

극지미생물로부터 기능성 지질 소재 합성을
위한 리파아제 효소 발굴

Screening of lipases from polar microorganisms for the
synthesis of functional lipids



가톨릭대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축에 관한 연구” 과제의 위탁연구 “극지미생물로부터 기능성 지질 소재 합성을 위한 리파아제 효소 발굴에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2017. 01. 31

(본과제) 총괄연구책임자	: 임 정 한
위탁연구기관명	: 가톨릭대학교
위탁연구책임자	: 김 형 권
위탁참여연구원	: 김 수 진
“	: 박 세 현
“	: 박 채 경

보고서 초록

위탁연구과제명	극지미생물로부터 기능성 지질 소재 합성을 위한 리파아제 효소 발굴				
위탁연구책임자	김 형 권	해당단계 참여연구원수	4명	해당단계 연구비	25,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 생명공학전공		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
- 극지연구소로부터 분양받은 미생물을 대상으로 TCN plate assay, pNPC assay, pH STAT assay를 통해서 리파아제 활성을 측정하고 활성이 높은 균주를 선발하였음. - 리파아제 활성이 높고 염기서열이 보고된 4가지 리파아제 유전자(<i>Marinobacter lipolyticus</i>_15672 triacylglycerol lipase, <i>M. lipolyticus</i>_LipBL lipolytic enzyme, <i>M. lipolyticus</i>_02075 acylglycerol lipase, <i>Croceibacter atlanticus</i>_11223 lipase)를 PCR cloning하고 염기서열을 분석하고 기존에 보고된 서열과 비교하였음. - 클로닝된 리파아제 유전자를 pET22 벡터에 삽입하고 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)균에 형질전환한 후, IPTG induction을 통해 효소발현을 수행하였음. Cell-free extract와 cell pellet에 대해서 SDS-PAGE와 pNPC assay를 통해서 재조합 리파아제 효소의 발현을 조사하였음. - 리파아제 활성이 높지만, PCR product를 얻지 못한 균주(<i>Marinobacter lipolyticus</i> 27-A9, <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> 31-A1, <i>Brevundimonas nasdae</i> 33-B6)를 대상으로 shotgun cloning을 수행함. <i>Marinobacter lipolyticus</i> 27-A9균주의 DNA library로부터 리파아제 활성을 보이는 클론을 발굴하고 DNA sequencing을 수행하여 리파아제 유전자를 찾음. - 발굴한 리파아제 유전자를 pET22 벡터에 삽입하고 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)균에 형질전환한 후, IPTG induction을 통해 효소발현을 수행하였음. - 재조합 <i>E. coli</i> 균이 TCN plate에서 분해 활성을 보였으며, pNPC assay를 통해 활성을 측정한 결과, cell-free extract의 효소활성이 923 U/mL로 측정됨. - 상업용 리파아제를 이용해서 FAVE 합성 반응조건을 잡고자 실험하였음. vanillyl alcohol과 fish oil을 사용하였음. 기질의 물비, 용매조건, 효소량, 반응시간을 조사하였으며, 생산된 FAVE를 이용해서 항산화활성, 항세균 활성을 확인하였음.					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	리파아제, 극지 미생물, 저온성 효소, PCR 클로닝, Shotgun 클로닝			
	영 어	lipase, polar microorganism, psychrophilic enzyme, PCR cloning, Shotgun cloning			

요 약 문

I. 제 목

극지미생물로부터 기능성 지질 소재 합성을 위한 리파아제 효소 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

극지 유래의 미생물로부터 신규 특수기능 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제를 대량으로 생산하는 것이 목적임. 개발된 리파아제는 항산화 활성과 항세균 활성을 지닌 페놀릭 리피드를 효소 합성하는 데에 사용하고자 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

극지연구소로부터 분양받은 극지미생물을 대상으로 다양한 방법으로 리파아제 활성을 측정하고 활성이 높은 균주를 선발함. DNA 서열정보가 보고된 리파아제 유전자를 PCR cloning하여 *E. coli* 세포에서 발현함. DNA 서열정보가 보고된 않은 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 발굴하고 *E. coli* 세포에서 발현함. 발현된 재조합 리파아제의 활성을 조사함.

IV. 연구개발결과

극지연구소가 분리하여 보관하고 있는 리파아제 생산균 46균주를 분양받았음. Tributyrin agar plate에서 배양하면서 콜로니 주변에 halo를 크게 형성하는 24개 균을 선발하고 이 균들을 20°C에서 48시간 동안 Marine broth 배지에서 액체 배양함. 배양액과 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay와 olive oil/pH stat assay를 수행하여 *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Brevundimonas*, *Croceibacter*균들이 olive oil/pH stat assay에서 높은 활성을 갖고 있음을 확인함.

리파아제 활성이 높은 균주들에 대해서 리파아제 유전자 정보를 조사하였고 *Marinobacter lipolyticus* SM19, *Pseudoalteromonas atlantica* ACTC BAA-1087, *Brevundimonas nasdae*, *Croceibacter atlanticus* KCTC12090 균으로부터 리파아제 유전자가 보고되었음을 확인함. 이 균들에 대해서 PCR클로닝을 수행함. PCR 반응을 수행한 결과, *C. atlanticus*_11223 probable lipase, *M. lipolyticus*_02075 acylglycerol lipase, *M. lipolyticus*_15672 triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus*_LipBL lipolytic enzyme 등 4개의 PCR product를 얻게 되었다. PCR product 4가지에 대해서 T벡터 클로닝과 pET22벡터 클로닝에 성공하였다. 각각 417, 318, 324, 318개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 서로간의 homology가 전혀 없는 것으로 밝혀졌다.

재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환하고 IPTG induction

실험을 진행하였다. 미생물 배양(20°C, 20시간) 이 끝난 후에 균체를 sonication 방법으로 파쇄하고 SDS-PAGE를 통해서 단백질 발현을 분석하였다. 3가지 유전자 발현 실험에서 예상된 단백질 밴드를 확인할 수 없었으며, 1가지 (*M. lipolyticus*_02075의 acylglycerol lipase) 유전자 발현에서 예상된 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. Cell pellet과 cell-free extract를 대상으로 lipase assay를 수행 결과, TBN plate에서 halo를 형성하지 않았고 pNPC assay에서도 pellet과 CFE 모두에서 낮은 효소활성을 보였다.

PCR product를 얻지 못한 균주 (*Marinobacter lipolyticus* 27-A9, *Pseudoalteromonas atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6) 를 대상으로 shotgun cloning을 수행하였다. 추출된 DNA를 pUC19 vector에 삽입한 후, 이를 *E. coli* XL1-Blue에 도입하였다. clone library 중 콜로니 주변에 halo를 형성하는 것을 선별하여 재조합 플라스미드를 분리하고 DNA 염기서열을 분석한 결과, LipBL 유전자를 포함한 염기서열이 확인되었다. LipBL은 본 과제에서 앞서 PCR cloning을 수행하였던 LipBL과 아미노산 서열이 99% 유사한 리파아제로, 2개의 아미노산 서열의 차이가 존재하였다. 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay를 수행한 결과, 7.6 U/mL의 활성을 나타냈다. shotgun cloning으로 발견한 LipBL을 대장균에서 대량 발현하기 위해 pET22백터 클로닝을 수행고 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하였고, LipBL의 대량 발현을 위해 상기 형질전환주 배양시 IPTG를 첨가하여 대량 발현을 유도하였다. 균체 추출액의 pNPC 활성 확인 결과, 활성이 923 U/mL로 확인됨.

상업용 리파아제를 이용해서 FAVE 합성 반응조건을 잡고자 실험하였다. 기질로서 vanillyl alcohol과 fish oil (Menhaden oil)을 사용하였고 CalB 리파아제를 효소로 사용하였다. 기질의 몰비, 용매조건, 효소량, 반응시간을 조사하였다. 생산된 FAVE를 사용해서 항산화활성, 항세균 활성을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

극지 미생물 유래의 리파아제를 대량으로 생산한 후에 리파아제를 생물전환 반응의 효소촉매로 활용하고자 함. 항산화활성, 항세균활성이 있어서 식품산업과 화장품 산업의 소재로 쓰이는 페놀릭 리피드를 비수계 반응으로 합성하는데 사용하고자 계획함.

S U M M A R Y

I. Title

Screening of lipases from polar microorganisms for the synthesis of functional lipid

II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this research is to screen new functional lipases from polar microorganisms and to produce the recombinant lipases. The lipases can be applied to produce some phenolic lipids with antioxidant and antibacterial activities.

III. Contents and Extent of R&D

In this research, we measured lipase activities towards the polar microorganisms received from Korea Polar Research Institute (KOPRI). PCR cloning was performed to produce some known lipase enzymes and shotgun cloning was performed to clone some unknown lipase genes. The recombinant lipases genes were expressed in *E. coli* cells and their lipase activities were measured.

IV. R&D Results

We received 46 polar microorganisms from KOPRI and tested their lipase activities using tributyrin agar plate. Among them, 24 strains formed halo zones around colonies. The lipolytic strains were cultivated in marine broth and culture broth and cell-free extract were tested about lipase activity using pNPC assay and olive oil/pH stat assay. *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Brevundimonas*, *Croceibacter* strains showed high lipase activities.

We tried PCR cloning towards *Marinobacter lipolyticus* SM19, *Pseudoalteromonas atlantica* ACTC BAA-1087, *Brevundimonas nasdae*, *Croceibacter atlanticus* KCTC12090 based on lipase gene sequences. We got 4 PCR products from *C. atlanticus*_11223 probable lipase, *M.*

lipolyticus_02075 acylglycerol lipase, *M. lipolyticus_15672* triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus_LipBL* lipolytic enzyme. PCR products were cloned into pET22 vectors and the resulting recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3). After IPTG induction, cellular proteins were analyzed using SDS-PAGE. Lipase bands were not detected and very low lipase activities were detected in cell-free extracts.

Shotgun cloning were performed towards *Marinobacter lipolyticus* 27-A9, *Pseudoalteromonas atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6. DNA library were inserted into pUC19 vectors and transformed into *E. coli* XL1-Blue. Halo-forming *E. coli* cells were detected and recombinant plasmids were analyzed. We found LipBL gene in the insert DNA and cloned it into pET22 vectors. *E. coli* cells harboring the LipBL gene showed halo on TCN plate and cell-free extract showed lipase activity of 923 U/ml.

We used CalB lipase to optimize the reaction condition for the production of FAVE. Molar ratio, organic medium, enzyme amount, reaction time were optimized. antioxidant activity and anti-bacterial activity were characterized using FAVE.

V. Application Plans of R&D Results

Functional lipases found and characterized from polar microorganisms were produced in recombinant form and used as catalysts in various biotransformation reactions. In particular, lipases can be used to produce phenolic lipids useful in food and cosmetic industries.

목 차

제 1 장 서론 -----	8
1절. 연구의 목적 -----	8
2절. 연구의 필요성 및 범위 -----	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	11
1절. 국내 기술개발 동향 -----	11
2절. 국외 기술개발 동향 -----	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	15
1절. 저온성 리파아제의 발굴 -----	15
2절. Shotgun cloning 실험 -----	23
3절. 상업용 리파아제를 이용한 FAVE 합성 -----	26
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 -----	27
1절. 성과목표 달성도 -----	27
2절 세부목표 달성 내용 -----	27
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	29
1절 학술적 활용계획 -----	29
2절 경제적 활용계획 -----	29
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	31
제 7 장 참고문헌 -----	31

제 1 장 서론

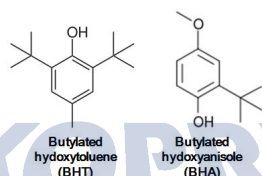
1절. 연구의 목적

극지 유래의 미생물로부터 신규 특수기능 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제를 대량으로 생산한다. 즉, 극지연구소로부터 분양받은 저온성 미생물로부터 특수기능 저온성 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제의 클로닝 및 활성 효소의 대량 생산을 수행하고 리파아제의 활성측정과 기능성 지질 합성을 위한 반응특성을 규명함

2절. 연구의 필요성 및 범위

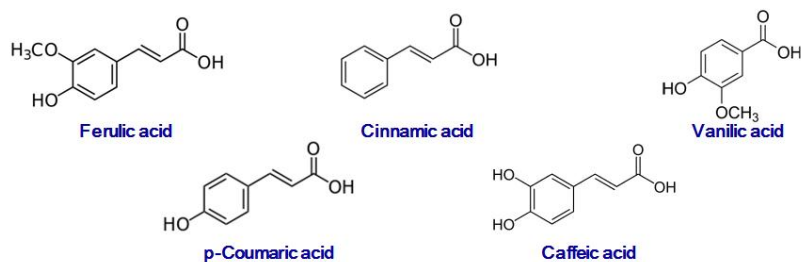
1. 리파아제를 이용한 페놀릭 에스테르 항산화제 개발 필요성

가. 항산화제는 일찍이 여러 산업분야에서 생산품의 산화를 방지하는 목적으로 사용되어왔는데 가장 널리 사용되었던 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)이다.



나. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 소수성을 띠는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 산업에서 생산되는 지질이 포함된 식품가공품에 첨가되어 지질의 산화를 방지하는데 널리 사용되었다. 하지만 BHT와 BHA가 온도의 상승에 따른 휘발성과 불안정성이 높다는 점, 암을 일으킬 수 있는 잠재성이 실험적으로 밝혀지게 되면서 이들의 사용은 꾸준히 감소하고 있는 추세이다.

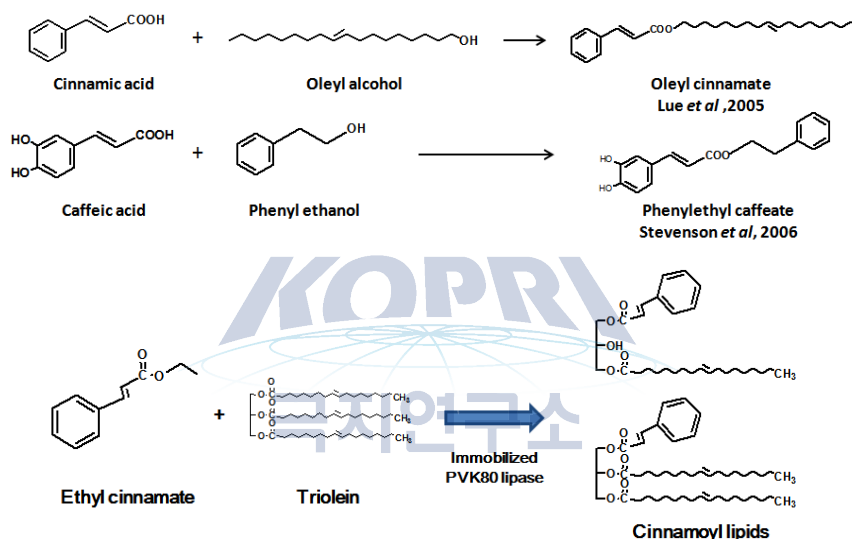
다. 최근 들어 천연항산화제로서 phenolic acid가 사람들의 주목을 받고 있다. Phenolic acid는 페놀기와 카르복실기를 동시에 갖는 구조를 가지며 페놀이 포함된 링 구조의 차이나 링 구조에 포함된 hydroxyl group의 개수에 따라서 여러 가지로 분류된다.



라. phenolic acid는 딸기, 밀, 계피 등 거의 대부분의 식물에서 발견되기

때문에 소비자로 하여금 친환경적인 이미지를 갖게 할 수 있다. 항산화 활성뿐만 아니라 항균 활성, 염증 억제 등 다양한 생리활성을 갖고 있다고 보고되었다.

마. Phenolic acid는 친수성을 갖고 있기 때문에 소수성이 높은 오일 또는 에멀션에서 그들의 항산화 활성이 낮아지게 된다. 또한 phenolic acid를 세포에 처리할 경우 친수성으로 인하여 세포막을 투과하는 효율성이 감소하게 되어 마찬가지로 항산화 활성이 감소한다. phenolic acid의 소수성을 증가시키는 방법으로 phenolic acid가 갖는 카르복실기를 다른 소수성을 띠는 알코올과의 esterification 반응을 통하여 치환시키거나 triglyceride와의 transesterification 반응을 통하여 기능성 지질을 합성하는 방법이 알려져 있다.



바. PUFA-phenol ester의 경우에는 항산화작용뿐만 아니라 PUFA에 의한 항균작용, 생리활성작용이 함께 나타낼 수 있다. 이것을 합성하기 위해서는 PUFA가 산화되는 것을 막기 위해서 저온에서 효소반응을 진행할 필요성이 있기 때문에 극지에서 분리한 저온 리파제를 사용하는 것이 효과적이다.

2. 저온성 리파아제의 탐색 및 효소전환 반응

가. 극지 연구소가 보유하고 있는 저온성 미생물을 대상으로 리파아제 생산 여부를 확인한다. 다량의 균을 대상으로 1차 스크리닝을 수행하기 위해서 TBN/TCN plate assay를 수행하고 선발된 균을 대상으로 2차 스크리닝을 수행한다. 배양액에 대해서 pNPC/pH stat assay를 수행하여 리파아제 활성을 정량적으로 분석한다.

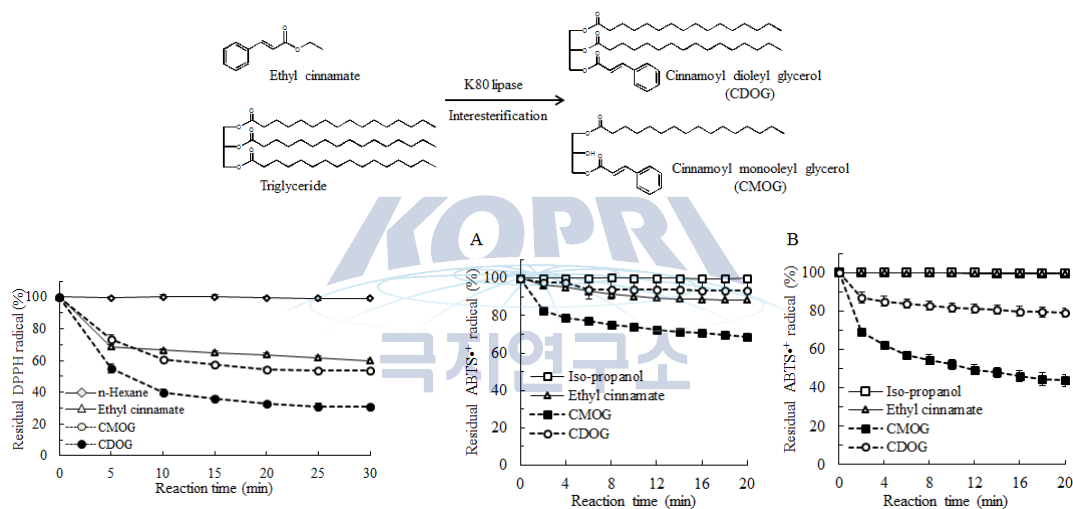
나. 기존에 보고된 리파아제 효소와의 중복성을 피하기 위해서 16S rRNA 분석을 통해 미생물 동정을 신속하게 수행한다. 또한, 균체 단백질에 대해 SDS-PAGE를

- 수행함으로써 분리군 간의 중복성을 피하고자 한다.
- 다. 리파아제 유전자를 확보하기 위해서 3가지 전략을 수행하고자 한다. 우선, 미생물 유전체 정보로부터 리파아제 유전자의 염기서열이 확인되는 경우에는 5' 및 3' 염기서열에 대해 primer를 제조하여 PCR 반응을 수행한다. 유전자 서열을 확인하지 못하는 경우에는 기존에 보고된 consensus 서열을 이용해서 primer를 제조하고 PCR을 수행한 후에 genome walking을 수행한다. 앞의 방법이 실패하는 경우에는 Shotgun cloning을 통해서 유전자를 확보하고자 한다.
 - 라. 확보한 유전자로부터 리파아제 효소를 대량으로 생산하기 위해서 유전자를 발현벡터에 삽입하고 대장균에서 생산할 계획이다. Inclusion body형태로 생산되는 것을 배제하고 활성형태로 생산되는 것을 선별해서 실험을 수행하고자 한다. 효소의 반응 특성을 규명하기 위해서 Ni-NTA 컬럼을 이용해서 효소를 분리할 계획이다.
 - 마. 리파아제 효소를 촉매로 이용하기 위해서는 온도, pH에 대한 특성을 파악해야 하기 때문에 최적반응 조건을 조사하고자 한다. 또한, 지방산 길이에 대한 분해 활성을 조사함으로써 기질특이성을 조사하고자 한다.
 - 바. 실제로 효소를 비수계에서 촉매로 사용하기 위해서는 동결건조하거나 bead에 고정화해야 한다. 동결건조의 경우에는 효소반응 시, 쉽게 현탁되지 않는 문제가 있기 때문에 bead 고정화법을 사용할 계획이다.
 - 사. 고정화 효소를 이용해서 기능성지질을 합성하기 위해서 먼저 각종 페놀릭 알코올과 지방산 또는 지방을 대상으로 transesterification 반응을 수행한다. 타깃 기질이 정해지면 기질 농도, 기질의 몰비, 용매, 효소양 등의 반응조건을 최적화한다.
 - 아. 효소반응을 통해서 생산된 페놀릭 에스테르를 Prep-HPLC로 분리하고 구조를 확인한다. 분리된 페놀릭 에스테르를 이용해서 항산화효과, 항균효과, anti-amyloidosis 활성을 조사한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술개발 동향

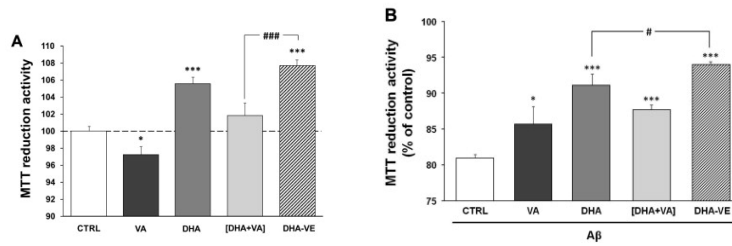
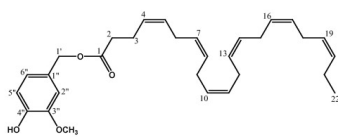
1. 인하대학교 구윤모 교수팀은 Ionic liquid ([Emim][Tf(2)N])에서 리파제를 이용하여 CAPE를 합성함. 즉, reaction time (36-60 h), reaction temperature (65-75 °C), substrate molar ratio of phenethyl alcohol to CA (20:1-40:1), and weight ratio of enzyme to CA (10:1-20:1) 등 반응조건을 최적화함. Bioprocess Biosyst Eng. (2013) 36: 799-807.
2. 가톨릭대 연구팀은 리파제를 이용한 interesterification 반응을 통해 cinnamic acid ester를 합성하였고 DPPH, ABTS 방법을 통해 비극성 용매에서 항산화활성이 크게 증가함을 밝혔다. J. Molecul. Catal. B: Enzym (2016)



2절. 국외 기술개발 동향

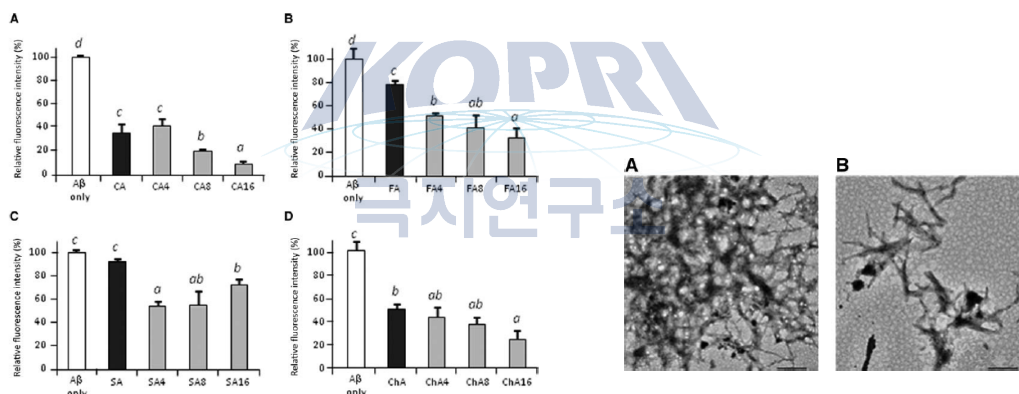
1. 리파아제를 이용한 DHA-vanillyl ester 합성 연구

가. DHA는 여러 가지 생리활성을 갖는 중요한 물질이지만 보관 과정에서 쉽게 산화되는 등 안정성이 떨어짐. 리파아제를 이용해서 DHA-vanillyl ester를 생산함으로써 항산화활성을 증가시킴. 실험용 쥐에 DHA-VE를 먹이로 주면 적혈구와 뇌 조직에서 DHA 함량이 증가됨을 확인하였고, in vitro 실험에서 DHA-VE에 의해서 Aβ를 처리한 rat primary neuron의 생존이 증가됨을 밝혔음. Food Chem. (2015) 171:397-404.



나. DHA-VE를 DHA-EE와 vanillyl alcohol를 사용해서 합성한 후, 장기간 보관하면서 산화되는 정도를 측정해서 비교함. 즉, conjugated diene 및 FTIR 측정을 통해 확인한 결과, DHA-VE가 DHA-EE 보다 산화에 대해 훨씬 안정함을 밝혔음. Food Chem. (2015) 169:41-48.

다. Caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, chlorogenic acid 에 butanol, octanol, or hexadecanol를 붙인 후, Aβ의 섬유화 저해 효과를 측정함 (anti-amyloid activity). 그 결과, caffeic acid에 hexadecanol를 붙였을 때에 anti-amyloid 효과가 가장 큰 것으로 밝혀짐. Biotechnol Appl Biochem. (2013) Nov 22. doi: 10.1002/bab.1182



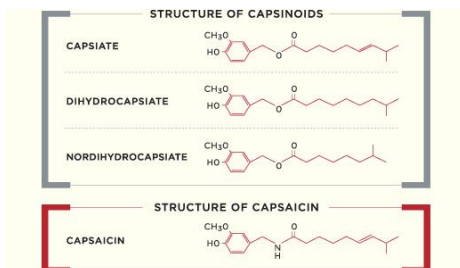
라. 연어에서 추출한 PUFA와 rutin, vanillyl alcohol를 이용해서 페놀리피드를 생산한 후, 항산화 활성을 측정함. BHT, α-토코페롤을 비교물질로 사용했으며, DPPH, thiobarbituric acid assay를 수행함. 소수성 용매, bulk oil 시스템, 에멀전시스템에서 측정한 결과, 페놀기에 의해서 PUFA의 산화가 느려지고 PUFA에 의해서 페놀기의 소수성 용매 용해도가 증가됨을 밝혔음. J Agric Food Chem. (2011) 59: 7021-7027.

2. 리파제를 이용한 Capsiate 합성 연구

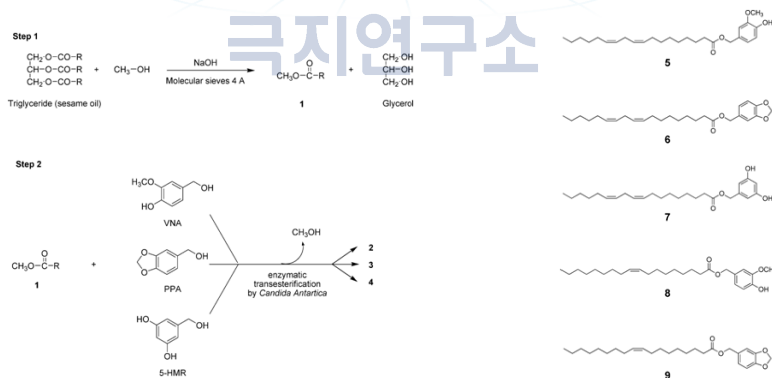
가. 10종의 capsiate를 합성하고 DPPH (polar medium), Rancimat (nonpolar medium), linoleic acid autoxidation (micellar medium) 활성을 측정함. BHT 및 α-tocopherol를 대조군으로 사용했으며 Tween 20 micelle-linoleic acid 시스템에서 vanillyl stearate, oleate, ricinoleate 가 가장 좋은 항산화 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food

Chem. (2011) 59: 564-569.

나. Capsiate는 항산화활성, 혈관형성 억제, 혈관투과 억제 효과를 보이기 때문에 약물 또는 식품첨가제로 사용됨. Capsaicinoid를 capsinoid로 전환하는 연구를 수행함. 즉, vanillyl alcohol과 nonanoic acid로 capsiate합성하는 방법과 capsaicin과 vanillyl alcohol를 사용해서 capsiate 합성하는 방법을 개발함. World J Microbiol Biotechnol. (2010) 26: 1337-1340.



다. 항산화능이 향상된 참기름 에스테르를 합성하는 연구를 수행함. 즉, vanillyl linoleate가 항산화 능력이 가장 좋으며, 스프레이형 에멀전을 만들어서 사용한 결과, UV 조사한 fibroblast를 보호하는 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food Chem. (2009) 57: 7311-7323.

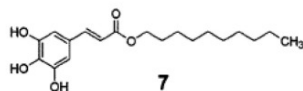


라. Vanillyl alcohol과 methyl nonanoate로부터 capsinoid (vanillyl nonanoate) 합성함으로써 capsiate and dihydrocapsiate를 대량 생산하는 연구 수행함. Biosci Biotechnol Biochem. (2002) 66: 319-327.

3. 리파제를 이용한 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) 합성 연구

가. 비만은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 암과 밀접하게 연관된 질병임. CAPE는 여러 가지 식물과 프로폴리스에서 발견되는 물질인데, 항염증, 면역조절, 세포면역, 비만세포로의 분화 억제 효능이 있음. CAPE 유도체를 합성하고 췌장 리파제, 지

질 흡수, 3T3-L1세포의 비만세포로의 분화에 대한 영향을 조사함 Bioorg Med Chem. (2015) 23: 3788-3795.

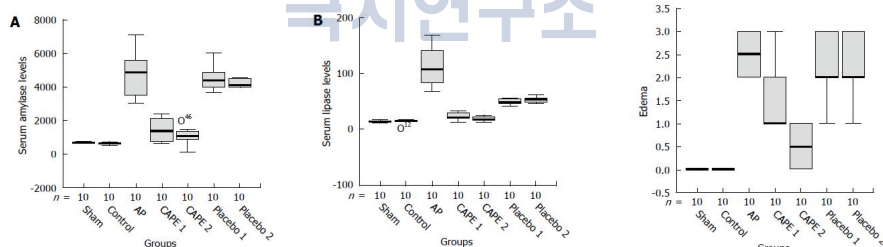


나. Vancomycin에 의해 유도된 췌장 손상을 CAPE가 방지하는 것을 밝힘. 즉, 췌장의 Serum alkaline phosphatase (ALP), amylase, γ -glutamyl transferase (GGT), lipase 활성을 측정한 결과, CAPE가 췌장 손상을 방지하는 것을 밝힘. Toxicol Ind Health. (2016) 32: 306-312.

다. CAPE는 급성췌장염을 치료하는 것으로 밝혀짐. 즉, amylase, lipase 양이 줄고 조직병리학적으로 췌장의 부종과 염증이 줄어듦. World J Gastroenterol. (2009) 15: 5181-5185.

Table 2 Biochemical, values and pathological scores in cerulein-induced AP (mean $\pm$ SD)

Groups	TNF- α (pg/mL)	Amylase (U/L)	Lipase (U/L)	White blood cells	Edema	Leukocytic infiltration	Total pathological score	Fat necrosis
Sham	65.14 $\pm$ 1.7	665.14 $\pm$ 54	14.41 $\pm$ 1.7	9279 $\pm$ 1867	0.00	0.00	0.00	0.00
Control	63.29 $\pm$ 3.8	630.20 $\pm$ 64	14.92 $\pm$ 1.7	8755 $\pm$ 1098	0.00	0.00	0.00	0.00
AP	63.83 $\pm$ 3.8	4752 $\pm$ 1328 ^b	112.3 $\pm$ 34.8 ^b	8574 $\pm$ 1437	2.50 $\pm$ 0.5	2.50 $\pm$ 0.42	8.00	0.30 $\pm$ 0.48
CAPE 1	61.55 $\pm$ 8.0	1400 $\pm$ 680 ^d	22.92 $\pm$ 6.9 ^d	8407 $\pm$ 418	1.50 $\pm$ 0.7	2.50 $\pm$ 0.52	4.00 ^e	0.00
CAPE 2	60.52 $\pm$ 6.5	1084 $\pm$ 533 ^d	18.65 $\pm$ 3.7 ^d	8940 $\pm$ 2746	0.50 $\pm$ 0.5 ^d	2.40 $\pm$ 0.51	3.00 ^e	0.00
Placebo 1	62.38 $\pm$ 9.5	4516 $\pm$ 749	49.2 $\pm$ 5.3	9267 $\pm$ 927	2.30 $\pm$ 0.6	2.70 $\pm$ 0.48	8.00	0.30 $\pm$ 0.48
Placebo 2	61.56 $\pm$ 2.5	4219 $\pm$ 235	52.54 $\pm$ 4.8	8544 $\pm$ 895	2.20 $\pm$ 0.6	2.70 $\pm$ 0.48	8.00	0.30 $\pm$ 0.48



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 저온성 리파아제의 발굴

본 과제에서는 저온성 신규 리파아제를 선별하기 위해서 극지연구소가 분리하여 보관하고 있는 리파아제 생산균 46균주를 분양받았다. 분양받은 균주의 번호, 분리장소의 위도, 경도, 균주 동정 결과를 정리하면 다음과 같다. 분양받은 균주는 *Acinetobacter*, *Alcalnivoras*, *Brevundimonas*, *Croceibacter*, *Erythrobacter*, *Hyphomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Salinimicrobium*, *Sulfitobacter* 등 다양한 세균으로 구성되어 있음을 확인하였다.

<극지연구소로부터 분양 받은 균주 목록>

Stock No.	Latitude	Longitude	Depth	Identification	Stock No.	Latitude	Longitude	Depths	Identification
#69-A9	69,49.325 4'S	170,20.216 9'E	2734	<i>Acinetobacter oryzae</i>	#27-D6	74,02.254 8'S	170,01.961 9'E	0	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
#32-B4	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	120	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#27-A9	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	20	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#10-B4	75,00.003 3'S	165,59.993 0'E	100	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#28-C8	74,28.915 5'S	168,05.364 1'E	10	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#30-E4	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	100	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#41-F2	60,12.369 0'S	161,21.217 8'E	250	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#53-D12	74,37.532 0'S	178,30.002 2'E	200	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#29-B9	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	100	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#30-A2	73,30.049 0'S	174,00.173 2'E	120	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#31-A11	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	100	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#15-A3	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	0	<i>Alcanivorax jadensis</i>	#33-H5	74,37.532 0'S	178,30.002 2'E	60	<i>Marinobacter maritimus</i>
#31-F4	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	100	<i>Alteromonas stellipolaris</i>	#32-F6	74,02.254 8'S	170,01.961 9'E	75	<i>Marinobacter salarius</i>
#33-B6	75,49.223 6'S	165,41.131 7'E	300	<i>Brevundimonas nasdae</i>	#15-A1	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	0	<i>Marinobacter salarius</i>
#40-F12	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	320	<i>Croceibacter atlanticus</i>	#63-H12	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	20	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#34-D1	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	200	<i>Croceibacter atlanticus</i>	#31-A1	75,01.238 6'S	179,54.111 2'W	75	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
#40-G5	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	200	<i>Erythrobacter citreus</i>	#60-A6	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	964	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
#15-B9	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	20	<i>Erythrobacter flavus</i>	#31-H6	76,00.878 0'S	164,59.494 0'E	870	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>
#39-F2	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	544	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	#73-C7	71,32.433 5'S	170,15.738 5'E	93	<i>Psychrobacter nivimaris</i>
#37-E7	72,39.361 5'S	170,11.799 3'E	70	<i>Hyphomonas atlantica</i>	#17-F1	75,00.003 3'S	165,59.993 0'E	150	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#27-A7	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	50	<i>Marinobacter algicola</i>	#15-B7	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	70	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#29-G5	74,15.002 0'S	177,00.014 1'W	150	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-F8	75,49.223 6'S	165,41.131 7'E	0	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#32-D9	73,08.262 4'S	172,36.427 9'E	477	<i>Marinobacter algicola</i>	#5-D9	71,19.247 4'S	178,19.385 2'E	100	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#2-E12	73,14.487 0'S	169,28.401 5'E	644	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-E6	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	75	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#27-G3	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	210	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-H6	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	150	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#32-H2	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	400	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#17-E4	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	400	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>
#30-G8	75,01.238 6'S	179,54.111 2'W	20	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#39-D12	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	150	<i>Salinimicrobium marinum</i>
#53-F8	74,15.002 0'S	177,00.014 1'W	30	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#32-F7	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	320	<i>Sulfitobacter porphyrae</i>

분양받은 균으로부터 리파아제 유전자를 클로닝하기 위해서 다음과 같이 실험을 진행하였다. 분리균의 리파아제 활성을 3가지 방법으로 측정하였다. 1차로 Tributyrin agar plate에서 배양하면서 halo 형성능을 조사하였다. 콜로니 주변에 halo를 크게 형성하는 24개 균을 선발하고 이 균들을 20°C에서 48시간 동안 Marine broth 배지에서 액체 배양하였다. 배양액과 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay와 olive oil/pH stat assay를 수행하였다. pNPC assay 결과로부터, *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* 균들이 높은 활성을 보이는 것으로 판명되었다. 특히, *Alteromonas* 균이 매우 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 하지만, olive oil/pH stat assay에서 활성이 거의 나타나지 않음을 통해서 lipase가 아닌 esterase 활성임을 알게 되었다. 반면에 *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* 균들과 *Psychrobacter*, *Brevundimonas*, *Croceibacter* 균들이 olive oil/pH stat assay에서 높은 활성을 보였고 이를 통해서 lipase 생산균임을 최종적으로 확인하였다.



<극지 미생물의 리파아제 활성 측정 결과>

Strain No.	Strain name	Lipase activity					Lipase gene reported
		TBN plate (halo size)	pNPC (U/ml)		pH STAT (U/ml)		
			Sup.	CFE	Sup.	CFE	
33-H5	<i>Marinobacter maritimus</i>	(++)	0.048	0.186	0.000	3.300	No
27-A9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.006	0.930	0.000	3.225	Yes (LipBL)
73-C7	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	(++++)	0.097	0.063	0.000	3.222	No
28-C8	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.020	1.044	0.000	3.220	Yes (LipBL)
31-A11	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	1.094	0.000	3.185	Yes (LipBL)
31-A1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(+++)	0.023	1.067	0.000	3.180	Yes
39-D12	<i>Salinimicrobium marinum</i>	(+++)	0.000	0.489	0.000	1.935	No
33-B6	<i>Brevundimonas nasdae</i>	(++++)	0.013	0.161	0.000	1.675	Yes
34-D1	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(+++)	0.015	0.275	0.000	0.829	Probable
63-H12	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.048	0.036	0.000	0.075	Yes (LipBL)
31-F4	<i>Alteromonas stellipolaris</i>	(++++)	0.436	15.541	0.000	0.045	Yes
40-F12	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(++++)	0.013	0.139	0.000	0.030	Probable
37-E7	<i>Hyphomonas atlantica</i>	(++)	0.000	0.300	0.000	0.030	Yes
53-F8	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(++)	0.006	0.016	0.000	0.015	Not yet
41-F2	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	0.862	0.000	0.005	Yes (LipBL)
17-E4	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	(++++)	0.005	0.019	0.000	0.005	No
15-B7	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(++++)	0.003	0.145	0.000	0.005	No
69-A9	<i>Acinetobacter oryzae</i>	(++++)	0.035	0.108	0.000	0.000	Not yet
29-B9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++++)	0.019	0.978	0.000	0.000	Yes (LipBL)
32-H2	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(++)	0.013	0.003	0.000	0.000	Not yet
40-G5	<i>Erythrobacter citreus</i>	(++++)	0.010	0.214	0.000	0.000	Yes
17-F1	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(++++)	0.006	0.072	0.000	0.000	No
39-F2	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	(++++)	0.000	0.499	0.000	0.000	Not yet
10-B4	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(++++)	0.000	0.070	0.000	0.000	Yes
30-E4	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(+)					
53-D12	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(+)					
2-E12	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
27-A7	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
27-G3	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
29-G5	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
32-D9	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
30-G8	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(+)					Not yet
27-D6	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	(+)					Yes
15-A1	<i>Marinobactersalarius</i>	(+)					
32-F6	<i>Marinobactersalarius</i>	(+)					
31-H6	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	(+)					Yes
5-D9	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-E6	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-F8	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-H6	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
60-A6	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(-)					Yes
32-F7	<i>Sulfitobacter porphyrae</i>	(-)					No

리파아제 활성이 높은 균주들에 대해서 정보분석을 통해 리파아제 유전자 정보를 조사하였다. *Marinobacter lipolyticus* SM19, *Pseudoalteromonas atlantica* ACTC BAA-1087, *Brevundimonas nasdae*, *Croceibacter atlanticus* KCTC12090 균으로부터 리파아제 유전자가 보고되었음을 확인했다. 반면에 *Marinobacter maritimus*, *Psychrobacter nivimaris*, *Salinimicrobium marinum* 균에 대해서는 리파아제 유전자가 보고되지 않았다. 본 과제에서는 유전자가 보고된 4가지 균에 대해서 우선적으

로 PCR클로닝을 수행하기로 결정하였다.

<리파아제 유전자 정보 분석>

Strain name	lipase name	gene ID
<i>Marinobacter maritimus</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	Triacylglycerol lipase	MARLIPOL_15672
	Lipolytic enzyme	lipBL
	GDSL family lipase	MARLIPOL_15869
	Acylglycerol lipase	MARLIPOL_02075
	Lipase/esterase	MARLIPOL_10801
<i>Psychrobacter nivimaris</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> ACTC BAA-1087	Lipase, class 2	Patl_1057
	Lipase, class 3	Patl_1267
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_0828
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_0498
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_3780
	Lipase, putative	Patl_2975
	Putative lipase/esterase	Patl_2922
	Carboxylic ester hydrolase	Patl_0510
	Carboxylic ester hydrolase	Patl_0874
<i>Salinimicrobium marinum</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Brevundimonas nasdae</i>	Lipase	RM53_06800
	GDSL family lipase	RM53_06435
	GDSL family lipolytic protein	RM53_16195
	Carboxylic ester hydrolase	RM53_12490
	Carboxylic ester hydrolase	RM53_14900
<i>Croceibacter atlanticus</i> KCTC12090	Probable lipase	CA2559_11223

극지연구소로부터 분양받은 균 중에서 리파아제 활성이 높고 리파아제 유전자 염기서열이 보고된 균이 총 6개 인데 분리균 3개가 모두 *Marinobacter lipolyticus*에 속하는 것으로 판명되었다. 본 과제에서는 총 4종의 균에 대해 리파아제 유전자 클로닝 실험을 수행하기로 결정하였다.

<분양받은 미생물 중에서 리파아제 활성이 확인되고 유전자가 보고된 균주>

Strain No.	Strain name	Lipase activity					<i>lipase gene Reported</i>
		TBN plate (Halo size)	pNPC		pH STAT		
			Sup.	CFE	Sup.	CFE	
27-A9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.006	0.930	0.000	3.225	Yes
28-C8	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.020	1.044	0.000	3.220	Yes
31-A11	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	1.094	0.000	3.185	Yes
31-A1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(+++)	0.023	1.067	0.000	3.180	Yes
33-B6	<i>Brevundimonas nasdae</i>	(++++)	0.013	0.161	0.000	1.675	Yes
34-D1	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(+++)	0.015	0.275	0.000	0.829	<i>Probable</i>

리파아제 유전자를 클로닝하기 위해서 보고된 유전자의 염기서열을 근거로 다음과 같이 클로닝 primer를 디자인하였다. 발현벡터로써 pET22를 사용할 계획이기 때문에 5'말단에 NdeI/NcoI 제한효소를 넣었고 유전자의 염기서열에 따라서 3'말단에

HindIII/BamHI 제한효소를 삽입하였다. 이후 PCR 반응을 수행한 결과, *C. atlanticus*_11223 probable lipase, *M. lipolyticus*_02075 acylglycerol lipase, *M. lipolyticus*_15672 triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus*_LipBL lipolytic enzyme 등 4개의 PCR product를 얻게 되었다. 이후에 리파아제 효소의 대량 발현을 위해서 T벡터 클로닝과 pET22벡터 클로닝을 수행하였다.

<PCR 클로닝을 위한 Primer>

Lipase gene name	Lipase info.	Restriction enzymes	Forward and reverse primers
<i>Brevundimonas nasdae</i> _06435	GDSL family lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTCACGCTTCATCACC-3' 5'-GATAAGCTTAAGCGGCAGTTTCAG-3'
<i>Brevundimonas nasdae</i> _06800	Lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTCCATTATAGACAAG-3' 5'-GATAAGCTTGATCGGCAGGATCGC-3'
<i>Brevundimonas nasdae</i> _12490	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGATCACGCGACGTAAG-3' 5'-GATAAGCTTGGTTCCCGGCTGGAT-3'
<i>Brevundimonas nasdae</i> _14900	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGACAATCGCCGCGCTT-3' 5'-GATAAGCTTGGGCCTCGGCCGCTC-3'
<i>Brevundimonas nasdae</i> _16195	GDSL family lipolytic protein	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGGACGCTGAGCAGGTC-3' 5'-GATGGATCCAACGGCGTCCGACGGGC-3'
<i>Croceibacter atlanticus</i> _11223	Probable lipase	<i>NcoI/BamHI</i>	5'-GATCCATGGAAAATGACCATTATAAAATCTATA-3' 5'-GATGGATCCAAAAGATGCTCATTAATAAATAT-3'
<i>Marinobacter lipolyticus</i> _02075	Acylglycerol lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCTGGACCGGCTTGAA-3' 5'-GATAAGCTTGCAGGCCTCTGACAG-3'
<i>Marinobacter lipolyticus</i> _10801	Lipase/esterase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTCCATCCCATTCGCG-3' 5'-GATAAGCTTGGACCGCTGTCAGC-3'
<i>Marinobacter lipolyticus</i> _15672	Triacylglycerol lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGAAACAATGGCTCAAA-3' 5'-GATAAGCTTGAGTCCGCGCTTTT-3'
<i>Marinobacter lipolyticus</i> _15869	GDSL family lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCACCTGCCCTTCTGG-3' 5'-GATAAGCTTAATATGTCGACGTAGCGG-3'
<i>Marinobacter lipolyticus</i> _LipBL	Lipolytic enzyme	<i>NcoI/HindIII</i>	5'-GATCCATGGAAAATGAGGGAATCGAAACAG-3' 5'-GATAAGCTTCACCAACGCGCATT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _0498	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCTCTATCACCTTGCT-3' 5'-GATAAGCTTTGCATGTCGAATGAGTTT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _0510	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/EcoRI</i>	5'-GATCATATGCAATTCGCCTTAGTC-3' 5'-GATGAATTCAACTGGGGTGTGCTGCT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _0828	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGATTAATTCACACATG-3' 5'-GATGGATCCAATTCACGCCAACAAAAC-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _0874	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGAACCAAGTCTTATTAAC-3' 5'-GATGGATCCAAGAACGAATAGTTCTGCCA-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _1057	Lipase, class 2	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGAATATAATAAAAGATGT-3' 5'-GATGGATCCAATGAATTAGCTCGTATTG-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _1267	Lipase, class 3	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGAAAAACTCAACGCG-3' 5'-GATAAGCTTGTGCTTATCAAAAAGTC-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _2922	Putative lipase/esterase	<i>NcoI/HindIII</i>	5'-GATCCATGGAAATGAAATTTCTGTACAGC-3' 5'-GATAAGCTTTTCACTGACCCGTTG-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _2975	Lipase, putative	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCGTGAAAAATTAGAG-3' 5'-GATAAGCTTATGCTTAACATTCCTTT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> _3780	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGACTGATTCGGAAG-3' 5'-GATAAGCTTGCGCATTAACTGGC-3'

PCR product 4가지 (*M. lipolyticus*_15672 triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus*_LipBL lipolytic enzyme, *M. lipolyticus*_02075 acylglycerol lipase, *Croceibacter atlanticus*_11223 lipase)에 대해서 T벡터 클로닝과 pET22벡터 클로닝에 성공하였다. 각각 417, 318, 324, 318개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 서로간의 homology가 전혀 없는 것으

로 밝혀졌다.

LipBL (Marinobacter lipolyticus) (L)

1	ATGAGGGAATCGAAACAGGTCAACGGCTTTCATCAGGCCACCTTACTCACATTGAAGACCATCTTGACCGCGCTATATCCAGCGGGG	90
1	M R E S K Q V T G L S S G H L T H I E D H L D R R Y I Q P G	30
91	AAATTGCCCGGGGGCTGACTCTGGTGGCCGACGTGGGGAATTGCTATCTGAAAGCTCAGGGGCGATGGATGTGGAGCGCAACAAG	180
31	K L P G A L T L V A R R G E I A Y L K A Q G P M D V E R N K	60
181	CCGGTCTGCCGGGATACGGTGTTCGGCATTATTTCATGACCAAGCCTATTACGTCCATCGCCATGATGCAGCTCTATGAGCAGGGCGG	270
61	P V C R D T V F R I Y S M T K P I T S I A M M Q L Y E Q G R	90
271	TTTTTGTGGATGATCGGTACACAAGTACATTCCGGCTGGAAGAACCTGCGGGTTTACAACAGTGGTGTCTATCCAACTTCCTGACC	360
91	F L L D D P V H K Y I P A W K N L R V Y N S G V Y P N F L T	120
361	ACACCTGCAACAGCACCATGACCAATTCCGGACCTGTTACCCACATGTTCAGGCCATGACCTATGGGTTCATGAACCGCACCAACGTTGAC	450
121	T P A T S T M T I R D L F T H M S G L T Y G F M N R T N V D	150
451	GCCGCTATCGGGAGCTGAAGCTGGATGGCAGCGGAATCTGACACTGGAAGCGTGGTGGTTCATCTGGCGGAACCTGCGCTGAGATTTC	540
151	A A Y R E L K L D G S R N L T L E A L V G H L A E L P L E F	180
541	TCACCGGGTACCGCTGGAACCTATTCCGGTTCAGCAAGGATGTGCTGGGGTATCTGGTGCAGTTGCTGGCTGATCAGCGTTTGTAGATAT	630
181	S P G T A W N Y S V S T D V L G Y L V Q L L A D Q P F D E Y	210
631	CTGCGGAGCATATCTTTGAACCATGGCCATGTCCGACACCGGCTTCCATGTTCTGTCAGCATCAGCTCGACCGTTTCCCGCGCTGCTAT	720
211	L R E H I F E P L A M S D T G F H V R D D Q L D R F A A C Y	240
721	CAGTACGATCGGGTGCACAGTTCAAGCTGACGAGCATCCGAGACCTCCCTTTCCGGGACAAAAGGAGGTTTCTGTCTGGTGGCGGC	810
241	Q Y D P V D Q F K L Q D D P Q T S P F R D K R R F L S G G G	270
811	GGGTGGTTTCCACCATGACGATTATTTCCACTTTGCCAGGCACTCTGTGAGGTGGCGAGTTTGGCGGGCGGCGATTATGGCCGA	900
271	G L V S T I D D Y F H F A Q A L C Q G G E F G G R R I I G R	300
901	AAGACTCTGGAATTCATCGCTGCAATCATCTACCGGCAATCAGGACCTGCCTGGCCTTTCCGTCGGTCCGTTTCAGCGAAACACCTTAT	990
301	K T L E F M R R N H L P G N Q D L P G L S V G P F S E T P Y	330
991	GCCGGACCGGCTTCCGGCTGGGCTTTTGGTAAAGACTGACGTGCGCAATCCAGATCAACGGCTCGGTGCGGAGTATGGTTGGGT	1080
331	A G T G F G L G F S V K T D V A K S Q I N G S V G E Y G W G	360
1081	GGCCTGGCCAGCAACCTTTTATTCATCGGTGGAGGAACCTGGTGGTATTTTCATGACGCAACTGATCCCTCTCGACCTACCGG	1170
361	G L A S T N F I I D P V E E L V V I F M T Q L I P S S T Y P	390
1171	ATCCGTGACGGAATTCGGGGGATTGTGAATGGCGGTGGTGAAGCTTGGCGGCACTCGAGCACCAACCACCACTGA	1254
391	I R Q E L R A I V N G A L V K L A A A L E H H H H H H ***	417

Triacylglycerol lipase (Marinobacter lipolyticus) (T)

1	ATGAAACAATGGCTCAAAGCAGCAACCATGCTGTGCATTCTGGCATGGTCCGGCGCGACCTGGCGTGGTGAACCTTACCCCATCCGAC	90
1	M K Q W L K A A T M L C I L A W S A P T L A W W N S T P S D	30
91	TATACCGATACCCGCTACCCGGTGTTCCTGGTACACGGTATGTTCGGTTTGTACTCCATAGCCGGTGTGATTACTGGTACGGTGTGGCT	180
31	Y T D T R Y P V V L V H G M F G F D S I A G V D Y W Y G V A	60
181	GAGATTTCGGTAAATACGGTGTGATGTCTACACCAAGCAAGTACCGGCCCTGGACAGCACCATTTGCCCGTGGTGAAGCACTACTGCCT	270
61	E D L R K Y G A D V Y T T Q V P A L D S T I A R G E A L L P	90
271	CAGGTTGAGCCATTCGGCGAGTCCATGGCAAGGTCAATCTGGTCCGCCACAGCCACGGCGGAACCAACGCAAGTACGTCCCGGTGTA	360
91	Q V E A I A A V H G K V N L V G H S H G G P T A R Y V A R V	120
361	CGACCGGATCTGGTTGCCTCCGTCACTTCTGTGGGCTCGGCCCATAAAGATCTCCGGTTGCCGATCTGATTGTGGCTCCCGGCCGAG	450
121	R P D L V A S V T S V G S P H K G S P V A D L I V G S P A E	150
451	GGCCTGGGTGAACCTCGGGCAATGGCGTGGGCGGACTCATTTGATCTGTTGTGACGGCGGGCTACGACCAGAACATGAGCGCCAGCATG	540
151	G L G A T L G N A L G G L I D L L S G G G Y D Q N M S A S M	180
541	TATTCATGACATCCAGGGCAGTGTGAATTCAACAATTTTGACACGGCGGGTGTCTTCCACCGCTCGGGCGAGGGCGGATATTC	630
181	Y S L T S Q G S A E F N N F A P A G V P S T A C G E G A Y S	210
631	GACAACGAGTGGTTCCTATCTGGGTGGCACAGGCGTTCGACCAATGCTCTGGAAGTGTCCGATGCCCTACTCGGCACCAACGAGC	720
211	D N G V R F Y S W G T G V L T N A L D V S D A L L G T T S	240
721	CTCGGTTTGGATTGAGTCCACGATGGTCTGGTAGGCGCTGCAGCAATCATTTCCGGGAAAGTCATCCGGGATAATTACTTTCATGAAC	810
241	L A F G F S A N D G L V G R C S N H F G K V I R D N Y F M N	270
811	CATCTGGATGAAGTCAATCAGACCTGGGGCTGCACAGCCTGTTTCGAGACTGACCGGAAGCGGTATTTTCAGCAACGCGCAACCGGTTG	900
271	H L D E V N Q T L G L H S L F E T D P K A V F Q Q H A N R L	300
901	AAAAACGCGGACTCAAGCTTGGGGCCGCACTCGAGCACCAACCACCACTGA	957
301	K N A G L K L A A A L E H H H H H H H ***	318

Acylglycerol lipase (Marinobacter lipolyticus) (A)

1	ATGCTGGACCGGCTGAACCGTTTGATCCGGCTCCCGCGGAACTGGGGGAAGAGATGGTGGCTTATTGCGCTTTACGGCCTGGAT	90
1	M L D R L E P F D P A S P R E L G E E M V A Y C R F Y G L D	30
91	CTCTGGGTGGAGCACCAGAGGTGAGCTACCATCAGGGTTATGTCAGTGGCGGGGCCAGGTCATGGTGCATTACTTCGGTCACCG	180
31	L W V E H P E V S Y H Q G Y V S A G R H Q V M V H Y F R S P	60
181	GAGAGCACCGGATCGAAGGGAACGGTTTTATCCTTCATGGGTACTTTGACCACTGGGGTGTACAGCCAGTTGATCGACCGCTGCCTG	270
61	E S T G S K G T V F I L H G Y F D H V G L Y S Q L I D R C L	90
271	GGGGCAGGGTTTGATGTGCTGTCTTATGATCAACAGGCCACGGACTGTCCAGTGGCACACCGCGGCCATTGGCAGTTTCTGGAGTAC	360
91	G A G F D V L S Y D Q P G H G L S S G T P A A I G S F L E Y	120
361	CAGGCGGTGCTGTCTAGGTGATAGCCGGATGAAAGGTAAAGTGAGGGGCCCCCTGGTATGCAGTGGGCGAGACACCGAGGGGCTATC	450
121	Q A V L S E V I A R M K G K V R G P W Y A V G Q S T G G A I	150
451	CTGATCGATTACCTGTCTGCAACAGCAGCATCAGCAGACGTCCGAATTTGTCGGATCGTGTGTTGGCGCATTGATCAGACCCATG	540
151	L I D Y L L S N Q Y H D Q Q T S E F R R I V L L A P L I R P M	180
541	GGATGGCTGGTGCAAAAGTTACTGCATAGCCTGGCCAGACCTTCCTGACGCGTGGCGTGGGTGTTGCCGAAAATAGCGGGAATACG	630
181	G W L G A K L L H S L A R P F L T R W R R V F A E N S G N T	210
631	CGGTTCTGCGGTTCTGAAAGAACACGACCGCTTCAGGCGCGGGCGGTTTCATGTGGATTGGGTATCGGCTCTGAGAAGTTGGGTACCC	720
211	R F L R F L K E H D P L Q A R A V H V D W V S A L R S W V P	240
721	CACATTGAATCTGCAGAACCGGTGAATTTTCGGTACGGTGGTTCAGGGGCAAAAGACCTGACCGTCGATTGGCAGCACAATTGCGG	810
241	H I E S A R P V N F P V T V V Q G E K D L T V D W Q H N L R	270
811	ATTATTCGTAATAAATTTCTCGGTGGAGGAACCTGTTATTCGGATGGTGTGTCATCTTGGTGAACGAGCAGGATCTGCAATCG	900
271	I I R N K F S S V E E L R I P D G R H H L V N E A Q D L Q S	300
901	ACGGTATTCAATACCATTATTGATACCTTCTCAAACGACCATCGGGTCTCTGTGACAGGCGCTGCAAGCTT	975
301	T V F N T I I D T F S N D H A G P L S E A C K L	324

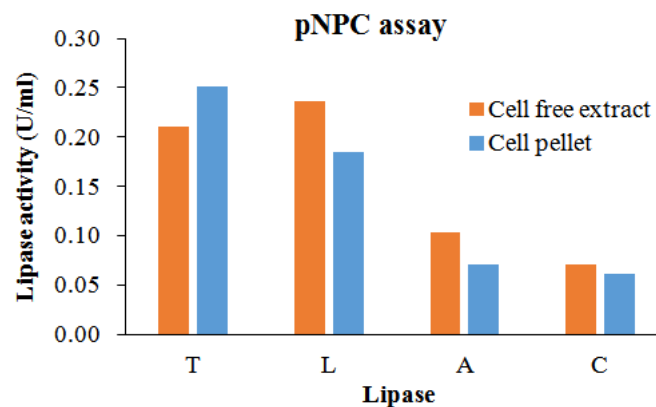
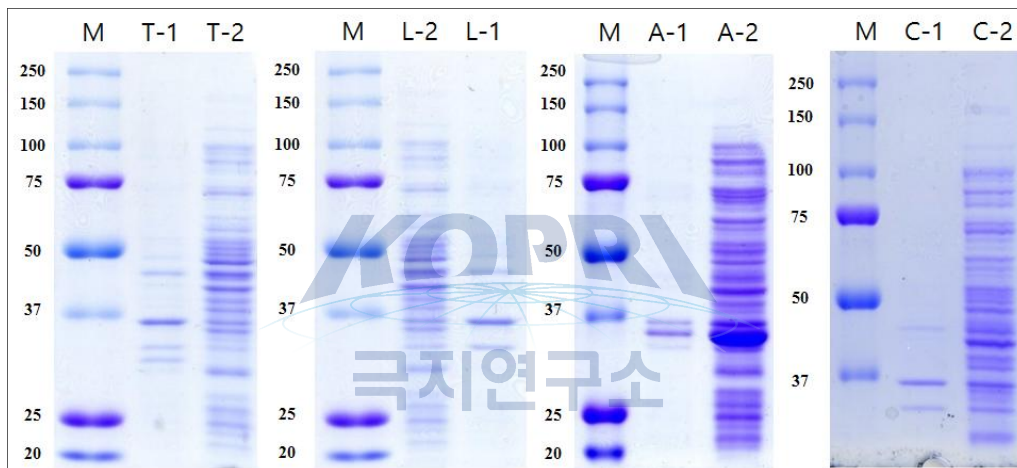
Probable lipase (Croceibacter atlanticus) (C)

1	ATGACCATTATAAAATCTATATGTATTGCAGTATCTCTTATGCTGTCTTTTTCATGCAGTTCAGATAACTCTAGTACCACAATTCAAGT	90
1	M T I I K S I C I A V S L M L S F S C S S D N S S T T I Q D	30
91	CCTGTTACAGAAAATCTCAAGAAGAACCAAAACCTTGAAGCAGAGATATATTGATGTAAGCTATGGAGACCATCAACAACAGGCT	180
31	P V T E N P Q E E P Q N L E A E D I F D V S Y G D H Q Q Q A	60
181	TATGACATTACTTGCTGCAAAATAGAACTACAGAAGCCACTAAAGTAATATTATTAATACATGGTGGTAGCTGGACAGCTGGTGATAAA	270
61	Y D I Y L P A N R T T E A T K V I L L I H G G S W T A G D K	90
271	AGTGATATGAATTATTTCTACCTATTTTACAAACCAACTTTCCGAATATGCAATAGTAAATATGAACATATGTTCTTGCTAATGAACT	360
91	S D M N Y F L P I L Q P Q L S E Y A I V N M N Y V L A N E T	120
361	ACAGCTGCATTTCCTAATCAGATAACTGATGTGGTGCAGTAATAGAACACGTGAAAAACAATGCCCTCAGAAATACCACATAAACCAACA	450
121	T A A F P N Q I T D V G A V I E H V K N N A S E Y H I N P T	150
451	TTTGGAGTTATGGTCTTAGCGCGCGCGCATATTGGATTGCAGTATACATATGCAGAACTACTAACCAAGATATTAATAATGGCTTGT	540
151	F G V I G L S A G A H I G L Q Y T Y A E D T N Q D I K M A C	180
541	AGCGTTGTTGGACCTGTAGATTTTACAGATCCTTATTATCTGAAACCCCTCAATTTCAATTTGTAACGATTAGTAGATGAAGATGCT	630
181	S V V G P V D F T D P Y Y S E N P Q F Q F V N D L V D E D A	210
631	TATCCTGAAGGTACAAAATTTGAAGAGGTTTTAAGTCTGCATTACAAGTCTCCCAACAAGTGTGCTACTATATTATTTATGGAGAA	720
211	Y P E G T N F E E V L S P A L Q V S Q Q S V P T I L F Y G E	240
721	AGTGATCCTTTGGTGCCTAAGCCAAGCTAATGCCATTAAAGATGCTTTAGAAGCAAAATAACGTTACACACCAATTAACAACCTTATGAA	810
241	S D P L V P L S Q A N A I N D A L E A N N V T H Q L T T Y E	270
811	GGTGGTCATGCCAATTGGAGTTTAGCAAGCTATGCAGATTACAATCTAAGCTTTCAATATTATTATATGAGCATCTTTTGGATCCGAAT	900
271	G G H A N W S L A S Y A D L Q S K L S I F I N E H L L D P N	300
901	TCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCGCGCACTCGAGCACCAACCAACCACTGA	957
301	S S S V D K L A A A L E H H H H H H *	318

이상 4가지 리파아제 유전자에 대해 효소 발현 실험을 수행하였다. 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환하고 IPTG (0.1 mM) induction 실험을 진행하였다. 미생물 배양(20°C, 20시간) 이 끝난 후에 균체를 sonication 방법으로 파쇄

하고 SDS-PAGE를 통해서 단백질 발현을 분석하였다. 3가지 유전자 발현 실험에서 예상된 단백질 밴드를 확인할 수 없었으며, 1가지 (A, *M. lipolyticus*_02075의 acylglycerol lipase) 유전자 발현에서 예상된 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 4가지 유전자의 발현 결과를 확인하기 위해서 cell pellet과 cee-free extract를 대상으로 lipase assay (pNPC)를 수행하였다.

T: *M. lipolyticus*_15672 triacylglycerol lipase(33.7kDa),
 L: *M. lipolyticus*_LipBL lipolytic enzyme(46.7kDa),
 A: *M. lipolyticus*_02075 acylglycerol lipase(37.97kDa),
 C: *C. atlanticus*_11223 probable lipase(35kDa)
 1: pellet of *E. coli* cell, 2: Cell-free extract of *E. coli* cell



Lipase gene name	Lipase information	Lipase activity		
		TBN plate (Halo size)	pNPC assay	
			pellet	CFE
Marinobacter lipolyticus_15672	Triacylglycerol lipase	(-)	0.251	0.211
Marinobacter lipolyticus_LipBL	Lipolytic enzyme	(-)	0.185	0.236
Marinobacter lipolyticus_02075	Acylglycerol lipase	(-)	0.071	0.104
Croceibacter atlanticus_11223	Probable lipase	(-)	0.063	0.071

실험 수행 결과, 4가지 유전자를 pET22 vector에 클로닝하고 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 IPTG 0.1mM, 20°C, 20h 조건에서 발현을 하였으나, 4가지 모두 TBN plate에서 halo를 형성하지 않았고 pNPC assay에서도 pellet과 CFE 모두에서 낮은 효소활성을 보였다.

2절. Shotgun cloning 실험

PCR product를 얻지 못한 균주 (*Marinobacter lipolyticus* 27-A9, *Pseudoalteromonas atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6)를 대상으로 shotgun cloning을 수행하였다.

shotgun cloning 수행을 위해 각 균주의 chromosomal DNA를 제한 효소 *EcoRI* 혹은 *HindIII*로 절단하였고, agarose gel 전기영동을 통해 2~9 kb의 DNA 단편을 추출하였다. 추출된 DNA를 동일 제한 효소로 절단된 pUC19 vector에 삽입한 후, 이를 *E. coli* XL1-Blue에 도입하였다. 얻은 형질전환주를 1% tributyrin 함유 LB 평판배지에 옮겨 배양하였다. 48 시간 배양 후, 콜로니 주변 halo 형성 유무를 관찰함으로써 리파아제 활성을 보이는 형질전환주를 선별하였다. 세 종의 균주 중 *M. lipolyticus*의 경우, *HindIII*를 사용하여 만든 clone library의 4,150개 콜로니 중 4개가 콜로니 주변에 halo를 형성하였다. 이들을 선별하여 재조합 플라스미드를 분리하고 insert DNA 염기서열을 분석한 결과, 모든 플라스미드에서 LipBL 유전자를 포함한 7,115 bp 크기의 염기서열이 확인되었다.

< 재조합 플라스미드 내 LipBL 유전자 염기 서열 (Marinobacter lipolyticus) >

1	ATGACGGAATCGAAACAGGTACCGGCCTTTCATCAGGCCACCTTACTCACATTGAAGACCATCTTGACCGCGCTATATCCAGCGGGG	90
1	M T E S K Q V T G L S S G H L T H I E D H L D R R Y I Q P G	30
91	AAATTGCCCGGGGCGCTGACTCTGGTGGCCGACGTGGGAAATTGCTATCTGAAAGCTCAGGGGCTGATGGATGTGGAGCGCAACAAG	180
31	K L P G A L T L V A R R G E I A Y L K A Q G L M D V E R N K	60
181	COGCTCTGCCGGGATACGGTGTCCGCATTATTCCATGACCAAGCCTATTAGTCCATCGCCATGATGCAGCTCTATGAGCAGGGGCGG	270
61	P V C R D T V F R I Y S M T K P I T S I A M M Q L Y E Q G R	90
271	TTTTTGCTGGATGATCGGTACACAAGTACATTCCGGCTGGAAGAACCTGCGGGTTTACAACAGTGGTCTCTATCCAACTTCTTGACC	360
91	F L L D D P V H K Y I P A W K N L R V Y N S G V Y P N F L T	120
361	ACACCTGCAACAGCACCATTGACCATTCGGACCTGTTCACCCACATGTGAGCCTGACCTATGGGTTCATGAACCGCACCAACGTTGAC	450
121	T P A T S T M T I R D L F T H M S G L T Y G F M N R T N V D	150
451	GCCGCTATCGGGAGCTGAAGCTGGATGGCAGCGGAATCTGACACTGGAAGCGCTGGTGGTCATCTGGCGGAACCTGCGCTGGAGTTC	540
151	A A Y R E L K L D G S R N L T L E A L V G H L A E L P L E F	180
541	TCACGGGTACCGCTGGAACATTTCGGTCAGCAAGGATGTGCTGGGTATCTGGTGCAGTTGCTGGCTGATCAGCGCTTTGATGAGTAT	630
181	S P G T A W N Y S V S T D V L G Y L V Q L L A D Q P F D E Y	210
631	CTGCGGAGCATATCTTTGAACCATGGCCATGTCCGACACCGGCTTCCATGTTCTGACGATCAGCTCGACCGTTTCCGCGCTGCTAT	720
211	L R E H I F E P L A M S D T G F H V R D D Q L D R F A A C Y	240
721	CAGTACGATCGGTGACCAAGTTCAAGCTGAGGACGATCCGAGACCTCCCTTTCCGGGACAAAAGGAGGTTTCTGTCTGGTGGCGGC	810
241	Q Y D P V D Q F K L Q D D P Q T S P F R D K R R F L S G G G	270
811	GGCTGGTTTCCACCATGACGATTATTTCCACTTTGCCAGGCATCTGTCAGGGTGGCGAGTTTGGCGGGCGGATTATTTGGCCGA	900
271	G L V S T I D D Y F H F A Q A L C Q G G E F G G R R I I G R	300
901	AAGACTCTGGAATTCATGCGTGCATATCTACCGGCAATCAGGACCTGCTGGCCTTTCGCTCGGTCCGTCAGCGAAACACCTTAT	990
301	K T L E F M R R N H L P G N Q D L P G L S V G P F S E T P Y	330
991	GCCGGGACCGCTTCCGGCTGGGCTTTTGGTAAAGACTGACCTGCGCAATCCAGATCAACGGCTCGGTGCGGAGTATGTTGGGGT	1080
331	A G T G F G L G F S V K T D V A K S Q I N G S V G E Y G W G	360
1081	GGCTGGCGAGCAACCTTTATTATCGATCGGTGGAGGAAGTGGTGGTATTTTCATGACGCAACTGATCCCTCTCGACCTACCGG	1170
361	G L A S T N F I I D P V E E L V V I F M T Q L I P S S T Y P	390
1171	ATCCGTCAGGAATTGCGGGCGATTGTGAATGGGGGTGGTCTAG	1215
391	I R Q E L R A I V N G A L V	404

shotgun cloning 결과 발견된 LipBL은 본 과제에서 앞서 PCR cloning을 수행하였던 LipBL과 아미노산 서열이 99% 유사한 리파아제로, 2개의 아미노산 서열의 차이가 존재하였다.

Query * 1	MTESKQVTGLSSGHLTHIEDHLDRRYIQPKLPGALTLVARRGEIAYLKAQGLMDVERNK	60
Sbjct** 1	M ESKQVTGLSSGHLTHIEDHLDRRYIQPKLPGALTLVARRGEIAYLKAQG MDVERNK	60
Query 61	PVCRDITVFRIYSMTKPIITSIAMQLYEQGRFLDDPVHKEYIPAWKNLRVYNSGVYPNFLT	120
Sbjct 61	PVCRDITVFRIYSMTKPIITSIAMQLYEQGRFLDDPVHKEYIPAWKNLRVYNSGVYPNFLT	120
Query 121	TPATSTMTIRDLFTHMSGTYGFMNRTNVDAAYRELKLDGSRNLTLEALVGHAEPLPEF	180
Sbjct 121	TPATSTMTIRDLFTHMSGTYGFMNRTNVDAAYRELKLDGSRNLTLEALVGHAEPLPEF	180
Query 181	SPGTAWNYSVSTDVGLVQLLADQPFDEYLREHIFEPLAMSDTGFHVRDDQLDRFAACY	240
Sbjct 181	SPGTAWNYSVSTDVGLVQLLADQPFDEYLREHIFEPLAMSDTGFHVRDDQLDRFAACY	240
Query 241	QYDPVDQFKLQDDPQTSPPFRDKRRFLSGGGGLVSTIDDYFHFAQALCQGGFEGGRR I IGR	300
Sbjct 241	QYDPVDQFKLQDDPQTSPPFRDKRRFLSGGGGLVSTIDDYFHFAQALCQGGFEGGRR I IGR	300
Query 301	KTLEFMRRNHLPGNQDLPGLSVGPFSETPYAGTGFLGFSVKTDVAKSQINGSVGEYGWG	360
Sbjct 301	KTLEFMRRNHLPGNQDLPGLSVGPFSETPYAGTGFLGFSVKTDVAKSQINGSVGEYGWG	360
Query 361	GLASTNFIIDPVEELVVFMTQLIPSSTYPIRQELRAIVNGALV	404
Sbjct 361	GLASTNFIIDPVEELVVFMTQLIPSSTYPIRQELRAIVNGALV KLAALAEHHHHHH	417

*Query : shotgun cloning 결과 LipBL, ** Sbjct : PCR cloning 결과 LipBL

그러나 Shotgun cloning을 통해 발견한 LipBL은 대장균 내에서 대량 발현을 하지 않았음에도 불구하고, 기존 PCR cloning 결과와 달리 TBN 배지에서 halo를 형성하였다. 또한, 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay를 수행한 결과, 7.6 U/mL의 활성을 나타냈다. 따라서 본 과제에서는 shotgun cloning으로 발견한 LipBL을 대장균에서 대량 발현하기 위해 T벡터 클로닝 및 pET22벡터 클로닝을 수행하기로 결정하였다. 이를 위해 상기 염기 서열 결과를 근거로 아래와 같이 primer를 디자인하였는데, 기존에 수행하였던 PCR cloning과는 다르게 C-terminal 6X-histidine tag 유도 서열을 포함하지 않도록 primer를 디자인하였다.

<LipBL의 PCR cloning을 위한 primer>

Strain name	Lipase info.	Resriction enzymes	Forward and reverse primers
<i>Marinobacter lipolyticus</i>	LipBL	NdeI/HindIII	5'-GATCATATGACGGAATCGAAACAGGTC-3'
			5'-GATAAGCTTCTAGACCAACGCCCCATTAC-3'

상기 primer를 이용하여 PCR을 수행하였고, 이를 통해 얻은 PCR product로 T벡터 클로닝 및 pET22벡터 클로닝을 수행하였다. 클로닝을 통해 얻은 재조합 플라스미드를 E. coli BL21(DE3)에 도입하였고, 형질전환된 균주를 TBN plate에 streak한 결과 콜로니 주변에 halo를 형성하는 것을 확인하였다.

<pET vector에 삽입된 LipBL의 TBN 배지에서의 halo 형성>

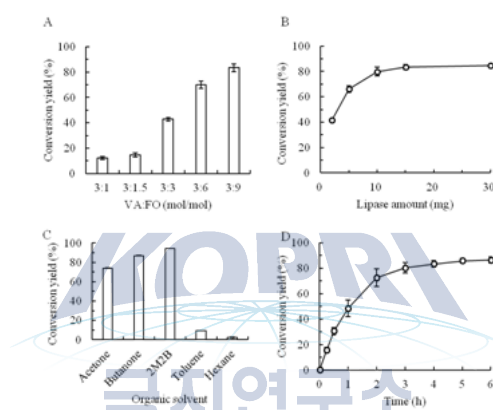
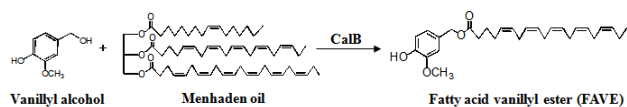


LipBL의 대량 발현을 위해 상기 형질전환주 배양시 1 mM IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 대량 발현을 유도하였다. 균체 추출액의 pNPC 활성 확인 결과, 활성이 923 U/mL로 확인되었다.

현재 LipBL의 순수분리 및 단백질의 분자량 확인을 위해 SDS-PAGE zymogram 연구를 수행중이다. SDS-PAGE zymogram으로 단백질을 확인한 후에는, LipBL의 효소 반응 특성을 규명하고자 한다. 다른 균주 *Pseudoalteromonas atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6에 대해서는 아직 shotgun cloning을 진행하고 있다.

3절. 상업용 리파아제를 이용한 FAVE 합성

본 과제를 통해 개발되는 저온성 리파아제를 이용해서 향후에 FAVE를 합성하고자 한다. 이를 위해서 우선, 상업용 리파아제를 이용해서 FAVE 합성 반응조건을 잡고자 실험하였다. 기질로서 vanillyl alcohol과 fish oil (Menhaden oil)을 사용하였고 CalB 리파아제를 효소로 사용하였다. 기질의 몰비, 용매조건, 효소량, 반응시간을 조사하였다. 생산된 FAVE을 이용해서 항산화활성, 항세균 활성을 확인하였다.



Antibacterial activity of FAVE-CalB

Compounds	MIC (μM) ^a		
	<i>G. steatothermophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>A. faecalis</i>
Vanillyl alcohol ^b	>2500	>2500	>2500
Menhaden oil ^c	> 25	> 25	> 25
FAVE-CalB	2.5	5	2.5

^a MIC (Minimum Inhibitory Concentration) : the lowest concentration of an antibacterial to inhibit the visible growth of bacteria

^b Vanillyl alcohol was used until 2500 μ M due to its solubility in water

^c Menhaden oil was used until 25 μ M because of its turbidity

DPPH radical scavenging activity

Compounds	IC ₅₀ (mM) ^a	
	1-Butanol	Toluene
BHT	0.421 ± 0.06	1.98 ± 0.09
Menhaden oil	22.4 ± 3.16	2.91 ± 0.15
Vanillyl alcohol	0.055 ± 0.02	1.25 ± 0.01
FAVE-CaIB	0.420 ± 0.08	0.596 ± 0.01

*IC₅₀: the amount of antioxidant necessary to decrease by 50 % the initial DPPH concentration.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절. 성과목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
극지 유래 특수기능 리파아제 발굴 및 재조합 리파아제 생산	1-1 극지 유래 특수기능 리파아제 발굴	- 극지에서 분리한 미생물 리파아제 활성 측정 - 리파아제의 신규성 및 기능성 조사	100%
	1-2 재조합 리파아제 생산	- 리파아제 유전자 클로닝 - 재조합 리파아제 생산 - 재조합 리파아제 특성조사	100%

2절 세부목표 달성 내용

1. 극지 유래 특수기능 리파아제 발굴

연구 내용	연구 결과
극지에서 분리한 미생물 리파아제 활성 측정	• 극지연구소로부터 46개 저온성 미생물을 분양받음. • TBN plate에서 활성을 보이는 24 균주 확보 • olive oil/pH stat assay에서 0.8 U/ml이상의 활성을 보이는 9 균주 확보 • 7개의 Species (<i>Marinobacter maritimus</i>, <i>Marinobacter lipolyticus</i>, <i>Psychrobacter nivimaris</i>, <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>, <i>Salinimicrobium marinum</i>, <i>Brevundimonas nasdae</i>, <i>Croceibacter atlanticus</i>)가 리파아제 활성을 보임
리파아제의 신규성 및 기능성 조사	• 4개의 Species (<i>Marinobacter lipolyticus</i>, <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>, <i>Brevundimonas nasdae</i>, <i>Croceibacter atlanticus</i>)로부터 리파아제 유전자가 보고되었음. 이 중에서 M. lipolyticus 리파아제에 대해 연구결과가 있지만, 다른 리파아제에 대해서는 연구가 진행되지 않은 상태이기 때문에 신규한 리파아제임. • 3개의 Species (<i>Marinobacter maritimus</i>, <i>Psychrobacter nivimaris</i>, <i>Salinimicrobium marinum</i>)로부터 리파아제 유전자가 밝혀지지 않음. 신규한 리파아제임.

2. 재조합 리파아제 생산

연구 내용	연구 결과
리파아제 유전자 클로닝	4개의 Species (<i>Marinobacter lipolyticus</i>, <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>, <i>Brevundimonas nasdae</i>, <i>Croceibacter atlanticus</i>)로부터 20종류의 리파아제 유전자가 보고되었기 때문에 20종류의 PCR 반응을 수행함 - PCR 반응 결과, 4개의 유전자에 대한 PCR products를 합성함. (<i>C. atlanticus</i>_11223 probable lipase, <i>M. lipolyticus</i>_02075 acylglycerol lipase, <i>M. lipolyticus</i>_15672 triacylglycerol lipase, <i>M. lipolyticus</i>_LipBL lipolytic enzyme)
재조합 리파아제 생산	4개의 리파아제 유전자에 대해 pET22벡터에 클로닝하는 데에 성공하였음 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) 균에서 리파아제 효소발현실험을 수행하였음.
Shotgun cloning을 통한 리파아제 유전자 발굴 및 리파아제 생산	<i>Marinobacter lipolyticus</i> 27-A9, <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> 31-A1, <i>Brevundimonas nasdae</i> 33-B6균을 대상으로 shotgun cloning을 수행하였으며 <i>M. lipolyticus</i> 27-A9균으로부터 LipBL 유전자를 찾음. - LipBL을 <i>E. coli</i> 균에서 생산하고 활성을 측정한 결과, 923 U/mL로 밝혀짐.
재조합 리파아제 특성조사	LipBL 리파아제의 분리 및 효소특성을 조사하고 있음.

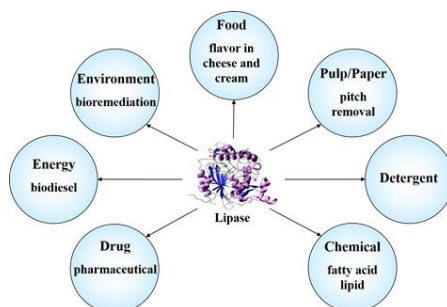
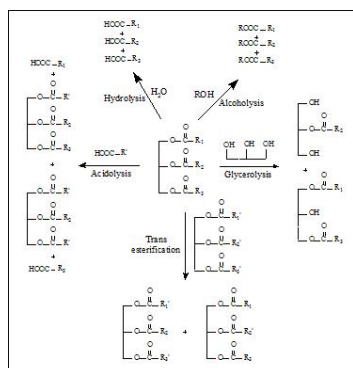
제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절 학술적 활용계획

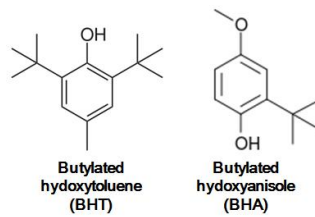
1. 극지에서 분리한 신규 저온성 미생물로부터 리파아제 효소를 분리하는 경우에 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 단백질 서열을 갖고 있으며 새로운 기능을 갖고 있는 특수기능 효소를 발굴할 수 있을 것이다.
2. 저온성을 갖고 있으며 효소의 비활성도가 높은 효소를 발굴하면 단백질 구조연구를 통해서 저온성 효소의 구조적 특성과 작용기작을 밝힐 수 있을 것이다. 이것을 바탕으로 효소엔지니어링 기술을 통해 인공적으로 저온성 효소를 개발할 수 있을 것이다.
3. 저온성 효소를 이용하여 저온에서 효소반응을 수행함으로써 상온 또는 고온에서 쉽게 변성되고 분해되거나 산화되는 물질을 기질로 사용할 수 있다. 특히, DHA와 같이 불포화지방산을 다량 함유하고 있는 지방산의 경우에는 상온에서 쉽게 산화되어 conjugated diene 또는 conjugated triene을 형성하는데 저온에서 반응을 수행하면 지질의 산화를 방지할 수 있을 것으로 기대한다. 따라서 PUFA를 함유한 기질을 사용해서 페놀릭 에스테르를 합성하는 데에 저온성 리파아제가 효과적으로 사용될 것이다.

2절 경제적 활용계획

1. 리파아제는 다양한 화학반응을 촉매할 수 있어서 중요한 산업용 효소를 분류하고 있다. 산업적으로 리파아제는 세제산업, 식품산업을 포함해서 다양한 분야에 사용되고 있다. 현재 CalB를 비롯해서 일부 곰팡이 및 세균 유래의 리파아제가 산업적으로 사용되고 있다. 극지에서 발굴하는 신규한 특수기능 저온성 리파아제를 대량생산하고 고정화해서 사용한다면 기존 산업용 효소를 대체할 수 있으며 나아가 새로운 산업을 창출할 수 있을 것으로 기대한다.



2. 항산화제는 일찍이 여러 산업분야에서 생산품의 산화를 방지하는 목적으로 사용되어왔는데 가장 널리 사용되었던 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)이다. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 소수성을 띠는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 산업에서 생산되는 지질이 포함된 식품가공품에 첨가되어 지질의 산화를 방지하는데 널리 사용되었다. 하지만 BHT와 BHA가 온도의 상승에 따른 휘발성과 불안정성이 높다는 점, 암을 일으킬 수 있는 잠재성이 실험적으로 밝혀지게 되면서 이들의 사용은 꾸준히 감소하고 있는 추세이다.



3. 페놀릭 산 또는 페놀릭 알코올은 항산화 활성을 갖고 있으며 지방산과 결합하여 에스테르 화합물로 만든다면 비극성용매 또는 에멀전에 대한 용해도를 증가시킬 수 있다. 즉, 리파아제를 통해서 생산하게 되는 페놀릭 에스테르는 항산화활성, 항균 활성, 항알칼로이드 활성을 갖고 있기 때문에 화장품, 식품, 제약산업에서 중요한 소재로 사용될 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

- Dolores Pe' rez, Sara Marti'n, Gloria Ferna'ndez-Lorente, Marco Filice, Jose' Manuel Guisa'n, Antonio Ventosa, Mari'a Teresa Garc'a, Encarnacio'n Mellado. A Novel Halophilic Lipase, LipBL, Showing High Efficiency in the Production of Eicosapentaenoic Acid (EPA). PLoS ONE 6 (8) e23325 (2011).
- Dolores Perez, Filip Kovacic, Susanne Wilhelm, Karl-Erich Jaeger, Maria Teresa Garcia, Antonio Ventosa and Encarnacion Mellado. Identification of amino acids involved in the hydrolytic activity of lipase LipBL from *Marinobacter lipolyticus*. Microbiology 158, 2192-2203 (2012).
- Maria de Lourdes Moreno, Dolores Perez, Maria Teresa Garcia and Encarnacion Mellado. Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. Life 3, 38-51 (2013)
- Singh P, Singh SM, Roy U. Taxonomic characterization and the bio-potential of bacteria isolated from glacier ice cores in the High Arctic. J Basic Microbiol. 56: 275-85 (2016).
- Goomber S, Kumar A, Singh R, Kaur J. Point Mutation Ile137-Met Near Surface Conferred Psychrophilic Behaviour and Improved Catalytic Efficiency to *Bacillus* Lipase of 1.4 Subfamily. Appl Biochem Biotechnol. 178: 753-65 (2016).
- Rasol R, Rashidah AR, Nazuha RS, Smykla J, Maznah WO, Alias SA. Psychrotrophic lipase producers from Arctic soil and sediment samples. Pol J Microbiol. 63: 75-82 (2014).
- Roby MH, Allouche A, Dahdou L, De Castro VC, da Silva PH, Targino BN, Huguet M, Paris C, Chrétien F, Guéant RM, Desobry S, Oster T, Humeau C. Enzymatic production of bioactive docosahexaenoic acid phenolic ester. Food Chem. 171: 397-404 (2015).
- Roby MH, De Castro VC, Targino BN, Alves Da Silva PH, Mangavel C, Chretien F, Humeau C, Desobry S. Oxidative stability of DHA phenolic ester. Food Chem. 169: 41-8 (2015).

주 의

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