[UCI]I804:24011-200000256598

2012년 2월

석사학위논문

Streptomyces sp. CS326 균주가 생산하는 지질분해효소의 정제 및 특성 분석

조선대학교 대학원

약 학 과

박 다 정

Streptomyces sp. CS326 균주가 생산하는 지질분해효소의 정제 및 특성 분석

Purification and Biochemical Characteristics of Lipase from *Streptomyces* sp. CS326

2012년 2월 24일

조선대학교 대학원

약 학 과

박 다 정

Streptomyces sp. CS326 균주가 생산하는 지질분해효소의 정제 및 특성 분석

지도교수 유 진 철

이 논문을 약학석사 학위신청논문으로 제출함

2011년 10월

조선대학교 대학원

약 학 과

박 다 정

박다정의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 성 준 (인)

위 원 조선대학교 교수 홍 준 희 (인)

위 원 조선대학교 교수 유 진 철 (인)

2011년 11월

조선대학교 대학원

Contents

List of tables
List of figures

ABSTRACT

Ⅰ. 서론 ····· 1
Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 7
1. 시약 ····· 7
2. 지질분해효소를 생산하는 토양방선균의 분리 및 동정 ····· 7
1) 지질분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리 ····· 7
3. 지질분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS326 균주의 최적 배양 조건 ····· 8
4. 지질분해효소의 정제 ····· 8
1) 균주배양 및 지질분해효소 정제용 효소시액 준비 ····· 8
2) 황산암모늄(Ammonium sulfate) 분획 ····· 8
3) Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토그래피 ····· 9
4) 겔 전기영동 ····· 9
5) N-말단 아미노산 염기 서열 분석 ····· 9

5. 지질분해효소 활성 측정 ····· 9
1) 지질분해효소 활성 측정 방법 ····· 9
6. 단백질 정량 ····· 11
7. 지질분해효소의 특성 ····· 11
1) 최적 지질분해효소 활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 ····· 11
2) 지질분해효소 활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 ····· 11
3) 지질분해효소 활성도에 대한 금속이온과 조절인자에 대한 영향 ····· 12
4) 지질분해효소 활성도에 대한 유기용매와 계면활성제의 영향 ····· 12
5) 단백질의 겔 전기영동 ····· 13
6) 위치특이성(Positional specificity) ····· 13
7) 기질특이성(Substrate specificity) ····· 13
8) 반응속도론(Kinetics) ····· 14
9) 바이오디젤 생산과 적용 연구 ····· 14
Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 15
1. *Streptomyces* sp. CS326 균주의 동정 ····· 15
1) 분자생물학적 특성 분석 ····· 15
2. 지질분해효소의 생산성 향상을 위한 배지 성분의 최적화 ····· 15
1) 탄소원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향 ····· 15

2) 질소원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향 ····· 16
3) 금속원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향 ····· 16
3. 지질분해효소의 생산 ····· 16
4. *Streptomyces* sp. CS326이 생산하는 지질분해효소의 분리 및 정제 ····· 16
5. 겔 전기영동 ····· 17
6. 지질분해효소의 활성도와 안정성에 대한 pH와 온도의 영향 ····· 17
7. 지질분해효소의 활성도에 대한 계면활성제의 영향 ····· 18
8. 지질분해효소의 활성도에 대한 금속이온과 조절인자의 영향 ····· 18
9. 지질분해효소의 활성도와 안정성에 대한 유기용매의 영향 ····· 18
10. 지질분해효소의 기질 특이성 ····· 19
11. 지질분해효소의 반응속도론 ····· 19
12. N-말단 아미노산 서열 ····· 19
13. 지질분해효소를 이용한 바이오디젤 생산 및 연구 ····· 19
Ⅳ. 결론 ····· 21
Ⅴ. 참고문헌 ····· 37

List of tables

Table 1. Updated classification of bacterial lipolytic enzymes·····5
Table 2. Summary of *Streptomyces* sp. CS326 purification····· 30
Table 3. Effect of detergents in *Streptomyces* sp. CS326 activity····· 31
Table 4. Effect of metal ions in the activity and modulators in the stability of *Streptomyces* sp. CS326·····32
Table 5. Organic solvent stability of *Streptomyces* sp. CS326·····33
Table 6. Effect of various chain length nitrophenyl substrates in *Streptomyces* sp. CS326 activity····· 34
Table 7. Comparison of N-terminal sequence of *Streptomyces* sp. CS326 with related hydrolases including a *Streptomyces* lipase····· 35

List of figures

Fig. 1. Bio-diesel production from various oils in the two-step chemical reaction ····· 2
Fig. 2. Synthetic method of biodiesel from triglyceride ····· 6
Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of *p*NPP releasing *p*NP ····· 10
Fig. 4. Photograph showing the colony morphology of *Streptomyces* sp. CS326 ····· 23
Fig. 5. Phylogenetic tree of strain CS326 with other closely related strains ····· 24
Fig. 6. Profile of Streptomyces sp. CS326 eluted from Sepharose CL-6B and SDS-PAGE of LP28 ····· 25
Fig. 7. Effects of pH and temperature ····· 26
Fig. 8. Determination of positional specificity of Streptomyces sp. CS326 by triolein hydrolysis ····· 27
Fig. 9. Streptomyces sp. CS326 catalyzed biodiesel production using methanol and soybean oil ····· 28
Fig. 10. LP326 Kinetics Lineweaver-Burk Plot ····· 29

ABSTRACT

Purification and Biochemical Characteristics of Lipase from *Streptomyces* sp. CS326

Park Da Jeong
Adviser : Prof. Yoo Jin-Cheol Ph.D.
Department of Pharmacy
Graduate School of Chosun University

In an attempt to isolate a biocatalyst able to catalyze biodiesel production from microbial source, *Streptomyces* sp. CS326 was screened from hundreds of soil isolates collected from various parts of Korea. In 16S rRNA sequence analysis, the strain showed high degree of similarity with *Streptomyces xanthocidicus*(99.79%), therefore it is classified as *Streptomyces* sp. CS326. An extracellular lipase produced by the strain(LP326) was purified using a single step gel permeation chromatography on Sepharose CL-6B. Molecular weight of LP326 was estimated to be 17kDa by SDS-PAGE. The activity was optimum at 40°C and pH7.0, and was stable at pH5.0-8.0 and below 50°C. It preferred *p*-nitrophenyl palmitate(C16), along chain substrate; and K_m and V_{max} for the substrate were determined to be 0.24mM and 4.6mM/min mg, respectively. First N-terminal amino acid sequences were APDLVALQSE, which are different from so far reported lipases. LP326 catalyzed biodiesel

production using methanol and various oils; therefore, the enzyme can be applicable in the field of bio-fuel.

Ⅰ. 서 론

Lipase[glycerol-ester-hydrolase[E.C.3.1.1.3]는 carboxylic ester hydrolase[EC 3.1.1]에 속하며 중성지질의 ester 결합을 가수분해하여 지방산과 부분적인 glycerides로 가수분해하며 다양한 기질 특이성을 가진다[1,2]. lipase는 산업적으로 이용하려는 연구가 끊임없이 확대되고 있고 유전공학 기술로 손쉽게 대량으로 얻을 수 있어 세제산업, 식물성 기름을 연료로 전환시키기 위한 생촉매제 산업, 지방과 기름, 산업세제와 음식의 가수분해, 펩티드합성, 제약 산업 그리고 기타 생명공학의 다양한 산업적 측면에서 지질분해효소는 널리 이용되고 있다[3,4,5,8].

지질분해효소는 글리세롤과 유리지방산은 중성지방 안에서 가수분해를 일으키는 효소들 중에서 가장 중요하고, 동물, 식물, 곰팡이 그리고 박테리아에서 보편적으로 존재하는 촉매작용을 하는 효소들은 에스터화 반응, 에스테르결합전이반응, 아미노분해, 산 가수분해, 그리고 산 가수분해 반응뿐만 아니라 중성지방의 가수분해도 촉진시킨다[6].

바이오디젤(bio-diesel)은 동, 식물성 기름이 메탄올과 에스테르 반응 후 생성되는 메틸에스테르(methyl ester)로 기존의 석유계 경유와 성질이 매우 유사하여 연소 시 공해가 거의 발생하지 않아 석유계 경유와 섞어서 사용할 경우 대기오염의 주범인 자동차 공해를 획기적으로 줄일 수 있는 선진국 형 청정 대체 에너지로 최근 그 수요와 필요성이 대폭 증대되고 있다. 각종 오일에서 바이오디젤이 생산되는 과정은 2단계의 화학 반응이 요구되는데 먼저 지질의 가수분해반응에 의하여 지방산과 글리세롤이 생산되고, 뒤이어 지방산과 알콜(메탄올)이 에스테르화하여 메틸에스테르화합물 즉 바이오디젤을 생산한다.(Fig. 1)

현재 바이오디젤 생산은 강염기 등을 이용하는 화학적 촉매방법을 주로 사용하고 있으나 복잡한 반응공정과 부산물발생 및 다량의 폐수발생으로 2차 환경오염을 유발하는 단점이 있다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여 미생물 유래 생촉매인 효소를 이용하여 바이오 디젤을 생산하기 위한 노력이 활발하게 진행되고 있다. 미생물을 이용한 효소 이용 산업의 역사는 각종 미생물로부터 각종 유용효소를 분리, 활용함으로써 산업용, 의약용, 분석용의 효소가 꾸준히 개발되어 왔으며, 생명공학의 산업적 기반을 이루는 기술 분야의 하나로 성장해 왔다. 현재까지 알려진 효소의 종류는 약 2000종을 상회하지만 산업적 측면에서 볼 때에는 약 20여종의 효소가 경제적으로 그 중요성을 인정받고 있다.

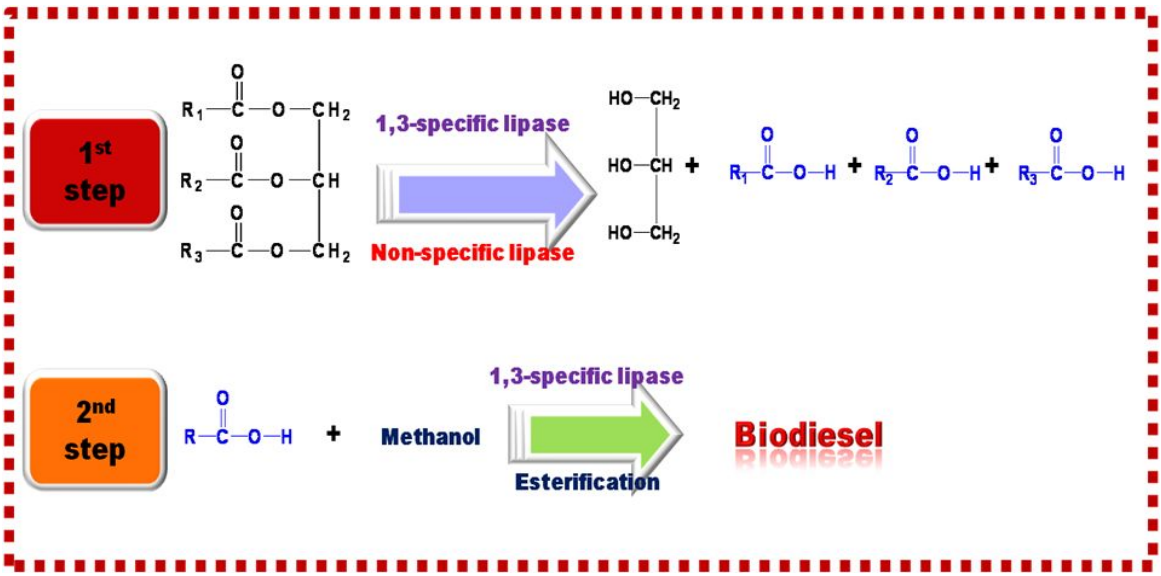

Fig. 1. Bio-diesel production from various oils in the two-step chemical reaction

다양한 미생물에서 여러 특성을 지닌 지질분해효소들이 발견되고 있고 일부 지질분해효소는 지질의 가수분해반응 뿐만 아니라 지방산과 메탄올 에스터화 반응을 동시에 촉매 하여 미래의 친환경 연료로 관심이 증가되고 있는 바이오디젤을 생산 할 수 있다. 1996년 Nelson 등은 유기용매 하에서 지방분해효소를 통해 바이오디젤 생산이 가능함을 최초로 보고한 바가 있고 일본에서는 고정화 지질분해효소로 바이오디젤 고효율 생산이 가능함을 보여주었다. 이러한 연구들은 바이오디젤 생산에 유기용매를 사용하지 않아 환경오염을 줄일 수 있다는 점에서 친환경적 생산 공정의 개발 가능성을 보여주어 현재의 화학공정 중심의 바이오디젤 생산을 미래 친환경 지향적인 생물공정으로 대체가능함을 보여주었다. 현재 lipase를 생산하는 대표적인 미생물에는 *Pseudomonas sp. Burkholderia sp. Bacillus sp. Geobacillus sp. Staphylococcus sp.* 균주 중에서 발견되고 있으며 *Vibrio sp, Serratia sp, Chromobacterium sp, Proteus sp, Streptomyces sp* 균주 등에서도 일부 발견되고 있다.(Table. 1)

산업적으로 활용이 가능한 지질분해효소는 생촉매 공정에 의한 바이오디젤 생산이 가능하다. 지질분해효소는 지질을 가수분해하여 지방산(fatty acid)와 글리세롤(glycerol)을 만들며, 동물의 췌장, 곰팡이와 효모, 세균에서 생산되고 오일을 가수분해하여 비누를 만드는 데 사용하기도 하고 폐수 속에 존재하는 지질-지방 화합물을 가수분해 시키는 데에도 사용할 수 있다. 이러한 지질분해효소는 지방산과 메탄 에스터화 반응을 동시에 촉매 하여 미래 친환경 연료인 바이오 디젤을 생산할 수 있다. 폐유와 동물지방, 알콜과 다양한 기름들로부터 에스테르 결합 전이 반응이 비수용성 매체 안에서 하나의 지질분해효소를 이용하여 지방산 에스테르, 바이오디젤이 생산된다.(Fig. 2) 짧은 반응시간 동안 자유지방산들이 높은 수율을 가진 중성지방, monoglyceride, diglyceride를 이용하여 바이오디젤 생산에 잠재력 있는 지질분해효소를 사용하였다. 알콜 그리고 온도, 생성물 억제 등등에 높은 저항성을 보인다[9]. 지질분해효소들은 그들이 내보이는 탁월한 화학적 선택성, 입체선택성 때문에 매우 유용하고 그들은 매우 가치 있는 큰 규모의 다양한 미생물과 그리고 많은 지질분해효소의 구조물결정체를 생산하는 이미 공학기술 전략을 실행하여 해결하였다[10].

본 연구에서는 전남 해안 지역 토양에서 분리한 700 여종의 토양미생물 중 강한 지질분해효소를 생산하는 미생물을 조사하여 *Streptomyces* sp. CS326 균주가 생산하는 지질분해효소가 지방분해능이 우수함을 확인 하였다[11]. *Streptomyces* sp. CS326 균주에서 분비되어지는 지질분해효소는 올리브오일, 콩 그리고 메탄올로부터 바이오디젤을 촉진 변환시켰다. 이번 연구는 *Streptomyces*로부터 바이오디젤 생산 및 이용에 관

한 문헌들이 드물기 때문에 의미가 있다.

Streptomyces sp. CS326 균주의 동정과 새로운 지질분해효소의 생산 그리고 정제, 특징 그리고 바이오디젤 생산의 이용법을 제시하였다. 방선균 유래 지질분해효소에 관한 보고 및 연구는 그 사례가 적어 *Streptomyces* sp. CS326이 생산하는 지질분해효소에 관한 연구는 학문적 가치가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 토양 방선균인 *Streptomyces* sp. CS326 균주를 분리 동정하였으며 균주의 최적 배양조건을 조사 하였고 최적 배지 하에 얻은 배양액에서 황산암모늄 침전, 아미콘 농축, 컬럼 크로마토그래피 등의 기법을 이용하여 지질분해 효소를 순수하게 정제하였다. 또한 정제한 지질분해 효소능의 최적온도, pH, 온도, pH 안정성, 금속이온, 계면 활성제, 유기용매에 대한 영향을 조사하였고 기질특이성 및 바이오디젤 전환능을 확인하여 산업적으로 이용이 가능한지 조사하였다.

Table 1. Updated classification of bacterial lipolytic enzymes

Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession No.	Similarity (%)	
			Family	Subfamily
1	*Pseudomona aeruginose*(LipA)*	D50587	100	
	Pseudomona fluorescens C9	AF031226	95	
	Vibrio cholerae	X16945	57	
	Pseudomona aeruginosa(LipC)	U75975	51	
	Acinetobacter calcoaceticus	X80800	43	
	Pseudomona fragi	X14033	40	
	Pseudomona wisconsinensis	U88907	39	
	Proteus vulgaris	U33845	38	
2	*Burkholderia glumae**	X70354	35	100
	*Chromobacterium viscosum**	Q05489	35	100
	*Burkholeria cepacia**	M58494	33	78
	Pseudomona luteola	AF050153	33	77
3	*Pseudomona fluorescens* SIKW1	D11455	14	100
	Serratia marcescens	D13253	15	51
4	*Bacillus subtilis*(LipA)*	M74010	16	100
	Bacillus pumilus	A34992	13	80
	Bacillus licheniformis	U35855	13	80
	Bacillus subtilis (LipB)	C69652	17	74
5	*Geobacillus stearothermophilus* L1	U78785	15	100
	Geobacillus stearothermophilus P1	AF237623	15	94
	Geobacillus thermocatenulatus	X95309	14	94
	Geobacillus thermoleovorans	AF134840	14	92
6	*Staphylococcus aureus*	M12715	14	100
	Staphylococcus haemolyticus	AF096928	15	45
	Staphylococcus epidermidis	AF090142	13	44
	Staphylococcus hyicus	X02844	15	36
	Staphylococcus xylosus	AF208229	14	36
	Staphylococcus warneri	AF208033	12	36
7	*Propionibacterium acnes*	X99255	14	100
	Streptomyces cinnamoneus	U80063	14	50

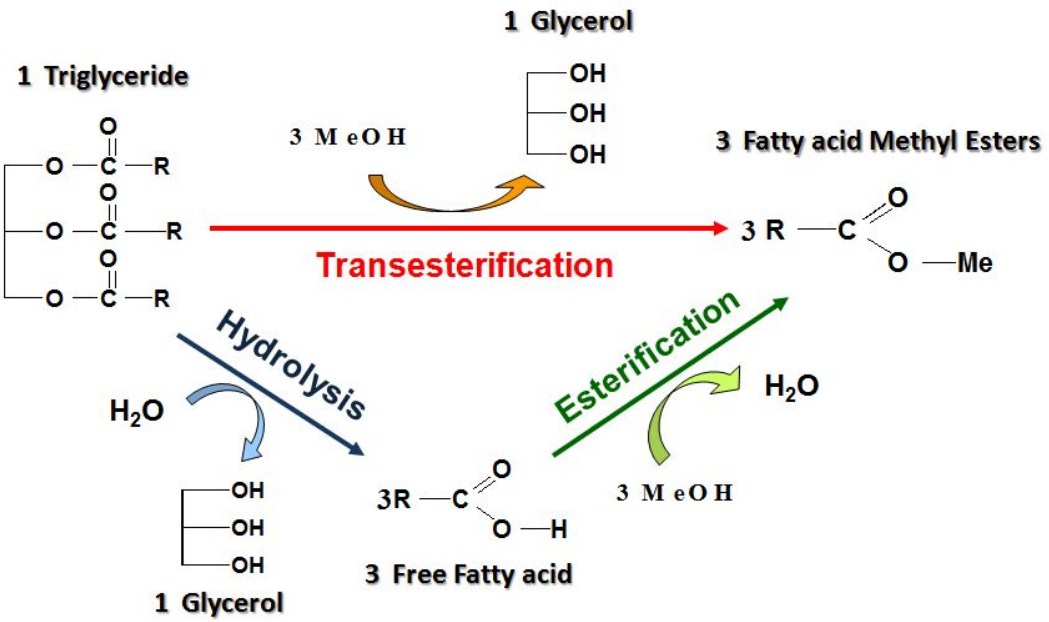

Fig. 2. Synthetic method of biodiesel from triglyceride

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약

방선균의 배양을 위한 배지는 Yakuri pure chemical사의 제품을 사용하였다. EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride) 등은 Sigma Aldrich(St. Louis. MO. USA)사, 기질 특이성 p-Nitrophenyl plamitate (pNpp)는 Sigma Aldrich, 아세토나이트릴(Acetonitrile)은 Merck사의 제품을 사용하였다. 효소 정제를 위한 Sepharose CL-6B는 Pharmacia (Uppsala, Sweden)의 제품을 사용하였으며 바이오디젤 생산 시험에 사용된 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) Silica gel plate는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 지질분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리 및 동정

1) 지질분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리

토양 미생물로부터 바이오디젤 생산에 적용 가능한 지질분해효소를 얻기 위해 실험실에서 보유한 약 700 여종의 토양 미생물 배양액을 이용하여 지질분해효소 활성을 시험하였다. 배양액 내에 지질분해효소 활성이 있는 방선균 중 CS326을 선별해 OSYM (2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Dried yeast, 1% Mannitol, pH 8.3) 평판배지에서 도말하여 28℃에서 1 ~ 7일간 배양하였다. OSYM 평판배지에 균주 집락을 액체 OSYM배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 배양하며 배양액내에 생성된 효소의 지질분해효소 활성을 관찰하였다. 균주의 장기 보관은 포자를 20% 글라이세롤(Glycerol)에 보관용기에 취해 -80℃에 보관하고 6개월마다 계대 배양하여 보존하였다.

3. 지질분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS326의 최적 배양 조건

OSYM 평판 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50㎖의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250㎖ 플라스크에 접종한 후 28℃, 180rpm에서 3일간 전 진탕 배양하였다. 탄소원, 질소원 그리고 금속원 등의 영양원에 따른 효소 생산성을 관찰하기 위해 28℃, 180rpm에서 7일간 배양하여 가장 높은 효소 생산성을 나타내는 최고 활성을 보이는 배지를 *Streptomyces* sp. CS326 최적 배양 배지로 선정하였다.

4. 지질분해효소의 정제

1) 균주배양 및 지질분해효소 정제용 효소시액 준비

OSYM 평판 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50㎖의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250㎖ 배플 플라스크(baffled flask)에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 전 진탕 배양하였다. 이 배양액을 지질분해효소의 생산을 위해 최적화한 지질분해효소용 배양배지(1% Glucose, 1% Soybean meal, 0.01% Na_2HPO_4)에 3% 수준으로 접종하여 28℃, 180rpm에서 7일간 배양하였다. 이 배양액은 6,000rpm에서 50분간 원심분리 후 상등액을 정제용 시료로 이용하였다.

2) 황산암모늄(Ammonium sulfate) 분획

원심분리 후 취한 배양액에 0~25%, 25~50%, 50~90%로 분획을 나누어 황산암모늄 (Ammonium sulfate)을 가하여 4℃에서 1시간 정도 교반시킨 후, 원심분리(×6,000rpm, 1시간)하여 침전물을 최소량의 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액에 녹여 회수하였다.

3) Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토그래피

준비한 조효소액은 Sepharose CL-6B (2.3 × 109cm) 컬럼을 이용하여 분리정제를 하였다. 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 10㎖/h의 속도로 흘려주었으며 각 분획을 지질분해효소 활성 측정법을 수행하여 활성을 확인 후 농축하였다.

4) 겔 전기영동

SDS-PAGE는 5% Stacking gel과 9% Polyacrylamide gel을 사용하였다. 활성 분획과 5X Sample 완충용액(60mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4mM β-Mercaptomethanol, 0.1% Bromophenol blue)와 혼합하여 100℃에서 5분간 중탕하여 전기영동을 수행하였고, Molecular weight maker (10 ~ 170 kDa)는 Fermentas (Glen Burine, MD, U.S.A) 회사의 제품을 사용하여 단백질의 분자량을 결정하였다. gel은 0.1%(w/v) coomassie brilliant blue R-250로 1시간동안 염색한 뒤 Methanol : glacial acetic acid : H_2O(1 : 1 : 8) 비율로 섞은 용액에 overnight하여 탈색시켜 분자량을 분석하였다.

5) N-말단 아미노산 염기 서열 분석

Procise model 492 단백질 시퀀서(sequencer)를 사용하여 Edman 분해를 이용해 정제된 효소의 N-말단 아미노산 염기 서열을 결정하였다(applied Biosystems, CA, USA).

5. 지질분해효소 활성 측정

1) 지질분해효소 활성 측정 방법

지질분해효소 활성 측정에 사용한 시약 A는 0.5%(v/v) Triton X -100과 0.15M 염화나트륨(NaCl)이 포함된 100mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 사용하였으며, 기질

(Substrate)은 10mM pNpp를 아세토나이트릴(Acetonitrile)에 녹여 준비하였다. 30℃ 항온조에서 중탕한 시약 A 350㎕와 효소 25㎕, 기질 25㎕을 넣고 즉시 섞어준 후 40℃ 항온조에서 30분간 반응하였다. 반응 후 아이스에서 10분간 방치한 뒤 원심분리(10,000rpm, 10분) 하여 405nm 분광광도계(UV microplate reader;Thermo, Multiskan EX)에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성(Unit)은 1분 동안 1㎛ol의 생성물을 생성시키는 효소의 양으로 정하였다.(Fig. 3)

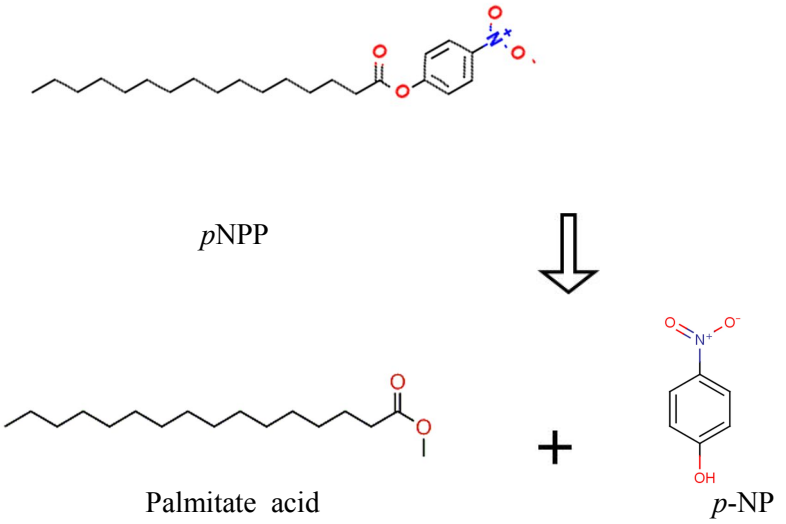

Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of *p*NPP releasing *p*NP

6. 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford의 방법을 이용하여 Bovine serum albumin(BSA) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 표준시료로 하여 측정하였으며 효소정제 과정 중 분획 내의 상대적 단백질 농도는 분광광도계(Spectrophotometer)사용하여 595nm 흡광도로 측정하였다.

7. 지질분해효소의 특성

1) 최적 지질분해효소 활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

최적 활성 온도는 4 ~ 70℃의 범위에서 10℃ 간격으로 효소 반응을 수행하여 효소 활성을 측정하였다. 효소의 온도 안정성을 알아보기 위해 각각의 온도(4 ~ 80℃)에서 정제된 효소를 2시간 동안 반응 시킨 후, 30분마다 시료를 채취하였다. 채취한 시료용액에 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 넣고 20분 동안 실온에 방치한 후, 동일 완충용액으로 총량을 맞춘 뒤 효소 활성을 측정함으로써 효소의 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

2) 지질분해효소 활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

정제된 효소활성에 대한 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3 ~ 11 범위 안에서 pH 1.0 간격으로 1M pH 완충액 (최종농도 100mM)을 넣고 최적온도에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 pH 3 ~ 11 범위 안에서 pH 1.0 간격으로 각각의 1M pH 완충액(최종농도 100mM)을 효소용액과 넣어 4℃에서 24시간동안 방치한 뒤, 최적 pH 완충액을 넣고 최적온도에서 30분간 반응시켜 효소 활성을 측정함으로써 pH 안정성을 측정하였다. 1M pH 완충액은 다음과 같이 pH 5 ~ 7은 Citrate-Na_2HPO_4 완충액, pH 7.5 ~ 9.5는 Tris-HCl 완충액, pH 9.6 ~ 11은 탄산수소나트륨(Sodium-Bicarbonate) 완충액을 사용하였다.

3) 지질분해효소 활성도에 대한 금속이온과 조절인자에 대한 영향

효소 활성에 금속이온들의 영향을 조사하기 위해 효소 용액에 금속이온 Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, K^{+}, Na^{+}을 최종농도가 2mM 되도록 첨가하여 최적온도에서 30분 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 또한 금속산화방지제(Metal chelator)가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Ethylenediamine tetra-acetic acid(EDTA), Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- etra-acetic acid(EGTA), 환원제로는 Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), ß-Mercaptoethanol 그리고 산화제로는 과붕산나트륨(Sodium perborate)을 최종농도 2mM이 되게 첨가하여 상온에서 반응 하였고, 30분 후 남아있는 효소 활성을 측정하였다.

4) 지질분해효소 활성도에 대한 유기용매와 계면활성제의 영향

효소 활성에 유기용매의 영향을 조사하기 위해 정제된 효소의 최종농도 25%가 되게 데케인(Decane), 옥테인(Octane), 헵테인(Heptane), 헥산(Hexane), 자일렌(Xylene), 톨루엔(Toluene), 벤젠(Benzene), 다이클로로메테인(Dichloromethane), 아세트산 에틸(Ethyl acetate), 이소프로판올(Iso-propanol), 아세톤(Acetone), 에탄올(Ethanol), 아세토나이트릴(Acetonitrile), 메탄올(Methanol), DMSO(Dimethy sulfoxide)를 섞어준 후 상온에서 24시간 반응 하였다. 그 후 최적온도에서 30분간 반응시켜 남아있는 효소활성을 측정하였다. 바이오디젤 생산은 메탄올에서 높은 안정성을 가진 효소를 이용할 수 있기 때문에 같은 방법으로 다양한 메탄올(0 ~ 40%) 농도에서 효소가 메탄올에서 어느 농도까지 안정한지 실험하였다.

효소 활성에 미치는 계면활성제의 영향을 조사하기 위해 최종농도 0.5%가 되게 10% Triton X-100, 10% Polyoxyethylene, 10% Tween 20, 10% SDS, 10% Deoxy cholic acid, 10mM EGTA, 10mM EDTA, 10mM PMSF를 첨가한 후 최적온도에서 30분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다.

5) 단백질의 겔 전기영동

컬럼을 통해 정제한 단백질은 9% SDS-PAGE를 이용하여 밴드를 확인하였다. 120V, 50mA에서 전기영동 후 겔을 0.1%(w/v) coomassie brilliant blue R-250에 1시간 염색한 후, 메탄올 : 아세트산 : 물(Methanol : Acetic acid : H_2O = 1 : 1 : 8) 비율로 섞은 용액을 이용해 탈색하여 밴드를 확인하였다. 단백질 Size maker (Fermentas co.)와 비교하여 분자량을 결정하였다.

6) 위치 특이성 (Positional specificity)

Triolein 으로부터 효소 생성물을 분석하여 그 효소의 위치특이성을 평가하였다[11]. 20mM Triolein 안에 50mM Tris/HCl (pH 8.0) 완충액을 넣고 효소(10 U)를 섞은 후 상온에서 200rpm으로 24시간 동안 혼합물 2ml을 반응시켰다. 반응 후 남은 생성물 안에 0.2ml Chloroform을 넣어 TLC 분석용 시료를 준비하였다. 분석용 시료는 TLC plate에 점적한 후 클로로폼 : 아세톤 : 아세트산 (Chloroform : Acetone : Acetic acid = 96 : 4 : 1) 전개용매를 전개시켰다. 전개 후 TLC plate는 건조 후 아이오딘(Iodine)과 반응 후 갈변하는 생성물의 위치를 확인하였다.

7) 기질특이성(Substrate specificity)

C_4(PNP_B : 4-Nitrophenyl butyrate), C_{10}(PNP_D : 4-Nitrophenyl decanoate), C_{14}(PNP_M : 4-Nitropheyl myristate), C_{16}(PNP_P : 4-Nitrophenyl palmitate)의 기질들을 아세토나이트릴(Acetonitrile)에 녹여 50mM의 농도로 만들어준다. 효소샘플 10㎕와 각각의 기질(50mM) 10㎕와 100mM Tris-HCl (pH 7.0)에 0.15M NaCl와 0.5% Triton X-100 가 포함된 완충액 350㎕을 혼합하여 40℃ 항온조에 넣어 30분간 반응 후 원심분리기에 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리 후 405nm에서 지질분해효소의 기질특이성을 확인하였다.

8) 반응속도론(Kinetics)

반응속도론 실험은 기질특이성에서 LP326이 가장 높은 활성을 보인 기질을 선택하여 실험한다. 선택한 기질을 2mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM, 80mM 160mM의 기질 농도별로 효소 활성을 측정한다. 효소(0.35㎍) 25㎕ + 농도별 기질 25㎕ + 100mM Tris-HCl (pH 7.0)에 0.15M NaCl과 0.5% Trition X-100이 포함된 완충액 350㎕을 혼합한 후 40℃의 항온조에 30분간 반응 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리 후 405nm에서 효소 활성을 측정한다. 효소의 활성은 최대속도(V_{max})와 Michaelis 상수(Km)에 의하여 특정 지어 지는데, V_{max}는 반응 최적조건 하에서 효소가 나타내는 최고의 반응 속도를 말하며, Km은 Michaelis 상수로서 효소의 기질에 대한 친화도와 반비례한다. Michelis-Menten식에 따라 V_{max}와 Km을 구할 수 있다. 그러나 Michelis-Menten 곡선을 이용하는 경우, 정확한 V_{max}와 Km값을 구하는 것이 어렵다. 따라서 직선 plot의 형식으로 바꾼 Hanes plot과 Lineweaver Burk plot을 이용하여 결정하였다.

9) 바이오디젤 생산과 적용 연구

바이오디젤 생산은 문헌의 방법을 변형시켜 수행하였다[11]. 20㎖ 유리병에 대두유 7.89㎖과 메탄올(Methanol) 0.99㎖, 지질분해효소(300U)를 함께 넣어 섞어 준 다음 96시간 동안 상온에서(25±2℃) 200rpm으로 교반하였다. 그리고 정해진 시간 간격마다 시료를 채취하였다. 회수한 시료 혼합물(100㎕)과 동일한 용량의 헥산(Hexane)을 넣어 혼합하였다. 혼합액을 10,000rpm으로 원심분리 한 뒤에, 분리된 상층을 TLC plate에 표준 지방산 메틸 에스테르(FAME, purity 99.9%)와 함께 점적 후 전개용매로 전개하여 확인하였다. plate 전개용매는 헥산 : 아세트산에틸 : 아세트산 (Hexane : Ethyl acetate : Acetic acid = 94 : 5 : 1)을 이용하였고 전개 후 건조 시킨 뒤 과망간산칼륨 용액(0.5%, w/v)에 plate를 노출하여 용액과 반응하여 발색한 바이오디젤 생성을 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *Streptomyces* sp. CS326 균주의 동정

1) 분자생물학적 특성 분석

본 실험실에서 보유한 700 여종의 토양 방선균 중 지질분해효소를 생산하는 균주를 선별하였으며 이 균주를 *Streptomyces* sp. CS326라고 명명하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과, *Streptomyces* sp. CS326은 *Streptomyces xanthocidicus*와 99.79% 일치하였으며 *Streptomyces* sp. CS326의 16S rRNA 의 염기서열에 의한 계통발생학적 위치는 phylogenetic tree로 나타내었다.(Fig. 5)

2. 지질분해효소의 생산성 향상을 위한 배지 성분의 최적화

지질분해효소 생산의 최적화를 위한 실험결과는 다른 배지에 비해 GSNA 배지에서 월등한 효과를 나타내었다.

1) 탄소원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향

효소의 생산을 위한 탄소원에 따른 활성을 조사하기 위하여 질소원인 Yeast extract 1%로 고정시킨 후 1%의 각 종류별 탄소원(Fructose, Sucrose, Lactose, Maltose, Mannitol, Starch, Glucose)을 첨가하여 28℃, 180rpm 96시간 배양하였다. 그 결과 지질분해효소 활성은 글루코스(Glucose)를 1%를 첨가 하였을 때 지질분해 활성이 가장 우수 하였다.

2) 질소원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향

효소의 생산을 위한 질소원에 따른 활성을 조사하기 위하여 탄소원 중 활성이 가장 뛰어난 글루코스(Glucose) 1%를 고정시킨 후 각 종류별 질소원(Yeast extract, Peptone, Tryptone, Beef extract, Oat meal, Soybean meal, Malt extract)을 1% 첨가하여 28℃, 180rpm, 96시간 배양하였다. 그 결과 지질분해효소 활성은 Soybean meal 1%를 첨가하였을 때 지질분해활성이 가장 우수하였다.

3) 금속원이 지질분해효소의 생산에 미치는 영향

효소의 생산을 위한 금속원에 따른 활성을 조사하기 위하여 글루코스(Glucose) 1%와 Soybean meal 1%를 고정시킨 후 0.01%의 각 종류별 금속원($MgCl_2$, Na_2HPO_4, $CaCl_2$, KCl, NaCl)을 첨가하여 28℃, 180rpm 96시간 배양하였다. 그 결과 지질분해효소 활성은 Na_2HPO_4를 0.01% 첨가하였을 때 지질분해활성이 가장 우수하였다.

3. 지질분해효소의 생산

Streptomyces sp. CS326 균주를 GSNA (1% Glucose, 1% Soybean meal, 0.01% Na_2HPO_4)배지 250㎖이 들어있는 1L 플라스크에 4%의 종배양액을 접종하고 28℃, 180rpm에서 168시간 동안 배양하면서 배양시간에 따른 지질분해효소의 활성, pH, 건조 중량의 변화를 조사하였다. 지질분해효소의 생성은 배양 1일부터 7일까지 pH가 증가할수록 지질분해활성도 증가하였다.

4. *Streptomyces* sp. CS326이 생산하는 지질분해효소의 분리 및 정제

Streptomyces sp. CS326을 GSNA 배지에서 168시간 동안 배양 후 지질분해효소의 배양액을 황산암모늄(Ammonium sulfate)으로 단백질을 침전시켰다. 조효소액을 가지고 황산암모늄(Ammonium sulfate) 농도 별로 분획을 나누어서 농축하고, 탈염시켰다.

황산암모늄 침전으로 나눈 분획 중 가장 높은 효소 활성을 나타낸 0-25% 황산암모늄(Ammonium sulfate) 농축액을 컬럼 크로마토 그래피를 수행하기 위한 시료로 선정하였다. 단백질 농축 시료는 Sepharose CL-6B 컬럼을 수행하여 lipase를 분리정제 하였다. Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토 그래피 수행 후 얻은 활성 분획은 Fig. 6a에 나타내었다. Sepharose CL-6B 컬럼을 통해 얻은 최대 활성 분획을 아미콘으로 농축하여 9%의 SDS-PAGE를 수행하였으며 그 결과 이 효소의 분자량이 17kDa임을 확인하였고 LP326으로 명명하였다.(Fig. 6b)

5. 겔 전기영동

SDS-PAGE는 5% Stacking gel과 9% Polyacrylamide gel을 사용하였다. 활성 분획과 5XSample 완충용액(60mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4mM β-Mercaptomethanol, 0.1% Bromophenol blue)와 혼합하여 100℃에서 5분간 중탕하여 전기영동을 수행하였고, Molecular weight maker (10 ~ 170 kDa)는 Fermentas (Glen Burine, MD, U.S.A) 회사의 제품을 사용하여 단백질의 분자량을 결정하였다. gel은 0.1%(w/v) coomassie brilliant blue R-250로 1시간동안 염색한 뒤 Methanol : glacial acetic acid : H_2O(1 : 1 : 8) 비율로 섞은 용액에 overnight하여 탈색시켜 분자량을 분석하였다. Sepharose CL-6B column chromatography를 이용한 정제 과정에서 얻어진 순수한 지질분해효소를 9% SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 분자량이 약 17 kDa인 부분에서 확인되었다.(Fig. 6b)

6. 지질분해효소의 효소활성도와 안정성에 대한 pH와 온도의 영향

온도와 pH에 대한 지질분해효소 LP326활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과 효소반응의 최적 온도는 40℃로 나타났으며 pH는 7.0이었다.(Fig. 7a, 7c) pH 6.0 - 8.0, 50℃까지 안정하였으며 그 이상의 온도에서는 활성이 저하되었다.(Fig. 7b, 7d) 대부분 활성이 중성 pH 범위에 안정하였으며 pH 4에서도 활성이 유지됨을 확인하였다. 온도 안정성에서는 초기 활성은 60℃에서 60분 동안 반응 후에도 없어지지 않고 60% 정도 남아있었다.(Fig. 7d) 이것을 통해 *Streptomyces* sp. CS326은 중성에서 활성이 좋은 효소임을 알 수 있었다.

7. 지질분해효소의 활성도에 대한 계면활성제의 영향

효소에 영향을 미치는 계면활성제인 Deoxy Chloride acid, CHAPS, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, N-lauryl sacoicine, SDS를 0.5%로 하여 LP326에 대한 계면활성제의 영향을 검토하였다. 실험결과 Table 3.에 나타낸 바와 같이 LP326은 Triton X-100에서 최대 활성을 나타내었다. SDS 첨가 시 활성이 저해되었으며, Deoxy Chloride acid에서는 활성이 나타나지 않았다. Triton X-100에서 최대 지질분해활성을 나타내어 Triton X-100의 농도에 따른 지질분해효소의 활성 변화를 조사하였다. Triton X-100을 농도 0.125%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%에서 실험 하였을 때 0.25%에서 최대 활성을 나타내었고 0.5%까지 활성이 유지되는 것을 확인하였다.

8. 지질분해효소의 활성도에 대한 금속이온과 조절인자의 영향

지질분해효소(LP326)에 대한 금속이온에 대한 영향을 조사하였다. 실험결과는 Table 3. 에 나타내었다. K^{+}를 제외한 모든 금속이온이 효소활성을 저해하였으며 Mg^{2+}, Fe^{2+}, Na^{+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}는 불활성화 되었다. 10%이하 Zn^{2+}과 Cu^{2+}에서는 활성이 억제되었다. 효소활성을 억제하는 Cu^{2+}, Zn^{2+}는 유기용매에 내성을 지니는 *Pseudomonas aeruginosa* LX1이 생산하는 지질분해효소 LX1와 매우 유사하였다[12]. 지질분해효소의 활성에 높은 영향을 미치는 다양한 금속이온들과 산화 방지제인 EDTA, EGTA는 약 50%활성을 억제하였으며 PMSF는 최종농도 2mM에서 약 32%활성을 억제하였다. 결과적으로 LP326은 Serine 계열에 속하는 것을 알 수 있었다.(Table 4.)

9. 지질분해효소의 활성도와 안정성에 대한 유기용매의 영향

Streptomyces sp. CS326의 다양한 유기용매에서의 안정성은 5.6-1.37 까지의 log P 값으로 Table 5.에서 나타내었다. 다양한 메탄올 농도에 대한 효소 안정성을 측정해

보았을 때 *Streptomyces* sp. CS326은 40% 메탄올의 농도까지 효소활성이 안정함을 보여주었다.

10. 지질분해효소의 기질 특이성

기질의 사슬길이(C4-C16)에 따른 지질분해효소 활성을 Table. 5에서 나타내었다. 지질분해효소는 긴 사슬의 지방산 기질인 p-Nitrophenyl palmitate (C16)와 반응이 최대의 활성을 보여주었고, 이 기질에 기질친화성을 보이는 것을 알 수 있었다.(Table 6.)

11. 지질분해효소의 반응 속도론

효소의 활성은 최대속도(V_{max})와 Michaelis 상수(Km)에 의하여 특정 지어지는데, 반응 최적조건 하에서 효소가 나타내는 최고의 반응 속도를 말하여, Km은 Michaelis 상수로소 효소의 기질에 대한 친화도와 반비례 한다. Michaelis-Menten 식에 따라 V_{max}와 Km을 구할 수 있었다. 그러나 Michaelis-Menten 곡선을 이용하는 경우, 정확한 V_{max}와 Km값을 구하는 것이 어렵다. 따라서 직선 plot 형식으로 바꾼 Lineweaver-Burk plot 방법을 이용하여 결정하였으며, LP326 지질분해효소의 V_{max}와 Km값은 각각 4.6mM/min/mg과 0.24mM로 산출되었다.(Fig. 10)

12. N-말단 아미노산 서열

N-말단 아미노산 서열 분석 결과 APDLVALQSF로 확인되었다. 이 아미노산 서열은 다른 가수분해 및 지질분해효소와 비교하였을 때 신규한 지질분해효소라고 사료된다.(Table 7.)

13. 지질분해효소를 이용한 바이오디젤 생산 및 연구

본 연구에서는 지질분해효소인 LP326을 이용하여 바이오디젤 생산 능력을 확인하였다. 바이오디젤 생산은 메탄올과 Soybean oil을 LP326 촉매 하에 반응을 진행하였

다. LP326은 메탄올과 올리브오일을 이용하여도 바이오디젤을 생산할 수 있었다.(Fig. 9) LP326을 촉매로 하고 콩 또는 올리브를 기질로 하여 바이오디젤을 생산 시 12시간부터 TLC plate 분석을 통해 생성물을 확인 할 수 있었으며[11] 48시간 만에 최대 생산량을 보였다.

Ⅳ. 결 론

본 연구에서, 지질분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS326 균주를 분리 정제하였다. 본 실험실에서 보유한 700 여종의 토양 방선균 중 지질분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS326균주를 선별하였다. *Streptomyces* sp. CS326를 최적 배지에서 배양하여 배양액으로부터 지질분해효소를 분리, 정제하고 그 특성을 조사하였다.

Streptomyces sp. CS326균주의 분자생물학적 특성(16S rRNA sequence) 유전자 염기서열 분석결과 *Streptomyces* sp. CS326은 *Streptomyces xanthocidicus*와 99.79% 일치하였으며 *Streptomyces* sp. CS326의 계통발생학적 위치는 phylogenetic tree figure으로 나타내었다. *Streptomyces* sp. CS326 균주는 최적배지 실험을 통해 선정된 GSNA (1% Glucose, 1% Soybean meal, 0.01% Na_2HPO_4) 배양배지에서 28℃, 180rpm에서 170시간 동안 배양하였으며 7일째에 최대 지질분해효소 활성을 나타내었다. 지질분해능이 최대 활성을 보인 시점에서 배양액을 회수하여 황산암모늄(Ammonium sulfate)침전, Sepharose CL-6B 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 지질분해효소를 순수하게 분리 정제하였으며 LP326이라 명명하였다. 위의 단계를 통해 최종 정제된 Lipase (LP326)은 SDS-PAGE를 통해 단일 단백질임을 확인하였으며, LP326은 분자량이 17kDa인 효소임을 확인하였다.

지금까지, 몇몇의 낮은 분자량의 지질분해 효소들은 *Bacillus thermoleovorans* CCR11[7], *Penicillin cyclopium* M1 균주가 생산하는 것으로 보고되었으며[12] *Streptomyces* sp. CS326가 생산하는 지질분해 효소로 낮은 분자량이었다. LP326의 최적 반응 온도는 40℃, pH는 7.0 이었다. LP326은 pH 6.0 - 8.0, 50℃까지 안정하였으며 그 이상의 온도에서는 활성이 저하되었다. LP326의 활성이 pH안정성 시험을 통해 좋은 내열성 효소임을 알 수 있었다. 최근 *Pesudomonas aeruginosa* 균주가 생산하는 분리된 지질분해효소 LX1 또한 LP326의 최적온도 40℃, 최적 pH 7.0으로 같았다. 또한 pH 4.5 ~ 12.0, 온도 안정성도 30 ~ 70℃ 범위에서 1시간 정도 안정하며 *Streptomyces* sp. CS326와 비슷한 특징이 나타남을 알 수 있었다. 계면활성제를 0.5%로 하여 LP326 활성에 대한 영향을 실험한 결과 Triton X-100을 첨가 시 지질분해 활성이 100%로 가장 높게 증가하였다. SDS 첨가 시 지질분해활성이 5%로 저해되었으며, Deoxy Chloride acid에서는 지질분해 활성이 완전히 손실되었다. Triton X-100을

농도 별 0.125%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%에서 실험 하였을 때 0.25%에서 최대 활성을 나타내었고 0.5%까지 활성이 유지되는 것을 확인되었다. LP326 활성에 대한 금속이온의 영향을 조사하였다. K^+를 제외한 모든 금속이온이 효소활성을 저해하였으며 Mg^{2+}, Fe^{2+}, Na^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}는 활성이 조금 저해되었다. Cu^{2+}과 Zn^{2+}는 활성을 3 ~40%로 억제되었다. *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 지질분해효소 LX1도 Cu^{2+}, Zn^{2+}에 억제적 영향을 받는 것으로 LP326과 매우 유사하였다[13]. 산화 방지제인 EDTA, EGTA는 거의 50%정도 활성을 억제하였으며 바이오디젤을 합성 시 메탄올이 사용되므로 다양한 농도의 메탄올이 LP326의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. LP326은 반응기 내에서 메탄올의 40% 농도까지 효소 활성이 안정함을 보여주었다. 메탄올에서 안정하다고 보고 되어지는 효소 중 상업적으로 사용 가능한 지질분해효소로 *Photobacterium lipolyticum*가 생산하는 효소와 비교할 수 있다[14]. 지금까지 보고되어진 *Pesudomonas cepacia, Candida rugosa* 그리고 *Candida antartica*가 생산하는 효소들은 10% 메탄올에 30분 동안 반응 후 무활성인 것으로 보고되어졌다. 메탄올에 내성이 있는 LP326은 다른 지질분해효소보다 바이오디젤 산업에 유용하게 사용가능하며 메탄올에 안정한 지질분해효소는 매우 잠재력 있는 효소로써 아주 중요하다. 이러한 관점에서 LP326은 바이오디젤 산업에 적합한 효소임을 확인 하였다. *Streptomyces* sp. CS326은 긴 사슬의 지방산 기질인 p-Nitrophenyl palmitate (C16)에서 기질특이성을 보이는 것이 확인 되었다. 위와 유사한 결과를 보이는 지질분해 효소에는 *Ralstonia* sp. CS274가 생산하는 LP274, *Pseudomonas aeruginosa* LX1[13]이 생산하는 LX1, *Streptomyces fradiae* var. k11[15]가 생산하는 lips221, *Pseudomonas aeruginosa* PseA가 생산하는 PseA 균주 그리고 다른 몇몇의 *Pseudomonas* 지질분해효소들이 보고되고 있다[16]. LP326의 반응속도 상수는 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 각각 Km=0.24mM, V_{max}=4.6mM/min/mg으로 계산되었다. *Pseudomonas aeruginosa* PseA가 생산하는 지질분해효소의 Km과 V_{max}는 70.4mM 그리고 2.24㎛ol/min mg이었다[16]. 따라서 V_{max}/Km 비를 비교시 LP326은 *Pseudomonas aeruginosa* PseA가 생산하는 지질분해효소 보다 더 효율적인 것으로 보여진다. LP326의 N-말단 아미노산 서열 분석 결과 APDLVALQSF로 이 서열은 다른 가수분해 및 지질분해효소와 비교하였을 때 신규한 지질분해효소라고 사료된다. NCBI에서 검색결과, LP326과 높은 동종관계를 보이는 가수분해 효소로는 *Aspergillus flavus* NRRL3357균주가 생산하는 에스테르 가수분해효소 *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*가 생산하는 지질분해효소가 있고, 그 서열 또한 지질분해효소 *Streptomyces rimosus*[17]와 동일한 서열 AxDxVAL이

보여진다. 그것을 제외하곤, 중요한 동종관계가 알려진 다른 지질분해효소들과 다르며, LP326이 새로운 유형의 지질분해효소로 사료되었다. 바이오디젤 생산을 위해 LP326 시료를 가지고 Methanol과 Soybean oil에 반응하여 생성물을 얻었다. 생성된 바이오디젤은 TLC 전개 후 발색시약을 이용하여 spot을 확인하였다. 바이오디젤 생산 실험결과 효소반응 12시간부터 48시간에 생성물의 양이 증가하는 것을 확인하였다. 최근에 보고된 RL74는 Methanol과 Soybean oil을 이용한 바이오디젤 생산 실험에서 바이오디젤 생산은 36시간일 때 최대였다. LP326은 RL74보다 느리지만 거의 비슷한 양상을 보였다[11]. 이 연구에서 효소 반응 후 얻은 바이오디젤은 TLC를 통하여 생성물을 확인하였기 때문에 정량분석이 정밀하지 못하므로 향후 GC(gas chromatography)를 이용한 정량적인 연구가 필요하다. 지질분해효소 촉매반응을 이용한 바이오디젤 생산에 있어서 화학적 바이오디젤 생산보다 유리하지만 문제점으로 높은 산업용 효소 생산단가와 환경오염 및 온화한 반응조건에 긴 반응 시간을 들 수 있다[9,18,19]. 기존의 지질분해효소들은 다양한 자원을 요구하고 5 ~ 72시간 동안 최대의 바이오디젤 생산율을 보여주었다[9]. 그러므로 LP326은 짧은 반응 시간 동안 높은 바이오디젤을 생산한다는 점에서 매우 의미가 있다. 산업화에 효소자원을 활용하기 위해 효소의 대량생산은 아주 중요하다. LP326은 한 단계의 겔 투과(gel permeation chromatography)를 통하여 정제를 하였고, 이는 효소의 산업화에 있어 상당히 유리하다. 추후 LP326효소를 고정화하여 바이오디젤 생산공정에 적용한다면 매우 효율적으로 바이오디젤을 생산할 수 있을 것으로 생각된다.

LP326은 가메탄올분해(Methanolysis) 반응이 짧은 단점이 있었다. 추후 바이오디젤 생성 반응의 pH와 온도조절, 교반속도조절, 메탄올 투여 단계 조정, 고정화 효소의 사용 등을 함으로써 최적의 바이오디젤 생산 증가에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

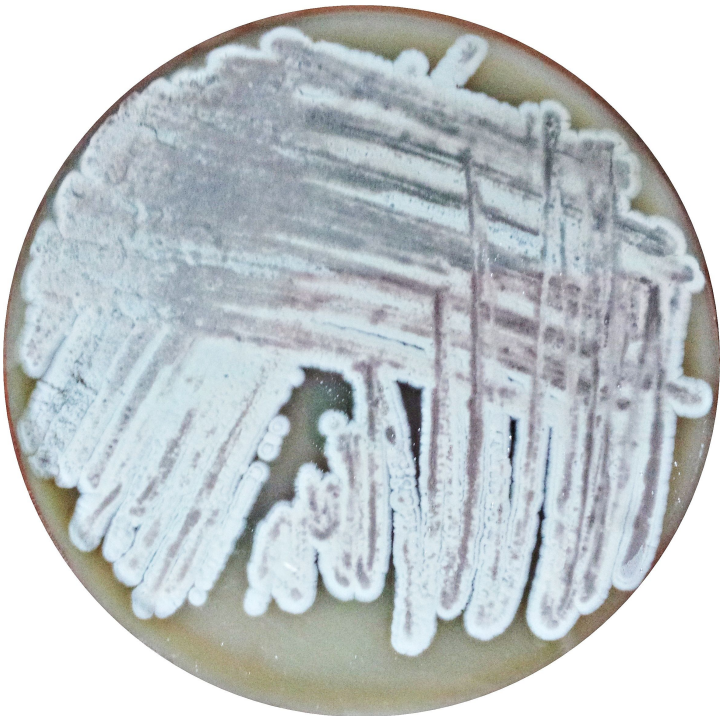

Fig. 4. Photograph showing the colony morphology of *Streptomyces* sp. CS326

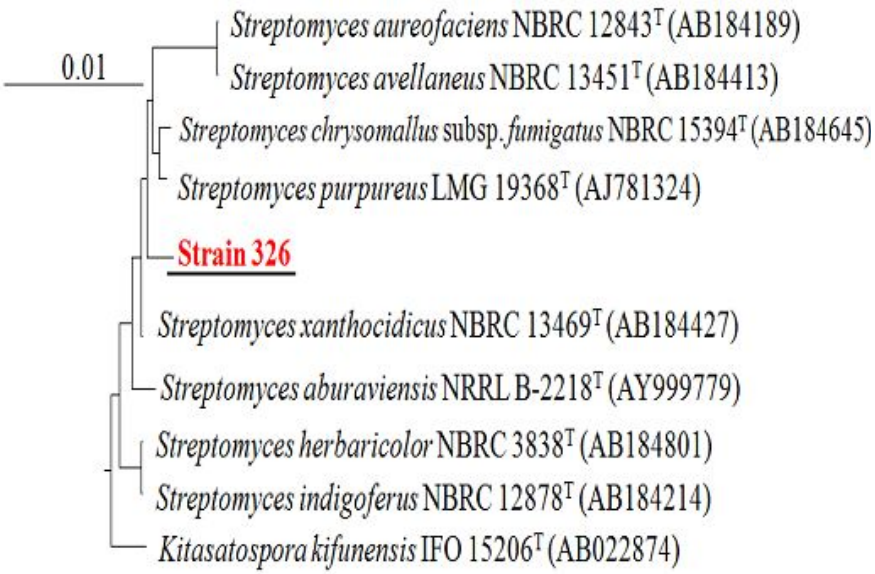

Fig. 5. Phylogenetic tree of strain CS326 with other closely related strains. The *bar* represents 0.01 nucleotide substitutions per site

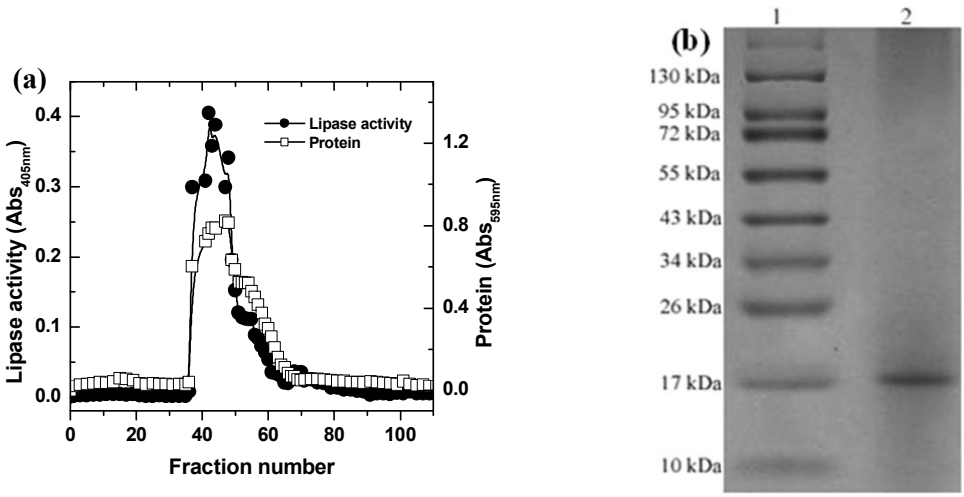

Fig. 6. (a) Profile of *Streptomyces* sp. CS326 eluted from Sepharose CL-6B. (b) SDS-PAGE of LP28. Lane 1: protein size marker (sizes in kDa are shown at the left of each lane) and lane 2: Purified *Streptomyces* sp. CS326

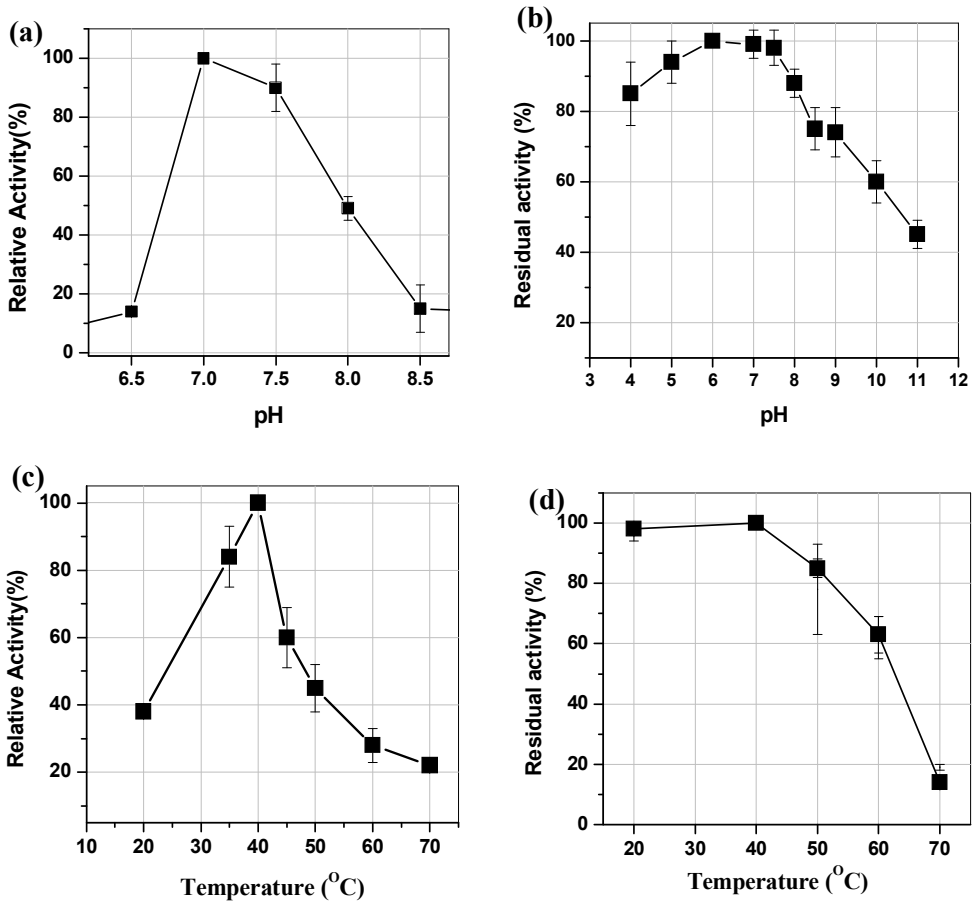

Fig. 7. Effects of pH and temperature

[(a) Optimal pH was determined by assessing the enzyme activity at pH 3.0-10.0. (b) pH stability was determined by measuring the residual enzyme activities after incubating the enzyme at various pH for 60min. (c) Temperature optimum determined by performing enzyme assay at various temperatures. (d) Thermo stability of the enzyme was evaluated by measuring the residual activities after incubating in various temperatures at pH 7.0. Each point represents the mean ±standard deviation (*n*=3)]

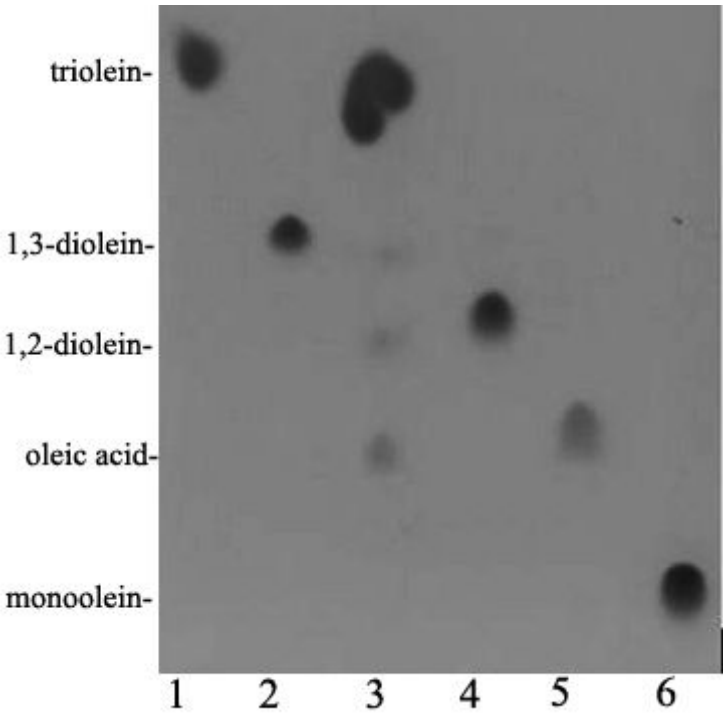

Fig. 8. Determination of positional specificity of *Streptomyces* sp. CS326 by triolein hydrolysis [Lane 1: triolein; lane 2: 1,3-diolein; lane 3: products of triolein after *Streptomyces* sp. CS326 hydrolysis; lane 4: 1,2-diolein; lane 5: oleic acid; lane 6: monoolein]

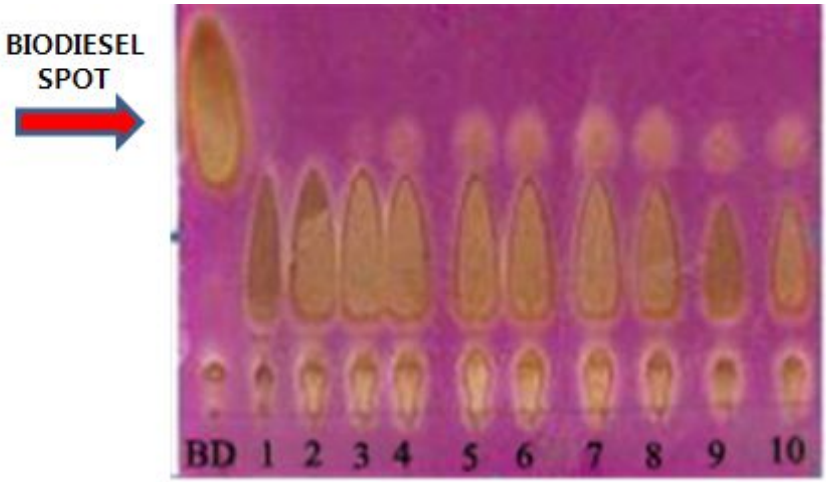

Fig. 9. *Streptomyces* sp. CS326 catalyzed biodiesel production using methanol and soybean oil [BD(100% biodiesel), biodiesel produced; 1 : negative control, reactants without enzyme; and 2 - 10 : reaction products after 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96h]

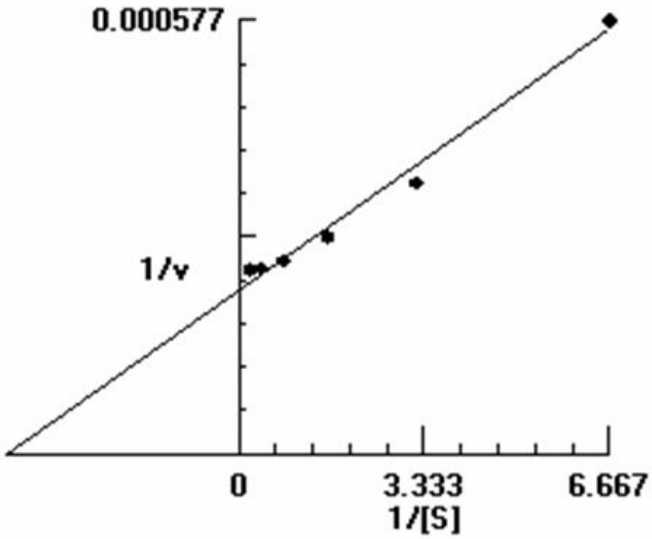

Fig. 10. LP326 Kinetics Lineweaver-Burk Plot

Table 2. Summary of LP326 purification

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Crude supernatant	229	993,458	3,338	100	1
Ammonium sulfate	88	558,589	6,348	56	1.9
Sepharose CL-6B	1.4	12,696	9,069	1.3	2.7

Table 3. Effect of detergents in LP326 activity

Detergent	Concentration (%)	Relative activity (%)
Deoxycholic acid	0.5	0 ± 0
CHAPS	0.5	32 ± 7
Tween-20	0.5	40 ± 8
Tween-80	0.5	38 ± 8
N-laurylsarcosine	0.5	17 ± 7
SDS	0.5	5 ± 1
Triton X-100	0.125	77 ± 10
	0.25	100 ± 0
	0.5	93 ± 9
	0.75	79 ± 15
	1	69 ± 7
None		8 ± 1

Results are presented as means ±standard deviation (n=3)

Table 4. Effect of metal ions in the activity and modulators in the stability of LP326

Effectors (2 mM)	Relative activity (%)
Metal ions	
MgSO4	89 ± 6
ZnSO4	42 ± 5
CuSO4	3 ± 0
NaCl	91 ± 5
KCl	100 ± 0
FeSO4	90 ± 10
MnSO4	92 ± 6
CoSO4	87 ± 10
CaCl2	93 ± 11
Modulators	
Sodium perborate	97± 9
PMSF	68± 12
β-Mercaptoethanol	118± 10
EGTA	42 ± 14
EDTA	57 ± 3
None	100 ± 9

Metal ions were added in there action mixture and assayed under standard assay protocol while enzyme samples were incubated with various modulators for 30min at room temperature, before measuring the residual activity. Results are presented as means ±standard deviation (n=3)

Table 5. Organic solvent stability of LP326

Organic solvent	log P	Residual activity (%)
Decane	5.6	14±4
Octane	4.9	11±3
Heptane	4.0	17±5
Hexane	3.5	30±8
Xylene	3.1	0
Toluene	2.5	1
Benzene	2.0	19±5
Dichloromethane	1.25	67±14
Ethyl acetate	0.71	16±13
Iso-propanol	0.074	71±15
Acetone	- 0.21	24±5
Ethanol	-0.24	34±8
Acetonitrile	-0.39	22±5
Methanol	-0.76	81±6
DMSO	-1.37	85±16
None	—	100±2.5
Methanol	**Concentration (%)**	**Residual activity (%)**
	0	100
	5	88± 6
	10	82± 7
	15	79± 7
	30	89± 3
	40	73± 5

[a]Enzyme samples were mixed with solvents (25%, v/v) and kept in room temperature for 24 h prior to determining the residual activity. Results are presented as means ±standard deviation (n=3)

Table 6. Effect of various chain length nitrophenyl substrates in LP326 activity

Substrate with various chain length	Relative activity (%)
p-nitrophenyl butyrate (C4)	46 ± 0.017
p-nitrophenyl decanoate (C10)	42 ± 0.016
p-nitrophenyl myristate (C14)	70 ± 0.023
p-nitrophenyl palmitate (C16)	100 ± 0.029

Results are presented as means ±standard deviation (n=3)

Table 7. Comparison of N-terminal sequence of LP326 with related hydrolases including a *Streptomyces* lipase

Enzyme and source	N-terminal sequence[a]	Accession /Ref
Esterase from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM1325	**PDLVAL**	YP_002975484
Hydrolase from *Aspergillus flavus* NRRL3357	**APDLVALQS**	XP_002372537.1
Lipase from *Streptomyces rimosus*	**ATDYVAL**GDS	[20]
LP326 from *Streptomyces* sp. CS326	**APDLVALQS**F	Current study

[a]Identical amino acid residues are in bold

V. 참고문헌

1. Gupta, R, Gupta, N and Rathi, P. Bacterial lipase an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 : 763-781. 2004

2. Bjrkling, F, Godtfredsen, SE and Kirk, O. The furture impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9 : 360-363. 1991

3. Park, SH, Choi, SH, Rhee, JS and Sung, NK. Purification and enzyme properties of alkaline lipase from the *Pseudomonase* sp. S4-14. Kor. J. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 22:271-276. 1994

4. Guo, Z and Xu, X. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. *Org. Biomol. Chem.* 3:2615-2619. 2005

5. Ban, K, Kaieda, M, Matsumoto, T, Kondo, A and Fukuda, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 8:39-43. 2001

6. Joseph B, Ramteke PW, Thomas G Cold active microbial lipases : Some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* 26:457-470.

7. Castro-Ochoa LD, Rodríguez-Gómez C, Valerio-Alfaro G, Oliart Ros R (2005) Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb Technol* 37:648-654.

8. Hasan F, Shah AA, Hameed A (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* 27:782-798.

9. Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R (2010) Biodiesel production through lipase catalyzed trans esterification: An overview. *J Mol Catal B Enzym* 62:9-14.

10. Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13:390-397.

11. Yoo H-Y, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, et al. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in bio diesel production. *Bio resour Technol* In Press, DOI:10.1016/*j. biortech.* 2011.02.046

12. Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* 52:1-18.

13. Ji Q, Xiao S, He B, Liu X (2010) Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for bio diesel production. *J Mol Catal B Enzym* 66:264-269.

14. Yang KS, Sohn JH, Kim HK (2009) Catalytic properties of a lipase from Photobacterium lipolyticum for bio diesel production containing a high methanol concentration. *J BiosciBioeng* 107:599-604.

15. Zhang Y, Meng K, Wang Y, Luo H, Yang P, et al. (2008) A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiaevar.* k11. *Enzyme Microb Technol* 42:346-352.

16. Gaur R, Gupta A, Khare SK (2008) Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Bio chem* 43:1040-1046.

17. Cavalcanti-Oliveira ED, Silva PR, Ramos AP, Aranda DAG, Freire DMG (2011)

Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by Thermomyces lanuginosus lipase and its application to bio diesel production via hydro esterification. *Enzyme Res*, in press Doi:10. 4061/2011/618692

18. Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D(2008) Perspectives for bio technological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:331-337.

19. ansal K, Mc Crady J, Hansen A, Bhalerao K (2008) Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in bio diesel. *Fuel* 87:3369-3372.

20. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

21. Gaur R, Gupta A, Khare SK (2008) Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochem* 43:1040-1046.

22. Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763-781.

23. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio phage T4. *Nature* 227:680-685.

24. Lescic I, Vukelic B, Majeric-Elenkov M, Saenger W, Abramic M (2001) Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces* rimosus. *Enzyme Microb Technol* 29:548-553.

25. Lineweaver H, Burk D (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc* 56:658-666.

26. Quyen DT, Giang Le TT, Nguyen TT, Oh T-K, Lee J-K (2005) High-level heterologous expression and properties of a novel lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Protein ExprPurif* 39:97-106.

27. Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T (2001) Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol* 67:4064-4069.

28. Simkhada JR, Cho, S. S., Choi, H.S., Kim, S. W., Lee, H.C., Sohng, J.K., Yoo, J. K. (2010) A new thermolabile alkaline phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS628. *Biotechnol Bioprocess Eng* 15:595-602.

29. Vujaklija D, Schroder W, Abramic M, Zou P, Lescic I, et al. (2002) A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Arch Microbio* 1178:124-130.

저작물 이용 허락서

학 과	약학과	학 번	20107360	과 정	석 사
성 명	한 글 박다정 한 문 朴다정 영 문 Park, Da-Jeong				
주 소	전라남도 목포시 석현동 빌리앙뜨 101동 1403호				
연락처	E-mail : ekwjd323@naver.com				
논 문 제 목	한글 : *Streptomyces* sp. CS326 균주가 생산하는 지질분해효소의 정제 및 특성 분석.				
	영문 : Purification and Biochemical Characteristics of Lipase from *Streptomyces* sp. CS326				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(o) 반대( )

2012년 2월

저작자: 박다정 (인)

조선대학교 총장 귀하