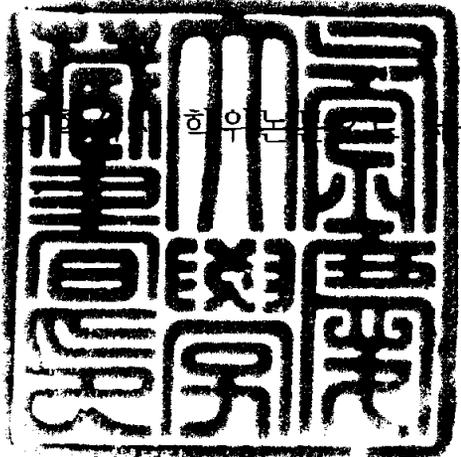


이학석사 학위논문

Pseudoalteromonas sp. KY-5가
생성하는 lipase에 의한 seed oil의
지방산 변화에 대한 연구

지도교수 : 이 원 재

이 논문을  출함



2003년 8월

부경대학교 대학원

미생물학과

김영미

김영미의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 6월 일

주 심 이학박사 이 명 숙



위 원 이학박사 김 영 태



위 원 농학박사 이 원 재



목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	10
1. 실험 재료	10
2. Lipase 생산 균주의 탐색	10
3. Lipase 생성 균주의 동정	13
3.1. Total genomic DNA 분리	13
3.2. Primers 합성	14
3.3. PCR 반응	15
3.4. Elution	15
3.5. Ligation	16
3.6. Competent bacterial cell의 준비	16
3.7. Transformation	16
3.8. Plasmid DNA mini prep.	17
4. Lipase 활성 측정	17
5. Lipase 생성 균주의 최적 증식 조건	19
5.1. 온도, pH, NaCl에 따른 최적 증식 조건	19
5.2. Lipase 활성 최적 조건	20

5.2.1. 조효소액의 조제	20
5.2.2. Lipase 활성 최적 온도와 pH	21
5.2.3. Lipase 활성 최적 배양을 위한 탄소원과 질소원의 효과	21
5.3. Seed oil 내에서의 지방산 변화 측정	22
5.3.1. Sample 준비	22
5.3.2. Gas chromatography method	22
III. 실험 결과 및 고찰	24
1. Lipase를 생성 균주의 분리와 탐색	24
2. Lipase 생성균의 동정	24
3. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. KY 5의 최적 증식 조건	26
4. 효소 생성을 위한 최적 배양조건	27
5. Olive oil의 지방산 변화	28
IV. 결 론	49
V. 감사의 글	50
VI. 참고문헌	52

Study on the change of fatty acid of seed oil by lipase from

Pseudoalteromonas sp. KY-5

Young-Mi Kim

Department of Microbiology, graduate school,

Pukyong National University

Abstract

A lipolytic enzyme producing bacterium was isolated from sea water samples. First, large clear zones forming on the Tween 80 agar plate 84 stains were isolated and of them, lipolytic enzyme producing 52 strains were selected by rhodamine B agar plate assay. Finally, we selected the only one stain which has the strongest lipolytic activity and identified by 16S rRNA sequencing, designated as *Pseudoalteromonas* sp. KY-5.

The medium for the lipase production from *Pseudoalteromonas* sp. KY 5 contained olive oil 1.5 %, peptone 0.1 %, tryptone 0.1 %, yeast extract 0.1 %, soluble starch 0.05 %, glucose 0.05 %, CaCl₂ 0.05 % and distilled water 1000 ml. The optimum temperature, time and initial

pH for the best production of lipase was respectively 25 °C, 46 hr and pH 8.0.

Then lipid hydrolysis on organic-aqueous two phase system using whole cell of *Pseudoalteromonas* sp. KY 5 as a source of lipase was carried out. As carbon and substrate sources, 15 % (w/v) olive oil was initially added to the two phase system that was adjusted 5:2 (v/v) medium to isooctane. Qualitative analysis of fatty acids in olive oil was performed by rapid gas chromatography method. Lipase from *Pseudoalteromonas* sp. KY 5 hydrolyzed oleic acid and produced 78% palmitic acid and 13% myristic acid in 50 hr.

I. 서 론

Lipase (E.C. 3.1.1.3)는 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소 (Desnuelle, 1972; Fig. 1)로, 1834년 J. Eberle에 의해 동물의 췌장 중에 존재한다는 것이 밝혀진 이래로 lipase의 생산 및 용도의 개발에 관한 많은 연구가 진행되어져 왔다.

lipase는 오래 전부터 연구되어 왔으나 protease나 amylase보다 비교적 많은 연구가 되어 있지 않은데 이는 기질인 지질이 불용성으로 효소 반응의 작용 부위가 물과 지질의 interface이므로 효소의 최대 활성을 위하여 emulsion을 증대시켜야 하고, 기질에 따라 그 구성 지방산의 종류가 다양하며 그 함유량이 다르기 때문에 정확한 기작을 알기 어렵다 (Robert, 1983).

일반적으로 lipase는 수용액에서 기질로 작용하는 carboxyl esterase와는 다른 heterogeneous system에서 수용액 내에 존재하는 acylglycerol의 carboxyl ester결합을 가수분해하여 지방산과 글리세롤로 분해하거나 역으로 합성하는 효소로서 주로 장쇄 지방산을 갖는 triacylglycerol의 에스테르 결합에 작용한다 (Brunc, 1992). 또한 fatty acids와 lowe alcohols의 ester를 자르는 효소와 glycerol을 가수분해하는 lipase로 구별을 한다. 특히 *Pseudomonas*속에서 생산되는 esterase의 경우, tributyrin의 에스테르 결합을 가수분해하는 활성을 갖고 있기 때문에 lipase와의 구분이 어렵게 되어 최근 lipase의 정의가 유화된 수용액 내에 존재하는 장쇄 지방산을 갖는 acylglycerol의 carboxyl 에스테르 결합을 가수분해하며, 기질에 대해 interfacial activation 현상을 보이는 가수분해 효소로 바뀌었

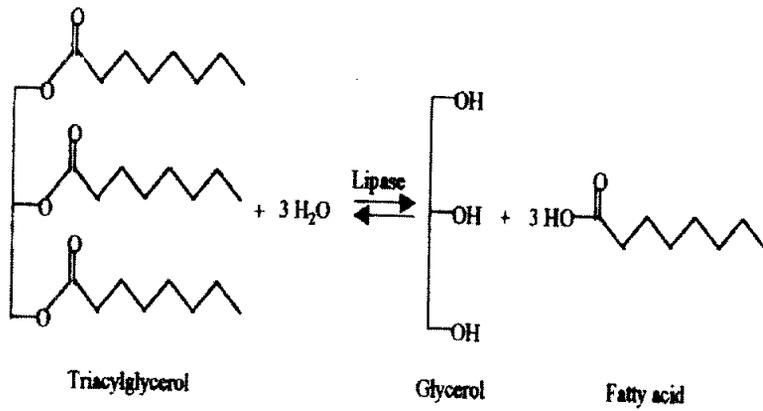


Fig. 1. Enzymatic reaction of lipase catalyzing hydrolysis or synthesis of a triacylglycerol.

다.

lipase는 interfacial activation에 의해서 물과 기름 층 사이의 접촉면에서 효소의 반응이 일어난다. 효소의 활성부위에는 lid 또는 flap라는 amphiphilic loop 형태의 peptide가 덮고 있어서 기질이 작용을 하지 못하다가 기질이 어느 일정 농도에 이르러 표면장력이 형성될 때 활성 부위에 기질 접근이 가능하게 lid가 이동되거나 구조적인 재배치가 일어나 활성부위의 소수성을 띠는 부분이 기질에 노출되고 active site를 덮고 있던 peptide가 열리면서 기질과 효소와의 hydrophobic interaction에 의해 효소반응이 일어난다 (Brzozowski, et al. 1991; Van Tilbeurgh, et al. 1993; Fig. 2). 이는 lipase가 일반적인 효소와 같이 기질의 농도에 따라 반응속도가 증가하는 Michaelis-Menten kinetic equation을 따르기보다는 어느 일정 농도 이상에서 효소 반응을 보이는 sigmoidal curve 형태의 독특한 특성을 보여 일반 효소들과 구분이 되는 대표적인 특징 중의 하나가 된다. 특히 lipase의 경우 소수성이 크기 때문에 기름 층에 붙어 있거나 세포 밖으로 lipase가 분비되는 마지막 단계에서 외부막에 흡착되는 경우가 많다. 이를 해결하기 위해 대사에 이용되지 않는 다당류를 첨가하여 lipase와의 흡착을 유도하여 분비를 증가시킨 보고도 있다 (Winkler, 1979). 일부 lipolytic enzyme중에는 계면활성을 가지지 않는 solvent-accessible active site를 가지기도 하는데 이러한 특성은 lid의 결핍으로 인해서 나타난다 (Hjirth, et al. 1993; Martinez, et al. 1992; Martinelle, et al. 1995).

그러나 lipase의 활성을 높이는 가장 우선되는 방법은 기질의 표면적을 늘리기 위한 어느 정도의 유화이다. 현재 산업적으로 지방이나 기름

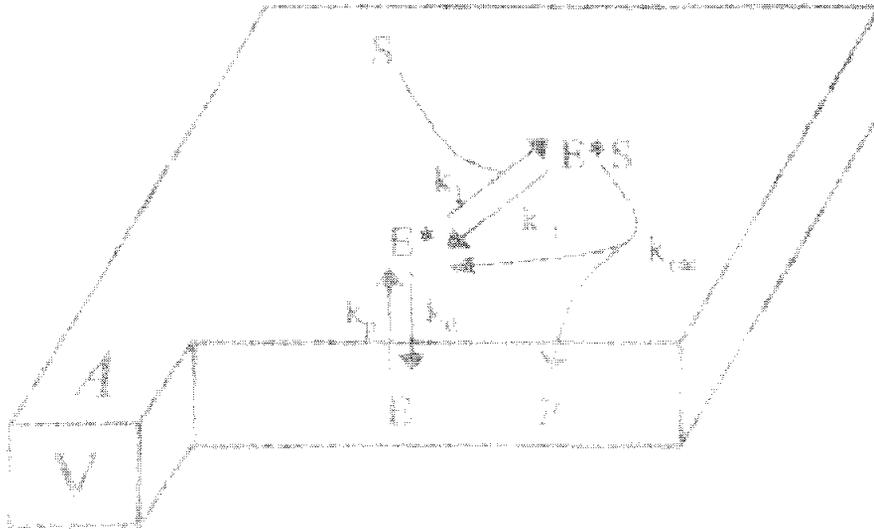


Fig. 2. A model of interfacial kinetics with a water soluble lipase acting on an insoluble substrate.

으로부터 유용한 물질로의 전환은 물리, 화학적인 방법들에 의해 행하여져 왔으나 lipase가 지방을 가수분해할 뿐만 아니라 기질에 특이적으로 재합성을 할 수 있기 때문에 지방의 분해, transesterification, racemic esters의 stereospecific hydrolysis와 세제에서의 이용 등 새로운 응용분야가 발전되어왔다. 상업적으로 이용되는 미생물이 생산하는 lipase는 진균류와 세균의 발효에 의해 주로 생산된다. 생산물은 lipases와 esterases의 혼합물로서 지방산의 사슬길기와 glycerol 분자에서의 위치에 따라 이들 효소들의 특이성이 의존된다.

lipase를 esterase와 비교할 때, 비슷한 효소 구조와 촉매기작을 공유하더라도 acyl moiety에 따라서 기질 특이성에 큰 차이를 보이며 기질 특이성은 각 lipase를 특징짓는 성질 중의 하나이다. 이 기질 특이성의 문제점은 하나의 lipase만으로는 다양한 oil을 분해할 수 없다는 것인데 이는 서로 다른 lipase와의 상호 보완작용으로 다양한 기질을 분해할 수 있고, 현재 recombinant DNA technology에 의해 산업으로 목적에 알맞게 lipase를 개량하여 선택적 특이성을 증가시킬 수도 있다.

미생물 유래의 lipase는 serine hydrolyses와 catalytic moiety로써 일치하는 sequence인 $G-X_1-S-X_2-G$ (G =glycine, S =serine, X_1 =histidine and X_2 =glutamic or aspartic acid)를 포함한다. 그런데 active domain이 주로 $G-X_1-S-X_2-G$ 의 순으로 된 아미노산 배열만이 거의 같을 뿐 그 외의 배열은 전혀 달라서 각기 다른 기질 특이성을 보이게 되는 특성 분야 때문에 응용분야가 실로 무궁무진하다. 따라서 상업적으로 잠재력이 큰 미생물이 생산하는 lipase에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 앞으로 더욱 필요하다.

실제로 미생물 유래의 lipase는 지방의 제거 또는 그 구조의 촉매로서 이용범위가 날로 증가하고 있다. 저온 세탁에서의 기름때를 제거하기 위한 세제, 낙농제품의 향기개선, 버터 지방제거, 유지중의 flavor 제조, 탈지 우유농축 및 제품 가공기술로써 lipase를 이용한 휘발성향과 지방산 개선, 과다 지방 성분 제거를 위한 어류가공, 폐유지 처리, 인체피부의 지압을 제거하는 화장품, 폐수처리제로서 기름성분의 제거, 유지의 ester 교환, 당 ester의 합성, wax의 제조, lethithin의 개선, 피혁의 전처리, 소화제나 고지혈증 환자의 진단 목적 등에 사용되는 의료분야, 등에서 널리 쓰이고 있다 (Kosugi, et al. 1988; Yamamoto and Fujiwara, 1988; T. Godfresy, 1996).

미생물 유래의 lipase는 기존의 화학적인 처리에 의한 생산물을 얻을 때 생기는 여러 부산물에 대한 문제를 해결할 수 있고, 일단 순수한 형태로 분리된 균주는 배양조건이 수립되면 원하는 시간에 필요한 양의 균체를 유용물질의 원료로 공급하여 생산 작업의 규모도 필요에 의해 증대할 수 있으며, 미생물 특히 세균의 경우에는 유전자 검색 및 조작 기술이 비교적 잘 확립되어 있고 그 genome의 크기가 작아 고난도의 기술 없이도 유전자 조작의 가능성이 열려있는 장점이 있다. 이러한 여러 이점으로 인해 미생물 유래 lipase의 공업적 이용에 대한 연구가 최근까지 활발하게 진행되고 있다.

그러나 아직까지 lipase의 효소활성 측정방법이 통일되어 있지 않아서 다른 미생물이 생산하는 lipase와의 활성 비교가 사실상 어렵다. 그리고 lipase를 생산하는 미생물은 배양조건에 따라서 다양한 isoform의 lipase를 생산하고 lipase외의 다른 가수분해효소를 함께 분비하는 효모와 곰

광이류도 있다. 산업적인 대량 배양에 있어서 배양 시마다 lipase 조효소액의 quality의 차이가 있어 문제를 야기하기도 하고 원하는 효소 외에 몇 종의 isoform이 존재하기 때문에 native lipase의 정제가 어렵다.

그러므로 미생물성 lipase도 영양원의 급원에 따라 기질의 특이성, 작용기작 등의 특이성이 다양하며, 배양조건에 따라 변동하므로 미생물성 lipase의 생산을 위해서는 우수균주의 선발, 배양조건 및 효소활성 측정 등에 대한 검토가 요구된다.

또한 현재까지는 lipase를 이용한 지방산 생성 공정이 경제적으로 불리하지만 궁극적으로 효소의 기질 특이성으로 인한 부작용이 적고 생성 폐기물이 적어 친환경적이며 고품질의 지방산을 생성할 수 있는 유용한 기술로 인정됨으로 lipase에 의한 가수분해 특성 및 기초 자료 축적이 필요한 실정이다.

현재 해양생물은 육상과 전혀 다른 환경에서 자라기 때문에 물질대사의 경로도 육상 생물과 다르며, 그 성분도 육상 생물과 다른 새로운 구조를 갖는 화학물질을 생산할 수 있을 것으로 기대되어 많은 연구자들이 해양생물의 특이성에 착안하여 새로운 생리활성 물질을 탐색하기 위한 목적으로 연구를 활발히 진행하고 있는 추세이다.

따라서, 원하는 목적에 맞는 lipase를 선택하기 위한 다양한 lipase에 대한 library의 구축에 기초자료로 제공하기 위하여, 기수역에서 서식하고 있는 세균 중 lipase 생성균을 탐색하고 olive oil을 기질로 하여 생성된 효소의 특이성을 알고 생성되는 물질을 탐색한 결과이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

시료 채취를 위하여 통영, 여수와 부산 다대포 해수욕장 및 광안리 해수욕장 주변 지역의 정점에서 해수를 채취하여 실험에 사용하였다. 해수는 180 ℃에서 건열 멸균한 광구병에 해양미생물용 채수기인 MB 채수기를 이용하여 무균적으로 시료를 채취하였다. 채취한 모든 시료는 Ice-Box에 보관하여 실험실로 옮겨 실험하였다.

2. Lipase 생산 균주의 탐색

lipase를 생성하는 세균의 탐색을 위하여 Fig. 3과 같이 실행하였다. 먼저, 무균적으로 채취한 시료를 PPES-II (Taga, 1968; Table 1) agar medium에 평판 도말하여 25 ℃에서 1주일간 배양한 후, 형성된 colony 중 특징적인 형태를 가지는 colony를 선별하여 사면배지에 접종, 배양하였다. 순수 분리한 균주는 3주 간격으로 계대 배양하여 paraffin tape으로 밀봉한 후 4 ℃에 냉장 보관하였다.

분리한 세균들의 지방 분해능을 알아보기 위하여 1 % Tween 80을 첨가한 PPES-II agar 배지에 접종한 뒤 불투명 환의 생성유무를 관찰하여 1차적으로 분리하였다 (Robert, 1983; Shelley, et al. 1987; Samad, et al. 1989; Wirth, 1992). 선별된 이들 균주를 olive oil 1 %와

Table 1. Composition of PPES-II medium

components	concentration
Trypton	0.1 %
Soytone	0.1 %
Yeast extract	0.1 %
Poly peptone	0.2 %
Ferric Citrate (0.1 %)	10 ml
Sea water	1000 ml
pH	7.6

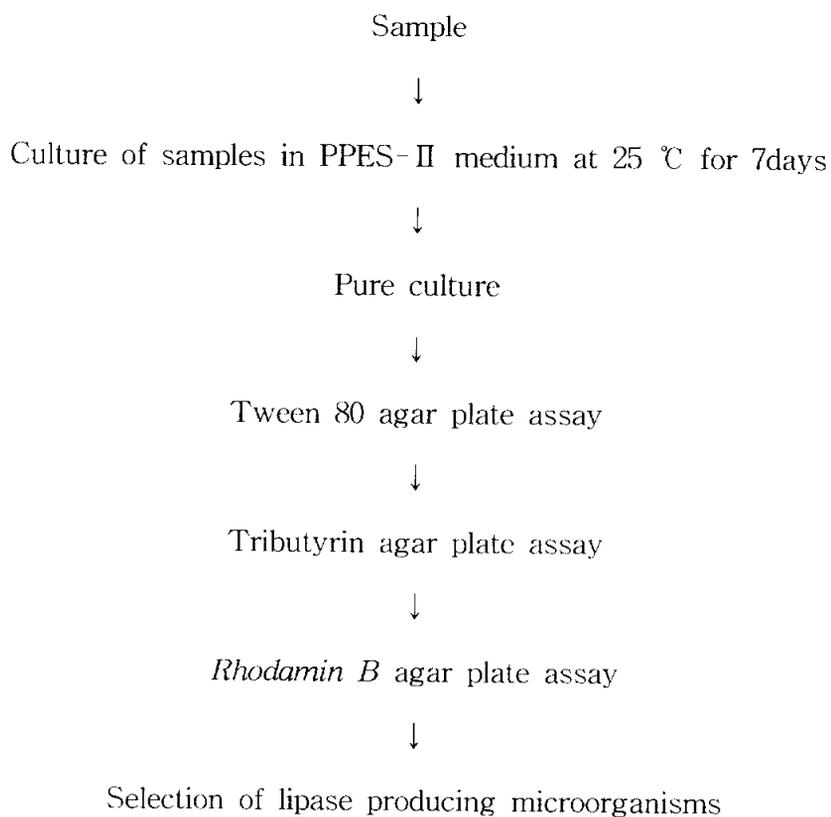


Fig. 3. Isolation scheme for lipase-producing bacteria.

rhodamine B 0.001 %가 첨가된 고체배지에 접종하여 25 °C, 30시간 배양한 후, 340nm의 UV 하에서 균락 주변에 오렌지색의 투명 환을 형성시키는 균주를 최종적으로 선별하였다 (Kouker and Jaeger, 1987; Graeme and Jurgen, 1997; Fig. 4, Fig. 5)

3. Lipase 생성 균주의 동정

선별된 균주는 colony의 색과 형태, Gram 염색법으로 1차 분류한 후 16S rRNA의 유전자를 이용한 sequencing을 통하여 동정하였다 (Seong, 1997).

3.1 Total genomic DNA 분리

AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 이용한 bacterial genomic DNA를 추출하였다. 추출 방법은 먼저 멸균된 1.5 ml tube에 배양액 1 ml를 넣고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 침전시킨 다음, pellet을 취하여 200 μ l의 lysis buffer를 첨가하였다. 여기에 20 μ l의 proteinase K를 첨가하여 잘 혼합한 후, 56 °C에서 1시간 반응시킨 뒤 spin down하고, 시료에 200 μ l의 Binding buffer를 넣어 60 °C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 tube에 100 μ l의 isopropanol을 넣고 가볍게 vortex하여 섞어준 뒤 짧게 spin down하였다. 그리고 시료를 collection tube에 결합시킨 binding column에 옮긴 후, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 여기에 Washing buffer 1을 500 μ l 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 다시 500 μ l의 Washing buffer 2를 tube에 넣고

8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하였다. Binding column을 collection tube에 옮긴 후 70 °C water bath에서 elution buffer 200 μ l를 넣고 5분 간 상온에 방치한 뒤 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 elution하였다. 이를 1 % agarose gel에 전기영동하여 genomic DNA를 확인하였고, PCR 반응의 template로 사용하였다.

3.2. Primers 합성

16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 Moyer 등 (1994)에 의해 고안된 것을 사용하였다. 이들 primer쌍은 eubacteria의 16S rRNA 유전자에서 잘 보존된 부분의 염기들로서 *Eschericia coli* 16S rRNA의 49-68, 1510-1492 위치에 해당되는 degenerate primer들로 만들어졌다. 추가로 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식부위를 첨가하였고, reverse primer의 5'에는 *BamHI*의 인식부위를 첨가하였다.

Forward primer :

5' AGAATTCTNANACATGCAAGTCGAICG 3' (27-mer)

Reverse primer :

5' GTGGATCCGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (27 mer)

N : degenerate including 4 nucleotides

Y : degenerate including pyrimidines

3.3. PCR 반응

PCR 반응은 PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 실시하였고 반응 혼합물의 조성은 10 pmol forward primer 3 μl , 10 pmol reverse primer 3 μl , template DNA 3 μl , 3차 멸균 증류수 41 μl 를 첨가하여 50 μl 로 만들어 잘 혼합하여 반응을 진행하였다. PCR 실행은 Minicycler (MJ Research, U.S.A)에서 실시하였다. 처음 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성시킨 후, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 62 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분씩 35 cycle을 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 extension time을 주어 PCR 반응을 종결하였다. 이를 1 % agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인하였다.

3.4. Elution

PCR 반응물을 1 % agarose gel, 0.5 \times TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 전기영동하여 band를 확인한 후, 확인된 band를 잘라내어 1.5 ml tube에 넣었다. 여기에 6 M NaI (6 M sodium Iodine) 600 μl 를 넣고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 gel을 녹였다. gel을 완전히 녹인 후, glass milk 8 μl 를 넣고 rotator에서 20분간 반응시키고 이를 다시 14,000 rpm에서 5초간 centrifuge하여 pellet을 취하였다. Washing solution (1 M NaCl 40 ml, 1 M Tris-Cl 4 ml, 0.5 M EDTA 2 ml, 3차 증류수 54 ml) 500 μl 를 넣고 pipetting으로 씻은 뒤, 5초간 centrifuge하여 pellet를 취하였으며 이 과정을 2회 하였다. vacuum에서 5-10분간 방치하여 남아있는 alcohol을 제거하고 이를 다시 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 방치한 뒤 3차 증류수를 20 μl 를 넣고 섞어주었고 14,000 rpm에서 1

분간 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 상등액 1 μl 을 취하여 1 % agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인하였다.

3.5. Ligation

elution된 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 연결하였다. DNA 3 μl , T vector 1 μl , ligase 1 μl , buffer (2X) 5 μl 를 사용하여 volume을 10 μl 로 맞추는 후에 상온에서 4시간 반응시켰다. 이후 이를 20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

3.6. Competent bacterial cell의 준비

LB agar 배지에 키운 *E. coli* XL-1 Blue를 3 ml의 LB 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 진탕배양하고, 이를 다시 10 ml tube에 4 ml의 LB 액체배지에 재접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균의 1 ml를 취하고 5000 rpm에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 침전된 세포들을 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각된 800 μl 의 CaCl_2 (50 mM)를 넣고 ice에서 20분간 resuspension 하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 200 μl 의 CaCl_2 (50 mM)를 넣고 resuspension하여 사용하였다.

3.7. Transformation

10 μl 의 ligation 반응물을 200 μl 의 XL1 blue competent cell과 혼합하여 ice에 30분간 방치하였다. 그리고 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90초간 heat shock를

주고 ice에서 5분간 방치하여 여기에 LB 배지 800 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 진탕배양하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고 LB 배지 200 μ l를 넣어 resuspension 하였다. 이를 Amp가 첨가된 Mackonkey agar 배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에 18시간 배양한 다음, 4 $^{\circ}$ C에 두어 색깔이 확실해지면 white colony만을 선택하여 LB (Amp+) broth에 접종하여 plasmid를 mini-prep 하였다.

3.8. Plasmid DNA mini prep.

alkaline lysis mini-prep방법 (Sambrook, 1989)으로 Plasmid DNA를 분리하고 제한효소로 잘라 삽입된 DNA 절편을 확인하였다. 확인된 plasmid는 RNase를 처리하고 phenol : chloroform 정제과정을 거쳐 OD₂₆₀에서 농도를 측정한 다음 염기서열 분석에 사용하였다.

4. Lipase 활성 측정

균체가 생산하는 lipase의 활성을 측정하기 위한 여러 방법 중 substrate로써 nitrophenyl을 사용하는 spectrophotometric method (Gaelle and Jacques, 1996)가 basic pH에서 불안정하기 때문에 (Shuen Fuh, et al. 1996; Kwon and Rhce, 1986) pH에 안정한 cupric acetate method로써 쉐 등 (Kwon and Rhce, 1986; Lee and Rhce, 1994)의 방법을 응용하여 측정하였다 (Fig. 6). 기질조제는 emulsion stock solution[20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 0.1M NaCl, 20 mM

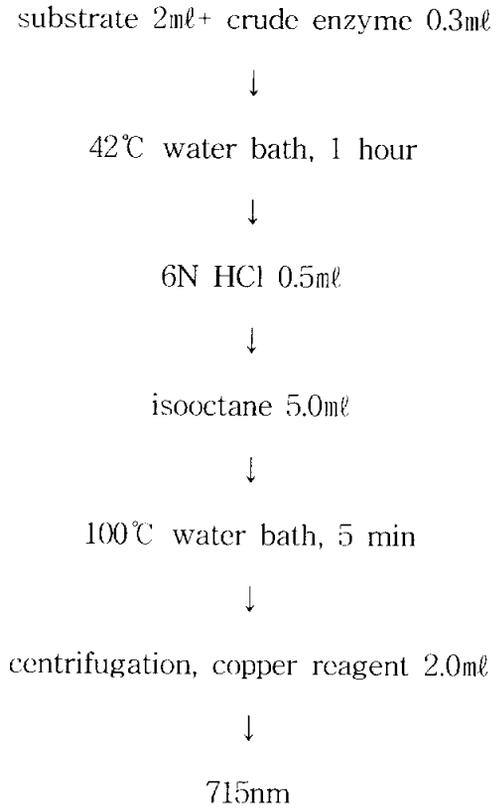


Fig. 6. Assay of lipase activity.

CaCl₂, 1 mM deoxycholate, 5 % gum arabic을 함유]에 5 % olive oil을 첨가하여 균질화 시킨 뒤 사용하였으며, 사용하기 직전에 조제하였다.

발색시약인 copper reagent는 Lowry & Tinsley 방법 (1976)에 의한 5 % (W/V) cupric acetate를 조제하여 Whatmann No.1 여과지로 여과한 후, pyridine으로 pH 6.1로 조정하여 사용하였다.

효소 활성 측정은 기질 2 ml에 효소액을 0.3 ml를 첨가하여 진탕배양 수조에서 40 °C, 1시간을 반응시켰다. 반응 후 6N HCl 0.5 ml를 첨가하여 효소반응을 정지시키고, 유리 지방산을 용해하기 위하여 isooctane 5.0 ml를 넣어서 혼합한 다음 100 °C에서 5분간 처리하였다. 분리한 isooctane층에 발색제인 copper reagent를 2.0 ml 첨가하여 vortex한 후 715nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 대조구는 효소액과 기질을 넣고 즉시 6N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤 위의 방법을 행하였다.

5. Lipase 생성 균주의 최적 증식 조건

5.1. 온도, pH, NaCl에 따른 최적 증식 조건

분리된 균의 최적 증식 조건을 알기 위하여 증식에 있어서 가장 기본적인 온도, pH, NaCl에 따른 성장 정도를 조사하여, 그 결과에 따라 최적 성장 조건에서 이후의 실험을 실시하였다. 먼저 세균의 온도에 따른 증식을 조사하기 위해 PPES-II broth에서 전배양한 세균 배양액을 PPES-II broth에 접종한 후, 각각 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 41 °C, 50 °C에서 배양하였다 (pH 7.5, NaCl 3 %). 그리고 염에 대한

증식을 조사하기 위하여 증류수를 사용한 PPES-II broth 100 ml에 염을 0 %, 1 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 %, 10 %, 11 %, 13 %, 15 %로 맞추고 배양액 100 μ l를 접종하여 shaking incubator에서 180 rpm으로 배양하였다 (pH 7.5, 온도 25 $^{\circ}$ C). 또한 pH에 대한 증식을 조사하기 위하여 PPES-II broth에 pH를 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 12로 맞추고 배양액을 접종하여 shaking incubator에서 180 rpm으로 배양하였다 (NaCl 3 %, 온도 25 $^{\circ}$ C).

조사된 최적 배양조건을 바탕으로 성장 곡선을 긋기 위하여 매 4시간마다 측정하였다. 균의 증식은 분광 광도계 (Shimadzu, UV-160)로 640nm 파장에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

5.2. Lipase 활성 최적 조건

5.2.1. 조효소액의 조제

olive oil을 탄소원으로 하여 1.5 % 첨가된 배지에서 균주를 46시간 배양한 후 배양액을 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이를 filter paper (Millipore, 0.45 μ m)를 사용하여 기름 층을 제거한 뒤 -80 $^{\circ}$ C의 동결고에 보관하고 이후의 실험에 조효소액으로 사용하였다.

5.2.2. Lipase 활성 최적 온도와 pH

분리한 균주가 생산한 lipase의 활성 최적 온도를 알아보기 위하여 기질과 효소액을 반응시킨 후 온도를 4, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 °C로 각각 달리하여 최적 활성 온도를 조사하였다.

또한 최적 pH를 조사하기 위하여 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0~pH 6.0), 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0), 10 mM Glycine-NaOH bufer (pH 10.0)에 기질이 1 %가 되게 녹인 후, 각각의 pH 완충용액으로 희석한 조효소액 0.2 μ l를 넣어 반응시킨 후 효소 활성을 측정하여 최적 pH를 조사하였다.

5.2.3. Lipase 활성 최적 배양을 위한 탄소원과 질소원의 효과

효소활성 최적 조건을 조사하기 위하여 배지내의 탄소원과 질소원의 효과를 알아보았다. 먼저 탄소원을 제한 PPES-II 배지에 탄소원으로써 glucose, lactose, sucrose, soluble starch, galactose, glucose + soluble starch가 각각 1 % 씩 되게 넣어서 최적 조건 하에서 배양하여 효소활성 측정법으로 측정하였다. 그리고 마찬가지로 질소원을 제한 PPES-II 배지에 질소원으로써 peptone, tryptone, soytone, yeast extract, nutrient broth, peptone + tryptone, soytone + peptone을 각각 1 %씩 되게 넣은 뒤 최적 조건 하에서 배양하여 이들을 효소활성 측정법으로 측정하여 질소원의 영향을 살펴보았다.

5.3. Seed oil 내에서의 지방산 변화 측정

5.3.1. Sample 준비

분리균주가 생성하는 lipase의 특성을 알아보기 위하여 seed oil내의 지방산 변화를 관찰하기로 하였다. seed oil로써는 앞선 실험에 사용하였고 보편적으로 많은 소비를 보이는 olive oil로 결정하였으며 권과 리 (1993)가 제시한 two phase system을 응용하여 sample을 준비하였다. 먼저 기질로써 olive oil을 15 % 사용하였고 최적 배양조건을 만족시키는 배지와 isooctane을 5:2 (v/v) 비율로 하여 전배양한 균을 접종하였다. 그리고 shaking incubator에서 180 rpm, 25 °C로 배양한 뒤 이후 시간별로 sampling하여 분석에 사용하였다.

5.3.2. Gas chromatography method

olive oil내의 지방산 변화를 알아보기 위하여 권과 리 (1993)가 제시한 gas chromatography method를 응용하여 사용하였다. GC는 GC 17AAFV V2 (Shimadzu)를 사용하였고 Column은 HP-1 (30m×0.250mm×0.25 μ m ; length × id × film thickness)을 사용하였다. injector와 detector의 온도는 250 °C이며 initial temperature를 110 °C로 하여 이후 temperature program을 110 °C에서 300 °C로 일 분에 15 °C 변화하게 설정하여 실험에 사용하였다. carrier gas는 nitrogen이며 carrier gas flow는 1.6 ml/min, injection volume은 0.5 μ l로 하여 실험

하였으며 실험 오차를 줄이기 위하여 5차례씩 반복 실험하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. Lipase를 생성 균주의 분리와 탐색

통영, 여수, 다대포, 광안리 및 부산 연안 (Fig. 7)에서 채취한 해수들을 PPES-II 배지에 도말 접종한 후, 1주일간 배양하여 250여종의 균주를 분리하였다. 이를 Tween 80이 포함된 선별배지에 접종한 후, 투명한 생성 유무의 결과를 경시적으로 측정하여 약 84여종을 1차로 분리하였다 (Fig. 4). 하지만 Kouker (1987)에 의하면 esterase에 의해서도 투명한 형성될 수 있기 때문에 rhodamine B agar plate에 의한 실험 방법에 따라 2차 screening을 하였다. 선별된 균주들을 rhodamine B agar plate에 접종한 뒤 pink colony를 띠며 340nm U.V. 하에서 오렌지색 발광이 관찰되는 52균주를 관찰하여 최종적으로 real lipase 생성균으로 확인하였다 (Fig. 5). 선별된 52종의 후보 균주들에서 환의 크기를 비교하여 상대적으로 큰 균주들을 선택하여 이들이 우수한 활성을 가지는 것으로 판단 (Kouker and Jaeger, 1987)하고 효소 활성 측정법으로 측정한 뒤 최종적으로 한 균주를 선택하여 동정에 들어갔다.

2. Lipase 생성균의 동정

균의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 이용한 sequencing을 통하여 최종 선별한 균주를 동정하였다. 선별 균주의 염기서열 분석 결과와 염

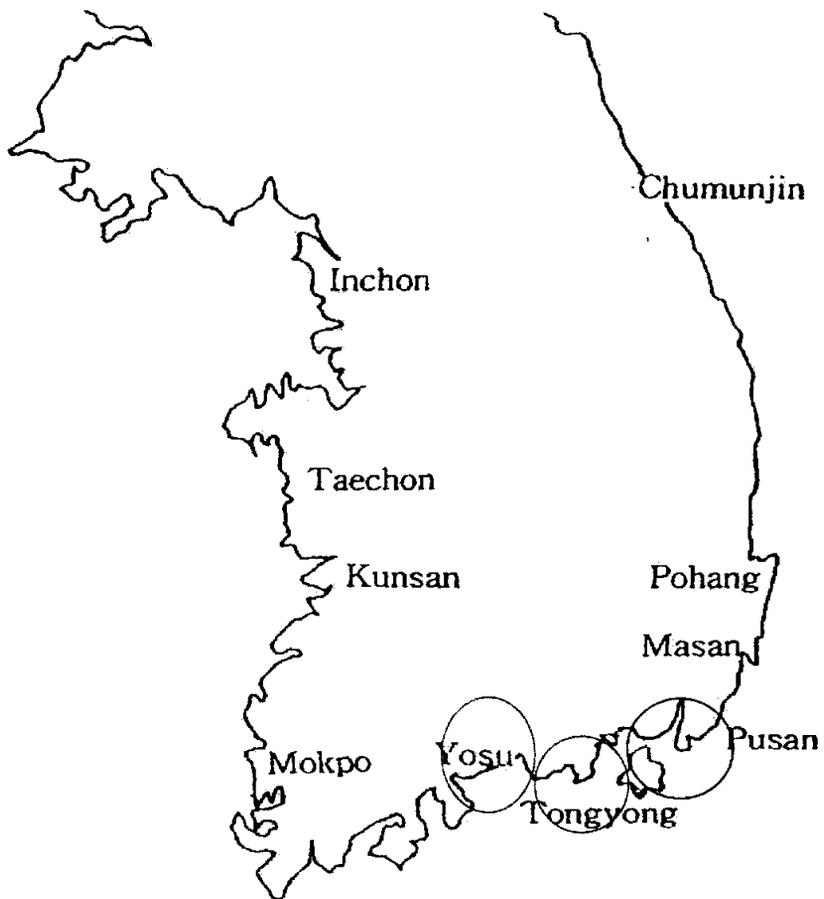


Fig. 7. Location of sampling station.

기서열을 대상으로 GenBank의 DNA database에서 가장 상동성이 높은 균주의 염기서열을 비교하여 나타내었다 (Fig. 8). 분석된 염기서열은 이미 밝혀진 균주의 염기서열과 비교하여 99 %이상의 상동성을 가지는 것으로 나타났으며 이 염기서열을 MEGA 2.1 package를 이용하여 계통수를 나타내었다 (Fig. 9). 최종 선택된 균주는 *Pseudoalteromonas*속이었으며, 위의 결과를 가지고 lipase 생성균주를 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 라고 명명하였다.

3. *Pseudoalteromonas* sp. KY-5의 최적 증식 조건

Pseudoalteromonas sp. KY-5의 최적 증식 조건을 설정하기 위해서 최적 pH 농도, 최적 온도, 최적 NaCl를 조사하였다. 최적 pH를 설정하기 위하여 PPES-II broth 100 ml (NaCl 3 %, 온도 25 °C)에 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10으로 맞추고 세균 배양액을 접종하여 shaking incubator에서 48시간 180 rpm으로 배양한 후, 640 nm에서 흡광도를 조사하였고 결과는 Fig. 10과 같고 최적 pH는 8.0이며, pH 9.0에서 부터는 가파르게 사멸하는 것을 알수 있다.

또한 최적 NaCl을 설정하기 위해 증류수를 사용한 PPES-II broth (pH 7.5, 온도 25 °C)에 염을 0 %, 1 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 %, 10 %로 맞추고 세균 배양액을 접종하여 shaking incubator에서 48시간 180 rpm으로 배양하여 640 nm에서 흡광도를 조사한 결과 Fig. 11과 같았다. 최적 NaCl의 농도는 2 %이며, 0 %에서 5 %까지 비교적 성장이 좋았다.

Pseudoalteromonas sp. KY-5의 최적 온도를 설정하기 위하여 PPES-II broth (pH 7.5, NaCl 3 %)에 세균 배양액을 접종하여 각각 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C에서 48시간 배양하여 640 nm에서 흡광도를 조사한 결과 Fig. 12와 같았다. 최적 온도는 25 °C였으며, 20 °C에서 40 °C 어느 정도의 성장을 보였다.

이상의 결과로 pH 8.0, 온도 25 °C, NaCl 2 %에서 최적의 성장 조건을 보였고 균의 성장 곡선은 Fig. 13과 같았다.

4. 효소 생성을 위한 최적 배양조건

lipase의 생산을 위한 최적 배양 조건을 설정하기 위해서 종배양에 사용하는 PPES-II medium을 기본으로 하여 최적 pH와 최적 온도를 비롯하여 탄소원과 질소원의 선택 및 최적 농도를 효소 활성 측정 방법으로 조사하였다.

먼저, 생산에 영향을 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 glucose와 soluble starch를 각각 0.05 %씩 사용했을 때 효소 생성이 가장 높았으며 (Table 2) 질소원의 경우, peptone과 tryptone을 0.1 %씩 사용하였을 때가 효소 생성이 높았다 (Table 3). 온도의 영향을 살펴보았을 때, *Pseudoalteromonas* sp. KY-5의 증식과 효소 생성에 미치는 온도를 조사하기 위하여 여러 온도에서 배양시켜 균의 증식과 효소 생성능을 비교한 결과, 균의 최대 증식 온도인 25 °C와 같은 온도에서 효소 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. pH의 영향을 알아보기 위해 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5의 배양 초기 pH를 4에서 11까지 조절하

여 실험한 결과, pH 6~pH 10에서 상대 활성이 57 % 이상의 lipase를 생성하며 pH 8에서 효소생성이 가장 높게 나타났다. 배양시간에 따른 균의 증식과 효소의 생성을 비교해 본 결과, 균의 증식 (Fig. 13)은 36시간 이후인데 비하여 효소의 생성 (Fig. 14)은 10시간 뒤인 46시간에서 최적을 나타내었다. 그러나 배양 후 46시간이 지나면 급격한 효소의 실패가 일어났다.

이상의 실험으로 결정된 배지의 조성 조건은 Table 4와 같이 peptone 0.1 %, tryptone 0.1 %, yeast extract 0.1 %, olive oil 1.5 %, soluble starch 0.05 %, glucose 0.05 %, CaCl₂ 0.05 %, NaCl 2 %, distilled water 1000 ml, initial pH 8.0, 25 °C에서 46시간으로 결정되었다.

5. Olive oil의 지방산 변화

생성되는 lipase의 특성을 olive oil의 지방산 변화로써 알아보기 위하여 GC를 사용하여 분석하였으며 분석의 용의함을 위하여 major peak만을 분석 대상으로 삼았다. standard로써 사용한 Fig. 15는 olive oil의 peak로써 가장 큰 peak가 oleic acid이며 이 지방산은 C18:1의 불포화 지방산으로 보편적으로 olive oil의 약 55 % ~ 85 %를 차지하는 것으로 알려져 있다. Fig. 16은 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5를 접종한 후 24시간 이후의 peak로써 oleic acid의 retention time보다 앞선 시간대에 새로운 peak가 나타남을 알 수 있으며 Fig. 17은 접종 후 50시간 이후의 결과로써 두개의 새로운 peak가 나타나며 oleic acid의 peak는 현저히 줄어

를 알 수 있다. retention time 12분대의 peak는 분석 결과 palmitic acid (C16:0)로 밝혀졌고 11분대의 peak는 myristic acid (C14:0)인 것으로 나타났다. 결과적으로 Table 5에서 보는 바와 같이 *Pseudoalteromonas* sp. KY 5가 생성하는 lipase는 olive oil의 oleic acid를 분해하여 50시간 후에는 78 %에 달하는 palmitic acid와 13 %의 myristic acid를 생성하였다. 이러한 결과는 oleic safflower oil (75 % oleic acid와 20 % linoleic acid 함유)을 *Rhisopus delemar* lipase로 에스테르 교환 반응시켜 분석하여 40 %의 palmitic acid를 생성한 실험 결과 (장, 1987)에 비하면 *Pseudoalteromonas* sp. KY 5 lipase가 oleic acid에 높은 특이성을 가지며 palmitic acid 생성이 우수함을 알 수 있다. 또한, oleic acid에 고도의 특이성을 가졌다고 알려진 *Geotricbum candidum* lipase의 경우에도 73 % oleic acid를 함유한 olive oil을 기질로 사용하여 3일동안 반응시킨 결과 8 %의 oleic acid만을 이용 (Macrae, 1983)한데 비하여 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 lipase가 훨씬 높은 oleic acid에 대한 기질 특이성을 보이고 있음을 알 수 있다.

이렇게 생성된 지방산들 중 palmitic acid의 경우 1995년 이전에는 순도가 떨어지는 70 % 이하의 제품으로 판매용이 아닌 자가소비용으로만 생산되었으며 그 이후 국내에서 생산이 중단되어 전량 수입에 의존하고 있고 현재 국내 소비의 70 %가 화장품용으로 사용되며 나머지는 대부분 세제용으로 사용되고 있다. myristic acid는 계면화성제의 원료로 사용되고 있는 지방산으로 순도 98 % 이상의 정제 팜핵유 100 g에서 16.3 g으로 소량 생산되고 있으며 현재 국내에서는 전량 수입에 의존되고 있다.

이러한 결과로 볼 때 oleic acid를 palmitic acid와 myristic acid로 변환

시키는 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 lipase가 공업적인 사용에 있어서 유용한 기초 자료로 이용될 수 있으리라 생각된다.

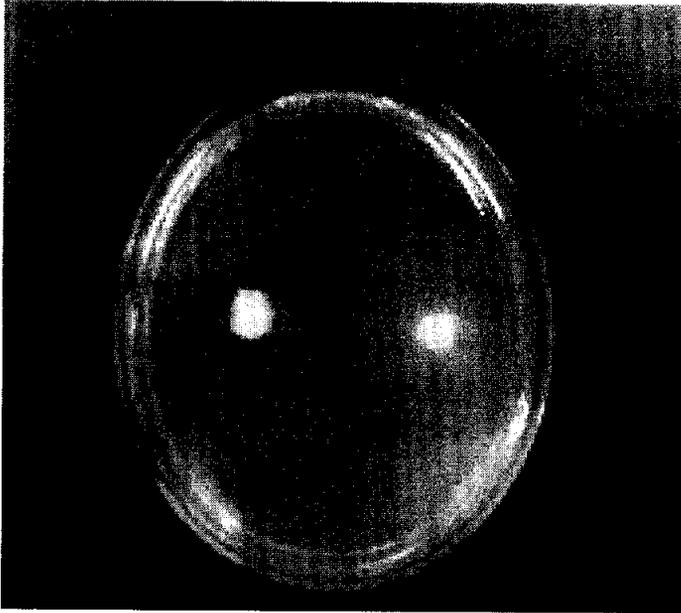


Fig. 4. Tween 80 agar plate assay for lipase activity.

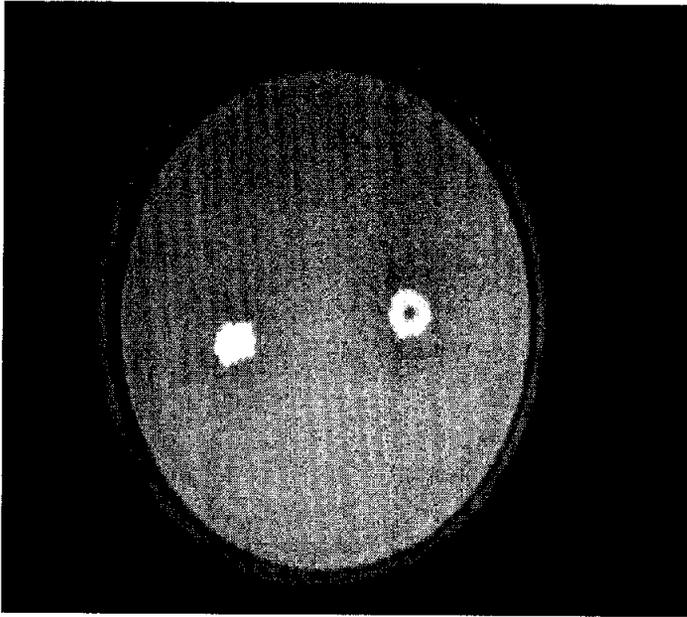


Fig. 5. Rhodamin B agar plate assay for lipase activity.

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAACAGAG

Pseudoalteromonas agarivorans ---AGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAACAGAA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 AGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCT

Pseudoalteromonas agarivorans AGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCT

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TGAGGTGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAA

Pseudoalteromonas agarivorans TGAGGTGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 GGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAGGTA

Pseudoalteromonas agarivorans GGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTAGGTA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT

Pseudoalteromonas agarivorans TGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT

Pseudoalteromonas sp. KY-5 GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGCAA

Pseudoalteromonas agarivorans GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATATTGCACAATGGCGCAA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 GCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGT

Pseudoalteromonas agarivorans GCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGT

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CAGGAGGAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCAC

Pseudoalteromonas agarivorans CAGGAGGAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCAC

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTA

Pseudoalteromonas agarivorans CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CTGGGCGTAAAGCGTACCGAGGGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC

Pseudoalteromonas agarivorans CTGGGCGTAAAGCGTACCGAGGGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CTGGGAAGTGCATTTGCAACTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGG

Pseudoalteromonas agarivorans CTGGGAAGTGCATTTGCAACTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGG

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGG

Pseudoalteromonas *agarivorans* TGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGG

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCTGGTAG

Pseudoalteromonas *agarivorans* TCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAG

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCCTGGCTCTGTTTTCAAAAGCTA

Pseudoalteromonas *agarivorans* TCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGAAGCTCGGAGCCCTGGCTCTGTTTTCAAAAGCTA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 ACGCATTAAAGTAGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC

Pseudoalteromonas *agarivorans* ACGCATTAAAGTAGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC

Pseudoalteromonas sp. KY-5 GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGATGCAACGGCAAGAACCTTAC

Pseudoalteromonas *agarivorans* GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGATGCAACGGCAAGAACCTTAC

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCCTCGGGAACTCTGATA

Pseudoalteromonas *agarivorans* CTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCCTCGGGAACTCTGATA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG

Pseudoalteromonas *agarivorans* CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG

Pseudoalteromonas sp. KY-5 AGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCG

Pseudoalteromonas *agarivorans* AGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCG

Pseudoalteromonas sp. KY-5 GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTC AAGTCATCATGCCCCTTACGTGTAAGGC

Pseudoalteromonas *agarivorans* GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTC AAGTCATCATGCCCCTTACGTGTAAGGC

Pseudoalteromonas sp. KY-5 TACACACGTGCTACAATGGCCATACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCA

Pseudoalteromonas *agarivorans* TACACACGTGCTACAATGGCCATACAGAGTGTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCA

Pseudoalteromonas sp. KY-5 CTTAAAGTGCCTCGTATGCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCG

Pseudoalteromonas *agarivorans* CTTAAAGTGCCTCGTATGCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCG

<i>Pseudoalteromonas</i> sp. KY-5	CTAGTAATCGCGTATCAGAATGATCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
<i>Pseudoalteromonas</i> <i>agarivorans</i>	CTAGTAATCGCGTATCAGAATGACGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC

<i>Pseudoalteromonas</i> sp. KY-5	CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTT
<i>Pseudoalteromonas</i> <i>agarivorans</i>	CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTT

<i>Pseudoalteromonas</i> sp. KY-5	TACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCCTAGGGGAACCTG
<i>Pseudoalteromonas</i> <i>agarivorans</i>	T-CCACGGAGT-ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGG-----
	* *****

Fig. 8. Alignment of 16S rRNA sequence of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 and *Pseudoalteromonas* *agarivorans*.

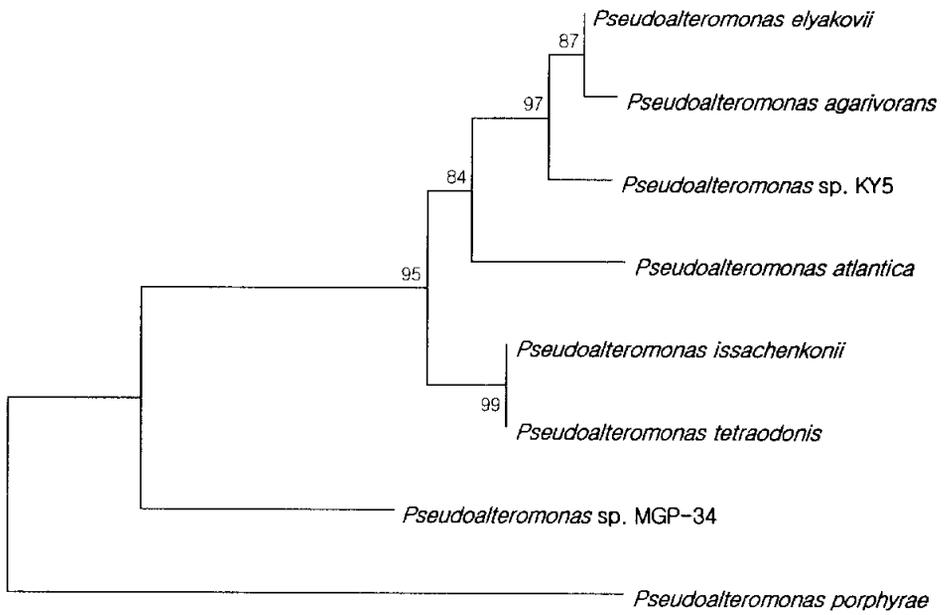


Fig. 9. Phylogenetic tree of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5.

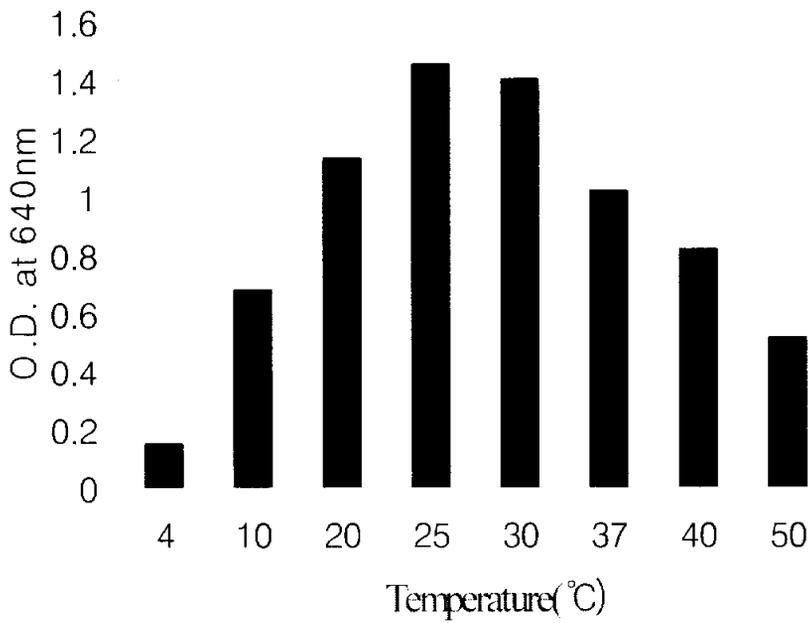


Fig. 10. Effects of temperature on the growth of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 in PPES II medium (pH 7.5, 3% NaCl).

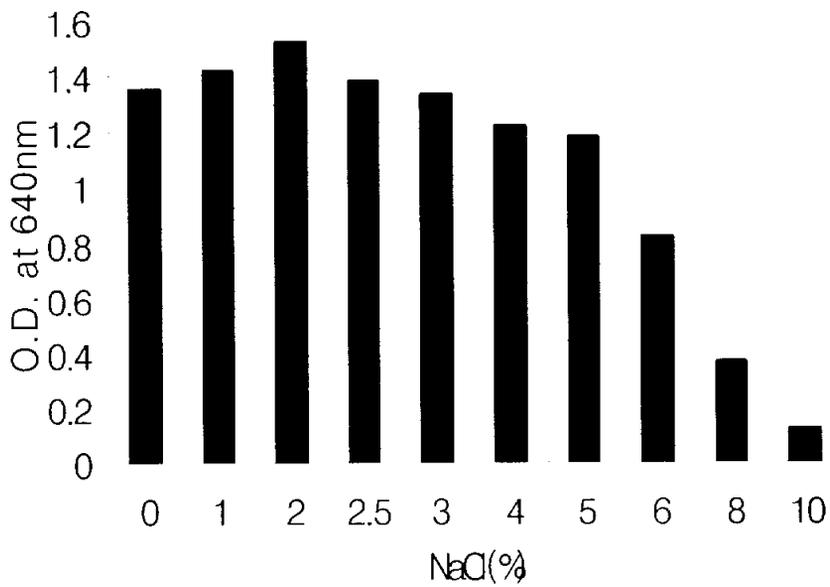


Fig. 11. Effects of NaCl on the growth of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 in PPES II medium (25°C, pH 7.5).

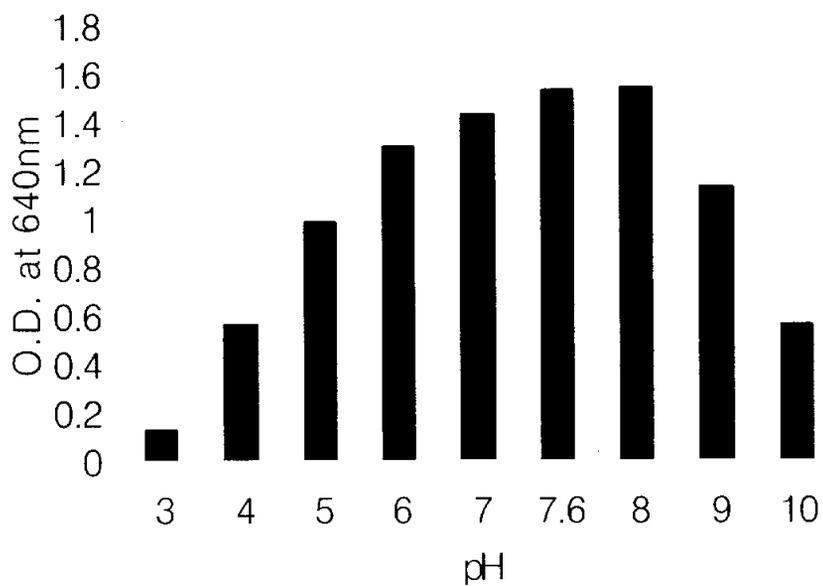


Fig. 12. Effects of initial pH on the growth of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 in PPES II medium (25°C, 3% NaCl).

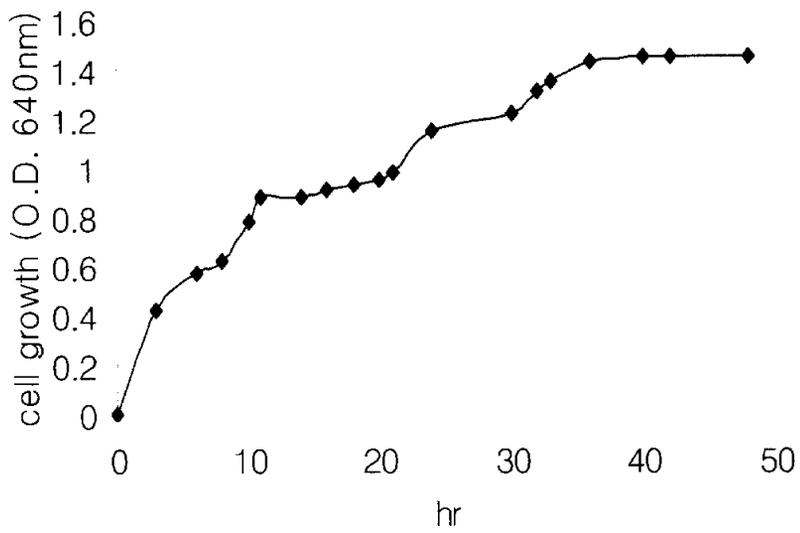


Fig. 13. Growth curve of *Pseudoalteromonas* sp. KY 5 at optimum culture conditions (25°C, pH 8.0, NaCl 2%).

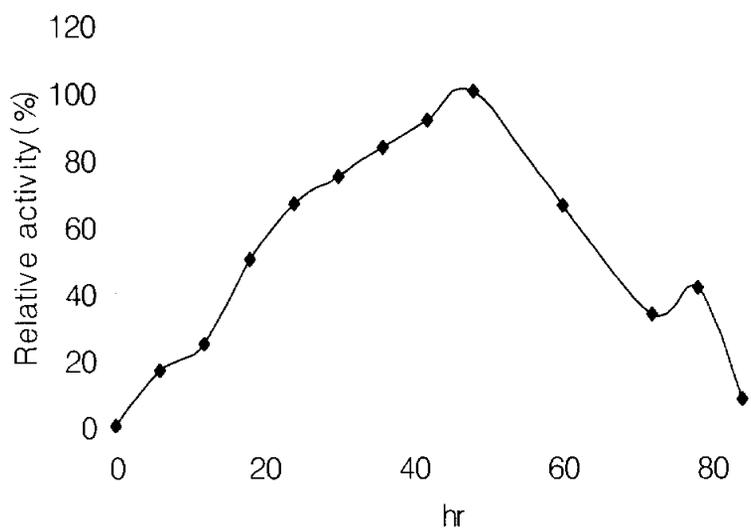


Fig. 14. Lipase production during cultivation of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 in the shaking culture.

Table 2. Effect of carbon source on the production of lipase by *Pseudoalteromonas* sp. KY-5

Carbon source (0.1 %)	Relative activity (%)
Glucose	7.3
Lactose	18.9
Sucrose	65.1
Soluble starch	100.0
Galactose	58.4
Glucose+Soluble starch	100.0
None	85.2

Table 3. Effect of organic nitrogen source on the production of lipase by *Pseudoalteromonas* sp. KY 5

Organic nitrogen source (0.1 %)	Relative activity (%)
Peptone	81.6
Tryptone	72.2
Soytone	19.0
Yeast extract	89.4
Nutrient broth	42.9
Peptone + Tryptone	100.0
Soytone + Peptone	21.9
None	90.8

Table 4. Composition of modified PPES-II medium for lipase production

components	concentration
Peptone	0.1 %
Tryptone	0.1 %
Yeast extract	0.1 %
Olive oil	1.5 %
Soluble starch	0.05 %
glucose	0.05 %
CaCl ₂	0.05 %
NaCl	2 %
Distilled water	1000 ml
pH	8.0

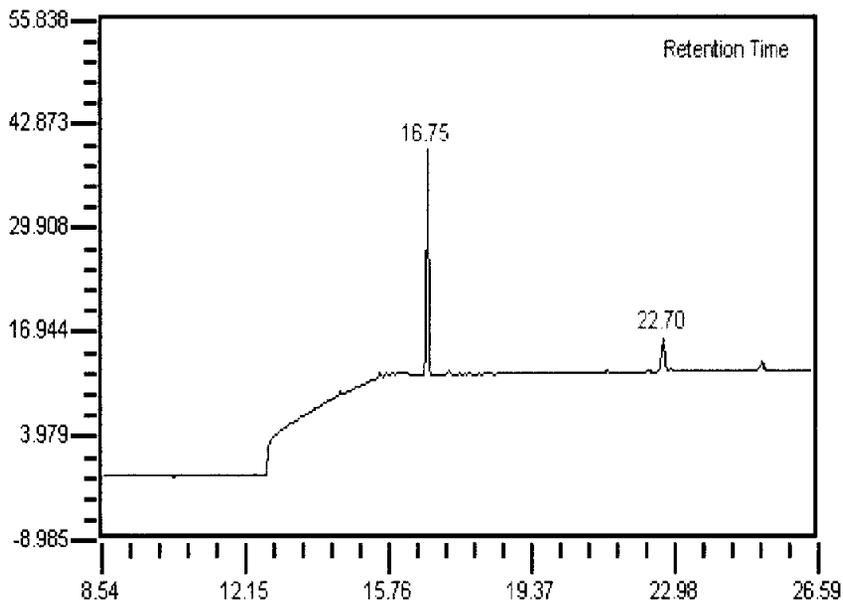


Fig. 15. GC separation of hydrolysis of triglyceride in organic - aqueous two phase system by whole cell of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 as a source of lipase. Analysis was performed on a HP-1 column. Temperature was programmed from 110 to 300 °C at 15 °C/min (0 hr).

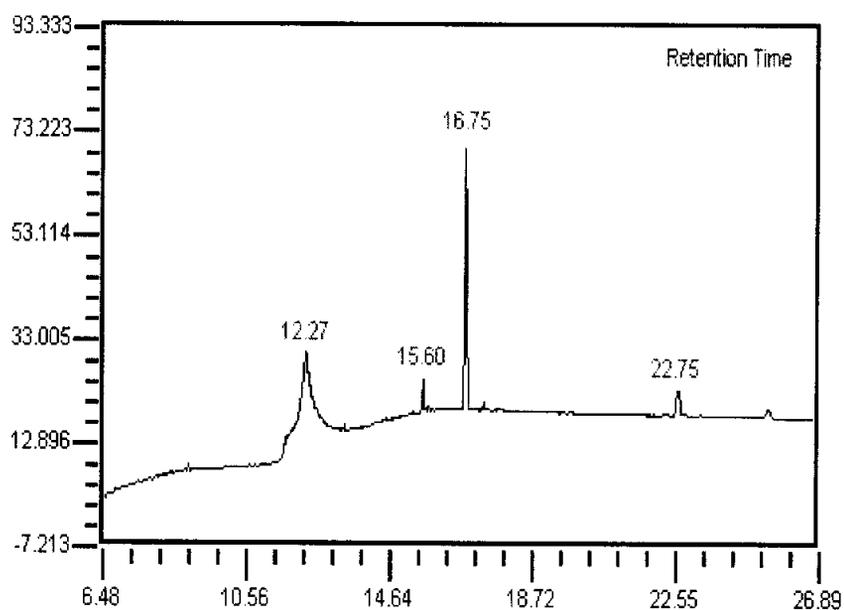


Fig. 16. GC separation of hydrolysis of triglyceride in organic - aqueous two phase system by whole cell of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 as a source of lipase. Analysis was performed on a HP-1 column. Temperature was programmed from 110 to 300 °C at 15 °C/min (24 hr).

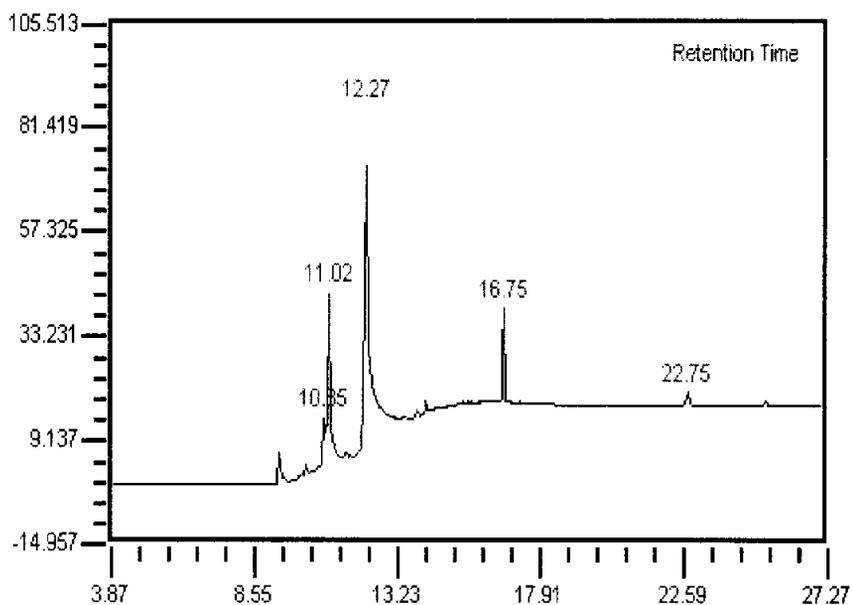


Fig. 17. GC separation of hydrolysis of triglyceride in organic - aqueous two phase system by whole cell of *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 as a source of lipase. Analysis was performed on a HP-1 column. Temperature was programmed from 110 to 300 °C at 15 °C/min (50 hr).

Table 5. Changes in triacylglycerol content in fractions of lipase catalysed olive oil in two phase system, using lipase from *Pseudoalteromonas* sp. KY-5

	RT	Area	Height	Area%
0 hr	16.753	28108	3.273	86.812
	22.703	4270	0.912	13.188
24 hr	12.265	9155	2.473	12.674
	15.600	6900	0.471	9.552
	16.752	50386	4.250	69.752
	22.749	5795	0.866	8.022
50 hr	11.018	37985	5.419	13.294
	12.265	58427	7.391	77.855
	16.747	21968	1.897	7.688
	22.752	3323	0.551	1.163

IV. 결 론

통영, 여수, 다대포, 광안리 및 부산 연안에서 분리한 250여종의 균주 중 두 차례에 걸친 screening으로 최고 활성을 보이는 한 균주를 선택하여 16S rRNA를 이용한 염기서열 분석을 통해 동정한 결과 *Pseudoalteromonas*속으로 밝혀져 이를 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5라고 명명하였다.

1.5 % olive oil을 첨가한 modified PPES-II 상에서의 최적 배양조건은 peptone 0.1 %, tryptone 0.1 %, yeast extract 0.1 %, olive oil 1.5 %, soluble starch 0.05 %, glucose 0.05 %, CaCl₂ 0.05 %, distilled water 1000ml, initial pH 8.0, 25 °C에서 46시간으로 최적조건 하에서의 배양 시 최적 lipase 생산량을 보였다. lipase 활성에 대한 온도와 pH의 영향을 살펴보았을 때 온도는 10~40 °C까지 50 %이상의 활성을 유지하였고, pH 6에서 pH 10까지 비교적 안정한 pH 범위를 가지고 있었다.

Pseudoalteromonas sp. KY-5 유래의 lipase의 기질 특이성을 olive oil의 지방산 변화를 통해 관찰하기 위하여 접종 후 시간별로 변화를 살펴보았다. 그 결과 *Pseudoalteromonas* sp. KY-5 유래의 lipase는 기질로 사용한 olive oil 내의 87 %를 차지하는 oleic acid를 분해하여 78 %의 palmitic acid와 13 %의 myristic acid를 생성함을 관측 할 수 있었다. 이는 타 미생물 유래의 lipase에 비하여 oleic acid에 대한 기질 특이성이 현저히 높은 특징을 나타내는 것으로 판단되며, 생성된 대량의 palmitic acid의 공업적 이용에 있어 기초자료가 될 수 있으리라 사료된다.

V. 감사의 글

먼저, 부족함이 많은 저에게 항상 관심과 충고를 아끼지 않으신 이원재 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 일정 속에서도 논문을 검토해주신 이명숙 교수님과 김영태 교수님께도 감사의 인사를 드립니다. 늘 지켜봐 주시고 관심어린 충고를 아끼지 않으셨던 이훈구 교수님, 김진상 교수님, 송영환 교수님, 최태진 교수님께도 감사를 드립니다.

많은 시간을 함께했던 해미방 식구들에게 진심으로 고마운 마음을 전합니다. 미숙하기 짝이 없는 후배를 오랫동안 친절히 도와주신 대성 선배, 동생처럼 친구처럼 지내며 항상 힘을 주었던 혜영이와 윤숙이, 힘으로 많이 도와주었던 동욱이^^, 활기를 더해준 희영이, 많이 도와준 지현이, 사랑스런 후배 현연이, 듬직하고 굿은일 마다하지 않고 도와준 기원이, 귀여운 민이..... 모두들이 없었으면 끝까지 해내지 못했을지도 모릅니다. 좋은 선후배님들을 만나 정말 즐거웠고 감사한 마음 뿐입니다. 그리고 졸업후에도 못난 후배 걱정해주신 용운 선배님과 경석 선배님께도 감사드립니다. 어려울 때마다 도와주신 지희 언니를 비롯한 7호관 3, 4층의 모든 미생물학과 실험실 식구들에게 감사의 말씀을 드립니다.

석사 기간 내내 저를 걱정해주고 힘을 준 한라산 동아리 선후배님과 8년지기 동기들에게도 항상 감사한 마음뿐입니다. 그리고 언제나 변함없이 격려해준 계원들^^ 동연이, 영숙이, 수민이, 종숙이, 효영이, 희재에게도 고맙다는 말 전하며 또한, 힘든 레지던트 생활하면서도 투정부리는 친구에게 많은 위로를 해준 민경이에게도 감사하며 좋은 의사가 될거라 믿습니다.

10년이 넘게 곁을 지켜주며 도와준 옥순이와 물리적으로 멀리 떨어져 있지만 마음만은 언제나 같이 있는 사랑하는 혜영이, 항상 그리운 두진이에게 언제나 지금과 같은 사랑으로 감사의 마음을 대신 하겠습니다.

마지막으로 제가 끝까지 포기하지 않도록 격려해주시고 믿어주신 세상에서 가장 사랑하고 존경하는 부모님과 언제나 의지하고 고마운 동생들 은미, 인수, 진수에게 제 작은 결실을 바칩니다.

VI. 참고문헌

장관식, 유지화학, 1997, 서울산업대학교 출판부

Brune, K. A., Gots, F. 1992. Degradation of lipids by bacterial lipases. *Microbial degradation of natural products*. 243-266

Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, D. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenbura, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S., A., Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex. *Nature*. 351, 491-494

Desnuelle, P. 1972. The Lipases. In P.D. Boyer(ed). *The Enzymes*. vol. 7, Academic press. New York and London. 575 616

Gaëlle Pencreac'h and Jacques C. Baratti, 1996. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and microbial technology*, 18, 417-422.

Graeme N. Jarvis, Jurgen H. Thiele, 1997. Qualitative Rhodamine B assay Which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately

anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 29, 41-47.

Hjirth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G. G., Thim, L., Verger, R., 1993. *Biochemistry*, 32, 4702-4707.

Kosugi, Y., Suzuki, H., Funada, T. 1988. Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas sp.* *Biotechnology Bioengineering*, 31, 349-356

Kouker, G., Jaeger, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Applied and environmental microbiology* 53, 211-213

Kwon Dae Y. and Rhee Joon S, 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63, 89-92

Kwon Seok Joon, Lee Seoung Yong, Cho Sang Woo and Rhee Joon Shick. 1993. A rapid gas chromatography method for quantitation of free fatty acids, monoacyl-, diacyl-, and triacylglycerols without derivatization. *Biotechnology Techniques*. 7, 727-732

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685
- Lee, S. Y., Rhee, J. S. 1994. Detection and determination of lipase activity. *Journal of microbiology and biotechnology*. 4, 85-94
- Lowry, R. R. and I. J. Tinsley. 1976. Rapid colorimetric determination. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 53, 470-476
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 60. 291-294
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K., 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1258, 272-276.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., Cambillau, C., 1992. *Nature*, 356, 615-618.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., and D. M. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through RFLP distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an

active, hydrothermal vent, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Env. Microbiol.* 60, 871-879

Robert G. Jensen, 1983. Detection and determination of lipase from various sources. *Lipids*, 18, 650-657

Samad, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. M. Z. W., Ampon, K. and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods*. 9, 51-56

Seong C. S. 1997. Identification of microorganism responsible for anaerobic degradation of pentachlorophenol using RFLP analysis of PCR amplified 16S rDNAs. Ph. M. thesis, Inje Univ.

Shelley, A. W., Deeth, H. C., and MacRae, I. C., 1987. Review of methods of enumeration, detection, and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *J. Microbiol. Methods*, 6, 123-137.

Shuen Fuh Lin, Chien ming Chiou, Chuan-Mei Yeh, Ying-Chieh Tsai. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and environmental microbiology*, 62, 1093-1095.

Godfresy T., West S., 1996. Industrial enzymology, ed. N.Y. Macmillan Press.

Van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Canbillau, C. 1993. Interfacial activation of the lipase procolopase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 362, 814-820

Winkler, U. K., Stuckmann, M. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 138, 663-670

Wirth, S. J. 1992. Water soluble, Dye-labelled fatty acid derivatives for preliminary detection of lipolytic microorganisms in agar media. *FEMS Microbiol. Lett.*, 95, 77-80.

Yamamoto, K., Fujiwara, N. 1988. Purification and some properties of a castor oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas sp.* *Agricultural Biological chemistry*. 52, 3015-3021