

## 유류오염지역에서 분리한 *Acinetobacter* sp. B2로부터의 Lipase 정제 및 특성

손성화 · 박경량\*

한남대학교 이과대학 미생물학과

대전 근교의 유류로 오염된 토양으로부터 유류를 분해하는 332개의 세균 콜로니를 분리한 후 이 중 lipase 활성이 우수한 한 균주를 최종 선별하여 생리생화학적 조사와 16S rRNA 염기서열분석 등을 통하여 동정한 결과 *Acinetobacter* sp. B2로 확인되었다. 최종 선별된 *Acinetobacter* sp. B2는 trehalose, mannitol을 제외한 다양한 당을 이용하였고, kanamycin, streptomycin, tetracycline, spectinomycin의 항생제에 대해서 약한 내성을, 그리고 Ba, Li, Mn, Al, Cr, Pb 등의 중금속에 대해서는 mg/ml 단위까지 강한 내성을 나타냈고 성장 최적 온도는 30°C로 확인되었다. *Acinetobacter* sp. B2에서 정제된 lipase의 분자량은 60 kDa이었고, 이 효소의 최적 온도와 pH는 각각 40°C와 pH 10이었다. 그리고 *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)를 가수분해하는데 필요한 활성화에너지는 4-37°C의 범위에서 2.7 kcal/mol 이었고, 60°C 이상의 온도에서는 불안정한 효소임이 확인되었다. 또 *p*NPP에 대한 이 효소의 Michaelis constant (*K<sub>m</sub>*)와 최대속도 상수 (*V<sub>max</sub>*) 값은 각각 21.8 μM과 270.3 μM min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> 이었고, 이 효소는 Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, EDTA, 2-mercaptoethanol에 의해 강하게 억제되었다.

**Key words** □ *Acinetobacter*, enzyme purification, lipase

산업의 발달로 원유의 사용이 지속적으로 증가되면서 그에 따른 환경오염문제가 날로 심화되고 있다. 일반적으로 원유는 방향족 탄화수소와 지방족 탄화수소 등 다양한 성분들이 혼합된 복합체로(12) 이들은 자연계에서 쉽게 분해되지 않고, 생태단계 농축 (biomagnification)되기 때문에 최종소비자인 인간에게 치명적인 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다(2). 따라서 독성이 적고 환경 친화적이며 생분해가 용이한 생물학적 처리 방법을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있고(5, 10), 이들 연구 중 특히 유류 분해에 필수적인 지질분해 효소 (lipolytic enzyme)의 특성을 밝히는 연구가 많이 진행되어 현재 지질분해 효소는 세제, 석유 화학, 식품 및 주류, 유지, 제지, 피혁, 화장품, 약품산업 등 광범위한 산업분야에서 사용되고 있다(27, 28).

지질분해 효소는 esterase [EC 3.1.1.1]와 lipase [triacylglycerol acyl hydrolase; EC 3.1.1.3]가 있으며 이들은 모두 carboxylic ester hydrolase [EC 3.1.1]에 속하면서 다양한 carboxylester를 가수분해하여 지방산을 생산한다. 그러나 esterase는 짧은사슬(short chain)의 지방산으로 구성된 수용성 기질을 가수분해하는 반면, lipase는 긴사슬(long chain)의 지방산으로 구성된 물에 녹지 않는 기질과 더 잘 반응한다. 이 차이는 lipase는 활성부위를 감싸고 있는 2차구조인 α-나선의 올리고펩티드 단위가 lid 구조를 가지고 있고 이 구조가 표면장력 활성을 나타내어 기질이 접근할 수 있도록 활성부위를 노출시키는데 반해(22), esterase는 이 구조가

없기 때문에 긴 사슬의 지방산에 작용하지 못하고 효소 구조에 따라 이용할 수 있는 기질도 달라지는 것으로 알려져 있다(7, 23, 27). 따라서 지질 분해에 더 효율적인 lipase의 특성을 밝히기 위해 *Acinetobacter calcoaceticus* (13)을 포함한 *Serratia marcescens* (32), *Pseudomonas luteola* (19), *Streptomyces cinnamonomeus* (29), *P. fluorescens* (4), *Staphylococcus epidermidis* (20) 등 다양한 세균의 lipase의 특성과 이들의 분비기작에 대한 연구가 진행된 바 있다.

본 논문은 다양한 용도로 사용되는 lipase를 산업적으로 활용하기 위한 연구의 일환으로, 유류 분해능이 뛰어난 *Acinetobacter* sp. B2를 자연계에서 분리하여 이 균주의 생리 생화학적 특성을 조사한 후, 이 세균의 최적 lipase 생성 조건을 확인하고 lipase 단백질을 정제하여 이 효소가 가지고 있는 최적 온도, 최적 pH, 열 안정성, 억제효과, *K<sub>m</sub>*값 등 다양한 생화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 분리 및 배지

대전 일원의 자동차 정비소, 세차장, 주유소, 폐차장 등으로부터 유류에 오염된 토양을 채취하여, 각각의 토양 1g을 멸균 생리식염수 100 ml이 들어 있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 그 현탁액을 2% crude oil이 단일 탄소 원료로 첨가된 bushnell-hass (0.02% magnesium sulfate, 0.002% calcium chloride, 0.1% monopotassium phosphate, 0.1% ammonium

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-629-7626, Fax: 042-629-8355  
E-mail: krpark@hannam.ac.kr

phosphate dibasic, 0.1% potassium nitrate, 0.005% ferric chloride, pH 7.0) 최소평판배지에 접종하고 2-3일 배양한 다음 단일 집락을 분리하였다. 분리된 세균집락을 2% crude oil이 단일 탄소원으로 첨가된 bushnell-hass 액체배지에 접종하여 30°C에서 전배양한 후 egg-yolk 고체배지 (1.5% egg-yolk emulsion(V/V), 1% sodium chloride, 0.3% beef extract, 0.5% peptone, pH 7.0)와 olive oil 고체배지 (2% olive oil(V/V), 0.04 mM rhodamine B, 1% sodium chloride, 0.3% beef extract, 0.5% peptone, pH 7.0)에 접종해 egg-yolk 고체배지에서는 세균집락 주위의 환이 크고, olive oil 고체배지에서는 장과장 자외선에서 세균집락 주위의 옐렌색 형광이 크고 성장이 우수한 균주를 육안으로 확인하여 최종적으로 하나의 균주를 선별하였다.

당 이용능을 조사하기 위해서는 busnell-hass 최소배지에 여러 종류의 당을 단일 탄소원으로 첨가하여 사용하였고 영양배지로는 LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH 7.0)를, 그리고 선별균주의 기질 이용능은 2×YT (1.6% bactotryptone, 1% yeast-extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 배지를 사용하여 결정하였다.

#### 생리, 생화학적 특성 조사

최종 선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (15)와 LWW's Organism Central (25) 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria (21)에 의거하여 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하고, 당 이용능, 증식속도, 항생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

#### 16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의 genomic DNA를 CTAB방법(30)으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기 서열을 조사하였다. 이때 선별 균주의 16S rDNA를 증폭하기 위해 forward primer 5-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'(27F)와 reverse primer 5-GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT-3' (1492R)를 사용하고 (BIONEX), 염기서열은 ABI model 310 (Applied Biosystem, U.S.A)을 사용하여 분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search(www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 비교, 분석하였다.

#### Lipase 활성 측정

100 ml LB배지를 함유한 500 ml 삼각 플라스크에 동일배지에서 배양한 전 배양액 1 ml를 접종하여 30°C에서 진탕 배양하면서 주기적으로 5 ml의 배양액을 취해 원심분리 (6,000×g, 10 min, 4°C)한 후 상등액과 세포를 각각 수확하여 상등액은 cell free lipase 측정에 사용하였고, 세포는 300 μl의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 현탁 시킨 후 2분간 파쇄 (output watts 14W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-Cell™, U.S.A.)후 원심분리

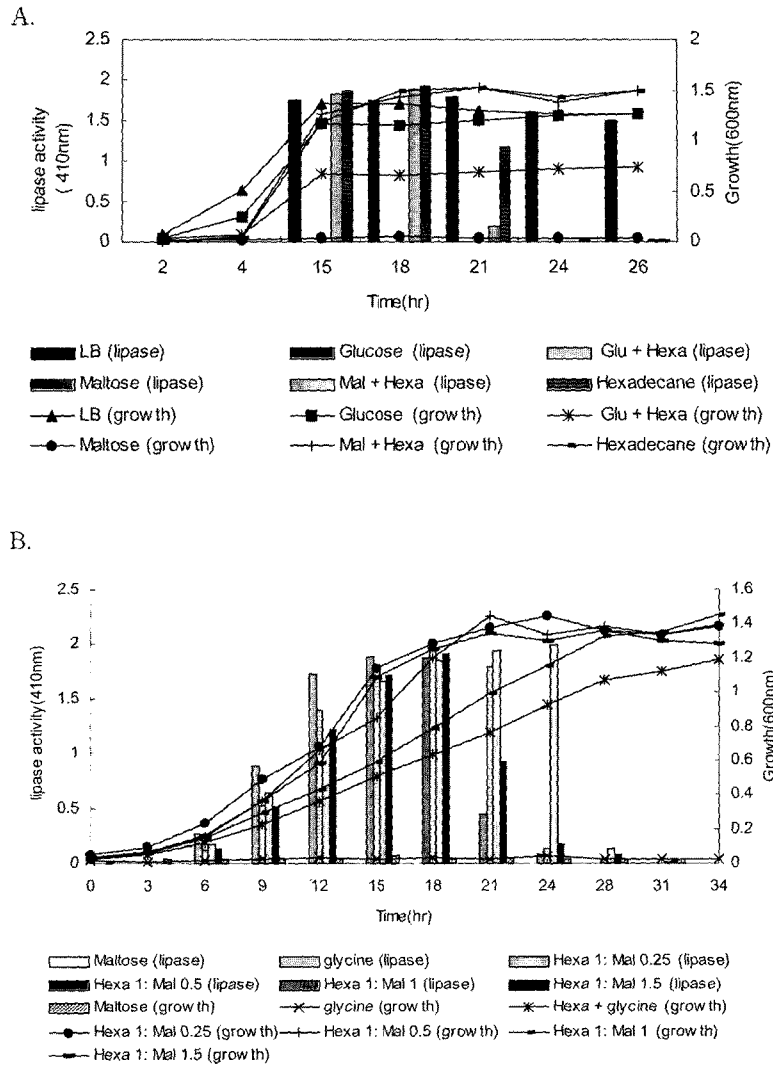
(10,000×g, 15 min, 4°C)하여 상등액을 cell bounded lipase 활성을 측정하는데 사용하였다.

Lipase 활성은 Falk (9)의 방법으로 측정하고, 효소활성은 pNPP를 1분 동안 1 μmol의 p-nitrophenol (pNP)를 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1 unit로 환산하였으며, 410 nm에서 pNP (pH 8.0)의 molar extinction coefficient는 14,900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>이다.

#### Lipase 정제 및 특성조사

선별균주가 생성하는 lipase를 정제하기 위해 1 L LB 배지에 균을 배양한 후, 배양액을 원심 분리 (4°C, 10 min, 6,000×g)하여 균체를 제거하고 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 완충액으로 사용하여 윤남경과 박경량 (3)의 방법에 의거하여 정제하였다. 정제된 효소는 Laemmli (16) 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 확인하였고, 표준 단백질로는 Bio-Rad사의 myosin (200 kDa), β-galactosidase (116.25 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa)를 사용하였다. 또 Sommer (29) 방법에 따라 SDS를 제거하기 위해 20% isopropanol에서 20분 처리하고 증류수에서 10분씩 두 번 수세한 후 1% tributylin (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1% tributylin, 1.3% agar)에 올려놓고 30°C 배양기에서 반응시켜 lipase에 활성이 있는 band를 조사하였다.

정제된 효소의 최적 온도는 20 mM phosphate buffer (pH 7.25)에 효소 (10 unit/ml)를 첨가한 후 반응액의 온도를 10-70°C로 변화시키며 효소 활성을 측정하였고, Arrhenius plot을 이용하여 효소의 활성화 에너지를 조사하였다. 효소의 최적 pH는 pH에 따라 각각의 20 mM 완충액, 즉 glycine-HCl (pH 2.2-3.5), sodium acetate (pH 3.5-5.5), Tris-malate (pH 5.5-7.0), Tris-HCl (pH 7.5-9.0), glycine-NaOH (pH 9.5-12.0)에서 효소를 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소의 열 안정성 조사는 효소 반응액을 30, 40, 50, 60, 70°C에서 시간별로 처리 후 남아있는 효소 활성을 측정하였다. 또 효소의 금속이온에 대한 효과는 효소를 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 각각 5 mM과 10 mM의 EDTA, 2-mercaptoethanol, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, HgCl 등과 함께 37°C에서 1시간 동안 배양 후, 8 μM pNPP를 첨가하여 남아있는 효소 활성을 측정하였고, K<sub>m</sub>값은 pNPP를 0.8 μM에서 12 μM까지 변화시키며 효소활성을 측정 후 Lineweaver-Burk plot법을 이용하여 결정하였다. 그리고 선별균주의 기질 이용능은 tributyrin (C<sub>4</sub>:0), tricaproin (C<sub>6</sub>:0), tricapyrin (C<sub>8</sub>:0), tricaprin (C<sub>10</sub>:0), trilaurin (C<sub>12</sub>:0), trimistyrin (C<sub>14</sub>:0), tripalmitin (C<sub>16</sub>:0), triolein [C<sub>18:1(cis)</sub>-9], triarachidin (C<sub>20</sub>:0) 이 각각 1%씩 첨가된 2×YT 배지에 균을 접종한 후 2일 후에 투명환 형성 여부로 관찰하여 결정하였다. 이때 각각의 기질은 약 10분간 파쇄 (output watts 14W; SONICS & MATERIAL INC., Vibra-Cell™, U.S.A.)한 후 사용하였다.



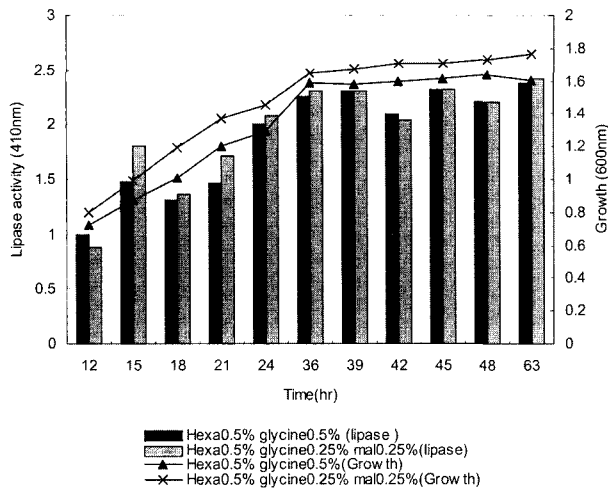
**Fig. 1.** Production of extracellular lipase. *Acinetobacter* sp. B2 was grown in LB broth and Bushnell-Haass broth with various carbon sources. Growth ( $OD_{600}$ ) and extracellular lipase activity ( $OD_{410}$ ) were measured in culture medium with pNPP as the substrate. (A) Glucose, Bushnell-Haass broth contained 1% glucose; Glu + Hexa, Bushnell-Haass broth contained 0.5% glucose and 0.5% hexadecane; Maltose, Bushnell-Haass broth contained 1% maltose; Mal + Hexa, Bushnell-Haass broth contained 0.5% maltose and 0.5% hexadecane; Hexadecane, Bushnell-Haass broth contained 1% hexadecane. (B) Maltose, Bushnell-Haass broth contained 1% maltose; Hexa + glycine, Bushnell-Haass broth contained 0.5% glycine and 0.5% hexadecane; glycine, Bushnell-Haass broth contained 1% glycine; Hexa 1: Mal 1.5, Bushnell-Haass broth contained 0.4% hexadecane and 0.6% maltose; Hexa 1: Mal 1, bushnell-haass broth contained 0.5% hexadecane and 0.5% maltose; Hexa 1: Mal 0.5, Bushnell-Haass broth contained 0.66% hexadecane and 0.33% maltose; Hexa 1: Mal 0.25, Bushnell-Haass broth contained 0.8% hexadecane and 0.2% maltose.

**결 과**

**최종 선별 균주의 특성 및 동정**

대전 지역의 주유소, 세차장, 자동차 정비소 등 유류로 오염된 토양에서 crude oil을 단일 탄소원으로 이용할 수 있는 332개의 세균 콜로니를 순수분리 하였고 그중 lipase 활성이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 최종 선별균주는 호기성 그람음성의 무포자 간균으로, citrate를 이용하고, catalase와 urease를 생성하며 methyl red 양성반응을, 그리고 nitrate,

gelatin, starch, oxidase, esculine, hydrogen sulfide, voges-proskauer 반응에 음성을 나타냈고, plasmid는 가지고 있지 않는 것으로 확인되었다(자료 미제시). 또 선별균주의 탄소원 이용능 시험에서 이 균주는 trehalose와 mannitol을 제외한 glucose, galactose, lactose, fructose, arabinose, cellulose, ribose, sorbose, sucrose, maltose, rhamnose, xylose, mannose 등 다양한 탄소원을 이용하였고, 발효능 시험에서도 이 균주는 trehalose와 mannitol, sucrose, maltose, sorbose를 제외한 glucose, galactose, lactose, fructose, arabinose, cellulose, ribose, rhamnose, xylose,



**Fig. 2.** Production of extracellular lipase. *Acinetobacter* sp. was grown in bushnell-haass broth with various carbon source. Growth (OD 600 nm) and extracellular lipase activity (OD 410 nm) were measured in culture medium with pNPP as the substrate.

mannose 등의 다양한 탄소원에 발효능이 있었다. 그리고 선별균주의 형태적 특징, 생리·생화학적 특성과 16S rRNA 염기 서열 분석 결과, 이 균주는 *Acinetobacter*로 확인되어 *Acinetobacter* sp. B2라 명명하였다.

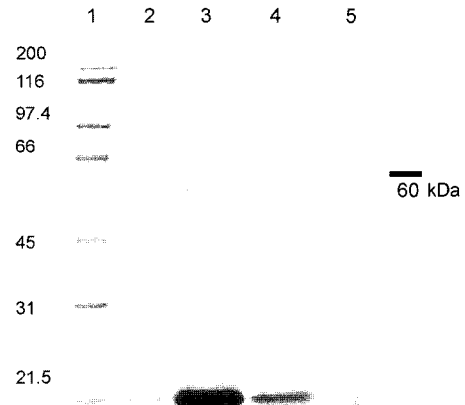
*Acinetobacter* sp. B2의 항생제에 대한 저항성을 조사한 결과, chloramphenicol에 대해서는 전혀 내성을 나타내지 않고 ampicillin에 대해선 150 µg/ml까지 강한 내성을 나타냈지만 spectinomycin은 25 µg/ml, kanamycine, streptomycin, tetracycline은 10 µg/ml의 농도까지 내성을 갖는 것으로 확인되었다. 또 Al, Ba, Cd, Co, Cu, Hg, Li, Mn, Ni, Pb, Cr와 Zn의 12종류의 중금속에 대한 내성능을 조사한 결과, 독성이 강한 Hg와 Cd는 10 µg/ml의 낮은 농도에서만 생장이 가능하였고 Ba, Li, Mn, Al, Cr, Pb에서는 각각 65, 12.8, 8, 7.2, 1.6, 1.5 mg/ml의 높은 농도까지, 그리고 Zn, Co, Cu, Ni 에서는 각각 300, 75, 100, 250 µg/ml의 농도까지 중금속 내성을 나타냄을 확인하였다.

**Lipase 활성**

**Table 1.** Purification steps of lipase from *Acinetobacter* sp. B2

Fraction	Total protein (mg)	Total activity <sup>a</sup> (U <sup>b</sup> )	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Crude extract <sup>c</sup>	179.7	242953	1352.1	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	7.5	11657.7	1556.5	4.8	1.2
DEAE-toyopearl 650M	0.107	550.3	5143.3	4.7	3.3
Sephadex-G200	0.003	67.8	22595	0.6	14.5

<sup>a</sup>Lipase activity was measured by using pNPP as the substrate.  
<sup>b</sup>One unit of enzyme activity was defined as the amount which produced 1 µM pNP per min at 30°C.  
<sup>c</sup>Supernatant from a 1-L culture grown for 18 h in LB medium.



**Fig. 3.** Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide gel after electrophoresis of lipase samples. Lanes: 1, marker proteins; 2, Crude extract; 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-precipitated protein; 4, preparation after DEAE-toyopearyl 650 M chromatography; 5, preparation after Sephadex G-200 chromatography.

*Acinetobacter* sp. B2의 lipase 활성을 영양 복합배지에서 균체 생육과 함께 측정된 결과, 접종 3시간 후에 지수기로 접어들었고, 세포 밖으로 분비되는 세포외효소인 lipase는 지수기인 배양 6시간 후에 약 200 unit/ml의 농도로 검출되기 시작해, 정지기인 배양 15-18 시간 후에 최대 활성인 약 1200 unit/ml을 나타낸 후 배양 22시간 후부터 약간씩 감소하였지만 배양 70시간 후에도 lipase의 효소활성 일부가 남아있음이 확인되었다.

*Acinetobacter* sp. B2의 균체 생육과 lipase 활성을 다양한 탄소원이 포함된 최소배지와 LB에서 주기적으로 측정해 본 결과, hexadecane을 단일 탄소원으로 사용했을 때 lipase 활성이 가장 높고 hexadecane과 maltose를 1:1로 혼합한 탄소원, 그리고 LB 순으로 lipase 활성이 높았다(Fig. 1A). Maltose는 lipase 활성뿐 아니라 성장도 없었으나 hexadecane과 함께 탄소원으로 주어졌을 때는 성장과 lipase 활성이 높는데 비해, glucose는 단독으로나 hexadecane과 함께 탄소원으로 주었을 경우 모두 약간의 성장은 있었으나 lipase 활성이 거의 없어 glucose가 lipase가 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 glucose가 lipase의 생성을 저해하는지 알아보기 위해 hexadecane과 glucose를 비율별로 처리하여 lipase 활성을 측정된 결과, 모두 성장은 되었으나 lipase 활성이 없음을 확인하였다(자료 미제시). 그리고 LB 경우에는 lipase 활성이 26시간이 지나도 높게 나타나는 반면 hexadecane은 21시간이 지난 후에 급격한 감소를 보이고 hexadecane과 maltose를 같이 준 경우 18시간이 지나면 급격한 감소를 보였다(Fig. 1A). 따라서 maltose가 lipase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 hexadecane과 maltose의 비율별 lipase 활성을 측정된 결과, 15시간 이전에는 maltose 비율이 적을수록 균의 성장과 lipase 활성이 높았으나 21시간 후에는 hexadecane과 maltose의 비율이 1:1일때 lipase 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 glycine만 처리했을 경우 lipase 활성이 거의 없었고, glycine과 hexadecane을 같이 처리했을 경우 lipase의 활성이 28시간 이후에도 계속 증가함을 확인하였다(Fig. 1B).

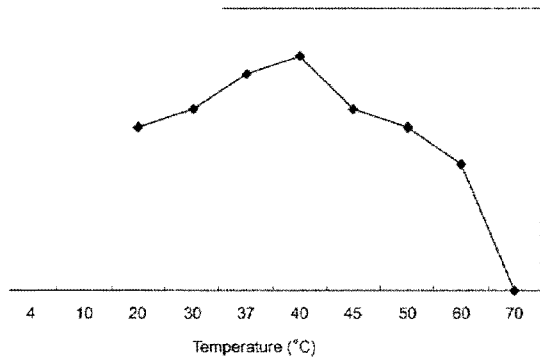


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of lipase. The enzyme was incubated with a mixture containing 20 mM phosphate buffer (pH 7.25), and 8 μM *p*-nitrophenyl palmitate at various temperatures for 10 min, and *p*-nitrophenol formed was measured. The value obtained at 40°C was taken as 100%.

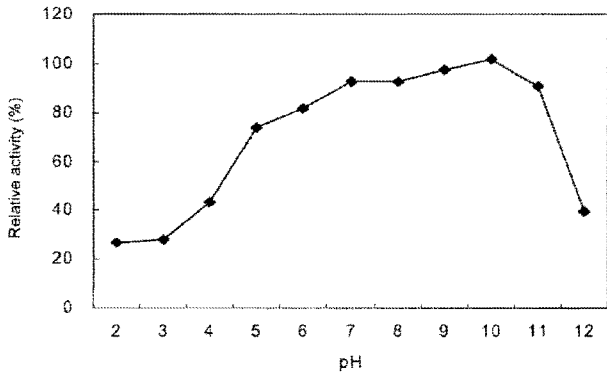


Fig. 5. Effect of pH on the activity of lipase. The activity was measured at various pH values, and presented as a percentage of the maximum activity, taken as 100%. Used buffers (final concentration, 20 mM) were glycine-HCl (pH 2.2 to 3.5); sodium acetate (pH 3.5 to 5.5); Tris-malate (pH 5.5 to 7.0); Tris-HCl (pH 7.5 to 9.0); and glycine-NaOH (pH 9.5 to 12).

따라서 glycine이 lipase 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 hexadecane과 glycine의 비율별 lipase 활성을 측정된 결과, hexadecane 단독 배양에서는 lipase 활성이 21시간 이후에 급격히 감소했으나 hexadecane과 glycine을 혼합한 탄소원에서는 63시간이 지나도 높은 lipase 활성을 나타내었다. 또한 hexadecane과 maltose를 혼합한 탄소원에서 18시간 이후에 lipase 활성이 급격히 감소했으나 여기에 glycine을 같이 처리했을 때에는 63시간이 지나도 높은 lipase 활성을 유지했고 93시간이 지나도 lipase 활성이 남아있음을 확인하였다(Fig. 2).

**Lipase의 정제**

LB 배지 1 L 에서 18시간 배양한 *Acinetobacter* sp. B2 배양액을 수확하여 15%-40% ammonium sulfate로 침전시켜 얻은 추목을 가지고 단백질 농도 및 효소활성을 측정된 결과 lipase는 총 11657.7 unit로서 조효소액에 비해 1.2배 농축되

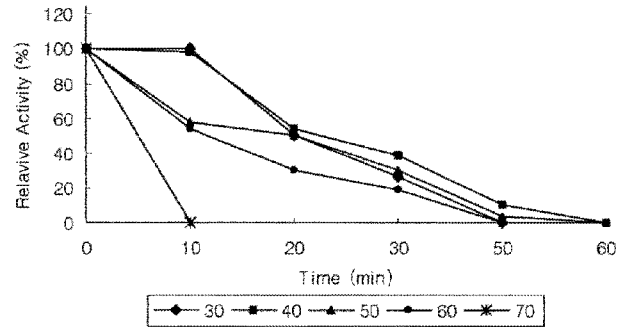


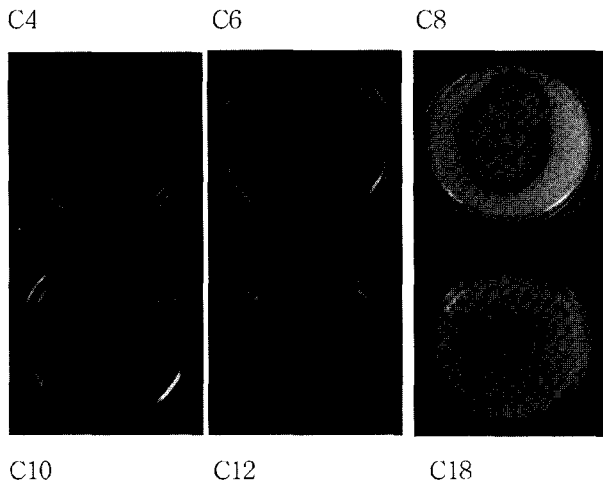
Fig. 6. Thermostability of lipase. The enzyme solution was incubated at 30, 40, 50, 60 and 70°C for various times in the absence of substrate. The remaining activity was determined by adding 8 μM *p*-nitrophenyl palmitate. The activity of the enzyme at time zero was used as 100%.

었으며 회수율은 4.8%임을 확인하였다(Table 1). 또 15%-40% ammonium sulfate로 침전시킨 시료를 DEAE-toyopearl 650 M을 충전시킨 column으로 ion exchange chromatography를 수행한 후 lipase 활성을 나타내는 분획을 모아 lipase 활성과 단백질량을 조사한 결과 lipase 효소활성은 550.3 unit로서 조효소액에 비해 3.3배 농축, 4.7%의 회수율을 나타냈고, Sephadex G-200으로 충전한 gel filtration에서는 효소활성이 14.5배 농축, 회수율은 0.6%를 나타내었다. 이 효소를 정제하여 각 단계마다 12% SDS-polyacrylamide 전기영동을 해본 결과 약 60 kDa에 위치한 밴드를 확인하였으며(Fig. 3), 1% tributyrin이 함유된 plate에서 효소 활성을 확인한 결과 SDS-PAGE 전기영동에서와 같은 위치에서 tributyrin이 분해되어 나타나는 투명한 단일 band가 관찰되어 이 lipase의 분자량은 약 60 kDa인 것으로 추정된다.

**Lipase의 특성**

효소의 최적 온도와 최적 pH를 조사한 결과 40°C, pH 10에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 4 & Fig. 5). 그리고 lipase가 *p*NPP를 가수분해할 때의 활성화 에너지는 10-37°C 범위에서 2.7 kcal/mol 이었으며, 40°C 이상의 온도에서는 12.8 kcal/mol의 불활성화 에너지로 점진적으로 효소활성이 사라짐을 확인하였다. 열 안정성 실험에서는 30, 40, 50, 60, 70°C에서 효소 반응액을 처리했을 때 30°C와 40°C 에서는 10분 정도 효소 활성이 안정하게 유지되고 30°C, 40°C, 50°C에서 20분까지는 50% 이상의 효소활성을 유지하였고, 70°C 이상의 온도에서는 효소가 불활성화되어 10분 이내에 효소활성이 완전히 사라짐을 보였다(Fig. 6).

효소의 활성에 영향을 줄 수 있는 EDTA, 2-mercaptoethanol은 54%, C 그리고 다양한 금속이온들과 반응을 시켜 EDTA는 33%, 2-mercaptoethanol은 54%, C는 51%, HgCl<sub>2</sub>는 96%, CdCl<sub>2</sub>는 24%, N-지해하였고, CaCl<sub>2</sub>는 111%, FeCl<sub>2</sub>는 NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O는 142%, LiCl<sub>2</sub>는 134% 증가시켰고, 10 mM의 농도에서는 효소활성 억제효과를 나타내



**Fig. 7.** Lipolytic activity with various substrates of *Acinetobacter* sp. B2. C4 to C18 indicated the triglycerides with the corresponding acyl chain length. The agar plates (2 × YT) contained 1% substrate and were incubated for 2 days at 30°C.

Burk 식을 이용하여 다양한 농도의 기질, pNPP를 가지고 lipase의  $K_m$  값을 알아본 결과 21.8  $\mu\text{M}$ 을 나타내었다.

*Acinetobacter* sp. B2의 기질 이용능을 조사하기 위해 2 × YT 배지에 C4 - C20의 기질을 1%씩 첨가하여 가수분해 여부를 조사한 결과, *Acinetobacter* sp. B2는 tributyrin ( $C_4:0$ ), tricaproin ( $C_6:0$ ), tricaprylin ( $C_8:0$ )과 같은 비교적 짧은 chain의 지방산뿐 아니라 tricaprין ( $C_{10}:0$ ), trilaurin ( $C_{12}:0$ ), triolein [ $C_{18:1(cis)-9}$ ]과 같은 긴 사슬의 지방산으로 구성된 기질도 분해할 수 있음을 확인하였다(Fig. 7).

## 고 찰

**Table 2.** Effects of various compounds on lipase activity

Compound	Remaining activity(%) <sup>a</sup> at a concentration (mM) of:	
	5.0	10
EDTA	33	30
2-Mercaptoethanol	54	8
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	142	58
CaCl <sub>2</sub>	111	61
CdCl <sub>2</sub>	24	26
LiCl <sub>2</sub>	134	109
CoCl <sub>2</sub>	47	49
FeCl <sub>2</sub>	141	36
MnCl <sub>2</sub>	165	68
HgCl <sub>2</sub>	96	24
BaCl <sub>2</sub>	143	76
NaN <sub>3</sub>	80	77

<sup>a</sup>Lipase (0.001 mg/ml) was incubated in 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) containing each compound at 37°C for 1 hr. Remaining activity was determined with 8  $\mu\text{M}$  p-nitrophenyl palmitate at 37°C and expressed as the percent of the control value (with no addition).

대전지역의 유류로 오염된 토양에서 crude oil을 단일 탄소원으로 이용할 수 있는 332개의 세균콜로니를 순수분리하고, 이 중 유류 유화활성이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 동정한 결과 *Acinetobacter* sp. B2로 확인되었다. 이 균의 항생제에 대한 내성 조사결과 대전지역의 토양과 하천에서 분리된 3-chlorobenzoic acid 분해세균이 갖는 항생제 내성보다는 약하지만 (11), 대전지역 토양에서 분리된 폐윤활유 분해세균(1, 3)보다 강한 것으로 확인되었다. 또 중금속에 대한 내성조사에서, 중금속에 따라 약간의 차이는 있지만 대전 지역에서 분리되었던 3-chlorobenzoic acid과 parathion, 그리고 폐윤활유 분해세균보다 내성이 강한 것으로 확인되었다.

*Acinetobacter* sp. B2를 영양 복합배지에 접종하여 균체생육과 lipase 활성을 측정된 결과 세포의 효소임을 알 수 있었고, glucose가 첨가되면 lipase 활성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 1A). 이러한 결과는 *Alternaria brassicicola* 균으로 실험한 Berto (6)와 *Yarrowia lipolytica*로 실험한 Pigne'de (26)의 논문에서도 보고된 바 있다. 그러나 Berto (6)는 maltose와 glycine이 첨가되면 균의 생장이 좋고 lipase를 많이 생성한다고 보고했지만 *Acinetobacter* sp. B2는 maltose와 glycine최소배지에서 균이 생장하지 않았다. 또 21시간 배양 후 lipase활성이 급격히 감소하는 hexadecane 최소배지와는 대조적으로 hexadecane과 glycine을 혼합한 탄소원에서는 균의 생장과 lipase 활성 또한 높아 63시간이 지나도 높은 활성이 유지되었다. 또한 hexadecane과 maltose를 혼합한 탄소원에서 18시간 배양 이후에 lipase의 활성이 급격한 감소를 보였으나 여기에 glycine을 처리했을 때는 hexadecane과 glycine의 혼합탄소원에서 배양했을 때와 마찬가지로 높은 lipase 활성이 63시간이 지나도 유지되었고 균의 성장도 우수하였다(Fig. 2). 따라서 glycine이 lipase 활성을 장기간 유지하고 증진시키는 데 비해, 비록 균이 다르기는 하지만 Berto (6)와 Pigne'de (26)의 보고와는 다르게 maltose가 본 실험에 사용된 *Acinetobacter* sp. B2의 lipase 활성과 관련이 없는 이유는 추후 계속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 lipase의 활성이 있는 균주는 triolein 배지에서 성장할 수 있지만 lipase 활성은 매우 낮아지고, 반면 nonlipase 기질인 hexadecane을 탄소원과 energy 원으로 했을 때는 extracellular lipase가 많이 생성되고 수일이 지나도 높은 활성을 유지한다고 보고되고 있다(14). 그러나 본 실험에 사용된 *Acinetobacter* sp. B2는 hexadecane에서 배양하면 활성은 LB보다 높았지만 수 시간이 지나면 lipase 활성이 없어지고(Fig. 1A), Li(17)가 보고 한 것과 같이 lipase가 잘 정제되지 않았다. 따라서 비록 hexadecane과 glycine과 maltose를 2:1:1비율로 혼합한 탄소원에서 lipase가 최대 활성을 나타냈지만 정제할 때는 LB에서 배양하여 정제를 하였다. 이렇게 LB에서 배양하여 정제된 효소는 동결건조하여 -80°C에서 보관할 때 5주 이상 활성손실이 없이 안정하고, pH 6-10에서 80% 이상 활성을 유지하였다(Fig. 5). 이런 결과는 thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841)이 pH 5-10.5 사이에서 90-95%(31), *Pseudomonas* sp. strain B11-1이 pH 6-9 사이에서(8), 그리고 *P. pseudoalcaligenes* F-111

이 pH 6-10 사이에서(18) 안정한 것과 유사하여 본 실험에 사용된 lipase가 산업적으로 사용될 가능성이 있는 것으로 확인되었다.

효소반응의 활성화에너지는 그 효소의 촉매능을 나타내고, 활성화 에너지가 낮다는 것은 그만큼 효소의 촉매능이 높다는 것을 말해주는데 본 실험에서 정제된 lipase가 pNPP를 가수분해할 때의 활성화 에너지는 4 - 37°C의 범위에서 2.7 kcal/mol로 나타났다. 이는 *Staphylococcus haemolyticus*의 8.63 kcal/mol (24), *Antarctic bacteria* 12 kcal/mol, Mesophilic *Pseudomonas aeruginosa* 25 kcal/mol (8) 보다는 낮은 결과이다.

또한 이 Lipase의 Michaelis constant ( $K_m$ )값은 21.8  $\mu$ M이었고, 최대 반응속도는 270.3  $\mu$ M  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 으로 *Bacillus* sp. RSJ-1(28) 보다  $K_m$ 값이 훨씬 작아 기질과의 친화성이 뛰어난 효소임을 확인하였다.

따라서 본 실험에 사용된 *Acinetobacter* sp. B2의 lipase는 기존에 보고되어 있는 각종 다양한 lipase 및 esterase와 활성이 비슷하고, 세포외로 분비되는 효소이며, 염기성 조건에서도 안정하고, 기질과의 친화성도 우수하며 비교적 긴 사슬의 지방산으로 구성된 기질도 분해할 수 있어 산업적으로 이용될 수 있는 효소라고 판단된다.

## 참고문헌

- 김갑정. 1999. *Acinetobacter lwoffii*의 유류분해 및 생물학적 계면활성제의 특성. 한남대학교. 박사학위논문.
- 김혜은. 2001. *Acinetobacter lwoffii* 16C-1이 생산하는 Esterase의 특성. 한남대학교. 석사학위논문.
- 윤남경, 박경량. 2004. 파라치온 분해 세균 *Pseudomonas rhodesiae* H5의 특성. *한국미생물학회지* 14, 582-588.
- Ahn, J.H., J.G. Pan, and J.S. Rhee. 1999. Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J. Bacteriol.* 181, 1847-1852.
- Atlas, R.M. 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Appl. Microbiol.* 30, 396-403.
- Berto, P., L. Belingheri, and B. Dehorter. 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria bras-sicora*. *Biotechnology Lett.* 19, 533-536.
- Charusheela, A., and L. Arvind. 2002. Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases. *Enzyme Microbial Technol.* 30, 19-25.
- Choo, D.W., T. Kurihara, T. Suzuki, K. Soda, and N. Esaki. 1998. A cold-adapted lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 486-491.
- Falk, M.P.F., E.A. Sanders, and W.D. Deckwer. 1990. Studies on the production of lipase from recombinant *staphylococcus carnosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 10-13.
- Floodgate, G.D. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystem, *In*: R.M. Atlas (ed.), Macmillan Publishing co., New York. *Colliet Macmillan publishers*, London. 355-397.
- Kim, G.J, I.S. Lee, and K.R. Park. 1999. Characteristics of Wasted Lubricant Degradation by *Acinetobacter Lwoffii* 16C-1. *Kor. J. Life Science* 9, 76-81.
- Jobson, A., F.D. Cook, and D.W.S. Westlake. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 23, 1082-1089.
- Kok, R.G., J.V.T. Jasper, M.N. Inge, B.W.B. Marc, R.E. Maarten, B.N. Clara, V. Ben, and J.H. Klaas. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology* 15, 803-818.
- Kok, R.G., B.N. Clara, H.G. Rodrigo, M.N. Inge, and J.H. Klaas. 1996. Physiological factors affecting production of extracellular lipase(LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid repression of lipA expression and degradation of LipA. *J. Bacteriol.* 178, 6025-6035.
- Krieg, N.R., and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, Wilkins, and Baltimore.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Li, C.Y., C.Y. Cheng, and T.L. Chen. 2001. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme Microbial Technol.* 29, 258-263.
- Lin, S.F., C.M. Chiou, C.M. Yeh, and Y.C. Tsai. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1093-1095.
- Litthauer, D., A. Ginster, and E.V.E. Skein. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase : A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme Microbial Technol.* 30, 209-215.
- Longshaw, C.M., A.M. Farrell, J.D. Wright, and K.T. Holland. 2000. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipase. *Microbiology* 146, 1419-1427.
- MacFaddin, J.F. 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams & Wilkins CoMiget, R.J., C.H. Oppenheimer, H.I. Kator, and D.A. La. Rock. 1969. Microbial degradation of normal paraffin hydrocarbon in crude oil. *In* proceedings of the joint conference on prevention and control of oil spills, A.D.O.F.W.P.C.A. *American Petroleum Institute.*, New York. 327-331.
- Muralidhar, R.V., R.P. Chirumamilla, R. Marchant, V.N. Ramachandran, O.P. Ward and P. Nigam. 2002. Understanding lipase stereoselectivity. *J. Microbial Biotech. Rev.* 18, 81-97.
- Nadini, M., D.A. Lang, K. Liebeton, K.E. Jaeger, and B.W. Dijkstra. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. *J. Biol. Chem.* 275, 31219-31225.
- Oh, B.C., H.K. Kim, J.K. Lee, S.C. Kang, and T.K. Oh. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS. Microbial. Lett.* 179, 385-392.
- Organism central*. 2001. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. Baltimore. New York.
- Pigne'de, G., W. Huijie, F. Franck, G. Claude, S. Michel, and N. Jean-Marc. 2000. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 182, 2802-2810.
- Reetz, M.T. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Op. Chem. Biol.* 6, 145-150.
- Sharma, R., S.K. Soni, R.M. Vohra, L.K. Gupta, and J.K. Gupta. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, *Process Biochemistry* 37, 1075-1084.
- Sommer, P., C. Bormannm, and F. Gotz. 1997. Genetic and Bio-

- chemical characterization of a New Extracellular Lipase from *Streptomyces cinnamomeus*, *Appl. Environ. Microbio.* 63, 3553-3560.
30. Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Marroof, S.M. Williams, B.P. Dancik, and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2097-2100.
31. Wang, Y., K.C. Srivastava, G.J. Shen, and H.Y. Wang. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1(ATCC 53841). *J. Fermentation Bioeng.* 79, 433-438.
32. Xuyang, L., T. Susanne, K.W. Ulrich, J. Karl-Erich, and J.B. Michael. 1995. Gene cloning, Sequence analysis, Purification, and Secretion by *Escherichia coli* of an Extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2674-2680.

(Received November 10, 2004/Accepted December 15, 2004)

---

**ABSTRACT : Purification and Characterization of Lipase from *Acinetobacter* sp. B2 Isolated from Oil-contaminated Soil**

**Seung Hwa Son and Kyeong Ryang Park\*** (Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

Three hundreds thirty two bacterial colonies which were able to degrade crude oil were isolated from soil samples that were contaminated with oil in Daejeon area. Among them, one bacterial strain was selected for this study based on its higher oil degrading ability, and this selected bacterial strain was identified as *Acinetobacter* sp. B2 through physiological-biochemical tests and analysis of its 16S rRNA sequence. *Acinetobacter* sp. B2 was able to utilize various carbohydrates but did not utilize trehalose and mannitol as a sole carbon source. *Acinetobacter* sp. B2 showed a weak resistance to antibiotics such as kanamycin, streptomycin, tetracycline and spectinomycin, but showed a high resistance up to mg/ml unit to heavy metals such as Ba, Li, Mn, Al, Cr and Pb. The optimal growth temperature of *Acinetobacter* sp. B2 was 30°C. The lipase produced by *Acinetobacter* sp. B2 was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography and Sephadex gel filtration chromatography. Its molecular mass was about 60 kDa and condition for the optimal activity was observed at 40°C and pH 10, respectively. The activation energy of lipase for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate was 2.7 kcal/mol in the temperature range of 4 to 37°C, and the enzyme was unstable at the temperature higher than 60°C. The Michaelis constant ( $K_m$ ) and  $V_{max}$  for *p*-nitrophenyl palmitate were 21.8  $\mu$ M and 270.3  $\mu$ M  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , respectively. This enzyme was strongly inhibited by 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , EDTA and 2-Mercaptoethanol.