

## 배양 조건이 *Candida albicans*의 phospholipase 생성에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 미생물학교실  
신운섭 · 이경호 · 박주영 · 고춘명

=Abstract=

### Effects of Culture Condition on Secretion of Phospholipase from *Candida albicans*

Woon-Seob Shin, Kyoung-Ho Lee, Joo Young Park and Choon-Myung Koh

Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

**Background:** The dimorphic yeast, *Candida albicans*, is considered as a dangerous opportunistic pathogen in immunocompromised hosts. Several phospholipases of *C. albicans* are known to be secreted into the culture medium. Phospholipases have been proposed as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infections.

**Objective:** In order to investigate enzyme production, we examined culture condition of secreted phospholipase production from *C. albicans*.

**Methods:** *C. albicans* ATCC 10231 was cultivated in various media at 37°C for 3 days.

Phospholipase activity was measured by fatty acid soap precipitation in plate containing 0.04% lecithin, 0.1 M citrate buffer, pH 4.2 and 1.5% noble agar.

**Results:** Phospholipase was highly induced when *C. albicans* was cultivated in broth medium (containing glucose 2%, albumin 0.2% and Fe<sup>++</sup> ion 0.01%) and Saboulaud's dextrose agar supplemented with 0.01% sodium deoxycholate.

**Conclusion:** Highly induction of secreted phospholipase by albumin from *C. albicans* may be play an important role in tissue invasion in the pathogenesis of *C. albicans*.

[Kor J Med Mycol 2(2): 123-128]

**Key Words:** *Candida albicans*, Phospholipase, Production

### 서 론

*Candida albicans*는 건강한 사람에서는 정상 균총으로 존재하여 심각한 감염을 유발하지 않으나 암환자, 장기 이식 환자, 후천성 면역 결핍 환자 그리고 장기 입원 환자 등 면역이 저하된 환자에게 치명적인 감염을 일으킨다<sup>1</sup>. 칸디다증의 병인 과정에는 한 종류의 독성 인자보다는 여러 가지 독성 인자가 상호 작용한다. 이런 독성 인

자들로는 조직 표면의 부착에 관계하는 인자들, germ tube 형성능, 조직 침습에 관여하는 효소들이 알려져 있으며<sup>2</sup>, 각 독성 인자들은 배지 성분이나 배양 조건에 따라 다르게 발현된다<sup>3</sup>. 이러한 독성 인자 중 조직 표면 부착능, germ tube 형성능, proteinase 생성능 등의 시험관내의 발현에 관한 실험들은 비교적 자세히 연구되었으며 각 독성 인자의 발현이 서로 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 그리고 칸디다 균주의 독성 인자 중 조직 침습에 관여하는 효소들로는 pro-

\* 본 연구는 1996년도 보건 의료기술 연구개발사업(# HMP-96-M-2-1060)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

† 별책 요청 저자: 신운섭, 220-701 강원도 원주시 일산동 162 연세대학교 원주의과대학 미생물학교실

teinase와 phospholipase가 알려져 있으며 이들 중 proteinase의 생성 조건은 잘 밝혀졌다<sup>4, 5, 6</sup>. 최근 Ibrahim 등<sup>7</sup>은 phospholipase 생성능이 높은 균주가 마우스 치사능이 높다고 보고하였으며 다른 독성 인자보다도 phospholipase가 *Candida* 병인에서 가장 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

Phospholipase에는 phospholipase A, B, C, D 등의 종류가 있으며 칸디다에서는 lysophospholipase, lysophospholipase-transacylase, phospholipase의 3가지 형태가 알려져 있다<sup>8</sup>. 이들은 세포막의 인지질을 분해하여 염증 반응에 관여한다<sup>9</sup>. Phospholipase를 높게 발현하는 균주가 마우스 치사능이 높으며 아울러 phospholipase를 높게 발현하는 균주가 세포표면의 소수성이나 proteinase의 발현이 높다고 보고하였다<sup>10</sup>. Banno 등<sup>11</sup>은 *C. albicans*는 3가지 형태의 phospholipase를 분비한다고 보고하였으며, Takahashi 등<sup>12</sup>과 Mirbod 등<sup>13</sup>은 서로 다른 형태의 lysophospholipase-transacylase를 분리하여 보고하였다.

Phospholipase 중에서도 phospholipase A나 phospholipase B가 주요 독성 인자로 생각되고 있으나 아직 phospholipase A나 phospholipase B형의 phospholipase의 분리나 그 성질 및 발현 조건에 관한 연구는 자세히 연구되어 있지 않은 형편이다. 따라서 본 연구에서는 *C. albicans*에서 여러 가지 배양 조건에 따른 phospholipase의 생성 양상을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험균주

*C. albicans* ATCC 10231을 Sabouraud's dextrose 액체 배지에서 3일간 배양하여 증류수로 세척한 후 멸균 증류수에  $1 \times 10^8$  cells/ml가 되도록 현탁하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 사용배지

평판 배양을 이용하여 phospholipase 생성에 미치는 질소원과 탄소원의 영향을 조사할 때는 탄소원의 경우 yeast nitrogen 배지 (Difuco)에 각종 탄소원을 각각 1%되게 첨가하여 사용하였으며 질소원의 경우는 yeast carbon 배지 (Difuco)에 각종 질소원을 각각 0.2%되게 첨가하여 사용하였다. 그리고 pH에 의한 영향과 각종 계면활성제에 의한 영향 조사시는 Sabouraud's dextrose 고체

배지를 기본 배지로 이용하였다.

액체 배양을 이용하여 phospholipase 생성능을 조사할 때는 Sabouraud's dextrose 액체 배지를 기본 배지로 사용하였다.

### 3. Phospholipase 활성 측정

평판 배양으로 phospholipase의 활성을 측정할 때는 Price 등의 방법<sup>14</sup>을 변형하여 증류 배지를 이용하였다. 먼저 bottom agar (0.1% sodium chloride, 0.001% calcium chloride, 0.2% lecithin, 1.5 % agar) 10 ml을 평판에 넣어 굳힌 후 여기에 각종 한천 배지를 10 ml씩 넣어 평판배지를 만들었다. 이 평판 위에 *C. albicans*를 면봉으로 접종하고 37°C에서 3일간 배양하여 이때 생성되는 침전대의 직경을 측정하여 침전대의 직경과 집락의 직경과의 비 (Pz value, 집락의 직경/침전대의 직경)로 phospholipase 활성을 나타내었다. 액체 배양액으로부터 phospholipase의 활성을 측정할 때는 sodium chloride 0.1%, calcium chloride 0.001% 그리고 Triton X-100이 0.05% 함유된 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.3)에 lecithin을 0.04%되도록 넣어 30분간 초음파를 사용하여 현탁시켰다. 그리고 여기에 멸균된 3% agar 용액을 동량을 섞어 평판을 만들었다. 그리고 이 평판 위에 5 mm 직경의 구멍을 뚫은 후 효소 용액을 30  $\mu$ l를 넣어 37°C 배양기에서 12시간 배양하였을 때 생성되는 침전대의 직경을 측정하였다.

### 4. 성장곡선

Spectrophotometer로 균수와 580 nm에서 흡광도의 상관관계를 기준으로 *C. albicans*의 증식을 표시하였다.

## 실험 결과

### 1. 탄소원에 따른 phospholipase의 생성능

*C. albicans*를 각종 탄소원이 1%씩 첨가된 yeast nitrogen base 평판 배지에 접종한 후 37°C 배양기에서 3일간 배양하였으며 또한 Sabouraud's dextrose 액체 배지의 glucose 대신 각종 탄소원을 4%씩 각각 첨가한 배지에 *C. albicans*를 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 phospholipase 생성능을 측정하였다 (Table 1).

고체 배양에서는 약하게 phospholipase의 활성을 관찰할 수 있었지만 탄소원에 따른 phos-

phospholipase의 생성능은 구분할 수 없었다. 액체 배양에서는 glucose를 탄소원으로 했을 때보다 galactose나 maltose 또는 sucrose를 탄소원으로 했을 때 phospholipase의 생성이 증대되었으며 fructose나 lecithin을 탄소원으로 했을 때는 오히려 phospholipase의 생성이 감소하였다.

Glucose 농도에 따른 phospholipase 생성능을 알아보기 위하여 Sabouraud's dextrose 액체 배지 내의 glucose 농도를 각각 0.5~8%까지 맞추어 배지를 만든 후 *C. albicans*를 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였다 (Fig. 1). Phospholipase의 생성능은 glucose 농도가 2%일때 까지 증가하였으나 glucose 농도가 4% 이상에서는 오히려 phospholipase 생성능이 감소하였다.

### 2. 질소원에 따른 phospholipase 생성능

고체 배양을 이용하여 phospholipase의 생성능을 측정할 때는 yeast carbon base에 각종 질소원을 각각 0.2%가 되도록 첨가하여 lecithin agar 위에 중층한 후 *C. albicans*를 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였다 (Table 2).

무기질소원과 asparagine에서 배양하였을 때

**Table 1.** Effect of carbon source on the production of phospholipase from *C. albicans*

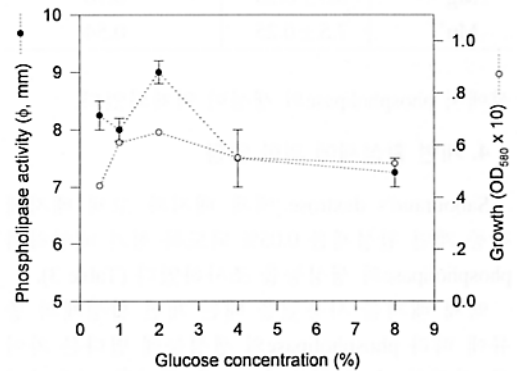
Carbon source	Activity (Φ, mm)	Growth (OD <sub>580</sub> × 10)
Glucose	8.3 ± 0.25	0.64
Galactose	9.8 ± 0.25	0.77
Fructose	8.0 ± 0.5	0.67
Maltose	9.3 ± 0.25	0.77
Sucrose	9.3 ± 0.25	0.71
Lecithin	7.0 ± 0.5	0.75

는 phospholipase의 생성이 억제되었으며, 유기질소원에서 배양할시에는 phospholipase의 생성이 유도되었다. 특히 yeast extract나 peptone보다는 albumin을 질소원으로 하였을 때 Pz value가 0.37로서 phospholipase 생성능이 가장 높았다.

액체 배양으로 phospholipase의 생성능을 조사하였을 때도 무기 질소원과 asparagine 보다는 yeast extract, peptone, serum 등의 유기 질소원에서 phospholipase의 생성이 증가되었으며 특히 albumin을 질소원으로 하였을 때 phospholipase의 생성능이 가장 높았다.

### 3. 인산염 농도에 따른 phospholipase의 생성능

Phospholipase 생성에 미치는 인산염 농도의 영향을 조사하기 위하여 Sabouraud's dextrose 액체 배지에 인산염을 각 농도별로 첨가한 후 *C. albicans*를 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 phospholipase의 생성능을 조사하였다 (Fig. 2). 인산염을 첨가하지 않았을 때 오히려 phospholipase의 생성능이 높았으며 인산염의 농도가 0.01% 이



**Fig. 1.** Effect of glucose concentration on the production of phospholipase from *C. albicans*.

**Table 2.** Effect of nitrogen source on the production of phospholipase from *C. albicans*

Nitrogen source	Broth culture		Solid culture
	Activity (Φ, mm)	Growth (OD <sub>580</sub> × 10)	Activity (Pz value)
Sodium nitrate	6.0 ± 0.5	0.05	1.00
Ammonium sulfate	5.8 ± 0.25	0.11	1.00
Asparagine	5.8 ± 0.25	0.16	1.00
Peptone	7.0 ± 0.5	0.69	0.55 ± 0.04
Yeast extract	8.5 ± 0.5	0.68	0.68 ± 0.02
Serum	8.5 ± 0.25	0.31	0.42 ± 0.02
Albumin	12.0 ± 0.5	0.12	0.37 ± 0.001

**Table 3.** Effect of surfactant on the production of phospholipase from *C. albicans*

Surfactant	Broth culture		Solid
	Activity ( $\Phi$ , mm)	Growth ( $OD_{580} \times 10$ )	Activity (Pz value)
Control	$7.3 \pm 0.25$	0.51	$0.55 \pm 0.01$
Sodium	$8.0 \pm 0.5$	0.73	$0.45 \pm 0.02$
Tween 20	$7.0 \pm 0.5$	0.58	$0.71 \pm 0.02$
Tween 80	$8.0 \pm 0.25$	0.45	$0.66 \pm 0.04$
Tritone X-100	$7.0 \pm 0.5$	0.55	$0.65 \pm 0.02$

**Table 4.** Effect of metal ion on the production of phospholipase from *C. albicans*

Metal ion	Activity ( $\Phi$ , mm)	Growth ( $OD_{580} \times 10$ )
Control	$8.0 \pm 0.25$	0.65
Na <sup>+</sup>	$8.0 \pm 0.5$	0.65
K <sup>+</sup>	$8.3 \pm 0.25$	0.69
Zn <sup>+</sup>	$7.0 \pm 0.25$	0.20
Fe <sup>++</sup>	$10.5 \pm 0.25$	0.76
Ca <sup>++</sup>	$8.5 \pm 0.25$	0.76
Mg <sup>++</sup>	$8.3 \pm 0.25$	0.70
Mn <sup>++</sup>	$7.5 \pm 0.25$	0.54

상에서 phospholipase의 생성이 억제되었다.

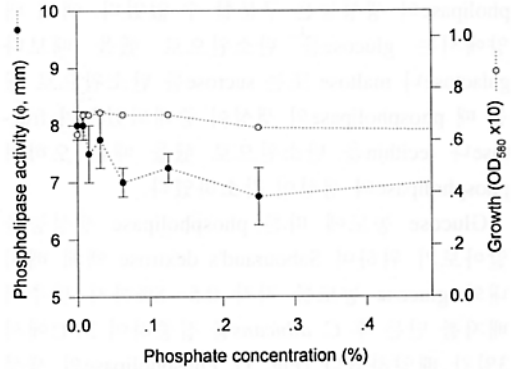
**4. 계면 활성제에 의한 영향**

Sabouraud's dextrose 액체 배지와 고체 배지에 각종 계면 활성제를 0.05% 되도록 첨가 배양하여 phospholipase의 생성능을 조사하였다 (Table 3).

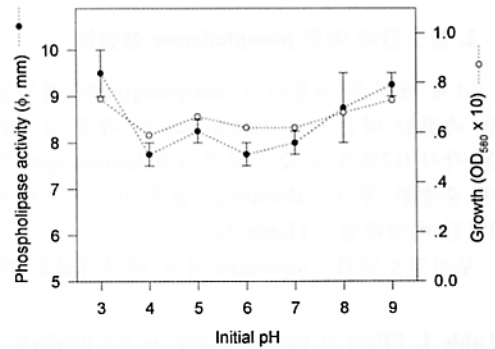
액체 배지를 사용했을 때는 계면 활성제의 종류에 따라 phospholipase의 생성능에 별다른 차이를 관찰할 수 없었으나, 고체 배지를 사용하여 phospholipase의 생성능을 조사하였을 때 Tween 20, Tween 80 또는 Triton X-100을 첨가하여 배양한 경우가 대조군 (Pz 0.55)에서 보다 phospholipase의 생성이 억제되었으며 (Pz 0.65~0.7), sodium deoxycholate를 첨가하여 배양하였을 때는 오히려 Pz value가 0.4로서 phospholipase의 생성이 증가하였다.

**5. 배양 pH에 의한 영향**

1 M HCl과 1 M NaOH를 사용하여 Sabouraud's dextrose 액체 배지와 고체 배지의 pH를 각각 3-9로 맞춘 후 *C. albicans*를 배양하여 pH에 따른 phospholipase의 생성능을 조사하였다 (Fig. 3).



**Fig. 2.** Effect of phosphate concentration on the production of phospholipase from *C. albicans*.



**Fig. 3.** Effect of pH on the production of phospholipase from *C. albicans*.

액체 배지를 사용하였을 때는 중성 pH 보다 pH 3과 pH 9에서 오히려 phospholipase의 생성이 증대되었으며 고체 배지를 사용하였을 때는 pH에 따른 phospholipase의 생성능에 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

**6. 금속 이온에 의한 영향**

각종 금속 이온을 각각 0.01% 되도록 Sabouraud's dextrose 액체 배지에 각각 첨가하여 *C. albicans*를 배양한 후 phospholipase의 생성능을 측정하였다 (Table 4).

Zn<sup>++</sup>이온은 phospholipase의 생성을 감소시켰으며, Fe<sup>++</sup>를 제외한 실험에 사용한 금속 이온들은 phospholipase의 생성에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 그러나 Fe<sup>++</sup>이온의 경우는 phospholipase의 생성을 현저하게 증가시켰다.

## 고 찰

장기이식 및 감염병 치료제의 개발 등 여러 가지 의학기술의 발전과는 반대로 진균 감염증은 과거 20 여년간 계속 증가하여 왔다. 칸디다는 건강한 사람에게는 정상 균총으로 존재하고 있으나 암환자, 장기이식 환자, 후천성 면역결핍 환자, 장기 입원 환자 등 면역이 저하된 환자에게는 치명적인 전신 감염을 일으킨다<sup>1</sup>. 칸디다 균주가 병을 일으키기 위하여는 면역 상태 등의 숙주측의 요인 뿐만 아니라 칸디다 균주 자체의 독성 인자가 중요한 역할을 한다. 이들 독성 인자 중 조직 침습에 관여하는 독성 인자로서 proteinase와 phospholipase가 알려져 있다<sup>4</sup>. 최근 phospholipase의 생성이 높은 균주가 병독성이 높다고 보고되고 있으므로 phospholipase가 독성 인자로서의 중요한 역할을 하리라 생각되고 있다<sup>7, 10</sup>. 칸디다의 독성 인자들은 배양 조건에 따라 독성 인자의 생성이 차이가 나는 것으로 보고 되었으며 proteinase의 경우는 단백질에 의하여 강력히 유도된다고 보고되었다<sup>5, 15, 16</sup>. 그러나 phospholipase의 생성에 관하여는 아직까지 자세 히 연구되어 있지 못한 형편이다. 따라서 본 연구에서는 배양 조건에 따른 phospholipase의 생성 능력을 조사하였다.

본 실험에서 보여준 탄소원에 따른 phospholipase의 생성능 결과는 고체 배양시 galactose나 sucrose에 의해 phospholipase의 생성이 억제된다는 보고와는 상이하였다<sup>17</sup>. 질소원에 따른 phospholipase 생성 실험에서 액체 배지를 사용할 때와 고체 배지를 사용할 때 모두 무기 질소원에서는 phospholipase의 생성이 억제되었으며, 유기 질소원에서는 phospholipase의 생성이 촉진되었다. 특히 질소원으로 albumin을 사용하였을 때 phospholipase가 강력히 유도되었다. 또한 proteinase도 albumin에 의하여 유도되며 기타 무기 질소원이나 아미노산에서는 유도되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>5, 15, 16</sup>. 이러한 결과로 볼 때 *C. albicans*가 실제 숙주 세포로 침입시 숙주의 단백질에 의해 proteinase와 phospholipase의 생성이 동시에 유도됨으로서 proteinase와 phospholipase의 파인 생성이 조직 침습에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 또한 phospholipase를 높게 생성하는 균주가 proteinase 생성능도 높고 germ tube 형성

능도 높다고 보고되었다<sup>18</sup>. 이러한 것은 칸디다의 독성 인자의 유전자들이 같은 조절 인자에 의해 조절되어 조직 침습시 각 독성 인자들이 동시에 발현하는 것으로 생각할 수 있으므로 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

한편 고 등<sup>19</sup> 및 Samaranayake 등<sup>17</sup>은 phospholipase의 생성이 pH 3-4의 좁은 범위에서 촉진되며 pH 9에서는 phospholipase가 생성되지 않는다고 보고하였으나 본 실험에서는 pH 3에서 pH 9까지의 범위에서 phospholipase가 생성되었다. 이러한 phospholipase의 생성능의 차이는 실험에 사용한 배지의 차이 때문으로 생각되었다. 그리고 인산염, glucose 및 무기 질소원에서 phospholipase의 생성이 억제되는 것은 아마도 carbon이나 nitrogen catabolite repression에 의한 것으로 생각된다.

## 결 론

액체 배지와 고체 배지를 이용하여 배양 조건에 따른 phospholipase의 생성능을 조사한 결과를 종합하여 보면 탄소원으로 glucose와 fructose를 사용했을 때 phospholipase 생성이 억제되었으며 sucrose, galactose, maltose를 사용하였을 때는 phospholipase의 생성이 증가하였다. 질소원으로 무기 질소원을 사용하였을 때보다는 유기 질소원을 사용하였을 때 phospholipase의 생성이 증가되었으며, 특히 albumin을 사용하였을 때 phospholipase의 생성이 현저히 증가하였다.

초기 배양 pH를 pH 3이나 pH 9로 조절하여 배양하였을 때에도 효소 생성이 증대되었으며 sodium deoxycholate 또는 Fe<sup>++</sup>이온을 첨가하여 배양하였을 때에도 phospholipase의 생성이 증가하였다.

## 참 고 문 헌

1. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. Clin Infect Dis 1992; 14 (suppl): 43-53
2. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol 1991; 45: 187-218
3. 이경호, 고춘명. *Candida albicans* 에서 배양

- 조건이 세포표면 소수성 (Cell surface hydrophobicity)의 발현에 미치는 영향. 대한미생물학회지 1990; 25: 51-59
4. Ogawa H, Nozawa Y, Rojanavanich M et al. Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infection. J Med Vet Mycol 1992; 30 (suppl 1): 189-196
  5. Lerner CG, Goldman RC. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. J Gen Microbiol 1993; 139: 1643-1651
  6. Banerjee A, Ganesan K, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1991; 137: 2455-2461
  7. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler-SG. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun 1995; 63: 1993-1998
  8. Waite M. Phospholipases, enzymes that share a substrate class. Adv Exp Med Biol 1990; 279: 1-22
  9. Filler SG, Ibe BO, LUCKETT PM, Raj JU, Edwards JE Jr. *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. J Infect Dis 1991; 164: 928-935
  10. Barrett BK, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 1985; 131: 1217-1221
  11. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. Sabouraudia 1985; 23: 47-54
  12. Takahashi M, Banno Y, Nozawa Y. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. J Med Vet Mycol 1991; 29: 193-200
  13. Mirbod F, Banno Y, Ghannoum MA et al. Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 1995; 1257: 181-188
  14. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20: 7-14
  15. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol 1995; 177: 5215-5221
  16. Lam M, Peterkin V, Reiss E, Morrison CJ. Effect of growth conditions on the extracellular production of the aspartic proteinase by *Candida albicans*. Adv Exp Med Bio 1991; 306: 265-267
  17. Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia 1984; 22: 201-207
  18. 고춘명, 김수기. *Candida albicans*의 proteinase 및 phospholipase 분비능과 구강상피세포 부착능과의 상호관계. 대한미생물학회지 1987; 22: 403-411
  19. 고춘명, 박전환. 구강에서 분리한 *Candida* species의 phospholipase 생성능 측정과 세포 화학적 활성위치에 대한 전자현미경적 관찰. 최신의학 1986; 29: 63-71