

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 “포스트 극지유전체 프로젝트: 극지 유용 유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구” 과제의 위탁연구 “극지 다기능 저온성 리파아제 효소 발굴과 기능성 지질 소재 합성” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	: 김 진 형
위탁연구기관명	: 가톨릭대학교
위탁연구책임자	: 김 형 권
위탁참여연구원	: 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	4명	해당단계 연구비	56,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 생명공학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고 서면 수	49
1. 유전자 확보 및 발현 시스템 구축 • 유전자 발굴: 극지 유래 리파아제 유전자의 Shotgun cloning 및 서열 분석 완료 • 벡터 구축: pET22 벡터를 이용한 PCR cloning 및 발현 시스템 구축 • 대량 생산: E. coli BL21 (DE3)을 활용한 EstPN8 효소의 대량 발현 • 고순도 정제: Ni-NTA 및 Gel filtration 컬럼 크로마토그래피를 통한 순수 분리 2. 효소 특성 분석 및 구조 연구 • 특성 규명: 최적 온도, pH, 기질 특이성 및 반응 속도론적 파라미터(Kinetic parameter) 조사 • 구조 분석: Homology modeling 및 Docking model을 통한 효소-기질 결합 메커니즘 연구 3. 분자진화기법을 통한 효소 개량 • 라이브러리 구축: epPCR 기반의 EstPN8 변이 효소 라이브러리 제조 및 생산 • 우수 변이체 선발: 자체 스크리닝 시스템을 통한 고활성 및 저온성 변이 효소 최종 선발 4. 산업적 응용 및 공정 최적화 • 향미 성분 생산: 고정화 효소를 이용한 Isoamyl butyrate 합성 • 공정 최적화: 반응 조건 최적화 및 생성물 분리 방법 개발 완료 5. 주요 연구 성과 • 논문 게재: J. Microbiol. Biotechnol. (2024) "Synthesis of isoamyl fatty acid ester, a flavor compound, by immobilized Rhodococcus cutinase" • 특허 등록: 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소 및 변이체 (대한민국 제1027106940000호, 2024. 09. 23.)					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	리파아제, 극지 미생물, Shotgun 클로닝, 효소 분자진화, 트랜스에스테르화 반응			
	영 어	lipase, polar microorganism, Shotgun cloning, molecular evolution, 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.

IV. 연구개발결과

- 유전자 발굴 및 분석: 극지 미생물 유래 리파아제 유전자의 shotgun cloning에 성공하였으며, 해당 유전자와 단백질의 서열 분석을 완료하였습니다.
- 발현 시스템 구축 및 생산: PCR cloning을 통해 리파아제 유전자를 pET22 벡터에 삽입하고, 이를 *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현시켜 EstPN8 효소를 대량으로 생산하였습니다.
- 단백질 정제: Ni-NTA 컬럼과 gel filtration 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 EstPN8 효소를 고순도로 정제 및 분리하였습니다.
- 효소 특성 및 구조 연구: 정제된 EstPN8 효소의 온도, pH, 기질 특이성 및 속도론적 파라미터(kinetic parameter)를 조사하고, homology 및 docking 모델을 구축하여 구조적 특성을 규명하였습니다.
- 변이체 라이브러리 구축: epPCR(error-prone PCR) 기법을 활용하여 EstPN8 변이 효소 라이브러리를 제조하고, 이를 바탕으로 다양한 변이 효소를 생산하였습니다.
- 우수 변이체 선발: 자체 개발한 스크리닝 시스템을 통해 효소 활성이 크게 향상된 변이체와 산업적 가치가 높은 저온성 변이 효소를 최종 선발하였습니다.

다.

- 산업적 응용 연구: 고정화 효소를 활용하여 식품 향미 성분인 isoamyl butyrate의 생산 공정을 구축하고, 생산 조건 최적화 및 분리 방법 개발을 수행하였습니다.
- 학술 논문 게재: 연구 성과를 2024년 *J. Microbiol. Biotechnol.*(34권 6호)에 "Synthesis of isoamyl fatty acid ester, a flavor compound, by immobilized Rhodococcus cutinase"라는 제목으로 발표하였습니다.
- 지식재산권 확보: 크로세이박터 아틀란티쿠스(*Crocibacter atlanticus*) 유래 지질분해효소 및 그 변이체에 대하여 국내 특허 등록(제1027106940000호, 2024년 9월 23일)을 완료하였습니다.

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 효소축매로 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

- Gene Discovery and Analysis: Successfully performed shotgun cloning of a lipase gene derived from a polar microorganism and completed the sequence analysis of both the gene and its encoded protein.
- Expression System Construction and Production: The lipase gene was inserted into the pET22 vector via PCR cloning and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) to achieve mass production of the EstPN8 enzyme.
- Protein Purification: The EstPN8 enzyme was purified to high homogeneity through Ni-NTA and gel filtration column chromatography.

- Enzymatic Characterization and Structural Study: Investigated the effects of temperature and pH on EstPN8, along with its substrate specificity and kinetic parameters; its structural characteristics were identified through homology and docking modeling.
- Mutant Library Construction: Developed an EstPN8 mutant library using error-prone PCR (epPCR) and produced a diverse range of mutant enzymes.
- Selection of Superior Mutants: Selected variants with significantly enhanced enzymatic activity and industrially valuable cold-adapted mutants using a custom-developed screening system.
- Industrial Application Research: Established a production process for isoamyl butyrate, a food flavor compound, using immobilized enzymes, and optimized reaction conditions as well as separation methods.
- Academic Publication: Published the research findings in the Journal of Microbiology and Biotechnology (2024, Vol. 34, No. 6) under the title "Synthesis of isoamyl fatty acid ester, a flavor compound, by immobilized *Rhodococcus cutinase*."
- Intellectual Property Rights: Completed the domestic patent registration for the *Crocibacter atlanticus*-derived lipase and its variants (Registration No. 1027106940000, Registered on September 23, 2024).

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.

목 차

제 1 장 서론 -----	8
1절. 연구의 목적 -----	8
2절. 연구의 필요성 및 범위 -----	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	13
1절. 국내 기술개발 동향 -----	13
2절. 국외 기술개발 동향 -----	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	20
1절. 남극유래의 신규 리파아제 발굴 -----	20
2절. 분자진화기법을 이용한 EstPNH8 변이효소 개발 -----	32
3절. <i>Rhodococcus Rcut</i> 효소를 이용한 향미소재 합성 -----	35
4절. 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소 -----	37
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 -----	39
1절. 성과목표 달성도 -----	40
2절 세부목표 달성 내용 -----	40
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	42
1절 학술적 활용계획 -----	42
2절 경제적 활용계획 -----	43
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	47
제 7 장 참고문헌 -----	47

제 1 장 서론

1절. 연구의 목적

남극 유래 저온성 미생물로부터 신규 리파아제(Lipase) 유전자를 발굴하여 대장균 기반의 고효율 재조합 생산 체계를 구축하고, 분자 개량을 통해 활성 및 안정성이 극대화된 변이 효소를 개발함으로써 의약·식품·화장품용 기능성 지질 합성 촉매로 활용하는 것을 목적으로 함.

2절. 연구의 필요성 및 범위

1. 리파아제 효소 반응을 이용한 기능성 항산화제 합성의 필요성

가. 합성 항산화제의 제한적 활용 및 안전성 문제

- 식품 및 화장품 산업에서 산화 방지를 위해 널리 사용되어 온 BHT (Butylated hydroxytoluene)와 BHA (Butylated hydroxyanisole)는 비극성 환경에서 우수한 활성을 나타내어 에멀션 제품 등에 주로 첨가되어 왔다.



- 그러나 이들은 고온에서의 높은 휘발성과 불안정성, 그리고 잠재적 발암 가능성이 보고됨에 따라 전 세계적으로 사용량이 감소하는 추세이다.

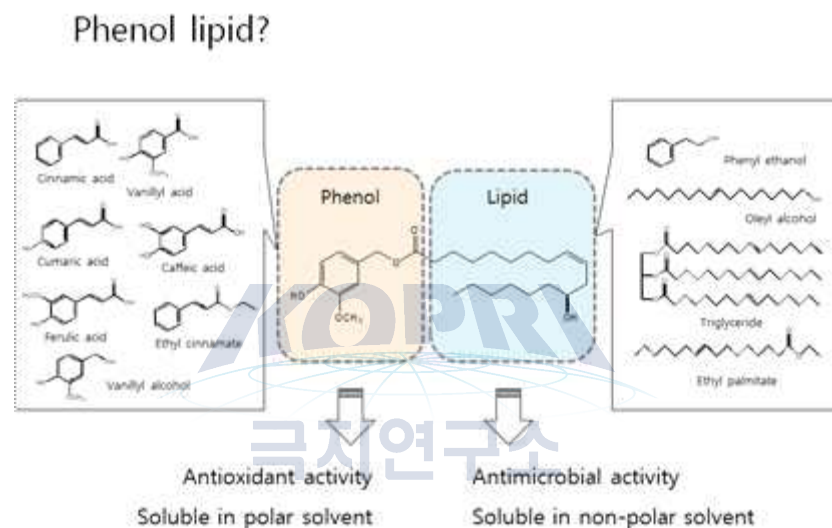
나. 천연 항산화제 및 페놀산(Phenolic acid)의 특성

- 이에 따라 카로티노이드, 폴리페놀, 비타민 등 천연 항산화제에 대한 수요가 급증하고 있으며, 특히 식물계에 풍부한 페놀산에 주목하고 있다.
- 페놀산은 Ferulic acid, Caffeic acid 등 구조적 다양성을 가지며, 항산화 작용 외

에도 향균, 항염 등 우수한 생리활성을 보유하여 소비자들에게 친환경적이고 안전한 물질로 인식되고 있다.

다. 페놀산의 물리화학적 한계 및 개선 방향

- 하지만 페놀산은 강한 친수성으로 인해 소수성인 오일이나 에멀션 시스템 내에서의 항산화 효율이 낮고, 세포막 투과성이 떨어지는 한계가 있다.
- 이를 극복하기 위해 알코올과의 에스테르화(Esterification) 또는 트리글리세라이드와의 전이 에스테르화(Transesterification) 반응을 통해 소수성을 부여한 기능성 지질 합성 연구가 요구된다.



라. 저온 리파아제를 이용한 PUFA-페놀 에스테르 합성의 중요성

- 특히 DHA, EPA와 같은 다불포화지방산(PUFA)과 페놀산을 결합한 'PUFA-phenol ester'는 항산화와 생리활성 시너지를 기대할 수 있는 고부가가치 물질이다.
- 다만, 열에 취약한 PUFA의 산패를 방지하기 위해서는 저온에서의 반응 공정이 필수적이며, 이를 위해 극저온성 리파아제(Psychrophilic lipase)를 활용한 효소 촉매 공정 개발이 매우 중요하다.

2. 저온성 리파아제의 탐색 및 효소전환 반응

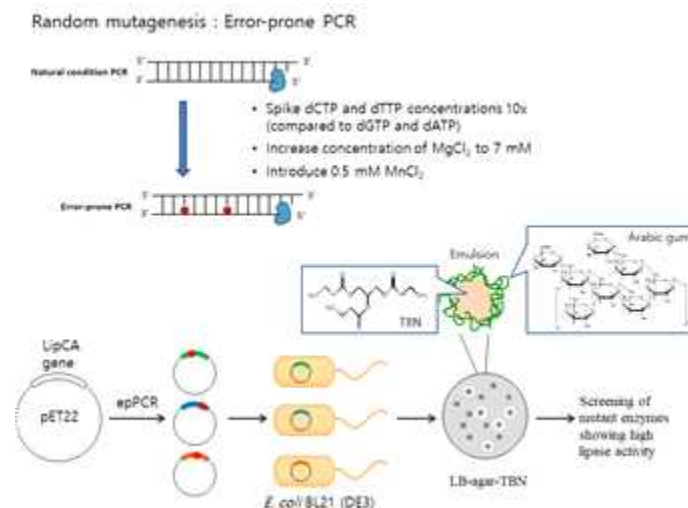
가. 신규 효소 발굴 및 유전자 확보

- 먼저 극지연구소에서 보유 중인 저온성 미생물 라이브러리를 대상으로 리파아제 생산 여부를 확인한다.

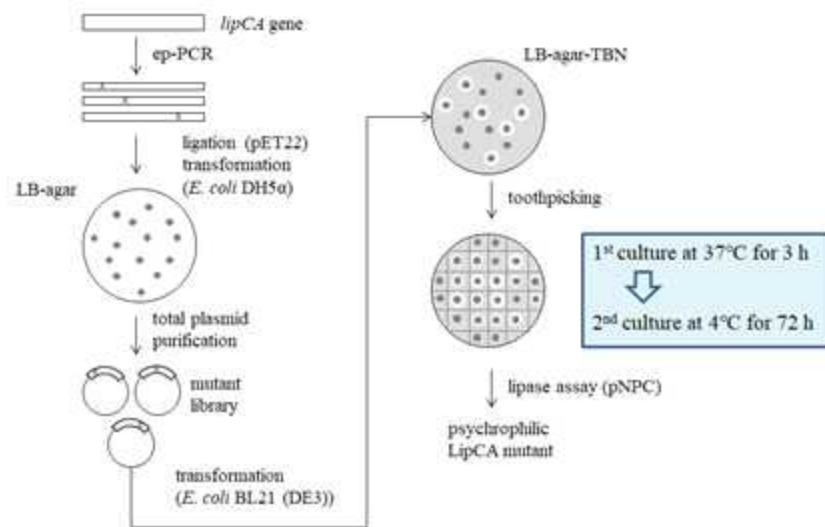
- 대량의 균주를 효율적으로 검토하기 위해 1차적으로 TBN/TCN plate assay를 실시하여 투명한(Clear zone) 형성 능력이 우수한 균주를 1차 선발하고, 배양액에 대한 pNPC 및 pH-stat assay를 통해 리파아제의 정량적 활성을 분석하는 2차 스크리닝을 수행한다.
- 선발된 미생물은 16S rRNA 분석과 SDS-PAGE를 통한 단백질 패턴 비교를 병행함으로써 종의 중복성을 배제하고 신속하게 동정한다.
- 리파아제 유전자 확보를 위해서는 세 가지 전략을 추진한다. 유전체 정보가 확인된 경우 특이적 프라이머를 제작하여 PCR로 증폭하고, 정보가 미비한 경우 Consensus 서열 기반의 프라이머 제작 및 Genome walking을 수행하며, 필요시 Shotgun cloning을 통해 신규 유전자를 발굴한다.

나. 재조합 단백질 생산 및 특성 규명

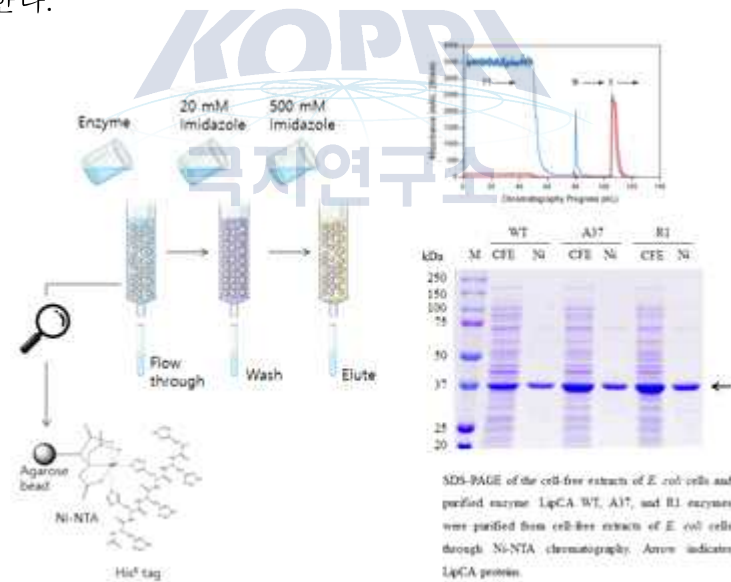
- 확보한 유전자는 발현 벡터에 삽입하여 대장균(*E. coli*) 시스템에서 대량 생산을 유도한다.
- 이때 단백질이 불용성(Inclusion body)으로 응집되는 것을 방지하고 활성 형태(Soluble form)로 생산되는 변이체를 선별하며, Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 고순도 효소를 정제한다.
- 정제된 효소는 온도와 pH 변화에 따른 최적 반응 조건을 조사하고, 지방산 사슬 길이에 따른 분해 활성을 측정하여 기질 특이성을 명확히 규명한다.
- 분자진화기법을 사용해서 리파아제 효소의 저온성 변이효소를 개발한다. 변이 효소의 온도특성을 조사하고 효소 구조와 저온성과의 관계를 규명한다.



Error-prone PCR and Screening of psychrophilic LipCA mutant

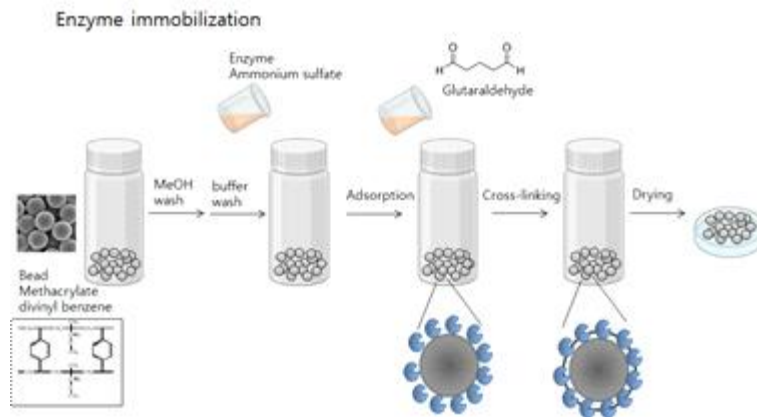


- 변이 효소를 Ni-NTA 컬럼을 이용해서 순수하게 분리하여 저온에서의 효소 특성을 조사한다.



다. 효소 고정화 및 기능성 지질 합성

- 비수계 반응에서 생촉매의 효율을 극대화하기 위해, 현탁 문제가 발생하는 동결건조 방식 대신 비드(Bead) 고정화법을 채택하여 안정성을 확보한다.



- 고정화 효소를 활용하여 페놀릭 알코올과 지방산 간의 전이 에스테르화 (Transesterification) 반응을 수행하며, 타깃 기질의 농도, 물비, 유기용매 종류 및 효소량 등을 변수로 공정 최적화를 진행한다.
- 합성된 페놀릭 에스테르는 Prep-HPLC를 통해 정제 및 구조를 확인하고, 항산화·항균 활성 및 항아밀로이드증(Anti-amyloidosis) 효능을 평가한다.
- 아울러 식품 향료 소재인 Butyl butyrate를 포함한 다양한 Butyl ester계 물질을 합성하여 반응 특이성을 조사하고, 이를 Homology modeling 및 Docking simulation을 통해 구조 생물학적으로 해석한다.

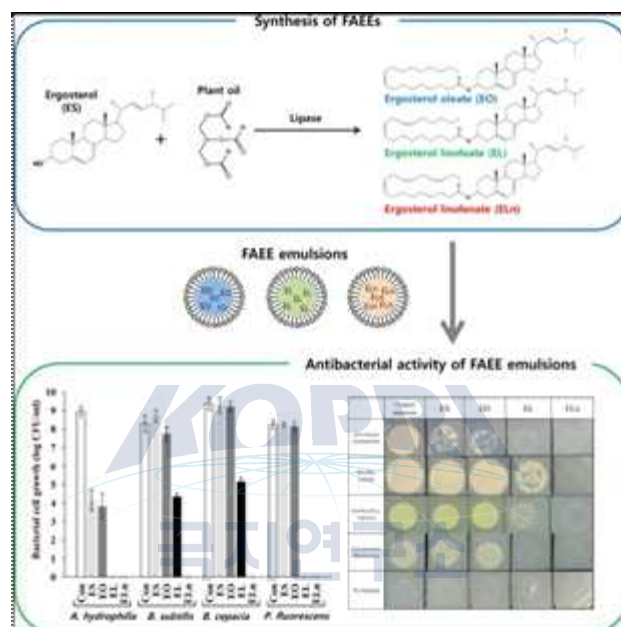
라. 응용 확대 및 분자 개량

- 개발된 저온성 리파아제의 활용 범위를 넓히기 위해 플라스틱 고분자의 가수분해 반응 공정 최적화를 수행한다.
- 마지막으로 효소의 생산 효율을 높이기 위해 분자 진화 기법(Directed evolution)을 도입하여 대장균 내 발현량이 증대된 변이체를 선발한다.
- 변이 효소의 유전자 서열 분석과 mRNA 구조 에너지 계산, 위치 특이적 변이 (Site-directed mutagenesis) 도입을 통해 단백질 발현에 직접적으로 관여하는 핵심 염기서열을 규명함으로써 고효율 생촉매 생산 체계를 구축한다.

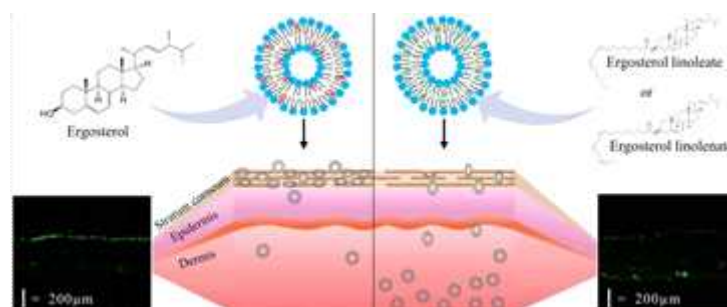
제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술개발 동향

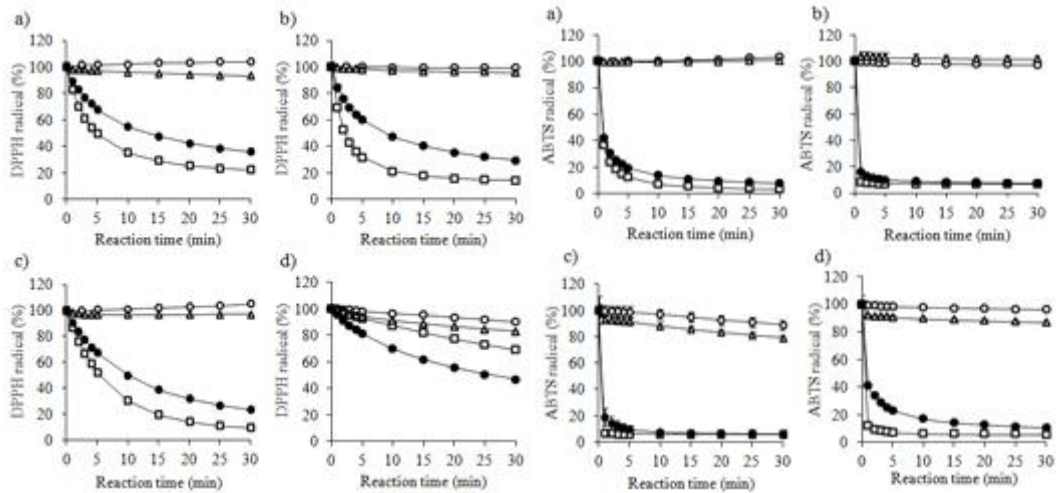
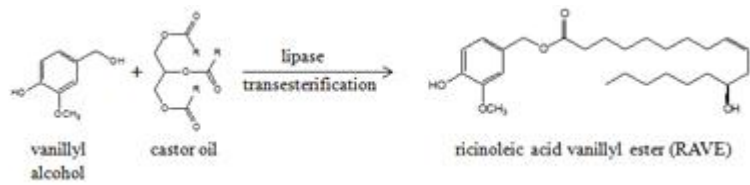
1. 가톨릭대 연구팀은 리파아제 효소반응을 이용해서 불포화지방산 ergosterol ester를 합성하였고 uFAEE를 이용하여 에멀전을 생산했다. EL, ELn의 그람양성균에 대한 항균활성을 확인하였다. Enz Micro. Technol. (2020) 139, 109581.



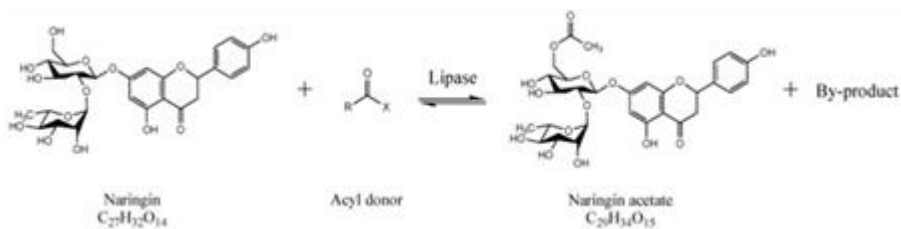
2. 가톨릭대 연구팀은 리파아제 반응으로 합성한 EL, ELn을 이용하여 리포솜을 개발하였음. 이것이 유연성, 안정성을 갖고 있으며 돼지피부를 투과하는 것을 확인하였음. Chem Phys Lipids (2023) 250, 105270.



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)



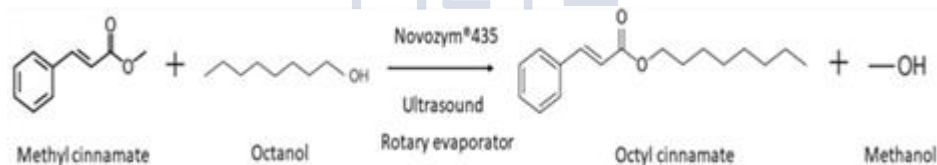
4. 감귤 플라보노이드 중 하나이며 천연 향산화제로 알려진 나린진은 낮은 안정성과 용해도로 인해 생체 이용률이 제한적임. 그러나, 아실화를 통해 형성된 나린진 에스테르는 최근 향상된 물리적 및 화학적 특성을 갖는 것으로 보고됨. 이러한 화합물의 개발은 식품, 화장품 및 제약 산업에서 큰 잠재력을 가지고 있지만 낮은 전환율과 생산성은 산업 응용 분야의 장벽임. 나린진 아세테이트의 합성에 대한 다양한 변수(효소 종류, 효소 농도, 아실 공여체, 반응물의 몰비, 반응 온도 및 용매)의 영향을 평가하여 최적의 반응 조건을 결정함. 이전에 보고된 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.

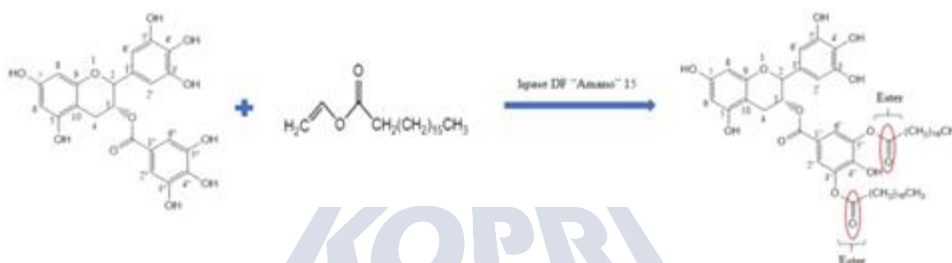
2절. 국외 기술개발 동향

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



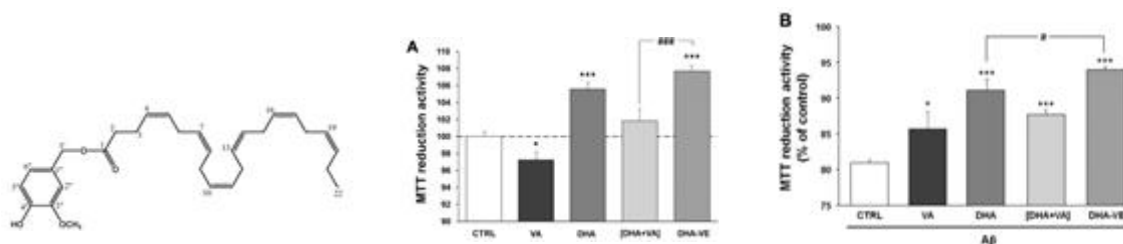
3. 리파아제 촉매 에스테르화 및 에스테르 교환 반응을 통해 페놀 글리코시드 아젤라산 에스테르를 합성하기 위한 효소 경로를 성공적으로 설정함. Novozyme 435가 에스테르화 촉매 활성이 가장 높았고 Lipozyme TLIM가 에스테르 합성을 위한 에스테르 교환 촉매화에서 가장 높은 기질 전환율을 보임. 효소 에스테르화 및 에스테르교환의 기질 전환율은 각각 98.7% 및 95.1%. 리포자임 TLIM을 촉매로 한 경우 가수분해 반응이 방해받아서 에스테르 교환 반응의 주요 생성물 비율이 99.0% 이상. 물리적 및 생물학적 특성의 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.



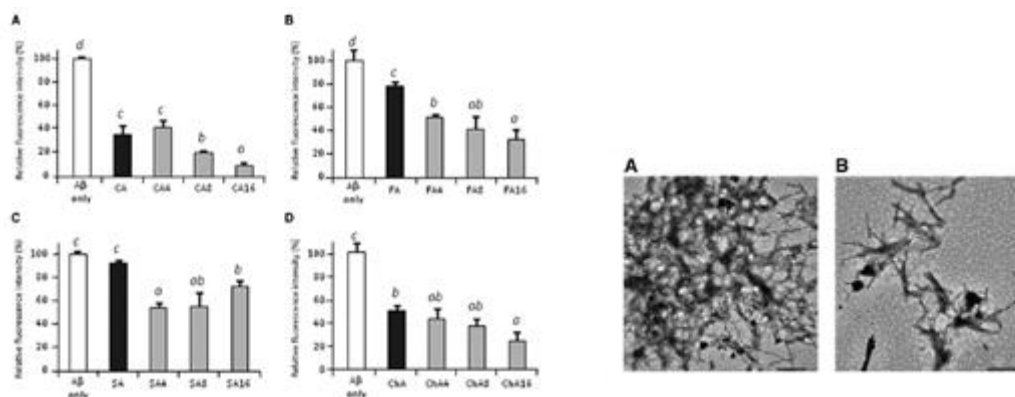
5. 리파아제를 이용한 DHA-vanillyl ester 합성 연구

- 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 β 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



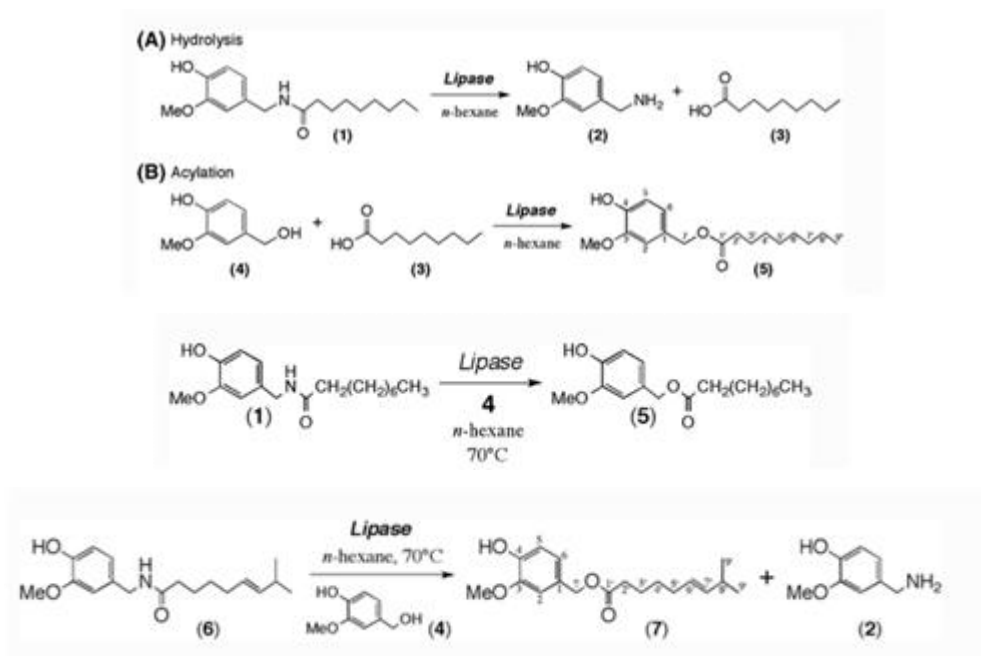
라. 연어에서 추출한 PUFA와 rutin, vanillyl alcohol를 이용해서 페놀리피드를 생산한 후, 항산화 활성을 측정함. BHT, α -토코페롤을 비교물질로 사용했으며, DPPH, thiobarbituric acid assay를 수행함. 소수성 용매, bulk oil 시스템, 에멀전시스템에서 측정한 결과, 페놀기에 의해서 PUFA의 산화가 느려지고 PUFA에 의해서 페놀기의 소수성 용매 용해도가 증가됨을 밝혔음. J Agric Food Chem. (2011) 59: 7021-7027.

극지연구소

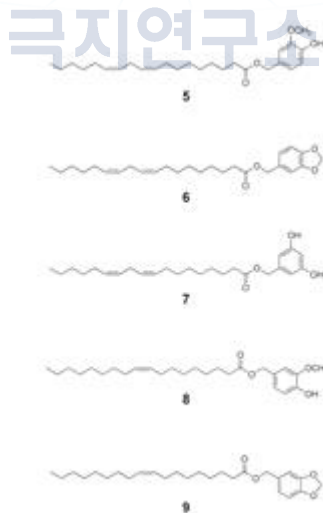
6. 리파제를 이용한 Capsiate 합성 연구

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

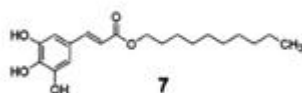


라. Vanillyl alcohol과 methyl nonanoate로부터 capsinoid (vanillyl nonanoate) 합성함으로써 capsate and dihydrocapsate를 대량 생산하는 연구 수행함. Biosci Biotechnol Biochem. (2002) 66: 319-327.

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, γ -glutamyl transferase (GGT), lipase 활성을 측정한 결과, CAPE가 췌장 손상을 방지하는 것을 밝힘. Toxicol Ind Health. (2016) 32: 306-312.

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



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 남극 유래의 신규 리파아제 발굴

1. 극지연구소 리파아제 생산균 분양

- 극지연구소로부터 남극에서 분리한 균주를 7종 분양받았음. 균주를 Marine-TBN 배지와 LB-TBN 배지에서 접종하고, 배양 가능성과 halo 생성능을 조사하였음.
- #1, #3, #4, #6, #7 균주는 Marine 배지에서 성장하였고, TBN 분해능을 갖고 있음. #1, #2, #3, #5, #7 균주는 LB배지에서 성장하였고, TBN 분해능을 갖고 있음.

Table 1. 극지연구소에서 분양받은 균주 목록

# No.	Identification	Origin type	Media	Marin-TBN	LB-TBN
#1	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	해양 지질토양	Marin broth	O	O
#2	<i>Rhodococcus fascians</i>	담수	Marin broth	X/o	O
#3	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	해안가 모래	Marin broth	O	O
#4	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	해안가 모래	Marin broth	O	O/x
#5	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	담수	R2A	X/o	O
#6	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	기지 앞 해수	Marin broth	O	X
#7	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	기지 앞 해수	Marin broth	O	O

2. 리파아제 유전자 발굴을 위한 shotgun cloning

- 남극 분리균 7종을 모두 배양하고, chromosomal DNA를 추출하였음.
- Chromosomal DNA를 *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Kpn*I, *Sac*I 제한효소로 절단한 결과, *Hind*III, *Pst*I 효소에 의해서 가장 많이 절단되는 것을 확인함.

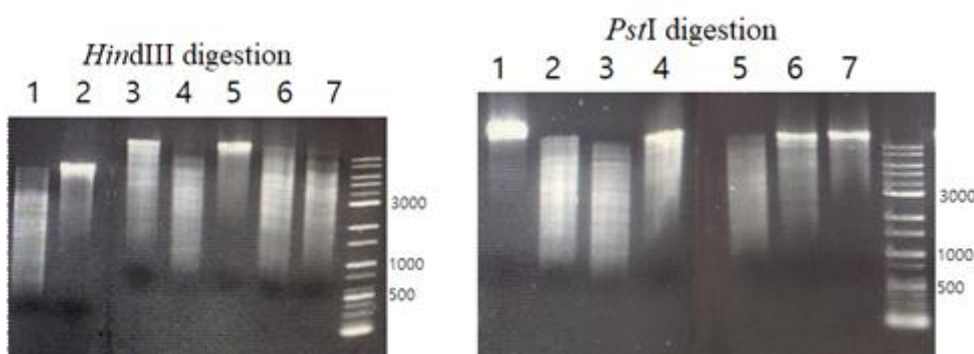


Fig. 1. Restriction enzyme digestion of chromosomal DNAs. Chromosomal DNAs were isolated from 7 bacterial strains and digested using *Hind*III and *Pst*I enzymes.

- DNA #1, #2, #3, #4, #6, #7은 *Hind*III로 절단하고, DNA #2, #3, #4, #5은 *Pst*I으로 절단하기로 결정함.

Table 2. Shotgun cloning

Restriction enzyme	bacterial strains
<i>Hind</i> III digestion	#1, #2, #3, #4, #6, #7
<i>Pst</i> I digestion	#2, #3, #4, #5

- 제한효소로 절단한 후에 2 kb부터 7 kb크기에 해당되는 DNA조각을 젤로부터 추출하였음. *Hind*III와 *Pst*I 절단 DNA을 균주 구분 없이 모아서 각각 하나의 풀로 만들고, 클로닝 과정을 진행하였음.
- 클로닝 벡터 pUC19을 *Hind*III와 *Pst*I으로 각각 절단하고, 젤에서 추출하였음. CIAP을 처리하고, 앞에서 준비한 DNA절편과 섞어서 ligation을 수행함.
- Ligation mixture을 *E. coli* DH5 α 균에 형질전환하고, LB-TBN 배지에 도말하였음. 37°C에서 2일간 배양하면서 halo 형성 콜로니를 선별하였음.

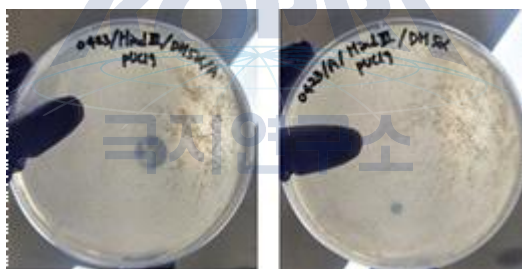


Fig. 2. Shotgun cloning results. *E. coli* DH5 α was transformed with ligation mixture and incubated on TBN-LB plate. Halo-forming colonies were screened after 2 day incubation.

- Halo를 형성하는 콜로니를 *Pst*I 조각으로부터 8개, *Hind*III 조각으로부터 7개 총 17개 선별하였음.

Table 3. Shotgun cloning results (halo forming colonies)

P1, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, H1, H2, H6, H7, H9, H8, H10

- 각 콜로니로부터 plasmid를 분리하고, insert DNA의 유무 및 크기를 확인하기 위해서 각각 *Pst*I, *Hind*III 효소를 절단하였음.
- pUC19 벡터와 insert DNA를 확인하였으며, 이중에서 H8 콜로니의 halo크기가 가

장 클 뿐만 아니라, insert DNA 크기(2 kb)가 작기 때문에 H8의 염기 서열을 분석함.

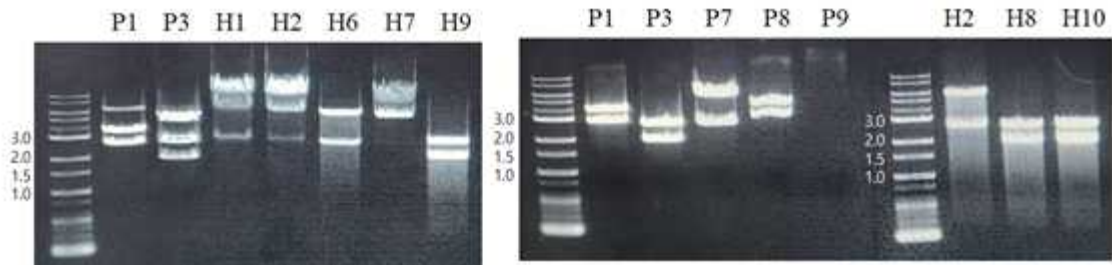


Fig. 3. Restriction enzyme digestion. Recombinant plasmids were purified from halo-forming *E. coli* cells and digested with *Hind*III and *Pst*I enzymes.

3. 리파아제 H8 발굴 및 PCR 클로닝

- H8 insert DNA로부터 ORF를 찾았으며, DNA와 단백질 서열을 분석하였음.
- Lipase H8 유전자는 총 672개의 염기로 구성되었고, 223개의 아미노산을 코딩하는 것으로 확인되었음.
- BLAST search를 통해서 기존에 보고된 유전자와 비교한 결과, *Psychrobacter* sp. MES7-P7E 유래의 diene lactone hydrolase family protein 과 일치하는 것으로 밝혀졌음.
- *Psychrobacter* diene lactone hydrolase에 대한 연구가 아직 진행되지 않았기 때문에 lipase H8에 대해 연구하기로 결정하였음.

```

1 ATGAGTAACTATTAGACGCCGTCGTCGTTGAGCACAATCCCTCTCAAAAAAGATAGATCGCGCAGTGATTGGCTACATGGCTTAGGT      90
1  M S N Y L D A V V V E H N P S Q K K I D R A V I W L H G L G      30
91 GCTAGCGGTCATGATTTTGAGCCAGTTGTACCGCAGCTTGCTTGCTAATGATATGGCAGTACGTTTATCTTCCGCATGCGCCCAAG      180
31  A S G H D F E P V V P Q L G L A N D M A V R F I F P H A P K      60
181 CGTCCTGTCACGGTCAATGGTGGGATGGTGATGCCGGCTTGGTATGATATCTTGGAGATGAGTCTTGAGCGCAAAGTTGATGTGACACAA      270
61  R P V T V N G G M V M P A W Y D I L E M S L E R K V D V T Q      90
271 ATTGAGACATCCTCGCAGCAGATTTCGGATTTGATTGCCCGGAGATTGAACGGCGGTCAAACCTGAACATATCGTTATCGTGGGTTT      360
91  I E T S S Q Q I R D L I A R E I E R G V K P E H I V I A G F      120
361 TCGCAGGGCGGGGCGGTTGCTTATCATGTGGCGCTCAGTCATCCAGAGCGCTTAGCGGGTCTGATGACGCTCTACCTACTTAGCAACC      450
121 S Q G G A V A Y H V A L S H P E R L A G L M T L S T Y L A T      150
401 AATGACAATATTGAGTATAGTGCTGCCAATAGAGACCTACCGATTTTGATTGAGCATGGTACGCATGATCCAGTCGTACCTGTGATGCTA      540
151 N D N I E Y S A A N R D L P I L I E H G T H D P V V P V M L      180
491 GCGAGCAGGCGCAGCAGTTATTGACGAGCAAAGGCTACAACGTTGAATACCATACTTATCCGATGGCACATCAAGTCTGTATGCCGCAG      630
181 G E Q A Q Q L L T S K G Y N V E Y H T Y P M A H Q V C M P Q      210
581 ATTCAAAATATCGGCAGATGGCTAAACACTGTTTTCATAGCATAG      672
211 I Q N I G R W L N T V L A ***      223

```

Fig. 4. Gene and protein sequence of lipase H8. ORF in the recombinant plasmid H8 was found and the gene was sequenced.

- Lipase H8 gene을 pET22 벡터에 삽입하기 위해서 PCR primer를 디자인하였음. *Nde*I과 *Xho*I제한효소를 사용하기 결정하였고, C-terminal에 His-tag를 붙이기로 정했음.

Table 4. PCR primers for pET22 vector cloning

F 5' CCC CAT ATG AGT AAC TAT TTA GAC GCC G 3'

R 5' GGG GAG CTC TGC TAA AAC AGT GTT TAG CCA TC 3'

- 재조합벡터 pUC19/H8을 template로 사용해서 PCR을 수행하였고, PCR product를 젤로부터 추출해서 *Nde*I과 *Xho*I으로 절단하여 pET22 벡터에 삽입하였음.
- Colony PCR을 통해서 H8 gene가 pET22 벡터에 삽입되었음을 확인하였음.
- *E. coli* BL21 (DE3)균에 pET22/H8를 형질전환하여 LB-TBN에 도말한 후, halo가 형성됨을 확인하였음. Lipase H8 유전자가 정상적으로 발현됨을 확인하였음.

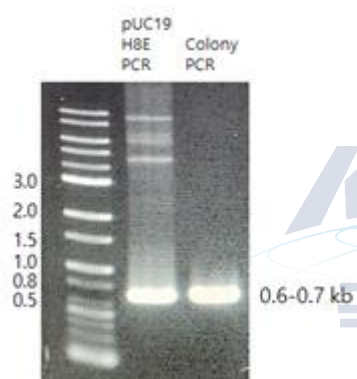


Fig. 5. PCR results. PCR was performed with pUC19/H8 plasmid and *E. coli* BL21 (DE3) cells showing halo. Lipase gene was found with 0.6-0.7 kb DNA band.



Fig. 6. *E. coli* BL21 (DE3) containing lipase H8 gene. *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with pET22/H8 and incubated on TBN LB plate.

4. 리파아제 H8 생산 및 순수 분리

- *E. coli* BL21 (DE3)/H8 균을 LB 배지에서 배양하고, IPTG induction을 통해서 lipase H8 발현을 유도하였음. 균체를 원심분리를 통해서 모은 뒤, 초음파 분쇄법으로 세포를 파쇄하였음.
- SDS-PAGE을 수행한 결과, lipase H8가 수용성 형태로 대량 생산되었음을 확인하였음.

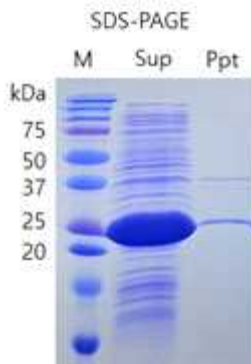


Fig. 7. SDS-PAGE for lipase H8 enzyme. *E. coli* BL21 (DE3)/H8 was cultured and the cell-free extract and precipitate were analyzed using SDS-PAGE.

- *E. coli* cell-free extract를 Ni-NTA 컬럼에 가하고, 결합하지 않은 단백질을 모두 제거하였다. 이후에 500 mM imidazole 용액을 사용해서 컬럼에 결합한 lipase H8을 용출시켰음.
- Lipase 활성을 조사한 결과, Fraction #4부터 #9까지 lipase 활성이 측정되었음. SDS-PAGE를 수행한 결과, Fraction #4부터 #9까지 lipase 단백질 밴드가 관찰되었고, #6 밴드가 가장 두꺼운 것이 확인되었음.

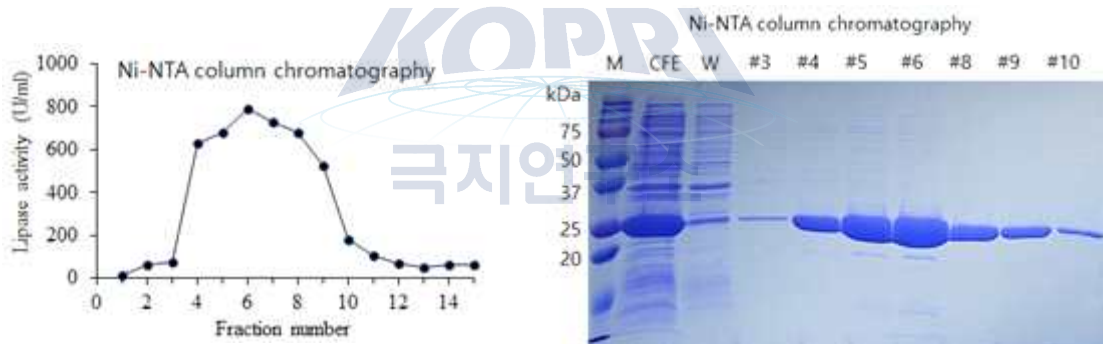


Fig. 8. Ni-NTA column chromatography. Cell-free extract of *E. coli* BL21 (DE3)/H8 was added to the column. Lipase H8 was eluted using 500 mM imidazole. Each fraction was analyzed using SDS-PAGE.

- Ni-NTA 컬럼을 통해 분리한 Lipase H8에 포함되어 있는 고농도의 imidazole을 제거하기 위해서 gel filtration chromatography를 수행하였음.
- PD-10 컬럼에서 Fraction #7부터 #9에서 lipase H8가 용출되었음.

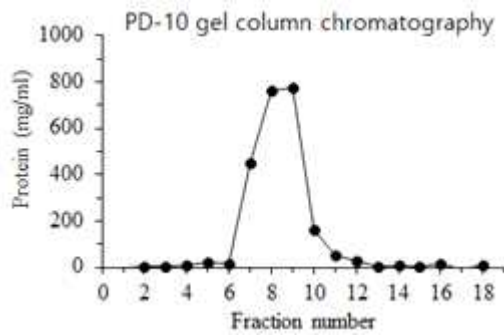


Fig. 9. Gel filtration column chromatography. Active fraction from Ni-NTA column was added to the PD-10 column and eluted using 50 mM potassium phosphate buffer. Each fraction was analyzed using Bradford protein assay method.

5. 리파아제 H8 효소특성 규명

- 순수 분리된 lipase H8의 효소적 특성을 규명하기로 결정함. 먼저 온도에 대한 특성을 조사.
- 10°C에서 50°C까지 효소 활성을 조사한 결과, 50°C에서 효소활성이 가장 높은 것으로 확인.
- 효소의 온도안정성을 조사한 결과, 40°C에서 30분까지 안정하였고, 45°C이상에서 안정성이 떨어지는 것을 확인하였음.
- 40°C부터 50°C까지 시간별로 온도 안정성을 조사할 결과, 40°C에서 활성이 유지되었지만, 45°C에서는 서서히 감소하였고, 50°C에서는 10분 내로 활성이 사라지는 것을 확인하였음.

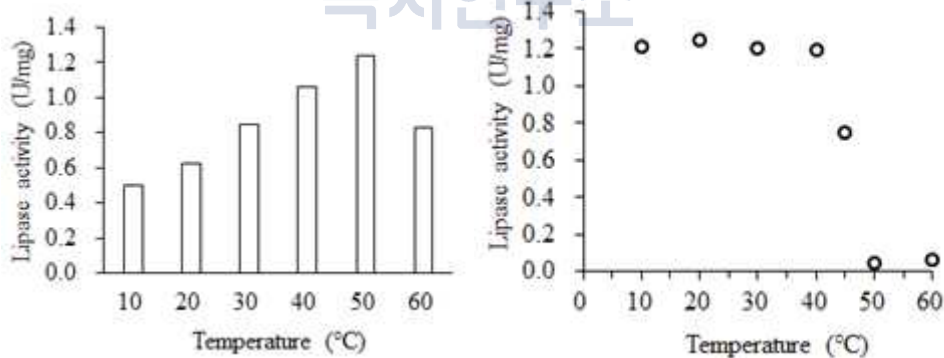


Fig. 10. Temperature effects on lipase activity. Lipase activity was assayed at various temperatures and residual activity was analyzed after 30 min incubation at various temperatures.

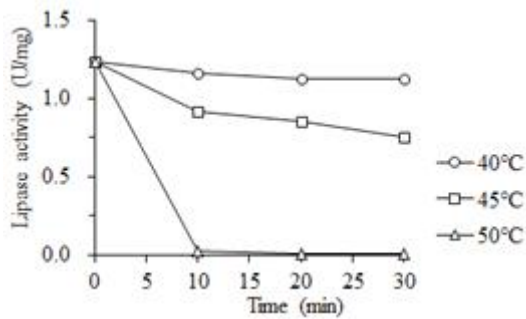


Fig. 11. Thermo-stability of lipase H8E. Residual activity of lipase was analyzed with time course at 40, 45, and 50°C.

- Lipase H8에 대한 pH의 영향을 조사하였음. pH 6부터 11까지 효소활성을 조사한 결과, pH 9에서 효소활성이 가장 높은 것을 확인하였음.
- pH에 따른 효소의 안정성을 조사한 결과, pH 6부터 11까지의 넓은 범위에서 효소활성이 유지되었고, pH 5 이하이거나, 12 이상인 경우에는 효소안정성이 급격히 떨어짐을 확인하였음.

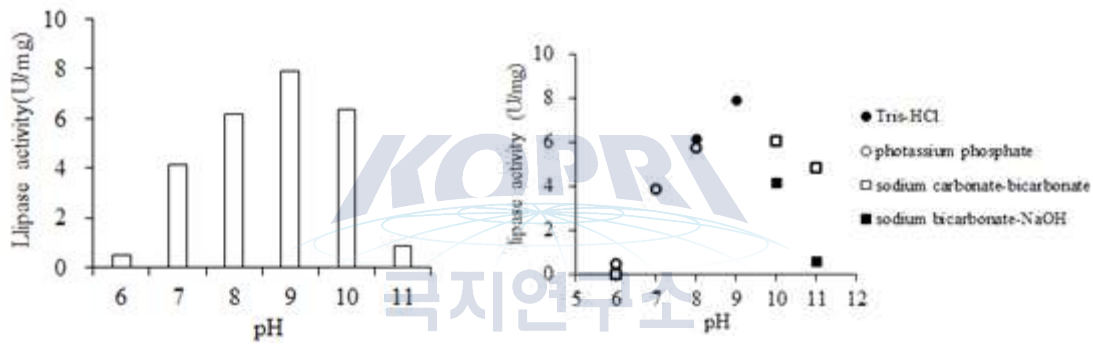


Fig. 12. pH effects on lipase activity. Lipase activity was assayed at various pHs.

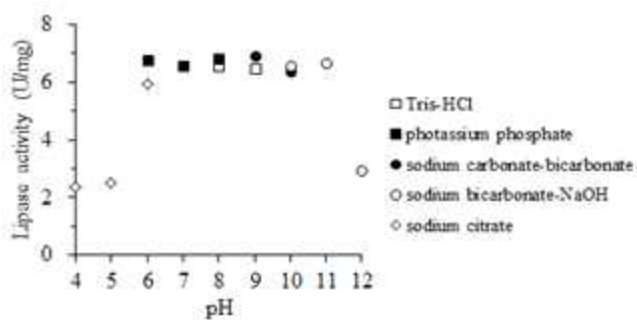


Fig. 13. pH stability of lipase. Residual activity of lipase H8E was assayed after 30 min incubation at various pHs.

- 기질의 chain length에 따른 lipase H8의 활성을 조사한 결과, C2부터 C12까지 분해할 수 있었고, C6에 대한 분해활성이 가장 높은 것으로 확인됨.

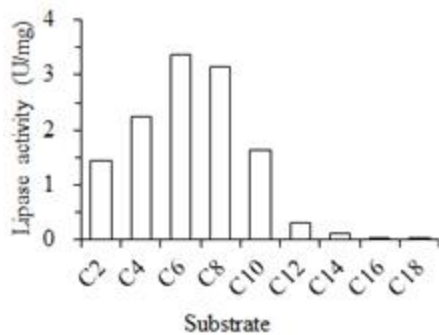


Fig. 14. substrate specificity of lipase. Lipase activity was assayed using various chain length of p-nitrophenol esters.

- H8 효소의 금속 이온에 대한 영향을 조사하였다. 금속이온을 5 mM 농도로 처리하고 pNPC방법으로 효소 활성을 측정한 결과, CaCl_2 에 의해서 효소 활성이 20% 정도 증가되었다. Calcium ion이 효소 활성 및 안정성에 기여하는 것이 많이 알려져 있다. 한편, KCl , MgSO_4 , LiCl , ZnSO_4 에 의해서는 활성의 변화가 거의 관찰되지 않았다. 하지만, CuSO_4 , NiCl_2 에 의해서는 활성이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 추가 실험을 통해 특정 금속이온에 의해서 활성이 증가하거나 감소한 이유에 대해서 밝히고자 한다.

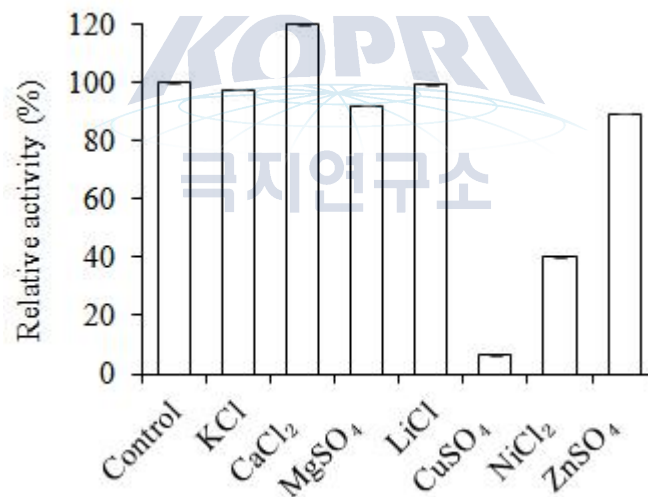


Fig. 16. Metal effects on H8 enzyme. Several metal were treated to H8 enzyme with 5 mM concentration and enzyme activity was assayed.

6. 리파아제 H8 효소의 구조 연구

- H8 효소의 구조를 homology modeling과 α -fold modeling 방법으로 구하였다. 중심에 9개의 β -strand로 구성된 mixed β -sheet를 갖고 있고, 앞과 뒤에 각각 2개와 4개의 helix로 구성된 전형적인 α/β hydrolase fold 구조를 갖고 있음을 밝혔다.
- 활성부위의 중심에 촉매 반응에 직접 관여하는 ^{121}Ser 을 갖고 있고, 기질 결합 부위가 ^{29}Leu , ^{146}Thr , ^{147}Tyr , ^{175}Val , ^{176}Val , ^{204}His 로 구성되어 있음을 밝혔다.

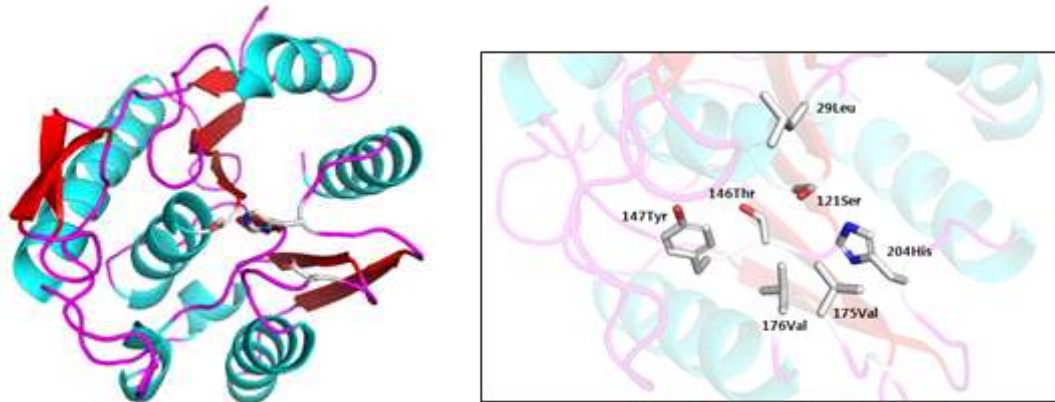
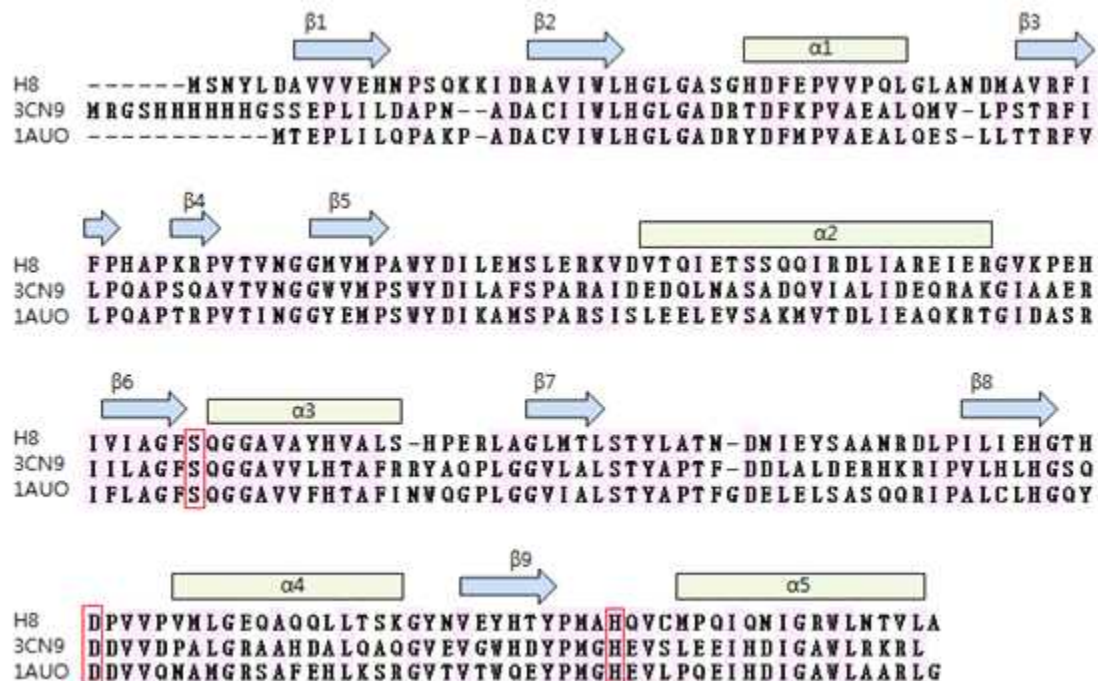


Fig. 17. Homology model of H8 enzyme and its active site structure.

- 구조가 밝혀진 기존의 lipase/esterase 효소들과 단백질 서열 및 구조를 비교한 결과, 2가지 효소와 구조가 유사함을 밝혔다. *Pseudomonas fluorescens* lipase (1AUO), *Pseudomonas aeruginosa* lipase (3CN9)의 구조가 H8 효소와 매우 유사한 구조를 갖고 있음을 알게 되었다. 단백질의 서열 유사도가 40% 정도임에도 불구하고, catalytic triad 부위와 oxyanion hole 부위가 잘 보존되어 있음을 알게 되었다.
- H8, 1AUO, 3CN9의 sequence alignment를 수행한 결과, 2차구조가 정확하게 일치함을 알 수 있었고, catalytic triad를 구성하는 ¹²¹Ser, ¹⁷³Asp, ²⁰⁴His가 β -strand와 α -helix을 연결하는 loop 구조에 위치함을 밝혔다.



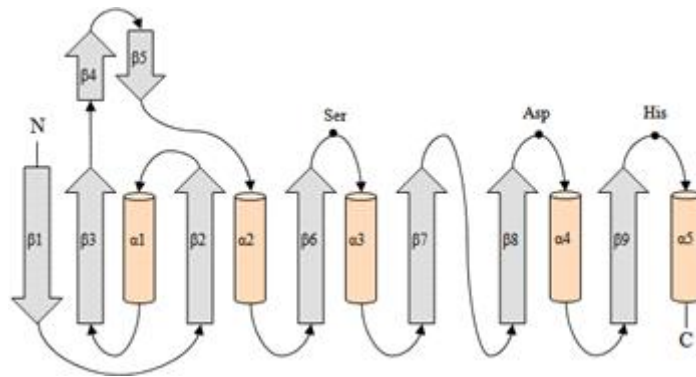


Fig. 18. Sequence alignment of H8 with other enzymes and their common secondary structure.

- 한편, 단백질 서열에 유사성이 전혀 없지만, 3차구조가 매우 유사한 세균유래의 esterase 효소를 찾을 수 있었다. *Bacillus subtilis* esterase (IISP)의 경우, 단백질의 크기가 H8 효소와 유사하고, 2차구조가 동일함을 밝혔다.

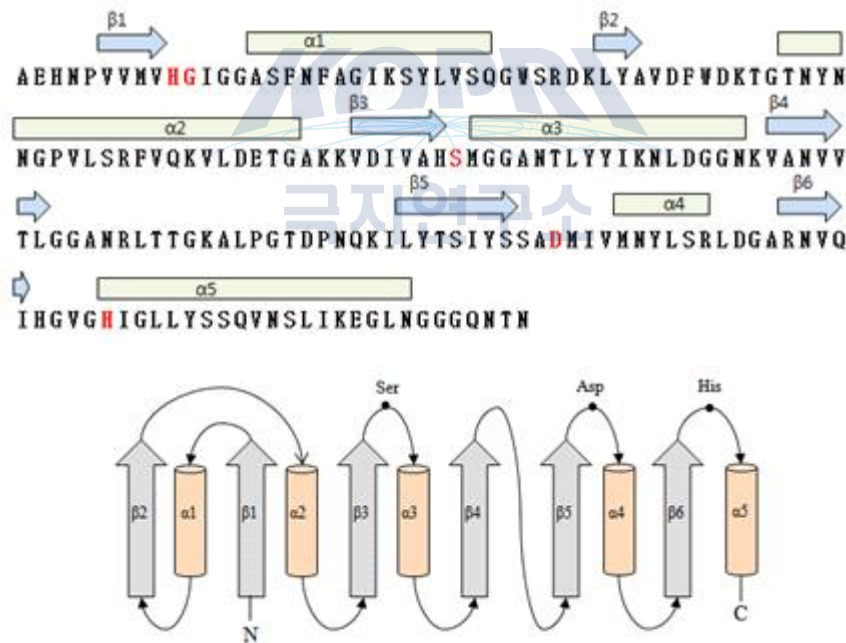


Fig. 19. *Bacillus subtilis* lipase sequence and its 2nd structure.

- 4가지 단백질(H8, 1AUO, 3CN9, IISP)의 서열 상동성을 ClustalW 방법으로 계산한 결과, H8은 1AUO 및 3CN9 와 40% 정도의 상동성을 보였지만, IISP와는 상동성을 거의 보이지 않았다. 단백질 서열이 전혀 다름에도 불구하고, 단백질의 2차구조 및 3차구조가 거의 유사한 점이 매우 흥미로운 점이다.

Table 6. Sequence identity of H8 and other enzymes

Enzyme	Percent identity (%)			
	H8	1AUO	3CN9	1ISP
H8	100	40.4	39.9	7.7
1AUO		100	61.0	8.3
3CN9			100	9.4
1ISP				100

1AUO, *Pseudomonas fluorescens* lipase

3CN9, *Psueomonas aeruginosa* lipase

1ISP, *Bacillus subtilis* esterase

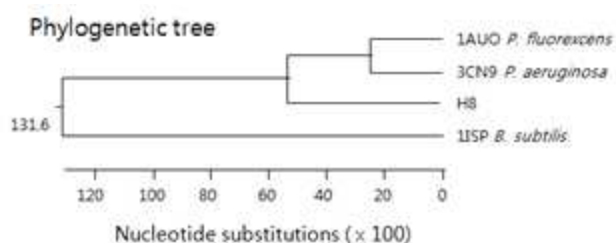


Fig. 20. phylogenetic tree of H8 enzyme and other 3 enzymes.

- 4가지 단백질의 활성부위 (oxyanion hole, catalytic triad)를 비교한 결과, 단백질 전체 서열의 차이에도 불구하고, oxyanion hole 부위와 serine 부위가 잘 보존되어 있고, aspartic acid 및 histidine 부위도 어느 정도 보존 되어있음을 알 수 있다.
- 4가지 효소의 활성 정도, 온도, pH, 기질특이성을 비교함으로써 효소 구조와 효소 특성의 차이를 조사하고, H8 효소의 활성 및 특성 개량을 수행하기 위한 비교 데이터로 사용하고자 한다.

Enzyme	Catalytic region	
H8	--VLHGLG--	--GFSQG--
1AUO	--VLHGLG--	--GFSQG--
3CN9	--VLHGLG--	--GFSQG--
1ISP	--MVHGIG--	--AHSMT--
H8	--THDPV--	--MAHQV--
1AUO	--SQDDV--	--MGHEV--
3CN9	--QYDDV--	--MGHEV--
1ISP	--SADM I--	--VGHIG--

1AUO, *P. fluorescens* lipase; 3CN9, *P. aeruginosa* lipase; 1ISP, *B. subtilis* esterase

Table 7. Catalytic site alignment within H8 and 3 other enzymes.

- H8 효소에 대해서 다양한 길이의 기질에 대해서 docking modeling을 수행하였음. 사용한 기질에는 p-nitrophenyl acetate (C₂), butyrate (C₄), hexanoate (C₆), octanoate (C₈), decanoate (C₁₀), dodecanoate (C₁₂) 이었으며, 그 결과, p-nitrophenyl caproate에

대해서 가장 binding energy 값이 낮게 계산되었다. 이 결과는 실제로 기질을 사용해서 구한 기질특이성과 일치하는 것으로 나타났다.

- Docking modeling을 통해서 기질과 결합하는 아미노산을 확인하고, rational design을 통해서 기질에 대한 결합력이 향상된 변이 효소를 개발하면, 효소의 활성을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.

Table 8. Average binding energy with various substrates.

Ligand (Carbon length)	pN-Acetate (C ₂)	pN-Butyrate (C ₄)	pN-Hexanoate (C ₆)	pN-Octanoate (C ₈)	pN-Decanoate (C ₁₀)	pN-Dodecanoate (C ₁₂)
Average Binding Energy (kcal/mol)	N.D.	-4.42	-6.09	-4.37	-4.49	-4.24

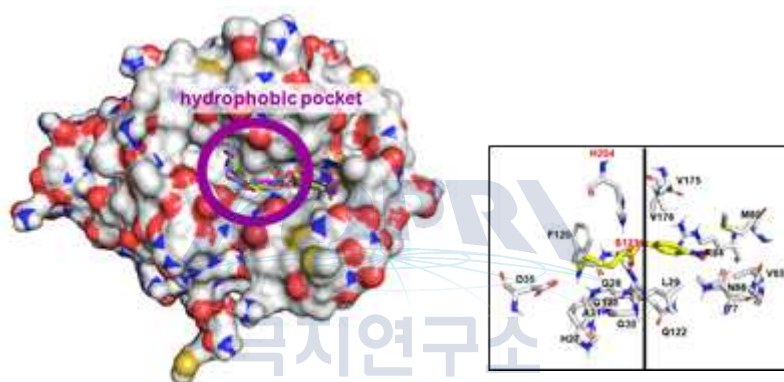


Fig. 21. Hydrophobic pocket of H8 enzyme and docking model of H8 enzyme with p-nitrophenyl hexanoate.

2절. 분자진화기법을 이용한 EstPNH8 변이효소 개발

- H8 효소에 대해서 돌연변이를 유도하여 향상된 효소를 개발하기 위하여 두 가지의 분자진화기법을 활용하였다.
- Error-prone PCR기법을 이용한 random mutagenesis 기법과 효소의 3차원 구조 분석을 수행한 후, site-directed mutagenesis 기법을 사용하였다.
- 분자진화 기법으로 돌연변이 효소를 개발한 과정은 다음과 같다.

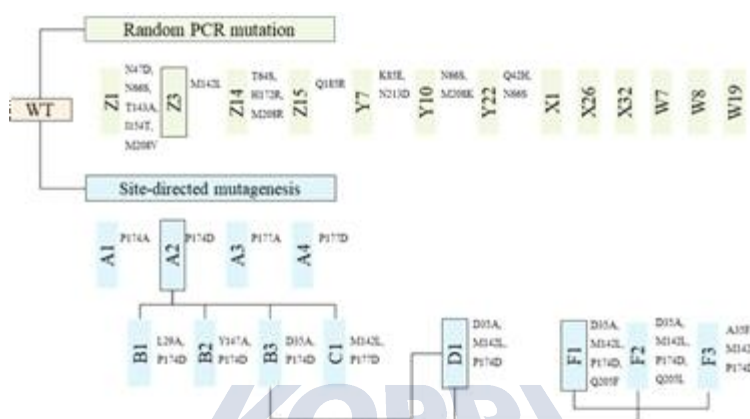


Fig. 22. Overview of mutant development

- Random mutagenesis를 통해서 개발한 돌연변이 효소의 활성을 측정하여 WT과 비교한 결과, Z3 (M142L) 변이효소의 활성이 가장 높은 것을 확인함.
- Site-directed mutagenesis 기법을 사용하여 효소의 루프구조, 활성부위 부근의 아미노산 서열을 변화시켰고, C6 기질에 대해 활성이 향상된 개체를 선별하였다.

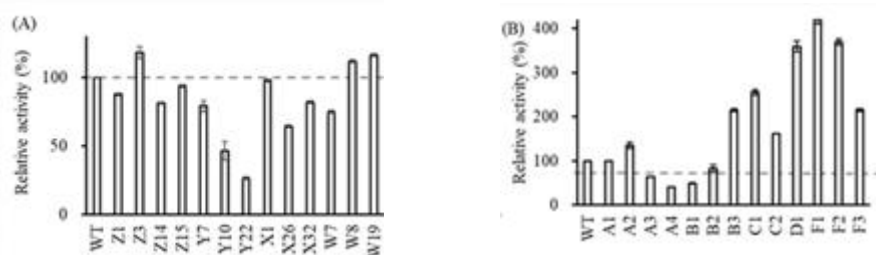


Fig. 23. Comparison of enzyme activities of EstPN8 mutants.

(A) Activities of randomly mutated clones (Wn-Zn) obtained by error-prone PCR. (B) Activities of site-directed mutants (An-Fn).

- 최종적으로 만들어진 돌연변이는 F1 (D35A, M142L, P174D, Q205F) 이고, F1은 WT보다 약 4배 향상된 activity를 보였다. 교체된 아미노산 중 특히 D35A, Q205F가 기질이 결합할 때 활성부위 근처에서 기질결합효율을 증가시켜 효소의 활성을 증가시키는 것으로 추측된다.

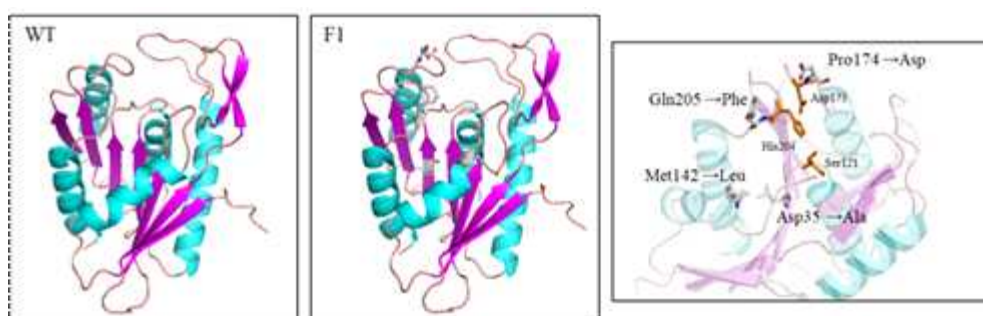


Fig. 24. Structures of the wild type and F1 mutant.

- 이후 특성연구에서는 F1이 WT과 유사한 양상을 가지고 있음을 확인했다.
- C6 기질에 대해 가장 높은 특이성을 가지고 있으며, 최적 온도는 40-50°C, 최적 pH는 7-9 이다.

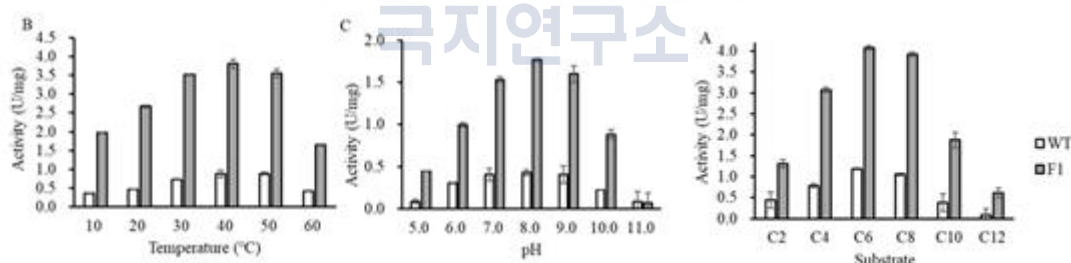


Fig. 25. Comparison of wild-type (EstPN8) and F1 mutant.

(A) Substrate specificity toward p-nitrophenyl esters with different acyl-chain lengths (C2, C4, C6, C8, C10, C12). (B) Esterase activity between EstPN8 and F1 at various temperatures (10-60 °C). (C) Esterase activity between EstPN8 and F1 at various pH buffers (pH 5-11).

- C6 기질의 농도를 10 mM 부터 200 mM 까지 증가시키면서 효소 활성을 구하고 lipase H8의 kinetic parameter를 측정하였다.
- WT의 C6 기질에 대한 K_M 값은 144 μM 이지만, F1은 100 μM 으로 감소하였다.
- WT의 k_{cat} 값은 81.2 min^{-1} 에서 F1의 k_{cat} 값은 283 min^{-1} 으로 증가하였고, 촉매 효율(k_{cat}/K_M)은 0.562 $\mu M^{-1}\text{min}^{-1}$ 에서 2.825 $\mu M^{-1}\text{min}^{-1}$ 으로 약 5배 향상되었다.

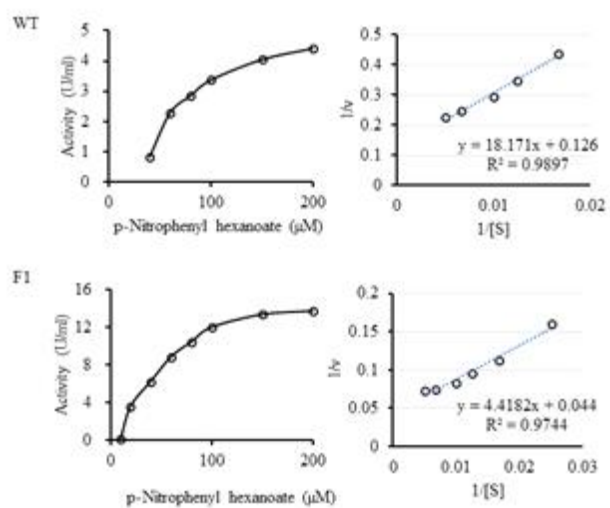


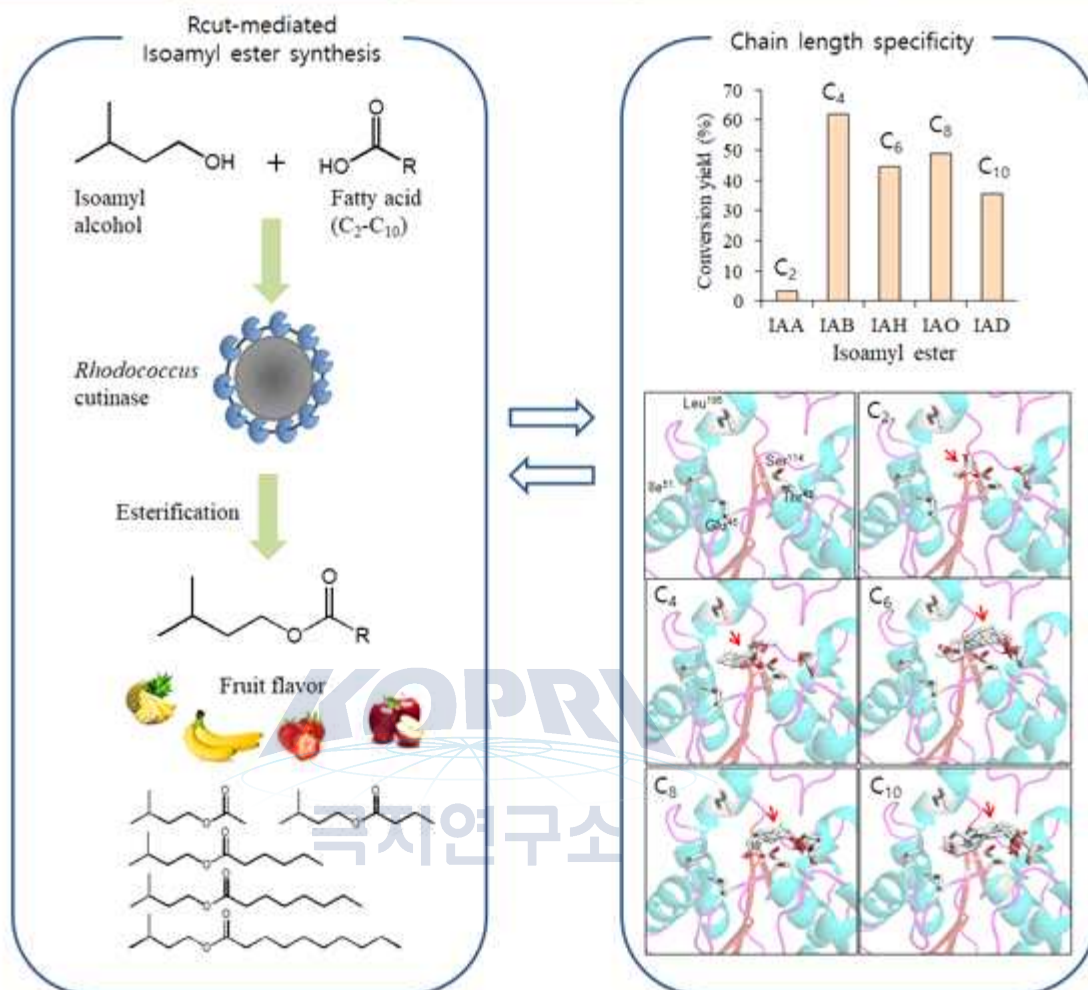
Fig. 4. Kinetic analysis of WT,F1.

Table. Kinetic parameters of WT and F1.

	WT	F1
$V_{\max}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	7.94	22.7
k_{cat} ($1/\text{min}$)	81.2	283
K_M (μM)	144	100
k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	0.562	2.825

3절. *Rhodococcus* Rcut 효소를 이용한 향미소재 합성

- 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-gamiTM 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 세린의 에 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.



- Journal of Microbiology and Biotechnology 저널 2024년 6월호에 논문이 게재됨.



4절. 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소

- 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.
- 특허등록: 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소 및 그 변이체 (등록번호 대한민국 제1027106940000호, 등록일자 2024년 9월 23일)



제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절. 성과목표 달성도

성과목표	세부목표		달성 주용내용	달성도(%)
1. 극지 유래 다기능 리파아제 발굴 및 재조합 리파아제 생산	1-1	기존 발굴 효소의 특성/구조 분석	- 극지 미생물 유래의 리파아제 PNH8를 대량으로 생산함. - H8 효소를 순수하게 분리함. - 온도, pH, 기질특이성, kinetic parameter를 조사함.	100
	1-2	극지 유래 다기능 리파아제 발굴	- 리파아제 유전자의 shotgun cloning 성공 - 리파아제 유전자의 서열분석 완료 - 리파아제 유전자의 PCR cloning을 통해서 pET22 벡터 클로닝 - 재조합 리파아제의 대량 생산	100
2. 저온성 변이 리파아제의 개발	2-1	변이효소 라이브러리 생산	- epPCR을 이용한 리파아제 변이 효소 라이브러리 제조 - 변이 효소 라이브러리를 이용한 변이 효소 생산 - 활성이 증가된 변이효소 스크리닝 시스템 개발	100
	2-2	저온 변이효소의 선별, 특성규명	- 개발된 스크리닝 시스템을 이용해서 활성이 증가된 변이효소 선별 - 저온성 변이 효소의 선별	100
3. 저온성 리파아제를 이용한 기능성 소재 생산	3-1	기능성 소재 생산	- 고정화 효소를 이용한 향미 성분의 생산 - Isoamyl butyrate 생산조건 최적화 및 분리 방법 개발	100
	3-2	기능성소재의 활성 조사	- 리파아제를 이용해서 합성한 페놀 리피드의 항산화, 항균 활성, 비극성 용매 용해도 조사	100

2절 세부목표 달성 내용

1. 극지 미생물 유래 리파아제의 특성규명

☐ 성과목표 1: 극지 유래 다기능 리파아제 발굴 및 재조합 리파아제 생산

○ 세부목표 1-1: 효소의 특성/구조 분석

연구 내용	연구 결과
리파아제 효소의 생산, 분리, 특성 규명	- 극지 미생물 유래의 리파아제 PNH8를 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)에서 대량으로 생산함. - H8 효소를 Ni-NTA 컬럼, gel filtration 컬럼을 통해서 순수하게 분리함. - 온도, pH, 기질특이성, kinetic parameter를 조사함. - H8 효소의 homology model, docking model을 연구함.

○ 세부목표 1-2: 극지 유래 다기능 리파아제 발굴

연구 내용	연구 결과
극지 유래 리파아제의 발굴	- 극지유래 리파아제 유전자의 shotgun cloning 성공 - 리파아제유전자의 서열분석 및 단백질 서열 분석 완료 - 리파아제 유전자의 PCR cloning을 통해서 pET22 벡터 클로닝 - 재조합 리파아제의 대량 생산

☐ 성과목표 2: 저온성 변이 리파아제 발굴

○ 세부목표 2-1: 변이 효소 라이브러리 생산

연구 내용	연구 결과
변이 효소 라이브러리 생산	- epPCR을 이용한 리파아제 변이 효소 라이브러리 제조 - 변이 효소 라이브러리를 이용한 변이 효소 생산 - 활성이 증가된 변이효소 스크리닝 시스템 개발

○ 세부목표 2-2: 변이효소의 선발, 특성 규명

연구 내용	연구 결과
변이효소의 선발, 특성 규명	- 개발된 스크리닝 시스템을 이용해서 활성이 증가된 변이효소 선발 - 저온성 변이 효소의 선발

□ 성과목표 3: 저온성 리파아제를 이용한 기능성 소재 생산

○ 세부목표 3-1: 기능성 소재 생산

연구 내용	연구 결과
기능성 소재 생산	- 고정화 효소를 이용한 향미 성분의 생산 - Isoamyl butyrate 생산조건 최적화 및 분리 방법 개발

○ 세부목표 3-2: 기능성 소재 활성 조사

연구 내용	연구 결과
기능성 소재 활성 조사	- 리파아제를 이용해서 합성한 페놀 리피드의 항산화, 항균 활성, 비극성 용매 용해도 조사 - 기능성 리피드의 Edge activator 기능 조사

3. 논문발표 실적

- 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, by immobilized *Rhodococcus* cutinase. J. Microbiol. Biotechnol. 34(6): 1356-1364. <https://doi.org/10.4014/jmb.2402.02033>
- Ye Won Jeon, Jun O Lee, Hyung Kwoun Kim (2026) Biochemical characterization of an Antarctic *Psychrobacter nivimaris* esterase and its catalytically enhanced mutants. (In preparation)

4. 특허등록 및 출원 실적

- "특허등록: 크로세이박터 아틀란티쿠스 유래 지질분해효소 및 그 변이체 (등록번호 대한민국 제1027106940000호, 등록일자 2024년 9월 23일)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절 학술적 활용계획

1. 신규 특수기능 효소 발굴:

- 남·북극 등 극한 환경의 미생물로부터 분리한 리파아제(Lipase)는 기존에 보고되지 않은 새로운 단백질 서열을 보유할 가능성이 높습니다.
- 이를 통해 저온 활성, 기질 특이성, 염분 및 유기용매 내성 등 차별화된 기능을 갖춘 신규 효소 자원을 확보할 수 있습니다.



2. 구조-기능 상관관계 규명 및 효소 개량:

- 저온 활성과 비활성(Specific activity)이 우수한 효소를 대상으로 단백질 구조 분석 및 작용 기작 연구를 수행할 것입니다.
- 이러한 기초 연구 데이터는 효소 공학(Enzyme Engineering) 기술과 결합하여, 산업적 수요에 최적화된 맞춤형 인공 저온 효소 개발의 토대가 될 것입니다.

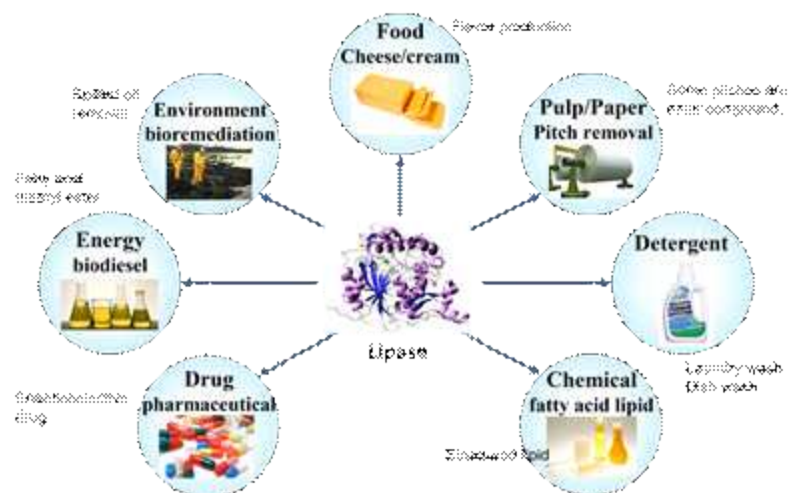
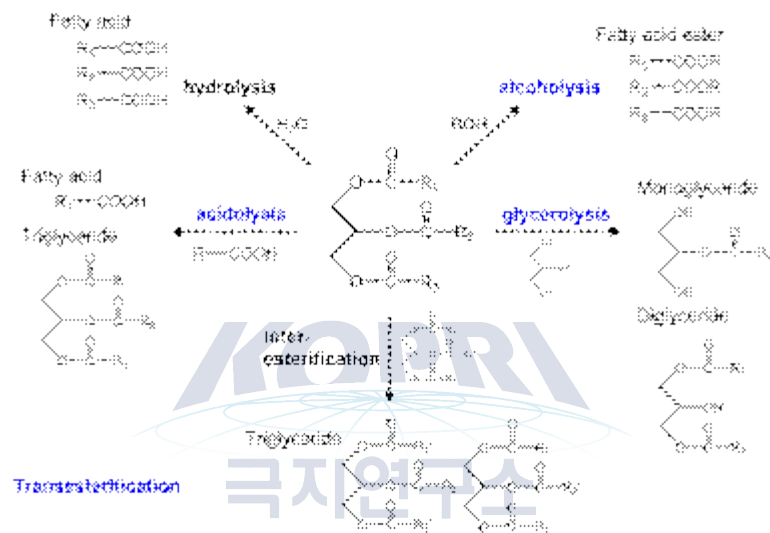
3. 열 민감성 물질의 효소 반응 공정 수립:

- 저온성 효소를 활용하면 상온이나 고온에서 변성·분해되기 쉬운 기질을 안정적으로 반응시킬 수 있습니다.
- 특히 DHA, EPA와 같은 다불포화지방산(PUFA)은 상온에서 산화되어 산화물(conjugated diene/triene)을 형성하기 쉬우나, 저온 공정을 적용함으로써 지질 산화를 억제하고 고순도의 페놀릭 에스테르(Phenolic ester)를 효율적으로 합성할 수 있습니다.

2절 경제적 활용계획

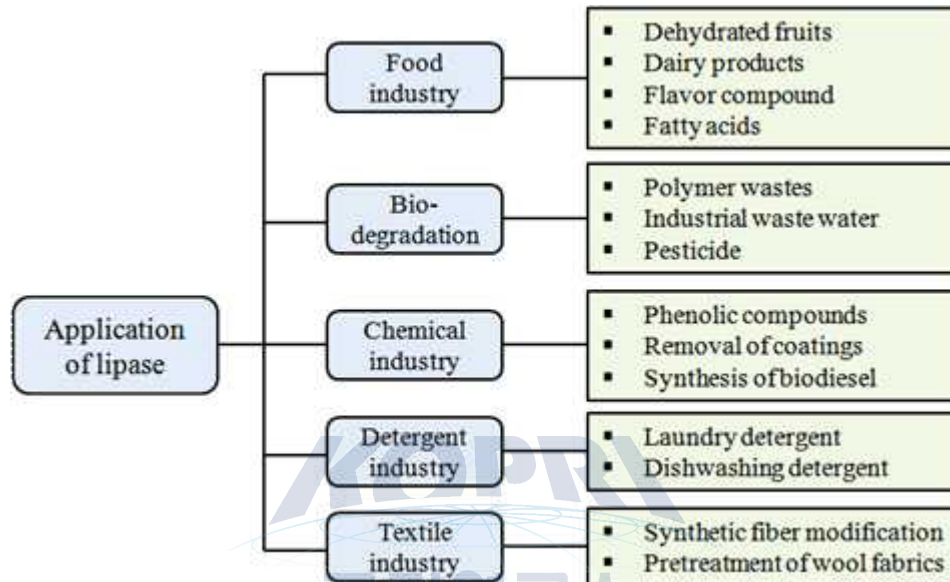
1. 기존 상업용 효소 대체 및 신시장 창출:

- 리파아제는 세제, 식품, 화장품, 제약 등 다양한 산업에서 필수적인 촉매입니다.
- 현재 CalB 등 특정 균주 유래 효소가 시장을 점유하고 있으나, 극지 유래 신규 리파아제를 대량 생산하고 비드 고정화 기술을 적용한다면 기존 수입 효소를 대체함은 물론 고부가가치 신산업을 창출할 수 있을 것으로 기대됩니다.



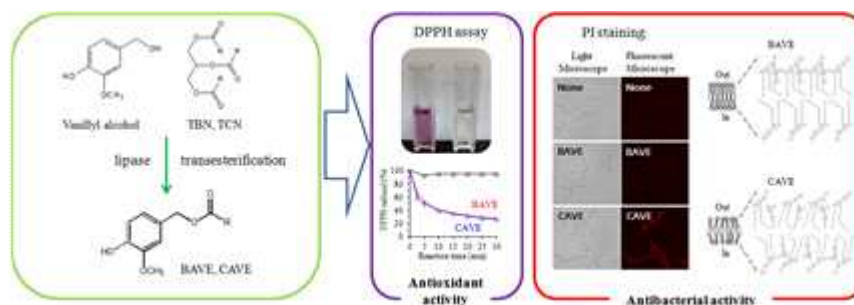
2. 산업별 다각적 활용:

- 식품: 과채 가공품, 유제품, 향미 성분 및 지방산 제조.
- 환경: 고분자 폐기물, 산업 폐액, 살충제 등의 바이오 분해 및 정화.
- 화학/에너지: 페놀 화합물 합성, 코팅제 제거, 바이오디젤 생산.
- 기타: 의류·식기용 세제 및 섬유 가공 전처리 공정.



3. 천연 항산화제 시장 대응:

- 기존 합성 항산화제인 BHT와 BHA는 지질 산화 방지 효과는 뛰어나나, 휘발성, 불안정성 및 발암 가능성 등의 안전성 이슈로 사용이 감소하고 있습니다.
- 리파아제를 이용해 천연물 유래 신규 항산화제를 개발한다면, 안전성이 담보된 프리미엄 항산화제 시장을 선점할 수 있습니다.



4. 고기능성 페놀릭 에스테르 소재화:

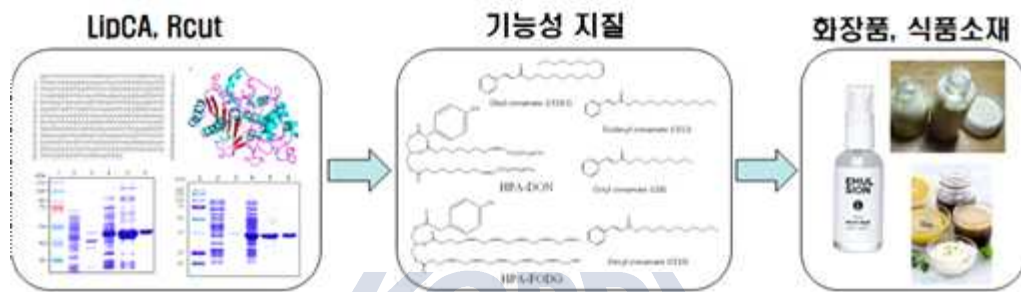
- 페놀릭 산/알코올에 지방산/지방족 알코올을 결합한 에스테르 화합물은 비극성

용매 내 용해도가 크게 향상됩니다.

- 이렇게 합성된 페놀릭 에스테르는 항산화, 항균, 항알칼로이드 활성을 동시에 보유하여 화장품, 식품, 제약 산업의 핵심 소재로 활용 가치가 매우 높습니다.

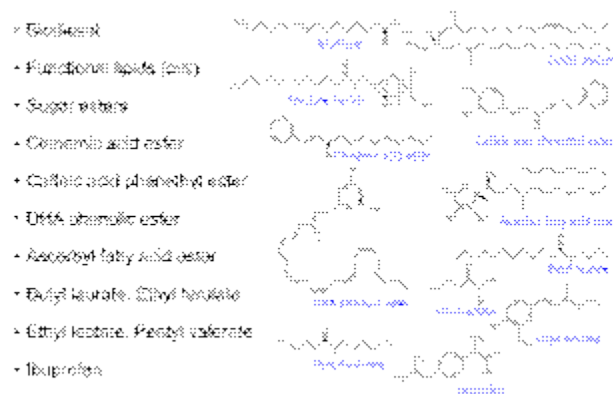
5. 극지 미생물 유래 효소의 상용화:

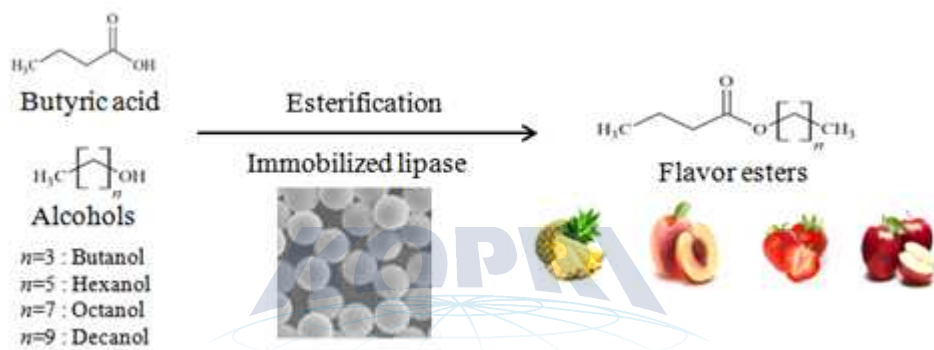
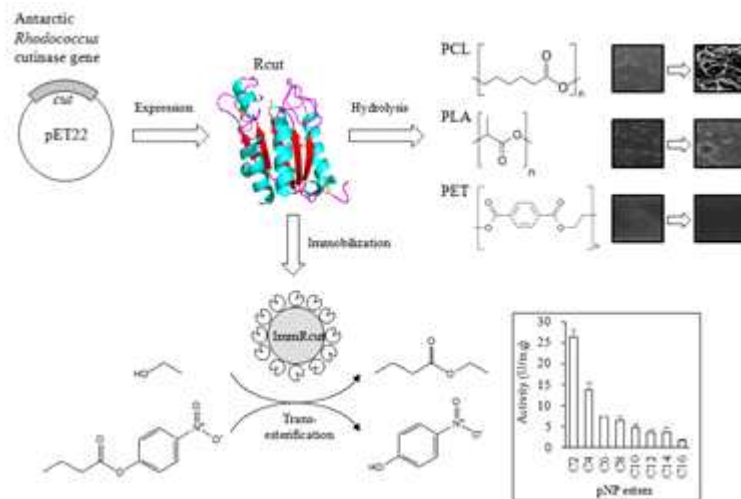
- 극지 미생물(*Croceibacter atlanticus*, *Rhodococcus* 등)에서 발굴한 LipCA, Rcut 효소를 활용하여 다양한 기능성 지질 화합물을 합성함으로써, 천연 유래 화장품 및 식품 소재 개발의 원천 기술을 확보할 것입니다.



6. 고정화 효소를 이용한 고효율 공정 구축:

- 극지 리파아제를 비드에 고정화하여 공정 재사용성을 높이고, 이를 통해 식품 산업에서 수요가 높은 단쇄·중쇄 기능성 지질 및 향미 물질을 경제적으로 생산할 수 있습니다.





제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

- Jochens H, Hesseler M, Stiba K, Padhi SK, Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. Protein engineering of α/β hydrolase fold enzymes. *Chembiochem*. 2011; **12**:1508–17.
- Dahiya D, Singh Nigam P. Sustainable biosynthesis of esterase enzymes of desired characteristics of catalysis for pharmaceutical and food industry employing specific strains of microorganisms. *Sustainability*.2022; **14**:8673.
- Barzkar N, Sohail M, Tamadoni Jahromi S, Gozari M, Poormozaffar S, Nahavandi R, et al. Marine bacterial esterases: Emerging biocatalysts for industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.2021; **193**:1187–214.
- Rafeeq H, Hussain A, Shabbir S, Ali S, Bilal M, Sher F, et al. Esterases as emerging biocatalysts: Mechanistic insights, genomic and metagenomic, immobilization, and biotechnological applications. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2022; **69**:2176–94.
- Panda T, Gowrishankar B. Production and applications of esterases. *Applied microbiology and biotechnology*. 2005; **67**:160–9.
- Kim J-T, Kang SG, Woo J-H, Lee J-H, Jeong BC, Kim S-J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007; **74**(4):820–8.
- Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Dos Santos VAM, Yakimov MM, et al. Microbial enzymes mined from the Urania deep sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry & biology*. 2005; **12**(8):895–904.
- Liu X, Zhou M, Sun R, Xing S, Wu T, He H, et al. Characterization of a Novel Esterase Est33 From an Antarctic Bacterium: A Representative of a New Esterase Family. *Frontiers in Microbiology*. 2022; **13**:855658.
- Gao W, Wu K, Chen L, Fan H, Zhao Z, Gao B, et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. *Microbial Cell Factories*. 2016; **15**(1):41.
- Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*. 2002; **26**(1):73–81.

- Park SH, Kim S j, Park S, Kim HK. Characterization of organic solvent-tolerant lipolytic enzyme from *Marinobacter lipolyticus* isolated from the Antarctic Ocean. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2019; **187**(3):1046–60.
- Bornscheuer UT, Pohl M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current opinion in chemical biology*. 2001 ;**5**(2):137–43.
- Jones BJ, Lim HY, Huang J, Kazlauskas RJ. Comparison of five protein engineering strategies for stabilizing an α/β hydrolase. *Biochemistry*. 2017; **56**(50):6521–32.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *nature*. 2021; **596**(7873):583–9.
- Peng Y, Fu S, Liu H, Lucia LA. Accurately determining esterase activity via the isosbestic point of p-nitrophenol. *BioResources*. 2016 ;**11**(4):10099–111.
- Guo H, Zhang Y, Shao Y, Chen W, Chen F, Li M. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant esterase from *Monascus ruber* M7. *Extremophiles*. 2016; **20**(4):451–9.
- Won S-J, Jeong HB, Kim H-K. Characterization of novel salt-tolerant esterase isolated from the marine bacterium *Alteromonas* sp. 39-G1. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2019; **30**(2):216.
- Wang G, Wang Q, Lin X, Bun Ng T, Yan R, Lin J, et al. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. *Scientific reports*. 2016; **6**(1):19494.
- Marchetti A, Orlando M, Mangiagalli M, Lotti M. A cold-active esterase enhances mesophilic properties through Mn²⁺ binding. *The FEBS Journal*. 2023; **290**(9):2394–411.
- Noby N, Johnson RL, Tyzack JD, Embaby AM, Saeed H, Hussein A, et al. Structure-guided engineering of a family IV cold-adapted esterase expands its substrate range. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; **23**(9):4703.
- Choo D-W, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; **64**(2):486–91.
- Song HM, Kim HK. Production of octyl butyrate using psychrophilic mutant lipase from *Croceibacter atlanticus* LipCA lipase developed by a molecular evolution technique. *Enzyme and Microbial Technology*. 2024; **173**:110370.
- He Y, Sun Z, Zhang X, Xing S, He H, Bielicki JK, et al. Expression and characterization of Est2: a novel cold-adapted esterase from Antarctic bacterium defining the new esterase family XXII. *Frontiers in Microbiology*. 2025; **16**:1662394.

Maester TC, Pereira MR, Malaman AMG, Borges JP, Pereira PAM, Lemos EG. Exploring metagenomic enzymes: A novel esterase useful for short-chain ester synthesis. *Catalysts*. 2020; **10**(10):1100.

Jeon JH, Lee HS, Kim JT, Kim S-J, Choi SH, Kang SG, et al. Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;**93**(2):623–31.



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.