Korean J. Food & Nutr. Vol. 22. No. 1, 14~19 (2009)

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

갯벌로부터 분리된 미생물에 의해 생산된 지질 분해 효소의 특성

최충식* · 이순열* · †이재학
*한경대학교 생명공학과, 서일대학 식품영양과

Characterization of Lipase Produced from the Microorganisms Isolated from Mud-flat

Choong-Sik Choi*, Soon-Youl Lee* and †Jaehag Lee
*Dept. of Biotechnology, Research Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea
Dept. of Food and Nutrition, Seoil University, Seoul 131-702, Korea

Abstract

This study was performed to characterize the lipases produced from *Gelidibacter* sp. YH333 and *Vibrio* sp. YH339 isolated from mud flats for industrial application of a lipase. Amount of the lipases secreted from the isolated strains was sharply increased in the proportion of increase of number of the cells. The lipases produced from the isolated strains were constitutively secreted from the cells. The lipase activity of *Gelidibacter* sp. YH333 was higher than that of *Vibrio* sp. YH339 to *p*-nitrophenyl esters. The lipases produced from both strains showed the highest activity in *p*-nitrophenyl laulate among various *p*-nitrophenyl esters. The molecular weights of the lipases from *Gelidibacter* sp. YH333 were about 50 KDa and 25 KDa, respectively. Molecular weight of the lipase from *Vibrio* sp. YH339 was about 50 KDa.

Key words: lipase, *Vibrio*, *Gelidibacter*, molecular weight, *p*-nitrophenyl laulate.

서 론

Lipase[glycerol-ester-hydrolase[E.C.3.1.1.3]는 carboxylic ester hydrolase[EC 3.1.1]에 속하며 중성지질의 ester 결합을 가수분해하여 지방산과 부분적인 glycerides로 가수분해한다[1]. Lipase는 다양한 기질 특이성을 가지므로 화학, 제약, 화장품 및 가죽산업 등에 널리 이용되어 왔다[2]. 생명공학 관련 회사 등에서 lipase를 산업적으로 이용하려는 연구가 끊임없이 확대되고 있고 유전공학 기술로 lipase를 손쉽게 대량으로 얻을 수 있어 세제산업, 식물성 기름을 연료로 전환시키기 위한 생축매제 산업 등에 널리 이용되고 있다[3~5].

다양한 생화학적 특성을 갖는 lipase가 미생물로부터 발견되고 있으며[6], 육상 미생물의 lipase에 대해서는 많은 연구가 되어 있지만 해양 미생물에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다[7,8]. 대부분의 해양 미생물의 경우, 생육환경이 저온이고 빈영양성, 친압성, 호염성 등의 특성을 가지고 있기 때문에 lipase의 활용도면에서 해양 미생물이 주목을 받고 있다. 특히 저온성의 미생물이 생산하는 lipase는 저온에서 높은 효소 활성을 가질 뿐만 아니라 수분활성이 낮은 조건에서도 효소 안정성과 효소 활성이 뛰어나기 때문에 세제산업, 직물산업, 식품산업, 생물학적 환경정화산업에 널리 사용되고 있다[9~11]. 뿐만 아니라 해양 유류 오염 사고로 인해 환경오염과 수산업의 피해를 최소화하기 위해 lipase를 분비하는 해양미생물의 연구는 친환경적이며 효율적인 유류 제거 방법을 제시할 수 있다[12,13].

본 연구에서는 서해안의 갯벌에서 lipase를 생산하는 해양미생물을 순수 분리하여 동정하고, 분리 균주들의 세포 증식에 따른 lipase의 생산과 세포 내, 외 분포를 조사하고, 생산된 lipase의 기질 특이성과 분자량을 조사하였다.

† Corresponding author: Jaehag Lee, Dept. of Food and Nutrition, Seoil University, #40-3 Myeonmok-Dong, Jungnang-Gu, Seoul 131-702, Korea. Tel: +82-2-490-7509, Fax: +82-2-490-7507, E-mail: wjjson@seoil.ac.kr

재료 및 방법

1. Lipase 생산 균주의 선별

서해안 제부도 인근 갯벌에서 흙을 채취하여 lipase 생산균주를 선별하기 위해 100 ㎖ Zobell(tryptone 5 g, yeast extract 1 g, 50% 멸균 해수/liter) 배지에 지질분해효소의 기질로 1% (v/v) tributylin (Sigma, USA)을 혼합한 액체배지에 채취한 갯벌 흙 1 g을 넣어 10℃에서 150 rpm으로 15일 동안 배양하였다. 배양액을 100배 희석한 후 100 ㎕를 취하여 1%(v/v) tributylin을 함유하는 Zobell 평판배지에 도말하고 10℃에서 배양하였다. 가장 넓은 투명환을 갖는 집락이 5일 후에 분리되었다[14]. 배지는 Difco사 제품, 일반 시약은 Sigma사 제품을 이용하였다.

2. 분리된 균주의 동정

분리된 균주의 동정을 위해 16S ribosomal DNA (rDNA) 염기서열을 확인하였다. 16S rDNA의 보존 지역의 염기서열로부터 9F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 926R(5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGR TT) 두 개의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다[15]. 분리 균주들로부터 지놈 DNA extraction kit(Intron, Korea)를 이용하여 지놈 DNA를 추출하였다. TaKaRa PCR Thermal Cycler를 사용하여 TaKaRa Ex Taq polymerase(5 units/㎕) 0.5 ㎕, 10X Ex Taq 완충용액 5 ㎕, dNTPs 혼합물(2.5 mM) 5 ㎕, 926R primer(2 pmol/㎕) 5 ㎕, 9F primer(2 pmol/㎕) 5 ㎕, 분리된 지놈 DNA 1 ㎍에 증류수로 총량 50 ㎕ 되게 하고 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초로 이루어진 과정을 35회 반복하여 16S rDNA의 유전자 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM®-T Easy Vector(Promega, USA)에 재조합시킨 후 재조합 plasmid DNA를 Mini prep kit(Atman Bio, Korea)를 이용하여 분리하고, DNA sequencer(Megabase1000, GE Healthcare Bioscience, USA)를 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와 상동성을 조사하였다.

3. 세포 증식에 따른 세포 내, 외의 Lipase 활성

분리균주들의 세포 증식에 따른 lipase의 활성을 측정하였다. Zobell 배지 200 ㎖에 전 배양액 1%를 접종하여 200 rpm, 25℃에서 배양하며 일정 시간 단위로 시료 1 ㎖를 채취하고 세포 증식을 확인하기 위해 600 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정한 후 시료를 원심분리(6,000×g, 10 min, 4℃)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 상등액은 세포 밖으로 분비된 lipase 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 침전된 세포는 300 ㎕의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 현탁시킨 후 약 2분간 초음파 파쇄(TAITEC, Japan)하고 원심분리(10,000×g, 15 min, 4℃) 하여 상등액을 세포 안에 존재하는 lipase 활성을 측정하는데 사용하였다. lipase 활성을 측정하기 위해 *p*-nitrophenyl laulate를 사용하였다.

4. 다른 탄소 길이를 갖는 기질에 대한 Lipase 활성 측정

기질 종류에 따른 lipase 활성을 알아보기 위해 *p*-nitrophenyl acetate(C2), *p*-nitrophenyl butylate(C4), *p*-nitrophenyl caprylate (C8), *p*-nitrophenyl laulate(C12), *p*-nitrophenyl palmitate(C16) 등이 기질들이 사용되었다. 기질용액(10 ㎛ *p*-nitrophenyl ester, 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 9.0), 1%(v/v) Acetonitrile, 4% (v/v) Isopropanol) 492.5 ㎕, 0.5 M $CaCl_2$ 5 ㎕, 조효소액 2.5 ㎕를 혼합한 후 반응액을 25℃에서 10분간 반응을 시킨 후 4M NaOH 1 ㎖를 첨가하고 5분간 반응을 시켜 반응을 종결시킨 후 410 ㎚에서 흡광도를 측정하였다[16]. Lipase의 활성은 *p*-nitrophenyl laulate(C12)에서 얻어지는 흡광도 값을 100으로 하여 다른 기질에 대한 상대적 활성을 결정하였다. *p*-nitrophenyl ester들은 Sigma(USA)사로부터 구입하였다.

5. Disk Assay를 이용한 Lipase 활성 측정

YT 선별 배지(Bacto-tryptone 16g, Yeast-extract 10 g, NaCl 5 g, Bacto agar 15 g, 기질 1%/1 liter)를 이용하여 Disk assay를 수행하였다[17]. 기질들로는 tributyrin(C4), tricaprylin(C8), trilaurin (C12), tripalmitin(C16)(Sigma, USA) 등을 사용하였고, 배지 제조 시 Branson 250 Sonifier로 3분간 유화시켰다. 분리균주들을 Zobell 액체 배지에 25℃에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 1 ㎖의 배양액을 취하여 원심분리(6,000×g, 10 min, 4℃)한 후 상등액 30 ㎕를 3MM 여과지 디스크(Whatman Cat No. 3030917, 지름 6 ㎜) disk에 흡수시킨 후 각 선별배지에 올려 놓고 25℃에서 48시간 동안 배양하여 투명환이 크기를 비교하였다.

6. 분리균주로부터 생산되는 Lipase의 분자량 결정

분리균주들로부터 생산되는 lipase를 부분적으로 정제하였다. Zobell 배지 500 ㎖에 분리균주 전 배양액 1%를 접종하여 200 rpm, 25℃에서 72시간 진탕 배양 후 배양액을 4℃에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상등액을 회수 후 상등액에 ammonium sulfate를 70%로 포화시켜 4℃에서 24시간 동안 염석하였다. 염석 후 4℃에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 침전물에 10 ㎖ 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)로 용해시킨 후 투석막(Sigma, USA, cut off size M.W. 12,400)에 넣고 동일 완충용액을 사용하여 4℃에서 2일간 주기적으로 완충용액을 갈아주면서 투석하였다[18]. 투석 후 Centricon YM-10(Millipore, USA)을 이용하여 농축하였다. native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 위해 12% polyacrylamide

젤과 4% polyacrylamide stacking 젤을 사용하였고[18], Land Mark ™ Mid range Prestained Protein Marker(mbiotech, Korea)를 size marker로 사용하였다. Zymogram을 위해 시료는 열전처리를 하지 않았고, 각각 두 개의 lane에 농축액을 전기영동하고 한 lane은 Coomassie Blue staining을 수행하고 다른 lane은 염색하지 않았다. 염색하지 않은 lane에 해당하는 젤을 자르고, 그 gel을 1% tributylin를 포함하는 1.3% agar 배지 위에 옮긴 후 25℃에서 6시간 동안 방치하였다[17].

결과 및 고찰

1. 지질분해효소 생산 균주의 분리 및 동정

Tributylin을 함유하는 강화배지와 선별평판배지를 이용하여 지질분해효소 생산 균주를 제부도 갯벌 흙으로부터 분리하였다. 가장 넓은 투명환을 보여주는 두 개의 집락을 채취하여 16S rDNA의 염기서열을 확인하고 확인된 염기서열을 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성 분석하였다. 분리된 두 개의 집락을 YH333과 YH339로 명명하였다. YH333은 *Gelidibacter* sp. 13-4와 98%, *Gelidibacter* sp. 4-3와 97%의 상동성을 보이는 것으로 나타났으며, YH339는 여러 종의 *Vibrio* sp.와 97% 상동성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 1). 상동성을 바탕으로 YH333은 *Gelidibacter* sp. YH333으로, YH339는 *Vibrio* sp. YH339로 명명하였다. 해양미생물 중에 *Aeromonas* sp.[14], *Pseudomonas* sp.[16], *Vibrio* [19] 등이 lipase를 생산함이 발견되었다.

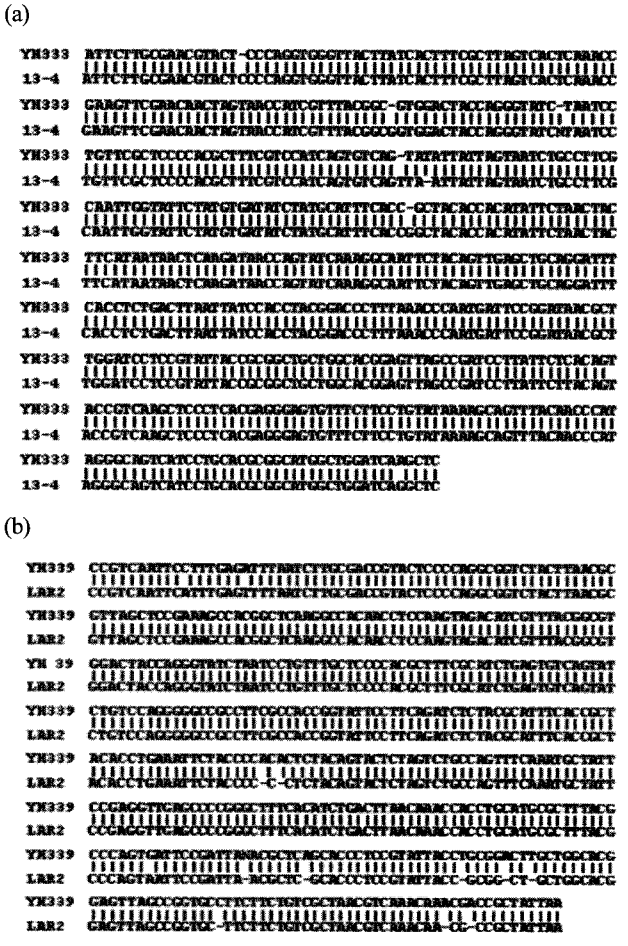

Fig. 1. Homology analysis for the nucleotide sequences of rDNA of *Gelidibacter* sp. YH333 (a) and *Vibrio* sp. YH339 (b) aligned with *Gelidibacter* sp. A13-4 and *Vibrio* sp. LAR2, respectively.

2. 세포 증식에 따른 세포 안과 밖에서 Lipase의 활성

Lipase를 세포 밖으로 분비하는 해양미생물로 동정된 *Gelidibacter* sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339의 세포 증식에 따라 생산되는 lipase 활성을 세포배양액 및 세포추출물로부터 측정하였다.

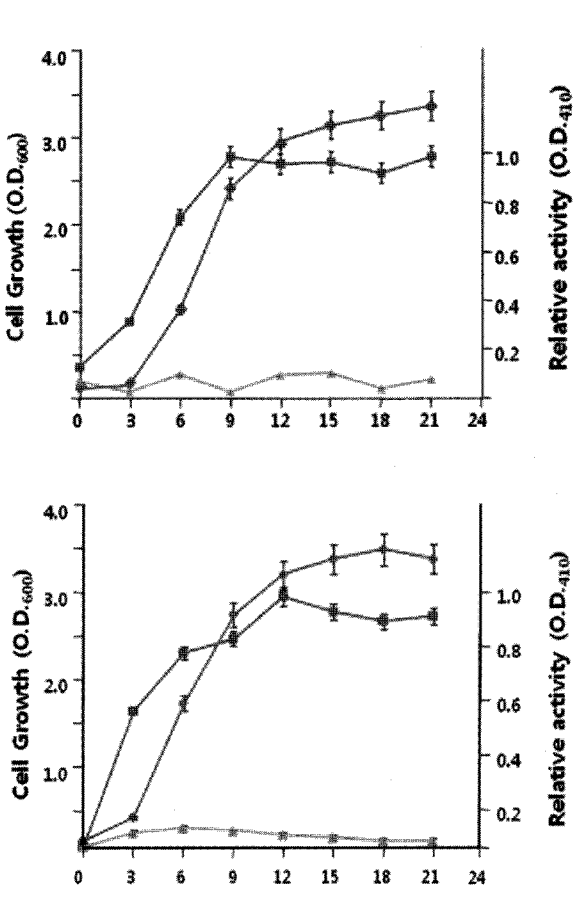

Fig. 2. Growth curve of (a) *Gelidibacter* sp. YH333 and (b) *Vibrio* sp. YH339 with extracellular and intracellular lipase activity assayed using *p*-nitrophenyl laulate. ◆: cell growth (O.D.$_{600}$), ■: extracellular lipase activity, ▲: intracellular lipase activity.

Gelidibacter sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339 두 균주 모두 세포 수의 증가에 비례하여 세포 외로 방출되는 lipase의 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 두 균주 모두 배양 시 대수기가 시작하는 시점에서 세포 외로 방출하는 lipase의 양이 급격하게 증가하기 시작하였으며 정지기에 들어간 후에도 lipase 활성이 일정하게 유지됨을 보였다. 반면, 세포 안에 존재하는 lipase 활성은 거의 보이지 않았다. 이러한 사실들로부터 lipase가 생산된 후 constitutively하게 세포 밖으로 분비됨을 확인하였다. 이는 Anguita 등[13]이 발견한 *Aeomonas hydropyhla*에서 세포 밖으로 분비되는 lipase를 분리하였고, Sommer 등[17]도 *Streptomyces cinnamomeus*에서 분비된 lipase의 활성을 측정한 보고와 유사한 결과이다.

3. 다른 탄소 길이를 갖는 기질에 대한 Lipase의 활성 측정

Gelidibacter sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339가 생산한 lipase의 기질 친화도를 확인하기 위하여 다양한 *p*-nitrophenyl esters를 기질로 사용하였다. 두 균주에서 생산하는 lipase의 경우 모두 *p*-nitrophenyl laulate(C12)에서 가장 높은 활성을 보여주고 있다(Fig. 3). *Vibrio* sp. YH339에서 생산하는 lipase의 경우 두 번째로 *p*-nitrophenyl palmitate(C16)에 대한 높은 활성을 보여주고 있다. 반면, *Gelidibacter* sp. YH333에서 생산하는 lipase의 경우는 *p*-nitrophenyl palmitate(C16)보다 *p*-nitrophenyl caprylate(C8)에 대한 높은 기질 친화력을 보여주고 있다. 위의 결과는 두 균주로부터 생산되는 lipase의 경우, 보고된 다른 lipase[14,16,19]와는 달리 짧은 탄소 사슬을 갖는 기질보다 긴 탄소 사슬을 갖는 기질에서 보다 높은 활성을 보여주고 있다. 특히 *Vibrio* sp. YH339의 경우, *p*-nitrophenyl laulate(C12)와 *p*-nitrophenyl palmitate(C16)에서 높은 활성을 보여준 것은 기존에 발견된 lipase와는 다른 것이어서 흥미를 갖고 있다. Lee 등[14]에 의하면 *Aeromonas* sp. LPB4가 생산하는 lipase는 C12나 C16보다 탄소 길이가 짧은 C3에서 C10에 대한 높은 활성을 보여주고 있다. Suzuki 등[16]이 분리한 *Pseudomonas* sp. Strain B11-2에 의해 생산되는 lipase의 경우도 C4~C6 acyl chain을 갖는 기질에 대해 높은 활성을 보여주고 있다.

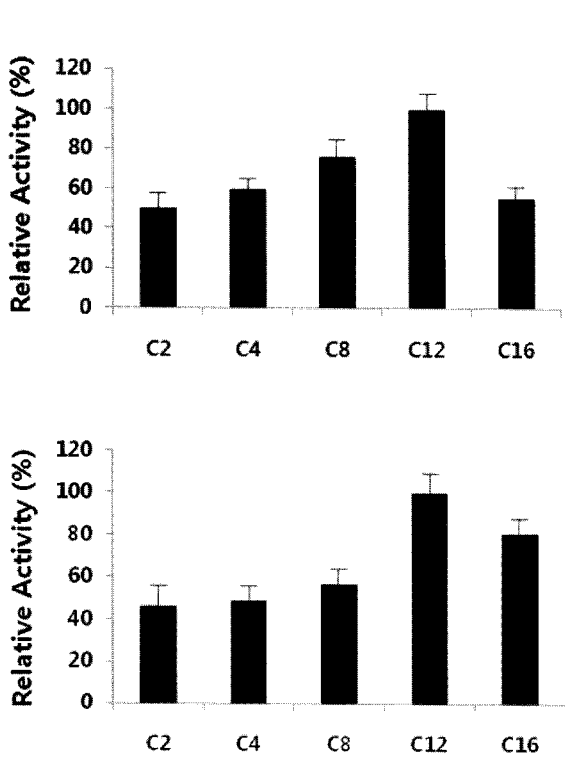

Fig. 3. Substrate specificity of the lipase produced from *Gelidibacter* sp. YH333 (a) and *Vibrio* sp. YH339 (b) using *p*-nitrophenyl acetate(C2), *p*-nitrophenyl butylate (C4), *p*-nitrophenyl caprylate(C8), *p*-nitrophenyl laulate (C12) and *p*-nitrophenyl palmitate(C16). O.D. $_{410\ nm}$ value after lipase assay with *p*-nitrophenyl laulate(C12) was counted as 100%.

기질에 따른 lipase의 활성을 disk assay로 측정한 결과는 탄소수가 커짐에 활성이 커져 C12에서 가장 높은 활성을 보였는데, 이는 *p*-nitrophenyl ester들을 이용한 실험 결과와 동일한 결과를 보여준다(Fig. 4). 또한, *Gelidibacter* sp. YH333에서 생산된 lipase는 *Vibrio* sp. YH339에 의해 생성된 lipase보다 본 연구에서 사용되어진 모든 기질에서 높은 활성을 보여주고 있다.

4. 분리 균주로부터 생산되는 Lipase의 분자량 결정

Gelidibacter sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339가 생산한 lipase를 배양액으로부터 부분적으로 분리하고 농축하고 native-PAGE를 수행하였다. Fig. 5의 Lane 1, 2는 Coomassie Blue로

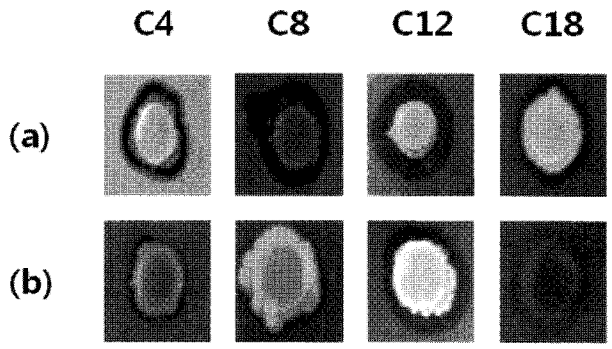

Fig. 4. Lipolytic activity of the lipase produced from *Gelidibacter* sp. YH333 (a) and *Vibrio* sp. YH339 (b) using tributyrin(C4), tricaprylin(C8), trilaurin(C12) and tripalmitin (C16). The agar plate contained 1% substrate and incubated for 48 hrs.

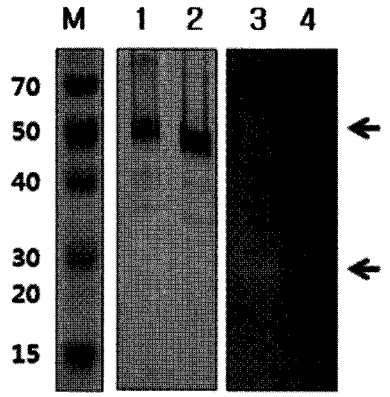

Fig. 5. Zymogram of the lipase produced from *Gelidibacter* sp. YH333 and *Vibrio* sp. YH339 using native-PAGE. M : Molecular weight marker, Lane 1: the partial purified lipase from *Gelidibacter* sp. YH333 after Coomassie Blue staining, Lane 2: the partial purified lipase from *Vibrio* sp. YH339 after Coomassie Blue staining, Lane 3: Zymogram of the partial purified lipase from *Gelidibacter* sp. YH333 using Zobell agar plate containing 1% tributylin, Lane 4: Zymogram of the partial purified lipase from *Vibrio* sp. YH339 using Zobell agar plate containing 1% tributylin.

염색한 결과이고, Lane 3, 4는 1% tributylin를 함유한 한천배지에서 Zymogram을 수행한 결과이다. Lee 등[14]에 의해 분리된 해양미생물인 *Aeromonas* sp. LPB4가 생산하는 lipase의 경우, 본 연구에서 발견된 lipase의 분자량과 유사한 50 KDa을 보여주고 있다. 반면, Choo 등[9]이 분리한 *Pseudomonas* sp. Strain B11-1에 의해 생산되는 lipase의 경우는 33 KDa의 분자량을 보여주고 있다. *Gelidibacter* sp. YH 333에서는 약 50 KDa과 약 25 KDa의 크기로 추정되는 2개의 띠가, *Vibrio* sp. YH339에서는 약 50 KDa 크기의 한 개의 띠가 관찰되었다. *Gelidibacter* sp. YH 333에서 생성된 약 50 KDa과 약 25 KDa의 분자량을 갖는 두 종류의 lipase의 상관성을 확인하기 위해 두 개의 lipase를 순수 분리한 후 단백질의 일차구조를 확인할 것이다.

본 연구를 통해 *Gelidibacter* sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339에 의해 생산된 lipase가 세포 밖으로 constitutively하게 분비됨을 확인하였고, 두 분리균주가 생산한 lipase의 *p*-nitrophenyl esters에 대한 기질 친화도를 확인하였다. 두 분리균주에 의해 생산된 lipase의 분자량은 약 50 KD 정도 되는 것이 확인되었고, 약 25 KD의 분자량을 갖는 lipase가 *Gelidibacter* sp. YH333에서 부가적으로 존재하는 것을 확인하였다. 산업적으로 이용할 수 있는 lipase를 연구하기 위해 두 분리균주에서 생산한 lipase의 생화학적, 분자생물학적 연구가 진행될 것이다.

요 약

본 연구는 산업적으로 활용할 수 있는 lipase를 개발하기 위해 갯벌에서 분리된 *Gelidibacter* sp. YH333와 *Vibrio* sp. YH339에 의해 생산되는 lipase의 특성에 대해 연구하였다. 분리 균주들로부터 세포 외로 방출하는 lipase의 양은 세포수의 증가와 비례하여 급격하게 증가하였다. 분리 균주들에 의해 생산되는 lipase는 대부분 세포 외로 lipase를 방출함으로 lipase가 세포 밖으로 constitutively하게 분비됨을 알 수 있었다. 두 균주에서 생산된 lipase 모두 *p*-nitrophenyl laulate(C12:0)에서 가장 높은 활성을 보여 주었다. *Gelidibacter* sp. YH333에서 생산된 lipase가 *Vibrio* sp. YH339에 의해 생성된 lipase보다 모든 기질에 있어 높은 활성을 보여주고 있다. *Gelidibacter* sp. YH333에서는 약 50 KDa, 25 KDa 등 두 개의 lipase가 확인되었고 *Vibrio* sp. YH339에서는 약 50 KDa에 해당하는 lipase가 확인되었다.

감사의 글

본 논문은 2007년도 서일대학 학술연구비에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. Gupta, R, Gupta, N and Rathi, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:763-781. 2004
2. Bjrkling, F, Godtfredsen, SE and Kirk, O. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9:360-363. 1991
3. Park, SH, Choi, SH, Rhee, JS and Sung, NK. Purification and enzyme properties of alkaline lipase from the *Pseudomonas* sp. S4-14. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 22:271-276. 1994
4. Guo, Z and Xu, X. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. *Org. Biomol. Chem.* 3:2615-2619. 2005
5. Ban, K, Kaieda, M, Matsumoto, T, Kondo, A and Fukuda, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 8:39-43. 2001
6. Jaeger, KE, Ransac, S, Dijkstra, BW, Colson, C, van Heuvel, M and Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:29-63. 1994
7. Margesin, R and Shinner, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *J. Bio-*

technol. 33:1-14. 1994

8. Kulakova, L, Galkin, A, Kurihara, T, Yoshimura, T and Esaki, N. Cold-active serine alkaline protease from the psychotropic bacteria *Shewanella* strain Ac10: gene cloning and enzyme cloning purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:611-617. 1999
9. Choo, DW, Kurihara, T, Suzuki, T, Soda, K and Esaki, N. A cold adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:486-491.1998
10. Takeshi, S, Toru, N, Tatsou, K, Tokuzo, N and Nobuyoshi, E. Cold-active lipolytic activity of psychtrophic *Acinetobacter* sp. Strain No. 6. *J. Biosci. Bioeng.* 92:144-148. 2001
11. Tanaka, S. Pollutions of inland waters and remedial technology. *Foods Food Ingred. J. Jpn.* 176:27-36. 1998
12. Alquati, C, De Gioia, L, Santarossa, G, Alberghina, L, Fantucci, P and Lotti, M. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *Eur. J. Biochem.* 269:3321-3328. 2002
13. Anguita, J, Aparicio, LBR and Naharro, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophyla* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2411-2417. 1993
14. Lee, HK, Ahn, MJ, Kwak, SH, Song, WH and Jeong, BC. Purification and characterization of cold active lipase from psychotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4. *J. Microbiology.* 41: 22-27. 2003
15. Um, KB, Yoon, SJ, Lee, JK, Lee, JH and Lee, SY. Isolation and characterization of a protease-producing halophilic *Vibrio* sp. *Korean J. Food Nut.* 20:108-113. 2007
16. Suzuki, T, Nakayama, T, Choo, DW, Hirano, Y, Kurihara, T, Nishino, T and Esaki, N. Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. *Protein Expr. Purify.* 30:171-178. 2003
17. Sommer, P, Bormann, C and Gotz, F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3553-3560. 1997
18. Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, pp123-146. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989
19. Park, SY, Kim, JT, Kang, SG, Woo, JH, Lee, JH, Choi, HT and Kim, SJ. A new esterase showing similarity to putative dienelactone hydrolase from a strict marine bacterium, *Vibrio* sp. GMD509. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 77: 107-115. 2007

(2008년 11월 21일 접수; 2009년 1월 30일 채택)