	0.7
45	<i>Virgibacillus</i>	3	2.2
	합 계	136	100

Table 4-9. 원주 농경지에서 분리한 세균의 동정 및 분포

번호	균주속 (Genus)	균주수	분포율
1	<i>Acidovorax</i>	3	2.1
2	<i>Agrobacterium</i>	4	2.7
3	<i>Aquaspirillum</i>	5	3.4
4	<i>Arthrobacter</i>	40	27.4
5	<i>Bacillus</i>	1	0.7
6	<i>Burkholderia</i>	10	6.8
7	<i>Collimonas</i>	20	13.7
8	<i>Curtobacterium</i>	1	0.7
9	<i>Hydrogenophaga</i>	3	2.1
10	<i>Janthinobacterium</i>	3	2.1
11	<i>Microbacterium</i>	3	2.1
12	<i>Paenibacillus</i>	2	1.4
13	<i>Plantibacter</i>	1	0.7
14	<i>Pseudomonas</i>	43	29.5
15	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	0.7
16	<i>Riemerella</i>	2	1.4
17	<i>Terrabacter</i>	2	1.4
18	<i>Zoogloea</i>	2	1.4
	합 계	146	

2. 비 배양 방법을 통한 토양세균의 다양성 분석 및 우점종 확인

가. 연구내용 및 방법

1) 연구내용

토양내의 미생물이 배양되는 비율은 현재까지 존재하는 전체 미생물중 0.1~1% 정도로 알려져 있다. 따라서 전체 토양내 미생물 다양성 분석은 배양에 의존하지 않는 방법으로 직접적으로 알아보는 것이 큰 의미가 있다. 이러한 이유로 여러 가지 metagenome 방법이 많은 연구에서 시도되고 있고 본 연구에서도 이러한 방법을 적용하였다. 먼저 각각의 수집지역에서 배양에 의한 방법으로 가장 다양성이 많이 보여진 시료를 선정해 metagenome을 추출하였다.

2) 연구방법

가) 다양한 토양의 DNA 추출

토양시료 0.5~1 g을 -80°C 에서 2시간정도 동결한 후에 동결건조기 (Ilshin lab, Korea)에서 over night를 하여 완전 건조시켰다. 동결건조된 토양시료는 soil DNA extraction kit (UltraClean Soil DNA kit, Mobio Co. USA)를 제조사의 방법대로 사용하여 최대한 순수하고 분자량이 큰 DNA를 추출, 분리하였다 (Fig. 4-1).

나) 16S rRNA를 이용한 토양세균의 다양성 분석

분리된 토양 DNA를 fd1 primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 rP2 primer (5'-ACGGCTACCTGTGTTACG ACTT-3')를 사용하여 PCR(MJ Research, USA)기기를 통하여 세균의 16S rRNA gene만을 선택적으로 증폭하였다. 이때 16S rRNA 증폭을 위한 PCR 수행조건은 다음과 같다. 증폭전 전처리를 94°C 에서 4분간 하였고, 94°C 에서 DNA해리 1분, 58°C 에서 annealing 1분, 72°C 에서 증폭 2분의 반응을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C 7min의 추가반응을 수행하였다.

추출된 DNA는 상기의 방법대로 fd1, rP2 primer로 PCR 증폭을 수행하여 1.5kb의 크기에 해당하는 16S rRNA PCR product를 얻었다 (Fig. 4-2).

다) 배양 불가능한 미생물의 분류, 우점종 확인 및 분포 해석비교

- 16S rRNA의 증폭 : 분리된 토양 DNA를 분리세균의 증폭방법과 같은 방법으로 PCR 증폭하였다. 이렇게 증폭된 PCR산물은 토양 DNA로부터 직접적으로 세균의 16S rRNA만을 선택적으로 증폭한 결과라고 볼 수 있다.
- 16S rRNA gene의 클로닝 : 증폭된 16S rRNA gene을 pGEM-T vector

(Promega, USA) 에 ligation한 후에 E.coli DH5 α 에 transformation하여 blue/white screening을 통해 클로닝 된 세포만을 분리하여 LB broth배지에 1일 배양한다. 배양된 세포에서 plasmid DNA만을 추출하여 vector내 부위인 T7 과 prGTr부위에 맞는 primer를 제작하여 PCR로 증폭한 후에 T7 primer만을 사용하여 배양세균의 염기서열분석과 같은 방법으로 부분염기서열을 분석하였다. 이때 Transformation을 통해 얻어진 product를 LB broth에서 1일 배양을 한 후 Plasmid DNA를 isolation한 다음 제한효소 (EcoR1)를 처리하여 그림3과 같이 16S rRNA insert의 존재를 확인하였다 (Fig. 4-3).

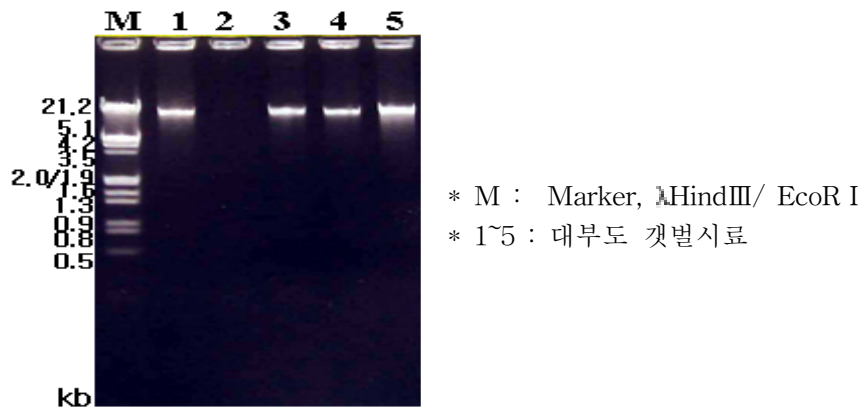


Fig. 4-1. 대부도토양에서 추출한 토양 DNA 전기 영동사진 (예)

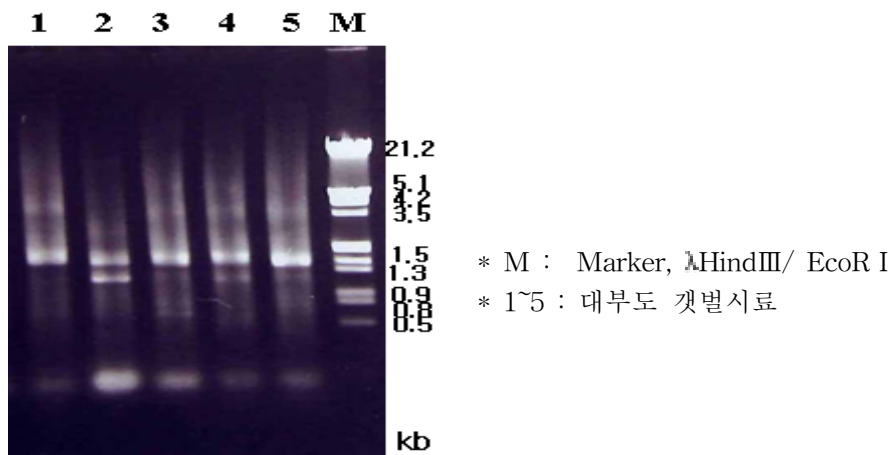


Fig. 4-2. 대부도토양에서 추출한 토양 DNA 의 16S rRNA PCR product 전기영동사진(예)

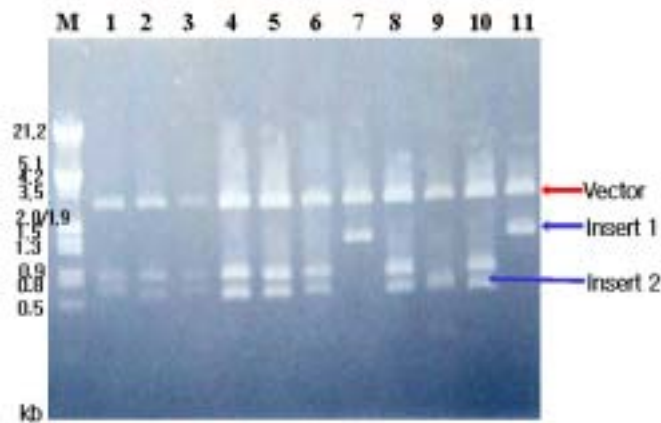


Fig. 4-3. EcoRI으로 처리한 대부도 토양DNA의 16S rRNA PCR product의 전기영동사진(예). M: Marker, λ HindIII/ EcoR I

* 1~11 : insert의 존재가 확인된 대부도 갯벌시료의 clone

- 계통도 작성 : 얻어진 각 염기서열은 DNASTAR (Lasergene, USA)의 CLUSTAL W software로 정렬하였다. 정렬된 전체 염기서열은 MEGA3.0 program (Kumar *et al.*, 2004)을 사용하여 진화 계통도를 작성하였다. 이때 진화적인 거리는 Jukes & Cantor algorithm을 사용하였고, 계통도 작성은 Neighbor-Joining method로 하고, 계통도의 안정성은 1000번 반복으로 Bootstrap value를 측정하였다. 작성된 계통도를 통하여 이미 분리, 부분동정, 보존되어 있는 배양 세균과의 분포도를 함께 비교함으로써 우점종을 확인하였다.

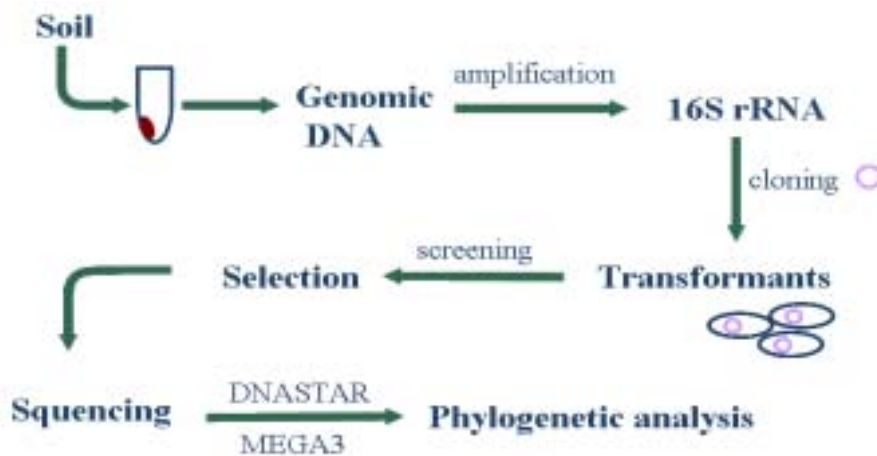


Fig. 4-4. 비배양 방법을 통한 토양 DNA의 세균다양성 분석 흐름도

나. 연구결과

1) 생태계 보존지역의 토양 DNA 분포해석

가) 우포늪 토양DNA의 미생물 다양성 분석

우포늪에서 채취한 52개의 시료중 PYGV배지위에서 희석평판법으로 가장 다양하게 미생물이 분리된 시료를 선정해서 0.5g의 토양에서 metagenome을 추출하였고 그 중 63개의 clone을 분리하여 토양 DNA의 분자계통도를 작성하였다. (Fig. 4-5)

*Acidobacteria*군에 속하는 미생물이 40%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, β -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 22.9%, *Actinobacteria*가 20%, α -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 11.4%, γ -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 5.7% 를 차지하여 배양에 의한 방법보다 실제로 많은 다양한 미생물이 존재함을 보였다.

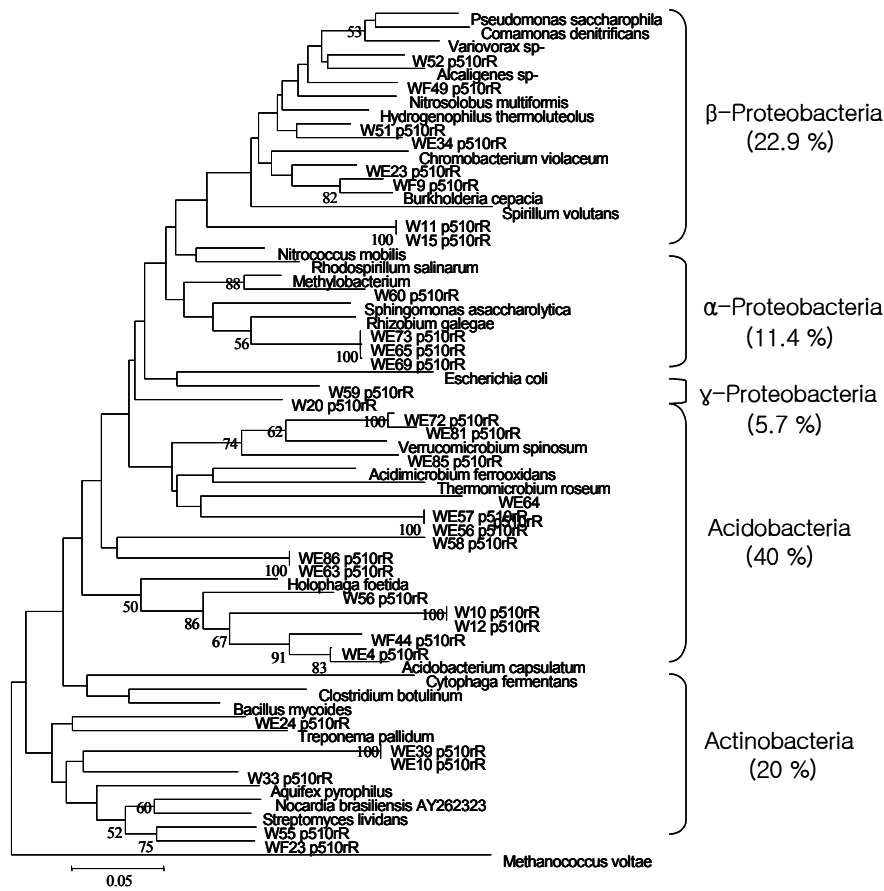


Fig. 4-5. 우포늪에서 분리한 토양 DNA의 분자계통도

나) 무제치늪 토양DNA의 미생물 다양성 분석

무제치늪에서 채취한 30개의 시료중 회석평판법으로 배양하여 가장 다양하게 미생물이 분리된 시료를 선정해서 0.5g의 토양에서 metagenome을 추출하였고 그중 43개의 clone을 분리하여 토양 DNA의 분자계통도를 작성하였다(Fig. 4-6).

*Acidobacteria*군에 속하는 미생물과 β -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 각각 23.3 %를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, *Actinobacteria*에 속하는 미생물이 16.6%, δ -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 13.3%, γ -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 13.3% 를 차지하였고 어느 그룹에도 속하지 않은 미생물이 10%비율로 존재함을 보였다.

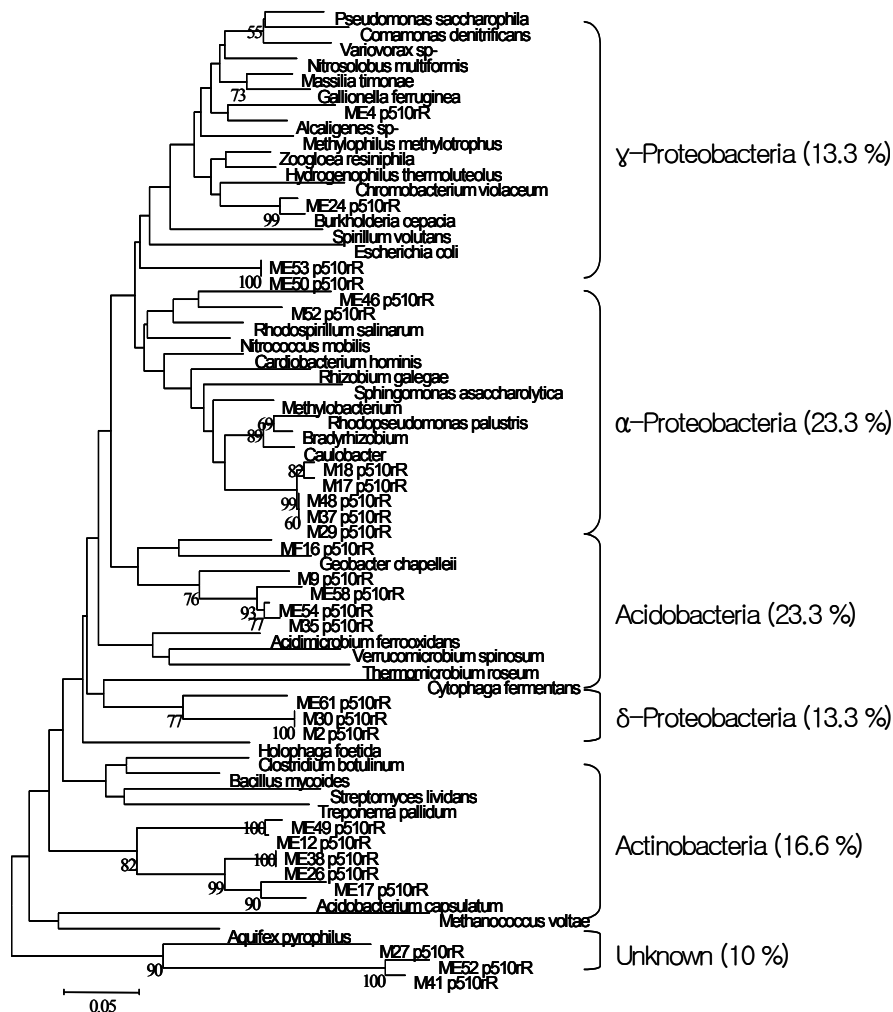


Fig. 4-6. 무제치늪에서 분리한 토양 DNA의 분자계통도

2) 고추재배 국내 농경지의 토양DNA 분포해석

가) 고추재배지 병 건전지역 토양DNA의 미생물 다양성 분석

고추재배지중 병이 발생하지 않은 건전지역의 근권토양에서 0.5 g을 취해 metagenome을 추출하였고 그중 52개의 clone을 분리하여 토양 DNA의 분자계통도를 작성하였다(Fig. 4-7).

*Acidobacteria*군에 속하는 미생물이 25%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, γ -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 11.1 %를 차지해 그다음으로 많은 분포를 보였다. β -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 8.3%, *Verrucomicrobia* 8.3%, δ -*Proteobacteria* 5.6%, *Actinobacteria*에 속하는 미생물이 5.6%, ϵ -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 5.6%,를 차지하였고 어느 그룹에도 속하지 않은 미생물이 10% 비율로 존재함을 보여 실제 배양에 의한 방법보다 더 다양한 미생물들이 토양내에 존재함을 확인하였다.

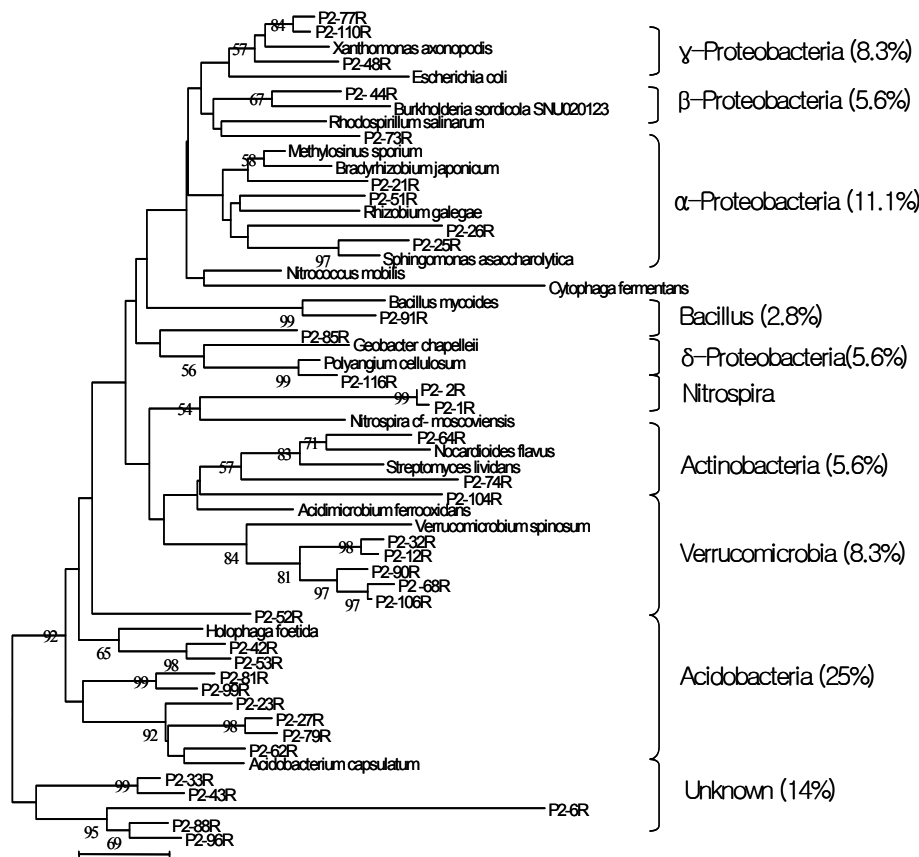


Fig. 4-7. 고추재배지 병 건전지역 토양 DNA의 분자계통도.

나) 고추재배지 병 발생지역 토양DNA의 미생물 다양성 분석

고추재배지중 병이 발생이 매우 심한 병 발생지역의 근권토양에서 0.5g을 취해 metagenome을 추출하였고 그중 32개의 clone을 분리하여 토양 DNA의 분자계통도를 작성하였다(Fig. 4-8).

□-*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 26.3 %를 차지해 가장 많은 분포를 보였고 *Acidobacteria*군에 속하는 생물이 20%를 차지해 그다음으로 많은 분포를 보였다. 그 외에도 *Verrucomicrobia*에 속하는 미생물이 16.3%, ▯-*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 10.5%, *Actinobacteria*에 속하는 미생물이 10.5%비율로 존재함을 보여 병 비발생지역보다 다양성이 적은 미생물들이 토양 내에 존재함을 확인하였다.

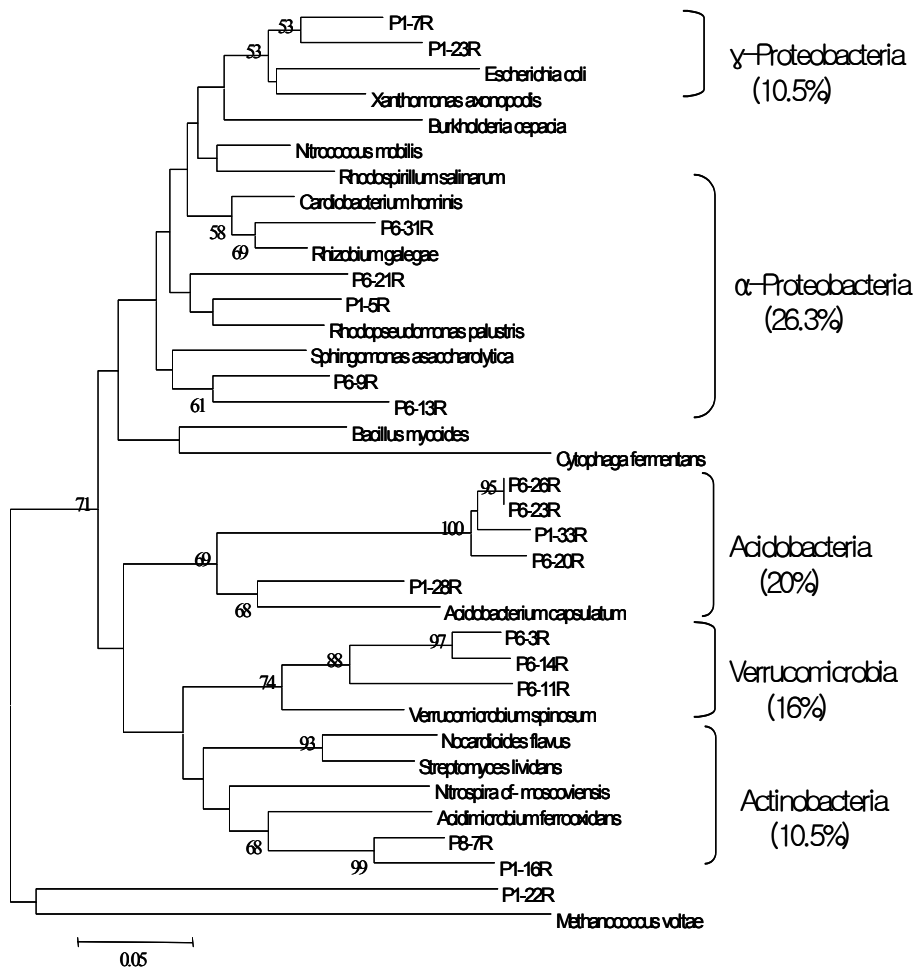


Fig. 4-8. 고추재배지 병 발생지역 토양 DNA의 분자계통도.

3) 서해안 갯벌 (대부도) 시료에서 추출한 토양 DNA의 미생물 다양성 분석

전체 cloning을 한 시료 중에서 insert의 존재가 확인된 clone은 총 52개의 clone을 분리하였고 상기의 방법대로 부분 염기서열 분석을 통해 분자계통도를 작성하였다.

α-Proteobacteria군에 속하는 미생물이 30.0%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, Cyanobacteria에 속하는 미생물이 27.3%, Sphingobacteria가 13.7%, β-Proteobacteria에 속하는 미생물이 9.1%를 차지하여 다양한 문(phylum)에 걸쳐 많은 미생물이 존재함을 보였다.

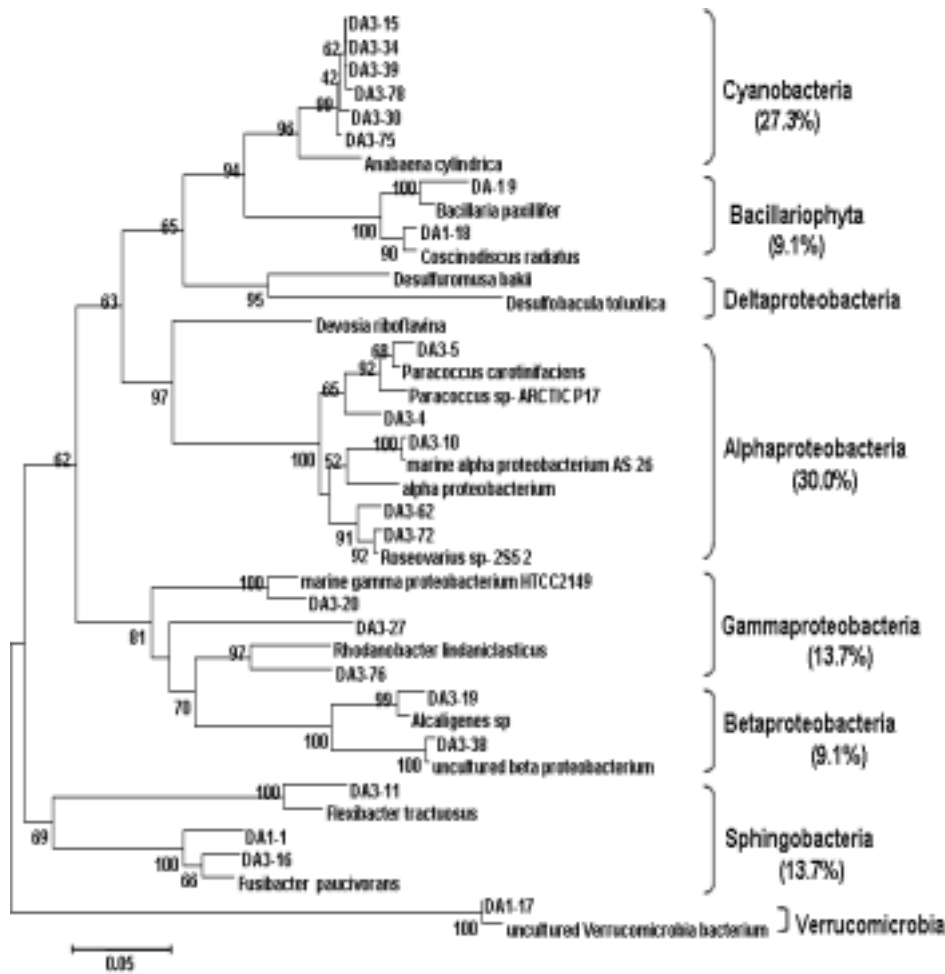


Fig. 4-9. 대부도에서 분리한 토양 DNA의 분자계통도.

4) 포항연안지에서 추출한 토양DNA의 미생물 다양성 분석

포항연안지 (호미곶, 대도항, 간절곶)에서 수집한 각각의 시료에서 0.5g의 토양으로 metagenome을 추출, 클로닝을 하였고 그중 60개의 clone을 분리하여 토양 DNA의 분자계통도를 작성하였다. *Proteobacteria*군에 속하는 토양 DNA 가 절대다수를 차지하였으며 특히 γ -*Proteobacteria* 에 속하는 세균 DNA가 53.0%를 보였다.

그 다음으로 β -*Proteobacteria* 가 23.5% 로 많은 분포를 차지하였다. 실제 배양 미물의 분포와는 다른 양상을 보임을 알 수 있다.

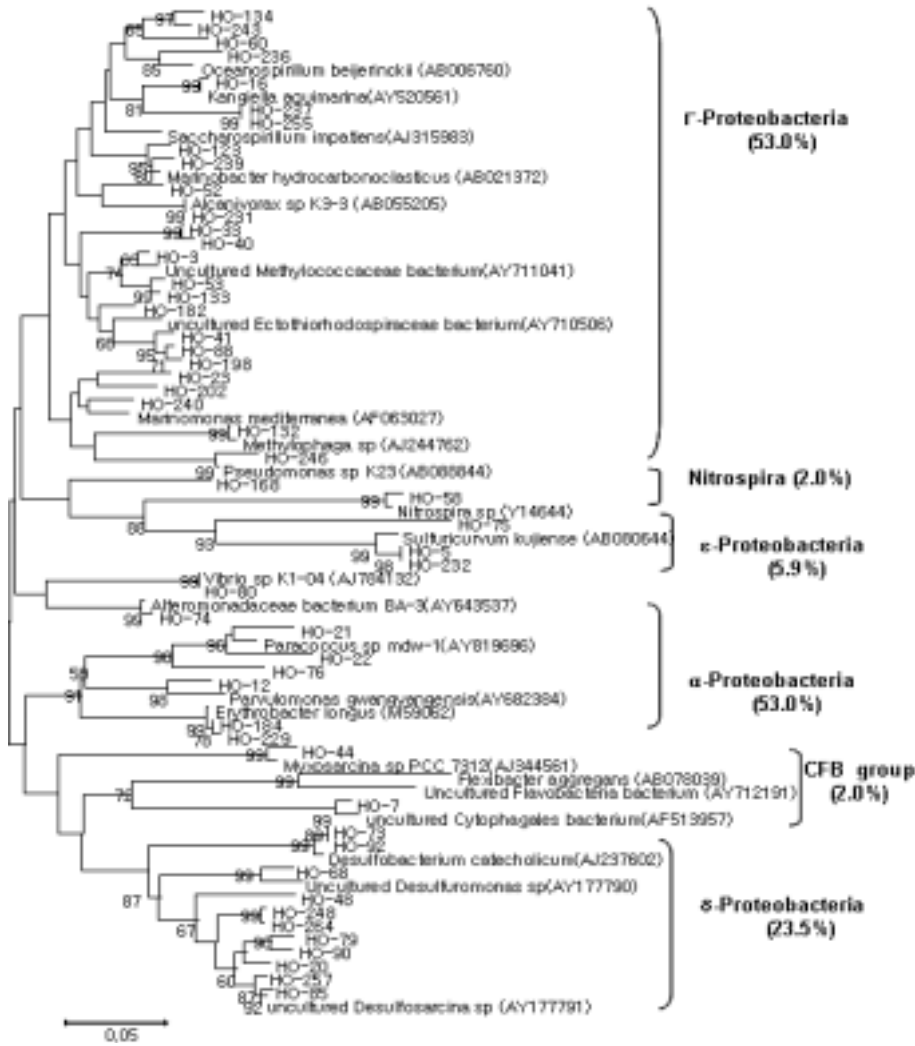


Fig. 4-10. 포항연안지에서 분리한 토양 DNA의 분자계통도.

5) 원주 토양에서 추출한 토양DNA의 미생물 다양성 분석

*Acidobacteria*군에 속하는 미생물이 33.7%를 차지해 가장 많은 분포를 보였고, β -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 17.3 %를 차지해 그다음으로 많은 분포를 보였다. α -*Proteobacteria*에 속하는 미생물이 10.9%, *Verrucomicrobia* 7.3% 등을 차지하여 실제 배양에 의한 방법보다 더 다양한 미생물들이 토양내에 존재함을 확인하였다.



Fig. 4-11. 원주 농경지에서 분리한 토양 DNA의 분자계통도.

3. 선발된 신규 미생물의 다상적 계통분류 연구

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용

미생물자체가 보유한 독특한 생리특성 및 기능성 효소 등은 그 경제적 및 학문적 가치로 인해 선진국을 비롯한 세계 각국에서는 오래전부터 다양한 서식환경으로부터 신규 미생물자원을 확보하고, 그 기능을 밝히기 위한 연구를 수행하고 있다. 자원의 가치가 높은 이러한 신규 미생물은 16S rRNA 염기서열만으로는 완전한 동정이 어렵고, 다양한 미생물 자체의 생리적 특성 및 화학적 특성도 함께 연구되어야 한다.

앞선 연구에서 본 연구진은 다양한 서식지에서 많은 미생물들을 분리하였고, 이들 미생물들을 동정하는 과정에서 분류, 동정이 어려운 미생물이 상당 수 포함되어 있었다는 것을 알게 되었고, 연구 결과 기존에 밝혀지지 않은 새로운 종의 미생물임을 밝혀 낼 수 있었다. 이러한 새로운 종의 미생물은 향후, 국내외적으로 표준균주로 인정받을 수 있을 뿐만 아니라 새로운 기능성 효소나 유전자의 공급원으로서의 가치를 지니고 있어 그 연구가치가 높다고 할 수 있다. 분리된 토양내 저영양 세균의 large subunit rRNA gene(16S rRNA gene)의 partial gene 염기서열 분석결과 기존의 표준균주와 95%이하의 염기서열 유사도를 나타내는 균주를 신종 예상균주로 구분하여 full gene 염기서열 분석을 실시하였다. 이를 통하여 기존 표준균주와 97%이하의 염기서열 유사도를 보인 신종 가능성 균주 43균주를 선발하여 이중 유전자 염기서열 이외의 생리생화학적, 화학적 분석을 통하여 신종 균주를 발굴, 학회에 보고하였다.

2) 연구방법

가) 선발된 균주의 16S rRNA분석

전체 염기서열 분석을 위해 앞서 기술한 여러개의 primer를 통해서 염기서열 분석을 하고 Seqman program(DNASTAR, Lasergene, USA)을 활용하여 full gene을 얻었다. 이것을 NCBI blast search를 통해 기존의 표준균주와 비교분석하여 유사도를 측정하였다.

나) 형태적 특성 조사

위상차 현미경(Carlzeiss, Germany)을 사용하여 세포의 형태 변화 및 운동성을 관찰하였고, 주사전자현미경(TEM, USA)을 활용하여 flagella등 균주의 세부형태를 측정하였다.

다) 생리학적 특성조사

가수분해 시험 및 탄소원 이용성등을 조사하였다. 가수분해는 starch, tween80, casein, aesculin 및 tyrosin등에 대하여 조사하였고, 당이용성 조사를 위한 탄소원으로는 arabinose, fructose, mannose, arbutin, salicin, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, adonitol, glycerol, xylose, galatose, mannitol, ribose 등을 사용하였다. 또한 API kit의 NIT 1,2 solution 이용하여 nitrate test를 하였다.

라) G+C 함량 측정

Chromosomal DNA의 G+C 함량(mol%)를 분석하기 위해서 Tamaoka와 Komagata의 방법을 사용하였다. 분리, 정제된 DNA (농도 500ng/ul) 를 10ul 채취한 다음 10 0°C에서 5분간 열처리하여 변성시킨 후에, DNA에 nuclease P1와 Alkaline phosphatase를 처리하여 nucleotide로 만든 다음 HPLC(Shimatzu, Japan)를 이용하여 270nm 파장에서 흡광도를 측정하여 각각의 A,T,C,G의 농도를 구한다. 이것으로써 G+C함량을 결정하였다. 분리컬럼은 C18(Supercosil, USA)를 사용하였으며, 전개 용매는 0.01M NH₄H₂PO₄ : CH₃CN (25:1, v/v)를 사용하였다.

마) 지방산(fatty acid) 분석

MIDI를 이용하여 균체 지방산 분석연구를 수행하였으며, FAMES의 분석에는 GC 5890(Hewlett Packard series, USA)를 사용하였으며, 분리컬럼은 methyl phenyl silicone fused silica capillary column(HP, USA)를 장착하였다.

바) Quinone분석

동결건조된 cell mass를 petroleum ether로 추출하고, 증발시킨후 hexane용액에 녹여 TLC분석을 통해 정제한다. TLC plate(Merck, Germany)에서 petroleum benzine: ethyl ether (9:1)로 전개하여 254nm에서 isoprenoid quinone band의 위치를 확인하고 acetone으로 추출한 후 여과하여 HPLC(Shimatzu, Japan)로 분석하였다. 컬럼은 C18 (Novopak, USA)을 사용하였고, 전개용매는 MeOH: Isopropanol (1:1)혼합액을 사용하여 270nm에서 흡광도를 측정하였다.

사) Phylogenetics

분리균주의 16S rRNA sequence를 관련한 분류군의 16S rRNA gene과 비교하여 CLUSTAL W software(Thompson et al., 1994)로 정렬하였다. 16S rRNA의 유사도는 염기서열을 비교 분석하여 계산하였으며, 염기서열중 gap부분은 분석에서 제외하였다. 진화적 거리는 Magalign(DNASTAR, Lasergene, USA) 프로그램 내에 Jukes&Cantor (1969)을 사용하였고 분자 계통도는 MEGA3 program을 사용하여 Neighbor-Joining method를 사용하여 구성하였다.

나. 연구결과

현재 미생물 종의 분류는 형태적 특성이나 유전적 특성등의 한가지 특성만이 아닌 종합적 실험결과를 바탕으로 (polyphasic approach) 하고 있으며, 이들 연구에는 많은 시간과 노력을 필요로 하는 것이 사실이다.

앞선 연구에서 분리된 균주를 분석하여 총 43균주의 신종 후보균을 확보하여 (Table 4-13) 1주의 신속과 5종의 신종을 분류하였으며, 국제 미생물분류학회지 (Int.J.Sys.Evol.Micro.)에 4종이 등록완료 되었고, 현재 2종이 투고되어 있는 상태이다 (Table 4-12).

이들 신종 미생물은 16S rRNA 염기서열에서 기존의 미생물과 다를 뿐만 아니라 생화학적 특성분석, 세포벽 성분등의 화학적 분석에서도 기존에 알려진 미생물과는 매우 상이해서 새로운 미생물로 제안할 만한 충분한 근거를 가지고 있다.

따라서 이들 신종 미생물의 보고는 국내 미생물자원의 농업적 활용에도 매우 큰 유용성을 가지고 있고, 향후 국내 농업 연구자들에게 분양, 활용될 수 있는 좋은 연구 소재가 될 것이다.

Table 4-12. 신속 및 신종 분류 연구 논문 게재 현황

번호	논문제목	IJSEM 논문번호	게재 상태
1	<i>Pseudomonas pohangensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64274	In press
2	<i>Idiomarina homiensis</i> sp. nov., isolated from seashore sand in Korea	IJSEM paper no. 64283	In press
3	<i>Loktanella koreensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64276	In press
4	<i>Exiguobacterium homiense</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64275	submitted
5	<i>Marinobacter koreensis</i> sp. nov., isolated from sea sand in Korea	IJSEM paper 64231	submitted
6	<i>Arenimonas donghaensis</i> gen. nov. sp. nov., isolated from seashore sand	IJSEM paper 64457	Accepted

Table 4-13. 신속 및 신종 예상 균주의 염기서열 상동성 비교

번호	isolate	Result of Blast in NCBI	isolate/matched strain (homology, %)
1	DA4-33	Sinorhizobium	1369/1401 (97%)
		Rhizobium daejeonense	1365/1401 (97%)
2	DA5-25	Agrobacterium vitis	1371/1404 (97%)
3	DA5-29	Arsenic resistant soil bacterium 7-03	1329/1338 (99%)
		Fratureia sp. WJ64	1377/1404 (98%)
4	DA5-32	Rhodobacter sp. TCRI 3	1335/1393 (95%)
		R. capsulatus	1325/1386 (95%)
5	DA5-32-1	Nocardioides sp. V4.BE.17	1426/1434 (99%)
		Nocardioides oleivorans	1437/1457 (98%)
6	DA5-49	Dyella koreensis	1431/1465 (97%)
7	DA5-51	Rodobacter capsulatus	1325/1386 (95%)
8	DA5-53	Sphingomonas sp. 2MPII	1397/1403 (99%)
		Alpha proteobacterium MBIC1549	1366/1405 (97%)
		Sphingopyxis composta	1327/1403 (94%)
9	DAT5-4	Rhodobacter sp. TCRI 3	1339/1397 (95%)
		R. capsulatus	1325/1386 (95%)
10	DAT5-14	Arctic sea ice bacterium ARK10016	1370/1398 (97%)
		Sphingomonas baekryungensis	1334/1412 (94%)
11	DAT5-15	Arsenic resistant soil bacterium 7-03	1329/1338 (99%)
		Fratureia aurantia	1417/1460 (97%)
12	DD-M2	Idiomarina sp. NT N116 gene	1393/1460 (95%)
		Idiomarina seosinensis	978/1015 (96%)
13	DD-M3	Marinobacter sp.	1422/1463 (97%)
		Marinobacter aquaeolei	1415/1464 (96%)
14	DD-R8	Phyllobacteriaceae bacterium NL21	1375/1414 (97%)
		Rhizobium loti	1366/1421 (96%)
15	DD-R8-1	Bacillus sp. HZ02	1450/1451 (99%)
		Bacillus aquamarinus	1434/1478 (97%)
16	DD-R11	Paracoccus sp. 88/2-4	1386/1395 (99%)
		Paracoccus zeaxanthinifaciens strain	1364/1390 (98%)
17	GA1-R4	Lysobacter concretionis	1426/1465 (97%)
		Lysobacter gummosus	1376/1417 (97%)
18	GA1-R11	Gram-positive bacterium str. 13-2 gene	1425/1444 (98%)
		Microbacterium lacticum (DSM20427)	1428/1457 (98%)

19	GA1-R12	Gram-positive bacterium str. 13-2	1425/1444 (98%)
		<i>Microbacterium lacticum</i> (DSM20427)	1428/1457 (98%)
20	GA2-M3	marine alpha proteobacterium AS-26	1341/1392 (96%)
		<i>Loktanella rosea</i>	1328/1380 (96%)
21	GA2-M9	<i>Rhodobacter</i> sp.	1329/1389 (95%)
		<i>Rhodobacter azotoformans</i> (strain SA16)	1322/1386 (95%)
22	GA2-M	<i>Octadecabacter orientus</i>	1378/1400 (98%)
		<i>Thalassobacter oligotrophus</i>	1342/1406 (95%)
23	GA2-M21	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9	1333/1393 (95%)
		<i>Rhodobacter azotoformans</i> (strain SA16)	1322/1386 (95%)
24	GA2-M22	Flavobacteriaceae bacterium	1412/1419 (99%)
		<i>Eastseaea dokdonensis</i>	1378/1455 (94%)
25	GA2-M24	<i>Loktanella hongkongensis</i> strain	1352/1362 (99%)
26	GA2-R13	<i>Microbacterium oleovorans</i>	1431/1462 (97%)
		<i>Microbacterium testaceum</i>	1426/1457 (97%)
27	GA2-R15	<i>Loktanella hongkongensis</i> strain	1336/1348 (99%)
28	H1-M6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> AB111112	1469/1473 (99%)
29	H1-M8	<i>Jannaschia helgolandensis</i>	1318/1344 (98%)
		<i>Jannaschia rubra</i>	1357/1399 (96%)
30	H1-M12	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9	1333/1387 (96%)
		<i>Rhodobacter azotoformans</i> (strain SA16)	1328/1386 (95%)
31	H1-R8	Bacterium str. 61610	1479/1482 (99%)
		<i>Exiguobacterium</i> sp. JL-36	1460/1482 (98%)
32	H1-R9	<i>Rhodobacter</i> sp. 2002-65602	1345/1402 (95%)
		<i>R. blastica</i>	1327/1389 (95%)
33	H2-R1	<i>Rhodobacter</i> sp. 2002-65602	1352/1406 (96%)
		<i>Rhodobacter massiliensis</i>	1343/1406 (95%)
34	H2-R8	Xanthomonas-like sp. V4.BO.41	1233/1269 (97%),
		<i>Lysobacter gummosus</i> gene	1226/1269 (96%)
35	H2-R14	Sphingomonadaceae bacterium KMM 6042	1352/1391 (97%)
		<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC1965	1339/1407 (95%)
36	H3-R3	Phyllobacteriaceae bacterium NL21	1374/1413 (97%)
		<i>Mesorhizobium</i> sp. TUT1018	1372/1413 (97%)
37	H3-R13	Sphingomonadaceae bacterium KMM 6042	1371/1391 (98%)
		<i>Novosphingobium subarcticum</i>	1352/1416 (95%)

38	H3-R18	Pseudomonas sp. R-20946	1410/1456 (96%)
		Pseudomonas anguilliseptica strain BI	1405/1456 (96%)
39	WJ1-1	Burkholderia sp. AC1100	1429/1454 (98%)
		Burkholderia fungorum	1421/1454 (97%),
40	WJ1-63	Arthrobacter sp. Ellin106	1424/1441 (98%)
		Arthrobacter nitroguaiacolicus	1423/1452 (98%)
41	WJ2-6	Pseudomonas sp. HF3/S21027	1459/1461 (99%)
		Pseudomonas lini	1452/1461 (99%)
42	WJ2-9	Actinobacterium EC5	1452/1452 (100%)
		A.uratoxydans	1403/1464 (95%)
43	WJ3-21	Gram-positive bacterium str. 12-8	1425/1447 (98%)
		Frigoribacter sp. 801	1400/1463 (95%)

1) *Pseudomonas pohangensis* sp. nov., isolated from seasand in Korea

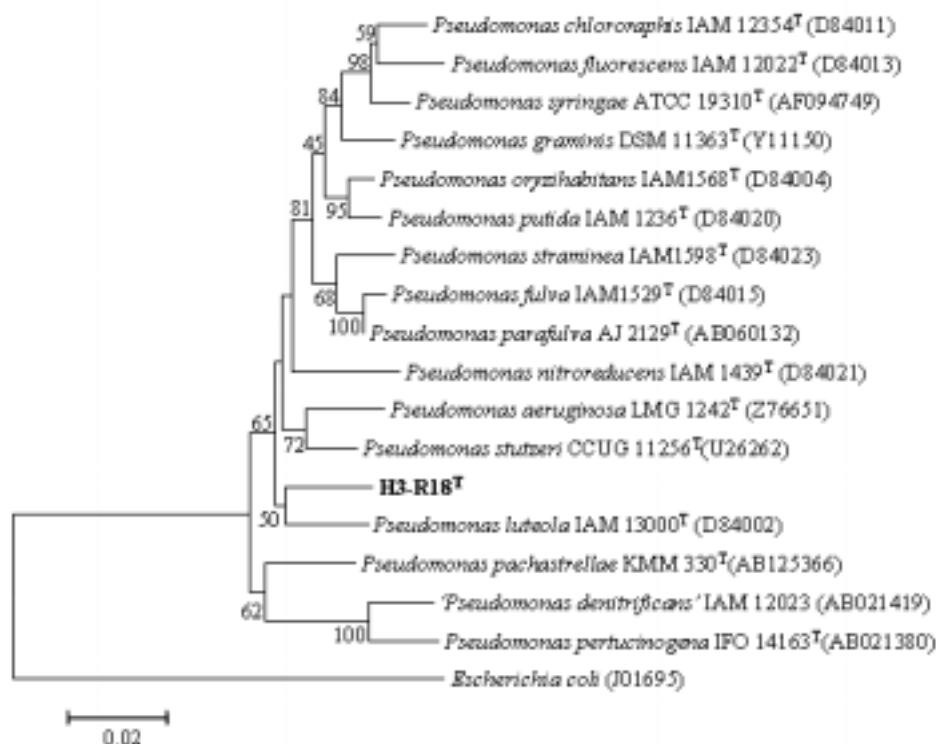


Fig. 4-14. Phylogenetic tree constructed from a comparative analysis of 16S rRNA gene sequences showing the relationships of *Pseudomonas pohangensis* sp. nov. strain H3-R18^T with some members of the genus *Pseudomonas*. *Escherichia coli* was used as the outgroup Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are shown at the branch points. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

Description of *Pseudomonas pohangensis* sp. nov.

Pseudomonas pohangensis (po.hang.en'sis. N.L. adj. *pohangensis* referring to Pohang city in Korea, where the bacteria were first found).

Cells are Gram-negative, non-motile, non-spore-forming rods approximately 0.6-0.8 x 1.5-3.0 μm in size. Colonies are irregular and creamy in color after 48 h on MA. Cells are non-fluorescent on King A and B. Catalase- and oxidase-positive. The strain can grow at temperatures between 4 and 35 ℃, at

pH values in the range 5 - 9 and can tolerate NaCl at concentrations of up to 3.0 %.

It does not hydrolyze alginic acid, casein, chitin, CM-cellulose, DNA, gelatin, starch, tyrosine and urea. The major fatty acids are summed feature 3 and C16:0, followed by C12:0, C12:0 3-OH, C 18:1 *n*-7c and C 14:0. The major isoprenoid quinone is Q-9. The DNA G+C content is 67.2 mol%. The type strain, H3-R18T (=KACC 11517T), was isolated from sea sand collected from Homi cape of Pohang city, Korea.



Supplementary figure. Transmission electron microscopy of strain H3-R18^T

2) *Idiomarina homiensis* sp. nov., isolated from seashore sand in Korea

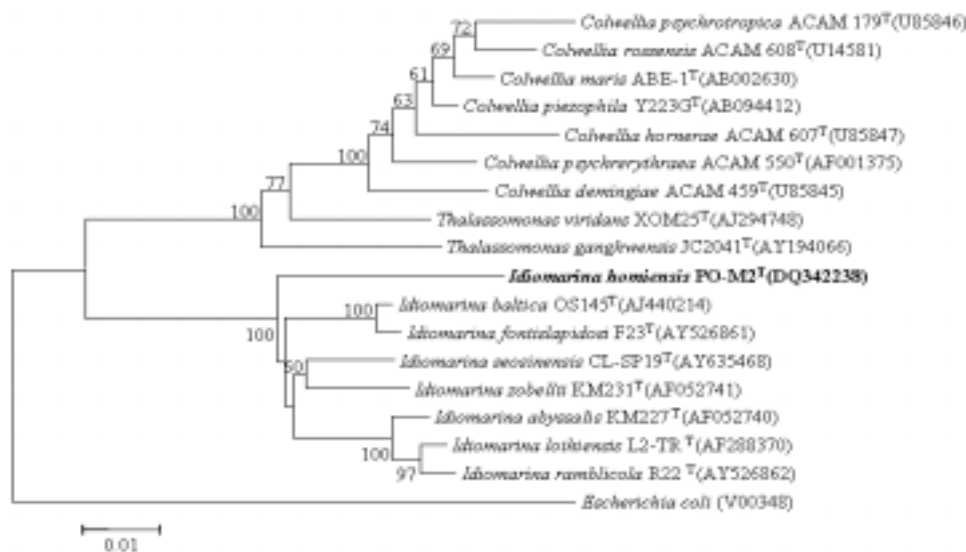


Fig. 4–15. Neighbor-joining tree showing the position of strain PO-M2^T and some other related taxa on the basis of 16S rRNA gene sequences. Numbers on the branches indicate the bootstrap confidence values (%) of 1000 resamplings; only those greater than 60% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Description of *Idiomarina homiensis* sp.nov.

Idiomarina homiensis (ho.mi.en'sis. N.L. fem. adj. *homiensis* referring to the Homi cape in Korea, where the type strain was isolated).

Cells are Gram-negative, aerobic and straight or slightly curved rods that are approximately 0.40.6 μm in width and 0.72.0μm in length. Motile by means of a single polar flagellum. On MA solid medium, colonies are light yellowish, round, convex. They grow within the temperature range 4–25 °C (optimum of 25–30 °C) and at pH values between 6 and 9. Growth occurs in NaCl concentrations of 1–15 % (w/v) (optimum of 3–5 %). It does not grow anaerobically.

Positive for oxidase, catalase, KOH test, production of H₂S from cysteine, and hydrolysis of tyrosine, DNA, gelatin and Tween 80. However, negative for indole production, VP test, phenylalanine deamination, and hydrolysis of casein, starch, chitin, leithin, cellulose, pectin and urea. It does not degrade alginate. In API

20NE tests, cells are positive for nitrate reductase activity and hydrolysis of aesculin, but negative for other reactions. In API ZYM tests, cells are positive for acid and alkaline phosphatase, esterase (C4 and C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin,

In Biolog tests, any reactions are not observed. The DNA G+C content is 45.1mol%. Ubiquinone-8 is the main respiratory lipoquinone. Major fattyacids are C₁₅ : 0 iso (19.3 %), C₁₇ : 1 w9c iso (11.9 %), C₁₇ : 0 iso (10.9 %), C₁₈ : 1 w7c (10.4 %), C₁₆ : 0 (9.0 %) and C₁₆ : 1 w7c and/or C₁₅ : 0 iso 2-OH (7.2 %) when grown on MA for 48hr.

The type strain is PO-M2^T (=KACC 11514^T), isolated from seasand in Pohang, Korea.

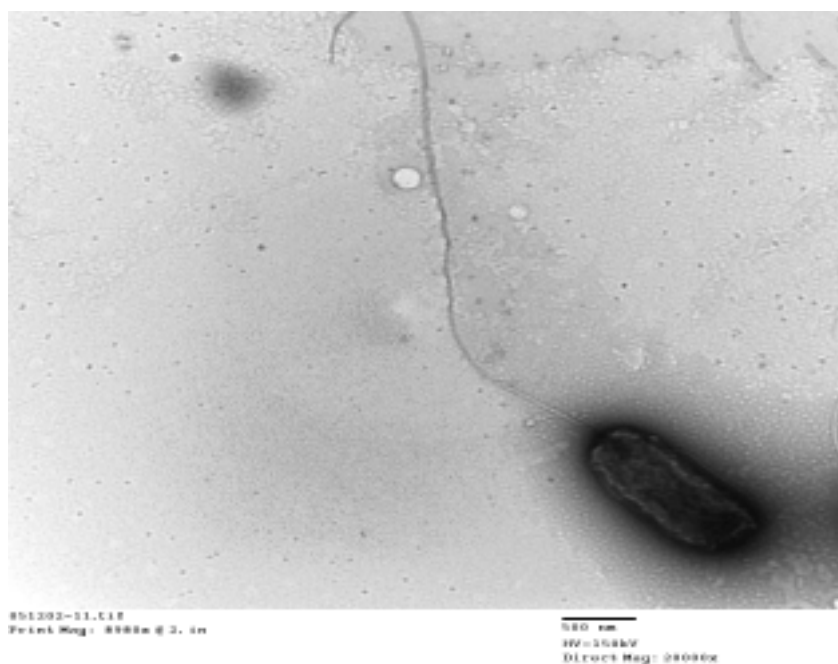


Fig. 4-16. Transmission of electron microscopy of strain PO-M2.

3) *Loktanella koreensis* sp. nov., isolated from seasand in Korea

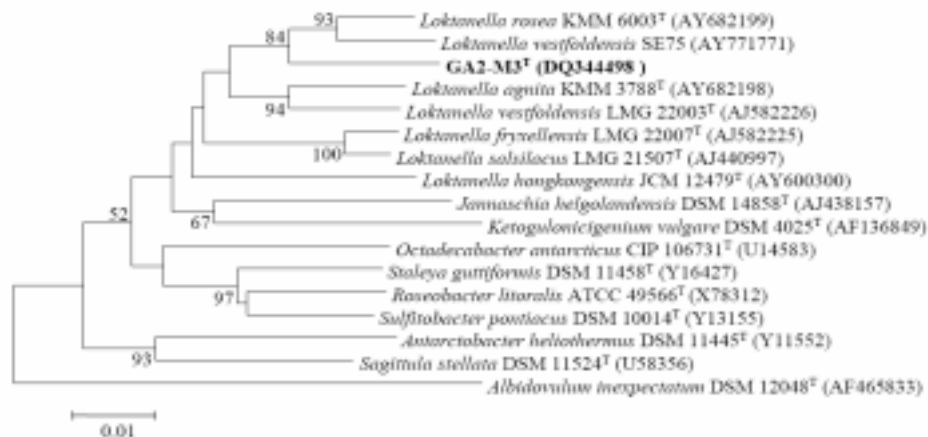


Fig. 4-17. Neighbor-joining dendrogram showing the phylogenetic position of GA2-M3^T on the basis of 16S rRNA gene sequences. The sequence length used in this tree was corresponding to 50-1,502nt of the *Escherichia coil* 16S rRNA gene sequence (Brosius et al., 1978). *Albidovulum inexpectatum* was used as an outgroup and bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are shown at the branch points. Bar, 0.01 substitutions per site.

Description of *Loktanella koreensis* sp. nov.

Loktanella koreensis (ko.re.en'sis. N.L. fem. adj. koreensis pertaining to Korea, from where the organism was isolated).

Cells are Gram-negative, immotile, non-spore-forming and short rod- to ovoid-shaped (0.5-0.8 x 0.8- 1.5µm). Colonies are round, convex with clear margin and light beige in color after 2 days on marine agar plates. The strain is able to grow between 5 and 30 °C and at pH 6.0-9.0. Tolerates up to 5 % NaCl. Positive reactions for catalase, oxidase, nitrate reduction and hydrogen sulfide production, but negative reaction for arginine dihydrolase, glucose fermentation, indole production and Voges-Proskauer reaction.

The strain does not grow on nutrient agar, trypticase soy agar and MacConkey agar. Hydrolyses aesculin, weakly hydrolyses gelatin (prolonged incubation of above 10 days) but does not hydrolyse agar, alginic acid, casein, chitin,

CM-cellulose, DNA, pectin, starch, tween 80, tyrosine and urea. With the API 20NE and API 50CH strips, no growth is observed on carbohydrates and acids are not produced from substrates.

Using API ZYM strip, alkaline phosphatase (weak), esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase (weak), cystine arylamidase (weak), α -chymotrypsin (weak), Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (weak), β -galactosidase (weak) and β -glucosidase are detected, but lipase (C14), trypsin, acid phosphatase, α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase and α -fucosidase are not detected. The main cellular fatty acid is 18:1 n7c (approx. 67%). Ubiquinone Q-10 is the major isoprenoid quinone. The G+C content is 60.0 mol%.

The type strain, GA2-M3^T (=KACC 11519^T), was isolated from a seasand taken from Homi cape of Pohang city, Republic of Korea.

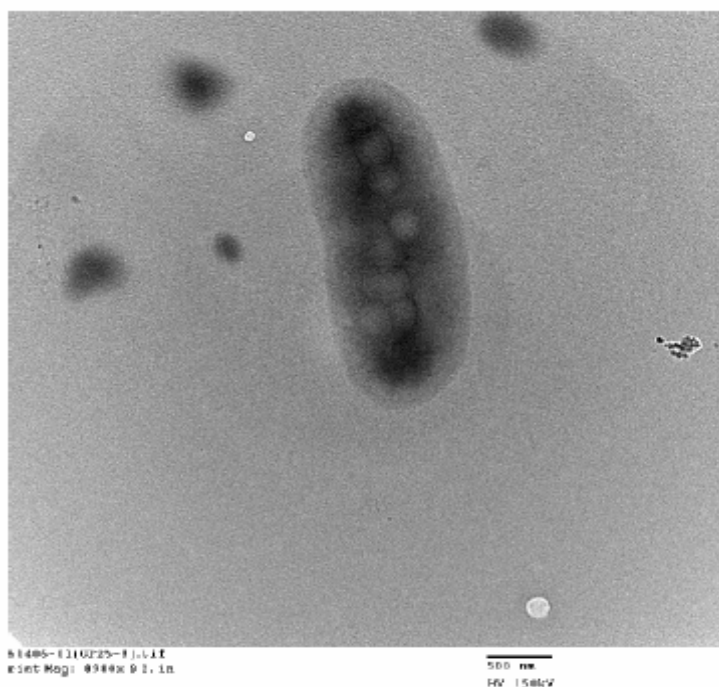


Fig. 4-18. Transmission of electron microscopy of strain GA2-M3^T.

4) *Exiguobacterium homiense* sp. nov., isolated from seasand in Korea

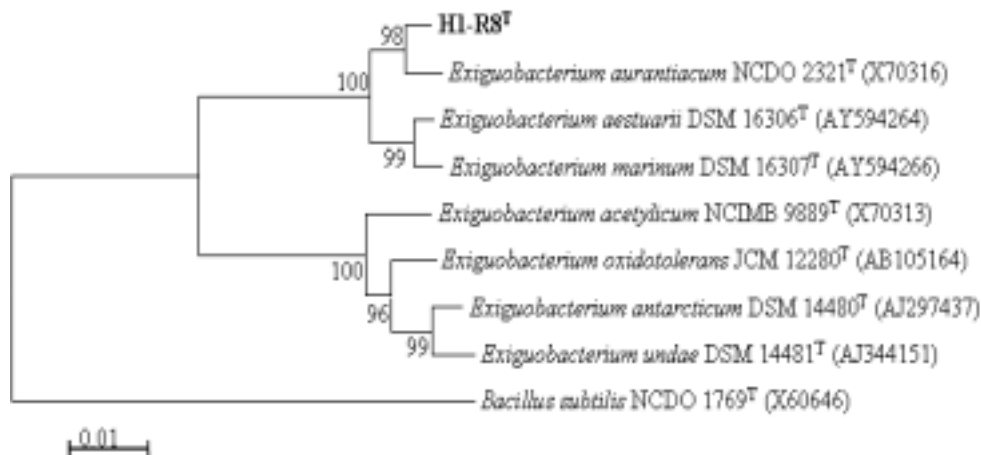


Fig. 4-19. Neighbor-joining dendrogram of the 16S rDNA relatedness, showing the position of H1-R8^T within the genus *Exiguobacterium*. The tree was rooted with *Bacillus subtilis* as an outgroup. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 sequence positions.

Description of *Exiguobacterium homiense* sp. nov.

Exiguobacterium homiense (ho.mi.en'se. N.L. neut. adj. *homiense* referring to Cape Homi, from where the type strain was recovered).

Cells are Gram-positive, rod shaped (0.8-1.0 x 1.5-2.5 μm). Colonies on marine agar appear orange, circular, convex with an entire margin. Growth occurs under aerobic and anaerobic conditions on marine agar. Good growth occurs on R2A agar, TSA, nutrient agar and MacConkey agar. Temperature range for growth is between 5-50°C, pH range between 5 and 9. Growth can occur in the presence of 10% NaCl, but not at 15% NaCl. Aesculin, casein, DNA, gelatin, Tween 80 and starch are hydrolyzed, but xanthine, alginate, chitin, CM-cellulose, pectin, tyrosine and urea are not degraded. Positive reaction for catalase, nitrate reduction and α-galactosidase (API 20NE). Negative reaction for oxidase, indole production, glucose fermentation and arginine dihydrolase (API 20NE). The predominant fatty acids are anteiso-C₁₃ : 0 (22.0%) and iso-C₁₇ : 0 (17.9%). The DNA G+C content of strain H1-R8^T is 52.2. The type strain, H1-R8^T (=KACC ^T=DSM ^T), was isolated from a seasand of Homi cape of Pohang city in Korea.

5) *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea



Fig. 4-20. Neighbor-joining tree, based on 16S rRNA gene sequences of *Marinobacter* species, showing the relationship between *Marinobacter koreensis* sp. nov. DD-M3^T and members of the genus *Marinobacter* species. *Oceanospirillum linum* was used as an outgroup and bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are shown at the branch points. Bar, 0.01 substitutions per site.

Description of *Marinobacter koreensis* sp. nov.

Marinobacter koreensis (ko.re.en'sis. N.L. fem. adj. koreensis pertaining to Korea, in which the strain was isolated).

Cells are Gram-negative, aerobic, motile by a single polar flagellum, moderately halophilic, straight rod-shaped (0.3-0.5 x 1.5-3.0 μ m), and do not form spores. Colonies on marine agar are creamy in color, circular (1-2 mm), convex with entire edges after 48 h at 28 °C. Growth range are at 10-45°C, with 1-10% NaCl and at pH 5-9. Tween 80 is hydrolyzed, but alginic acid, casein, chitin, CM-cellulose, DNA, gelatin, pectin, tyrosine, starch and urea are not. Tween 40, tween 80, pyruvic acid methyl ester, acetic acid, β -hydroxybutyric acid, α -keto glutaric acid, α -keto valeric acid, DL-lactic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-glutamic acid and L-proline are utilized and glycogen, succinic acid mono-methyl-ester and L-leucine are used weakly (BIOLOG GN2 microplate).

Positive for nitrate reduction, but negative for indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, urease, aesculin hydrolysis, gelatin hydrolysis and β -galactosidase. Assimilates malic acid and phenylacetic acid, but does not assimilate D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, D-maltose, potassium gluconate, capric acid, adipic acid and trisodium citrate (API 20NE strip). Enzymatic activity is observed for alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and N-acetyl- β -glucosaminidase, and no enzymatic activity is observed for lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, Trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase and α -fucosidase (API ZYM).

The predominant isoprenoid quinone is ubiquinone Q-9. The main fatty acids were 16:0, summed feature 3 and 18:1 ω 9c. The DNA G+C content is 54.1 mol% (determined by HPLC).

The type strain, DD-M3^T (=KACC 11513^T), was isolated from an sea sand in Homo cape of Pohang city, Korea.

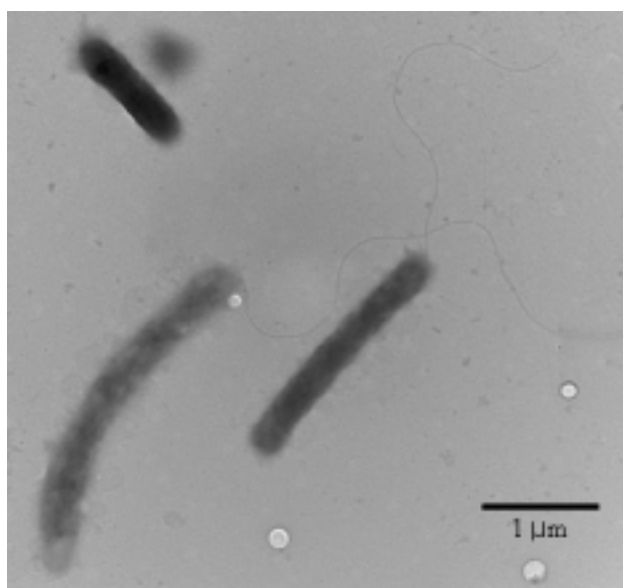


Fig. 4-21. Transmission of electron microscopy of strain DD-M3^T.

6) *Arenimonas donghaensis* gen. nov. sp. nov., isolated from seashore sand

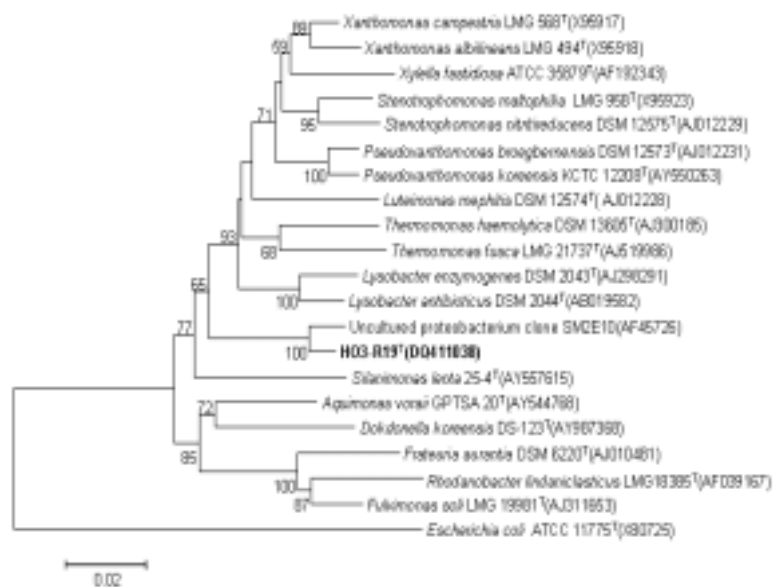


Fig. 4–22. Phylogenetic relationships between strain HO3–R19^T and related taxa on the basis of 16S rRNA gene sequences. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor–joining method (Saito & Nei, 1987), and the 16S rRNA gene sequence of *Escherichia coli* ATCC 11775^T was used as the outgroup. The numbers at the nodes indicate the levels of the bootstrap support based on a Neighbor–joining analysis of 1,000 resampled data sets. The bootstrap values below 50% were not indicated. Bar, 0.02 substitution per site.

Description of *Arenimonas* gen.nov.

Arenimonas (A.re.ni'.mo.nas. L. fem. n. *arena* sand; L. fem. n. *monas* a unit, monad; N.L. fem. n. *Arenimonas* a sand monad, referring to a bacterium isolated from sand).

Cells are aerobic, Gram-negative, non-spore-forming rods. Oxidase- and catalase-positive. Nitrate and Nitrite are not reduced. Major isoprenoid quinone is Q-8. Predominant cellular fatty acids are iso-branched fatty acids such as C₁₅: 0 iso, C₁₆: 0 iso, C_{17:1} iso and C_{14:0} iso.

Phylogenetically, the genus belongs to the family '*Xanthomonadaceae*' within the class '*Gammaproteobacteria*'. The type species is *Arenimonas donghaensis*.

Description of *Arenimonas donghaensis* sp. nov.

Arenimonas donghaensis (dong.ha.en'sis. N. L. fem. adj. donghaensis, pertaining to Donghae, the Korean name of the East Sea in Korea where the organism was isolated).

Cells are Gram-negative, aerobic and straight or slightly curved rods that are 0.40.6 μ m wide and 1.33.0 μ m long. Colonies are light yellowish white, translucent and convex on R2A medium. Motile by means of a single polar flagellum. The pH range for growth is 7.09.0, with an optimum at pH 8.0. The temperature range for growth is 437°C, with an optimum at 28°C. Growth occurs in NaCl concentrations of 03 % (w/v) (optimum of 1-2%). Does not grow on anaerobic medium. Positive for oxidase, catalase, and hydrolysis of casein, tyrosine, DNA and gelatin. However, negative for indole production, VP test, phenylalanine deamination, and hydrolysis of starch, urea and cellulose. Nitrate and nitrite are not reduced. In API 20NE tests, cells are positive for hydrolysis of gelatin, but negative for other reactions. In API ZYM tests, cells are positive for alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), trypsin, α -chymotrypsin, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, but negative for lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, *N*-acetyl--glucosaminidase, α -mannosidase and α -fucosidase.

Major isoprenoid quinone is Ubiquinone8 (Q-8). Predominant polar lipids are diphosphatidylglycero(DPG), phosphatidylglycerol(PG), phos-phatidyl-ethanolamine (PE), a small amount of an unknown phospholipids and an unknown amino-phospholipid. Major fatty acids are C₁₆: 0 iso (31.0 %), C₁₅: 0 iso (26.9 %),

C_{17:1} iso w9c (14.7 %), C_{14:0} (6.4 %) and C_{11:0} iso 3-OH (5.5 %) when grown on R2A for 3 days. DNA G+C content is 65.0 mol% (HPLC).

The type strain is HO3-R19^T (=KACC 11381^T= DSM), isolated from seasand in Pohang, Korea.



Fig. 4-23. Transmission of electron microscopy of strain HO3-R19^T.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표 달성도

구 분	연구목표의 달성도	
	연구 목표	달성도(%)
1차년도 (2003- 2004)	○ 국내 농경지 오염토양 및 염류 집적지 토양시료 채취	100
	○ eDNA 대상 균체집적 및 DNA 분리법 확립	100
	○ eDNA library 구축기술 확립	100
	○ Biotic 스트레스 유전자 선발	100
	○ 저영양배지 (PYGV 등)를 이용한 배양 가능한 세균의 분리 최대화	100
	○ 분리된 세균의 16S rRNA를 이용한 분류	100
	○ 특성에 따른 배양 가능한 세균의 분포해석	100
	○ 세균의 다양성확보에 의한 미생물 자원의 보전	100
	○ 항균성 효소 유전자 분리 및 분자구조 비교분석	100
	○ 선발된 eDNA clone의 유전자활성 영역탐색	100
2차년도 (2004- 2005)	○ 96well plate 이용한 high throughput screening system 확립	100
	○ A biotic 스트레스 관련 유전자 선발	100
	○ 선발 eDNA clone의 유전자 활성 영역 탐색	100
	○ eDNA clone의 유전자 활성영역 탐색 (Tn mutant 선발 및 유전자 확인)	100
	○ 16S rRNA를 이용한 토양세균의 다양성 분석	100
	○ 16S rRNA에 의한 계통학적인 위치분석	100
	○ 분자생물학적인 방법으로 토양 우점종의 분석	100
	○ 배양 가능한 세균과의 비교분석	100
3차년도 (2005- 2006)	○ 발현산물에 대한 기능성 역가 검정	100
	○ 발현증진을 위한 host system 개발	100
	○ 발현에 따른 기능성 효율증진 여부 조사	90
	○ 특이기능을 가진 토양 DNA clone의 16S rRNA를 이용한 계통 발생학적 위치 규명	100
	○ 16S rRNA이외의 gene을 이용한 계통발생학적 위치 해석	100
	○ 선발된 clone의 분류학적 위치 해석	100
	○ Biotic & abiotic유전자의 분자구조 해석 동정	100
	○ 유전자 활성영역의 재조합체 구축 및 발현양상 분석	100

제2절 관련분야 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

○ 2010년 생명공학산업의 세계시장규모가 약 2,000억\$로 추정되며 그중 상당 부분이 미생물 관련 제품 일 것으로 예상됨.

○ 미생물 분야는 선진국과의 기술 격차가 크지 않고, 그 자원이 우리 나라 고유의 것으로 외국의 원천 기술 특허를 피하고 세계적인 경쟁에서 충분히 살아 남을 수 있는 가능성이 있음.

○ 현재 세계시장에서 미생물 제품으로 citric acid (40만톤 14억불), MSG (100만톤 13억불), 라이신 (60 만톤 9 억불) 등이 생산되고 있으며, 290억불의 항생제 시장에서 cephalosporins 계만 약 93억불의 시장을 형성하고 있음. 유전자 재조합 미생물 발현 시스템을 이용한 대표적인 제품으로 EPO (29억불), 인간 성장호르몬 (11억불), 인터페론 (10억불) 등이 있음. 이외에 전세계 효소 시장은 연간 약 1조 6천억원 규모이며 이중 상당수가 미생물로부터 유래된 것임. 국내의 효소 시장의 경우 대부분 외국의 기업에 지배되고 있으며 세제용 프로테아제의 경우 국내 시장만 100억원을 상회하는 실정임.

2. 경제 · 산업적 측면

○ 현재 국내의 미생물 산업은 외국에서 개발된 종균을 수입해 이를 개량하는 수준으로 원천 기술과 특허가 부족하여 고부가가치 제품의 세계 시장 점유가 어려운 상황임. 이를 타개하기 위해 신규 미생물과 미배양 미생물에서 유래한 신기능 효소, 항생제, 면역증강제, 항암제, 생리활성물질, 향장소재 등을 발굴한다면, 국내 미생물 산업을 선진국 수준으로 끌어올릴 수 있음.

○ 또한, 중국 등의 후발주자에게 크게 위협받고 있는 미생물 발효 시장에서 유전체 연구를 이용한 고효율 생산균주 및 공정의 개발로 세계 시장을 석권할 수 있는 기틀을 마련할 수 있음.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 논문 게재 실적

번호	학술지명	논문제목	IJSEM 논문번호	발행년도 권호	SCI
1	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Pseudomonas pohangensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64274	In press (2006)	0
2	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Idiomarina homiensis</i> sp. nov., isolated from seashore sand in Korea	IJSEM paper no. 64283	In press (2006)	0
3	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Loktanella koreensis</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64276	In press (2006)	0
4	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Exiguobacterium homiense</i> sp. nov., isolated from seasand in Korea	IJSEM paper no. 64275	submitte d (2006)	0
5	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Marinobacter koreensis</i> sp. nov., isolated from sea sand in Korea	IJSEM paper no. 64231	In press (2006)	0
6	Int.J. Sys. Evol.Micro	<i>Arenimonas donghaensis</i> gen. nov. sp. nov., isolated from seashore sand	IJSEM paper no. 64457	Accepted (2006)	0
7	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem	Screening and isolation of a gene encoding 4-hydroxyphebylpyruvate dioxygenase from a metagenomic library of soil DNA		48(4), 345-351 (2005)	
8	FEMS Microbiolog y letter	Characterization and isolation of a novel chitinase gene from metagenomic libraries		게 제 예 정	0
9	J.Appl. Microbiol	Purification and Characterization of novel chitinases derived from metagenome clones		게 제 예 정	

2. 학회발표 실적

가. 한국미생물생명공학회포스터발표

1) 2004. Screening of chitinase and other enzymes from uncultured soil microorganisms.

Kim, Soo-Jin, Yun-Soo Yeo, In-Cheol Park, Hee-Jung Cho, Sang-Hong Yun, Bon-Sung Koo*

2) 2005. Bacterial diversity compared by cultivation and 16S rDNA gene cloning method in rice field soil contaminated oil.

Byung-Yong KIM*, Youn-Kyung BAEK, Jung-Min BONG, Soon-Wo KWON and Seung-Joo GO

2) 2005. Isolation and characterization of genes related to chitinase from metagenome.

Seung-Hwan Kim, Dae-Sung Lee, Bon-Sung Koo, Soo-Jin Kim, Yun-Su Y대, hee-Wan Kang*.

나. 한국미생물학회 국제 학술대회 포스터발표

: 2004. Comparison of rhizosphere community structures associated with healthy and Phytophthora-infected hot peppers using FAME and 16S rDNA analysis.

Kim Byung-Yong, Yeom Hye-Jin, Lee Seon-Young, Song Jaekyeong, Kwon Soon-Wo, Cho Hyun-Suk and Cho Yang-Hee

다. 미국미생물학회 국제 학술대회 포스터발표

: 2005. Construction and screening of metagenomic library for genes of novel enzymes.

Kim, Soo-Jin, Yun-Soo Yeo, In-Cheol Park, Hee-Jung Cho, Sang-Hong Yoon, Bon-Sung Koo*

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

지난 수년 동안 유익하거나 혹은 해로운 배양 가능한 미생물 연구에 분자생물학적인 기법이 사용됨으로 가치 있는 정보를 얻을 수 있다. 그러나 배양할 수 있는 미생물은 극히 일부분에 지나지 않아 DNA나 RNA에 기초한 기술을 이용하여 배양이 불가능한 미생물의 유전자를 선별할 수 있는 기술을 개발 하였다. 미생물 군락에서 일어나는 일들을 연구하기 위해 배양가능하거나 배양이 불가능한 미생물들을 이용하여 분자생물학적인 방법을 이용하였다. 배양 가능한 미생물의 경우 다양한 유전자 추출 방법을 이용하여 배양한 미생물을 파괴시켜 DNA를 빠르고 간편하게 얻을 수 있고 추출한 DNA나 RNA를 이용하여 샘플에 존재하는 미생물 분포 뿐 만 아니라 활발하게 일어나는 유전자 전환도 분석할 수 있게 되었다. 유전자 증폭기술도 DNA량을 소량으로 사용하여 확립하였고 증폭된 유전자 산물로부터 유전자 단편을 클론 할 수 있으며 유전자 염기서열분석을 이용하여 데이터베이스와 비교함으로써 유전자가 재조합된 클론을 개발할 수 있었다.

가. Metagenome 염기서열 분석

Tyson 등은 난배양 미생물로부터 작성한 shot-gun 은행과 fosmid 은행의 전체 유전자 염기서열 분석으로부터 전체 contig를 작성하여 직접적인 유용 유전자 검색을 도모하는 연구를 수행 등이 screening을 통해 유전자를 선별하는 방법을 극복하는 것으로 여겨지고 있다.

나. Microchip을 이용한 다양성 조사

Banfield 등이 극한 지역으로부터 채취한 샘플로부터 작성한 유전자 은행으로부터 Glimmer 프로그램을 사용하여 예상한 단백질들의 양상과 발현되는 단백질의 functional category 분석을 수행하거나 Anderson 등은 탄소·질소 순환, 황 환원, 인 이용 등에 관계하는 특정 유전자에 대한 표지를 이용하여 수행한 microarray로 해양 샘플등에서의 관련 미생물과 유전자의 다양성과 분포를 분석하는 연구를 수행하고 있다. 또한 Noble 등에 의해 Gel Pad-based DNA Microarrays를 이용하여 gel 상에서 표지를 부착시켜 미생물의 다양성을 분석하는 새로운 기술이 진행되고 있다.

제 7 장 참고문헌

Amos, B. O., and Ilan, C. (1992) Cloned chitinase in fungal plant-pathogen control strategies. *Focus*. 10, 392-394.

Atlas, R. M. (1993) In *Handbook of Microbiological Media*, p. 967. Edited by L. C. Park. London: CRC Press.

Brady, S. F., Chao, C. J., Handelsman, J, and Clady, J. (2001) Cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Organic Letter*. 3, 1981-1984.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Pro Natl Acad Sci USA* 75, 4801-4805.

Bodour, A. A. and Miller-Maier, R. M. (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiological Methods*. 32, 273-280.

Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. and Meyer, H. H. (1998) Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of Epothilones. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 554-559.

Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta, A. S. J. and Giulietti, A. M. (1996) Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 82-84.

Che, C.T, Huang, C.J, Wang Y.H and Chen C.Y. (2004) Two-step purification of *Bacillus circulans* chitinase A1 expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Protein Expression and Purification*. 37, 27-31.

Choi S. S. Lee J. K., Han K. J., Han K. J., Lee H. K., Lee J. and Suh H. W. (2003) Effect of ginsenoside Rd on nitric oxide system induced by lipopolysaccharide plus TNF- α in C6 rat glioma cells. *Arch. Pharm. Res.* 26,

375-382.

Coia, G., Pontes-Braz, L., Nuttal, S. D., Hudson, P. J. and Irving, R. A. (2001) Panning and selection of proteins using ribosome display. *J. Immunological Methods*. 254, 191-197.

Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., and Vad, K. (1993) Plant chitinase. *Plant J.* 3, 31-40.

Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224-229.

Fuchs, R. L., Mcpherson, S. A., and Drahos, D. J. (1986) Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 504-509.

Fujino, T., Sukhumavasi, J., Sasaki, T., Ohmiya K. and Shimizu, S. (1989) Purification and properties of an endo-1,4- β -glucanase from *Clostridium josui*. *J. Bacteriol.* 171, 4076-4079.

George N. Agrios. Plant Pathology Fourth Edition p.245-247

Gilespe, D. E, Brady, S. F, Bettermann, A. D, Cianciotto, N. P, Lies, M. R, Rondon, M. R, Clady J, Goodman R. M and Handelsman, J. (2002) Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4301-4306.

Goryshin, I. Y. and Reznikoff, W. S. (1998) Development of the hyperactive EZ::TN (Tn5) in vitro transposition system. *J. Biol. Chem.* 273, 7367.

Gonzalez-Blasco, G., Sanz-Aparicio, J., Gonzalez, B., Hermoso, J. A. and Polaina, J. (2000) Directed evolution of β -glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *J. Biological Chemistry.* 275, 13708-13712.

Gregersen, T. (1978) Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 5, 1231-27.

Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K. & Rainey, F. A. (1996) *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol* 46, 234-239.

Helen, C. R., Susan, G., Brian, J., William, D. G. and Shaun, H. (2003) Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles*. 7, 415-421.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., and Goodman, R. M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5, R245-249.

Heimbrook, M. E., Wang, W. L. L. & Campbell, G. (1989) Staining bacterial flagella easily. *J Clin Microbiol* 27, 2612-2615.

Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3113-3116.

Hiraishi, A. (1992) Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett Appl Microbiol* 15, 210-213.

Hiroshi, T., Hideyuki, O., Hiromi T., Kazuhiro, M., Chiaki, I., Yoshiro, O. and Yoshihiko, I., (1993) Cloning sequencing, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium.

Hsieh, F. C., Li, M. C., Lin, T. C. and Kao, S. S. (2004) Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*. 49, 186-191.

Jaime, M., and Elwyn, T. R. (1968) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J.*

Microbiol. 15, 689–696.

Johnson, M. K. and Boese-Marrazzo, D. (1980) Production and properties of heat stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29, 1028– 1033.

Jonathan, D. G. J., Karen, L. G., Trevor, V. S. and John, R. B. (1986) Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO.* 5, 467–473.

Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 211–32. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.

Jung, H. C., Ko, S., Ju, S. J., Kim, E. J., Kim, M. K. and Pan, J. G. (2003) Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. *Enzymatic.* 26, 177–184.

Kim, M. W., Ko, S. R., Choi, K. J. and Kim, S. C. (1987) Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and changes of its contents according to root age. *Korean J. Ginsen Sci.* 11, 10–16.

Kim, S. J., Koo, B. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Yun, S. S., Sa, T. M. and Yeo, Y. S. (2004) Evaluation of DNA recovery from Soil and Sediment Samples. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47, 194–198.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.

Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K. and Jackson, P. J. (1998) Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2463–2472.

Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K., & Go, S. J. (2003) *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 21-27.

MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn., pp. 424-438. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Leonid, S. C et al. (1997) Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 834-839.

MacNeil, I. A, Tiong, C. L, Minor, C, August, P.R, Grossman, T. H, Loiacono, K.A, Lynch, B.A, Phillips, T, Narula, S, Sundaramoorthi, R. (2001) Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 301-308.

Matthew, T. C., Jessica, A. M. and David, L. K. (1999) Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65. 2553-2557.

Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 1591-167.

Moran A. C., Alejandra M. M. and Sineriz F. (2002) Quantification of surfactin in culture supernatant by hemolytic activity. *Biotechnol. Lett.* 24, 177- 180.

Partrick, L, Klaus, L, Frank, N. and Jurgen, E. (2002) Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 572-577.

Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. and Soberon-Chavez, G. (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnopolysyltransferase 2, an enzyme responsible for rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40, 708-718.

Robbins, P. W., Overbye, K., Albright, C., Benfield, B. and Pero, J. (1992) Cloning and high-level expression of chitinase-encoding gene of *streptomyces plicatus*. *Gene*. 111, 69-76.

Robert, W. K. and Selitennikoff, C. P. (1988) Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134, 169-176.

Daniel, R. (2004) The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 199-204.

Rondon, M. R., Agust, P. R., Bettermann, A. D, Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A. and Minor, C. (2000) Cloning the soil Metagenome: a Strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541-2547.

Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

Seldin, L. & Dubnau, D. (1985) Deoxyribonucleic acid homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans*, and other nitrogen-fixing *Bacillus* strains. *Int J Syst Bacteriol* 35, 151-154.

Shi, Q, Hao, Q., Bouissac, J., Lu, Y., Tian, S. and Luu, B. (2005) Ginsenoside-Rd from *Panax notoginseng* enhances astrocyte differentiation from neural stem cell. *Life Sci.* 76, 983-995.

Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L. C., Wolters, A. and van Elsas, J. D. (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 78-85.

Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: America Society for Microbiology.

Srisomsap, C., Svasti, J., Surarit, R., Champattanachai, V., Sawangareetrakul, P., Boonpuan, K., Subhasitanont, P. and Chokchaichamnankit, D. (1996) Isolation and characterization of an enzyme with β -glucosidase and β -fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* pierre. *J. Biochem.* 119, 585-590.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846849

Stemmer, WPC. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 370, 389-391.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (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, 46734680.

Ueda, K. (2004) Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. *Nucleic Acid Research* 32, 4937-4944.

Van Elsas, J. D., Mantynen, V. and Wolters, A. C. (1997) Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fertil. Soils.* 24, 188-195.

Vigdis, T and Lise, O. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245.

Voorhorst, W. G., Eggen, R. I., Luesink, E. J. and de Vos, W. M. (1995) Characterization of the *celB* gene coding for β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 7105-7111.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464.

Woo, C. J and Park, H. D. (2003) An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product. *Biotechnol. lett.* 25, 4009-4012.

Zang, J., Dawes, G. and Stemmer, W. P. C. (1997) Evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 4504-4509.

Zhao, H. and F. H. Arnold. (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 25, 1307-1308.

김용환 1996. *Serratia marcescens* W1으로부터 도열병균 군사생육억제 관여 유전자 탐색 및 특성검정. 전남대학교 박사학위논문

주 의

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