

Pseudomonas sp. J-19가 생산하는 Alkaline Lipase의 정제와 특성

신원철^{1*} · 정광선¹ · 유재홍¹ · 유주현²

¹강원대학교 공과대학 발효공학과, ²연세대학교 공과대학 식품공학과

Purification and Properties of Alkaline Lipase from *Pseudomonas* sp. J-19

Shin, Won-Cheol^{1*}, Kwang-Seon Jeong¹, Jae-Hong Yu¹ and Ju-Hyun Yu²

¹Department of Fermentation Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — A strain J-19 was isolated from soil, produced lipase which has resistant against alkali and linear alkylbenzene sulfonate. The strain was identified as *Pseudomonas* sp.. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex and Sephadex G-100 column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 35 unit/mg protein and the yield of enzyme activity was 17%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide disc gel electrophoresis. Molecular weight of the purified enzyme was estimated about 36,000 by Sephadex G-100 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature were pH 10.0 and 30°C, respectively. Activity of the purified enzyme was increased 2-fold by the addition of 0.1% linear alkylbenzene sulfonate and 2.5-fold by the addition of 0.05% Tide. This enzyme remained stable from pH 8.0 to 10.0 and stable up to 40°C.

Lipase(E.C. 3.1.1.3)는 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소로 (1), 1834년 Eberle에 의하여 토끼의 체액 중에서 처음 발견되었으며, 식물 및 미생물에도 존재하는 것으로 알려졌다(2). 이러한 lipase는 생체내에서 지방산의 전달, 산화 및 glyceride와 phospholipid의 재합성에 관여할 뿐만 아니라, 치즈 향기의 증진이나 야채의 발효에 유리지방산의 증가, 육류 숙성에 있어서 향기 증가 및 어류의 지방분해에도 작용한다고 보고되었다(3,4). 한편, Seitz(5)는 합성세제에 amylase나 protease를 혼합 사용하면 세탁 효과가 있고, 특히 lipase를 사용하면 세탁 효과가 향상된다고 보고하였다.

Lipase를 세제와 혼합 사용하기 위해서는 알칼리 내성과 detergent 내성이 중요한 문제로 되어 있다.

Key words: *Pseudomonas*, alkaline lipase, linear alkylbenzene sulfonate resistant lipase

*Corresponding author

알칼리 내성 lipase는 Watanabe 등(6)과 Kokusho 등(7)이 토양으로부터 생산균주를 분리하여 균주의 동정 및 lipase의 분리정제에 관한 보고가 있을 뿐 알칼리 내성과 detergent 내성이 있는 lipase에 관한 보고는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 세제와 혼합 사용할 수 있는 lipase를 개발하기 위하여 토양으로부터 분리한 알칼리 내성 및 linear alkylbenzene sulfonate(LAS) 내성인 lipase 생산균주의 동정과 lipase의 정제 및 효소학적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 정 등(8)이 춘천시 근교의 토양으로부터 분리한 J-19 균주를 사용하였다.

균주의 동정

J-19 균주의 동정은 Microbiology a laboratory manual(9), Manual of methods for general bacteriology(10), 미생물의 분류와 동정(11), Bergey's manual of determinative bacteriology(12) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology(13) 등에 수록되어 있는 일반적인 세균 동정법에 따라 행하였다.

효소활성 측정법

Yamada 등(14)의 방법을 이용하여 다음과 같이 lipase 활성을 측정하였다.

Intralipos(glycerin 2.5 g, soybean oil 10 g, lecithin 1.2 g, 증류수 100 ml를 10,000 rpm에서 15분간 유화) 90 ml에 LAS(linear alkylbenzene sulfonate) 0.1 g을 넣고 0.5 M glycine-NaOH 완충용액 10 ml를 가한 후 2 N NaOH로 pH 10.0으로 조절하여 기질로 사용하였다. 기질 2 ml를 시험관에 넣어 37°C에서 5분간 방치한 후 효소액 0.1 ml를 넣어 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 떨어뜨린 후 0.05 N HCl로 적정하였고, 대조구는 기질 2 ml에 증류수 0.1 ml를 넣어 위의 방법과 동일하게 행하였다. 효소의 1 unit는 1분간에 1 μ mole의 지방산을 유리하는 효소의 양으로 하였다(15).

단백질 정량

단백질량은 Lowry 등(16)의 방법에 따라 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준단백질로 사용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

조효소액의 조제

효소생산 배지(glycerin 20 g, corn steep liquor 10 g, yeast extract 20 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, K₂HPO₄ 2 g, soybean oil 15 ml, LAS 1 g, 1l, pH 10.0)에서 25°C, 72시간 진탕배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 20 분)하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

조효소액에 ammonium sulfate를 60% 포화농도가 되게 가해 4°C에서 하룻밤 처리하였다. 원심분리하여

효소단백질을 회수하고 소량의 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 뒤, Sephadex G-25 column chromatography를 행하여 ammonium sulfate를 제거하였다. 탈염한 효소액을 DEAE-Sephadex column(column size ; 2.0×30 cm, flow rate 9 ml/hr)에 흡착시킨 후 이온강도를 증가시키면서 용출하여 활성부위를 모았다. 이를 Sephadex G-100 column(column size ; 2.4×60 cm, flow rate 5 ml/hr)에 넣은 후 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 용출하여 활성부위를 모은 뒤 다시 같은 조건하에서 gel filtration을 행하여 정제하였다.

전기영동

Polyacrylamide disc gel 전기영동은 Davis(17)의 방법에 따라 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 coomassie brilliant blue로 염색하고 acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

분자량은 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 방법을 이용하여 측정하였다. Gel filtration은 Andrews(18)의 방법에 따라 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sephadex G-100(column size ; 2.4×60 cm)을 이용하여 행하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin(M.W. 66,000), egg albumin(M.W. 45,000) 및 egg white lysozyme(M.W. 14,000)을 사용하였다. 또한, SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli 등(19)의 방법에 따라 12.5% acrylamide gel을 조제하여 정제효소와 표준단백질을 전기영동시킨 후 coomassie brilliant blue로 염색하고 Fairbanks 등(20)의 방법에 따라 탈색하였다. 이 때 사용한 표준단백질은 hemoglobin, cross-linked bovine(Sigma Co. M.W. 16000, 32000, 48000, 64000)을 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

Alkaline lipase 생산균주의 전자현미경 사진을 Fig. 1에 나타내었으며 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 1과 같다.

분리균은 Gram음성의 단간균이었으며, 운동성이

있었고 절대 호기성이었으며 포자는 존재하지 않았다. 또한, catalase 양성, oxidase 양성 및 urease 양성을 나타내었다. 이상과 같은 특성으로부터 J-19 균주는 *Pseudomonas* 속으로 판단되어 *Pseudomonas* sp. J-19로 명명하였다.

효소의 정제

Pseudomonas sp. J-19가 생산한 alkaline lipase를 ammonium sulfate 침전, Sephadex G-25 gel filtration에 의한 탈염, DEAE-Sephadex column chromatography 및 Sephadex G-100 gel filtration을 행하여 정제한 결과, Table 2와 같이 비활성도는 35 unit/mg, 정제도는 70배이었으며 수율은 17%이었다. 정제효소를 polyacrylamide disc gel 전기영동을 행한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 단백질 band가 하나로 확인되어 본 효소는 단일성분으로 판단되었다. 또한 정제효소의 분자량은 Sephadex G-100 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 행한 결과(Fig.

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of the strain J-19.

1. Morphological characteristics	
Gram staining	Negative
Shape	Short rod
Cell size	0.5 × 2.0 μm
Motility	Motile
Flagella	Positive
Spore staining	Negative
2. Cultural characteristics	
Colony on nutrient agar (30°C, 1~2 days);	
Form	Punctiform
Surface	Mucoid
Elevation	Raised
Edge	Undulate
Opacity	Translucent
Color	Whitish cream
Brilliancy	Glistening
Nutrient broth (30°C, 1~2 days);	
Turbid with pellicle and sediment	
3. Physiological characteristics	
Temperature range for growth	4°C~42°C
pH range for growth	6.0-12.0
Catalase	Positive
Oxidase	Positive
Urease	Positive
Hydrolysis of starch and casein	Negative
Hydrolysis of cellulase and esculin	Negative
Utilization of citrate	Utilized
Voges-Proskauer test	Negative
Nitrate reduction	Positive
Denitrification	Positive
Levan formation from sucrose	Positive
O-F test	Oxidative
Methyl red test	Negative
Indole production	Negative

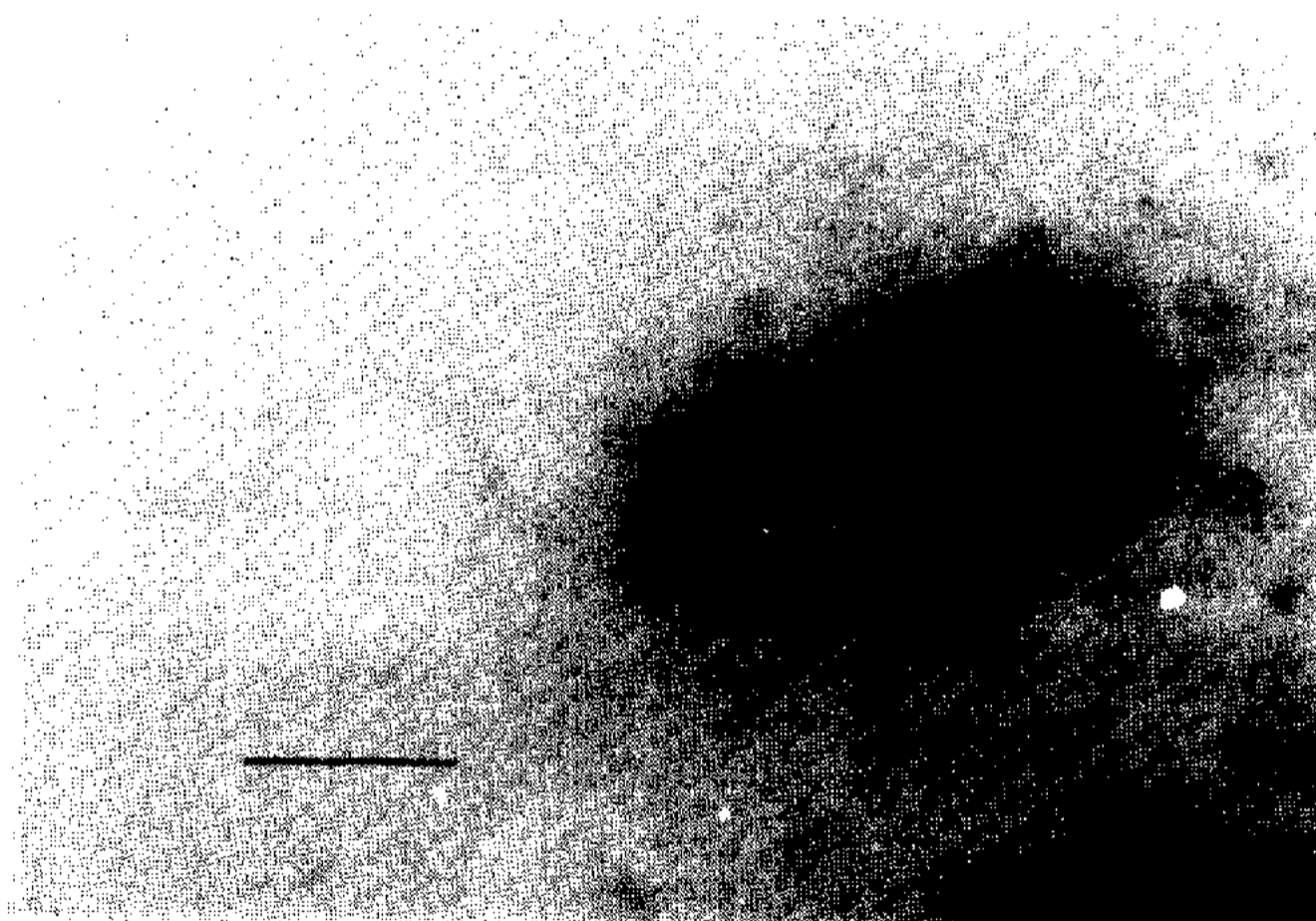


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain J-19 (× 21,000).
Bar equals 1 μm.

Table 2. Summary of purification procedure of alkaline lipase.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification (folds)
Crude enzyme solution	6,600	3,300	0.5	100	1
60% saturated (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	2,120	1,600	0.75	48.5	1.5
DEAE-Sephadex	90.6	1000	11.0	30.3	22.1
Sephadex G-100	37.6	648	17.2	19.6	34.2
Sephadex G-100	16.0	563	35.2	17.1	70.4

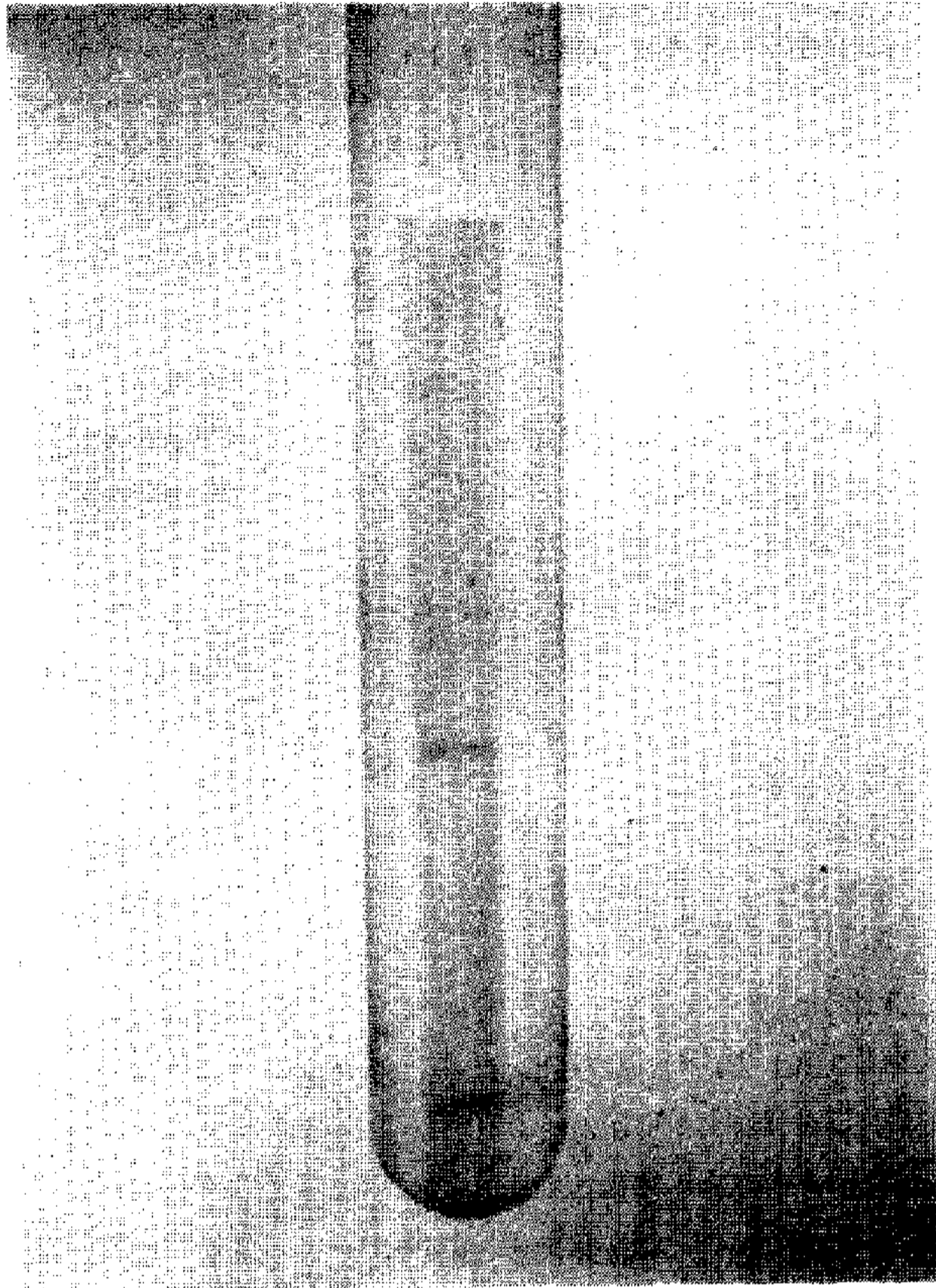


Fig. 2. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified lipase.
The enzyme was electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

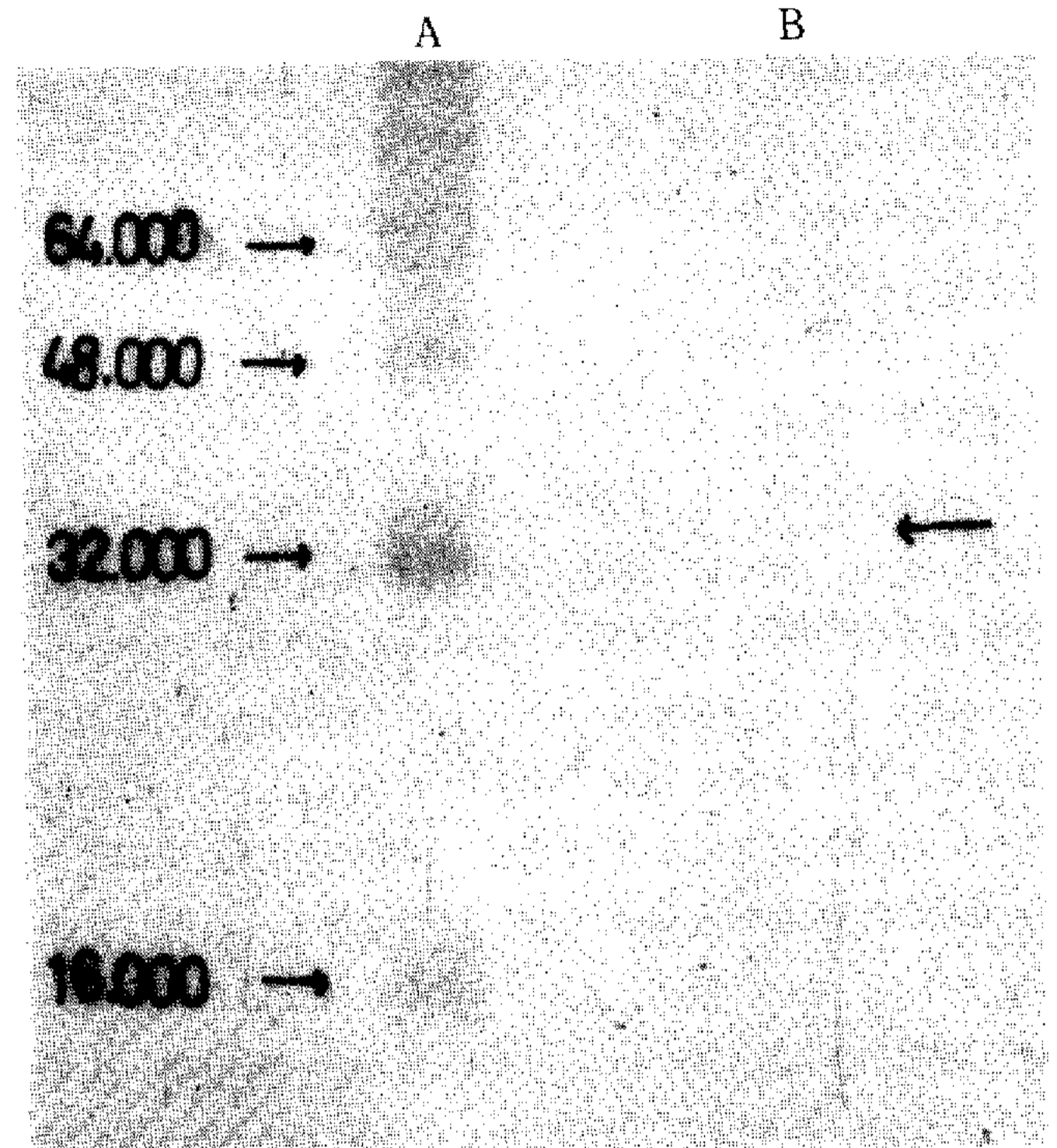


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified lipase.
The enzyme was electrophoresed on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel. The gel was stained with coomassie brilliant blue.
A: hemoglobin, cross-linked bovine (M.W. 16,000~64,000)
B: purified lipase

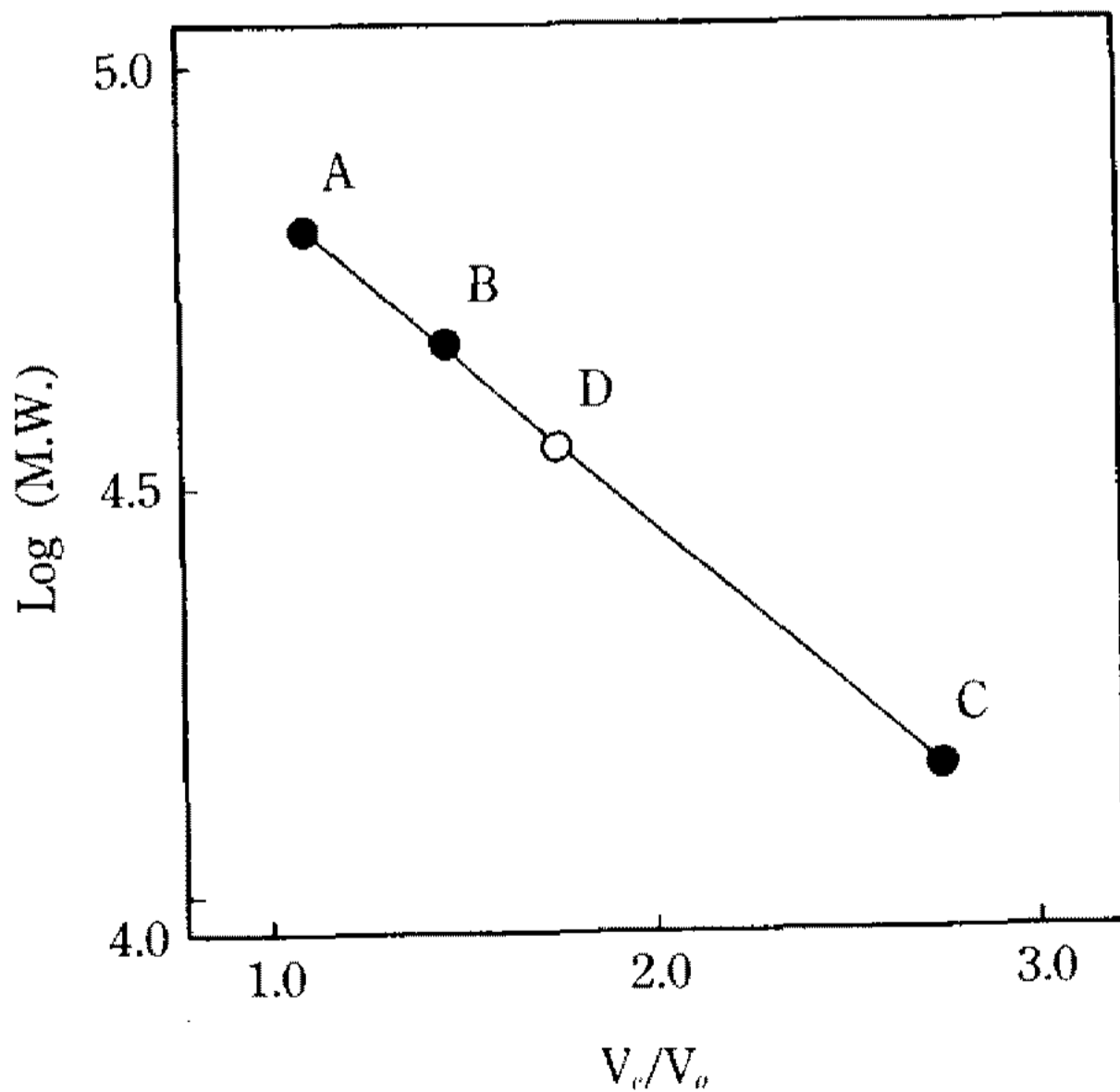


Fig. 3. Molecular weight determination of the purified lipase by gel filtration on Sephadex G-100.
A: bovine serum albumin (M.W. 66,000)
B: egg albumin (M.W. 45,000)
C: egg white lysozyme (M.W. 14,000)
D: purified lipase

3,4) 36,000 정도로 추정되었고, monomer 형태로 되어 있는 것을 알 수 있었다. Liu 등(21)은 *Humicola lanuginosa*가 생산하는 lipase 분자량이 27,000 정도라고 보고하였고, Nagaoka 등(22)은 *Mucor* sp.의 lipase 분자량을 30,000 정도라고 보고하였는데 본 효소는 이들 효소보다 분자량이 약간 큰 것으로 나타났다.

효소의 특성

본 효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 5~12의 pH에서 효소활성을 측정된 결과, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 pH 10.0에서 최대 활성을 보였으며 pH 11.0에서도 66%의 활성을 나타내었다. 이는 Watanabe 등(6)에 의해 분리된 *Pseudomonas fragi*와 *Pseudomonas nitroreducens* nov. var. *thermotolerans*의 최적 pH 9.5 보다 더 높은 pH에서 활성을 나타내었다. 또한 본 효소의 최적온도를 알아보기 위하여 10~50°C에서 효소활성을 검토한 결과 Fig. 6에서와 같이 30°C에서

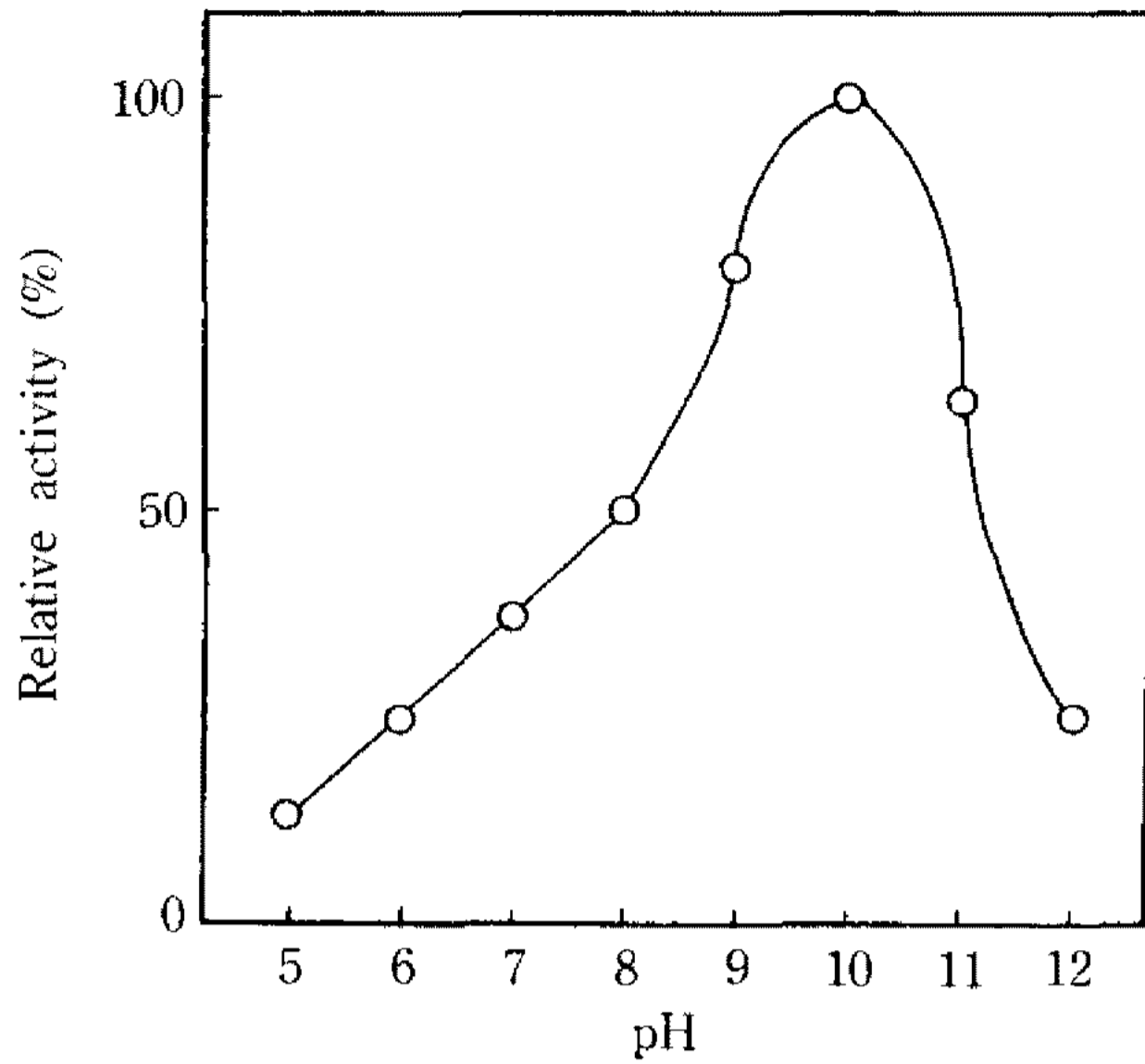


Fig. 5. Effect of pH on the lipase activity.
 The following buffer systems were used; sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.0), KH_2PO_4 -NaOH buffer (pH 6~7), Tris-HCl buffer (pH 8~9), glycine-NaOH buffer (pH 10.0), Na_2HPO_4 -NaOH buffer (pH 11~12). The enzyme activities were assayed at 30°C for 1 hour.

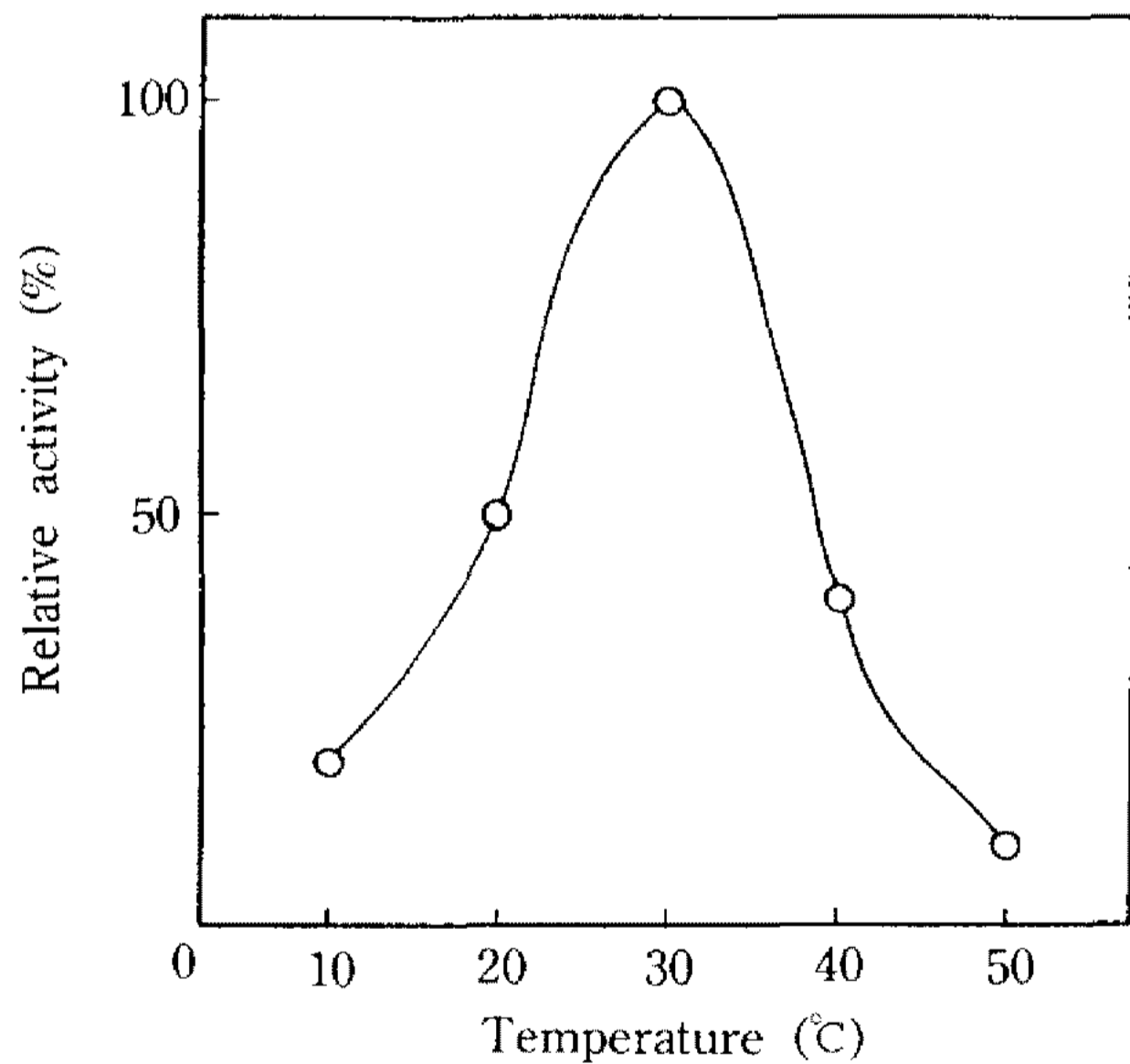


Fig. 6. Effect of temperature on the lipase activity.
 The reaction was carried out at the temperature indicated at pH 10.0 for 1 hour.

높은 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 Yamaguchi 등(23)이 보고한 *Chromobacterium viscosum* lipase의 반응최적온도 65°C와 Watanabe 등(6)이 보고한 *Pseudomonas nitroreducens* nov. var. *thermotolerans* alkaline lipase의 반응최적온도 50°C 및 박(24)이 보고한 *Pseudomonas aeruginosa* lipase의 반응최적온도 37°C와 비교하여 볼 때 본 효소는 비교적 낮은 온도

Table 3. Effect of LAS and Tide on the lipase activity.

LAS* (w/v)	Relative activity (%)	Tide (w/v)	Relative activity (%)
None	100	None	100
0.05	140	0.05	250
0.10	200	0.10	200
0.15	160	0.15	165
0.20	110	0.20	120
0.25	80	0.25	95

*LAS: linear alkylbenzene sulfonate
 The enzyme activities were assayed at 30°C for 1 hour (pH 10.0).

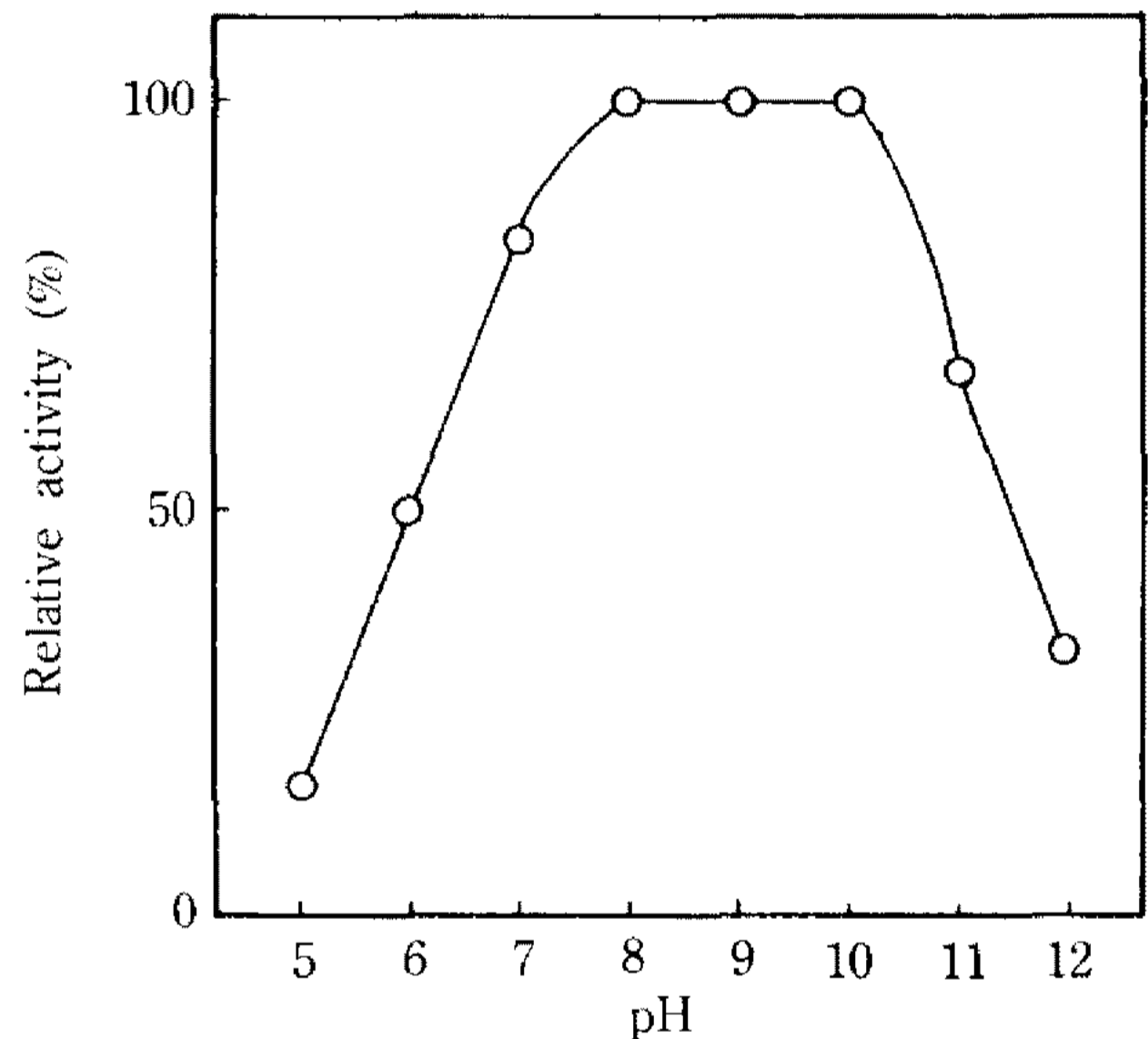


Fig. 7. Effect of pH on the lipase stability.
 The enzymes of various pH values were incubated for 24 hours at 30°C, and then the residual activity was assayed at 30°C for 1 hour (pH 10.0). The buffer systems were used same as the optimum pH.

에서 활성이 높다는 것을 알 수 있었다. 효소활성에 미치는 계면활성제인 LAS와 Tide의 영향을 검토한 결과, Table 3에 나타낸 바와 같이 LAS를 0.1% 첨가하였을 때 활성이 2배 증가하였고, Tide는 0.05%일 때 효소활성이 2.5배 증가하였다. 이와 같은 결과로부터 본 효소는 저농도의 계면활성제에 효소활성이 증가되어 세제와 혼합 사용이 가능할 것으로 생각된다. 본 효소의 pH에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 pH 8.0~10.0 범위에서 안정하였으며 pH 7.0에서는 20%, pH 11.0에서는 34% 정도 실활되었다. 박(24)이 보고한 lipase는 pH 7.0

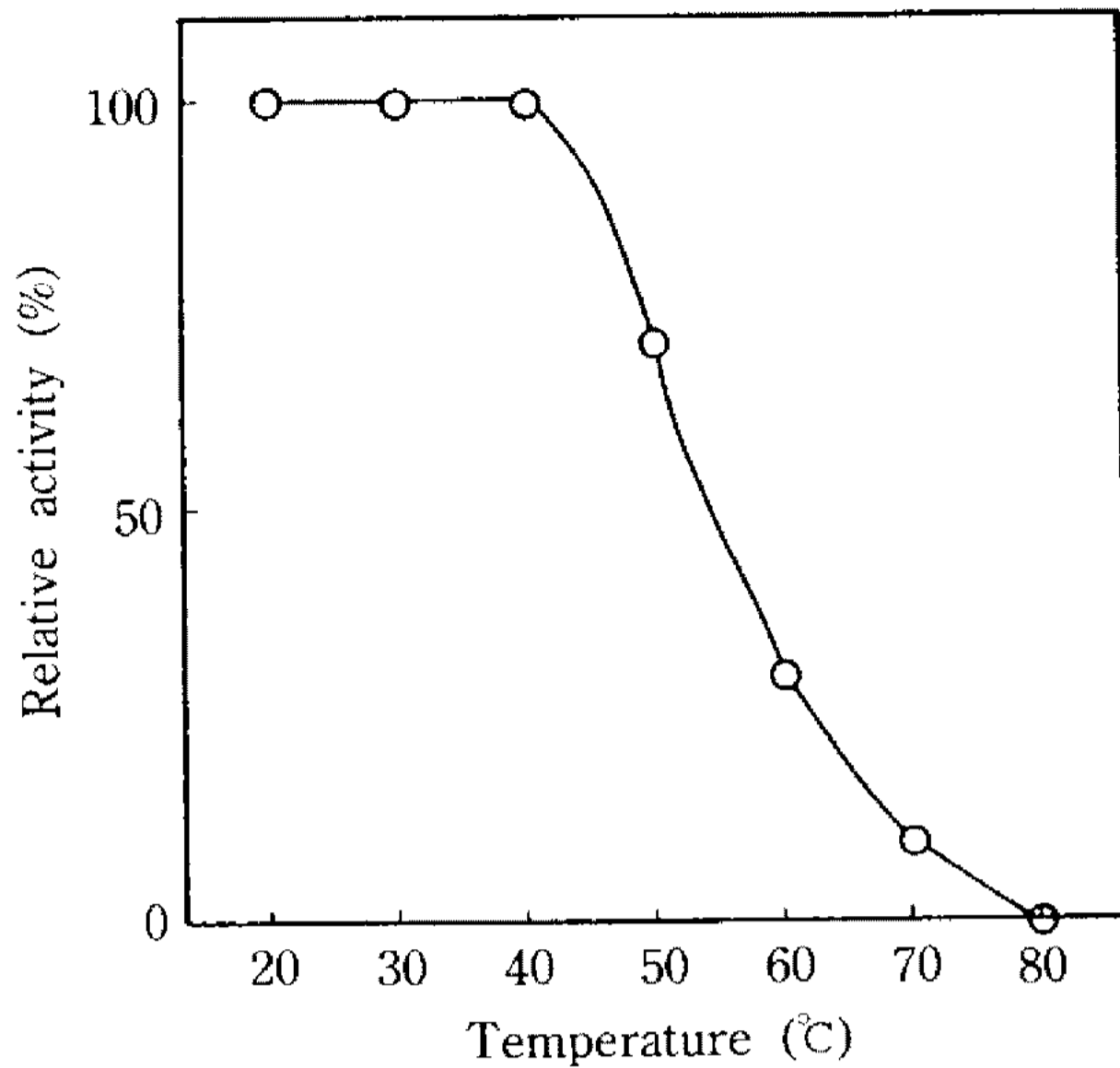


Fig. 8. Effect of temperature on the lipase stability. The enzyme was incubated in glycine-NaOH buffer (pH 10.0) at various temperatures for 30 min, and then residual activity was assayed at 30°C for 1 hour (pH 10.0).

에서 가장 안정하였고, Watanabe 등(6)은 pH 9.0에서 안정하였다고 보고하였다. 따라서 본 효소는 이들 효소보다 알칼리 pH에서의 안정성이 우수하였다. 한편, 본 효소의 온도에 대한 안정성을 검토하기 위하여 20~80°C에서 30분 동안 처리한 후 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 본 효소는 40°C까지 안정하였으나 50°C에서는 70%, 60°C에서는 33%의 활성을 나타내어 온도에 민감하다는 것을 알 수 있었다. Nagaoaka 등(25)은 *Mucor lipolyticus*가 생산하는 lipase는 37°C에서 1시간, Sugiura 등(26)이 보고한 *Pseudomonas fluorescens* lipase는 40°C 이하에서 안정하였다는 결과와 비교하여 볼 때 본 효소는 이들 효소와 비슷한 경향을 보였다.

요 약

토양으로부터 분리한 알칼리 내성 및 linear alkylbenzene sulfonate 내성인 lipase 생산균주를 동정하여 *Pseudomonas* sp. J-19로 명명하였다. 호알칼리성 lipase는 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex와 Sephadex G-100 column chromatography로 정제하였고, 정제효소의 비활성도는 35 unit/mg protein, 수율은 17%이었다. 정제효소는 polyacrylamide disc gel 전기영동에서 단일 band를 나타내었고, Sephadex G-

100 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 추정된 분자량은 36,000이었다. 정제효소의 최적 pH는 10.0, 최적온도는 30°C이었다. 정제효소의 활성은 0.1% linear alkylbenzene sulfonate 첨가에 의하여 2배 증가되었고, 0.05% Tide에 의하여 2.5배 증가되었다. 정제효소는 pH 8.0~10.0, 40°C 이하에서 안정하였다.

감사의 말

본 연구는 1986년도 문교부 자유과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

1. Shahani, K.M.: Enzymes in Food Processing, Academic Press, N.Y., 2nd ed., (1975).
2. Whitaker, I.R.: Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, Inc. N.Y., (1972).
3. Shahani, K.M., R.G. Arnold, A. Kilara and B.K. Dwivedi: *Biotech. Bioeng.* **18**, 891 (1976).
4. Nelson, J.H.: *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **49**, 559 (1972).
5. Seitz, E.W.: *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **51**, 12 (1974).
6. Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada: *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1353 (1977).
7. Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki: *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1159 (1982).
8. 정광선, 함철주, 신원철: 강원대학교 산업기술연구소 논문집, 7, 59(1987).
9. Cappuccino, J.G. and N. Sherman: *Microbiology a laboratory manual*, Benjamin and Cummings, California, (1975).
10. Gerhardt, R., R.G.E. Murray, R.N. Costilow and E.W. Nester: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society Microbiology, (1981).
11. 長谷川武治: 微生物 分類 同定, 東京大學出版會, (1975).
12. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbson: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins, 8th ed., (1974).
13. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, (1986).
14. Yamada, K., Y. Ota and H. Machida: *J. Agric. Chem. Soc.* **36**, 860 (1962).
15. Bergmeyer, H.U.: *Methods of Enzymatic Analy-*

- sis, Academic Press, N.Y., Vol. 2, (1974).
16. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 17. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
 18. Andrews, P.: *Biochem. J.* **91**, 222 (1964).
 19. Laemmli, U.K. and M. Favre: *J. Mol. Biol.* **80**, 575 (1973).
 20. Fairbanks, G., T.L. Steck and D.F.H. Wallach: *Biochem.* **10**, 2606 (1971).
 21. Liu, W.H., T. Beppu and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2493 (1973).
 22. Nagaoka, K. and Y. Yamada: *Agric. Biol. Chem.* **33**, 986 (1969).
 23. Yamaguchi, T., N. Muroya, M. Isobe and M. Sugiura: *Agric. Biol. Chem.* **37**, 999 (1973).
 24. 박현주 : 연세대 석사학위논문(1986).
 25. Nagaoka, K. and Y. Yamada: *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2791 (1973).
 26. Sugiura, M., T. Oikawa, K. Hirano and T. Inukahi: *Biochem. Biophys. Acta.* **488**, 353 (1977).

(Received December 23, 1990)