

ORIGINAL ARTICLE

## 산업적 응용을 위한 Lipoxygenase 생산 세균의 분리 및 특성

김예린 · 박규림 · 김예담 · 이오미<sup>1)</sup> · 손흥주\*

부산대학교 생명환경화학학과 및 생명산업융합연구원, <sup>1)</sup>농림축산검역본부 조류세균과

### Isolation and Characterization of Lipoxygenase-producing Bacteria for Industrial Applications

Yerin Kim, Gyulim Park, Yedam Kim, O-Mi Lee<sup>1)</sup>, Hong-Joo Son\*

Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Life and Industry Convergence Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

<sup>1)</sup>Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

#### Abstract

Lipoxygenase is an enzyme, mainly produced by plants, capable of converting unsaturated fatty acids to fatty acids. It has vast application potential in the food, pharmaceutical and agricultural industries. The aim of this study was to isolate novel lipoxygenase-producing bacteria from the environment and to investigate the lipoxygenase enzymatic properties for industrial production. The strain, NC1, isolated from cultivation soils, was identified as *Bacillus subtilis* based on the phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequencing. This strain formed a pink color around the colony when cultured on indamine dye formation plates. The production of lipoxygenase by *B. subtilis* NC1 was influenced by the composition of the medium and linoleic acid concentrations. The optimum temperature and pH for lipoxygenase activity was determined to be 40 °C and pH 6, respectively. The enzyme showed relatively high stability at temperatures ranging from 20–50 °C and acid-neutral regions. In addition, the lipoxygenase produced by *B. subtilis* NC1 was able to degrade commercially available oils including sunflower seed oil and Perilla oil. In this study, a useful indigenous bacterium was isolated, and the fundamental physicochemical data of bacterial lipoxygenase giving it industrial potential are presented.

**Key words** : *Bacillus*, Biological activity, Fatty acid, Hydroperoxides, Lipoxygenase

#### 1. 서론

Lipoxygenase (EC. 1.13.11.12)는 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid와 같이 cis-cis-1,4-pentadiene 구조를 포함하고 있는 불포화지방산의 이산화반응을 촉매하여 fatty acid hydroperoxides

(HPOD)를 생성하는 효소이다(Hansen et al., 2013). Lipoxygenase는 대두, 밀, 채소 등 다양한 식물에 풍부하게 존재하는데, 특히 콩에 고농도로 존재하면서 비린 내를 유발하는 것으로 알려져 이를 제거하기 위한 연구가 오래전부터 진행되었다(Wolf, 1975; Siedow, 1991; Son et al., 2006).

Received 14 February, 2022; Revised 2 March, 2022;

Accepted 7 March, 2022

\*Corresponding author: Hong-Joo Son, Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Phone: +82-55-350-5544

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

Ⓒ 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.

오랫동안 lipoxygenase는 동물, 식물 및 균류 등 진핵생물에만 존재하는 것으로 알려졌다(Brash, 1999). 그러나, 2004년 *Pseudomonas aeruginosa*에서 lipoxygenase가 검출된 이후, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Shewanella*와 같은 그람음성세균에서도 그 존재가 확인됨으로써 진핵생물의 독점적 효소라는 그동안의 생각이 잘못된 것이 명확해졌다(Vance et al., 2004; Hansen et al., 2013). Lipoxygenase는 동물에서 염증, 생물학적 신호 분자의 형성, 면역 반응 및 지질 전달에, 식물에서는 해충에 대한 방어 시스템, oxylipin 생합성 및 발아에 관여하는 것으로 보고된 반면(Kusaka and Ikeda, 1993; Brash, 1999; Porta and Rocha-Sosa, 2002; Liavonchanka and Feussner, 2006), 세균에서는 세포막의 역동성에 영향을 미칠 것이라는 추측만 있을 뿐 그 생물학적 활성은 아직 해명되지 않고 있다(Vance et al., 2004).

Lipoxygenase는 식품가공 공정에서 이미 제거(Conte et al., 2010), 광학적으로 순도가 높은 방향족 화합물 합성(Fukushige and Hildebrand, 2005; Gounaris, 2010), 표백제제 개발(Cai et al., 2010), 제지 공정에서 지방산 변형(Nguyen et al., 2007), 제약에서 chlorpromazine과 같은 독성 화합물 제거(Santano et al., 2002) 등 산업적으로 활용 가능성이 매우 높은 효소이다. 최근 보고에 의하면 lipoxygenase는 peroxidase와 같은 효소와 함께 동반 작용하여 항균, 항염증, 항당뇨 등의 생리활성효과를 나타내는 물질을 생성하는 것으로 밝혀졌다(Heshof et al., 2016). Lipoxygenase에 의해 생성되는 대표적인 물질로서 resolvin을 들 수 있는데, 이것은 arachidonic acid가 lipoxygenase에 의해 산화됨으로써 생성되는 강력한 항염증 물질이기 때문에 제약 산업에서 많은 주목을 받고 있다(Balas and Durand, 2016). 이 외에도 lipoxygenase가 관여함으로써 생성되는 물질로서 jasmonic acid, HPOD, colneleic acid, lipoxin, hepoxilin 등이 있으며, 이들은 식품, 제약, 농업 분야에서 활용가능하다고 보고되었다(Recchiuti, 2013).

현재, 산업적으로 이용되고 있는 소수의 lipoxygenase는 식물 유래가 대부분인데, 식물은 재배에 장시간이 소요되는 동시에 기상조건에 영향을 받으며, 결과적으로 효소 획득에 오랜 시간이 소요되는 단점이 지적되고 있다(Horn et al., 2004). 세균은 빠른 생육속도, 다양한 기질 이용능, 인공변이의 용이성, 높은 균일성을 가지기 때

문에 효소의 대량생산 측면에서 큰 장점을 가진다(Kaur and Kaur, 2015). 그럼에도 불구하고 세균 유래 lipoxygenase에 관한 연구는 극소수에 불과하며, 효소학적 특성도 거의 보고되어 있지 않은 실정이다(Busquets et al., 2004; Bae et al., 2010). 따라서 비용 경제적인 lipoxygenase의 활용이라는 측면을 고려할 때, 자연계로부터 lipoxygenase 생산 세균의 확보가 선행되어야 할 필요가 있다.

본 연구는 산업적 활용가능성이 높은 세균유래 lipoxygenase 개발이라는 목표 하에 토양으로부터 lipoxygenase를 생산하는 새로운 세균을 분리 및 동정한 후, 생산된 lipoxygenase의 특성을 조사함으로써 유용 토착미생물 자원 및 효소반응에 필요한 기초자료를 확보하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. Lipoxygenase 생산 세균의 분리

Lipoxygenase 생산 균주는 indamine dye formation plate assay (Nyssola et al., 2012)에 의하여 분리하였다. Hematin 촉매 반응에서, lipoxygenase 반응산물인 linoleic acid hydroperoxides 존재 하에 3-methyl-2-benzothiazolinone는 3-(dimethylamine)benzoic acid와 산화적으로 커플링되어 분홍색의 indamine dye를 형성한다. 결과적으로 lipoxygenase를 생산하는 균주 집락의 주변부는 분홍색으로 변하게 된다. 경남 일원의 농경지 토양과 농작물 근권 토양을 채집한 후, 생리적 식염수를 이용하여 토양 현탁액을 조제하였다. 각 토양 현탁액을 계단 희석한 후, indamine dye formation plate에 도말하여 30°C에서 배양하면서 집락 주변에 분홍색을 형성하는 균주를 lipoxygenase 생산균주로 선정하였다.

### 2.2. 선정균주의 동정

선정균주의 형태학적 및 배양적 성질 등의 표현형적 특성은 Manual for the identification of medical bacteria (Barrow and Feltham, 1993)에 의하여 검토하였으며, Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt et al., 1993)를 참고하여 동정하였다. 그 후, 선정균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석함으로써 계통학적 동정을 실시하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하는데 사용된 primer는 27F (AGAGTT

TGATCMTGGCTCAG)와 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT)이었으며, 도출된 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 이용하여 관련 균주들과의 상동성을 비교하였고, MEGA software를 이용하여 계통학적 위치를 결정하였다(Lane, 1991).

### 2.3. 효소활성 및 생육도 측정

배양액을 12000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리한 후, 상등액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. 조효소액의 lipoyxygenase 활성은 Anthon and Barrett의 방법(2001)에 따라 측정하였다. 조효소액 100  $\mu$ l를 25 mM linoleic acid와 20 mM 3-(dimethylamine)benzoic acid가 함유된 100 mM potassium phosphate 완충액(pH 6) 400  $\mu$ l에 첨가하여 30°C에서 5분간 반응시켰다. 이 반응액에 10 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone 400  $\mu$ l, 0.1 mg/ml hematin 400  $\mu$ l 및 50 mM EDTA 40  $\mu$ l를 첨가하여 다시 30°C에서 5분간 반응시킨 후, 1% sodium lauryl sulfate 500  $\mu$ l를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 반응 정지액을 12000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후, 상등액의 흡광도를 598 nm에서 측정하여 효소 활성을 조사하였다. Lipoyxygenase의 활성 1 unit는 반응조건에서 1  $\mu$ mol의 hydroperoxy linoleic acid를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 세포 생육도는 660 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 모든 실험은 삼반복으로 수행되었으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

### 2.4. Lipoyxygenase 생산에 대한 배지 및 linoleic acid의 영향

선정균주의 lipoyxygenase 생산에 영향을 미치는 배지의 종류[Luria Broth (LB), Nutrient Broth (NB), Tryptic Soy Broth (TSB)] 및 기질인 linoleic acid의 농도(0-3 mM)를 조사하였다. 전배양은 50 ml의 LB가 함유된 250-ml 삼각플라스크에 LB 평판배지에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간동안 배양하였다. 전배양액을 본배양액 50 ml가 함유된 250-ml 삼각플라스크에 2% (v/v) 접종한 후, 200 rpm에서 일정시간 배양하면서 시간 경과에 따라 세포 생육도 및 lipoyxygenase 활성을 측정하였다.

### 2.5. Lipoyxygenase 활성에 대한 온도 및 pH의 영향

조효소액을 사용하여 온도(10-50°C) 및 pH (pH 3-11)에 따른 lipoyxygenase의 상대활성을 비교하였다. 이때 pH에 따른 lipoyxygenase 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium acetate 완충액(pH 3-6), 100 mM potassium phosphate 완충액(pH 6-8), 100 mM Tris-HCl 완충액(pH 7-9), 100 mM glycine-NaOH 완충액(pH 9-11)을 사용하였다.

### 2.6. Lipoyxygenase의 온도 및 pH 안정성

조효소액을 사용하여 온도(4°C, 20-70°C, 100°C에서 각각 1시간 노출) 및 pH (pH 3-11에서 각각 1시간 노출)에 따른 lipoyxygenase의 잔존활성을 비교하였다. pH 안정성 측정에 사용된 완충액은 효소활성 최적 pH 측정에 사용된 것들과 동일하였다.

### 2.7. Lipoyxygenase 활성에 대한 금속이온의 영향

상기에서 확립된 효소활성 최적 온도 및 pH에서 조효소액을 사용하여 다양한 금속이온(FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, FeCl<sub>3</sub>, NiSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> 각 0.1 mM) 첨가에 따른 lipoyxygenase의 상대활성을 비교하였다.

### 2.8. Lipoyxygenase의 기질 특이성

상기에서 확립된 효소활성 최적 온도 및 pH에서 조효소액을 사용하여 다양한 오일 기질(포도씨유, 견과유, 해바라기씨유, 대두유, 올리브유, 카놀라유, 들기름, 폐대두유)에 대한 lipoyxygenase의 상대활성을 비교하였다. 이때 반응액에 첨가되는 오일 기질의 양은 대조기질인 linoleic acid와 동일하게 조정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Lipoyxygenase 생산균주 분리 및 동정

농작물 재배 토양으로부터 indamine dye formation plate에서 집락 주위에 분홍색을 나타내는 균주 혼합체를 분리한 후, 연속적인 도말을 통하여 NC1 균주를 순수 분리하였다(Fig. 1A). NC1 균주는 그람양성반응을 나타내는 막대형 세균으로서, 내생포자를 형성하였으며, 운동성이 있었다. 세포 크기는 평균적으로 길이 2.0-2.2  $\mu$ m, 폭 0.4-0.6  $\mu$ m이었다(Fig. 1B). Oxidase와 catalase를 생성하였으며, glucose로부터 산성물질을 생성하였다. Nutrient agar 평판배지에서 생육한 집락은 중앙부가

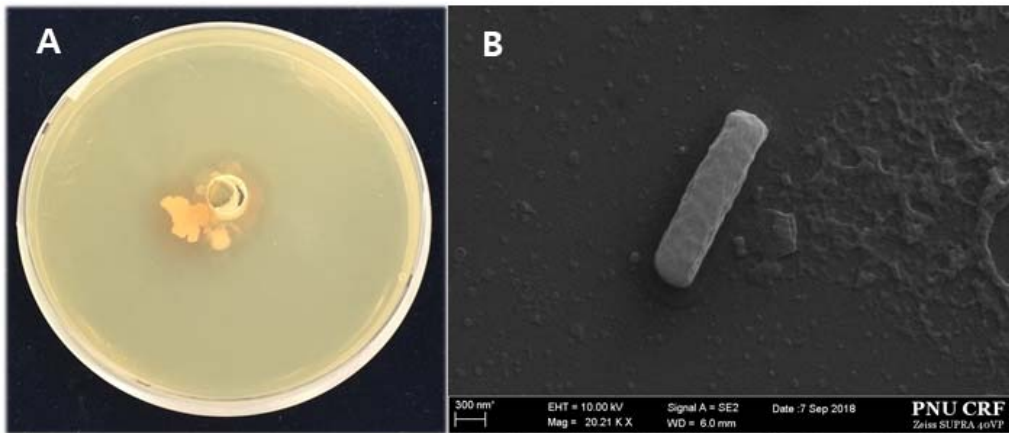


Fig. 1. Phenotypic characters of isolate NC1. A, growth pattern on indamine dye formation plate; B, cell shape.

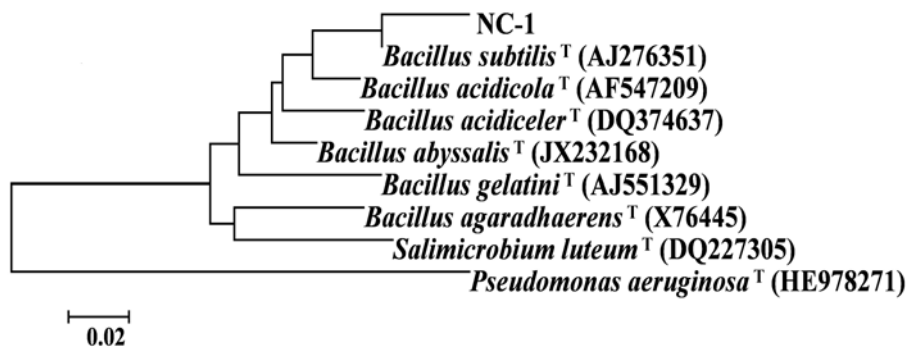


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using 16S rRNA gene sequences, available in the GenBank database, employing the Neighbour-joining method.

편평한 반투명의 크림색을 나타내었으며, 배양 48 시간이 경과했을 때 rhizoid growth를 보여주었다. Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt et al., 1993)에 기재된 내용을 참고했을 때 NC1 균주는 전형적인 *Bacillus* 속의 특성을 나타내었다. NC1 균주를 보다 정확하게 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 후, GenBank 데이터베이스에 등록된 유사 균주와 비교한 결과, *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 보여주었다. 또한 기존의 *Bacillus* 속 표준균주들과의 관련성을 조사하기 계통도를 작성한 결과, NC1 균주는 계통분류학적으로 *B. subtilis*와 동일한 클러스터에 포함되었다(Fig. 2). 지금까지 lipoxygenase를 생산하는 세균은 *Pseudomonas aeruginosa*를 포함한 그람음성세균

에서만 알려져 있다(Vance et al., 2004; Hansen et al., 2013). 그러나 본 연구를 통하여 *B. subtilis*와 같은 그람 양성세균도 lipoxygenase를 생산할 수 있음이 확인되었기에 향후 균주 스크리닝시 이 사항을 고려한다면 보다 많은 lipoxygenase 생산 세균을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

### 3.2. Lipoxygenase 생산에 대한 배지의 영향

앞에서 언급했다시피 lipoxygenase 생산 세균에 대한 연구는 *P. aeruginosa*를 대상으로 한 소수의 결과만 보고되었으며, 이 보고에서 효소 생산에 사용된 배지는 TSB이었다(Busquets et al., 2004). 따라서 배지의 종류가 효소 생산에 영향을 미칠 것이라는 가정 하에 세균

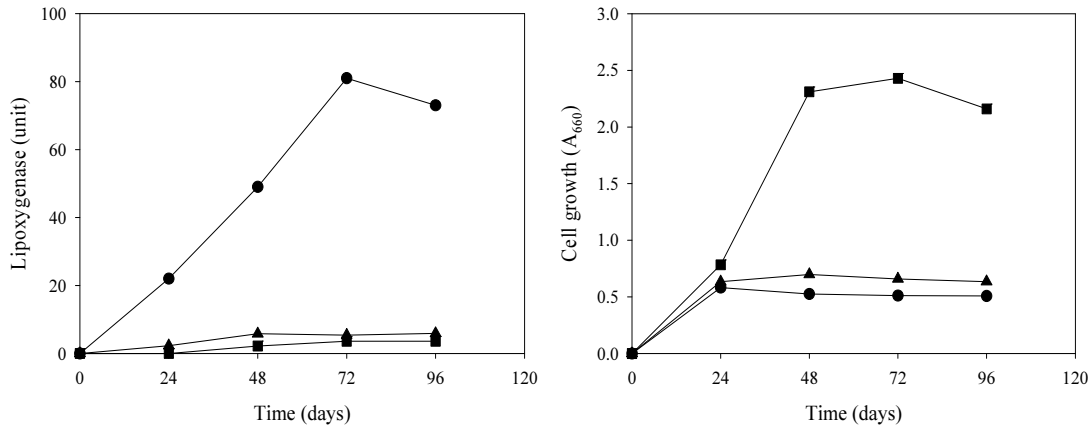


Fig. 3. Time courses of lipoxygenase production and cell growth of *B. subtilis* NC1 in different media. ●, Luria broth; ■, tryptic soy broth; ▲, nutrient broth.

배양에 널리 사용되고 있는 배지들의 영향을 조사하였다. NC1 균주의 lipoxygenase 생산에 영향을 미치는 배지의 종류를 배양시간 경과에 따라 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. LB에서 배양시간 경과에 따라 lipoxygenase가 비례적으로 생산되어 72시간에 최대 활성을 나타낸 반면 TSB와 NB에서는 생산량이 매우 적었다. 그러나 세포 생육도는 lipoxygenase 생산 양상과 반대의 경향을 나타내었다. TSB는 LB와 NB에 비해 질소 성분과 탄소성분이 풍부하게 함유된 배지이다. 따라서 세포 생육은 이들에 의해 촉진되는 반면 lipoxygenase 생산은 nitrogen repression에 의하여 다른 배지에 비해 상대적으로 저조한 것으로 판단되었다. 결과적으로 배지의 성분은 lipoxygenase 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었기에 배지 최적화에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

### 3.3. Lipoxygenase 생산에 대한 linoleic acid의 영향

Lipoxygenase의 대표적인 기질은 linoleic acid이다 (Hansen et al., 2013). 따라서 배지 성분으로서 linoleic acid가 효소 생산에 어떤 영향을 미치는지 확인할 필요가 있다. NC1 균주의 lipoxygenase 생산에 영향을 미치는 linoleic acid의 농도를 배양시간 경과에 따라 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. Linoleic acid가 첨가되지 않은 실험구에서도 lipoxygenase가 생산되었으나 기질의 첨가 농도가 높아질수록 lipoxygenase 생산량은

증가하였으며, 증가하는 양상은 시간 의존적이었다. 이것은 lipoxygenase는 구성적으로 생산되지만 기질의 첨가에 의하여 생산이 강하게 유도됨을 시사한다. 한편, 세포 생육도는 lipoxygenase 생산 양상과 반대되는 경향을 나타내었는데 일정 농도 이상의 지방산은 세포 생육을 저해한다는 기존 보고와 일치하였다(Casillas-Vargas et al., 2021; Zheng et al., 2005).

### 3.4. Lipoxygenase 활성 최적 온도 및 pH

각 반응온도별 lipoxygenase의 활성을 조사한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. Lipoxygenase의 linoleic acid 분해활성은 반응온도 증가에 따라 비례적으로 증가하여 40°C에서 최대값을 나타낸 후, 그 이상의 온도에서는 완만하게 감소하였다. 10°C, 20°C 및 30°C에서의 효소 상대활성은 각각 28.1%, 58.1% 및 91%이었다. 따라서 NC1 균주가 생산한 lipoxygenase의 활성 최적온도는 40°C로 결정되었다. 한편, *P. aeruginosa* PR3 및 *Pseudomonas* 42A2가 생산한 lipoxygenase의 활성 최적온도는 각각 60°C (Bae et al., 2010) 및 25°C (Busquets et al., 2004)로 보고되어 균주마다 효소 활성 최적온도는 다르다는 것을 알 수 있었다.

최적 온도에서의 반응 pH별 lipoxygenase의 활성을 조사한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. Lipoxygenase의 linoleic acid 분해활성은 100 mM sodium acetate 완충액(pH 6)에서 가장 높았으며, 그 이하 및 이상의 pH

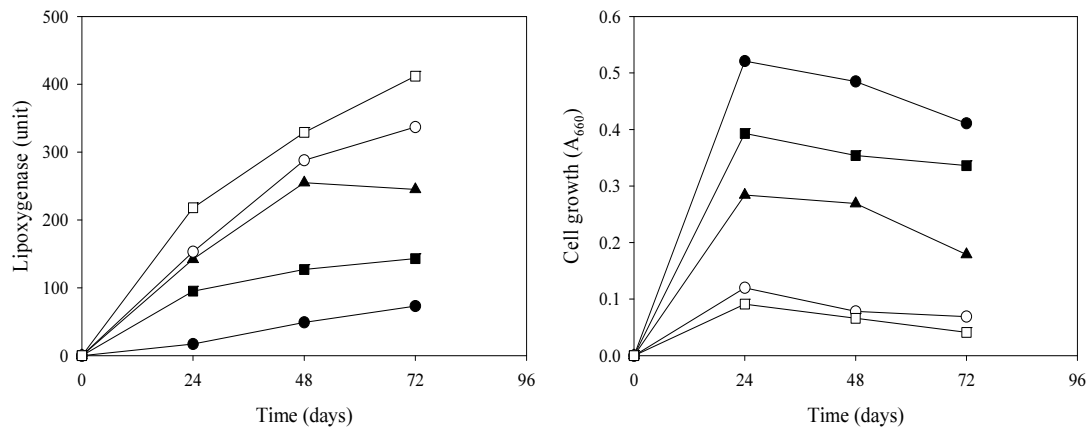


Fig. 4. Influence of different linoleic acid concentrations on lipoxxygenase production and cell growth of *B. subtilis* NC1. ●, 0 mM; ■, 1.5 mM; ▲, 2 mM; ○, 2.5 mM; □, 3 mM.

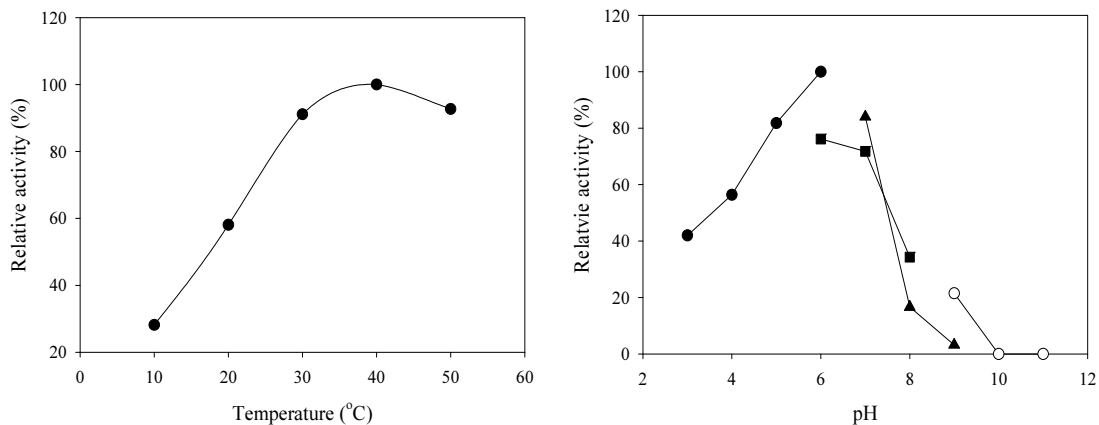


Fig. 5. Influence of different temperatures on lipoxxygenase produced by *B. subtilis* NC1.

Fig. 6. Influence of different pHs on lipoxxygenase produced by *B. subtilis* NC1. ●, sodium acetate buffer; ■, potassium phosphate buffer; ▲, Tris-HCl buffer; ○, glycine-NaOH buffer.

범위에서는 완충액의 종류에 관계없이 효소활성은 감소하였는데, 특히 pH 10 이상에서는 효소반응이 완전히 정지되었다. 따라서 NC1 균주가 생산한 lipoxxygenase의 활성 최적 pH는 pH 6 (sodium acetate 완충액)으로 결정되었다. *P. aeruginosa* PR3가 생산한 lipoxxygenase의 활성 최적 pH는 6이었으며, 그 이상의 pH에서는 활성이 크게 감소하여(Bae et al., 2010) NC1 균주가 생산한 효소와 비슷한 특성을 나타낸 반면, *Pseudomonas*

42A2의 lipoxxygenase는 pH 9에서 최적 활성을 나타내었다(Busquets et al., 2004).

### 3.5. Lipoxxygenase의 온도 및 pH 안정성

NC1 균주가 생산한 lipoxxygenase의 열 안정성을 조사한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 노출온도 증가에 따라 효소활성은 감소하여 100°C에서 효소반응이 완전히 정지되었다. 즉 20-50°C 범위에서 효소의 잔존활성은 99.2%-85.3%를 나타내었고, 60°C, 70°C 및 100°C에서는

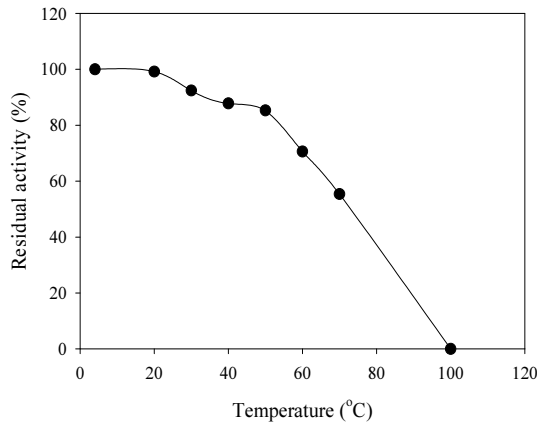


Fig. 7. Thermal stability of lipoxygenase produced by *B. subtilis* NC1.

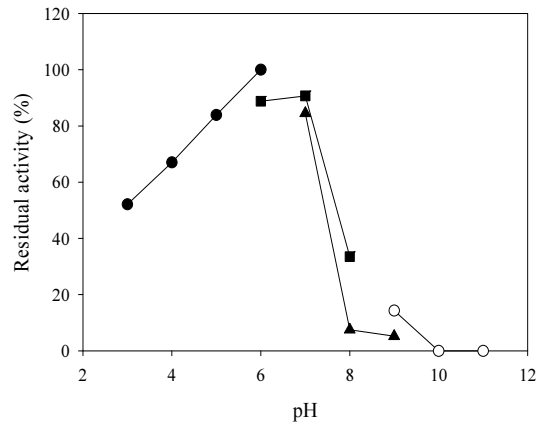


Fig. 8. pH stability of lipoxygenase produced by *B. subtilis* NC1. ●, sodium acetate buffer; ■, potassium phosphate buffer; ▲, Tris-HCl buffer; ○, glycine-NaOH buffer.

각각 70.6%, 55.4% 및 0%를 나타내었다. 따라서 NC1 균주가 생산한 lipoxygenase는 약간의 내열성을 가지고 있음을 알 수 있었다. *Pseudomonas* 42A2의 lipoxygenase는 15-45°C 범위에서 효소활성이 안정적으로 유지되었으나 그 이상의 온도에서는 활성이 급격하게 감소하였다고 보고되었다(Busquets et al., 2004). 그러나 *P. aeruginosa* PR3가 생산한 lipoxygenase는 60°C에서 75%의 상대활성을 나타내어 비교적 열에 안정하다고 하였다(Bae et al., 2010).

NC1 균주가 생산한 lipoxygenase의 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 효소활성 pH 범위와 대단히 유사한 결과를 나타내었다. pH 4-5 범위에서 효소의 잔존활성은 52.1%-83.9%를 나타내었으나 pH 10 이상에서는 효소활성이 나타나지 않았다. 따라서 NC1 균주가 생산한 lipoxygenase는 알칼리 영역에서 활용할 수 없지만 산성 영역에서는 충분히 사용 가능할 것으로 판단되었다. 한편, *Pseudomonas* 42A2와 *P. aeruginosa* PR3의 pH 안정성은 보고되지 않아 본 균주가 생산한 lipoxygenase와 비교할 수 없었다.

### 3.6. 금속이온 첨가에 따른 lipoxygenase 활성

Fe<sup>2+</sup>은 대부분의 식물유래 lipoxygenase 활성을 증가시킨다는 보고가 있다(Baysal and Demirdoven, 2007). 따라서 상기에서 확립된 효소활성 최적 온도 및 pH에서

다양한 금속이온이 lipoxygenase 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>는 각각 125.3%, 165.4%의 상대활성을 보여주었으며, 그 외 금속이온들은 효소활성을 저해하였다. *Pseudomonas* 42A2의 lipoxygenase는 Mg<sup>2+</sup>에 의하여 상대활성이 157% 촉진되었으나 Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 및 Hg<sup>2+</sup> 첨가시 각각 15.9%, 16.2% 및 4.7%의 상대활성을 나타내었다(Busquets et al., 2004). 반면 *P. aeruginosa* PR3의 lipoxygenase는 Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에 의하여 효소활성이 509.5%, 531.1% 증가되었다고 보고되었다(Bae et al., 2010). 요약하면, 세균유래 lipoxygenase의 금속이온 요구성은 식물유래 효소와 상이하어 그 구조적 특성이 서로 다를 것으로 판단되었다.

### 3.7. Lipoxygenase의 기질 특이성

산업적 활용 측면에서 순도가 높은 시약급 오일보다 상업적으로 판매하는 오일들에 대한 기질 특이성을 조사하는 것이 훨씬 실용적이다. 따라서 NC1 균주가 생산한 lipoxygenase의 상업용 오일 기질에 대한 특이성을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 조사한 모든 오일 기질에 대해 대조구인 linoleic acid보다 높은 효소활성을 나타내었다. 특히, 사용한 이후 산패된 폐대두유에서도 높은 효소활성이 나타나 오일 폐기물의 재활용 측면에서 의의가 있을 것으로 판단되었다. 본 균주의 결과와

직접적으로 비교할 수는 없지만 *Pseudomonas* 42A2와 *P. aeruginosa* PR3의 lipoxygenase는 oleic acid, linolenic acid에 대한 분해활성이 linoleic acid 대비 각각 46%, 60.4% (Busquets et al., 2004) 및 119.8%, 0% (Bae et al., 2010)인 것으로 나타났다.

**Table 1.** Influence of different metal ions on lipoxygenase produced by *B. subtilis* NC1

Metal ion (0.1 mM)	Relative activity (%)
Control	100.0
NaCl	98.2
CoCl <sub>2</sub>	99.4
MnSO <sub>4</sub>	125.3
FeSO <sub>4</sub>	41.4
HgCl <sub>2</sub>	80.9
FeCl <sub>3</sub>	98.2
CaCl <sub>2</sub>	91.4
NiSO <sub>4</sub>	94.4
KCl	94.4
MgSO <sub>4</sub>	94.4
CdCl <sub>2</sub>	65.4
ZnSO <sub>4</sub>	72.2
CuSO <sub>4</sub>	165.4

**Table 2.** Substrate specificity of lipoxygenase produced by *B. subtilis* NC1

Substrate	Relative activity (%)
Linoleic acid	100.0
Grape seed oil	106.4
Nuts oil	107.5
Sunflower seed oil	108.0
Soybean oil	105.9
Olive oil	105.9
Canola oil	108.6
Perilla oil	110.7
Waste soybean oil	108.6

#### 4. 결론

Lipoxygenase는 주로 식물에 의하여 생산되는 불포화지방산 전환효소로서, 식품, 제약, 농업분야에서 활용

가능성이 매우 높다. 본 연구에서는 lipoxygenase의 산업적 대량생산 가능성을 향상시키기 위하여 토양으로부터 새로운 lipoxygenase 생산 세균을 분리한 후, 생산된 효소의 특성을 조사하였다. 농작물 재배토양으로부터 indamine dye formation 평판배지에서 집락 주변에 분홍색 환을 형성하는 NC1 균주를 분리한 후, 표현형적 특성과 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과에 기초하여 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. *B. subtilis* NC1에 의한 lipoxygenase 생산은 배지성분과 linoleic acid 농도에 크게 영향을 받았다. 생산된 효소의 활성 최적 온도 및 pH는 각각 40℃ 및 pH 6이었으며, 20-50℃ 및 산성-중성 영역에서 비교적 높은 안정성을 보여주었다. 또한 본 효소는 상업적으로 판매되는 오일들을 분해할 수 있었다. 본 연구를 통하여 새로운 유용 토착세균의 확보 및 세균유래 lipoxygenase의 산업적 응용에 필요한 효소의 물리화학적 기초자료 제시할 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

#### REFERENCES

- Anthon, G. E., Barrett, D. M., 2001, Colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 32-37.
- Bae, J. H., Hou, C. T., Kim, H. R., 2010, Thermostable lipoxygenase is a key enzyme in the conversion of linoleic acid to trihydroxy-octadecenoic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 15, 1022-1030.
- Balas, L., Durand, T., 2016, Dihydroxylated E,E,Z-docosatrienes. An overview of their synthesis and biological significance, *Prog. Lipid Res.*, 61, 1-18.
- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A., 1993, *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge University Press, New York.
- Baysal, T., Demirdoven, A., 2007, Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review, *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 491-496.
- Brash, A. R., 1999, Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.*,



- 274, 23679-23682.
- Busquets, M., Deroncelé, V., Vidal-Mas, J., Rodríguez, E., Guerrero, A., Manresa, A., 2004, Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (*S*)-(*E*)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid, *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 129-139.
- Cai, Y., Xu, H., Xia, Y., Fang, Y., 2010, Application of linoleic acid hydroperoxide as a mild and green bleaching agent, *AICHE Spring Meeting & 6th Global Congress on Process Safety, Conference Proceedings*, San Antonio, TX, United States, Mar. 21-25, (1), cail/1-8.
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Valle, R. G. D., Carballeira, N. M., Sanabria-Ríos, D. J., 2021, Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents, *Prog. Lipid Res.*, 82, 101093-101102.
- Conte, L., Macri, F., Vianello, A., 2010, Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in two olive varieties from Northern Italy, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 780-790.
- Fukushige, H., Hildebrand, D., 2005, A Simple and efficient system for green note compound biogenesis by use of certain lipoxygenases and hydroperoxide lyase sources, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6877-6882.
- Gounaris, Y., 2010, Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates, A review, *Flavour Frag. J.*, 25, 367-386.
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M. C., Busquets, M., Manresa, A., 2013, Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 4737-4747.
- Heshof, R., de Graaff, L. H., Villaverde, J. J., Silvestre, A. J. D., Haarmann, T., Dalsgaard, T. K., Buchert, J., 2016, Industrial potential of lipoxygenases, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36, 665-674.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Horn, M. E., Woodard, S. L., Howard, J. A., 2004, Plant molecular farming: systems and products, *Plant Cell Rep.*, 22, 711-720.
- Kaur, J., Kaur, H., 2015, Advantages and effectiveness of bacterial culture in medical laboratories, *Int. J. Adv. Res.*, 3, 1028-1039.
- Kusaka, T., Ikeda, M., 1993, Liquid chromatography-mass spectrometry of fatty acids including hydroxy and hydroperoxy acids as their 3-methyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one derivatives, *J. Chromatography* 639, 165-173.
- Lane, D. J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing, in: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Liavonchanka, A., Feussner, I., 2006, Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis, *J. Plant Physiol.*, 163, 348-357.
- Nguyen, D., Zhang, X., Paice, M., Tsang, A., Renaud, S., 2007, Microplate enzyme assay for screening lipoxygenases to degrade wood extractives, *Biocatal. Biotransform.*, 25, 202-210.
- Nyysola, A., Heshof, R., Haarmann, T., Eidner, J., Westerholm-Parvinen, A., Langfelder, K., Kruus, K., de Graaff, L., Buchert, J., 2012, Methods for identifying lipoxygenase producing microorganisms on agar plates, *AMB Express* 2, 17-23.
- Porta, H., Rocha-Sosa, M., 2002, Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features, *Plant Physiol.*, 130, 15-21.
- Recchiuti, A., 2013, Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 107, 64-76.
- Santano, E., Pinto, M., Macias, P., 2002, Chlorpromazine oxidation by hydroperoxidase activity of covalent immobilized lipoxygenase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36, 95-100.
- Siedow, J. N., 1991, Plant lipoxygenase: structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 145-188.
- Son, B. Y., Lee, Y. H., Lee, S. H., 2006, Change of lipoxygenase activity during seed germination in soybean, *Kor. J. Crop Sci.*, 51, 209-214.
- Vance, R. E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C. N., Mekalanos, J. J., 2004, The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 2135-2139.

Wolf, W. J., 1975, Lipoxygenase and flavor of soybean protein product, *J. Agric. Food Chem.*, 23, 136-141.

Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., Kim, W. G., 2005, Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Lett.*, 579, 5157-5162.

- 
- Graduate student. Ye-Rin Kim  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
shvc2966@pusan.ac.kr

- 
- Graduate student. Gyu-Lim Park  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
cookie30830@pusan.ac.kr
  - Undergraduate student. Ye-Dam Kim  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
kyd43888@pusan.ac.kr
  - Researcher. O-Mi Lee  
Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine  
Agency  
lomi78@korea.kr
  - Professor. Hong-Joo Son  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
shjoo@pusan.ac.kr