

Lipolytic 효소를 생산하는 *Acinetobacter* sp. BD5 균주의 분리 및 특성

박인혜 · 김선희 · 이상철 · 안순철¹ · 김철민¹ · 최용락*

동아대학교 응용생명공학부, ¹부산대학교 의과대학 의학과

Received February 27, 2006 / Accepted April 7, 2006

Isolation and Characterization of *Acinetobacter* sp. BD5 Producing Lipolytic Enzyme. Park, In-Hye, Sun-Hee Kim, Sang-Cheol Lee, Soon-Cheol Ahn¹, Cheol-Min Kim¹ and Yong-Lark Choi*. *Department of biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹School of medicine, College of Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – A bacterium producing novel lipolytic enzyme was isolated from house sewage and identified as *Acinetobacter* sp. BD5 based on physiological characterization and 16S rDNA sequencing. The lipolytic activity of *Acinetobacter* sp. BD5 was tested using an EL agar medium and CE agar medium supplemented with 1% tributyrin and olive oil, respectively. The formation of a clear zone around the colony was detected by agar medium supplemented with 1% tributyrin and olive oil, respectively and *Acinetobacter* sp. BD5 formed powder-like zone around the colony on LB agar medium containing Tween 20. The quantitative lipolytic activity was determined by using *p*-NP butyrate as substrate. *Acinetobacter* sp. BD5 secreted the lipolytic enzyme during exponential growth phase, reaching a maximum amount after 6 hours of incubation. The lipolytic enzyme was found to be optimally active at 60°C and retained more than 70% at 70-80°C. It displayed a high degree of activity in a pH of 7.0 to 10.6, with an optimal pH of 9.0.

Key words – *Acinetobacter* sp. BD5, lipolytic enzyme, lipolytic activity

Lipase (EC 3.1.1.3), esterase, carboxylesterase (EC 3.1.1.1)와 다양한 lipolytic 효소들은 박테리아에서부터 인간에 이르기 까지 넓은 범위의 생물에서 발견되어진다[13]. 일반적으로 esterase는 물-수용성 기질에 작용하여 아실기의 탄소원자가 10 개 이하인 기질의 가수분해를 촉진시키는 반면, lipase는 물-지용성 기질에 작용하여 10개 이상의 탄소원자를 가진 기질의 가수분해를 촉진시키고, esterase 기질도 가수분해 할 수 있다. Lipolytic 효소는 수용성인 아실 글리세롤 또는 단일 에스테르 기질의 가수분해를 선호하지만, 실제로 기질은 물에서 불용성을 지니고 있어 일반적으로 기질의 미셀 또는 유화액에 접촉하여 가수분해하며, 기질 특이성, 영역 특이성, 키랄 특이성, 온도 안정성과 유기용매에 안정성 등의 특성을 가지고 있어 매력적인 생물학적 촉매제로서 주목받고 있다[9,17,18]. 특히 미생물 유래의 lipolytic 효소는 동물이나 식물 유래의 lipolytic 효소에 비해 높은 열안정성을 지니고 있어 유기합성이나 진단시약에서 잠재적인 이용 가치를 지니고 있을 뿐만 아니라 현재 화학공정으로 인해 야기되는 환경문제와 경제적인 문제를 대체할 수 있는 생물학적인 응용측면에서 잠재적으로 유용한 가치를 지니고 있다[8]. 이러한 lipolytic 효소의 산업적인 응용을 위하여 새로운 미생물로부터 lipolytic 효소의 자원개발에 대한 요구가 증대되고 있다. 실제로 *Candida* sp.,

Pseudomonas sp., *Bacillus* sp., 그리고 *Rhizopus* sp.에 속하는 미생물이 생산하는 lipolytic 효소는 정교한 chemoselectivity, regioselectivity, stereoselectivity를 나타내며, 곰팡이와 박테리아 같은 미생물로부터 대량생산이 가능하고, lipolytic 효소의 결정구조가 합리적인 공정 과정의 디자인을 촉진할 수 있다. 또한 특별한 조효소가 필요 없이 반응이 이루어지므로 산업적으로 가치가 큰 효소로서 생물공학 분야에서 중요한 역할을 하고 있다[3,15]. 이러한 미생물들이 생산하는 lipolytic 효소는 소수성 에스테르 분해, transesterification, alcoholysis, acidolysis, aminolysis를 촉매하는 능력을 가진 생물학적 촉매제로서의 기능을 가지고 있기 때문에 제약, 화장품, 피혁, 식품, 향수, 의학용 진단시약과 다른 유기 합성물질 생산 등의 산업으로 광범위하게 적용되어지고 있다[12,20]. 제약 산업에서는 화학 요법제 및 항암제에 대한 키랄 약품 중간체 합성과 소화제 합성에 이용되고 있고, 폐기물처리 분야에서는 폴리우레탄이나 폐유를 분해하는데 이용된다[10]. *Serratia marcescens* 유래의 lipase는 Diltizem과 같은 약을 생산하여 제약 산업에서 대량으로 이용되고 있으며, *Pseudomonas* AK lipase는 강력한 항암물질인 epothilone A의 약품 중간체 합성에 이용되고 있을 뿐만 아니라 지방분해를 위한 세제에 연간 약 100톤 정도로 미생물 유래의 lipase가 사용되고 있다[1,3].

본 연구에서는 지방분해와 유기합성 물질 생산 등 다양한 용도에 사용할 생물학적 촉매제 개발을 위한 기초 자료를 얻 을 목적으로 lipolytic 효소 생성이 우수한 균주를 분리, 동정 하여 분류학상의 위치를 확인하고, lipolytic 효소를 생성하는

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7585, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : ylchoi@dau.ac.kr

균주의 특성과 lipolytic 효소의 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

유용효소 생산 균주의 분리

본 실험에서는 유용효소를 생산하는 균주의 분리를 위하여 부산시 사하구 일대 가정하수의 일부를 채취하여 시료로 사용하였으며, 배양배지는 LBM, R2A, M9 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 LBM 배지는 polypeptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l에 탄소원으로 glucose 1 g/l을 첨가하였으며, R2A 배지는 yeast extract 0.5 g/l, proteose peptone 0.5 g/l, casamino acids 0.5 g/l, glucose 0.5 g/l, soluble starch 0.5 g/l, Na-pyruvate 0.3 g/l, K₂HPO₄ 0.3 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/l이고, M9의 배지조성은 Na₂HPO₄ 6 g/l, K₂HPO₄ 3 g/l, NH₄Cl 1 g/l, NaCl 0.5 g/l과 같다. 각 배지에서 37°C, 180 rpm으로 3회 반복하여 진탕 배양한 균주를 1% tributyrin이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 37°C에서 배양하여 생육활성대(growth-clear zone)을 형성하는 것을 lipolytic 효소 활성 양성균으로 하였으며, HC ratio (clear zone의 크기/colony의 크기)가 높은 균을 선별하여 사용하였다[19].

분리된 균주의 동정 및 유연관계 분석

선별된 균주는 Bergey's manual의 Systematic bacteriology[4]를 근거로 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성을 파악하였다. 또한 선별된 균주의 정확한 동정을 위하여 선별된 균주의 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 전 배양한 균주를 LB배지에 20 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에 12시간동안 진탕 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1 X TE buffer (50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁하고, 현탁액을 -70°C에서 30분간 동결시켰다. 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 10 mg/ml의 농도로 용해한 lysozyme 용액 400 µl를 첨가하여 가끔 혼합해주면서 실온에서 용해한 후 얼음에 45분간 방치하였다. 800 µl STEP buffer (0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 400 mM EDTA, 1 mg/ml proteinase)를 첨가해 50°C에서 1시간동안 lysis하고 phenol-chloroform으로 정제하였고, 정제한 sample을 99% 에탄올로 침전시켜 가느다란 유리병으로 염색체 DNA를 감아 회수하였다. 70% 에탄올로 세정하여 건조한 후 멸균수에 용해시켜 염색체 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA를 주형으로 하여 PCR반응을 수행하였으며, PCR에 사용된 primer는 *E. coli*의 16S rDNA의 upstream 9-27bp와 downstream 1,542-1,525bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하였다 (primer 1 : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTAG-3', primer 2 : 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). PCR은 Thermal cycler (Takara thermal cycler)를 사용하여, 95°C에서 30초, 5

5°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 30회 수행하였다. 증폭된 단편은 pGEM T-easy vector (promega, USA)에 cloning하여 16S rDNA 유전자의 염기서열을 결정된 다음 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 통해 상동성을 비교하였다. 동정된 균주와 유사한 종들간의 유연관계를 알아보기 위해 16S rDNA를 기초로 하여, ClustalX program을 이용하여 phylogenetic analysis를 수행하였다.

균주의 생육도 측정

선별된 균주의 생육정도를 조사하기 위하여, 전 배양시킨 균주를 LB배지 100 ml에 접종하여 37, 50 및 60°C에서 180 rpm, 48시간동안 진탕 배양하였다[11]. 배양시간에 따른 균체의 생육정도는 진탕 배양한 배양액을 3시간 간격으로 1 ml를 취해서 UV-VIS spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

고체배지에서의 lipolytic 효소의 활성

각각의 기질을 첨가한 고체배지 상에서 선별된 균주의 lipolytic 기질에 대한 분해능을 확인하기 위하여 Emulsion LB (EL) agar medium과 Chromogenic EL (CE) agar medium을 사용하였다. 사용된 EL 고체배지의 조성은 다음과 같다[6]. 45 ml의 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ 5% gum arabic solution에 기질로써 1% tributyrin 또는 1% olive oil을 첨가하여 waring blender (Heidolph DIAX900, Germany)로 2분간 균질화한 Emulsion 50 ml에 LB 고체배지 450 ml를 혼합하여 EL 고체배지를 준비하였다. CE 고체배지는 1% olive oil을 기질로 첨가한 EL 배지에 1% phenol red를 첨가하여 사용하였다[17]. 선별된 균주를 tributyrin을 기질로 한 EL 고체배지와 olive oil을 기질로 한 CE 고체배지에 희석을 그어 37°C에서 72시간동안 배양하여 생육활성대의 형성을 확인하였다. 또한 선별된 균주를 1% Tween 20이 첨가된 LB 고체배지(Tween 20-LB 고체배지)에 희석을 그어 37°C에서 3일간 정지 배양하여 생육활성대의 생성여부를 관찰하였다[5].

액체배지에서의 lipolytic 효소의 활성 측정

Lipolytic 효소의 양적인 활성 측정은 기질로서 *p*-NP butyrate를 사용하여 Sigurgisladottir등의 방법[16]을 약간 변형하여 수행하였다. *Acinetobacter* sp. BD5를 LB 액체 배지에서 37°C, 12시간동안 배양한 후 배양상등액을 조효소로 사용하였다. 배양 시간별 효소 활성은 6시간 간격으로 배양상등액을 일정량(1 ml) 취하여 수행하였다[7]. 효소활성의 최적온도는 배양상등액 250 µl에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.1) 650 µl와 25 mM *p*-NP butyrate 100 µl를 기질로 사용하여 37, 50, 60, 70 및 80°C에서 30분간 반응시킨 후 100

mM Na₂CO₃ 250 μl를 첨가하여 반응을 중지시키고, UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 측정하였다. 효소 활성의 1 unit은 분당 1 μmol *p*-nitrophenol을 형성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하고, 활성은 최대일 때를 100%로 하여 상대적인 활성으로 나타내었다. 효소 활성의 최적 pH는 50 mM sodium acetate (pH 4.0-6.0), potassium phosphate (pH 7.0-8.1), Tris-HCl (pH 9.0-9.8)과 glycine-NaOH (pH 10.6)를 사용하여 60°C에서 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 선별

부산시 사하구 일대의 가정하수로부터 유용효소를 생산하는 균주를 분리하였으며, 각각의 배지조성에 따른 다양한 균주를 분리하기 위하여 LBM, R2A, 그리고 M9 배지를 사용하였다. LBM 배지에서 생육활성대를 형성하는 다수의 균주를 확보하여 이 중 우수한 균주 4종을 분리하였으며, R2A, 그리고 M9 배지에서는 LBM 배지에 비해 생육활성대를 형성하는 다수의 균주를 확보하지 못하였으며, 1종을 분리하였다(자료 미제시). 분리된 균주들 중 HC ratio가 높은 균주인 BD5를 lipolytic 기질 분해능이 우수한 균주로서 최종적으로 선정하였으며, LBM 배지에서 최적의 성장을 나타내었다.

균주의 동정과 phylogenetic analysis

선별된 균주 BD5는 그램 염색법에 의하여 그램 음성 균주로 확인되었으며, 광학현미경 관찰에 의하여 단간균의 형태가 관찰되었다(Table 1). 16S rDNA 염기서열 분석 결과 BD5는 *Acinetobacter baumannii*와 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, 형태학적, 생리적인 특징도 *Acinetobacter baumannii*와 유사하여 분리된 균주를 *Acinetobacter* 속으로 동정하고 *Acinetobacter* sp. BD5로 명명하였다. 선별된 균주의 phylogenetic analysis 결과(Fig. 1) *Acinetobacter calcoaceticus*와 밀접한 관련이 있으며, 본 연구와 같이 *Acinetobacter* sp. ADP1은 lipolytic 효소를 생산한다는 보고도 있었다. 현재 lipolytic 효소를 생성하는 균주는 *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp.와 *Acinetobacter*

Table 1. Gram stain and hydrolysis activity against various substrates of isolated bacteria

Name	Strain	Gram stain	Hydrolysis activity		
			Tween 20	Tributyryn	Olive oil
BD 1	<i>Micrococcus</i> sp.	+	+	-	-
BD 2	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	+	+	-
BD 3	<i>Exiguobactrium</i> sp.	-	-	-	-
BD 4	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	+	+	-
BD 5	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	+	+	+

+ : positive, - : negative

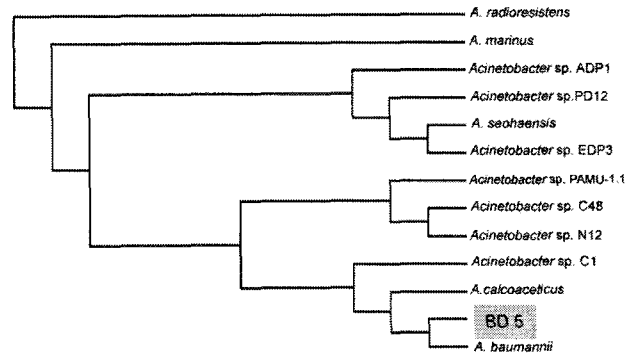


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* sp. BD5 based on 16S rDNA sequence using clustalX program. The accession numbers of the sequence of the strain used in the phylogenetic analysis are X81666, *A. radioresistens*; AY633607, *A. marinus*; CR543861, *Acinetobacter* sp. ADP1; AY673994, *Acinetobacter* sp. PD12; AY633608, *A. seohaensis*; AY613433, *Acinetobacter* sp. EDP1; AB18222, *Acinetobacter* sp. PAMU-1.11; B167213, *Acinetobacter* sp. C48; AB208676, *Acinetobacter* sp. N12; AB167183, *Acinetobacter* sp. C1; X81668, *A. calcoaceticus* and AY738400, *A. baumannii*, respectively.

sp.등이 알려져 있으며, *Pseudomonas* sp.와 *Bacillus* sp.가 생산하는 lipolytic 효소가 보고되어 있다[2,20].

균주의 생육

Acinetobacter sp. BD5의 생육도를 측정결과는 Fig. 2와 같다. 37°C에서 배양한 경우 6시간만에 대수 증식기에 도달하여 빠른 성장을 보였으나, 50°C의 경우 37°C에 비하여 낮은 성장을 보이며 12시간 이후로는 완만하게 감소되는 것으로 나타났다. 60°C에서는 매우 낮은 성장을 보였다(자료 미제시). 이러한 결과는 대부분의 *Acinetobacter* 종들의 최적온도가 35~50°C로 보고되고 있는 것과 일치하는 특성을 보여 주며, 이와 같은 호열성 균주들은 용매와 세체에 대하여 안정하고, 열에 안정한 효소를 생산할 수 있으므로 생물공학 산업에서 적용가능하다고 보고된 바 있다[13]. 이는 *Acinetobacter*

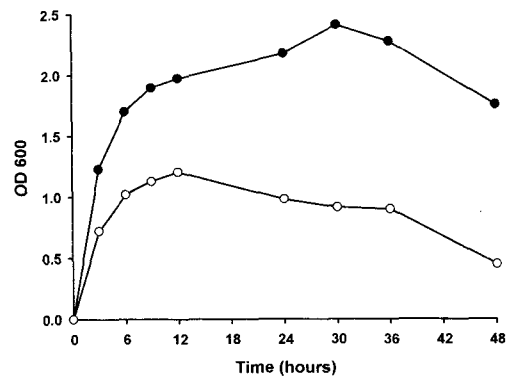


Fig. 2. Cell growth of *Acinetobacter* sp. BD5 at 37°C (●) and 50°C(○).

sp. SY-01이 생산하는 lipolytic 효소[2]와 유사한 양상을 보이며, *Acinetobacter* sp. BD5는 고온에서 성장하는 호열성균주로서 이 균주가 생산하는 lipolytic 효소는 열에 안정할 것으로 보인다.

고체배지에서의 lipolytic 효소 생성 검증

LB 배지에 전 배양한 배양액을 1%의 tributyrin이 첨가된 EL 고체배지에 획선을 그어 37°C에서 배양 12시간 때에 투명한 생육활성대(growth-clear zone)를 형성하였다(Fig. 3). Fig. 4와 같이 olive oil이 첨가된 CE 고체배지에서는 24시간 배양하였을 때 투명한 생육활성대와 노란색으로 색깔 변화를 나타내었으며, 다른 균주에서는 활성을 나타내지 않았다(자료 미제시). CE 고체배지 상의 색깔 변화는 선별된 균주가 생산하는 lipolytic 효소에 의해 olive oil이 분해되어 생성되는 지방산이 pH를 감소시켜 나타나는 것으로 이는 선별된 균주가 olive oil을 가수분해하는 것으로 보인다. Tween 20-LB 고체배지에서 12시간 배양하였을 때 파우더와 같은 생육활성대

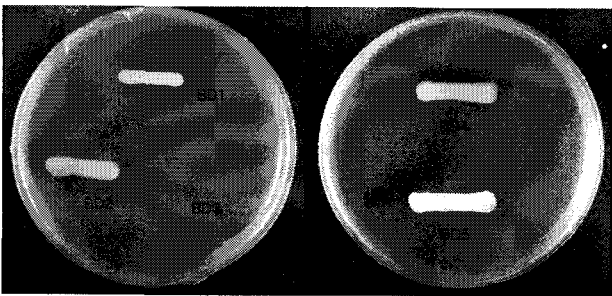


Fig. 3. Isolated bacteria and its lipolytic activity on EL agar medium containing 1% tributyrin. Lipolytic activity showed clear zone around the colony in EL agar medium containing tributyrin. The EL agar medium was incubated at 37°C for 3 days.

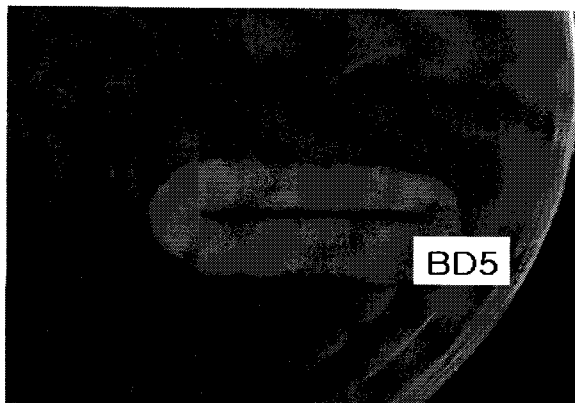


Fig. 4. Lipolytic activity of *Acinetobacter* sp. BD5 on CE agar medium containing 1% phenol red. Lipolytic activity showed change in color pink to yellow and clear zone around the colony. The CE agar medium was incubated at 37°C for 3 days.

(powder-like zone)를 형성하였으며, BD3은 EL과 CE 고체배지에서 거의 생육이 이루어지지 않아 이 실험에서 제외하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 균주가 생산하는 lipolytic 효소에 의해 tributyrin, olive oil과 Tween 20이 가수분해되어 형성되는 것이다. 이는 상업적인 lipase인 lipolase (novonordisk)가 tributyrin과 olive oil에서 활성을 보이는 결과[17]와 매우 유사한 것으로 보이며, Tween 20에 대한 분해능은 *A. lwoffii* 16C-1보다 우수한 것으로 나타났다[5]. *Acinetobacter* sp. BD5가 다양한 lipolytic 기질을 분해하는 것으로 보아 이 균주가 lipolytic 효소를 생산하는 것으로 보이며, *A. lwoffii* 16C-I보다 빠른 시간 내에 lipolytic 기질을 분해하는 것으로 나타나 산업적으로 유용할 것으로 기대된다.

액체배지에서의 lipolytic 효소의 활성 평가

Acinetobacter sp. BD5가 세포외로 방출하는 lipolytic 효소 활성의 최적 배양조건을 검토하기 위해 배양 시간별 lipolytic 활성을 측정하였다. Fig. 6의 결과와 같이 37°C에서 빠른 성장을 보이는 배양 6시간째에 1.167 units/min · ml로 가장 높은 lipolytic 효소 활성을 보였으며, 37°C보다는 활성이 낮았으나 50°C에서 배양 6시간째에 0.572 units/min · ml로 비교적 높은 효소 활성을 나타내었다. 이는 37°C와 50°C 모두 배양 6시간때인 대수증식기에 도달할 때까지 lipolytic 효소의 활성이 증가하는 양상을 보였으나, 균주의 성장속도가 감소함에 따라 활성의 비율도 감소하는 것으로 나타났으며, 배양 18시간까지 50% 이상의 잔존활성을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *A. lwoffii* 16C-1의 경우 배양 12시간째에 lipolytic 효소가 40% 정도의 활성을 나타내는 결과[5]와 달리, *Acinetobacter* sp. BD 5의 경우 비교적 빠른 시간(배양 6시간 때)에 많은 lipolytic 효소를 생성하는 것으로 보인다. 이후의 실험을 위한 조효소는 lipolytic 효소활성이 가장 높은 6시간까지 배양한 배양상등액을 사용하였다. 효소활성의 최적온도는 Fig. 7에 나타내고 있다. lipolytic 효소의 활성은 60°C에서 0.97 units/min · ml로 최고로 최적의 활성을 나타

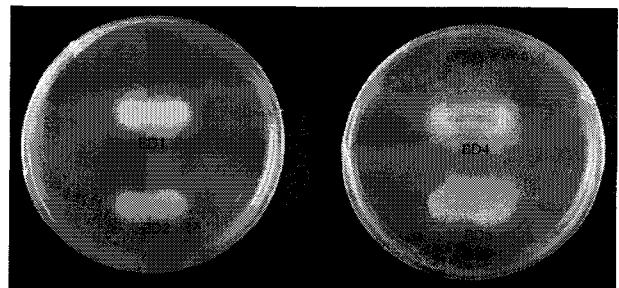


Fig. 5. Isolated bacteria and its lipolytic activity on LB agar medium containing 1% Tween 20. Lipolytic activity showed powder-like zone around the colony in LB agar medium containing Tween 20. The LB agar medium was incubated at 37°C for 3 days.

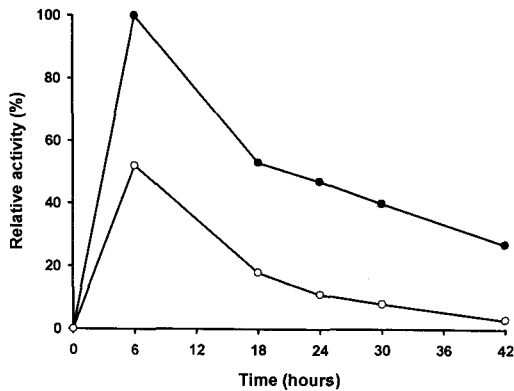


Fig. 6. Lipolytic activity during growth on LB medium at 37°C (●) and 50°C (○).

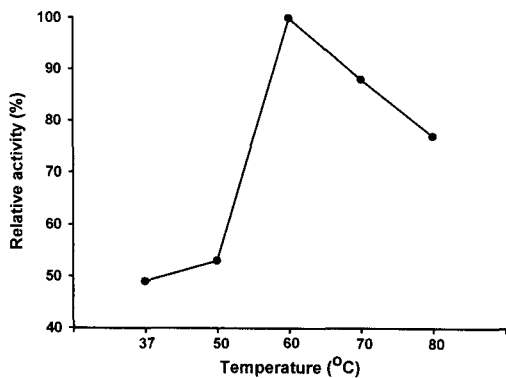


Fig. 7. Effect of temperature on lipolytic activity. The data presented were based on comparison to maximum activity (100%).

내며, 60°C에서 나타난 효소활성을 기준으로 하였을 때, 70°C에서 88%, 80°C에서 77%의 잔존활성을 갖는 것으로 나타났다. 37°C와 50°C에서도 50%이상의 활성을 보여 비교적 넓은 범위의 온도에서 활성을 나타내었다. *Acinetobacter* sp. BD5가 생산하는 lipolytic 효소의 최적 온도는 *P. fluorescens*보다 높으며, *B. thermocatenuulatus*보다 유사하거나 낮았다[3]. 이는 *Acinetobacter* sp. BD5가 호열성 균주로 이 균주가 생산하는 lipolytic 효소는 열에 안정할 것이라는 예상을 뒷받침해주며, 산업적으로 유용할 것으로 기대된다. Fig. 8에 각 pH에서 보이는 효소의 활성을 나타내었다. 효소 활성의 최적 pH는 9.0이었으며, pH 7.0-8.1범위에서 90% 이상의 활성이 유지되는 것으로 나타났고, pH 5.0-6.0과 pH 9.8-10.6범위에서 50% 이상의 활성이 존재하여 넓은 범위의 pH에서 lipolytic 효소의 활성이 나타났다. *Acinetobacter* sp. BD5의 lipolytic 효소 활성의 pH는 *Bacillus* sp. BP-6 LipA가 생산하는 lipolytic 효소의 최적 pH[14]와 *A. calcoaceticus* BD413의 pH 7.8-8.8보다 다소 높은 것이며, *Acinetobacter* sp. RAG-1과 *Acinetobacter* sp. SY-01과 유사한 것이었다[18]. 이는 *Acinetobacter* sp. BD5이 생산하는 lipolytic 효소는 alkaline lipolytic 효소인 것으로 생각되어진다. 본 균주가 생산하는 lipolytic 효소는 비교

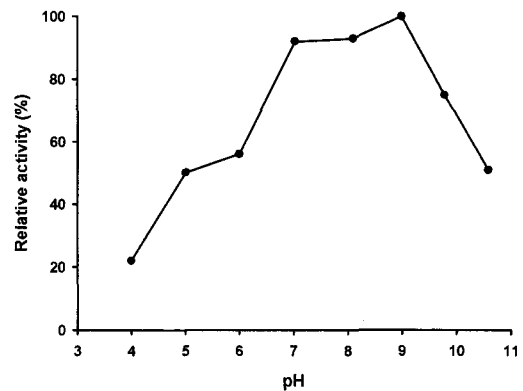


Fig. 8. Effect of pH on lipolytic activity. The data presented were based on comparison to maximum activity (100%). (50 mM sodium acetate, pH 4.0-6.0 ; 50 mM potassium phosphate, pH 7.0-8.1 ; 50 mM Tris-HCl, pH 9.0-9.8 ; 50 mM glycine-NaOH, pH 10.6).

적 넓은 pH범위와 고온에서 활성이 유지되는 것으로 보아 폐유분해, 세제 합성과 유기물질 합성 등에 적용가능하며, 생물공학분야와 산업적으로 잠재적 가치가 있을 것으로 생각된다. 그러므로 이 물질을 생산하는 균주의 기초 자료를 얻기 위해 PCR primer를 설계하여 균주로부터 lipolytic 효소의 유전자를 검출하고, 그 특성을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

요 약

유용효소를 생산하는 균주를 가정하수로부터 분리하기 위하여 LBM, R2A, M9배지를 이용하여 다수의 균주를 분리하였다. 분리된 균주 중 1% tributyrin이 첨가된 배지에서 생육 활성대의 형성이 우수한 균주 1종을 최종적으로 선별하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성을 관찰하였다. 16S rDNA 염기서열 분석결과 *Acinetobacter Baumannii* (99%)로 *Acinetobacter* 속에 속하는 균주임을 확인하고, *Acinetobacter* sp. BD5로 명명하였다. *Acinetobacter* sp. BD5는 37°C와 50°C에서 생육하는 것으로 보아 호열성 균주이며, 1% tributyrin과 olive oil 첨가된 EL과 CE 고체배지와 Tween 20이 첨가된 LB 고체배지에서 생육활성대의 형성을 확인하여 이 균주가 lipolytic 효소를 생산하는 것으로 나타났다. 효소 활성의 최적 배양조건을 검토하고자 배양시간별 효소 활성을 측정할 결과, 배양 6시간 때인 대수 증식기에 가장 높은 효소활성을 나타내어 비교적 빠른 시간 내에 lipolytic 효소를 생성하는 것으로 나타났다. 또한 효소활성의 최적 온도는 60°C로 70-80°C에서 70%이상의 잔존활성을 보이는 것으로 나타나 *Acinetobacter* sp. BD5는 호열성 균주로 이 균주가 생산하는 lipolytic 효소도 내열성을 보이는 것으로 생각된다. 최적 pH는 9.0이며, pH 9.8-10.6범위에서 50% 이상의 활성이 유지되어 alkaline lipolytic 효소인 것으로 생각되어진다. *Acinetobacter* sp. BD5가 생산하는 lipolytic 효소는 비교적 넓은 pH

범위와 고온에서 활성이 유지되는 것으로 보아 폐유분해, 세계 합성과 유기물질 합성 등 생물공학분야와 산업적으로 잠재적 가치가 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(801-2005-000-11128-0)지원으로 수행되었음.

참고 문헌

- Bell, P. J. L., A. Sunna, M. D. Gibbs, N. C. Curach, H. Nevalainen and P. L. Bergquist. 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiol.* **148**, 2283-2291.
- Han, S. J., J. H. Back, M. Y. Yoon, P. K. Shin, C. S. Cheong, M. H. Sung, S. P. Hong, I. Y. Chung and Y. S. Han. 2003. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. *Biochimie.* **85**, 501-510.
- Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390-397.
- John, G. H., H. R. Krieg and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria part B the gammaproteobacteria.* pp.425-437, 2th eds., Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Kim, H. E., I. S. Lee, J. H. Kim, K. W. Hahn, U. J. Park, H. S. Han and K. R. Park. 2003. Gene cloning, sequencing and expression of an esterase from *Acinetobacter lwoffii* I6C-1. *Curr. Microbiol.* **46**, 91-295.
- 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.
- Kok, R. G., C. B. Nudel, R. H. Gonzalez, I. M. N. Roodzant and K. J. Hellingwerf. 1996. Physiological factors affecting production of extracellular lipase(LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid repression of lipA expression and degradation lipA. *J. bacterol.* **178**, 6025-6035.
- Lee, D. G., C. M. Kim, S. J. Kim, S. H. Lee and J. H. Lee. 2003. Investigation of conserved regions in lipase genes. *Kor. J. Life Science.* **5**, 723-731.
- Lee, S. W., K. H. Woo, H. K. Lim, J. C. Kim, G. J. Choi and K. Y. Cho. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 720-726.
- Ma, J., Z. Zhang, B. Wang, X. Kong, Y. Wang, S. Cao and Y. Feng. 2006. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.* **45**, 22-29.
- Mosbah, H., A. Sayari, H. Mejdoub, H. Dhouib, Y. Gargouri. 2005. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1723**, 282-291.
- Quyen, D. T., T. T. Nguyen, T. T. G. Le, H. K. Kim, T. K. Oh and J. K. Lee. 2004. A novel lipase/chaperone pair from *Ralstonia* sp. M1: analysis of the folding interaction and evidence for gene loss in *R. solanacearum*. *Mol. Genet. Genomics.* **272**, 538-549.
- Rhee, J. K., D. G. Ahn., Y. G. Kim and J. W. Oh. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 817-825.
- Ruiz, C., F. I. J. Poster and P. Diaz. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 354-359.
- Sekhon, A., N. Dahiya, R. P. Tiwari and G. S. Hoondal. 2005. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *J. Basic. Microbiol.* **45**, 147-154.
- Sigurgrisdottir, S., M. Konraosdottir, A. Jonsson, J. K. Kristjansson and E. Matthiasson. 1993. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot spring. *Biotechnol. Lett.* **15**, 361-366.
- Singh, Rajni, N. Gupta, V. K. Goswami and R. Gupta. 2004. A simple activity staining protocol for lipases and esterase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1-4.
- Snellman, E. A. and R. R. Colwell. 2004. *Acinetobacter* lipase: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 391-400.
- Sung, C. K., S. W. Gal, S. W. Lee and Y. J. Choi. 2001. Purification and characterization of extracellular lipase from *Staphylococcus xylosus* SC-22. *Kor. J. Life Science.* **11**, 457-463.
- Teo, J. W. P., L. H. Zhang and C. L. Poh. 2003. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene.* **312**, 181-188.