

Alkalophilic microorganism이 생산하는 lipase 에 관한 연구

정 광 선*, 함 철 주*, 신 원 철**

Studies on the Lipase Produced by Alkalophilic Microorganism

Kwang-Seon Jeong*, Cheol-Joo Ham*, Won-Cheol Shin**

Abstract

In order to obtain a strain of producing lipase which has resistance against alkaline and detergent, a screening test was carried out.

Among 500 strains isolated from soil samples, the strain J-19 was selected for this study.

The composition of the optimum medium for the highest lipase production was 2.0% glycerin, 1.0% corn steep liquor, 2.0% yeast extract, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% K_2HPO_4 , 1.5% soy bean oil and 0.1% LAS (linear alkylbenzene sulfonate) with initial pH value of 10.0 and 3-day cultivation at 25°C.

The lipase activity of the strain J-19 under optimal condition was 3.3 units/ml, which was increased about 1.3-fold than that of basal medium.

I. 서 론

Lipase (E. C. 3, 1, 1, 3)는 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소로¹⁾ 1834년 Eberle에 의하여 토끼의 췌액중에서 처음 발견

되었으며, 식물 및 미생물에도 존재한다는 것이 알려졌다.²⁾

이러한 lipase는 생체내에서 지방산의 전달, 산화 및 glyceride와 phospholipid의 재합성에 관여 할 뿐만 아니라, 치즈 향기의 증진이나 야채의 발효에 유리 지방산의 증

* 공과대학 발효공학과 대학원생

** 공과대학 발효공학과 부교수

* Graduate Student, Dept. of Fermentation Technology Kangweon National University.

** Associate Prof., Dept. of Fermentation Technology Kangweon National University.

(이 논문은 1986년 자유과제 학술연구 조성비의 일부에 의하여 수행되었음)

가 육류 숙성에 있어서 향기 증가 및 어류의 지방분해에 lipase가 작용 한다고 보고되었다.³⁾ 또한 lipase는 유가공에 있어서 치즈나 버터 제조에 첨가하여 향기를 증진시키고 화장품공업이나 제약공업등에 공업적으로도 사용되고 있다.^{4,5)}

이러한 목적으로 1950년 후반 부터 미생물 기원의 lipase가 보고되었는데, 예를 들면 *Penicillium roqueforti*⁶⁾, *Mucor lipolyticus*⁷⁾, *Rhizopus japonicus*^{8,9)}, *Pseudomonas fragi*^{10,11)} 및 *Streptomyces* sp.¹²⁾ 등이 lipase 생산균으로 알려졌다. 한편, Seitz 등⁴⁾은 합성 세제에 amylase 나 protease를 혼합하여 사용하면 세탁 효과가 향상 된다고 보고하였다. 이러한 세제혼합용 효소는 alkali 내성이 있어야 하고 세제 수용액에서의 안정성이 중요한 문제로 되어있다. Alkali 내성 lipase는 Watanabe 등¹³⁾ 과 Kokusho 등¹⁴⁾이 토양으로 부터 생산 균주를 분리하여 균주의 동정 및 lipase의 분리정제에 관한 보고가 있을 뿐 현재 생산되고 있는 lipase로서 alkali 내성과 세제 내성의 두가지 조건을 모두 만족시키는 것은 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 세제와 혼합하여 사용할 수 있는 lipase를 개발하기 위하여 토양으로 부터 alkali 내성 및 세제 내성인 lipase 생산균을 분리하고 lipase 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 생산균의 분리

1) 일차 screening

춘천에서 채취한 토양을 Table 1에 표시한 분리용 액체배지에 50 ml에 백금이로 1회 접종하여 30°C에서 6일간 진탕배양하였다. 배양액 0.2 ml를 Table 2에 표시한 분리용 고체 배지에 도말하여 30°C에서 6일간 배양한 후 clear zone을 형성하는 균주를 일차 분리하

였다.

Table 1. Liquid medium for isolaton.

Glycerin	1.0 % (w/v)
Poly peptone	2.0 % (w/v)
Yeast extract	0.5 % (w/v)
K ₂ HPO ₄	0.2 % (w/v)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 % (w/v)
Scybean oil	1.1 % (v/v)
LAS*	0.1 % (w/v)
pH 10.0 (with Na ₂ CO ₃)	

LAS: linear alkylbenzene sulfonate

Table 2. Solid medium for isolaton.

Poly peptone	0.3 % (w/v)
Yeast extract	0.1 % (w/v)
K ₂ HPO ₄	0.1 % (w/v)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05% (w/v)
Intralipos	5.0 % (v/v)
LAS*	0.1 % (w/v)
Agar	1.2 % (w/v)
pH 10.0 (with Na ₂ CO ₃)	

*LAS: linear alkylbenzene sulfonate

2) 이차 screening

일차 분리한 균을 Table 1에 표시한 분리용 액체배지에 백금이로 1회 접종하여 30°C에서 6일간 진탕배양하였다. 배양액을 조효소액으로 하여 lipase 활성 측정법¹⁵⁾에 의하여 각 균주의 lipase 생산능을 측정하였다. 분리한 균중에서 lipase 생산능이 가장 좋은 균을 본 실험에서 사용하였다.

2. 종균 배양

분리용 고체배지에 사면배양 시킨 균주를 분리용 액체배지 50 ml에 백금이로 1회 접종한 후 30°C에서 3일간 진탕배양시킨 것을 종균으로 사용하였다.

3. Lipase 활성 측정법

Yamada¹⁵⁾의 변법을 이용하여 활성을 측정하였다.

1) 기질의 조제법

Intralipos (glycerin 2.5 g, soybean oil 10 g, lecithin 5 g, 증류수 100 ml를 10,000 rpm에서 15분간 유화) 90 ml에 LAS (linear alkylbenzene sulfonate) 0.1 g을 넣고 0.5 M glycine buffer 용액 10 ml를 가한 후 2 N NaOH로 pH 10.0으로 조절하였다.

2) 활성 측정법

기질 2 ml를 시험관에 넣어 37°C에서 5분간 방치한 후 조효소액 0.1 ml를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Acetone-ethanol (v/v 1:1) 4 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 60% ethanolic 0.1 N KOH를 2 ml 첨가하였다. 지시약으로서 phenolphthalein을 2~3방울 떨어 뜨린 후 0.05 N HCl로 적정하였고 대조구는 기질 2 ml에 증류수 0.1 ml를 넣어 위의 방법과 동일하게 행하였다. 효소의 lunit는 1분간에 1 μmole의 지방산을 유리하는 양으로 하였다.¹⁶⁾

4. 효소 생산조건 검토

1) 배양시간의 영향

분리용 액체배지에 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 30°C에서 진탕배양하면서 1일 간격으로 배양액을 취하여 효소의 활성을 측정하였다.

2) 온도의 영향

분리용 액체배지에 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 온도를 달리하여 일정시간 배양 후 효소의 활성을 측정하였다.

3) 탄소원의 영향

분리용 액체배지에 각종 탄소원을 최종농도 1% (w/v)씩 첨가하여 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

4) 유기 질소원의 영향

분리용 액체배지에 각종 유기 질소원을 최종농도 1% (w/v, v/v)씩 첨가하여 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

5) 무기 염류의 영향

분리용 액체배지에 각종 무기 염류를 최종농도 0.1% (w/v)씩 첨가하여 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

6) Soybean oil의 영향

분리용 액체배지에 soybean oil의 농도를 각각 달리 첨가하여 종균 배양액 1% (v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소 생산균의 분리

춘천 근교에서 채취한 토양으로부터 일차 screening에 의하여 약 500주를 분리하였고, 이차 screening으로 lipase 활성이 있는 균주를 9주 분리하였다. 이 분리군 중에서 lipase 활성이 가장 높은 균주를 선정하여 J-19로 명명하였다.

2. 효소 생산조건 검토

1) 배양시간의 영향

배양시간에 따른 J-19 균주의 lipase 생산 변화를 검토한 결과는 Fig. 1 과 같다.

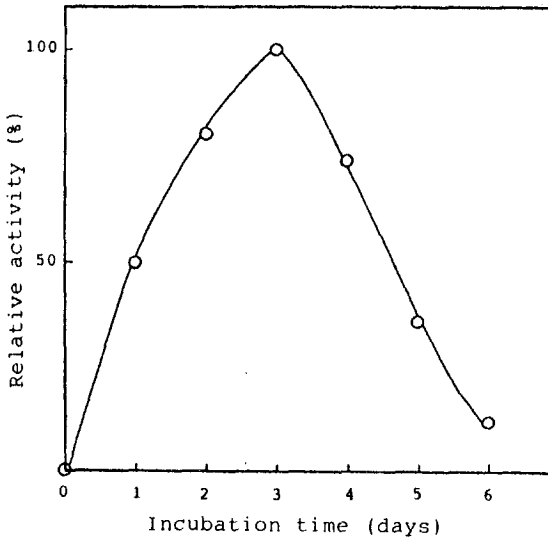


Fig. 1. Effect of incubation time on the production of lipase.

Fig. 1에 나타낸 바와 같이 lipase 생산은 1일 부터 시작 되었고, 3일에서 lipase 생산은 최고에 도달하였으며, 그 이후에는 점차 감소하였다.

Alford 등¹⁷⁾은 *Saccharomycopsis lipolytica*는 4일, *Micrococcus caseolyticus*는 3일, *Bacillus licheniformis*는 7일, *Staphylococcus* sp.는 2일에서 lipase 생산이 가장 높다고 보고하였고, Uyeda 등¹²⁾이 보고한 *Streptomyces* sp.는 3일이 가장 좋았다. 따라서 J-19 균주는 *Micrococcus caseolyticus* 나 *Streptomyces* sp.의 배양시간과 같은 결과를 보여 주었으며, 이후의 실험은 배양시간을 3일로 하여 행하였다.

2) 온도의 영향

Fig. 2에는 온도에 따른 lipase 생산의 변화를 검토한 결과를 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 lipase 생산은 25°C에서 가

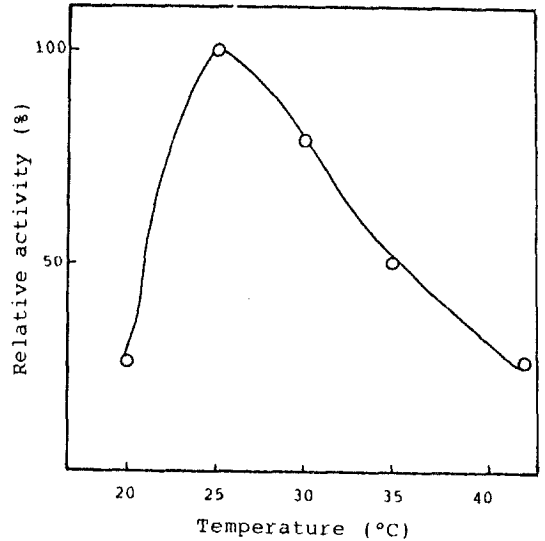


Fig. 2. Effect of temperature on the production of lipase.

장 좋았다.

Alford 등¹⁷⁾은 *Saccharomycopsis lipolytica*, *Bacillus licheniformis* 및 *Staphylococcus* sp.는 각각 40°C, 45°C 및 25°C에서 lipase 생산이 높다고 보고하였고, 정¹⁸⁾이 보고한 *Geotrichum candidum*은 30°C에서 lipase 생산이 가장 높다고 보고하였다. 따라서 J-19 균주는 다른 lipase 생산 균주들과 비교하여 볼때 *Staphylococcus* sp.와 같이 비교적 낮은 온도에서 생산이 좋다는 사실을 알수 있었다.

3) 탄소원의 영향

Lipase 생산에 미치는 각종 탄소원의 영향을 검토한 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

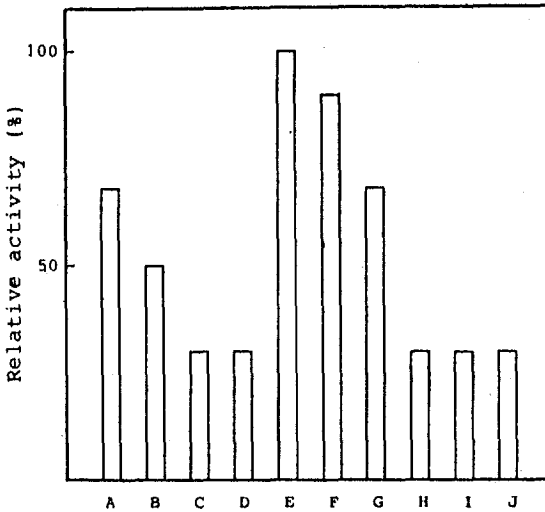


Fig. 3. Effect of carbon sources on the production of lipase.

A: Maltose B: Fructose C: Dextrin
 D: Sucrose E: Glycerin F: Starch
 G: Lactose H: Raffinose I: Glucose
 J: Mannitol

Fig. 3에서 보는 바와 같이 glycerin을 탄소원으로 사용하였을 경우 lipase 생산이 가장 높았다. 또한 lipase 생산에 적당한 glycerin의 농도를 검토한 결과 (Fig. 4),

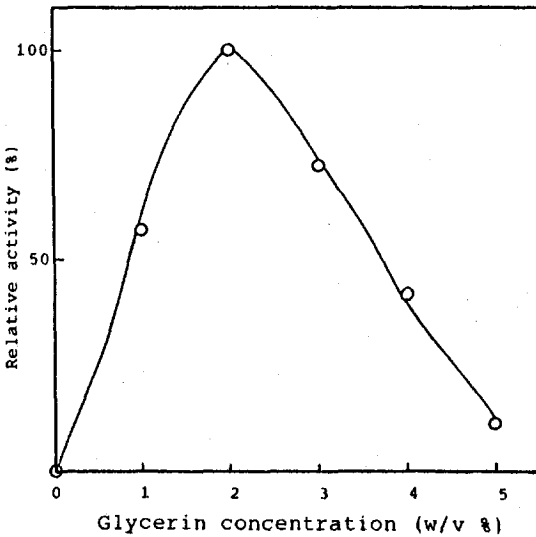


Fig. 4. Effect of glycerin concentration on the production of lipase.

2% (w/v)일때 가장 높게 나타났다. 따라서 이후의 실험은 탄소원으로 glycerin 2% (w/v)를 첨가하여 행하였다.

Aisaka 등⁸⁾은 *Rhizopus japonicus*의 최적 탄소원으로 glucose가 적당하다고 보고하였으며, 정¹⁸⁾은 *Geotrichum candidum*의 lipase 생산에는 soluble starch가 가장 좋다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 사용한 J-19 균주는 glycerin이 탄소원으로 가장 좋게 나타났는데, 이는 균주의 차이에 의한 것으로 판단되었다.

4) 유기 질소원의 영향

Lipase 생산에 미치는 각종 유기 질소원의 영향을 검토한 결과를 Fig. 5에 나타내었

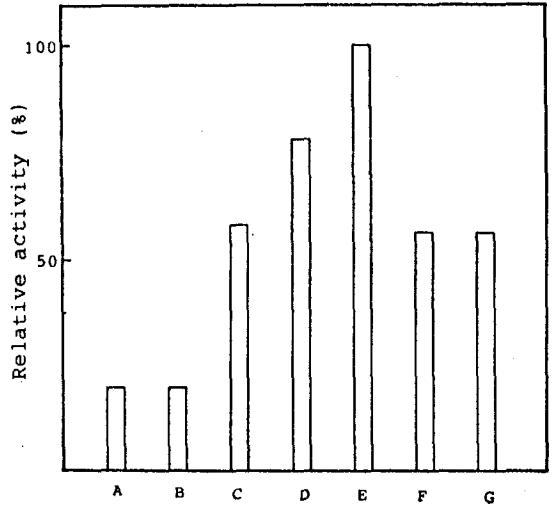


Fig. 5. Effect of organic nitrogen sources on the production of lipase.

A: Malt extract B: Soybean meal
 C: Beef extract D: Yeast extract
 E: Corn steep liquor F: Poly peptone
 G: Tryptone

다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 유기 질소원으로 corn steep liquor를 첨가 하였을 때 lipase 생산이 가장 높았다. 또한 lipase 생산에 적당한 corn steep liquor의

농도를 검토한 결과(Fig. 6), 1% (v/v)를 첨가 하였을 때 가장 높게 나타났다. 한

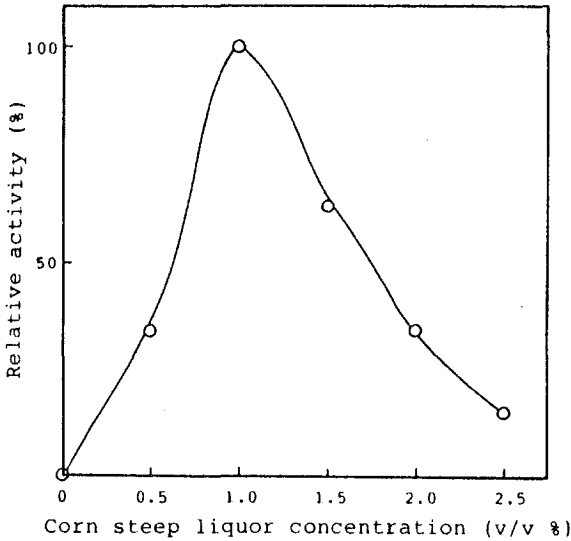


Fig. 6. Effect of corn steep liquor concentration on the production of lipase.

편, corn steep liquor 다음으로 lipase 생산이 좋은 yeast extract의 농도를 검토한 결과, Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 2%

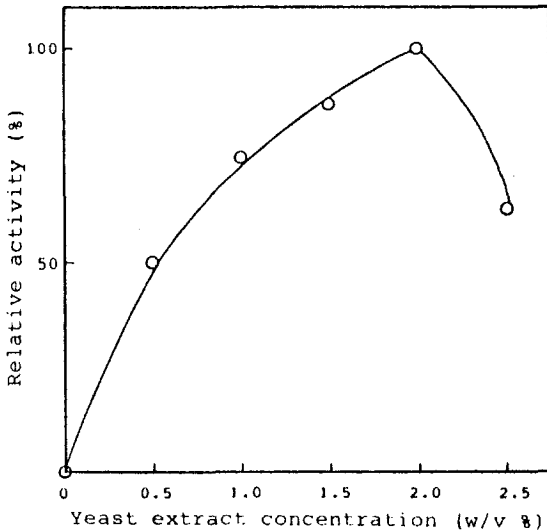


Fig. 7. Effect of yeast extract concentration on the production of lipase.

(w/v)가 가장 높게 나타났다. 유기 질소원으로 corn steep liquor 1% (v/v)와 yeast extract 2% (w/v)를 혼합 첨가한 것이 corn steep liquor 1% (v/v)와 yeast extract 2% (w/v)를 단독 첨가한 것 보다 lipase 생산이 더 높게 나타났다. (Fig. 8).

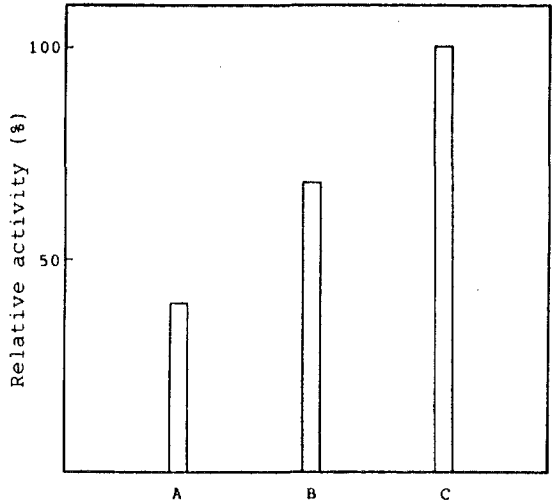


Fig. 8. Effect of corn steep liquor and yeast extract on the production of lipase.

A: Corn steep liquor 1% (v/v)

B: Yeast extract 2% (w/v)

C: Corn steep liquor 1% (v/v) + Yeast extract 2% (w/v)

Aisaka 등⁸⁾은 *Rhizopus japonicus*의 lipase 생산에는 poly peptone이 가장 좋고, 다음으로 yeast extract가 좋다고 보고하였

으며, 정¹⁸⁾은 *Geotrichum candidum*의 최적 유기 질소원으로 soybean meal이 좋다고 보고하였다. 그러나 J-19 균주는 corn steep liquor와 yeast extract가 유기 질소원으로 가장 좋았고, 단독 첨가 보다는 혼합 첨가에 의하여 lipase 생산이 더욱 증가되었다. 따라서 이후의 실험은 유기 질소원으로 corn steep liquor 1% (v/v)와 yeast extract 2% (w/v)를 혼합 첨가하여 행

하였다.

5) 무기 염류의 영향

Lipase 생산에 미치는 각종 무기 염류의 영향을 검토한 결과는 Fig. 9에 나타내었다.

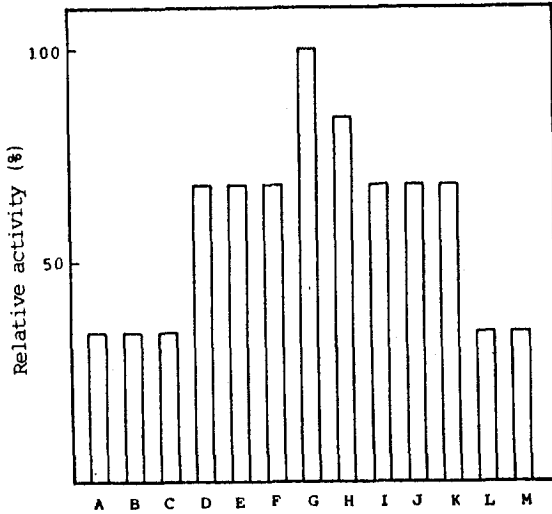


Fig. 9. Effect of mineral salts on the production of lipase.

- | | | |
|-------------------------|---------------|-------------|
| A: K_2HPO_4 | B: $CoSO_4$ | C: $FeSO_4$ |
| D: $NaCl$ | E: $CaCO_3$ | F: $MnCl_2$ |
| G: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | H: KH_2PO_4 | I: $CaCl_2$ |
| J: KCl | K: $BaCl_2$ | L: $CuSO_4$ |
| M: $ZnCl_2$ | | |

Fig. 9에서 보는 바와 같이 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가 하였을때 lipase 생산이 가장 높게 나타났다. 또한 lipase 생산에 적당한 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도를 검토한 결과(Fig.10) 0.1% (w/v) 일때 가장 높게 나타났다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 다음으로 lipase 생산이 좋은 KH_2PO_4 의 농도를 검토한 결과(Fig. 11), 0.1(w/v)일때 가장 높게 나타났다. 한편, 기본 배지의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 K_2HPO_4 를 혼합 첨가한 것이 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 KH_2PO_4 를 단독이나 혼합 첨가한 것보다 더 높게 나타났다.

(Fig.12). 따라서 이후의 실험은 lipase 생산 용 액체배지에 무기 염류로서 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%(w/v)와 K_2HPO_4 0.2%(w/v)를 혼합 첨가하여 행하였다.

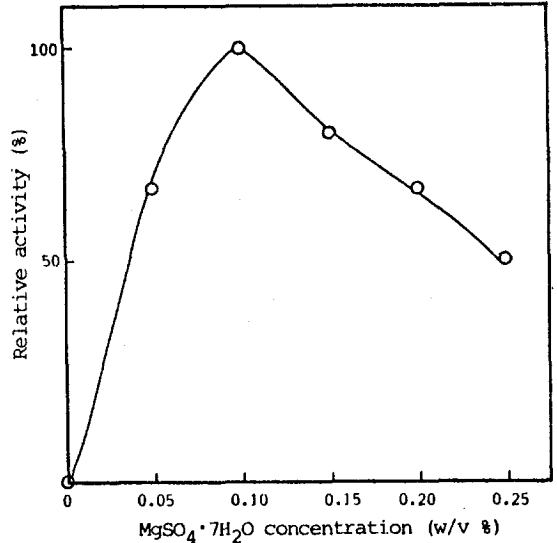


Fig. 10. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on the production of lipase.

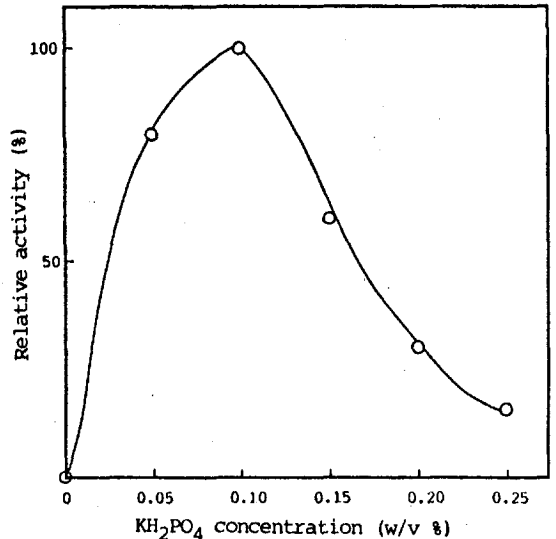


Fig. 11. Effect of KH_2PO_4 concentration on the production of lipase.

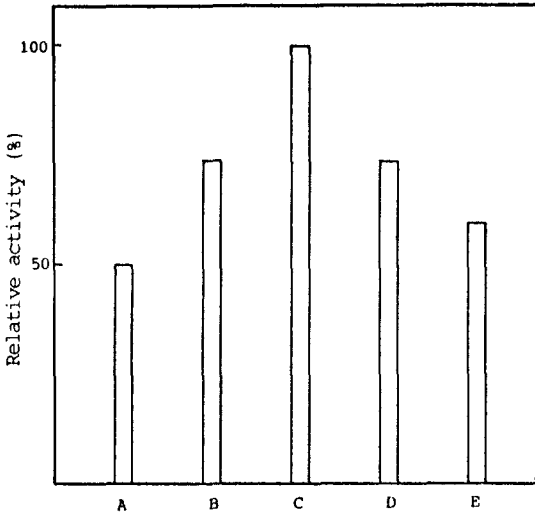


Fig. 12. Effect of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the production of lipase.

- A: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (w/v)
 B: KH_2PO_4 0.1% (w/v)
 C: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (w/v) + K_2HPO_4 0.2% (w/v)
 D: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (w/v) + KH_2PO_4 0.2% (w/v)
 E: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (w/v) + KH_2PO_4 0.1% (w/v)

정^{9,18)}은 *Rhizopus japonicus*와 *Geotrichum candidum*의 lipase 생산에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 K_2HPO_4 의 혼합 무기 염류가 적당하다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 사용한 J-19 균주와 같은 결과를 보여주었다.

6) Soybean oil의 영향

Lipase 생산에 미치는 soybean oil의 영향을 검토한 결과를 Fig.13에 나타내었다. Fig.13에서 보는 바와 같이 soybean oil 농도는 1.5% (v/v)를 첨가 하였을때 lipase 생산이 가장 높게 나타났다.

정¹⁸⁾은 olive oil, soybean oil 및 coconut oil의 첨가에 의하여 lipase 생산이 증가되었으며, 1% olive oil 첨가시 lipase 생산이 가장 좋았다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 soybean oil만을 검토한 결과, 정¹⁸⁾이 보고한 농도와 유사한 값

을 나타내었다.

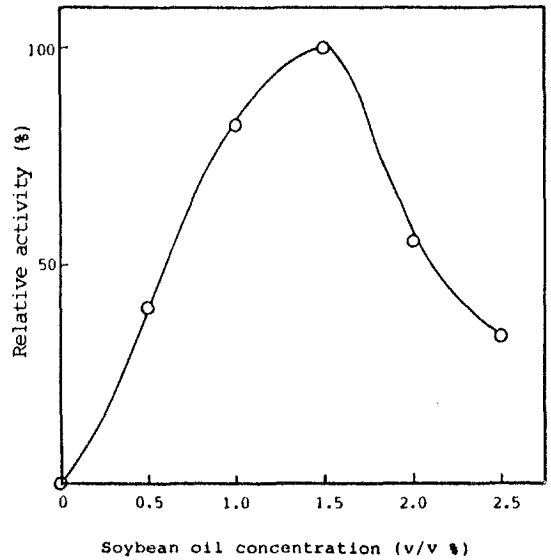


Fig. 13. Effect of soybean oil concentration on the production of lipase.

이상의 결과로부터 J-19 균주의 lipase 생산 최적 배지조성을 Table 3에 나타내었으며 이 배지를 J-medium이라 명명하였다.

Table 3. Composition of the optimum medium for lipase production.

Glycerin	2.0 % (w/v)
Corn steep liquor	1.0 % (v/v)
Yeast extract	2.0 % (w/v)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 % (w/v)
K_2HPO_4	0.2 % (w/v)
Soybean oil	1.5 % (v/v)
LAS*	0.1 % (w/v)
pH 10.0 (with Na_2CO_3)	

*LAS: linear alkylbenzene sulfonate

7) 희분 배양

Table 3에 나타낸 J-medium과 분리용

액체배지를 사용하여 회분 배양한 결과는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 J-medium이나 분리용 액체배지 모두 1일 이후 부터 lipase 생산이 시작되었으며, 3일에서 최대 생산을 나타내었다. pH변화는 J-medium이나 분리

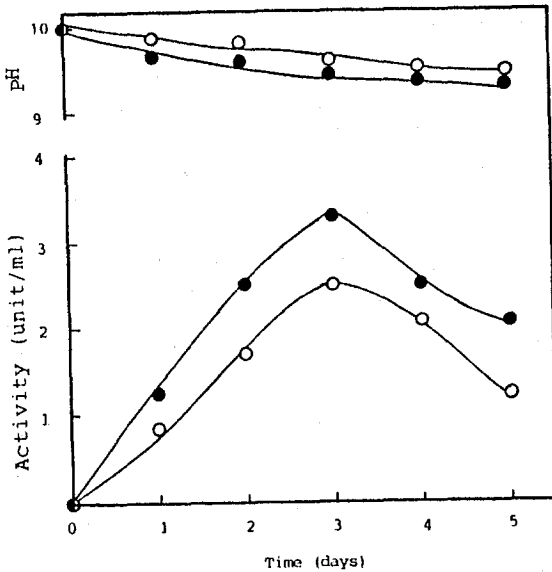


Fig. 14. Time course of lipase production.

● : J-medium
○ : Basal medium

용 액체배지 모두 pH 10.0에서 배양시간에 따라 pH 9.5로 점차 감소하였다. 이는 lipase가 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 지방산을 생성하는 이외에 대사산물인 유기산에 의하여 pH가 감소하였을 것으로 생각된다. 분리용 액체배지와 J-medium에서 3일 배양하였을 경우 분리용 액체배지에서는 2.5 units/ml, J-medium에서는 3.3 units/ml로 약 1.3배 lipase 생산이 증가한 것을 알 수 있었다.

IV. 결 론

토양으로부터 alkali 내성 및 세제 내성인 lipase 생산균을 분리하여 lipase 생산

의 최적 배지조성 검토를 행하였다. J-19균주의 lipase 생산을 위한 최적 배지조성은 glycerin 2.0% (w/v), corn steep liquor 1.0% (v/v), yeast extract 2.0% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% (w/v), K_2HPO_4 0.2% (w/v), soybean oil 1.5% (v/v), LAS (linear alkylbenzene sulfonate) 0.1% (w/v)이었으며 온도는 25°C 배양시간은 3일이었다. J-medium과 분리용 액체배지에서 J-19균주의 lipase 생산성을 비교 검토한 결과 J-medium에서 3.3 units/ml로 분리용 액체배지에서의 2.5 units/ml보다 1.3배 증가를 나타내었다. 이상의 lipase 생산 최적 배양조건 검토 결과를 기초로 하여 앞으로 lipase 분리 정제에 관한 연구를 진행하려고 한다.

참 고 문 헌

1. Shahani, K. M.; Enzymes in Food Processing, G. Reed, (2nd. ed.) Academic Press, N.Y., p. 181(1975)
2. Whitaker, J.R.; Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, Inc., N.Y., p. 481 (1972)
3. Shahani, K.M., Arnold, R.G., Kilara, A. and Dwivedi, B.K.; *Biotech. Bioeng.*, 18, 891 ~ 907(1976)
4. Seitz, E.W.; *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 51, 12 ~ 16(1974)
5. Nelson, J. H.; *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 49, 559 ~ 562 (1972)
6. Eitenmiller, R.R., Vakil, J.R. and Shahani, K.M.; *J. Food Sci.*, 35, 130 ~ 133(1970)
7. Nagaoka, K. and Yamada, Y.; *Agric Biol. Chem.*, 33, 986 ~ 993(1969)

8. Aisaka, K. and Terada, O.; *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2125 ~ 2129 (1979)
9. 정만재 ; 한국 식품과학회지 8, 33 ~ 41 (1976)
10. Mencher, J. R. and Alford, J. A. ; *J. Gen. Microbiol.*, 48, 317 ~ 328 (1967)
11. Lu, J. Y. and Liska, B. J. ; *Appl. Microbiol.*, 18, 104 ~ 107 (1969)
12. Uyeda, M., Hirotsu, M., Itonaga, M., Urata, S., Suzuki, K. and Shibata, M. ; *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2739 ~ 2746 (1983)
13. Watanabe, N., Ota, Y., Midoda, Y. and Yamada, K. ; *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1353 ~ 1358 (1977)
14. Kokusho, Y., Machida, H. and Iwasaki, S. ; *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1159 ~ 1164 (1982)
15. Yamada, K., Ota, Y. and Machida, H. ; *J. Agric. Chem. Soc.*, 36, 860 ~ 864 (1962)
16. Bergmeyer, H. U. ; *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, (2nd. ed) Academic Press, N. Y. p. 815 (1974)
17. Alford, J. H. and David, B. G. ; *J. Appl. Bact.*, 37, 571 ~ 581 (1974)
18. 정만재 : 충북대학 논문집 8, 163 ~ 171 (1974)