

In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형  
산화환원 효소 개발

Development of psychrophilic and thermophilic fusion  
oxidoreductase by in vitro coevolution (2nd)



동의대학교 산학협력단

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴”과제의 위탁 연구“In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형 산화환원효소 개발(2차년도)”과제의 최종보고서로 제출합니다.



2016. 1. 23.

총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 : 동의대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 전 승 중

위탁참여연구원 : 문 수 정

위탁참여연구원 : 정 성 환

위탁참여연구원 : 왕 지 연

위탁참여연구원 : 강 동 훈

위탁참여연구원 : 김 령 아

## 보고서 초록

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                    |                |       |             |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|-------|-------------|-------------|
| 위탁연구과제명                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형 산화환원효소 개발(2차년도) |                |       |             |             |
| 위탁연구책임자                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 전 승 중                                              | 해당단계<br>참여연구원수 | 6명    | 해당단계<br>연구비 | 40,000,000원 |
| 연구기관명 및<br>소속부서명                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 동의대학교 산학협력단<br>(생명공학과)                             |                | 참여기업명 | —           |             |
| 국제공동연구                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | —                                                  |                |       |             |             |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                    |                |       | 보고서<br>면수   | 54          |
| <div><div><div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div><div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> <div><div><div><span></span></div><div><span></span></div></div></div> |                                                    |                |       |             |             |

# 요 약 문

## I. 제 목

In vitro coevolution에 의한 저온/고온 융합형 산화환원효소 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

생명정보학적, 합성생물공학적 기법을 이용하여 저온 및 고온 단백질의 융합화 전략을 구체화하고 이를 바탕으로 산업적 생물전환/소재개발에 부합하는 단백질 고활성화 및 안정화 획득 방식을 개발하고자 한다.

### 2. 필요성

저온, 중온, 고온균 유래의 효소들은 통상 각각 저온, 중온, 고온 하에서 효율적인 촉매 반응을 수행한다. 자연적으로 진화된 상동성 효소 또는 인공적으로 가공된 효소들의 비교 연구를 보면 대부분 효소들은 안정성에 요구되는 구조적 견고함과 활성에 필요한 구조적 유연성 중에서 어느 한쪽을 유지하는 것으로 보여 진다. 그럼에도 불구하고 분자진화 및 점 돌연변이를 통하여 몇몇 효소 변이체는 높은 활성과 높은 안정성을 동시에 소유할 수 있다. 효소의 산업화를 위해서는 공통적으로 효소 내열성이 요구된다. 반면, 저온에서 효소의 높은 촉매 활성은 에너지 절약 차원에서 경제적이고 환경적인 이점을 제공한다. 효소의 산업화를 위해 높은 상동성을 가지는 저온 및 고온성 산화환원효소(laccase, glucose dehydrogenase)들은 서로 다른 온도에서 적응하는 효소의 구조적 안정성과 활성과의 관계를 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 본 연구에서는 효소 활성과 안정성에 중요한 구조적 메커니즘을 규명하기 위하여 in vitro evolution을 통하여 저온 및 고온 융합형 산화환원효소의 특성에 대하여 연구하였다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

저온균(*Planococcus donghensis*) 유래 small laccase의 유전자 클로닝과 대장균에서의 효소 생산을 수행하고 small laccase의 생화학적 특성을 연구하였다. 또한 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 quinoprotein aldose sugar dehydrogenase (ASD) 유전자를 클로닝하고 대장균 세포에서 발현하였다. ASD의 야생형 및 돌연변이(Y156A

and Y156K)형에 대하여 생화학 및 구조학적 특징을 분석하였다.

#### IV. 연구개발결과

저온균(*Planococcus donghensis*)로부터 small laccase 유전자를 클로닝하였고 대장균 SoluBL21 세포에서 발현 하였다. 발현된 효소는 아미노산 서열에서 계산된 분자량과 같은 28 kDa을 나타내었다. 정제된 효소의 최적 온도는 30°C이고 ABTS 기질에 대한 최적 pH는 7.5이었다.

*Thermus thermophilus* HJ6 유래 aldose sugar dehydrogenase (ASD)유전자는 1059개의 nucleotides로 구성되고 352개 아미노산을 암호화하여 분자량은 38.9 kDa으로 예상되었다. 아미노산 서열은 *Pyrobaculum aerophilum*과 *Escherichia coli* 유래의 ASD와 각각 42.9% 및 33.9%의 상동성을 보였다. Tt\_ASF 유전자는 대장균에서 His-tag와의 융합 단백질로 발현되었고 39kDa의 분자량을 나타냈다. 효소의 최적 pH는 7.0~7.5이고 최적 온도는 75°C이다. 효소는 apoenzyme의 경우 활성의 반감기는 85°C에서 25분인 반면, 보효소인 PQQ와 결합한 holoenzyme의 경우 내열성이 증가하여 활성의 반감기는 85°C에서 100분이었다. 효소는 다양한 당(hexoses, pentoses, desacchrides, polysacchrides)과 알코올을 산화하였다. 이 효소에 유일하게 존재하는 tyrosine156 잔기의 기능을 알기 위해 Y156A와 Y156K mutant를 제작하고 효소 속도 상수를 측정한 결과 모든 기질에 대하여 친화도가 감소하였고 알코올에 대해서는 활성을 모두 잃어 버렸다. 따라서, tyrosine156 잔기는 효소의 기질 특이성에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 확인되었다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 당 및 알코올 모두에 활성을 보이는 quinoprotein glucose dehydrogenase의 첫 번째 연구결과이다. 이 결과들은 고온균(*T. thermophilus*)의 당대사를 깊이 이해하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 바이오센서 및 바이오연료전지 분야에서 ASD의 활용 가능성을 높일 수 있다.

# Summary

## I. Title

Development of psychrophilic and thermophilic fusion oxidoreductase by in vitro coevolution

## II. Purpose and Necessity of R&D

Enzymes from psychrophiles, mesophiles, and thermophiles usually perform efficient catalysis under low, moderate and high temperatures, respectively. Comparing studies of either naturally evolved homologous enzymes or artificially engineered enzymes have demonstrated that there is a trade-off between the rigidity required for stability and the flexibility necessary for activity in most enzymes. Nevertheless, some variant enzymes coupling high activity and high stability have been engineered by directed evolution or site-directed mutagenesis. Thermostability is one of the main requirements for commercial enzymes, because thermal inactivation represents a common problem in the application of enzyme. Meanwhile, enzymes with high catalytic activity at low temperatures offer economic and environmental benefits through energy savings.

The psychrophilic and thermophilic laccases share high identities (27~37%), as well as psychrophilic and thermophilic glucose dehydrogenase, providing us an opportunity to improve our understanding of structure stability-activity relationship in enzymes adapted to different temperatures.

In this study, we have subjected the psychrophilic and thermophilic fusion oxidoreductase by in vitro evolution in order to understand the structural mechanisms important for enzyme activity and stability.

## III. Contents and Extent of R&D

The gene of small laccase from the *Planococcus donghensis*, was cloned and expressed in *Escherichia coli* SoluBL21 cells. The biochemical properties of psychrophilic small laccase have studied. The gene encoding a quinoprotein aldose

sugar dehydrogenase (ASD) from *Thermus thermophilus* HJ6 (Tt\_ASd) was cloned and sequenced. The biochemical and structural properties of wild type and mutants (Y156A and Y156K) Tt\_ASdS were characterized.

#### IV. R&D Results

The open reading frame of small laccase from the *Planococcus donghensis* was cloned and expressed in *Escherichia coli* SoluBL21 cells. The molecular mass was determined to be about 28 kDa, which is similar to the molecular mass calculated from the amino acid sequence (28,597 Da). The purified enzyme exhibited the laccase activity with the optimal catalytic temperature at 30°C. The optimum pH for the oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) was 7.5.

The gene encoding a quinoprotein aldose sugar dehydrogenase (ASD) from *Thermus thermophilus* HJ6 (Tt\_ASd) was cloned and sequenced; it comprised 1,059 nucleotides encoding a protein containing 352 amino acids that had a predicted molecular mass of 38.9 kDa. The deduced amino acid sequence showed 42.9% and 33.9% identities to the ASD proteins from *Pyrobaculum aerophilum* and *Escherichia coli*, respectively. The biochemical properties of Tt\_ASd were characterized. The optimum pH for the oxidation of glucose was 7.0~7.5 and the optimum temperature was 70°C. The half-life of heat inactivation for the apoenzyme was about 25 min at 85°C. The enzyme was highly thermostable, and the activity of the pyrroloquinoline quinone-bound holoenzyme was not lost after incubation at 85°C for 100 min. Tt\_ASd could oxidize various sugars, including hexoses, pentoses, disaccharides, and polysaccharides, in addition to alcohols. Structural analysis suggested that Tyr156 would be the substrate-binding residue. Two mutants, Y156A and Y156K, had impaired activities and affinities for all substrates and completely lost their activities for alcohols. This structural and mutational analysis of Tt\_ASd demonstrates the crucial role of Tyr156 in determining substrate specificity.

## V. Application Plans of R&D Results

This study is the first report of a quinoprotein glucose dehydrogenase that shows activity towards sugars and alcohols. The information presented in this study contributes to a deeper understanding of sugar metabolism in *T. thermophilus*. Furthermore, these results elucidate the characteristics of an unusual thermostable ASD enzyme with potential applications in the fields of biosensors and biofuel cells.





# 목 차

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 제 1 장 서론 .....                                                                                                      | 9  |
| 제 1 절 연구개발의 목적 .....                                                                                                | 9  |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 .....                                                                                               | 10 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....                                                                                             | 12 |
| 제 1 절 국외 연구 동향 .....                                                                                                | 12 |
| 제 2 절 국내 연구 동향 .....                                                                                                | 13 |
| 제 3 절 세부 주제별 연구동향 .....                                                                                             | 13 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....                                                                                          | 15 |
| 제 1 절 <i>Planococcus donghaensis</i> 유래 small laccase의 유전자 클로닝 및 생화학적 특성···                                         | 15 |
| 1. 서론 .....                                                                                                         | 14 |
| 2. 재료 및 방법 .....                                                                                                    | 16 |
| 3. 결과 및 고찰 .....                                                                                                    | 20 |
| 제 2 절 <i>Thermus thermophilus</i> HJ6 유래 aldose sugar dehydrogenase의 wild-type 및 Tyr156 mutants의 생화학 및 구조학적 특성····· | 29 |
| 1. 서론 .....                                                                                                         | 29 |
| 2. 재료 및 방법 .....                                                                                                    | 30 |
| 3. 결과 및 고찰 .....                                                                                                    | 32 |
| 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....                                                                                      | 47 |
| 제 1 절 연구개발목표 및 달성도 .....                                                                                            | 47 |
| 제 2 절 대외기여도 .....                                                                                                   | 48 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....                                                                                            | 49 |
| 제 1 절 추가연구의 필요성 .....                                                                                               | 49 |
| 제 2 절 타연구에의 응용 .....                                                                                                | 49 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....                                                                                   | 50 |
| 제 1 절 In vitro evolution에 의한 allosteric 효과·····                                                                     | 50 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                                                                                                    | 52 |

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구개발의 목적

#### 1. 연구 최종 목적

본 연구에서는 생명정보학적, 합성생물공학적인 기법을 이용하여 저온 및 고온 단백질의 융합화 전략을 구체화하고 이를 바탕으로 산업적 생물전환 및 소재개발에 부합하는 단백질 고활성화 및 안정화 획득 방식을 개발하고자 한다. 당해년도 세부 연구목표로는 저온 및 고온성 산화환원효소의 생화학적 특성을 규명하고 저온/고온 효소 융합형 변이체 구축하여 산화환원효소의 활성 메카니즘 및 온도 감수성에 대한 단백질 구조 기반의 원리를 규명하는 것이다.

#### 2. 연구개발 세부목표 및 연구내용

| 성과목표                     | 세부목표                              | 달성 주요내용                                                                                                                                                  | 달성도                                                                                   |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 저온/고온 산화환원효소의 융합형 변이체 구축 | 저온성 효소의 생화학적 특성 분석                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저온균 (<i>Planococcus donghaensis</i>) 유래 Laccase의 정제 및 효소 활성 측정</li> <li>- 효소 최적 pH, 온도, 금속이온의 의존성 규명</li> </ul> | 저온성 산화환원효소의 생화학적 특성 규명 (1건)                                                           |
|                          | 저온/고온 효소 융합형 변이체 구축               | Aldose sugar dehydrogenase (ASD)의 point mutation에 의한 효소 변이체 생산 및 정제                                                                                      | Point mutation에 의한 효소 변이체 확보 (2건)                                                     |
|                          | 산화환원효소의 고활성화 및 단백질 구조 기반 반응 원리 규명 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wild type 및 mutant ASD의 kinetic 특성 비교 분석</li> <li>- 단백질 X선 구조 기반 분석을 통한 효소의 기질 특이성 원리 규명</li> </ul>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 논문투고 (1건)</li> <li>- 학술회의 발표 (2건)</li> </ul> |

## 제 2 절 연구개발의 필요성

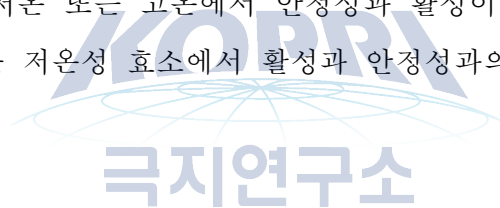
자연계에 존재하는 저온균, 중온균 및 고온균 유래의 효소들은 각각 저온, 중온, 고온의 조건에서 효율적인 촉매 반응을 완성한다. 남극 및 북극과 같은 추운 지방에서 발견되는 저온균 유래 효소들은 단백질 2차 구조상에서 많은  $\alpha$ -helix와 적은  $\beta$ -sheet 구조를 가져 유연한 분자구조를 가지고, 고온성 효소에 비해 극성 아미노산이 많고 소수성 아미노산이 적으며 단백질 domain 간의 상호작용이 적기 때문에 단백질에 유연성이 제공된다. 또한 이런 유연성으로 인하여 저온성 효소는 중온 및 고온성 효소에 비해 높은 비활성(specific activity)을 가지는 것으로 알려져 있다[1, 2]. 그러나 저온성 효소는 유연한 구조로 인해 열에 약하고 구조적으로 불안정하여 산업적인 적용에 있어서는 한계점이 있다. 반면, 고온성 효소들은 아미노산간의 이온결합의 증가와 소수성 아미노산의 밀집으로 인하여 구조적인 고정성을 가지게 되고 이로 인하여 열에 대한 구조적 안정성을 획득하게 된다. 반면에 구조적인 고정성으로 인해 저온성 효소에 비해 효소의 비활성이 낮다는 단점을 가지고 있다.

자연적으로 진화된 효소와 인공적으로 조작된 효소와의 비교 연구를 보면, 대부분의 효소들은 안정성을 위해서 구조적인 고정성이 요구되고 효소 활성을 위해서는 유연성이 필요하게 된다[3, 4]. 이와 같이 효소는 목적에 맞는 구조적 특성이나 새로운 기능을 지닌 단백질을 설계하는 방향으로 다양한 연구가 진행되고 있다. 1980년대에 부위 특이적 돌연변이기술(site-directed mutagenesis)이 발표된 이후로 진화분자공학(directed evolution)의 핵심기술인 DNA shuffling technology [5] 및 Error-prone PCR [6] 방법을 바탕으로 한 무작위적 돌연변이기술(random mutagenesis)을 사용하여 효소 개량 연구가 진행되고 있다. 분자진화기술(directed molecular evolution)은 자연계의 진화현상을 in vitro에서 인위적으로 가속화시켜 단기간 내에 우리가 원하는 성질을 갖는 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 즉, 서로 다른 돌연변이를 가지고 있는 상동유전자군으로부터 유전자의 일부를 서로 바꾸어 다양한 재조합 유전자 라이브러리(random mutants library)를 만들어내고, 이 library로부터 유용한 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 그러므로 재조합 유전자 라이브러리 제조기술과 더불어 다양한 재조합 유전자 변이체들 중에서 원하는 유전자 변이체를 간편하고, 빠르며, 대량으로 선별할 수 있는 탐색 기술, 즉 HTS(High-Throughput Screening) 기술 또한 중요하다.

효소의 산업적 적용에 대한 공통적인 문제점은 열에 의한 불활성화이고, 산업용 효

소의 주된 요구사항은 열안정성이다. 동시에 낮은 온도에서 높은 촉매활성을 가지는 효소들은 에너지 절약 차원에서 경제적이고 환경적인 이득을 줄 수 있다. 저온균(*Planococcus donghaensis*)과 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6, *Geobacillus* sp. AR1) 유래 laccase는 25~27%의 상동성을 나타내고, 저온균(*Planococcus donghaensis*)과 고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 glucose dehydrogenase는 37%의 비교적 높은 상동성을 나타내기 때문에 급격하게 다른 온도 조건에 적응하는 효소의 구조적 안정성과 활성과의 관계를 이해하기 위한 좋은 재료로 생각된다. 이론적인 단백질의 구조 설계는 효소의 온도 적응을 위한 몇 가지 특별한 메커니즘을 제공할 수 있다. 그러나 높은 안정성과 활성을 가진 효소를 개량하기 위해서는 이런 방법으로는 한계가 있고 무작위적 돌연변이기술이 더욱 가능성이 높다고 할 수 있다.

본 연구에서는 산화환원효소인 laccase와 glucose dehydrogenase에 대하여 효소 활성과 안정성에 관한 중요한 아미노산 잔기들을 동정하기 위하여 저온 및 고온성 효소의 융합형 진화과정을 수행한다. 또한 효소 활성값의 분석과 구조 모델링 연구를 통하여 야생형과는 다른 저온 또는 고온에서 안정성과 활성이 향상된 변이체를 선별하도록 하고, 최종적으로는 저온성 효소에서 활성과 안정성과의 복잡한 구조적 관계를 이해하도록 한다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 연구 동향

#### 1. 효소 최적화에 관한 연구

독일 막스 플랑크 (Max Planck) 연구소의 화학자들이 효소를 실용적인 관점에서 최적화하는 방법을 개발했다. 이 연구성과는 미 학술원 회보지 (Proceedings of the National Academy of Sciences)에 발표되었다[7]. 유전자 조작으로 막스 플랑크 연구소의 화학자들이 monooxygenase 를 변환시켰다. 다양한 기질을 다룰 수 있도록 만든 것이다. 이들은 생촉매의 결합 지점과는 멀리 떨어진 곳에 있는 두개의 아미노산을 치환했다. 이 치환은 효소의 전체적인 구조를 바꿔서 더 많은 수의 다양한 화합물들을 변환할 수 있도록 한 것이다. 게다가 이는 전통적인 합성시 생기는 라세믹(racemic) 화합물이라 알려진 두개의 거울상 이성질체(enantiomer) 중에 하나를 더 많이 생산한다. 이 거울상 이성질체들은 화학적으로는 동일하지만 구조상 다르다. 이 두 개 중 한가지만이 의학적으로 유용하다. 이 연구덕분에 화학 산업계의 요구뿐만 아니라 제약업계의 요구도 충족하는 맞춤형 효소의 전환이 가능하게 되었다.

#### 2. 저온 적응 효소 연구

단백질 결정연구, 상동성 모델 연구, 아미노산 서열 분석을 통해서 촉매효율의 증가와 안정성 저하에 대한 공통된 구조적인 특징을 설명하기는 어렵지만 다음과 같이 효소 안정성에 대한 몇 가지 중요한 특징(분자 내 수소결합, 이온결합, proline, methionine, glycine, arginine의 수, 분자표면의 잔수성, helix 안정성, core packing 등)이 보고 되었다[8]. 저온 적응 효소는 촉매 효율 증가와 안정성 감소를 동반하는 분자의 유동성을 확보하기 위하여 몇 가지 구조적인 조정이 필요하고, 활성 부위에서 정전기적인 최적화에 의해 효소 활성이 증가한다.

#### 3. 저온, 중온, 고온 효소에 대한 극한 온도에서의 적응 연구

효소의 활성/유동성/안정성의 관계를 이해하기 위하여 저온, 중온 및 고온성

ligase의 3차원 모델 비교, 활성값, 표면 소수성, 구조적 투과성, 구조 안정성, 열변성을 통하여 연구를 수행하였다[9]. 저온성 효소는 저온에서 활성이 증가하고 분자 구성물의 불안정성 및 높은 구조적 유동성을 동반하였다. 반대로 중온 및 고온성 효소들은 저온 활성이 감소하고, 높은 안정성과 낮은 유동성을 보였다.

## 제 2 절 국내 연구 동향

### 1. In vitro coevolution에 의한 맞춤형 산화환원효소의 개발(21세기 프론티어연구개발 사업 연구과제)

#### 가. 산화환원효소(amine oxidase 및 polyol dehydrogenase)의 분자 구조 분석

본 연구는 산화환원효소의 분자 모델 구축 및 다양한 기질의 docking 분석과 산화환원효소의 결정구조와 분자모델과의 비교 분석을 통한 기본 데이터를 확립하였다.

#### 나. In vitro coevolution에 의한 산화환원효소 기질특이성의 분자기반 규명

신규 기질특이성을 갖는 효소 개발을 위해 기질과 효소의 단계적 coevolution 기법을 도입하였고, 효율적인 coevolution 위해 in silico 스크리닝과 시험관 진화의 hybrid법을 사용 하였다. 산화환원효소의 목적 기질에 대한 활성을 갖는 효소 변이체를 확보하고, 구조분석 및 특이성에 대한 분자기반의 규명을 완성하였다.

## 제 3 절 세부 주제별 연구동향

### 1. Laccase에 관한 연구 활용

라카아제는 식품산업에서 페놀 유도체들의 선택적인 제거를 통하여 과일주스, 포도주 및 맥주와 같은 음료의 안정화에 사용하고, 오래된 병 포도주에 생기는 독특한 코르크 감염과 수축을 산화적 방법으로 감소시킨다. 라카아제의 주요한 기술적 이용은 직물, 염색 또는 인쇄 공업에서 염료의 탈색과정이고, 펄프와 제지공업에서 목질섬유의 리그닌 분해 과정에 이용된다. 또한, 벤질, 알릴, 프로파길, 지방족 알코올의 알데히

드와 케톤으로의 산화와 제약 화합물(마취제, 항염증제, 항생제, 진정제)의 합성 및 바이오센서 및 바이오연료전지 분야에 사용하는 등 다양한 활용가치를 가지고 있다.

## 2. Glucose dehydrogenase 및 aldose sugar dehydrogenase에 관한 연구 활용

바이오연료전지의 음극에서 glucose 또는 다른 탄수화물에서 전자를 생성하는 역할을 수행하므로 바이오연료전지의 핵심 촉매 효소로서 활용할 수 있다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 *Planococcus donghaensis* 유래 small laccase의 유전자 클로닝 및 생화학적 특성

#### 1. 서론

Laccase (EC 1.10.3.2)는 구리를 함유하는 multicopper oxidase의 일종으로 대부분 3가지 cupredoxine-type domain으로 구성된 비슷한 구조를 가진다. 이들 효소는 monophenols, polyphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic amines, lignin을 포함하는 많은 페놀 화합물들을 산화시키므로 다양한 기질 특이성을 가진다[43]. 대부분의 laccase는 3개의 구리이온을 함유하며 단백질 구조 내에 3가지 (type-1, type-2, type-3)의 구리결합자리를 가지고 있다. 효소반응에서 기질의 산화반응은 type-1 구리에 의해 촉매 되어 전자는 trinuclear cluster (1개의 type-2 copper와 2개의 type-3 copper로 구성)을 따라 이동하고, 산소분자의 환원과 물 분자의 방출을 동반하게 된다. 이런 전자이동 메커니즘을 바탕으로 laccase는 monomer의 교차연결, polymer의 분해 및 방향족 화합물의 계열에 관여한다. 이와 같이 laccase는 다양한 기질 특이성뿐만 아니라 폭넓은 반응 능력 때문에 염료 탈색[10], 펄프 표백[11], 생물학적 환경 정화[12], 폴리머 합성[13], 바이오센서[14] 및 바이오 연료전지[15] 등의 여러 분야에서 활용되고 있다.

Laccase는 곰팡이[16], 식물[17], 곤충[18] 및 세균[19, 20]에서 다양하게 분포하고 있지만 고등생물에서는 발견되지 않는 것으로 알려져 있다. 생명공학적인 적용에는 곰팡이 유래의 laccase가 주로 사용되었고[21], 최근 다양한 세균의 전체 게놈분석이 빠르게 진행됨에 따라 세균 유래 laccase에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다.

현재까지 보고된 저온균 laccase로는 *Pseudomonas putida* AKPSYL 유래의 laccase[22]와 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 유래의 laccase[23]가 있으며 *Pseudomonas putida* AKPSYL 유래의 laccase는 효소재활용을 위하여 nano-enzyme system에 적용하였고 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 유래의 laccase는 차



가운 폐수의 정화에 적용할 수 있는 가능성을 보여주었다. 그러나 저온균은 고온균에 비하여 성장하는데 시간이 오래 걸리고 다루기가 어려워 연구가 활발히 이루어지지 않고 있다[24].

본 연구에서는 저온균(*Planococcus donghaensis*) 유래 small laccase를 생산하기 위하여 저온균의 small laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 또한 pET-21a vector system을 이용하여 대장균에서 재조합 small laccase를 생산 및 정제하고 효소학적 특성을 분석 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 사용균주와 배양

본 연구에서 사용한 *Planococcus donghaensis* (KCTC 13050)는 생물자원센터 (KCTC)에서 분양받아 사용하였고, 보관용 배지는 Trypticase soy broth 사면배지를 사용하여 25℃에서 24시간 동안 배양한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다. 얻어진 배양 상등액을 이용해 본 연구에서 정제 및 특성화를 수행하는 효소원으로 사용하였다.

### 나. Laccase 유전자 클로닝 및 발현 vector 구축

*Planococcus donghaensis* 염색체는 GeneAll GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Small Laccase 유전자를 클로닝 하기 위하여 게놈 염기서열이 밝혀진 *Planococcus donghaensis*의 laccase 유전자 염기 서열을 바탕으로, 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두 가지 primer, forward primer로 5'-TTGAAAGTGAAATTTTATGA-3'와 reverse primer로 5'-CTA TTGCGTATTTTTGTTCA-3'를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 initial denaturation 98℃에서 2분, denaturation 98℃에서 10초, annealing 54.4℃에서 30초, elongation 72℃에서 1분을 30 cycles로 반복하고 final elongation은 72℃에서 5분간 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase (INTRON Biotech., Korea)를 사용하여 DNA 단편을 증폭하였고 Topo blunt vector (Enzymomics, Korea)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다. 발현vector pET-21a에 효소 유전자를 클로닝하기 위하여 ORF를 바탕으로 2가지 primer인

forward primer 5'-GGAATTCCATATGAAAGT GAAATTTTATGA-3'와 reverse primer 5'-TAACTCGAGTTGCG TATTTTTGTTCATAGC-3'를 제작하고 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 절단한 후 같은 효소로 절단한 pET-21a vector에 연결하고 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. pET-21a로 발현한 단백질은 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다(Figure 1).

#### 다. 효소생산 및 정제

*E. coli* BL21(DE3)/pET21a-PdLac(0.768kb)는 100 µg/ml ampicillin을 더한 LB배지에 접종하여 30℃에서 전배양을 하고 전배양액의 1%를 LB배지(triptonen 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에 접종하여 30℃에서 본 배양을 하였다. OD<sub>600nm</sub>=0.4-0.6이 되었을 때 0.3 mM IPTG를 넣고 25℃로 온도를 낮추어 16시간 동안 유도 배양하였다. 배양된 세포를 원심 분리하여 멸균수로 세척한 후 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 1 mM CuSO<sub>4</sub>) 로 현탁 하여 초음파로 cell을 파쇄하고, 원심 분리하여 상등액과 침전으로 분리하였다. 상등액을 0.45 µm pore size의 cellulose nitrate filter로 filtering하고 filter된 단백질은 His-Trap HP column (GE Healthcare)에 적용하고, buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) + 500 mM NaCl)을 적어도 10 column volume으로 세척하여 결합단백질을 ÄKTA start (GE Healthcare)으로 동일한 완충액에서 0.25 mM imidazole의 농도구배로 최소 2 mL min<sup>-1</sup>의 유속으로 용출하였다. Small laccase 활성을 포함하는 분획을 모아 YM-10 membrane (Amicon, U.S.A.)을 이용해 한외여과로 농축시켰다. Small laccase의 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

#### 라. 활성측정

정제된 단백질(0.92 mg/ml)은 1 mM ABTS와 50 mM MES buffer (pH 6.0), 그리고 1 mM CuSO<sub>4</sub>를 이용하여 30℃에서 5분간 반응하였다. 이 때 ABTS가 산화되는 정도를 UV-spectrophotometer를 사용하여 흡광도 420 nm에서 측정하였다.

#### 마. 최적온도와 최적 pH

활성의 온도 의존성은 50 mM MES buffer (pH 6.0)와 기질로서 ABTS를 사용하여 5-40℃의 온도 범위로 측정하였다. 최적 pH는 ABTS를 기질로 사용하였으며 50 mM sodium phosphate buffer를 사용하여 pH 5.5-8.0의 범위에서 측정하였다.



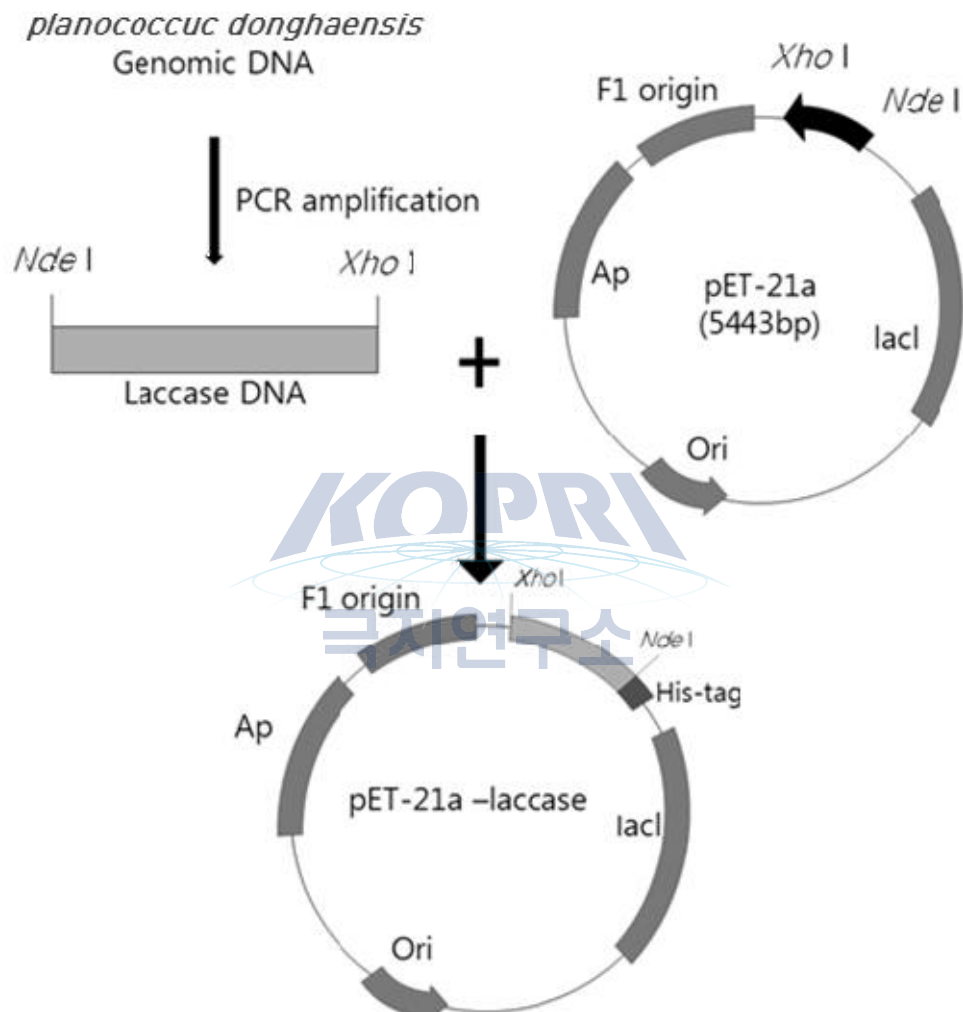


Fig. 1. Construction of pET21a-Laccase.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. Small laccase의 유전자 클로닝 및 염기서열분석

*Planococcus dongheansis* 유래의 small laccase (PdSLAC)를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *Planococcus dongheansis*의 PdSLAC 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 PdSLAC를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝된 유전자의 open reading frame (ORF)는 768 bp의 길이로 255 아미노산을 암호화하고 있었다 (Figure 2). 클로닝된 유전자를 DNA agarose gel 전기영동으로 분석한 결과는 Figure 3에 나타내었다. Figure 4에서는 클로닝 된 유전자로부터 예상되는 아미노산 서열과 상동성을 가지는 단백질을 대상으로 alignment를 작성하였다. 클로닝된 유전자는 *Planococcus antarcticus* 유래의 laccase (NCBI Accession No. WP\_065536877)와 가장 높은 상동성 (69.44% identity)을 나타내었고, *Psychrobacter arcticus* laccase (NCBI Accession No. WP\_011280528)와 *Psychrobacter cryohalolentis* laccase (NCBI Accession No. WP\_011513464)와는 각각 24.4%와 23.8%의 identity를 나타냈다. 이와 같은 생물정보학 분석을 통하여 *Planococcus dongheansis*의 염색체로부터 클로닝 한 유전자는 laccase를 암호화하는 것으로 예상되었다.

#### 나. Small laccase의 발현형태

발현vector pET-21a에 효소 유전자를 클로닝하기 위해 ORF를 바탕으로 forward primer와 reverse primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Nde* I 과 *Xho* I으로 절단 한 후 같은 효소로 pET-21a vector를 절단하고 절단된 pET-21a vector에 laccase gene을 연결해 pET21a/PdSLAC (6.2 kb)를 구축하였다. 이 후 vector를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였고, 37℃에서 배양하여 흡광도 ( $A_{600}$ )값이 0.4-0.5에 도달하였을 때 IPTG를 첨가하여 단백질 생산을 유도하였다. 발현된 단백질은 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다.

#### 다. *E.coli*로부터 small laccase의 발현 생산 및 정제

본 실험에서 laccase의 효소활성을 측정하기 위해 정제하였다. *E. coli* BL21(DE3)/pET21a-PdSLAC의 초음파 상등액을 원심분리하여 상등액과 침전으로 분

리하였다. 얻은 상등액과 침전액을 SDS-PAGE 전기영동 상에 나타냈더니 상등액보다 침전액에서 약 3배정도 많은 불용성 단백질을 확인하였다(Figure 5). 분리된 상등액을 0.45  $\mu\text{m}$  pore size의 cellulose nitrate filter로 filtering하였다. 단백질은 His-Trap HP column (GE Healthcare)에 적용하고, buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl)을 적어도 10 column volume으로 세척하여 결합단백질을 ÄKTA start (GE Healthcare)으로 동일한 완충액에서 0.25 M Imidazole의 선형구배로 최소 2 mL min<sup>-1</sup>의 유속으로 용출하였다. laccase활성을 포함하는 분획을 선택하여 15%의 SDS-PAGE 상에서 단일밴드를 확인하였다(Figure 6). 이렇게 정제된 PdSLAC은 효소의 특성분석에 사용하였다.

#### 라. 효소의 최적온도와 최적 pH

정제된 단백질(0.92 mg ml<sup>-1</sup>)의 온도의존성은 50 mM MES buffer (pH 6.0)와 기질로서 ABTS를 사용하여 5-40°C 온도범위로 측정하였다. 최적 pH는 ABTS를 기질로 사용하였으며 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5-8.0)를 사용하여 30°C에서 반응한 후 ABTS가 산화되는 정도를 UV-spectrophotometer를 사용하여 흡광도 420 nm에서 측정하였다. 그 결과 최적 온도는 30°C로 나타났고, 최적 pH는 7.5이었다(Figure 7, 8). 이 결과는 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 유래 laccase [57]의 최적온도가 10°C인 것과 비교하여 *Planococcus donghaensis*의 small laccase는 최적온도가 더 높은 것으로 나타났다.



10            20            30            40            50            60  
 MKVKFYENNT N FVSGITLKE LTAPEENNMA LHACKNPEAI LSNRKSLAEF LDVSLDDFIC  
 70            80            90            100            110            120  
 TQQTHSANFR RVNRHHKGS AYT VETAISD TDALYTFDSG IVLCSFVADC APVIIHDKTT  
 130            140            150            160            170            180  
 GLIGVIHSGW QGT VKEITLE FLKHIISIEQ CNPTDIEIQI GASISQQQFE VDQDVYLKFE  
 190            200            210            220            230            240  
 ALGYANEFMY FNSATNKYHI DNQATVKKQC ELAGIPSSQI LVDSTCTFLN SDGFSYRQDR  
 250            260  
 KCGRHLIFAM NKNTQ

Fig. 2. Amino acid sequences of the small laccase gene.

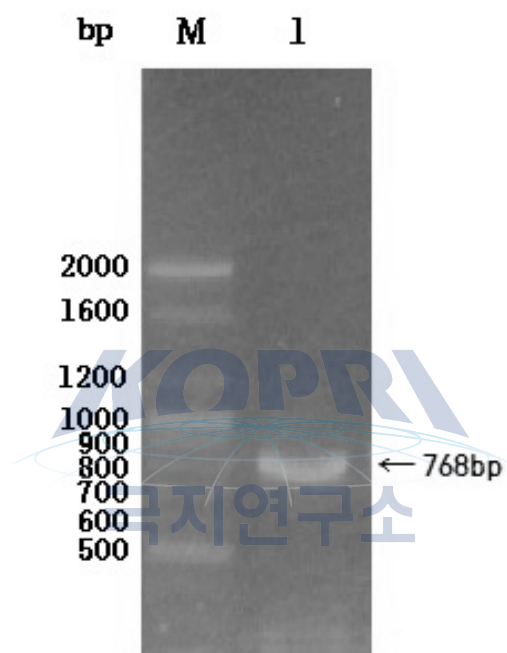


Fig. 3. PCR amplification of small laccase gene from *Planococcus donghaensis*.



|                  |                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------|
| P.donghaensis    | mhsqh--rqfninstvrlfnaaglsfftlnlfhiavllfwlilylkkvmtlkvkfyann   |
| P.cryohalolentis | mkntlpmtllaqlddvavfqtagfsdidiyanidisrs-----kinq-----          |
| P.arcticus       | miktlpitllaqldgavfqtaafsdmdcssidiags-----kinqhmy----          |
| P.antarcticus    | -----mkaklyvndg                                               |
|                  | ::                                                            |
| P.donghaensis    | nfvsgitlkelaapeenmalhacknpeavlsnrkslaefld-----vsldd           |
| P.cryohalolentis | ---qppqrqqasygelnlglhvnddasvvlsnrmrvlatineqmiqqnlpvhsvpvka    |
| P.arcticus       | ---qqshqqqasygelnlglhvnddasvvlhnmrvlaaineqliqqnlpvhsvpvka     |
| P.antarcticus    | qyvsgmtlkdlapesnmalhacenpqsvlanrkkldfisi-----apvss            |
|                  | :: * , *:,, ,: , ** ** : , , , ,                              |
| P.donghaensis    | fictqqthsanfrvdrhrkgrgaytvetaisdtdglytfdpgivlcsfaadcapviihd   |
| P.cryohalolentis | lhwnqvghnhihdt-----tvlsmapmaadamvskdgtglaimtadcvpivlyq        |
| P.arcticus       | lhwnqvghkhihdt-----tvlsmapmaadamvskdgtglaimtadcvpivlyq        |
| P.antarcticus    | ficaqqthsanfrvrsakdkgrgaydtedafsdtdalytydsrvvlcsfaadcvpviid   |
|                  | : ,:*,*, ::: , , , * :*,: , , *, :****,*:::                   |
| P.donghaensis    | kttgligvihsgwggtvkeitlkflkhiisieqcnptdleiqigasisqqqfevdqdvyl  |
| P.cryohalolentis | patgqiaaihagwqglacgvikataerf-----sdsgeimawigvcisqdsyevgsqvr   |
| P.arcticus       | patgqiaaihagwqglacgvikttsrf-----dntmpikawigvcisqanyevntdyrd   |
| P.antarcticus    | rktgligvvhsgwggtikeimskllqqlidleqcdpvdldiqigaaisqqqfevdqdvys  |
|                  | ** *,, :*::**** : ,:: : : **,,*** ,:***, :*                   |
| P.donghaensis    | kfetlgyanefmyfns-----atnkyhidnqat                             |
| P.cryohalolentis | kllagciannalttdaisnfderyvmasgtseldaastadklsdntpvyaekikidlpki  |
| P.arcticus       | kllagckengalsekqlddfvalfs-----ipshddkikidlpki                 |
| P.antarcticus    | kldslyasefmyfnn-----mtkkyhidnqat                              |
|                  | *: : ,: : , , , , , *                                         |
| P.donghaensis    | vkqcelagipssqilvdstctflnsdgfsyrqdrkc-----grhlifainkntq----    |
| P.cryohalolentis | aadqlqaagiyyvch-essipcsyadghyysyrrqthlqqaatgrmal-iitrsasiys-- |
| P.arcticus       | aaiqlaagvtvin-dlpvdcyadsryysyrrqthlqqpatgrmal-viarstqssdre    |
| P.antarcticus    | vkrcelvgvtsgqihidptctflsldgfsyrqdrks-----grhlifamkk-----      |
|                  | , * : ,*: : , *:: , , ****:: : ** : : :                       |
| P.donghaensis    | ----                                                          |
| P.cryohalolentis | ----                                                          |
| P.arcticus       | isai                                                          |
| P.antarcticus    | ----                                                          |

Fig. 4. Alignment of the deduced amino acid sequence of PdSLAC with its homologues. The primary sequences of laccases from several organisms were aligned with Clustal W. P.donghaensis, *Planococcus donghaensis*; P.cryohalolentis, *Psychrobacter cryohalolentis* (WP\_011513464); P.arcticus, *Psychrobacter arcticus*(WP\_011280528); P.antarcticus, *Planococcus antarcticus*(WP\_065536877). An asterisk (\*) denotes that residues at that position are exactly same. A colon (:) indicates that residues at that position are very similar. A dot (.) indicates that residues are more or less similar.

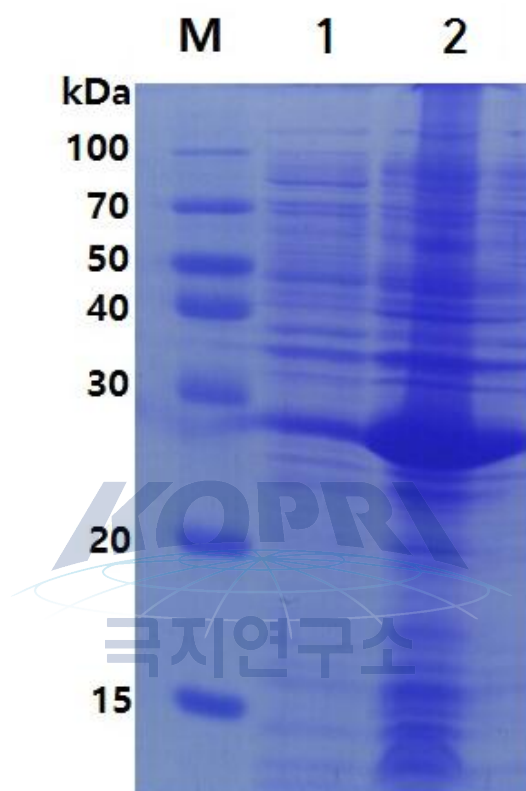


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of PdSLAC. M, molecular mass marker; lane 1, soluble protein fraction from supernatant of sonication for induced cell; lane 2. insoluble protein fraction from sediment of sonication for induced cells.

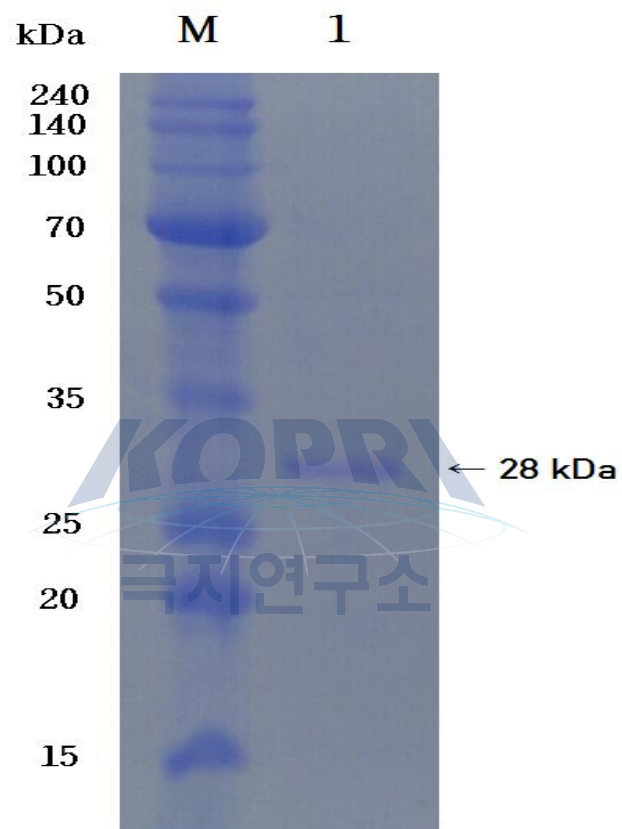


Fig. 6. purification of recombinant small laccase from *Planococcus donghaensis*:  
Lane 1 represent the protein staining bands of molecular markers and purified enzyme.

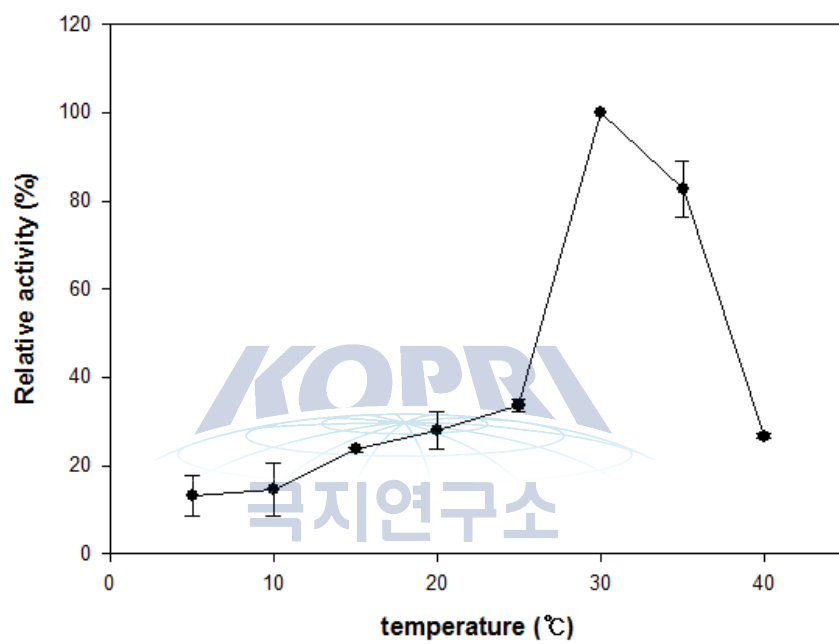


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of small recombinant laccase from *P. donghaensis*. Small laccase was assayed at temperature range from 5 to 40°C and pH 6 with ABTS as a substrate.

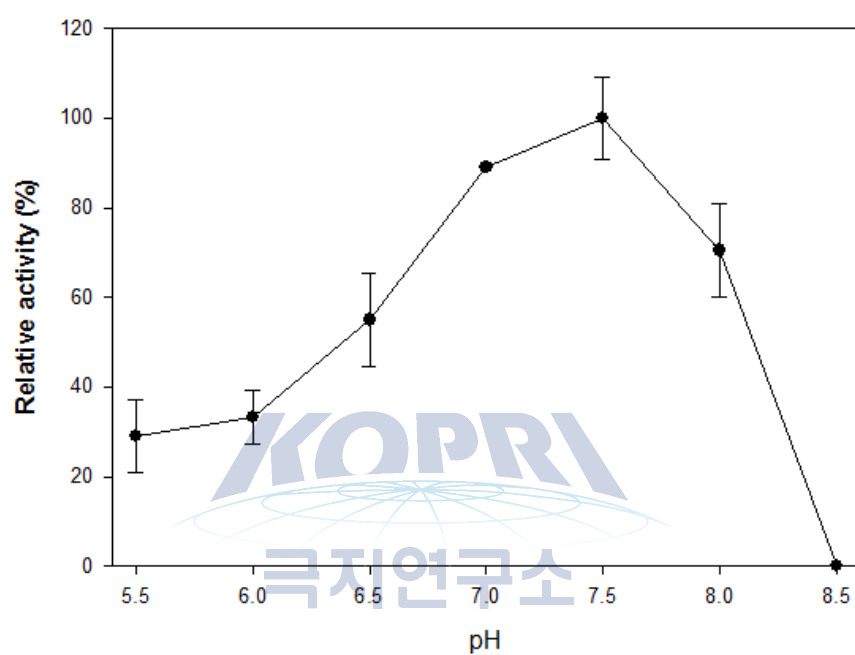


Fig. 8. Effect of pH on the activity of recombinant small laccase from *P. donghaensis*. The assay was carried out at 30°C with ABTS as a substrate, using sodium phosphate buffer (pH 5.5–8.5).

## 제 2 절 *Thermus thermophilus* HJ6 유래 aldose sugar dehydrogenase의 wild-type 및 Tyr156 mutants의 생화학 및 구조학적 특성

### 1. 서론

PQQ 의존성 dehydrogenase는 quino protein family의 가장 큰 효소 그룹이다. PQQ는 apoenzyme 과 결합하여 holoenzyme을 형성한다. PQQ enzyme은 quinoprotein alcohol dehydrogenases (ADH)와 quinoprotein glucose dehydrogenases (GDH)의 2가지로 분류된다. ADH는 알코올의 산화를 촉매하고 다시 3가지로 분류된다. Type I은 methanol dehydrogenase (MDH)와 ethanol dehydrogenase이고 Type II는 C-말단에 heme C를 포함하는 soluble quinoxinoprotein이고 Type III는 membrane-bound quinoxinoprotein이다. Quinoxinoprotein GDH는 glucose와 다른 aldose의 산화를 촉매하고 PQQ를 보조소로 사용한다. PQQ-GDH는 2종류로 분류되고 하나는 soluble glucose dehydrogenase (sGDH)이고 다른 하나는 membrane-bound form (mGDH)이다.

*Acinetobacter calcoaceticus* sGDH (Ac\_sGDH) [25]는 homodimeric이고 분자량 50kDa이며 1개의 subunit당 1개의 PQQ를 포함한다.  $Ca^{2+}$ 은 sGDH에서 2량체 형성과 PQQ 결합에 필요하다[26]. 이 효소는 다양한 pentose와 hexose 당을 산화하고 lactone을 형성한다[27]. sGDH는 N-methylphenazonium methyl sulfate [28] 및 electroconducting polymers [29]와 같은 중성 및 양성 전자수용체에 전자를 공급할 수 있다. 또한, 높은 turnover 수 및 PQQ의 전기화학적 재생 능력을 가지고 있어 바이오센서[25] 및 바이오연료전지[30-32]에 사용된다.

최근 새로운 soluble quinoxinoprotein sugar dehydrogenase (Ec\_ASD)가 대장균에서 동정되었다. 이 효소는 monomer이고 glucose와 maltose에 낮은 친화성을 가지고 다양한 mono-, di-, tri-saccharide aldose sugar들에 활성을 나타내었다. Ec\_ASD와 Ac\_sGDH의 결정 구조를 비교해 보면  $\beta$ -propeller fold는 비슷하지만 loop와 표면 노출 부분은 전혀 다르다[33]. 따라서, Ec\_ASD는 PQQ-dependent soluble dehydrogenases의 새로운 그룹으로 분류되고 aldose sugar dehydrogenase (ASD) 그룹으로 명명하였다[33]. 고세균에서 *Pyrobaculum aerophilum* 유래 ASD

(Pa\_ASD)는 동정되었고, 구조 및 촉매활성에서 Ec\_ASD와 매우 비슷한 특징을 가졌다[34].

본 연구에서는 고온균 *Thermus thermophilus*에서 sGDH homolog 유전자를 클로닝 및 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 대장균에서 발현하였고, 구조 및 돌연변이 분석을 통하여 기질 결합 부위에 존재하는 Tyr156 잔기의 역할을 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 사용균주와 배양

본 연구에서 사용한 *Thermus thermophilus*는 본 연구실에서 분리한 균주이고, 배양용 배지는 ATCC medium 1598 (bactotryptone, 2.5 g; yeast extract, 2.5 g; nitrilotriacetic acid, 100 mg; CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4 mg; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 200 mg; 0.01 M Fe-citrate, 0.5 mL; 0.5 mL trace element solution, Na.K phosphate buffer (pH 7.2, 0.16 M), per liter)를 사용하여 80℃에서 24시간 동안 배양한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다.

### 나. Tt\_ASD 유전자 클로닝 및 wild-type and mutant enzymes의 구축

*Thermus thermophilus* 염색체는 GeneAll GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Tt\_ASD 유전자를 클로닝 하기 위하여 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB8, HB27, or JL-18의 ASD 유전자 염기서열을 바탕으로, 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두 가지 primer, F1 primer로 5'-GTCGGGGAAGGGGGTGGCTG-3'와 R1 primer로 5'-AGGTCCGCTTCCGCAAGAGG-3'를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 initial denaturation 98℃에서 2분, denaturation 98℃에서 10초, annealing 54.4℃에서 30초, elongation 72℃에서 1분을 30 cycles로 반복하고 final elongation은 72℃에서 5분간 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase (INTRON Biotech., Korea)를 사용하여 DNA 단편을 증폭하였고 Topo blunt vector (Enzynomics, Korea)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다. 발현vector pET-21a에 효소 유전자를 클로닝하기 위하여 ORF를 바탕으로 2가지 primer인 F2

primer 5'-GGGGTGGCATATGGACCGGAGGCGCTTTCT-3'와 R2 primer 5'-CCGAAGCTTAAGGAGGCGTAGCACCCGG-3'를 제작하고 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 절단한 후 같은 효소로 절단한 pET-21a vector에 연결하여 pET21a-asd를 구축하고 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. pET-21a로 발현한 단백질은 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다. Y156A mutant를 구축하기 위해서 2가지 primer인 F3 primer 5'-GGGGAGGTCGCCGAGCGGGAG-3'와 R3 primer 5'-CTCCCGCTCGGCGACCTCCCC-3'를 제작하였고, Y156K mutant를 구축하기 위하여 2가지 primer인 F4 primer 5'-GGGGAGGTCAAAGAGCGGGAG-3'와 R4 primer 5'-CTCCCGCTCTTTGACCTCCCC-3'를 제작하였다. 이들 primer와 주형으로 pET21a-asd를 사용하여 site-directed mutagenesis kit (Muta-Direct, iNtRon)의 protocol대로 PCR을 수행하여 점 돌연변이를 도입하고 염기서열을 확인하였다.

#### 다. 효소 생산 및 정제

*E. coli* codon-plus (DE3)/pET21a-asd는 100 µg/ml ampicillin을 더한 LB배지에 접종하여 30℃에서 전배양을 하고 전배양액의 1%를 LB배지(triptonen 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에 접종하여 30℃에서 본 배양을 하였다. OD<sub>600nm</sub>=0.4-0.6이 되었을 때 0.3 mM IPTG를 넣고 25℃로 온도를 낮추어 16시간 동안 유도 배양하였다. 배양된 세포를 원심 분리하여 DW로 세척한 후 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 1 mM CuSO<sub>4</sub>)로 현탁하여 초음파로 cell을 파쇄하고, 원심 분리하여 상등액과 침전으로 분리하였다. 상등액을 0.45 µm pore size의 cellulose nitrate filter로 filtering하고 filter된 단백질은 His-Trap HP column (GE Healthcare)에 적용하고, buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) + 500 mM NaCl)을 적어도 10 column volume으로 세척하여 결합단백질을 ÄKTA start (GE Healthcare)으로 동일한 완충액에서 0.25 mM Imidazole의 농도구배로 최소 2 mL min<sup>-1</sup>의 유속으로 용출하였다. 효소 활성을 포함하는 분획을 모아 YM-10 membrane (Amicon, U.S.A.)을 이용해 한외여과로 농축시켰다. 단백질의 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인하였고, 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.



라. PQQ에 의한 효소의 재구축

정제된 apoenzyme (1.7 mg/ml)은 buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl and 1 mM CaCl<sub>2</sub>)속에서 10배 물수의 PQQ와 함께 25℃에서 16시간 반응하였다.

마. 효소의 활성 및 kinetic 측정법

표준분석은 다음과 같은 조성(860  $\mu$ L 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer; 100  $\mu$ L 1 M D-glucose; 10  $\mu$ L 6 mM DCIP ( $\epsilon_{600} = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); 10  $\mu$ L 60 mM PMS; 20  $\mu$ L of enzyme sample)으로 혼합한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 DCIP의 흡광도 감소를 측정하였다. 기질 특이성을 평가하기 위하여 다양한 기질 농도[D-glucose (0.01-0.8 M), D-galactose (0.01-0.8 M), D-mannose (0.01-1.2 M), L-arabinose (0.01-0.8 M), D-xylose (0.01-1.2 M), D-ribose (0.01-0.5 M), 2-deoxy-glucose (0.05-0.8 M), glucosamine (0.01-0.3 M), glucose 6-phosphate (0.01-0.3 M), maltose (0.01-0.8 M),  $\alpha$ -Lactose (0.01-0.5 M), D-cellobiose (0.01-0.4 M), maltotriose (0.01-0.5 M), xylitol (0.02-0.5 M), mannitol (0.1-0.7 M), methanol (0.05-0.5 M), and ethanol (0.05-0.5 M)]를 사용하여 kinetic 값을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. Tt\_ASF 유전자의 동정

고온균(*Thermus thermophilus* HJ6) 유래 Tt\_ASF를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *Thermus thermophilus* HB27의 GDH 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 GDH를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 1,059 bp의 길이로 352 아미노산을 암호화하고 있었다. 예상된 분자량은 38.9 kDa 이었고 등전점은 10.17이다. *Thermus thermophilus* HJ6 유래 Tt\_ASF의 아미노산 서열과 상동성을 보이는 다른 종의 아미노산 서열을 대상으로 alignment를 작성하였다(Figure 9). Pa\_ASF (identity 42.9%)와 Ec\_ASF (identity 33.9%)와 비교적 높은 상동성을 보였고 이 효소는 ASF 효소 그룹에 속하는 것으로 동정하였다. 염기서열은 DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database에 accession number AFN86158로 등록하였다.

나. Tt\_ASD의 대장균 발현 및 정제

*E. coli* BL21(DE3)/pET21a-asd의 초음파 파쇄액을 원심분리하여 상등액에 대항여 열처리한 후 metal chelating column을 사용하여 정제하였다(Figure 10). SDS-PAGE 결과 분자량 37 kDa을 나타내어 아미노산 서열에서 계산한 분자량보다 조금 더 낮았다. Superdex™ 200 column을 사용한 gel filtration chromatography 분석에서 효소의 분자량은 80 kDa을 나타내어 본 효소는 homodimer를 형성하는 것으로 확인되었다.

PQQ와 결합한 holoenzyme은 ultraviolet-visible (UV) absorption spectra를 측정한 결과 apoenzyme과 다른 양상을 나타내었다. PQQ가 결합한 300-400 nm에서 흡광도를 올라가고 342 nm에서의 분자흡광계수( $9620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )로 계산하면 94%의 단백질에 PQQ가 결합한 것으로 확인되었다(Figure 11).

다. 효소 활성의 최적 pH 및 온도

Tt\_ASD의 pH 의존성은 pH 3~9.5의 범위에서 overlapping buffer를 사용하여 측정하였다. 본 효소의 최적 pH는 7~7.5로 나타나서 Ec\_ASD의 최적 pH 8.75보다는 더 낮다. 최적 온도는 60~80℃ 범위에서 90% 이상의 활성을 나타내었고 70℃에서 가장 높았다 (Figure 12). 따라서 본 효소는 *T. thermophilus* HJ6 균주의 최적생육온도 (80℃) 보다는 더 낮은 온도에서 최적효소활성을 가지는 것으로 나타났다. 또한, 본 효소의 holoenzyme은 85℃에서 100분 동안 열처리한 후에 100%의 활성을 유지하여 매우 높은 내열성을 보였지만 PQQ가 결합하지 않은 apoenzyme은 급격하게 내열성이 떨어져서 본 효소는 PQQ와의 결합을 통하여 내열성이 향상되는 것으로 판단되었다(Figure 13).

라. 기질 특이성

본 효소의 기질 특이성은 Michaelis-Menten 식에 의해 분석되었다(Figure 14). 효소는 다양한 aldose sugars (hexoses, pentoses, disaccharides, and polysaccharides)와 alcohol에 대해서도 활성을 나타내었다 (Table 1). 비록 alcohol에 대한 catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m$ )은 sugar에 대한 값보다는 낮지만, ethanol과 methanol에 모두 활성을 보였다. Ethanol에 대한  $K_m$  값은 *Comamonas testosteroni* 유래 quinoprotein ADH (2.23 mM) 보다 더 높다. Ethanol에 대한 catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m$ )은 *C. testosteroni* 유래 ADH ( $8027 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) 보다는 더 낮았다. 가장 낮은  $K_m$  값은

glucosamine이고, 가장 높은  $k_{cat}$  값은  $\alpha$ -lactose이며, 가장 높은  $k_{cat}/K_m$  ratio은 2-deoxy-glucose이다. Glucose에 대한  $K_m$  값(0.21 M)은 Pa\_ASAD (0.68 M) 및 Ec\_ASAD (0.4 M)보다 낮아 기질 친화성이 높은 것으로 나타났다. 또한, disaccharides 및 trisaccharides에 대한  $K_m$  값은 glucose 보다도 더 낮았다. 종합적으로 기질 친화성 및 촉매 효율은 Pa\_ASAD 보다는 높고, Ec\_ASAD 보다는 낮은 것으로 확인되었다.

#### 마. 단백질 구조 및 돌연변이 분석

Tt\_ASAD 효소의 알코올 산화를 이해하기 위하여 단백질의 3-D 구조 분석을 수행하였다. 본 효소는 이미 3차 구조가 밝혀진 *T. thermophilus* HB8 유래 putative oxidoreductase (GDH) (PDB ID: 2ISM)와 아미노산 서열에서 3개만 다르기 때문에 거의 구조가 같다고 할 수 있고, 이것을 바탕으로 Tt\_ASAD의 구조 모델링을 통하여 구조를 확인할 수 있었다(Figure 15). Tt\_ASAD의 3차 구조는 6개의 four-stranded antiparallel  $\beta$ -sheets를 포함하는  $\beta$ -propeller 구조를 가지고 Pa\_ASAD와 매우 유사한 구조를 가졌다. Tt\_ASAD와 Ac\_sGDH와의 구조는 long loop와 표면 구조에서 다른점을 나타내었다(Figure 16). Tt\_ASAD, Ac\_sGDH (PDB ID:1CQ1), Pa\_ASAD (PDB ID: 3A9H)의 3가지 단백질 구조는 least-squares approach에 의해 매우 일치하는 PQQ 결합구조를 나타낸다(Figure 16). Ac\_sGDH의 ligand-complex 구조에서 Gln168 잔기는 glucose와 결합한 수소원자와 연관된 것으로 확인된다. Tt\_ASAD에 유일하게 존재하는 Tyr156 잔기의 hydroxyl group과 glucos 분자의 hydroxyl O1 group 간의 거리는 4.0 Å 이다(Figure 18). Ac\_sGDH의 long loop 안에 위치하는 Gln168 잔기는 Tt\_ASAD의 Tyr156 잔기와 같은 구조적 위치에 존재한다. Tt\_ASAD와 Ac\_sGDH의 Ca backbone의 위치는 5.1 Å 떨어져 위치한다(Figure 17, 18). 따라서 Tt\_ASAD의 Tyr156 잔기는 기질 결합에 관여하는 것으로 예상된다. Tt\_ASAD에서 Tyr156 잔기의 역할을 분석하기 위하여 2가지 mutant (Y156A, Y156K)를 제작하고 효소학적 특성을 분석하였다. Table 1에서와 같이 2가지 mutant 효소는 모든 기질에 대하여  $K_m$  값이 증가하고  $k_{cat}$  값이 감소한 것으로 보아, 활성과 기질 친화도가 손상 되는 것으로 확인되었다. Y156A mutant의 촉매 효율은 Y156K의 촉매효율보다 낮았고 더구나 2가지 mutant 는 alcohol 기질에 대하여 거의 활성을 잃어 버렸다. 따라서, Tyr156 잔기의 역할은 기질 친화성과 특이성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 결과적으로 Tyr156 잔기는 Tt\_ASAD의 alcohol 결합 친화성을 결정하는 유일한 잔기로 판명되었다.

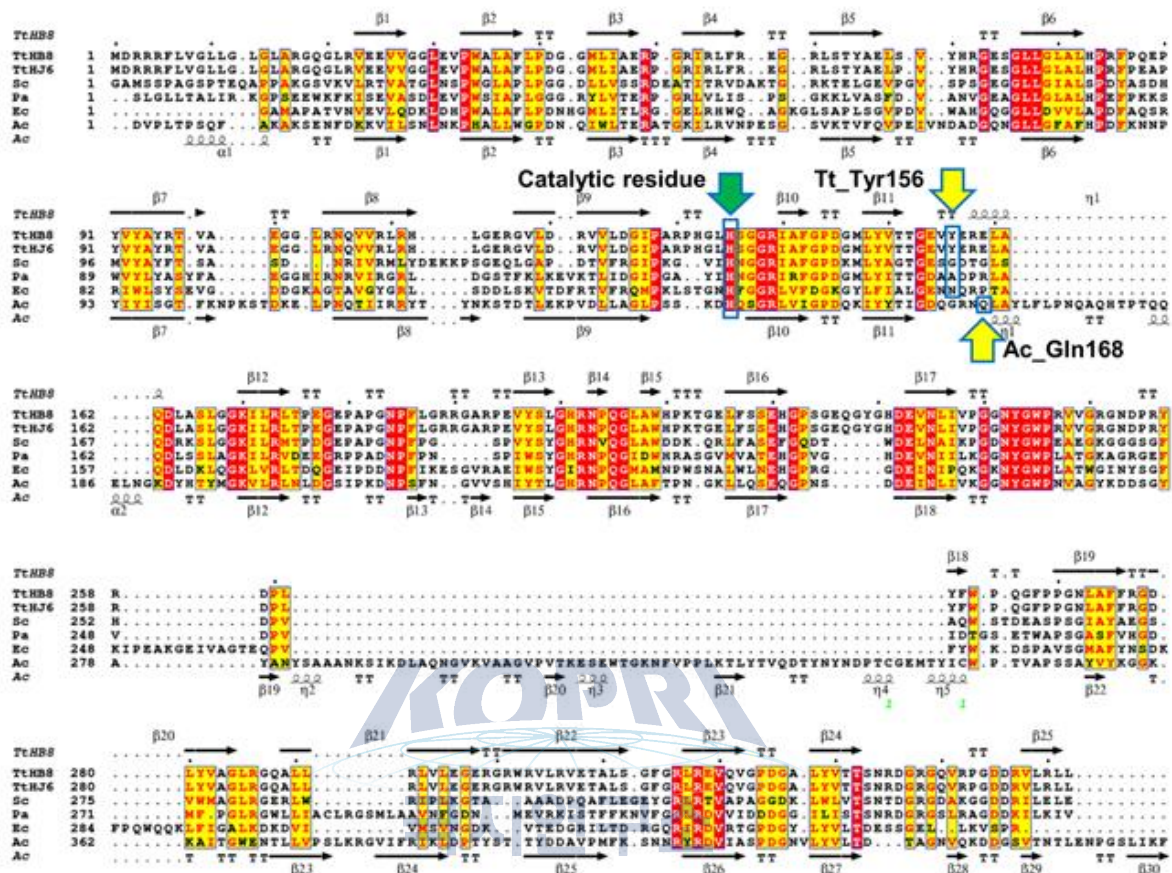


Fig. 9. Alignment of the deduced amino acid sequence of Tt\_ASF with its homologues. The sequences were aligned with CLUSTALW and displayed in ESPrnt along with secondary structure assignments for Tt\_ASF (PDB ID: 2ISM) and Ac\_ASF (PDB ID: 1CQ1). Strain abbreviation of each protein and Protein ID are as follows: TtHB8, *T. thermophilus* HB8 (UniProtKB code Q5SKS3); TtHJ6, *T. thermophilus* HJ6 (UniProtKB code I7A144); Sc, *Streptomyces coelicolor* (UniProtKB code Q9Z571); Pa, *Pyrobaculum aerophilum* (UniProtKB code Q8ZUN8); Ec, *Escherichia coli* (UniProtKB code M8PTY9); Ac, *Acinetobacter calcoaceticus* (UniProtKB code P13650).

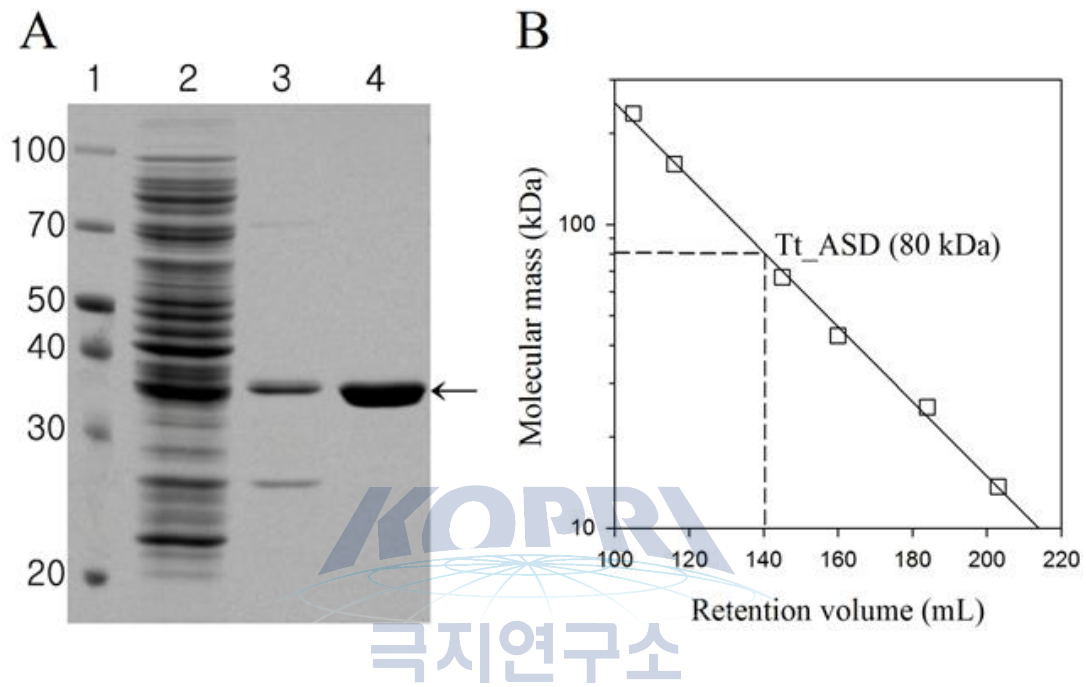


Fig. 10. SDS-PAGE and gel filtration analysis of recombinant Tt\_ASD. (A) Purification of recombinant Tt\_ASD. M, molecular mass marker; lane 1, crude extract induced cells; lane 2, supernatant of crude extract after heat treatment at 80 °C for 20 min; lane 3, Histrap column peak fractions. The gel was stained with coomassie brilliant blue. (B) Molecular mass determination of recombinant Tt\_ASD. The molecular mass of recombinant Tt\_ASD was determined by analysis of the elution of standard proteins from a Sephacryl S-200 HR 26/60 column.

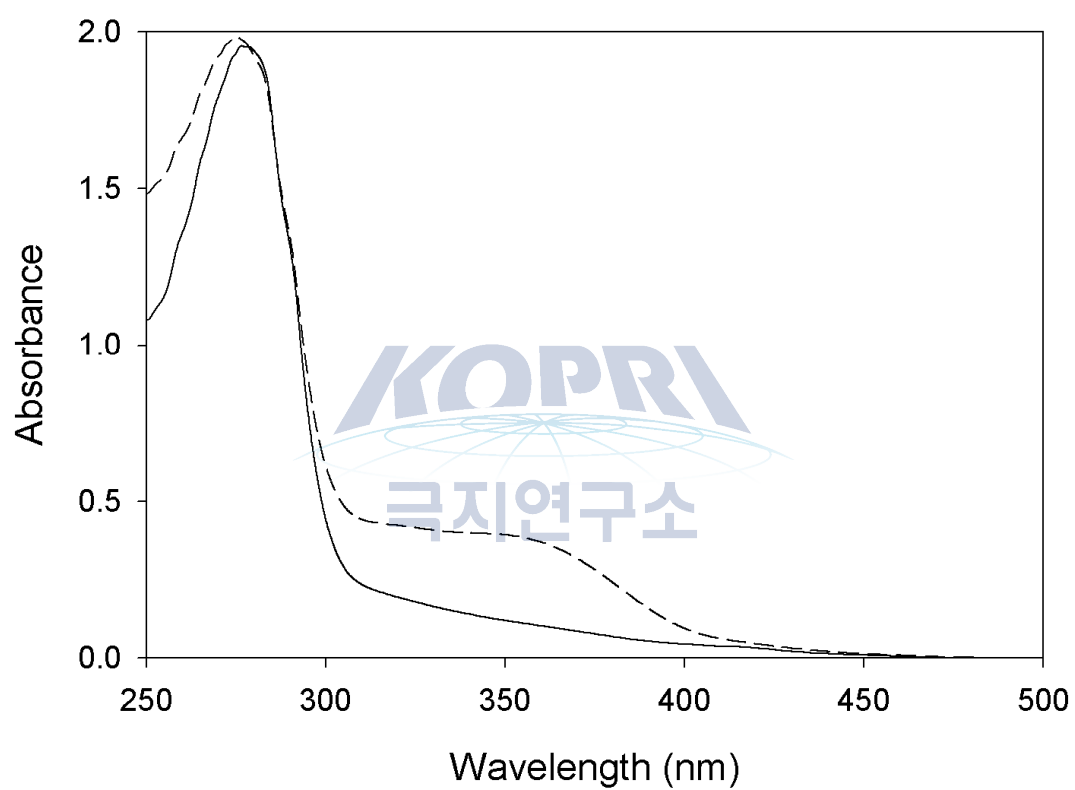


Fig. 11. UV-visible absorption spectra of recombinant Tt\_ASD. Absorbance spectra of Tt\_ASD before (solid line) and after (dashed line) binding of PQQ.

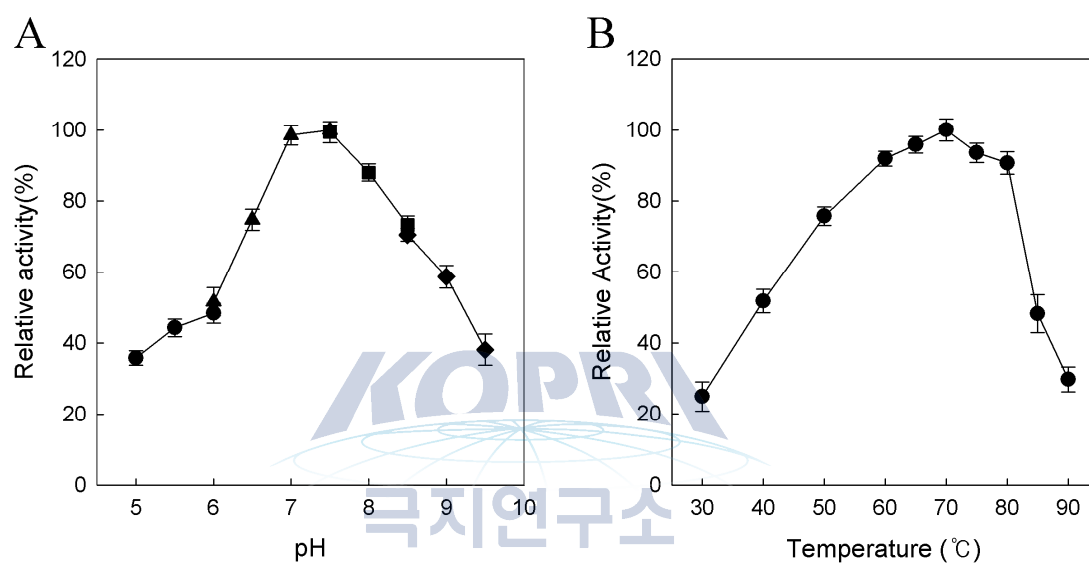


Fig. 12. Effects of pH and temperature on the enzyme activity. (A) pH dependence of the activity. circles, 50 mM sodium acetate; triangles, 50 mM sodium phosphate; squares, 50 mM Tris-HCl; diamonds, 50 mM glycine-NaOH. (B) Temperature dependence of the activity.

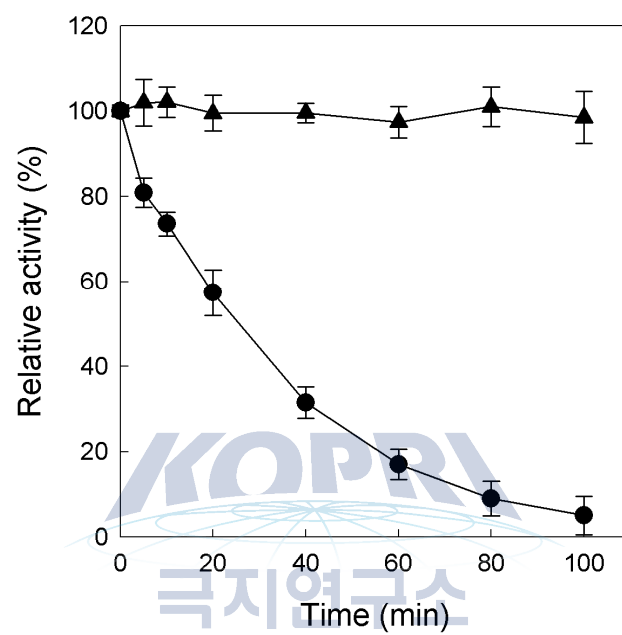


Fig. 13. Thermostability of recombinant Tt\_ASD. The apoenzyme (circles) and holoenzyme (triangles) was incubated for various lengths of time at 85°C, and the residual activity of samples were measured at 70°C and pH 7.5.



Table 1. Kinetic parameters and substrate specificities of the wild type and mutant Tt\_ASDs. Data represent the mean ( $\pm$ SE) of duplicate measurements.

| Group and name             | Wild type                               |                       |                                                                   | Y156A                                   |                       |                                                                   | Y156K                                   |                       |                                                                   |
|----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                            | $k_{\text{cat}}$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_{\text{m}}$<br>(M) | $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$<br>( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) | $k_{\text{cat}}$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_{\text{m}}$<br>(M) | $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$<br>( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) | $k_{\text{cat}}$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_{\text{m}}$<br>(M) | $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$<br>( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) |
| <b>Simple sugars</b>       |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |
| D-Glucose                  | 1054 $\pm$ 203                          | 0.21 $\pm$ 0.08       | 5021 $\pm$ 2543                                                   | 339 $\pm$ 10                            | 0.47 $\pm$ 0.03       | 719 $\pm$ 291                                                     | 316 $\pm$ 23                            | 0.25 $\pm$ 0.05       | 1287 $\pm$ 485                                                    |
| D-Galactose                | 823 $\pm$ 56                            | 0.11 $\pm$ 0.02       | 7488 $\pm$ 2801                                                   | 160 $\pm$ 16                            | 0.38 $\pm$ 0.09       | 417 $\pm$ 187                                                     | 193 $\pm$ 6                             | 0.2 $\pm$ 0.02        | 952 $\pm$ 333                                                     |
| D-Mannose                  | 1627 $\pm$ 311                          | 0.13 $\pm$ 0.06       | 12518 $\pm$ 5199                                                  | 265 $\pm$ 16                            | 0.14 $\pm$ 0.03       | 1858 $\pm$ 533                                                    | 261 $\pm$ 18                            | 0.16 $\pm$ 0.04       | 1610 $\pm$ 482                                                    |
| L-Arabinose                | 1755 $\pm$ 312                          | 0.16 $\pm$ 0.06       | 10972 $\pm$ 5211                                                  | 142 $\pm$ 10                            | 0.17 $\pm$ 0.04       | 796 $\pm$ 264                                                     | 154 $\pm$ 7                             | 0.14 $\pm$ 0.02       | 1079 $\pm$ 330                                                    |
| D-Xylose                   | 1681 $\pm$ 350                          | 0.14 $\pm$ 0.07       | 12011 $\pm$ 5006                                                  | 305 $\pm$ 46                            | 0.46 $\pm$ 0.16       | 699 $\pm$ 291                                                     | 204 $\pm$ 29                            | 0.23 $\pm$ 0.10       | 872 $\pm$ 294                                                     |
| D-Ribose                   | 260 $\pm$ 103                           | 0.13 $\pm$ 0.10       | 2062 $\pm$ 983                                                    | 181 $\pm$ 17                            | 0.07 $\pm$ 0.02       | 2724 $\pm$ 835                                                    | 715 $\pm$ 135                           | 0.44 $\pm$ 0.13       | 1631 $\pm$ 1034                                                   |
| <b>Alcohols</b>            |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |
| Xylitol                    | 15 $\pm$ 2                              | 0.09 $\pm$ 0.03       | 173 $\pm$ 60                                                      | ND <sup>a</sup>                         | ND                    | ND                                                                | ND                                      | ND                    | ND                                                                |
| Mannitol                   | 38 $\pm$ 4                              | 0.09 $\pm$ 0.04       | 414 $\pm$ 103                                                     | ND                                      | ND                    | ND                                                                | ND                                      | ND                    | ND                                                                |
| Methanol                   | 76 $\pm$ 42                             | 0.15 $\pm$ 0.18       | 506 $\pm$ 237                                                     | ND                                      | ND                    | ND                                                                | ND                                      | ND                    | ND                                                                |
| Ethanol                    | 123 $\pm$ 28                            | 0.18 $\pm$ 0.10       | 680 $\pm$ 291                                                     | ND                                      | ND                    | ND                                                                | ND                                      | ND                    | ND                                                                |
| <b>Substituted glucose</b> |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |
| 2-Deoxy-glucose            | 1141 $\pm$ 162                          | 0.04 $\pm$ 0.02       | 29483 $\pm$ 8503                                                  | 69 $\pm$ 2                              | 0.08 $\pm$ 0.01       | 921 $\pm$ 249                                                     | 128 $\pm$ 11                            | 0.14 $\pm$ 0.04       | 903 $\pm$ 275                                                     |
| Glucosamine                | 197 $\pm$ 6                             | 0.02 $\pm$ 0.00       | 12989 $\pm$ 2811                                                  | 104 $\pm$ 16                            | 0.02 $\pm$ 0.01       | 5727 $\pm$ 1846                                                   | 117 $\pm$ 29                            | 0.02 $\pm$ 0.01       | 8696 $\pm$ 2475                                                   |
| Glucose 6-phosphate        | 192 $\pm$ 33                            | 0.08 $\pm$ 0.04       | 2543 $\pm$ 918                                                    | ND                                      | ND                    | ND                                                                | ND                                      | ND                    | ND                                                                |
| <b>Disaccharide</b>        |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |
| Maltose                    | 1022 $\pm$ 150                          | 0.17 $\pm$ 0.05       | 6012 $\pm$ 3003                                                   | 186 $\pm$ 20                            | 0.37 $\pm$ 0.09       | 500 $\pm$ 222                                                     | 170 $\pm$ 18                            | 0.26 $\pm$ 0.07       | 654 $\pm$ 252                                                     |
| $\alpha$ -Lactose          | 1953 $\pm$ 485                          | 0.19 $\pm$ 0.09       | 10280 $\pm$ 5245                                                  | 282 $\pm$ 82                            | 0.64 $\pm$ 0.29       | 439 $\pm$ 281                                                     | 225 $\pm$ 61                            | 0.65 $\pm$ 0.27       | 343 $\pm$ 221                                                     |
| D-Cellobiose               | 1042 $\pm$ 415                          | 0.07 $\pm$ 0.05       | 14893 $\pm$ 8316                                                  | 160 $\pm$ 17                            | 0.30 $\pm$ 0.06       | 527 $\pm$ 280                                                     | 186 $\pm$ 35                            | 0.23 $\pm$ 0.05       | 808 $\pm$ 654                                                     |
| <b>Polysaccharide</b>      |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |                                         |                       |                                                                   |
| Maltotriose                | 772 $\pm$ 247                           | 0.13 $\pm$ 0.08       | 6160 $\pm$ 3143                                                   | 822 $\pm$ 169                           | 0.60 $\pm$ 0.20       | 1366 $\pm$ 861                                                    | 363 $\pm$ 34                            | 0.16 $\pm$ 0.03       | 2283 $\pm$ 961                                                    |

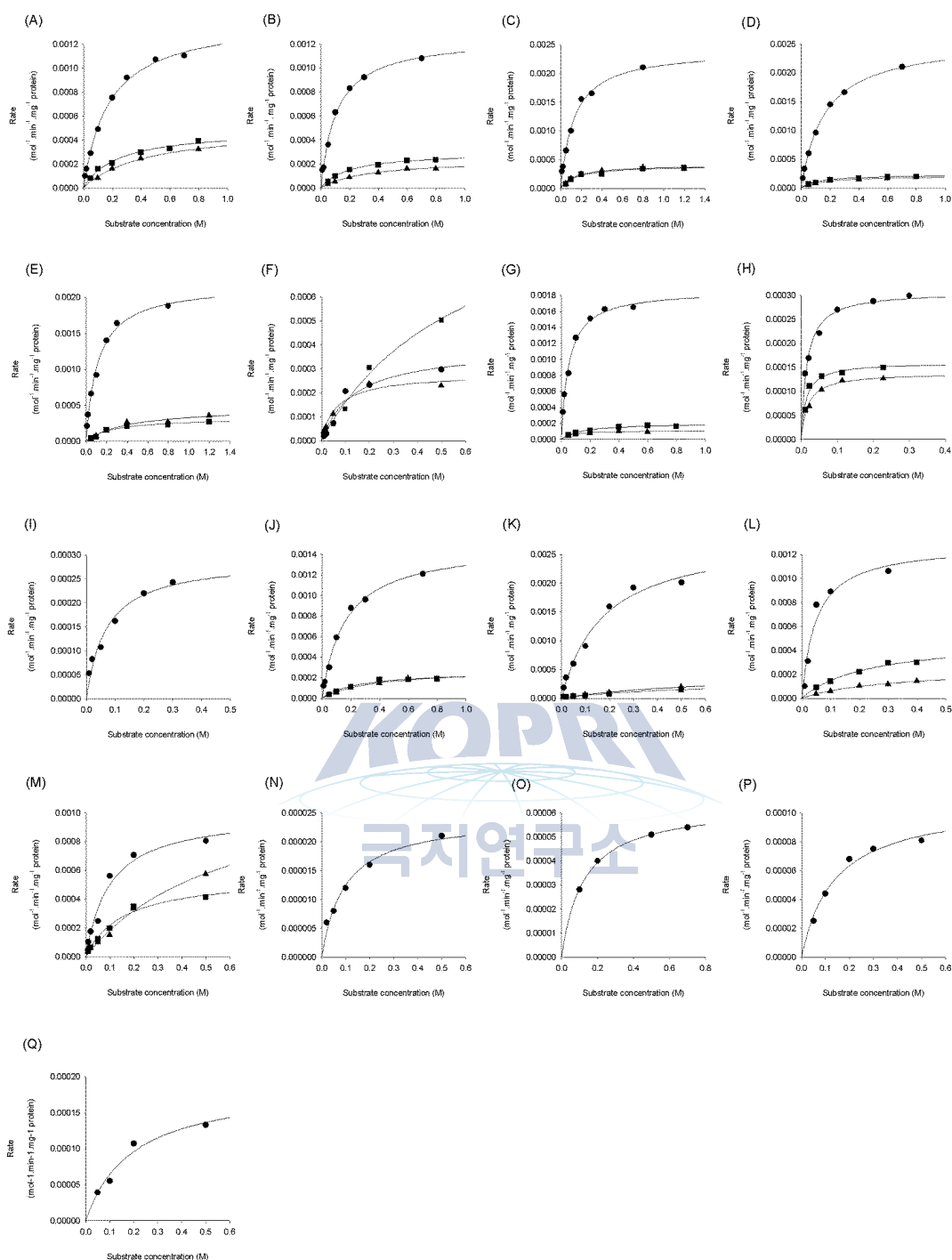


Fig. 14. Michaelis-Menten kinetics data for Tt\_ASD. Michaelis-Menten plots showing purified Tt\_ASD activity, and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM D-glucose, 0.06 mM DCIP, 0.6 mM PMS, and wild type (●), Y156A (▲), or Y156K (■) enzyme (10  $\mu$ g) with increasing concentrations of (A) D-glucose, (B) D-galactose, (C) D-mannose, (D) L-arabinose, (E) D-xylose, (F) D-ribose, (G) 2-deoxy-glucose, (H) glucosamine, (I) glucose 6-phosphate, (J) maltose, (K)  $\alpha$ -Lactose, (L) D-cellobiose, (M) maltotriose, (N) xylitol, (O) mannitol, (P) methanol, and (Q) ethanol.

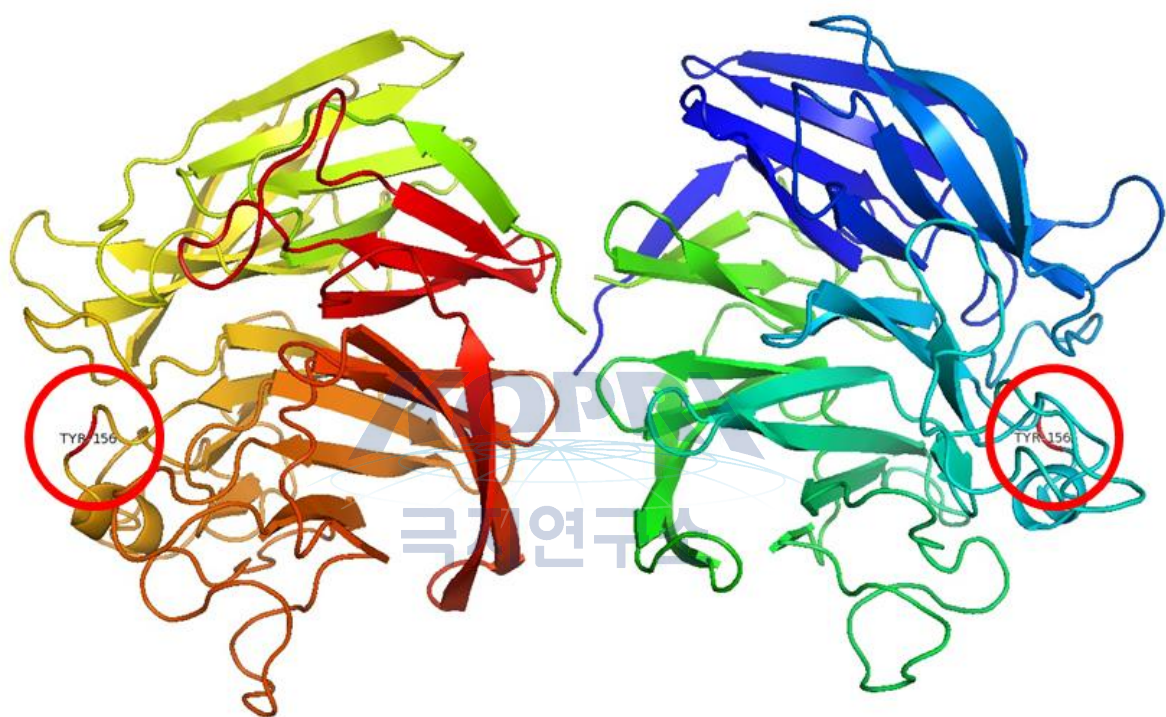


Fig. 15. 3-D structure model the Aldose Sugar Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HJ6.

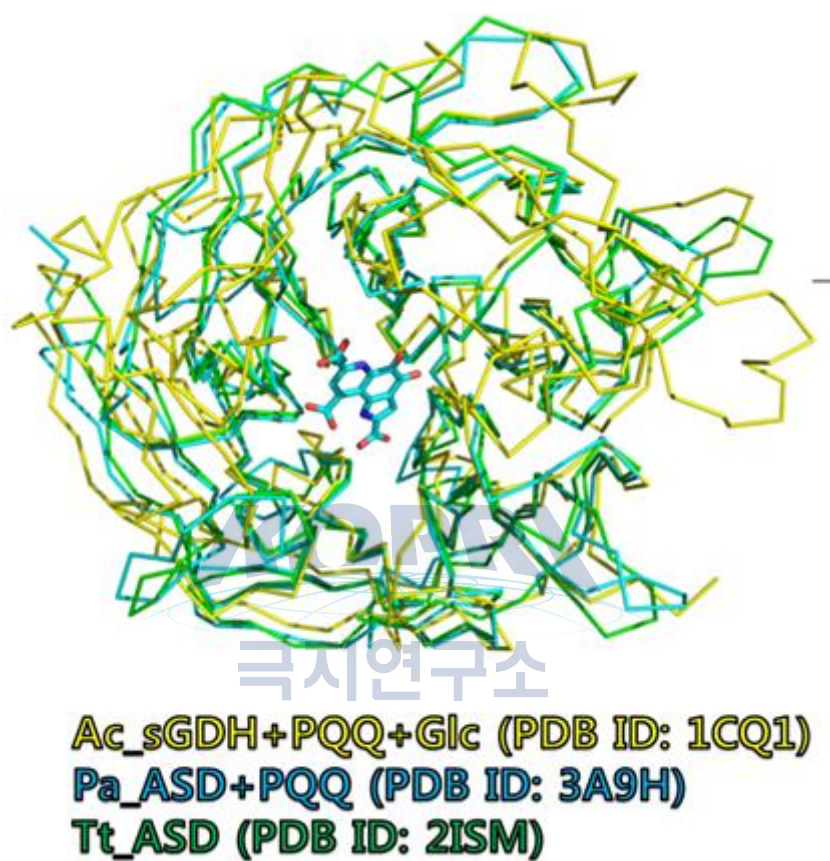


Fig 16. Structural comparison of three sugar dehydrogenases (Tt\_ASAD, Pa\_ASAD and Ac\_sGDH). Structural superposition of the three enzymes is represented as ribbon models.

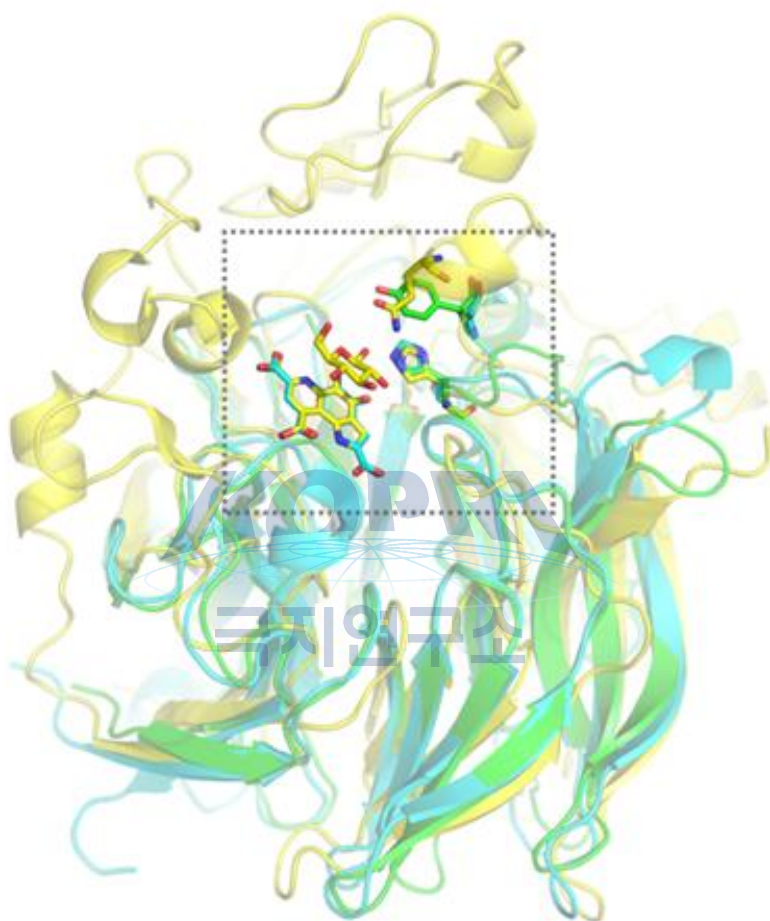


Fig. 17. The orientation of the cartoon model is rotated 90 around the horizontal axis on the panel. The open active site is exposed to solvent. The ligand-binding region is indicated as dotted box.

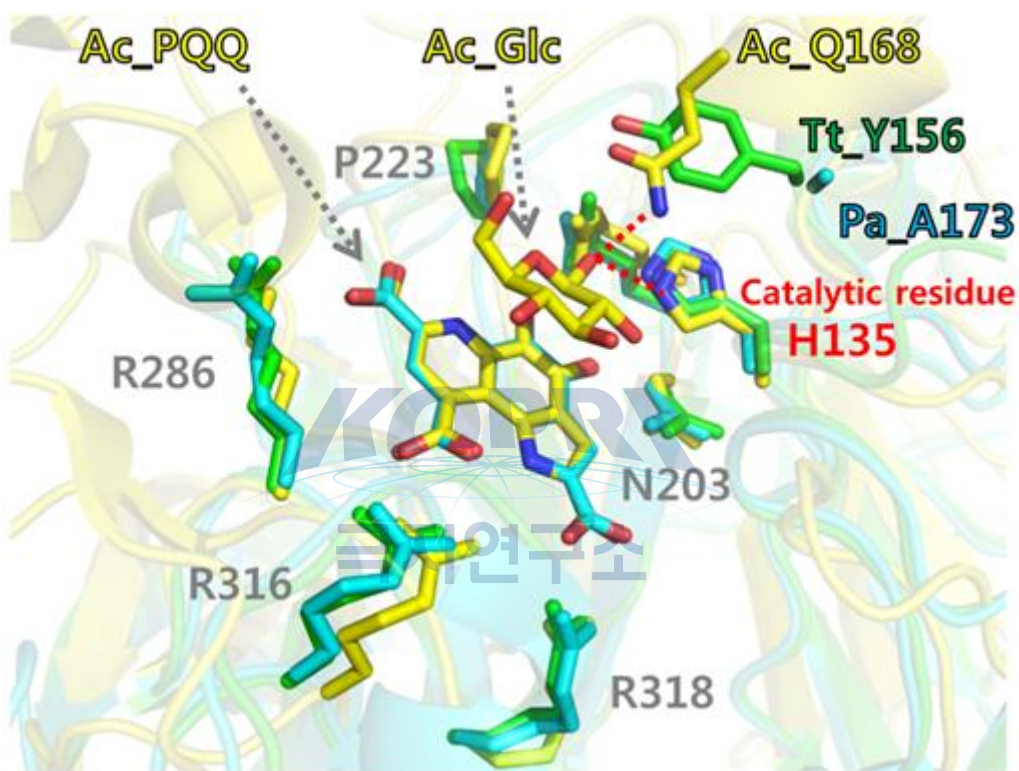


Fig. 18. Close-up view showing the catalytic and ligand binding site. Residues involved in PQQ and glucose binding are shown as stick models using the same color code as shown in panel.



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 연구개발목표 및 달성도

#### 1. 연구성과목표

: 저온/고온 산화환원효소의 융합형 변이체 구축

#### 2. 세부내용

가. 저온성 효소의 생화학적 특성 분석

(1) 저온균 (*Planococcus donghaensis*) 유래 Laccase의 정제 및 효소 활성 측정

(2) 효소 최적 pH 및 온도 규명

나. 저온/고온 효소 융합형 변이체 구축

(1) 저온성 및 고온성 Laccase의 DNA Shuffling

(2) Aldose sugar dehydrogenase의 point mutation에 의한 효소 변이체 생산 및 정제

다. 산화환원효소의 고활성화 및 단백질 구조 기반 반응 원리 규명

(1) Wild type 및 mutant aldose sugar dehydrogenase의 kinetic 특성 비교 분석

(2) 단백질 X선 구조 기반 분석을 통한 효소의 기질 특이성 원리 규명

#### 3. 평가의 착안점에 입각한 달성도

가. 저온성 산화환원효소의 생화학적 특성 규명 1건 달성

- 목표 달성도 : 100%

나. DNA shuffling에 의한 mutation 분석은 실패했지만, point mutation에 의한 효소 변이체 구축 2건 달성

- 목표달성도 : 70%

다. 효소 변이체의 활성 및 기질 특이성 분석

- 목표 달성도 : 100%

## 제 2 절 대외기여도

### 1. 학술적 기여도

- 가. 활성이 우수한 효소를 탐색하는 고전적 방법 대신 목적에 따라 용이하게 효소 활성을 조절할 수 있는 구조인자를 규명하면 생물전환 관련 기초 및 응용연구를 위한 원천 기반기술이 확보됨
- 나. In vitro coevolution 기술은 핵심적 원천 융합 학문으로서 다른 효소 연구에도 광범위하게 적용될 수 있음
- 다. 저온 및 고온성 효소의 특이적인 구조를 확보하고 분석함으로써 자연계에서 각 효소 단백질이 어떤 진화과정을 거쳐 저온 및 고온에 적응하게 되었는지에 대한 생물 진화과정의 기초적 정보를 제공하게 될 것임
- 라. 본 연구를 통하여 활성과 특이성이 강화된 저온성 산화환원효소를 개발하면 implantable biofuel cell에 적용하고 이것을 남극생물에 이식하여 남극생물의 생태 연구에 활용할 수 있음

### 2. 경제적 기여도

- 가. 산화환원효소의 고활성화 및 안정화에 대한 조절 기반기술이 확보되면 산업적으로 다양한 화합물의 환경 친화적 및 경제적 생산이 가능하게 됨
- 나. Laccase의 고효율화를 통하여 염료탈색, 펄프표백, 폴리머 합성, 바이오센서, 바이오연료전지, 환경정화 등에 활용하면 높은 경제적 수익을 창출할 수 있음
- 다. In vitro coevolution에 의한 효소 설계 기술은 앞으로 새로운 산업용 효소 개발, 단백질 의약품 개발, White Biotechnology, 합성 생물학 등의 분야에서 광범위하게 활용되어 생명공학의 산업화에 크게 기여할 수 있음
- 라. In vitro coevolution에 의한 활성 및 기질특이성 조절의 원천기술이 확보되면 신균주의 선별 없이도 산업적으로 중요한 화합물의 환경 친화적 생산이 가능하게 됨. 이를 통해 고부가가치 산화환원효소 관련 화합물의 신개념 산업적 생산법을 제시할 뿐만 아니라 유사 효소 산업에도 적용할 수 있어 파급 효과가 커지게 됨



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

1. DNA shuffling에 의한 산화환원효소의 변이체 확보가 필요함
2. 산화환원효소의 활성이 향상된 변이체 확보를 위하여 High throughput screening 기술 확보가 필요함
3. 변이체의 아미노산 서열 및 구조 분석을 통하여 산화환원효소의 고활성화 및 온도 감수성에 대한 단백질 구조 기반 원리 규명이 필요
4. 저온성 효소의 온도 의존성 작용 기작의 규명이 필요함
5. 저온성 산화환원효소의 바이오연료전지에서의 활용가치 발굴이 필요함

### 제 2 절 타연구에의 응용

In vitro coevolution에 의한 효소 설계 기술은 앞으로 새로운 산업용 효소 개발, 단백질 의약품 개발, white biotechnology, 합성 생물학 등의 분야에서 광범위하게 활용되어 생명공학의 산업화에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한, in vitro coevolution에 의한 활성 및 기질특이성 조절의 원천기술이 확보되면 새로운 균주의 선별 없이도 산업적으로 중요한 화합물의 환경 친화적 생산이 가능하게 된다. 이를 통해 고부가가치 산화환원효소 관련 화합물의 신개념 산업적 생산법을 제시할 뿐만 아니라 유사 효소 산업에도 적용할 수 있어 큰 파급 효과를 가질 것으로 기대한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 In vitro evolution에 의한 allosteric 효과

#### 1. Distal mutation을 도입에 의한 allosteric 효과 유발 기술

##### 가. 기술 개요

- 일반적으로 효소의 allosteric 효과는 binding pocket에서 먼 부위에서 effector의 도킹에 의해 발생한다. 그러나, effector가 없는 상태에서 binding pocket의 변형 수반과 함께 domain 이동을 일으키는 distal mutation을 도입하여 allosteric 효과를 유발하는 기술을 제시하였다.

##### 나. 기술 내용

- Wild-type과 결합하지 않는 기질의 비평형 Baeyer - Villiger 반응에 관여하는 효소로 phenylacetone monooxygenase (PAMO)를 사용하여 effector compound 없이 allosteric 효과를 유도할 수 있는 mutant를 제작하였고 400개의 형질전환체중에서 double mutant는 2-substituted cyclohexanone derivatives 뿐만 아니라 3개의 다른 4-substituted cyclohexanones의 산화를 촉매할 수 있었다(Figure 19). 결과적으로 large domain의 이동은 binding pocket의 변형과 노출을 야기하였고, 이 방법은 전통적인 기질 결합 부위의 직접적인 분자진화 방식의 다른 대안방식으로 효소의 allosteric 효과를 유도하는 것으로 확인되었다.

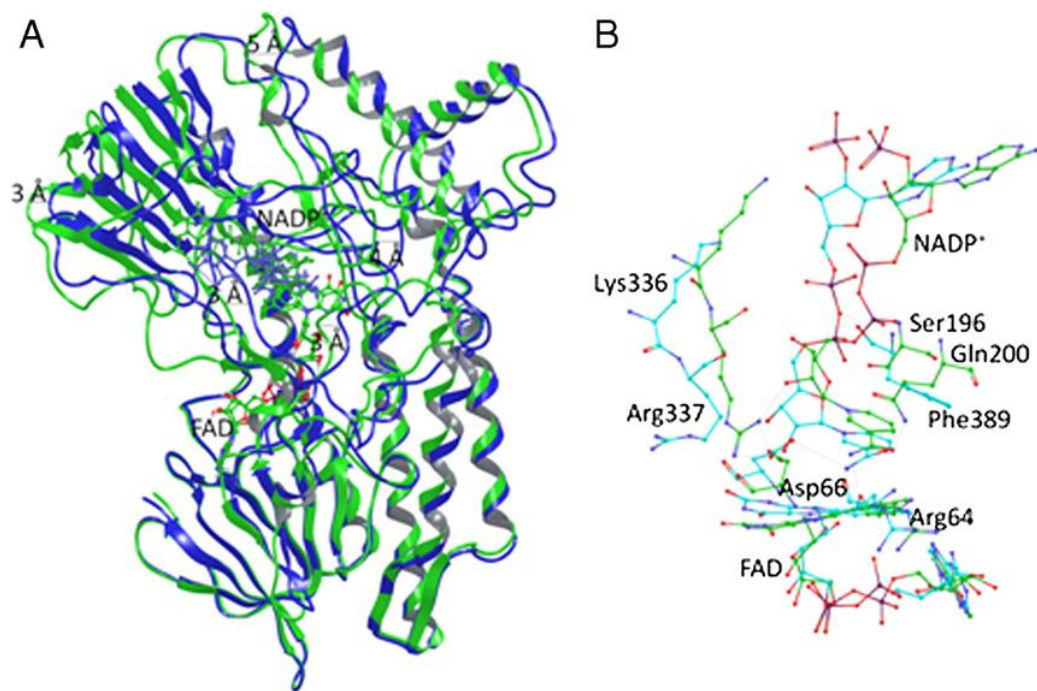


Fig. 19. Cartoon representation of the superimposed wild-type PAMO (Green) and mutant Gln93Asn/Pro94Asp (Blue) structures [7].



## 제 7 장 참고문헌

- [1] Feller G. (2003) Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 648-662.
- [2] Smalas AO, Leiros HK, Os V, Willassen NP. (2000) Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.
- [3] Feller G, Gerday C. (2003) Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 200-208.
- [4] Jaenicke R. (1981) Enzymes under extremes of physical conditions. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10: 1-67.
- [5] Stemmer WP. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 370: 389-3891.
- [6] McCullum EO, Williams BA, Zhang J, Chaput JC. (2010) Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* 634: 103-109.
- [7] Wu S, Acevedo JP, Reetz MT. (2010) Induced allostery in the directed evolution of an enantioselective Baeyer-Villiger monooxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2107: 2775-2780.
- [8] Smalas AO, Leiros HK, Os V, Willassen NP. (2000) Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.
- [9] Georlette D, Damien B, Blaise V, Depiereux E, Uversky VN, Gerday C, Feller G. (2003) Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J. Biol. Chem.* 278: 37015-37023.
- [10] Claus H, G Faber, H Konig. (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 672-678.
- [11] Palonen H, Viikari L. (2004) Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 550-557.
- [12] Murugesan K. (2003) Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1239-1248.

- [13] Huttermann A, Mai C, Kharazipour A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 387-394.
- [14] Peter MG, Wollenberger U. (1997) Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS.* 80: 63-82.
- [15] Liu X, Gillespie M, Ozel AD, Dikici E, Daunert S, Bachas LG. (2011) Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399: 361-366.
- [16] Baldrian P. (2006) Fungal laccases - Occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- [17] Mayer, AM. (1987) Polyphenol oxidases in plants - Recent progress. *Phytochemistry* 26: 11-20.
- [18] Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 29-41.
- [19] Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1953-1958.
- [20] Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones, GH, Henriques AO. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277: 18849-18859.
- [21] Alexandre G, Zhulin IB. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18: 41-42.
- [22] Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, Chakrabarti K. (2015) Enhanced functionality and stabilization of a cold active laccase using nanotechnology based activation-immobilization *Bioresource Technology* 179: 573 - 584.

- [23] Parrilli E, Papa R, Tutino ML, Sannia G. (2010) Engineering of a psychrophilic bacterium for the bioremediation of aromatic compounds *Bioengineered Bugs* 1: 213-216
- [24] Morita R. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 144-167.
- [25] Cleton-Jansen AM, Goosen N, Wenzel TJ, van de Putte P. (1988) Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. *J. Bacteriol.* 170: 2121-2125.
- [26] Olsthoorn AJ, Otsuki T, Duine JA. (1997)  $\text{Ca}^{2+}$  and its substitutes have two different binding sites and roles in soluble, quinoprotein (pyrroloquinoline-quinone-containing) glucose dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 247: 659-665.
- [27] Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. (1989) Quinoprotein D-glucose dehydrogenase of the *Acinetobacter calcoaceticus* respiratory chain: membrane-bound and soluble forms are different molecular species. *Biochemistry* 28: 6276-6280.
- [28] Olsthoorn AJ, Duine JA. (1996) Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Biochem Biophys* 336: 42-48.
- [29] Ye L, Hammerle M, Olsthoorn AJJ, Schuhmann W, Schmidt HL, Duine JA, Heller A. (1993) High current density "wired" quinoprotein glucose dehydrogenase electrode. *Anal. Chem.* 65: 238-241.
- [30] Gobel G, Schubart IW, Scherbahn V. (2011) Direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase at modified carbon nanotubes electrodes. *Electrochem. communi.* 13: 1240-1243.
- [31] Tanne C, Gobel G, Lisdat F. (2010) Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/ $\text{O}_2$ -biofuel cell. *Biosen. bioelectr.* 26: 530-535.
- [32] Yuhashi N, Tomiyama M, Okuda J, Igarashi S, Ikebukuro K, Sode K. (2005) Development of a novel glucose enzyme fuel cell system employing protein

- engineered PQQ glucose dehydrogenase. *Biosen. bioelectr.* 20: 2145–2150.
- [33] Southall SM, Doel JJ, Richardson DJ, Oubrie A. (2006) Soluble aldose sugar dehydrogenase from *Escherichia coli*: a highly exposed active site conferring broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 281: 30650–30659.
- [34] Sakuraba H, Yokono K, Yoneda K, Watanabe A, Asada Y, Satomura T, Yabutani T, Motonaka J, Ohshima T (2010) Catalytic properties and crystal structure of quinoprotein aldose sugar dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 502: 81–88.





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