

극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과  
기능성 소재 합성

Screening of multi-functional psychrophilic lipase from  
polar microorganisms and synthesis of functional  
compound



가톨릭대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지바이오 대사체 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과 기능성 지질 소재 합성” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



|               |   |        |
|---------------|---|--------|
| (본과제) 총괄연구책임자 | : | 임 정 한  |
| 위탁연구기관명       | : | 가톨릭대학교 |
| 위탁연구책임자       | : | 김 형 권  |
| 위탁참여연구원       | : | 원 석 재  |
| “             | : | 박 세 현  |
| “             | : | 정 한 별  |

## 보고서 초록

|   |                                  |  |            |               |              |
|---|----------------------------------|--|------------|---------------|--------------|
| 위탁연구과제명   | 극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과 기능성 소재 합성 |  |            |               |              |
| 위탁연구책임자   | 김 형 권                            | 해당단계<br>참여연구원<br>수   | 4명         | 해당단계<br>연구비   | 125,000,000원 |
| 연구기관명 및<br>소속부서명  | 가톨릭대학교 생명공학과                     |  | 참여기업명      |               |              |
| 국제공동연구  | 상대국명 :                           |  | 상대국연구기관명 : |               |              |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)   |                                  |  |            | 보고<br>서면<br>수 | 58           |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 남극 <i>Croceibacter atlanticus</i> 균에서 발견된 LipCA 리파제의 반응 특성을 개선하기 위해 error-prone PCR 방법을 사용함.</li> <li>• 변이 균주 M3-1은 WT 균주보다 약 3배 더 많은 리파아제 효소를 생산함.</li> <li>• M3-1 유전자의 염기서열이 WT 유전자와 4개의 염기서열(73, 381, 756, 822)이 다른 것을 확인한 후, WT와 M3-1 mRNA의 2차 구조를 예측하여 RNAfold로 비교함.</li> <li>• 73번 염기를 바꾸면(T→C), WT 효소 생산량이 감소하면서 돌연변이 효소 생산량이 감소함.</li> <li>• mRNA 서열을 변화시키면 mRNA의 안정성을 증가시킬 수 있고 대장균에서 외래 단백질의 생성을 증가시킬 수 있음을 입증함.</li> <li>• 고정화 리파아제를 이용한 에스터 교환 반응을 통해 TBN 또는 TCN과 함께 VA로부터 부티르산 바닐릴 에스테르(BAVE) 또는 카프릴산 바닐릴 에스테르(CAVE)를 합성함.</li> <li>• BAVE 및 CAVE는 DPPH 라디칼을 제거하고 Menhaden 에멀전 시스템에서 항산화 활성을 보임.</li> <li>• CAVE는 <i>Bacillus coagulans</i>를 포함한 식품 부패 박테리아에 대한 항균 활성을 나타냄.</li> <li>• CAVE는 항산화 및 항균 활성을 동시에 갖는 이중 기능성 소재로서 식품 및 화장품 산업에서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨.</li> <li>• 남극 로스해에서 분리한 <i>Rhodococcus</i> (RosL12)에서 지질분해효소(Rcut)가 발견됨. BLAST 검색을 통해 cutinase 유전자로 밝혀짐. 활성</li> <li>• 신호 서열을 포함하는 온전한 유전자가 <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS로 형질전환된 후에 활성을 지닌 Rcut가 생성됨.</li> <li>• Rcut은 폴리카프로락톤과 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 분해하여 환경 오염을 일으키는 합성 플라스틱의 분해에 사용될 수 있음.</li> <li>• 고정화 Rcut를 사용하여 다양한 지방 알코올과 부티르산으로부터 다양한 알킬 부티레이트를 합성함.</li> <li>• 다양한 사슬 길이의 알코올을 이용하여 알킬 부티레이트 합성 반응을 수행한 결과, 알코올 기질에 대한 선호도는 C6 &gt; C4 &gt; C8 &gt; C10 &gt; C2 순으로 나타남.</li> <li>• 분자 도킹 분석을 통해 알코올의 소수성이 클수록 효소의 활성 부위에 대한 접근성이 높다는 것을 발견함. 사슬의 길이가 길어질수록 비틀림의 수가 증가하기 때문에 알코올의 수산기 산소가 효소 활성 부위에 있는 세린의 에 접근하기 어려움.</li> <li>• Rcut은 이소옥탄 용매에서 5일 동안 매일 100 mM의 기질을 첨가하고 반응을 수행하여 452 mM의 부틸 부티레이트를 합성함.</li> </ul> |                                  |  |            |               |              |
| 색 인 어<br>(각 5개 이상)  | 한 글                              | 리파아제, 극지 미생물, 고정화 효소, Shotgun 클로닝, 트랜스에스테르화 반응                                       |            |               |              |
|   | 영 어                              | lipase, polar microorganism, immobilized enzyme, Shotgun cloning, trnaesterification |            |               |              |

# 요 약 문

## I. 제 목

극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과 기능성 소재 합성

## 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 비드에 고정화 한 후, 항산화 활성과 항세균 활성을 지닌 페놀릭 리피드 및 기능성 식품소재인 지질 에스테르를 합성하는 데에 사용하고자 함.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

극지연구소로부터 분양받은 극지 미생물을 대상으로 TCN plate, pNPC 방법으로 리파아제 활성을 측정하고 활성이 높은 균주를 선발함. 리파아제 유전자를 shotgun cloning하여 *E. coli* 세포에서 발현함. 분자진화기법으로 효소 활성 및 발현량을 증가시킴. 대장균에서 발현된 재조합 리파아제를 비드에 고정화하고 트랜스에스테르 반응을 통해서 기능성 에스테르 물질을 합성함. 상업용 리파아제를 이용해서 페놀 리피드를 합성하는 반응시스템을 확립함.

## IV. 연구개발결과

효소를 산업적으로 이용하기 위해서는 분자진화 기술을 통해 효소의 활성을 높이고 반응 특성을 최적화하는 것이 필요함. 남극 *Croceibacter atlanticus* 균에서 발견된 LipCA 리파제의 반응 특성을 개선하기 위해 error-prone PCR 방법을 사용함. 변이주(M3-1)의 리파제 활성은 야생형(WT)주에 비해 크게 증가함. M3-1 균주는 WT 균주보다 약 3배 더 많은 리파아제 효소를 생산함. M3-1 유전자의 염기서열이 WT 유전자와 4개의 염기서열(73, 381, 756, 822)이 다른 것을 확인한 후, WT와 M3-1 mRNA의 2차 구조를 예측하여 RNAfold로 비교함. WT mRNA의 평균 자유 에너지(MFE)와 비교하여 M3-1 mRNA의 평균 자유 에너지(MFE)는 4.4 kcal/mol 감소했으며, MFE 값은 염기 73 및 756의 돌연변이에 의해 감소함. 73번 염기를 바꾸면(T→C), WT 효소 생산량이 감소하면서 돌연변이 효소 생산량이 감소함. 이러한 결과는 73번 위치에서 염기 변화가 단백질 발현 수준에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 보여주고, mRNA 서열을 변화시키면 mRNA의 안정성을 증가시킬 수 있고 대장균에서 외래 단백질의 생성을 증가시킬 수 있음을 입증함.

고정화 리파아제를 이용한 에스테르 교환 반응을 통해 트리부티린 또는 트리카

프릴린과 함께 VA로부터 부티르산 바닐릴 에스테르(BAVE) 또는 카프릴산 바닐릴 에스테르(CAVE)를 합성함. BAVE 및 CAVE는 유기 용매에서 DPPH 라디칼을 제거함. 또한 BAVE와 CAVE는 Menhaden 에멀전 시스템에서 항산화 활성을 보임. CAVE는 *Bacillus coagulans*를 포함한 식품 부패 박테리아에 대한 항균 활성을 나타냄. 제타 전위 측정을 통해 BAVE와 CAVE가 *B. coagulans* 막에 삽입되었음을 확인함. 또한 요오드화 프로피듐 섭취 분석 및 형광 현미경 검사에서 CAVE가 *B. coagulans* 막 투과성을 증가시키는 것으로 나타남. 따라서 CAVE는 항산화 및 항균 활성을 동시에 갖는 이중 기능성 소재로서 식품 및 화장품 산업에서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨.

남극 로스해에서 분리한 *Rhodococcus* (RosL12)에서 지질분해효소(Rcut)가 발견됨. 216개의 아미노산을 암호화하는 651개의 염기로 구성된 해당 유전자는 BLAST 검색을 통해 cutinase 유전자로 밝혀짐. 활성 Rcut은 신호 서열을 포함하는 온전한 유전자가 *Escherichia coli* Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS로 형질전환된 후에 생성됨. 정제 효소의 비활성도는 2,190 U/mg로 측정됨. Rcut은 40°C에서 가장 높은 활성을 보였고 활성화 에너지는 3.16 kcal/mol로 측정됨. Rcut은 중쇄 지방산(C4-C10)에 대해 높은 활성을 보임. Rcut은 폴리카프로락톤과 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 분해하여 환경 오염을 일으키는 합성 플라스틱의 분해에 사용될 수 있음.

알킬 부티레이트는 식품 산업에서 중요한 첨가제로 알려짐. 고정화 Rcut를 사용하여 다양한 지방 알코올과 부티르산으로부터 다양한 알킬 부티레이트를 합성함. 다양한 사슬 길이의 알코올을 이용하여 알킬 부티레이트 합성 반응을 수행한 결과, 알코올 기질에 대한 선호도는 C6 > C4 > C8 > C10 > C2 순으로 나타남. 분자 도킹 분석을 통해 알코올의 소수성이 클수록 효소의 활성 부위에 대한 접근성이 높다는 것을 발견함. 사슬의 길이가 길어질수록 비틀림의 수가 증가하기 때문에 알코올의 수산기 산소가 효소 활성 부위에 있는 세틴의에 접근하기 어려움. Rcut은 이소옥탄 용매에서 최소 5일 동안 합성 효율을 유지함. 5일 동안 매일 100 mM의 기질을 첨가하고 반응을 수행하여 452 mM의 부틸 부티레이트를 합성함. Rcut이 식품 산업에서 사용되는 알킬 부티레이트를 생산하는 데 효율적인 효소임을 보여줌.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

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

# S U M M A R Y

## I. Title

Screening of multi-functional psychrophilic lipase from polar microorganisms and synthesis of functional compound

## II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose is to discover special functional lipases with great industrial usefulness from microorganisms isolated from polar regions, and to mass-produce active lipases through gene cloning and expression. The recombinant lipase produced is intended to be immobilized on beads and then used to synthesize phenolic lipids with antioxidant and antibacterial activities and lipid esters, which are functional food materials.

## III. Contents and Extent of R&D

Lipase activity was measured by the TCN plate and pNPC method for polar microorganisms distributed by the Polar Research Institute, and strains with high activity were selected. Lipase gene was expressed in *E. coli* cells by shotgun cloning. Enzyme activity and expression level are increased through molecular evolution techniques. Recombinant lipase expressed in *Escherichia coli* is immobilized on beads and a functional ester material is synthesized through a transesterification reaction. We developed a reaction system for synthesizing phenolic lipids using commercial lipase.

## IV. R&D Results

In order to use enzymes industrially, it is necessary to increase the activity of enzymes and optimize reaction characteristics through molecular evolution technology. An error-prone PCR method was used to improve the reaction characteristics of LipCA lipase found in Antarctic *Croceibacter atlanticus*. The lipase activity of the mutant strain (M3-1) was greatly increased compared to the wild type (WT) strain. The M3-1 strain produced about 3 times more lipase enzyme than the WT strain. After confirming that the base sequence of the M3-1 gene differs from the WT

gene in four base sequences (73, 381, 756, 822), the secondary structures of the WT and M3-1 mRNAs are predicted and compared by RNAfold. Compared to the mean free energy (MFE) of WT mRNA, the mean free energy (MFE) of M3-1 mRNA decreased by 4.4 kcal/mol, and the MFE value was reduced by mutations at bases 73 and 756. When base 73 is changed (T→C), mutant enzyme production decreases while WT enzyme production decreases. These results demonstrate that base changes at position 73 can significantly affect protein expression levels, and that altering the mRNA sequence can increase mRNA stability and increase the production of foreign proteins in *E. coli*.

Synthesis of vanillyl butyric acid (BAVE) or vanillyl caprylic acid (CAVE) from VA with tributyrin or tricaprylin through transesterification using immobilized lipase. BAVE and CAVE remove DPPH radicals from organic solvents. Also, BAVE and CAVE showed antioxidant activity in the Menhaden emulsion system. CAVE exhibits antibacterial activity against food spoilage bacteria including *Bacillus coagulans*. Zeta potential measurement confirmed the insertion of BAVE and CAVE into the *B. coagulans* membrane. In addition, propidium iodide uptake assay and fluorescence microscopy showed that CAVE increased *B. coagulans* membrane permeability. Therefore, CAVE is expected to play an important role in the food and cosmetic industries as a dual functional material with both antioxidant and antibacterial activity.

A lipolytic enzyme (Rcut) was found in *Rhodococcus* (RosL12) isolated from the Antarctic Ross Sea. The gene consisting of 651 bases encoding 216 amino acids was identified as a cutinase gene through BLAST search. Active Rcut is generated after transformation of the intact gene containing the signal sequence into *Escherichia coli* Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS. The specific activity of the purified enzyme was determined to be 2,190 U/mg. Rcut showed the highest activity at 40°C and the activation energy was measured as 3.16 kcal/mol. Rcut shows high activity against medium chain fatty acids (C4-C10). Rcut decomposes polycaprolactone and polyethylene terephthalate and can be used to decompose synthetic plastics that cause environmental pollution.

Alkyl butyrates are known as important additives in the food industry. Synthesis of various alkyl butyrates from various fatty alcohols and butyric acid using immobilized Rcut. As a result of the synthesis of alkyl butyrates using alcohols of various chain lengths, the preference for

alcohol substrates was in the order of C6 > C4 > C8 > C10 > C2. Through molecular docking analysis, they found that the more hydrophobic the alcohol, the more accessible it is to the active site of the enzyme. As the chain length increases, the number of twists increases, making it difficult for the hydroxyl oxygen of the alcohol to access the serine in the active site of the enzyme. Rcut maintains synthesis efficiency for at least 5 days in isooctane solvent. 100 mM substrate was added daily for 5 days and the reaction was carried out to synthesize 452 mM butyl butyrate. We showed that Rcut is an efficient enzyme for producing alkyl butyrates used in the food industry.

#### V. Application Plans of R&D Results

Discovery of new lipase gene from polar microorganisms and mass production of active lipase. After investigating the reaction characteristics of active lipase, the active lipase is immobilized on beads and used as an enzyme catalyst for bioconversion reaction. It is planned to be used to synthesize phenolic lipids and alkyl esters used as materials in the food and cosmetic industries by non-aqueous reaction because of their antioxidant activity and antibacterial activity.

극지연구소



# 목 차

|  |    |
|--|----|
| 제 1 장 서론 -----                                   | 9  |
| 1절. 연구의 목적 -----                                 | 9  |
| 2절. 연구의 필요성 및 범위 -----                           | 9  |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----                          | 12 |
| 1절. 국내 기술개발 동향 -----                             | 12 |
| 2절. 국외 기술개발 동향 -----                             | 14 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----                       | 19 |
| 1절. <i>Croceibacter atlanticus</i> 리파아제 개량 ----- | 19 |
| 2절. 중쇄지방산 페놀리피드 합성 -----                         | 28 |
| 3절. <i>Rhodococcus</i> sp. 리파아제 개발 -----         | 33 |
| 4절. Rcut 리파아제를 이용한 에스테르 합성반응 -----               | 41 |
| 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 -----                   | 50 |
| 1절. 성과목표 달성도 -----                               | 50 |
| 2절 세부목표 달성 내용 -----                              | 51 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----                         | 54 |
| 1절 학술적 활용계획 -----                                | 54 |
| 2절 경제적 활용계획 -----                                | 54 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----                | 57 |
| 제 7 장 참고문헌 -----                                 | 57 |

# 제 1 장 서론

## 1절. 연구의 목적

남극에서 분리한 미생물로부터 신규 리파아제 유전자를 발굴하고 대장균에서 재조합 리파아제를 대량으로 생산함. 저온성 미생물로부터 특수기능 저온성 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제의 클로닝 및 활성 효소의 대량 생산을 수행함. 리파아제를 비드에 고정화하고 유기용매에서 트랜스에스테르 반응을 통해 의약품, 식품용, 화장품용 기능성 지질 물질을 합성함.

## 2절. 연구의 필요성 및 범위

### 1. 리파아제 효소반응을 이용한 기능성 항산화제 합성 필요성

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

나. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 비극성을 갖는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 및 화장품 산업에서 생산되는 에멀전이 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),  $\alpha$ -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 소비자로서 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 방법으로 phenolic acid가 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 항균 작용, 생리활성작용이 함께 나타낼 수 있다. 이것을 합성하기 위해서는 PUFA가 산화되는 것을 막기 위해서 저온에서 효소반응을 진행할 필요성이 있기 때문에 극지에서 분리한 저온 리파아제를 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. 기존 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. 또한, Shotgun cloning을 통해서 유전자를 확보한다.

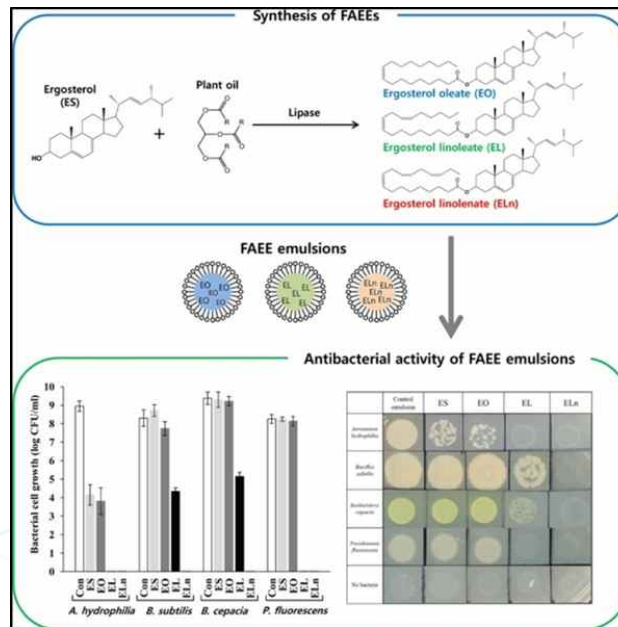
라. 확보한 유전자로부터 리파아제 효소를 대량으로 생산하기 위해서 유전자를 발현벡터에 삽입하고 대장균에서 생산한다. Inclusion body형태로 생산되는 것을 배제하고 활성형태로 생산되는 것을 선별해서 실험을 수행한다. 효소의 반응 특성을 규명하기 위해서 Ni-NTA 컬럼을 이용해서 효소를 분리한다.

- 마. 리파아제 효소를 촉매로 이용하기 위해서는 온도, pH에 대한 특성을 파악해야 하기 때문에 최적반응 조건을 조사한다. 또한, 지방산 길이에 대한 분해 활성을 조사함으로써 기질특이성을 조사한다.
- 바. 실제로 효소를 비수계에서 촉매로 사용하기 위해서는 동결건조하거나 bead에 고정화해야 한다. 동결건조의 경우에는 효소반응 시, 쉽게 현탁되지 않는 문제가 있기 때문에 bead 고정화법을 사용한다.
- 사. 고정화 효소를 이용해서 기능성지질을 합성하기 위해서 먼저 각종 페놀릭 알코올과 지방산 또는 지방을 대상으로 transesterification 반응을 수행한다. 타겟 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.
- 자. 리파아제 반응을 통해서 기능성 식품소재인 butyl butyrate를 합성한다. 또한, 다양한 길이의 butyl ester 물질을 합성하고 반응특이성을 조사한다. 리파아제 구조를 분석하고 homology modeling, docking modeling을 수행함으로써 반응특이성을 구조적으로 해석한다.
- 차. 극저온성 리파아제의 가수분해 반응을 통해서 플라스틱 고분자의 가수분해 반응을 수행한다. 반응의 최적화를 수행한다.
- 카. 저온성 리파아제를 발현량을 증가시키기 위해서 분자진화기법을 활용한다. 대장균에서 발현량이 증가된 변이효소의 유전자 서열을 분석하고 mRNA 구조의 에너지를 계산한다. 위치특이적 변이효소를 생산함으로써 단백질 발현에 직접 관여한 염기서열을 조사한다.

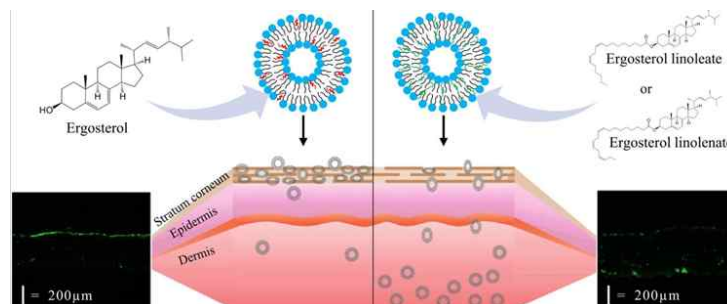
## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내 기술개발 동향

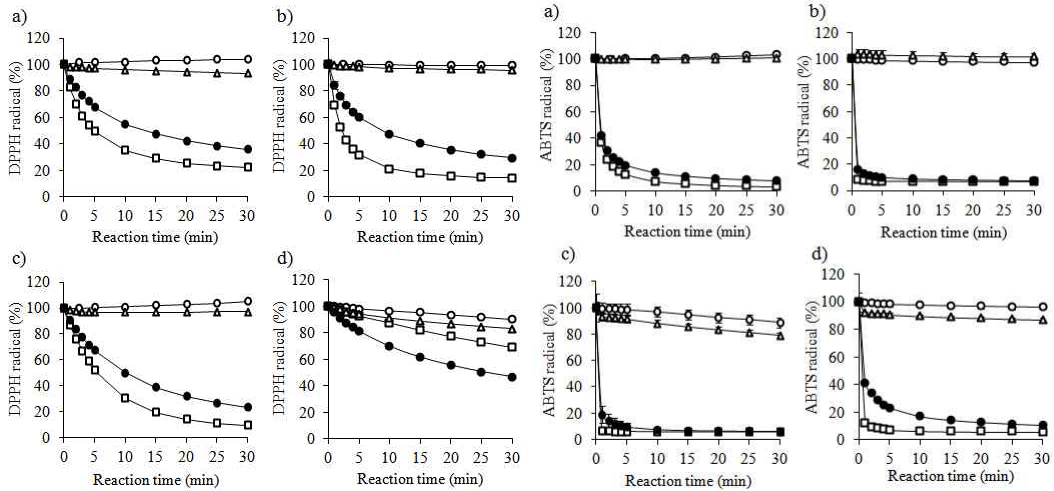
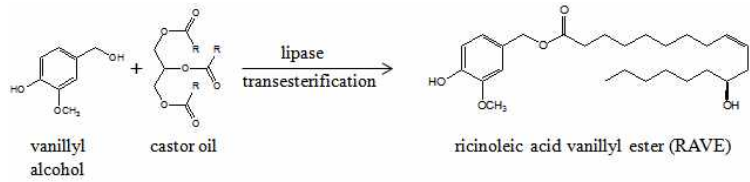
1. 가톨릭대 연구팀은 리파아제 효소반응을 이용해서 불포화지방산 ergosterol ester를 합성하였고 uFAEE를 이용하여 에멀전을 생산했다. EL, ELn의 그람양성균에 대한 항균활성을 확인하였다. *Enz Micro. Technol.* (2020) 139, 109581.



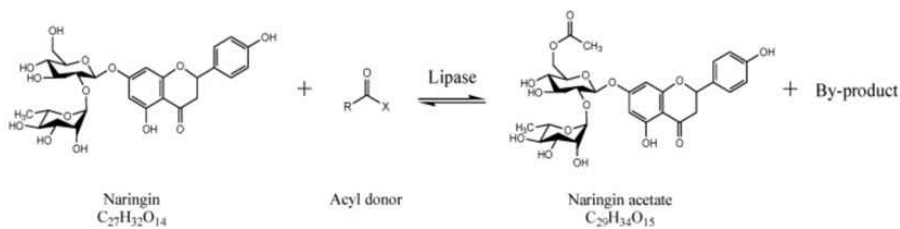
2. 가톨릭대 연구팀은 리파아제 반응으로 합성한 EL, ELn을 이용하여 리포솜을 개발하였음. 이것이 유연성, 안정성을 갖고 있으며 돼지피부를 투과하는 것을 확인하였음. *Chem Phys Lipids* (2023) 250, 105270.



3. 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)



4. 감귤 플라보노이드 중 하나이며 천연 향산화제로 알려진 나린진은 낮은 안정성과 용해도로 인해 생체 이용률이 제한적임. 그러나, 아실화를 통해 형성된 나린진 에스테르는 최근 향상된 물리적 및 화학적 특성을 갖는 것으로 보고됨. 이러한 화합물의 개발은 식품, 화장품 및 제약 산업에서 큰 잠재력을 가지고 있지만 낮은 전환율과 생산성은 산업 응용 분야의 장벽임. 나린진 아세테이트의 합성에 대한 다양한 변수(효소 종류, 효소 농도, 아실 공여체, 반응물의 몰비, 반응 온도 및 용매)의 영향을 평가하여 최적의 반응 조건을 결정함. 이전에 보고된 값과 비교하여 짧은 시간 내에 높은 전환율을 달성하여 해당 공정의 상업적 가능성을 확인함. *Int J Environ Res Public Health* (2022) 19: 2972.

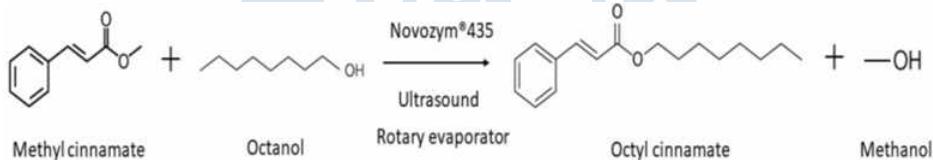


5. 구윤모 교수팀은 Ionic liquid ([Emim][Tf(2)N])에서 리파제를 이용하여 CAPE를 합성함. 즉, 반응 시간 (36-60 h), 반응 온도 (65-75 °C), 기질의 몰비(20:1-40:1), 효소와 기질의 몰비 (10:1-20:1) 등 반응조건을 최적화함. *Bioprocess Biosyst Eng.* (2013) 36: 799-807.



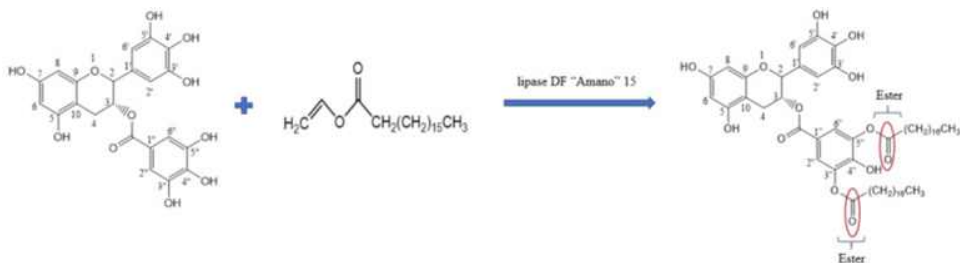
## 2절. 국외 기술개발 동향

1. 페룰산(Fa), 트랜스-페룰산(trans-Fa), 메틸 갈레이트(MG) 및 에틸 갈레이트(EG)로 수성/유기상을 사용하는 효소적 방법을 통해 펙틴을 개질하여 펙틴의 물리화학적 및 생체 활성 속성을 개선함. 리파아제가 수상에서 펙틴 내 에스테르 결합의 가수분해를 촉매하고 Fa/trans-Fa의 파라 위치에 있는 하이드록실 그룹 또는 MG/EG의 2'-OH 그룹과 카르복실 그룹 사이의 에스테르 교환 반응을 촉진함. 천연 펙틴과 비교하여 변형된 펙틴은 점도 및 유화 활성이 개선됨. DPPH, ABTS의 라디칼 소거율이 향상됨. 대장균과 황색포도상구균에 대해 강력한 항균 활성을 나타냄. *J Food Sci* (2022) 87: 3013-3025.
2. 계피산은 계피 또는 기타 천연 식물에서 분리되는 페놀 화합물 중 하나로 광범위한 생리 활성을 지님. 계피산은 용해도가 낮고 경구 생체 이용률이 낮기 때문에 적용이 제한됨. 이 연구에서는 메틸 신나메이트와 옥탄올을 출발 물질로 사용하여 진공 하에서 회전 증발과 초음파 보조에 의한 옥틸 신나메이트 생산 가능성을 연구함. 반응 온도(55-75°C), 반응 시간(4-12h) 및 초음파 출력(90-150W)을 포함한 작동 매개변수의 영향을 평가함. 초음파와 진공 시스템을 갖춘 회전식 증발기에 의한 옥틸 신나메이트의 고효율 합성은 RSM 최적화를 통해 달성함. *Molecules* (2022) 27: 7148



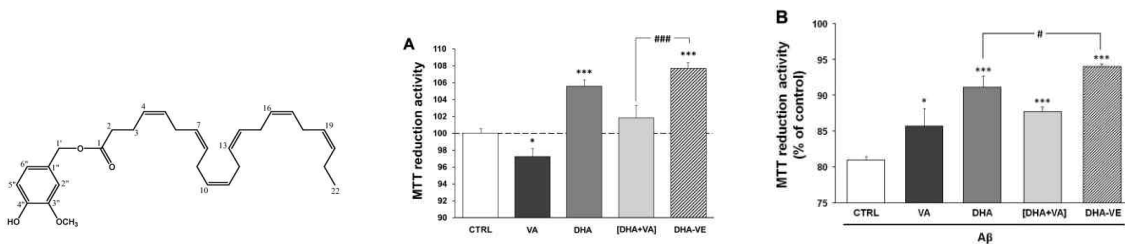
3. 리파아제 촉매 에스테르화 및 에스테르 교환 반응을 통해 페놀 글리코시드 아젤라산 에스테르를 합성하기 위한 효소 경로를 성공적으로 설정함. Novozyme 435가 에스테르화 촉매 활성이 가장 높았고 Lipozyme TLIM가 에스테르 합성을 위한 에스테르 교환 촉매화에서 가장 높은 기질 전환율을 보임. 효소 에스테르화 및 에스테르교환의 기질 전환율은 각각 98.7% 및 95.1%. 리포자임 TLIM을 촉매로 한 경우 가수분해 반응이 방해받지 않아 에스테르 교환 반응의 주요 생성물 비율이 99.0% 이상. 물리적 및 생물학적 특성의 결과는 모든 에스테르가 모 화합물보다 더 높은 Clog p 값을 가짐. 높은 막 침투력과 tyrosinase 억제 효과로 인해 phenolic glycosides, azelaic acid(AA) 및 이들의 물리적 혼합물보다 높은 세포 내 tyrosinase 억제 및 탈색 활성을 보임. *J Agric Food Chem* (2021) 69: 13102-13112.

4. Vinyl stearate는 EGCG의 효소적 에스테르 교환 반응에 첨가되어 비수성 시스템에서 친유성과 항산화 능력을 강화함. 리파아제 DF "Amano" 15가 촉매로 사용됨. 용매로서 아세토니트릴, 비닐 스테아레이트:EGCG의 몰비 3:1, 효소량 4.0% (기질 질량비), 반응 온도 및 시간 50°C 및 96시간, 각각 65.2% EGCG 전환율 달성. EGCG 스테아릴 유도체의 친유성(3.49 ± 0.34)은 모체 EGCG(0.69 ± 0.08)보다 더 높았다(5.06배). 또한, EGCG 스테아릴 유도체는 BHT, BHA 및 부모 EGCG에 비해 우수한 지질 산화를 나타냈다. EGCG 스테아릴 유도체를 함유한 대두유의 POV(18.17 ± 0.92 mEq/kg)는 EGCG(48.50 ± 1.23 mEq/kg)에 비해 21일에 유의하게 감소(62.5%)했습니다. EGCG 유도체가 친유성 환경/고지방 식품에서 광범위한 항산화제 적용 전망을 가지고 있음을 나타냅니다. *Antioxidants* (2021) 10: 1282.



#### 5. 리파아제를 이용한 DHA-vanillyl ester 합성 연구

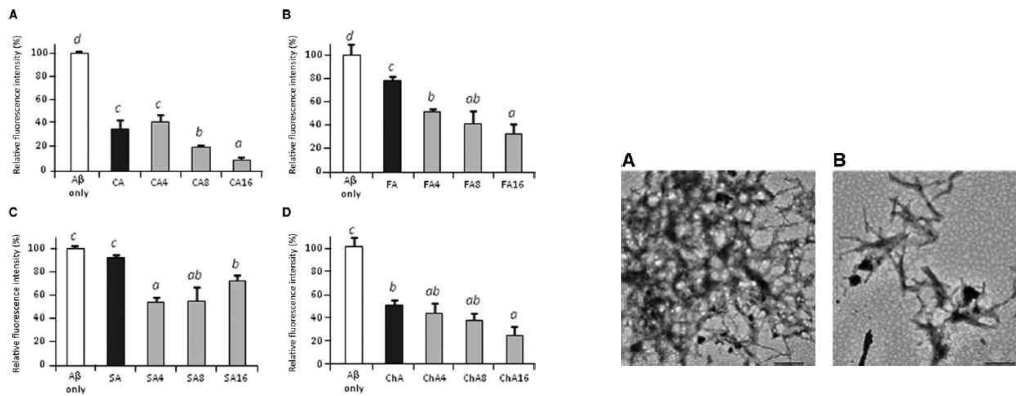
가. DHA는 여러 가지 생리활성을 갖는 중요한 물질이지만 보관 과정에서 쉽게 산화되는 등 안정성이 떨어짐. 리파아제를 이용해서 DHA-vanillyl ester를 생산함으로써 항산화활성을 증가시킴. 실험용 쥐에 DHA-VE를 먹이로 주면 적혈구와 뇌 조직에서 DHA 함량이 증가됨을 확인하였고, *in vitro* 실험에서 DHA-VE에 의해서 Aβ를 처리한 rat primary neuron의 생존이 증가됨을 밝혔음. *Food Chem.* (2015) 171:397-404.



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, hexadecanol를 붙인 후, A $\beta$ 의 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

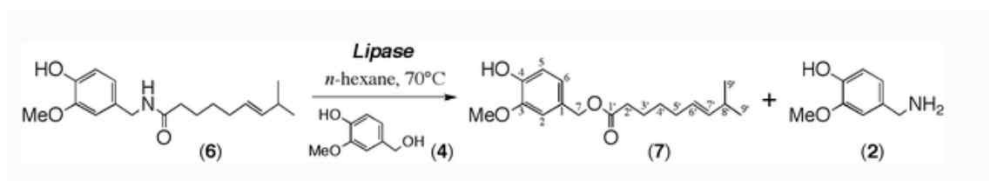
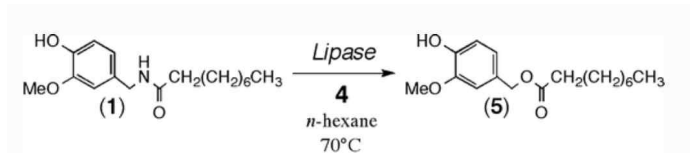
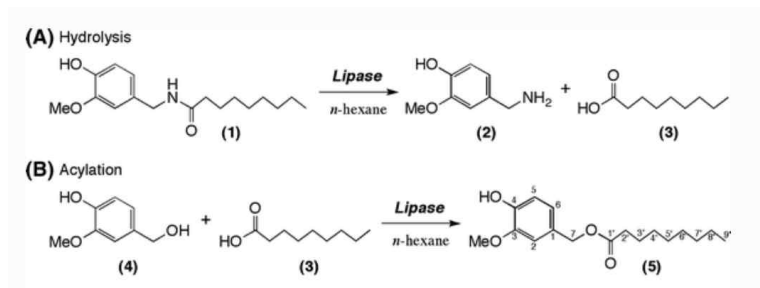


라. 연어에서 추출한 PUFA와 rutin, vanillyl alcohol를 이용해서 페놀리피드를 생산한 후, 항산화 활성을 측정함. BHT,  $\alpha$ -토코페롤을 비교물질로 사용했으며, DPPH, thiobarbituric acid assay를 수행함. 소수성 용매, bulk oil 시스템, 에멀전시스템에서 측정된 결과, 페놀기에 의해서 PUFA의 산화가 느려지고 PUFA에 의해서 페놀기의 소수성 용매 용해도가 증가됨을 밝혔음. *J Agric Food Chem.* (2011) 59: 7021-7027.

## 6. 리파제를 이용한 Capsiate 합성 연구

가. 10종의 capsiate를 합성하고 DPPH (polar medium), Rancimat (nonpolar medium), linoleic acid autoxidation (micellar medium) 활성을 측정함. BHT 및  $\alpha$ -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.

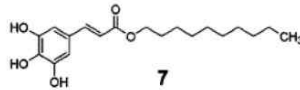


라. Vanillyl alcohol과 methyl nonanoate로부터 capsinoid (vanillyl nonanoate) 합성함으로써 capsiate and dihydrocapsiate를 대량 생산하는 연구 수행함. Biosci Biotechnol Biochem. (2002) 66: 319-327.

7. 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, 비

만세포로의 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.



나. Vancomycin에 의해 유도된 췌장 손상을 CAPE가 방지하는 것을 밝힘. 즉, 췌장의 Serum alkaline phosphatase (ALP), amylase,  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT), lipase 활성을 측정된 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 줄어들음. *World J Gastroenterol.* (2009) 15: 5181-5185.



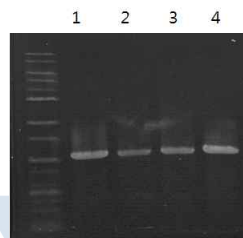
## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. *Croceibacter atlanticus* 리파아제 개량

#### 1. 분자진화기법을 이용한 LipCA 변이효소 개발

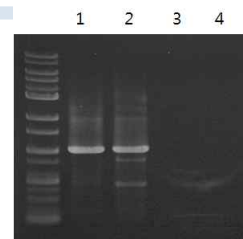
- LipCA 리파아제의 변이효소를 개발하기 위해서 error-prone PCR를 수행함. 우선, 기질로 사용하는 dNTP 중에서 dATP의 농도를 낮춰서 PCR를 수행함. dATP 농도가 1/10인 경우, PCR product 양이 대략 1/2로 감소함. dATP 농도가 1/5인 경우, PCR product 양이 일부 감소함. dATP 농도가 1/2인 경우, PCR product 양이 동일함. 따라서 dATP 농도를 1/10으로 줄여서 PCR 반응을 수행하면 mutation 유도가 가능할 것으로 결정함

| (mM) | 1(con) | 2     | 3    | 4     |
|------|--------|-------|------|-------|
| dATP | 0.25   | 0.025 | 0.05 | 0.125 |
| dTTP | 0.25   | 0.25  | 0.25 | 0.25  |
| dGTP | 0.25   | 0.25  | 0.25 | 0.25  |
| dCTP | 0.25   | 0.25  | 0.25 | 0.25  |

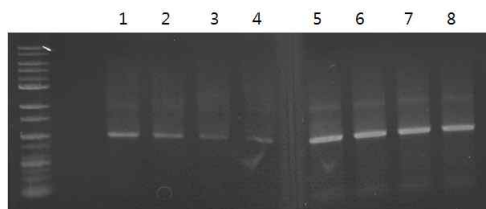


- $Mn^{2+}$  농도가 1.5 mM 이상으로 첨가되면 PCR 반응 진행되지 않음.  $Mg^{2+}$  농도가 2배로 높아지면 non-specific 반응이 진행됨. 따라서  $Mg^{2+}$  농도를 2배로 높여서 PCR 반응을 수행하면 mutation 유도 가능할 것으로 결정함

| (mM)     | 1(con) | 2   | 3   | 4   |
|----------|--------|-----|-----|-----|
| $MgCl_2$ | 1.5    | 3.0 | 1.5 | 0   |
| $MnCl_2$ | 0      | 0   | 1.5 | 3.0 |

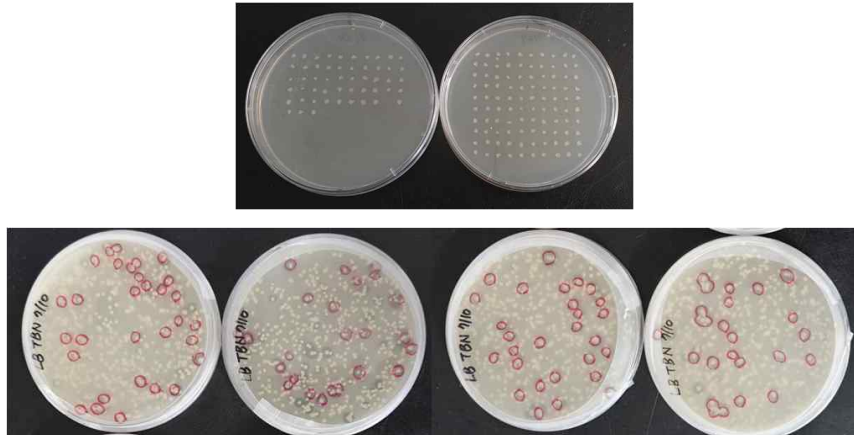


- $Mg^{2+}$  농도를 2배로 증가하고, dATP 농도를 1/10만큼 감소해서 epPCR 반응을 수행함. 총 100  $\mu$ L 반응 수행.



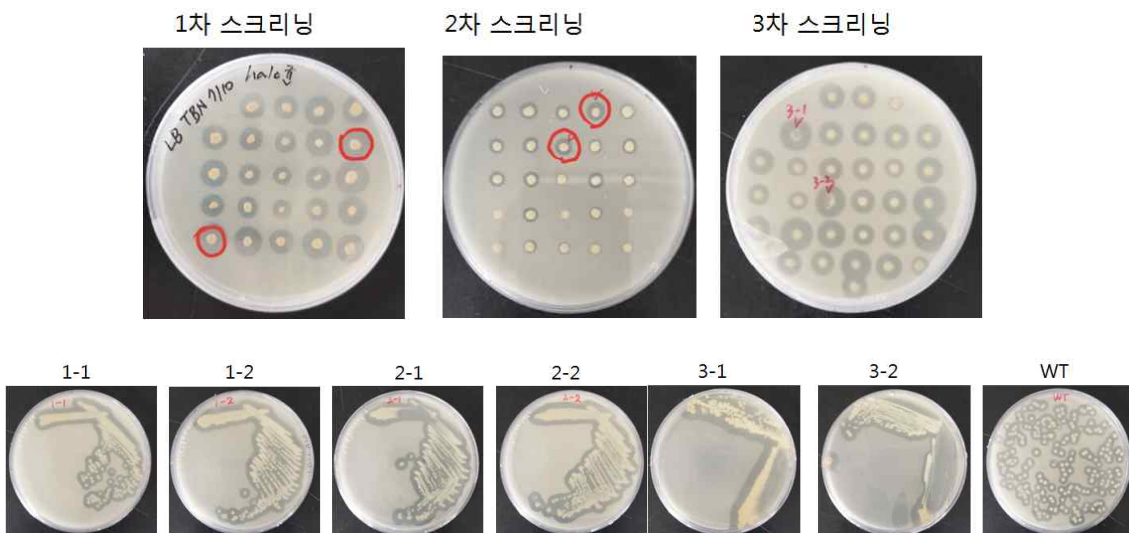
- 생성된 DNA양을 1.6  $\mu$ g으로 정량하고 다음 단계를 진행함. Gel extraction 이후, *Nde*I, *Hind*III 제한효소로 자르고 spin column washing, 그리고 pET22 벡터에 삽입함. *E. coli* DH 5 $\alpha$  균에 transformation 수행함. *E. coli* DH 5 $\alpha$  균에 transformation 수행한 후에 형성된 콜로니를 새로운 고체 배지에 toothpick

수행함. 총 153개 콜로니를 확보함.



## 2. LipCA 변이효소 스크리닝

○ *E. coli* DH5  $\alpha$  균 153개로부터 plasmid를 한꺼번에 분리해서 *E. coli* BL21(DE3)에 transformation 한 결과, TBN에서 halo를 형성하는 콜로니를 찾음. 전체 콜로니 중에서 halo 형성균의 비율이 10% 정도이기 때문에 halo 형성균 중에서 중복된 것을 배제하면 15개 정도가 의미 있는 콜로니로 추정됨. 1, 2, 3차 스크리닝을 통해서 가장 halo가 큰 콜로니를 찾아냄. Mut(1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2)로 명명하였음.



## 3. LipCA 변이효소의 생산 및 활성 측정

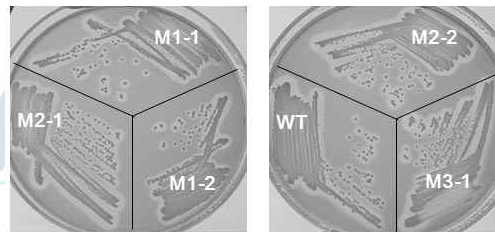
○ 재조합 균을 배양하고 효소활성을 측정한 결과, 1-2, 2-2, 3-1, 3-2 변이균이 WT 보다 높은 활성을 보임.





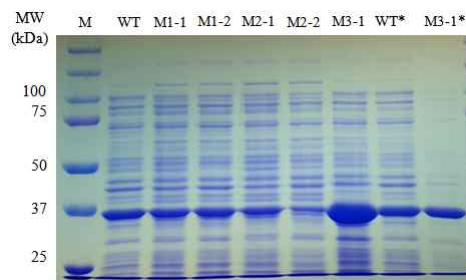
|         |    |     |     |     |
|---------|----|-----|-----|-----|
|         | 73 | 381 | 755 | 822 |
| WT      | T  | A   | T   | T   |
| Mut3-1  | C  | G   | C   | C   |
| 73 C→T  | T  | G   | C   | C   |
| 381 G→A | C  | A   | C   | C   |
| 755 C→T | C  | G   | T   | C   |
| 822 C→T | C  | G   | C   | T   |

- 변이효소 유전자를 지닌 *E. coli* BL21 (DE3) 균을 배양하고 균체의 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분석하였다. 변이효소 M3-1 발현량이 WT을 포함해서 다른 변이효소에 비해 매우 많은 것을 확인하였다.
- Error-prone PCR방법을 사용해서 LipCA 변이효소를 개발하였다. 변이 효소를 지닌 *E. coli* BL21 (DE3)균의 TBN 분해 활성을 측정하였다.



**Fig.** *E. coli* colonies carrying WT and mutant LipCA genes. *E. coli* BL21 (DE3) cells carrying WT and mutant LipCA genes were cultured in TBN-LB agar medium.

- Mutant 유전자를 지닌 *E. coli* BL21 (DE3)균의 CFE를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다. M3-1 효소가 WT 효소에 비해서 3배 이상 만들어진 것을 확인하였다.



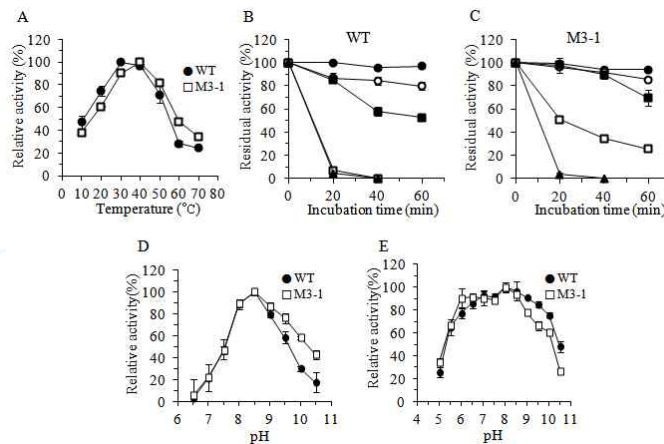
**Fig.** SDS-PAGE of cell-free extracts of *E. coli* cells carrying WT and mutant genes. The cell-free extracts of *E. coli* cells containing WT and mutant genes were analyzed by SDS-PAGE. M, protein size marker; WT\* and M3-1\*, CFE of 0.2 lipase unit.

- Mutant 유전자를 지닌 *E. coli* BL21 (DE3)균의 CFE에 대해 효소활성을 측정한 결과, M3-1의 효소활성이 WT에 비해서 3배 증가된 것을 확인하였다.

Table. Lipase specific activity of CFEs of *E. coli* cell obtained by molecular evolution

| Mutant | Specific activity (U/mg) |
|--------|--------------------------|
| WT     | 94.3                     |
| M 1-1  | 90.6                     |
| M 1-2  | 52.9                     |
| M 2-1  | 55.2                     |
| M 2-2  | 39.1                     |
| M 3-1  | 292.7                    |

- WT과 M3-1 변이효소에 대해서 온도 활성과 안정성, 그리고 pH에 대한 활성과 안정성을 확인하였다.



**Fig.** Effects of temperature and pH on LipCA lipase WT and M3-1. (A) The lipase activities of LipCA lipase WT and M3-1 were measured in the temperature range (10–70) °C. (B) and (C) The residual activities of WT and M3-1 were measured at intervals of 20 min under heat treatment for 60 min from (20 to 50) °C. ●, 20 °C; ○, 30 °C; ■, 40 °C; □, 45 °C; ▲, 50 °C. (D) The lipase activities of WT and M3-1 were measured in the pH range (6.5 – 10.5). (E) The residual activities of WT and M3-1 were measured after pH treatment for 60 min from pH (5 to 10.5).

- WT과 M3-1 유전자의 Codon usage를 비교하였다. 즉, 변이가 일어남으로써 달라진 codon usage를 비교한 결과, WT과 M3-1 유전자의 codon usage상에 큰 차이가 없음을 확인하였다.



Table. Comparison of codons in WT and M3-1 genes

| Mutation position | WT    |                    |                  | M3-1  |                    |                  |
|-------------------|-------|--------------------|------------------|-------|--------------------|------------------|
|                   | Codon | Amino acid         | Codon usage (%)* | Codon | Amino acid         | Codon usage (%)* |
| 73                | TTT   | Phe <sup>25</sup>  | 0.51             | CTT   | Leu <sup>25</sup>  | 0.10             |
| 381               | GAA   | Glu <sup>127</sup> | 0.70             | GAG   | Glu <sup>127</sup> | 0.30             |
| 756               | TTT   | Phe <sup>252</sup> | 0.51             | TTC   | Phe <sup>252</sup> | 0.49             |
| 822               | GGT   | Gly <sup>274</sup> | 0.38             | GGC   | Gly <sup>274</sup> | 0.40             |

\* Codon usage in *E. coli* genes

- WT과 M3-1 mRNA의 구조를 안정화하는 에너지를 비교하였다. 그 결과 M3-1 mRNA의 안정화 에너지가 증가하였고 그중에서도 73번 위치의 염기가 변이되면서 에너지가 크게 변했음을 확인하였다.

Table. Minimal free energy of WT and mutant LipCA mRNA

| Gene      | Minimal free energy of mRNA (kcal/mol) |   |
|-----------|--|---|
|           | MFE secondary structure <sup>†</sup>   | Thermodynamic ensemble structure <sup>‡</sup> |
| WT        | -469.90                                | -485.72                                       |
| M3-1      | -474.30 (-4.4)**                       | -488.63 (-2.91)                               |
| M3-1-73*  | -472.10 (-2.2)                         | -487.67 (-1.95)                               |
| M3-1-381* | -474.30 (-4.4)                         | -488.05 (-2.33)                               |
| M3-1-756* | -472.60 (-2.7)                         | -487.52 (-1.80)                               |
| M3-1-822* | -473.80 (-3.9)                         | -488.31 (-2.59)                               |

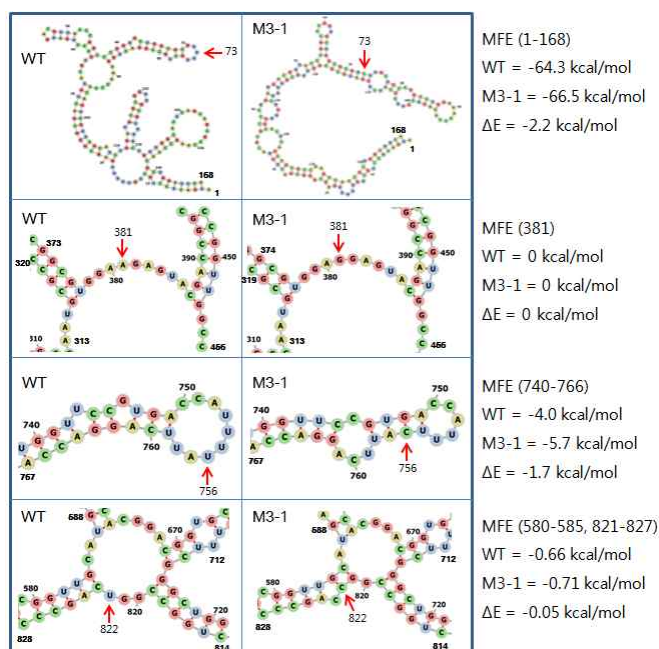
\* Back mutation of M3-1 gene; M3-1-73 (C<sup>73</sup> → T), M3-1-381 (G<sup>381</sup> → A), M3-1-756 (C<sup>756</sup> → T), M3-1-822 (C<sup>822</sup> → T)

<sup>†</sup> The MFE structure of an RNA sequence is the secondary structure that contributes a minimum of free energy. This structure is predicted using a loop-based energy model and the dynamic programming algorithm introduced by Zuker et al. [33].

<sup>‡</sup> The thermodynamic ensemble is a statistical ensemble that is a probability distribution for the state of the system.

\*\* Parentheses indicate the energy difference between mutant and WT.

- WT과 M3-1 mRNA의 부분 구조를 비교하였다. 73번 염기를 포함하는 1-168 구간의 에너지가 크게 낮아진 것을 확인하였다. 이것을 통해 73번 염기의 변화를 통해 mRNA 안정성이 증가되었음을 확인하였다.



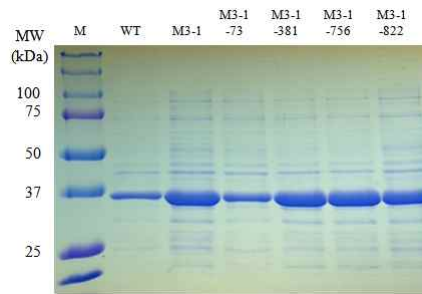
**Fig.** Prediction of the mRNA secondary structures of WT and M3-1. The sub-structures around the four base mutations ( $U^{73} \rightarrow C, A^{381} \rightarrow G, U^{756} \rightarrow C,$  and  $U^{822} \rightarrow C$ ) in the predicted structure of WT and M3-1 mRNA were compared. Arrows indicate mutated base positions.

- M3-1 유전자의 back mutation을 수행하고 각각을 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 발현한 후, CFE를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다. 예상했던대로 73번 염기를 WT과 동일하게 변화시킨 경우, 단백질의 발현양이 WT과 유사하게 되었다.

#### Primers used in back mutation

| name | Primer (5' - 3')                                    |
|------|---|
| F73  | GCCCGGTGCTGGCGCGT <u>TTT</u> GCTGCCGACTGGAAAC       |
| R73  | GTTTCCAGTCCGGCAGCAA <u>A</u> ACGCGCCAGCACCGGCGC     |
| F381 | TACTGTGGGCGGCGTGGA <u>A</u> GAGTACGACCGGCTGTGC      |
| R381 | GCACAGCCGGTCGTACTC <u>TT</u> CACGCCGCCACAGTA        |
| F756 | CACTGGTTCGTTGACCAT <u>TTT</u> TATTCAGGACCAGGCACTGAT |
| R756 | ATCAGTGCCTGGTCTGAAT <u>AAA</u> ATGGTCACGGAACCAGTG   |
| F822 | CAACCCGATCTGGCC <u>GGT</u> CAGCCCCCGCAATTGTG        |
| R822 | CACAATTGCCGGGGGCTG <u>ACC</u> GGCCAGATCCGGGTTG      |

Primers were prepared to induce the 4 mutations from the M3-1 gene to the WT gene. Italics are bases for inducing back mutations, and underlined regions mean codons containing mutations.

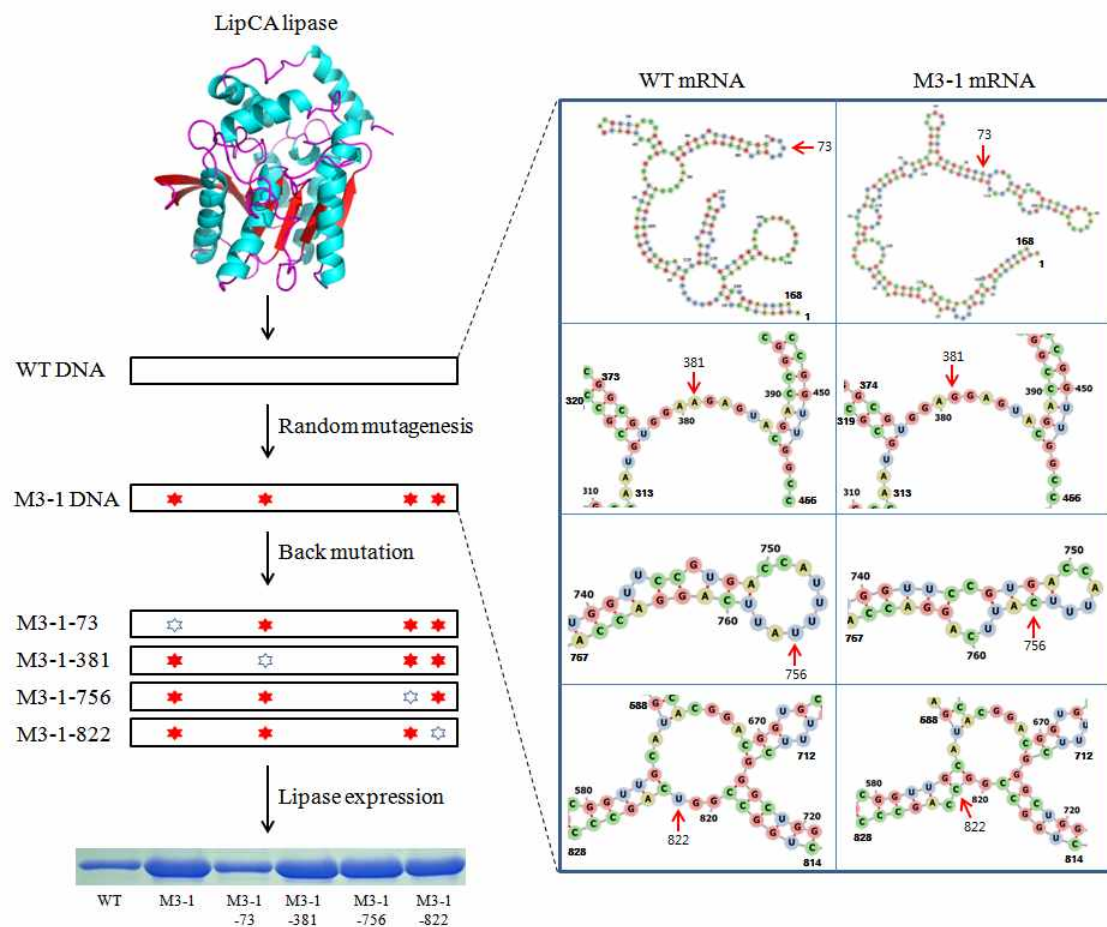


**Fig.** SDS-PAGE of the cell-free extracts of *E. coli* cells carrying WT, M3-1, and four back mutants. Cell-free extract of *E. coli* cells containing WT, M3-1, and four back mutant genes were analyzed by SDS-PAGE. M, protein size marker.

- M3-1 유전자의 back mutation을 수행하고 각각을 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 발현한 후, CFE의 효소활성을 측정한 결과, M3-1-73의 경우, 효소활성이 크게 감소해서 WT과 유사한 값을 보였다. 따라서 본 연구를 통해 73번 염기 변화를 통해 mRNA의 안정성이 증가되고 단백질의 발현량이 크게 증가된 것을 확인하였다.

Table. Lipase specific activity of CFEs of *E. coli* cells obtained by back mutation

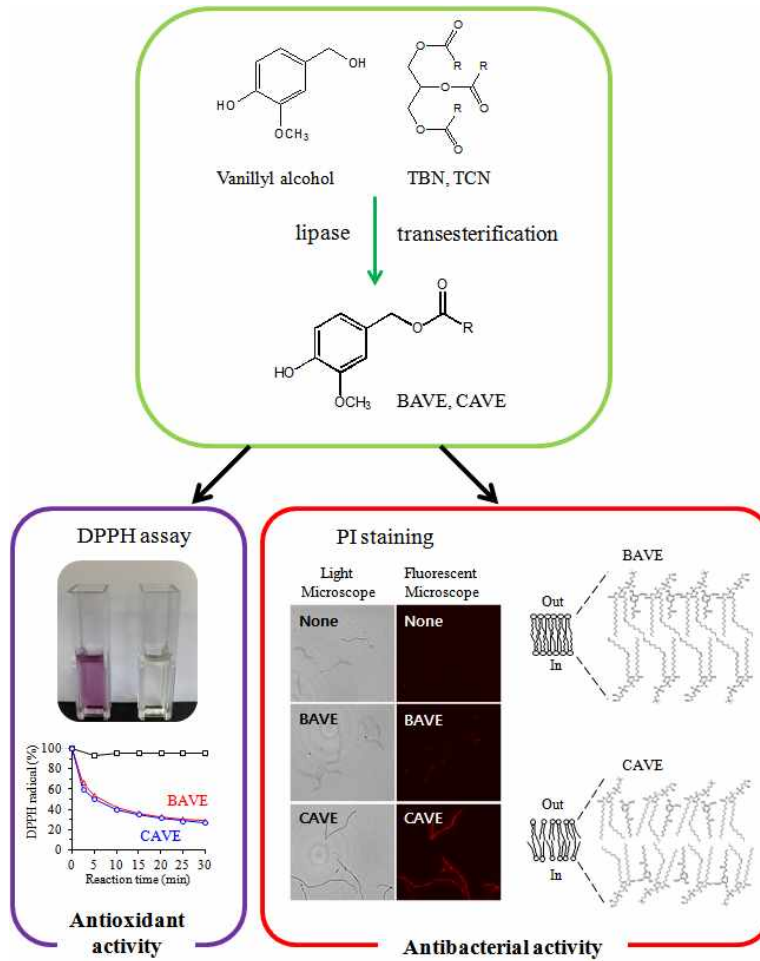
| Mutant   | Specific activity (U/mg) |
|----------|--------------------------|
| WT       | 94.3                     |
| M3-1     | 292.7                    |
| M3-1-73  | 128.8                    |
| M3-1-381 | 235.2                    |
| M3-1-756 | 276.7                    |
| M3-1-822 | 225.2                    |



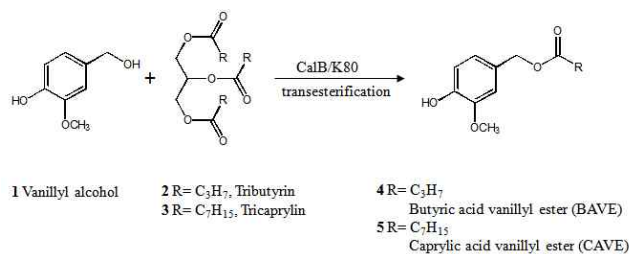
○ 이상의 실험 결과를 논문에 게재하였음. Han Byeol Jeong, Hyung Kwoun Kim (2021) Increased mRNA stability and expression level of *Croceibacter atlanticus* lipase gene developed through molecular evolution process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 882-889

## 2절. 중쇄지방산 페놀리피드 합성

- 리파아제를 이용하여 중쇄지방산의 페놀리피드 합성하였음. 리파아제를 이용한 트랜스에스테르화 반응을 수행함으로써 caprylic acid vanillyl ester (CAVE), butyric acid vanillyl ester (BAVE)를 합성하고, DPPH radical scavenging, conjugated diene, triene test, emulsion partition test, 항균활성, zeta-potential, PI test를 수행함.



- CalB, K80 효소를 이용한 트랜스에스테르 반응으로 vanillyl alcohol, TBN (TCN) 으로부터 BAVE, CAVE을 합성함.



**Fig.** Lipase-mediated transesterification of vanillyl alcohol and triglycerides.

- CalB, K80 리파아제를 이용해서 효소반응을 수행하고 C18컬럼을 장착한 HPLC를 이용해서 반응산물을 분석함. BAVE, CAVE가 합성된 것을 확인하고 prep-HPLC를 이용해서 BAVE, CAVE를 순수하게 분리정제함.

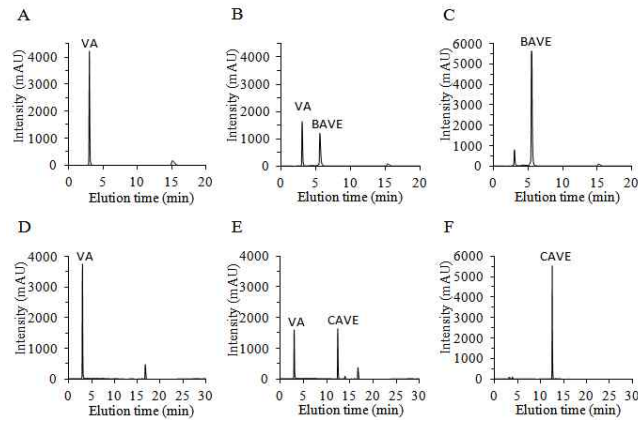


Fig. High-performance liquid chromatography chromatograms. (A) Reaction mixture containing VA and TBN was analyzed at 0 h. (B) Reaction mixture containing VA and TBN was analyzed at 1 h. (C) Purified BAVE was analyzed. (D) Reaction mixture containing VA and TCN was analyzed at 0 h. (E) Reaction mixture containing VA and TCN was analyzed at 0.5 h. (F) Purified CAVE was analyzed.

- CalB, K80 리파아제를 이용해서 BAVE, CAVE를 대량 생산하기 위해서 효소반응 최적화를 수행함. TBN, TCN양을 변화시켜서 반응을 수행함. 리파아제 효소량을 변화시켜서 반응을 수행함. 반응시간을 변화시키면서 반응산물을 분석함.

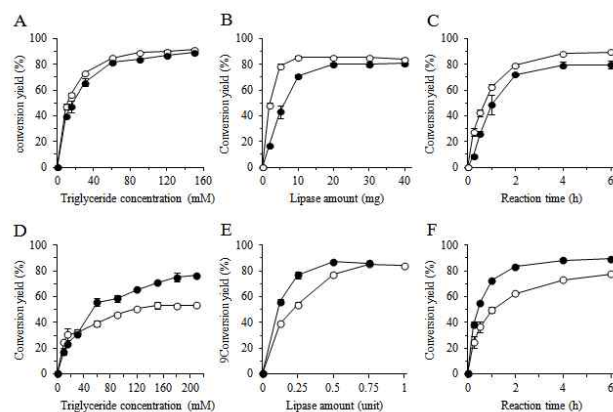


Fig. Optimization of transesterification reaction parameters using CalB (A-C) and K80 (D-F) lipases. The specific activity of CalB and K80 is 2.7 and 10.7 U/mg of bead, respectively. (A) and (D) The effects of the molar ratio of VA and



triglyceride were investigated. The concentration of VA was fixed at 30 mM, while the concentration of triglyceride was changed. (B) and (E) The effect of lipase amount was investigated. (C) and (F) The time course of conversion yield was calculated under optimized conditions. ○, TBN; ●, TCN.

- BAVE, CAVE의 항산화 활성을 조사함. DPPH 라디칼을 소거하는 속도를 methanol, butanol, toluene 용매에서 측정함으로써 BAVE, CAVE의 항산화 활성을 확인함.

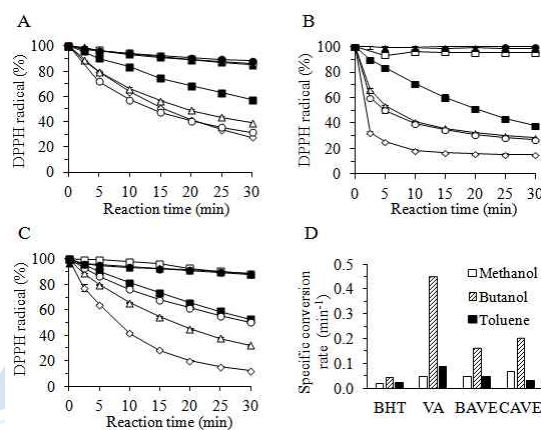


Fig. DPPH radical scavenging activities of BAVE and CAVE. Assay was performed in methanol (A), butanol (B), and toluene (C). □, solvent; ■, 1 mM BHT; ◇, 1 mM VA; △, 1 mM BAVE; ▲, 1 mM TBN; ○, 1 mM CAVE; ●, 1 mM TCN. (D) The specific conversion rate of each antioxidant in methanol, butanol, and toluene was calculated.

- BAVE, CAVE의 항산화 활성을 Menhaden oil 에멀전 시스템에서 확인함. Menhaden oil이 산화되어 CD, CT가 생성되는 속도를 측정하였고, BAVE, CAVE에 의해서 CD, CT 생성 속도가 감소되는 것을 확인하였음.

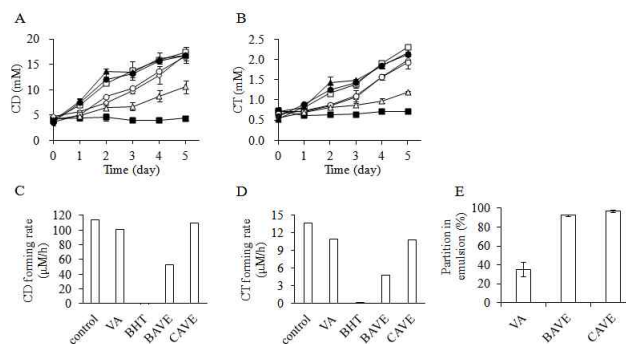


Fig. Effects of antioxidants on MO-in-water emulsion. MO-in-water emulsion was prepared with 10% MO, 1% Tween 20, and 1 mM test compounds. MO-in-water emulsion was stored at 35°C for 5 days. (A) Formation of CD was measured on the basis of absorbance at 237 nm. (B) Formation of CT was measured on the basis of absorbance at 270 nm. □, None; ■, 1 mM BHT; ◇, 1 mM VA; △, 1 mM BAVE; ▲, 1 mM TBN; ○, 1 mM CAVE; ●, 1 mM TCN. (C) and (D) CD or CT-forming rate was calculated from the linear equation obtained by the least-square method. (E) Partition behavior of VA, BAVE, and CAVE in MO-in-water emulsion system. Emulsion was prepared with 50% MO, 1% Tween 20, and 1 mM test compounds. After 24 h, emulsion and aqueous phases were analyzed using HPLC.

- BAVE, CAVE가 *Bacillus coagulans* 균의 표면에 결합하는 것을 조사함. 제타 포텐셜을 측정한 결과, BAVE, CAVE가 균에 결합함으로써 제타전위가 음의 방향으로 증가한 것을 확인함.

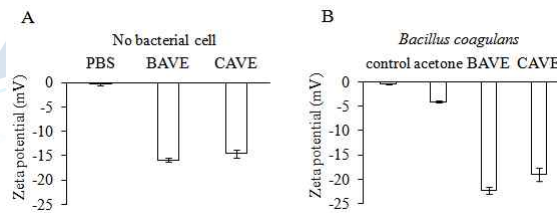


Fig. Zeta potential measurements. (A) Zeta potential was measured for BAVE and CAVE. (B) Zeta potential was measured for *Bacillus coagulans* after incubation for 4 h in PBS, 5% acetone, 2 mM BAVE, and 2 mM CAVE.

- BAVE, CAVE가 다양한 식품미생물에 대해 항균 활성이 있는지 조사함. CAVE가 항균활성이 있으며, 특히, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*에 항균활성이 강하게 나타나는 것을 확인함. CAVE가 그람 양성균에 강하게 결합하는 것을 확인함.



Antibacterial activities of various compounds

| Bacterial strain                         | MIC ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |       |      |
|--|-----------------------|-------|-------|-------|------|
|  | VA                    | TBN   | TCN   | BAVE  | CAVE |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> KCTC2678     | >1000                 | >1000 | >1000 | >1000 | 991  |
| <i>Bacillus coagulans</i> KCCM11715      | >2000                 | >2000 | >2000 | >2000 | 15.0 |
| <i>Bacillus subtilis</i> KCTC2189        | >2000                 | >2000 | >2000 | >2000 | 57.4 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> KCCM41443 | >2000                 | >2000 | >2000 | >2000 | 200  |

\* MIC (minimum inhibitory concentration) was calculated as a concentration that causes 90% growth inhibition compared to control bacteria.

- BAVE, CAVE가 *B. coagulans* 세포막 투과성에 영향을 주는 것을 확인하기 위해서 BAVE, CAVE를 처리하고 형광물질 PI의 투과성을 확인함. 형광광도계를 사용하여 측정된 결과, CAVE를 처리하면 PI가 세포 안으로 많이 들어감을 확인함.
- 형광현미경을 통해 관찰한 결과, CAVE를 처리한 세포의 경우, PI가 세포 안으로 들어가서 형광이 강하게 나타나는 것을 확인함. CAVE가 세포막의 투과성을 증가시켜서 항균활성을 보이는 것으로 판명됨.
- 이상의 결과를 논문으로 발표함. Jin Ju Kim, Hyung Kwoun Kim (2021) Antioxidant and antibacterial activity of caprylic acid vanillyl ester produced by lipase-mediated transesterification. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 317-326

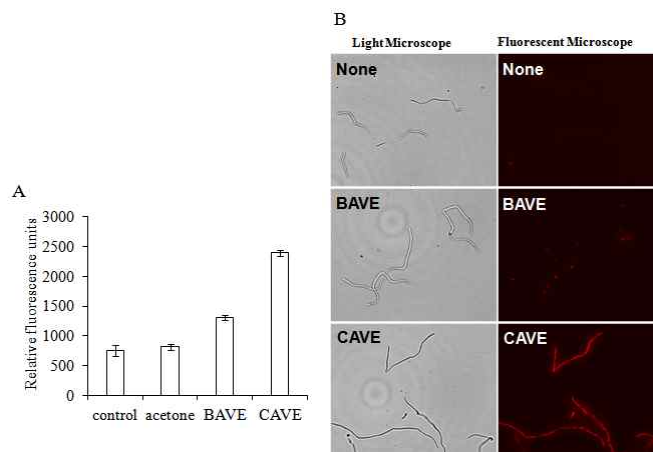


Fig. PI uptake assay and fluorescent microscopy. (A) After treating BAVE and CAVE for 4 h, the levels of PI uptake of *B. coagulans* were measured. (B) *Bacillus coagulans* treated with PBS (none), BAVE, and CAVE were stained with PI, and observed with light microscopy and fluorescent microscopy.

### 3절. *Rhodococcus* sp. 리파아제 개발

○ *Rhodococcus* (RosL12, #3 A12)

*E. coli* BL21 (DE3)

```

ATGAAGAGAAGCCTGATCGCCATTCGATTGCTGACATTCGDDATCTCGGCCACAGCAGTGGCGCTTCCACCGGAGTGGCCCTCGGCCGCG
M K R R L I A Y S I A A L A I S A T A V A L P I G V A S A A
C CGTGTTCGGATGTGGACGTCTCGTTCGCTCECGGCACCGGGAACTTCGCGGCCTCGGCATCAGCGGTACTCCTTTTGTGAACAGCGCTC
P C S D V D V S F A R G T G E L P G L G I T G T P F V N S V
AAATCGCAACTCTCGGATCGCTCGGTCAGCACTGACGCGCTGAACTAGCGCGCGACCTCACCCAGGCCAAGCGCGGACCTGGATCTCGG
K S Q L S D R S V S I Y A V K Y A A D F T Q A S A G P G S R
GACCTCCCTCCCTCATCTCAATTCGGTTGCGGCACTCCCTCCGTCGAGCGAAATTTGTGATCCGCGGTACTCCGACGGCGGACCGCTGCTC
D L V A I I L N S V A A S C P S T K F V I G G Y S Q G A T V V
ACCAACCCAGTCCGCTCGGCCTCCGAGCAGCTTCACCGCGCGCTCATCCGCGCGCGATCGCGGACCGGCACTCGAGCGCGGTGTGGTTC
T N A V G L R T P S S F I Q A V I P A A I A D R I E A V V V
TTCCGCAATCCATTCGGGCTCACCGGCAGGAAGATCGAAACAGCCAGCAGCACATACCGGTACCGCACCAACAGCTTCTGCAACTTCGGT
F G N P F G L I G R A L T A S S T Y G S H I N S F I N H G
GACCCGGTGTGCGAGATCGGTGGCTTCAACACCTTCGCTCAGCTGACCTAGCGCACCAACCGCTCGACGACGGAGGGTGGCTCGTTCGGG
D P V C Q I G G P N I P A H L T Y G T N G S T I Q G A S P A
GCGGCTCAGGTACCGCACCTGA
A A Q V R S
    
```

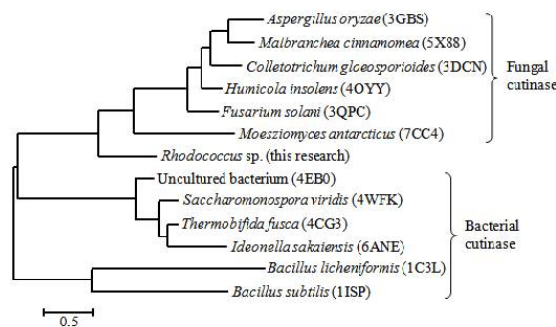
○ 651 bp, 216 amino acid , Blast search , *Rhodococcus* sp.

PBTS2 cutinase 98% , 100%

, *Rhodococcus* cutinase

○ Ross Sea *Rhodococcus* (strain RosL12) lipase  
(Rcut)

○ *Rhodococcus* cutinase  
cutinase

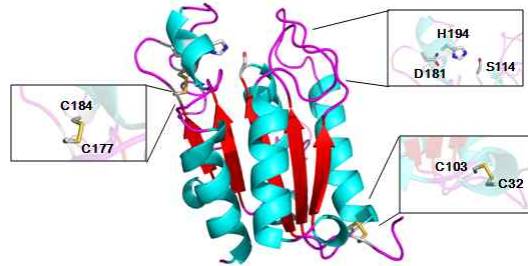


**Fig.** Phylogenetic tree of *Rhodococcus* cutinase.

A phylogenetic tree was constructed by comparing sequences of *Rhodococcus* cutinase with those of bacterial and fungal cutinases using the Maximum Likelihood method. The scale bar means the number of amino acid substitutions per site.

○ *Rhodococcus* cutinase homology modeling ,  $\alpha/\beta$

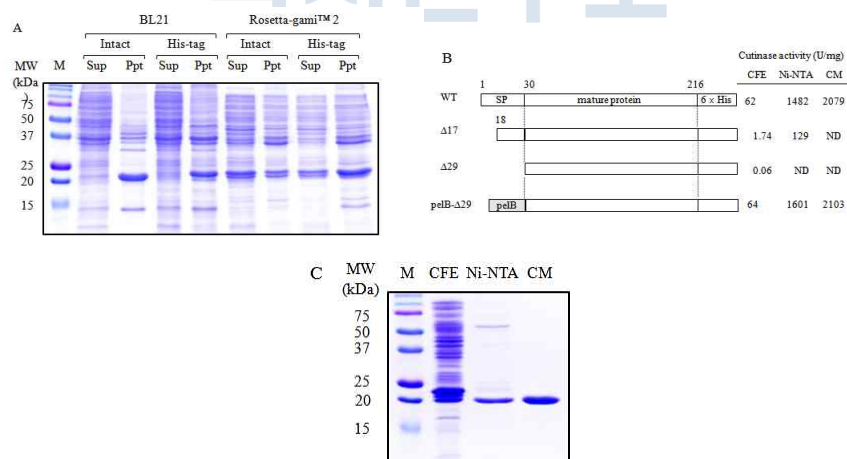
hydrolase 구조를 갖고 있으며, 활성부위에 Ser114, His194, D181을 지니고 있으며 'lid' 구조가 없는 'open active site'를 형성하고 있다. 또한, 단백질의 양 끝부분에 두 개의 disulfide 구조를 갖고 있는 것이 밝혀졌다.



**Fig.** Homology model of *Rhodococcus* cutinase.

A homology model of *Rhodococcus* cutinase was constructed on the SWISS-MODEL server using *Fusarium solani* cutinase (PDB: 1cex) as a template.  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -sheets, and loops are presented by cyan, red, and magenta colors, respectively. Inboxes detail the catalytic triad and two disulfide bonds.

- *Rhodococcus* cutinase 효소를 대장균에서 대량 생산하기 위해서 *E. coli* BL21 (DE3)균과 *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) 균을 사용하였다. 이 경우, *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) 균에서 cutinase가 활성형태로 많이 생산되는 것을 확인하였다. 또한, N말단의 신호서열을 사용해서 재조합 단백질을 생산하는 경우, 활성형태가 만들어짐을 확인하였다.

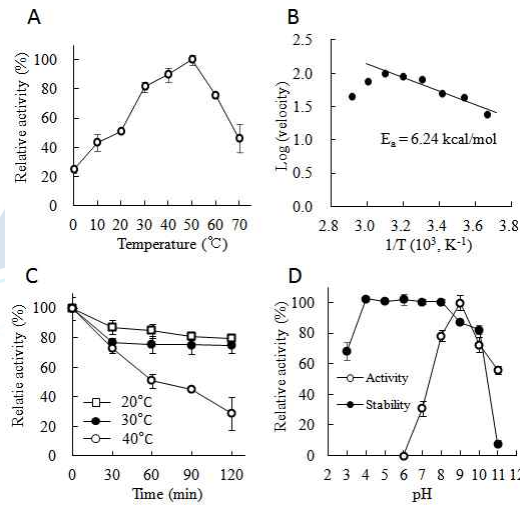


**Fig.** Expression and purification of *Rhodococcus* cutinase.

A. SDS-PAGE was performed using the supernatant and precipitate of *E. coli* BL21 (DE3) and Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS cells containing intact and His-tagged cutinase genes. B. Mutant cutinases having modified N-terminal signal sequence were prepared and

produced in *E. coli*. Enzyme activities were then measured, respectively. In addition, after purification, enzyme activities were measured, respectively. SP, signal peptide. C. SDS-PAGE was performed using enzyme samples after cell lysis, Ni-NTA chromatography, and CM chromatography.

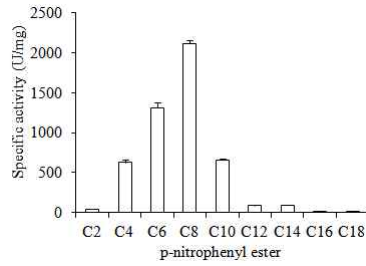
- *Rhodococcus* cutinase 효소를 순수하게 분리하고 온도에 대한 특성을 조사하였다. 최적 반응온도가 50°C로 나타났지만, 효소의 활성화에너지가 6.24 kcal/mol로 측정됨에 따라서 'cold-adapted enzyme'임이 확인되었다. 효소의 열안정성 실험에서 30°C까지 안정하지만 40°C부터 안정성이 떨어지는 것이 확인되었다. 효소의 최적 pH는 9.0인 것으로 확인되었다.



**Fig.** Effects of temperature and pH on *Rhodococcus* cutinase.

A. Effects of temperature on cutinase activity. B. Graph was made using Arrhenius equation to obtain the activation energy of Rcut. C. Effects of temperature on cutinase stability. D. Effects of pH on cutinase activity and stability.

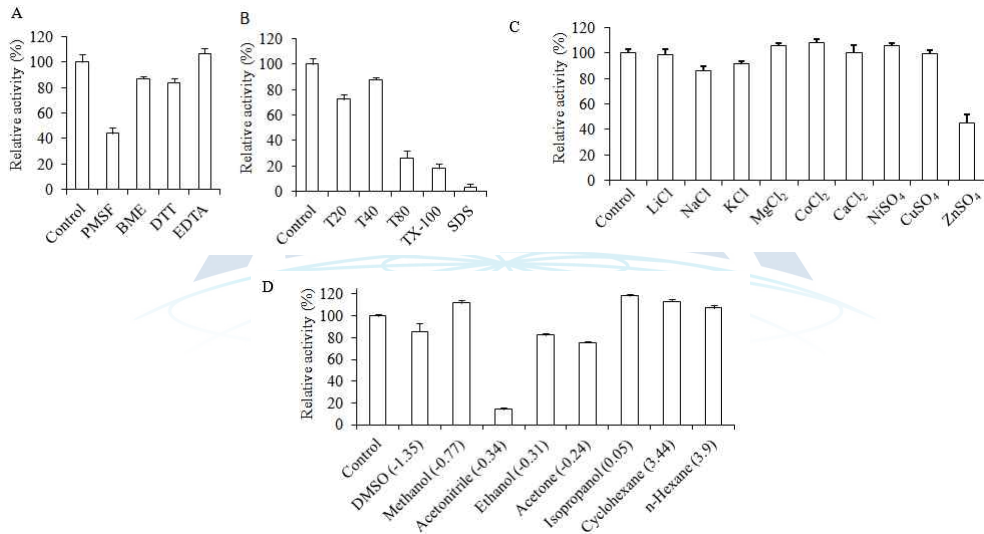
- *Rhodococcus* cutinase 효소의 기질특이성을 조사한 결과, 지방산의 사슬길이가 8개인 경우에 가수분해 활성이 가장 높았고 비교적 짧은 사슬길이에 대해서 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다.



**Fig.** Chain length specificity of *Rhodococcus* cutinase.

Hydrolytic activity of Rcut was measured towards p-nitrophenyl esters with various chain lengths.

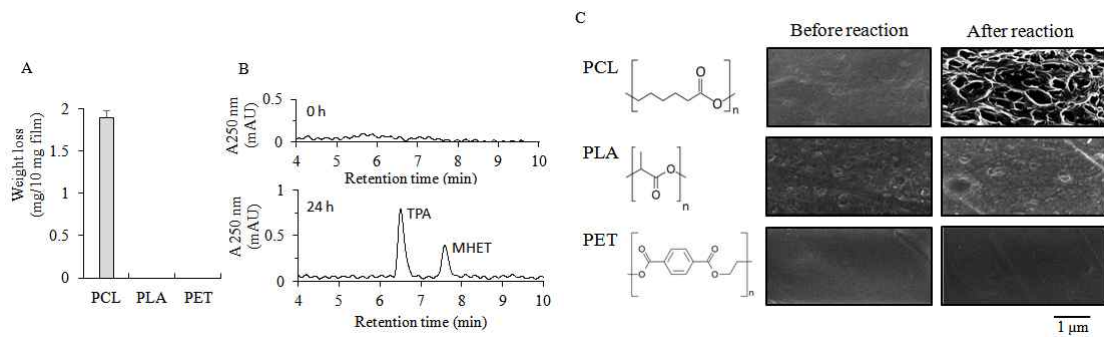
- *Rhodococcus* cutinase에 대해서 여러 가지 효소저해제, 계면활성제, 금속이온, 유기용매에 대한 안정성을 측정하였다.



**Fig.** Stability of *Rhodococcus* cutinase towards various reagents.

A. Residual activity of Rcut was measured after it was treated with various inhibitors (10 mM) for 1 h. B. Residual activity of Rcut was measured after it was treated with various detergents (0.5%) for 1 h. C. Residual activity of Rcut was measured after it was treated with various metal ions (5 mM) for 1 h. D. Residual activity of Rcut was measured after it was treated with various organic solvents (30%) for 1 h. Numbers in parentheses refer to LogP values.

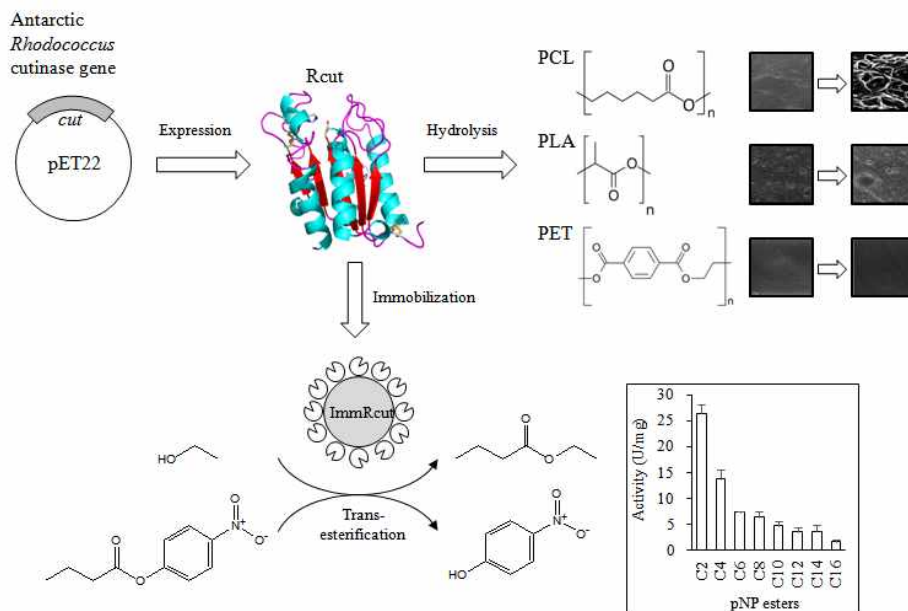
- *Rhodococcus* cutinase를 이용해서 합성물질인 PCL, PLA, PET분해활성을 측정하였다. PCL에 대한 분해활성이 가장 높았으며, PLA과 PET에 대해서도 반응속도가 느리지만 분해할 수 있는 것으로 밝혀졌다.



**Fig.** Degradation of synthetic polymers by Rcut.

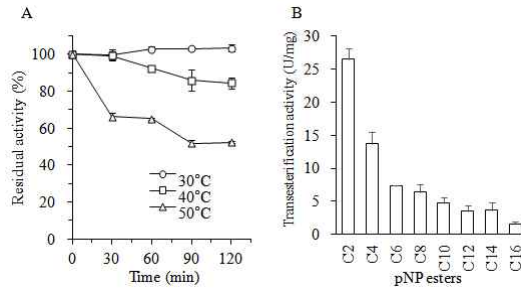
A. Rcut was used to treat three types of biofilms (PCL for 6 h, PLA and PET for 24 h). Amounts of weight loss were measured, respectively. B. Rcut was used to treat PET fragment for 24 h. The reaction product was then analyzed by HPLC. C. After treatment with Rcut, changes in surface structures of three types of films were observed by SEM. PCL, polycaprolactone; PLA, polylactic acid; PET, polyethylene terephthalate; TPA, terephthalate; MHET, mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate.

- 전문 학술지 게재: Seok-Jae Won, Han Byeol Jeong, Hyung-Kwoun Kim. 2020. Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 216-225.





- *Rhodococcus cutinase*를 MA-DVB 비드에 고정화하고 열안정성을 측정하였다. 또한, 다양한 사슬길이의 기질을 이용해서 transesterification 활성을 측정하였다. 고정화 효소가 짧은 길이의 기질에 대해 높은 transesterification 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 정리해서 극지연과 공동으로 특허출원을 진행하고 있음.



**Fig.** Thermal stability and transesterification assay of immobilized Rcut. A. Effects of temperature on immobilized Rcut stability. B. Transesterification reaction was performed with each pNP-ester using immobilized Rcut. Enzyme activity was measured by calculating the reduced amount of pNP-ester used as a substrate.

- *Rhodococcus*로부터 얻은 cutinase를 *E. coli* BL21 (DE3)과 Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS에서 발현하였을 때, CFE에서 pNPC를 기질로 이용하여 측정된 활성은 각각 4.62 U/mL와 61.68 U/mL이었다. Cutinase는 이황결합을 갖고 있기 때문에 BL21 (DE3) 균주에서 발현이 어려운 것으로 예상되며, 실제 연구결과로도 대부분의 단백질이 봉입체형태로 생성되었다. 그러한 결점이 보완된 후자의 균주에서 더 많은 목표단백질을 생산할 수 있었다. 하지만 후자의 균주 역시 Cell free extract를 전기영동하여도 젤상에서 목표밴드가 확인하기 어려울 만큼 적은 양의 단백질이 생산되었다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 *Pichia pastoris* (X-33) 균주를 이용하여 단백질을 생산하고자 하였다. 또 이전 연구에서 이 단백질은 N-terminal에 신호서열이 존재할 때 더 발현이 잘 되는 것으로 확인되었다. 따라서 Yeast 신호서열 ( $\alpha$ -factor)을 포함한 형태와 Rcut (*Rhodococcus cutinase*)가 자체로 가지고 있는 신호서열을 포함한 형태의 단백질을 각각 생산하였다. PCR을 통해 Rcut의 유전자를 합성하였고 이에 이용된 primer는 다음과 같다.

| Vector  | Primer name        | Sequence (5'-3')            |
|---------|--------------------|-----------------------------|
| pPICZaA | $\alpha$ -factor F | CGGAGTGGCCGAATTCGCGCCGTGTT  |
|         | $\alpha$ -factor R | ATTCGGTGAGGTACCTCAGCTGCGT   |
| pPICZA  | Native F           | CAAGGAGAATTCATGAAGAGACGCCTG |
|         | Native R           | ATTCGGTGAGGTACCTCAGCTGCGT   |

- Cloning vector를 제작하였고, 이후 일련의 실험들은 invitrogen사의 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Manual part no. 25-0172)의 방법으로 진행하였다.

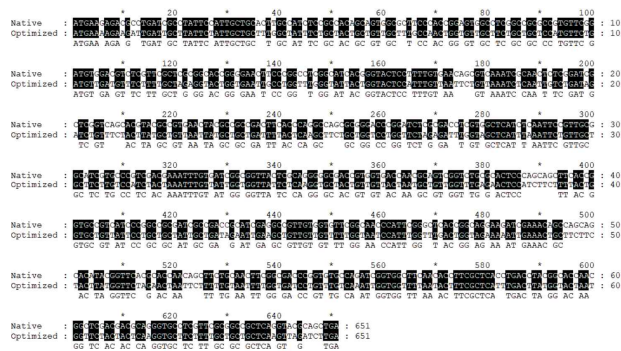
1. pPICZaA-Δ29Rcut



2. pPICZA-Rcut



- 각각의 cloning vector를 갖고 있는 형질전환체를 배양하여 세포배양액을 이용하여 pNPC를 기질로 하여 활성을 측정하였을 때 pPICZaA-Δ29Rcut 형질전환체에서는 1.88 U/mL의 활성이 측정되었으며, pPICZA-Rcut를 갖는 형질전환체에서는 1.38U/mL의 활성이 측정되었다. 형질전환이 이뤄지지 않은 본래의 *Pichia pastoris*에서는 세포배양액에서 활성이 거의 나타나지 않았으며, 형질전환체의 세포 파쇄액에서도 활성이 거의 나타나지 않았다. *E. coli*에서 생산된 Rcut의 활성보다 더 낮은 활성을 나타냈기 때문에 목표 단백질이 매우 적게 생산되었을 것이라 추측하였다. 유전자의 codon이 *Pichia pastoris* codon usage에 적합하지 않아 이러한 결과가 발생되었을 것이라 예상하여, 유전자의 codon을 변경하여 다시 Rcut을 발현하기로 하였다. 유전자합성은 Bionics사에서 진행하였으며, 본래의 유전자에서 215개의 DNA서열을 변경하였다. 변경된 DNA서열을 나타냈다.



- Native gene에서의 codon adaptation index (CAI)의 값은 0.56에 GC percent는 63.75%로 계산되었다. 이를 *Pichia pastoris* 균주에서 가장 많이 이용되는 codon으로 Codon optimization한 결과 CAI값은 0.98에 GC percent는 36.77%로 계산되었다. CAI값 계산은 <https://www.biologicscorp.com>에서 수행하였고, 이 값은 0과 1사이의 값을 가지며, 1과 가까울수록 균주가 가장 선호하는 codon을



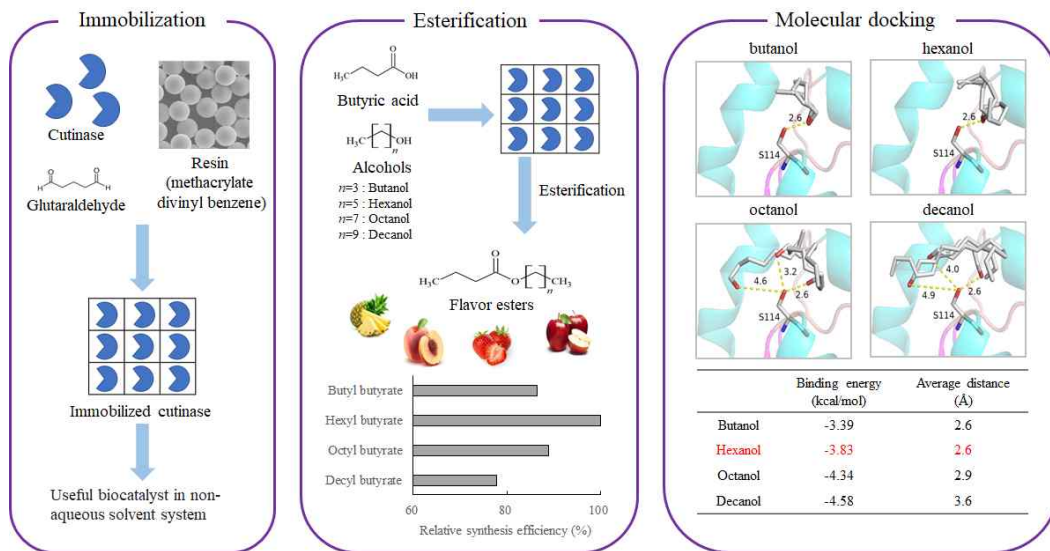
이용하는 것이다. 합성된 유전자는 DNA 양끝 말단에 cloning에 필요한 제한효소 enzyme site가 포함되어 있기 때문에 따로 primer 제작은 필요하지 않았다. 이전과 동일한 방법으로 형질전환체를 만들고 그것을 배양하였다. 세포배양액의 활성을 측정하였을 때 1.35 U/mL의 활성이 측정되었다. 기존의 활성과 유사한 활성이 optimized gene에서도 나타났다.

| Vector-gene       | Expression host               | pNPC activity (U/mL) | Total volume(mL) | Protein solution status |
|-------------------|-------------------------------|----------------------|------------------|-------------------------|
| pPICZaA-29Rcut    | <i>Pichia pastoris</i>        | 1.88                 | 90               | Cell culture media      |
| pPICZA-Rcut       | <i>Pichia pastoris</i>        | 1.38                 | 90               | Cell culture media      |
| pPICZA-Rcut (opt) | <i>Pichia pastoris</i>        | 1.35                 | 90               | Cell culture media      |
| pET22-Rcut        | <i>E. coli</i> (BL21)         | 4.62                 | 10               | Cell free extract       |
| pET22-Rcut        | <i>E. coli</i> (Rosetta-gami) | 61.68                | 10               | Cell free extract       |

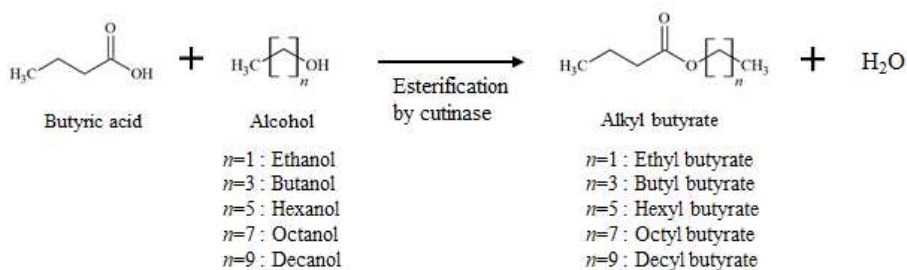
○ *Rhodococcus. sp*로부터 얻은 cutinase는 *E. coli*와 *Pichia pastoris* 균주에서 발현될 수 있고, *E. coli* Rosetta-gami™ 2(DE3) pLysS 균주에서 가장 발현이 잘되었다. 보다 많은 양의 단백질을 얻기 위해 다른 발현 host를 이용하였지만 기존 결과보다 더 적은 양의 단백질이 생산되어 원하고자 하는 결과를 얻지 못하였다. Codon optimized 유전자를 이용한 실험결과도 거의 유사한 결과를 보인 것으로 보아 cutinase의 발현에 codon usage는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 또 세포 파쇄액을 전기영동으로 확인하였을 때 봉입체는 형성되지 않았으며, 세포내에 효소활성이 거의 없는 것으로 보아 형질전환체에서 생산된 목표 단백질은 세포외부로 거의 모두 빠져나갔을 것으로 예상된다. 결과적으로 목표단백질의 발현에서 다른 문제점이 확인되지 않았고, 대량생산을 위해 host와 codon을 변경했을 때 개선되지 않았다. 이 단백질을 발현하기 위해 다른 조건이 있을 것으로 예상되며 그것은 아마도 발현을 위해 생산된 mRNA가 불안정하거나 또는 발현되기 어려운 2차구조를 형성하여 발현자체를 막았을 가능성도 있다.

## 4절. Rcut 리파아제를 이용한 에스테르 합성반응

- 남극 Ross Sea에서 분리한 *Rhodococcus* (strain RosL12) 균으로부터 cutinase 유전자를 분리하고 대장균에서 대량 발현하였다. Cutinase 효소를 MA-DVB 비드에 고정화하고 비수계에서 에스테르 합성반응을 수행하였다.
- 에스테르 합성반응을 통해서 butyric acid와 알코올로부터 다양한 alkyl butyrate를 합성하였다. 합성한 alkyl butyrate은 다양한 향미를 지니고 있어서 식품산업에 사용되는 유용 소재이다.



- 에스테르 합성반응을 통해서 만든 물질에는 ethyl, butyl, hexyl octyl decyl butyrate가 포함되어 있으면, 이들 물질이 합성되는 것을 HPLC로 확인하였다.



Scheme Schematic depiction of alkyl butyrate synthesis by esterification reaction using immobilized cutinase (immRcut).

- 에스테르 합성반응의 최적 반응조건을 구하기 위해서 30, 40, 50도에서 반응을 수행하였다. 100mM butanol과 butyric acid를 기질로 사용한 결과, 50도에서 초기 반응이 가장 빨랐으나, 8시간 이후에는 생산 수율이 거의 일치하였다. 75mM butyl butyrate를 합성할 수 있었다. 반응 수율이 유사하였기 때문에 이후 반응을

30도에서 수행하기로 결정하였다.

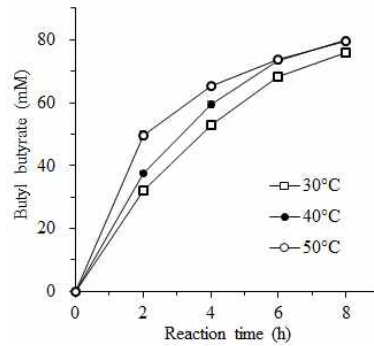


Fig.. Effect of temperature on butyl butyrate synthesis with immRcut.

Synthesis reaction was performed at each temperature using 100 mM butyric acid and 100 mM 1-butanol as substrates.

- 에스테르 합성 반응의 최적조건을 구하기 위해서 기질의 농도별로 반응을 수행하였다. Butanol을 100mM 농도로 고정하고 Butyric acid를 50에서 250mM 농도로 증가시키면서 반응을 수행하였다. butyric acid 농도가 100mM 이상으로 높아지는 경우, 오히려 반응수율이 감소하였다. 이것은 butyric acid 농도가 높아져서 반응액의 pH가 낮아졌기 때문이라고 보인다.
- butyric acid를 100mM 농도로 고정하고 butanol을 50에서 250mM 농도로 증가시키면서 반응을 수행하였다. butanol 농도가 150 mM농도가 될 때까지 반응수율이 계속 증가했고 그 이상의 농도에서는 saturation 현상이 나타났다.

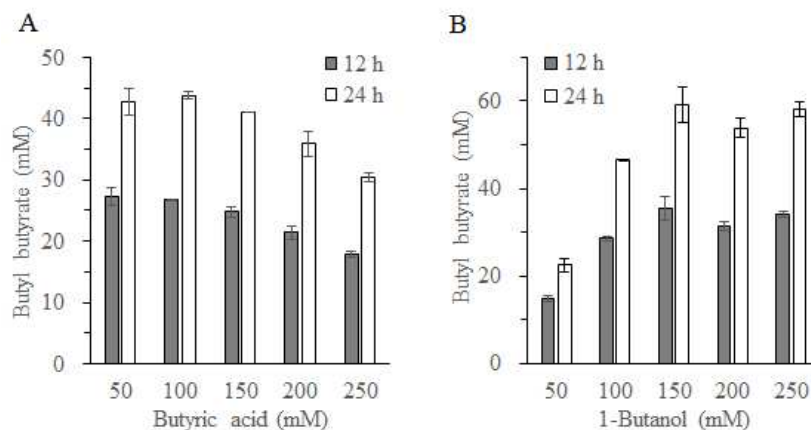


Fig. Effects of butyric acid and 1-butanol concentrations on butyl butyrate synthesis using immRcut. (A) The amount of BB synthesized was measured when the 1-butanol concentration was fixed at 100 mM and the butyric acid concentration was increased from 50 to 250 mM. (B) The synthesis amount of BB was measured when the butyric acid concentration was fixed at 100 mM and the 1-butanol concentration was increased from 50 to 250

mM.

- 에스테르 합성을 수행하는 데에 가장 적합한 유기용매를 선정하기 위해서 4가지 용매를 사용해서 반응을 수행하였다. Hexane을 사용한 경우에 가장 수율이 높았지만, heptane, isooctane, cyclohexane용매와 크게 차이 나지 않았다. hexane, cyclohexane의 증기압이 상대적으로 높기 때문에 장시간 반응을 수행하는 데에 불리하다. 따라서 우리는 isooctane을 사용해서 반응을 수행하기로 결정하였다.

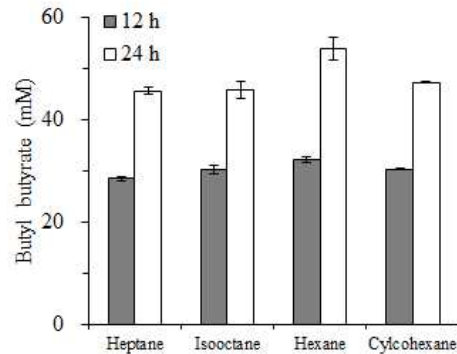


Fig.. Effects of organic solvents on the synthesis of butyl butyrate.

The BB synthesis reaction in each solvent was performed using 100 mM butyric acid and 100 mM 1-butanol as substrates.

- 고정화 효소의 안정성과 에스테르 반응을 반복해서 수행할 수 있는지 조사하였다. 5회 반복 사용할때까지 반응 수율이 거의 떨어지지 않았으며 6회 이상 사용하는 경우에 반응수율이 크게 감소하였다.
- 기질을 100mM 농도로 하루에 한번씩 5회 넣어주는 것과 한꺼번에 500mM을 넣어주는 것을 비교하였다. 한꺼번에 넣어준 경우에는 반응수율이 매우 낮았지만, 5번 나눠서 넣은 경우에는 반응수율이 매우 높게 나왔다. 이것을 통해서 기질의 농도를 조절하면 고농도의 butyl butyrate을 생산할 수 있음을 알게 되었다.

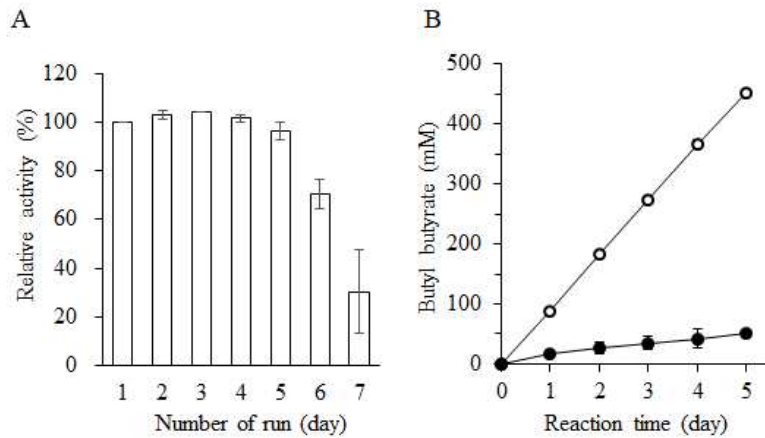


Fig. Investigation of the stability of immRcut in isooctane solvent and continuous synthesis of butyl butyrate using immRcut.

(A) The reaction was performed in isooctane solvent with 100 mM butyric acid and 100 mM 1-butanol as substrates. After washing the used immobilized enzyme, the reaction was repeated 7 times under the same conditions. (B) BB was synthesized continuously for 5 days using immRcut. Butyric acid and 1-butanol at 100 mM were added to the reaction solution every 24 h (open circle). Butyric acid and 1-butanol at 500 mM were added at the beginning of the reaction (closed circle).

- 고정화 cutinase 효소가 butyl butyrate 이외에 다른 에스테르 화합물을 생산할 수 있는지 조사하였다. butanol 대신, ethanol, hexanol, octanol, decanol을 넣고 반응을 수행한 후, ethyl butyrate, hexyl butyrate, octyl butyrate, decyl butyrate가 합성되는 것을 HPLC 분석을 통해서 확인 하였다.

Fig. S1. HPLC analysis of ethyl butyrate (A)

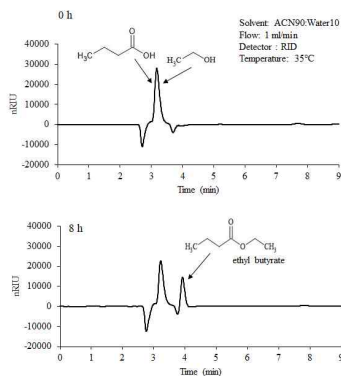


Fig. S1. HPLC analysis of butyl butyrate (B)

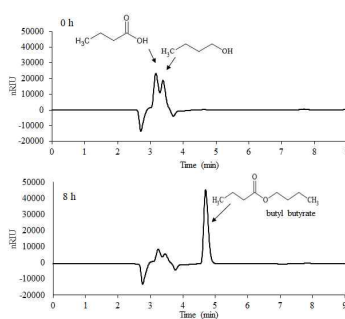


Fig. S1. HPLC analysis of hexyl butyrate (C)

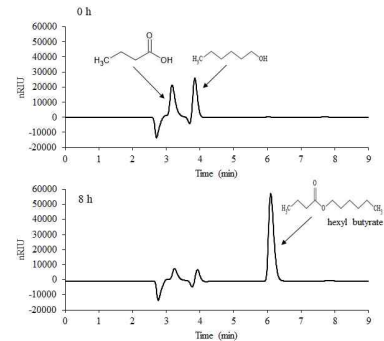


Fig. S1. HPLC analysis of octyl butyrate (D)

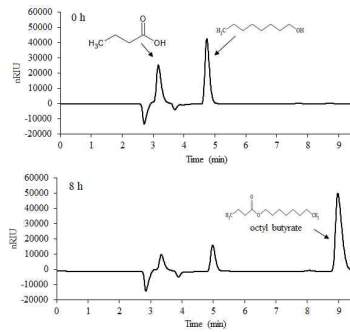
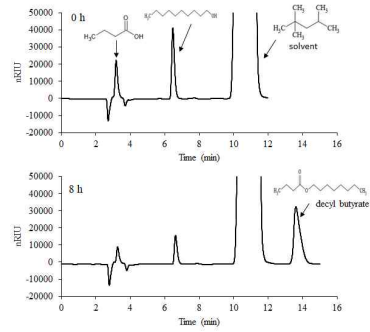


Fig. S1. HPLC analysis of decyl butyrate (E)



- 고정화 cutinase를 사용해서 다양한 alkyl butyrate가 생산되는 것을 조사하였다. 반응속도를 조사한 결과 hexyl butyrate가 가장 빠르게 합성되었고 그 다음으로 butyl, octyl, decyl butyrate 순서로 합성되었다. ethyl butyrate가 가장 느리게 합성되었다.
- butanol, hexanol, octanol을 한 번에 넣고 반응속도를 측정한 결과, hexyl butyrate와 butyl butyrate가 가장 빠르게 합성되었다. 또한, butanol, hexanol을 한 번에 넣고 반응속도를 측정한 결과, hexyl butyrate가 가장 빠르게 합성되는 것을 확인하였다.
- cutinase 효소가 alcohol 기질에 대한 선호도가 있으며, hexanol에 대해 가장 특이성이 높고 그 다음으로 butanol, octanol 순서임을 예측할 수 있다.

극지연구소



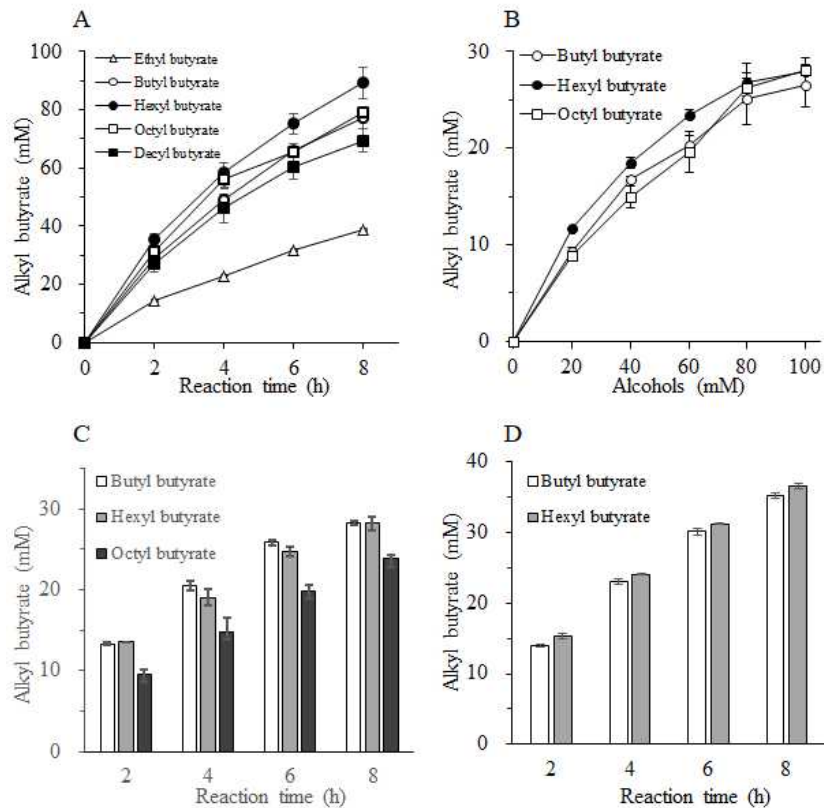
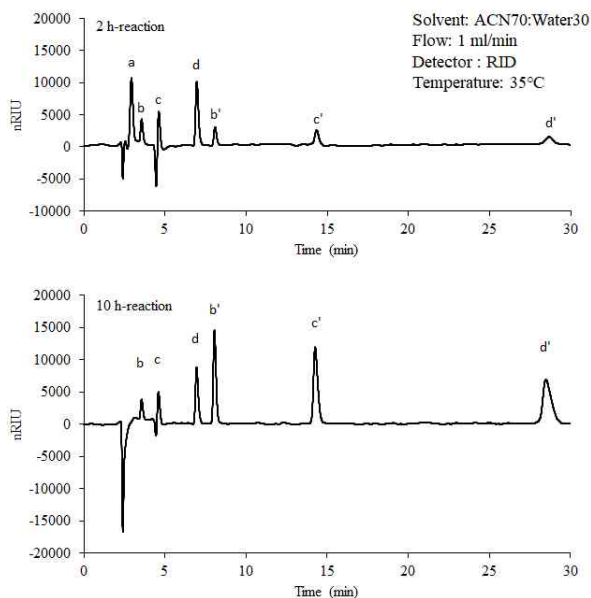


Fig. Alkyl butyrate synthesis of immRcut according to the chain length of alcohol.

(A) Each reaction was carried out with 100 mM of butyric acid and 100 mM of each alcohol (ethanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-decanol) as substrates. (B) The synthesis amount of alkyl butyrate was measured while the butyric acid concentration was fixed at 100 mM and the alcohol (1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol) concentration was increased from 0 to 100 mM. (C) 100 mM butyric acid, 50 mM 1-butanol, 50 mM 1-hexanol, and 50 mM 1-octanol were all put into one vial and the synthesis reaction was performed. (D) 100 mM butyric acid, 50 mM 1-butanol, and 50 mM 1-hexanol were all put into one vial and the synthesis reaction was performed.

- 유기용매에 cutinase 효소를 넣고 여기에 butyric acid, butanol, hexanol, octanol을 한 번에 넣었다. 반응을 수행하면서 기질의 감소, 반응산물의 증가를 HPLC로 분석하였다. 앞서 언급한대로 hexyl butyrate의 합성이 가장 빠르고 그 다음으로 butyl butyrate, octyl butyrate 순서임을 알 수 있다.

Fig. S1. HPLC analysis of one-pot reaction using butanol, hexanol, and octanol (F)  
a, butyric acid; b, butanol; c, hexanol; d, octanol; b', butyl butyrate; c', hexyl butyrate; d', octyl butyrate



- 알킬 부티레이트 합성에서 Rcut의 기질 특이성을 설명하기 위해 분자 도킹 분석을 수행하였다. S114는 활성 부위 세린입니다. N190과 F80은 기질이 효소 포켓에 접근할 수 있는 게이트키퍼인 것으로 보인다.
- 분자 도킹을 통해 각 알코올의 효소 활성 부위에 대한 접근성을 조사한 결과, 탄소 사슬이 가장 긴 기질(1-decanol)과 Rcut의 복합체가 가장 낮은 자유 에너지(-4.58 kcal/mol)를 나타냈다. 효소 활성 부위 근처의 소수성 방향족 잔기는 긴 탄소 사슬의 기질 특이성과 관련이 있을 수 있다고 보고되었습니다. 가장 소수성인 알코올이 가장 높은 결합에너지를 갖는 이유는 게이트키퍼 역할을 할 수 있는 아미노산 중 F80의 페닐기가 돌출되어 있기 때문일 것이다.

Table Chemical property of alcohol, binding energy, and average distance

|           | Number of carbons | Number of rotatable bonds | Binding energy (kcal/mol) | Average distance (Å)* |
|-----------|-------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Ethanol   | 2                 | 1                         | -2.78                     | -                     |
| 1-butanol | 4                 | 3                         | -3.39                     | 2.6                   |
| 1-hexanol | 6                 | 5                         | -3.83                     | 2.6                   |
| 1-octanol | 8                 | 7                         | -4.34                     | 2.9                   |
| 1-decanol | 10                | 9                         | -4.58                     | 3.6                   |

\*Average distance between the hydroxyl group of 50 each alcohol molecules and the oxygen of the active site serine of the enzyme

- 에스테르화 반응에서 ping-pong bi-bi 메커니즘에 따라 산과 효소가 결합하여 아실 중간체를 형성할 수 있습니다. 중간체는 알코올의 수산기의 친핵성 공격에 의해 다시 에스테르와 효소로 전환된다. 즉, 효소에 대한 알코올의 접근성이 에스테르화 반응에 영향을 미칠 수 있다. 그러나 우리의 결과에 따르면 이러한 알코올의 접근성과 효소의 기질 선호도는 정확히 일치하지 않았습니다. 1-Decanol이 가장 효율적인 것으로 예상되었습니다. 그러나 6개의 탄소 사슬을 가진 1-헥산올에서 가장 높은 효율을 보였다.
- 에탄올, 1-부탄올 및 1-헥산올에서 알코올의 히드록실 산소는  $\gamma$ O-S114 근처에 깔끔하게 정렬되었다. 그러나, 1-옥탄올 및 1-데칸올에서 히드록실 산소는  $\gamma$ O-S114와 정렬되지 않았다. 1-decanol의 수산기는  $\gamma$ O-S114와 다른 방향으로 정렬된 1-octanol보다 더 많은 volunteer를 생성했습니다.
- 알코올의 수산기 산소와  $\gamma$ O-S114 사이의 평균 거리를 측정한 결과, 알코올의 탄소 길이가 증가할수록 거리가 증가함을 관찰하였다. 1-decanol의 경우 거리는 3Å보다 훨씬 길었다. 이러한 현상은 알코올의 비틀림 수에 따른 결과인 것으로 보인다. 즉, 탄소 길이가 증가할수록 비틀림 수가 증가하였다. 비틀림 수의 증가는 알코올의 히드록실 산소가 에스테르화 반응을 수행하는 것을 방해하는 것으로 보인다.

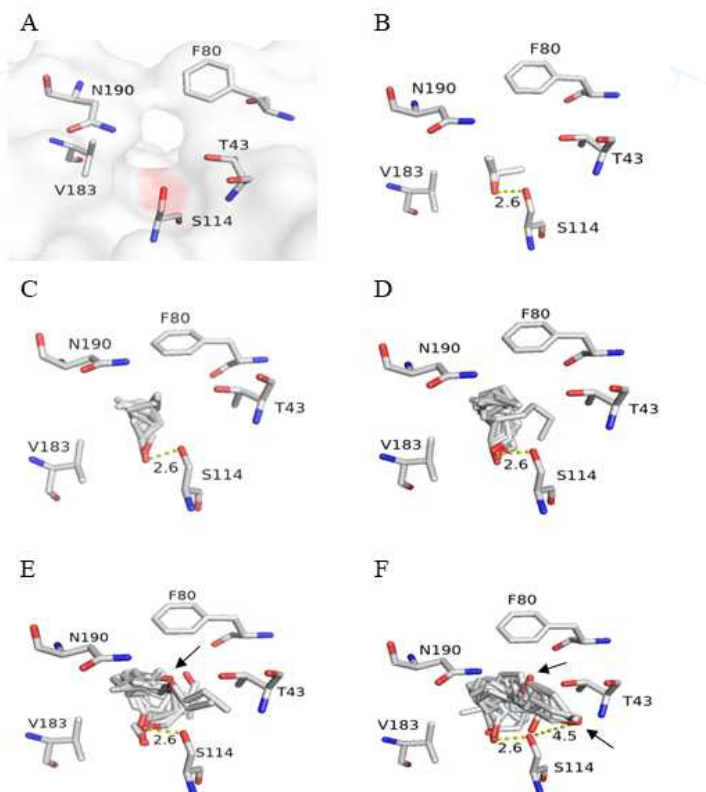
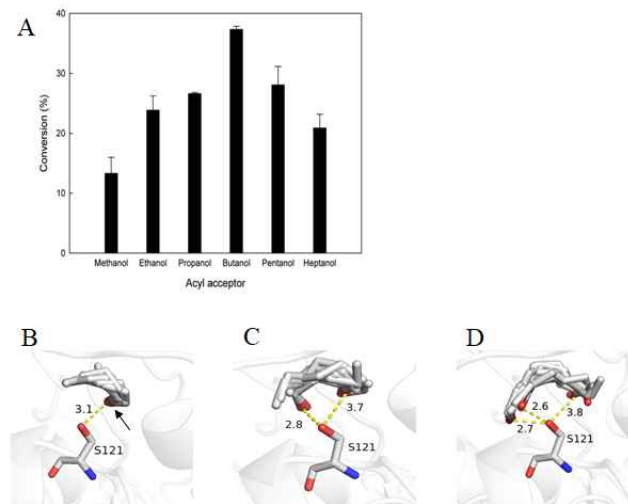


Fig. 3D structure of the active site of Rcut and the result of molecular docking of each alcohol and the active site of Rcut.

(A) Amino acids near the active site of Rcut are indicated. S114 is responsible for the enzymatic activity of Rcut. Results of molecular docking of 10 volunteer ethanol (B), 1-butanol (C), 1-hexanol (D), 1-octanol (E), and 1-decanol (F) to the active site of the enzyme are presented. In the molecular structure, arrows indicate hydroxyl groups of each alcohol.

- Rcut과 달리 *F. oxysporum* cutinase(FoC)를 이용하여 알킬 부티레이트를 합성할 때 1-부탄올이 가장 높은 합성 효율을 보인 반면, 탄소 사슬이 긴 알코올은 합성 효율이 점진적으로 감소하였다. FoC는 또한 분자 도킹을 통해 분석되었습니다. 1-부탄올의 하이드록실 산소는 활성 부위에서 Ser의  $\gamma$ O에 깔끔하게 정렬되었습니다. 그러나 FoC는 Rcut의 경우와 달리 1-hexanol의 일부 지원자가 활성 부위에서 Ser의  $\gamma$ O와 정렬되지 않음을 보여 주었다. 이러한 불일치는 탄소가 두 개 더 많은 1-헵탄올에서 더 분명했습니다.

Fig. S3. Alkyl butyrate synthesis and molecular docking results using FoC.  
A, Alkyl butyrate synthesis using FoC [18]. B-E, molecular docking result of butanol (B), pentanol (C), and heptanol(D).



- 이상의 결과를 논문으로 작성하여 투고하여 온라인에 게재되었음.
- Seok-Jae Won, JoungHanYim, Hyung Kwoun Kim (2022) Synthesis of short-chain alkyl butyrate through esterification reaction using immobilized *Rhodococcus* cutinase and analysis of substrate specificity through molecular docking. Process Biochem. (in press)

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1절. 성과목표 달성도

| 성과목표                  | 세부목표 |                             | 달성 주요내용  | 달성도(%)                                     |
|-----------------------|------|-----------------------------|--|--|
| 극지 미생물 유래 리파아제의 특성규명  | 1-1  | 리파아제 효소의 특성 규명              | - <i>Rhodococcus cutinase</i> 효소의 생산, 분리, 특성규명<br>- Rcut 효소의 고정화, 특성규명                             | - 학술회의 발표<br>- 논문 발표<br>- 100% 달성          |
|                       | 1-2  | 리파아제 효소의 개량                 | - LipCA 효소의 random mutagenesis, mutant library 제조<br>- 저온성 변이효소 선발<br>- 저온성 mutant 분리, 특성규명        | - 저온성 mutant 2종 개발<br>- 100% 달성<br>- 논문 발표 |
| 리파아제를 이용한 유용 바이오소재 생산 | 2-1  | Rcut 효소를 이용한 butyl ester 합성 | - Rcut 효소를 이용한 비수계 효소 반응 수행<br>- Butyl butyrate 합성 반응조건 조사<br>- 다양한 알코올을 이용해서 butyl ester 합성 반응 수행 | - 학회 발표<br>- 논문 발표<br>- 달성도 100%           |
|                       | 2-2  | Rcut 효소의 작용기작 모델 개발         | - Rcut 효소의 기질 특이성 조사<br>- Rcut 효소의 homology model 제작<br>- Rcut 효소의 기질 cocking model 제작             | - 학회 발표<br>- 논문 발표<br>- 달성도 100%           |
|                       | 2-3  | 리파아제를 이용한 페놀 리피드 합성         | - 리파아제 반응으로 BAVE, CAVE 합성<br>- BAVE, CAVE 항산화 활성 조사<br>- BAVE, CAVE 항균 활성 조사<br>- CAVE 항균 메카니즘 규명  | - 학회 발표<br>- 논문 발표<br>- 달성도 100%           |

## 2절 세부목표 달성 내용

### 1. 극지 미생물 유래 리파아제의 특성규명

#### ○ 세부목표 1-1: 리파아제 효소의 특성 규명

| 연구 내용  | 연구 결과  |
|--|--|
| <i>Rhodococcus cutinase</i> 효소의 생산, 분리, 특성규명 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhodococcus</i>로부터 리파아제 유전자를 클로닝함</li> <li>• <i>Rhodococcus cutinase</i> 효소를 대장균에서 발현하고 재조합 효소를 분리함.</li> <li>• Rcut 효소의 온도, pH 등 반응특성을 조사함.</li> </ul>              |
| Rcut 효소의 고정화, 특성규명                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rcut를 MA-DVB 비드에 고정화하고 transesterification 반응을 수행함.</li> <li>• 고정화 효소의 안정성을 조사하고 유기용매에 따른 반응속도를 측정함.</li> <li>• Rcut를 이용하여 PET, PCL 등 환경오염 유발 고분자 분해활성을 조사함.</li> </ul> |

#### ○ 세부목표 1-2: 리파아제 효소의 개량

| 연구 내용   | 연구 결과  |
|---|--|
| LipCA 효소의 random mutagenesis, mutant library 제조 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LipCA 유전자를 이용해서 error-prone PCR을 수행함</li> <li>• pET22백터를 이용해서 LipCA mutant library 제조함</li> </ul> |
| 저온성 mutant 선발                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 돌연변이 LipCA를 <i>E. coli</i> BL21(DE3) 균에서 생산하고 저온성 변이효소를 선발함.</li> </ul>                           |
| 저온성 mutant 분리, 특성규명                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 선발된 2종의 변이효소를 분리하고 효소의 온도 특성을 조사함</li> </ul>  |
| 변이효소 M3-1 mRNA 구조 분석                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 변이효소 M3-1 mRNA의 2차구조를 구하고 에너지를 계산함.</li> <li>• M3-1 효소의 역변이 효소를 제조하고 효소 발현양을 조사함.</li> </ul>      |



2. 리파아제를 이용한 유용 바이오소재 생산

○ 세부목표 2-1: Rcut 효소를 이용한 butyl ester 합성

| 연구 내용                              | 연구 결과   |
|------------------------------------|---|
| Rcut 효소를 이용한 비수계 효소 반응 수행          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhodoccus cutinase</i> 효소를 MA-DVB 비드에 고정화하고 유기용매에서 에스테르 합성반응을 수행함.</li> <li>• butyl ester 물질의 HPLC 분석조건을 조사함</li> </ul> |
| Butyl butyrate 합성 반응조건 조사          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 온도, 기질의 몰비, 반응시간 등 반응조건을 조사함으로써 butyl butyrate 합성 최적 조건을 구함.</li> </ul>  |
| 다양한 알코올을 이용해서 butyl ester 합성 반응 수행 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ethanol, butanol, hexanol, octanol, decanol을 이용해서 butyl ester 합성 반응을 수행하고 반응 수율을 구함.</li> </ul>                            |

○ 세부목표 2-2: Rcut 효소의 작용기작 모델 개발

| 연구 내용   | 연구 결과   |
|---|---|
| Rcut 효소의 기질 특이성 조사                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 알코올에 대한 Rcut 효소의 기질특이성을 구한 결과, C6&gt;C4&gt;C8&gt;C10&gt;C2로 밝혀짐</li> </ul> |
| Rcut 효소의 homology model 및 기질 docking model 제작 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rcut 효소의 3차원 구조모델을 구하고 알코올 기질에 대한 docking 모델을 구함.</li> </ul>                   |

○ 세부목표 2-3: 리파아제를 이용한 기능성 페놀 리피드 합성

| 연구 내용                   | 연구 결과   |
|-------------------------|---|
| 리파아제를 이용한 BAVE, CAVE 합성 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 리파아제 반응으로 BAVE, CAVE 합성</li> <li>• BAVE, CAVE 생산 조건 최적화</li> <li>• BAVE, CAVE 순수 분리정제</li> </ul> |
| BAVE, CAVE 활성 조사        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• BAVE, CAVE 항산화 활성 조사</li> <li>• BAVE, CAVE 항균 활성 조사</li> <li>• CAVE 항균 메카니즘 규명</li> </ul>        |

### 3. 논문발표 실적

- Seok-Jae Won, Han Byeol Jeong, Hyung-Kwoun Kim (2020) Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 216-225.
- Han Byeol Jeong, Hyung Kwoun Kim (2021) Increased mRNA stability and expression level of *Croceibacter atlanticus* lipase gene developed through molecular evolution process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 882-889
- Jin Ju Kim, Hyung Kwoun Kim (2021) Antioxidant and antibacterial activity of caprylic acid vanillyl ester produced by lipase-mediated transesterification. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 317-326
- Seok-Jae Won, JoungHanYim, Hyung Kwoun Kim (2022) Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from Antarctic *Rhodococcus* sp. *Protein Expr. Purif.* 195: 106077.
- Seok-Jae Won, JoungHanYim, Hyung Kwoun Kim (2023) Synthesis of short-chain alkyl butyrate through esterification reaction using immobilized *Rhodococcus* cutinase and analysis of substrate specificity through molecular docking. *J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1-9 (doi: 10.4014/jmb.2211.11022).

### 4. 특허등록 및 출원 실적

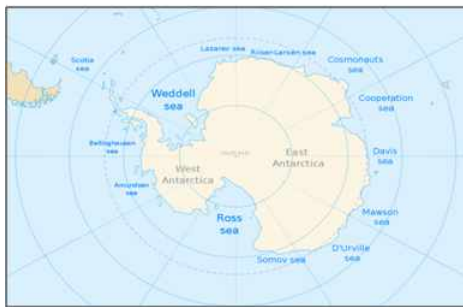
- "신규한 하이드록시페닐아세트산 유도체를 유효성분으로 함유하는 향산화 또는 향균용 조성물" 제10-2216846호 (2021년 02월 10일)
- "크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소" 제10-2228821호 (2020년 11월 30일)
- "해양 박테리아 유래 에스테레이즈 변이 효소(Variants of Esterase Isolated from the Marine Bacterium)" 제10-21287380000호 (2020년 6월 25일)
- "마리노박터 리포르티쿠스 유래 지질분해효소(Lipase from *Marinobacter lipolyticus*)" 제10-20977200000호 (2020년 3월 31일)
- "Rhodococcus cutinase 및 기능성 에스테르 합성" 특허를 극지연구소와 공동으로 출원함(2022년)

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

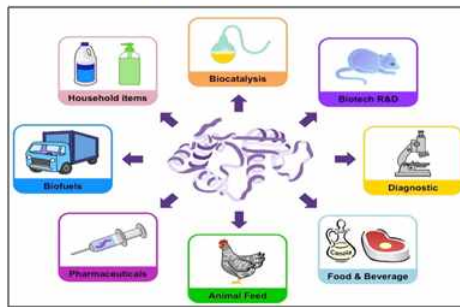
### 1절 학술적 활용계획

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.

남극지방에서 리파아제 발굴



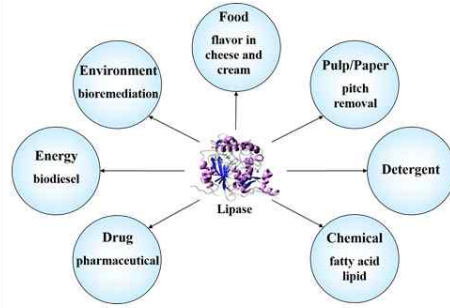
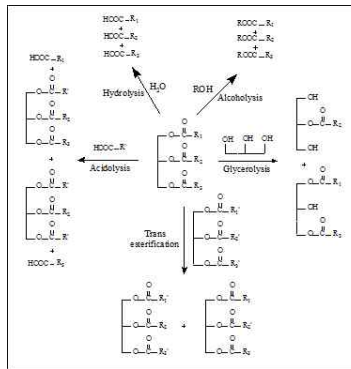
리파아제 효소의 활용



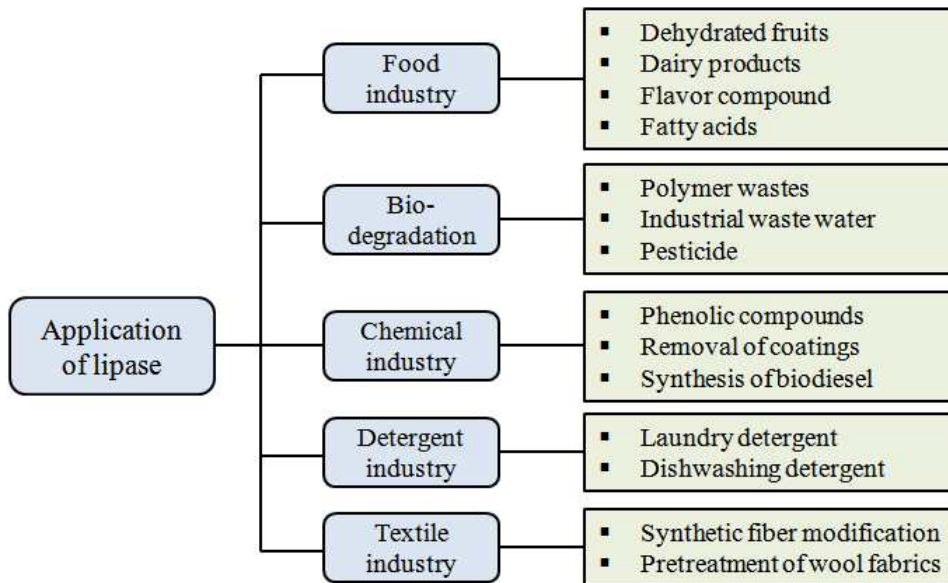
2. 저온성을 갖고 있으며 동시에 효소의 specific activity가 높은 효소를 발굴하면 단백질 구조연구를 통해서 저온성 효소의 구조적 특성과 작용기작을 밝힐 수 있을 것이다. 이것을 바탕으로 효소엔지니어링 기술을 통해 인공적으로 저온성 효소를 개발할 수 있을 것이다.
3. 저온성 효소를 이용하여 저온에서 효소반응을 수행함으로써 상온 또는 고온에서 쉽게 변성되고 분해되거나 산화되는 물질을 기질로 사용할 수 있다. 특히, DHA, EPA와 같이 polyunsaturated fatty acid (PUFA)를 다량 함유하고 있는 지방산의 경우에는 상온에서 쉽게 산화되어 conjugated diene 또는 conjugated triene을 형성하는데 저온에서 반응을 수행하면 지질의 산화를 방지할 수 있을 것으로 기대한다. 따라서 PUFA를 함유한 기질을 사용해서 페놀릭 에스테르를 합성하는데 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 산업용 효소를 대체할 수 있으며 나아가 새로운 산업을 창출할 수 있을 것으로 기대한다.



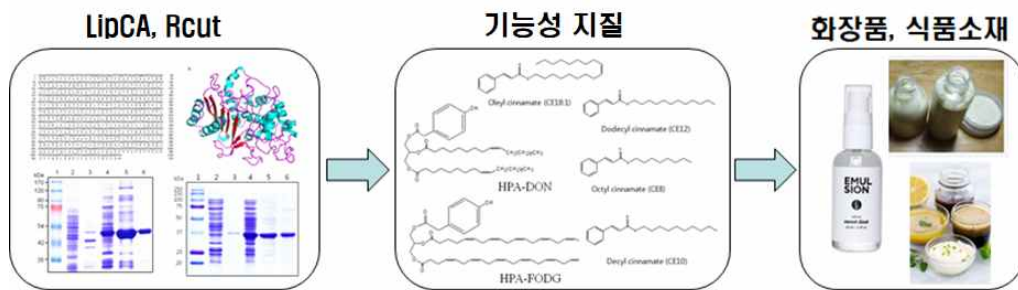
2. 리파아제는 식품산업에서 과일제품, 유제품, 향미성분, 지방산을 만드는 데에 사용된다. 바이오분해 공정을 이용해서 고분자 폐기물, 산업용 폐액, 살충제를 분해하는 데에 사용한다. 화학산업에서는 페놀 화합물 합성, 코팅제 제거, 바이오디젤 합성에 사용된다. 세제산업에서는 의류 및 식기 세탁에 사용된다. 직물산업에서는 섬유 가공, 전처리에 사용된다.



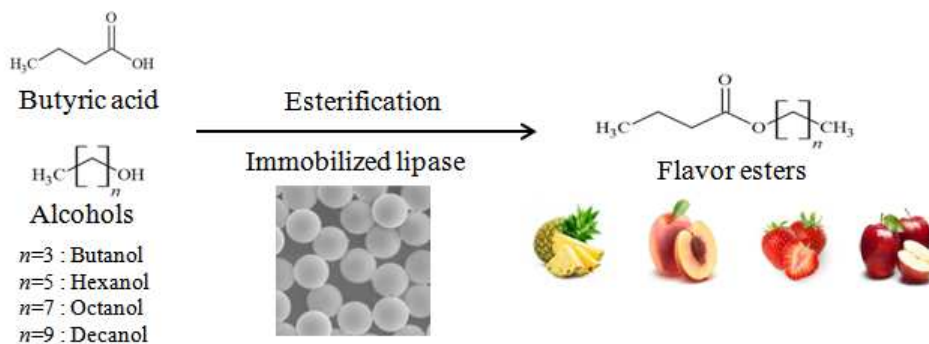
3. 항산화제는 일찍이 여러 산업분야에서 생산품의 산화를 방지하는 목적으로 사용되어왔는데 가장 널리 사용되었던 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)이다. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 소수성을 띠는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 산업에서 생산되는 지질이 포함된 식품가공품에 첨가되어 지질의 산화를 방지하는데 널리 사용되었다. 하지만 BHT와 BHA가 온도의 상승에 따른 휘발성과 불안정성이 높다는 점,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

따라서 리파아제를 이용해서 천연물질로부터 신규 향산화제를 개발한다면, 새로운 향산화제 시장을 개척할 수 있을 것이다.

4. 페놀릭 산 또는 페놀릭 알코올은 항산화 활성을 갖고 있으며 지방산 또는 지방족 알코올과 결합하여 에스테르 화합물로 만들 수 있다. 이 방법으로 페놀 화합물의 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.
5. 극지 미생물인 *Croceibacter atlanticus*, *Rhodococcus* 균으로부터 발굴한 LipCA, Rcut 효소를 이용해서 다양한 지질 화합물을 합성하면, 천연물질로부터 신규한 화장품, 식품 소재로 개발 할 수 있다.



6. 극지에서 분리한 리파아제 효소를 비드에 고정화해서 다양한 지질 화합물을 합성할 수 있다. 단쇄, 중쇄 지질물질은 식품산업에서 기능성 향미물질로 사용된다.



## 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 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).

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.

Seok-Jae Won, Han Byeol Jeong, Hyung-Kwoun Kim (2020) Characterization of Novel Salt-Tolerant Esterase Isolated from the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 216-225.

Han Byeol Jeong, Hyung Kwoun Kim (2021) Increased mRNA stability and expression level of *Croceibacter atlanticus* lipase gene developed through molecular evolution process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 882-889

Jin Ju Kim, Hyung Kwoun Kim (2021) Antioxidant and antibacterial activity of caprylic acid vanillyl ester produced by lipase-mediated transesterification. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 317-326

Seok-Jae Won, JoungHanYim, Hyung Kwoun Kim (2022) Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from Antarctic *Rhodococcus* sp. *Protein Expr. Purif.* 195: 106077.

Seok-Jae Won, JoungHanYim, Hyung Kwoun Kim (2023) Synthesis of short-chain alkyl butyrate through esterification reaction using immobilized *Rhodococcus* cutinase and analysis of substrate specificity through molecular docking. *J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1-9 (doi: 10.4014/jmb.2211.11022).

김

## 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.