

발간등록번호

11-1543000-000799-01

효소를 이용한 수출용 사과 잔류농약 친환경 제거기술
개발

(Removal of pesticide residues from apples for export
using enzyme)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “효소를 이용한 수출용 사과 잔류농약 친환경 제거기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 1 월 20 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 최수근

세부연구책임자 : 최수근

연 구 원 : 박승환

연 구 원 : 반재구

연 구 원 : 정다은

연 구 원 : 소연주

협동연구기관명 : (주)제노포커스

협동연구책임자 : 김의중

요 약 문

I. 제 목 : 효소를 이용한 수출용 사과 잔류농약 친환경 제거기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현재 농산물 수출의 문제점은 (1) 생산단계에서의 고품질 농산물 생산 미흡 (2) 유통단계에서 수확 후 관리기술의 낙후로 인한 품질저하 (3) 영세한 수출업체 난립으로 인한 시장개척 부진 등임.
- 국내 원예작물 총생산액은 약 11조이지만 수확 후 유통 중 손실은 약 3조원으로 수확 후 관리가 매우 중요함. 수확 후 관리는 검사, 세척, 선별, 예냉, 저장, 운반 등의 단계로 이루어져 있는데 이 중 저장 전 처리는 품목에 따라 다르지만 큐어링, 예냉, 예조 및 병충해 방제 등이 있음.
- 특히 수확 후 병충해 방제는 농산물의 품질 유지를 위해 매우 중요한 단계로써 현재는 훈증을 하거나 화학농약을 처리하고 있음. 그러나 잔류농약 문제로 인한 유해성과 수출국의 검역 통관에 걸림돌로 작용하고 있음.
- 사과는 우리나라 주요 수출 과일 중 하나로 2010년 기준 약 1000만불 수출을 달성하고 있는데 이 중 대만에 대한 수출이 80% 이상을 차지하고 있음.
- 그러나 대만 수출 사과의 경우 2009년 미등록 농약 검출이 3건 발생하여 사과 수출이 일시 중단되었으며 2010년 같은 문제가 8건 발생, 한국산 사과에 대한 통상검사를 전수조사로 강화되었음. 그러나 2011년에도 6건이 발생함. 이러한 일부 잔류농약 검출 사례는 우리나라 전체 사과의 신뢰성을 떨어뜨려 수출에 걸림돌로 작용함. 따라서 고품질 농산물의 수출증대 및 다양한 국가로의 수출 다변화를 위해서는 환경친화적인 잔류농약 제거 기술을 이용하여 검역 통관에 대비하는 것이 필요함.
- 바실러스는 포자를 형성하는 그람양성 세균으로써 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 등 몇몇

종은 전통식품 발효에 사용되어 먹을 수 있는 안전한 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물이며 다양한 항생제를 생산하고 있고 protease, chitinase, glucanase 등 다양한 항진균 효소를 생산하고 있음.

- 바실러스는 전세계 산업용 효소 생산의 60%를 담당하고 있는 가장 중요한 산업균주로 다양한 식품용, 산업용, 의약용 물질 생산 균주로 활용되어져 왔음. 포자는 열, 건조, 유기용매 등의 스트레스에 매우 안정하기 때문에 운반 및 보관에 유리하여 현재 시판되고 있는 농업용 미생물제제는 대부분 *Bacillus*를 기반으로 한 제품들임.
- 바실러스 포자에는 잔류농약을 분해할 수 있는 Laccase 효소가 표면에 디스플레이 되어 있으며 imazalil 등 항진균제로 널리 사용되는 화학농약 등을 분해하는 활성이 보고되어 있으며 다양한 화학물질을 분해하는 것으로 잘 알려짐.
- 포자 표면에 발현된 효소는 고정화 되지 않은 효소형태에 비해 매우 안정해서 오랫동안 활성을 유지할 수 있고 열, 건조 등 외부 스트레스에 대해서도 비교적 안정함.
- Laccase 효소를 대량생산한 후 효소제를 개발하거나 효소를 과발현시킨 바실러스 포자를 직접 수확 후 사과 잔류농약의 제거에 이용할 수 있을 것임. 효소제품 및 포자제품은 물에 의해 쉽게 씻겨 제거되므로 별도의 세척 단계 및 제거 기술은 필요하지 않을 것으로 사료됨.
- 바실러스 포자를 이용할 경우 배양액에 포함되어 있는 각종 천연 항생제와 효소의 작용에 의해 병 발생을 억제할 수 있고 포자 표면 발현 효소에 의해 잔류농약을 분해하는 효과를 기대할 수 있으며 포자의 안정성으로 인해 제품의 보관과 운반에 유리함. 또한 바실러스는 먹을 수 있는 안전한 미생물이므로 친환경기술임.
- 바실러스 포자를 사과의 잔류농약 제거에 직접 적용할 경우에는 디스플레이된 효소의 고생산을 위한 non-GMO 균주개발이 필수적임.
- 전통적인 바실러스 균주 개량 방법인 chemical mutagen을 사용한 random mutagenesis는 시간이 오래 걸리고 타겟의 생산성을 저하하는 돌연변이가 대부분이며 원하는 방향으로 돌연변이가 일어날 확률은 0.01-1% 정도로 매우 낮음.
- 유전자 재조합 기술을 이용한 균주 개량 방법도 많이 사용되나, positive selection을 위해 항생제 저항성 유전자를 사용하므로 개량된 균주는 GMO 문제 때문에 환경에 직접 적용하는 분야에 사용하기 어려움. 또한 항생제 저항성 유전자 수가 제한되어 있기 때문에 여러 가지 유전자를 한꺼번에 돌연변이를 일으키는 데 한계가 있음.

- 따라서 바실러스에서 효소 또는 유용 물질의 대량생산을 위한 genome engineering을 원활히 수행하기 위해서는 항생제 유전자 등 외래유전자 도입 없이 다양한 유전자를 한꺼번에 돌연변이를 일으킬 수 있는 새로운 genome engineering 기술이 필요함.
- 이러한 기술을 이용하여 잔류농약 분해효소를 고생산하는 non-GMO 바실러스 균주를 만들 수 있고 이는 수확 후 사과의 잔류농약 분해에 유용하게 사용될 수 있을 것임.
- 또한 non-GMO 바실러스 균주 개량기술은 바실러스를 숙주로 한 유용물질 및 효소의 대량생산에 응용할 수 있고 항생제 대체 사료첨가용 미생물 개발, 의약품 신규 항생제 개발 등 다양한 분야에 응용 가능한 파급력이 큰 기술임.
- 잔류농약 분해효소는 농약 과다 사용에 의한 토양오염을 복원하거나, 섬유산업의 탈색제, 제지 산업의 리그닌 분해, 식빵, 주스, 와인 제조 등 다양한 용도로 사용 가능하기 때문에 본 연구를 통해 개발되는 효소제는 다양한 분야에 사용될 수 있음.
- 본 과제에서는 다양한 농약 분해효소 유전자 라이브러리를 확보하고 분자진화기술을 이용한 효소의 개량, 새로운 균주 개량기술을 이용한 농약 분해효소 고생산 non-GMO 바실러스 균주 제작, 고유의 발현시스템을 이용한 대량발현 등을 통해 수출용 사과의 잔류농약을 친환경적으로 제거하는 기술을 개발하고자 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 수행내용

가. 잔류농약 분해효소 Laccase 유전자 확보 및 개량

- 100종 이상의 바실러스 균주 수집 및 특성 분석
- 10종 이상의 laccase 유전자 확보 및 과발현
- Laccase 유전자의 특성 분석
- 유기인계 화합물 가수분해효소 (OPH)의 과발현 및 농약분해활성 측정

나. 분자진화기술을 이용한 Laccase 효소 개량

- laccase 개량을 위한 스크리닝 시스템 수립
- 분자진화기술을 통하여 laccase 활성이 증가된 변이체 확보 및 염기서열 분석

다. non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발

- 고효율 형질전환 기술 개발
- counter selectable marker 개발을 위한 새로운 합성유전자 조절회로 설계
- 합성유전자 조절회로를 이용하여 계놈 상 특정 위치에 돌연변이 유발하는 기술 개발
- non-GMO 과발현 균주 제작 및 농약분해능 확인

라. 단백질 대량 생산을 위한 바실러스 발현시스템 개발

- 프로모터 변이체를 이용한 단백질 대량 생산 방법 개발
- 번역 수준 조절을 통한 발현 라이브러리 제작
- 바실러스 발현시스템을 이용하여 농약분해능 효소의 대량 발현
- 대량배양 배지를 이용한 효소 발현 및 농약분해활성 검정을 위한 시제품 제작

마. 사과 잔류농약 성분의 분해능 검정

- 꿀벌부채명나방 유충을 이용한 생물학적 검정을 통해 살충제 분해능 확인
- 농약에 의한 *Fusarium solani*에 대한 저해환 크기 비교를 통해 살균제 분해능 확인
- 사과에서의 잔류 농약 제거 확인

2. 연구범위 및 방법

가. 잔류농약 분해효소 Laccase 유전자 확보

1) 확보된 바실러스 균주의 계놈으로부터 laccase 유전자 확보

- 다양한 laccase 효소 자원을 위한 126종의 바실러스 균주 수집
- 수집한 바실러스 균주의 항진균 및 항세균 활성 측정
- 수집한 바실러스 균주의 식물생장 촉진능과 유도저항성 활성 측정
- 바실러스 균주로부터 laccase 유전자 확보
- 본 연구팀의 고유 바실러스 발현 시스템을 이용하여 laccase 과발현

2) Laccase 유전자의 특성 분석

- Laccase 활성은 ABTS를 기질로 사용하여 측정
- Laccase 분비발현은 단백질 분해효소 aprE 유전자의 시그널 펩타이드 이용
- 8개의 extracellular proteases가 knockout된 WB800N을 사용하여 laccase의 stability 확인

- stability 확인을 위해 다양한 유기 용매와 계면활성제 이용
- 발현량 비교를 위해 상업적으로 판매하는 바실러스 발현시스템과 비교
- 다른 화학 물질의 분해 여부를 알아보기 위해 염색시약인 indigo carmine 분해능 확인

3) 유기인계 화합물 가수분해효소 (OPH)의 과발현

- *Flavobacterium*의 OPH 유전자 (opd) 확보
- 바실러스 서틸리스 168에서 OPH 과발현
- OPH 활성은 메틸 파라치온을 기질로 측정

나. 분자진화기술을 이용한 Laccase 효소 개량

- Laccase의 분자진화는 error prone PCR을 사용
- 분자진화 후 스크리닝은 ABTS, CuCl₂를 사용하여 고체 배지에서 수행
- 활성이 우수한 후보군을 선별하여 laccase assay 수행 후, 유전자 염기서열 확인

다. non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발

- ComK 활성을 유도한 고효율 형질전환 기술 개발
- counter selectable marker를 위해 합성생물학에서 사용되는 기술인 합성 유전자 회로를 이용하여 새로운 방법 개발
- 합성 유전자 회로는 두 개의 프로모터와 두 개의 repressor로 구성
- 신규 합성 유전자 회로를 이용한 genome engineering 기술의 효율성 검증은 바실러스 서틸리스 168의 *trpC*, *amyE*, *aprE*, *nprE* 유전자와 *pps* 오페론을 대상으로 수행
- non-GMO Laccase 과발현 균주를 제작하여 고체 배지에서 colony의 색깔 변화를 통해 ABTS의 산화여부 또는 1-naphthol의 분해 여부를 알아봄
- 최소배지에 유기인계 살충제인 chlorpyrifos를 첨가하여 clear zone을 관찰하여 laccase 또는 OPH 과발현 균주의 농약분해능 조사

라. 단백질 대량 생산을 위한 바실러스 발현시스템 개발

- *Bacillus thuringiensis cry* 프로모터의 상위 부위에 *B. subtilis* 유래의 *aprE* 또는

rapA 프로모터를 위치시키는 변이체 개발

- 프로모터 변이체의 활성 측정에 단백질 분해효소인 AprE를 리포터 단백질로 사용
- 또다른 변이체로 *Bt cry* 프로모터의 상위 부분에 UP 엘리먼트를 첨가
- GFP를 리포터 단백질로 사용하여 활성이 증가된 프로모터를 선발
- 선발된 프로모터에 목적 단백질로 AprE를 발현하여 단백질 발현이 증가됨을 확인
- 동의돌연변이 (synonymous mutations)을 이용하여 번역 수준의 조절을 통한 발현 라이브러리 제작
- 생물정화에 사용되는 효소 중 농약 분해에 관여하는 효소들이 위 바실러스 발현시스템으로 과발현되었음을 단백질 전기영동으로 확인

마. 사과 잔류농약 성분의 분해능 검정

- 과발현된 laccase와 OPH의 chlorpyrifos 분해능, laccase의 테부코나졸 분해능 확인을 위해 LC-MS 수행
- 농약분해능 검정을 위해 살충제 (톡소리, 피레탄, 스미치온, 선충탄, 수프라사이드)와 살균제 (프로라츠, 실바코) 사용
- 꿀벌부채명나방 유충을 이용한 생물학적 검정으로 살충제에 대한 분해능 확인
- 병원균 첨가된 고체 배지에서 저해환 크기 비교로 살균제에 대한 농약 분해능 확인
- 바실러스 발효배지에서 균주 배양 후 라이소자임과 계면활성제를 처리하여 세포 내에서 발현된 단백질 분비시킨 농약분해 검정용 시제품 제작
- 사과에 직접 특정 농약과 제작된 시제품을 처리하여 잔류농약 검사를 통해 농약 분해 여부를 알아봄.

IV. 연구개발결과

1. Laccase 유전자 확보

가. 확보된 바실러스 균주의 계놈으로부터 Laccase 유전자 확보

- 다양한 Laccase 효소자원을 수집하기 위하여 총 126주의 바실러스 균주를 수집하였

고 이들에 대해 항진균 활성 및 항세균 활성을 측정하였음.

- 그 결과 29종의 바실러스 균주가 곰팡이 *Rhizoctonia solani*에 대한 항진균 활성을 보였고 32종이 *Botrytis cinerea*에 활성을 보임. 그람양성균인 *Micrococcus luteus*에 대한 항세균 활성을 보인 균주는 20종이었음.
- 알려진 여러 바실러스 종의 laccase 유전자 염기서열을 확보하여 비교한 결과 homology가 많이 다름을 알 수 있었는데, 이는 바실러스 laccase가 종마다 서로 다른 염기서열을 가진다는 것을 알 수 있음.
- 바실러스 균주로부터 총 26종의 laccase 유전자를 확보하였고, 기 확보된 바실러스 발현시스템을 이용하여 바실러스 서틸리스 168 균주에서 6종의 laccase 유전자를 과발현하였음.

나. Laccase의 특성 분석

- 과발현된 6종의 laccase 유전자 중, 바실러스 서틸리스 laccase에 대한 특성을 분석하였음.
- Laccase는 세포 내에서 발현되는 단백질이므로 발현된 단백질의 효율적인 회수를 위하여 단백질이 세포 밖으로 분비될 수 있도록 단백질 분해효소 (*aprE*)의 signal peptide를 붙여 발현하였음. 그 결과 세포 내에서만 laccase가 과발현됨을 확인하였음.
- Laccase가 세포 내에서 발현되는 단백질이나 대부분 효소 활성이 상등액에 존재하는 것으로 보아 laccase가 세포 내에서 발현되었지만 자가분해 (autolysis)에 의해 세포 밖으로 분비된 것으로 생각됨.
- 바실러스 서틸리스에는 8개의 세포외 단백질 분해효소 (extracellular proteases)가 존재하여 발현된 단백질이 쉽게 분해될 수 있음.
- 8개의 세포외 단백질 분해효소가 결핍된 WB800N 균주에서의 효소 활성과 바실러스 서틸리스 168의 효소 활성이 비슷한 것으로 보아, laccase가 세포외 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되지 않음을 확인하였음. 과발현된 laccase를 상온에서 30일 이상 보관하여도 효소 활성이 유지되는 것을 확인하였음.
- Laccase를 다양한 유기용매들과 상온에서 2시간 반응시킨 뒤 효소 활성을 검정해본 결과, 에탄올, 2-propanol, 아세톤, triton X-100에 대하여 그 활성이 유지됨을 확인

함.

- 상업적 발현벡터 (pHT01)를 이용하여 제작한 laccase 발현 균주와 본 연구에서 사용한 laccase 과발현 균주의 효소 발현 정도를 비교해보고자 함.
- 본 연구의 발현 시스템을 이용한 균주와 상업적으로 판매되는 발현 벡터를 이용한 균주의 효소 활성을 측정해 본 결과, 본 연구팀의 발현시스템을 이용한 균주의 효소 활성이 상업적으로 판매되는 벡터를 이용한 효소 활성보다 약 10배 이상 높게 나타남.
- 포자형성 배지에서 균주 배양 후 포자 표면에서의 효소 활성을 비교한 결과, 상업적 발현 시스템에 의한 효소 활성보다 본 연구의 발현시스템에 의한 효소 활성이 10배 이상 높게 나타났음. 과발현된 laccase는 120시간까지 포자 표면에서 잘 발현되며 활성이 안정하게 유지됨.
- laccase가 화학물질을 분해하는지 알아보기 위해 염색시약인 indigo carmine과 laccase 과발현 균주를 반응시킨 후 과발현한 laccase가 indigo carmine을 모두 분해 시킴을 확인하였음.

다. 유기인계화합물 가수분해효소 (OPH)의 과발현

- 생물학적 환경정화 (bioremediation)는 미생물, 곰팡이, 식물 또는 그 효소를 이용하여 오염 물질을 제거하는 방법임.
- 최근 유기인계화합물의 분해에 효소를 이용한 생물학적 처리 방법들이 관심을 받고 있음. 그 중, 유기인계화합물 가수분해효소 (OPH)는 농약뿐만 아니라 사린 가스 등과 같은 생화학무기용 화학물질의 해독 작용에 관여함.
- *Flavobacterium*의 OPH 유전자를 확보하여 바실러스 서털리스 168에서 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 과발현하였음.
- 메틸 파라치온을 기질로 사용하여 OPH가 바실러스에서 과발현 되었음을 확인하였음.

2. 분자진화기술을 이용한 Laccase 효소 개량

- 분자진화 (Directed evolution) 기술은 목적 단백질 또는 생명체를 우리가 원하는 특성을 갖도록 초고속으로 개량하는 기술임.
- 분자진화 기술을 이용한 laccase 개량을 위해 먼저 스크리닝 시스템을 구축할 필요가

있었음.

- Bromophenol blue, Indigo carmine, Tannic acid, ABTS 등 다양한 laccase 기질을 사용하여 고체 배지에서 활성을 검정한 결과 0.25 mM CuCl₂와 0.4mM의 ABTS가 들어 있는 1/3 TSA 배지가 스크리닝에 가장 적합하였음.
- 바실러스 서틸리스 laccase 유전자를 Clontech 사의 Diversify PCR mutagenesis kit 를 이용하여 error prone PCR을 수행하고 본 연구의 발현시스템에 클로닝하여 바실러스 서틸리스에 도입하였음. 위에서 언급된 스크리닝 배지에 도말하여 우수한 활성을 보이는 다양한 콜로니를 확보할 수 있었음.
- 활성이 우수해 보이는 후보군 10개를 선별하여 laccase assay를 통해 개량 전의 효소 활성보다 약 0.5 ~ 3배 이상 높아졌음을 확인함.
- 각 후보군의 laccase 활성이 다양하게 나타나 laccase 유전자의 아미노산 서열을 분석한 결과, 후보군마다 서로 다른 부분에 변이가 생성됨을 확인함.

3. non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발

- 특정 효소가 고발현된 균주를 제작하는 방법은 random mutagenesis 또는 유전공학적 기법을 이용한 rational mutagenesis가 있음.
- Random mutagenesis 방법은 wild-type 균주에 UV 또는 화학 물질을 처리하여 게놈 상에서 무작위로 돌연변이를 일으키는 방법으로 원하는 형질을 가진 돌연변이체가 찾아질 때까지 반복함. 그러나 원하는 돌연변이가 생길 확률이 매우 낮고 원하지 않는 돌연변이가 게놈상에서 축적되어 세포 성장이나 포자형성에 문제가 발생할 가능성이 높음. 또한 원하는 형질을 가진 돌연변이체를 얻기까지 시간이 많이 걸리며 새로운 타겟이 생기면 처음부터 사이클을 다시 반복해야 한다는 단점이 있음.
- 유전공학적 기법을 이용한 Rational mutagenesis의 경우 원하는 유전자만 선택적으로 돌연변이를 시킬 수 있지만 스크리닝을 위해 항생제 저항성 유전자를 사용하기 때문에 GMO 균주로써 환경에 직접 사용할 수 없다는 단점이 있음.
- 따라서 본 연구에서는 외래 유전자의 흔적을 전혀 남기지 않고 특정 유전자의 돌연변이를 유도하는 새로운 원천기술을 개발하였음.
- 먼저 바실러스에서 고효율 형질전환 기술을 개발할 필요가 있었음.
- 바실러스의 natural comtetency를 이용한 형질전환 기작에서 key regulator 역할을 하

는 것이 ComK임. ComK가 활성화된 균주는 형질전환 효율이 증가하도록 조작하여 형질 전환 효율이 획기적으로 증가된 바실러스 균주를 제작하였음.

가. counter-selectable marker를 위한 합성유전자 회로 설계

- 흔적을 남기지 않는 계놈 엔지니어링 기술은 효율적인 counter-selectable marker (CSM)가 필요함.
- 기존에 사용되었던 CSM인 *upp*, *blaI*, *araR* 등은 계놈 상에 다른 특정 mutation이 필요하기 때문에 이로 인한 돌연변이체는 GMO임. *mazF*의 경우 세포에 대한 독성을 가지고 있어 매우 많은 false-positive가 발생하여 원하는 돌연변이를 찾기가 매우 어려움.
- 이들의 단점을 극복하고자 합성생물학에서 많이 사용되는 핵심 기술인 합성 유전자 회로를 사용하여 CSM을 위한 새로운 방법을 개발하였음. 새로 설계된 유전자 회로는 두 개의 프로모터와 두 개의 repressor 유전자로 구성되어 있음.
- Repressor 1은 항상 발현하고 있으며 프로모터 1에 작용하여 Repressor 2 발현을 억제함. 이는 Repressor 2의 조절을 받는 프로모터 2로부터 reporter의 발현을 유도하여 detection이 가능하게 함. 여기에 inducer 1을 넣어주면 Repressor 1의 작용을 방해하여 repressor 2의 발현을 유도함. 발현된 Repressor 2는 프로모터 2의 발현을 방해하여 reporter를 detection 할 수 없음. reporter를 detection 하기 위해서는 프로모터 1과 repressor 2가 제거되어야만 함. 따라서 이것이 CSM으로 작용할 수 있게 됨.
- 본 연구에서는 프로모터 1에는 xylose로 발현이 유도되는 바실러스 서틸리스 *xyIA* 프로모터 (P_{xyI})를, 프로모터 2에는 IPTG로 발현이 유도되는 *spac* 프로모터 (P_{spac})을, repressor 1에는 *xyIR* 유전자를, repressor 2에는 *lacI* 유전자를 reporter에는 클로르암페니콜 저항성 유전자 (*cat*)을 사용하였음.

나. 합성유전자 회로를 이용한 non-GMO 균주 제작

- 이렇게 제작된 유전자 합성 회로를 CSM로 사용 가능한 지 여부를 검정하였음. 바실러스 서틸리스 168 균주는 tryptophan auxotroph (Trp-)로, 이는 *trpC* 유전자 내에 3개의 염기 (ATT)가 결실된 것이 원인임. 본 연구에서 3개의 염기를 다시 삽입하여

tryptophan 의존성을 없앤 균주 (Trp+)를 신규 합성 유전자 회로를 사용하여 제작하였음.

- 제작된 균주 Trp+는 tryptophan이 포함되지 않은 최소배지에서도 잘 자라는 것으로 보아 *trpC* 유전자의 기능이 회복되었음을 알 수 있음.
- 다음으로 계놈 상에서 특정 염기의 제거 또는 point mutation도 용이하게 이루어진다는 사실을 증명하였음.
- 먼저 deletion mutant 제작을 위해 단백질 분해효소인 *aprE* 유전자에서 두 개의 염기 (GT)가 제거되도록 하였고, point mutant 제작을 위해서는 단백질 분해효소 *nprE* 유전자의 A가 T로 바뀌어 stop codon이 생기도록 하였음.
- 상기 Trp+ 균주 제작과 같은 방법으로 Trp+ AprE-, Trp+ NprE-, Trp+ AprE- NprE- 균주를 제작하였음. 제작된 균주들의 단백질 분해효소 활성을 측정한 결과 wild type에 비해 mutant 모두 활성이 감소한 것으로 보아 mutant가 잘 만들어 졌음을 알 수 있음.
- 합성유전자 회로의 광범위한 사용을 위하여 전체 유전자 또는 오페론의 deletion mutant를 만들기로 함.
- 먼저 유전자의 deletion mutant를 만들기 위해 탄수화물 분해효소인 *amyE* 유전자에서 대부분의 염기 (약 2 kb)가 제거되도록 하였음. 고체 배지 상에서 요오드/녹말 반응을 통해 *amyE*- mutant에서 효소의 활성이 사라짐을 확인하였고, PCR을 이용하여 *amyE* 유전자가 제거되었음을 확인하였음.
- 또한 항진균활성을 나타내는 fengycin 생합성 관련 유전자 집단인 *pps* 오페론 (*ppsABCDE*)에서 이를 구성하고 있는 유전자 집단이 제거될 수 있도록 제작하였음. PCR을 통해 *pps* 오페론이 확실히 제거되었음을 확인하였음.
- 따라서 본 연구에서 개발된 계놈 엔지니어링 기술은 계놈 상에서 insertion, deletion 및 point mutation 등 모든 mutation을 매우 효율적으로 제작할 수 있음을 확인하였음.

다. Laccase 과발현 균주 제작 및 농약분해능 시험

- Laccase가 과발현된 균주를 친환경적으로 만들면 농약분해 용도로 균주 또는 포자형태의 제품을 만들 수 있을 것이라 생각됨.

- 바실러스 균주는 항균활성이 우수하므로 농약분해효과 뿐만 아니라 병원성 곰팡이의 발병을 억제하는 두 가지 효과를 기대할 수 있을 것임.
- 본 연구에서 개발된 non-GMO 균주 제작 기술을 이용하여 바실러스 laccase가 과발현된 친환경 균주를 제작하였음. 이를 위해 laccase를 암호화하고 있는 *cotA* 유전자 개시 코돈 바로 앞 부위에 바실러스에서 유래된 프로모터를 다른 외래 유전자의 흔적을 남기지 않고 삽입하였음.
- 이렇게 제작된 Laccase 과발현 균주 (nonGMO *cotA*)는 laccase assay를 통해 과발현되었음을 확인하였음.
- 구리를 첨가한 최소 배지 CHPYG1에 ABTS를 기질로 사용하여 non-GMO Laccase 과발현 균주를 처리함. 과발현된 laccase에 ABTS가 산화되어 배지의 색이 보라색으로 바뀌는 것을 확인하였음.
- 다양한 살충제의 전구체로 사용되며 살충제인 카바릴과 나프탈렌의 대사산물인 1-naphthol은 분해되면 검은색을 나타냄.
- 1-naphthol이 첨가된 최소 배지 CHPYG1에서 각 균주를 키워 콜로니의 색깔 변화를 살펴본 결과, non-GMO Laccase 과발현 균주와 laccase, OPH를 함께 과발현한 균주가 검은색 콜로니를 나타냄.
- 최소 배지 CHPYG1에 유기인계 살충제인 chlorpyrifos를 첨가하여 non-GMO Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주에 의한 clear zone을 관찰하였음. Laccase, OPH를 함께 발현한 균주가 OPH 과발현 균주보다 약 1.5배정도 높은 activity를 나타내 laccase와 OPH가 농약 분해에 있어 시너지 효과를 나타내는 것으로 여겨짐.

4. 단백질 대량 생산을 위한 바실러스 발현시스템 개발

가. 프로모터 변이체를 이용한 단백질 생산 방법

- 바실러스는 산업적으로 유용한 단백질을 생산하는 주요 숙주로 사용되지만 대장균과 비교하여 바실러스에는 강력하고 조절 가능한 프로모터가 없고, 많은 단백질 분해효소의 존재로 인하여 발현된 단백질의 안정성에 문제가 있음.
- 이를 해결하기 위하여 *Bacillus thuringiensis cry* 프로모터의 상위 부위에 *B. subtilis* 유래의 *aprE* 프로모터 또는 *rapA* 프로모터를 포함하는 프로모터 변이체를 개

발하였음.

- 단백질 분해효소인 AprE를 리포터 단백질로 사용하여 각 프로모터 변이체의 하위에 위치시키고, AprE의 발현량을 확인하였음.
- 각 프로모터 변이체들은 모두 개량된 프로모터 P84에 비해 유전자 발현량이 2배 이상 증진함을 확인하였음.
- 또다른 프로모터 변이체로 Bt Cry 프로모터의 상위 영역에 뉴클레오타이드 아데닌 (A)과 티민 (T)이 풍부한 UP 엘리먼트를 첨가하는 프로모터 변이체를 제작하였음.
- GFP를 리포터 단백질로 사용하여 발현량이 증가된 프로모터를 스크리닝하였음. 활성이 우수한 7개 프로모터 변이체를 선별하였고, 선별된 프로모터들은 기존 개량된 *cry* 프로모터인 P84보다 GFP 활성이 20~30배 이상 증가된 것을 확인하였음.
- 프로모터 변이체 중 대표적으로 PuryC13과 PuryC23을 이용하여 목적 단백질인 단백질 분해효소 AprE를 발현하였고, P84 프로모터보다 활성이 2배 이상 증가되었음을 확인함.

나. 번역수준 조절을 통한 발현 라이브러리 제작

- 단백질의 번역 과정에서 같은 아미노산을 지정하는 코돈이 2종류 이상임에도 특정 종류의 코돈이 다른 코돈보다 많이 사용되는 현상을 코돈 치우침 (Codon bias)이라 함.
- 그러나 최근 연구 (Kudla et al. 2009)에서 코돈 치우침은 단백질 발현에 큰 영향을 미치지 못함이 밝혀졌음. 한편 같은 연구에서 리포터 단백질인 GFP에 동의돌연변이 (Synonymous mutations) 라이브러리를 제작하여 mRNA 2차 구조와 번역 개시율이 유전자의 발현량을 결정하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 증명함.
- 위 연구를 토대로 본 연구에서는 목적 단백질인 *aprE*의 개시 코돈 뒤 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하였음.
- 탈지유가 포함된 고체 배지에서 다양한 크기의 투명환을 관찰할 수 있었고, 변이체들을 선별하여 단백질 활성을 측정하여 효소 활성이 낮은 균주부터 높은 균주까지 연속적으로 나타나는 것을 확인하였음.
- 이러한 기술을 OPH 발현에 적용하였음. OPH 유전자의 개시 코돈 뒤 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하고 GFP와 fusion 되게 벡터를 제작하였음. 바실

러스에 도입 후 GFP의 발현이 높은 콜로니를 고르고 이 중에서 효소 활성이 높아진 콜로니를 확보하였는데 wild-type 보다 약 6배 이상 효소 활성이 높아진 변이체를 확보하였음.

다. 바실러스 발현시스템을 이용한 여러 효소들의 과발현

(1) multicopy Laccase 과발현 균주 제작

- non-GMO Laccase 과발현 균주에 laccase 또는 개량 laccase 유전자를 하나 더 삽입하여 laccase 활성을 비교하였음.
- 기존 laccase 과발현 균주와 multicopy 과발현 균주의 laccase 활성에 차이가 없는 것으로 보아, 본 연구의 발현 시스템에 의한 laccase 유전자의 발현은 포화 상태로 더 이상의 발현량 증가가 없는 것으로 생각됨.

(2) 농약분해 관여 효소의 과발현

- 생물학적 환경정화를 위한 효소 중 주로 유기 농약 분해에 관여하는 효소로는 Cytochrome P450s, Esterases, Peroxidases, Transferases 등이 있음.
- 지금까지 구축된 바실러스 발현 시스템을 이용하여 이미 과발현시킨 Laccase, OPH 뿐만 아니라, 위의 농약 분해능 유전자들을 발현시키고자 함.
- Cytochrome P450 효소는 대부분의 생물체에 존재하며 매우 다양한 산화반응의 촉매 역할을 하는 효소들로 구성됨. 그 중 세균에서 가장 잘 알려진 바실러스 메가테리움 (*B. megaterium*) 유래의 P450을 선택하였음,
- 바실러스 메가테리움에는 CYP102 (BM3)와 CYP106 (BM-1) 유전자를 가지고 있음. 각 유전자를 본 연구의 단백질 대량 생산 시스템을 이용하여 과발현하였음.
- 약제 저항성 곤충의 해독효소들 중에서 집파리의 Cytochrome P450 (CYP6A1), 진딧물의 Esterase (E4), 집파리의 Glutathione S-transferase (GST)를 바실러스 서틸리스에 최적화된 코돈으로 바꿔 화학적으로 합성하였음.
- 합성된 유전자들은 바실러스 서틸리스에 도입하였고, 단백질 전기영동을 통해 OPH, CYP6A1을 제외한 나머지 효소들이 과발현됨을 확인하였음.

5. 사과 잔류농약 성분의 분해능 검정

가. 다양한 농약분해효소를 이용한 농약분해능 확인

- 본 연구의 바실러스 발현 시스템을 이용하여 과발현시킨 농약분해능 효소들의 농약 분해 활성을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 진행함.
- Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주의 클로르피리포스 분해능을 LC-MS를 통해 살펴보았음. laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주에서 클로르피리포스의 피크가 줄어들고, 새로운 피크가 나타났음. 이 새로운 피크는 클로르피리포스가 분해되어 생긴 부산물이라 여겨지며 반응에 사용한 클로르피리포스가 고농도라 클로르피리포스의 피크가 남아있다고 여겨짐.
- 클로티아니딘과 과발현한 농약분해능 후보균들과 섞어 37℃에서 24시간 반응시킨 후 꼴벌부채명나방유충에 처리하여 유충의 사망률을 확인함. OPH, BMC21 (*B. megaterium* CYP102), GST, Mix (CYP6A1 + E4 + GST) 처리구에서 사망률이 현저하게 줄어들었음.
- 사이퍼메트린에 대해서는 BMC21, OPH, CYP6A1, Mix 처리구에서 유충의 사망률이 줄어들었음.
- 페니트로치온에 대하여 BMC21, CYP6A1, E4, GST, Mix 처리구에서 유충의 사망률이 줄어들었고, OPH 처리구에서 색 변화가 나타나 농약을 분해한 것으로 여겨졌지만, 나방 유충의 사망률은 높게 나타나 OPH에 의한 페니트로치온 분해산물 또한 독성을 나타내는 것으로 생각됨.
- 포스티아제이트에 대해서는 BMC21과 GST 처리구에서 현저하게 유충 사망률이 낮아졌음.
- 메티다치온에 대해서는 OPH와 E4에서 사망률이 낮아졌음.
- 프로클로라츠 살균제로 병원균인 푸사리움 솔라니 (*Fusarium solani*)가 첨가된 고체 배지 상에서 저해환을 형성함.
- 과발현한 농약분해능 후보균들과 농약을 섞어 병원균이 첨가된 고체 배지에 접종하여 저해환의 크기를 관찰하였음.
- *aprN*, *bioI*, E4, *lip*, *nprE* 처리구에서 저해환의 크기가 약간 줄어들었고, *aprE*, BMC21, BMC63 처리구에서는 저해환이 현저하게 줄어들었음.
- LC-MS를 통해 Laccase 과발현 균주의 테부코나졸에 대한 농약분해능을 살펴보았음. Laccase 과발현된 바실러스 서틸리스 168와 1028 균주에서 테부코나졸 피크가

사라지거나 줄어들었음.

- 테부코나졸이 첨가된 CHPYG1 배지에 순수 분리된 Peroxidase를 처리하여 투명환이 형성되는 것을 확인함.
- 병원균이 첨가된 고체 배지에서 OPH, *aprN*, *nprE*, BMC21, CYP6A1, E4, GST, Mix (CYP6A1 + E4 + GST)의 처리구에서 저해환이 control에 비해 줄어들었음.
- 결론적으로 BMC21이 다양한 농약에 대한 분해능을 보였고 이를 이용하여 사과와 잔류농약 분해를 시도함.

나. 효소 대량배양 및 시제품 제작

- BMC21 균주를 바실러스 대량배양 배지에서 60시간동안 배양하였음.
- 발현된 단백질이 세포 밖으로 분비되도록 라이소자임과 계면활성제를 처리하여 세포를 용해시킨 농약분해 활성 검정용 시제품을 제작함.

다. 사과의 잔류농약 분석

- 위에서 준비한 시제품을 사과에서 잔류농약 제거에 이용될 수 있는지 확인하고자 다음과 같은 실험을 진행하였음.
- 시중에서 판매되는 사과에 특정 농약 (실바코 (주성분: 테부코나졸))과 제작된 시제품을 처리하여 잔류농약 검사를 의뢰함.
- 그 결과, 농약만 처리한 사과에서는 테부코나졸 외 3종의 농약이 검출되었지만, 농약과 BMC21를 함께 처리한 사과에서는 어떤 농약성분도 검출되지 않았음.
- 따라서 다양한 농약에 대한 분해능을 가진 BMC21을 필드에 이용하여 친환경적으로 사과의 잔류농약을 제거할 수 있을 것으로 예상됨.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 효소가 과발현된 바실러스 균주는 균을 모두 과쇄하여 제품화 하여야 할 것임. 대량배양용 배지를 사용하여 균을 배양한 후 균을 모두 과쇄한 시제품을 제작하였음.
- 2014년 9월 2일 참여기업 연구원을 대상으로 단백질 발현 기본 원리 및 발현시스템 특허에 대해 교육하였음. 이는 효율적인 효소 생산에 활용될 수 있을 것임.
- 다음과 같은 3편의 특허를 국내에 출원하였음.
 - 제목: 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 생산방법, 출원번호: 10-2014-0002546, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-01-08.
 - 제목: 변이균주 제조용 조성물 및 이를 이용하여 변이균주를 제조하는 방법, 출원번호: 10-2014-0014256, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-02-07.
 - 제목: 바실러스 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질의 제조방법, 출원번호: 10-2014-0063980, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-05-27.
- 국외 저명저널 (Nucleic Acids Res.(IF=8.808))을 포함하여 다음과 같은 3편의 논문을 발표하였음.
 - Jeong H, Jeong DE, Sim YM, Park SH, Choi SK. 2013. Genome Sequence of *Lysinibacillus sphaericus* Strain KCTC 3346. Genome Announc. 1: 625-626.
 - Jeong H, Park SH, Choi SK. 2014. Genome Sequence of the AcrySTALLiferous *Bacillus thuringiensis* Serovar *Israelensis* Strain 4Q7, Widely Used as a Recombination Host. Genome Announc.. 2: 1-2.
 - Jeong DE, Park SH, Pan JG, Kim EJ and Choi SK. 2014. Genome engineering using a synthetic gene circuit in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. doi: 10.1093/nar/gku1380.
- 국내 및 국제 학술대회 성과는 다음과 같음.
 - 학술대회 명칭: 2013 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 평창 알펜시아, 일시: 2013-07-04, 발표논문 제목: Overexpression of Laccase in *Bacillus subtilis*, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, Jae-Gu Pan, Eui-Joong Kim and Soo-Keun Choi.

- 학술대회 명칭: SIMB 2013 Annual meeting, 장소: Sheraton San Diego, San Diego, CA, USA. 일시: 2013-08-11, 발표논문 제목: Development of a counter-selectable marker system for genome mutation in *Bacillus subtilis*. 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, and Soo-Keun Choi.
- 학술대회 명칭: 2013 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, 장소: The-K Seoul Hotel, Seoul, Korea, 일시: 2013-10-17, 발표논문 제목: Expression of *Bacillus* spore enzyme CotA in *Bacillus subtilis*, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, Jae-Gu Pan, Eui-Joong Kim and Soo-Keun Choi.
- 본 연구의 성과는 참여기업인 (주)제노포커스에 기술이전할 예정임. 현재 기술이전에 대한 구체적인 조건을 협상 중에 있음.
- 본 연구의 효소는 추후 필드테스트 및 발효 스케일업 등의 후속연구를 수행한 후 참여기업을 통해 사업화할 예정임.
- 본 연구의 효소제품은 단독제품으로도 사용 가능하지만 기존 미생물농약과 함께 사용할 수 있는 복합제제의 형태로도 제품화 할 수 있을 것으로 기대함.
- 기존 국내외에서 시판되는 미생물제제는 자연에서 분리된 미생물을 대량배양하여 식물 성장 촉진 및 생산 시 병충해방제에 치중되어 있으므로 본 연구과제에서는 농약분해효소 또는 효소가 디스플레이 되어 있는 포자를 기반으로 하는 제품 개발을 추진하여 수출용 농산물의 수확 후 관리에 적용할 계획임.

SUMMARY

The gross production cost of agricultural crops in South Korea has reached \$11 billion, yet poor post-harvest management (PHM) makes almost \$3 billion lost every year. Therefore, the role of PHM has increased in agricultural industries in order to maintain the quality of products, keep them from being lost, avoid their decomposition and retain freshness to deliver safe products to consumers. There are several steps in PHM, which includes – cleaning, sorting, quick cooling, storage, transportation and distribution. This project is focused on handling before storage, the pesticide residue control.

In case of apple, its export in Korea reached \$1000 million in the year of 2010. However, apple exports to Taiwan was temporarily suspended due to the pesticide residue detection and products that do not satisfy export customs clearance procedures were caught in following years. This phenomenon remained a great concern to develop an environmental-friendly method for removal of residual pesticides. Consequently, preventing pesticide residue on agricultural products to meet the standards of any export customs clearance procedures is indispensable.

Laccase is an enzyme exists in diverse organisms like higher plants, insects, bacteria. Laccase belongs to a multi-copper oxidase that catalyzes biodegradation of lignin and the oxidation of the other aromatic compounds such as polyphenol and diamine. Also, in the presence of redox mediator, Laccase can catalyze the oxidation of non-phenolic compounds. By considering its characteristic to possess broad substrate spectrum, Laccase is known to degrades various chemical compounds containing imazalil.

Recently, a lot of attention has been given to bioremediation of organophosphates and studies have shown that organophosphorus hydrolase (OPH) can detoxify certain pesticides: Parathion, Methyl parathion and Methamidophos. In the same context, cytochrome P450s, esterases, peroxidases and transferases have identified as enzymes that can be used in bioremediation.

As a heme monooxygenase, Cytochrome P450s catalyze biodegradation of aromatic and alicyclic compound, whereas the esterases break down the ester bond for

detoxification of chemical compounds. Peroxidases destroy aromatic compounds by catalyzing oxidation–reduction reaction when transferases such as Glutathione S–transferase (GST) catalyze dehydrohalogenation of cyclic compounds.

The over–expression of these pesticide detoxifying enzymes is a common mechanism by which pests become resistant to pesticides. Therefore, study of the enzymes; cytochrome P450s, esterases, Glutathione s–transferase (GST) may help to identify the most proficient enzyme that can be used in eco–friendly removal of residual pesticides.

Esterases hydrolyse organophosphorus, carbamates, and pyrethroid pesticides by transferring their ester group into alcohol and acid for lower pesticide toxicity. On the other hand, GSTs, detoxify organophosphorus, organochlorine, and pyrethroid pesticides by catalyzing the conjugation of endogenous xenobiotic alkylating agents and glutathione to excrete them outside the cell.

Throughout this project, we obtained diverse gene library for pesticide degradation enzymes and improved existing pesticide degrading enzymes using direct evolution technique. Also, we constructed novel non–GMO *Bacillus* strain that can over–produce pesticide degrading enzyme to remove pesticide residue on apple eco–friendly.

Among different *Bacillus* strains collected, one of the known pesticide degrade enzyme Laccase was isolated and overexpressed in *B. subtilis*. The overexpressed *B. subtilis* Laccase indicated that it has inner cell expression and remain stable at room temperature. Also, its safety has confirmed along with the ability to degrade different types of pesticides.

Moreover, organophosphorus hydrolase (OPH) gene isolated from *Flavobacterium* was over–expressed in *Bacillus* and its ability to degrade pesticide was confirmed as well.

Newly designed synthetic gene circuit to develop counter selectable marker made possible to cause site specific mutation on *B. subtilis* genome without leaving any foreign DNA behind.

It was also successful to express cytochrome P450, esterase, and GST in *Bacillus*, and their pesticide degradation ability was confirmed through bioassay in the presence of Clothianidin, Cypermethrin, Fenitrothion, Methidathion, and Fosthiazate. Further

antifungal plate assay with Prochloraz and Tebuconazole assured that BMC21 and GST were effective on degrading most of the pesticides. Finally, Tebuconazole containing pesticide was sprayed on the surface of the apples along with BMC21 enzyme sample, and pesticide residue analysis confirmed that Tebuconazole was not detected with BMC21 enzyme treated apples. Therefore we concluded that products containing BMC21 enzyme is suitable for pesticide degradation on apple exports.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of research and development project

Chapter 2. Domestic and international technology developments

Chapter 3. Contents and results of research

Chapter 4. Goal attainment and Contribution of the related fields

Chapter 5. Research performance and application

Chapter 6. Foreign science and technology information

Chapter 8. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 최근 FTA 등의 시장개방에 의해 저가 수입농산물의 유입이 지속적으로 확대됨에 따라 단순생산 중심의 산업구조, 인력 감소 및 고령화, 경영비 상승 등으로 경쟁력이 약화된 농업분야가 큰 타격을 받을 것으로 예상됨.
- 이를 극복하기 위해서는 적극적인 수출 장려 노력으로 농업 경쟁력을 확보하여 대처하는 것이 바람직하며 이를 위해서는 가격경쟁력보다는 품질경쟁력에 중점을 두는 노력이 필요함.
- 1990년대 초반 이후 정부의 적극적인 수출농업 추진으로 2011년 농림수출액은 77억 달러를 달성하였고 수출대상국도 다변화하고 있음.
- 선진국의 경우 농식품이 수출에서 차지하는 비중이 평균 10% 수준이지만 우리나라는 1.4%에 불과하며 그나마 대부분은 주류, 면류, 당류, 과자류 등 가공완제품이 차지하고 있음.
- 그러나 농식품 수출은 일본, 미국 등 기존 시장에서 신규시장으로 다변화되고 있는 변곡점에 있으며 향후 수출산업으로 발전할 가능성이 높음.
- 현재 농산물 수출의 문제점은 (1) 생산단계에서의 고품질 농산물 생산 미흡 (2) 유통단계에서 수확 후 관리기술의 낙후로 인한 품질저하 (3) 영세한 수출업체 난립으로 인한 시장개척 부진 등임.
- 수확 후 관리는 수확된 농산물이 생산자의 손을 떠나 최종 소비자에게 도달할 때까지 신선도를 유지하고 부패를 방지함으로써 품질유지, 손실방지, 유통기간 연장 등을 목적으로 하는데 국내 원예작물 총생산액은 약 11조이지만 수확 후 유통 중 손실은 약 3조원으로 수확 후 관리가 매우 중요함.
- 수확 후 관리는 검사, 세척, 선별, 예냉, 저장, 운반 등의 단계로 이루어져 있는데 이 중 저장 전 처리는 품목에 따라 다르지만 큐어링, 예냉, 예조 및 병충해 방제 등이 있음.
- 특히 수확 후 병충해 방제는 농산물의 품질 유지를 위해 매우 중요한 단계로써 현재는 훈증을 하거나 화학농약을 처리하고 있음. 그러나 잔류농약 문제로 인한 유해성과 수출국의 검역 통관에 걸림돌로 작용하고 있음.
- 사과를 우리나라 주요 수출 과일 중 하나로 2010년 기준 약 1000만불 수출을 달성하고

있는데 이 중 대만에 대한 수출이 80% 이상을 차지하고 있음 (표 1).

- 그러나 대만 수출 사과와 경우 2009년 미등록 농약 검출이 3건 발생하여 사과 수출이 일시 중단되었으며 2010년 같은 문제가 8건 발생, 한국산 사과에 대한 통상검사를 전수조사로 강화되었음. 그러나 2011년에도 6건이 발생함. 이러한 일부 잔류농약 검출 사례는 우리나라 전체 사과의 신뢰성을 떨어뜨려 수출에 걸림돌로 작용함. 따라서 고품질 농산물의 수출증대 및 다양한 국가로의 수출 다변화를 위해서는 환경친화적인 잔류농약 제거 기술을 이용하여 검역 통관에 대비하는 것이 필요함.
- 바실러스는 포자를 형성하는 그람양성 세균으로써 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 등 몇몇 종은 전통식품 발효에 사용되어 먹을 수 있는 안전한 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물이며 다양한 항생제를 생산하고 있고 protease, chitinase, glucanase 등 다양한 항진균 효소를 생산하고 있음.
- 또한, 바실러스는 전세계 산업용 효소 생산의 60%를 담당하고 있는 가장 중요한 산업균주로, purine nucleotide, vitamin, poly- γ -glutamic acid, D-ribose, sweet-tasting protein, polyhydroxybutyrate, streptavidin 등 다양한 식품용, 산업용, 의약품 물질 생산균주로 활용되어져 왔음.
- 바실러스 포자는 열, 건조, 다양한 화학물질 등의 스트레스에 강한 저항성을 가지며 장기간 생존 가능하여 대부분의 농업용 미생물제제는 *Bacillus*를 기반으로 시판되고 있음.
- Laccase (benzenediol : oxygen oxidoreductase, EC. 1. 10. 3. 2)는 고등식물, 곤충, 박테리아 등에서 발견되는 multi-copper 산화효소로 목재의 주성분인 리그닌의 생분해 반응을 촉매함.
- Laccase는 폴리페놀, 메톡시기가 치환된 모노페놀, 다이아민 등을 포함하는 광범위한 방향족 화합물의 산화반응에 관여하고, 산화 환원 매개체가 존재할 경우 비페놀성 기질의 산화를 촉매하는 등 폭넓은 기질 범위를 가지는 것으로 알려져 있음 (그림 1). 이를 기반으로 Laccase가 imazalil을 포함한 다양한 화합물을 분해한다는 보고가 있음 (그림 2).
- 넓은 기질 특이성과 광범위한 반응 능력을 가진 laccase는 오염된 수질 및 토양 환경을 재생, 복원하거나 섬유산업의 탈색제, 제지 산업의 리그닌 분해, 식빵, 주스, 와인 제조 등 다양한 용도로 사용 가능함 (그림 3).

표 1 연도별 사과 생산량과 수출량 변동

구분		2000	2002	2004	2006	2008	2010	2011
생산량(천톤)		489	433	357	408	471	460	380
수출량 (톤)	대만	-	7,590 (96.9)	2,531 (95.8)	965 (95.5)	4,207 (90.1)	7,296 (86.5)	2,107 (67.3)
	싱가포르	335 (14.3)	-	-	5 (0.5)	53 (1.1)	397 (4.7)	409 (13.1)
	기타	2,005 (85.7)	246 (3.1)	110 (4.2)	41 (4.1)	409 (8.8)	744 (8.8)	616 (19.7)
	전체	2,340 (100)	7,836 (100)	2,641 (100)	1,011 (100)	4,669 (100)	8,437 (100)	3,132 (100)

* 자료 : 농업전망 2012, 한국농촌경제연구원 (사과수출연구단 재인용)

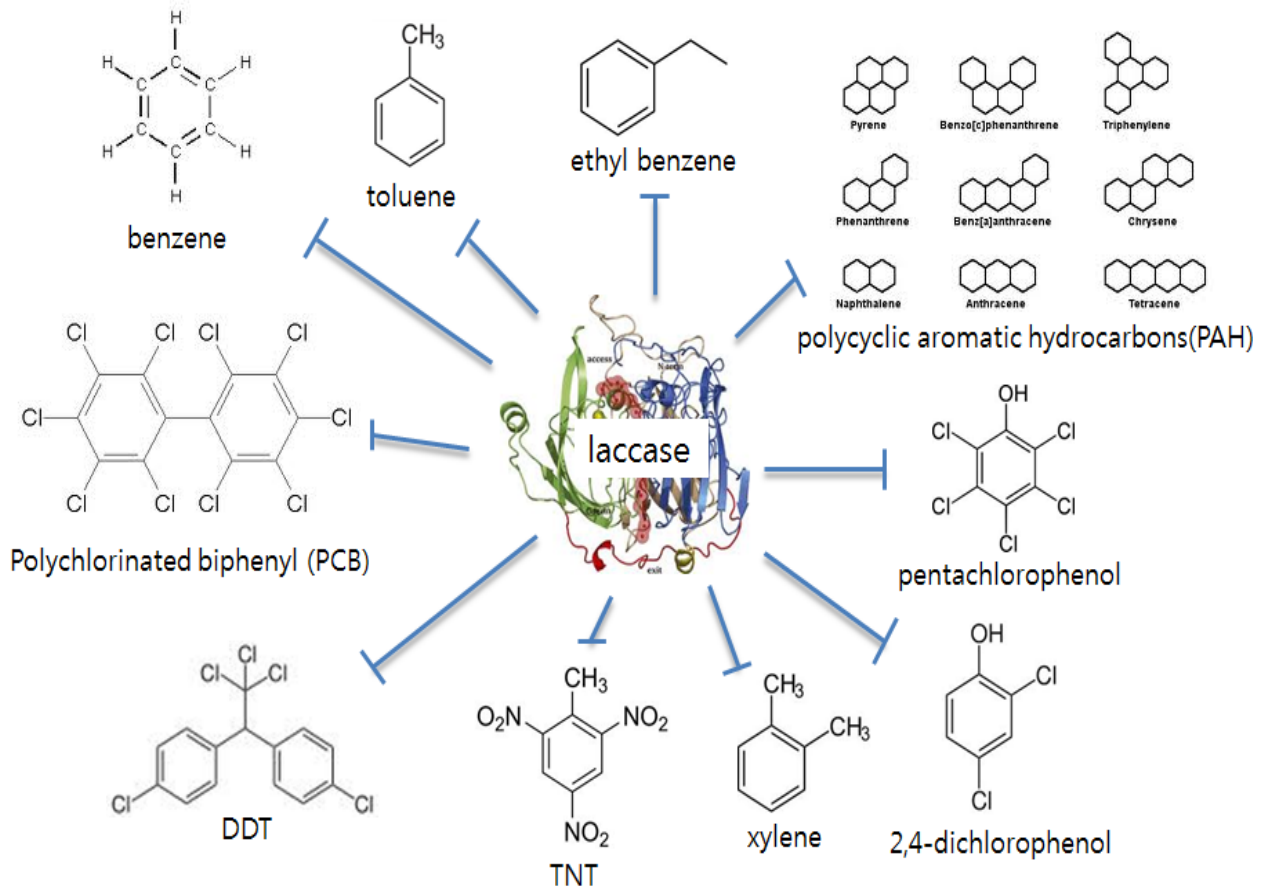


그림 1. Laccase에 의해 분해되는 화합물들.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Application of **laccase**-mediator system (LMS) for the degradation of organophosphorus compounds

Marie Trovaslet-Leroy^{a,*}, Claude Jolival^b, Marie-Thérèse Fro Bertrand Lefebvre^d, Denis Daveloose^d, Florian Nachon^a, Patri



^a Département de Toxicologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA), 24 Avenue de
^b Laboratoire Charles Friedel UMR 7223, ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France
^c Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales, 601 rue de la chimie, 38041 Grenoble Cedex 9, Fr
^d Unité de Biospectrométrie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA), 38702 La Tron

Process
Biochemistry

Process Biochemistry 42 (2007) 459–461

www.elsevier.com/locate/procbio

Short communication

Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil

Tatsuo Maruyama^{a,*}, Chiho Komatsu^a, Junji Michizoe^a, Shinji Sakai^b, Masahiro Goto^{a,*}

^a Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering and Center for Future Chemistry, Kyushu University, 744 Moto-oka, Fukuoka 812-8581, Japan

^b Department of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 20 April 2006; received in revised form 30 August 2006; accepted 11 September 2006

426

Biotechnol. Prog. 2006, 22, 426–430

Laccase-Mediated Oxidative Degradation of the Herbicide Dymron

Tatsuo Maruyama^{*,†}, Chiho Komatsu[†], Junji Michizoe[†], Hirofumi Ichinose[‡], and Masahiro Goto^{*,†,‡}

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering and Center for Future Chemistry, Kyushu University, 744 Moto-oka, Fukuoka 819-0395, Japan, and PRESTO, JST (Japan Science and Technology Corporation), 744 Moto-oka, Fukuoka 819-0395, Japan

그림 2. Laccase 효소의 농약 분해 활성 논문들

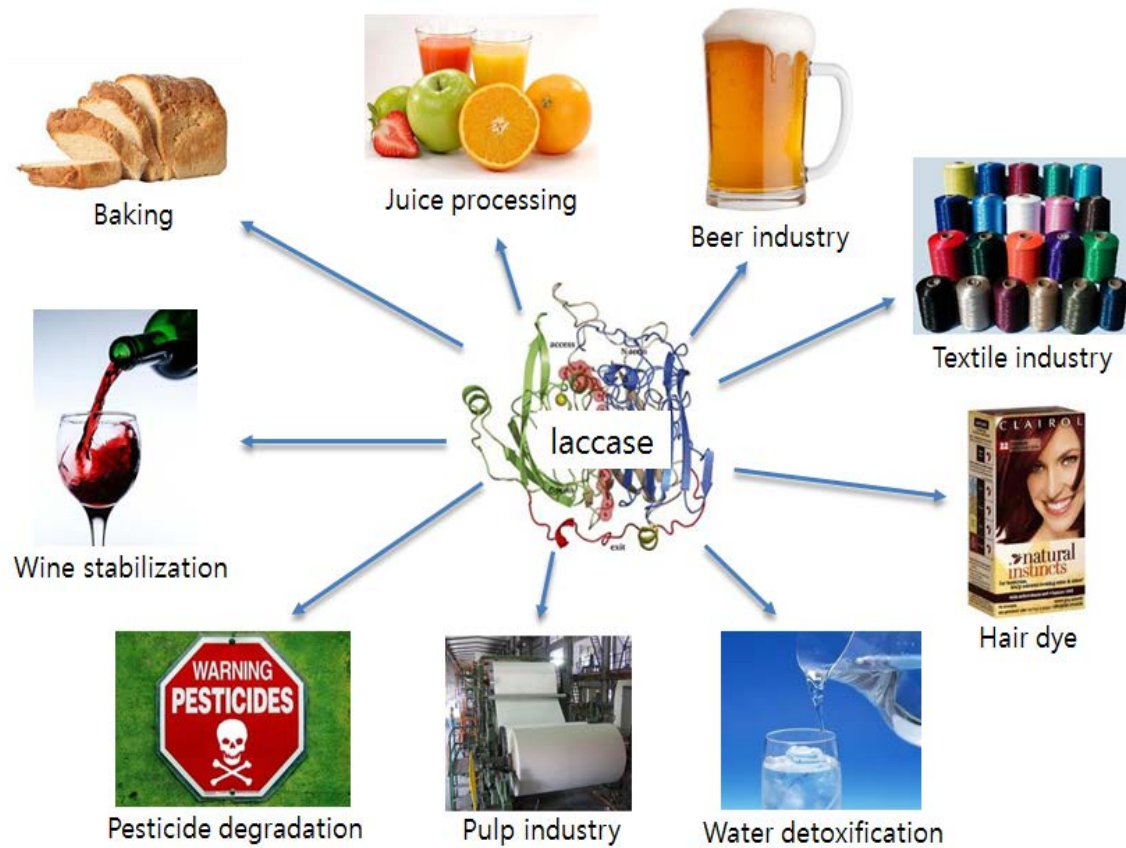


그림 3. Laccase의 응용 다양성

- 가장 많이 알려진 세균의 laccase는 바실러스 서틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래 CotA임. CotA는 포자의 외피층 (outer coat layer)의 구성성분으로 (그림 4), 포자 특유의 갈색 색소의 생합성에 관여하고, UV와 과산화수소에 대한 보호 역할을 가지며 높은 열안정성의 특성을 가진 것으로 알려짐.
- 이처럼 포자 표면에 발현되는 laccase는 고정화 되지 않은 효소형태에 비해 매우 안정해서 오랫동안 활성을 유지할 수 있고 열, 건조 등 외부 스트레스에 대해서도 매우 안정함.
- Laccase와 같이 농약 분해활성을 가진 효소를 대량생산한 후 효소제를 개발하거나 효소를 과발현시킨 바실러스 포자를 직접 수확 후 사과 잔류농약의 제거에 이용할 수 있을 것임. 효소제품 및 포자제품은 물에 의해 쉽게 씻겨 제거되므로 별도의 세척 단계 및 제거 기술은 필요하지 않을 것으로 사료됨.
- 바실러스 포자를 이용할 경우 배양액에 포함되어 있는 각종 천연 항생제와 효소의 작용에 의해 병 발생을 억제할 수 있고 포자 표면 발현 효소에 의해 잔류농약을 분해하는 효과를 기대할 수 있으며 포자의 안정성으로 인해 제품의 보관과 운반에 유리함. 또한 바실러스는 먹을 수 있는 안전한 미생물이므로 친환경기술임.
- 바실러스 포자를 사과의 잔류농약 제거에 직접 적용할 경우에는 디스플레이된 효소의 고생산을 위한 non-GMO 균주개량이 필수적임.
- 전통적인 바실러스 균주 개량은 chemical mutagen을 사용한 random mutagenesis 방법을 사용하는데 이러한 균주 개량은 대개 수년에서 수십 년이 걸리며 돌연변이가 genome 전체에 random하게 일어나므로 원하는 타겟의 생산성을 저하하는 돌연변이가 대부분이며 원하는 방향으로 돌연변이가 일어날 확률은 0.01-1% 정도로 매우 낮음.
- 유전자 재조합 기술을 이용하여 원하는 유전자를 제거하거나 염색체 내로 삽입하여 균주를 개량하는 방법도 많이 사용되어져 왔음. 이러한 방법은 positive selection을 위해 항생제 저항성 유전자를 사용하므로 개량된 균주는 GMO 문제 때문에 환경에 직접 적용하는 분야에 사용하기 어려움. 또한 항생제 저항성 유전자 수가 제한되어 있기 때문에 여러 가지 유전자를 한꺼번에 돌연변이를 일으키는 데 한계가 있음.
- 따라서 바실러스에서 효소 또는 유용 물질의 대량생산을 위한 genome engineering을 원활히 수행하기 위해서는 항생제 유전자 등 외래유전자 도입 없이 다양한 유전자를 한꺼번에 돌연변이를 일으킬 수 있는 새로운 genome engineering 기술이 필요함.

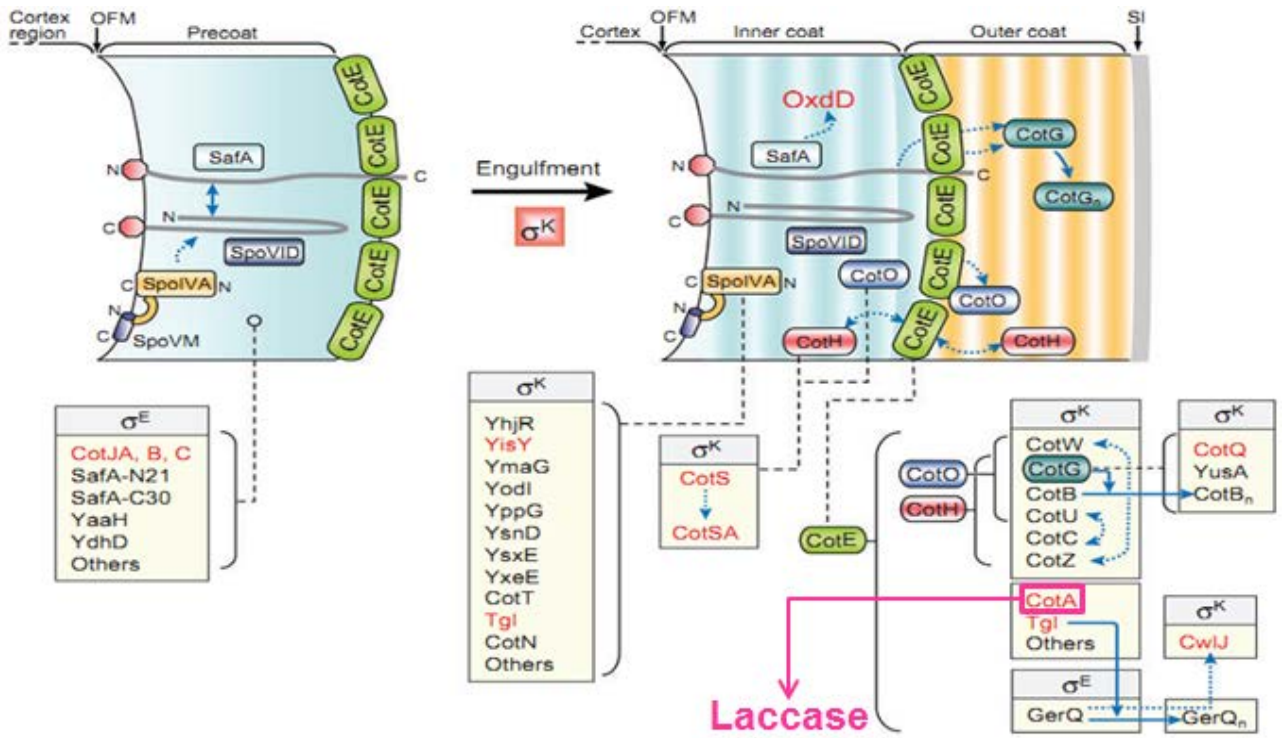


그림 4. 바실러스 서틸리스의 포자 형성에 관여하는 단백질

- non-GMO 바실러스 균주 개량기술은 바실러스를 숙주로 한 유용물질 및 효소의 대량생산에 응용할 수 있고 항생제 대체 사료첨가용 미생물 개발, 의약품 신규 항생제 개발 등 다양한 분야에 응용 가능한 파급력이 큰 기술임.
- 본 과제에서는 다양한 농약 분해효소 유전자 라이브러리를 확보하고 분자진화기술을 이용한 효소의 개량, 새로운 균주 개량기술을 이용한 농약 분해효소 고생산 non-GMO 바실러스 균주 제작, 고유의 발현시스템을 이용한 대량발현 등을 통해 수출용 사과와 잔류농약을 친환경적으로 제거하는 기술을 개발하고자 함 (그림 5).

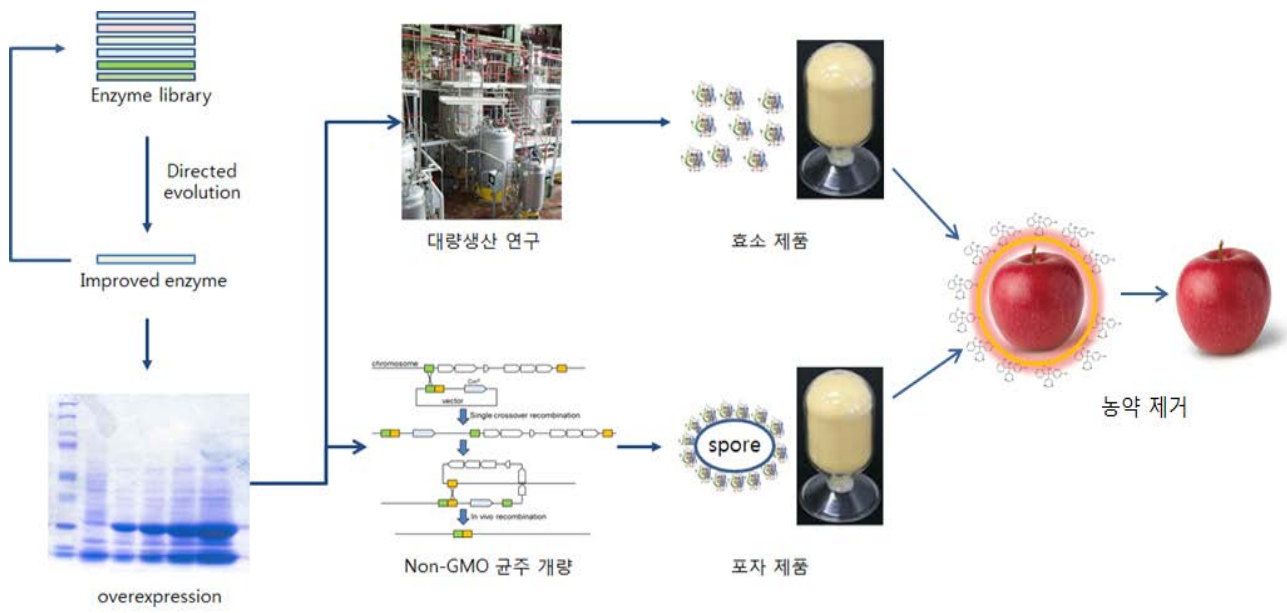


그림 5. 연구 개발 추진 전략

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1) 국내 제품 생산 및 시장 현황

- 지난 1981년 21억 달러 수준이었던 농식품 수출 규모는 1988년 서울올림픽을 맞아 32억 달러로 커졌고 2011년에는 77억 달러까지 치솟았으며 2012년 목표는 100억 달러임. 특히 2007년의 38억 달러에서 지난해 77억 달러로 4년 만에 수출 규모가 두 배나 증가했음. 네덜란드·벨기에 등 세계 10대 농식품 수출 강국의 농식품 수출 비중은 평균 10.2% 수준임에 비해 우리나라의 경우 국가 전체 수출에서 농식품이 차지하는 비중은 1.4%에 불과하고 한국산 파프리카·딸기 등의 수출이 전세계적으로 늘어나고 있는 점을 감안하면 농수산업이 새로운 수출동력산업이 될 수 있을 것임. (서울경제신문 2012.09.10.)
- 수확시점에서 외관이나 맛이 모두 우수한 농산물일지라도 저장·유통 단계에서 취급 잘못으로 신선도 저하가 심하게 되면 소비단계에서 고품질의 농산물이라고 할 수 없게 되고, 손상되기 쉬운 농산물은 수확해서 소비자에 이르기까지 품질저하나 부패로 인하여 상당량이 폐기되고 있음. 국내 원예작물 총생산액은 약 11조이지만 수확 후 유통 중 손실은 약 3조원으로 수확 후 관리가 매우 중요함.
- 수확 후 병충해 방제는 농산물의 품질 유지를 위해 매우 중요한 단계로써 현재는 훈증을 하거나 화학농약을 처리하고 있음. 그러나 잔류농약 문제로 인한 유해성과 수출국의 검역 통관에 걸림돌로 작용하고 있음. 예를 들어 우리나라 사과수출의 80% 이상을 차지하는 대만 수출 사과의 경우 2009년 미등록 농약 검출이 3건 발생하여 사과 수출이 일시 중단되었으며 2010년 같은 문제가 8건 발생, 한국산 사과에 대한 통상검사를 전수조사로 강화되었음. 그러나 2011년에도 6건이 발생함. (사과수출연구사업단, 2010) 따라서 고품질 농산물의 수출증대를 위해서는 환경친화적인 수확 후 병충해 방제기술 및 잔류농약 제거 기술이 필요함.
- 국내에서 미생물농약과 생화학농약 연구는 1980년대 태동해 1987년 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나 개발로 시작되어 본격적인 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며, 한국화학연구원과 한국생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교 등의 대학교, 동부하이텍, 그린바이오텍, 비아이지, 고려바이오 등 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해 왔음. 국내 바이오농약 시장은 2007년 약

300억 원 정도로 추산되고 있으며, 바이오농약관리법규 이외에 비료관리법과 친환경농업 육성법의 친환경 목록 공시제에 의해 제도권 내에서 만들어진 시장규모는 약 3,000억 원으로 추산되고 있음 (한국바이오협회-바이오농약 2010). 국내 친환경 자재 시장은 주로 대기업과 중소기업이 대결구도를 이루고 있으며, 이외에 다수의 군소업체들이 나름대로 지역적인 입지를 이용해 시장을 형성하고 있는데, 특히 다른 OECD국가와 마찬가지로 합성농약을 40% 줄이고자 하는 친환경농업정책의 일환으로 본격적인 상업화 연구가 진행되고 있음. 미생물제제의 경우 상당수는 친환경유기농자재의 형태로 출시되었는데 바이오농약, 토양미생물 제제, 천연물 비료 그리고 친환경 목록 공시자재 등을 통틀어 친환경 자재 시장으로 규정하고 있음. 2011년 기준 1154종의 친환경 유기농자재가 목록공시 되었는데 이 중 미생물제제는 205종임 (농업진흥청-2011 친환경 유기농자재 목록공시). 이처럼 많은 미생물제제가 출시된 이유는 진입장벽이 상대적으로 낮아서 비교적 개발이 용이하기 때문임. 그러나 대부분의 미생물 기반 제품들은 자연에서 분리한 균주를 배양하여 농작물의 생산 시 병충해 방제에 이용되고 있으며 수확 후 잔류 농약 분해를 위한 효소 또는 미생물 제제는 없음.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 생물농약의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있음. 전 세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 주요 사업으로 펼치고 있는 것으로 알려져 있음. 이들 중에서 연간 3천만불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물농약 시장의 5%), Certis USA사(미생물농약 시장의 6%), AgraQuest사(미생물농약 시장의 6%) 등이 있고, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 BioWorks사와 E-nema사가 있으며, 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciences사와 Exosect사 등이 알려져 있음 (생물농약의 연구개발 동향-바이오인, 2009년 10호). 전 세계 바이오농약 시장은 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억 달러이었으나, 2005년 전체 농약 시장의 2.5% 점유율을 보이고 있으며, 2010년에는 4.3%의 시장 점유율로 10억 7,500만 달러의 시장이 형성될 것으로 추정됨. 최근에는 OECD 국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억 달러에 달할 것으로 추정되고 있음 (한국바이오협회 보고서 2010).
- 일본의 바이오농약 개발기업으로는 가켄사(기존 의약품생산시스템 구축).아그로 가네

쇼사.SDS사 등이 있으며, 가시적인 성과들을 만들고 있음. 특히, 가켄사의 경우 기존 항생제 생산 시스템에 대한 노하우로 인하여 성공적인 바이오농약 개발 모델을 만들고 있는 것으로 알려지고 있음. 또한, 일본은 바이오농약 규정에 따라 천적곤충에 대한 등록 수가 많으며, 시장도 마찬가지로 이러한 맥락에서 증가하고 있는 것으로 알려져 있음. 중국의 경우 1996년부터 기존의 각성과 농민중심의 바이오농약 사용이 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약 산업화개발이 포함되어 있었음. 제1 생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제 산업화가 채택되었으며, 지원액은 8,760만 위안이며, 길림연변춘퇴생물제품유한공사에서 담당하여 진행해 왔음. 생물농약산업화제품(연간 생산 1,000만 위안 이상)은 2001년에 13개가 되었음. (바이오농약-한국바이오협회 2010)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 잔류농약 분해효소 Laccase 유전자 확보

가. 확보된 바실러스 균주의 계놈으로부터 Laccase 유전자 확보

- 다양한 Laccase 효소자원을 수집하기 위하여 먼저 바실러스 균주를 수집하였음. 총 126주의 바실러스 균주를 수집하였고 이들에 대해 항진균 활성 및 항세균 활성을 측정하였음. 그 결과 29종의 바실러스 균주가 곰팡이 *Rhizoctonia solani*에 대한 항진균 활성을 보였고 *Botrytis cinerea*에 활성이 있는 균주는 32종이었음. 그람양성균인 *Micrococcus luteus*에 대한 항세균 활성을 보인 균주는 20균주였음.
- 세균에서는 *Azospirillum lipoferum* 유래 laccase가 처음으로 보고되었음. 이후 *Pseudomonas syringae*, *Escherichia coli*, *Streptomyces griseus* 등 다양한 세균으로부터 laccase가 분리되었고, 그 중 가장 잘 알려진 세균 laccase는 CotA임. CotA는 *B. subtilis*의 포자 외피층을 구성하는 성분으로, multi-copper oxidase와 유사성을 나타냄. 알려진 다른 바실러스 종의 laccase 유전자 염기서열을 확보하여 비교해 본 결과 homology가 많이 다름을 알 수 있었는데, 이는 바실러스 laccase가 종마다 서로 다른 염기서열을 가진다는 것을 알 수 있음 (그림 6).
- 위의 바실러스 균주로부터 PCR을 이용하여 총 26종의 laccase 유전자를 확보하였고, 기 확보된 바실러스 발현시스템을 이용하여 바실러스 서틸리스 168 균주에서 과발현을 시도하였음. Laccase는 과발현이 매우 어렵다고 알려져 있으나, 본 연구의 바실러스 발현시스템을 통해 6종의 laccase 유전자가 과발현되었음 (그림 7).

나. Laccase 유전자의 특성 분석

- 과발현된 6종의 laccase 유전자 중, 바실러스 서틸리스 laccase에 대한 특성을 분석하였음.

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
Bsutilis : --ALEKFDALPDPDLKVVQSSKEKYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPTIEKRNENYVKWNNLFPSTHFLPIDETIHHSDSCQEBFEVKTVVHL : 106
Bamyloliqu : --ALEKFDALPDIETLQCKKSDGSIYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPTIDNKDENYIKWNNLFDKHFLLPVDTHHSESGQEBFDVKTVVHL : 106
Bcoagulans : MSPNLEKFDRLDPAEKIRVVEEGGIYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPLFDVPHGKPKRVKWNNEFLQRFHFLPMLDITILD-EMGTDFFEVRTVVHL : 107
Bclausii : --ALEKFDALPDIETLQCKKSDGSIYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPTIEMRGKPKRVKWNNEFLQRFHFLPMLDITILD-H-HVAEE-REVTVVHL : 103
Bsiamensis : --ALEKFDALPDIETLQCKKSDGSIYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPTIDNCGESIYVKWNNLFDKHFLLPVDTHHSESGQEBFDVKTVVHL : 106
Bpumilus : --NLEKFDALPDIPEVAEIVKKNPRQYYEVMNEEETHLHRDLPFRLWGYNCFPGPTIKANRNEKRVKWNNEFLQRFHFLPVDTHH-AGHDEBEVKTVVHL : 104
      m LEKF D 6P6 P YYE6 M E k6HRDL PT4LWqYlg ffgPti v 6KwMn LP HFLP6D 3I h P V4TVVHL

      *          120          *          140          *          160          *          180          *          200          *
Bsutilis : HGVVDPDSDGYPEAWFSKDFEQTGYYERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 214
Bamyloliqu : HGVVDPDSDGYPEAWFTKDFKKEICGYYERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 214
Bcoagulans : HGVVDPDSDGYPEAWFTKDFKKEICGYYERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 215
Bclausii : HGVVDPDSDGYPEAWFTKDFKKEICGYYERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 211
Bsiamensis : HGVVDPDSDGYPEAWFTKDFKKEICGYYERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 214
Bpumilus : HGVVDPDSDGYPEAWFSRDFEALCGEERREYYVYVNCYRGILWYHDHAMAATRLNVYAGLVAYIIRDFEERFLFSDIYVPLLTDRTHNDGSLFVPSAFEN : 212
      HGg T SDGYPEAWF34DF Gp F Evy YpN Qr a LWYHDHA6 TRLNVAAGL G Y6I Ek 1 LP e5d6PL66 DR3 n DGsL YP P N

      *          220          *          240          *          260          *          280          *          300          *          320
Bsutilis : --PSPS-TPNPSIVPFAFCGETILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 320
Bamyloliqu : --PSET-TPNPSIVPFFCGNTILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 320
Bcoagulans : --PGPE-TPNPSIVVFFTCDTILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 321
Bclausii : --PAPN-TPNPSIVLPPVFCGDTILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 315
Bsiamensis : --PSET-TPNPSIVVPLGNTILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 320
Bpumilus : TPEDS-TPNPSIVVPPFCGDTILVNGRWVPYLEVEPRRYRFRVINAASNRIRYVNSLNGGDFIQIGSDGGILERSVKLNSFSLAPAERMIIIDFTAVEGESTITANSA : 320
      P 1P PS6Pff G TILVNGK WPY62VEPR YRFR66NaSN R 5 L Ll f QIq3DGG1L R V 6 PAER d 66DF3 5 g I L N

      *          340          *          360          *          380          *          400          *          420          *
Bsutilis : CCGGDVDFDADANVMCFVVKPKKEDT-SRKKKYASTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 427
Bamyloliqu : CCGGDVDFDADANVMCFVVKPKKEDT-SRKKKYASTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 427
Bcoagulans : CPNADPADCT-CDVMCFVVKPKKEDT-SRKRYSSTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 427
Bclausii : --NAS-TDAA-ADVMCFVVKPKKEDT-SRKRYSSTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 418
Bsiamensis : CCGGDVDFDADANVMCFVVKPKKEDT-SRKKKYASTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 427
Bpumilus : CCGGEVDFDADANVMCFVVKPKKEDT-SRKRYSSTNENI-TSKRHHNRRLKISGATDYGREPLILNLRKLSDDPVEBAPLGLTETWSTINEMGGHPIHHLVQ : 427
      g T a16MQF V P6 g d 3 P 1 P iR Ik6 t D YGRP6L Link W DPVte P 6G tEGws N tHP6H6HL6

      *          440          *          460          *          480          *          500          *          520          *
Bsutilis : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 513
Bamyloliqu : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 512
Bcoagulans : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 522
Bclausii : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 509
Bsiamensis : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 510
Bpumilus : FRVLDLRFPDIERYNKFGDIIVYTGFAVPPPPSEGWKDTVCAHSGEVVRIATFPAPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMREMTITPHK----- : 508
      F 66DrRpFl Y G 6 ytGP pP E G5KDT6 A G26 R6 a F P5sG YVWHCHILEHEDYDMMRP 6 d

```

그림 6. 다양한 바실러스 Laccase 유전자의 염기서열 비교

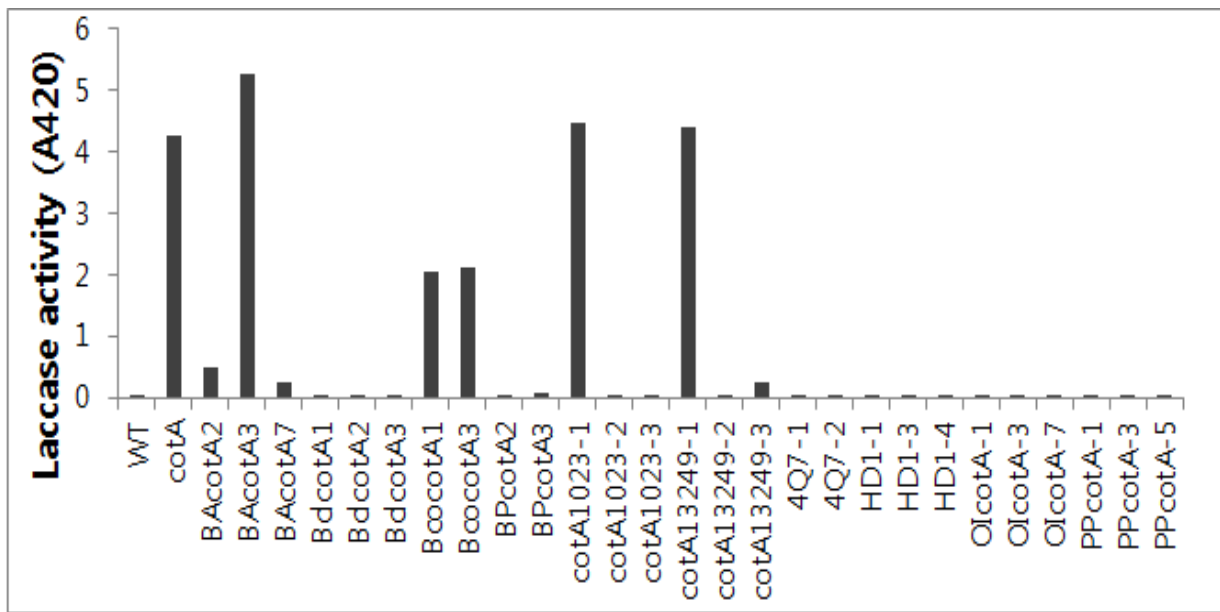


그림 7. 바실러스 서틸리스 168 균주에서 다양한 Laccase의 발현

- Laccase는 세포 내에서 발현되는 단백질이므로 발현된 단백질의 효율적인 회수를 위하여 단백질이 세포 밖으로 분비될 수 있도록 단백질 분해효소 (aprE)의 signal peptide를 붙여 발현하였음. 이들 균주를 TSB 배지 (Difco)에서 24시간 배양한 후 기질로 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 사용하여 Laccase assay를 수행하였음.
- 그 결과 세포 내에서만 laccase가 과발현됨을 확인하였음 (그림 8). Laccase가 세포 내에서 발현되는 단백질임에도 불구하고 대부분의 효소 활성이 상등액에 존재하는 것으로 보아 laccase가 세포 내에서 발현되었지만 자가분해 (autolysis)에 의해 세포 밖으로 분비된 것으로 생각됨 (그림 9).
- 바실러스 서틸리스에는 8개의 세포외 단백질 분해효소 (extracellular proteases)가 존재하여 발현된 단백질이 쉽게 분해될 수 있음.
- 과발현된 laccase가 세포 내에서 안정하게 존재하는지 알아보기 위하여 8개의 세포외 단백질 분해효소가 결핍된 WB800N 균주에서 laccase를 발현하였음. WB800N의 효소 활성과 바실러스 서틸리스 168의 효소 활성이 비슷한 것으로 보아, laccase가 세포외 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되지 않음을 알 수 있음. 또한, 과발현된 laccase를 상온에서 5일 이상 보관하여도 효소 활성이 유지되는 것을 확인하였음 (그림 10).
- 바실러스 서틸리스 1028에서도 laccase를 과발현하였고, 1028에서 발현된 laccase는 바실러스 서틸리스 168의 그것보다 약 2배정도 높은 활성을 나타냈으며, 상온에서 30일 이상 보관하여도 활성이 유지됨. Laccase를 다양한 유기용매들과 상온에서 2시간 반응시킨 뒤 효소 활성을 검정해본 결과, 에탄올, 2-propanol, 아세톤, triton X-100에 대하여 그 활성이 유지됨을 확인함(그림 11). 따라서 Laccase는 단백질 분해효소, 다양한 유기용매에 대한 안정성이 뛰어난 것으로 생각됨.
- “MoBiTec “에서 상업적으로 판매되는 발현 벡터 (pHT01)를 이용하여 laccase를 포자 표면에 발현시킨 이전 보고가 있었음 (Cho, et al. 2011).
- 상업적 발현벡터 (pHT01)를 이용하여 제작한 laccase 발현 균주와 본 연구에서 사용한 laccase 과발현 균주의 효소 발현 정도를 비교해보고자 함. 본 연구의 발현 시스템을 이용한 균주와 상업적으로 판매되는 발현 벡터를 이용한 균주를 TSB 배지에서 24시간 배양 후 효소 활성을 측정해 본 결과, 본 연구팀의 발현시스템을 이용하여 발현한 효소의 활성이 상업적으로 판매되는 벡터를 이용하여 발현한 효소의 활성보다 약 10배 이상 높게 나타남 (그림 12).

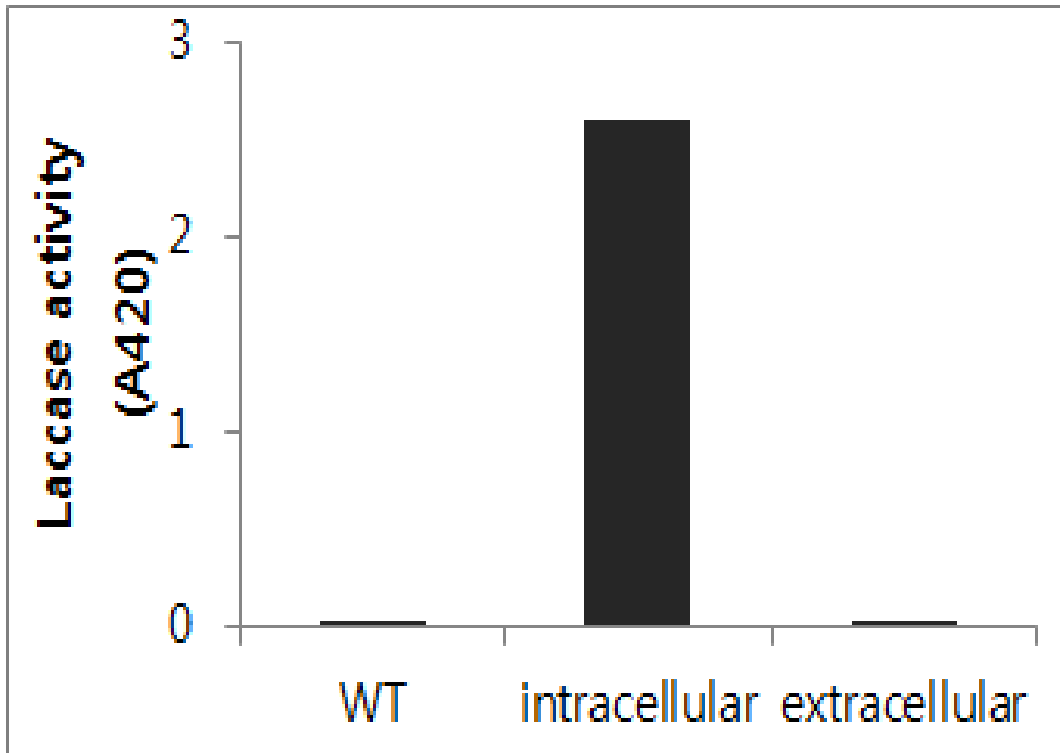


그림 8. Laccase의 세포 내 또는 세포 외 발현 비교

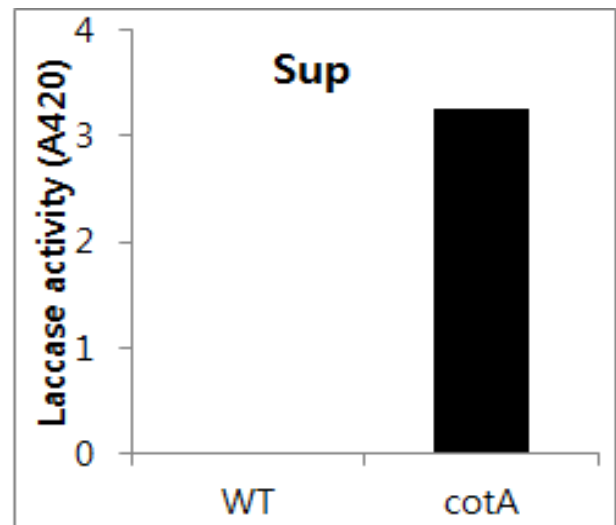
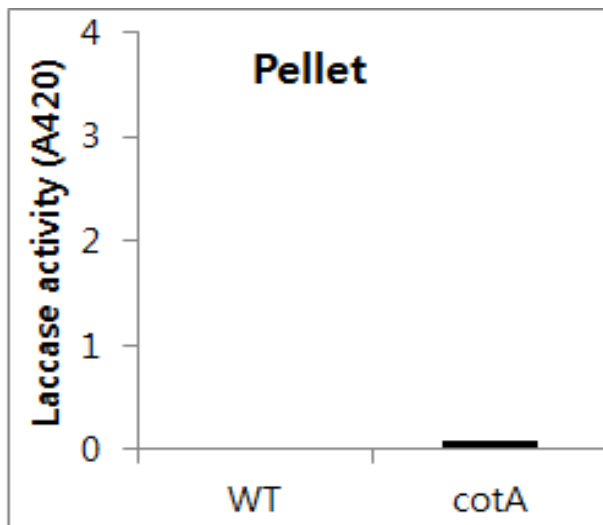
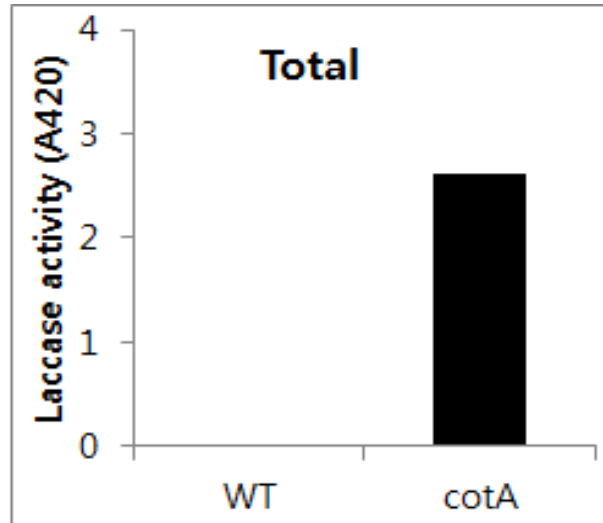


그림 9. 세포 내에서 발현된 Laccase의 활성 분포

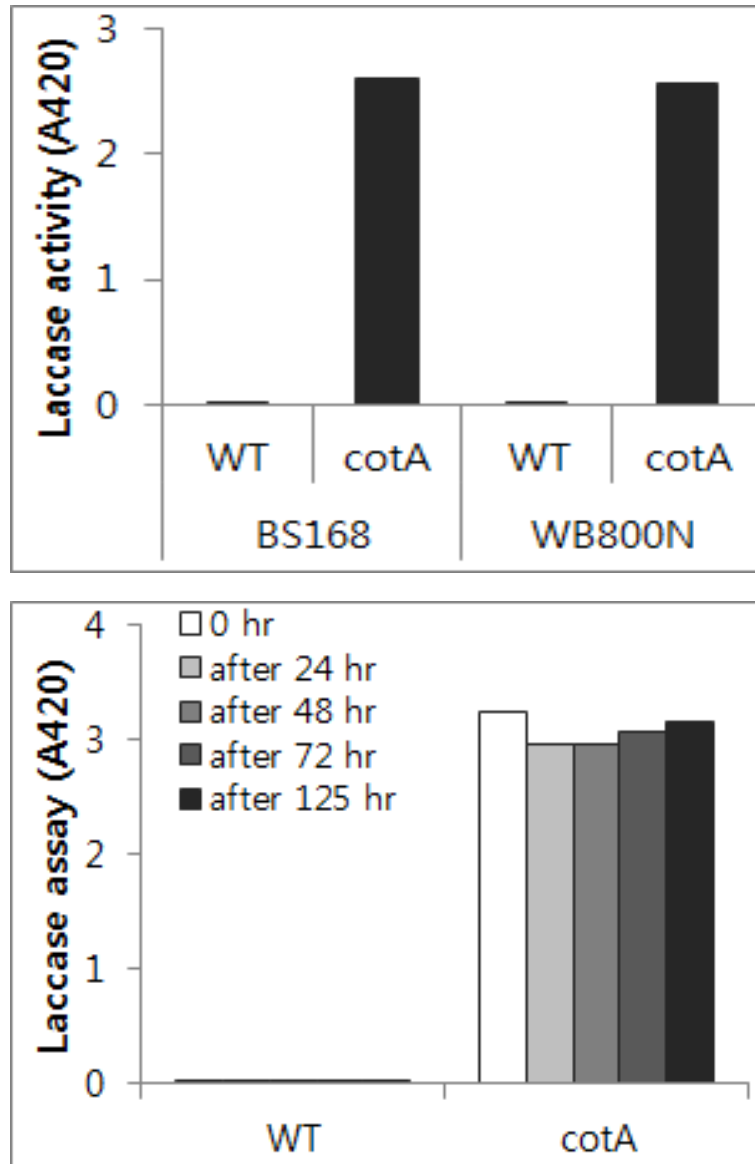


그림 10. 바실러스 서털리스 168과 8개의 세포외 단백질 분해효소가 결핍된 WB800N 균주에서의 Laccase 발현 비교 및 5일동안 상온 보관된 Laccase 활성 검정

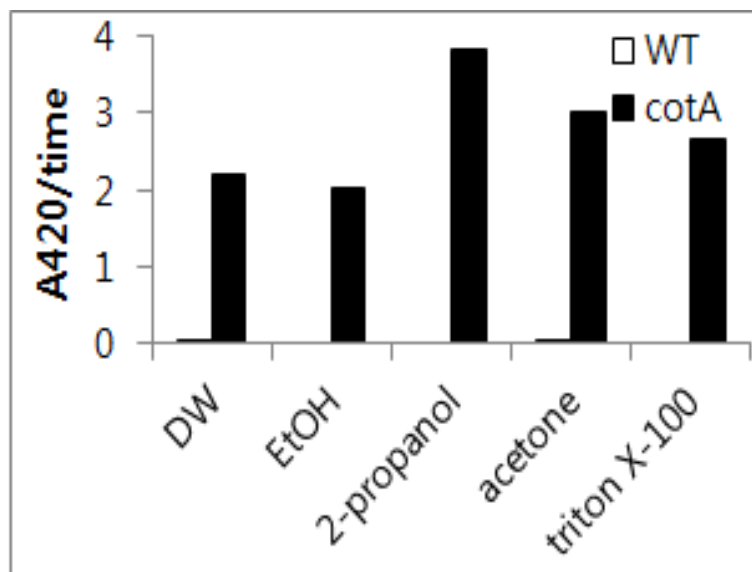
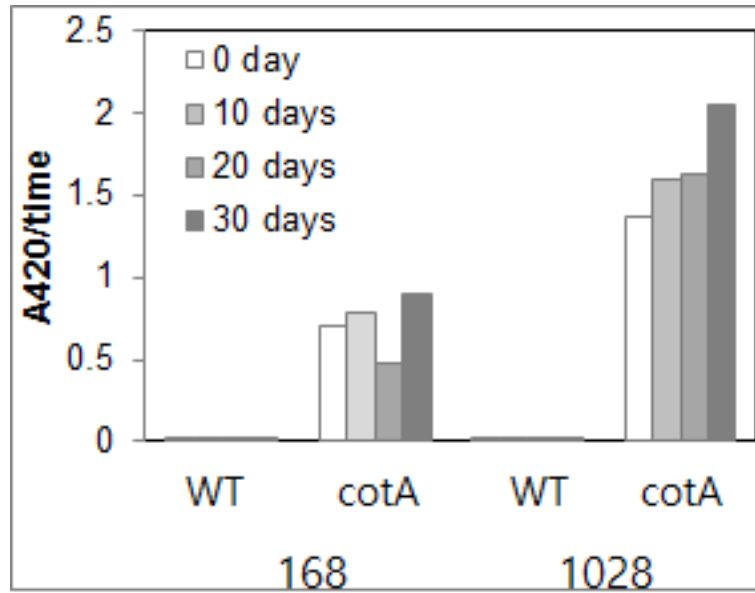


그림 11. 바실러스 서틸리스 168과 1028에서의 Laccase 발현 비교 및 다양한 유기용매에 대한 안정성 확인

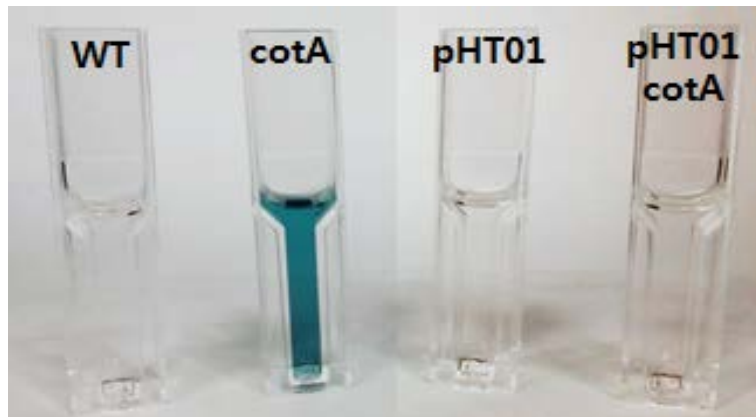
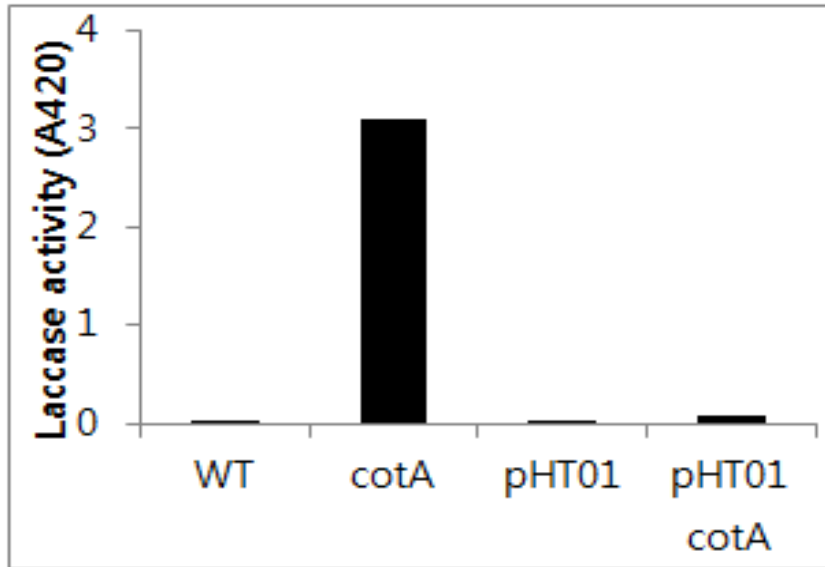


그림 12. 본 연구의 발현시스템 (cotA)과 상업적 발현시스템 (pHT01)의 Laccase 발현 비교

- 바실러스 laccase는 포자 표면 단백질이므로 과발현된 laccase가 포자 표면에 위치하는지 확인하였음. 포자형성 배지 (2X SG)에서 각 균주를 배양한 후 포자를 순수 분리하여 laccase 활성을 측정한 결과 분리한 포자 표면에서 높은 laccase 활성이 관찰되었음. 본 연구의 발현시스템과 상업적 발현시스템의 포자 표면에서의 효소 활성을 비교한 결과, 상업적 발현 시스템에 의한 포자의 효소 활성보다 본 연구의 발현시스템에 의한 포자의 효소 활성이 10배 이상 높게 나타났음. 과발현된 laccase는 120시간까지 포자 표면에서 잘 발현되며 활성이 안정하게 유지됨을 확인하였음 (그림 13).
- Laccase는 리그닌과 연계된 페놀계 및 비페놀계 화학물질을 비롯하여 살충제, 제초제, 염료 등의 환경오염물질을 분해할 수 있다는 연구가 보고되었음 (Eggert, et al. 1996). 이에 과발현된 laccase가 화학물질을 분해하는지 알아보기 위해 염색시약인 indigo carmine과 TSB에서 24시간 배양한 균주를 반응시켰음. 반응 1시간 후 과발현한 laccase가 indigo carmine을 모두 분해시킴을 확인하였음 (그림 14).

다. 유기인계화합물 가수분해효소 (Organophosphours hydroase,OPH)의 과발현

- 유기인계 농약은 광범위한 대상에 대한 강한 살충 효과로 인하여 현재 농약으로 등록된 살충제 중에서 가장 많이 사용되고 있음. 그러나 농약의 부적절한 사용은 농산물에 잔류한 농약이 동물과 인체에 축적되어 만성 혹은 급성 독성을 유발시키고, 토양, 하천 및 지하수 등의 오염을 일으키는 등 심각한 문제를 초래함. 따라서 유기인계 농약을 효과적으로 제거할 수 있는 기술의 확보가 필요함.
- 생물학적 환경정화 (bioremediation)는 미생물, 곰팡이, 식물 또는 그 효소를 이용하여 오염 물질을 제거하는 방법으로 오래 전부터 미생물을 이용한 오염정화기술을 개발하여 이용해 왔으며 다양한 분야에서 활용되고 있음.
- 최근 유기인계화합물의 분해에 효소를 이용한 생물학적 처리 방법들이 관심을 받고 있음. 그 중, 유기인계화합물 가수분해효소 (OPH)는 파라치온, 메틸 파라치온, 메타미도포스 등과 같은 농약뿐만 아니라 사린 가스 등과 같은 생화학무기용 화학물질의 해독 작용에 관여함.

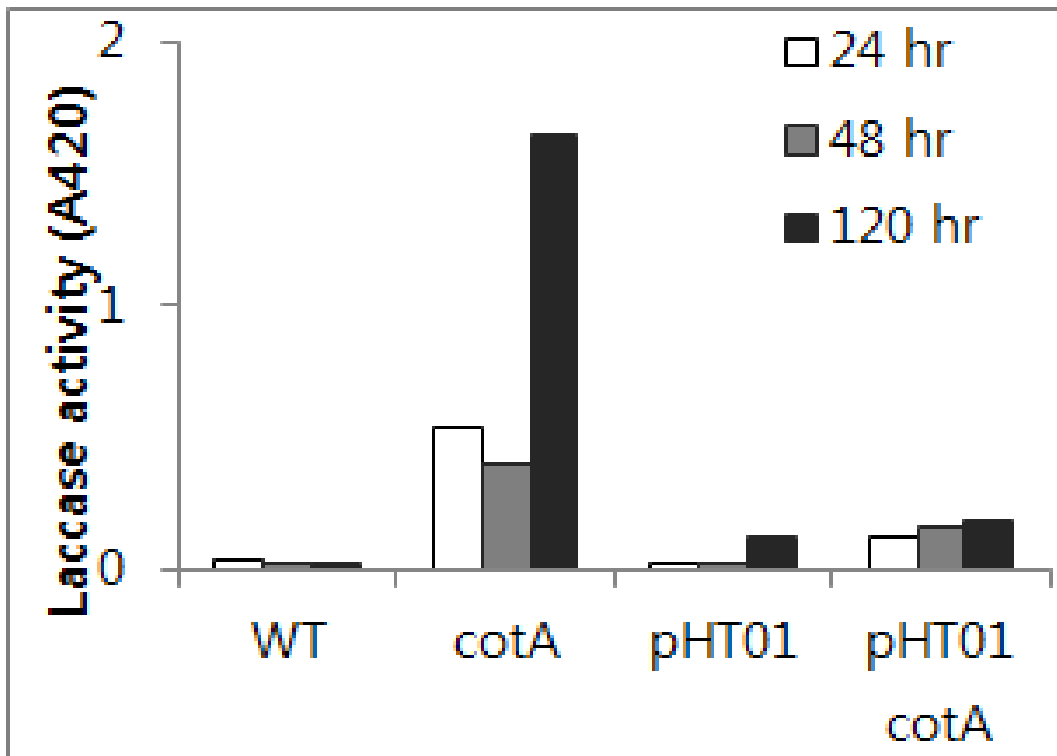


그림 13. 순수 분리된 포자 표면에서의 Laccase 활성 측정 및 상업적 발현시스템 (pHT01)과 본 발현시스템 (cotA)과의 포자표면 발현 비교

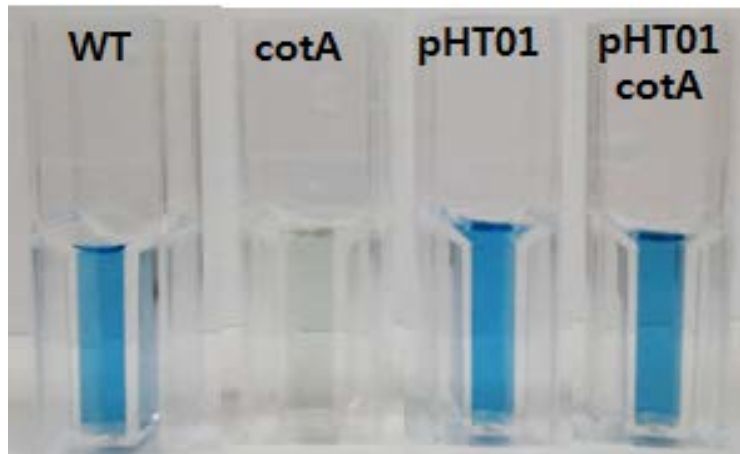
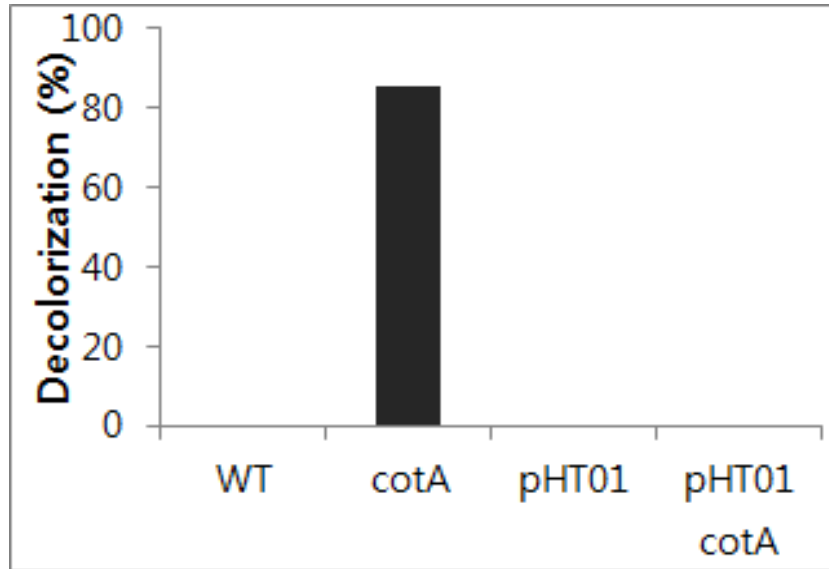


그림 14. Laccase의 indigo carmine 분해 활성

- OPH는 토양미생물인 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacterium* sp. ATCC27551에서 분리되었으며, OPH를 발현시킨 재조합 대장균을 이용하여 유기인계 화합물을 분해하고자 하였음. 그러나 대장균에서는 세포막 통과 효율이 낮기 때문에 세포 밖 농약과 세포 내 또는 periplasm으로 발현된 OPH 간의 접근이 용이하지 않아 농약을 무독화시키기 어려운 문제점이 있었음.
- 바실러스는 세포막이 없어 단백질을 쉽게 세포 밖으로 분비할 수 있는 장점이 있음. 이에 *Flavobacterium* sp.의 OPH 유전자를 화학적으로 합성하여 바실러스 서털리스 168에서 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 과발현을 시도하였음. 농약인 메틸 파라치온을 기질로 효소의 활성을 측정한 결과 OPH가 바실러스에서 과발현 되었음을 확인하였음 (그림 15).

2. 분자진화기술을 이용한 Laccase 효소 개량

- 분자진화 (Directed evolution) 기술은 목적 단백질 또는 생명체를 우리가 원하는 특성을 갖도록 초고속으로 개량하는 기술임.
- 분자진화 기술을 이용하여 laccase를 개량하였고, 이를 위해 먼저 스크리닝 시스템을 구축할 필요가 있었음.
- 스크리닝은 간편성이 매우 중요하고 고체 배지에서 활성으로 스크리닝하는 것이 바람직함. Bromophenol blue, Indigo carmine, Tannic acid, ABTS 등 다양한 laccase 기질을 사용하여 고체 배지에서 활성을 검정한 결과 0.25 mM CuCl_2 와 0.4mM의 ABTS가 들어 있는 1/3 TSA 배지가 스크리닝에 가장 적합하다는 것을 알 수 있었음 (그림 16).
- 바실러스 서털리스 laccase 유전자를 Clontech 사의 Diversify PCR mutagenesis kit를 이용하여 error prone PCR을 수행하고 본 연구의 발현시스템에 클로닝하여 대장균에 도입하였음. 이를 다시 바실러스 서털리스에 도입하여 위에서 언급된 스크리닝 배지에 도말하였음 (그림 17). 그 결과 활성이 우수해 보이는 다양한 콜로니를 확보할 수 있었음 (그림 18).

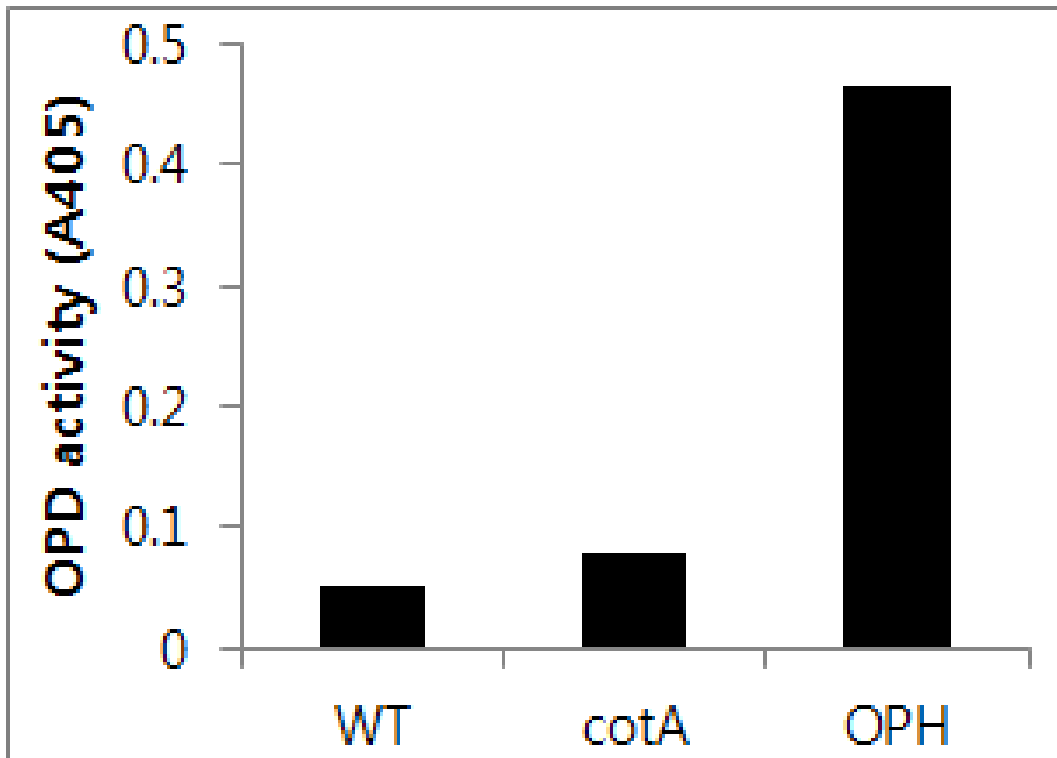


그림 15. 바실러스 서틸리스 168에서 메칠 파라치온을 대상으로 한 Laccase와 organophosphate hydrolase 효소의 활성 측정

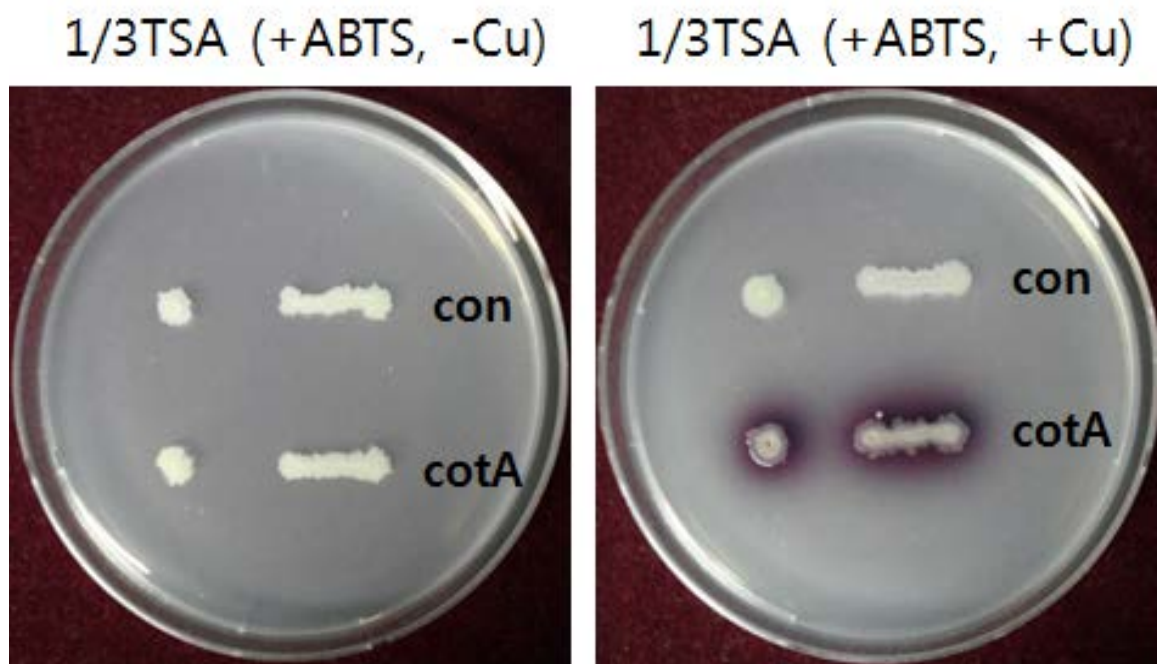


그림 16. 고체배지 상에서 Laccase 활성 측정

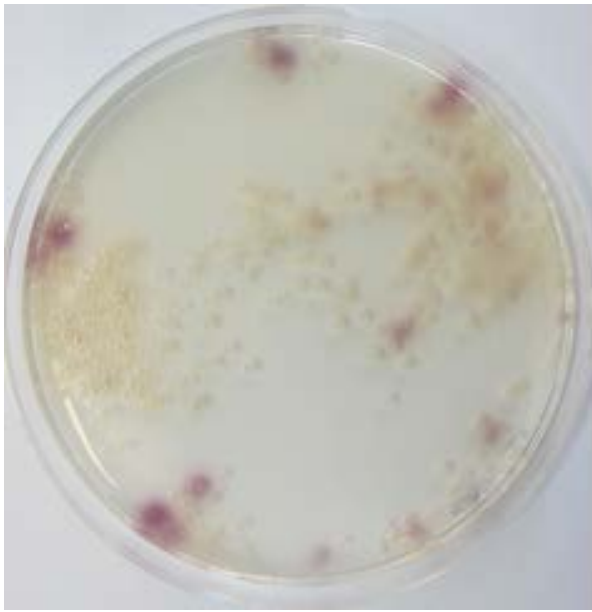


그림 17. Laccase 스크리닝 배지에 도달된 돌연변이체 라이브러리

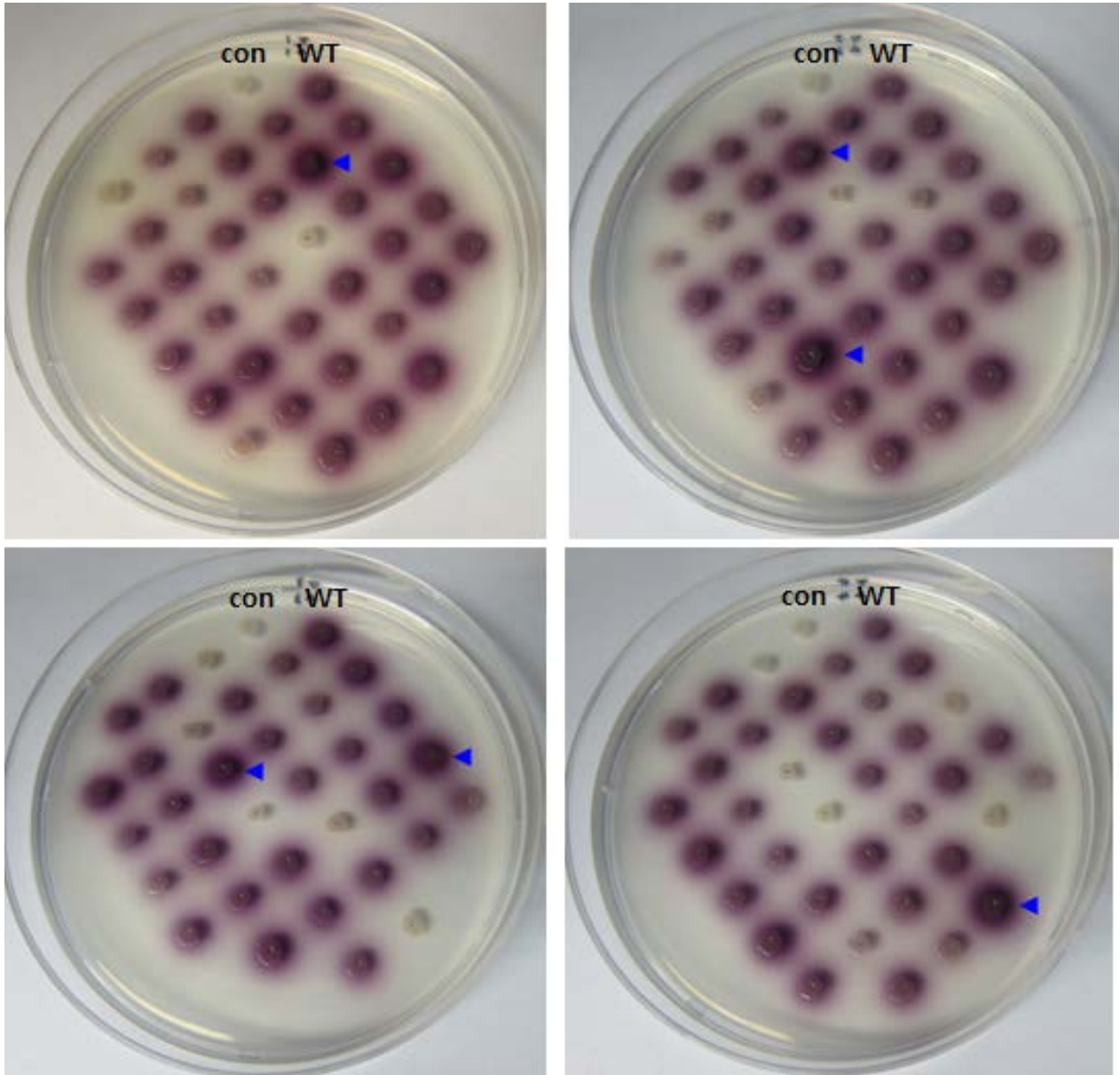


그림 18. 효소활성이 증가된 Laccase 변이체 스크리닝. con, negative control (*B. subtilis* 168); WT, wild-type Laccase 발현 균주; 화살표, 효소 활성이 증가된 변이체

- 위 스크리닝 배지에서 활성이 우수해 보이는 후보군 10개를 선별하여 laccase assay를 통해 개량 전의 효소 활성과 비교해 보았음 (그림 19). 우수 후보군의 laccase 활성은 wild type의 활성보다 약 0.5~3배 이상 높아짐. 각 후보군의 laccase 활성이 다양하게 나타나 laccase 유전자의 아미노산 서열을 확인한 결과, 각 후보군마다 서로 다른 부분에 변이가 생성됨을 확인함 (그림 20).

3. non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발

- 특정 효소가 고발현된 균주를 제작하는 방법은 random mutagenesis 또는 유전공학적 기법을 이용한 rational mutagenesis가 있음. Random mutagenesis 방법은 wild-type 균주에 UV 또는 화학 물질을 처리하여 게놈 상에서 무작위로 돌연변이를 일으키고 원하는 형질을 가진 돌연변이체를 스크리닝한 후 다시 돌연변이를 일으키는 사이클을 원하는 형질을 가진 돌연변이체가 찾아질 때까지 반복함 (그림 21). 이러한 방법으로 제작된 돌연변이체는 non-GMO로 인식되어 식품 또는 환경에 사용할 수 있음. 그러나 이러한 방법은 원하는 돌연변이가 생길 확률이 0.01% 미만으로 매우 낮고 원하지 않는 돌연변이가 게놈상에서 축적되어 세포 성장이나 포자형성에 문제가 발생할 가능성이 높음. 또한 원하는 형질을 가진 돌연변이체를 얻기까지 수년에서 수십년이 걸리며 새로운 타겟이 생기면 처음부터 사이클을 다시 반복해야 한다는 단점이 있음.
- 유전공학적 기법을 이용한 Rational mutagenesis의 경우 원하는 유전자만 선택적으로 돌연변이를 시킬 수 있지만 스크리닝을 위해 항생제 저항성 유전자를 사용하기 때문에 GMO 균주로써 환경에 직접 사용할 수 없다는 단점이 있음 (그림 22).
- 따라서 본 연구에서는 외래 유전자의 흔적을 전혀 남기지 않고 특정 유전자의 돌연변이를 유도하는 새로운 원천기술을 개발하였음.
- 먼저 바실러스에서 고효율 형질전환 기술을 개발할 필요가 있었음. 바실러스의 natural competency를 이용한 형질전환 기작에서 key regulator 역할을 하는 것이 ComK임. ComK는 ComP-ComA two component system에 의해 발현이 증가된 ComS에 의해 활성화되는데 이러한 조절기작을 인위적으로 차단하고 ComK가 활성화된 균주는 형질전환 효율이 증가함. 이러한 조작을 통하여 형질전환 효율이 획기적으로 증가된 바실러스 균주를 제작하였음 (그림 23).

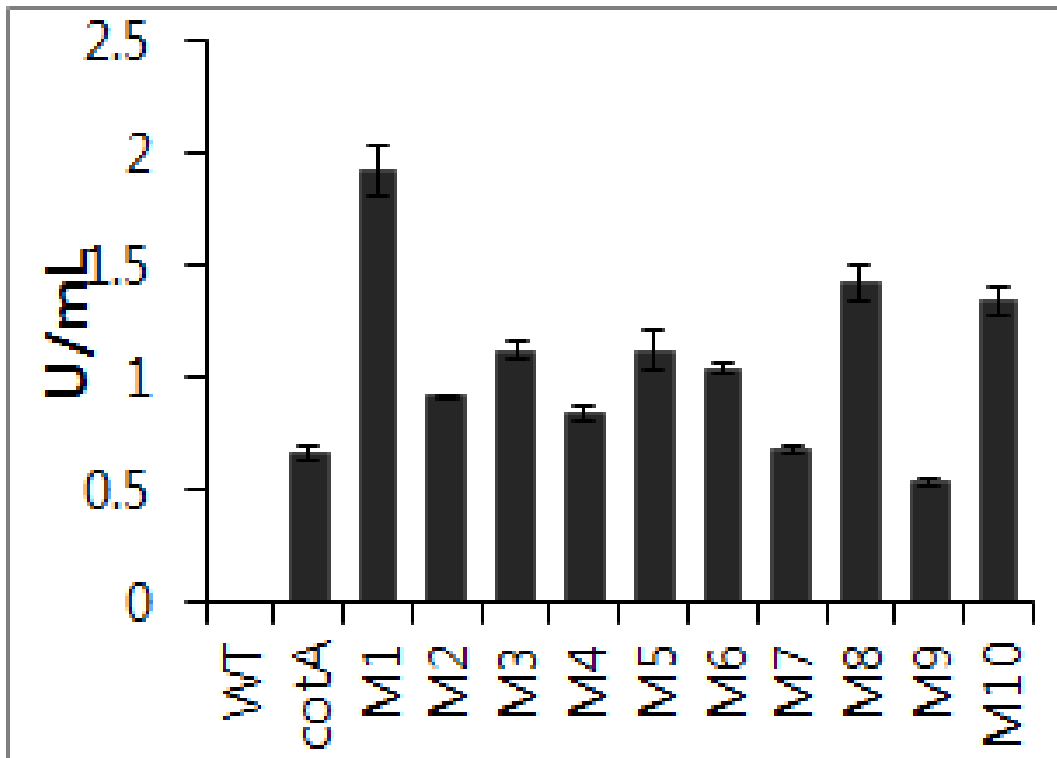


그림 19. 분자진화기술로 개량한 우수 후보군의 Laccase 활성 비교

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120      *      140      *      160      *
C : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM1 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM2 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM3 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM4 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM6 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM7 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
cotAM8 : NTLKFFVCLDIPDTLFFVCCQREKTYTYVMEKCTGCLHQLPPTRLGYNGLFPGPTIEVFNENFYVMNKLPGHFLPDIITINSGCQEEKFEVTVVHLGGVTPCCGGVPEANYRSCFQGPFFRKYVYVNCQGAILWYHCHAMALTRLNYYAGLVGAYIIG : 176
      *      180      *      200      *      220      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
C : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM1 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM2 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM3 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM4 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM6 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM7 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
cotAM8 : DKRKLKLDGCEYVPLLIITQPTIMEGGLFYSAFENRPFLLNPSIVPAFCGETILYKRWVYLEVPRKYRFFVINAERTHTNLSLNGGDFIQIGGGGLLPRVYKLSRFAFAKRYDIIIDPTAYGESIILANBAGGGGVNPTDANIMCFVYTKPLAQKRESRF : 352
      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *      480      *      500      *
C : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 515
cotAM1 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 505
cotAM2 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 506
cotAM3 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 505
cotAM4 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 506
cotAM6 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 506
cotAM7 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 506
cotAM8 : KYLAFYFVLERIQNIPDLKLAGQCEYGRVPLLNRFNHCPTETFRVGTTEINGIINPTGTFHILHLVRFVLCRPFPIARYCQSGELSTGAVYVFFPFIQKRDTCQAGEVLAIAATGDPYGRVYVNHCHLEHEDTMMHDIITCFRRRF : 506

```

그림 20. 우수 활성 후보군의 아미노산 서열 비교

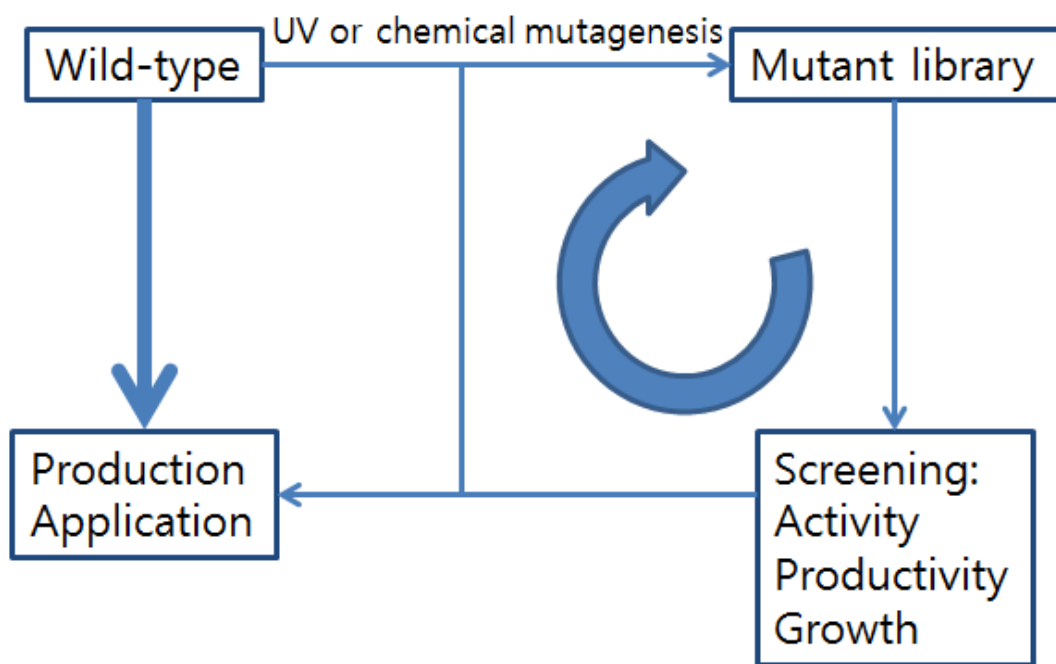


그림 21. Random mutagenesis 방법의 모식도

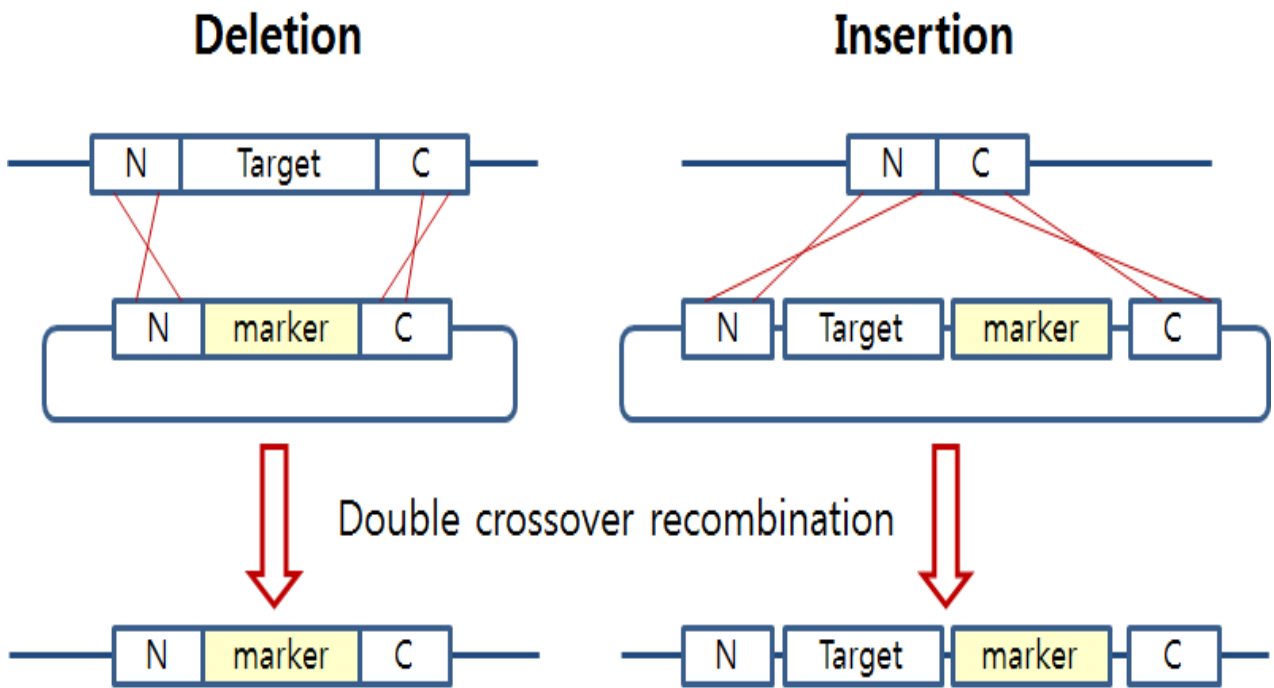


그림 22. Rational mutagenesis 방법의 모식도

B. subtilis



B. Subtilis
(Active ComK)



그림 23. ComK가 활성화된 균주의 형질전환 효율 검정

가. counter-selectable marker를 위한 합성유전자 회로 설계

- 흔적을 남기지 않는 게놈 엔지니어링 기술은 효율적인 counter-selectable marker (CSM)가 필요함. 기존에 사용되었던 CSM은 *upp* (Mol. Microbiol. 2002. 46: 25-36), *blaI* (Appl. Environ. Microbiol. 2004. 70: 7241-7250), *mazF* (Nucleic Acids Res. 2006. 34: e71), *araR* (Microbiology 2008. 154: 2562-2570) 등이 있는데 *upp*, *blaI*, *araR* 등은 게놈상에 다른 특정 mutation이 필요하기 때문에 이 방법을 사용한 돌연변이체는 여전히 GMO임. *mazF*의 경우에는 세포에 대한 독성을 가지고 있기 때문에 이를 사용하면 매우 많은 false-positive가 발생하여 원하는 돌연변이를 찾기가 매우 어려움. 따라서 본 연구에서 이들의 단점을 극복하고자 합성생물학에서 많이 사용되는 핵심 기술인 합성 유전자 회로를 사용하여 새로운 방법을 개발하였음.
- 합성 유전자 회로는 최근 유전학, 세포생물학 등의 연구에서 다양하게 사용되고 있는데 CSM을 위한 유전자 회로는 개발된 적이 없음. 본 연구에서 CSM을 위한 새로운 유전자 회로를 설계하였음. 새로 설계된 유전자 회로는 두 개의 프로모터와 두 개의 repressor 유전자로 구성되어 있음 (그림 24).
- Repressor 1은 항상 발현하고 있으며 프로모터 1에 작용하여 Repressor 2 발현을 억제함. 이는 Repressor 2의 조절을 받는 프로모터 2로부터 reporter의 발현을 유도하여 detection이 가능하게 함. 여기에 inducer 1을 넣어주면 Repressor 1의 작용을 방해하여 repressor 2의 발현을 유도함. 발현된 Repressor 2는 프로모터 2의 발현을 방해하여 reporter를 detection 할 수 없음. reporter를 detection 하기 위해서는 프로모터 1과 repressor 2가 제거되어야만 함. 따라서 이것이 CSM으로 작용할 수 있게 됨. 본 연구에서는 프로모터 1에는 xylose로 발현이 유도되는 바실러스 서틸리스 *xyIA* 프로모터 (P_{xyl})를, 프로모터 2에는 IPTG로 발현이 유도되는 *spac* 프로모터 (P_{spac})을, repressor 1에는 *xyIR* 유전자를, repressor 2에는 *lacI* 유전자를 reporter에는 클로르암페니콜 저항성 유전자 (*cat*)을 사용하였음.

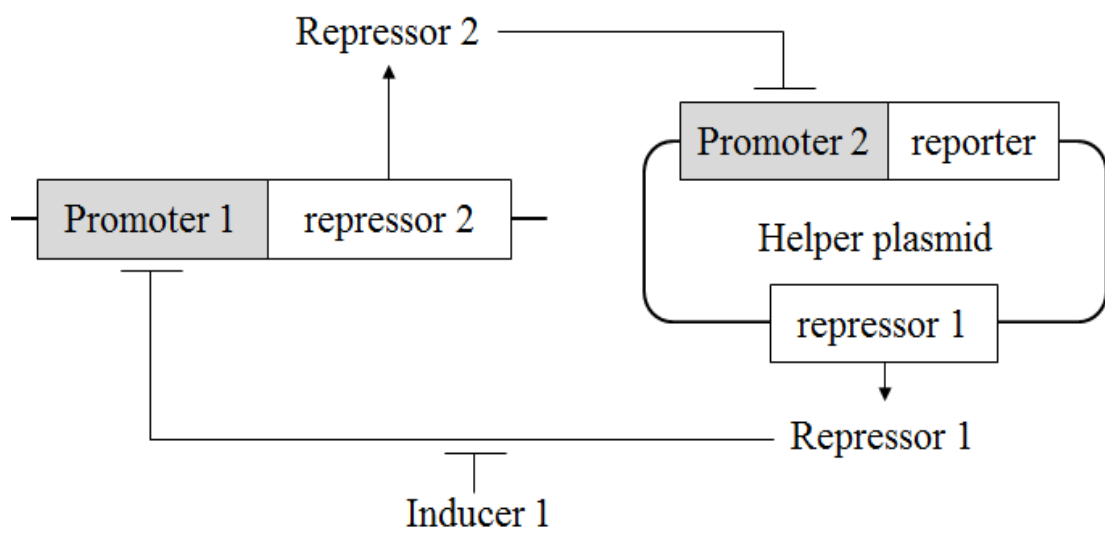


그림 24. 신규 합성 유전자 회로 모식도

나. 합성유전자 회로를 이용한 non-GMO 균주 제작

- 이렇게 제작된 유전자 합성 회로를 CSM로 사용 가능한 지 여부를 검정하였음. 바실러스 서틸리스 168 균주는 최소배지에서 자라기 위해서는 tryptophan이 필요함. 즉 tryptophan auxotroph (Trp-)임. 이는 168 균주의 *trpC* 유전자 내에 3개의 염기 (ATT)가 결실된 것이 원인임. 본 연구에서 3개의 염기를 다시 삽입하여 tryptophan의 존성을 없앤 균주 (Trp+)를 신규 합성 유전자 회로를 사용하여 제작하였음 (그림 25).
- 먼저 *Pxyl-lacI* 카세트, 네오마이신 저항성 유전자 (*neo*) 및 ATT 염기가 회복된 *trpC* 유전자 등을 포함한 integration vector를 제작하였고 이를 Trp- 균주에 도입하였음. 도입된 벡터는 single crossover가 일어나 게놈상에 삽입됨. 여기에 Pspac-cat 카세트와 *xyIR* 유전자를 가진 helper 플라스미드를 도입함. 이렇게 제작된 균주는 발현된 XylR에 의해 Pxyl에 의한 LacI의 발현이 억제되고 이는 *cat*의 발현을 유도하게 되어 클로로암페니콜이 포함된 배지에서 자라게 됨. 여기에 xylose와 클로로암페니콜을 첨가하면 xylose는 XylR을 방해하여 Pxyl로부터 LacI의 과발현을 유도함. 과발현된 LacI는 Pspac 프로모터에 작용하여 *cat*의 발현을 억제함. 따라서 클로르암페니콜에서 자라기 위해서는 in vivo recombination에 의해 Pxyl-LacI 카세트 및 *neo* 유전자가 제거되어야 함. 이러한 in vivo recombination이 일어날 때 돌연변이가 일어나는 것임. in vivo recombination이 일어날 때 wild-type이 만들어질 확률과 mutation이 생길 확률은 동일함. 돌연변이가 일어난 후 helper 플라스미드를 제거하여 바실러스 서틸리스 168 Trp+ 균주를 제작하였음. 제작된 Trp+ 균주의 *trpC* 유전자를 sequencing 한 결과 원하는 돌연변이가 일어났음을 확인하였음 (그림 26).
- 제작된 균주 Trp+는 네오마이신 배지에서 성장이 억제되는 것으로 보아 *neo*를 포함한 부위가 제거되었음을 알 수 있고 tryptophan이 포함되지 않은 최소배지에서도 잘 자라는 것으로 보아 *trpC* 유전자의 기능이 회복되었음을 알 수 있음 (그림 27).
- 합성유전자 회로를 이용한 Trp+ 균주 제작을 통해 genome 상으로 특정 염기의 삽입은 용이하게 이루어진다는 사실을 증명하였는데 다음으로는 게놈상에서 특정 염기의 제거 또는 point mutation도 용이하게 이루어진다는 사실을 증명하였음.

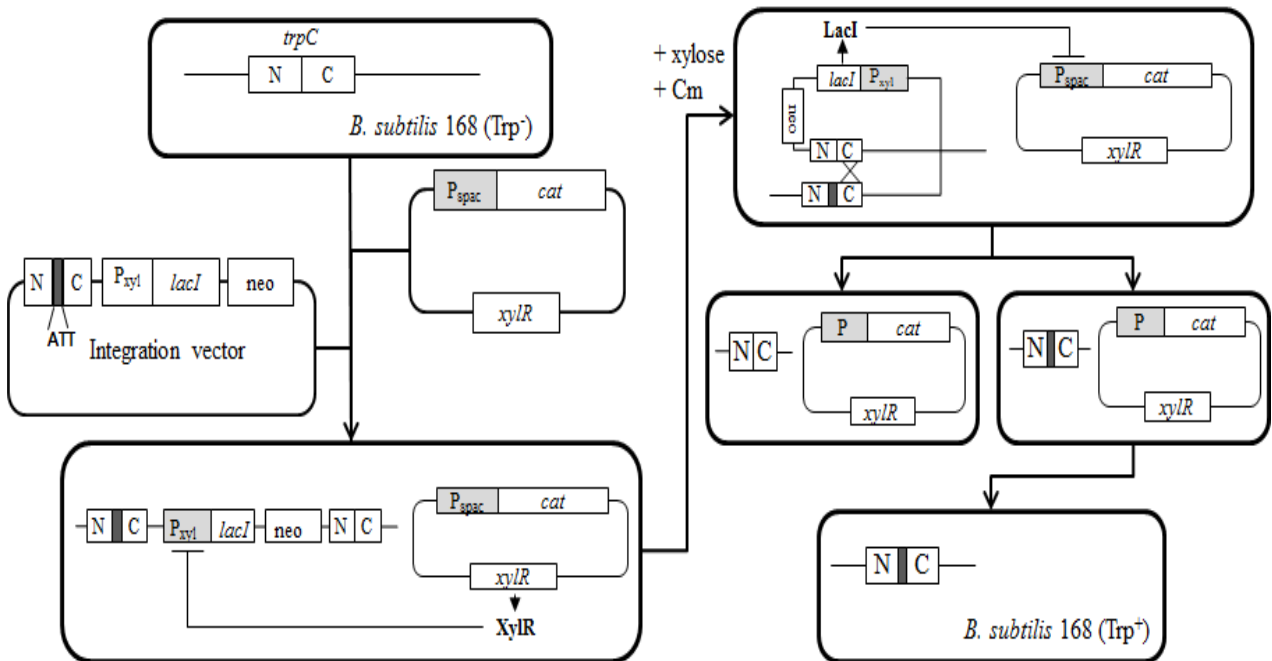


그림 25. 바실러스 서틸리스 168 Trp⁺ 균주 제작과정 모식도

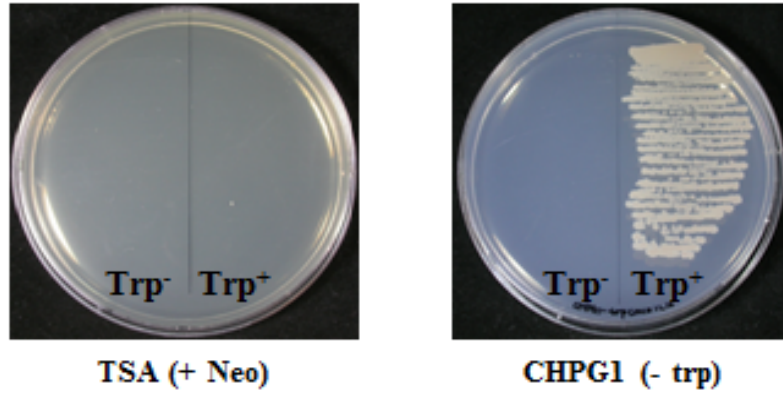
BS168 (Trp⁻) 321-agattttatt---gattctcttc-340



BS168 (Trp⁺) 321-agattttatt**att**gattctcttc-343

그림 26. 바실러스 서틸리스 168 Trp⁻와 Trp⁺ 균주의 trpC 유전자 염기서열 비교

(A)



(B)

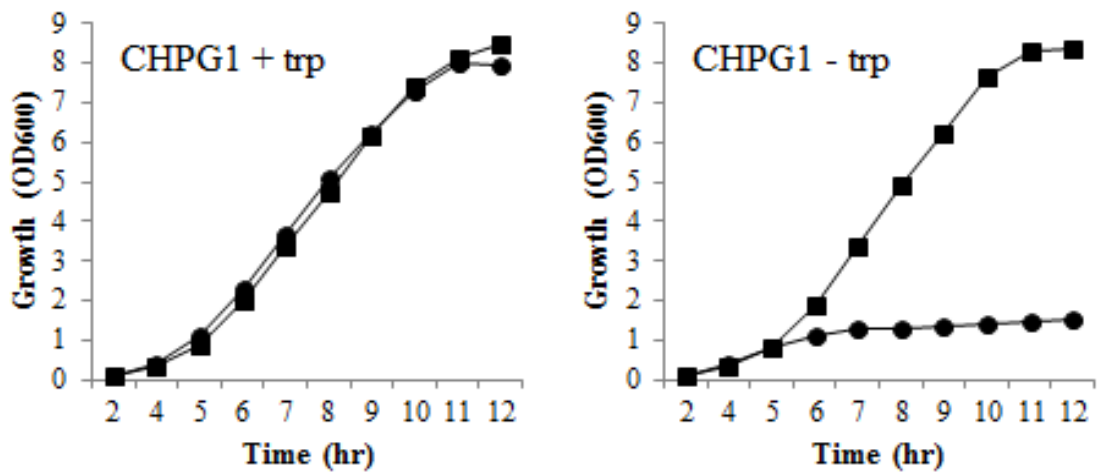


그림 27. 바실러스 서틸리스 168 Trp⁻와 Trp⁺ 균주의 고체배지 (A) 및 액체배지 (B)에서의 Growth. TSA(+Neo)는 네오마이신을 포함한 TSA 배지이며 CHPG1 (-trp)은 tryptophan을 포함하지 않은 최소배지임. (B)에서 동그라미는 Trp⁻ 균주이며 네모는 Trp⁺ 균주임.

- 먼저 deletion mutant 제작을 위해 단백질 분해효소인 *aprE* 유전자에서 두 개의 염기 (GT)가 제거된 *aprE* 유전자 (*aprE*⁻) (그림 28, A)를 포함하고 있는 상기 integration 벡터를 제작하였고 point mutant 제작을 위해서는 단백질 분해효소 *nprE* 유전자의 A가 T로 바뀌어 stop codon이 생기게 한 *nprE* 유전자 (*nprE*⁻) (그림 28, B)를 포함하고 있는 상기 integration 벡터를 제작하였음.
- 다음 상기 Trp⁺ 균주 제작과 같은 방법으로 Trp⁺ *AprE*⁻, Trp⁺ *NprE*⁻, Trp⁺ *AprE*⁻ *NprE*⁻ 균주를 제작하였음. 제작된 균주들의 단백질 분해효소 활성을 측정한 결과 wild type에 비해 mutant 모두 활성이 감소한 것으로 보아 mutant가 잘 만들어 졌음을 알 수 있음 (그림 29).
- 위의 합성유전자 회로를 이용하여 특정 염기의 삽입, 제거, point mutation이 용이하게 이루어진다는 것을 증명하였는데, 다음으로는 게놈 상에서 특정 유전자 또는 오페론의 제거도 용이하게 이루어진다는 것을 증명하였음.
- 합성유전자 회로의 광범위한 사용을 위하여 전체 유전자 또는 오페론의 deletion mutant를 만들기로 함. 먼저 유전자의 deletion mutant를 만들기 위해 탄수화물 분해효소인 *amyE* 유전자에서 대부분의 염기 (약 2 kb)가 제거된 *amyE* 유전자 (*amyE*⁻)를 포함하는 integration 벡터를 제작하였음 (그림 30). 고체 배지 상에서 요오드/녹말 반응을 통해 *amyE*⁻ mutant에서 탄수화물 분해효소의 활성이 사라짐을 확인하였고 (그림 31), 중합효소연쇄반응 (PCR)을 이용하여 *amyE* 유전자가 제거되었음을 확인하였음 (그림 32).
- 합성유전자 회로를 이용하여 위의 *amyE* 유전자보다 큰 크기의 유전자를 용이하게 제거할 수 있는지 알아보기 위하여 항진균활성을 나타내는 fengycin 생합성 관련 유전자 집단인 *pps* 오페론 (*ppsABCDE*)에서 이를 구성하고 있는 유전자 집단이 제거될 수 있도록 integration 벡터를 제작하였음 (그림 33). PCR을 통해 *pps* 오페론이 확실히 제거되었음을 확인하였고 (그림 34), 이를 통해 큰 크기의 유전자도 합성유전자 회로에 의해 용이하게 제거될 수 있음을 증명하였음.
- 따라서 본 연구에서 개발된 게놈 엔지니어링 기술은 게놈 상에서 insertion, deletion 및 point mutation 등 모든 mutation을 매우 효율적으로 제작할 수 있음을 확인하였음.

(A) BS168 AprE⁺ 243-tgaaaaagct**g**taaaagaattg-264
 ↓
 BS168 AprE⁻ 243-tgaaaaagct--aaaagaattg-262

(B) BS168 NprE⁺ 387-atctgctgcaaaaacagata-406
 ↓
 BS168 NprE⁻ 387-atctgctgcataaacagata-406
 stop

그림 28. AprE⁻ 및 NprE⁻ 유전자의 염기서열 비교

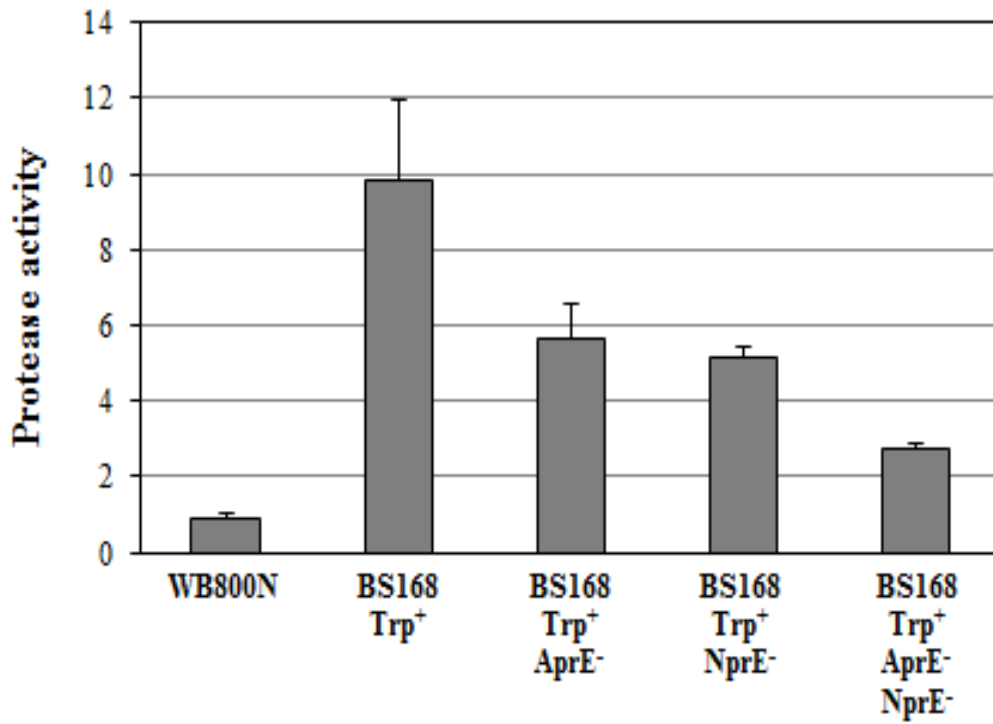


그림 29. 제작된 mutants의 단백질 분해효소 활성 검정

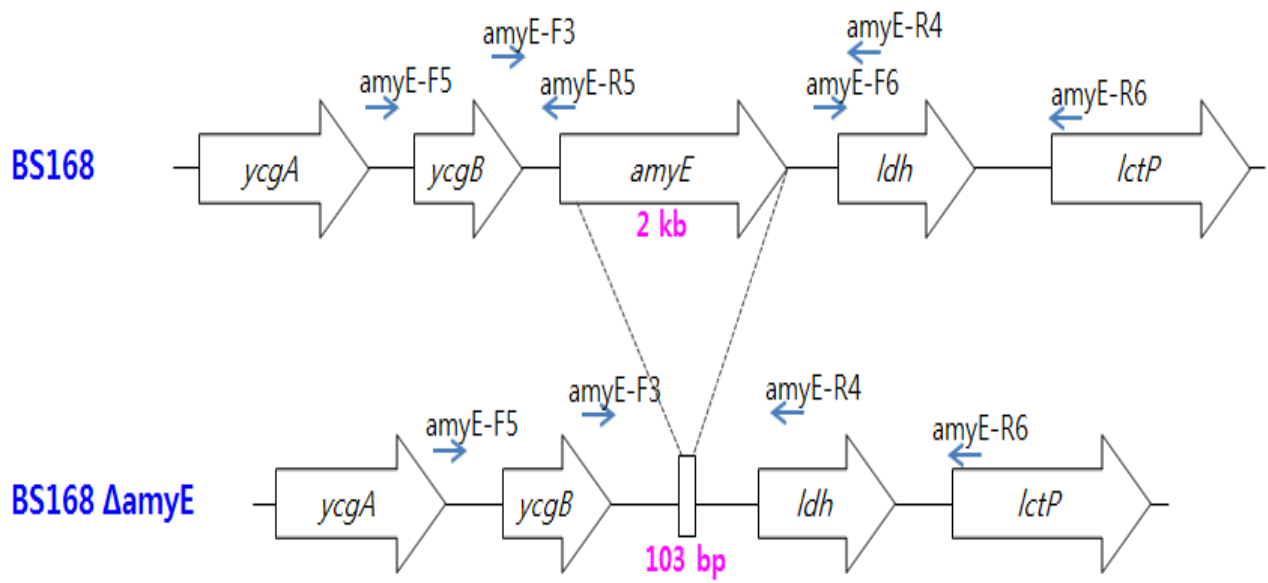


그림 30. 바실러스 서틸리스 *amyE* 유전자의 제거 과정 모식도

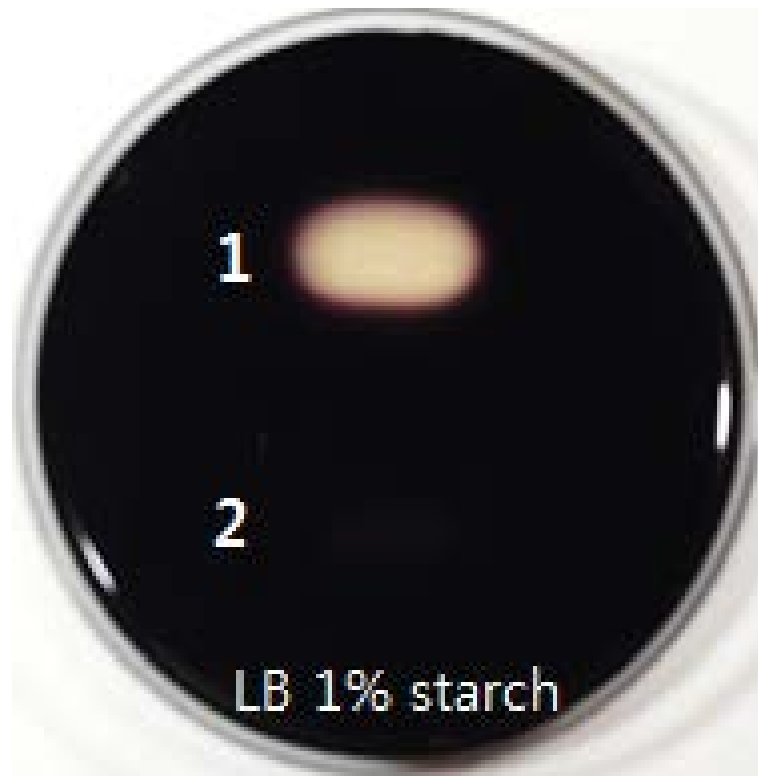
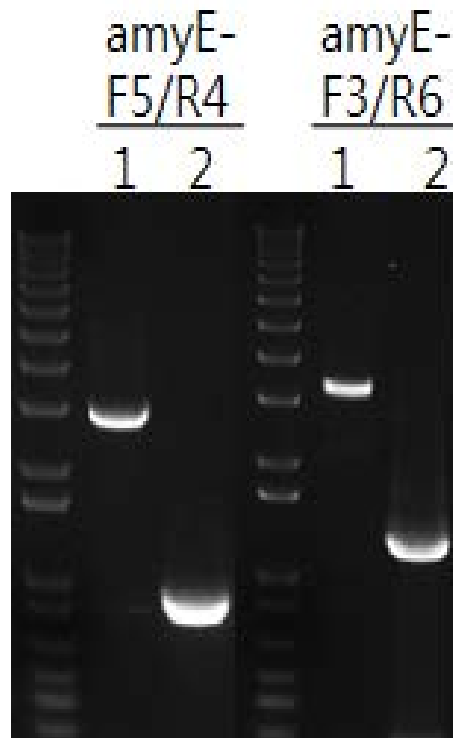


그림 31. 고체 배지 상 탄수화물 분해효소의 요오드/녹말 반응 실험.

1, negative control (*B. subtilis* 168); 2, amyE- mutant



	1 (BS168)	2 (BS168 Δ <i>amyE</i>)
amyE- F5/R4	2.7 kb	0.8 kb
amyE- F3/R6	3.1 kb	1.2 kb

그림 32. PCR을 통한 바실러스 서틸리스 168의 *amyE* 유전자 deletion 확인

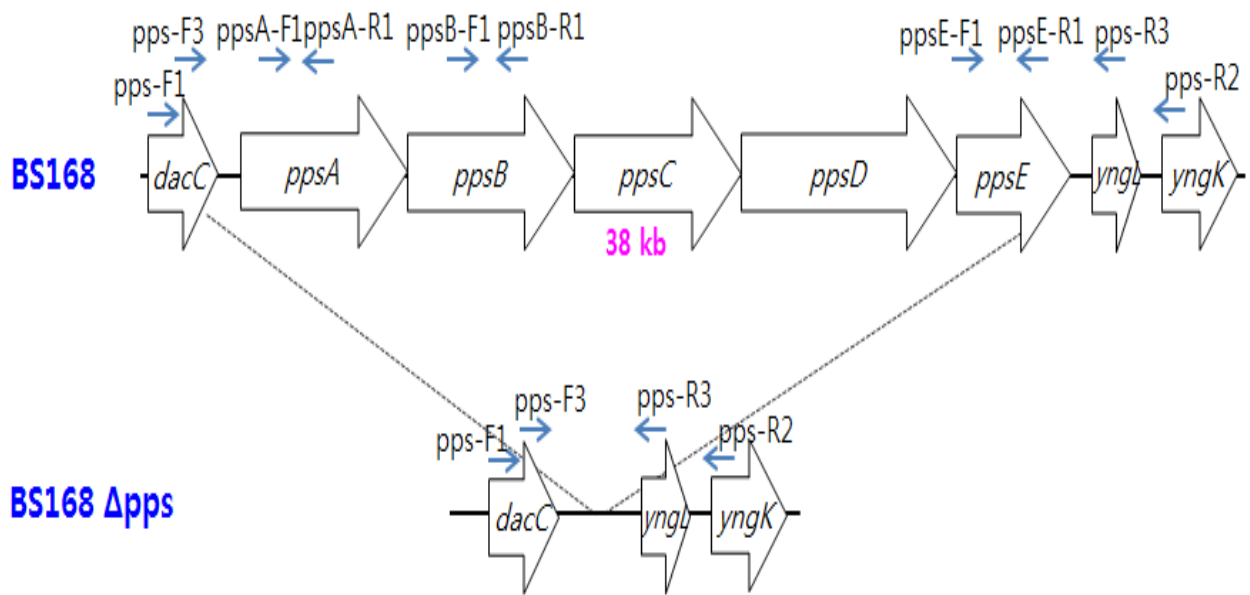
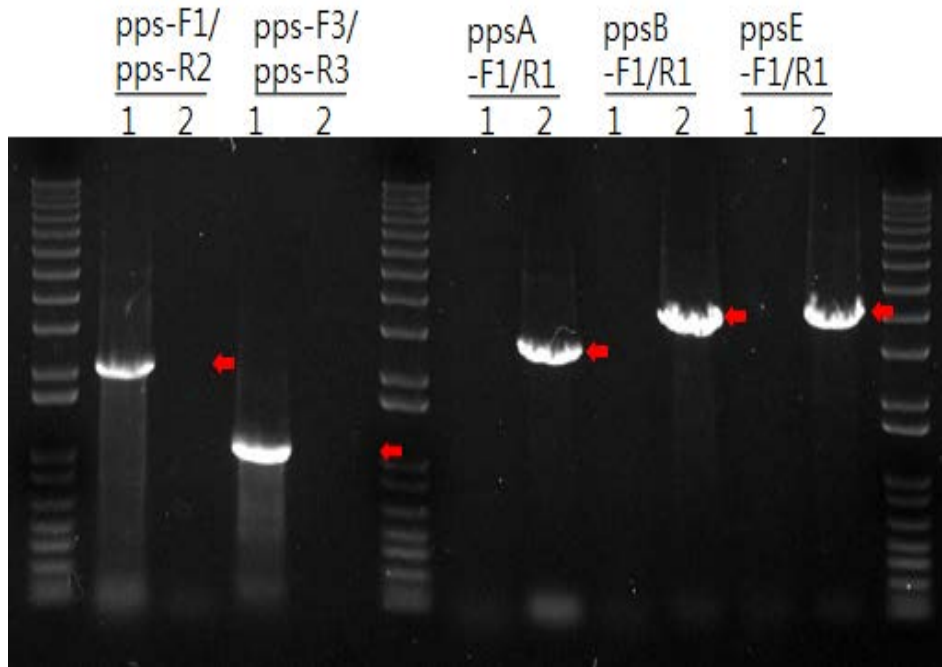


그림 33. 바실러스 서틸리스 *pps* 오페론의 제거 과정 모식도



	1 (BS168)	2 (BS168 Δpps)
pps-F1/pps-R2	39.8kb	2.0 kb
pps-F3/pps-R3	39.0 kb	1.0 kb
ppsA-F1/R1	2.6 kb	-
ppsB-F1/R1	3.3 kb	-
ppsE-F1/R1	3.7 kb	-

그림 34. PCR을 통한 바실러스 서틸러스 168의 *pps* 오페론 deletion 확인

다. Laccase 과발현 균주 제작 및 농약분해능 시험

- Laccase가 과발현된 균주를 non-GMO로 만들면 농약분해 용도로 균주 또는 포자형태의 제품을 만들 수 있을 것이라 생각됨. 바실러스 균주는 항균활성이 우수하므로 농약분해효과 뿐만 아니라 병원성 곰팡이의 발병을 억제하는 두 가지 효과를 기대할 수 있을 것임. 본 연구에서 개발된 non-GMO 균주 제작 기술을 이용하여 바실러스 laccase가 과발현된 non-GMO 균주를 제작하였음. 이를 위해 laccase를 암호화하고 있는 *cotA* 유전자 개시 코돈 바로 앞 부위에 바실러스에서 유래된 프로모터를 다른 외래 유전자의 흔적을 남기지 않고 삽입하였음. 이렇게 제작된 non-GMO Laccase 과발현 균주 (nonGMO *cotA*)와 상기 GMO Laccase 과발현 균주의 laccase 활성을 비교한 결과 non-GMO 균주 역시 laccase가 과발현되었음을 확인하였음 (그림 35). 또한 최소 배지인 CHPYG1에 구리를 첨가하고 ABTS를 기질로 하여 non-GMO Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주를 처리한 결과, non-GMO Laccase 과발현 균주에 의해 ABTS가 산화되어 배지의 색이 보라색으로 바뀌는 것을 확인하였음 (그림 36).
- non-GMO Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주가 농약을 분해할 수 있는지 알아보기 위해 다양한 살충제의 전구체로 사용되며, 살충제인 카바릴과 나프탈렌의 대사산물인 1-naphthol을 이용하였음. 1-naphthol이 분해되면 검은색을 나타냄. 1-naphthol이 첨가된 최소 배지인 CHPYG1에서 각 균주를 키워 콜로니의 색 변화를 살펴본 결과, non-GMO Laccase 과발현 균주와 laccase, OPH를 함께 과발현한 균주가 검은색 콜로니를 나타냄 (그림 37). Laccase, OPH를 함께 과발현한 균주가 non-GMO Laccase 과발현 균주보다 진한 검은색을 나타내는 것으로 보아 두 효소가 농약 분해에 시너지 효과가 있는 것으로 생각됨.
- 제작된 non-GMO Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주에 대해 농약분해능을 조사하였음. 이를 위해 최소 배지인 CHPYG1에 organophosphate insecticide인 chlorpyrifos를 첨가하여 clear zone을 관찰하였음. 그 결과 OPH 과발현 균주와 laccase, OPH를 함께 과발현한 균주에서 clear zone이 나타남 (그림 38). 그리고 laccase, OPH를 함께 과발현한 균주가 OPH 과발현 균주보다 약 1.5배정도 높은 activity를 나타냄. 이는 laccase와 OPH가 농약 분해에 있어 시너지 효과를 나타내는 것으로 여겨짐.

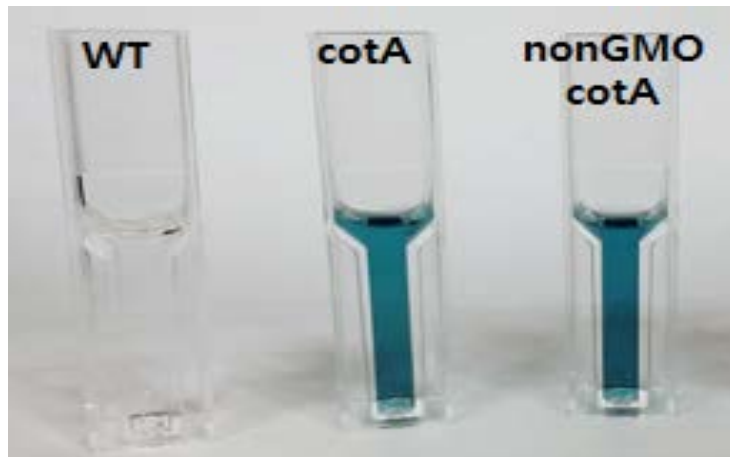
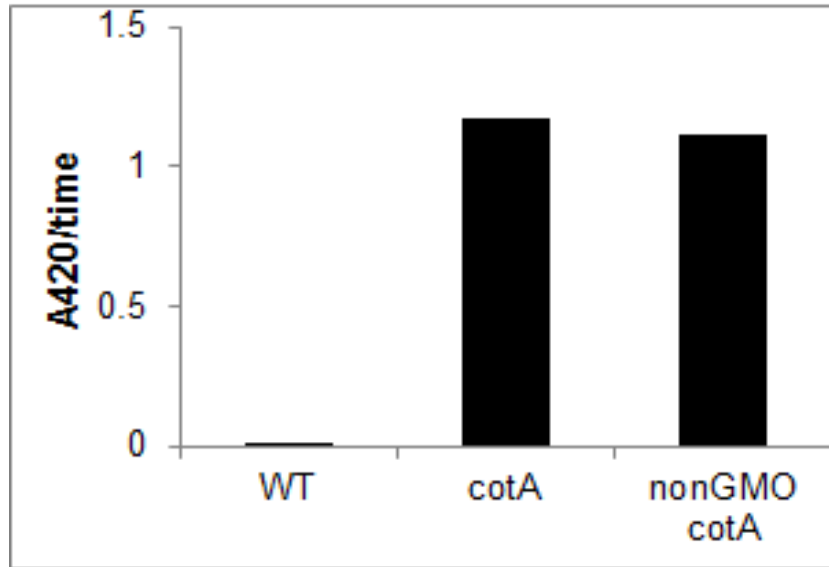


그림 35. non-GMO Laccase 과발현 균주와 Laccase 과발현 균주 (*cotA*)의 Laccase 활성 비교

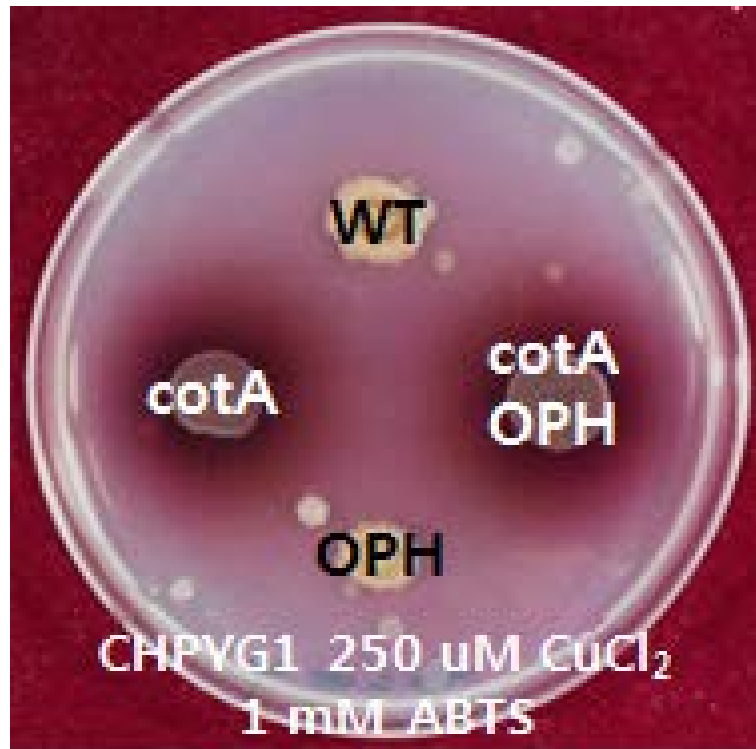


그림 36. 고체 배지 상에서의 non-GMO Laccase 활성 측정

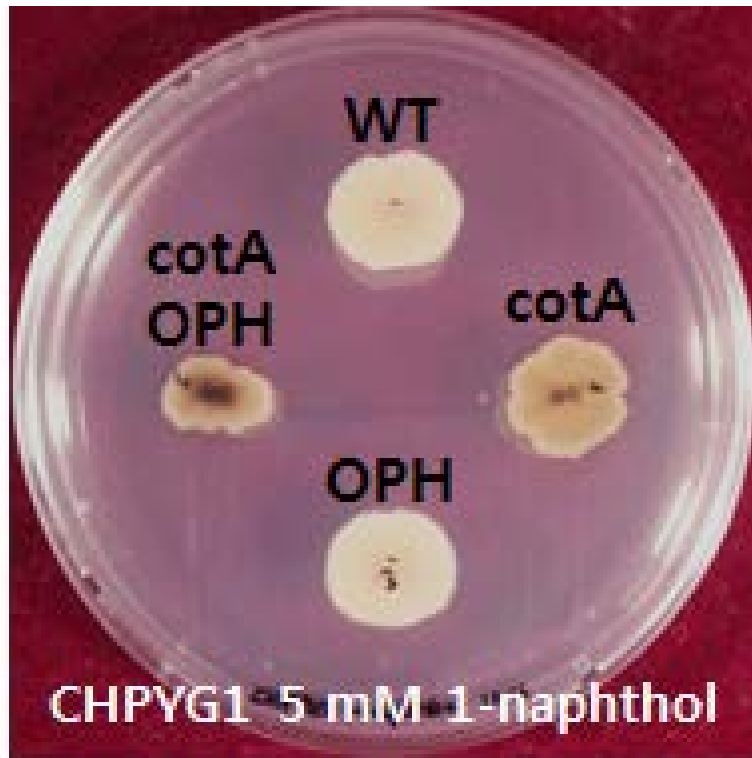


그림 37. Laccase 및 OPH의 1-naphthol 분해능 확인

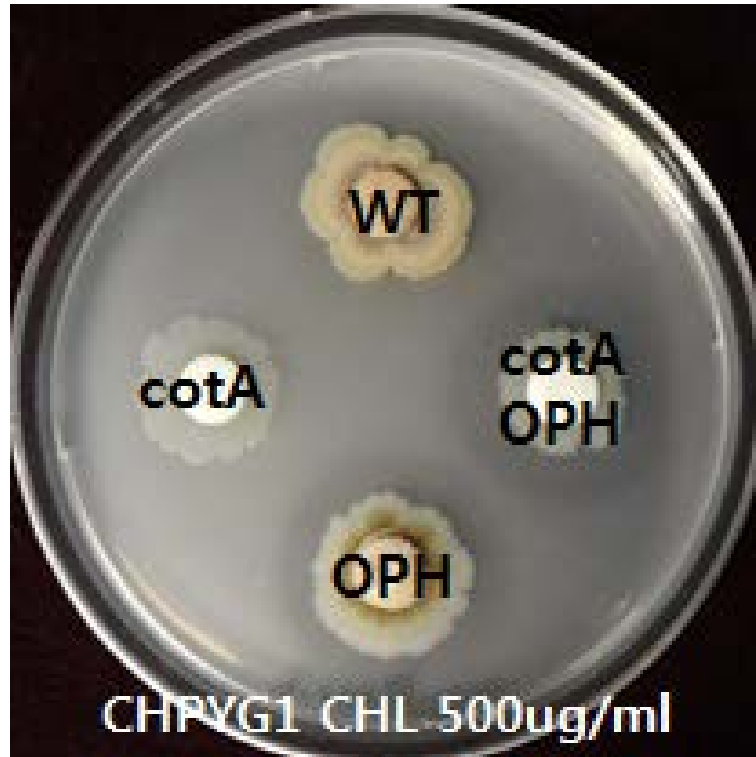


그림 38. Laccase 및 OPH의 organophosphate insecticide인 chlorpyrifosdp 대한 농약 분해능 plate assay

4. 단백질 대량 생산을 위한 바실러스 발현시스템 개발

가. 프로모터 변이체를 이용한 단백질 생산 방법

- 바실러스는 산업적으로 유용한 단백질을 생산하는 주요 숙주로 사용되어짐. 그러나 대장균과 비교하여 바실러스에는 강력하며 조절 가능한 프로모터가 없고, 많은 단백질 분해효소의 존재로 인하여 발현된 단백질의 안정성에 문제가 있으며, 발현된 단백질의 세포외 분비 시 세포막에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해가 일어나는 단점이 있어, 바실러스에서 생산된 단백질 의약품이 시장진입에 성공한 예가 없음.
- 위의 문제점을 해결하기 위하여 *Bacillus thuringiensis cry* 프로모터의 상위 부위에 *B. subtilis* 유래의 *aprE* 프로모터 또는 *rapA* 프로모터를 포함하는 프로모터 변이체 및 이를 이용한 목적 단백질의 대량 생산 방법을 개발하였음 (그림 39).
- 단백질 분해효소인 AprE를 리포터 단백질로 사용하여 각 프로모터 변이체의 하위에 위치시키고, AprE의 발현량을 확인하여 프로모터 변이체가 하위 목적 유전자의 발현을 증진시키는지 알아보았음. 각 프로모터 변이체들은 모두 개량된 *cry* 프로모터 P84에 비해 유전자 발현량이 2배 이상 증진함을 확인하였음. 또한, AprE의 발현 정도를 단백질 전기영동으로 재확인함 (그림 40).
- 목적 유전자의 발현 증진을 위하여 위의 변이체와는 별개인 또다른 프로모터 변이체를 개발하였음. *Bt cry* 프로모터의 상위 영역에 뉴클레오타이드 아데닌 (A)과 티민 (T)이 풍부한 UP 엘리먼트를 첨가하여 하위 유전자의 발현을 증가시키는 프로모터 변이체를 제작하고, GFP (Green Fluorescence Protein)를 리포터 단백질로 사용하여 발현량이 증가된 프로모터를 스크리닝함 (그림 41).
- 위처럼 확보된 프로모터 PuryC는 대장균 (*Escherichia coli*)과 바실러스 서틸리스 168에 도입한 후, LB 고체 배지에서 강한 형광을 보이는 콜로니를 선발하였음 (그림 42). 선발된 콜로니들을 LB 배지에서 24시간 배양한 후 GFP의 발현량을 측정하여 활성이 우수한 7개 프로모터 변이체를 선발하였고, 선발된 프로모터들은 기존 개량된 *cry* 프로모터인 P84보다 GFP 활성이 20~30배 이상 증가된 것을 확인함 (그림 43).

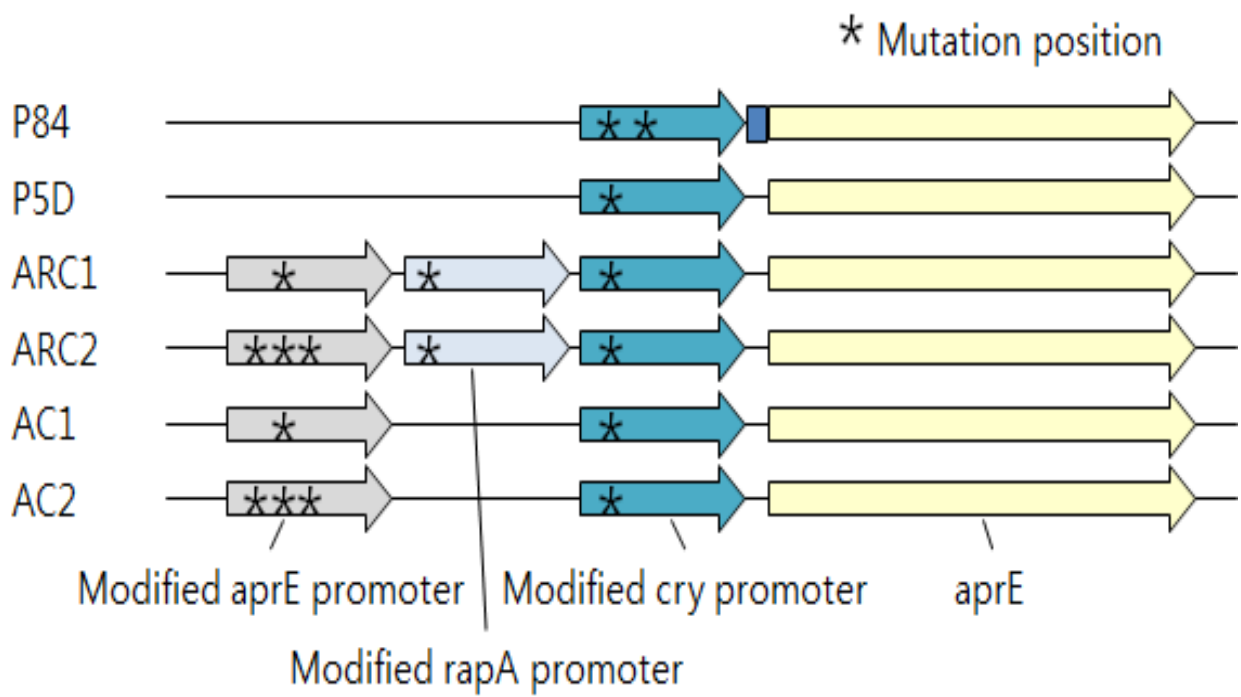


그림 39. 프로모터 변이체를 포함하는 벡터의 모식도

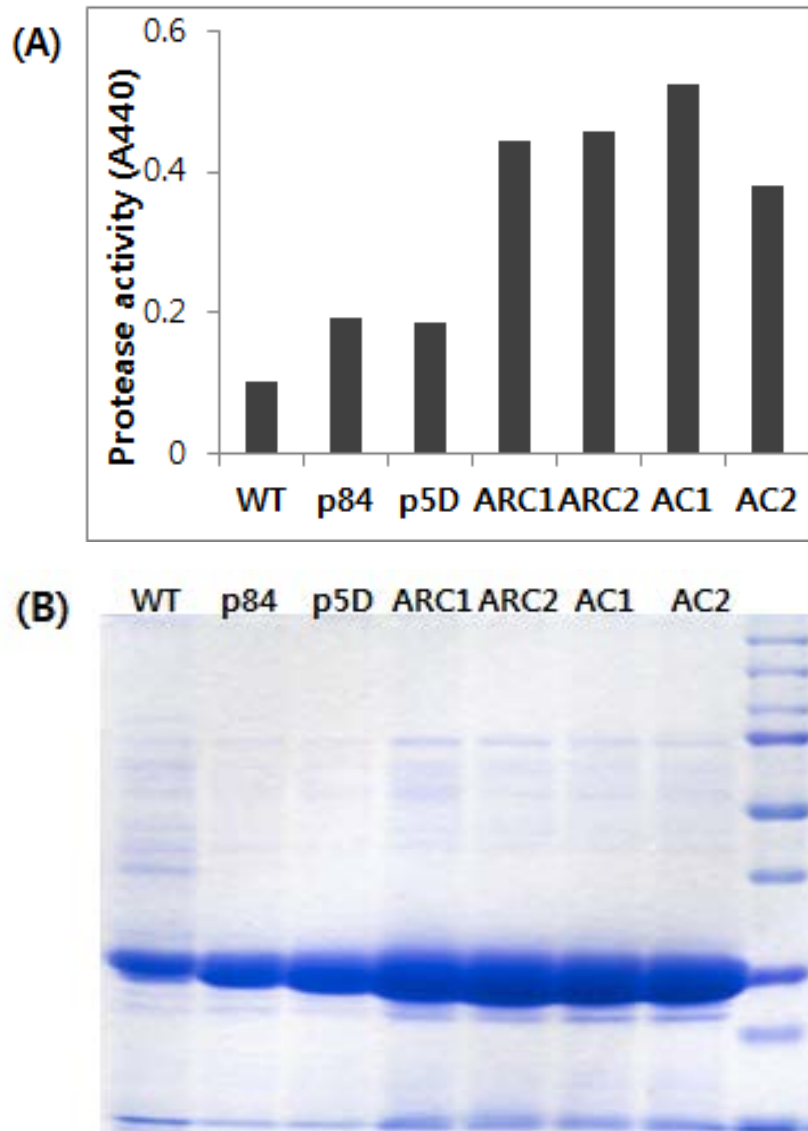


그림 40. 다양한 프로모터 변이체를 이용한 단백질 분해효소 활성 검정 (A) 및 발현된 AprE의 단백질 전기영동 (B)

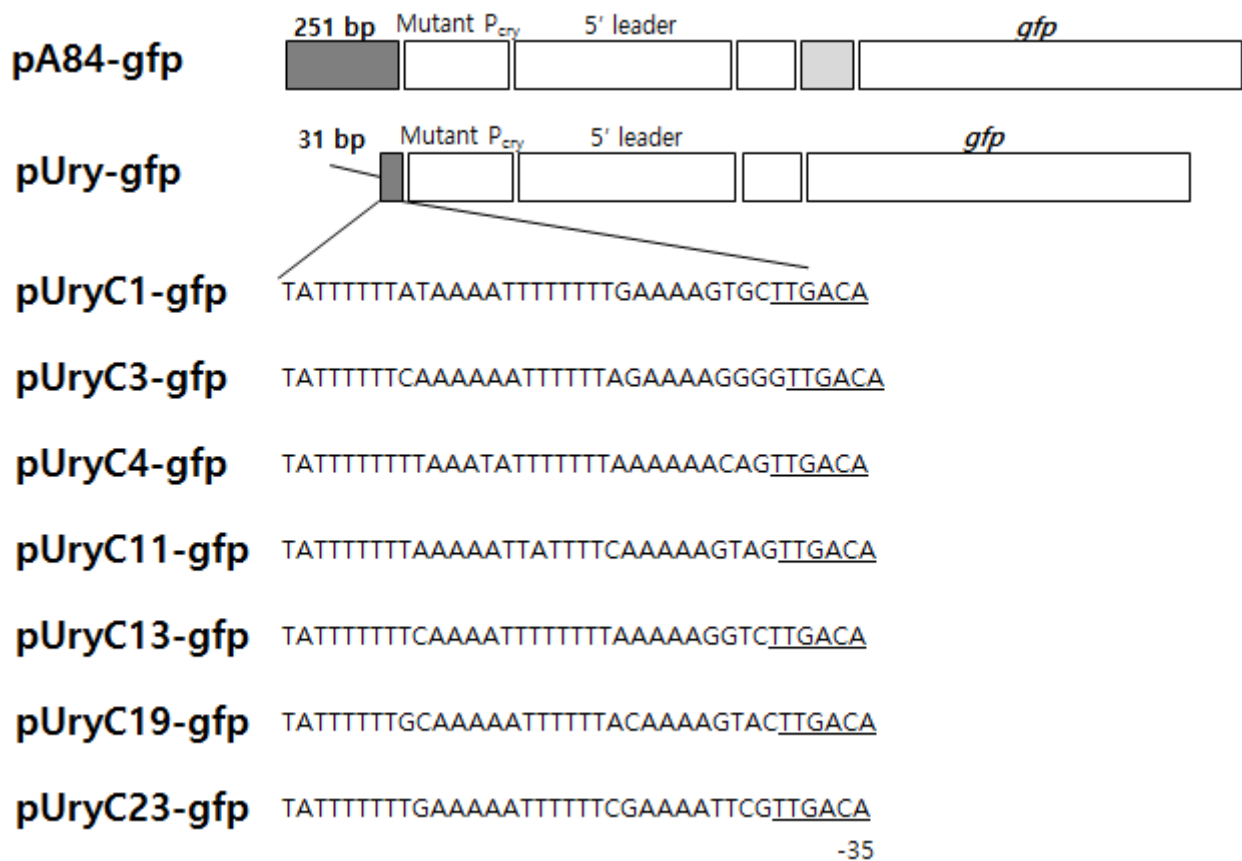
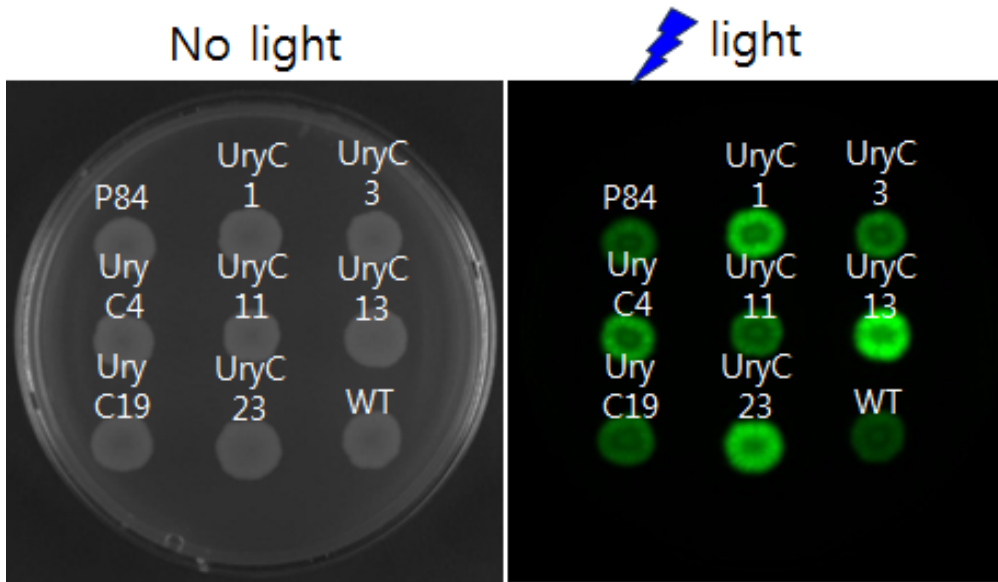
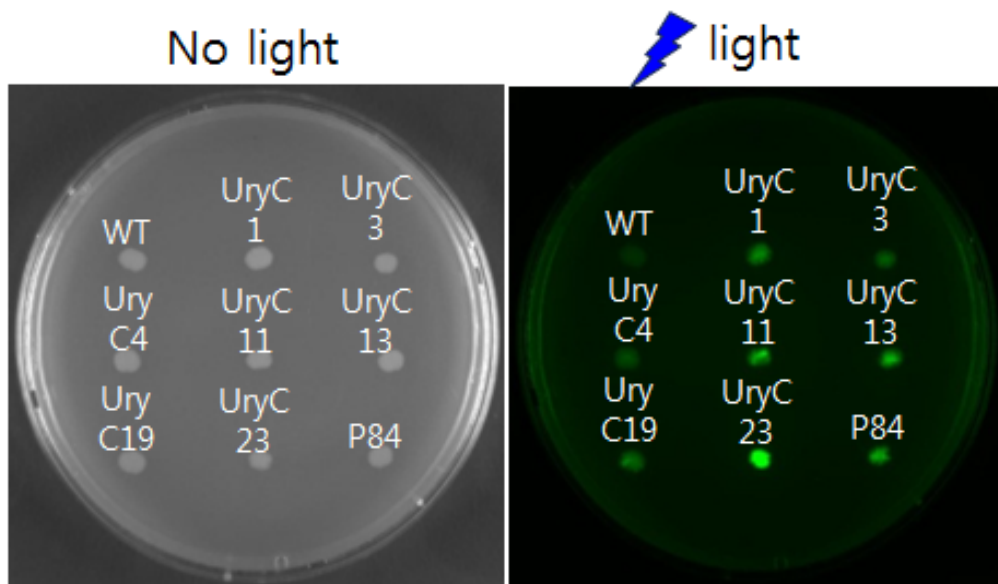


그림 41. 프로모터 변이체를 포함하는 벡터의 구조 모식도



< *B. subtilis* >



< *E. coli* >

그림 42. 고체 배지 상의 GFP 활성 비교

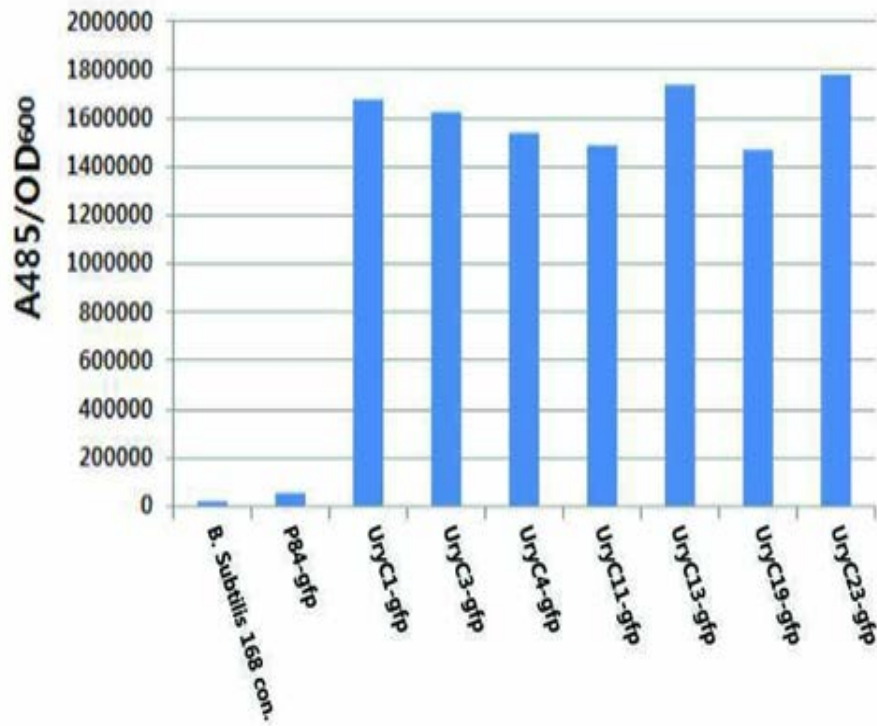


그림 43. Ury 프로모터를 이용한 GFP 활성 검정

- 또한, 위 프로모터 변이체 중 대표적으로 PuryC13과 PuryC23을 이용하여 대량 생산이 요구되는 목적 단백질인 단백질 분해효소 AprE를 발현하여 단백질 활성을 측정함. PuryC13 및 PuryC23 프로모터를 사용한 경우, P84 프로모터를 사용한 경우에 비해 AprE 활성이 2배 이상 증가하였고, 단백질 전기영동을 통해 단백질의 발현 또한 현저하게 증가되었음을 확인함 (그림 44).

나. 번역수준 조절을 통한 발현 라이브러리 제작 및 OPH 발현

- 단백질의 번역 과정에서 같은 아미노산을 지정하는 코돈이 2종류 이상임에도 특정 종류의 코돈이 다른 코돈보다 많이 사용되는 현상을 코돈 치우침 (Codon bias)이라 함. mRNA에 자주 사용되는 코돈은 이에 상응하는 tRNA의 상대적인 양과 상관관계가 있어 이종 유래 (heterologous) 유전자를 과발현하는 경우, 번역의 효율을 극대화하기 위하여 숙주 내에 많은 양으로 존재하는 tRNA에 상응하는 코돈을 선택하기도 함.
- 최근 연구 (Kudla et al. 2009)에서 리포터 단백질인 GFP에 동의돌연변이 (Synonymous mutations) 라이브러리를 제작하여 코돈 사용빈도와 세포 내 tRNA의 존재도 (abundance) 간의 일치가 단백질의 번역 비율과 최종 단백질 양에 영향을 미치는지 확인해 보았음. 코돈 치우침 정도에 상관없이 형광 수준 (Fluorescence level)이 산재해서 나타나는 것으로 보아 코돈 치우침과 단백질 발현량은 상관관계가 없고 (그림 45, A), mRNA 자유 에너지가 높을수록 형광 수준이 높게 나타나는 것으로 보아 mRNA의 2차 구조와 단백질 발현량은 상관관계가 있음(그림 45, B).
- 위 연구에서는 강한 mRNA 구조로 인해 발현이 잘 이루어지지 않는 유전자의 발현을 높이기 위해, 낮은 수준으로 발현되는 GFP 유전자 앞에 사용빈도 (usage)가 낮지만 약한 mRNA 2차 구조를 가지는 28개의 코돈을 표지하였음. 28개의 코돈 표지가 없을 때에는 GFP 발현이 낮았지만, 28개의 코돈을 표지한 후에는 GFP가 지속적으로 높게 발현하는 것을 확인하여 (그림 46), mRNA 2차 구조와 번역 개시율이 유전자의 발현량을 결정하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 증명함.

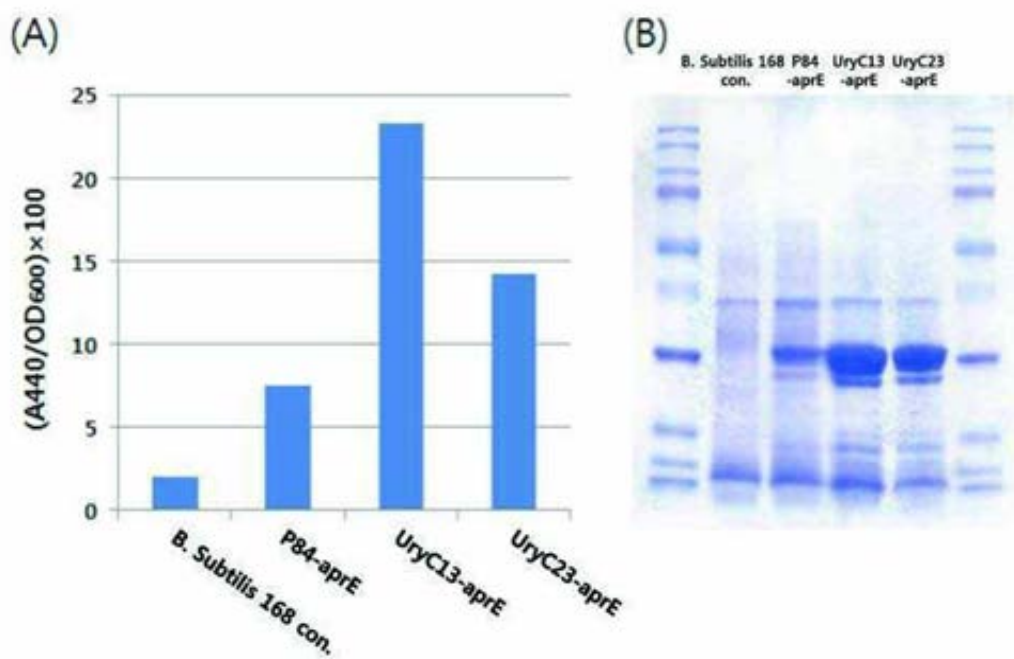


그림 44. Ury 프로모터를 이용한 단백질 분해효소 활성 검정 (A) 및 발현된 AprE의 단백질 전기영동 (B)

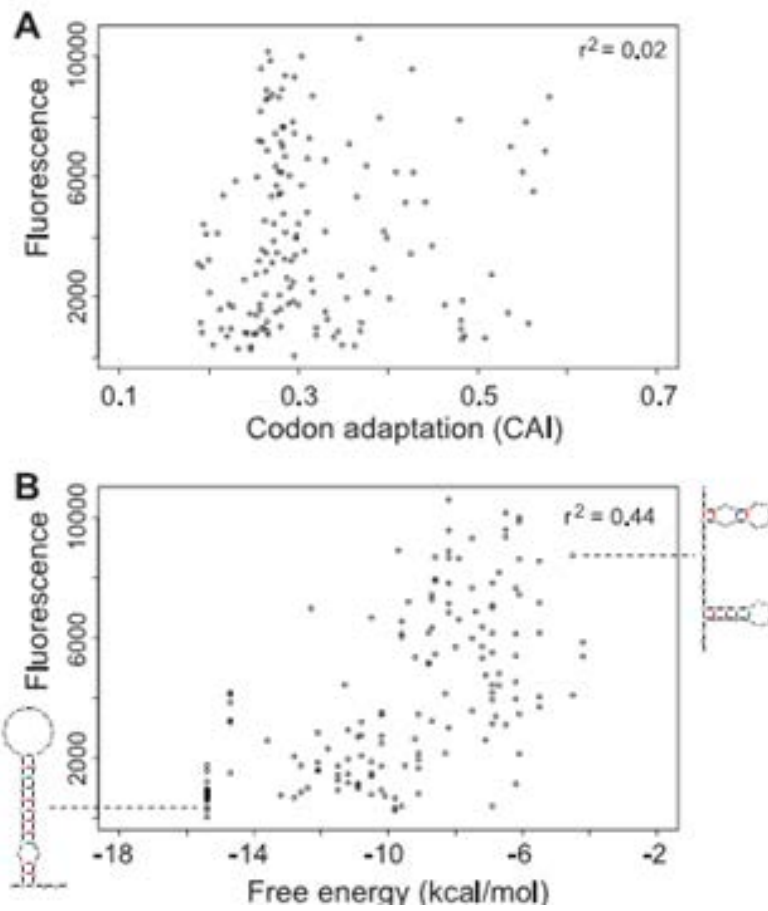


그림 45. 코돈 치우침 (A) 및 mRNA 2차 구조 (B)와 GFP 발현량과의 상관관계. (Kudla et al. 2009)

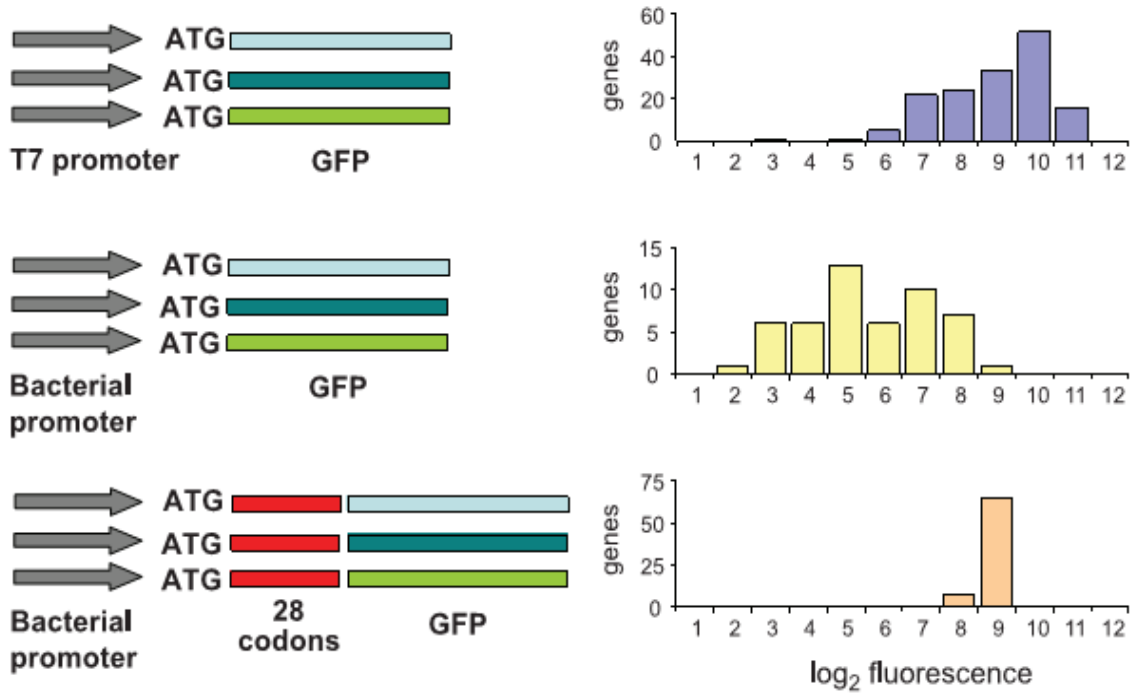


그림 46. GFP 발현량 비교. (위) 강한 프로모터에 의한 발현 (중간) 약한 프로모터에 의한 발현 (아래) 약한 프로모터에 28개 코돈을 표지하여 발현. (Kudla et al. 2009)

- 위 연구를 토대로 본 연구에서는 목적 단백질인 AprE의 개시 코돈 뒤 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하였음. 바실러스 서틸리스 168에 라이브러리를 도입하여 탈지유가 포함된 TSA 고체 배지에 도말하였고, 다양한 크기의 투명환을 관찰할 수 있었음. 투명환의 크기별로 콜로니들을 선발하여 단백질 활성을 측정하여 단백질 활성이 낮은 균주부터 높은 균주까지 연속적으로 나타나는 것을 확인하였음 (그림 47).
- 번역수준 조절을 통한 OPH 과발현을 시도하였음. 효율적인 라이브러리 스크리닝을 위해 GFP와 translational fusion 벡터를 제작하였는데 (그림 48) 이 벡터를 사용하면 OPH는 GFP와 fusion된 형태로 발현이 되고 GFP의 형광이 높은 변이체를 탐색하면 fusion되어 있는 OPH의 발현양이 높은 변이체를 탐색할 수 있을 것이라 기대함.
- OPH의 개시 코돈 뒤 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하고 GFP fusion 벡터에 클로닝하여 OPH-GFP 라이브러리를 제작하였음.
- 이 라이브러리를 바실러스에 도입한 후 GFP 형광이 높은 변이체를 1차 선정하였음.
- 선정된 변이체들을 대상으로 methy parathion을 기질로 하여 OPH 효소활성을 측정한 결과 1.6-6 배 정도 효소활성이 증가되었음 (그림 49). 따라서 번역수준 조절에 의한 발현 라이브러리를 통해 원하는 효소의 발현양을 증가시킬 수 있음을 확인하였음.

다. 바실러스 발현시스템을 이용한 여러 효소들의 과발현

(1) multicopy Laccase 과발현 균주 제작

- multicopy Laccase 발현 균주 제작을 위해 non-GMO Laccase 과발현 균주에 laccase 또는 개량 laccase 유전자를 하나 더 삽입하여 laccase 활성을 비교하고, 단백질 발현 정도를 단백질 전기영동으로 확인함 (그림 50). 기존 laccase 과발현 균주와 multicopy 과발현 균주의 laccase 활성에 차이가 없는 것으로 보아, 본 연구의 발현 시스템에 의한 laccase 유전자의 발현은 포화 상태로 더 이상의 발현량 증가가 없는 것으로 생각됨.

(2) 농약분해 관여 효소의 과발현

- 생물학적 환경정화를 위한 효소 중 주로 유기 농약 분해에 관여하는 효소로는 Cytochrome P450s, Esterases, Peroxidases, Transferases 등이 있음.

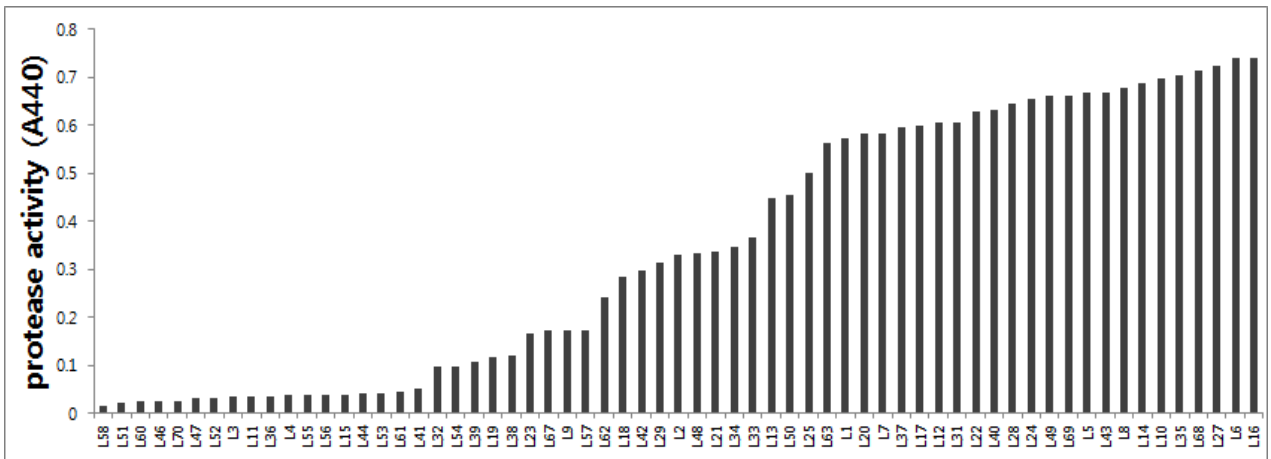
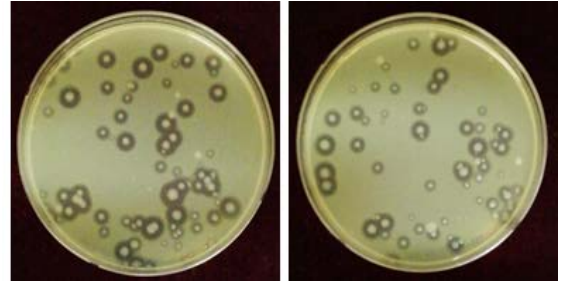
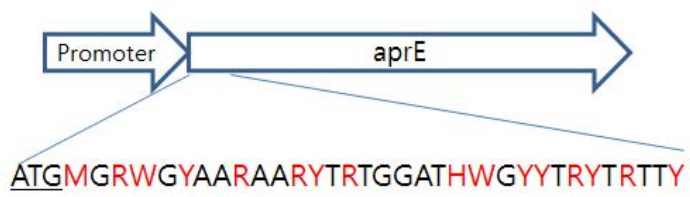


그림 47. 번역 수준의 조절을 통한 발현 라이브러리 제작

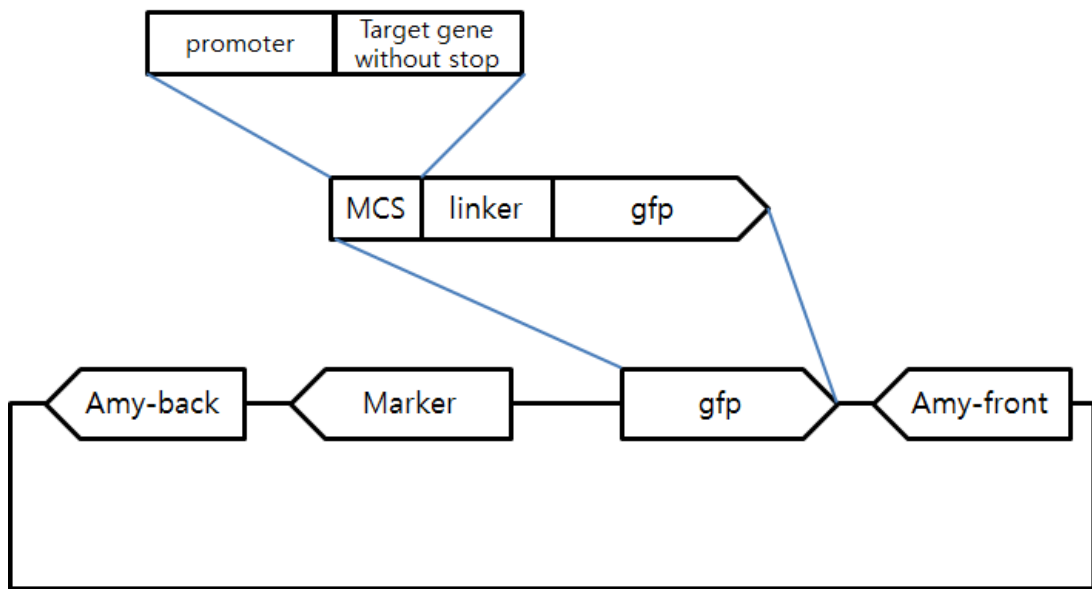


그림 48. GFP fusion 벡터의 모식도

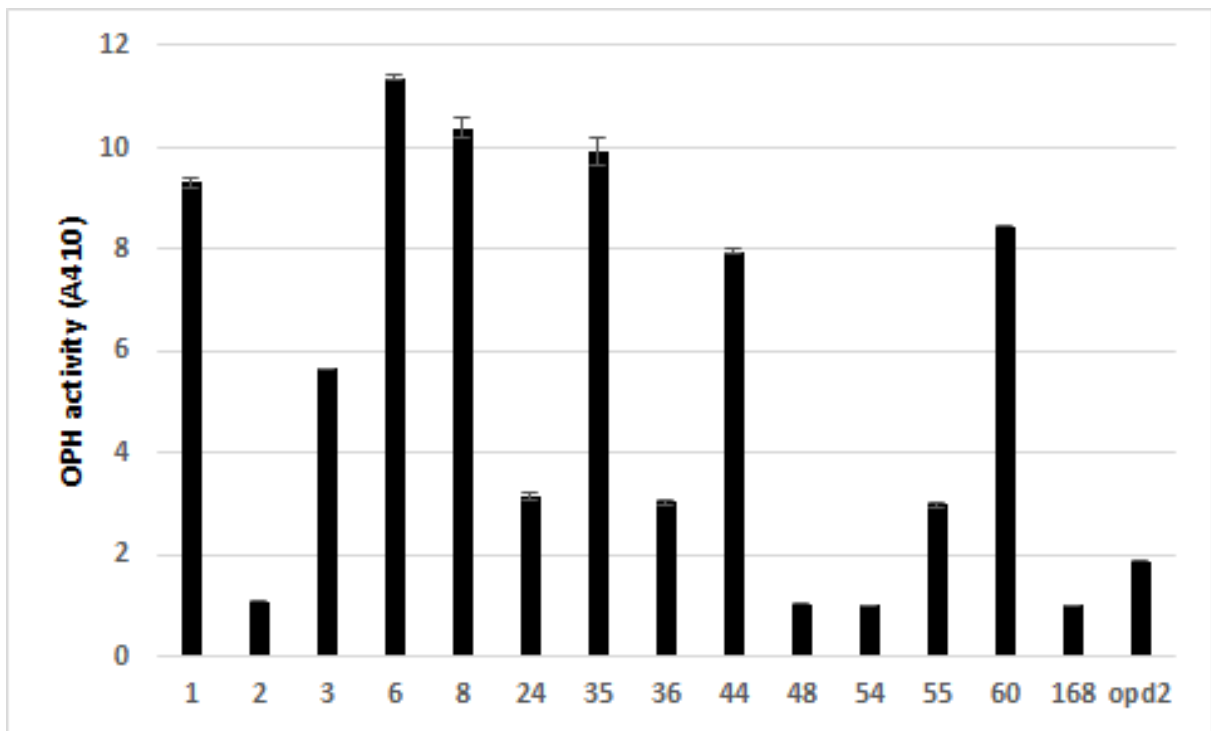


그림 49. 번역수준 조절에 의한 OPH-GFP 발현 라이브러리 변이체의 OPH 활성 검정.

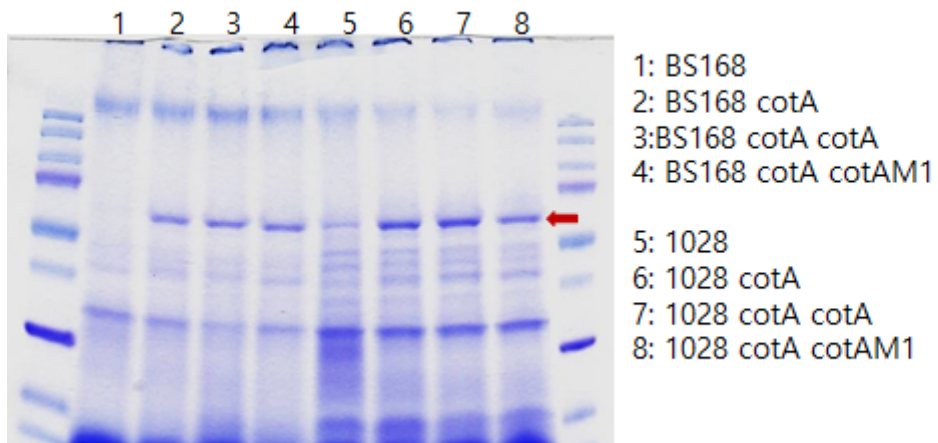
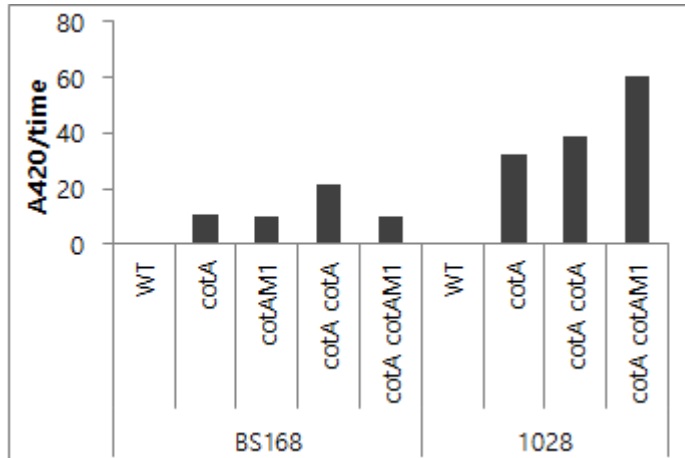


그림 50. multicopy Laccase 발현 균주의 Laccase 활성 측정 및 단백질 전기영동

- Cytochrome P450은 heme monooxygenase로, 방향족 또는 지방족 고리 화합물의 생물 분해 (biodegradation)를 촉매하고, Esterase는 에스테르 결합을 분해하는데 관여함. Peroxidase는 산화-환원 반응을 촉매하여 여러 종류의 방향족 화합물을 분해하고 페놀 화합물의 대다수를 산화시키는 것으로 보고되었음. Trasnferases 중 Glutathione S-transferase (GST)가 생물정화와 관련된 효소로 주로 고리화합물의 탈할로겐화를 촉매함 (Biodegradation 2013).
- 병해충 방제를 위한 유기합성 농약의 광범위한 사용은 약제 저항성 해충의 출현을 야기함. 약제 저항성 해충에서 농약을 대사하는 일반적인 해독효소들로 Cytochrome P450s, Esterases, GSTs 등이 있음.
- Cytochrome P450은 유전자 다양성, 넓은 기질 특이성과 촉매 다기능성으로 인해 대부분의 살충제에 대한 저항성을 가짐.
- Esterase는 에스테르 그룹을 가지고 있는 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계열의 약제를 가수분해시켜 알코올이나 산의 형태로 전환시킴으로써 약효를 저하시킴.
- GST는 유해한 친전자성 물질이나 체내에서 일차적으로 산화과정을 거친 생성물들을 glutathione과 접합시켜 배설을 촉진함으로써 약효를 저하시키는 것으로 알려져 있고, 주로 유기인계, 유기염소계, 피레스로이드계 농약에 대한 저항성을 나타냄.
- 이들 해독효소들은 각 유전자의 염기서열 증폭, 전사 증강, 암호화 돌연변이 등에 의해 농약에 대한 저항성 기작을 가짐.
- 지금까지 구축된 바실러스 발현 시스템을 이용하여 이미 과발현시킨 Laccase, OPH 뿐만 아니라, 위의 농약 분해능 유전자들을 발현시키고자 함.
- Cytochrome P450 효소는 대부분의 생물체에 존재하며 매우 다양한 산화반응의 촉매 역할을 하는 효소들로 구성됨. 그 중 세균에서 가장 잘 알려진 바실러스 메가테리움 (*B. megaterium*) 유래의 P450을 선택함. 바실러스 메가테리움에는 산화 및 환원 두 가지 기능을 가진 CYP102 (BM3)와 스테로이드, 지방산, 생체 이물 등을 산화시키는 CYP106 (BM-1) 유전자를 가지고 있음. 각 유전자를 본 연구의 단백질 대량 생산 시스템을 이용하여 과발현하였고, 그 발현 정도를 단백질 전기영동을 통해 확인하였음 (그림 51). BMC21은 바실러스 메가테리움의 CYP102, BMC63은 바실러스 메가테리움의 CYP106 유전자를 나타냄.

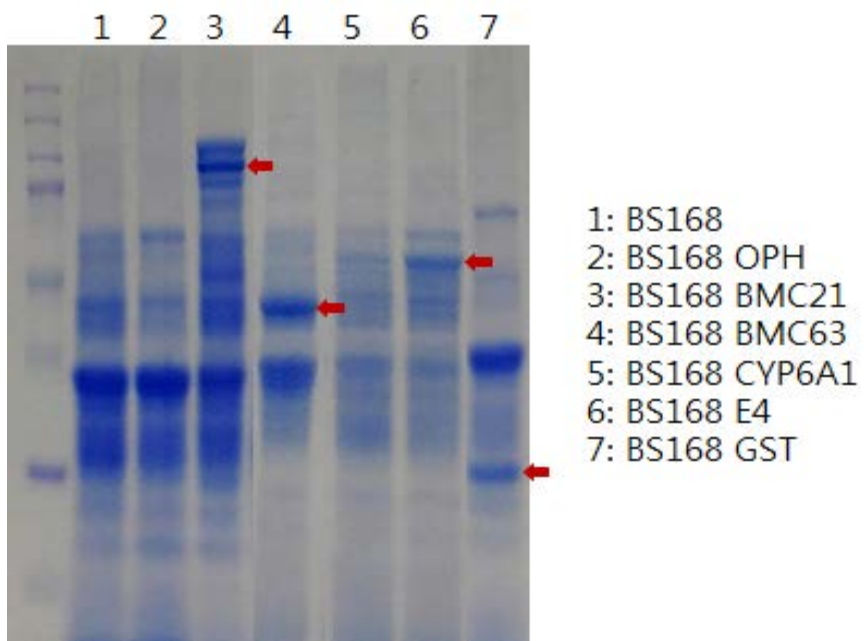


그림 51. 농약분해능 유전자의 단백질 전기영동

- 또한 약제 저항성 곤충의 해독효소들 중에서 집파리의 Cytochrome P450 (CYP6A1), 진딧물의 Esterase (E4), 집파리의 GST를 선택하였고, 각 유전자들은 바실러스 서틸리스에 최적화된 코돈으로 바꿔 화학적으로 합성하였음. 합성된 유전자들은 위 바실러스 발현 시스템에 의해 과발현하였고, 발현 정도를 단백질 전기영동을 통해 확인한 결과 OPH, CYP6A1을 제외한 나머지 균주에서 각 효소들이 과발현되었음 (그림 51).

5. 사과 잔류농약 성분의 분해능 검정

가. 다양한 농약분해효소를 이용한 농약분해능 확인

- 본 연구의 바실러스 발현 시스템을 이용하여 과발현시킨 농약분해능 효소들의 농약 분해 활성을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 진행함.
- 클로르피리포스 (Chlorpyrifos)는 광범위한 살충 작용을 나타내는 유기인계 살충제 중 대표적인 물질임. 그러나 인체 위해 가능성으로 인해 비농업적 사용은 금지되고 있는 추세이나, 농작물의 해충 피해를 방지하기 위한 목적으로는 현재 세계적으로 널리 사용되고 있음.
- Laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주의 클로르피리포스 분해능을 LC-MS를 통해 살펴보았음. 바실러스 발효 배지에서 24시간 배양한 균주 배양액에 2.5 mg/ml의 클로르피리포스를 첨가하고 37℃에서 3일 반응한 후, LC-MS로 클로르피리포스가 분해되었는지 확인하였음. 그 결과 laccase 과발현 균주와 OPH 과발현 균주에서 클로르피리포스의 피크가 줄어들고, 새로운 피크가 나타났음. 이 새로운 피크는 클로르피리포스가 분해되어 생긴 부산물이라 여겨지며 반응에 사용한 클로르피리포스가 2.5 mg의 고농도이기 때문에 클로르피리포스의 피크가 남아있다고 여겨짐. 잔류농약 수준의 낮은 농도에서는 반응 후 남아있는 클로르피리포스가 거의 없을 것이라 예상함 (그림 52).
- 클로티아니딘 (clothianidin)은 곤충의 시냅스 후막에서 신경전달물질인 아세틸콜린 수용체 결합을 방해하여 자극 전달을 촉진하고, 이상흥분으로 인해 곤충이 치사에 이르게 함. 이 농약은 저독성으로 90년대 이후부터 전 세계에서 널리 사용되었으나 2012년에 꿀벌 생태계에 영향을 미친다는 연구가 발표되어 일부 국가에서는 사용이 제한됨.

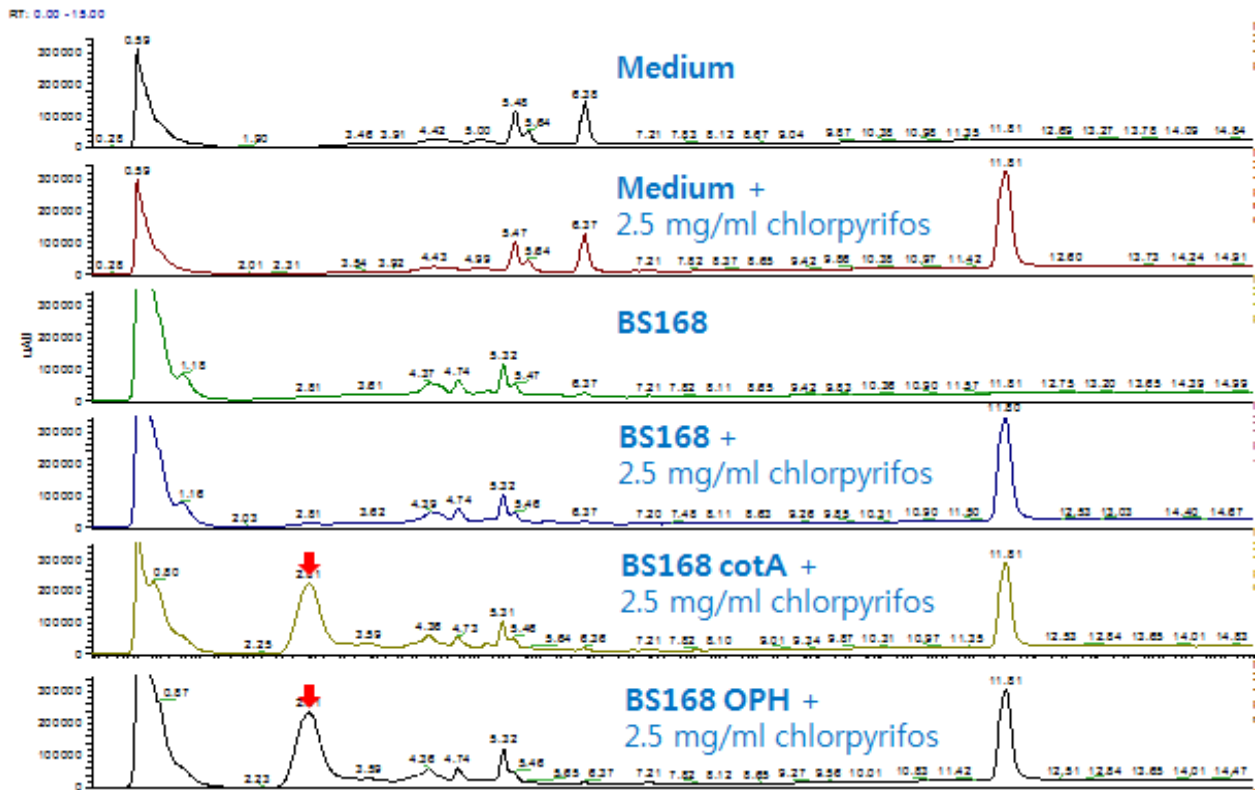


그림 52. Laccase 및 OPH의 chlorpyrifosdp 분해 LC-MS 결과

- TSB 배지에서 배양한 바실러스는 자가분해 (autolysis)에 의해 농약분해 관여 효소들이 세포 밖으로 분비될 것으로 예상됨. TSB 배지에 클로티아니딘 입상수용제 농약인 푹소리를 0.5 ug/ml이 되도록 첨가하고 농약분해능 후보 균주들을 37°C에서 24시간동안 배양한 후, 배양 상등액을 꿀벌부채명나방유충에 처리하여 유충의 사망률을 확인함 (그림 53). 유충의 사망률은 전체 유충 수에서 죽은 유충 수의 비율로 나타냄. 농약분해능 효소에 의해 농약이 분해되었다면 나방 유충의 사망률이 낮아질 것으로 예상함. OPH, BMC21, GST, Mix (CYP6A1 + E4 + GST) 처리구에서 사망률이 현저하게 줄어들어 위 처리구가 클로티아니딘을 분해한 것으로 생각됨.
- 사이퍼메트린 (Cypermethrin)은 신경계에서 나트륨 이온이 신경막을 통과할 때, 통로문의 개폐 역할을 하는 ATPase를 저해하여 치사에 이르게 함. 이는 환경호르몬의 하나로 현재 스프레이형 모기 퇴치제에 많이 들어 있는 성분으로 발암 가능성이 있는 내분비 장애물질임.
- 위의 클로티아니딘과 같은 방법으로 과발현한 농약분해능 후보균의 농약분해능 활성을 알아보았음. 사이퍼메트린에 대해서는 BMC21의 활성이 가장 좋았고, OPH, CYP6A1, Mix 처리구에서도 약하게 활성이 나타남 (그림 54). 따라서 BMC21, OPH, CYP6A1, Mix 처리구에서 사이퍼메트린을 분해한 것으로 생각됨.
- 페니트로치온 (Fenitrothion)은 신경화학전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린 에스터레이즈의 활성작용을 저해하여 신경전달 기능에 이상을 일으키게 되고, 경련과 마비가 오면서 치사에 이르게 함.
- 페니트로치온의 경우, 농약 첨가 후 72시간 지나 관찰한 결과 OPH 처리구가 노란색으로 변하였고, CYP6A1, E4, GST, Mix 처리구에서도 약하게 노란색으로 변한 것을 확인하였음 (그림 55). 페니트로치온은 유기인계 농약으로 OPH에 의해 분해될 것으로 예상되므로 페니트로치온이 분해되면서 노란색을 나타내는 것으로 생각됨.
- 위의 클로티아니딘과 같은 방법으로 농약분해능 활성을 알아봄. BMC21, CYP6A1, E4, GST, Mix 처리구에서 페니트로치온을 분해한 것으로 생각됨 (그림 56). OPH 처리구에서 색 변화가 나타나 농약을 분해한 것으로 여겨졌지만, 나방 유충의 사망률은 높게 나타남. 이는 OPH에 의해 페니트로치온으로부터 독성대사물이 생성된 것으로 생각됨.

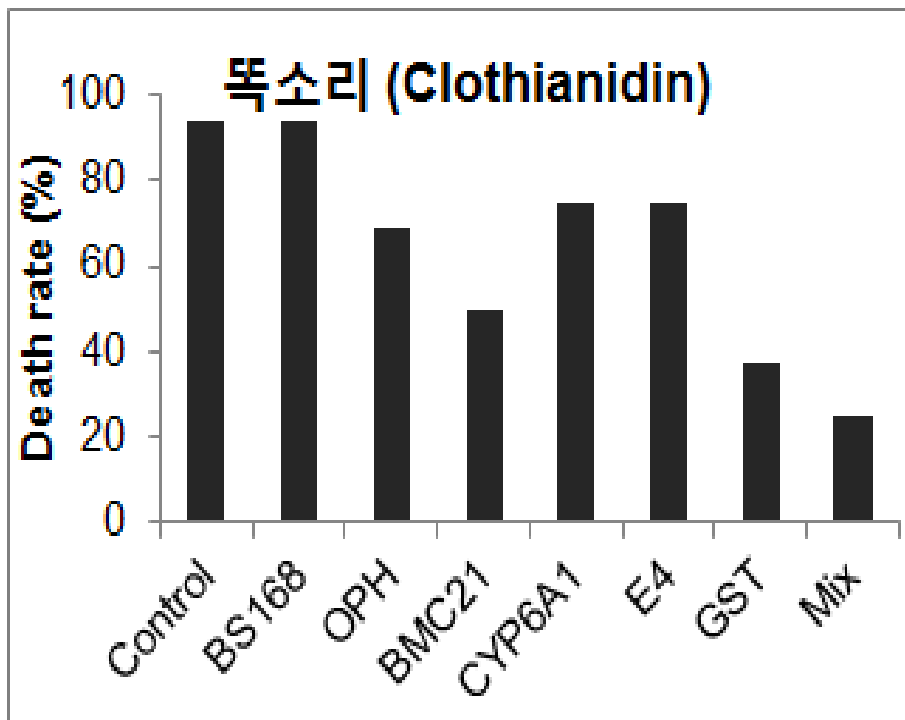


그림 53. 클로티아니딘에 대한 농약분해능 생물학적 검정

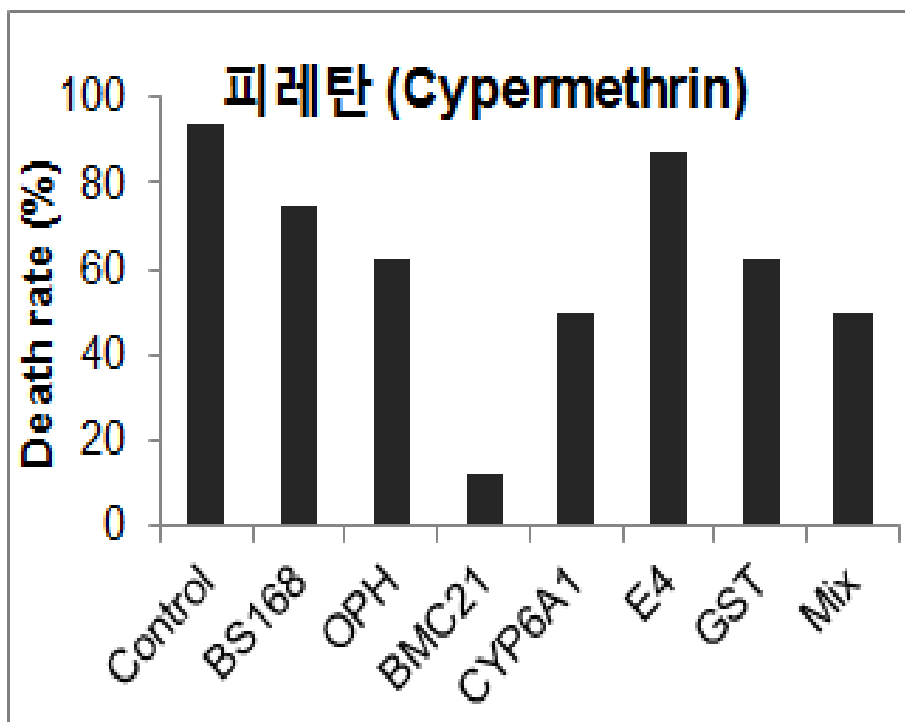
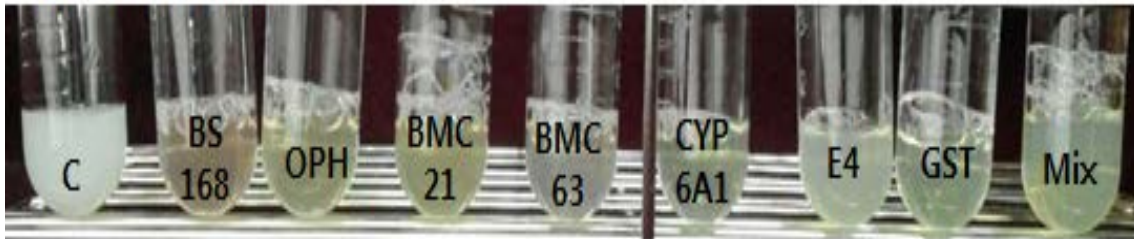


그림 54. 사이퍼메트린에 대한 농약분해능 생물학적 검정

농약 첨가 후 0 hr



농약 첨가 후 72 hr

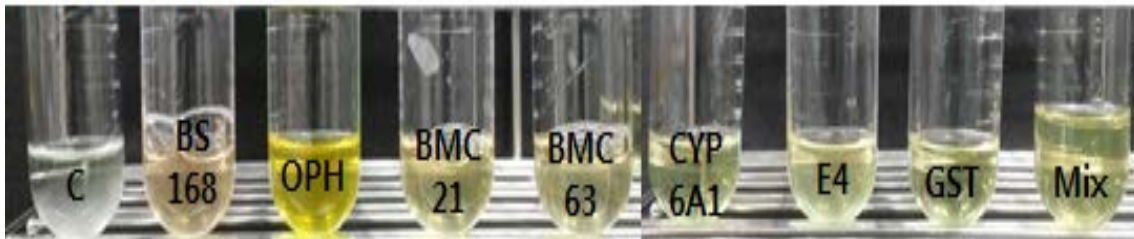


그림 55. 농약 첨가 후 색 변화 관찰

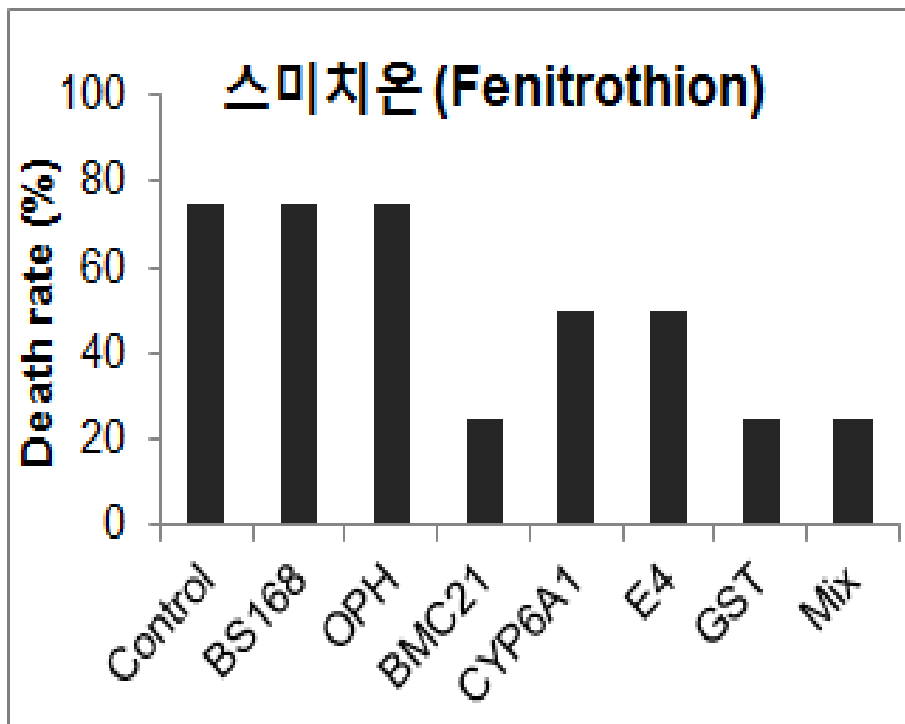


그림 56. 페니트로치온에 대한 농약분해능 생물학적 검정

- 포스티아제이트 (Fosthiazate) 역시 페니트로치온과 같은 기작으로 곤충을 치사시킴. 이는 유기인계 침투성 살선충제로 식물체 내의 잔류성이 문제됨. 위의 클로티아니딘과 같은 방법으로 농약분해능 활성을 알아본 결과, BMC21과 GST 처리구에서 현저하게 사망률이 낮아져 이들이 포스티아제이트를 분해한 것으로 여겨짐 (그림 57).
- 메티다치온 (Methidathion) 역시 페니트로치온과 같은 기작으로 곤충을 치사시키고, 고독성으로 국내에서는 이미 골프장에서의 사용이 금지됨. 위의 클로티아니딘과 같은 방법으로 농약분해능 활성을 알아본 결과, OPH와 E4에서 사망률이 낮아졌고 이들이 메티다치온을 분해한 것으로 생각됨 (그림 58).
- 프로클로라즈 (Prochloraz)는 병원균의 세포막 구성성분인 에르고스테롤의 생합성을 저해시켜 병원균의 성장을 막음. 프로클로라즈는 살균제이므로 병원균인 푸사리움 솔라니 (*Fusarium solani*) 또는 푸사리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum*)이 첨가된 고체 배지 상에서 저해환을 형성함.
- TSB에서 과발현한 농약분해능 후보군들과 농약을 섞어 37℃에서 24시간 반응시킨 후, 병원균이 첨가된 고체 배지에 접종하여 저해환의 크기를 관찰하였음. 단백질 분해효소인 나토키네이스 (aprN)와 바실러스 서틸리스의 Cytochrome P450 (bioI), 곤충의 Cytochrome P450 (CYP6A1), 곤충의 Esterase (E4), 지방분해효소 리파아제 (lip), 중성 단백질 분해효소 (nprE) 처리구에서는 저해환의 크기가 약간 줄어들었고, 단백질 분해효소 서브틸리신 (aprE), 바실러스 메가테리움의 Cytochrome P450 (BMC21, BMC63) 처리구에서는 저해환이 현저하게 줄어들었음 (그림 59). 이는 단백질 분해효소, Cytochrome P450, Esterase, 리파아제 등이 프로클로라즈를 분해하여 살균 활성이 줄어든 것으로 생각됨.
- 테부코나졸 (Tebuconazole)은 프로클로라즈와 같은 기작으로 병원균의 성장을 저해하는 것으로 현재 미국환경보호청에서는 발암 가능 물질로 구분하고 있음.
- LC-MS를 통해 Laccase 과발현 균주의 테부코나졸에 대한 농약분해능을 살펴보았음. 농약분해능 후보 균주 배양액에 100 ug/ml의 테부코나졸을 첨가한 후, 37℃에서 24시간 반응시키고 LC-MS로 확인한 결과, 바실러스 서틸리스 168 뿐만 아니라 1028의 Laccase 과발현 균주에서 테부코나졸 피크가 사라지거나 줄어들었음 (그림 60).
- 250 ug/ml의 테부코나졸이 첨가된 CHPYG1 배지에 순수 분리된 Peroxidase를 처리하였음. Peroxidase 주변에 투명환이 형성되는 것으로 보아 Peroxidase에 의해 테부코나졸이 분해된 것으로 생각됨 (그림 61).

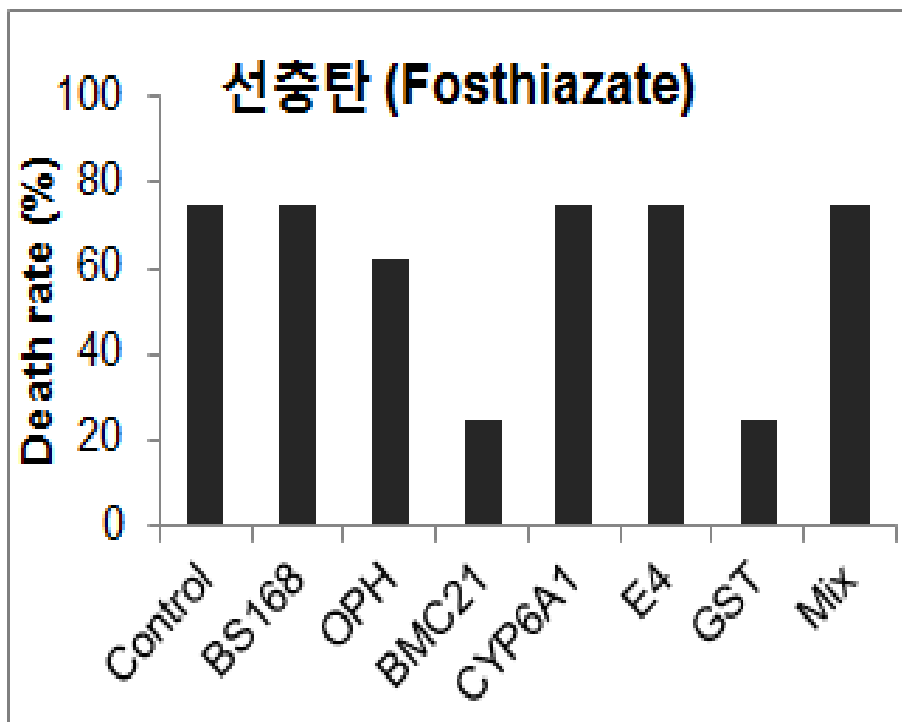


그림 57. 포스티아제이트에 대한 농약분해능 생물학적 검정

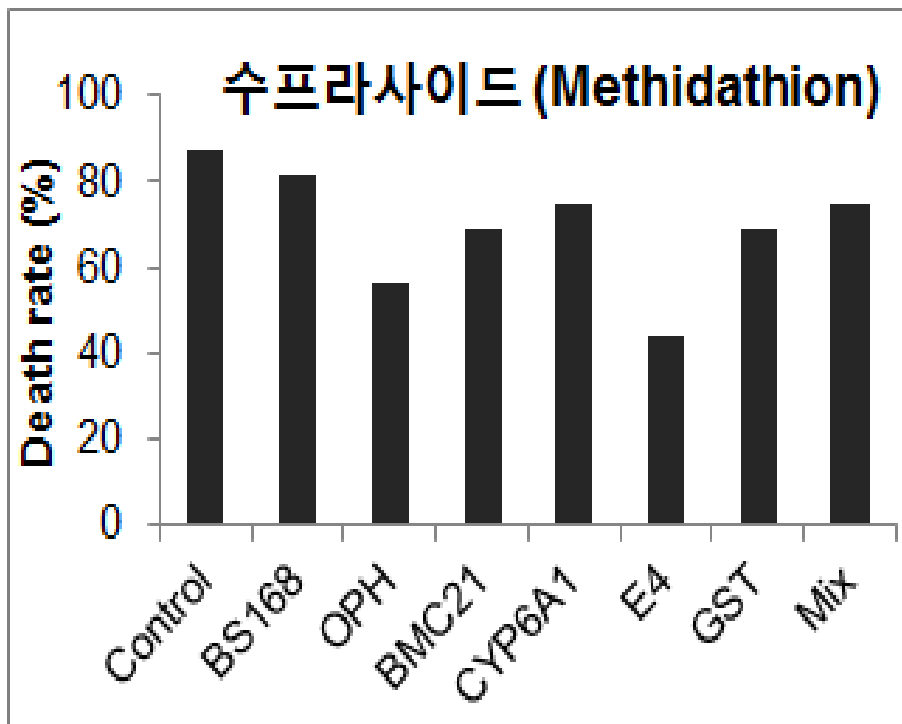


그림 58. 메티다치온에 대한 농약분해능 생물학적 검정

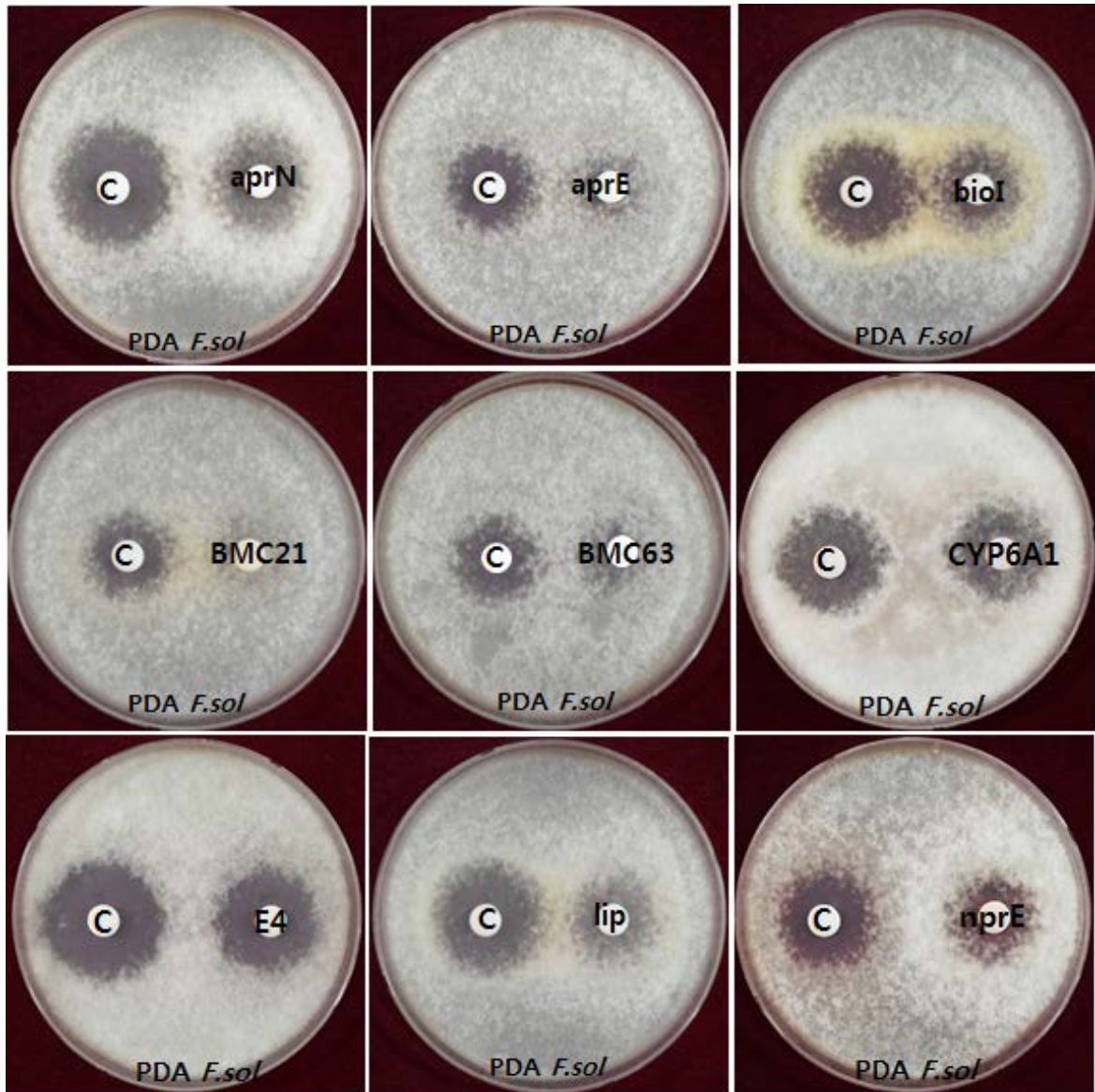


그림 59. 고체 배지 상 프로클로라츠에 대한 농약분해능 검정. C, negative control.

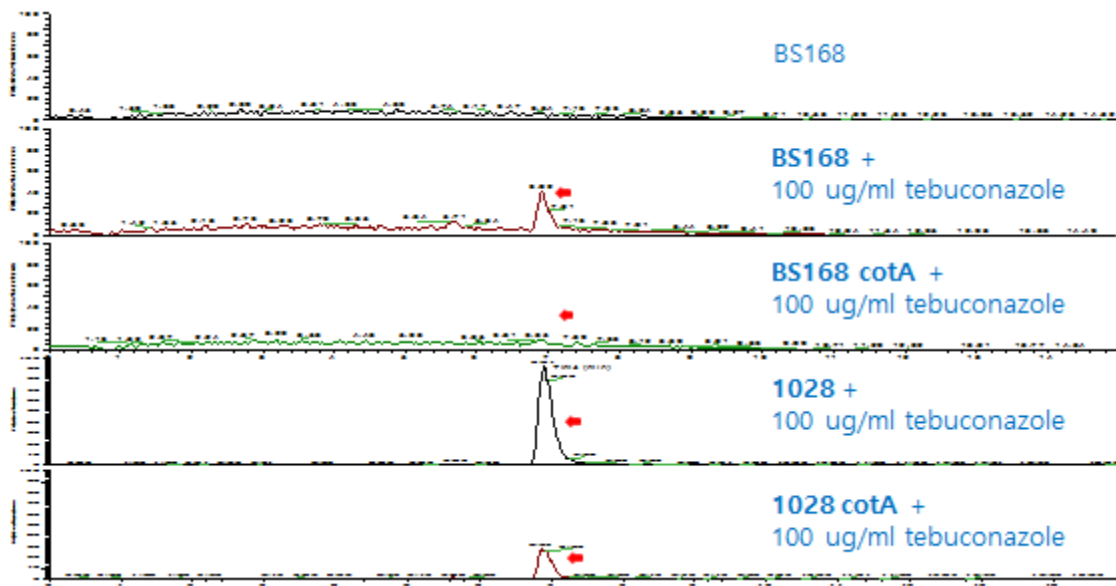


그림 60. Laccase의 테부코나졸 분해 LC-MS 결과



그림 61. Peroxidase의 테부코나졸에 대한 농약분해능 검정

- 프로클로라츠와 같은 방법으로 병원균이 첨가된 고체 배지에서 저해환의 크기를 살펴 보았음. OPH, 단백질 분해효소 (aprN, nprE), Cytochrome P450 (BMC21, CYP6A1), Esterase (E4), GST, Mix (CYP6A1 + E4 + GST)의 처리구에서 저해환이 control에 비해 줄어들어 이들이 농약을 분해한 것으로 생각됨 (그림 62).
- 위의 농약분해능 실험 결과를 정리하여 표로 나타냄 (표 2). BMC21이 다양한 농약에 대한 분해능을 보였고, GST도 농약 분해능이 높은 것으로 여겨짐.

나. 효소 및 포자 대량생산, 시제품 제작

- 대부분의 농약에 대하여 분해 활성을 보인 BMC21 균주를 바실러스 대량배양 발효 배지에서 60시간 동안 배양하였음.
- Cytochrome P450은 세포 내에서 발현되므로, 발현된 단백질이 세포 밖으로 분비되도록 해야 함. 또한 BMC21을 과발현 시킨 바실러스 균주는 GMO 균주이므로 세포를 파괴한 후 사용할 수 있을 것임. 농약분해 활성 검정을 위한 시제품 제작을 위하여 대량배양 배지에서 배양된 BMC21 균주 (1×10^9 cfu/ml)에 1 mg/ml의 리소자임을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 계면활성제인 triton X-100을 0.1% 첨가하였음. 세포가 제대로 용해되었는지 현미경으로 관찰하였음.
- 세포 용해를 위해 사용된 리소자임은 항균 효소로 수확 후 과일과 채소의 썩음을 방지하는데 이용할 수 있음. triton X-100과 같은 계면활성제는 수확, 포장 후 판매와 수출용 과실의 표면으로부터 진드기 등의 여러 가지 표면 손상 해충들을 제거할 수 있음 (<http://bric.postech.ac.kr/myboard/read.php?Board=news&id=112639>). 그러나 이들이 인체에 다량 노출되면 심각한 질병을 유발할 가능성이 높고, 생분해도가 떨어져 환경문제를 야기할 수 있어 세포 파괴를 위한 새로운 방법이 필요함.
- 바실러스는 세포성장 정지기 후반기에 포자가 형성되면 자동으로 세포가 파괴되어 세포 내에 있던 단백질이 배지로 노출되어 세포 내에서 발현된 단백질의 효율적인 회수가 가능함. 이러한 자가분해 능력을 이용한 세포파괴 방법을 사용할 수 있음. 또한 *spo0A*, *sigE*, *sigK* 등 포자형성에 관여하는 유전자의 결손이 일어나면 세포성장 후반기에 포자는 형성되지 않으면서 세포가 쉽게 자가분해됨. 따라서 이러한 돌연변이를 이용하여 세포파괴를 손쉽게 할 수 있을 것임.

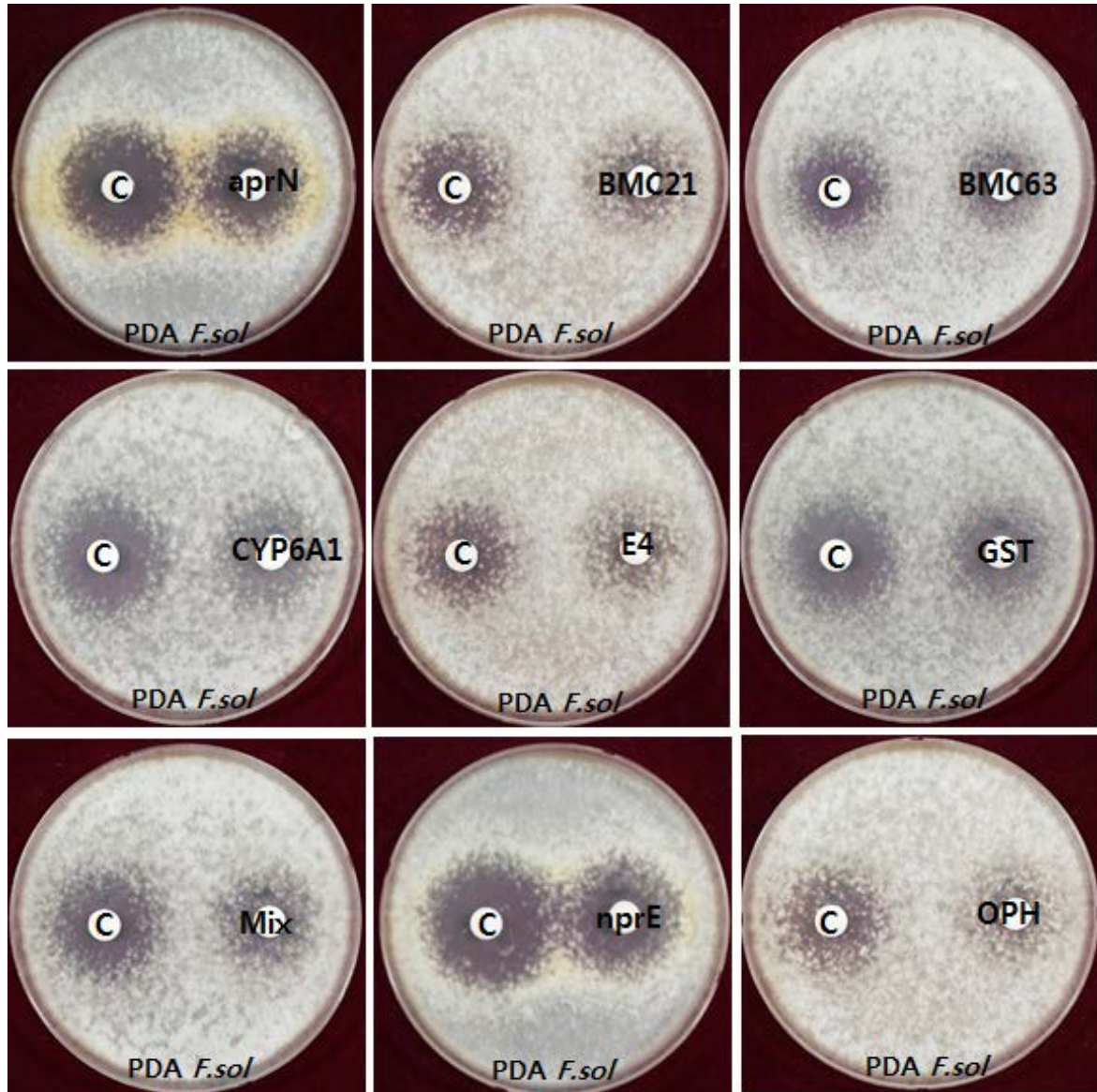


그림 62. 고체 배지 상 테부코나졸에 대한 농약분해능 검정. C, negative control.

표 2. 각 효소의 농약분해능

	살충제						살균제	
	Chlorpy -rifos	Clothia -nidin	Cyper- methrin	Fenitro -thion	Fosthia -zate	Methida -thion	Prochlo -raz	Tebuco -nazole
WT	-	-	-	-	-	-	-	-
cotA	+	-	-	-	-	-	-	+
OPH	+	+	+	-	-	+	-	+
BMC21	n.d	+	+++	++	++	+	+++	++
CYP6A1	n.d	-	+	+	-	-	+	++
E4	n.d	-	-	+	-	++	+	+
GST	n.d	++	+	++	++	-	-	+
Mix	n.d	++	+	++	-	-	-	+
aprN							+	+
aprE							+++	-
bioI							+	-
BMC63							+++	++
lip							++	-
nprE							+	+

- 바실러스는 열과 건조 등 환경스트레스에 견딜 수 있는 포자를 형성하여 장기간 보존에도 활력을 유지하는 장점을 가짐. 이에 현재 시판되는 미생물 농약은 대부분 바실러스 포자를 기반으로 함. 본 연구의 농약 분해 관여효소들은 포자 표면에 디스플레이할 수 있음. 효소가 디스플레이된 포자를 이용할 경우 세포 파괴를 위한 화학 용매의 사용이 필요하지 않음.

다. 사과와 잔류농약 분석

- 위에서 준비한 시제품을 사과에서 잔류농약 제거에 이용될 수 있는지 확인하고자 다음과 같은 실험을 진행하였음.
- 시중에서 판매되는 사과를 사용약량 (0.5 ml/L)의 10배 높은 농도로 희석한 특정 농약 (실바코 (주성분: 테부코나졸))에 3시간 담금 처리하고 1시간 건조하였음, 여기에 위에서 준비한 시제품을 사과의 표면에 처리 (15 ml/개)하여 하룻밤동안 반응시킨 후, 농약을 분해하였는지 알아보기 위해 잔류농약 분석 전문기관에 잔류농약 검사를 의뢰함. 그 결과, 농약만 처리한 사과에서는 테부코나졸 외 3종의 농약이 검출되었지만, 농약과 BMC21도 함께 처리한 사과에서는 어떤 농약성분도 검출되지 않았음 (그림 63). 그러나 잔류농약 분석 결과는 충분한 재실험 후 검토되어야 할 것임.
- 다양한 농약에 대한 분해능을 가진 BMC21을 포함한 제품을 이용하여 친환경적으로 사과의 잔류농약을 제거할 수 있을 것으로 기대함. 이러한 제품은 사과 수확직전에 처리하거나 수확 후 처리할 수 있을 것임. 이전의 보고에 의하면 바실러스 포자를 사과나무에 처리하였을 때 사과 잎의 생장이 촉진되고 수확량과 당도가 증가한다는 보고가 있었음 (Ryu, 2011). 따라서 수확전 처리는 바실러스 포자와 같이 처리하면 사과의 수확량, 당도 증가 효과 뿐만 아니라 수확후 잔류농약 저감 효과도 같이 기대할 수 있을 것임. 수확 후 처리는 검사, 세척, 선별, 예냉, 저장, 운반 등의 단계 중 세척 단계에서 처리할 수 있을 것임. 이러한 효소를 이용한 잔류농약 제거는 다양한 종류의 효소를 혼합하는 것이 더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이나 생산 단가를 낮추는 것이 필요함.

시험 성적서 (Test Certificate)		접수번호	PCAM - 1412 - 0213	
		페이지	(1) / (총 1)	
우 305-510 대전광역시 유성구 테크노 11로 12 (합림동 867) / 전화 (042)823-8680-1 / 전송 (042)823-8682				
1. 시료내용				
기관명	한국생명공학연구원	의뢰일자	2014년 12월 11일	
생산지/주소	대전광역시 유성구 과학로 125	의뢰자	한국생명공학연구원	
시료명	시료(3-1)	시험장소	분석실	
시험기간	2014년 12월 11일 ~ 2014년 12월 16일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC	
용도	연구용 (102항목)	시험환경온도	(22 ~ 24) °C	
		시험환경습도	(35 ~ 40) %	
2. 잔류농약검사결과				
검사항목 102 성분				
Acetamiprid	Cypermethrin(Total)	Fenvalerate	Methidathion	Tebuconazole
Azoxystrobin	Cyprodinil	Fipronil	Methiocarb	Tebufenozide
Bifenthrin	Deltamethrin	Fludioxonil	Methomyl	Tebufenpyrad
Bifentanol	Diazinon	Flufenoxuron	Nuarimol	Tebupirimfos
Boscalid	Dichlofluanid	Fluquinconazole	Paclotubrazol	Teflubenzuron
Buprofezin	Dicofol	Flutolanil	Parathion	Tefluthrin
Butachlor	Diethofencarb	Fthalide	Penconazole	Terbufos
Cadusafos	Difenoconazole	Furathiocarb	Pencycuron	Tetraconazole
Carbaryl	Diflubenzuron	Halfenprox	Pendimethalin	Tetraclorid
Carbendazim	Dimethomorph	Hexaconazole	Permethrin	Thiacloprid
Carbofuran	Diniconazole	Imidacloprid	Phenthoate/PAP	Thiamethoxam
Chlorfenapyr	Edifenphos	Indoxacarb	Phorate	Thifluzamide
Chlorfluzuron	Endosulfan(Total)	Iprobenfos	Phosalone	Toiclofos-methyl
Chlorothalonil	EPN	Iprodione	Pirimiphos-methyl	Triadimelone
Chlorpyrifos	Ethoprophos(Ethoprop)	Isoprocarb/MIPC	Probenazole	Tricyclazole
Chlorpyrifos-methyl	Fenarimol	Isoprothiolane	Procymidone	Trifloxystrobin
Clothianidin	Fenitrothion/MEP	Kresoxim-methyl	Pyraclostrobin	Triflumizole
Cyazofamid	Fenobucarb	Lufenuron	Pyrazophos	Vinclozolin
Cyfluthrin(Total)	Fenoxanil	Malathion	Pyridaben	
Cyhalothrin	Fenpropathrin	Mepanipyrim	Pyridalyl	
Cymoxanil	Fenthion/MPP	Metaxyl	Pyrimethanil	
결과 (mg/kg)	Boscalid 0.159(기준치:1.0), Carbendazim 0.017(기준치:3.0) Kresoxim-methyl 0.037(기준치:0.1), Tebuconazole 0.087(기준치:0.5) 외 상기항목 불검출			
확인	작성자(시험자)		승인자(기술책임자)	
	성명: 이화진	성명: 이혜숙		
* 본 분석결과를 선전·광고·소송 등 법적요건으로 사용할 수 없습니다. * 위와 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것입니다. * 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.				
2014년 12월 16일				
주식회사 피렘코리온				

시험 성적서 (Test Certificate)		접수번호	PCAM - 1412 - 0214	
		페이지	(1) / (총 1)	
우 305-510 대전광역시 유성구 테크노 11로 12 (합림동 867) / 전화 (042)823-8680-1 / 전송 (042)823-8682				
1. 시료내용				
기관명	한국생명공학연구원	의뢰일자	2014년 12월 11일	
생산지/주소	대전광역시 유성구 과학로 125	의뢰자	한국생명공학연구원	
시료명	시료(3-2)	시험장소	분석실	
시험기간	2014년 12월 11일 ~ 2014년 12월 16일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC	
용도	연구용 (102항목)	시험환경온도	(22 ~ 24) °C	
		시험환경습도	(35 ~ 40) %	
2. 잔류농약검사결과				
검사항목 102 성분				
Acetamiprid	Cypermethrin(Total)	Fenvalerate	Methidathion	Tebuconazole
Azoxystrobin	Cyprodinil	Fipronil	Methiocarb	Tebufenozide
Bifenthrin	Deltamethrin	Fludioxonil	Methomyl	Tebufenpyrad
Bifentanol	Diazinon	Flufenoxuron	Nuarimol	Tebupirimfos
Boscalid	Dichlofluanid	Fluquinconazole	Paclotubrazol	Teflubenzuron
Buprofezin	Dicofol	Flutolanil	Parathion	Tefluthrin
Butachlor	Diethofencarb	Fthalide	Penconazole	Terbufos
Cadusafos	Difenoconazole	Furathiocarb	Pencycuron	Tetraconazole
Carbaryl	Diflubenzuron	Halfenprox	Pendimethalin	Tetraclorid
Carbendazim	Dimethomorph	Hexaconazole	Permethrin	Thiacloprid
Carbofuran	Diniconazole	Imidacloprid	Phenthoate/PAP	Thiamethoxam
Chlorfenapyr	Edifenphos	Indoxacarb	Phorate	Thifluzamide
Chlorfluzuron	Endosulfan(Total)	Iprobenfos	Phosalone	Toiclofos-methyl
Chlorothalonil	EPN	Iprodione	Pirimiphos-methyl	Triadimelone
Chlorpyrifos	Ethoprophos(Ethoprop)	Isoprocarb/MIPC	Probenazole	Tricyclazole
Chlorpyrifos-methyl	Fenarimol	Isoprothiolane	Procymidone	Trifloxystrobin
Clothianidin	Fenitrothion/MEP	Kresoxim-methyl	Pyraclostrobin	Triflumizole
Cyazofamid	Fenobucarb	Lufenuron	Pyrazophos	Vinclozolin
Cyfluthrin(Total)	Fenoxanil	Malathion	Pyridaben	
Cyhalothrin	Fenpropathrin	Mepanipyrim	Pyridalyl	
Cymoxanil	Fenthion/MPP	Metaxyl	Pyrimethanil	
결과 (mg/kg)	상기항목 불검출			
확인	작성자(시험자)		승인자(기술책임자)	
	성명: 이화진	성명: 이혜숙		
* 본 분석결과를 선전·광고·소송 등 법적요건으로 사용할 수 없습니다. * 위와 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것입니다. * 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.				
2014년 12월 16일				
주식회사 피렘코리온				

그림 63. 잔류농약 시험성적서

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용 및 관련분야에의 기여도
<p>잔류농약 분해효소 Laccase 유전자 확보 및 개량</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 126종의 바실러스 균주를 수집하고 항진균 및 항세균 활성 검정 등의 특성 분석 - 28종의 잔류농약 분해효소 Laccase 유전자를 확보 및 바실러스에서 과발현 시도 - 과발현된 바실러스 서틸리스 Laccase에 대한 특성 분석 결과, 세포내에서만 발현되며 상온에서 매우 안정하게 활성이 유지되고 단백질 분해효소에 대한 안정성이 우수하며 다양한 화학물질 분해능이 있음을 확인하였고 바실러스 포자에서의 표면발현 확인 - 발현양 비교를 위해 상업적으로 판매하는 바실러스 발현시스템과 비교 - <i>Flavobacterium</i>의 organophosphate hydrolase (OPH) 유전자를 화학적으로 합성하여 바실러스에서 과발현하였고 농약 분해활성을 확인 - 잔류농약 분해효소의 개량을 위한 스크리닝 시스템 수립 - 분자진화기술을 통하여 활성이 증가된 변이체 다수 확보
<p>non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - non-GMO 바실러스 게놈 엔지니어링 기술 개발을 위한 고효율 형질전환 기술 개발 - counter selectable marker 개발을 위해 새로운 합성유전자 조절회로를 설계하였고 이를 이용하여 외래 유전자의 흔적을 전혀 남기지 않고 바실러스 게놈상에서 특정 위치의 DNA 염기서열에 돌연변이를 일으키는 원천기술 개발 - 이를 이용하여 게놈의 특정 위치에 insertion, deletion 및 point mutation이 효율적으로 일어남을 증명 - non-GMO 게놈엔지니어링 기술을 이용하여 Laccase가 과발현된 non-GMO 바실러스 균주 제작 - Laccase가 과발현된 non-GMO 바실러스 균주 및 OPH 과발현 균주를 대상으로 농약분해 활성을 검정한 결과 Laccase와 OPH가 시너지 효과가 있음을 확인 - 논문 (Nucleic Acids Res (IF=8.080) 및 특허 출원

<p>바실러스 발현시스템 개발</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바실러스에서 산업적으로 유용한 단백질을 생산하기 위하여 <i>Bacillus thuringiensis</i> 유래 Cry 프로모터를 포함하고, 상위에 <i>B. subtilis</i> 유래의 <i>aprE</i> 또는 <i>rapA</i> 프로모터를 포함하는 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 대량 생산방법 개발, 특허 출원 - 또한 <i>B. thuringiensis</i> Cry 프로모터의 상위 영역에 UP 엘리먼트를 포함하는 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 생산방법 개발, 특허 출원 - 목적 단백질인 AprE의 개시 코돈 뒤의 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하여 활성이 연속적으로 나타나는 것을 확인 - OPH 개시코돈 뒤 11개 아미노산에 동의돌연변이 라이브러리를 제작하고 스크리닝한 결과 약 6배 정도 효소활성이 증가된 변이체 확보 - multicopy Laccase 발현 균주는 single copy Laccase 발현 균주와 비슷한 활성을 나타냄을 확인 - Laccase, OPH 외에 농약을 분해할 수 있는 Cytochrome P450, Esterase, GST 유전자를 성공적으로 발현
<p>효소 및 포자 대량생산, 시제품 제작</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바실러스 대량배양 발효 배지에서 48시간동안 대량배양 - 세포 내에서 발현되는 단백질을 세포 밖으로 분비되도록 라이소자임과 계면활성제를 처리한 잔류농약 분해 성능 검정용 시제품을 제작
<p>사과 잔류농약 성분의 분해능 검정</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 클로티아니딘, 사이퍼메트린, 페니트로치온, 메티다치온, 포스티아제이트에 대한 농약 분해능은 생물학적 검정을 통해 확인 - 프로클로라츠, 테부코나졸에 대한 분해능은 고체 배지 상 저해환 크기를 통해 확인 - BMC21, GST가 대부분 농약에 대한 분해능이 있음을 확인 - 특정 농약 (실바코)과 위의 시제품을 처리한 사과의 잔류농약분석 결과, 농약이 검출되지 않았음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 효소가 과발현된 바실러스 균주는 균을 모두 파쇄하여 제품화 하여야 할 것임. 대량배양용 배지를 사용하여 균을 배양한 후 균을 모두 파쇄한 시제품을 제작하였음.
- 2014년 9월 2일 참여기업 연구원을 대상으로 단백질 발현 기본 원리 및 발현시스템 특허에 대해 이는 효율적인 효소 생산에 활용될 수 있을 것임.
- 다음과 같은 3편의 특허를 국내에 출원하였음.
 - 제목: 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 생산방법, 출원번호: 10-2014-0002546, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-01-08.
 - 제목: 변이균주 제조용 조성물 및 이를 이용하여 변이균주를 제조하는 방법, 출원번호: 10-2014-0014256, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-02-07.
 - 제목: 바실러스 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질의 제조방법, 출원번호: 10-2014-0063980, 출원국: 대한민국, 출원일: 2014-05-27.
- 국외 저명저널 (Nucleic Acids Res.(IF=8.808))을 포함하여 다음과 같은 3편의 논문을 발표하였음.
 - Jeong H, Jeong DE, Sim YM, Park SH, Choi SK. 2013. Genome Sequence of *Lysinibacillus sphaericus* Strain KCTC 3346. Genome Announc. 1: 625-626.
 - Jeong H, Park SH, Choi SK. 2014. Genome Sequence of the AcrySTALLiferous *Bacillus thuringiensis* Serovar *Israelensis* Strain 4Q7, Widely Used as a Recombination Host. Genome Announc.. 2: 1-2.
 - Jeong DE, Park SH, Pan JG, Kim EJ and Choi SK. 2014. Genome engineering using a synthetic gene circuit in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. doi: 10.1093/nar/gku1380.
- 국내 및 국제 학술대회 성과는 다음과 같음.
 - 학술대회 명칭: 2013 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 평창

알펜시아, 일시: 2010-07-04, 발표논문 제목: Overexpression of Laccase in Bacillus subtilis, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, Jae-Gu Pan, Eui-Joong Kim and Soo-Keun Choi.

- 학술대회 명칭: SIMB 2013 Annual meeting, 장소: Sheraton San Diego, San Diego, CA, USA. 일시: 2013-08-11, 발표논문 제목: Development of a counter-selectable marker system for genome mutation in Bacillus subtilis. 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, and Soo-Keun Choi.

- 학술대회 명칭: 2013 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, 장소: The-K Seoul Hotel, Seoul, Korea, 일시: 2013-10-17, 발표논문 제목: Expression of Bacillus spore enzyme CotA in Bacillus subtilis, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, Jae-Gu Pan, Eui-Joong Kim and Soo-Keun Choi.

- 본 연구의 성과는 참여기업인 (주)제노포커스에 기술이전할 예정임. 현재 기술이전에 대한 구체적인 조건을 협상 중에 있음.
- 본 연구의 효소는 추후 필드테스트 및 발효 스케일업 등의 후속연구를 수행한 후 참여기업을 통해 사업화할 예정임.
- 본 연구의 효소제품은 단독제품으로도 사용 가능하지만 기존 미생물농약과 함께 사용할 수 있는 복합제제의 형태로도 제품화 할 수 있을 것으로 기대함.
- 생물농약 전문기업과 기술, 생산, 마케팅 제휴

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 중국, 대만의 WTO 가입, 여러 나라간의 자유무역협정 (FTA)의 체결 등으로 우리나라의 농업 여건이 급격하게 변하고 있음. 농산물 교역의 자유화는 해외 농산물의 수입 증대로 인하여 국내 농업의 파괴 등 파급효과가 클 것으로 예상되지만 한편으로는 중국, 일본을 비롯한 해외 시장으로의 수출 증대 가능성도 높아지는 긍정적인 측면도 있음.
- 경제 수준의 향상으로 외식, 가공식품의 이용이 증대하면서 고품질, 안전한 먹거리에 대한 요구도 높아지고 있음. 여기에 농산물의 농약 잔류 문제는 신선농산물에 대한 신뢰, 안정 문제로 직결되기 때문에 높은 수준의 관리가 필요함.
- 최근 일본, 대만, 유럽 등 농산물 수입국이 자국농업 보호와 안정성 확보를 위해 수입농산물에 대한 검역을 강화하고 있어 잔류농약 문제가 농산물 수출에 걸림돌이 되고 있음.
- 안전성이 확보된 고품질의 수출농산물을 생산하기 위하여 수확후 처리과정에서 친환경적인 소재를 적용하여 잔류량 자체를 경감하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있음.
- 살포된 농약성분들 중에서 농작물에 흡수되지 못하는 것들이 토양에 잔류하는 문제가 나타났고, 이에 오염물질을 분해하는 미생물을 이용한 친환경적이며 비용 효율이 높은 생물학적 처리 방법에 대한 관심이 높아짐.
- 미국 노스캐롤라이나대학 연구자들은 감자 밭 토양 속에서 자라는 세균에 있는 효소가 감자에 발생하는 해충을 방제하기 위해 사용되는 강력한 농약의 잔류물을 분해시킬 수 있다는 사실을 밝혀냄. (KISTI 『글로벌동향브리핑(GTB)』)
- 중국과학원 산하 미생물 연구소에서는 설퍼닐류어리어 (Sulfonylurea) 유형 제초제를 분해하는 미생물 자원을 수집 및 육성하는데 성공하였음. (KISTI 『글로벌동향브리핑(GTB)』)
- Pesticides in the Modern World (2011)에 따르면, 주로 토양에 서식하는 *Bacillus*, *Archrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonase* sp.가 유기염소계 농약을 분해한다고 알려져 있음. 유기인계 농약을 분해할 수 있는 미생물로는 fenpropathrin을 분해하는 *Sphingobium* sp., Organophosphorus hydrolase (OPH)를 생산하여 유기인계 화합물을 분해하는 *Flavobacterium*, *Pseudomonas* sp., ρ -nitrophenol (PNP)을 분해하는 *Ochrobacterium* sp.가 있음. 카바메이트계 농약은 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*,

Achromobacterium, *Sphigomonas*, *Arthrobacter* sp.,에 의해 분해될 수 있음. 미생물의 dual-species 콘소시움을 구성하여 유기인계 농약에서 가장 많이 이용되는 methyl parathion을 완전 분해할 수 있었음. 단일 균주에 의한 농약 분해는 한계가 있어 위와 같이 분해 미생물의 콘소시움을 이용하여 농약을 최종적으로 물과 이산화탄소로 무기화시키는 방법을 구축하였음.

- Biodegradation (2013)과 Pesticides (2012)에 따르면, 미생물에 의해 생산된 효소가 많은 농약의 분해 작용에 중요한 역할을 하여 생물학적 정화에 이용됨. 농약 분해에 관여하는 효소로는 lignin peroxidase, laccases, oxidases, esterases, glutathione S-transferases (GSTs), cytochrome P450s 등이 있음. 알려진 농약 분해 효소 중 Phosphotriesterases (PTEs)는 유기인계 농약을 가수분해하거나 해독시킴. methyl parathion에 대한 가수분해 능력이 있는 효소로 *Flavobacterium* sp.로부터 분리된 OPH (opd gene), *Plesimonas* sp.로부터 분리된 MPH (mpd gene). *Pseudomonas motteilli*로부터 분리된 HOCA (hydrolysis of coroxon; hocA gene)가 발견되었음. Estrases는 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 농약의 에스테르 결합을 가수분해를 촉매함. Oxidoreductases는 전자를 한 분자에서 다른 분자로 옮기는 촉매역할을 하는 효소로, 전 세계적으로 널리 사용되는 유기 염소계 농약인 endosulfan의 분해에 관여함. Endosulfan이 분해되면 첫 번째 대사산물로 endosulfan diol과 endosulfan sulfate가 생성되는데, endosulfan sulfate는 endosulfan과 비슷한 독성을 가짐. endosulfan이 완전히 무기화된 보고는 없지만, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepaeia*가 이를 분해하여 저독성의 대사산물을 만들어 냄. Cytochrome P450s은 화학물질의 산화를 촉매하는 heme monooxygenase로, 광범위한 기질 특이성을 가져 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계, DDT, 키틴생합성 저해제, 유충호르몬 모방물질 등과 같은 다양한 범위의 물질을 대사할 수 있음.

- 다음과 같이 세균이나 곰팡이 유래의 laccase가 다양한 화학 물질을 분해할 수 있다고 다수 보고되었음. Keum 등 (2004)은 매개체인 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidiny1 N-oxy radical (TEMPO) 존재 시 백색부후균의 laccase가 polychlorinated biphenyls (PCBs)를 분해한다는 결과를 발표하였음. Tatsuo 등 (2006)은 구름버섯의 laccase와 매개체로 ABTS를 사용하여 제초제인 Dymron을 24시간동안 90% 이상 분해하였음. Koschorreck 등 (2008)는 *Bacillus licheniformis*의 laccase를 *E.coli*에서 발현하여 몇몇 개의 페놀산을 산화시키거나 이합체화 반응을 유발하는 것을 확인하였음. 이 외에도 Koschorreck 등 (2009)은 효소의 기능을 개선하기 위해 laccase에 임의돌연변이와 위치

지정돌연변이를 유발하여 야생균주보다 발현정도를 11.4배 높였고, 페룰산 (ferulic acid)의 이합체화 반응과 산업적 염료의 탈색 반응에 훨씬 높은 효율을 나타내었음. Cholarajan 등 (2009)은 laccase활성을 가진 영지버섯을 순수 배양하여 cypermethrin과 endosulfan과 섞어 30일 이상 반응시켰을 때 각 농약이 분해됨을 확인함. Trovaslet-Leroy 등 (2010)은 구름버섯으로부터 순수 분리한 laccase가 환원 매개체인 ABTS 존재 하에서 유기인계 화합물을 분해한다고 보고하였음. Wang 등 (2011)은 토양으로부터 laccase활성을 가진 *B. subtilis*를 분리하고, 이들의 포자를 이용하여 염료가 50~90% 탈색되는 것을 확인하였음. Huifang 등 (2013)은 효모 *Pichia pastoris*에서 구름버섯의 laccase를 발현시켰고, 천연 매기체인 바닐린을 첨가하여 chlorpyrifos의 분해정도가 증가한 것을 확인하였음. Uclnik (2013)는 2종의 백색부후균 (구름버섯, 느타리 버섯) 배양액에 유기염소계 살충제인 lindane과 endosulfan을 첨가하여 GC-MS를 통해 농약이 분해된 것을 확인하였고, 곰팡이 laccase와 세균의 laccase(CotA) 역시 이들을 분해하는 것을 확인하였음. 또한 세균의 laccase가 곰팡이 laccase보다 훨씬 효과적인 살충제 분해효과를 보였음.

- 이 외에도 Mollania 등 (2011)은 *Bacillus* sp. HR03 유래 laccase의 내열성을 증가시키기 위해 directed point mutation을 유발하여 야생균주보다 9배 높은 활성을 가진 돌연변이를 얻었음. Gupta 등 (2010)은 *B. subtilis*의 CotA의 낮은 기질 특이성을 개선하기 위하여 분자진화기술을 이용하여 CotA의 라이브러리를 제작하였고, 기질인 ABTS와 SGZ를 이용하여 120배 이상 활성이 증가된 균주를 스크리닝함. 위와 같은 활성을 가진 laccase는 오염된 환경을 재생, 복원하는 bioremediation 산업 등에 적용할 수 있을 것임.
- 핀란드 멧겐(MetGen)사는 산업가공에서 다양하게 쓰이는 효소를 개발하는 곳으로, 유전적 변형을 거친 laccase를 경제성 있는 규모로 생산해 다양한 산업별 요구에 활용하고 있음 (코트라 헬싱키 무역관 보유 자료).
- 유기인계 화합물 (Organophosphate, OP)은 살충제, 제초제, 가스제, 연료성분 및 생화학 무기 등에 광범위하게 사용되고 있으며, 이는 환경오염 등의 많은 문제를 야기함. 유기인계 화합물의 제거는 주로 소각, 매립 등의 물리화학적 방법이 사용되고 있으나 또 다른 유해 물질이 배출되어 2차 처리가 요구되는 문제가 있음. 이에 효소를 이용하여 이들을 효과적으로 무독화 시키는 방법에 대한 연구가 이루어지고 있음.
- 유기인계 가수분해효소 (Organophosphate hydrolase, OPH)는 유기인계 화합물을 가수분해하는 효소로, 이를 재조합 대장균에서 발현시키고자 하였음. OPH의 낮은 용해성으로 생산 수율이 매우 낮았고 (Mulbry, et al. 1989), 대장균의 세포막의 기질 또는 독성 물질의

확산 저해에 의한 물질전달의 문제로 인하여 유기인계 화합물의 분해 효율에 영향을 미친다고 알려짐 (Rainina, et al. 1996). 이에 대장균, 효모 등의 세포 표면 (Shimazu, et al. 2001, Takayama, et al. 2006)에서 효과적으로 발현하여 효과적으로 유기인계 화합물을 분해하고자 하였음. Cho 등 (2004)은 가수분해가 쉽지 않은 기질인 클로르피리포스의 기질 특이성을 높이기 위하여 분자진화기술을 통해 활성이 25배 높아진 변종을 얻었음. 또한 OPH에 의해 가수분해된 OPs는 분광학적으로나 전기화학적으로 모니터링 될 수 있기 때문에 살충농약 검출 바이오센서에 사용됨 (Mulchandani, et al. 2001).

- Santos 등 (2014)은 *B. subtilis*와 *Pseudomonas putida*의 dye-decolorizing peroxidases (DyP)를 *E.coli*에서 발현하여 5종의 anthraquinonic dye와 17종의 azo dye를 분해하는지 알아보았음. 24시간 반응시킨 결과, 효소들에 의해 각 염료들이 표백된 정도의 차이가 있었음. *B. subtilis* 효소보다 *Pseudomonas* 효소가 높은 활성을 보였으며, *B. subtilis* laccase와 *Pseudomonas*의 azoreductase보다도 2~40배 높은 활성을 나타내었음.
- Pizzul 등 (2009)은 manganese peroxidase (MnP), laccase, lignin peroxidase (LiP), horseradish peroxidase (HRP)의 농약분해능을 조사하였음. MnP와 $MnSO_4$ 반응에서 glyphosate가 완전히 분해되었고, laccase는 ABTS와 $MnSO_4$, Tween 80이 존재할 때 glyphosate를 분해하였음. LiP는 glyphosate를 분해하지 못하였고, 활성을 보인 효소 mixture를 22개의 다른 농약에 처리하여 이들 모두 20~100% 분해됨을 확인하였음.

제 7 장 연구시설 장비 현황

해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌

- Biodegradation – Life of Science. 2013. Chapter 10. Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process.
- Cho, et al. 2004. Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4681–4685.
- Cho, et al. 2011. Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enz Microb Tech.* 49: 100–104.
- Cholarajan, et al. 2009. Laccase mediated degradation of cypermethrin and endosulfan by using *Ganoderma lucidum*. *Scientia Acta Xaveriana* 1: 49–55.
- Eggert, et al. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of nonphenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS letter.* 391: 144–148.
- Gupta, et al. 2010. Directed evolution of CotA laccase for increased substrate specificity using *Bacillus subtilis* spores. *Protein Engineering Design & Selection.* 23: 679–682.
- Huifang, et al. 2013. Production of a recombinant laccase from *Pichia pastoris* and biodegradation of chlorpyrifos in a Laccase/Vanillin System. *J Microbiol Biotechnol.* 23: 864–871.
- Keum, et al. 2004. Fungal laccase–catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 56: 23–30.
- Koschorreck, et al. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79: 217–224,
- Koschorreck, et al. 2009. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site–directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.* 9: 12–21.
- Kudla, et al. 2009. Coding–sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science.* 324: 255–258.

- Maruyama, et al. 2006. Laccase-mediated oxidative degradation of the herbicide Dymon. *Biotechnol Prog.* 22: 426–430.
- Mollania, et al. 2011. Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme and Microbial Technology.* 49: 446–452.
- Mulbry, et al. 1989. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *J Bacteriol.* 171: 6740–6746.
- Mulchandani, A., et al. 2001. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosens Bioelectron.* 16: 225–230.
- Pesticides – Recent Trends in Pesticide Residue Assay. 2012. Chapter 12. Biodegradation and Bioremediation of Organic Pesticides.
- Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. 2011. Chapter 20. Biodegradation of Pesticides.
- Pizzul, et al. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation.* 20: 751–759.
- Rainina, et al. 1996. The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. *Biosens Bioelectron.* 11: 991–1000.
- Ryu, et al. 2011. Potential for augmentation of fruit quality by foliar application of *Bacilli* spores on apple tree. *Plant Pathol. J.* 27: 164–169.
- Santos, et al. 2014. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 2053–2065.
- Shimazu, et al. 2001. Cell surface display of organophosphorus hydrolase using ice nucleation protein. *Biotechnol Prog.* 17: 76–80.
- Takayama, et al. 2006. Surface Display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog.* 22: 939–943.
- Trovaslet-Leroy, et al. 2010. Application of laccase-mediator system (LMS) for the

- degradation of organophosphorus compounds. *Chemico-Biological Interactions*. 187: 393–396,
- Ulcnik, et al. 2013. Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol*. 29: 2239–2247.
 - Wang, et al. 2011. Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology*. 10: 2186–2192.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.