

Culture Conditions of *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 for Production of Thermophilic Extracellular Lipase

Sung-Jong Jeon^{1,2,3*} and Hyun-Woo Kang¹

¹Department of Biotechnology & Bioengineering, ²Department of Biomaterial Control, and ³Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received March 2, 2010 / Accepted March 30, 2010

A producer of thermophilic extracellular lipase, *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263, was selected from various microorganisms of the *Geobacillus* genus. We investigated optimum conditions for mass production of *G. kaustophilus* lipase. Among the different natural oil media, olive oil was optimal for enzyme production. The maximum amount of enzyme production was obtained when *G. kaustophilus* was grown in a medium containing 0.5% olive oil as a carbon source. The pH and temperature for optimal growth were pH 8.0 and 55°C, respectively, while the optimum pH and temperature for lipase production were pH 6.0 and 50°C, respectively. In the presence of Mg²⁺ and Mn²⁺, lipase production was dramatically enhanced by 247% and 157%, respectively, whereas enzyme production was inhibited by Zn²⁺, Cu²⁺, and Cd²⁺. The addition of 0.1% (v/v) triton X-100 increased lipase production and cell growth when compared to the negative control.

Key words : Lipase, *Geobacillus kaustophilus*, thermophilic, extracellular, olive oil, triton X-100

서 론

Lipase (glycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3)는 지질과 물의 현탁액 상태에서 triglycerides를 가수분해하여 mono-glycerides, glycerol, 유리 지방산을 형성할 뿐만 아니라 alcohol과 지방산으로부터 ester 합성 또는 교환 반응을 촉매하기도 한다[4,11]. 이 효소는 동물의 체액에서 처음 발견된 이래, 동물의 기관, 식물의 종자 내에 존재함이 밝혀졌으며, 곰팡이, 세균 등의 미생물 유래 lipase도 발견되어 생물계 전반에 널리 분포되어 있음이 확인되었다[2]. 이 중, 미생물이 생산하는 extracellular lipase는 동물과 식물 유래의 lipase 보다 열에 더 안정하므로 산업용 및 진단용 효소로 많은 주목을 받고 있다[17]. 높은 온도에서의 효소 반응은 전환율 증가, 기질 용해도 증가, 미생물 오염 방지, 점도 감소 등의 효과가 있기 때문에 내열성 lipase는 산업적으로 매우 유용하다[12,14]. 또한, 내열성 lipase는 에스테르와 펩타이드의 합성, racemic 혼합물의 가수분해 및 변형, 식품의 향미 개선, 세제 첨가제, 의약품, 폐수처리와 같이 다양한 산업 분야에 이용되고 있으며[4,17], 많은 산업적인 응용을 위해서 새로운 내열성 lipase의 자원개발에 대한 요구가 증대되고 있다. 최근에는 높은 온도에서 생장하는 고온균에서 유기용매와 열에 잘 견디는 내열성 lipase를 분리하는 연구가 진행되고 있고[1,3], 현재 *Pseudomonas fluorescens* [5], *Aspergillus niger* [13], *Bacillus stearothermophilus* [7], *Thermosyntropha lipolytica* [15], *Geobacillus* sp. TW1 [10]

등이 생산하는 내열성 lipase가 보고되어 있다. 또한 최근에는 *Geobacillus* 속 고온균들(*Geobacillus kaustophilus* HTA426, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, *Geobacillus* sp. WCH70, *Geobacillus* sp. Y412MC10, *Geobacillus* sp. Y412MC61)의 genome project가 진행되어 이들은 모두 lipase 유전자를 보유하는 것으로 나타났다[6,19].

본 연구에서는 우수한 내열성 extracellular lipase 생산균을 분리하기 위하여 고온균인 *Geobacillus* 속 균주들로부터 lipase 활성이 높은 균주를 선별하였고, 이 균주의 extracellular lipase 효소 생산을 증가시키기 위해 배양조건을 최적화함으로써 선별균주로 하여금 lipase의 활성을 향상시키고자 하였다.

재료 및 방법

균주 선별

내열성 lipase 생산균을 선별하기 위하여 genome 정보에서 lipase 유전자를 모두 보유하는 것으로 잘 알려진 *Geobacillus* 속의 균주를 선별 대상균주로 삼았다. *Geobacillus* 속 균주는 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 표준균주 8종(*G. caldodoxylosilyticus*, *G. gargensis*, *G. jurassicus*, *G. kaustophilus*, *G. lituanicus*, *G. pallidus*, *G. stearothermophilus*, *G. subterraneus*)을 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 미생물 중에서 지질 분해균의 선별을 위한 기질로 tributyrin을 사용하였으며 plate assay 법[9]으로 lipase 활성이 높은 균주를 선별하였다. 지질 분해균 선별 배지에 균을 접종하여 colony 주위에 투명환(clear zone)을 형성하는 것을 lipase 활성 양성균으로 선별하였고 이들을 1% olive oil nutrient broth에서 배양하여 배양 상등액의 효소

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2278, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : jeon.sj@deu.ac.kr

활성이 가장 높은 균주를 최종 선별하여 사용하였다.

효소 생산

효소 생산을 위해 선별된 균주를 LB배지에서 50°C, 24시간 배양한 후 이 배양액을 0.5% olive oil이 함유된 최소배지(0.7% NaNO₃, 0.2% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.01% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.001% CaCl₂, 0.0012% FeSO₄·7H₂O, 0.01%(v/v) Trace elements solution (0.026% H₃BO₃, 0.05% CuCl₂·2H₂O, 0.05% MnCl₂·4H₂O, 0.006% Na₂MoO₄·2H₂O, 0.07% ZnSO₄·7H₂O), 0.1 % yeast extract)에 1% 농도로 접종한 후 50°C, 36시간 배양한 후 원심분리(10,000 rpm, 10min)하여 상등액을 회수하였다. 여기에 ammonium sulfate를 70%로 포화시켜 4°C에서 12시간 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 20min)하여 얻은 침전물을 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)로 투석한 것을 조효소액으로 사용하였다.

Lipase 활성 측정

효소 활성측정은 표준물질로서 *p*-nitrophenyl butyrate를 사용한 colorimetric 방법[18]에 의하여 수행되었다. *p*-nitrophenyl butyrate (PNPB) 30 mg을 2-propanol 10 ml에 녹인 용액과 sodium deoxycholate (Na-DOC) 0.207 g 및 gum arabic 0.1g을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 90 ml에 녹인 용액을 혼합하고 혼합한 용액 2 ml에 효소액 0.1 ml을 가하여 50°C에서 10분간 반응한 후 2M Na₂CO₃ 용액 0.9 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. Lipase 활성은 생성된 *p*-nitrophenol의 양을 410 nm에서 측정하였다. 다른 lipase 활성 측정법으로 Kwon 등[9]의 방법을 변형하여 사용하였다. 기질은 emulsion stock solution (50 mM Tris-HCl pH 7.0 buffer, 20 mM CaCl₂, 1 mM deoxycholate, 5% gum arabic을 함유)에 5% olive oil을 첨가한 후, homogenizer를 이용하여 유화시켜서 사용하였다. 효소활성측정은 기질 2 ml에 효소액 0.2 ml를 첨가하여 진탕 배양수조에서 200 rpm으로 진탕하면서 50°C, 1 시간 동안 반응시켰다. 효소반응 정지액으로 6 N HCl 0.5 ml을 첨가한 후, 유리 지방산을 용해하기 위하여 isoctane 5 ml을 넣어서 혼합한 다음 100°C에서 3분간 처리하였다. 분리한 isoctane 층에 발색제인 copper reagent (5% cupric acetate를 조제하여 Whatman 여과지로 여과한 후 pyridine으로 pH 6.1로 조정) 1 ml을 첨가하여 90초간 vortex한 후 흡광도 715 nm에서 측정하였다. Lipase 활성 측정은 colorimetric 방법과 Kwon 등의 방법을 병행하여 사용하였고 두 가지 측정값의 평균값을 사용하였다. Lipase의 1 unit는 1분 동안에 1 μmol의 유리지방산을 생산하는 효소 양으로 나타내었다.

결과 및 고찰

내열성 lipase 생산균주의 선별

고온성 균주로 알려진 *Geobacillus* 속 표준균주 8종(*G. cal-*

doxylosilyticus, *G. gargensis*, *G. jurassicus*, *G. kaustophilus*, *G. lituanicus*, *G. pallidus*, *G. stearothermophilus*, *G. subterraneus*)을 1% tributyrin을 첨가한 nutrient agar 배지에서 배양하고 생성되는 투명환으로 lipase 생성균을 1차 선별 하였다. 그 결과, 모든 균주에서 투명환이 생성되었고, 그 중 *G. kaustophilus* DSM 7263가 가장 넓은 투명환을 나타내었다(Fig. 1). 8종의 균주를 액체배지에서 배양하여 배양 상등액의 효소활성을 측정 한 결과, *G. kaustophilus* DSM 7263가 가장 높은 활성을 나타내어(data not shown), 이 균주를 내열성 lipase 생산 균주로 최종 선별하였다.

효소 생산을 위한 탄소원의 영향

G. kaustophilus DSM 7263의 lipase 생산을 위해 탄소원의 영향을 조사하였다. 탄소원으로 olive oil, lard oil, fish oil, sesame oil, soybean oil, grapeseed oil, canola oil 등의 각종 천연 오일을 최소배지에 최종 농도가 0.5%가 되게 첨가하고 50°C에서 36시간 배양한 후 조효소액을 취하여 lipase 활성을 측정하였다. Lipase 활성 측정 결과, olive oil이 가장 활성이 높았고 fish oil, sesame oil에서도 95% 이상의 높은 활성을 보였으며 soybean oil과 canola oil에서는 약 50%의 활성을 나타냈다(Fig. 2). 반면 lard oil과 grapeseed oil에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 가장 높은 활성을 보인 olive oil에 대해서 최소 배지에 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%의 다양한 농도로 첨가하고, 배양시간대별로 lipase 활성을 측정하였다. 그 결과 Lipase 활성은 olive oil 농도 0.5%에서 가장 높은 활성을 나타냈고 균의 생육 정지기인 18시간에서 36시간까지 높은 활성을 유지하였다(Fig. 3). 따라서 lipase 생산을 위해서는 0.5%의 olive oil 농도가 가장 적합한 것으로 판단되었다.

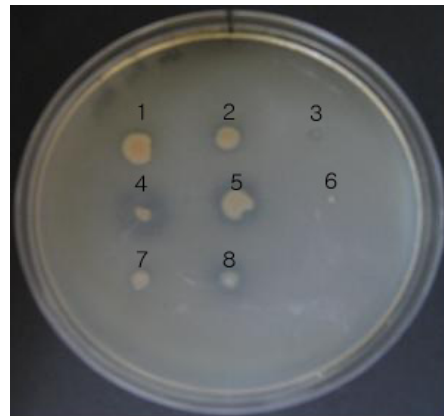


Fig. 1. Lipase activities of the thermophilic microorganisms. The strains were grown on a tributyrin agar plate containing 1% tributyrin for 48 hr at 50°C. 1, *G. caldoxylosilyticus*; 2, *G. gargensis*; 3, *G. jurassicus*; 4, *G. kaustophilus*; 5, *G. lituanicus*; 6, *G. pallidus*; 7, *G. stearothermophilus*; 8, *G. subterraneus*.

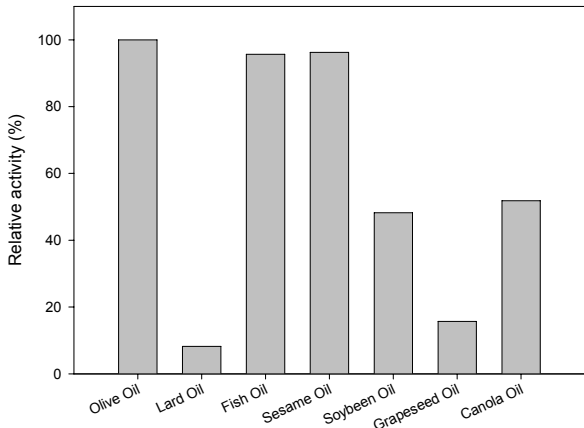


Fig. 2. Effect of carbon substrates on lipase production. Cultures were grown at 50°C for 36 hr in the presence of each of the carbon substrates.

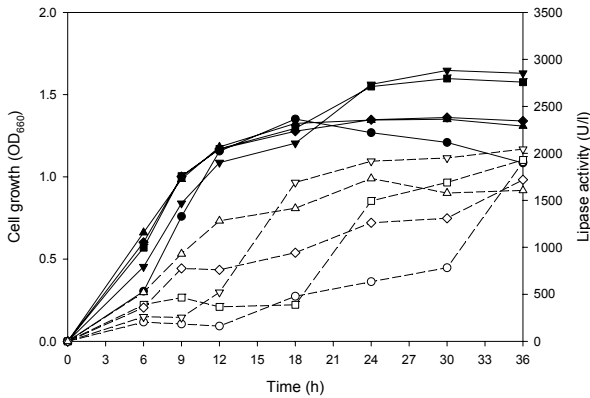


Fig. 3. Effect of various concentrations of olive oil on lipase production. Cultures were grown at 50°C for 36 hr in the presence of various concentrations of olive oil. Cell growth (●, 0.1% olive oil; ▼, 0.5% olive oil; ■, 1.0% olive oil; ◆, 1.5% olive oil; ▲, 2.0% olive oil), Lipase activity (○, 0.1% olive oil; ▽, 0.5% olive oil; □, 1.0% olive oil; ◇, 1.5% olive oil; △, 2.0% olive oil).

최적 pH 및 온도

Lipase 생산을 위한 최적 pH를 확인하기 위하여 pH 4-11의 범위에서 서로 다른 완충용액을 사용하여 효소활성을 측정하였다. pH 4.0-5.5는 0.05 M sodium acetate buffer, pH 6.0-7.0은 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 8.0-9.0은 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 10.0-11.0은 0.05 M glycine-NaOH buffer를 이용하여 배지의 pH를 조정하였고 50°C에서 36시간 배양한 후 조효소액을 취하여 효소활성을 측정하였다(Fig. 4). Fig. 4의 결과와 같이 미생물 성장에 있어서는 pH 8.0에서 가장 높은 성장을 보였으나 낮은 pH에서는 미생물 생장이 좋지 않았다. 한편 pH 5.5-7.0 범위에서 배양한 시료에서 비교적 높은 효소활성을 나타냈고, 그 중 pH 6.0에서 가장 높은 값을 나타내어 효소 생산을 위한 최적 pH는 6.0으로 확인하였다. 효소

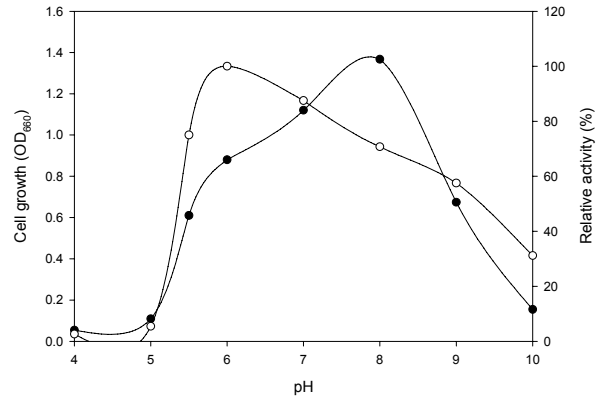


Fig. 4. Effect of pH on lipase production. Cultures were grown at 50°C for 36 hr in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.0-5.5), 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.0-7.0), 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0-9.0), 0.05 M glycine-NaOH buffer (pH 10.0-11.0).

생산을 위한 최적 온도를 측정하기 위하여 30°C, 37°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C에서 배양한 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 미생물 생장은 55°C에서 가장 높은 성장을 보였고, 효소 활성에 있어서는 50°C가 가장 높아 효소 생산을 위한 최적 온도는 50°C로 나타났다(Fig. 5).

효소생산에 대한 금속이온의 효과

*G. kaustophilus*의 lipase 생산에 있어 금속이온이 미치는 효과를 알아보기 위하여 최소배지에 2 mM의 금속이온을 첨가하고 50°C에서 36시간 배양한 후 조효소액을 취하여 lipase 활성을 측정하였다(Table 1). Table 1에서와 같이 금속이온 중에서 Mg²⁺와 Mn²⁺을 배지에 첨가한 경우, 금속이온을 넣지 않은 대조구에 비해 각각 247%와 157%로 효소 활성이 증가하

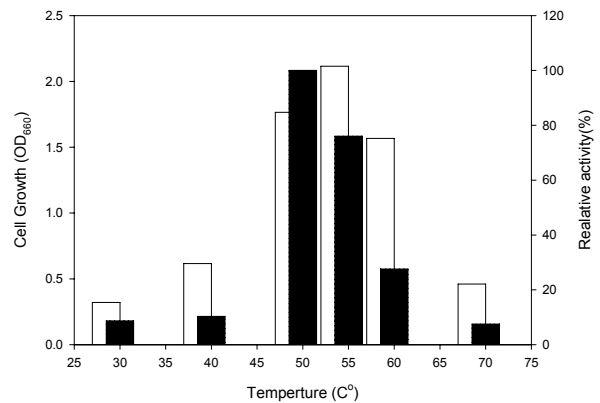


Fig. 5. Effect of temperature on lipase production. Cultures were grown at pH 6.0 for 36 hr in the presence of 0.5 % olive oil. Enzyme reaction carried out at 50°C for 10 min in 0.05 M sodium phosphate (pH 6.0). □, Cell growth; ■, Enzyme activity.

Table 1. Effect of metal ions on lipase production

Metal ion	Relative activity (%)	Metal ion	Relative activity (%)
None	100	Fe ²⁺	48.1
Ni ²⁺	49.8	Mg ²⁺	246.5
Ca ²⁺	90.5	Cu ²⁺	51.8
Co ²⁺	39.0	Na ⁺	150
Mn ²⁺	156.9	K ⁺	109.5

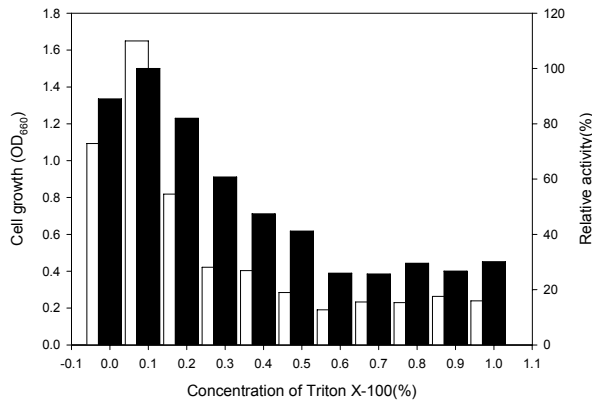


Fig. 6. Effect of various concentrations of Triton X-100 on lipase production. Cultures were grown at 50°C for 36 hr. Enzyme reaction carried out at 50°C for 10 min in 0.05 M sodium phosphate (pH 6.0). □, Cell growth; ■, Enzyme activity.

여 두 가지 금속은 효소 생산에 좋은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반면, Co²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺는 효소 생산을 저해시키는 것으로 나타났다.

효소생산에 대한 triton X-100의 효과

여러 가지 계면활성제(tween 20, tween 80, triton X-100)를 배지에 첨가하여 lipase 활성을 측정 한 결과, triton X-100이 *G. kaustophilus*의 효소 생산을 향상시키는 것으로 나타났다 (data not shown). 배양 배지에 triton X-100을 0-1.0% (v/v)까지 다양한 농도로 첨가하여 배양한 후 조효소액을 취하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 0.1% (v/v) triton X-100의 농도에서 배양했을 때 가장 높은 효소생산율을 보였고 균의 성장도 높게 나타났다(Fig. 6). 그러나 0.3% 이상의 농도에서는 균의 성장 및 효소 생산 모두 저해 되는 것으로 나타났다. Triton X-100에 의한 효소 생산의 증가는 plasma membrane의 투과성을 변형시켜 세포의 compounds 흡착능이 촉진되기 때문인 것으로 생각된다[16].

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국

연구재단(구, 한국학술진흥재단)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다(331-2007-1-D00220).

References

1. Alberghina, L., R. D. Schmid, and R. Verger. 1991. Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, Wiley-VCH, Weinheim.
2. Antonian, E. 1988. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids* **23**, 1101-1106.
3. Bornscheuer, U. T. 2000. (Ed.), Enzymes in Lipid Modification, Wiley-VCH, Weinheim.
4. Brockman, H. W., W. E. Mornsen, and T. Tsuijita. 1988. The biology, biochemistry and biotechnology of lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 891-896.
5. Chung, G. H., Y. P. Lee, G. H. Jeohn, O. J. Yoo, and J. S. Rhee. 1991. Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2359-2365.
6. Feng, L., W. Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao, Y. Tang, X. Liu, W. Han, X. Peng, and R. Liu, 2007. Wang L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 5602-5607.
7. Kim, H. K., S. Y. Park, J. K. Lee, and T. K. Oh. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 66-71.
8. Kouker, G. and K. E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 211-213.
9. 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**, 89-92.
10. Li, H. and X. Zhang. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expr. Purif.* **42**, 153-159.
11. Macrae, A. R. 1983. Extracellular microbial lipases. pp. 225-250, In Fogarty, W. M. (ed.), *Microbial enzyme and Biotechnolog.* Applied science Publisher Ltd., England,
12. Mozhaev, V. V., I. V. Berezin, and K. Martinek. 1988. Structure-stability relationship in proteins: Fundamental tasks and strategy for the development of stabilized enzyme catalyst for biotechnology. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **173**, 147-154.
13. Nambodiri, V. M. and R. Chattopadhyaya. 2000. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* **35**, 495-502.
14. Rubin, B. and E. A. Dennis. 1997. Lipases: Part B. Enzyme Characterization and Utilization, *Methods in Enzymology* **286**, 1-563.
15. Salameh, M. A. and J. Wiegel. 2007. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from

- Thermosyntropha lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7725-7731.
16. Shuen, F. L., C. M. Chiou, and Y. C. Tsai. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotech. letters.* **17**, 959-962.
 17. Sugihara, A., T. Tani, and Y. Tominaga. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem.* **109**, 211-215.
 18. Stuer, W., K. E. Jaeger, and U. K. Winkler. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**, 1070-1074.
 19. Takami, H., S. Nishi, J. Lu, S. Shimamura, and Y. Takaki. 2004. Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. *Extremophiles* **8**, 351-356

초록 : 내열성 extracellular lipase 생산을 위한 *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263의 배양조건

전송종^{1,2,3*} · 강현우¹

(동의대학교 ¹생명공학과, ²바이오물질제어학과, ³블루바이오RIC)

고온성 균주로 알려진 *Geobacillus* 속의 다양한 균주로부터 내열성 extracellular lipase를 생산하는 *G. kaustophilus* DSM 7263를 선별하였다. 우리는 본 균주로부터 lipase를 대량생산하기 위한 최적 조건을 조사하였다. 배양 배지에 다양한 천연오일을 첨가한 결과, lipase의 최적 생장을 위한 탄소원으로는 0.5% 올리브 오일이 최적 조건으로 확인되었다. 본 균주의 생장을 위한 최적온도와 pH는 각각 55°C와 8.0인 반면, lipase 생산을 위한 최적 온도와 pH는 각각 50°C와 6.0을 나타내어 최적생육조건과는 다른 양상을 나타내었다. 금속이온에 대한 영향에 대해서는 배지에 Mg²⁺과 Mn²⁺을 첨가한 경우 각각 247%와 157%의 효소 생산이 증가한 반면, Co²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺는 효소 생산을 저해 하였다. 또한 0.1% (v/v) triton X-100을 첨가하면 대조구에 비해 효소생산과 균의 생장이 모두 증가하는 것으로 나타났다.