TSPM15050-064-3

양극해 해양미생물유래 지질분해효소 개발

Development of lipases from polar oceanic microbes

KOPRI
극지연구소

연세대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발”과제의 위탁연구“양극해 해양미생물유래 지질분해효소 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

KOPRI 극지연구소

2016. 5. 31

총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 연 세 대

위탁연구책임자 : 구 본 훈

위탁참여연구원 : 김 두 식

보고서 초록

위탁연구과제명	양극해 해양미생물유래 지질분해효소 개발				
위탁연구책임자	구 본 훈	해당단계 참여연구원수	2	해당단계 연구비	40,000,000
연구기관명 및 소속부서명	연세대학교 생명시스템연구원		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약				보고서 면수	42

1. 지질분해효소 활성을 갖는 북극해 유래 미생물로부터 저온활성 지질분해효소의 유전자 발굴
; Psychrobacter sp. ArcL13균주로부터 PCR을 이용한 gene prospecting 방법으로 새로운 지질분해효소 유전자인 ArcL13-Lip을 분리 동정하였으며, 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 염기 서열의 유사성은 낮지만, 84-90%의 아미노산 서열 유사성을 보였음.

2. 대장균에서 재조합 지질분해효소의 최적 발현시스템 확립
; ArcL13-Lip을 발현벡터로 형질 전환시킨 대장균에서 발현 시, 약 35 kDa의 분자량을 갖는 단백질 봉입체 형태로 발현되었음.

3. 효소 상용화를 위한 재조합 지질분해효소 생산기술 개발
; 단백질 봉입체 형태로 발현된 지질분해효소를 활성형으로 전환시키는 기술을 개발하였음. 8M urea, 20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM 2-mercaptoethanol 용액에서 단백질 봉입체의 unfolding 효율이 가장 높았고, 20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM cysteine/1mM cystine, 0.4M glucose 용액에서 refolding 효율이 가장 높았음.

4. 재조합 지질분해 효소의 물리?화학적 특성 규명
; ArcL13-Lip은 p-nitrophenyl caprylate(C8), 그 다음으로 p-nitrophenyl decanoate(C10)에 대해 최고의 활성을 보였고, pH8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였음. 또한 저온활성을 보였으며, CuCl2와 ZnSO4 등에 의해 활성이 50%정도 억제되었으나 나머지 이온들에 의해 활성이 영향 받지 않았음.

KOPRI 극지연구소

색 인 어	한 글	지질분해효소, 저온성, 재조합, 재접힘, 봉입체
	영 어	lipase, cold active, recombinant, refolding, inclusion body

요 약 문

Ⅰ. 제 목

양극해 해양미생물유래 지질분해효소 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

극지의 해양 미생물로부터 저온활성 지질분해효소의 분리 및 특성을 규명하고, 저온활성 지질분해효소의 재조합 생산기술 개발을 통해 상업적 생산을 가능하게 하는 것

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 지질분해효소 활성을 갖는 북극해 유래 미생물로부터 저온활성 지질분해효소의 유전자 발굴
 가. 북극해 유래 Psychrobacter sp. ArcL13의 배양 조건 확립
 나. Psychrobacter sp. ArcL13로부터 저온활성 지질분해효소 유전자 분리
 다. 유전자 서열 규명

2. 대장균에서 재조합 지질분해효소의 최적 발현시스템 확립
 가. 지질분해효소 유전자를 대장균 발현 벡터에 클로닝 함.
 나. 지질분해효소 발현벡터로 형질 전환시킨 대장균에서 발현 여부를 확인
 다. 단백질 봉입체 형태로 발현되는지 확인

3. 효소 상용화를 위한 활성형의 재조합 지질분해효소 생산기술 개발
 가. 형질전환 대장균으로부터 단백질 봉입체 분리조건 확립
 나. 지질분해효소의 unfolding 조건 확립
 다. 지질분해효소의 refolding 조건 확립

4. 재조합 지질분해 효소의 물리·화학적 특성 규명
 가. 지질분해효소의 기질 특이성 규명
 나. 지질분해효소 활성을 위한 최적의 pH 규명
 다. 온도에 따른 지질분해효소 활성 영향 규명

Ⅳ. 연구개발결과

1. 지질분해효소 활성을 갖는 북극해 유래 미생물로부터 저온활성 지질분해효소의

KOPRI 극지연구소

유전자 발굴

; Psychrobacter sp. ArcL13균주로부터 PCR을 이용한 gene prospecting 방법으로 새로운 지질분해효소 유전자인 ArcL13-Lip을 분리 동정하였으며, 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 염기 서열의 유사성은 낮지만, 84-90%의 아미노산 서열 유사성을 보였음.

2. 대장균에서 재조합 지질분해효소의 최적 발현시스템 확립

; ArcL13-Lip을 발현벡터로 형질 전환시킨 대장균에서 발현 시, 약 35 kDa의 분자량을 갖는 단백질 봉입체 형태로 발현되었음.

3. 효소 상용화를 위한 재조합 지질분해효소 생산기술 개발

; 단백질 봉입체 형태로 발현된 지질분해효소를 활성형으로 전환시키는 기술을 개발하였음. 8M urea, 20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM 2-mercaptoethanol 용액에서 단백질 봉입체의 unfolding 효율이 가장 높았고, 20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM cysteine/1mM cystine, 0.4M glucose 용액에서 refolding 효율이 가장 높았음.

4. 재조합 지질분해 효소의 물리·화학적 특성 규명

; ArcL13-Lip은 p-nitrophenyl caprylate(C8), 그 다음으로 p-nitrophenyl decanoate(C10)에 대해 최고의 활성을 보였고, pH8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였음. 또한 저온활성을 보였으며, $CuCl_2$와 $ZnSO_4$ 등에 의해 활성이 50%정도 억제되었으나 나머지 이온들에 의해 활성이 영향 받지 않았음.

KOPRI 극지연구소

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

저온활성 지질분해효소는 세제 혹은 토양과 폐수 정화 등에 첨가제로 다양하게 사용될 수 있기 때문에 특히 주목을 받고 있음. 본 연구를 통해 이루어진 성과들은 산업화를 위한 대량생산 기술 개발에 활용될 것임.

영문요약서 (Summary)

Ⅰ. Title

Development of lipases from polar oceanic microbes

Ⅱ. Needs and aims of R&D

1. Needs

Lipases have various practical applications, including the detergent, food, pharmaceutical, dairy, and cosmetic industries. As cold-active lipases from cold-adapted microorganisms show higher catalytic activity than those from mesophilic microorganisms at low temperature, they are expected to be useful for biotechnological exploitation in various fields.

2. Aims

Our research aim is to isolate and characterize cold-active lipases from microbes selected for lipase activity in polar seas and to develop technologies that enable commercial production of the lipases.

KOPRI 극지연구소

Ⅲ. Contents and Extent of R&D

1. Isolation of cold-active lipase genes from cold-adapted microorganisms in the Arctic ocean

A. Establishment of cultivation conditions for Psychrobacter sp. ArcL13
B. Isolation of cold active lipases from Psychrobacter sp. ArcL13
C. Determination of the complete nucleotide sequences for the cold active lipases

2. Establishment of a bacterial expression system for recombinant lipase

A. Cloning of the lipase gene into bacterial expression plasmid
B. Confirmation of lipase expression in transformed E.coli
C. To verify if the lipase is expressed in the form of inclusion bodies

3. Development of technologies that enable commercial production of the

lipase.

A. Purification of inclusion bodies from cultured E.coli
B. Establishment of unfolding condition for the lipase
C. Establishment of refolding condition for the unfolded lipase

4. Characterization of the recombinant lipase

A. Characterization of lipase activity toward various substrates
B. Analysis of lipase activity at different pH
C. Analysis of lipase activity at various temperatures

IV. R&D Results

1. Isolation of cold-active lipase genes from cold-adapted microorganisms in the Arctic ocean
; A novel lipase gene (ArcL13-Lip) was isolated from Psychrobacter sp. ArcL13 strain by gene prospecting using PCR, and its complete nucleotide sequence was determined. Sequence analysis showed that ArcL13-Lip has high amino acid sequence similarity to lipases from bacteria of some Psychrobacter genus (84-90%) despite low nucleotide sequence similarity.

KOPRI 극지연구소

2. Establishment of a bacterial expression system for recombinant lipase
; When the lipase gene was cloned into the bacterial expression plasmid and expressed in E.coli, ArcL13-Lip was expressed as inclusion bodies with a molecular mass of about 35 kDa.

3. Development of technologies that enable commercial production of the lipase.
; Refolding technology was developed to produce catalytically active recombinant lipase from inactive inclusion bodies through a refolding method. Unfolding was achieved in unfolding buffer (8M urea, 20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM 2-mercaptoethanol). Refolding was performed by diluting the unfolded protein into refolding buffer (20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM cysteine/1mM cystine, 0.4M glucose) and incubating at 4°C for 3 days.

4. Characterization of the recombinat lipase
; Recombinant ArcL13-Lip showed high hydrolytic activity toward p-nitrophenyl caprylate and p-nitrophenyl decanoate among different p-nitrophenyl esters. It displayed its maximal activity at pH8.0-8.5 and cold-active lipase activity. Its activity was approximately 50% inhibited by $CuCl_2$ and $ZnSO_4$, but not by other metal ions and inhibitors.

Ⅴ. Application Plans of R&D Results

Cold-active lipases are of particular interest for biotechnology because they can be used as additives in laundry detergents or for soil and waste water bioremediation. Achievements through this project will lead to the development of technologies that enable mass production of the lipases for industrial applications in various fields.

KOPRI
극지연구소

목 차

제 1 장 서론 ----------7

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ----------9

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ----------16

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도----------37

제 5 장 연구개발결과의 활용계획----------38

제 6 장 참고문헌----------39

KOPRI
극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구목적

극지의 해양 미생물로부터 저온활성 지질분해효소의 분리 및 특성을 규명하고, 저온활성 지질분해효소의 상업적 생산이 가능한 기술을 개발하는 것을 최종 목표로 한다.

제 2 절 연구의 필요성

최근 북극해의 축치해(Chuckchi Sea)로부터 저온활성 지질분해효소를 생산하는 균주들이 분리되었으며, 그 중 Psychrobacter sp. ArcL13에서 가장 높은 효소 활성이 확인되었다. 그러나, 직접 이 균주를 사용해 산업화에 필요한 효소를 경제적으로 대량생산하기 어려운 문제점이 있었기 때문에, 이 균주로부터 지질분해효소 유전자를 분리 동정하고 다른 발현 숙주에서 대량으로 생산하는 기술 개발이 필요하였다.

KOPRI 극지연구소

1. 기술적 측면

가. 2003 - 2006년에 시행한 17차, 18차 및 19차 “남극하계연구사업”을 통해 저온효소 생산 미생물 300 균주 이상이 확보되었으며, 2005년 “북극해 해양조사 연구”(PM05010)에서 해양미생물로부터 저온효소 생산 미생물 200 균주 이상이 이미 확보되었다.

나. 남극에서 분리한 저온미생물인 아스로박터 TAD/505로부터 생산되는 저온성 미토바이오스 이용, 남극에서 분리한 저온미생물인 슈도알토모나스로부터 생산되는 베타-갈락토시다제를 락토오즈 분해에 이용, 어병미생물인 플라보박터리움 사이클로피리움으로부터 생산되는 단백질분해효소의 이용 등 다수의 연구사례가 있다.

다. 생물공정 산업용 저온효소의 개발 및 이를 산업적으로 이용하기 위한 연구는 아직 초기상태이며, 저온효소를 이용하여 온도조절을 통한 공정단축 등의 연구가 보고되고 있다.

라. 스크리닝을 통해 저온성 지질분해효소 활성을 갖는 다수의 극지유래 미생물이 확인되었다.

마. 이들 저온성 지질분해효소들의 산업화를 위해서는 이들 미생물로부터 지질분해효소 유전자의 분리 및 대량생산 공정기술 개발이 필요한 실정이다.

2. 경제 산업적 측면

가. 저온효소에 대한 연구는 주로 효소의 저온적응 기작에 대한 연구 및 분자생물학적 정보를 이용한 효소의 저온적응 특성 도입 등에 대한 기초연구로부터 cold washing을 위한 세척제, 치즈, 제빵, 육우숙성 등의 식품사업, 저온에서 환경독성물질의 제거, 저온에서 기질변성 저해를 통한 공정개선 등에 활용될 수 있다.

나. 공정용 저온효소의 응용기술개발은 생물공정의 공정개선, 특히 공정단계의 축소와 반응조건의 완화를 통하여 생산비용의 절감이라는 효과가 기대되며, 생물자원을 이용한 환경 친화적 산업화에 보다 광범위하게 적용 시킬 수 있는 고부가가치 기술이다.

다. 남극에서 분리한 Candida antarctica가 생산하는 지방분해효소 lipase B는 세계적인 효소회사인 덴마크의 노보자임스(Novozymes)사에서 Novozym 435라는 이름으로 세계적으로 독점 공급되고 있으며, 재구성 지질의 상업적 생산에 활용되고 있다.

라. 저온성 지질분해효소는 세탁세제, 각종 세정제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제, 식품산업의 첨가제, 환경오염 제거 및 분자생물학적 응용 등 산업적 응용성이 매우 크다.

KOPRI 극지연구소

3. 사회 문화적 측면

가. 지속 가능한 발전이란 청정기술의 계속적인 혁신과 개선, 청결한 기술을 통해 환경오염 문제의 해결 및 자원 소비 형태의 근원적인 변화를 불러 올 때 가능하다.

나. 산업경제의 발전에 따라 안정성 및 환경오염의 문제를 극복할 수 있는 친환경적인 시스템의 개발이 요구된다.

다. 바이오기술을 통하여 석유화학을 기반으로 하는 산업구조를 biomass를 적극적으로 이용하는 상업현태로의 전환이 가능하다.

라. 특히 생체촉매는 대부분 단백질로 이루어져 있으므로 생 분해가 가능하고 화학물질 사용으로 인해 발생되는 유해 물질의 감소 및 고 효율에 의한 에너지 소비를 감소시켜 친환경적이다.

마. 선진국을 중심으로 자국 내 유통되는 공산품에 대하여 환경규제가 까다로워져 화학물질을 대체할 수 있는 친환적인 생체촉매의 개발이 시급하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술, 산업동향

1. 효소 관련 기술 동향

가. 효소 관련 기술 개요

(1) 효소 관련 시장은 생명공학 연구개발 성과에 직접적인 영향을 받고 있으며, 이는 단순히 연구개발에 사용되는 효소의 증가 및 유전자 조작 기술에 의해 얻을 수 있는 효소 생산 기술이 획기적으로 진보함을 의미한다.

(2) 효소는 동물, 식물, 또는 효소를 생산하는 야생종의 미생물에서 직접 얻을 수도 있으나, 이러한 과정은 고비용, 저 효율적이며 산업적으로 요구되는 효소 수요를 충족시키지 못한다.

(3) 유전자 조작 기술 등의 생명공학 기술을 이용하여 많은 양의 효소를 빠르게 생산할 수 있으며, 효소 특이성을 개선하고 활성을 증가시키기 위한 단백질 구조변화 등의 효소 디자인이 가능해진다.

(4) 대부분의 효소생산 회사들은 수익의 13%를 연구개발에 투자하여 경쟁이 치열한 효소시장에서 살아남기 위해 노력하고 있다.

(5) 효소에는 활성 부위가 존재하며 기질에 대한 특이성을 가짐, 효소가 반응 기질에 결합하면 효소 자신과 기질의 구조 변화를 통해 활성 효소-기질 복합체를 형성하고 이러한 활성 효소-기질 복합체 형성 과정이 효소 활성을 결정짓는 가장 중요한 요인이 되며 여기에는 pH, 온도, 기질 농도, 효소 특이성 등 다양한 요소가 관여한다.

나. 관련 기술 동향

(1) 스크리닝 기술

(가) 기술 개요 및 동향

① 발색단을 가지는 기질 등을 사용하여 원하는 기능의 효소를 발현하는 균주를 찾는 방법이다.

② 가장 일반적으로 사용되는 방법으로 발색단을 배출하는 기질을 직접 이용하거나 산물을 이용하는 다른 효소를 함께 이용하는 방법이다.

③ 세포표면에 효소가 발현되도록 한 다음 flow-cytometer를 이용하여 발색단을 함유한 기질을 반응한 후 발색단을 직접 검출할 수도 있다.

④ 개별 균주를 대량으로 검색할 수 있는 colony picking machine의 확보 되어야 한다.

(나) 핵심 특허 및 기술

① GigaMatrix ultra high throughput screening platform (M. Lafferty and M.J. Dycaico, 2004, Methods Enzymol. 388:119- 134)

② 미국 Diversa 사가 보유하고 있는 최첨단 효소 스크리닝 시스템으로 인간 머리카락 굵기에 백만 개 이상의 반응조를 가진 플레이트를 이용하여 스크리닝을 수행한 후 분석장비들을 이용하여 효소 생성균주를 직접 검출해낸다.

(2) 방향진화 기술

(가) 기술 개요 및 동향

① 특정 효소에 목적하는 기능을 부여하기 위하여 대상 효소의 목적 돌연변이 또는 다른 효소와의 도메인을 치환한 후 선별하여 목적한 기능을 가지는 효소를 탐색하는 방법이다.

② Error-prone PCR을 이용하여 random mutagenesis와 DNA shuffling 등의 유전자 재조합을 이용하는 기술을 함께 개발한다.

③ 수 많은 라이브러리에서 원하는 돌연변이주를 만들어내는 기술 및 ar적하는 돌연변이주를 선별하기 위한 방법에 관련된 다양한 연구개발이 이루어지고 있다.

(나) 핵심 특허 및 기술

① Methods for in vitro recombination (US patent 5,607,793)

② DNA shuffling과 관련된 특허로 미국 Maxygen사가 보유하고 있으며, 최근 molecular breeding 기술로 불리며 발전하였다.

(3) 유전자 재조합 기술

(가) 기술 개요 및 동향

① 효소 생산 관련 기술 중 가장 기본적인 기술로 목적하는 효소를 생산하는 생물의 DNA를 다른 종 (주로 세균)에 도입한 후, 유전자 발현 조절 기술들을 이용하여 목적효소를 생산한다.

② 효소개량을 위한 방향진화 기술은 재조합 DNA 기술에 바탕을 두고 개발되었다.

KOPRI 극지연구소

③ 그러나 유전자 재조합 기술은 주로 세균을 이용하여 발현이 이루어지므로 동물이나 식물 기원의 복적효소를 발현시키는데 어려움이 있을 수 있다.

(나) 핵심 특허 및 기술

① Directed evolution of novel binding proteins (US patent 5,223,409A)

② 새로운 결합 단백질의 유전자 진화기술에 관련된 특허로서 Protein Engineering사가 등록하였으며, 300 건 이상의 피인용 건수를 기록하고 있다. (1993년 등록)

(4) 단백질 공학 및 논리적 효소 재설계 기술

(가) 기술 개요 및 동향

① 단백질 공학이라는 개념은 유전자 조작 기술이 나타나기 이전에 이미 사용되기 시작하였으며, 단백질 구조 분석 등을 통해 유추한 효소 촉매반응의 활성기 등을 인위적으로 변화시켜 목적하는 특성을 부여하는 기법이다.

② 일반적으로 단백질 3차구조 연구를 이용하여 효소 재설계를 하는 경우가 일반적이며 최근에는 아미노산 서열을 이용한 컴퓨터 모델링으로 예측된 구조를 토대로 효소 개량이 가능하다.

KOPRI 극지연구소

(나) 핵심 특허 및 기술

① Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold (H.-S. Park et al., 2006, Science, 311: 535 - 538)

② 인간 체내에서 독성 물질의 해독에 관여하는 glyoxylase II 효소의 뼈대를 사용하여 논리적인 효소 재설계 기술를 이용한 다른 기능인 베타 락탐 계열의 cefotaxim 항생제를 분해하는 기능을 부여한다. 이는 알려진 단백질을 이용하여 전혀 새로운 기능을 갖는 효소를 새롭게 창출하는 것이 가능하다는 사실을 증명한다.

2. 산업동향

가. 효소 시장 현황 및 전망

(1) 효소는 섬유 산업 등 산업적 용도에서부터 생명과학 연구 및 의료용 제품 생산과 같은 정밀 공정까지 생산 공정 전 분야에 다양하게 사용되고 있다.

(2) 상업적으로 이용되는 효소는 크게 당 분해 효소 (carbohydrase), 단백질 분해효소인 프

로테아제 (protease), 중합 효소 (polymerase) 및 핵산 제한효소 (nuclease), 지방 분해 효소인 리파아제 (lipase) 및 기타 효소들로 분류된다.

(3) 효소 시장은 크게 대량으로 생산, 판매되는 저가의 산업용 효소 시장과 소량으로 생산되어 고부가가치를 가지는 특수 효소 시장으로 분류된다.

나. 세계 효소 시장

(1) 시장 개요

(가) 전 세계의 산업용 효소 시장 규모는 2011년 40억 달러를 기록했으며, 이후 연평균 9.1%의 성장률을 기록해 2016년 약 61억 달러에 달할 것으로 예상된다.

(나) 산업용 효소 시장은 테크니컬 효소, 식품 및 음료용 효소, 기타의 3개 부문으로 분류

(다) 미국 등 북미 지역과 서유럽 국가들이 세계 효소 시장의 1, 2위를 차지해 전체 효소 시장의 70%를 점유하고 있음. 특히 노보자임과 제넨코라는 기업이 거의 시장을 독점하고 있다.

(라) 향후 수십 년간 이들 선진국들의 효소 시장 점유는 지속될 것으로 예상되나 안정된 시장 형성으로 성장률은 낮을 것으로 전망되며, 아시아/태평양 지역 국가들과 동유럽에서는 특히 제조업 분야의 성장으로 인해 가장 빠른 시장의 성장이 이루어질 것으로 전망된다.

KOPRI 극지연구소

(마) 의료용이나 특수 공정을 위한 특수 효소들의 경우 선진국에서 시장의 빠른 성장이 이루어지고 있으며 생명공학 기술을 이용한 연구 개발 역시 활발히 진행 중이다.

(바) 특수 효소 시장의 경우 선진국에서 시장 선점을 위해서 생명공학분야에 집중되고 있는 막대한 연구 개발 투자가 앞으로의 특수 효소는 물론 전체 효소 시장의 판도를 좌우하는 가장 중요한 요인이 될 것으로 전망된다.

(사) 아시아/태평양 지역 국가들과 동유럽 지역 국가들의 경우 현재 산업 구조의 개편 및 고학력 노동자들을 이용하여 선진국의 효소 수요의 충족을 위한 효소 생산기술 개발이 진행되고 있으나 특수 효소 시장에의 진입은 아직도 미흡하다.

(아) 효소 종류별로는 다양한 용도로 사용되는 당분해효소가 가장 큰 시장을 형성하고 있으며 단백질 분해 효소가 두 번째 큰 시장을 형성하고 있다.

(자) 중합 효소 및 제한 효소가 현재 세 번째 규모의 시장을 형성하고 있으나 앞으로 특수 용도로 이용 가능한 리파아제와 기타 효소들의 시장 규모가 빠르게 확대될 것으로 전망 된다.

(2) 산업용 효소시장

산업용 효소 시장에는 대량 생산 공정용 효소 (알코올 생산, 식음료 가공, 펄프 종이 제조, 전분 가공, 의류 직물 공정) 에서부터 동물 사료 첨가제나 세제 첨가제 같은 최종 생산물로서의 효소들까지 광범위한 종류의 제품이 망라되어 있다.

(가) 식음료용 효소 시장

① 식음료용으로 이용되는 효소 시장은 현재 연간 약 6.3%의 증가세를 보이고 있다.

② 미국, 서유럽 등의 지역에서는 식음료용 효소 시장의 성장률이 감소할 것으로 예상되나 아시아/태평양 지역을 포함한 다른 지역에서는 앞으로도 강한 성장세가 예상된다.

③ 효소를 이용한 식음료 공정은 식음료의 생산성 향상, 질적 향상 및 제품의 품질 유지에 기여하고 있다.

④ 치즈 생산 공정, 우유 젖당 제거, 제빵, 맥주 및 와인 발효, 음료 제조 등에 다양하게 이용되고 있다.

(나) 세제 첨가용 효소 시장

① 현재는 세제에 효소가 첨가되는 것이 필수적인 것으로 인식되고 있으며 전체 효소 시장의 27%를 차지한다.

② 1980년대 세제에 첨가된 인산염에 대한 규제가 강화되면서 세탁 용도의 효소시장이 폭발적으로 증가되기 시작하였다.

③ 가격 경쟁력, 저온에서의 반응성, 다양한 물질들에 대한 처리 능력 등이 주된 관심사로 여겨지고 있으며, 다양한 종류의 효소들이 앞으로도 경쟁력 있는 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다.

④ 기존의 세탁 용도의 효소들 이외에 가정용 세정제나 식기 세척용 효소들의 개발시장이 지속적으로 증가할 것으로 예상된다.

(다) 사료 첨가용 효소 시장

① 사료 첨가용 효소시장은 수십 년간 비약적으로 성장하였으며 2010년 5억 4천만 달러의 시장을 형성되었다.

② 사료 첨가형 효소시장은 연간 약 20%의 빠른 시장 성장이 이루어지고 있으며, 향후 10년간 세배 이상 성장이 예상된다.

③ 곡물 속에 들어있는 불용성 인(phytate)을 가용성 인으로 바꾸어 동물 섭취를 용이하게

KOPRI 극지연구소

하는 피타아제 (phytase)의 경우, 비교적 최근에 동물 사료에 첨가되기 시작하였으나, 인과 관련된 대사 뿐 아니라 각종 무기질 섭취에 도움을 준다는 사실이 입증되며 시장 규모가 폭발적으로 증가하여 현재 전체 사료 첨가용 효소 시장의 2/3 이상을 차지하고 있다.

④ 피타아제 이외에 새로운 기능을 가지는 다양한 효소들이 동물 사료 첨가제로 개발되고 있다.

(라) 기타 효소시장

① 에탄올 합성, 전분 가공, 섬유 산업 등에 이용되는 효소 시장도 연간 약 4.9%의 성장을 보이고 있다.

② 다양한 소규모 시장들이 지속적으로 성장하고 있으며, 2014년에는 약 11.5억 달러의 시장을 형성할 것으로 예상된다.

③ 에탄올 합성용 효소는 곡류에서 전분을 분해하여 미생물 발효가 용이하게 하는 전분분해 효소가 주를 이루고 있다.

④ 섬유 공정용 효소의 경우, 섬유 전처리 및 세척용 효소들이 주류를 이루고 있으며, 공정 효율의 증가, 비용 절감, 오염 물질 배출 감소 등에 탁월한 효과가 있어 효소 시장의 연간 4.7% 성장이 예상된다.

⑤ 이 외에 전분을 분해하여 설탕, 시럽 등의 당 생산, 화장품 원료, 석유 공정, 펄프 등 제지산업, 오염 정화 등에 이용되는 효소 시장이 다양하게 분포하고 있다.

⑥ 2004년 서유럽보다 큰 시장이 형성된 아시아, 태평양 지역이 효소시장의 성장을 주도하고 있으며, 2014년에는 북미 시장과 맞먹는 규모의 시장을 형성할 것으로 예상된다.

제 2 절 국내 기술, 산업동향

1. 2004년 국내 효소 시장 규모는 5,700만 달러로 아시아/태평양 국가 중 세번째 규모를 형성하고 있으나 1, 2위 국가인 일본, 중국에 비해서는 매우 작은 규모이다.
2. 수요 증대로 인해 해마다 10% 이상의 성장이 이루어져, 2014년까지 약 1억 4천만 달러 규모의 시장이 형성될 것으로 예상되고 있다.
3. 효소에 대한 수요는 산업용 효소, 특수 효소 모두 상당한 정도로 증가하고 있으나, 생산 증가는 산업용 효소에 치우쳐 있다.

KOPRI 극지연구소

4. 효소 시장의 상당 부분을 외국계 효소 회사들 (특히, 노보자임과 제넨코의 시장 점유율은 70%를 넘음)이 점유하고 있다.

5. 연구 개발 능력에 비해 효소의 국내 생산 능력이 저하되어 있다는 점은 세계 업계에서도 놀라운 점의 하나로 인식되고 있다.

6. 1990년대 이후 최근 들어 국내 소규모 회사들에 의해 자체 생산된 효소의 생산, 공급이 이루어지기 시작하고 있다.

KOPRI
극지연구소

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

지질분해효소(triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3)는 동식물, 곰팡이, 박테리아 등에서 지질(triacylglycerols)에 특이적으로 작용해 가수분해를 유도하는 촉매 역할을 한다(Cardenas et al., 2001; Salameh and Wiegel, 2007; Sarkar et al., 2012). 이중 박테리아 유래 지질분해효소는 탁월한 안정성, 기질 특이성, 입체선택성 등을 보이기 때문에 세탁세제, 세정제와 같은 산업용뿐 아니라 식품용, 의약품용, 축산용, 화장품용 등으로 다양한 활용 가능성을 갖고 있다(Jaeger et al., 1994; Jaeger et al., 1999).

저온환경에서 박테리아, 효모, 지의류, 곰팡이 등은 다양한 방법으로 저온에 적응하며 살아오고 있다(Gerday et al., 2000). 특히, 저온에 적응한 미생물들은 유용한 저온활성 효소들의 원천이기 때문에 산업적으로 중요한 자원으로 간주되고 있다(Jaeger et al., 1999; Zhang et al., 2007; Joseph et al., 2008). 저온활성 지질분해효소(cold-active lipase)는 중온성 생물(mesophile)에서 유래된 지질분해효소와 비교하여 저온에서 높은 효소활성을 보인다(Joseph et al., 2008). 4 - 10℃ 근처에서 효소활성이 같은 기질을 사용하는 상온효소에 비해 10배까지 높게 나타난다. 저온활성 지질분해효소는 중온활성 지질분해효소와 다르게 단백질 구조의 일부를 변화시킬 수 있는 유연성을 갖추고 있으며, 효소의 반응온도를 낮추어 중온활성 효소에 비교하여 높은 효소촉매 효율을 가지는 것으로 알려져 있다(Joseph et al., 2008). 따라서 중온활성 지질분해효소와 비교하여 저온활성 지질분해효소는 안정성, 효율성, 경제성 측면에서 우월하여 산업용효소 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

지금까지 다양한 저온환경에서 저온활성 지질분해효소를 생산하는 미생물들이 동정되었으며, 그 미생물로부터 분리된 지질분해효소의 특성이 연구되었다(Gerday et al., 2000). 최근 북극해의 축치해(Chuckchi Sea)로부터 저온활성 지질분해효소를 생산하는 균주들이 분리되었으며, 그 중 Psychrobacter sp.(Psychrobacter sp. ArcL13로 명명)에서 가장 높은 효소 활성이 확인되었다(Kim et al., 2015). 그러나 직접 이 균주를 사용해 산업화에 필요한 효소를 경제적으로 대량생산하기 어려운 문제점이 있었기 때문에, 이 균주로부터 지질분해효소 유전자를 분리 동정하고 다른 발현 숙주에서 대량으로 생산하는 기술 개발이 필요하였다. 특히, Psychrobacter sp. ArcL13의 genome sequence는 밝혀져 있지 않았기 때문에, 유전자의 분리 동정은 어려운 과정이었다. 따라서 본 연구에서는 genome sequence에 대한 정보가 없었음에도 PCR을 이용한 gene prospecting 방법을 활용하여 Psychrobacter sp. ArcL13로부터 저온활

KOPRI 극지연구소

성 지질분해효소 유전자를 분리 동정하고, 발현벡터를 제작하여 대장균에서 발현시켜 지질분해효소를 대량생산하는 기술을 개발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 균주 및 배양 배지

저온활성 지질분해효소 활성을 보이는 Psychrobacter sp. ArcL13(KCTC 12498BP)는 한국 극지연구소에 의해 북극해의 축치해(Chuckchi Sea)로부터 미생물 스크리닝 과정을 거쳐 분리되었다. 배양 배지는 Marine broth(BD Biosciences)를 사용하였고, 25°C에서 배양하였다. DNA 클로닝 실험을 위해 DH-5α를 사용하였고, 단백질 발현을 위해 BL21(DE3)를 사용하였다.

2. PCR & DNA 클로닝

Psychrobacter sp. ArcL13을 48시간 배양시킨 후, 원심분리하여 cell pellet을 모았다. 그 다음 Genomic DNA extraction kit(㈜인트론)를 사용하여 cell pellet으로부터 genomic DNA를 분리하고 PCR 주형으로 사용하였다. PCR primer들은 ㈜코스모진텍에서 합성하였고, i-pfu DNA Polymerase(㈜인트론)를 사용하여 사이클 당 95°C에서 30초, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분 총 25사이클의 반응 조건으로 PCR을 수행하였다. Signal peptide 부위를 제외한 저온활성 지질분해효소(ArcL13-Lip으로 명명) 전체 유전자는 Forward: 5′-GTACATATGGCAGGGCAGTACTATAAT-3′(밑줄부분; NdeI site)와 Reverse: 5′-ATACTCGAGTTAAAGGTTAGCGTTTTTAAG-3′(밑줄부분; XhoI site와 stop codon) primer 쌍을 사용해 genomic DNA로부터 PCR로 증폭시켰다. 그 다음 PCR 산물을 NdeI/XhoI restriction enzyme(New England Biolabs)으로 37°C에서 2시간 처리하고 Gel Extraction Kit(㈜인트론)로 정제한 후, 미리 같은 enzyme들로 digestion시킨 pET-28a(+) vector(Invitrogen)에 cloning하여 발현벡터를 제작하였다. 제작한 발현벡터 안의 ArcL13-Lip 전체 염기 서열은 양방향에서 읽어 검증하였다(㈜ 코스모진텍).

3. 대장균에서 ArcL13-Lip 발현 확인

ArcL13-Lip 발현벡터를 BL21(DE3) cell에 transformation시킨 후, LB 배지에서 A600nm=0.6까지 배양하였다. ArcL13-Lip 발현 유도를 위해 0.2mM IPTG를 처리하고 4시간

더 배양한 후, 발현 정도를 확인하기 위해 배양액을 SDS-PAGE로 분석하였다. 또한 발현된 ArcL13-Lip이 단백질 봉입체 형태로 발현되는지 확인하기 위해 초음파로 파쇄한 cell을 원심분리한 후, 상층액과 침전물을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다.

4. 유가식 발효 (fed-batch fermentation)

발현 균주를 LB배지에 접종 후, 37℃에서 16시간 진탕배양하였다. 5리터 발효기에 2리터 기본배지를 넣고 미리 멸균한 후, 배양한 종균을 5%되게 발효기에 접종하였다. 35℃에서 발효를 수행하였으며, pH는 알칼리수를 사용하여 pH6.8로 일정하게 유지하였다. 배양 중 더 이상 pH가 떨어지는 것이 멈추고 올라가기 시작하면, 기본배지의 탄소원이 모두 소모된 것으로 판단해 feeding medium을 pH 변화가 일어나지 않도록 일정한 속도로 주입하기 시작하였다. Feeding 시작 약 3시간 후, IPTG가 0.2mM이 되게 첨가하여 induction을 시작하였다. Induction 시작 후 약 15시간을 계속 feeding하며 배양을 지속하였다.

<배지 조성>

	성분	조성비 (리터당)
기본 배지 (basal medium)	Glucose	20g
	Yeast extract	5g
	$(NH_4)_2HPO_4$	2.5g
	KH_2PO_4	7.5g
	$MgSO_4$-$7H_2O$	1.2g
	미량금속용액	5ml
	Kanamycin	50mg
Feeding medium	Glucose	385g
	Yeast extract	64g
	$MgSO_4$-$7H_2O$	20g

KOPRI 극지연구소

* 미량금속 (리터당)
Zn_2SO_4-$7H_2O_4$-4g, $FeSO_4$-$7H_2O$-6g, $MnSO_4$-H_2O-2.4g, $CuSO_4$-$5H_2O$-0.9g, Boric acid-0.6g
Molybdenum oxide-0.6g, $CoSO_4$-$7H_2O$-0.7g, 35% HCl-10ml

5. 단백질 봉입체(inclusion body) 분리

단백질 봉입체 분리를 위해 발효 배양액을 20분 동안 5,000 rpm으로 원심분리한 후, 상층액은 제거하고 cell만을 취하였다. 초음파로 파쇄한 cell을 30분 동안 5,000 rpm에서 원심분리를 수행한 후, 상층액은 제거하였다. Cell debris등을 제거하기 위해 침전물을 1% Triton X-100로 suspension한 후 원심분리를 수행하고, 침전물만 회수하였다. 이 과정을 1회 더 반복하였으며, 마지막으로 증류수로 침전물을 suspension한 후 원심분리하여 잔존해 있는 Triton X-100를 제거하였다.

6. 단백질 봉입체의 refolding

우선 단백질 봉입체의 unfolding 조건 확립을 위해 다양한 urea농도와 pH 조건하에서 unfolding실험을 수행하였다. 단백질 봉입체를 20mM Tris-HCl (pH8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11), urea (2M, 4M, 6M, 8M), 10mM β-mercaptoethanol 용액에 첨가한 후, 상온에서 1시간 교반시켰으며 unfolding 상태는 A595nm에서 흡광도 측정을 통해 turbidity 정도로 확인하였다. Refolding을 위한 최적의 조건을 확립하기 위해 refolding buffer로 arginine, Tween 80, glycerol, propylene glycol, glucose, PEG 6000등과 10mM cysteine/1mM cystine을 첨가한 20mM Tris-HCl (pH8.0)를 사용하였다. Refolding을 위해 10배 부피의 refolding buffer를 unfolding sample과 바로 섞은 후 4℃에서 3일간 반응시켰다. Refolding 정도를 확인하기 위해 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용하여 효소 반응을 시킨 후, A405nm에서 흡광도 증가 정도를 측정하여 효소활성을 확인하였다.

7. ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성 규명

효소활성은 다양한 p-nitrophenyl ester (pNP-butyrate (C4), pNP-caprylate (C8), pNP-decanoate (C10), pNP-dodecanoate (C12), pNP-palmitate (C16)) (최종농도; 0.1mM)와 10μl 효소를 1ml의 50mM Tris-HCl (pH 8.0)에 첨가하고, 25℃에서 2분간 반응시킨 후 405nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. ArcL13-Lip 활성을 위한 최적의 pH를 확인하기 위해 pH 6.0-10.0 범위에서 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용해 2분간 활성을 측정하였다. 사용한 buffer는 phosphate-buffered saline (PBS; pH 6.0-7.5), 50mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0), 50mM glycine-NaOH (pH 9.0-10.0)이었다. ArcL13-Lip 활성의 온도 의존성을 확인하기 위해 5-70℃ 범위에서 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용해 2분간 활성을 측정하였다. 다양한 금속이온(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+})과 효소 저해제(PMSF, EDTA)의 ArcL13-Lip 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1mM의 각 첨가물이 포함된 50mM Tris-HCl (pH 8.0)에 10μl의 ArcL13-Lip 시료를 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후, 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용해 효소활성을 측정하였다.

8. 통계분석

결과는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고, 실험 결과는 3회 반복 실험하여 unpaired Student's t test로 분석하였다. 0.05 이하의 p값은 통계적으로 유의

성이 있는 것으로 간주된다.

제 3 절 연구 결과

1. ArcL13-Lip 유전자 동정 및 분리

Psychrobacter sp. ArcL13의 genome sequence가 알려져 있지 않았기 때문에, 이 균주로부터 지질분해효소 유전자를 분리 동정하기 위해 PCR을 이용한 gene prospecting 방법을 활용하였다(Bell et al., 2002). 대부분의 박테리아 유래 지질분해효소들은 oxyanion hole 부위와 active site 부위에서 염기 서열이 서로 다름에도 불구하고 아미노산 서열들이 비교적 잘 보존되어 있기 때문에, 이 보존된 아미노산 서열들을 coding하는 degenerate primer들을 이용하였다(Table 1). Oxyanion hole로부터 active site 사이의 염기 서열(약 200-250 염기쌍)을 찾기 위해 OXF1+ACR1, OXF1+ACR2, OXF1+ACR3, OXF1+ACR4, OXF2+ACR1, OXF2+ACR2, OXF2+ACR3, OXF2+ACR4, OXF3+ACR1, OXF3+ACR2, OXF3+ACR3, OXF3+ACR4로 조합한 primer 쌍들과 Psychrobacter sp. ArcL13균주로부터 분리한 genomic DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 액을 agarose gel에서 분석한 결과, OXF1+ACR2(lane 2), OXF1+ACR4(lane 4), OXF2+ACR3(lane 7), OXF3+ACR3(lane 11) primer 쌍에서 200-250 염기쌍의 PCR 산물들이 확인되었다(Figure 1A). 각 PCR 산물들의 염기 서열을 분석한 결과, OXF1+ACR2과 OXF1+ACR4 primer 쌍으로부터 얻은 PCR 산물들에서 189개의 동일한 염기 서열을 읽을 수 있었다(Figure 1B). 그러나, OXF2+ACR3와 OXF3+ACR3 primer 쌍을 통해 얻은 PCR 산물들에서는 염기 서열이 읽히지 않았다. Basic Local alignment Search Tool(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)을 사용해 이 염기 서열과 유사한 서열을 갖는 유전자들을 찾고자 하였지만, 유사성이 있는 유전자가 확인되지 않았다. 확인된 염기 서열을 DNA translation program(http://web.expasy.org/translate/)을 사용해 아미노산 서열로 translation시킨 후(Figure 1C), 다시 Basic Local alignment Search Tool을 사용해 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 찾은 결과 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래 지질분해효소들과 유사성을 보였다(Figure 1C, underlined & Figure 1D). 따라서, 이 Psychrobacter 속 박테리아 유래 지질분해효소들의 N-말단과 C-말단 부위의 아미노산들을 coding할 수 있는 degenerate primer들과 이미 확인된 ArcL13-Lip 염기 서열(Figure 1B, underlined)에 대한 primer들(Table 2)을 다양하게 조합해 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행한 후, agarose gel로 분석하였다. 분석 결과, Psychro-2-F+L13-internal-R와 L13 internal-F+Psychro-R primer 쌍으로부터 약 300 염기쌍(Figure 2A)과 약 700 염기쌍(Figure 2C)의 PCR 산물들이 각각 확인되었다. 이 PCR 산물들에 대해 염기 서열 분석을 수행한 후

(Figure 2B & 2D), 염기 서열을 Basic Local alignment Search Tool을 사용해 분석한 결과 유사성은 낮지만 Psychrobacter sp. JCM 18903 lipase의 염기 서열과 비교되는 결과를 얻었다. 이 결과들을 바탕으로 N-말단 부위를 coding하는 337개의 염기 서열(Figure 2B)과 C-말단부위를 coding하는 669개의 염기 서열(Figure 2D)를 확인할 수 있었다. 이 두 염기 서열들을 결합하여 1074개의 전체 ArcL13-Lip 유전자 염기 서열을 얻었다(Figure 3A). 다시 ArcL13-Lip 유전자에 대한 5′-말단과 3′-말단 primer 쌍, genomic DNA를 사용해 PCR를 수행한 결과 약 1Kb의 PCR 산물을 확인할 수 있었고(Figure 3B), PCR 산물의 염기 서열 분석 결과 이미 확인된 ArcL13-Lip 유전자 염기 서열과 일치하였다. DNA translation program을 사용해 ArcL13-Lip 유전자의 염기 서열을 translation시킨 결과, ArcL13-Lip 단백질은 358개의 아미노산으로 구성되었다(Figure 3C).

KOPRI
극지연구소

Table 1. Degenerate primers for Figure 1.

Primer	Region	Primer sequence
OXF1	Lipase-oxyanion hole	CCYGTKGTSYTNGTNCAYGG
OXF2	Lipase-oxyanion hole	CCRATMRTWYTNGTNCAYGG
OXF3	Lipase-oxyanion hole	CCKYTWGTKYTNATHCAYGG
ACR1	Lipase-active site	AGGCCNCCCAKNGARTGNSC
ACR2	Lipase-active site	AGRCCNCCCAKRCTRTGNSC
ACR3	Lipase-active site	AGGCCRCCNTGNGARTGNSC
ACR4	Lipase-active site	AGGCCNCCNTGRCTRTGNSC

R:A,G Y:C,T
W:A,T M:A,C
S:C,G K:G,T
N:A,C,G,T H:A,T,C

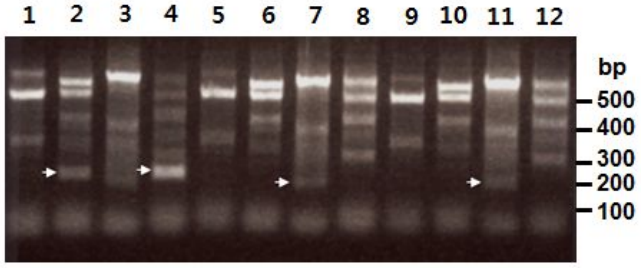
Table 2. PCR primers used for Figure 2

Primer	Primer sequence
L13-internal-F	GAGCAGCTGCTACAACAG
L13-internal-R	CTGTTGTAGCAGCTGCTC
Psychro-1-F	ATGACGCTAAAATCTTCTCT
Psychro-2-F	ATGACGCTTTCTTTGTACAT
Psychro-3-F	ATGACKCTAAARWCYTYYYT
Psychro-R	TTAWAGGTTRGCGTTTTTMA

R:A,G Y:C,T
W:A,T K:G,T
M:A,C

KOPRI 극지연구소

A



B

5'-CGTCATTGATTATTTTAATGGGATTCCTGATGAGTTGATGAA
GGTGGCTCAGAGGTTTATACCACGAAAACATCAGCGGTTAATA
ATAGCGAAGTGCGCGGCGAGCAGCTGCTACAACAGGTAAAAA
CCATCACTGCCATCTCAGGCGATCCTAAAGTCAATTTGTTTGG
ACACAGCCTGGGCGGCCTA-3'

C

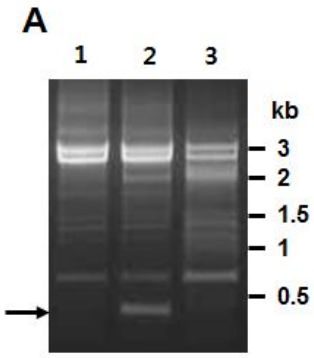
RH-LF-WDS--VDEGGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQ
LLQQVKTITAISGDPKVNLFGHSLGGL

D

L13	GGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTITAISGDPKVNLFGHSLGG
WP_058024309.1	GGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTITAISGDPKVNLFGHSQGG
ERL56372.1	GGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTITAISGKAKVNLFGHSQGG
GAF53800.1	GGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTIAAISGESKVNLFGHSQGG
WP_057758519.1	GGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTIAAISGESKVNLFGHSQGG

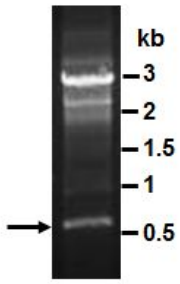
극지연구소

Figure 1. PCR using lipase-prospecting primers. (A) PCR was performed using genomic DNA from Psychrobacter sp. ArcL13 as a template and various pairs of primers. Lanes: 1; OXF1+ACR1, 2; OXF1+ACR2, 3; OXF1+ACR3, 4; OXF1+ACR4, 5; OXF2+ACR1, 6; OXF2+ACR2, 7; OXF2+ACR3, 8; OXF2+ACR4, 9; OXF3+ACR1, 10; OXF3+ACR2, 11; OXF3+ACR3, 12; OXF3+ACR4. Arrows indicate predicted PCR products for lipase gene fragments. (B) Nucleotide sequence for PCR products from PCR using pairs of primers (OXF1+ACR2 or OXF1+ACR4). (C) Translated amino acid sequence from the nucleotide sequence in (B). (D) Alignment of the deduced amino acid sequence with sequences of other lipases: L13; Psychrobacter sp. ArcL13, WP_058024309.1; Psychrobacter piscatorii, ERL56372.1; Psychrobacter aquaticus CMS 56, GAF53800.1; Psychrobacter sp. JCM 18900, WP_057758519.1; Pychrobacter sp. P11G3.



B

5'-ATGTGGACGCTTTCTTTGTACATTCGCGCCGCGCTCAC
GCCAAGAGCATTTTTACCAATACTGGGTTCTATCAGTACTT
GCGTTTTATTAATGACCATGCAAACCACCTCAGCGCAAGC
GGCAGGGCAGTACTATAATTGTGCCAACGCCAATGGCTG
CACGCTAGTCGACAGCAAATATTTTACCTCTAATTATACCA
AAACTCAGTATCCAGTGGTCATGGCGCATGGACTTTTCGG
CTTTACCAAATTATTTGGCGTCATTGATTATTTTAATGGGA
TTCCTGATGAGTTGATGAAAGGTGGCTCAGAGGTTTATAC
CACGAAAACATCAGCGT-3'



D

5'-CCTAAAGTCAATTTGTTTGGGCACAGTCAAGGCGGTATCGATATTCGT
TATGTCGCTGGTGTCGCGCCAAAATATGTCGCATCAGTCACCGCCGTATC
AAGCCCAGAGCAAGGCTCAAAAACAGCCGATTTTGTCAAAAACGTCCTT
GAACCAAACAATGACACAGGTGAGCCATCAAACGTTACGACACAGCTGG
TATCAGGGGTGTTTAATTTGATTGGCGGCTTTACAGATGTGGGATCAGGC
ATCAGTTTTAAAGAGATACAAGAGCAAGATGGCTGGCAAGCACTCATGG
CGCTATCAACCGATGGTGCGGCCAAATTCAATGCCAAATTCCCAGCAGC
CATGCCAACAAGTTACTGTGGTCAGCCGACCAGTACTGCTGCCAATGGT
ATCAAATATTATTCATTTAGTGGCGTTGGGCAAGTCACAAGCGTCCTTGA
CCCTAGTGATTATCTGCTTGCAGCAACAAGCGTACCGTTTTTATTTGATG
CCAATGATGGTCTGGTCTCTGCCTGCTCAAGCCGACTTGGGTATGTGATT
CGTGACAACTACCTCATGAACCATTTGGATTCAGCAGACCAAGTACTAG
GTCTGACCGCTTGGGGCGAGTCTGAGCCAAAATCTATCTATCGTACTCA
GGTCAATCGTCTTAAAAACGCTAACCTTTAA-3'

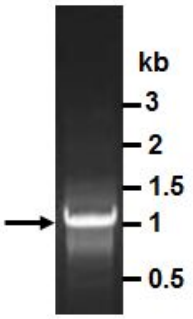
극지연구소

Figure 2. PCR using primers encoding N- and C-terminal amino acid sequences of Psychrobacter genus lipases described in Figure 1D and primers for ArcL13-Lip internal sequence. (A) PCR was performed using the genomic DNA as a template and various pairs of primers. Lanes: 1; Psychro-1-F+L13-internal-R, 2; Psychro-2-F+L13-internal-R, 3; Psychro-3-F+L13-internal-R. Arrow indicates predicted PCR product for a lipase gene fragment. (B) Nucleotide sequence for the PCR product from PCR using a pair of primers (Psychro-2-F+L13-internal-R). (C) PCR was undertaken using the genomic DNA as a template and a pair of primers (L13 internal-F+Psychro-R). Arrow indicates predicted PCR product for a lipase gene fragment. (D) Nucleotide sequence for the PCR product from PCR using a pair of primers (L13 internal-F+Psychro-R).

A

5'-ATG ACG CTT TCT TTG TAC ATT CGC GCC GCG CTC ACG
CCA AGA GCA TTT TTA CCA ATA CTG GGT TCT ATC AGT
ACT TGC GTT TTA TTA ATG ACC ATG CAA ACC ACC TCA
GCG CAA GCG GCA GGG CAG TAC TAT AAT TGT GCC AAC
GCC AAT GGC TGC ACG CTA GTC GAC AGC AAA TAT TTT
ACC TCT AAT TAT ACC AAA ACT CAG TAT CCA GTG GTC
ATG GCG CAT GGA CTT TTC GGC TTT ACC AAA TTA TTT
GGC GTC ATT GAT TAT TTT AAT GGG ATT CCT GAT GAG
TTG ATG AAA GGT GGC TCA GAG GTT TAT ACC ACG AAA
ACA TCA GCG GTT AAT AAT AGC GAA GTG CGC GGC GAG
CAG CTG CTA CAA CAG GTA AAA ACC ATC ACT GCC ATC
TCA GGC GAT CCT AAA GTC AAT TTG TTT GGG CAC AGT
CAA GGC GGT ATC GAT ATT CGT TAT GTC GCT GGT GTC
GCG CCA AAA TAT GTC GCA TCA GTC ACC GCC GTA TCA
AGC CCA GAG CAA GGC TCA AAA ACA GCC GAT TTT GTC
AAA AAC GTC CTT GAA CCA AAC AAT GAC ACA GGT GAG
CCA TCA AAC GTT ACG ACA CAG CTG GTA TCA GGG GTG
TTT AAT TTG ATT GGC GGC TTT ACA GAT GTG GGA TCA
GGC ATC AGT TTT AAA GAG ATA CAA GAG CAA GAT GGC
TGG CAA GCA CTC ATG GCG CTA TCA ACC GAT GGT GCG
GCC AAA TTC AAT GCC AAA TTC CCA GCA GCC ATG CCA
ACA AGT TAC TGT GGT CAG CCG ACC AGT ACT GCT GCC
AAT GGT ATC AAA TAT TAT TCA TTT AGT GGC GTT GGG
CAA GTC ACA AGC GTC CTT GAC CCT AGT GAT TAT CTG
CTT GCA GCA ACA AGC GTA CCG TTT TTA TTT GAT GCC
AAT GAT GGT CTG GTC TCT GCC TGC TCA AGC CGA CTT
GGG TAT GTG ATT CGT GAC AAC TAC CTC ATG AAC CAT
TTG GAT TCA GCA GAC CAA GTA CTA GGT CTG ACC GCT
TGG GGC GAG TCT GAG CCA AAA TCT ATC TAT CGT ACT
CAG GTC AAT CGT CTT AAA AAC GCT AAC CTT TAA-3'

B



C

MTLSLYIRAALTPRAFLPILGSISTCVLLMTMQTTSAQAAGQYYNCA
NANGCTLVDSKYFTSNYTKTQYPVVMAHGLFGFTKLFGVIDYFNGIP
DELMKGGSEVYTTKTSAVNNSEVRGEQLLQQVKTITAISGDPKVNL
FGHSQGGIDIRYVAGVAPKYVASVTAVSSPEQGSKTADFVKNVLEP
NNDTGEPSNVTTQLVSGVFNLIGGFTDVGSGISFKEIQEQDGWQAL
MALSTDGAAKFNAKFPAAMPTSYCGQPTSTAANGIKYYSFSGVGQ
VTSVLDPSDYLLAATSVPFLFDANDGLVSACSSRLGYVIRDNYLMN
HLDSADQVLGLTAWGESEPKSIYRTQVNRLKNANL

극지연구소

Figure 3. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ArcL13-Lip. (A) Complete nucleotide sequence of ArcL13-Lip. (B) PCR was performed using the genomic DNA as a template and a pair of primers designed to amplify the entire gene. (C) Deduced amino acid sequence of ArcL13-Lip. The putative signal peptide region is underlined.

2. ArcL13-Lip의 아미노산 서열 분석

ArcL13-Lip 단백질의 전체 아미노산 서열을 Basic Local alignment Search Tool을 사용해 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 확인한 결과, ArcL13-Lip은 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 84-90%의 아미노산 서열 유사성을 보였다(Figure 4). 다른 지질분해효소들과의 유사성을 기초로, catalytic triad는 144번째 serine(Ser144), 302번째 aspartate(Asp302), 324번째 histidine(His324)로 구성되며, oxyanion hole은 73번째 methionine(Met73)과 145번째 glutamine(Gln145)로 형성됨을 추론하였다(Figure 4). SignalP 4.1 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)를 이용하여 signal peptide 유무를 분석한 결과, ArcL13-Lip은 39개의 아미노산으로 구성된 signal peptide를 갖고 있음이 확인되었다(Figure 3C, underlined). 따라서 Psychrobacter sp. ArcL13에서 ArcL13-Lip는 분비 단백질로 예상된다.

KOPRI
극지연구소

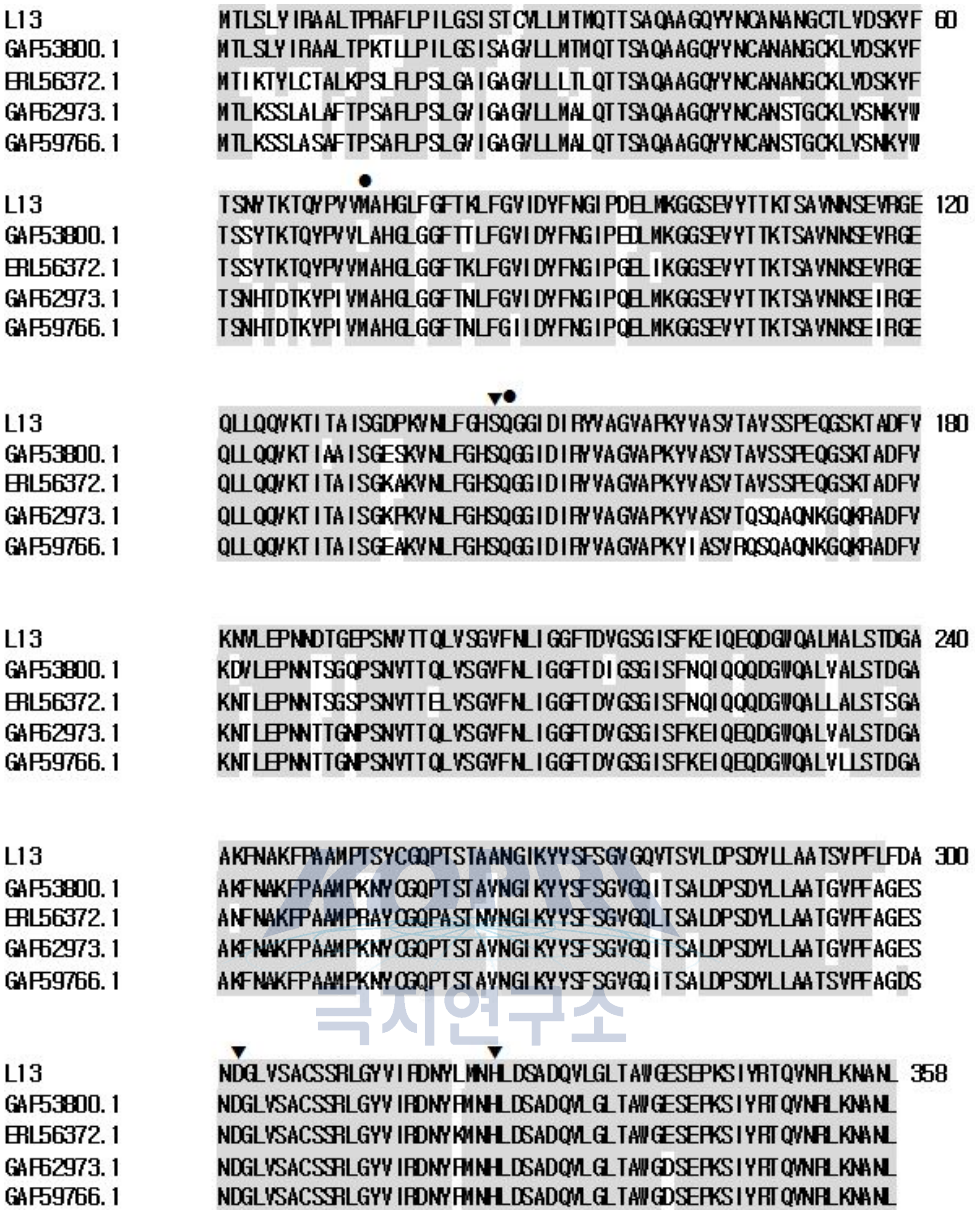


Figure 4. Alignment of ArcL13-Lip amino acid sequence with sequences of other lipases: L13; Psychrobacter sp. ArcL13, GAF53800.1; Psychrobacter sp. JCM 18900, ERL56372.1; Psychrobacter aquaticus CMS 56, GAF62973.1; Psychrobacter sp. JCM 18903, GAF59766.1; Psychrobacter sp. JCM 18902. Amino acid residues belonging to the catalytic triad are indicated by ▼ and to the oxyanion hole are indicated by ●.

3. ArcL13-Lip 유전자의 클로닝 및 대장균에서의 발현

Signal peptide 부위를 제외한 ArcL13-Lip 전체 유전자(Figure 3)를 genomic DNA로부터 PCR로 증폭시킨 후, PCR 산물을 pET-28a(+) 벡터에 클로닝하여 발현벡터를 제작하였다. 이 발현벡터를 BL21(DE3) cell에 형질전환 시킨 후, LB 배지에서 배양하며 IPTG로 ArcL13-Lip 단백질의 발현을 유도시켰다. 배양액을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 발현을 유도시킨 cell에서만 약 35 kDa의 분자량을 갖는 ArcL13-Lip이 과발현됨을 확인하였다(Figure 5A). ArcL13-Lip을 과발현시킨 cell을 초음파로 파쇄한 후 원심분리를 수행하였으며, 상층액과 침전물을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다. 분석 결과 ArcL13-Lip의 발현은 오직 침전물에서만 관찰되었으며, 이것은 ArcL13-Lip 유전자를 대장균에서 발현시킬 경우 단백질 봉입체 형태로 발현됨을 의미 한다(Figure 5B).

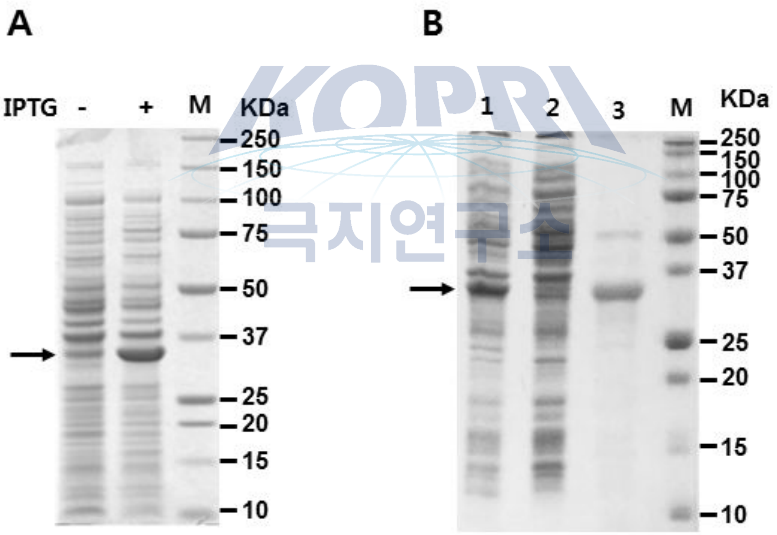


Figure 5. SDS-PAGE analysis showing ArcL13-Lip expression in transformed BL21(DE3) cells. (A) SDS-PAGE analysis of uninduced and induced cells. Arrow indicates ArcL13-Lip. (B) SDS-PAGE analysis of supernatant and precipitate after centrifugation of sonicated cells. Lanes: 1; total cell lysate, 2; supernatant, 3; precipitate, M; molecular markers (Bio-Rad). Arrow indicates ArcL13-Lip.

4. ArcL13-Lip의 refolding

발현시킨 단백질 봉입체 형태의 ArcL13-Lip은 불활성 상태이기 때문에, 활성형으로 전환시키기 위해서는 단백질 봉입체의 unfolding과 refolding 과정이 필수적이다. 우선 대장균으로부터 고순도의 단백질 봉입체를 분리하기 위해, 파쇄한 cell들을 비이온 계면활성제가 포함된 buffer로 수 차례 세척하였다. 단백질 봉입체의 unfolding 조건 확립을 위해 다양한 urea농도와 pH 조건하에서 unfolding실험을 수행하였다. 실험 결과 8M urea, 20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM β-mercaptoethanol 용액에서 단백질 봉입체의 unfolding 효율이 가장 높았다. Refolding 조건을 최적화하기 위해 unfolding시킨 ArcL13-Lip을 다양한 첨가물이 포함된 buffer에 희석시키고, refolding을 위해 4°C에서 반응시켰다. 3일 후 각 반응액에서 ArcL13-Lip의 refolding 정도를 확인하기 위해 지질분해효소 활성 분석을 수행하였다. 활성 분석 결과, 오직 glucose에 의해서만 ArcL13-Lip의 refolding 수율이 크게 증가하였다(Figure 6A). Glucose 농도에 따른 ArcL13-Lip의 refolding 수율 영향을 확인하기 위해 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1M glucose을 포함하는 buffer에 ArcL13-Lip을 refolding시킨 후, 효소 활성을 측정하였다. 측정 결과 0.4M에서 refolding 효율이 정점을 나타내었고, 더 이상의 농도에서는 refolding 효율이 증가하지 않았다(Figure 6B).

KOPRI
극지연구소

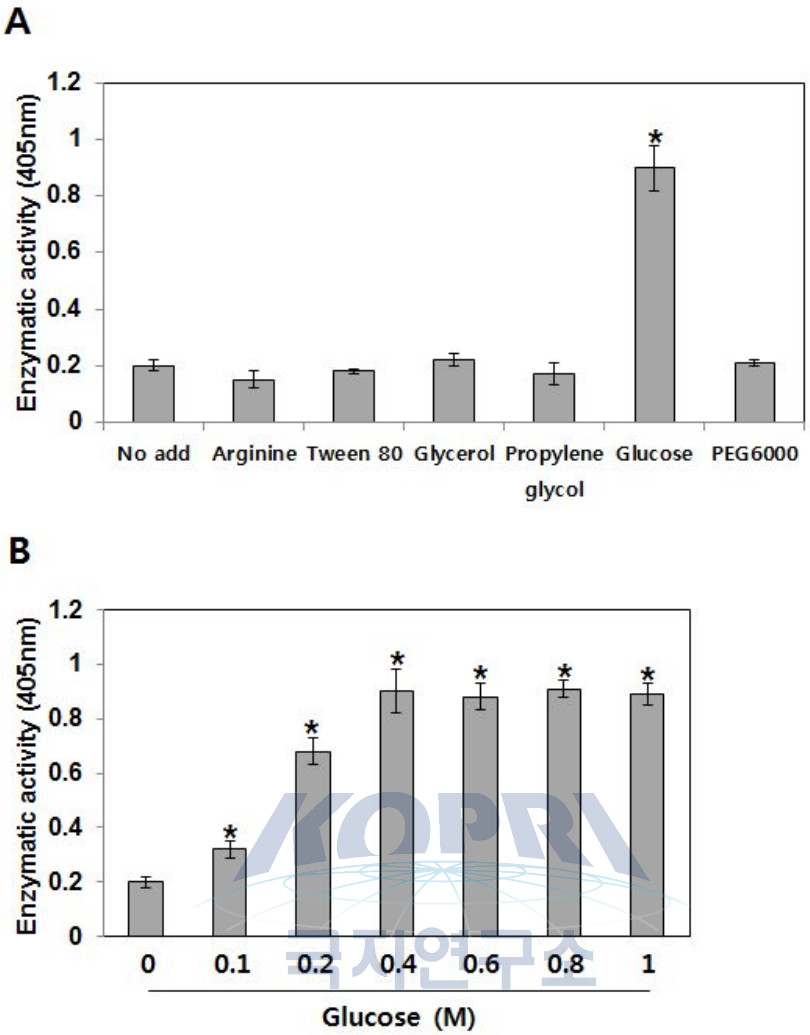


Figure 6. Effect of various additives on refolding of ArcL13-Lip. (A) Refolding of ArcL13-Lip was performed in buffers containing 0.5M arginine, 0.1% Tween 80, 5% glycerol, 5% propylene glycol, 0.5M glucose, or 1mg/ml PEG 6000. Enzymatic activity of refolded ArcL13-Lip was assessed by measuring hydrolysis of p-nitrophenyl caprylate at 405nm. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. *P<0.05 versus control. (B) Refolding of ArcL13-Lip in buffers containing different concentrations of glucose. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. *P<0.05 versus control.

5. 재조합 ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성

다양한 분야에서의 적용을 위해, ArcL13-Lip의 기질 특이성, 다양한 pH 조건 및 반응 온도에 따른 활성 변화, 다양한 금속이온들과 효소저해제들의 효소 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 기질 특이성은 다양한 길이의 chain을 갖는 p-nitrophenyl ester에 대한 효소 활성 정도를 측정하여 확인하였다. 활성 측정 결과 ArcL13-Lip은 p-nitrophenyl caprylate(C8), 그 다음으로 p-nitrophenyl decanoate(C10)에 대해 최고의 활성을 보였다(Figure 7A). 반면, 더 짧거나 더 긴 chain의 기질에 대해서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다(C4; 60%, C12; 50%, C16; 45%). 기질로 p-nitrophenyl caprylate를 사용해 pH의 효소 활성에 대한 영향을 조사한 결과, ArcL13-Lip은 pH8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였다(Figure 7B). 효소 활성을 다양한 온도에서 측정한 결과, ArcL13-Lip은 40°C에서 최고의 활성을 나타내었고, 10°C와 20°C에서 각각 최고 활성 대비 약 40%와 73%의 효소 활성을 나타내었다(Figure 7C). 이와 같은 저온에서 ArcL13-Lip의 높은 효소 활성은 전형적인 저온활성 효소의 특징을 보여주는 것이다(Joseph et al., 2008). 그 다음 다양한 금속이온들과 효소저해제들의 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 ArcL13-Lip의 효소 활성은 $CoCl_2$, $NiCl_2$, EDTA등에 의해 미약하게 억제되었고, $CuCl_2$와 $ZnSO_4$에 의해서는 약 50% 억제되었다. $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, PMSF는 ArcL13-Lip의 효소 활성에 영향을 주지 않았다(Table 3).

KOPRI
극지연구소

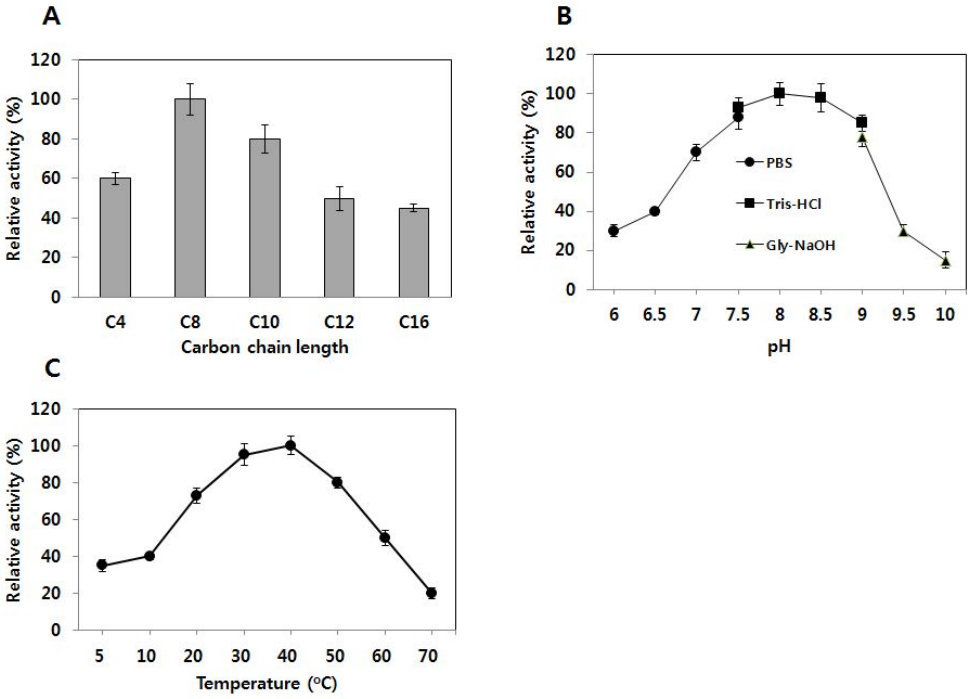


Figure 7. Effects of substrates, pH, and temperature on the lipase activity of ArcL13-Lip. (A) Substrate specificity of ArcL13-Lip. Hydrolytic activity of ArcL13-Lip toward p-nitrophenyl esters with various chain lengths (C4, C8, C10, C12, and C16) were measured at 405nm. Activity towards p-nitrophenyl caprylate was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. (B) Effect of pH on the ArcL13-Lip activity. Lipase activity was assayed in different pH buffers (●; PBS (pH 6.0-7.5), ■; 50mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0), ▲; 50mM glycine-NaOH (pH 9.0-10.0)). Activity obtained at pH8.0 was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments. (C) Effect of temperature on the ArcL13-Lip activity. The enzyme activity was assayed at different temperatures for 2 min. Activity obtained at 40°C was taken as 100%. Data represent the mean and standard deviation of three experiments.

Table 3. Effect of various metal ions and additives on ArcL13-Lip activity.

Reagents (1mM)	Relative activity (%)[a]
None	100
$CaCl_2$	98±5
$MgCl_2$	100±3
$MnCl_2$	99±2
$CuCl_2$	53±3
$CoCl_2$	97±4
$NiCl_2$	96±2
$ZnSO_2$	56±1
EDTA	95±3
PMSF	99±2

Data are given as means ± SD, n = 3. a ArcL13-Lip was incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing each compound for 10 min. Remaining activity was determined using 0.1 mM p-nitrophenyl caprylate at 25℃.

KOPRI
극지연구소

제 4 절 고찰

본 연구의 내용을 간략히 요약하면 첫째, Psychrobacter sp. ArcL13균주로부터 PCR을 이용한 gene prospecting 방법으로 새로운 지질분해효소 유전자인 ArcL13-Lip을 분리 동정하였다. 둘째, ArcL13-Lip은 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래의 지질분해효소들과 염기 서열의 유사성은 낮지만, 84-90%의 아미노산 서열 유사성을 보였다. 셋째, ArcL13-Lip 유전자를 대장균에서 발현 시, 약 35 kDa의 분자량을 갖는 단백질 봉입체 형태로 발현되었다. 넷째, glucose에 의해서 ArcL13-Lip의 refolding 수율이 크게 증가하였다. 다섯째, 다양한 길이의 chain을 갖는 p-nitrophenyl ester에 대해 효소 활성을 나타내었으며, 저온활성을 보였다.

같은 계열의 유전자들 사이에서 전체 아미노산 서열의 유사성이 낮더라도, 기능이나 구조에 중요한 역할을 하는 domain의 경우 아미노산 서열이 상당히 유사하다. 그러나 이 domain들의 아미노산 서열이 잘 보존되어 있다 하더라도, 이 아미노산들을 coding하는 염기 서열은 서로 다를 수 있다. 따라서, 이 아미노산들을 모두 coding할 수 있는 염기들로 구성된 degenerate primer들을 사용해 PCR을 수행하게 되면 원하는 유전자를 찾을 수 있는 확률이 높아진다. 이와 같은 방법을 gene prospecting이라 하며, 지금까지 지질분해효소 유전자를 포함한 다양한 유전자들을 발굴하는데 사용되어왔다(Bell et al., 2002; Sunna and Bergquist, 2003; Shandilya et al., 2004; Finnegan et al., 2005). 현재까지 Psychrobacter sp. ArcL13의 genome sequence는 밝혀져 있지 않기 때문에, 이 균주로부터 원하는 유전자를 발굴하기는 쉽지 않다. 그러나, genome sequence를 모르더라도 gene prospecting 방법을 사용할 경우, 좀더 경제적으로 원하는 유전자를 발굴하기 용이해진다. 따라서, gene prospecting 방법은 다양한 환경으로부터 스크리닝 과정을 통해 발굴된 유용한 활성을 갖는 다양한 균주로부터 genome sequence의 규명 없이도 원하는 유전자를 발굴하는데 유용하게 쓰일 것이라 기대된다.

ArcL13-Lip이 Psychrobacter sp. ArcL13의 지질분해효소 활성(Kim et al., 2015)을 대표한다는 근거는 다음과 같다. 첫째, 둘 다 저온활성을 보였다. 둘째, p-nitrophenyl caprylate와 그 다음으로 p-nitrophenyl decanoate에 대해 최고의 활성을 보였다. 셋째, 미세한 차이는 존재하지만, 둘 다 pH8.0-8.5에서 최고의 활성을 보였다. 넷째, 10-70℃ 범위에서 온도에 따른 효소 활성이 거의 유사하였다.

Basic Local alignment Search Tool을 사용해 ArcL13-Lip과 일부 Psychrobacter 속 박테리아 유래 지질분해효소들의 아미노산 서열 유사성이 확인되었지만, 이들 Psychrobacter 속 박테리아 유래 지질분해효소들에 대한 연구가 전무한 상황이다. 따라서 이들 유전자들이 지질분해효소로서의 역할을 수행하는지에 대해서는 추후의 연구가 필요하다. 그러나, ArcL13-Lip은 몇 가지 이유로 진정한 지질분해효소임을 주장할 수 있다. 첫째, 지질분해효소 활성에 대한

스크리닝 과정을 통해 Psychrobacter sp. ArcL13을 분리하였다(Kim et al., 2015). 둘째, 지질분해효소의 기질들에 대해 활성을 나타내었다. 셋째, 아미노산 서열에 전형적인 지질분해효소의 특징인 catalytic triad와 oxyanion hole을 구성하는 아미노산들을 갖고 있다(Jaeger et al., 1994; Jaeger et al., 1999). 결론적으로 ArcL13-Lip과 아미노산 서열이 유사한 Psychrobacter 속 박테리아 유래 지질분해효소들은 지질분해효소로서의 가능성만 제시되었을 뿐 실제 지질분해효소로서의 기능과 특성을 규명한 것은 ArcL13-Lip이 처음이다.

알려진 대부분의 저온활성 지질분해효소는 Psychrobacter 속 박테리아를 포함한 호냉성(psychrophlilic)과 내냉성(psychrotolerant) 미생물에서 분리되었다(Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009; Chen et al., 2011). 특히, 시베리아 저온 염수호 유래 Psychrobacter cryohalolentis K5T로부터 저온활성 지질분해효소 유전자가 분리되었으며, 그 특성이 규명되었다(Bakermans et al., 2006; Novototskaya-Vlasova et al., 2012; Novototskaya-Vlasova et al., 2013a; Novototskaya-Vlasova et al., 2013b). ArcL13-Lip과 Psychrobacter cryohalolentis K5T 지질분해효소는 저온에서 서식하는 같은 Psychrobacter 속 박테리아 유래 저온활성 효소라는 공통점이 있다. 반면, 차이점은 첫째, Psychrobacter cryohalolentis K5T 지질분해효소는 ArcL13-Lip에 비해 긴 chain의 기질에 대해 높은 효소활성을 보인다(Novototskaya-Vlasova et al., 2013a). 둘째, ArcL13-Lip은 다른 저온활성 지질분해효소와 비슷하게 40°C 근처에서 최고의 활성을 보이지만(Suzuki et al., 2002; Park et al., 2009), Psychrobacter cryohalolentis K5T 지질분해효소는 25°C에서 최고의 활성을 보인다(Novototskaya-Vlasova et al., 2013a). 셋째, Psychrobacter cryohalolentis K5T 지질분해효소를 포함한 대부분의 저온활성 지질분해효소는 EDTA에 의해 활성을 잃게 되지만(Kulakova et al., 2004; Chen et al., 2011; Novototskaya-Vlasova et al., 2013a), ArcL13-Lip 활성은 EDTA 영향을 거의 받지 않는다. 이것은 ArcL13-Lip의 활성에는 금속이온이 필요 없지만, 대부분의 저온활성 지질분해효소의 활성을 위해서는 금속이온이 필수적임을 의미한다.

대부분의 이종 단백질은 대장균에서 불활성 상태인 단백질 봉입체 형태로 발현된다. 단백질 봉입체 형태로 발현되는 것의 장점은 단백질을 과발현시킬 수 있고, 세포 파쇄 후 단백질 봉입체의 세척 과정만으로 고순도의 단백질을 얻을 수 있기 때문에 정제 과정이 복잡하지 않다는 것이다. 반면, 단백질 봉입체는 불활성 상태이기 때문에 활성 형으로 전환시키기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요하다. In vivo에서 단백질 folding 과정에는 chaperone이 관여하여, folding intermediate들의 aggregation을 방지함으로써 단백질 folding을 촉진한다(Hartl et al., 2011). In vitro에서는 단백질 folding 효율성을 높이기 위해 folding intermediate들의 aggregation을 방지하는 다양한 첨가제들(예; arginine, 계면활성제, glycerol, sucrose, glucose, polyethylene glycol)이 사용된다(Vallejo and Rinas, 2004). 특히, glucose는 in vitro에서 단백

질 안정화에 기여한다는 다양한 보고가 있다. 예로, glucose는 높은 온도에서 native 상태를 유지할 수 있도록 효소들을 안정화시키는 역할을 한다(Hottiger et al., 1994). Glucose는 효과는 작지만 변성된 rhodanese의 aggregation을 억제한다는 보고도 있다(Singer and Lindquist, 1998). 또한, S450-650(SARS-coronavirus spike protein의 450 - 650 polypeptide fragment)을 대장균에 발현시켜 얻은 단백질 봉입체의 in vitro refolding 과정에서 glucose는 aggregation을 방지해 S450-650의 refolding 효율을 높인다(Zhao et al., 2005). Glucose, lactose, sucrose 등과 같은 당들은 물과 단백질 사이의 접촉 면적을 최소화해 단백질의 native와 denatured 상태 사이의 평형 상태를 native 상태 쪽으로 유리하게 해, 단백질의 native 구조를 안정화시키는 역할을 한다(Lee and Timasheff, 1981; Arakawa and Timasheff, 1982). 따라서 glucose에 의한 ArcL13-Lip의 refolding 효율의 증가는 glucose가 refolding 과정에서 protein aggregation 방지를 통해 refolding 효율을 증가시키는 것으로 설명할 수 있다.

저온활성 지질분해효소는 세제 혹은 토양과 폐수 정화 등에 첨가제로 다양하게 사용될 수 있기 때문에 특히 주목을 받고 있다. 본 연구를 통해 이루어진 ArcL13-Lip의 물리·화학적 특성 규명, 발현 균주, 최적의 refolding 방법을 바탕으로 ArcL13-Lip의 산업적 응용을 위해서는 우선 대량생산 기술 개발이 필요하다. 그 다음 필드에서의 테스트를 통해 다양한 분야로의 적용 가능성을 검증하는 것이 뒤따라야 할 것이다.

KOPRI
극지연구소

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절. 연구개발목표 달성도

목 표	달 성 도 (%)	내 용
○효소 상용화를 위한 활성형의 재조합 지질분해효소 생산기술 개발	100	○형질전환 대장균으로부터 단백질 봉입체 분리 조건 확립 ○Unfolding 조건 확립 ○Refolding 조건 확립.
○재조합 지질분해 효소의 특성 연구	100	○재조합 지질분해효소의 물리·화학적 특성분석

KOPRI 극지연구소

제 2 절. 연구개발 대외기여도

본 연구는 양극해 해양미생물로부터 유래한 저온활성 지질분해효소의 상용화 기술 개발을 목표로 진행하였다. 저온활성 지질분해효소로 노보자임사의 Novozym 435만 상용화되어 독점적으로 공급되고 있다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 저온성 지질분해효소는 수입대체 효과뿐 아니라 Novozym 435와 차별되는 Arcl13 자체만의 특성 (예; no transesterification activity)등으로 인해 세탁 첨가제, 각종 세정제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제, 식품산업의 첨가제, 환경오염 제거 및 분자생물학적 응용 등 산업적 응용성이 매우 클 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 연구개발결과의 활용계획

1. 산업용 지질분해효소 분야는 생물공학 분야 중에서도 자본이 다량 투입되는 기술 분야가 아니므로 다양한 극한지 생물자원, 유전공학 및 단백질 공학기술을 이용하여 접근이 가능한 분야임.
2. 현재 상용화된 저온성 지질분해효소로는 남극에서 분리한 Candida antarctica가 생산하는 지방분해효소 lipase B로 세계적인 효소회사인 덴마크의 노보자임스(Novozymes)사에서 Novozym 435가 유일함. 따라서 본 연구를 통해 개발된 저온성 지질분해효소는 세정제, 피혁제품 가공제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제, 식품산업의 첨가제, 환경오염 제거 및 분자생물학적 응용 등 산업적 응용성이 매우 큼. 따라서 관련업계에 기술이전을 할 계획임.
3. 산업화를 위해서는 경제적인 비용의 대량생산 기술 개발이 필수적이기 때문에, 본 연구 성과들은 저온활성 지질분해효소의 추가적인 대량생산 기술 개발 연구에 이용될 것임.
4. 다양한 특성을 갖는 후속 저온성 지질분해효소 기술개발은 다양한 용도에 사용이 가능한 특화된 효소 개발을 가능하게 할 것임.

KORDI 극지연구소

제 2 절. 연구개발결과의 파급효과

1. 양극해의 다양한 미생물자원을 활용하여 산업용소재로서의 이용성을 제고하고, 이들을 체계적으로 첨단생명공학기술의 접목을 위한 기초적 토대 마련.
2. 양극해 유래 저온효소의 효율적인 발현시스템의 확립은 극지 유래 유용 단백질의 신규 발굴 및 단백질의 응용연구를 효율적으로 추진할 수 있는 기반이 됨.
3. 산업화 관련 기술의 연구개발을 통해 저온효소의 산업화가 가능할 것으로 기대
4. 고 활성효율 및 저온활성을 갖는 저온 지질분해효소의 개발을 통하여 생채촉매 시장에 새로운 분야를 개척함.
5. 국내기술을 기반으로 한 저온효소 상용화의 선도적 연구는 향후 저온효소의 산업적 이용 및 기술향상에 기여할 수 있을 것으로 기대
6. 아직까지 상대적으로 산업화가 많이 진행되지 않은 저온효소의 성공적인 상업화를 통해 세계 시장에서 주도적인 위치를 확보

제 6 장 참고문헌

Arakawa, T., and Timasheff, S.N. 1982. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry 21, 6536-6544.

Bakermans, C., Ayala-del-rio, H.L., Ponder, M.A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., and Tiedje, J.M. 2006. Psychrobacter cryohalolentis sp nov and Psychrobacter arcticus sp nov., isolated from Siberian permafrost. International journal of systematic and evolutionary microbiology 56, 1285-1291.

Bell, P.J., Sunna, A., Gibbs, M.D., Curach, N.C., Nevalainen, H., and Bergquist, P.L. 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. Microbiology 148, 2283-2291.

Cardenas, F., de Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W., and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme Microb Tech 28, 145-154.

Chen, R.P., Guo, L.Z., and Dang, H.Y. 2011. Gene cloning, expression and characterization of a cold-adapted lipase from a psychrophilic deep-sea bacterium Psychrobacter sp C18. World J Microb Biot 27, 431-441.

Finnegan, P.M., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, H., and Bergquist, P.L. 2005. Diverse dextranase genes from Paenibacillus species. Archives of microbiology 183, 140-147.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., and Feller, G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends in biotechnology 18, 103-107.

Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 475, 324-332.

KOPRI 극지연구소

Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., and Wiemken, A. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. European journal of biochemistry / FEBS 219, 187-193.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., and Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu Rev Microbiol 53, 315-+.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Vanheuvel, M., and Misset, O. 1994. Bacterial Lipases. Fems Microbiol Rev 15, 29-63.

Joseph, B., Ramteke, P.W., and Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. Biotechnol Adv 26, 457-470.

Kim, S., Wi, A.R., Park, H.J., Kim, D., Kim, H.W., Yim, J.H., and Han, S.J. 2015. Enhancing Extracellular Lipolytic Enzyme Production In An Arctic Bacterium, Psychrobacter sp ArcL13, By Using Statistical Optimization And Fed-Batch Fermentation. Prep Biochem Biotech 45, 348-364.

Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., and Esaki, N. 2004. Cold-active esterase from Psychrobacter sp Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly -> Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. Bba-Proteins Proteom 1696, 59-65.

Lee, J.C., and Timasheff, S.N. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. The Journal of biological chemistry 256, 7193-7201.

Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. 2013a. Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from Psychrobacter cryohalolentis K5(T). Protein expression and

KOPRI 극지연구소

purification 91, 96-103.

Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. 2012. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by Psychrobacter cryohalolentis K5T from Siberian cryopeg. Fems Microbiol Ecol 82, 367-375.

Novototskaya-Vlasova, K.A., Petrovskaya, L.E., Rivkina, E.M., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. 2013b. Characterization of a cold-active lipase from Psychrobacter cryohalolentis K5(T) and its deletion mutants. Biochemistry-Moscow+ 78, 385-394.

Park, I.H., Kim, S.H., Lee, Y.S., Lee, S.C., Zhou, Y., Kim, C.M., Ahn, S.C., and Choi, Y.L. 2009. Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by Acinetobacter baumannii BD5. J Microbiol Biotechn 19, 128-135.

Salameh, M.A., and Wiegel, J. 2007. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline Lipases from Thermosyntropha lipolytica. Applied and environmental microbiology 73, 7725-7731.

Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A., and Bag, P.K. 2012. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from Staphylococcus aureus isolated from Arachis hypogaea rhizosphere. Process Biochem 47, 858-866.

Shandilya, H., Griffiths, K., Flynn, E.K., Astatke, M., Shih, P.J., Lee, J.E., Gerard, G.F., Gibbs, M.D., and Bergquist, P.L. 2004. Thermophilic bacterial DNA polymerases with reverse-transcriptase activity. Extremophiles : life under extreme conditions 8, 243-251.

Singer, M.A., and Lindquist, S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. Molecular cell 1, 639-648.

Sunna, A., and Bergquist, P.L. 2003. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. Extremophiles :

KORRI 극지연구소

life under extreme conditions 7, 63-70.

Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., and Esaki, N. 2002. Primary structure and catalytic properties of a cold-active esterase from a psychrotroph, Acinetobacter sp strain no. 6. isolated from Siberian soil. Biosci Biotech Bioch 66, 1682-1690.

Vallejo, L.F., and Rinas, U. 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microb Cell Fact 3.

Zhang, A.J., Gao, R.J., Diao, N.B., Xie, G.Q., Gao, G., and Cao, S.G. 2009. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from Pseudomonas fluorescens JCM5963. J Mol Catal B-Enzym 56, 78-84.

Zhang, J., Lin, S., and Zeng, R.Y. 2007. Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, Psychrobacter sp 7195. J Microbiol Biotechn 17, 604-610.

KOPRI
극지연구소

Zhao, J.C., Zhao, Z.D., Wang, W., and Gao, X.M. 2005. Prokaryotic expression, refolding, and purification of fragment 450-650 of the spike protein of SARS-coronavirus. Protein expression and purification 39, 169-174.

KOPRI
극지연구소

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서 입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.