

Pseudomonas sp. S4-14가 생산하는 Alkaline Lipase의 정제 및 효소학적 성질

박상호 · 최수철 · 이준식¹ · 성낙계*

경상대학교 식품공학과, ¹한국과학기술원 생물공학과

Purification and Enzymatic Properties of Alkaline Lipase from the *Pseudomonas* sp. S4-14

Park, Sang-Ho, Soo-Chul Choi, Joon-Shick Rhee¹ and Nack-Kie Sung*

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Korea

¹Department of Biotechnology, KAIST, Taejon 305-701, Korea

Abstract — The strain S4-14 which produced alkaline lipase and had resistance against linear alkylbenzene sulfonate was isolated from soil or water samples. The isolated strain S4-14 was identified a species belong to *Pseudomonas*. Alkaline lipase secreted by *Pseudomonas* sp. S4-14 was purified by ammonium sulfate precipitation procedure followed by DEAE-Cellulose, DEAE-Sepharose and gel filtration chromatographies with 995.15 U/mg protein and 16.1% yield. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 65,000 dalton by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the purified enzyme was 10.5 and 45°C, respectively. The enzyme was stable at 45°C for 1 hr and in a pH range from 8.0 to 12.0 for 24 hr at 4°C. The activity of lipase was enhanced by Ca²⁺ while inhibited strongly by Pb²⁺, Zn²⁺ or Fe³⁺. The activity of lipase was inactivated about 50~60% in the presence of 50 mg/l linear alkylbenzene sulfonate, α -olefin sulfonate, alcohol ethoxylate or perborate.

Lipase(glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3)는 tri-glyceride를 가수분해하여 glycerol과 지방산의 생성을 촉진한다(1, 2). Lipase는 동·식물 및 미생물에 널리 분포되어 있고, 또한 그 source에 따라 특성이 다양하다(3). 이러한 lipase의 산업적인 응용분야는 식품에서의 향기 증진, 세제성분, 의약품, 폐수처리, biotransformation 등에 이용된다(4). 특히 1970년대 이후 세제산업에 lipase를 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다(5-11).

Lipase가 세제성분으로서 이용되기 위해서는 알칼리 내성과 세제성분들에 대한 안정성을 가지고 있어야 한다. 미생물 유래의 alkaline lipase에 대한 연구는 Watanabe 등(12), Kokusho 등(13), Lee 등(14)이 보고하였다. 또한, Shin 등(15)은 알칼리 내성 및 linear alkylbenzene sulfonate(LAS) 내성인 lipase 생산균주의 동정과 lipase의 효소학적 성질을 검토하였으며 정(16)도 alkaline lipase 생산균주를 분리동정한 뒤

효소정제 후에 상품화된 lipolaseTM와 비교연구를 하였다.

본 연구에서는 알칼리 내성이면서 detergent 내성인 lipase를 생산하는 균주를 분리동정하고 이 균주가 생산하는 효소를 정제하여 효소학적 성질을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리

지방함량이 높은 토양을 수집하여 생리식염수에 현탁시킨 다음 분리용 고체배지(16)에 평판하여 30°C에서 72시간 배양하여 선별한 균주를 액체배지(16)에서 72시간 배양하여 얻은 상정액으로 효소활성을 측정하였고, 상정액에 LAS를 50 mg/l 첨가하여 30°C에서 20분 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하여 활성이 크게 저해되지 않는 균주를 최종선정하였다.

균주의 동정

분리된 균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 및 당

Key words: Alkaline lipase, resistance against linear alkylbenzene sulfonate

*Corresponding author

자화성을 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(17), 일반 미생물학 실험(18)과 API 20NE 동정 kit를 이용하여 조사한 뒤 그 결과들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(19)에 준하여 동정하였다.

효소활성 측정

Kwon 등(20)의 방법을 변형하여 활성을 측정하였다. 10% gum arabic 45 ml과 0.1 M glycine-NaOH buffer(pH 10.0) 100 ml(20 mM CaCl₂, 0.6 M NaCl 함유)를 혼합한 뒤 olive oil 5 ml을 첨가하여 유화를 시켜서 기질로 사용하였다. 기질 5 ml을 시험관에 넣어 30°C에서 5분간 방치한 후 효소액 1 ml을 넣고 30°C에서 200 rpm으로 진탕하면서 1시간 동안 반응시켰다. 6 N HCl 1 ml을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 효소와 기질 혼합물의 유화가 파괴될 때까지 100°C에서 끓인 다음 isooctane 5 ml을 첨가하여 90초 동안 vortexing을 하였고, 원심분리에 의하여 시험관의 상층액(isooctane)을 회수한 뒤 발색시약(pyridine을 이용하여 pH 6.1로 조정된 5% cupric acetate)을 1 ml 첨가하여 90초 동안 vortexing 하였다. 발색된 isooctane을 분리하여 715 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 지방산을 정량하였다. lipase의 1 unit는 1분 동안에 1 μM의 유리지방산을 생산하는 효소양으로써 나타내었다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford의 dye binding assay 방법(21)에 의하여 595 nm에서 흡광도로써 나타내었으며 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

조효소액의 조제

균주를 효소생산 배지(1% yeast extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄, 0.5% fructose, pH 10.0)에서 30°C, 72시간 배양하여 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 회수하였다. 여기에 ammonium sulfate를 70% 포화시켜 4°C에서 12시간 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min)하여 얻은 침전물을 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 투석하여 동결건조하여 농축시킨 것을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

조효소액을 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 팽윤화시킨 DEAE-cellulose column(2.5×30 cm, flow rate 2 ml/min)에 흡착시킨 뒤 NaCl로 농도구배시켜

용출시킨 뒤 효소활성이 있는 분획을 모아 동일 buffer로 팽윤화시킨 DEAE-sepharose column(1×15 cm, flow rate 0.5 ml/min)에 흡착시켰다. 동일한 방법으로 농도구배시켜 활성이 있는 분획을 모아 Centricon 10(Amicon)으로 농축한 뒤 fast performance liquid chromatography(FPLC)를 이용하여 0.5 ml/min의 flow rate로 gel filtration을 하여 효소활성이 있는 분획을 모았다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(22)의 방법에 따라 running gel과 stacking gel을 각각 12%와 4%로 하여 30 mA에서 행하였다. 전기영동한 후 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 염색시킨 후 탈색용액(40% methanol : 10% acetic acid)으로 탈색시켰다.

결과 및 고찰

균주의 분리와 동정

고체배지에서 lipase 생성 미생물의 탐색은 흔히 tributyrin을 기질로 이용하였으나(23) 이것은 알칼리 조건에서 자가 가수분해되기 때문에 정(16)의 방법에 준하여 tributyrin 대신에 tricaprilyn을 이용하여 colony 주위에 투명한이 형성되는 균주를 1차 분리한 뒤 olive oil을 함유한 액체배지(16)에서 배양하여 얻은 상층액에 LAS를 첨가하여 효소활성이 크게 저해되지 않는 균주를 최종 선정하여 S4-14라 명명하였다.

분리된 S4-14의 전자현미경 사진을 Fig. 1에 나타내었고 여러가지 생화학적 특성은 Table 1과 같으며



Fig. 1. Photograph of scanning electron microscope of S4-14.

Bar equals 1.24 μm.

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain S4-14

Characteristics	S4-14
Morphological characteristics	
Gram staining	-
Shape	Rod
Size	0.2~0.3×1.3~1.8 μm
Motility	Motile
Spore staining	-
Cultural characteristics	
Colony on nutrient agar	
Form	Functiform
Surface	Mucoid
Growth on MacConkey agar	+
Physiological characteristics	
NaCl tolerance for growth	9%
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	+
Nitrate reduction	-
Indole production	-
V-P test	-
Arginine hydrolase	+
Glucose acidification	-
Esculin hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
PNPG	-
(p-nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase)	
Cytochrome oxidase	+
Assimilation of sugars	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	-
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	-
Maltose	-
Gluconate	+
Caprate	-
Adipate	-
Malate	+
Citrate	-
Phenylacetate	-

그 결과 *Pseudomonas* 속으로 판단되어 *Pseudomonas* sp. S4-14로 동정되었다.

효소의 정제

Pseudomonas sp. S4-14를 배양하여 얻은 alkaline lipase를 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose column chromatography 및 DEAE-sepharose co-

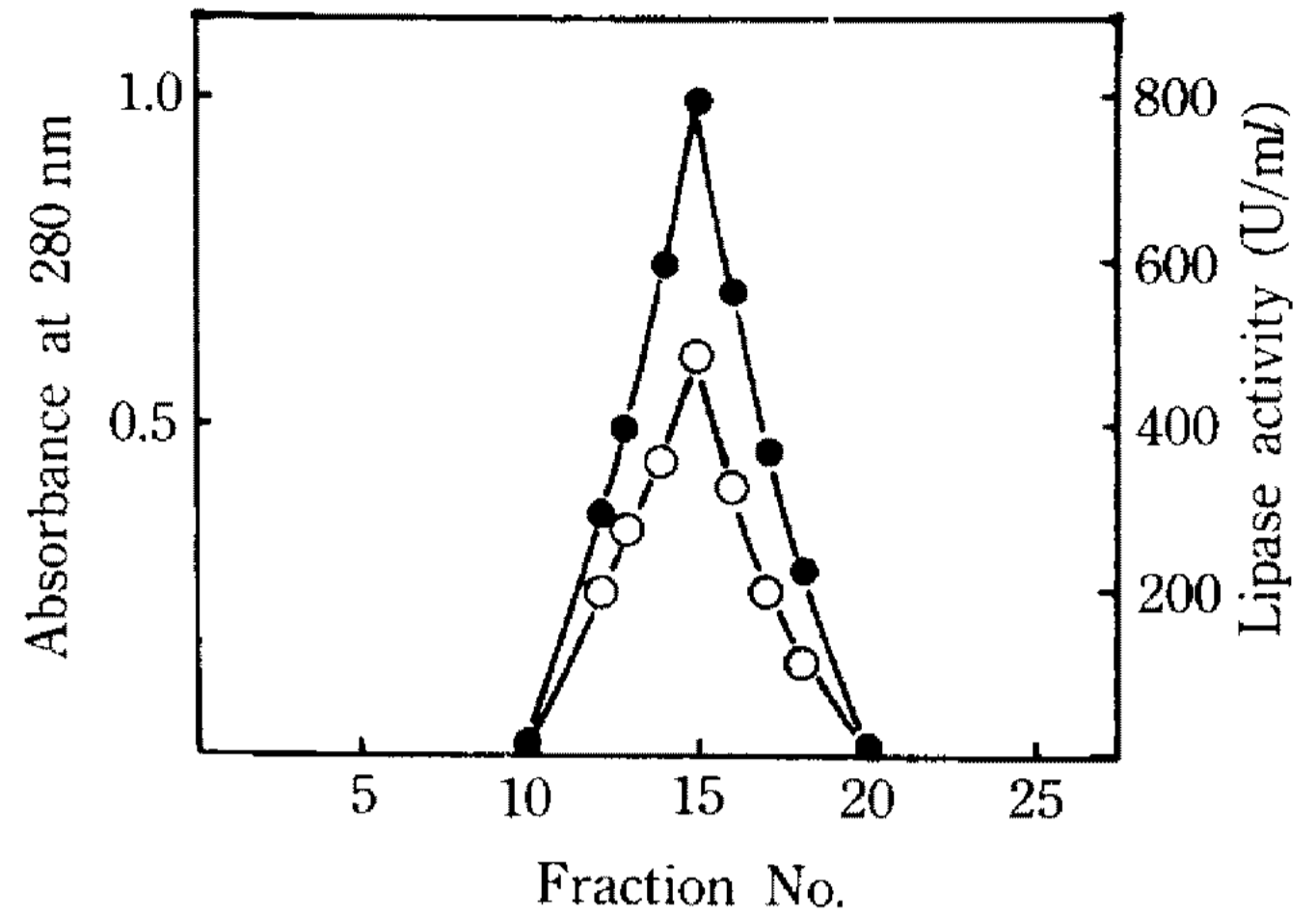


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of lipase on Superose 6 column.

Elution was carried out with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Flow rate: 0.2 ml/min, Fraction: 1 ml/tube, ○-○: protein, ●-●: activity

lumn chromatography의 과정을 거쳐 FPLC를 이용하여 Superose 6 gel filtration한 결과 Fig. 2에서와 같이 12~18번까지의 분획에서 lipase 활성을 가진 단일 peak를 얻었다.

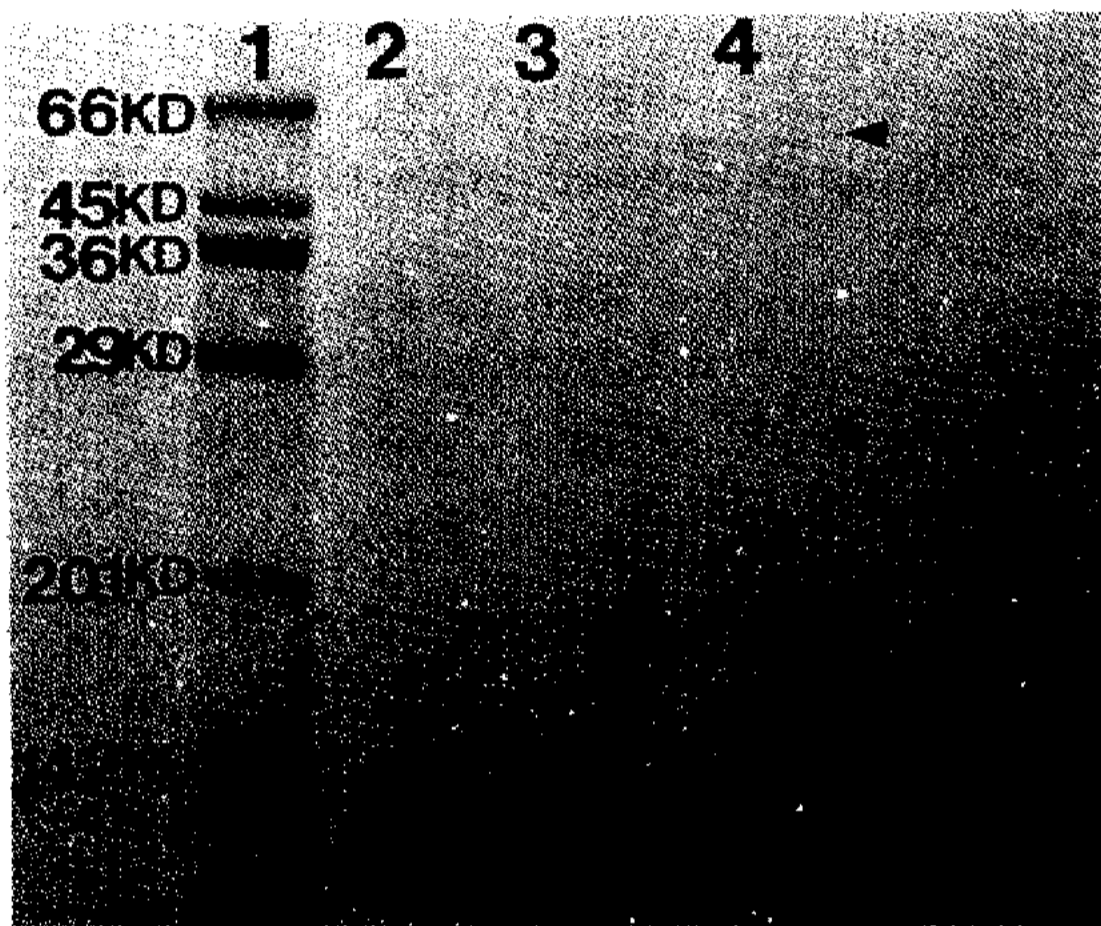
이러한 정제과정들을 Table 2에 요약하였는데 lipase의 비활성도는 992.15 U/mg이었으며 수율은 16.1%, purity는 39.2배까지 증가되었다. 정제과정을 통해 분리된 효소를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 3에서와 같이 단일 band를 얻었으며 분자량은 약 65,000 dalton으로 추정된다. *Pseudomonas fragi* 22.39B(24)가 생산하는 lipase 분자량은 33,000 dalton, *Pseudomonas aeruginosa* JM-123(14)의 lipase 분자량은 56,000 dalton, *Pseudomonas* sp. J-19(15)의 분자량은 36,000 dalton, *Pseudomonas* sp.(25)의 분자량은 30,000 dalton이었는데 이들 효소의 분자량과는 다소 상이하였으나 Baillargeon 등(26)이 *Geotrichum candidum* NRRL Y-553에서 분리한 lipase 분자량(64,000 dalton)과는 본 효소와 유사하였다.

효소의 특성

온도의 영향: 효소와 기질의 반응최적온도와 효소의 온도안정성을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 온도를 각각 달리하여 기질과 효소액을 반응시켜 최적온도를 조사한 결과 효소반응의 최적온도는 45°C 이었는데 이러한 결과는 Isobe 등(27)이 보고한 *Penicillium cyclopium*과 Lee 등(14)이 보고한 *Pseudomonas aeruginosa* JM-123의 lipase 반응최적온도인 40°C와는 유사하였지만 Yamamoto 등(25)과 Shin 등(15)이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 최적온도인 60°C, 30

Table 2. Summary of purification procedure

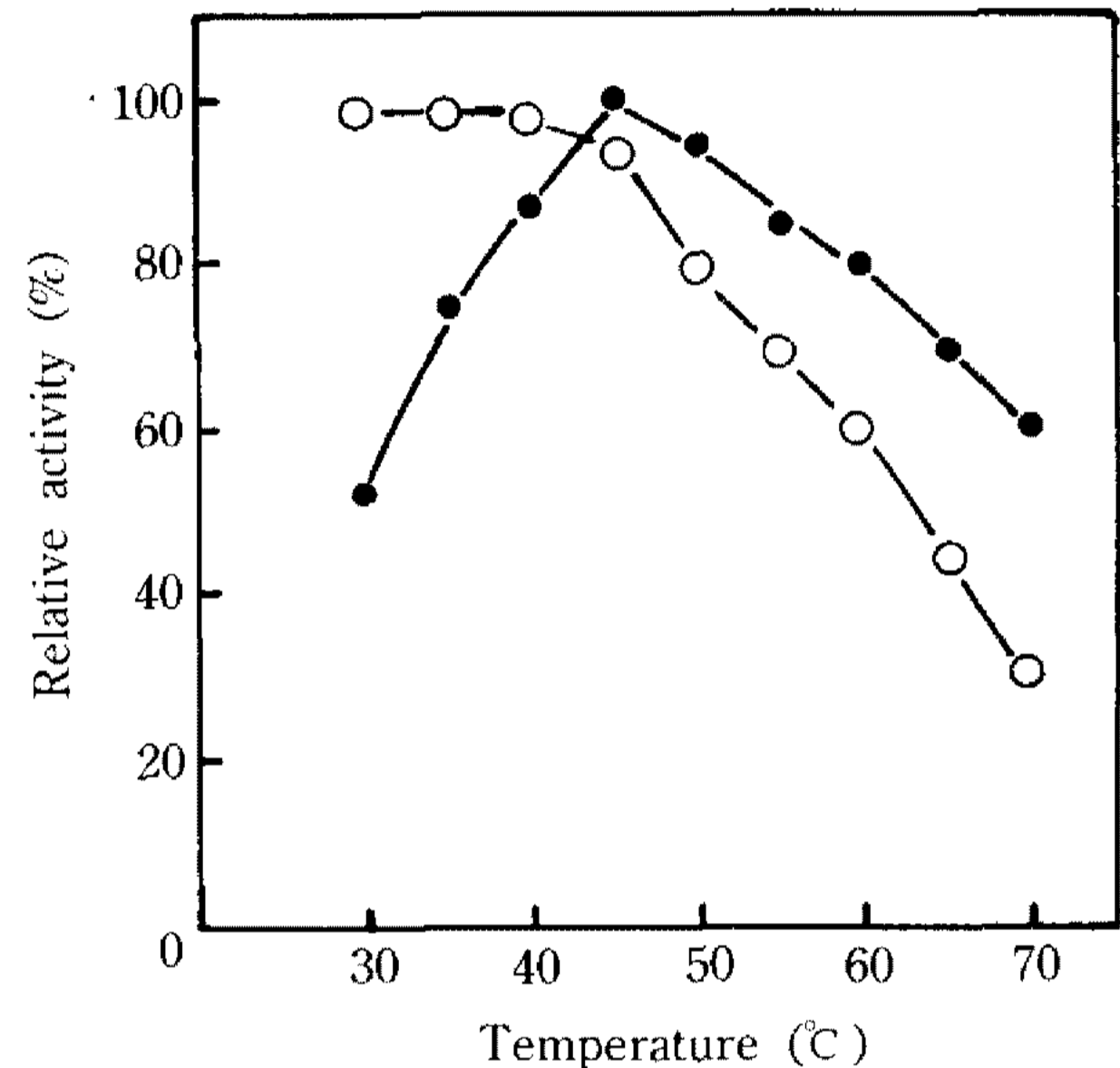
	Total protein (mg)	Total activity (u)	Specific activity (u/mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Culture	685.0	17.337	25.31	100.0	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	154.0	9.782	63.52	56.4	2.51
DEAE-cellulose	10.5	7.627	726.04	44.0	28.70
DEAE-sepharose	5.3	4.775	901.03	27.5	35.60
Superose 6	2.8	2.778	992.15	16.1	39.20

**Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of alkaline lipase purified by various steps.**

Proteins were electrophoresed in discontinuous gel system consisting of 4% stacking gel and 10% separating gel. After running at 30 mA, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1: standard molecular weight, Lane 2: enzyme purified by DEAE-cellulose, Lane 3: enzyme purified by DEAE-Sepharose, Lane 4: enzyme purified by gel filtration

℃와는 약간 상이하였다. 그리고 30℃~70℃까지 온도를 각각 달리하여 1시간 동안 정제효소를 처리한 후 잔존활성을 측정하여 온도안정성을 조사한 결과 50℃까지 효소활성의 80%를 유지하였으나 60℃부터는 활성이 급격히 떨어졌다.

pH의 영향: 효소와 기질의 반응최적 pH와 효소의 pH 안정성을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 기질의 pH를 달리한 뒤 효소액과 45℃에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하여 최적 pH는 10.5였다. Yamamoto 등(25)이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 최적 pH는 7.0이었으며 Nishio 등(24)이 보고한 *Pseudomonas fragi* 22.39B와 Lee 등(14)이 보고한 *Pseudomonas aeruginosa* JM-123의 최적 pH는 9.0이었고 *Pseudomonas aeruginosa* YS-7(28)은 7.0이었는데 이들 효소보다는 pH가 높았다. 또한 Shin 등(15)이 보고한 *Pseudomonas* sp. J-19의 최적 pH는 10.0이었

**Fig. 4. Effect of temperature on the activity and stability of lipase.**

The lipase activity was measured by standard assay method at each temperature. For thermal stability, the enzyme was treated at each temperature for 1 hr. After heat treatment, the residual activity of lipase was measured by standard assay method. ●-●: Optical temperature, ○-○: Thermal stability

는데 본 효소와 유사하였다. 그리고 효소액에 pH 5.0~13.0까지의 완충액을 이용하여 pH를 달리한 후 4℃에서 24시간 처리한 후 잔존활성을 측정하여 pH 안정성을 조사하였는데 pH 8.0~12.0까지의 알칼리성 부위에서는 90% 이상 활성을 유지하였다.

금속이온의 영향: 정제효소액에 각종 금속이온의 최종농도를 1 mM되게 하여 45℃에서 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 2가 양이온 Ca²⁺에 의해 활성이 약간 증가되었으나 Pb²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺에 의해 활성이 크게 저해되었다. Haas 등(29)이 보고한 *Rhizopus delemar*, Nishio 등(24)이 보고한 *Pseudomonas fragi*, Shin 등(15)이 보고한 *Pseudomonas* sp.에서도 Ca²⁺에 의해 활성이 증가되는 유사성을 보였다.

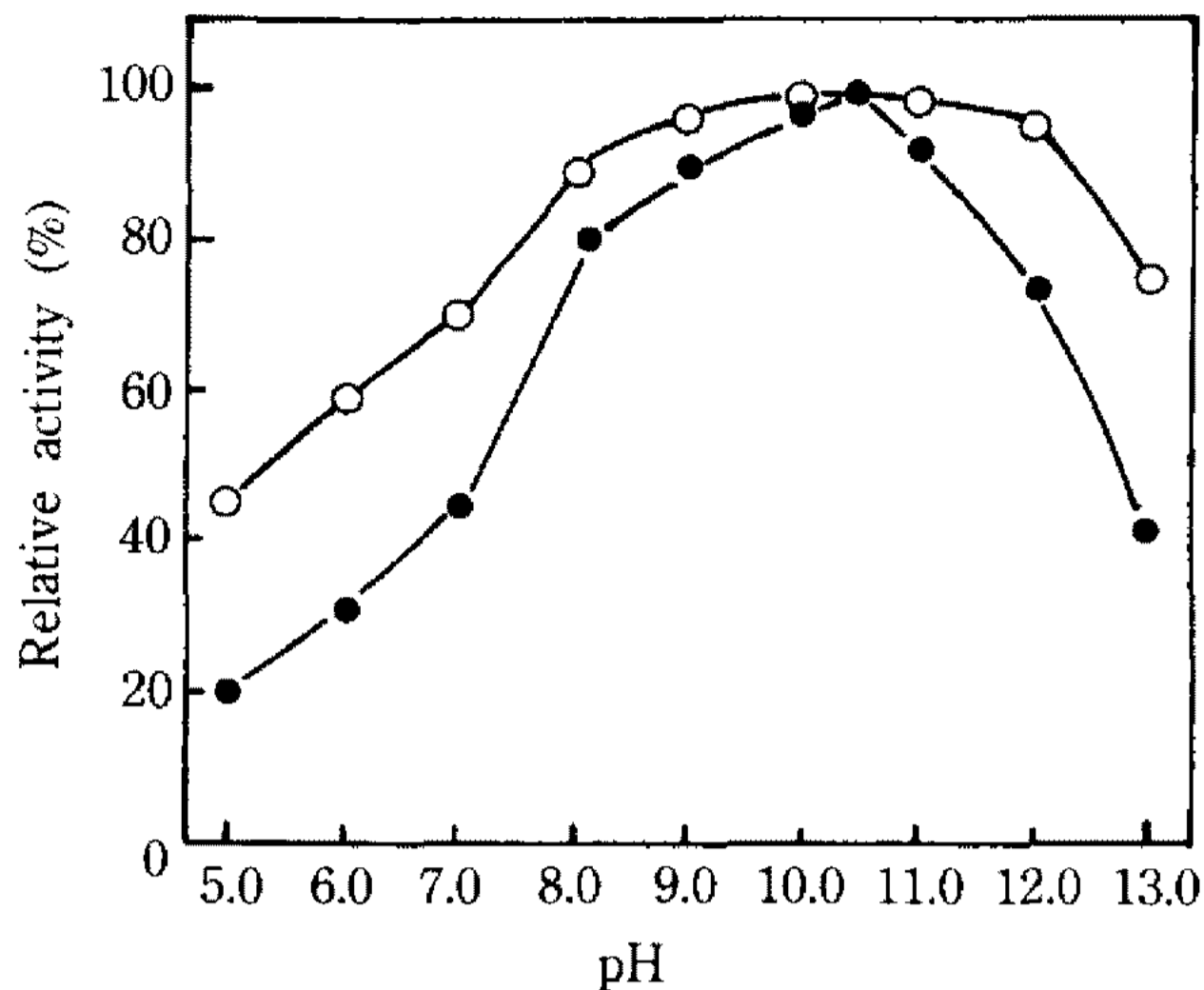


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of lipase.

The lipase activity was measured by standard assay method at each pH. For pH stability, the enzyme was treated at each pH for 24 hr at 4°C. The residual activity of lipase was measured by standard assay method. Buffers used were 10 mM Mcllvaline buffer(pH 5.0~6.0), 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0~9.0), 10 mM Glycine-NaOH buffer(pH 10.0), 10 mM Phosphate buffer (pH 11.0), 10 mM KCl-NaOH buffer(pH 12.0~13.0).

Table 3. Effect of metal ions on activity of the purified lipase

Metal ion (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
K ⁺	87
Na ⁺	100
Pb ²⁺	20
Ca ²⁺	107
Mg ²⁺	95
Zn ²⁺	46
Co ²⁺	80
Cu ²⁺	63
Mn ²⁺	78
Fe ²⁺	74
Fe ³⁺	49

계면활성제의 영향 : 정제효소액에 최종농도를 달리하면서 세제의 계면활성제로 사용하는 LAS, α -olefin sulfonate(AOS), alcohol ethoxylate(AE-7)과 perborate등을 첨가하여 45°C에서 20분 동안 방치한 후 기질과 반응시켜 잔존활성을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 계면활성제와 표백제에 대해 50 mg/l 정도에서 약 50~60% 정도의 실활을 나타냈다. lipolaseTM와 분리균주가 생산하는 효소와의 계면활성제에

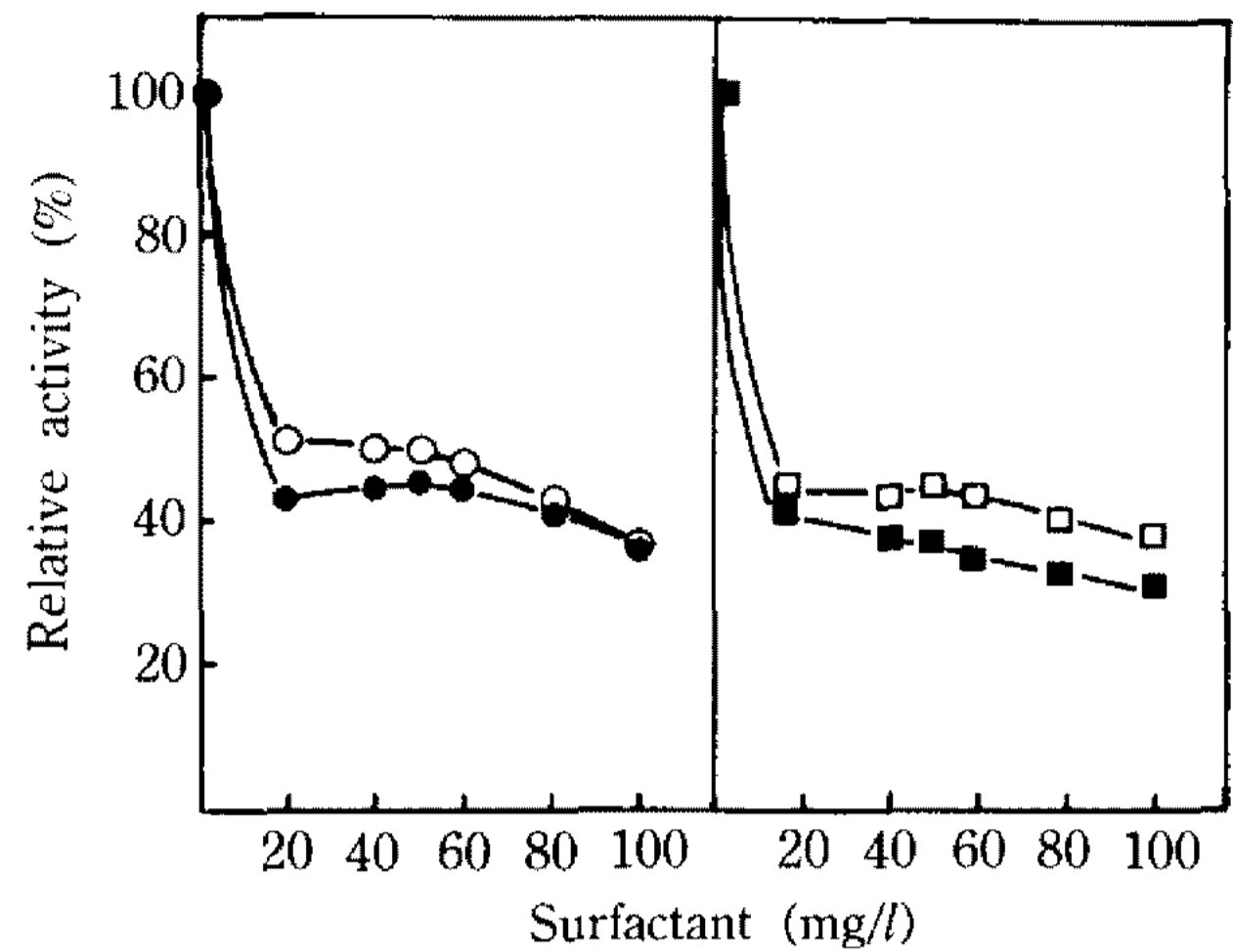


Fig. 6. Effect of surfactant on the stability of lipase. After incubation at 45°C, pH 10.0 for 20 min with LAS, AOS, AE-7 and perborate, remaining activity was measured by standard assay method. ○-○: AOS, ●-●: LAS, □-□: perborate, ■-■: AE-7

대한 영향을 비교한 정(16)의 보고에서는 분리정제한 효소가 50 mg/l의 LAS에서 80%, lipolaseTM은 85% 실활되었고, AOS의 경우 두 효소 모두 60%가 실활된 반면 AE-7에서는 거의 실활되지 않았다. 그러나 본 효소에서는 LAS, AOS, AE-7에 대해 각각 55%, 50%, 63%의 실활을 나타내어 다소 상이한 결과를 나타내었다.

요 약

각종 균원시료로부터 LAS에 대해 내성이 있는 alkaline lipase를 생산하는 균주를 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas* sp. S4-14라 명명하였다. *Pseudomonas* sp. S4-14를 배양하여 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose, DEAE-sepharose 및 gel filtration의 과정을 거쳐 정제하였으며 그 결과 비활성도는 992.15 U/mg protein, 수율은 16.1%이었다. 정제효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 확인되었으며 분자량은 약 65,000 dalton이었다. 정제된 alkaline lipase의 최적 pH는 10.5였으며, 최적온도는 45°C였다. pH 안정성 범위는 8.0~12.0이었고 온도안정성은 45°C에서 1시간 동안 안정하였으며 50°C에서는 80% 활성을 유지하였다. alkaline lipase의 금속이온에 대한 영향을 검토한 결과 Pb²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺에 의해 활성이 크게 저해되었고 Ca²⁺에 의해 활성이 약간 증가되었다. 계면활성제(LAS, AOS, AE-7)와 표백제(perborate)에 대한 영향을 조사한 결과에서는 50 mg/l 정도에서 약 50~60% 정도가 실활되었다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 한국과학재단의 특정기초연구 과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Brokerhoff, H. and R.G. Jensen. 1974. *Lipolytic enzymes*, Pp. 1. Academic Press, New York.
2. 武内忠男, 小川和朗. 1980. *Lipase*. 新酵素組職化學, Pp. 240-254. 朝倉書店.
3. Antonian, E. 1988. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of Lipases. *Lipids*. **23**: 1101-1106
4. Borgstrom, B. and H.L. Brockman. 1984. *Lipases*, Pp. 443-466. Elsevier Sci. Amsterdam.
5. Aaslyng, D., E. Gormsen, and H. Malmos. 1991. Mechanistic studies of protease and lipase for the detergent industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **50**: 321-330.
6. Andree, H., W.R. Muller, and R.D. Schmid. 1980. Lipase as detergent components. *J. Appl. Biochem.* **2**: 218-229.
7. Fujii, T., T. Tatara, and M. Minagawa. 1986. Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency. I. *J. Amer. Oil. Soc.* **63**: 796-799.
8. Tatara, T., T. Fujii, T. Kawase, and M. Minagawa. 1985. Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency. II. *J. Amer. Oil. Soc.* **62**: 1053-1058.
9. Hasimoto, T., T. Fujii, T. Kawase, and M. Minagawa. 1985. Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency. III. *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.* **34**: 606-611.
10. Hasimoto, T., T. Fujii, and M. Minagawa. 1986. Studies on applications of lipolytic enzymes in detergency. IV. *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.* **35**: 293-298.
11. Umehara, K., Y. Masago, M. Mukaiyama, and O. Okumura. 1990. Behavior of alkaline lipase on detergency. *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.* **39**: 321-326.
12. Watanabe, N., Y. Ota, Y. Midoda, and K. Yamada. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1353-1358.
13. Kokusho, Y., H. Machda, and S. Iwasaki. 1982. Studies on alkaline lipase: Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1159-1164.
14. Lee, J.M., R.S. Kim, B.O. Kim, Y.D. Park, and I.N. Jin. 1993. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain producing an extracellular alkaline lipase catabolically regulated by glucose and purification of the lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 239-246.
15. Shin, W.C., K.S. Jeong, J.H. Yu, and J.H. Yu. 1991. Purification and properties of alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. J-19. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 57-63.
16. 정수민. 1993. 호알칼리성 리파제를 분비하는 미생물의 분리 및 정제한 효소의 특성. 한국과학기술원 석사학위 논문.
17. Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
18. 홍순우, 최영길. 1978. 일반 미생물학 실험. 일신사.
19. Krieg, R.N. and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
20. Kwon, D.Y. and J.S. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil. Soc.* **63**: 89-92.
21. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
22. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
23. Jensen, R.G. 1983. Detection and determination of lipase activity from various sources. *Lipids* **18**: 650-657.
24. Nishio, T., C. Takahide, and K. Minoru. 1987. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 181-186.
25. Yamamoto, K. and N. Fujiwara. 1988. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 3015-3021.
26. Baillargeon, M.W. and S.G. McCarthy. 1991. *Geotrichum candidum* NRRLY-553 lipase: Purification characterization and fatty acid specificity. *Lipids* **26**: 831-836.
27. Isobe, K., T. Akiba, and S. Yamaduchi. 1988. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 41-47.
28. Shabtai, Y. and N. D. Mishne. 1992. Production, purification and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 174-180.
29. Haas, M.J., D.J. Chichowicz, and D.G. Bailey. 1992. Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids* **27**: 571-576.

(Received April 9, 1994)