

Organic Solvent-tolerant Lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 154

Hye Jung Choi¹, Min Jung Hwang¹, Jeoung-Yoon Seo² and Woo Hong Joo^{1*}

¹Department of Biology and Interdisciplinary Program for Biotechnology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

²Department of Environmental Engineering, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

Received January 23, 2013 / Revised September 30, 2013 / Accepted October 22, 2013

An organic solvent-tolerant lipase of *Pseudomonas* sp. BCNU 154 that was isolated from wastewater in the industrial complex region had optimal activity at 37°C and pH 8. This crude extracellular lipase from BCNU 154 exhibited maximum stability in toluene, retaining about 6.01 U/ml (117.53%) activity for 2 h. Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, and Na⁺ ions and triton X-100 activated the enzymes, whereas Ba²⁺, Hg²⁺, and Zn²⁺ ions inhibited their activity. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 lipase revealed stable activity comparable to that of the commercial immobilized Novozym 435. Thus, this organic solvent-tolerant lipase could have potential as a whole cell biocatalyst in industrial chemical processes without the use of immobilization.

Key words : Lipase stability, organic solvent tolerant lipase, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas* sp. BCNU 154

서 론

리파아제는 지질을 분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 지질 가수분해 효소로, 반응조건에 따라 에스테르화합물의 가수분해뿐만 아니라 이들의 합성반응 및 트랜스에스테르화 반응 등 다양한 화학반응을 촉매할 수 있다. 리파아제는 높은 위치특이성, 기질특이성 및 입체특이성 등 유용한 반응특성을 가지고 있으며[12], 화학적 촉매 공정에서 발생하는 산업폐수 및 부산물이 적고, 상대적으로 낮은 온도에서 반응이 일어나므로 에너지 측면에서도 많은 이점이 있어 산업적으로 광범위하게 활용되고 있는 추세이다[1, 20]. 그러나 효소의 높은 단가로 제한적으로 사용된다는 점[3], 공정과정에서 안정성과 효소 활성이 낮아지는 점 등 효율성이 떨어지는 단점이 있다. 이에 따라 고정화, 생화학적 수식, 화합물의 첨가 및 단백질공학 기법 등으로 효소의 안정성을 증가시켜 사용하고 있으며[2, 10, 11], 특히 고정화 기술이 산업적 공정에 많이 적용되고 있다.

한편 유기용매 내성 미생물이 생산하는 리파아제는 넓은 범위의 온도와 pH 조건에서도 안정하며, 효소활성이 뛰어난 뿐만 아니라 수계 조건에서 불가능한 aminolysis, esterification, thioesterification, transesterification, oximolysis의 반응을 촉매하는 등 미수계 및 소수계에서의 반응성이 뛰어나기 때문에 정밀화학산업에 많은 이점을 제공한다고 보

고되고 있다[5, 6, 17].

본 연구에서는 리파아제를 생산하는 유기용매 내성 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 균주의 조효소액으로 온도, 유기용매 및 금속이온 등 여러가지 환경요인 하에서 효소의 안정성을 검토함으로써 산업공정에서 보다 경제적이면서 효율적인 whole cell 리파아제로서의 이용 가능성에 대해 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

유기용매 내성 세균 분리 및 특성조사

울산과 안산공단 지역에서 채취한 폐수 및 토양 시료 1 g을 100 ml의 nutrient broth (NB)와 Luria-Bertani (LB) broth 배지에 접종 후 10% (v/v) *n*-hexane을 첨가하여 27°C에서 7일간 농화배양을 실시하였다. *n*-Hexane에 내성을 가진 균주 배양액 1 ml은 100 ml의 신선한 LB broth에 재접종하였고 10% toluene을 첨가하여 27°C와 37°C에서 각각 배양한 뒤, 유기용매 내성세균을 순수분리하였다. 분리된 균주는 LB agar 배지에 희석도말한 뒤 toluene을 overlay하여 37°C에서 3일 배양하였고, 최종적으로 toluene에 내성이 뛰어난 균주를 선별하였다. 선별균주의 생리생화학적 특성과 16S 리보솜 RNA에 기초한 유연관계는 상법에 준하여 조사하였다.

리파아제 생성조사 및 조효소액 조제

내성균주의 리파아제 생성여부와 생성정도는 기질로서 1% (w/v) tributyrin (C8)을 LB agar에 첨가하여 37°C에서 24-48 시간 배양 후 투명환을 관찰함으로써 확인하였다. 선별된 균주는 전배양한 후 LB broth 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 진탕 배양하였으며, 배양액은 10,000× g 15 분간 원심분리

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 후, 상등액을 membrane filter (0.22 μm)로 필터한 후 조효소액으로서 사용하였다[4].

리파아제 활성 측정

균주가 생산하는 리파아제의 활성은 조효소액 100 μl 에 50 mM의 *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) 10 μl , 0.5% Triton X-100과 0.15 M NaCl이 첨가된 0.1 M의 Tris-HCl (pH 8) 900 μl 를 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였으며[19], 양성대조구로 고정화 효소인 Novozym 435를 1 mg/ml 농도로 조제하여 사용하였다. pNPP 에서 1분 동안 1 μmol 의 *p*-nitrophenol (pNP)을 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1 unit로 하여 효소활성을 계산하였다[9].

pH 및 온도에 대한 안정성 조사

pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 0.1 M sodium acetate (pH 4-5), 0.1 M potassium phosphate (pH 6-7), 그리고 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8-10)을 조제하여 다양한 pH 범위에서 30분간 반응시킨 후 410 nm에서 효소의 잔존 활성을 측정하였

고, 온도에 대한 안정성 조사는 30-70°C의 다양한 온도 조건에서 0.1 M Tris-HCl (pH 8)을 사용하여 30분간 효소반응을 실시하였다.

다양한 유기용매 및 금속이온에 대한 안정성 조사

유기용매에 대한 효소의 안정성은 조효소액 3 ml에 25% (v/v) 농도의 benzene, toluene, xylene 및 *n*-hexane 등 9종의 유기용매 1 ml를 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 2시간 반응시킨 후 잔존 효소활성을 확인함으로써 조사하였다[13]. 또한 다양한 금속이온 등의 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 조효소액에 1 mM의 각종 인자를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 기질을 첨가하고 5분간 반응시킨 후 잔존 효소활성을 측정하였다[7].

결과 및 고찰

리파아제를 생성하는 유기용매 내성 세균

Pseudomonas sp. BCNU 154는 유기용매에 대한 내성이 뛰

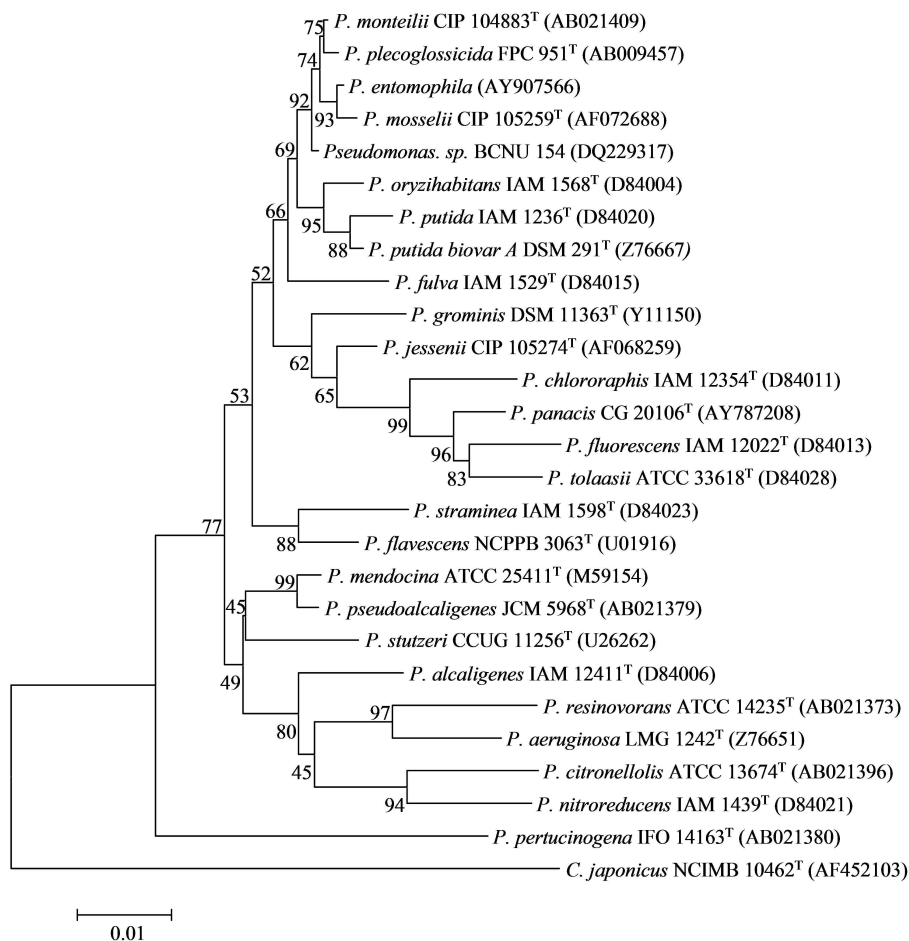


Fig. 1. A phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the organic solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 154 and closely related species. GenBank accession numbers are shown in parentheses. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 1% sequence dissimilarity.



Fig. 2. Lipase activity shown by the clear zones formed around *Pseudomonas* sp. BCNU 154 colonies.

어난 균주로 toluene을 첨가한 LB agar 배지에서 toluene 분해 산물로 추정되는 노란색(unpublished data) 물질을 생성하며 잘 증식함이 확인되었다. 이 균주는 생리생화학적 성질과 16S 리보솜 염기서열을 기초로 한 계통관계에서 *Pseudomonas putida* 근연종임이 확인되었으며(Fig. 1), tributyrin이 첨가된 배지에서 콜로니 주변에 투명한을 형성함으로써 리파아제를 생산함이 확인되었다(Fig. 2).

BCNU 154가 생산하는 리파아제의 pH 및 온도 안정성

넓은 pH 범위에서 리파아제의 활성을 조사한 결과, pH 8에서 6.36 U/ml의 효소활성을 보였으며, pH 5-7에서도 상대활성이 80-90% 이상으로 높게 유지되는 것으로 나타났다. 고정화 효소인 Novozym 435는 1 mg/ml 농도일 때 pH 8에서 4.91 U/ml의 활성을 보였으며, 대체로 약염기 조건에서 80-90%의 상대활성이 유지됨이 확인되었다(Fig. 3).

한편 온도에 따른 효소 활성은 37°C에서 7.61 U/ml로 가장 높게 나타났으며, 50°C에서 잔존활성이 74%였고, 60°C에서 약 50%까지 감소하는 것으로 확인되었다. Novozym 435는 BCNU 154와 유사하게 37°C에서 5.90 U/ml로 활성이 가장 높았으며, 50°C와 60°C에서도 각각 90%와 70% 이상으로 잔존활성이 유지되었다(Fig. 4). *Pseudomonas* sp. LST-03은 BCNU 154와 유사하게 37°C, pH 5-8 사이에서 효소 안정성이 높게 나타났으며[13], *Pseudomonas* sp. M-37은 55°C, pH 9 [15], *Pseudomonas* sp. AG-8은 45°C, pH 8 [16] 조건에서 안정성이 높은 것으로 보고된 바 BCNU 154가 생산하는 리파아제의 효소학적 특성이 이들과 유사함이 확인되었다.

Novozym 435는 *Candida antarctica*에서 유래된 고정화 리파아제(CalB)로 macroiorous resin (Lewatit VP OC 1600)에

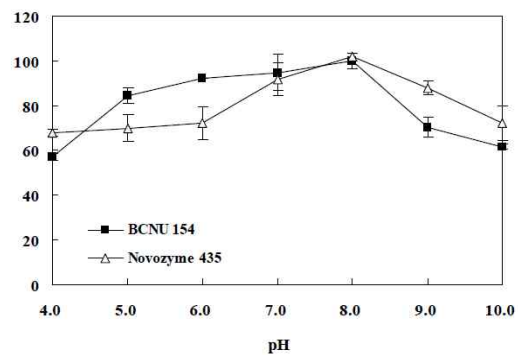
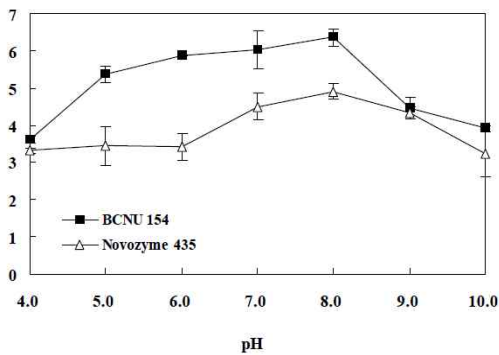


Fig. 3. Effect of pH on the lipase activity and stability. The stability was measured after incubation at 37°C for 30 min with the following buffers; 0.1 M sodium acetate (pH 4-5), 0.1 M potassium phosphate (pH 6-7), and 0.1 M Tris-HCl (pH 8-10). The remaining activity at pH 8 (6.4 U/ml) was taken as 100%. All measurements were repeated three times.

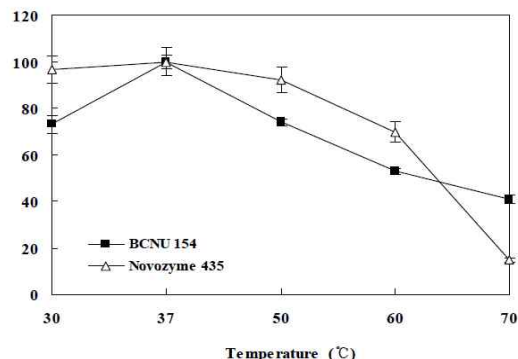
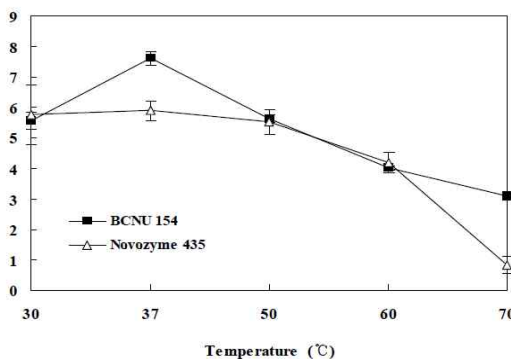


Fig. 4. Effect of temperature on the lipase activity and stability. The diluted cell-free supernatant was incubated with the substrate at different temperatures for 30 min in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8). The remaining activity (7.23 U/ml) at 37°C was set as 100%. All measurements were repeated three times.

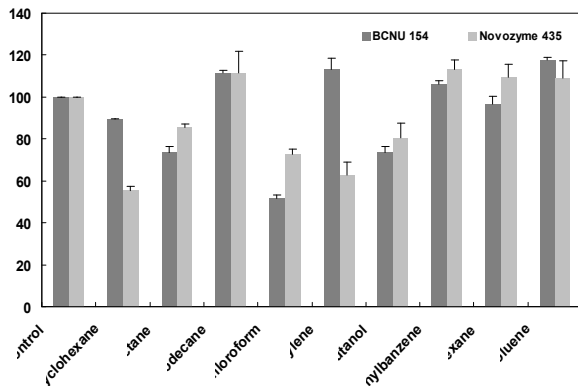


Fig. 5. Effects of various organic solvents on the lipase stability. Lipase stability was assayed by measuring the residual activity after incubation of enzyme (3 ml) in the presence of various organic solvents (1 ml; 25% v/v) in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 2 h. Error bars represent the standard deviation calculated from at least three independent experiments.

Table 1. Effect of various metal ions and detergents on the lipase activity and stability

Metal ions/Detergents	Relative activity (%)
None	100
CaCl ₂	120.82±2.88
CuCl ₂	67.38±0.98
MgSO ₄	114.90±2.57
BaCl ₂	47.42±1.09
HgCl ₂	57.01±2.35
NiCl ₂	82.34±3.27
ZnSO ₄	61.98±3.35
MnCl ₂	96.12±2.29
KCl	87.80±2.18
NH ₄ Cl	126.46±1.20
NaCl	125.21±4.29
SDS	77.02±1.95
EDTA	69.81±1.78
Triton x-100	106.64±1.26
Tween 80	101.98±3.65
Tween 100	115.10±2.89

흡착되어 있으며, 바이오디젤 합성반응 등 산업적으로 많이 사용되는 효소로[8], BCNU 154 균주의 조효소액과 다양한 조건에서 상호 비교 검토함으로써 고정화하지 않고도 산업적으로 이용될 수 있는지에 대한 가능성을 조사하기 위해 본 실험에서 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과, pH와 온도 안정성에서 BCNU 154 리파아제는 고정화 효소와 큰 차이가 없음이 확인되었다.

리파아제의 유기용매 및 금속이온 안정성

고농도(25%)의 다양한 유기용매에 대한 효소 안정성은 tol-

uene, dodecane, xylene, 및 ethylbenzene과 같은 water-immiscible 용매를 첨가했을 때 용매를 넣지 않은 대조군에 비해 각각 117%, 111%, 113% 그리고 106%로 리파아제의 안정성이 증가하였다. 특히 xylene과 cyclohexane 첨가시 Novozym 435는 안정성이 현저히 감소하는 반면에 BCNU 154는 효소 안정성이 오히려 증가하거나 89% 이상으로 유지되어, 다양한 유기용매하에서 효소 안정성이 유지되는 것으로 조사되었다(Fig. 5).

Pseudomonas sp. LST-03이 생산하는 리파아제는 BCNU 154와 유사하게 water-immiscible 용매하에서 효소의 안정성이 있음을 보고되어 있는[13] 반면에, *Pseudomonas* sp. AG-8에서는 20% 농도의 ethanol과 methanol 등 water-miscible 용매 존재하에서 효소 안정성이 증가함이 보고되었다[16]. 또한 *Pseudomonas* sp. S5는 30분 처리시 benzene, chloroform, cyclohexane 및 *n*-hexane 존재하에서 높은 안정성이 나타났으나 2시간 처리시에는 1-pentanol, 1-octanol 및 cyclohexane에서 안정성이 떨어지는 것으로 보고되었다[14]. 이에 비해 BCNU 154가 생산하는 리파아제는 2시간 처리시에도 chloroform과 *n*-butanol을 제외하고는 대부분 효소 안정성이 증가하거나 유기용매 존재에 크게 영향을 받지 않는 것으로 확인되어 미수계 반응을 요하는 산업공정에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

또한 다양한 금속이온, 킬레이트제 및 계면활성제를 첨가하여 효소 안정성을 조사한 결과 Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, Na⁺, triton X-100, tween 80 및 tween 100을 첨가했을 때 리파아제 효소 안정성은 101-126%로 증가하였다. 반면에 Cu²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺ 및 EDTA는 효소의 안정성을 30% 이상 저해하는 것으로 조사되었다(Table 1). *Pseudomonas* sp. S5 [14], *Pseudomonas* sp. AG-8 [16] 및 *Pseudomonas* sp. TK-3가 생산하는 리파아제는 Ca²⁺과 Mg²⁺ 존재하에 안정성이 증가되었으며, Cu²⁺와 Zn²⁺ 등의 전이 금속이온에서는 강하게 저해받는 것으로 나타났다 [18]. BCNU 154가 생산하는 리파아제는 상기 균주들에 비해 다양한 알칼리 및 알칼리토금속 존재하에서도 효소 안정성이 증가함으로써 구조적으로도 보다 안정적인 것으로 판단된다.

다양한 산업공정에서 효소 촉매방법을 보다 효율적으로 이용하기 위해서는 순수 정제된 리파아제를 사용하는 것보다 whole cell 자체를 사용하는 것이 경제적인 측면에서 더 바람직하며[3], 효소 자체의 안정성 및 활성이 유지된다면 추가 고정화 비용을 들이지 않고도 안정성과 반응성을 확보할 수 있어 여러 산업분야에서 광범위하게 이용될 수 있을 것이다. 따라서 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 균주가 생산하는 리파아제는 비교적 넓은 pH 범위, 다양한 유기용매, 금속이온 및 계면활성제에서 효소 안정성을 가진 것으로 확인되었고, 고정화 효소인 Novozym과 비교하여도 효소 안정성에 손색이 없으므로 최적생산조건에 대한 추가적인 실험을 통해 효소안정성을 확보한다면 환경 및 정밀화학 산업분야에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기본연구지원사업(과제번호: 2010-0009141)에 의해 지원되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- Aono, R., Itoh, M., Inoue, A. and Horikoshi, K. 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 145-146.
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H. and Madamwar, D. 2009. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour Technol* **100**, 3374-3381.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* **92**, 405-416.
- Ruchi, G., Anshu, G. and Khare, S. K. 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application. *Bioresour Technol* **99**, 4796-4802.
- Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* **39**, 235-251.
- Jaeger, K. E. and Eggert, T. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 305-313.
- Ji, Q., Xiao, S., He, B. and Liu, X. 2010. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LK1 and its application of biodiesel production. *J Mol Catal B: Enzyme* **66**, 264-269.
- Jose, C., Austic, G. B., Bonetto, R. D., Burton, R. M. and Briand, L. E. 2013. Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. *Catalysis Today* **213**, 73-80.
- Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acid for lipase assay. *J Am Oil Chem Soc* **63**, 89-92.
- Laane, C. 1987. Medium engineering for bio-organic synthesis. *Biocatal Biotransform* **1**, 17-22.
- Magnusson, A. O., Rotticci-Mulder, J. C., Santagostino, A. and Hult, K. 2005. Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. *Chem Biochem* **6**, 1051-1056.
- Ogino, H., Miyamoto, K. and Ishikawa, H. 1994. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable lipolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3884-3886.
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasudo, N. and Ishikawa, H. 2000. Purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng* **89**, 451-457.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Baharum, S. N., Basri, M. and Salleh, A. B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Anal Biochem* **341**, 267-274.
- Chen, S., Qian, L. and Shi, B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochem* **42**, 988-994.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P. and Hoondal, G. S. 2001. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. *J Basic Microbiol* **41**, 363-366.
- Sulong, M. R., Rahman, R. N. Z., Salleh, A. B. and Basri, M. 2006. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Pro Exp Puri* **49**, 190-195.
- Tanaka, D., Yoneda, S., Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Kayashima, T., Yamakawa, K. and Nakamura, S. 2012. Characterization of a new cold-adapted lipase from *Pseudomonas* sp. TK-3. *Appl Biochem Biotechnol* **168**, 327-338.
- Winkler, U. K. and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**, 663-670.
- Yoo, H. Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N. and Yoo, J. C. 2011. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour Technol* **102**, 6104-6111.

초록 : *Pseudomonas* sp. BCNU 154 유래의 유기용매 내성 리파아제

최혜정¹ · 황민정¹ · 서정운² · 주우홍^{1*}

(¹창원대학교 생물학과 · 생물공학협동과정, ²창원대학교 환경공학과)

산업공단지역의 폐수에서 분리한 유기용매 내성 *Pseudomonas* sp. BCNU 154 리파아제의 최적조건은 37°C, pH 8로 조사되었다. BCNU 154의 crude 리파아제는 toluene에서 2시간 반응시 효소활성 약 6.01 U/ml (117.53%)로 가장 안정한 것으로 나타났다. 한편 Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, Na⁺ 이온 및 triton X-100은 효소를 활성화시킨 반면에 Ba²⁺, Hg²⁺ 및 Zn²⁺ 이온은 효소활성을 억제하였다. *Pseudomonas* sp. BCNU 154 리파아제는 상용 고정화 효소인 Novozym 435와 비교해서도 안정한 활성을 보였다. 그러므로 유기용매 내성 리파아제는 별도의 고정화 처리없이도 화학산업공정에서 가능성 있는 whole cell 생물촉매로서 유용할 것으로 판단된다.