

## Lipase 생산 효모균주의 분리 및 배양조건 최적화

박명훈 · 류현진 · †오경근

단국대학교 공업화학과

(접수 : 2004. 3. 9., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

## Isolation of Lipase Producing Yeast and Optimization of Cultivation Condition

Myoung-Hoon Park, Hyun Jin Ryu, and Kyeong Keun Oh†

Department of Industrial Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received : 2004. 3. 9., Accepted : 2004. 4. 25.)

Lipase catalyzes the hydrolysis of glycerides into fatty acids and glycerol. The study of microbial lipases has been stimulated in recent years. It is due to the potential uses of lipases in esterification of oils to glycerol, alcohols and carbohydrates. Development of lipase producing yeast has been focused concerning to the utilization of yeast culture for animal feed. In this study, yeast like cells were isolated from a waste oil and sludge. A strain having higher lipase activity was selected by random mutagenesis using UV-radiation. The optimal cultivation conditions in submerged culture were examined in terms of lipase production. 2.0% of high fructose syrup, 1.0% of CSL, and 1.0% of olive oil were selected as the nutritional media for the production of lipase. The maximum lipase activity of 1.12 U/ml and viable cell number of  $8.8 \times 10^7$  cells/mL were obtained at 27°C with an initial pH of 5.0.

**Key Words :** Lipase, lipase producing yeast, mutagenesis, lipase activity

### 서론

Lipase (glycerol ester hydrolase EC 3.1.1.3)는 지질과 물의 현탁액 (emulsion)의 상태에서 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소(1)를 총칭한다. 이 효소는 동물의 혈액에서 처음으로 발견된 이래, 동물의 폐, 신장, 부신, 지방 조직, 태반 등과 식물의 밀이나 아주 까리, 콩 등의 종자 내에 존재함이 밝혀졌으며, 곰팡이, 효모, 세균 등에 존재하는 미생물성 lipase도 발견되어져 생물계 전반에 lipase가 널리 분포되어 있음이 확인되었다(2).

이 중, 미생물성 lipase는 racemic 혼합물의 가수분해나 에스테르와 펩타이드의 합성, 지방산의 생산과 가수분해, 식품이나 세제 첨가제 등 그 응용 범위가 매우 다양하여 미생물성 lipase의 공업적 이용에 관한 연구들(3, 4)이 활발한 진행 중에 있으며, 현재 *Rhizopus delemar* lipase(5), *Candida cylindracea* lipase(6-8), *Candida parapolityca* lipase(9) 등은

공업적으로 생산되어지고 있다.

그러나 lipase는 기질이 불용성이므로 효소반응의 부위와 물과 지질의 interface임을 고려한 효소의 최대 역가를 위해서는 emulsion을 증가시켜야 하고, 기질에 따라 구성 지방산의 종류와 함유율이 차이를 보이기 때문에 정확한 작용 기작을 알기 어려우며, 기질의 공급원이 주로 동물의 기관, 혹은 식물의 종자 등으로 극히 제한되어 있어 그 응용이 매우 어려운 실정이다(2). 또한 미생물성 lipase는 영양원의 급원에 따라 기질 특이성, 작용기작 등의 특이성이 다양하고 lipase의 역가 또한 배양조건에 따라 차이를 보이므로 미생물성 lipase의 생산성에 관한 연구를 위해서는 우수균주의 분리 및 동정, 배양조건 및 효소역가 측정 등에 대한 전반적인 지식이 뒷받침 되어야 할 것이다.

최근 들어 효모 배양물의 동물사료적 이용가치에 대한 관심이 높아지고 있다. 효모 배양물과 같은 미생물체의 사료첨가제로서의 기능은 반추위동물의 장내 미생물의 균형을 유지하고, 영양소의 소화율 및 가축의 생산성을 개선시킬 수 있다고 보고 되었다.

본 연구에서는 (주)강남유지로부터 채취한 폐유와 슬러지로부터 lipase를 생산하는 효모 균주를 분리하였으며, 분리된 균주의 자외선 돌연변이를 통해 lipase 생산성이 높은 균주를

† Corresponding Author : Department of Industrial Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea  
Tel : +82-41-550-3558, Fax : +82-41-554-4769  
E-mail : kkoh@dankook.ac.kr

개발하고자 하였다. 또한 자외선 돌연변이 선별 균주의 증식 곡선을 관찰하여 효소 생성관계를 조사하고, 배양조건을 최적화함으로써 선별균주로 하여금 lipase의 역가를 향상시키고자 하였다.

**재료 및 방법**

**균주의 분리**

Lipase 생산균의 분리를 위해 (주)강남유지로부터 채취한 폐유와 슬러지를 균 분리원으로 이용하였다. 슬러지 1 g과 폐유 1 mL, 그리고 증류수 50 mL를 진탕배양기 (K. M. C-8480SFN, Vision Scientific Co., LTD., Korea)에서 200 rpm으로 1시간 동안 혼합한 후, 혼합액을 NA (Nutrient Agar) 배지와 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에 분주하여 30°C에서 36시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 세포군체를 한천배지에서 순수분리 배양한 후 광학현미경 (CH-2, OLYMPUS Co., USA)으로 균주의 형태를 관찰하여 효모로 추정되어지는 균주를 선별하였다.

**자외선 돌연변이를 통한 변이주의 선별**

선별한 균주를 PDB (Potato Dextrose Broth)배지에서 36시간 동안 배양한 후, 균체 수가  $1 \times 10^3$  cells/mL이 되도록 멸균수로 희석하였다. 희석액은 1%의 올리브유가 첨가된 PDA 배지에 100  $\mu$ l씩 분주하고, 10초 간격으로 자외선 ( $18.8 \times 10^2$  Watt/mm<sup>2</sup>)을 조사시킨 후 배양기 (MIR-153, Sanyo Co., Ltd., Japan)를 이용, 30°C에서 36시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 균체들은 0.1%의 tetracycline을 포함한 PDB 평판배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 2% agar)에 접종하여 배양한 후, 각 배지 상의 기름이 분해된 영역과 세포균체의 직경을 측정하여 세포균체의 직경에 대한 분해된 기름영역의 비율을 비교함에 의해 lipase 역가가 높은 변이주를 선별하였다.

**Lipase 역가 측정**

선별된 변이주를 PDB배지를 이용, 30°C에서 36시간 동안 배양한 후, 배양액을 10000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 분리한 상등액을 시료로 이용하였다. 1 mL의 시료를 반응혼합물 (10%의 올리브유를 함유한 isooctane 10 mL + 물 10 mL)에 가하여 진탕항온수조를 이용, 37°C, 150 rpm에서 30분 동안 반응시킨 후 6N HCl을 첨가하여 30초 동안 혼합하였다. 혼합액 2 mL을 시험관으로 옮겨 0.5 mL의 cupric acetate-pyridine 시약을 첨가하였다. isooctane에 용해된 지방산의 양은 지방산의 농도와 흡광도의 검정곡선을 이용, 710 nm에서 분광광도계 (CMF80, Hanil Science Industrial, Korea)에 의해 측정되었다. Lipase 효소 역가는 37°C에서 1분 동안 1  $\mu$ mol의 지방산을 분해하는 양으로 결정하였다(10).

**단백질 분석**

Bradford stock solution (95% 에탄올 10 mL + 88% 인산 20 mL + Serva blue G 35 mg)과 Bradford working buffer (증류수 85 mL + 95% 에탄올 3 mL + 88% 인산 6 mL + Bradford stock solution 6 mL)용액을 제조하였다. 배양액을 10000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액 100  $\mu$ l를 시험관에 넣고 1 mL의 Bradford working buffer를 가하여 혼합하였다. 2분 경과 후 분광광도계를

이용, 599 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준물질로는 1 mg/mL의 BSA (Bovine Serum Albumin)를 사용하였다(11).

**Cellulase 분석 (Filterpaper assay)**

Cellulase의 역가는 filter paper (Whatman No. 1)를 이용하여 분석하였다. filter paper를 50 mg (1 × 6 cm)이 되도록 자른 후 효소 0.5 mL과 0.05 M phosphate buffer (pH 5.8~6.0) 1 mL를 첨가하여 50°C에서 60분간 반응시켰다. 생성된 환원당 농도는 DNS 방법을 이용, 550 nm에서 분광광도계로 측정하였다.

**Amylase 분석 (Starch degradation)**

Amylase 역가는 Bernfeld 방법(12)에 의해 측정하였다. 1% 산화분분 용액 0.5 mL에 0.4 mL의 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8)와 0.1 mL의 효소액을 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시킨 후, 1 mL의 DNS 시약을 첨가하여 분광광도계를 이용, 흡광도를 측정 (at 540 nm)하여 amylase 역가를 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**Lipase 생산 균주 선별**

자외선 조사 균주의 생존율을 Fig. 1에 나타내었다. 본 실험에서는 자외선 ( $18.8 \times 10^2$  Watt/mm<sup>2</sup>) 투광시간을 120초로 한 5% 내의 생존된 균주를 대상으로 하여 lipase 역가를 측정하였으며, 각각의 균주에서의 lipase 역가를 비교한 결과, 12 m-70에서 세포균체의 직경에 대한 분해된 기름영역의 비율이 2.33으로 다른 변이주들의 지방분해 활성에 비해 다소 높은 값을 가져(Table 1), 이 균주를 lipase 생산균주로 선별하였다.

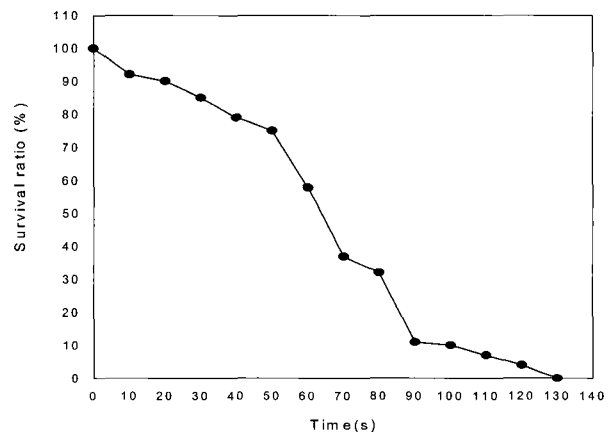


Figure 1. The survival ratio of selected strain treated with UV light ( $15.2 \times 10^3$  Watt/mm<sup>2</sup>).

**선별균주의 증식곡선과 효소생성관계**

선별균주의 lipase 생성을 위한 조건에서 배양시간에 따른 균의 증식과 효소 생성능을 조사한 결과, 균의 증식은 배양 8시간 이후 급격하게 이루어져 배양시간 24시간에  $5.15 \times 10^7$  cells/mL의 균체농도를 나타내었으며, lipase는 32시간에 0.50 U/mL로 최대에 도달하였다(Fig. 2). 배양액의 pH는 30시간까

지 급격하게 감소하였으나 그 이후에는 일정하게 유지되었다. 효소생성은 균의 증식과 함께 증가하였으나 배양 24시간 이후에는 효소 실패율이 일어남을 확인할 수 있었다.

Table 1. Lipase activities of mutants

Microorganism	Diameter of colony (mm)	Diameter of clear zone (mm)	Diameter of cleared zone / diameter of colony
9m-13	0.70	1.00	1.43
9m-21	0.70	1.10	1.57
9m-23	1.10	1.60	1.46
9m-24	1.00	1.50	1.50
11m-32	0.90	1.30	1.44
11m-34	1.20	1.65	1.37
12m-18	0.70	1.40	2.00
12m-21	0.65	1.20	1.84
12m-50	0.65	1.35	2.07
12m-64	0.60	1.10	1.83
12m-68	0.75	1.60	2.15
12m-70	0.60	1.40	2.33
control	0.85	1.05	1.23

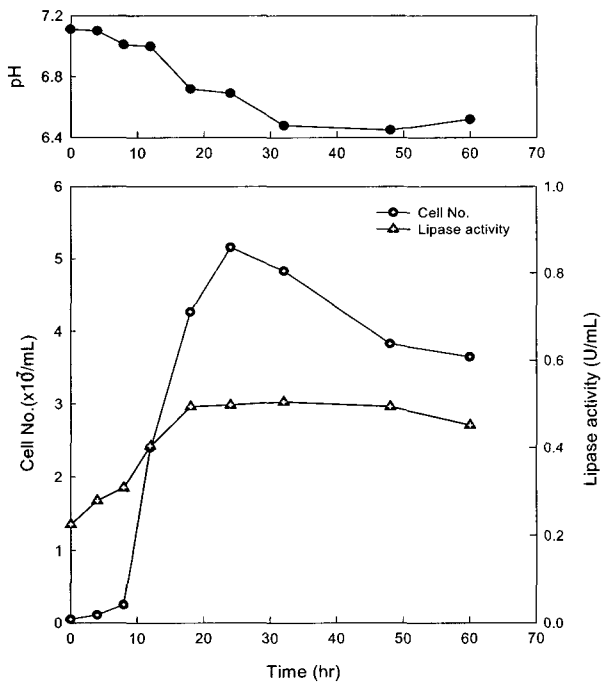


Figure 2. Growth characteristics of 12m-70 mutant and changes of lipase activity.

접종량 영향

Fig. 3은 접종량의 변화에 따른 균체의 성장과 효소역가의 효과를 나타낸 것이다. 접종량 2%에서 lipase 역가와 균체의 수가 각각 0.36 U/mL,  $2.43 \times 10^7$  cells/mL로 가장 적게 나타났으며, 4% 이상에서는 lipase 역가와 균체의 수가 각각 3.55~3.92  $\times 10^7$  cells/mL, 4.14~0.53 U/mL로 나타나 균체의 접종량이 균체수와 lipase 역가에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 본 실험

에서는 초기 접종량을 4%로 고정하여 실험을 수행하였다.

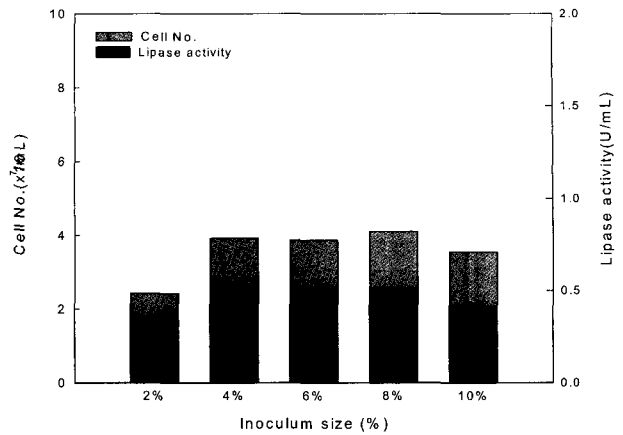


Figure 3. Effect of inoculum size on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

오일첨가에 의한 영향

오일의 농도에 따른 lipase의 생산성을 알아보기 위해 올리브유의 농도를 0~10%로 첨가하여 lipase 역가를 비교하여 보았다(Fig. 4). 오일이 첨가되지 않았을 때에는 lipase 활성이 0.14 U/mL를 나타낸 반면, 1% 오일이 첨가되었을 때 lipase 활성이 0.50 U/mL으로 증가하여 lipase의 생산은 오일 첨가에 의해 유도되어짐을 알 수 있었다. 오일의 농도를 2% 이상 10%까지 증가시켰을 때 lipase 역가가 더 이상 증가하지 않아 별 다른 경향성을 보이지 않았으며, 그러므로 본 실험에서는 배양시 1%의 올리브유를 첨가하여 실험을 수행하였다.

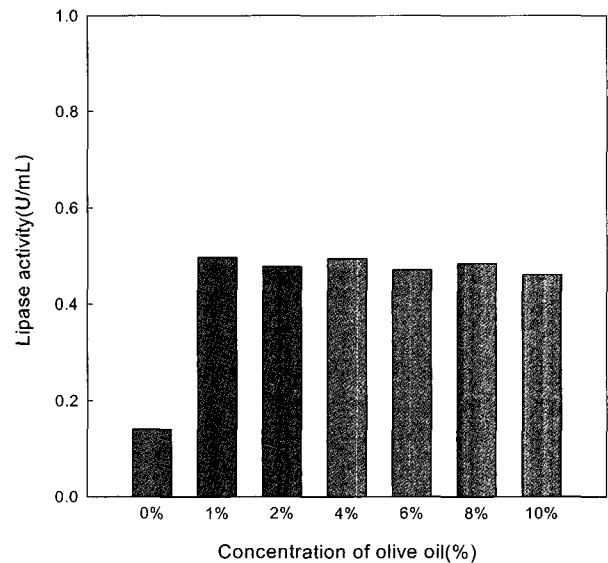


Figure 4. Effect of concentration of olive oil on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

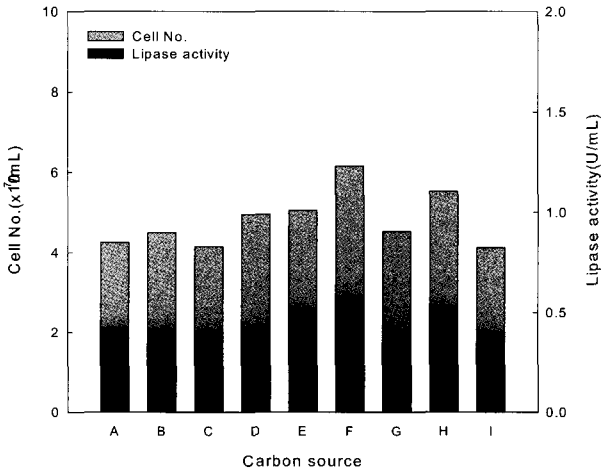
탄소원 영향

Lipase 생산 향상을 위한 균주의 성장조건 확립을 위해,

탄소원 선별 실험을 수행하였다. 탄소원으로는 포도당, fructose, sucrose, galactose, 옥수수전분, 고과당, 저당, 산화전분이 이용되었으며, 이들의 농도는 모두 1%로 고정하였다. 이 때, 질소원은 1% yeast extract로 동일하게 사용하였으며 1% 올리브유를 첨가하였다. Fig. 5에서 알 수 있듯이, 대조구로 사용한 PDB와 시약급 탄소원 (포도당, fructose, sucrose, galactose)에서는 비슷한 실험값을 얻었으며, 고과당 (균체수:  $6.13 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.58 U/mL)과 산화전분 (균체수:  $5.25 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.53 U/mL)을 이용했을 때, 비교적 높은 lipase 역가가 나타남을 확인할 수 있었다. Fig 6은 고과당과 산화전분의 농도에 따른 lipase 역가의 변화를 나타낸 것이다. 두 탄소원 모두 2%의 농도에서 가장 높은 lipase 역가를 나타내었으며, 고과당에서 좀 더 높은 lipase 역가 (0.67 U/ml)를 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 2%의 고과당을 최종 탄소원으로 선정하였다.

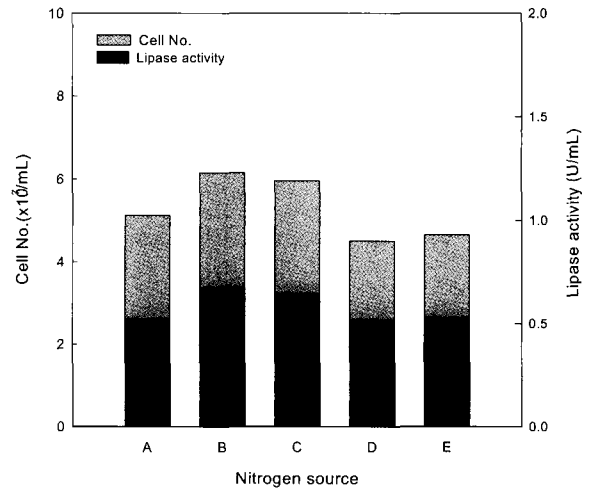
**질소원 영향**

질소원 선정을 위해 4가지의 질소원 (대두박, corn steep liquor, 산업용 양조효모, yeast extract)이 이용되었으며, 이들의 농도는 각각 0.5%로 고정하였다. 탄소원으로는 2%의 고과당을 이용하였으며 1%의 올리브유를 첨가하였다. Fig. 7은 각각의 질소원에 따른 균체수와 lipase 역가를 나타낸 것이다. 대조구에서는 균체수:  $5.12 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.52 U/mL인데 비해, 산업용 양조효모 (균체수:  $5.95 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.65 U/mL)와 CSL (균체수:  $6.15 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.68 U/mL)에서 약간 높은 셀 수와 lipase 역가를 얻을 수 있었다. Fig. 8은 산업용 양조효모와 CSL의 농도에 따른 lipase 역가를 나타낸 것이다. 두 질소원 모두 1%에서 최대의 lipase 역가를 나타내었으며, CSL에서 다소 높은 lipase 역가 (0.62 U/mL)를 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 1%의 CSL을 최종 질소원으로 선정하였다.



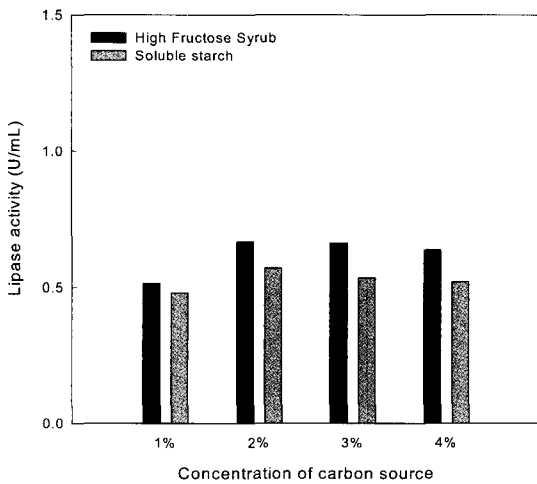
A : glucose, B : fructose, C : sucrose, D : galactose, E : corn starch  
F : high fructose syrup, G : low dextrose syrup, H : soluble starch, I : PDB

**Figure 5.** Effect of carbon source on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

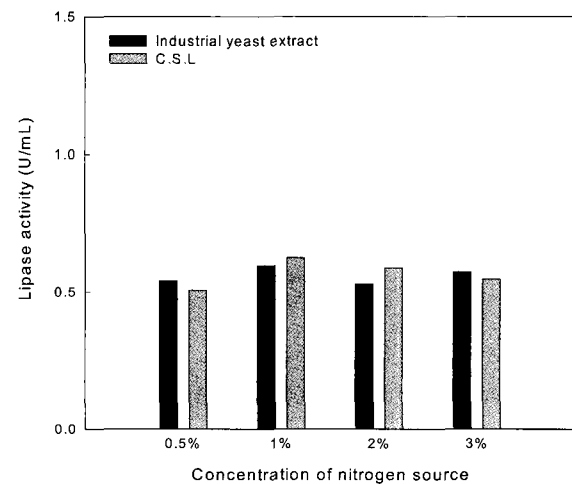


A : Soy bean meal, B : CSL, C : Industrial yeast extract, D : Yeast extract, E : PDB

**Figure 7.** Effect of nitrogen source on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.



**Figure 6.** Effect of concentration of carbon source on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.



**Figure 8.** Effect of concentration of nitrogen source on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

**초기 pH 영향**

배양배지의 초기 pH가 균체성장 및 lipase 역가에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본 배지의 초기pH를 4-9로 조절하여 실험을 수행하였다. Fig. 9는 초기 pH의 변화에 따른 균체 수와 lipase 역가의 변화를 나타낸 것이다. Fig. 9에서 볼 수 있듯이, pH 5에서 가장 높은 균체 수와 lipase 역가가 관찰되었으며, pH가 증가할수록 균체 수와 lipase 역가가 감소하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 균체 수와 lipase 역가가 가장 높은 초기 pH 5를 최적의 pH 조건으로 결정하였으며, 이 때의 균체 수와 lipase 역가는 각각  $6.10 \times 10^7$  cells/mL, 0.66 U/mL으로 대조구 (균체수:  $4.95 \times 10^7$  cells/mL, lipase 역가: 0.49 U/mL)에 비해 약 30% 증가했음을 알 수 있었다.

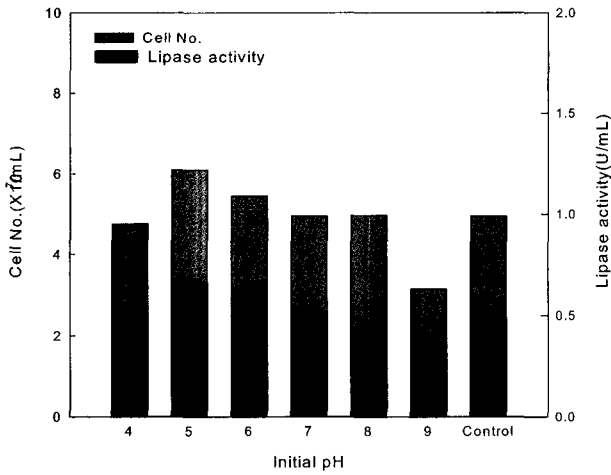


Figure 9. Effect of initial pH on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

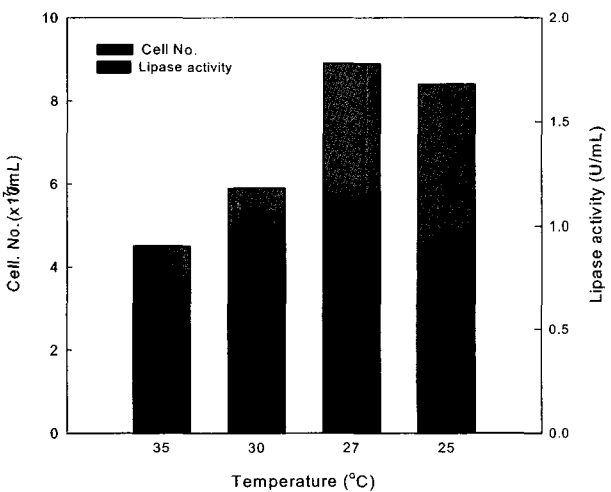


Figure 10. Effect of temperature on the cell growth and lipase production of 12m-70 mutant.

**온도의 영향**

Fig. 10은 초기 배양배지의 온도를 25°C에서 35°C까지 변화시켰을 때의 균체 수 및 lipase 역가를 나타낸 것이다.

Fig. 10에서 볼 수 있듯이, 배양온도 25°C와 27°C에서의 균체 수는 각각  $8.40 \times 10^7$  cells/mL와  $8.90 \times 10^7$  cells/mL로 비슷한 값을 가졌으나, 27°C 이상의 온도에서는 온도가 높아질수록 균체 수가 감소하는 경향을 나타내었다. lipase 역가는 27°C의 배양온도에서 가장 높은 값 (1.23 U/mL)을 얻을 수 있었으며, 27°C 이상의 배양온도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 균체 성장과 lipase 역가 모두를 고려한 최적 배양온도는 27°C로 결정하였다.

Table 2. Protein content and enzyme activity of 12m-70

	PDB (control)	Optimal condition	Commercial <i>S. cerevisiae</i>
Cell No.	$4.85 \times 10^7$	$8.80 \times 10^7$	$1.83 \times 10^8$
Protein content (mg/mL)	0.15	0.29	0.35
Lipase activity (U/mL)	0.51	1.12	0.27
Amylase activity (U/mL)	0.36	0.37	0.40
Cellulase activity (U/mL)	0.02	0.04	0.06

**최적화된 배양조건에서의 효소역가**

Table 2는 lipase 역가의 향상을 고려한 최적화된 배양조건에서의 배양액 내의 효소 역가와 단백질 함량, 균체 수를 나타낸 것이다. 최적화된 조건에서의 amylase의 역가와 cellulase의 역가는 각각 0.37 U/mL, 0.04 U/mL로 대조구 (amylase 역가: 0.36 U/mL, cellulase 역가: 0.02 U/mL)와 비교하여 별 다른 차이를 나타내지 않았으나, 균체 수와 단백질 함량은 각각 두 배가 증가한 것을 확인할 수 있었다. lipase 역가 또한 최적배양조건에서 1.12 U/mL (대조구: 0.51 U/mL)까지 증가하여 배양조건 최적화를 통한 선별된 변이 균주의 lipase 생성능 향상을 확인할 수 있었다.

**요 약**

활성 효모의 동물사료 첨가제로의 이용성을 증진시키기 위하여 lipase 생산성이 높은 효모를 (주)강남유지로부터 채취한 폐유와 슬러지로부터 분리하였다. 분리된 균주를 이용, 자외선 돌연변이를 통해 lipase 생산성이 높은 균주를 개발하였으며 산업용 배양배지의 선별, 배양공정의 개선에 관한 연구를 수행하였다. 산업용 배지의 탄소원으로는 고과당, 질소원으로는 CSL이 각각 선정되었으며, 2%의 고과당, 1%의 CSL에서 배양조건을 최적화시키고자 하였다. 1%의 올리브유 첨가, 접종량 4%, 초기 pH 5, 그리고 배양온도 27°C에서 lipase의 생산성이 최대가 됨을 확인할 수 있었으며 이 때 lipase 역가는 1.12 U/mL를 얻을 수 있었다.

**감 사**

본 연구는 2003학년도 단국대학교 대학 연구비의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Desnuelle, P. (1972), The Lipases, In P. D. Boyer ed., p575-616, Academic Press, New York and London.
2. 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**, 161-168.
3. Bjorkling, F., S. E. Godtfredsen, and O. Kirt (1991), The Future Impact of Industrial Lipases, *Trends Biotechnol.* **9**, 360-363.
4. Malcata, F. X. (1996), Engineering of/with Lipases: Scope and Strategies, p1-16, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
5. Iwai, M. and Y. Tsujisaka (1974), The Purification and Properties of Three Kinds of Lipases from *Rhizopus delemar*, *Agr. Biol. Chem.* **38**, 1241-1247.
6. Yamada, K. and H. Machida (1962), Studies on the Production of Lipases by Microorganisms, I/II., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.* **36**, 858-864.
7. Yamada, K. and H. Machida (1963), Studies on the Production of Lipases by Microorganisms, III., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.* **37**, 645-648.
8. Kawase, M. and A. Tanaka (1989), Effects of Chemical Modification of Amino Acid Residues on the Activities of Lipase from *Candida cylindracea*, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 44-48.
9. Ota, Y. and K. Yamada (1963), Studies on the Production of Lipases by Microorganisms, V., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.* **37**, 653-657.
10. Kwon, D. Y. and J. S. Rhee (1986), A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay, *JAOCs.* **63**.
11. Diniel, M. B. and J. E. Stuart (1991), Protein Methods, p50-51, John Wiley & Sons, Inc., New York.
12. Ugwuanyi, J. O., L. M. Harvey, and B. M. Neil (2003), Development of Thermophilic Populations, Amylase and Cellulase Enzyme Activities during Thermophilic Aerobic Digestion of Model Agricultural Waste Slurry, *Process Biochemistry* Article in Press Corrected Proof, 1-9.