

Characterization of Organic Solvent Stable Lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 106

Hye Jung Choi¹, Min Jung Hwang¹, Dong Wan Kim² and Woo Hong Joo^{1*}

¹Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

²Department of BioHealth Science, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received January 12, 2016 / Revised February 3, 2016 / Accepted February 11, 2016

A crude extracellular lipase from solvent-tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. BCNU 106 was highly stable in the broad pH range of 4-10 and at temperature of 37°C. Crude lipase of BCNU 106 exhibited enhanced stability in 25% organic solvents such as xylene (121.85%), hexane (120.35%), octane (120.41%), toluene (118.14%), chloroform (103.66%) and dodecane (102.94%) and showed excellent stability comparable with the commercial immobilized enzyme. In addition, the stability of BCNU 106 lipase retained above 110% of its enzyme activity in the presence of Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺, whereas Fe²⁺ strongly inhibited its stability. The detergents including tween 80, triton X-100 and SDS were positive signals for lipase stability. Because of its stability in multiple organic solvents, cations and surfactants, the *Pseudomonas* sp. BCNU 106 lipase could be considered as a potential biocatalyst in the industrial chemical processes without using immobilization.

Key words : Lipolytic stability, organic solvent stable lipase, organic solvent-tolerant, *Pseudomonas* sp.

서 론

리파아제는 트리글리세리드(triglyceride)를 mono- 또는 diglyceride와 유리 지방산으로 분해하는 가수분해효소로 가수분해 반응을 촉매 할 뿐만 아니라 거울상이성질화 반응 특이성을 가지고 있기 때문에 에스테르의 합성과 에스테르 교환 반응을 촉매한다.

효소 시장에서 리파아제는 당 분해 효소, 단백질 분해효소와 함께 이용가치가 높은 3대 효소로, 식품, 의약품, 화장품, 가죽 가공, 정밀화학, 세제, 종이 제조 및 폐수처리 등 다양한 분야에서 사용되고 있다[1, 17]. 리파아제는 식물, 포유동물 및 미생물에 의해 생산되어 자연계에서 쉽게 얻을 수 있으며, 현재 많은 진균과 세균이 생산하는 리파아제는 높은 입체특이성, 위치특이성 및 넓은 기질특이성에 기인하여 생물공학 및 유기화학 관련 산업에서 광범위하게 사용되고 있다[9-11, 20]. 일반적인 리파아제는 공정과정에 사용되는 다양한 유기용매에 대해 효소활성과 안정성이 떨어지므로, 많은 생물공정에서는 안정성을 증대시킨 고정화 효소를 사용함으로써 반응의 선택성 및 에너지 효율성을 높이고 있다[3, 14].

현재 고정화 효소로 *Candida antarctica* lipase B (CalB,

Novozym® 435), *Rhizomucor miehei* lipase (RML), *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) 및 *Candida rugosa* lipase (CRL) 등이 상업적으로 시판되고 있다[3, 8, 14, 16]. Novozym® 435는 뛰어난 선택적 합성능력과 반응의 다양성으로 생물촉매 분야에서 주로 사용되고 있고, RML은 무수 유기용매, 초임계 유체 등에서의 높은 활성과 안정성으로 초기에는 식품산업에 주로 이용되었으며 최근에 바이오디젤 생산 및 유기 화학분야에서 응용을 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다[14, 16]. 한편 산업공정에서 이용될 수 있는 많은 리파아제 생산 미생물이 새롭게 분리되어 연구되고 있는 가운데 유기용매 내성 세균이 생산하는 리파아제는 이상계에서도 효소의 안정성과 활성이 유지 또는 향상되므로 별도의 고정화 과정 없이 다양한 생물공정에 직접 적용 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다[2, 18].

본 연구에서 사용한 *Pseudomonas* sp. BCNU 106 균주는 다양한 유기용매에 대해 내성이 있으며, 특히 hexane, toluene 및 xylene에서는 거의 포화농도에서도 내성을 가지는 우수한 유기용매 내성 균주임을 보고한 바 있다[6]. 따라서 BCNU 106의 조효소액을 사용하여 다양한 범위의 pH와 온도에서 효소 활성과 유기용매 및 금속이온 등의 존재하에서 효소 안정성을 상업적으로 시판되는 Novozym 435와 비교·검토함으로써 고정화 없이도 이상계에서 이용 가능성을 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

효소 생산 조사

LB 배지에 1%(w/v) tributylin과 1.5% tween 80을 첨가하

*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.

여 제조한 agar 배지에 *Pseudomonas* sp. BCNU 106 균주를 접종하여 37°C에서 48-72시간 배양한 후, 효소에 의해 동물성 oil인 tributylin (C_{15})이 분해되면서 생기는 clear zone을 관찰함으로써 유기용매 내성 리파아제 생산 여부를 확인하였다.

효소 활성 측정

리파아제 활성 측정을 위한 조효소액은 LB broth 배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 뒤, 원심분리 ($10,000\times g$, 15 min)하여 그 상등액을 필터(cellulose acetate membrane, 0.22 μm)한 뒤 사용하였다. 100 μl 의 조효소액에 10 μl 의 50 mM *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)와 0.5% triton-100과 0.15 M NaCl이 포함된 900 μl 의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8)를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다[4]. 효소 활성 1 unit은 기질인 *p*NPP가 1분 동안 1 μmol 의 *p*-nitrophenol (*p*NP)을 생산하는데 관여하는 효소의 양으로 계산하였으며, 대조군으로 Novozym 435 (Sigma, Denmark)를 사용하였다.

다양한 조건에서의 효소 안정성 조사

온도에 대한 효소 안정성은 조효소액과 50 mM *p*NPP를 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8)에 첨가한 후 30-70°C의 다양한 온도 범위에서 각각 반응시킨 뒤 410 nm에서 효소의 잔존 활성을 측정하였고, pH 변화에 대한 안정성은 pH 4-5의 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6-7의 0.1 M potassium phosphate buffer 그리고 pH 8-10의 0.1 M Tris-HCl buffer를 제조하여 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 잔존 활성을 측정함으로써 확인하였다[4].

또한 유기용매에 대한 효소 안정성은 다양한 log *P* (0.8-6.8) 값을 가진 9종의 유기용매 butanol (0.8), chloroform (2.0), toluene (2.5), ethylbenzene (3.1), xylene (3.1), cyclohexane (3.2), hexane (3.6), octane (4.5) 그리고 dodecane (6.8)을 각각 조효소액과 1:3 비율로 혼합하여 37°C에서 2시간과 10일간 진탕 배양시킨 뒤 조효소액을 채취하여 각각 잔존 활성을 확인하였다[15]. 그리고 각종 금속이온 및 계면활성제가 포함된 조건에서의 안정성을 확인하기 위해 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8)에 조효소액과 1 mM 농도의 12종의 금속이온, 3종의 계면활성제 및 킬레이트제를 각각 첨가하였다. 37°C에서 1시간 전반응시킨 후, *p*NPP를 첨가하고 5분간 반응시킨 뒤 효소의 잔존 활성을 측정하였다[13].

각 실험은 대조군인 Novozym 435를 같은 조건에서 반응시킨 뒤 잔존 활성을 측정함으로써 *Pseudomonas* sp. BCNU 106의 조효소액과 비교 검토하였다.

통계처리

모든 결과는 3회 이상 반복 실험하였고 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성 검정은 SPSS 22 (IBM SPSS Inc,

New York, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

유기용매 내성 *Pseudomonas* sp. BCNU 106 균주의 리파아제 생산

다양한 고농도 유기용매에서 내성을 보이는 BCNU 106 균주를 기질로서 tributyrin이 첨가된 LB agar 배지에 배양한 결과, 콜로니 주변에 clear zone이 관찰됨으로써 리파아제 분비를 확인하였다(Fig. 1).

온도와 pH에 대한 리파아제 활성 및 안정성

넓은 온도 범위에서 효소의 활성을 측정한 결과, 균주의 최적 증식온도인 37°C에서 6.10 U/ml로 가장 활성이 좋았고, 이를 기준으로 30과 50°C에서 약 70%의 상대활성을 유지함으로써 효소 안정성이 확인되었다(Fig. 2A). 1 mg/ml의 Novozym 435는 37°C에서 5.90 U/ml로 활성이 가장 높았고, 30과 50°C에서 90% 이상의 상대활성을 나타내었다. 또한 BCNU 106은 pH 8에서 8.33 U/ml로 효소 활성이 높았으며, pH 7과 9에서 약 90%의 상대활성을 유지하였고, Novozym 435는 pH 8일 때 4.91 U/ml의 활성을 나타내었으며, pH 7과 9에서 상대활성이 약 90% 유지됨이 확인되어 BCNU 106의 리파아제와 유사한 효소 안정성을 보였다(Fig. 2B). BCNU 106은 최적조건에서 뛰어난 효소활성을 보임으로써 pH 4-6과 10의 상대활성은 다소 낮게 조사되었으나, pH 4-10 전 범위에서 Novozym



Fig. 1. Lipase activity from *Pseudomonas* sp. BCNU 106. BCNU 106 is grown on LB agar medium supplemented with 1% tributyrin and 1% tween 80 at 37°C for 72 hr. Lipase activity is indicated by opaque halo zones around the colonies.

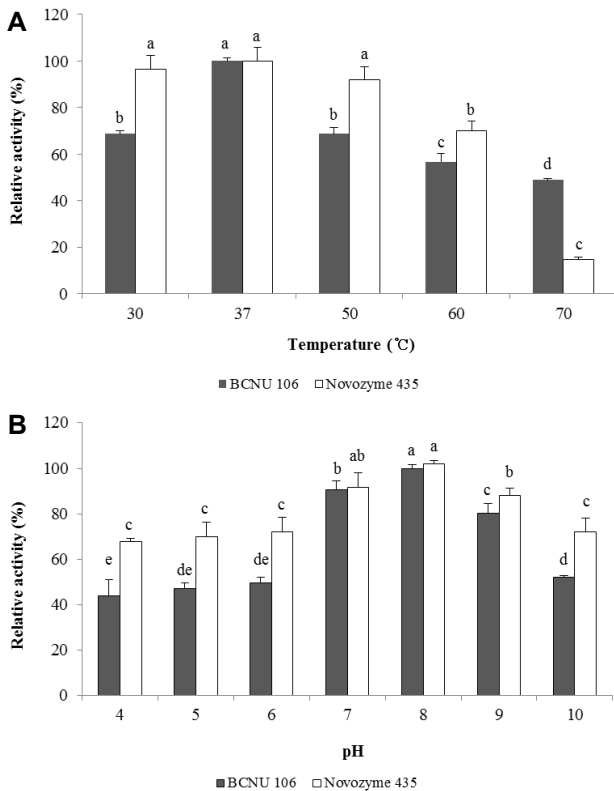


Fig. 2. Characterization of lipase indicating the effect of temperature (A) and pH (B) on the relative activity. The stability was evaluated after incubation at 37°C for 30 min with the substrate at different temperature and pH values. The relative activity at 37°C (6.40 U/ml) and pH 8 (8.33 U/ml) were taken as 100%, respectively.

435보다 효소활성이 우수한 것으로 확인되었다. *Pseudomonas* sp. BCNU 154와 BCNU 171은 37°C, pH 8일 때[4, 5], *Alkalibacillus salilacus*와 *Burkholderia cepacia* RQ3은 40°C, 각각 pH 8과 9에서 효소 활성이 가장 높은 것으로 보고하였으며[18], *Staphylococcus aureus* ALA1과 *S. warneri*는 pH 8에서 각각 30°C와 55°C가 리파아제 활성의 최적 조건임을 보고하였다[2, 22]. *Pseudomonas* sp. BCNU 106 균주를 포함한 많은 유기용매 내성 세균이 생산하는 리파아제 연구에서 대부분 30-50°C, pH 8 조건일 때 효소 안정성이 높은 것으로 나타났다.

다양한 유기용매와 금속이온에 대한 리파아제의 안정성

25%의 농도 유기용매를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 측정된 효소의 안정성은 xylene, octane, hexane 및 toluene 등 6종에서 용매를 첨가하지 않은 대조구에 비해 상대활성이 높게 나타났으며, butanol, cyclohexane 및 ethylbenzene에서도 70% 이상의 활성이 유지되었다(Fig. 3A). 또한 10일 반응 후에 toluene과 chloroform은 약 140%의 높은 안정성을 보였고, butanol, hexane, octane 및 xylene에서도 70% 이상의 활성을 유지함으로써 효소 안정성이 뛰어남이 확인되었다(Fig. 3B).

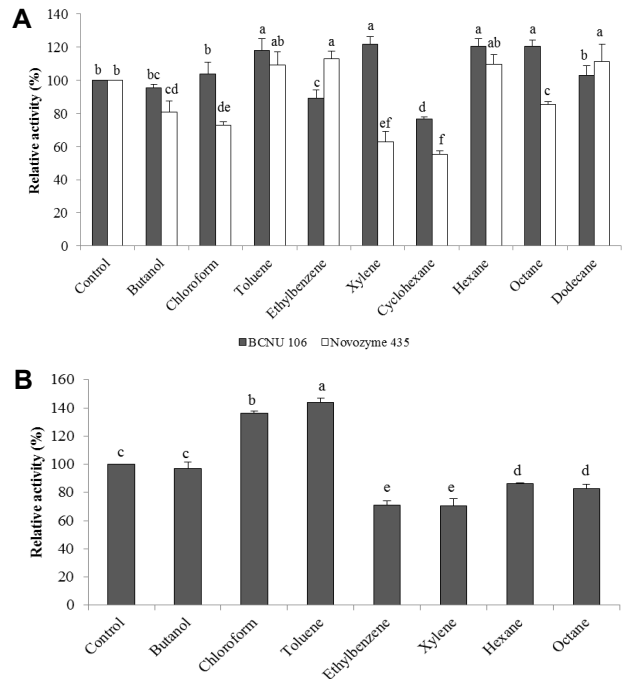


Fig. 3. Effects of 25% organic solvents on the lipase stability. The stability was evaluated by measuring the residual activity after incubation at 37°C for 2 hr (A) and 10 day (B) in the presence of organic solvents. The relative activity of the non-solvent containing control was taken as 100%.

Butanol (log P: 0.8)은 덜 소수성이며 상대적으로 물과 친하여 효소의 안정성을 떨어뜨릴 수 있으나, BCNU 106 lipase는 10일 후에도 97% 이상의 높은 안정성을 나타내었다.

Novozym 435는 ethylbenzene, decane, hexane 및 toluene 첨가 시 약 110%의 상대활성을 보였으나, BCNU 106에 비해 대체로 활성이 떨어지는 것으로 조사되었다. *Pseudomonas* sp. BCNU 171 리파아제는 BCNU 106과 유사하게 toluene, xylene 및 octane에서 안정성이 높았으며, *S. aureus* ALA1은 acetonitrile, benzene 및 toluene 존재시에 거의 100% 효소 안정성을 유지했음을 보고하였고[2], *S. warneri*는 diethyl ether, hexane 그리고 cyclohexane에서 효소 활성이 증가됨을 보고하였다[22]. 또한 *Bacillus*가 생산하는 리파아제는 75% acetone, butanol, DMSO 및 ethanol을 첨가하고 7일 배양한 후에도 70%의 안정성이 유지됨을 보고한 바 있다[12]. *Pseudomonas* sp. BCNU 106이 생산하는 리파아제는 log P 0.8-6.8 범위의 다양한 유기용매에 대해 장기간 높은 효소 안정성을 유지하는 것으로 확인되었으며, 다양한 분야에 적용을 위해 log P<0 이하의 극성 용매에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편 BCNU 106이 생산하는 리파아제는 알칼리 토금속인 Ca²⁺, Mg²⁺ 및 Ba²⁺과 알칼리 금속인 K⁺과 Na⁺에 의해 활성화됨으로써 이온이 촉매로서의 역할보다는 구조적 역할이 확인되어 BCNU 106 리파아제는 metal activated 효소로 확인되었

다(Table 1). 전이금속인 Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} 및 Mn^{2+} 존재하에서도 110% 이상의 상대활성을 내었고, Ni^{2+} 에서도 80% 이상 활성이 유지되었으나, Fe^{2+} 존재하에서 효소활성이 억제되었는데 이는 리파아제 활성 부위에 존재하는 aspartic acid 또는 glutamic acid 잔기에 결합하는 Fe^{2+} 의 능력에서 기인한 것으로 알려져 있다[7]. 또한 계면활성제인 tween 80과 SDS 존재시에도 대조군에 비해 활성이 높은 것으로 나타났으며, triton X-100은 대조군과 거의 차이가 없는 것으로 확인되었다(Table 1). *Pseudomonas* sp. BCNU 154 [4], *P. mendocina* M-37 [7], *Pseudomonas* sp. AG-8 [19] 및 *Pseudomonas* sp. TK-3 [21] 리파아제는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 Na^{+} 첨가시 활성화되고 Cu^{2+} , Hg^{2+} 그리고 Zn^{2+} 존재시 억제되는 metal activated 효소임이 보고되었다. BCNU 171 리파아제는 Na^{+} 과 계면활성제에서는 효소 활성이 크게 증가했으며, 알칼리 토금속이나 전이금속에서는 80% 이상 상대활성을 유지했고, Fe^{2+} 존재시 활성이 강하게 억제되는 것으로 보고하였다[5].

Pseudomonas sp. BCNU 106이 생산하는 리파아제는 이러한 군주와 비교하여 상당히 다양한 종류의 금속이온에 대해 효소 활성이 증대되거나 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 현재 세균 리파아제의 상업적 이용은 효소 정제로 인한 높은 생산 단가로 인해 아직 초기단계에 머물러 있으므로 새로운 리파아제 생산 세균 탐색 및 배양 조건에 대한 검토는 꾸준히 연구되어야 할 분야이다. 본 연구에서 BCNU 106이 생산하는 리파아제 조효소액을 이용하여 다양한 조건에서 Novozym 435와 비교한 결과, 고정화 효소에 못지않은 효소 활성 및 안정성을 유지함으로써 효소의 정제 없이도 리파아제 사용 공정에 적용할 수 있는 가능성을 본 논문에서 제시하고자 한다.

Table 1. Effect of various additives on the lipase stability

Additions (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100 ^c
CaCl_2	118.55±2.16 ^b
CuCl_2	108.07±6.49 ^d
FeCl_3	45.80±6.91 ^g
MgSO_4	116.67±2.54 ^{bc}
BaCl_2	114.53±3.63 ^{bc}
HgCl_2	115.06±2.50 ^{bc}
NiCl_2	80.29±1.77 ^f
ZnSO_4	111.48±2.57 ^{cd}
MnCl_2	118.47±1.41 ^b
KCl	114.91±1.38 ^{bc}
NaCl	129.79±1.16 ^a
SDS	91.40±1.70 ^b
EDTA	41.82±1.27 ^d
Triton X-100	83.67±0.61 ^c
Tween 80	113.64±0.66 ^a

감사의 글

본 논문은 창원대학교 2015-2016 학년도 교내연구비 지원을 받아 수행된 연구이므로 이에 감사드립니다.

References

- Basheer, S. M., Chellappan, S., Beena, P. S., Sukumaran, R. K., Elyas, K. K. and Chandrasekaran, M. 2011. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. *N. Biotechnol.* **28**, 627-638.
- Ben Bacha, A., Moubayed, N. M. and Al Assaf, A. 2015. An organic solvent stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* ALA1 strain with potential for use as an industrial biocatalyst. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi: 10.1002/bab.1381.
- Chiou, S. H. and Wu, W. T. 2004. Immobilization of *Candida rugose* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials* **25**, 197-204.
- 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.
- Choi, H. J., Kwon, G. S. and Joo, W. H. 2015. Organic Solvent-tolerant Lipase from *Pseudomonas* sp. BCNU 171. *J. Life Sci.* **25**, 345-348.
- Choi, H. J., Seo, J. Y., Hwang, S. M., Lee, Y. I., Jeong, Y. K., Moon, J. Y. and Joo, W. H. 2013. Isolation and characterization of BTEX tolerant and degrading *Pseudomonas putida* BCNU 106. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **18**, 1000-1007.
- Dahiya, P., Arora, P., Chaudhury, A., Chand, S. and Dilbaghi, N. 2010. Characterization of an extracellular alkaline lipase from *Pseudomonas mendocina* M-37. *J. Basic Microbiol.* **50**, 420-426.
- Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal., B Enzym.* **62**, 197-212.
- 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. and Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.
- Jain, D. and Mishra, S. 2015. Multifunctional solvent stable *Bacillus* lipase mediated biotransformations in the context of food and fuel. *J. Mol. Catal., B Enzym.* **117**, 21-30.
- 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.
15. 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.
 16. Rodrigues, R. C. and Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor mehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Catal., B Enzym.* **654**, 1-22.
 17. Romdhane, I. B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A. and Belghith, H. 2010. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochem. Eng. J.* **53**, 112-120.
 18. Samaei-Nouroozi, A., Rezaei, S., Khoshnevis, N., Doosti, M., Hajihoseini, R., Khoshayand, M. R. and Faramarzi, M. A. 2015. Medium-based optimization of an organic solvent-tolerant extracellular lipase from the isolated halophilic *Alkalibacillus salilacus*. *Extremophiles* **19**, 933-947.
 19. 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.
 20. Singh, A. K. and Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486-520.
 21. 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.
 22. Yele, Y. U. and Desai, K. 2015. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; Optimization of media and production conditions using statistical methods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 855-869.

초록 : *Pseudomonas* sp. BCNU 106이 생산하는 유기용매 내성 리파아제의 특성

최혜정¹ · 황민정¹ · 김동원² · 주우홍^{1*}

(¹창원대학교 생물화학융합학부, ²창원대학교 생명보건학부)

유기용매 내성 세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 106으로부터 생산된 리파아제 조효소액은 pH 4-10의 넓은 범위의 pH와 37°C에서 매우 안정적이었다. BCNU 106의 리파아제 안정성은 25% xylene, hexane, octane, toluene, chloroform 및 dodecane에서 증가하였으며, 상업적인 고정화 효소와 비교해도 우수한 안정성을 보이고 있다. 그리고 Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺ 및 Mn²⁺ 존재 하에서 110% 이상의 상대활성을 나타낸 반면에, Fe²⁺에서는 효소활성이 억제되었다. 게다가 계면활성제인 tween 80과 triton X-100 및 SDS에서도 높은 안정성을 유지됨이 확인되었다. 본 연구에서 유기용매 내성 *Pseudomonas* sp. BCNU 106의 리파아제는 고정화 효소에 못지않은 효소 활성 및 안정성을 유지함이 밝혀져 다양한 산업공정에서 잠재적인 생물촉매로 적용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.