

Organic Solvent Stable Lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 171

Hye Jung Choi¹, Gi-Seok Kwon² and Woo Hong Joo^{1*}

¹Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-240, Korea

²Department of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received December 26, 2014 / Revised January 28, 2015 / Accepted January 30, 2015

An organic solvent stable lipase from solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 171 had an optimal pH of 8 and an optimal temperature of 37°C. This crude extracellular lipase from BCNU 171 exhibited increased stability in the presence of various types of solvents at high concentrations (25%, v/v). The lipase stability was found to be highest in the presence of xylene (137%), followed by toluene (131%), octane (130%), and butanol (104%). Overall, BCNU 171 lipase tended to be more stable than immobilized commercial lipase (Novozyme435) in the presence of organic solvents. Furthermore, BCNU 171 lipase maintained about 90% of its enzyme original activity in the presence of NH₄⁺, Na⁺, Ba²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, and Ca²⁺ ion and significantly increased its enzyme activity in the presence of various emulsifying agents. Thus, the organic solvent stable lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 171 could be usable as a potential whole cell biocatalyst and for synthetic applications of enzymes for industrial chemical processes in organic solvents without using immobilization.

Key words : Lipase stability, organic solvent stable lipase, organic solvent tolerant bacterium *Pseudomonas* sp.

서 론

리파아제는 글리세롤과 장쇄 지방산의 ester 결합의 가수분해 및 합성을 촉매하는 효소로 식품, 화장품, 의약품, 바이오디젤 및 섬유화학산업 등 분야에서 다양한 응용이 가능하다. 특히 미생물 기원 리파아제는 유기용매에 대한 안정성, 넓은 기질 특이성, 높은 입체특이성 및 보조 인자를 요구하지 않는다는 점에서 생물공학적으로 잠재력이 뛰어나다[7]. 현재 다양한 생물공학 산업에서 사용되고 있는 리파아제의 70%는 진균과 세균 유래로, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacia* 및 *Pseudomonas alcaligenes* 리파아제 등은 세제, 식품 소재, 펄프 및 제지 산업 등에서[4, 6, 7], *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter* sp., *Serratia marcescens* 및 *C. antarctica* B 기원의 리파아제는 유기화학 관련 산업에서는 촉매제로 광범위하게 사용되고 있다[5, 12].

Pseudomonas sp. BCNU 171은 기연구에서 유기용매 내성 균주로 고농도의 benzene, toluene, ethylbenzene 및 xylene 등 유기용매에 내성이 뛰어난 것을 보고한 바 있다[2]. 따라서 본

연구에서는 *Pseudomonas* sp. BCNU 171 균주가 생산하는 리파아제의 whole cell 리파아제로서의 활용가능성을 알아보고자 다양한 유기용매와 금속이온에 대한 효소 안정성을 검토하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

리파아제 생성 확인

유기용매내성 세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 171의 리파아제 생성여부는 기질로서 동물성 지방인 tributyrin (1%, w/v)과 1.5% tween 80을 첨가한 LB agar배지에서 37°C, 3일 배양 후, 리파아제에 의해 기질이 분해되면서 생기는 투명환을 관찰함으로써 확인하였다.

조효소액 조제 및 리파아제 활성 측정

조효소액 조제는 LB broth 배지에 전배양한 균주를 접종하고 37°C에서 24시간 진탕 배양한 뒤, 15분간 원심분리(10,000 × g)하여 상층액을 membrane filter (0.22 μm)로 필터한 후 사용하였다. 리파아제의 활성은 Winkler와 Stuckmann의 방법을 참고하여, 조효소액 100 μl와 기질로 50 mM *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) 10 μl에 0.1 M Tris-HCl (pH 8) 완충액 900 μl를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. Macroporous resin에 흡착되어 있는 상용 고정화 효소(CalB)인 Novozyme 435를 대조군으로 사용하여 비교하였으며[9], pNPP에서 1분 동안 1 μmol의 *p*-nitrophenol (pNP)을 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1

*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.

unit으로 하여 효소활성을 계산하였다.

pH 및 온도에 대한 리파아제의 안정성 조사

pH에 대한 안정성은 0.1 M sodium acetate, 0.1 M potassium phosphate 및 0.1 M Tris-HCl 완충액을 pH 4-10 범위로 조제하여 30분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였고, 온도에 대한 안정성은 30-70°C 범위의 온도조건에서 0.1 M Tris-HCl (pH 8) 완충액을 사용하여 반응 시킨 후 잔존 활성을 측정하였다.

유기용매 및 금속이온에 대한 리파아제의 안정성 조사

조효소액과 9종의 25% 유기용매를 각각 3:1 비율로 첨가하여 35°C에서 150 rpm으로 2시간 및 10일 반응시킨 후 잔존 효소활성을 확인함으로써 조사하였다[10]. 또한 조효소액에 1 mM 농도의 12종의 금속이온, 6종의 유화제 및 킬레이트제를 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 전반응시킨 뒤 pNPP를 첨가하고 5분간 반응시킨 후 잔존 효소활성을 측정하였다[8].

결과 및 고찰

유기용매 내성 리파아제를 생성하는 *Pseudomonas sp.*

고농도 toluene에 대한 내성이 뛰어난 *Pseudomonas sp.* BCNU 171은 LB agar 배지에서 toluene 분해 산물로 추정되는 형광의 노란색 물질을 생성하며 증식하였고, lipase 생성확인 배지에서 콜로니 주변에 투명한이 관찰되어 효소를 분비하는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

pH 및 온도에 대한 리파아제의 안정성

다양한 pH 범위에서 효소의 활성을 조사한 결과, pH 8일 때 5.87 U/ml로 활성이 가장 높게 나타났으며, pH 6-9에서도 상대활성이 80-90% 이상으로 높게 유지되었다. Novozyme 435 (1 mg/ml)는 pH 8에서 4.91 U/ml로 높은 활성을 보였으며, pH 7과 9에서 상대활성이 약 90%로 유지됨이 확인되었다 (Fig. 2).

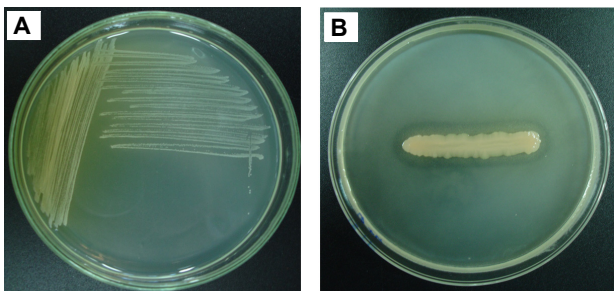


Fig. 1. Photograph of *Pseudomonas sp.* BCNU 171 colonies on LB agar with toluene (A) and on LB agar with 1% tributyrin and 1.5% tween80 (B).

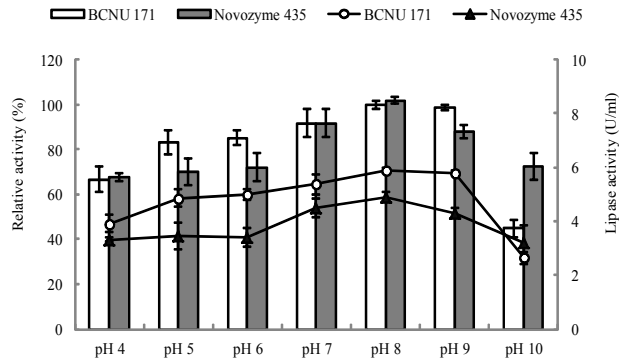


Fig. 2. Effect of pH on lipase stability (bar) and activity (line). The remaining activity was measured after incubation at 37°C for 30 min with the substrate at various pH values. The remaining activity (5.87 U/ml) at pH 8 was taken as 100%.

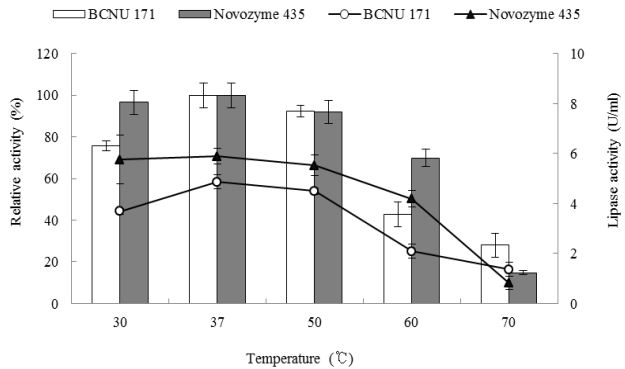


Fig. 3. Effect of temperature on lipase stability (bar) and activity (line). The remaining activity was measured after incubation with the substrate for 30 min in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8). The remaining activity (4.87 U/ml) at 37°C was taken as 100%.

또한 온도에 따른 효소 활성은 37°C에서 4.87 U/ml로 높게 나타났고, 50°C까지 상대활성이 90% 이상으로 유지되었다. Novozyme 435는 37°C에서 효소활성이 5.90 U/ml였으며, 30-50°C에서 90% 이상의 상대활성을 보였다(Fig. 3). *Pseudomonas sp.* BCNU 154와 *Pseudomonas sp.* LST-03은 37°C, pH 5-8 범위에서 효소 안정성이 높았으며[3, 10], *Pseudomonas sp.* M-37은 55°C, pH 9 [1], *Pseudomonas sp.* AG-8은 45°C, pH 8 [13] 조건에서 안정성이 높은 것으로 보고하였다. *Pseudomonas sp.* BCNU 171이 생산하는 유기용매 내성 리파아제는 pH 5-9로 넓은 범위에서 상업화된 효소보다 안정하였으며, 37°C와 50°C에서 안정성이 유지되는 것으로 나타났다.

유기용매 및 금속이온에 대한 리파아제의 안정성

25%의 toluene, octane, butanol 및 xylene을 첨가했을 때 용매를 넣지 않은 대조군에 비해 크기는 136%까지 효소 안정성이 증가하였으며, 9종의 유기용매에 대해 80% 이상 안정성

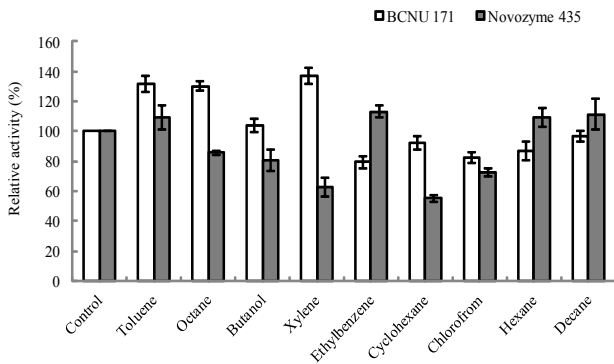


Fig. 4. Effects of various organic solvents (25%, v/v) on lipase stability. Lipase stability was tested by measuring the residual enzymatic activity after incubation in the presence of organic solvents in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 2 hr. The lipase activity in a non-organic solvent condition was taken as control (100%).

이 유지되는 것으로 나타났다. Novozyme 435는 4종의 유기용매를 첨가했을 때 110% 전후로 안정성이 증가하였지만 BCNU 171에 비해 대체로 안정성이 떨어지는 것으로 조사되었다 (Fig. 4).

Pseudomonas sp. BCNU 171은 BCNU 154 리파아제와 유사하게 toluene 및 xylene에서 안정성이 높았으며, BCNU 154에 비해 다양한 유기용매에서 안정적이었다[3]. 한편 *Pseudomonas* sp. S5는 1-octanol 및 cyclohexane 을 첨가하고 30분 반응시 안정성이 유지되었으나, 2시간 반응시에는 효소의 안정성이 떨어지는 것으로 보고되었다[11]. 이에 비해 BCNU 171이 생산하는 리파아제는 toluene과 octane을 첨가한 뒤 10일 동안 배양한 뒤에도 100% 이상으로 효소 안정성을 유지하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 따라서 다양한 유기용매 존재하에

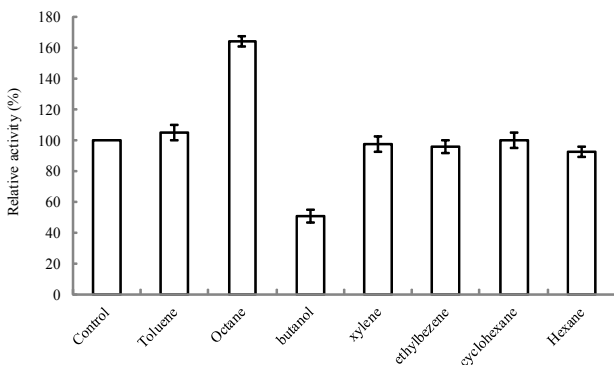


Fig. 5. Effects of various organic solvents (25%, v/v) on the lipase stability. Lipase stability was tested by measuring the residual enzymatic activity after incubation of enzyme in the presence of organic solvents in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 10 days. The lipase activity in a non-organic solvent condition was taken as control (100%).

Table 1. Effect of various metal ions and emulsifying agents on the lipase stability

	Relative activity (%)
None	100
CaCl ₂	89.13±5.47
CuCl ₂	89.03±3.63
FeCl ₃	53.92±2.35
MgSO ₄	78.07±2.68
BaCl ₂	98.49±3.82
HgCl ₂	96.12±2.98
NiCl ₂	89.23±3.27
ZnSO ₄	77.91±3.28
MnCl ₂	83.22±3.68
KCl	83.55±3.31
NH ₄ Cl	117.21±3.90
NaCl	113.45±4.52
SDS	185.04±3.00
EDTA	109.19±3.00
DMSO	188.07±6.11
Triton X-100	119.26±1.80
Tween 80	121.33±3.11
Tween 100	158.74±9.26

서 안정성이 증가하거나 대체로 영향을 받지 않는 것으로 확인됨으로써 비수계 반응을 요하는 산업공정에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 BCNU 171 리파아제는 NH₄⁺과 Na⁺을 첨가했을 때 110% 이상으로 효소 안정성이 증가하였고, Ba²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ 및 Ca²⁺ 등에서는 89% 이상 안정성을 유지하였으며, 6종의 유화제 및 킬레이트제를 첨가했을 때는 약 110-190%로 효소 안정성이 증가하였다(Table 1). *Pseudomonas* sp. BCNU 154, *Pseudomonas* sp. AG-8 [13] 및 *Pseudomonas* sp. TK-3가 생산하는 리파아제는 Ca²⁺과 Mg²⁺이 첨가된 반응에서 안정성이 증가되었으며, 그 외의 전이 금속이온에서는 강하게 저해받는 것으로 나타났다[14]. BCNU 171이 생산하는 리파아제는 다양한 전이금속과 유화제 존재하에서 효소 안정성이 증가하거나 80% 이상으로 유지하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서 *Pseudomonas* sp. BCNU 171 균주가 분비하는 리파아제는 Novozyme 435와 비교하여 다양한 pH 범위, 유기용매, 금속이온 및 유화제에서 효소 안정성을 유지하여 잠재적인 whole cell 리파아제로서의 가능성을 확인하였다. 따라서 추가적인 실험을 통해 최적생산조건을 검토하고 안정성과 반응성을 확보한다면 순수 리파아제 분리 및 고정화하지 않고도 환경, 정밀화학 및 바이오디젤 등 광범위한 산업공정에서 응용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기본연구지원사업(과제번호: 2010-

0009141)에 의해 지원되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- 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.
- Choi, H. J., Kim, S. A., Kim, D. W., Moon, J. Y., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2008. Characterization of *Pseudomonas* sp. BCNU 171 tolerant to organic solvents. *J. Basic Microbiol.* **48**, 473-479.
- Choi, H. J., Hwang, M. J., Seo, J. Y. and Joo, W. H. 2013. Organic Solvent-tolerant Lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 154. *J. Life Sci.* **23**, 1246-1251.
- Gilbert, E. J. 1993. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 634-645.
- Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235-251.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29-63.
- Jaeger, K. E. and Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for *biotechnology*. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.
- 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. Enzym.* **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. *Catal. Today* **213**, 73-80.
- 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.
- Singh, A. K. and Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486-520.
- 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.
- 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.

초록 : *Pseudomonas* sp. BCNU 171이 생산하는 유기용매 내성 리파아제

최혜정¹ · 권기석² · 주우홍^{1*}

(¹창원대학교 생물학과, ²안동대학교 생명자원과학부)

유기용매 내성 *Pseudomonas* sp. BCNU 171 균주가 생산하는 유기용매 내성 리파아제의 최적활성은 pH 8과 37°C로 나타났다. BCNU 171 균주가 생산하는 세포외 리파아제는 고농도의 다양한 유기용매하에서 안정성이 증가하는 것으로 나타났다. 리파아제의 안정성은 xylene (137%) 첨가시 가장 높은 것으로 확인되었고, toluene (131%), octane (130%) 그리고 butanol (104%) 순으로 안정성이 높은 것으로 나타났다. 전체적으로 대부분의 용매에서, 상용 고정화 효소(Novozyme 435)와 비교하여 효소안정성이 높은 것으로 나타났다. 나아가 NH₄⁺, Na⁺, Ba²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ 및 Ca²⁺의 존재하에서 약 90%로 효소 안정성을 유지하였으며 다양한 유화제 첨가시에는 현저하게 안정성이 증가하였다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. BCNU 171의 유기용매 내성 리파아제는 잠재성이 높은 whole cell 생물촉매로서 사용가능 할 것이며, 고정화 하지 않고도 유기용매에서의 공업적인 화학공정에서 효소를 이용한 합성에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.