

Serratia liquefaciens AL-11이 생산하는 Alkaline Lipase의 특성 및 작용양상

최 청* · 김태완 · 안봉진¹ · 김영환² · 손준호 · 김 성 · 최희진
영남대학교 자연자원대학 식품가공학과, ¹동국전문대 향장공업과, ²보건전문대 임상병리과

Characteristics and Action Pattern of Alkaline Lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11. Cheong Choi*, Tae-Wan Kim, Bong-Jeon Ahn¹, Yung-Hwal Kim², Jun-Ho Son, Sung-Kim and Hee-Jin Choi. Department of Food Science and Technology, Yeungnam University 712-749, Korea, ¹Department of Cosmetic Engineering, Dongkook Jr. College, Taegu 702-080, Korea, ²Department of Clinical Pathology, Taegu Health Jr. College, Taegu, 702-060, Korea - The optimum temperature and pH for the enzyme activity were 45°C and 10.0, respectively. The enzyme was stable in a pH range of 5 to 10, and 62% of its activity was lost on heat treatment at 60°C for 20 min. The activity of the purified enzyme was inhibited by Fe²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺, and slightly activated by Mn²⁺ and Ca²⁺. γ -Chloromercuribenzoic acid, 2,4-dinitrophenol and H₂O₂ did not show inhibitory effect on the lipolytic activity of the alkaline lipase but ethylenediaminetetraacetic acid inhibited the enzyme activity. This suggested that the enzyme have metal group in its active site. Sodium salts of bile acids stimulated the enzyme activity. Analysis of hydrolyzates of olive oil after the lipase reaction revealed that *Serratia liquefaciens* AL-11 produced non-specific lipolytic enzyme.

최근 미생물 lipase에 관한 연구가 활발히 진행되어 감에 따라 의학적, 산업적 용도에 적용될 수 있는 여러 가지 특성을 지닌 많은 lipase들에 관한 보고가 있었다. Watanabe 등(1)과 Nishio 등(2)은 alkaline lipase에 관하여, Shin 등(3)은 세제공업에 사용할 수 있는 detergent 내성을 가진 alkaline lipase에 관하여 보고하였다. 또한 Kokusho 등(4)은 소화보조제로 이용하기 위해 담즙산 염에 의해 활성이 촉진되는 alkaline lipase를 분리, 정제하여 그 특성을 보고하였다. 하지만 실제 산업적으로 이용되고 있는 효소는 제한되어 있으므로 더 많은 lipase 생산균주의 개발과 그 효소학적 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 효소활성이 강한 alkaline lipase를 생산하여 소화보조제로 제약 공업에 이용할 목적으로 토양으로부터 분리 동정한 *Serratia liquefaciens* AL-11이 생성하는 alkaline lipase의 효소학적 특성과 작용양상을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균은 대구지역 일대의 토양과 하천수 및 유지공장의 침적지 토양에서 분리한 *Serratia liquefaciens* AL-11 균주를 동정하여 사용하였다.

배지 및 배양 방법

Alkaline lipase 생산균을 분리하기 위한 선택배지는 gall powder 함유배지(5), TGY 배지(6)와 olive oil-nut-

rient broth를 사용하였고, 분리된 균주는 효소생산배지(1% peptone, 0.5% tryptone, 0.1% yeast ext., 1% tween 80, 1% soluble starch, 0.05% CaCl₂, 0.05% NaCl)에서 30°C, 40시간 배양하였다.

정제효소액의 조제

효소최적생산조건에서 배양된 배지로 부터 얻은 조효소액을 gel filtration과 ion exchange chromatography를 이용하여 specific activity가 27.01 unit/mg, 정제배수가 8.8배로 전기영동상 단일밴드가 확인될 때까지 정제한 뒤 정제효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정법

Lipase의 활성측정은 권 등(7)의 방법에 따라 측정하였다. 기질제조는 emulsion stock solution[20 mM glycine-NaOH buffer(pH 10.0)에 0.1M NaCl, 20 mM CaCl₂, 1 mM deoxy chloride, 5% gum arabic을 함유]에 5% olive oil을 첨가한 후, homogenizer를 이용하여 18,000 rpm에서 3분간 유평시켜 사용하였으며, 사용하기 직전에 조제하였다. 발색시약(copper reagent)은 5%(w/v) cupric acetate를 조제하여 Whatmann NO.1 여과지로 여과한 후 pyridine으로써 pH 6.1로 조정하여 사용하였다. 효소 활성측정은 기질 2 ml에 효소액 0.2 ml를 첨가하여 진탕배양수조(130 strokes/min)에서 45°C, 20분간 동안 반응시켰다. 반응후 6N HCl 0.5 ml를 첨가하고 유리 지방산을 용해하기 위하여 isoctane 5.0 ml를 넣어서 혼합한 다음 100°C에서 5분간 처리하였다. 분리한 isoctane 층에 발색제인 copper reagent 1.0 ml를 첨가하여 Vortex로 교반한 후 715 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 효소액과 기질을 넣고 즉시 6N HCl을 첨가하여

*Corresponding author.

Key words: Alkaline lipase, *Serratia liquefaciens*

반응을 정지시킨 후 위의 방법으로 행하였으며, 효소 1 unit는 1분간에 1 μmol의 지방산을 유리하는 효소량으로 하였다. 유리지방산의 정량은 oleic acid를 각각의 농도 별로 하여 isooctane 5.0 ml를 첨가한 다음, copper reagent를 첨가하여 발색시켜 715 nm에서 흡광도를 측정하여 유리 지방산의 표준곡선을 작성한 다음, 이로써 시료의 유리 지방산을 정량하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin(Sigma co.)을 표준단백질로 하여 Lowry 등(8)의 방법에 의하여 측정하였다.

Olive oil의 가수분해 작용양상

효소 활성측정시 사용한 기질과 같은 반응액 5 ml에 효소액 0.5 ml를 첨가한다. 40°C에서 반응시킨 후, 25 ml의 diethyl ether를 반응액에 0.5 ml를 첨가하고, 40°C에서 반응시킨 후, 25 ml의 diethyl ether를 반응액에 첨가하여 반응을 중지시키고, 반응 생성물을 추출한다. 부분 글리세라이드의 이성화를 막기 위해 신속하게 반응생성물을 추출한 다음, 추출액은 동결시킨다. 반응생성물은 thin layer chromatography method(TLC)에 의해 분석되었다. TLC 분석을 위한 전개용매는 petroleum ether와 diethyl ether, acetic acid(80 : 30 : 1)를, 발색제는 1% iodine-petroleum ether를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소학적 성질

pH의 영향 pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액의 pH를 변화시켜 45°C에서 30분간

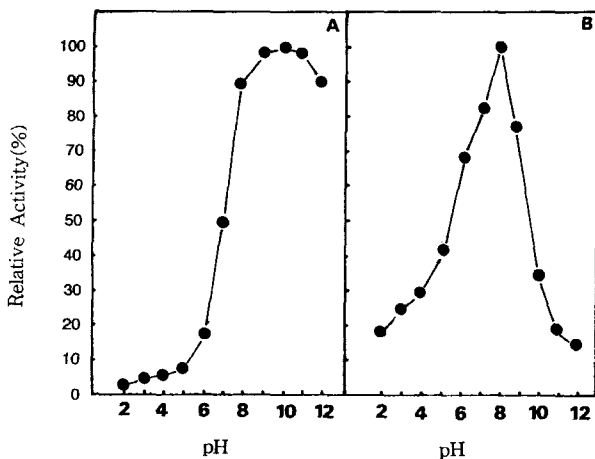


Fig. 1. (A) Effect of pH on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11. (B) Effect of pH on the stability of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11.

반응시킨 후 효소활성을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 10.0에서 최대활성을 보였으며, pH 9.0에서 98.1%, pH 11.0에서 98.3%로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). Kokusho 등(4)이 분리한 *Alcaligenes* sp.와 이 등(9)이 분리한 *Pseudomonas* sp.의 최적 pH 9.0, Watanabe 등(1)이 분리한 *Pseudomonas* sp. 최적 pH 9.5보다 더 높은 pH에서 활성을 나타내었으며, 이는 신 등(3)이 분리한 *Pseudomonas* sp.의 최적 pH와 비슷한 결과를 나타냈다. 효소의 안정성에 미치는 pH를 10.0으로 조정하여 기질을 첨가한 후 45°C에서 30분간 반응하여 잔존 활성을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 7~9의 범위에서 안정한 것으로 나타나 안정범위는 좁은 편이었다.

온도의 영향 효소활성에 대한 최적 온도를 조사한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 olive oil을 기질로 했을 때 45°C 부근에서 최대활성을 나타냈었으며, 70°C에서는 활성이 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 Izumi 등(5)이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 lipase가 최적 반응온도 60°C라는 보고와 Kokusho 등(4)이 분리한 *Alcaligenes* sp.의 lipase와 Watanabe 등(1)이 분리한 *Pseudomonas* sp.의 lipase 최적 반응온도 50°C라는 보고보다 낮은 온도에서 활성이 높지만, 신 등(3)이 보고한 *Pseudomonas* sp. lipase보다는 높은 온도에서 활성을 나타내었다. 한편 효소의 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해 glycine-NaOH buffer(pH 10.0)에 효소액을 첨가한 후 각각의 온도에서 시간에 따른 잔존 활성도를 측정한 결과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 50°C에서 80분까지는 비교적 안정하였으나, 70°C에서 20분간 열처리하였을 때 효소활성 감소가 관찰되어 이 효소는 비교적 열에 강한 것으로 판단되었다.

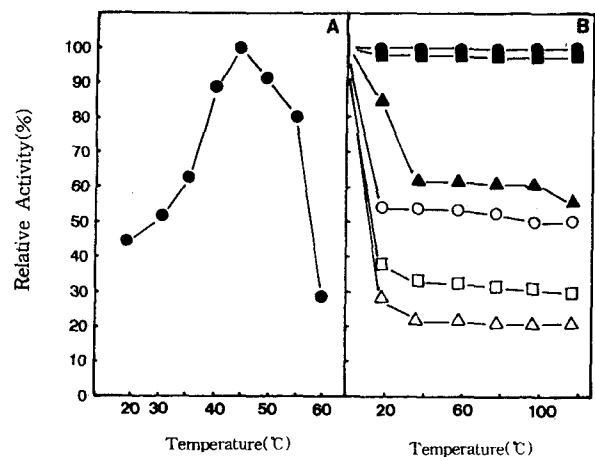


Fig. 2. (A) Effect of temperature on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11. (B) Effect of temperature on the stability of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11. ●—●: 20°C, ■—■: 30°C, ▲—▲: 40°C, ○—○: 50°C, □—□: 60°C, △—△: 70°C

Table 1. Effect of metal ions on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11

Ion	Metal	Relative activity (%)
Mn ²⁺	MnSO ₄	119.4
Ca ²⁺	CaCl ₂	113.5
Mg ²⁺	MgSO ₄	107.1
Ba ²⁺	BaCl ₂	105.5
Ag ²⁺	AgNO ₃	105.4
Co ²⁺	CoCl ₂	103.0
Cu ²⁺	CuSO ₄	97.8
Hg ²⁺	HgCl ₂	97.0
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	83.7
Zn ²⁺	ZnSO ₄	81.4
Fe ²⁺	FeSO ₄	67.3
None		100.0

금속이온의 영향 금속염이 alkaline lipase에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이들 금속이온의 농도가 1 mM 이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정된 결과는 Table 1 과 같다. 본 효소는 Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Ag²⁺ 등에 의해서는 활성이 다소 증가하였으나 Fe²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ 등에 의해 활성이 저해를 받았다. 이상의 결과는 Yoshino 등(10)과 Eitenmiller 등(11)이 보고한 alkaline lipase가 Mn²⁺에 의해 효소활성이 증가되고 Nishio 등(2)과 Izumi 등(5), 이 등(9), Ota 등(12)이 보고한 alkaline lipase가 Fe²⁺에 의해서 강한 저해작용을 받는다는 결과와 비슷하였다.

각종 저해제의 영향 효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 2,4-dinitrophenol(DNP), γ -chloromercuribenzoic acid(PCMB), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H₂O₂를 선정하여 *Serratia* sp. AL-11의 alkaline lipase 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노산이 효소활성부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-DNP를 증류수에 용해하여 1.0×10⁻²~1.0×10⁻⁵M로 만들고 2,4-DNP 용액 1 ml에 효소액 1 ml을 혼합하여 4°C에서 30분간 전처리한 후 활성을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 현저한 저해가 일어나지 않음을 알 수 있었다. 효소분자중 SH기 저해제로 알려진 PCMB의 영향을 검토하기 위하여 에탄올 98 ml에 10% NaOH 2 ml를 가한 ethanol-NaOH 용액에 PCMB를 용해시켜 1.0×10⁻²~1.0×10⁻⁵ M의 농도로 만든 다음 같은 양의 효소액과 혼합한 다음 4°C에서 30분간 전처리 하여 효소활성을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 큰 활성의 저하는 나타나지 않았다. 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA의 영향을 알아보기 위하여 증류수에 EDTA를 용해시켜 1.0×10⁻²~1.0×10⁻⁵M의 농도로 만든 다음 같은 양의 효소액과 혼합한 다음 4°C에서 30분간 전처리하여 효소활성을 측정된 결과

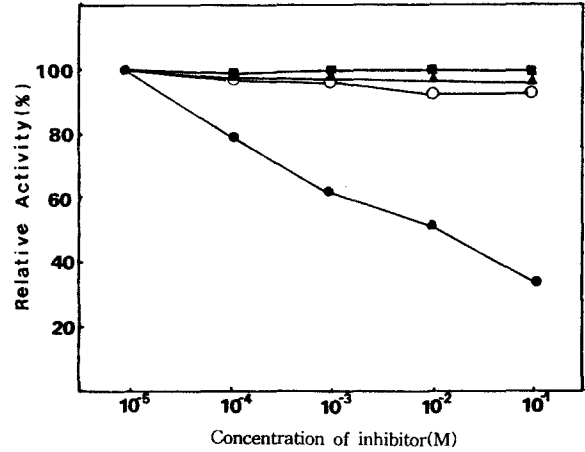


Fig. 3. Effect of various inhibitors on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11.

■--■: 2,4-dinitrophenol
 ▲--▲: p-chloromercuribenzoic acid
 ●--●: Ethylenediaminetetraacetic acid
 ○--○: Hydroperoxide

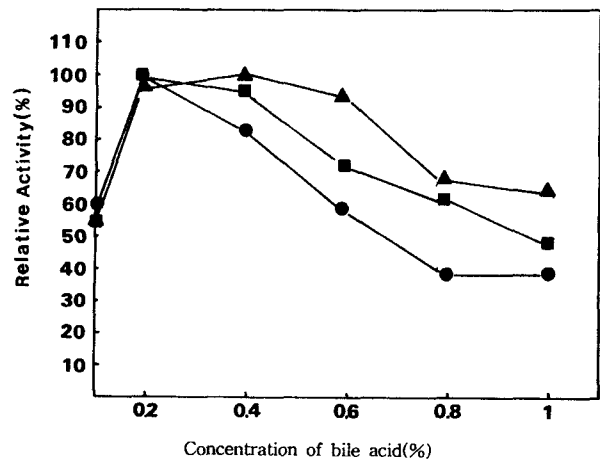


Fig. 4. Effect of bile acids on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11.

●--●: sodium taurocholate
 ■--■: sodium cholate
 ▲--▲: sodium deoxycholate

Fig. 3에서와 같이 EDTA의 농도가 높아짐에 따라 효소 활성이 감소하는 것으로 보아 본 효소의 활성단에 금속이온이 존재하는 것으로 판단되었다. 이같은 결과는 Yamamoto 등(13)과 이 등(9), Sarada 등(14), Ota 등(12)의 보고와 비슷하였다. 효소활성단이 histidine의 imidazole 기인 경우 그 활성단을 저해하는 H₂O₂를 농도별로 처리한 결과 Fig. 3에서와 같이 큰 활성의 저하는 나타나지 않았다. 담즙산의 영향 소화효소로서 본 효소가 작용할 때 유화작용을 가지는 담즙산염이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 sodium taurocholate와 sodium cholate, sodium deoxycholate를 각각 농도별로

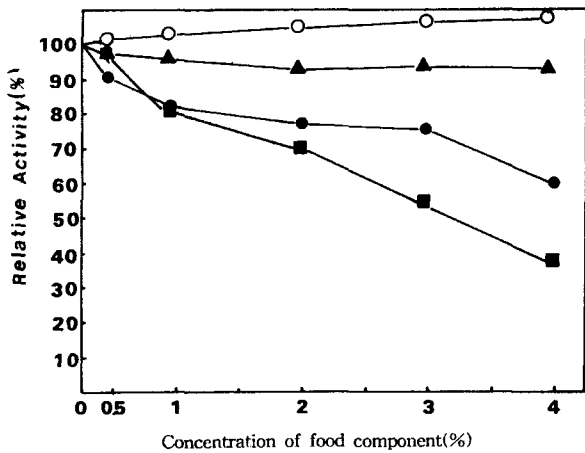


Fig. 5. Effect of various food components on the activity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11.

- : Casein
- : Albumin
- ▲--▲: Starch
- : Ethanol

Table 2. Substrate Specificity of alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11

Substrate	Relative activity (%)
Olive oil	100.0
Soybean	104.3
Corn oil	100.7
Coconut oil	95.4
Sesame oil	83.3
Caster oil	37.5
Lard	88.0
Beef tallow	56.7
Tween 20	15.1
Tween 60	17.0
Tween 80	10.0
Span 80	24.5
Tributyryn	4.5

기질에 첨가하여 반응시킨 후 효소활성을 측정된 결과 Fig. 4에서와 같이 저농도의 담즙산에서 활성이 높았다. 이는 Kokusho 등(4)의 보고와 유사한 결과를 보여 저농도의 담즙산염 존재 하에서도 효소활성이 크게 증가되어 본 효소를 소화보조제로 사용할 수 있으리라 판단된다.

식품성분의 영향 소화효소로서 작용시 milk casein과 egg albumin, starch, ethanol과 같은 식품성분이 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질에 각 성분을 농도별로 첨가하여 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며 그 결과 Fig. 5와 같이 albumin과 casein에 의해 식품성분의 농도가 증가할 수록 효소활성이 저하됨을 알 수 있었다.

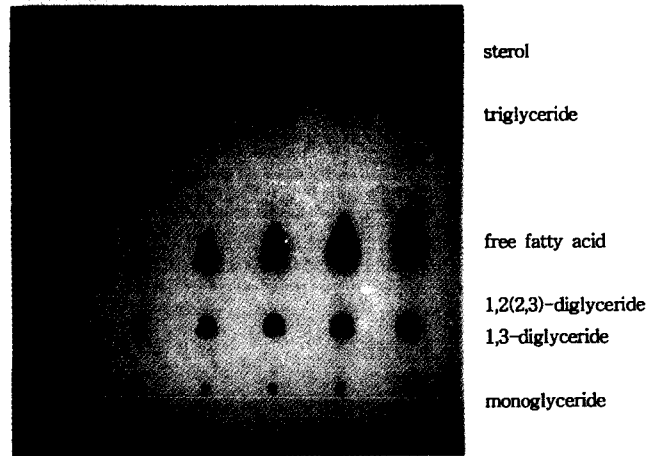


Fig. 6. Hydrolysis of olive oil by alkaline lipase from *Serratia liquefaciens* AL-11.

기질의 특이성

천연유지와 합성에스테르에 대한 가수분해도를 측정하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다. 천연유지의 경우 대두유에 대한 가수분해도가 가장 높았으며, 피마자유의 가수분해도는 상대활성 37.5%로 낮은 편이었다. 또한 본 효소는 sorbitan ester, fatty acid methyl ester보다 triglyceride에 더 활성이 높다는 것을 알 수 있었다.

Olive oil의 가수분해양상

본 효소에 의한 olive oil의 가수분해정도와 효소작용의 위치 특이성을 알아보기 위해 유지를 가수분해시킨 다음 diethyl ether로 반응물을 추출한 다음, 박층크로마토그래피를 이용하여 반응물을 분석하였다(Fig. 6). Omar 등(15)은 *Humicola canuginosa*의 lipase가 1,3 위치의 지방산에 특이적으로 작용한다고 보고하였는데, 본 효소에 의한 가수분해물을 분석한 결과 1,2(2,3)-diglyceride와 1,3-diglyceride가 모두 검출되었으므로 본 효소는 기질인 지방에 무작위로 작용하여 지방산과 글리세롤을 생성한다는 사실을 알 수 있었다.

요 약

본 효소의 최적 반응온도는 약 45°C이고, 최적 pH는 10.0 정도였고, pH 7.0~10.0 범위와 30~50°C의 범위에서 안정하였다. 금속이온중 Mn^{2+} , Ca^{2+} 등에 의하여 활성이 증대되었으나 Fe^{2+} , Pb^{2+} 와 Zn^{2+} 등에 의해서는 효소활성이 저해되었고, 효소활성 저해제 중 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)에 의해 강한 저해작용을 나타내어 본 효소는 효소분자 중 금속이온이 관여하는 것으로 추정되었다. 효소반응 처리한 olive oil 가수분해물을 박층크로마토그래피 분석한 결과 *Serratia liquefaciens* AL-11이 생산하는 지방분해효소는 기질특이성이 비특이적이었으며, sodium cholate, sodium deoxychol-ate, so-

dium taurocholate 등의 담즙산염에 의해 효소활성이 증대되었다.

감사의 말

이 논문은 1995학년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

참고문헌

1. Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1353-1358.
2. Nishio, T., T. Chikano and M. Kamimura. 1987. Purification of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 181-186.
3. Shin, W., K. Jeong, J. Yu and J. Yu. 1991. Purification and properties of alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. J-19. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 57-63.
4. Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1743-1750.
5. Iizumi, T., K. Nakamura and T. Fukase. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1253-1258.
6. Hou, C.T. and T.M. Johnston. 1992. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *JAOCS.* **69**: 1088-1097.
7. 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.
8. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
9. Lee, J., R. Kim, B. Kim, Y. Park and I. Jin. 1993. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain producing an extracellular alkaline lipase catabolically regulated by glucose, and purification of the lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **21**: 239-246.
10. Yoshino, T., T. Sasaki, Y. Watanabe, T. Nagasawa and T. Yamane. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 660-664.
11. Eitenmiller, R.R., J.R. Vakil and K.M. Shahani. 1970. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Science.* **35**: 130-133.
12. Ota, Y., K. Gomi, S. Kato, T. Sugiura and Y. Minoda. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2885-2893.
13. Yamamoto K. and N. Fujiwara. 1988. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 3015-3021.
14. Sarada R. and R. Joseph. 1992. Purification and properties of lipase from the anaerobe *Propionibacterium acidipropionici*. *JAQAC.* **69**: 974-977.
15. Omar, I., M. Hayashi and S. Nagai. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola Canuginosa* NO. 3. *Agric. Biol. Chem.* **51**(1): 37-45.

(Received 10 November 1995)