

660.6

GOVP1200516104

01078826

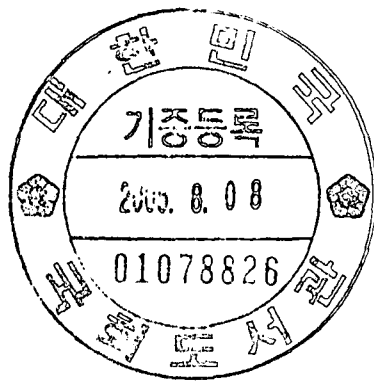
서해 특산 다모류로부터 유용신물질의
특성 및 응용성 연구

Screening and Characterization of
a Novel Bioactive Molecules
from Polychaeta in the Yellow Sea

연 구 기 관
인 하 대 학 교

2003. 4

해양수산부



제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “서해 특산 다모류로부터 유용신물질의 특성 및 응용성 연구” 과제의 4차년 도 (2002. 03 - 2003. 02) 연차보고서로 제출합니다.

주관연구기관명	:	인하대학교
주관연구책임자	:	장 정 순
연 구 원	:	최 장 원
연 구 원	:	주 한 승
연 구 원	:	김 기 태
연 구 조 원	:	박 건 춘
연 구 조 원	:	탁 은 식
연 구 조 원	:	C. G. Kumar
연 구 조 원	:	류 경 희
연 구 조 원	:	박 윤 창
연 구 조 원	:	김 신 영

요 약 문

I. 제 목 : 서해 특산 다모류로부터 유용신물질의 특성 및 응용성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 잠재력이 크고 다양한 해안선과 세계 5대 갯벌 조간대의 하나를 가지고 있다. 이러한 지형적 특성은 이에 포용되고 있는 우리 고유의 다양한 해양생물상과 아울러 생물다양성 유지의 근원이 되는 미래의 자원이며 또한 21C 고부가가치 해양공학산물의 산실일 뿐만 아니라 해안선의 특징을 보아도 단조로운 동해안, 리아스식 해안선의 남해바다 그리고 엄청난 갯벌 조간대를 이루고 있는 서해안 등 실로 우리만이 갖고 있는 특이 해양생물자원의 보고라고 생각된다.

본 연구의 목적은 우리나라 고유의 해양 생물자원으로부터 유용 신물질을 조기에 실용화하기 위한 해양생물 및 갯벌 유래의 해양 신물질 탐색 및 기법개발을 연구의 중요 목표로 설정하였다. 특히 본 연구는 서해연안 갯벌 조간대란 열악한 환경 하에서 훌륭한 적응 특이성을 보이며 서식하고 있는 갯지렁이를 위시한 몇 종류의 갯벌 특이 생물을 이용하여 새로이 발견된 신물질의 특성과 응용성을 집중적으로 분석하고자 하였다. 이는 열악하고 극한적인 변화의 해양 환경 하에 생명체가 주위의 환경을 훌륭히 정화시키면서 적응 서식하고 있는 갯벌생물의 무한한 환경적응력과 생체 내에서의 회복 및 복원과정이 타 생물과는 매우 판이하다는 사실을 암시하며 이러한 생체 내 process를 원활히 수행하기 위해서는 특이 기능을 보유하고 있는 효소 등이 존재해야만 된다고 사료된다. 이미 선진국은 극한효소류 (extremozymes) 나 기타 극한 친화생물질류 (extremophiles) 를 활용한 산업화에 많은 진전을 보이고 있으나 국내의 경우는 본 연구에서와 같이 고유의 우리만의 자원을 갖고 있으면서도 아직 기초단계를 벗어나지 못하고 있다. 또한 아직도 많은 해양 및 갯벌 생물 종은 인류에게 노출되지 않고 태고의 신비를 간직한 채 오늘날에도 아직 밝혀지지 않은 수없이 많은 종류의 신물질을 포용하고 있는 신물질 자원의 보고로 풍부한 해양자원을 가진 우리나라는 무궁무진한 잠재 가능성을 가지고 있는 해양생물의 탐색연구와 유용해양신물질의 한 차원 높은 개발이 시급한 실정이다. 이러한 관점으로 볼 때 갯벌환경이나 특이해양환경에 서식하고 있는 미생물을 포함한 해양생물은 뛰어난 환경적응능력 보유하고 그 기능은 극한 효소 류나 극한 친화생물질 류가 담당할 것으로 추측되며 이를 활용한 해양 생물 공학적 BT로의 접근이 절실하다. 그러나 위에 기술한 생물공학 제품은 선진제국과의 분초를 다투는 치열한 경쟁속에서 우위를 차지해야 만 되는 큰 부담을 안고 있으나 상대적으로 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 이로 인한 기술적인 파급효과는, 유용신물질의 탐색기술에 대한 know-how의 축적, 탐색된 유용신물질의 효과를 확인하고 이의 산업적, 의·약학 기술 및 임

상기술 수준으로의 접목과 발전 가능하고 확인된 유용신물질을 대량생산하고 분리·정제하는 전반적인 해양생물공학산업의 동반 발전할 것이 예상됨으로써, 체계적인 운영과 집중적이고도 조직적인 연구가 이루어질 경우 가까운 장래에 가장 경쟁력과 잠재력이 큰 분야로 부상될 수 있다고 사료된다. 특히 세계 3-4위를 차지하고 있는 갯벌조간대란 매우 특이한 우리 고유의 환경 하에서 서식하고 있는 해양생물을 이용할 경우 신물질의 발견과 실용화를 앞당길 수 있는 큰 경쟁력을 포용하고 있는 분야로 판단된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 실험에 사용한 재료로는 흰 이빨 참 갯지렁이 및 이 갯지렁이에 공생하는 미생물을 사용하였다. 특히 흰 이빨 참 갯지렁이는 현재까지 전 세계적으로 1屬 1種으로 기재되어 있으며 열악한 환경 하에서 훌륭한 적응을 보이며 서식하고 있는 한국 특산종이다. 일반적으로 우리나라 갯벌의 서식 환경은 심한 조수간만의 차, 오염된 민물의 유입 및 극심한 계절별 (여름 및 겨울) 온도 변이 등 매우 열악한 서식환경이지만 훌륭히 적응 생존하고 있음을 알 수 있다. 이러한 열악한 환경을 극복하기 위해서는 갯지렁이 체내에 타 생명체에 비하여 특이 신물질이 존재할 가능성이 높음을 시사한다고 판단되어 갯지렁이 체내 유래의 기능성 신물질 중 제일 후보물질로는 생체 내 반응을 주도하고 있는 “단백질 분해 효소”를 목표로 삼았다. 갯지렁이로부터 추출 정제된 단백질 분해효소는 기존 효소의 기능을 훨씬 능가하는 super효소의 기능을 갖고 있음을 알 수 있었으며 (특허출원 1999. 7. 22.; 등록 326941 호) 이 효소를 대량 생산하기 위하여 단백질 분해효소를 coding 하는 유전자를 cloning을 시도하였다. 또한 이미 전 세계적으로 상업적 용도로 쓰이는 효소의 경우 (덴마크 Novo社의 Alcalase, Esperase, Everase 및 Savinase 등), 대부분이 *Bacillus licheniformis* 와 같은 여러 가지 *Bacillus* 속 미생물 및 이들 미생물을 돌연 변이 시켜 얻고있는 효소이다. 본 연구 결과인 슈퍼효소와 비교하였을 때 갯지렁이 및 갯지렁이 공생 미생물로부터 얻은 효소는 천연효소란 특성을 지니고 있음에도 불구하고 온도 내열성만을 제외하고는 전반적으로 모든 특성 등이 우위를 나타내고 있다. 즉 pH 안정성, 반응최적 pH, 단위 mg 당 효소 활성능, chaotropic agent 존재하의 효소 활성, 중금속 존재하의 효소 활성이 비교 우위를 나타나는 것으로 밝혀졌다. 그러나 Novo 사의 단백질 분해효소를 포함하는 대부분의 단백질 분해효소가 가지고 있는 문제점은 산화제 (과산화수소수 등) 및 음이온성 계면활성제 (SDS 등) 에 매우 불안정한 것으로, 5% 로 처리하여도 그 활성을 잃는 단점이 있다. 그러나 본 연구의 갯지렁이 공생 미생물로부터 유래된 단백질 분해효소는 음이온성 계면활성제 및 산화제 (과산화 수소수 및 sodium perborate) 에 매우 뛰어난 안정성을 가지고 있는 것으로 보고한 바 있다. 이러한 특성을 지니고 있는 갯지렁이 및 갯지렁이 공생미생물의 단백질 분해효소는 상업적 이용성이 매우 광범위하여 우선 세제의 효소첨가제, 가죽제품 공정중 dehairing process, silk degumming process, contact lens washing solution 첨가제, 환경 오염 처리 첨가제, 가죽사료 첨가제 및 의료용 등 실로 방대한 분야에 대한 응용가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구는 이들 단백질 분해효소를 대량 생산하기 위하여, 유전자를 cloning 하고 대량 발효를 통한 산업적으로 사용할 수 있는 가능성을 연구하고자 하였다.

IV. 연구개발결과

제 1단계로

- ① 갯지렁이를 대량으로 채집하여, 시료를 확보함으로써 계절적 시료 난 현상을 최소화하였다.
- ② 채집한 갯지렁이로부터 전 조직을 이용하여 분쇄 후 crude enzyme (조 효소) 분획을 분리하였다
- ③ 분리된 조 효소 분획 (crude enzyme fraction) 을 사용하여 각종 정제과정(ammonium sulfate 처리, 각종 chromatography 단계, 친화chromatography 및 FPLC 등) 을 거친 다음 고도로 정제된 효소 분획을 얻음
- ④ 정제된 효소 분획에 대한 다양한 효소학적 실험 (반응 최적온도, pH, 중금속류에 의한 억제 실험, 기질특이성 실험, 각종 detergent 및 산화제에 의한 영향) 등을 실험하였다.
- ⑤ 이상의 실험 결과로부터 정제한 갯지렁이 단백질 분해효소는
 - Serine계열의 단백질 분해효소 (serine protease)
 - 최적효소 활성도 pH 10
 - 분자량 28 kDa 의 단량체
 - 전 pH 영역에서 안정화
 - 최적 활성 온도는 Temp 50℃
 - 특히 낮은 온도 하에서의 효소 능은 매우 탁월함 (10℃에서30~40% 유지)
 - Detergent, Oxidizing agent, heavy metal ions, reducing agent등의 고농도 노출 하에도 효소의 안정성 유지
- ⑥ N-terminal 아미노산 서열 및 random internal sequence 약 25 잔기에 대한 아미노산서열 분석 후 peptide searching결과 현재까지는 novel peptide로 확인되고 있음

이러한 결과로 미루어보아 서해연안 갯벌서식 갯지렁이로부터 추출, 정제된 serine계열의 단백질 분해효소는 효소학적 측면으로 보아 일반효소의 특성을 훨씬 능가하는 슈퍼효소의 범주에 들며 이와 유사한 현재 상용화된 효소와의 특성분석을 비교하였을 때 여러 특성이 우위를 보임으로서 매우 넓은 산업적 응용성을 제시하였다고 판단된다.

제 2차 년도로는

제 1차년도에서 얻은 여러 결과를 분석한 후 다음과 같은 가장 중요한 연계실험을 일부 하였다. 제 2차 년도 실험은

- 정제된 물질 (extremozyme or 신기능성물질) 에 대한 아미노산 서열 분석
- 전체 아미노산 조성비율 분석
- 정제된 물질의 cDNA library를 제조
- 갯지렁이로부터 단백질 분해효소를 분비하는 미생물 분리
- 공생미생물로부터 단백질 분해효소의 탐색

- 공생미생물로부터 단백질 분해효소의 최적 생산 조건 검토
- 공생미생물로부터 단백질 분해효소와 갯지렁이 슈퍼효소와의 identity 실험
- 공생미생물로부터 단백질 분해효소의 정제 방법 확립
- 미생물의 fermentation 연구

제 3차 년도로는

제 1차 및 2차년도에서 얻은 여러 결과를 분석한 후 다음과 같은 가장 중요한 연계실험을 일부 하였다. 제 3차 년도 실험은

- 갯지렁이 유래의 단백질 분해효소의 gene cloning
- 갯지렁이 유래의 단백질 분해효소에 대한 polyclonal antibody 제조
→ gene cloning 시 antibody screening 방법에 사용
- 공생미생물의 동정
- 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 정제 방법 개선
- 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 최적 생산 조건 검토 (플라스크)
- 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 최적 생산 조건 검토 (배양조)
- 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 특성 분석
- 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 gene cloning
- 미생물의 fermentation 연구
→ 저가 배지 성분 사용을 통한 생산 단가의 경제성 검토 및 대량 생산 방법 확립

제 4차 년도로는

제 1, 2차 및 3차 년도에서 얻은 여러 결과를 분석한 후 다음과 같은 가장 중요한 연계실험을 일부 하였다. 제 4차 년도 실험은

갯지렁이 유래 단백질분해효소

- RT-PCR에 의한 partial DNA 증폭 및 T-vector cloning
- 염기서열 분석 및 BLAST search
- Plaque hybridization에 의한 full length cDNA 검색 및 클론 확보
- In vivo excision & plasmid purification
- 전체 염기서열 분석
- BLAST search 및 GenBank 등록
- PCR에 의한 mature form 증폭 및 발현 vector로 cloning
- Clone screening 및 sequencing
- 단백질 발현 유도 및 분석

공생미생물 유래 단백질분해효소

- 단백질 분해효소의 최적 발현 조건 검토
- 단백질 분해효소의 다양한 응용성 연구
- 단백질 분해효소의 과별현
- Site-directed 돌연변이를 통한 단백질 분해효소의 성능 개선

V. 연구개발결과의 활용계획

이미 위에 기술한바와 같이 갯지렁이 유래의 슈퍼효소에 대한 물질특허 및 제조 특허를 출원한바 있고 선진제국에서의 결과에서와 같이 본 연구결과와 같은 부류에 속하는 슈퍼효소로 이의 응용성은 매우 광범위하다. 본 연구의 응용분야는 세제효소용 (detergent, 세척액, 생활용품, 등), 의학단백질용 (혈전용해제, complement factor, 단백질분해효소 저해제), 식품가공용 (소화 촉진, 연육제, 유제품), 사료첨가제 (Feed additive) 및 화장품용 효소등의 다양한 응용성을 갖고 있다.

S U M M A R Y
(영 문 요 약 문)

We reported a 28 kDa trypsin-like protease in *P. leucophryna*, a unique Korean polychaeta living in the tidal mud flat of Kwangwha island in the Korean West sea (Yellow sea), which is resistant to pH, detergents and also bleaches. We also presumed that there might be possibilities of the presence of some symbiotic bacteria producing proteases in association with the polychaeta, *P. leucophryna*. Therefore, we screened several protease-secreting bacterial species from the body fluid of *P. leucophryna*, and finally isolated twenty-two bacterial strains producing extracellular proteases. Among them, *B. horikoshii*, which was identified on the basis of a partial 16S rRNA sequence, was selected for further studies in an effort to increase the efficiency of protease production. Maximal enzyme production was achieved when the bacterium was incubated in a medium containing 1.5% (w/v) soybean meal supplemented with 1% (w/v) casein and 0.5% (w/v) potassium phosphate at pH 9.0 and 34 °C with shaking at 250 rpm for 16 to 18 h. The partially purified protease was inhibited by PMSF, suggesting that it is a member of the serine protease family (Table 4). The protease had an optimum pH of around 9, which is a typical characteristic of the alkaline proteases. The enzyme had high pH stability and maintained its activity over a broad pH range between 5.5 and 12. Its optimum temperature was ca. 45°C, and it proved stable up to 50°C. The results presented in this paper show that the protease secreted by *B. horikoshii* is an alkaline serine protease, and might be a useful source of protease for industrial and medicinal applications and/or other purposes.

We have also screened and cloned gene encoding protease from polychaeta, *P. leucophryna*.

C O N T E N T S
(영 문 목 차)

CHAPTER 1 Introduction

1. Research Goal and General Subject Matter
2. Point of Aims for R/D

CHAPTER 2 Statement of Art for R/D In and Outside of Nation

1. Status of In and Outside of Nation
2. Industrial Use of Super-enzyme from *Polychaeta* and symbiotic bacteria
3. Prospect and Changes of R/D Circumstance

CHAPTER 3 Results of R/D

1. Detailed Subject Matter For R/D
2. Result of R/D

CHAPTER 4 Degree of achievement of Present R/D for Contribution to Outside

CHAPTER 5 Plan for Application of R/D Effect

CHAPTER 6 Reference

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 목적 및 내용

1. 연구 목적

제 2 절 연구의 착안점

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

1. 국외의 현황

2. 국내의 현황

제 2 절 갯지렁이 및 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 산업적 이용성

제 3 절 여건변화와 전망

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 수행 내용

1. 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

1) Activity assay

2) Gene Screening and Characterization

2-1. PCR and RT-PCR

2-2. Plaque hybridization

2-2-1. Plating

2-2-2. Filter Blotting 및 probe DNA 제조

2-2-3. Hybridization & autoradiography

3) 갯지렁이 cDNA library 재구축

3-1. Total RNA 및 poly(A⁺) RNA 추출

3-2. First & second cDNA 합성

3-2-1. First strand 합성

3-2-2. Second strand 합성

3-3. Phage vector의 packaging 및 library amplification

4) 항체를 이용한 갯지렁이 serine protease의 검색

5) Gene characterization

5-1. DNA sequencing and restriction mapping

5-2. Southern blot analysis

5-3. Northern blot analysis

6) Genomic DNA library 구축 및 검색

- 6-1. Genomic DNA 추출
- 6-2. 제한효소 처리 및 size fractionation
- 6-3. Packaging & Amplification
- 6-4. Plaque hybridization
 - 6-4-1. Plating
 - 6-4-2. Filter Blotting 및 probe DNA 제조
 - 6-4-3. Hybridization
 - 6-4-4. PCR에 의한 유전자 증폭 및 확인
 - 6-4-5. Genomic DNA 분석

7) Expression of the serine protease gene in *E. coli*

- 7-1. 발현 vector로 클로닝
- 7-2. 재조합 단백질 유도 및 PAGE 분석
- 7-3. 단백질 분석 (Western blot analysis)
- 7-4. Expression optimization

2. 공생 미생물 유래 단백질 분해효소

- 1) Activity assay
- 2) 발효에 의한 bacterial protease 의 생산
- 3) Bacterial 단백질 분해효소의 gene cloning
 - 3-1. gene cloning
 - 3-2. Expression

제 2 절 지금까지의 연구결과

1. 당해 연도 종합

- 1) 갯지렁이 유래 단백질 분해효소
- 2) 공생 미생물 유래 단백질 분해효소

2. 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

- 1) RT-PCR에 의한 serine protease 유전자 검색
 - 1-1. Oligonucleotide design for new conserved region
 - 1-2. RT-PCR
 - 1-3. Total cDNA를 주형으로 이용한 PCR

2) 염기서열분석 및 blast search

3) Screening of the full-length serine protease cDNA using partial probe DNA from cDNA library of *Periserrula leucophryna*

- 3-1. Primary Screening by plaque hybridization
 - 3-1-1. Filter Blotting 및 probe DNA 제조
 - 3-1-2. Hybridization & autoradiography
- 3-2. Secondary Screening by plaque hybridization

3-2-1. Plating, hybridization, & autoradiography

3-3-2. In vivo excision

- 4) 염기서열분석 및 blast search
 - 5) 재조합 단백질 유도 및 PAGE 분석
3. 공생미생물 유래 단백질 분해효소
- 1) Lab scale fermentation
 - 2) Large scale fermentation
 - 3) 단백질 분해효소 회수 공정
 - 4) 공생미생물 유래 단백질 분해효소의 안정성 비교 분석
 - 5) 세척력
 - 6) 대두박 분해능
 - 7) Capsulation
 - 8) 단백질 분해효소를 분비하는 미생물의 screening
 - 9) 공생미생물 유래 단백질 분해효소의 overexpression
4. 향후 계획
- 1) 갯지렁이 유래 단백질 분해효소
 - 2) 미생물 유래 단백질 분해효소

제 4 장. 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도

제 2 절 대외 기여도

1. 기술적 측면
2. 경제 · 산업적 측면
3. 사회 · 문화적 측면

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

제 6 장 참고 문헌

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 목적 및 내용

1. 연구 목적

우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 잠재력이 큰 다양한 해안선과 세계 5대 갯벌 조간대의 하나를 가지고 있다. 이러한 천혜의 지형적 특성을 갖고 있음에도 불구하고 해양과학 전반에 걸친 물이해와 지정학적 특성이 해양과학의 발전을 크게 저하시켰으나 21C에 들어오면서 해양선진국대 열진입 이란 기치아래 해양수산부주체로 해양과학 전반에 걸친 총괄적 연구개발을 새로이 주도하고 있음은 매우 고무적인 사안이라고 사료된다.

위에 기술한 지형적 특성은 이에 포용되고 있는 우리나라 고유의 다양한 해양생물과 아울러 생물 다양성 유지의 근원이 되는 미래생물자원의 보고이며 또한 21C 고부가가치 해양생물공학산물의 산실일 뿐만 아니라 해안선의 특징을 보아도 단조로운 동해안, 리아스식 해안선의 남해안 그리고 엄청난 갯벌 조간대를 이루고 있는 서해안 등 실로 우리만이 갖고 있는 특이 해양생물자원의 보고라고 생각된다.

이러한 측면으로 볼 때 우리나라 고유의 해양생물자원으로부터 유용신물질을 조기에 실용화하기 위한 해양생물 유래의 해양신물질 탐색 및 기법개발이 매우 시급하다고 생각된다

본 연구는 우리나라 고유의 해양생물자원으로부터 유용 해양신물질을 조기에 실용화하기 위한 탐색 및 기법개발에 연구의 주목적을 두고 있으며 우선 가장 가능성이 큰 두 가지 연구방향으로 추적할 예정이다.

즉 서해연안 갯벌 조간대란 열악한 환경 하에서 훌륭한 적응특이성을 보이며 서식하고 있는 갯지렁이를 위시한 몇 종류의 갯벌 특이생물체를 이용하여 천연소재의 해양 유래의 신물질을 탐색, 실용화를 위한 각종기법 연구를 시도할 예정이다.

제 2 절 연구의 착안점

- 본 실험에 사용한 재료로는 흰 서해 연안 갯벌에 서식하는 흰 이빨 참 갯지렁이 및 갯지렁이 공생 미생물을 screening 하여 사용
- 현재까지 이 종은 전 세계적으로 1屬 1種으로 기재되어 있음으로써, 한국 특산 종으로 확인됨
- 서해연안의 갯벌 조간 대는 세계 3-4 위를 차지하고 있는 갯벌 해양생물의 보고
- 갯벌의 서식 환경이 매우 열악하나 갯벌 특이생물은 훌륭히 생존하고 있음으로 열악한 환경을 극복하기 위해서는 갯지렁이 체내에 특이 물질이 존재할 가능성 높음으로써 이러한 물질이 서식환경과 해양생태학적측면으로 볼 때 오염 정화, 유기물 분해 등 환경오염 제거 등의 현상과 직관된다고 추정
- 갯지렁이 체내 기능성 신물질 중 제일 후보물질로는 생체 내 화학반응을 주도하고 있는 “단백질 분해 효소”를 목표로 삼음.
- 갯지렁이뿐만 아니라 갯지렁이에 공생하는 미생물에서도 특이 물질이 존재할 가능성 높

을 것으로 추측하여 갯지렁이로부터 단백질 분해효소를 분비하는 공생미생물 screening

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

1. 국외의 현황

- 생물산업의 세계 시장규모는 2002년에 약 3,000억 달러 이상으로 전망
- 미국 A. D. Little사와 DRI(Decision Resources Inc.)사의 자료에 따르면, 연 평균 20% 이상의 고성장을 지속할 것으로 전망 (표 1).
- 전체 생물산업 전체 시장중 미국이 약 24%를 차지하고 있고 우리나라는 약 0.2%만을 점유하고 있음. 이는 이 분야의 장래 전망이 매우 희망적인 점 과 아울러 이 분야의 국내 활성화가 절실히 함을 동시에 나타내고 있음 (표 2 및 3)
- 따라서 생물공학 기술의 발전은 가격경쟁력까지 유도하게 되면서, 세계의약품 시장의 미래는 생물 산업에 의한 생산으로 이동될 것으로 전망되고 있음(표 4 및 5).
- 거대한 잠재력과 고부가 가치성 및 환경 친화적인 생물산업 내지 해양생물공학산업은 우리나라 와 같이 부존자원은 적으나 많은 고급인력을 갖고있는 상황에서는 경제, 산업적 측면에서 적합
- 따라서 해양생물자원으로부터의 유용신물질 개발사업은 국가의 경제적으로나 사회적으로 절실히 요구됨

<표 1> 세계 의약품의 수용 전망

(단위 : 억 \$)

구 분	1995 년	2000 년	2005 년	연 평균 증가율 (%)	
				1995~2000	2000~2005
합성의약품	2,600	3,300	4,000	4.9%	3.9%
생물의약품	200	500	1,200	20.1%	19.12%
전체의약품	2,800	3,800	5,200	6.3%	6.5%

자료 : 미국 A.D. Lite/ [MS Pharma Strategy Group, LG 경제연구원, 바이오 의약품산업의
전망과 과제, 1997 년]

<표 2> 1995~2005년중 산업별 성장률 전망

(단위 : %)

생물산업	반도체	메카트로닉스	신소재	자동차	항공기
22.1	9.4	9.1	6.9	3.5	1.4

자료 : Decision Resources Incorporation

<표 3> 주요 선진국과의 비교

(단위 : 억 달러, 개 명)

	미국	일본	한국	비고
시장규모(1999)	134	120	5.6	· 세계시장의 1.2% · 미국의 4.2%
정부예산(1999)	180	27	1.5	· 중앙정부 기준
업체수(2000)	1,283(1999)	약 1,000	350	· 미국의 25%
연구인력	305,000(1995)	130,000(1998)	8,200(1999)	· 미국의 2.4% · 일본의 5.7% 수준

<표 4> 미국의 분야별 효소시장 변화 예측

효소분류	효소종류	효 소 시 장 (억불\$, 5년간 증가율%)		
		1999년 (점유률)	2004년	2009년
특수 효소	Specialty medical	8.7(47.5)	12.75(46.6)	18.55(45.4)
	Polymerases & related	2(10.9)	2.85(42.5)	3.70(29.8)
	Nuclease % related	1.2(6.6)	1.6(33.3)	2.1(31.3)
	Other specialty			
	enzymes	1.5(8.2)	2.5(66.7)	4.5(80.0)
	소계	13.4(73.2)	19.7(47.0)	28.85(46.5)
산업용 효소	식품 & 음료	1.68(9.2)	2.3(36.9)	3.2(39.1)
	농업	1.3(7.1)	1.7(30.8)	2.23(31.2)
	세제	1.09(6.0)	1.48(35.8)	2.0(35.1)
	화장품	0.31(1.7)	0.5(61.3)	0.75(50.0)
	섬유	0.25(1.4)	0.37(48.0)	0.55(48.7)
	기타	0.27(1.5)	0.25(-)	0.02(-)
	소계	4.9(26.8)	6.6(34.7)	8.75(32.6)
합계		18.3(100)	26.3(43.7)	37.6(43.0)

(자료출처 :Freedonia Group보고서)

<표 5> 응용산업별 향후 전망

구 분	내 용
농업분야	-특정활성을 갖는 효소의 유전자 이용 원하는 특정 성질을 갖는 유전자 변형 농작물에 관한 연구
세제분야	-알카리 셀룰라아제, 리파아제등이 첨가되어 이들 효소의 사용량이 증가될 것으로 사료됨
진단분야	-효소의 기질 특이성, 입체적 반응특성으로 인해 고분자/ 저분자 물질이 혼재된 반응액에서 원하는 특정 성분을 물리화학적 예비처리 없이 단 시간에 쉽게 측정 할 수 있음
화학분야	-산업적 목적에 적합하도록 기능이나 특성을 변화시키는 효소개량 기술과 비수용성 유기용매 하에서도 반응을 수행 할 수 있는 반응 시스템 및 이를 위한 효소반응기 개발 등에 관한 연구가 기대됨
식품분야	-기존추세를 유지하는 범위내에서 많이 이루어 질 것으로 판단됨
시약분야	-앞으로 생물산업이 활성화 됨에 따라 주로 이를 위한 기초연구에 활용될 수 있는 실험에 활용될 수 있는 효소들의 발효기술 및 대량 생산 기술 개발이 꾸준히 이루어질 것으로 판단됨
측정분야	-효소를 이용한 바이오센서의 개발은 최근 급격히 발전되고 있는 추세임. 효소막의 안정성을 향상시키는 방향 및 효소를 막에 고정화시키는 기술을 중심으로 특히 임상적인 관련 물질 및 환경오염물질을 측정할 수 있는 장치개발
의약분야	-종래에 대량의 효소 생산이 어렵고, 아직 임상에 응용되지 못했던 극히 미량 존재의 효소나 인체형 효소를 최신 유전공학 기법을 이용하여 쉽게 대량 생산할 수 있기 때문에 효소의 기능성을 기준으로 치료용 약품으로서의 효소이용이 많이 연구도리 것으로 판단됨.

- 산업관련 분야는 세제, 화학, 식품 및 전분 가공, 섬유 등 다양한 산업의 공정 개선 및 제품 기
능 향상에 필요한 물질을 개발하여 공급하는 영역
- 유전자 재조합, 지노믹스, 조합화학 등의 바이오테크 기술이 활발히 적용되고 있음
- 현재 산업관련 바이오산업에서는 산업공정 및 제품에 필요한 효소를 개발하여 공급하는 산업용
효소 분야가 주를 이루고 있음
- 산업용 효소의 개발에 있어 지노믹스, 조합화학 기술을 응용하여 효소의 안정성 제고와 향상된
기능을 가진 신규 효소 탐색 등의 노력이 활발히 이루어지고 있음
- 초기에 효소의 산업적 응용은 주로 섬유공업에서 사용

- *Bacillus subtilis* 로부터 액체배양으로 생산된 α -amylase 가 그 시초
- 효소의 산업적 생산이 활발히 이루어지면서 식품 제조용의 α -amylase, glucoamylase 와 세제용 효소인 alkaline protease 등의 산업적 수요가 증가
- 세제용 효소는 1913년 Otto Rohm이 pancreatin 과 sodium carbonate 로 이루어진 Burnus 란 효소세제를 개발
- 현재는 화학세제로 인하여 심각한 환경오염문제가 대두하게 됨에 따라서 1960 연대 이후, alkaline protease 를 이용한 효소세제의 상품화가 빠른 속도로 진척
- 또한 세제용 효소는 식기 세척용 등의 액체 효소 세제를 사용하려는 움직임이 커짐
- 따라서 내열성 amylase, lipase, protease 를 이용하려는 움직임
- 현재 세계 시장이 연간 6억 달러 규모인 세탁세제용 효소는 덴마크의 Novo가 4가지 효소 (Alcalase, Savinase, Esperase 및 Everase) 를 개발해 전 세계 시장의 60%, 미국의 Genencor (Purafect, Proferase 등) 가 나머지 40% 를 장악

2. 국내의 현황

국내 효소 시장은 표 6 와 같다.

<표 6> 95년 기준 국내 산업용 효소 시장현황 (단위 : 억원)

용도	금액	비중 (%)
세제용	65	16
섬유용	60	15
전분당 관련	40	10
의약용	200	50
환경용 (피혁 등)	35	9
합계	40	100

- 국내 세제용 효소 시장은 합성세제의 수요 정체로 전체 수요가 감소
- Novo 와 Genencor 외의 나머지 기업들은 96년을 기점으로 효소사업을 정리
- 한편, 전량 수입(연간 120억원)에 의존해왔던 세탁 세제용 효소가 국내에서도 개발
 - 제일제당생활화학 연구소와 한국외대 생명공학과 이현환 교수팀은 5년 간 12억 원의 연구비를 투입하여 국내 토양과 한강폐수로부터 단백질 분해효소를 분비하는 균주를 개발하였으나 실용화 는 안되고 있음
 - 인섹트바이오테크는 한국산 무당거미 공생세균으로부터 Arazyme을 개발
- 그외, 국내에서는 의약용 소염 효소제인 serratiopeptidase 가 생산되고 있으며 (유한양행 등), 산업용 효소의 생산은 극히 저조한 실정

제 2 절 갯지렁이 및 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 산업적 이용성

위에 기술한 각종 부가가치가 높은 생물공학 제품은 선진제국과의 분초를 다투는 치열한 경쟁 속에서 우위를 차지 해야만 되는 큰 부담을 안고 있으나 상대적으로 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 체계적인 운영과 집중적인 연구비의 지원이 약속될 경우 가장 경쟁력과 잠재력이 큰 분야라고 사료되며 특히 세계 3-4위를 차지하고 있는 갯벌 조간대란 매우 특이한 우리 고유의 환경 하에서 서식하고 있는 해양생물을 이용할 경우 신물질의 발견과 실용화를 앞당길 수 있는 큰 경쟁력을 포용하고 있는 분야로 판단된다. 따라서 갯지렁이 (특허등록번호 326941 호 및 특허출원번호 01-04027) 및 공생미생물로부터 생산, 정제된 단백질 분해효소는 기존 효소의 성질을 훨씬 능가하는 고 안정성 및 고 기능성 효소의 기능을 갖고 있는 것으로 판단된다. 특히 갯지렁이 공생 미생물이 생산하는 단백질 분해효소의 경우 가장 특징적인 특성은 약산성 이상의 pH (pH 5~12) 에서 매우 안정하며, 음이온성 계면활성제 및 산화제에 매우 안정성이 뛰어나므로써 산업적 응용성이 충분한 것으로 판단된다. 이는 기존의 효소 시장을 장악하고 있는 덴마크 Novo社 의 Alcalase, Savinase 및 Esperase 등이 이러한 안정성을 모두 갖고 있는 효소가 없다는 사실로부터 그 산업적 응용성이 충분함을 추측할 수 있게 하였다. 이러한 특성을 지니고 있는 갯지렁이 공생미생물 유래의 단백질 분해효소는 산업적 이용성은 매우 광범위하여 우선 세제의 효소첨가제, 가죽제품 공정중 dehairing process, silk degumming process, contact lens cleaning solution 첨가제, 환경 오염처리 첨가제, 가죽사료 첨가제 등 실로 방대한 분야에 대한 응용가능성을 제시하고 있다. 따라서 공생 미생물 유래의 단백질 분해 효소를 대량 생산 및 회수하는 방법을 확립함으로써 전적으로 수입에 의존하고 있는 산업용 효소 (연간 120 억원) 를 국산화하고자 하였다. 이상과 같이 효소 산업은 어느 정도의 국내 시장이 존재하고 유용성과 경제성이 입증되면 바로 수익 모델이 될 수 있다는 점에서 벤처기업과 관련 연구자들이 연합하여 도전해 볼 만한 유망한 분야로서 이를 위해서는 효소 및 중요 기술에 대한 특허권 확보 및 시장보호 전략이 무엇보다도 중요하다.

제 3 절 여건변화와 전망

선진제국은 오는 21C의 가장 유력하고 고부가가치의 창출과 환경 친화적인 산업의 일종으로 생명공학분야의 산업을 제 1 로 꼽고 있다. 이 생명공학 분야의 주류는 의약품 및 각종 fine chemicals 등이 대두되고 있다. 이러한 연구를 위한 재료로서 앞으로의 발전 가능성이 큰 분야는 아직까지도 인류에게 많이 노출되지 않아 많은 신비에 쌓여 있으며, 태고의 모습을 간직하고 있는 각종 해양생물로부터의 새롭고 전혀 상상치 못하였던 신 기능성을 갖고 있는 물질이 존재 확률이 가장 높다고 할 수 있다. 이는 많은 해양생물들이 아직도 인간이 쉽게 접근할 수 없는 환경에 서식함으로써, 새로운 신기능성 물질의 보고로 생각되고 있다. 즉 점차적으로 육상으로부터 해양생물로의 전환을 쉽게 알 수 있으며 이는 해양생물자체의 무궁무진한 가능성에 초점이 맞추어진 것으로 생각된다.

국내의 여러 여건은 아직 선진제국과는 많은 격차가 있으나 우리나라 만 이 갖고 있는 많은 장점, 즉 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 잠재력이 큰 다양한 해안선과 세계 5대 갯벌 조간대의 하나를 가지고 있는 천혜의 지형적 특성을 갖고 있다. 따라서 지속적인 투자와 연구가 뒷받침된

다면, 심해저 및 갯벌 등을 포함하는 다양한 해양 환경으로부터 유용한 21C 고부가가치 해양 신물질 및 유용 생물자원을 창출할 것으로 생각된다. 국내 효소시장 상황은 산업적 효소 이용 측면에서 볼 때 선진국에서 생산되는 효소제품을 자유롭게 수입하여 사용할 수 있는 상황으로 사용자 입장에서는 보다 유리하게 선호할 수 있는 상황이다. 따라서 국내 효소 생산 측면에서 기존 효소 제품과 경쟁할 수 있는 품질, 가격이 유리한 효소 제품을 생산하여야 하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 관점에서 기업, 학계 모두 효소 생산 공급원의 검색, 선별작업을 체계적으로 운영하여야 하며 또한, 생산 균주의 탐색 및 기존 효소의 개량작업도 끊임없이 이어져야 할 것이다. 이렇게 함으로써 경쟁 우위의 우수한 생산력을 지닌 균주 확보가 달성될 수 있을 것이며 이를 가능하도록 하기위해 정부, 기업, 학계 등 모두 분야별 공동 협력이 절실히 요구되고 있다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 수행 내용

Protease 는 소화, 흡수, 방어 등의 다양한 기능을 직 간접적으로 담당하고 있으며 활성 자리의 구조에 따라 serine protease, cysteine protease, aspartic protease 그리고 metalloprotease로 구분하고 있다. 본 연구는 서해연안 특종의 한국산 갯지렁이 유래의 단백질 분해효소 gene cloning 및 갯지렁이 공생 미생물 유래의 단백질 분해효소의 최적 생산 조건을 연구하였으며, 공생 미생물로부터 단백질 분해효소를 분리, 정제하여 그 특성을 규명하고 산업적으로 응용 가능성을 연구하였다 (Ref 1~5).

1. 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

1) Activity assay

Assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.0/5 mM CaCl₂)와 sample을 100 ul 되게끔 가하여 mixing한 후 5 ul의 substrate 용액을 가하여 37°C에서 10 분간 incubation 한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 갯지렁이 protease의 경우 이미 확립된 방법을 이용하여 정제하였다.

2) Gene Screening and Characterization

갯지렁이 유래 serine protease cDNA를 찾기 위하여 기존에 구축된 cDNA library를 이용하여 단백질의 부분 아미노산 서열 분석에 의해 얻어진 아미노산 서열에 대한 degenerated oligomer를 합성하였고, 또한 serine protease의 공통적인 conserved region에 대한 oligonucleotide를 설계하여 cDNA 검색을 위한 probe DNA로 사용하였다. 그러나 이런 probe들의 경우 degeneracy 경향에 의해 정확하게 serine protease 아미노산에 대한 codon들과 hybridization 될 확률은 매우 낮기 때문에 probe oligonucleotide 효율을 높일 수 있는 새로운 primer를 설계하여 PCR, RT-PCR, plaque hybridization을 수행하며 또한 경우에 따라서 갯지렁이 내의 serine protease mRNA abundancy가 높은 조직 부위를 선택하여 갯지렁이 cDNA library를 재 구축하여 antibody screening을 병행하려 하였다.

2-1. PCR and RT-PCR

갯지렁이 cDNA library의 total phage DNA 와 *in vivo* excision에 의해 얻은 total cDNAs를 주형으로 여러 가지 농도의 DNA를 사용하여 primer를 각각 1-2 pmole이 되도록 첨가하고, 10 x buffer, 0.2-0.5 mM dNTPs, *Taq* polymerase (1-2 unit) 넣어 primer 길이에 따른 annealing 온도를 결정한 후, 다음과 같은 program에 의해 PCR을 수행한다 (95°C-5 min, 40-45°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 1 cycle, 95°C-1 min, 40-45°C-30 sec, 72°C-2 min 조건에서 30 cycle, 72°C-10 min에서 1 cycle). 얻어진 PCR product는 agarose gel 전기영동에 의해 확인하고 해당되는 위치의 DNA band를 elution하여, T-cloning vector에 subcloning하여 얻은 클론들을 염기서열 분석에 의해 확인하였다.

RT-PCR은 갯지렁이로부터 추출한 total RNA (10-20 μg) 및 poly(A⁺)RNA (1-5 μg)를 주형으로 사용하였다. 1st cDNA 합성은 MMLV reverse transcriptase를 이용하여 oligo(dT)₁₂₋₁₅ 및 random

hexamer primer, buffer, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, RNasin 등을 첨가하여 42°C에서 1 시간 반응 후 heat inactivation 시켰다. Second cDNA는 반응이 끝난 1st cDNA를 주형으로 Taq polymerase를 사용하여 상기 PCR 조건에 의해 관심의 부위를 증폭시켰다. 얻어진 PCR 산물은 agarose gel에서 elution하여 pGEM vector에 클로닝 후 염기서열을 분석하였다.

2-2. Plaque hybridization

새로 설계한 primer를 이용하여 PCR과 RT-PCR에 의해 얻은 클론들의 부분 서열과, 합성한 oligonucleotide를 직접 이용하여 full-length protease cDNA 검색을 위한 탐침유전자로 사용하여 기존에 구축되어 있는 cDNA library를 plaque hybridization을 통해 검색하였다.

2-2-1. Plating

Deep freezer에 보관중인 cDNA library의 titer를 재결정한 후 NZY agar (5 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 5 g yeast extract, 10 g NZ amine, 15 g agar/liter)를 함유하는 150 mm petri dish에 약 80,000 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 plating 하였다. 즉 0.2% maltose와 10 mM MgSO₄를 포함하는 LB 배지 (10 g trypton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl/liter)에서 자란 XL1-Blue MRF 세포들의 밀도를 600 nm (A=600)에서 0.5로 조절한 후 세포 600 μ l 와 SM buffer (5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 ml 2% gelatin/liter)에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액을 섞어 37°C에서 15 분간 배양하였다. 그 후 48°C로 식힌 NZY top agarose 8 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 NZY plate에 붓고 37°C에서 confluent lysis가 일어나도록 배양하였다.

2-2-2. Filter Blotting 및 probe DNA 제조

Plaque hybridization을 위한 일련의 과정들은 Grunstein and Hogness (1975)의 방법에 따라 수행하였다. Lysis가 일어난 plate를 4°C에서 약 1 시간 정도 방치한 후 멸균된 137 mm plaque screen membrane disc (NEN, Du Pont)를 agar plate에 2-3 분 정도 올려놓고 needle을 이용하여 위치를 표시하였다. False positive plaque을 방지하기 위하여 duplicate filter를 약 4 분간 같은 agar plate에 올려놓고 blotting을 하여 1차 screening 과정을 위해 2 개의 filter를 사용하였다. 사용한 master agar plate는 최종적으로 autoradiography에 의한 positive plaque picking을 위해 4°C에 보관하였다. 이렇게 준비된 filter는 1.5 M NaCl과 0.5 N NaOH를 포함하는 denaturation 용액에 2-3 분간 방치하여 phage DNA를 변성시켰다. 그 다음 변성된 DNA를 중화시키기 위하여 1.5 M NaCl과 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)을 갖는 neutralization 용액으로 옮겨 약 5 분간 방치한 후 3 MM paper로 옮겨 수분을 제거하였다. 젖은 상태의 membrane에 DNA를 더욱 견고하게 binding 시키기 위해 UV crosslinker (120,000 μ J of UV energy)로 약 30 초간 crosslink 시켰다.

Probe DNA 제조는 PCR과 RT-PCR에 의해 확보한 클론의 partial DNA에 α -P³²-dCTP와 Prime-a-gene labelling kit (Promega)를 이용하여 동위원소를 labelling 시키고, 합성한 oligonucleotide는 약 1 nmole 정도에 적당량의 γ -P³²-ATP를 넣고 polynucleotide kinase로 end-labelling 한 다음, Sephadex-G-50 column에서 결합되지 않은 동위원소를 제거한 후 겐지럼이

의 serine protease cDNA screening을 위한 probe DNA로 사용하였다.

2-2-3. Hybridization & autoradiography

준비된 membrane들은 prehybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA)를 포함하는(3 ml/membrane) glass dish에 넣고 42°C에서 2 시간 이상 반응시킨 다음, 만들어진 probe DNA를 prehybridization 용액 1 ml 당 약 1×10^6 cpm 이 되도록 첨가하여 42°C에서 8 시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 hybridization 용액을 제거하고 실온에서 2 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10분씩, 2회 washing한 후 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 30 분씩 55-60°C에서 2회 세척하고 최종적으로는 0.1 x SSC and 0.1% SDS 용액으로 background를 줄이는 high stringency 조건하에서 washing한 다음 filter들을 말리고 saran wrap으로 덮어 intensifying screen이 있는 cassette folder에 넣은 후 -70°C에서 X-ray film에 overnight 노출시켰다. Autoradiography에 의해 얻은 duplicate film들을 비교하여 putative plaque들을 master plate로부터 picking하여 SM buffer에 넣고 4°C에 overnight 방치하여 phage들이 스며 나오도록 하였다. 이런 phage들이 protease cDNA를 갖는지 여부를 이차 screening을 통하여 다시 hybridization을 하여 single plaque의 재조합 phage를 분리하고 XL1-Blue MRF 세포로 다시 infection한 후 phage DNA를 추출한 다음 *EcoRI* 과 *HindIII*로 digestion하여 도입된 insert DNA 크기를 agarose gel 상에서 전기영동을 통하여 확인하였다. 또한 *in vivo* excision 과정에 의해 도입된 insert DNA를 함유하는 plasmid를 얻어 유전자 분석을 위해 사용하였다.

3) 갯지렁이 cDNA library 재구축

3-1. Total RNA 및 poly(A⁺) RNA 추출

갯지렁이로부터 total RNA 분리는 Chirgwin 등(1979)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, deep freezer에 보관 중인 갯지렁이 1 g에 10 ml의 denaturing solution (4 M guanidium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)을 넣은 후 얼음 하에서 homogenization을 하고, 원심분리 (5,000 rpm, 15 분)에 의해 상등액을 회수하였다. 그 상등액에 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol과 2 M sodium acetate 0.1 volume을 넣어 수 차례 추출하고 isopropanol로 침전시켜 total RNA pellet를 회수하였다. 얻어진 pellet에 DEPC-treated water를 첨가하여 녹인 후 A₂₆₀에서 농도를 측정한 다음 사용하였다.

갯지렁이에서 분리한 약 500 μg 의 total RNA로부터 oligo(dT) cellulose를 사용하여 Molecular cloning 실험 protocol (Sambrook *et al*, 1989)에 따라 polyadenylated cytoplasmic RNA를 추출하였다. 즉, oligo(dT) powder (Collaborative Biomedical Products) 100 mg을 loading buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS)에 녹여 10 분간 방치하여 equilibration 시킨 후, 원심분리 (1,500 rpm)에 의해 다시 pellet을 회수하여 5 ml의 같은 buffer에 현탁시켰다. Sample RNA가 녹아있는 용액에 5 M NaCl을 첨가하여 최종적으로 0.5 M의 농도로 조절한 후 oligo(dT)가 녹아있는 buffer에 섞고 실온에서 2 시간 배양하였다. 그 후 원심분리에 의해 pellet을 회수하여 loading buffer로 1회 washing한 다음, 같은 buffer에 현탁하여 Econo column (Bio-Rad)에 packing하고, nonpolyadenylated RNA를 제거하기 위하여 washing buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4,

1 mM EDTA, 0.2% SDS)로 260 nm에서 OD 값이 zero가 될 때까지 washing 한 후, elution buffer (1 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS)를 첨가하여 분획을 받아 ethanol 침전에 의해 poly(A⁺) RNA만을 회수하였다. DEPC를 처리한 물로 RNA를 녹인 후 spectrophotometer로 260 nm 와 280 nm에서 각각 OD를 측정하여 양과 순도를 결정한 후 다음 단계인 역전사효소의 template 로 사용하였다.

3-2. First & second cDNA 합성

갯지렁이로부터 분리한 poly(A⁺)RNA에 대한 cDNA library 제조는 directional cDNA library Kit (Novagen)를 이용하여 약간의 실험방법을 변형하여 제조하였다.

3-2-1. First strand 합성

First cDNA의 제조는 5 μ g의 poly(A⁺)RNA를 사용하여 oligo(dT) tail에 HindIII 제한효소 부위를 갖는 oligo(dT) primer를 이용하여 50 μ l의 reaction volume하에서 제조하였다. 즉, 5 μ g의 poly(A⁺)RNA 와 2 μ g의 primer, 적당량의 DEPC-treated 물을 섞고 70°C에서 10 분간 반응 후 얼음 으로 옮겨 RNA의 2차구조를 제거한 다음, 5 μ l의 10 X buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 μ g/ml of RNase free-BSA), 5-methyl dCTP를 함유하는 10 mM dNTPs 3 μ l, RNase Block Ribonuclease inhibitor 1 μ l (40 U/ μ l)를 첨가하여 실온에서 10 분간 방 치하면서 annealing 시켰다. 그 후 Molony murine leukemia virus 역전사효소 4 μ l (200 U/ μ l)를 넣 고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. First cDNA의 합성된 양을 측정하기 위해 0.5 μ l의 α -³²P-dATP (800 Ci/mmol)가 들어있는 다른 tube로 상기의 반응 mixture (5 μ l)를 취하여 옮긴 후 같이 반응하 였다. 반응이 끝난 후 합성된 양을 측정하기 위하여 glass microfiber filter를 사용하여 TCA 침전에 의해 표지된 방사성 동위원소의 양을 counting 하여 계산하고 효율성을 측정하고 그 중 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하였다.

3-2-2. Second strand 합성

Second strand cDNA의 제조는 좋은 수율로 합성된 first cDNA의 반응 mixture에 second strand buffer [20 mM Tris-HCl, pH 6.9, 90 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂, 0.15 mM β -NAD, 10 mM (NH₄)₂SO₄], 10 mM dNTPs, α -³²P-dATP, RNase H (3 unit), DNA polymerase (100 unit)를 첨가한 후, 물로 반 응 volume을 400 μ l로 맞춘 다음 16°C에서 2.5 시간 반응하였다. 반응이 끝난 후 일정량을 취하여 second cDNA 합성효율을 TCA침전에 의해 측정하여 cDNA가 만들어졌음을 확인하고 그 반응 mixture내의 합성된 cDNA의 5'-말단 부위를 *pfu* polymerase 효소를 사용하여 72°C에서 30 분간 blunting 한 다음, cDNA는 phenol-chloroform 추출과 ethanol 침전에 의해 회수하였다. 회수한 second strand의 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하고, 또한 cDNA의 방향성을 부여 하기 위하여 *Eco*RI 및 *Hind*III 제한효소 부위를 포함하는 adaptor를 첨가하여 만들어진 cDNA들과 blunt-end ligation을 한 후 polynucleotide kinase로 5'-말단부위를 인산화 시켰다. 말단 linker내에 있 는 *Eco*RI 및 *Hind*III 제한효소 부위를 sticky end로 만들기 위해 100 unit의 *Eco*RI 및 *Hind*III를 처리 하고 phage vector내로 cloning 효율을 높이기 위하여 cDNA size fractionation column (GIBCO BRL,

Bethesda, MD)을 사용하여 cDNA의 크기별로 분획을 회수한 후 그 중 일부를 취하여 TAE buffer를 사용한 agarose gel 에서 cDNA 분포를 확인하였다. 분획 중 0.5 kb 이상 되는 cDNA만을 모아 phenol-chloroform 추출정제 후 ethanol 침전에 의해 cDNA를 회수한 다음 EtBr agarose plate 상에서 정량하여 그 중 100 ng을 0.5 μ g의 λ Screen vector arm과 12°C에서 overnight ligation하여 packaging을 위해 사용하였다.

3-3. Phage vector의 packaging 및 library amplification

재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 행하였다. 즉, ligation mixture 1 μ l를 kit에 의해 제공된 packaging extract에 넣어 잘 섞고 22°C에서 2 시간 동안 반응한 다음 SM buffer (5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄, 50 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 ml of 2% gelatin/liter) 500 μ l 와 20 μ l의 chloroform 을 첨가하여 반응을 중지하고 원심 분리에 의해 pellet으로부터 상등액을 분리하여 host cell로 infection을 위해 사용하였다. 재조합된 cDNA의 효율을 측정하기 위하여 XL1-Blue MRF' host cell에 packaged phage를 여러 배로 희석한 후, 각각 1 μ l를 첨가하여 균에 흡착시킨 다음 IPTG와 X-Gal이 포함된 top agarose와 섞어 plating 하였다. 그 결과 재조합 plaques (white color)의 cloning 효율을 확인하고 plaque의 수를 측정하여 cDNA library size를 결정하였다. 안정하고 높은 titer를 갖는 library를 만들기 위해 packaged phage를 plate (150 mm)당 50,000 plaques 정도가 형성 되도록 host cell에 infection 하여 NZY bottom agar를 포함하는 150 mm plate에 top agar를 도말하여 1회 amplification을 하였다. SM buffer로 재조합 phage들을 추출하여 titer를 결정하고 DMSO를 첨가하여 -80°C에 보관하였다. Phage library내에 도입된 insert DNA size 분포를 알아보기 위해 helper phage를 이용한 plasmid excision 과정을 거쳐 rescued clone들을 확보한 후, 임의로 20개 clones을 선정하여 LB/Amp 배지에서 키운 다음 plasmid DNA를 추출하여 적절한 제한효소 (*EcoRI* & *HindIII*)로 잘라 agarose gel 전기영동에 의해 insert DNA 크기를 확인하였다.

4) 항체를 이용한 갯지렁이 serine protease의 검색

갯지렁이로부터 serine protease를 순수 분리 정제하여 rat immunization에 의해 만들어진 1차 항원과 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항원을 이용한 ECL system에 의해 갯지렁이 serine protease를 생성하는 클론을 선별하였다. Phage DNA λ TriplEx2 vector에 클로닝 되어 있는 유전자들은 모든 reading frame으로 해독이 가능하므로 발현 유도 시, 유전자 특성에 따른 단백질 검색에 사용될 수 있고, 또한 *lac* promoter를 가지므로 IPTG에 의해 단백질 생성을 유도할 수 있는 특징을 가지고 있다. 보관되어 있는 cDNA library의 titer를 재결정한 후, 0.2% maltose와 10 mM MgSO₄를 포함하는 LB 배지에서 자란 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 600 nm (A=600)에서 0.5로 조절한 후, 세포 600 μ l 와 SM buffer에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액 (약 5,000-10,000 pfu)을 섞어 37°C에서 15 분간 배양하였다. 그 후 48°C로 식힌 2 X YT top agarose 8 ml을 감염된 세포와 섞은 다음, 2 X YT plate (16 g bactotryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl, 15 g Agar/liter)에 붓고 37°C에서 plaque의 크기가 0.5-1 mm 정도 되도록 배양하였다. 비대칭적으로 표시한 membrane filter를 10 mM IPTG 용액에 담궈 equilibration 시킨 다음, plate에 놓고 37°C에서

4 시간동안 배양하여 발현을 유도하였다. 배양 후, filter를 수거하여 TBST 용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)으로 잔여분의 agarose를 제거한 다음, 5% skim milk 용액에 넣고 비특이적인 단백질 결합을 방지하기 위하여 1 시간 배양하였다. Filter를 TBST 용액으로 충분히 washing한 후, 1 차항체 (anti rat IgG)를 TBST 용액으로 희석 (1:1,000) 한 다음, filter를 넣고 1 시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, filter를 washing 하고 2 차항체 (HRP-labelled goat anti rat IgG)를 희석한 (1:1,000) 용액에 filter를 옮겨 1 시간 동안 반응이 일어나도록 하였다. 반응 후, TBST 용액으로 다시 washing 한 다음, ECL 기질 용액과 반응하여 짧은 시간동안 X-ray film에 expose 시킨 후, development하여 결과를 분석하였다. 1 차 screening에 의해 얻은 클론들은 master plate에서 SM buffer에 picking 하여, 2 차, 3 차 screening 과정을 반복하며 최종적으로 얻은 single plaque들은 *in vivo* excision에 의해 plasmid로 rescue한 다음 염기서열 분석에 의해 serine protease 유전자임을 확인하였다.

5) Gene characterization

5-1. DNA sequencing and restriction mapping

선별된 protease cDNA를 갖는 putative phage들로부터 helper phage를 이용한 *in vivo* excision을 행하여 각 clone들에 대한 pScreen-1b phagemid를 얻어 제한효소로 자른 다음 insert DNA size를 비교하였다. 그 중 full-length 크기의 protease cDNA 갖는 clone를 선택하여 cDNA의 염기서열을 T7 또는 SP6 sequencing primer를 이용하여 Sanger-dideoxy chain termination (1977) 방법에 의해 분석하며, 또한 genomic clone의 경우 전체 또는 부분적으로 잘라 pBluescript vector로 subcloning한 다음 sequencing을 수행하였다. 클로닝 된 serine protease 유전자를 여러 가지 제한효소를 처리하여 자르고 agarose gel에서 fractionation하여 얻어진 조각들의 크기와 염기서열을 이용하여 분석된 제한효소 부위와 비교하여 유전자의 정확한 map을 결정하였다.

5-2. Southern blot analysis

Blin and Stafford (1976)의 방법에 따라 추출 정제한 genomic DNA 10 μ g을 여러 가지 제한효소를 처리하여 37°C에서 반응시킨 다음, 0.8% agarose gel에서 fractionation 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25 N HCl에 담구어 depurination 시키고, denaturation과 neutralization을 수행하였다. 분리된 DNA들은 capillary reaction에 의해 gene screen plus membrane으로 이동시킨 다음, protease 부분 유전자를 random prime labelling kit를 이용하여 α -P³²-dCTP 동위원소를 labelling 시켰다. Prehybridization, hybridization, washing, autoradiography는 plaque hybridization을 할 때와 같은 방법에 의해 수행하고, 얻은 결과를 분석하였다.

5-3. Northern blot analysis

갯지렁이 protease mRNA의 정확한 transcript의 크기 및 분포를 조사하기 위하여 total RNA를 Chirgwin 등(1979)의 방법에 의해 분리하고, oligo(dT) cellulose를 사용하여 poly(A⁺) RNA를 추출한 다음, 1% formaldehyde agarose gel에서 fractionation한 후 protease cDNA의 부분적 DNA를 probe로 하여 northern blot을 수행하였다. 즉, 갯지렁이로부터 추출한 poly(A⁺) RNA 2 μ g을 100%

formamide 12.5 μl , 30% formaldehyde 5 μl , 10 x MOPS (Morpholinoprane sulfonic acid, 400 mM MOPS, 100 mM sodium acetate, 10 mM EDTA) 1.5 μl 와 혼합한 후, 60°C에서 10 분간 반응시킨 다음 급속히 얼음 속에서 냉각시켰다. 그후 10 x RNA loading buffer (5 ml glycerol, 20 μl 0.5 M EDTA, 40 mg bromphenol blue, 40 mg xylene cyanol in 10 ml DW)를 첨가하여 sample들을 준비하고, formaldehyde 와 MOPS buffer를 첨가하여 만든 1% agarose gel에 각각의 sample을 loading한 후 fractionation하였다. Blotting, prehybridization, hybridization, washing등은 Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989)의 실험 방법들에 따라 수행하였다.

6) Genomic DNA library 구축 및 검색

6-1. Genomic DNA 추출

갯지렁이로부터 genomic DNA의 추출은 Blin and Stafford (1976)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 액체질소에 얼려 있는 조직 1 g을 미리 냉각시킨 grinding buffer (0.3 M sucrose, 3 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH7.4)에 넣고 덩어리가 없어질 때까지 grinding 한 후, 핵을 얻기 위하여 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 다음 핵을 세척하기 위하여 5 ml의 grinding buffer에 현탁시키고 다시 원심분리에 의해 핵을 수거하였다. Proteinase K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 DNA 추출 lysis 용액 (100 mM EDTA, 1% Sarkosyl) 10 ml을 첨가하여 pellet이 현탁되도록 부드럽게 흔들고 난 후, rotator에 튜브를 놓고 37°C에서 overnight 반응시켰다. 반응이 끝난 용액에 RNase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 1 시간 (37°C) 반응시킨 다음, 5 ml Phenol과 5 ml CHCl_3 를 넣어 섞고 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하였다. 여러 차례 phenol extraction을 한 다음, 상등액을 새로운 튜브로 옮기고 NaCl (0.25 M)과 동량의 isopropanol을 넣어 DNA를 침전시켰다. Pasteur pipette을 이용하여 DNA fiber를 회수하고 70% ethanol로 남아 있는 isopropanol을 제거한 다음, 말리고 적당량 (1 ml)의 TE buffer에 녹여 농도를 측정 한 후 genomic library 구축을 위해 사용하였다.

갯지렁이로부터 분리한 genomic DNA를 사용한 library 구축은 여러 크기의 DNA 조각의 replacement가 가능한 Lambda FIX II vector system (Stratagene)을 이용하며, *in vitro* packaging은 Gigapack Gold III Packaging Extracts (Stratagene)를 사용하여 1 회 amplification에 의해 genomic library를 구축하였다.

6-2. 제한효소 처리 및 size fractionation

분리한 갯지렁이 genomic DNA 50 μg 을 *Bam*HI 효소로 partial digestion 하여 0.6% agarose gel에서 확인한 후, 2 kb에서 6 kb에 이르는 band들을 gel로부터 elution 하여 분리 정제하였다. Lambda FIX vector와 compatible end (*Xho*I digested, filled in with dCTP and dTTP) 를 만들기 위해 GATC의 sticky end를 갖는 각 크기별의 genomic DNA는 dATP와 dGTP만을 사용하여 klenow 효소에 의해 부분적으로 filling 시켰다. Phenol/chloroform에 의한 정제 후 ethanol 침전에 의해 각 크기별로 분포하는 genomic DNA를 얻고, 이미 탈인산화가 되어 있는 vector DNA 1 μg 과 각 크기별 genomic DNA 1 μg 을 섞고 T_4 DNA ligase 2 weiss unit 을 첨가하여 16°C에서 overnight 동안 ligation 반응을 수행하였다. Ligation이 끝난 후 일부를 취하여 agarose gel에서 ligation efficiency를 확인한 다음 1 μl ligate를 사용하여 *in vitro* packaging 하였다.

6-3. Packaging & Amplification

In vitro packaging 은 Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, #200203)를 사용하여 수행하였다. -80°C 에 보관중인 packaging extract를 녹인 후 ligation 된 DNA $1\ \mu\text{l}$ (약 200 ng)를 첨가하고 실온에서 2 시간동안 반응시킨 다음, $500\ \mu\text{l}$ 의 SM buffer와 $20\ \mu\text{l}$ 의 chloroform을 첨가하여 잘 섞고 원심분리에 의해 debris들을 제거한 다음 titering을 위해 4°C 에 보관하였다. 0.2% maltose 와 10 mM MgSO_4 를 포함하는 LB 배지에서 자란 XL1-Blue MRF (P2) 세포들의 밀도를 absorbance 600 nm ($A=600$)에서 측정하고 10 mM MgSO_4 로 흡광도가 0.5가 되도록 희석한 후 숙주세포 $200\ \mu\text{l}$ 와 final packaging extract를 연속적으로 희석한 후 섞어 37°C 에서 15 분간 배양하였다. 그 후 48°C 로 식힌 NZY top agarose 4 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 100 mm NZY agar plate에 붓고 37°C 에서 10 시간 배양한 후 titer를 결정하여 사용한 원액 $1\ \mu\text{l}$ 에 대하여 genomic library의 average size를 측정하였다. Genomic library의 high titer stock을 안정하게 많은 양 얻기 위하여 lambda FixII vector에 cloning 된 genomic DNA를 함유하는 phage를 1 회 증폭하였다. 즉, 상기와 같이 준비된 숙주세포 $600\ \mu\text{l}$ 에 150 mm plate에 1×10^5 plaques이 형성되도록 phage를 섞고 37°C 에서 15 분 배양한 후 10 ml 의 top agarose 용액을 넣어 섞은 후 150 mm plate에 부어 37°C 에서 confluent lysis가 일어날 때까지 배양하였다. 그 후 lysis가 일어난 plate에 SM buffer 10 ml을 첨가한 후 phage가 스며 나올 수 있도록 shaking 하면서 4°C 에서 overnight 배양하였다. 각각의 plate로부터 SM buffer를 회수한 후 chloroform을 5% 되게 넣어 실온에서 15 분간 배양한 후 원심분리에 의해 debris를 제거하였다. 그 중 일부는 DMSO가 7% 되게 첨가하여 -80°C 에 stock으로 보관하고 나머지는 chloroform을 0.3% 되게 넣은 다음 갯지렁이 genomic DNA의 screening을 위해 사용하였다.

6-4. Plaque hybridization

6-4-1. Plating

Deep freezer에 보관중인 genomic DNA library의 titer를 재결정한 후, 150 mm NZY agar plate에 약 50,000 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 plating 하였다. 즉 0.2% maltose와 10 mM MgSO_4 를 포함하는 LB 배지에서 자란 XL1-Blue MRF (P2) 세포들의 밀도를 absorbance 600 ($A=600$)에서 0.5로 조절한 후 세포 $600\ \mu\text{l}$ 와 SM buffer에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액을 섞어 37°C 에서 15분간 배양하였다. 그 후 48°C 로 식힌 NZY top agarose 10 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 150 mm NZY plate에 붓고 37°C 에서 confluent lysis가 일어나도록 배양하였다.

6-4-2. Filter Blotting 및 probe DNA 제조

Plaque hybridization을 위한 일련의 과정들은 Grunstein and Hogness의 (1975) 방법에 따라 수행하며, 갯지렁이 protease cDNA를 screening 할 때와 같이 형성된 plaques들을 membrane filter로 이동시키고 변성과 중화과정을 실시하였다. Protease genomic DNA를 찾기 위한 probe DNA 제조는 이미 찾은 protease cDNA의 full gene이나 또는 부분유전자를 agarose gel에서 elution한 후, Prime-a-Gene Labelling System (Promega)을 이용하여 DNA를 labelling 시켜 갯지렁이의 protease genomic DNA screening을 위하여 사용하였다. 즉, 추출한 DNA 25 ng 정도를 TE buffer와 섞고 9

5°C에서 2 분간 가열하여 변성시킨 다음, reaction buffer, dNTPs, α -P³²-dCTP, klenow fragment (5 unit) 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 가열과 EDTA (20 mM) 첨가에 의해 반응을 중지시킨 다음, Sephadex-G-50 spun column을 이용하여 결합되지 않은 동위원소를 제거한 후, hybridization에 사용하였다.

6-4-3. Hybridization

Prehybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)를 넣은 (3 ml/membrane) glass dish에 filter를 넣고 42°C 에서 2 시간 이상 반응시킨 다음, 만들어진 probe DNA는 100°C에서 5 분간 heating 한 후 급속히 얼음에 담궈 single strand로 변성시키고 hybridization 용액 1 ml 당 약 1×10^6 cpm이 되도록 첨가하여 42°C에서 8 시간 이상 반응시켰다. Washing 과정은 실온에서 2 x SSC 용액으로 10 분씩 2회 washing 한 후, 2 x SSC and 0.5% SDS 용액에서 10 분간 2회, 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10 분씩 (55-60°C) 2회 세척하며 최종적으로는 0.2 x SSC and 0.2% SDS 용액에서 Geiger counter로 동위원소 양을 측정하면서 세척한 후, filter들을 말리고 X-ray film에 노출시켜 development를 실시하였다. 1차 screening 과정에서 얻은 여러 putative plaque들을 picking 하여 갯지렁이 protease genomic DNA를 갖고 있는지 여부를 southern blotting이나 PCR 방법에 의해 확인한 다음, 2차 및 3차 screening 과정을 통하여 single plaque의 phage를 분리하고 다시 숙주세포를 감염시켜 많은 양의 phage DNA 얻은 후 유전자를 분석하였다.

6-4-4. PCR에 의한 유전자 증폭 및 확인

Promoter 분리 및 유전자 분석 또는 필요한 부분을 증폭하기 위하여 밝혀진 protease cDNA의 염기서열 및 클로닝 vector의 서열을 참조하여 primer를 합성하고, Taq polymerase를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 즉, 여러 가지 농도의 DNA를 사용하여 primer를 각각 1-2 pmole이 되도록 첨가하고, 10 X buffer, 0.2-0.5 mM dNTPs, Taq polymerase (1-2 unit) 넣어 primer 길이에 따른 annealing 온도를 결정한 후, 다음과 같은 program에 의해 PCR을 수행한다 (95 °C-5 min, 40-45 °C-30 sec, 72 °C-2 min 조건에서 1 cycle, 95 °C-1 min, 40-45 °C-30 sec, 72 °C-2 min 조건에서 30 cycle, 72 °C-10 min에서 1 cycle). 얻어진 PCR product는 agarose gel 전기영동에 의해 확인하고 T-cloning vector를 이용하여 subcloning하고 그 다음 분석을 위해 사용하였다.

6-4-5. Genomic DNA 분석

선별된 갯지렁이 serine protease genomic DNA를 갖는 phage를 XL1-Blue MRF (P2) 세포로 infection 한 다음 confluent lysis가 일어날 때까지 배양하였다. 그 후 lysis가 일어난 plate에 λ diluent 10 ml을 첨가한 후, phage가 스며 나올 수 있도록 shaking 하면서 4°C에서 overnight 배양하였다. 각각의 plate로부터 λ diluent를 회수한 후, plate lysate 방법에 (Sambrook *et al*, 1989) 따라 λ DNA를 추출하고 여러 제한효소 등으로 잘라 insert size 및 제한효소에 의한 restriction map을 확인하였다. 확인된 클론들은 전체 또는 부분적으로 잘라 pBluescript vector로 subcloning 한 다음

Sanger-dideoxy chain termination 방법에 의해 sequencing을 수행하였다.

얻어진 genomic DNA의 염기서열을 cDNA 및 다른 종들의 것과 비교하여 signal sequence, open reading frame, exon과 intron 부위 및 추정된 아미노산 서열을 결정하였다. 또한 genomic clone의 염기서열을 참고로 하여 promoter 부위를 증폭해 낼 수 있도록 oligonucleotide를 합성하고, template로서 phage나 genomic clone을 사용하여 PCR에 의해 product를 얻어 T-vector로 subcloning 하였다. 제한효소를 이용하여 정확한 부분이 증폭된 지를 확인한 후, 염기서열 분석에 의해 갯지렁이 serine protease 유전자의 5'-flanking 부분의 특성을 파악하였다. 또한 primer extension 방법에 의해 전사시작부위를 확인하기 위하여 추정된 개시코돈 아래쪽의 적절한 부위에 해당하는 oligonucleotide를 합성한 후, γ - P^{32} -ATP와 polynucleotide kinase를 사용하여 end-labelling을 시키고 갯지렁이의 total RNA와 역전사효소를 첨가하여 primer extension 반응을 행하였다. 반응산물의 크기를 측정하기 위하여 같은 primer로 protease genomic clone을 sequencing 한 후, 같은 gel에서 이동시켜 그 크기를 추정하여 전사개시부위를 확인하였다. 얻어진 protease promoter의 세기는 reporter 유전자를 갖는 promoter searching vector로 subcloning한 후, reporter 유전자와 전사적인 융합에 의해 promoter가 작동하면서 발현되는 reporter gene의 단백질 활성을 측정하여 promoter 세기를 측정하였다.

7) Expression of the serine protease gene in *E. coli*

7-1. 발현 vector로 클로닝

분석된 갯지렁이 serine protease 유전자가 클로닝 되어있는 vector로부터 full-length의 유전자를 적절한 제한효소로 자르고 agarose gel에서 fractionation 후, DNA elution kit를 사용하여 유전자를 확보하였다. 발현 vector로는 강력한 T7 promoter를 갖는 pT7-7 vector (Tabor & Richardson, 1985)와 이미 다른 진핵세포 유래의 유전자들을 발현할 때 단백질 생성 효율이 높았던 *trc* promoter와 high copy number를 갖는 pUBJ vector (Choi & Lee, 1996)를 갯지렁이 유전자 cloning을 위하여 변형시켜 vector와 insert DNA를 ligation 시켰다. 대장균의 형질전환은 Cohen 등 (3)의 방법을 변형하여 실시하였다. *E. coli* HB101을 37°C에서 25 ml의 LB 배지에 세포밀도가 OD₆₀₀=0.5가 될 때까지 진탕 배양한 후, 4°C에서 원심분리에 의해 세포를 수거하였다. 균체 침전물에 5 ml의 칼슘 buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 75 mM CaCl₂, 250 mM KCl)를 넣어 균을 현탁시키고 얼음에서 20 분간 방치한 후 6000 rpm에서 3 분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 균체 침전물에 0.8 ml의 칼슘 buffer를 넣어 현탁하여 competent cell을 제조하였다. 이 competent cell 100 μ l에 0.1-0.5 μ g의 DNA를 첨가하여 얼음에 30 분간 방치한 후 42°C에서 1.5 분간 heat shock을 주고, 1 ml의 LB 배지를 첨가하여 37°C에서 1 시간 배양 후, ampicillin (50 μ g/ml)이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하고 37°C에서 overnight 배양하여 형질전환체들을 얻는다. 형질전환체들은 항생제가 첨가된 LB 액체배지에 접종하여 배양하고, 그 배양액의 일부를 취하여 alkaline lysis 방법 (3)에 따라 플라스미드를 추출하였다. Insert DNA가 도입되지 않은 control 플라스미드와 함께 agarose gel에서 크기가 증가한 것들을 일차적으로 선별한 다음 클로닝된 부위의 제한효소로 절단하여 도입된 insert DNA를 확인하였다. 확인된 클론은 T7 발현벡터의 경우에는 *E. coli* BL21(DE3)로 *trc* promoter를 함유하는 vector의 경우에는 *E. coli* JM109 세포로 도입하였다.

7-2. 재조합 단백질 유도 및 PAGE 분석

갯지렁이 유전자가 도입된 발현벡터를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3) 또는 *E. coli* JM109 형질전환체들을 각각 ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 37°C에서 하루 밤 배양하였다. 그 다음날 균을 함유하는 배양액은 같은 배지에 1/200로 희석한 후, 세포밀도가 OD₆₀₀에서 0.5에 도달할 때까지 키운다. 단백질 합성을 유도하기 위하여 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가한 다음, 시간별로 배양액 1 ml을 취하여 단백질 분석을 위한 시료 제조를 위하여 사용하였다. 배양액으로부터 얻어진 균체를 sample buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol blue) 200 μl 에 현탁하여 세포를 파괴한 후 단백질 분석을 위하여 사용하였다. 단백질 전기영동은 Laemmli (1970)에 의한 discontinuous buffer system을 이용한 12% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel에서 분석하였다. 일정한 전기장에서 분리가 끝난 gel은 coomassie brilliant blue 용액에 1 시간 정도 염색한 후 탈색용액 (30% methanol, 10% acetic acid)에 옮겨 탈색을 행하고, 그 후 kodak X-100 필름을 사용하여 촬영한 다음, 전체단백질 중 관심 단백질의 양은 Imageanalyser (Alphainnotech 2200)를 이용하여 분석하였다.

7-3. 단백질 분석 (Western blot analysis)

SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리한 후, Immobilon-P membrane으로 단백질 이동은 electroblotting buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM glycine, 10% methanol)을 사용하여 wet gel blotting을 실시한다 (20 mA, 2 hr). Membrane에 이동 후 비특이적 결합을 방지하기 위해 3% non-fat dried milk가 첨가된 phosphate-buffered saline (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4)으로 1 시간 동안 blocking하고 polyclonal anti-bGH antibody (1:2,000 dilution)를 넣어 1 시간 동안 반응을 시켰다. 결합하지 않은 1차 항체는 washing buffer (PBE + 0.5% Triton X-100)로 10 분간 3회 세척하여 제거하고, goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1:2,000 dilution)를 넣어 1시간 반응을 시키고, 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 그 다음 BCIP/NBT phosphatase substrate system을 사용하여 발색시켜 항원항체 반응에 의해 형성된 band를 확인하였다.

7-4. Expression optimization

갯지렁이 serine protease 생성이 확인된 클론들의 단백질 생성 효율을 최적화 하기 위하여 여러 가지 가능한 배양 조건 즉, 배지, 배양온도, induction stage, expression time, IPTG 농도, host strain 등의 변화에 따른 발현양을 비교 분석하여 대량 생산을 위한 최적 조건을 확립하였다.

2. 공생 미생물 유래 단백질 분해 효소

1) Activity assay

Assay buffer (0.1 M Glycine-NaOH, pH 11) 에 0.5% 가 되게 casein을 녹인 기질 용액 500 μl 와 위의 assay buffer 에 적당하게 희석된 sample 을 100 μl 를 가하여 잘 mixing 하였다. 50°C 에서 10 분간 incubation 한 후 500 μl 의 stop solution (0.11 M trichloroacetic acid/0.22 M sodium acetate/0.33 M acetic acid) 을 가하여 ice 에서 10 분간 더 방치하였다. 15,000 rpm 으로 10 분간

원심 분리하여 반응하지 않은 기질을 제거하고, 상층액을 회수하여 Lowry 방법을 통하여 단백질 분해효소의 작용으로 생성된 tyrosine 의 양을 측정하였다. 280 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Control 로는 20~200 ug 의 tyrosine 을 이용하여 tyrosine 표준 곡선을 얻어 직선식을 얻었으며, 이 직선식으로부터 생성된 tyrosine 의 양을 계산하였다. 효소 1 unit 는 1 분간 1 ug 의 tyrosine 생산에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

2) 발효에 의한 bacterial protease 의 생산

rpm 조건을 변화시키면서 단백질 분해효소의 생산성을 검토하였다.

3) Bacterial 단백질 분해효소의 gene cloning

3-1. gene cloning

이미 cloning 되어 있는 단백질 분해효소의 full gene clone 으로부터 단백질 분해효소 만을 coding 하는 structural gene 을 PCR 방법을 통하여 얻은 후, expression vector 에 cloning 하여 control 로 사용하였다. Primer 1 은 5' end 에 *Bam*HI site 를 갖게 design 하였으며, primer 2 는 *Eco*RI site 를 갖게 design 하였다.

Template (20 ng/ul)	1 ul
Primer 1 (10 pmole/ul)	1 ul
Primer 2 (10 pmole/ul)	1 ul
증류수	17 ul

총	20 ul

각 PCR 반응은 95℃ 에서 4 분간 pre-denaturation 시킨 후 95℃ 에서 1 분간 denaturation, 60℃ 에서 1 분간 annealing, 72℃ 에서 1 분간 extension 하였으며, 위의 denaturation, annealing, extension 과정을 35 번 반복한 후, 최종적으로 72℃ 에서 5 분간 더 extension 하여 주어 생성된 PCR product 의 3' 말단에 A nucleotide 를 갖게 하였다. 생성된 PCR product 는 1% agarose 전기영동하여 약 0.87 Kb 위치의 DNA fragment 를 확인하고, *Eco*RI 및 *Bam*HI 으로 digestion 한 후 예상되는 0.87 Kb DNA fragment 를 Agarose Gel extraction Kit (QIAGEN 사) 를 이용하여 DNA fragment 를 agarose 로부터 용출하였다. 용출한 DNA 는 다시 1% agarose gel electrophoresis 로 확인하여 정량하고 *Eco*RI 및 *Bam*HI 으로 digestion 한 pGEX-4T 또는 pT7-7 vector ligation 하였다.

2× ligation buffer	5.0 ul
<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI treated PCR product	1.5 ul
증류수	1.5 ul
<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI treated vector (50 ng/ul)	1.0 ul
Ligase (3 U/ul)	1.0 ul

total	10.0 ul

반응은 14°C 에서 16 시간 동안 진행하였다. 각 반응액을 *E. coli* BL21(DE3) competent cell 에 transformation 하고 X-gal/IPTG 를 함유하는 LB/Amp plate 에 spreading 한 후 37°C 에서 16 시간 정도 incubation 하여 생성된 colony 를 확인하였다. 이 때 생성된 colony 중에서 recombination 에 의하여 생성된 white colony 만을 선택하였다. Transformation 된 *E. coli* 로부터 Plasmid prep kit (Qiagen 사) 를 이용하여 plasmid 를 정제하여 sequencing 을 의뢰하였다. 얻어진 sequence 결과로부터 target sequence 가 mutation 되었는 지를 확인하였다.

3-2. Expression

단백질 분해효소를 coding 하는 유전자가 도입된 발현벡터를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3) 형질 전환체들을 각각 50 µg/ml 의 ampicillin 이 첨가된 LB 액체 배지에 접종한 후, 37°C 에서 하루 밤 배양하였다. 이 배양액을 100 ml 의 LB 배지에 1% (v/v) 되게 접종한 후, 세포 밀도가 OD₆₀₀ 에서 0.5 에 도달할 때까지 배양한 후 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가한 다음, 시간별로 배양액 1 ml을 취하여 단백질 분석을 위한 시료 제조를 위하여 사용하였다. 배양액으로부터 얻어진 균체를 2X SDS sample buffer 50 µl에 현탁하여 세포를 파괴한 후 단백질 분석을 위하여 사용하였다. 발현된 단백질은 12% SDS-PAGE 로 분석하였다. 일정한 전기장에서 분리가 끝난 gel은 coomassie brilliant blue 용액에 1 시간 정도 염색한 후 탈색용액 (30% methanol, 10% acetic acid)에 옮겨 탈색하여 분석하였다.

제 2 절 지금까지의 연구결과

1. 당해 연도 종합

1) 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

- 3 type의 trypsin-like serine protease partial 클론 확보 (No.5-2, No.9-105, No.10-54)
- 3 type의 trypsin-like serine protease novel gene 확보 (PLSP1, PLSP2, PLSP3)
- 부수적 유전자 확보 [cysteine protease(PLCP), Myohemerythrin, Cyt C oxidase, ribosomal protein, Peroxiredoxin, Calmodulin, etc)
- GenBank 등록 (PLSP2 & PLCP) (bankit517619AY224209)
- pT7/PLSP1(14종), pT7/PLSP2(13종), pT7/PLSP3(10종) 발현 vector 구축

2) 공생 미생물 유래 단백질 분해효소

- Lab-scale 발효조 (5 L)를 이용한 단백질 분해효소의 생산성 개선 연구한 결과 40,000 U/ml 이상의 단백질 분해 효소를 생산
 - 이는 목표치 (30,000 U/ml)를 초과 달성
- Pilot-scale (500 L)로 두 번 대량 생산 결과 약 35,000U/ml 이상의 단백질 분해효소 생산
 - 지속적인 연구 시 생산성 향상 가능성 충분하다고 판단
- 500 L (혹은 그 이상) 대량 생산 시 단백질분해효소를 회수하는 공정 개선
 - 경비, 시간 및 환경 오염을 줄이는 방향으로 지속적 개선예정
- 단백질 분해효소의 산업적 응용성 연구 결과
 - SDS 및 산화제(H₂O₂) 에 Novo 사의 Alcalase 보다 안정성이 뛰어난 것으로 확인
 - EMPA soiled fabric을 이용한 Swatch test (세척력) 시 Novo 사의 Alcalase 와 비교시 세척력 우위에 있음을 확인함으로써 세제첨가제로서 사용 시 경쟁력이 있다고 평가
 - 사료첨가제로서 사용하기 위한 대두박 분해능 연구 결과 사료의 주성분인 대두박의 분해능이 뛰어날 뿐만 아니라 대두박에 존재하는 트립신 inhibitor를 불활성화 시킴으로써 사료 첨가제로서의 사용 가능성을 확인
 - 사료 첨가제로 사용하기 위하여 장에서 잘 작용하도록 장용성 entero-capsulation 시도
 - 갯벌로부터 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 약 100 여종 확보
 - 이들 미생물들 중 최소한 2 종류는 high potent를 갖는 미생물로 판단
 - 지속적인 연구시 매우 높은 단백질 분해효소를 생산하는 균주일 가능성 큼
 - 미생물 유래 단백질 분해효소를 과 발현하기 위하여 발현용 여러 가지 plasmid로 클로닝
 - 재조합 단백질 유도 및 PAGE로 분석한 결과 발현된 미생물 유래 단백질 분해효소가 전체 세포 단백질의 30% 이상 생산

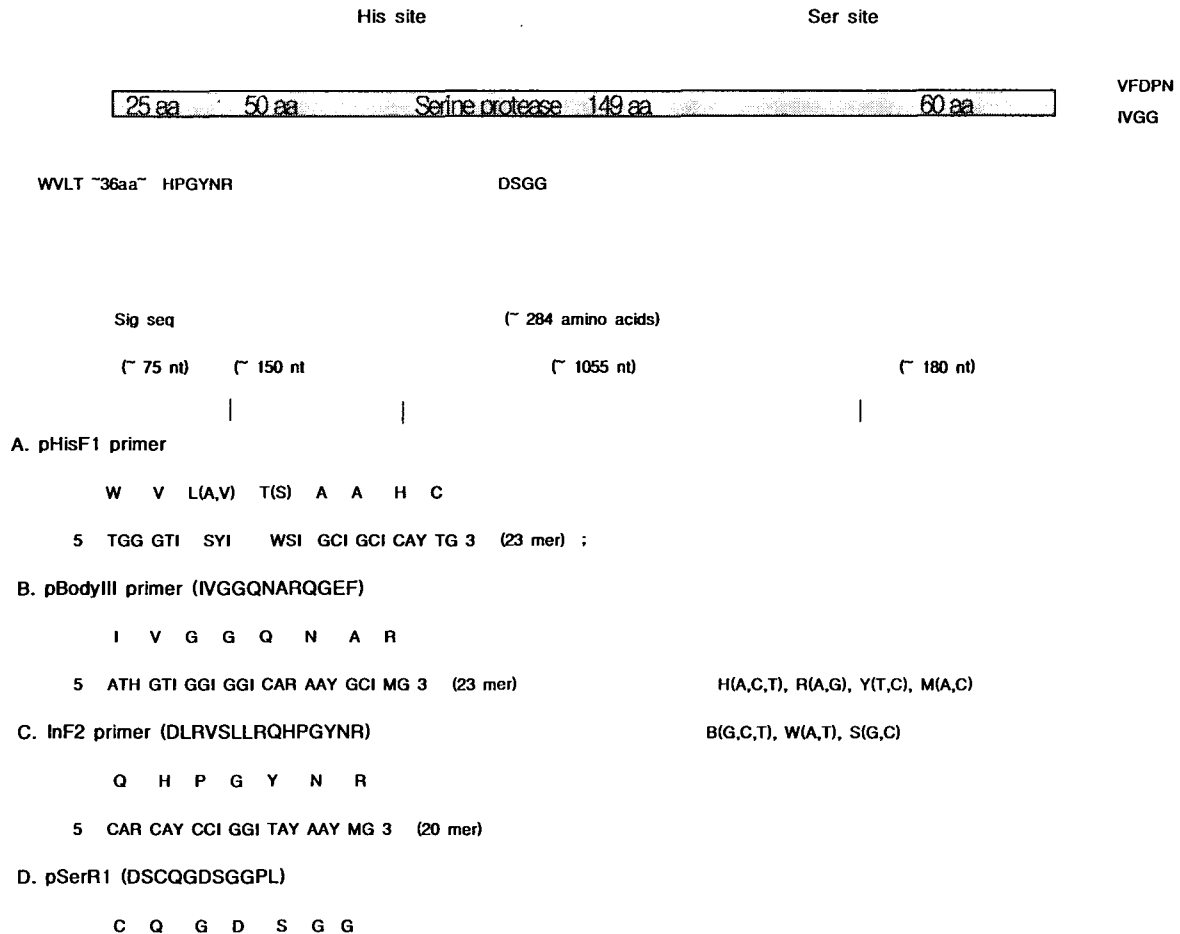
2. 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

1) RT-PCR에 의한 serine protease 유전자 검색

1-1. Oligonucleotide design for new conserved region

*Periserrula leucophryna*로부터 순수분리 정제한 serine protease의 부분 아미노산 서열 분석 결과

밝혀진 아미노산 서열 (VFDPNDFNTLDDNY, IVGGQNARQGEF, DLRVSLLRQ HPGYNR)에 대하여 합성한 oligonucleotide들 (PP1-5, N3, pBody1, pBody2, RP2, InF1 및 InR1)과 catalytic site 중의 하나인 serine conserved region (DSCQGDSGGPL)에 대한 oligonucleotide (SPF1, SPR1, SPF2, 및 SPR2)를 이용한 RT-PCR, total cDNA를 이용한 PCR 및 plaque hybridization 실험 결과, 원하는 serine protease 유전자를 screening 할 수가 없었다. 이는 합성한 oligonucleotide들의 높은 degeneracy에 의해, 즉 정확하게 일치되는 확률이 낮으므로 원하는 클론을 확보하기가 어려운 것으로 판단되었다. 따라서 현재까지 알려진 다른 종들의 serine protease에 관한 정보들을 참조로 하여 degeneracy를 낮출 수 있는 oligonucleotide 합성이 필요하였다. 일반적으로 trypsin like serine protease의 경우 약 280여 개 아미노산으로 구성되어 있고 유전자 크기는 약 1 kb로 예상할 수 있으며 보존된 아미노산 서열을 기준으로 57번 위치의 histidine, 102번의 aspartic acid, 195번의 serine기로 구성된 catalytic triad를 가지고 있으므로 이런 위치의 보존된 아미노산 서열을 참조로 하여 4 가지 종류의 새로운 oligonucleotide를 합성하였다. Histidine 57번에 해당하는 pHisF1 primer와 Serine 195번을 포함하는 pSerR1 primer를 합성하였고 이미 서열 분석에 의해 밝혀진 부분에 대하여 새롭게 설계한 pBodyIII 및 InF2 primer를 합성하여 PCR에 의한 증폭 실험에 사용하였다. Primer 합성 시 degeneracy를 낮추기 위하여 무작위 서열 (A,C,G,T)이 들어가는 부분에 대하여 inosine을 사용함으로써 annealing 과정 동안에 target sequence와 결합할 수 있는 가능성을 증가시켰다.



3 ACR BTY CCI CTR WSI CCI CC 5

5 CC ICC ISW RTC ICC YTB RCA3 (20 mer)

1-2. RT-PCR

total RNA 1 mg으로부터 약 80 μg 의 poly(A⁺) RNA를 얻었으며 260 nm 와 280 nm의 OD 값에 대한 비율은 약 1.7의 순도를 갖는 poly(A⁺)RNA를 얻었다. 그러나 RNA 순도를 더욱 높이기 위하여 상기의 과정을 한번 더 반복하였으며 이때 얻어진 RNA에는 cDNA 합성 효율을 감소시키는 ribosomal RNA band는 전혀 관찰되지 않았으며 RNA 자체의 integrity 또한 넓게 분포하는 것으로 보아 좋은 상태였으므로 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다 (그림. 1).

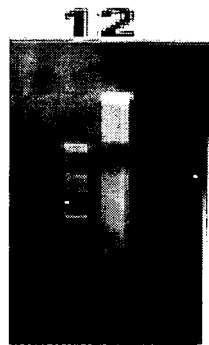


그림 1. Agarose gel pattern of *Periserrula leucophryna* poly(A⁺) RNA.

lane 1: 1 kb ladder, lane 2: 1 μl of poly(A⁺) RNA

분리한 poly(A⁺)RNA 2 μg 을 reverse transcriptase를 이용한 1st cDNA 합성의 template로 사용하였다. 즉, poly(A⁺)RNA (2 μg), oligo(dT) primer (1.5 μg) 및 random hexamer (0.1 μg)를 섞고 70°C에서 5 분간 heating 후, 얼음에 급속히 냉각시켰다. 그 반응액에 10x reaction buffer, DTT, RNasin, MgCl₂, dNTPs, 및 reverse transcriptase를 첨가하여 잘 섞고, 42°C에서 1 시간 동안 반응시킨 다음, 95°C에서 10 분간 변성 후 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. PCR을 위한 primer는 2 종류의 set (pHisF1 & pSerR1, InF2 & pSerR1)를 최종농도 4.6 μM 로 사용하였고, 주형의 농도를 (5, 10 μl of RT reaction) 변화시키면서, MgCl₂는 2 mM, dNTPs는 0.125 mM로 첨가하여 (95°C-1', 45°C-1', 72°C-1')에서 2 cycle, (95°C-1', 50°C-1', 72°C-1')에서 28 cycle, (72°C-7')에서 1 cycle 동안 2 종류의 Taq polymerase (Ampli-taqgold & Biotools) 사용하여 반응시켜 원하는 부위를 증폭시킨 다음, agarose gel에서 확인하였다 (그림 2, 3).

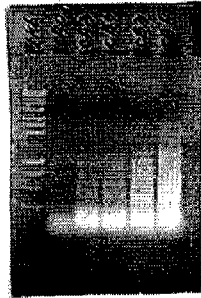


그림 2. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with pHisF1 & pSerR1 using 1st cDNA as template.

lane 1: 1 kb ladder, lane 2: negative control

lane 3: template (5/30 $\mu\ell$, Ampli-taq), lane 4: template (10/30 $\mu\ell$, Ampli-taq)

lane 5: template (5/30 $\mu\ell$, Biotools), lane 6: template (10/30 $\mu\ell$, Biotools)

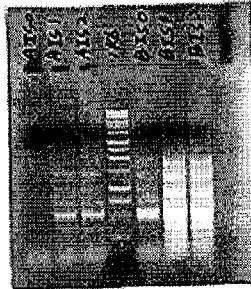


그림 3. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with InF2 & pSerR1 using 1st cDNA as template.

lane 1: negative control,

lane 2: template (5/30 $\mu\ell$, Ampli-taq), lane 3: template (10/30 $\mu\ell$, Ampli-taq)

lane 4: 1 kb ladder, lane 5: negative control

lane 6: template (5/30 $\mu\ell$, Biotools), lane 7: template (10/30 $\mu\ell$, Biotools)

증폭된 여러 크기의 band들을 직접적으로 또는 관심의 band를 elution하여 (그림 4) pGEM-easy vector로 ligation하여 *E. coli* JM109 strain으로 도입하여 형질전환체를 얻었다.



그림 4. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with pHisF1 & pSerR1 using total cDNAs as template.

lane 1: 1 kb ladder, lane 2: negative control
 lane 3: template (50 ng of total cDNAs, Ampli-taq),
 lane 4: template (100 ng of total cDNAs, Ampli-taq)

Primer set pHisF1 & pSerR1에 의해 증폭된 PCR product에 의해 얻어진 형질전환체들은 No. 5 series clone들로 명명하였고, InF2 & pSerR1의 경우에는 No.10 series clone들로 명명하였다. 얻어진 형질전환체들로부터 플라스미드 DNA를 추출한 다음, control DNA와 비교하여 size selection 후, *EcoRI* (그림. 5)으로 잘라 insert 크기를 확인한 후 염기서열을 분석하였다.

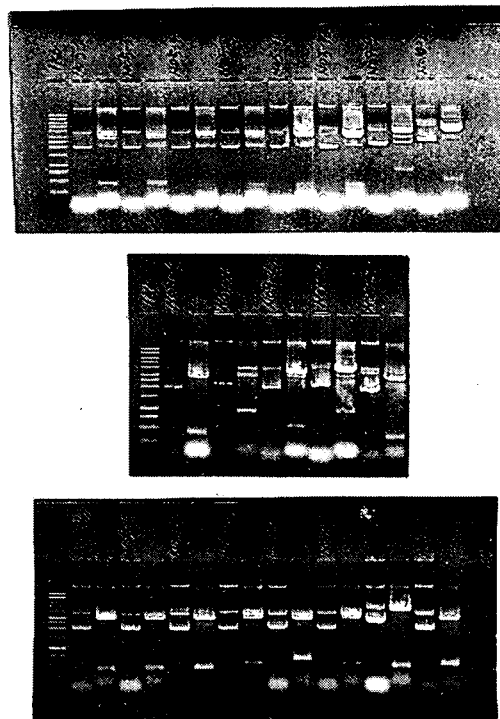


그림 5. Restriction enzyme patterns of No.5, 9 & 10 series clones in agarose gel.

1-3. Total cDNA를 주형으로 이용한 PCR

Periserrula leucophryna cDNA library로부터 적당 양의 phage를 취한 다음, *E. coli* BM25.8에서 *in vivo* excision에 의해 얻어진 total cDNA를 주형으로 하여 pHisF1 & pSerR1 primer set를 사용하여 RT-PCR과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 agarose gel에서 확인하였고 (Fig. 4), 얻어진 band들은 polynucleotide kinase를 사용하여 5'-말단을 인산화 한 후, pGEM-easy vector로 클로닝하여 *E. coli* JM109 strain으로 도입하여 얻어진 형질전환체들은 No.9 series clone들로 명명하였다. 상기 클론들과 마찬가지로 형질전환체들로부터 플라스미드 DNA를 추출한 다음, control DNA와 비교하여 size selection 후, *Eco*RI (Fig. 5)으로 잘라 insert 크기를 확인한 후 염기서열을 분석하였다.

2) 염기서열분석 및 blast search

얻어진 클론들의 염기서열과 추정된 amino acid 서열을 Blast search 결과 *Periserrula leucophryna*에는 현재까지 3 가지 종류의 trypsin like serine protease가 존재한다는 것을 확인하였다. 무척추동물의 경우 trypsin like serine protease가 적어도 3-7 종류까지 존재하는 것으로 알려져 있으며, 즉 *Lucilia cuprina* larvae (Casu *et al.* 1993)의 경우 3 종류, 초파리는 7 종 (Yun & Davis, 1989), *Anopheles gambiae* (모기, Muller *et al.* 1993)의 경우도 7 종류의 family로 구성되어 있다. 따라서 더 많은 종류의 serine protease family가 존재하는지 여부를 조사하기 위하여 RT-PCR 및 total cDNA를 주형으로 증폭된 band들을 cloning하여 얻은 형질전환체들로부터 DNA를 추출하여 염기서열을 분석 중에 있다. No.5 series 클론들 경우 No.5-2와 No.5-3 클론은 446 bp로 같은 크기의 insert DNA를 가지고 있었으며 (그림 5, 6), 염기서열 분석 결과 같은 DNA 서열을 가지고 있었다. 아미노산 서열 분석에 의하면 heart specific serine protease (Human), embryonic serine protease (*Xenopus laevis*), transmembrane protease (*Mus musculus*), neurotrypsin (*Rattus norvegicus*), serine protease (*Anopheles gambiae*), trypsin (*Dicentrarchus labrax*) 등과 유사성을 가지고 있으며, trypsin like serine protease의 conserved region 및 catalytic triad (His57, Asp102, Ser195)를 가지고 있어 새로운 serine protease 계열인 것으로 판명되었다 (그림 7). Total cDNA를 주형으로 pHisF1 & pSerR1 primer에 의해 증폭된 No.9-105 클론의 경우 481 bp의 insert DNA를 가지고 있으며 (그림 5, 6), 아미노산 분석 결과 putative coagulation serine protease (*Ciona intestinalis*), kallikrein-like serine protease (Human), transmembrane protease (*Mus musculus*), oviductin (*Bufo japonicus*), trypsin (*Pacifastacus leniusculus*) 등과 유사성을 보였으며 No.5-2 clone과 마찬가지로 trypsin like serine protease의 conserved region 및 catalytic triad (His57, Asp102, Ser195)를 가지고 있어 또 다른 종류의 serine protease로 판단되었다. No.10-54 clone의 경우 1st cDNA를 주형으로 Asp102 근처의 conserved 서열인 HPGYNR에 대한 primer InF2와 pSerR1에 의해 증폭되었으며 insert DNA는 323 bp로 구성되어 있으며 아미노산 서열의 blast search에 의하면 갯지렁이와 비슷한 계통인 *Lumbricus rubellus*의 fibrinolytic enzyme과 가장 큰 유사성을 가지고 있으며 그 외 lumbrokinase (*Lumbricus bimastus*), trypsin precursor (Pig), serine protease (Human), pancreatic trypsin (*Rattus norvegicus*), chymotrypsin (*Lumbricus rubellus*) 등과도 유사성을 보였다. 또한 상기 클론들과 마찬가

지로 trypsin like serine protease의 conserved region 및 catalytic triad (Asp102,, Ser195)를 가지고 있었으며, 갯지렁이 serine protease 아미노산 분석에 의해 밝혀진 서열중의 일부를 가지고 있으므로 현재 분석된 아미노산 서열을 근거로 판단할 때 찾고자하는 갯지렁이의 trypsin like serine protease의 유전자일 것으로 판단된다.

<p>No.5-2(5-3) : 446 bp</p> <p><u>TGGGTGGTGAGGGCGGCATTGTTACGAAGGTAGAGCTAAGGAACTGTTCCGGGTA</u>CTGGTAGGA GACCATGACTTGTGGCTGGCAGACTTGCACCAGCAGTCATTTGCAGTTGAGGAAATTATACTTCACC CTGCTTATGACACAAGAACACACGACTATGACTTCGCCCTGTTGAAGGTATCTGGAGAGATCCTGATG AGTCAGCATGTTCAACCAGCATGTTTGCAGACTCTGACCAGCTTTATGTACCTGGGATGAGGTGCT ACATTTCTGGATGGGGCAGCACAGGGGAACACAGTCCTAGGAAGCTAAAGGCAGCAGTGGTTCCTC TGATCTCCAGGCCAGTGTGTAAGCAGCTCTACAAGTTTACAGTTACGGACAGAATGTTCTGTGCGGG ATACCTGGAAGGCAACATAGACTCCTGTCAGGGCGACTCCGGCGG</p> <p>No.9-105 : 481 bp</p> <p><u>TGGGTGCTGAGGGCGGCAGCTGTTTCATGCAGAAAGAGGCTGCTGGACAAAACCTGAACAGTGG</u> ACGGCAAGATATGGAGATAAAGACCTAGAGGCTTCGTTTTGGGAGTCGTTGTTTGGCAGTAAGGATA AATGGGAACGACAAGGAAAATATATAGTAGTCCACGAGAAATACAACCCAGGAGATCACTGGCTAAT GACATAGCGCTCCTGAGGATGACGGAACCAATACAAGATGTAGGACAGGCGAGACCCATCACGATA CCAGACCAAGGAGATGACCTCTACCCTCTGCCGAACCAATACTGCATCGCCATGGGTTGGGGTTGTA CTGAACCTGGCAGAGATTTGACAGACAGAGCACGCCAGGTGGAGATACCAGTACTAAGTGACATAAG TTGCCAGCGCACCTGGGGAGTAACCACAGAAACACGACTGTGTGCTGGAGAATTTGACAAGAACAA GGGCATTTGCAAAG</p>

그림 6. Nucleotide sequence of No.5-2(5-3) & No.9-105. Underlines indicate the primers used for amplification of PCR product

	His57
5-2	WVLTAAHCYEGRAKELFRVLVGDHDLWLADLHQQSFAVEEIL
9-105	WVLRAAHCFMQKEAAGQKPEQWTARYGDKDLEASFWESLFGSKDKWER
	Asp102
5-2	HPAYDTRTHDYDFALLKVSQEILMSQHVQPACLPDSQQLYVPGMR
9-105	QGKYIVVHEKYNPGDHWLNDIALLRMTEPIQDVGQARPITIPDQGDDLYPLPN
5-2	CYISGWGSTGEHSPRKLKAAVPLISRPVCKQLYKFTVTDRMFCAGYLEGNI
9-105	QYCIAMGWGCTEPGRDLTDRARQVEIPVLSDISCQRTWGVTTETRLCAGEF
	Ser195
5-2	DSCQGDSGG
9-105	DKNKGICE

그림 7. Comparison of amino acid sequences of No.5-2(5-3) & No.9-105, clones. His57, Asp102, and Ser195 indicate the catalytic triad of trypsin like serine protease

3) Screening of the full-length serine protease cDNA using partial probe DNA from cDNA library of *Periserrula leucophryna*

3-1. Primary Screening by plaque hybridization

3-1-1. Filter Blotting 및 probe DNA 제조

염기서열 분석에 의해 trypsin like serine protease로 확인된 No.5-3(5-3), No.9-105, No.10-54 각각의 클론들을 대장균에서 대량배양에 의해 plasmid DNA를 추출한 다음 *EcoRI*으로 잘라 insert DNA를 elution하여 serine protease cDNA 분리를 위한 probe로서 사용하였다 (그림 8). Deep freezer에 보관중인 갯지렁이 cDNA library의 titer를 재결정한 후 NZY agar (5 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 5 g yeast extract, 10 g NZ amine, 15 g agar/liter)를 함유하는 150 mm petri dish에 약 70,000 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 plating 하였다. 즉 0.2% maltose와 10 mM MgSO₄를 포함하는 LB 배지 (10 g trypton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl/liter)에서 자란 XL1-Blue MRF 세포들의 밀도를 600 nm (A₆₀₀)에서 0.5로 조절한 후, 세포 600 μ l 와 SM buffer (5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1 M Tris-Cl, pH 7.5, 5 ml 2% gelatin/liter)에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액을 섞어 37°C에서 15분간 배양한 후, 48°C로 식힌 NZY top agarose 8 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 NZY plate에 붓고 37°C에서 confluent lysis가 일어나도록 배양하였다. Lysis가 일어난 plate를 4°C에서 약 1시간 정도 방치한 후 멸균된 137 mm plaque screen membrane (NEN, Du Pont)을 agar plate에 2-3분 정도 올려놓고 needle을 이용하여 위치를 표시하고 false positive plaque을 방지하기 위하여 duplicate filter를 약 4 분간 같은 agar plate에 올려놓고 blotting을 하여 1차 screening 과정을 위해 2 개의 filter를 사용하였다. 사용한 master agar plate는 최종적으로 autoradiography에 의한 positive plaque picking을 위해 4°C에 보관하였다. 이렇게 준비된 filter는 1.5 M NaCl과 0.5 N NaOH를 포함하는 denaturation 용액에 2-3분간 방치하여 phage DNA를 변성시킨 다음, 변성된 DNA를 중화시키기 위하여 1.5 M NaCl과 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)의

조성을 갖는 neutralization 용액으로 옮겨 약 5 분간 방치한 후 3 MM paper로 옮겨 수분을 제거하였다. 젖은 상태 membrane의 DNA를 더욱 견고하게 결합시키기 위해 UV crosslinker (120,000 μ J of UV energy)로 약 30 초간 반응시킨 다음, 건조시키고 prehybridization 과정을 수행하였다.

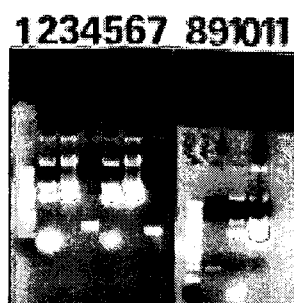


그림 8. Elution of insert DNA after digestion of No.5-2(5-3) & No.9-105, clones with *Eco*RI
 lane 1: 1 kb ladder, lane 2: No.5-2 intact (rapid), lane 3: No.5-2 intact (PEG)
 lane 4: No.5-2 /*Eco*RI, lane 5: No.10-54 intact (rapid), lane 6: No.10-54 (PEG)
 lane 7: No.10-54/*Eco*RI, lane 8: 1 kb ladder, lane 9: No.9-105/*Eco*RI
 lane10: No.9-105 intact (rapid), lane11: No.9-105 intact (PEG)

3-1-2. Hybridization & autoradiography

준비된 membrane들은 hybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)를 포함하는 (3 ml/membrane) glass dish에 넣고 42°C에서 2 시간 이상 반응시킨 다음, 만들어진 probe DNA를 hybridization 용액 1 ml 당 약 1×10^6 cpm이 되도록 첨가하여 42°C에서 8 시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 hybridization 용액을 제거하고 실온에서 2 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10 분씩, 2회 washing한 후 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 30 분씩 55-60°C에서 2회 세척하고 최종적으로는 0.1 x SSC and 0.1% SDS 용액으로 background를 줄이는 high stringency 조건 하에서 washing 한 다음 filter들을 말리고 saran wrap으로 덮어 intensifying screen이 있는 cassette folder에 넣은 후 -70°C에서 X-ray film에 3 일 동안 노출시켰다. Autoradiography에 의해 얻은 duplicate film (그림 9)들을 비교하여 추정된 positive plaque들을 master plate로부터 picking하여 SM buffer에 넣고 4°C에 overnight 방치하여 phage들이 스며나오도록 하였다. 일차 screening 후, No 5에 대하여 한 plate에 대한 두 장의 필름을 대조하여 서로가 일치는 10 개의 plaque들을 얻었으며. No. 9는 14 개의 plaque를 picking 하여 이차 screening 과정을 수행하였다.



그림 9. Autoradiography of primary screening for serine protease gene of *Periserrula leucophryna* using P^{32} -labeled probe DNA. The arrows indicate putative clones.

Panel A: For No. 5

Panel B: For No. 9

3-2. Secondary Screening by plaque hybridization

3-2-1. Plating, hybridization, & autoradiography

SM buffer 100 μ l에 들어있는 각각의 phage들을 이차 screening을 위하여 100 mm plate에 약 200-300 plaque 정도를 형성하도록 희석하여 XL1-Blue MRF에 infection 시킨 다음, blotting, denaturation, neutralization, hybridization, washing, 및 autoradiography 등의 일련의 과정은 일차 screening 때와 마찬가지로 수행하였다. 이차 screening 과정을 통하여 No. 5에 대하여 single plaque으로 분리된 phage 10 clones을 얻었으며, No. 9는 14 clones, No. 10은 11 clones을 얻어 (그림 10) SM buffer에 single plaque들을 picking하여 넣고 phage들이 스며 나오도록 4°C에서 overnight 방치하였다.

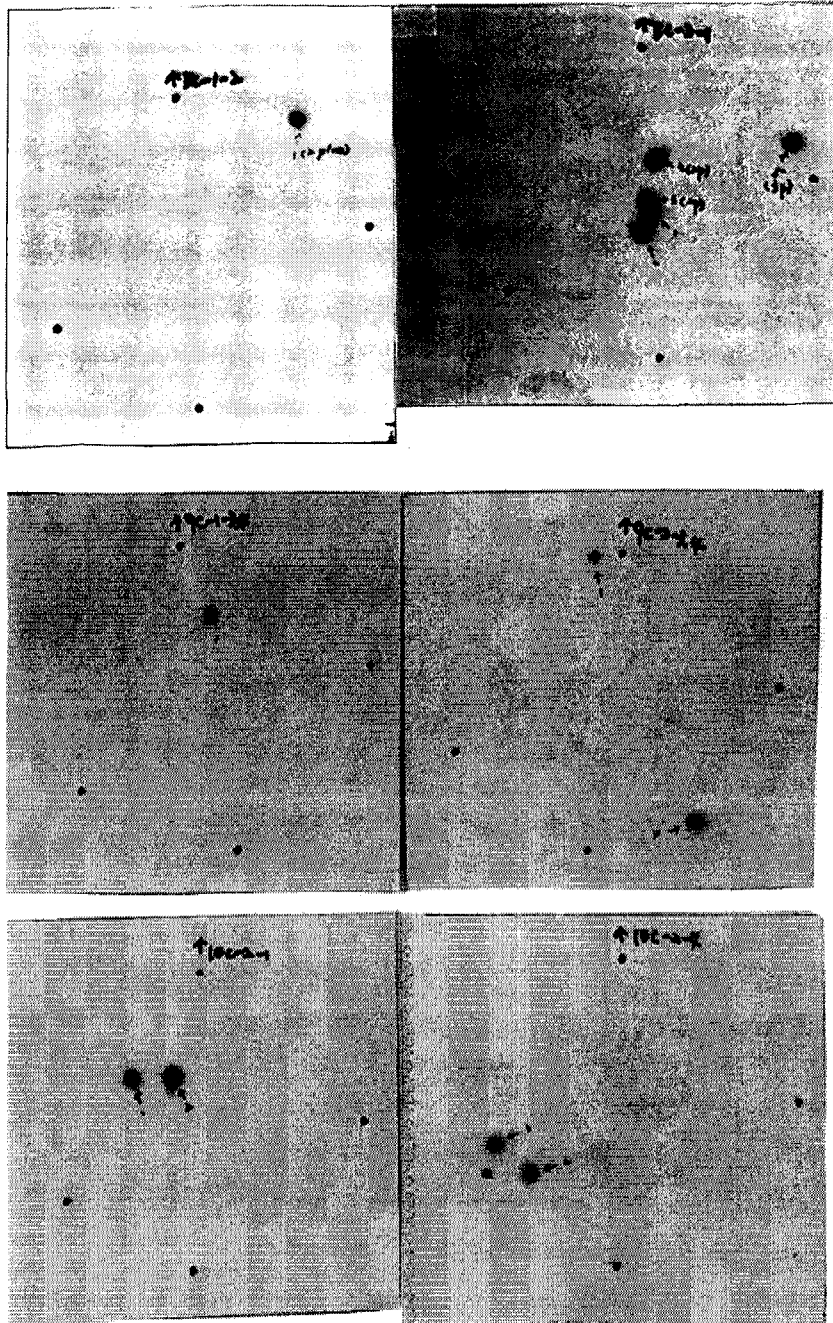


그림 10. Autoradiography of secondary screening for serine protease gene of *P. leucophryna* using P^{32} -labeled probe DNA. The arrows indicate the isolated single plaque.

3-2-2. In vivo excision

이렇게 분리한 single plaque들의 phage DNA로부터 재조합 pTripleEx2 플라스미드를 분리하기 위하여 0.2% maltose와 10 mM $MgSO_4$ 를 포함하는 LB 배지에서 배양한 *E. coli* BM25.8에 phage 추출액을 적당 양 섞고 37°C에서 30 분간 배양한 다음, carbenicillin (50 $\mu g/ml$), X-gal (0.8 mg/plate), 및 IPTG (0.8 mg/plate)가 첨가된 LB agar 배지에 spreading하여 37°C에서 overnight 배양

한 후, 형성된 각각의 rescued 클론들에 대하여 5 개의 white colony들을 배양하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 얻은 intact plasmid들은 *EcoRI* 과 *HindIII*로 double digestion하여 agarose gel 상에서 전기영동을 통하여 도입된 insert DNA 크기를 확인하였고 (그림 11), 각각의 serine protease의 유전자들이 도입된 클론들 중에서 full-length에 가까운 크기를 갖는 클론을 선별하여 plasmid를 순수 분리 정제하여 유전자 염기 서열 분석을 위한 주형으로 사용하였으며, 2 종류의 serine protease 클론들에 대한 염기 서열을 분석하였다.

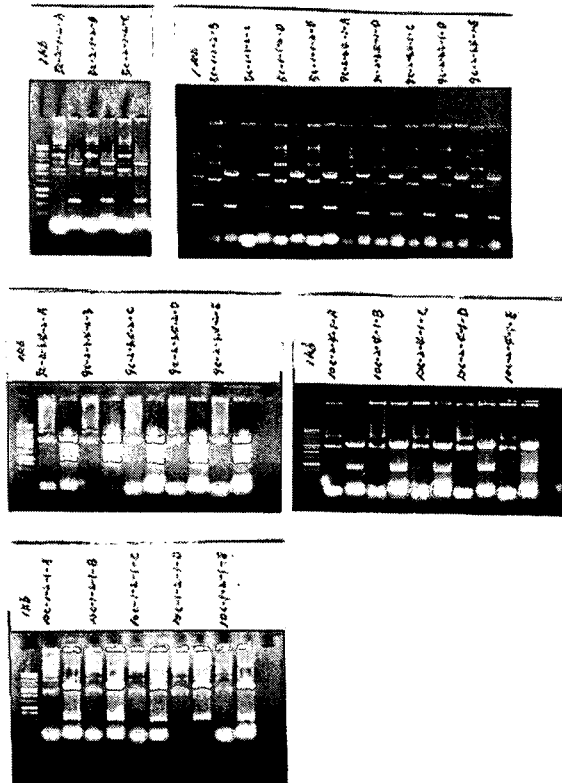


그림 11. Restriction pattern of the obtained clones by *in vivo* excision after digestion with *EcoRI* & *HindIII*

4) 염기서열분석 및 blast search

2 차 screening 하여 얻어진 클론 중 clone 9 (PLSP 2 protease) 의 염기서열과 추정된 amino acid 서열을 Blast search 결과를 그림 12 에 나타내었다.

A. PLSP2 gene 의 염기서열

```
ACAATTGTCATCTTACTGTGTCTCAGTTTAATAGTAACTTTTGAACCAGAT
CCAGGTTCCAGAGGTCATGACCTTCACACATTATTTGACCTTCATATTCCTGC
TGACCTTCACTGACCTTCAAGGTTCCAGATGTCAATCCGCTTCAGAAGTCAA
GCAGTTAGCACGTCTGCTGCAGCAGCTGCTGGATAAAGATGTTGACAAGAG
AATTATTGGAGGAGAGGTGATTAGCGACGATATGGAACAACCCTGGCTCGT
CTCTCTGACGACAGAGGTGACCGTCAGCGAGTTTTTGGGGTTTACGATACG
CAGTAGGACAATTCCTGCGCTGGAAGTCTGATCAGCAGGGAATGGGTGCT
GACATCTGCCAACTGTTTCATGCAGAAAGAGGCTGCTGGACAAAAACCTGA
ACAGTGGACGGCAAGATATGGAGATAAAGACCTAGAGGCTTCGTTTTGGGA
GTCGTTGTTTGGCAGTAAGGATAAATGGGAACGACAAGGAAAATATATAGT
AGTCCACGAGAAATACAACCCAGGAGATCACTGGCTAAATGACATAGCGCT
CCTGAGGATGACGGAACCAATAAAGATGTAGGACAGGCGAGACCCATCAC
CGCCATGGGTTGGGGTTGACTGAACCTGGCAGAGATTTGACAGATAGAGC
GATACCAGACCGAGGAGATGACCTCTACCCTCTGCCGAACCAACTGCAT
ACGCCAGGTGGAGATAACAGTACTAAGTGACATAAGTTGCCAGCGCACCTG
GGGAGTAACCACAGAAACACGACTGTGTGCTGGAGAATTTGACAAGAACAA
GGGCATTTGCAAGGGGGATAACGGAGGACCTCTGATTTGCAAGAAAATGA
ACAATGGTTGCAGGCTGGGATTGCATCTTTTGCGCATGCCAGAGACCTGG
ACAGTATCCAGCCGTTTTCACTAAGGTGGCCGCTTACAGCAACTGGATTAT
GTCACATATTAAGTAATGACTTTCTGCATCGTGCATATGCGGACTATTACG
GAGGTGTTATATGCGTACTTTCTAAAGTTTCGCTGTGTTCTTTATTTGGCT
CTTACGTAAATAATCTGATTCCCAACCACGCGAGACATGGATGAGACTACAT
CCTACGTCAGCAATGTAATTTAGACCGAGGATTAATGTACATCGTTTTTC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

B. PLSP2 protease 의 아미노산 서열

```
MTFTHYLTFIFLLTFTDLQGSVDVNSASEVKQLARLLQQLLDKDVKRIIGGEVISDDM
EQPWLVSILTTEVTVSEFLGFTIRSRTHHCAGSLISREWVLTSANCFMQKEAAGQKPEQ
WTARYGDKDLEASFWEFLFGSKDKWERQKQYIVVHEKYNPGDHWLNDIALLRMT
EPIQDVGQARPITIPDRGDDLYPLPNQYCIAMGWGCTEPGRDLTDRARQVEIPVLSDI
SCQRTWGVTTETRLCAGEFDKNKGICKGDNGGPLICKKNEQWLQAGIASFAHAQRP
GQYPAVFTKVAAYSNWIMSHIK (306 AA)
```

그림 12. Serine protease PLSP2 gene 의 염기서열 (Panel A, 1207 bp) 및 아미노산 서열 (Panel B; 306 아미노산)

위의 clone No. 9 protease (PLSP 2 protease) 는 Plasma kallikrein B1 precursor (human, rat 및 mouse), Polyprotein (*X. laevis*), Transmembrane protease, Brain-specific serine protease-4 (*Homo sapiens*), elastase, Enterokinase, Factor XI (*Oryctolagus cuniculus*) 및 Platelet coagulation factor XI (Human) 와 sequence homology를 갖는 serine 계열의 protease 임이 확인되었으며 그 서열이 보고 되지 않은 novel protease 임을 확인하였으며 Gene bank 등록하였다 (bankit517619AY224209).

표 7. 갯지렁이 유래 단백질 분해 효소의 DNA서열의 Gene bank 등록

DEFINITION	Periserrula leucophryna mRNA (PLSP-2) for trypsin-like serine protease, complete cds.	
GENENURI		KS108682
SUBMIT_ID	109821.494809	
ACCESSION		
NID		
KEYWORDS		
SOURCE	Periserrula leucophryna Paik1977.	
ORGANISM	Periserrula leucophryna Paik1977	
REFERENCE	1 (bases 1 to 1207)	
AUTHORS	Jang-Won Choi, Han-Seung Joo, Chung-Soon Chang	
TITLE	Trypsin-like Serine Protease	
JOURNAL	(unpublished)	
COMMENT	Contact: Chung-Soon Chang, Department of Biochemistry, College of Medicine, Inha University 253 Yonghyun-Dong, Nam-ku, Incheon, South Korea, 402 - 751 Tel: 82-32-890-0931 Fax: 82-32-884-6726 E-mail: cschang@inha.ac.kr	
FEATURES	Location/qualifiers	
source	1..1207 /organism="Periserrula leucophryna Paik1977"	
gene	1..1207 /gene="PLSP2"	
CDS	68..988 /gene="PLSP2" /codon_start=2 /product="Trypsin-like Serine Protease"	
/translation="MTFTHYLTFIFLLTFTDLQGSVDNSASEVKQLARLLQQLLDKDVD KRIIGGEVISDDMEQPWLVSLLTTEVTVSEFLGFTIRSRTHCAGSLISREWVLTSA NCFMQKEAAGQKPEQWTARYGDKDLEASFWESLFGSKDKWERQGKYIVVHEKYN PGDHWLNDIALLRMTEPIQDVGQARPITIPDRGDDLYPLPNQYCIAMGWGCTEPGR DLTDRARQVEIPVLSDISCQRTWGVTTETRLCAGEFDKNKGICKGDNGGPLIC KNEQWLQAGIASFAHAQRPGQYPAVFTKVAAYSNWIMSHIK"		

그 외 2 가지 다른 기능을 갖는 serine 계열의 protease gene 을 확보하였다 (PLSP1, PLSP2).

5) 재조합 단백질 유도 및 PAGE 분석

위의 clone을 발현용 plasmid 인 pT7-7 에 cloning (그림 13) 하여 *E. coli* BL21(DE3) 에 transformation (그림 14) 하여 PLSP2 protease 의 발현 최적화를 시도하였다.

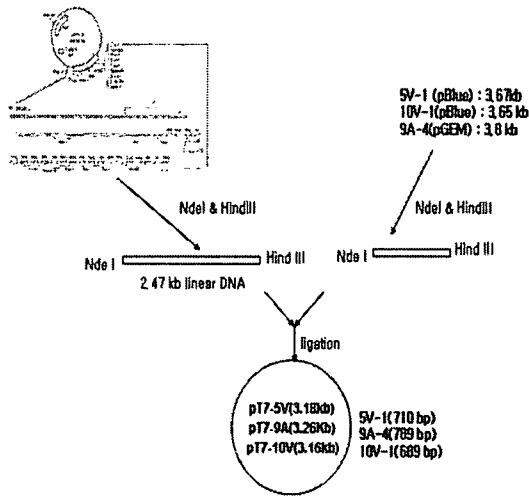


그림 13. 갯지렁이 유래 단백질 분해 효소의 발현용 cloning 전략

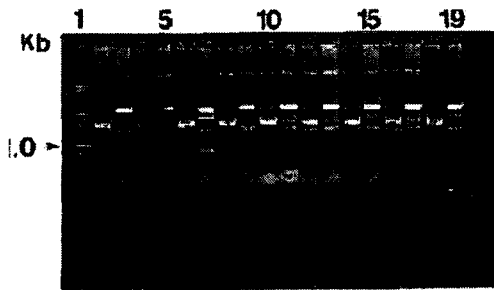


그림 14. pT7-7-9A plasmid construction

- | | |
|----------------------|---|
| lane 1 : 1 Kb ladder | |
| lane 2 : pT7-7-9A-1 | lane 3 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 4 : pT7-7-9A-2 | lane 5 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 6 : pT7-7-9A-3 | lane 7 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 8 : pT7-7-9A-4 | lane 9 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 10 : pT7-7-9A-5 | lane 11 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 12 : pT7-7-9A-6 | lane 13 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 14 : pT7-7-9A-7 | lane 15 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |
| lane 16 : pT7-7-9A-8 | lane 17 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion |

lane 18 : pT7-7-9A-9

lane 19 : pT7-7-9A-1 Nde I & Hind III digestion

위의 clone 들 중 1, 3, 5, 7 및 9 번을 선택하여 overexpression을 시도하였으며 그 결과를 그림 15 에 나타내었다.

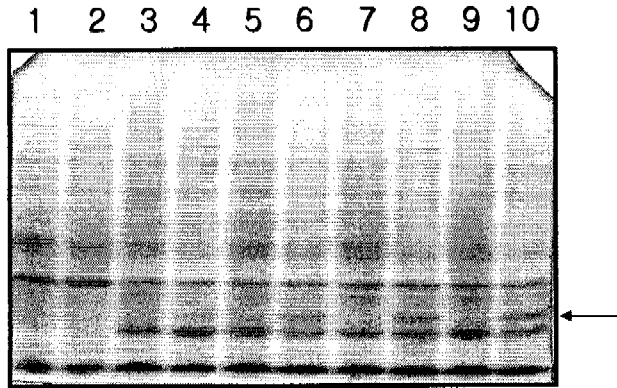


그림 15. INduction of protease PLSP2 in *E. coli* BL21 (DE3)

lane 1. pT 7-7/BL21(DE3), Control;	lane 2. pT 7-7/BL21(DE3), Induction
lane 3. pT 79A-1/(DE3), Control;	lane 4. pT 79A-1/(DE3), Induction
lane 5. pT 79A-3/(DE3), Control;	lane 6. pT 79A-3/(DE3), Induction
lane 7. pT 79A-7/(DE3), Control;	lane 8. pT 79A-7/(DE3), Induction
lane 9. pT 79A-9/(DE3), Control;	lane 10. pT 79A-9/(DE3), Induction

위의 그림 15 에서 보듯이 1 mM IPTG 로 induction 한 후 6 시간 동안 더 배양하여 그 발현 product를 분석하였을 때 PLSP2 protease 는 약 26-28 kDa 위치에서 발현됨을 알 수 있었다.

3. 공생미생물 유래 단백질 분해효소

1) Lab scale fermentation

3 차 및 4 차 년도의 최적화 조건을 이용하여 lab scale 로 rpm 조건을 변화시키면서 단백질 분해효소의 생산성을 검토하였다. 배양 온도는 37℃, 통기 조건은 1 vvm 으로 하였고, rpm 은 300-600 rpm 범위에서 조절하였다. 표 8에서 보듯이, 500 rpm 으로 배양하였을 때, 단백질 분해효소의 생산량이 많았다.

<표 8> Lab scale fermentation (3 L 발효조)

차수	활성 (U/ml)	비고
1차	48,689	배양조건 37 °C 500 rpm 1 vvm 48 시간 배양 배지는 증류수에 제조
2차	48,521	
3차	53,433	
4차	54,589	
5차	53,128	
6차	49,860	
7차	55,345	
8차	47,515	
9차	62,063	
10차	60,642	
평균	약 53,370	
1차	42,358	배양조건 37 °C 500 rpm 1 vvm 48 시간 배양 배지는 수도물에 제조
2차	42,428	
3차	37,948	
4차	36,488	
5차	41,688	
6차	43,011	
7차	41,082	
8차	40,127	
평균	약 40,640	

위의 표에서 보듯이 증류수에 배양액 제조 시 평균 단백질 분해효소 생산량은 약 53,370 U/ml 이었지만, 배양액 제조 시 증류수를 사용하였을 때 제조 원가에 상당한 원가 부담을 가져올 뿐 만 아니라, 대량 배양시 증류수 공급에 문제점을 가지고 있다. 비록 수도물에 배양을 제조하였을 때 단백질 분해효소의 생산량이 약 20% (40640 U/ml) 정도 감소하는 것으로 나타났지만 경제성을 감안할 때, 수도물에 배양액을 제조하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

2) Large scale fermentation

위의 실험에서 확립된 최적화 조건을 이용하여 500 L 대형 발효조를 이용하여 단백질 분해효소를 생산하였다.

<표 9> 500 L 대형 발효조를 이용한 fermentation

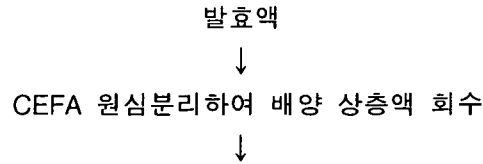
차수	활성 (U/ml)	비고
1차	34,451	pH 조절을 탄산나트륨으로 하지 않고, 멸균 후 NaOH 로 pH를 10.5 로 조정
2차	37,830	pH 조절을 탄산나트륨으로 함

위의 표에서 보듯이 500 L 대형 발효조를 사용하여 단백질 분해효소를 생산하였을 때 평균 약 36000 U/ml을 회수하였다. 이상의 결과로부터 대형 발효조를 이용하여 fermentation 연구를 지속할 경우 생산성을 충분히 올릴 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 생산성을 5 배정도 올릴 경우 공생미생물 유래의 단백질 분해효소는 경제성이 있을 것으로 판단된다.

3) 단백질 분해효소 회수 공정

Lab scale 발효조를 이용하여 단백질 분해효소 생산하였을 때, 배양액으로부터 단백질 분해효소를 회수하는 공정을 그대로 적용하여 500 L 배양액으로부터 단백질 분해효소 회수를 시도하였다. 48 시간 동안 배양한 후 CEPA 원심분리기를 이용하여 배양액을 회수하였다. 회수한 배양액을 1000 L 의 반응조에 넣고 5% (w/v) 되게 Diaion HP 20 resin을 처리하오 100 rpm 으로 16 시간 동안 stirring 하여 반응액으로부터 단백질 분해효소를 resin 에 흡착하였다. Suction filter 로 resin을 회수한 후 수돗물로 resin을 간단하게 씻어준 후, resin voume 의 약 3 배 부피의 25% acetone을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 용액을 가한 후 상온에서 약 3 시간 동안 stirring 하여 resin 에 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 용출액은 suction filtration 으로 회수하였으며 위의 과정을 한 번 더 반복하였다. 두 용출액을 합한 후, 약 2.5 부피의 cold acetone을 서서히 가하여 단백질을 침전시켰다. 위의 용액을 4℃에서 하루 동안 방치하여, 침전물을 잘 생성하게 한 후 suction 으로 상층액을 건어낸 후, 원심 분리하여 침전물을 회수하고, 회수한 침전물은 -70℃ 에 보관하였다 (표 10). 기존의 방법을 사용하였을 때 시간, 경비 및 과량의 acetone 사용으로 인한 폐수 처리비용 등의 문제점을 가지고 있다. 그러나 회수한 배양액을 MF (membrane filtration) 및 UF (Ultrafiltration) 방법으로 단백질 분해효소 회수하였을 때 빠르고, 저비용으로 회수할 수 있었다.

<표 10> 단백질 분해효소 회수 공정 개선



1 차 (기존 방법)	2 차 (개선된 방법)
<p>상층액</p> <p>↓</p> <p>5% (10 Kg) 되게끔 HP-20 resin 처리</p> <p>↓</p> <p>상온에서 O/N 로 stirring</p> <p>↓</p> <p>Suction filtration 으로 resin 회수</p> <p>↓</p> <p>2-3 배 부피의 25% acetone (약 30 L) 으로 단백질 용출. 이 때, Mechanical stirrer 사용, 3-4 시간 stirring at RT</p> <p>↓</p> <p>Suction filtration 으로 용출액 회수</p> <p>↓</p> <p>2 배 부피의 cold acetone (약 60 L) 가하여 단백질 침전</p> <p>↓</p> <p>상온에서 O/N 방치</p> <p>↓</p> <p>원심분리하여 침전물 회수</p> <p>↓</p> <p>침전물 건조</p> <p>↓</p> <p>냉동 보관</p>	<p>상층액</p> <p>↓</p> <p>0.2 um 로 membrane 여과</p> <p>↓</p> <p>여과액</p> <p>↓</p> <p>MWCO 30,000 으로 UF</p> <p>↓</p> <p>농축액</p> <p>↓</p> <p>분주하여 냉장 보관</p>
<p>장점 및 단점</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 유기 용매 사용량 많음으로 폐수처리 비용 증가 2. Resin 회수 시 시간 많이 소요 3. Acetone 침전 후 시간 많이 소요 4. 결과적으로 비용 및 시간 증가 	<p>장점 및 단점</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MF 및 UF membrane 가격 비쌘 2. 그러나 반복 사용 가능하기 때문에 비용 절감 효과 3. 처리 시간 단축

4) 공생미생물 유래 단백질 분해효소의 안정성 비교 분석

공생미생물 유래 단백질 분해효소의 계면활성제 및 산화제에 대한 안정성을 Novo 사의 Alcalase Esperase 및 Savinase 와 비교 분석하였다 (그림 16, 17).

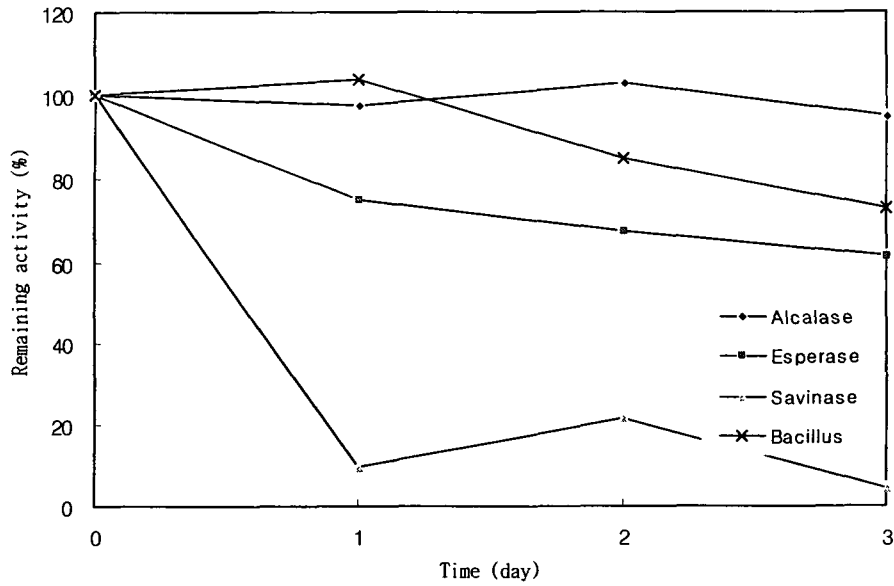


그림 16. Novo 효소와 SDS 에 대한 안정성 비교

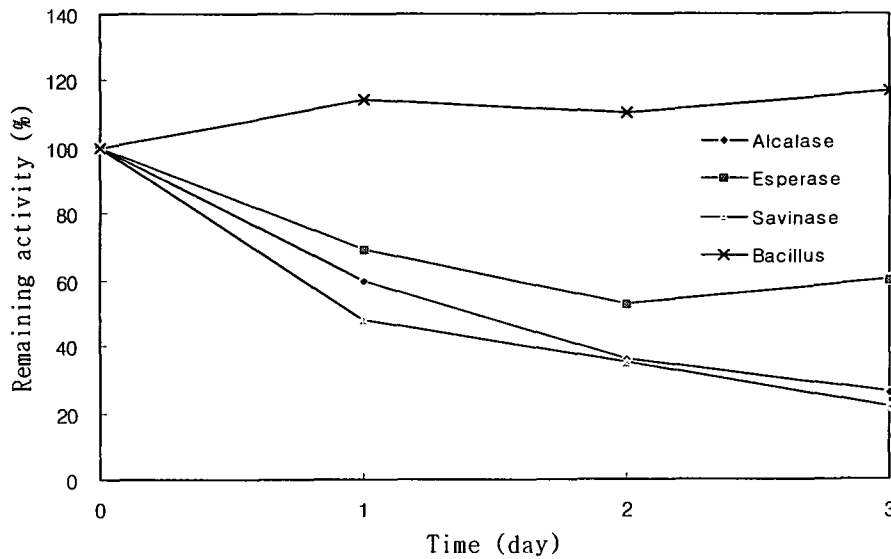


그림 17. Novo 효소와 H₂O₂ 에 대한 안정성 비교

위의 그림 16, 17 에서 보듯이 공생미생물 유래 (*Bacillus*) 단백질 분해효소는 음이온성 계면활

성제인 SDS 뿐만 아니라 강력한 산화제인 과산화 수소수의 존재하에서도 그 활성이 매우 안정하게 유지되는 효소임을 알 수 있었다. 이는 Novo 사의 Alcalase 및 Savinase 등과 비교하였을 때 안정성 면에서 우위에 있음을 알 수 있었으며, 따라서 이 단백질 분해효소를 세제의 첨가물로서 사용할 수 있는 가능성이 충분함을 알 수 있었다. 단백질 분해효소가 산업용 (예; 세제 첨가물 등) 로서 사용되기 위해서 충족되어야 할 조건들을 표 11 에 나타내었으며 이 연구의 공생미생물 유래 단백질 분해효소가 갖는 효소학적 특성을 표 12 에 나타내었다.

<표 11> 단백질 분해효소가 산업용으로 사용하기 위한 전제 조건

Heat stability	stable up to 60°C
pH stability	stable
H ₂ O ₂ stability	stable
Surfactant stability	stable
Calcium ion sensitivity	insensitive

<표 12>. *Bacillus* 유래 단백질 분해효소의 효소학적 특성

특성	<i>Bacillus</i> 유래 단백질 분해효소
Optimum pH	pH 8~12
pH stability (16 h)	stable in pH 5.5~12
Optimum temp	≈60°C
Heat stability	stable upto 50°C
Stability in nonionic detergents	very stable
Stability in anionic detergents	very stable
Stability in oxidants	very stable
Stability in organic solvents	very stable
Stability in chaotropic agents	very stable
Stability in metal ions	very stable

이상의 결과로부터 갯지렁이 공생 미생물인 *Bacillus* 가 생산하는 단백질 분해효소는 산업용으로 응용 가능성이 충분히 있다고 사료되었다.

5) 세척력

공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 세척 능력을 시험하였다. 세척포는 blood-soiled EMPA

fabric을 사용하였으며, 이 때 control 로는 Novo 사의 Alcalase를 사용하였다. 이 실험은 국가 공인 기관인 한국 섬유 연구소에서 실시하였다 (그림 19).

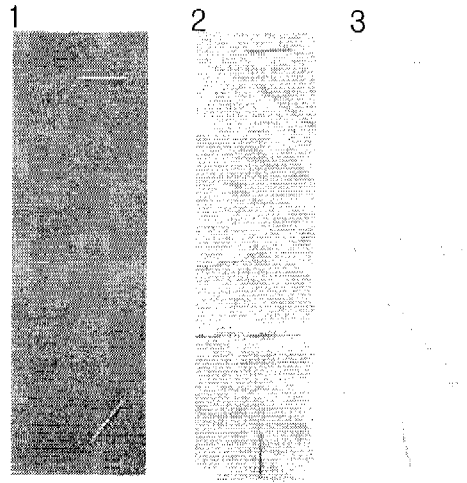


그림 18. Swatch test (세척력) 비교

1. control (Not treated)
2. Alcalase (5,000 U/ml)
3. 우리 효소 (5,000 U/ml)

그림 18 에서 보듯이 공생미생물 유래의 단백질 분해효소는 Alcalase 에 비해 세척력에 있어서 비교 우위에 있음을 알 수 있었다.



한국섬유기술연구소

(국가공인시험검사기관)

서울특별시 강남구 역삼동 819-5 TEL: (02) 3451-7000 FAX: (02) 3451-7171

시험성적서

KOTITI REPORT NO.: A-11705 2002. 4. 30.

수 신 : 인하대
제 목 : 시험결과회보
시 료 : 직 물

4월 24일자로 시험 의뢰하신 위 시료에 대한 시험결과를 아래와 같이 회보합니다.

Item : EMPA TLOT MATERIAL

시험항목	시험결과	시험방법
세탁견뢰도(40°C), 급		AATCC 61 2A
(변퇴색)	1	(WOB)
(변퇴색)	1	(0.05% 효소 A)
(변퇴색)	1	(0.05% 효소 B)
(변퇴색)	1-2	(0.05% 효소 C)
(변퇴색)	1-2	(0.05% 효소 D)
(변퇴색)	1	(0.2% 효소 A)
(변퇴색)	1	(0.2% 효소 B)
(변퇴색)	1	(0.2% 효소 C)
(변퇴색)	1	(0.2% 효소 D)

.../2

Kyu Huk
소장 허 규

본 성적서가 인터넷 팩스로 송부되는 경우, 본 연구소 직인이 생략되며 시료가 부착되지 않습니다.

- 시료의 명칭은 의뢰자가 제시한 호칭이며 본 시험결과는 의뢰자가 제시한 시료에 한한 결과임.
- 이 결과는 선전, 소송 및 기타 법적 요건으로 사용하지 못함.

그림 19. 한국 섬유기술연구소 시험성적서

참고 : 1, 세척력 우수

2, 보통

세척력을 정량적으로 비교하기 위하여, 효소 처리 후 grain 의 제거 정도를 Reflector meter (CHROMA METER CR-210b, MINOLTA) 를 사용하여 측정하였다. 사용한 EMPA fabric 의 종류를 표 13 에 나타내었으며, 대조군으로, 액상효소는 Novo 사의 Alcalase 와 Savinase 를, 과립형 효소는 Savinase 6T, Savinase 12T 및 Everase 6T 를 사용하였다. 세척력 결과를 그림 20 및 21 에 나타내었다.

<표 13> 사용한 EMPA fabric

오염포	오염 물질	오염물농도 (g/m ²)
EMPA 115	Cotton soiled with immedial black (bleaching test)	135/90
EMPA 116	Cotton soiled with blood/milk/ink	160/200
EMPA 117	Polyester/Cotton (65/35) soiled with blood/milk/ink	147/165

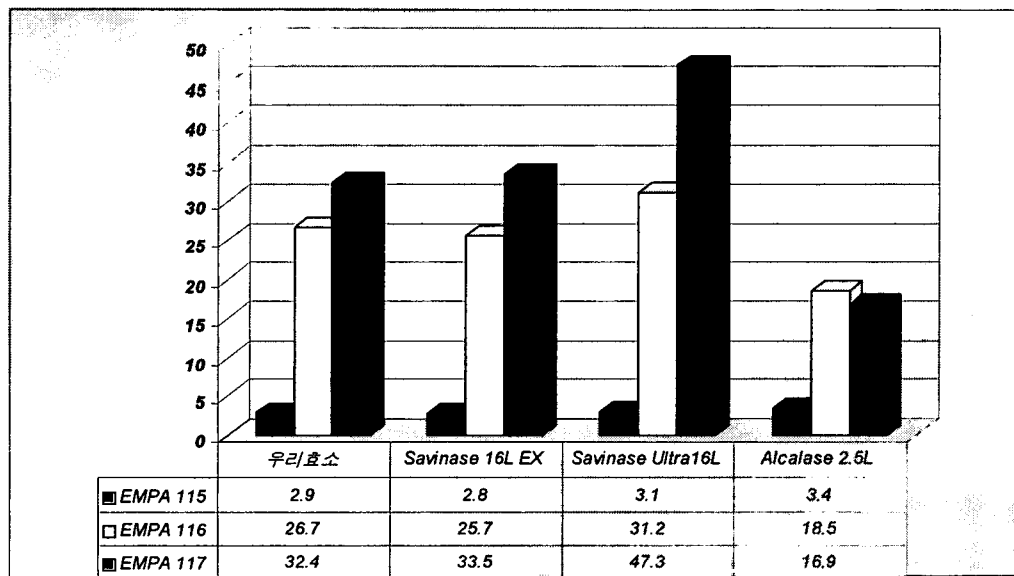


그림 20. Novo 액상 효소 (Alcalase 및 Savinase) 와 세척력 비교

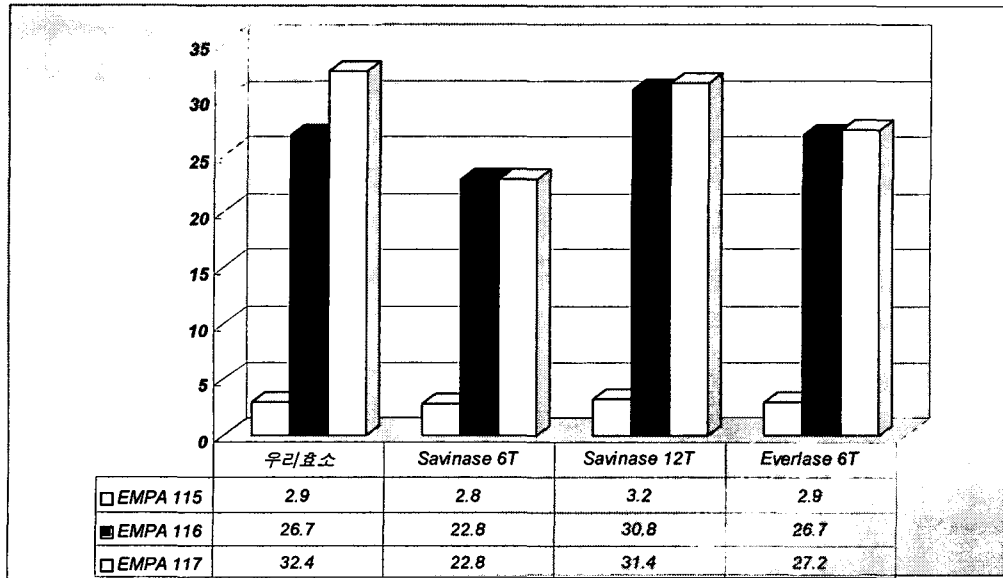


그림 21. Novo 과립형 효소 (avinase 6T, Savinase 12T 및 Everase 6T) 와 세척력 비교

위의 그림 20 및 21 에서 보듯이 공생미생물 유래 단백질 분해효소 (우리 효소) 는 Novo 사의 액상형 효소 및 과립형 효소와 비교하였을 때 모두 비교 우위를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들로부터 이 단백질 분해효소를 세제의 첨가물로서 사용할 수 있는 가능성이 충분함을 알 수 있었다.

6) 대두박 분해능

미생물 유래 단백질 분해 효소는 세제 첨가물 뿐만 아니라 사료 첨가제로도 사용할 수 있다. 사료의 주성분은 대두박 (soybean meal) 으로 단백질이 약 44%를 차지함으로써 사료의 효율을 높이기 위해서는 단백질 분해효소의 작용이 필수적이다 (표 14). 또한 대두박에는 항영양인자 중의 하나인 트립신 활성 저해제 (soybean trypsin inhibitor, SBTI) 가 존재함으로써, 얼마나 효율적으로 SBTI를 inactivation 시키는 지가 사료용 효소로서의 중요한 척도가 된다. 본 연구에서는 공생미생물 유래의 단백질 분해효소의 대두박의 단백질 (Soy protein) 분해능 뿐만 아니라 항영양인자인 SBTI 의 inactivation을 조사하였다.

<표 14> 대두박의 영양 성분

영양분	함량(%)
Crude protein	44.0
Lysine	2.69
Methionine	0.62
Cystein	0.66
Threoin	1.72
Tryptophan	0.74
Linoleic acid	0.40
Calcium	0.29
Sodium	0.01

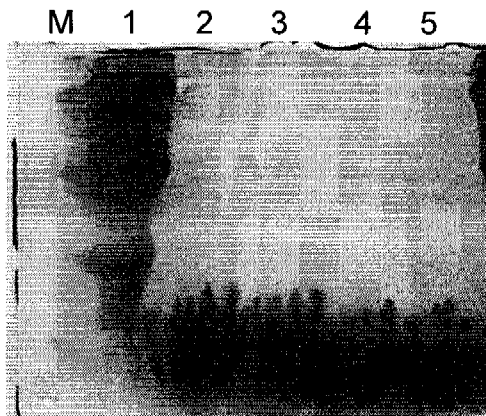


그림 22. 50℃에서 미생물 유래 단백질 분해효소에 의한 대두박 분해능

lane M; MW marker

lane 1, Control

lane 2, for 2 h

lane 3, for 4 h

lane 4, for 8 h

lane 5, for O/N

위의 그림에서 보듯이 soybean protein 은 공생 미생물 유래 단백질 분해 효소의 작용에 의하여 2 시간 내에 대부분 가수분해되는 것으로 나타났다 (그림 22). 이 결과를 더 확인하기 위하여 콩 단백질 분해물을 FPLC 로 분석한 결과를 그림 23 에 나타내었다.

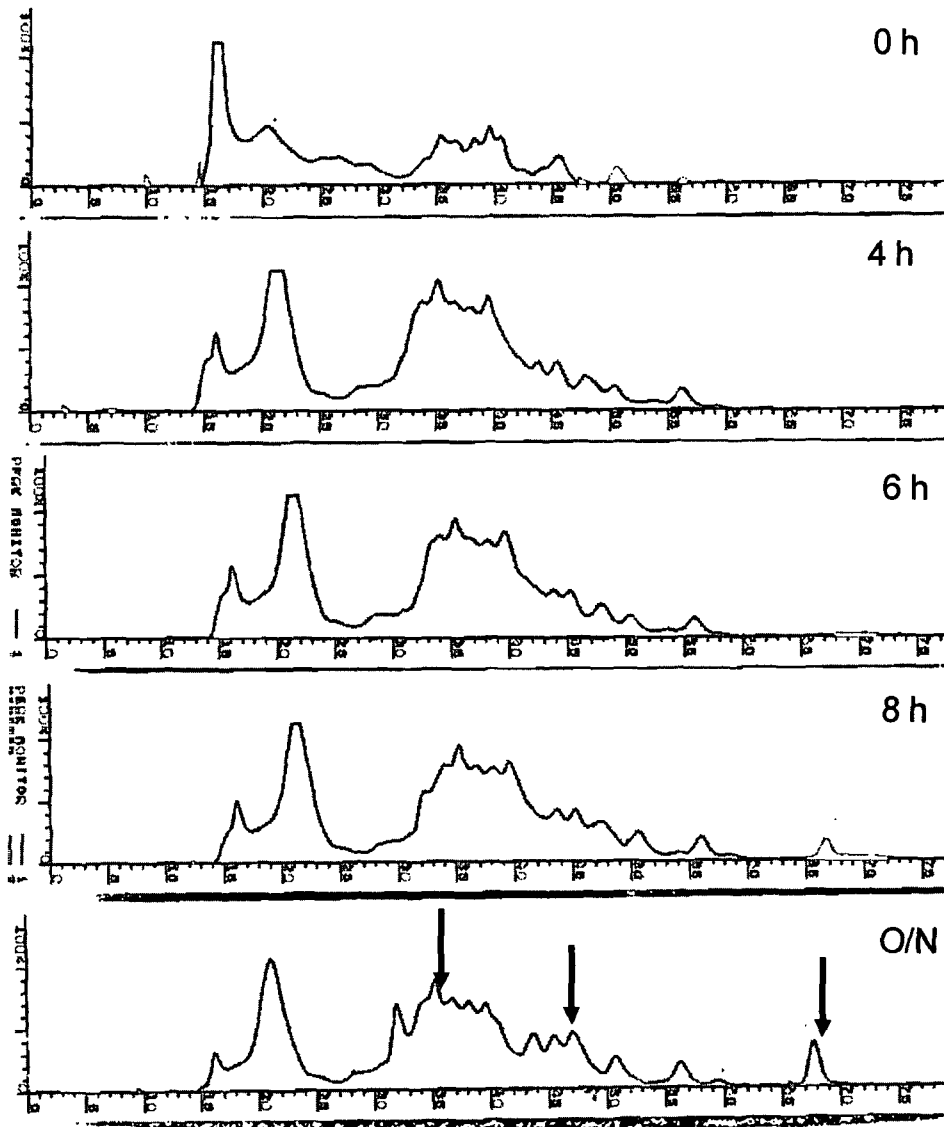


그림 23. FPLC 에 의한 대두박 분해능 분석

위의 그림 23에서 보듯이 retention time 20 분대의 고 분자량을 갖는 protein 들이 저 분자량의 protein 및 peptide 성 물질로 분해됨을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 미생물 유래의 단백질 분해효소는 사료용 첨가제로도 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 상온 및 50℃에서 대두박을 공생 미생물 유래의 단백질 분해효소로 처리한 후 trypsin inhibitor 의 활성을 특정하였으며 그 결과를 표 15 에 나타내었다.

<표 15> 미생물 유래 단백질 분해효소에 의한 SBTI 활성 inactivation

Sample	A405
control	1.633
처리전 sample	0.206
after 2 h	1.454
after 4 h	1.381
after 8 h	1.484
after O/N	1.687

위의 표에서 보듯이 SBTI의 활성은 효소로 처리한 지 2시간 내에 거의 inactivation 됨을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하였을 때, 공생 미생물 유래 단백질 분해효소는 사료 첨가제로서도 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

7) Capsulation

일반적으로 체내로 흡수된 사료는 위에서 위산의 작용으로 강산성으로 변하게 되는데 이 때 첨가된 단백질 분해효소는 극 산성 조건에 노출되게 됨으로써 효소의 기능을 잃을 가능성이 커진다. 따라서 사료용 효소 첨가제로서 제 기능을 하기 위하여 위에서는 release 되지 않아 극 산성 조건에서는 안정하고, 장 (intestine) 에서 효소가 release 되는 장용성 capsulation 이 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구실에서는 미생물 유래 효소가 최적의 활성 조건을 갖는 알칼리성 조건인 장에서 release 되도록 enterencapsulation 을 시도하였다 (그림 24).



그림 24. 미생물 유래 alkaline protease 의 장용성 capsule

8) 단백질 분해효소를 분비하는 미생물의 screening

갯지렁이 공생 미생물에서 뿐만 아니라 여러 source 로부터 단백질 분해효소를 분비하는 미생물을 계속적으로 screening 하였으며 그 결과를 표 16 에 나타내었다.

<표 16> 단백질 분해효소 생산하는 균주 탐색

Isolate No.	Activity (U/ml, x10 ⁻¹)	Isolate No.	Activity (U/ml, x10 ⁻¹)	Isolate No.	Activity (U/ml, x10 ⁻¹)
4	421.9	222	532.7	362	82.5
9	436.0	223	609.9	363	132.7
21	458.6	224	786.9	364	149.3
22	434.0	401	509.5	365	120.5
60	419.0	402	527.4	366	76.0
83	478.0	404	577.6	367	136.0
94	536.0	405	507.9	368	165.7
105	531.4	406	546.4	369	78.0
106	506.6	411	538.4	370	173.6
120	503.7	412	523.8	372	130.3
122	553.9	413	520.5	374	195.3
189	561.9	414	585.8	375	249.1
201	557.3	415	523.8	376	175.8
202	551.7	416	564.3	377	86.4
203	433.6	417	911.5	378	190.2
204	504.2	418	478.9	379	147.3
205	513.4	419	477.8	380	280.9
206	537.8	420	542.7	381	114.5
207	504.8	421	500.0	383	110.1
208	485.3	358	605.5	384	764.3
209	560.4	384	686.0	385	218.5
210	622.1	400	626.5	387	174.3
211	554.6	351	182.5	389	160.3
212	586.7	352	209.2	391	100.8
213	570.3	353	214.5	392	181.6
214	527.4	354	141.3	393	154.4
215	526.5	355	147.3	394	230.0
216	549.5	356	299.9	395	155.3
217	552.8	357	82.7	396	186.9
218	568.8	358	307.5	397	118.3
219	654.4	359	168.7	399	149.3
220	600.4	360	162.1		
221	560.6	361	259.5		

단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 screening 하여 약 100 여종 확보하였으며 이들 미생물들 중 최소한 2 종류는 high potent 를 갖는 미생물로 판단되며 지속적인 연구 시 매우 높은 단백질 분해효소를 생산하는 균주일 가능성 크다고 판단된다.

9) 공생미생물 유래 단백질 분해효소의 overexpression

4 차 년도 연구 결과에 의해서 분리된 공생미생물 유래 단백질 분해효소를 coding 하는 gene을 발현 vector 인 pT7-7 에 cloning 하여 *E. coli* BL21(DE3) 에 transformation 하여 overexpression을 시도하였으며 그 결과를 그림 25 에 나타내었다.

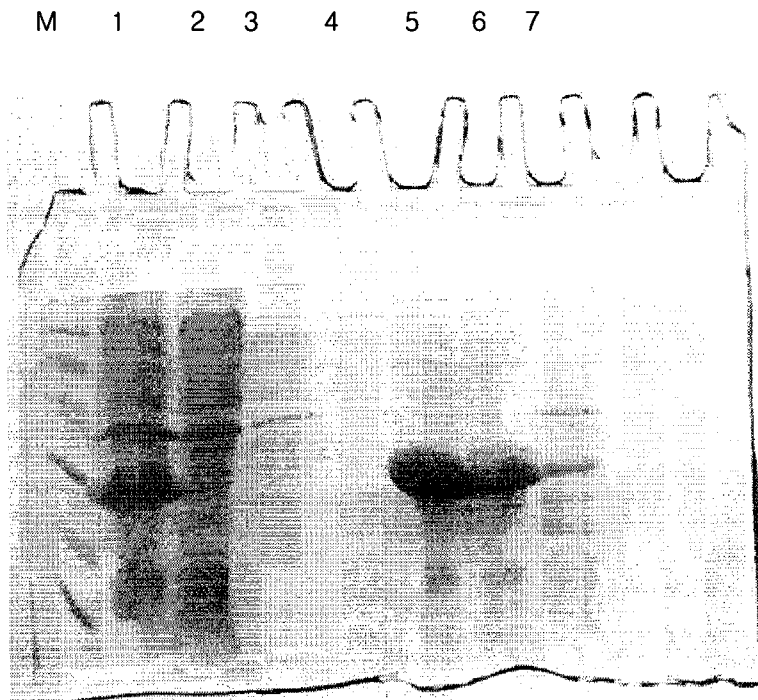


그림 25. 15% SDS-PAGE 에 의한 bacterial protease 발현 유도 분석

위의 그림 25 에서 보듯이 공생 미생물 유래 단백질 분해효소를 overexpression 하였을 때, 전체 세포 단백질의 30% 이상 생산하는 것을 알 수 있었다. 그러나 아직 과발현된 효소를 활성을 갖게끔 Refolding 연구를 진행중이다.

4. 향후 계획

1) 갯지렁이 유래 단백질 분해효소

- 여러 형태의 serine protease 유전자를 미생물 (대장균, *Bacillus*, Yeast)로 도입
- 단백질 발현 및 분비 유도
- 대량 생산을 위한 발현 최적화
- 재조합 단백질 특성 규명 및 생물학적 활성 조사

2) 미생물 유래 단백질 분해효소

- Pilot-scale 발효를 통하여 단백질 분해 효소의 생산성을 높임 : 목표치 60,000 U/ml
- 대량 생산 시 배양액으로부터 단백질 분해 효소의 경제적인 회수 공정 확립
- 세척력 시험 완료. 이 때 각종 세제 성분에 대한 안정성 연구 병행
- 효소의 안정화 연구 (고정화 등의 방법)
- 사료용 capsule화 연구 (capsule 내 효소 역가 별, capsule type 별 효소에 의한 대두박 분해능 연구)
- bioassay 시도 (사료 첨가제로서 응용 가능성 타진)

등을 중점적으로 연구하고 그 외 부수적으로 갯벌 및 갯벌에 서식 생물로부터 단백질 분해효소를 생산하는 새로운 균주 탐색하며 대장균 (또는 다른 종의 미생물)에서 유전공학적 방법을 이용한 단백질 분해효소의 대량 생산 연구

제 4 장. 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도 (계획,▶ ; 진도 —▶)

연구 내용	연구 분담	추진 일정 (개월)												연구비 (천원)	비고		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
<ul style="list-style-type: none"> 갯지렁이 채집 및 갯벌 미생물 계속 채집 갯벌미생물 screening 갯지렁이 protease gene screening 및 cloning 계속 Cloning후 over-expression 조건실험 갯지렁이에 대한 해양생물 공학실험 계속 갯벌미생물에 대한 2차screening 및 clone채취 갯벌미생물 발효조건실험 및 최적배지 선정실험 갯벌미생물분비효소 정제 실험 및 규명실험 5L fermentor실험 효소최대생산 실험 공생미생물 발현실험 및 해양공학 제반실험 기타 미생물실험 결과분석 행정업무 및 보고서 작성 	장 정 순																
	주 한 승		←	←	←	←	←										
	Kumar																
	주 한 승		←	←	←	←	←										
	최 장 원	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	박 윤 창																
	최 장 원				←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	박 윤 창																
	최 장 원	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	주 한 승																
	주 한 승		←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	Kumar																
	주 한 승																
	Kumar				←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	박 건 춘 외																
	Kumar																
	주 한 승		←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	주 한 승	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	
	박건춘 외																
	주 한 승																
박건춘외	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←		
박건춘외																	
박건춘외																	
장 정 순	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←		
김 신 영																	
사업진도 (%)		20	30	35	15												
연구비 (천원)		34,000	51,000	59,500	25,500												

제 2 절 대외 기여도

1. 기술적 측면

효소가 유기화합물 합성에 촉매로서 사용될 수 있는 가능한 효소의 여러 장점에 기인하고 있는데, 효소의 촉매 효율성은 비슷한 반응조건 하에서의 비 효소적 (nonenzymatic) 화학반응에 비해, 무려 $10^8 \sim 10^{14}$ 배나 되며 기질에 대한 특이성, 광학 활성에 대한 특이성, 화학구조상의 특정부위에 대한 특이성 등의 특성이 있어, 화학 촉매반응에 비해 반응의 선택성이 매우 높다. 현재까지 알려진 효소의 종류는 약 3,000 여종이 되며, 산업적으로 응용이 가능한 효소는 150 여종이고, 현재 상업적으로 생산되고 있는 효소는 60 여종에 불과하다. 그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 효소의 실제 산업적 응용을 제한하는 것은 효소를 산업적인 목적으로 사용할 때 발생하는 문제점에 기인하고 있다. 즉 단백질인 효소는 열이나 산, 알카리, 중금속 등과 같은 stress 요인에 매우 약하며 유기합성에 흔히 사용되고 있는 유기용매 등에 의해 쉽게 불활성화가 일어나게 된다. 산업적 용도에서 사용하는 효소의 경우 생체 내부의 항상적 환경조건에 비해 변화가 심하고, 보다 극심한 생체 외부 환경 하에서 효소가 활성을 유지해야 하기 때문에 환경 stress에 대한 강한 저항성을 갖는 효소가 요구된다. 산업용 효소의 활성에 미칠 수 있는 stress의 종류는 ① 극심한 pH에 노출, ② 극심한 온도의 변화, ③ 산화-환원제의 노출정도, ④ 반응액에 존재하는 stress물질 (예: 계면활성제, 강산화제, 등), ⑤ 중금속에의 노출 등 이 있다. 따라서 이러한 극한 조건에서도 효소의 활성을 잃지 않는 효소의 개발이 절실하며, 현재 국내 뿐만 아니라 선진국에서 이러한 특성을 갖는 효소를 개발하려고 집중적인 연구와 투자가 이루어지고 있는 실정이다. 고온, 저온 혹은 높은 염 농도 및 특수 해양환경 같은 다양한 극한 환경으로부터 미생물을 분리하고 이들이 가지고 있는 효소는 특수한 환경을 극복해야되는 특성을 가지고 있는 경우가 많은데 이들의 효소를 총칭하여 extremozyme이라고 하였다. 최근에는 extremozyme의 기능(function)과 구조(structure)에 대한 이론적인 연구와 아울러 산업적인 응용이 선진국에서 시도되고 있다. 그럼에도 특수한 환경에서 유래된 효소는 그 환경에 대한 안정성만 확보하게 되는 단점이 있다 (예: 호열성 세균에서 유래된 효소는 고열에 대한 안정성만 확보되며, pH, 산화제, 염 농도 등 과 같은 stress는 보장받지 못함).

갯벌은 단지 육지와 해안의 연결지점이라는 의미보다는 육지로부터 유입되는 각종 다양한 유기물, 유기폐기물 및 대량의 하천 수 유입 등이 집적되는 곳으로 이런 열악하고 극한적인 변화의 해양 환경 하에 생명체가 주위의 환경을 훌륭히 정화시키면서 적응 서식한다는 것은 해양 생태학적 측면으로 볼 때 갯벌생물의 무한한 환경적응력과 생체 내에서의 회복 및 복원과정이 타 생물과는 매우 판이하다는 사실을 암시하고 있다. 이러한 관점으로 볼 때 갯벌 환경이나 특이 해양 환경에 서식하고 있는 해양 생물 상은 정상적인 환경보다는 분명히 특이한 환경을 극복하고 적응하기 위한 특수기능을 갖고있다고 생각되며 이는 곧 신물질 보유라는 가능성을 암시하고 있고 높은 기능성의 극한효소류 (extremozymes) 나 극한 친화성 물질류 (extremophiles) 를 갖고 있으리라는 것은 충분히 납득할 수 있다고 생각된다. 갯벌은 그 생태환경이 저온, 알카리성 및 고 염분 환경등 극한 환경 조건으로서, 저온 환경에 생육하는 저온성 생물 (psychrophiles), pH 8~12 의 알칼리성 환경에 생육하는 호알칼리성 생물 (alkalophiles) 및 높은 염분환경에 생육하는 호염성 생물 (halophiles) 등이 생존할 수 있는 가능성이 높은 곳이다. 현재 전 세계적으로 extremophiles 에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Extremophile (혹은 extremozyme) 에 관한 연구는 그 역사가 채 10여 년도 안 되는 신생 연구분야로 지금까지 extremophiles 를 이용한 연구는 주로 심해저, 온천수, 고압상태 및 알카리성 조건 등의 natural condition 에서 분리한 미생물에 대한 연구가 주를 이

루고 있고 그나마도 국내의 경우는 여건상 태생기적 상황이다. 지금까지의 연구결과 서해연안에 서식하고 있는 갯벌생물(갯지렁이)과 이들의 공생 미생물로부터 매우 유용성이 높다고 사료되는 신 기능성 alkaline serine protease를 얻어 그 성질을 밝힌 바 있으며 위의 분리된 2가지 효소 역시 extremozyme 으로서 응용면으로의 기능을 갖고 있다고 사료된다. 이는 열악하고 극한적인 변화의 해양 환경 하에 생명체가 주위의 환경을 훌륭히 정화시키면서 적응 서식하고 있는 갯벌생물의 무한한 환경적응력과 생체 내에서의 회복 및 복원하려는 과정이 타 생물과는 매우 판이하다는 사실을 암시하며 이러한 생체 내 process를 원활히 수행하기 위해서는 위에 기술된 특수 기능을 보유하고 있는 효소 등이 존재해야만 된다고 생각된다. 그러나 선진국은 이상의 extremozymes 류나 기타 extremophiles 를 활용한 산업화에 많은 진전을 보고있으나 국내의 경우는 본 연구에서와 같이 고유의 우리만의 자원을 갖고 있으면서도 아직 기초 단계를 벗어나지 못하고 있다. 그러나 아직도 많은 해양 생물 종은 인류에게 노출되지 않고 태고의 신비를 간직한 채 오늘날에도 아직 밝혀지지 않은 수없이 많은 종류의 신물질을 포용하고 있는 신물질 자원의 보고이므로 풍부한 해양자원을 가진 우리나라는 무궁무진한 잠재 가능성을 가지고 있는 해양생물의 탐색연구와 유용 해양신물질의 한 차원 높은 개발이 시급한 실정이다. 즉 이들 생물 상을 이용하여 새로운 기능을 갖고 있을 것으로 추측되는 신물질을 탐색하고 이에 대한 기초연구와 아울러 응용성을 타진하는 일은 순수 학문적일 뿐만 아니라 기술적인 측면으로도 매우 큰 의의가 있다고 생각된다.

2. 경제 · 산업적 측면

생물다양성 협약이 발효된 이후 세계 각 국은 자국 고유의 생물자원을 미래의 자원 보고화 함으로써, 국내에서도 이에 대한 각종 보호대책 수립이 절실해지고 있다. 따라서, 자국내의 생물자원에 대한 보전과 특히 유전자관리 분야로의 정책을 새로이 펴고 있고 이를 이용한 개발을 강력하게 추진하고 있다. 생물다양성 문제는 일반적으로 육상의 동 · 식물을 주로 다루고 있지만 생물의 보고라 할 수 있는 해양 및 해양 갯벌생물은 아직도 많은 연구가 이루어져있지 않다. 이미 선진 제국에서는 범국가적 차원에서 이 분야에 대한 중요도를 인식하고 많은 연구를 선행 중에 있다. 예를 들면, 미국에서는 1994년에 미생물 유전체 연구계획 (Microbial Genome Program; MGP) 을 수립하고 다양한 미생물에 대한 유전체 연구를 수행하고 있으며, TIGR (The Institute for Genomic Research)에서 해양세균인 *Caulobacter crescentus* 의 전체 염기서열을 밝히는 등 많은 연구가 진척되고 있다. 일본의 경우 JAMSTEC (Japan Marine Science and Technology Center)에서는 심해저에서 채집한 몇몇 extremophiles 의 전체 염기서열을 분석하고 있으며, 그밖에, 현재 연구가 진행중인 해양미생물은 *Prochlorococcus marinus* MED4 와 *Prochlorococcus marinus* MIT9313 등 몇 가지 종에 불과한 실정이다. 이러한 활발한 연구 결과 최근 새로운 미생물의 분류체계 인 고세균 (Archaea) 의 분류를 탄생시켜 세계적으로 극한 미생물연구 에 대한 관심이 집중되고 있으며, 극한 미생물이 보유한 극한효소의 산업적 응용 연구가 활발히 진행되어 산업화되고 있다. 이러한 극한 미생물 이용 기술은 21 세기 신기술의 개념인 환경과 친화, 경제적 친화, 사회적 친화 및 국제적 친화의 개념이 적극적으로 도입된 21 세기 프론티어 기술로 대두되고 있어 국가연구개발 사업으로서 추진되어야 할 필요성이 매우 높다고 판단된다. 이러한 극한 생물로부터 현재 상업화되어 있는 대표적인 효소가 열 안정성 DNA polymerase (예; Taq DNA polymerase, Pfu

DNA polymerase 등)로서 현재 PCR에 가장 많이 사용되고 있는 효소 군이며, 앞으로 산업용 효소 시장을 이들 극한 미생물로부터 유래한 효소들이 석권할 것으로 사료된다.

생물산업의 세계 시장규모는 예측기관에 따라 차이가 있으나, 2000년에 1,000억 달러로 전망하고 있으며, 미국 A. D. Little사와 DRI (Decision Resources Inc.)사의 자료에 따르면, 연평균 20% 이상의 고성장을 지속할 것으로 전망된다. 전체 생물산업의 시장중 생물약품과 생물관련 1차 산업제품이 차지하는 비율이 매우 높을 것으로 전망되고 있다. 더욱이, 같은 의약품이라도 생물공학적으로 생산된 의약품이 광학 활성이 높고 순도가 높아 부작용이 적은 것으로 밝혀지고, 생물공학 기술의 발전으로 가격 경쟁력까지 생기면서, 세계의약품 시장의 미래는 결국 생물산업에 의한 생산으로 이동될 것으로 전망되고 있다 (표 17).

표 17. 세계 의약품의 수요 전망

(단위 : 억 US\$)

구분	1995년	2000년	2005년	연평균 증가율 (%)	
				199~2000	2000~2005
합성의약품	2,600	3,300	4,000	4.9%	3.9%
생물의약품	200	500	1,200	20.1%	19.1%
전체의약품	2,800	3,800	5,200	6.3%	6.5%

자료 : 미국 A. D. Little / IMS Pharma Strategy Group
 LG경제연구원, 바이오의약품산업의 전망과 과제, 1997년

전세계의 생물 산업을 선도하고 있는 미국의 경우 1999년도 전체 순수 효소 시장의 규모는 약 19억 달러로 이 중 약 30% 정도를 산업용 효소가 차지하고 있다. 또한 이 시장 규모는 향후 5년 간 약 45% 정도 성장할 것으로 예측하고 있다 (표 18).

표 18. 미국의 분야별 효소 시장의 변화 예측

자료출처 : Freedonia Group보고서

효소 분류	효소 종류	효 소 시 장 (억불\$, 5년간 증가율%)		
		1999년 (점유률)	2004년	2009년
특수 효소	의약 및 시약용	13.4(73.2)	19.7(47.0)	28.85(46.5)
산업용 효소	식품 & 음료	1.68(9.2)	2.3(36.9)	3.2(39.1)
	농업	1.3(7.1)	1.7(30.8)	2.23(31.2)
	세계	1.09(6.0)	1.48(35.8)	2.0(35.1)
	화장품	0.31(1.7)	0.5(61.3)	0.75(50.0)
	섬유	0.25(1.4)	0.37(48.0)	0.57(48.7)
	기타	0.27(1.5)	0.25(-)	0.02(-)
	소계	4.9(26.8)	6.6(34.7)	8.75(32.6)
합계		18.3(100)	26.3(43.7)	37.6(43.0)

산업용 효소의 2002 연도 시장 규모 예측은 표 19에 나타내었다.

표 19. 산업용 효소의 세계 시장 예측 (1997-2002)

단위 (백만 \$)

Market Sector	1997	1998	2002	연평균 증가율 (%) 1997-2002
Food and animal feed	705	729.7	833.1	3.5
Detergents/cleaners	475.2	498	600.9	4.8
Textiles, leather and fur	161	164.2	182.7	2
Pulp and paper	97.6	104.3	136	6.9
Chemicals manufacture	59.2	60.8	67.6	2.7
Total	1,498.0	1,557.0	1,820.3	4

Source: Business Communications Company, Inc.

C-147NA INDUSTRIAL ENZYMES: PRODUCTS, TECHNOLOGIES AND APPLICATIONS

위의 표 19 에서 보듯이 산업용 효소 중 가장 높은 비중을 차지하는 것이 세제 첨가용 효소이며, 이 중 단백질 분해 효소가 가장 큰 부분을 차지하고 있다. 세제 첨가효소로서의 protease 는 세제 첨가효소 중 가장 많은 부분이 사용되고 있으며, 또한 다른 산업분야에서도 응용적 가치가 높기 때문에 활발한 연구 및 상품화가 진행되고 있다. 세제 산업에 이용되는 효소의 판매는 Novo Nordisk사 (덴마크), Genencor International사 (미국), Gist-Brocades사 (네델란드), Solvay사 (벨기에), Showa-Denko사 (일본)가 전 세계시장을 석권하고 있다. 그러나, 1995년 초에 Genencor사는 Gist-Brocades사와 Solvay사의 효소세제사업부를, Novo Nordisk사는 Showa-Denko사의 효소세제 사업부를 인수함으로써 이 두 회사가 전 세계 시장의 95%를 독점하고 있다. 흥미로운 점은 2001년도 Novo Nordisk사의 경영분석보고서에 따르면 이 회사의 세제용 protease의 매출이 전년도에 비해 11% 감소한 것으로 발표하였다. 이 보고서는 이러한 매출감소는 환율의 문제 및 경쟁사의 영업에 따른 시장의 분할을 이유로 들었다. 이 Novo Nordisk사의 제품군을 살펴보면, 생산 효소의 협소한 pH 범위 및 세제 사용 목적에 따라 배합되는 화합물에 의한 활성억제등을 이유로 사용하는 세제에 따라 다양한 효소 원으로부터 protease를 생산하는 것을 알 수 있는데, 이런 다양한 효소 원의 사용은 과도한 생산원가를 유발시킴으로써 경쟁력에서 뒤쳐질 수 있음을 제시하였다. 화학 세제로 인하여 심각한 환경오염문제가 대두하게 됨에 따라서 1960년대 이후, alkaline protease를 이용한 효소세제의 상품화가 빠른 속도로 진척되었다. 1976년경에 amylase의 세제사용으로 더욱 효소사용이 증가하였고 1984년경에 alkaline cellulase를 세제에 이용하였고, 1989년에는 alkaline lipase를 효소세제에 이용하고 있다 (표 20).

<표 20> 대표적인 세제 첨가효소의 종류와 생산 미생물

효소의 종류	생산균주
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus amyloliquefacience</i>
	<i>Bacillus alclophilus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
Amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cellulase	<i>Humicola insolens</i>
	<i>Bacillus</i> sp. KSM-635
Lipase	<i>Humicola lanuginosa</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>

세제용 단백질 분해 효소를 포함한 생물산업은 이러한 거대한 잠재력과 고부가가치 성 및 환경

친화적인 생물산업 내지 해양 생물공학 산업은 우리나라와 같이 부존 자원은 적으나 많은 고급 인력을 갖고 있는 상황에서는 경제, 산업적 측면으로 볼 때 더 할 나위 없이 적합한 분야로써 해양 생물자원으로부터의 유용신물질 개발사업은 국가의 경제적으로나 사회적으로 절실히 요구되고 있는 분야라고 판단되며, 이는 현재 전량 수입에 의존하고 있는 산업용 효소의 수입 대체 효과 뿐만 아니라 국가 수출구조의 개선에도 큰 몫을 할 것으로 기대되는 신기술이라고 판단된다. 또한 극한 미생물이 생산하는 극한 효소는 일반적으로 고온, 고압, 극한 pH 및 유기용매 등의 극한 조건에서도 효소반응을 수행할 수 있어, 기존의 독성이 강한 화학 약품 등을 사용한 합성 방법을 대체하여 독성이 적은 극한 효소를 사용함으로써 고 부가가치의 화합물을 생산할 수 있다. 이는 화학 약품에 의한 대기 및 수질 오염을 줄이는 환경 친화형 산업으로 전환이 가능할 것으로 판단되며 이미 제지산업이나 가죽 가공 산업에서는 산업용 효소로 대체 됨으로써 환경 오염 저감 가능을 하며, 화학 합성에 의한 생산은 비 특이적 부산물의 생성을 줄임으로써 생산 효율의 증가를 가져올 수 있음으로써 여러 가지 장점을 갖는다. 이미 기술하였듯이 21 세기에 걸 맞는 가장 경쟁력 있고 고부가 기술은 생물산업기술이며 특히 우리 고유의 생물 상을 이용하여 실용화시킬 때의 경제적 파급효과가 클 것이다. 특히 극한 미생물 (Thermophile, Halophile, Alkalophile 등)이 생산하는 극한 효소 류는 다양한 산업분야 (세제, 가죽, 사료, 화학 합성 등)에 적용이 가능한 기술로 판단된다.

3. 사회·문화적 측면

과거 중국 문화권이었던 우리나라는 중국의 영향력을 우리 고유의 형태로 소화시켜 다양한 문화를 재창출한 역사적 배경을 갖고 있다. 이미 잘 알려진 바와 같이 중국에서 발달한 한의학은 우리나라에서 사상의학 내지 동의보감을 주축으로 하는 새로운 차원의 동 의학으로 새로운 형태의 꽃을 피우고 있으며 우리 선대에는 많은 경험으로부터 얻은 민간요법 내지 동의학적 치료법이 다양하다. 여기에는 우리 토질에서 난 육상생물과 아울러 많은 해양생물을 이용하고 있는 치료법이 의외로 많음을 알 수 있다.

본 연구에서 시도할 각종 연구의 사회·문화적 배경으로는 우리 고유의 민간요법으로부터의 경험적 idea를 얻어 이를 과학화할 경우 새로운 차원의 사회·문화적으로 큰 파급효과를 나타낼 수 있다고 생각된다. 특히 환경 친화적 효소 제제의 개발에 의한 환경오염의 방지 및 억제 효과 및 생물의학 제제의 대량생산 기반 조성을 통한 국민 보건 증진에 공헌할 것으로 사료된다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

① 우리나라 특산종이고 고유종인 참 갯지렁이 유래의 신 기능성 슈퍼효소에 대한 생화학적 내지 효소학적 특성이 1- 4 차 연도에 마무리되었으며, 몇 가지의 효소학적 특성을 비교 분석함으로써, 이들 효소들이 화학적, 물리적으로 안정성이 있음이 확인되었으며, 따라서 이들 효소를 생산하고자 하는 단백질 공학과 생물산업에 커다란 도움을 제공 할 수 있을 것으로 판단된다.

② 갯지렁이 공생 세균 유래의 단백질 분해효소는 효소의 안정성, 특히 SDS 및 산화제에 대한 안정성이 매우 뛰어난 효소임을 밝혔으며, 이는 산업용으로 충분한 활용 가치가 있는 것으로 판단된다. 수행 추진 전략은 다음과 같다.

- 여러 가지 기능성 실험 수행 (세탁 능력 등)
- 국내 규격 (KT mark) 신청
- 경제성 및 시장성 검토
- 기술 이전 추진
- Licensing-out 검토

그 적용 분야는

- 세제 효소용 : detergent, 세척액, 생활용품, 수질정화
- 의학단백질용 : 혈전용해제, complement factor, 단백질분해효소 저해제
- 식품가공용 : 소화 촉진, 연육제, 유제품
- 사료첨가제 (Feed additive)
- 피혁 및 섬유산업용
- 화장품용 효소
- 임상, 진단, 생물공학용 배지 및 시약

③ 갯지렁이는 전 세계적으로 한국 서해 연안 갯벌에만 서식하는 1 종, 1 속의 생물로서, 갯지렁이 유래의 어떠한 물질도 새로운 물질로 보고될 수 있으며, 이는 세계적 기업 뿐 만 아니라 국내의 어떠한 기업과도 특허 분쟁의 여지가 없는 것으로 판단된다.

→ 따라서 갯지렁이 유래 단백질 분해효소는 고 부가가치를 갖는 제품으로 개발할 필요성이 절실하며 이를 위해서는 **과감한 연구 수행 및 지원이 필수로** 생각된다. 또한 갯지렁이 및 갯지렁이 공생미생물에는 단백질 분해 효소 외에 다양한 종류의 생리활성을 갖는 물질이 존재할 것으로 판단하며, 본 연구 성공 시 이미 구축하여 놓은 갯지렁이 cDNA library 를 이용하여 또 다른 유용한 생리 활성 물질 개발을 유도하고 아울러 우리나라 고유의 바다 (갯벌 포함) 생물로부터 유용하고 특이기능을 갖고있는 생리 활성물질의 적극적 개발에 일익을 담당 할 예정

④ 경제·산업적 측면에서는 다양한 각도에서의 응용성을 토대로 고부가가치의 생물 소재 물질을

생산함으로써 21C 주도형의 새로운 생물산업기반을 조성하게되며 경쟁력 있는 venture 기업의 창출 및 새로운 분야에 대한 국가 경쟁력을 극대화시켜 나갈 수 있다. 상기 슈퍼효소의 활용 방안은 매우 광범위하나 우선 활용에 큰 무리가 없는 산업적인 측면으로의 활용도가 클 것으로 기대된다.

⑤ 그 외에도

- 정밀활성 및 무독성을 요구하는 의약학 제제로서의 응용성이 크다.
- 극한효소류 경우 생체내 분해가 쉽고 독성출현 등의 확률이 낮으며 따라서 다양한 질환의 치료제나 예방제에 응용가능성이 크다.
- Supraphysiological temperature(초생리적 온도)인 저온 및 고온과 같은 극한 조건을 요구하는 각종 생물반응, 생물 반응기 및 이를 충족시킬 수 있는 기술 시에 효과적 역할 담당 가능성이 크다.
- 갯벌내 유기생체의 1차 기능이 정화작용임을 미루어보아 그로부터 유래된 극한효소류는 정화촉진제로서의 가능성이 클 것으로 예상된다.
- 오염물질 정화시의 특수환경인 산성 및 혐기성 조건에서 유지되는 효소의 활성도로 미루어 응용성의 극대화 가능
- 미생물을 이용한 생물화학공정에 이용함으로써 생산성의 증가뿐만 아니라 식품첨가제로서의 응용성이 커 산업적 응용성을 증진시킬 수 있다.
- 기타 일상생활에 필요한 각종 세제류 (주방세제, 액체 세제) 및 생활폐수의 전처리에 사용될 가능성이 크다.
- 활성과 안정성이 큰 극한효소류는 고부가가치의 생물소재 산업분야에 무한한 응용성을 갖고 있고 이외에도 생명과학분야의 기초학문 발전에 지대한 공헌을 할 것으로 기대되며 결과적으로 경제적 파급효과 역시 클 것으로 기대됨.

제 6 장 참고 문헌

- Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1997) Alkaline pH acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stability and potential as detergent additives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 43-46.
- Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1998) Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technol.* 64, 175-183.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. and Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35, 213-219.
- Beg, Q.K. and Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzymes and Microbial Technology* 32, 294-304.
- Christiansen, T. and Nielsen, J. (2002) Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady-state transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology* 97, 265-273.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. (1996) Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 327-332.
- Gattinger, L.D., Duvnjak, Z. and Khan, A.W. (1990) The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 21-25.
- Gessesse, A. (1997) The use of nug meal as low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresource Technology* 62, 59-61.
- Gonzalez, G., Gonzalez, C. and Merino, P. (1992) Thermostabilization of *Cucurbita ficifolia* protease in the presence of additives. *Biotechnology Letters* 14, 919-924.
- Greene, R.V., Griffin, L.I.L., and Cotta, M.A. (1996) Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications. *Biotechnology Letters* 18, 759-764.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K. and Khan, S. (1999) Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 21, 135-138.
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 15-32.
- Horikoshii, K. (1999) Alkalophiles: Some applications of their products for biotechnology *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 735-750.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S. and Hatada, Y. (1998) Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* 2, 185-190.
- Jacobs, M.F. (1995) Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene* 152, 67-74.
- Johnvesly, B. and Naik, G.R. (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry* 37, 139-144

- Joo, H.S., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R. and Chang, C.S. (2001) Simple methods for alkaline protease purification from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry* 37, 299-303.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R. and Chang, C.S. (2002) Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry* 38, 155-159.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K. and Hoondal, G.S. (2001) Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 17, 125-129.
- Kembhavi, A.A., Kulkarni, A. and Pant, A. (1993) Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38, 83-92.
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S. and Ito, S. (1995) Purification and properties of an alkaline protease form alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-16 *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 473-481.
- Kumar, C.G. and Takagi, H. (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17, 561-594.
- Kumar, C.G. and Tiwari, M.P. (1999) Use of alkaline proteases for ultrafiltration membrane cleaning. *Biotechnology Techniques* 13, 235-238.
- Kumar, C.G., Malik, R.K. and Tiwari, M.P. (1998) Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. *Current Science* 75, 1312-1318.
- Kumar, C.G., Tiwari, M.P. and Jany, K.D. (1999) Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Process Biochemistry* 34, 441-449.
- Layman, P.L. (1986) Industrial enzymes: battling to remain specialties. *Chemical Engineering News* 64, 11-14.
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.S. and Abdel-Fattah, A.F. (1999) Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology* 69, 155-159.
- Masui, A., Fujiwara, N., Takagi, M. and Imanaka, T. (1999) Feasibility study for decomposition of gelatin layers on X-ray films by thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnoogy Letters* 13, 813-815.
- Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F. and Filho, J.L.L. (2002) Application of protease from *Nocardiosis* sp. As a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 307-312.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. (1993) Some observations on protease production in continuous suspension culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 43-54.
- Nehete, P.N., Shah, V.D. and Kothari, R.M. (1985) Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture *Biotechnology Letters* 7, 413-418.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K. and Gupta, R. (2001) Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 493-497.
- Puri, S., Beg, Q.K. and Gupta, R. (2002) Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Current Microbiology* 44, 286-290.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatage, M.S. and Deshpande, V.V. (1998) Molecular and

- biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 597–635.
- Razak, N.A., Samad, M.Y.A., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W., Ampon, K. and Salleh, A.B. (1994) Thermostable extracellular protease of *Bacillus stearothermophilus*: factors affecting its production *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 260–263.
- Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S. and Ito, S. (2002) A novel species of alkalophilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* 6, 65–72.
- Stevenson, D.E., Ofman, D.J. and Fenton, G.A. (1998) Protease-catalysed condensationoligomerisation of hydrophobic peptides as a means of flavour modification *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, 39–44.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M. and Wang, S.L. (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 406–413.

주 의

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