Evaluation of the Potential of Organic Solvent Tolerant *Bacillus* sp. BCNU 5005Hye Jung Choi¹, Min Jung Hwang², Young-Kee Jeong³ and Woo Hong Joo^{1,2*}¹Interdisciplinary Program in Biotechnology and ²Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea³Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received February 4, 2011 / Accepted March 6, 2011

Using enrichment procedures, we isolated organic solvent-tolerant *Bacillus* sp. BCNU 5005 from waste water and soil in the Ulsan industrial plant region. BCNU 5005 had a maximum similarity of 98% with *B. subtilis* and was designated as *B. subtilis* based on phylogenetic analyses using 16S rDNA sequences. Generally, most bacteria and their enzymes are destroyed or inactivated in the presence of high concentrations of organic solvents. However, the lipase activity of *B. subtilis* BCNU 5005 was very stable in the presence of various kinds of solvents (25%, v/v) except chloroform, ethylbenzene and decane. Furthermore, BCNU 5005 was determined to have a degradative ability towards organic solvents. This organic solvent tolerant *Bacillus* sp. BCNU 5005 could be used as a new potential resource for biotransformation and bioremediation.

Key words : *Bacillus* sp. BCNU 5005, organic solvent tolerant bacteria, organic solvent tolerant lipase, degradative ability

서론

방향족 화합물을 포함한 유기용매는 석유·화학관련 산업, 농업, 생활 폐수 등에서 발생하는 주요 오염물질로 화학적 발암성분들을 다수 포함하고 있어 인간에게 심각한 위협이 되고 있다. 이들 방향족 화합물을 포함하는 유기용매들은 물리·화학적으로 안정하기 때문에 하천 및 토양 중에 유입되면 잘 분해되지 않고 환경에 축적되는 성질을 가지고 있어 고등생물의 생식력을 감퇴시키고, 돌연변이와 기형을 유발하며 내분비 교란물질로 작용하여 생체 내 대사에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[1,3,17]. 그러므로 이들 물질의 생물학적 처리는 인류의 생존에 필수적이다.

Toluene을 포함한 다양한 유기용매는 0.1% (v/v)의 저농도에서 대부분의 미생물 세포를 비롯한 모든 세포들을 구조적·기능적으로 손상시킬 수 있는 강한 독성을 나타낸다. 그러나 1989년 이후로 고농도 유기용매에서 내성을 나타내는 미생물들이 분리 보고되고 있으며[9,21], 현재는 이런 유기용매 내성미생물의 산업적 활용도를 높이려 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 다양한 종류의 고농도 유기용매에 대해 내성을 가진 미생물은 방향족 화합물을 포함한 난분해성 물질을 분해하여 새로운 bioreactor로써 사용이 가능하며 특히 환경공학, 발효공업 및 효소산업에서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

현재 산업적으로 사용되고 있는 대부분의 효소는 수용액하에서 사용되며 유기용매에 내성이 없는 효소이다. 용매로써의

물은 가수분해, 아실기의 전이, 수산화이온의 친핵적 첨가 등의 원하지 않는 부반응으로 인해 대부분의 화학적 변환에 있어서 그다지 좋은 반응매체가 되지 못하며, 효소반응 대상인 지방, 오일, 방향족화합물, 스테로이드 등 많은 유기화합물은 수난용성이다[16]. 따라서 지용성 또는 수난용성 화합물의 생화학적 변환에서 이러한 난점을 극복하고자 유기용매 하에서의 효소반응에 대한 연구와 다양한 생체촉매의 탐색과 개발에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다[11,20]. 유기용매에서의 효소반응으로 가장 많이 연구되고 있는 lipase는 수계에서는 불가능한 transesterification, esterification, aminolysis, thioesterification 등의 반응을 촉매하며, 최근에는 lipase의 transesterification 기능을 이용한 새로운 ester 화합물의 합성과 이들 물질을 합성하는데 있어서의 가장 유리한 유기용매계의 선택 및 반응계의 제반조건 등에 대한 연구가 다양하게 행해지고 있다[8,12,22,24]. 현재 산업적으로 활용되고 있는 lipase 생성균주로는 *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Pseudomonas* sp. 등이 있으며, 그 중에서도 *Pseudomonas* sp. 균주가 생산하는 lipase가 광범위하게 사용되고 있다[2,4,10,15,26]. 또한 유기용매 내성 효소의 탐색과 이용도 산업적으로 매우 중요한 과제로서 집중적인 연구가 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 울산공단 일대의 폐수 및 토양에서 유기용매 내성을 나타내는 균주를 분리하였고, 아직 보고가 미흡한 유기용매 내성 세균인 *Bacillus* sp. 균주에 대해 다양한 유기용매에 대한 내성 등 기본적인 조사를 실시하였다. 그리고 그 용용성을 검증하기 위하여 온도, pH, 금속이온, 유기용매 등 여러 환경인자들이 lipase에 미치는 영향과 각종 물질의 분해능력을 조사함으로써 *Bacillus* sp. BCNU 5005 균주의 산

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

업적인 이용 가능성에 대해 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

유기용매 내성 세균의 분리 및 lipase 생성 균주 선별

유기용매 내성세균을 분리하기 위해 울산공단 일대의 폐수 및 토양을 채취하여 nutrient broth (NB) 등의 분리배지에 10% (v/v) *n*-hexane을 첨가한 후 25℃에서 농화배양을 실시하였다. *n*-Hexane에 대해 내성이 있는 균을 1차 선별하였고, 10% toluene을 첨가하여 25℃에서 48 시간 동안 배양하여 toluene에 내성이 뛰어난 균주를 2차 선별하였다. 유기용매 내성균주의 lipase 생산여부를 확인하기 위해서 기질인 1% (w/v) tributyrin이 첨가된 nutrient agar (NA) 배지 등 분리배지에 균을 접종하여 37℃에서 24-48시간 배양 후 투명한 생성여부를 관찰하였다.

생리, 생화학적 특성 및 형태학적 특성 조사

유기용매 내성이 뛰어난 균주에 대해 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [18]에 준하여 생리, 생화학적 특성을 조사하였고, 정확한 동정을 위하여 forward primer (5' AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3')와 reverse primer (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3')를 사용하여 16S 리보솜 DNA를 증폭하였으며 그 염기서열을 분석하였다. 나아가 염기서열의 유사도를 조사하였고 계통수는 neighbor joining 법과 bootstrap 분석에 의거하여 작성하였다.

유기용매 내성 및 분해능 조사

유기용매에 대한 내성 조사를 위해 균이 접종된 NA 평판배지에 11종의 다양한 유기용매를 overlay하여 37℃에서 48-96 시간 동안 정치배양하였고, 유기용매에 대한 분해능 조사는 최소배지인 minimum salts medium (MSM; 0.715 g Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0.365 g KH₂PO₄, 0.5 g (NH₄)₂SO₄, 0.1 g MgSO₄ · 7H₂O, and 0.5% trace elements solution (0.88 g Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 0.2 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.01 g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.01 g H₃BO₃, 0.01 g CoSO₄ · 7H₂O, 0.01 g CuSO₄ · 5H₂O, 0.004 g MnSO₄ · H₂O, 0.004 g Ni(NO₃)₂ · 6H₂O, 0.003 g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.002 g Na₂WO₄ · 2H₂O, 0.05 N H₂SO₄)를 사용하였다. Duham tube를 이용하여 다양한 유기용매 및 난분해성 물질을 유일한 탄소원으로 첨가하였고 37℃에서 48-96시간 동안 정치배양한 뒤 생존유무로 분해능 여부를 확인하였다.

조효소액 조제

NB 배지에서 37℃에서 24시간 진탕 배양하여 얻은 배양액을 원심분리 (10,000× g 15 min)한 후, 배양 상등액을 membrane filter (0.22 μm)로 여과 한 후 조효소액으로 사용하였다 [7].

Lipase 활성도 측정

Lipase의 활성은 기질인 *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)를 사용하여 측정하였다[25]. 즉, 조효소액에 50 mM *p*NPP 10 μl과 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 8) 0.9 ml을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 조효소액을 첨가하지 않은 용액을 대조구로 사용하였다.

효소활성은 *p*NPP로부터 1분 동안 1 μmol의 *p*-nitrophenol (*p*NP)을 생산하는데 관여하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

효소의 온도와 pH 안정성 조사

조효소액의 온도 안정성을 조사하기 위하여 조효소액과 기질, 완충액을 혼합한 효소혼합액을 30, 40, 50, 60, 70℃에서 1 시간 반응시킨 후 410 nm에서 잔존 효소 활성을 측정하였다. 또한 조효소액의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.1 M sodium acetate (pH 4-5), 0.1 M potassium phosphate (pH 6-7), 그리고 0.1 M Tris-HCl (pH 8-10) 완충액을 사용하여 37℃에서 24 시간 반응한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 양성대조구로 고정화 리파아제인 novozyme 435 (Novozyme, Denmark)를 사용하여 효소의 안정성을 비교하였다.

효소의 유기용매 안정성 조사

유기용매에 대한 조효소액의 안정성은 benzene, toluene, xylene, *n*-hexane 등 각종 유기용매를 사용하여 확인하였다 [19]. 조효소액에 25% (v/v) 농도의 유기용매를 첨가하여 37℃에서 150 rpm으로 2시간 진탕시킨 후 조효소액을 채취하여 잔존 효소활성을 측정하였다. 양성대조구로 novozyme 435를 사용하여 유기용매에 대한 효소의 안정성을 비교하였다.

효소 활성에 대한 금속이온 영향 조사

금속이온에 대한 효소활성도의 영향을 측정하기 위해 다양한 금속이온(CaCl₂, FeCl₃, CuCl₂, MgSO₄, BaCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnSO₄, MnCl₂, KCl, NH₄Cl 및 NaCl)를 사용하여 확인하였다 [13]. 조효소액과 1 mM의 금속이온을 37℃에서 1시간 전반응시키고 기질을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 410 nm에서 잔존 효소활성을 조사하였다.

결 과

유기용매 내성세균 및 효소 생산 균주의 분리

울산공단 일대의 폐수 및 토양시료에서 toluene에 내성을 가진 균주 10여 종을 분리하였으며, 선별된 균주를 대상으로 tributyrin이 함유된 NA 배지에서 lipase 효소 생산여부를 확인하였다. 고농도의 toluene이 포함된 환경에서 생장률이 뛰어나며 lipase를 생산하는 균주를 선별하여 BCNU 5005로 명명하여 본 실험에 사용하였다.

생리, 생화학적 특성 및 분자진화적 동정

BCNU 5005 균주의 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과, 그람양성으로 25-70°C에서 생육가능하였으며, pH 4에서 9까지 넓은 pH범위에서 생육가능함이 확인되었다. 또한 amylase, protease, lipase, urease 그리고 lecithinase를 생산하는 것으로 확인되었고(Table 1), 16S 리보솜DNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus subtilis*와 98% 상동성을 가진 것으로 나타났으며 계통학적으로도 *Bacillus subtilis* 그룹에 속함이 확인되었다(Fig. 1).

Bacillus sp. BCNU 5005의 유기용매 내성 및 분해능

유기용매의 독성을 나타내는 일반적인 지표로 사용되는 log Pow 값이 3.9-0.8 사이의 다양한 유기용매에 대한 내성을 조사한 결과, propylbenzene, *o*, *m*, *p*-xylene 그리고 toluene을 포함한 log Pow 값이 3.9-2.5 사이의 다양한 유기용매에 대해 내성을 나타내었다(Table 2). 또한 최소배지에 유기용매 및 난분해성 물질을 첨가하여 균의 생존여부로 확인하는 분해능 실험 결과 anthracene, dibenzothiophene, naphthalene, nitrobenzene 그리고 toluene을 첨가했을 때 분해능이 우수함을 확인할 수 있었다(Table 3).

Lipase의 안정성 및 활성에 미치는 유기용매의 영향

다양한 유기용매에 대한 효소의 안정성을 조사하기 위하여

Fig. 1. A phylogenetic tree of the organic solvent-tolerant *Bacillus* sp. BCNU 5005 and closely related species.

Table 1. Physiologocal and biochemical characteristics of BCNU 5005

Characteristics	
Gram reaction	+
Culture Characteristics	
Growth temperature (25-37°C)	+
Growth pH (4-9)	+
Growth NaCl (2-7%)	+
Assimilation of	
mannose	+
mannitol	+
fructose	+
lactose	-
glucose	+
galactose	-
Production of	
amylase	+
protease	+
lipase	+
gelatinase	+
catalase	-
urease	+
oxidase	-
lecithinase	+
methyl red reaction	-
nitrate reduction test	-

(+: positive, -: negative)

Table 2. Organic solvent tolerance of *Bacillus* sp. BCNU 5005

Solvent	log Pow	<i>Bacillus</i> sp. BCNU 5005
<i>n</i> -Hexane	3.9	+
Propylbenzene	3.6	+
Cyclohexane	3.2	+
<i>o</i> -Xylene	3.1	+
<i>m</i> -Xylene	3.1	+
<i>p</i> -Xylene	3.1	+
Toluene	2.5	+
Benzene	2.0	-
Chloroform	2.0	-
Phenol	1.5	-
<i>n</i> -Butanol	0.8	-

25%의 고농도 유기용매를 첨가한 뒤 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 toluene, cyclohexane, butanol 그리고 octane을 첨가했을 때 각각 140%, 108%, 111%, 128%로 효소활성이 증가한 것으로 나타나 고정화 리파아제인 novozyme 435보다 *Bacillus* sp. BCNU 5005가 생산하는 lipase가 더 안정함을 알 수 있었다. 그러나 chloroform, ethylbenzene 및 hexane을 첨가했을 때는 효소안정성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Table 3. Biodegradative potential of *Bacillus* sp. BCNU 5005

Solvent	<i>Bacillus</i> sp. BCNU 5005
Anthracene	++++
Benzene	-
Benzene sulfonic acid	-
Dibenzothiophene	+++
<i>p</i> -Dichlorobenzene	-
Diphenyl	-
Monochloroacetic acid	-
Naphthalene	++++
1-Naphthalene sulfonic acid	++
4-Nitrophenol	++
Nitrobenzene	++++
Pentachlorophenol	-
Phenanthrene	+
Phenolphthalein	+++
Toluene	++++

Fig. 2. Effect of organic solvent on the lipase stability. The lipase activity of the non-solvent containing control was taken as 100%.

Bacillus sp. BCNU 5005가 생산하는 lipase 활성에 미치는 온도의 영향

효소 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해서 30-70°C까지의 넓은 온도 범위에서 실험한 결과, 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 30°C와 50°C에서도 각각 잔존활성이 53%, 71%로 비교적 높은 효소활성을 유지함이 조사되었다 (Fig. 3).

Lipase 활성에 미치는 pH의 영향

pH 변화에 따른 lipase 활성을 조사하기 위해 다양한 pH 범위의 완충액을 사용하여 측정된 결과 *Bacillus* sp. BCNU 5005는 pH 8에서 가장 높은 활성을 나타냈고, pH 5-7에서 80% 이상의 높은 효소활성을 보였으며, pH 4에서도 70% 정도의 효소 활성을 나타내었다(Fig. 4).

Lipase 활성에 미치는 금속이온의 영향

다양한 금속이온을 첨가하여 효소 활성에 미치는 영향을

Fig. 3. Effect of temperature on lipase activity. The diluted cell-free supernatant was incubated with the substrate at different temperatures. The activity (7.39 U/ml) at 37°C was taken as 100%.

Fig. 4. Effect of pH on the lipase stability. The remained activity was measured by incubating enzyme with the substrate at different pH values.

Table 4. Effect of metal ions on the lipase activity of BCNU 5005

	Relative activity (%)
None	100
CaCl ₂	79.16
CuCl ₂	117.02
FeCl ₃	113.43
MgSO ₄	109.24
BaCl ₂	75.13
HgCl ₂	89.91
NiCl ₂	63.74
ZnSO ₄	61.68
MnCl ₂	47.88
KCl	104.06
NH ₄ Cl	117.19
NaCl	83.64

측정된 결과, CuCl₂, FeCl₃, MgSO₄, KCl 그리고 NH₄Cl를 첨가했을 때 1-1.2배 높은 활성을 보였으며, CaCl₂, HgCl₂, ZnSO₄ 등을 첨가했을 때는 효소활성이 저해를 받는 것으로 나타났

다. 특히 $MnCl_2$ 에 의해 lipase의 활성이 가장 떨어지는 것으로 나타났다(Table 4).

고 찰

산업적으로 유기용매에 내성을 가지는 미생물과 그 효소에 의한 생물전환 및 생물복구에 대한 기술개발이 꾸준히 요구됨에 따라 고농도의 유기용매에서 생육할 수 있는 미생물의 탐색과 기능해석 및 산업적 응용 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 유기합성 공업에는 주로 미생물이나 동물기원의 효소가 이용되고 있으며, 이들 미생물들은 유기용매 내에서 생존이 어렵거나 사멸하므로 고정화시키는 것이 일반적이다. 그러나 유기용매 내성세균으로 대체하면 이러한 고정화 비용 및 효소 사용비용을 절감할 수 있고 균주의 회수와 재이용이 가능하므로 유기용매 내성 세균과 그 효소는 새로운 생체촉매로서 높은 이용가치를 갖는다.

본 연구에서는 울산공단 일대의 폐수 및 토양에서 유기용매 내성 세균을 새롭게 분리하였으며, *Bacillus* sp. BCNU 5005의 난분해성 물질의 분해능력과 생산하는 lipase의 여러 가지 효소학적 특성에 대해 조사하였다. 균주가 생산하는 lipase는 고정화 리파아제인 novozyme 435와 비교했을 때 유의하게 37°C, pH 8에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 온도 30-50°C, pH 4-7, 9범위에서도 최고활성의 70% 이상의 활성이 있는 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. RN2는 45°C, pH 9가 최적조건이나 효소 활성은 약 60%로 나타났으며[14], *Bacillus cereus* C71과 *Pseudomonas* sp. M-37은 각각 33°C, pH 9, 55°C, pH 9에서 높은 활성을 나타냈으나, 그 외 조건에서 효소활성이 급격히 떨어지는 것으로 보고되었다[5,23]. 이에 비하여 *Bacillus* sp. BCNU 5005가 생산하는 lipase는 비교적 넓은 온도와 pH범위에서도 효소 안정성이 있음이 확인되었다. BCNU 5005 균주는 hexane, propylbenzene, xylene 및 toluene을 포함한 다양한 유기용매에 대해 내성을 나타내었으며, 특히 독성이 강한 toluene에서는 빠른 생육속도를 보였다. 또한 anthracene, dibenzothiophene, naphthalene, 1-naphthalene sulfonic acid, 4-nitrophenol 및 nitrobenzene 등 다양한 난분해성 물질을 분해하는 것으로 확인되었다.

각종 금속이온에 대한 영향은 $CuCl_2$, $FeCl_3$, $MgSO_4$, KCl , NH_4Cl 를 첨가했을 때 대조군에 비해 1-1.2배 높은 효소활성을 나타내어 대부분의 금속이온에 크게 영향을 받지 않는 것으로 조사되었다. *Bacillus* sp. RN2는 연구에서 KCl , $CuCl_2$, $ZnCl_2$ 를 첨가했을 때 효소활성이 증가했으나, 대부분의 금속이온이 대조군에 비해 활성이 다소 떨어진다고 보고한 바 있다[14]. 또한 butanol, cyclohexane, toluene 그리고 octane을 첨가했을 때 효소활성이 100% 이상으로 고농도의 유기용매하에서도 안정성이 뛰어났다. *B. sphaericus*는 정제된 lipase의 경우 n-butanol과 toluene을 첨가했을 때 효소 안정성이 각각 23%, 40%로

떨어졌으며[23], 대부분의 유기용매에 대해 효소활성이 떨어진 *Staphylococcus saprophyticus*와 비교했을 때[6] BCNU 5005는 선택적으로 대조군에 비해 효소 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

유기용매 내성 lipase를 생산하는 *Bacillus* sp. BCNU 5005는 비교적 넓은 온도와 pH 범위, 다양한 유기용매 및 금속이온 하에서 안정한 효소활성을 가졌으며, 현재 산업적으로 사용하고 있는 고정화 리파아제인 novozyme 435와 비교했을 때도 비교적 안정한 효소활성을 가진 것을 알 수 있었다. 또한 일부 유기용매 하에서는 *Bacillus* sp. BCNU 5005가 생산하는 lipase가 고정화된 효소보다 더 안정함을 확인할 수 있었다. 따라서 지속적인 연구를 통해 미생물을 이용한 생분해 등 환경산업 분야와 생물전환반응 등 화학산업분야를 포함한 고부가가치의 산업기술 분야에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 크게 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기본연구지원사업(과제번호: 2010-0009141)에 의해 지원되었으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Abe, A., A. Inoue, R. Usami, K. Moriya, and K. Horikoshi. 1995. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent tolerant bacteria from Deep Sea. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1154-1156.
2. Aono, R., M. Itoh, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 145-146.
3. Bouchez, M., D. Blanchet, and J. P. Vandecasteele. 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 556-561.
4. Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, and D. T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in two phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2723-2729.
5. Dahiya, P., P. Arora, A. Chaudhury, S. Chand, and N. Dilbaghi. 2010. Characterization of an extracellular alkaline lipase from *Pseudomonas mendocina* M-37. *J. Basic Microbiol.* **50**, 420-426.
6. Fang, Y., Z. Lu, F. Lv, X. Bie, S. Liu, Z. Ding, and W. Xu. 2006. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent stable lipase. *Curr. Microbiol.* **53**, 510-515.
7. Gaur, R., A. Gupta, and S. K. Khare. 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application. *Bioresour. Technol.* **99**, 4796-4802.
8. Hasan, F., A. A. Shah, and A. Hameed. 2006. Industrial ap-

- plications of microbial lipase. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235-251.
9. Inoue, A. and K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas putida* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**, 264-266.
 10. IWai, M. and Y. Tsujisaka. 1974. The purification and properties of three kinds of lipase from *Rhizopus delemar*. *Arg. Biol. Chem.* **38**, 1241-1247.
 11. Jaeger, K. E., B. W. Dijkstra, and M. T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315-351.
 12. Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 305-313.
 13. Ji, Q., S. Xiao, B. He, and X. Liu. 2010. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LK1 and its application of biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzyme.* **66**, 264-269.
 14. Kanjanavas, P., S. Khuchareontaworn, P. Khawsak, A. Pakpitcharoen, K. Pothivejkul, S. Santiwatanakul, K. Matsui, T. Kajiwaru, and K. Chansiri. 2010. Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3783-3792.
 15. Kawase, M. and A. Tanaka. 1989. Effects of chemical modification of amino acid residues on the activities of lipase from *Candida cylindracea*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 44-48.
 16. Kodera, Y., H. Nishimura, A. Matsushima, M. Hiroto, and Y. Inada. 1994. Lipase made active in hydrophobic media by coupling with polyethylene glycol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 335-338.
 17. Lee, S. K. and S. B. Lee. 2001. Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 1-12.
 18. Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera, pp. 2451-2492, In Williams, S. T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 9th, Vol. 4, Williams & Willikins, Baltimore.
 19. Ogino, H., K. Miyamoto, M. Yasuda, K. Ishimi, and H. Ishikawa. 1999. Growth of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 in the presence of various organic solvents and production of lipolytic enzyme in the presence of cyclohexane. *Biochem. Eng. J.* **4**, 1-6.
 20. Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, and U. T. Soccol. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 119-131.
 21. Pinkart, H. C., J. W. Wolfram, R. Rogers, and D. C. White. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1129-1132.
 22. Polizzi, K. M., A. S. Bommarius, J. M. Broering, and J. F. Chaparro-Riggers. 2007. Stability of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 220-225.
 23. Shaoxin, C., Q. Lilia, and S. Bingzhao. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochem.* **42**, 988-994.
 24. Sulong, M. R., R. N. Abdul Rahman, A. B. Salleh, and M. Basri. 2006. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Pro. Exp. Puri.* **49**, 190-195.
 25. Winkler, U. K., A. Gupta, and M. Stuckmann. 1979. Glycoen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, 663-670.
 26. Yamada, K. and H. Machida. 1962. Studies on the production of lipases by microorganisms, I / II., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.* **36**, 858-864.

초록 : 유기용매내성 세균 *Bacillus* sp. BCNU 5005의 유용성에 대한 검증

최혜정¹ · 황민정² · 정영기³ · 주우홍^{1,2*}

(¹창원대학교 생물공학협동과정, ²창원대학교 생물학과, ³동아대학교 생명공학과)

농화배양법을 이용하여 울산공단 일대의 폐수 및 토양에서 유기용매 내성 *Bacillus* sp. BCNU 5005를 분리하였다. 16S 리보솜DNA 염기서열 분석결과 BCNU 5005 균주는 *B. subtilis*와 98% 상동성을 가진 것으로 나타났으며 계통학적으로도 *B. subtilis*임이 확인되었다. 일반적으로 대부분의 세균과 그들의 효소는 고농도 유기용매하에서 불활성화되거나 파괴된다. 그러나, *Bacillus* sp. BCNU 5005의 lipase 활성은 chloroform, ethylbenzene 그리고 decane을 제외한 다양한 종류의 유기용매(25%, v/v)에서 매우 안정함을 보였다. 게다가 BCNU 5005는 유기용매를 분해하는 능력을 가진 것으로 확인하였다. 유기용매 내성 *Bacillus* sp. BCNU 5005는 생물전환과 생물복구산업을 위한 새로운 잠재적인 자원으로써 이용될 수 있다.