

*Candida*屬 Lipase의 活性에 影響을 미치는 諸因子에 관한 研究

金聖烈 · 朴允仲 · 李春寧*
忠南大學校 農科大學 · 서울大學校 農科大學*

Factors that Influence the Activity of A *Candida* Lipase

S. Y. Kim, Y. J. Park

College of Agriculture, Choongnam University

C. Y. Lee*

College of Agriculture, Seoul National University*

(Received Dec. 10, 1971)

Summary

An enzyme preparation from a newly isolated *Candida* that showed a high lipase activity was subjected to examination of its reaction rate under various conditions. The original and a diluted enzyme solutions showed the zero order curve starting at the point of 50 minutes in time. When PVA was used as an emulsifier more activity was observed than the case of gum arabic. The optimal temperature and pH were 37~40°C and 7.0, respectively. Oleic acid as a fatty acid conferred on the enzyme an inhibitory action while calcium ion a positive one. Sodium cholate yielded an increase in reaction rate at the first stage.

緒 言

脂肪은 三大 榮養 要素의 하나이므로 이것을分 解하는 Lipase도 Amylase, Protease와 함께 重要한 酵素群인데 이에 對한 研究는 다른 主要加水分解 酵素에 比하여 뒤떨어져 있다. 이의 原因은 Lipase의 主要給源이 近來까지 動物臟器나 植物種子에 국한되어 왔으며 이들 酵素가 물로 抽出하기가 어렵고 不安定하여 또 물과 기름의 不均一系에서 反應을 일으켜야하는 등의 難點때문이었든 것 같다.

最近 微生物이 生産하는 Lipase의 工業的 生産 및 利用을 目的으로 하는 많은 研究와 酵素의 分離精 製技術의 急進的인 發達에 依해서 Lipase에 關한 많은 難題들이 解明되어가고 있으나 origin에 따라 많은 特異性이 알려지고 있어 앞으로는 많은 研究가 期待되고 있다.

Lipase의 定量法에 關하여는 많은 研究가 있다. 其中 Willstätter⁽¹⁾가 創案하고 Desnuelle^(2,3)等, Nord等⁽⁴⁾, Hagomy⁽⁵⁾ 등이 改良한 뒤 Yamada⁽⁶⁾ 등이 더욱 改良한 Alkali 適定法 即 Olive oil 또는

Tributyryn의 Emulsion에 Lipase를 작용시켜反應初期에生成되는脂肪酸를 Alkali로 適定하는方法이 現在 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 Desnuelle^(2,3)等 Baskys⁽⁷⁾等 Yamada^(6,8)等 및 Alford⁽⁹⁾等 이指摘한 바와 같이 Lipase는 origin에 따라 作用溫度, pH, 基質特異性等이 다르며 Calcium ion, Bile salts, Fatty acid等이 cofactor로서 作用하는 경우와 反對로 Inhibitor로써 作用하는 경우 등이 알려져 아직 Lipase 定量法은 統一되지 못하고 있다.

著者等은 微生物 Lipase의 工業的 生産을 目的으로 Lipase 生産能이 강한 菌株을 screening 하여 *Candida*屬 有用新菌株을 選定하였으며⁽¹⁰⁾ 이의 培養生理와 酵素의 特性을 檢討하는 途中 Lipase의 反應速度에 影響을 주는 諸要因을 檢討하여 몇가지 興味있는 事實을 發見하였기로서 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 酵素液

Yamada⁽⁶⁾等이 사용한 soybean meal media에 著者等이 分離選定한 *Candida*屬菌을 接種하여 shaking incubator 中에서 30°C 24時間 shaking culture 한 後 遠沈하여 菌體其他를 除去한 淸澄液을 酵素原液으로 使用하였다.

2. 乳化劑溶液

Polyvinyl alcohol (PVA)로서는 日本倉敷製品(平均重合度 1725)을 使用하였다. 즉 PVA 20g을 1L의 蒸溜水에 懸濁시키고 攪拌하면서 徐徐히 加溫하여 80°C에 達하면 이 溫度에서 1時間 加熱溶解한 다음, 冷却, 濾過하여 使用하였으며 Gum arabic은 日本林純藥社製의 것 100g을 1L의 蒸溜水에 溶解, 濾過하여 使用하였다.

3. Olive oil

Spain產 SABATER社製의 pure olive oil을 그대로 또는 Bird⁽¹⁶⁾等의 有機溶媒洗滌法에 依하여 精製後使用하였다.

4. Emulsion의 調製

Nord⁽⁴⁾等, Yamada等變法⁽⁶⁾에 따라 調製하였다. 即 2% PVA 溶液 75ml와 Olive oil 25ml를 Homogenizer(日本精器製)에 넣어 充分히 冷却시킨 後 氷冷을 繼續하면서 10分間 乳化시킨 Emulsion을 使用하였다. 이밖에 PVA 溶液 代身에 10% gum arabic 溶液을 同量使用하여 調製하여 使用하

기도 하였다.

5. Lipase 測定法

Yamada⁽⁶⁾等의 變法을 若干 變形하여 使用하였다. 即 Olive oil emulsion 5ml, citrate-phosphate buffer 4ml (또는 Buffer soln 3ml와 添加物質 1ml)를 Test tube (2×15cm) 또는 50ml Erlenmeyer flask에 넣어 混合하고 37°C의 water bath 中에서 5分間 豫熱한 後 酵素液 1ml (合計 10ml)를 加하고 迅速히 混合하여 反應始發點으로 하였다. 10~60分間反應시킨 後 Alcohol-acetone(1:1)20ml를 加하여 反應을 中止시키고 Test tube의 것은 50ml Erlenmeyer flask에 옮겨 1% phenolphthalein을 indicator로 하여 0.05N NaOH로 滴定하였다. Blank는 Emulsion과 Buffer soln을 混合한것에 Alcohol-acetone 20ml를 먼저 加하여 Emulsion을 破壞한 後 酵素液을 加하고 滴定하였으며 兩滴定 差를 그대로 Lipase activity로 表示 하였다.

結果 및 考察

1. 反應時間의 영향

酵素原液을 여러가지 濃度로 稀釋하여 10~60分間作用시킨 結果는 Fig. 1.과 같으며 原液과 原液을 0.75% 酵素液이 되도록 稀釋한것을 使用한 경우에는 反應時間 50分에서 折點이 보였으므로 이 特點에서 反應速度가 變하는 二段階零次反應임을 알 수 있다.

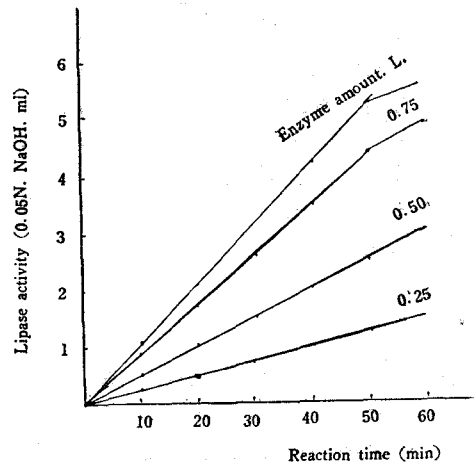


Fig. 1. Effect of reaction time on lipase activity

Yamada^(6,8)等은 *Candida cylindraceae*와 *Candida paraliopolytica* lipase를 이方法을 使用하여 反應시켜 origin에 關係없이 二段 零次反應을 나타

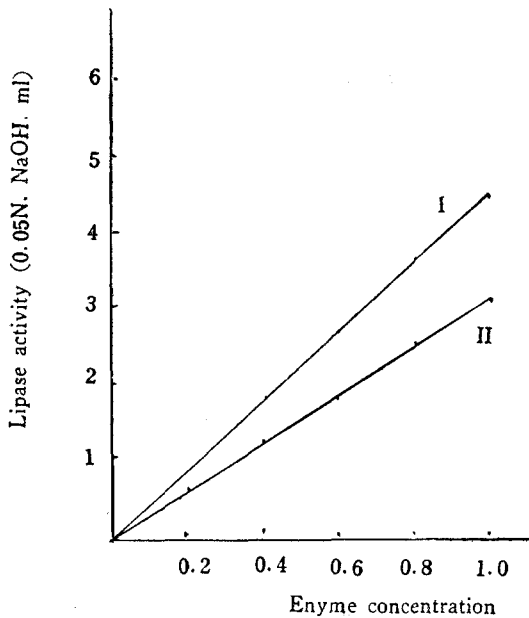


Fig. 2. Effect of enzyme concentration
I: 10% gum arabic
II: 2% PVA.

낸다는 것을 確認하였다.

本實驗結果에 依하여 이와같은 條件下에 있어서의 Lipase의 反應速度測定에 있어서는 50分以內의 反應時間이 適當함을 알수 있다.

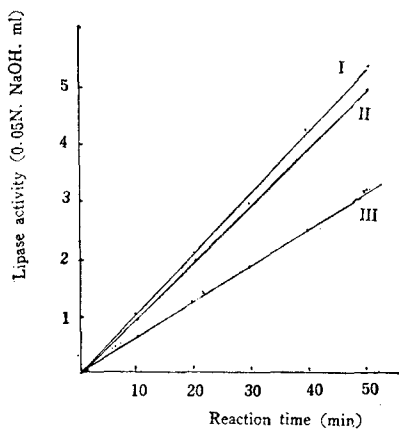


Fig. 3. Effect of reaction temperature
I: Reaction temperature: 40°C
II: Reaction temperature: 37°C
III: Reaction temperature: 30°C

2. 酵素量의 영향

PVA溶液과 Gum arabic 溶液으로 調製한 Emulsion을 使用하여 40分間 作用시킨 結果는 Fig. 2에 表示한 바와 같으며 40分間反應시킬 때에는 酵素量과 滴定値가 잘 比例 함을 알수있다.

그러나 Gum arabic을 乳化劑로 使用하였을 경우 Nord⁽⁴⁾等 및 Yamada⁽⁶⁾等の 報告와는 달리 PVA 使用時 보다 相當히 높은 滴定値를 보였다.

이것은 Foder⁽¹¹⁾가 指摘한 바와 같이 Gum arabic이 本 Lipase의 Activator로서 作用한것인지 Gum arabic의 品質關係인지 不明하다.

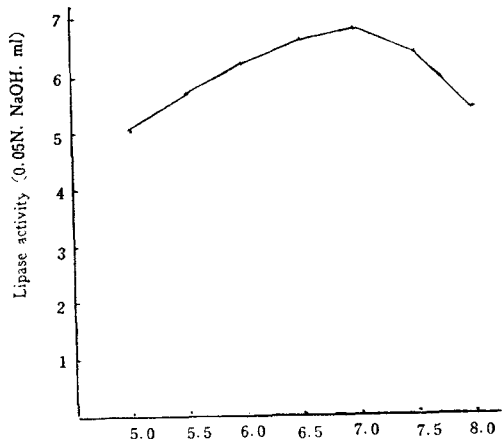


Fig. 4. Effect of pH

3. 反應溫度의 영향

30, 37, 40°C에 있어서의 初期反應速度를 測定한 結果 Fig. 3에 表示 한바와 같이 30~40°가 適溫이었다. Wills⁽¹²⁾에 依하면 大部分의 Lipase의 適溫은 30~40°C, Schlstke⁽¹³⁾ 및 Rothe⁽¹⁴⁾에 依하면 pancreatic lipase의 適溫은 35~40°C, Kirsh⁽¹⁵⁾에 依하면 *Penicillium oxalicum* lipase의 適溫은 37~40°C, Fodor⁽¹⁶⁾等에 依하면 *Aspergillus* lipase의 適溫은 30°C라고 하였다.

以上에서 알수 있는 바와같이 Lipase의 作用適溫은 origin에 따라 若干씩 差異가 있으며 本 Lipase의 作用適溫은 *Penicillium oxalicum* lipase와 비슷함을 알수 있다.

4. 反應 pH의 영향

Wills⁽¹²⁾에 依하면 Lipase의 反應速度에 미치는 pH의 영향은 酵素自體뿐만 아니라 乳化劑의 種類, 基質의 性質 界面의 狀態等에 따라서도 差異가 있을수 있다고 하였으며 Yamada⁽¹⁷⁾等에 依하면

Candida cylindraceae lipase 에 있어서는 Buffer solution 의 種類에 따라서로 差異가 있었다고 하였다.

pH.50~8.0 (Citrate-phosphate buffer 使用)에서 40分間 作用시킨 結果는 Fig 4.에 表示한바와 같으며 pH7.0 이 가장 適當하였으나 pH5.0~8.0 사이에서 큰 差異가 나타나지 않는것으로 보아 作用 pH의 範圍가 넓다고 볼수있다.

Desnuelle⁽¹⁸⁾等. Sumner⁽¹⁹⁾等, Rayman⁽²⁰⁾等은 pancreatic lipase 의 作用最適 pH는 8.2~9.2, Gunter⁽²¹⁾等은 Yeast lipase은 6.6~6.8, Nelson⁽²²⁾等은 *Pseudomonas fragi* lipase 는 7.0~7.2 라고 하였다. 이와같이 Lipase의 最適 pH는 origin 에 따라 많은 差異가 있음을 알 수 있다.

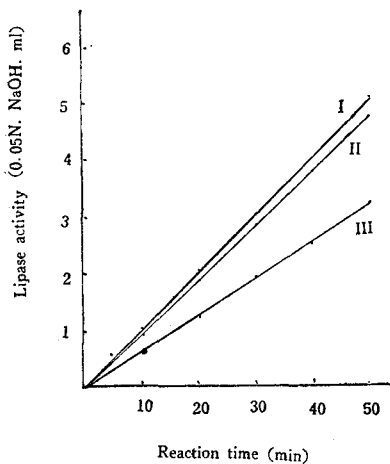


Fig. 5. Effect of the concentration of emulsion

- I: 25% (v/v) olive oil in 1% PVA
- II: 25% (v/v) olive oil in 2% PVA
- III: 5% (v/v) olive oil in 2% PVA

5. 乳化劑 및 基質 濃度の 영향

Yamada⁽⁶⁾等은 Nord⁽⁴⁾等의 Lipase 定量法을 改良하여 Emulsion 을 調製할때 pipette 使用에 支障이 없는 限 高濃度の PVA 溶液과 Olive oil 을 混合하여 乳化 할것을 提唱하였다. 著者等이 PVA 및 Olive oil 의 濃도가 反應速度에 미치는 영향을 檢討한 結果는 Fig.5에 表示한바와 같으며 乳化劑와 基質의 濃도에 따라 反應速度에 差異가 있었다. 乳化劑의 濃도에 있어서는 2% PVA 溶液을 使用하였을때 보다 1% 용액을 使用하였을 때 反應速度가 빨랐다. 따라서 乳化劑의 種類와 濃도에 對해서는 아직도 檢討할點이 많다고 생각된다.

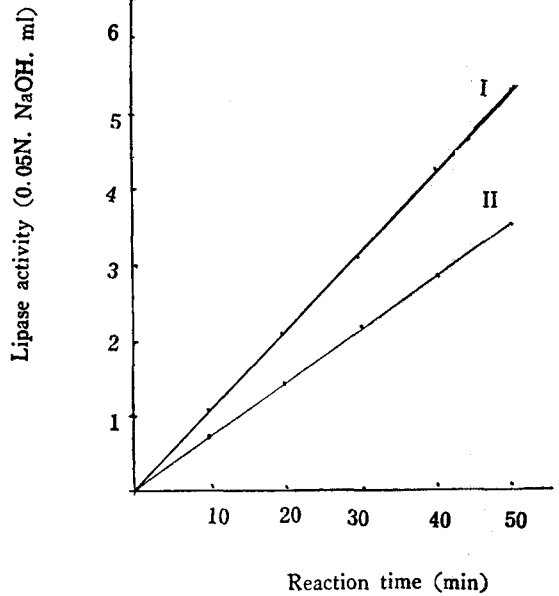


Fig. 6. Effect of fatty acid

- I: purified olive oil
- II: 2% oleic acid added to purified olive oil.

6. 脂肪酸의 영향

Bird⁽¹⁰⁾等의 有機溶媒洗滌法에 依하여 精製한 Olive oil과 이것에 2%의 Oleic acid 를 添加한 基質을 2% PVA溶液과 混合, 乳化한 Emulsion 을 使用하여 37°C에서 40分間 作用시킨 結果는 Fig. 6에 表示한 바와 같으며 脂肪酸이 本 Lipase 의 反應速度를 阻害한다는 것을 알 수 있다.

脂肪酸이 Liase activity에 미치는 영향에 關하여는 活性化의 경우와 阻害의 경우가 報告되어있다. Alford⁽⁹⁾等은 Microbial lipase에 對한 脂肪酸의 영향을 調查하여 *Pseudomonas fragi*와 *Geotrichum candidum*의 Lipase는 各種脂肪酸에 依하여 阻害를 받았으나 *Staphylococcal* lipase와 pancreatic lipase는 阻害를 받지 않았다고 하였으며 Yamada⁽⁶⁾等은 *Candida cylindraceae*와 *Candida paraliopolytica*의 Lipase 및 pancreatic lipase에 미치는 Oleic acid의 영향을 檢討하여 이들 三者에 對하여 共히 反應速度를 增大시키나 Origin에 따라 그 程度에 差異가 있었다고 報告하였다.

7. Calcium ion의 영향

Calcium chloride 溶液(M/10) 1ml를 反應液에 添加하여 calcium ion이 反應速度에 미치는 영향을 檢討한 結果는 Fig.7에 表示한 바와 같으며 初期부터 反應速度가 增大 되었다.

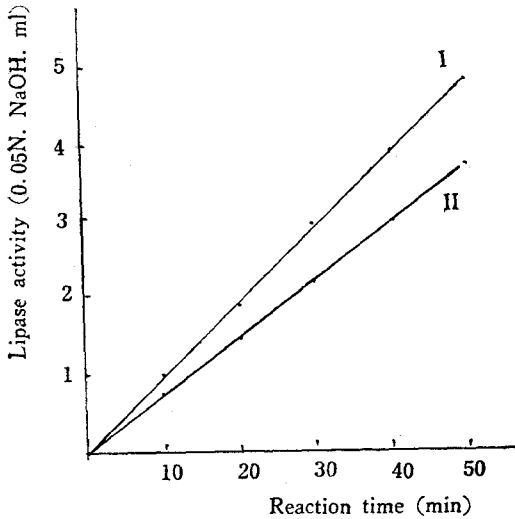


Fig. 7. Effect of Calcium ion
I: CaCl_2 (M/100) added.
II: Control

Lipase의 작용에 미치는 Calcium ion의 영향에 대하여는 많은 연구가 있으며 Willstätter⁽¹⁾等 Bomann⁽²³⁾等 Desnuelle⁽²⁴⁾等은 pancreatic lipase에 대한 Calcium ion의活性化作用을 確認하였으나 Yamada⁽⁶⁾等은 *Candida cylindraceae* lipase, Iwai⁽²⁵⁾等은 *Aspergillus niger* lipase에 대한 Calcium ion의 영향을 檢討하여 初期反應速度는 變化시키지 못하며 脂肪酸이 어느 程度 蓄積된 後부터 反應速度를 增大시킨다고 報告하였다. 이들은 Lipase에 依해서 生成된 脂肪酸과 Calcium ion이 結合하여 界面의 物理的인 狀態를 Lipase가 作用하기 쉽게 단는것 같다고 하였다 最近 Ota⁽²⁶⁾等은 *Candida paraliopolytica* lipase의 作用에 미치는 Calcium ion의 영향을 檢討하여 必須的인 역할을 한다는것을 確認하였다.

本實驗에 있어서는 精製하지 않고 酵素液과 Olive oil을 使用하였으므로 Lipase 定量條件을 決定하는 因子로 생각 할수 있으나 精製한 Olive oil과 酵素를 使用하는 경우의 Lipase에 미치는 Calcium ion의 영향에 對하여는 別途로 檢討할 必要가 있다고 생각된다.

8. Bile salt의 영향

反應溶液에 0.2% Na-cholate를 添加하여 反應速度에 미치는 영향을 檢討한 結果는 Fig. 8에 나타난 바와 같으며 初期反應速度를 約 2.2倍 增大시켰다.

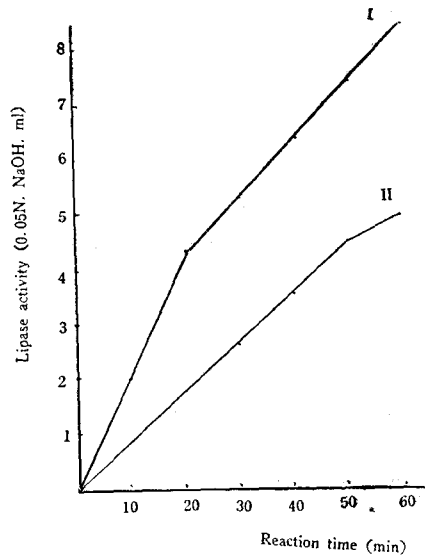


Fig. 8. Effect of Sodium Cholate
I: 0.2% (w/v) Na-cholate added.
II: Control

Bile salt가 Lipase activity에 미치는 영향에 대하여는 많은 연구가 있으며 Origin에 따라 Cofactor인 경우와 inhibitor인 두경우가 報告되어 있다.

Yamada^(6,8)等은 Na-taurocholate를 使用하여 *Candida cylindraceae* lipase에 對해서는 沮害作用을 하고, pancreatic lipase에 對해서는 反應速度를 2.9倍나 增大시키며 *Candida paraliopolytica* lipase에 있어서는 必須活性化劑임을 確認하였다. 이 밖에도 Bile salt가 Lipase의 Cofactor로서 作用한다는 報告도 相當히 많다.

Wills⁽¹²⁾에 依하면 Bile salt가 油脂와 물의 界面에 있어서의 酵素의 配置를 良好하게 하는것 같다고 하였으며 最近 Brockerhoff⁽²⁰⁾는 Lipase protein의 Denaturation을 保護한다고 報告하였다. 以上과 같이 Bile salt는 大部分의 Lipase를 크게 活性化시키는 沮害하는 경우도 알려져 있으므로 이點에 對하여는 더욱 檢討할 必要가 있다고 생각된다.

結 論

*Candida*屬의 新菌株가 生産하는 Lipase의 初期反應速度에 영향을 미치는 諸要因을 檢討하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 本 Lipase는 酵素原液과 이의 0.75稀釋液을 使用했을 경우 反應時間 50分內外에서 反應速度가 變하는 二段零次反應을 表示하였다.
2. 乳化劑中 PVA보다 Gum arabic을 使用하였

을때 酵素 反應速度가 빨랐다.

3. 本實驗條件下에 있어서의 反應 適溫은 37~40°C 였고 Citrate-phosphate buffer 를 使用하였을때 最適pH는 7.0이였다.
4. 脂肪酸은 初期反應速度를 阻害하였다.
5. Calcium ion은 反應速度를 增大 시켰다.
6. Na-cholate 는 初期反應速度를 크게 增大 시켰다.

References

- 1) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz: Z. Physiol. Chem., **125**, 132 (1923).
- 2) P. Desnuelle: Advances in Enzymology., **23**, 129 (1961)
- 3) P. Desnuelle, L. Sarda: Biochem. Biophys. Acta., **30**, 513 (1958)
- 4) F.F. Nord, J.V. Fiore: Arch. Biochem. Biophys., **23**, 473. (1949)
- 5) P.L. Hágony, L. Vekerdi, T. Keleti: Enzymologia, **23**, 321 (1961)
- 6) K. Yamada, Y. Ota, H. Machida: J. Agr. Chem. Soc. Japan. **36**, 858 (1962).
- 7) B. Baskys, E. Klein, W.F. Lever: Arch. Biochem. Biophys., **99**, 25 (1962).
- 8) Y. Ota, K. Yamada: J. Agr. Chem. Soc. Japan., **37**, 653 (1963)
- 9) J.A. Alford, J.L. Smith: Appl. Microbiol., **14**, 699 (1966)
- 10) E.W. Bird, D.F. Breazeale: J. Dairy Sci., **21**, 335 (1935)
- 11) P.I. Fodor: Expl. Med. and Surg., **5**, 140 (1947)
- 12) E.D. Wills: Advan Lipid. Res., **3**, 197 (1965)
- 13) E. Schlotke: Forsch. Forsch., **17**, 385 (1941)
- 14) M. Rothe: Ernahrungsforschung **1**, 619 (1956)
- 15) D. Kirsh: J. Biol. Chem., **108**, 421 (1935)
- 16) P.J. Fodor, A. Chari: Enzymologia, **13**, 258 (1948)
- 17) K. Yamada, H. Machida: J. Ferm. Assoc. Japan. **22**, 447 (1964)
- 18) P. Desnuelle, M.J. Constantin, J. Baldy: Bull. Soc. Chim. Biol., **37**, 285 (1955)
- 19) J.B. Sumner, E.B. Herr: Ann. Acad. Sci. Fenniae Ser. A.II. **60**, 64 (1955)
- 20) M.M. Rayman, T.H. Burton, M.L. Goldman: Food Res., **19**, 503 (1954)
- 21) H. Günter, G. Gorbach: Monatsh Chem. **61**, 47 (1932)
- 22) F.E. Nelson, S.A. Nashif: J. Dairy Sci., **36**, 471 (1953)
- 23) E. Bomann, P. Leaverenz: Z. Physiol. Chem., **223**, 185 (1934)
- 24) P. Desnuelle, M. Naudet, M.J. Constantin: Biochim. Biophys. Acta, **5**, 561 (1950)
- 25) M. Iwai, Y. Jsujisaka, J. Fukumoto: J. Gen. Appl. Microbiol., **10**, 87 (1964)
- 26) Y. Ota, K. Yamada: Agr. Biol. Chem., **30**, 351 (1966)
- 27) H. Brockerhopp: J. Biol. Chem., **246**, 5828 (1971)