

## 絲狀菌의 脂肪分解酵素에 關한 研究

### 第 3 報 分離絲狀菌 *Rhizopus japonicus* lipase의 精製에 關하여

鄭 萬 在

忠北大學 農化學科  
(1976년 5월 10일 수리)

## Studies on the Lipolytic Enzyme of Molds

### part 3. Purification of *Rhizopus japonicus* lipase

by

Man-Jae Chung

Dept. of Agricultural chemistry, Chung Buk National University, Taejun, Korea

(Received may 10, 1976)

#### Abstract

1) The purified enzyme was obtained with the specific activity 126.5 u/mg protein (about 45 times of the original activity) and the yield of 4.2%, by means of salting out with ammonium sulfate (0.5 saturation) of the crude enzyme solution, desalting by Sephadex G 25, CM cellulose column chromatography, concentration by Sephadex G 25, and gel filtration by Sephadex G 75.

2) In the acrylamide gel disc electrophoresis of the purified enzyme, the main band and two obscure ones on the both side of the main band appeared, which indicated that the enzyme was considerably purified compared with its crude enzyme solution, even if it is not referred to as a pure protein.

#### 緒 言

絲狀菌의 脂肪分解酵素生産에 關한 基礎資料를 얻기 위하여 自然界에서 212株의 lipase生産能이 있는 絲狀菌을 分離하고 lipase生産能을 檢討하여 가장 優秀하다고 認定된 一菌株을 選拔하여 諸特性을 檢討한 結果 *Rhizopus japonicus*로 同定되었으며 lipase生産에 미치는 培養條件을 多角的으로 檢討하여 報告한바 있다<sup>(1)</sup>

微生物 lipase의 精製에 關한 研究로는 Tatsuoka 등<sup>(2)</sup>은 *Rhizopus* 302 lipase를 硫安飽和, Calcium phosphate chromatography 및 Electrophoresis에 依하여  $\alpha$ -lipase,  $\beta$ -lipase 및 partially purified lipase를 分離하였고, Fukumoto 등<sup>(3,4,5,6)</sup>은 *Aspergillus niger* lipase를 硫安

鹽析, acetone分別, acrinol添加, Duolite A<sub>2</sub>에 依한 吸着等에 依하여 lipase를 結晶狀으로 分離하였으며 또한 *Rhizopus delemar* lipase를 Sephadex G 25로 脫鹽, SE Sephadex G 15 및 Sephadex G 25에 依한 分別로 高度로 精製하였고, Tomizuka 등<sup>(7)</sup>은 *Candida cylindracea* lipase를 硫安沈澱, Sodium deoxycholate處理, SE sephadex, Sephadex G 100 column chromatography 등으로 精製하였으며, Somkuti 등<sup>(8)</sup>은 *Mucor pusillus* lipase를 Sephadex G 75에 依한 gel filtration, DEAE Sephadex A 50에 依한 anion exchange chromatography로 精製하였고 Ota 등<sup>(9)</sup>은 *Candida paraliptoytica* lipase를 acetone沈澱, CM Sephadex G 50, DEAE Sephadex column Chromatography로 精製하였으며 Henderson<sup>(10)</sup>은 *Anaerovibrio lipolytica* lipase를 硫安沈澱, Sephadex

G 100과 Sephadex G 20 Column chromatography로 精製하였고, Kim<sup>(11)</sup>은 *Trichosporon cutaneum* lipase를 Sephadex G 25에 의한 脫鹽, DEAE cellulose column chromatography에 의하여 精製하였으며, Iwai등<sup>(12,13)</sup>은 *Geotrichum candidum* lipase를 DEAE Sephadex column chromatography, sephadex G 100에 의한 gel filtration 등으로 結晶狀으로 分離하였다.

筆者는 優秀選拔菌株인 *Rhizopus japonicus*의 lipase를 여러가지 方法으로 精製하였으며 acrylamide gel disc electrophoresis에 의하여 精製酵素의 純度を 檢定하고 그 結果를 報告하는 바이다.

**實驗方法**

**1. 粗酵素液의 蒸製 및 lipase活性的 測定**

Table 1의 基本培地 200ml를 500ml 容振盪 플라스크에 넣어 殺菌한 다음 麥芽汁寒天培地에서 3日間 培養한 供試菌株을 4白金耳 接種하고 27°C에서 36時間 振盪培養(120 Oscills/min)한 後 10,000 rpm으로 10分間 遠心分離(sorvall型)하여 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다. lipase活性은 Nord등<sup>(14)</sup>의 變法으로 測定하였다.

**Table. 1. Basal medium for the lipase production**

Soybean meal 2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, PH 6.8

**2. 酵素의 精製法**

**1) 硫安鹽析**

粗酵素液 40ml씩을 100ml 비이커에 取하고 magnetic stirrer로 淸淸히 攪拌해 주면서 硫安粉末을 0.1~0.6飽和度<sup>(15)</sup>까지 徐徐히 加하여 完全히 硫安을 녹인 後 5°C에서 12時間 保管하였다. 그 後 3,000rpm에서 10分間 冷凍遠心分離하여 沈澱物을 分離하였다.

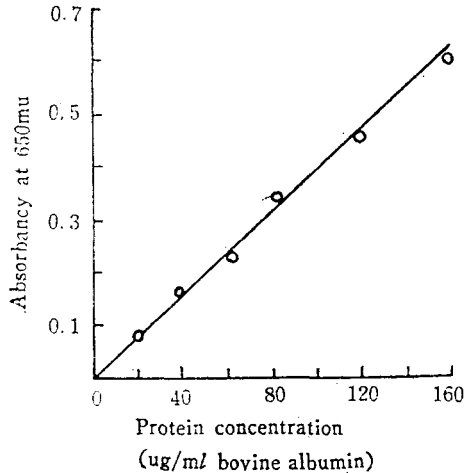
**2) Sephadex G 25에 의한 除鹽方法**

Sephadex G 25 (Medium size, Pharmacia, Uppsala, Sweden) 約 30g를 10倍量의 蒸溜水에 懸탁시켜 約 6時間 膨潤시켰다. 膨潤된 粒子는 傾斜法에 依하여 微粒子를 除去한 後 27×28cm의 column에 氣泡가 생기지 않도록 充填하여 常溫에서 gel bed를 安定시킨 後 5°C의 冷藏室에서 蒸溜水로 0.5ml/min의 流速으로 約 12時間 column을 平衡化시켰다. 形成된 column은 0.15% blue dextran 2,000으로 充填狀態를 檢定하였다.

硫安鹽析에 依하여 얻은 沈澱物을 少量의 蒸溜水에 녹여 約 20ml를 column bed上에 조용히 添加하여 column에 吸着시킨 後 蒸溜水로 2ml/min의 流速으로

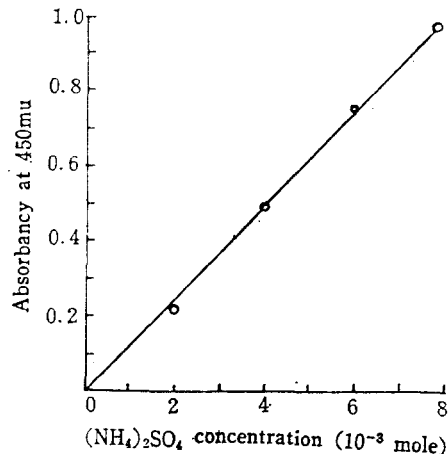
溶離시켜 automatic fraction collector (L.K.B型)로 tube當 2ml씩 fraction을 分割하였다.

分割된 各 fraction의 蛋白質濃度는 Folin-Lowry-Miller法<sup>(16,17,18)</sup>에 依하여 測定하였다. Bovine albumin (Sigma chemical Co.)을 使用하여 얻은 標準曲線은 Fig. 1과 같으며 여기에 使用한 Protein溶液의 濃度는 Tanford와 Robert法<sup>(19)</sup>에 依하여 補正해 주었다.



**Fig. 1. Calibration curve for protein concentration by Folin-Lowry-Miller method.**

한편 試料溶液中 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 濃度測定에는 Thompson과 Morrison<sup>(20)</sup>의 方法을 使用하였다. Fig. 2는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液을 使用하여 얻은 標準曲線이다.



**Fig. 2. Calibration curve for ammonium sulfate concentration by a colorimetric method.**

**3) CM cellulose column chromatography**

CM cellulose (Carl Schleicher & Schull Co.) 約 30g

를 0.5N NaOH, 0.5N NaCl 等容混合溶液 500ml에 分散시킨 後 같은 溶液으로 黃色色素가 더 以上 溶出되지 않을때 까지 數回 洗滌하였으며 傾斜法에 依하여 微細한 粒子를 樣去하였다. 이것을 glass filter(IG 4)로 濾過한 後 filter cake를 500ml의 1N HCl에 分散시켰다가 신속히 濾過하여 蒸溜水로 洗滌하여 濾液의 pH가 中性이 되도록 하였다. 이것을 다시 500ml의 0.5N NaOH-0.5N NaCl에 分散시켜 濾過한 後 蒸溜水로 充分히 洗滌하고 0.01M acetate buffer로 pH를 調整한 後 2.7×28cm의 Column에 充填하였다. 常溫에서 自然落下에 依하여 安定시킨 column은 5°C의 冷藏室에서 0.01M acetate butter(pH 5.0)로 0.5ml/min의 流速으로 12時間 column을 平衡化시킨 後 試料를 添加하였다.

除鹽된 試料는 18,000 rpm에서 10分間 冷凍遠心分離하여 沈澱物을 除去한 後 acetate buffer로 pH 5.0로 調整하고 蛋白質의 含量이 約 500mg程度가 되게 調節하여 column에 吸着시켰다. 試料의 展開는 Schwab등에 依한 linear gradient elution method<sup>(21)</sup>를 使用하였다. 即 reservoir에는 0.01M acetate buffer (pH 5.0)에 NaCl이 1M이 되게 녹인 溶液 1,000ml를 채웠고 mixing chamber에는 0.01M acetate buffer (pH 5.0)만을 1,000ml 加하여 magnetic stirring을 하여 주었다. 이때의 濃度는 다음式에 依하여 計算하였다.

$$[E] = M_2(1 - e^{-V/R})$$

[E] : mixing chamber로 부터  $\phi$ ml가 흘러 나갔을 때의 NaCl의 濃度

$M_2$  : reservoir溶液의 濃度

VR : mixing chamber의 부피

이때의 流速은 0.5ml/min이며 各 fraction(3ml)마다 蛋白質의 含量과 lipase活性을 測定하였다.

4) 酵素液의 濃縮法

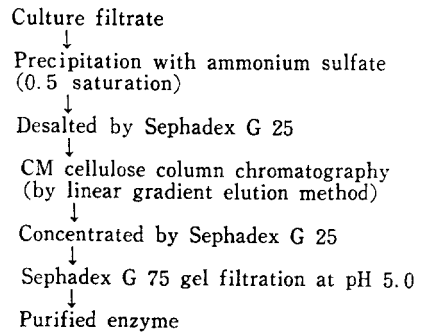
一定量의 Sephadex G 25를 酵素液에 加하여 10分間 膨潤시킨 後 5°C에서 濾過하였으며 이 過程을 反覆하므로써 效果의으로 濃縮할 수 있었다.

5) Sephadex G 75에 依한 gel filtration

Sephadex G 75 約 25g을 0.01M acetate buffer (pH 5.0)에 3時間 膨潤시킨 後 傾斜法에 依하여 微細한 粒子를 除去하였으며 2.7×28cm의 Column에 Sephadex G 25에서와 같은 方法으로 均一하게 充填시켜 같은 溶液으로 平衡化시켰다.

CM cellulose column chromatography에서 얻은 酵素部分을 15ml로 濃縮하여 column에 吸着시킨後 0.01M acetate buffer(pH 5.0)로 0.5ml/min의 流速으로 tube當 2ml씩 分割하였다. 以上의 精製方法을 要約하면 Table 2와 같다.

Table. 2. Purification procedure for the lipase.



3. 精製酵素의 純度檢定

精製된 酵素의 純度를 보기 爲하여 acrylamide gel disc electrophoresis를 行하였다.<sup>(22)</sup> 即 gel은 methylene bis acrylamide를 3%가 되게 20% acrylamide溶液에 녹인 것 20ml, tetra methyl ethylene diamine을 2%가 되게 緩衝液(pH 4.2, 1N potassium hydroxide-acetic acid)에 녹인 것 10ml, 蒸溜水 10ml와 觸媒로서 0.2% ammonium persulfate溶液 40ml를 함께 混合하여 調製하였다.

分析用試料는 濃度가 50~100 $\mu$ g 程度가 되게 5% Sucrose와 0.05% bromphenol blue를 含有한 液과 같이 gel에 吸着시켰다. 電氣泳動緩衝液은 pH 4.0의 acetic acid glycine을 使用하였고 tube當 5 miliampere를 常溫에서 90分間 泳動시켰다. 泳動이 끝난 gel은 tube에서 꺼낸 後 7% acetic acid로 만든 1% amidoblack 10B溶液에 1時間 담가 染色시켰다. 脫色은 7% acetic acid溶液中에서 gel當 15 miliampere의 電流를 通하여 60分間 泳動시켜 脫色시켰다.

實驗結果 및 考察

1. 精 製

1) 硫安鹽析

硫安飽和度와 lipase活性과의 關係를 살핀 結果는 Table 3과 같다.

Table. 3. Ammonium sulfate fractionation

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturation	total activity (unit)	yield (%)	specific activity (unit/mg protein)
0	600.0	100.0	2.8
0.1	26.7	4.5	3.2
0.2	180.6	30.1	3.4
0.3	330.0	55.0	4.0
0.4	373.0	62.2	4.2
0.5	384.0	64.0	4.3
0.6	394.7	65.8	3.8

Table 3의 結果에 依하여 本實驗에서는 lipase의 specific activity가 가장 크며 (試料의 約 1.5倍) 試料 lipase의 64%를 回收할 수 있는 0.5飽和度의 硫安鹽析을 實施하였다.

2) Sephadex G 25에 依한 脫鹽

硫安鹽析에 依하여 얻은 沈澱에는 硫安이 殘存하는데 이 殘存硫安은 Fig. 3에서 보는바와 같이 Sephadex G 25에 依하여 完全히 除去할 수 있었다. 암모늄鹽의 除去에 依하여 酵素液의 specific activity는 9.1 unit/mg protein으로서 硫安沈澱物보다 約 2倍로 增加하고 있다

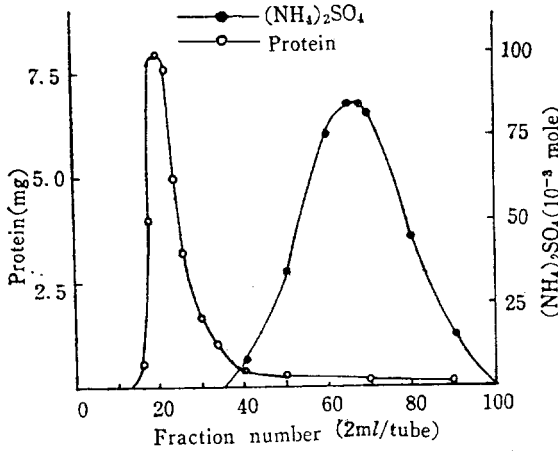


Fig. 3. Desalting by Sephadex G 25 gel filtration.

3) CM Cellulose column Chromatography

Fig. 4에서 보는 바와 같이 Fraction No. 71에서 lipase活性이 나타나기 始作하였다. Lipase活性이 있는 部分을 모아 分析한 結果 Specific activity는 72.4 unit/mg protein으로서 酵素原液에 比하여 約 26倍 精製되었고 收率은 約 25%이었다.

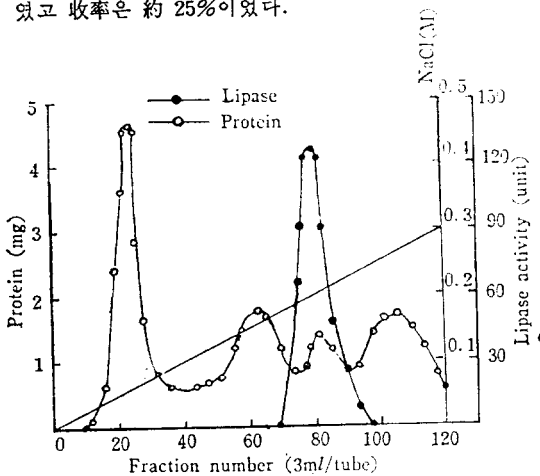


Fig. 4. Elution pattern of lipase by CM cellulose column chromatography.

4) Sephadex G 25에 依한 濃縮

濃縮에 依하여 液量을 1/6로 減少시켰을 때 specific activity는 70.2 unit/mg protein으로서 濃縮前에 比하여 약간 떨어졌는데 이것은 實驗操作時의 損失에 基因되는 것으로 생각된다.

5) Sephadex G 75에 依한 gel filtration

Fig. 5에서 보는 바와 같이 3個의 peak中 가운데 部分에 lipase活性이 있었다. 이때의 Specific activity는 126.5 unit/mg protein으로서 酵素原液에 比하여 約 45倍 精製되었고 이때의 收率은 4.2%이었다

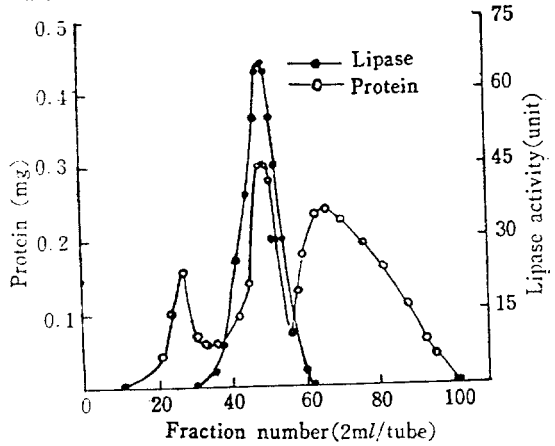


Fig. 5. Gel filtration by Sephadex G 75.

以上の 精製經過를 要約하면 Table 4와 같다.

Table 4. purification procedure of *Rhizopus japonicus* lipase.

Procedure	volume (ml)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)
Culture filtrate	1,500	22,500	2.8
Ammonium sulfate fractionation (0.5 saturation)	225	15,975	4.3
Desalted by Sephadex G 25	480	14,784	9.1
CM cellulose column chromatography	90	5,625	72.4
Concentrated by Sephadex G 25	15	5,100	70.2
Sephadex G 75 gel filtration	30	945	126.5

Tsujijsaka 등<sup>(13)</sup>은 *Geotrichum candidum* lipase를 Specific activity 447로서 原活性의 40.6倍, 收率 20%로, Fukumato 등<sup>(15)</sup>은 *Aspergillus niger* lipase를 Specific activity 390으로 原活性의 78倍로, Tomizuka 등<sup>(7)</sup>은 *Candida cylindracea* lipase를 Specific activity 1,140으

로 原活性의 33.4배, 收率 約 18%로 Ota 등<sup>(9)</sup>은 *Candida paraliptolytica* lipase를 約 132배, 收率 32%로 精製하였으며 Iwai 등<sup>(28)</sup>은 *Rhizopus delemar* lipase를 A lipase, B lipase, C lipase로 分離하고 A lipase는 Specific activity 1,140으로 原活性의 87.7배, B lipase는 250으로 原活性의 7.6배, C lipase는 1,020으로 原活性의 78.5배, Kim<sup>(11)</sup>은 *Thichosporon cutancum* lipase를 specific activity 112.8로 原活性의 18.8배, 收率 3.8%가 되도록 精製하였다고 報告하였는데 本菌株의 lipase는 Specific activity 126.5로 原活性의 約 45배, 收率 4.2%가 되도록 精製하였다.

## 2. 精製酵素的 純度

除鹽된 粗酵素液과 Sephadex G 75 gel filtration에 의하여 精製된 酵素를 acrylamide gel disc electrophoresis에 의하여 分離시킨 結果는 Fig. 6와 같다.

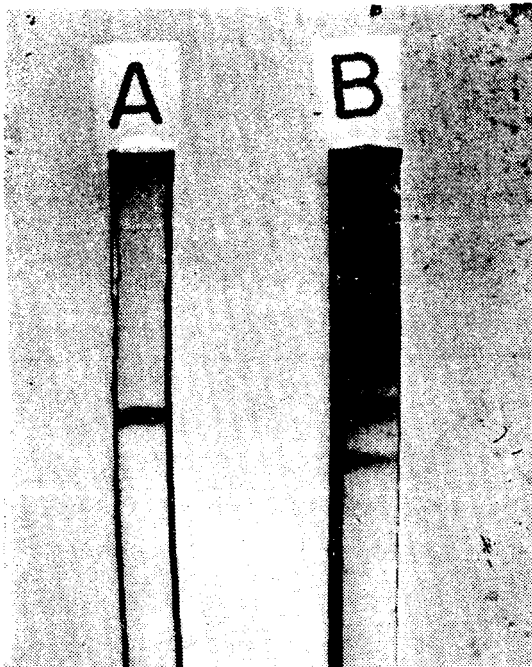


Fig. 6. Pattern of acrylamide gel disc electrophoresis for crude and purified enzyme preparation.

(A) Purified enzyme (B) Crude enzyme

精製된 酵素는 하나의 生된 band와 그 兩側に 2개의 微미한 band가 나타나 있으므로 純粹한 하나의 蛋白質이라고는 할 수 없으나 粗酵素液에 比하여 相當히 精製가 되었음을 알 수 있다.

## 要 約

1) 粗酵素液을 硫酸鹽析(0.5飽和度) Sephadex G 25에 의한 除鹽, CM Cellulose column chromatography, Sephadex G 25에 의한 濃縮, Sephadex G 75 gel filtration에 의하여 Specific activity 126.5/mg protein, 原活性의 約 45배, 收率 4.2%의 精製酵素를 얻었다.

2) 精製酵素를 Acrylamide gel disc electrophoresis에 의하여 分離시킨 結果 하나의 主된 band와 그 兩側に 2개의 微미한 band가 나타나 있으므로 하나의 純粹한 蛋白質이라고는 할 수 없으나 粗酵素液에 比하여 相當히 精製되었다.

## 參 考 文 獻

- 1) 鄭萬在 : 한국식품과학회지, 8, 33 (1976)
- 2) Tatsuoka, S., Miyake, A., Wada, S. and Matsmura, C. : *J. Biochem.*, 46, 575 (1959)
- 3) 福本, 岩井, 辻阪 : 科學と工業, 38, 373 (1964)
- 4) 福本, 岩井, 辻阪 : 日本酵化シンポジウム講演集, 18, 53 (1962)
- 5) Fukumoto, J., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 353 (1963)
- 6) Fukumoto, J., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 10, 257 (1964)
- 7) Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K. : *Agr. Biol. Chem.*, 30, 576 (1966)
- 8) Somkuti, G.A., Babel, F. J. and Somkuti, A. C. : *App. Microbiol.*, 17, 606 (1969)
- 9) Ota, Y., Nakayama, T. and Yamada, K. : *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1368 (1970)
- 10) Henderson, C. : *Pro. Biochem. Soc.*, 119, 5 (1970)
- 11) 金聖烈 : 忠南大學校大學院研究報告集, 53 (1972)
- 12) Iwai, M., Tsujisaka, Y., Okamoto, Y. and Fukumoto, J. : *Agr. Biol. Chem.*, 47, 929 (1973)
- 13) Tsujisaka, Y., Iwai, M. and Tominaga, Y. : *Agr. Biol. Chem.*, 37, 1457 (1973)
- 14) 山田, 太田, 町田 : 日農化, 38, 860 (1962)
- 15) Dixon, M and Webb, E.C. : *Enzymes*, Academic press New York, 49 (1958)
- 16) Folin, O. and Ciocalteu, V. : *J. Biol. Chem.*, 73, 627 (1927)
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)

- 18) Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 964 (1959)
- 19) Tanford, C. and Robert, G.L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2509 (1952)
- 20) Tompson, A.F. and Morrison, G.R. : *Anal. Chem.*, **23**, 1153 (1951)
- 21) Schwab, H., Rieman ■ and Vaughan, P.A. : *Anal. Chem.*, **29**, 1357 (1957)
- 22) Smith, I.: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. ■. *Zone Electrophoresis* 2nd ed., Interscience publisher, New York, 365 (1968)
- 23) 岩井, 辻阪, 板谷, 岡本, 福本 : *科學と工業* **40**, 18 (1966)