

Trichosporon cutaneum Lipase의 作用機 作 및 位置特異性

金 聖 烈 · 李 春 寧*

忠南大學校 農科大學, 서울대학교 農科大學*

(1980년 3월 8일 수리)

The Mode of Action and the Positional Specificity of *Trichosporon cutaneum* Lipase

Seung Yeol Kim and Chun Yung Lee*

College of Agriculture, Chungnam National University and College of Agriculture,
Seoul National University*

Abstract

This study was conducted to clarify the mode of action and the positional specificity of *Trichosporon cutaneum* lipase during the course of hydrolysis of triolein and monoolein mixture by thin-layer chromatography.

1. The hydrolytic activity of the lipase to oleyl glycerides was in the order of triolein > diolein > monoolein.
2. Both of triolein and diolein were hydrolyzed by the lipase at high and almost the same rate.
3. The hydrolysis of monoolein by the lipase was very slow compared to the other two oleyl glycerides.
4. This lipase appeared to have a very low specificity toward the outer chains of triolein.

緒 論

Lipase에 依해서 triglyceride가 分解될 때 ester 結合中 어느 位置가 어느 順序로 切斷되는나하는 問題를 解明하기 爲한 研究은 오래前부터 試圖되어왔고 特히 胰臟 lipase의 作用機作에 關한 報告^{1,2)}는 많으며 오랫동안 triglyceride를 α, β -diglyceride를 거쳐 β -monoglyceride까지 分解하고 β 位置의 結合은 切斷하지 못하는 것으로 알려져 왔으나 後 Desnuelle³⁾ 등은 Ca과 多量의 물 및 bile salt가 存在하면 β 位置의 結合도 切斷한다고 報告하였고 Borgström⁴⁾도 同一한 結果를 얻

었다고 報告하였다. 한편 Savary^{5,6)} 등은 피마자 lipase 및 *Aspergillus flavus* lipase는 triglyceride에 對하여 位置特異性을 나타내지 않았다고 報告한바 있으며 最近에는 lipase의 精製方法이 開發됨에 따라 各種微生物이 生産하는 lipase를 精製하여 그들의 作用機作을 檢討, 報告하고 있으며 Ogiso⁷⁾ 등은 *Mucor*屬, Okumura⁸⁾ 등 및 福本⁹⁾ 등은 *Geotricum candidum* Link, *Penicillium cyclopium* Westring, *Aspergillus niger* 및 *Rhizopus delemar* 등이 生産하는 lipase의 作用機作에 關하여 報告하였으며 origin에 따라 作用機作에 差異가 있음이 알려져지고 있다.

著者 등은 強力 lipase 生産菌株로서 分離, 同

定¹⁰⁾되어 있으며 그 酵素生産條件, 精製方法 및 精製酵素의 一般의性質^{11,12)}이 알려진 *Trichosporon cutaneum* lipase의 作用機作을 thin layer chromatography 및 chromatogram analyzer를 사용하여 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

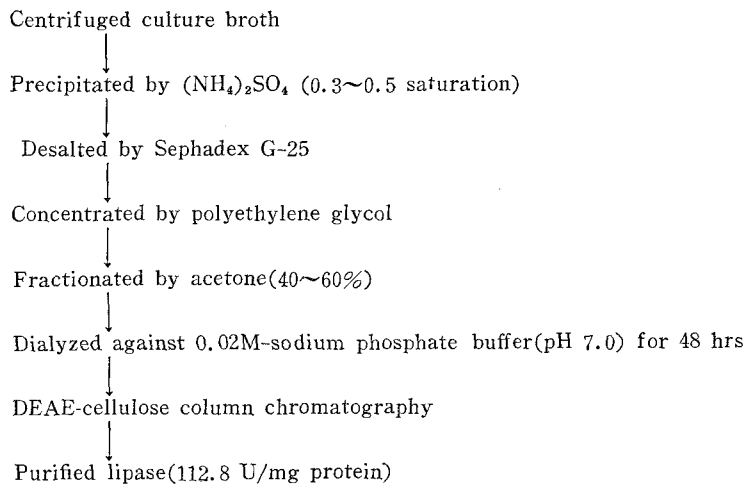
基質로 使用한 triolein 및 α, β -monoolein은 Nakarai Chemicals Ltd.製를 使用하였고 標準物質로 使用한 Oleic acid는 Nakarai Chemicals

Ltd.製, triolein, diolein, α -monoolein 및 β -monoolein은 上記基質들로부터 silica gel column chromatography¹³⁾法에 依해서 分離, 使用하였으며 thin layer chromatography用 展開溶媒인 ethyl ether, petroleum ether와 發色劑인 phosphomolybdic acid는 Wako Chemical Co. Ltd.製를 使用하였다.

2. Lipase

本試驗에 使用한 *Trichosporon cutaneum* lipase는 Table 1에 表示한 方法¹¹⁾에 依하여 精製한 酵素를 目的에 따라 適正濃度로 稀釋하여 使用하였다.

Table 1. Purification procedure for *Trichosporon cutaneum* lipase



3. 酵素作用

1) Triolein의 分解: Triolein의 分解順序를 檢討하는데는 前報¹²⁾의 脂質分解法(olive oil emulsion法)을 若干變形하여 使用하였으며 基質로서 olive oil 대신에 triolein을 使用하고 基質一定量에 對하여 適正濃度로 稀釋한 酵素液(15units/ml)을 1:1 및 1:2의 比率이 되도록 調節하여 作用시키면서 反應時間에 따르는 分解產物의 生成量을 測定하였다, 即 1 및 2ml의 triolein emulsion (2% polyvinyl alcohol 溶液中에 25%의 triolein을 乳化시킨 液) 1ml에 0.1M-phosphate citrate buffer(pH 7.0)를 加하여 37°C의 incubator中에서 10分間 豫熱하고 2ml의 上記酵素液을 加하여 1~24時間 靜置反應시킨 後 20ml의 ethyl ether를 加하여 酵素作用을 中止시키고 아울러 分解產物을 抽出하여 密栓해서 freezer中에 保管하였다가 TLC用試料로 使用하였으며 撮影用은 이 ether抽出液을 그대로 使用하였고 定量用은 이를

5배로 稀釋한 溶液을 使用하였으며 이들의 모든 室內操作은 5~10°C의 室溫下에서 遂行하였다.

한편 脂質의 分解速度確認을 爲해서는 Ogiso¹⁷⁾ 등의 攪拌法도 併用하였으며 0.2ml의 triolein을 0.3ml의 n-heptane에 溶解한 溶液에 1ml의 前記 buffer solution을 加하여 豫熱하고 前記酵素液 1ml를 加한 다음 magnetic stirrer로 攪拌(300rpm)하면서 1~24時間 作用시키고 前記한바와 같이 ether로 抽出하여 TLC 用試料로 使用하였다.

2) Monoolein의 分解: Monoolein은 polyvinyl alcohol 溶液中에서 잘 乳化되지 않았으므로 Ogiso¹⁷⁾ 등의 攪拌法을 使用하였으며 그의 分解方法 및 分解產物의 抽出, 測定方法은 上記한 triolein의 攪拌分解法과 同一한 方法을 使用하였다

4. Thin-layer chromatography

Ogiso¹⁷⁾ 등의 方法에 準하였으며 precoated silica gel plate(type 60, Merck)에 前記 ether 抽

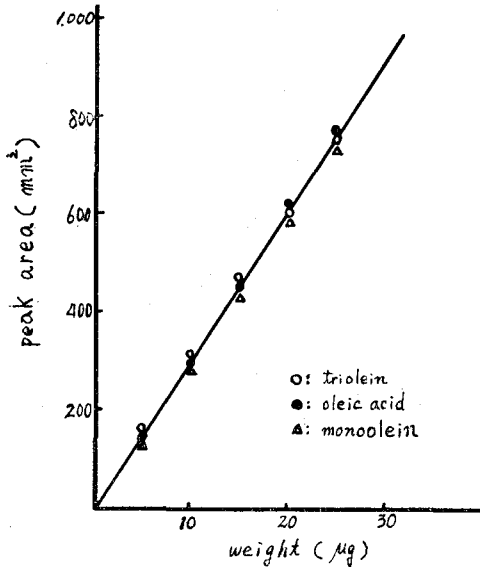


Fig. 1. Standard Calibration Curve of Oleyl glycerides and Oleic acid.

出液 5ml씩을 spotting하여 petroleum ether : ethyl ether : acetic acid=70 : 30 : 1의 溶媒系에서 約 12cm 展開하고 風乾한 後 10% ethanolic phosphomolybdic acid 溶液을 均一하게 噴霧하고 130°C에서 20分間 加熱하여 發色시켰다.

5. 分解産物の 定量

Phosphomolybdic acid에 依해서 發色된 脂質의 量을 VIS-UV-2 Chromatogram analyzer(Farrand Optical Co. Inc.)를 使用한 reflectance scanning에 依하여 測定하였으며 이들 spot의 吸

光度는 466nm에서 最大吸收値를 나타냈으므로 이 波長下에서 scanning하였고 試料量과 peak area間에는 Fig. 1과 같은 關係를 나타냈으므로 이 標準 calibration curve를 使用하여 脂質의 量을 計算하였다.

結 果

1. Triolein의 分解

A) Emulsion法에 依한 늦은 分解 : Triolein emulsion 一定量에 對하여 添加하는 酵素量을 調節하여 分解作用을 遲延시켰을 경우의 反應時間에 따르는 分解産物의 差異를 測定한 結果는 Fig. 2 및 Table 2에 나타난바와 같으며 反應初期부터 diolein과 α, β -monoolein이 蓄積되기 始作하였고 diolein은 oleic acid과 蓄積됨에 따라 減少하는데 反하여 α, β -monoolein의 蓄積은 反應 12時間까지 增加하다가 그後 若干 減少하는 傾向을 나타냈으며 $\alpha : \beta$ 의 比率은 2 : 1 内外를 維持하였다. 이와같이 diolein이 比較的 빠른 時間內에 減少되기 始作하는데 比하여 α, β -monoolein이 oleic acid의 生成量과 關係없이 繼續 蓄積되는 現象은 本 lipase의 diolein 分解速度가 monoolein 分解速度에 比하여 顯著히 빠르다는 事實을 意味하며 α -monoolein과 β -monoolein의 蓄積比率이 繼續 2 : 1 内外를 維持하는 現象은 이와같이 彌한 酵素作用下에 있어서는 monoolein의 分解가 거의 이루어지지 않는다는 事實을 意味한다고 認定된다.

Table 2. Composition of hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* lipase. (1) emulsion method, slow hydrolysis

Reaction time(hr)	Hydrolysis products				
	Triolein (mg%)	Diolein (mg%)	Oleic acid (mg)	Total monoolein (mg)	$\gamma(3)$ -monoolein(%)
Control	7,270	—	—	—	—
1	5,720	1,180	—	360	64.8
3	5,510	1,270	80	420	67.2
6	5,460	1,020	250	540	67.9
12	5,280	910	540	780	68.8
24	5,220	840	710	680	67.1

Note: TLC was performed with precoated silicagel plate and petroleum ether /ethyl ether/ acetic acid (70 : 30 : 1) as the solvent system, and 10% ethanolic phosphomolybdic acid as the detector. The charred spots were measured at 466 nm with a densitometer

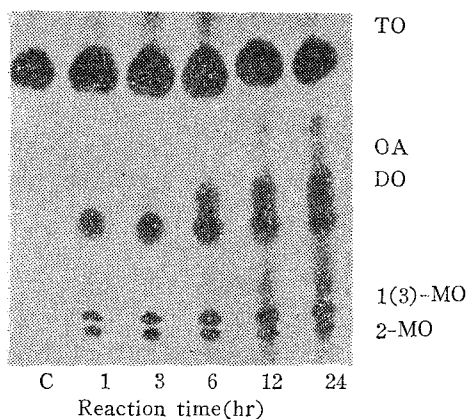


Fig. 2. Hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* lipase (1). (emulsion method, slow hydrolysis) The mixture which contained 2ml of triolein emulsion, 1ml of 0.1M-citrate phosphate buffer (pH 7.0), and 2ml of lipase solution (15 units) was incubated for each time at 37°C. After incubation, 20ml of ethyl ether were added to the reaction mixture to stop the reaction and to extract the reaction products. Five microliters of the ether extracts were spotted on silica gel plate. Petroleum ether/ethyl ether/acetic acid (70 : 30 : 1) as the solvent system and 10% ethanolic phosphomolybdic acid solution as the detector were used. TO, triolein; DO, diolein; OA, oleic acid; 1(3) and 2-MO, 1(3) and 2-monoolein; C, control.

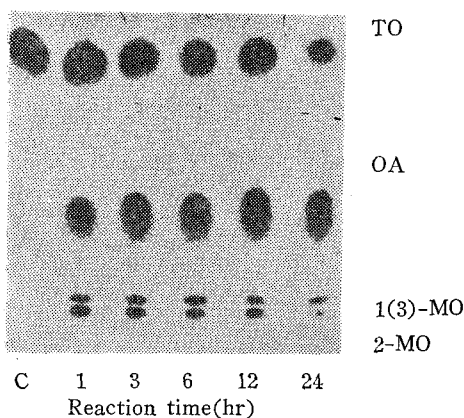


Fig. 3. Hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* lipase (2) (emulsion method, rapid hydrolysis) All procedures were carried out in the same way as described for Fig. 2. 1 ml of triolein emulsion was added to the reaction mixture in the experiments.

B) Emulsion法에 의한 빠른 分解: 前項에 比하여 酵素의 添加量을 2倍 增加시켜 分解作用을 増大시켰을 경우에는 Fig. 3 및 Table 3에 表示된 바와같이 反應初期부터 α, β -monoolein과 oleic acid가 蓄積되었을뿐 diolein은 나타나지 않았다. 이와같이 反應初期에도 diolein이 나타나지 않는 現象은 diolein의 分解速度가 triolein의 그

Table 3. Composition of hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* lipase (2) emulsion method, rapid hydrolysis

Reaction time (hr.)	Hydrolysis products			
	Triolein (mg%)	Oleic acid (mg%)	Total monoolein (mg%)	1(3)-monoolein (%)
control	3,810	—	—	—
1	3,042	540	228	65.8
3	2,280	1,440	252	61.9
6	1,820	1,740	270	63.0
12	1,530	1,940	249	64.5
24	1,260	2,160	206	62.0

Note: TLC plate, the solvent system and the detector were the same as note on Table 2.

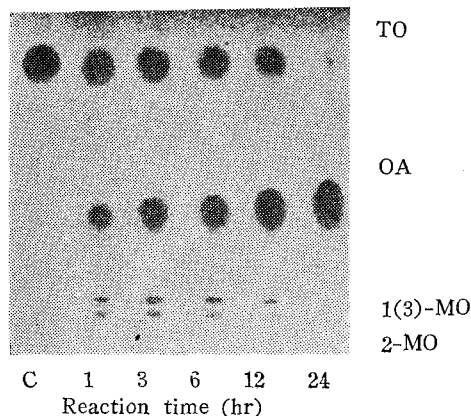


Fig. 4. Hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* lipase (3). (agitating method) The mixture which contained 0.2 ml of triolein, 0.3ml of n-heptane, 1ml of 0.1M-citrate phosphate buffer (pH 7.0) and 1ml of the lipase solution was incubated at 37°C for each time with constant agitation. After incubation, 20ml of ethyl ether were added to the reaction mixture to stop the reaction and to extract the reaction products. All procedures for TLC were carried out in the same way as described for Fig. 2.

것과 비슷한 정도로 빠르다는 사실을 의미하며 全過程中 相當량의 α, β -monoolein이 蓄積되어 있음은 monoolein의 分解速度가 그만큼 늦다는 사실을 의미하는 것이고 total monoolein에 對한 α -monoolein의 比率이 始終 60% 이상을 維持하고 있음은 本 lipase의 位置特異性이 그만큼 顯著하지 못하다는 사실을 의미한다고 推定되었다.

C) 攪拌法에 의한 分解: 攪拌法에 의하여 triolein의 거의 大部分이 分解될 때까지 反應시켰을 때 나타난 結果는 Fig. 4 및 Table 4에 表示된 바와 같으며 Emulsion法에 의한 빠른 分解時에 있어서와 같이 反應初期부터 α, β -monoolein과 oleic acid만 蓄積되고 diolein은 나타나지 않았고 α, β -

Table 4. Composition of hydrolytic products of triolein by *Trichosporon cutaneum* Lipase. (3) agitating method, rapid hydrolysis

Reaction time (hr.)	Hydrolytic Products			
	Triolein (mg%)	Oleic acid (mg%)	Total monoolein (mg%)	1(3)-monoolein (%)
Control	3,715	—	—	—
1	3,240	220	250	64.0
3	1,710	1,740	270	63.0
6	1,480	1,990	240	60.5
12	1,280	2,250	212	61.0
24	82	3,510	110	57.5

Note: TLC plate, the solvent system and the detector were the same as note on Table 2.

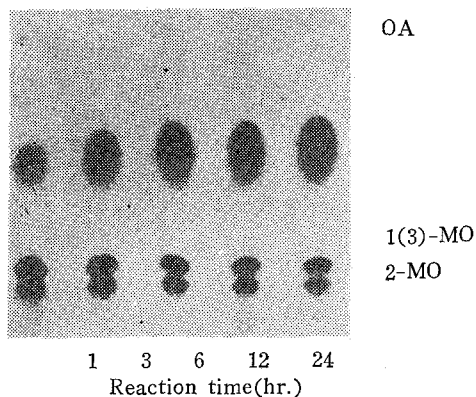


Fig. 5. Hydrolytic products of monoolein mixture by *Trichosporon cutaneum* lipase (agitating method) All procedures were carried out in the same way as described for Fig. 4. Monoolein mixture(1(3) : 2=77 : 23) was used as the substrate in the experiments.

monoolein은 triolein의 大部分이 分解될 때까지 殘存하여 本 lipase의 monoolein 分解速度가 大端히 늦다는 사실이 確認되었고 分解產物中の total monoolein에 對한 α -monoolein의 比率이 漸次 低下(64~57%)하여 本 lipase의 微弱한 α -位置特異性이 推定되었다.

Table 5. Composition of hydrolytic products of monoolein mixture(1(3) : 2=77 : 23) by *Trichosporon cutaneum* Lipase. (agitating method)

Reaction time(hr.)	Hydrolytic products		
	Total monoolein (mg%)	Oleic acid (mg%)	1(3)-monoolein(%)
Control	1,710	—	77.0
1	1,100	606	74.5
3	1,010	920	71.0
6	880	980	68.5
12	670	1,090	64.0
24	610	1,130	56.0

Note: TLC plate, the solvent system and the detector were the same as note on Table 2.

2. Monoolein의 分解

Triolein 分解法에 依해서 本 lipase의 微弱한 α -位置特異性이 推定되었으나 보다 積極인 方法에 依해서 이를 確認하기 爲하여 α, β -monoolein mixture(77 : 23)를 基礎로 하여 分解시킨 結果는 Fig. 5 및 Table 5에 나타난 바와 같으며 total monoolein에 對한 α -monoolein의 比率이 77%에서 56%까지 低下하는 現象을 나타내어 微弱한 α -位置特異性이 確認되었다.

考 察

臍臟 lipase의 位置特異性^{1,2)}에 對하여는 널리 알려져 있으며 triglyceride의 α 位置는 容易하게 分解하나 β 位置는 잘 分解하지 못하며 triglyceride의 分解速度는 大端히 빠르나 monoglyceride의 分解速度는 매우 늦은 것으로 認定되고 있다. 最近 Ogiso³⁾ 등은 *Mucor* lipase가 triglyceride의 α 位置를 먼저 分解하고 다음에 β 位置를 分解하며 加水分解速度는 triglyceride > diglyceride = monoglyceride의 順이나 bile salt가 存在하면 diglyceride > monoglyceride의 順으로 變하고 bile salt는 初期分解速度를 促進하나 末期分解速度에는 影響을 주지않거나 오히려 遲延시키는 傾

向을 나타냈다고 報告한바 있는데 本 *Trichosporon cutaneum* lipase의 脂質分解速度는 triglyceride > diglyceride > monoglyceride의 順이었고 diglyceride의 分解速度는 triglyceride의 그것과 비슷한 程度로 빠른데 比하여 monoglyceride의 分解速度는 大端히 늦어 거의 大部分의 triglyceride가 分解될때까지 殘存하였다. 따라서 本lipase의 monoglyceride分解速度는 胰臟 lipase^{1,2)}의 그것과 一致하는 傾向을 나타냈다고 볼 수 있으나 特殊한 反應條件下에서가 아니면 蓄積되지 않을 程度로 빠른 diglyceride 分解速度는 本lipase의 特殊한 性質이라고 認定되며 이와같은 性質을 가진 lipase에 關한 既往의 報告는 찾아 볼 수 없다

한편 Savary^{5,6)} 등은 일찌기 피마자 lipase와 *Aspergillus flavus* lipase가 α, β 位置特異性を 나타내지 않았다고 報告한바 있고 最近 Okumura⁸⁾ 등은 *Aspergillus niger* lipase와 *Rhizopus delemere* lipase는 強한 α 位置特異性を 나타내어 β 位置는 分解하지 못하였으나 *Geotricum candidum* Link lipase와 *Penicillium cyclopium* Westring lipase는 位置特異性を 나타내지 않았다고 報告한바 있는데 本 *Trichosporon cutaneum* lipase는 極히 微弱한 α 位置特異性を 나타내어 既往에 報告된 lipase들과는 다른 位置特異性を 가졌다고 認定된다. 이와 別途로 bile salt의 影響에 對해서도 檢討하였으나 Ogiso⁷⁾ 등이 報告한 바와 같이 triolein의 初期分解速度를 促進하기는 하였으나 diolein 및 monoolein의 分解速度에는 影響을 주지 않았다.

摘 要

Trichosporon cutaneum lipase의 作用機作 및 位置特異性を thin-layer chromatography 및 densitometer를 使用하여 檢討하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 本 lipase 脂質分解速度는 triolein > diolein

> monoolein의 順이었다.

2. 本 lipase의 diolein 分解速度는 triolein의 그것과 비슷한 程度로 빨랐다.

3. 本 lipase의 monoolein分解速度는 triolein 및 diolein의 그것에 比하여 顯著히 늦었다.

4. 本 lipase는 極히 微弱한 α -位置特異性を 나타내었다.

參 考 文 獻

1. Wills, E.D.: Advans. Lipid Res., 3: 197 (1965)
2. 岩井美枝子, 辻阪好夫: 科學と工業, 39: 415 (1965)
3. Desnuelle, P., Naudet, M. and Constantin, M.J.: Biochim. Biophys. Acta., 7: 251 (1953)
4. Borgström, B.: Acta. Physiol. Scand., 30: 231(1954)
5. Savary, P., Franzy, J. and Desnuelle, P.: Bull. Soc. Chim. Biol., 39: 413(1957)
6. Savagy, and Franzy, J.: Bull. Soc. Chim. Biol., 40: 637(1958)
7. Ogiso, T. and Sugiura, M.: Chem. Pharm. Bull., 19: 2457(1971)
8. Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y.: Agr. Biol. Chem., 40: 655(1976)
9. 福本素一郎, 岩井美枝子, 辻阪好夫: 科學と工業, 38: 373(1964)
10. 金聖烈: 한국농화학회지, 15: 221(1972)
11. 金聖烈: 忠南大 大學院 研究報告集, 1: 53 (1973)
12. 金聖烈: 忠南大 農業技術研究所報, 4: 105 (1973)
13. Quinlin, P. and Weiser, H. J. Jr.: J. Am. Oil Chemist's Soc., 35: 325(1958)