보안과제[ ] 일반과제[○] (제출용)

BSPN24014-007-12
NRF-2021M1A5A1075524
RS-2021-NR056064

(총괄) NRF-2021M1A5A1065407 / (세부) NRF-2021M1A5A1075524
(위탁) NRF-2022M1A5A1034723 / NRF-2022M1A5A1034884
(1단계) (KOPRI) (BSPN21014 / PN22014) / (2단계) (PN23014 / PN24014)

해양극지기초원천기술개발사업
(Brain Research Program)

(총괄) 북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발
(Circum-Arctic Environmental Changes: Monitoring, Assessment, Projection, and Adaptation Strategy Development)(CA-MAP)

(4세부과제) 환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발
(Development of microbial enzymes degrading recalcitrant materials from the Arctic Circle)

2025. 11. 06.

한국해양과학기술원부설
극지연구소

과학기술정보통신부

제 출 문

과학기술정보통신부 장관 귀하

이 보고서를 “북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발“ (총괄과제)의 4세부과제 “환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발“)의 최종 보고서(연구기간: 2021.04.27～2025.03.31)로 제출합니다.

2025년 11월 05일

주관연구기관명 : 한국해양과학기술원부설
극지연구소(‘21.04～ ‘25.03)
4세부과제 연구책임자 : 김한우
연 구 원 : 김민서, 남예원, 도학원, 신승철, 원석재, 유선희, 이민주, 이준혁, 정찬수, 최 웅, 황지섭
(이상 극지연구소)

1위탁연구기관명 : 경북대학교
위탁연구책임자 : 김상우(‘21.04～ ‘23.12)
연 구 원 : 유완기
(이상 성균관대학교)

2위탁연구기관명 : 서울대학교
위탁연구책임자 : 김효진(‘21.04～ ‘23.12)
연 구 원 : 구단열
(이상 서울대학교)
(이상 성명 가나다순)

(본 보고서는 2021.04.27부터 2025.03.31.까지 정부(과학기술정보통신부/한국연구재단)로부터 지원받은 해양·극지기초원천기술개발사업의 일환으로 수행한 연구활동의 최종 보고서로서, 1단계(2021.04.27.～2022.12.31)와 2단계(2023.01.01～2025.03.31)의 전체 연구개발기간의 연구개발과제 수행에 참여한 4세부과제와 위탁과제의 연구내용을 담고 있다(근거 : “한국연구재단 지원사업 관련 법규집” 제12조5항, vol.2021.01.01.).

이에 당초 연차실적계획서에서 제시한 1단계와 2단계의 연구목표와 내용 및 범위 등의 모든 내용이 연속적으로 기술되어야 하므로, 보고서의 연구수행 내용 중 1단계 보고서에서 기술한 내용과 부분적으로 불가피하게 중복될 수 있음을 밝혀 둔다.

최종보고서

보안등급
일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	과학기술정보통신부	사업명	사업명	거대과학연구개발사업
전문기관명(해당 시 작성)	한국연구재단		내역사업명	해양극지기초원천기술개발
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호		2021M1A5A1075524

기술분류							
국가과학기술 표준분류	ND1104	40%	LA0601	30%	LA0606	30%
부처기술분류 (해당 시 작성)	G20905	70%	G21101	30%		

총괄연구개발명	국문	북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발
	영문	Circum-Arctic Environmental Changes: Monitoring, Assessment, Projection, and Adaptation Strategy Development (CA-MAP)
연구개발과제명 (4세부과제)	국문	환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발
	영문	Development of microbial enzymes degrading recalcitrant materials from the Arctic Circle
1위탁과제명	국문	환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발
	영문	Identification of cold-active plastic-degrading enzymes for removing microplastic
2위탁과제명	국문	유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발
	영문	*Paenibacillus* based recalcitrant waste treatment research platform by CRISPR-Cas9 genome editing system

주관연구개발기관	기관명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	사업자등록번호	134-82-06870
	주소	(우)21990 인천시 연수구 송도미래로26	법인등록번호	131471-0018173
연구책임자	성명	김한우	직위	책임연구원
	연락처 직장전화	032-760-5526	휴대전화	010-3472-1326
	연락처 전자우편	bylee@kopri.re.kr	국가연구자번호	1011 2267

연구개발기간	전체		2021. 04. 27. - 2025. 03. 31. (4년 개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 27. - 2022. 12. 31. (1년 9개월)
		2단계	2023. 01. 01. - 2025. 03. 31. (2년 3개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		1,635,000							1,635,000		1,635,000	
1단계	1년차	380,000							380,000		380,000	
	2년차	500,000							500,000		500,000	
2단계	1년차	500,000							500,000		500,000	
	2년차	255,000							255,000		255,000	

KOPRI 극지연구소

극지기초원천기술개발사업 최종보고서
(평가/제출용, 세부과제용)

① 부처사업명(대)	거대과학연구개발사업	④ 보안등급(보안, 일반)	일반
② 사업명(중)	해양극지기초원천기술개발	⑤ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초
③ 세부사업명(소)	해양극지기초원천기술개발		
⑥ 총괄과제명	북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발		
⑦ 세부과제명	국 문	환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발	
	영 문	Development of microbial enzymes degrading recalcitrant materials from the Arctic Circle	
⑧ 주관연구기관명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	⑨ 사업자 등록번호	134-82-06870
⑩ 위탁과제기관명	경북대학교, 서울대학교		
⑪ 주관연구책임자	성 명	김한우	국가연구자번호 1011 2267
	전 공	단백질 공학	직급(직위) 책임연구원
	소속부서	저온신소재연구단	전자우편 hwkim@kopri.re.kr
	전 화	032-760-5526	휴대전화 010-3472-1326

⑫ 연구개발비 현황(단위: 천원)

년 도	정부 출연금 (A)	기업체부담금			정부외출연금 (B)	합계 G=(A+B+E)	상대국 부담금 (F)
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)			
1차년도	380,000					380,000	
2차년도	500,000					500,000	
3차년도	500,000					500,000	
4차년도	255,000					255,000	
5차년도							
6차년도							
7차년도							
8차년도							
합계	1,635,000					1,635,000	

⑬ 총연구기간	2021. 04. 27. - 2025. 03. 31. (48개월)						
⑭ 다년도연구기간	2023. 01. 01. - 2025. 03. 31. (27개월)						
⑮ 당해연도연구기간	2024. 01. 01. - 2025. 03. 31. (15개월)						
⑯ 참여기업 수	중소기업		중견기업		대기업		계
⑰ 국제공동연구	국가명		상대국 연구기관수		상대국 연구개발비		상대국연구책임자수
⑱ 실무담당자	성 명	장경국	휴대전화	010-9259-9299	전자우편	jk@kopri.re.kr	

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

주관연구책임자 : 김한우 (직인생략)

주관연구기관장 : 신형철 (직인생략)

과 학 기 술 정 보 통 신 부 장 관 귀하

ㅇ 공동연구개발기관 등 현황

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관							
위탁연구개발기관	경북대	김상우	연구교수	010-4661-5734	ksu93@knu.ac.kr	난분해 유기물질 분해 활성 검증 (2차년도부터 참여)	대학교
	서울대	김효진	부교수	010-9805-0199	erythritol@snu.ac.kr	극지미생물 기반 난분해성 물질 분해 유전자 교정 연구 플랫폼의 개발 (2차년도부터 참여)	대학교
연구개발기관 외 기관							

KOPRI 극지연구소

〈 요 약 문 〉

연구개발 목표 (500자 내외)	○ 환북극권 미생물로부터 생물정화와 바이오 화학산업에 활용성이 우수한 난분해 유기 물질을 분해하는 새로운 효소를 발굴 ○ 발굴된 효소와 기능성 단백질의 분자구조 기반의 활성기작 규명
연구개발 내용 (1000자 내외)	○ 환북극권 유래의 환경미생물 유전체 확보와 기능성 탐색을 위한 유전체 라이브러리 제작 ○ 환경미생물 유전체로부터 저온성 효소 단백질 발굴 ○ 효소 활성기반 대량 탐색을 통한 난분해 유기 물질인 리그닌, 오일류, 미세플라스틱를 가수분해할 수 있는 효소 확보 ○ 재조합 효소 단백질의 생산 및 정제 조건 확보 ○ 고기능성 가수분해 효소의 생화학적 특성 및 반응 생산물 분석 ○ 난분해 유기 물질 가수분해 효소의 단백질 삼차 구조 분석을 통한 분자 구조 수준에서 활성기작 이해 ○ 효소 단백질의 단백질 개량 기술 등을 적용하여 산업적 활용성 확대
활용계획 및 기대효과 (500자 내외) (응용분야 및 활용범위 포함)	○ 환북극권 미생물 자원을 활용함으로써 고부가가치의 미래 미생물자원을 발굴하고 데이터베이스 구축을 통한 미래 생명산업의 기반인 극지 고유의 생물자원을 확충 ○ 발굴된 효소의 생촉매기작 분석결과를 이용하여 바이오 의약, 화학, 에너지, 환경 정화기술 등의 다양한 산업군에서 활용성을 확대 ○ 극지 미생물 유전체 자원의 라이브러리 확보와 기능성 탐색을 통하여 새로운 생리 활성 물질 탐색 활용

국문핵심어 (8개)	환북극권	난분해 유기 물질	효소	생물정화
	미세플라스틱	동토층	단백질	미생물
영문핵심어 (8개)	Arctic Circle	recalcitrant material	enzyme	bioremediation
	microplastic	permafrost	protein	microorganism

KOPRI 극지연구소

〈 연구 분야 〉

코드구분	중심분야		관련분야1		관련분야2		관련분야3		관련분야4	
	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중
국가과학기술표준분류	ND1104	40 %	LA0601	20 %	LA0606	20 %	LA0804	20 %		%
국가과학기술표준분류 (적용분야)	Y05	100 %		%		%		%		%
과학기술 분야분류	G20905	70 %	G21101	30 %		%		%		%
6T 기술분류	020314	70 %	020114	30 %		%		%		%
NTRM 분류	B020216	60 %	B030316	40 %		%		%		%
원천기술 개발분야	0412	100 %		%		%		%		%

KOPRI 극지연구소

〈 보안 등급의 분류 및 결정사유 〉

보안 등급 분류 (선택)	보안	일반
	N	Y
결정 사유	연구책임자 의견	연구기관 자체 검토결과
	보안과제 해당없음	보안과제 해당없음

< 목 차 >

제1장. 연구개발 목표 및 평가항목별 성과 ····· 1
1. 연구개발 목표 ····· 3
2. 평가항목별 성과 ····· 5
3. 목표 미달 시 원인 분석 ····· 11
4. 연구개발 목표 및 주요내용 변경사항 ····· 11
5. 선정/단계/연차점검의견 ····· 13
제2장. 추진내용 · 연구결과 및 추진일정 실적 ····· 15
1. 추진내용 · 연구결과 ····· 17
2. 목표 달성 수준 및 추진일정 실적 ····· 76
제3장. 연구개발 결과의 활용 방안 ····· 79
1. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여정도 ····· 81
2. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ····· 81
3. 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 ····· 81
제4장. 당초 연구계획 대비 주요 변경사항 ····· 83

첨부1 연구개발 목표의 달성도 증빙 ····· 89
첨부2 연구개발결과 활용계획서 ····· 114
첨부3 자체평가의견서 ····· 123
첨부4. [해당 시] 연구개발성과 공개제한 요청사유서 ····· 126
첨부5. [해당 시] 청년 의무채용 관련 실적 ····· 126
첨부6. [해당 시] 참여기업 의견서 ····· 126

KOPRI 극지연구소

KOPRI
극지연구소

제 1 장

연구개발 목표 및 평가항목별 성과

KOPRI
극지연구소

KOPRI
극지연구소

1. 연구개발 목표

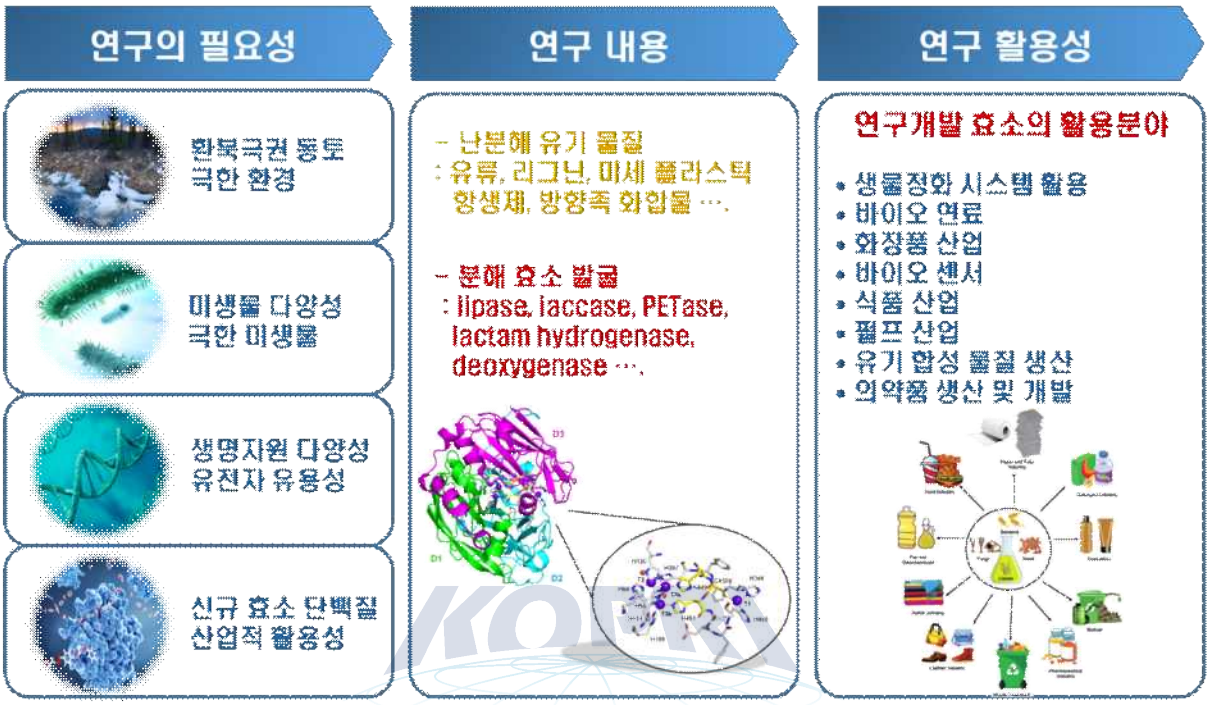
최종목표	환북극권 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발
세부목표	1. 환북극권 동토 유래 미생물 유전체로부터 난분해 유기 분해 효소 발굴 2. 분해 효소 단백질의 생촉매 활성 특성 분석 3. 효소 단백질의 구조와 기능 간의 관계 규명
연차별목표	1. 1단계 ○ 1년차: 환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구 ○ 2년차: 난분해 유기 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구 2. 2단계 ○ 3년차: 난분해 유기 물질 분해 효소의 생촉매 기능성 연구 ○ 4년차: 효소 단백질의 분자구조 분석과 활성기작 규명 최종 성과목표 ○ 효소와 기능성 단백질 5종 이상 확보 ○ SCI(E)급 논문 4편 이상 출판 ○ 특허등록 1건 이상.

KOPRI 극지연구소

위탁과제1 (경북대): 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴

위탁과제2 (서울대): 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발

유용 생물자원(연구 내용)



KOPRI
극지연구소

세부과제-4 : 유용 생물자원(연차별 정량성과 창출)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)
[정량성과] 환북극권 미생물 생명자원으로부터 난분해 물질 분해 효소 유전자 탐색 및 효소의 생촉매 반응 특성 연구	60	난분해 유기 분해 효소 발굴 및 효소 단백질의 생촉매 활성 특성 분석	1차년도 (1단계)	○ 활성 효소 유전자 분석 (SCI급 논문 1편 이상)
			2차년도 (1단계)	○ 발굴 효소의 생화학적 특성 연구 (SCI급 논문 1편 이상, 특허출원 2건 이상)
			3차년도 (2단계)	○ 효소 단백질 구조 정보 확보 (PDB 등록) ○ 발굴된 효소 및 기능성 단백질의 연구 (SCI급 논문 1편 ; 상위 20% 이내)
			4차년도 (2단계)	○ 단백질 구조 기반의 기능성 연구 (SCI급 논문 1편 ; 상위 20% 이내, 특허등록 1건 이상)
			최종	○ 환북극권 환경 미생물 유래 유용 효소 개발 연구 (SCI급 논문 4편; 상위 20% 논문 2편 포함), 특허출원 2건/등록 1건 이상)

❖ 나머지 가중치 40%는 계획서의 정성적인 항목(단백질 탐색, 구조분석, 활성기작 규명, 효소 발굴 및 개발 등)에 배정함

2 평가항목별 성과 (기간 : 2021.04.27.~2025.03.31.)

□ 4세부과제

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	달성도 (%)	관련증빙
(정량) 환북극권 미생물 유전체 라이브러리 제작을 통한 생명자원 확보 및 유전자 기능성 탐색	40	1	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 환북극권 동토 환경시료 유래의 미생물과 극지연구소 미생물 유전체 라이브러리 확보 (5×10^4 fosmid clone 이상) ▪ 기능성 효소 발굴을 위한 활성 기반 탐색 기술 확립	▪ PAMC에서 북극 유래 미생물의 유전체 라이브러리 (Fosmid library) 3건 획득 (8.7×10^4 fosmid clone) ▪ 구축된 미생물 유전체 라이브러리 (Fosmid library) 로부터 56종의 lipase/esterase 활성 클론 및 16종의 laccase 활성 클론 확보	100	1. 라이브러리 제작 결과 보고서 2. lipase/laccase 효소 활성 검증 사진
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 신규 또는 기존의 환경시료 전처리를 통한 미생물 유전체 라이브러리 확보 (2×10^4 fosmid clone 이상) ▪ 미생물 유전체로부터 난분해 유기 물질(리그닌, 오일류, 플라스틱 등) 분해 효소 유전자 발굴 (2종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	▪ 북극해 코어시료 상층부에서 51,333 fosmid clone 확보 ▪ 환경 미생물 유전체 라이브러리를 이용하여 lipase, laccase 등 총 20종의 fosmid clone sequence를 KPDC 등록	100	3. 라이브러리 제작 결과 보고서 4. KPDC 등록 리스트
			3차년도 (단계) (2단계 1차년도)	▪ 유전체 라이브러리를 이용한 효소 활성 기반 탐색기술의 고도화 연구	▪ PAMC 및 환경시료를 활용하여 구축된 북극 유래 미생물 유전체 라이브러리 (Fosmid library)로부터 4종의	100	5. lipase/esterase 효소 활성 검증 및 KPDC 등록번호

KOPRI 극지연구소

				▪ 난분해 유기 물질 분해 효소 유전자 발굴 (2종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	lipase/esterase 활성 클론 확보		
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 활성기반 탐색기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	▪ 고활성 Lipase 효소 단백질 유전자 5종과 플라스틱 분해 활성을 가지는 유전자 1종을 발굴하여 KPDC 등록	100	6. KPDC 등록 리스트
(정량) 효소 활성 기반 탐색을 통한 극지 유래 난분해 물질 분해 효소 유전자의 발현 생산 및 효소의 생촉매 반응 특성 연구	20	2	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 효소와 기능성 유전자의 발현 벡터 및 숙주 선정 ▪ 효소 단백질의 특성 연구 논문 1편 이상 (SCI급)	▪ 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 novel putative sugar isomerase 효소의 구조분석	100	7. 출판 논문 1건
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 난분해 유기 물질 분해 효소의 정제 단백질 확보, ▪ 발굴된 효소의 기질 특이성 및 효소학적, 생화학적 특성 분석 논문 1편 이상 (SCI급) ▪ 효소 단백질의 특허출원 2 건 이상	▪ 난분해 유기물질 분해 효소 esterase 4종의 생화학적 분석 및 단백질 구조 분석 완료 ▪ 극지 저온성 효소 단백질의 활용성 관련 특허 2건 출원	100	8. 출판 논문 4건 9. 특허출원 2건
			3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 단백질 구조 분석을 통해 도출된 정보를 이용한 효소의 생화학적 특성 비교 분석 논문 1편	▪ 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 신규 GHSR-type esterase 효소의 구조분석 논문 게재 (1건, 연구실적표 참고)	100	10. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐

KOPRI 극지연구소

				이상 (상위 20%)			
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석신규 발굴 ▪ 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상	▪ 환경오염 물질 선형 에폭사이드에 높은 특이성을 가지는 효소를 발굴하고, 기질 특이성 분석에 대한 연구 (논문 게재) ▪ 비타민 B12 합성과 관련된 효소의 단백질 구조와 활성기작 규명 (논문 게재) ▪ 극지 저온성 효소 단백질의 활용성 관련 특허 2건 (등록심사중)	90	11. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
(정성) 발굴된 효소와 기능성 단백질의 3차 구조 분석과 활성 기작 규명	20	3	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 효소와 기능성 단백질의 구조분석을 위한 단백질 결정 조건 탐색 및 최적화	▪ 저온성 미생물 (Flavobacterium psychrolimnae) 유래 dienelactone hydrolase 효소의 2.25Å 해상도의 삼차구조 해석	100	12. diienelactone hydrolase 효소의 삼차구조 PDB 일부 캡쳐 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 발굴된 효소 단백질의 X-ray 회절 실험을 통한 분자 구조 해석	▪ 저온성 단백질 (ScEst, LgEstI, 등) 5종의 X-ray 회절 기반의 분자 구조 해석 완료	100	13. 출판 논문 참조
			3차년도(단계) (2단계 1차년도)	▪ 단백질 구조 기반의 효소 단백질 기능 분석과 활성 기작 연구	▪ 저온성 미생물 유래의 플라스틱 분해 효소 EaBHETase, LaFae, EaEst2, LgEstI) 의 단백질 삼차구조 해석 관련 논문 게재 (3건, 연구실적표 참고)	100	14. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 활성의 증가/감소에 관여하는 분자구조를 규명하기 위한 단백질-기질 복	▪ 연구비삭감에 따른 해당내용 연구수행 불가		해당사항 없음

KOPRI 극지연구소

				합체 구조 분석			
(정성) 난분해 물질 분해 효소 및 기능성 단백질의 활성 특성을 이용한 응용 및 활용성 확대 연구	20	3	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보 ▪ 목적 효소군에 대한 활성 측정 방법 확립	▪ 북극 토양 미생물(Paenibacillus sp. R4) 유래의 신규 esterase PsEst3 효소의 다양한 합성기질에 대한 활성 데이터 확보	100	15. PsEst3 효소의 활성 데이터 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 효소 활성 기반의 유용 기능성 단백질 탐색 기술 확보. ▪ 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구	▪ 기질 배지를 이용한 lipase(2종), 항생제 내성 유전자(7종), ▪ 플라스틱 분해 효소(4종) 발굴 및 2차 검정 완료 ▪ 미생물 균주(P. xylanexedens)의 난분해성 물질에 따른 생장 분석 및 물질 이용 분석 정보 확보	100	16. 메타지놈 라이브러리를 이용한 기능성 탐색 결과물 사진 17. 플라스틱 분해 활성 사진 18. 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프
			3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 난분해 유기 물질 분해 효소를 생산하는 형질전환체 또는 효소 단백질을 이용한 생물정화 효능 분석	▪ 난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주 확보 ▪ 신규 미세플라스틱 분해 효소(EaBHETase와 HaBHETase)의 생물리화학적 특성 분석	100	19. 연차 보고서 (난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주 제작) 20. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 생촉매 효소 활성을 이용한 유용물질 생산 또는 반응생성물의 유용성 분석	▪ 연구비삭감에 따른 해당내용 연구수행 불가		해당사항 없음
합계	100						

KOPRI 극지연구소

□ 1위탁과제(경북대 : 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	달성도(%)	관련증빙
(정량) 극지 미생물내 잠재적 플라스틱 분해 효소의 탐색, 정제 및 특성 분석	35	1,2	2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 유전자재조합 기술을 이용한 E.coli 대량 정제 시스템의 확보	▪ 9종 신규 극지 미생물 유래 효소 탐색 ▪ 9종 신규 효소의 대량 정제 시스템 확보	100	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 1.실험결과1 2.논문1 3.논문2
(정성) 고정화 및 돌연변이를 통한 효소 안정성 및 기능 개선	15	1,2	2차년도 (1단계2차년도)	▪ High-throughput 시스템을 통해 플라스틱 분해 및 다기능 저온 효소의 발굴	▪ 4종 신규 효소 플라스틱 분해 활성 확인	100	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 4.실험결과2
(정량) 극지 미생물내 잠재적 플라스틱 분해 효소의 탐색, 정제 및 특성 분석	35	1,2	3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 4종 이상의 신규 미세플라스틱 분해 효소의 생물리화학적 특성 분석	▪ 신규 극지 미생물 유래 미세 플라스틱 분해 4종 탐색 및 분석 수행 ▪ 신규 극지 미생물 유래 유용 효소 3종 탐색 및 분석	100	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 5.논문3 6.실험결과3,4,5,6
(정성) 고정화 및 돌연변이를 통한 효소 안정성 및 기능 개선	15	1,2	3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 고정화 및 돌연변이 구축을 통한 효소 안정성 및 기능 개선	▪ 신규 탐색된 효소에 관하여 고정화 및 돌연변이 구축을 통해 효소 안정성 및 기능 개선을 수행	100	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 7.논문4 8.논문5 9.실험결과7
합계	100						

□ 2위탁과제(서울대 : 극지미생물 기반 난분해성 물질 분해 유전자 교정 연구 플랫폼의 개발)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	관련증빙
(정성) 난분해성 물질 분해를 위	*70*	*1,2*	2차년도 *(1단계 2차년도)*	▪ (달성률 100%) ▪ *P. xylanexedens*의 유전자 교정을 위한 Cas9과 sgRNA,	▪ *P. xylanexedens*의 유전자 교정에 사용 가능한 플라	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 1. 플라스미드 지도

한 *P. xylanexedens*의 유전자 교정 플랫폼 구축				repair template 등 시스템 확보	스미드 1건 제작	(map) (p. 26 참조)
			3차년도 *(2단계 1차년도)*	▪ **(달성률 100%)** ▪ 난분해성 물질 처리를 위한 *P. xylanexedens* 유전자 교정 균주 확보 및 확인	▪ *셀로바이오스 처리를 위한 유전자 교정 P. xylanexedens*의 균주 1건 제작	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 2. 유전자 교정 확인 전기영동 사진 (p. 27 참조)
(정량) *P. xylanexedens*의 야생 균주와 유전자 교정 균주의 특성 분석	*30*	*1,2*	2차년도 *(1단계 2차년도)*	▪ **(달성률 100%)** ▪ *P. xylanexedens* 야생 균주의 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석	▪ 균주의 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프 및 사진 데이터	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 3. 발효특성 분석 그래프 및 사진 파일 1건 이상 확보 (p. 26 참조)
			3차년도 *(2단계 1차년도)*	▪ **(달성률 100%)** ▪ *P. xylanexedens* 야생 균주의 난분해성 물질 처리를 위한 대사경로 분석 및 유전자 타겟 설정	▪ *확보된 난 분해성 물질인 셀로바이오스 타겟 클러스터 및 유전자*	[위탁보고서 관련 증빙 기재] 4. 유전자 경로 및 타겟 유전자와 그를 위한 sgRNA, repair DNA 목록 (p. 28 참조)
합계	100					

KOPRI 극지연구소

3. 목표 미달 시 원인 분석 (해당사항 없음)

4 연구개발 목표 및 주요내용 변경사항

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	–	• Tycho 장비 구매 (3천만원 이상 연구장비 구매)	• 효소 활성 검증을 위한 정밀 분석을 위한 장비의 조기 도입	2021.10.14. 심의결과 통보
	1단계 2차년도부터 위탁연구1(숙명여대)에 대한 연구추진 내용으로서 “미세플라스틱 분해효소 탐색효소의 생화학적 특성분석 효소 응용 기술 “ 대한 내용으로 공동연구를 계획함. (선정시 연구계획서에기 언급함).	• (위탁연구1, 숙명여대): 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴 • (위탁연구2, 서울대):유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발 ※ 당초 계획한 1개의 위탁연구(숙명여대)에서, 1개를 더 추가(서울대)하여 변경코자 함 .	• 전체적인 연구목표 및 내용에 있어서 주요 변경사항은 없음. • 당해연도(1단계 2차년도)부터는 연구개발계획서의 위탁연구1(숙명여대)과 신규 위탁연구과제 1개를 추가하여 공동연구를 진행하여, 보다 강화된 목표 달성을 모색함.	2021.12.14. 연차 협약
	• 2개 위탁연구 • 제1위탁과제–숙명여대(과제번호: 2022M1A5A1034723) • 제2위탁과제–서울대(과제번호: 2022M1A5A1034884)	• 2개 위탁연구 • 제1위탁과제를 경북대학교로 이관하여 과업수행 • 제2위탁과제(서울대)는 변경사항 없음	• 위탁연구과제의 책임자(숙명여대 김두헌 교수)의 연구수행 중 갑작스런 작고(作故)로, 위탁연구과제(위탁1)의 중단이 불가피함 • 연구목표 달성을 위해 제1위탁과제를 경북대학교로 이관하여 수행함 • 기존 위탁연구기관(숙명여대)에서 주도적으로 참여한 참여 연구원을 변경기관(경북대)에서 참여시킴으로서 원활한 과업수행을 가능하게 함	2022.09.15. 심의결과 통보

※ 2024년도 전체 연구비 감액으로 인한 목표 하향 조정 및 내용 축소, 일부분의 목표만 달성토록 조정

주요 변경 사항 [해당 사항 ○, × 중 선택]	당초 계획(2024년)	협약 변경 내용(2024년)	관련 페이지
연구비 (과제 구성 포함) [○]	■ 연구비 : 500,000 천원 • 주관연구: 320,000 천원 • 위탁연구: 80,000 천원	■ 연구비 : 255,000 천원 • 주관연구: 255,000 천원 • 위탁연구: 0 천원	pp. 41
연구목표 [○]	■ 효소 활성기반 탐색기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록) ■ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 ■ 신규 발굴 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상 ■ 효소 활성의 증가/감소에 관여하는 분자구조를 규명하기 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석 ■ 생촉매 효소 활성을 이용한 유용물질 생산 또는 반응생성물의 유용성 분석	<해당내용 변경없이 수행> ■ 효소 활성기반 탐색기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록) ■ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 ■ 신규 발굴 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상 **<해당내용 중단>** ■ **효소 활성 개량을 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석 불가로 중단** ■ **효소 반응생성물의 유용성 분석 수행 불가로 중단**	pp. 34-36
연구내용 [○]	■ 위탁과제1(경북대): 난분해 유기 물질 분해 효소 활성 검증 ✓ 효소 3차원 구조 결정을 위한 단백질 결정 제작 ✓ 작동 메카니즘 규명을 위한 가설 정립 및 가설 확인을 위한 돌연변이체 제작 ■ 위탁과제2(서울대): 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발 ✓ 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주의 성능 검토 ✓ 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주의 사료용 프로바이오틱스로의 이용 가능성 확인	**■ 연구비 감액으로 연구 수행 불가- 연구 중단** **해당 연구내용 삭제**	pp. 37-39
연구기간 [×]	■	■	pp. 00-00

5. 선정/단계/연차점검의견

선정평가 (해당사항 아래 표 참조)	1. 종합의견 : 2. 수정 및 보완사항 : 3. (필요시)연구비 조정사항 :	● 각 해당 사항에 대해, 아래 표에 별도로 기술함
1단계 1차년도 연차점검 – 해당사항 없음	1. 종합의견 : 해당사항 없음 2. 수정 및 보완사항 : 3. (필요시)연구비 조정사항 :	
1단계 2차년도 연차점검	1. 종합의견 : 2. 수정 및 보완사항 : 3. (필요시)연구비 조정사항 :	

※ 본 자료는, 선정평가 시 평가의견을 수렴하여, 당초 연구계획서에 기 반영하여 작성, 제출(해당 페이지 참조)하였으며, 본 최종보고서는 이를 참고하여, 1차년도와 2차년도(전 단계) 연구 수행하였음.

평가의견 (수정 및 보완사항)	수정 및 보완 내용	해당 페이지	비고
○ 확보된 현장 연구자료 및 연구성과들이 향후 4년 동안 어떻게 활용될 것인지에 대한 구체적인 제시보다 나열식 설명만 있어 아쉬움.	○ 활용방안 부분에서 "확보된 유전체 라이브러리를 이용하여 신규 생리활성 물질 탐색 및 개발에 활용"으로 보완하였음	세부계획서 p.20	연구성과의 활용에 대한 구체적인 방안을 제시함
○ 연차별 예산이 대부분 유사하게 편성되어 있는데(1차년 제외), 현장 관측팀의 경우, 1-2-3차년의 예산을 늘려서 현장관측자료 확보에 많이 투자하고, 4-5차년에는 현장관측 일수를 줄이고 분석데이터에 집중하게 하는 등 세부과제별로 총액 내에서 연차별 예산을 유연하게 편성할 수 있도록 권고함.	○ 연구개발비 사용계획을 수정 보완하였음	세부계획서 p.37, 42	연도별 배분 예산은 합리적으로 편성되었기에, 연도별 예산 내 2, 3, 4차년도의 비목별 예산 수정함

KOPRI
극지연구소

제 2 장

추진내용 · 연구결과 및 추진일정 실적

KOPRI
극지연구소

KOPRI
극지연구소

1. 추진내용 · 연구결과

년도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
1차년도 (1단계 1차년도)	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	▪ 난분해 유기 물질 분해 효소와 새로운 기능성 단백질 탐색을 위하여 유전체 라이브러리 제작 및 유전체 분석 ▪ 미생물 유전체 라이브러리 제작과 클론 확보 ▪ 효소 활성과 기능성 기반의 효소 단백질 탐색 및 유전자 확보 ▪ 다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보
2차년도 (1단계 2차년도)	난분해 유기 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구	▪ 환북극권 동토 환경시료 확보와 환경미생물 유전체 라이브러리 추가 제작 ▪ 발굴된 효소 단백질의 효소학적, 생화학적 특성 분석 ▪ 발굴된 효소 단백질의 X-ray 회절 실험을 통한 분자구조 해석 ▪ 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구
3차년도 (2단계 1차년도)	난분해 물질 분해 효소의 생촉매 기능성 연구	▪ 미생물 유전체 라이브러리의 효소활성 고감도 검출법 도입 ▪ 단백질 구조 기반의 효소 단백질 기능 분석과 활성 기작 연구 ▪ 효소의 구조적 변화에 의한 활성변화의 중요한 야생형과 돌연변이형 효소의 생화학적 특성 비교분석 ▪ 난분해 유기 물질 분해 효소를 생산하는 형질전환체 또는 효소 단백질을 이용한 생물정화 효능 분석
4차년도 (2단계 2차년도)	효소 단백질의 분자구조 분석과 활성기작 규명	▪ 효소활성 기반 탐색기술을 이용한 난분해 유기 물질 분해 효소와 기능성 단백질 유전자 추가 발굴 ▪ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 ▪ (연구비삭감에 따른 해당내용 연구수행 불가) ▪ 효소 활성의 증가/감소에 관여하는 분자구조를 규명하기 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석 ▪ 생촉매 효소 활성을 이용한 유용물질 생산 또는 반응생성물의 유용성 분석

(참고) 4세부과제에서의 위탁과제별 수행 필요성 및 내용, 성과목표* 달성 기여

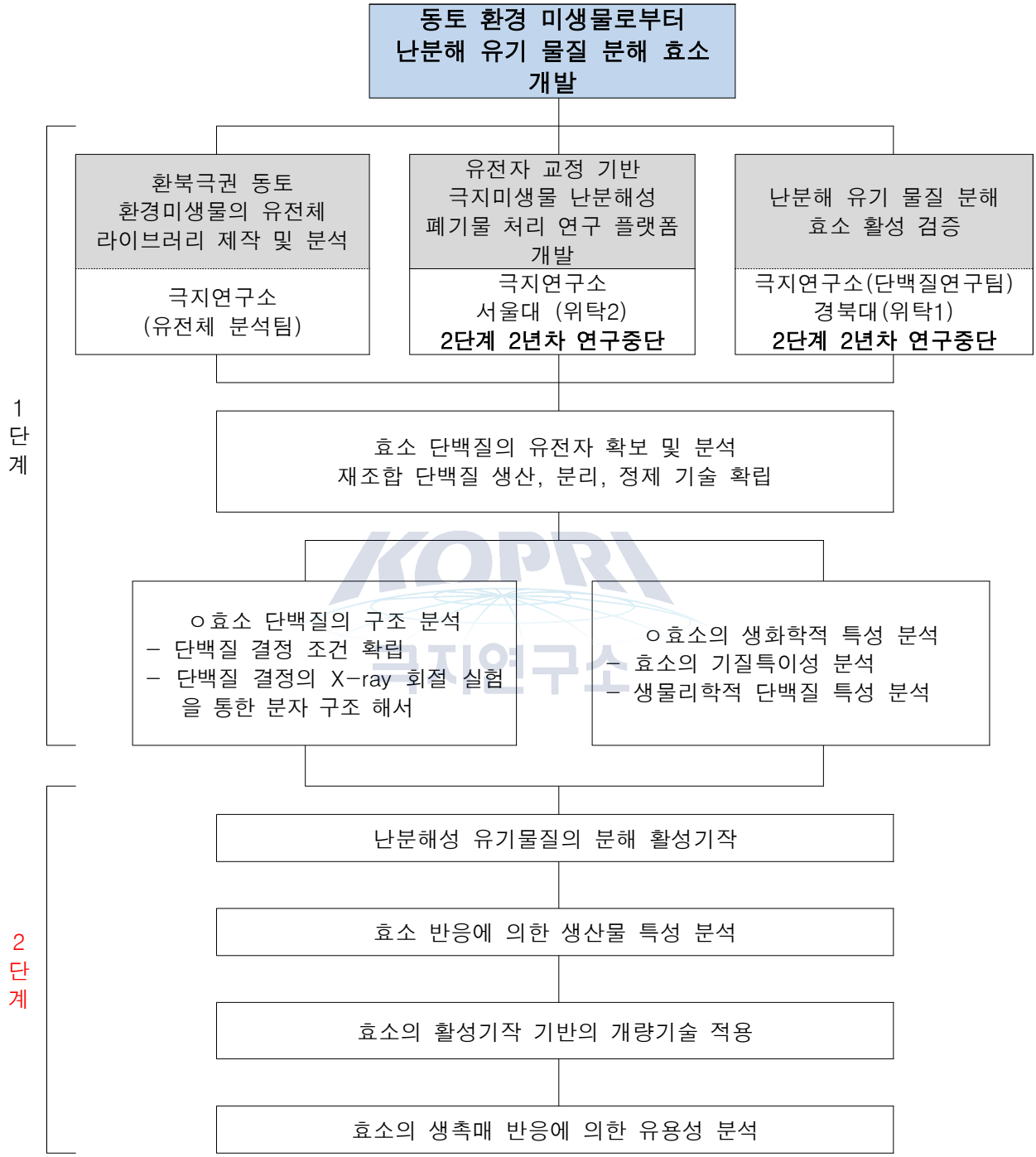
* 1) 1단계 성과목표: 북극권 동토 미생물의 환경적응 대사기작 규명
  2) 2단계 성과목표: 북극권 동토 미생물 유용성 연구

– <u>RFP에 제시된 성과목표를 항목별로 나눠볼 때, “탐색, 기작, 유용성 ” 으로 구분할 수 있을 듯함</u>

※ 각 위탁연구과제는, 난분해성 물질 분해 효소 개발 연구 및 북극권 극지 미생물의 대사공학적 기법을 통한 균주 개량는 활성 기작에 대한 연구를 통하여 신규 효소의 활성기작 연구와 더불어서 유용성, 유용성을 확대하기 위하여 학계의 전문가 협력하여 연구를 수행하고자 함.

구 분	과 제 명	발주 기관	수행자	수행 기관	위탁 또는 용역 필요성	위탁 또는 용역 핵심 목표 및 내용	최종목표 달성 기여 내용	기여도 (%)
세부4 (2개 위탁 연구)	유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발	극지 연구소	김효진	서울대	난분해 물질 분해 효소의 유용성 확장	극지미생물 기반 난분해성 물질 처리 연구 플랫폼 개발	극지미생물의 자연적인 난분해성 물질 분해 연구만으로는 한계가 있고 미생물을 대사공학적방법으로 engineering 한 균주 개량	기작 40% 유용 60%
	미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴	극지 연구소	김상우	경북대	플라스틱 유래 난분해 유기물질 분해 효소의 활성 검증	난분해 기질의 분해 활성 능 확인 및 응용 분야 확장	다양한 난분해성 물질을 분해할 수 있는 다기능 촉매 효소의 개발	기작 70% 유용 30%
	2개 국내대학 위탁							

KOPRI 극지연구소


동토 환경 미생물로부터
난분해 유기 물질 분해 효소
개발
환북극권 동토
환경미생물의 유전체
라이브러리 제작 및 분석
극지연구소
(유전체 분석팀)
유전자 교정 기반
극지미생물 난분해성
폐기물 처리 연구 플랫폼
개발
극지연구소
서울대 (위탁2)
2단계 2년차 연구중단
난분해 유기 물질 분해
효소 활성 검증
극지연구소(단백질연구팀)
경북대(위탁1)
2단계 2년차 연구중단
1
단
계
효소 단백질의 유전자 확보 및 분석
재조합 단백질 생산, 분리, 정제 기술 확립
ㅇ효소 단백질의 구조 분석
- 단백질 결정 조건 확립
- 단백질 결정의 X-ray 회절 실험
을 통한 분자 구조 해서
ㅇ효소의 생화학적 특성 분석
- 효소의 기질특이성 분석
- 생물리학적 단백질 특성 분석
2
단
계
난분해성 유기물질의 분해 활성기작
효소 반응에 의한 생산물 특성 분석
효소의 활성기작 기반의 개량기술 적용
효소의 생촉매 반응에 의한 유용성 분석

1) 환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구

○ 난분해 유기 물질 분해 효소와 새로운 기능성 단백질 탐색을 위하여 유전체 라이브러리 제작 및 유전체 분석

- Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC)에서 ice와 soil로 분류되는 균주를 선정하여, Pacbio Sequel II를 이용하여 genome sequencing 진행

Table 1.The results from the sequence analysis by Pacbio Sequel II

Cell Name	Polymerase Read Bases	Polymerase Reads	Polymerase Read N50	Average Read Length
icesoil	138,492,356,009	6,891,829	31,580	20,095

○ 미생물 유전체 라이브러리 제작과 클론 확보

- PAMC의 glycerol stock을 ice, soil과 sediment 분류군에 포함하는 clone을 pooling함
- pCC1FOS fosmid vector을 이용하여 fosmid library 제작하고 제작된 fosmid library 의 insert의 평균 size 확인

KOPRI 극지연구소

Table 1. The results of fosmid library construction (Fosmid clone number and Insert size)

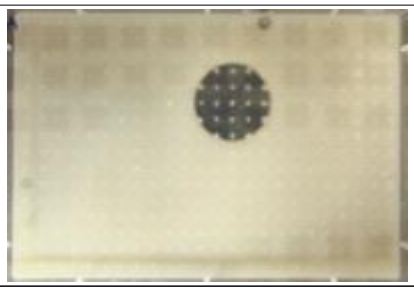
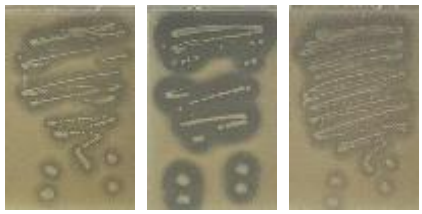
	평균 insert size	Fosmid clone
Ice	32	23,000
Soil	26	54,000
Sediment	30	10,000

○ 효소 활성과 기능성 기반의 효소 단백질 탐색 및 유전자 확보

- 확보된 fosmid library를 이용하여 다양한 효소 및 기능성 단백질 screening을 위해 기질이 포함된 specific media plate 제작
- Lipase/esterase 활성을 갖는 fosmid 클론 screening 결과

▷ Lipase 및 esterase의 활성 클론을 screening 하기 위해 Tributyrin 기질이 포함된 agar plate에 384 well plate로 제작된 fosmid library를 배양하여 각 clone의 활성을 확인하고 screening 함. 그 결과, 총 75 plate (28,800 클론)에서 총 53종의 활성 클론을 선별하였음.

Table 2. The representative of fosmid clone with lipase activity

Plate ID	Well no.			Tributyrin 분해 활성 clone	단일 클론 검증
PIC-3	A16	F14	K1		

– 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 novel putative sugar isomerase 효소 (PbSI) 의 구조분석

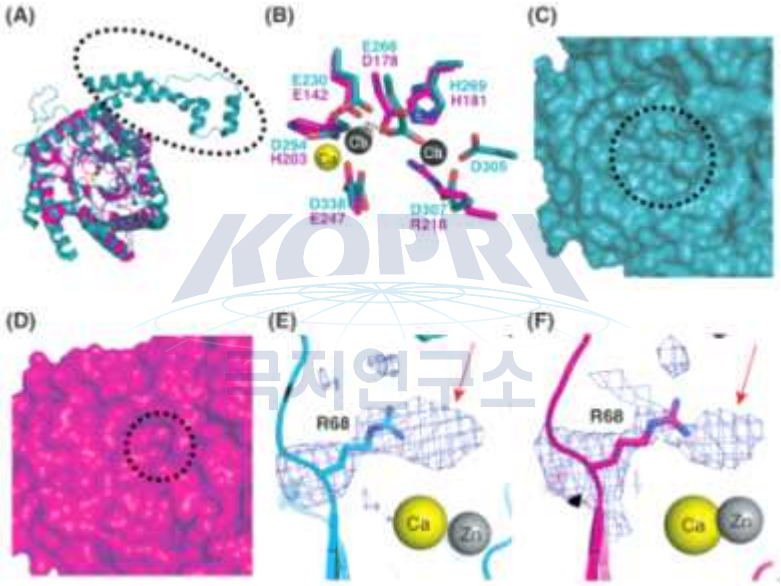


Fig. 1. Structural comparison of cold-active enzyme PsSI and PbXI.

▷ PbSI 효소는 PbXI 효소에 비해 보다 넓고 열려있는 기질 결합 부위를 가짐. 전자밀도맵 분석을 통해 PbSI 의 Arg68 잔기 근처에 아직 규명되지 않은 기질이 결합할 가능성이 있음.

○ **다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보.**

저온성 esterase PsEst3의 구조 분석 및 생화학적 특성 분석

▷ PsEst3의 단백질 구조 분석에 의해 기질 결합 부위를 예측하고 관련 아미노산 잔기의 돌연변이형 제작

▷ 기질 결합과 관련된 아미노산 잔기 S128의 활성에 대한 역할을 규명하기 위하여 야생형과 돌연변이형의 효소 활성을 분석하였으며, PsEst3 유사 esterase family에서의 특성

을 규명함.

▷ 기질의 ester chain 길이에 따라 효소의 반응을 분석하여 효소 활성의 특성을 규명하였음.

▷ 사용된 기질은 p-Nitrophenyl ester 기반의 합성기질과 fluorescein 기반의 C8과 C12 기질로서 기질 결합 부위의 구조정보와 활성 데이터를 활용하여 활성기작을 분석하였음.

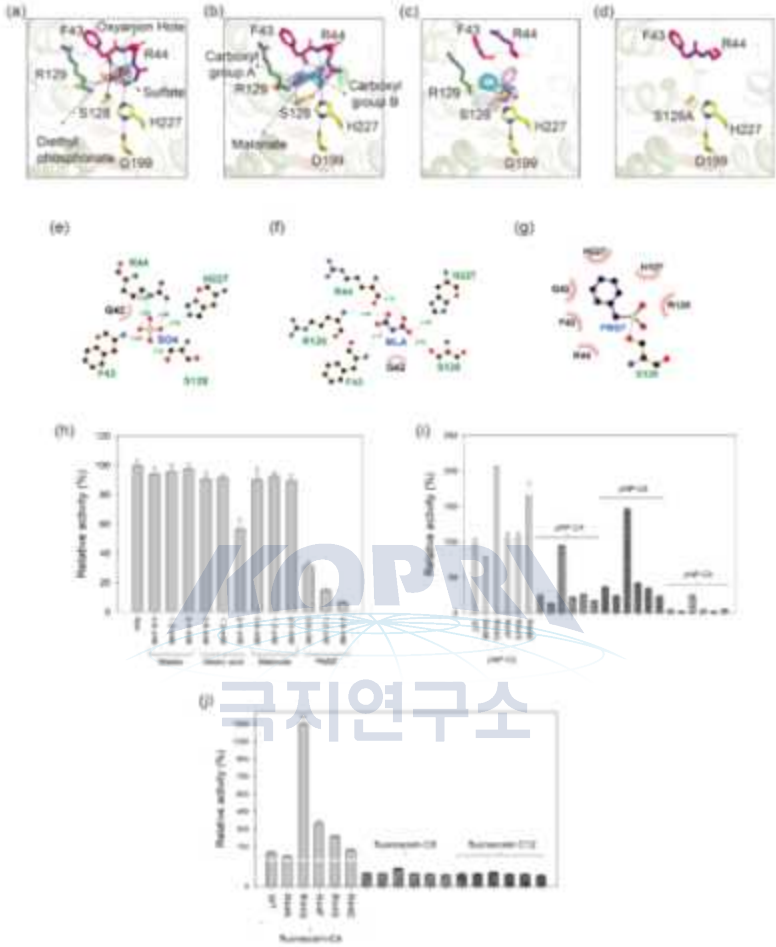


Fig. 2. the enzyme activity comparison for various substrate and ligand binding patterns of the cold-active enzyme PsEst3.

2) 난분해 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구

○ 환북극권 동토 환경시료 확보와 환경미생물 유전체 라이브러리 추가 제작

- 북극해 코어 환경시료 및 PAMC균주(Lichen/water 유래)로부터 환경미생물 유전체 fosmid library 제작

▷ 북극해 코어시료의 상층부 (~5cm)와 중층부 (30~35cm) 토양으로부터 환경유전체 DNA를 추출하였으나, 중층부의 시료에서는 라이브러리 구축을 위한 최소한의 DNA량을 확보하기 어려웠으며, 상층부에서 31 μg DNA를 확보하였음.

▷ DNA 추출은 MPBIO사의 FastDNA Spin kit for soil 제품을 사용하였으며, 1개 column 당 약 200 mg 의 토양시료를 사용하여 10 g의 시료로부터 토양 DNA를 추출함. 확보된 환경 유전체를 이용하여 pCC1FOS vector를 이용하여 라이브러리를 구축함. 전체 library titer는 51,333 clones를 확보(using 384 format plate)

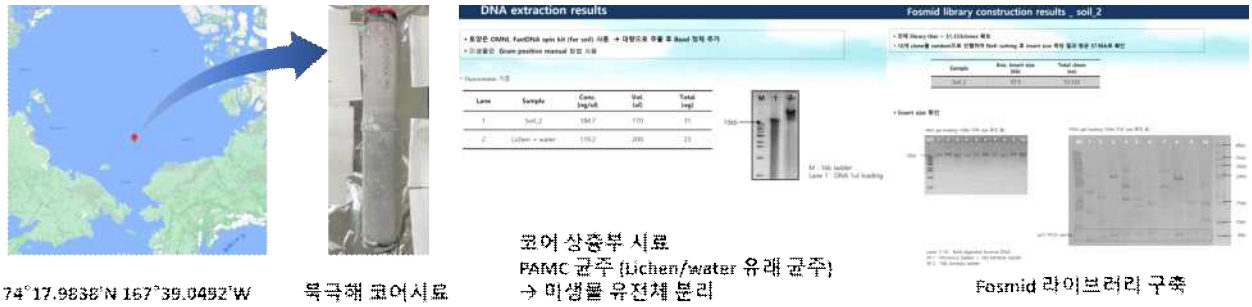


Fig.3. Construction of fosmid library using environmental sample of the Arctic ocean and PAMC strains.

○ 발굴된 효소 단백질의 효소학적, 생화학적 특성 분석

– *Psychrobacter* sp. PAMC 21119에서 유래한 OTCs(Ps_cOTC, Ps_aOTC)의 생화학적, 구조적 특성 분석

▷ Arginine deiminase (ADI) 합성경로와 arginine 생합성은 미생물이 환경 변화에 적응하는데 필요한 물질을 만들어 내는 것으로 알려져 있음. 특히, ADI 시스템은 pH가 낮아지면 유전자 오페론 전사량을 증가시켜 암모니아를 생산하고 pH가 낮은 환경에 대응하는 시스템임.

▷ ADI 합성경로와 arginine 생합성에서 촉매작용을 일으키는 중요한 단백질이 Ornithine carbamoyltransferases (OTC)로 알려져 있으며 이 단백질은 catalytic OTC (cOTC)와 anabolic OTC (aOTC) 두 단백질이 존재하며 서로 다른 방향의 촉매작용을 촉진함.

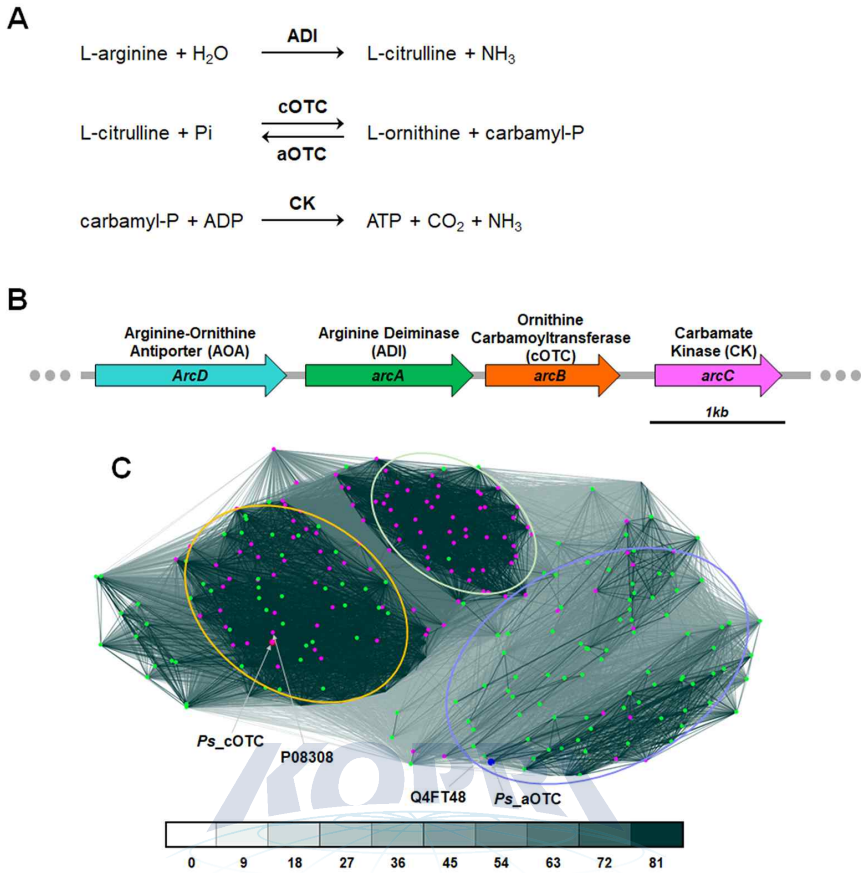


Fig. 4. The catabolic OTC (cOTC) and anabolic OTC (aOTC) from Psychrobacter sp. PAMC 21119. (A) Schematic representation ofthe ADI pathway and the reaction catalyzed by the OTCs. (B) Schematic representation ofgene organization within the ADI system ofthe PAMC 21119 strain. (C) Clustering analysis ofOTCs searched using ProtBLAST/PSI-BLAST from the PBD and Uniprot_sport databases. The three clusters are indicated with light green, purple-blue, and orange circles. The genes annotated with arcB or argF are indicated with green and purple dots. Ps_cOTC and Ps_aOTC are indicated with red and blue dots. Darker and shorter connecting lines indicate higher sequence similarity. Connections with P-values higher than 1e-x are drawn in the corresponding color (x = number below).

○ 효소 활성 기반의 유용 기능성 단백질 탐색 기술 개발.

- 환경 유전체 라이브러리를 이용한 활성 기반의 기능성 유전자 탐색

▷ 북극해 코어시료와 PAMC 균주(Lichen/water 유래)의 추출된 DNA을 사용하여 구축된 환경유전체 라이브러리를 이용하여 기능성 단백질을 발현하는 유전자를 탐색하였으며, 효소활성 관련 기질 혹은 항생제를 포함한 배지에서 활성을 관찰하였음.

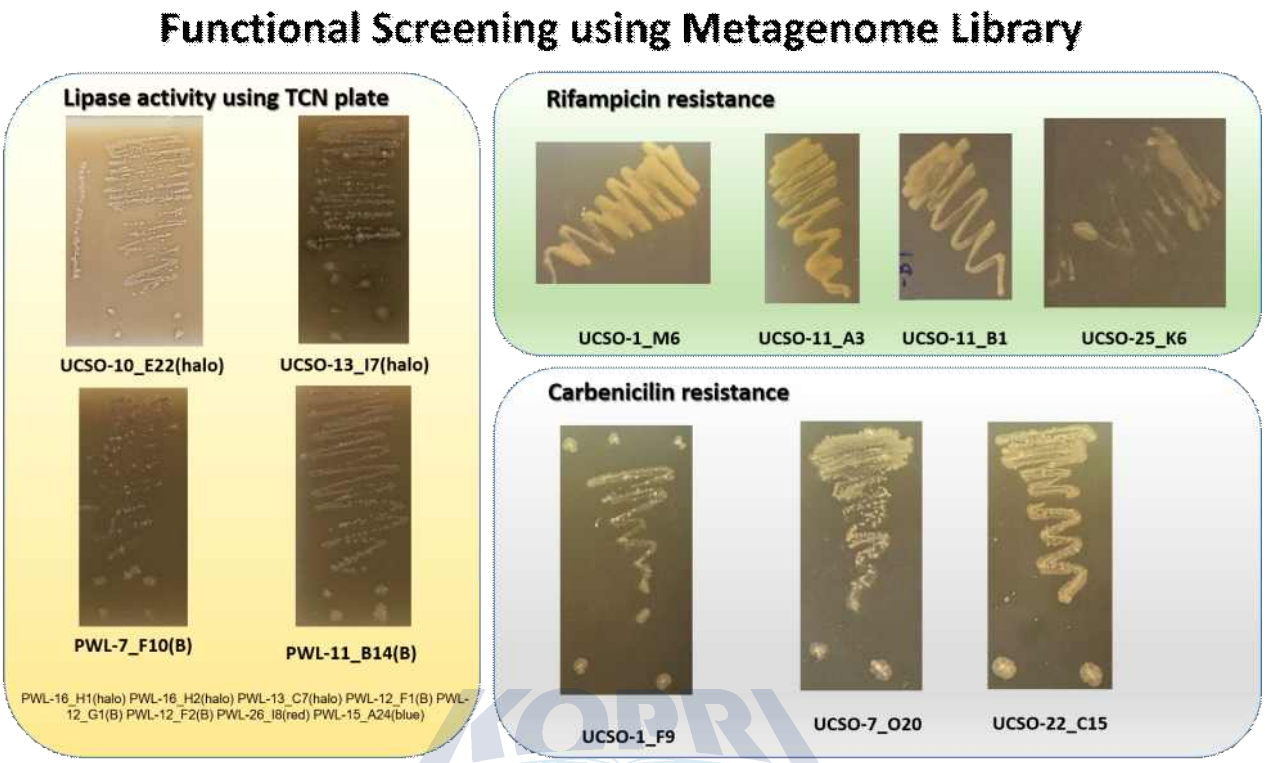


Fig.5. The fosmid clones selected from functional screening using metagenome library.

KOPRI 극지연구소

○ 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구

– P. xylanexedens의 난분해성 물질에 따른 생장 분석

▷ P. xylanexedens을 난분해성 물질인 cellulose와 xylan에서 정치배양(20 ℃)으로 30일간 관찰한 결과 비슷하게 xylan에서 glucose와 거의 유사한 속도로 자라는 것이 확인되었고 이에 비해 cellulose에서는 자라지만 그 속도가 미미했음. 이 실험은 혐기조건(anaerobic condition)에서도 진행되었는데 이 조건의 경우도 xylan과 glucose 배지에서 자라는 속도가 비슷했는데 매우 느리게 자라는 것으로 확인 됨. 이에 비해 cellulose는 거의 이용하지 못하는 것으로 확인 됨.

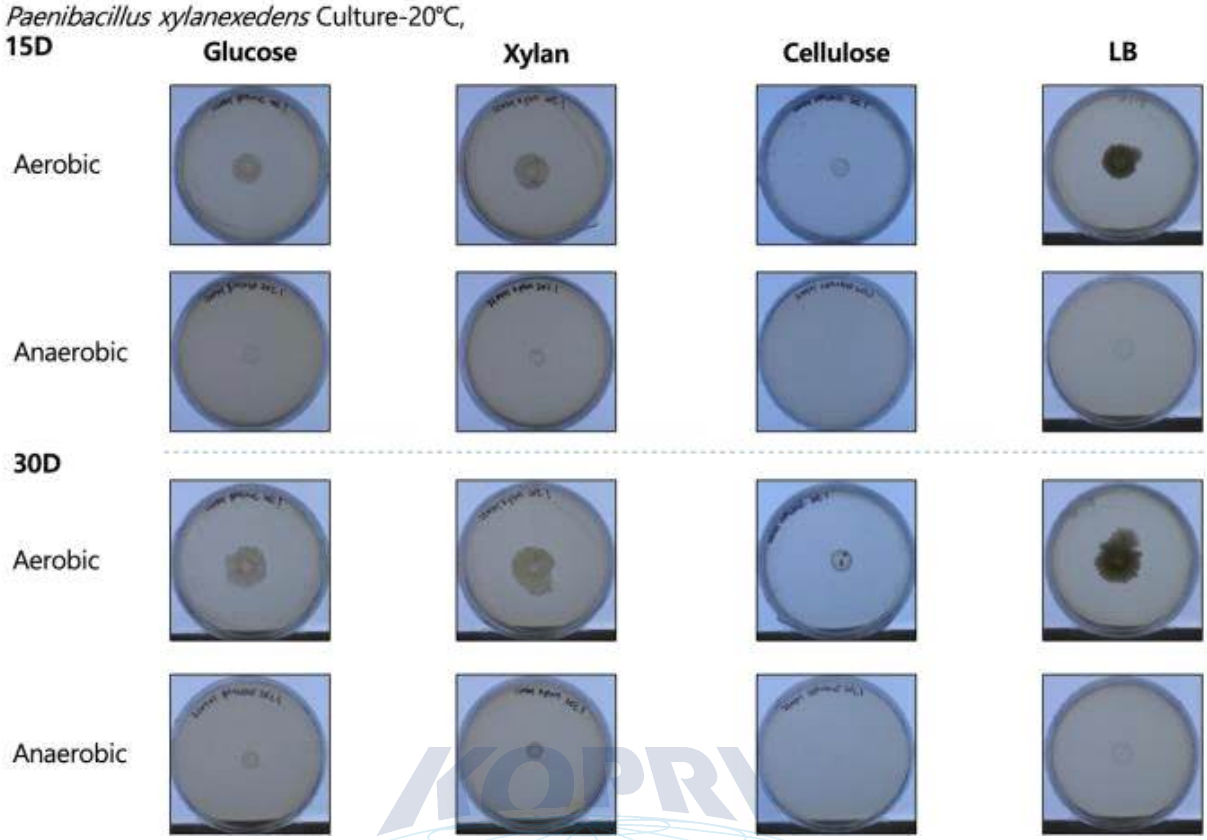


Fig.6. The growth analysis of P. xylanexedene accordign to the recalcitrant materials.

KOPRI 극지연구소

3) 난분해 유기 물질 분해 효소의 생촉매 기능성 연구

○ 미생물 유전체 라이브러리의 효소활성 고감도 검출법 도입

- 낮은 활성에서도 검출이 가능한 기질을 활용하여 384 plate에서 저활성 효소 유전자를 검출할 수 있는 기술을 도입

○ 단백질 구조 기반의 효소 단백질 기능 분석과 활성 기작 연구

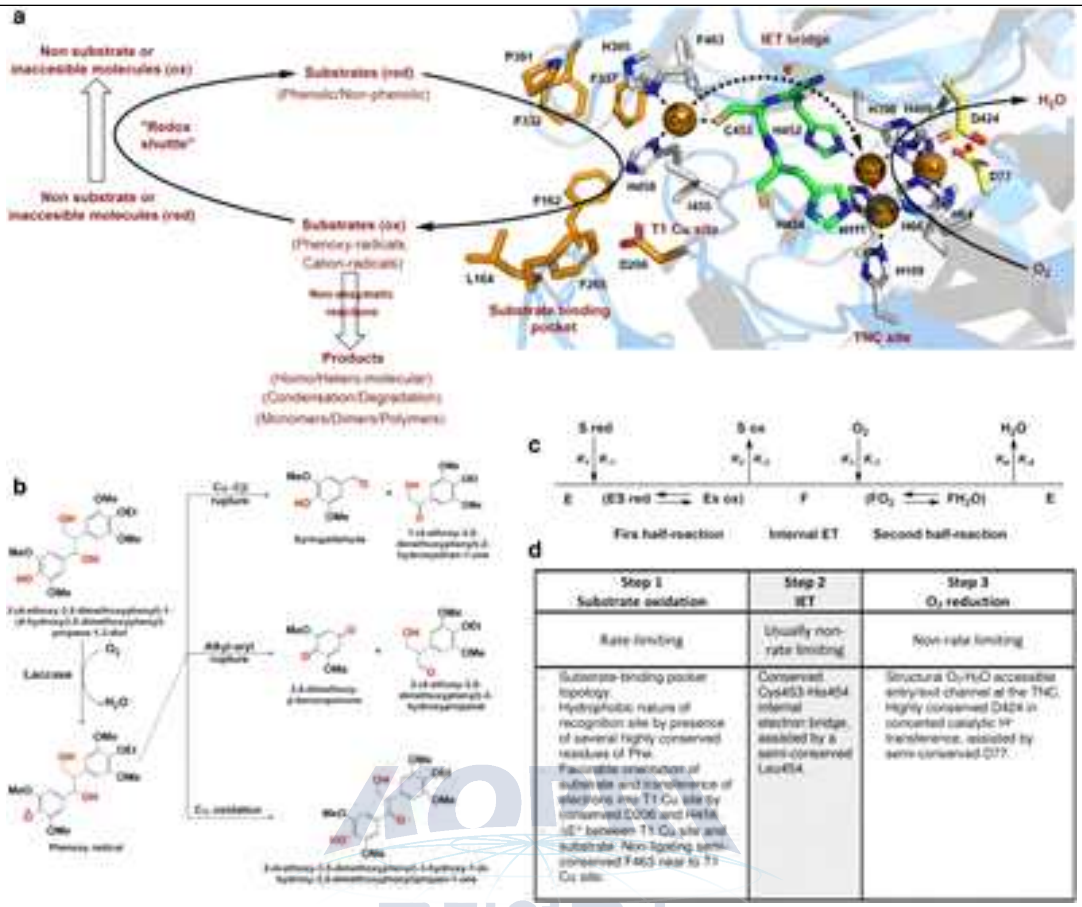


Fig.7. Catalytic mechanism and functional properties of laccase, lignin degrading enzyme.

○ 효소의 구조적 변화에 의한 활성변화의 중요한 야생형과 돌연변이형 효소의 생화학적 특성 비교분석

– 단백질 구조 분석을 통하여 활성에 중요한 영향을 미치는 아미노산 잔기(아미노산 서열)을 변형하여 돌연변이형 효소를 구축하고 이에 따른 특성 변화를 분석함

○ 난분해 유기 물질 분해 효소를 생산하는 형질전환체 또는 효소 단백질을 이용한 생물정화 효능 분석

– 효소에 의한 분해와 비교하기 위하여 형질전환체를 이용한 활성능을 분석함으로서 활용성을 확보할 수 있음

3) 연구개발결과

○ 미생물 유전체 라이브러리의 효소활성 고감도 검출법 도입

– PAMC 및 환경 유전체 라이브러리를 pooling 및 culture를 통하여 전체 유전체 발현이 가능한 배양체 확보함

– 미생물 유전체 라이브러리 배양체의 세포내 파쇄액과 액체 기질과의 반응을 통하여 효소

활성 유무를 검정하였음

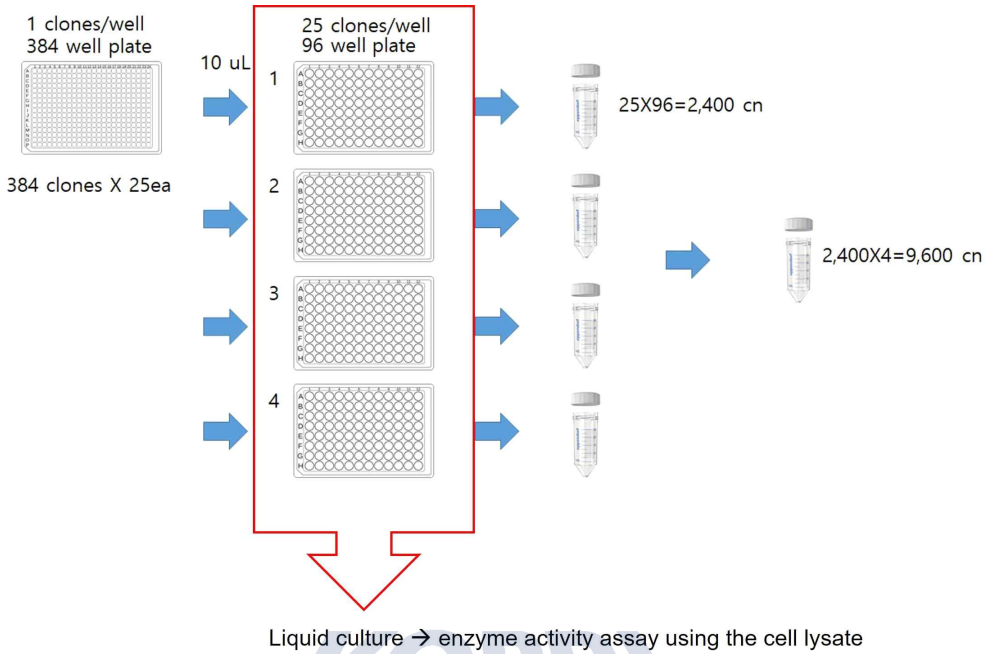


Fig. 8. The fosmid library pooling strategy for the protein gene screening based on the enzyme activity.

KOPRI 극지연구소

- p-nitrophenyl 유도체를 가지는 기질을 활용하여 lipase 및 esterase 유전자를 확보함.

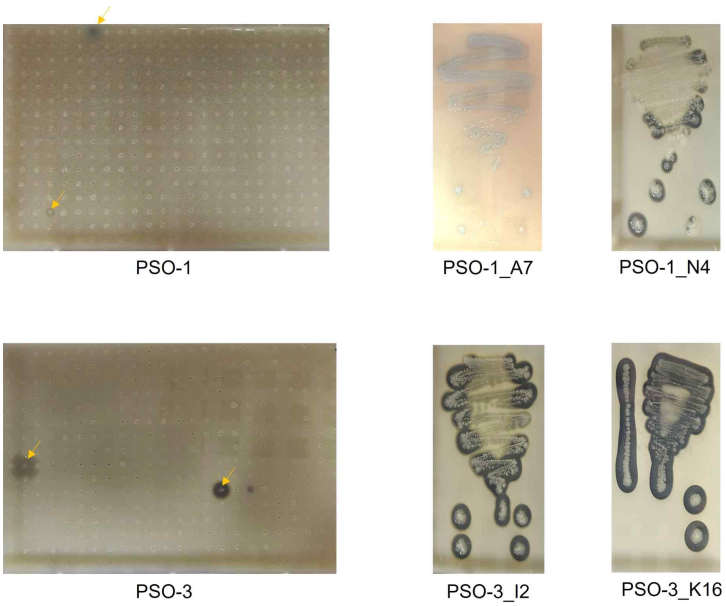


Fig. 9. The representative of fosmid clones with lipase activity.

- 미생물 유전체 라이브러리의 효소활성 고감도 검출법을 통하여 4종의 fosmid clone을 확보하여 clone의 유전체 정보를 KPDC에 등록함.

(KPDC 등록번호)

KOPRI-KPDC-00002394

KOPRI-KPDC-00002395

KOPRI-KPDC-00002396

KOPRI-KPDC-00002397

○ 단백질 구조 기반의 효소 단백질 기능 분석과 활성 기작 연구

◆ Lactobacillus acidophilus에서 유래한 페룰릴 에스테라아제(LaFae) 연구

- 기능성 단백질에 대한 특성 분석이라는 목표를 달성하기 위해 에스테라아제에 대한 구조 분석 및 기능 연구 실시
- 페룰릭산 및 관련 하이드록시신남산산 (hydroxycinnamic acids)은 식품, 화장품, 제약 및 생물기술 산업에서 항산화제 및 보존제로 사용되며, 식물 생물질의 중요한 성분 중 하나로 안전하고 대량 생산 가능한 페룰릭산 및 하이드록실시나믹산을 생산할 수 있는 새로운 화합물의 도출이 중요 함.
- 본 연구에서는 Lactobacillus acidophilus에서 유래한 페룰릴 에스테라아제(LaFae)를 획득하고 그 특성을 조사하였음.

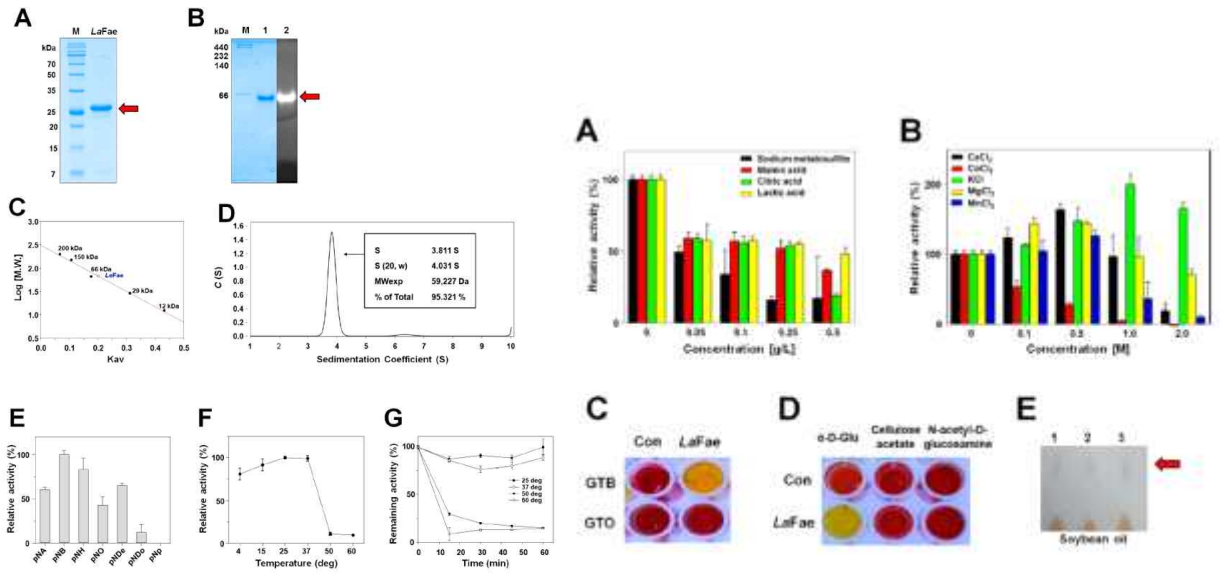


Fig.10. Biochemical characterization of LaFae.

✓ LaFae의 효소적 특성 분석

- LaFae를 발효제로서의 잠재적 유용성을 평가하기 위해 유기산인 말레산, 시트르산, 그리고 유산과 sodium metabisulfite의 존재에서의 활성을 측정함 (그림 10A). 0.05 g/L의 sodium metabisulfite에서 LaFae는 초기 활성의 약 50%를 유지하였으며, 0.25 g/L 농도의 세 가지 유기산에서는 효소가 초기 활성의 약 60%를 나타냈음. 이러한 관찰 결과는 LaFae가 발효 과정에서 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 나타냄.

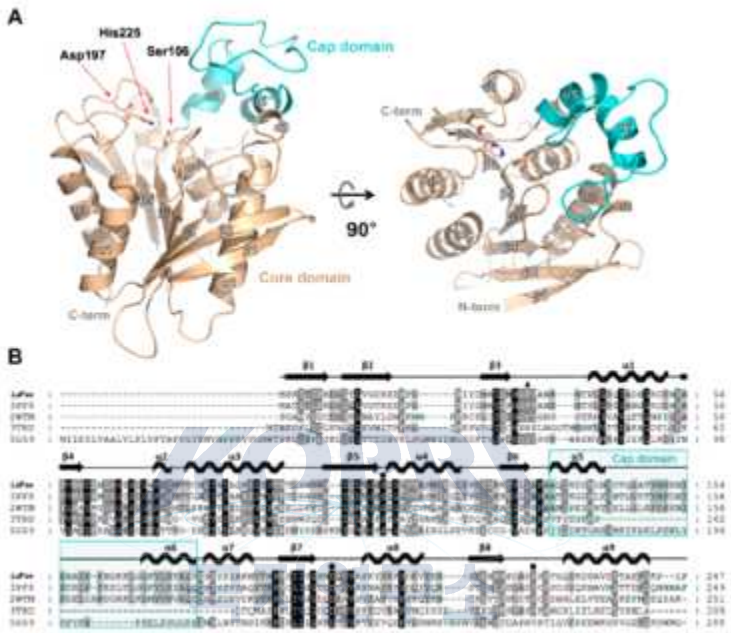


Fig. 11. Overall structure and multiple sequence alignment of LaFae.

◆ Exiguobacterium antarcticum로부터 분리한 bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) 분해 카르복실에스테라아제(carboxylesterase)의 연구

- 남극 극저온 박테리아 Exiguobacterium antarcticum로부터 분리한 bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) 분해 카르복실에스테라아제(carboxylesterase)의 구조 및 생화학적 기능 연구 실시

✓ EaEst2의 생화학적 특성 분석

- 재조합된 EaEst2의 기질 특이성은 다양한 ester 화합물과 다른 가능한 기질을 사용하여 연구를 진행하였음. 먼저, EaEst2의 다른 아실(acyl) 사슬 길이에 대한 상대적인 선호도를 측정하였으며, 결과적으로 가장 짧은 사슬 길이를 가진 p-nitrophenyl esters (C2)에 가장 높은 활성을 나타냈으며 기질의 길이가 증가함에 따라 활성이 서서히 감소 함

- EaEst2의 생화학적 특성을 이해하기 위해 EaEst2 구조를 해석함. EaEst2의 전체 구조는 핵심 도메인에서 α/β hydrolase fold를 형태를 취하고 있으며, 이 폴드는 α- helices 로

둘러싸인 비틀린 β sheet로 이루어져 있으며 캡 도메인 (cap domain)을 포함 (그림 9B). EaEst2의 기질 결합 포켓은 α2- , α5- , 및 α6- helix로 이루어진 캡 도메인에 의해 덮여 있음 (그림 12C). 이러한 구조적 그리고 생화학적 특성 연구를 통해서 극지 유래 기능성 단백질의 활성 기작을 규명 하였음.

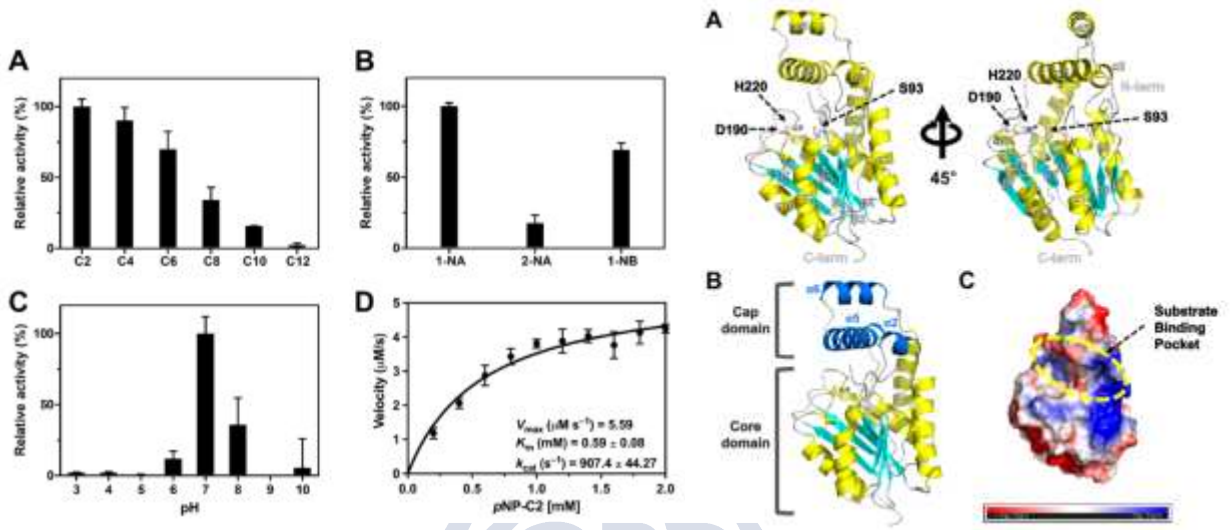


Fig.12. (Left)Hydrolase ativity assay and optimal pH of EaEst2. (Right) Overall structure of EaEst2.

KOPRI 극지연구소

◆ Lactococcus garvieae에서 분리된 신규 미생물 acetylesterase인 LgEstI 연구

- 에스터아제(Esterase)는 serine hydrolase 패밀리의 구성원으로, ester 결합의 분리 및 생성을 높은 위치 및 입체 특이성으로 촉매화하는 데 사용되며, 이로 인해 순수한 물질의 합성에 적합한 바이오촉매로 사용됨.

✓ LgEstI의 생화학적 특성 분석

- C2에서 C12까지 다른 p-nitrophenyl esters를 테스트했을 때, LgEstI는 효과적으로 pNA에만 활성을 나타냈으며 pNH 및 pNO에 대해서는 활성이 감소하였음.

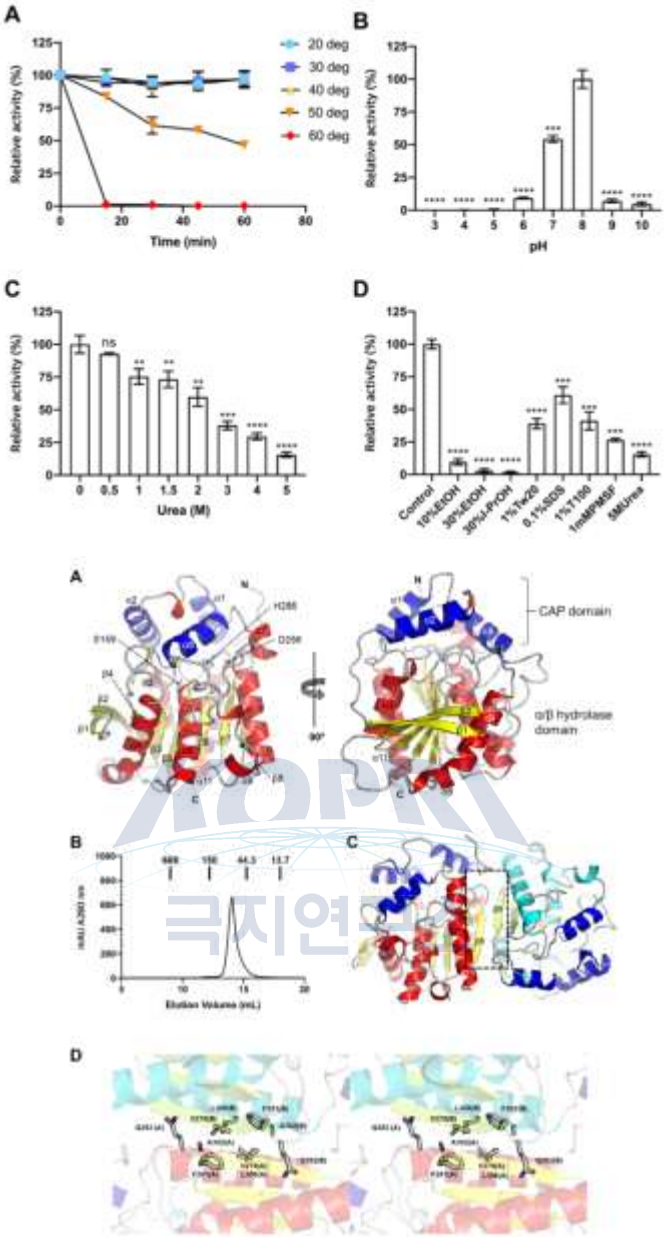


Fig. 13. Characterization and overall structure of the esterase LgEstI.

✓ LgEstI의 전체 구조

– LgEstI의 생화학적 특성을 더 잘 이해하기 위해 구조 결정 및 비교 분석을 수행하였음. LgEstI의 X-선 결정학 방법으로 2.0 Å 분해능을 가진 3차원 구조를 결정함. 대부분의 아미노산이 electron density maps에 잘 맞았으며, LgEstI은 asymmetric unit당 세 개의 단량체를 포함하고 있었음. 세 개의 cis peptides가 세 개의 단량체에서 동일한 위치에서 발견되었음 (His21-Pro22, Ser120-Pro121 및 Tyr125-Pro126).

✓ LgEstI의 기질 접근 채널 분석

- 알려진 단백질과의 구조적 비교를 통해 LgEstI의 활성 부위로 향하는 기질 접근 채널이 비교적 좁고 얕다는 것을 알아냄. 깔대기 모양의 채널은 대략 16 Å 깊이 (Leu35의 CD2와 Ser159의 OG 사이)와 6.5 Å 폭 (Phe207의 CZ와 Ile24의 CD1 사이)을 가지고 있음. 기질로 접근하는 채널을 형성하는 벽은 Phe14, Asn18, Ile24, Lue36, Gly88, Phe91, Phe207, Lue208, Met213, Phe216, Lue258 및 Met290로 둘러싸여 있음 (그림 12A). 이 중 Phe207, Lue208, Phe216 및 Lue258은 촉매 삼중체와 가까운 위치에 있었으며, 아마도 p-nitrophenyl ester를 인식하고 소수성 상호작용을 통해 이와 상호작용할 것으로 생각됨.

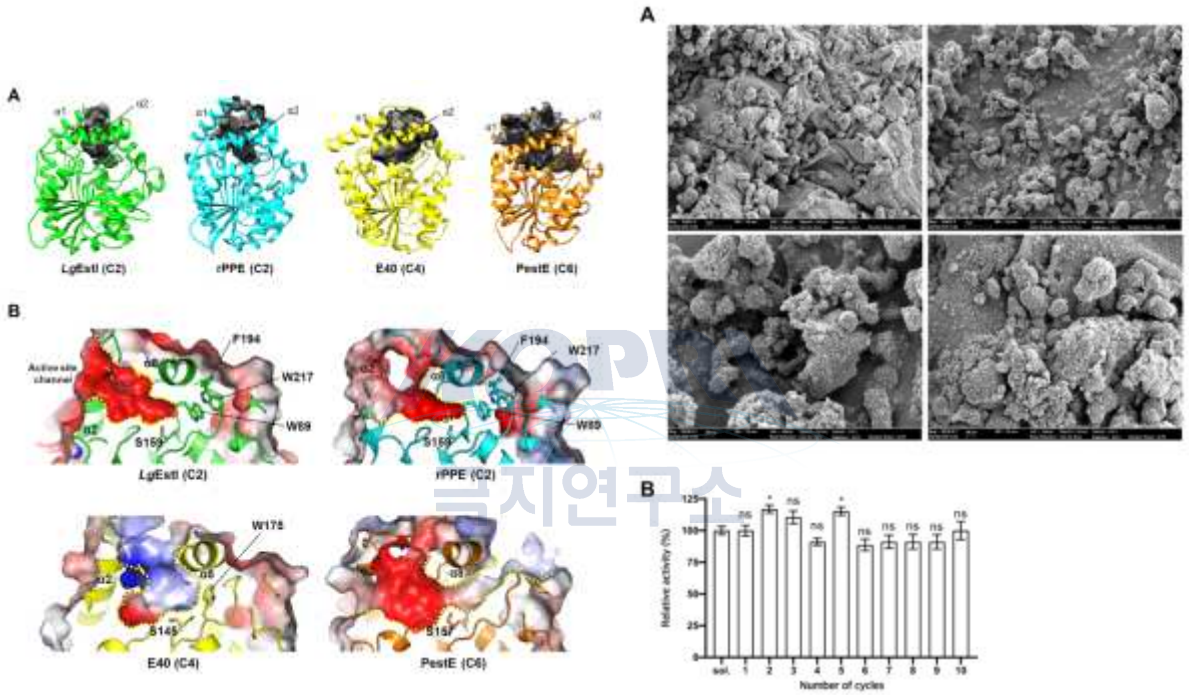


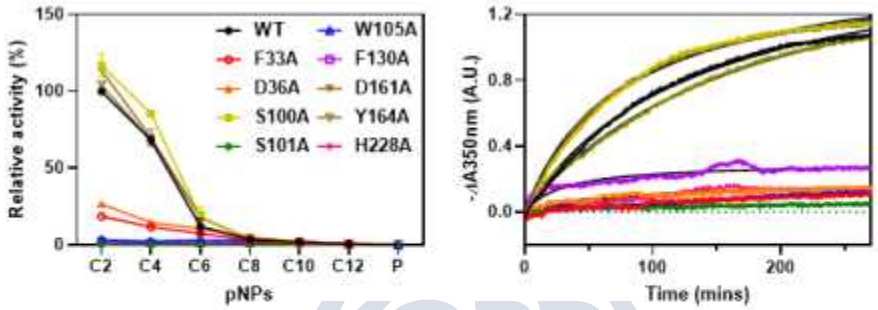
Fig 14. (Left) Comparison of the substrate access channel (Right) Immobilization of LgEstI and activity.

✓ LgEstI의 고정화

- 에스테라아제는 산업 응용 분야에서의 잠재적인 생물 촉매이며, 고정화는 효소의 재활용성과 안정성을 보장하기 위한 널리 사용되는 방법임. 교차 링크된 효소 응집체 (CLEAs)의 형성은 종종 효소의 산업에서의 적용 가능성을 향상시키기 위해 사용되며, 이는 효소 안정성을 보장하고 효소 재사용성의 가능성을 나타냄. 따라서 우리는 LgEstI를 암모늄 황산과 glutaraldehyde로 단백질을 침전시켜 LgEstI-CLEAs를 생성하였음.

○ 효소의 구조적 변화에 의한 활성변화의 중요한 야생형과 돌연변이형 효소의 생화학적 특성 비교분석

탐색된 신규 효소들의 물리화학적 특성 개선과 효소학적 특성 개선을 위해 cross-linking을 통한 효소 고정화와 돌연변이 구축을 진행함. HaBHETase 서열 분석을 통해 효소 활성에 영향을 미칠 수 있는 잠재적 아미노산을 특정하고 가수 분해 효소 활성 분석을 통해 야생형 (WT) 대비 활성 효율이 올라간 돌연변이형 확인 (그림 15, (좌, 위)). BHET 분해 활성 분석을 통해 일부 HaBHETase 돌연변이형의 BHET분해 활성 또한 WT대비 올라간 것을 확인함 (그림 15, (우, 위), (아래)).



BHET hydrolysis	WT	S100A	S101A	D36A	D161A	H228A	F33A	F130A	W105A	Y164A
Relative V0	100.00	152.53	1.01	4.04	153.54	13.13	4.04	270.71	5.05	989.90
Relative Abs	100.00	107.00	3.49	12.62	106.06	12.09	8.95	24.27	10.42	98.84

Fig. 15.(L, R) Hydrolysis activity analysis of wild type and mutants of HaBHETase using spectrophotometry.

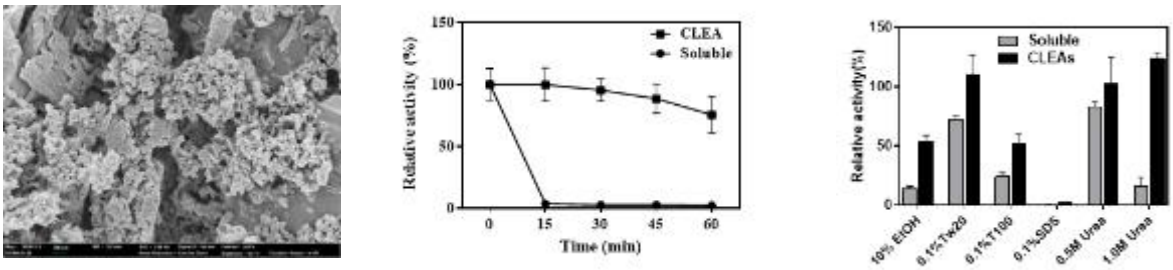


Fig. 16. (Left) CLEAs Scanning Electron Microscope (SEM).

본 연구과제에서는 EaBHETase 및 HaBHETase의 CLEAs 형성후 물리화학적 특성을 분석하였음. 형성된 CLEAs는 전자현미경 분석결과 balls-and-sticks 구조로 기존에 보고된 연구들과 같은 구조로 형성되었음

○ 난분해 유기 물질 분해 효소를 생산하는 형질전환체 또는 효소 단백질을 이용한 생물정화 효능 분석

4) 효소 단백질의 분자구조 분석과 활성기작 규명

○ 효소활성 기반 탐색기술을 이용한 난분해 유기 물질 분해 효소와 기능성 단백질 유전자 추가 발굴

– 신규 lipase LipE22 발굴

❑ 구조적 차이

– 새로 발견된 LipE22의 경우, 지금까지 알려져있는 단백질 중 트라이아실 글리세롤 리파제(Triacylglycerol lipase)와 가장 유사한 서열을 보이나 30 %라는 낮은 서열 유사성을 보인다. 그래서 LipE22의 어떤 다른 기능 혹은 역할을 수 있는 단백질로 추측되어 연구를 진행하게됨.

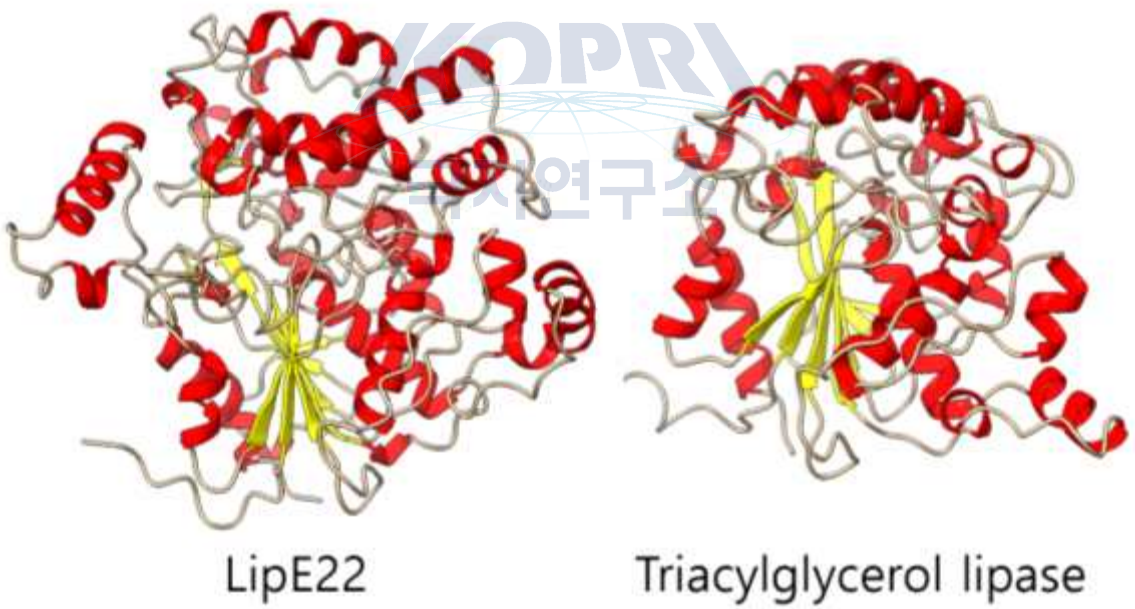


Fig 17. The structure of LipE22 and Triacylglycerol lipase. Red represents the spiral structure and yellow represents the folding screen structure.

❑ 단백질 생화학적 특성

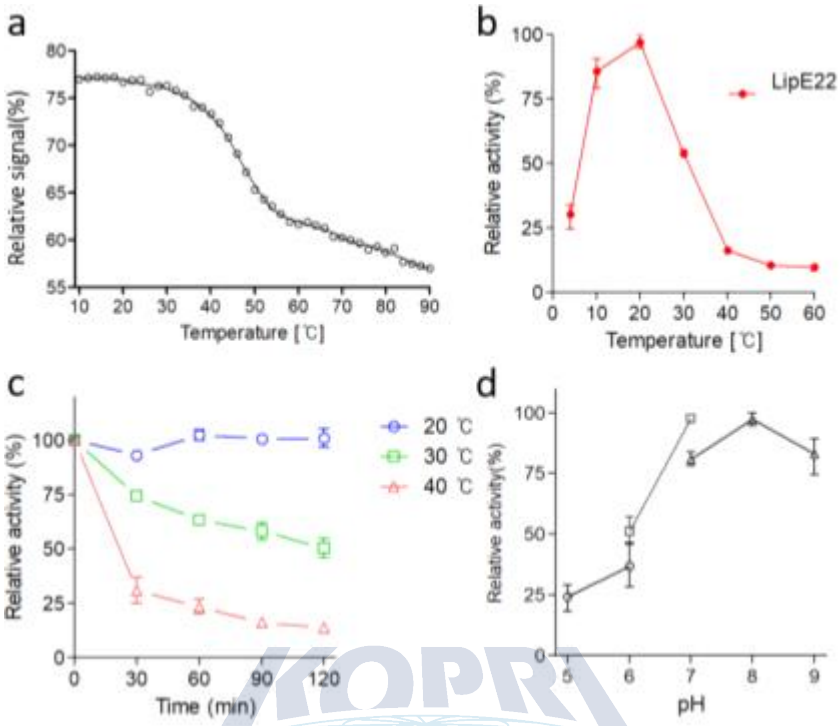


Fig. 18. Results for characteristics of LipE22. (a) Results of analyzing the CD percentage (%) of LipE22 according to temperature. (b) Results of analyzing the appropriate active temperature of LipE22 as a percentage (%). (c) Results of analyzing the durability of LipE22 to heat as a percentage (%). (d) Results of analyzing the appropriate active pH of LipE22 as a percentage (%).

❑ 리포솜(Liposome) 바인딩

-LipE22가 인지질로 구성된 리포솜에 결합이 가능함. 이는 세포의 세포막에 결합할 수 있음을 시사함.

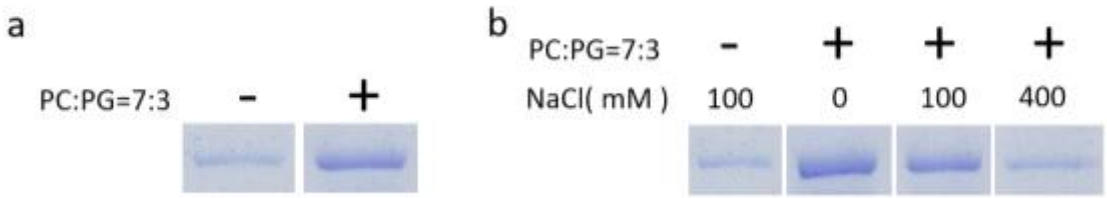


Fig. 19. SDS gel photographs. (a) The size of the band indicates the combined amount of liposome composed of phospholipids (Liposome). (b) SDS gel results showing the liposome binding force of LipE22 according to NaCl concentration.

❑ 단백질 독성 분석

-LipE22의 발현은 대장균의 성장 속도를 낮추는 결과를 보여주며, LipE22가 세포막의 인지질을 분해할 수 있는 가능성이 존재함

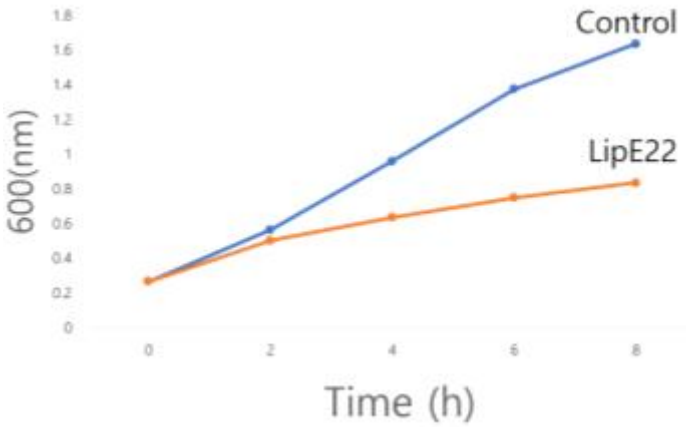


Fig. 20. As a result of testing the toxicity of LipE22 to cells, the growth rate of the experimental group (E. coli expressing LipE22) decreases compared to that of the control group (E. coli expressing LipE22).

KOPRI 극지연구소

- 신규 플라스틱 분해 효소 PLI 단백질 발굴

❑ 단백질 특성

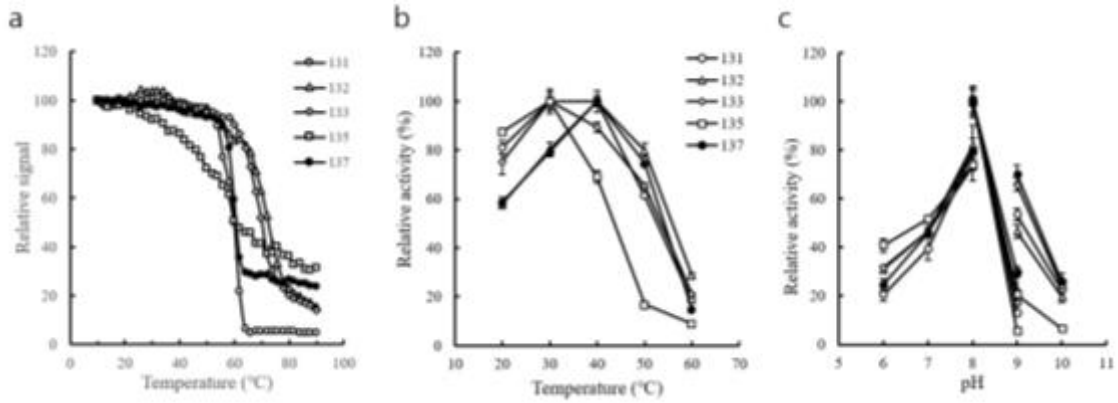


Fig. 21. Results of characteristics of PLI proteins (131,132,133,135,137). (a) Results of analyzing the CD percentage (%) of PLI proteins according to temperature. (b) Results of analyzing the proper activity temperature of PLI proteins as a percentage (%), and (c) Results of analyzing the proper activity pH of PLI proteins as a percentage (%).

❑ 기질 특이성

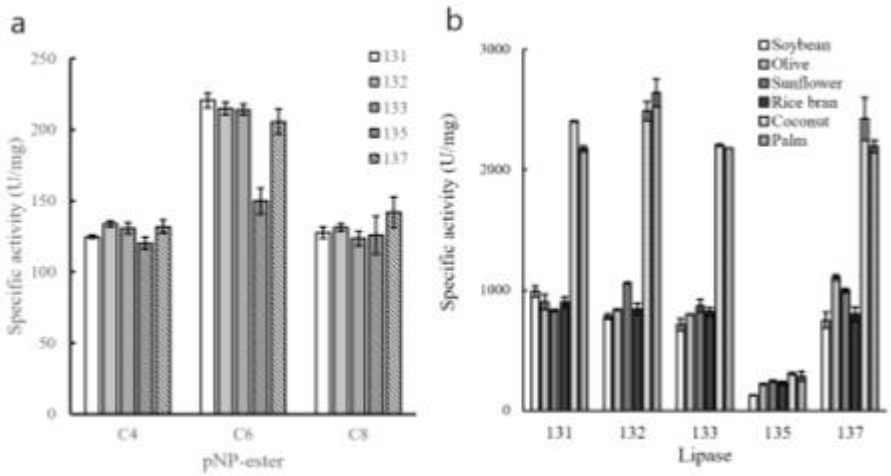


Fig. 22. Results of substrate specificity of PLI proteins (131,132,133,135,137). (a) results of measuring enzyme activity according to carbon chain lengths (C4, C6, C8) of PLI proteins. (b) results of measuring enzyme activity according to oil types (Soy bean, Olive, Sunflower, Rice bean, Coconut, Palm) of PLI proteins.

KOPRI 극지연구소

❑ Polycaprolactone(PCL) 분해 특이성

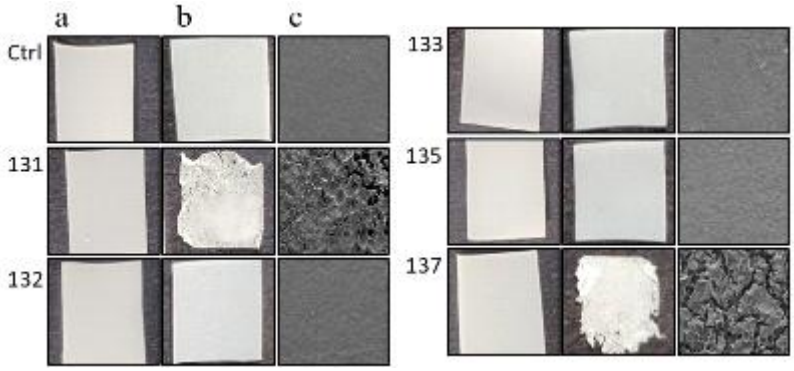


Fig. 23. SEM(scanning electron microscope) photos of PCL degraded by PLI proteins (131,132,133,135,137). (a) photograph of PCL film before experiment. (b) photograph of PCL film of (a) after treatment with PLI protein (131,132,133,135,137). (c) photograph of PCL film of (b) taken with a scanning electron microscope (SEM).

❑ 구조적 차이

PLI 단백질들의 구조를 서로 비교한 결과, 서로 높은 서열유사성을 가짐에도 불구하고, PCL 분해를 하는데 있어 많은 차이를 보임, 이는 PLI 단백질의 몇 가지 아미노산 잔기가 PCL을 분해하는 데 결정적인 영향을 준다는 것을 시사함.

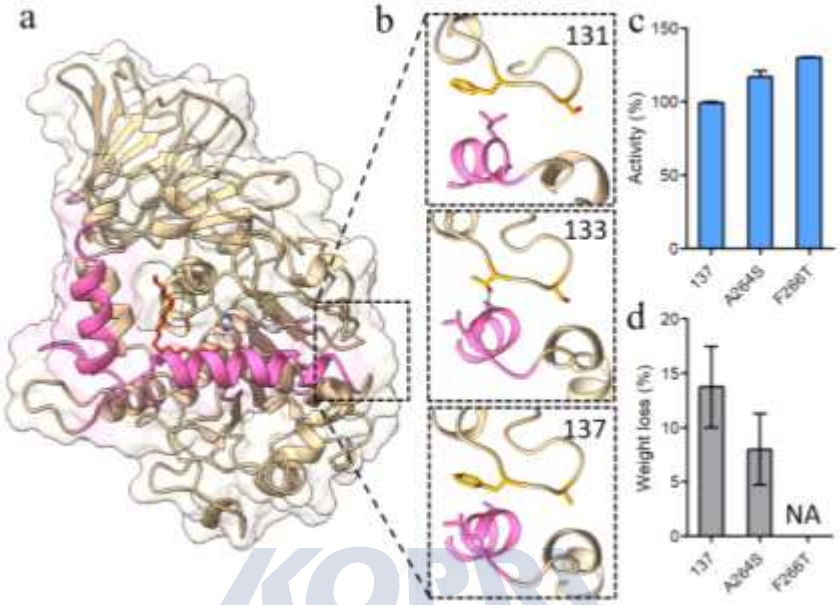


Fig. 24. (a) Structure of PLI Protein (b) Conserved Sequence Structure of PLI Protein (131, 133, 137) respectively. (c) Activity of PLI137 wild-type and PLI137 mutants (A264S, F266T) to pNPB substrate is expressed as percentage (%). (d) PCL resolution of PLI137 wild-type and PLI137 mutants (A264S, F266T) is expressed as percentage (%).

❑ 단백질 공학

- PLI 137의 활성 부위를 중심으로 PCL 분해능에 영향을 미칠 아미노산 잔기를 변형한 돌연변이체를 형성.

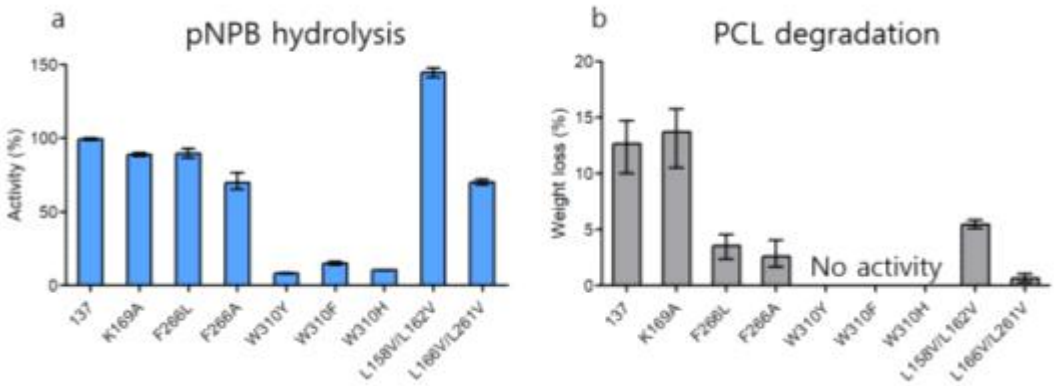


Fig. 25. Comparative analysis of the activities of the PLI137 wild type and the PLI137 mutant against the substrate pNPB and PCL in percentage (%) showed that (a) the activity of the mutants (W310Y, W310F, and W310H) compared to the activity of the pNPB of the PLI137 wild type decreased; conversely, the activity of the mutants (L158V/L162V) increased (b) the activity of the mutants (K169A) compared to the PCL resolution of the PLI137 wild type decreased PCL resolution, especially the resolution of the mutants (W310Y, W310F, and W310H).

KOPRI 극지연구소

○ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석

- Epoxide Hydrolases(EH)는 에폭사이드를 다이올로 전환하는 효소로, 약물 개발 및 화학 산업에서 중요한 역할을 함.
- EH는 다양한 생물체에서 발견되며, 특히 산업적으로 중요한 enantioselective(거울상 선택적) 반응에 유용 함. 본 연구에서는 극지 미생물에서 유래한 두 가지 새로운 EH(*Bo*EH와 *Ca*EH)의 구조와 기능을 비교하여 기질 특이성을 분석하였음.

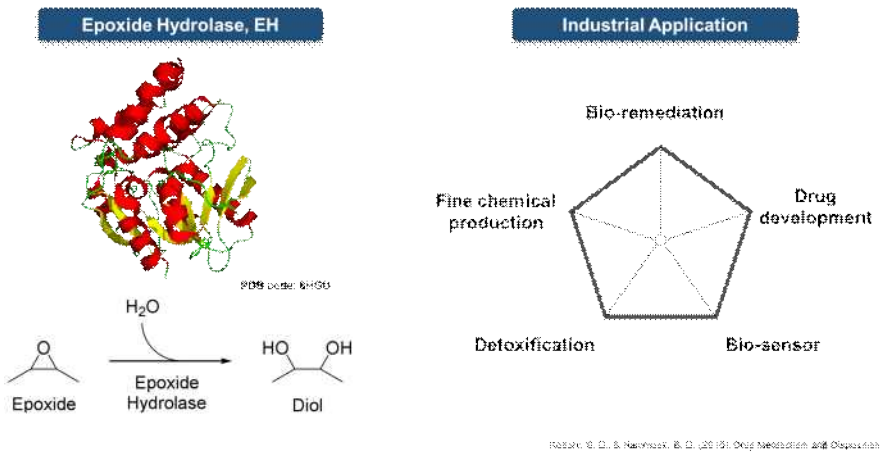


Fig. 26. A structure and specific chemical reaction (left) in which the EH enzyme

consisting of α/β structure is shown in red and yellow. EH is an environmentally friendly enzyme that efficiently promotes chemical reactions and has applications in various industries such as pharmaceutical manufacturing, chemical synthesis, and environmental purification (right).

- 연구에 사용된 Epoxide Hydrolases(EH)는 *Bosea* sp. PAMC 26642 및 *Caballeronia sordidicola* PAMC 26510에서 유래한 단백질로 각각 *Bo*EH 혹은 *Ca*EH로 명명하였음.
- *Bo*EH와 *Ca*EH 두 단백질은 각각 분석된 계통수에서 위치가 명확히 구분되어 있으며, 다른 종과의 유전적 유사성을 나타냄.

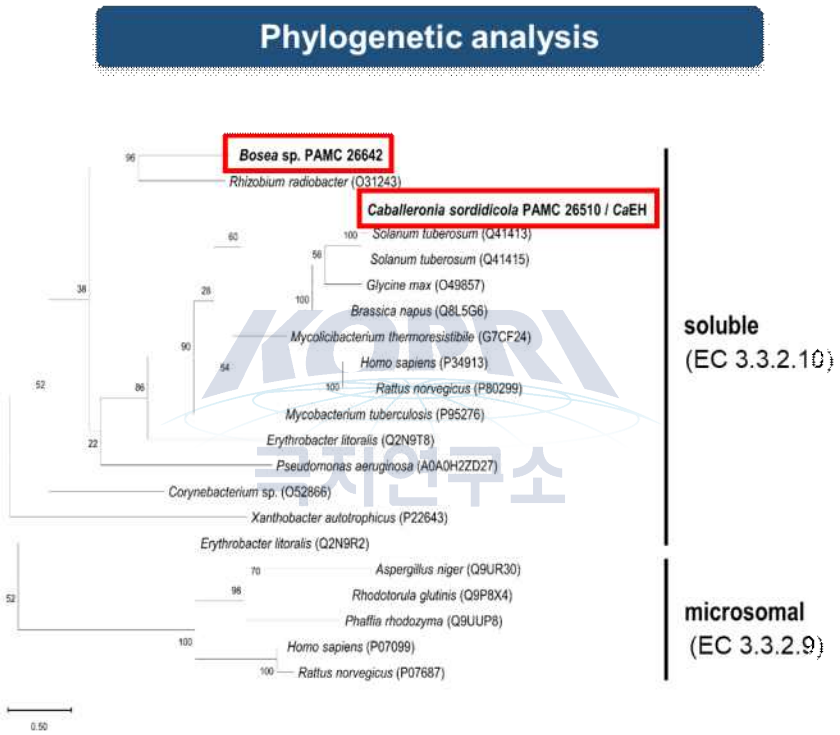


Fig. 27. Phylogenetic analysis of Epoxide Hydrolase (EH) enzymes found in various organisms. Bosea sp. PAMC 26642 (BoEH) and Caballeronia sordidicola PAMC 26510 (CaEH) are highlighted as EH derived from bacteria (red box).

❑ 기질 특이성

- *Bo*EH는 선형 aliphatic 에폭사이드에 대해 높은 활성을 보였으나, 고리형 및 방향족 에폭사이드에 대해서는 낮은 활성을 보였음. 반면에, *Ca*EH는 방향족 및 고리형 에폭사이드에 대해 높은 특이성을 보였으며, 선형 에폭사이드에는 낮은 활성을 나타냄.

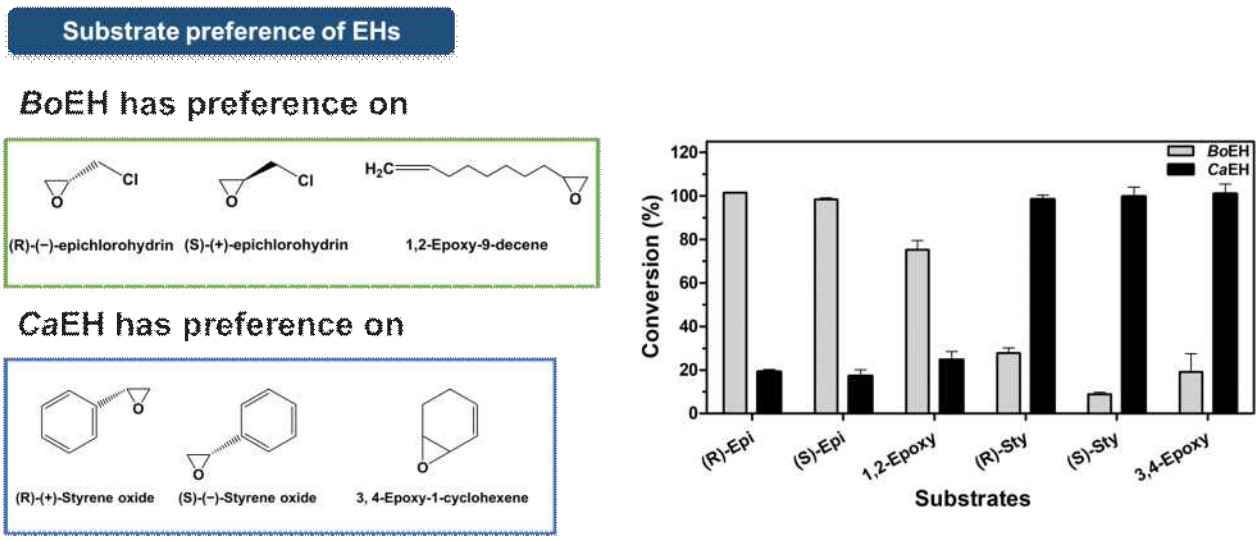


Fig. 28. A comparison of reactivity and conversion (%) preferred by the Epoxide Hydrolase (EH) enzymes BoEH and CaEH for prefered substrates

KCPRI 극지연구소

❑ 구조적 차이

- *Bo*EH와 *Ca*EH의 구조적 비교 결과, 두 효소는 34.5%의 서열 유사성에도 불구하고 촉매 α/β hydrorase 도메인에서 높은 구조적 보존성을 나타냈으며, 이는 에폭사이드 가수분해 반응에 필수적인 코어 기능을 공유함을 시사함. 그러나 주요 차이는 cap 도메인에서 관찰되었으며, *Bo*EH는 His145- Gly207 사이에 4개의 α- 나선(α4α8)으로 구성된 반면, *Ca*EH는 Val141- Thr228 사이에 5개의 α- 나선(α5α8)으로 구성되어 있음. 이러한 cap 도메인의 구조적 및 서열적 차이는 기질 결합 부위에 공간적 형태와 유연성에 영향을 미치며, 이는 *Bo*EH와 *Ca*EH의 기질 특이성을 결정하는 중요한 요인으로 작용할 것으로 예상.

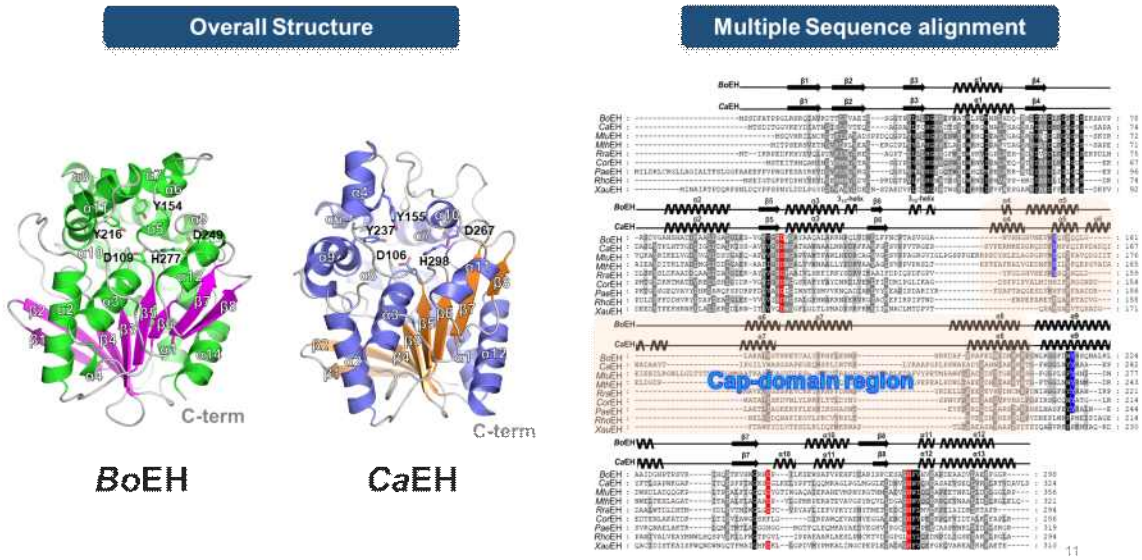


Fig. 29. The structure and multiple sequence alignment results for BoEH and CaEH. BoEH that consists of 12 α- helixes and 8 β- strands, with the major active sites being labeled Asp109, Tyr154, Tyr216 and His277. CaEH consists of 13 α- helixes and 8 β- strands, with the major active sites being labeled Asp106, Tyr155, Tyr237, and His298. Structural differences between BoEH and CaEH in multiple sequence alignment are evident in the cap domain region, and the cap domain portion in sequence alignment showed low conservativeness, and the catalytic domain showed high conservativeness.

KOBRI 극지연구소

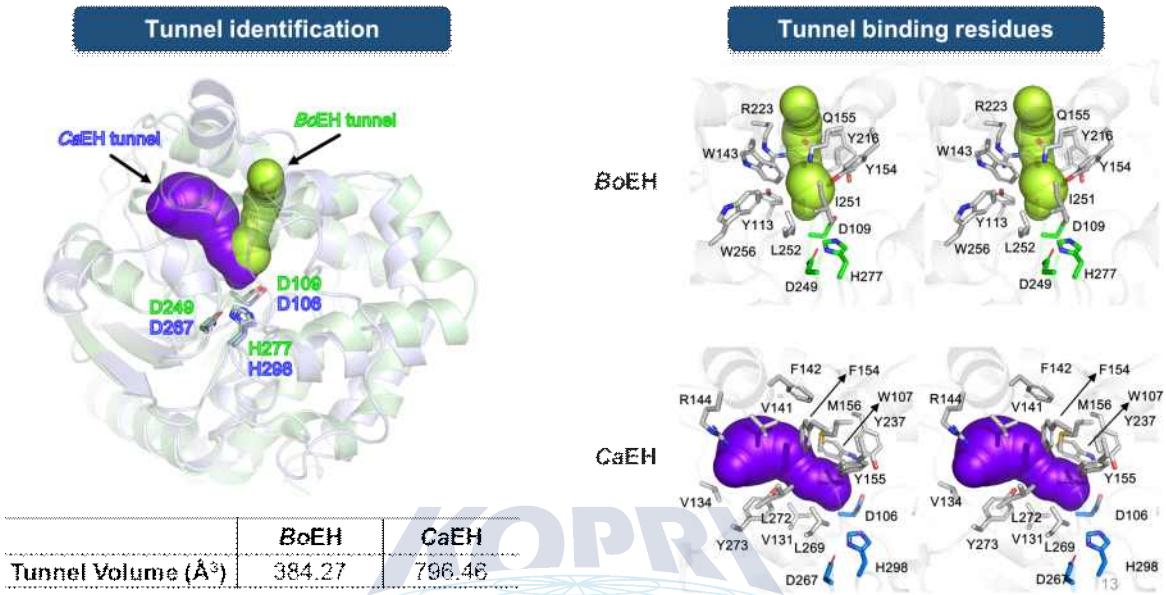
❑ 서열 및 구조적 상동체를 활용한 비교 분석

- *Bo*EH와 *Ca*EH는 수용성 에폭사이드 hydroase 그룹에 속하며, *Bo*EH는 Rhizobium radiobacter 유래 효소와, CaEH는 진핵생물 및 병원성 박테리아 유래 효소와 밀접한 관련성을 보였음. DALI 서버 분석에 따르면 *Bo*EH는 고온 환경 메타지놈 유래 효소(PDB 코드: 5NG7)와, *Ca*EH는 *Streptomyces* sp. CBMAI 2042 유래 효소(PDB 코드: 6UNW)와 높은 유사도를 나타냄.

❑ 컴퓨터 모델링 및 도킹 시뮬레이션

- 컴퓨터 도킹 시뮬레이션을 통해 *Bo*EH와 *Ca*EH의 기질 결합 터널을 분석한 결과, 두 효소의 구조적 특성이 기질 특이성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타남. *Bo*EH는 좁은 결합 터널을 가지고 있어, 이는 선형 기질과의 상호작용에 적합한 구조적 특징을 제공할 것으로 예상됨. 이 좁은 터널은 기질 결합 과정에서 기질의 방향성과 안정성을 강화하는 역할을 할 수 있으며, 선형 aliphatic 에폭사이드와 같은 기질에서 높은 반응성을 보이는 이유로 분석됨. 반면, *Ca*EH는 상대적으로 더 크고 유연한 결합 터널을 가지고 있어, 방향족

및 고리형 기질과 효과적으로 결합할 수 있는 공간적 여유를 제공하며, 이러한 터널의 크기와 형태는 방향족 화합물 및 고리형 에폭사이드와 같은 부피가 큰 기질과의 상호작용에 최적화된 구조적 특징을 나타냄.



	BoEH	CaEH
Tunnel Volume (Å³)	384.27	796.46

Fig. 30. Tunnel Identification and Binding Residues Comparison. Substrate binding tunnels in BoEH (green) and CaEH (purple). Both BoEH and CaEH contain active site residues (BoEH: Asp109, Asp249, His277; CaEH: Asp106, Asp267, His298), and the size and shape of the tunnels determine the substrate specificity of each enzyme. Residues that form substrate binding tunnels in BoEH and CaEH.

❑ 단백질 공학

- *Bo*EH와 *Ca*EH의 구조적 변이를 기반으로 특정 아미노산 잔기를 변형한 돌연변이체를 생성.
- 돌연변이 *Bo*EH는 방향족 에폭사이드에 대한 기질 특이성이 확장되었으나, *Ca*EH는 큰 변화가 없음.

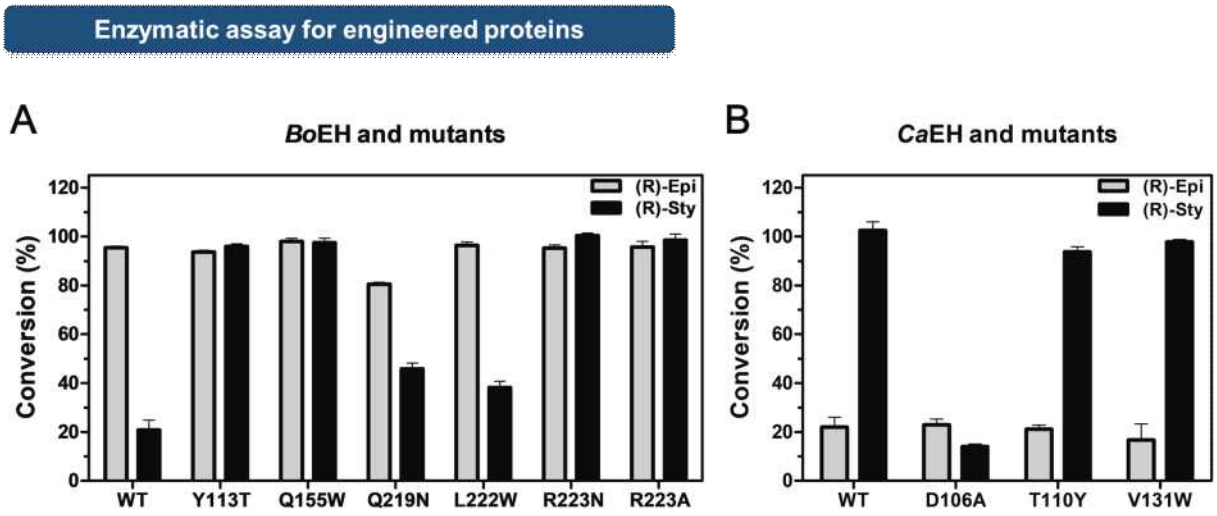


Fig. 31. Results of enzyme activity analysis comparing the conversion rate (Conversion%) of BoEH and CaEH wild-type (WT) and mutants to (R)-Epi and (R)-Sty substrates. (A) BoEH WT showed low conversion rate to (R)-Epi, but mutants (Y113T, Q155W, Q219N, L222W, R223N, and R223A) enhanced the conversion rate. All mutants maintained high conversion rate to (R)-Sty. (B) CaEH WT showed low conversion rate to (R)-Epi, but mutants (D106A, T110Y, and V131W) increased the conversion rate to (R)-Epi. Both wild-type and mutant showed high conversion rate to (R)-Sty.

KOPRI 극지연구소

❑ 결론 및 산업적 의미

- 본 연구에서 분석한 두 EH는 극지 미생물에서 발견된 새로운 효소로, 구조적 정보를 활용하여 산업적 용도의 맞춤형 효소 개발 가능성을 제시.
- 특히, 방향족 화합물의 처리 또는 선형 화합물의 변환을 위한 효소 개발에 유용한 정보를 제공.
- 에폭사이드 하이드롤라제의 기질 특이성에 대한 새로운 통찰을 제공하며, 이를 바탕으로 효소 공학과 산업적 응용에 대한 발전 가능성을 제시.

◆ 1위탁과제(경북대 : 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴)
(세부내용 별도 제출 보고서 기재)

- 신규 미세플라스틱 분해 효소의 생물리화학적 특성 분석

✓ 미세플라스틱 단위체 분해 활성 분석

Bis-hydroxyethyl terephthalate (BHET)는 terephthalic acid (TPA)에 ethylene glycol 2분자가 결합된 구조로, 고분자 PET 플라스틱으로 합성될 수 있는 단위체임. 기존에 보고된 플라스틱 분해 효소 대부분이 BHET에 대한 분해 활성 (BHETase)을 가지고 있으며, 이 특성을 분석 및 개선하여 유용한 효소 발굴에 이용하고 있음 (그림 32).

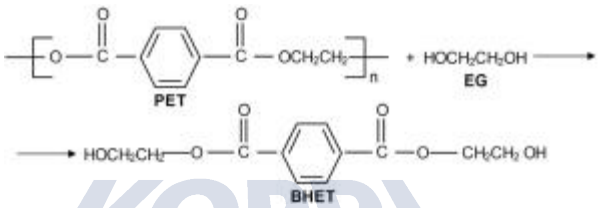


Fig. 32. Molecular formula of Bis-hydroxyethyl terephthalate (BHET), ethylene glycol (EG) and polyethylene terephthalate (PET).

KOPRI 극지연구소

당해연도에서는 전년도 연구를 통해 발굴된 신규 효소에 관하여 BHETase 활성 분석을 진행함. *Exiguobacterium antarcticum*에서 유래된 EaBHETase는 1시간동안의 배양후 (그림 33, (좌)), BHET의 87.1%를 분해하여 MHET를 생성하는 것을 high-performance liquid chromatography (HPLC)분석법을 통해 검증함 (그림 33, (우)).

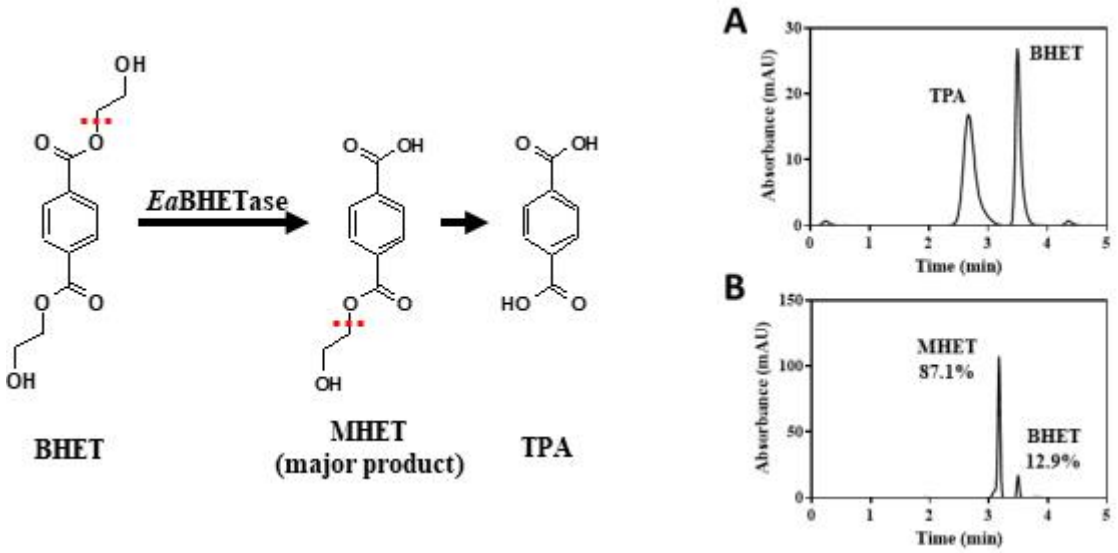
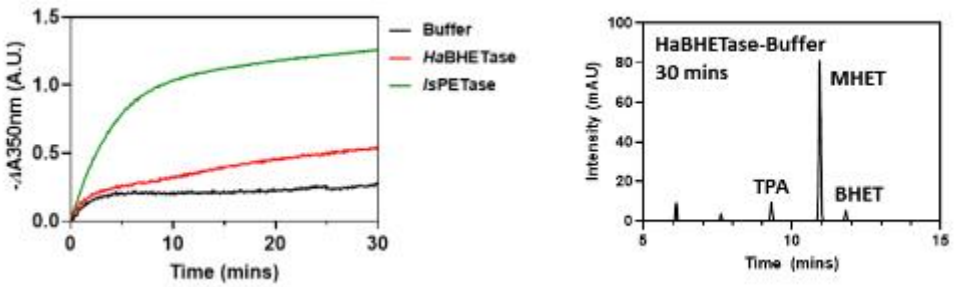


Fig. 33. (Left) Schematic table of BHET decomposition with EaBHETase (Right) BHET-degrading HPLC analysis using EaBHETase.

*Halocynthiibacter arcticus*로부터 유래한 HaBHETase의 경우, 기존에 보고된 IsPETase이 비하여 낮은 BHETase 활성을 보였으나, 30분 배양을 통해 90%이상의 BHET를 MHET로 분해하는 높은 분해 활성을 보임 (그림 34, (우, 위)). *Staphilococcus chromogenes*로부터 유래한 Sc60의 경우, EaBHETase 및 HaBHETase보다 MHET 분해활성이 떨어지는 것으로 확인됨. Phthalate esters 단위체와 Thin-layer chromatography (TLC) 분석법을 이용하여 분석한 결과 Sc60은 작은 크기의 기질에 더 적합한 활성 부위를 가지고 있는 것으로 예상됨. 따라서 크기가 큰 BHET에 관하여 가수분해 활성이 비교적 낮은 것으로 생각됨

.



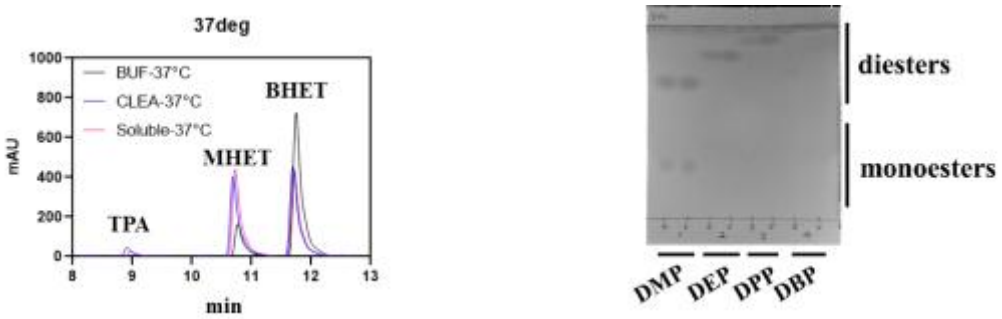


Fig. 34. (Left, Upper) Analysis of BHET degradation activity using spectrophotometric analysis and comparison with IsPETase (Right, Upper) The HPLC analysis of BHET degradation by HaBHETase. (Left, Lower) The HPLC analysis of BHET degradation by St60. (Right, Lower) TLS analysis of phthalate esters degradation by t60.

✓ 효소 특성 분석 및 저온 활성 분석

기존에 보고된 극지미생물 유래 효소의 경우, 미생물 서식 환경에 따른 특징이 효소 활성에서도 일부 나타나는 것으로 알려져 있음. 이러한 극지 환경 특징은 산업적 이용가치가 높은 효소의 필수 요소임으로, 본 연구과제에서는 남극과 북극유래 미생물에서 탐색한 효소들에서 저온 활성 특징이 보이는지 분석하였음. 그림 35는 *Halocynthiibacter arcticus*로부터 유래한 HaBHETase가 저온에서 가수분해 활성이 가장 높고 (그림 35, (좌)), 오랜시간동안 높은 활성을 유지 할 수 있음을 보여줌 (그림 35, (가운데)). 이러한 특성은 EaBHETase에서도 확인됨 (그림 35, (우)).

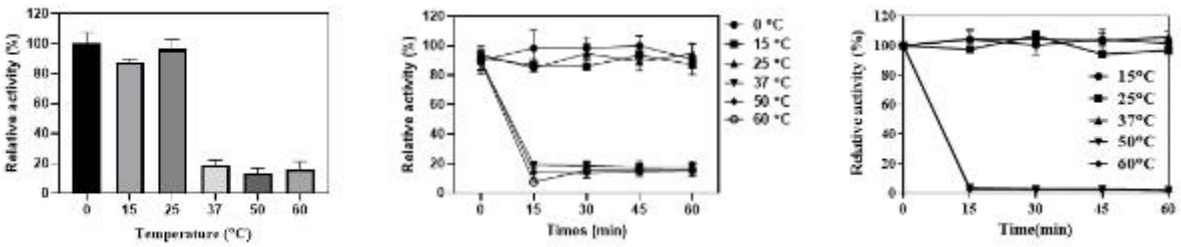


Fig. 35. (Left) Hydrolysis activity of HaBHETase according to temperature. (Center) Time-dependent Hydrolysis activity of HaBHETase (Right) Time-dependent Hydrolysis activity of EaBHETase.

◆ 2위탁과제(서울대 : 극지미생물 기반 난분해성 물질 분해 유전자 교정 연구 플랫폼의 개발)
(세부내용 별도 제출 보고서 기재)

– 분석된 전장유전체를 기반 난분해성 물질 처리를 위한 타겟 설정

✓ 난분해성 물질 처리를 위한 대사경로 분석

–기 분석된 *P. xylanexedens* 균주의 전장 유전체를 분석한 결과 이 균주에 셀룰로즈 분해 대사경로 중 **난분해성 물질인 셀로바이오즈**(cellulobiose) 분해 대사경로가 잘 발달된 것을 확인

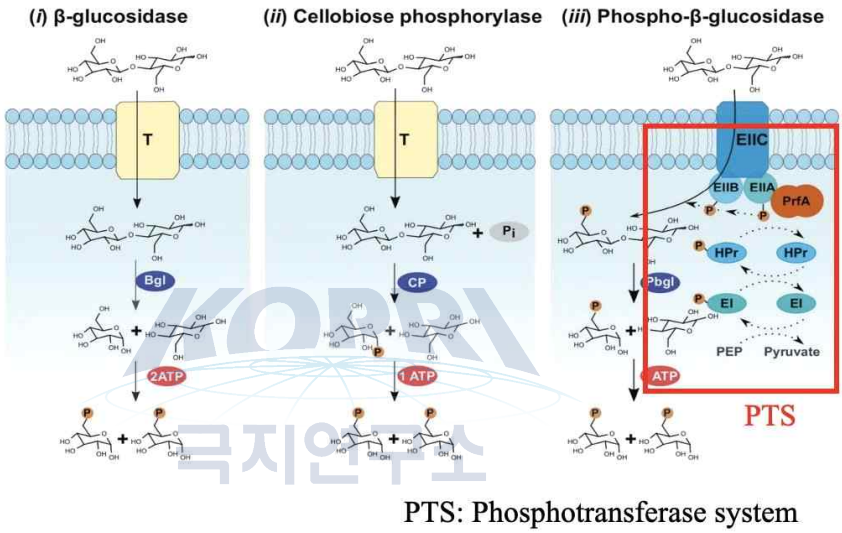


Fig. 36. A schematic diagram of the manufacturing and analysis method of sgRNA, repair template for gene correction for P. xylanexedens strain improvement (adapted from (Liu et al., ISME J. 2019))

–셀로바이오즈 대사경로는 위 그림(Fig. 36)과 같은 세가지 경로가 박테리아에서 잘 알려져 있고, 이 중에 phospho-beta-glucosidase에 의한 셀로자이오즈가 사용되는 대사경로가 *P. xylanexedens* 균주에서 확인됨.

Fig. 37. Prediction for cellobiose degradation-related metabolic clusters within the *P. xylanexedens* strain

✓ 난분해성 물질 처리 향상을 위한 knock-out 유전자 타겟 설정

- Geneious 유전 annotation 프로그램을 통한 예측 결과 *P. xylanexedens* 균주 내에 예측된 셀로바이오즈 분해 관련 대사 클러스터가 11개 존재하는 것을 예측할 수 있었고(Fig. 37), 이 중 빨간색은 PTS 시스템 관련 유전자이고, 녹색은 6-phospho-beta-glucosidase, beta-glucoside bgl operopn antiterminator 유전자로 예측되었음.

- 이 클러스터들 중에 이전에 셀로바이오즈 이용과 연관이 있는 것으로 *Streptococcus pneumoniae*에서 실험적으로 확인된 6-phospho-beta-clucosidase의 경우 Fig. 37의 4, 5, 6, 7번 클러스터와 가장 연관성이 가장 가까운 (identities가 5-6%, positive가 10%) 것으로 확인 되었고, *Paenibacillus* 중에 가장 연구가 많이 된 Paenibacillus polymyxa의 PTS IIC와 identities가 13-14%, posititive가 25% 유사한 클러스터가 4와 8번으로 나타나서 4번 클러스터를 유전자 교정 타겟으로 설정 (Fig. 37)

- **난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 *P. xylanexedens* 균주 확보**

✓ 제작된 sgRNA 및 repair template를 이용하여 유전체 교정된 *P. xylanexedens* 균주 확보

- 확보된 RNP complex와 electroporation을 진행하기 위한 competent cell 제조 방법은 아래와 같음

① Stock을 이용하여 LB broth에 배양 (25℃, overnight)

② 배양한 P. xylanexedens를 새로운 LB 100mL에 OD600 값 0.1이 되도록

배양 후, 1% glycine 첨가

③ OD값 0.4에 도달 시, 4000rpm, 20min centrifuge 후 상등액 제거

④ 10mM MgCl2을 넣어 4000rpm, 10min, 4℃로 washing 후 상등액 제거

⑤ ④번을 한번 더 반복

⑥ 0.5M Sucrose+ 10% Glycerol 2mL과 lysozyme(10ug/mL) 1uL을 첨가 후 37℃에서 30min Incubation

⑦ 4000rpm, 10min, 4℃로 centrifuge 후 상등액 제거

⑧ 0.5M Sucrose+ 10% Glycerol 10mL을 넣어 4000rpm, 10min, 4℃로 washing 후 상등액 제거

⑨ ⑧번을 한번 더 반복

⑩ 0.5M Sucrose+ 10% Glycerol 1mL에 pellet을 녹인 후 1.5mL tube에 50uL씩 분주하여 -80℃에서 보관

- RNP 요소별 농도 및 electroporation 조건은 아래와 같음

Table 3. Concentration condition by RNP component

	Competent cell	TE Buffer	Cas9 (D10A)	sgRNA	Repair template
ntrol	50ul	14ul			
hospho ta-gluc idase	50ul		8ul (10ug/ul)	2ul+2ul (10ug/ul)	2ul (20ug/ul)

- 1mm gap Cuvette에 넣고 1250V, 400Ω, 25MF 조건으로 Purse 2회 진행

- Electroporation 이후, Cellobiose M9 배지 5mL을 넣어 recovery 12h 진행 후, OD값 측정

✓ 타겟 유전자의 교정 여부 확인

- 전기영동방법을 통해 변이균주의 교정 여부 확인

(참고) 극지연구소 KPDC(Korea Polar Data Center) 생물자원 등재 목록 (2024.12. 현재)

※ 4세부과제(NRF-2021M1A5A1075524 / 극지연구소 과제분류번호-PN21014, PN22014, PN23014, PN24014)의 한국극지데이터센터(KPDC; Korea Polar Data Center) 등재 목록

순번	PN21014 (1차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름1)	메터데이터 ID2)	메터데이터 제목3)	
1	Fosmid clone (PIC13-E19)	KOPRI-KPDC-00001808	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC13-E19)	등록 (2021-09-30)
2	Fosmid clone (PSO25-J20)	KOPRI-KPDC-00001807	Fosmid sequence carrying genes related with indigo synthesis (PSO25-J20)	등록 (2021-09-30)
3	Fosmid clone (PSO21-P18)	KOPRI-KPDC-00001806	Fosmid sequence carrying genes related with indigo synthesis (PSO21-P18)	등록 (2021-09-30)
4	Fosmid clone (PIC17-E19)	KOPRI-KPDC-00001805	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC17-E19)	등록 (2021-09-30)

순번	PN22014 (2차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름1)	메터데이터 ID2)	메터데이터 제목3)	
1	Fosmid clone (PSO23-K9)	KOPRI-KPDC-00002012	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying amylase gene (PSO23-K9)	등록 (2022-09-23)
2	Fosmid clone (PSO_Lac5C)	KOPRI-KPDC-00002013	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac5C)	등록 (2022-09-23)
3	Fosmid clone (PSO_Lac6E)	KOPRI-KPDC-00002014	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6E)	등록 (2022-09-23)
4	Fosmid clone (PSO_Lac6H)	KOPRI-KPDC-00002015	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6H)	등록 (2022-09-23)
5	Fosmid clone (PIC15-F4)	KOPRI-KPDC-00002016	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PIC15-F4)	등록 (2022-09-23)
6	Fosmid clone (PWL12-F1)	KOPRI-KPDC-00002017	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PWL7-F10)	등록 (2022-09-23)
7	Fosmid clone (PWL13-C7)	KOPRI-KPDC-00002018	Fosmid sequence carrying genes related with lipase gene (PWL13-C7)	등록 (2022-09-23)

8	Fosmid clone (PIC14-H14)	KOPRI-KPDC-00002019	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-H14)	등록 (2022-09-23)
9	Fosmid clone (PSO2-I10)	KOPRI-KPDC-00002020	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO2-I10)	등록 (2022-09-23)
10	Fosmie clone (PIC19-A15)	KOPRI-KPDC-00002021	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC19-A15)	등록 (2022-09-23)
11	Fosmie clone (PIC14-E21)	KOPRI-KPDC-00002022	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-E21)	등록 (2022-09-23)
12	Fosmie clone (PIC7-O11)	KOPRI-KPDC-00002023	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC7-O11)	등록 (2022-09-23)
13	Fosmie clone (PIC8-F9)	KOPRI-KPDC-00002024	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC8-F9)	등록 (2022-09-23)
14	Fosmid clone (PSO20-P6)	KOPRI-KPDC-00002025	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO20-P6)	등록 (2022-09-23)
15	Fosmid clone (PSO2-K8)	KOPRI-KPDC-00002026	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO2-K8)	등록 (2022-09-23)
16	Fosmid clone (PSO1-A20)	KOPRI-KPDC-00002027	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO1-A20)	등록 (2022-09-23)

순번	PN23014 (3차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름	메터데이터 ID	메터데이터 제목	
1	Fosmid clone (PSO1-A7)	KOPRI-KPDC-00002394	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO1-A7)	등록 (2023-11-03)
2	Fosmid clone (PSO1-N4)	KOPRI-KPDC-00002395	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO1-N4)	등록 (2023-11-03)
3	Fosmid clone (PSO3-I2)	KOPRI-KPDC-00002396	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO3-I2)	등록 (2023-11-03)
4	Fosmid clone (PSO3-K16)	KOPRI-KPDC-00002397	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO3-K16)	등록 (2023-11-03)

순번	PN24014 (4차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름	메터데이터 ID	메터데이터 제목	
1	Lipase gene (PLI131-135)	KOPRI-KPDC-00002695	Nucleotide sequence of lipase gene (PLI131-135)	등록 (2024-12-24)
2	Lipase gene (PLI137)	KOPRI-KPDC-00002696	Nucleotide sequence of plastic degrading enzyme gene (PLI137)	등록 (2024-12-24)

KOPRI 극지연구소

1) 진도관리, 자체평가 결과 등을 반영하여 성과가 우수한 6 대 기술을 선정

- (① 신규 저온성 에스테라제 발굴 및 기능성 개선 기술) 알래스카 영구 동토층에 서식하는 호냉성(psychrophilic)미생물인 Paenibacillus sp. R4 균주 유래의 저온에서 활성이 뛰어난 에스터 가수분해효소 PsEst3를 발굴하였으며, 이의 구조적인 특징에 의해 특정 아미노산 잔기에 특정 변이를 유발시켰을 때, 에스터 가수분해효소 활성이 약 2배 정도 증가된 PsEst3 변이체를 제작함.

- (② 극지 효소를 이용한 L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조 기술) 극지 저온성 미생물 (Psychrobacter sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석하고, 두 효소를 이용해서 L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조할 수 있는 기술을 제공

- (③ 항산화제 및 보존제 대량 생산을 위한 생합성 생산 기술) *Lactobacillus acidophilus*에서 유래한 페룰릴 에스테라아제(LaFae)를 획득하고 그 특성을 조사 하였고, LaFae가 에칠페룰산과 반응하며 밀초와 쌀초, 옥수수 줄기 등의 원료로부터 효과적으로 페룰릭산을 생산할 수 있음을 입증

- (④ 남극 극저온 박테리아 *Exiguobacterium antarcticum*에서 유래한 카르복실에스테라아제를 이용한 미세플라스틱 분해 기술) 다양한 기질을 이용한 EaEst2의 활성 측정 결과 EaEst2는 플라스틱 폴리에틸렌테렙탈레이트(polyethylene terephthalate; PET) 분해 중간체인 BHET에 대한 분해 능력을 보였으며, 세포 고정화를 통해 산업 응용 가능성을 보임.

- (⑤ 활성이 증가된 에스터아제의 돌연변이 효소 개발 기술) LgEstI의 에스터 분해 능력을 규명하고 돌연변이체를 통해서 활성이 증가된 에스터아제 변형체(F207A) 개발 하고 효소 고정화를 통해서 10번의 세척 후에도 활성이 유지되는 산업적 촉매로서의 잠재력을 가진 에스터라제 발굴

- (⑥ 단백질 구조적 정보를 활용하여 기질 특이적 맞춤형 효소 개발) 기존 에폭사이드 hydrorase의 기질 특이성과 효율성을 극복한 맞춤형 효소 설계하여 산업용 효소로의 개발 가능성을 제시하고, 기존 기술 대비 비용 절감과 생산성을 향상함.

2) 성과별 내용

성과 1	신규 저온성 에스테라제 발굴 및 기능성 개선 기술

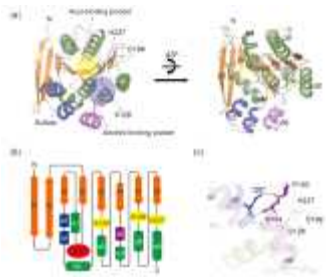
① 성과개요

연구자	극지연구소 김한우/신승철/손종현/최웅/김현								
과제명	극지기초원천기술개발								
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영
		O	O						

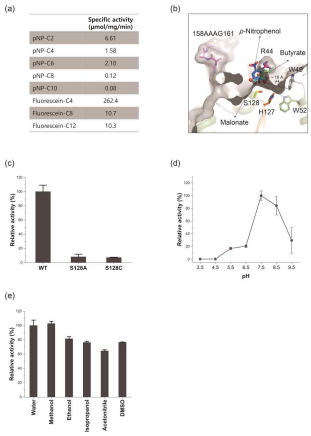
성과개요

- 핵심 개발 내용: 알래스카 유래 저온성 미생물 유래의 신규 효소 발굴 및 기능성 개량

1) 가수분해효소로 분류되는 에스터 가수분해효소(E.C. 3.1.1.1)와 리파아제(E.C.3.1.1.3)는 지방산 에스테르의 가수분해 및 에스테르 교환반응을 촉진시키는 산업용 효소로 활용이 가능함.
2) 저온 환경에서 상대적으로 높은 촉매활성을 보이는 저온성 효소는 에너지 절약 측면이나 저온에서의 촉매 반응이 필요한 정밀화학 등의 산업영역에서 잠재성은 상당히 높음.
3) 북극권 토양에서 분리한 저온성 미생물 Paenibacillus sp. R4 유래의 신규 에스테라제 PsEst3 의 유전자 분석 결과, 효소활성을 위한 촉매잔기인 serine을 함유하는 특유의 pentapeptide (GHSRA) 서열을 가지고 있는 것이 확인됨.
4) 신규 발굴된 PsEst3의 단백질 구조 분석을 통하여 기질 결합부위를 결정하고, 특정 아미노산을 변이시켜 가수분해 활성을 2배 증가시킨 변이체를 제작함으로서 효소의 기능성을 개선시킴.



PsEst3의 단백질 구조

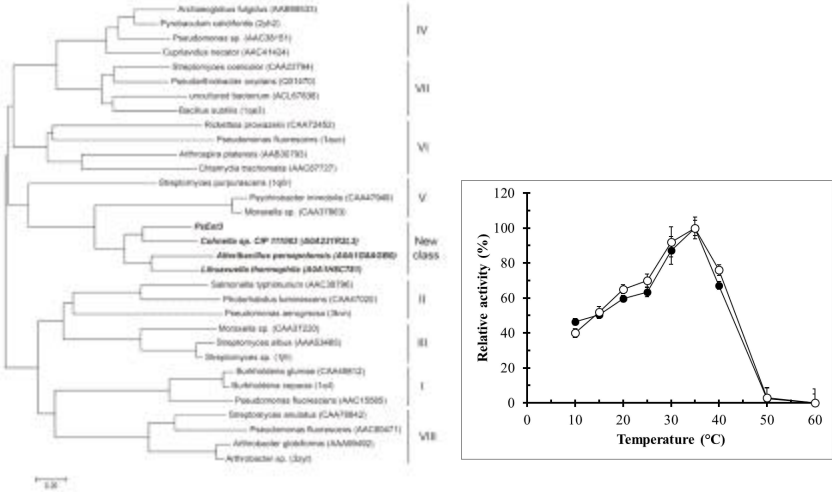
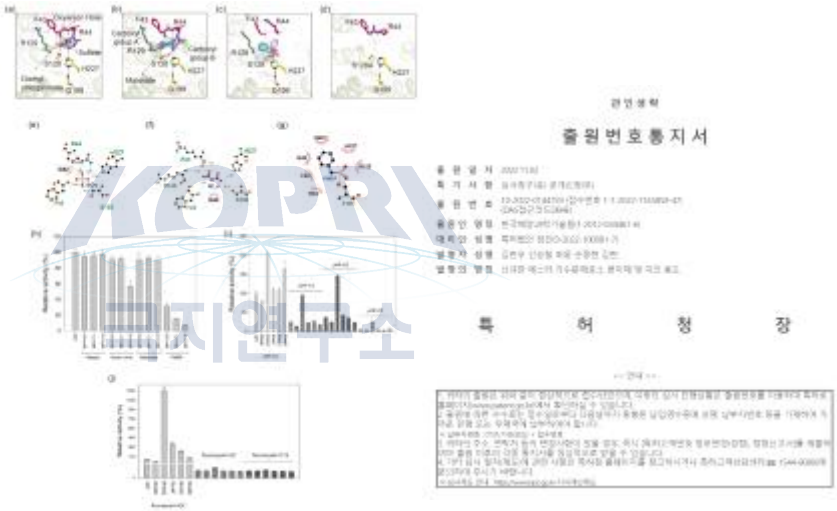


기질 결합부위의 구조와 생화학적 특성분석

② 성과내용

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
신규 에스테라제/ 저온 환경에서 높은 생촉매 활성	

	 알래스카 유래 저온성 효소 PsEst3의 신규성과 저온 효소활성
변이체 제작을 통한 기능성 개선	 단백질 구조분석을 통한 변이체 제작과 활성이 향상된 개량 효소 개발 (특허출원)

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- PsEst3의 아미노산 서열을 분석한 결과 지금까지 알려진 8개의 lipase/esterase family 중에서 class V family와 연관이 된 것으로 나타나지만, 초기 진화단계에서 분화되어 새로운 family로 판단됨.(신규성 입증)
- 신규 에스테라제의 효소 활성에 대한 데이터를 구축하고 생화학적 특성을 분석하여, 기존 효소 대비 높은 저온활성과 각종 화학물에 대한 변성내성이 있음을 규명하였음.

– 우수성

- 저온성 효소 PsEst3에 대한 단백질 구조 분석을 통하여, 효소활성 및 기질과의 결합에 관여하는 아미노산의 위치와 역할에 대하여 분자 수준에서 규명함.
- 단백질 구조분석 결과를 기반으로 하여, 발굴된 야생형 효소 단백질의 활성보다 탁월하게 증가된 변이체를 제작함으로서 기능성 향상에 따른 활용성이 높은 개량된 효소를 개발함.

– 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기물질 분해 효소 발굴	• 알래스카 유래 저온성 미생물에서부터 신규 에스테라제 효소 개발
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구 –	• 동토에서 분리된 미생물 Paenibacillus sp R4 의 유전체 정보를 기반으로 신규 에스테라제 효소 PsEst3을 발굴하고 생화학적 특성을 규명 • 발굴된 효소의 기능성 개선을 위하여 단백질 구조분석을 통해 변이체를 제작하고, 다양한 기질에 대한 활성을 검정하여 고활성 변이체를 개발함.

③ 연구성과의 활용 현황 및 계획

– 산업화/산업현장 적용

- 활용 가능한 산업현장으로서는 의약품 산업, 바이오 디젤, 세제 생산, 환경정화 산업 등 광범위한 산업적 응용이 가능함.
- 특허등록을 통한 재산지식권 확보와 해당기술이 요구되는 산업체와의 협력을 통하여 상용화를 추진 계획

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				
창업	미정				

KOPRI 극지연구소

④ 파급효과/기대효과

– (학술적/기술적/인프라 측면)

- 신규 에스테라제의 생화학적 활성특성과 단백질 구조 분석정보를 통하여 확보된 기질의 결합 및 활성기작에 대한 학술정보를 제공
- 동토 유래의 저온성 미생물을 활용한 다양한 효소 개발의 가능성과 북극 생명자원을 기술소재로서 활용함으로서 생물소재의 다양성 확보
- 동토 유래 다양한 생명자원을 이용한 국내 생명공학 기술개발을 위하여, 환북극권 관측거점의 인프라 활용에 대한 효과 기대

– (산업경제적 측면)

- 에너지 저감 및 저온에서 에스터 가수분해 반응이 요구되는 식품, 의약, 에너지 등의 다양한 산업분야에서 생촉매 소재로서 활용 가능

– (사회적 측면)

- 생물소재의 다양성을 제공함으로서 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력을 향상시킴

⑤ 성과근거자료

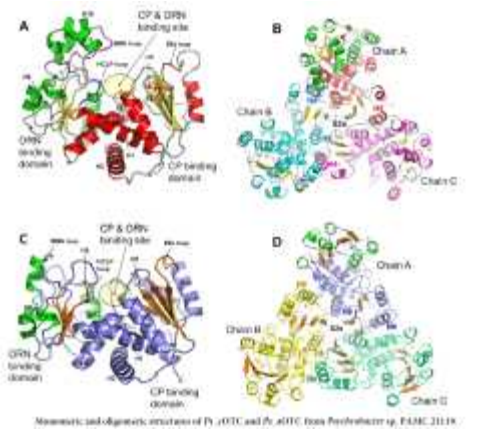
구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간				○						

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Structural and biochemical insights into PsEst3, belonging to a new class of esterases, obtained from Paenibacillus sp. R4 strain		IUCrJ	5.588	2023년 03월
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	출원	신규한 에스터 가수분해효소 변이체 및 이의 용도	10-2022-0144759 (접수번호 1-1-2022-1165859-47) (DAS접근코드DB4E)	대한민국	
창업	기술명		기업명	창업일	
	-		-	-	

성과 2	극지 저온성 미생물 *Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소의 용도: L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine) 제조 기술

① 성과개요

연구자	극지연구소 도학원/황지섭/이민주/이준혁/한세종								
과제명	극지기초원천기술개발								
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영
		O	O						

성과개요	– 극지 저온성 미생물 (*Psychrobacter* sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석 – 두 효소 (cOTC 와 aOTC) 의 기질 결합 부위 구조적 차이로 인해 기질과 반응물이 서로 다른 반대방향의 화학반응을 촉매한다는 사실 규명	

② **성과내용**

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
(1) 카타볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(catabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_cOTC)를 이용하여 L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조하는 방법을 제공 (2) 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_aOTC)를 이용하여 L-오르니틴으로부터 L-시트룰린을 제조하는 방법을 제공	L-arginine + H_2O $\xrightarrow{ADI}$ L-citrulline + NH_3 L-citrulline + Pi $\underset{aOTC}{\overset{cOTC}{\rightleftharpoons}}$ L-ornithine + carbamyl-P carbamyl-P + ADP $\xrightarrow{CK}$ ATP + CO_2 + NH_3 본 연구결과로 2.6 Å 과 2.2 Å 분해능에서 극지 저온성 미생물인 *Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC의 구조를 해석하고 기질 선호도를 비교하여, L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine) 제조를 위해서는 Ps_cOTC를 이용해야 하고, L-오르니틴으로부터 L-시트룰린 제조를 위해서는 Ps_aOTC를 이용해야 하는 것을 확인

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(Ornithine carbamoyltransferases, OTC; EC2.1.3.3)는 아르기닌 디이미나제(arginine deiminase, ADI) 경로 및 아르기닌 생합성에 관여하는 효소
- 카타볼릭 OTC(catabolic OTC, cOTC) 및 아나볼릭 OTC(anabolic OTC, aOTC) 두 종류의 효소가 존재
- cOTC는 시트룰린(citrulline)의 인산분해(phosphorolysis)를 촉매하여, 오르니틴(ornithine, ORN) 및 카바모일 포스페이트(carbamoyl phosphate, CP)를 생성하고, 이는 ADI 경로를 통해 카바메이트 키나제(carbamate kinase)에 의해 ADP로부터 ATP를 생성하는 역할 수행
- 다양한 종의 OTC에 대한 구조적 및 생화학적 연구가 수십 년 동안 수행되었지만, 두 효소의 단방향 촉매 과정의 구조 기반 메커니즘은 아직까지 명확하지 않음
- 동일한 종에서의 aOTC 및 cOTC에 대한 연구가 부족
- 두 OTC 간의 가장 큰 구조적 차이점은 CP 및 ORN 바인딩 포켓(binding pocket)의 크기 차이임
- Ps_cOTC 및 Ps_aOTC를 사용한 생화학적 연구와 구조적 연구 결과는 80s 루프의 독특한 배열이 다른 기질 선호도와 OTC의 활성을 결정 한다는 사실 규명

– 기술적 우수성

- 카타볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(catabolic Ornithine carbamoyltransferases,

Ps_cOTC) 및 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_aOTC)의 구조적 및 화학적 특징을 분자수준에서 규명

- 구조적 및 화학적 서로 다른 특징으로 인하여 L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine)를 제조하기 위해서는 Ps_cOTC를 이용해야 하고, L-오르니틴으로부터 L-시트룰린을 제조하기 위해서는 Ps_aOTC를 이용해야 함을 확인

- 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기물질 분해 효소 발굴	• 본 연구에서는 극지 저온성 미생물(Psychrobacter sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석을 통해 두 효소 (cOTC 와 aOTC) 의 기질결합 부위 구조적 차이로 인해 기질과 반응물이 서로 다른 반대방향의 화학반응을 촉매한다는 사실을 규명
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	• aOTC 는 기질로 이용하는 인산카르바모일과 강한 affinity를 가지는 반면 cOTC 는 인산카르바모일과 매우 약한 affinity를 가짐 • 두 효소 (cOTC 와 aOTC)의 기능적 차이를 규명한 연구 결과는 향후 해당 효소를 이용한 유용물질 생산에 활용 가능

③ 연구성과의 활용 현황 및 계획

- 산업화/산업현장 적용
  - 향후 두 효소 (cOTC 와 aOTC)의 생산방법, 구조정보, 기능적 특성에 대한 추가 연구 및 특허권 확보 이후에 기술 이전을 통한 사업화 추진을 목표로 설정

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				

④ 파급효과/기대효과

- (학술적/기술적/인프라 측면)
  - OTC의 구조와 기능 관계를 분자수준에서 이해하기 위해, 두 효소 (Ps_cOTC 와 Ps_aOTC)의 결정 구조를 해석
  - OTC의 알로스테릭(allosteric) 효과 및 기질 선호도를 이해하기 위해, 트리머에서 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC의 구조적 차이 규명
- (산업경제적 측면)
  - cOTC 와 aOTC 효소의 특성 규명 연구결과는 의약소재 및 건강기능식품 원료 물질인 아르기닌, 시트룰린, 오르니틴의 효소적 대량 생산에 이용 가능
- (사회적 측면)
  - 효소 및 생물소재의 국산화를 통해 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력 향상

⑤ 성과근거자료

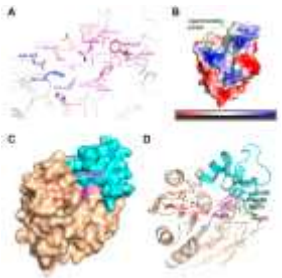
구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		○		○						

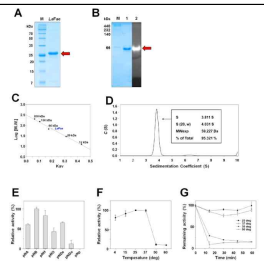
논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from *Psychrobacter* sp. PAMC 21119		PLoS ONE	3.752	2022년 9월
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	출원	*Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소 및 이의 용도	10-2022-0145788 (DAS접근코드BC49)	대한민국	
창업	기술명		기업명	창업일	
	-		-	-	

KOPRI 극지연구소

성과 3	항산화제 및 보존제 대량 생산을 위한 생합성 생산 기술

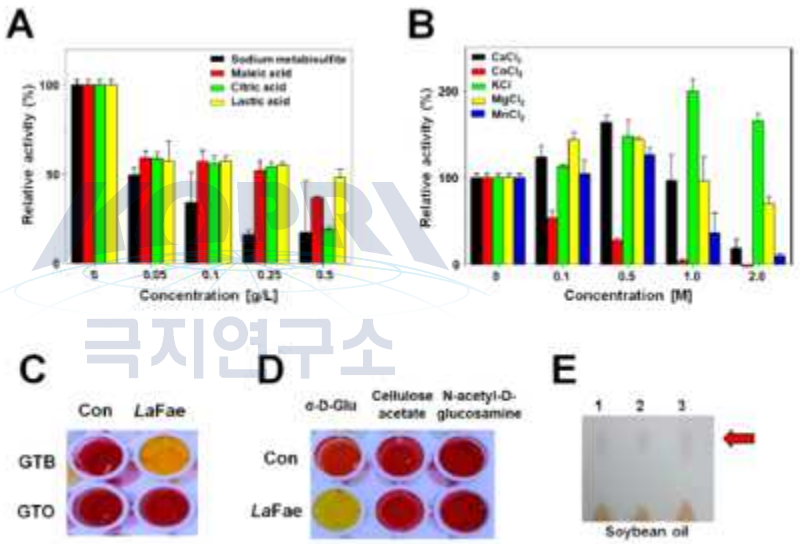
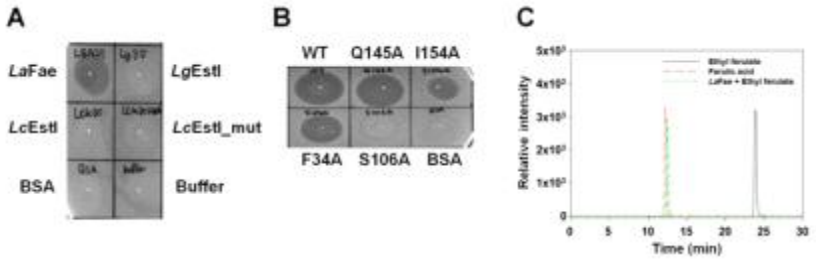
① 성과개요

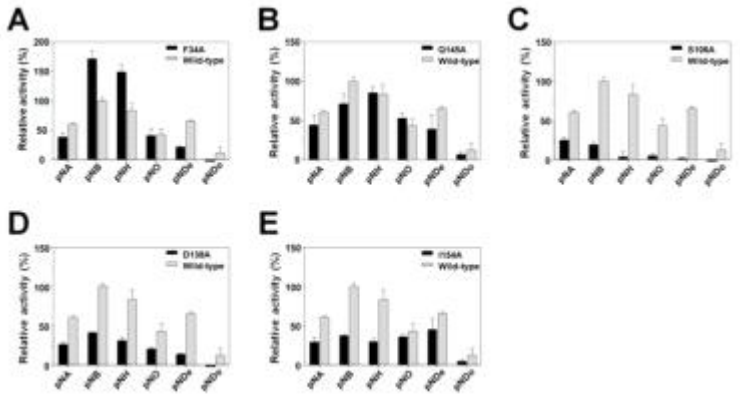
연구자	극지연구소 황지섭/신승철/김한우/도학원/이준혁								
과제명	극지기초원천기술개발								
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영
		O	O						
성과개요	• 핵심 개발 내용: 대량 생산 가능한 페룰릭산 및 하이드록실시나믹산을 생산할 수 있는 단백질 발굴 및 연구 1) 페룰릭산 및 관련 하이드록시신남산 (hydroxycinnamic acids)은 식물 생물질의 중요한 성분 중 하나로 안전하고 대량으로 생산할 수 있는 새로운 화합물의 도출이 중요함. 2) LaFae가 에칠페룰산과 반응하며 밀초와 쌀초, 옥수수 줄기 등의 원료로부터 효과적으로	 LaFae의 단백질 구조							

	페룰릭산을 생산할 수 있음을 입증. 3) 또한, 자일라나제 보충이 LaFae 효소 가수분해를 향상시키고 페룰릭산 생산을 증가시킴을 발견하였음. 4) LaFae가 식물 생물질 및 농산물에서 페룰릭산을 생산하는 데 상당한 응용 잠재력이 있다는 점을 확인함.	 LaFae의 생화학적 특성 분석

② **성과내용**

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
유용 물질 생합성 효소/ 새로운 화합물 생성 가능한 효소	 LaFae를 이용한 유용 물질 생합성을 증가시키는 조건 탐색 결과
변이체 제작을 통한 활성 특성 연구/ 기능 개선형 변이체 F43A는 활성 부위의 크기를 확장시키는 돌연변이로 활성을 증가시켜 유용 물질의 생산을 증대시킴	



다른 에스터레이즈와의 활성 비교 및 변이체 제작과 활성 연구를 통한 분자 수준의 메커니즘 연구 (위), 변이체 제작과 활성 연구를 통한 활성이 증가된 기능 개선형 효소 발견 (아래)

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- Phe34를 Ala로 돌연변이 하면 p-nitrophenyl butyrate에 대한 LaFae 활성이 약 1.6배 증가하는 것으로 나타났으며 이 결과는 LaFae가 식물 생물질 및 농산물에서 페룰릭산을 생산하는 데 상당한 응용 잠재력이 있다는 점을 시사.
- 이러한 변이를 다른 유사 효소에 적용하여 효소 활성을 증가시키는 일반적인 돌연변이 위치를 찾음.

– 우수성

- LaFae에 대한 단백질 구조 분석, 효소 활성 및 무기염과 유기산의 영향 평가를 통해 최적화된 활성 기작을 분자 수준에서 규명하고 최적의 활성 조건을 찾아냄.
- 단백질 구조 분석 결과를 기반으로 하여, 발굴된 야생형 효소 단백질의 활성보다 탁월하게 증가된 변이체를 제작함으로서 기능성 향상에 따른 활용성이 높은 개량된 효소를 개발함.

– 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기물질 분해 효소 발굴	• 미생물에서부터 신규 페룰릴 에스테라아제 효소 개발
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구 –	• 신규 에스테라아제 효소 LaFae를 발굴하고 생화학적 특성을 규명 • 발굴된 효소의 기능성 개선을 위하여 단백질 구조 분석을 통해 변이체를 제작하고, 다양한 기질에 대한 활성을 검정하여 고활성 변이체를 개발함.

③ 연구성과의 활용 현황 및 계획

– 산업화/산업현장 적용

- 건강 식품, 화장품, 제약 분야에서 필요한 항산화제 및 보존제의 생물학적 생산 및 응용이 가능함.

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				
창업	미정				

④ **파급효과/기대효과**

– (학술적/기술적/인프라 측면)

- 신규 에스테라아제의 생화학적 활성 특성과 단백질 구조 분석 정보를 통하여 확보된 기질의 결합 및 활성 기작에 대한 학술정보를 제공
- 다양한 에스테라아제를 확보함으로써 기업 대학교와 공동 연구를 위한 발판 마련

– (산업경제적 측면)

- 에스터 가수분해 반응이 요구되는 식품, 의약, 에너지 등의 다양한 산업 분야에서 생촉매 소재로서 활용 가능

– (사회적 측면)

- 다양한 기능을 가진 생물자원을 제공함으로서 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력을 향상시킴

⑤ **성과근거자료**

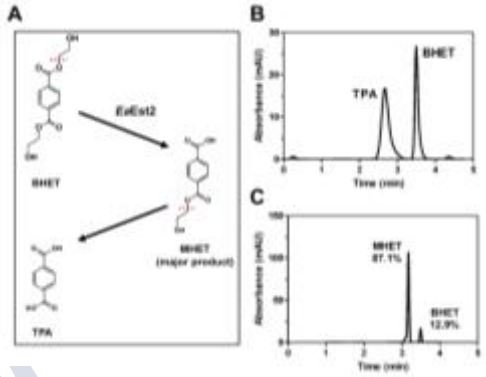
구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		○								

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Feruloyl Esterase (LaFae) from Lactobacillus acidophilus: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production		International Journal of Molecular Sciences	6.208	2023.07.06
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	–	–	–	–	
창업	기술명		기업명	창업일	
	–		–	–	

성과 4	남극 극저온 박테리아 *Exiguobacterium antarcticum*에서 유래한 카르복실에스테라아제를 이용한 미세플라스틱 분해 기술

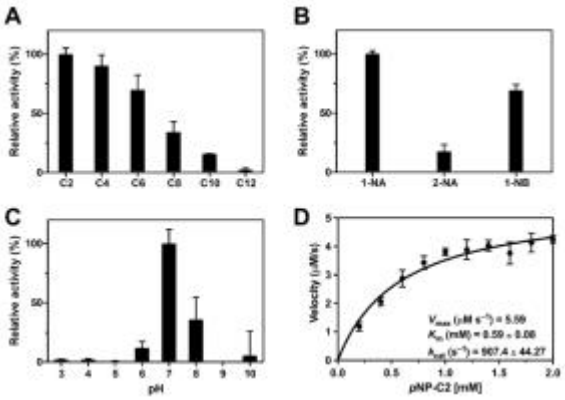
① 성과개요

연구자	극지연구소 황지섭/신승철/김한우/도학원/이준혁								
과제명	극지기초원천기술개발								
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영
		O	O						

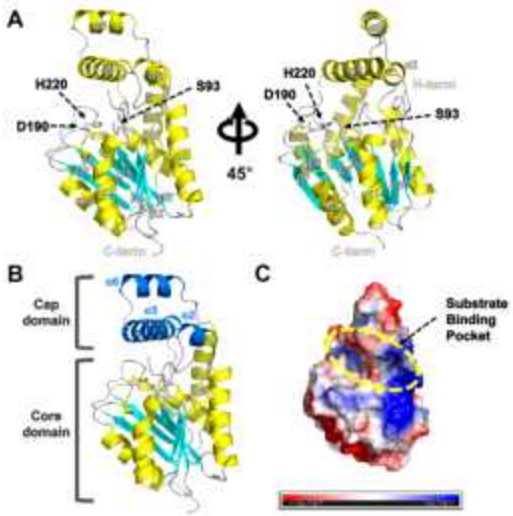
성과개요	– 남극 극저온 박테리아 *Exiguobacterium antarcticum*에서 유래한 카르복실에스테라아제(EaEst2)의 생화학적 구조적 특성 규명 – 카르복실에스테라아제(EaEst2)를 이용한 미세플라스틱의 분해 사실 확인	 EaEst2를 이용한 polyethylene terephthalate(PET)의 중간체 분해 능력 확인

② 성과내용

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
(1) EaEst2는 구조 및 생화학적 기능 / aEst2의 전체 구조는 핵심 도메인에서 α/β hydrolase fold를 형태를 취하고 있으며 아실 사슬이 짧은 기질을 선호함. (2) 미세플라스틱 분해 기능 / bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) 분해 가능한 카르복실에스테라아제(carboxylesterase)의 구조 및 생화학적 기능 확인	 – 다양한 기질을 이용한 활성 측정 결과 결과 EaEst2는 로 p-nitrophenyl esters의 다양한 아실 길이를 가진 기질에 반응함. 특히 짧은 아실 길이를 가진 기질에 대해 높은 활성을 보임.

KOPRI 극지연구소



– 구조 분석을 통한 EaEst2의 기질 특이성 연구

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- 계통 분석을 통해 EaEst2 단백질은 서로 다른 clade에 속한 Est30 (GenBank ID: AAN81911.1)와 높은 서열 유사성인 65.04%를 보이기 때문에 carboxylesterase Family XIII에 속함.
- 서열 분석 결과, EaEst2는 아미노산 서열에서 공통된 펜타펩타이드 GLSLG를 가지고 있으며, 이는 carboxylesterase Family XIII 효소에서의 전형적인 모티프인 촉매 Ser 잔기를 포함함
- EaEst2의 최적 활성 pH를 측정한 결과 EaEst2는 pH 7.0에서 최대 활동을 나타냈으며, pH 8.0에서는 최대 활동의 약 40%만 유지되었음. 최적 조건 하에서 EaEst2의 효소 활성을 측정한 결과 Vmax 및 Km 값은 각각 5.59 uM s-1 및 0.59 mM 였음.
- 다양한 기질을 이용한 EaEst2의 활성 측정 결과 EaEst2는 플라스틱 폴리에틸렌테렙탈레이트(polyethylene terephthalate; PET) 분해 중간체인 BHET에 대한 분해 능력을 보였으며, 세포 고정화를 통해 산업 응용 가능성을 보임.

– 기술적 우수성

- EaEst2의 에스터 분해 능력과 미세플라스틱 분해 능력을 구조 분석을 통해 분자 수준에서 규명
- EaEst2의 구조적 및 생화학적 특성화는 미세플라스틱 분해 분야에서 산업적 촉매로서의 잠재력을 보여줌.

– 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기물질 분해 효소 발굴	• 본 연구에서는 남극 극저온 박테리아 Exiguobacterium antarcticum에서 유래한 카르복실에스테라아제(EaEst2)의 생화학적 구조적 특성 규명 및 효소를 이용한 미세플라스틱의 분해 능력 및 과정을 분자 수준에서 증명
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의	• 신규 유용 효소의 탐색 결과로 미세플라스틱을 분해하는 유용 효소를 찾음

	유전체 기반의 효소 탐색 연구	• 효소의 고해상도 구조 규명을 통해 분자 수준에서의 촉매작용을 밝히고 미세플라스틱 분해에 대한 연구 발판을 마련

③ **연구성과의 활용 현황 및 계획**

– 산업화/산업현장 적용

• EaEst2의 생산방법, 구조정보, 기능적 특성에 대한 추가 연구를 통해 최적화된 돌연변이를 개발하고 미세플라스틱 분해 촉매제로서의 가능성을 모색할 예정

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				

④ **파급효과/기대효과**

– (학술적/기술적/인프라 측면)

• EaEst2 구조와 기능 관계를 분자 수준에서 이해하기 위해, 고해상도의 구조를 해석

• 이번 연구를 통해 다른 극지 미생물 유래 에스테라아제의 미세플라스틱 분해 가능성에 대한 기초를 마련

– (산업 경제적 측면)

• 미세플라스틱에 대한 생물학적 분해 연구에 기초를 마련하고 효소의 산업적 이용에 대한 가능성을 제시

– (사회적 측면)

• 극지 유래 효소 및 생물 소재의 국산화를 통해 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력 향상

⑤ **성과근거자료**

구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		○								

KOPRI 극지연구소

논문	논문명	학술지명	IF	게재년월
	Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium Exiguobacterium antarcticum	International Journal of Molecular Sciences	6.208	2023.07.27

특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국
	–	–	–	–

창업	기술명	기업명	창업일
	–	–	–

성과 5	활성이 증가된 에스터아제의 돌연변이 효소 개발 기술

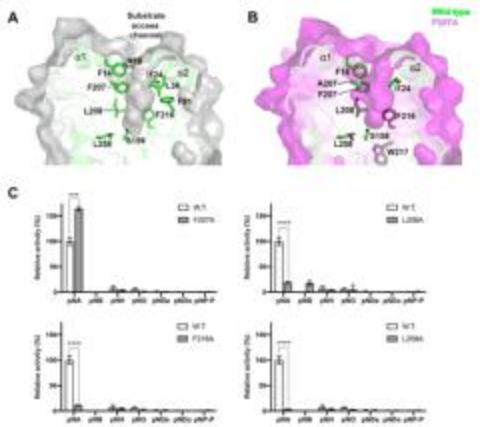
① 성과개요

연구자	극지연구소 도학원/신승철/김한우/이준혁								
과제명	극지기초원천기술개발								
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영
		O	O						

성과개요

– 에스테라아제(Esterase)는 serine hydrolase family의 구성원으로, ester 결합의 분리 및 생성을 높은 위치 및 입체 특이성으로 촉매화하는데 사용되며, 이로 인해 순수한 물질의 합성에 적합한 바이오 촉매로 사용됨

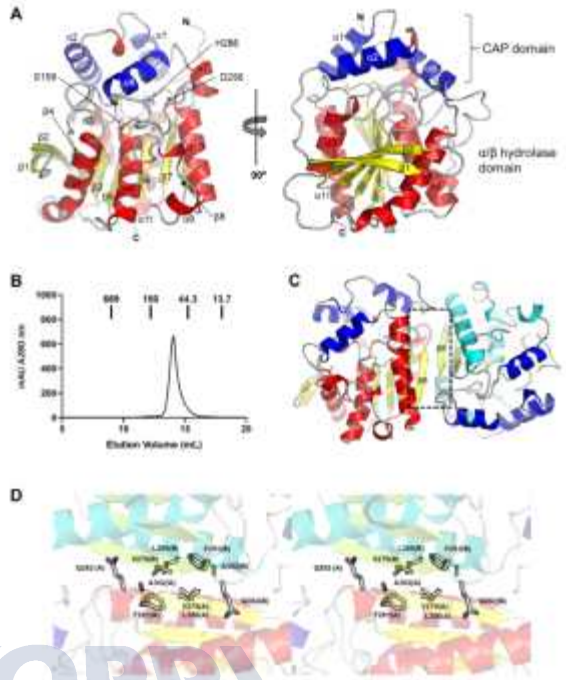
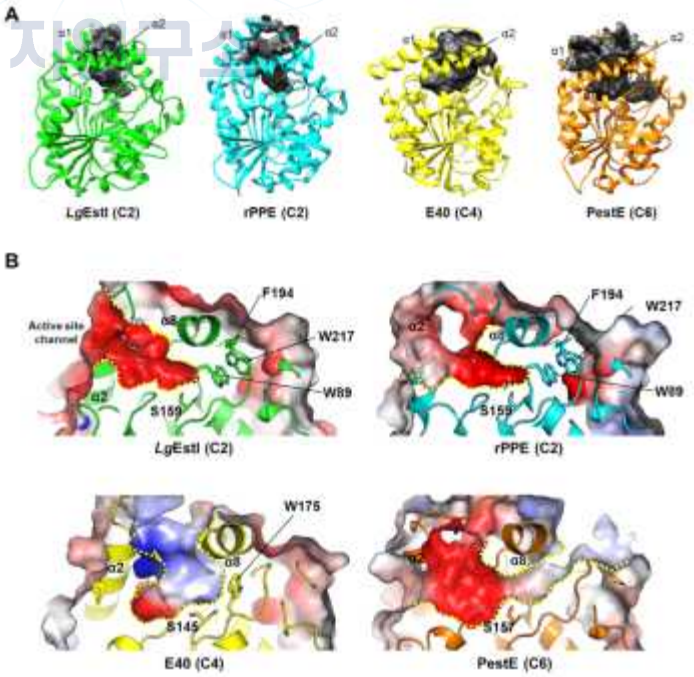
– 신규 효소 LgEstI의 돌연변이 및 활성 측정 연구를 통해서 F207A 돌연변이에서 활성이 증가하는 것을 발견하였고 구조 규명을 통해서 활성 증가의 메커니즘을 분자 수준의 증명



LgEstI의 구조분석 및 돌연변이체 연구를 통해서 활성 증가 된 돌연변이 발굴

② 성과내용

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
(1) LgEstI의 전체 구조/ LgEstI는 일반적인 α/β hydrolase fold를 나타내며, 활성 부위에 핵심 잔기를 보존하고 있음. 단량체는 CAP 도메인과 α/β hydrolase 도메인 두 부분으로 나눌 수 있으며, CAP 도메인은 세 개의 삼각형 모양 helix(α1, α2 및 α8)로 이루어져 있으며, α/β hydrolase 도메인은 중앙에 90도로 비틀린 β- sheet, 다섯 개의 인접한 α- helix (α3, α4, α6, α10 및 α11) 및 helix와 strand를 연결하는 회전이 포함되어 있음 (2) LgEstI의 기질 접근 채널 분석/ 기질로 접근하는 채널을 형성하는 벽은 Phe14, Asn18, Ile24, Lue36, Gly88, Phe91, Phe207, Lue208, Met213, Phe216, Lue258 및 Met290로 둘러싸여 있음. 이 중 Phe207, Lue208, Phe216 및 Lue258은 촉매 삼중체와 가까운 위치에 있었으며, 아마도 p-nitrophenyl ester를 인식하고 소수성 상호작용을 통해 이와 상호작용	 – LgEstI의 전체 구조  – 구조 분석을 통한 기질 결합 특이성 연구

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- LgEstI는 효과적으로 pNA에만 활성을 나타냈으며 pNH 및 pNO에 대해서는 활성이 감소하였음. LgEstI의 열안정성은 20-60˚C의 온도에서 1 시간마다 15 분 동안 테스트하였을 때,

KOPRI 극지연구소

LgEstI의 활성은 40 ˚C까지는 별다른 변화가 없었으나, 50 ˚C에서 60 분 후에 활동이 50%로 감소

- 산업 응용 분야에서 에스테라아제는 고농도의 알콜, 세제 및 단백질과 상호 작용하는 화학물질과 같은 불리한 조건을 견딜 수 있어야 하기 때문에 다양한 변성제에 대한 화학적 안정성을 조사하였음.
- LgEstI를 암모늄 황산과 glutaraldehyde로 단백질을 침전시켜 LgEstI-CLEAs를 생성하였음
- LgEstI-CLEA의 활성을 세척 단계 사이에서 측정한 결과, 세척 단계 동안 활성은 크게 감소하지 않았음. 10번의 세척 후에도 LgEstI-CLEAs의 활성은 초기 활성의 약 90%를 유지.

- 기술적 우수성
  - LgEstI의 에스터 분해 능력을 규명하고 돌연변이체를 통해서 활성이 증가된 에스터아제 변형체 개발 (F207A)
  - 효소 고정화를 통해서 10번의 세척 후에도 활성이 유지됨을 확인함으로써 산업적 촉매로서의 잠재력을 보여줌.

- 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기물질 분해 효소 발굴	• 본 연구에서는 에스테라아제의 생화학적 구조적 특성 규명을 통해 산업적 촉매로서의 잠재력을 보여줌.
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	• 돌연변이 연구를 통한 활성이 증가된 돌연변이체 개발 • 효소 고정화를 통한 효소의 재활용성을 증가시킨 기법 개발

KOPRI 극지연구소

③ **연구성과의 활용 현황 및 계획**

- 산업화/산업현장 적용
  - LgEstI의 구조정보 및 기능적 특성에 대한 추가 연구를 통해서 돌연변이의 안정성을 높이는 방법을 개발하고 촉매제로서의 재사용 가능한 효소의 활용도를 모색할 예정

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				

④ **파급효과/기대효과**

- (학술적/기술적/인프라 측면)
  - EaEst2 구조와 기능 관계를 분자 수준에서 이해하기 위해, 고해상도의 구조를 해석
- (산업경제적 측면)
  - 에스테라아제는 단당류 및 베타-락탐 항생제로부터 아세틸 그룹을 제거하는 데 사용될 수 있으며, 이로써 식품 및 의료 분야에서 유용하게 활용될 수 있음을 입증함
- (사회적 측면)
  - 극지 유래 효소 및 생물 소재의 국산화를 통해 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력 향상

⑤ **성과근거자료**

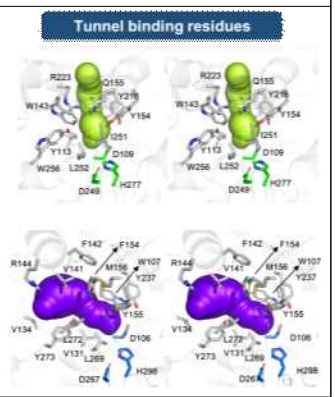
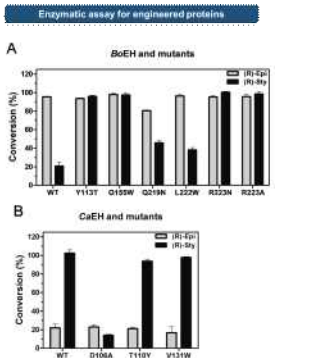
구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		○								

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (LgEstI) from Lactococcus garvieae		Plos One	3.7	2023.02.06
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	–	–	–	–	
창업	기술명		기업명	창업일	
	–		–	–	

KOPRI 극지연구소

성과 6	단백질 구조적 정보를 활용하여 기질 특이적 맞춤형 효소 개발

① 성과개요

연구자	극지연구소 이준혁 박사 / 극지연구소 황지섭 연수생
과제명	극지기초원천기술개발
성과개요	• *Bo*EH 돌연변이체의 기질 특이성 향상 1) 돌연변이체(Y113T, Q155W, Q219N, L222W, R223N, R223A)가 (R)-Epi 기질에 대한 변환율을 크게 향상시킴. 2) (R)-Sty 기질에 대해서도 높은 변환율을 유지, 다기능 효소로의 가능성 제시. • *Ca*EH 돌연변이체의 기질 선호도 조정 1) 돌연변이체(D106A, T110Y, V131W)가 (R)-Epi 기질에 대해 높은 변환율을 보이며, 기질 결합 터널의 구조적 조정을 통한 효소 기능 조정 가능성 확인. 2) (R)-Sty에 대한 높은 효율성은 유지, 기질 다양성을 확대. • 효소 공학을 통한 효율성 개선 1) *Bo*EH와 *Ca*EH 모두에서 기질 특이성을 조정하여, 특정 기질에 대한 효소의 성능을 최적화. 2) 돌연변이를 통해 효소의 기능을 확장하고 산업적 응용 가능성을 높임. • 기질 특이성 기반 효소 설계 가능성 제시 1) *Bo*EH와 *Ca*EH의 야생형(W.T.)과 돌연변이체의 비교를 통해 기질 특이성을 조절할 수 있는 주요 구조적 요소(예: 결합 터널 및 활성 부위)를 규명. 2) 이 연구는 효소의 특성을 특정 요구에 맞게 설계하는 효소 공학의 가능성을 보여줌.	 

② 성과내용

– 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내 용
기질 특이성	*Bo*EH: 선형 에폭사이드에 높은 특이성 / CaEH: 방향족 및 고리형 에폭사이드에 높은 특이성
효소 효율성	*Bo*EH 및 *Ca*EH 돌연변이체를 통해 (R)-Epi 및 (R)-Sty 기질 변환율 각각 100%에 근접
유연성 및 안정성	돌연변이를 통한 효소 기능 조정 가능성, 산업적 기질 적용성 확대
적용 가능성	다양한 산업 분야(의약품 합성, 화학 촉매)에서 활용 가능

– 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

• 기존 에폭사이드 hydrorase의 기질 특이성과 효율성을 극복한 맞춤형 효소 설계.

KOPRI 극지연구소

- 컴퓨터 도킹 및 돌연변이 설계를 활용하여 특정 기질에 최적화된 터널 구조 생성.
- *Bo*EH와 *Ca*EH 돌연변이체를 통해 다양한 기질을 처리할 수 있는 유연성을 확보.
- 산업용 효소로의 개발 가능성을 제시하며, 기존 기술 대비 비용 절감과 생산성 향상.

– 우수성
- *Bo*EH와 *Ca*EH 돌연변이체는 기존 야생형(W.T.) 효소 대비 특정 기질((R)-Epi, (R)-Sty)에 대한 변환율을 최대 100%로 향상.
- BoEH는 좁은 터널 구조를 활용하여 선형 기질에 특화된 성능을 보이며, CaEH는 넓은 터널을 통해 방향족 및 고리형 기질에서 뛰어난 성능을 보임.
- 타 연구와 비교했을 때, 효소의 기질 특이성 및 효율성에서 우위에 있음.
- 효소 공학적 접근을 통해 산업적 응용 가능성을 극대화함.

– 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표		
분야별 목표	– –	– –

③ **연구성과의 활용 현황 및 계획**

– 산업화/산업현장 적용
- *Bo*EH와 *Ca*EH 돌연변이체는 화학 합성, 의약품 제조, 환경 촉매 등 다양한 산업 분야에서 활용 가능
- 선형 및 방향족 기질을 처리할 수 있는 맞춤형 효소 설계를 통해 기존 화학 촉매를 대체할 가능성 확보
- 컴퓨터 도킹 시뮬레이션 및 효소 공학적 접근을 활용하여 추가적인 효소 설계 및 산업 적용 테스트 진행 중

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전					
창업					

④ **파급효과/기대효과**

– (학술적/기술적/인프라 측면)
- 선형 및 방향족 기질을 효과적으로 처리할 수 있는 맞춤형 효소 개발로 화학, 의약품, 환경 산업 분야에서의 활용 가능성 확대
- 기존 화학 촉매 대비 효율성이 높고 환경 친화적인 대안을 제공하여 지속 가능한 산업 환경 구축에 기여
- 효소를 활용한 신규 촉매 기술은 다양한 산업 공정에서의 적용 가능성을 확보하며, 시장 경쟁력을 강화

– (산업경제적 측면)

KCPRI 금지연구소

- 효소 기반 촉매 공정을 통해 에너지 소비와 원가를 절감, 생산성 향상 효과 기대.
- 환경 규제가 강화되는 글로벌 시장에서 친환경 기술로의 전환을 촉진하며, 글로벌 효소 시장 진출 가능성 확대
- 효소 기반 기술의 상업화로 새로운 시장 창출 및 관련 산업의 부가가치 증대
- 기술 이전 및 상용화를 통해 국내 바이오 및 화학 산업의 국제 경쟁력 강화

– (기후변화 대응 측면)

⑤ **성과근거자료**

구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		1								

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Structural insights into the distinct substrate preferences of two bacterial epoxide hydrolases		International Journal of Biological Macromolecules	7.7	2024.02.27
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	등록			대한민국	
	출원			PCT	
창업	기술명		기업명	창업일	

KOPRI 극지연구소

2. 목표 달성 수준 및 추진 일정 실적

1차년도 (1단계 1차년도)														
개발내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
환북극권 미생물 유전체 확보													김한우 (극지연구소)	
효소와 기능성 단백질 탐색 및 특성 조사													김한우 (극지연구소)	
단백질 발현 생산 정제 시스템 환경 구축													김한우 (극지연구소)	
효소 단백질 구조분석을 위한 결정화 조건 조사													김한우 (극지연구소)	

2차년도 (1단계 2차년도)														
개발내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
환북극권 미생물 유전체 확보													김한우 (극지연구소) 김효진 (서울대)	
발굴 효소 단백질의 생물리학적 특성 분석 평가													김한우 (극지연구소) 김상우 (경북대)	위탁연구 책임자 변경에 따른 일정 변경
효소 단백질의 3차 구조 해석													김한우 (극지연구소)	
효소활성 탐색기술 확보													김한우 (극지연구소)	

3차년도 (2단계 1차년도)														
개발내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
환북극권 미생물 유전체 확보와 기능성 효소 단백질 탐색													김한우 (극지연구소)	
발굴 효소 단백질의 생물리학적 특성 분석 평가													김한우 (극지연구소) 김상우 (경북대)	
단백질의 3차 구조와 활성기작 분석													김한우 (극지연구소)	
효소와 기능성 단백질의 응용 기술 조사 및 적용													김한우 (극지연구소) 김효진 (서울대)	

4차년도 (2단계 2차년도)																	
개발내용	추진 일정															책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
효소와 기능성 단백질 발굴																김한우 (극지연구소)	연구기간 3개월 연장
발굴 효소 단백질의 생물리학적 특성 분석 평가																김한우 (극지연구소)	
효소 단백질의 3차구조 해석과 활석기작 분석																김한우 (극지연구소)	

당초계획 실 적

■ 4세부과제 예산집행 실적 (‘25.01.16일 기준)

(단위: 천원)

비목	세목				2024 예산	2024 집행액	2024 집행률(%)	비고 (잔액활용 계획)
직접비	인건비	내부 인건비	미지급		16,901	16,901	100	
			지급(A)	현금	79,578	79,578	100	
				현물				
		외부 인건비	미지급					
			지급(B)	현금	41,001	41,001	100	
				현물				
		연구지원인력인건비(C)						
	학생 인건비(D)				52,294	45,850	88	‘25.2~3월 인건비
	인건비 소계(E=A+B+C+D)				172,873	166,429	96	
	연구시설·장비비(F)	현금	일반		557	557	100	
			통합관리					
		현물						
	연구활동비(G)	현금			21,382	17,318	81	국내출장 및 회의비
		현물						
	연구재료비(H)	현금			11,276	10,778	96	기타 소모품 구입
		현물						
	연구수당(I)				24,000	12,000	50	‘25.3월 집행
	위탁연구개발비(J)				–	–	–	
	국제공동연구개발비(K)							
	직접비 소계(L=E+F+G+H+I+J+K)				230,088	207,082	90	
간접비(M)					35,062	35,062	100	
(간접비 중 연구실 안전관리비)					(2,029)			
연구개발비 총액(N=M+L)					265,150	207,082	91.3	

연구개발비 총액 구조 : 2024년 예산 (255,000 천원) + 2023년 이월금(10,150천원)

KOPRI 극지연구소

제 3 장

연구개발 결과의 활용 방안

KOPRI
극지연구소

KOPRI
극지연구소

1. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여정도

○ 본 연구과제에서는 극지 미생물에서 난분해성 유기물질을 분해하는 효소를 탐색하고 발굴함으로서 국내에서는 아직 보고된 바가 없는 신규성이 높고 저온에서의 고활성을 가지는 저온성 효소를 중점적으로 개발함. 극지 미생물을 유용 효소의 새로운 유전자 풀로서 제안하고, 관련된 국내 기초 과학 연구 활성화 및 상업적 응용에 대한 상당한 기여가 예상됨.

○ 이 연구에서 사용된 유전체 교정기술은 아직까지 미증유의 영역인 극지미생물의 유전자 교정 분야에서 세계적인 선도가 가능하기 때문에 이에 대한 육성을 통해 관련 분야의 기여할 수 있으며 이에 대해 이 연구에서 확보된 정보와 tool들이 활용될 수 있을 것임.

구분	기대 효과
기술적 측면	○ 환북극 동토 환경 미생물 생명자원을 활용하여 국내 생명공학 소재 개발에 대한 국가 경쟁력을 제고 ○ 효소의 생촉매 활성 탐색에 대한 기술력 진보 ○ 환경복원에 필요한 생물정화 핵심기술을 개발하여 환경산업에 적용 ○ 극한 환경 유래의 다양한 효소에 대한 유전자 데이터 대량 확보
경제적 산업적 측면	○ 바이오산업에 유용한 저온 활성 단백질과 유용물질 개발을 통하여 시너지 효과 창출 ○ 생명공학 분야에서 국가 경쟁력을 향상시킴 ○ 신규 생명자원 개발과 바이오산업의 기반자원 제공함

KOPRI 극지연구소

2. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 북극 관측거점 유래의 환경유전체 라이브러리의 제작과 지속적인 관리를 통하여 국내 생명공학 연구자에게 생명자원의 확장성과 활용성을 제공할 계획임.

○ 저온에서 생촉매 활성이 요구되는 정밀화학, 의약품 생산 등의 산업분야에서 활용성이 매우 높을 것으로 사료되며, 지식재산권 확보를 통하여 생명공학 산업의 경쟁력을 강화.

○ 생분해방식을 이용한 후속 생물전환공정 기술 개발은 기존의 화학공정을 대체할 수 있으므로, 국내 효소 및 글로벌 산업계의 지속가능한 발전을 촉진할 것으로 기대되므로, 산업재산권 출원 및 기술이전을 통하여 본 연구결과의 상용화를 추진

○ 극지생명체에서 유용효소 및 친환경 효소 생물공정의 개발은 앞으로 다양한 효소의 학술연구 및 산업적 이용을 촉진하여 고부가가치 창출할 수 있으며, 국내의 극지연구에 새로운 패러다임을 제시하고 새로운 성장 동력을 부여할 것으로 기대

○ 본 연구는 바이오파운드리, 화이트바이오 사업과 같은 대형과제를 통해 유전자교정 기반 연구의 난분해성 물질 분해 이용 및 value-added 기능성물질 생산을 위한 다양한 극지미생물로 확장 연구 과제를 도출할 수 있을 것으로 판단됨.

3. 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 (해당사항 없음)

KOPRI
극지연구소

제 4 장

당초 연구계획 대비 주요 변경사항

KOPRI
극지연구소

KOPRI
극지연구소

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구계획 변경 신청	–	Tycho 장비 구매 (3천만원 이상 연구장비 구매)	효소 활성 검증을 위한 정밀 분석을 위한 장비의 조기 도입	2021.10.14. 심의결과 통보

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	–	1단계 2차년도부터 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발에 대한 연구를 주제로 위탁연구 2를 추가하여 연구	북극 미생물의 대사기작과 유용 효소의 유용성을 확대하기 위하여 공동연구 협의	–
연구책임자	–	위탁연구 책임자 김효진	–	–
주관기관	–	서울대	–	–
연구비	–	총연구비 9천만원 (당해년도 3천만원)	–	–
연구기간	–	22.01.01~24.12.31.	–	–

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	–	–	–	–
연구책임자	김두헌	김상우	위탁과제 책임자의 사망 따른 연구책임자 변경	22.09.15
주관기관	숙명여자대학교	경북대학교	–	–
연구비	–	–	–	–
연구기간	–	–	–	–

KOPRI 극지연구소

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	세부목표 3; 효소 단백질의 구조와 기능 간의 관계 규명	해당 연구내용 중단 <관련 위탁과제연구 중단>	1. 변경사유: 연구비 삭감에 따른 분석비, 재료비 및 인건비 부족으로 해당 연구수행 불가 2. 조치사항: 평가가중치 수정	

※ 2024년도 전체 연구비 감액으로 인한 목표 하향 조정 및 내용 축소, 일부분의 목표만 달성토록 조정

주요 변경 사항 [해당 사항 ○, × 중 선택]	당초 계획(2024년)	협약 변경 내용(2024년)	관련 페이지
연구비 (과제 구성 포함) [○]	■ 연구비 : 500,000 천원 • 주관연구: 320,000 천원 • 위탁연구: 80,000 천원	■ 연구비 : 255,000 천원 • 주관연구: 255,000 천원 • 위탁연구: 0 천원	pp. 41
연구목표 [○]	■ 효소 활성기반 탐색기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록) ■ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 ■ 신규 발굴 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상 ■ 효소 활성의 증가/감소에 관여하는 분자구조를 규명하기 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석 ■ 생촉매 효소 활성을 이용한 유용물질 생산 또는 반응생성물의 유용성 분석	<해당내용 변경없이 수행> ■ 효소 활성기반 탐색기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록) ■ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 ■ 신규 발굴 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상 <해당내용 중단> ■ 효소 활성 개량을 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석 불가로 중단 ■ 효소 반응생성물의 유용성 분석 수행 불가로 중단	pp. 34-36
연구내용 [○]	■ 위탁과제1(경북대): 난분해 유기 물질 분해 효소 활성 검증 ✓ 효소 3차원 구조 결정을 위한 단백질 결정 제작 ✓ 작동 메카니즘 규명을 위한 가설 정립 및 가설 확인을 위한 돌연변이체 제작	■ 연구비 감액으로 연구 수행 불가- 연구 중단 해당 연구내용 삭제	pp. 37-39

주요 변경 사항 [해당 사항 ○, × 중 선택]	당초 계획(2024년)	협약 변경 내용(2024년)	관련 페이지
	■ 위탁과제2(서울대): 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발 ✓ 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주의 성능 검토 ✓ 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주의 사료용 프로바이오틱스로의 이용 가능성 확인		
연구기간 [×]	■	■	pp. 00-00

KOPRI
극지연구소

[첨부목록]

구분	목록	제출여부(Y/N)
첨부1	연구개발 목표의 달성도 증빙	Y
첨부2	연구개발결과 활용계획서	Y
첨부3	자체평가의견서	Y
첨부4	[해당 시] 연구개발성과 공개제한 요청사유서	N
첨부5	[해당 시] 청년 의무채용 관련 실적	N
첨부6	[해당 시] 참여기업의견서	N

KOPRI
극지연구소

첨부1 연구개발 목표의 달성도 증빙

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약 (달성도 %)	관련증빙
(정량) 환북극권 미생물 유전체 라이브러리 제작을 통한 생명자원 확보 및 유전자 기능성 탐색	40	1	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 환북극권 동토 환경시료 유래의 미생물과 극지연구소 미생물 유전체 라이브러리 확보 (5×10^4 fosmid clone 이상) ▪ 기능성 효소 발굴을 위한 활성 기반 탐색 기술 확립	▪ PAMC에서 북극 유래 미생물의 유전체 라이브러리 (Fosmid library) 3건 획득 (8.7×104 fosmid clone) (100%) ▪ 구축된 미생물 유전체 라이브러리 (Fosmid library)로부터 56종의 lipase/esterase 활성 클론 및 16종의 laccase 활성 클론 확보 (100%)	1. 라이브러리 제작 결과 보고서 2. lipase/laccase 효소 활성 검증 사진
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 신규 또는 기존의 환경시료 전처리를 통한 미생물 유전체 라이브러리 확보 (2×10^4 fosmid clone 이상) ▪ 미생물 유전체로부터 난분해 유기 물질(리그닌, 오일류, 플라스틱 등) 분해 효소 유전자 발굴 (2종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	▪ 북극해 코어시료 상층부에서 51,333 fosmid clone 확보 (100%) ▪ 환경 미생물 유전체 라이브러리를 이용하여 lipase, laccase 등 총 20종의 fosmid clone sequence를 KPDC 등록 (100%)	3. 라이브러리 제작 결과 보고서 4. KPDC 등록 리스트
			3차년도 (단계) (2단계 1차년도)	▪ 유전체 라이브러리를 이용한 효소 활성 기반 탐색기술의 고도화 연구 ▪ 난분해 유기 물질 분해 효소 유전자 발굴 (2종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	▪ PAMC 및 환경시료를 활용하여 구축된 북극 유래 미생물 유전체 라이브러리 (Fosmid library)로부터 4종의 lipase/esterase 활성 클론 확보 (100%)	5. lipase/esterase 효소 활성 검증 (보고서 Fig.3.) 및 KPDC 등록 번호
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 활성기반 탐색 기술에 의한 효소와 기능성 유전자 발굴 (1종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	▪ 고활성 Lipase 효소단백질 유전자 5종과 플라스틱 분해 활성을 가지는 유전자 1종을 발굴하여 KPDC 등록 (100%)	6. KPDC 등록 리스트
(정량) 효소 활성 기반 탐색을 통한	20	2	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 효소와 기능성 유전자의 발현 벡터 및 숙주 선정 ▪ 효소 단백질의 특성	▪ 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 novel putative sugar isomerase 효소의	7. 출판 논문 1건

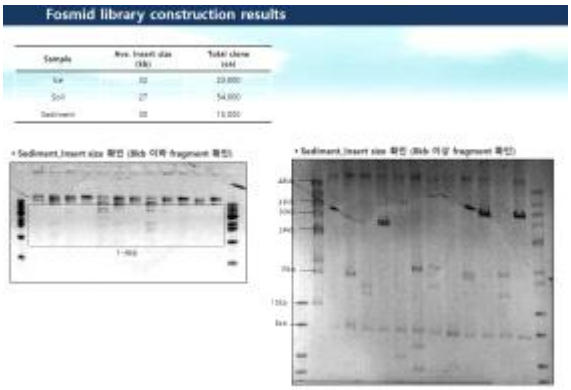
극지 유래 난분해 물질 분해 효소 유전자의 발현 생산 및 효소의 생촉매 반응 특성 연구				연구 논문 1편 이상 (SCI급)	구조분석 (100%)	
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 난분해 유기 물질 분해 효소의 정제 단백질 확보, ▪ 발굴된 효소의 기질 특이성 및 효소학적, 생화학적 특성 분석 논문 1편 이상 (SCI급) ▪ 효소 단백질의 특허 출원 2 건 이상	▪ 난분해 유기물질 분해 효소 esterase 4종의 생화학적 분석 및 단백질 구조 분석 완료 ▪ 극지 저온성 효소 단백질의 활용성 관련 특허 2건 출원 (100%)	8. 출판 논문 4건 9. 특허출원 2건
			3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 단백질 구조 분석을 통해 도출된 정보를 이용한 효소의 생화학적 특성 비교분석 논문 1편 이상 (상위 20%)	▪ 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 신규 GHSR-type esterase 효소의 구조분석 논문 게재 (1건, 연구실적표 참고) (100%)	10. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 반응 산물 또는 기질의 물리화학적 변화 분석을 통한 생촉매 반응 특성 분석 신규 발굴 ▪ 효소의 반응 특성 분석 관련 연구 논문 1편 이상 (상위 20%), 특허등록 1건 이상	▪ 환경오염 물질 선형 에폭사이드에 높은 특이성을 가지는 효소를 발굴하고, 기질 특이성 분석에 대한 연구 (논문 게재) (100%) ▪ 비타민 B12 합성과 관련된 효소의 단백질 구조와 활성기작 규명 (논문 게재) (100%) ▪ 극지 저온성 효소 단백질의 활용성 관련 특허 2건 (등록심사중)	11. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
(정성) 발굴된 효소와 기능성 단백질의 3차 구조분석과 활성기작 규명	20	3	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 효소와 기능성 단백질의 구조분석을 위한 단백질 결정 조건 탐색 및 최적화	▪ 저온성 미생물 (Flavobacterium psychrolimnae) 유래 dienelactone hydrolase 효소의 2.25Å 해상도의 삼차구조 해석 (100%)	12. diienelactone hydrolase 효소의 삼차 구조 PDB 일부 캡쳐 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 발굴된 효소 단백질의 X-ray 회절 실험을 통한 분자 구조 해석	▪ 저온성 단백질 (ScEst, LgEstI, 등) 5종의 X-ray 회절 기반의 분자 구조 해석 완료 (100%)	13. 출판 논문 참조
			3차년도(단계) (2단계 1차년도)	▪ 단백질 구조 기반의 효소 단백질 기능 분석과 활성 기작 연구	▪ 저온성 미생물 유래의 플라스틱 분해 효소 EaBHETase, LaFae, EaEst2, LgEstI) 의 단백질 삼차구조 해석 관련 논문 게재 (3건, 연구실적표	14. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐

					참고) (100%)	
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 효소 활성의 증가/감소에 관여하는 분자 구조를 규명하기 위한 단백질-기질 복합체 구조 분석	▪ 연구비삭감에 따른 해당내용 연구수행 불가	해당사항 없음
(정성) 난분해 물질 분해 효소 및 기능성 단백질의 활성 특성을 이용한 응용 및 활용성 확대 연구	20	3	1차년도 (1단계 1차년도)	▪ 다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보 ▪ 목적 효소군에 대한 활성 측정 방법 확립	▪ 북극 토양 미생물(Paenibacillus sp. R4) 유래의 신규 esterase PsEst3 효소의 다양한 합성기질에 대한 활성 데이터 확보 (100%)	15. PsEst3 효소의 활성 데이터 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년도)	▪ 효소 활성 기반의 유용 기능성 단백질 탐색 기술 확보. ▪ 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구	▪ 기질 배지를 이용한 lipase(2종), 항생제 내성 유전자(7종), ▪ 플라스틱 분해 효소(4종) 발굴 및 2차 검정 완료 (100%) ▪ 미생물 균주(P. xylanexedens)의 난분해성 물질에 따른 생장 분석 및 물질 이용 분석 정보 확보 (100%)	16. 메타지놈 라이브러리를 이용한 기능성 탐색 결과물 사진 17. 플라스틱 분해 활성 사진 18. 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프
			3차년도 (2단계 1차년도)	▪ 난분해 유기 물질 분해 효소를 생산하는 형질전환체 또는 효소 단백질을 이용한 생물정화 효능 분석	▪ 난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주 확보 (100%) ▪ 신규 미세플라스틱 분해 효소(EaBHETase와 HaBHETase)의 생물리화학적 특성 분석 (100%)	19. 연차 보고서 (난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주 제작) 20. 논문 초록 부분, 논문 사사 부분 캡쳐
			4차년도 (2단계 2차년도)	▪ 생촉매 효소 활성을 이용한 유용물질 생산 또는 반응생성물의 유용성 분석	▪ 연구비삭감에 따른 해당내용 연구수행 불가	해당사항 없음
합계	100					

극지연구소

번호	관련증빙 명
1	*1. 라이브러리 제작 결과 보고서*

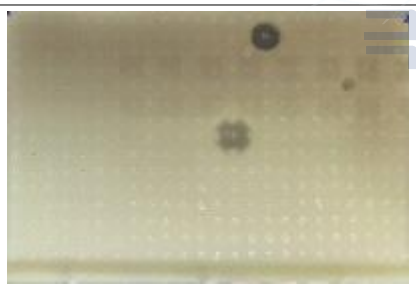
제작된 fosmid library의 초저온 냉동고 보관



메타지놈 라이브러리 제작 및 insert size확인

번호	관련증빙 명
2	*Lipase/laccase 효소 활성 검증 사진*

Tributyrin 분해 활성 clone

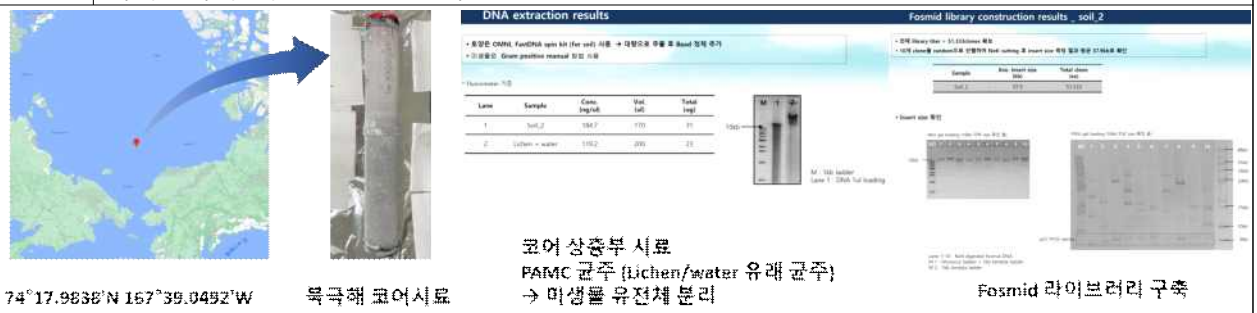


극지연구소 KPDC(Korea Polar Data Center) 생물자원 등재 목록

데이터 이름	메터데이터 ID
Fosmid clone (PIC13-E19)	KOPRI-KPDC-00001808
Fosmid clone (PSO25-J20)	KOPRI-KPDC-00001807
Fosmid clone (PSO21-P18)	KOPRI-KPDC-00001806
Fosmid clone (PIC17-E19)	KOPRI-KPDC-00001805

KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
3	*라이브러리 제작 결과 보고서*



북극해 환경시료 및 PAMC 균주를 이용한 fosmid library 제작 보고서 내용

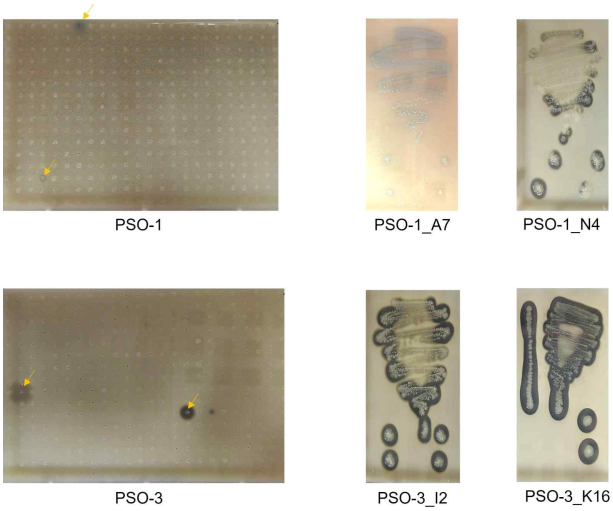
KOPRI
극지연구소

번호	관련증빙 명
4	lipase/esterase 효소 활성 검증/KPDC 등록번호

순번	PN22014 (2차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름1)	메터데이터 ID2)	메터데이터 제목3)	
1	Fosmid clone (PSO23-K9)	KOPRI-KPDC -00002012	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying amylase gene (PSO23-K9)	등록 (2022-09-23)
2	Fosmid clone (PSO_Lac5C)	KOPRI-KPDC -00002013	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac5C)	등록 (2022-09-23)
3	Fosmid clone (PSO_Lac6E)	KOPRI-KPDC -00002014	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6E)	등록 (2022-09-23)
4	Fosmid clone (PSO_Lac6H)	KOPRI-KPDC -00002015	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6H)	등록 (2022-09-23)
5	Fosmid clone (PIC15-F4)	KOPRI-KPDC -00002016	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PIC15-F4)	등록 (2022-09-23)
6	Fosmid clone (PWL12-F1)	KOPRI-KPDC -00002017	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PWL7-F10)	등록 (2022-09-23)
7	Fosmid clone (PWL13-C7)	KOPRI-KPDC -00002018	Fosmid sequence carrying genes related with lipase gene (PWL13-C7)	등록 (2022-09-23)
8	Fosmid clone (PIC14-H14)	KOPRI-KPDC -00002019	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-H14)	등록 (2022-09-23)
9	Fosmid clone (PSO2-I10)	KOPRI-KPDC -00002020	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO2-I10)	등록 (2022-09-23)
10	Fosmie clone (PIC19-A15)	KOPRI-KPDC -00002021	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC19-A15)	등록 (2022-09-23)
11	Fosmie clone (PIC14-E21)	KOPRI-KPDC -00002022	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-E21)	등록 (2022-09-23)
12	Fosmie clone (PIC7-O11)	KOPRI-KPDC -00002023	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC7-O11)	등록 (2022-09-23)
13	Fosmie clone (PIC8-F9)	KOPRI-KPDC -00002024	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC8-F9)	등록 (2022-09-23)
14	Fosmid clone (PSO20-P6)	KOPRI-KPDC -00002025	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO20-P6)	등록 (2022-09-23)
15	Fosmid clone (PSO2-K8)	KOPRI-KPDC -00002026	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO2-K8)	등록 (2022-09-23)
16	Fosmid clone (PSO1-A20)	KOPRI-KPDC -00002027	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO1-A20)	등록 (2022-09-23)

KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
5	lipase/esterase 효소 활성 검증/KPDC 등록번호



1	Fosmid clone (PSO1-A7)	KOPRI-KPDC-00002394
2	Fosmid clone (PSO1-N4)	KOPRI-KPDC-00002395
3	Fosmid clone (PSO3-I2)	KOPRI-KPDC-00002396
4	Fosmid clone (PSO3-K16)	KOPRI-KPDC-00002397

번호	관련증빙 명
6	lipase/esterase 효소 활성 검증/KPDC 등록번호

KOPRI 극지연구소

순번	PN24014 (4차년도)			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름	메터데이터 ID	메터데이터 제목	
1	Lipase gene (PLI131-135)	KOPRI-KPDC-00002695	Nucleotide sequence of lipase gene (PLI131-135)	등록 (2024-12-24)
2	Lipase gene (PLI137)	KOPRI-KPDC-00002696	Nucleotide sequence of plastic degrading enzyme gene (PLI137)	등록 (2024-12-24)

번호	관련증빙 명
7	출판 논문 1건

Biochemical and Biophysical Research Communications 585 (2021) 48–54

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Crystal structure of a novel putative sugar isomerase from the psychrophilic bacterium *Paenibacillus* sp. R4

Sunghark Kwon [a], Hyun Ji Ha [b], Yong Jun Kang [b], Ji Hye Sung [b], Jisub Hwang [c, d], Min Ju Lee [c], Jun Hyuck Lee [c, d, **], Hyun Ho Park [b, *]

[a] Department of Biotechnology, Konkuk University, Chungju, Chungbuk, 27478, Republic of Korea
[b] College of Pharmacy, Chung-Ang University, Dongjak-gu, Seoul, 06974, Republic of Korea
[c] Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea
[d] Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon, 21990, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 October 2021
Accepted 7 November 2021
Available online 11 November 2021

Keywords:
Sugar isomerase
Xylose isomerase
Glucose isomerase
Paenibacillus
Psychrophilic bacteria
Cold adaptation

ABSTRACT

Sugar isomerases (SIs) catalyze the reversible conversion of aldoses to ketoses. A novel putative SI gene has been identified from the genome sequence information on the psychrophilic bacterium *Paenibacillus* sp. R4. Here, we report the crystal structure of the putative SI from *Paenibacillus* sp. R4 (*Pb*SI) at 2.98 Å resolution. It was found that the overall structure of *Pb*SI adopts the triose-phosphate isomerase (TIM) barrel fold. *Pb*SI was also identified to have two heterogeneous metal ions as its cofactors at the active site in the TIM barrel, one of which was confirmed as a Zn ion through X-ray anomalous scattering and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. Structural comparison with homologous SI proteins from mesophiles, hyperthermophiles, and a psychrophile revealed that key residues in the active site are well conserved and that dimeric *Pb*SI is devoid of the extended C-terminal region, which tetrameric SIs commonly have. Our results provide novel structural information on the cold-adaptable SI, including information on the metal composition in the active site.

© 2021 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Sugar isomerases (SIs) reversibly catalyze the conversion of aldoses to ketoses. Xylose isomerases (XIs; a type of SI), also known as glucose isomerases catalyze the isomerization of D-xylose and D-glucose to D-xylulose and D-fructose, respectively [1]. XIs have become popular in the food industry because they can be efficiently used for high-fructose corn syrup production without forming any by-products [2,3]. Moreover, xylulose is used as a fermentation source for ethanol production in the biofuel industry, and the conversion of xylose to xylulose by this process can be achieved using XIs [4,5]. XIs also have catalytic activity for other sugars such as D-ribose, D-allose, and L-arabinose besides D-xylose and D-glucose [6].

SIs including XIs adopt the triose-phosphate isomerase (TIM) barrel fold structure, primarily exhibiting the tetrameric form as a functional unit [7–12]. They also have metal cofactors for catalysis in the active site [1,13]. The metal cofactors comprise two divalent cations such as Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Co^{2+} [1,13], one of which contributes to substrate fixation and the other is directly involved in hydride shift [14]. Despite these generalized roles of the metal ions, SIs show a diversity of metal species depending on host organisms [1]. Moreover, the heterogeneity or homogeneity of metal composition needs to be confirmed to understand the specific roles of the respective metal ions. Therefore, metal preference identification for the cofactor is necessary for characterization of a novel SI.

To date, numerous studies on SIs, including XIs, have revealed their structures and mechanisms of action [15–18]. However, these primarily included the SIs from mesophilic and thermophilic bacteria. Studies conducted on SIs from psychrophilic bacteria are rare [19]. Such limited research has resulted in a scarcity of structural and functional information on SIs from psychrophilic bacteria.

Abbreviations: SI, sugar isomerase; *Pb*SI, sugar isomerase from *Paenibacillus* sp. R4; TIM, triose-phosphate isomerase; XI, xylose isomerase; *Pb*XI, xylose isomerase from *Paenibacillus* sp. R4; *St*XI, xylose isomerase from *Salmonella typhimurium*; *Tt*XI, xylose isomerase from *Thernus thermophilus*; *Tts*XI, xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfuriigenes*; SEC-MALS, size exclusion chromatography-coupled multi-angle light scattering; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry.

** Corresponding author. Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea.
* Corresponding author. College of Pharmacy, Chung-Ang University, Dongjak-gu, Seoul, 06974, Republic of Korea.
E-mail addresses: junhyucklee@kopri.re.kr (J.H. Lee), xrayleox@cau.ac.kr (H.H. Park).

https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.026
0006-291X/© 2021 Published by Elsevier Inc.

번호	관련증빙 명
8	출판 논문 5건

crystals

MDPI

Article

Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Novel Esterase (*Sc*Est) from *Staphylococcus chromogenes*

Jisub Hwang [1,2,†], Sangeun Jeon [3,†], Min Ju Lee [1], Wanki Yoo [4], Juwon Chang [3], Kyeong Kyu Kim [4], Jun Hyuck Lee [1,2], Hackwon Do [1,2,*] and T. Doohun Kim [3,*]

1 Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea; hjsub9696@kopri.re.kr (J.H.); minju0949@kopri.re.kr (M.J.L.); junhyucklee@kopri.re.kr (J.H.L.)
2 Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea
3 Department of Chemistry, Graduate School of General Studies, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea; sangeun94@sookmyung.ac.kr (S.J.); cjw1423@naver.com (J.C.)
4 Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon 440746, Korea; vlqkshqk61@skku.edu (W.Y.); kyeongkyu@skku.edu (K.K.K.)
* Correspondence: authors: hackwondo@kopri.re.kr (H.D.); doohunkim@sookmyung.ac.kr (T.D.K.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Ester prodrugs can develop novel antibiotics and have potential therapeutic applications against multiple drug-resistant bacteria. The antimicrobial activity of these prodrugs is activated after being cleaved by the esterases produced by the pathogen. Here, novel esterase *Sc*Est originating from *Staphylococcus chromogenes* NCTC10530, which causes dairy cow mastitis, was identified, characterized, and analyzed using X-ray crystallography. The gene encoding *Sc*Est was cloned into the *p*VFT1S vector and overexpressed in *E. coli*. The recombinant *Sc*Est protein was obtained by affinity and size-exclusion purification. *Sc*Est showed substrate preference for the short chain length of acyl derivatives. It was crystallized in an optimized solution composed of 0.25 M ammonium citrate tribasic (pH 7.0) and 20% PEG 3350 at 296 K. A total of 360 X-ray diffraction images were collected at a 1.66 Å resolution. *Sc*Est crystal belongs to the space group of $P2_12_12_1$ with the unit cell parameters of a = 50.23 Å, b = 68.69 Å, c = 71.15 Å, and $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Structure refinement after molecular replacement is under progress. Further biochemical studies will elucidate the hydrolysis mechanism of *Sc*Est. Overall, this study is the first to report the functional characterization of an esterase from *Staphylococcus chromogenes*, which is potentially useful in elaborating its hydrolysis mechanism.

Keywords: carboxylesterase; *Staphylococcus chromogenes*; X-ray crystallography

check for updates

Citation: Hwang, J.; Jeon, S.; Lee, M.J.; Yoo, W.; Chang, J.; Kim, K.K.; Lee, J.H.; Do, H.; Kim, T.D. Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Novel Esterase (*Sc*Est) from *Staphylococcus chromogenes*. *Crystals* **2022**, *12*, 546. https://doi.org/10.3390/cryst12040546

Academic Editor: Waldemar Maniukiewicz

Received: 27 February 2022
Accepted: 2 April 2022
Published: 13 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Multiple drug resistance (MDR) bacteria are an emerging global threat that potentially imposes healthcare and economic issues [1,2]. The production of drug-inactivating enzymes, such as β-lactamase and aminoglycoside modifying enzymes [3], drug elimination from the cell, mutation of an existing target, and acquisition of a target by-pass system have been proposed as major MDR resistance mechanisms. Therefore, the necessity for discovering and developing novel antibiotics with unconventional modes of action has increased in order to overcome these resistance mechanisms [4].

One of the strategies to avoid MDR is antibacterial prodrugs that are pharmacologically inactive and are cleaved by bacterial enzymes to become active antibiotics [5]. Antibacterial prodrugs are synthesized by adding functional groups to the antibiotic skeleton and may have multiple advantages [5]. For example, adding a lipophilic pivaloyloxymethyl to cephalosporin cefditoren increases its absorption in the small intestine [6]. Ester is also a functional group that is added to antibiotics to increase the delivery efficiency, cell permeability, and oral bioavailability of the prodrug [7,8]. Carbenicillin, carfecillin (phenyl

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from *Psychrobacter* sp. PAMC 21119

Hackwon Do[1,2☯], Dieu Linh Nguyen[2,3☯], Chang Woo Lee[1], Min Ju Lee[1], Hoejung Oh[1], Jisub Hwang[1,2], Se Jong Han[2,3], Sung Gu Lee[1,2], Jun Hyuck Lee[1,2*]

1 Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea,
2 Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon, Republic of Korea,
3 Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea

☯ These authors contributed equally to this work.
* junhyucklee@kopri.re.kr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Do H, Nguyen DL, Lee CW, Lee MJ, Oh H, Hwang J, et al. (2022) Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from *Psychrobacter* sp. PAMC 21119. PLoS ONE 17(9): e0274019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274019

Editor: Petri Kursula, Universitetet i Bergen, NORWAY

Received: April 25, 2022

Accepted: August 22, 2022

Published: September 23, 2022

Copyright: © 2022 Do et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The final refined coordinates and structure factors of the Ps_cOTC and Ps_aOTC have been deposited in the RCSB Protein Data Bank. The entry (7XJT) has been assigned the following PDB DOI: https://doi.org/10.2210/pdb7XJT/pdb, and the entry (7X99) has been assigned the following PDB DOI: https://doi.org/10.2210/pdb7X99/pdb.

Funding: This work was supported by Korea Institute of Marine Science & Technology Promotion(KIMST) grant funded by the Ministry of

Abstract

Ornithine carbamoyltransferases (OTCs) are involved in the arginine deiminase (ADI) pathway and in arginine biosynthesis. Two OTCs in a pair are named catalytic OTC (cOTC) and anabolic OTC (aOTC). The cOTC is responsible for catalyzing the third step of the ADI pathway to catabolize citrulline into carbamoyl phosphate (CP), as well as ornithine, and displays CP cooperativity. In contrast, aOTC catalyzes the biosynthesis of citrulline from CP and ornithine *in vivo* and is thus involved in arginine biosynthesis. Structural and biochemical analyses were employed to investigate the CP cooperativity and unidirectional function of two sequentially similar OTCs (32.4% identity) named *Ps*_cOTC and *Ps*_aOTC from *Psychrobacter* sp. PAMC 21119. Comparison of the trimeric structure of these two OTCs indicated that the 80s loop of *Ps*_cOTC has a unique conformation that may influence cooperativity by connecting the CP binding site and the center of the trimer. The corresponding 80s loop region of in *Ps*_aOTC was neither close to the CP binding site nor connected to the trimer center. In addition, results from the thermal shift assay indicate that each OTC prefers the substrate for the unidirectional process. The active site exhibited a blocked binding site for CP in the *Ps*_cOTC structure, whereas residues at the active site in *Ps*_aOTC established a binding site to facilitate CP binding. Our data provide novel insights into the unidirectional catalysis of OTCs and cooperativity, which are distinguishable features of two metabolically specialized proteins.

Introduction

Ornithine carbamoyltransferases (OTCs; EC2.1.3.3) are the enzymes involved in the arginine deiminase (ADI) pathway and arginine biosynthesis [1]. A pair of distinct OTCs are named the catabolic OTC (cOTC) and anabolic OTC (aOTC). The cOTC catalyzes the phosphorolysis

crystals

MDPI

Communication

Sequence Analysis and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of an Acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*

Hackwon Do [1,2,†], Ying Wang [3,†], Chang Woo Lee [1], Wanki Yoo [4], Sangeun Jeon [3], Jisub Hwang [1,2], Min Ju Lee [1], Kyeong Kyu Kim [4], Han-Woo Kim [1,2], Jun Hyuck Lee [1,2,*] and T. Doohun Kim [3,*]

1 Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea; hackwondo@kopri.re.kr (H.D.); lcw@xenohelix.com (C.W.L.); hjsub9696@kopri.re.kr (J.H.); minju0949@kopri.re.kr (M.J.L.); hwkim@kopri.re.kr (H.-W.K.)
2 Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea
3 Department of Chemistry, Graduate School of General Studies, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea; ying.wang@oci.uni-hannover.de (Y.W.); sangeun94@sookmyung.ac.kr (S.J.)
4 Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon 16419, Korea; vlqkshqk61@skku.edu (W.Y.); kyeongkyu@skku.edu (K.K.K.)
* Correspondence: junhyucklee@kopri.re.kr (J.H.L.); doohunkim@sookmyung.ac.kr (T.D.K.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: A gene encoding *Lg*EstI was cloned from a bacterial fish pathogen, *Lactococcus garvieae*. Sequence and bioinformatic analysis revealed that *Lg*EstI is close to the acetyl esterase family and had maximum similarity to a hydrolase (UniProt: Q5UQ83) from *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV). Here, we present the results of *Lg*EstI overexpression and purification, and its preliminary X-ray crystallographic analysis. The wild-type *Lg*EstI protein was overexpressed in *Escherichia coli*, and its enzymatic activity was tested using *p*-nitrophenyl of varying lengths. *Lg*EstI protein exhibited higher esterase activity toward *p*-nitrophenyl acetate. To better understand the mechanism underlying *Lg*EstI activity and subject it to protein engineering, we determined the high-resolution crystal structure of *Lg*EstI. First, the wild-type *Lg*EstI protein was crystallized in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.2 M calcium acetate hydrate, and 19% (*w*/*v*) PEG 3000, and the native X-ray diffraction dataset was collected up to 2.0 Å resolution. The crystal structure was successfully determined using a molecular replacement method, and structure refinement and model building are underway. The upcoming complete structural information of *Lg*EstI may elucidate the substrate-binding mechanism and provide novel strategies for subjecting *Lg*EstI to protein engineering.

Keywords: esterase; *Lactococcus garvieae*; X-ray crystallography

check for updates

Citation: Do, H.; Wang, Y.; Lee, C.W.; Yoo, W.; Jeon, S.; Hwang, J.; Lee, M.J.; Kim, K.K.; Kim, H.-W.; Lee, J.H.; et al. Sequence Analysis and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of an Acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*. *Crystals* **2022**, *12*, 46. https://doi.org/10.3390/cryst12010046

Academic Editor: Abel Moreno

Received: 16 December 2021
Accepted: 26 December 2021
Published: 29 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Esterases (E.C. 3.1.1.X) catalyze the hydrolysis of various substrates containing ester groups. Esterases are serine hydrolases that contain a conserved Ser-Asp/Glu-His catalytic triad with an α/β hydrolase fold. Although esterases harbor the same α/β hydrolase fold and have high sequence homology, they have different substrate specificities and perform varying biological functions. Recently, esterases of microbial origin have gained significant interest in scientific research because of their potential applications in the biotechnology industry [1,2]. Therefore, extensive efforts are being made to identify unique esterases with higher activity, improved stability, and broad substrate specificity from newly found microorganism genomes as well as metagenomes. Such esterases can be further subjected to protein engineering to generate esterases with a precise structure and desirable functions [3].

To date, many microbial esterases have been discovered and characterized [4,5]. In particular, pathogenic bacteria have been well-known for producing various extracellular esterases. These secreted esterases may be important for the virulence and pathogenesis

International Journal of Biological Macromolecules 206 (2022) 203–212

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Dual functional roles of a novel bifunctional β-lactamase/esterase from *Lactococcus garvieae*

Ly Thi Huong Luu Le [a,1], Wanki Yoo [a,b,1], Ying Wang [a], Sangeun Jeon [a], Kyeong Kyu Kim [b], Han-Woo Kim [c,d], T. Doohun Kim [a,*]

[a] Department of Chemistry, Graduate School of General Studies, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Republic of Korea
[b] Department of Precision Medicine, Sungkyunkwan University, College of Medicine, Suwon 2066, Republic of Korea
[c] Unit of Practical Applications, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea
[d] Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
*Lg*LacI
Bifunctional enzyme
β-Lactamase/esterase
Antibiotics
Biodiesels

ABSTRACT

A novel bifunctional β-lactamase/esterase (*Lg*LacI), which is capable of hydrolyzing β-lactam-containing antibiotics including ampicillin, oxacillin, and cefotaxime as well as synthesizing biodiesels, was cloned from *Lactococcus garvieae*. Unlike most bacterial esterases/lipases that have G-x-S-x-G motif, *Lg*LacI, which contains S-x-x-K catalytic motif, has sequence similarities to bacterial family VIII esterase as well as β-lactamases. The catalytic properties of *Lg*LacI were explored using a wide range of biochemical methods including spectroscopy, assays, structural modeling, mutagenesis, and chromatography. We confirmed the bifunctional property of *Lg*LacI hydrolyzing both esters and β-lactam antibiotics. This study provides novel perspectives into a bifunctional enzyme from *L. garvieae*, which can degrade β-lactam antibiotics with high esterase activity.

1. Introduction

β-Lactam antibiotics have been extensively used in medicine, food, pharmacy, fisheries, and agriculture [1–3] However, due to indiscriminate usages, antibiotic residues have been one of the main environmental pollutants that are commonly discovered in soil, groundwater, and wastewater [4–6]. Unfortunately, this phenomenon is largely responsible for the occurrence of multiple-antibiotic resistances in human and animal pathogens, which contributes to the rise of antibiotic-resistant clinical infections [7,8]. Thus, the removal of antibiotic residues significantly reduces the health risks of humans as well as those of other vertebrates [9,10].

To date, a wide range of methods including adsorption, sedimentation, coagulation, and filtration have been extensively explored to remove antibiotics from the environment, although these methods have some disadvantages, such as low levels of degradation, formation of hazardous byproducts, and high economic cost [11,12]. Therefore, it is highly indispensable to develop effective alternatives for antibiotics removal from the environment, where they exist in high concentrations as organic and inorganic mixtures. In this respect, biodegradation could be an effective, economical, and ecological method for the degradation of antibiotics [13,14]. Specifically, excellent functional properties and environmentally friendly characteristics of enzymes make biodegradation attractive tools for the removal of environmental pollutants [15–17].

Although several enzymes have been characterized for the elimination of ecological pollutants and contaminants, there is a growing interest in hydrolases from lactic acid bacteria (LAB) [18–20]. Specifically, these LAB-related enzymes were shown to be implicated in microcystin-LR removal process [21], detoxification of zearalenone [22], organophosphorus pesticides [23], and the hydrolysis of phthalates [24].

Here, we report a novel bifunctional lactamase/esterase from *Lactococcus garvieae*, which is capable of biodegradation of β-lactam antibiotics and synthesis of biodiesels. *L. garvieae*, a highly virulent gram-positive lactic acid bacteria, is widely distributed in fish, animals, vegetables, and meat [25–27]. Interestingly, this bacterium exhibits strong metal dissolution properties, which can lead to an environmentally friendly biodegradation process in comparison to heat or toxic chemical methods [28]. Although there are several reports on biodegradation of β-lactam compounds [29–32], there is no report on a bifunctional

* Corresponding author.
E-mail address: doohunkim@sm.ac.kr (T.D. Kim).
[1] These two authors equally contributed to this work.

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.081
Received 19 December 2021; Received in revised form 27 January 2022; Accepted 14 February 2022
Available online 17 February 2022
0141-8130/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

번호	관련증빙 명
9	*특허 출원 2건*

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2022.11.02
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2022-0144759 (접수번호 1-1-2022-1165859-47) (DAS접근코드DB4E)
출원인 명칭	한국해양과학기술원(1-2012-034461-6)
대리인 성명	특허법인 정진(9-2022-100081-7)
발명자 성명	김한우 신승철 최웅 손종현 김현
발명의 명칭	신규한 에스터 가수분해효소 변이체 및 이의 용도

KOPRI 극지연구소

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : https://www.kipo.go.kr-지식재산제도

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2022.11.04
특 기 사 항	심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(065)
출 원 번 호	10-2022-0145788 (접수번호 1-1-2022-1172517-13) (DAS접근코드BC49)
출원인 명칭	한국해양과학기술원(1-2012-034461-6)
대리인 성명	이처영(9-2003-000118-9)
발명자 성명	도학원 황지섭 이민주 이준혁 한세종
발명의 명칭	Psychrobacter sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소 및 이의 용도

특 허 청 장

KOPRI 극지연구소

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : https://www.kipo.go.kr-지식재산제도

번호	관련증빙 명
10	논문 초록부분, 논문 사사 부분 캡쳐

research papers

IUCrJ

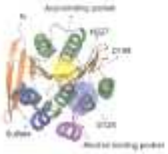
BIOLOGY | MEDICINE

Structural and biochemical insights into PsEst3, a new GHSR-type esterase obtained from *Paenibacillus* sp. R4

Jonghyeon Seo,[1,2] Woong Chu,[3] Hyun Kim,[3] Minsoo Kim,[4] Jun Hyuck Lee,[1*] Seung Chul Shin[4] and Hae-Yeon Kim[1*]

Received 11 June 2020
Accepted 10 February 2021

PsEst3, a psychrophilic esterase obtained from *Paenibacillus* sp. R4, which was isolated from the permafrost of Alaska, exhibits relatively high activity at low temperatures. Here, crystal structures of PsEst3 complexed with various ligands were generated and studied at atomic resolution, and biochemical studies were performed to analyze the structure–function relationship of PsEst3. Certain unique characteristics of PsEst3 distinct from those of other classes of lipases/esterases were identified. Firstly, PsEst3 contains a conserved GHSRAG pentapeptide sequence in the Gx[S/A]G motif around the nucleophilic serine. Additionally, it contains a conserved HGFRN consensus sequence in the oxyanion hole, which is distinct from that in other lipases/esterases families, as well as a specific domain composition (for example α-helix–turn–helix motif) and a disproportative lid domain that exposes the active site to the solvent. Secondly, the electrostatic potential of the active site in PsEst3 is positive, which may cause unwanted binding of negatively charged chemicals in the active site. Thirdly, the last residue of the oxyanion hole-forming sequence, Arg44, separates the active site from the solvent by sealing the acyl-binding pocket, suggesting that PsEst3 is an enzyme that is customized to some as-yet-unknown substrate that is distinct from those of classical lipases/esterases. Collectively, this evidence strongly suggests that PsEst3 belongs to a distinct family of esterases.



OPEN ACCESS

1. Introduction

Esterases (EC 3.1.1.1) and lipases (EC 3.1.1.3), classified as lipase/esterases, catalyze the hydrolysis of various types of substrates, including carboxylic esters, aryl esters and acylglycerols, to produce an acid and an alcohol. These enzymes are widely distributed in animals, plants and microorganisms, and play important roles in lipid metabolism (Liao *et al.*, 2016) and drug metabolism (Lauteri *et al.*, 2013). Research in recent decades has revealed several characteristics of lipases/esterases. Firstly, many lipases can utilize a broad range of substrates, which increases their spectrum of applicability (Li *et al.*, 2016). Secondly, as chirality is an important factor in the efficacy of many drugs, the stereoselectivity of lipases/esterases is also highly useful. Thirdly, lipases/esterases are stable in organic solvents (Sangui *et al.*, 1992). Owing to these characteristics, lipases/esterases have been used as biocatalysts in various industries, including the pharmaceutical industry, as food modification and as detergent production (Gupta/Verth *et al.*, 2008; Bornscheuer, 2002; Houde *et al.*, 2004; Panda & Gowrishankar, 2005).

research papers

the activity of PsEst3 was not significantly affected by different organic solvents.

4. Conclusion

The esterase PsEst3 was investigated to understand its structural and biochemical characteristics (Kim *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2020). The structure of PsEst3 was determined at 1.8 Å resolution and was found to share certain structural features with class V and VI esterases (Supplementary Fig. S2). However, the phylogenetic tree constructed based on the sequence homology of lipases/esterases showed that PsEst3 diverged from an early common ancestor (Fig. 4). Furthermore, BLAST using the UniProt database identified proteins with a pentapeptide sequence (GHSRA) identical to that of PsEst3, which is annotated as a dienelactone hydrolase. Sequence analysis further identified the catalytic serine residue within the pentapeptide 138-GHSRA-138 as the conserved motif GxSxG. Nevertheless, the unique characteristic of the 126-GHSRA-130 pentapeptide sequence, the oxyanion hole-forming sequence 41-HGFR-44, the positively charged electrostatic potential of the active site, which may function as a landing strip for negatively charged ligands, and the nonconserved dienelactone recognition residues in PsEst3 provide sufficient evidence to classify PsEst3 into a new family of esterases.

The Arg44 residue is another feature of PsEst3 that distinguishes it from other esterases and functions to partially cover the active site, thereby inhibiting the hydrolytic function of PsEst3. However, the specific role of Arg44 in the activity of PsEst3 remains unclear. Nevertheless, we concluded that it is customized for a substrate that has not yet been identified. Moreover, the results of the substrate-specificity assay indicate that the specific hydrolytic activity of fluorescein diacetate was 40-fold higher than that of *p*NP esters, suggesting that the true PsEst3 substrates might contain bulky alcoholic moieties (Fig. 6(*c*)). Together, in terms of protein engineering, the increased activity of R46G and the moderate activity of PsEst3 at low temperatures enhance the value of PsEst3 as an industrial biocatalyst.

Acknowledgements

We thank the supporting staff at beamline BL5C and BL7A of the Pohang Accelerator Light Source, Pohang, Republic of Korea for providing help with data collection. The authors declare no conflicts of interest.

Funding information

This research was supported by a National Research Foundation of Korea Grant from the Korean Government (MSIT; Ministry of Science and ICT; NRF-2021M3A5A1075524, KOPRI-Grant PM20014). This work was also supported by a Korea Institute of Marine Science and Technology Promotion (KIMST) grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KIMST 20200410; KOPRI Grant PM20030).

References

Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H. & Adams, P. D. (2012). *Acta Cryst.* **D68**, 352–367.
Argiroff, J. L. & Jaeger, K. E. (1998). *Biochem. J.* **333**, 177–183.
Barbirz, S., Koralewski, R. & Bornscheuer, U. T. (2008). *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 1908–1911.
Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P., Mourey, L., Andrei, L., Marty, A. & Truntzer, S. (2010). *Biophys. J.* **99**, 2225–2234.
Bornscheuer, U. T. (2002). *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73–81.
Chatch, L., Ashley, G. W., Gary, J. & Ollis, D. (1993). *Proteins*, **16**, 64–78.
Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. & Brenner, S. E. (2004). *Genome Res.* **14**, 1188–1190.
Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. & Derewenda, Z. S. (1992). *Biochemistry*, **31**, 1532–1541.
Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.-P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.-A. & Feller, G. (2000). *Trends Biotechnol.* **18**, 103–107.
Goldstein, D. C., Villar-Briones, A. G., Till, M., Kelly, W. J., Attwood, G. T. & Arcus, V. L. (2010). *Proteins*, **78**, 1457–1469.
Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Métoz, F. (1999). *J. Biol. Chem.* **268**, 1267–1269.
Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C. & Mora, D. (2008). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1294–1298.
Hitch, T. C. A. & Clavel, T. (2019). *Front. T.* e7249.
Holm, L. (2020). *Protein Sci.* **29**, 128–140.
Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. (2004). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 155–170.
Huang, J., Hao, Y.-Y., R. R., Kuang, S., Li, C., Yu, X.-W. & Li, J. (2018). *Sci. Rep.* **6**, 20503.
Jaenicke, A., Nieder, J., Mandrada, F. & Schmidt, G. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 39006–39013.
Kim, H., Park, A. K., Lee, J. H., Shin, S. C., Park, H. & Kim, H. W. (2018). *Acta Cryst.* **F74**, 367–372.
Kim, H.-K., Lee, J.-W., Cho, P. D. & Ollis, D. L. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 930–931.
Kim, H. W., Wi, A. R., Jeon, B. W., Lee, J. H., Shin, S. C., Park, H. & Jeon, S.-I. (2015). *Biochem. Lett.* **35**, 1087–1093.
Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Choe, S., Yoo, O. J. & Suh, S. W. (1997). *Structure*, **5**, 1571–1584.
Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549.
Lai, K. K., Stopkie, P. L., Yu, C., Xu, X., Cui, H., Molloy, S., Sarchenko, A., Yakunin, A. & Gonzalez, C. F. (2011). *PLoS One*, **6**, e23098.
Lauteri, S. C., Herring, V., Hu, Z., Wilbrecht, K. & Parker, R. B. (2013). *Pharmacotherapy*, **33**, 216–222.
Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P. & Chatonnet, A. (2013). *Nucleic Acids Res.* **41**, D423–D429.
Li, C., Hunter, M. & Bugg, T. D. (2006). *ChemBioChem*, **9**, 71–78.
Liao, J., Nelson, R. & Lehner, R. (2016). *Proteins Cell*, **9**, 156–165.
Liu, H. & Naismith, J. H. (2008). *BMC Biotechnol.* **8**, 91.
Nam, K. H., Kim, S.-J., Priyadarshi, A., Kim, H. S. & Hwang, K. Y. (2009). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 247–250.
Neves Petersen, M. T., Fojan, P. & Petersen, S. B. (2001). *J. Biotechnol.* **85**, 115–147.
Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. & Goldman, A. (1992). *Protein Eng. Des. Sel.* **5**, 197–211.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
Panda, T. & Gowrishankar, B. S. (2005). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 160–169.
Pathak, D. & Ollis, D. (1998). *J. Mol. Biol.* **284**, 497–525.

KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
11	논문 초록부분, 논문 사사 부분 캡쳐

International Journal of Biological Macromolecules 264 (2024) 130919

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Structural insights into the distinct substrate preferences of two bacterial epoxide hydrolases

Jinsh Hwang [a,b,1], Min Ju Lee [a,1], Sung Gu Lee [a,c], Hackwon Do [a,b,*], Jun Hyuck Lee [a,b,*]

[a] Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea
[b] Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea
[c] Synthetic Biology and Biomaterials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 34141, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Crystal structure
Epoxide hydrolase
Substrate specificity

ABSTRACT

Epoxide hydrolases (EHs), which catalyze the transformation of epoxides to diols, are present in most eukaryotic and prokaryotic organisms. They have recently drawn considerable attention from organic chemists owing to their applications in the stereoselective synthesis of enantiopure chiral compounds. Here, we report the crystal structures of BdEH (into dimer, ip, PDBC: 8H4G) and CdEH (into conformational orthologs PDBC: 8H5H at 1.95 and 2.45 Å resolution, respectively). Structural analysis showed that the overall structures of BdEH and CdEH commonly possess rigid α/β hydrolase fold with the same ring-opening residues (Tyr-Tyr) and conserved catalytic triad residues (Asp-Asp-His). However, the two enzymes were found to have significantly different substrate compositions in the cap domain region, which is involved in the formation of the substrate-binding site in both enzymes. Enzyme activity assay results showed that BdEH had the strongest activity toward the bulky alpha-substituted substrates, whereas CdEH had a higher preference for aromatic and cycloaliphatic substrates. Computational docking simulations and mutant identification revealed important residues that determine substrate-binding preferences. Collectively, structure comparison studies, together with mutant docking simulation results, suggested that the differences in substrate-binding site residues were highly correlated with substrate specificity.

1. Introduction

Epoxide hydrolases (EHs) convert various epoxides into diols (containing two hydroxyl groups). Epoxide compounds are widely used in medicinal chemistry (for drug discovery) and in fine chemical industry [1]. Several antibiotics, such as fosfomycin and epoxomicin, possess epoxide groups. However, epoxide compounds are also considered toxic to human health; thus, EHs have been commonly studied as biocatalysts for the detoxification of epoxide derivatives [2]. In fine chemical industry, the enantioselective hydrolysis of epoxides by enzymes is highly valuable [3].

EHs are widespread in all organisms, including mammals, plants [4–6], and bacteria. Thus, hydrolysis of epoxides is crucial in living organisms, as their mechanisms are mainly involved in detoxifying external epoxide compounds. With increasing research on EHs, they have been classified into two large groups, namely microsomal (EC 3.3.2.9) and soluble (EC 3.3.2.10) EHs, three small groups, namely leukotriene-A4 hydrolase (EC 3.3.2.6), haloalkane-epoxide hydrolase (EC 3.3.2.7), and cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (EC 3.3.2.11), and one unique haloacetate-1,2-epoxide hydrolase (EC 3.3.2.5) group, as per the BRENDA database [7]. In particular, microsomal and soluble EHs are distinguished by their cellular localization sites and specific properties, although both are vital for cellular metabolism [8–11]. Most soluble EHs are localized in the cytosol and peroxisomal matrix, and have a dimeric having an N-terminal phosphatase domain and C-terminal epoxide hydrolase domain (α/β hydrolase fold) [12,13]. Conversely, microsomal EHs are structured into membrane-anchored forms and have N-terminal transmembrane residues preceding the α/β hydrolase fold. The N-terminal residues are important for their stability [8,14]. Both soluble and microsomal EHs from mammalian organisms are considered significant clinical targets for the development of inhibitory drugs, as they are involved in various diseases, such as cardiovascular, inflammatory, and neurological [15–17].

Microbial EHs were found in numerous source organisms, even from metagenomes, and most of them were included in the soluble EH group. Microbial EHs are currently gaining industrial interest in

* Corresponding authors at: Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea.
E-mail addresses: hackwon@kopri.re.kr (H. Do), junhyuck@kopri.re.kr (J.H. Lee).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130919
Received 20 November 2023; Received in revised form 22 January 2024; Accepted 22 February 2024
Available online 27 February 2024
0141-8130/© 2024 Published by Elsevier B.V.

J. Hwang et al. International Journal of Biological Macromolecules 264 (2024) 130919

Table 3
X-ray diffraction data collection and refinement statistics.

Data set	BdEH	CdEH
X-ray source	PAL 7A	PLS-II MICROFOCUS 6D[a]
Space group	P212121	P212121
Unit cell parameters (Å, °)	a = 97.54, b = 104.91, c = 98.28, α = β = γ = 90, p = 100.91	a = 41.37, b = 51.46, c = 79.04, α = β = γ = 90, p = 90.02
Wavelength (Å)	0.9793	1.5418
Resolution (Å)	50.1–1.95 (1.98–1.95)	41.24–2.45 (2.54–2.45)
Total reflections	1,612,130	90,140 (8,710)
Unique reflections	151,095 (15,014)	20,165 (1,922)
Average I/σ (I)	19.96 (4.23)	10.3 (6.1)
R_{merge}[b]	0.110 (0.41)	0.090 (0.177)
Redundancy	4.4 (2.7)	4.5 (4.2)
Completeness (%)	99.9 (92.3)	97.7 (93.3)
Refinement		
Resolution range (Å)	20.0–1.95 (1.93–1.95)	41.41–2.45 (2.56–2.45)
No. of reflections in working set	151,067 (10,004)	20,129 (1,918)
No. of reflections in test set	7,542 (494)	974 (96)
No. of amino acid residues	1179	634
No. of water molecules	669	152
R_{work}[c]	0.172 (0.226)	0.171 (0.291)
R_{free}[c]	0.200 (0.254)	0.217 (0.252)
r.m.s. bond length (Å)	0.013	0.011
r.m.s. bond angle (°)	1.75	1.33
Average B-value (Å²) (protein)	22.50	26.00
Average B-value (Å²) (solvent)	36.24	33.29

Values in parentheses refer to the highest resolution shells.
[a] $R_{merge} = \sum_h \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_h \sum_i I_i$.
[b] $R_{work} = \sum_h \|F_{obs}| - |F_{calc}\| / \sum_h |F_{obs}|$.
[c] R_{free} calculated with 5.0 % of all reflections excluded from refinement steps using high-resolution data.

PDBSUM online [18]. The number of molecules in the asymmetric unit of BdEH and CdEH was estimated using the Matthews coefficient in the CCP4 suite. Validation of the final models of both EHs was carried out using MolProbity, and the final structures had R_{work} and R_{free} values of 0.172 and 0.200 for BdEH and 0.171 and 0.217 for CdEH, respectively. All structural figures were generated using the PYMOL software. The coordinates and structure factors of BdEH and CdEH have been deposited in the Protein Data Bank under the accession codes 8H4G and 8H5H, respectively.

4.5. 4.6. Analytical size-exclusion chromatography

To investigate the oligomerization of both BdEH and CdEH, analytical size-exclusion chromatography was performed using Superdex 200 16/100 GL column and molecular weight in solution was calculated against standard proteins. The standard mixture contained bovine thyroglobulin (670 kDa), γ-globulin from bovine blood (150 kDa), albumin chicken egg grade VI (44.3 kDa), ribonuclease A type 1-A from bovine pancreas (13.7 kDa), and p-aminobenzoic acid (pABA, 137.1 Da). Linear regression analysis and equation for molecular weight calculation using standard protein mixture are presented with 99 % coefficient of determination. The standard protein mixture and purified EHs were eluted using a buffer composed of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl. The oligomeric status of BdEH and CdEH were investigated using calibration curves. The interfacial area and interacting residues between the oligomers were assessed using PDBePISA [19].

4.6. Circular dichroism analysis

To evaluate the secondary structure and folding of BdEH and CdEH, circular dichroism (CD) analysis was performed using a Chirascan Circular dichroism spectropolarimeter (Applied Photophysics, Surrey, UK) equipped with a temperature-controlled cell holder. Protein solutions of both EHs were prepared at 1 mg/mL with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer, without salt, to reduce noise in the 190–200 nm spectrum. Scanning was performed in the far-UV area (190–250 nm), in triplicate, using 0.1 cm path-length quartz cuvette. Thermal shift assay of both EHs was performed by increasing the temperature from 5 to 95 °C, and the thermal denaturation profiles were recorded at every 2.5 °C. Datasets were collected in triplicate and normalized by subtracting the background scan with a buffer. CD melting curves were obtained by plotting the changes in ellipticity at 222 nm for each ramping temperature. Melting temperature (T_m) was defined as the point at which 50 % of the protein had denatured, and the T_m value of each EH was calculated with Boltzmann equation fitting. All figures regarding CD analysis were generated using PlotnG (GraphPad).

4.7. Tunnel and substrate-binding pocket analysis

To identify the substrate-binding tunnel, the spatial area that connects the buried cavity with the bulk solvent region was predicted using Caver v3.0.3 PyMol, plugin software [20]. 1.4 Å of minimum probe radius, 3 Å of shell radius, and 4 Å of shell depth were used as the search parameters. The catalophore cavities and binding sites of EHs were predicted with 1.4 Å of probe radius and the volume of cavities was calculated by CavityMark v1.0 (Biosphere GmbH, 2022) using modified LIGSITE algorithm [21]. Analysis and visualization of tunnels and pockets for both EHs were conducted using PYMOL (2.4.1 software. All software were used at default parameters unless mentioned otherwise.

4.8. Computational docking simulation

Molecular docking simulations were performed using Autodock 1.1.2 (AutoDock Vina) thus, improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [22]. Monomeric structures of BdEH and CdEH were selected for the simulation. Coordinates for (R)-(−)-epichlorohydrin and (R)-(−)-glycidyl oxide were generated and registered by Ligand (a graphical tool for the CCP4 template-mediated library) [23]. Before the docking simulation, hydrogen was added to the polar residues of the proteins, and the location and dimensions of the grid box were determined using AutoDock Tools software based on the catalytic residues [24]. The size of each grid box for both BdEH and CdEH was set as 30 Å for each side of the x, y, and z axis. The center coordinate of the grid box for BdEH (PDB ID, 8H4G) and CdEH (PDB ID, 8H5H) were parallel at x = 14, y = 0, z = 25 and x = −3.8, y = −3.8, z = 2, respectively, which includes catalytic triad (Asp-Asp-His) and substrate binding residues.

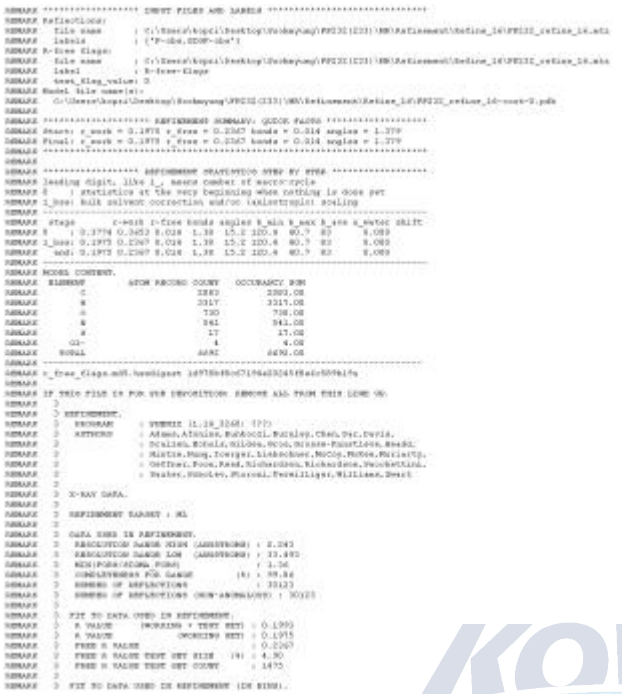
Funding information

This work was a part of the project titled "Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources", funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Republic of Korea [KIMST 20200430, 30300; grant number PM24030], and also supported by the National Research Foundation of Korea Grant from the Korean Government (NRF; Ministry of Science and ICT) (grant number NRF-2021M1A5A1075524, RDPR-PG24014).

CRediT authorship contribution statement

Jinsh Hwang: Writing – original draft, Visualization, Validation, Investigation, Formal analysis. **Min Ju Lee**: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Sung Gu**

번호	관련증빙 명
12	*diienelactone hydrolase 효소의 삼차구조 PDB 일부 캡쳐 그림 파일*



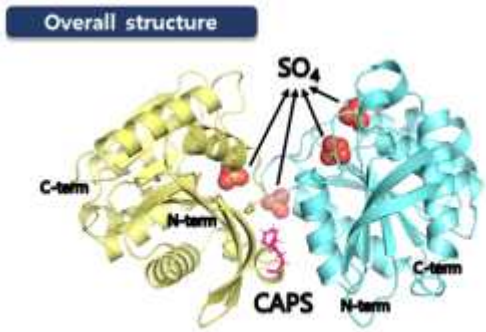


Figure. Overall structure of dienelactone hydrolase homolog from *Flavobacterium psychrolimnae*. Dimer shape of protein, CAPS and SO_4 molecules compose the asymmetric unit of protein crystal.

KOPRI
극지연구소

번호	관련증빙 명
13	논문 초록부분, 논문 사사 부분 캡쳐

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*

Hackwon Do[1,2], Manki Yoo[3¶], Ying Wang[1], Yewon Nam[1], Seung Chul Shin[2], Han-Woo Kim[1,2], Kyeong Kyu Kim[4], Jun Hyuck Lee[1,2]*

1. Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon, Korea, 2. Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon, Korea, 3. Department of Precision Medicine, Graduate School of Basic Medical Sciences (GSBMS), Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, Korea, 4. Department of Chemistry, Graduate School of General Studies, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea, 5. Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, Korea

¶ These authors contributed equally to this work.
* junhyuklee@kopri.re.kr

OPEN ACCESS

Citation: Do H, Yoo M, Wang Y, Nam Y, Shin SC, Kim H-W, et al. (2023) Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*. PLoS ONE 18(2): e0280898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280898

Editor: Thus J. Boggon, Yale University School of Medicine, UNITED STATES

Received: July 27, 2022

Accepted: January 13, 2023

Published: February 6, 2023

Copyright: © 2023 Do et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The coordinates and structural factors deposited in the Protein Data Bank PDB (https://www.rcsb.org/) under accession codes 7K0D and 7K0K.

Funding: This research was a part of the project titled 'Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources (KIMST 20200610, KOPRI Grant PM20020)' funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea. (J.H.L.). This research was also supported by a National Research Foundation of Korea Grant

Abstract

Esterase, a member of the serine hydrolase family, catalyzes the cleavage and formation of ester bonds with high regio- and stereospecificity, making them attractive biocatalysts for the synthesis of optically pure molecules. In this study, we performed an in-depth biochemical and structural characterization of a novel microbial acetylesterase, *Lg*EstI, from the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. The dimeric *Lg*EstI displayed substrate preference for the short acyl chain of p-nitrophenyl esters and exhibited increased activity with F297A mutation. Comparative analysis with other esterases indicated that *Lg*EstI has a narrow and shallow active site that may exhibit substrate specificity to short acyl chains. Unlike other esterases, *Lg*EstI contains bulky residues such as Trp88, Phe194, and Trp217, which block the acyl chain channel. Furthermore, immobilized *Lg*EstI retained approximately 80% of its initial activity, indicating its potential in industrial applications. This study expands our understanding of *Lg*EstI and proposes novel ideas for improving its catalytic efficiency and substrate specificity for various applications.

Introduction

Hydrolases catalyze the hydrolysis of a wide range of substrates, including peptides, amides, halides, esters, triglycerides, and non-natural substrates. They perform various biological functions [1, 2]. Among the α/β hydrolase enzymes, esterases catalyze the hydrolysis of a wide range of substrates with ester groups and are useful in the field of biotechnology for food processing, agriculture, detergents, and synthesis of optically active drugs [3]. Carboxylesterase from *Octadecabacter antarcticus* Y22-1, *Salinibacter ruber* (EstSr) [4], and *Pseudomonas* sp. strain CW7 exhibited catalytic activity for the detoxification of pyrethroid, which is widely used as an insecticide in agriculture and home applications and is toxic to humans [5–8].

PLOS ONE

Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*

Funding: [redacted] There was no additional external funding received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Esterase EstI1 from *Sphingobium* sp. C3 transforms dimethyl terephthalate (DMT) into the less toxic mono-methyl terephthalate (MMT). DMT is an additive widely used in the synthesis of polyester fibers, films, paints, and industrial plastics, such as polyethylene terephthalate (PET), polytrimethylene terephthalate (PTT), and polybutylene terephthalate (PBT) [2–4]. The esterase from the filar ochrilc strain ID has the potential to degrade pesticides, such as cypermethrin, in contaminated soil and water [5,6].

Biochemical and structural investigations of numerous esterases have been conducted to understand their biological functions [7]; common characteristics in sequences and structures are observed. The common features of esterases include canonical catalytic triad of Ser–Asp/Glu–His, conserved catalytic oxyan, the HGGG motif for the stabilization of the oxyanion hole during hydrolysis [11], and several other conserved residues [12]. These features are often used for enzyme classification, predicting biological functions, and in protein engineering of enzyme [13–15]. However, their systematic classification based on similarities in their primary, secondary, and tertiary structures does not always correlate with their EC numbers because of their structural plasticity and complexity [14–16]. This indicates that a detailed structural and mechanistic characterization of individual enzymes is required.

In this study, we investigated acetylesterase (*Lg*EstI) from *Lactococcus garvieae*, a major fish pathogen. We characterized the enzymatic features of *Lg*EstI that contributes to its narrow substrate specificity for acetate esters. Substrate specificity was further analyzed using three-dimensional structures, comparative analysis, and single mutagenesis of the binding pocket residues of *Lg*EstI.

Materials and methods

Materials

The p-nitrophenyl acyl esters (acetate, butyrate, octanoate, decanoate, myristate, and palmitate) were obtained from Sigma-Aldrich (Yongin, Korea). All enzymes, including Taq polymerase, thrombin, and gel filtration calibration kits for size exclusion chromatography, were obtained from Sigma-Aldrich (Yongin, Korea). Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and kanamycin were purchased from Fisher Scientific (Seoul, Korea).

KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
14	논문 초록부분, 논문 사사 부분 캡쳐

International Journal of Molecular Sciences

MDPI

Article

Feruloyl Esterase (*La*Fae) from *Lactobacillus acidophilus*: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production

Sangeun Jeon [1,†], Jisub Hwang [2,3,†], Hackwon Do [2,3,†], Ly Thi Huong Lua Le [1], Chang Woo Lee [2], Wanki Yoo [1,4], Min Ju Lee [2], Seung Chul Shin [5], Kyeong Kyu Kim [4], Han-Woo Kim [2,3] and Jun Hyuck Lee [2,3,*]

[1] Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Republic of Korea
[2] Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea
[3] Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea
[4] Department of Precision Medicine, Graduate School of Basic Medical Science (GSBMS), Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon 16419, Republic of Korea
[5] Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea; ssc@kopri.re.kr
* Correspondence: hackwon.do@kopri.re.kr (H.D.); junhyuck.lee@kopri.re.kr (J.H.L.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Ferulic acid and related hydroxycinnamic acids, used as antioxidants and preservatives in the food, cosmetic, pharmaceutical and biotechnology industries, are among the most abundant phenolic compounds present in plant biomass. Identification of novel compounds that can produce ferulic acid and hydroxycinnamic acids, that are safe and can be mass-produced, is critical for the sustainability of these industries. In this study, we aimed to obtain and characterize a feruloyl esterase (LaFae) from *Lactobacillus acidophilus*. Our results demonstrated that LaFae reacts with ethyl ferulate and can be used to effectively produce ferulic acid from wheat bran, rice bran and corn stalks. In addition, xylanase supplementation was found to enhance LaFae enzymatic hydrolysis, thereby augmenting ferulic acid production. To further investigate the active site configuration of LaFae, crystal structures of unliganded and ethyl ferulate-bound LaFae were determined at 2.3 and 2.39 Å resolutions, respectively. Structural analysis shows that a Phe54 residue, located at the active site entrance, acts as a gatekeeper residue and controls substrate binding. Mutating this Phe54 to Ala produced an approximately 3.6-fold increase in LaFae activity against *p*-nitrophenyl butyrate. Our results highlight the considerable application potential of LaFae to produce ferulic acid from plant biomass and agricultural by-products.

Keywords: crystal structure; LaFae; ferulic acid; feruloyl esterase; X-ray crystallography

Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 11370 19 of 17

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241411370/s1. References [29,31,32,46–50] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Methodology, S.J., H.D., C.W.L., W.Y., M.J.L., S.C.S. and H.-W.K.; Software, J.H., H.D. and C.W.L.; Validation, S.J., H.D., L.T.H.L.L., M.J.L., S.C.S. and K.K.K.; Formal analysis, S.J. and H.-W.K.; Investigation, J.H. and W.Y.; Data curation, H.D. and K.K.K.; Writing—original draft, J.H.; Writing—review & editing, J.H.L.; Supervision, J.H.L.; Funding acquisition, J.H.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by a National Research Foundation of Korea Grant from the Korean Government (MSIT; the Ministry of Science and ICT) (NRF-2021M1A5A1075524) (KOPRI-PN23014). This research was also a part of the project titled "Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources (KIMST 20200610, KOPRI Grant PM23030)", funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Wild-type apo and S106A ethyl ferulate complex of LaFae have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 7X0H and 7X8L respectively.

Acknowledgments: We would like to thank the staff at the X-ray core facility of the Korea Basic Science Institute (KBSI; Ochang, Korea) and the BL-5C and 6L-7A of the Pohang Accelerator Laboratory (Pohang, Korea) for their kind help with X-ray diffraction data collection.

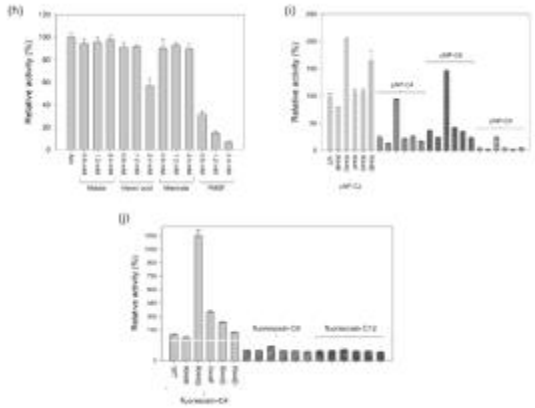
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

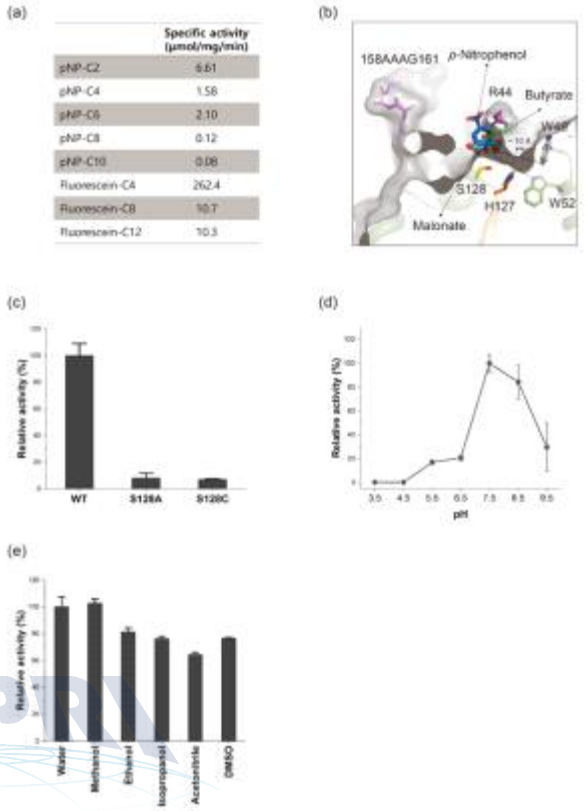
References

1. Bartecka-Floryszczyk, E.; Fabisiewicz, A.; Zwiniak, B. Phenolic acids derivatives—Biotechnological methods of synthesis and bioactivity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 1098–1113. [CrossRef] [PubMed]
2. Cornuz, V.; Yoshiaki, D.C. Hydroxycinnamic acids and human health: Recent advances. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 493–499. [CrossRef] [PubMed]
3. Tsuchiya, O.; Gonzalez-Paramatz, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules* **2017**, *22*, 281. [CrossRef] [PubMed]
4. Tamuka, R.; Chenpuk-Kuhn, P.; Maniquez, S.; Chiuyu, P. Bioconversion of plant-derived phenolic acids. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, e1700052. [CrossRef] [PubMed]
5. Kosaki, T.; Fushinobu, S.; Ardiansyah; Shirakawa, H.; Komai, M. Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 803–810. [CrossRef]
6. Oliveira, D.M.; Mota, T.R.; Oliva, B.; Segato, F.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O.; Faulds, C.B.; Dos Santos, W.D. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresour. Technol.* **2019**, *278*, 408–423. [CrossRef] [PubMed]
7. Huang, D.W. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *133*, 87–112. [CrossRef] [PubMed]

KOPRI 극지연구소

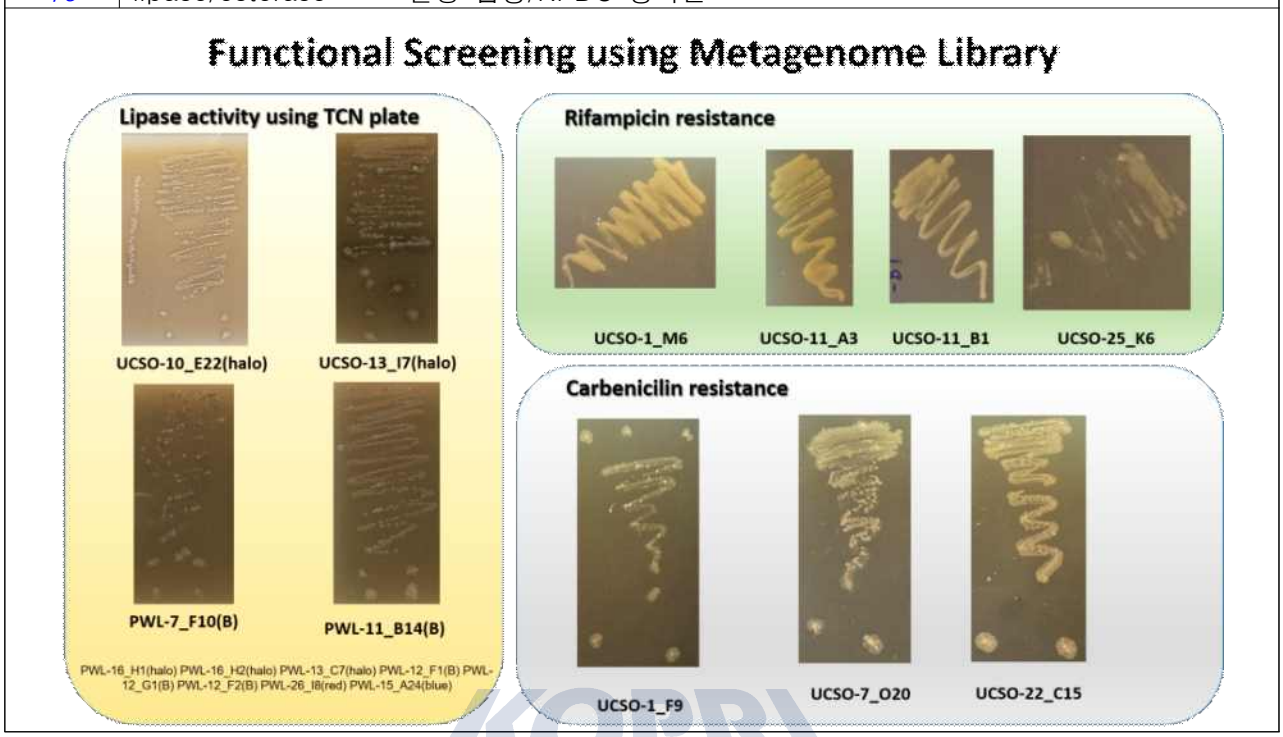
번호	관련증빙 명
15	*PsEst3 효소의 활성 데이터 그림 파일*





KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
16	lipase/esterase 효소 활성 검증/KPDC 등록번호



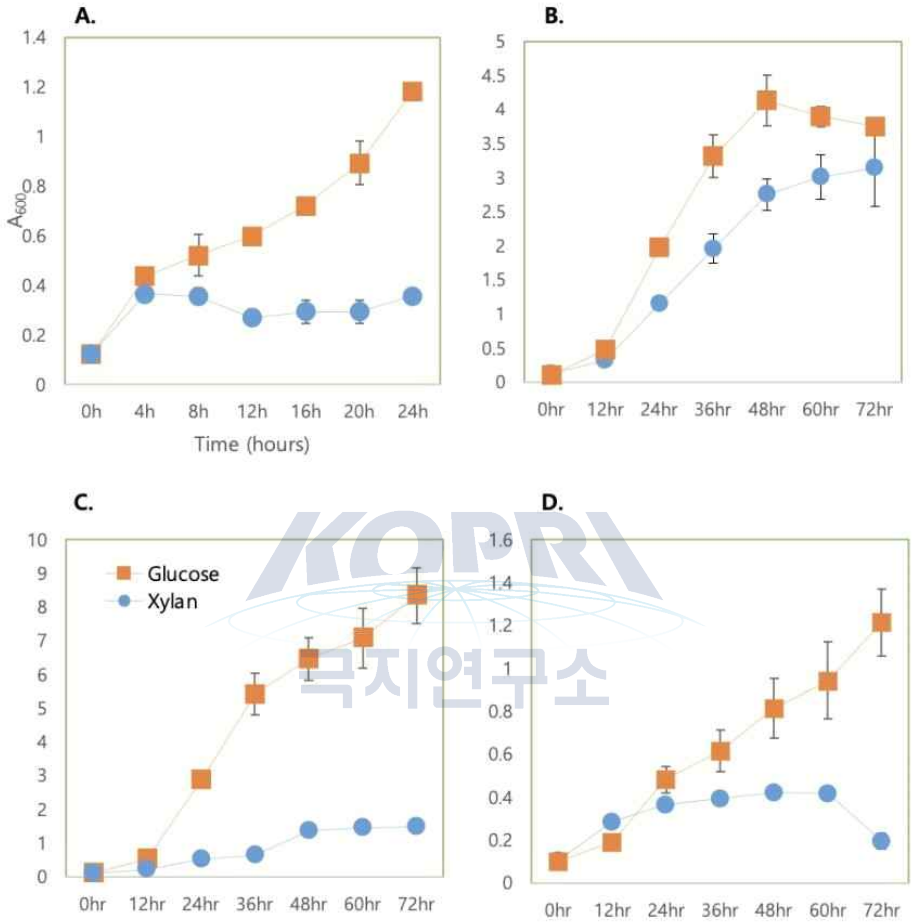
KOPRI
극지연구소

번호	관련증빙 명
17	플라스틱 분해 활성 사진

BHET plate 실험. 효소에 의한 BHET 분해 후 혼탁 정도의 변화를 통해 BHET 분해를 확인.

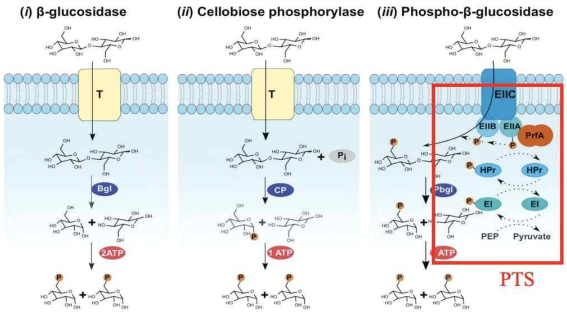
KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
18	21. 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프

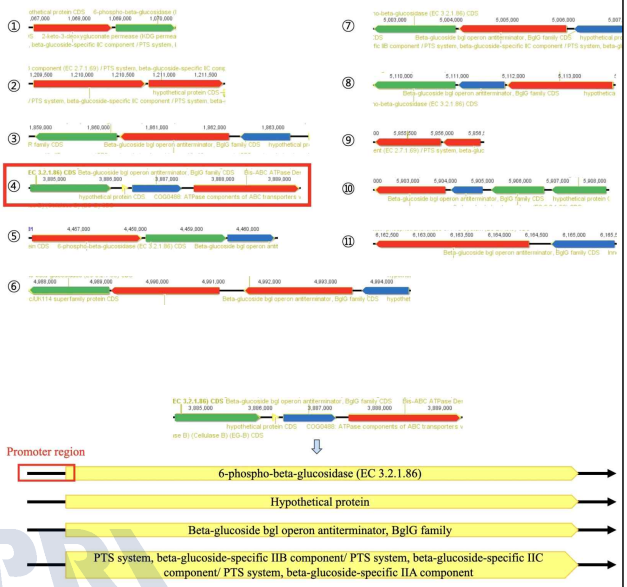


대장균과 *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 따른 생장 분석. 대장균의 37 ℃에서의 성장(A). *P. xylanexedens*의 25 ℃ (B), 30 ℃ (C), 37 ℃ (D)에서의 성장

번호	관련증빙 명
19	연차 보고서 (난분해성 물질 처리를 위해 유전체 교정된 P. xylanexedens 균주 제작)



PTS: Phosphotransferase system



KOPRI 극지연구소

번호	관련증빙 명
20	논문 초록부분, 논문 사사 부분 캡쳐

International Journal of Molecular Sciences

MDPI

Article

Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium *Exiguobacterium antarcticum*

Jisub Hwang [1,2,†], Wanki Yoo [3,4,†], Seung Chul Shin [5], Kyeong Kyu Kim [4], Han-Woo Kim [4], Hackwon Do [1,2,*] and Jun Hyuck Lee [1,2,*]

1 Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea; hwajisub@kopri.re.kr
2 Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea
3 Department of Chemistry, Graduate School of General Studies, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Republic of Korea; yooyoo@sookmyung.ac.kr
4 Department of Precision Medicine, Graduate School of Basic Medical Science (GSBMS), Inje University Seoul of Medicine, Busan 04419, Republic of Korea; kyeongkyu@ibms.or.kr (K.K.K.); hanwoo@kopri.re.kr (H.-W.K.)
5 Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea; ecol@kopri.re.kr
* Correspondence: hackwon@kopri.re.kr (H.D.); junhyuck@kopri.re.kr (J.H.L.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: This study aimed to elucidate the crystal structure and biochemically characterize the carboxylesterase ExEst2, a thermotolerant biocatalyst derived from *Exiguobacterium antarcticum*, a psychrotrophic bacterium. Sequence and phylogenetic analyses showed that ExEst2 belongs to the Family XIII group of carboxylesterases. ExEst2 has a broad range of substrate specificities for short-chain p-nitrophenyl (pNP) esters, 1-naphthyl acetate (1-NAA) and 1-naphthyl butyrate (1-NB). Its optimal pH is 7.0, losing its enzymatic activity at temperatures above 50 °C. ExEst2 showed degradation activity toward bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET), a polyethylene terephthalate degradation intermediate. We determined the crystal structure of ExEst2 at a 1.74 Å resolution in the ligand-free form to investigate BHET degradation at a molecular level. Finally, the biochemical stability and immobilization of a cross-linked enzyme aggregate (CLEA) were assessed to examine its potential for industrial applications. Overall, the structural and biochemical characterization of ExEst2 demonstrates its industrial potency as a biocatalyst.

Keywords: carboxylesterases; *Exiguobacterium antarcticum*; psychrotrophic bacteria

check for updates

Citation: Hwang, J.; Yoo, W.; Shin, S.C.; Kim, K.K.; Kim, H.-W.; Do, H.; Lee, J.H. Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium *Exiguobacterium antarcticum*. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 12022. https://doi.org/10.3390/ijms241512022

with ester bonds and decompose environmental pollutants. Collectively, these findings may be useful for the development and modification of new BHET-degrading enzymes using previously known esterase enzymes.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241512022/s1.

Author Contributions: Data curation, Formal analysis, Methodology, Validation, Visualization, Writing—original draft, J.H. Data curation, Formal analysis, Methodology, Validation, Visualization, Writing—original draft, W.Y. Data curation, Validation, S.C.S. Data curation, Validation, K.K.K. Data curation, Validation, Writing—review and editing, H.-W.K. Data curation, Formal analysis, Methodology, Validation, Visualization, Writing—review and editing, H.D. Supervision, Funding acquisition, Writing—review and editing, J.H.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a National Research Foundation of Korea Grant from The Korean Government (MSIT, Ministry of Science and ICT, grant number NRF-2022M3A9H1079224 and KOPRI-PN23010). This research was also a part of the project titled "Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources (KIMST 20210610, KOPRI Grant number PM23030)," funded by the Ministry of Oceans And Fisheries, Republic of Korea.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data analyzed during this research have been included in this article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: We would like to thank the staff at the X-ray core facility of the Korea Basic Science Institute (KBSI) Ochang, Republic of Korea and BL-5C of the Pohang Accelerator Laboratory (PAL), Republic of Korea for their kind help with data collection. We thank Sungwoo Kim (School of Life sciences, BK21 FOUR KNU Creative BioResearch Group, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea) for advice on experimental design of BHET hydrolysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bornscheuer, U.T. Microbial carbonyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 73–81.
2. Araujo, E.L.; Hirsch, D.C.; Silva, G.O.; Antunes, A.; Nagamura, V.L.R.; Gonçalves, L.R.B.; Melo, V.M.M. A novel bacterial carboxylesterase identified in a metagenome derived clone from Brazilian mangrove sediments. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 3919–3928.
3. Shin, H.; Yu, L.; Lee, Y. Biochemical characterization of a carboxylesterase from the archaeon Pyrobaculum sp. 1860 and a rational explanation of its substrate specificity and thermostability. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1680–1693.

KOPRI 극지연구소

첨부2 연구개발결과 활용계획서

연구개발결과 활용계획서			
사업명	① 부처사업명(대) 거대과학연구개발사업 –② 사업명(중) 해양극지기초원천기술개발사업–③ 세부사업명(소) 해양극지기초원천기술개발사업		
과제명	환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발		
주관연구기관명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	주관연구책임자 성명	김한우
총 연구기간	2021. 04. 27 – 2025. 03. 31 (48개월)	자체평가 해당 연구기간	2021. 04. 27 – 2025. 03. 31 (48개월)

1. 연구성과 및 활용 현황

사업명	해양극지기초원천기술개발사업	연구책임자	김한우	주관기관	한국해양과학기술원 부설 극지연구소
과제번호	2021M1A5A1075524	과제명	환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

KOPRI 극지연구소

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)

전문학술지 논문게재				초청강연실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상실적	출판실적		표준		신기술지정	기술제품인증
국내논문		국외논문					출원		등록								
SCI	비SCI	SCI	비SCI		국내	국제	국내	국외	국내	국외		저역서	보고서	국내	국제		
0	0	14	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)

학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)

과학자교류		국제협력기반			학술회의개최
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	학술회의개최(국내,국제 통합)
0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)

기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)						
기술실시계약(기술이전 등)	기술지도	기술무역	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용	기술마케팅	시험제품	사업화계획
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

기타 성과(단위 : 건)

언론보도 성과	생명자원/신품종/화합물	원자력연구개발사업실적(원자력연구개발사업에한함)				법령반영	정책활용내용	설계기준
		기술보고서	설계문서	장비구축 및 개발	분석방법개발			
0	0	0	0	0	0	0	0	0

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202112	Crystal structure of a novel putative sugar isomerase from the psychrophilic bacterium Paenibacillus sp. R4	Kwon, Sunghark; Ha, Hyun Ji; Kang, Yong Jun; Sung, Ji Hye; Hwang, Jisub; Lee, Min Ju; Lee, Jun Hyuck; Park, Hyun Ho;	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	585()	국외	SCI등재	3.575	아니오	33
2021M1A5A1075524	202201	Sequence Analysis and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of an Acetylesterase (LgEstI) from Lactococcus garvieae	Do, Hackwon; Wang, Ying; Lee, Chang Woo; Yoo, Wanki; Jeon, Sangeun; Hwang,	SCI	CRYSTALS	(0)	국외	SCI등재	2.670	아니오	33

KOPRI 극지연구소

			Jisub; Lee, Min Ju; Kim, Kyeong Kyu; Kim, Han-Woo; Lee, Jun Hyuck; Kim, T. Doohun;								

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202202	Dual functional roles of a novel bifunctional beta-lactamase/esterase from Lactococcus garvieae	Yoo, Wanki; Wang, Ying; Jeon, Sangeun; Kim, Han-Woo; Le, Ly Thi Huong Luu; Kim, Kyeong Kyu; Kim, T. Doohun;	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	206(0)	국외	SCI등재	8.025	아니오	33
2021M1A5A1075524	202204	Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Novel Esterase (ScEst) from Staphylococcus chromogenes	Hwang, Jisub; Jeon, Sangeun; Lee, Min Ju; Yoo, Wanki; Chang, Juwon; Kim, Kyeong Kyu; Lee, Jun Hyuck;	SCI	CRYSTALS	12(0)	국외	SCI등재	2.670	아니오	33

KOPRI 극지연구소

			Do, Hackwon; Kim, T. Doohun;								

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202204	Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Single Stranded DNA Binding Protein (LjSSB) from Psychrophilic Lacinutrix jangbogonensis PAMC 27137	Choi, Woong; Son, Jonghyeon; Park, Aekyung; Jin, Hongshi; Shin, Seung Chul; Lee, Jun Hyuck; Kim, T. Doohun; Kim, Han-Woo;	SCI	CRYSTALS	12(0)	국외	SCI등재	2.670	아니오	50
2021M1A5A1075524	202205	Investigating the Functional Role of the Cysteine Residue in Dehydrin from the Arctic Mouse-Ear Chickweed Cerastium arcticum	Kim, Il-Sup; Choi, Woong; Park, Ae Kyung; Kim, Hyun; Son, Jonghyeon; Lee, Jun Hyuck; Shin, Seung Chul; Kim, T. Doohun; Kim, Han-Woo;	SCI	MOLECULES	(0)	국외	SCI등재	4.927	아니오	50

KOPRI 극지연구소

2021M1A5A1075524	202209	Safety evaluation of mycotoxin citrinin production from Monascus ruber through whole-genome sequencing and analytical evaluation	Yoon, Hye Ree; Ku, Danyeol; Han, Suk; Shin, Seung Chul; Kim, Han-Woo; Kim, Hyo Jin;	SCI	3 BIOTECH	(0)	국외	SCI등재	2.893	아니오	50

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202209	Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from Psychrobacter sp. PAMC 21119	Do, Hackwon; Nguyen, Dieu Linh; Lee, Chang Woo; Lee, Min Ju; Oh, Hoejung; Hwang, Jisub; Han, Se Jong; Lee, Sung Gu; Lee, Jun Hyuck;	직접입력	PLOS ONE	17(9)	국외	SCI등재	3.752	아니오	50
2021M1A5A1075524	202302	Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (LgEstI) from Lactococcus garvieae	Do, Hackwon; Yoo, Wanki; Wang, Ying; Nam, Yewon; Shin, Seung Chul;	SCI	PLOS ONE	18(2)	국외	SCI등재	3.7	아니오	50

KOPRI 극지연구소

			Kim, Han-Woo; Kim, Kyeong Kyu; Lee, Jun Hyuck;								

전문학술지 논문게재 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202303	Structural and biochemical insights into PsEst3, a new GHSR-type esterase obtained from Paenibacillus sp. R4	Son, Jonghyeon; Choi, Woong; Kim, Hyun; Kim, Minseo; Lee, Jun Hyuck; Shin, Seung Chul; Kim, Han-Woo;	SCI	IUCRJ	10(0)	국외	SCI등재	3.9	아니오	50
2021M1A5A1075524	202307	Feruloyl Esterase (LaFae) from Lactobacillus acidophilus: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production	Jeon, Sangeun; Hwang, Jisub; Do, Hackwon; Le, Ly Thi Huong Luu; Lee, Chang Woo; Yoo, Wanki; Lee, Min Ju; Shin, Seung Chul;	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	24(13)	국외	SCI등재	5.6	아니오	50

KOPRI 극지연구소

			Kim, Kyeong Kyu; Kim, Han-Woo; Lee, Jun Hyuck;								

전문학술지 논문게재 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2021M1A5A1075524	202308	Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium Exiguobacterium antarcticum	Hwang, Jisub; Yoo, Wanki; Shin, Seung Chul; Kim, Kyeong Kyu; Kim, Han-Woo; Do, Hackwon; Lee, Jun Hyuck;	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	24(15)	국외	SCI등재	5.6	아니오	50
2021M1A5A1075524	202404	Structural insights into the distinct substrate preferences of two bacterial epoxide hydrolases	Hwang, Jisub; Lee, Min Ju; Lee, Sung Gu; Do, Hackwon; Lee, Jun Hyuck;	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	264(0)	국외	SCI등재	7.7	아니오	50
2021M1A5A1075524	202411	A structure-based mechanism of adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferas	Nam, Yewon; Ahn, Yong-Yoon; Kim, Bo-Mi; Kim,	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULE	280(0)	국외	SCI등재	7.7	아니오	50

KOPRI 극지연구소

		e (MpaCobU) from Methylocapsa palsarum	Kitae; Lee, Jun Hyuck; Do, Hackwon;		S						

지식재산권 성과정보										
과제번호	출원등록연월	재산권구분	출원등록구분	발명제목	출원등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호	활용형태	기여도
2021M1A5A1075524	20221102	특허	출원	신규한 에스터 가수분해효소 변이체 및 이의 용도	한국해양과학기술원	대한민국	김한우 신승철 최웅 손종현 김현	10-2022-0144759	보유기관자체활용	100
2021M1A5A1075524	20221104	특허	출원	Psychrobacter sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소 및 이의 용도	한국해양과학기술원	대한민국	도학원 황지섭 이민주 이준혁 한세종	10-2022-0145788	보유기관자체활용	50

KOPRI 극지연구소

2. 연구개발결과 활용 계획 (해당항목에 “○” 표시)

기술이전	기업화	후속연구 추진	타 사업 활용	그 밖의 목적 활용	연구결과 활용 중단
		○			

< 연구개발성과 활용계획표>

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후5년 이내
국외논문	SCIE	매년 상위20% 이내 논문 약 1편 게재
	비SCIE	계상하지 않음
	계	5편
국내논문	SCIE	계상하지 않음
	비SCIE	계상하지 않음
	계	계상하지 않음
특허출원	국내	2
	국외	–
	계	2
특허등록	국내	–
	국외	–
	계	–
인력양성	학사	N/A
	석사	1
	박사	N/A
	계	1
사업화	상품출시	N/A

	기술이전		N/A
	공정개발		N/A
제품개발	시제품개발		N/A
비임상시험 실시			N/A
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	N/A
		2상	N/A
		3상	N/A
	의료기기		N/A
진료지침개발			N/A
신의료기술개발			N/A
성과홍보			N/A
포상 및 수상실적			N/A
정성적 성과 주요 내용			기후위기 대응을 위한 동토 유래 유용 생명공학 소재의 활용기술 개발

가. 당해연도 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

해당사항 없음

나. 활용방법

해당사항 없음

다. 차년도 이후 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

해당사항 없음

3. 기대효과

※ 향후 연구개발결과 활용에 따른 기술적, 사회.경제적(ERC만 해당) 파급효과(정량적, 정성적)를 전문가 입장에서 구체적으로 작성

– 예상매출액(단위: 백만 원), 수입대체효과(단위: 백만 원), 수출증대효과(단위: 백만 원), 원가절감(단위: 백만 원, 기존대비%), 에너지절감효과(단위: 백만 원, 기존대비%), 생산성 향상(단위: 백만 원, 기존대비%) 인력양성 또는 고용창출효과(단위: 명), 투자유치실적((단위: 백만 원), 인프라구축 효과 등

4. 문제점 및 건의사항

※ 연구성과의 제고를 위한 제도.규정 및 연구관리 등의 개선점

첨부3 자체평가의견서

Ⅰ. 연구개발 실적

※ 다음 각 평가 항목에 따라 자체 평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발성과의 우수성/창의성

■ 등급: (아주 우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 극지 생물소재의 핵심인 극지 희귀 환경유전체 DNA를 fosmid library 형태로 복제 및 증폭이 가능함
- 북극 유래 미생물의 유전체 라이브러리 약 14×10^4 fosmid clone을 확보함 (목표대비 2배)
- 북극 환경미생물 라이브러리의 활성기반 탐색을 통해서 난분해성 물질 분해효소 및 신규 기능성 효소 유전자 확보 (KPDC 등록 26건)

2. 연구개발성과의 파급 효과

■ 등급: (아주 우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 북극 미생물 유래의 유전체를 fosmid clone 형태로 확보함으로서 다양한 기능성 단백질의 지속적인 발굴 가능성과 국내 연구자들의 극지 생물소재 활용에 대한 편의성을 제공.
- 북극 환경시료를 이용한 극지 미생물의 메타지놈 라이브러리 제작을 통하여 희귀한 유전자원을 확보함
- 유전자원의 신규성 확보 및 활성기반의 탐색을 통한 연구기간 단축 효과

3. 연구개발성과에 대한 활용 가능성

■ 등급: (아주 우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 저온성 에스테라제 (PsEst3, ScEst, LgEstI 등)은 저온에서 생촉매 반응이 요구되는 정밀화학분야, 식품 및 의약품 제조에 활용성이 높으며, 산업적으로 매우 유용한 특성을 가지고 있음
- 극지 미생물 유래의 플라스틱 분해효소 4종을 발굴하였으며, PET 플라스틱의 재활용 산업에서 적용이 가능함.
- 저온성 난분해 물질 분해효소를 이용한 생물정화시스템의 응용분야에 활용 가능.

KOPRI 극지연구소

4. 연구개발 수행의 성실도

■ 등급: (아주 우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 신규 및 고활성의 기능성 효소 유전자를 확보하기 위하여 미생물 유전체 라이브러리를 제작하였으며, 이를 통하여 오일류 분해효소 및 리그닌 분해 효소를 탐색하고 성공적으로 관련 유전자를 확보함
- 북극 유래의 새로운 효소의 유전자가 확보됨에 따라 생화학적 분석 및 단백질 구조분석을 통한 효소의 활용가능성을 규명할 수 있는 연구기반을 조성

5. 공개 발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급: (아주 우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- beta-lactamase와 esterase 활성을 동시에 가지는 효소 개발, IJBM 저널 게재(mrnIF 94.382)
- 저온 활성 신규 효소(PsEst3)의 개량기술과 대사회로에서 중요한 두 효소 (Ps_cOTC 및 Ps_aOTC)의 활성기작에 대한 연구를 통하여 재산지식권을 확보 (특허 출워 2건)
- 정량적 연구개발 목표(논문 2건, 특허출원 2건) 대비 우수성과 달성 (논문 14건, 특허출원 2건)

KOPRI 극지연구소

Ⅱ. 연구 목표 달성도

세부 연구 목표 (연구계획서의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 환북극권 동토 유래 미생물 유전체로부터 난분해 유기 분해 효소 발굴	40	100	• 환북극권 미생물 유전체 라이브러리 제작을 통한 생명자원 확보 및 유전자 기능성 탐색 수행하여 총 46여종의 산업용 효소 발굴 (KPDC 등록 26건)
2. 분해 효소 단백질의 생촉매 활성 특성 분석	30	100	• 극지 유래 난분해 물질 분해 효소 유전자의 발현 생산 및 효소의 생촉매 반응 특성 연구 결과물로 논문 14건 출판
3. 효소 단백질의 구조와 기능 간의 관계 규명	30	90	• 난분해 물질 분해 효소 및 기능성 단백질의 활성 특성을 이용한 응용 및 활용성 확대 연구를 통하여 특허 2건 출원
합계	100	100	

Ⅲ. 종합 의견

1. 연구개발성과에 대한 종합의견

- 본 연구를 통하여 환북극권 동토 유래 환경유전체 라이브러리를 구축함으로서 국내 생명공학 산업에서 활용할 수 있는 다양한 생명자원을 유전자 클론 상태로 확보함
- 난분해성 물질인 유류와 플라스틱을 분해할 수 있는 동토 미생물 유래의 단백질 유전자를 화보하고, 재조합 단백질 형태로 발현 생산에 성공하였으며, 효소학적 특성을 분석하여 14건의 논문을 게재함.
- 산업적으로 활용성이 뛰어난 단백질에 대한 지식재산권(특허 2건)을 확보함

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

- 2차년도 연구성과로서 2건의 특허를 출원하였으나, 최근 특허심사 지연에 따라 4차년도 현재(2024년 12월)까지 결과를 통보받지 못함. 2025년 상반기까지 심사결과 통보 예정임.

3. 연구개발성과의 활용방안 및 향후 조치에 대한 의견

- 동토 북극권 극지생명자원을 활용하여 극지생명공학 분야의 국가 경쟁력을 제고하였음.
- 북극 동토층에 축적되어 있는 유용 효소단백질 유전자를 발굴하여 생물 자원화 하는 기술개발에 대한 기초 및 응용 연구 정보를 제공함
- 산업적으로 유용한 저온 활성 단백질 또는 유용물질의 발굴과 같은 실용화 연구로 관련 산업의 동반 성장 효과를 가져옴.
- 극지 생명공학 분야 국가 경쟁력 향상
- 우선적인 특허출원전략으로 지식재산권 확보함으로서 자체활용 혹은 산업체 기술이전
- 난분해 물질 분해 효소 및 기능성 단백질의 활성 특성을 이용한 응용 및 활용성 확대 연구

Ⅳ. 보안성 검토 (※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성)

1. 연구책임자의 의견

- 해당없음

2. 연구기관 자체의 검토 결과

- 해당없음

첨부4	[해당 없음] 연구개발성과 공개제한 요청사유서

첨부5	[해당 없음] 청년 의무채용 관련 실적

첨부6	[해당 없음] 참여기업 의견서

KOPRI
극지연구소

KOPRI
극지연구소

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업 “북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발” 총괄과제의 “환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발” 4세부과제의 최종보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술정보통신부(한국연구재단)에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

KOPRI
극지연구소

주 의

1. 이 보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업“북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발”총괄과제의“환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발”4세부과제의 최종 보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술정보통신부(한국연구재단)에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

KOPRI 극지연구소