

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 : 김 일 찬
위탁연구기관명 : 가톨릭대학교
위탁연구책임자 : 김 형 권
위탁참여연구원 : 송 하 민
“ : 이 가 영
“ : 김 영 아
“ : 전 예 원

보고서 초록

위탁연구과제명	극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과 기능성 소재 합성				
위탁연구책임자	김 형 권	해당단계 참여연구원 수	5명	해당단계 연구비	40,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 생명공학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고 서면 수	53
<ul style="list-style-type: none"> • 남극에서 분리한 <i>Croceibacter atlanticus</i> 균의 LipCA 리파아제의 온도 특성을 변화시키기 위해 분자진화기법(ep-PCR)을 사용함. 변이효소 A37, R1를 선발함. • A37의 경우, F43L, R1의 경우, F43L, S48G, S49G, N141K, K297R가 확인됨. • 효소의 상대활성 $RA^{10/30}$ 값이 WT은, 59%, A37은 65%, R1은 67%로 측정됨. • LipCA WT, A37, R1 효소의 최적온도가 40°C이고, WT, A37, R1의 활성화에너지가 각각 4.45, 3.47, 3.11 kcal/mole로 계산됨 • WT, A37, R1의 k_{cat}/K_M 값은 38, 42, 63 $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$로 계산됨 • LipCA WT, A37, R1 효소가 10°C, 20°C, 30°C에서 butyric acid와 octanol을 사용해서 식품 향미성분인 octyl butyrate을 합성함. • Back mutation을 통해서 L43F, G48S, G49S가 효소활성에 중요함을 밝힘. • 남극에서 분리한 <i>Rhodococcus</i> 균의 Rcut 리파아제를 이용해서 식품 향미성분인 isoamyl fatty acid ester를 합성함 • <i>E. coli</i> Rosetta gami (DE3)에서 Rcut 효소를 생산하고, Rcut 효소를 MA-DVB 비드에 고정함. • 고정화 Rcut을 이용한 esterification 반응에서 isoamyl butyrate, isoamyl octanoate, isoamyl hexanoate, isoamyl decanoate, isoamyl acetate 순으로 반응산물이 빠르게 합성됨. • 효소와 지방산의 Docking model을 통해서 결합에너지와 거리를 구하고 기질특이성을 규명함 • isoamyl butyrate 합성반응의 반응온도, 기질농도, 반응시간 등 반응조건을 최적화함. • 고정화 Rcut 효소를 esterification 반응에 6회 반복사용해도 효소활성이 유지되는 것을 확인함. 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	리파아제, 극지 미생물, 고정화 효소, 분자진화, 에스테르화 반응, 향미성분			
	영 어	lipase, polar microorganism, immobilized enzyme, molecular evolution, esterification reaction, flavor compound			

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 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 기능성 식품소재인 지질 에스테르를 합성하는 반응시스템을 확립함.

IV. 연구개발결과

남극에서 분리한 *Croceibacter atlanticus* 균의 LipCA 리파아제의 온도 특성을 변화시키기 위해 분자진화기법(ep-PCR)을 사용함. 1st Round screening을 통해 변이효소 A37를 발굴하고, 2nd Round screening을 통해 변이효소 R1를 발굴함. 변이효소 A37의 경우, 1개의 변이(F43L), 변이효소 R1의 경우, 5개의 변이(F43L, S48G, S49G, N141K, K297R)가 확인됨. 10°C와 30°C에서 효소의 활성을 측정 한 결과, 상대활성 $RA^{10/30}$ 값이 LipCA WT은, 59%, A37은 65%, R1은 67%로 측정됨. 효소가 지닌 His-tag를 이용해서 Ni-NTA 컬럼을 사용해서 효소를 순수하게 분리함. LipCA WT, A37, R1 효소의 최적온도가 40°C이고, WT, A37, R1의 activation energy가 각각 4.45, 3.47, 3.11 kcal/mole로 측정됨. 이 결과로부터 변이효소 R1이 'cold-adapted enzyme'임을 확인함. LipCA WT, A37, R1의 kinetic parameter를 10°C에서 조사한 결과, k_{cat}/K_M 값은 38, 42, 63 $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 로 계산됨. 변이효소 R1이 저온에서 효소효능이 향상되었음을 확인함. 효소를 MA-DVB 비드에 소수성결합과 공유결합으로 고정화하고 비극성 용매에서 에스테르 합성반응을 수행함. 고정화 효소가 10°C, 20°C, 30°C에서 butyric acid와

octanol을 사용해서 식품 향미성분인 octyl butyrate을 합성하는 것을 확인함. 변이효소 R1이 WT, A37에 비해서 octyl butyrate을 합성하는 수율이 높음을 확인함. Site-directed mutagenesis를 통해 5가지 back mutant를 제조함. Back mutation을 통해서 L43F, G48S, G49S가 효소활성에 중요함을 밝힘. 이상 3가지 아미노산은 활성부위와 인접한 'lid' 부위에 위치함을 밝힘. 본 과제를 통해 남극 유래의 리파아제를 분자진화해서 저온성 효소를 개발하고 기능성 리피드를 합성하는 방법을 개발하였음.

남극에서 분리한 *Rhodococcus* 균의 Rcut 리파아제를 이용해서 식품 향미성분인 isoamyl fatty acid ester를 합성함. *E. coli* BL21 (DE3)에서 inclusion body 형태로 생산되기 때문에 *E. coli* Rosetta gami (DE3)에서 Rcut 효소를 생산함. Rcut 효소를 MA-DVB 비드에 소수성결합과 공유결합으로 고정함. Isoamyl alcohol과 다양한 길이의 단쇄, 중쇄 지방산(C2-C10)을 사용하여 에스테르 화합물을 합성함. 고정화 Rcut을 이용한 esterification 반응에서 isoamyl butyrate, isoamyl octanoate, isoamyl hexanoate, isoamyl decanoate, isoamyl acetate 순으로 반응산물이 빠르게 합성됨. 기질 길이에 따른 반응속도의 차이를 설명하기 위해서 Docking model을 조사함. 효소와 지방산의 Docking model을 통해서 결합 에너지와 거리를 구하고 기질특이성을 규명함. 가장 빠르게 합성되는 과일 향미성분인 isoamyl butyrate 에 대해서 반응온도, 기질농도, 반응시간 등 반응조건을 최적화함. 고정화 Rcut 효소를 esterification 반응에 6회 반복사용해도 효소활성이 그대로 유지되는 것을 확인함. 본 과제를 통해 남극 유래의 리파아제를 비드에 고정화하고, 이것을 이용해서 식품 향미성분의 isoamyl fatty acid ester 합성 반응방법을 개발함.

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 효소촉매로 활용하고자 함. 식품산업과 화장품 산업의 소재로 쓰이는 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 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 flavor lipids using immobilized lipase.

IV. R&D Results

Molecular evolution technique (ep-PCR) was used to change the temperature characteristics of LipCA lipase of *Croceibacter atlanticus* isolated from Antarctica. Mutant enzyme A37 was discovered through 1st round screening, and mutant enzyme R1 was discovered through 2nd round screening. In the case of mutant enzyme A37, one mutation (F43L) was confirmed, and in the case of mutant enzyme R1, five mutations (F43L, S48G, S49G, N141K, K297R) were confirmed. As a result of measuring the enzyme activity at 10°C and 30°C, the relative activity RA10/30 values were measured to be 59% for LipCA WT, 65% for A37,

and 67% for R1. The enzyme is separated purely using a Ni-NTA column using the enzyme's His-tag. The optimal temperature of LipCA WT, A37, and R1 enzymes is 40°C, and the activation energies of WT, A37, and R1 were measured to be 4.45, 3.47, and 3.11 kcal/mole, respectively. From these results, it was confirmed that mutant enzyme R1 was a 'cold-adapted enzyme'. As a result of examining the kinetic parameters of LipCA WT, A37, and R1 at 10°C, k_{cat}/K_M values were calculated to be 38, 42, and 63 min-1mM-1. It was confirmed that the enzyme efficacy of mutant enzyme R1 was improved at low temperatures. The enzyme is immobilized on MA-DVB beads by hydrophobic and covalent bonds, and an ester synthesis reaction is performed in a non-polar solvent. It was confirmed that the immobilized enzyme synthesizes octyl butyrate, a food flavor ingredient, using butyric acid and octanol at 10°C, 20°C, and 30°C. It was confirmed that mutant enzyme R1 has a higher yield of octyl butyrate synthesis compared to WT and A37. Five back mutants were produced through site-directed mutagenesis. Through back mutation, it was revealed that L43F, G48S, and G49S are important for enzyme activity. It was revealed that the above three amino acids are located in the 'lid' site adjacent to the active site. Through this project, we developed a low-temperature enzyme by molecularly evolving lipase from Antarctica and developed a method to synthesize functional lipids.

Isoamyl fatty acid ester, a food flavoring ingredient, is synthesized using Rcut lipase from *Rhodococcus* bacteria isolated from Antarctica. It was produced in the form of an inclusion body in *E. coli* BL21 (DE3). We produced the Rcut enzyme in *E. coli* Rosetta gami (DE3). Rcut enzyme was immobilized on MA-DVB beads by hydrophobic and covalent bonds. Ester compounds are synthesized using isoamyl alcohol and short- and medium-chain fatty acids (C2-C10) of various lengths. In the esterification reaction using immobilized Rcut, reaction products are rapidly synthesized in the following order: isoamyl butyrate, isoamyl octanoate, isoamyl hexanoate, isoamyl decanoate, and isoamyl acetate. Docking model was investigated to explain the difference in reaction rate according to substrate length. Binding energy and distance were obtained through docking model of enzyme and fatty acid. Through this, substrate specificity was identified. Reaction conditions such as reaction temperature, substrate concentration, and reaction time are optimized for isoamyl butyrate, the most rapidly synthesized fruit flavor ingredient. It was confirmed that the enzyme

activity was maintained even when the immobilized Rcut enzyme was used repeatedly in the esterification reaction 6 times. Through this project, lipase from Antarctica was immobilized on beads and a reaction method for synthesizing isoamyl fatty acid ester, a food flavor ingredient, was developed using this.

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 alkyl esters used as materials in the food and cosmetic industries by non-aqueous reaction.



목 차

제 1 장 서론 -----	9
1절. 연구의 목적 -----	9
2절. 연구의 필요성 및 범위 -----	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	16
1절. 국내 기술개발 동향 -----	16
2절. 국외 기술개발 동향 -----	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	24
1절. <i>Croceibacter atlanticus</i> lipase (LipCA) 연구 -----	24
2절. <i>Rhodococcus</i> lipase (Rcut) 연구 -----	36
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 -----	43
1절. 성과목표 달성도 -----	43
2절 세부목표 달성 내용 -----	44
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	47
1절 학술적 활용계획 -----	47
2절 경제적 활용계획 -----	49
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	52
제 7 장 참고문헌 -----	52

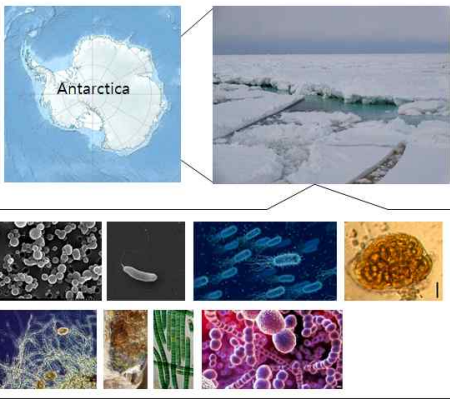
제 1 장 서론

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.

<남극에서 분리된 다양한 미생물 목록>

Novel and valuable psychrophilic bacteria are discovered in Antarctica.



Antarctica


Antarctica

- Acinetobacter*
- Aliicyclobacillus acidocaldarius*
- Aquaspirillum*
- Arthrobacter*
- Acospirillum*
- Bacillus*
- Bicionia argentinensis*
- Brevibacterium*
- Brevundimonas*
- Chryseobacterium*
- Corynebacterium*
- Flavobacterium*
- Gloeocapsa*
- Hymenobacter roseosalivarius*
- Leptolyngbya frigida*
- Massilia*
- Micrococcus*
- Modestobacter multiseptatus*
- Neisseria*
- Nocardia*
- Nostoc commune*
- Paenibacillus*
- Planococcus*
- Pseudonocardia antarctica*
- Pseudomonas*
- Psychrobacter*
- Sphingobacterium*
- Staphylococcus*
- Stenotrophomonas*
- Streptococcus*
- Streptomyces*

- Antarctic psychrophilic bacteria produce novel psychrophilic enzymes.
- Psychrophilic enzymes are used in biotransformation as biocatalyst.

<가톨릭대 연구팀이 분리한 남극 리파아제 생산균>

Lipase-producing bacteria were isolated from Antarctic Ross sea by KOPRI.



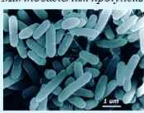


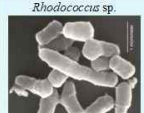
Antarctica

Ross sea

KOPRI (Sejong, Antarctica)

KOPRI (Incheon, Korea)

KOPRI
Korea Polar Research Institute

 <p><i>Marinobacterium lipolyticus</i></p>	<p>Domain: Bacteria Phylum: Pseudomonadota Class: Gammaproteobacteria Order: Alteromonadales Family: Alteromonadaceae Genus: Marinobacter Species: M. lipolyticus</p>	 <p><i>Croceibacter atlanticus</i></p>	<p>Domain: Bacteria Phylum: Bacteroidota Class: Flavobacteriia Order: Flavobacteriales Family: Flavobacteriaceae Genus: Croceibacter Species: C. atlanticus</p>
 <p><i>Alteromonas</i> sp.</p>	<p>Domain: Bacteria Phylum: Pseudomonadota Class: Gammaproteobacteria Order: Alteromonadales Family: Alteromonadaceae Genus: Alteromonas</p>	 <p><i>Rhodococcus</i> sp.</p>	<p>Domain: Bacteria Phylum: Actinomycetota Class: Actinomycetia Order: Mycobacteriales Family: Nocardiaceae Genus: Rhodococcus</p>

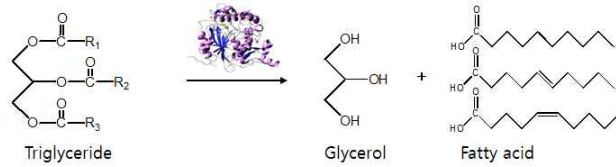
2절. 연구의 필요성 및 범위

1. 리파아제는 지방 분해 효소로서 트리글리세리드를 글리세롤과 지방산으로 분해함. 미생물들은 세포주변의 지방을 분해하여 영양분으로 흡수하기 위한 목적과 병원성을 나타내기 위해서 리파아제를 세포 밖으로 분비함. 리파아제는 산업용 효소로서 식품, 펄프/제지, 세제, 정밀화학, 환경, 에너지, 의약산업에서 널리 사용되고 있음.

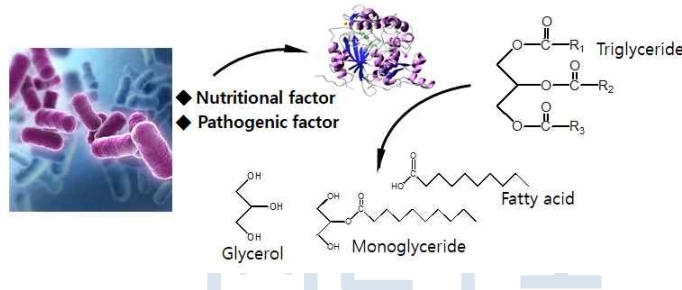
<리파아제의 가수분해 반응 및 미생물 리파아제의 생물학적 작용>

Lipase: triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3)

Lipase hydrolyzes triglyceride to produce glycerol and fatty acids.

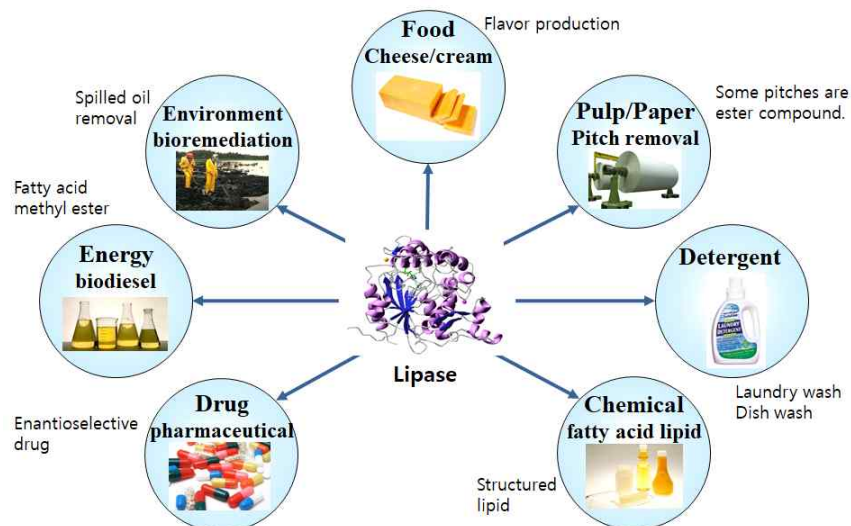


Microorganism produce lipases as nutritional factor or pathogenic factor.



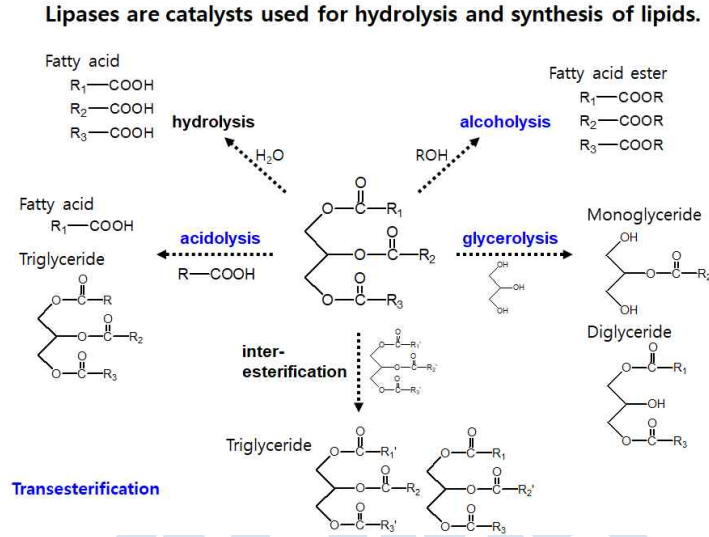
<리파아제의 산업적 활용>

Lipases are commercial enzymes used widely in various industries.



2. 리파아제는 물속에서 가수분해 반응을 촉매하지만, 비수계에서는 반응물질과 환경에 따라서 esterification, transesterification, interesterification 반응을 촉매함. 리파아제를 이용한 다양한 물질을 합성해서 산업적으로 활용하는 것이 중요함.

<리파아제의 다양한 촉매 반응>



3. 리파아제 효소반응을 이용한 기능성 항산화제 합성 필요성
 가. 식품, 화장품, 의약, 연료, 윤활유, 사료, 플라스틱 산업에서 물질의 산화를 방지하는 목적으로 항산화제가 널리 사용되어왔는데 가장 많이 사용되었던 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)이다.

<항산화제의 산업적 활용>

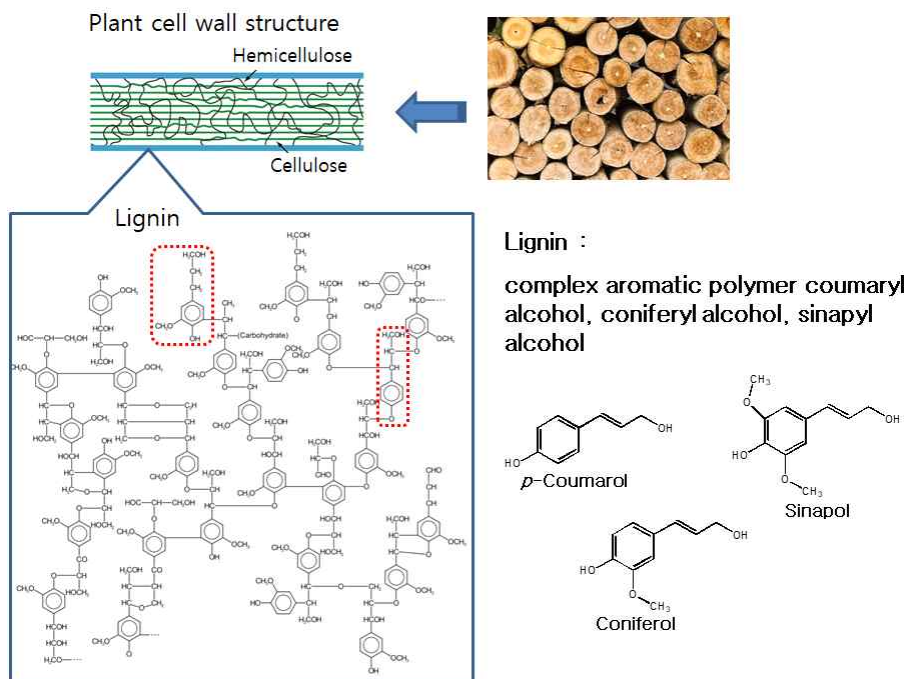
• Synthetic and natural antioxidants are used widely in various industries.



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), 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.

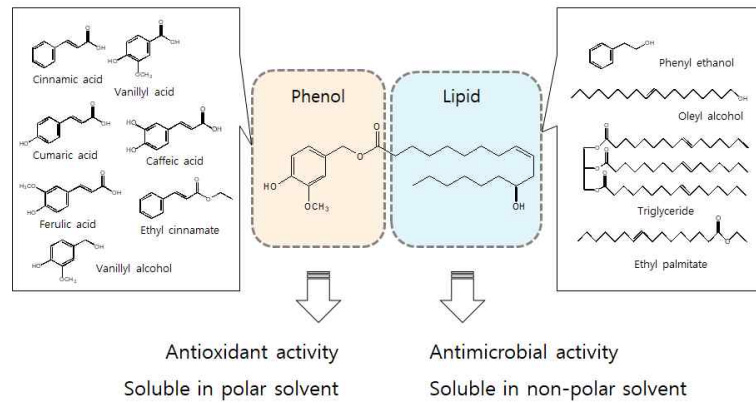
<리그닌 구조와 리그닌을 구성하는 페놀릭 알코올의 종류>



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.

<페놀리피드의 종류 및 양친성 구조>

Phenol lipid?




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 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.

4. 저온성 리파아제의 탐색 및 효소전환 반응

가. 저온성 리파아제는 산업적으로 매우 중요한 효소임. 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.

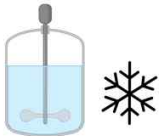
<저온성 효소의 산업적 중요성>

What is psychrophilic enzyme? 

- High activity at low temperature

Why is psychrophilic enzyme?

- Biotransformation reactions for heat-labile substrate and products
- Low temperature food processing, thus discouraging microbial growth
- Low temperature industrial process, thus reducing processing costs
- Commercial trends favor low temperature operation (detergent application)
- High stability and activity in organic solvent



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 body 형태로 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

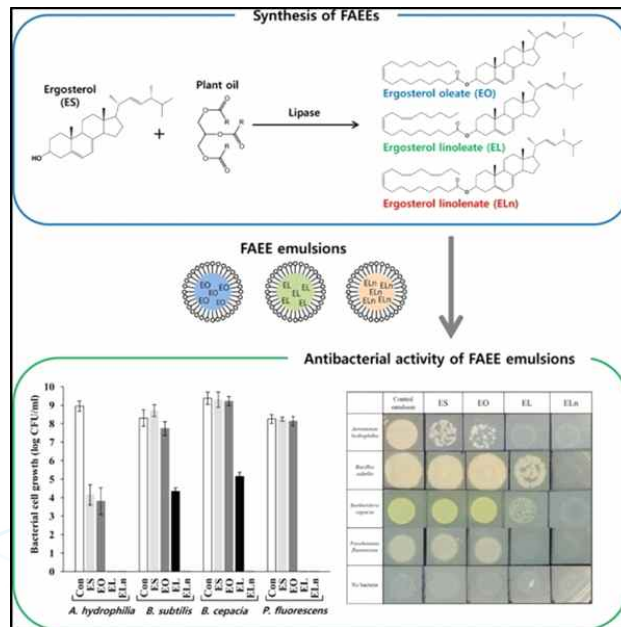
있기 때문에 bead 고정화법을 사용한다.

- 사. 고정화 효소를 이용해서 기능성지질을 합성하기 위해서 먼저 각종 페놀릭 알코올과 지방산 또는 지방을 대상으로 transesterification 반응을 수행한다. 타깃 지질이 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 엔지니어링을 계산한다. 위치특이적 변이효소를 생산함으로써 단백질 발현에 직접 관여한 염기서열을 조사한다.

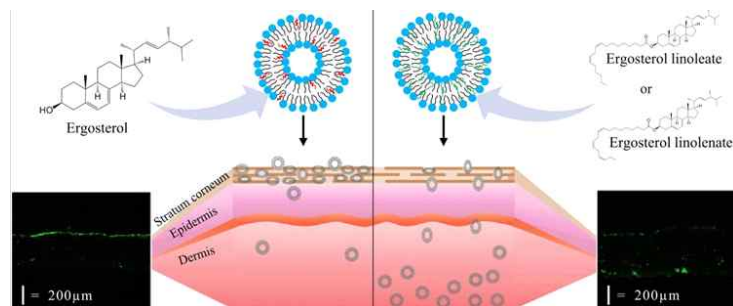
제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술개발 동향

- 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.



- 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.



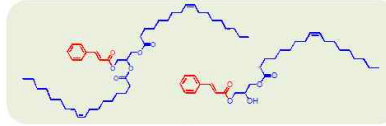
- 가톨릭대 연구팀은 리파아제를 이용한 transesterification 반응을 통해 ricinoleic acid vanillyl ester를 합성하였고 DPPH, ABTS 방법을 통해 비극성 용매에서 항산화활성이 크게 증가함을 밝혔다. *Enz. Microbial. Technol.* (2020)

<가톨릭대 연구팀이 개발한 페놀리피드 종류>

Phenol lipids produced in our lab

1. CMOG (Cinnamoyl monooleyl glycerol)

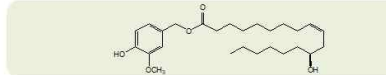
CDOG (Cinnamoyl dioleoyl glycerol)



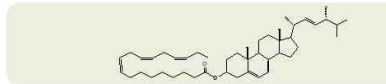
2. uFAVE (Unsaturated Fatty acid vanillyl ester)



3. RAVE (Ricinoleic acid vanillyl ester)

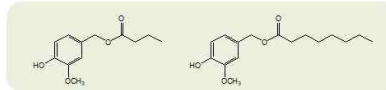


4. uFAEE (Unsaturated fatty acid ergosterol ester)

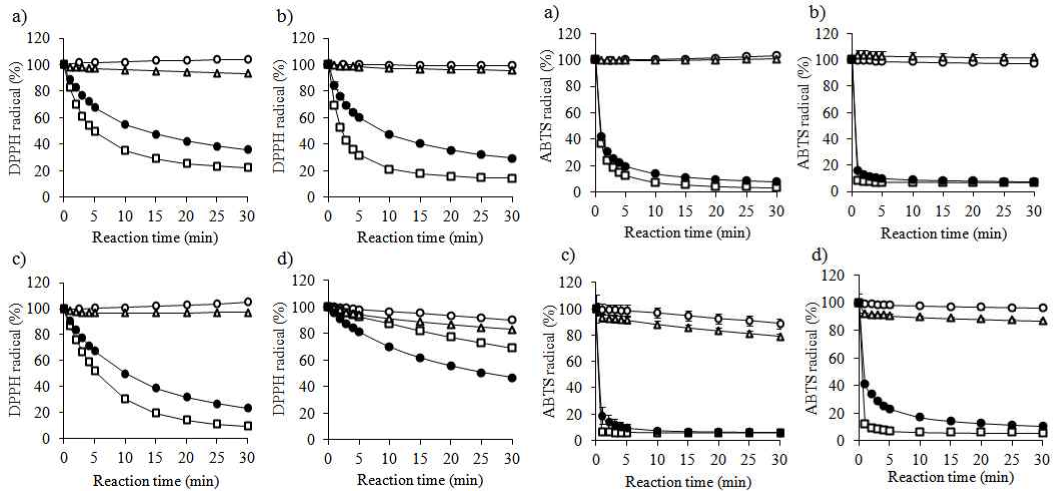
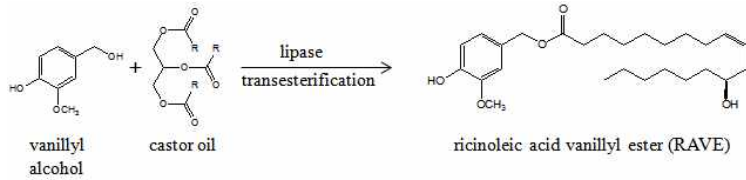


5. BAVE (Butyric acid vanillyl ester)

CAVE (Caprylic acid vanillyl ester)

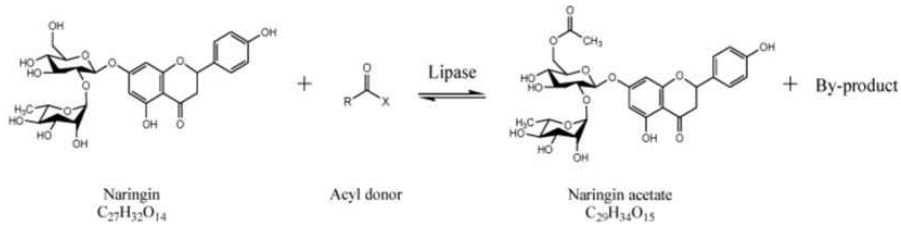


<페놀리피드의 합성 및 항산화 활성 측정>



4. 감귤 플라보노이드 중 하나이며 천연 항산화제로 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.

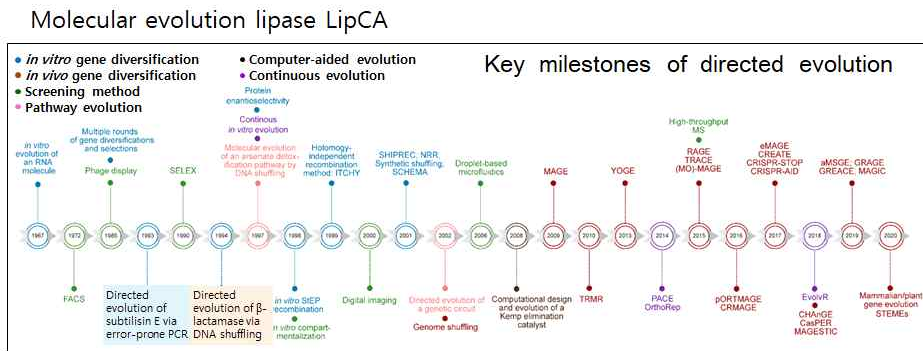


5. 구윤모 교수팀은 Ionic liquid ([Emim][Tf(2)N])에서 리파제를 이용하여 CAPE를 합성함. 즉, 반응 시간 (36-60 h), 반응 온도 (65-75 °C), 기질의 몰비(20:1-40:1), 효소와 기질의 몰비 (10:1-20:1) 등 반응조건을 최적화함. *Bioprocess Biosyst Eng.* (2013) 36: 799-807.

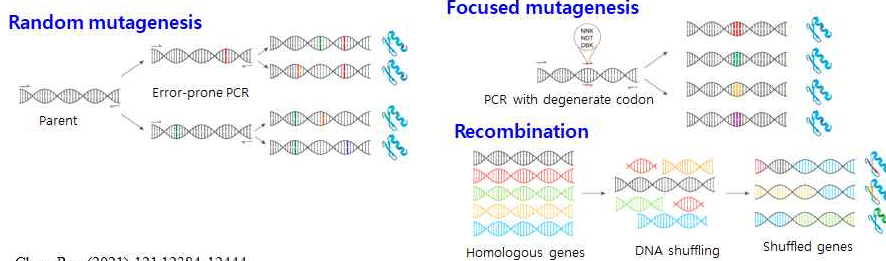
2절. 국외 기술개발 동향

1. 분자진화기법을 통해서 다양한 변이효소를 개발 할 수 있음. In vitro gene 변이방법으로써 Random mutagenesis, focused mutagenesis, recombination 방법이 개발되어서 활발히 사용되고 있음.

<분자진화기법의 발전 과정>



Summary of in vitro gene diversification methods



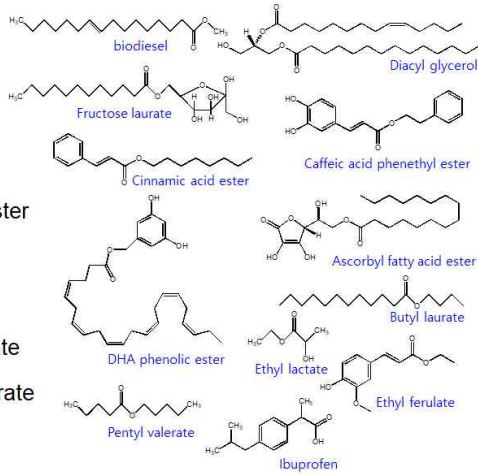
Chem Rev (2021) 121:12384-12444

2. 페롤산(Fa), 트랜스-페롤산(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.

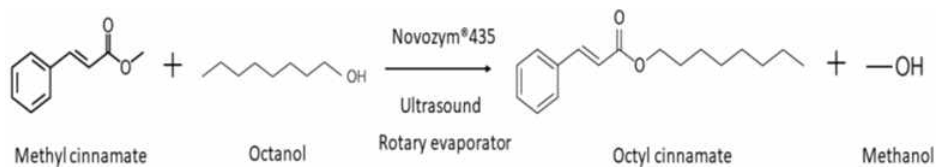
<리파아제를 이용한 효소반응의 주요산물 현황>

Recent issues in lipase-mediated reactions

- Biodiesel
- Functional lipids (oils)
- Sugar esters
- Cinnamic acid ester
- Caffeic acid phenethyl ester
- DHA phenolic ester
- Ascorbyl fatty acid ester
- Butyl laurate, Ethyl ferulate
- Ethyl lactate, Pentyl valerate
- Ibuprofen

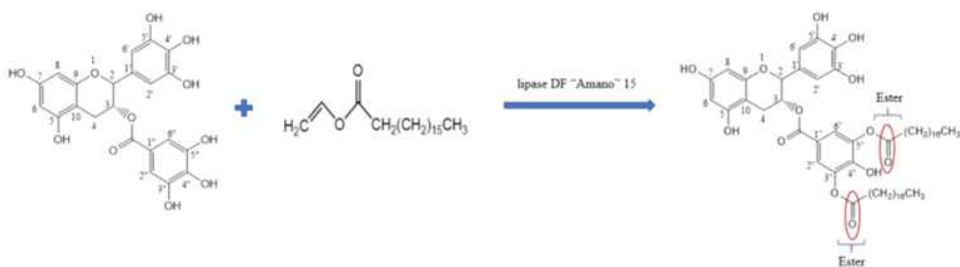


3. 계피산은 계피 또는 기타 천연 식물에서 분리되는 페놀 화합물 중 하나로 광범위한 생리 활성을 지님. 계피산은 용해도가 낮고 경구 생체 이용률이 낮기 때문에 적용이 제한됨. 이 연구에서는 메틸 신나메이트와 옥탄올을 출발 물질로 사용하여 진공 하에서 회전 증발과 초음파 보조에 의한 옥틸 신나메이트 생산 가능성을 연구함. 반응 온도(55-75°C), 반응 시간(4-12h) 및 초음파 출력(90-150W)을 포함한 작동 매개변수의 영향을 평가함. 초음파와 진공 시스템을 갖춘 회전식 증발기에 의한 옥틸 신나메이트의 고효율 합성은 RSM 최적화를 통해 달성함. *Molecules* (2022) 27: 7148



4. 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 방해를 받아 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.

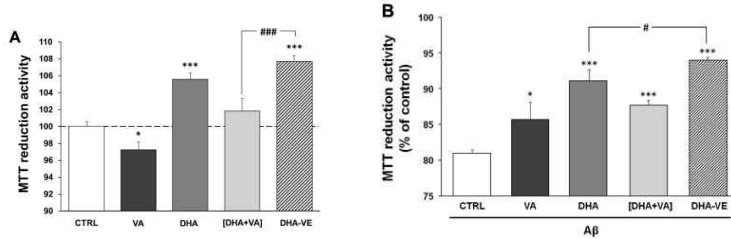
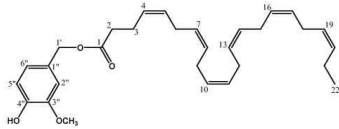
5. Vinyl stearate는 EGCG의 효소적 에스테르 교환 반응에 첨가되어 비수성 시스템에서 친유성과 항산화 능력을 강화함. 리파아제 DF "Amano" 15가 촉매로 사용됨. 용매로서 아세토니트릴, 비닐 스테아레이트:EGCG의 몰비 3:1, 효소량 4.0% (기질 질량비), 반응 온도 및 시간 50°C 및 96시간, 각각 65.2% EGCG 전환율 달성. EGCG 스테아릴 유도체의 친유성(3.49 ± 0.34)은 모체 EGCG(0.69 ± 0.08)보다 더 높았다(5.06배). 또한, EGCG 스테아릴 유도체는 BHT, BHA 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.



6. 리파아제를 이용한 DHA-vanillyl ester 합성 연구

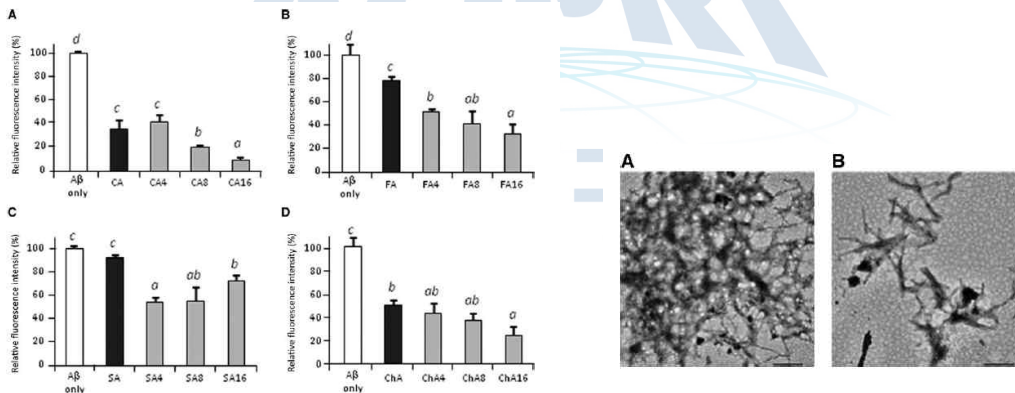
가. DHA는 여러 가지 생리활성을 갖는 중요한 물질이지만 보관 과정에서 쉽게 산화되는 등 안정성이 떨어짐. 리파아제를 이용해서 DHA-vanillyl ester를 생산함으로써 항산화활성을 증가시킴. 실험용 쥐에 DHA-VE를 먹이로 주면 적혈구와 뇌 조직에서 DHA 함량이 증가됨을 확인하였고, in vitro 실험에서 DHA-VE에 의해서 Aβ를 처리한 rat primary neuron의 생존이 증가됨을 밝혔음. Food Chem.

(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, Aβ의 섬유화 저해 효과를 측정함 (anti-amyloid activity). 그 결과, caffeic acid에 hexadecanol를 붙였을 때에 anti-amyloid 효과가 가장 큰 것으로 밝혀짐. Biotechnol Appl Biochem. (2013) Nov 22. doi: 10.1002/bab.1182



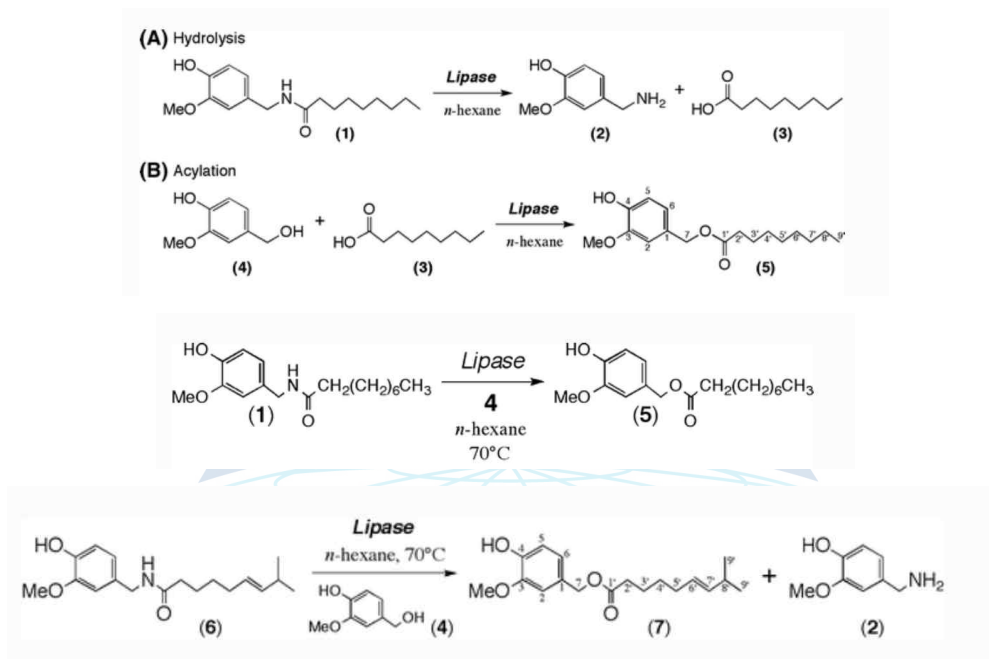
라. 연어에서 추출한 PUFA와 rutin, vanillyl alcohol를 이용해서 페놀리피드를 생산한 후, 항산화 활성을 측정함. BHT, α-토코페롤을 비교물질로 사용했으며, DPPH, thiobarbituric acid assay를 수행함. 소수성 용매, bulk oil 시스템, 에멀전시스템에서 측정한 결과, 페놀기에 의해서 PUFA의 산화가 느려지고 PUFA에 의해서 페놀기의 소수성 용매 용해도가 증가됨을 밝혔음. J Agric Food Chem. (2011) 59: 7021-7027.

7. 리파제를 이용한 Capsiate 합성 연구

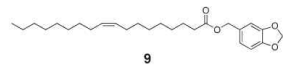
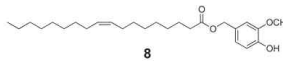
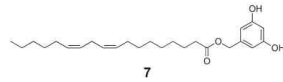
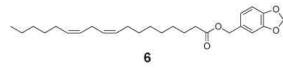
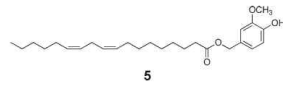
가. 10종의 capsiate를 합성하고 DPPH (polar medium), Rancimat (nonpolar medium), linoleic acid autoxidation (micellar medium) 활성을 측정함. BHT 및 α-tocopherol를 대조군으로 사용했으며 Tween 20 micelle-linoleic acid 시스템에서 vanillyl stearate,

oleate, ricinoleate 가 가장 좋은 항산화 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food Chem. (2011) 59: 564-569.

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



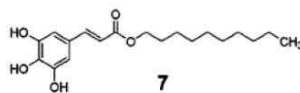
다. 항산화능이 향상된 참기름 에스테르를 합성하는 연구를 수행함. 즉, vanillyl linoleate가 항산화 능력이 가장 좋으며, 스프레이형 에멀전을 만들어서 사용한 결과, UV 조사한 fibroblast를 보호하는 능력을 갖는 것을 밝힘. J Agric Food Chem. (2009) 57: 7311-7323.



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

8. 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.



나. Vancomycin에 의해 유도된 췌장 손상을 CAPE가 방지하는 것을 밝힘. 즉, 췌장의 Serum alkaline phosphatase (ALP), amylase, γ -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

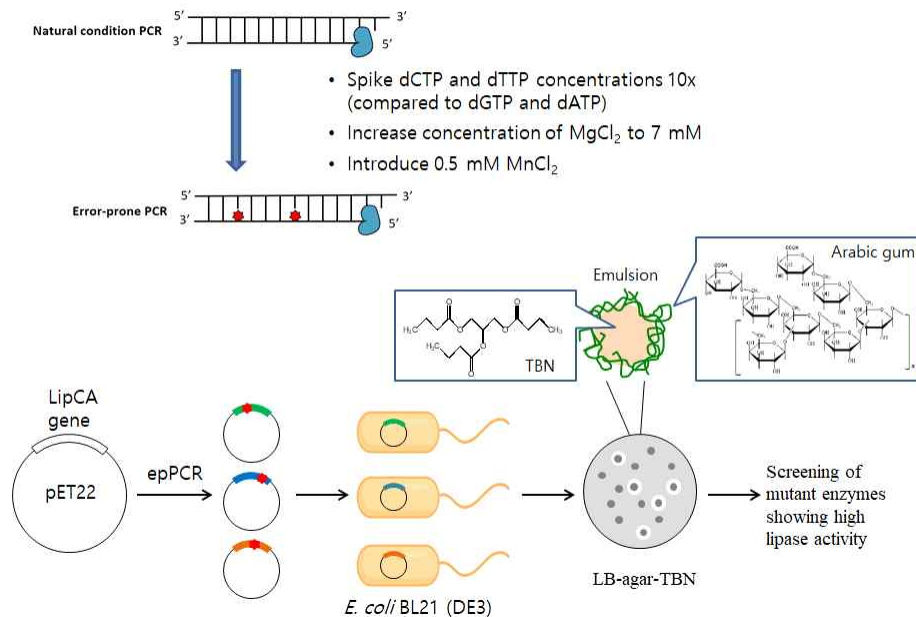
1절. *Croceibacter atlanticus* lipase (LipCA) 리파아제 연구

1. 분자진화기법을 이용한 LipCA 변이효소 개발

- 남극에서 분리한 *Croceibacter atlanticus* 균의 LipCA 리파아제의 온도특성을 변화시키기 위해서 분자진화기법을 사용하였다. 즉, 저온에서 높은 활성을 보이는 변이효소를 개발하기 위해서 error-prone PCR 기법을 사용하였음. 1st Round ep-PCR 과정에서는 dATP의 농도(0.025 mM)를 dTTP, dGTP, dCTP (0.25 mM)에 비해 1/10로 낮췄고, 4 mM MgCl₂을 첨가하여 PCR 반응을 수행하였다.

<분자진화기법을 이용한 리파아제 변이효소 스크리닝>

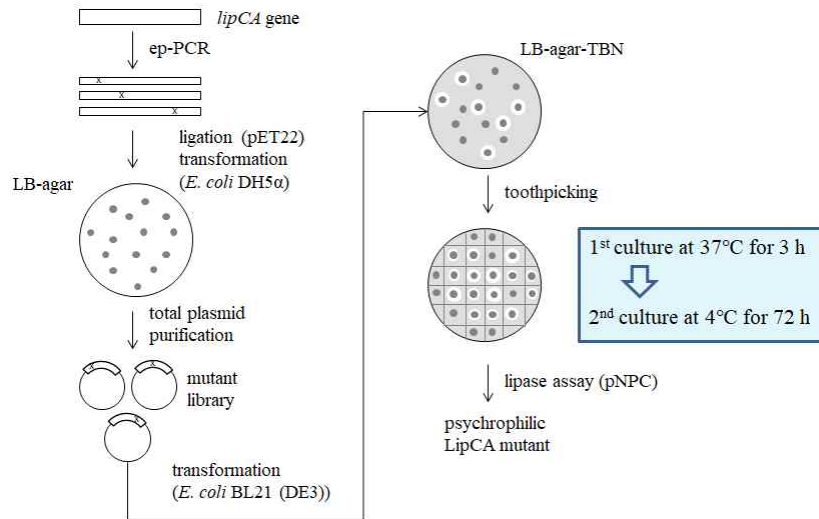
Random mutagenesis : Error-prone PCR



- PCR 반응산물을 pET22 벡터에 삽입하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환하였다. 배양한 후, TBN-LB 배지에서 투명환을 형성하는 콜로니를 찾고, toothpick 방법으로 새로운 TBN-LB 배지에 접종하였다. 37°C에서 3시간동안 배양하고 4°C에서 72시간동안 배양하여 투명환이 WT과 비교해서 사이즈가 큰 콜로니를 선별하였다.

<분자진화기법을 이용한 저온성 리파아제 스크리닝>

Error-prone PCR and Screening of psychrophilic LipCA mutant



- 1st Round screening에서 선발한 A37 gene을 template로 사용하여 2nd Round ep-PCR를 수행하였다. 이번에는 dGTP 농도를 증가시키고 MnCl₂를 첨가한 Clontech (Takara) kit를 사용하여 ep-PCR 반응을 수행하였다. 이후 과정은 1st Round screening 과정과 동일하였다.

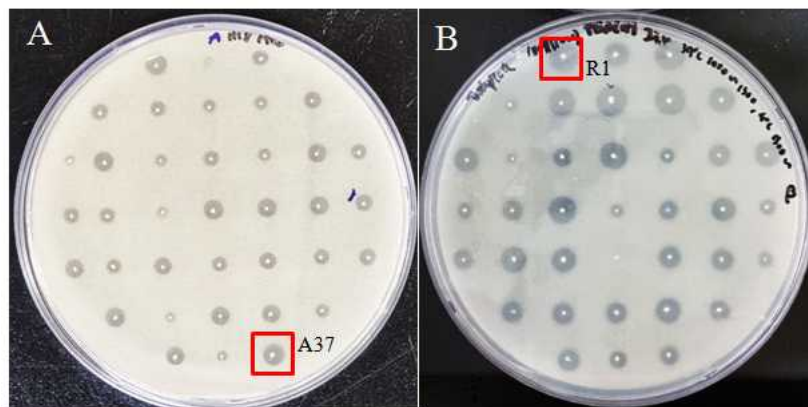


Fig. The 1st and 2nd screening of LipCA mutants. A. *E. coli* BL21 (DE3) carrying various mutant genes obtained from LipCA WT was toothpicked in TBN medium and cultured at low temperature. The mutant strain A37 was selected by confirming the halo size around the colony. B. By using the same screening method, mutant R1 was selected from *E. coli* BL21(DE3) having various mutant genes obtained from LipCA A37.

- 1st Round screening을 통해서 9개의 mutant (A37, A24, B6, C27, E7, E9, H17, J10, K30)를 선발하였다. 각각의 변이효소를 대장균에서 생산한 후에 cell-free extract (CFE)의 효소활성을 pNPC 방법으로 30°C와 10°C에서 각각 측정하였다. WT 효소에 비해서 저온 상대활성(10°C/30°C)이 증가한 변이효소(A37)를 선발하였다.
- 2nd Round screening을 통해 9개의 mutant (R1, Q15, S30, S52, T26, T32, T39, U10, V1)를 선발하였다. 1st screening과 마찬가지로 방법으로 30°C와 10°C에서 효소활성을 측정하였다. A37 변이효소에 비해서 저온 상대활성(10°C/30°C)이 증가한 변이효소(R1)를 선발하였다.

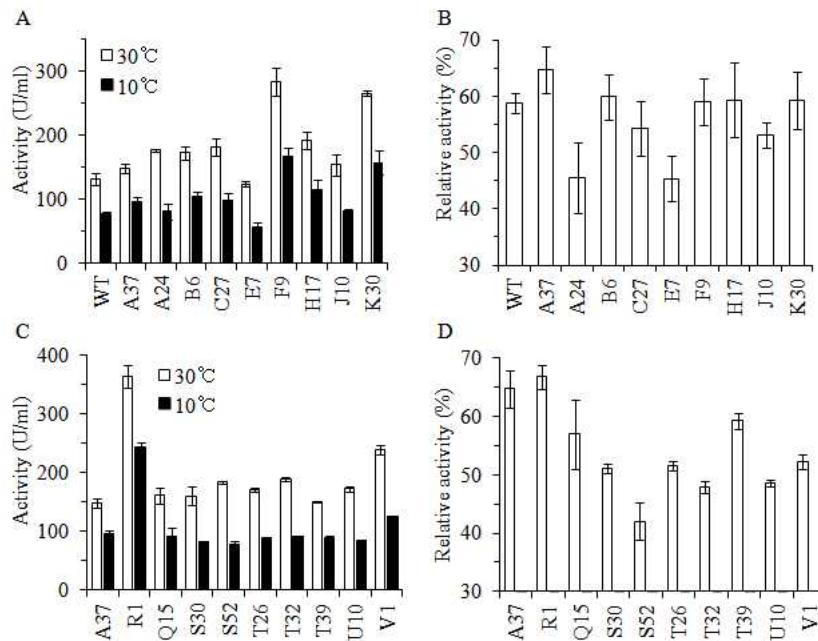


Fig. Lipase activity and RA^{10/30} of CFEs of *E. coli* cells obtained by error-prone PCR. (A) and (B) show the 1st round of molecular evolution mutant enzymes; (C) and (D) show the 2nd round of molecular evolution mutant enzymes. RA^{10/30} was calculated as the ratio of activity at 10°C and 30°C.

- ep-PCR을 통해서 선발한 A37과 R1 변이효소 유전자의 염기서열을 분석하고 단백질서열을 확인하였다. 변이효소 A37의 경우, 1개의 아미노산 변이(Phe43Leu)를 확인하였고, 변이효소 R1의 경우, 5개의 아미노산 변이(Phe43Leu, Ser48Gly, Ser49Gly, Asn141Lys, Lys297Arg)를 확인하였다.
- SWISS Modeller 프로그램을 통해 LipCA 효소의 3차 구조를 예측하고, 각 변이가 나타난 위치를 조사하였다. 3개의 변이(F43L, S48G, S49G)는 효소의 활성부위를 덮고 있는 'lid'구조에서 관찰되었고, 나머지 2개의 변이(N14K, K297R)는 활성부위에서 떨어진 부위에서 관찰되었다.

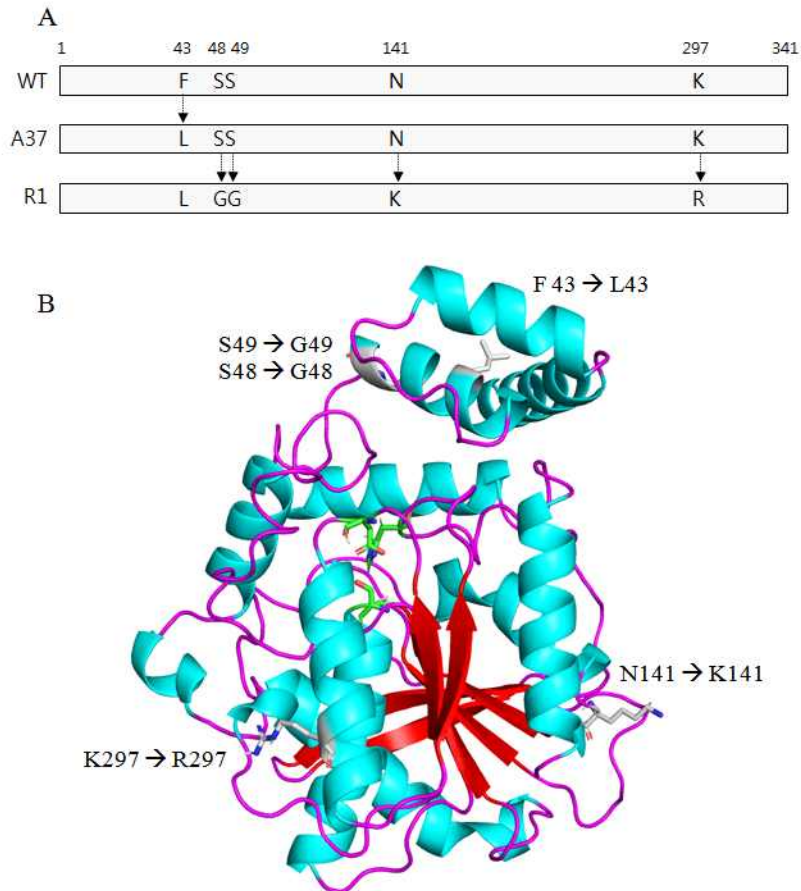


Fig. Molecular structures of LipCA WT, A37, and R1. (A) In A37, the amino acid at position 43 was changed from Phe to Leu. In R1, Ser at 48, Ser at 49, Asn at 141, and Lys at 297 were changed to Gly, Gly, Lys, and Arg, respectively. (B) 3D structure of mutant R1. Five mutated amino acids (F43L, S48G, S49G, N141K, and K297R) were indicated. In case of A37, one amino acid was changed (F43L). Catalytic residues are shown in green.

- LipCA WT, A37, R1 효소의 activity를 30°C와 10°C에서 측정하였다. $RA^{10/30}$ 값이 WT의 경우, 59%인 반면에, A37은 65%, R1은 67%로 계산되었다. 이것은 ep-PCR을 통해서 개발된 변이효소가 저온에서 효소활성이 증가되었음을 보여준다.

Table S1. Mutation position and lipase activity of WT, A37, and R1

LipCA lipase	Mutation position	Activity at 30°C (U/ml)*	Activity at 10°C (U/ml)	RA ^{10/30} (%)
WT	None	131 ± 8.9	77.2 ± 2.5	58.8 ± 1.7
A37	F43L	148 ± 7.8	95.9 ± 6.6	64.6 ± 3.1
R1	F43L, S48G, S49G, N141K, K297R	363 ± 20	242 ± 7.7	66.7 ± 1.9

* Lipase activity were measured using cell-free extracts of *E. coli* BL21 (DE3) cells having LipCA WT, A37, and R1 genes, respectively.

2. LipCA 변이효소 분리 및 온도 특성 규명

○ LipCA WT, A37, R1 효소의 특성을 조사하기 위해서 각각의 효소를 순수하게 분리하였다. 각 효소의 C말단에 His-tag을 갖고 있기 때문에 Ni-NTA 컬럼을 이용해서 분리하였다. 각각의 CFE를 컬럼에 부어 넣고 깨끗이 씻어준 후에 imidazole 용액을 넣어서 WT과 변이효소를 용출시켰다. SDS-PAGE을 통해서 WT과 변이효소가 분리되었음을 확인하였다.

<Ni-NTA 컬럼을 이용한 효소의 분리>

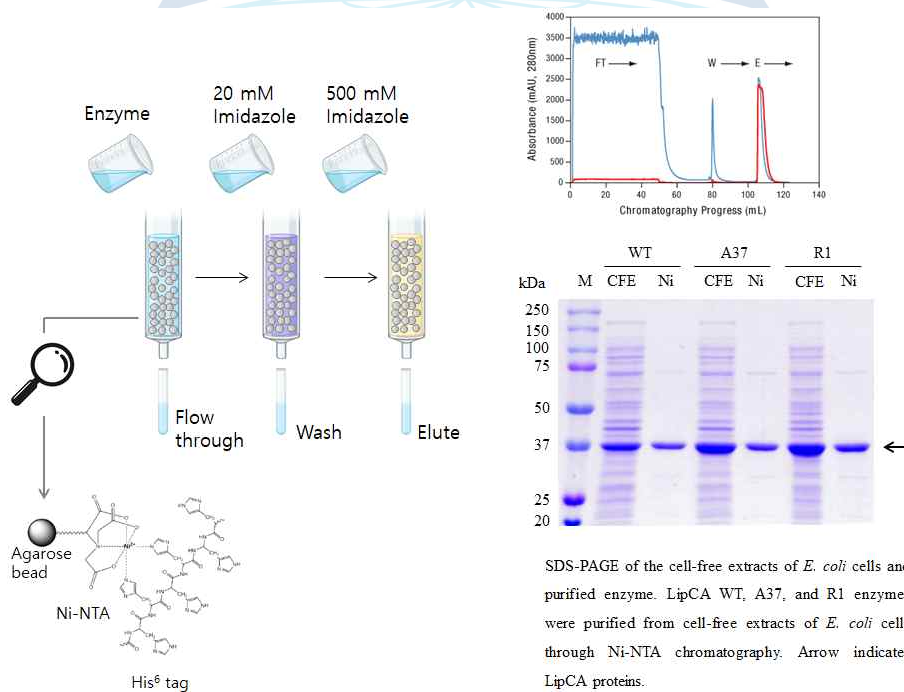


Fig. SDS-PAGE of the cell-free extracts of *E. coli* cells and purified enzyme. LipCA WT, A37, and R1 enzymes were purified from cell-free extracts of *E. coli* cells through Ni-NTA chromatography. Arrow indicates LipCA proteins.

- LipCA WT, 변이효소의 온도에 따른 효소활성을 측정하였다. 5°C에서 70°C까지 효소활성을 측정한 결과, 모든 효소의 최적 온도는 40°C인 것으로 밝혀졌다. 최적온도에서부터 출발해서 온도가 점점 낮아지는 방향으로 효소활성이 어떻게 유지되는지를 알기 위해서 활성화에너지를 계산하였다.
- WT, A37, R1의 활성화에너지가 각각 4.45, 3.47, 3.11 kcal/mole로 계산되었다. 활성화에너지가 낮을수록 저온에서 높은 활성을 나타내기 때문에, 우리가 개발한 변이효소가 WT에 비해 저온에서 활성이 높게 나타난 것을 알 수 있다.
- WT, A37, R1의 효소 동역학 parameter을 조사하였다. 우리는 10°C에서 기질의 농도를 증가시키면서 효소활성을 측정하여 Michaelis-Menten 그래프를 구하였다. 이것으로부터 Lineweaver-Burk 그래프를 그리고 V_{max} 와 K_M 값을 구하였다. WT, A37, R1의 V_{max} 값은 각각 37, 34, 46 $\mu\text{M}/\text{min}$ 으로 계산되었고, K_M 값은 0.116, 0.102, 0.147 mM 으로 계산되었다. 효소의 몰농도를 반영해서 k_{cat} 값을 구한 결과, 4.41, 4.27, 9.26 s^{-1} 로 계산되었다. 최종적으로 효소의 성능을 나타내는 k_{cat}/K_M 값은 38, 42, 63 $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 로 계산되었다.

<저온성 변이효소를 확인하기 위한 활성화 에너지 계산법>

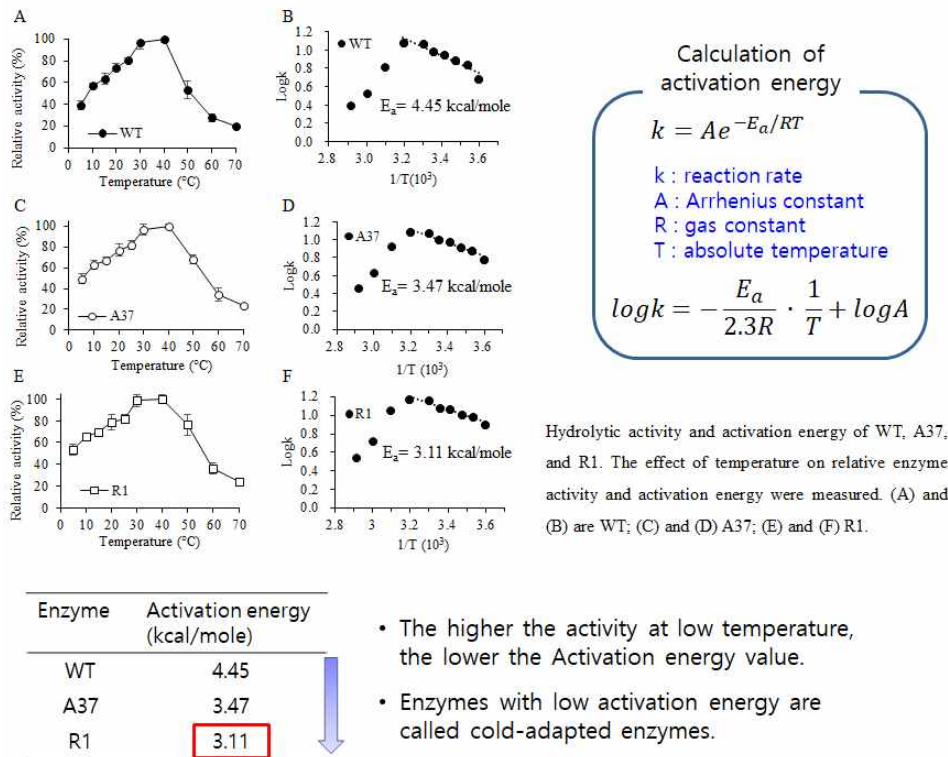


Fig. Hydrolytic activity and activation energy of WT, A37, and R1. Effects of temperature on relative enzyme activity and activation energy were measured. (A) and (B) are WT; (C) and (D) A37; (E) and (F) R1.

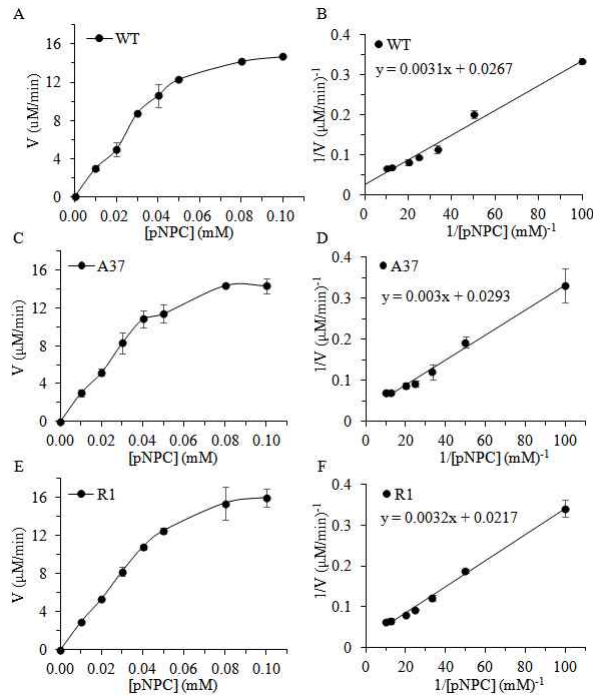


Fig. Calculation of kinetic parameter of WT, A37, and R1 at 10 °C. (A), (C), and (E) show Michaelis-Menten analysis of WT, A37, and R1. (B), (D), and (F) are Lineweaver-Burk analysis of WT, A37, and R1.

Table 1. Kinetic parameters of LipCA and mutant enzymes at 10°C

LipCA lipase	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M (mM)	$[E]_t$ (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)
WT	37.5	0.116	8.49	4.41	38.0
A37	34.1	0.102	8.00	4.27	41.7
R1	46.1	0.147	4.98	9.26	62.8

3. LipCA 변이효소 고정화 및 효소전환반응 수행

○ LipCA WT과 A37, R1 변이효소를 이용해서 에스테르 합성반응을 수행하기 위해서 효소를 MA-DVB 비드에 고정화하였다. CFE를 비드와 섞고 glutaraldehyde을 이용하여 효소를 비드에 고정화하였다. 고정화 이후에 효소활성을 pNPC assay 방법으로 측정하여 효소가 비드에 결합된 것과 효소활성을 확인하였다.

<효소의 MA-DVB 비드 고정화>

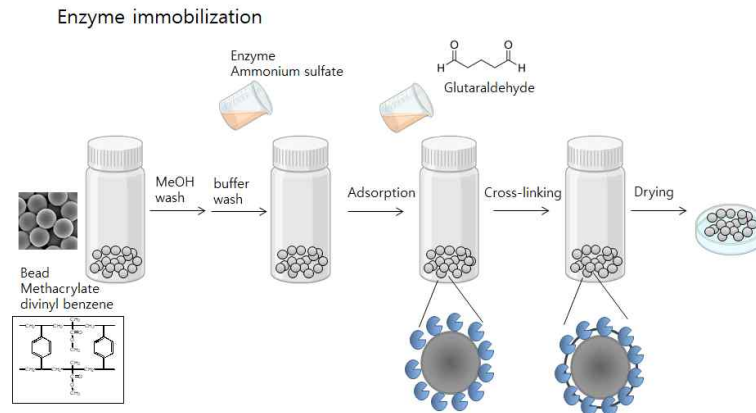


Table S2. Enzyme activity of cell free extract and immobilized enzyme

Enzyme type	LipCA lipase	Enzyme activity	Total amount*	Total activity (U)
Cell-free extract	WT	18.9 ± 1.3 U/mg	60 ± 2.1 mg	1130 ± 76
	A37	20.1 ± 0.6 U/mg	61 ± 1.7mg	1240 ± 46
	R1	31.7 ± 0.7 U/mg	67 ± 4.2mg	2140 ± 47
Immobilized enzyme	WT	0.76 ± 0.07 U/g	1 g	0.76 ± 0.07
	A37	0.38 ± 0.08 U/g	1 g	0.38 ± 0.08
	R1	0.47 ± 0.08U/g	1 g	0.47 ± 0.08

* Total amounts of CFE and immobilized enzyme mean protein amount and bead amount, respectively.

- Butyric acid와 octanol을 기질로 사용해서 esterification 반응을 통해 octyl butyrate을 합성하고자 하였다. MA-DVB 비드에 고정한 LipCA WT과 A37, R1 변이효소를 이용해서 10°C, 20°C, 30°C에서 반응을 수행하였다.
- 반응 산물을 분석하기 위해서 반응액을 HPLC로 분석하였다. Acetonitrile:Water (90:10) 용매를 사용하고 RID 검출기로 측정된 결과, butyric acid, octanol, octyl butyrate가 각각 2.88분, 4.70분, 11.23분에 용출되었다.
- 모든 온도에서 octyl butyrate가 생성되었으며, R1 > A37 > WT 순서로 반응물질이 많이 생성되었다.

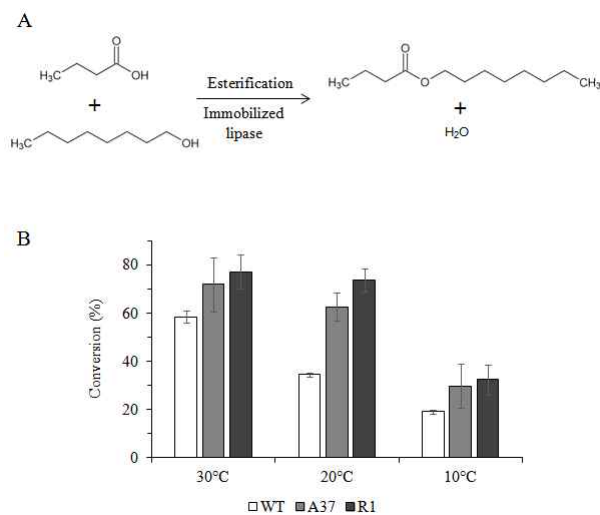


Fig. Conversion yield of octyl butyrate synthesis. (A) Schematic depiction of the synthesis process of octyl butyrate through an esterification reaction from butyric acid and octanol using immobilized LipCA, A37, and R1. (B) Reactions were carried out using immobilized LipCA WT, A37, and R1. Conversion yields were then measured. Butyric acid (20 mM), octanol (100 mM), immobilized enzyme (100 mg), and molecular sieve (200 mg) were mixed in a reaction vial and esterification reactions were performed for 18 h at various temperatures.

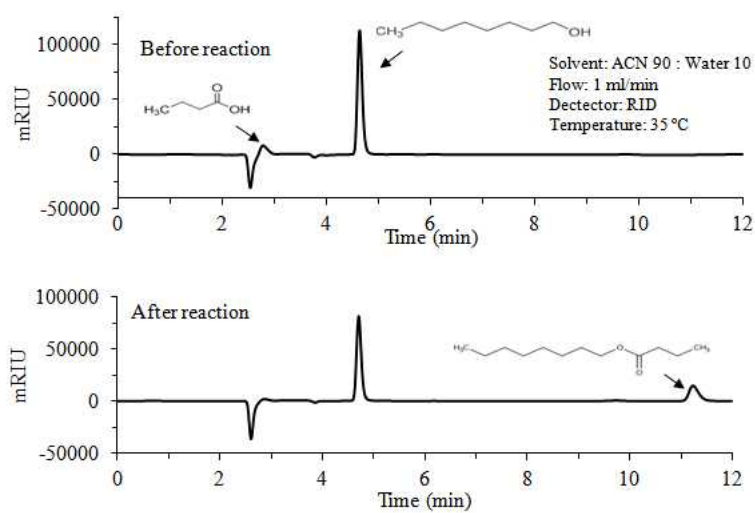


Fig. HPLC analysis of reaction mixture. octyl butyrate. The retention time of butyric acid, octanol, and octyl butyrate were 2.88 min, 4.70 min, and 11.23 min, respectively.

4. LipCA 변이효소 back mutation 및 구조 분석

- R1 변이효소가 WT에 비해서 저온에서 활성이 증가된 이유를 밝히기 위해서 5개 아미노산을 site-directed mutagenesis 방법으로 back mutation 시키고자 하였다.
- 다음과 같이 back mutation을 위해서 5개의 primer set를 제조하여 SDM을 수행하였다.

Table S3. Primers used for back mutation

Name	Primer (5' - 3')
F129(43)	CGCGGTTGCGT <u>TTT</u> CTGTTGGCACTC
R129(43)	GAGTGCCAACAG <u>AAA</u> ACGCAACCGCG
F142(48)	CGTTTGCTGTTGGCACTC <u>AGC</u> GGCGCCAAGCCAACGCTG
R142(48)	CAGCGTTGGCTTGGCGCC <u>GCT</u> GAGTGCCAACAGCAAACG
F145(49)	TGGCACTCGGC <u>AGC</u> GCCAAGCCAACG
R145(49)	CGTTGGCTTGGCG <u>CTG</u> CCGAGTGCCAA
F423(141)	TGCTGATCGCACCA <u>AA</u> TGCGGTGGTGCTCAG
R423(141)	CTGAGCACCA <u>CCG</u> CA <u>TTT</u> GGTGCGATCAGCA
F890(297)	GGCCTGGAGTACGCCGAA <u>AA</u> ACTGCGTGCGGCGGGGAGC
R890(297)	GCTCCCCGCCGCACGCAGT <u>TTTT</u> TCGGCGTACTCCAGGCC

* Numbers in parenthesis indicate the amino acid number of the enzyme. The underlined part is the codon to change the amino acid, and the italicized letter is the base to change

- Back mutation을 통해서 L43F, G48S, G49S, K141N, R297K 변이효소를 생산하였다. 원하는 back mutant가 제조된 것을 확인하기 위해서 sequencing을 수행하고 *E. coli* BL21 (DE3) 균에서 변이효소를 생산하였다. SDS-PAGE를 수행한 결과, 모든 변이효소가 soluble form으로 생산된 것을 확인하였다.

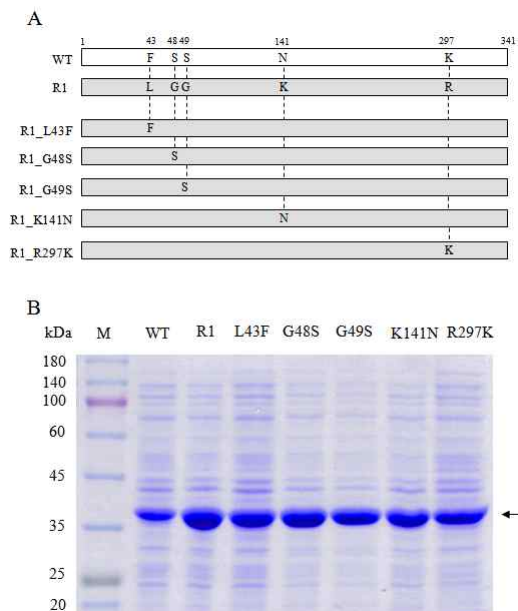


Fig. Production of back mutants. (A) In L43F, the amino acid at position 43 was changed from Leu to Phe. In G48S, Gly 48 was changed to Ser. In G49S, Gly 49 was changed to Ser. In K141N, Lys 141 was changed to Asn. In R297K, Arg 297 was changed to Lys. (B) SDS-PAGE of cell-free extracts of *E. coli* cells carrying WT, R1, and R1 back mutant gene.

- WT, R1 변이효소, 5가지 back mutant (L43F, G48S, G49S, K141N, R297K)의 상대활성을 측정하여 비교하였다. 3가지 back mutant (L43F, G48S, G49S)의 상대활성이 R1에 비해 크게 감소하였으나, 2가지 back mutant (K141N, R297K)의 상대활성이 R1과 비슷하게 유지되었다.

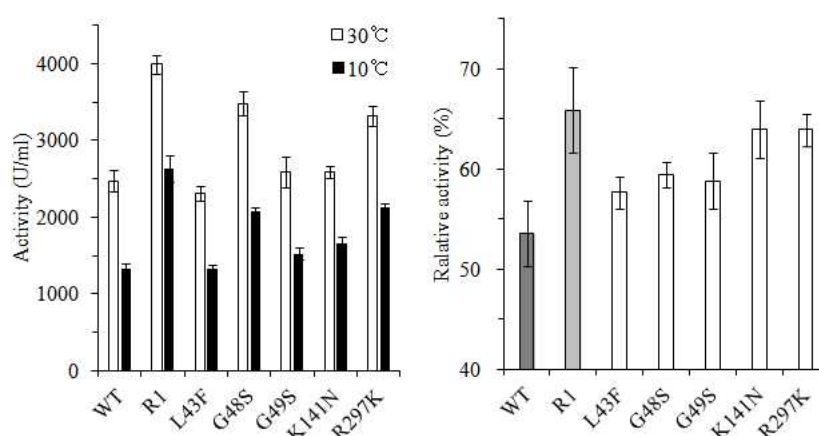


Fig. Lipase activity of CFEs of *E. coli* cell obtained by back mutation. (A) Hydrolytic activity of CFEs was measured using pNPC assay at 10 °C and 30 °C. (B) $RA^{10/30}$ was calculated as the ratio of activity at 10°C and 30°C. Two dotted lines show relative activities of WT and R1.

Table S4. Lipase activity of CFEs of *E. coli* cells obtained by back mutation

Lipase	Activity at 30°C (U/ml)	Activity at 10°C (U/ml)	$RA^{10/30}$ (%)
WT	2470 ± 140	1320 ± 80.9	53.7 ± 3.2
R1	4000 ± 117	2630 ± 172	65.9 ± 4.3
L43F	2310 ± 92.3	1330 ± 41.9	57.7 ± 2.0
G48S	3490 ± 150	2070 ± 51.6	59.4 ± 1.3
G49S	2590 ± 203	1520 ± 77.6	58.8 ± 2.7
K141N	2590 ± 83.4	1660 ± 84.9	64.0 ± 2.8
R297K	3320 ± 127	2120 ± 61.3	63.9 ± 1.6

○ R1 변이효소가 WT에 비해서 저온 활성이 크게 증가된 것은 F43L, S48G, S49G 변이에 의해 진행되었음을 알 수 있다. F43L, S48G, S49G 변이는 활성부위 'lid' 에서 변이가 진행되었으며, 이것을 통해 'lid'부위의 변이가 효소 활성에 중요하게 작용함을 밝혔다.

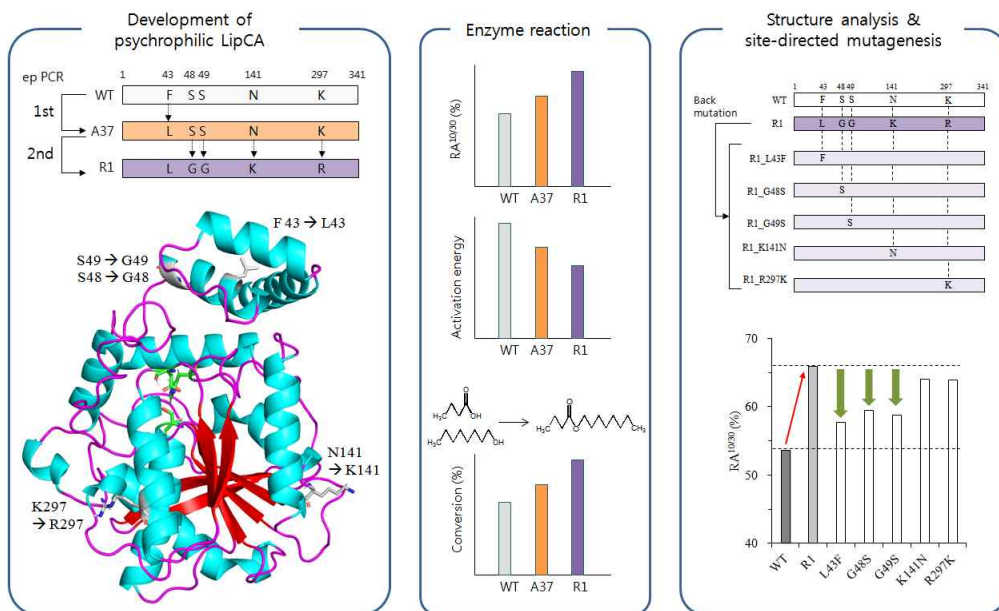
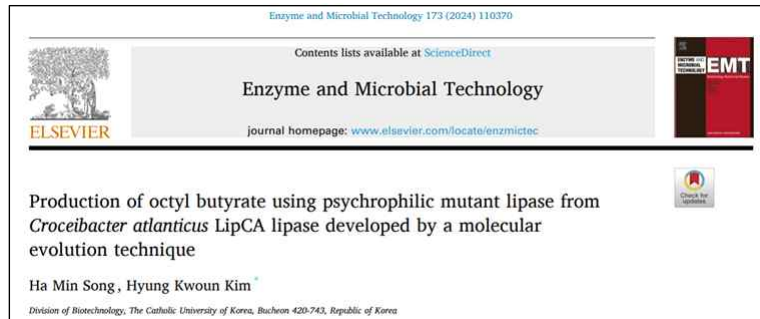
5. LipCA 변이효소 개발 및 저온 특성 규명

○ 본 연구과제에서는 분자진화기법으로 LipCA 변이효소를 개발하고, A37, R1 변이효소의 단백질 서열과 3차구조를 분석하였다. A37, R1 변이효소가 저온(10°C)에서 상대활성이 증가된 것을 확인하였고, Activation energy가 감소한 것도 확인하였다.

○ A37, R1 변이효소를 고정화하고 이것을 이용해서 저온에서 octyl butyrate를 합성하는 반응을 수행하였다.

○ Back mutation을 통해 효소활성에 중요하게 작용한 F43L, S48G, S49G 변이를 확인하였다.

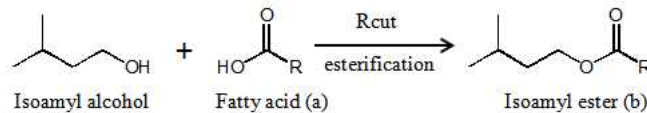
○ 실험결과를 *Enzyme and Microbial Technology* 저널 2024년 2월호에 게재하였다.



2절. *Rhodococcus* lipase (Rcut) 리파아제 연구

1. Rcut 효소를 이용한 에스테르 합성반응

- 본 연구과제에는 남극에서 분리한 *Rhodococcus* 균 유래의 Rcut 효소를 이용해서 식품산업에 중요하게 사용되는 향미성분인 isoamyl fatty acid ester를 합성하고자 하였다. isoamyl alcohol과 다양한 길이(C2, C4, C6, C8, C10)의 지방산을 기질로 사용해서 에스테르 합성반응을 수행하였다. 효소반응을 통해 IAA, IAB, IAH, IAO, IAD를 합성하고자 하였다.



Fatty acid (a)	Isoamyl ester (b)
Acetic acid	Isoamyl acetate (IAA)
Butyric acid	Isoamyl butyrate (IAB)
Hexanoic acid	Isoamyl hexanoate (IAH)
Octanoic acid	Isoamyl octanoate (IAO)
Decanoic acid	Isoamyl decanoate (IAD)

Scheme Isoamyl ester synthesis using Rcut-mediated esterification reaction

2. Rcut 효소의 발현

- Rcut 효소를 *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현시킨 결과, 대부분 불용성 형태(PPT)로 합성되는 것을 확인하였다. 숙주를 *E. coli* Rosetta gami (DE3)로 바꿔서 Rcut 발현을 시도하였다. *E. coli* Rosetta gami (DE3)에는 rare codon plasmid가 들어 있기 때문에 ampicillin 외에 chloramphenicol을 배지에 추가적으로 넣고 배양하였다. 이 경우에는 Rcut가 대부분 수용성 형태로 생산되었음을 확인하였다. chloramphenicol을 배지에 넣지 않은 경우에도 Rcut가 소량 생산되는 것을 확인하였다.
- *E. coli* Rosetta gami (DE3)에서 Rcut 효소를 생산하고, cell-free extract (CFE)를 제조하였다. CFE에 들어있는 Rcut 효소를 MA-DVB 비드에 고정화하고 에스테르 합성반응에 사용하였다.

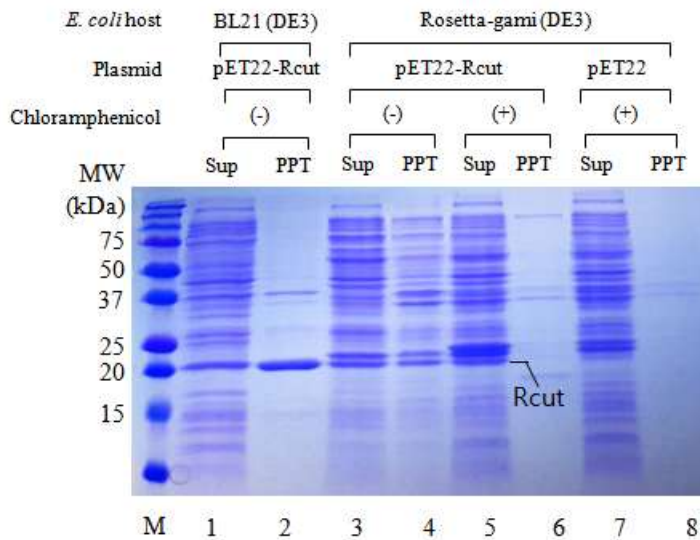


Fig. Expression of *Rhodococcus cutinase* in *E. coli* cells.

SDS-PAGE was performed using supernatant and precipitate after *E. coli* cells were lysed. Lane M, size marker; lane 1-2, *E. coli* BL21(DE3); lane 3-8, *E. coli* Rosetta-gami (DE3); lane 1-6, pET22-Rcut; lane 7-8, pET22; lane 1-4, no chloramphenicol lane 5-8, chloramphenicol.

3. 에스테르 합성반응 및 HPLC를 이용한 반응 수율 계산

- HPLC를 통해서 기질과 반응산물을 분석하였다. 기질로 사용한 Isoamyl alcohol, acetic acid, butyric acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid 피크를 확인하였고, 반응산물인 isoamyl acetate (4 min), butyrate (5 min), hexanoate (6.5 min), octanoate (10 min), decanoate (16 min) 피크를 확인하였다.
- Isoamyl acetate, butyrate, hexanoate, octanoate, decanoate를 구입하고, authentic sample로 사용하였다. HPLC를 사용해서 각 물질을 농도별로 분석하였다. IAA, IAB, IAH, IAO, IAD 0-100 mM 농도에 따른 피크면적을 그래프로 그리고 직선의 식을 구했다. IAB의 경우에는 0-500 mM 농도까지 분석하여 직선의 식을 구했다.
- Isoamyl alcohol 100 mM, fatty acid 100 mM을 넣고, 고정화된 Rcut 효소를 사용해서 에스테르 합성반응을 수행하면서 시간별로 반응산물을 측정하였다.
- 지방산의 chain length에 따라서 반응속도 및 반응수율이 다를 수 있다. IAB, IAO, IAH, IAD 순으로 반응이 빠르게 진행되었고, IAA의 경우에는 반응이 거의 진행되지 않았다. IAB가 가장 빠르게 생성되었는데 5시간 후에 반응수율이 55%에 도달하였다.

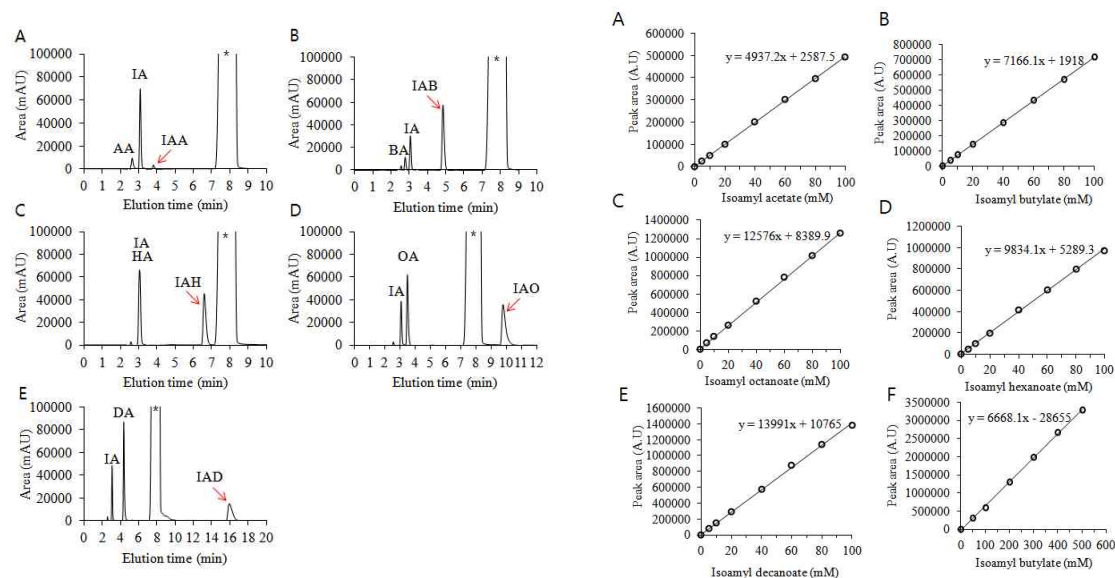


Fig. HPLC analysis of the reaction mixture.

HPLC was performed after 5 h-reaction using isoamyl alcohol and various fatty acids. isoamyl alcohol (IA), acetic acid (AA), butyric acid (BA), hexanoic acid (HA), octanoic acid (OA), decanoic acid (DA), isoamyl acetate (IAA), isoamyl butyrate (IAB), isoamyl hexanoate (IAH), isoamyl octanoate (IAO), isoamyl decanoate (IAD). *, cyclohexane peak. Fig. S1. Standard curve for isoamyl ester molarity and peak area.

(A) Isoamyl acetate (B) Isoamyl butyrate (C) Isoamyl hexanoate (D) Isoamyl octanoate (E) Isoamyl decanoate (F) Isoamyl butyrate (50-500 mM)

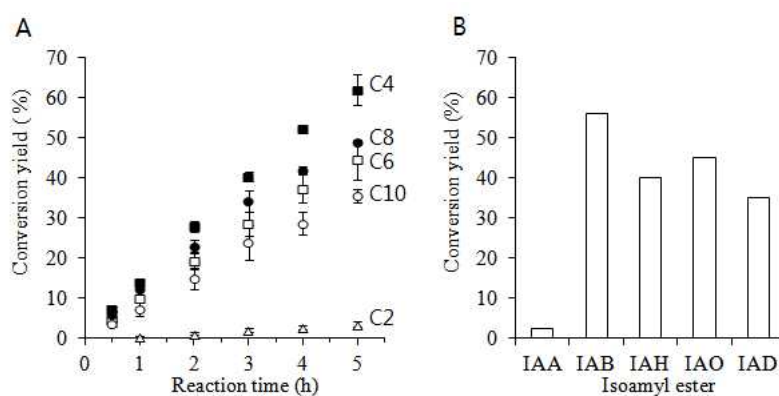


Fig. Isoamyl ester synthesis using isoamyl alcohol and various fatty acid.

Reaction was carried out with 100 mM of isoamyl alcohol and 100 mM of fatty acid. The molar concentration was calculated from the product peak area and the conversion yield was calculated. A, Time course of conversion

yield was calculated. B, conversion yield after 5 h-reaction. \triangle , isoamyl acetate (IAA); \blacksquare , isoamyl butyrate (IAB); \square , isoamyl hexanoate (IAH); \bullet , isoamyl octanoate (IAO); \circ , isoamyl decanoate (IAD)

4. Docking model을 이용한 반응 특이성 해석

- 지방산의 길이에 따라서 에스테르 합성 속도 및 수율이 다르게 나타나는 것을 단백질 구조적으로 설명하기 위해서 효소와 지방산의 docking model을 만들었다. Rcut 효소는 Ser-His-Asp triad을 갖고 있으며, 기질이 결합하는 활성부위에 Thr, Glu, Ile, Leu 아미노산을 갖고 있다.
- Rcut 효소는 활성부위를 덮는 lid구조를 갖고 있지 않기 때문에 지방산 기질이 쉽게 활성부위에 접근할 수 있다. 지방산이 효소에 결합하는 과정에서 결합에너지가 강한 candidate를 각각 10개씩 구하였다. 각 candidate의 결합에너지와 Ser114의 O_γ 까지의 거리를 구하여 그래프에 좌표로 표시하였다.

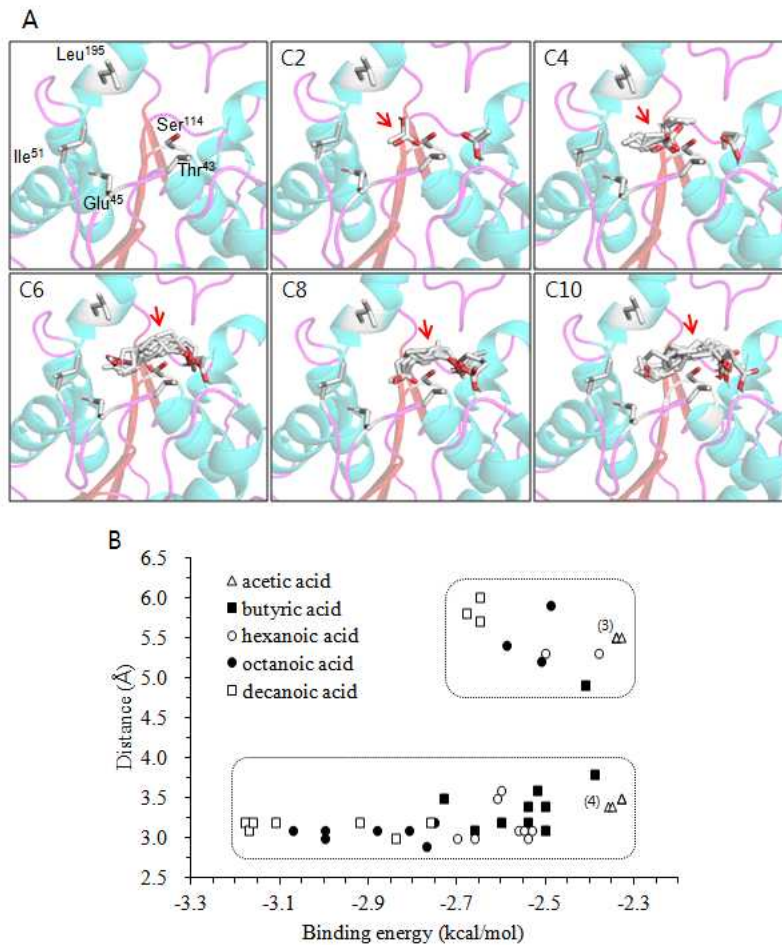


Fig. Docking models of each fatty acids at the active site pocket of Rcut enzyme. A. Five amino acids in the Rcut active site were indicated, and 10 docking candidates of each fatty acid indicated. B. For 10 candidates of

each fatty acid, the distances between the O_γ of Rcut Ser¹¹⁴ and the carbonyl carbon of the fatty acids were measured, and the binding energies of each candidate were calculated.

- Decanoic acid, octanoic acid, hexanoic acid는 거리가 5 Å 이상인 candidate가 많이 있다. 반면에 butyric acid는 거리가 5 Å 인 candidate가 1개밖에 없고, 나머지는 모두 거리가 4 Å 미만이다. 이러한 docking model 결과에 따라서 IAB 생성량이 가장 빠른 것을 설명할 수 있다. Acetic acid는 대부분 결합에너지가 작고, 거리가 5 Å 이상인 candidate가 4개인 것으로 밝혀졌다. 이것으로써 IAA의 생성량이 매우 적은 것을 설명할 수 있다.

5. Rcut 효소 반응의 최적화

- IAB 생성량이 가장 많았으며, 이것이 식품산업에서 과일 향미성분으로 사용되기 때문에 IAB의 생성 반응 최적화를 수행하였다.

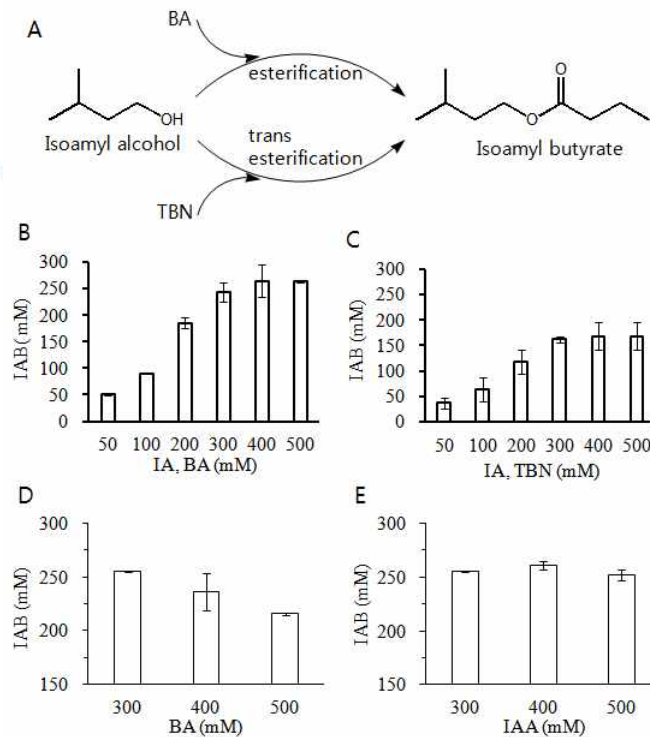


Fig. Effects of substrate concentration on conversion yield

(A) Isoamyl butyrate was produced by cutinase-mediated esterification and transesterification. (B) The amount of isoamyl butyrate was measured after 24 h-reaction using butyric acid and isoamyl alcohol (50-500 mM). (C) The amount of isoamylbutyrate was measured 24 h-reaction using tributyrin and

isoamyl alcohol (50-500 mM). (D) The amount of isoamyl butyrate was measured while the butyric acid concentration was fixed at 300 mM and the isoamyl alcohol concentration was increased from 300 to 500 mM. (E) The amount of isoamyl butyrate was measured while the isoamyl alcohol concentration was fixed at 300 mM and the butyric acid concentration was increased from 300 to 500 mM.

- IAB 는 butyric acid를 사용한 esterification 반응, TBN을 사용한 transesterification 반응으로 합성할 수 있다. 두 가지 반응을 모두 진행한 결과, esterification 반응을 통해 더 높은 수율이 달성되었다. 이것은 단순히 esterification과 transesterification 반응의 차이이기 보단 기질 크기와 구조의 차이에 기인한다고 판단된다.
- 기질 농도를 50 mM에서 500 mM까지 증가시킨 결과, 기질 300 mM까지 IAB 생성량이 계속 증가했지만, 기질 300 mM 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다.
- Isoamyl alcohol을 300 mM로 고정하고 butyric acid를 증가시킨 결과, 오히려 IAB 생성량이 감소하였다. 반면에 butyric acid를 300 mM로 고정하고 Isoamyl alcohol을 증가시킨 결과, IAB 생성량이 유지되었다. 따라서 butyric acid 300 mM 이상에서 효소반응이 저해되는 것을 확인하였다. 이것은 butyric acid의 pKa 값이 4.82이기 때문에 비수계 반응임에도 불구하고 고농도로 사용하면 효소주변을 산성으로 변화시켜 효소의 활성화에 영향을 끼치는 것으로 판단된다.

6. 고정화 Rcut 효소의 반복사용 가능성 조사

- 고정화 Rcut를 산업적으로 사용하려면, 반복사용이 가능해야 한다. 효소반응을 24시간 진행하고 효소 비드를 씻은 후에 다시 효소반응을 수행하는 방식으로 6회까지 진행하였다. Molecular sieve를 넣은 경우에는 IAB 생성 수율이 거의 감소하지 않았음을 확인하였다. 하지만, Molecular sieve를 넣지 않은 경우에는 IAB 생성 수율이 크게 감소하였다.

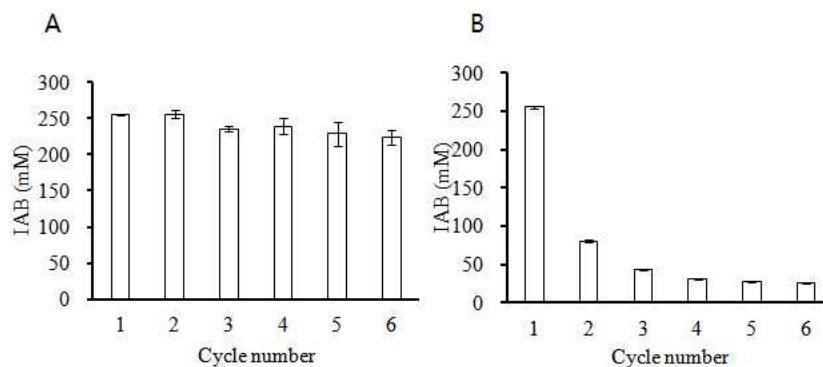


Fig. Reusability of immobilized Rcut. The amount of isoamyl butyrate

synthesized by immobilized Rcut was measured after 24 h-reaction. Reaction system contained 300 mM isoamyl alcohol, butyric acid, and immobilized Rcut in cyclohexane. (A) Reaction with molecular sieve (B) Reaction without molecular sieve

- 고정화 Rcut가 향미성분인 IAB를 250 mM 농도까지 합성할 수 있고, 6차례까지 반복 사용하여도 활성이 감소하지 않는 것을 확인했다. 이상의 결과를 논문으로 작성해서 *Journal of Microbiology and Biotechnology* 저널에 투고할 계획이다.



제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절. 성과목표 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
극지 미생물 유래 리파아제의 고정화 및 효소 개량	1-1	리파아제 효소의 고정화	- <i>Croceibacter atlanticus</i> 리파아제의 생산 및 고정화 - <i>Rhodococcus cutinase</i> 의 생산 및 고정화	- 학술회의 발표 - 논문 발표 - 100% 달성
	1-2	분자진화기법을 이용한 저온성 리파아제 개발	- LipCA 효소의 random mutagenesis, mutant library 제조 - 저온성 mutant 선발 - 저온성 mutant 분리, 특성규명	- 저온성 mutant 개발 - 100% 달성 - 논문 발표
리파아제를 이용한 유용 바이오소재 생산	2-1	LipCA 및 Rcut 효소를 이용한 기능성 리피드 합성	- LipCA WT 및 저온 변이효소를 이용한 octyl butyrate 합성 - Rcut 효소를 이용한 isoamyl fatty acid ester 합성	- 학회 발표 - 논문 발표 - 달성도 100%
	2-2	리파아제 효소의 구조분석 및 작용기작 모델 개발	- LipCA 변이효소 R1의 활성 분석 - Rcut 효소의 기질 특이성 조사 - Rcut 효소의 homology model 및 기질 docking model 제작	- 학회 발표 - 논문 발표 - 달성도 100%

2절 세부목표 달성 내용

1. 극지 미생물 유래 리파아제의 고정화 및 효소 개량

○ 세부목표 1-1: 리파아제 효소의 고정화

연구 내용	연구 결과
<i>Croceibacter atlanticus</i> 리파아제의 생산 및 고정화	<ul style="list-style-type: none"> 남극 유래의 <i>Croceibacter atlanticus</i> lipase WT 및 저온성 변이효소를 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)에서 수용성 형태로 발현시킴. LipCA 효소를 MA-DVB 비드에 고정화하고 효소활성을 측정함.
<i>Rhodococcus cutinase</i> 의 생산 및 고정화	<ul style="list-style-type: none"> 남극 유래의 <i>Rhodococcus cutinase</i>를 <i>E. coli</i> Rosetta gami (DE3)에서 수용성 형태로 발현시킴. Rcut를 MA-DVB 비드에 고정화하고 효소활성을 측정함.

○ 세부목표 1-2: 분자진화기법을 이용한 저온성 리파아제 개발

연구 내용	연구 결과
LipCA 효소의 random mutagenesis, mutant library 제조	<ul style="list-style-type: none"> LipCA 유전자를 이용해서 error-prone PCR을 수행함 pET22벡터를 이용해서 LipCA mutant library 제조함
저온성 mutant 선발	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 LipCA를 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) 균에서 생산하고 저온성 변이효소를 선발함. 1st Round screening을 통해 A37 변이효소 선발 2nd Round screening을 통해 R1 변이효소 선발
저온성 mutant 분리, 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> 선발된 저온성 변이효소 A37, R1의 분리 변이효소의 온도 특성을 조사함 저온에서 변이효소의 kinetic parameter 조사

2. 리파아제를 이용한 유용 바이오소재 생산

○ 세부목표 2-1: LipCA 및 Rcut 효소를 이용한 기능성 리피드 합성

연구 내용	연구 결과
LipCA WT 및 저온 변이효소를 이용한 octyl butyrate 합성	<ul style="list-style-type: none"> 고정화 LipCA WT 및 A37, R1 변이효소를 이용해서 butyric acid, octanol로부터 esterification 반응을 통해서 식품 향미성분인 octyl butyrate를 합성 R1 변이효소를 이용해서 저온(10°C)에서 octyl butyrate 합성함
Rcut 효소를 이용한 isoamyl fatty acid ester 합성	<ul style="list-style-type: none"> 고정화 Rcut를 이용해서 유기용매에서 에스테르 합성반응을 수행함. Isoamyl alcohol과 단쇄(C2, C4, C6), 중쇄 지방산(C8, C10)의 esterification 반응으로 다양한 isoamyl fatty acid ester 합성함. Isoamyl fatty acid ester 물질의 HPLC 분석조건을 조사함

○ 세부목표 2-2: 리파아제 효소의 구조분석 및 작용기작 모델 개발

연구 내용	연구 결과
LipCA 변이효소 R1의 활성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Back mutation을 통해서 R1 변이효소의 활성 증가에 크게 영향을 주는 아미노산 분석 단백질 3차 구조분석을 통해 효소 활성에 중요한 아미노산의 위치를 분석함
Rcut 효소의 기질 특이성 조사	<ul style="list-style-type: none"> 단쇄, 중쇄 지방산에 대한 Rcut 효소의 기질특이성을 구한 결과, C4>C8>C6>C10>C2로 밝혀짐
Rcut 효소의 homology model 및 기질 docking model 제작	<ul style="list-style-type: none"> Rcut 효소의 3차원 구조모델을 구하고 지방산 기질에 대한 docking 모델을 구함. 기질의 결합에너지와 거리를 측정해서 효소의 기질 특이성을 설명함.

3. 논문발표 실적

- 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: 268-276.
- Ha Min Song, Hyung Kwoun Kim (2024) Production of octyl butyrate using psychrophilic mutant lipase from *Croceibacter atlanticus* LipCA lipase developed by a molecular evolution technique. *Enzyme Microb. Technol.* 173: 110370.
- Ye Won Jeon, Ha Min Song, Ka Yeong Lee, Yeong A Kim, Hyung Kwoun Kim (2024) Synthesis of isoamyl fatty acid ester, a flavor compound, through immobilized *Rhodococcus* cutinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* (submitted).

4. 특허등록 및 출원 실적



제 5 장 연구개발결과의 활용계획

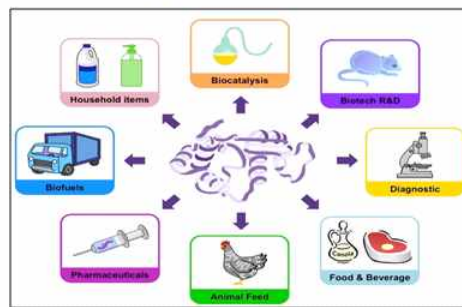
1절 학술적 활용계획

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



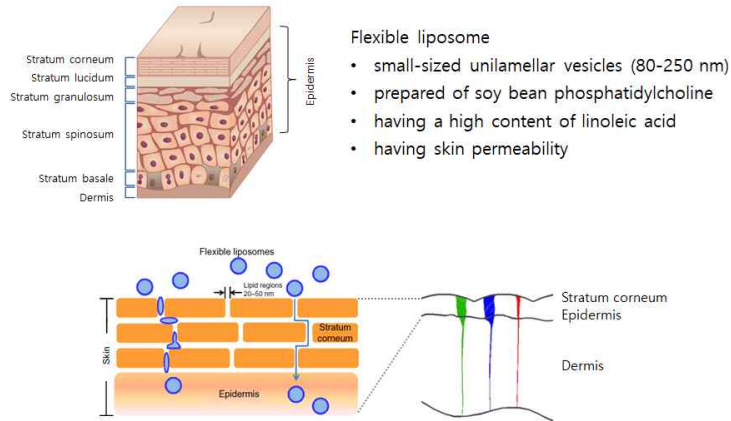
리파아제 효소의 활용



2. 저온성을 갖고 있으며 동시에 효소의 **specific activity**가 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 합성하는데에 저온성 리파아제가 효과적으로 사용될 것이다.
4. 리파아제 효소반응을 통해서 합성한 기능성 지질 물질을 이용해서 플렉서블 리포솜을 제조함. 플렉서블 리포솜은 유동성, 유연성, 안정성, 피부투과성이 향상된 리포솜으로서 피부의 표피층을 통과해서 진피층에 도달할 수 있음. 플렉서블 리포솜 내에 화장품소재, 의약품 소재를 탑재함으로써 목표물질을 진피까지 전달할 수 있음.

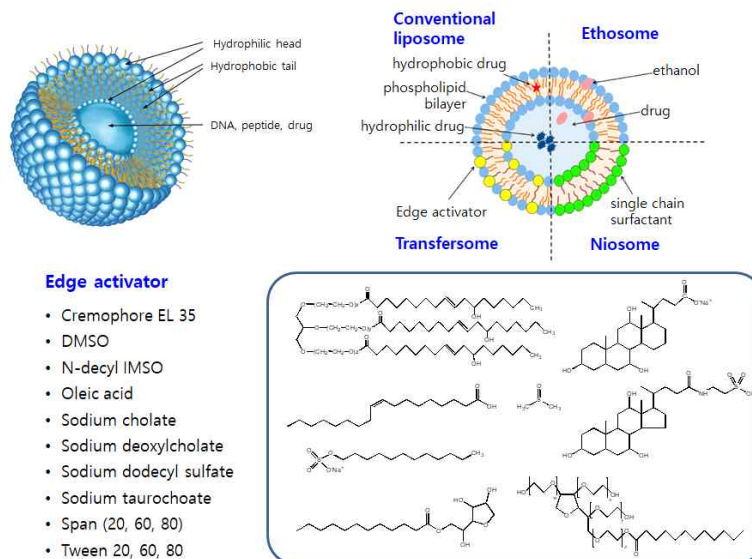
<플렉서블 리포솜의 작용기작>

Flexible liposome and skin penetration



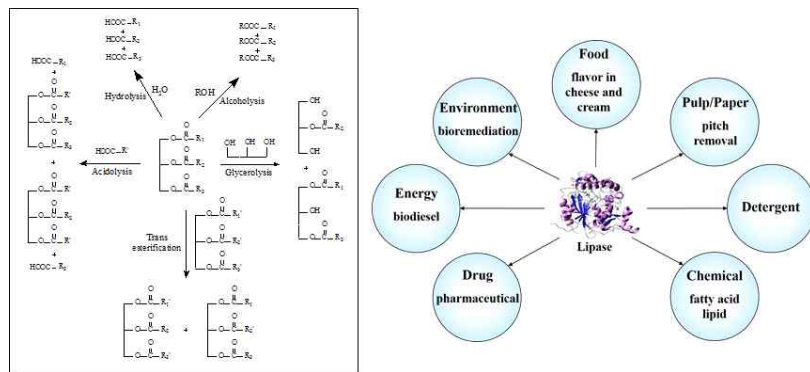
5. 리파아제 반응을 통해서 다양한 edge activator를 개발할 수 있음. Edge activator 물질은 다양한 길이의 지방산을 지닌 물질로서 리포솜의 유동성, 유연성, 안정성, 피부투과성을 향상시킬 수 있음. 본 과제를 통해 개발되는 에스테르 지방산 화합물을 이용해서 신규한 edge activator를 개발할 수 있음.

<플렉서블 리포솜을 개발하기 위한 Edge activator>

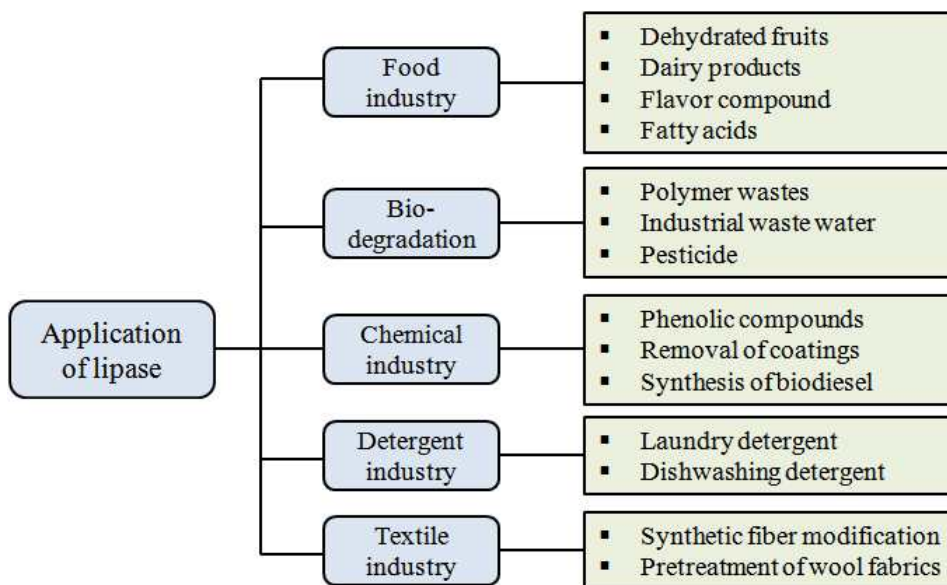


2절 경제적 활용계획

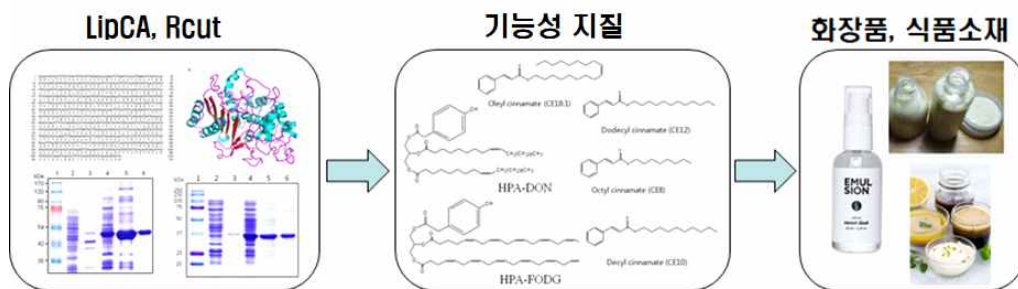
1. 리파아제는 다양한 화학반응을 촉매할 수 있어서 중요한 산업용 효소를 분류하고 있다. 산업적으로 리파아제는 세제산업, 식품산업, 화장품산업, 제약산업을 포함해서 다양한 분야에 사용되고 있다. 현재 CalB를 비롯해서 일부 곰팡이 및 세균 유래의 리파아제가 산업적으로 사용되고 있다. 극지에서 발굴하는 신규한 특수기능 저온성 리파아제를 대량생산하고 비드에 고정화해서 사용한다면 기존 상업용 효소를 대체할 수 있으며 나아가 새로운 산업을 창출할 수 있을 것으로 기대한다.



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.

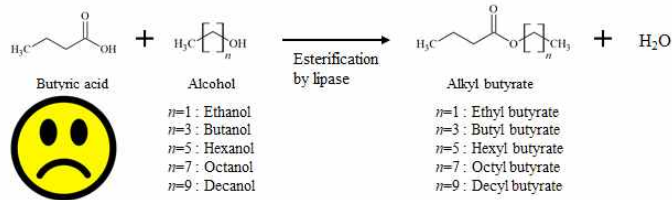


3. 항산화제는 일찍이 여러 산업분야에서 생산품의 산화를 방지하는 목적으로 사용되어왔는데 가장 널리 사용되었던 항산화제는 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)이다. BHT와 BHA는 화학적인 공정을 통하여 합성된 항산화제로 소수성을 띠는 환경에서 높은 항산화 활성을 갖기 때문에 주로 식품 산업에서 생산되는 지질이 포함된 식품가공품에 첨가되어 지질의 산화를 방지하는데 널리 사용되었다. 하지만 BHT와 BHA가 온도의 상승에 따른 휘발성과 불안정성이 높다는 점,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



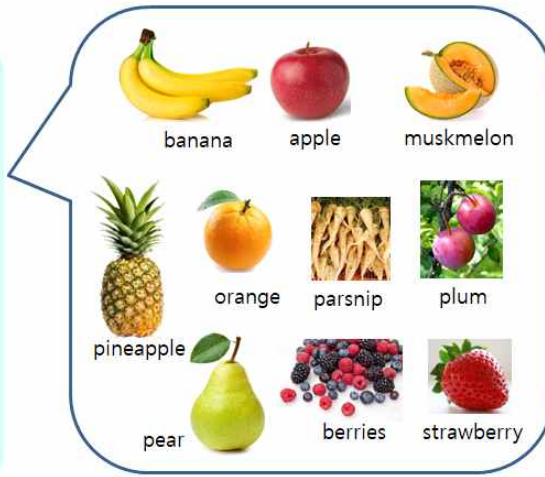
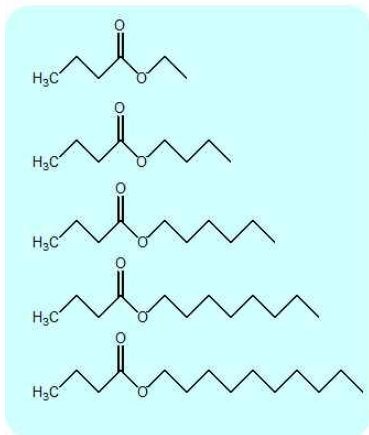
6. 극지에서 분리한 리파아제 효소를 비드에 고정화해서 다양한 지질 화합물을 합성할 수 있다. 단쇄, 중쇄 지질물질은 식품산업에서 기능성 향미물질로 사용된다.
7. 리파아제를 이용해서 Butyric acid와 다양한 지방족 알코올을 기질로 사용해서 에스테르 화합물을 합성하면 식품산업에서 많이 사용하는 과일 맛 향미성분을

합성할 수 있음. 또한, 리파아제를 이용해서 Isoamyl alcohol과 다양한 길이의 지방산을 기질로 사용하면 과일 맛 향미성분을 합성할 수 있어서 식품삼엽의 소재로 사용할 수 있음.



Wow! It smells good.

Fruit flavors



극지연구소

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: 268-276.

Ha Min Song, Hyung Kwoun Kim (2024) Production of octyl butyrate using psychrophilic mutant lipase from *Croceibacter atlanticus* LipCA lipase developed by a molecular evolution technique. *Enzyme Microb. Technol.* 173: 110370.

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.