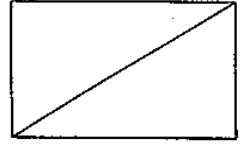


제 1 단 계  
최종보고서

BSNB0221-924-5



# 특수환경 미생물의 기능 및 공정 이용기술

Development of Industrial Application Technology  
of Extremophile Function

연구기관

한국과학기술연구원  
생명공학연구소

과학기술처

페이지는

여백입니다

# 제 출 문

## 과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "특수환경미생물의 기능 및 공정이용기술 개발"과제의 제1단계 최종보고서로 제출합니다.

1997. 7.

주 관 연 구 기 관 명 : 한국과학기술연구원 생명공학연구소

총 팔 연 구 책 임 자 : 안종석 (생명공학연구소 책임연구원)

세부과제 1. 연구책임자 : 안종석 (생명공학연구소 책임연구원)

세부과제 2. 연구책임자 : 이선복 (포항공대 화학공학과 교수)

세부과제 3. 연구책임자 : 성문희 (생명공학연구소 책임연구원)

세부과제 4. 연구책임자 : 전효곤 (생명공학연구소 선임연구원)

이 페이지는

여백입니다

# 요 약 문

## I. 제 목

특수환경 미생물의 기능 및 공정이용기술

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

고온, 저온, 강산성, 강알칼리, 고농도의 염, 고압, 건조, 다량의 유기용매 및 저영양상태 등의 특수환경에 서식하는 미생물에 대한 연구는 생명과학의 기초 연구에도 매우 중요한 역할을 할 것이며 이러한 연구결과에 의해 파생되는 정보는 현재 비약적인 발전을 하고 있는 생물공학(biotechnology)에도 많은 파급효과를 줄 것이다. 특수환경 미생물이 생산하는 특수한 성질을 가진 효소의 연구를 통하여 특수 효소의 공업적 응용, 새로운 효소설계에 활용, 의학 및 분자생물학에 이용 등을 가능하게 한다. 지구의 특수환경에 생육하는 미생물에 대한 연구는 이제 시작단계며 계속적으로 새로운 특수환경 미생물의 분리 및 관련 연구가 속속 보고되고 있다. 따라서 이 분야의 연구는 신규 미생물자원의 확보 및 신 기술개발의 주요 대상으로 매우 중요한 가치를 지닌다.

특수환경 미생물자원을 확보하고 이들이 갖는 기능을 연구하여 활용하는 일은 생명공학산업에 필수적이며, 특히 의약품 및 정밀화학 제품의 생산에 이들의 특수기능을 이용하여 청정산업을 발달시킬 필요가 있다. 특수환경 미생물의 탐색은 기초연구의 성과가 실용화에 직접 반영될 수 있는 기술이며, 대상 미생물종, 미생물 대사기능, 응용분야 등에 있어서 다양성이 풍부한 기술이다. 본 연구는 특수한 환경에서 서식하는 미생물을 탐색하거나 회소미생물을 탐색하여 이들 미생물의 특정 생리·생화학적 기능을 이용하여 유용한 생물산업의

소재를 생산할 수 있는 기술을 개발하는 것으로 앞으로 산업기술의 개방과 세계적 경쟁체제에서는 필수적으로 이룩해야 하는 분야이다. 그리고 이러한 미생물의 이용을 통해서 기존의 화학공정을 대체할 수 있어서 지구환경보전과 환경친화적 산업의 개발을 이루어 생물산업의 발전에 기여할 수 있는 중요한 연구이다.

특수환경 미생물의 탐색기술은 제품개발기술이 아니므로 관련 시장규모를 정확히 판단할 수는 없으나, 관련되는 생물소재산업분야의 최종산물의 시장성으로 추정할 때 1994년의 경우 세계시장은 300억불 정도로 추정된다. 일본에 있어서는 생물산업시장 전체의 규모가 1988년에 4,000억엔이었으며 2,000년에는 4.6조엔에 달할 것으로 예측하고 있다. 이 중에서 신기능 미생물 탐색 기술개발의 결과가 기여하는 부분이 5%정도라 하더라도 1988년에는 200억엔에 달하였고 2,000년에는 2,300억엔에 달할 것으로 추정된다. 국내시장은 아직까지 국내 고유의 기술개발에 의해 신규미생물의 탐색에서부터 산업화에까지 이른 경우가 거의 없어 아주 작다고 하겠으나 앞으로의 시장성은 무한하다고 해야 할 것이다.

특수환경 미생물의 탐색은 기초연구의 성과가 실용화에 직접 반영될 수 있는 기술이며, 대상 미생물종, 미생물 대사기능, 응용분야 등에 있어서 다양성이 풍부한 기술이다. 본 연구는 특수한 극한환경에서 서식하는 특정 미생물군과 일반환경에서 서식하는 최소미생물군을 대상으로하여 분류학상 경계지점에 해당되는 신규미생물을 탐색하거나 특정 생리·생화학적 기능을 가진 신기능성 미생물을 탐색하여, 이들의 특수한 생체기능을 산업적으로 이용함을 목적으로 한다.

### III. 연구개발의 범위 및 내용

특수환경에서 서식하는 특정 미생물군과 일반환경에서 서식하는 희소 미생물군을 대상으로 이들이 갖는 특이 생체반응을 산업적으로 이용하는 기술을 개발하거나 생체반응을 이용하여 물질변환이 가능한 미생물을 탐색하고 이들의 기능을 이용하여 유용물질을 생산하는 변환계를 개발할 수 있는 기술을 수립한다. 특수환경 미생물로서는 특정 미생물군과 일반환경에서 서식하는 희소 미생물군, 고온성 미생물, 저영양성 미생물, 유기용매내성 미생물을 대상으로하여 분류학상 경계지점에 해당되는 미생물을 탐색한다.

이들 미생물을 대상으로 비타민 D<sub>3</sub> 전환 미생물을 탐색하고, 초호열성 미생물의 고농도 배양기술의 개발과 신규 고온미생물의 탐색과 생육기능과 연관된 D-펩타이드 합성효소의 응용 및 생물전환기술을 연구하며 유기용매 내성균의 분리와 이들이 생산하는 효소의 유기용매내성을 분석하는 연구를 수행한다.

#### 1. 미생물에 의한 활성형 비타민 D<sub>3</sub>의 변환기술개발

가. 국내 동굴토양에서 희소방선균의 탐색

나. 비타민 D<sub>3</sub> 전환반응생성물의 분석조건확립

다. 비타민 D<sub>3</sub> 전환 미생물의 탐색조건 수립 및 전환 미생물의 탐색

라. 탐색균주로부터 비타민 D<sub>3</sub> hydroxylase-coding 유전자의 cloning 및 분석

마. Pervaporation module을 이용한 부탄올추출반응기 개발

#### 2. 초호열성 미생물의 고농도배양기술개발

가. Model system으로서 *Sulfolobus solfataricus* 균주를 선정

나. 배지 및 배양조건 최적화

다. *S. solfataricus*의 고농도 배양

라. *S. solfataricus*의 고농도 성장장애요인에 대한 분석

마. Constant-volume 유가식 배양기술개발

### 3. 고온성 미생물의 탐색과 D-peptide 합성

가. 국내 고온환경으로부터 신규 고온성 미생물의 탐색

나. 내열성 D-aminopeptidase(DAP)의 탐색

다. DAP의 역반응을 이용한 D-peptide의 합성

라. DAP 유전자의 cloning

### 4. 유기용매 내성균의 기능해석 및 이용기술개발

가. 유기용매 내성균의 선별을 위한 배양조건의 확립

나. 유기용매 내성균주의 분리 및 선별

다. 유기용매 내성균의 유기용매내성도 조사

라. 유기용매 내성균주의 동정

마. 유기용매에 의해 유도되는 단백질의 확인 및 정제

## IV. 연구개발결과

### 1. 미생물에 의한 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)의 변환기술개발

가. 국내 8곳의 자연동굴토양에서 저영양성에 해당하는 방선균 400주와 곰팡이 200주를 분리하였다. 270주의 방선균은 분류학상의 속명을 동정하여 *Micromonospora*와 *Nocardioform*의 방선균, *Actinomadura*, *Norcardiopsis*, *Norcardioides*, *Streptosporangium*, *Kineospora*에 해당하는 희소 방선균임을 확인하였다.



나. Vitamin D<sub>3</sub>와 활성형 vitamin D<sub>3</sub>인 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ (OH) vitamin D<sub>3</sub> 및 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>들에 대한 분석방법을 photodiode arrayed HPLC을 사용하여 확립하였다.

다. 활성형 VD<sub>3</sub>로 전환을 위한 유리한 배양배지를 선정하였고 균체량 0.1 mg/ml(wet weight), 초기 배지에 첨가하는 VD<sub>3</sub> 양 20 mg/ml, 반응시간 48시간 및 추출용매 MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 1) 등의 일차 탐색조건을 확립하였다.

라. 분리한 방선균과 곰팡이를 대상으로 vitamin D<sub>3</sub>를 25(OH) VD<sub>3</sub>로 전환시키는 활성균주 9주를 1차로 선정한 후 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub>를 생성할 수 있는 MTV 960912와 MTV 960312 등의 두균주를 최종 선정하였다. 이중 전환능이 우수한 MTV 960912를 동정하여 *Streptomyces pactum* MTV 960912으로 명명하였다.

마. *Streptomyces pactum* MTV 960912의 VD<sub>3</sub> hydroxylase의 특성을 조사한 결과 고등동물의 VD<sub>3</sub> hydroxylase와 같은 cytochrome P450 계열의 hydroxylase였으며 이균주에서 hydroxylase 유전자를 cloning하고 *S. lividans*에서 발현하여 효소활성을 조사하고 있다.

바. 부탄올 발효세균인 *Clostridium acetobutylicum*에 의한 부탄올 발효시 silicone tube를 이용한 pervaporation module을 제작한 후 운전성능을 분석한 결과 예측한 운전모델과 잘 일치함을 알았다.

## 2. 초호열성 미생물의 고농도배양기술개발

가. 초호열성 미생물인 *S. solfataricus*의 고농도 배양에 관한 연구를 3.7 L 및 19 L 발효기에서 수행하여 22.6 g/L (cell dry weight)의 최고세포 농도를 얻을 수 있었다.

나. 본 연구에서는 처음으로 초호열 성미생물의 고농도성장 장애요인을 분

석하여 가장 중요한 장애요인은 inorganic ion들의 배양액내 축적임을 밝혔다.

다. 초호열성 미생물의 유가식 배양에 있어서 배양액의 부피변화가 없도록 할 수 있는 CVFB (Constant Volume Fed Batch) 프로토콜을 개발하였으며, 실험결과 이 기술이 초호열 성미생물의 고농도 배양시 기존의 유가식 배양방법보다 적용이 용이한 것으로 나타났다.

### 3. 고온성 미생물의 탐색과 D-peptide 합성

가. 국내의 고온환경에서 수집한 시료로부터 65℃의 고온에서 생육하는 고온성미생물 약 1,300 균주를 탐색하였다.

나. 탐색한 1,300여 고온성미생물 균주로부터 D-aminopeptidase(DAP) 활성을 보유한 17 균주를 일차 선정하였고 (D-Ala-D-Ala)를 사용하여 D-펩타이드의 분해활성을 HPLC로 분석한 결과, 1 균주가 DAP 활성을 보유함을 확인하여 균주를 동정하여 *Bacillus* sp. BCS-1으로 명명하였다.

다. 각종 D-펩타이드에 대하여 *Bacillus* sp. BCS-1의 DAP의 D-peptide에 대한 분해활성 및 기질특이성을 조사한 결과, D-alanine-p-nitroanilide와 (D-alanine)<sub>2</sub>에 대해 높은 분해활성을 나타내었다.

라. 위의 DAP와 chymotrypsin을 사용하여 효소역반응으로 D-펩타이드 (Bz-Tyr-D-Ala-OBzl) 합성의 생물전환반응을 검토한 결과, 95% 아세트나이트릴, 5% 물(pH 9.0)의 용매에서 37℃ 반응 두시간후, 수율 약 80%로 D-alanine 함유 D-펩타이드 합성을 확인하였다.

### 4. 유기용매 내성균의 기능해석 및 이용기술개발

가. 50%의 toluene을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 균주로 3P1과

3P14를 선별하였으며 50%의 cyclohexane을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 168 균주 중에서 cyclohexane을 함유한 배지에서 배양할 때에 유기용매내성의 esterase를 생산하는 CH-76, CH-120 균주와 유기용매내성의 protease를 생성하는 CH-4 균주를 선별하였다.

나. 3P14 균주는 분리된 균주 중에서 유기용매내성이 가장 강한 균주로 log  $P_{ow}$ 값이 2.3인 dimethylphthalate까지 생육이 가능하였고 CH-76, CH-120, CH-4, XD-146-1 균주는 모두 3.2인 cyclohexane까지 생육할 수 있었다.

다. CH-120 균주가 생산하는 esterase의 유기용매에 대한 효소의 안정성을 조사한 결과, log  $P_{ow}$ 값이 3.2이상인 용매에서 아주 안정하였고 또한 log  $P_{ow}$ 값이 -0.23과 -0.24인 acetone과 ethanol에서도 대조구에 비하여 활성이 감소되지 않았다.

라. Dimethylphthalate, toluene등에 내성이 있는 3P14 균주는 *Pseudomonas putida*로 동정되었고 유기용매내성의 esterase를 생산하는 CH-120 균주는 *Pseudomonas stutzeri*와 가장 유사한 것으로 나타났고 CH-76 균주는 *Pseudomonas aureofaciens*와 유사한 것으로 나타났다. 또한 유기용매내성 protease를 생성하는 CH-4 균주는 *Pseudomonas putida*와 유사한 것으로 나타났다.

마. *Pseudomonas stutzeri* CH-120 균주가 생산하는 31kDa의 esterase를 정제하여 N-말단의 아미노산서열을 부분 결정한 결과 Ala-Pro-Leu-Pro-Asp-Thr-Pro-Gly-Thr-Pro-Phe-Pro-Ser-Val-X-Asn-Phe-Asp-Asn으로 나타났다.

바. 유기용매에 내성이 강한 *Pseudomonas putida* 3P14 균주로부터 유기용매에 의해 강력하게 유도되는 단백질, 74, 57, 34kDa 등의 3가지 단백질을 정제하였다.

이 페이지는

여백입니다

# SUMMARY

## I. Title

Development of Industrial Application Technology of Extremophile Function

## II. Objective and Importance

The study on microorganisms from extreme environments such as high or low temperature, strong acid or alkali, high concentration of salts, high pressure, arid, large amount of solvent, and innutritious habitats, is expected to contribute to the fundamental study of life science and to the development of biotechnology. It is possible to apply special enzymes to the industrial process, design of a novel enzyme system, and medicine or molecular biology through the result from the study on special enzymes of extremophiles. Therefore, the research on extremophiles is very worthwhile to maintain novel microbial resources and to create a new technology. It is very important to maintain extremophiles and to make use of their particular functions to the development of bioindustry and to the production of medicines and fine chemicals. The result of basic study on extremophiles can be utilized to the industrial application and their versatile metabolic functions have high potential for commercial application. The main content of this research is to screen extremophiles or rare microbes and to establish the production system for valuable bioproducts via the utilization of their unique physiological or biochemical functions. These bioprocesses which can

substitute for chemical processes, are sure to contribute to the conservation of global environment and to the development of environmentally favorable industry.

### III. Research Scope and Content

#### 1. Development of microbial conversion technology for production of active vitamin D<sub>3</sub>

- 가. Screening of rare Actinomycetes species from domestic cave soils
- 나. Establishment of analytical condition for vitamin D<sub>3</sub> and its converted products.
- 다. Establishment of screening condition for vitamin D<sub>3</sub>-converting microbes
- 라. Cloning of vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase gene and analysis
- 마. Design of reactor for butanol extraction using pervaporation module

#### 2. Development of high density cultivation method for hyperthermophilic

- 가. Selection of *Sulfolobus solfataricus* as a model strain
- 나. Optimization of media and culture condition
- 다. High density cultivation of *S. solfataricus*
- 라. Analysis of inhibitory factors in high density cultivation of *S. solfataricus*
- 마. Development of cultivation method of constant-volume fed-batch system

### **3. Development of bioconversion of useful D-peptide by the functional study of thermophiles isolated from the soil of Korea**

- 가. Screening of novel thermophilic microbes from thermophilic environment
- 나. Screening of novel, thermophilic D-aminopeptidase(DAP)
- 다. Synthesis of D-aminopeptide by reverse reaction of DAP
- 라. Cloning of DAP gene

### **4. Functional analysis and industrial application of organic solvent-tolerant bacteria**

- 가. Optimization of culture condition for screening of organic solvent-tolerant bacteria.
- 나. Isolation and selection of organic solvent-tolerant bacteria.
- 다. Investigation of solvent tolerance of organic solvent-tolerant bacteria.
- 라. Identification of organic solvent-tolerant bacteria.
- 마. Confirmation and purification of proteins induced by organic solvent

## **IV. Result**

### **1. Development of microbial conversion technology for production of active vitamin D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)**

- 가. Fungal 200 strains and oligotrophic Actinomycetes 400 strains were isolated from domestic soils of eight caves and Actinomycetes 270 strains were identified as rare Actinomycetes like *Micromonospora*,

*Norcardioform*, *Actinomodura*, *Norcardiopsis*, *Norcardioides*,  
*Streptosporangium*, and *Kineospora*.

- 나. We established the analytical method for  $VD_3$ ,  $25(OH) VD_3$ ,  $1\alpha(OH) VD_3$  and  $1\alpha,25(OH)_2 VD_3$  using photodiode arrayed HPLC.
- 다. We set up the reaction condition for the detection of converted forms of  $VD_3$  such as addition of 0.1 mg/ml(wet weight) of cell mass, addition of 20 mg/ml of  $VD_3$ , 48 hr-reaction time, and extraction with MeOH :  $CH_2Cl_2$ (2 : 1).
- 라. We primarily selected 9 isolates which can convert  $VD_3$  into  $25(OH) VD_3$ . Two isolates, MTV 960912 and MTV 960312 which have an additional converting activity of  $1\alpha,25(OH)_2 VD_3$ , were finally selected. One of them, MTV 960912 isolate with higher converting activity was identified as *Streptomyces pactum* MTV 960912.
- 마. We verified that  $VD_3$  hydroxylase from *Streptomyces pactum* MTV 960912 was the same as that from P450 and cloned  $VD_3$  hydroxylase gene by PCR technology.
- 바. Pervaporation module using silicone tubing was devised to perform butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*.

## 2. Development of high density cultivation method for hyperthermophilic

- 가. The highest maximal cell density of hyperthermophilic *S. solfataricus*, 22.6 g/L, was obtained in 3.7 L and 19 L controlled fed-batch cultures.



나. We elucidated that the buildup of inorganic ions had an inhibitory effect on high density growth of *S. solfataricus*.

다. To eliminate the problems caused by evaporation of the medium due to high culture temperature, we have devised a constant-volume fed-batch system and the developed method was applied to high density cultivation of *S. solfataricus*.

### 3. Development of bioconversion of useful D-peptide by the functional study of thermophiles isolated from the soil of Korea

가. About 1,300 thermophilic microbes which can grow at 65°C were isolated from samples collected from domestic, thermophilic environments.

나. We primarily selected 17 isolates with D-aminopeptidase(DAP) activity and one strain was secondarily selected according to DAP activity toward D-peptide(D-Ala-D-Ala). We identified that strain as *Bacillus* sp. and named *Bacillus* sp. BCS-1.

다. We investigated hydrolyzing activity and substrate specificity of DAP from *Bacillus* sp. BCS-1 toward several D-peptides and confirmed it had strong hydrolyzing activity toward D-Ala-p-nitroanilide and (D-Ala)<sub>2</sub>.

라. Using DAP and chymotrypsin, D-Peptide(Bz-Tyr-D-ala-Obzl) containing D-Ala was synthesized 85% of conversion efficiency through the reverse reaction in which reaction was done for 2 hours in the presence of 95% acetonitrile and 5% of water(pH 9.5).

#### 4. Functional analysis and industrial application of organic solvent-tolerant bacteria

- 가. Two bacteria, 3P1 and 3P14 which can grow in media containing 50% of toluene, were selected. And two bacteria, CH-76 and CH-120 which produce solvent-tolerant esterase and one bacterium, CH-4 which produces organic solvent-tolerant protease, were selected in media containing 50% of cyclohexane, respectively.
- 나. Bacterium 3P14 showed the strongest organic solvent-tolerance and were able to grow in the presence of dimethylphthalate( $\log P_{ow}=2.3$ ). Four bacteria, CH-76, CH-120, CH-4 and XD-146-1 were able to grow in the presence of cyclohexane( $\log P_{ow}=2.3$ ).
- 다. Organic solvent tolerance of esterase from isolate CH-120 was very high in solvent which has over 3.2 of  $\log P_{ow}$  value. Furthermore, acetone and ethanol had no effect on its activity, compared to that of control.
- 라. Identification of 3P14, CH-120, CH-76 and CH-4 revealed that four all isolates belonged to genus of *Pseudomonas*. 3P14 was identified as *P. putida*. CH-120, CH-76 and CH-4 were closest to *P. stutzeri*, *P. aureofasciense* and *P. putida*, respectively.
- 마. We purified 31kDa esterase from *P. stutzeri* CH-120 and the determination of the partial N-terminal sequences revealed that they were Ala-Pro-Leu-Pro-Asp-Thr-Pro-Gly-Thr-Pro-Phe-Pro-Ser-Val-X-Asn-Phe-Asp-Asn.
- 바. Three proteins with MW of 74, 57 and 34 kDa which were induced by organic solvent were purified from *P. putida* 3P14.

# 목 차

제 1 장	서론	-----	19
제 2 장	세부과제 1. 연구결과		
	미생물에 의한 활성형 비타민 D <sub>3</sub> 변환기술 개발	-----	23
제 3 장	세부과제 2. 연구결과		
	초호열성 미생물의 최적배양조건 확립 및 고농도		
	배양기술 개발	-----	35
제 4 장	세부과제 3. 연구결과		
	신규 극한환경 미생물의 기능연구를 통한 유용·의약품		
	D-펩타이드의 합성 및 생산 기술 연구	-----	41
제 5 장	세부과제 4. 연구결과		
	유기용매내성균의 기능해석 및 산업적 고도이용기술 개발	-----	49

이 페이지는

여백입니다

## 제 1 장 서 론

살아있는 생명체는 제한된 온도, 압력, pH 및 수분활성도의 범위에서만 생존할 수 있는 것으로 알려져 왔으나 최근에 기존 생물체의 성장 가능 영역을 벗어나는 소위 극한환경 (extreme environment)에서 성장하는 생명체가 해저 분화구, 온천, oil reservoir 등에서 다수 발견되어 큰 관심을 불러일으키고 있다. 이들 중 100°C 이상 수백기압에서 최적으로 성장하는 초호열성 미생물 (extreme thermophile)의 발견은 기초학문적인 측면에서뿐만이 아니라 응용적 측면에서 많은 주목을 받고 있다. 이의 발견은 현재의 상온 상압으로 한정된 생물촉매기술영역을 기존의 화학공업분야로까지 획기적으로 확대시키는 계기가 될 것으로 예상되고 있다.

비타민 D<sub>3</sub>는 calciferol이라고 불리며 Ca과 P의 대사조절의 기능을 갖는다. 비타민 D<sub>3</sub>는 간에서 25번 탄소에 hydroxylation되어 25(OH)D<sub>3</sub>로 전환되고 이는 다시 신장에서 다시 1 $\alpha$  탄소에 hydroxylation되어 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub>]로 전환된다. 이렇게 hydroxylation되어 전환된 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 생체내 Ca 흡수 및 대사조절 활성이 있는 활성형 비타민 D<sub>3</sub>로 알려져 있다. 이중 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 생체내에서 가장 활성이 강한 비타민 D<sub>3</sub> 활성형임이 밝혀져 있다.

미생물에 의한 많은 의약품의 hydroxylation 전환반응은 stereospecific하고 regiospecific하게 가능하며 이러한 기능은 동물생체내에서 이루어지는 hydroxylation 대사기능을 대체할 수 있음이 입증되었다. 따라서 활성형 vitamin D<sub>3</sub>를 고도의 기술과 고가의 반응과정이 요구되는 화학합성에 의해 전환하는 방법을 미생물의 hydroxylation 기능에 의해 경제적으로 저렴하고 다단계의 화학반응공정을 거치지 않는 방법으로 대체할 수 있다.

그러므로 이러한 기능을 갖는 미생물을 자연계로부터 탐색할 때 특수

한 환경 혹은 회소미생물을 대상으로 탐색한다면 기존의 미생물에 의한 전환방법과는 다른 새로운 미생물 혹은 전환효율이 높은 미생물을 탐색해낼 수 있다. 그리고 이렇게 선발된 미생물을 이용할 전환공정기술의 개발과 hydroxylase 유전자의 cloning과 대량발현에 의해 hydroxylase를 이용한 효소반응 공정기술을 개발하여 최종적으로 기존의 방법과는 다르고 그 생산원가를 획기적으로 낮출 수 있는 가능성이 있다.

초고온성 미생물에 대한 기초 및 응용기술개발연구는 미국, 일본, 유럽 등 선진각국에서 활발히 이루어지고 있으며 이 분야 기술개발이 국력 및 기술력의 척도가 되고 있어 국가간의 기술 경쟁이 매우 치열하다. 특히 일본의 경우 미국을 앞지르기 위한 장기계획을 마련하고 본격적인 연구에 착수하였다. Deep Program으로 불리는 일본의 국책연구사업에는 미생물의 탐색 및 배양설비에만 \$5.25 million (약42억원)의 예산을 사용하는 것으로 보고되었다. 한편 초호열성 미생물로부터 얻을 수 있는 효소는 고온에서 안정하고 유기용매의 첨가에 의해서도 쉽게 불활성화되지 않는 것으로 알려져 있어 이와 같이 안정한 효소를 기존의 화학공정에 도입한다면 생물공정이 environmentally friend technology라는 측면에서 생물공학기술의 영역확대에 많은 기여를 할 것으로 예상된다.

유기용매는 일반적으로 미생물세포에 대하여 강력한 독성을 나타내는데 이는 고농도에서 뿐만 아니라 저농도에서도 극히 뚜렷하게 나타나는 현상으로서 대부분의 유기용매의 경우 "threshold effect"가 존재한다. 최근의 생물공학에서 유기용매에 내성을 가진 생체촉매에 의한 생물전환(biotransformation) 기술이나 생물복구(bioremediation)기술의 개발이 절실히 요구됨에 따라, 고농도의 유기용매에서 생존할 수 있는 미생물의 탐색과 유기용매내성균주의 기능해석 및 산업적 용도개발은 우선적으로 실시되어야 할 과제로 인식되고 있다. 따라서 고농도 유기용매내성균의 탐색 및 용도개

발은 유기용매계에서 산업적으로 유용한 소수성 기질의 고부가가치화를 위한 물질전환의 새로운 장을 열 수 있을 것이다. 또 다른 관점에서 유기용매 내성균을 유효하게 이용할 수 있는 분야는 새로운 산업으로 부상하고 있는 bioremediation 분야이다.

우리나라는 보건의료 및 복지환경의 개선으로 인구의 고령화가 가속화함에 따라 필연적으로 수반되는 노인성 질환인 골다공증 환자의 급격한 증가로 이의 예방 및 치료제 시장이 급격히 성장하고 있다. 이에 따라 Ca 흡수 및 뼈대사 개선제인 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 골다공증 예방 및 치료제의 시장이 급격히 신장하고 있으나 현재까지 이의 원료 및 완제품을 전량 일본 등 선진국으로부터 전량 수입하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 골다공증 치료를 위한 vitamin D<sub>3</sub> 제제시장에 대한 정확한 통계자료는 없으나 우리나라와 생활관습이 유사하고 우리나라보다 고령화사회의 시대가 앞서있는 일본(1993년 350억엔)을 비교하여 인구규모와 전체 제약, 의료산업의 수준을 고려하여 추정하면 1993년 현재 약 350억원의 시장을 추정할 수 있다.

1993년 현재 세계의 골다공증 치료제 시장은 10억\$로 추정되고 이중 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 제제가 전체의 55%인 5.5억\$ 규모이고 44%의 calcitomin 제제시장과 기타 esterogen 제제가 차지하고 있다. 이러한 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 제제는 세계적인 인구의 증가율과 인구의 고령화 추세로 2000년대의 시장성은 20억\$ 이상으로 신장될 것으로 예측된다.

메탄올과 에탄올은 물에 대한 용해도가 무한대로서 연료중에 수분이 포함되는 문제점을 소지하고 있으며 단위 몰당 발열량에서도 부탄올에 훨씬 미치지 못하고 있다. 실제로 1980년대 초반 오일 쇼크때 부탄올 발효에서 얻어지는 용제성분(부탄올, 아세톤 및 에탄올이 약 6 : 3 : 1의 비율)을 혼합물 상태 그대로 휘발유 및 디젤 자동차 엔진에 대체하여 사용할 수 있음이 연구결과로 발표되었다. 따라서 본 연구는 향후 각광을 받게될 청정에너지 중

에서 그 물성이 가장 우수한 부탄올을 경제적으로 생산해 낼 수 있는 추출 발효 공정을 개발하는데 기여함으로써 부탄올을 자동차 연료로 사용하는 것을 가능케 한다는 기술적 측면에서 매우 중요한 연구 과제로 사료된다.

현재까지 초호열성 미생물이 성장과정에서 분비하는 대사산물 중 의약품등 산업적으로 유용한 물질이 발표된 바는 없지만 이들이 존재할 가능성이 많다고 판단되기 때문에 이들에 대한 탐색이 이루어지고 있다. 또한 많은 초호열성 박테리아가 유황성분을 에너지원으로 사용할 수 있기 때문에 석탄 및 석유탈황에의 응용이 적극 검토되고 있으며 기타 다른 위험 공해물질의 제거에도 응용가능성이 매우 높다.

현재의 bioreactor 중에서 물을 사용하지 않고 유기용매를 사용하게 되면 반응기가 compact하게 되며 반응계가 균일하게 되고 반응속도가 향상되게 되어 생산성이 크게 향상될 것으로 기대되고 있다. 또한 생물반응의 기질이나 반응산물이 용매에 잘 녹고 물에 잘 녹지 않는 경우 가능한 유기용매내에서 반응을 진행시켜야 한다. 따라서 이러한 생물반응기의 요구에 부응하기 위해서는 유기용매에 내성을 갖는 biotransformation용 미생물의 탐색이 절실히 요구된다.

현대사회의 가장 큰 문제 중의 하나는 환경오염일 것이며 이중에서도 발암성물질로 의심되고 있는 benzene, toluene 등의 방향족화합물에 의한 오염은 특히 문제되고 있다. 이들 물질 외에 많은 유기용매들이 여러산업분야에서 용제로 사용되고 있어 이들에 의한 오염도 심각한 상태이다. 따라서 오염된 장소의 처리기술이나 오염되기전에 분해처리하는 기술의 개발이 요구되고 이를 위해서는 유기용매에 대해 내성을 가지는 오염물질분해균의 탐색이 중요하다.



## 제 2 장 세부과제 1.

### 미생물에 의한 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 변환기술 개발

안 종 석

생명공학연구소

이 페이지는

여백입니다

# 요 약 문

## I 제 목

미생물에 의한 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 변환기술 개발

## II 연구의 목적 및 중요성

현재 우리나라는 보건의료 및 복지환경의 개선과 소득수준의 향상으로 질병의 예방 치료율이 증가하여 수명 연장에 따른 고령화 사회로 진입하고 있다. 이에 따라 과거에는 문제화되지 않았던 노인성질환인 골다공증 환자의 증가가 커다란 사회문제로 대두되고 있다.

골다공증의 예방이나 치료를 위해 estrogen 투여나 Ca 결합단백질인 calcitonin 투여 혹은 뼈의 Ca 흡수촉진을 위하여 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)인 1 $\alpha$ (OH)VD<sub>3</sub>나 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>를 투여하고 있다. 현재 estrogen은 호르몬으로 계속 투여시 여러가지 부작용을 초래하여 그 치료효과에 문제점이 대두되고 calcitonin제에는 피하주사로만 투여가 가능해 투약의 불편함과 단백질로서 체내에서 분해되므로 지속적으로 일정한 간격을 두고 투여해야 하는 문제점이 있다. 이에반해 활성형 vitamin D<sub>3</sub>는 정상인의 경우 간과 신장에서 vitamin D<sub>3</sub>의 전환에 의해 생성되는 것으로 부작용이 적고, 경구투여로 간단히 투약이 가능하며 생리학적으로 뼈에 Ca의 흡수를 촉진시켜 골다공증의 치료효과가 탁월하다.

활성형 vitamin D<sub>3</sub>인 1 $\alpha$ (OH)VD<sub>3</sub>, 25(OH)VD<sub>3</sub>와 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>는 vitamin D<sub>3</sub>로부터 유기합성에 의해 hydroxylation시켜 생산된다. 이때에 화학구조상의 stereospecificity와 regiospecificity를 고려하고 C1 혹은 C25에 선택적으로 hydroxylation시켜야 하는 고도의 다단계 유기합성기술과 고가의 합성과

정을 거쳐야 한다. 미생물에 의한 많은 의약품의 hydroxylation 전환반응은 stereospecific하고 regiospecific하게 일어나며 이러한 기능은 동물생체내에서 이루어지는 hydroxylation 대사기능을 대체할 수 있음이 입증되었다. 따라서 활성형 vitamin D<sub>3</sub>를 고도의 기술과 고가의 반응과정이 요구되는 화학합성에 의해 전환하는 방법을 미생물의 hydroxylation 기능에 의해 경제적으로 저렴하고 다단계의 화학반응공정을 거치지 않는 방법으로 대체할 수 있는 생산기술의 개발이 가능하다고 입증되고 있다.

따라서 국내의 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 제제의 시장성 증가의 필연성과 이에 따른 수입증가가 명확하기 때문에 국내에서 우리기술에 의해 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 생산이 절실히 요망되는 상황이다. 이를 위해서 화학적 합성반응에 의한 생산기술의 어려움과 환경보전과 국내의 미생물 이용기술의 발달에 따라서 미생물의 수산화 반응 기능을 이용하여 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 전환기술개발의 필요성이 요구된다.

영양원이 극히 적은 환경에서 살아갈 수 있는 미생물들이나 자연 생육환경에서 그 수가 적은 희소 미생물들은 그들의 저영양 환경을 극복하거나 수적인 열세에 의한 영양원 취득의 불리함을 극복하기 위한 수단으로 에너지대사의 효율을 극대화하거나 다양한 유기, 무기 화합물을 이용하기 위한 산화환원 대사 기구가 잘 발달되었다. 이러한 산화환원기구의 발달과 효율의 극대화에 의해서 이들 미생물들은 특히 oxygenase, hydroxylase 등의 효소활성이 높거나 그 종류가 다양하다. 따라서 이러한 미생물들의 다양한 화합물들에 대한 수산화 반응능이 발견되고 있다.

그러므로 이러한 기능을 갖는 미생물을 자연계로부터 탐색할 때 저영양성의 특수한 환경 또는 희소미생물을 대상으로 탐색한다면 기존의 전환방법과는 다른 새로운 미생물 혹은 전환효율이 높은 미생물을 탐색해 낼 수 있다. 그

리고 이렇게 선발된 미생물을 이용하는 균체에 의한 전환공정기술의 개발과 hydroxylase 유전자의 cloning과 대량발현에 의해 hydroxylase를 이용한 효소 전환공정기술을 개발한다면 최종적으로 기존의 화학합성 방법과는 다르고 그 생산원가를 획기적으로 낮출 수 있는 새로운 생물전환공정에 의한 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 생산공정이 개발될 가능성이 높다.

한편 지구의 환경을 보전하기 위해 화석연료 사용량을 감소시키기 위한 노력의 일환으로 알콜류의 청정 대체에너지 개발이 요구되고 있다. 자동차 연료로서 물리 및 화학적 특성이 메탄올이나 에탄올보다 우수한 부탄올의 장점이 있음에도 불구하고 부탄올을 자동차 대체 연료로 사용하는 연구개발이 뒤쳐져 있는 것은 발효에 의한 부탄올 생산공정 개발이 에탄올 발효공정에 비해 늦었기 때문이다. 따라서 향후 각광을 받게 될 청정에너지 중에서 그 물성이 가장 우수한 부탄올을 경제적으로 생산해낼 수 있는 추출발효공정, 그 중에서도 투과증발(permeation)을 이용한 부탄올 추출발효공정의 개발이 필요하다.

### III 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 특수환경에 서식하는 미생물의 분리

자연동굴 등에서 토양을 채취하거나 영양원이 극히 고갈된 토양을 채취하여 이들로부터 저영양성이고 희소 방선균에 해당하는 방선균과 저영양성의 곰팡이들을 선택적으로 분리하고 이들의 속명을 동정한다.

#### 2. VD<sub>3</sub> 전환반응 생성물의 분석조건

활성형 vitamin D<sub>3</sub> 전환 미생물의 탐색을 위한 가장 기본적인 기술인 vitamin D<sub>3</sub>와 vitamin D<sub>3</sub>의 전환반응 생성물로 예상되는 1 $\alpha$ -(OH)VD<sub>3</sub>, 25-(OH)VD<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-(OH)VD<sub>3</sub> 를 배양 추출물로부터 신속, 정확한 정량을 위

한 분석방법을 검토한다.

### 3. 전환 미생물의 탐색조건 수립

Vitamine D<sub>3</sub>의 수산화 변환능이 알려진 표준균주를 수집하여 이 균주들을 이용한 VD<sub>3</sub> 전환 미생물 탐색조건을 수립하고 자 배지 및 배양조건과 균체량, 전환반응시간, 배양반응액에 첨가해 주는 VD<sub>3</sub> 농도에 따른 screening의 효과를 조사하고 또한 가장 간편하고 효율적인 배양 반응액에서의 추출방법을 적용하여 최적의 1차 탐색법을 수립한다.

### 4. 전환 미생물의 탐색

탐색조건을 수립한 후 이를 종합하여 1차 탐색법을 확정하고 이의 방법에 따라 분리된 미생물을 대상으로하여 1차로 vitamin D<sub>3</sub>의 25-(OH)vitamin D<sub>3</sub>로의 변환능을 조사하였다. 그리고 이어서 이들 활성이 있는 1차 선별주를 대상으로 하여 25-(OH)vitamin D<sub>3</sub>로부터 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>의 생성여부를 2차 탐색으로 실시하여 최종적으로 활성균주를 선별한다.

### 5. 탐색균주의 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 효소의 특성분석

탐색해낸 균주로부터 vitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase 및 25-hydroxylase 효소의 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub>에 대한 각각의 기질특이성을 조사하고 이들 효소활성의 특성을 분석하여 유전자의 cloning을 위한 기초자료로 활용하고 탐색균주의 활용가치를 판단하고 자 하였다.

### 6. Vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 코딩 유전자의 클로닝

탐색결과 얻은 균주의 vitamin D<sub>3</sub>의 hydroxylase 유전자를 PCR법으로 클로닝하기 위하여 P-450 cytochrome oxygenase 계열중 가장 잘 보존된

heme-binding domain 및 oxygen-binding domain에 상응하는 PCR-probe (25-mer) 를 합성하여 PCR 을 수행하였다..

## 7. Pervaporation module을 이용한 부탄올 추출반응기 개발

수학적 모델링을 통해 투과증발시 막의 두께, 표면적 및 기체의 흐름량 등이 부탄올 생성에 미치는 영향을 조사하고, 부탄올에 선택적이면서 높은 flux를 갖는 막물질을 선정하여 module을 제작하고 이를 발효조에 장착하고 make-up 용액을 이용하여 module의 성능을 시험하였다. 그리고 회분식(batch) 실험을 통하여 투과증발이 있는 경우와 없는 경우를 비교한 후 부탄올발효 생성 균주의 수포형성에 의한 부탄올발효에 대한 영향을 분석하였다.

## IV 연구개발 결과

본 과제의 제1단계의 2년간의 연구(제2차년도 95. 10. 1 - 96. 7. 31 와 제 3차년도 96. 8. 1 - 97. 7. 31)를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. 특수환경 회소방선균의 분리

국내 8곳의 자연동굴의 토양에서 탄소원이 거의 없고 humic acid와 무기 염만이 첨가된 humic acid 배지를 이용하여 저영양성에 해당하는 방선균 400 주와 곰팡이 200주를 분리하였다. 270주의 방선균은 분류학상의 속명을 동정하여 *Micromonospora*와 nocardioform의 방선균, *Actinomadura*, *Norcardiopsis*, *Norcardioides*, *Streptosporangium*, *Kineospora*에 해당하는 회소 방선균임을 확인하였다.

### 2. 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 분석 기술 수립

Vitamin D<sub>3</sub>를 활성형 vitamin D<sub>3</sub>로 전환시킬 수 있는 전환미생물을 탐색하기 위하여 vitamin D<sub>3</sub>와 활성형 vitamin D<sub>3</sub>인 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ (OH) vitamin D<sub>3</sub> 및 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>를 방선균의 균체배양액에서 분리 추출하여 신속하게 분석할 수 있도록 추출방법을 수립하였다. 그리고 photodiode arrayed HPLC에 의한 vitamin D<sub>3</sub> 유도체들의 분석방법을 확립하였다.

### 3. 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 전환 미생물의 탐색 조건 수립

분리주들의 vitamin D<sub>3</sub>의 활성형 vitamin D<sub>3</sub>로의 전환능을 검정하여 탐색하기에 유리한 배양배지를 선정하였고 전환능의 탐색조건으로 균체량은 wet weight로 0.1mg/ml, 초기 배지에 첨가해 주는 vitamin D<sub>3</sub> 양은 20 mg/ml, 반응시간은 48시간이 가장 적합함을 알았다. 그리고 배양액의 추출용매로는 MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 1)을 이용하는 추출법을 적용하여 photodiode arrayed HPLC에 의한 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>의 생성 여부를 분석하는 1차 탐색조건을 확립하였다.

### 4. 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 전환 미생물의 탐색

자연동굴의 토양에서 분리한 270주의 희소방선균과 400주의 저영양성 방선균 그리고 200주의 곰팡이 분리주를 대상으로 vitamin D<sub>3</sub>를 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>로 전환시키는 전환능을 검정하여 9주를 활성균주로 선정하였다. 그리고 이들 1차선별주 중에서 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>를 생성할 수 있는 전환능을 검정하여 최종적으로 MTV 960912와 MTV 960312 두 주를 선정하였다.

### 5. 전환 미생물의 전환효소의 특성 분석

그리고 이들 균주의 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 효소의 특성을 저해제를 이



용한 분석을 시도하여 고등동물의 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 효소와 같은 cytochrom P450 계열의 hydroxylase 효소임을 알았다.

## 6. 전환 미생물의 균주동정

2개의 최종 선정된 균주 중 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>로의 전환활성이 높고 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>까지 전환시킬 수 있는 분리주 MTV 960912를 최종균주로 선정하고 이 균주의 동정을 시도하여 *Streptomyces pactum*과 유사하나 약간의 특성이 다름을 확인하고 *Streptomyces pactum* MTV 960912로 명명하였다.

## 7. 전환 미생물의 전환효소 유전자의 분리

최종 선정된 *Streptomyces pactum* MTV 960912의 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 유전자를 cloning하기 위하여 cytochrom P450 계열의 hydroxylase 유전자의 공통 염기서열을 함유하는 probe를 합성하여 PCR법에 의해 분리주의 염색체 DNA에서 5가지의 유전자를 분리하고 이중 가장 염기서열이 유사한 한가지의 유전자를 방선균의 운반벡터에 재조합하여 *S. lividans*에서 발현시켜 효소활성을 조사하고 있다.

## 8. Pervaporation module을 이용한 발효세균의 부탄을 생성

부탄을 발효세균인 *Clostridium acetobutylicum*에 의한 부탄을 발효시 수포생성에 의한 부탄을 생성에 대한 효과를 분석하고 pervaporation시의 막두께와 표면적의 기체흐름량에 따른 pervaporation 효율을 분석하여 최적조건을 결정할 수 있었다. 아울러 silicone tube를 이용한 pervaporation module을 제작한 후 *Clostridium acetobutylicum*에 의한 부탄을 발효를 실시하여 운전성능을 분석한 결과 예측한 운전모델과 잘 일치함을 알았다.

## IV 연구개발 결과의 활용계획

본 과제 1단계의 연구수행에서 활성형 vitamin D<sub>3</sub> 중 생체내에서 활성이 가장 강한 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>를 생성할 수 있는 미생물 분리주를 선발 확보하였으므로 계속해서 이 균주를 이용하여 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 생산을 위하여 균체 반응조건의 최적화 연구와 전환효율을 높이기 위한 균주개량 연구를 동시에 수행한다면 실제 산업적으로 이용 가능한 균주의 개발과 생산공정이 개발될 가능성이 있다. 한편 현재 탐색된 균주의 전환효소 유전자의 cloning 연구수행에 의해서 확보한 5가지의 유전자들 중에서 전환효소 활성이 확인되면 이 유전자를 이용한 재조합균주를 육성하여 전환효소의 대량생산을 위한 연구와 아울러 효소에 의한 전환반응공정의 최적화 연구를 추가로 수행할 필요가 있다. 이러한 연구가 성공적으로 수행된다면 효소전환에 의한 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 생산이 균체전환반응에 의한 공정보다 간편하고 효율이 향상된 경제적인 공정으로 개발될 수 있다.

그리고 본 연구의 활용을 위한 추가연구 이외에도 현재까지의 연구결과와 수립된 기술을 바탕으로 하여 다음과 같은 다양한 여러가지의 연구개발에 직간접적으로 활용할 수 있다.

국내의 자연동굴 토양을 미생물의 분리원으로 사용하여도 다양한 방선균이 분리될 수 있으므로 이를 활용하여 새로운 생리활성생산 균주나 산업적으로 유용한 미생물의 탐색이 가능하다. 그리고 회소 방선균의 분리와 동정에 대한 기반기술이 수립되었으므로 기존의 잘 알려진 방선균 이외에도 새로운 탐색균주로서 그 가능성이 높은 이들 회소방선균을 대상으로 미생물의 분리와 동정기술로 활용될 수 있다.

Vitamin D<sub>3</sub>의 다양한 유도체의 분석기술이 수립되었으므로 이들과 화학구조상 유사한 steroid 홀몬과 이들의 유도체, 지질 및 지방산 대사관련 생리활

성 대사산물의 분석, cholesterol 유도체 및 이들의 새로운 생체활성의 개발과 이를 활용하는 의약품의 개발에 분석기술로 활용이 가능하다.

고혈압과 뇌졸중의 예방과 진단을 위한 cholesterol oxidase에 의한 혈중 cholesterol 정량법에 본 연구에서 수립한 분석기술과 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 유전자로 판단되는 유전자를 방선균에서 과발현시켜 이 효소를 대량 생산하여 경제적으로 값싸게 이 효소로 대체할 수도 있을 것이다.

또한 이 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase 효소를 이용하는 물질전환공정에 의해서 compactin을 기질로 사용하여, cholesterol 생합성의 저해제로서 고혈압 예방치료제로서 가장 큰 시장을 차지하는 pravastin을 생산할 수도 있는 가능성을 제시할 수 있다.

한편 부탄올 발효생산을 위한 pervaporation module의 설계제작기술을 활용하여 다른 종류의 알콜이나 유용용매의 미생물에 의한 발효생산시 이들 생산 산물의 분리를 위하여 투과증발 막 module을 설계제작하는데 필요한 기초 데이터로 활용할 수 있다.

이 페이지는

여백입니다

## 제 3 장 세부과제 2.

### 초호열성 미생물의 최적배양조건 확립 및 고농도 배양기술 개발

이 선 복

포항공과대학교

이 페이지는

여백입니다

# 요 약 문

## I. 제 목

초호열성미생물의 고농도배양 및 산업적 응용기술개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 최종 연구목표

초호열성 미생물의 최적배양조건 확립 및 고농도 배양기술 개발

### 2. 연구의 필요성

75°C 이상에서 최적으로 성장하는 초호열성 미생물의 응용은 현재의 상온 상압으로 한정된 생물촉매기술영역을 기존의 화학공업분야까지 획기적으로 확대시키는 계기가 될 것으로 예상되고 있으나 국내에서는 이에 관한 연구가 거의 수행된 바가 없다. 이와 같은 초호열성 미생물을 이용하기 위해서는 우선 배양기술의 개발이 필수적이며 많은 공학적 문제가 해결되어야 하는 바 현단계에서는 우선 자연환경이 아닌 실험실 조건하에서 어떻게 이러한 미생물을 효율적으로 배양하는가 하는 문제가 있다. 이를 위해서는 먼저 초호열성 미생물의 배양에 적합한 생물반응기를 개발하여야 하는 데 이는 기존의 배양장치로는 70°C 이상에서의 사용이 불가능하며 균주보관을 위한 고형배지도 특수물질을 사용하여야만 하기 때문이다. 초호열성 미생물을 이용하는 데 있어서의 또 하나의 문제점은 대부분의 균주에 대해 아직 생리 및 대사과정, 그리고 최적 환경에 대한 지식이 매우 결여되어 있다는 데에 있다. 따라서 초호열성 미생물을 생물공정에 응용하기 위해서는 고온과 고압의 극한조건에서 생존이 가능한가

하는 기초연구를 비롯하여 보다 체계적인 미생물 생리학적 및 대사공학적 연구 접근 방식을 통한 고농도 배양기술의 개발을 필요로 하고 있다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 대표적인 호기적 초호열성 고미생물인 *Sulfolobus solfataricus*의 고온에서의 효율적인 고농도 fed-batch 배양기술의 탐색이라는 목표하에 *S. solfataricus*의 고농도 성장에 장애가 될 수 있는 요소들의 배양액내 축적을 최소화할 수 있는 최적의 feeding strategy를 개발하였다. 연구의 대상인 *S. solfataricus*는 최적 pH가 2 - 3이고 최고 성장가능온도가 89°C인 extreme acidophile이며 대부분의 hyperthermophilic archaea가 절대 혐기성인 데 반하여 호기성 미생물이기 때문에 고농도배양을 할 때 공정효율측면에서 다른 혐기성 미생물들에 비해 유리하다는 장점을 가지고 있다. 본 과제의 전체적인 연구개발내용은 *Sulfolobus solfataricus*의 고농도 배양, *Sulfolobus solfataricus*의 고농도 성장 장애요인에 대한 분석, Constant-volume 유가식배양 기술 개발의 세 가지로 각각 나눌 수 있다.

### IV. 연구개발결과

#### 1. 초호열성 미생물인 *Sulfolobus solfataricus*의 고농도 배양

최고성장온도가 90°C이며, 78°C에서 최적으로 성장하는 초호열성 미생물인 *S. solfataricus*의 고농도 배양에 관한 연구를 3.7 L 및 19 L 발효기에서 수행하여 22.6 g/L (cell dry weight)의 최고세포농도를 얻을 수 있었으며, 이는 지금까지 발표된 연구성과 중 전세계적으로 가장 높은 수치이다.

#### 2. 초호열성 미생물의 고농도성장 장애요인에 대한 분석



초호열성 미생물의 경우 중온성 미생물에 비하여 극히 낮은 농도의 세포성장을 보이는 것으로 알려져 왔으며 그 원인이 현재까지 확실히 규명되지 않아 산업적 응용을 위한 고농도 배양기술개발에 큰 장애가 되어 왔다. 본 연구에서는 이 분야의 연구로는 처음으로 초호열성 미생물의 고농도성장 장애요인을 분석하였으며, 가장 중요한 장애요인은 inorganic ion들의 배양액내 축적임을 밝혀 내었다.

### 3. Constant-volume 유가식배양기술 개발

고온으로 인한 배양액의 증발현상은 초호열성 미생물의 배양에 있어서 큰 장애가 되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 고농도배양을 위한 유가식 배양시 배지를 계속적으로 첨가하여야 한다는 점으로부터 착안하여 초호열성 미생물의 유가식 배양에 있어서 배양액의 부피변화가 없도록 할 수 있는 CVFB (Constant Volume Fed Batch) 프로토콜을 개발하였으며, 실험결과 이 기술이 초호열성미생물의 고농도 배양시 기존의 유가식 배양방법보다 적용이 용이한 것으로 나타났다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

1. 초호열성 미생물 배양기술을 기반으로한 산업화연구에의 활용
2. 미래 생물공학분야에서 선진국과 경쟁할 수 있는 기반기술을 구축
3. 고온 생물반응기 제작 기술의 기업이전

이 페이지는

여백입니다

## 제 4 장 세부과제 3.

신규 극한환경 미생물의 기능연구를 통한 유용·의약품

D-펩타이드의 합성 및 생산기술연구

성 문 회

생명공학연구소

이 페이지는

여백입니다

# 요 약 문

## I. 제 목

신규 극한환경 미생물의 기능연구를 통한 유용·의약용 D-펩타이드의 합성 및 생산기술연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

지구상의 극한환경(고온, 고압, 산성 또는 알칼리성 및 유기용매등과 같은 극한환경)에 적응하여 생육하고 있는 극한환경미생물에 관한 기능연구 및 관련 기술 개발연구는 새로운 미생물자원의 탐색 및 유용 미생물자원의 확보에 절대적으로 필요한 연구로 대두되고 있으며, 이중에서도 극한환경미생물(특히 고온성미생물)의 산업적 이용기술은 생물산업의 새로운 분야를 창출하고 있으며, 신기술개발에 중요한 연구분야라고 판단되고 있다.

이러한 기술개발의 필요성에 따라 극한환경에서 적응하여 생존하는 극한환경미생물(고온환경미생물 대상)의 탐색 및 기능연구와 국내의 고온환경에서 탐색된 신규 극한환경미생물이 보유하고있는 신규 내열성 D-펩타이드합성효소를 이용하여 유용·의약용 D-펩타이드 합성 생물전환기술 개발을 목적으로 연구 및 기술개발을 수행하고 있으며, 이중에서도 최근 저칼로리 고감미도의 신감미료로의 용도로 기술개발이 수행되고 있는 D-아미노산 함유 유용 D-펩타이드(D-alanine 함유 D-펩타이드)를 target로 하여 관련연구를 집중적으로 수행하였다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

국내의 고온환경(온천, 토양, 하수, 고온의 폐수처리장, 퇴비등)등에 적응

하여 생육하는 신규 고온성 미생물을 탐색·분리 및 보존기술을 확립하고, 이와같이 탐색된 신규 고온성 미생물의 세포벽 펩티도글리칸의 구성성분인 D-아미노산 생합성관련 기능연구의 수행을 통하여 획득된 신규 내열성 D-펩타이드 합성효소를 이용한 고부가가치 유용·의약품 D-펩타이드의 합성 및 생산을 위한 생물전환기술개발을 목표로 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. 국내 고온환경의 분리원(온천, 토양, 하수, 고온의 폐수처리장, 퇴비 등)으로부터 신규 고온성미생물의 탐색·분리·동정 및 보존기술의 확립
2. 신규 고온성미생물의 세포벽 펩티도글리칸의 구성성분인 D-아미노산 생합성 관련 기능연구를 통한 D-아미노산함유 D-펩타이드분해활성 보유 신규 내열성 생물촉매 D-aminopeptidase(DAP)의 탐색 및 특성연구
3. 신규 고온성미생물로부터 탐색된 신규 내열성 D-aminopeptidase 생물 촉매 역반응을 이용한 D-아미노산 함유 D-펩타이드 합성반응 특성연구 (국제 공동연구포함)
4. D-아미노산함유 유용 D-펩타이드 합성반응연구 및 응용연구 (위탁연구 포함)
5. 신규 고온성 미생물로부터 탐색된 신규 내열성 D-펩타이드합성 생물 촉매 DAP의 대량생산을 위한 gene cloning

#### **IV. 연구개발결과**

1. 국내 고온환경의 분리원으로부터 신규 고온성미생물의 탐색·분리·동정 및 보존기술의 확립

국내 각지의 고온환경(온천, 토양, 하수, 고온의 폐수처리장, 퇴비 등)에서 수집한 시료로부터 65℃의 고온에서 생육하는 고온성미생물 약

1,300여 균주를 탐색·분리하여 보존중에 있으며, 국내의 고온환경에서 탐색·분리된 고온성미생물의 약 80% 이상이 spore를 형성하는 고온성 *Bacillus* 균주들로(*Bacillus stearothermophilus* 포함) 확인되었고, 이외에도 고온성 *Thermoactinomyces*가 다수 포함되어 있음을 확인하였다.

## 2. 신규 고온성미생물의 세포벽 펩티도글리칸의 구성성분인 D-아미노산 생합성기능과 연관된 D-아미노산 함유 D-펩타이드분해활성 보유 신규 내열성 생물촉매(D-Aminopeptidase, DAP)의 탐색 및 특성연구

미생물 세포벽 peptidoglycan의 구성성분인 D-alanine과 D-glutamate의 생합성계는 그람 음성균과 그람 양성균에 따라 서로 차이가 있는 것으로 보고되어 있으며, 최근 고온성미생물에서도 D-아미노산 생합성 관련효소연구가 진행되어 관련연구가 보고되고 있다. 이러한 연구와 연관된 D-아미노산의 유도체 및 D-아미노산 함유 펩타이드 (D-alanine 함유 펩타이드대상)에 대하여 분해활성을 보유한 D-aminopeptidase(DAP)의 탐색연구 수행을 통하여 획득된 DAP의 특성연구를 수행하여 효소 역반응활성을 이용한 D-아미노산 함유 D-펩타이드 합성 생물전환연구를 수행하고자 하였다.

탐색·분리된 1,300여 고온성미생물 균주로부터 D-펩타이드 분해활성을 보유한 신규 고온성미생물을 신속하게 탐색·분리하기 위하여 1차 탐색법으로 D-alanine-p-nitroanilide를 사용한 p-nitroaniline 검출법으로 DAP활성보유 고온성미생물균주 17균주를 획득하였고, 이러한 고온성미생물균주를 대상으로 2차 탐색을 수행하였다.

DAP활성의 2차탐색은 D-아미노산함유 D-펩타이드(D-Ala-D-Ala)를 사용하여 D-펩타이드의 분해활성을 HPLC로 분석한 결과, 1 균주가 신규 내열성 DAP활성을 보유함을 확인하여 균주 동정연구를 수행한 결과, 새로운 고온성미생물균주로 판단되어 *Bacillus* sp. BCS-1으로 명명하고, 신규 고온성 *Bacillus*

sp. BCS-1으로부터 생산되는 신규 내열성 DAP의 특성연구를 수행하였다.

### 3. 신규 고온성미생물로부터 탐색된 신규 내열성 DAP 효소역반응 이용을 위한 DAP의 생물촉매 전환반응 특성연구 (국제공동연구포함)

신규 내열성 DAP의 생물촉매 전환반응 및 기질특이성 연구수행을 위하여 다양한 D-아미노산 함유 D-펩타이드를 국제공동연구팀인 일본 Osaka 대학 산업과학연구소의 K. Tanizawa 교수팀과 공동으로 각종 D-peptide를 합성하였다.

이러한 각종의 D-펩타이드에 대하여 *Bacillus* sp. BCS-1의 조효소액을 사용하여 각종 D-peptide에 대한 분해활성 및 기질특이성을 조사한 결과, D-alanine-p-nitroanilide와 (D-alanine)<sub>2</sub>에 대해 높은 분해활성을 나타내었다. 이외에도 (D-alanine)<sub>3</sub>, (D-alanine)<sub>4</sub>, D-alanine-L-aspartic acid, D-alanine-glycine-glycine, (D-leucine)<sub>2</sub>, (D-phenylalanine)<sub>2</sub>, (D-trptophan)<sub>2</sub>, (D-tyrosine)<sub>2</sub>에 대해서도 분해활성을 나타내었다.

이러한 결과로부터 *Bacillus* sp. BCS-1가 보유한 신규 내열성 DAP는 L-아미노산의 펩타이드 보다는 D-아미노산 함유 D-peptide에 대해 보다 특이적으로 작용하는 신규 내열성 효소임을 확인하였다.

### 4. D-아미노산 함유 유용 D-펩타이드 합성 생물전환기술 확립을 위한 D-펩타이드 합성 생물전환반응연구 (위탁연구 포함)

상기의 신규 내열성 DAP이외의 기존 단백질분해효소 chymotrypsin을 사용하여 효소역반응으로 opioid 펩타이드 enkephalin의 활성을 나타내는 D-alanine 함유 D-펩타이드(Bz-Tyr-D-Ala-OBzl) 합성생물전환반응을 검토한 결과, 95% 아세트나이트릴, 5% 물(pH 9.0)의 용매에서 37℃ 반응 두시간후, 수율 약 80%로 D-alanine 함유 D-펩타이드 합성을 확인하였다. 그러나 펩타이드



P1 아미노산의 아미노기를 block하지 않은 경우에는 D-펩타이드합성을 확인할 수 없었다.

따라서, 상기에서 탐색된 신규 내열성 DAP를 이용한 D-펩타이드 합성 생물전환반응연구는 매우 중요하리라 판단된다.

#### 5. 신규 고온성미생물로부터 탐색된 신규 D-펩타이드합성 생물촉매 DAP의 대량생산을 위한 gene cloning 수행

D-아미노산 함유 유용 D-펩타이드합성 생물전환기술을 확립하기 위해서는 탐색된 신규 내열성DAP의 대량생산연구가 필수적으로 수행되어야하므로, 신규 내열성 DAP활성 보유 신규 고온성 *Bacillus* sp. BCS-1으로부터 chromosomal DNA를 획득하여 gene cloning을 수행 중에 있다.

### V. 연구개발결과의 활용계획

1단계 연구기간(1995. 10. 1 - 1997. 7. 31)동안 수행된 “극한환경 미생물의 기능연구를 통한 유용·의약품 D-펩타이드의 합성 및 생산 기술 연구” 개발결과를 다음과 같이 활용하고자 한다.

1. 국내의 토양에서 신규 고온성미생물의 탐색과 탐색된 고온성미생물의 생육현상 및 기능연구는 극한환경미생물연구와 관련된 학문적·기술적 체계 확립에 활용
2. 신규 고온성미생물이 보유하고있는 신규 내열성 유용 효소자원을 생물산업 전반에 활용하고, 기존의 화학공업과 연계된 신산업분야의 창출에 활용
3. 국내의 고온환경에서 탐색된 신규 고온성미생물이 보유하고있는 신규 내열성 DAP를 이용하여 연구개발 2단계에서는 유용 D-펩타이드합성 생

물전환기술을 개발함 (특히 저칼로리 고감미도의 신감미료로의 용도로 기술 개발이 수행되고 있는 D-아미노산 함유 유용 D-펩타이드를 target로 하여 관련연구를 집중적으로 수행할 예정임)

## 제 5 장 세부과제 4.

유기용매내성균의 기능해석 및 산업적 고도이용기술 개발

전 효 곤

생명공학연구소

이 페이지는

여백입니다

# 요 약 문

## I. 제 목

유기용매내성균의 기능해석 및 산업적 고도이용기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

유기용매는 일반적으로 미생물 세포에 대하여 강력한 독성을 나타내는데 이는 고농도에서 뿐만 아니라 저농도에서도 극히 뚜렷하게 나타나는 현상이다.  $\log P$ (octanol과 물의 혼합물에서 어느 용매의 분배계수의  $\log$ 값)값이 2.0에서 3.5사이의 용매 [benzene(2.0), heptanol(2.3), toluene(2.5), styrene(2.8) *p*-xylene(3.1), ethylbenzene(3.3), cyclohexane(3.4)] 의 경우 0.1%이하가 독성 효과의 분기점으로 나타나 있다. 즉, 일반적인 미생물은 0.1%이상의 상기 유기용매 존재하에서는 생육할 수 없게 된다. 하지만 최근의 생물공학에서 유기용매에 내성을 가진 생체촉매에 의한 생물전환(biotransformation)기술이나 생물복구(bioremediation)기술의 개발이 절실히 요구됨에 따라, 고농도의 유기용매에서 생육할 수 있는 미생물의 탐색과 유기용매내성균주의 기능해석 및 산업적 용도 개발은 우선적으로 실시되어야 할 과제로 인식되고 있다. 생물전환공정에서 고농도 유기용매사용의 잇점으로 첫째, 비수용성 기질이나 산물의 농도를 증가시킬 수 있고 둘째, 산물이나 기질에 의한 저해효과를 감소시키며 셋째, 기질과 산물의 분배율을 변형시킬 수 있으며 넷째, biotransformation의 입체선택성을 개량할 수 있으며 다섯째, 산물의 회수가 용이하고 여섯째, 기존의 화학공정과 통합에 유리하다. 그러므로 이러한 많은 잇점 때문에 유용한 전환반응을 수행할수 있는 유기용매 내성균의 확보 및 개발은 고도 생물전환반응에 필수불가결한 것으로 간주되고 있다. 또한, 유기용매내성균이 생성하는 효소의 탐색소재로 유기용매 내성미생물이 사용될 수 있을 것이다. 따라서 고농도유기용매내성

균의 탐색 및 용도개발은 유기용매계에서 산업적으로 유용한 소수성기질의 고부가가치화를 위한 물질전환의 새로운 장을 열 수 있을 것이다.

본 연구에서는 특수환경 미생물로서 유기용매에 대해 내성을 가지는 미생물을 분리동정하고 이 미생물이 가지고 있는 유용한 기능을 생화학 및 분자생물학적으로 해석하여 산업적으로 유용한 생물전환(biotransformation)기술을 개발한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 유기용매내성미생물의 집적배양

유기용매(cyclohexane, toluene)를 1%수준으로 첨가한 배지에 유기용매내성균이 많이 존재할 것으로 예상되는 토양 및 폐수시료를 첨가하여 배양할 시 균의 생육이 인정된 시료를 유기용매농도를 5%, 25%로 점진적으로 증가시킨 배지에 이동시키면서 균의 생육여부를 확인하여 유기용매내성균을 집적한다.

#### 2. 유기용매내성균주의 분리 및 선별

50%의 toluene을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 균주를 분리선별 하였고 50%의 cyclohexane을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 균주 중에서 유용효소를 생산하거나 유용반응을 수행하는 균주를 분리선별한다.

#### 3. 유기용매내성균의 유기용매내성도 조사

물과 n-octanol의 이상계에서 각각의 유기용매의 분배계수  $Pow$ 값의 사용대수인  $\log Pow$ 값은 낮을수록 미생물에 대한 독성이 강한 것으로 알려져 있는데  $\log Pow$ 값이 -1.0인 N, N-dimethylformamide에서부터 6.6인 n-dodecane까지의 18종의 유기용매(N, N-Dimethylformamide, ethanol, acetone, n-butanol,

benzene, chloroform, dimethylphthalate, 1-heptanol, toluene, styrene, p-xylene, cyclohexane, n-hexane, n-heptane, n-octane, isooctane, n-dodecane, n-decane를 첨가한 배지에서 분리선별한 균주의 생육가능한 log Pow값을 결정한다.

#### 4. 유기용매내성균이 생산하는 효소의 유기용매 내성도

유기용매를 첨가한 배지와 유기용매를 첨가하지 않은 배지에 유기용매내성균주를 배양하여 생산된 효소의 역가를 비교한다. 무균여과한 효소용액을 유기용매존재하에서 30일간 30℃에서 진탕배양할시 유기용매를 첨가하지 않은 대조구와 역가를 비교하였고 유기용매의 종류별로 유기용매에 대한 효소의 안정성을 조사한다.

#### 5. 유기용매 내성균주의 동정

API Kit, fatty acid profile에 의한 자동동정시스템인 MIDI, 전자현미경관찰, Gram staining, catalase test, oxidase test, metabolic finger printing (Biolog), quinone 분석하여 유기용매내성균을 동정한다.

#### 6. 유기용매내성효소의 정제 및 특성

유기용매성균인 *Pseudomonas stutzeri* CH-120 균주가 생산하는 효소를 유안침전 및 다종의 resin을 사용하여 분리정제하고 그 특성을 조사하여 활용에 관한 실험을 한다.

#### 7. 유기용매에 의해 유도되는 단백질의 발현확인 및 정제

log Pow 값이 2.5-3.5 사이의 유기용매를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에 생육시켜 세포외와 세포내 유도되는 단백질의 양상을 조사하고 유기용

매에 의해 유도되는 단백질을 확인하고 그 단백질을 분리정제 한다.

## IV. 연구개발결과

### 1. 유기용매내성균의 집적배양

LB배지에 cyclohexane과 toluene을 1%수준으로 첨가한 각각의 배지에 폐수, 세차장 퇴적토, 주유소 토양, 차량정비소 토양등의 200점의 시료를 첨가하여 30°C에서 진탕배양할시 균의 생육이 인정된 시료를 유기용매농도를 5% 25%로 점진적으로 증가시킨 배지에 이동시키면서 균의 생육여부를 확인하여 유기용매내성균을 집적하였다. 그 결과 200점의 시료 중에서 폐수 2점에서 25% toluene을 함유한 배지에서 균의 생육이 관찰되었고 25%의 cyclohexane을 함유한 배지에서 145점의 시료로부터 균의 생육을 관찰할 수 있었다. 25%의 유기용매를 함유한 배지에서 균의 생육이 관찰된 시료의 배양액을 50%의 유기용매를 함유한 배지에 1%수준으로 접종하여 배양하여 본 결과 모든 시료에서 균의 생육이 관찰되었다.

### 2 유기용매내성균주의 분리 및 선별

50%의 toluene을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 균주로 3P1 과 3P14 균주가 분리선별되었으며 50%의 cyclohexane을 함유하는 배지에서 생육이 가능한 168균주 중에서 cyclohexane을 함유한 배지에서 배양할 때에 유기용매내성의 esterase를 생산하는 CH-76, CH-120 균주와 유기용매내성의 protease를 생성하는 CH-4 균주가 선별되었다.

### 3. 유기용매내성균의 유기용매내성도 조사

log Pow값이 -1.0인 N,N-Dimethylformamide에서 부터 6.6인 n-dodecane



까지의 18종의 유기용매를 첨가한 배지에서 분리선별한 균주의 생육가능한 log Pow값을 결정하였다. 3P14 균주는 분리된 균주 중에서 유기용매내성이 가장 강한 균주로 log Pow값이 2.3인 dimethylphthalate까지 생육가능하였고 CH-76, CH-120, CH-4, XD-146-1 균주는 모두 3.2인 cyclohexane까지 생육할 수 있었다.

#### 4. 유기용매내성 CH-120 균주가 생산하는 esterase의 유기용매내성도

CH-120균주는 유기용매(cyclohexane)존재하에서 유기용매를 첨가하지 않는 경우에 비하여 생산되는 esterase의 역가는 더 높은 것으로 나타났다. 즉 유기용매를 첨가하지 않은 배지에 접종하였을 경우에는 12시간 배양하였을 때에 27 U/ml의 최대활성을 나타내었으나 유기용매를 첨가한 배지에 배양하였을 경우에는 36시간 배양하였을 때에 40 U/ml의 최대활성을 나타내었다. 무균효소 용액을 유기용매존재하에서 8일간 30°C에서 shaking incubation할시 유기용매를 첨가하지 않은 대조구에 비하여 효소역가의 급격한 감소는 관찰되지 않았고 유기용매의 종류별로 유기용매에 대한 효소의 안정성을 조사하여 본 결과, log Pow값이 3.2이상인 용매에서 아주 안정하였고 또한 log Pow값이 -0.23과 -0.24인 acetone과 ethanol에서도 대조구에 비하여 역가의 감소는 관찰되지 않았으며 유기용매에 대한 효소안정성이 가장 낮은 것으로 나타난 chloroform(2.0)에서도 유기용매를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 55%의 역가를 유지하는 것으로 나타났다.

#### 5. 유기용매내성균주의 동정

Dimethylphthalate, toluene등에 내성이 있는 3P14균주는 API, Bergey's manual 등에 따르면 *Pseudomonas putida*로 동정되었고 유기용매내성의 esterase를 생산하는 CH-120균주는 fatty acid profile에 의한 자동동정시스템인

MIDI에서 *Pseudomonas*의 특징적인 3-hydroxy fatty acid의 존재가 확인되었고 다른 *Pseudomonas*의 지방산 profile과의 비교에서 *Pseudomonas stutzeri*와 가장 유사한 것으로 나타났고 전자현미경관찰, Api test(Table 5), Gram staining, catalase test, oxidase test, metabolic fingerprinting(Biolog), quinone 분석을 행하였다. CH-76균주는 유기용매내성의 esterase 및 protease를 생산하는 균주로 MIDI에서 *Pseudomonas aureofaciens*와 유사한 것으로 나타났다. 또한 유기용매내성 protease를 생성하는 CH-4균주는 MIDI에서 *Pseudomonas putida*와 유사한 것으로 나타났다.

#### 6. 유기용매내성 *Pseudomonas stutzeri* CH-120가 생산하는 esterase의 분리정제 및 특성

*Pseudomonas stutzeri* CH-120 균주의 배양액을 유안 침전, CM-Sepharose, Superdex120칼럼크로마토그래피등에 의해 순수하게 분리정제하여 SDS전기영동에 의해 단일 밴드임을 확인하였다. 본 효소는 31kDa의 분자량을 나타내고 최적 pH 및 온도는 각각 9.5와 50°C로 나타났다. 본 효소는 장쇄의 지방산(C12-C16)보다 단쇄의 지방산(C2-C4)으로 구성된 p-nitrophenol ester에 잘작용하였으며 저해제에 의한 실험을 통하여 활성부위에 catalytic triad Ser-His-Asr/Glu를 함유하고 있는 것으로 나타났고 그 N-terminal 아미노산서열은 Ala-Pro-Leu-Pro-Asp-Thr-Pro-Gly-Thr-Pro-Phe-Pro-Ser-Val-X-Asn-Phe-Asp-Asn으로 규명되었고 정제효소는 유기용매내성이 아주 높은 것으로 나타났다.

#### 7. 유기용매에 의한 유기용매내성균에서 단백질의 발현 및 유기용매 유도단백질의 정제

유기용매에 내성이 강한 *Pseudomonas putida* 3p14균주를 LB배지와 LB

에 30% toluene를 함유한 배지에 생육시켜 배양여액과 균체의 단백질패턴을 전기영동에서 비교하여 본 결과 유기용매에 의해 강력하게 유도되는 단백질이 존재하여 Q Sepharose, phenyl sepharose, Mono Q 등에 의해 74, 57, 34kDa 등의 3가지, 유기용매 유도 단백질을 분리 정제하였다.

## V. 연구개발결과의 활용 계획

### 1. 유기용매내성 esterase는 난수용성 정밀화학소재의 광학분할에 이용

유기용매내성 esterase는 대량 생산방법이 확립되면 난수용 성화학물의 고효율 물질전환에 유효하게 사용될 수 있으며 유용한 광학분할반응의 확립에 관한 추가의 연구가 필요하다.

### 2. 유기용매 내성이 있고 유기용매를 분해하는 균주는 유기용매의 처리나 물질변환에 활용

유기용매의 생물복구기술에서 유기용매의 독성에 기인하여 문제가 있으므로 유기용매내성미생물의 사용은 이 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법으로 생각되며 생물복구에 관한 응용연구가 필요하다.

### 3. 유기용매 내성관련 단백질을 이용한 유기용매 감수성 미생물의 유기용매 내성화에의 활용

유기용매 유도단백질의 유전자 확보를 통하여 유기용매내성에 관여하는 유전자의 이종발현이 실현되면 산업용균주에 유기용매내성을 부여할 수 있을 것이며 이에 관한 추가의 연구가 필요하다.

이 페이지는

여백입니다

## 주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학 기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외 적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.