

갯벌에서 분리된 *Psychrobacter* sp. S3균 유래의 저온성 리파제에 의한 트리글리세리드의 가수분해 특성

이성아 · 이정현¹ · 김상진¹ · 김형권*
가톨릭대학교 생명공학부, ¹한국해양연구원

Hydrolysis of Triglycerides with Cold-Adapted Lipase of *Psychrobacter* sp. S3 Isolated from Intertidal Flat. Lee, Sung-A, Jung-Hyun Lee¹, Sang-Jin Kim¹, and Hyung-Kwoun Kim*. Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1, Yockok 2-dong, Wonmi-gu, Bucheon, Gyeonggi-do 420-743, Korea, ¹Marine Biotechnology Research Centre, KORDI, Ansan, P. O. Box 29, 425-600, Korea – Lipase-producing bacteria (S3) were isolated from intertidal flat at Saemanguem. A isolated strain was identified as *Psychrobacter* species by physiological and fermentational characterization as well as 16S rRNA analysis. The strain was then named as *Psychrobacter* sp. S3. *P. sp. S3* grew most rapidly at 30°C, but grew well even at 10°C and its lipase activity was most high when cultivated at 20°C. Lipase S3 had optimum temperature of 30°C for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl caproate and had more than 80% activity even at 10°C. The activation energy was calculated to be 1.5 kcal/mol, which showed that it was a typical cold-adapted enzyme. It was an alkaline enzyme with optimum pH of 9.0-9.5. It could hydrolyze various length of triglycerides. Among them, it hydrolyzed most rapidly C₄, C₁₄, C₁₆-length triglycerides. When added to tributyrin-agarose gel, lipase S3 hydrolyzed tributyrin most rapidly at 30 and 40°C, but it could hydrolyze well even at 4°C.

Key words: Lipase, *Psychrobacter*, triglyceride, psychrophilic enzyme

리파제는 아실글리세롤의 카르복실에스테르결합을 가수분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 효소이다[7]. 리파제의 잘 알려진 기능은 지방의 가수분해이지만 반응조건에 따라 지방 이외의 다양한 에스테르화합물의 가수분해를 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 에스테르 합성반응과 트랜스에스테르화 반응 등 다양한 화학반응을 촉매할 수 있기 때문에 각종 산업에서 널리 사용되고 있다. 미생물(세균 및 곰팡이)이 생산하는 리파제는 다양한 기질특이성, 위치특이성, 입체특이성 등의 유용한 반응특성을 지니고 있다[8, 15]. 특히, 저온성 미생물이 생산하는 리파제는 대부분 저온에서 최적 활성을 지니는 저온성 효소이다[3, 5-6]. 이것들은 저온에서 높은 활성을 가질 뿐만 아니라 수분활성이 낮은 조건에서도 안정성과 효소활성이 뛰어나기 때문에 세제산업, 직물산업, 식품산업, 생물학적 환경정화산업에서 사용되고 있다. 또한, 미수계에서의 반응성이 뛰어나기 때문에 정밀화학산업에서의 효소촉매로 점차 많이 사용되고 있다[2, 4, 6, 13].

최근 해양미생물이 주목을 받는데 이것은 육상미생물과는 달리 아직 많은 연구가 진행되지 않았으며, 저온성, 빈영양성, 친압성, 호염성 등의 특성을 갖고 있기 때문이다. 특히, 대부분의 해양미생물은 생육환경이 저온이기 때문에 이들

균주가 생산하는 효소도 앞서 언급한대로 대부분 저온성 효소로 밝혀지고 있다[3, 5].

본 연구에서는 산업적으로 유용성이 뛰어난 신규 저온성 리파제를 탐색하기 위해서 갯벌에서 생육하는 저온성 세균을 분리하였으며 이 분리균이 생산하는 리파제 효소의 생화학적 특성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

리파제 생산균의 분리

서해안 새만금 지역의 갯벌 샘플로부터 리파제를 생산하는 세균을 다음과 같이 탐색하였다. 갯벌샘플(100 mg)를 3 ml 부피의 트리카프틸린(TCN)배지 (1% TCN, 2% 바다소금, 0.01% 폴리펩톤, 0.002% 효모추출액)에 넣고 20°C에서 6일간 농화배양하였다. 배양액 0.1 ml를 리파제생산균 분리배지인 TCN-LB 한천배지에 도말하고 20°C에서 배양하면서 TCN를 분해하여 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하였다.

TCN-LB 한천배지는 다음과 같이 제조하였다[10]. TCN 5 ml를 45 ml 부피의 아라비아고무(gum arabic) 용액 (5% 아라비아고무, 200 mM 염화나트륨, 10 mM 염화칼슘)에 넣고 Waring blender로 2분간 균질화해서 TCN 에멀전을 제조하였다. TCN 에멀전 50 ml를 450 ml 부피의 바다소금이 첨가된 LB한천배지 (1%트립톤, 0.5% 효모추출액, 0.5% 염화나트륨, 1.5% 한천, 2% 바다소금)와 섞은 후, TCN-LB 한

*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4890, Fax: 82-2-2164-4865

E-mail: hkkim@catholic.ac.kr

천배지를 제조하였다.

미생물의 동정

분리균의 생화학적 특성 및 발효특성을 조사하기 위해 API 20NE kit를 이용하였다 (Biomerieux, Inc. NC). 또한, 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 콜로니PCR기법을 수행하였다. 균체를 소량(0.1 ml)의 멸균수에 현탁시키고 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열된 균체용액을 원심분리하여 상등액을 PCR의 주형 DNA 용액으로 사용하였다. 염기서열을 분석하기 위해서 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') 프라이머를 사용하였다. PCR 반응을 다음 조건에서 수행하였다(열변성, 95°C, 1분; 냉각, 50°C, 1분; 합성반응, 72°C, 1분). 아가로스 전기영동을 수행하고 젤로부터 원하는 크기(1.5 kb)의 PCR 산물을 추출하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열에 대해 BLAST Search 프로그램을 이용해 가장 유사한 균을 찾아내었다.

효소의 정제

분리균을 바다소금(2%)이 첨가된 LB 배지에 접종하고 20°C에서 18시간동안 배양하였다. 배양상등액에 황산암모늄을 20%까지 포화되도록 넣어준 후 침전물을 제거하고 다시 70%까지 포화되도록 첨가하였다. 생성된 단백질 침전물을 회수하여 30 ml 부피의 인산칼륨용액 (20 mM, pH 6.5)으로 녹인 후 동일 용액으로 투석하였다. 이 단백질용액을 DEAE 컬럼의 상단에 가하였다. 먼저 동일한 인산칼륨용액으로 씻어준 후, 염화칼륨의 농도를 순차적으로 증가시키면서(0.1 M, 0.2 M, 0.3 M), 컬럼에 결합된 단백질을 용출시켰다. 활성분획을 모아서 황산암모늄을 사용하여 염색하고 10 ml 부피의 인산칼륨용액(10 mM, pH 7.0)에 녹여 투석한 후, Hydroxyapatite 컬럼의 상단에 가하였다. 인산칼륨의 농도를 점차적으로 증가시키면서 컬럼에 결합된 단백질을 용출시켰다. 활성분획을 모아서 효소의 생화학적 특성규명을 위한 효소액으로 사용하였다.

효소의 활성측정 및 특성조사

트리글리세리드 기질에 대한 효소의 분해활성을 pH stat 법으로 측정하였다 [9]. 먼저 기질에멸전을 다음과 같이 제조하였다. 기질 5 ml를 495 ml 부피의 아라비아고무 용액 (0.5% 아라비아고무, 20 mM 염화나트륨, 1 mM 염화칼슘)에 넣고 Waring blender로 2분 동안 균질화해서 기질 에멸전을 제조하였다. 기질 에멸전 20 ml를 온도조절장치가 장착된 반응조에 넣고 10 mM 수산화나트륨을 이용해서 pH를 8.0으로 맞춘 후, 적당량의 효소액(5~20 µl)을 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응액의 pH를 일정하게 유지하기 위해 자동적으로 첨가되는 수산화나트륨용액의 양을 pH Titrator (718 STAT Titrino, Metrohm, Swiss)로 측정함으로써 효소

활성을 구하였다. 효소활성 1U는 1분동안 1마이크로몰의 지방산을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

합성기질을 사용한 효소의 활성측정을 다음과 같이 수행하였다[10, 14]. 기질혼합액은 10 mM *p*-nitrophenyl caproate (PNPC)와 에탄올 및 50 mM Tris-HCl용액(pH 8.0)을 10:40:950의 비율로 섞어 사용하였다. 이 혼합액에 적당량(5~20 µl)의 효소액을 넣고 35°C에서 3분간 반응시키고 효소반응에 의해서 생성된 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm파장의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 효소활성 1U는 1분동안 1마이크로몰의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

SDS전기영동은 12% 아크릴아미드 젤을 이용하여 수행하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 단백질 밴드를 관찰하였다[12].

젤상에서 효소의 활성밴드를 보기 위해서 zymogram을 수행하였다. 우선, SDS를 뺀 전기영동을 수행하고 이것을 트리뷰티린(TBN)기질(1%)이 첨가된 아가로스 젤에 붙이고 37°C에서 반응시키면서 활성밴드를 관찰하였다.

온도에 따른 효소활성과 열안정성 실험은 10~60°C의 범위에서 5°C씩 차이를 두고 그 값을 측정하였다. 온도별 잔존활성의 경우, 0.1 mg/ml농도의 소 혈청알부민(BSA)을 효소액에 첨가하고 각 온도에서 30분간 처리한 후, 잔존활성을 측정하였다.

pH에 따른 활성과 pH 안정성 실험을 pH 4~11범위에서 측정하였다. 각 pH별 완충액으로 100 mM GTA(100 mM 3,3-dimethylglutaric acid, 100 mM Tris, 100 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

리파제 생산균의 분리과 동정

새민금 갯벌샘플을 TCN을 첨가한 배지에 넣고 20°C에서 농화배양한 후, TCN-LB한천배지에 도말하여 배양함으로써 콜로니 주변에 투명환을 형성하는 균주 8개를 탐색하였다. 이들 분리균주를 LB 배지에 접종하고 20°C에서 16시간 배양한 후, 배양상등액의 TCN분해능력이 가장 뛰어난 균주(S3)를 최종 선발하였다.

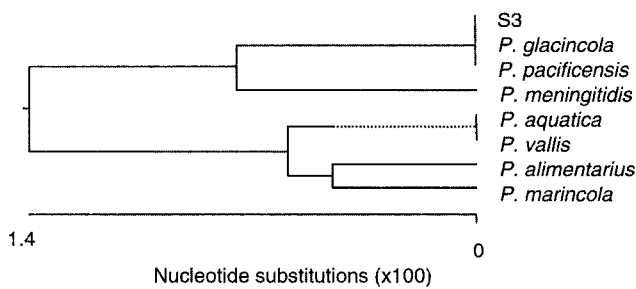
분리균 S3는 그람음성의 구균이었으며, API 20NE 테스트 결과, 아라비노스(arabinose)와 말토제(maltose)를 동화하는 호기성균이었다(Table 1).

이 분리균의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *Psychrobacter* 속의 종들과 매우 높은 상동성을 나타내었다. 그중에서도 *P. glacincola* 및 *P. pacificensis*와 염기서열이 100% 일치하였다(Fig. 1). 이 결과에 따라서 분리균을 *Psychrobacter* sp. S3로 명명하였다.

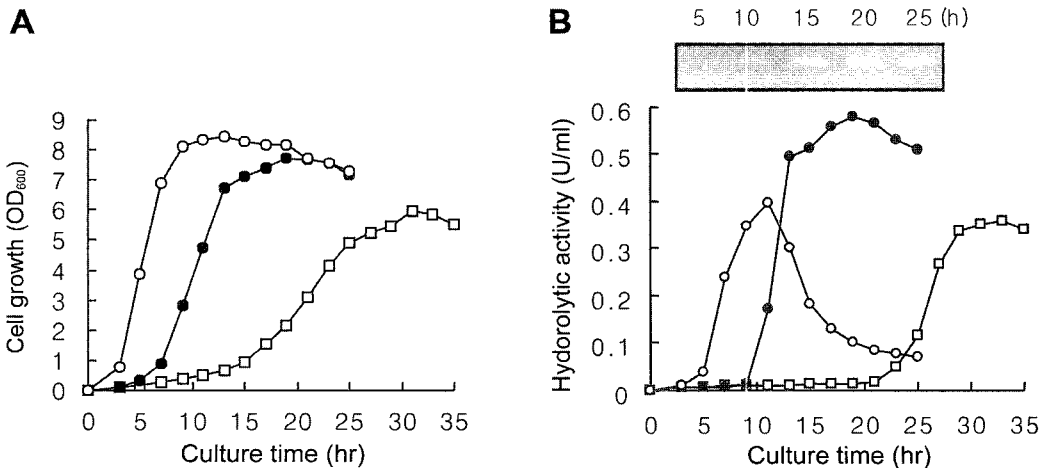
이 균들이 생산하는 리파제효소에 대해서는 아직 전혀 보고되어 있지 않다. *Psychrobacter*균으로부터 알려진 리파제

Table 1. Physiological and fermentation properties of the isolated strain S3.

Test reaction/enzyme	Result	Test reaction/enzyme	Result
Nitrate to nitrite	-	Mannose assimilation	-
Nitrate to nitrogen	-	Mannitol assimilation	-
Indole production	-	<i>N</i> -Acetyl-glucosamine assimilation	-
Acidification	-	Maltose assimilation	-
Arginine dihydrolase	-	Gluconate assimilation	-
Urease	-	Caprate assimilation	-
β -Glucosidase	-	Adipate assimilation	-
Protease	-	Malate assimilation	+
β -Galactosidase	-	Citrate assimilation	-
Glucose assimilation	-	Phenyl-acetate assimilation	-
Arabinose assimilation	+	Cytochrome oxidase	+

**Fig. 1. Phylogenetic tree of the isolated strain S3 and closely related *Psychrobacter* species.**

효소는 지금까지 2종류 밖에 없다. 남극에서 분리된 저온성 세균인 *P. immobilis* B10 균이 분자량 33,000인 리파제 (Q02104)를 생산하는 것으로 보고되었다[1]. 최근, *P. sp.* 273-4균의 유전체 정보로부터 리파제로 추정되는 유전자 (ZP_00340941)가 발굴되었으나, 아직 효소활성이 확인되지는 않았다.

**Fig. 2. Growth curve and lipase production of *P. sp.* S3. A. *P. sp.* S3 was cultured at 30°C (○), 20°C (●), and 10°C (□) and cell growth was measured with absorbance at 600 nm. B. Hydrolytic activity of growth media was measured by pNPC assay. TBN-zymogram was done with growth media obtained from 20°C-cultivation.**

P. sp. S3균의 배양 특성

P. sp. S3균의 염분농도에 따른 배양특성을 조사하기 위해서 바다소금의 농도(0~5%)를 달리하여 배양하였다. 그 결과 1% 바다소금이 첨가된 배지에서 가장 잘 성장하였으나, 모든 농도 범위에서 대부분 잘 성장하였다. 이것은 분리균이 호염성균이라기보다 내염성(halotolerant)균임을 의미한다.

분리균의 최적배양온도를 확인하기 위해서 10, 20, 30°C에서 각각 배양곡선을 구하였다(Fig. 2A). 30°C에서 가장 빠르게 성장하였으나, 또 상대적으로 빠르게 세포용해가 진행되었다. 20°C에서 배양한 경우, 19시간 후에 최대 세포농도를 보였다. 반면에 10°C에서는 상대적으로 느리게 성장하였으며 30시간 이후에 최대 세포농도를 보였다.

배양온도와 시간에 따른 효소의 생산량을 비교해 보기 위해서 배양액의 pNPC 분해활성을 측정하였다(Fig. 2B). 분석 결과, 오히려 20°C에서 배양하는 경우에 가장 높은 효소활성이 측정되었다. 30°C 배양에 비해 효소생산시간이 늦으나, 배양액의 효소활성이 훨씬 높았다(~0.57 U/ml). 10°C 배양 시 효소생산량은 30°C의 경우와 비슷하였다. 이것은 *P. sp.* S3균이 전형적인 저온성균임을 보여주고 있다.

한편, 20°C에서 균을 배양하면서 5시간마다 샘플링하여 TBN-zymogram을 수행한 결과, 한 종류의 활성밴드가 나타났다. 이 밴드의 굵기와 배양액의 효소활성이 정확하게 일치하였다. 이 결과는 배양액에서 관찰된 효소활성(pNPC 분해활성)이 젤상에서 관찰된 해당 리파제효소에 의한 것임을 보여준다.

효소의 생화학적 특성

DEAE-Sepharose겔럼과 hydroxyapatite겔럼을 통과시켜서 리파제 S3를 부분정제하였다(Fig. 3). 효소의 활성과 젤 상에서의 단백질 밴드의 패턴을 비교한 결과, 분자량 33,000에 해당하는 단백질이 리파제 S3로 추정되었다.

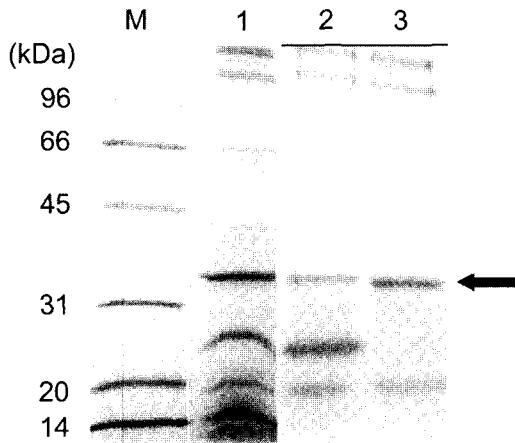


Fig. 3. SDS-PAGE of lipase S3. Lane 1, protein size marker; lane 2, sample from ammonium sulfate precipitation; lane 3, from DEAE-Sepharose chromatography; lane 4, from hydroxyapatite chromatography. Arrow indicates the 33,000-sized putative lipase.

이 단백질을 PVDF 막에 옮기고 N말단 아미노산 서열을 분석한 결과, Ala(Met)-Asn-Ala-Pro-Leu로 밝혀졌다. 현재까지 *Psychrobacter* 속으로부터 리파제 활성이 확인된 유일한 효소는 *P. immobilis* B10 리파제(Q02104)이며, 이 효소의 N말단은 Cys-Thr-Asn-Ala-Pro-Asn-Ala-Leu-Ala-Val-Asn-Thr로 알려져 있다. 따라서 리파제 S3는 N말단 5개 아미노산 중에서 3개가 *P. immobilis* B10 리파제와 일치하는 것으로 밝혀졌다. 이 결과는 리파제 S3가 아미노산 서열상에서 기존의 리파제 효소와 상당히 다른 신규한 효소일 가능성을 보여주고 있다.

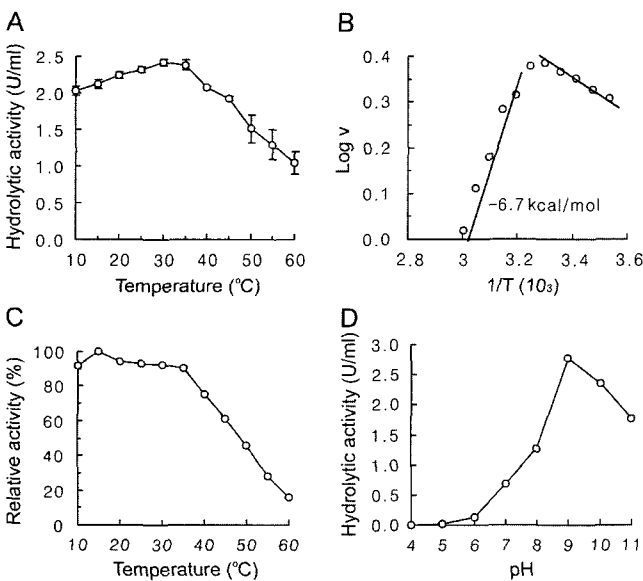


Fig. 4. Effects of temperature and pH on lipase S3. A. Hydrolytic activity toward pNPC was measured at different temperatures. B. 1/T-Log(v) graph was drawn to calculate activation and inactivation energy. C. Thermostability was measured. D. Hydrolytic activity was measured at different pHs.

부분정제된 효소액을 이용해서 리파제 S3의 온도와 pH 특성 및 기질특이성 등 생화학적 특성을 조사하였다. 10°C에서 60°C까지의 온도범위에서 효소의 pNPC 분해활성을 조사한 결과, 30°C에서 최적활성을 보였으며 넓은 온도범위에서 비교적 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4A). 10°C에서도 최대활성의 80% 이상을 유지하였다. 또한, 온도-활성그래프를 1/T-log(반응속도)그래프로 전환해서 이 효소의 활성화에너지(Ea)를 구한 결과, 온도범위 10~30°C에서 1.5 kcal/mol의 매우 낮은 값을 갖는 것으로 밝혀졌다(Fig. 4B). 이것은 온도에 따른 효소활성의 변화가 작은 경우에 나타나는 값으로서 이 효소가 전형적인 저온성 효소임을 명확히 보여 주는 결과이다[11].

여러 온도에서 30분간 열처리를 수행한 후, 잔존활성을 측정해보니 35°C까지 안정하고 그 이상의 온도에서 점차 활성이 감소하였다(Fig. 4C). pH 4에서 11까지의 범위에서 효소의 pNPC 분해 활성을 조사한 결과, 최적 pH는 9.0이었으며 중성보다는 알칼리조건에서 높은 활성을 갖고 있었다(Fig. 4D).

리파제 S3의 각종 트리글리세리드의 분해활성을 조사하였다. 짧은 사슬로부터 긴사슬의 지방산으로 구성된 트리글리세리드 기질을 대부분 분해 할 수 있으며, 이 중에서 트리뷰티린(tributyrin, C₄)과 트리팔미틴(tripalmitin, C₁₆), 트리미리스틴(trimyrustin, C₁₄) 기질에 대한 활성이 상대적으로 높았다(Fig. 5A). 또한, 천연오일/지방에 대한 가수분해활성을 조사한 결과, 예상대로 장쇄지방산(C₁₄, C₁₆)을 주성분으로 갖는 팜유 및 우지(beef tallow)에 대한 분해활성이 제일 좋은 것으로 나타났다(Fig. 5B).

Fig. 6은 리파제 S3를 TBN-아가로스 젤 상단에 가하고 온도별로 반응시킴으로써 젤의 투명도가 증가되는 것을 관찰한 결과이다. 효소의 분해작용에 의해서 젤의 상단부터 투명하게 변하였는데, 30°C와 40°C에서 가장 빠르게 진행되었다. 그러나, 4°C에서도 효소의 작용으로 TBN기질이 분해된 것이 관찰되었으며 이것은 리파제 S3가 4°C에서도 효소활성이 뛰어난 저온성 효소임을 증명하는 결과이다.

본 연구에서는 새만금 갯벌로부터 리파제 활성이 있는 *Psychrobacter* 균을 탐색하였으며, 이 균이 생산하는 리파제 효소의 트리글리세리드에 대한 반응 특성을 살펴보았다. 이 효소는 4°C에서도 활성이 있는 신규 저온성 효소로서 산업적 활용 가능성이 높은 것으로 추정된다.

요 약

새만금 갯벌로부터 리파제를 생산하는 균주(S3)를 분리하였다. 생리적, 발효적 특성 및 계통분류학적 특성을 통해서 이 분리균이 *Psychrobacter* 속에 속하는 것으로 판명되어서 *Psychrobacter* sp. S3로 명명하였다. 이 균의 온도에 따른 배양특성을 구한 결과, 30°C에서 성장속도가 가장 빨랐으나,

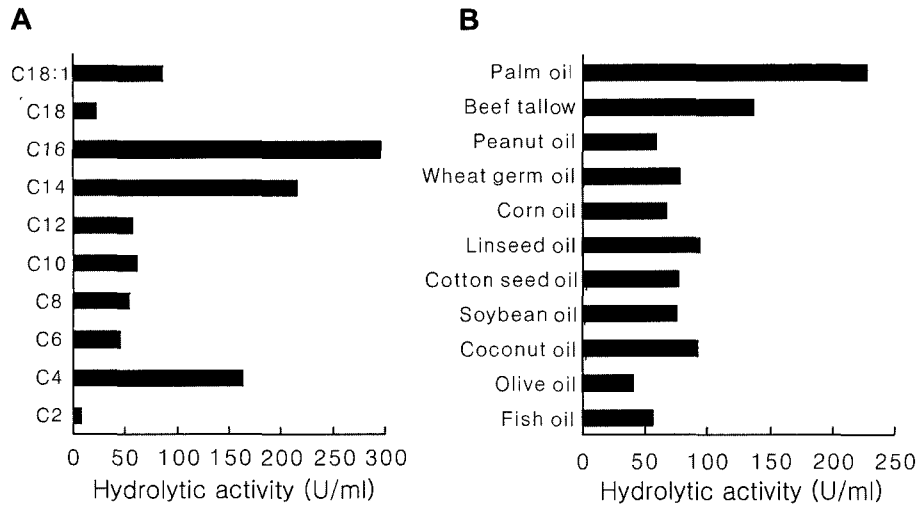


Fig. 5. Substrate specificity of lipase S3. A. Hydrolytic activity was measured toward various triglycerides. B. Hydrolytic activity was measured toward various natural fats or oils.

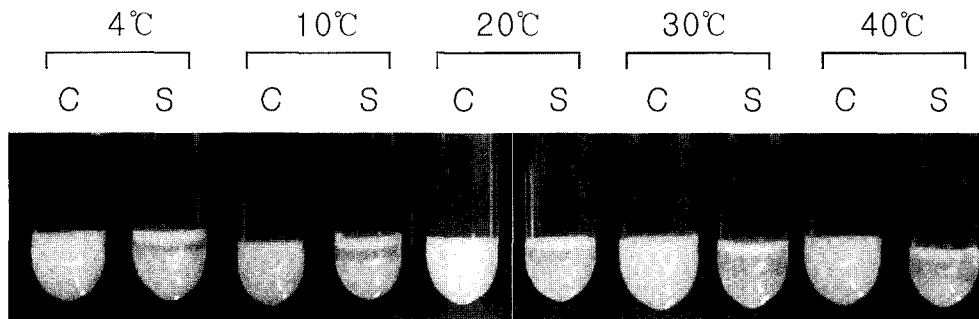


Fig. 6. Hydrolytic of TBN-agarose gel with lipase S3. TBN-agarose gel was hydrolyzed with lipase S3 at different temperatures. C, no enzyme; S, lipase S3.

리파제 효소의 활성은 20°C에서 가장 높았다. S3 리파제의 온도에 따른 *p*-nitrophenyl caproate 분해활성을 측정된 결과, 최적 온도가 30°C로 판명되었으며 10°C에서도 최고활성의 80% 이상의 활성을 유지하였다. 또한, 10~30°C 범위에서의 효소활성에너지가 1.5 kcal/mol로 매우 낮게 계산되었다. 이것을 통해 S3 리파제가 전형적인 저온성 효소임이 확인되었다. 이 효소는 최적 pH가 9.0~9.5인 알칼리성 효소로 확인되었다. 여러 길이의 트리글리세리드 기질을 분해할 수 있으며 그 중에서 C₄, C₁₄, C₁₆ 기질을 가장 빠르게 분해하였다. S3 리파제를 트리뷰티린-아가로스 젤에 가하여 온도별로 반응시킨 결과, 30°C와 40°C에서 반응이 빠르게 진행되었으나, 4°C에서도 분해가 진행되었다.

감사의 글

본 연구는 과기부 21세기 프론티어 미생물유전체활용기술 개발사업단의 지원(MG02-0101-001-1-0-0)으로 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Arpigny, J. L., G. Feller, and C. Gerday. 1993. Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**: 331-333.
2. Feller, G. and C. Gerday. 1997. Psychrophilic enzymes-molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 830-841.
3. Feller, G., E. Narinx, J. L. Arpigny, M. Aittaleb, E. Baise, S. Genicot, and C. Gerday. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 189-202.
4. Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J. P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D. Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georgette, A. Hoyoux, T. Lonhienne, M. A. Meuwis, and G. Feller. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**: 103-107.
5. Herbert, R. A. 1992. The perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* **10**: 395-402.
6. Ingraham, J. L. and J. L. Strokes. 1959. Psychrophilic bacte-

- ria. *Bacteriol. Rev.* **23**: 97-108.
7. Jaeger, K. E., S. W. Dijkstra and M. T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.
 8. Jaeger, K. K. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 390-397.
 9. Kim, H. K., H. J. Choi, M. H. Kim, C. B. Sohn, and T. K. Oh. 2002. Expression and characterization of Ca²⁺-dependent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim. Biophys. Acta* **1583**: 205-212.
 10. Kim, H. K., Y. J. Jung, W. C. Choi, H. S. Ryu, T. K. Oh, and J. K. Lee. 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**: 349-355.
 11. Kulakova, L., A. Galkin, T. Nakayama, T. Nishine, and N. Esaki. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly → Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 59-65.
 12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 13. Margesin, R. and F. Schinner. 1994. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *J. Biotechnol.* **33**: 1-14.
 14. Quinn, D. M., K. Shirai, R. L. Jackson, and J. A. K. Harmony. 1982. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl ester: inhibition by apolipoprotein-II. *Biochemistry* **21**: 6872-6879.
 15. Reetz, M. T. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150.

(Received Feb. 22, 2005/Accepted Mar. 14, 2005)