극지미생물 유래 리파아제 효소를 이용한 기능성 지질 소재 생산

Synthesis of functional lipids using lipases from polar microorganisms

KOPRI
극지연구소

가톨릭대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “극지미생물 유래 리파아제 효소를 이용한 기능성 지질 소재 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

KOPRI
극지연구소

2020. 01. 23

(본과제) 총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 가톨릭대학교

위탁연구책임자 : 김 형 권

위탁참여연구원 : 박 세 현

“ : 박 채 경

“ : 정 한 별

보고서 초록

<table>
<tr><td>위탁연구과제명</td><td colspan="5">극지미생물 유래 리파아제 효소를 이용한 기능성 지질 소재 생산</td></tr>
<tr><td>위탁연구책임자</td><td>김 형 권</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>4명</td><td>해당단계
연구비</td><td>120,000,000원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2">가톨릭대학교 생명공학전공</td><td>참여기업명</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="5">상대국명 :　　상대국연구기관명 :</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서
면수</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="6">

- 극지연구소로부터 분양받은 미생물을 대상으로 TBN, TCN plate assay, pNPC assay, pH STAT assay를 통해서 리파아제 활성을 측정하고 활성이 높은 균주를 선발하였음.
- 극지 분리균(Stock No. #27-A9)인 *Marinobacter lipolyticus* 균으로부터 리파아제 유전자(lipA9)를 shotgun cloning 방법으로 발굴함.
- 재조합 *E. coli*균을 배양하고 LipBL 생산을 유도하였음. 재조합 *E. coli* 세포 추출물로부터 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 LipBL 효소를 분리한 후, 온도, pH에 대한 특성, 기질특이성, 유기용매 내성, NaCl 활성을 조사함.
- LipBL 효소를 CLEA 방법으로 고정화시켜 생화학적 특성 및 안정성을 비교함.
- LipBL 효소의 homology modeling을 수행하고 활성부위의 구조를 조사함.
- 극지 분리균(Stock No. #40-F12)인 *Croceibacter atlanticus* 균의 genomic DNA로부터 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 찾음.
- 재조합 *E. coli* 균으로부터 LipCA를 생산하고 세포추출물로부터 LipCA를 분리함.
- 온도, pH에 대한 특성, 기질 특이성을 조사함
- LipCA 효소를 CLEA 방법으로 고정화시켜 생화학적 특성 및 안정성을 비교함.
- LipCA 효소의 homology modeling을 수행하고, 활성부위, lid 구조를 확인함.
- 극지 분리균(Stock No. #39-G1)인 *Alteromonas* sp. 균의 genomic DNA로부터 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 찾음.
- N-terminal deletion mutant (Δ20, Δ54)를 개발하여 활성 효소를 생산함.
- 효소를 분리하고, 온도, pH 특성, 기질특이성, 유기용매 안정성을 확인함.
- Cold-adapted 효소이고, 고농도 염분에서 활성을 높게 유지되는 효소임
- 상업용 리파아제를 이용해서 FAVE, HPA-FO, 중쇄지방족 알코올 cinnamate을 합성함. 기질의 몰비, 용매조건, 효소량, 반응시간을 조사하였으며, 생산된 페놀 리피드를 사용해서 항산화활성, 항세균 활성을 확인하였음.

</td></tr>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td colspan="4">리파아제, 극지 미생물, 저온성 효소, PCR 클로닝, Shotgun 클로닝</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td colspan="4">lipase, polar microorganism, psychrophilic enzyme, PCR cloning, Shotgun cloning</td></tr>
</table>

요 약 문

Ⅰ. 제 목

극지미생물 유래 리파아제 효소를 이용한 기능성 지질 소재 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

극지에서 분리한 미생물로부터 산업적 유용성이 큰 특수기능 리파아제를 발굴하고, 유전자 클로닝 및 발현을 통해서 활성 리파아제를 대량으로 생산하는 것이 목적임. 생산된 재조합 리파아제는 항산화 활성과 항세균 활성을 지닌 페놀릭 리피드를 합성하는 데에 사용하고자 함.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

극지연구소로부터 분양받은 극지 미생물을 대상으로 TCN plate, pNPC, pH stat 방법으로 리파아제 활성을 측정하고 활성이 높은 균주를 선발함. 리파아제 유전자를 shotgun cloning하여 *E. coli* 세포에서 발현함. 재조합 리파아제를 순수하게 분리하고 리파아제의 생화학적 특성을 조사함. 상업용 리파아제를 이용해서 페놀 리피드를 합성하는 반응시스템을 확립함.

Ⅳ. 연구개발결과

극지연구소가 분리하여 보관하고 있는 리파아제 생산균주를 분양받았음. TBN 또는 TCN agar plate에서 배양하면서 콜로니 주변에 halo를 크게 형성하는 균을 선발하고 이 균들을 20℃에서 48시간 동안 Marine broth 배지에서 액체 배양함. 배양액과 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay와 olive oil/pH stat assay를 수행하여 리파아제 활성이 높은 균을 선발함.

극지 분리균(Stock No. #27-A9)인 *Marinobacter lipolyticus* 균으로부터 리파아제 유전자(lipA9)를 shotgun cloning 방법으로 발굴함. 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환하고 IPTG induction 실험을 진행함. 미생물 배양(20℃, 20시간) 이 끝난 후에 균체를 sonication 방법으로 파쇄하고 SDS-PAGE를 통해서 단백질 발현을 분석함. 세포 추출물로부터 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 LipBL 효소를 분리한 후, 온도, pH에 대한 특성, 기질특이성, 유기용매 내성, NaCl 활성을 조사함. LipBL 효소를 CLEA 방법으로 고정화시켜 생화학적 특성 및 안정성을 비교함. LipBL 효소의 homology modeling을 수행하고 활성부위의 구조를 조사함.

극지 분리균(Stock No. #40-F12)인 *Croceibacter atlanticus* 균의 genomic DNA로부터 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 찾음. 재조합 *E. coli* 균으로부터 LipCA를 생산하고 세포추출물로부터 LipCA를 분리함. 온도, pH에 대한

특성, 기질 특이성을 조사함. LipCA 효소를 CLEA 방법으로 고정화시켜 생화학적 특성 및 안정성을 비교함. LipCA 효소의 homology modeling을 수행하고, 활성부위 및 lid 구조를 확인함.

극지 분리균(Stock No. #39-G1)인 *Alteromonas* sp. 균의 genomic DNA로부터 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 찾음. N-terminal deletion mutant (Δ20, Δ54)를 개발하여 활성 효소를 생산함. 효소를 분리하고, 온도, pH 특성, 기질특이성, 유기용매 안정성을 확인함. cold-adapted 효소이고, 고농도 염분에서 활성을 높게 유지되는 효소임.

상업용 리파아제를 이용해서 FAVE, HPA-FO, 중쇄지방족 알코올 cinnamate을 합성함. 기질의 몰비, 용매조건, 효소량, 반응시간을 조사하였으며, 생산된 페놀 리피드를 사용해서 항산화활성, 항세균 활성을 확인하였음.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

극지 미생물로부터 신규 리파아제 유전자를 발굴하고 활성 리파아제를 대량으로 생산함. 활성 리파아제의 반응 특성을 조사한 후에 활성 리파아제를 생물전환 반응의 효소촉매로 활용하고자 함. 항산화 활성, 항세균 활성이 있어서 식품산업과 화장품 산업의 소재로 쓰이는 페놀릭 리피드를 비수계 반응으로 합성하는 데에 사용하고자 계획함.

KOPRI 극지연구소

S U M M A R Y

I. Title

Production of functional lipid materials using lipase enzymes from polar microorganisms

II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to identify special functional lipases with high industrial usefulness from microorganisms isolated from polar regions and to produce large amounts of active lipases through gene cloning and expression. The recombinant lipase produced is intended to be used to synthesize phenolic lipids with antioxidant and antibacterial activity.

III. Contents and Extent of R&D

The active strains are selected by measuring lipase activity with TCN plate, pNPC, and pH stat method for polar microorganisms received from Korea polar research institutes. The lipase gene was isolated by shotgun cloning method and expressed in *E. coli* cells. Recombinant lipase was purely isolated and the biochemical properties of lipase were examined. We established a reaction system that synthesizes phenolic lipids using commercial lipases.

IV. R&D Results

We received lipase production strain that the Korea Polar Research Institute isolated from the Polar. Bacterial strains that form large halo around the colony while culturing in a TBN or TCN agar plate were selected and these bacterial strains were liquid cultured in a Marine broth medium at 20°C for 48 h. The bacteria with high lipase activity of the cell free extract and culture fluid through the pNPC assay and active oil / pH stat assay were selected.

The lipase gene (lipA9) was isolated from the polar isolate *Marinobacter lipolyticus* bacteria (Stock No. #27-A9) by shotgun cloning method.

Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) bacteria and IPTG induction experiments were conducted. After microbial culture (20°C, 20 h), the *E. coli* cells were crushed by sonication and protein expression was analyzed through SDS-PAGE. After the LipBL enzyme was isolated from the cell extract through anion exchange chromatography, the property about temperature, pH, the substrate specificity, the organic solvent resistance, and the NaCl activity were examined. The lipBL enzyme was immobilized by CLEA method to compare biochemical properties and stability. The homology modeling of the LipBL enzyme was performed and the structure of the active site was examined.

We found the lipase gene from the genomic DNA of the polar isolate *Croceibacter atlanticus* (Stock No. #40-F12) by shotgun cloning. LipCA was produced from recombinant *E. coli* bacteria and LipCA was purified from cell extracts. The properties of temperature and pH, and substrate specificity were examined. The LipCA enzyme was immobilized by CLEA method to compare biochemical properties and stability. The homology modeling of the LipCA enzyme was performed. The active site and lid structure were identified.

We found lipase gene from the genomic DNA of the polar isolate *Alteromonas* sp. bacteria (Stock No. #39-G1) by shotgun cloning method. N-terminal deletion mutant (20, 54) was developed to produce active enzymes. We purified the enzyme, and confirm temperature, pH characteristics, substrate specificity, and organic solvent stability. It was the cold-adapted enzyme and the lipase activity was high maintained in the high concentration salinity.

We synthesized fatty acid vanillyl ester, hydroxy phenyl acetic acid-fish oil, and medium chain fatty acid cinnamate by commercial lipase. The substrate molar ratio, solvent condition, enzyme amount, reaction time were investigated. Antioxidant activity and antibacterial activity were measured using the produced phenol lipid.

V. Application Plans of R&D Results

We identified new lipase genes from polar microorganisms and produced large quantities of active lipase. After investigating the reaction characteristics of the active lipase, the active lipase can be used as an enzyme catalyst for bioconversion reaction. It is planned to be used to synthesize phenolic lipids used as materials for food industry and cosmetics industry because of antioxidant activity and anti-bacterial activity.

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. 극지 분리균의 리파아제 활성 측정 ---------- 15
2절. *Marinobacter lipolyticus* 리파아제 발굴 ---------- 17
3절. *Croceibacter atlanticus* 리파아제 발굴 ---------- 25
4절. *Alteromonas* 리파아제 발굴 ---------- 31
5절. 상업용 리파아제를 이용한 FAVE 합성 ---------- 42
6절. 상업용 리파아제를 이용한 HPA-FO 합성 ---------- 43
7절. 상업용 리파아제를 이용한 중쇄지방산 cinnamate 합성 --------- 44

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ---------- 47
1절. 성과목표 달성도 ---------- 47
2절 세부목표 달성 내용 ---------- 48

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ---------- 51
1절 학술적 활용계획 ---------- 51
2절 경제적 활용계획 ---------- 51

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 53

제 7 장 참고문헌 ---------- 53

KOPRI 극지연구소

제 1 장 서론

1절. 연구의 목적

극지방에서 분리한 미생물로부터 신규 리파아제 유전자를 발굴하고 대장균에서 재조합 리파아제를 대량으로 생산함. 즉, 극지연구소로부터 분양받은 저온성 미생물로부터 특수기능 저온성 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제의 클로닝 및 활성 효소의 대량 생산을 수행하고 리파아제의 활성측정과 기능성 지질 합성을 위한 반응 특성을 규명함

2절. 연구의 필요성 및 범위

1. 리파아제를 이용한 페놀릭 에스테르 항산화제 개발 필요성

가. 식품산업, 화장품산업에서 물질의 산화를 방지하는 목적으로 항산화제가 널리 사용되어왔는데 가장 많이 사용되었던 항산화제는 butylated hydoxytoluene (BHT)와 butylated hydroxylanisole (BHA)이다.

나. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 비극성을 갖는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 및 화장품 산업에서 생산되는 에멀젼이 포함된 제품에 첨가되어 물질의 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 있다.

다. 천연항산화제에 대한 관심이 최근 크게 증가되었으며, Carotene (Carotenoids), Theaflavin-3-gallate (Polyphenol), Ascorbic acid (Vitamin), α-tocopherol (Vitamin) 등 다양한 천연항산화제가 개발되고 있다. 이중에서도 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. Ferulic acid, Cinnamic acid, Vanillic acid, p-Coumaric acid, Caffeic acid가 식물에 가장 많이 포함되어 있는 phenolic acid이다.

라. Phenolic acid는 딸기, 밀, 계피 등 거의 대부분의 식물에서 발견되기 때문에 소비자로 하여금 친환경적인 이미지를 갖게 할 수 있다. 이 물질들은 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 방법으로써 phenolic aicd가 갖는 카르복실기를 다른 소수성을 띠는 알코올과의 esterification 반응을 통하여 치환시키거나 triglyceride와의 transesterification 반응을 통하여 기능성 지질을 합성하는 방법이 알려져 있다.

바. DHA 및 EPA 등의 polyunsaturated fatty acid (PUFA)와 phenolic acid를 결합시켜 만든 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 투명환을 크게 형성하는 균을 선발한다. 선발된 균을 대상으로 2차 스크리닝을 수행한다. 균을 배양한 후, 배양액에 대해서 pNPC/pH stat assay를 수행하여 리파아제 활성을 정량적으로 분석한다.

나. 이미 많은 연구를 통해서 리파아제가 발굴되었다. 기존에 보고된 리파아제 효소와의 중복성을 피하기 위해서 16S rRNA 분석을 통해 미생물 동정을 신속하게 수행한다. 또한, 균체 단백질에 대해 SDS-PAGE를 수행함으로써 단백질 패턴을 비교함으로써 분리균 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.

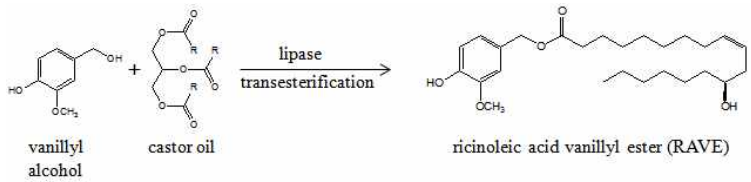
아. 효소반응을 통해서 생산된 페놀릭 에스테르를 Prep-HPLC로 분리하고 구조를 확인한다. 분리된 페놀릭 에스테르를 이용해서 항산화효과, 항균효과, anti-amyloidosis 활성을 조사한다.

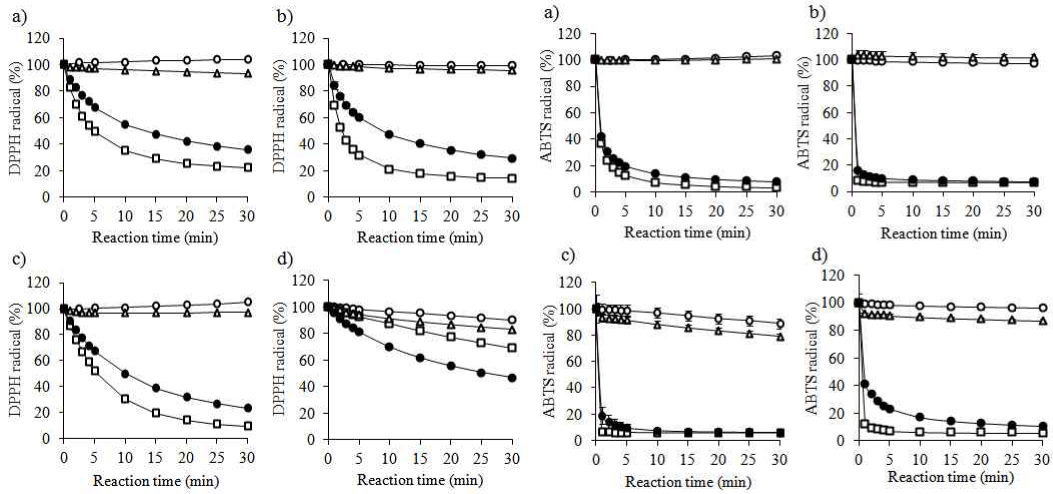
KOPRI 극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술개발 동향

1. 구윤모 교수팀은 Ionic liquid ([Emim][Tf(2)N])에서 리파제를 이용하여 CAPE를 합성함. 즉, 반응 시간 (36-60 h), 반응 온도 (65-75 °C), 기질의 몰비(20:1-40:1), 효소와 기질의 몰비 (10:1-20:1) 등 반응조건을 최적화함. Bioprocess Biosyst Eng. (2013) 36: 799-807.
2. 가톨릭대 연구팀은 리파제를 이용한 transesterification 반응을 통해 ricinoleic acid vanillyl ester를 합성하였고 DPPH, ABTS 방법을 통해 비극성 용매에서 항산화활성이 크게 증가함을 밝혔다. Enz. Microbial. Technol. (2020)

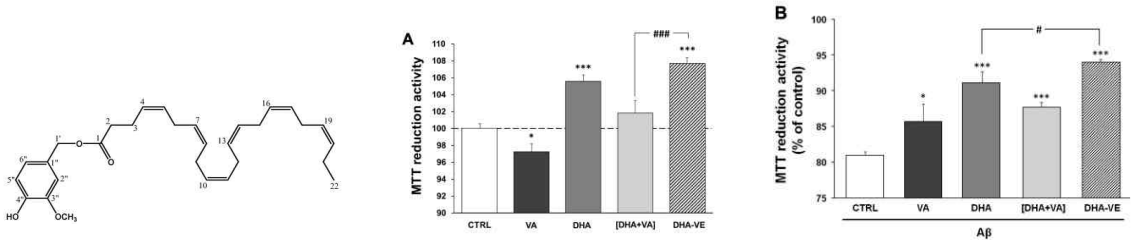




2절. 국외 기술개발 동향

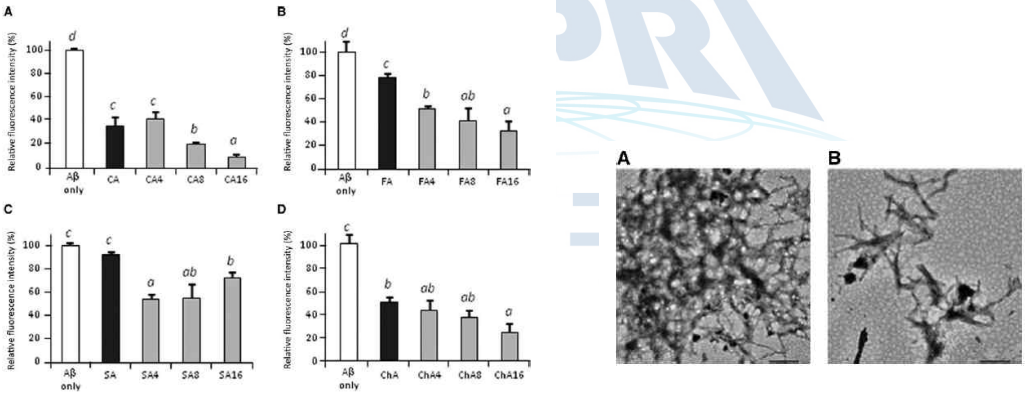
1. 리파아제를 이용한 DHA-vanillyl ester 합성 연구

가. DHA는 여러 가지 생리활성을 갖는 중요한 물질이지만 보관 과정에서 쉽게 산화되는 등 안정성이 떨어짐. 리파아제를 이용해서 DHA-vanillyl ester를 생산함으로서 항산화활성을 증가시킴. 실험용 쥐에 DHA-VE를 먹이로 주면 적혈구와 뇌조직에서 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, hexadecanol를 붙인 후, Aβ의 섬유화 저해 효과를 측정함 (antiamyloidal activity). 그 결과, caffeic acid에 hexadecanol를 붙였을 때에 antiamyloidal 효과가 가장 큰 것으로 밝혀짐. Biotechnol Appl Biochem. (2013) Nov 22. doi: 10.1002/bab.1182



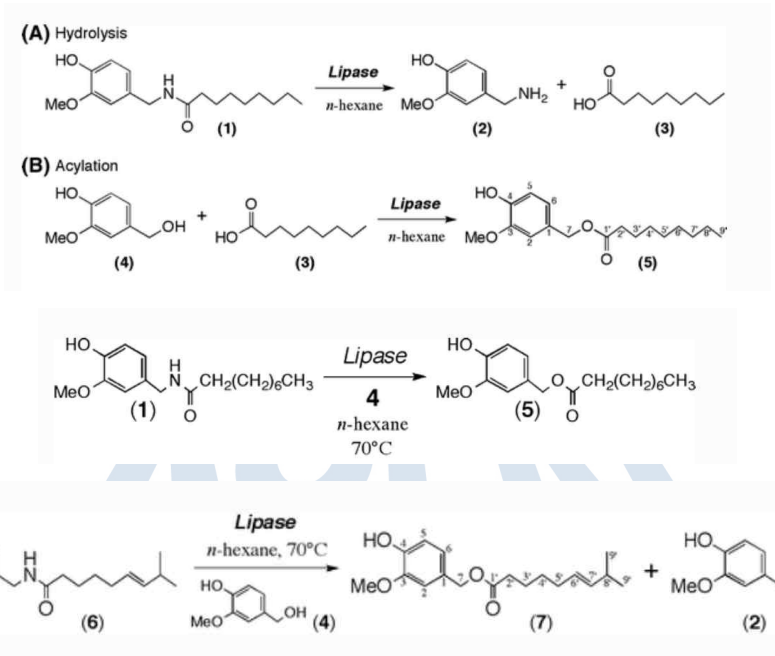
라. 연어에서 추출한 PUFA와 rutin, vanillyl alcohol를 이용해서 페놀리피드를 생산한 후, 항산화 활성을 측정함. BHT, α-토코페롤을 비교물질로 사용했으며, DPPH, thiobarbituric acid assay를 수행함. 소수성 용매, bulk oil 시스템, 에멀젼시스템에서 측정한 결과, 페놀기에 의해서 PUFA의 산화가 느려지고 PUFA에 의해서 페놀기의 소수성 용매 용해도가 증가됨을 밝혔음. J Agric Food Chem. (2011) 59: 7021-7027.

2. 리파제를 이용한 Capsiate 합성 연구

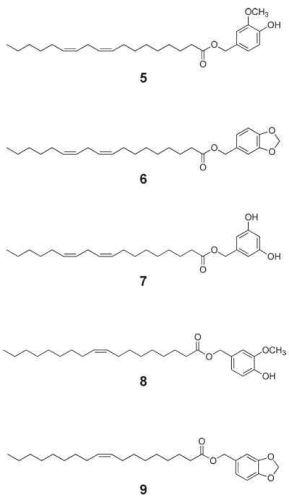
가. 10종의 capsiate를 합성하고 DPPH (polar medium), Rancimat (nonpolar medium), linoleic acid autoxidation (micellar medium) 활성을 측정함. BHT 및 α-tocopherol를 대조군으로 사용했으며 Tween 20 micelle-linoleic acid 시스템에서 vanillyl stearate, oleate, ricinoleate 가 가장 좋은 항산화 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food

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.



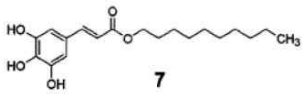
다. 항산화능이 향상된 참기름 에스테르를 합성하는 연구를 수행함. 즉, vanillyl linoleate가 항산화 능력이 가장 좋으며, 스프레이형 에멀젼을 만들어서 사용한 결과, UV 조사한 fibroblast를 보호하는 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food Chem. (2009) 57: 7311-7323.



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



7

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.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 극지 분리균의 리파아제 활성 측정

- 극지연구소로부터 1차 분양받은 극지 분리균을 대상으로 리파아제 효소활성을 측정하였다. 분리균을 Marine-TBN (tributyrin) 고체배지에 접종하고 20℃에서 48시간 배양하고 clear zone을 형성하는 활성을 측정한 후, 활성 크기에 따라서 (-, +, ++, +++, ++++)으로 구분하였다.
- 극지 분리균을 배양한 후에 배양액과 세포추출액의 활성을 PNPC 방법과 pH stat방법으로 측정하였다. pH stat방법에서 1 U/ml 이상의 활성을 지닌 분리균을 대상으로 리파아제 유전자 분석과 유전자 클로닝 연구를 진행하였다.

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

- 극지연구소로부터 2차 분양받은 균을 대상으로 리파아제 효소활성을 측정하였다. Marine-TBN 고체배지에서 clear zone을 형성하는 활성을 측정하였고 배양액과 세포추출액의 활성을 PNPC방법과 pH stat방법으로 측정하였다.

stock	Strain	Name	Lipase activity				
			TBN plate (Halo formation)	pNPC		pH STAT	
				PPT	CFE	PPT	CFE
1	01-A8	*Psychrobacter*	(+++)	0.000	0.503	-	-
2	01-B9	*Pseudoaltermonas*	(++)	0.000	0.492	-	-
3	01-C1	*Pseudoaltermonas*	(++)	1.542	1.507	-	-
4	01-C6	*Pseudoaltermonas*	(++)	0.135	0.867	0.600	2.560
5	01-C9	*Pseudoaltermonas*	(+++)	0.375	0.531	-	-
6	01-D5	*Pseudoaltermonas*	(++++)	9.043	13.193	3.140	2.320
7	02-B10	*Pseudoaltermonas*	(++)	0.599	2.309	0.000	2.280
8	02-B11	*Pseudoaltermonas*	(++)	0.542	2.226	0.000	2.980
9	02-C2	*Pseudoaltermonas*	(++)	-	-	-	-
10	02-D7	*Pseudoaltermonas*	(++)	1.272	1.996	-	-
11	02-D8	*Alteromonas*	(+)	0.202	1.069	-	-
12	02-E1	*Alteromonas*	(++++)	0.254	0.281	2.500	2.680
13	02-F10	*Alteromonas*	(+++)	0.261	0.741	0.000	2.200
14	02-F4	*Alteromonas*	(++)	0.461	0.502	-	-
15	02-F6	*Alteromonas*	(+)	0.159	0.442	-	-
16	02-G2	*Alteromonas*	(++)	0.374	1.351	2.820	2.860
17	02-G7	*Alteromonas*	(++)	0.227	1.757	2.340	3.140
18	02-H10	*Psychrobacter*	(++++++)	3.303	17.888	3.140	3.600
19	03-H10	*Alteromonas*	(++++)	0.082	0.423	-	-
20	04-F2	*Psychrobacter*	(+)	0.270	0.517	-	-
21	04-H10	*Psychrobacter*	(+)	0.100	0.836	2.160	0.740
22	05-H3	*Alteromonas*	(++)	0.126	0.710	2.400	3.680
23	14-A8	*Alteromonas*	(++)	9.571	22.953	3.180	2.560
24	14-D12	*Pseudoaltermonas*	(++)	0.051	0.396	-	-
25	22-D10	*Psychrobacter*	(++++++)	0.152	0.030	1.820	2.360
26	22-G1	*Psychrobacter*	(+++++)	0.598	0.031	-	-
27	23-E5	*Alteromonas*	(+++)	4.715	22.001	2.820	3.000
28	25-A2	*Pseudomonas*	(+)	-	-	-	-
29	25-D4	*Marinobacter*	(+)	-	-	-	-
30	27-G1	*Pseudoaltermonas*	(++++++)	0.051	2.401	-	-
31	28-C9	*Alteromonas*	(++++)	5.826	22.216	2.580	2.880
32	28-D6	*Alteromonas*	(++++)	7.545	16.200	3.440	2.980
33	28-E12	*Alteromonas*	(+++)	0.384	0.048	-	-
34	28-E5	*Psychrobacter*	(++)	8.389	23.321	2.620	2.900
35	30-B10	*Marinobacter*	(++)	-	-	-	-
36	30-B11	*Marinobacter*	(++)	-	-	-	-
37	33-A8	*Alteromonas*	(++++)	15.034	15.464	3.040	2.760
38	33-C3	*Alteromonas*	(++++)	3.248	5.213	-	-
39	33-C8	*Alteromonas*	(++++)	3.494	18.410	2.980	3.040
40	34-A12	*Psychrobacter*	(++++)	0.277	0.027	-	-
41	34-B8	*Psychrobacter*	(++++)	0.719	0.229	-	-
42	34-E8	*Psychrobacter*	(++++)	0.670	7.944	-	-
43	35-E9	*Alteromonas*	(+)	1.100	1.124	-	-
44	38-D9	*Alteromonas*	(++++)	1.836	8.834	-	-
45	38-F2	*Alteromonas*	(++++)	4.169	17.428	2.600	3.520
46	39-G1	*Alteromonas*	(+++)	4.304	17.121	3.120	2.960

2절. *Marinobacter lipolyticus* 리파아제 발굴

- 극지 분리균(Stock No. #27-A9)인 *Marinobacter lipolyticus* 균으로부터 리파아제 유전자(lipA9, lipBL)를 shotgun cloning 방법으로 찾아내었음.
- DNA 염기서열을 분석한 결과, 총 7124개의 염기로 구성되었으며, 그 중에서 3796-5010 위치에 리파아제 유전자가 들어 있음을 밝혔음.

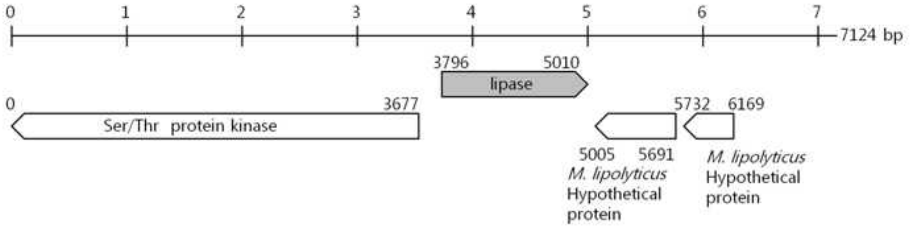


Fig. Nucleotide sequence and gene map of insert DNA

Insert DNA consists of 7,124 bps. The open reading frame of *lipA9* gene was written in red.

- LipA9 유전자는 총 1,215개의 염기로 구성되어 있으며, 단백질은 404개의 아미노산으로 구성되어 있음.

```
   1  ATGACGGAATCGAAACAGGTCACCGGCCTTTCATCAGGCCACCTTACTCACATTGAAGACCATCTTGACCGCCGCTATATCCAGCCGGGG    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  AAATTGCCCGGGGCGCTGACTCTGGTGGCCCGACGTGGGGAAATTGCCTATCTGAAAGCTCAGGGGCTGATGGATGTGGAGCGCAACAAG    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  CCGGTCTGCCGGGATACGGTGTTCCGCATTTATTCCATGACCAAGCCTATTACGTCCATCGCCATGATGCAGCTCTATGAGCAGGGGCGG    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  TTTTTGCTGGATGATCCGGTACACAAGTACATTCCGGCCTGGAAGAACCTGCGGGTTTACAACAGTGGTGTCTATCCCAACTTCCTGACC    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  ACACCTGCAACCAGCACCATGACCATTCGCGACCTGTTCACCCACATGTCAGGCCTGACCTATGGGTTCATGAACCGCACCAACGTTGAC    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  GCCGCCTATCGGGAGCTGAAGCTGGATGGCAGCCGGAATCTGACACTGGAAGCGCTGGTCGGTCATCTGGCGGAACTGCCGCTGGAGTTC    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  TCACCGGGTACCGCCTGGAACTATTCGGTCAGCACGGATGTGCTGGGGTATCTGGTGCAGTTGCTGGCTGATCAGCCGTTTGATGAGTAT    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  CTGCGCGAGCATATCTTTGAACCATTGGCCATGTCCGACACCGGCTTCCATGTTCGTGACGATCAGCTCGACCGTTTCGCCGCCTGCTAT    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  CAGTACGATCCGGTCGACCAGTTCAAGCTGCAGGACGATCCGCAGACCTCCCCTTTCCGGGACAAAAGGAGGTTTCTGTCTGGTGGCGGC    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  GGGCTGGTTTCCACCATTGACGATTATTTCCACTTTGCCCAGGCACTCTGTCAGGGTGGCGAGTTTGGCGGGCGGCGGATTATTGGCCGA    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  AAGACTCTGGAATTCATGCGTCGCAATCATCTACCCGGCAATCAGGACCTGCCTGGCCTTTCCGTCGGTCCGTTCAGCGAAACACCTTAT    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  GCCGGGACCGGCTTCGGGCTGGGCTTTTCGGTAAAGACTGACGTCGCCAAATCCCAGATCAACGGCTCGGTCGGCGAGTATGGTTGGGGT   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  GGCCTGGCCAGCACCAACTTTATTATCGATCCGGTGGAGGAACTGGTGGTGATTTTCATGACGCAACTGATCCCCTCCTCGACCTACCCG   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  ATCCGTCAGGAATTGCGGGCGATTGTGAATGGGGCGTTGGTCTAG                                                1215
 391   I  R  Q  E  L  R  A  I  V  N  G  A  L  V  .                                                  404
```

Fig. Sequence of *lipA9* gene and its deduced amino acid sequence (GenBank accession

number MG988389). The conserved S-x-x-K and G-x-S-x-G sequences are underlined. The amino acid sequences (Thr^{2},Ser^{161},Leu^{176},Ser^{222},andAsp^{234})underlined are different from those of *M. lipolytic* SM-19.

- 리파아제 유전자를 pET22 벡터에 삽입하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환 수행하였음.
- 재조합 *E. coli*균을 배양하고 IPTG를 처리하여 LipBL 생산을 유도하였음. 재조합 *E. coli* 세포 추출물로부터 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 LipBL 효소를 분리한 후, 온도, pH에 대한 특성, 기질특이성, 유기용매 내성, NaCl 활성을 조사하였음.
- LipBL 효소는 대장균에서 수용성 형태로 대량 발현되었고 세포추출액에서의 효소 비활성도가 97 U/mg으로 측정되었다. 세포추출액을 pH 8.0 조건에서 음이온 교환수지에 흡착시키고 NaCl 농도 기울기를 증가하여 용출시킨 결과, 효소 활성분획을 얻게 되었으며, 효소 비활성도가 579 U/mg으로 증가하였다. 효소용액을 농축해서 겔 여과크로마토그래피를 통과시킨 결과, 최종적으로 효소를 순수 분리하였으며 효소 비활성도가 905 U/mg으로 측정되었다.
-

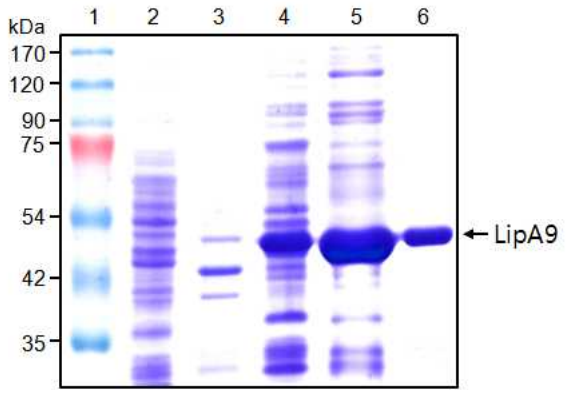


Fig. SDS-PAGE analysis of LipA9. Lane 1, protein size marker; Lane 2, cell-free extract of *E. coli* cells harboring empty vector (pET22); Lane 3, insoluble fraction of *E. coli* cells expressing LipA9; Lane 4, cell-free extract of *E. coli* cells expressing LipA9; Lane 5, purified LipA9 by anion exchange chromatography; Lane 6, purified LipA9 by gel permeation chromatography.

Table Purification table of LipA9

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell-free extract	153	14,900	97.4	100	1
AIEC	23.3	13,500	579	90.6	5.95
GPC	5.58	5,050	905	33.9	9.29

- 효소의 활성은 pNPC (C_8) 기질의 분해에 따른 405 nm 흡광도 변화로 측정하였으며, 분리효소를 이용하여 각종 효소활성을 조사하였다.
- 효소의 최적 pH는 8.0으로 측정되었고 pH 7.5-10 범위에서 높은 활성을 보였다. 최적 온도는 70℃로 측정되었고 60℃ 보다 낮은 온도에서 효소 활성이 크게 감소하였다.
- 다양한 길이의 기질에 대한 효소활성을 측정한 결과, 지방산 사슬길이가 짧은 기질에 대해 높은 분해 활성을 보였고 특히, C_4-C_8 길이의 기질에 대해 가장 높은 활성을 나타내었다. 트리글리세리드 기질을 이용한 활성 측정의 경우에도 tributyrin에 대한 활성이 tricaprylin 또는 olive oil에 대한 활성보다 높게 나타났다. 하지만, tricaprylin 또는 olive oil에 대한 분해활성을 갖고 있는 것을 근거로 LipBL 효소는 리파아제 효소임을 알 수 있다.

KORRI 극지연구소

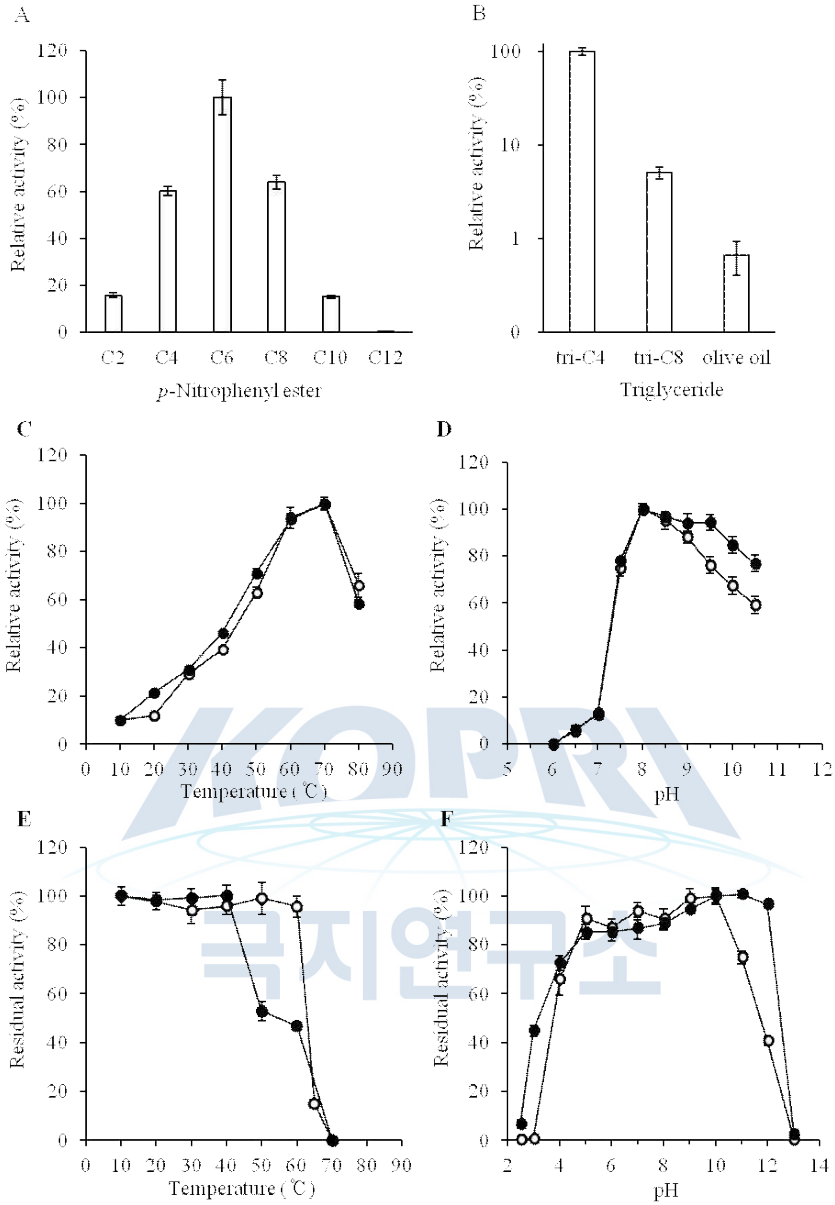
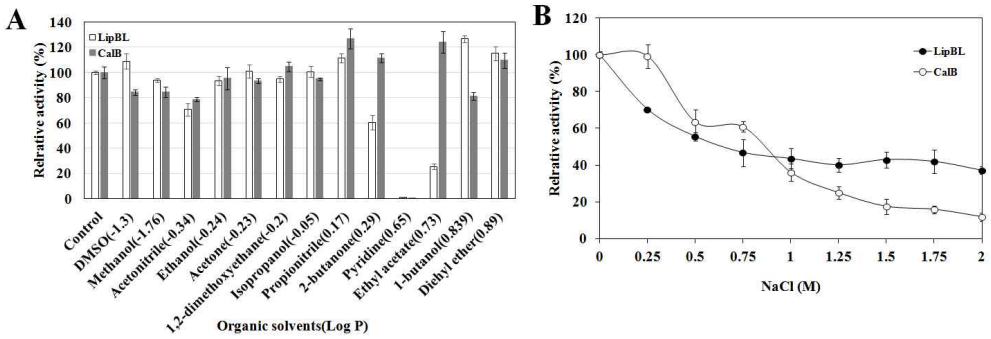


Fig. Substrate specificity and effects of temperature and pH on LipA9 and LipA9^{CLEA}. The hydrolytic activity of LipA9 toward various (A) *p*-NP esters, and (B) triglycerides was measured. (C) Activity versus temperature was measured at pH 8.0. (D) Activity versus pH was measured at 37 °C. (E) Residual activity was measured after incubation at various temperatures. (F) Residual activity was measured after incubation at various pHs. Open circle indicates LipA9, while closed circle indicates LipA9^{CLEA}.

- 극지미생물인 *Marinobacte lipolyticus* 로부터 발굴한 LipBL 효소의 유기용매에 대한 내성을 측정하기 위해서 LogP 값이 −1.3에서 0.89 범위에 속하는 13가지 용매를 25% 농도로 30분간 처리하였다. 2-butanone, pyridine, ethyl acetate를 제외한 다른 용매에 대해 효소활성이 줄지 않았으며, 상업용 효소인 CalB와 비교한 결과, 2-butanone 및 ethyl acetate을 제외하고 비슷한 결과를 얻었다.

- 염분(NaCl)의 농도에 따른 활성변화를 조사한 결과, 0-0.75 M 농도 범위에서 활성이 감소했지만, 0.75-2 M 범위에서 효소 활성이 변동 없이 유지되었다. 반면 상업용 CalB 효소의 경우, 0.25 M 까지 활성 변화가 없었지만 0.25-2 M 까지 효소활성이 계속 감소하였다.



Effect of different organic solvents and salt on the stability of LipBL. 10mM p-NPC was used as substrate at pH 8 and 37℃ for 3min reaction and CalB lipase was used as control. A) Enzyme was pre-incubated with 25% organic solvent for 30 min at room temperature, and residual activity was measured without organic solvent. B) Effect of concentration of NaCl.

- LipBL 효소를 CLEA (cross linked enzyme aggregate) 방법으로 고정화시켜 생화학적 특성 및 안정성을 비교하였다. *E. coli* 세포추출액의 효소활성을 측정한 결과, 효소활성도가 97 U/mg으로 나타났다. CLEA과정을 통해 LipBL^{CLEA}를 생산하고 효소활성을 측정한 결과, 116 U/mg으로 측정되었고 activity retention은 40%로 계산되었다.

Sample	Protein Conc. (mg/ml)[a]	Enzyme activity (U/ml)[b]	Enzyme activity (U/mg)	Immobilization Yield (%)	Activity retention (%)
Cell-free extract (LipBL^{free})	21.9	2131.3 ± 71.4	97.3 ± 3.3	-	100
LipBL^{CLEA}	7.4	858.2 ± 22.7	116.1 ± 3.1	33.8	40.3

a Protein concentration of soluble LipBLand CLEA LipBLwere measured by Bradford method.
b Enzyme activities of LipBLfree and LipBL CLEA were measured using *p*-NP hexanoate assay.

- LipBL^{free}와 LipBL^{CLEA}효소의 반응 특성을 비교하였다. 온도, pH, 기질특이성, NaCl

농도에 따른 활성, 유기용매 내성 등을 조사한 결과, 고정화 이전과 이후에 큰 변화가 관찰되지 않았다. 다만, LipBL^{CLEA} 효소가 pH 9-10.5 구간에서 안정성이 증가된 것으로 나타났다.

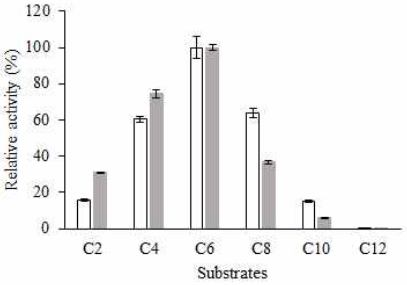


Fig. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl (*p*-NP) esters.
10 mM p-NP esters were used as substrate at pH 8 and 37°C for 3 min reaction.

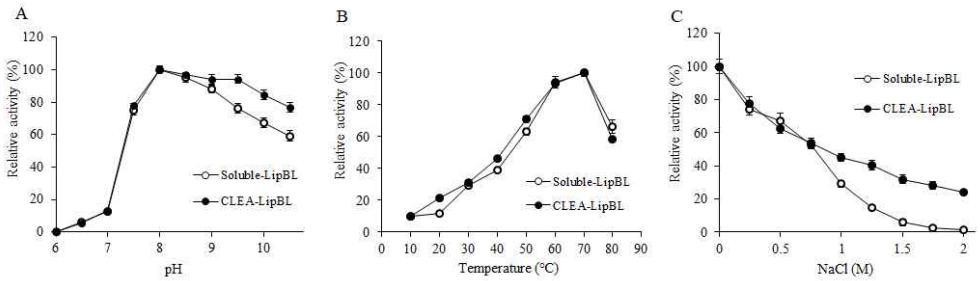


Fig. Effect of pH, temperature and salt on the LipBL activity by *p*-nitrophenyl caprylate (*p*-NPC) assay. 10 mM *p*-NPC was used as substrate for 3 min reaction. A) Effect of pH at 37°C and 50 mM of the following buffer were used; potassium phosphate pH 6-8, Tris-HCl pH 8.5, sodium bicarbonate pH 9-10.5. B) Effect of temperature at pH 8. C) Effect of NaCl concentration

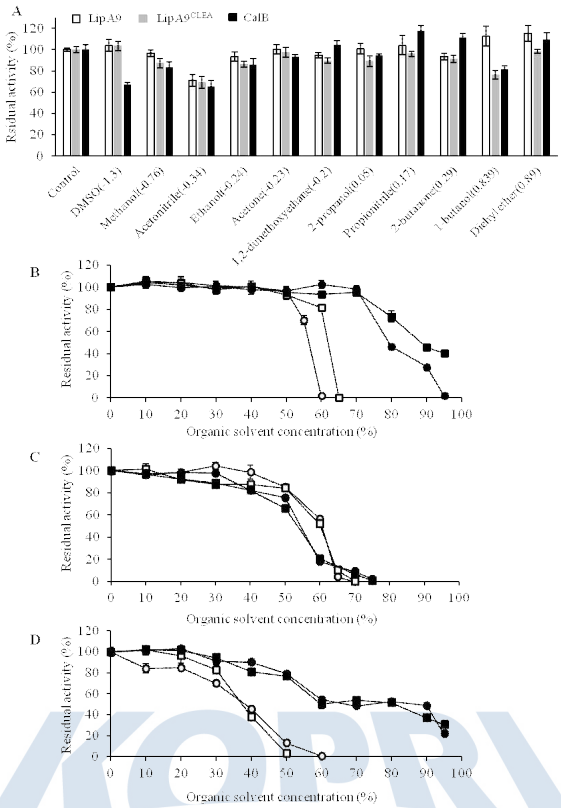


Fig. Organic solvents stability of LipA9, LipA9^{CLEA},andCalB. (A) After incubation of the enzymes with organic solvents at 30 % concentration at 25 °C, residual activity was measured by *p*-NPC assay at standard condition. Organic solvent stability test was performed four times and mean values were calculated. Standard deviation were shown with error bars. After incubation of (B) LipA9, (C) LipA9^{CLEA}, and (D) CalB with the organic solvents at various concentrations at25 °C, residual activities were measured. Open circle, DMSO; open square, methanol; closed circle, acetone; closed square, 2-propanol. Numbers in parenthesis mean log P values.

- LipBL 효소의 homology modeling을 수행하고 활성부위의 구조를 조사하였다. 일반적으로 리파아제는 catalytic triad (Ser-His-Asp)를 갖고 있지만, LipBL 효소의 경우에는 catalytic dyad (Ser^{72}-Lys^{75}) 구조를 갖고 있음이 밝혀졌다. 또한, Lys^{75} 주변에 Tyr 잔기가 2개 위치하고 있어서 효소활성을 도와주는 것으로 예상되었다. 이중에서 Tyr^{188}잔기는 Ser 및 Lys에 모두 영향을 주고 있지만, Tyr^{141}잔기는 Lys에만 영향을 주는 것으로 보인다.

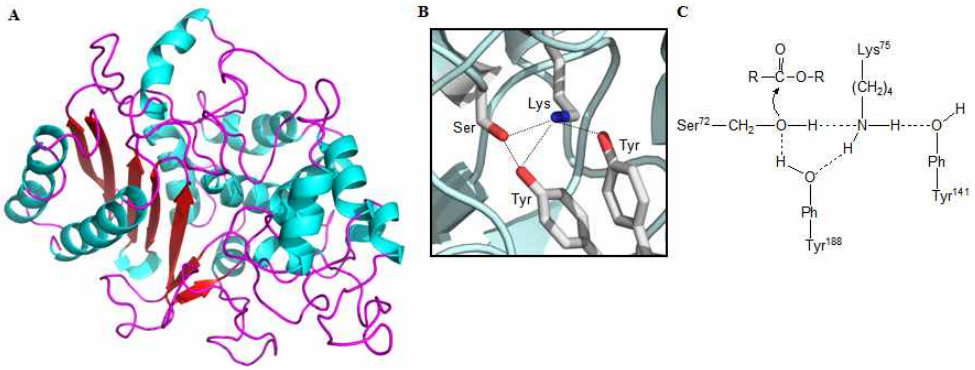


Fig. 3D structural homology model of LipA9. Schematic 3D structure of LipA9 (A) and the side chains of active sites Ser^{72},Lys^{75},Tyr^{141},andTyr^{188}(B and C) are shown.

Table Evaluation of the homology model by using ProSA, VERIFY3D, and ERRAT

	ProSA	VERIFY 3D	ERRAT
LipA9 model	z-score	compatibiliy score (%)[a]	quality factor
	-9.59	95.70%	83.679

[a]Percentage (%) of the residues with averaged 3D-1D score ≥ 0.2. More than 80% of the residues should have scored ≥ 0.2 in the 3D-1D profile.

- Site-directed mutagenesis를 통해서 활성부위 아미노산을 변경하고 아미노산의 역할을 조사한 결과, Tyr^{188}잔기가 Phe로 바뀐 경우에는 활성이 모두 사라졌지만 Tyr^{141}잔기가 Phe로 바뀌면 22% 활성이 유지되었다.
-

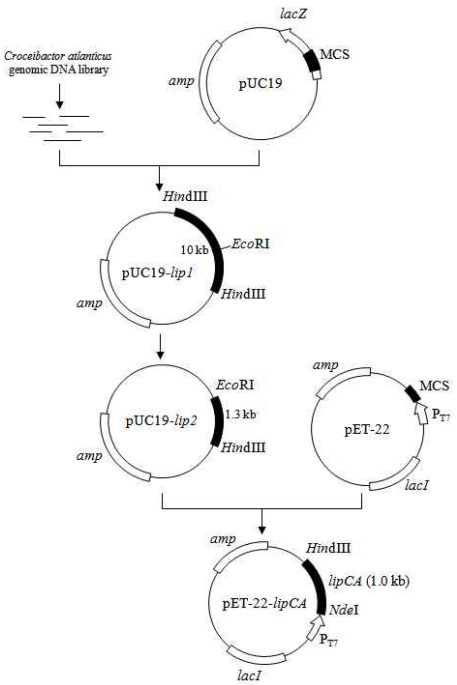
Table A comparison of specific activity and kinetic parameters of the wild type LipA9 and the derived mutants

Constructs	Relative activity (%)[a]	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M (s^{-1} μM^{-1})
Wild type	100	4.05±0.33	708±32.3	175
S72A	<1	nd	nd	nd
K75H	<1	nd	nd	nd
Y141F	22.1	5.43±0.2	155±1.51	28.5
Y188F	<1	nd	nd	nd
Y141F-Y188F	<1	nd	nd	nd

a, Activity was measured by *p*-NPC assay at standard condition. nd, not determined

3절. *Croceibacter atlanticus* 리파아제 발굴

- *Croceibacter atlanticus* 균의 genomic DNA로부터 리파아제 유전자를 shotgun cloning 방법으로 찾고 염기서열과 단백질서열을 분석한 결과, *Alcanivorax* sp. DG881 lipase (LipCA로 임시 명명)와 일치하는 것으로 밝혀짐.
- 분리균의 16S rRNA 서열을 다시 분석한 결과, *C. atlanticus* 균임을 확인하였음. 따라서 *C. atlanticus* 균과 *Alcanivorax* 균이 동일한 리파아제 유전자를 갖고 있음이 밝혀짐.
- 확보한 리파아제 유전자를 발현벡터에 삽입하고 *E. coli* 균에서 대량 발현하였음.



Supplementary Fig. S1. Shotgun cloning and sub cloning of *lipCA* gene.

- LipCA 유전자 염기 서열과 단백질 서열을 분석한 결과, 1,023개 염기로 구성되었으며, 단백질의 경우, 341개 아미노산으로 구성되었음. Homology modeling 수행 결과, Ser^{191}, His^{315}, Asp^{285} 아미노산이 효소의 활성부위를 구성하는 catalytic triad로 추정되는 전형적인 리파아제로 확인됨.

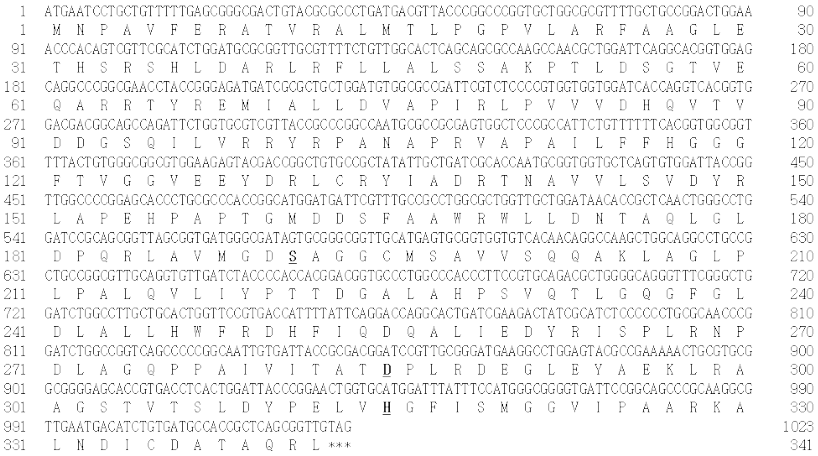


Fig. Nucleotide and amino acid sequence of *Croceibacter atlanticus* LipCA. Catalytic residues are underlined.

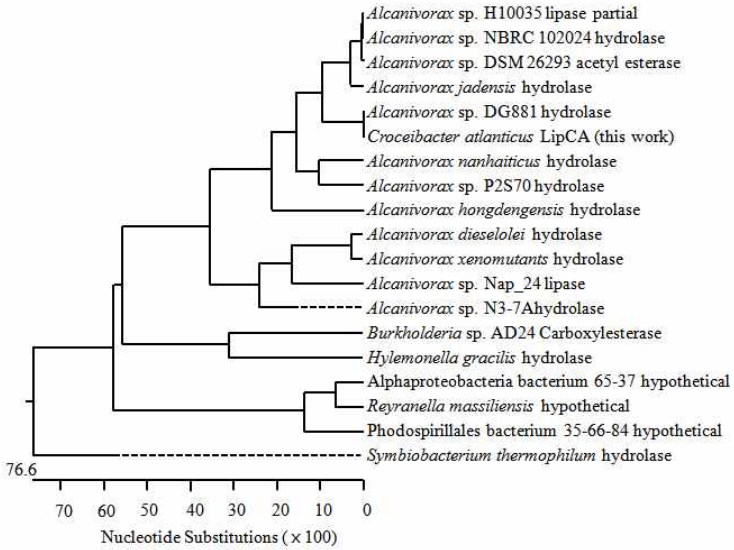


Fig. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic positions of *Croceibacter atlanticus* LipCA and some other related proteins. For making phylogenetic tree, DNAStar megalign program was used.

- 확보한 리파아제 유전자를 pET22벡터에 삽입하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 대량 발현 실험을 수행함.
- *E. coli* 추출액을 pH 8.0 조건에서 음이온교환 수지에 가한 경우, 대부분의 단백질이 컬럼에 흡착되지만 LipCA 효소는 흡착되지 않고 통과하였다. SDS-PAGE를 수행하여 LipCA가 순수하게 분리되었음을 확인하였다.

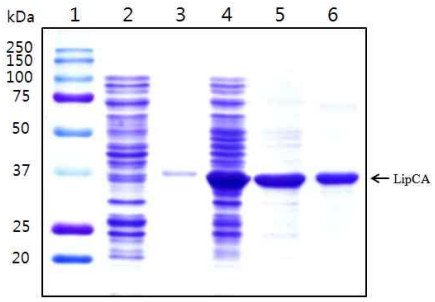


Fig. Expression and purification of LipCA. Lane 1, protein size marker; lane 2, cell-free extract of *E. coli* cells harboring empty vector; lane 3, insoluble fraction of *E. coli* cells expressing LipCA; lane 4, cell-free extract of *E. coli* cells expressing LipCA; lane 5, purified LipCA by 30% ammonium sulfate precipitation; lane 6, purified LipCA by Gel filtration chromatography after ammonium sulfate precipitation.

Table 1. Purification of LipCA

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell-free extract	2370	51.0	46.5	100	1
$(NH_4)_2SO_4$PPT	1640	8.00	205	69	4.4
GPC	1420	4.32	329	60	7.0

- pNPC (C^8)를 기질로 사용해서 효소특성을 조사하였다. 최적 반응 pH가 8.5로 밝혀졌고 최적 반응온도가 40℃임이 확인되었다.
- 다양한 합성 기질에 대한 분해활성을 조사해보니 C_8에 대한 활성이 가장 높았고 C_6, C_{10}에 대한 활성이 높았다.
- 트리글리세리드 기질에 대한 활성을 조사한 결과, tributyrin에 대한 활성이 가장 높았지만, olive oil과 tricaprylin에 대한 분해활성도 크게 나타났다. 이것은 LipCA가 전형적인 리파아제 효소임을 보여주는 결과이다.

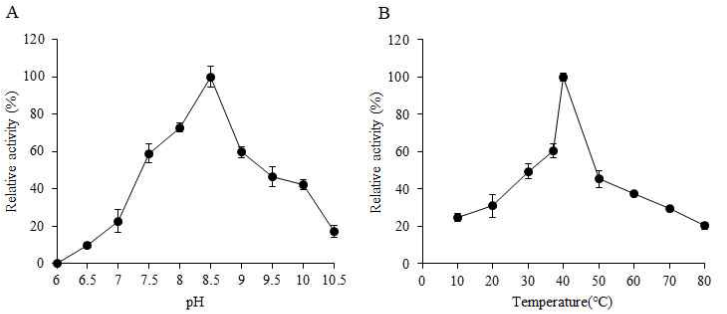


Fig 2. Effect of pH and temperature on the LipCA activity. 10 mM *p*-NPC was used as a substrate for 3 min reaction. A. Effect of pH at 37°C and 50 mM of the following buffer were used; potassium phosphate pH 6-8, Tris-HCl pH 8, 8.5, sodium bicarbonate pH 9-10.5. B. Effect of temperature at pH 8. Potassium phosphate pH8 buffer was used.

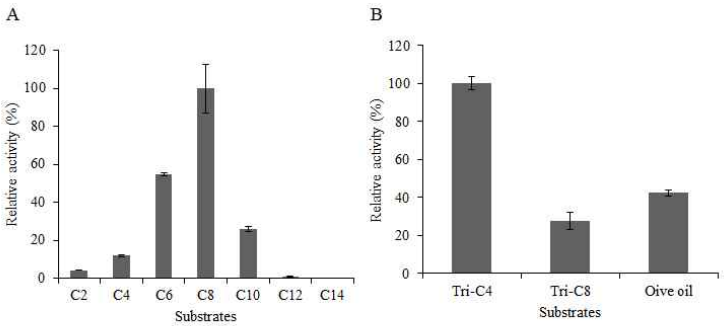


Fig. 3. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl (*p*-NP) esters and tri-glycerol esters. A. 10 mM *p*-NP esters were used as a substrate at pH 8.5 and 37°C for 3 min reaction. An enzyme activity of 100% corresponds to 13.98 U/mg B. Substrate was carried out for 3 min and released fatty acids were neutralized with 10 mM NaOH at 37°C to maintain constant pH value. An enzyme activity of 100% corresponds to 75.2 U/mg.

- LipCA리파아제를 CLEA 방법으로 고정화고 효소활성을 측정하였으며, 원래 효소와 고정화 효소에 대해서 온도, pH에 대한 특성을 조사함.
- 고정화 효소의 반복 사용 시, 잔존 활성을 측정하였고 합성기질과 triglyceride기질에 대한 분해활성을 측정하여 비교하였음.

Table S1. Activity retention of LipCA^{CLEA} preparation

Lipase preparation	Total activity (U)	Activity retention (%)
Cell free extract	128	100
LipCA^{CLEA} prepared with GA[a] Conc. of		
0 mM	83.6	65.5
25 mM	138	108
50 mM	92.9	72.8
75 mM	46.6	36.5
100 mM	30.1	23.6

[a]GA, Glutaraldehyde

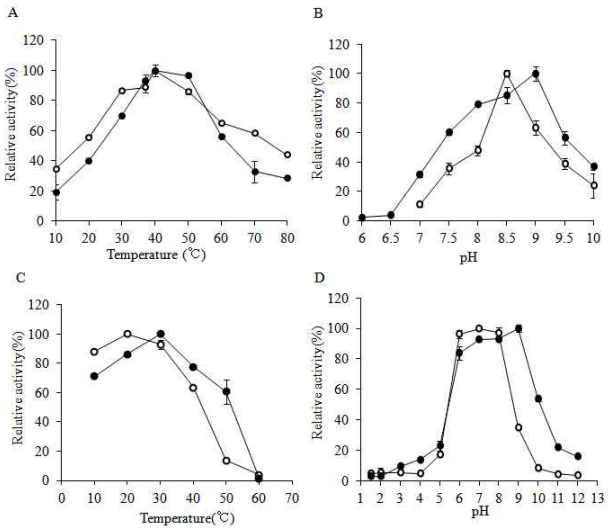


Fig. Effect of temperature and pH on LipCA and LipCA^{CLEA} activity and stability. A. Effect of temperature on LipCA and LipCA^{CLEA} activity. B. Effect of pH on LipCA and LipCA^{CLEA} activity. C. Effect of temperature on LipCA and LipCA^{CLEA} stability. D. Effect of pH on LipCA and LipCA^{CLEA} stability. Open circle, LipCA; closed circle, LipCA^{CLEA}

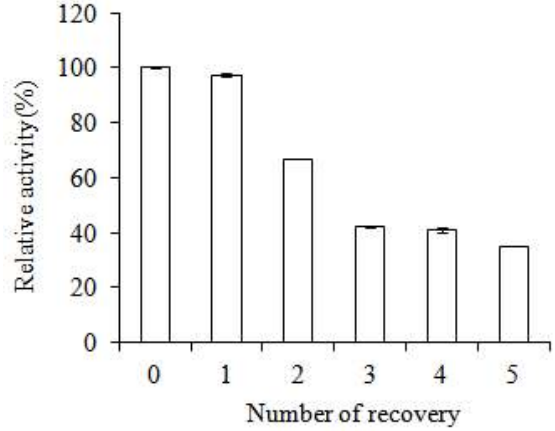


Fig. Reusability of LipCA^{CLEA}. Lipase activity was measured repeatedly after recovery by centrifugation.

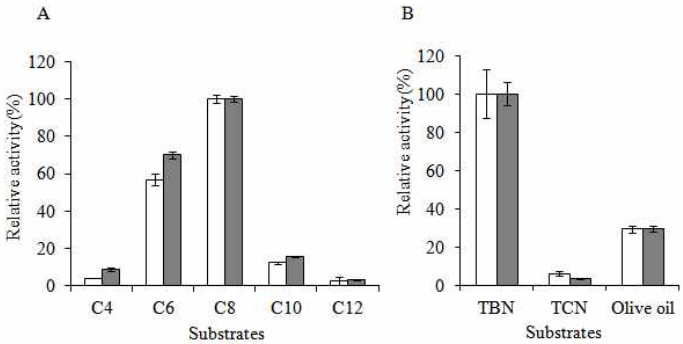


Fig. Substrate specificity of LipCA and LipCA^{CLEA}.A.Various*p*-NP esters were used as substrates. B. Three triglycerides were used as substrates and pH stat assay was used. Open bar, LipCA; closed bar, LipCA^{CLEA}

- Spain Arreo lake metagenome에서 유래한 alpha/beta hydrolase enzyme (PDB ID 5JD4)를 기반으로 homology modeling을 수행하였고 전형적인 리파아제의 특징인 α/β hydrolase fold를 지니며 있고 활성부위에서 Ser-His-Asp구조를 확인하였고, 활성부위를 덮고 있는 lid구조를 확인하였음.

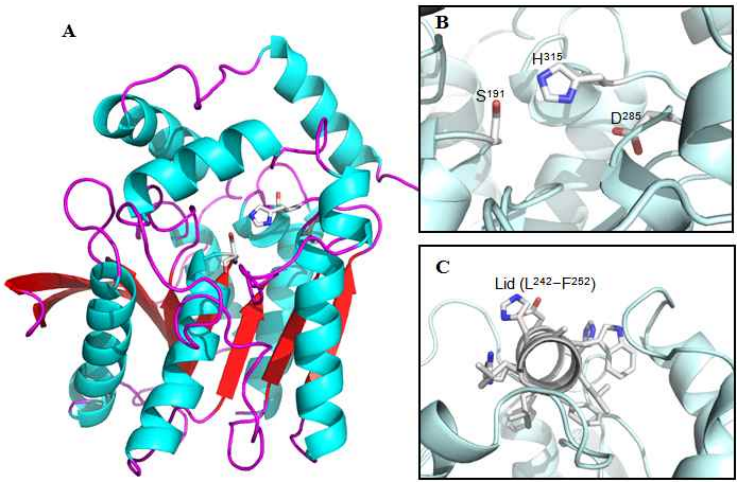


Fig. Homology model of LipCA. A. Three-dimensional structure of LipCA is presented. B. Active site of LipCA is shown. C. Lid structure of LipCA is shown.

4절. *Alteromonas* 리파아제 발굴

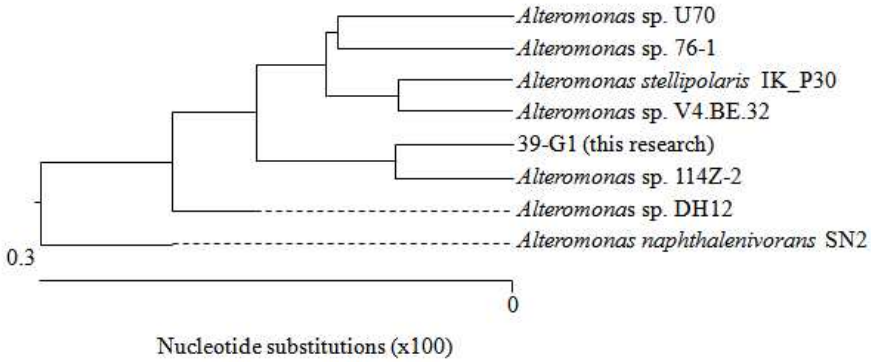
- 북극 Beaufort Sea (70-56-1581 N, 136-25-1178 W)에서 분리한 해양세균 39-G1을 16S rRNA 분석을 수행하고 균주 동정을 수행한 결과, *Alteromonas* 균으로 판명되었음.
- 16S rRNA 서열은 *Alteromonas* sp. 76-1 (GenBank : KY697829.1)와 99.86%, *Alteromonas naphthalenivorans* SN2 (GenBank : GU166736.2)와 99.86%, *Alteromonas stellipolaris* IK_P30 (GenBank : LR218081.1)과 99.64% 상동성을 보였다. 따라서, 39-G1 균주는 Alteromonas 속으로 분류되었고, Alteromonas sp. 39-G1으로 명명하였다. DNASTAR 프로그램의 Clustal W 방법에 의해 생성된 계통수들은 동일한 분류를 보여주었다.

KOPRI 극지연구소

Supplementary Fig. S1. 16S rRNA sequence of strain 39-G1

```
   1 ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAAACATGTCTAGCTTGCT   60
  61 AGATGATGTCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTTGCGAGGGGGA  120
 121 TAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGACCAAACGGGGCTTAGGC  180
 181 TCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAG  240
 241 GCAACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC  300
 301 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGC  360
 361 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAG  420
 421 TTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG  480
 481 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGC  540
 541 GCACGCAGGCGGTTTGTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACGGTCAT  600
 601 TTAGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGGAGTGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA  660
 661 TGCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGA  720
 721 CTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAA  780
 781 ACGCTGTCTACTAGCTGTTTGTGGCTTTAAGCCGTGAGTAGCGAAGCTAACGCGATAAGT  840
 841 AGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA  900
 901 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGAC 1060
1061 ATGTTGAGAAGTTACTAGAGATAGTTTCGTGCCTTCGGGAACTCAAACACAGGTGCTGCA 1120
1121 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT 1180
1181 TGTCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA 1240
1241 GGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTA 1300
1301 CAATGGCATATACAGAGGGATGCGAGACAGTGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGTATGTC 1360
1361 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG 1420
1421 GTCAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG 1480
1481 GAGTGGGATGCAAAAGAAGTAGTTA                                     1505
```

Supplementary Fig. S2. Phylogenetic tree of strain 39-G1 using 16S rRNA sequence



- 유전체 DNA는 *Alteromonas* sp. 39-G1에서 추출되었다. DNA 단편은 pUC19 플라스미드에 삽입되었고, 재조합 플라스미드 라이브러리를 사용해서 *E. coli* DH5α를 형질전환 하였다. 트리부티린/LB 한천판에서 명확한 halo zone을 보이는 클론을 발견하고, 클론으로부터 얻은 재조합 플라스미드를 분석하였다. 이러한 결과 분석은 에스테라제/리파제 유전자로 추정되는 하나의 유전자 ORF을 발견했다.

- 유전자는 1,140개의 뉴클레오티드와 379개의 아미노산으로 구성되어 있다. BLAST search를 통해 이 단백질은 esterase family IV에 속하는 것으로 밝혀졌다. 이 효소를 '에스터라제 EstA1'이라고 부르기로 했다. esterase EstA1 및 family IV에 속하는 다른 esterases를 사용하여 계통수를 구성하였으며, 이 esterase EstA1은 *Alteromonas* sp. esterase (GenBank PHS53692.1)와 동일하다는 것이 밝혀졌습니다. 이 단백질 서

열은 이미 보고되었지만, 이 단백질에 대한 보고가 없었기 때문에 본 과제를 통해 효소의 생산, 특성분석 등의 연구를 처음으로 수행하였음.

Supplementary Fig. S3. Nucleotide and protein sequence of esterase EstA1

```
   1 ATGAACCTACTTACCTTTTCCTTCGCCTTTTTCATTTTGGTGGTATCAATGACCTTTTCGGCTTCTACATCTGGGGCTTCTACCCACAAC    90
   1  M  N  L  L  T  F  S  F  A  F  F  I  L  V  V  S  M  T  F  S  A  S  T  S  G  A  S  T  H  N    30
  91 ACTGATACGGCCAGTGCGAGTAAACAAAAGGCCGATACAGTCAAAATCTCTAATGAATCTCCGTTAACCGTGCCAGCTAAAACGTTACCG    180
  31  T  D  T  A  S  A  S  K  Q  K  A  D  T  V  K  I  S  N  E  S  P  L  T  V  P  A  K  T  L  P    60
 181 CTGCCAAGTGCTTCAAGCGATGAACTTAAAAGCGCGATTTCTCAATACCCCATGCCGTCAGTTGATGAAGTCATTAACAACACGCCTCAA    270
  61  L  P  S  A  S  S  D  E  L  K  S  A  I  S  Q  Y  P  M  P  S  V  D  E  V  I  N  N  T  P  Q    90
 271 TCTATAGAGCAGTGGCGTGAATTGATTCAAATAAGAAATGCAGATCAGAAAAAGAAAATCAAAAAAATGCGCAAGCAGTTTGATGTTGAT    360
  91  S  I  E  Q  W  R  E  L  I  Q  I  R  N  A  D  Q  K  K  K  I  K  K  M  R  K  Q  F  D  V  D    120
 361 GTGTCTTTGGAAAAAATTAATGGCGTACCGGTCAGGCGACTTACGCCAAAGACCATTGCCCCTGAATTTAAAAACAAGGTATTTATTGAC    450
 121  V  S  L  E  K  I  N  G  V  P  V  R  R  L  T  P  K  T  I  A  P  E  F  K  N  K  V  F  I  D    150
 451 GTACACGGTGGCGCTTACGTGTTTTTTTCCGGGCTGCCCAGCATAGAAGAAAGCTTGTTAATTGCCCATAGAGTGGGTATTACAGTGATT    540
 151  V  H  G  G  A  Y  V  F  F  S  G  L  P  S  I  E  E  S  L  L  I  A  H  R  V  G  I  T  V  I    180
 541 AGTATCGATTATAGCATGCCACCTCATGCGCCATTTCCAGCAGCACTTAACGATGTAGTGTCGGTTTATAGCAGCGTGGCTGCAGAACAT    630
 181  S  I  D  Y  S  M  P  P  H  A  P  F  P  A  A  L  N  D  V  V  S  V  Y  S  S  V  A  A  E  H    210
 631 GGCGCACAGAATCTTTTTATAGGTGGCACATCTGCAGGAGCAGGTTTAGTGCTTGCTGCCGTGCAAACGCTTATTGCTGACAAGCAACCG    720
 211  G  A  Q  N  L  F  I  G  G  T  S  A  G  A  G  L  V  L  A  A  V  Q  T  L  I  A  D  K  Q  P    240
 721 TTGCCAGCAGCAGTGTATGCGGGCACCCCTTGGGCTGATTTGACGAAAACCGGCGATACCCTTTATACCAATGAAGGTGTTGATCGTATT    810
 241  L  P  A  A  V  Y  A  G  T  P  W  A  D  L  T  K  T  G  D  T  L  Y  T  N  E  G  V  D  R  I    270
 811 TTGGTGACATACCAAGGGTTTTTGGAAGCAGCGGCTAATCTATATGCTGGAAGCGAAAGCTTAACCCACTCCTCTATTTCCCCTCTTTAT    900
 271  L  V  T  Y  Q  G  F  L  E  A  A  A  N  L  Y  A  G  S  E  S  L  T  H  S  S  I  S  P  L  Y    300
 901 GGCAATTTTGATGGCTTCCCGCCTACGTTTTTAATATCTGGCACGCGAGATATGTTTCTAAGCGATACGGTGCGGGTGAATCGTAAGCTA    990
 301  G  N  F  D  G  F  P  P  T  F  L  I  S  G  T  R  D  M  F  L  S  D  T  V  R  V  N  R  K  L    330
 991 CGTGATGCACAAGTACGCACCCAGTTAGAGGTTTTCGAAGGGTTATCCCATGCCGATTACGTTGTTGCTTATGAAACCCCAGAATCTCAC   1080
 331  R  D  A  Q  V  R  T  Q  L  E  V  F  E  G  L  S  H  A  D  Y  V  V  A  Y  E  T  P  E  S  H    360
1081 TCTGTATACCAAGAGCTTAAGCAATTTCTACTAAGCGTGTGTACTAAAAGTAGCGACTAA                                  1140
 361  S  V  Y  Q  E  L  K  Q  F  L  L  S  V  C  T  K  S  S  D ***                                  379
```

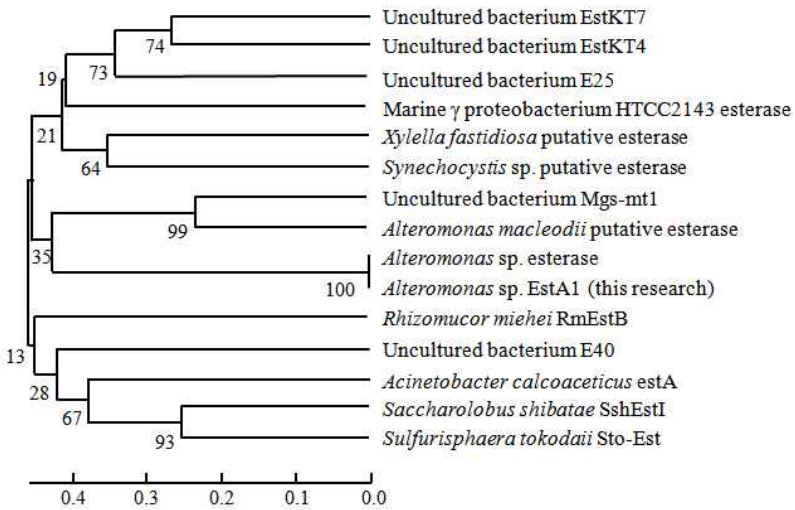


Fig. Esterase EstA1 sequence was compared with similar proteins, including uncultured bacterium EstKT7 (GenBank ADH59413.1), uncultured bacterium EstKT4 (GenBank ADH59412.1), uncultured bacterium E25 (PDB 4Q05), marine gamma proteobacterium HTCC2143 putative esterase (ZP_01615954.1), *Xylella fastidiosa* putative esterase (UniProtKB/Swiss-Prot Q9PCN5), *Synechocystis* sp. putative esterase (UniProtKB/Swiss-Prot P72953), uncultured bacterium Mgs-mt1 (PDB 4Q3O), *Alteromonas macleodii* esterase (YP_002127854.1), *Alteromonas* sp. esterase (GenBank PHS53692.1), *Rhizomucor miehei* RmEstB (PDB 4WY8), uncultured bacterium E40 (PDB 4XVC), *Acinetobacter calcoaceticus* estA (GenBank CAA50601.1), *Saccharolobus shibatae* SshEstI (PDB 3WJ1), and *Sulfurisphaera tokodaii* Sto-Est (PDB 3AIK). The

phylogenetic tree was generated with the neighbor-joining method (MEGA 5.2). Bootstrap values (n = 1,000 replicates) are reported as percentages.

- Esterase 39-G1의 2차, 3차 구조를 예측하기 위해서 기존에 연구된 family IV 효소들과 sequence alignment를 수행하였음. 보존된 HGG, GTSAG 모티브 서열을 확인하였고, catalytic triad (Ser221, Asp317 and His347)를 찾았음. Family IV에 특이적인 N-terminal cap domain (α1, α2, and α3)을 확인함

- esterase EstA1의 구조 상동 모델을 구축하기 위해, 우리는 template 구조로서 uncultured bacterium Mgs-mt1 esterase (PDB:4Q3O)를 사용하였다. 예상대로, esterase EstA1은 중심에 β 시트가 있는 α/β 가수 분해 효소 폴드 구조와 앞뒤로 둘러싸인 여러 α 나선을 가지고 있습니다. 앞서 언급한 S221, D317 및 H347은 활성 사이트 포켓에서 서로 약 3Å 떨어져 있으며 catalytic triad 로 식별된다. 흥미롭게도, family IV enzymes는 활성 부위를 덮는 캡 도메인과 나머지 대부분을 차지하는 촉매 도메인으로 구성된다. 이 cap domain은 효소 활성, 특이성, 위치 선택성, 열 친화성 및 열 안정성과 직접 또는 간접적으로 관련이 있는 것으로 알려져 있다. esterase EstAl의 구조는 3개의 나선 (α1, α2, 및 α3)과 활성 부위를 포함하는 촉매 도메인으로 명확하게 나뉘어져 있다.

- *E. coli* BL21 (DE3) 세포에서 esterase EstA1을 생산하는데 pET 22 벡터를 사용하였다. C-말단에서 His6 tag를 가진 intact enzyme 은 대장균 세포에서 생산되었지만, 세포 없는 추출물에서의 효소 활성은 높지 않았다 (4.7 U/mg protein). 따라서 SDS-PAGE에서는 예상되는 재조합 단백질 밴드가 검출되지 않았다. 활성 에스터라제 EstA1을 생산하기 위해 우리는 N 말단 서열을 부분적으로 제거한 두 개의 돌연변이 단백질을 만들었다. SignalP 4.1 Server 프로그램은 N terminal 신호 서열이 Met1에서 Ser20까지 위치할 것으로 예측하여 신호 서열이 제거된 하나의 돌연변이 효소를 제조하였다(Δ20). 또 다른 돌연변이 효소(Δ54)는 3D 구조가 이미 밝혀진 Mgs-mt1 esterase (PDB: 4Q3O)와 비교하여 N-terminal 54 아미노산을 제거하여 제조하였다. *E. coli* BL21 (DE3) 세포에서 두 돌연변이체를 발현시키고자 하였으며, 두 돌연변이체 모두 높은 효소 활성을 보였다(약 23 U/mg protein). 또한 SDS-PAGE에

서 두 개의 가용성 재조합 단백질 밴드의 예상 크기를 검출할 수 있었다. 두 돌연변이체는 높은 활성을 보였지만, 두 번째 돌연변이체(Δ54)는 약간 더 높은 활성을 보였으며, 이 연구에서 두 번째 돌연변이체(Δ54)는 정제되었고, 생화학적 특성을 조사하였다.

- Esterase 39-G1를 *E. coli* BL21 (DE3)에서 생산하기 위해서 두 가지 mutant (Δ1-20, Δ1-54) 를 제조함. WT에 비해서 mutant 효소의 생산량이 증가했고 효소활성이 5배 정도 커졌음.

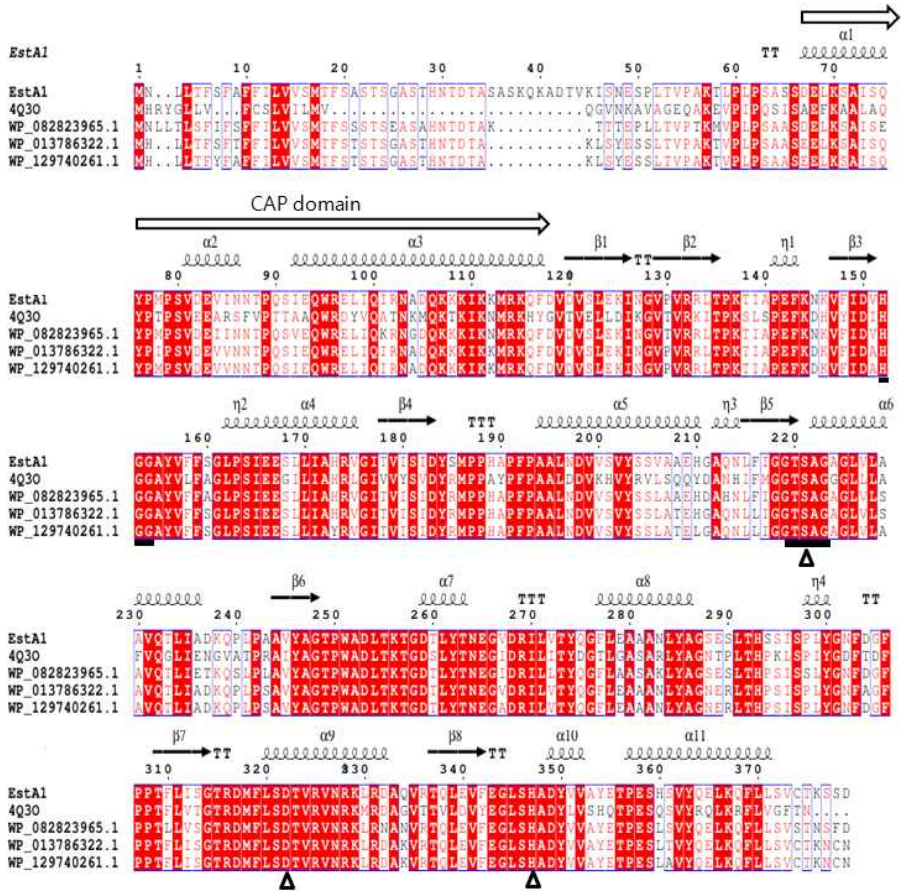


Fig. Multiple sequence alignment of esterase EstA1 with other related enzymes. 4Q3O, MGS-MT1 α/β hydrolase from uncultured bacteria; WP_082823965.1, α/β hydrolase from *Alteromonas stellipolaris*; WP_013786322.1, α/β hydrolase from *Alteromonas naphthalenivorans*; WP_129740261.1 α/β hydrolase from *Alteromonas* sp. 76-1. Empty triangles (△) represent putative catalytic triad: S221, D317, H347. The α-helix, β-sheet, random coil, and beta turn represent as α, β, η, and T, respectively. Black squares

represent the oxyanion hole and pentapeptide near active site serine residue. White arrow represents the Cap domain of esterase EstA1. Red boxes indicate regions with identical amino acids residues.

- Esterase 39-G1의 특성을 연구하기 위해서 mutant (Δ1-54)를 분리하였다. Ni-NTA컬럼과 GPA컬럼을 사용해서 효소를 분리한 결과, 비활성이 98.6 U/mg이고 분리수율은 13.8%로 나타났다. SDS-PAGE상에서 단일 밴드로 분리되었다. 분리된 효소의 기질특이성, 온도 및 pH 특성을 조사하였다. 이 효소는 최적온도가 40도이지만, 0도에서도 40% 활성이 유지되었고 0-40도 구간에서 E_a값이 4.15 kcal/mol로 측정되어서 전형적인 cold-adapted enzyme임을 확인함.

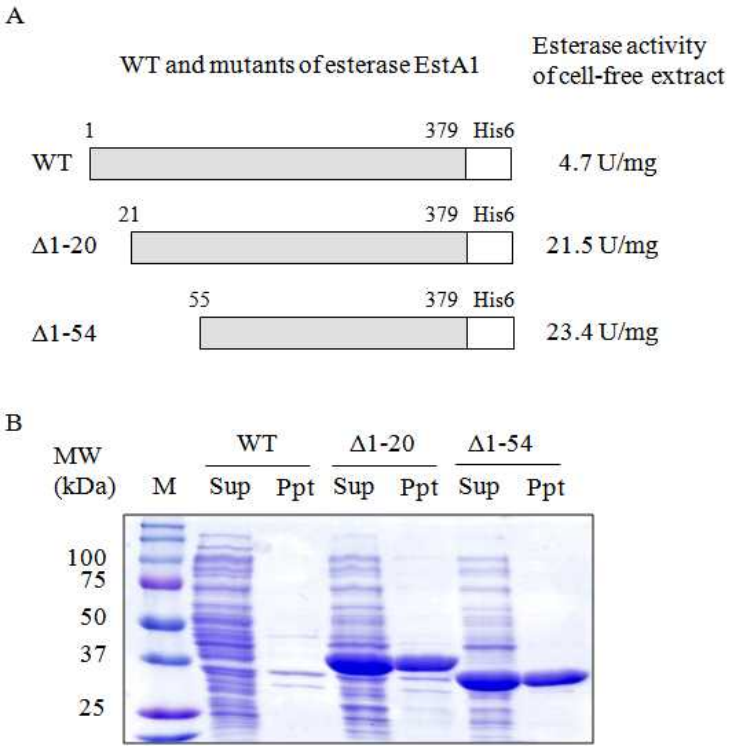
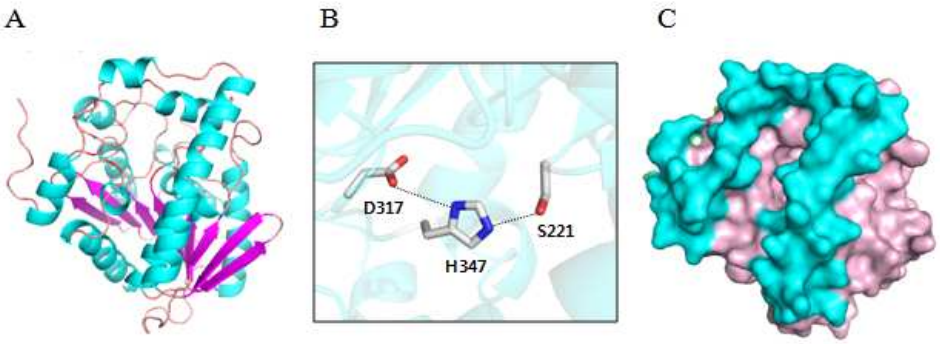


Fig. Construction of mutant esterase EstA1 for protein expression in *E. coli*
A, Wild type (WT) and two mutants (Δ1-20, Δ1-54) were constructed, and the esterase activities of the three recombinant *E. coli* cell-free extracts were measured. B, Protein profiles of the three recombinant *E. coli* cells were analyzed by SDS-PAGE. M, protein size marker; Sup, supernatant (cell-free extract); Ppt, pellet.



Supplementary Table S2. Purification of EstA1

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Cell-free extract	2010	86.0	23.4	1.0	100
Ni-NTA agarose	876	10.7	81.9	3.5	43.5
Superose 12	277	2.81	98.6	4.2	13.8

Fig. Structure homology model of esterase EstA1

A, Homology model of esterase EstA1 constructed by SWISS-MODEL with MGS-MT1 (PDB 4Q3O) used as the template. The α-helix, β-sheet, loop, and catalytic triad are shown in cartoon in sky blue, purple, pink, and red, respectively. B, An enlarged view of the esterase EstA1 putative catalytic triad. Three amino acids (S221, D317, H347) that were expected to affect enzyme activity were located close to each other. C, Cap domain and catalytic domain are shown purple and red, respectively.

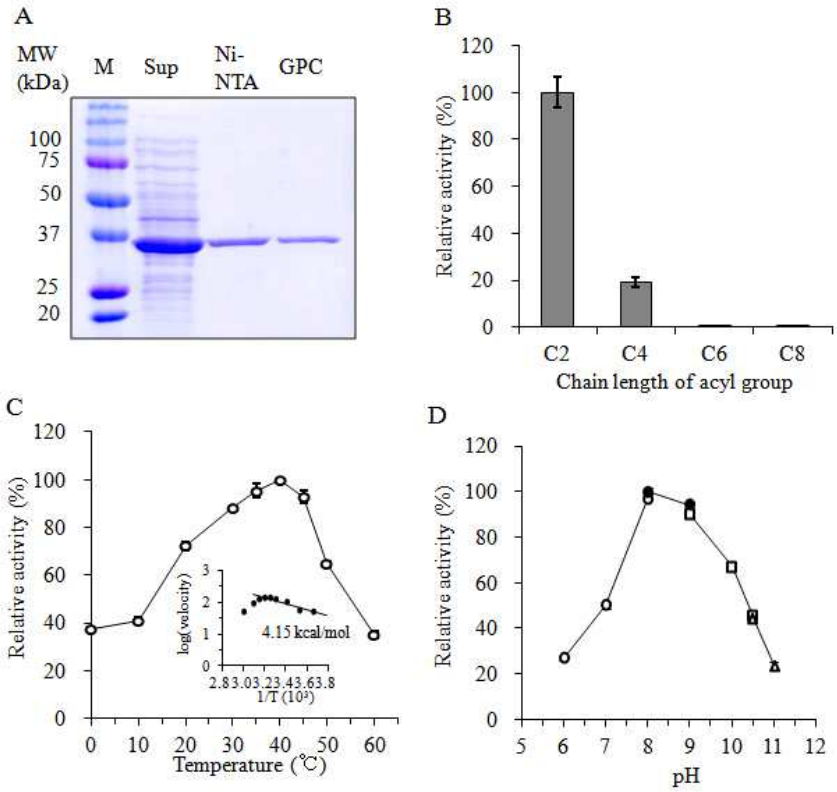
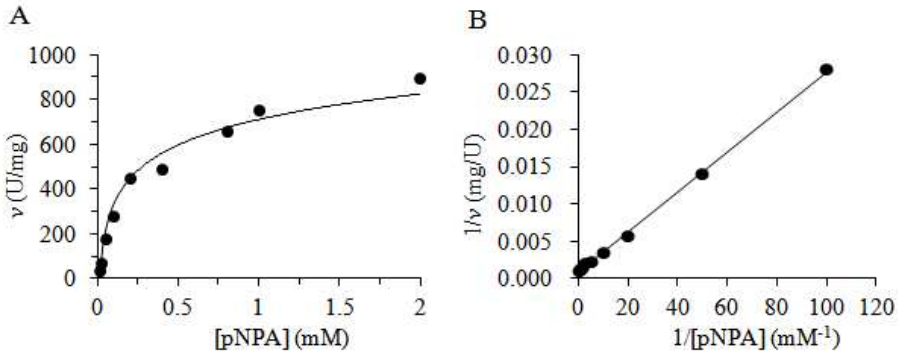


Fig. Purification and characterization of esterase EstA1

A, During purification of esterase EstA1, protein profiles were analyzed by SDS-PAGE. M, protein size marker; Sup, cell-free extract; Ni-NTA, proteins after Ni-NTA chromatography; GPC, proteins after gel permeation chromatography. B, Substrate specificity of esterase EstA1 was examined towards *p*-NP esters (C2, acetate; C4, butyrate; C6, caproate; C8, caprylate). C, Effect of temperature on the esterase EstA1 was measured. D, A graph was made using the Arrhenius equation to obtain the activation energy of the esterase EstA1. E, The effect of pH on the esterase EstA1 was measured. pH (6.0–8.0), 50 mM potassium phosphate; pH (8.0–9.0), 50 mM Tris-HCl; pH (9.0–10.5), 50 mM carbonate-bicarbonate; pH (10.5–11.0), 50 mM Na_2HPO_4-NaOH.

- Esterase 39-G1의 enzyme kinetic을 수행한 결과, 기질 pNPA에 대한 K_m, V_{max}, k_{cat} 값이 각각 0.28 mM, 1000 μmol·mg^{-1}·min^{-1}, 320 s^{-1},로 측정됨.

- 효소저해제, detergent에 대한 활성 및 안정성을 측정하였고, NaCl 농도에 따른 활성을 측정하였다. 이 효소가 3-4 M NaCl 농도에서 가장 높은 활성을 보였고 동일 농도에서 8시간까지 안정성이 유지되었음. 따라서 북극 해양에서 분리된 esterase 39-G1는 salt-tolerant enzyme임이 확인됨.



Supplementary Fig. S4. Enzyme kinetics of the esterase EstA1 using pNPA (C_2) substrate.

A, This graph shows enzyme activity according to pNPA concentration. B, Lineweaver-Burk plot was drown to calculate the K_M and V_{max} values.

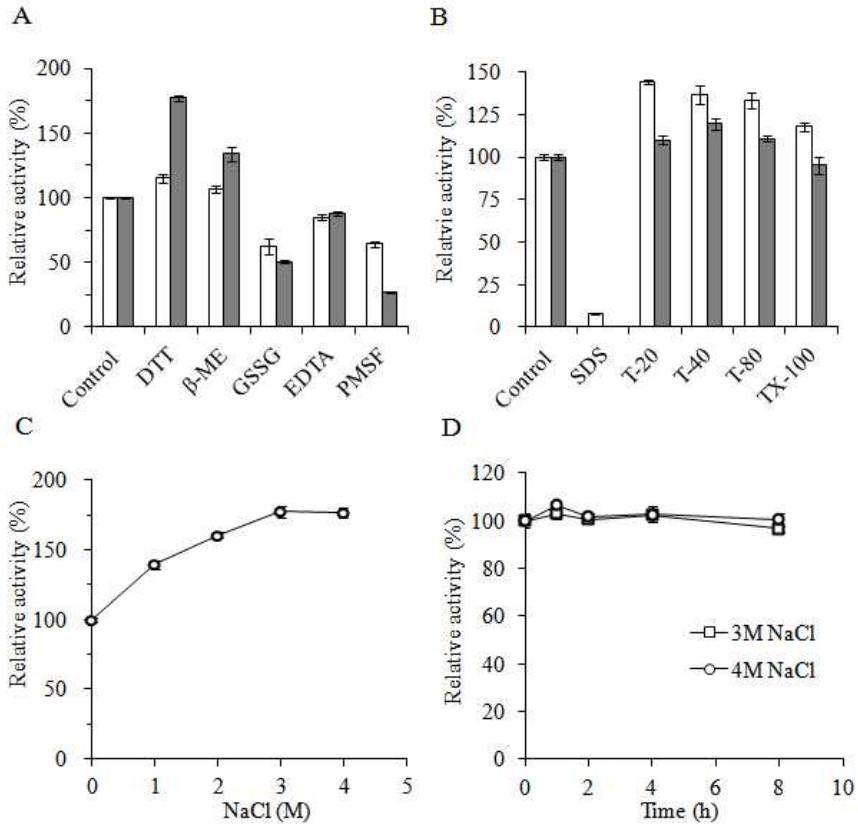


Fig. Effect of chemical reagents on esterase EstA1

A, The effect of various inhibitors on esterase EstA1 was measured. White bar, 1 mM; black bar, 5 mM. B, The effects of various detergents on esterase EstA1 were measured. White bar, 0.1%; black bar, 0.5%. C, The effect of NaCl on esterase EstA1 activity was measured. D, The effect of NaCl on esterase EstA1 stability was measured.

- Esterase 39-G1의 유기용매 내성을 측정한 결과, 대부분의 용매에서 15% 농도까지 안정한 효소임이 확인되었고, DMSO, cyclohexane, n-hexane에서 30%까지 안정한 것으로 밝혀짐.

- 이 효소는 북극 해양 미생물로부터 분리되어 있기 때문에 높은 농도의 NaCl에 대한 안정성과 활성을 기대할 수 있었다. 이 효소의 활성은 NaCl 농도가 증가함에 따라 지속적으로 증가하였고, 3M NaCl 농도에서 177%의 효소 활성을 나타내었다. 효소는 4 M NaCl에서도 매우 높은 활성을 보였다 (176%). 이 효소는 (3-4) M NaCl의 존재 하에서 8시간 동안 효소 활성을 유지했다. 물 분자는 단백질의 구조와 기능에 필수적이며 단백질 응집을 방지하는 데 필수적이다. 수용액에서 염 이온의 농도가 높으면 단백질이 사용할 수 있는 물 분자의 수가 감소하여 단백질이 수화되는 것이 불가능합니다. 이 현상은 유기 용매에의 한 단백질에 이용 가능한 물 분자의 감소와 유사하다. 그러나 호염성 단백질은 염 이온이 증가하더라도 구조를 유지하고 효소 활성을 유지할 수 있다. 일부 호염성 효소는 높은 염 농도 하에서 더 나은 효소 활성을 나타낼 수 있다. 염 농도는 호염성 단백질의 접힘, 형태, 서브 유닛 구조 및 운동학에 유의한 영향을 미칠 수 있습니다. 이 효소는 높은 염 농도에서 높은 활성 및 안정성을 가지고 있기 때문에 이 효소의 구조 및 활성 연구는 학문적으로나 산업적으로 의미 있다.

- 각종 금속이온에서 효소가 안정한 것으로 밝혀짐. 따라서 이 효소는 북극 해양에서 발견된 신규한 효소로서 저온에서 활성이 있고 염분, 유기용매, 금속이온에 안정한 효소인 것으로 판명되었음.

Table 1. Effects of organic solvents on EstA1 esterase

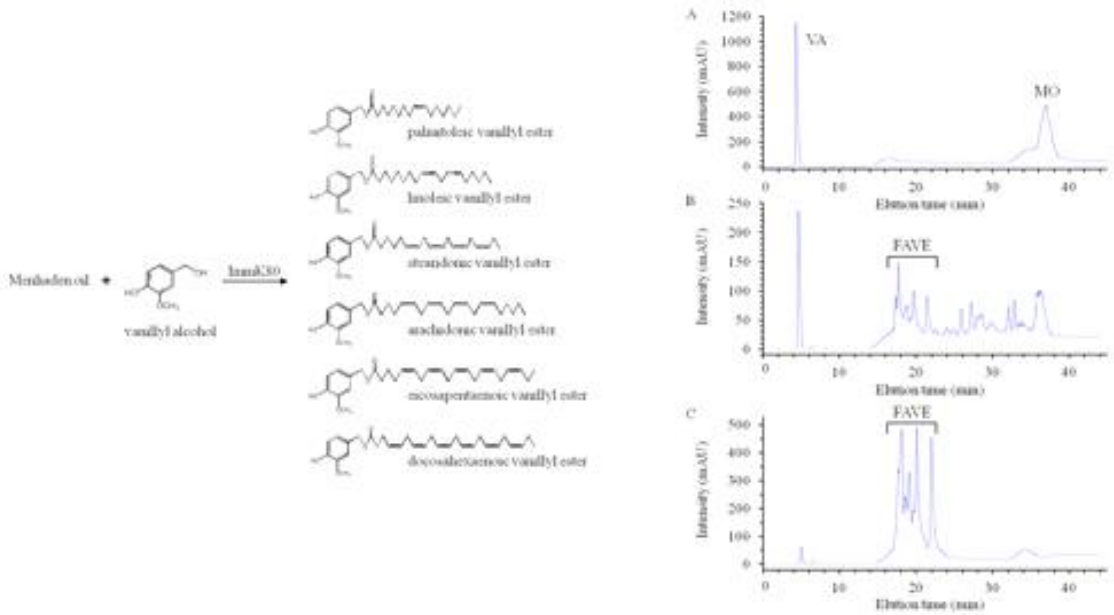
Solvent	log *P*	Residual activity (%) at a concentration of		
		15%	30%	50%
None		100 ± 2.08	100 ± 2.08	100 ± 2.08
DMSO	-1.3	93.63 ± 1.97	102.53 ± 0.68	100.15 ± 2.88
Methanol	-0.76	62.52 ± 1.41	13.12 ± 0.68	ND
Acetonitrile	-0.33	2.01 ± 0.09	ND	ND
Ethanol	-0.24	94.84 ± 0.69	ND	ND
Acetone	-0.23	87.68 ± 0.38	ND	ND
Isopropanol	0.1	93.64 ± 1.69	ND	ND
Chloroform	2.0	58.33 ± 0.79	54.39 ± 1.71	47.42 ± 1.06
Cyclohexane	3.2	93.48 ± 1.69	84.95 ± 3.65	ND
n-Hexane	3.5	99.65 ± 2.86	84.24 ± 1.46	ND

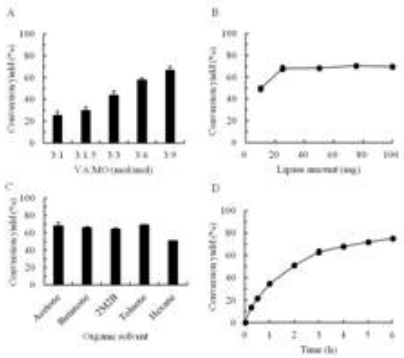
Table 2. Effects of metal ions on EstA1 esterase

Ion	Relative activity (%)	
	1mM	5mM
None	100 ± 4.32	100 ± 4.32
Li^+	139.91 ± 7.75	139.34 ± 5.02
Na^+	118.92 ± 3.40	140.28 ± 11.56
K^+	112.05 ± 5.98	128.23 ± 2.37
Mg^{2+}	120.14 ± 8.19	121.17 ± 5.99
Ca^{2+}	143.01 ± 11.47	143.76 ± 5.08
Co^{2+}	100.94 ± 8.75	90.39 ± 2.71
Ni^{2+}	114.02 ± 4.24	113.27 ± 1.39
Zn^{2+}	78.07 ± 3.30	38.54 ± 1.42
Cu^{2+}	94.63 ± 7.04	48.79 ± 1.02

5절. 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. Fish oil에는 다양한 불포화 지방산이 포함되어 있기 때문에 이것들을 FAVE로 명명하였음.
- 기질의 몰비, 유기용매 조건, 효소량, 반응시간을 조사하였다.
- 생산된 FAVE을 사용해서 DPPH를 이용한 항산화활성을 확인하였다.
- FAVE의 *G. stearothemophilus*, *B. coagulans*, *A. faecalis* 균에 대한 생장 저해 활성을 조사하였다.





<DPPH radical scavenging activity>

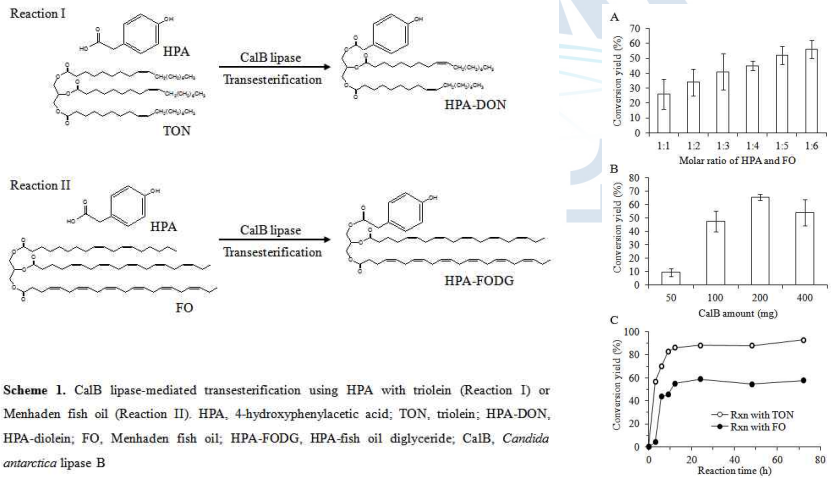
Compounds	IC_{50} (mM)[a]	
	1-Butanol	Toluene
BHT[b]	0.421	1.98
Menhaden oil	22.4	2.91
Vanillyl alcohol	0.055	1.25
FAVE	0.457	0.555

<MIC values of vanillyl alcohol, menhaden oil, and FAVE>

Compounds	MIC (μM)[a]		
	G. stearothermophilus	*B. coagulans*	*A. faecalis*
Vanillyl alcohol[b]	>2500	>2500	>2500
Menhaden oil[c]	> 25	> 25	> 25
FAVE	1.25	2.5	1.25

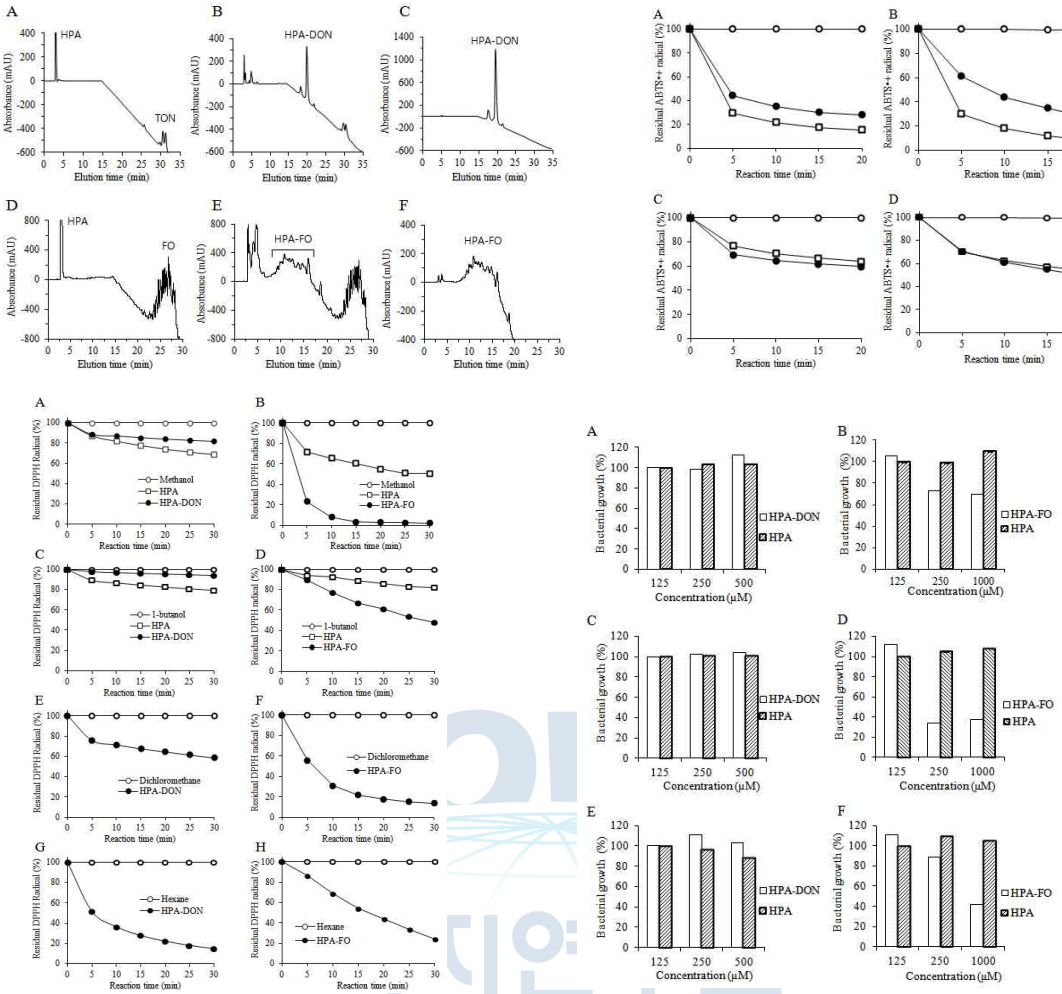
6절. 상업용 리파아제를 이용한 HPA-FO 합성

- 상업용 리파아제인 CalB효소를 이용해서 phenol lipid 합성반응을 수행하였음.
- 반응I에서는 HPA와 TON을 기질로 사용해서 HPA-DON를 합성하는 반응이고, 반응II에서는 HPA와 FO를 기질로 사용해서 HPA-FO를 합성하는 반응임.
- 반응조건을 최적화하기 위해서 기질의 농도, 효소 양, 반응시간을 증가하면서 반응 수율을 구하였음.



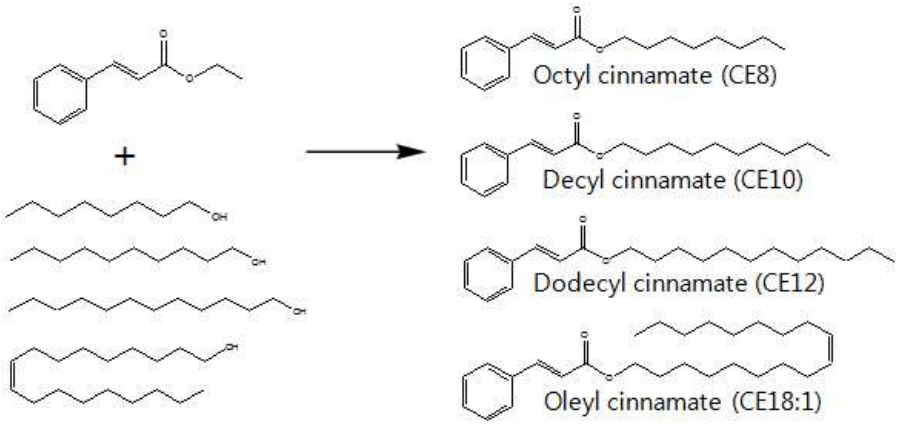
Scheme 1. CalB lipase-mediated transesterification using HPA with triolein (Reaction I) or Menhaden fish oil (Reaction II). HPA, 4-hydroxyphenylacetic acid; TON, triolein; HPA-DON, HPA-diolein; FO, Menhaden fish oil; HPA-FODG, HPA-fish oil diglyceride; CalB, *Candida antarctica* lipase B

- 반응산물을 확인하기 위해서 HPLC 분석을 수행하였음. 반응이 진행됨에 따라서 HPA기질이 감소하고 반응산물인 HPA-DON, HPA-FO가 증가하는 것을 확인함. Prep-LC를 사용해서 반응산물을 순수하게 분리하였음.
- 반응산물을 이용해서 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical scavenging assay, ABTS assay를 수행하였음. HPA-DON은 비극성 용매에서 항산화 활성이 크게 나타났고 HPA-FO은 극성 및 비극성 용매에서 모두 활성이 크게 나타났다.
- 반응산물을 이용해서 3가지 식품유해균에 대한 생장 저해활성을 조사하였음. HPA-FO의 경우, *Alcaligens faecalis*균과 *Geobacillus stearothermophilus*균에 대해 높은 항균활성을 보였음.



7절. 상업용 리파아제를 이용한 중쇄지방산 cinnamate 합성

- cinnamate는 항산화 활성을 지니고 있고, 중쇄지방족 알코올이 항균 활성을 지니고 있기 때문에 중쇄지방족 알코올을 cinnamate에 결합하기로 계획함
- ethyl cinnamate와 다양한 길이의 fatty alcohol을 기질로 사용해서 phenolic lipid를 합성하였음.
- 지방족 알코올의 길이를 caprylic (C8), capric (C10), lauric (C12), oleic (C18:1)까지 다양하게 사용해서 효소반응을 수행함.



- 최적의 효소반응 비극성 용매를 선정하기 위해서 2-butanone, cyclohexane, dichloromethane, hexaene, toluene 용매에서 반응을 수행함.
- ethyl cinnamate와 지방족 알코올 기질의 몰비를 1:1부터 1:6까지 변화하면서 반응을 수행하고 전환 수율을 측정함.

KOPRI

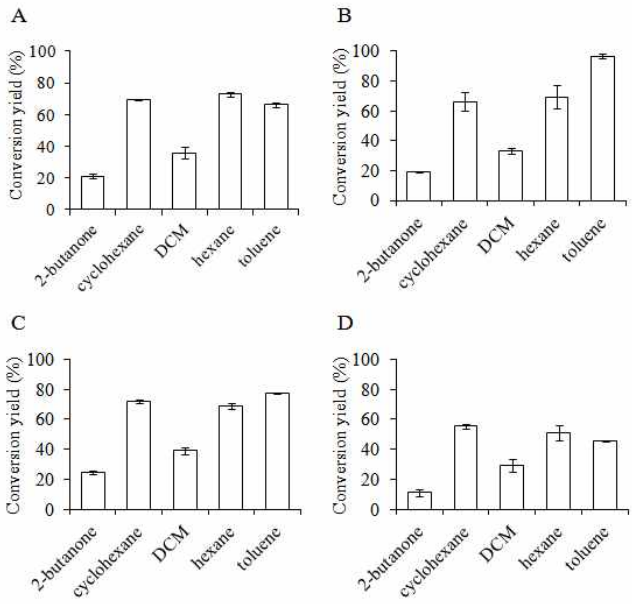


Fig. 1. Effects of organic solvents on the conversion yield.

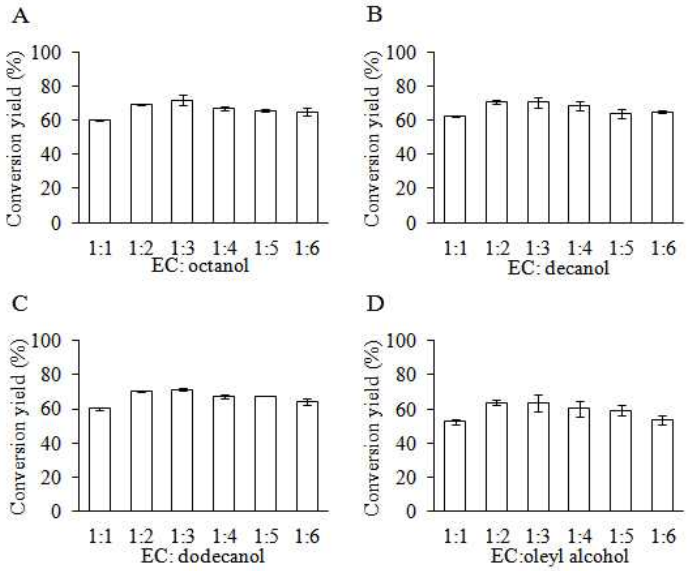


Fig. 2. Effects of molar ratio of EC and fatty alcohol on the conversion yield.

- 효소 반응시간에 따른 반응 수율을 측정함으로써 반응 최적 시간을 결정함.
- 최종적으로 4가지 반응산물 (CE8, CE10, CE12, CE18:1)에 대한 반응 수율을 95% 까지 높이는 데에 성공함.
- 이들 반응산물을 이용해서 항산화활성, 항균활성을 조사 진행.

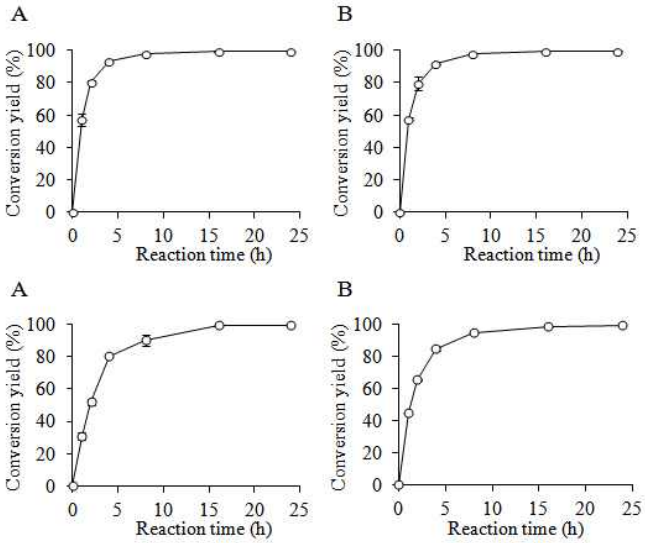


Fig. 4. Time course of enzyme conversion.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절. 성과목표 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 유래 특수기능 리파아제 발굴 및 재조합 리파아제 생산	1-1	극지 유래 특수기능 리파아제 발굴	*Marinobacter lipolyticus* LipA9, *Croceibacter atlanticus* LipCA, *Alteromonas* 39-G1 리파아제 유전자를 클로닝 하였음	-리파아제/에스터라제 유전자 발굴 -달성도 100%
	1-2	재조합 리파아제 생산	LipA9, LipCA, EstA1 유전자를 pET 22벡터에 삽입하고 *E. coli* 균에서 활성 형태로 대량 생산하였음 LipA9, LipCA, EstA1 효소를 순수 분리하고 온도 및 pH 활성, 기질특이성 등 효소반응특성을 규명하였음	-LipA9, LipCA, EstA1 대량 생산, 분리, 특성규명 -달성도 100%
2. 극지 미생물 리파아제의 mutant 제조	2-1	리파아제 변이효소 제조	EstA1 효소 구조를 기반으로 N-말단이 deletion된 mutant enzyme 제조	-변이활성효소 △20, △54 mutant 제조 -달성도 100%
	2-2	변이효소 특성규명	변이효소 △20, △54 mutant의 특성을 규명하였음	-△20, △54 변이효소의 특성 규명 -100% 달성
3. 극지 리파아제를 이용한 페놀릭 리피드 생산	3-1	페놀릭 리피드 생산	리파아제를 이용해서 FAVE, HPA-FO, cinnamate ester 4종을 합성하였음	-FAVE 합성 -HPA-FO 합성 -CE8, CE10, CE12, CE18 합성 -100% 달성
	3-2	페놀릭 리피드 활성조사	FAVE, HPA-FO, CE8, CE10, CE12, CE18의 항산화 활성 조사	-FAVE활성 조사 -HPA-FO 활성 조사 -CE8, CE10, CE12, CE18 활성 규명 -90% 달성

KOPRI 극지연구소

2절 세부목표 달성 내용

1. 극지 유래 특수기능 리파아제 발굴

연 구 내 용	연 구 결 과
극지에서 분리한 미생물 리파아제 활성 측정	• 극지연구소로부터 저온성 미생물을 분양받음. • TBN plate에서 활성을 보이는 균주 확보 • olive oil/pH stat assay에서 1 U/ml이상의 활성을 보이는 균주 확보 • *Marinobacter lipolyticus* 27-A9 균으로부터 LipA9 리파아제 유전자를 발굴함 • *Croceibacter atlanticus* 40-F12 균으로부터 LipCA 리파아제 유전자를 발굴함 • *Alteromonas* 39-G1 균으로부터 EstA1 에스터라제 유전자를 발굴함
리파아제의 신규성 및 기능성 조사	• LipA9 유전자는 총 1,215개의 염기로 구성되어 있으며, 단백질은 404개의 아미노산으로 구성되어 있음. LipA9효소가 유기용매 내성이 우수한 효소임을 밝힘 • LipCA 유전자는 1,023개 염기로 구성되었으며, 단백질의 경우, 341개 아미노산으로 구성되었음. 효소 특성이 전혀 보고되지 않은 효소임. • EstA1 유전자는 1,140개의 뉴클레오티드와 379개의 아미노산으로 구성되어 있다. 효소 특성이 전혀 보고되지 않은 효소임.

KOPRI 극지연구소

2. 재조합 리파아제 생산

연 구 내 용	연 구 결 과
리파아제 유전자 클로닝	• *Marinobacter lipolyticus* 27-A9 균으로부터 LipA9 리파아제 유전자를 발굴함 • *Croceibacter atlanticus* 40-F12 균으로부터 LipCA 리파아제 유전자를 발굴함 • *Alteromonas* 39-G1 균으로부터 EstA1 에스터라제 유전자를 발굴함
재조합 리파아제 생산	• LipA9 리파아제 유전자를 pET22벡터에 클로닝하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 리파아제 효소발현실험을 수행하였음. • LipCA 리파아제 유전자를 pET22벡터에 클로닝하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 리파아제 효소발현실험을 수행하였음. • EstA1 에스터라제 유전자로부터 N-terminal이 삭제된 mutant를 개발하고, 변이효소 △20, △54 유전자를 pET22벡터에 클로닝하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 리파아제 효소발현실험을 수행하였음.
재조합 리파아제 특성조사	• LipA9 리파아제를 분리하고 온도, pH, 유기용매, 기질특이성을 조사함. 유기용매 내성이 매우 우수한 효소임 • 학술지: Se Hyeon Park, Soo-jin Kim, Seongsoon Park, Hyung Kwoun Kim (2019) Characterization of organic solvent-tolerant lipolytic enzyme from *Marinobacter lipolyticus* isolated from the Antarctic Ocean, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 187:1046-1060. • LipCA 리파아제를 분리하고 온도, pH, 유기용매, 기질특이성을 조사함. • 학술지: Chae Gyeong Park, Hyung Kwoun Kim (2018) Production, immobilization, and characterization of *Croceibacter atlanticus* lipase isolated from the Antarctic Ross Sea, *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 46: 234-243. • EstA1 에스터라제 분리하고 온도, pH, 유기용매, 기질특이성을 조사함. 저온성을 지니고 있고 염분농도가 높은 조건에서도 활성이 증가함. • 학술지: S.J. Won, H.K. Kim, (2020) Characterization of novel salt-tolerant esterase isolated from the marine bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *J. Microbiol. Biotechnol.* (in press)

3. 극지 리파아제를 이용한 페놀릭 리피드 생산

연 구 내 용	연 구 결 과
페놀릭 리피드 생산	• 리파아제를 이용해서 vanillyl alcohol과 fish oil로부터 FAVE을 합성함. 반응 조건을 최적화하기 위해서 유기용매, 기질의 몰비, 효소량, 반응시간을 조절함. • 리파아제를 이용해서 hydroxyphenyl acetic acid와 triolein, fish oil로부터 HPA-DON, HPA-dFO을 합성함. 반응 조건을 최적화하기 위해서 유기용매, 기질의 몰비, 효소량, 반응시간을 조절함. • etyl cinnamate와 중쇄지방족 알코올(caprylic, capric, lauric, oleic alcohol)로부터 cinnamate ester 4종(CE8, CE10, CE12, CE18:1)을 합성하였음. 반응 조건을 최적화하기 위해서 유기용매, 기질의 몰비, 효소량, 반응시간을 조절함.
페놀릭 리피드 활성조사	• FAVE의 DPPH 항산화 활성을 측정함. • FAVE의 *G. stearothemophilus*, *B. coagulans*, *A. faecalis* 균에 대한 생장 저해 활성을 측정함. • HPA-FO의 DPPH 항산화 활성을 측정함. • HPA-FO의 *G. stearothemophilus*, *B. coagulans*, *A. faecalis* 균에 대한 생장 저해 활성을 측정함. • 학술지: M. Sari, Y. Chung, F. Agatha, H.K. Kim. (2019) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of phenolic lipids produced by the transesterification of 4-hydroxyphenylacetic acid and triglycerides. *Appl. Biol. Chem*. 62, 5.

○ 학술대회 발표(포스터): Production and characterization of *Croceibacter atlanticus* lipase isolated from the Antarctic Ross Sea, 한국미생물생명공학회 정기학술대회(2018년 6월, 여수)

○ 학술대회 발표(포스터): Characterization of novel salt-tolerant esterase isolated from the marine bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. 한국미생물생명공학회 정기학술대회(2019년 6월, 제주)

○ 특허출원: 마리노박터 리포리티쿠스 유래 지질분해효소 출원번호 10-2018-0119955

○ 특허출원: 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소 출원번호 10-2018-0119954

○ 특허출원: 리파아제를 이용한 HPA, TG로부터 페놀리피드를 합성한 결과를 극지연구소와 공동으로 특허출원 진행함

○ 특허출원: 북극 해양세균 *Alteromonas* 39-G1균 유래의 에스터라제 유전자를 클로닝하고 활성효소를 대량 생산한 결과를 극지연구소와 공동으로 특허 출원 진행함

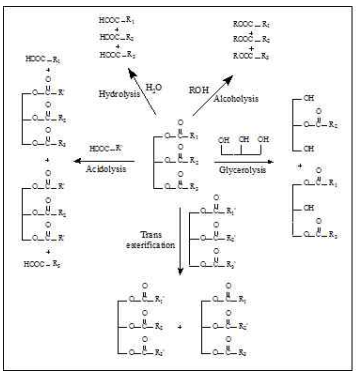
제 5 장 연구개발결과의 활용계획

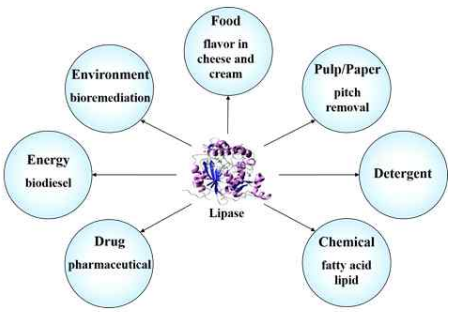
1절 학술적 활용계획

1. 남극 또는 북극과 같은 극한 환경에서 분리된 신규 저온성 미생물로부터 리파아제 효소를 분리하는 경우에 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 단백질 서열을 갖고 있으며 저온성, 기질특이성, 염분 내성, 유기용매 내성 등 새로운 기능을 갖고 있는 특수기능 효소를 발굴할 수 있을 것이다.
2. 저온성을 갖고 있으며 동시에 효소의 specific activity가 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, DHA, EPA와 같이 polyunsaturated fatty acid (PUFA)를 다량 함유하고 있는 지방산의 경우에는 상온에서 쉽게 산화되어 conjugated diene 또는 conjugaed 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

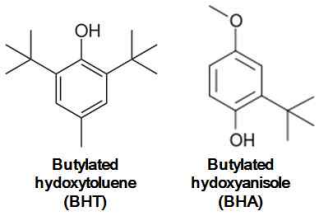
1. 리파아제는 다양한 화학반응을 촉매할 수 있어서 중요한 산업용 효소를 분류하고 있다. 산업적으로 리파아제는 세제산업, 식품산업, 화장품산업, 제약산업을 포함해서 다양한 분야에 사용되고 있다. 현재 CalB를 비롯해서 일부 곰팡이 및 세균 유래의 리파아제가 산업적으로 사용되고 있다. 극지에서 발굴하는 신규한 특수기능 저온성 리파아제를 대량생산하고 비드에 고정화해서 사용한다면 기존 상업용 효소를 대체할 수 있으며 나아가 새로운 산업을 창출할 수 있을 것으로 기대한다.





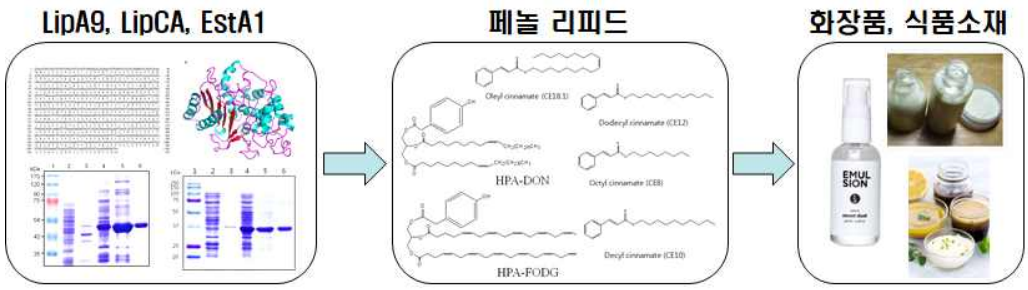
극지연구소

2. 항산화제는 일찍이 여러 산업분야에서 생산품의 산화를 방지하는 목적으로 사용되어왔는데 가장 널리 사용되었던 항산화제는 butylated hydoxytoluene (BHT)와 butylated hydroxylanisole (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. 따라서 리파아제를 이용해서 천연물질로부터 신규 항산화제를 개발한다면, 새로운 항산화제 시장을 개척할 수 있을 것이다.



3. 페놀릭 산 또는 페노릭 알코올은 항산화 활성을 갖고 있으며 지방산 또는 지방족 알코올과 결합하여 에스테르 화합물로 만들 수 있다. 이 방법으로 페놀 화합물의 비극성용매 또는 에멀젼에 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.

4. 극지 미생물인 Mariobacter lipolyticus, Croceibacter atlanticus, Alteromonsa 균으로부터 발굴한 LipA9, LipCA, EstA1 효소를 이용해서 다양한 페놀리피드를 합성하면, 천연물질로부터 신규한 화장품 식품 소재로 개발 할 수 있다.



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

Agnes Natalia, Soo-jin Kim, Hyung Kwoun Kim (2016) Antioxidant and antibacterial activity of fatty acid vanillyl ester produced by Proteus vulgaris K80 lipase-mediated transesterification. J. Molecul. Catal. B Enzym. 133, S475-S481.

Chae Gyeong Park, Hyung Kwoun Kim (2018) Production, immobilization, and characterization of *Croceibacter atlanticus* lipase isolated from the Antarctic Ross Sea, *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 46: 234-243.

Chae Gyeong Park, Jin Ju Kim, Hyung Kwoun Kim (2020) Lipase-mediated synthesis of ricinoleic acid vanillyl ester and evaluation of antioxidant and antibacterial activity. Enz. Microb. Technol., 133, 109454.

Dolores Pe´ rez, Sara Martı´n, Gloria Ferna´ndez-Lorente, Marco Filice, Jose´ Manuel Guisa´n, Antonio Ventosa, Marı´a Teresa Garcı´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).

KOPRI 극지연구소

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).

Se Hyeon Park, Soo-jin Kim, Seongsoon Park, Hyung Kwoun Kim (2019) Characterization of organic solvent-tolerant lipolytic enzyme from *Marinobacter lipolyticus* isolated from the Antarctic Ocean, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 187:1046-1060.

S. J. Won, H.K. Kim, (2020) Characterization of novel salt-tolerant esterase isolated from the marine bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *J. Microbiol. Biotechnol.* (in press)

KOPRI 극지연구소

주 의

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