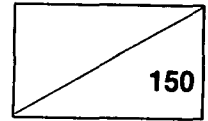


GOVP 12007938

최 종
연구보고서

GA0125-9907



고부가가치 입체특이적 식품소재 지방산 에스테르화합물 개발에 관한 연구

Development of Stereo-or Regiospecific Fatty
Acids Ester Compound Using Lipases

연 구 기 관
한국식품개발연구원

농 립 부



제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 “고부가가치 입체특이적 식품소재 지방산에스테르화합물 개발에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 권 대 영

책임 연구원 : 윤 석 후

연구 원 : 양 혜 정

연구 원 : 홍 윤 정

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 김 우 연

연구 보조원 : 김 진 환

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 경 현

연구 보조원 : 김 규 래

여 백

요 약 문

I. 제 목

고부가가치 입체특이적 식품소재 지방산에스테르화합물 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

21세기에는 기술적 우위에 근거한 농수산물로부터 고부가가치 식품소재 개발에 식품산업과 농업의 발전의 열쇠가 주어졌다. WTO체제하에서 국경 없는 경쟁사회에서는 오로지 21세기 첨단기술개발만이 살길이다. 값싼 입체 이성질체 혼합물에서 값비싼 입체이성질체의 선택적 분리는 식품 산업의 고부가가치 창조의 기술이다. 따라서 본 연구에서는 입체특이성이 우수한 리파제를 이용하여 입체특이적 지방산 에스테르화합물 식품소재 생산기술을 개발하고자 한다. 그러므로 입체특이적 지방산에스테르 등을 생산하는데는 리파제를 이용한 생물변환기술이 최적합인데, 이에 우수한 리파제를 개발하는 것과 우수한 반응조건을 구비하는 것이 핵심 기술이다. 지질의 분해, 즉 유지의 가수분해, 에스테르분해를 효과적으로 촉매하는 리파제는 요즈음 고부가가치 식품성분의 합성가능성 때문에 산업적으로 중요성을 인정받고 있다. 산업적으로 이용되는 효소시장의 비율 protease와 carbohydrase의 뒤를 잇는 시장수요를 갖는 주요 효소이다. 광범위한 기질 특이성(substrate specificity)을 보유하는 리파제를 이용하는 연구는 오래전부터 이루어져 왔고, 주요 이용분야로 치즈의 숙성이라든가 변형된 트리글리세라이드를 제조하는 반응에 쓰이고 있으며, mild한 조건에서 가수분해를 가능하게 하는 합성 중간산물의 반응에도 쓰이고 있다. 또한 리파제가 높은 선택성의 입체특이성(enantiomeric specificity)을 갖는 점은 고부가가치 산업에의 이용을 밝게 하고 있다. 리파제를 이용하여 식품재료로서의 신기능성을 갖는 지질식품에 관한 연구는 주로 광범위한 기질특이성을 이용한 지방산의 길이

(length)나 불포화도 (unsaturation)의 변화에 초점이 맞추어져 왔다. 최근 단백질 공학적연구를 통하여 새로운 신기능성 효소의 개발이 수행되고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

핵심 연구내용은 고부가가치 입체특이적 식품소재 지방산에스테르화합물 생산에 필요한 리파제의 탐색, 선발, 동정 및 발현, 선발 리파제의 변형 및 입체특이성 활성화도 개선, 입체특이성 지질의 생합성 반응 조건 확립, 지질식품소재 (ester 결합식품)의 고순도 분리, 정제기술 확립이다. 이에 따른 단계적인 연구 범위는 다음과 같다.

1. 입체특이성이 우수한 리파제의 선정 및 분석 시스템 개발

에난치오메릭특이성 우수리파제 분리

우수 진핵세포 리파제 선발 및 리파제 cDNA 클로닝

지방산에스테르 입체특이성 분석법개발

리파제 효소반응계 설계

2. 입체특이적 리파제의 구조 분석 및 리파제 반응시스템 개발

Conformation 변화에 의한 특이성 개선

선발리파제의 특성(우수성) 연구

리파제 발현시스템 탐색

생물반응기 설계, 최적화

리파제 결정화 조건 screening 확립

3. 입체특이적 리파제의 생산 및 시제품 생산

Site directed mutagenesis에 의한 리파제 mutant 개발 및 발현

효소생산 및 발효기술

지질소재(에스테르) 시제품 생산

생물반응기 운전 최적화

3차구조 및 계면활성 구조 분석 및 Mutant lipase 설계

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

고부가가치 입체특이적 식품소재 지방산에스테르화합물 개발하기 위하여 먼저 고부가가치 지방산 에스테르 화합물을 선정하였다. 선정된 지방산에스테르 화합물은 2-methylbutanoic acid ethylester였다. 이 화합물은 식품향으로써 사과향을 나타내는 물질로써 보통 racemic 형태로는 약간의 butyric acid 냄새가 나는 데 (S)-2-methylbutanoic acid ethylester만이 강한 사과향을 나타내고 있다. 물론 이물질을 생산하기 위한 기질인 2-methylbutanoic acid는 butyric acid 냄새를 내고 있었다. 따라서 리파제의 입체특이성을 이용하여 저급인 2-methylbutanoic acid로부터 가격이 100이상 비싼 (S)-2-methylbutanoic acid ethylester를 생산하는 연구는 매우 큰 부가가치를 높이는 연구가 되었다.

이와 같은 부가가치가 높은 연구결과를 수행하려면 입체특이성이 강한 리파제 즉 racemic 2-methylbutanoic acid로부터 (S)-2-methylbutanoic acid ethylester를 생산하는 특이 리파제를 탐색하는 과정이 매우 중요하다. 따라서 20여 종류의 상업적 리파제를 검색한 결과 *Aspergillus niger* 리파제가 가장 enantiomeric selectivity가 높았으며 enantiomeric excess (ee)는 67% 정도였다. 이 결과를 바탕으로 *Aspergillus niger* 리파제를 이용하여 순수 분리와 순수분리된 리파제의 conformation 분석을 시도하였다. 여러 가지 column chromatography를 통한 순수분리한 후 순수도를 LC-MS를 통하여 확인하였고 SDS-electrophoresis 결과 분자량은 66,000 dalton 정도였고 CD (circular dichroism) 분석에 의한 conformation 측정결과 전형적인 helix folding 구조를 보여주지 못하였다. Yang's program으로 conformation을 측정한 결과 α -helix 구조가 33.8%, β -sheet 구조가 0.1%, β -turn 구조가 34.8% 그리고 random

coil 구조가 34.4%로 β -turn 구조가 상당히 많았다.

리파제를 분리 후 conformation 변형에 의한 입체 특이성 증진 실험을 시도한 결과 유사체인 (S)-2-methylbutanoic amine과 (R)-2-methylbutanoic amine과 같은 입체특이적 이성질체로 conformation 변화를 유도한 결과 enantiomeric selectivity가 증가하지 않았으나 competitive inhibitor인 (S)-와 (R)-2-methylbutanoic amide로 conformation을 유도한 결과 (R)-amide는 입체 특이성이 증가하지 않고 오히려 감소하였으나 (S)-2-methylbutanoic amide로 conformation을 유도한 경우 현저히 enantiomeric selectivity가 증가하였다.

동시에 이 inhibitor를 화학적으로 합성하여 inhibitor에 의한 리파제의 반응 kinetics를 연구한 결과 competitive inhibition 역할을 하는 것으로 보아 inhibitor가 기질 중 (S)-isomer만 특이적 binding을 유도하는 것으로 보았다.

이러한 연구 결과를 토대로 선발된 리파제에 의한 고부가가치 지방산에스테르 화합물의 합성 반응기를 설계하였으며 아울러 합성물의 추출시스템을 개발하였다. 리파제 반응시스템은 비수계유기용매 시스템에서만 합성반응이 가능하였으며 특히 반응 수율을 올리기 위하여 silica gel로 수분을 제거하는 것이 효과적이었다. 정제시스템은 molecular distillation 가장 적합하였으며 반응기에 직접 연결하여 사용하였다. 다만 이 정제 시스템은 기질인 acid와 결합물인 ester와의 분류만 가능하지 (S)-지방산에스테르와 (R)-지방산에스테르의 선택적 분리는 가능하지 않았다. 생성한 지방산 에스테르 시제품을 숙련된 관능평가요원으로부터 분석한 결과 매우 향기성분이 우수한 것으로 판명되었다. 또한 중앙대에서 탐색한 리파제 생산균주를 이용하여 리파제 생산 연구를 시도한 결과 발효조건이 log phase 후반 부분에서 리파제 생성량이 가장 많았다.

효소적으로 입체특이적 화합물을 합성하기 위해서는 에스테르화 반응에서 입체특이성을 가지는 리파제가 요구된다. 이러한 리파제를 다양한 생물체로부터 얻기 위해서 리파제 유전자들의 클로닝이 필요하다. 이러한 클로닝에 PCR을 이용하는 것이 일반적이지만, 리파제의 경우는 다른 종들 사이에 상동성이 낮아 이 방법을 사용할 수가 없으므로 cDNA 라이브러리에서 리파제 역가를 가

지는 클론을 phagemid 상태로 클로닝하는 방법을 이용하였다. 이용한 cDNA 라이브러리로는 rice cDNA 라이브러리, *Aspergillus nidulans* cDNA 라이브러리, *Aspergillus fumigatus* cDNA 라이브러리가었으며 rice 라이브러리와 *Aspergillus* cDNA 라이브러리에서 리파제 유전자를 가지는 클론을 얻을 수 있었다. 이 중에서 이용가능한 상태로 얻을 수 있는 *Aspergillus nidulans*의 A-22, N-30B, N-53을 기질이 포함된 역가 측정 agar plate에서 역가를 조사한 결과, tributyrin을 녹이며 올리브유를 분해하여 로다민 존재하에 UV 상에서 형광을 나타내는 리파제임을 확인하였다.

상기의 3종류 균으로부터의 추출물과 펠렛 모두 agar plate 상의 tributyrin 과 올리브유를 녹이는 역가를 보였지만, 추출물의 역가가 더 높았다. 세 가지 추출물을 7.5% 폴리아크릴아마이드 전기 영동 후에 겔을 기질을 포함한 agar plate에 올려 놓은 후 37 °C에서 하룻밤 두었다. tributyrin agar plate에서는 투명한 밴드가 나타났고 올리브유/로다민 agar plate에서는 형광 밴드를 보여 이 물질이 단백질이며 리파제임을 보여주었다. 따라서 *Aspergillus nidulans* cDNA 라이브러리에서 3 종류의 리파제 유전자가 클로닝되었다.

대장균에서 pET 벡터를 이용하여 리파제를 대량발현하기 위하여 세 유전자의 DNA 염기서열을 결정한 결과, A-22 유전자는 N-30B의 일부로서 동일한 유전자이며 N-53은 다른 유전자임이 밝혀졌다. N-30B 유전자는 polyA를 제외하고 1016 bp이고 212개 아미노산으로 구성된 단백질이며 N-말단에 28개 아미노산의 signal peptide를 가지고 있다. 이는 기질에 대해 입체특이성을 가진 *Fusarium solani*의 lipolytic cutinase와 상동성이 높았다. N-30B 유전자는 124와 128번째 아미노산 사이에 Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly motif를 가져 lipase의 consensus 서열인 Gly-His/Tyr-Ser-X-Gly와 일치함을 알 수 있었다.

Fusarium solani cutinase의 disulfide bond를 환원시키면 역가가 사라지고 대장균의 세포질이 환원된 상태이므로, PCR 반응을 이용하여 signal sequence를 포함하는 N-53 유전자를 pET28a의 대량발현 vector에 subcloning하였다. 이를 BL21pLysS 균에 형질전환하고 배양하면서 IPTG 처리하여 N-30B

lipolytic enzyme을 대량발현하였으며 His-affinity column에서 정제하였다. 약 23 kDa의 단백질이 대량발현되어 정제되었으며 1 l의 대장균 배양액으로부터 1 단계의 정제공정을 거쳐 약 80% 순도를 가지는 50 mg의 lipolytic cutinase를 얻을 수 있었다.

이 효소는 tributyrin과 올리브유를 녹이며 *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl laurate, and *p*-nitrophenyl palmitate를 다른 정도로 분해하여 리파제 계열임이 확인되었으며 *Fusarium* lipolytic cutinase가 합성반응 역가를 보인다는 보고에 따라 (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester를 합성하는 역가를 여러 유기용매에서 조사하였으나 역가가 나타나지는 않았다. 이는 이 효소가 다른 에스터화합물 합성에는 이용될 수 있으나 조사한 유기용매와 반응조건에서는 (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester를 합성하는 역가를 보이지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 역가를 변화시키고자 N-30B/pET28a의 784, 785, 786번 nucleotide CTC (Leu)를 AAC (Asn)로 치환하는 *in vitro* mutagenesis 결과, 단백질은 생성되나 기존의 분해역가도 사라져 이 leucine이 역가에 중요함을 알 수 있었다. *p*-nitrophenyl butyrate를 기질로 사용하였을 경우 이 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 9와 50 °C이었다. tributyrin과 올리브유를 녹이는 N-53 리파제는 기존 발표된 리파제와 상동성을 가지지 않은 새로운 리파제이다. N-30B 및 N-53 리파제의 대량발현은 앞으로 이 두 효소의 기질에 대한 입체특이성 조사에 기여할 것이다.

고부가가치 입체특이성 이성질체를 합성하는 lipase 효소의 단백질 공학적 접근을 통해 최적의 기질특이성 및 입체특이성을 갖는 효소의 디자인 및 개발을 추진하려는 연구의 목적을 위해서, 우선 기존에 알려진 lipase의 3차구조를 이용하여 모델링 (modeling)을 수행하고 유전자 변이유발 (site-directed mutagenesis)에 필요한 아미노산 잔기의 선택을 유도하고자 하였다. 기존에 클로닝 되어진 *Pseudomonas fluorescens* lipase의 발현을 통하여 inclusion body로 생성되었고, solubilization과 refolding를 시도하였다. 여러 가지 가능한 refolding 조건과 기술을 확립하였고, 이중에서도 SEPROS (size exclusion

protein chromatography refolding system) 방법이 refolding을 시도한 여러 방법중 가장 효과적인 방법임을 확인하였다. 분리정제를 통하여 95% 순수분리 하였으며, 고농도로 제조된 효소의 결정화 조건을 탐색하였고, circular dichroism 및 fluorescence를 이용한 2차구조의 분석, 그리고 calcium ion에 의한 단백질 구조의 안정성 및 기능의 상관관계를 fluorescence를 이용하여 분석한 점은 단백질 구조연구에 대한 성과를 얻었다고 판단된다.

본 연구 결과는 직접적으로 식품에서 여러 방면에서 활용되고 있는 고부가가치 입체이성질체 지방산 에스테르 소재를 여태껏 사용되지 않은 방법인 자연적인 방법으로 직접 생산할 수 있는 가능성을 확보해 주었다. 이 방법은 고부가가치 식품향의 정확한 시장분석과 수출시장 분석 및 기술 및 시설투자분석을 병행하여 면밀히 검토 조사한 후 국제 경쟁력이 있는 상품으로 개발하고자 할 때 대기업 중심으로 접촉하여 고부가가치 입체특이적 지방산 에스테르 생산할 때 활용하고자 한다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Development of Stereo- or Regiospecific Fatty Acids Ester Compound
Using Lipases

II. Specific Aims and Significances

Lipases are recognized as an important industrial biomaterials for their modification of fats which includes the hydrolysis of lipids, esterification, and especially ester synthesis. World market for industrial lipases has followed that of protease and carbohydrase. Lipases have a wide substrate specificity, enantiomeric specificity and their application in the market has been considered for the past decades. They have been used for cheese maturation, medium chain synthesis and synthesis of modified triglycerides. In addition, lipase has a high stereospecificity of which the property is utilized for making highly valued products such as apple flavor or enantiomer of fatty acid esters. In order to make new functional lipid foods, research on lipases has been concentrated on a wide substrate specificity, in particular, on a modification of the length and the extent of unsaturation of fatty acids. In coming new millenium, new value added products will be produced with the development of biotechnology to cope with the international open market such as WTO and New Round. The high value added product like as (S)-2-methylbutanoic acid ethylester was produced using lipases in organic solvent system using high enantiomeric selectivity of lipases.

III. Research Range and Scope

1. Screening of enantioselective lipase and analysis of enantiomeric selectivity
 - Screening of enantiomeric selective lipase
 - Screening of stereospecific lipase genes
 - Cloning of cDNA lipase
 - Development of assay methods for enantiomeric selectivity
 - Screening of reaction system of synthesis of fatty acid ester
 - Database search and modeling of specific enzyme structure

2. Structural analysis of lipase and bioreaction system
 - Conformation change for improve enantiomeric selectivity
 - Characteristics of lipase for synthesis
 - Development of overexpression systems for the lipases.
 - Reactor design
 - Screening of crystallization conditions of PFL

3. Optimization for production and lipase production
 - Selection of amino acid residues for their site-directed mutagenesis
 - Production conditions for lipase production
 - Synthesis of value additive fatty acid ester
 - Optimization for lipase reaction
 - Structural work of PFL

IV. Results and Opinions

Lipase screening, lipase purification and production of enantiomeric esters

Enantiomeric selective (S)-2-methylbutanoic acid ester was screened as a

high value added fatty acid ester, which was apple and strawberry flavor. Only (S)-form has a flavor characteristics, the natural flavors are produced limitedly because of high cost for production as well as the difficulty in separating the active form from the enantiomeric mixture. Therefore, most of commercialized flavors are artificial products. Thus the development of these high value added flavors with highly enantiomeric purity has been spot-lighted as a new research field in food technology.

Using the commercial enzymes, enantiomeric selective synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methylester, which is known as major apple and strawberry flavor, was performed from the racemic mixture-2-methylbutanoic acid using lipases in organic solvent. Among twenty lipases, Lipase IM 20 (immobilized lipase of *Rhizomucor miehei*), Lipase AP (*Aspergillus niger*) and Lipase FAP-15 (*Aspergillus javanicus*) exhibited higher enzymatic activities and enantioselectivities and were selected for the synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methylester. Using these enzymes, the reaction conditions such as temperature, lyophilizing pH were optimized and kinetic parameters were determined. All the reactions were performed in isoctane, which was identified as the best reaction media for non-aqueous system. At 20°C maximum enantiomeric excess was observed, while synthetic activity increased as the temperature increased. Lipases only lyophilized at pH 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0 showed the synthetic activity. At this pH range, enantioselectivities were not influenced by the lyophilizing pH. The $K_{M,S}$ and $K_{M,R}$ values for ester synthetic activity of lipase were 1120 mM and 1240 mM, respectively. Enzyme activity was inhibited by (S)-2-methylbutanoic amide and its K_i was calculated as 84 mM. (S)-2-Methylbutanoic amide acted as a competitive inhibitor. Using this enantiomeric competitive inhibitor, enantiomeric selectivity was

increased with 40% by molecular imprinting of lipase by lyophilization of lipase with the this ligand.

Lipase was purified with ion exchange chromatography, gel filtration and HPLC. The molecular weight of lipase was 66,000 daltons, their structural conformation determined by circular dichroism (CD) was 33.8 % of α -helix, 0.1 % of β -sheet, 34.8% of β -turn and 34.4 % of random coil. The modified conformation of lipase by ligand was not detected by CD. Using this reactor system, lipase reactor for the synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid ethylester was designed and optimized the reactor system. In addition, distillation system for purifying the products was developed to remove the by products. However, (R)-form of products was not separated by molecular distillation, although, residual substrate (2-methylbutanoic acids) was removed. The produced was identified as a high value added products and favorite natural flavors which was detected by organoleptic panel test. With this development of technology for enantiomeric selective products, lipase producing microorganism was screened for our own organism in next section.

Screening of stereospecific lipase genes and development of overexpression systems for the lipases.

To synthesize the stereospecific compounds enzymatically, it is necessary to obtain the lipases, which show stereospecificity in the esterification reaction. Phagemids containing lipase genes could be screened from cDNA libraries using chromogenic lipid substrates in the agar plate instead of using PCR method. In order to clone lipases, we have tried to screen genes for lipolytic enzymes from rice cDNA library and two *Aspergillus* cDNA libraries, i.e. the libraries for *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*.

Only three colonies named A-22, N-53 and N-30B from *Aspergillus nidulans* cDNA library showed tributyrin-hydrolyzing activities and orange fluorescent halos under the 366 nm UV light after 48 hr of incubation on the agar plate containing olive oil and rhodamine B.

Both the extracts and pellets of the above three cells could hydrolyze tributyrin in the agar plate. In the case of the olive oil agar plate, the cell extracts showed more intense fluorescent halos than the cell pellets. Extracts from N-53, N-30B, and A-22 cells were electrophoresed in 7.5% native polyacrylamide gel. Gels were run at 4 °C and overlaid overnight at 37 °C on the tributyrin agar plate and the agar plate containing olive oil and rhodamine B for the lipolytic enzyme activity print. Bands showing clear zones and fluorescent zones were observed. These results clearly indicate that the fluorescence in the agar plate was caused by the enzymes separated in the polyacrylamide gel. So three candidate lipolytic enzyme genes were obtained from *Aspergillus nidulans* cDNA library.

DNA sequencing for the three genes was carried out to subclone each lipase gene into a pET vector to over-express them in *E. coli*. It was found that A-22 gene is part of N-30, which is lipolytic enzyme, and N-53 is different from A-22 and N-30B genes. The N-30B cDNA is 1016 bp in length without poly A tail and has an open reading frame encoding cutinase of 212 amino acids. The lipolytic enzyme contains a putative signal sequence of 28 amino acid residues at N-terminus. It is interesting that this lipolytic enzyme, which has been reported to be a stereospecific lipolytic enzyme in the case of *Fusarium solani*, has the Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly motif between 124 and 128 amino acid residues, which matches the consensus sequence (Gly-His/Tyr-Ser-X-Gly) commonly present in lipases.

Because the reduction of the disulfide bridge of the *Fusarium solani*

lipase results in the complete inactivation of the enzyme and cytoplasm of *E. coli* is in more reduced state than periplasm. PCR was carried out using B2 primer and S2 primer, which covers the whole lipase coding sequences including the signal peptide. The PCR product was subcloned into pET 28a over-expression vector. BL21pLysS was transformed with the pET28a containing the whole lipase coding region and grown for over-productin of the N-30 B lipolytic enzyme. For the purification of the expressed lipase, the cell extract was chromatographed on the His-affinity column. Approximately 23 kDa protein was over-expressed and purified. Fifty mg of 80% pure *Aspergillus nidulans* lipase could be obtained from 1 l culture of *E. coli* after one-step purification.

N-30 B lipolytic cutinase could hydrolyze the tributyrin, olive oil, *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl laurate, and *p*-nitrophenyl palmitate to different degrees, whereas it did not show esterification activity for (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester in some organic solvents tested. Optimum pH and temperature of the lipase for *p*-nitrophenyl butyrate were pH 9 and 50 °C, respectively. N-53 B lipolytic enzyme, which has no amino acid sequence homology with any lipase reported, also could hydrolyze olive oil as well as tributyrin. The over-expression of the N-30B and N-53 lipolytic enzyme may provide a means to characterization of the substrate stereospecificity of these two enzymes in the future.

Structural analysis and engineering of lipases for a new function including interfacial activation

Here we have worked on structural aspects of triglyceride-hydrolyzing lipase for optimization of its substrate specificity as well as stereospecificity,

resulting in making possible the protein engineering of the enzyme for a new enzyme design. First, we built a three-dimensional structure model of lipase from a known lipase database and selected plausible amino acid residues for their site-directed mutagenesis. Next, we acquired *Pseudomonas fluorescens* lipase(PFL) cloned in *Escherichia coli*, which is over-expressed in high amounts but as an inclusion body in the cell. In order to purify and obtain a high concentration of PFL, we tried to solubilize and refold the inclusion body form of PFL. SEPROS(size exclusion protein chromatography refolding system) was finally found to obtain at best high concentration of PFL. From the purified PFL, we obtained structural results of the enzyme. Particularly, the secondary structure of PFL was analyzed and the structural stability was enhanced in the presence of calcium ions, which is essential for the enzyme activity.

In conclusion, using the development technology, high value added enantiomeric fatty acid ester as a natural flavor can be produced as a commercial products, for this further efforts will be concentrated to disseminate the technology into the industry. Major market of this products should be a USA and Japan.

여 백

CONTENTS

Chapter I. Introduction	35
1. Specific Aims of Significance	35
1.1. Research backgrounds	35
1.2. Significance of research	36
1.3. State of arts for the related technology	37
Chapter II. Materials and Methods	41
1. Lipase Purification and Production of fatty Acid Esters	41
1.1. Database and information search	41
1.2. Selection of fatty acid ester	41
1.3. Enzyme reaction system for the synthetic reaction	42
1.4. Lipase screening for enantiomeric selectivity	42
1.5. Development of enantioselective analysis	43
1.6. Purification of lipase	49
1.7. Conformational studies and improve of lipase selectivity by conformational change	54
1.8. Characteristics of lipase and development of lipase reactor	56
1.9. Production of fatty acid esters	59
1.10. Lipase production from microorganism	60
2. Screening of stereospecific lipase genes and development of overexpression systems for the lipases.	61
2.1. Screening of lipase gene	61
2.2. Isolation of lipase gene and identification	62
2.3. Lipase cloning	63

2.4. Overexpression of lipase	65
2.5. Lipase purification and production	67
3. Lipase Refolding and Engineering for Interfacial Activation	69
3.1. Database analysis	69
3.2. Refolding of expressed lipase and purification	69
3.3. Screening of lipase crystallization conditions	72
3.4. Stability studies of expressed lipase	73
Chapter III. Results and Discussion	75
1. Lipase Purification and Production of fatty Acid Esters	75
1.1. Database and information search	75
1.2. Selection of value-added fatty acid ester	75
1.3. Reaction system for lipase catalyzed synthetic reaction	76
1.4. Lipase screening for high enantiomeric selectivity	76
1.5. Method for enantioselective analysis	77
1.6. Purification of lipase	80
1.7. Conformational structures and improvement of lipase selectivity	88
1.8. Characteristics of lipase and development of lipase reactor	107
1.9. Production of fatty acid esters	118
1.10. Lipase production	122
2. Screening of stereospecific lipase genes and development of overexpression systems for the lipases.	125
2.1. Screening of lipase gene	126
2.2. Isolation of lipase gene and identification	131
2.3. Cloning of lipase expression	152

2.4. Overexpression of lipase and reaction characteristics	182
3. Structural analysis and engineering of lipases for a new function including interfacial activation	190
3.1. Database analysis	190
3.2. Purification of inclusion body lipase	192
3.3. Purification of lipase and its refolding study	194
3.4. Screening of lipase crystallization conditions and stabilization study	212
3.5. Results and application	214
References	223
Appendices	237

여 백

목 차

제 1장 서론	35
제 1절 연구필요성	35
제 1항 연구배경	35
제 2항 연구개발의 필요성	36
제 3항 기술개발 현황	37
제 2장 재료 및 방법	41
제 1절 리파제의 분리 및 구조규명 및 지질식품소재 생산기술 개발	41
제 1항 기술정보 수집 및 전문가 협의	41
제 2항 지방산 에스테르 화합물 선정	41
제 3항 리파제의 효소반응계 설계	42
제 4항 에난치오메릭 특이성 우수 리파제 탐색	42
제 5항 지방산에스테르 입체특이성 분석법 개발	43
제 6항 리파제의 분리	49
제 7항 리파제의 conformation 측정과 conformation 변형에 따른 입체 특이성 증가	54
제 8항 선발리파제 특성 및 생물반응기 설계 및 최적화	56
제 9항 합성 입체특이적 지방산 에스테르 생산	59
제10항 리파제의 생산 연구	60
제 2절 리파제유전자의 탐색 및 리파제 발현시스템 개발	61
제 1항 리파제 유전자 탐색	61
제 2항 리파제 유전자의 분리 및 확인	62
제 3항 리파제의 클로닝	63

제 4항 리파제의 대량발현	65
제 5항 리파제의 정제 및 생산	67
제 3절 리파제의 refolding 및 계면활성 구조 분석	69
제 1항 단백질 Data Base 탐색 및 자료 수집	69
제 2항 발현된 Lipase의 분리 및 정제 및 refolding 연구	69
제 3항 효소의 결정화 조건 screening	72
제 4항 리파제의 안정성 연구	73
제 3장 결과 및 고찰	75
제 1절 리파제 분리 및 구조규명과 지질식품소재 생산 기술	75
제 1항 기술정보의 수집 및 전문가 협의	75
제 2항 지방산에스테르 화합물선정	75
제 3항 리파제 효소반응계 설계	76
제 4항 특이성 우수 리파제 탐색	76
제 5항 지방산 에스테르 입체특이성 분석법 개발	77
제 6항 리파제의 분리	80
제 7항 리파제 conformation과 변형	88
제 8항 선발리파제 반응특성 및 생물반응기 설계 및 최적화	107
제 9항 입체특이적 지방산 에스테르 생산	118
제10항 리파제의 생산 연구	122
제 2절 입체특이적 리파제의 발현시스템 개발	125
제 1항 리파제 유전자 탐색	125
제 2항 리파제유전자의 분리 및 확인	131
제 3항 리파제 유전자 클로닝	152
제 4항 발현리파제의 반응특성	182

제 3절 리파제의 refolding 연구와 계면활성 구조 연구	190
제 1항 단백질 정보수집	190
제 2항 Inclusion body 리파제 분리	192
제 3항 리파제의 분리정제 및 Refolding 연구	194
제 4항 리파제 효소의 결정화 조건 및 구조안정화 연구	212
제 5항 결과 및 논의	214
 참고문헌	 223
 부록	 237

여 백

List of Figures

Figure 1. GC chromatogram of enantiomers of 2-methylbutanoic acid methylester	44
Figure 2. The HPLC chromatogram of oleic acid, diolein, triolein	47
Figure 3. Lipase purification step	51
Figure 4. HPLC electron density in various oleic acid concentration	53
Figure 5. GC Chromatogram of stereoisomers of (R),(S)-2-methylbutanoic acid methylester produced by lipase from (±)-2-methylbutanoic acid	58
Figure 6. The comparison activity of crude lipase and lipases which were treated with alcohol and acid	81
Figure 7. The effect of 2-propanol concentration on the lipase activity and protein yield	82
Figure 8. Gel filtration of lipase from <i>Aspergillus niger</i> with Bio-Gel P-100	84
Figure 9. Lipase activity of each lipase fractions which were purified with Bio-Gel P-100 column	85
Figure 10. HPLC purification of lipase which was purified with ion-exchange HPLC column (protein wax)	86
Figure 11. Lipase activity of each lipase fractions which were purified with ion-exchange column	87
Figure 12. HPLC purification of lipase which was purified with reverse phase column (Vydac C ₁₈ column)	89
Figure 13. The chromatogram of purified lipase obtained from peptide sequencer	90
Figure 14. Circular dichroism spectrum of lipase which was purified with ion- exchange HPLC column	95
Figure 15. Circular dichroism spectrum of lipase which was purified with reverse phase HPLC column	96
Figure 16. Effect of temperature on the conformational structure of purified lipase	97
Figure 17. Effect of temperature on the conformational structure of purified lipase	98

Figure 18. Temperature profile of lipase activity and enantioselectivity for (S)- MBE synthesis by lipase FAP-15 in isooctane	99
Figure 19. The change of conformational structure of lipase on pH	101
Figure 20. The change of conformational structure of lipase on pH	102
Figure 21. HPLC Chromatogram of (S)-2-methylbutanoic amide after synthesis from methylbutanoic acid	105
Figure 22. Mass spectrum of synthesized (S)-2-methylbutanoic amide	106
Figure 23. The optimized system for ester synthesis reaction	110
Figure 24. Time course of stereoisomers of fatty acid ester synthesis of lipase in isooctane from the 2-(±)-methylbutanoic acid	111
Figure 25. (S)-Methylbutanoic acid methyl ester produced during the inhibition reaction of lipase by methylbutanoic amide	114
Figure 26. The Lineweaver-Burk plot of lipase inhibition by (S)-methyl-butanoic amide	119
Figure 27. The molecular distillation kit	121
Figure 28. Changes in cell population (CFU/ml) and p-nitrophenyl production activity of <i>Aspergillus niger</i> during aerobic incubation	123
Figure 29. A, Mass excision using ExAssist™ helper phage selection; B, ZAP Express functional regions	126
Figure 30. The screening of <i>E. coli</i> for lipase activity. Arrows indicate the colonies containing the lipase-inserted pBluescript	128
Figure 31. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes	129
Figure 32. Fluorescence photograph of SOLR cells harboring the pBluescript plasmid	130
Figure 33. Fluorescence photograph of RL, which is Y1089 cell harboring λ gt11 containing a rice lipase gene	132
Figure 34. Formation of a clear halo on tributyrin LB agar media by RL strain	133
Figure 35. SDS-polyacrylamide gel electro- phoresis of a putative lipase polypeptide induced by IPTG	135
Figure 36. PCR amplification of the rice lipase inserted into a λ gt11 in Y1089	136

Figure 37. Fluorescence photograph of NL1, NL2, <i>Pseudomonas cepacia</i> 2475, and <i>Pseudomonas fragi</i> 2345 on the rhodamine assay agar plate	137
Figure 38. Digestion of A-22 plasmid containing a lipolytic enzyme gene with <i>EcoRI</i> and <i>XhoI</i>	139
Figure 39. Digestion of N-30B plasmid containing a lipolytic enzyme gene with <i>EcoRI</i> and <i>XhoI</i>	141
Figure 40. Digestion of N-53 plasmid containing a lipolytic enzyme gene with <i>EcoRI</i> and <i>XhoI</i>	142
Figure 41. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes	144
Figure 42. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing olive oil and rhodamine B by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes	145
Figure 43. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing tributyrin	146
Figure 44. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing olive oil and rhodamine B	148
Figure 45. DNA sequence of A-22 inserted in pBluescript	149
Figure 46. DNA sequence of N-30B inserted in pBluescript	150
Figure 47. DNA sequence of N-53 inserted in pBluescript	151
Figure 48. Subcloning of N-53, N-30B, A-22 inserted in pBluescript into pET32b	153
Figure 49. Fluorescence photograph of pLysS cell harboring pET32b plasmid containing A-22 insert	154
Figure 50. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the polypeptide expressed in the pLysS cells harboring pET32b plasmid containing A-22 lipolytic enzyme gene	155
Figure 51. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert	157

Figure 52. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing rhodamine and olive oil by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert	158
Figure 53. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert	159
Figure 54. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing N-30B insert	160
Figure 55. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing rhodamine and olive oil by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert	161
Figure 56. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing N-30B insert	162
Figure 57. Nucleotide sequence of an <i>Aspergillus nidulans</i> cutinase gene	164
Figure 58. Similar regions of the N-30B nucleotide sequence to others	165
Figure 59. Similar regions of the N-30B amino acid sequence to others	166
Figure 60. Alignment of cutinase amino acid sequences	168
Figure 61. Amino acid sequence of the N-30B	169
Figure 62. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B1S1-N30B gene	170
Figure 63. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B2S1-N30B gene	172
Figure 64. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cutinase (B2S1-N30B) at various stages of purification procedure	173
Figure 65. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by cutinase (B2S1-N30B) at various stages of purification procedure	174
Figure 66. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B3S1-N30B gene	176

Figure 67. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cutinase (B3S1-N30B) at various stages of purification procedure	177
Figure 68. Schematic representation of the plasmid pET28a-N30B	178
Figure 69. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the cutinase (B2S2-N30B) at various stages of purification procedure ..	180
Figure 70. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cutinase (B2S2-N30B) at various stages of purification procedure	181
Figure 71. Lipolytic activities of N-30B cutinase depending on substrates.	184
Figure 72. Effect of pH on the lipolytic activity of N-30B cutinase	185
Figure 73. Effect of temperature on the lipolytic activity of N-30B cutinase	186
Figure 74. Temperature stability of N-30B cutinase	187
Figure 75. N-53 DNA and amino acid sequences	189
Figure 76. The elution profile of lipase using DEAE-Sepharose CL-6B	195
Figure 77. The elution profile of SAM-DC	198
Figure 78. The elution profile of lipase purified by DEAE-Sepharose CL-6B	199
Figure 79. The elution profile of lipase purified by Superdex 75 FPLC	200
Figure 80. SDS-PAGE of Soluble lipase at various stages of purification procedure	201
Figure 81. SDS-PAGE analysis of lipase fractions from SEPROS	203
Figure 82. Ion-exchange chromatography elution profile using DEAE-Sepharose CL-6B	206
Figure 83. SDS-PAGE analysis of fractions after DEAE chromatography	207
Figure 84. The first gel filtration FPLC	208
Figure 85. Anion-exchange FPLC elution profile using Mono-Q	209
Figure 86. Final Gel filtration FPLC using Superdex 200	210
Figure 87. SDS-PAGE analysis of each purification step	211
Figure 88. Molar ellipticity of renatured lipase on circular dichroism	215
Figure 89. Denaturation plots of PFL in the presence and absence of calcium ions	217
Figure 90. The effect of calcium ions on PFL	218

여 백

List of Tables

Table 1. Analytical conditions for separation of (S)-and (R)-2-methyl-butanoic acid methylester using gas chromatography	45
Table 2. Enantioselectivities for various lipases in synthesizing the (S)-MBE in organic solvent	78
Table 3. Purification steps of lipase and their characteristics of each step purified lipase	92
Table 4. The results of secondary structure estimation of purified lipase with circular dichroism	94
Table 5. The changes of enantiomeric specificity of lipase treated by amine	103
Table 6. Improvement of enantiomeric excess by lipase whose conformation was changed competitive inhibitor in organic solvent	108
Table 7. Three dimensional structure of lipases	191
Table 8. Optimal conditions for lipase refolding at high concentration	196
Table 9. Comparison between the yields from the dilution and SEPROS. ...	204
Table 10. Summary of the purification of refolded lipases	213
Table 11. The results of secondary structure estimation of lipase with circular dichroism in the presence and absence of calcium ions	216

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구필요성

제1항 연구배경

현대사회에서는 생활수준의 향상으로 인하여 많은 국민이 고열량식품 특히 지질식품을 과다 섭취하는 식생활습관으로 인해 성인성 질환 등의 발생이 심각한 문제로 대두되었으며 식생활이 국민 건강에 미치는 영향이 지대하다. 지방질 식품 중에서 지방산 에스테르 화합물질(지방산이나 다른 유기산 에스테르화합물) 중에도 입체특이성에 따라서 높은 부가가치를 갖는 것들이 있는데 이들은 특수식 원료, 유화제, 천연 식품향료 등으로 중요하게 사용되고 있다.

이러한 입체특이성이 높은 부가가치 지방산 에스테르를 생산하는 방법은 화학적합성이나 효소적 합성 방법을 생각할 수 있으나 화학적인 방법은 특이적 입체이성질체 생산 과정 중에 racemization이 일어날 확률이 높아 적합하지 않다. 따라서 이러한 고부가가치 입체이성질체 합성에는 효소적 생산 방법이 응용 될 수 있다.

그러나 입체특이성이 강한 효소가 많이 알려져 있지 않아서 효소적인 합성에 제한적인 요소로 작용하고 있다. 따라서 이러한 입체특이적 효소를 찾는 것은 매우 중요하며 또한 입체특이성이 증가된 효소의 개발이 새로운 고부가가치 지방산 에스테르 개발에 매우 중요하다. 이와 같은 새로운 기능의 효소개발은 산업화에 중요한 위치를 차지하여 왔으며 효소의 높은 효율성과 더불어 효소 그 자체가 첨단 산업의 상품으로 될 것이다. 생물학적 기술의 발달로 효소 작용을 다양화시키고 적용범위를 확대시킬 수 있을 것으로 본다.

기존에 사용된 단백질의 화학적 변형 방법은 변형위치가 임의적이므로 효소의 특이성을 증진시키는 데 부족하여 리파제를 이용하여 입체특이적 지방산

에스테르 등을 생산할 수 있을 것으로 본다. 따라서 우수한 리파제를 개발하는 것과 우수한 반응조건을 구비하는 것이 핵심 기술이다.

제2항 연구개발의 필요성

우리 나라는 그 동안 농산물 그 자체를 식품소재로 이용하여 왔으나 WTO 체제의 개방경제 체제하에서는 고부가가치 식품소재의 개발만이 국제경쟁력에서 살아남을 수 있다. 이러한 고부가가치 식품소재를 개발하려면 고부가가치 식품소재 생산기술 개발이 급선무이다. 이러한 측면에서 값싼 입체이성질체 혼합물에서 고순도의 고가 입체이성질체의 선택적 분리는 식품 산업의 고부가가치 창조의 핵심기술이다. 동시에 이 기술은 효소의 특이성을 이용하므로 반응 부산물을 최대한 줄일 수 있으며 기존의 유기화학적 합성에 의한 생산물보다 순도를 높임으로써 값비싼 제품을 생산할 수 있고 사람이 먹었을 때 생리적 부작용을 막을 수 있다. 이미 선진 산업사회에서는 고기능성 식품의 소재개발과 이의 응용기술에 특허권을 보유함으로써 자국의 기술보호를 이루고 있는 실정이다.

입체이성질체 지방산을 선별적으로 분리할 수 있는 효소를 탐색하고 이들 효소의 입체이성특이성을 증진하는 연구는 기초연구 및 특수 성능의 효소개발이라는 산업적 측면에서 필요로 하는 첨단기술이다. 국내에서 수행 개발되어온 식품관련 효소 개발기술은 유전자 클로닝에 의한 효소의 발현, 분리, 발효조건 등의 연구에 국한되어 왔다. 앞으로는 유전자공학, 효소공학, 생물공학 등의 첨단 생명공학기술의 상부상조적인 성격을 갖는 연구로서 기술 집약을 통한 핵심기술의 자립화를 꾀하여야 할 것으로 본다.

선진국이 고도의 분자생물학, 식품화학, 식품가공학 기술에 의거하여 고부가가치 지방산에스테르 화합물 식품소재를 개발하여 가공식품을 생산 판매한다면 우리 나라의 식품회사는 이에 경쟁력을 잃게 되며 결과적으로 식품원료를 생산하는 농민이 영향을 받게되므로 이를 극복하기 위해 본 연구를 수행하였으

며, 새로운 지질식품소재 개발에 기존의 figure 이외에 새로운 source로 식물 리파제를 이용하였다.

이와 같이 효소에 의한 고부가가치 기능성 지방산에스터 소재를 생산할 수 있는 기술개발을 통하여, 신기능성 식품 선도물질을 공급할 수 있게 되어 수입 대체 효과를 올릴 수 있으며 국내 식품소재의 부가가치를 높이고 WTO에 대비한 국내의 신기능성 식품산업의 국제경쟁력을 키우고 수출 전략상품으로 개발할 수 있다. 본 기술은 궁극적으로 입체특이적 리파제의 이용으로 고가의 지방산에스테르화합물 식품소재를 개발하여 국내 농축산물의 부가가치를 높여 WTO에 대응할 수 있는 기술을 개발하였으며, 이러한 생산기술 및 새로운 리파제의 확보로 외부와의 국제경쟁에서 대응이 가능할 뿐 아니라 생산제품의 국제 경쟁력을 높여 결과적으로 우리 농업을 보호할 수 있을 것으로 본다.

제3항 기술개발 현황

리파제의 특성 및 지질의 분해, 즉 트리글리세라이드나 콜레스테롤 에스테르의 분해반응을 촉매하는 리파제 (lipase)는 인간의 위나 췌장 (pancreas)으로부터 분비되는 것 외에, 세균 및 곰팡이를 포함하는 많은 미생물에서 발견되고 있다. 효소의 크기는 발견되는 생물의 종에 따라 25,000에서 55,000의 범위를 갖고 있다. 리파제는 에스터 결합분해에 특이적으로 작용하는 점 외에, 다른 수용성 효소들과는 달리 물층과 기름층 사이의 interface에 결합되어야 활성이 증가하는 소위 interfacial activation을 보이는 점이 특징이다.

유지의 가수분해, 에스테르분해 및 합성반응을 효과적으로 촉매하는 점은 산업적으로 중요성을 인정받고 있다. 리파제는 산업적으로 이용되는 효소시장의 비율 중 protease와 carbohydrase의 뒤를 잇는 시장수요를 갖는 주요 효소이다. 특히 리파제가 산업적으로 이용되기 시작한 역사가 이 두 효소들에 비해 짧은 점, 그리고 이용되는 범위가 훨씬 더 다양하다는 점에서 미래 효소시장에서

의 리파제가 갖는 산업적 잠재력은 크다고 하겠다. 광범위한 기질 특이성 (substrate specificity)을 보유하는 리파제를 이용하는 연구는 오래 전부터 이루어져 왔고, 주요 이용분야로 치즈의 숙성이라든가 변형된 트리글리세라이드를 제조하는 반응에 쓰이고 있으며, mild한 조건에서 가수분해를 가능하게 하는 합성 중간산물의 반응에도 쓰이고 있다. 또한 리파제가 높은 선택성의 입체특이성 (stereospecificity)을 갖는 점은 고부가가치 산업에의 이용을 밝게 하고 있다. 리파제를 이용하여 식품재료로서의 신기능성을 갖는 지질식품에 관한 연구는 주로 광범위한 기질특이성을 이용한 지방산의 길이(length)나 불포화도 (unsaturation)의 변화에 초점이 맞추어져 왔다.

트리글리세라이드 결합을 분해하는 리파제 효소의 단백질 공학적 접근을 통해 최적의 기질특이성 및 입체특이성을 갖는 효소의 디자인 및 개발을 추진하려는 연구의 목적을 위해서, 우선 기존에 알려진 리파제의 3차구조를 이용하여 모델링(modeling)을 수행하고 유전자 변이유발(site-directed mutagenesis)에 필요한 아미노산 잔기의 선택을 유도하고자 하였다. 기존에 클로닝 되어진 *Pseudomonas fluorescens* 리파제를 높은 농도와 순도의 조건으로 효소를 분리, 정제한 다음, X-선 회절법으로 high resolution의 자료를 제공하는 결정을 얻기 위한 최적조건을 확립하고자 하였다. 효소의 3차구조의 분석을 위한 자료수집과 위상결정을 또한 수행함으로써 리파제의 3차구조의 분석에 필요한 연구를 수행하였다.

리파제의 광범위한 기질 특이성(substrate specificity)과 높은 에난치오 특이성 (enantiospecificity)을 보유하는 변종(variant)을 제조하려는 노력은 화학공업 분야에서 시작되었다(Faber, 1992). 즉, 인공적인 에스테르류 화합물을 입체 특이적으로 반응시킴으로써 순수 입체이성질체 에스테르 화합물이나 이의 선도 물질의 생산이 가능하게 되었다. 이에 따라 제약산업에서의 적용이 가능하게 되었고 제약회사들은 독자적으로 차세대 입체특이적 신약개발에 박차를 가하고 있다. 예를 들어 *Candida rugosa*로부터 얻은 리파제의 변이를 통해 ketoprofen ester를 입체특이적으로 가수분해함으로써 더욱 효과적인 non-steroidal

anti-inflammatory drug(NSAID)을 개발하는 연구가 진행되고 있다(Wu et al., 1990). 입체특이적 효소의 반응 생성물은 약효가 훨씬 높고 부작용이 적기 때문에 미국 FDA(food and drug administration)에서는 몇몇 제약에 대하여 향후 입체 이성질체의 도입을 검토하고 있는 추세이다.

입체 특이성이 높은 리파제를 screening하기 위하여 이제까지 사용되어온 화학적 지식으로는, 2차 알코올(secondary alcohol)이나 카복실산(carboxylic acid)의 경우 입체중심에 결합되어 있는 치환그룹(subsistent)의 크기에 따라 리파제의 입체특이성이 변한다는 것이다. 1990년 들어와서 밝혀지기 시작한 리파제의 3차구조적 연구결과는 (Brady et al., 1990; Martinez et al., 1992; Noble et al., 1993; Derewenda et al., 1994) 입체 특이성에 대한 반응기작의 구조적 해석뿐만 아니라 독특한 반응에 적용시킬 수 있는 리파제의 인공적인 변이까지 가능하게 하고 있다. 특히 *Candida rugosa*의 경우, 전이상태 유사물 (transition state analog)이 결합된 활성부위의 구조를 통해 acyl group에 대한 선택성과 각 탄소위치에 대한 입체 특이성의 연구가 가능하게 되었다(Holmberg et al., 1991).

외국에서의 경우 이미 특정 리파제의 screening이 많이 연구되어 있는 이유 때문에, 주로 미생물에서의 리파제 검색이 이루어져 왔다. 리파제에 관하여 아직 많이 연구되지 않은 *Pseudomonas*로부터 효소를 분리해 내는 노력이 있어 왔고 최근 *Pseudomonas fluorescence*에서의 효소를 찾아내어 대량생산하는 길이 열렸다(Lee et al., 1993). 이 효소는 100 °C 에서 90%의 활성을 감소시키는데 무려 50분의 시간을 요하는 강한 열안정성을 보유하는 일반적 특성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다(Adams and Brawley, 1981). 이미 리파제의 유전자 조작을 통하여 주로는 열안정성을 갖는 효소변종의 개발에 연구가 진행되고 있으며, 한국 식품개발연구원과 전주 우석대 및 두산기술원의 산학연으로 기질특이성을 갖는 리파제의 탐색 및 개량연구를 수행해 오고 있다. 또한 위치특이성이나 지방산 특이성이 있는 리파제를 생산하는 미생물의 스크리닝, 돌연변이나 유전자조작을 통한 활성증대 그리고 이러한 효소의 대량생산에 관한 연구가 진

행되고 있다(Cho and Yoon, 1992). 열안정성을 보유한 *Pseudomonas fluorescence* lipase의 단백질 공학적 연구를 수행함으로써 단기적으로는 생물물리학적 접근을 통하여 구조적 정보를 얻고 장기적으로는 단백질 공학적 연구를 통한 새로운 효소 혹은 산업용 신소재의 개발은 국제경쟁사회에서 꼭 필요한 연구이다. 영국의 식품연구소 (Institute of Food Technology, Reading & Norwich)를 중심으로 리파제의 발현시스템을 갖추기 위한 연구가 진행되고 있고, 더욱이 본 연구의 1,2차년도에서 지적했듯이 이 리파제도 interfacial activation에 의하여 활성화되는 결과를 보여주고 있는 데 리파제의 interfacial 상에서 interfacial activation에 대하여 많은 연구를 하는 것으로 알려졌다. (Vulfson & Brooker)

제 2 장 재 료 및 방 법

제1절 리파제의 분리 및 구조규명 및 지질식품소재 생산 기술 개발

제1항 기술정보 수집 및 전문가 협의

FSTA, Chemical Abstract 등 문헌정보검색시스템을 이용하여 리파제의 응용연구관련 논문과 입체특이적 응용관련 자료를 조사하였다. 모든 데이터 분석은 protein data bank 시스템을 이용하여 자료를 확보하였으며 이 시스템을 이용하여 정보를 교환하였다.

관련자료 및 본 연구 및 다른 연구결과를 종합하여 판단할 때 본 연구에 활용 가능한 리파제의 반응시스템으로 유기용매내반응 (비수계반응, non-aqueous system)과 reversed micelle 시스템을 포함한 미수계 (microaqueous reaction system)로 결론지어 예비 실험을 통하여 확정하였다.

리파제와 관련된 연구를 외국유명 전문과학자 (미국 MIT의 화학과 Klibanov 박사와 영국 식품연구소 (IFR), Biotransformation 부장인 Vulfson 박사)와 연구진행방향을 협의하였다.

미수계 내에서의 반응에 관하여는 Klibanov박사와 반응기작에 관하여 많은 정보를 교환하였으며 리파제의 분리 및 발현시스템에 관하여는 Vulfson박사와 협의하여 상호 교류를 통하여 정보교환 및 기술교환을 이루어 냈다.

제2항 지방산 에스테르 화합물 선정

현재 문헌과 시장조사 결과를 통하여 각종의 mono-glyceride, diglyceride 등과 각각의 지방산에스테르 화합물을 조사하였다. 이들 중에서 입체특이적 특성에 따라 부가가치가 높고 낮음이 결정되는 것은 알콜 지방산에스터를 조사하

였다. 즉 지방산에 알콜이 에스터 결합을 하여 생긴 입체특이적 이성질체에 따라 식품으로써 활용가치의 차이가 나고 이에 따라 부가가치에 크게 차이가 남을 조사하였다. 따라서 이를 중심으로 리파제에 의한 합성방법을 연구하고자 한다.

이와 같이 리파제에 의한 첨단합성기술이 개발된다면 다른 물질로의 응용은 큰 문제가 되지 않으므로 우선 이 기술개발에 중점을 두고자 한다.

제3항 리파제의 효소반응계 설계

여러 가지 반응 시스템 중 지금까지 연구결과에 따른 선택인 비수계유기용매시스템 (non-aqueous organic solvent system)과 미수계반응시스템 (micro-aqueous system)을 각각 결정하여 리파제에 의한 에스테르화합물을 합성할 수 있는지 여부를 실험하였다. 미수계는 유기용매나 리파제에서 물을 제거하기 위하여 molecular sieve를 이용하여 유기용매의 물을 제거하였으며, 리파제의 물은 동결건조하여 물을 제거하였다. 미수계 반응은 reverse micelle system과 물을 제거하지 않은 상태의 유기용매시스템을 사용하였다.

예비 실험결과 미수계는 에스터결합이 전혀 일어나지 않았으므로 미수계 반응시스템을 이용하기로 결정하였다. 따라서 본 반응시스템은 각종 리파제를 동결건조하여 수분을 제거하고, 유기용매는 molecular sieve를 이용하여 용매내에 있는 물을 제거한 다음 지방산과 알콜을 유기용매내에 녹인 다음, 리파제를 첨가하여 10초동안 sonication한 다음 지방산 에스테르를 합성하였다. 반응조건은 rotary shaker를 이용하여 (100 rpm) 37 °C에서 반응시켰다.

제4항 에난치오메릭 특이성 우수 리파제 탐색

현재 상업적 또는 비상업적으로 구할 수 있는 20여 종류의 리파제 중에서 일단 지방산 에스테르 합성력이 강한 리파제를 선정한 다음 입체특이적 지방산 에스테르 화합물을 생산할 수 있는 리파제를 입체특이성을 다음에 언급한 GC

에 의하여 분석함으로써 입체특이성이 강한 리파제를 선정하였다. 사용한 리파제는 Amano회사(Nagoya, Japan)에서 구입한 *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus javanicus*, *Penicillium roueforti*, *Rhizopus delemar*, *Humicola lanuginosa*, *Penicillium cyclopium*, *Pseudomonas*. sp. *Candida rugosa*이며 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 *Candida cylindracea*, pancreatic lipase, Toyo Jozo에서 구입한 *Chromobacterium viscosum*, Meito Sankyo에서 구입한 Lipase MY, *Candida rugosa* 그리고 Novo에서 구입한 Lipozyme (immobilized lipase from *Rhizopus miehei*)이다.

제5항 지방산에스테르 입체특이성 분석법 개발

1. 입체이성질체 에스테르화합물 분리

원칙적으로 합성하고자 하는 대상물질에 따라 각각 분리방법이 다르다. 여기서는 지방산알콜 에스테르화합물 중 입체특이적인 isomer (또는 에난치오머)를 GC를 이용하여 분리하였다 (Figure 1). HP5890 series II의 GC를 이용하였으며 사용한 칼럼은 superchiral capillary column (0.25 i.d. (mm), 30 m length, Alltech, USA) 이며 FID detector (220℃)를 이용하여 에스테르화합물을 검출하였다. 온도는 40℃에서부터 gradient를 걸어 올렸다. Flow rate는 1ml이고 split ratio는 50 : 1로 조절하였다 (Table 1).

2. 리파제의 입체특이성 반응활성도 측정방법 개발

지방산에스테르의 종류와 필요에 따라 입체특이적 특성을 잴 수 있는 방법을 개발 개선하였다. 본 연구에서는 리파제의 입체특이적 활성도는 앞서 언급한 바와 같이 입체특이성 합성과정 중 나타나는 화합물인 2-methylbutanoic ethylester의 stereoisomer를 앞서 개발한 입체특이성 지방산에스테르화합물 분리 방법인 chiral GC column을 이용한 분리방법으로 (Figure 1) 각각 측정하였다.

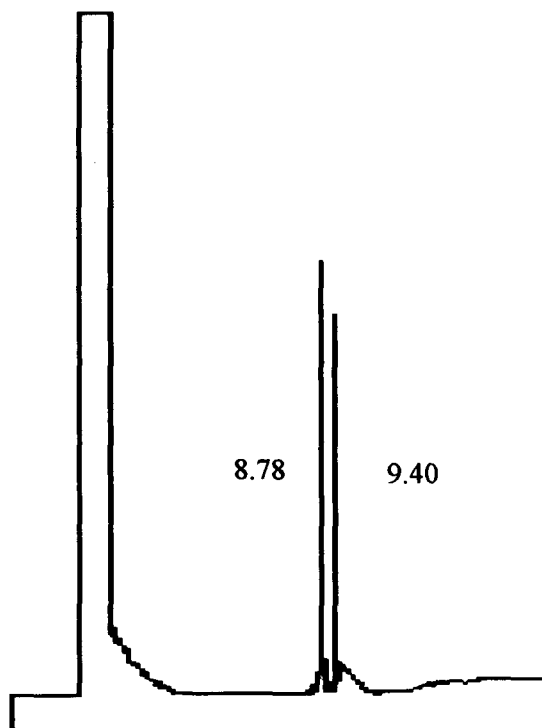


Figure 1. GC chromatogram of enantiomers of 2-methyl butanoic acid methylester. 8.78 (R)-2-MBE, 9.40 (S)-2-MBE

Table 1. Analytical conditions for separation of (S)-and (R)-2-methyl
-butanoic acid methylester using gas chromatography

GC model	Hewlett Packard 5890 Series I
Column	Alltech ChiralDEX G-TA Capillary Column : 30m x 0.25mm i.d. x 0.125 μ film
Detector	FID
Temperature	Injector : 200 $^{\circ}$ C Detector : 220 $^{\circ}$ C
Column temperature	Initial : 40 $^{\circ}$ C for 4 min Final temp.(I) : 53 $^{\circ}$ C for 0.1 min Rate(I) : 2 $^{\circ}$ C/min Final temp.(II) : 140 $^{\circ}$ C for 4 min Rate(II) : 30 $^{\circ}$ C/min
Carrier gas	Helium : 50ml/min with split Split ratio : 50:1
Inject sample	0.4 μ l
Chart speed	0.2 cm/min

3. 리파제의 반응활성도 측정방법 및 개선

지방산에스터의 종류와 필요에 따라 입체특이적 특성을 쥘 수 있는 방법을 개발 개선하여야 한다. 본 연구에서는 리파제의 입체특이적 활성도는 앞서 언급한 바와 같이 입체특이성 합성과정 중 나타나는 stereoisomer를 앞서 개발한 GC를 이용한 분리방법으로 (Figure 1) 각각 측정하였다.

또한 리파제의 반응활성도 측정법은 에멀전법, cupric acetate 이용법, pH stat 이용법, reverse micelle 법 등 여러 가지 방법이 있으나, 여기서는 HPLC를 이용하여 분해활성도를 측정하였다 (Figure 2). 이 방법의 장점은 분해과정 중 중간산물인 diglyceride, monoglyceride의 생성과정을 추적할 수 있는 장점이 있어서 본 연구에 활용하였다. HPLC 분석과정 중 detector는 RI와 UV를 동시에 이용하여 측정하였으며 HPLC system은 JASCO HPLC system이다. 이 때 사용한 기질인 지방은 triolein이며 리파제의 역가는 분해반응 중에 나타나는 분해활성도 (생성된 diolein, monoolein 및 oleic acid를 측정)를 추적함으로써 측정하였다. (Figure 2)

리파제의 활성도를 측정하는 반응조건은 다음과 같다. 리파제의 활성도 측정은 에멀전을 만들어 분석하였다. 20mM phosphate buffer(pH 7.0)에 효소를 녹이고, triolein은 쉽게 산화하고 빛에 민감하므로 실험 전 질소 가스로 충전된 시험관과 buffer를 사용하도록 한다. Triolein과 단백질 농도를 측정된 효소액을 50mM phosphate buffer(pH 5.8)에 녹인다. 37°C circulator에 sample을 넣고 1시간 30분 동안 반응시킨다. 반응 후 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 triolein층에서 약 5 μ l씩 분리해 195 μ l의 acetone에 녹여 Vydac C₁₈ column을 이용해 HPLC로 분석하였다. 유동상은 acetonitrile : acetone = 1 : 1 (v/v)이며 리파제 분해활성도 1unit는 분해된 1 μ mol oleic acid/min/ml로 정의하였다. 분리정제 중의 리파제의 specific activity는 리파제 용액 1ml이 생성하는 oleic acid 생성량을 micromole 단위로 측정하여 계산하였다. 위에서 언급한 반응조건 하에서 생성된 oleic acid를 측정하여 계산하였다. 생성된 oleic acid 농도는 206

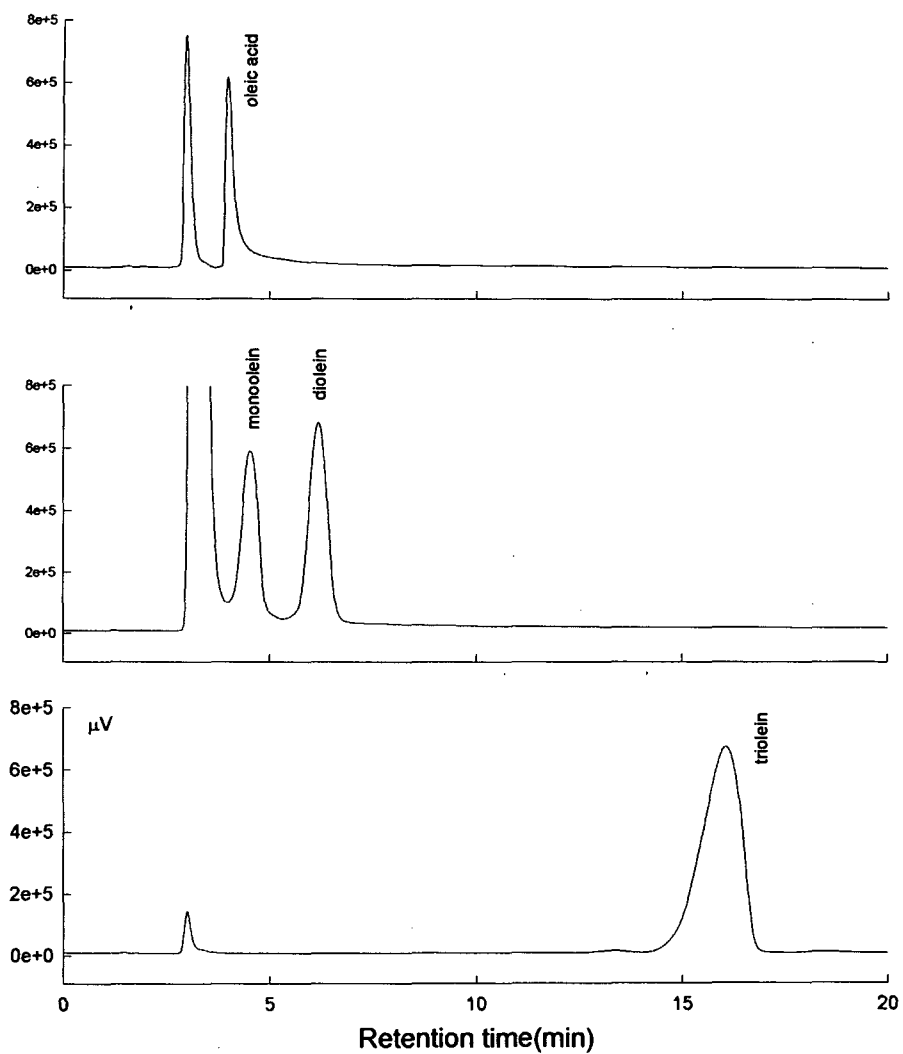


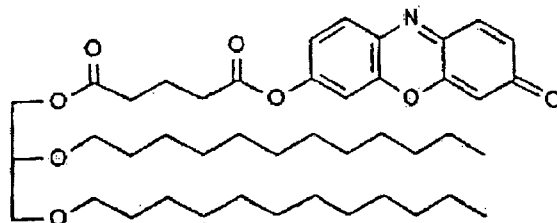
Figure 2. The HPLC chromatogram of oleic acid, diolein, triolein.

nm에서의 흡광도를 HPLC 상의 detector 의 electron density를 측정하여 표준 곡선 에서 환산하여 계산하였다.

4. 리파제의 계면활성 유무 측정방법

리파제의 반응특성은 interface에서 계면활성 (interfacial activation)이 일어나야만 non-polar한 지방을 분해하거나 다른 반응을 하는 것이다. 이 반응은 interfacial activation을 일으키지 않고도 분해가 가능한 에스터라제 (esterase)의 반응과 크게 다르다. 동시에 리파제는 interfacial activation을 일으키지 않고도 짧은 지방산으로 된 (tributylin)을 분해하기도 한다. 그러나 에스터라제는 tributyrin은 분해가 가능하여도 긴 지방산으로 된 지방은 분해할 수 없다.

리파제가 계면활성 유무를 측정하기 위하여 계면활성이 잘 일어나지 않아도 분해작용이 일어나는 p-nitrophenylbutyrate를 인공기질로하여 분해작용을 측정하였고, interfacial activation이 일어나야만 하는 인공기질로는 resorufin (1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-resorufin ester)을 구입하여 사용하였다. 에스터라제나 리파제가 p-nitrophenylbutyrate를 분해할 경우 nitrophenyl과 butyric acid의 에스터 결합을 끊어주어 p-nitrophenyl ($\lambda_{max} = 405\text{nm}$)기를 생성하므로 405nm에서 흡광도성도들을 측정하여 활 계산하였다. p-nitrophenylbutyrate를 acetonitrile에 녹인(10mM) 후 이 기질 10 μl 를 990 μl 의 효소용액(효소를 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0, 6% ethanol)) 첨가 후 반응도를 잰다. 또한 interfacial activation이 일어나는 경우는 resorufin을 인공기질로 하여 여부를 확인한다. Resorufin은 다음과 같은 구조를 하고 있



어서 리파제의 계면활성이 일어나야만 상당히 비극성인 기질이 분해되어 먼저 glutaric acid-resorufin 에스터가 생성된 다음 이는 다시 resorufin ($\lambda_{\max} = 572\text{nm}$) 되므로 spectrophotometer에서 바로 측정할 수 있다. 반응조건은 이 기질을 dioxane-Thesit (Boehringer Mannheim) 용액 1: 1에 녹인 다음 pH 6.8 (0.1 M phosphate buffer) 용액에서 리파제를 반응시켜 반응 초기속도 (initial velocity)를 재어 측정하였다. 리파제의 1 unit는 1 μmol 의 p-mitrophenyl과 resorufin을 생성할 때의 효소활성도를 말한다.

제6항 리파제의 분리

1. 단백질 침전

입체특이성이 가장 높은 *Aspergillus niger* 리파제(연구 결과란에 후술)를 이용하여 순수분리를 시도하였다. 먼저 칼럼을 걸기 전에 전처리 방법으로 단백질을 침전시키기 위하여 여러 가지 방법을 시도하여 처리하였다. 즉 2-propanol (alcohol), ammonium sulfate, acid treatment (*Aspergillus niger* 리파제가 산에 강한 것으로 알려졌다으므로) 등을 처리하여 단백질을 침전시켜 1차 회수단백질량과 반응 활성도를 측정하였다. Ammonium sulfate는 10%에서부터 60%까지 조절하여 수행하였으며, isopropanol 농도도 10%에서 60%까지 증가시키면서 리파제의 반응 활성도를 측정하였다.

연구실험결과 2-propanol이 제일 분리수율이 높아서 *Aspergillus niger* 리파제를 Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 용해시켜 10,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상정액을 4°C에서 66% 2-propanol로 한 방울씩 떨어뜨려 침전시켰다. 이를 다시 원심분리(10,000rpm, 10분)하여 pellet을 얻었다. 감압조건하에서 2-propanol을 제거한 후 다시 Tris-HCl (pH 7.0)에 용해시켰다. 계속적인 리파제의 분리는 ion exchange column이나 gel filtration column 더 나아가서 HPLC column (reversed phase나 ion exchange column을 이용)을 이용하여 초

순수 분리를 시도하였다. (Figure 3)

2. Bio-Gel P-100 column

2-Propanol 처리한 리파제를 gel permeation chromatography인 Bio-Gel P-100 column으로 분석하였다 (5x50cm, flow rate : 0.5ml/1min). 254nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 각각의 fraction들의 효소활성을 측정해보고 효소 활성을 보인 활성분액 (active fraction)을 desalting하여 동결건조시켰다. Bio-gel P-100 (1.8 x 60 cm)을 사용하였으며 elution buffer는 20 mM phosphate buffer (pH 7.5)이며 flow rate는 0.4 ml/min이고 detector는 uv detector (280 nm)를 사용하였으며 fraction size는 5ml이었다. 모든 실험은 효소의 작용을 방지하기 위하여 4°C에서 수행하였다.

3. Ion exchange HPLC column

앞에서 얻어진 리파제를 다시 Tris-HCl (pH 7.5)에 녹여 filtering 한 후 Protein Wax column (1x5cm, μ -Bondapak)을 이용하여 순수분리 하였다. 유동상으로는 A용액으로 25mM Tris-HCl buffer를, B 용액으로 0.5M NaCl in Tris-HCl buffer를 사용하였으며 처음 10분간은 A용액만을 흘려주고 30분간 B 용액이 100%가 되도록 flow gradient를 사용하였고 (flow rate : 2.5ml/min) 검출기는 UV detector를 사용하였다. 분리된 두 개의 fraction을 각각 탈염하여 동결건조 시켰다. Ion exchange column fraction을 바로 HPLCdp 분리를 시도하였으며 초 순수분리는 10°C로 column oven을 사용하여 조절하였다.

4. Reverse phase HPLC column

앞에서 분리된 각각의 fraction들을 protein C₄ column (Vydac, preparative, 10 micrometer, 10 mm x 25 cm)을 이용하여 분리하였다. 유동상으로 A용액은 0.11% TFA in water를, B 용액은 0.09% TFA in ACN로 flow gradient를 사용하였다(flow rate : 2.5ml/min). 처음 10분간은 A용액을 흘려주고 다시 40분

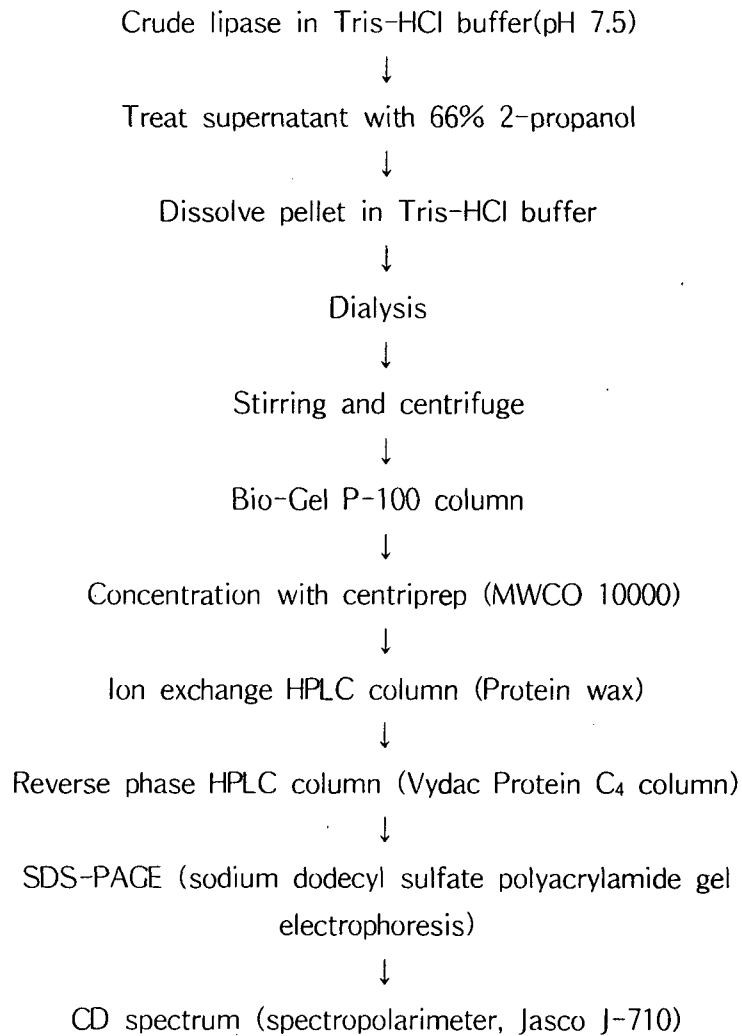


Figure 3. Purification step of lipase from *Aspegillus niger*

동안 B용액이 100%가 되도록 흘려준 후 다시 A용액을 10분간 흘려주었다. 각각의 fraction들을 Quick-vac concentrator로 유기용매를 제거하고 난 후 효소 활성도를 측정하고 SDS-PAGE를 걸어 본 뒤 동결건조시켜 보관하였다. HPLC system은 앞서 언급한바와 같이 Jasco system이었으며 column은 semi-preparative Vydac C₄ column (10 μm, 10 mm x 25 cm)을 사용하였으며 flow rate는 1ml/min이며 injection volume은 30 μl 이다. Detector는 semi-prep cell uv detector (280nm)이며 eluent로 A는 0.11 % TFA(trifluoro acetic acid) in H₂O이며, B는 0.09% TFA in acetonitrile 용액이다. 시간이 지남에 따라 100% A 용매에서 100% 용매 B로 1%/min으로 gradient를 걸어주면서 분리를 시도하였다.

5. 효소활성도 측정

분리정제 중의 리파제의 specific activity는 리파제 용액 1ml이 생성하는 oleic acid 생성량을 micromole 단위로 측정하여 계산하였다. 위에서 언급한 반응조건하에서 생성된 oleic acid를 측정하여 계산하였다. 생성된 oleic acid 농도는 206 nm에서의 흡광도를 HPLC 상의 detector 의 electron density를 측정하여 표준곡선 (Figure 4)에서 환산하여 계산하였다.

6. 단백질 정량 및 순도확인

1차분리한 다음 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 걸어 순도를 확인하기 PVDF membrane에 electroblotting하여 측정하였으며 분자량도 표준단백질을 maker로 사용하여 측정하였다. SDS-PAGE는 Phast system (Pharmacia, Sweden)을 사용하였으며 destaining은 Phast system에 부착되어 있는 자동화 시스템을 사용하여 자동적으로 destaining 하였다. PAGE gel을 바로 PVDF membrane (Sigma, MO)에 electroblotting 하여 바로 보관하거나 sequencing에 사용하였다.

Micro BCA protein assay kit(Pierce co.)를 이용하여 단백질을 정량하였다.

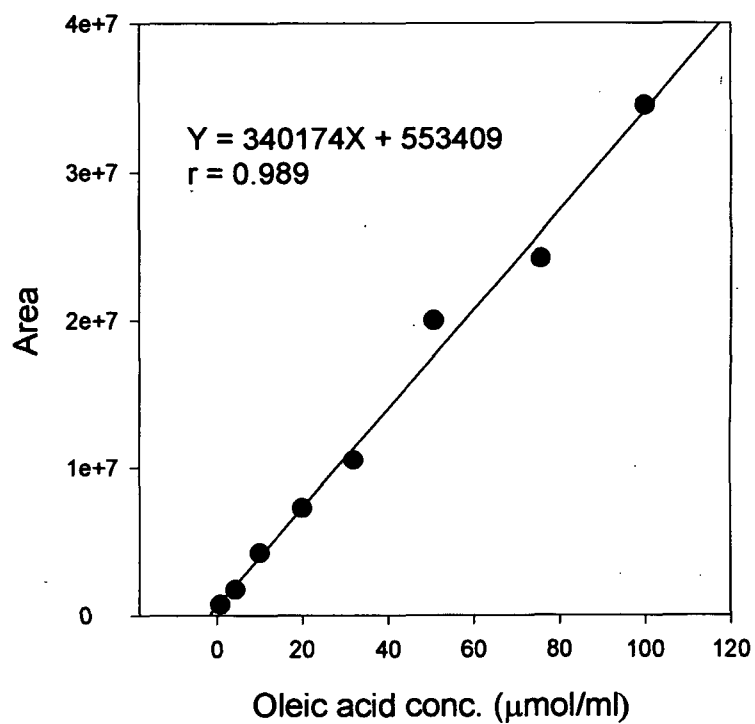


Figure 4. HPLC electron density in various oleic acid concentration.

반응액에 단백질을 넣고 60℃에서 30분간 반응시켜 582nm에서 흡광도를 측정하였다. BSA를 사용하여 Standard calibration curve를 만들었다.

제7항 리파제의 conformation 측정과 conformation 변형에 따른 입체특이성 증가

1. 리파제의 2차구조와 conformation 측정

리파제 2차 구조 측정이나 conformation 변화는 선광분광계 (spectropolarimeter, Jasco J710)에 의한 CD(circular dichroism)을 측정하여 조사하였다. 온도와 pH에 따른 구조변화를 측정하기 위해서 정제된 리파제를 HPLC용 water에 녹여 10mM 정도의 농도가 되도록 희석시킨 후 사용하였다.

구조변화에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해서 spectropolarimeter를 온도프로그램으로 4 - 100℃까지 온도를 변화시켜 가면서 (Jasco temperature controller, Peltier PTC-343) 190 - 250nm에서 circular dichroism spectrum을 측정하였다 (cell length : 0.1mm, sensitivity : 100mdeg, band width : 1.0nm, response : 1 sec). 동시에 pH의 영향을 알아보기 위해서 pH 2 - 6까지는 0.1N HCl을, pH 8 - 14까지는 0.1M NaOH를 사용하여 pH의 변화를 주었고 4℃에서 CD를 측정하였다.

2. 리파제의 conformation 변형

리파제의 변형은 주로 단백질의 conformation 변형을 통하여 enantiomeric specificity를 증가시키는 것으로 리파제를 기질의 stereoisomer와 비슷한 리간드를 리파제의 물 제거 과정인 동결건조기간에 incubation 시킨 다음 이들 리파제에 결합한 리간드를 동결건조 후 acetonitrile 등으로 washing 하여 제거한 후 이들의 입체특이성을 앞서 언급한 GC로 측정하였다. 우선 앞서 결정한 고부가가치 입체 이성질체를 2-methylbutanoic ethylester로 결정하였으므로 이 반응의 기질인 2-methylbutanoic acid를 지방산으로 하여 이들 에스터 결합을 합성

하는 과정에서 기질 2-(S)-methylbutanoic acid와 2-(R)-methylbutanoic acid의 유사체인 2-(S)-methylbutyric amine 과 2-(R)-methylbutyric amine과 2-(S)-methylbutanoic amide와 2-(R)-methylbutanoic amide를 리간드가 가장 적합한 리간드로 생각되나 amide는 commercial하게 공급되지 않으므로 우선 amine (Sigma)을 가지고 리파제의 변형을 시도하였다. 2-(S)-Methylbutanoic amide는 2-(S)-methylbutanoic acid로 부터 각각 화학합성하여 우선 각각의 amide를 제조한 후에 똑 같은 방법으로 리파제의 변형을 통하여 stereospecificity를 증가시켰다.

3. 기질유사체(amide) 합성 및 recrystallization

본 연구의 목적에 따르면 리파제의 conformation을 변화시킬 수 있는 강력한 ligand의 존재가 필요하다. 이 ligand는 수용액 상에서 리파제에 작용하여 그 conformation을 변화시키고 이것을 동결건조한 후 ligand를 제거해 주면 구조가 변형된 리파제를 얻을 수 있다. 그 ligand로써 적당한 것이 (S)-2-methylbutanoic amide인데 이 amide를 합성하는 방법은 다음과 같다.

Round bottom flask에 (S)-2-methylbutanoic acid를 넣고 약간의 DMF를 첨가했다. 환류냉각장치에 이 flask를 연결하고 냉각관을 통해서 SOCl_2 3-4ml를 첨가한 후 15-20분 동안 steam bath위에서 조심스럽게 데우고 이 용액을 상온으로 식힌 후 acid chloride를 첨가하면서 ice-cold concentrated NH_4OH 10ml에 천천히 부어주었다. 이렇게 해서 합성된 crude amide를 모은 후 alcohol, water로부터 recrystallization 시켰다. Recrystallization은 결정을 녹이거나 용해시켜 결정구조를 완전히 분해시킨 후 다시 결정을 형성하게 함으로써 불순물이 용액 속에 남아있게 하여 순도를 높이고자 하는 목적으로 실시하며 다음과 같은 과정을 행하였다. 합성한 amide를 buffer에 녹인 후 amide의 끓는점에서 용해시키고 녹지 않는 물질을 제거하기 위해 뜨거운 용액을 filtration하였다. 이를 온도를 낮추면서 결정을 형성시키고 표면에 떠오르는 용액은 제거하였다. 결정에 묻은 용액을 제거하기 위해 여러 번 씻어주고 건조시켰다.

4. 합성된 amide의 identification

위와 같은 방법으로 합성한 (S)-2-methylbutanoic amide는 HPLC, Mass spectrometry에 의해 분석되어졌다. Mass spectrometry는 Platform II Mass spectrometry(Micromass, Manchester, U.K.)를 사용하였고 Electrospray⁺ ionization 및 APcI⁺ (atmosphere pressure chemical ionization⁺) MS가 (S)-2-methylbutanoic amide를 분석하기 위해 각각 사용되었다. Mass range는 0~ 500 a.m.u.(dalton/e)에서 실시하였다. HPLC system은 Jasco PU-980 pumps, rheodyne injector, UV-975 detector, CO-965 column oven 등으로 구성되어 있었다. 선택한 column은 reverse phase C₁₈ column으로써 Kromasil (25mm x 4mm, AKZO NOBEL Co.)를 사용하였다.

제8항 선발리파제 특성 및 생물반응기 설계 및 최적화

1. Lipase에 의한 고부가가치 지방산에스테르 화합물 합성

고부가가치 지방산에스테르 화합물인 (S)-methylbutanoic acid methylester를 methylbutanoic acid로부터 합성하는 방법에는 두가지 방법이 있는데 하나는 화학적 반응이고 다른 하나는 효소적인 반응을 통해서이다. 화학적으로 methylbutanoic acid methylester를 생산할 경우 대부분 enantioselection이 없으므로 불가능하다. 따라서 Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입한 (S)-2-methylbutanoic acid를 가지고 화학적으로 (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester를 생성시켰다.

효소적인 반응은 본 연구 결과를 종합하여 비수계 유기용매 시스템에서 다음과 같은 과정을 실행하였다. Molecular sieve로 미리 물을 제거한 isooctane에 기질 (±)-2- methylbutanoic acid을 700mM 넣고 이 용액 1ml에 lipase 50mg 과 silica gel 50mg을 첨가하여 10초 동안 sonication시키고 여러 온도에서 교반 하면서 반응시켰다. 이 반응용액을 반응시간마다 GC syringe로 미량 취하여

GC로 반응활성도를 측정하였다. (Figure 5)

2. 입체특이성인 stereoselectivity 및 enantiomeric excess (EE)의 측정

Lipase의 입체특이성은 보통 stereoselectivity와 enantiomeric activity로 정의되는 데, 생성된 반응산물인 (S)- 와 (R)-methylbutanoic acid methylester의 함량을 GC를 이용하여 분석할 때 stereoselectivity는 $(k_{cat}/K_m)_s/(k_{cat}/K_m)_r$ 로 표시되고 (여기서 $(k_{cat}/K_m)_s$ 와 $(k_{cat}/K_m)_r$ 은 (S)-와 (R)-형의 반응동력학 상수이다), enantioselectivity를 나타내는 (S)-형 enantiomeric excess(EEs)는 다음과 같이 구하였다.

$$EEs (\%) = \frac{[S- MBE(\%) - R- MBE(\%)]}{[S- MBE(\%) + R- MBE(\%)]} \times 100$$

3. 반응 동력학

고부가가치 지방산에스테르 화합물을 유기용매내에서 (S)-methylbutanoic acid에 대한 반응동력학 상수 (k_{cat} , K_m)를 측정하기 위하여 기질의 농도를 30, 50, 80, 150, 300, 700, 1000, 1200, 1700 mM로 바꾸어 가면서 초기 반응속도를 측정하였다. 또한 여기서 Michaelis-Menten 곡선을 그린다음 이 곡선에서 double reciprocal plot (Liweaver-Burk plot)에서 유기용매에서의 반응동력학 상수 (k_{cat} , K_m)를 추정하였다.

4. 반응기의 최적화 연구

Lipase의 동결건조 pH에 따른 고부가가치 지방산 에스테르의 합성활성도와 입체특이성의 변화를 조사하기 위하여 *Aspergillus niger* 리파제의 stereospecificity의 변화를 pH 3, 4, 5, 5.5, 6.5, 7, 8, 9에 해당하는 완충용액 (0.05M)을 제조하였다. pH 3, 4, 5는 citrate buffer, pH 4.5, 5.5는 succinate buffer, pH 6, 6.5, 7, 8은 phosphate buffer, pH 8, 9는 tris buffer를 사용하였다.

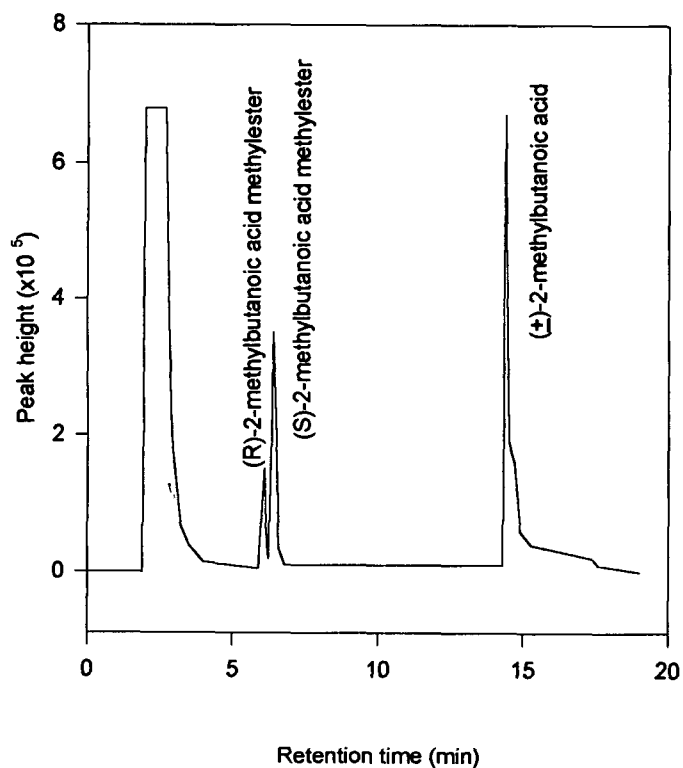


Figure 5. GC Chromatogram of stereoisomers of (R),(S)-2-methylbutanoic acid methylester produced by lipase from (±)-2-methylbutanoic acid. Reaction conditions; substrate concentration 700mM; lipase loading 50mg/1ml solvent; silica gel 50mg; shaking speed 200rpm; reaction temperature 25°C.

또한 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 °C에서의 각각 온도에서 리파제의 활성도와 enantiomeric excess (%)와 stereospecific activity를 조사하였다. 높은 온도에서 휘발되는 것을 막기 위하여 isooctane을 사용하였으며 철저히 봉합하였다. 반응과정 중 생성된 수분을 흡수하기 위하여 silica gel의 양에 따라 리파제의 활성도 변화를 조사하였다.

제9항 합성 입체특이적 지방산 에스테르 생산

1. 향기성분 분석

1) Racemic 지방산에스테르화합물의 향기특성

효소 반응 후 생긴 지방산 에스테르 화합물의 향기 특성을 확인하기 위하여 리파제에 의하여 합성 후 증류시켜 만든 racemic 지방산에스테르 화합물의 향기 특성을 관능검사로 확인하였다. 이때 패널은 20명이었다. 분석항목은 향기의 기호도, 무슨 향기성분 같은가, 등을 단순하게 물었다.

2) 고부가가치 (S)-지방산에스테르 화합물의 향기 특성

고부가가치 지방산에스테르 화합물인 (S)-methylbutanoic acid ethylester를 효소합성 후 증류하여 순수하게 다량 얻을 수 없으므로 직접 관능검사를 할 수 없었다. 따라서 앞서 언급한 방법대로 값비싼 기질인 (S)-methylbutanoic acid로부터 화학합성하여 소량 얻은 후에 관능검사를 실시하였다. 이 때 패널은 20명이었으며 똑 같은 질문을 하였다.

2. 합성지방산 에스테르의 정제

합성지방산에스테르와 기질(산)과의 분리 및 합성지방산중 (S)-와 (R)-형의 지방산에스테르의 분리를 분자증류시스템을 이용하여 분리를 시도하였다. 분자증류시스템은 Kontes. (Kimble Kotes, Vineland, NJ, USA)을 사용하였으며, boiling 온도는 heating mantle (영지과학, HMI-F500, 서울)을 이용하여 100°C로 유지

시켰다. 넘치는 것을 방지하기 위하여 boiling chip을 넣었다.

4. 생물반응기의 운전최적화

앞서 연구한 연구 결과를 종합하여 고부가가치 입체이성질체 지방산에스테를 생산하는 조건을 최적화 하였다. 즉 동결건조조건, 유기용매, 수분제거 조건, 반응조건 (온도 등)은 그대로 사용하였다. 다만 앞서 개발한 분자증류시스템을 reactor에 바로 부착하여 반응물을 분별증류를 시도하였다. 반응 중 반응액을 소량($10\ \mu\text{mol}$)을 채취하여 반응도를 계산하였다.

제10항 리파제의 생산 연구

1. 발효기술 개발

리파제는 중앙대에서 개발한 *Aspergillus nidulans*를 이용하였으며 배양배지로는 minimal broth davis without dextrose (Difco, Detroit, MI, USA)에 탄소원으로 에멀전화한 butyric acid를 첨가하여 사용하였다. 배양시간은 36시간이었으며, 배양조건은 pH 6.5, 온도 37°C 이며 리파제 활성도는 p-nitrophenyl butyrate를 기질로 하여 측정하였다. 미생물농도는 평판배양 후 형성된 집락을 계수하였다.

2. 효소 생산 기술

균주로부터 리파제를 추출한 후 효소 생산 기술은 앞서 본 연구에서 개발한 *Aspergillus niger* 리파제 분리정제 방법을 그대로 따랐다.

제2절 리파제유전자의 탐색 및 리파제 발현시스템 개발

제1항 리파제 유전자 탐색

1. Lambda ZAP cDNA library로부터 곰팡이 리파제 유전자 탐색

Rhodamine B는 lipase가 기질과 반응하여 나오는 free fatty acid와 반응하여 UV하에서 형광을 나타내는데, 이러한 원리에 의한 lipase gene을 selection하는 방법을 이용하였다. 먼저 *Aspergillus* lipase를 클로닝 한 후 이 방법으로 lipase gene을 확인하였다. *Aspergillus fumigatus*와 *Aspergillus nidulans* lambda Uni-ZAP cDNA library로부터 Chung 등 (1991)과 Kouker and Jaeger (1987)의 활성도발현 방법을 응용하여 lipase 유전자를 screening하였다.

XL1-Blue와 SOLR cell을 LB 배지에서 30 °C로 하룻밤 키웠다. 각각의 균을 원심분리하고 10 mM MgSO₄ 용액에 600 nm에서의 Absorbance 1.0으로 현탁하였다. 50 ml conical tube에 각각 *Aspergillus nidulans*와 *Aspergillus fumigatus* lambda Uni-ZAP cDNA library와 XL1-Blue cell을 1:10 (phage:cell) 비율로 혼합하고 여기에 amber mutant helper phage인 Exassist를 10:1 (helper phage:cell) 비율로 첨가하고 37 °C에서 15분간 phage가 흡착하도록 하였다. 여기에 20 ml의 LB 배지를 첨가하고 2-3 시간 동안 진탕하면서 배양한 후 70 °C로 15 분간 열처리하였다. 이를 원심분리한 후 상등액 1 µl에 SOLR cell 200 µl를 첨가하고 37 °C로 15 분간 정치하였다. 이 용액 100 µl를 0.01% rhodamine B, 0.1% olive oil, 0.01% TX-100이 포함된 LB/ampicillin plate에 도말하여 하룻밤 배양한 후 UV에서 형광을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 이러한 콜로니를 다시 0.001% rhodamine B, 0.5% olive oil, 0.1% gum arabic, 150 µg/ml ampicillin이 함유된 LB plate에 도말하여 하룻밤 배양한 후 UV에서 형광을 나타내는 콜로니를 선별하였다.

2. pBluescript에서의 리파제 insert 확인

Rescue된 pBluescript plasmid에 포함되어있는 DNA insert를 확인하기 위하여 각각의 콜로니를 LB/ampicillin 배지에서 하룻밤 키운 후 균을 1.5 ml tube에서 원심분리하여 얻은 후 STE buffer 300 μ l에 현탁하고 10 μ l lysozyme (10 mg/ml)를 첨가하고 끓는 물에 1 분간 처리하였다. 이의 원심분리 상등액에 1/2 volume의 10 M ammonium acetate와 2 volume의 에탄올을 첨가하고 -70 °C에서 10 분간 정치한 후 침전시켰다. 70% 에탄올을 세척 후 20 μ l 1X TE에 녹이고 RNase를 처리하였다. Lambda Uni-ZAP vector에서 library 제작시 이용한 제한효소들인 *EcoRI*과 *XhoI*을 동시에 사용하여 분리 pBluescript를 절단하고 1% agarose gel electrophoresis로 클로닝된 DNA insert의 크기를 확인하였다.

제2항 리파제 유전자의 분리 및 확인

1. Y1089 strain을 이용한 rice lipase 함유 λ gt11 분리

Y1089 cell을 37 °C에서 약 8시간 정도 키운 후 1 ml의 cell에 rice λ gt11 cDNA library 1 μ l를 infection 시켰다. 이를 42°C에서 약 15분간 방치한 후 여기에 IPTG를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가하고 37°C에서 2시간 배양하였다. 이를 LB/MgSO₄/maltose/rhodamine assay배지 (10 mM MgSO₄, 0.2% maltose, 0.01% rhodamine B, 0.1% olive oil, 0.01% TX-100)에 도말하고 하루 이상 37 °C에서 배양한 후 형광을 나타내는 콜로니를 선발하였다.

2. Clear zone 형성 콜로니 선발

위에서 선발한 콜로니를 LB/MgSO₄/maltose/tributyryn배지 (10 mM MgSO₄, 0.2% maltose, 0.01% rhodamine B, 0.1% tributyrin, 0.01% TX-100)에 도말한 후 37 °C에서 배양하여 맑은 halo가 나타나는 것을 관찰하였다.

3. PCR(polymerase chain reaction)에 의한 insert 확인

λ gt11내의 DNA insert를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR은 최종량이 100 μ l 되도록 하며 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0.002% gelatin, forward primer로서 NEB#1218 lambda gt11 primer (GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)와 reverse primer로서 NEB#1222 primer (TTGACACCAGACCAACTGGTAATG) 80 pmol을 1.5 ml tube에 넣은 다음, insert를 가진 균주의 콜로니 한 loop를 넣고 mineral oil을 증충한 다음 10분간 끓인 후 얼음에서 2-3분간 냉각하였다. 여기에 *Taq* DNA polymerase 2.5 unit를 첨가한 다음 thermal cycler에서 target gene의 증폭을 시도하였다. 이때 denaturation은 94°C에서 1분, primer annealing은 54°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분간 실시하여 30 cycle을 시행하며 31번째 cycle에서는 72°C에서 3분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR산물을 1% agarose gel에서 전기영동하여 조사하였다.

제3항 리파제의 클로닝

1. PCR subcloning

박테리아의 lipase를 클로닝하기 위하여 *Pseudomonas cepacia* DNA를 template으로 PCR을 하여 Invitrogen TA vector에 subcloning한다. PCR은 최종량이 100 μ l 되도록 하며 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0.002% gelatin, forward primer (AACATGCATG-GCCAGGACG) 및 reverse primer (GAGCGTTACCGCGCGCTG) 80pmol을 1.5 ml tube에 넣은 다음, *Pseudomonas cepacia* 콜로니 한 loop를 넣고 여기에 *Taq* DNA polymerase 2.5 unit를 첨가한 다음 thermal cycler에서 target gene의 증폭을 시도하였다. 이때 denaturation은 94°C에서 1분, primer annealing은 54°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분간 실시하여 30 cycle을 시행하며 31번째 cycle에서는 72°C에서 3분간 extension을 실시하였으며 이를 1% agarose

gel에서 확인하였다. PCR산물을 정제하기 위하여 mineral oil 밑층을 피펫으로 뽑아낸 다음 증류수를 가하여 300 μ l가 되도록 한 후 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)로 처리한 다음, 상등액을 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1)로 처리하였다. 상등액 부피의 0.1배에 해당하는 3 M sodium acetate (pH 5.0)와 2배량의 ethanol을 가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 이상 정치한 후 12,000 \times g 에서 20분간 원심분리하여 PCR 산물을 얻었다. 이 PCR 산물을 70% alcohol로 세척하고 vacuum drier에서 건조한 후 증류수 20 μ l에 현탁하였다. Cloning은 TA cloning system (Invitrogen Co.)을 이용하여 실시하였다. PCR II vector를 25 ng/ μ l가 되도록 하며 vector와 PCR insert의 분자 비율이 1 : 2가 되도록 하여 10 \times ligation buffer 1 μ l, pCR II vector 2 μ l, PCR product 1 μ l (10.0 ng), T4 DNA ligase 1 μ l, 증류수 6 μ l를 넣고 16 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 ligation 반응시켰다. 0.5 M β -mercaptoethanol 2 μ l를 competent cell (DH5a) 50 μ l, TA cloning ligation reaction 1 μ l에 넣은 후 가볍게 섞어주고 얼음 위에서 30분간 정치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 정확히 45초간 반응시키고 다시 얼음 위에서 2분간 정치하였다. 여기에 LB medium 450 μ l를 넣어주고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 진탕배양하여 배양된 균액 50 μ l를 X-gal (20 mg/ml in dimethylformamide) 50 μ l, IPTG (200 mg/ml in D.W.) 50 μ l이 함유된 LB agar (ampicillin 100 μ g/ml)에 펼친 다음 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 무색의 콜로니를 선발하여 원하는 insert가 있는지를 mini-prep method로 확인하였다.

2. 단백질 발현 및 추출

Lipolytic activity를 가지는 단백질을 발현시키기 위하여 각각의 균주를 2X YT 배지 50 ml에서 30 $^{\circ}$ C로 absorbance가 0.6 될 때까지 키우고 IPTG를 2 mM, CaCl₂를 0.2 mM되게 첨가한 후 2시간 30분동안 배양하였다. 균체를 원심분리한 후 이를 2.5 ml의 lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.0, 1% CHAPS, 10 mM CaCl₂)에 현탁하고 lysozyme을 최종농도 0.1 mg/ml되게 첨가하였다. 세포현탁액을 얼음 속에서 30분동안 방치하고 -20 $^{\circ}$ C에서 동결시킨 후 tube를

물 속에 넣고 녹였다. XL2020 sonicator (Misonix, USA)를 이용하여 현탁액을 240 W에서 3번 각각 20 초씩 3번 초음파분쇄하고 12,000 x g에서 15분간 원심 분리하고 상등액과 pellet의 lipase 활성도를 plate에서 측정하였다.

3. Polyacrylamide gel 상에서의 역가 확인

Laemmli (1970) 방법에서 SDS를 첨가하지 않고 stacking gel을 제거한 7.5% acrylamide gel을 사용하여 50 V 조건으로 16시간동안 4 °C에서 전기영동을 수행하였다. Lipase 활성도가 print technique (Hofelmann *et al.*, 1983)에 의거하여 전기영동한 acrylamide gel을 2% tributyrin을 함유하는 agar plate와 0.5% olive oil 및 0.001% rhodamine을 포함한 agar 배지 위에 올려 놓은 후 37 °C에서 하룻밤 반응시켰다. 단백질을 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다.

4. DNA 염기서열 결정

A-22 및 N-30B로부터 얻은 pBluescript SK의 *EcoRI*과 *XhoI* 자리에 들어가는 리파제 유전자를 T7 promoter primer와 T3 promoter primer를 각각 primer로 이용하여 AccuPower™ DNA Sequencing Kit (BIONEER)를 사용하여 PCR sequencing을 수행하였다. 그리고 시료를 6% 와 4% polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후 Silverstar™ staining system (BIONEER)으로 염색하여 염기서열을 결정하였다.

제4항 리파제의 대량발현

1. pET32 vector에 subcloning

단백질을 대량발현시키기 위하여 A-22, N-30B, N-53 플라스미드의 insert를 pET 32 vector에 subcloning 하였다. Insert를 가진 pBluescript를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 후 절편을 1% agarose gel에서 분리하고 역시 동일한 두 제한효소

로 절단한 pET32b 발현백터와 ligation하였다. 0.5 M β -mercaptoethanol 2 μ l competent cell (DH5a) 50 μ l, ligation reaction 액 1 μ l에 넣은 후 가볍게 섞어주고 얼음 위에서 30분간 정치한 후 42°C에서 45초간 처리하고 다시 얼음 위에서 2분간 정치하였다. 여기에 LB medium 450 μ l를 넣어주고 37°C에서 1 시간동안 진탕배양하여 배양된 균액 50 μ l를 ampicillin이 함유된 LB agar (ampicillin 100 μ g/ml)에 도말한 다음 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 원하는 insert가 있는지는 조제한 플라스미드를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 확인하였다.

2. pET 28 vector에 subcloning

Thioredoxin fusion protein으로 생산되는 pET32 vector 대신에 fusion 없이 단백질을 발현시킬 수 있는 pET28 vector에 cutinase 유전자를 새롭게 cloning 하기 위해 2개의 oligonucleotide를 한 쌍으로 하는 primer 4개조를 사용하여 PCR 증폭하였다. Primer로 사용한 2개의 oligonucleotide 중 cutinase 유전자의 5' 쪽에 결합할 primer는 *Bam*HI 제한효소 잘림 자리를 포함하는 5'-ACGGATCCGAGAGGCAGGTCTACCCTCG-3' (28 mers, CutBam1 -①), 5'-ACGGATCCAAGCTCCAGCTCCACCTCGC-3' (28 mers, CutBam2 -②), 5'-GTGGATCCAATCCAATCCGTCTC-3' (23 mers, CutBam3 -③) 을 사용하였고, 3' 쪽에 결합할 primer는 *Sal*I 제한효소 잘림 자리를 포함하는 5'-GTGTCGACTTCCCAACAAGAAAGTCA-3' (26 mers, CutSal1 -④) 5'-GTGTCGACCTTCCCAACAAGAAAGTC-3' (26 mers, CutSal2 -⑤) 을 사용하였다 (Figure 5). 증폭과정은 PCR 고유의 에러율을 낮추기 위하여 Vent polymerase (New England Biolab) 효소와 25 cycle의 과정을 거쳐 증폭하였고 증폭된 각각의 DNA 조각은 phenol/chloroform 추출 후, *Bam*HI과 *Sal*I으로 처리하여 전기영동하고 agarose gel 에서 Gene clean kit (BIO 101)을 사용하여 분리하였다. 분리 정제한 DNA 조각은 미리 *Bam*HI과 *Sal*I으로 처리, 분리된 pET-28 vector (Novagen)에 ligation 시켜 subcloning 하였다.

3. 단백질의 대량발현 및 정제

상기의 lipolytic enzyme activity를 갖는 유전자를 포함하는 pET28 벡터로 대장균 BL21 또는 BL21pLysS를 형질전환시킨 후 100 ug/ml의 ampicillin이 포함된 LB배지에서 absorbance (600 nm) 0.6이 될 때까지 배양하였다. 여기에 IPTG (isopropyl thiogalactosylpyranoside)를 최종농도 1 mM되게 첨가하고 상기의 방법으로 단백질을 발현시켰다. 균체 100 ml를 원심분리한 후 이를 4 ml의 binding buffer (5 mM imidazole, 500 mM sodium chloride, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)에 현탁하고 XL2020 sonicator (Misonix, USA)를 이용하여 현탁액을 240 W에서 3번 각각 20 초씩 3번 초음파 분쇄하고 12,000 x g에서 15분간 원심분리하였다. 15 ml의 charge buffer (50 mM nickel sulfate)와 9 ml의 binding buffer로 평형화한 3 ml의 His-Bind metal chelation column에 약 4 ml의 상기 용액을 loading한 후 30 ml의 binding buffer와 18 ml의 wash buffer (60 mM imidazole, 500 mM sodium chloride, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 세척한 후 18 ml의 elute buffer (1 M imidazole, 250 mM sodium chloride, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 용리하였다. 이를 Laemmli (1970) 방법에 의거하여 전기영동을 하였다.

제5항 리파제의 정제 및 생산

1. 리파제의 cell내 활성도와 정제 후 활성도 측정

Lipolytic 활성을 갖는 유전자를 함유하고 있는 BL21pLysS 균주의 리파제 활성도를 측정하기 위해 2% tributyrin을 함유하는 LB/kanamycine plate에 세포 배양액 5 μ l를 고르게 도포한 후 밤새 37°C에서 일정시간 키운 후 활성도를 관찰하였다. 정제 과정 중 얻은 리파제 단백질의 활성도 측정을 위해서 2% tributyrin을 함유하는 agar plate에 20 μ l를 고르게 도포한 후 리파제의 활성도를 확인하였다. Spectrophotometer에 의한 lipolytic enzyme의 활성도 측정에는 앞서 언급한 *p*-nitrophenyl butyrate를 이용하였다. 990 μ l of assay buffer (100

mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer와 ethanol을 95:4로 혼합)에 적당량의 시료를 첨가 한 후 10 μ l 기질용액 (10 mM *p*-nitrophenyl butyrate in acetonitrile)을 넣었다. 20 °C에서 5분 반응 후 spectrophotometer로 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 분당 생성되는 *p*-nitrophenol의 μ mol로 정의한다.

2. *In vitro* mutagenesis에 의한 리파제의 변형

N-30B/pET28a의 784,785,786번 nucleotide CTC (leu)를 AAC (asn)로 치환하기 위해 4개 primer를 이용하여 PCR하였다. 우선 N-30B를 template으로하여 primer CutBam2 (5'-ACGGATCCAAGCTCCAGCTCCACCTCGC-3')/ CutM1 (5'- CAGTAATGACGTTTCGTGCCCTCGCAA-3')/ CutSal2 (5'-GTGTC-GACCTTCCCAACAAGAAAGTC-3')/ CutM2 (5'-TTTGCGAGGGCA-CGAACGTCATTAAGT-3')로 각각 1차 PCR을 실시하여 각 580bp와 95bp 크기의 PCR 산물을 얻고, 이것을 PCR purification kit (QIAGEN)로 정제하였다. 정제한 두 product를 template으로 하여 primer CutBam2와 CutSal2를 이용하여 2차 PCR을 실시하였다. PCR 후 전기영동으로 PCR 산물의 크기 (656bp)를 확인하고, 그 band의 gel을 잘라내어 GeneClean (Bio 101)으로 정제한 후, 제한 효소 *Bam*HI과 *Sal*I으로 처리하였다. Digestion 후 미리 *Bam*HI과 *Sal*I으로 자른 pET28a에 ligation하고, XL1-Blue에 형질전환하였다. 플라스미드 조제 후 insert를 조사하고 염기서열을 결정하여 mutation을 확인하였다.

제3절 리파제의 refolding 및 계면활성 구조 분석

제1항 단백질 Data Base 탐색 및 자료 수집

1. 리파제 효소의 아미노산 잔기배열 및 3차구조 정보의 입수

단백질 Data Base 탐색은 Protein Data Bank를 이용하였고, 현재 리파제의 경우 약 25개의 서로 다른 결정 3차원 구조정보가 축적되어 있다. 본 연구실에 설치되어 있는 graphics workstation에 이들의 3차원 구조정보를 download하여 분석을 하였다.

제2항 발현된 리파제의 분리 및 정제 및 refolding 연구

1. 박테리아균 생산 및 inclusion body 분리

pTTY2 plasmid를 함유하는 *E. coli* BL21을 LB medium에서 IPTG induction으로 *Pseudomonas fluorescens* 리파제를 대량생산하였다. IPTG는 1mM의 농도로 absorbance 0.5에서 가하였고 세포는 Ultrasonic processor VCX-400을 이용하여 분쇄하였다. Cell debris를 Triton X-100을 처리하여 제거한 뒤 inclusion body를 6M urea를 포함하는 Tris 완충용액으로 용해하였다. Induction의 확인 및 단백질들의 분리정도와 순도를 Laemmli 방법에 따라 SDS-PAGE를 통해 측정하였으며 (Laemmli, 1971), 10% 혹은 12% polyacrylamide gel을 실온에서 수행하였고, staining은 Coomassie brilliant blue R-250을 이용하였다.

2. Inclusion body 형태의 리파제의 추출 및 분리

1) Denatured 상태의 분리

Inclusion body의 denatured 된 상태로 분리 정제하기 위하여 6M urea 용

액으로 모든 분리과정을 거치도록 노력하였다. Inclusion body를 용해시킬 때 이용하는 6M urea 용액으로 ion exchange 및 gel filtration column chromatography를 수행하였다. 6M urea에 resistant한 DEAE sepharose를 이용한 ion exchange chromatography를 수행하였고, 다시 Sephacryl S-200을 이용하여 size별로 단백질을 분획하였다. 이 때 유출되는 속도는 peristaltic pump를 이용하여 50 ml/hr로 하였고 분획된 부분중 280nm를 흡수하는 부분만을 모아 농축하였다. DEAE는 6M urea 외에 0-3 M의 guanidine HCl의 직선 농도기울기로 분리하였다.

2) Native 상태의 분리

Denature된 상태의 단백질을 다시 native한 형태로 바꾸기 위한 작업으로 dilution과 dialysis의 두 가지 방법을 채택하여 연구를 수행하였다.

3. 리파제의 수거

*Pseudomonas fluorescens*의 리파제 유전자를 (vector pTTY2)을 한국과학기술원에서 받아 *E. coli* BL21에 transformation 하여 LB medium에서 pre-culture 20 ml, main culture 1 l 로 100 µg/ml의 ampicillin stress하에서 IPTG로 유도하였다 (absorbance 560 = 0.6). 원심분리기 (Beckman)로 10,000 rpm, 5 min에서 cell을 수거하여 50 ml buffer A (50mM Tris-HCl (pH 8.5), 1mM EDTA)로 용해한 후 lysozyme으로 30분 동안 37 °C에서 처리, 2분 동안 sonication 하였다. 다시 15,000 rpm으로 20분 동안 centrifugation 한 후 supernatant를 수거하였다.

4. Soluble 리파제의 분리

Ion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose CL-6B, 26x50 mm)를 이용하여 단백질 용액을 buffer A로 평형화한 column에 5 ml을 apply한 후 150 ml buffer A로 washing 하였다. NaCl 0~1 M linear gradient로 효소를 elution

시킨 후 activity를 check 하여 리파제 fraction을 수거하였다. Ion-exchange를 거친 sample을 amicon (MW cutoff 10,000)으로 농축하여 buffer A로 평형화한 superdex 75 FPLC column에 apply한 후 0.5 ml/min의 flow rate로 elution 하였다.

5. 리파제의 refolding 및 분리

1) Guanidine HCl에 의한 리파제 refolding

기존의 inclusion body 분리방법을 약간 변형하여, inclusion body의 분리에 일반적으로 적용할 수 있는지의 여부를 알아보기 위하여 다음과 같은 방법을 시행하였다. Inclusion body를 6 M urea 용액 최소부피에 녹인 후, ion exchange column를 수행하였다. 이 때 urea 6-0 M의 역 gradient를 사용하여 단백질의 refolding을 유도하였고, refolding이 유도된 단백질은 다시 Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 충분히 씻어주었다. 이번에는 NaCl 0-1 M gradient를 사용하여 binding 되어 있는 단백질의 유출을 유도하였다.

2) SEPROS (size exclusion chromatography)를 이용한 리파제의 refolding

앞의 방법과 같은 방법으로 리파제를 수거한 후, 리파제의 refolding과 분리를 동시에 수행하기 위하여 50 mM Tris buffer (pH 8.), 0.5% Triton X-100에 녹인 후 centrifugation 하고 난 다음 cell debris를 제거하였다. 2번 반복하고 난 뒤, 8M urea를 포함하는 Tris buffer에 용해하고, 1시간 상온에서 incubation하였다. 이를 15,000g에서 원심분리한 다음 supernatant를 filtering하거나 30,000g에서 원심분리하여 supernatant를 최종적으로 얻었다. SEPROS (size exclusion protein chromatography refolding system) 수행은 Sephacryl S-200 (2.5x75cm) column을 이용하였고, 0.2 ml/min의 flow rate로 Tris buffer로 유출하였다.

3) Purification of Lipase

SEPROS에서 얻은 리파제 분획을 ion-exchange chromatography

(DEAE-Sepharose CL-6B, 26x50 mm)에 가하였다. 단백질 용액을 buffer A로 평형화한 column에 5 ml을 apply한 후 150 ml buffer A로 washing 하였다. NaCl 0~0.6 M linear gradient로 효소를 elution 시킨 후 activity를 check 하여 리파제 fraction을 수거하였다. Ion-exchange를 거친 sample을 Amicon centricon (MW cutoff 10,000)으로 농축하여 buffer A로 평형화한 Superdex 200 FPLC column에 apply한 후 0.5 ml/min의 flow rate로 elution 하였다. 이를 다시 Mono-Q 0-0.6M gradient로 유출하였다. 분리정도에 따라 Mono-Q chromatography 후 Superdex 200 FPLC column으로 다시 한번 분리를 시도하였다.

제3항 효소의 결정화 조건 screening

1. 리파제의 결정화 조건 screening

단백질 결정화를 위하여 단백질 용액에 CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl, LiCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등의 염과 acetate, citrate, cacodylate, imidazole, TRIS, HEPES 등의 완충액 그리고 침전제 (precipitating agents) 등을 첨가함으로써 조건의 변화를 꾀하였고, 침전제로는 유기물로 2-propanol, 2-methyl-2,4-pentanediol, dioxane과 polymer로 polyethyleneglycol (PEG)-400, PEG-1500, PEG-4000, PEG-8000 등을 이용하였다. 일반적으로 단백질 결정화는 단백질의 포화상태 (supersaturation)에서 이루어지기 때문에 그 결정화 조건은 전혀 예측할 수 없고 위에 열거한 염, 완충액, 그리고 침전제 등 여러 조건의 조합에 의해서 일일이 대응하는 즉, factorial matrix search를 이용하였다. 따라서 많은 양의 단백질이 필요하였고, 또한 순수한 단백질이 요구되었다. 현재 생체고분자 결정화에 많이 이용되고 있는 Sparse Matrix Sampling Technique로 결정화 Screening을 시도하였다.

제 4항 리파제의 안정성 연구

1. *P. fluorescens* lipase의 calcium ion에 의한 구조적 안정화

앞서 refolding하면서 분리한 *P. fluorescens* lipase의 구조적 특성과 calcium ion과의 관계를 알아보기 위해 circular dichroism spectroscopy, fluorescence spectroscopy 그리고 activity assay를 수행하였다. 각각 준비된 protein sample을 10 mM CaCl₂ 또는 10 mM EDTA가 함유된 buffer에서 4 °C, overnight incubation 한 후에 20 mM Tris (pH8.0) buffer로 dialysis한 후 비교 분석하였다.

2. Guanidium hydrochloride에 의한 denaturation 연구

준비된 sample을 0-4 M까지의 guanidium hydrochloride 농도에 따라 각각 분주하여 상온에서 1 h 동안 방치한 후 fluorescence와 activity assay를 수행하면서 denaturation 연구를 수행하였다. 단백질의 3차구조 변화를 보기 위하여 fluorescence emission spectrum연구 수행하였고 (Schimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer, Chiyoda-ku, Kyoto, Japan) (TB-85 thermo bath로 15 °C를 유지), 리파제의 활성도 변화를 측정하기 위하여 인공기질인 p-nitrophenyl butyrate를 이용하였다. 기질을 acetonitrile에 10 mM로 용해시킨 p-nitrophenylbutyrate 용액 10 μl를 20 mM Tris (pH8.0), 4 % ethanol 효소용액 (990 μl)과 상온에서 반응시켜 405 nm의 absorption으로 측정하였다.

여 백

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 리파제 분리 및 구조규명과 지질식품소재 소재 생산 기술

제1항 기술정보의 수집 및 전문가 협의

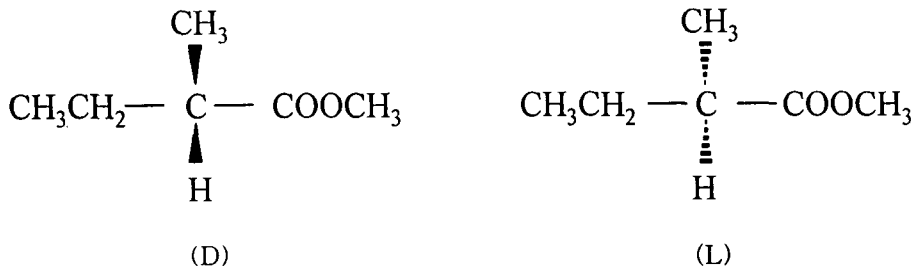
FSTA, Chemical Abstract 등 문헌정보검색시스템을 이용하여 리파제의 응용연구관련 논문 (총 146건)과 입체특이적 응용관련 자료 (총 12건)를 확보하여 본 연구에 활용하였다. 지방에스테르화합물의 이용도 및 관련자료 보충하였다. 관련자료 및 지금까지 연구결과를 검토한 결과 본 연구에 활용가능한 리파제의 반응시스템으로 비수계 유기용매내반응 (nonaqueous organic solvent system) 과 reverse micelle 시스템을 제외한 미수계 (microaqueous system)가 최적합하다고 판단하였다.

미수계 내에서의 반응에 관하여는 미국 Klibanov박사, 영국 Vulfson, 한국의 본 연구팀이 매우 좋은 연구결과를 발표하고 있다. (Kwon, 1992; Kwon et al, 1996, Kwon et al, 1997) 특히 영국의 Dr. Vulfson은 리파제 mutant expression system을 적극 제공하여 주기로 하였으며 기술적인 지원을 받았으며 서로 실험이 진행중이거나 실용화 단계에서 공동연구를 하기로 약정하였다.

제2항 지방산에스테르 화합물선정

지방산 에스테르 화합물 중에서 입체특이적 특성에 따라 부가가치가 높고 낮음이 결정되는 것은 알콜지방산 에스테르를 각종의 문헌조사와 시장조사를 통하여 알아냈다. 특히 이중 butyric acid 등과 같이 지방산에 알콜이 에스테르 결합을 하여 생긴 입체특이적 이성질체에 따라 식품으로써 특히 고가성 식품의 향기성분으로 활용가치가 차이가 나서 부가가치가 크게 차이를 보여주고 있다.

참고로 지방산 butyric acid의 methanol 에스터화합물의 입체이성질체에 따른 가격차이는 100배이상 차이가 난다. 즉 D-형이 L-형보다 대체로 100배이상 가격차이가 난다.



이는 본 연구를 활용하여 생산으로 이어진다면 고부가가치 지방에스테르화합물을 효과적으로 생산할 수 있음을 보여주고 있다.

제3항 리파제 효소반응계 설계

1. 반응시스템 연구

본 연구에 앞서 예측한바와 같이 비수계 유기용매시스템 (nonaqueous organic solvent system)에서만 에스테르화합물을 합성할 수 있었으며 미수계반응시스템 (microaqueous system)에서는 합성 반응이 가능하지 않았다. 따라서 앞으로는 비수계반응시스템을 사용하였다. 이 실험중 일부를 지방산에 글리세롤 에스터를 합성하는 방법을 특허로 신청하였다. 그러나 글리세롤과 결합하는 지방산 에스터의 stereospecificity를 측정하는 방법이 확립되지 않아 리파제의 입체특이성은 보여 주고 있지 못하였다.

제4항 특이성 우수 리파제 탐색

1. 에난치오메릭 특이성 우수 리파제 탐색

현재 상업적 또는 비상업적으로 구할 수 있는 20여종류의 리파제 중에서 일단 입체특이적 지방산에스테르 화합물을 생산할 수 있는 리파제에 대하여 조사한 결과 (Table 2), *Aspergillus niger* 균주에서 추출한 리파제가 입체특이성이 가장 높았다. 이 균주가 D-형 (S-형)과 L-형 (즉 R-형)의 입체특이적 에스테르화합물 합성분별력은 3 : 1 정도 되었다. 그 다음으로 *Rhizopus javanicus*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*에서 추출한 리파제가 상대적으로 높은 입체특이성을 보여주고 있었다.

반면에 Sigma 사의 *Candida cylindracea*나 *Chromobacterium viscosum* 등은 지방산에스테르 합성활성도를 전혀 나타내지 않고 있었다. 또한 pancreatic lipase, *Geotricum candidum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti*, *Humicola lanuginosa*, *Penicillium cyclopium* 등의 균주에서 추출한 리파제는 합성활성은 있으나 전혀 입체특이성이 없었다. 본 연구의 결과는 비수계에서 리파제의 기질에 대한 특이성은 기질에 따라 전혀 다름을 보여주고 있다. 즉 어느 리파제는 특수 알콜과의 에스테르 결합작용을 잘 합성하지만 다른 알콜에는 전혀 ester 화합물을 생성하지 못함을 보여주므로 리파제의 탐색은 전적으로 실험을 해보아야 그 결과를 알 수 있음을 보여주고 있다.

제5항 지방산 에스테르 입체특이성 분석법 개발

1. 입체이성질체 에스테르화합물 분리

대상물질에 따라 각각 분리방법이 다르게 적용되어야 함을 다시 한 번 확인하였다. 여기서는 지방산알콜에스테르화합물 중 입체특이적인 isomer (또는 에난치오머)를 GC를 이용하여 분리하였다 (Figure 1). 분리결과 enantiomer가 GC에서 거의 1분 가량 resolution을 두고 분리되었다. 본 연구결과는 독일에서 개발된 기존의 2대의 GC를 연결하여 다른 enantiomer를 분리하는 방법

Table 2. Enantioselectivities for various lipases in synthesizing the (S)-MBE in organic solvent.

Enzyme	Enantiomeric Excess(%)	2-Methylbutanoicacid methylester ¹⁾	
		(R)-MBE	(S)-MBE
<i>Rhizomucor miehei</i>	33.3	33,091	66,578
<i>Candida cylindracea</i>	23.0	869	1,478
Pancreatic lipase	0.0	17,865	17,617
<i>Geotrichum candidum</i> (GC)	0.0	37,203	36,481
<i>Aspergillus niger</i> (AP)	49.5	23,028	68,371
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PS)	0.0	38,872	42,494
<i>Chromobacterium viscosum</i> (CV)	0.0	-	-
<i>Candida lipolytica</i> (L)	0.0	34,259	33,725
<i>Aspergillus javanicus</i> (F-AP 15)	49.8	20,641	61,429
<i>Penicilium roqueforti</i> (R)	0.0	25,630	25,673
<i>Humicola lanuginosa</i> (CE)	9.0	22,520	26,517
<i>Penicilium cyclopium</i> (G)	9.0	21,608	25,054
<i>Candida rugosa</i> (OF-360)	25.9	34,586	59,914
Lipase CES(<i>Pseudomonas</i> sp)	0.0	32,151	31,655
Lipase AY(<i>Candida rugosa</i>)	7.4	37,019	42,987
Lipase AP-10(<i>Aspergillus niger</i>)	20.0	39,645	59,457
<i>Penicilium cyclopium</i> (GT-20)	0.0	41,819	42,452
Lipozyme(immobilized <i>R. miehei</i>)	33.3	26,795	49,610

¹⁾ Integral area by integrator of GC.

(Mosandle, 1991) 보다 시간과 비용을 절약할 수 있는 아주 효과적인 방법으로 매우 신속하게 분리할 수 있었다. 그러나 이 방법은 다른 지방산 에스터 입체이성질체를 분리하는 데에는 약간의 변형이 요구될 것이다.

앞으로 다른 지방에스테르를 입체특이적으로 분리할 경우, 예를 들면 입체특이적 mono- 또는 diglyceride를 분리할 경우는 GC 등 다양한 방법을 시도할 예정이다. 그러나 아직까지 완전한 분리방법은 개발되지 않았기 때문에 필요에 따라 개발되어야 할 것으로 본다. 본 연구의 방법으로 분석한 결과 화학적으로 합성한 경우는 (R)-2-methylbutanoic acid methylester의 양이 약간 더 많이 생성되었고 (Figure 2), 효소반응을 통해 생성된 물질은 고부가가치인 (S)-2-methylbutanoic acid methylester의 양이 더 많이 생성하였다 (Figure 5).

2. 리파제의 활성도 측정방법 및 개선

리파제의 활성도 측정법은 매우 다양하여 앞서 언급한 바와 같이 에멀전을 만들어 pH stat에서 측정하는 방법, 리파제 반응 후 유기용매로 추출하여 측정하는 방법 등 매우 다양하다. 여기서는 리파제의 분해활성도 측정법 그리고 enantiomeric selectivity (입체이성특이성) 측정 등 크게 두 가지로 나눌 수 있다. Enantiomeric selectivity는 앞서 개발한 바와 같이 입체특이성 합성과정중 나타나는 stereoisomer를 앞서 개발한 GC를 이용한 분리방법 (Figure 1)이 적절하였다. 그러나 대상물질이 바뀌면 그때그때 필요에 따라 입체특이적 특성을 짚 수 있는 방법을 개발 개선하여야 한다.

리파제의 분해 활성도는 HPLC를 이용한 리파제의 분리과정중에 나타나는 리파제의 활성도 측정법은 매우 신속하고 정확한 방법으로 나타났으며 (Figure 2), 또한 분해과정중에 생기는 diolein, monoolein, oleic acid를 직접 측정할 수 있는 장점이 있어서 분해 패턴을 추적할 수 있다.

리파제의 interfacial activation을 유무를 측정하기 위한 방법으로 리파제의 인공기질, 즉 p-nitrophenylbutyrate와 resorufin을 이용하였다. 즉 p-nitrophenylbutyrate는 리파제가 interfacial activation이 일어나지 않아도 분

해할 수 있으므로 에스터라제(esterase) 역할을 하는 것이고, resorufin은 긴사슬 지방산 에스테르 (long chain fatty acids ester)이므로 효소가 interfacial activation 없이는 작용이 불가능하다. 즉 리파제는 inactive 한 closed form에서 active 한 open form으로 interfacial activation 일어나야 반응을 한다.

제6항 리파제의 분리

1. 단백질침전

Aspergillus niger 리파제를 이용하여 순수분리를 하기 위하여, 먼저 칼럼을 걸기 전에 단백질을 침전시키기 위하여 여러가지 방법을 시도하여 처리하였다. 즉 isopropanol (alcohol), ammonium sulfate, acid treatment (*Aspergillus niger* 리파제가 산에 강한 것으로 알려졌으므로) 등을 처리하여 단백질을 침전시켜 1차 회수단백질량과 반응역가를 추정하였다. 그 결과 (Figure 6) 일단은 isopropanol 처리가 가장 효과적이었으며 다음이 ammonium sulfate 처리, 그리고 산처리 순이었다. 또한 UF (ultra filtration)을 이용하여 전처리하여 분리를 도모하고자 하였으나 비용관계상 수율과 활성면에서 가장 좋은 결과를 보인 침전 방법인 알콜침전방법을 사용하여 1차적으로 분리를 시도하였다. Figure 7에 나타난 바와 같이 2-propanol 농도를 증가시키면 회수율은 높았으나 activity는 약간씩 줄어들었다. 2-Propanol 농도 30%에서 회수율 14.26%이고 대체로 리파제 활성도 높았다. 그러나 40%에서는 회수율은 약간 증가하였으나 활성도가 상당히 떨어지다가 50%에서는 다시 활성도가 올라가고 회수율도 30%이상되었다. 이는 리파제 isopropanol 50%에서 상당히 침전되었으며 활성도도 유지됨을 보여주고 있다. 또한 낮은 농도에서 활성도가 높다가 다시 떨어지는 것은 리파제가 monomer로 존재하지 않고 polymer로 존재할 가능성도 있음을 보여주고 있다. 다음으로 2-propanol의 함량을 달리하여 처리한 결과 66%로 처리한 것이 가장 효소활성도도 높았고 수율도 높게 나타났다. 따라서 리파제를 66%

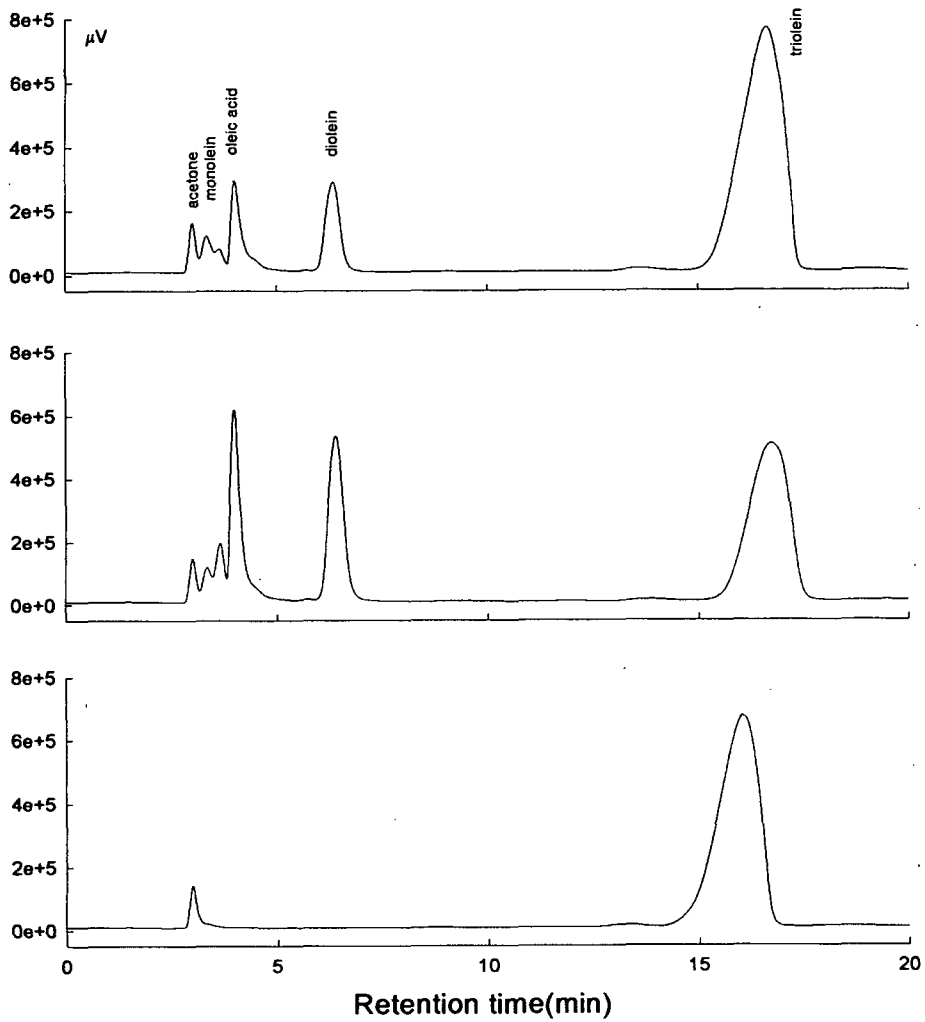


Figure 6. The comparison activity of crude lipase and lipases which were treated with alcohol and acid. First chromatogram : Crude lipase, second : 2-Propanol treatment, third : HCl treatment (pH 3.3).

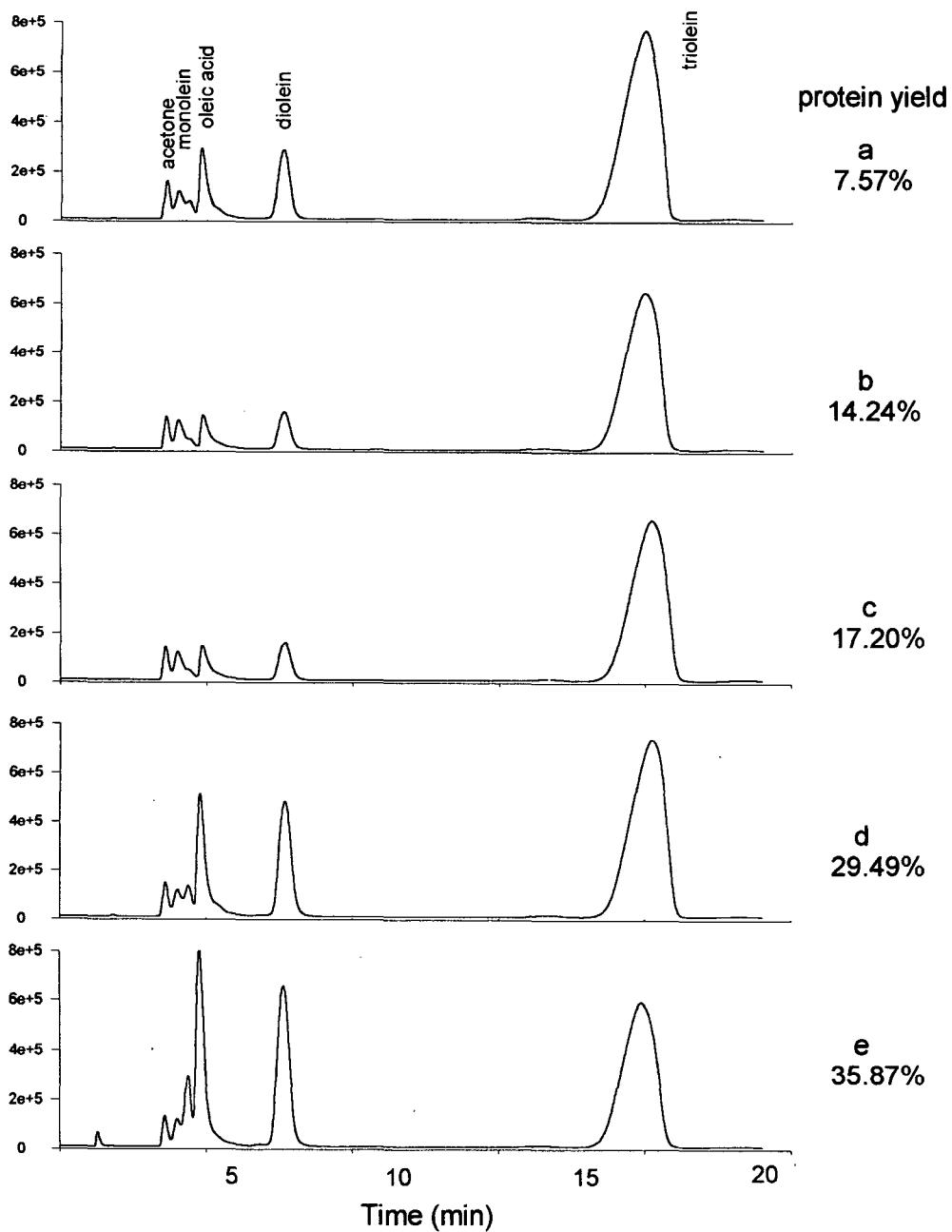


Figure 7. The effect of 2-propanol concentration on the lipase activity and protein yield.

2-propanol로 처리한 후 gel filtration (Bio-Gel P-100, 5x50cm)하여 254nm에서 흡광도를 재어 (UV spectrophotometer, Jasco V-550) fraction을 분획하였다 (Figure 8). 그 중 효소활성을 나타내는 fraction을 모아 동결건조시킨 후 다시 Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 녹여 다음 실험을 계속하였다 (Figure 9). 그림에서 본 바와 같이 어느 정도 분리가 가능하였으며 활성이 높은 것은 단일 fraction으로 분리하였다.

2. Chromatography에 의한 리파제 분리

1차분리한 다음 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 걸어 순도를 확인하기 electroblotting하여 순도를 측정한 결과 초순수하지는 않지만 분리는 되었으며 분자량은 66,000 dalton 정도였다. 그러나 분리된 리파제는 단일 펩타이드일 가능성이 많지 않은 것으로 나타났다. (Figure 6). 따라서 계속적으로 이 fraction을 받아 HPLC에서 ion exchange column (Protein Wax)을 이용하여 2차 순수분리를 하였다(A용액 : 25mM Tris-HCl buffer, B 용액 : 0.5M NaCl in tris-HCl buffer, flow rate : 2.5ml/min). 그 결과 앞의 작은 peak와 뒤의 큰 peak로 두 개의 peak로 분리되었는데 (Figure 10), 이들의 리파제 활성도를 측정한 결과 앞의 작은 peak가 상대적으로 효소활성이 높았다 (Figure 11). 이 ion-exchange column으로 분리한 리파제가 단일 물질일 가능성이 높았으나(실제로 SDS-PAGE를 통한 결과도 단일 물질과 같이 보였다) LC-MS로 정확하게 단일 물질인지 아닌지를 분석한 결과 단일 물질이 아님이 밝혀졌다 (mass spectrum 생략). 따라서 불순물이 혼합된 것인지 아니면 polymer된 리파제인지 확인하기 위하여 reverse phase HPLC에서 Vydac C₄ column을 이용하여 초순수분리를 시도하였다 (A용액 : 0.11% TFA in water, B 용액 : 0.09% TFA in ACN, flow rate : 2.5ml/min). 그 결과는 우리의 예측이 맞아 fraction 1 (peak 1 in Figure 11)은 적어도 4개의 peak로 나타났고 (Figure 13), fraction 2 (peak 2 in Figure 11)도 역시 적어도 5개 이상의 peak로 분리되었다. 그러나 이들 분해된 peak를 받아서 리파제

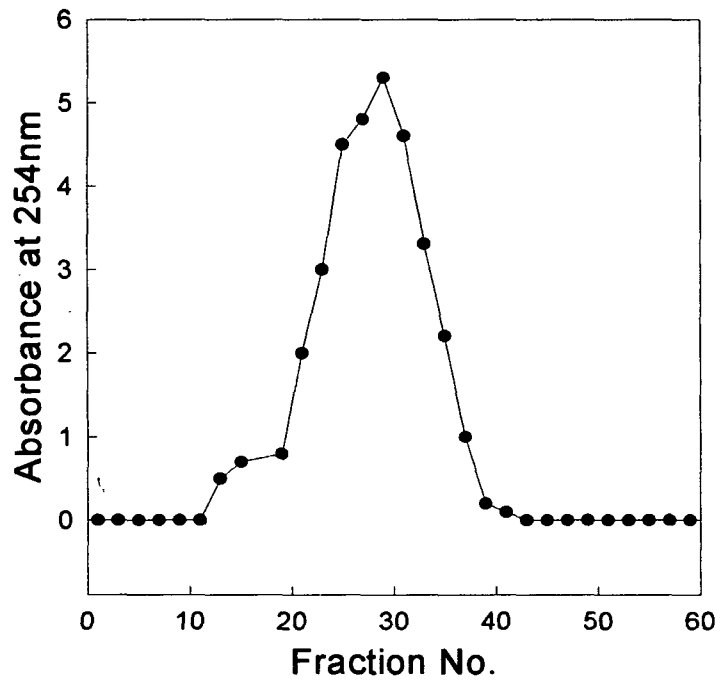


Figure 8. Gel filtration of lipase from *Aspergillus niger* with Bio-Gel P-100

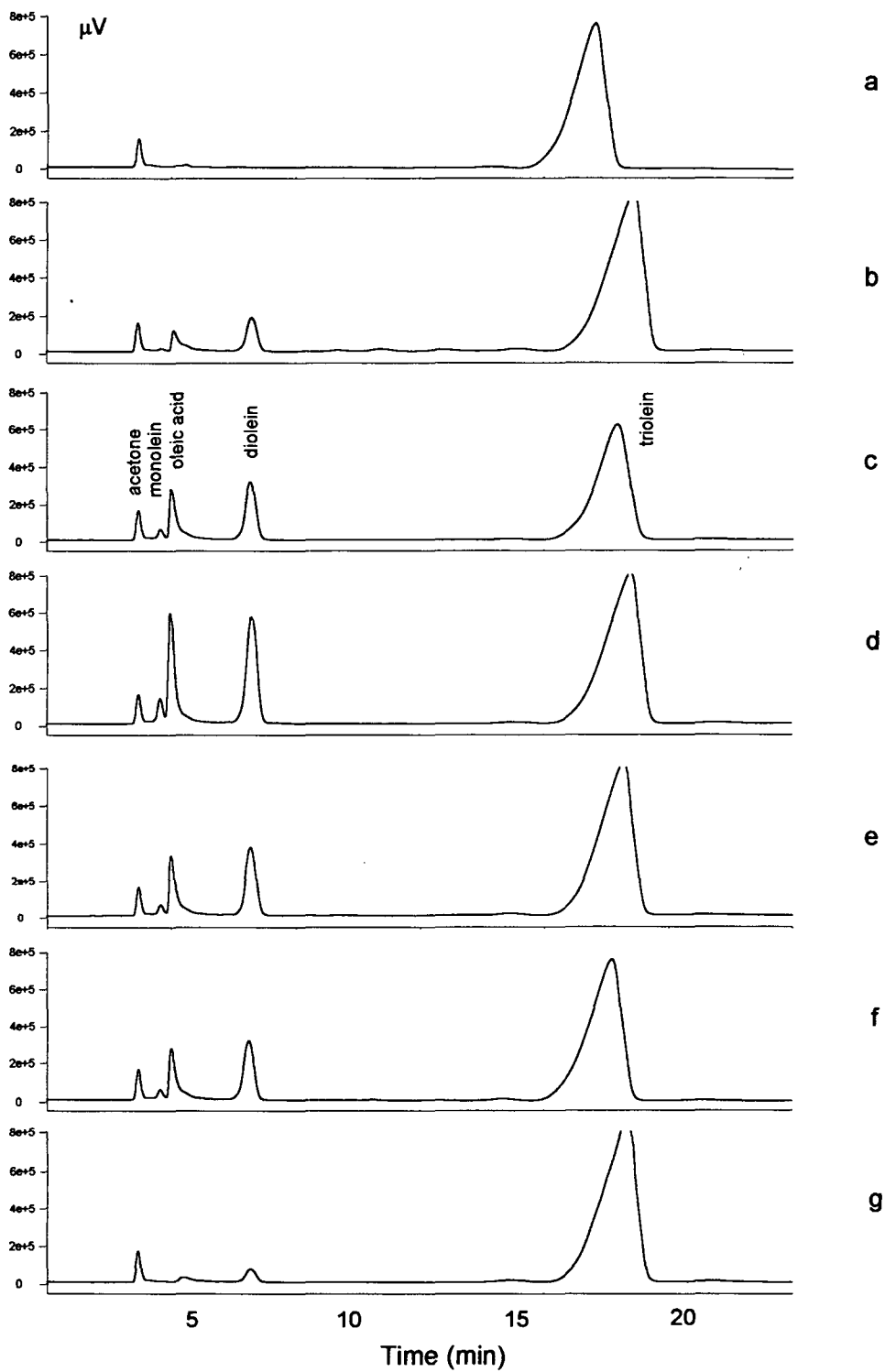


Figure 9. Lipase activity of each lipase fractions which were purified with Bio-Gel P-100 column. a, fraction #20; b, #24; c, #27; d, #30; e, #32; f, #34; g, #36.

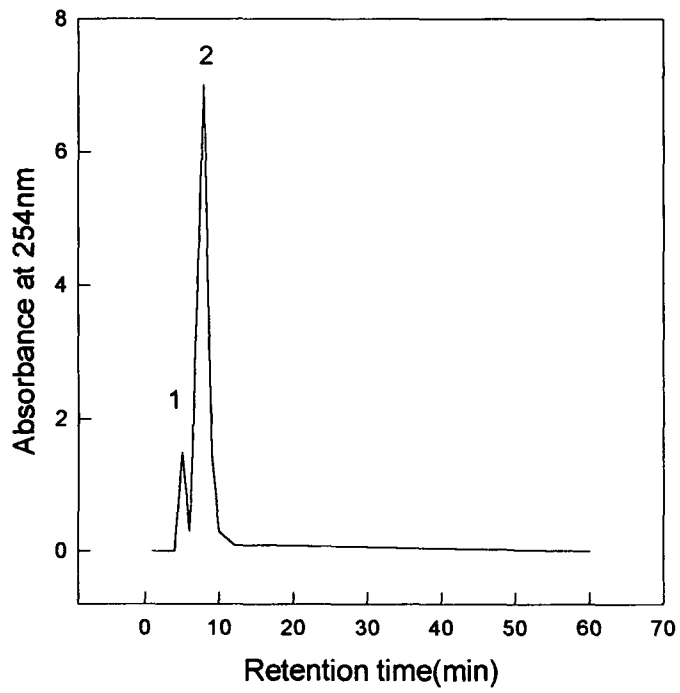


Figure 10. HPLC purification of lipase which was purified with ion-exchange HPLC column (protein wax).

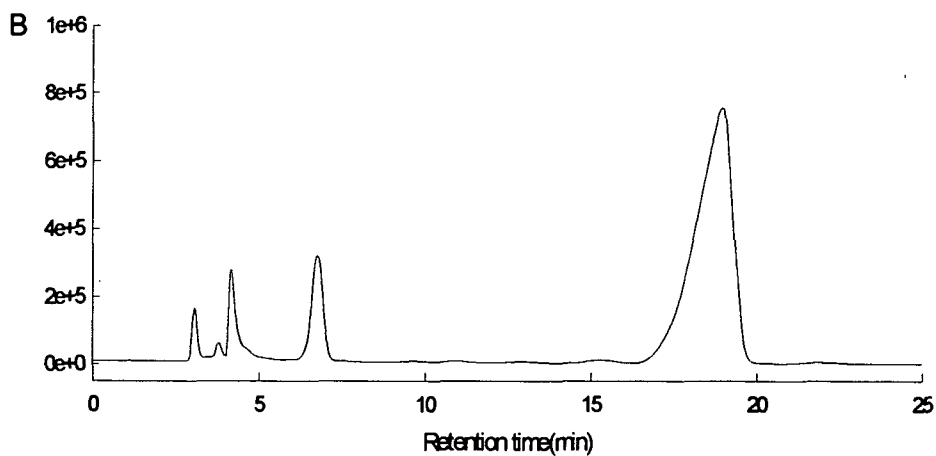
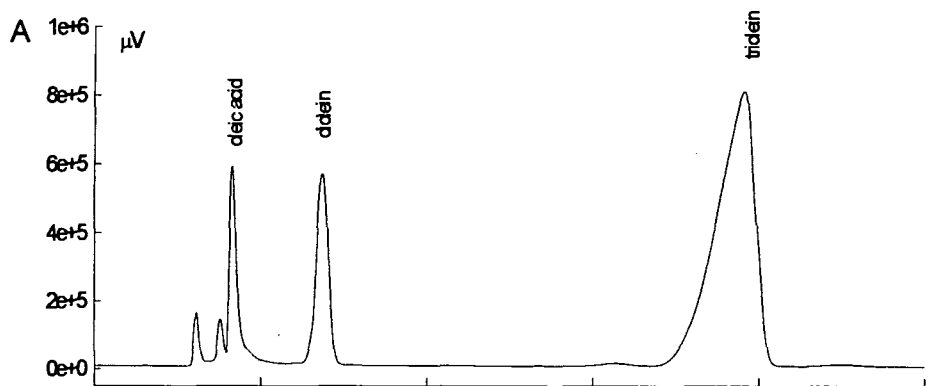


Figure 11. Lipase activity of each lipase fractions which were purified with ion-exchange column. A : lipase activity of small peak of figure 9 (peak 1), B : lipase activity of large peak of figure 9 (peak 2).

효소활성도를 측정한 결과 모든 fraction에서 효소활성도가 나타나지 않았다. 당연히 reverse phase 에서 받은 리파제 fraction은 유기용매에 unfolding 되기 때문에 리파제활성이 나타나지 않은 것으로 볼 수 있다. 하지만 이들 각각의 fraction을 각각 따로 받아 유기용매를 제거한 후 refolding을 거쳐서 반응 activity를 측정하였을 때도 활성은 나타나지 않았다.

이는 리파제가 여러개의 monomer가 결합하여 리파제를 형성하고 있고 이들이 단일 펩타이드로 분리되었을 때는 리파제의 활성이 나타나지 않으며 이들이 결합하여 polymer를 형성하였을 때 리파제의 활성이 나타남을 보여주고 있다.

이와 같은 분리과정을 거친 리파제의 분리과정에 따른 활성도와 수율을 Table 3에 나타냈다. 역시 최종 reverse phase HPLC의 경우는 단일 band로 나타났고 ion-exchange column의 경우는 3개정도의 band로 나타났다.

7. N-terminal sequence 분석

분리한 리파제의 아미노산 배열순서(sequence)를 알기 위하여 우선 N-terminal에서 10개의 아미노산 배열순서를 확인한 결과 Figure 13의 chromatogram을 얻었고 DHGNSTQTHG (Asp-His-Gly-Asn-Ser-Thr-Gln-Thr-His-Gly)의 아미노산 서열을 가지는 것으로 나타났다.

제7항 리파제 conformation과 변형

1. 리파제의 conformation

순수분리하기전에 리파제의 conformation을 1차년도에서 이미 측정한바 있다. 2차년도에서는 순수분리 과정중에 나타나는 리파제의 conformation 변화를 분석하였다. 1차년도 결과 순수분리전에 리파제의 folding 구조를 전혀 보여주지 않았다. 그렇지만 ion exchange column에서 분리된 두 fraction (Fraction 1,

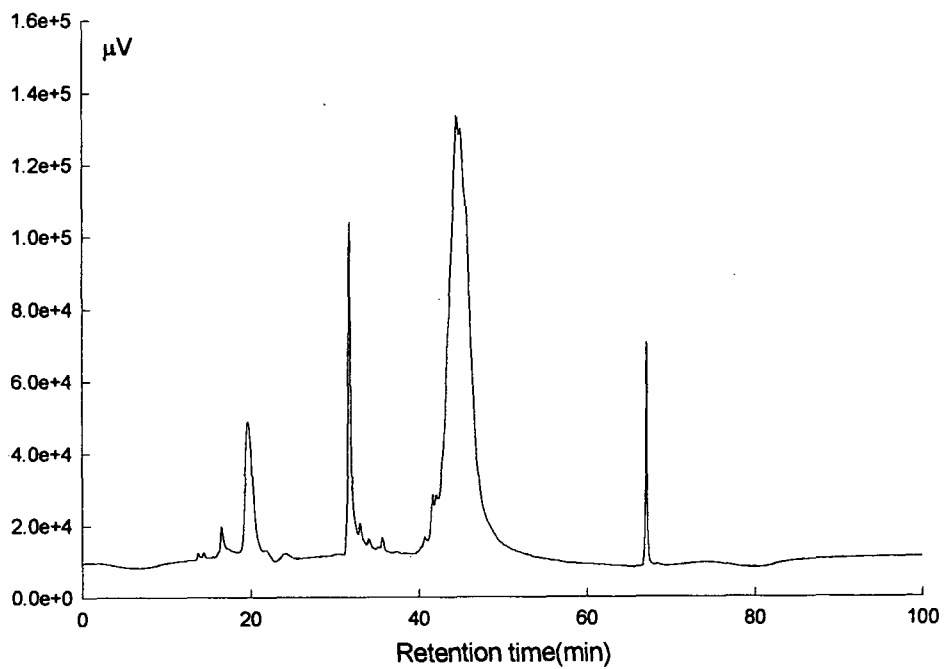


Figure 12. HPLC purification of lipase which was purified with reverse phase column (Vydac C₄ column)

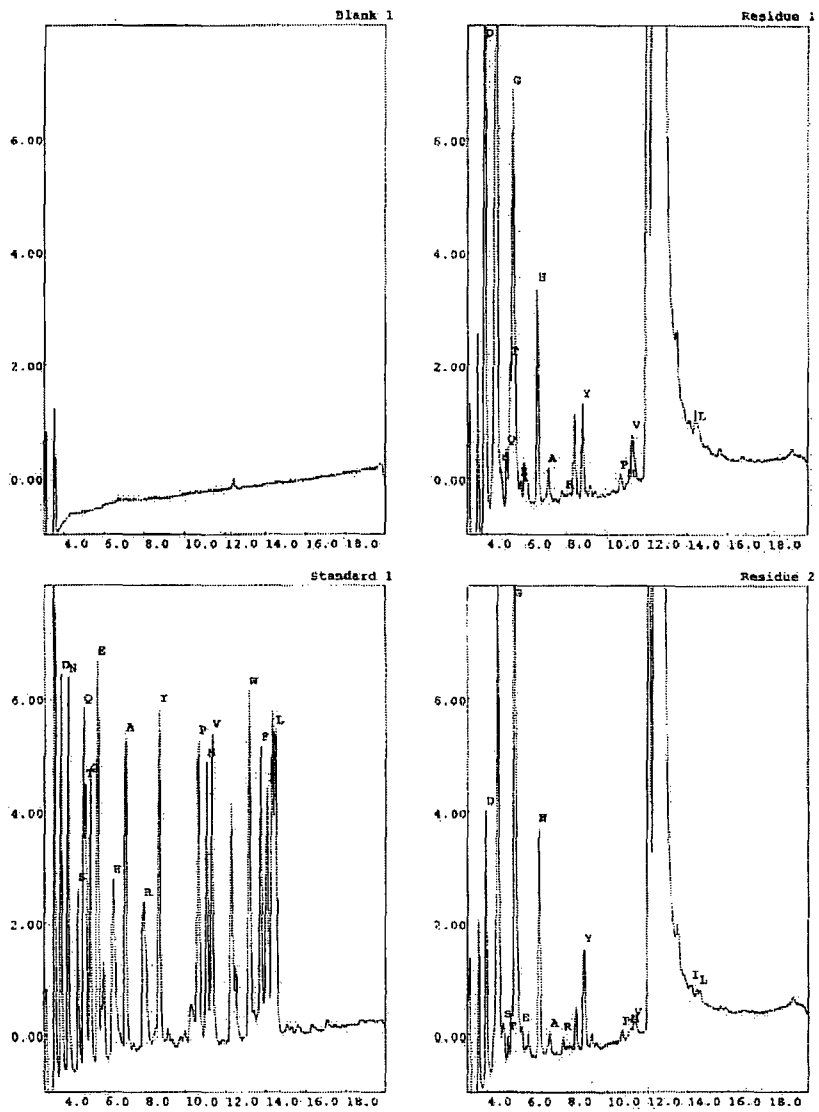


Figure 13. The chromatograms of purified lipase obtained from peptide sequencer

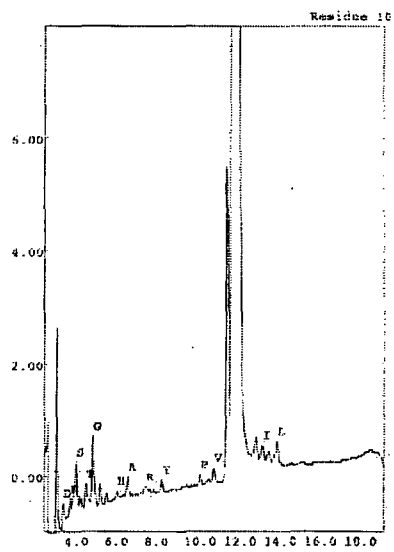
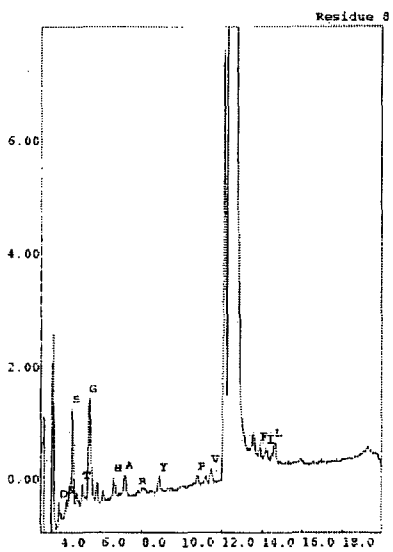
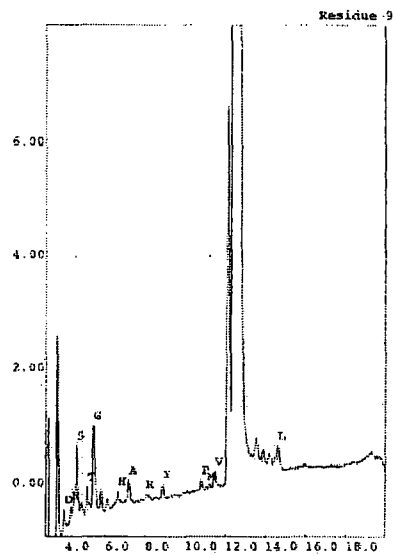
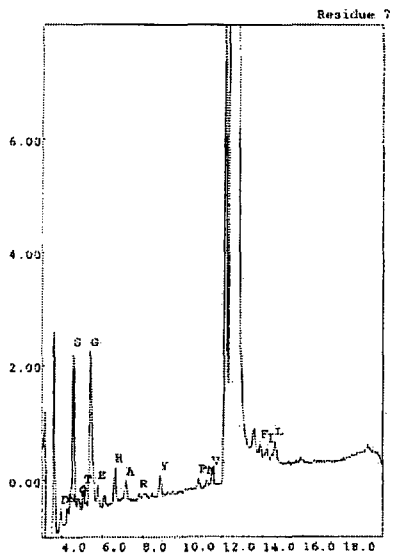


Table 3. Purification steps of lipase and their characteristics of each step purified lipase

	Protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification	Yield (%)
Crude	223.0	6690	0.75	1	100.0
2-Propanol treatment	172.3	4308	1.93	2.57	64.4
Bio-Gel P-100	85.6	1284	7.01	9.35	19.2
Ion-exchange column (Vydac protein wax)					
peak 1	1.4	7	18.50	24.67	0.1
peak 2	63.6	636	0.16	0.21	9.5
Reverse phase column (Vydac Protein C ₄)	0.4	0.4	28.30	37.73	0.004

2 in Figure 10) 에 대해 리파제의 CD spectrum을 조사하여 conformation 및 folding 구조를 조사하였는데 (Spectropolarimeter, Jasco J-710) 리파제의 활성이 큰 것은 강한 folding 구조를 가지고 있고 (Figure 14A) 활성이 낮은 것은 약한 folding 구조를 나타내고 있었다 (Figure 14B). 특히 fraction 1 (Figure 15)은 강한 α -helix conformation을 갖고 있는 folding 구조임을 보여주고 있다. 그러나 많은 양을 보이고 있는 fraction 2는 α -helix가 아닌 β -sheet 와 같은 unfolding 구조를 보여주고 있다. 이는 리파제의 활성이 단백질의 구조 안정성과 밀접한 연관이 있음을 보여준다. 리파제를 reverse phase의 마지막 단계에서 분리한 리파제의 1-4의 fraction에 대한 CD spectrum을 조사한 결과 역시 완전한 folding 구조를 보여주지 않고 있지만 약간의 folding 구조를 유지함을 보여주고 있다 (Figure 15). 이 reverse phase column으로 분리한 리파제를 Yang 등의 reference spectra를 가지고 2차구조를 측정 한 결과 α -helix는 30.8%, β -sheet는 0.1%, β -turn는 34.8%, random coil은 34.3%로 나타났다 (Table 4). 이들의 결과를 종합하여 볼 때 리파제의 활성은 단백질의 구조 안정과도 매우 밀접한 관계임을 처음으로 직접적인 결과를 이 연구결과에서 보여주고 있다.

또한 ion-exchange column으로 분리한 리파제를 이용하여 온도와 pH에 따른 conformation을 보기 위하여 리파제의 CD spectrum을 조사한 결과, 203 nm로 대표되는 mean residue ellipticity의 온도에 따른 변화를 보면 (Figure 16, 17), 온도가 70°C 정도까지는 conformation change가 거의 일어나지 않음을 보여주고 있다. 앞에서 리파제는 유기용매 내에서 반응활성도가 60°C이상까지 유지된다는 결과를 얻었는데(Figure 18) purified lipase는 수용액상에서 상당히 고온에서도 conformation 변화가 거의 없음을 보여주고 있다. 즉 다시 말하면 적어도 구조적으로는 이 리파제가 수용액상에서 70°C이상에서도 안정하다는 결과를 보여주고 있다. 대부분의 단백질이 고온에서 unfolding 되는 것과는 대조적이다. 아울러 이 분리한 리파제는 pH 6-10까지 리파제의 conformation을 어느 정도 유지됨을 알 수 있었다 (Figure 19, 20).

Table 4. The results of secondary structure estimation of purified lipase with circular dichroism.

	Ratio (%)
α -Helix	30.8
β -Sheet	0.1
β -Turn	34.8
Random coil	34.3
Total	100

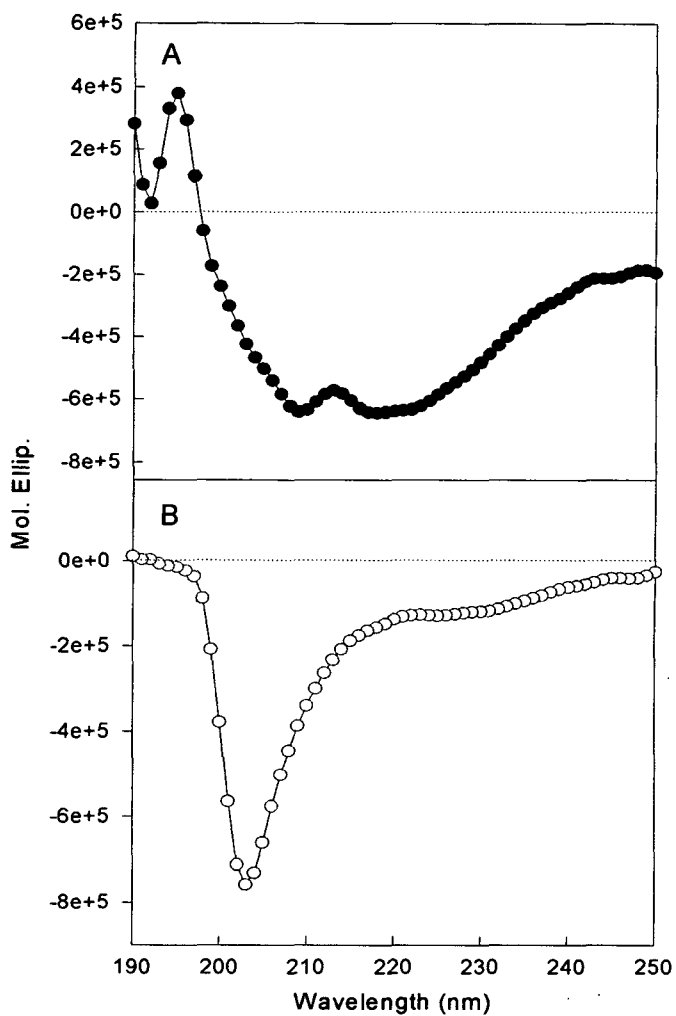


Figure 14. Circular dichroism spectrum of lipase which was purified with ion-exchange HPLC column. A : CD spectrum of small peak of figure 9 (peak 1), B : CD spectrum of large peak of figure 9 (peak 2).

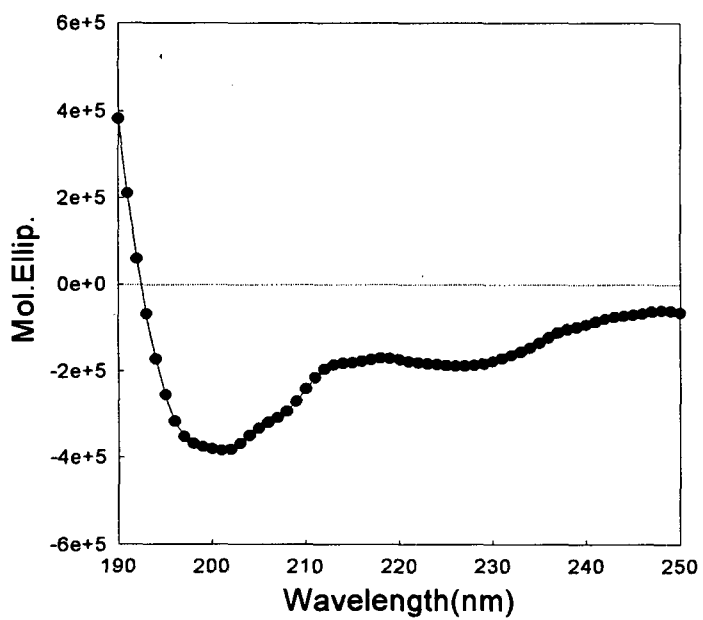


Figure 15. Circular dichroism spectrum of lipase which was purified with reverse phase HPLC column.

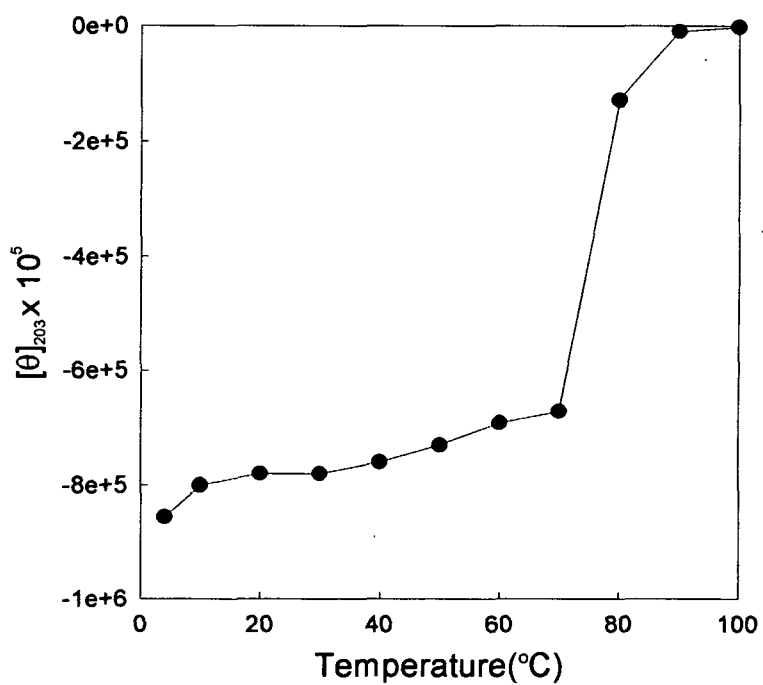


Figure 16. Effect of temperature on the conformational structure of purified lipase

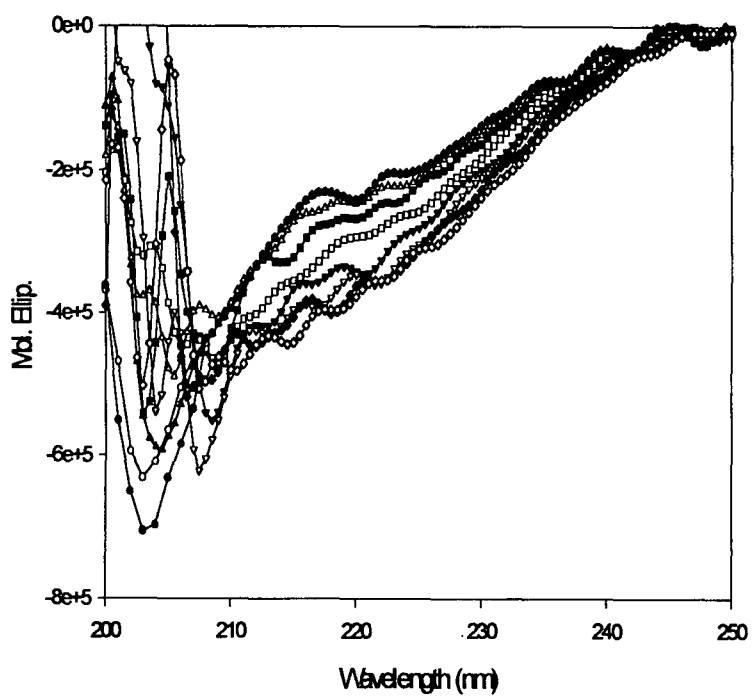


Figure 17. Effect of temperature on the conformational structure of purified lipase

● : 4°C, ○ : 20°C, ▲ : 30°C, △ : 40°C, ■ : 50°C, □ : 60°C, ▼ : 70°C,
 ▽ : 8°C, ◆ : 90°C, ◇ : 100°C.

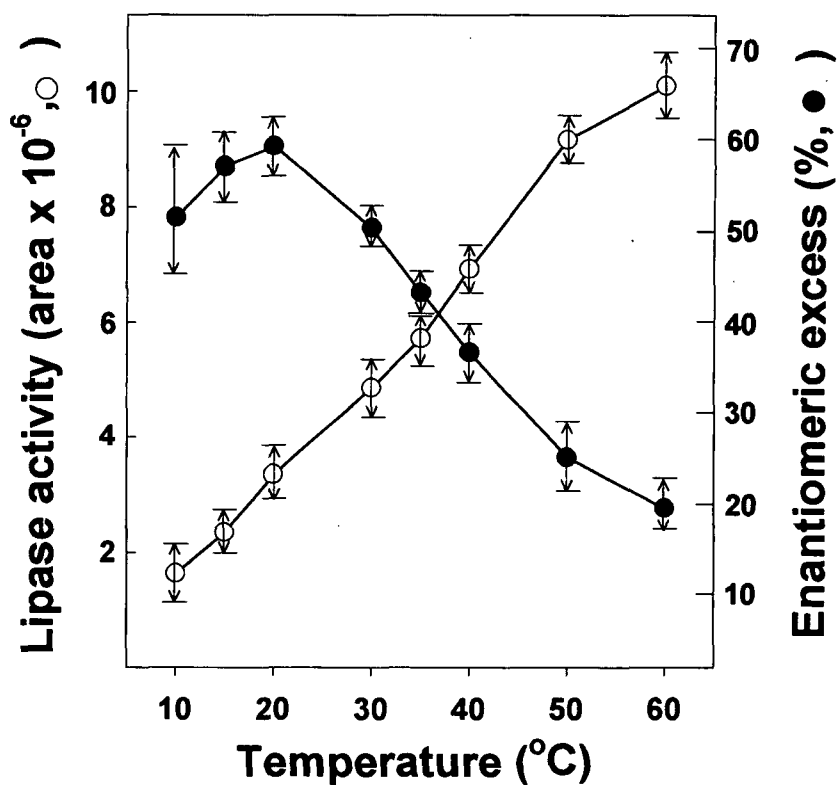
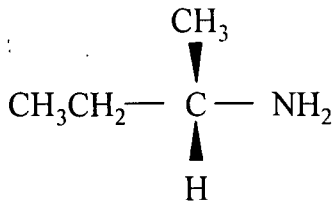


Figure 18. Temperature profile of lipase activity (O) and enantioselectivity (●) for (S)-MBE synthesis by lipase FAP-15 in isooctane. Error bars indicate mean \pm standard deviation of 3 samples.

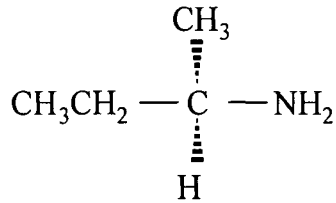
이상과 같은 결과를 종합하여 보면 이 리파제는 polymer로 형성되어서 그런지 열과 pH에 상당히 안정된 구조를 형성하고 있음을 보여주고 있다.

2. 리파제의 conformation 변형에 의한 입체특이성 증진

순수분리 하기 전(1차년도 결과)과 Bio-Gel을 통하여 1차 분리한 리파제(2차년도)를 이용한 리파제의 변형은 주로 단백질의 conformation 변형을 통하여 enantiomeric specificity를 증가시키는 것을 목적으로 하였다. 먼저 기질과 비슷한 amine 유도체를 이용하여 conformation을 변형시켜보았다.



2-(S)-methylbutanoic amine



2-(R)-methylbutanoic amine

Table 5에 나타낸 바와 같이 amine 유도체로는 크게 입체특이성이 증가되지 않았다. 이 원인은 정확히 알지 못하나 2-methylbutyryl amine이 리파제에 강하게 결합하지 않기 때문에 conformation 변형이 일어나지 않는 것 같다. 동시에 CD에 의한 conformation은 측정된 결과 amine에 의한 conformation 변화는 나타나지 않았다. 이는 crude한 리파제를 사용하였기 때문으로 보인다.

3. 변형리간드 합성과 identification

따라서 HPLC로 분리한 리파제에 대하여 더욱 실험을 해볼 필요가 있으며, 다른 입체특이적 리간드인 기질(2-methylbutanoic acid)의 competitive inhibitor인 2-methylbutanoic amide의 입체 이성질체를 이용하여 실험하고자 한다.

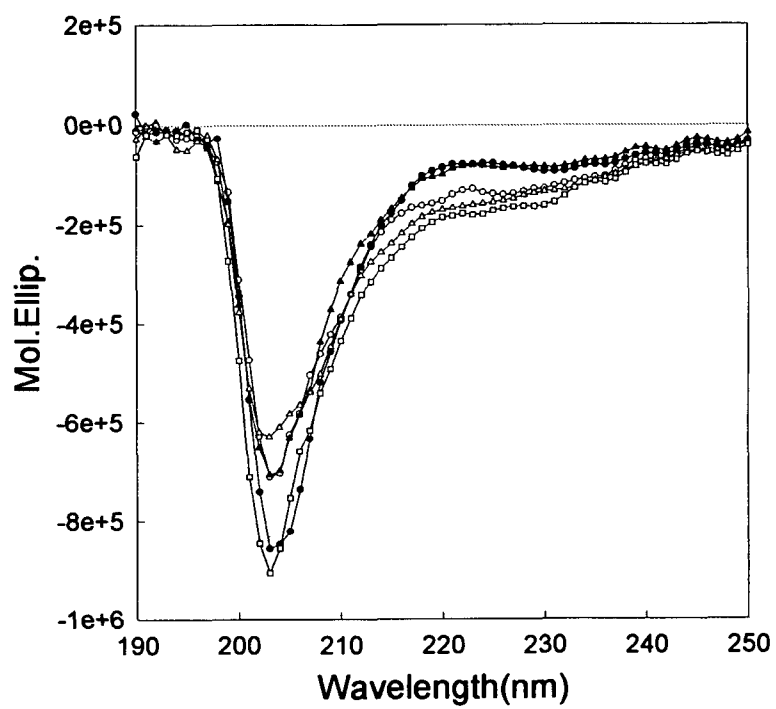


Figure 19. The change of conformational structure of lipase on pH.

Δ : pH 14.0, \blacktriangle : pH 12.0, \circ : pH 10.5, \bullet : pH 8.0

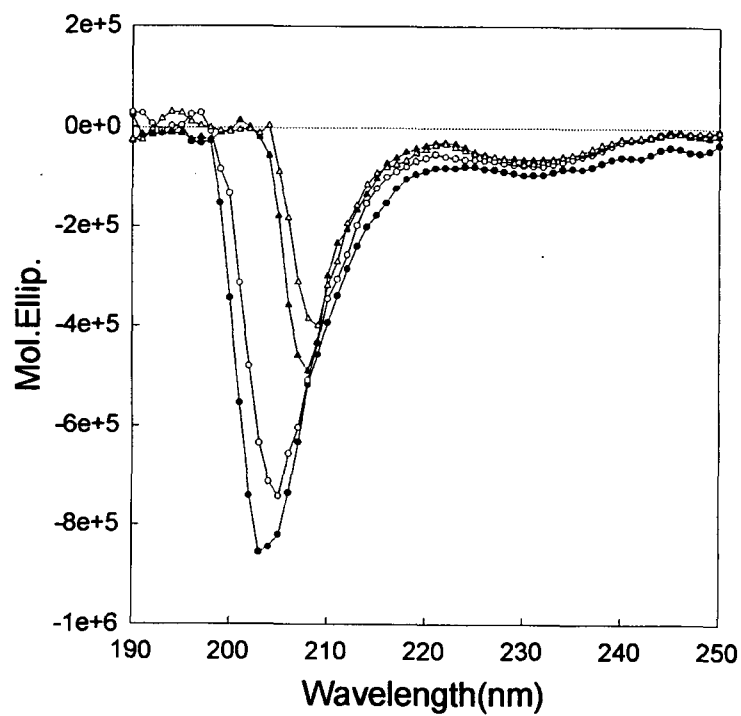
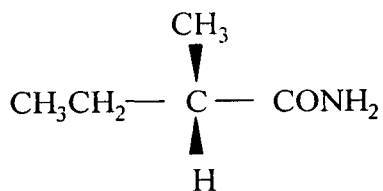


Figure 20. The change of conformational structure of lipase on pH.

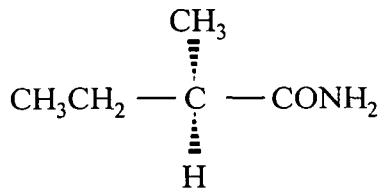
□ : pH 2.4, △ : pH 3.3, ▲ : pH 5.5, ○ : pH 6.4, ● : pH 7.5

Table. 5 The change of enantiomeric specificity of lipase treated by amine.

Lipase	2-methylbutanoic methylester ratio	
	(S)-form	(R)-form
Crude lipase		
Non treatment		
Amine treatment	3.6	1
(S)-form	3.7	1
(R)-form	3.6	1
Gel filtrated lipase		
Non treatment	3.5	1
Amine treatment	3.5	1
(S)-form	3.6	1
(R)-form		



(S-형 methylbutanoic amide)



(R-형 methylbutanoic amide)

다만 2-(S)-methylbutanoic amide와 2-(R)-methylbutanoic amide는 가장 적합한 리간드로 생각되나 쉽게 구할 수 없어서 화학합성하여 사용하였다. 리파제의 변형은 순수분리된 리파제를 가지고 리파제의 conformation change를 시도하였다.

합성 후 HPLC 분석 결과 합성한 amide는 상당히 순수한 단일 peak로 분리되었고 (S)-2-methylbutanoic acid와 다른 물질로 확인되었다 (Figure 21). 분자량은 101.1인데 mass spectroscopy를 통해 확인한 결과 (S)-methylbutanoic amide임이 확인되었다 (Figure 22). 이 합성 방법은 합성중 racemization이 일어나지 않는다고 보고되어 있다. 또한 polarimeter(Jasco, Japan)에 의하여 optical rotation을 조사하여 본 결과 합성과정 중에 racemization은 일어나지 않음을 확인하였다.

4. 리간드에 의한 conformation 변형과 입체특이성 증진

이렇게 얻은 amide를 이용하여 분리한 리파제와 결합시켰을 때의 conformation의 변화를 CD를 통하여 보았으며, 그 후 리파제를 이들 inhibitor를 리파제에 결합시켜 conformation 즉 입체특이성을 유도시켜 입체특이성을 올린 다음 inhibitor를 제거한 후 이 conformation이 변화된 리파제를 이용하여 원하는 지방산 에스터를 합성할 때 enantiomeric excess를 측정하였다. 앞에서 언급한 바대로 stereospecificity는 효소 반응동력학 상수를 정확하게 측정할 수 없어서 여기서는 사용할 수 없었다.

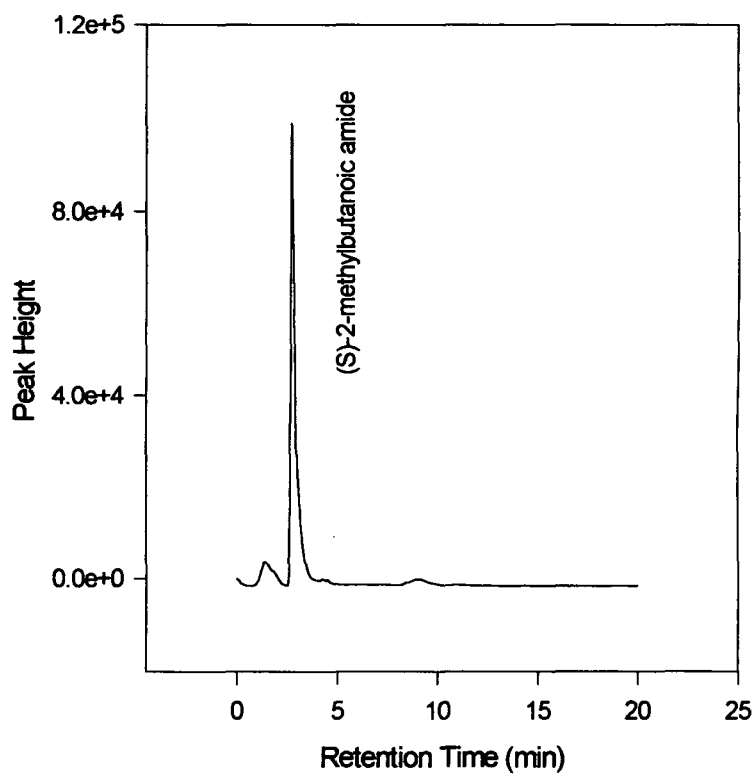


Figure 21. HPLC Chromatogram of (S)-2-methylbutanoic amide after synthesis from methylbutanoic acid.

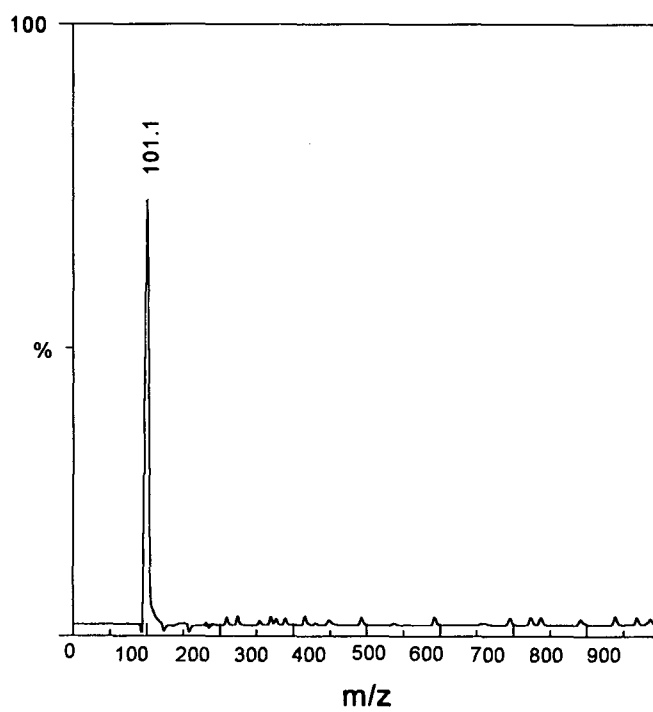


Figure 22. Mass spectrum of synthesized (S)-2-methylbutanoic amide

먼저 ion-exchange에 의하여 purified된 리파제의 inhibitor 리간드의 결합에 의한 conformation change는 나타나지 않았다 (data not shown). 이는 리간드 결합으로 전체적인 conformation 변화는 거의 측정되지 않음을 알 수 있다. amine의 결과 순수분리하기전의 conformation 변화가 없는 것이 단백질이 분리되지 않았기 때문으로 추정하였으나 오히려 리간드 결합으로 인하여 리간드 결합부위인 active site 부분의 부분적인 configuration 변화는 나타날지라도 (induced fit) 전체적인 conformation 변화는 보여주지 않는다고 결론지을 수 있다.

아무튼 conformation 변화는 관찰되지 않았더라도 입체특이적인 리간드를 통하여 active site를 입체특이적으로 induction 시킨 리파제는 이 conformation이 고부가가치 입체특이적인 지방산 에스터화합물을 합성할 경우 입체 특이성이 크게 증가함을 보여주고 있다 (Table 6). 이는 Klivanov가 주장하는 enzyme memory 현상과도 크게 관련이 있음을 보여주고 있다. 앞서 pH memory에 이어 발견된 크나큰 효소 반응 현상이다. 아쉽게도 본 연구에서는 2차 구조적인 뒷받침을 못해준 것이 아쉽지만 효소의 리간드 결합에 의하여 입체특이성이 비수계용매 반응계에서 증가됨을 보여주는 또 다른 증거를 보여주고 있다. 앞으로 리파제의 interface내에서 리간드에 의한 conformation 변화를 단백질의 3차구조적인 접근에서 밝히는 것이 매우 중요한 project가 될 것이다. 특히 nmr에 의한 리파제의 interface에서 dynamic behavior를 측정하는 것은 매우 흥미로운 것이다.

제8항 선발리파제 반응특성 및 생물반응기 설계 및 최적화

1. 반응시간에 따른 입체특이적 고부가가치 지방산에스터의 합성변화

설계한 생물반응기(Figure 23)내에서 *Aspergillus niger* 리파제를 이용하여

Table 6. Improvement of enantiomeric excess by lipase whose conformation was changed competitive inhibitor in organic solvent.

Lipase (<i>Aspergillus niger</i>)	EE for (S)-2-methylbutanoic methylester(%)
Ion-exchanged lipase	
Non treatment	59
Amide treatment	75

일반적으로 반응시간 4, 8, 15, 24시간에 반응산물인 고부가가치 지방산 에스터 화합물인 (S)-2-methylbutanoic acid와 total methylbutanoic acid 합성량을 측정하였다. 합성시간에 따라 (S)-지방산 에스터 및 전체 ester 의 생성량은 꾸준히 증가되었으나, enantio-selectivity (EEs)는 시간에 따라 크게 변하지는 않았다 (figure 24). 이상의 결과는 리파제 반응활성도 (Table 2)와 stereoselectivity와는 특별한 관련이 없음을 보여 주고 있다.

2. 온도 및 pH에 의한 영향

리파제 동결건조 pH에 따라 효소의 활성도를 조사한 결과 낮은 pH (pH 3, 4, 5)와 높은 pH (pH 8, 9, 10)에서는 전혀 반응이 일어나지 않았으며, pH 5.5, 6, 6.5, 7.0에서 활성을 나타냈다. 일반적으로 수용액상에서 리파제의 최적 pH는 6-7 정도이다(Kwon et al, 1986). 그러나 본 실험에서는 pH 5.5 - 7.0에서 pH에 따라 activity에 차이가 있을 것이라는 예상과는 달리 일률적으로 변하지 않았다. 이는 아마 동결건조 시킬 때 완충용액의 염이 동결 건조후 남아 있어서 문제가 되는 것으로 생각된다. 따라서 염을 제거하는 방법이 강구되어야 하는데 여러 방법을 시도해 보았으나 데이터가 연속적이지 않아서 문제점으로 계속 남아 있다. Klivanov의 이론(Zaks & Klivanov, 1986)에 의하면 유기용매내에서 반응시키기 위하여 동결건조시키는 최적 pH는 수용액상에서 리파제의 최적 pH와 일치한다고 주장하였다. 즉 어느 pH에서 동결건조할 경우 동결건조 바로 전의 구조가 동결건조 후 유기용매에서도 그대로 유지된다는 이론이다(pH 기억이론). 이와 같은 이유 때문에 본 연구에서와 같이 낮은 pH나 높은 pH에서 동결건조할 경우, 효소의 3차 구조가 변형되어 그대로 동결건조된 후 유기용매내에서 반응시에도 구조가 전혀 변하지 않기 때문에 효소활성도가 나타나지 않는 것으로 보인다.

리파제 AP에 대하여 온도에 대한 영향을 조사한 결과 (Figure 18), 온도가 60℃까지도 계속해서 반응활성도가 꾸준히 증가하였다. 그러나 본 실험에서는 온도가 올라갈수록 실험적인 문제점, 즉 유기용매가 쉽게 증발되어 농축되거나,

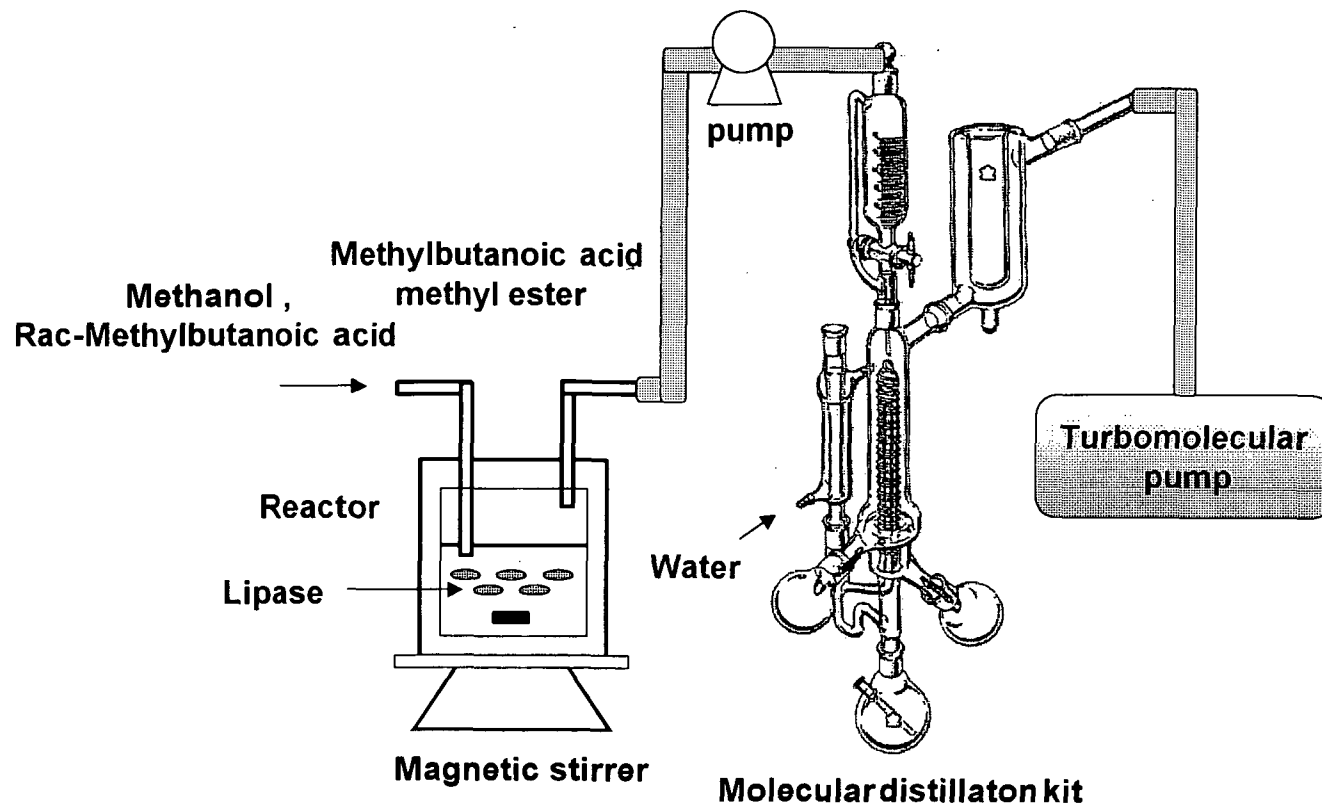


Figure 23. The optimized system for ester synthesis reaction.

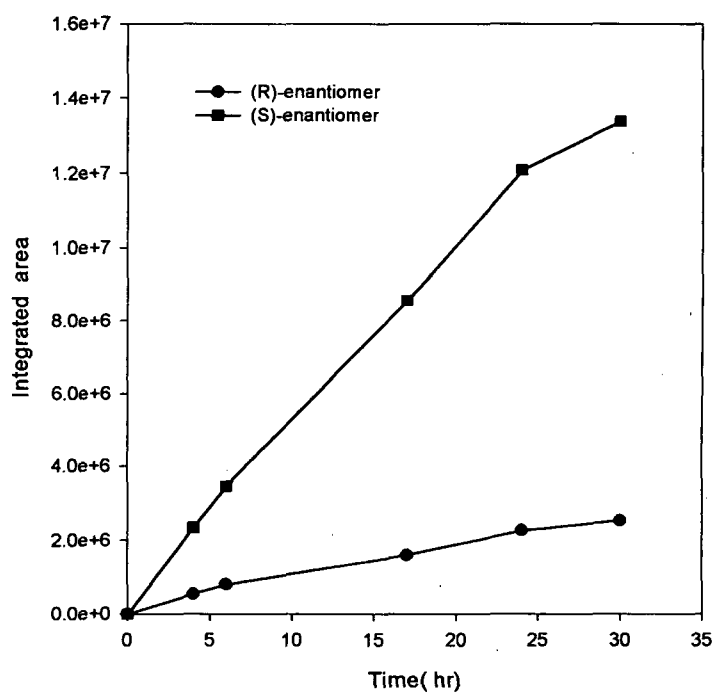


Figure 24. Time course of stereoisomers of fatty acid ester synthesis of lipase in isooctane from the 2-(±)-methylbutanoic acid.

온도조절의 문제점 때문에 60℃까지만 실험하였다. 앞에서 언급한바와 같이 물이 없는 효소는 유기용매내에서는 매우 rigid하여 구조가 쉽게 변하지 않는다는 이론을 뒷받침한다. 다른 두 리파제도 60℃까지 똑같이 증가하였다. *Aspergillus niger* 리파제의 경우 반응온도 40, 60℃에서도 초기 반응속도가 차례로 증가하여 60℃ 경우에는 실온에서보다 반응속도가 두세 배 증가함을 보여주고 있으며, 고정화 효소도 똑같이 증가하였다. 아마도 고정화 효소는 더욱 온도에 안정성이 높을 것으로 생각된다. 일반적으로 고정화시키면 activation energy는 증가되기 마련인데 IM 20은 다른 자유리파제보다 크게 증가하지 않았고 오히려 비슷하였다. 이는 유기용매내에서는 자유효소나 고정화효소 모두 steric hinderance를 똑같이 받기 때문에 차이가 없는 것으로 보인다. 앞으로 이에 대한 자세한 연구가 더 필요하다.

보통 리파제가 50℃ 또는 60℃에서 1시간 이내에 활성이 거의 다 파괴되는 경우를 생각하면 유기용매내에서 리파제의 열안정은 매우 증가된다. 실제로 리파제가 변성될 때 물분자가 크게 작용하여 먼저 H-bond가 끊어지면서 파괴된다. 그러나 물분자가 거의 없는 유기용매내에서는 리파제가 열에 매우 강하여 60-70℃에서도 강한 반응활성도를 나타낸다. 그러나 효소반응시간이 6-7시간 지나면 생성된 물 등 다른 원인에 의하여 효소가 서서히 변성됨을 보여주고 있다. 물론 물이 없는 상태에서 리파제를 120℃ 등 고온에서 저장할 경우 크게 파괴되지는 않는다.

입체특이성(enantioselectivity)에 미치는 온도의 효과를 조사한 결과 아주 중요한 정보를 얻을 수 있었다. 온도를 증가시켜줄 때 전체 반응활성도는 증가한 반면에 (S)-MBE를 생산하는 enantioselectivity는 온도가 증가할수록 감소함을 보여주고 있다. 가장 강한 enantioselectivity를 나타내 주는 온도는 20℃로 세 리파제간에 비슷하였다. 이는 온도가 올라갈수록 flexibility는 증가하여 전체 합성활성도는 증가하지만 enantioselectivity를 나타내는 specificity는 감소함을 보여주고 있다. *Aspergillus niger*의 경우는 20℃에서 (S)-2-methylbutanoic acid를 61.4% 정도의 EE 까지 전환시킬 수 있었다. 효소의 반응특이성은 구조

의 특수성에 기인하기 때문에 리파제의 conformation의 flexibility가 증가하면 효소의 rigidity는 감소하여 효소특이성이 떨어지는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로도 진행될 circular dichroism (CD) 등을 통하여 온도가 증가할 때 유기용매내에서 리파제의 구조와 온도와의 관계를 추적하는 것은 매우 흥미로운 연구가 될 것으로 생각된다(Kwon, 1994).

3. 반응동력학

유기용매내에서 insoluble한 리파제를 이용한 soluble기질에 반응동력학을 보기 위하여 2-MBE 의 농도를 바꿔가면서 Michaelis-Menten 곡선을 그려보았다 (Figure 25). 세 가지 효소 모두 다 기질의 농도 70mM 까지는 리파제의 반응활성이 거의 없었다. 기질 농도 80mM 이상이 되어서야 정상적인 Michaelis-Menten 식이 적용됨을 보여 주고 있다. 그러나 세 효소 모두 다 뚜렷한 포화곡선을 나타내주지 못하고 있다. 이는 본 반응시스템은 리파제가 유기용매에 녹지 않고 기질만 유기용매에 녹는 비정상적인 heterocatalytic system 이어서 기질 농도가 어느 농도 이하에서는 diffusion limit 등 물리적인 제한 때문에 전혀 반응이 되지 않고 있다가, 어느 농도 이상이 될 때 이러한 제한요소가 극복되기 때문에 (계면활성, interfacial activation) 이 농도 이상에서 Michaelis-Menten 곡선이 적용되는 것으로 본다. 따라서 기질 70mM이 반응의 임계농도(activation concentration)로 추정되었다. 또한 이러한 heterocatalytic reaction에서는 효소고유의 반응 parameter를 구할 수 없다. 그러나 겉보기 반응 파라미터인 $appK_M$, $appV_{max}$ 를 이들의 Michaelis-Menten 곡선에서 임계농도 이상의 농도에 대한 double reciprocal plot (Lineweaver-Burk plot)에 의하여 구하려고 시도하였다. 그러나 heterocatalytic 이어서인지 double reciprocal plot에서 정확한 직선상의 곡선을 구할 수 없었다. 따라서 정확한 값의 $appK_M$, $appV_{max}$ 는 구할 수 없었으나 대략적인 효소반응 데이터를 구하였다(data not shown).

기질의 농도에 따라 stereospecific selectivity에 차이가 있는지 기질의 농도 별로 조사하였다. 농도가 변함에 따라 EE는 변하지 않았으나 농도가 1500mM

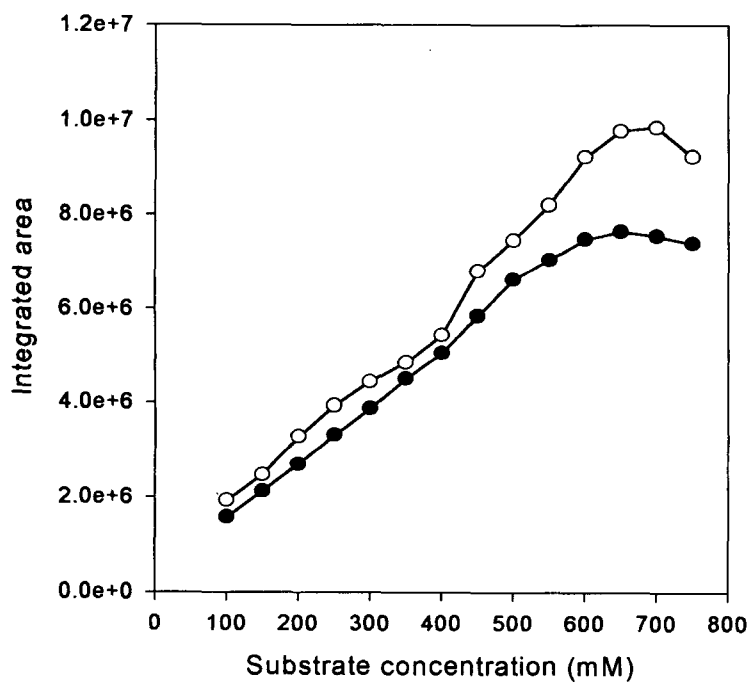


Figure 25. (S)-methylbutanoic acid methyl ester produced during the inhibition reaction of lipase by methylbutanoic amide. Methylbutanoic amide contents were (○) 0mM, (●) 20mM. The reaction was performed by the same method as the ester synthesis reaction

이상일 때에는 stereo-selectivity가 줄어들었다. 이는 과농도의 기질이 있는 경우는 여러 가지 물리적인 barrier 등 때문에 stereo-selectivity가 줄어드는 것으로 보인다.

이상과 같이 비수계반응시스템 (Non-aqueous organic solvent system)에서 반응의 효율을 높이기 위하여 유기용매에서의 물을 제거하기 위하여 molecular sieve를 이용하여 물을 제거하는 것이 합성반응의 효율을 높일 수 있었으며, 아울러 리파제의 분산이 잘되도록 silica gel을 첨가하였을 때 합성반응효율도 훨씬 높았다. Silica gel은 아울러 리파제의 물이나 합성과정중 생기는 물을 흡수함으로써 리파제의 반응활성도를 높일 수 있었다. 따라서 생물반응기의 설계 및 최적화 시스템을 위한 어느 정도 정보는 다 얻었다고 본다. 앞으로 최종 생산단계에서는 scale 문제를 해결하는 것이 중요하다고 본다.

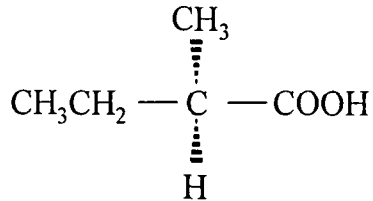
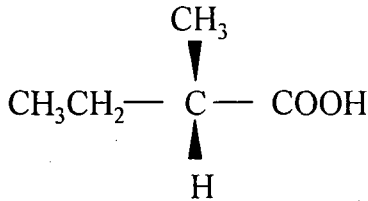
4. 리파제에 대한 inhibitor의 inhibition kinetics

1) Inhibitor 합성

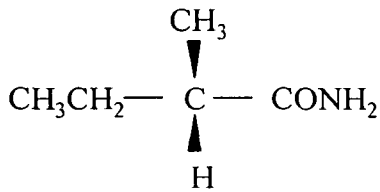
리파제의 변형은 리파제의 순수분리가 거의 되었기 때문에 이를 가지고 리파제의 conformation change를 시도하였다. 먼저 리파제의 입체특이적 activity를 conformation 변형으로 높이기 위하여 이 리파제의 기질 (2-methyl butanoic acid)의 inhibitor를 다음과 같이 제조하였다. 0.5 g의 2-methylbutanoic acid가 담긴 둥근바닥 플라스크에 DMF(N,N- dimethylformamide)를 1방울 가한 후 냉각관을 연결한다. 여기에 3-4ml의 SOCl_2 를 섞고 steam bath에서 15-20분간 반응시킨다. 반응액을 상온까지 식힌 후 10 ml의 ice-cold NH_4OH 용액에 조심스럽게 한방울씩 저어가며 넣는다. 이 때마다 amide 합성 정도를 check하기 위하여 반응 μ -Bondapak C_{18} column을 이용하여 amide를 분석하였고 (Fig. 21) mass spectroscopy를 이용하여 분자량을 확인하였다.(Fig. 22). 순수한 amide를 얻기 위하여 여기에서 얻은 crude amide를 recrystallization하였다. crude amide를 증류수에 녹여 끓인 후 녹지 않는 물질을 제거하기 위하여 뜨거워진 용액을 거른 후 온도를 낮춰 결정을 형성시킨다. 표면에 떠오르는 모액으로부터 결정을

거른 후 물은 용액을 제거하기 위하여 증류수로 세척하고 결정을 말린다.

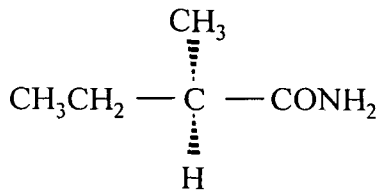
기질의 구조



competitive inhibitor인 기질의 amide 구조



(D-형 amide)



(L-형 amide)

이렇게 합성된 리파제의 기질(2-methyl butanoic acid)의 inhibitor를 가지고 리파제의 conformation이 flexible한 phosphate buffer solution(pH 7)에 리파제와 함께 넣어 conformation의 변형을 유도하였다. 변형된 구조를 유지하기 위해 동결 건조한 후 리파제의 conformation을 유지하면서 잔존하는 inhibitor를 제거하기 위하여 acetonitrile로 washing해 주었다. Acetonitrile로 washing한 후에 얻어진 리파제를 가지고 2차년도에서 확립한 최적 반응시스템을 이용하여 2-methylbutanoic acid methyl ester합성반응을 진행하였다. 그러나 이 과정에서 washing후 자연 건조하여 얻어진 리파제는 반응유기용매 내에서 dispersion이 잘 되지 않아 기질과의 접촉에 상당한 문제점을 보여주었다. 그 결과 충분한 반응시간이 지난 후에도 ester의 합성이 거의 이루어지지 않았다. 이는 리파제에 대한 inhibitor의 affinity측면에서 고려해 보아야 할 사항이었다.

2) Inhibition kinetics

따라서, 리파제에 대한 inhibitor의 inhibition kinetics에 대한 연구를 실행하였다. 먼저 initial velocity는 반응시간에 따른 ester합성 양을 GC에서의 (R), (S)-enantiomer 각각의 integrated area로써 측정하였다(Figure 5) 그 결과 24시간까지 linear하게 증가하는 것을 볼 수 있었고(Figure 24) 따라서 16시간 후 product의 생성량으로써 initial velocity를 구하였다. 마찬가지로 방법으로 반응을 진행시키되 inhibitor 20mM를 반응 전 reaction vial에 넣고 여러 농도의 (±)-2-methylbutanoic acid에 일정한 농도의 methanol을 기질로 하여 반응을 진행시킨 후 ester합성 activity를 측정하였다. Activity는 GC를 이용하여 분리된 (S), (R)-methylbutanoic acid methyl ester의 integrated area로써 측정하였다. 16시간 반응시킨 후 기질농도증가에 따른 ester합성정도를 가지고 Michaelis-Menten curve를 그려본 결과 전형적인 포화곡선을 그리는 것으로 나타났다.(Figure 25)

리파제가 관여하는 대부분의 heterocatalytic reaction에서는 리파제를 반응이 일어나기에 적합한 구조로 만들기 위해 interfacial activation이 필요한데 이 interfacial activation을 위한 최소한의 농도를 interfacial activation concentration이라고 한다. 기질의 농도가 80mM이하에서 ester합성이 이루어지지 않는 것으로 보아 이 농도를 interfacial activation농도로 보았다. 100mM에서부터 점차적으로 기질의 농도를 증가시켜 나갈 때 기질의 농도가 750mM을 넘어서면 product inhibition의 결과로 ester합성 양이 점차적으로 줄어드는 것으로 나타났다. Reaction kinetics parameters를 구하기 위해 double reciprocal plot(Linweaver-Burk plot)을 그리고 y절편값으로써 $_{app}K_M$, $_{app}V_{max}$, K_i 을 구하였다.(Figure 26) 그 결과 리파제에 대한 inhibitor, 즉 2-methylbutanoic amide의 inhibition은 competitive inhibition성격이 강하며 $_{app}K_M$ 은 1121.36mM, K_i 은 84.175mM임을 구할 수 있었다. 1/2 V_{max} 에 도달하기 위해 필요한 기질의 농도로 정의되는 $_{app}K_M$ 값이 1121.36mM인데 반해 효소와 inhibitor복합체의

dissociation을 의미하는 상수인 K_i 값이 84.174mM으로, ${}_{app}K_M$ 에 비해 10배 이상 감소하는 것을 볼 때 이 inhibitor는 리파제에 대한 affinity가 매우 높아 일단 복합체를 형성한 후에는 해리되기 어렵다는 것을 알 수 있었다. 때문에 먼저 실행한 inhibitor를 이용한 리파제 구조 변형실험에서 inhibitor가 효소와 irreversible하게 결합함으로써 제거해 주기가 어려웠던 것임을 알 수 있었다.

Inhibitor를 리파제에 결합시키고 conformation 즉 enantioselectivity를 올리고 이 conformation이 변화된 리파제를 이용하여 원하는 ester를 합성하고자 하는 것이 본 연구의 목적이었던 만큼 우선 리파제에 대해 reversible하게 결합하여 제거가 용이한 inhibitor를 찾음으로써 문제점이 개선될 수 있으리라 보고 위와 같은 실험을 통해 리파제의 kinetics에 관한 자료를 제공할 수 있었다.

제9항 입체특이적 지방산 에스테르 생산

1. 향기성분 분석

Racemic 지방산에스테르화합물의 향기특성은 약간의 사과향이 난다고 하였지만 대부분(19명/20명)이 향기로운 듯하면서도 발코랑내 냄새가 난다고 하였다. 향기가 좋다고 판정한사람은 없고 잘모르겠다 (3점: 7명), 싫다 (0점: 13명)이었다. 이어 값비싼 기질인 (S)-methylbutanoic acid로 부터 화학합성하여 소량 얻은 후에 관능검사를 실시한 결과 모두 (10명) 매우 향기로운 향으로 사과향(7명), 딸기향(3명)으로 판정하였고, 9명이 매우 좋다고 판정하였다(5점: 1명, 4점)하였다. 이는 이 고부가가치 지방산에스테르 화합물인 (S)-methylbutanoic acid methylester를 값싸게 합성할 경우 상품성이 매우 큰 것으로 보인다. 참고로 지방산 butyric acid의 methanol 에스테르화합물의 입체이성질체에 따른 가격차이는 100배 이상 차이가 난다. 즉 D-형이 L-정보다 대체로 100배 이상 가격차이가 난다.

앞으로 본연구가 성공적으로 잘 진행되면 고부가가치 지방산에스테르화합물

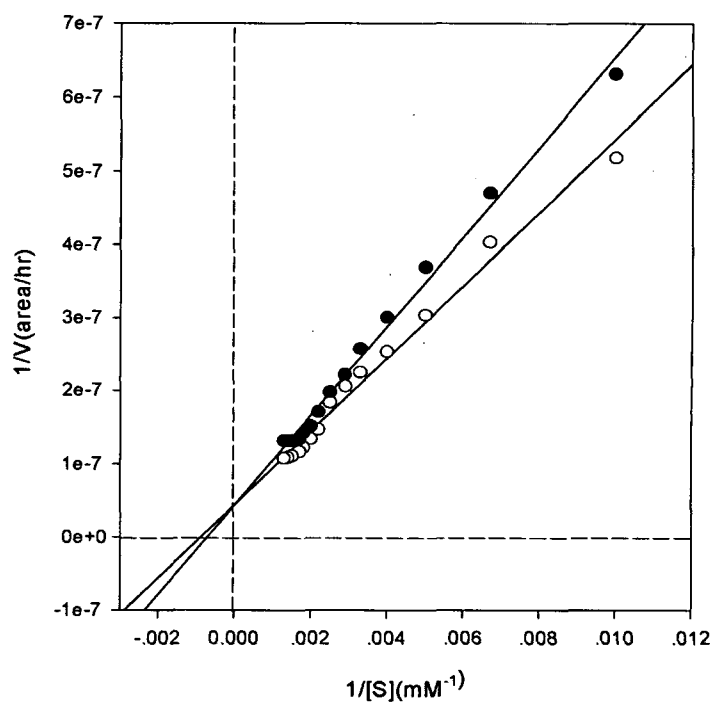


Figure 26. The Lineweaver-Burk plot of lipase inhibition by (S)-methyl-butanoic amide. Inhibitor contents were (○) 0mM, (●) 20mM.

을 값비싸게 생산할 수 있다. 다만 아직 소량이기 때문에 3년 연구로는 시작품을 생산 연구를 충분히 할 수 없음을 아쉽게 생각한다.

2. 합성 지방산 에스테르의 정제

본 연구에서 리파제에 의하여 생산된 고부가가치 지방산에스테르 화합물은 앞서의 관능 평가 결과 매우 좋은 결과를 얻었으므로 정제 과정을 거치지 않고 사용하더라도 큰 문제는 없을 것으로 사료된다. 그러나 기질(acid)에 의한 약간의 불쾌취가 문제가 될 수 있을 것으로 사료되어 Figure 27과 같은 분자증류시스템 (molecular distillation system)을 이용하여 rac-2-methylbutanoic acid를 제거하도록 하였다. 분자 증류 후 기질이 따로 분리됨을 GC 분석결과와 소집단 관능평가로 확인하였다. 그러나 분자증류후 반응산물을 GC 분석결과 불행하게도 분자증류시스템으로는 고부가가치 입체특이성 지방산 에스테르화합물의 입체이성질체를 직접 분리할 수는 없었다. 즉 분자증류로는 (S)-2-methylbutanoic acid ethylester와 (R)-2-methylbutanoic acid ethylester를 분리할 수는 없었다. 따라서 이 분자 증류시스템을 반응기에 연결하여 on-line 분리정제 시스템을 개발하였다 (Figure 23).

3. 생물반응기의 최적화

앞서 언급한 바와 같이 유기용매는 isooctane을 이용하고 리파제는 *Aspergillus* 계통의 리파제를 부분 정제후 비수계유기용매시스템 (non-aqueous organic solvent system)에서 고부가가치 입체이성질체 지방산 에스테르 ((S)-2-methylbutanoic acid ethylester)를 생합성하였다. 반응 조건은 리파제를 pH6-7에서 lyophilization하여 물을 제거하였고, 이 과정 중 경쟁적저해제인 입체이성질체 amide ((S)-methylbutanoic amide)를 이용하여 molecular imprinting을 통하여 리파제의 입체특이성을 증가시킬 수 있었다. 또한 반응 조건은 입체특이성을 증가시키기 위하여는 낮은 온도 (10℃)가 적합하였으며 acid에서 ester로의 전환은 높은 온도 (40-50℃)가 유리하였다. 반응후 Figure 23과

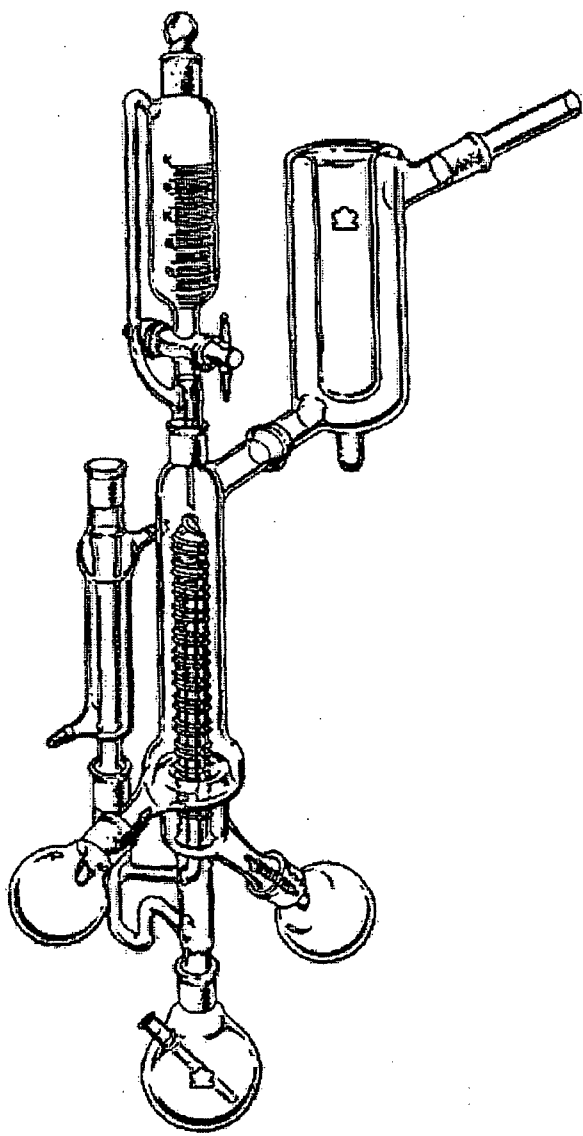


Figure 27. The molecular distillation kit

같이 입체특이적 지방산 에스테르를 분자증류시스템으로 정제할 수 있었고 효소는 재활용하여 사용할 수 있어서 새로운 기질을 공급하여 사용할 수 있다. 참고로 비수계유기용매에서는 효소의 안정성 (operation stability)는 매우 높다고 보고되어 있으며 실제 본 실험의 결과도 매우 높았다.

제10항 리파제의 생산 연구

1. 발효기술 개발

앞으로 리파제를 생산할 경우 본 연구에서 사용한 일본에서 구입한 리파제 (*Aspergillus niger*)의 경우 일본에서 생산성이 높게 생산되고 있으므로 한국에서 같은 리파제를 이용하여 경쟁하는 것은 경쟁력이 떨어질 것으로 보아 본 연구의 협동 연구결과(중앙대) 입체특이성이 우수한 것으로 판명된 *Aspergillus nidulans* 계통의 리파제를 생산하기 위한 발효조건 및 생산 조건을 조사하였다. (Figure 28). 발효조건은 대수기(log phase) 후반에서 리파제의 활성이 가장 높았으므로 리파제를 *Aspergillus nidulans* 균주를 18시간 배양 후 반응을 중지한 후 바로 리파제 생산에 이용하였다. 이 리파제는 carbon source 미니말 배지에서 리파제 활성이 높았으며 pH 6.5에서 가장 강한 리파제 활성도를 보여주고 있다. 앞으로 다양한 발효조건하에서 리파제의 생산 조건을 연구할 필요성이 있을 것으로 생각되나 현재로서는 *Aspergillus nidulans*에서 생산된 리파제의 발효기술연구는 일본의 균주보다 enantiomeric selectivity가 높지 않아서 (후술) 문제가 있으므로 자세한 연구의 필요성은 느끼지 않는다. 따라서 앞으로 정확한 경제성 분석이 우선되어야 할 것으로 본다. 경제성이 보장된다면 더 나아가서는 리파제 생산 균주의 탐색부터 시작하여야 할 것으로 본다.

2. 효소 생산 기술 개발

리파제 생산 균주로부터 리파제의 분리 정제 생산 기술은 앞서 연구한 분리

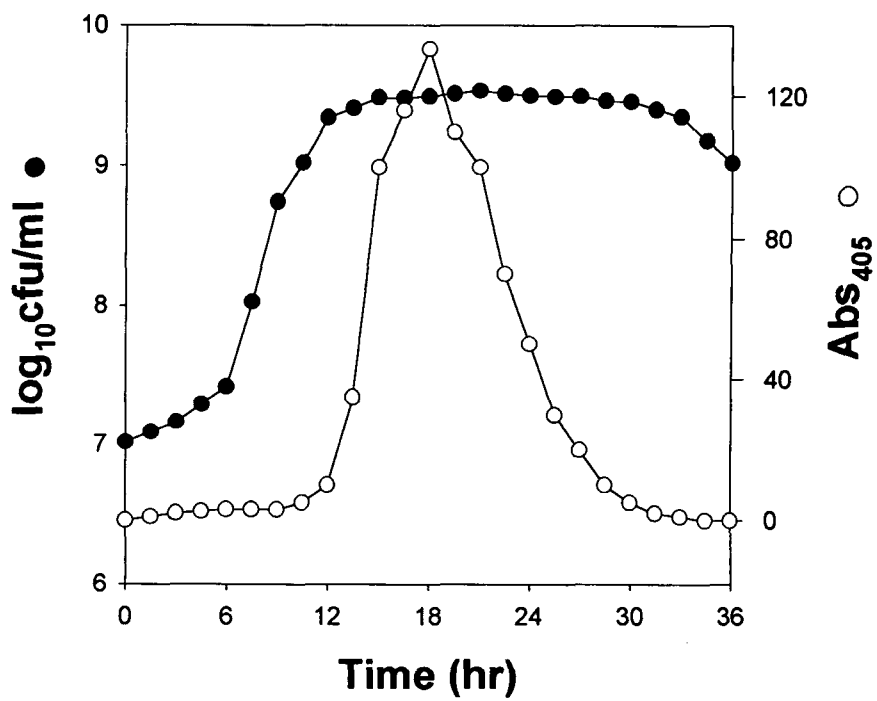


Figure 28. Changes in cell population (CFU/ml) and p-nitrophenyl production activity of *Aspergillus niger* during aerobic incubation at 37°C for 36 h.

정기술을 인용하여 적용할 것으로 본다. 다만 새로운 균에서의 발효기술과 생산 기술은 앞으로 고부가가치 입체특이성을 갖는 리파제가 탐색된다면 별도의 연구를 진행하여 발효기술과 분리정제 기술을 변형하여 진행해야 할 것으로 보인다. 다만 일본에서 현재 생산되고 있는 리파제는 부분정제되어 상품화하고 있으므로 이를 본 연구에서와 같이 정제할 필요성이 있다면 본 연구의 결과가 고부가가치 입체 이성질 지방산 에스테르 화합물 생산에 그대로 활용될 것으로 본다. 다만 이때는 정제에 드는 비용과 enantiomeric excess 증가율과의 경제성 분석이 우선되어야 할 것으로 본다.

제2절 입체특이적 리파제의 발현시스템 개발

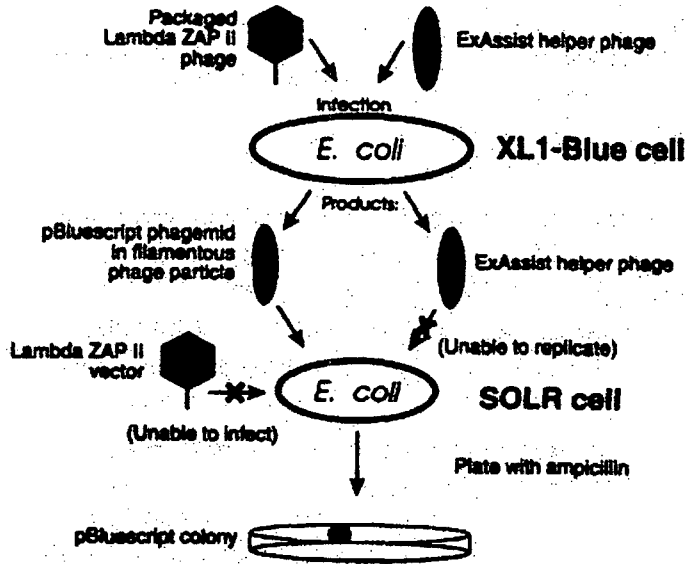
제 1항 리파제 유전자 탐색

1. Lambda ZAP cDNA library로부터 곰팡이 lipase gene screening

Lipase 유전자는 species간에 homology가 매우 적은 것으로 알려져 있다. 따라서 이 유전자를 선별하기 위해서는 PCR이나 항체를 이용한 방법은 적당하지 않을 것으로 생각된다. Rhodamine B는 lipase가 기질과 반응하여 나오는 유리 지방산과 반응하여 UV하에서 형광을 나타내는데, 이러한 원리에 의한 lipase 유전자를 선별하는 방법을 이용하였다. 본 연구에서는 1차년도에 *Aspergillus* lipase, rice lipase 및 *Pseudomonas* lipase를 클로닝 한 후 이를 확인하고자 하였다. 주관연구기관의 연구결과에 의하면 *Aspergillus*속의 lipase가 입체특이성을 높게 나타내어 *Aspergillus* 속을 먼저 이용하였으며 별도로 rice 및 박테리아 *Pseudomonas* 속으로부터 lipase를 선별하고자 하였다. *Aspergillus fumigatus*와 *Aspergillus nidulans* lambda ZAP cDNA library로부터 Chung 등 (1991)의 역가발현 방법을 응용하여 lipase 유전자를 screening하였다. Figure 29은 lambda ZAP으로부터 플라스미드 pBluescript으로의 rescue 과정을 보여준다.

XL1-Blue와 SOLR cell을 LB 배지에서 30 °C로 하룻밤 키웠다. 각각의 균을 원심분리하고 10 mM MgSO₄ 용액에 600 nm에서의 absorbance 1.0으로 현탁하였다. 50 ml conical tube에 lambda ZAP cDNA library와 XL1-Blue cell을 1:10 (phage:cell) 비율로 혼합한 후 amber mutant helper phage인 Exassist를 10:1 (helper phage:cell) 비율로 첨가하고 37 °C에서 15분간 phage가 흡착하도록 하였다. 여기에 20 ml의 LB 배지를 첨가하고 2-3 시간 동안 진탕하면서 배양한 후 70 °C로 15 분간 열처리하였다. 이를 원심분리한 후 상등액 1 µl에 SOLR cell 200 µl를 첨가하고 37 °C로 15 분간 정치하였다. 이 용액 100 µl를

A



B

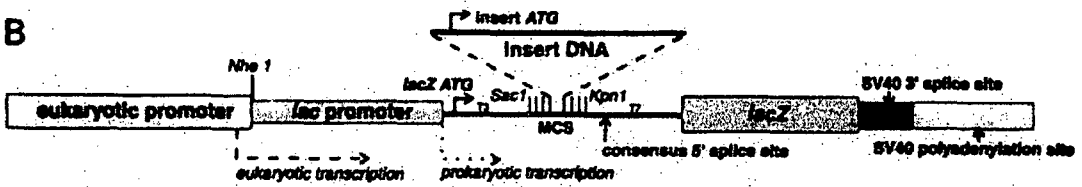


Figure 29. A, Mass excision using ExAssist™ helper phage selection; B, ZAP Express function regions.

0.001% rhodamine B, 0.5% tributyrin, 0.1% gum arabic이 함유된 LB/ampicillin plate에 도말하여 배양한 후 clear zone을 나타내는 콜로니를 선발하였다.

Aspergillus nidulans 및 *Aspergillus fumigatus*로부터 얻은 NL, FL 계열의 클론들이 생산하는 효소의 기질로서 tributyrin 이외에 olive oil을 사용한 결과 역가가 거의 나타나지 않아 olive oil에서도 역가를 갖는 클론을 얻기 위해 다시 screening을 수행하였다. Screening 시 먼저 tributyrin배지에서 역가를 가지는 클론을 선별하고 다시 olive oil 역가배지에 도말하여 역가를 확인하였다.

선발된 콜로니를 0.5% olive oil/0.001% rhodamine 배지에 도말하여 366 nm에서 형광을 나타내는 콜로니를 선별하였다. Figure 30는 형광을 보이는 SOLR cell의 콜로니들을 보여준다. 여기서 *Aspergillus nidulans*의 lambda ZAP cDNA library로부터의 rescue된 콜로니들 중에 lipase 유형의 역가를 나타내어 UV 상에서 형광을 보이는 것을 화살표가 보여준다. Rhodamine 배지에서 형광을 나타내는 균은 플라스미드에서 lipase 유전자가 발현되는 것을 의미하므로 이러한 콜로니들을 선발하였다.

여러 콜로니가 가지고 있는 플라스미드를 분리하고 insert를 제한효소로 절단하여 제한효소 절단 양상을 조사한 결과 중복되는 것을 제외하고 *Aspergillus nidulans*에서 뚜렷이 lipolytic activity를 보이는 A-22, N-53, N-30B 등 3개의 클론을 얻을 수 있었다. Figure 31는 tributyrin이 용해됨에 따른 clear zone을 보이는 A-22, N-30B, N-53 클론의 균을 보여준다. Insert가 없는 pBluescript를 가지는 SOLR cell (A)에서는 변화가 없으나 A-22, N-30B, N-53 plasmid를 포함하는 SOLR cell은 각각 (B), (C), (D) 에서 보여주듯이 clear zone을 나타낸다. 이러한 균은 Rhodamine 배지에서 형광을 나타내는 특징으로 선별을 한 것이나, 다시 rhodamine과 olive oil을 포함한 배지에 3 균을 도말하여 activity를 확인한 것을 Figure 32가 보여준다. Figure 31처럼 (A)는 대조구이며 (B), (C), (D)는 각각 A-22, N-53, N-30B을 나타낸다. 여기에서 A-22, N-30B와 N-53 모두 형광을 나타내었다. 이와 같이 tributyrin 배지에서 clear zone을 나타내고

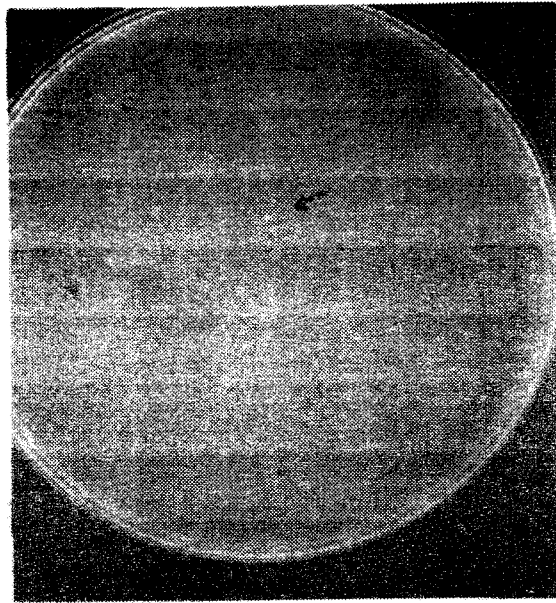


Figure 30. The screening of *E. coli* for lipase activity. Arrows indicate the colonies containing the ω -inserted pBluescript.



Figure 31. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes. A; SOLR harboring the pBluescript plasmid, B; SOLR harboring the A-22 plasmid, C; SOLR harboring the N-30B plasmid, D; SOLR harboring the N-53 plasmid.

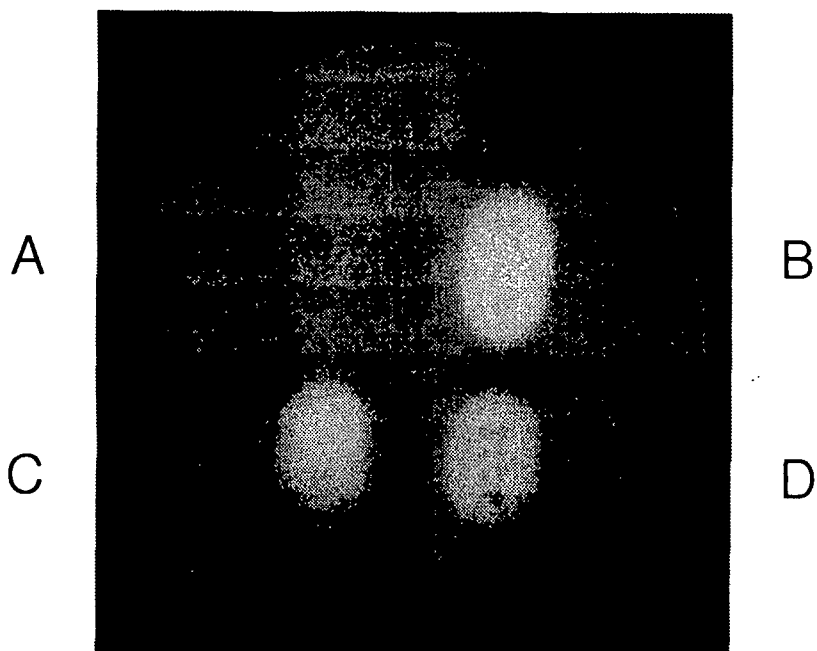


Figure 32. Fluorescence photograph of SOLR cells harboring the pBluescript plasmid. A, SOLR harboring the pBluescript plasmid; B, SOLR harboring the A-22 plasmid; C, SOLR harboring the N-30B plasmid; D, SOLR harboring the N-53 plasmid. Cells were grown on the agar plate containing olive oil and rhodamine B.

rhodamine/olive oil 배지에서 형광을 나타낸다는 것은 플라스미드에 있는 lipolytic activity를 가지는 효소의 유전자가 대장균에서 발현되는 것을 의미하므로 이러한 콜로니들을 선발하였다.

제 2 항 리파제유전자의 분리 및 확인

1. 식물 리파제 gene cloning 및 확인

λ gt11에 만든 germinating rice cDNA library를 Y1089 lysogeny cell에 infection시킨 후 assay 배지에 도말하여 강한 형광을 내는 colony를 선발하여 이를 RL로 명명하였다. Figure 33는 lipase activity를 나타내는 콜로니 RL을 분리한 후 assay 배지에 plating된 콜로니들로 강한 형광을 보여주고 있다. 확인을 위하여 λ gt11이 infection된 균주임을 확인하는 실험과 선발균주에서 나오는 형광이 효소활성에 의해서 나타나는 것임을 확인하는 실험으로 나누어 진행하였다. 먼저 λ gt11이 infection되지 않은 Y1089와 기타 다른 *E. coli*를 assay 배지에서 키워 형광을 내는지 관찰하였으며 lambda에 infection되었으나 형광을 나타내지 않은 Y1089를 대조구로 사용하였다. 실험결과 선발된 RL균주 이외에 어떤 다른 균주에서도 형광을 관찰 할 수 없었다. Biolog 96 well plate를 사용하여 동정한 결과 RL균주는 *E. coli*임을 알 수 있었다. 두번째로 효소 활성에 의한 형광인지를 확인하기 위하여 배지에서 기질을 빼고 RL균주를 키워 보았다. 그 결과 기질을 넣어주지 않은 배지에서는 형광을 관찰할 수 없었다. 하지만 여기서 선발된 RL균주는 위의 실험방법에서 수행한 IPTG induction 과정이 없이도 효소활성을 나타내었다. 따라서 각각의 실험과정에 대한 control 실험을 진행하였다. 선발된 RL균주는 IPTG를 처리하지 않아도 역가를 나타내는 것을 보아 λ gt11에 있는 β -gal promoter에 영향을 받지 않고 다른 방향의 promoter에 영향을 받았을 가능성이 있다. 실제로 Chirala 등 (1986)에 의하면

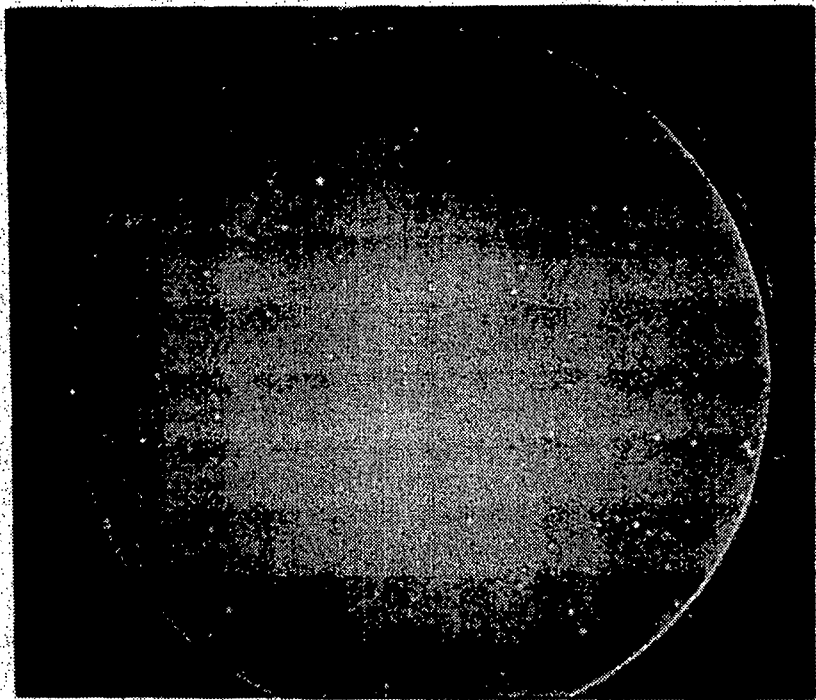


Figure 33. Fluorescence photograph of RL, which is Y1089 cell harboring λ gt11 containing a rice lipase gene.

β -gal promoter와 반대방향의 *lom* (b와 J사이의 20 kDa outer membrane protein) promoter가 β -gal promoter 대신에 이용될 수 있음을 발표하였다. 한편 대장균내의 lipase를 방출시키는데 isooctane 처리가 특별한 효과를 보여주지는 않았다.

Figure 34은 tributyrin배지에서 RL균이 clear halo를 보이는 것을 나타낸다. RL균은 olive oil 배지에서는 형광을 나타내나 clear zone의 형성은 약하였다. 하지만 tributyrin 배지에서는 이를 이상 배양하였을 경우 이를 녹여 clear zone이 뚜렷이 보였다.

Figure 35은 12% SDS-polyacrylamide gel에서 약 분자량 60,000을 나타내는 lipase 단백질 (화살표)이 발현되는 것을 보여준다.

선발한 λ gt11에 존재하는 insert DNA를 확인하기 위하여 NEB#1218 lambda gt11 forward primer (GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)와 NEB#1222 reverse primer (TTGACACCAGACCAACTGGTAATG)를 사용한 PCR반응 결과를 Figure 36이 보여 준다. 여러 PCR band가 나타났으나 가장 강한 밴드가 약 1.5 kb 정도이므로 Figure 37에서 측정된 분자량 약 60,000의 단백질과 계산상으로 일치함을 알 수 있었다.

2. *Pseudomonas cepacia* lipase 유전자 클로닝

*Pseudomonas*속의 박테리아는 역가가 높은 lipase를 분비하기 때문에 이에 대한 연구는 활발하다. *Pseudomonas fragi*의 lipase에 유전자에 대한 연구 (Kugimiya *et al.*, 1986)가 발표되었으며 *Pseudomonas aeruginosa*의 extracellular lipase 유전자의 DNA 염기서열이 발표되었다 (Wohlfarth *et al.*, 1992). 국내에서는 한국과학기술원의 이준식 교수 실험실에서 *Pseudomonas fluorescens*로부터 내열성의 lipase 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시켰다 (Chung *et al.*, 1991). 본 실험실에서는 박테리아로서 높은 lipase 역가를 가지는 균주 NL1과 NL2를 선발하여 동정한 결과 *Pseudomonas cepacia*와 70% homology가 있는 것으로 판정되었다. Figure 37에서 보여 주듯이 NL1과 NL2

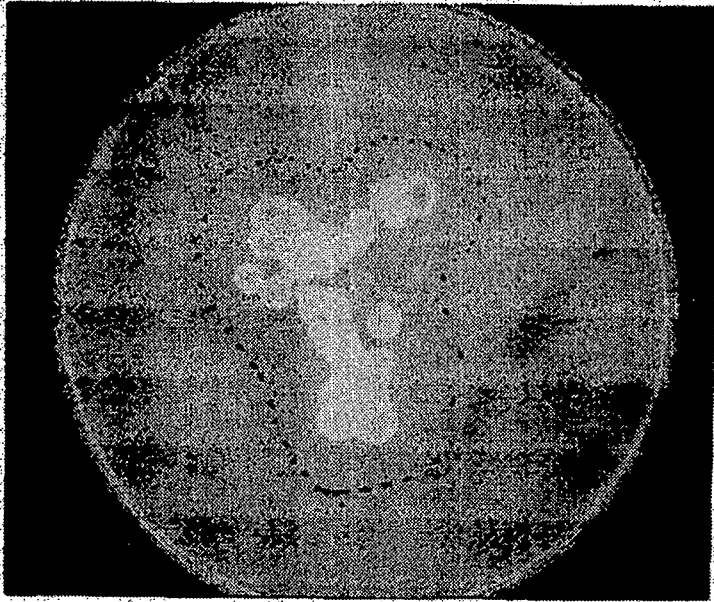


Figure 34. Formation of a clear halo on tributyrin LB agar media by RL strain. Dotted line show the clear halo.

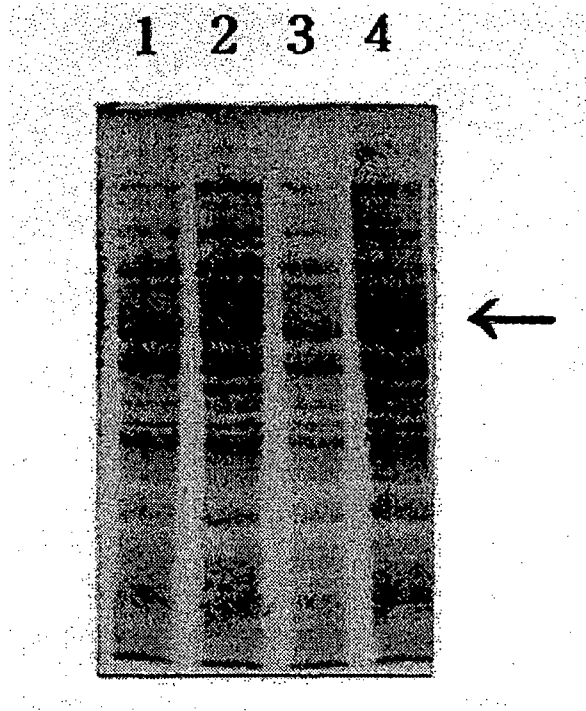


Figure 36. PCR amplification of the rice lipase inserted into a λ gt11 in Y1089. Lane 1, Stratagene's 1 kb DNA ladder; lanes 2-4, amplified DNA fragments. Arrow indicates the putative amplified DNA fragment based on the lipase molecular weight shown in the lane 4 of Fig. 7.

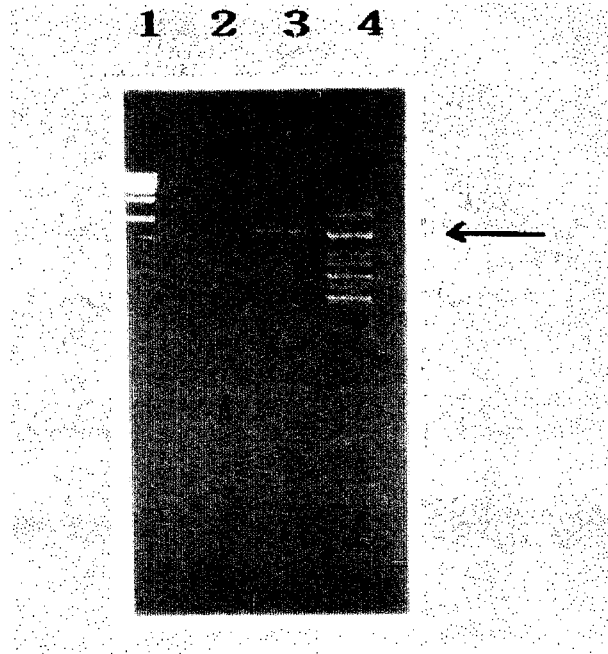


Figure 36. PCR amplification of the rice lipase inserted into a λ gt11 in Y1089. Lane 1, Stratagene's 1 kb DNA ladder; lanes 2-4, amplified DNA fragments. Arrow indicates the putative amplified DNA fragment based on the lipase molecular weight shown in the lane 4 of Fig. 7.

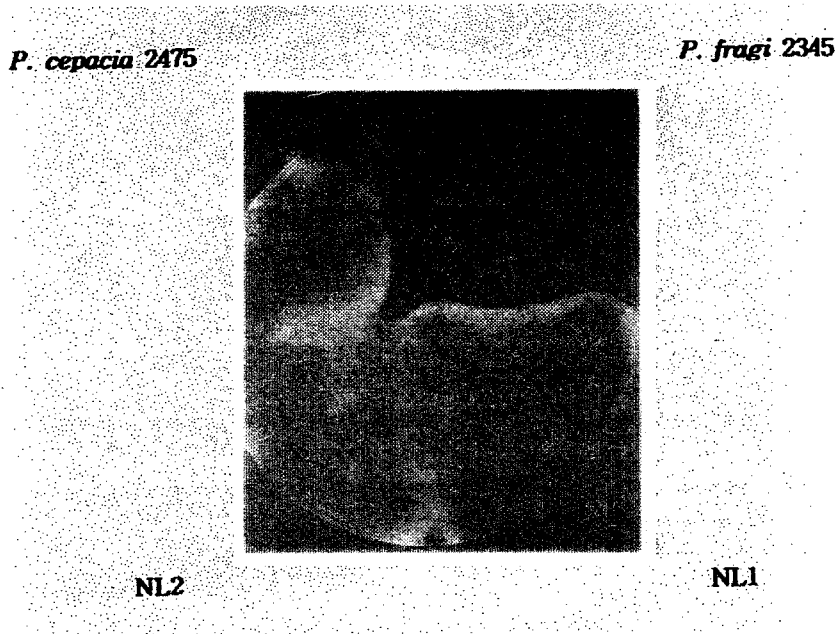


Figure 37. Fluorescence photograph of NL1, NL2, *Pseudomonas cepacia* 2475, and *Pseudomonas fragi* 2345 on the rhodamine assay agar plate.

는 rhodamine assay 배지에서 아주 강한 형광과 halo를 보여주나 *Pseudomonas fragi* 2345는 형광과 halo를 나타내지 않았다. *Peudomonas cepacia* 2475와 2860도 역시 강한 형광과 넓은 halo를 형성하나 육안의 콜로니 색깔은 상이하여서 동일한 species일지는 모르나 다른 특성의 균주라 생각된다.

Pseudomonas cepacia lipase 유전자의 클로닝과 대장균에서의 발현에 대한 연구 (Jorgensen *et al.*, 1991)에 의하면 lipase 단백질이 역가를 보이기 위해서는 특이하게 *limA*라는 또다른 단백질을 필요로 한다는 것이 밝혀졌다. *limA*의 역할은 아마도 chaperone으로서 단백질 생합성시 folding과 이어서 분비에 관여할 것으로 추정되고 있다 (Hobson *et al.*, 1993; Aamand *et al.*, 1994; Hobson *et al.*, 1995).역가에 의해서 lipase를 클로닝할 때나 이를 대장균에서 overexpression 할 경우에 예상과는 달리 역가가 낮게 나오는 것이 일반적으로 관찰된다. *limA* 단백질이 없을 경우 lipase가 발현된다 할지라도 효소역가가 나타나지 않는 것이 이 현상에 대한 일부 설명이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 1차년도에 벼 발아종자 lambda gt11 cDNA library로부터 lipase역가를 나타내는 하나의 클론을 선별하였고 lipase 역가가 높은 *Pseudomonas* 속의 균주를 분리하였고 *Aspergillus nidulans* Uni-ZAP cDNA library 로부터 tributyrin을 분해하는 역가를 가지는 세종류의 클론들을 얻었다. 하지만 곰팡이의 lipase가 입체특이적이라는 주관연구기관의 결과가 있어 곰팡이의 lipase에 초점을 맞추었다.

3. pBluescript에서의 lipase insert 확인

클론된 *Aspergillus nidulans* cDNA insert의 크기를 확인하기 위하여 lambda ZAP vector에서 library 제작시 이용한 제한효소들인 *EcoRI*과 *XhoI*을 동시에 사용하여 분리된 pBluescript를 절단하였다. Figure 38에서 A-22 플라스미드를 두 제한효소로 절단한 결과를 1% agarose gel 전기영동으로 보여주고 있다. Lane 1은 절단하지 않은 플라스미드를 나타내고 lane 2는 *EcoRI*으로 절단한 경우로 약 800 bp의 절편을 얻을 수 있어 pBluescript의 *EcoRI*과 *XhoI*

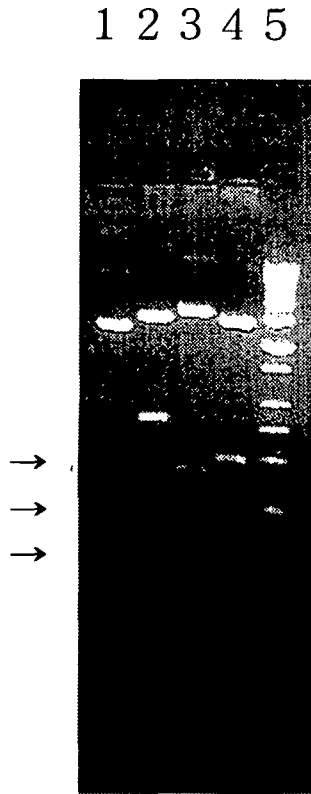


Figure 38. Digestion of A-22 plasmid containing a lipolytic enzyme gene with *EcoRI* and *XhoI*
Lane 1, uncut A-22 plasmid; lane 2, digested A-22 with *EcoRI*; lane 3, digested A-22 with *XhoI*
lane 4, digested A-22 with *EcoRI* and *XhoI*; lane 5, Stratagene's 1 kb DNA ladder.

site 사이에 들어가 있는 insert 내부에 *EcoRI* site가 하나 있음을 보여준다. Lane 3는 *XhoI*으로 절단한 경우로 약 400 bp 이상의 절편을 얻을 수 있어 역시 내부에 *XhoI* site가 하나 있음을 나타낸다. Lane 4는 *EcoRI*과 *XhoI*을 동시에 사용하여 절단한 결과이며 약 500 bp, 300 bp, 그리고 희미하게 보이지만 약 100 bp 이상의 3개 절편이 보인다. Lane 5는 Stratagene의 1 kb DNA ladder size marker이다. 이러한 결과에 의거하여 A-22에 있는 lipase 역가를 보이는 DNA는 약 900 bp이상으로 pBluescript의 *EcoRI* site 쪽으로부터 약 500 bp 정도에 *XhoI* site가 있고 그곳으로부터 약 300 bp 정도에 *EcoRI* site가 있다는 것을 알 수 있다. Figure 39은 N-30B 플라스미드를 두 제한효소로 절단한 결과이다. Lane 1은 절단되지 않은 플라스미드이고 lane 2는 *EcoRI*으로 절단한 경우로 약 1000 bp의 절편을 얻을 수 있어 pBluescript의 *EcoRI*과 *XhoI* site 사이에 들어가 있는 insert 내부에 *EcoRI* site가 하나 있음을 보여준다. Lane 3는 *XhoI*으로 절단한 경우로 약 400 bp 이상의 절편을 얻을 수 있어 역시 내부에 *XhoI* site가 하나 있음을 나타낸다. Lane 4는 *EcoRI*과 *XhoI*을 동시에 사용하여 절단한 결과이며 약 700 bp, 300 bp, 그리고 희미하게 보이지만 약 100 bp 이상의 3개 절편이 보인다. Lane 5는 Stratagene 회사의 1 kb DNA ladder size marker이다. 이러한 결과에 의거하여 N-30B에 있는 lipase 역가를 보이는 DNA는 약 1100 bp 이상으로 pBluescript의 *EcoRI* site 쪽으로부터 약 700 bp 정도에 *XhoI* site가 있고 그곳으로부터 약 300 bp 정도에 *EcoRI* site가 있다는 것이 밝혀졌다. Figure 40은 N-53 플라스미드를 두 제한효소로 절단한 결과이다. Lane 1은 절단하지 않은 플라스미드이고 lane 2와 3는 각각 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 것을 보여주며 선형의 플라스미드만이 gel에 나타나는 것으로 보아 내부에 이 효소의 절단지역이 없음을 알 수 있다. Lane 4는 *EcoRI*과 *XhoI*을 동시에 사용하여 절단한 경우로 insert의 크기가 약 560 bp임을 알 수 있다.

4. Cell extract에서의 lipolytic enzyme activity

A-22, N-30B, N-53 cell을 배양하고 lysis buffer에 현탁한 후 lysozyme 처

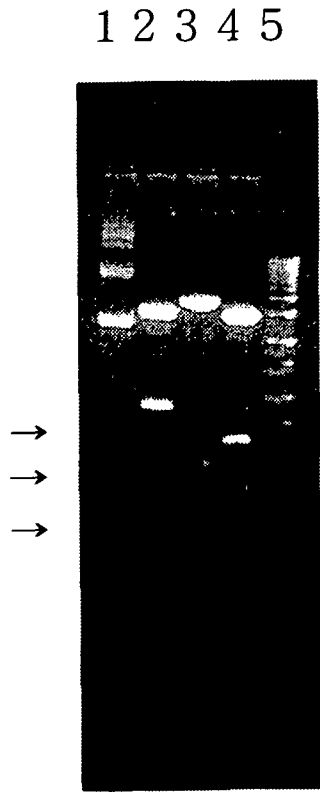


Figure 39. Digestion of N-30B plasmid containing a lipolytic enzyme gene with *EcoRI* and *XhoI*. lane 1, uncut N-30B plasmid; lane 2, digested N-30B with *EcoRI*; lane 3, digested N-30B with *XhoI*; lane 4, digested N-30B with *EcoRI* and *XhoI*; lane 5. Stratagene's 1 kb DNA ladder.

1 2 3 4 5

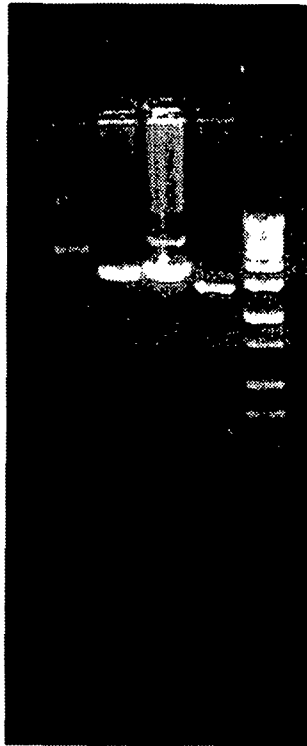


Figure 40. Digestion of N-53 plasmid containing a lipolytic enzyme gene with *EcoRI* and *XhoI*. Lane 1, uncut N-53 plasmid; lane 2, digested N-53 with *EcoRI*; lane 3, digested N-53 with *XhoI*; lane 4, digested N-53 with *EcoRI* and *XhoI*; lane 5, Stratagene's 1 kb DNA ladder.

리, freezing/thawing 처리, sonication하여 각각의 cell pellet과 상등액을 얻었다. Tributyrin agar plate 위에 약 3 mm의 구멍을 뚫고 여기에 동량의 상등액 (A)과 cell pellet (B)을 loading한 후 이를 동안 37 °C에서 반응시킨 결과를 Figure 41이 보여준다. 1은 pBluescript 플라스미드를 포함하는 균, 2는 N-53 균, 3은 N-30B 균, 4는 A-22 균을 나타낸다. 대조구인 pBluescript 플라스미드를 함유하는 대장균의 경우를 제외하고는 N-53, N-30B, A-22를 포함하는 대장균의 경우 상등액과 cell pellet에서 모두 clear zone이 보인다. 이는 pBluescript 벡터내의 lipolytic enzyme gene이 대장균에서 발현될 때 soluble form과 insoluble form 모두가 존재함을 나타낸다. Figure 41과 동일한 형태의 실험을 olive/rhodamine agar plate에서 수행하였다 (Figure 42). 대조구인 pBluescript 플라스미드를 포함하는 대장균의 경우를 제외하고는 N-53, N-30B, A-22를 포함하는 대장균의 경우 상등액에서 뚜렷한 형광을 나타내었다. 특히 A-22의 경우 N-53에 비교하여 더 강한 lipolytic enzyme activity를 보여주었고 N-30B는 중간의 역가를 나타냈으며 이러한 경향은 기타의 실험에서도 알 수 있었다. Cell pellet에서는 N-53, N-30B, A-22의 경우에 아주 약하기는 하지만 olive oil을 분해하는 활성화를 보여주어 역시 soluble form과 insoluble form 모두가 존재함을 나타내었다.

5. Native polyacrylamide gel에서의 activity staining

리파제 활성화가 print technique (Hofelmann *et al.*, 1983)에 의거하여 전기영동한 acrylamide gel을 2% tributyrin을 함유하는 agar plate에 올려 놓은 후 37 °C에서 하룻밤 반응시킨 결과를 Figure 43가 보여준다. Lane 1은 pBluescript를 포함하는 SORL cell extract, lane 2에서 4는 각각 N-53, N-30B, A-22를 포함하는 cell의 extract를 전기영동한 것이다. 대조구의 경우는 역가를 가지는 단백질이 발현되지 않았기 때문에 activity band가 보이지 않으나, N-53 (lane 2), N-30B (lane 3), A-22 (lane 4)의 경우는 native acrylamide gel 전기영동후에도 뚜렷한 tributyrin 분해역가를 나타내었다. 0.5% olive oil 및 0.001%

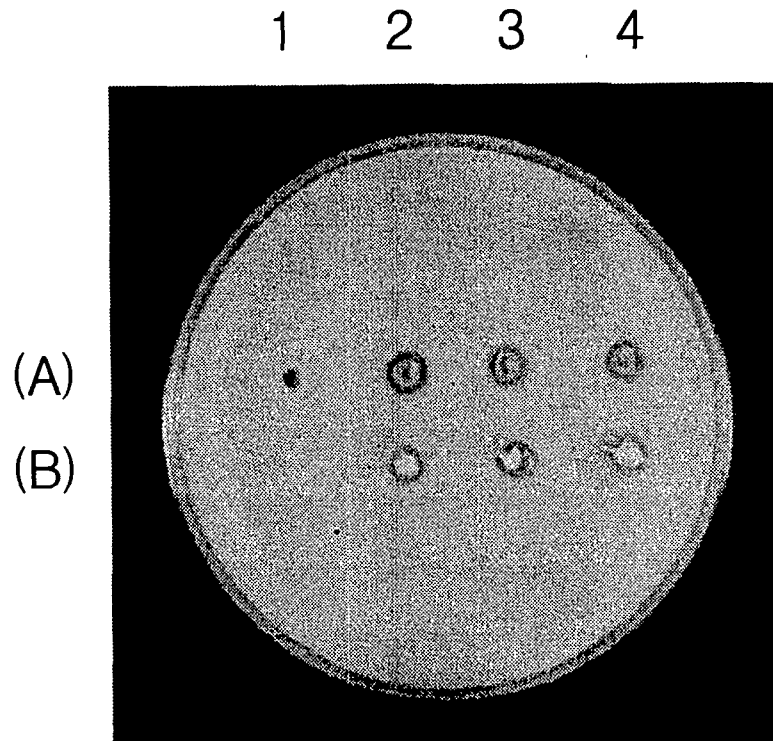


Figure 41. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes.

A, cell extracts; B, Cell pellets; lane 1, SOLR harboring the pBluescript plasmid; lane 2, SOLR harboring the N-53 plasmid; lane 3, SOLR harboring the N-30B plasmid; lane 4, SOLR harboring the A-22 plasmid.

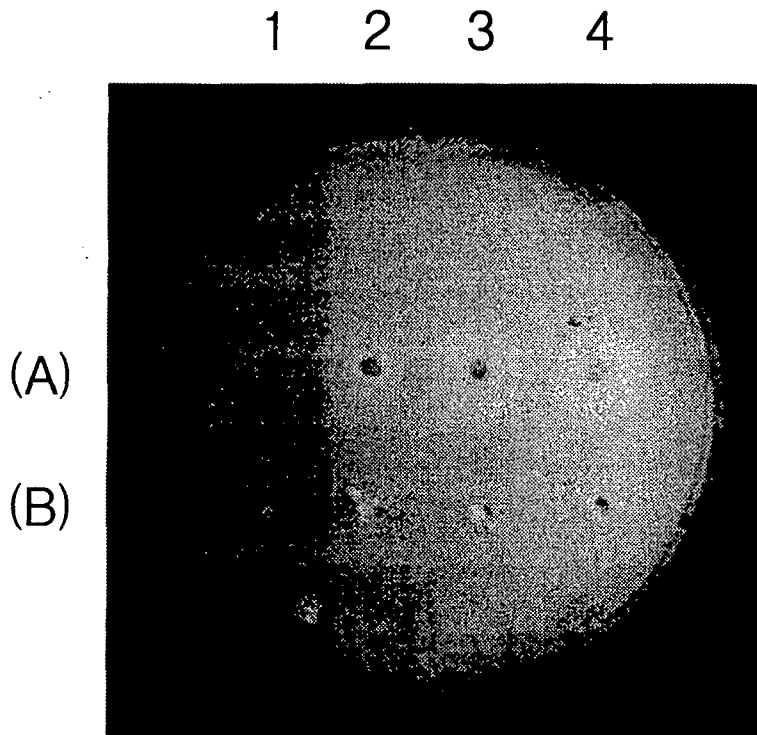


Figure 42. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing olive oil and rhodamine B by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes. A, cell extracts; B, cell pellets; lane 1, SOLR harboring the pBluescript plasmid; lane 2, SOLR harboring the N-53 plasmid; lane 3, SOLR harboring the N-30B plasmid; lane 4, SOLR harboring the A-22 plasmid.

1 2 3 4

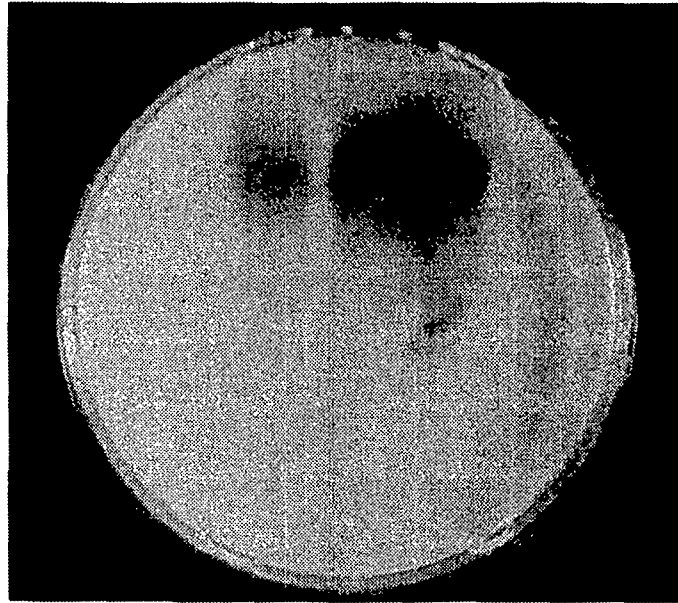


Figure 43. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing tributyrin. Cell extracts were electrophoresed in 7.5% native polyacrylamide gel, which was put later on the agar plate containing tributyrin. Lane 1, extract of the SOLR cell harboring the pBluescript plasmid; lane 2, extract of the SOLR cell harboring the N-53 plasmid; lane 3, extract of the SOLR cell harboring the N-30B plasmid; lane 4, extract of the SOLR cell harboring the A-22 plasmid.

rhodamine을 함유한 agar 배지 위에서도 역시 N-53, N-30B, A-22를 포함하는 cell extract들의 경우 전기영동한 gel에서 activity를 가져 Figure 44에서 보여 주듯이 뚜렷한 형광을 나타내었다. 이 두 실험에서도 N-53의 역가가 N-30B와 A-22와 비교하여 상대적으로 lipolytic enzyme의 역가가 낮았다.

5. 부분 염기서열 결정

N-53, A-22 및 N-30B로부터 얻은 플라스미드를 Pharmacia Automatic DNA sequencer와 silver sequencing을 이용하여 insert의 5'-말단과 3'-말단으로부터의 DNA 부분 염기서열을 얻었다. A-22 (Figure 45)와 N-30B (Figure 46)는 서로 동일 또는 homology가 높은 유전자로 결정되었으며 부분염기서열을 BLAST program으로 분석한 결과 곰팡이 *Fusarium solani*의 cutinase 유사 유전자로 밝혀졌다. Ettinger 등 (1987)에 의하면 fatty acid ester인 cutin을 분해하는 cutinase는 일종의 lipolytic enzyme으로 triacyl glycerol도 분해할 수 있어 olive oil을 분해하는 방법에 의한 본 실험의 클로닝 방법이 유효하다는 것을 알 수 있다. 따라서 Martinez 등 (1992)에 의한 X-ray crystallography에 의하면 cutinase는 lipase와는 달리 catalytic serine이 속으로 들어가 있지 않고 외부에 위치하므로 lipase에서 나타나는 interfacial activation 현상이 없다. N-53 플라스미드의 insert의 경우는 비록 일부 확실하지 않은 염기서열이 있지만 insert의 DNA sequence를 결정했다. pBluescript의 *EcoRI*가 insert 왼쪽 (밑줄)에 있음을 Figure 47에서 알 수 있다. Homology search에 의하면 특별히 유사한 유전자가 없으나 낮은 정도로 glucanase와 유사성을 보이고 본 실험에서 olive oil/rhodamin 배지에서 형광과 clear zone을 나타내는 것을 보아 lipolytic enzyme으로 생각된다. 완벽하지는 않지만 현재까지의 염기서열에 의거하여 아미노산 서열을 살펴보면 lipase consensus sequence와 유사서열이 있어 이 유전자가 lipase 계열의 유전자임을 알 수 있다. 앞으로 interfacial activation을 조사한다면 lipase 여부를 확정할 수 있을 것이다. 본 연구의 목적이 입체특이적 식품소재 지방산 에스테르화합물 개발을 위한 효소의 유전자를 screening하는 것

1 2 3 4

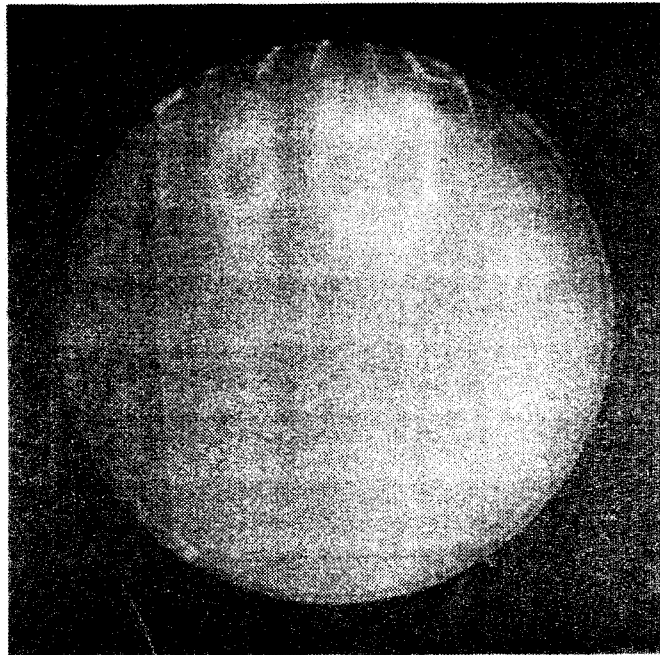


Figure 44. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing olive oil and rhodamine B. Cell extracts were electrophoresed in native polyacrylamide gel, which was put later in the agar plate containing olive oil and rhodamine B. Lane 1, extract of the SOLR cell harboring the pBluescript plasmid; lane 2, extract of the SOLR cell harboring the N-53 plasmid; lane 3, extract of the SOLR cell harboring the N-30B plasmid; lane 4, extract of the SOLR cell harboring the A-22 plasmid.

```
1 ACCGCGGTGG CGGCCGCTCT AGAACTAGTG GATCCCCGGG CTGCAGGAAT
51 TCGGCACGAG AGAACAGCCG GCCTCATCAA GGATATTCAC ATCCAACGCT
101 CCCCTCAATC ATACAAGCAA AATGAAGCTC CAGCTCCACC TCGCCCTTTC
151 CCTCCTTGCC GCTATTGTGG CAGCGAATCC AATCCGTCTC GATCAACGSC
201 AGATCACGGG AAACGAGCTC CGCGACGGTT CCTGCCACGA TGTCACCTTT
251 ATCTTCGCTC GTGGCTCTAC TGAGCTTGGG TACCTGGGCA GCACCGTCGG
301 GCCCBCTACC TGCAATGTCC TGAAACTCAG GAAGCCCSSC CAAGTCGCAT
351 GCCAGGGCGT TGCGCCGGCG TATATCGCCg MCCTGGBTTC TAACTTTCTG
401 CCACAAGG
```

Figure 45. DNA sequence of A-22 inserted in pBluescript.

```

1 GCGCCGCTCT AGAACTAGTG GATCCCCGGG CTGCAGGAAT TCGGCACGAG
51 GAGAGACCCT TGCAATKGGg TAGTATCCAT CAAGTGCCGA CACCATCAAA
101 GCGTTGACAT TGCCGGGTGT CGTAGTAAAC AGACCCTTAG GATGAGGTTA
151 TAAAGAGAGG CAGGTCTACC CTCGAAGAAC AAGCACATTA TCACAGCAGA
201 ACAGCCGGCC TCATCAAGGA TATTCACATC CAACGCTCCC CTCAATCATA
251 CAAGCAAAAT GAAGCTCCAG CTCCACCTCG CCCTTTCCCT CCTTGCCGCT
301 ATTGTGGCAG CGAATCCAAT CCGTCTCGAT CAACGCCAGA TCACGGGAAA
351 CGRGCTCCGC GACGGTTCCT GCCACGATGT CACCTTTATC TTCGCTCGKG
401 GCTCTACTGA GCTTGGGTAC CTGGGCAGCA CCGTCGGGCC CBCTACCTRC
451 AATGTCCTGA AACTCAGGAA GCCCGSGcA AGTCGCATGC CAGGGCGTTG
501 CGCCGGCGTA TATCGCCMCC TGGSTTCTAA CTTTCTGCCA CAAGGRACGA
551 ACCAAATTKC TATTAACGAG gCAAATCT

```

Figure 46. DNA sequence of N-30B inserted in pBluescript.


```
1 GCTCTAGACT AGTGGATCCC CGGGCTGCAG GAATTCGGCA CGAGTTCACG
51 TCTCGCTTNA CCCNCGGTCC TGAGCAACTT CGACAAGAAA ACTGGTGCCA
101 GCGAGCGCGC CAAGGGTCTT GATGAGAGCT ATAAGATCAG CGACAAGGCC
151 GCCAACAGCT GCGCGGGCTT GCACAGCTAC TTTGAGAAGG CTATCAACAC
201 CCCCTCGGGC CGGAAGCTGC GTGACTTTTA CTCTCAGACC GATAAGCAAG
251 TTCGCGATAT TCACGCTGAG GCTCGAAGAC TGGCGGATCT GAAGGCTGGA
301 AAGACTGAGG AGAAGAAAGC TGAGGGTGAA AGCAGCTCTC CTGCGACGGA
351 GTCTAACCCCT GCCCCTGCCC CTGCTCCTGG TGTTGAGCCC GAGGCTGCCC
401 AGGCCGCTCC TGCTACGACC GAGAAGGCGT AGTGGAGTCA CCCTTTGTCA
451 ATTATTGTAT TCGACGATGA CTTTTAACGT CCTAATGACT TTCGCGGATG
501 TGTTTTAGCA TGACATCCTT CAATTTCTCA CGTCATACCT ATCCCCNTGT
551 ATGCTCAAAN ACTTCAATTA CCTATGNACA GNAAAAAAAAA AACC
```

Figure 47. DNA sequence of N-53 inserted in pBluescript.

이므로 본 실험에서 선별한 세 개의 유전자가 앞으로 이용될 수 있을 것이며, 보다 정확한 유전자 염기서열을 결정을 하면 3가지 유전자를 대량발현하는데 도움이 될것이다.

제 3 항 리파제 유전자 클로닝

1. pET32 vector subcloning

상기의 insert DNA를 overexpression하기 위하여 pET32 vector에 subcloning하였다 (Figure 48). A, B, C는 각각 pET32b 벡터에 subcloning된 N-53, N-30B, A-22를 나타낸다. 각각의 lane 1은 MW marker를 나타내고 lane 2는 insert를 가진 각각의 벡터를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 것을 나타내며 이의 양상이 pBluescript에서와 동일한 것을 알 수 있다 (Figure 38-40 참조). 이렇게 pET32b에 subcloning된 것들은 olive oil/rhodamine agar plate에서 역가를 나타내며 하나의 예로 Fig. 49에서 A-22가 subcloning된 pET32b 벡터를 가지는 pLysS cell의 형광을 보여주고있다.

2. 단백질 발현

IPTG로 induction하거나 하지 않은 균 200 ul를 원심분리하고 200 ul buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA)로 3번 세척하고 2 X Laemmli buffer 100-200 ul에 현탁하고 5분간 끓인 후 10-20 ul를 전기영동하여 분석하였다. A-22를 가지는 pET32b를 포함하는 pLysS cell을 IPTG로 induction한 것 (lane 2)과 IPTG로 induction하지 않은 것 (lane 4), 그리고 pET32b를 포함하는 pLysS cell을 IPTG로 induction한 것 (lane 3)의 단백질 양상을 Fig. 50의 12% polyacrylamide gel에서 보여주고 있다. Lane 3의 진한 band는 thioredoxin을 나타내며 lane 4와 비교하여 lane 2에서 특별히 진한 band가 나타나지 않으나, 분자량 20,000과 30,000 사이의 thioredoxin보다 약간 높은 쪽에 왼쪽의 화살표

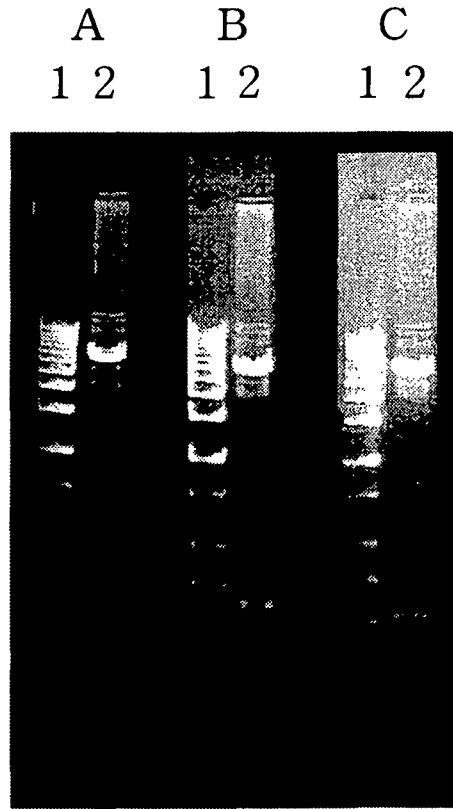


Figure 48. Subcloning of N-53, N-30B, A-22 inserted in pBluescript into pET32b. A, N-53; B, N-30B; C, A-22; lane 1, molecular weight markers; lane 2, subcloned pET32b plasmids digested with *EcoRI* and *XhoI*.

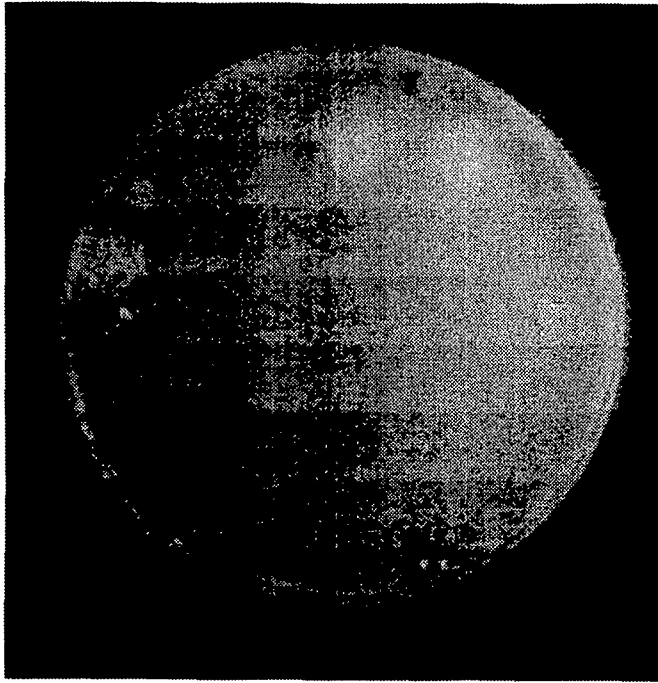


Figure 49. Fluorescence photograph of pLysS cell harboring pET32b plasmid containing A insert. Cells were grown on the agar plate containing rhodamine B and olive oil.

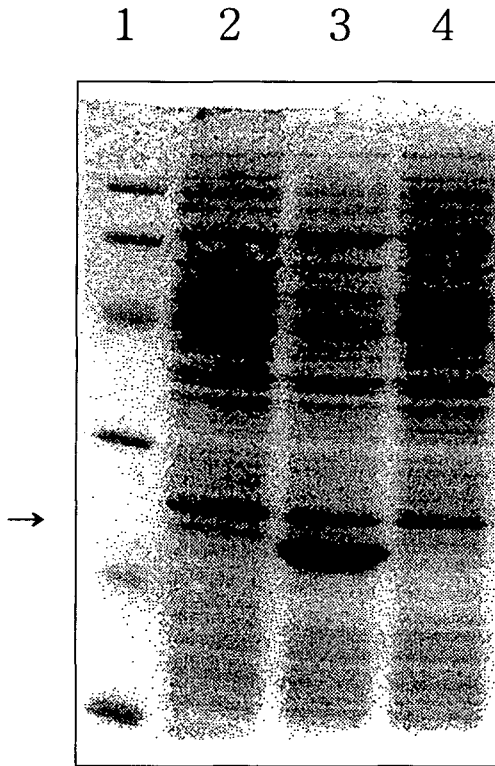


Figure 50. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the polypeptide expressed in the pLysS cells harboring pET32b plasmid containing A-22 lipolytic enzyme gene. Lane 1, M.W. markers; lane 2, cells harboring A-22 with IPTG induction; lane 3, cells harboring pET32b with IPTG induction lane 4, cells harboring A-22 without IPTG induction. Arrow indicates the expressed polypeptide.

방향에서 나타내듯이 약하게 한 단백질이 발현됨을 알 수 있다. 하지만 thioredoxin에 fusion된 부분이 너무 적은 것을 알 수 있어 pLysS cell 대신에 BL21 cell에 A-22와 N-30B를 가지는 pET32b 벡터를 형질전환시켜 단백질 발현을 살펴보았다.

A-22를 가지는 pET32b를 포함하는 BL21 cell를 IPTG로 induction하고 상기에 기술한 방법으로 cell extract를 만들고 이를 His-Bind Resin을 이용하여 정제하였다. pET32b 벡터에서 발현된 단백질은 thioredoxin이 fusion되어 있으며 hexahistidine이 있어 His-Bind Resin에 의해 정제할 수 있다. Figure 51은 2% tributyrin을 함유하는 agar plate에 정제 과정 중의 시료를 넣고 역가 측정된 결과이다. 그림에서 보여주듯이 cell extract (1), flow-through (2), wash (3)에서는 tributyrin을 분해하는 역가를 나타내나, hexahistidine이 붙어 있어 His-Bind Resin에 결합되었다가 정제된 시료에서는 역가가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 olive oil과 rhodamine이 함유된 agar plate에서 형광을 관찰하는 실험에서도 동일하였다 (Figure 52). 발현된 단백질을 확인하기 위해 정제 과정 중의 시료를 12% polyacrylamide-SDS gel에서 전기영동한 결과를 Figure 53가 보여주고 있다. Lane 2에서 6까지는 flow-through를 나타내고 lane 7과 8은 column wash를 나타내며 lane 9와 10은 용리시킨 시료를 나타낸다. Lane 9에서 뚜렷이 보이는 overexpressed polypeptide는 thioredoxin 위치 또는 그보다 약간 위의 단백질로 Figure 50의 결과와 유사하다. N-30B의 경우도 A-22와 동일한 형태의 실험을 수행하였다. Figure 54은 tributyrin을 용해시키는 역가를 측정된 경우이고 Figure 55은 olive oil과 rhodamine agar plate에서 형광을 나타내는 것을 조사한 것인데, A-22와 동일하게 His-Bind Resin에 결합되었다가 용리된 시료에서는 lipolytic enzyme 역가를 나타내지 않았다. 이러한 시료의 전기영동에서도 Figure 56의 lane 9에서 11의 용리시킨 시료에서 보여주듯이 thioredoxin보다 약간 분자량이 큰 단백질이 resin에 결합되었다가 용리된 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 비록 pBluescript에서 발현되는 것에 의거하여 lipolytic enzyme 유전자를 선별했다 하더라도 진핵세포인 *Aspergillus nidulans*

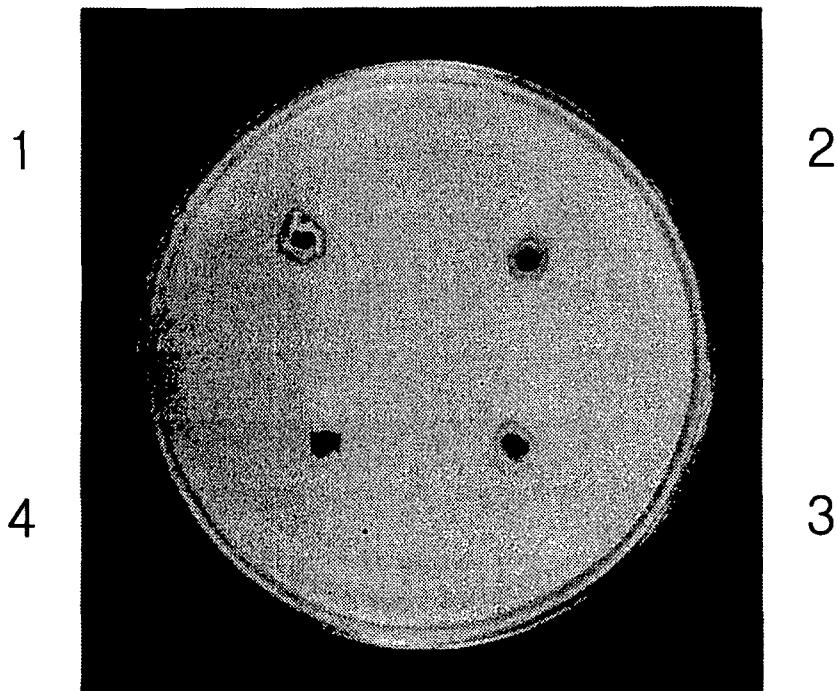


Figure 51. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert. 1, cell extracts; 2, flow-through; 3, wash; 4, eluate.

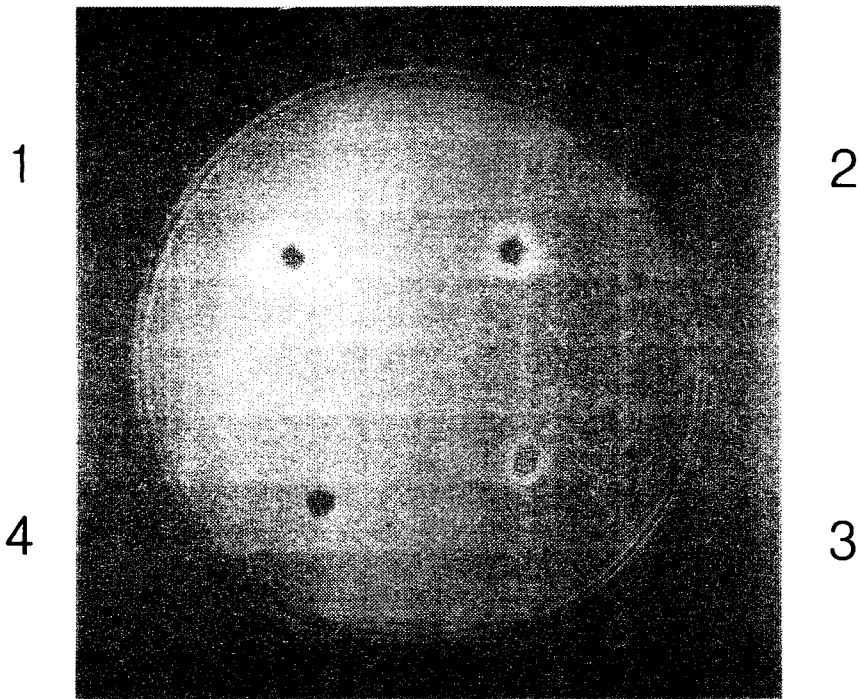


Figure 52. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing rhodamin and olive oil by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL2 cell harboring pET32b containing A-22 insert. 1, cell extract; 2, flow-through; 3, wash; 4, eluate.

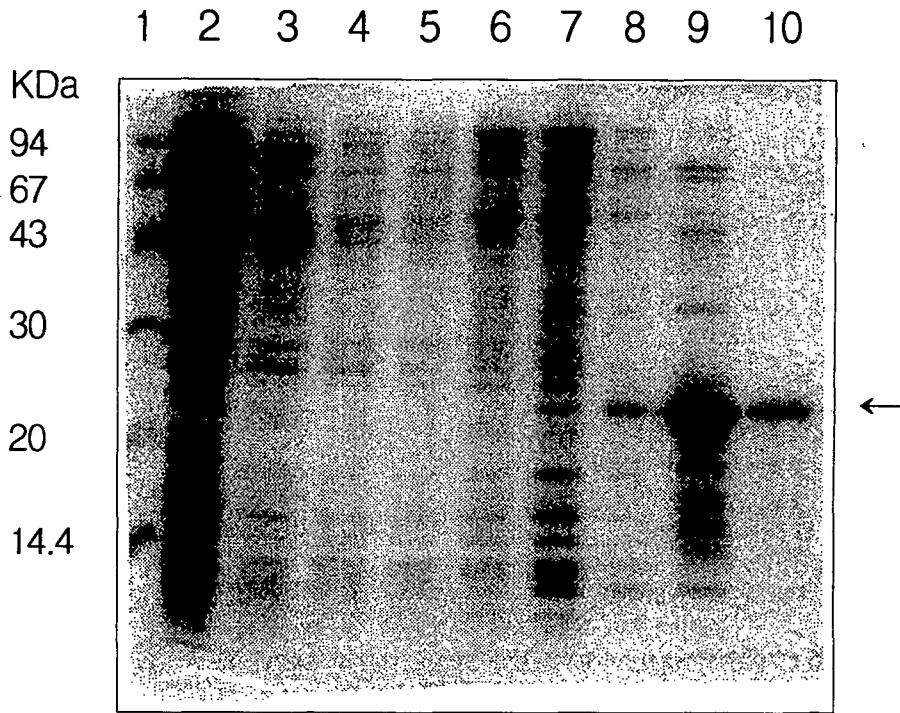


Figure 53. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert. Aliquots of samples were electrophoresed in a 12% polyacrylamide-SDS gel. The gel was stained with Coomassie Blue. Lane 1, M.W. markers; lanes 2-6, flow-through; lanes 7 and 8, column wash; lanes 9 and 10, fractions eluted by the elute buffer. Arrow indicates the expressed polypeptide.

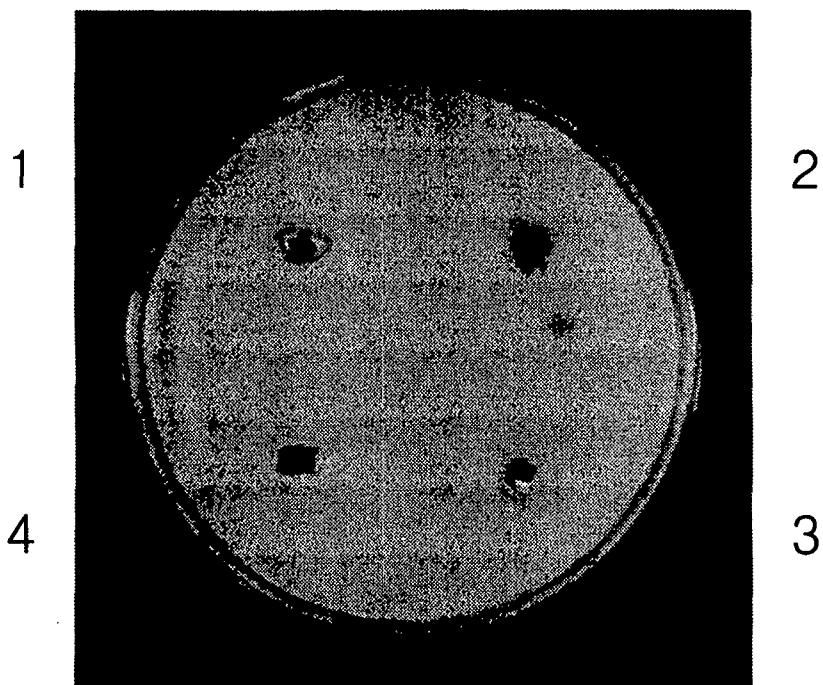


Figure 54. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing N-30B insert. 1, cell extract; 2, flow-through; 3, wash; 4, eluate.

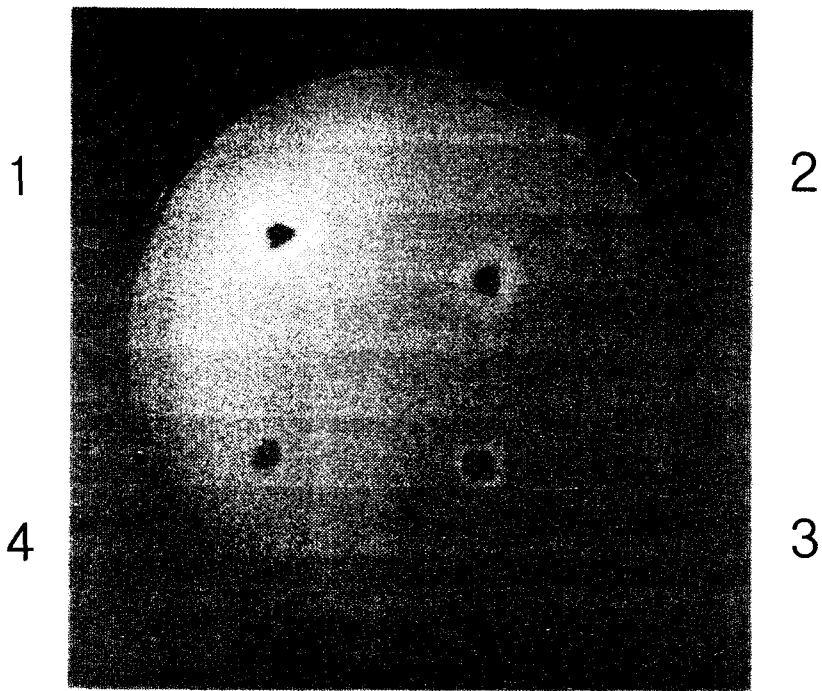


Figure 55. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing rhodamine and olive oil by the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing A-22 insert. 1, cell extracts; 2, flow-through; 3, wash; 4, eluate.

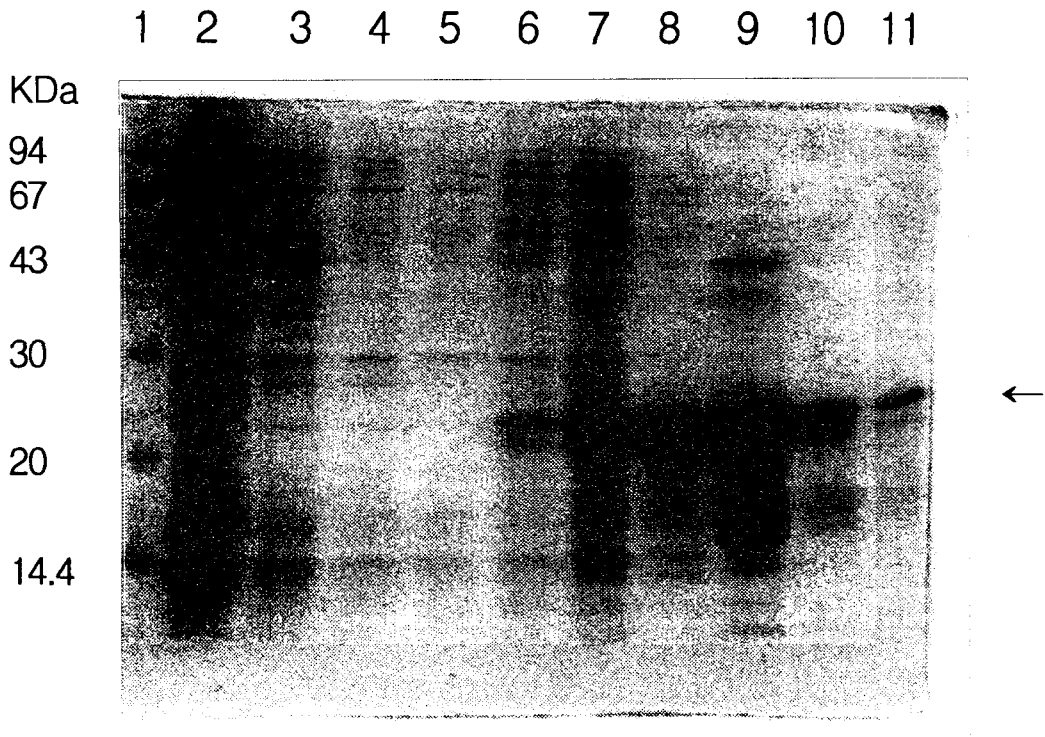


Figure 56. : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the samples during purification of the lipolytic enzyme expressed in the BL21 cell harboring pET32b containing N-30B insert. Aliquots of samples were electrophoresed in a 12% polyacrylamide-SDS gel. The gel was stained with Coomassie Blue. Lane 1, M.W. markers; lanes 2-6, flow-through; lanes 7 and 8, column wash; lanes 9-11, fractions eluted by the elute buffer. Arrow indicates the expressed polypeptide.

의 cDNA가 대장균의 유전자 발현 system을 이용하는 pBluescript 벡터 내에서 발현되는 것이 최적 상태가 아님을 알 수 있다. 즉 start codon과 stop codon 사이의 coding region 이외에도 5'-untranslated region이나 3'-trailer 지역이 pBluescript 벡터의 발현 reading frame 내에 포함됨에 따라 ribosome의 translation에 영향을 줄 수 있을 것이다. 보다 정확한 발현을 위하여 A-22, N-53B의 DNA sequence를 결정하였다.

3. *Aspergillus nidulans*의 lipolytic enzyme gene N-30B (lipase cDNA)의 염기서열 결정

*Aspergillus nidulans*의 lipolytic enzyme 중 N-30B 유전자와 A-22 유전자의 염기서열을 비교한 결과 A-22는 N-30B의 부분이며 모두 lipolytic enzyme의 일종인 cutinase 유전자임이 밝혀졌다. 다른 종의 cutinase와의 유사성 조사를 위하여 N-30B cutinase의 유전자 염기서열을 분석하였다. 그 결과 Figure 57에서 보는바와 같이 polyA 지역을 포함해서 약 1.1kb의 크기임을 알 수 있었다. 초기 cDNA library 제작시 이용된 제한자리인 5'쪽의 *EcoRI*과 3'쪽의 *XhoI*자리를 확인하였다. 그리고 예상되는 start codon과 stop codon을 표시하였다.

이 유전자가 기존 다른종의 cutinase와의 유사성이 어느 정도인지, full clone인지 부분 clone인지 등을 조사하기 위하여 NCBI Blast search 프로그램을 이용하여 유사성검사를 실시하였다. Figure 58의 위에 표시된 query는 실험에 사용된 N-30B를 나타내고 아래 나타나 있는 사각형의 위치는 유사성을 나타내는 단백질과의 유사부위를 뜻하며 각 사각형 내의 숫자는 그 부위와 N-30B와의 유사한 정도를 표시한 것이다. 그러나 Figure 58에서 보여주듯이 염기서열 비교에서는 유사지역도 극히 좁을 뿐더러 유사도 또한 낮아 별다른 유사성을 발견할 수 없었다. 이를 다시 아미노산으로 변환하여 검사를 실시한 후에야 비로소 유사성을 가지는 다른 단백질들을 찾을 수가 있었다. Figure 59에서 보듯이 N-30B와 다른 단백질과의 유사지역은 약 250 base부터 850 base사이에 걸쳐서

1 GGAATTCGGC ACGAGGAGAG ACCCTTGCAA TGGGTAGTAT CCATCAAGTG CCGACACCAT
 61 CAAAGCGTTG ACATTGCCGG GTGTCGTAGT AAACAGACCC TTAGGATGAG GTTATAAAGA ①
 121 GAGGCAGGTC TACCCTCGAA GAACAAGCAC ATTATCACAG CAGAACAGCC GGCCTCATCA
 181 AGGATATTCA CATCCAACGC TCCCCTCAAT CATAACAAGCA AAATGAAGCT CCAGCTCCAC ②
 241 CTCGCCCTTT CCCTCCTTGC CGCTATTGTG GCAGCGAATC CAATCCGTCT CGATCAACGC ③
 301 CAGATCACGG GAAACGAGCT CCGCGACGGT TCCTGCCACG ATGTCACCTT TATCTTCGCT
 361 CGTGGCTCTA CTGAGCTTGG GTACCTGGGC AGCACCGTCG GGCCCGCTAC CTGCAATGTC
 421 CTGAAACTCA GGAAGCCCGG CCAAGTCGCA TGCCAGGCGT TGCGCCGCGT ATATCGCCGA
 481 CCTGGCTTCG AACTTTCTGC CACAAGGAAC GAACCAAATT GCTATATACG AAGCCAAATC
 541 TCTTTTGAAG CTCGCGGCGC CAAGTGCCCC AACACCAAGA TCGTCGCGGG TGGATACAGC
 601 CAGGGAGCGG CAGTCATGCA TGCTGCCATC TCGACGCTCT CGAGTACTGT TCAGGACCAG
 661 ATCAAGGGGG TTGTTCTCTT TGGCGACACG CGCAATAAAC AGGATGGCGG ACGTATTCCG
 721 AACTTTCCCA CTGATAAGAC AAAGATCATT TGTGCATTTG GTGATCTGGT TTGCGAGGGC
 781 ACGCTCGTCA TTAAGTGGGC TCATCTTAGT TACATTGATG ATGTTCCGGA TGCTGCTGAC ④⑤
 841 TTTCTTGTTG GGAAGCTTTA AGTAGCTCAC CTTCAAGTTT CTGCATCTGG GGTGAGCCTG
 901 GTTTCCAGAC CTTGGGGATT TTTTGCTGGA ATTCGAGATG TTTGTTCTTT ATTGGCGAGG
 961 CCGCCGACAA TAGTCCTGTA TGGATATTGA CGCAGAATGA ATATGGATAT TTTTTTCATA
 1021 AAAAAAAAAA AA . . . CTCGAG

Figure 57. Nucleotide sequence of an *Aspergillus nidulans* cutinase gene.

Underlined sequences indicate the synthesized primers. Predicted sequence of start-codon and stop-codon are indicated by shaded boxes.

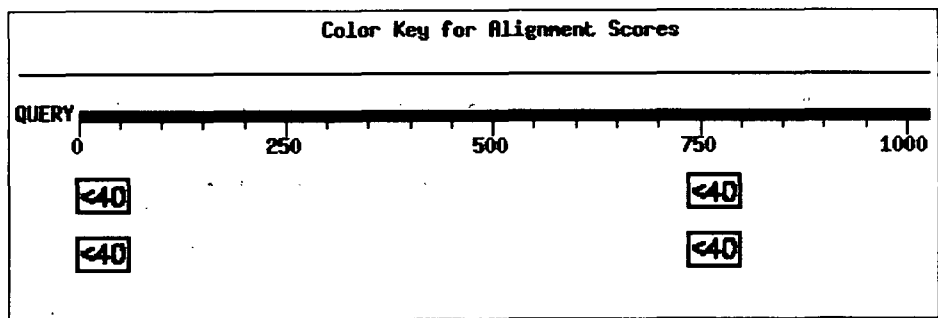


Figure 58. Similar regions of the N-30B nucleotide sequence to others.

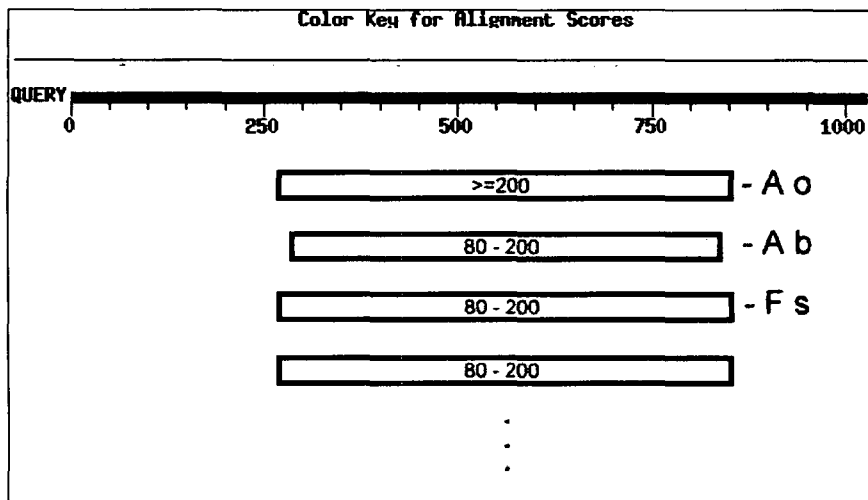


Figure 59. Similar regions of the N-30B amino acid sequence to others. Comparison of cutinase sequences from *Aspergillus oryzae* cutinase (A o), *Alternaria brassicicola* cutinase (A b), and *Fusarium solani* cutinase (F s).

폭넓게 나타났고 유사도 역시 상당히 높은 수치를 보였다. 유사도를 보인 것 중 상위에 위치한 것들은 대부분이 cutinase이었고, 유사성 검사를 통해 얻은 결과를 가지고 행한 상호 alignment에서 N-30B는 *Aspergillus oryzae*와의 cutinase와는 67%, *Alternaria brassicicola* 의 cutinase와는 59%, *Fusarium solani* 의 cutinase와는 63%의 높은 아미노산 일치성을 가지는 것으로 나타났다. Figure 60는 상호 alignment를 표시한 것인데 이들의 상호 맞춤을 위해 공백은 -로 표시하였다. N-30B와 서로 일치하는 아미노산인 경우에는 검은색 상자로 표시했고 유사한 아미노산인 경우엔 회색의 상자로 나타났다. 대체로 leucine과 alanine이 많이 위치한 5'쪽 보다는 130 bp 이후부터 상당히 유사한 효소임을 보였다. N-30B의 5'쪽은 약 220 bp정도가 이제까지 밝혀진 어떤 효소와도 유사성이 거의 없었으며 이는 5' leader sequence로 추측되었다. 5'쪽과 3'쪽에서 몇 개의 stop codon이 위치해 있었고 이들을 coding region에서 제외 한 후 start codon인 methionine을 예측하였다. Start codon 후 약 28 a.a.정도가 다른 지역에 비해 유사도가 현저히 떨어지는 것으로 보아 기존 논문에서 보고되었던 signal sequence라는 추측을 할 수 있었다. 나머지 지역중 높은 유사성을 나타내는 부분에서는 cutinase 같은 serine esterase의 consensus sequence인 Gly-His/Tyr-Ser-X-Gly motif (W. Kugimiya,1986)도 확인 할 수 있었다 (Figure 61). N-30B중에서 다른 종의 리파제와 높은 유사성을 보이는 지역은 약 600 bp 정도였고 이를 바탕으로 실험을 진행하였다.

4. CutBamI와 CutSall primer를 이용한 PCR (B1S1-N30B)

CutBamI과 CutSall primer를 사용하여 수행한 PCR 산물은 737 bp의 크기를 가졌으며 이를 pET28c 벡터에 삽입 (B1S1-N30B라 명명)하여 발현되는 단백질의 리파제 활성도를 측정하였다. 이 clone은 Figure 62에서와 같이 *E.coli*가 자란 주위로 tributyrin을 녹이는 esterase(리파제가 interfacial activation안하고도 분해하는 작용)활성을 나타냈다. 여기에서 IPTG induction 처리 전시료인 A와 후시료인 B와 C가 균주위에서 모두 활성을 나타내는 결과로 보아

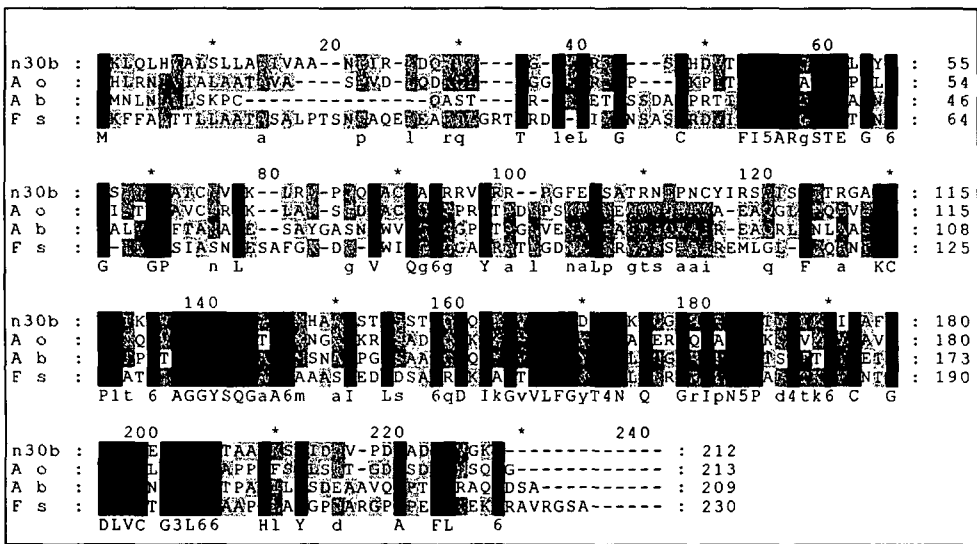


Figure 60. Alignment of cutinase amino acid sequences.

Comparison of cutinase sequences from N-30B, *Aspergillus oryzae* (A o), *Alternaria brassicicola* (A b), and *Fusarium solani* (F s). Amino acids identical to N-30B are indicated by black boxes. Amino acids almost identical to N-30B are indicated by shaded boxes. Gaps introduced for optimal alignment are indicated by a dash.

GIRHEERPLQ	WVVS	IKCRHH	QSVDI	AGCRS	KQTL	RML*R
EAGLPSKNKH	IITAE	QPASS	RIFTS	NAPLN	HTSK	<u>MKLQLH</u>
<u>LALSLLAAIV</u>	<u>AANPI</u>	<u>RLDQR</u>	<u>QITGN</u>	<u>ELRDG</u>	SCHD	VTFIFA
RGSTELGYLG	STVGP	ATCNV	LKLR	KPGQVA	CQAL	RRVYRR
PGFELSATRN	EPNCY	IRSQI	SFETR	GAKCP	NTKIV	<u>AGGYS</u>
<u>QGA</u>	<u>AVM</u>	<u>HAAI</u>	<u>STLS</u>	<u>STVQDQ</u>	<u>IKGV</u>	<u>VLFGDT</u>
RFNPTDKTKII	CAFG	DLVCEG	TLVIT	AAHLS	YIDD	VDAAD
FLVGKL*VAH	LQVS	ASGVSL	VSRP	WGFFAG	IRDV	CLLAR
PPTIVLYGY*	RRMN	MDIFFI	KK			

Figure 61. Amino acid sequence of the N-30B.

Amino acids corresponding to signal peptide are underlined. Shaded box indicates consensus sequence of serine esterases.

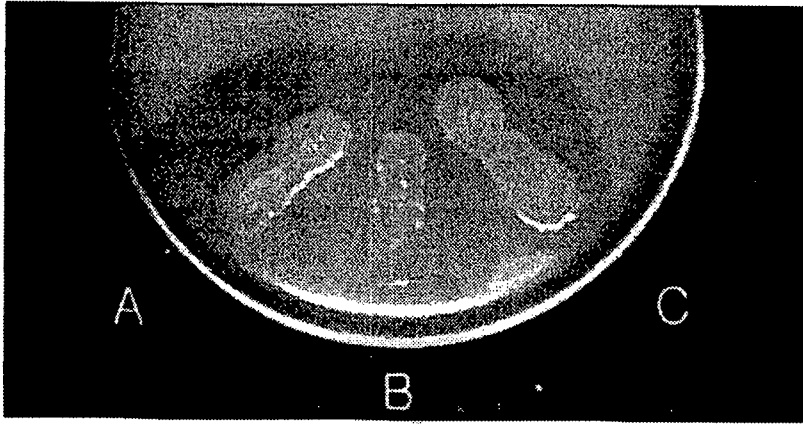


Figure 62. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B1S1-N30B gene. (A), uninduced; (B), (C) induced with IPTG.

B1S1-N30B는 pET 벡터내의 조절 시스템에 영향을 받지 않고, 삽입된 DNA의 자체 발현 기작에 의해 발현이 조절되는 것으로 추측되었다. 각각 시료를 단백질 전기영동을 통해 비교한 결과도 단백질 band에 있어서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다 (전기영동 결과 미첨가).

5. CutBam2와 CutSal1 primer를 이용한 PCR (B2S1-N30B)

Cutinase 단백질을 pET 벡터의 발현시스템에 의해 발현이 조절되게 하기 위하여 subcloning 되어 있는 N30B 유전자의 5' 쪽을 좀 더 제거하였다. CutBam2과 CutSal1 primer를 사용하여 수행한 PCR 산물은 630bp의 크기를 가지며 이를 frame이 맞도록 계산된 pET28a vector에 ligation (B2S1-N30B라 명명) 시키고 pLysS 균주에 형질전환시킨 후 발현 시킨 결과, IPTG induction 하지 않은 cell에서는 cutinase 역가를 보이지 않았으나 IPTG induction 한 후의 cell은 주위의 tributyrin을 녹이는 역가를 나타내었다 (Figure 63). 이를 통해 N-30B clone에서 5'쪽으로 약 220 bp 정도를 제거한 결과 자체적으로 발현하는 능력을 상실하고 pET 벡터의 발현시스템의 조절에 의해서 cutinase의 발현이 결정되는 것을 확인 할 수 있었다. 이 clone을 대량 발현하여 세포 용해액을 니켈 친화 column에 통과시켜서 정제를 시도하였으나 1 M imidazole을 포함하는 elution buffer 분획에서 원하는 크기의 단백질을 전기영동을 통해서 확인할 수 없었다 (Figure 64). 각각의 fraction의 cutinase 역가를 살펴보기 위하여, tributyrin agar plate에 시료를 20 μ l 씩 첨가한 후 발효 반응시킨 결과 대부분의 역가가 flow-through fraction과 wash fraction에서 나타났다 (Figure 65). N-30B clone에서 5'쪽으로 약 220 bp 정도를 제거한 B2S1-N30B 클론은 활성을 가지는 cutinase를 발현하나 Ni-affinity column에 결합하지 않아 이 column으로 정제 할 수 없었다.

6. CutBam3와 CutSal1 primer를 이용한 PCR (B3S1-N30B)

N30B와 63%정도의 아미노산 유사성을 가지는 *Fusarium solani*의 경우에서

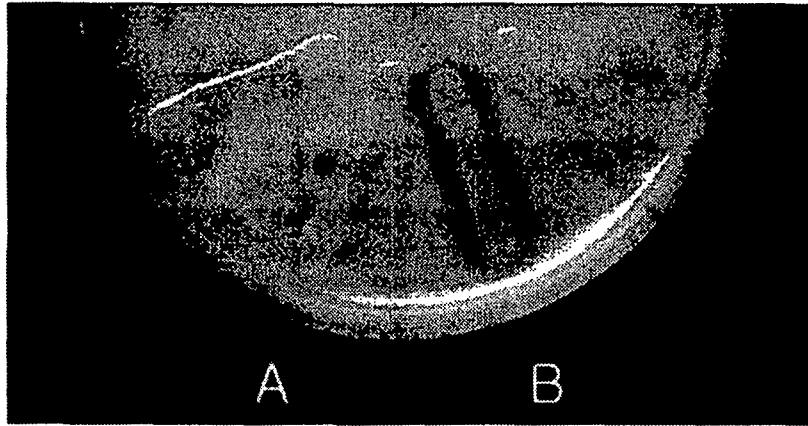


Figure 63. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B2S1-N30B gene. (A), uninduced; (B), induced with IPTG.

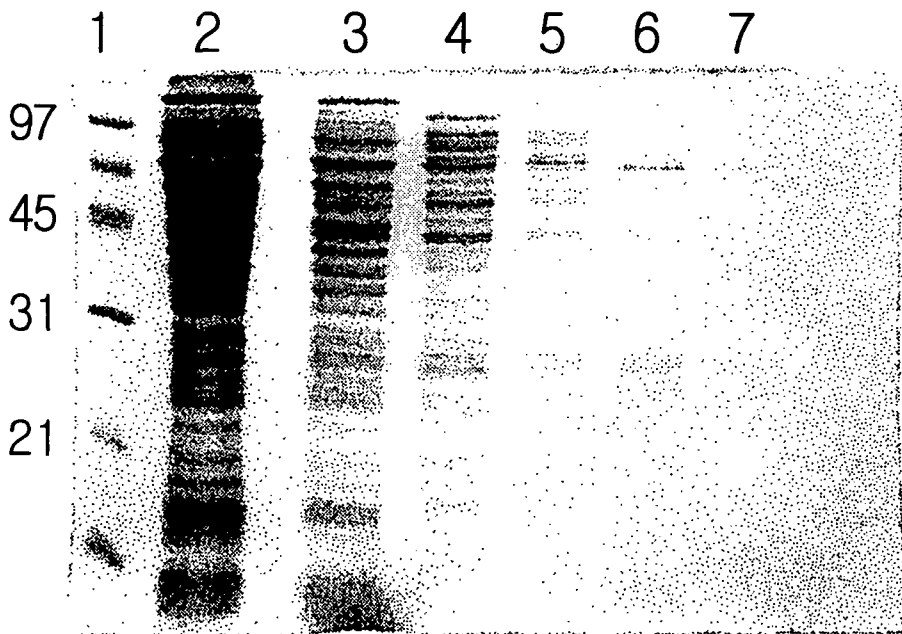


Figure 64. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cutinase (B2S1-N30B) at various stages of purification procedure.

Lane 1, molecular weight markers; lane 2, *E.coli* total proteins; lane 3, flow through fraction; lanes 4 and 5, wash fractions; lanes 6 and 7, elution fractions.

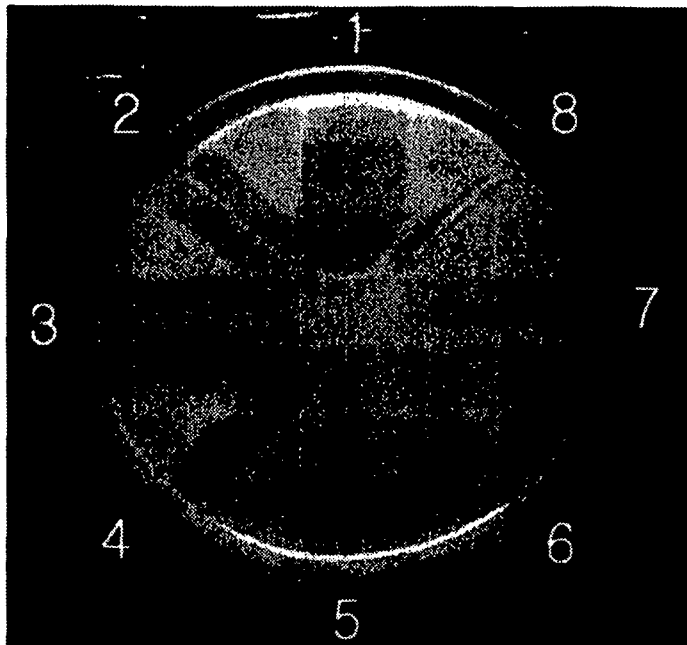


Figure 65. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by cutinase (B2S1-N30I) at various stages of purification procedure.

1, input; 2 and 3, flow-through fractions; 4, 5, and 6, wash fractions; 7 and 8, elution fractions

cutinase의 N-말단지역에 31개의 a.a로 구성된 signal sequence가 있다는 보고 (Soliday *et al*, 1984)와 N-30B의 start codon으로부터 약 28 a.a가 다른 곰팡이 cutinase와 유사도가 상대적으로 낮다는 결과에 근거하여, 이 N-30B의 signal sequence를 B2S1-N30B로부터 제거해보았다. B3S1-N30B는 B2S1-N30B보다 5' 쪽으로 54 bp 더 작은 클론으로, N-30B의 signal sequence 중 일부인 18개의 아미노산을 제외한 지역의 sequence로 구성되어 있다. 이로부터 얻어진 PCR 산물을 pET28a에 ligation (B3S1-N30B라 명명) 시키고 대장균 pLysS 세포에 형질전환한 후에 상기에서 수행한 실험들을 반복하였다.

리파제 활성도 검사를 위하여 2% tributyrin LB plate에서 cell을 발새 키운 결과 예상과는 달리 IPTG 처리 전후 모두 cutinase 활성을 나타내지 않았다 (Figure 66). 이 세포의 추출액을 Ni-affinity column을 통과시켜 정제한 결과 이전에 보이지 않았던 23 kDa 크기의 단백질이 wash와 elution 단계에서 대량 분리되었다 (Figure 67). 이 단백질의 크기가 기존에 보고되어진 cutinase와 유사한 것으로 보아 cutinase가 대량발현된 것으로 보이지만 활성은 가지지 않았다. 이러한 결과들을 종합해 보면 N-30B 유전자의 N-말단지역에는 약 28 a.a로 구성된 signal sequence가 존재하는데 이 sequence가 존재 할 경우에만 대장균이 cutinase 활성을 가지며 signal sequence를 제거 할 경우에는 cutinase 역가는 사라진다는 것을 알 수 있었다.

7. CutBam2, CutSal2 primer를 이용한 PCR (B2S2-N30B)

B3S1-N30B를 이용한 실험을 통해 N-30B의 signal sequence를 제거했을 경우 활성을 가지는 리파제를 얻기 힘들고 signal sequence는 리파제 발현 과정에서 N-말단쪽에 있는 pET28 vector의 His-tag와 함께 잘려져 나가는 것으로 추정되어, 정제를 위하여 His-tag를 C-말단에 붙일 수 있도록 primer를 제작하였다 (Figure 68).

CutBam2와 CutSal2 primer를 사용하여 PCR 수행 후 산물인 630 bp 정도의 DNA를 pET28a와 결합 (B2S2-N30B라 명명) 시켜 리파제의 발현을 시도하

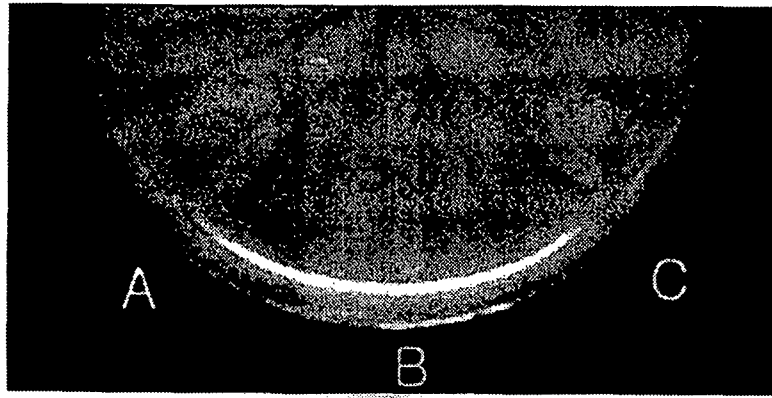


Figure 66. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the pLysS cells harboring B3S1-N30B gene. (A), uninduced; (B), (C) induced with IPTG.

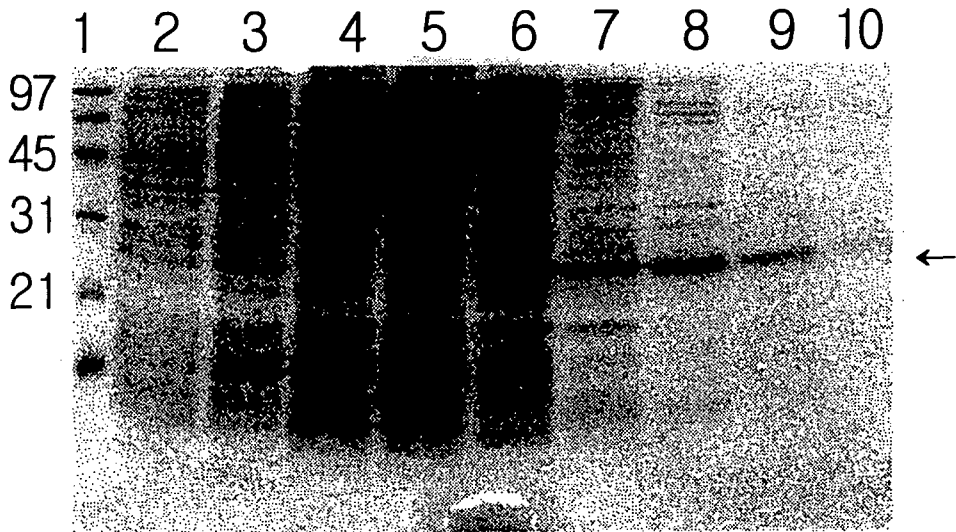


Figure 67. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cutinase (B3S1-N30B) at various stages of purification procedure.

Lane 1, molecular weight markers; lane 2, *E.coli* total proteins; lane 3, induced *E.coli* total proteins; lane 4, flow through fraction; lanes 5, 6, and 7, wash fractions; lanes 8, 9, and 10, elution fractions.

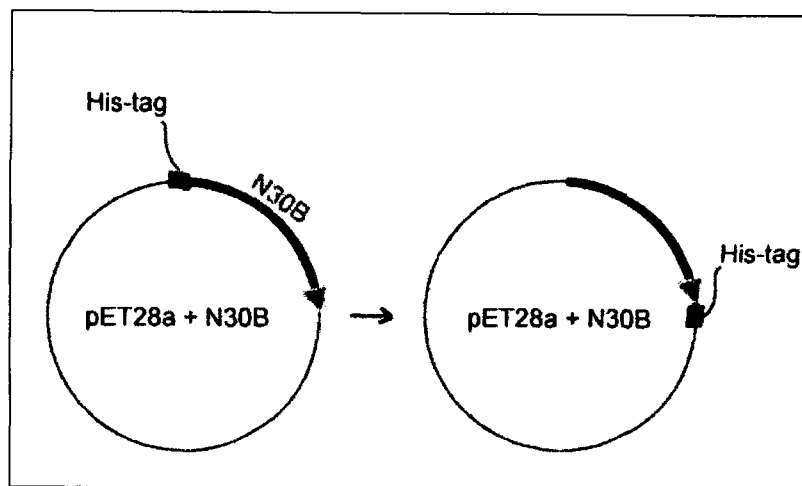


Figure 68. Schematic representation of the plasmid pET28a-N30B.

었다. N-말단쪽에 결합될 His-tag은 발현과정중에 제거된다 하더라도 C-말단쪽에 결합될 His-tag은 남아있으므로 정제과정중에 리파제를 손실하지 않을 것이다. Figure 69에서 보는 바와 같이 발현 과정중에 얻은 각 단계의 리파제 시료 20 μ l를 tributyrin agar plate에 고루 도포하여 활성도를 측정해 본 결과 flow-through와 wash 단계에서는 활성을 보이지 않으나 elution 단계에서는 주변의 tributyrin을 녹이는 리파제 활성을 나타내었다. 이 시료를 전기영동 해 본 결과 flow-through와 wash 단계에서는 보이지 않던 단백질 band가 elution 단계에서 약 23 kDa정도의 크기로 나타나 이것이 리파제임이 확인되었다 (Figure 70). 이와같은 대장균에서의 대량발현과 정제방법을 이용하여, 1 l 배지의 대장균의 배양으로부터 80% purity를 가지는 50 mg의 cutinase를 얻을 수 있었다. 본 실험으로 기존의 곰팡이 배양액으로부터 정제하는 것에 비해 저렴한 비용으로 lipolytic enzyme을 대량생산할 수 있는 system 구축에 기초를 마련했다 할 수 있겠다.

B3S1-N30B의 경우는 단백질은 만들어지나 리파제가 lipase activity를 나타내지 않지만 B2S2-N30B의 경우는 만들어진 단백질이 lipase activity를 나타내었다. 이는 아마도 signal sequence가 없을 경우 (B3S1-N30B)에 cutinase가 cytoplasm에 발현되며 내부에 포함하고 있는 두개의 disulfide bond가 cytoplasm에서 발현과정 중에 환원되어 원래의 구조를 형성하지 못하여 효소역가를 가지지 못하기 때문일 것이다. 반면 signal sequence가 있을 경우 (B2S2-N30B)에는 리파제의 발현 후 산화 되어있는 대장균의 periplasm 지역으로 이동하여 제대로된 3차구조 형성을 이루어 효소활성을 나타내는 것으로 추측된다. 이 실험에서 가정했던 signal sequence의 유무를 확인하기 위해서는 B2S2-N30B의 대량발현으로 얻은 리파제의 N-말단 아미노산 염기서열을 읽어봄으로써 증명할 수 있을 것이다. 또한 signal sequence를 제거한 경우 활성도를 보이지 않는 현상에 관해서는 cytoplasm이 상대적으로 산화된 상태인 AD494 cell을 사용해 봄으로써 periplasm에 존재해야지만 제대로된 disulfide bond를 형성하여 활성도를 보이리라는 예상을 확인해 볼 수 있겠다. 대량 발

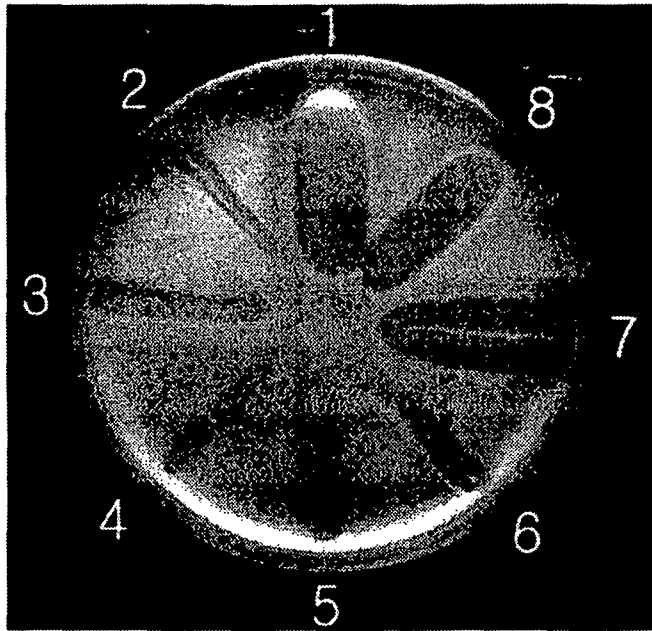


Figure 69. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the cutinase (B2S2-N30B) at various stages of purification procedure.

1, input; 2 and 3, flow-through fractions; 4, 5, and 6, wash fractions; 7 and 8, elution fractions.

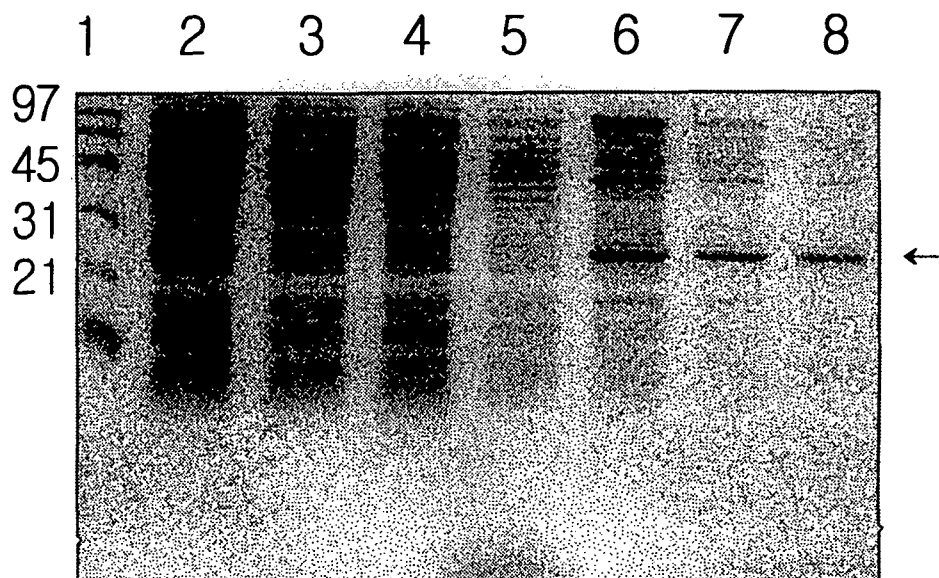


Figure 70. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cutinase (B2S2-N30B) at various stages of purification procedure.

Lane 1, molecular weight markers; lane 2, induced *E. coli* total proteins; lane 3, flow-through fraction; lanes 4 and 5, wash fractions; lanes 6, 7, and 8, elution fractions.

현으로 얻어진 리파제를 이용하여 기질에 대한 stereo-specificity 등을 조사해 보며 site-directed mutagenesis를 통해 이를 조정해 보는 실험을 수행 할 수 있겠다.

제 4 항. 발현리파제의 반응특성

1. Lipolytic enzyme N-30B 의 solvent에서의 반응성

N-30B lipolytic enzyme은 esterase나 olive oil을 분해하는 역가를 가진 일종의 lipase이다. Cutinase는 active site가 반응 후에 밖으로 노출되는 interfacial activation 현상을 가지는 lipase와는 달리 이 리파제는 active site가 이미 밖으로 노출되어 있다는 것이 특징이다 (Martinez, *et al.*, 1994). 이러한 cutinase가 chiral preference를 가진다는 보고 (Mannesse, *et al.*, 1997)와 *Fusarium cutinase*의 solvent에서의 반응성에 대한 특허 (De Geus, 1990)에 의거하여 총괄과제 책임자인 한국식품개발연구원의 권대영 박사 팀과 공동으로 solvent에서의 반응을 조사하였다. 수용액 상태가 아닌 합성반응에 필요한 적당한 용매를 발견하기 위하여 상기한 방법으로 정제한 리파제용액을 동결건조하였다. 동결건조한 리파제를 이용하여 여러 solvent, 예를 들면 pyridine, isooctane, dimethyl sulfoxide 등을 사용하여 (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester의 생성을 GC를 통하여 분석한 결과 특별히 반응이 일어나지 않았다. 아마도 이 화합물 합성에는 N-30B 효소가 적당하지 않은 것 같다. 기존의 lipase도 반응물의 종류에 따라 반응성이 다르다는 사실이 알려져 있으며, 특허에서 예시했듯이 *Fusarium cutinase*가 solvent 상에서 입체 특이적인 물질 생산에 이용할 수 있다는 보고가 있으므로 앞으로 다른 화합물의 입체특이적 합성에 N-30B lipolytic enzyme (cutinase)이 이용될 수 있다 하겠다.

2. *In vitro* mutagenesis에 의한 lipolytic enzyme의 역가 변환

N-30B/pET28a의 784,785,786번 nucleotide CTC (Leu) 지역은 기질이 결합되는 지역으로 알려져 있다. 따라서 이 지역의 hydrophobic amino acid인 leucine을 극성 아미노산인 asparagine으로 치환하는 실험을 하여 site directed mutagenesis에 의한 N-30B의 역가 변환을 시도하였다. CTC (Leu)를 AAC (Asn)로 치환한 경우 단백질은 생성되었지만, lipolytic enzyme 역가를 나타내지 않아 이 지역이 역가에 중요하다는 것을 알 수 있었다. Lipolytic enzyme의 반응성과 입체적 반응성 변환에 앞으로 이러한 mutagenesis 법이 이용될 수 있을 것이다.

3. Lipolytic enzyme N-30B의 특성조사

Tributylin과 olive oil을 녹이는 N-30B lipolytic enzyme의 기질에 대한 특이성을 조사하였다. 기질로는 *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl laurate, 그리고 *p*-nitrophenyl palmitate를 사용하였다. Figure 71에서 보여주듯이 *p*-nitrophenyl butyrate에서 가장 강한 역가를 보여주었고, aliphatic chain이 길어질 수록 낮은 역가를 보여 *p*-nitrophenyl palmitate을 기질로 사용하였을 경우에는 전자와 비교하여 약 10% 정도의 역가를 나타내었다.

반응 pH에 대한 효과를 Figure 72가 보여준다. 일반적으로 알칼리 지역에서 더 높은 역가를 보여주었으며 최적 pH는 *p*-nitrophenyl butyrate를 기질로 사용하였을 경우에 9.0으로 조사되었다.

온도에 따른 역가를 *p*-nitrophenyl butyrate를 기질로 사용하여 조사한 결과를 Figure 73가 보여준다. 40에서 50 °C 부근에서 최적온도를 가지는 것을 알 수 있다. 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 N-30B 효소를 각각의 온도에서 5분간 처리하고 20 °C에서 *p*-nitrophenyl butyrate를 기질로 사용하여 반응시켰다. Figure 74이 보여주듯이 90 °C 까지는 뚜렷한 변성을 보이지 않았고, 100 °C에서 5분 열처리하였을 경우에 약 10%의 역가 감소를 나타낼 정도로 열에 대한 안정성이 강하여 앞으로 이용도가 높다 하겠다.

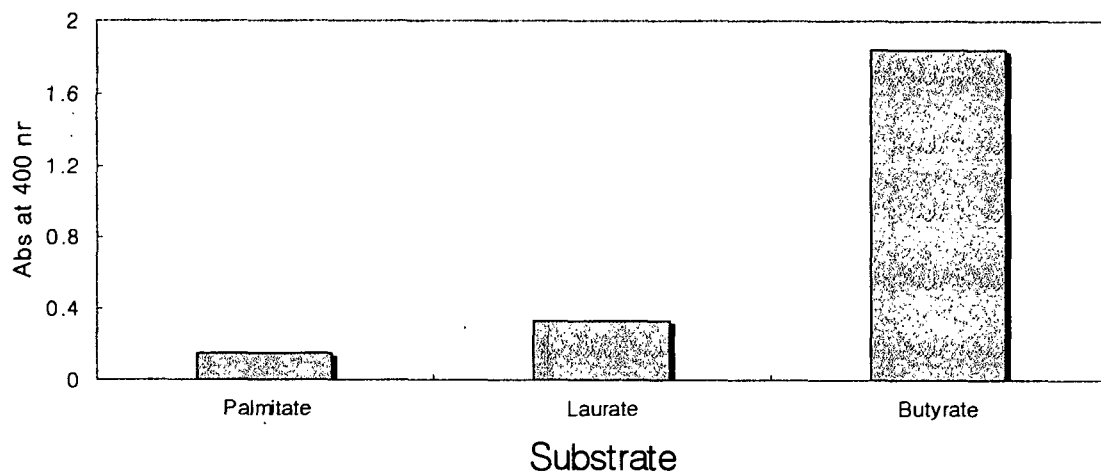


Figure 71. Lipolytic activities of N-30B cutinase depending on substrates.

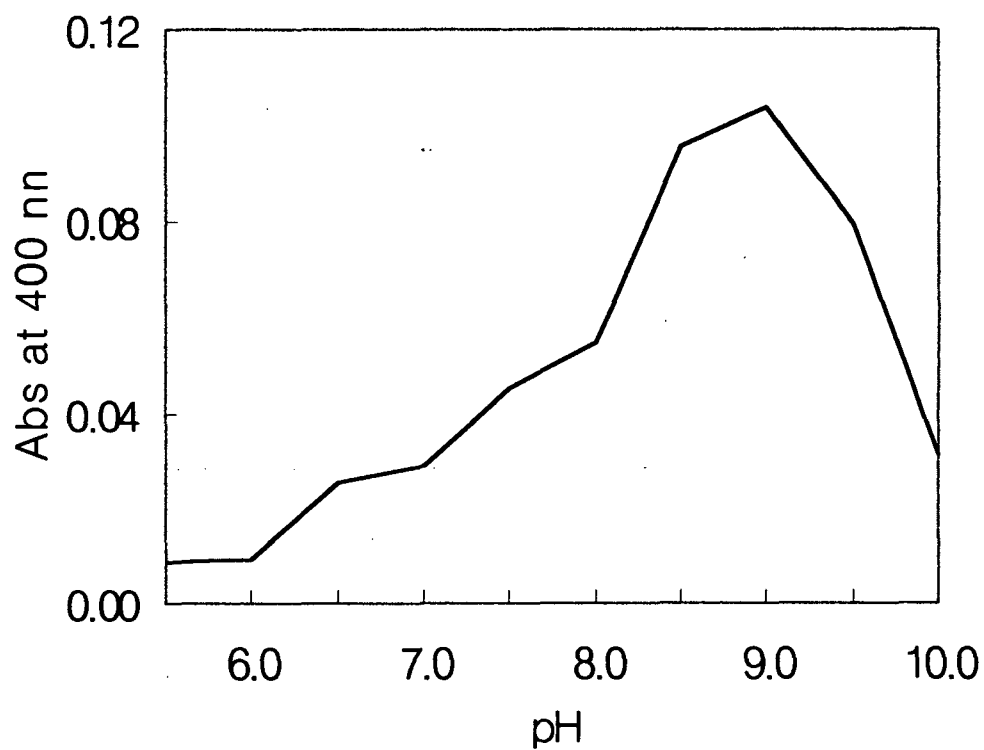


Figure 72. Effect of pH on the lipolytic activity of N-30B cutinase.

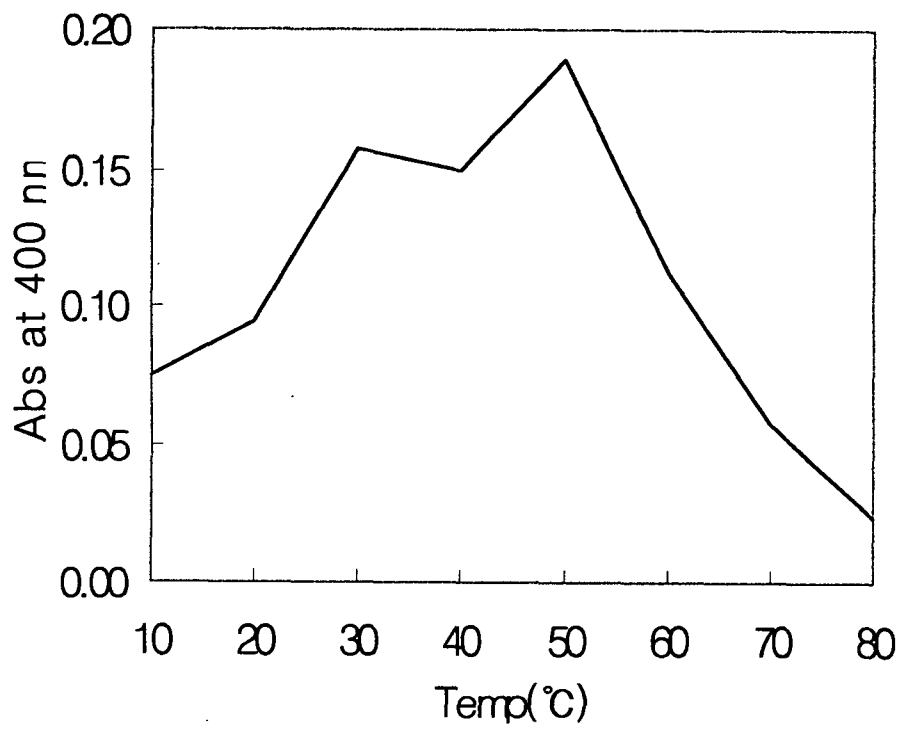


Figure 73. Effect of temperature on the lipolytic activity of N-30B cutinase.

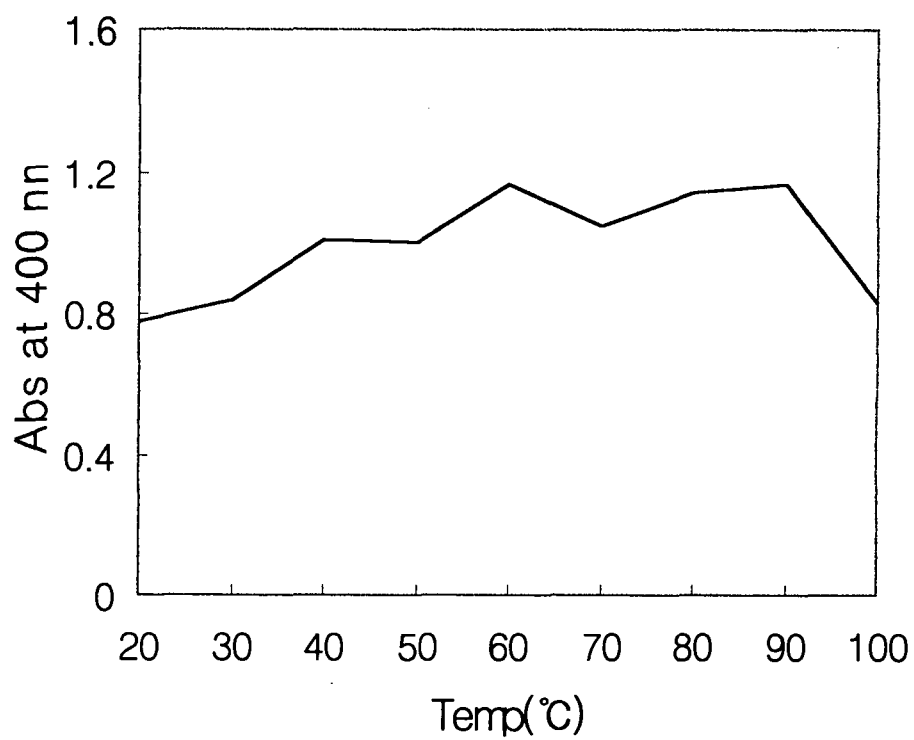


Figure 74. Temperature stability of N-30B cutinase.

4. 새로운 lipase 유전자 N-53의 염기서열 및 특성

Figure 75이 N-53의 DNA 염기서열과 아미노산 서열을 보여준다. 붉은 색으로 표시한 지역에서 Gly-X-Ser-X-X-X-X-Ser과 같은 lipolytic enzyme의 consensus와 유사한 motif가 나타나고 있으며 olive oil을 녹이는 역가를 보이는 것으로 보아 새로운 유형의 lipase라 생각된다. N-53 클론은 full clone이 아니며 N-말단이 일부 결실된 것으로 추정된다. 따라서 tributyrin과 olive oil을 녹이는 lipase activity에 의거하여 screening 하였지만 효소의 안정성이 떨어지는 현상을 보였다. 앞으로 full clone을 이용한다면 N-53은 새로운 lipase 유전자로서 이용가능성이 높다 하겠다. 그러나 이 모든 종류의 리파제는 resorufin을 기질로 한 interfacial activation은 일어나지 않았다.

GAATTCGGCACGAGTTCACGTCTCGCTTCACCAGCGTCTGAGCAACTTCGACAAGAAA
I R H E F T S R F T S V L S N F D K K
ACTGGTGCCAGCGAGCGCGCCAAGGGTCTTGATGAGAGCTATAAGATCAGCGACAAGGC
T G A S E R A K G L D E S Y K I S D K A
CGCCAACAGCTGGCGCGGCTTGACAGCTACTTTGAGAAGGCTATCAACACCCCTCGG
A N S W R G L H S Y F E K A I N T P S G
GCCGGAAGCTGCGTGACTTTTACTCTCAGACCGATAAGCAAGTTCGCGATATTCACGCT
R K L R D F Y S Q T D K Q V R D I H A
GAGGCTCGAAGACTGGCGGATCTGAAGGCTGGAAAGACTGAGGAGAAGAAAAGCTGAGGG
E A R R L A D L K A G K T E E K K A E G
TGAAAAGCAGCTCTCCTGCGACGGAGTCTAACCCCTGCCCTGCCCTGCTCCTGGTGTG
E S S S P A T E S N P A P A P A P G V E
AGCCCGAGGCTGCCAGGGCGGCTCCTGCTACGACCGAGAAGGCGTAGTGGAGTCACCCT
P E A A Q A A P A T T E K A * W S H P
TTGTCAATTATTGTATTTCGACGATGACTTTTAAACGTCCTAATGACTTTCGCGGATGTGT
L S I I V F D D D F * R P N D F R G C V
TTTTAGCATGACATCCTTTCAAATTTCTCCACGTTCACTCTATTCCCCTTTGTTTAT
F S M T S F Q F S P R S Y S I P L C L L
TGTCTGAAAAGAAGCTTTCAAATTGAGCCTAATGGCACAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
S G K E A F K L S L M A Q S K K K K K

Figure 75. N-53 DNA and amino acid sequences.

제3절 리파제의 refolding 연구와 계면활성 구조 연구

제1항 단백질 정보수집

1. 단백질 Data Base 탐색 및 자료 수집

지방산 에스테르 화합물에 대한 기질 특이성과 interfacial activation에 대한 구조 분석을 통해 다음과 같은 결과를 알 수 있었다. 여러 source로 부터 얻어지는 리파제는 아미노산 잔기배열의 homology가 일반적으로 낮다. 그럼에도 불구하고 1990년대에 들어와서 밝혀지기 시작한 효소의 3 차결정구조 연구결과(Table 7) 리파제가 α/β hydrolase fold를 갖고 있으며, Ser-Asp-His으로 대변되는 3 잔기의 catalytic triad 활성부위가 거의 유사한 구조를 갖고 있음을 보여주고 있다. 특히 소수성 아미노산과 GX SXG로 대변되는 consensus sequence를 갖는 9개 아미노산 잔기는 기존에 알려진 mammalian 그리고 microbial lipase에서 공통적으로 발견되고 있다. *Candida*, *Humicola*, *Rhizomucor*에서 얻어진 리파제는 두 가지 conformations를 보임에 따라 효소 활성부위를 가로막고 있는 소위 "lid" 혹은 "flap" 부분이 interfacial activation과 연관이 있음을 알게 되었다. 즉, lid가 가로막고 있는 conformation을 "closed form", 그리고 활성부위가 노출되어 있는 conformation을 "open form"으로 규정하고, interfacial activation을 보이는 리파제는 예외없이 lid의 움직임으로 인한 conformation의 변화를 통해 효소활성이 증가하는 것으로 추정되고 있다. 특히 Table 7에 나타난 바와 같이 lid의 구조는 one-turn에 불과한 짧은 helix에서 두 개의 긴 helix, 그리고 helix를 포함하는 긴 loop로 이루어져 있음을 알 수 있고, 리파제가 분자량 크기 40,000 이하의 그룹과 40,000 이상의 두 그룹으로 나누어 지는 것을 볼 때, 40,000 이하에서는 짧은 helix로 그러나 40,000 이상의 분자량 리파제는 긴 helix와 loop로 활성부위를 덮고 있음을 알 수 있다. 그러나 lid의 공통적인 구조적 motif는 발견되지 않고 있으며 본질적인 기능 역시 따라서 다양하다.

Table 7. Three dimensional structure of lipases.

Lipase	Abbre- viation	MW (kDa)	PDB files ^b	Lid
<i>Candida antarctica</i>	CALB	33	1tca, 1lbs	stereospecificity
<i>Candida rugosa</i> (open)	CRL	60	1crl, 1lps	3 loops
<i>Candida rugosa</i> (closed)	CRL	60	1trh,	3 loops
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL	60	1thg	2 helices
Horse pancreas	HPL	50	1hpl	
Human pancreas	HPL	37	1lpa	short helix
<i>Humicola lanuginosa</i>	HLL	30	1tib	short helix
<i>Penicillium camembertii</i>	PCL	30		
<i>Pseudomonas glumae</i>	PGL	33	1tah	
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	29.5	1tgl, 5tgl	short helix
<i>Rhizopus delmar</i>	RDL	29.5	1tic	short helix

^aBrookhaven protein databank에 등록된 coordinates 돌임 (1996년 10월 현재).

^b효소를 구성하는 원자배열의 파일명.

Guinea pig와 coypu pancreatic lipase는 interfacial activation을 보이지 않고 있는 반면, 활성부위를 덮고 있는 lid를 보유하고 있는 점에서 phospholipase 활성화와 같은 기능의 차이를 보이고 있다. Human pancreatic lipase의 경우, 크기가 큰 trp252는 내부에 존재하면서 활성부위 ser152의 바로 위에서 발견되며, phe77과 packing되어 있음을 알 수 있다.

2. 컴퓨터 그래픽스를 이용한 모델링 체계 확립

본 연구실에 설비되어 있는 Graphics Workstation에 Dial box를 완비함으로써 모델링을 위한 hardware 준비를 완료하였으며, software 중 프로그램 O version 5.10을 스웨덴의 DatOno AB 소속으로 되어 있는 Dr. Alwyn Jones로부터 download받아 설치 완료하였다.

입체특이적 효소디자인의 기초연구가 되는 site-directed mutagenesis를, 분자 모델링을 통하여 특이활성부위 아미노산 잔기의 예측을 시도하였다. 즉 입체특이성 및 기질특이성 변화 양상을 현재 연구 수행 중인 리파제에 맞는 모델을 설정함으로써 향후 필요한 유전자 조작 방법을 위한 기초 모델로서의 제시를 이루었다.

제2항 Inclusion body 리파제 분리

1. 박테리아균 생산 및 inclusion body 분리

배지 약 1L에서 박테리아균 약 4g을 얻었고 세포내의 단백질 생산은 inclusion body 형태로 이루어졌다. Induction의 확인은 SDS-PAGE를 이용하였고, 48k 리파아제가 major band 단백질을 확인하였다. Triton X-100의 처리 후 8M urea 최소부피에 용해시키는 단계에서 6M urea 용액으로도 가능하다는 사실외에, urea 시약자체의 purity가 낮아 HPLC 용 membrane filter를 이용하였다. Purity 외에 단백질의 안정성 즉, 단백질의 산화 및 modification에 있어서

urea 보다는 guanidine HCl의 사용을 점진적으로 추진하였다.

2. Lipase의 분리 및 정제

Lipase가 inclusion body 형태로 수확되고 또한 고농도의 효소용액을 얻어야 하는 문제점을 해결하기 위하여 두 가지 방법으로 접근하였다. 특히 고농도(약 25 mg/ml)의 단백질 용액을 native한 상태로 얻는 것이 어렵기 때문에 일단 denatured된 상태로 분리를 수행하는 방법과 refolding 시켜서 분리를 수행하는 방법을 병행하였다. 두 가지 방법 모두 column chromatography를 이용하였다.

1) Denatured 상태의 분리

기존에 이루어진 방법이 native 한 상태로 분리 및 정제를 하는 것이었던 반면, 본 연구실에서는 denatured 상태로 분리를 시도하였다. 먼저 DEAE sepharose를 이용한 ion exchange chromatography를 수행하여 0-3 M guanidine HCl 직선농도기울기로 리파아제의 분리에 효과적이었음을 Ion exchange elution profile 및 SDS-PAGE로 확인하였다. Major 단백질 분획을 pooling하여 6M urea를 포함하는 완충용액에 투석한 다음, gel filtration column으로 분리를 수행하였다. 특히 6M urea 용액에 resistant 한 Sephacryl S-200을 이용하였으며, 분리정도 역시 elution profile 및 SDS-PAGE로 확인하였다.

2) Native 상태의 분리

8M urea 용액이나 6M guanidium HCl 용액을 이용한 단백질의 용해는 비교적 손쉽게 이루어진 반면, 이를 다시 native한 형태로 바꾸는 단계가 매우 어려웠다. Inclusion body로 분리되는 단백질의 refolding에 reduction potential의 중요성을 이해하여 환원제와 산화제의 비율을 조정함으로써 단백질 refolding을 향상시키는 방법과, 거의 순수하게 분리한 뒤 이를 refolding 시켜 고농도의 단백질 용액을 만들려는 노력을 하였다. Reduction potential을 유지하기 위하여 산화 및 환원형의 glutathione을 약 1:10의 비율로 여러 농도에서 처리하였고, 기타 변수 즉, pH, 온도 및 Ca 농도 등의 변화에 따른 효과를 분석하

었다. Refolding된 효소는 즉시 DEAE 및 Sephacryl을 이용한 column chromatography를 수행함으로써 분리 노력하였다. 현재까지 refolding 하기 위한 조건으로써 reducing agent와 reducing potential을 이용하는 방법으로 guanidine HCl과의 상관관계를 조사하였다(Table 8). 즉 1.1M의 guanidine HCl 용액에서 약 5mg/ml의 고농도로 refolding 하는데 성공하였으며 이는 대단히 고무적인 결과라고 사료된다. 이에 따른 activity에 대한 측정에서도 reducing potential을 이용한 방법이 가장 높은 활성을 보여주었다.

제3항 리파제의 분리정제 및 Refolding 연구

1. Lipase의 분리 및 정제

고농도 (25 mg/ml)의 단백질 용액을 denatured한 상태와 native한 상태로 분리하는 방법을 병행한 결과, denatured한 상태의 분리가 기술상 장점을 갖고 있다고 판단되었다. 우선 native한 상태를 얻기 위한 refolding 실험이 어려웠고, 고농도의 단백질인 경우 refolding 실험은 여러번 실패 하였다. 많은 양의 lipase가 aggregation되어 유실되었다. 따라서 denatured된 상태로 이루어진 protocol을 변형하여 분리를 수행하였다. 우선 inclusion body의 denatured 된 상태로 분리 정제하기 위하여 6 M urea 용액으로 ion exchange (Figure 76) 및 gel filtration column chromatography를 수행하였다.

처음에는 0-3 M guanidine HCl gradient를 이용하여 분리하였으나, 실험 결과 gradient 효과는 없었고, 단지 Sepharose CL-6B에 의한 gel filtration chromatography의 효과를 얻었다고 판단되었다. Inclusion body는 다시 superdex 75 FPLC를 통과하여 이를 SDS-PAGE로 확인한 결과 95% 이상 순수하게 분리되는 것으로 판단된다. 그러나 native form으로 refolding 시키는 과정이나 고농도로 농축하는 과정에서 쉽게 aggregation되는 것을 막지 못하였지만, 현재까지 5 mg/ml의 농도까지는 가능한 것을 발견하였다.



Figure 76. The elution profile of lipase using DEAE-Sepharose CL-6B. Elution buffer 20 mM Tris (pH 8.0), 6M urea, 20mM β -mercaptoethanol.

Table 8. Optimal conditions for lipase refolding at high concentration

Conditions			GuHCl concentration (M)					
GSH	pH	GuHCl(M)	3.0	1.5	1.3	1.1	0.9	0.7
5mM	7	0.1	-	-	-	-	+	+
		1	-	-	-	+	++	+++
		10	-	+	+	++	++++	++++
	7.5	0.1	-	-	-	-	+	+
		1	-	-	-	-	++	+++
		10	-	-	+	++	++++	++++
	8	0.1	-	-	-	-	+	A
		1	-	-	-	-	+	A
		10	-	-	+	+	+++	++++

A:aggregation, +:~10U, ++:~40U, +++:~100U, ++++:~200U (1U=1uM/min/mg)

2. Ion exchange chromatography를 이용한 단백질의 정제법 개발여부

Inclusion body 분리 정제 과정을 거치면서, 실험실 내에 축적된 기술과 방법이 일반적인 inclusion body 단백질에 적용 가능한 지에 대한 실험을 수행하였다. 기존의 분리방법을 약간 변형하여, inclusion body를 6 M urea 용액 최소 부피에 녹인 후, ion exchange column를 urea 6-0 M의 gradient를 사용하여 단백질의 refolding을 유도하였고, refolding이 유도되었다고 생각되는 단백질은 완충용액으로 충분히 씻어주었다. 이번에는 NaCl 0-1 M gradient를 사용하여 binding 되어 있는 단백질의 유출을 유도하였으며 실험실내에서 inclusion body로 생산되는 단백질에 대해 실험을 수행하고 있다. SAM-DC (S-adenosyl methionine decarboxylase)에 대한 결과가 Figure 77에 나타나 있다.

Elution 결과 두 개의 peak을 확인할 수 있었고, SDS-PAGE로 측정하였을 때, 각 peak은 단백질과 DNA가 동시에 혼합 혹은 화합되어 있는 결과를 보여주었다 (data not shown). Lipase의 경우, DNA가 먼저 분리되어 유출되고 lipase가 유출되는 결과를 갖고 있다. 앞으로 다른 두 가지 단백질에 대한 elution 결과를 분석한 다음 방법의 가능성을 타진할 생각이다.

3. Soluble lipase 단백질의 분리

Pseudomonas fluorescens lipase를 함유하는 plasmid(pTTY2)를 *E. coli* BL21에 transformation 하여 단백질을 발현한 결과, 이제까지 얻었던 inclusion body와는 다르게 soluble form으로 생산되었다. 아직까지 inclusion body로 발현되던 gene이 soluble form으로 발현되는 결과에 대하여 확실한 이유를 알 수 없다. 그러나 lipase는 활성과 분자량을 측정한 결과 기존의 lipase임이 판명되었고, 따라서 현재 soluble form에 대한 분리정제를 적극 수행하고 있다. 먼저 ion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose CL-6B, 26x50 mm)를 이용하여 NaCl 0~1 M linear gradient로 효소를 elution 시킨 후 activity를 check 하여 lipase fraction을 수거하였다 (Figure 78).

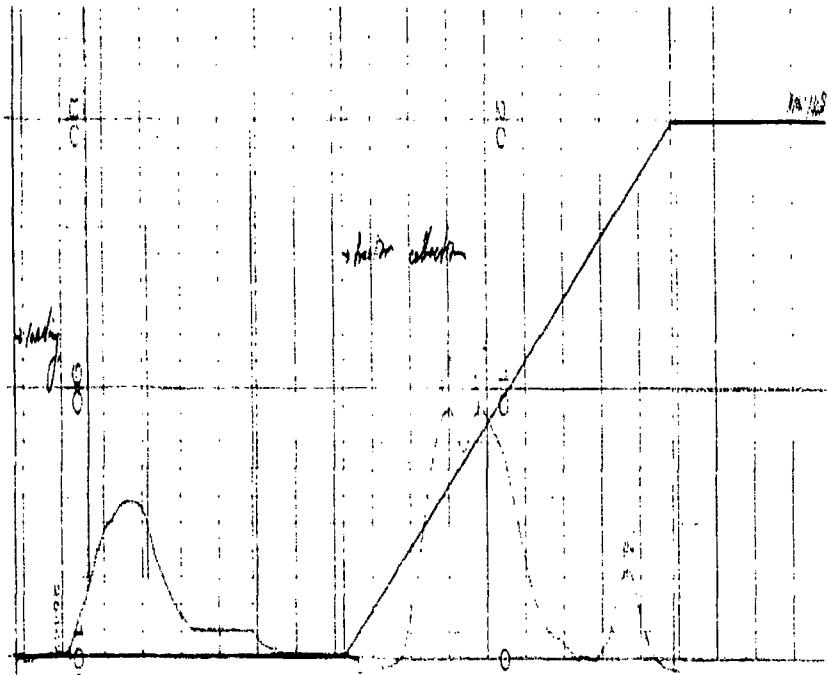


Figure 77. The elution profile of SAM-DC

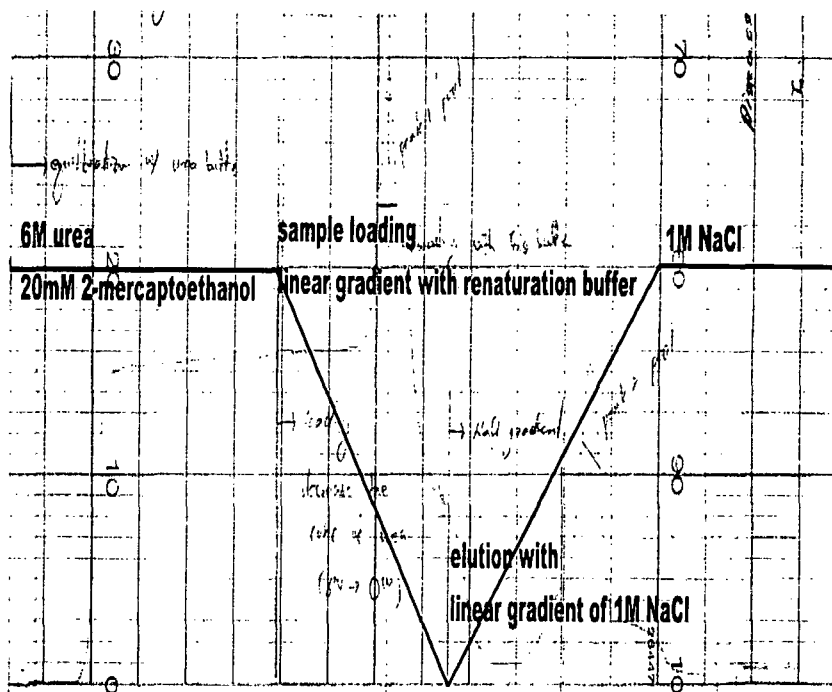


Figure 78. The elution profile of lipase purified by DEAE-Sephacel CL-6B

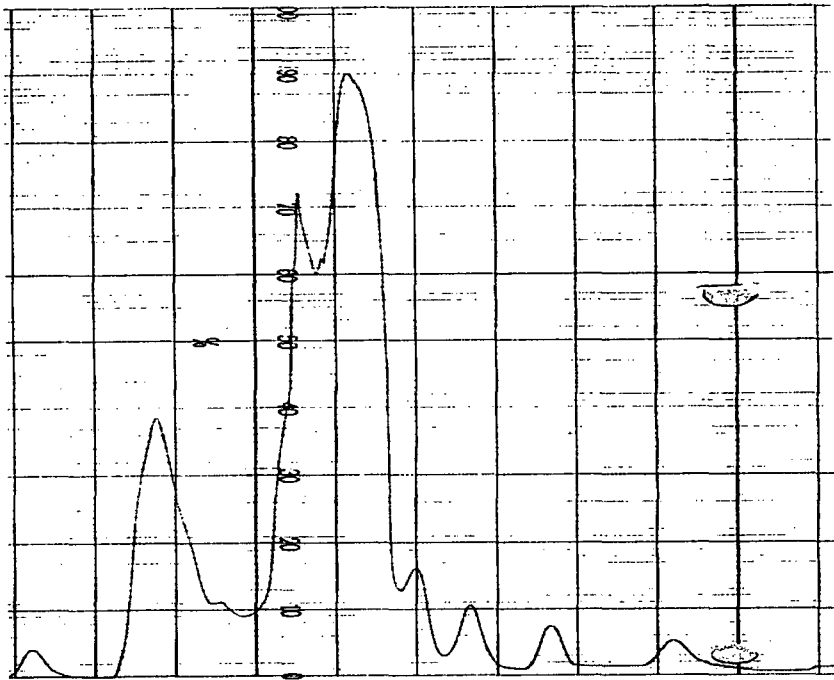


Figure 79. The elution profile of lipase purified by Superdex 75 FPLC.

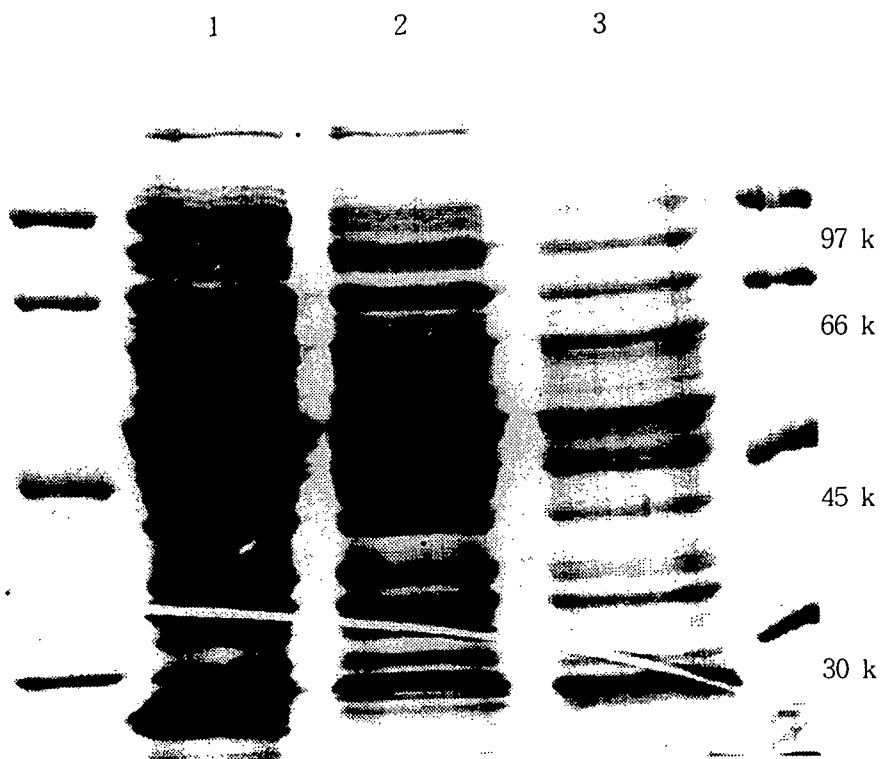


Figure 80. SDS-PAGE of Soluble lipase at various stages of purification procedure. Lane M : Molecular weight markers, lane 1: crude extract, lane 2: after DEAE-Sepharose, CL-6B, lane 3: after superdex 75 FPLC.

4. Dilution에 의한 refolding

부분정제된 Ion-exchange column chromatography와 gel filtration으로 정제된 denaturated lipase를 pH, 온도, 첨가제에 의한 변수에 따라 고농도 조건에서의 optimal refolding condition screening과 stepwise dilution에 의한 다량의 refolded lipase 획득을 수행하였다.

고농도에서의 refolding은 folding intermediate들간의 interaction에 의해 침전되었기 때문에, 일반적인 direct dilution method 보다는 denaturant 농도에 따라 dialysis와 step-dilution을 수행함으로써 aggregation을 방지하고 보다 고농도의 active protein을 획득할 수 있었다. pH는 중성에 가까울수록, 온도는 4℃가, 그리고 10mM CaCl₂와 5mM glutathione의 첨가가 가장 최적의 조건인 것으로 밝혀졌다 (Table 9). 또한 direct dilution method를 개선하여 한 batch에 추가적인 dilution refolding을 수행하는 stepwise dilution method도 시도하였는데 이 경우 보다 많은, 고농도의 refolded lipase를 얻을 수 있었다. 이때 사용된 renaturation condition 역시 위의 경우에 준하여 pH 7.5, 4℃에서 수행되어졌다.

5. Size-exclusion chromatography를 이용한 inclusion body의 refolding

처음에는 dialysis와 step dilution을 이용하여 refolding을 유도하였으며, yield (activity, quantity)가 매우 낮아 실제적으로 어려움이 많았으나 gel chromatography를 이용한 SEPROS는 상당히 향상된 refolding yield를 제공하였다 (Figure 81). 본 실험에서는 Sephacryl S-200 (Amersham-Pharmacia Biotech)을 gel media로, 1mM EDTA와 10mM CaCl₂를 함유한 50mM Tris buffer (pH 8.0)를 refolding buffer로 사용하였다. Column은 econo column (Bio-Rad)에 gel 400ml을 충전하여 1ℓ의 refolding buffer로 평영화 한 후 여기에 2ml의 추출된 inclusion body sample solution을 loading하였다. 유속은 20ml/h로, 0.05 AUF이상의 분획을 10분 단위로 나누어 총 200ml을 받았다. Table 9는 기존의 step dilution과 SEPROS로 분리 및 정제된 lipase의 활성과 양을 비

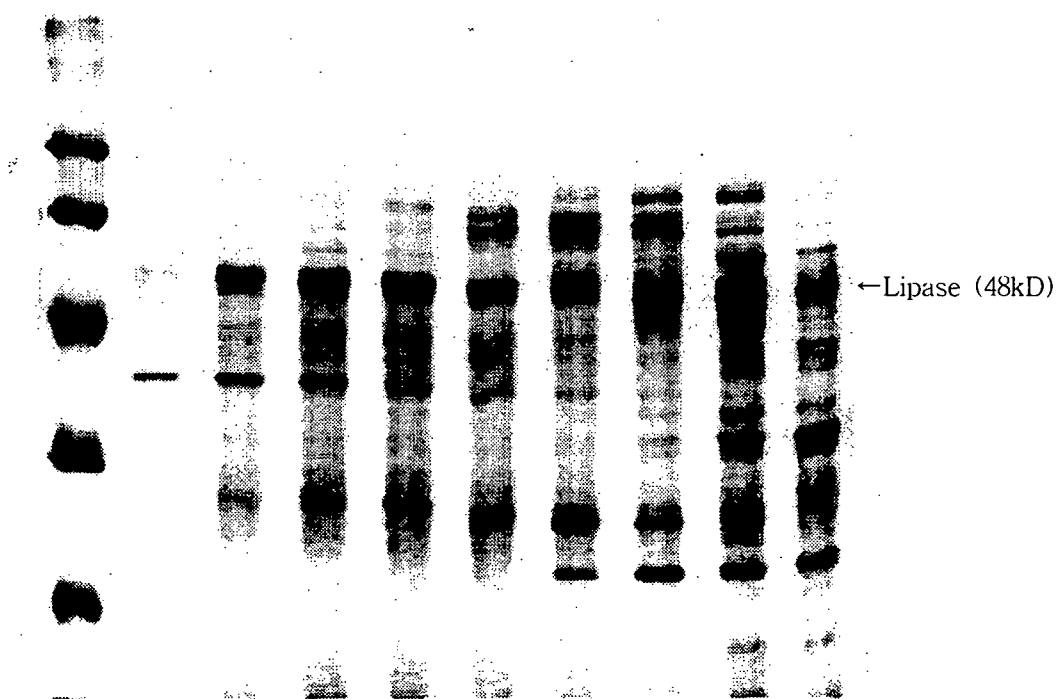


Figure 81. SDS-PAGE analysis of lipase fractions from SEPROS.

Table 9. Comparison between the yields from the dilution and SEPROS.

	100 fold dilution	SEPROS
Refolding condition	50mM Tris (pH 8.0), 0.7M urea, 1mM EDTA, 10mM CaCl ₂ , at 4°C	50mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA, 10mM CaCl ₂ , at 4°C
Total time	Overnight	3 days
Recovered protein yield (quantity /specific activity)	10-16%/250-450 unit	20-30%/1200-4000 unit

교해 본 결과이다. Dilution의 경우 시간이 빠르다는 장점이 있지만 SEPROS에 비하여 yield 면에서 볼 때 큰 차이를 보이고 있다. 따라서 연구수행은 이후 SEPROS로 이루어진 lipase를 가지고 수행하였다.

SEPROS로부터 얻은 sample을 DEAE-Sepharose CL-6B (from pharmacia, 2.6×5 cm) open column에 0.5 ml/min의 유속으로 loading, Biologic LP (Bio-Rad) system을 이용하여 0 - 0.6 M NaCl gradient로 elution한 후 1 M NaCl로 2 column volume을 washing 하였다. Gradient 이후부터 2 ml씩 분획하였다 (Figure 82.) 단백질 분획은 앞의 2개 peak에서 발견되었으며, 마지막 peak은 DNA 분획으로 판단된다. Lipase는 두 번째 peak에서 나타났으며 (Figure 83) 이들 분획을 모아 다음 실험을 수행하였다.

6. SDS-PAGE of fractions from DEAE

DEAE로부터 얻은 lipase active fraction들을 pooling 한 후 centriprep 30 (Millipore co.)으로 농축 한 후 gel filtration chromatography를 수행하였다. Superdex 200 HR 10/30 (pharmacia)을 FPLC (pharmacia) system에서 50mM Tris (pH 8.0) buffer, 0.5ml/min의 유속으로 평영화 한 후 0.1ml의 sample을 주입하였다. Lipase 분획은 injection 이후 15 - 17ml사이에서 확인되었으며 (Figure 84), 이들은 다시 Mono Q column으로 ion-exchange chromatography를 수행하였다. Mono Q 역시 FPLC system을 이용하였으며 유속은 4ml/min로 0 - 0.6 M NaCl elution을 하였다 (Figure 85). Active fraction은 최종적으로 Superdex 200 HR을 이용한 gel-filtration을 수행하였다 (Figure 86).

7. 분리정제 향상

SEPROS로부터 얻은 sample을 DEAE, gel filtration, Mono-Q 그리고 다시 gel filtration FPLC를 수행한 결과가 Figure 87에 나타나있다. 각 분리정제 단계에서 얻어진 효소의 순수도는 특히 SEPROS와 ion exchange chromatography가 매우 효과적이었음을 보여주고 있다. Superdex 200 FPLC를

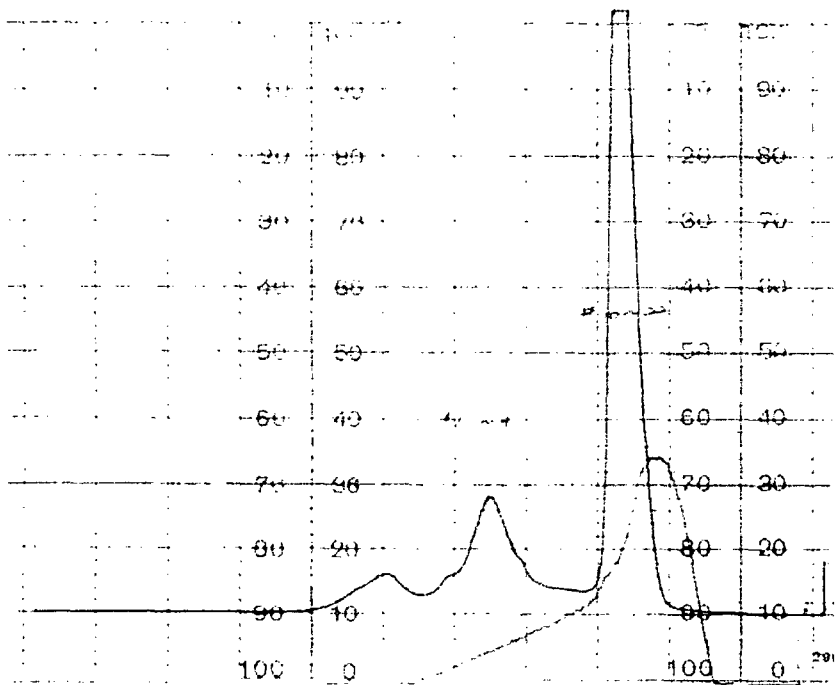


Figure. 82. Ion-exchange chromatography elution profile using DEAE-Sepharose CL-6B. chart speed : 1cm/h, Absorbance at 280nm by 0.5 AUF; blue line is O.D. at 280. red line is conductivity. The first and second peaks were protein fractions and the third was DNA fraction.

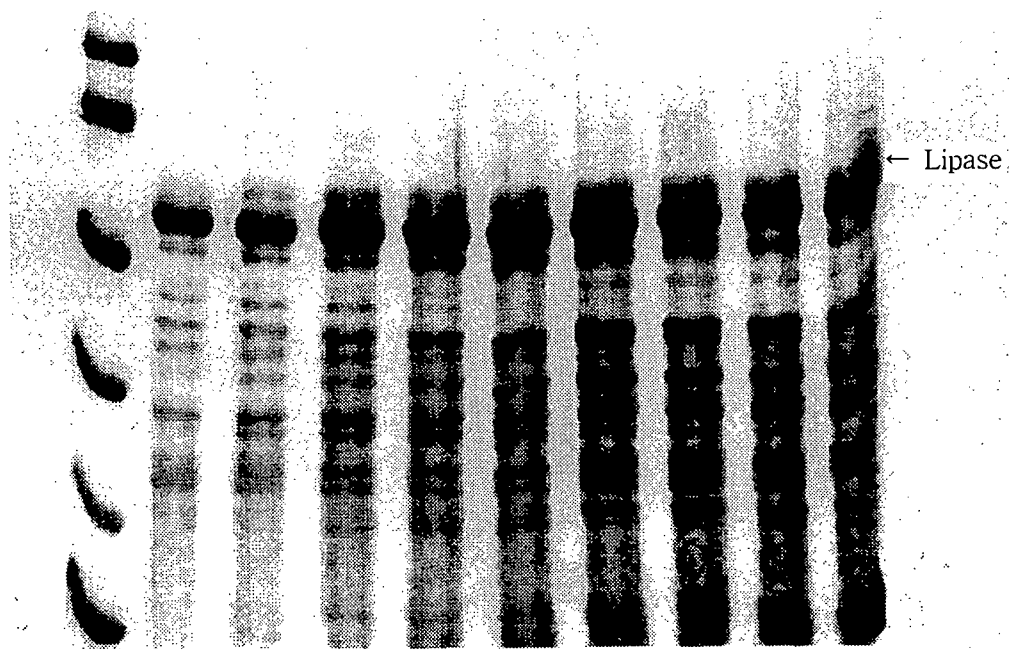


Figure 83. SDS-PAGE analysis of fractions after DEAE chromatography. Fractions of the first and second peak are shown. 12% of SDS separating gel was used.

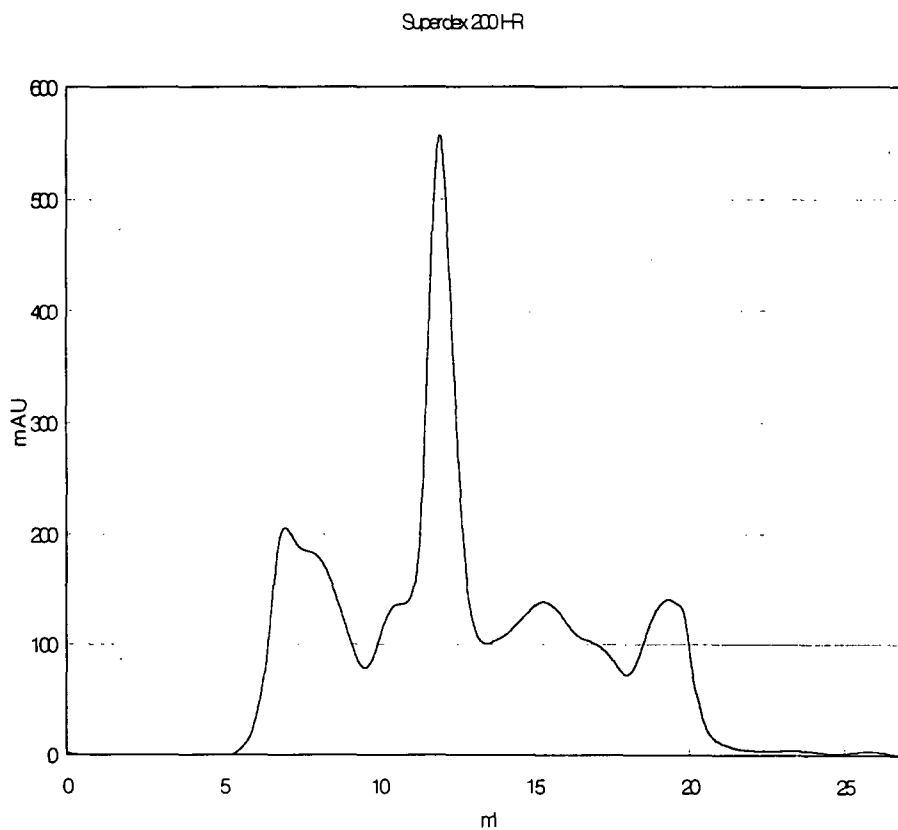


Figure 84. The first gel filtration FPLC. Sample was applied with 0.1ml of lipase from DEAE using buffers of 50 mM Tris (pH 8.0). Superdex 200 HR 10/30 prepacked column was used and flow rate was 0.5 ml/min.

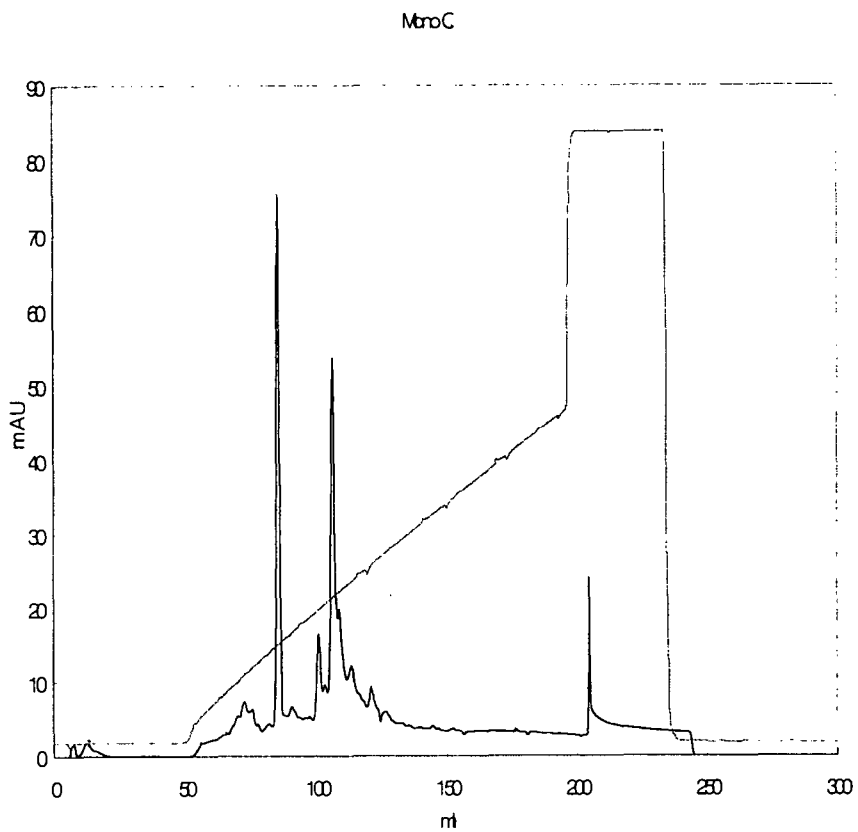


Figure 85. Anion-exchange FPLC elution profile using Mono-Q. Sample was applied with 2 ml of lipase from Superdex 200 HR. 0-0.6 M NaCl gradient was used with a flow rate of 4 ml/min. Peaks around 100ml was the most active.

final Superdex 200

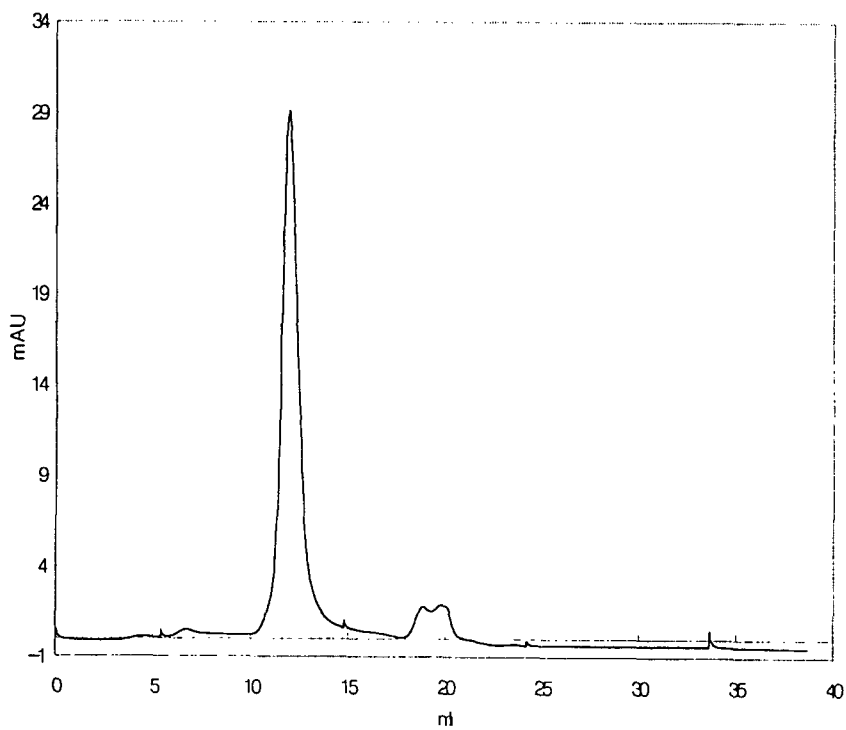


Figure 86. Final Gel filtration FPLC using Superdex 200. Sample was applied with 0.1ml of lipase from Mono Q and all conditions were equal to the conditions of the first Superdex 200 run.

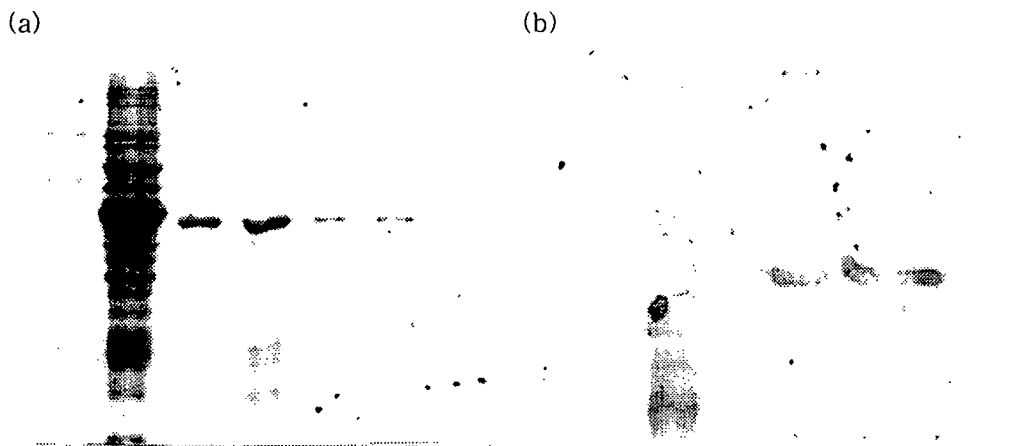


Figure 87. SDS-PAGE analysis of each purification step. 12% of separating gel was used and molecular weight markers used were 94, 67, 43, 30 kD, respectively. (a) lane 1, crude inclusion bodies in urea buffer; lane 2, from SEPROS; lane 3, from DEAE; lane 4, from Superdex FPLC; lane 5 : from Mono Q; lane 6, from Superdex FPLC. (b) activity staining of lipase.

수행하고 난 결과는 95% 이상의 순수도를 갖는 lipase를 얻었다고 판단된다. 또한 activity staining을 하였을 때 lipase의 band와 일치함을 알 수 있었다. Table 10은 purification step에 따른 단백질 정제 효율을 보여주고 있다. Table에서 보이는 바와 같이 SEPROS와 ion exchange가 specific activity 면에서 상대적으로 분리정제에 높은 효율을 보여주었다.

제4항 리파제 효소의 결정화 조건 및 구조안정화 연구

1. 효소의 결정화 조건 screening

X-선 crystal data collection에 가장 적절한 single crystal을 얻는데 주력하고, 필요한 조건을 잡았다. Inclusion body로 생산되는 lipase에 대한 단백질 결정화를 위하여 단백질 용액에 생체고분자 결정화에 많이 이용되고 있는 sparse matrix sampling technique으로 결정화 screening을 시도하였다. 결정화 조건의 screening 결과 거의 대부분의 조건에서 aggregation이 나왔고, solubility가 가능한 조건에서 이들에 대한 결정화 조건을 얻기 위해 노력하였지만, 성공하지 못하였다. 이는 inclusion body로 발현되는 단백질의 어려움을 대변해 주는 것이라 할 수 있다. 다만, inclusion body에 대한 연구의 결과는 매우 뜻깊은 것이며 inclusion body를 극복하기 위한 방법이 실험실내에 know-how가 쌓였다고 판단된다.

2. CD에 의한 리파제의 2차구조 분석

정제된 refolded lipase를 0.2 mg/ml로 적정하여 far UV CD spectra (190 - 240 nm)를 얻어 mean residual molar ellipticity 즉, θ 값을 평균 아미노산 분자량 110으로 계산하였다. JASCO J-715 spectropolarimeter (Hachijochi, Tokyo, Japan)와 peltier temperature controller로 15 °C에서 수행한 4회의 동일조건 spectrum을 평균화 하였으며 2차 구조는 Yang et al (1986)의 reference

Table 10. Summary of the purification of refolded lipases

purification step	total protein (mg)	protein yield (%)	total activity (unit)	specific activity (unit/mg protein)	activity yield
cell lysate	387	100	440	1.2	
inclusion body	175	45	0	0	
SEPROS	49	12.67	178850	3650	100
DEAE-Sepharose CL-6B	43.8	11.3	154614	3530	80.45
Superdex 200 HR	16.2	2.9	124189	7666	69.44
Mono Q HR	4.4	1.14	35724	8931	19.9
Superdex 200 HR	2.7	0.69	25450	9426	14.23

spectra를 가지고서 측정하였다(Figure 88). Calcium이 제거된 경우 helix content가 줄어들며 상대적으로 random region의 구획이 증가함을 알 수 있었다(Table 11). Calcium ion이 존재할 때 PFL의 2차구조는 α -helix와 turn의 경우 10%정도, β -strand의 경우 약 7% 정도가 증가하게 됨을 관찰할 수 있었고, 이는 결국 3차구조 혹은 단백질의 conformation의 안정에 따른 활성 증가와 상호 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

3. GuHCl에 의한 리파제 Unfolding

Lipase는 guanidium의 농도증가와 더불어 denaturation 되는 것을 확인할 수 있었다. Calcium ion이 없는 경우 denaturation transition은 0.5M 구간에서 나타나지만, 10 mM calcium ion의 존재 하에서는 2M 구간에서 나타났다. 이러한 결과는 activity assay와 fluorescence spectrum이 동일하였다(Figure 89).

4. Cosolvents의 리파제 구조에 미치는 영향

Calcium ion에 의한 lipase의 stabilizing effect는 cosolvent, 즉 TFE (trifluoroethanol ; 0-24%)와 DMSO (dimethyl sulfoxide ; 0-24 %)를 이용하여 inactivating transition plot으로 동일한 결과를 얻었다 (Figure 90). 역시 각각의 sample은 각 cosolvent의 조건하에서 상온 1 h 반응 후 activity를 측정하였다. 단순히 calcium ion에 의한 conformational change 또 chemical denaturation에 있어서 circular dichroism spectrum, fluorescence, 그리고 activity assay를 통해 본 결과 calcium ion은 renaturated *P. fluorescens* lipase에 대해 conformational stabilizer로서 작용한다는 것을 알게 되었다.

제5항 결과 및 논의

1. Inclusion body 형태의 단백질 aggregate의 refolding

CD profile of PFL in the presence and absence of calcium ion

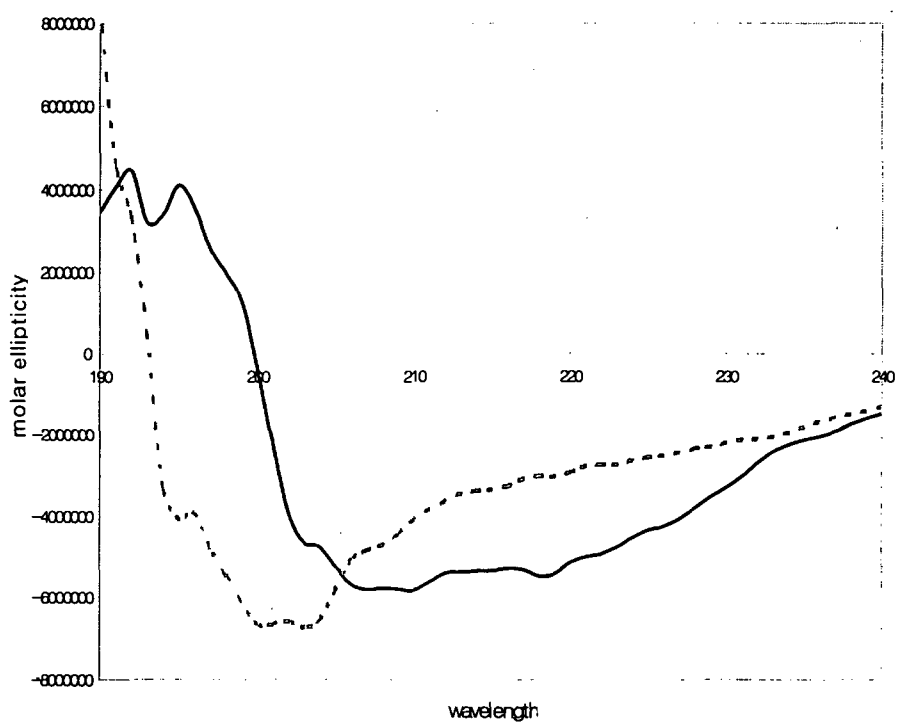
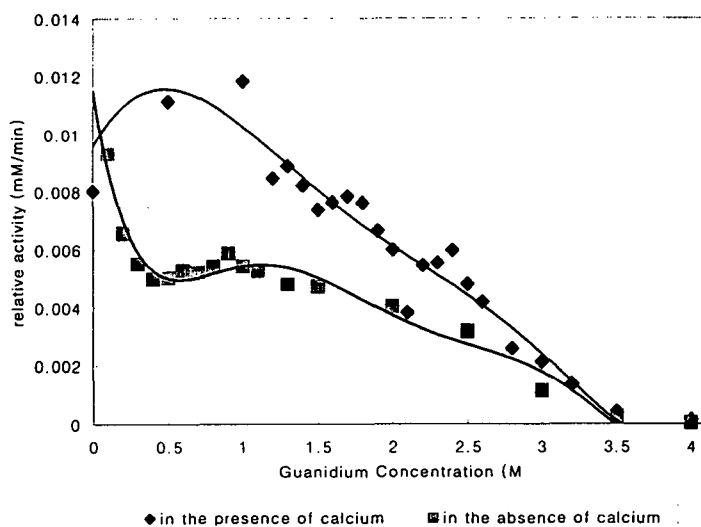


Figure 88. Molar ellipticity of renatured lipase on circular dichroism.
: 10 mM calcium ion addition, ----- : no addition

Table 11. The results of secondary structure estimation of lipase with circular dichroism in the presence and absence of calcium ions

	In the presence of calcium		In the absence of calcium	
	fraction	ratio	fraction	ratio
Helix	13779	20.2	2288	6
Beta	23819.5	34.9	10168.3	26.6
Turn	8429.3	12.4	247.3	0.6
Random	22166	32.5	25508.6	66.8
Total	68193.8	100	38212.2	100

(a)



(b)

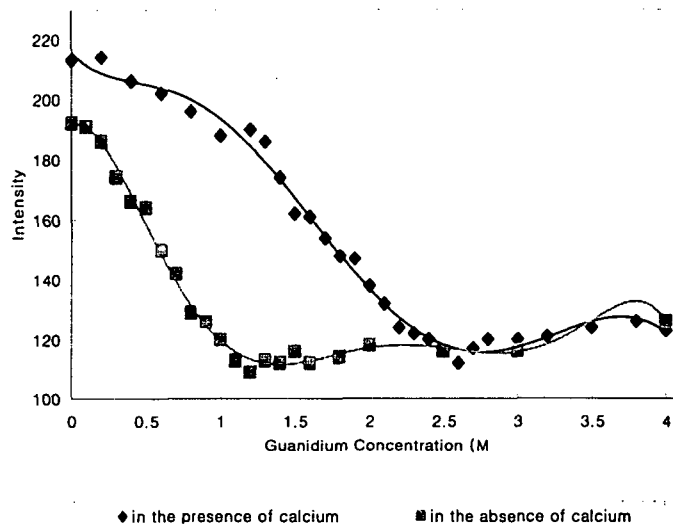


Figure 89. Denaturation plots of PFL in the presence and absence of calcium ions (a) fluorescence emission intensity at 336 nm (b) lipase activity

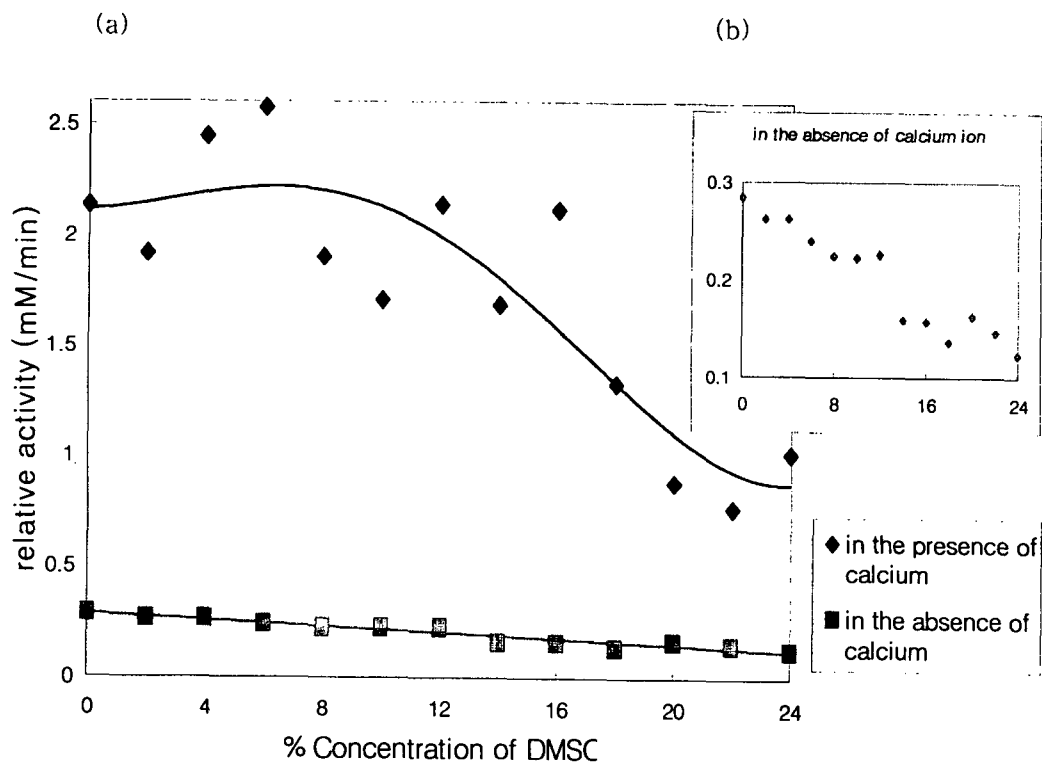


Figure 90. The effect of calcium ions on PFL when (a) DMSO and (b) trifluoroethano were used as cosolvents with increasing concentrations.

열저항성 PFL의 *E. coli* 내 recombinant 단백질 발현은 대량생산 되는 점이 장점인 반면, *E. coli*에서 inclusion body로 발현되며 예상외로 inclusion body의 refolding이 어렵기 때문에 본 연구의 수행에 가장 큰 문제점으로 인정되어 왔다. 초기의 *P. fluorescens* lipase 분리정제는 inclusion body라고 하는 단백질 aggregation에 대한 경험이 부족하여 시행착오를 반복하였다. Inclusion body 상태의 장점을 살리기 위하여 PFL이 denature된 상태에서 분리 정제하려던 연구는 idea는 좋았지만, 결과적으로 성공적이지 못하였다. 이는 PFL의 refolding이 그만큼 어렵다는 사실을 대변해주는 결과였지만, 그렇다고 native 한 상태를 분리정제 초기부터 얻는 작업이 워낙 어려웠던 이유이기도 하였다.

연구기간동안 단백질 특성연구를 통해 PFL inclusion body의 solubilization을 위한 적절한 조건을 optimization 하여 왔고, soluble 단백질을 대량 확보하는 목적으로 연구를 수행하였다. 첫째, 단백질 refolding을 위해서 step dilution, dialysis, glutathione을 이용한 reducing potential 조절 및 refolding screening kit을 이용하기도 하였고, 또한 *E. coli* 배양온도를 낮추거나 sucrose나 glycerol과 같은 단백질 stabilizer를 사용하기도 하였으나, yield가 매우 낮았던 점이 실제적인 어려움이었다. 시도된 방법 중에서 gel filtration chromatography를 이용한 SEPROS는 상당히 향상된 refolding yield를 제공하였다(Figure 84). 본 방법은 약 20년전 Thomas Creighton에 의하여 개발된 ion exchange chromatography를 이용한 denaturation 및 renaturation을 동시에 시도하는 연구와 유사한 방법이다. 단지 gel filtration chromatography에서 최근에 사용되는 gel matrix의 size exclusion을 이용함으로써 refolding되는 단백질과 단백질간의 상호작용을 차단하여 단백질의 aggregation을 방지하려는 시도라고 할 수 있다. 본 연구의 PFL에 적용한 결과, Sephacryl S-200를 이용하였을 때 기존의 step dilution이나 다른 refolding 방법에 비하여 yield 면에서 큰 차이를 보여주었다(Table 9). 따라서 refolding을 위한 SEPROS 방법의 시도는 향후 단백질 refolding에 있어서 매우 중요한 know-how로 이용되리라 판단된다.

2. PFL의 분리와 정제

SEPROS로부터 얻은 lipase 분획은 DEAE-Sepharose CL-6B를 이용한 ion exchange chromatography와 Superdex 200 HR FPLC를 이용한 gel filtration chromatography를 수행하였다. 확인된 PFL 분획은 Mono Q ion-exchange FPLC와 최종적으로 다시 Superdex 200 gel filtration FPLC를 수행하였다. 분리정제를 수행한 결과가 Figure 87에 나타나있다. 각 분리정제 단계에서 얻어진 효소의 순수도는 특히 SEPROS와 ion exchange chromatography가 매우 효과적이었음을 보여주고 있다. Superdex 200 FPLC를 수행하고 난 결과는 95% 이상의 순수도를 갖는 lipase를 얻었다고 판단되었고, 4 L 배양액으로부터 대략 1-3mg의 단백질을 확보할 수 있었다. 또한 activity staining을 하였을 때 lipase의 band와 일치함을 알 수 있었다. Table 10은 purification step에 따른 단백질 정제 효율을 보여주고 있다. SEPROS와 gel filtration FPLC가 specific activity 면에서 상대적으로 분리정제에 높은 효율을 보여주었다. Inclusion body로 생산되는 lipase에 대한 단백질 결정화를 위하여 단백질 용액에 생체고분자 결정화에 많이 이용되고 있는 sparse matrix sampling technique으로 결정화 screening을 시도하였으나 거의 대부분 조건에서 aggregation이 나왔고, solubility가 가능한 조건에서 이들에 대한 결정화 조건을 얻기 위해 노력하였지만, 성공하지 못하였다. 특히 FPL의 경우, 고농도 즉 5mg/ml의 농도이상의 조건에서는 4°C에서도 aggregation이 수 시간내에 일어날 정도로 단백질 stability가 낮았다. 그러나 결정화 조건의 kit는 단백질의 refolding 조건을 탐색하는데 의미있는 시도라는 점에서 역시 중요한 know-how로 작용할 것으로 기대된다.

3. Circular dichroism을 이용한 2차구조(secondary structure) 분석

정제된 refolded lipase를 far UV CD spectra (190 - 240 nm)에서 molar ellipticity를 측정한 결과, α -helix, β -strand 그리고 turn이 PFL에는 각각 20%, 35%, 12% 존재함을 확인하였다. 나머지 약 33%는 random coil로 관찰되었다.

20%, 35%, 12% 존재함을 확인하였다. 나머지 약 33%는 random coil로 관찰되었다.

PFL에 calcium ion이 존재할 때와 존재하지 않을 때를 비교하였을 때 효소의 2차구조는 α -helix와 turn의 경우 10%정도, β -strand의 경우 약 7% 정도가 증가하게 됨을 관찰할 수 있었고, 이는 결국 3차구조 혹은 단백질의 conformation의 안정에 따른 활성 증가와 상호 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. random region의 구획이 증가함을 알 수 있었다. 단백질 stability 연구를 위해서 denaturation 즉, denaturant에 따른 단백질의 활성과 structure를 fluorescence로 확인하였다. PFL은 guanidium의 농도증가와 더불어 denaturation 되는 것을 확인할 수 있었다. 이 때 calcium ion이 없는 경우 denaturation transition은 0.5M 구간에서 나타나지만, 10 mM calcium ion의 존재 하에서는 2M 구간에서 나타남으로써 calcium ion이 활성과 단백질의 구조 모두에 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다.

4. Stability on cosolvents

Calcium ion에 의한 리파제의 안정성 영향은 cosolvent, 즉 TFE와 DMSO를 이용하여 inactivating transition plot으로 동일한 결과를 얻었다. Calcium ion은 renaturated PFL에 대해 conformational stabilizer로서 작용하는 것으로 기대된다.

5. 연구결과의 이용

식품분야에서의 첨단 생물공학적인 기술개발을 위한 효소 공학적 기술은 향후 효소산업에 있어서 매우 중요한 인자로 작용할 것으로 기대된다.

1) 기술적으로는

Inclusion body 형태로 발현되는 단백질의 refolding 기술이 확립되었다는 점은 효소산업의 기초분야에 필요한 기술제공이 가능하다고 판단된다. 특히

powder 형태로 만들어지는 제반 식품공정에서의 단백질 관련 시료에 대한 기술적 지원이 가능하다.

2) 학문적으로는

Homology가 높은 효소의 modeling을 통해 mutation 가능한 아미노산을 선택할 수 있는 바이오 컴퓨팅 기술과, 결정 3차구조에는 미치지 못하지만, 2차구조와 특히 calcium ion에 의한 활성과 구조에 대한 안정성을 보여주었다는 점은 학문적으로 중요한 연구결과라고 사료된다.

또한 SEPROS와 같은 refolding 기술은 단백질 renaturation에 있어서 주목할 만한 기술이라고 판단된다.

참고문헌

- Aamand, J.L., Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T. Diderichsen, B. and McConell, D.J. (1994) Chaperone-mediated activation *in vivo* of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol. Gen. Genet.* 245, 556-564.
- Adams, D.M. and Brawley, T.G. (1981) *J. Food Sci.* 46, 673-676.
- Allenmark, S.; Ohlsson, A. Studies of the heterogeneity of a *Candida cylindracea (rugosa)* lipase : Monitoring of esterolytic activity and enantioselectivity by chiral liquid chromatography. *Biocat. analysis.* 1992, 6, 211-221.
- Antonian, E. (1988) Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids*, 23, 1101-1106.
- AOAC. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th edn). Cunniff, P. Ed.; Association of Official Analysis Chemists: Arlington, VA, USA. 1995; Ce 2-66.
- Aoyama, S., Yoshida, N. & Inouye, S. (1988). Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. *FEBS Letters*, 242, 36-40.
- Audrieth, L. F.; Kleinberg, J. Acid catalysis in liquid ammonia. III. Effect of α -substituents on the ammonolysis of esters. *J. Org. Chem.* 1938, 3, 312-316.
- Bactenburg, A.M., Egmont, M.R., Frenken, L.G.J. & Verrips, C.T. (1990). Lipase enzymes including mutant lipase enzymes, e.g., from *Pseudomonas* species, are produced and modified by recombinant DNA technique. The enzymes are applicable in detergent and cleaning compositions, with advantage for example of improved stability to proteolytic digestion.

- European patent application, EP O 407 225 A1.
- Barbeni, M., Allegrone, G., Cisero, M. and Guarda ; GC and NMR enantiodiscrimination of 2-methyl substituted aliphatic acids via diastereomeric esterification with (R)-pantolactone. *Flavour Fragrance J.* 7, 163 (1992)
- Benzonana, G. and Desnuelle, P. Etude cinetique de l'action de la lipase pancreatique sur des triglycerides en emulsion. Essai d'une enzymologie en milieu heterogene. *Biochim. Biophys. Acta* 1965, 105, 121-136.
- Bianchetta, J.D., Bidaud, J., Guidoni, A.A., Bilicel, J.J., Tovery, M. (1979). Porcine pancreatic lipase, Sequence of the first 234 amino acids of the peptice chain. *Eur. J. Biochem.*, 97, 395-405.
- Bodmer, M.W., Angal, S., Yarranton, G.T., Harris, T.J.R.m, Lyons, A., King, D.J., Pieroni, G., Riviere, C.m Verger, R. & Lowe, P.A. (1987). Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim. Biophys. acta*, 909, 237-244.
- Boel, E. & Huges-Jensen, B. (1988). Recombinant Humicola lipase and process for production of recombinant Humicola lipases. European patent application 305 216A1.
- Boel, E., Huges-Jensen, B., Chistensen, M., Thim, L. & Fiil, N.P. (1988). Rhizomucor miehei triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids*, 23, 701-706.
- Bovara, R.; Carrea, G.; Ottilina, G.; Riva, S. Water activity dose not influence the enantioselectivity of lipase PS and lipoprotein lipase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 169-174.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huges-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., and Menge, U. (1990) *Nature* 343, 767-770.

- Brockerhoff, H. A model of pancreatic lipase and the orientation of enzymes at interfaces. *Chem. Phys. Lipids* 1973, 10, 215-222.
- Cai, S.-J., Wong, D.M., chen, S.-H. & chan, L. (1989). structure of the human hepatic triglyceride lipase gene. *Biochemistry*, 28, 8966-8971.
- Caro, J. De, Boudouard, M., Bomicel, J., Guidoni, A., Desmuelle, P. & Roverly, M. (1981). Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 671, 129-138.
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 7294-7299.
- Chirala, S. (1986) *Nucleic Acids Research* 14, 5935.
- Cho, S.Y. and Yoon, S.H. (1992) *Foods and Biotechnol.* 1, 34-41.
- Chung G. H., Lee, Y. P., Yoo O. J. and Rhee, J.S. (1991) Overexpression of a thermostable lipase from *Pseudomonas fluorescences* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 237-241.
- Cooper, D.A., Stein, J.C., Strieleman, P.J. & Bensadoun, A. (1989). Avian adipose lipoprotein lipase: cDNA sequence and reciprocal regulation of mRNA levels in adipos and heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 1008, 92-101.
- Cygler, M. et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3180-3186.
- Dabulis, K.; Klibanov, A. M. Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 41, 566-571.
- Datta, S., Luo, C-C., Li, W.-H., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Brown, M.A., Chen, S-H., Liu, S.-W. & chan, L. (1988). Human hepatic lipase. *J. Biol. Chem.*, 263, 1107-1110.
- De Geus, P. (1990) *Cutinase*. WO 90/09446.
- Deeb, S.S. & Peng, R. (1989). Structure of the human lipoprotein lipase

- gene. *Biochemistry*, 28, 4131-4135.
- Derewenda, U. et al. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1, 36-47.
- Derewenda, Z. S.; Sharp, A. M. News from the interface: the molecular structures of triglyceride lipases. *Trend Biochem. Sci.* 1993, 18, 20-25.
- Docherty, A. J. P., Bodmer, M.W., Anga I, S., Verger, R., Ribiere, C., Lowe, P.A., Lyons, A., Entage, J.S. & Harris, T.J.R. (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of rat lingual lipase cDNA. *Nucl. Acids Res.*, 13, 1891-1903.
- Dudal, Y.; Lortie, R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 45, 129-134.
- Enerback, S. & Bjursell, G. (1989). Genomic organisation of the encoding guinea-pig lipoprotein lipase; evidence for exon fusion and unconventional splicing. *Gene*, 84, 391-397.
- Enerback, S., Semb, H., Bentsson-Olivecrona, G.m Carlsson, P., Hermansson, M.-L., Olivecrona, T. & Bjursell, G. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding lipoprotein lipase of guinea-pig. *Gene*, 58, 1-12.
- Engel, K.-H., lipase-catalyzed enantioselective acidolysis of chiral 2-methylalkanoates. *Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 146-150 (1992)
- Ettinger, W.F., Thukral, S.K., and Kolattukudy, P.E. (1987) *Biochemistry*, 26, 7883-7886.
- Faber, K. (1992) *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag
- Fitzpatrick, P. A., Klibanov, A. M. How can the solvent affect enzyme enantio- selectivity? *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 3166-3171.
- Fujiki, Y., Aizono, Y. and Funatsu, M. (1978) Characterization of minor subunit of rice bran lipase. *Agric. Biol. Chem.* 42, 2401-2402.

- Funatsu, M., Aizono, Y., Hayashi, K., Inmasu, M. and Yamaguchi, M. (1971) Biochemical studies on rice bran lipase: purification and physical properties. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 734-742.
- Gargouri, Y., Moreau, H. and verger, R. (1989) Gastric lipases: biochemical and physiological studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1006, 255-271.
- Gotz, F. Popp, F., Korn, E. Schleifer, K.H. (1985). Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Stahylococcus carnosus*. *Nucl. Acids Res.*, 13, 5895-5906.
- Gray, G.L., Poulouse, A.J. & Power, S.D. (1986). A substantially enzymatically pure hydrolase is provided which is secreted by and isolatable from *Pseudomonas putida* ATCC52552. Cloning the gene expressing the hydrolase into a suitable expression vector and culturing, such as fermenting the *E. coli* strain JM101 harboring a plasmid designated pSntacII, has been found to provide surprisingly high yields of the hydrolase. European patent application EP O 268 452 A2.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., and Cygler, M. (1994) *Prot. Sci.* 3, 82-91.
- Grusby, M.J., Nabavi, N., Wong, H., Dick, R.F., Bluestone, J.A., schotz, M.C. & Glimcher, L.H. (1990). Cloning of and interleukin-4 inducible gene from cytotoxic T lymphocytes and its identification as a lipase, *Cell*, 60, 451-459.
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Aamand, J.L., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. and McConell, D.J. (1993) Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5682-5686.
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. and McConell, D.J. (1995) Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959

- lipase with its chaperone, *lim A*. J. Biochem. 118, 575-581.
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B. and McConnell, D.J. (1995) Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, *lim A*. J. Biochem. 118, 575-581.
- Hofelmann, M., Kittsteiner-Eberle, R., and Schreier, P. (1983) Ultrathin-layer agar gels : a novel print technique for ultrathin-layer isoelectric focusing of enzymes. Analytical Biochem. 128, 217-222.
- Holmberg, E. and Hult, K., temperature as an enantioselective parameter in enzyme resolutions racemic mixtures. Biotechnol. Lett. 13, 323-326 (1991b)
- Holmberg, E., Dahlen, E., Norin, T., and Hult, K. (1991) Biocatalysis 4, 305-312.
- Holmberg, E.; Holmquist, M.; Hendenstroem, E.; Berglund, P.; Norin, T.; Hoeborg, H. E.; Hult, K. Reaction conditions for the resolution of 2-methylalkanoic acids in esterification and hydrolysis with lipase from *Candida cylindracea*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 35, 572-578.
- Holmberg, E.; Hult, K. Temperature as an enantioselective parameter in enzyme resolutions racemic mixtures. Biotechnol. Lett. 1991, 13, 323-326.
- Jorgensen, S. Skov, K.W. and Diderichsen, B. (1991) Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia* : lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. J. Bacteriol. 173, 559-567.
- Kamiya, N.; Goto, M. Preparation of surfactant-coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. J. Biotechnol. 1998, 52, 81-88
- Karl, V., Rettinger, K., Dietrich, H. and Mosandle, A., 2-Alkylverzweigte Aromastoffe-structur, Geruch and irospezifische. Deutsche Lebensmittel Rundschau 88, 147-149(1992a)

- Kazlauskas, R.J. (1994) Trends in Biotechnol. (1994) 12, 464-472.
- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T. and Cuccia, L.A. (1991) J. Org. Chem. 56, 2656-2665.
- Kikkawa, S.; Takahashi, K.; Katada, T.; Inada, Y. Esterification of chiral secondary alcohols with fatty acid in organic solvents by polyethylene glycol-modified lipase. *Biochem. Int.* 1989, 19, 1125-1131.
- Kim, K. H.; Kwon, D. Y.; Rhee, J. S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *Lipids* 1984, 19, 975-977.
- Kirchgessner, T.g., Chuat, J-C., Heinzman, C., Etienne, J., Guilhot, S., Svensson, K., Ameis, D., Pilon, C., d'Auriol, L., Andalibi, A., Schotz, M., Galibert, F. & Lusic, A.J. (1989). Organisation of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9647-9651.
- Kirchgessner, T.G., Svensson, K.L., Lusic, A.J. & Schotz, M.C. (1987). the sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. a member of a lipase gene family. J. Biol. Chem., 262, 8463-8466.
- Kirk Othmer, Encyclopedia of chemical technology, vol4,3rd ed., John-Wiley and sons, New York,1978,p835
- Klibanov, A. M. Enzyme memory-What is remembered and why? *Nature* 1995, 374, 596.
- Klibanov, A. M. Enzyme Work in organic solvents. *Chemtech* 1986, 16, 354-359.
- Kolattukudy, in "Lipases", Börgstrom and Brockman, eds, Elsevier, North Holland, pp. 471-504, 1984.
- Koshland, D. E.; Neet, K. E. The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 1968, 37, 359-410.
- Kouker, G. and Jaeger, K.-E. (1987) Specific and sensitive plate assay for

- bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 211-213.
- Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. & Takagi, Y. (1986). Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 141, 185-190.
- Kwon, D. Y. Synthesis of stereoisomer trifluoroethylmandelates and their stereospecificity for the uses as the substrate of lipase in organic solvent. *J. Kor. Chem. Soc.* 1992, 36, 125-130.
- Kwon, D. Y.; Kim, K. H.; Rhee, J. S. Characteristic of lipases in two-phase system. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 1987, 15, 43-48.
- Kwon, D. Y.; Rhee, J. S. Immobilization of lipase for fat splitting. *Kor. J. Chem. Eng.* 1983, 1, 153-156.
- Kwon, D. Y.; Song, H. N.; Yoon, S. H. Esterification patterns of lipases for synthesizing tricaprolylglycerols in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1287-1290.
- Kwon, D. Y.; Song, H. N.; Yoon, S. H. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 1521-1525.
- Kwon, D. Y.; Yang, H. J.; Yoon, S. H. Separation of enantiomers of (S)- and (R)-2-methylbutanoic acid methylester using chiral GC column. *Food Sci. Biotechnol.* 1999, 8, 139-141.
- Kwon, D.Y. (1992), Synthesis of stereoisomer trifluoroethylmandelate and their stereospecificity for the use of lipases in organic solvent, *J. Korean Chem. Soc.* 36, 125
- Kwon, D.Y., H.D. Kim, and S.H. Yoon (1998), Lipase catalyzed hydrolysis and esterification of glycerides in organic solvent, 7, 1
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.

- Lee, C.Y. & Iandolo, J.J. (1986). Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. *J. Bacteriol.*, 166, 385-391.
- Lee, J.-G., Park, D.-R., Choi, E.-S. and Kim, W.-Y. (1998) *Food Sci. Biotechnol.* 7, 300-304.
- Lee, Y.P., Chung, G.H. and Rhee, J.S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 156-164.
- Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 658-666.
- Lowe, M.E., Rosenblum, J.L. & Strauss, A.W. (1989). Cloning and characterisation of human pancreatic lipase cDNA. *J. Biol. Chem.*, 264, 20042-20048.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Maciel, M. I.; Hansen, T. J.; Aldinger, S. B.; Labows, J. N. Flavor chemistry of cashew apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 923-927.
- Macleod, A. J.; Pieris, N. M. Volatile flavor compounds of wood apple and a processed product. *J. Agric. Food Chem.* 1981, 29, 49-53.
- Macrae, A. R. Microbial lipases catalysts for the interesterification of oils and fats, In *Biotechnology for the Oils and Fats Industry*; Ratledge, C.; Dawson, P.; Rattray, J. Eds.; AOCS Press, Champaign, IL, USA. 1984; pp. 189-198.
- Mannesse, M.L.M., de Haas, G.H., van der Hijident, H.,T.W.M., Egmond, M.R., and Verheji, H.M. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25, 165-170.
- Martinelle, M.; Hult, K. Kinetics of triglyceride lipases. In *Lipase*. Woolley,

- P.; Petersen, S. B. Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK. 1994; pp. 159-180.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., and Cambillau, C. (1992) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 356, 615-618.
- Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Curdrey, C., Verger, R., and Cambillau, C. (1994) Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*, 33, 83-89.
- Nishiro, T., Kamimura, M. Murata, M., Terao, Y. and Achiwa, K.(1989) Production of optically active esters and alcohols from racemic alcohols by lipase-catalyzed stereoselective transesterification in non-aqueous system. *J. Biochem.* 105; 510-512
- Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., and Frenken, L.G.J. (1993) *FEBS Lett.* 331, 123-128.
- Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. L.; Klivanov, A. M. The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 51, 95-99.
- Ollis et al. (1992) *Prot. Eng.* 5, 197-211.
- Osaki, K. Flavor of fresh leaves of *Mentha* spp. *Koryo* (Japanese). 1992, 176, 77-86.
- Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S.; Sartore, L.; Veronese, F. M. Effect of the enzyme from on the activity, stability and enantioselectivity of lipoprotein lipase in toluene. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14, 947-952.
- Pham, L.J. and Kwon, D.Y. (1992), Regiospecific analysis of triacylglycerols of some seed oils by pancreatic lipase, *Food & Biotechnol.* 1, 75
- Phillips, R. S. Temperature effects on stereochemistry of enzymatic

- reactions. *Enz. Microb. Technol.* 1992, 14, 417-419.
- Rossmann, M.G. and Blow, D.M. (1962) *Acta Crystallogr.* 15, 24-31.
- Russel, A.; Klivanov, A. M. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 11624-11625.
- Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 1958, 30, 513-520.
- Schwab, W.; Schreier, P. Simultaneous enzyme catalysis extraction; a versatile technique for the study of flavor precursors. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36, 1238-1242.
- Soliday, C.L., Flurkey, W.H., Okita, T.W. and Kolattukudy, P.E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3939-3943
- Stryer, L., Kendrew, J.C. and Watson. H.C. (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 96-104.
- Vulfson, E. N.; Alexander, C.; Whitcombe, M. J. Molecular imprinting : Assembling the molecular cast. *Chem. Brit.* 1997, 33, 23-26.
- Weissfloch A. N. E.; Kazlauskas, R. J. Enantioference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 6959-6969.
- Wen, H. W.; Akoh, C. C.; Phillips, R. S. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of di-menthol in organic solvent using acid anhydrides as acylation agents. *Enz. Microb. Technol.* 1996, 18, 536-539.
- Wescott, C. R.; Klivanov, A. M. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1206, 1-9.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. and Winkler, U.K.(1992) Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1325-1335.
- Wu, S.H., Guo, Z.W. and Sih, C.J. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1990-1995.

- Yamaguchi, Y., Komatsu, A. and Moroe, T. (1976) *J. Agri. Chem. Soc. Jpn* 50, 619-620.
- Yoon, S.H., Kwon, D.Y. and Song, H.N., Enzymatic Synthesis of Medium Chain Triglycerides using Lipase, Report of G7, Ministry of Science and Technology, Seoul (1994)
- Zaks, A.; Klivanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 3194-3201.
- Zaks, A.; Klivanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* 1984, 224, 1249-1251.
- Zaks, A.; Klivanov, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 8017-8021.

부 록

여 백

부 록

부록목차

- 부록 1. Separation of Enantiomers of (S)- and (R)-methylbutanoic Acids
Methylester Using Chiral GC Column (발표논문) 238
- 부록 2. Lipase Catalyzed and Hydrolysis and Esterification of Glycerides in
Organic Solvent (발표논문) 241
- 부록 3. Molecular Cloning of Genes for Lypolytic Enzymes of *Aspergillus*
nidulans (발표논문) 246
- 부록 4. Enantiomeric Synthesis of (S)-2-Methylbutanoic Acid Methylester,
Apple Flavor Using Lipases in Organic Solvent (계제확정논문) 251
- 부록 5. Refolding and Secondary structure of Lipase from *Pseudomonas*
fluorescens 278

Separation of Enantiomers of (*S*)- and (*R*)-2-Methylbutanoic Acid Methyl ester using Chiral GC Column

Dae Young Kwon*, Hye-Jeong Yang and Suk Hoo Yoon

Division of Food Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, Songnam, 463-420, Korea

Abstract The 2-methylbutanoic acid methyl ester is known to be a major flavor of apple or strawberry. Among the two enantiomers of 2-methylbutanoic acid methyl ester, only (*S*)-methylbutanoic acid methyl ester has a flavor characteristic. Enantiomers of (*S*)-2- and (*R*)-2-methylbutanoic acid methyl ester were separated using the chiral capillary column by gas chromatography. This method is simpler and more rapid than other reported methods.

Keywords: Enantiomers, 2-methylbutanoic acid methyl ester, gas chromatography

Introduction

The 2-methylbutanoic acid methyl ester, which is known as one of the main flavor components of apple (1, 2), is an enantiomer of which only the (*S*)-form has a flavor characteristic (2-4). (*S*)-enantiomer has a natural potent flavor. However, it is not commercialized because of the high cost for its enantioselective separation. Successful analysis or separation of (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester from the (*R*)-form should be the first gateway to the production of this flavor. Nowadays, many attempts for the production of enantiomeric selective value-added materials such as flavors, food ingredients, and pharmaceutical components were done.

For analyzing the enantiomer of aliphatic acid like 2-methylbutanoic acid or its ester, the multidimensional gas chromatography (MDGC) using two gas chromatographs (GC) with 2 or 3 different columns connected in series was reported (5). However, this method is very complex and complicated. GC-mass spectrometry or GC-NMR spectroscopy were used for analyzing (*S*)- or (*R*)-2-methylaliphatic acid using heptakis (2,3,6-tri-*o*-methyl- β -cyclodextrin) column or others (2, 6). Other methods (7, 8) for analyzing (*S*)- or (*R*)-2-methylaliphatic acid were also complicated because it is necessary to make 2-methylbutanoic acid lactone derivatives for a good reso-

lution by diastereomeric esterification with (*R*)-pan-tolactone. At the present time, the separation of enantiomers of methylaliphatic acids or their ester derivatives are complicated and cumbersome in that more than one analytical instrument must be connected in series for successful separation.

Here, a rapid, simple and direct method for analyzing the enantiomer of (*S*)- or (*R*)-2-methylbutanoic acid methyl ester was studied.

Materials and Methods

Materials As a precursor of 2-methylbutanoic acid methyl ester, racemic and pure (*S*)-2-methylbutanoic acid were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA).

Synthesis of (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester for using the authentic sample for identification was synthesized chemically from (*S*)-methylbutanoic acid by the AOAC method (9). Racemization was not observed during the methylation of 2-methylbutanoic acid, which is the same as previously reported (10).

Identification of (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester The structure of synthesized (*S*)-methylbutanoic acid methyl ester was identified using GC-mass spectrometry (Concept II, Kratos Analytical, Manchester, UK), and the optical rotation, $[\alpha]_D^{20}$, of (*S*)-methylbutanoic acid methyl ester was determined by polarimetry (Jasco, P-1020, Hachioji, Japan) at 589 nm (sodium D line) at 20°C using a standard cell with 10-cm light path.

Separation of enantiomers of (*R*)- and (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester For the racemic 2-methylbutanoic acid methyl ester, which was produced from racemic methylbutanoic acid by the process mentioned above, each enantiomeric isomer in hexane was separated by gas chromatography (Hewlett-Packard 5890 Series I, Avondale, PA, USA). The column used for GC analysis was the Chiraldex GTA capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.125 μ m film thickness; Alltech Inc, Deerfield, IL, USA). In GC analysis, (*S*)-2-methyl-

*Corresponding author: Korea Food Research Institute, 46-1 Backhyun-dong, Bundang-gu, Kyunggi-do 463-420, Korea
Tel: 82-342-780-9230
Fax: 82-342-780-9265
E-mail: dykwon@kfri.re.kr

butanoic acid methylester was identified using synthesized (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester from (*S*)-2-methylbutanoic acid.

Results and Discussion

The optical rotations, $[\alpha]_D^{20}$ (in substance), for (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester and (*R*)-2-methylbutanoic acid were 16.8 and 18.4, respectively. There has been no previous report for $[\alpha]_D^{20}$ of (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester, and our data confirms well with the known value for $[\alpha]_D^{20}$ of (*S*)-2-methylbutanoic acid (reported value is 19.0 in substance) (11). Generally, a large-size molecule like methoxyl group (-OCH₃) attached to an asymmetric carbon in an acid methylester has a higher value of $[\alpha]_D^{20}$ than small-size molecules such as the hydroxyl group (-OH). This should account for the higher value of $[\alpha]_D^{20}$ for (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester (18.4) than that of (*S*)-2-methylbutanoic acid (16.8).

Figure 1 shows the GC chromatogram of two enantiomers of (*S*)- and (*R*)-2-methylbutanoic acid methylester. The later peak (designated by S in the chromatogram) was identified as a peak of (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester using synthesized (*S*)-2-methylbutanoic acid (*R*)-methyl ester. Thus the former peak (peak R) which had about 1 min faster retention time was estimated as an (*R*)-2-methylbutanoic acid methylester. In separation of enantiomers between (*S*)- and (*R*)-2-methylbutanoic acid (*R*)-pantolactone derivatives, the (*R*)-enantiomer also appeared earlier than the (*S*)-form (7). At the present time, it is not clear why (*R*)-enantiomer eluted earlier than (*S*)-enantiomer. Optimum separation conditions for two enantiomers of (*S*)- and

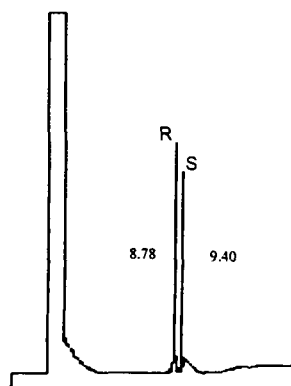


Fig. 1. GC chromatogram of enantiomers of 2-methylbutanoic acid methylester.

R, S designate the (*R*)- and (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester and numbers besides the peaks, 8.78 and 9.40 min, represent the retention time of (*R*)-2- and (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester, respectively.

Table 1. Analytical conditions for separation of (*S*)- and (*R*)-2-methylbutanoic acid methylester using gas chromatography

GC model	Hewlett Packard 5890 Series I
Column	Alltech Chiraldex G-TA Capillary Column : 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.125 film
Detector	FID
Temperature	Injector : 200°C Detector : 220°C
Column temperature	Initial : 40°C for 4 min Rate (I) : 2°C/min Final temp.(I) : 53°C for 0.1 min Rate (II) : 30°C/min Final temp.(II) : 140°C for 4 min
Carrier gas	Helium : 50 ml/min with split
Injection volume	0.4 µl
Chart speed	0.2 cm/min

(*R*)-2-methylbutanoic acid were summarized in Table 1.

Multi-dimensional gas chromatography (MDGC) methods proposed by Mosandle's group (5, 6) for analyzing enantiomers of 2-methylaliphatic acid like 2-methylbutanoic acids have the advantage of a good resolution. However, these methods are complex because they use two identical GC and two or three different columns connected in series. Moreover, the heptakis (2,3,6-tri-*o*-methyl)- β -cyclodextrin column, a major chiral column, is not available commercially and it is not easy to pack. Other method for analyzing (*S*)- and/or (*R*)-2-methylaliphatic acid reported by Barbeni *et al.* (7) was also very complicated because it required the production of 2-methylbutanoic acid lactone derivatives for a good resolution by diastereomeric esterification with (*R*)-pantolactone. However, this indirect method is not applicable to the synthesis of apple flavor such as (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester, because 2-methylbutanoic acid-lactone derivatives are insoluble in organic solvents. Also, it involves time-consuming steps for preparing the derivatives of flavor.

The method developed here is a simpler, more rapid, and direct method compared to other reported methods mentioned above (5-7). Figure 1 shows that the separation resolution between enantiomers of (*S*)- and (*R*)-2-methylbutanoic acid methylester is good (retention time difference, 0.6 min) and correlates with reported data (5, 7) and also has a very good reproducibility (data not shown). The method can be directly applied to analyzing the (*S*)-2-methylbutanoic acid methylester in the production of flavors such as apple and strawberry in the food industry or enantiomeric synthesis of flavors by enzymes (12).

Acknowledgment

This work was done with support in part by a grant from the Agricultural Research Promotion Program under the Ministry of Agriculture and Forestry, Korea

References

1. Maciel, M.I., Hansen, T.J., Aldinger, S.B. and Labows, J. N. Flavor chemistry of cashew apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 34: 923-927 (1986)
2. Mosandl, A., Rettinger, K., Weber, B. and Henn, D. Untersuchungen zur enantiomerenverteilung von 2-methylbuttersäure in fruchten und anderen lebensmitteln mittels multidimensionaler gas chromatographie. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 86: 375-379 (1990)
3. Schwab, W. and Schreier, P. Simultaneous enzyme catalysis extraction: A versatile technique for the study of flavor precursors. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1238-1242 (1988)
4. MacLeod, A.J. and Pieris, N.M. Volatile flavor components of wood apple and a processed product. *J. Agric. Food Chem.* 29: 49-53 (1981)
5. Karl, V., Rettinger, K., Dietrich, H. and Mosandl, A. 2-Akylverzweigte aromastoffe-struktur, Geruchund chirosepezifische analysis. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 88: 147-149 (1992a)
6. Mosandl, A., Fisher, K., Hener, U., Kreis, P., Rettinger, K., Schubert, V. and Schmarr, H.-G. Chirosepezifische analysis of natural flavors and essential oils using multidimensional gas chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 39: 1131-1134 (1991)
7. Barbeni, M., Allegrone, G., Cisero, M. and Guarda, P.A. GC and NMR enantiodiscrimination of 2-methyl substituted aliphatic acids via diastereomeric esterification with (R)-pantolactone. *Flavour Fragrance J.* 7: 163-167 (1992)
8. Wang, D., Kubota, K. and Kobayashi, A. Optical isomers of methyl jasmonate in tea aroma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 508-510 (1996)
9. Cunniff, P. (ed.) *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed. Association of Official Analysis Chemists, Ce 2-66, Arlington, VA, USA (1995)
10. Kwon, D.Y. Synthesis of stereoisomer trifluoroethylmandelates and their stereospecificity for the uses as the substrate of lipase in organic solvent. *J. Kor. Chem. Soc.* 36: 125-130 (1992)
11. *Aldrich Catalog of Handbook of Fine Chemicals*, (Beil 2304) 1997-1998 ed., Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA
12. Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yoon, S.H. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1521-1525 (1996)

(Received November 30, 1998; accepted February 3, 1999)

Lipase Catalyzed Hydrolysis and Esterification of Glycerides in Organic Solvent

Dae Young Kwon*, Hoo-Deok Kim and Suk Hoo Yoon

Food Chemistry and Physics Division, Korea Food Research Institute,
Poondang P.O. Box 2, Songnam, Kyongki 463-050, Korea

Abstract

Using lipases of varying hydrolytic specificities, the enzymatic hydrolysis and/or reverse synthesis (esterification) of tricaprins to dicaprin, monocaprin, and fatty acid and the reaction of *vice versa* in organic solvent were studied. Three lipases were used based on their specificities for both hydrolysis in aqueous system and synthesis in organic solvent: Lipase MY (from *Candida rugosa*), Lipase PS (*Pseudomonas aeruginosa*) and Lipase F-AP15 (*Rhizopus javanicus*). Lipase MY and Lipase PS easily catalyzed the tricaprins/dicaprin hydrolysis and reverse synthesis. But it was preferred synthetic reaction to hydrolysis for Lipase PS. Lipase F-AP15 synthesized tricaprins from dicaprin steadily up to 24 hr, but it catalyzed hydrolysis reaction from tricaprins to dicaprin at a slow rate but it was substantial. Conversion rate from dicaprin to monocaprin is negligible for all lipases after reacting for 2 days. The esterifying patterns of Lipase PS and F-AP15 which represents the same hydrolytic 1,3-positional specificities in aqueous phase were slightly different in organic solvent.

Key Words: hydrolysis, esterification, tricaprins, dicaprin, lipase specificity

Introduction

Enzymatic reaction in organic solvent was advantages in esterifying the water insoluble compounds (1, 2), controlling the water content during the reaction (3), controlling the equilibrium between hydrolysis and its reverse synthesis (4, 5), and synthesizing enantiomerically pure compounds (6, 7).

So far, it was already reported the synthesis of medium chain glycerides from glycerol and capric acid using lipases in organic solvent (4), and also reported that there were two different classes of lipases within 1,3-specific lipases in aqueous phase which have different pattern in esterification of tricaprins in organic solvent for the synthesis of triglyceride (8). Currently, among the published reports on the reaction properties or performances of lipases in organic solvents (1, 2, 7), only a few studied hydrolysis of triglyceride in organic solvent. In addition, the hydrolysis pattern of triglyceride in aqueous or emulsion system (9, 10), two phase system (11) and reversed micelles (12, 13) were investigated as well. However, there is no published paper yet which analyzed the reaction pattern or kinetics in esterification

or hydrolysis pattern of triglyceride in organic solvent by lipases. Therefore, it is necessary to study the enzyme catalyzed hydrolysis of tricaprins with various lipases in organic solvent. Here, dicaprin, the main intermediate of hydrolysis or synthesis in the reaction chain, was used to understand reaction mechanisms and reaction patterns of hydrolysis and/or esterification.

In this study, three lipases were used namely: Lipase MY (obtained from *Candida rugosa*), Lipase PS (*Pseudomonas aeruginosa*) and Lipase F-AP15 (*Rhizopus javanicus*) (4, 8). Lipase MY was known to be the best in Group I (*Candida cylindracea* and *Candida rugosa*). Lipase PS and Lipase F-AP15 were also known as the best lipases among Group II (*Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizomucor miehei* and *Chromobacterium viscosum*) and Group III (*Aspergillus niger*, *Rhizopus javanicus* and *Rhizopus delemar*), respectively (8). Group I lipase (Lipase MY) represents non-specific lipase during triglyceride hydrolysis in aqueous system (9, 14), which produced dicaprin maximally in organic solvent from glycerol and capric acid (4). Group II lipase (Lipase PS) which has 1,3-specificity in the hydrolysis of triglyceride (7) showed good activities for tricaprins production in organic solvent. Group III lipase (Lipase F-AP15), which were also known as 1,3-specific in hydrolysis reaction (9, 14), produced dicaprin maximally in synthetic reaction in organic solvent (4, 8).

In this paper, the enzymatic hydrolysis of tricaprins using three lipases with different specificities in organic solvent was investigated to elucidate hydrolytic patterns of tricaprins and to compare the esterification reaction of dicaprin in terms of lipase specificities.

Materials and Methods

Enzymes and Chemicals

Lipase PS (*Pseudomonas aeruginosa*) and Lipase F-AP 15 (*Rhizopus javanicus*) supplied by Amano Enzyme Co. (Nagoya, Japan), and Lipase MY (*Candida rugosa*) from Meito Sankyo (Osaka, Japan) were used. Lipid standards such as capric acid, monocaprin, dicaprin and tricaprins were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Isooctane (2,2,4-trimethylpentane) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Acetonitrile and isopro-

*Corresponding author

pyl alcohol (2-propanol) were of HPLC grade.

Enzyme Reaction

For the hydrolysis enzyme reaction, 50 mg of dried lipases were added in 5 mL of isooctane containing 500 μ M of tricaprln and/or dicaprln. Water in isooctane, determined by Karl Fisher's method using Dosimat 665 (Metrohm, Zurich, Switzerland), was 0.02% (w/w). After 10 sec sonication, the reactions were performed at 25°C in reciprocal shaking incubator (200 rpm). Enzymatic synthesis of tricaprln from dicaprln was performed at 25°C as previously described (Waters Milford, MA, USA) (Waters, Milford, MA, USA) (4, 8) except that no glycerol and capric acid were added. The water in isooctane was removed by adding molecular sieve (Wako Chemical Co., Osaka, Japan) prior to the use for esterification of dicaprln (2, 6). Aliquots were withdrawn at specific time intervals up to the 48 hr and assayed for capric acid, mono-, di- and tricaprln using HPLC (4, 8). To avoid the water limitation during the hydrolysis reaction of tricaprln, 0.2 μ L of water was added very carefully to the reaction media at a given time with a microsyringe (5, 16, 17). From preliminary works, it was found that addition of water over >0.5 L resulted in the aggregation of the dried enzyme powder, adhesion to the wall of reaction vessel and also a negligible reaction (18).

Assay of lipase activity

Lipase activity profiles were assayed by determining the amount of mono-, di- and tricaprln produced in the reaction using Waters analytical HPLC (Milford, MA, USA). The HPLC column used was a reversed phase Novapak C₁₈ column (8 mm ID \times 10 cm, 4 m), using acetonitrile:2-propanol:acetic acid=15:15:1 (v/v) (19) as the mobile phase at isocratic flow of 0.5 mL/min. The peaks were detected by RI detector (Model 410 Differential Refractometer, Waters, Milford, MA, USA), and the amount of each product synthesized/hydrolyzed were calculated from the previously prepared standard curves (4). Molar percentage of each product was obtained by dividing the molar concentration of tricaprln, dicaprln, monocaprln and capric acid from the total concentration (4) assuming that the total amount of glycerides and fatty acid was 100%.

Results and Discussion

Hydrolysis of tricaprln by three kinds of lipases were performed and the hydrolytic patterns of each product (dicaprln, monocaprln and capric acid) for up to 72 hr were constructed. The hydrolysis profiles for Lipase MY, Lipase PS and Lipase MY, Lipase PS and Lipase F-AP15 are shown in Figures 1, 2 and 3, respectively. Lipase PS and Lipase F-AP15 hydrolyzed tricaprln with the similar reaction patterns, i.e. increasing proportionately for 24 hr and then slowly levelling off as

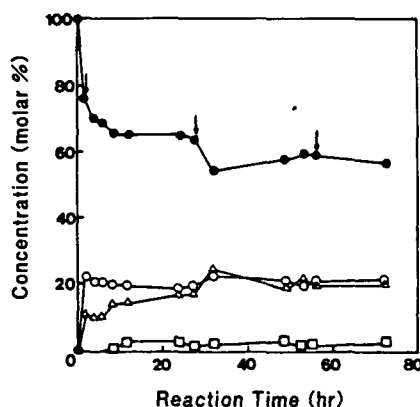


Fig. 1. Hydrolysis of tricaprln by Lipase MY (lipase from *Candida rugosa*) in isooctane. The arrows above tricaprln curve designate the time at which the small amount of water was added for more hydrolysis, ●, tricaprln; ○, dicaprln; □, monocaprln; △, capric acid. All points in the figures represent the mean value of three determinations.

shown in Fig. 2 and 3. In general, reaction rates of first hydrolysis is assumed to be faster, because reaction sites in substrate (ester bond in tricaprln) are two or three for 1,3-specific and nonspecific lipases, respectively, but the remaining reaction sites of next reaction step are only one (1,3-specific) or two (nonspecific) (8). This is one of the reasons why most of hydrolytic reaction of triglycerides took place rapidly within 2 hr. On the other hand, Lipase MY hydrolyzed tricaprln very rapidly up to 2 hr and thereafter tricaprln was not hydrolyzed. Without adding a small amount of water, further hydrolysis rarely took place (Fig. 1) (15, 16).

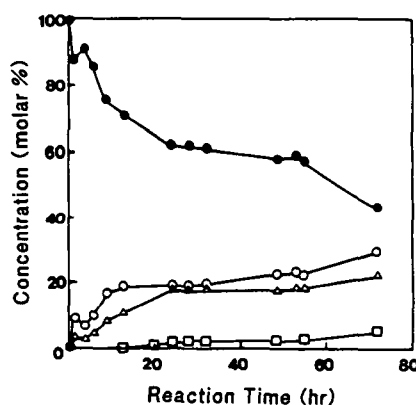


Fig. 2. Hydrolysis of tricaprln by Lipase PS (from *Pseudomonas aeruginosa*) in isooctane. No addition of water to isooctane, ●, tricaprln; ○, dicaprln; □, monocaprln; △, capric acid.

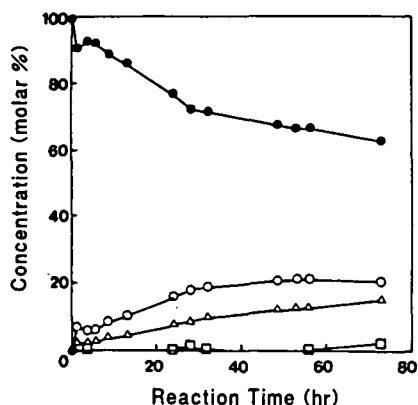


Fig. 3. Hydrolysis of tricaprln by Lipase F-AP15 (from *Rhizopus javanicus*) in isooctane, ●, tricaprln; ○, dicaprln; □, monocaprln; △, capric acid.

Capric acid, the final product, was produced in a relatively small amount (20%). Monocaprln was produced negligibly (less than 5%) throughout the hydrolysis of tricaprln for all lipases (Fig. 1, 2 and 3). These results showed that two lipases which have the same 1,3-hydrolytic specificities in aqueous solvent showed the same pattern of hydrolysis of tricaprln in organic solvent. On the other hand, the lipase which has different hydrolytic specificity in aqueous solvent showed the different hydrolytic specificity in organic solvent.

To obtain more information about the reaction mechanisms of hydrolysis by lipases in organic solvent, dicaprln was used instead of tricaprln as the initial substrate because dicaprln is the first product of the chain of reactions in tricaprln hydrolysis without adding any

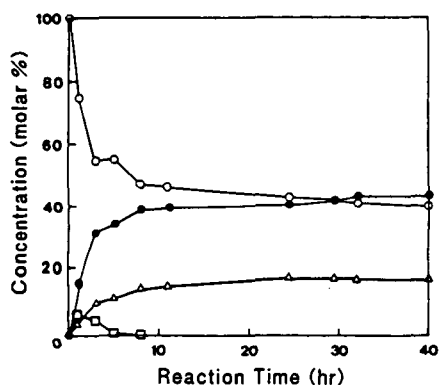


Fig. 4. Esterification and hydrolysis pattern of dicaprln by Lipase MY in microaqueous isooctane. No addition of glycerol and water in the solvent, ○, dicaprln; ●, tricaprln; □, monocaprln; △, capric acid.

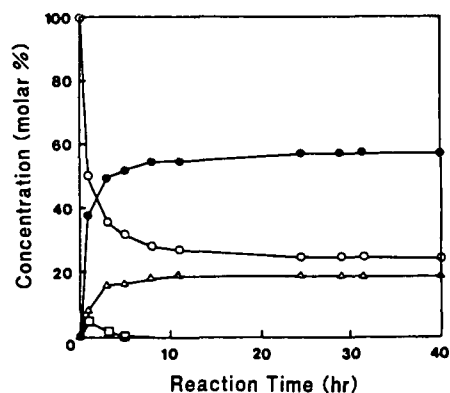


Fig. 5. Esterification and hydrolysis pattern of dicaprln by Lipase PS in microaqueous isooctane, ○, dicaprln; ●, tricaprln; □, monocaprln; △, capric acid.

glycerol and capric acid. In contrast to tricaprln hydrolysis, dicaprln was hydrolyzed to monocaprln only within 8 hr of the reaction. After 8 hr of the reaction, either of them must be easily hydrolyzed to capric acid or synthesized to dicaprln and tricaprln, again.

Lipase MY catalyzed dicaprln hydrolysis to monocaprln, but faster synthetic reaction was taken place (Fig. 4). Lipase PS esterified dicaprln to tricaprln more rapidly than Lipase MY and Lipase F-AP15, attaining steady state in less than 10 hr. (Fig. 5 and 6). Dicaprln was also easily hydrolyzed to the unstable monocaprln which appears only at the first 3 hr of the reaction. Esterification of tricaprln from dicaprln was comparatively not easy in Lipase F-AP15 than that of Lipase PS in organic solvent (Fig. 6), even though both lipases have the same 1,3-positional hydrolytic specificities in aque-

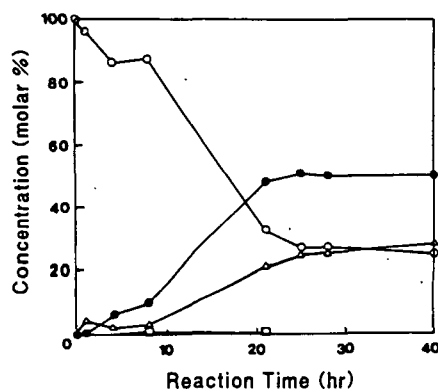


Fig. 6. Esterification and hydrolysis pattern of dicaprln by Lipase F-AP15 in isooctane, ○, dicaprln; ●, tricaprln; □, monocaprln; △, capric acid.

ous system (8, 14). Esterification occurred hardly and dicaprin was slowly hydrolyzed to monocaprin and capric acid at the first 10 hr reaction. Between 10 to 20 hr of the reaction, Lipase F-AP15 catalyzed the reaction of hydrolysis and synthesis easily, and then equilibrated at over 25 hr (Fig. 6).

Although the reaction mechanism of esterification may be different from that of the hydrolysis of triglyceride, the usual patterns of tricaprin hydrolysis by lipases, having the same hydrolytic specificity, are the same and esterification patterns in organic solvent must also be the same. It was already reported that the esterification pattern from capric acid to tricaprin was not the same even for 1,3-specific lipases (14) in the organic solvent (8). The present results also showed that there were two different patterns of esterification of dicaprin to tricaprin, at least, in organic solvent for the lipases having the same 1,3-hydrolytic specificities.

For Lipase MY, the non-specificity in hydrolysis of the tricaprin, caused further hydrolysis of monocaprin to fatty acid instead of the monocaprin accumulation during the tricaprin hydrolysis (Fig. 1). Also, the synthesis of tricaprin from dicaprin was favored (Fig. 4). Although the hydrolysis of dicaprin to monocaprin was not small, monocaprin was not accumulated because the hydrolysis of monocaprin to capric acid was considerably fast. Therefore, the hydrolysis of dicaprin to monocaprin was slower than that of tricaprin and monocaprin. Without adding water, further hydrolysis reaction from tricaprin to dicaprin hardly took place in organic solvent (Fig. 1), because hydrolysis of glyceride in organic solvent is a water requiring reaction. When a small amount of water was added, tricaprin was converted into dicaprin fast (see the arrows in Fig. 1). Fig. 1 and Fig. 4 showed that at limited the concentration of water such as in organic solvent system, esterification took place faster than hydrolysis. However, in aqueous system, hydrolysis reaction overwhelmed the synthetic reaction.

Lipase PS and Lipase F-AP15, both having 1,3-positional hydrolytic specificities in aqueous system, hydrolyzed the tricaprin to dicaprin readily and no monocaprin accumulated (Fig. 2 and 3). For both lipases, the hydrolysis of dicaprin to monocaprin are slower than other hydrolysis reaction such as tricaprin and monocaprin hydrolysis in organic solvent. However, without the addition of glycerol, the two lipases showed different patterns of esterification of dicaprin to tricaprin in isoctane (Fig. 5 and 6), although they have the same hydrolytic specificity in aqueous solvent and even in non-aqueous solvent. Clearly, synthesis of tricaprin is greater than hydrolysis at a limited concentration of water and glycerol for Lipase PS, while Lipase F-AP15 hydrolysis is faster than synthesis in organic solvent system (Fig. 6). This result suggests that the synthetic pathways from dicaprin to tricaprin in organic solvent must be slightly different between the two lipases (Lipase PS

and Lipase F-AP15), although they have the same hydrolytic specificities in aqueous solvent (or organic solvent).

The present results are the second evidence of our previous conclusion (8) that Group II (Lipase PS) and Group III (Lipase F-AP15) showed different pattern in esterification of medium chain glycerides in organic solvent even though these two lipases have the same 1,3-specificities in hydrolyzing the triglyceride in aqueous solvent.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant from 96' High-Technology Development Project Program for Agriculture, Forestry and Fishery under the Ministry of Agriculture and Forestry.

References

1. Klivanov A.M.: Enzyme Work in Organic Solvents. *Chemtech*. 16: 354 (1986)
2. Kwon D.Y.: Synthesis of Stereoisomeric Trifluoroethylmandelates and Their Stereospecificity for the Uses as the Substrate of Lipases in Organic Solvent. *J. Korean Chem. Soc.* 36: 125 (1992)
3. Zaks, A. and Klivanov, A.M., The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *J. Biol. Chem.* 263: 8017 (1988)
4. Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yoon, S.H.: Synthesis of Medium Chain Glyceride by Lipase in Organic Solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1521 (1996)
5. Svensson, I., Wentje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B.: Effect of Water Activity on Reaction Rates and Equilibrium Positions in Enzymatic Esterification. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 549 (1994)
6. Russel, A. and Klivanov, A.M.: Inhibitor-Induced Enzyme Activation in Organic Solvents. *J. Biol. Chem.* 263: 11624 (1988)
7. Orsat, B., Drtina, G.T., Williams, M.G. and Klivanov, A. M.: Effect of Support Materials and Enzyme Pretreatment on Enantioselectivity of Immobilized Subtilisin in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 1265 (1995)
8. Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yoon, S.H.: Esterification Patterns of Lipases for Synthesizing Triacylglycerols in Organic Solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1287 (1997)
9. Macrae, A.R.: Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 291 (1983)
10. Bezonana, G. and Esposito, S.: On the Positional and Chain Specificities of *Candida cylindracea* Lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 231: 15 (1971)
11. Kwon, D.Y., Kim, K.H. and Rhee, J.S.: Characteristics of Lipases in Two Phase System. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15: 43 (1987)
12. Han, D. and Rhee, J.S.: Characteristics of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil in AOT-Isooctane Reversed Micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1250 (1986)
13. Chang, P.S. and Rhee, J.S.: Characteristics of Lipase Catalyzed Glycerolysis of Triglyceride in AOT-Isooctane Reversed Micelles. *Biocatalysis* 3: 343 (1990)
14. Macrae, A.R.: Microbial Lipases as Catalysts for the Interesterification of Oils and Fats, in *Biotechnology for the Oils and Fats Industry* (eds. by C. Ratledge, P. Dawson and J. Rattray), Am. Oil Chemists' Society, pp. 189-198, Champaign, IL, USA (1984)
15. Bezonana, G.: Some Properties of Extracellular Lipase

Lipase Specificity in Organic Solvent

- from *Rhizopus arrhizus*. *Lipids*. 9: 166 (1974)
16. Han, D., Rhee, J.S. and Lee, S.B.: Lipase Reactions in AOT-Isooctane Reversed Micelles: Effect of Water on Equilibria. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 381 (1987)
 17. Dudal, Y., and Lortie, R.: Influence of Water Activity on the Synthesis of Triolein Catalyzed by Immobilized *Mucor miehei* Lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 129 (1995)
 18. Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Guffens, W.M., Cauwenbergh, S.M.-Van and Tobback, P. P.: Lipase-Catalyzed Ester Exchange Reactions in Organic Media with Controlled Humidity. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 258 (1987)
 19. Kim, S.M. and Rhee, J.S.: Production of Medium-Chain Glycerides by Immobilized Lipase in a Solvent Free System. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 68: 499 (1991)

(Received July 11, 1997)

Molecular Cloning of Genes for Lipolytic Enzymes of *Aspergillus nidulans*

Je-Geun Lee, Dae-Ryong Park, Eun-Suk Choi and Woo-Yeon Kim*

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

Abstract

Phagemids containing genes coding for lipolytic enzymes were screened from an *Aspergillus nidulans* cDNA library. The *Aspergillus nidulans* Uni-ZAP cDNA library was converted into a phagemid library using the ExAssist/SOLR system, which allowed efficient excision of the pBluescript phagemid from the Uni-ZAP vector. SOLR cells harboring pBluescript phagemids with *Aspergillus nidulans* cDNA inserts were plated on the media containing tributyrin and olive oil with a fluorescent dye, rhodamine B, respectively. Three different cells with lipolytic enzyme activity were isolated based on the formation of both a clear zone and a fluorescent zone. Sizes of the cDNA inserts in three different pBluescript phagemids were found to be 1.3 kb, 1.1 kb, and 0.6 kb, respectively.

Key words: molecular cloning, *Aspergillus nidulans*, lipolytic enzyme genes

Introduction

Lipase (EC 3.1.1.3) catalyzes the hydrolysis of fats and oils to form free fatty acid, partial glycerides and glycerol, and in the reverse reaction the formation of glycerides from glycerol and free fatty acid under certain conditions (1). The use of organic solvent in lipase reactions has advantages in esterifying the water insoluble compounds (2), controlling the equilibrium between hydrolysis and its reverse synthesis, and synthesizing enantiomerically pure compounds (3). Lipases are commonly found in many species of animals, plants, and microorganisms. In spite of ubiquity of lipases, their specificities are very broad. Kwon *et al.* (4) have tested 21 commercial lipases to study their syntheses of medium-chain glycerides in organic solvents and reported the different reaction properties among lipases from various sources. In their recent studies 2 lipases from *Rizopus javanicus* and *Pseudomonas aeruginosa* showed different patterns in esterification of medium-chain glycerides in organic solvents even though those 2 lipases have the same 1,3-specificities in hydrolyzing triglycerides in aqueous solvents (5). Even within the fungi, lipases have very different specificities depending on the genus and species. It has been reported that regioselectivity of the lipase from *Aspergillus niger*

was enhanced by the partial purification of the enzyme (6).

To synthesize the regiospecific and/or enantiomeric compounds enzymatically, it is necessary to obtain the lipases, which show chemo-, regio-, and stereospecificity in the esterification reaction. It would be better, instead of directly purifying the lipase from the species, to overexpress a fungal recombinant lipase in *E. coli* and purify it to a homogeneity for the characterization of the reaction properties. However, it is relatively difficult to clone the lipase using the current molecular biology technique like polymerase chain reaction (PCR) due to low degrees of similarities between the different lipase groups (7). Phagemids containing lipase genes could be screened from the fungal cDNA library using chromogenic lipid substrates in the agar plate instead of using PCR method (8, 9). In order to clone the lipase from *Aspergillus* species, we have tried to screen genes for lipolytic enzymes from 2 *Aspergillus* cDNA libraries, i.e. the libraries for *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. Here the molecular cloning of three lipase genes from *Aspergillus nidulans* is described.

Materials and Methods

Materials

Aspergillus nidulans Uni-ZAP cDNA library was obtained from the Fungal Genetics Stock Center (Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA). Yeast extract and tryptone were purchased from Difco Laboratory (Detroit, MI, USA). Tris, IPTG (isopropyl thiogalactopyranoside), HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate), ampicillin, olive oil, tributyrin, rhodamine B and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

E. coli strains and plasmids

XL1-Blue MRF' and SOLR strains (Stratagene, La Jolla, CA, USA) were used for *in vivo* excision. *E. coli* strains were grown in a Luria-Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) and in a 2x YT medium (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl).

*Corresponding author

In vivo excision of pBluescript phagemid from *Aspergillus nidulans* Uni-ZAP cDNA library

The ExAssist/SOLR system allowing efficient excision of the pBluescript phagemid from Uni-ZAP cDNA library for *Aspergillus nidulans* was used according to Stratagene's manual for the agar plate assay in screening fungal lipase genes. Both 200 μ L of SOLR cells (A_{600} of 1) and 1 μ L of excised phagemid pBluescript packaged as filamentous phage particles were added to a 1.5 mL microtube. After incubating the tube at 37°C for 15 min, 40 μ L of above mixture was plated on the assay plate described as follows.

Screening of phagemids containing lipolytic enzyme genes from the excised pBluescript library

Both the tributyrin agar plate and the olive oil agar plate containing fluorescent dye, rhodamine B, were prepared to screen the lipase genes with a minor modification (8-11). The tributyrin diffusion agar method was used to find colonies with activities of a carboxylic ester-hydrolyzing enzyme. Tributyrin was added to a final concentration of 2% to 25 mL of LB agar containing gum arabic (0.1%) and ampicillin (150 μ g/mL). After vigorous mixing, the solution was immediately poured into a petri dish. SOLR cells harboring the pBluescript plasmids excised from *Aspergillus nidulans* cDNA library were grown on tributyrin agar plates at 37°C for 48 hr, and colonies forming a clear zone were isolated. The colonies showing clear zones on the tributyrin agar plate were transferred onto the LB agar plate containing olive oil (0.5%), rhodamine B (0.001%), gum arabic (0.1%), and ampicillin (150 μ g/mL). Lipase activity was monitored by irradiating the plates with UV light of 366 nm. After 48 hr of incubation the bacteria showing a fluorescent zone around colonies were selected as lipase producers.

Extraction of lipolytic enzymes produced in *E. coli*

Each cell showing a lipolytic enzyme activity was grown in a 2x YT medium containing 150 μ g/mL of ampicillin until the absorbance at 600 nm reached 0.6, and then IPTG and CaCl₂ were added to a final concentration of 2 mM and 0.2 mM, respectively. The culture was continued for 3 hr further. Cells from the 50 mL culture were harvested and resuspended in 2.5 mL of lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.0, 1% CHAPS, 10 mM CaCl₂). Lysozyme was added to a final concentration of 100 μ g/mL. The cells were incubated for 30 min on ice, frozen at -20°C, and then thawed by immersing the tube in water. The thawed cells were sonicated by ten 20 sec bursts at 240 W with a XL2020 sonicator (Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA), allowing 1 min for cooling between each cycle. The lysate was centrifuged at 12,000 \times g for 15 min at 4°C, and the supernatant and

the pellet were saved for the lipolytic enzyme assay.

Native polyacrylamide gel electrophoresis for lipolytic enzyme activity print

Native polyacrylamide gel electrophoresis was carried out according to the method of Laemmli (12) without SDS and stacking gel. The resolving gel was 7.5% acrylamide. Gels were run at 4°C and overlaid overnight at 37°C on the tributyrin agar plate and the olive oil agar plate with rhodamine B, respectively, for the lipolytic enzyme activity print as described by Hofelmann *et al.* (13).

Results and Discussion

Screening of phagemids containing lipolytic enzyme genes from *Aspergillus nidulans* Uni-ZAP cDNA library

The Uni-ZAP vector has been designed to allow simple *in vivo* excision and recircularization of any cloned insert contained within the lambda vector to form a pBluescript phagemid with the cloned insert. SOLR cells harboring the pBluescript phagemid from the Uni-ZAP cDNA library for *Aspergillus nidulans* were spread on the tributyrin agar plate for screening fungal lipases. Many colonies showing clear zones on the tributyrin agar plate were selected. However, only three colonies named A-22, N-53 and N-30B showed orange fluorescent halos under the 366 nm UV light after 48 hr of incubation on the agar plate containing olive oil and rhodamine B. Fig. 1 shows the clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the 3 cells. As expected, SOLR cell harboring only the pBluescript plasmid (Fig. 1A) did not show any clear zone. A-22 and N-30B cells clearly showed clear zones on the tributyrin agar plate. N-53 cell could also hydrolyze tributyrin, though they showed

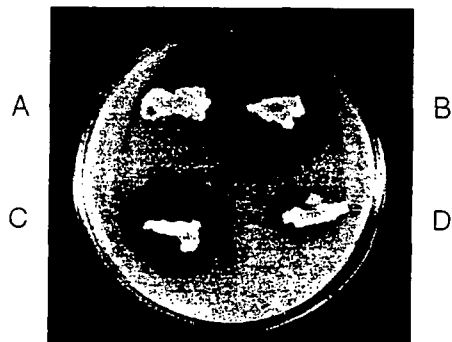


Fig. 1. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes. A. SOLR harboring the pBluescript plasmid; B. SOLR harboring the A-22 plasmid; C. SOLR harboring the N-30B plasmid; D. SOLR harboring the N-53 plasmid

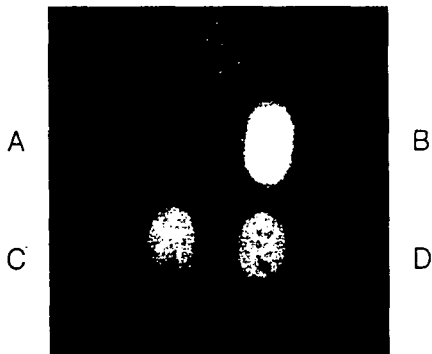


Fig. 2. Fluorescence photograph of SOLR cells harboring the pBluescript plasmid.

A, SOLR harboring the A-22 plasmid; B, SOLR harboring the N-30B plasmid; C, SOLR harboring the N-53 plasmid; D, Cells were grown on the agar plate containing olive oil and rhodamine B.

weaker activity compared to the other 2 cells. Except for the cell harboring the pBluescript plasmid (A) the 3 cells could also hydrolyze olive oil. A-22 and N-30B showed the fluorescent halos on the olive oil agar plate containing rhodamine B as shown in B and C of Fig. 2. The fluorescence of N-53 cell was less intense compared to the other two cells indicating a weaker lipolytic enzyme activity of N-53.

Size determination of the cloned lipase genes in pBluescript plasmids

In order to determine the size of the DNA insert in the rescued pBluescript plasmids, plasmids were prepared from A-22, N-53, and N-30B cells, respectively and digested with *EcoRI* and *XhoI*, which had been used for the construction for Uni-ZAP cDNA library for *Aspergillus nidulans*. In Fig. 3, lanes 2 and 3 indicate the A-22 plasmid digested with *EcoRI* and *XhoI*, respectively. The presence of about 950 bp fragment (lane 2) and about 450 bp (lane 3) indicates that internal *EcoRI* and *XhoI* sites are located in A-22. Double digestion with both restriction enzymes generated three DNA fragments of approximately 650 bp, 300 bp, and 150 bp, respectively (lane 4). Therefore, the size of the lipase gene inserted in the A-22 plasmid was calculated to be about 1.1 kb. In the case of the N-30B plasmid, double digestion with both restriction enzymes generated three DNA fragments of about 850 bp, 300 bp, and 150 bp, respectively (lane 8). The entire size of the insert is presumed to be 1.3 kb. Based on the digestion with *EcoRI* (lane 6) and *XhoI* (lane 7), there is one internal site for *EcoRI* and *XhoI*, respectively, in this plasmid. Digestion of the N-53 plasmid with the single restriction enzyme produces only a linear DNA fragment (see lanes 10 and 11). This indicates that there is no

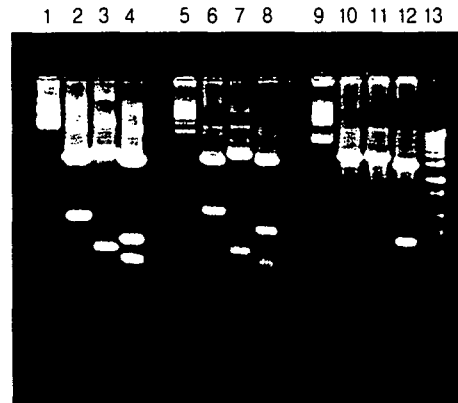


Fig. 3. Digestion of the three pBluescript plasmids containing a lipolytic enzyme gene with *EcoRI* and *XhoI*.

Lane 1, uncut A-22 plasmid; lane 2, A-22 digested with *EcoRI*; lane 3, A-22 digested with *XhoI*; lane 4, A-22 digested with *EcoRI* and *XhoI*; lane 5, uncut N-30B plasmid; lane 6, N-30B digested with *EcoRI*; lane 7, N-30B digested with *XhoI*; lane 8, N-30B digested with *EcoRI* and *XhoI*; lane 9, uncut N-53 plasmid; lane 10, N-53 digested with *EcoRI*; lane 11, N-53 digested with *XhoI*; lane 12, N-53 digested with *EcoRI* and *XhoI*; lane 13, Stratagene's 1 kb DNA ladder

internal *EcoRI* and *XhoI* site in the N-53 plasmid. The size of the gene inserted in the N-53 plasmid was found to be about 600 bp according to the double digestion result shown in lane 12.

Expression of each *Aspergillus nidulans* lipase gene in *E. coli*

Cell extracts and pellets of N-53, N-30B, A-22 cells were prepared as described in "Materials and Methods". Same amounts of the cell extracts and the cell pellets were loaded on the holes of the agar plate for lipolytic enzyme assay. Both the extracts and pellets of the 3 cells could hydrolyze tributyrin in the agar plate (Fig. 4). This implies that the fungal lipolytic enzyme genes were expressed in *E. coli* both as soluble and insoluble forms. In the case of the olive oil agar plate, the cell extracts showed more intense fluorescent halos than the cell pellets. A-22 and N-30B cell extracts showed stronger lipolytic enzyme activities than N-53 extract (Fig. 5).

Extracts from N-53, N-30B, and A-22 cells were electrophoresed in 7.5% native polyacrylamide gel. Gels were run at 4°C and overlaid overnight at 37°C on the tributyrin agar plate (Fig. 6) and the agar plate containing olive oil and rhodamine B (Fig. 7) for the lipolytic enzyme activity print. Bands showing clear zones and fluorescent zones were observed in the gels of Fig. 6 and 7, respectively. These results clearly indicate that the fluorescence in the agar plate was caused by the enzymes separated in the polyacrylamide

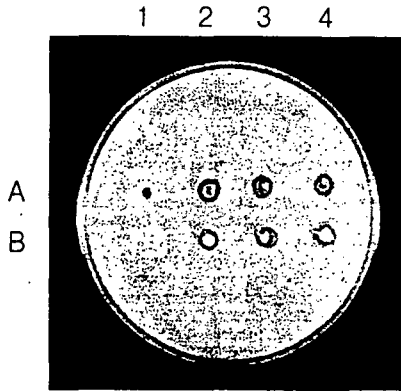


Fig. 4. Clear zone formation on the agar plate containing tributyrin by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes. A, cell extracts; B, cell pellets; lane 1, SOLR harboring the pBluescript plasmid; lane 2, SOLR harboring the N-53 plasmid; lane 3, SOLR harboring the N-30B plasmid; lane 4, SOLR harboring the A-22 plasmid

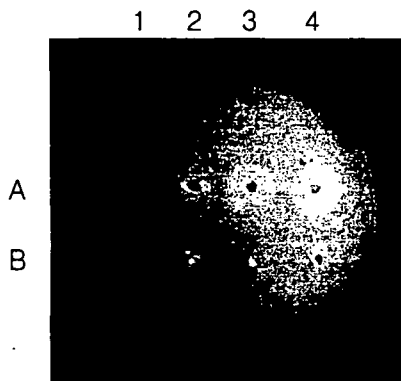


Fig. 5. Fluorescent zone formation under UV light on the agar plate containing olive oil and rhodamine B by the extracts and the pellets of the SOLR cells harboring lipolytic enzyme genes. A, cell extracts; B, cell pellets; lane 1, SOLR harboring the pBluescript plasmid; lane 2, SOLR harboring the N-53 plasmid; lane 3, SOLR harboring the N-30B plasmid; lane 4, SOLR harboring the A-22 plasmid

gel. The lipolytic activity of N-53 was again the lowest among the 3 cells.

There are few reports about purified lipase proteins and genes from *Aspergillus* species. An acid-resistant lipase from *Aspergillus niger* has been purified from a crude commercial preparation with several purification steps (14). The N-terminal sequence of the electroeluted protein was found to be XVSTSTLDELQFALQ. A mono- and diacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae* has been purified, and the molecular weight

was estimated to be 41,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15). The determined N-terminal sequence of this enzyme is XIPTTQLXXFKFWVQYAAA, which is highly homologous with that of the mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* U-150. It has been reported that *Aspergillus nidulans* also produces an extracellular lipase when grown in solid or liquid cultures con-

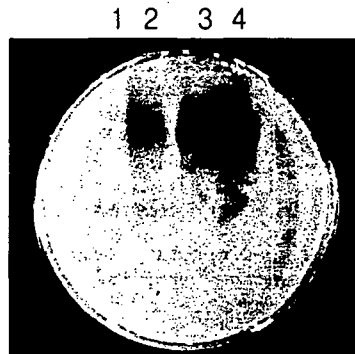


Fig. 6. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing tributyrin. Cell extracts were electrophoresed in 7.5% native polyacrylamide gel, which was put later on the agar plate containing tributyrin. Lane 1, extract of the SOLR cell harboring the pBluescript plasmid; lane 2, extract of the SOLR cell harboring the N-53 plasmid; lane 3, extract of the SOLR cell harboring the N-30B plasmid; lane 4, extract of the SOLR cell harboring the A-22 plasmid.

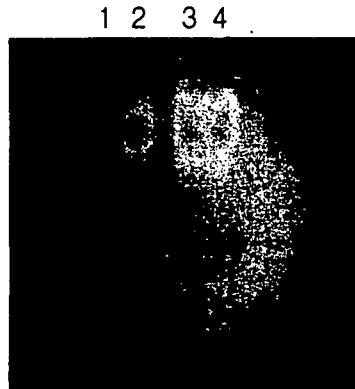


Fig. 7. Lipolytic enzyme activity print on the agar plate containing olive oil and rhodamine B. Cell extracts were electrophoresed in native polyacrylamide gel, which was put later on the agar plate containing olive oil and rhodamine B. Lane 1, extract of the SOLR cell harboring the pBluescript plasmid; lane 2, extract of the SOLR cell harboring the N-53 plasmid; lane 3, extract of the SOLR cell harboring the N-30B plasmid; lane 4, extract of the SOLR cell harboring the A-22 plasmid

taining lipids as carbon source (16, 17). However, no studies have been done on the amino acid sequence of the lipase from *Aspergillus nidulans*, which was used for cloning lipase genes in this research.

We are currently trying to overexpress the *Aspergillus nidulans* lipases in *E. coli*. Even though each lipase gene in pBluescript plasmid was expressed showing lipolytic enzyme activity, bands for those proteins were not clearly observed in SDS-polyacrylamide gels due to the low expression of the lipase genes in this system (data not shown). DNA sequencing for the three genes is being carried out to subclone each lipase gene into a pET vector to overexpress them in *E. coli*. The overexpression of the lipolytic enzymes may provide a means to characterization of the substrate stereospecificity of these three enzymes in the future.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the '96 High-Technology Development Project Program for Agriculture and Forestry under the Ministry of Agriculture and Forestry.

References

1. Tsujisaka, Y., Okumura, S. and Iwai, M.: Glyceride synthesis by 4 kinds of microbial lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 489: 415 (1977)
2. Klivanov, A.M.: Enzyme work in organic solvents. *Chemtech.* 16: 354 (1986)
3. Orsat, B., Drtina, G.T., Williams, M.G. and Klivanov, A. M.: Effect of support materials and enzyme pretreatment on enantioselectivity of immobilized subtilisin in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 1265 (1995)
4. Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yoon, S.H.: Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1521 (1996)
5. Kwon, D.Y., Kim, H.-D. and Yoon, S.H.: Lipase catalyzed hydrolysis and esterification of glycerides in organic solvent. *Food Sci. Biotechnol.* 7: 1 (1998)
6. Chen, H.-P., Hsiao, K.-W., Wu, S.-H. and Wang, K.-T.: Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 17: 305 (1995)
7. Svendsen, A.: Sequence comparisons within the lipase family. P. 1. In: *Lipases: Their structure, biochemistry and application.* Woolley, P. and Petersen, S.B. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK (1994)
8. Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. and Takagi, Y.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141: 185 (1986)
9. Chung, G.H., Lee, Y.P., Jeohn, G.H., Yoo, O.J. and Rhee, J.S.: Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2359 (1991)
10. Kouker, G. and Jaeger, K.-E.: Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 211 (1987)
11. Lawrence, R.C., Fryer, T.F. and Reiter, B.: Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 213: 1264 (1967)
12. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680 (1970)
13. Hofelmann, M., Kittsteiner-Eberle, R. and Schreier, P.: Ultrathin-layer agar gels: A novel print technique for ultrathin-layer isoelectric focusing of enzymes. *Anal. Biochem.* 128: 217 (1983)
14. Torossian, K. and Bell, A.W.: Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13: 205 (1991)
15. Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi K. and Sekiguchi, J.: Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1199 (1995)
16. Kawasaki, L., Farres, A. and Aguirre, J.: *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp. Mycol.* 19: 81 (1995)
17. Ogundero, V.W.: Hydrolysis of vegetable oils and triacylglycerides by the thermotolerant and zoopathogenic species of *Aspergillus* from Nigerian palm produce. *Mycopathologia* 77: 43 (1982)

(Received September 25, 1998; accepted October 20, 1998)



Journal of Agricultural and Food Chemistry

PUBLISHED BY
THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Western Regional Research Center, ARS-USDA
800 Buchanan Street
Albany, CA 94710
Phone: (510) 559-6043 / (510) 559-6039
Fax: (510) 559-6129
E-mail: jafc@pw.usda.gov

Russell J. Molyneux, Ph.D., *Associate Editor*

November 26, 1999

Dr. Dae Young Kwon
Food Science and Biotechnology Division
Korea Food Research Institute
San 46-1, Packhyondong Poondang, Songnam
Kyongki-do, 463-420
Republic of Korea
KOREA
FAX +82-342-709-9876

Dear Dr. Kwon:

We are pleased to inform you that your manuscript entitled "Enantiomeric Synthesis of (s)-2-Methylbutanoic Acid Methylene Ester, Apple flavor, Using Lipases in Organic Solvent" (our number JF990871W) has been accepted for publication in the JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY.

Your galley proof will be prepared by our staff in Columbus, Ohio, and, unless otherwise directed, will be sent to you at the address listed above. Since your paper is not yet scheduled for an issue, we cannot tell you the exact time you will receive the proof. As a general rule, galleys are mailed to authors at least five weeks prior to publication of the issue in which the paper is scheduled to appear. Prompt return of your proof will be greatly appreciated.

If in the future you have questions about your paper, please contact the Columbus staff directly. The number is (614) 447-3665. We have enjoyed working with you on this paper and look forward to receiving other contributions from you in the future.

Sincerely yours,

Fe Molyneux
Editorial Assistant

Running title: Enzymatic Production of Methylbutanoic Acid Methylene Ester

**Enantiomeric Synthesis of (S)-2-Methylbutanoic Acid Methylene Ester, Apple Flavor
Using Lipases in Organic Solvent**

Dae Young Kwon*, Yoon-Jeong Hong and Suk Hoo Yoon

Food Science and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, San 46-1,
Paekhyondong, Poondang, Songnam, Kyongki-do, 463-420, Republic of Korea

Author to whom correspondence should be addressed:

Tel : +82-342-780-9230; Fax :+82-342-709-9876

E-mail : dykwon@kfri.re.kr

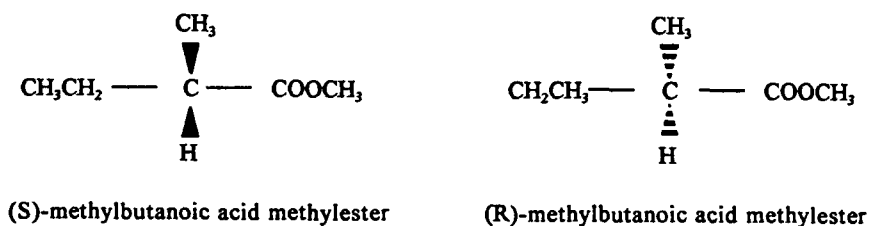
ABSTRACT

Enantiomeric selective synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methylester, which is known as major apple and strawberry flavor, was performed from the (S)-2-methylbutanoic acid using lipases in organic solvent. Among twenty lipases, Lipase IM 20 (immobilized lipase of *Rhizomucor miehei*), Lipase AP (*Aspergillus niger*) and Lipase FAP-15 (*Aspergillus javanicus*) which exhibited high enzymatic activities and enantioselectivities were selected for the synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methylester. Using these enzymes, the reaction conditions such as temperature, lyophilizing pH were optimized and kinetic parameters were determined. All these reactions were performed in isooctane, which was screened as the best reaction media for non-aqueous system. At low temperature, enantiomeric excess for (S)-2-methylbutanoic acid methylester was rather high, while low synthetic activity was observed. Enantioselectivities were not influenced by the lyophilizing pH of lipases. The $K_{M,S}$ and $K_{M,R}$ values for ester synthetic activity of lipase were 1120 mM and 1240 mM, respectively. Enzyme activity was inhibited by (S)-2-methylbutanoic amide and its K_i was calculated as 84 mM. (S)-2-Methylbutanoic amide acted as a competitive inhibitor.

Keywords: *apple flavor; (S)-2-methylbutanoic acid methylester; enantiomeric synthesis; lipase.*

INTRODUCTION

The 2-methylbutanoic acid methylester (MBE), which is known as the main flavor component of apple or strawberry, is an enantiomer (Maciel et al., 1986) as follows;



Among these enantiomers, only (S)-form has a flavor characteristic (Maciel et al., 1986; Macleod and Pieris, 1981). Generally, the natural flavors such as MBE are produced limitedly because of high cost for production as well as the difficulty in separating the active form from the enantiomeric mixture. Therefore, most of commercialized flavors are artificial products. Thus, the development of these high value-added flavors with highly enantiomeric purity has been spotlighted as a new research field in food technology.

An enzymatic method to produce the (S)-MBE from chief racemic 2-methylbutanoic acid (rac-MBA) using the enantioselectivity of enzyme can be suggested as a solution to cope with above problems (Fitzpatrick and Klivanov, 1991; Klivanov, 1995; Kwon, 1992; Russel and Klivanov, 1988).

Among the esterifying enzymes such as esterases and lipases, lipase was found to be the good enzyme to synthesize the esters from fatty acids and other acids (Klibanov, 1986; Kwon, 1992; Kwon et al., 1996).

The enzymatic synthetic reaction from the acid to ester must be quite different from the hydrolysis reaction, because it is essential to remove the water in the reaction system (Kwon et al., 1996). Non-aqueous organic solvent system is advantageous for the synthetic reaction of the water insoluble acids such as MBA, aliphatic fatty acid and other aromatic acid to their ester (Klibanov, 1986; Zaks and Klibanov, 1984). In addition to these advantages, the structure of enzyme in organic solvent is so rigid that the conformation induced before lyophilization can not be easily changed (Kamiya and Goto, 1998; Klibanov, 1995; Kwon et al., 1996; Vulfson et al., 1997; Zaks and Klibanov, 1988). Thus, the enantioselectivity of enzyme is also maintained during the reaction (Russel and Klibanov, 1988). Usually the conformation of enzyme in aqueous phase is easily induced by substrate to fit its substrate structure (induced fit: Koshland and Neet, 1968). Therefore, organic solvent system is recommended as the best reaction system (Dabulis and Klibanov, 1993; Russel and Klibanov, 1988).

Many lipases showed their enantioselectivity for the hydrolysis of esters or synthesis of esters from acids and alcohols (Allenmark and Ohlsson, 1992; Russel and Klibanov, 1988; Weissfloch and

Kazlauskas, 1995; Wen et al., 1996). Our previous paper (Kwon, 1992) showed some lipases had a high enantioselectivity for synthesis of esters. Klivanov group reported enzyme specificity was influenced by solvents (Fitzpatrick and Klivanov, 1991; Wescott and Klivanov, 1994) and also temperature affected the enantiomeric selectivity of lipase in organic solvent (Holmberg and Hult, 1991; Pillips, 1992). In dioxane, nitromethane and acetonitrile, *Rhizomucor miehei* lipase had higher enantioselectivity at low temperature than high temperature (Noritomi et al., 1996). Engel (1992) reported that *Candida cylindracea* (CCL) lipase hydrolyzed the (S)-2-methyl-alkanoic alkylester in heptane enantioselectively. Water content also affected the enantioselectivity in organic solvent system (Bovara et al., 1993; Dudal and Lortie, 1995). Holmberg et al. (1991) showed enantiomeric resolution depended on the structure of alcohol in the esterification of 2-methylalkanoic acid by CCL lipase in aqueous phase.

The objective of this paper is enantiomeric selective synthesis of (S)-2-methylbutanoic methylester, major apple flavor component, from racemic mixture 2-methylbutanoic acid by lipase in organic solvent and their synthetic characteristics are reported.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Enzymes. Lipases used in this experiment were the same lipases as in previous paper (Kwon et al., 1996). Namely, Lipase CES, Lipase AY, Lipase AP-10, Lipase GT-20, Lipase GC, Lipase AP, Lipase PS, Lipase L, Lipase FAP-15, Lipase R, Lipase D, Lipase CE, and Lipase G were supplied from Amano Pharmaceutical Co. (Nagoya, Japan). Two lipases from *Candida cylindracea* and *Pancreatic lipase* were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Lipase from *Rhizomucor miehei* and Lipozyme IM-20 (immobilized lipase of *R. miehei*) were obtained from Novo Enzyme Co. (Bagsvaerd, Denmark). The last two lipases, Lipase MY and Lipase OF-360 were from Meito Sankyo (Osaka, Japan) and Lipase CV was from Toyo Jozo (Shizuoka, Japan).

Chemicals. Racemic-2-methylbutanoic acid (rac-MBA) and (S)-2-methylbutanoic acid ((S)-MBA) were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). (S)-2-Methylbutanoic acid methylester (MBE) as a standard was synthesized from (S)-MBA by AOAC method (1995) (Kwon et al., 1999). The chiral column, Chiraldex GTA capillary column for GC, was supplied from Alltech Inc. (Deerfield, IL) (Kwon et al., 1999). Isooctane (2,2,4-trimethylpentane), octane, cyclohexane and heptane were purchased from Aldrich Chemical Co., and acetonitrile and isopropanol (2-propanol) were of HPLC pure grade purchased from Burdick & Jackson Co. (Muskegon, MI). All other chemicals were of analytical grade. Water in solvents was previously removed by 3 Å molecular sieve (1/16") (Wako Chemical Co., Osaka, Japan) just before the reaction (Kwon et al., 1996). Silica Gel-60 (particle size 0.063 - 0.2 mm) (Merck, Darmstadt, Germany) was used to remove water produced during the reaction (Kwon et al., 1996).

Enzyme Reactions for MBE Synthesis. Typical enzymatic synthesis of MBE was performed according to the method of synthesis of medium chain glycerides (Kwon et al., 1996): Fifty milligrams of

each lyophilized lipase was added to 1 mL of solvent in the presence of 700 mM of rac-MBA and 700 mM of methanol. About 50 mg of silica gel was added to the mixture (1 mL of solvent) to remove the water. After 10 s sonication, the reaction vials were placed in a rotary shaker at 200 rpm at 30°C. Periodically, aliquots were withdrawn and the amounts of (S)- and (R)-2-methylbutanoic acid methylester were assayed by GC with the same conditions in previous paper (Kwon et al., 1999).

Assay of Enantioselectivity. Enantiomeric excess (ee_e) for (S)-MBE was used as an enantioselectivity of lipase, which was calculated by following equation (Chen et al., 1982) :

$$ee_e (\%) = \frac{|[(S)\text{-MBE}(\%)] - [(R)\text{-MBE}(\%)]|}{[(S)\text{-MBE}(\%)] + [(R)\text{-MBE}(\%)]} \times 100$$

For determining the enantiomeric excess, electron density of integrator (integral area) instead of molar concentration of each enantiomer was used because authentic standard of each enantiomer was not available. Fortunately, the ratio of integral area between (S)- and (R)-MBE was exactly 1 : 1 for chemical synthesized racemic MBE from racemic MBA (1 : 1).

Enzyme Screening and Solvent Screening. For screening the lipases, the ee_e and integral area of each enantiomer for synthesized MBE with 20 lipases in organic solvent were determined at 30°C for 4 h. With the same methods the best solvent was screened from heptane, octane, cyclohexane, hexane and isooctane (Kwon et al., 1996).

Effects of pH and Temperature on Synthetic Activities. Screened lipases were lyophilized at different pHs. Buffers used in lyophilization of lipases were citrate buffer for pH 3, 4, and 5; succinate buffer for pH 4, 5, and 5.5; phosphate buffer for pH 6, 6.5, 7 and 8; and Tris-HCl buffer for pH 9. After lyophilization, enzymes were washed with acetonitrile to remove the salt on the glass filter (Kwon, 1992). The amount of enzyme loaded was adjusted to 30mg of protein concentration determined by

Lowry method (Lowry et al., 1951). Temperature effect on enantioselectivity of lipase was investigated by determining the enantiomeric excess (%) of MBE in various temperatures (15, 20, 25, 30, 40, 50 and 60 °C).

(S)-2-Methylbutanoic Amide Synthesis and Identification. The stereoisomer of each methylbutanoic amide that acts as an inhibitor on lipase was synthesized as follows (Audrieth and Kleinberg, 1938): one hundred milligrams of (S)-2-methylbutanoic acid was sampled into the round-bottom flask and 1 drop of dimethylformamide was added. The flask was attached to a reflux condenser and 3 to 4 mL of thionylchloride (SOCl₂) was added through the condenser. Reactant was refluxed for about 20 min on a steam bath carefully and 10 mL ice-cold concentrated ammonium hydroxide (NH₄OH) was added. The precipitated amide was collected by vacuum filtration and recrystallized from water and aqueous alcohol. The synthesized amide was identified by HPLC (Jasco, Tokyo, Japan) and mass spectrometer (Platform II Mass Spectrometry; Micromass, Manchester, U.K.).

Kinetic Studies. Reaction kinetic study was performed for lipase FAP-15 which was good in enantioselectivity, with various concentrations rac-MBA (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 and 750 mM) and various reaction times (4, 6, 16 and 24 h). Synthetic reaction was performed in the same way as described above. Michaelis constant ($_{app}K_M$) value and $_{app}V_{max}$ value for each enantiomeric product were calculated from Lineweaver-Burk double reciprocal plots obtained by plotting $1/v$ versus $1/[S]$ (Lineweaver and Burk, 1934). For the inhibition studies, K_i measurement was carried out without and with 20 mM of (S)-2-methylbutanoic amide. All kinetic parameters were the means of at least two determinations and were reproducible.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of Lipase and Solvent for Enantioselectivity. Table 1 shows the results of screening of lipases for (S)-2-methylbutanoic acid methylester ((S)-MBE) synthesis using 20 lipases in isooctane. The enzymes good for enantioselective (S)-MBE synthesis were Lipase IM 20 (immobilized lipase of *Rhizomucor miehei*), Lipase AP (*Aspergillus niger*) and Lipase FAP-15 (*Aspergillus javanicus*). The ee, values of the latter two enzymes were about 50%, which means production ratio of (S)-MBE to (R)-MBE is about 3 : 1. This ee, was not so high compared to hydrolysis reaction (Engel, 1992). In hydrolysis reaction, (S)-aliphatic acid was produced from rac-aliphatic ester by CCL lipase (*Candida cylindracea*) in solvent with 70 % enantioselectivity (Engel, 1992). However, Lipase OF-360, GC, M-AP10, GT-20, PS and G showed low enantioselectivity (ee), although they had high synthetic activity of rac-MBE in isooctane (Table 1). Remaining lipases had poor activities for both synthesis and enantioselectivity. The lipases which were selected as good for enantioselectivity of (S)-MBE or total MBE synthesis were different from the lipases which were good for synthesis of medium chain glycerides (Kwon et al., 1996) and methylesterification of trifluoromandelic acid (Kwon, 1992). These results mean that selecting the best lipase for hydrolysis, synthesis or interesterification depends on the nature of substrate compounds (alcohols as acyl acceptors and acids as acyl donors) and their reaction mechanisms (Holmberg et al., 1991; Kwon et al., 1996). Table 1 also shows that enantioselectivity of lipases was not

affected by the lipase specificity (Kwon et al., 1997; Macrae, 1984).

Synthetic activities and enantiomeric selectivities of (S)-MBE were determined for various solvents to select the solvent which was good for our reaction using screened three lipases; Lipase IM 20, Lipase AP and Lipase FAP-15. In a non-aqueous organic solvent system for synthesizing MBE, hexane and isooctane were the best solvent. This result is consistent with our previous data (Kim et al., 1984; Kwon et al, 1996). The total synthetic activity was the highest in hexane, but the solvent was very volatile. On the contrary, the isooctane showed a little lower activity than hexane but it was not evaporated during the reaction. Therefore, isooctane was selected as the optimum solvent in this research to avoid concentration of products during the reaction. The enantioselectivity for (S)-MBE was not affected by the kinds of solvents (data not shown), while Klivanov group reported enzyme specificity was affected by the solvents (Fitzpatrick and Klivanov, 1991; Wescott and Klivanov, 1994).

Time Course of Lipase Synthetic Reaction. To check how long the reaction rate maintained linearity as the increase of the reaction time and substrate concentration, time course of the synthesis of (S)-MBE in isooctane using Lipase FAP-15 was investigated for the various reaction times (4, 6, 16, 24 and 30 h) with different substrate concentration (Figure 1). The initial velocity (v_0) for each substrate concentration maintained their linearity over 24 h even at low concentration of substrate. Here initial velocity was obtained by determining the production amount of (S)-MBE up to 12 h for each lipase. Enantioselectivity (ee_s) of Lipase FAP-15 by reaction time was not changed (data not shown), while

total synthetic amount of (S)-MBE was increased gradually. This was the same for Lipase AP and Lipase IM 20.

Effects of pH and Temperature on Synthetic Activity and Enantiomeric Selectivity. By checking the linearity of the reaction, synthetic reaction conditions were optimized in terms of lyophilization pH and reaction temperature. The overall synthetic rate of product was increased in proportion to reaction temperature as expected (Kwon et al., 1996). As increase of temperature up to 60 °C, synthetic activity was increased, which means lipase was stable over 60 °C due to the rigidity of enzyme structure in organic solvent (Klibanov, 1986; Kwon et al., 1996; Ottolina et al., 1992) (Figure 2). The ee, was increased firstly up to 15-20 °C, however, it was decreased with the increase of temperature over 20 °C (Figure 2). Thus, the ee, was the highest around 20 °C as 60 %. This was the same as in both Lipase AP and Lipase IM 20 (Figure 3), which were also highly active and stable over 60 °C.

Enzymatic enantioselectivity usually decreases with temperature (Holmberg and Hult, 1991; Noritomi, 1996; Phillips, 1992). Some enzymes became more enantioselective at high temperature in both organic media and aqueous media (Noritomi et al., 1996). Generally, enantiomeric- or stereo-specificity of enzyme was dependent on the structure or conformation of active site of enzyme. Thus, if the conformation of enzyme is easily induced by substrate or changed by circumstance, enzyme easily lost its specificity. In organic media, the conformation of enzyme is so rigid that the enzyme retains its stereo- or enantiomeric specificity (Kwon et al., 1996; Russel and Klibanov, 1988). However, at high

temperature this rigid structure of enzyme will be a little bit more flexible compared to low temperature. Therefore, lipase probably loose the enantiomeric specificity at high temperature due to the increased flexibility. Our data were consistent with the data of Noritomi et al. (1996) who reported that *Rhizomucor miehei* lipase showed higher enantioselectivity at lower temperature rather than higher temperature (45°C) in dioxane, nitromethane and acetonitrile. However, subtilisin Carlsberg did not show enantioselectivity difference between low and high temperature. Further study is necessary to confirm the conformational change of enzymes in organic solvent by temperature increase.

The lipases lyophilized at pH 3, 4, 5, 8, 9, and 10 showed very poor (S)-MBE synthetic activity in organic solvent. Only lipases prepared with pH 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0 showed the synthetic activity (data not shown). The optimum pH (pH 6.5) in synthesis in organic media also corresponds the optimum pH of hydrolytic reaction of lipases in aqueous phase (Kwon et al., 1987) and medium chain triglyceride synthesis in organic solvent (Kwon et al., 1996). Also they did not show any different enantioselectivity between pHs. This datum also supports the pH memory theory suggested by Klibanov group (Klibanov, 1995; Kwon et al., 1996; Zaks and Klibanov, 1988). This result supports that imprinting of enzyme by ligand is still the best way to improve the enantiomeric selectivity (Kamiya and Goto, 1998; Kwon 1992; Vulfson et al., 1997).

Reaction Kinetics of Lipase in Organic Solvent System. In organic solvent system, enzyme reaction kinetics for enantiomeric synthesis of (S)-MBE were investigated by determining the synthetic

activity and enantioselectivity of lipases with the various concentrations of substrate (rac-MBA). Firstly, Michaelis-Menten curves of the lipase reaction in organic solvent with the different substrate concentration was constructed (Figure 4), which did not show typical saturation curve (Figure 4). Below 80 mM of rac-MBA, lipase did not show any catalytic activity in organic solvent, which means minimum substrate concentration is required for the activation of lipase at the interface. At high concentration of substrate (over 700mM), synthetic reactivity was decreased with increase of substrate concentration.

Lipase is well known for its interfacial activation because all the lipase catalyzed reactions can take place at the interface between enzyme and substrate in the heterocatalytic reaction system (Brockerhoff, 1973; Derewenda et al., 1993): 1) water soluble enzyme with water insoluble substrate in aqueous or emulsion system (Benzonana and Desnuelle, 1965); 2) solvent soluble substrate with solvent insoluble enzyme in organic solvent system (Klibanov, 1986; Kwon et al., 1996). For this reason, usually interfacial activation takes place to activate the lipase structure for the reaction (Sarda and Desnuelle, 1958). Here minimum substrate concentration for interfacial activation called as interfacial activation concentration (S_{im}) is required. So in our reaction, 80 mM of substrate (racemic form) should be the apparent interfacial concentration for synthesis of (S)-MBE in organic solvent. This value is higher than those reported in aqueous or emulsion phase (Kwon and Rhee, 1983). Usually in organic solvent system, interfacial activation concentration of lipases was bigger than in aqueous or

emulsion system and also hydrophobic substrate had higher values (Martinelle and Hult, 1994). In heterocatalytic reaction like lipases especially in organic solvent system, diffusion limitation of substrate to the interface in addition to the active site is a main obstacle of reaction, because every heterocatalytic reaction including organic solvent system has the diffusion barrier in transporting the substrate to interface in low concentration (S_{diff}). Thus lipase reaction in organic solvent system may have higher interfacial activation concentration ($S_{int} + S_{diff}$) apparently than those of aqueous or emulsion solvent system (S_{int}). However, detailed study to discriminate S_{int} from S_{diff} is necessary. Benzonana and Desnuelle (1965) also could not discriminate S_{int} from S_{diff} in emulsion system. Moreover, interfacial activation in organic solvent is more obscure than in aqueous phase and emulsion system, since the S_{int} and S_{diff} should depend on the reaction system. For this interfacial activation and diffusion limitation, synthetic reaction of lipase in organic solvent might require more than 80 mM concentration of rac-MBA (Kwon and Rhee, 1983). While synthetic activity of lipase was increased with the increase of substrate in organic solvent up to 700 mM, enantioselectivity was not changed with increase of substrate concentration (Figure 4). The enantiomeric excess (ee) for (S)-enantiomers were about 50-60 for the substrate concentration ranged from 100 mM to 600 mM. And above 700 mM (racemic form), synthetic activity of lipase in organic solvent was decreased. The same phenomenon was observed in lipase reaction in emulsion system (Kwon and Rhee, 1983). It might be due to physical barrier for the substrate transportation into the interfacial area in case of excess of substrate or

substrate inhibition. However, it is still unclear the reason why the enzyme activity is decreased at high substrate concentration.

From these heterocatalytic reactions, reaction kinetic parameters such as K_M , and V_{max} were obtained by drawing a double reciprocal plot (Lineweaver-Burk plot) from Michaelis-Menten curve as an apparent value (Figure 5). The apparent Michaelis-Menten constants for (S)-MBE production such as ${}_{app}K_{M,S}$ and ${}_{app}V_{max,S}$ were evaluated to be 1,120 mM and 2.24×10^7 area/h from the intersection points. For the (R)-enantiomers, ${}_{app}K_{M,R}$ and ${}_{app}V_{max,R}$ were 1,240 mM and 7.09×10^6 area/h, respectively. The K_M values in organic solvent system were higher than in aqueous and emulsion system probably due to the rigidity of enzyme in organic solvent. In fact, in aqueous and micelle system, K_M values of lipases for the hydrolysis of esters were about 10-50 mM, and in organic solvent system K_M values were around 500 mM (Kikkawa et al., 1989; Martinelle and Hult, 1994).

The data that there is a little difference in ${}_{app}K_M$ but substantial difference in ${}_{app}V_{max}$ between (R)- and (S)-MBA show that enzyme could not discriminate (S)- from (R)-MBA, which can bind at the active site with the same binding affinity. However, the enzyme catalyzed synthesis of MBE with the different rates between (S)- and (R)-MBA. This result means that the enantioselectivity was not originated from the substrate binding affinity but from the catalytic activity of lipase in organic solvent. The $(V_{max,S}/K_{M,S})/(V_{max,R}/K_{M,R})$ for MBE production was 3.48 which corresponded to above 50-60 % of enantiomeric excess. In esterification of *n*-dodecanoic acid with secondary alcohols in organic solvent

using *Pseudomonas fragi* lipase, $(V_{max,R}/K_{M,R})/(V_{max,S}/K_{M,S})$ was varied from 0.96 to 15, depending on the secondary alcohols (Kikkawa et al., 1989).

(S)-2-Methylbutanoic Amide Identification and Inhibition Study. In the first place, (S)-2-methylbutanoic amide as competitive inhibitor on lipase was synthesized. This inhibitor was identified by HPLC and mass spectrometer as (S)-2-methylbutanoic amide that is structurally analogous to (S)-2-methylbutanoic acid (Figure 6).

Inhibitors are substances which tend to decrease the rate of an enzyme-catalyzed reaction by prohibiting the substrate binding (competitive inhibition) or changing the conformation of enzyme or active site (uncompetitive inhibition or noncompetitive inhibition). The presence of (S)-2-methylbutanoic amide (20 mM) in the reaction mixture reduced the lipase activity. Lineweaver-Burk plot (Figure 7) confirmed that (S)-2-methylbutanoic amide acted as a competitive inhibitor of a lipase because it changed $_{app}K_{M,S}$ value and did not change $_{app}V_{max,S}$. The apparent dissociation constant (K_i) for enzyme-inhibitor (EI) complex was 84 mM which was much smaller than that of enzyme-substrate complex ($_{app}K_M$). This means that binding affinity of inhibitor ((S)-2-methylbutanoic amide) is highly stronger than substrate ((S)-2-methylbutanoic acid) and inhibition of (S)-2-methylbutanoic amide occurs by prohibiting the substrate from binding.

ACKNOWLEDGMENT

This work was done with support in part by a grant from the Agricultural Research Promotion Program under the Ministry of Agriculture and Forestry, Korea.

LITERATURE CITED

- Audrieth, L. F.; Kleinberg, J. Acid catalysis in liquid ammonia. III. Effect of α -substituents on the ammonolysis of esters. *J. Org. Chem.* **1938**, *3*, 312-316.
- Allenmark, S.; Ohlsson, A. Studies of the heterogeneity of a *Candida cylindracea* (*rugosa*) lipase: Monitoring of esterolytic activity and enantioselectivity by chiral liquid chromatography. *Biocatalysis* **1992**, *6*, 211-221.
- AOAC. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed.; Cunniff, P., Ed.; Association of Official Analysis Chemists: Arlington, VA, USA. 1995; Ce 2-66.
- Benzonana, G.; Desnuelle, P. Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *105*, 121-136.
- Bovara, R.; Carrea, G.; Ottilina, G.; Riva, S. Water activity does not influence the enantioselectivity of lipase PS and lipoprotein lipase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 169-174.
- Brockerhoff, H. A model of pancreatic lipase and the orientation of enzymes at interfaces. *Chem. Phys. Lipids* **1973**, *10*, 215-222.
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- Dabulis, K.; Klivanov, A. M. Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 566-571.
- Derewenda, Z. S.; Sharp, A. M. News from the interface: the molecular structures of triglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 20-25.
- Dudal, Y.; Lortie, R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 129-134.
- Engel, K. H. Lipase-catalyzed enantioselective acidolysis of chiral 2-methylalkanoates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 146-150.
- Fitzpatrick, P. A.; Klivanov, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166-3171.
- Holmberg, E.; Hult, K. Temperature as an enantioselective parameter in enzyme resolutions racemic mixtures. *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 323-326.
- Holmberg, E.; Holmquist, M.; Hendenstroem, E.; Berglund, P.; Norin, T.; Hoeborg, H. E.; Hult, K. Reaction conditions for the resolution of 2-methylalkanoic acids in esterification and hydrolysis with lipase from *Candida cylindracea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 572-578.

- Kamiya, N.; Goto, M. Preparation of surfactant-coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. *J. Biotechnol.* 1998, 52, 81-88
- Kikkawa, S.; Takahashi, K.; Katada, T.; Inada, Y. Esterification of chiral secondary alcohols with fatty acid in organic solvents by polyethylene glycol-modified lipase. *Biochem. Int.* 1989, 19, 1125-1131.
- Kim, K. H.; Kwon, D. Y.; Rhee, J. S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *Lipids* 1984, 19, 975-977.
- Klibanov, A. M. Enzyme Work in organic solvents. *Chemtech* 1986, 16, 354-359.
- Klibanov, A. M. Enzyme memory-What is remembered and why? *Nature* 1995, 374, 596.
- Koshland, D. E.; Neet, K. E. The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 1968, 37, 359-410.
- Kwon, D. Y. Synthesis of stereoisomer trifluoroethylmandelates and their stereospecificities for the uses as the substrate of lipase in organic solvent. *J. Kor. Chem. Soc.* 1992, 36, 125-130.
- Kwon, D. Y.; Rhee, J. S. Immobilization of lipase for fat splitting. *Kor. J. Chem. Eng.* 1983, 1, 153-156.
- Kwon, D. Y.; Kim, K. H.; Rhee, J. S. Characteristic of lipases in two-phase system. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 1987, 15, 43-48.
- Kwon, D. Y.; Song, H. N.; Yoon, S. H. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 1521-1525.
- Kwon, D. Y.; Song, H. N.; Yoon, S. H. Esterification patterns of lipases for synthesizing tricaprolylglycerols in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1287-1290.
- Kwon, D. Y.; Yang, H. J.; Yoon, S. H. Separation of enantiomers of (S)- and (R)-2-methylbutanoic acid methylester using chiral GC column. *Food Sci. Biotechnol.* 1999, 8, 139-141.
- Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 658-666.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Macrae, A. R. Microbial lipases catalysts for the interesterification of oils and fats, In *Biotechnology for the Oils and Fats Industry*, Ratledge, C.; Dawson, P.; Rattray, J., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, USA. 1984; pp. 189-198.
- Maciel, M. I.; Hansen, T. J.; Aldinger, S. B.; Labows, J. N. Flavor chemistry of cashew apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 923-927.
- Macleod, A. J.; Pieris, N. M. Volatile flavor compounds of wood apple and a processed product. *J. Agric. Food Chem.* 1981, 29, 49-53.

- Martinelle, M.; Hult, K. Kinetics of triglyceride lipases. In *Lipase*; Woolley, P.; Petersen, S. B., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK. 1994; pp. 159-180.
- Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. L.; Klivanov, A. M. The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, *51*, 95-99.
- Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S.; Sartore, L.; Veronese, F. M. Effect of the enzyme from on the activity, stability and enantioselectivity of lipoprotein lipase in toluene. *Biotechnol. Lett.* 1992, *14*, 947-952.
- Phillips, R. S. Temperature effects on stereochemistry of enzymatic reactions. *Enz. Microbiol. Technol.* 1992, *14*, 417-419.
- Russel, A.; Klivanov, A. M. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 1988, *263*, 11624-11625.
- Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 1958, *30*, 513-520.
- Vulfson, E. N.; Alexander, C.; Whitcombe, M. J. Molecular imprinting : Assembling the molecular cast. *Chem. Brit.* 1997, *33*, 23-26.
- Weissfloch, A. N. E.; Kazlauskas, R. J. Enantiopreference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. *J. Org. Chem.* 1995, *60*, 6959-6969.
- Wen, H. W.; Akoh, C. C.; Phillips, R. S. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of di-menthol in organic solvent using acid anhydrides as acylation agents. *Enz. Microbiol. Technol.* 1996, *18*, 536-539.
- Wescott, C. R.; Klivanov, A. M. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, *1206*, 1-9.
- Zaks, A.; Klivanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science* 1984, *224*, 1249-1251.
- Zaks, A.; Klivanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 1988, *263*, 3194-3201.

Figure Legends

Figure 1. Time course of the synthesis of (S)-MBE (2-methylbutanoic acid methylester) (○) and (R)-MBE (●) by Lipase FAP-15 in isooctane from the 2-(±)-methylbutanoic acid (rac-MBA).

Figure 2. Temperature profile of lipase activity (○) and enantioselectivity (●) for (S)-MBE synthesis by Lipase FAP-15 in isooctane. Error bars indicate the standard deviation at each point for 3 determinations.

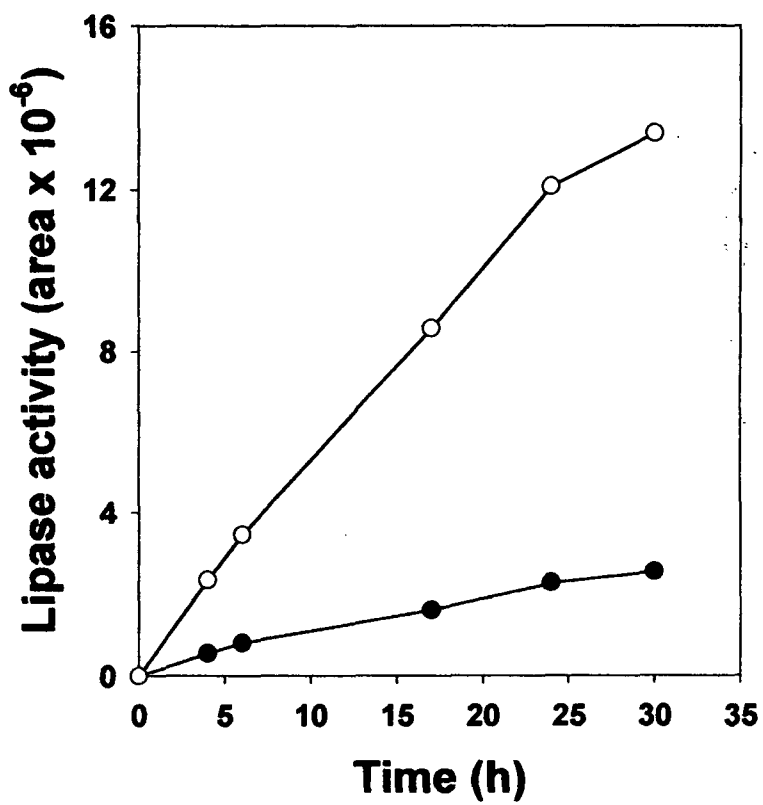
Figure 3. Effect of temperature on enantioselectivity of Lipase FAP-15 (●), Lipase AP (○), Lipase IM 20 (▲) in synthesizing the (S)-MBE in isooctane. Error bars indicate the mean ± SD for 3 determinations.

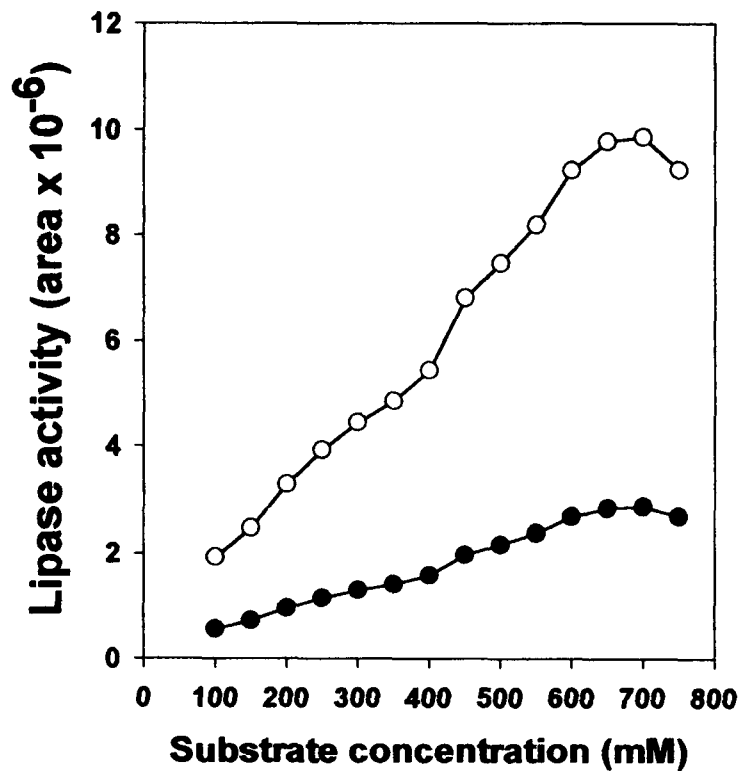
Figure 4. Michaelis-Menten curves for synthesis of (S)-MBE (○), (R)-MBE (●) with Lipase FAP-15.

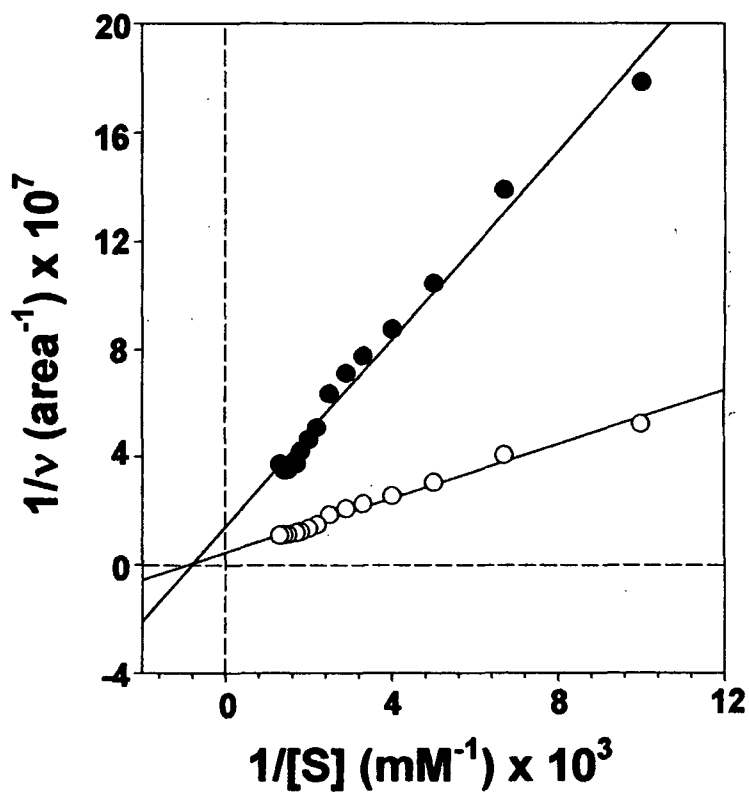
Figure 5. Lineweaver-Burk plot of lipase activity from Figure 4 for (S)-MBE (○), (R)-MBE (●) synthesis in organic solvent.

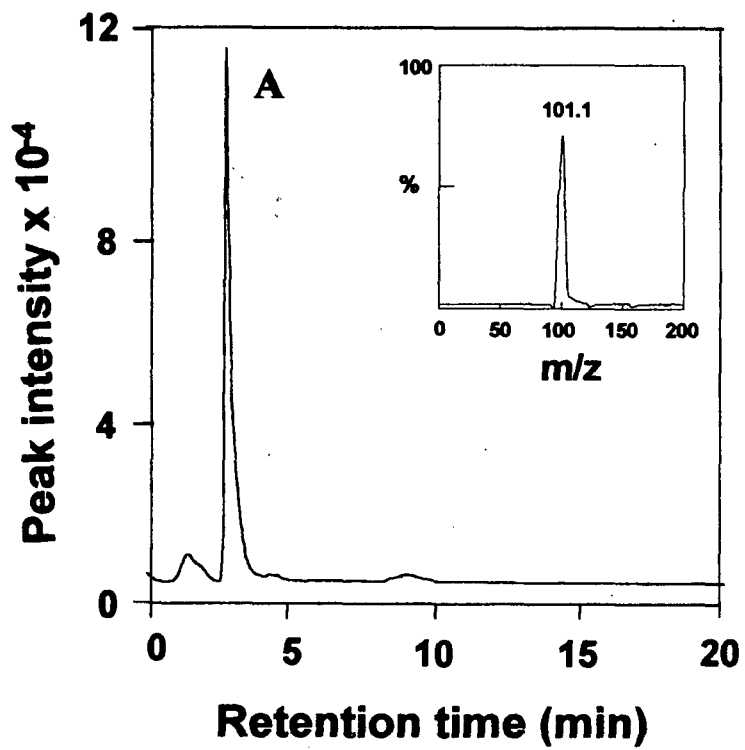
Figure 6. HPLC chromatogram of (S)-2-methylbutanoic amide (peak A) after synthesis from (S)-2-methylbutanoic acid. HPLC solvent condition was 7 : 3 = water : acetonitrile in isocratic system. Electrospray mass spectrum of synthesized (S)-2-methylbutanoic amide (peak A in HPLC chromatogram) is shown on right top in the chromatogram. The number on the peak (101.1) indicates the mass for single charge of (S)-2-methylbutanoic amide.

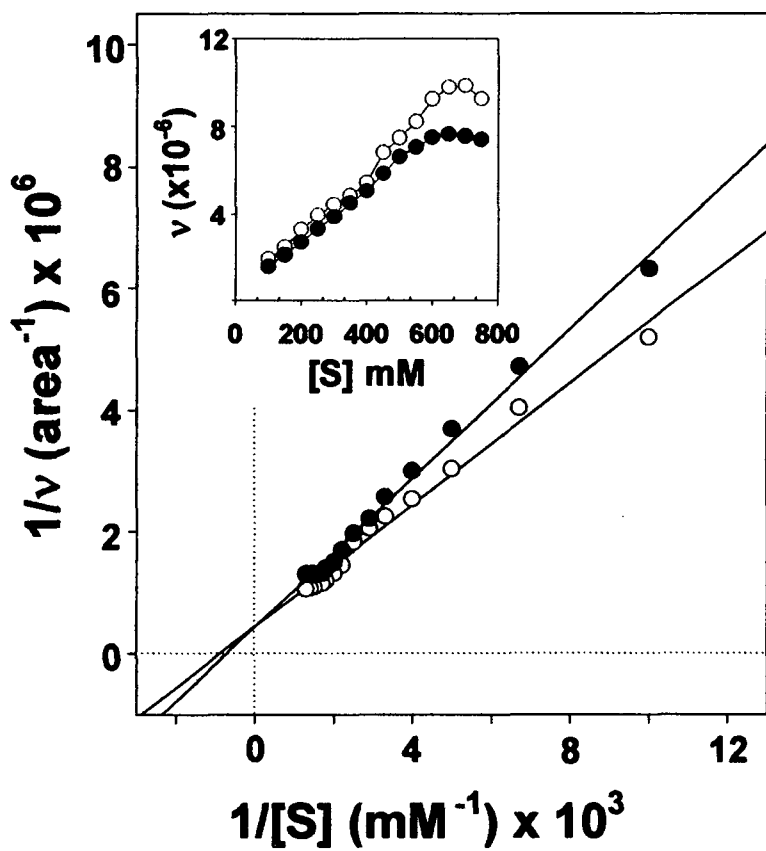
Figure 7. The Lineweaver-Burk plot of lipase synthetic activity for (S)-MBE without (○) and with (S)-2-methylbutanoic amide (●). The Michaelis-Menten curve for each plot is shown inside the graph.











July 24th, 1999

Refolding and Secondary Structure of Lipase from *Pseudomonas fluorescens*

Kyu R. Kim¹, Dae Y. Kwon², Suk H. Yoon², Woo Y. Kim³, and Kyung. H. Kim¹

¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

²Korea Food Research Institute, Songnam, Kyungki-do 463-050, Korea

³Dept. of Biotechnology, Choongang University, Ahnsung, Kyungki-do 456-756, Korea

Running title: Refolding and secondary structure of *Pseudomonas fluorescens* lipase

Keywords: Refolding, secondary structure, circular dichroism, fluorescence, lipase

*Corresponding author: Prof. Kyung Hyun Kim

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Tel 0415-860-1416, Fax 0415-864-2665

Email address: khkim@kucenx.korea.ac.kr

Abstract

Thermostable *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase (PFL) believed to be responsible for the spoilage of milk was overexpressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. Renaturation efforts using size exclusion protein refolding system (SEPROS) resulted in the increase of protein yields by two times, and of specific activity by 5 - 10 times higher than that obtained from a conventional dilution method. Renatured lipase was purified homogeneously through a series of chromatographic purification steps including ion exchange and gel filtration chromatography. The PFL activity is highly enhanced in the presence of calcium ion. Secondary structure of the purified PFL was monitored by circular dichroism, showing that the activity increase of PFL due to the presence of calcium ion coincides with the significantly raised α helix content and decreased β sheet content. Intrinsic fluorescence intensity is also increased by calcium ion. The PFL protein structure was more resistant to denaturation by guanidine hydrochloride as well as cosolvents such as DMSO and trifluoroethanol, suggesting that the Ca^{2+} -induced conformational change is important in maintaining the stability of the enzyme structure.

Introduction

Pseudomonas secretes a number of extracellular enzymes, including lipases, in response to fluctuating external nutrients. The lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 produces an extremely heat stable enzyme (PFL-SW) which is believed to be responsible for the spoilage of milk in its natural habitat (1). PFL-SW was subcloned and transformed into *E. coli* BL21 (2). However, the lipase overexpression led to its cytoplasmic accumulation as inclusion bodies. Refolding of recombinant proteins from inclusion bodies requires solubilizing the insoluble protein in a strong denaturant which is subsequently removed. It is a common observation that the refolding yield is inversely proportional to the concentration of denatured protein undergoing buffer exchange (3, 4). The loss of activity at high protein concentrations is strongly linked to aggregate formation, caused by nonspecific intermolecular interactions due to the insolubility of the denatured proteins. Aggregation can be greatly suppressed if protein molecules are separated from each other during refolding. This enables partially folded molecules with exposed hydrophobic regions to proceed with intramolecular folding by reducing the probability of intermolecular interactions. Several methods for separating protein molecules during refolding have been described (5-7). Recently, size-exclusion chromatography protein refolding system (SEPROS) using crosslinked structures of gel filtration media was introduced for protein refolding (8), where proteins passing through the gel beads were dynamically trapped and separated from denaturants as well as from each other.

Divalent metal cations, particularly Ca^{2+} , play an important role in the structure and function of proteins. Early study showed that the activity of PFL was significantly enhanced in the presence of calcium ions (9). Among metal ions tested, calcium ion was specific for the activation of and its presence made PFL more stable at alkaline pH.

In this study, we describes how PFL-SW expressed as inclusion bodies in *E. coli* was refolded, resulting in high yields of protein. Refolded PFL-SW was homogeneously purified and catalytically active with higher specific activity than that previously reported (9). It is also shown the renatured PFL-

SW has significant conformational changes in the presence of calcium ions that affect the protein stability.

MATERIALS AND METHODS

Materials

E. coli BL21 transformed with pTTY2 containing PFL-SW gene was a kind gift from Prof. J. S. Lee at the Korea Advanced Institute of Science and Technology (Dae Jeon, Korea). Calcium chloride, guanidine hydrochloride (GdnHCl), urea, dithiothreitol (DTT), *p*-nitrophenyl butyrate were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, U.S.A.). Isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG) and ampicillin were purchased from Roche Ltd. (Basel, Switzerland). Dye reagents for Bradford, econo-columns and Biologic LP system were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, U.S.A.). Sephacryl S200, DEAE-Sephacrose CL-6B, Superdex 200 HR 10/30 and AKTA FPLC system were obtained from Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Preparation of Inclusion Bodies

Cultivation of cells was followed by the method described previously (2). The cultured cells were harvested and resuspended in the lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]. After disrupting the cells with the treatment of lysozyme (0.2 mg/ml) and subsequent sonication for 1 min, inclusion bodies were separated by centrifugation and the pellet was then washed with 2% of Triton X-100 for removing the cell debris and other impurities (10)[Titchener-Hooker *et al.*, 1991]. They were resuspended with the denaturation buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8M urea, 20 mM β -mercaptoethanol] and the insoluble components were removed by centrifugation at 100,000 g for an hour and filtration using 0.45 μ m syringe filter (11)[Meagher *et al.*, 1994].

Refolding of Inclusion Bodies

Step-dilution was done by the following protocol: 10 ml of solubilized inclusion bodies was dissolved in 1 L of the refolding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] containing 10 mM CaCl₂, and incubated overnight. The stepwise addition of the inclusion bodies was done to the refolding buffer at 4 °C. SEPROS was carried out at 4 °C using Sephacryl S-200 on Biologic LP system. The solubilized inclusion bodies in 8 M urea (1.5 ml) were applied onto the column (2.5x75 cm) equilibrated with the refolding buffer and eluted at a flow rate of 15 ml/min.

Purification of Lipase

The active fractions from SEPROS were pooled and directly applied to a DEAE-Sepharose CL-6B anion-exchange column (2.6x10 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.5). The elution was performed with linear NaCl gradient from 0-0.6 M at 4 °C. The pooled lipase fractions were then applied to the gel filtration and subsequent ion exchange FPLC using Superdex 200 and Mono Q prepacked columns, respectively. The fractions with lipase activity were pooled, concentrated and subjected to the second gel filtration FPLC using Superdex 200.

Gel Electrophoresis and Activity Staining

SDS-PAGE was carried out using 12% gels (12) which were stained with Coomassie Brilliant blue R-250 or silver stain (Bio-Rad). Activity staining was carried out by incubating the gels in the refolding buffer at 4 °C overnight. Gels were then transferred to a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing β -naphthyl acetate and Fast Blue RR. After 30 min of agitation, the gels were rinsed with water and stored in 7% acetic acid (13). The dark yellow color appeared within 20 min.

Protein Estimation

The protein content was measured according to Bradford (14) using bovine serum albumin (BSA) as a

standard. For the purified lipase, the concentration was estimated based on the calculated value of the extinction coefficient of $72063(\text{Mc m})^{-1}$ (14).

Activity Assay

PFL-SW activity was assayed by a colorimetric method with the substrate of *p*-nitrophenyl ester and hydrolysis of 1,2-dilauryl-*rac*-glycero-3-glutaric acid resorufin ester based on the method of (15) Nachlas and Blabkburn (1958) and Lehner and Verger (1997). One unit of activity for *p*-nitrophenyl butyrate and resorufin was defined as $\mu\text{ mol}$ of *p*-nitrophenol released per min (16) [Blow *et al.*, 1987].

Spectroscopic Studies

Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a JASCO J-715 spectropolarimeter (Tokyo, Japan) in the structural biology center at the Korea Institute of Science and Technology (Seoul, Korea). Spectra were averaged from eight data accumulations and base lines corrected. The enzyme concentration was $10\ \mu\text{M}$ and molar ellipticity was calculated with 449 amino acid residues.

Steady-state fluorescence measurements were performed on a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer (Kyoto, Japan). The intrinsic fluorescence excitations were carried out at 295 nm to eliminate contributions from amino acids other than tryptophan. Emission spectra were recorded from 300 nm to 400 nm. The enzyme concentration was $5\ \mu\text{M}$. A transition of unfolding was monitored at various GdnHCl concentrations.

RESULTS

Refolding and Purification of lipase

The final yield of recovered proteins were almost three times higher than those obtained from step

dilution. The specific activity increased more than five-times compared with that from step dilution (Table 1). The only disadvantage of SEPROS was that it took almost 3 days to finish the chromatographic elution. However, SEPROS were superior to step dilution in the protein yield and the specific activity.

Monomeric lipase (48 kDa) whose molecular weight was approximately estimated with that of BSA (67 kDa) was eluted with NaCl gradient at the concentration of about 0.3 M NaCl concentrations. The final lipase fractions were concentrated with Centriprep 30 to the final volume of 0.5 ml at a concentration of 2 mg/ml and stored at -70 °C. After the final gel filtration FPLC, the lipase was purified almost homogeneously with more than 95% purity. Activity staining was also carried out to demonstrate the purified lipase activity (Fig. 2). The data indicates that SEPROS was very effective in protein refolding and purification.

Structural Studies

Secondary structure estimations with circular dichroism

The purified lipase diluted to a final concentration of 0.2 mg/ml was used for CD. The far UV spectra 190 - 240 nm (Fig. 3) were obtained. The secondary structure was analyzed with reference spectra of three component model, α -helix, turn, and random coil [Yang *et al.*, 1986].

Denaturation with guanidium hydrochloride

Lipase become denatured as the concentration of guanidium hydrochloride increased. The mid-point of denaturation transition of PFL was found to be about 0.5 M. However, when 10 mM calcium ions were added, the mid-point of transition shifted to about 2 M. Activity assay also showed the similar effect of the ions on lipase activity. These results allow suggesting that calcium ions have a significant stability effect on lipase structure. Cosolvents such as trifluoroethanol and DMSO were also used to test the

stabilization effect of calcium ions.

DISCUSSION

The renaturation of protein from inclusion bodies is a critical step to obtain a high yield of protein with native conformations. For structural studies, homogeneous and high concentrations of protein are essential for crystallization. Various efforts to solubilize and renature *P. fluorescens* lipase were unsuccessful. Since the lipase has 8 cysteine residues, mismatched disulfide bond formation might be a major cause of formation of aggregates when the dilution method was used. Protein aggregates were easily formed in the absence of DTT during refolding. To enhance the purification yield of native lipase, SEPROS was introduced to suppress aggregate formation. The porous beads are believed to allow high yields of native structure, in particular at low temperature compared to the simple dilution method. The proteins can be recovered by solubilization in denaturing solvents followed by subsequent refolding under carefully controlled conditions. Refolding proteins of inclusion bodies is not a simple task. Strong denaturants such as guanidine hydrochloride (GdnHCl) or urea is believed to disrupt the bonds holding the protein aggregates together. Removal of the denaturant is therefore necessary to allow the molecule to fold spontaneously into its native structure, typically by dialysis or dilution. Upon removal of the denaturing agent, the protein molecule is expected to refold spontaneously because all of the information required for its three-dimensional structure is contained within the amino acid sequence [Anfinsen, 1973].

Purification of refolded lipase was carried out by gel filtration and anion-exchange chromatography. Use of DEAE anion-exchanger gave two important advantages; one was the concentration effect from large volumes (about 100 - 150 ml) of refolded lipase applied and the other was the effective separation of contaminants, mainly nucleotides, from proteins. The pre-washed solution showed high turbidity and, in addition, eluents with 1.0 M NaCl concentration mainly contained nucleotides. The subsequent gel

filtration chromatography with Superdex 200 HR 10/30 was a rate-limiting step during the lipase purification. However, the step rendered lipase of high purity. To obtain high purity lipase, anion-exchange and size exclusion chromatography steps were essential.

The secondary structure estimation of purified lipase using CD showed helix dominant conformations in the presence or absence of calcium ions. Calcium ions are necessary for lipase activity as a cofactor and also required for refolding of *P. fluorescens* lipase. Denaturation studies with guanidium hydrochloride exhibited a transition shift from about 0.5 M to 2.0 M for the enzymes in the absence and presence of calcium ions, respectively. These results suggest that calcium ions are important in maintaining the stability of lipase structures. The effects of the additives on protein stability are currently being screened using fluorescence and circular dichroism.

REFERENCES

1. Anderson, R. E., Hedlund, C. B., Jonsson, U. (1979) Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* 62, 361-367.
2. Chung, G. H., Lee, Y. P., Yoo, O. J., Rhee, J. S. (1991) Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 237-241.
3. Goldberg, M. E., Rudolph, R. and Jaenicke, R. (1991) A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* 30, 2790-2797.
4. Matsubara, M., Norihara, D., Kurimoto, E., Kuroda, Y. and Sakai, T. (1993) "Loose folding" and "delayed oxidation" procedures successfully applied for refolding of fully reduced hen egg white lysozyme. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1207-1210.
5. Sinha, N. K., Light, A. (1975) Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. *J. Biol. Chem.* 250, 8624 - 8629.
6. Creighton, T. E. In : DL Oxender (ed.). *UCLA Symposia on Molecular and Cellular biology, new series* (1986) vol. 39, pp. 249 - 257. Alan R. Liss. New York.
7. Hager, R., Craig, S., Dain, R. H. (1991) Protein folding and its implications for the production of recombinant proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9, 47-87.
8. Batas, B and Chaudhuri, J.B. (1996) Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol. and Bioeng.* 50, 16-23.
9. Lee, Y. P., Chung, G. H., and Rhee, J. S. (1993) Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 156-164.
- 10.
11. Alford, J. A., and D. A. Pierce. 1961 Lipolytic activity of microorganism at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *J. Food Sci.* 26 : 518
12. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
13. Higerd, T. B. and Spizzen, J. 1973 Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 114 : 1184 - 1192
14. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (3rd ed) G.P. Fasman, ed. Nucleic Acids, Volume I, pp.581-599.
- 15.
16. Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. and Goldman, A. 1992 The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5 : 197 - 211
17. Anfinsen, C. B. 1973 Principles that govern the folding of protein chain. (Nobel Lecture). *Science* 181 : 223 - 230

Table 1. The comparison of the yields from dilution and SEPROS

	100 fold dilution	SEPROS
Refolding condition	50 mM Tris (8.0), 0.7 M urea, 1 mM EDTA or 10 mM CaCl ₂ at 4 °C	50 mM Tris (8.0), 1 mM EDTA or 10 mM CaCl ₂ at 4 °C
Total time	More 10 hours for each step	3 days (total running time)
Recovered protein yield (quantity / specific yield)	8 – 11% / 250 – 450 unit	20 – 30% / 1200 – 4000 unit

Table 2. Secondary structure estimation of lipase

	In the absence of calcium		In the presence of calcium	
	Fraction	Ratio	Fraction	Ratio
Helix:	2288	6	13779	20.2
Beta:	10168.3	26.6	23819.5	34.9
Turn:	247.3	0.6	8429.3	12.4
Random:	25508.6	66.8	22166	32.5
Total:	38212.2	100	68193.8	100

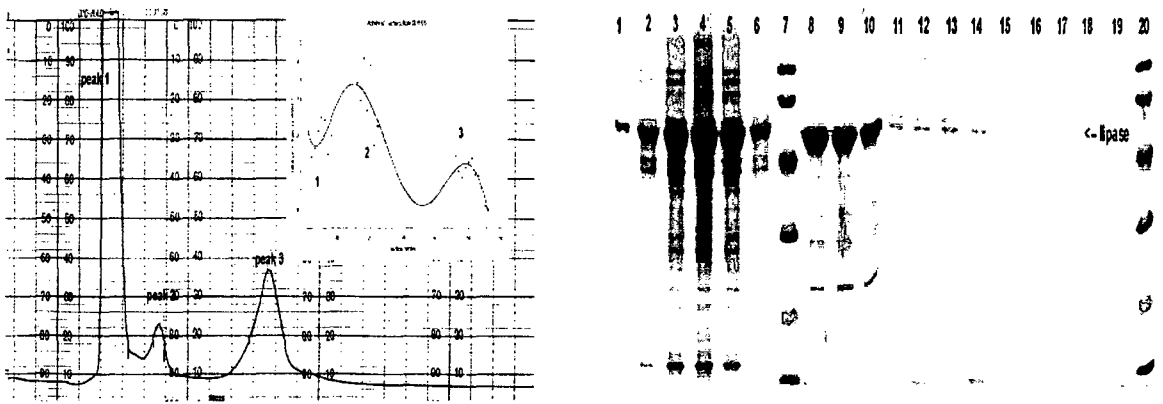


Figure 1. SEPROS; Elution profile (left) and SDS-PAGE (right) of eluted fractions [lane 7 and 20 are molecular weight marker, lane 1 – 6 are fractions from first peak, lane 8-10 are second peak, and lane 11 – 19 are third peak].

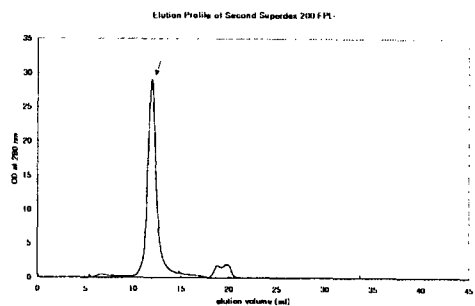
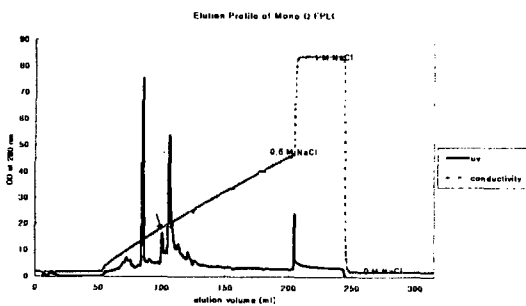
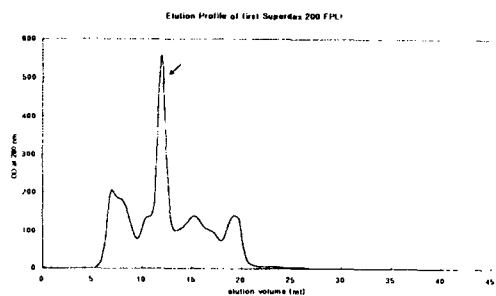
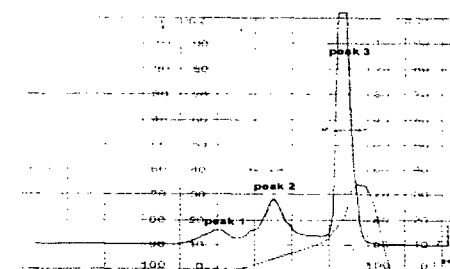


Figure 2. Purification of Lipase. The lower line of DEAE profile (top fig.) represents conductivity with NaCl gradient. The black arrows indicate the most active peak.

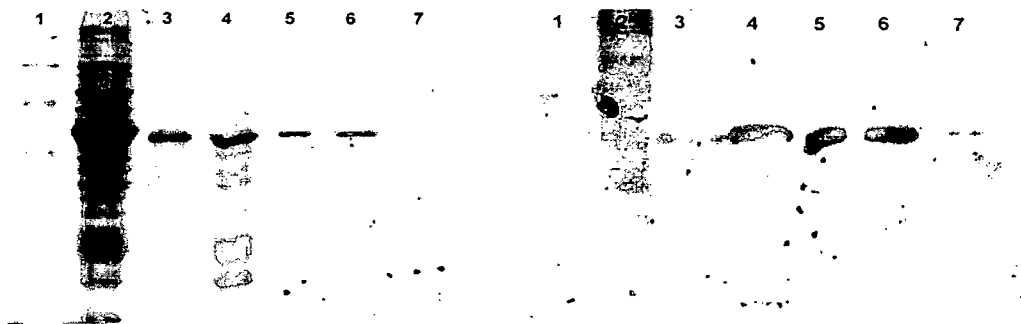


Figure 3. SDS-PAGE (left) and Activity staining (right) of lipases along purification steps. From left lane; molecular weight marker, inclusion body isolates, after SEPROS, DEAE, Superdex 200 FPLC, Mono Q, final gel filtration FPLC.

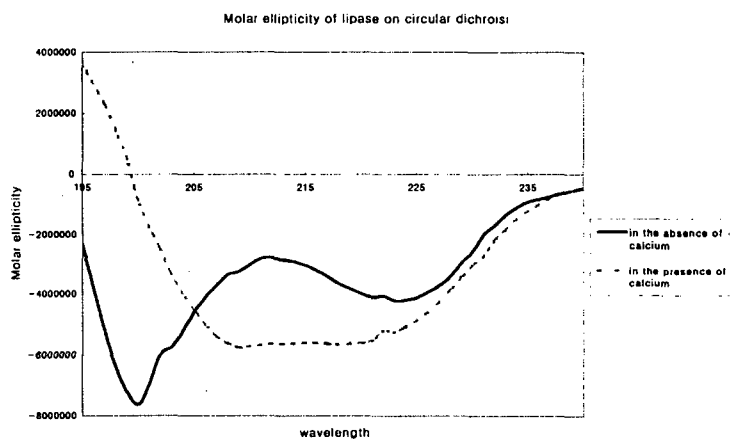


Figure 4. Circular dichroism spectra of lipase in the presence (dotted line) and absence (continuous line) of calcium ions.

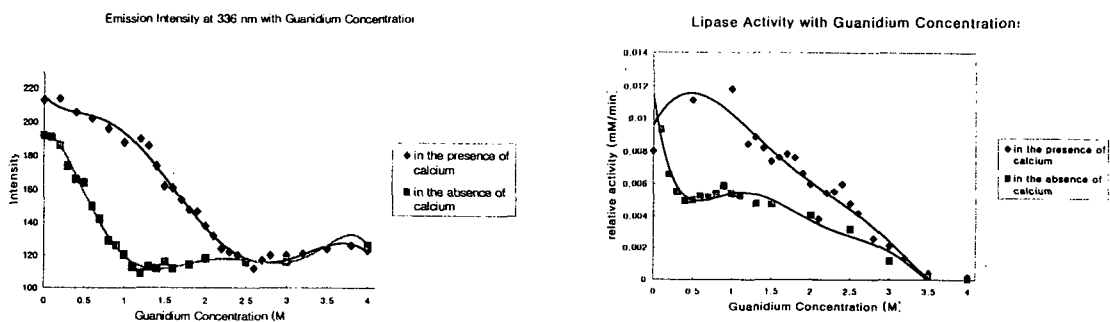


Figure 5. Denaturation of lipase with guanidinium hydrochloride in the presence (diamond) and absence (square). Plots represent the fluorescence emission (left) and activity (right).

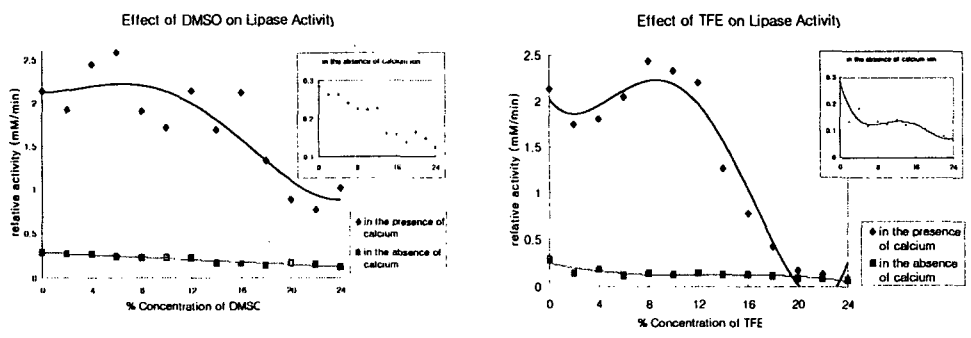


Figure 6. The effects of calcium ions on lipase when DMSO (left) and trifluoroethanol (right) were used as cosolvents at increasing concentration.