

絲狀菌의 脂肪分解酵素에 關한 研究

第 4 報 分離絲狀菌 *Rhizopus japonicus*의 精製 Lipase의 特性에 關하여

鄭 萬 在

忠北大學 農化學科
(1976. 9. 13 수리)

Studies on the Lipolytic Enzyme of Molds

Part. 4. Characteristics of the Purified lipase of *Rhizopus japonicus*

by
Man-Jac Chung

Department of Agricultural chemistry, Chung-Buk National University, Cheongju, Korea

(Received September 13 1976,)

Abstract

These experiment were conducted to investigate the characteristics of the purified lipase of *Rhizopus japonicus*.

1. The optimum pH for the lipase action was 6.8, the stable pH ranged 5.0~8.0 and the optimum temperature was 35°C. The Purified lipase was stable below 45°C and inactivated abruptly above 45°C

2. Coconutoil castor oil and palm oil were most favorably hydrolyzed by the purified lipase, wheres olive oil and soybean oil were slightly less than the former three, and Tween 80 was hydrolyzed only 30% compared with coconut oil.

3. The purified lipase was activated by Ca^{++} and Mg^{++} , whereas it was inhibited by Hg^{++} and Fe^{++} .

緒 論

優秀選拔菌株인 *Rhizopus japonicus*의 lipase를 硫安沈澱, Sephadex G 25에 의한 脫鹽, linear gradient elution method에 의한 CM cellulose column chromatography, Sephadex G 75에 의한 gel filtration 依하여 精製하고 Acylamide gel disc electrophoresis에 依하여 精製酵素의 純度を 檢定하여 그 結果를 報告한바 있다.⁽¹⁾

微生物 lipase의 酵素의 特性에 關한 研究로는 *Penici-*

llium oxalicum lipase,⁽²⁾ *Fusarium lini* lipase,⁽³⁾ *Penicillium roqueforti* lipase,⁽⁴⁾ *Rhizopus* 302 lipase,⁽⁵⁾ *Aspergillus niger* lipase, *Rhizopus delemar* lipase,⁽⁹⁾ *Candida cylindracea* lipase,⁽¹⁰⁾ *Candida Paralipolytica* lipase,⁽¹¹⁾ *Mucor pusillus* lipase,⁽¹²⁾ *Trichosporon cutaneum* lipase,⁽¹²⁾ *Geotrichum candidum* lipase,^(14,15) 등에 關한 研究를 들수있다.

筆者는 *Rhizopus japonicus*의 精製 lipase의 酵素의 特性을 多角의으로 檢討하고 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗方法

1. lipase activity의 測定

本實驗 條件下에서는 前記한 Nord 등의 變法으로 測定하였으며 0.05N NaOH Soln.의 滴定值가 3ml에 達할 때 까지는 酵素量과 滴定值가 比例하므로 이 範圍에 들도록 酵素의 濃度와 反應時間을 調節하여 測定하였다.

lipase activity 1 unit는 上記와 같은 條件下에서 1分間에 1 micro 當量의 脂肪酸을 遊離하는데 必要한 酵素量으로 하였다.

2. 供試精製酵素

Culture filtrate를 Ammonium sulfate (0.5% Saturation)로 沈澱시키고 Sephadex G25로 desalting, CM cellulose column chromatography, Sephadex G25로 濃縮, Sephadex G75 gel filtration에 依하여 Specific activity 126.5로 原活性의 約 45倍, 收率 4.2%가 되도록 精製한 lipase를 使用하였다.⁽¹¹⁾

實驗結果 및 考察

1. 酵素作用에 미치는 pH의 影響

Citrate-Phosphate buffer (pH 3~8)와 NH₄OH-NH₄Cl buffer(pH9~10)를 使用하여 基質溶液의 pH를 3~9로 調節한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 1과 같으며 最適pH는 6.8이었다.

微生物 lipase의 最適 pH에 관한 研究를 보면 *Trichosporon cutaneum* lipase⁽¹³⁾는 pH 8.0, *Aspergillus niger* lipase⁽⁸⁾는 pH 5.6, *Geotrichum candidum* lipase⁽¹⁴⁾는 pH 5.0~7.0, *Rhizopus delemar* A.B.C. lipase⁽⁶⁾는 pH 5.6, *Candida cylindracea* lipase⁽¹⁰⁾는 pH 7.2, *Candida paraliopolytica* lipase⁽¹¹⁾는 pH 8.0, *Mucor*

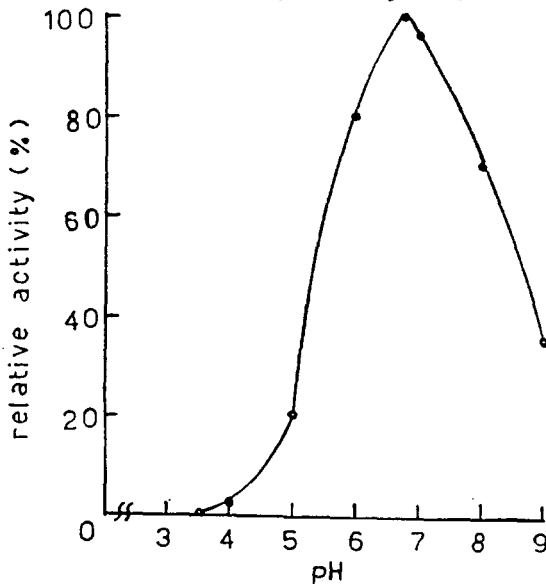


Fig. 1. Effect of pH on the lipase activity

pusillus lipase⁽¹²⁾는 PH5.0~5.5, *Rhizopus* 302⁽¹⁶⁾의 α-lipase는 pH 4.9, β-lipase는 pH 4.9와 6.8이라고 報告하였는데 本菌의 lipase는 微酸性에서 잘 作用하였다.

2. 酵素의 安定度에 미치는 pH의 影響

酵素液에 同量의 Citrate-Phosphate buffer 및 NH₄OH-NH₄Cl buffer를 加하여 所定 pH로 하고 30°C에서 12時間 維持한 後 0.1M phosphate buffer로 pH 6.8로 調節하고 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 2와 같이 安定 pH 範圍는 5.0~8.0이 었다.

微生物 lipase의 安定 pH範圍에 관한 研究를 보면 *Trichosporon cutaneum* lipase⁽¹³⁾는 4~9, *Rhizopus delemar* lipase⁽⁶⁾는 2.2~6.8, *Geotrichum candidum* lipase⁽¹⁵⁾는 4.6~9.8, *Candida cylindracea* lipase⁽¹⁰⁾는 2.0~8.5라고 報告하였는데 本菌의 lipase는 弱酸性에서 弱알칼리性에 걸쳐 安定하였다.

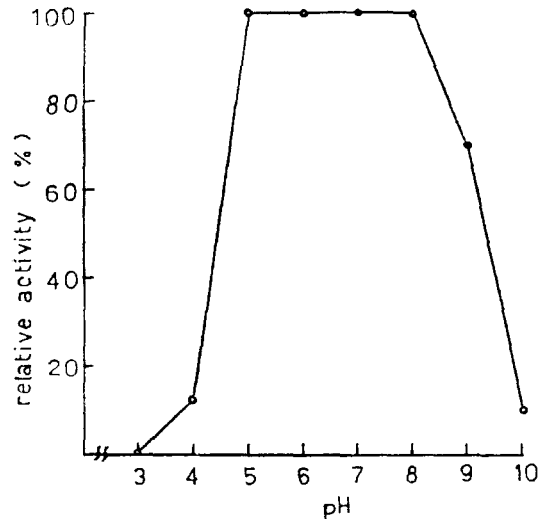


Fig. 2. Effect of pH on the lipase stability

3. 酵素作用에 미치는 溫度의 影響

0.1M phosphate buffer로 pH 6.8로 調節하고 20~45°C의 溫度에서 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 3과 같이 作用 最適溫度는 35°C이었다.

微生物 lipase의 最適溫度에 관한 報告를 보면 *Mucor pusillus* lipase⁽¹²⁾는 50°C, *Trichosporon cutaneum* lipase⁽¹³⁾는 37°C, *Aspergillus niger* lipase⁽⁸⁾는 25°C, *Geotrichum candidum* lipase⁽¹⁵⁾는 40°C, *Candida cylindracea* lipase⁽¹⁰⁾는 45°C, *Rhizopus delemar*⁽⁶⁾의 A lipase는 30°C B lipase는 40°C, C lipase는 35°C, *Candida paraliopolytica* lipase⁽¹¹⁾는 37°C로서 菌株에 따라 相當히 差를 알 수 있다.

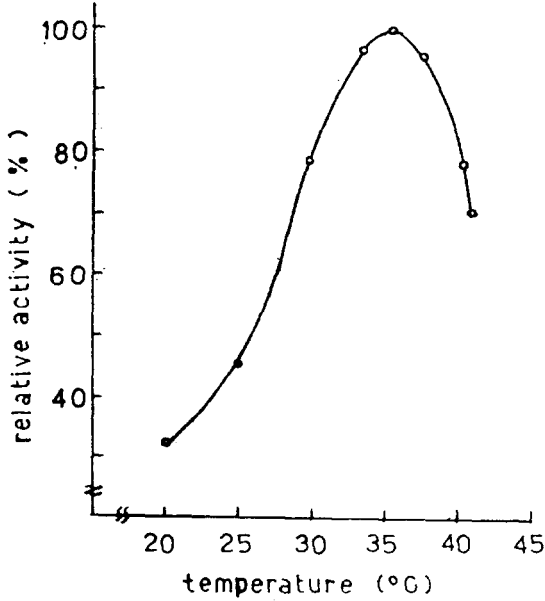


Fig. 3. Effect of temperature on the lipase activity

4. 酵素의 安定度에 미치는 温度의 影響

酵素液을 0.1M phosphate buffer(pH 6.8)에서 30°C ~60°C의 温度로 20分間 維持한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같이 45°C 以下에서는 安定하나 그 以上의 温度에서는 急激하게 不安定하였다.

微生物 lipase의 熱安定性에 關한 研究를 보면 *Trichosporon cutaneum* lipase⁽¹³⁾는 15~70°C로 60分間 處理하고 殘存活性을 測定한 結果 15°C의 處理로 5% 以上

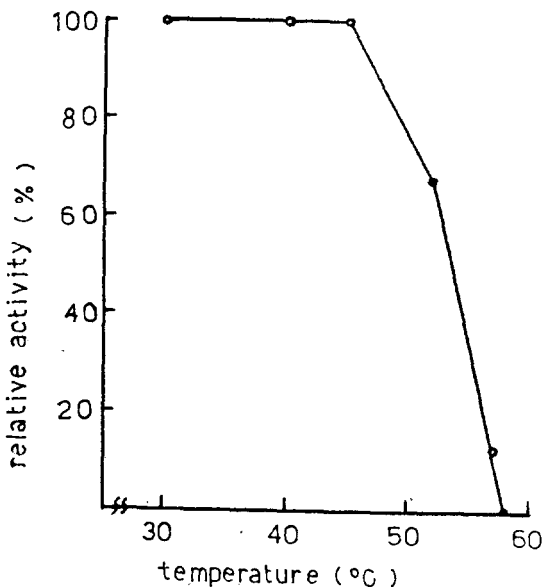


Fig. 4. Effect of temperature on the lipase Stability

이, 50°C의 處理로 88%가 失活되었으며, *Geotrichum candidum* lipase⁽¹⁵⁾는 55°C 以下에서, *Candida paraliptolytica* lipase⁽¹¹⁾는 37°C 以下에서, *Rhizopus delemar* A lipase⁽⁹⁾는 65°C, B,C lipase는 45°C 以下에서 *Candida cylindracea* lipase⁽¹⁰⁾는 15°C 以下에서, *Aspergillus niger*⁽⁸⁾는 50°C 以下에서, *Propionibacterium Shermani* lipase⁽¹⁷⁾는 45°C 以下에서 安定하다고 한 報告等으로 미루어 그 差가 큼을 알수 있다.

5. 酵素作用에 미치는 基質의 影響

各種 油脂를 Polyvinyl alcohol soln.으로 乳化시킨 基質溶液의 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 本菌의 lipase는 Coconut oil, Castor oil, palm oil을 特히 잘 分解시키며 Tween 80은 coconut oil에 比하여 約 30%程度의 分解能밖에 없었다.

Trichosporon cutaneum lipase⁽¹³⁾는 Sesame oil, Perilla oil, Soybean oil을 잘 分解시키나 Rape seed oil, Tributyrin, Triacetin, Tween 80 Span 20의 分解率은 極히 微弱하며 *Aspergillus niger* lipase⁽⁸⁾는 各種 植物油脂中 Olive oil, Wheat germ oil을 가장 잘 分解시키며 Triacetin, Tributyrin과 같은 低級脂肪酸의 glyceride 및 Tween, Span과 같은 特殊 ester도 相當히 分解시키나

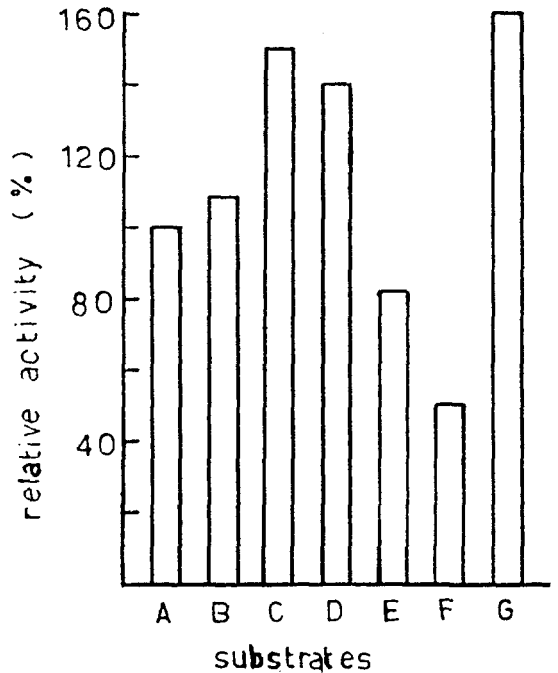


Fig. 5. Effect of substrates on the lipase activity

A : olive oil B : soybean oil C : castor oil
D : palm oil E : cotton seed oil
F : Tween 80 G : coconut oil

桐油, Castor oil, 야자油의 分解率은 낮으며 *Rhizopus delemar* lipase⁽⁹⁾는 olive oil, wheat germ oil, castor oil을 잘 分解시키나 桐油, 야자油의 分解率은 相當히 낮고 *Pseudomonas fragi* lipase^(18,19)는 合成 triglyceride 및 methylbutyrate를 *Staphylococcus* genus lipase^(20,21)는 tributyrin, tridecanoil, triolein을 잘 分解시키며 *Propionibacterium shermani* lipase⁽¹⁷⁾는 tripropionin을 가장 잘 分解시키고 또한 tributyrin, triacetin, tricaprilyn 등의 分解能을 가지고 있으며, *Penicillium roqueforti* lipase⁽²²⁾는 tripropionin, tributyrin, tricaprilyn, triolein 중에서 tributyrin을 가장 잘 分解시키나 triolein과 tripropionin의 分解率은 極히 낮다고 報告하였는데 本菌의 lipase는 *Aspergillus niger* lipase 및 *Rhizopus delemar* lipase와는 달리 coconut oil을 가장 잘 分解시켰다.

6. 酵素作用에 미치는 金屬이온의 影響

olive oil emulsion 5ml에 酵素液 1ml와 0.1M phosphate buffer (pH6.8) 3ml, 0.1M KCl NaCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, FeCl₃, SnCl₂, CuSO₄, HgCl₂를

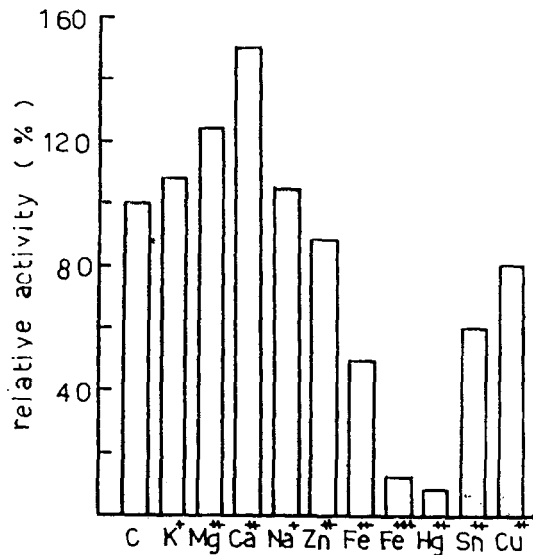


Fig. 6. Effect of metal ions on the lipase activity (c; control)

液 1ml를 各各 添加하고 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같이 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺이 가장 큰 活性化作用이 있었고, Hg⁺⁺, Fe⁺⁺은 가장 큰 阻害作用을 보여주었다.

微生物 lipase에 關한 金屬이온의 影響을 보면 *Aspergillus niger* lipase⁽⁶⁾의 活性은 Ca⁺⁺의 添加로 42% 增加되었으나 Li⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺, Na⁺, K⁺은 全然 活性化效果를 나타내지 않았고 *Rhizopus delemar* lipase^(23,24,25,26)는 Mg⁺⁺에 依하여 顯著하게 活性化되었으나 Li⁺에 依하여는 影響을 받지 않았으며, *Tricosporon cutaneum*

lipase⁽¹³⁾는 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺이온에 依하여 活性化效果를 나타내었으나 Cu⁺⁺과 Ca⁺⁺에 依하여 甚하게 阻害되었고, *Penicillium roqueforti* lipase⁽²²⁾는 Mn⁺⁺과 Mg⁺⁺에 依하여 活性化되었으나 Hg⁺⁺, Ag⁺, Zn⁺⁺에 依하여는 顯著하게 阻害되었고, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Co⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺에 依하여는 別影響을 받지 않았으며, *Candida paralipolytica* lipase⁽¹¹⁾는 Ca⁺⁺, Sr⁺⁺, Ba⁺⁺에 依하여 顯著하게 活性化되었으나 Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺에 依하여는 甚하게 阻害되었다고 報告하였는데 本菌의 lipase는 *Rhizopus delemar* lipase, *Trichosporon cutaneum* lipase와 같이 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺에 依하여 活性化되었으나 *Trichosporon cutaneum* lipase는 Cu⁺⁺에 依하여 顯著하게 阻害되는데 反하여 本菌의 lipase는 Hg⁺⁺과 Fe⁺⁺에 依하여 甚하게 阻害되었다.

要 約

*Rhizopus japonicus*의 精製 lipase의 特性을 檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 精製 lipase의 作用最適 PH는 6.8, 安定 PH 範圍는 5.0~8.0, 最適溫度는 35°C이고, 45°C以下에서 安定하였으며 그 以上の 溫度에서는 急激하게 不活性化되었다.
2. 精製 lipase는 coconut oil, castor oil 및 palm oil을 가장 잘 分解시켰다. olive oil, 및 soybean oil에서는 分解率이 약간 떨어지며, Tween 80에서는 分解率이 coconut oil의 30% 程度 밖에 되지 않았다.
3. 精製 lipase는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺에 依하여 顯著하게 活性化되었으며, Hg⁺⁺, Fe⁺⁺에 依하여는 甚하게 阻害되었다.

參 考 文 獻

- 1) 鄭萬在 : 한국식품과학회지, 8 (3), 141 (1976)
- 2) Kirsh, D.: *J. Biol. Chem.*, 108, 421 (1935)
- 3) Fiore, T.V. and Nord, F.F.: *Arch. Biochem.*, 23, 149 (1949)
- 4) Shipe, W.F.: *Arch. Biochem.*, 30, 165 (1951)
- 5) Tatsuoka, s., Miyake, A., Wada, s., and Matsumura, C.: *J. Biochem.*, 46, 575 (1959)
- 6) 福本, 岩井, 辻阪 : 科學と工業, 38, 373 (1964)
- 7) 福本, 岩井, 辻阪 : 日本酸化シンポジウム講演集, 18, 53 (1962)
- 8) Fukumoto, J., Iwai, M. and Tsujisaka, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9, 353 (1963)
- 9) 岩井, 辻阪, 板谷, 岡本, 福本 : 科學と工業 40, 18

- (1966)
10. Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1090 (1966)
- 11) Ota, Y. Nakayama, T. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1368 (1970)
- 12) Somkuti, G.A., Babel, F. J. and somkuti A.C.: *Appl. Microbiol.*, **17**, 606 (1969)
- 13) 金聖烈 : 忠南大學校大學院研究報告集, 53 (1972)
14. Iwai, M., Tsujisaka, Y., and Fukumoto, J.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 929 (1973)
- 15) Tsujisaka, Y. Iwai, M. and Tominaga, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1457 (1973)
16. Satomura, Y., Susumu, O., Swada, A. and Fukumoto, J.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **23**, 150 (1959)
17. Oterholm, A., Ordal, Z.J. and Witter, L.D.: *Appl. Microbiol.*, **20**, 16 (1970)
- 18) Lu, J.Y. and Liska, B. J.: *Appl. Microbiol.*, **18**, 104 (1969)
- 19) Lu, J.Y. and Liska, B.J.: *Appl. Microbiol.*, **18**, 108 (1969)
- 20) Shaha, D.B. and Wilson, J.B.: *J. Bacteriol.*, **89**, 949 (1965)
- 21) Tompson, A.F. and Morrison, G.R.: *Anal. Chem.*, **23**, 1153 (1951)
- 22) Eitenmiller, R.R., Vakil, J.R. and Shakani, K.M.: *J. Food Sci., & Tech.* **35**, 130 (1970)
- 23) 岩井, 辻阪, 福本 : 日本酸化シンポジウム講演集 235 (1964)
- 24) Iwai, M., Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10** 13 (1964)
- 25) Iwai, M., Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 87 (1964)
- 26) Iwai, M., Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J.: *Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 81 (1970)