

Code No. 129-06441 (1 g)
127-06442 (25 g)

Lipase H, from *Candida cylindracea*

Source : *Candida cylindracea*

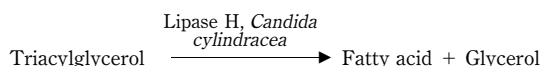
Appearance : Slightly white ~ Blackish brown, Powder

Activity : ≥ 360 units/mg

Assay Method

1. Principle

The emulsion of olive oil as a substrate, the enzyme was allowed to act, it is quantified by titration of fatty acids produced by the enzymatic reaction.



2. Reagents

Reagent A (Olive oil emulsion)

It is set to 100 mL by adding water⁽¹⁾ to the Polyvinyl alcohol (degree of polymerization 2000) 2 g. And dissolved by heating with a hot stirrer (Note the rest melted). Put the liquid 45 mL and 30 mL olive oil into a homogenizer container, using an ice and salt is 4~5 °C, for about 1 hour homogenizer at more than 15,000 rpm (emulsification).

*This emulsified liquid should be prepared just before use.

Reagent B (Phosphate buffer)

Mix Disodium hydrogenphosphate 12-water 6 g, Citric acid monohydrate 0.36 g and water 90 mL, and adjust to pH 6.9 ~7.1 with 1 mol/L Hydrochloric Acid or 1 mol/L Sodium Hydroxide solution. Then, it is set to 100 mL by the addition of water.

Reagent C (Lipase solution)

Accurately weigh Lipase (20 mg) is placed in a volumetric flask 200 mL, it is filled up with the cooled water⁽¹⁾ 10 °C below. Then, it was left on ice for 10 minutes and shaken vigorously for 5 minutes⁽²⁾. 2 mL up in a total volume pipette and placed in a volumetric flask 100 mL, and it is set to 100 mL by the water cooled to 10 °C less.

Reagent D (Reaction stop solution)

90% Methanol (ice-cold)

Reagent E

0.1 mol/L Sodium Hydroxide solution

3. Operation

We used a 50 mL stoppered tubes in the reaction. Titration using an automatic titrator was transferred to a 100 mL beaker.

Reagent	Main test	Blank test
A (Emulsified olive oil)	5.0 mL	5.0 mL
B ⁽³⁾ (Phosphate buffer)	4.0 mL	4.0 mL
	Sufficiently stirred a mixer, to pre-heating for 10 minutes at 37 °C (about 120 times/min shaking)	
C (Lipase solution)	1.0 mL	—
	Mix well, exactly 30 minutes reaction at 37 °C (about 120 times/min shaking)	
D (Reaction stop solution)	30.0 mL	30.0 mL
C (Lipase solution)	—	1.0 mL
	Ice-cold ⁽⁴⁾	
E (Titration) ⁽⁵⁾	a mL	b mL

(Note)

- (1) We used the ultra-pure water.
- (2) There is a case to acknowledge the insoluble matter.
- (3) The emulsion adhering to the innere wall of the test tube is placed in the wash with buffer.
- (4) Since the stop even after the reaction proceeds little by little, I kept on ice until just before titration.
- (5) When transferred to a beaker, and transferred to a beaker and washed the test tube with reagent D and Water.

4. Definition of unit

One unit is the amount of enzyme that produce 1 μ mol fatty acid at 37 °C per minute.

(Calculation)

$$A = (a-b) \times F \times \frac{100 (\mu\text{mol})}{30 (\text{min})} \times \frac{200}{S} \times \frac{100}{2}$$

A : Activity (units/mg)

a : Titer of main test (mL)

b : Titer of blank test (mL)

F : Factor of 0.1 mol/L Sodium hydroxide solution

S : Weighed mass of this product took (mg)

5. Storage conditions

Inert gas filled, 2~10 °C, Stored in the dark

コード No. 129-06441 (1 g)
127-06442 (25 g)

リパーゼ H, *Candida cylindracea* 由来

起 源 : *Candida cylindracea*

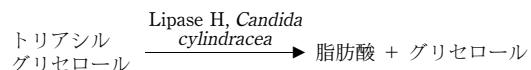
外 観 : ほとんど白色～黒褐色, 粉末

活 性 : 360 units/mg以上

酵素活性測定法

1. 原 理

オリーブオイルの乳化液を基質とし, 酵素を作用させて, 酵素反応により生成した脂肪酸を滴定することにより定量する.



2. 試 液

試液 A. 乳化オリーブ油

ポリビニルアルコール (重合度2000) 2 gに水⁽¹⁾を加え100 mLとし, ホットスターラーを用いて溶け残りに注意しながら加熱溶解する. その45 mLとオリーブ油 30 mLをホモジナイザ容器に入れ, 氷と塩を用いて4～5℃に冷却し, 15,000 rpm以上で約1時間ホモジナイズ (乳化) する. なお, この乳化液は使用直前に調製する.

試液 B. リン酸緩衝液

りん酸水素二ナトリウム12水 6 g, くえん酸一水和物 0.36 g および水90 mLを1 mol/L塩酸又は1 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.9～7.1に調整し, 水を加え100 mLとする.

試液 C. リパーゼ溶液

本品20 mg (正しく) を全量フラスコ200 mLに入れ, 10℃以下に冷却した水⁽¹⁾を加え200 mLにメスアップする. その後, 氷中に10分間放置し, 5分間激しく振り混ぜ⁽²⁾, 全量ピペットで2 mLを取り全量フラスコ100 mLに入れ, 10℃以下に冷却した水で100 mLにメスアップする.

試液 D. 反応停止液

90%メタノール (氷冷)

試液 E.

0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

3. 操 作

反応は50 mL共栓試験管を用いて行い、滴定は100 mLビーカーに移して自動滴定装置を用いる。

試 液	本試験	空試験
A（乳化オリーブ油）	5.0 mL	5.0 mL
B ⁽³⁾ （りん酸緩衝液）	4.0 mL	4.0 mL
	ミキサーで十分に攪拌し，37℃で10分間予備加温（約120回/分振とう）	
C（リパーゼ溶液）	1.0 mL	－
	よく混合し，37℃で正確に30分間反応（約120回/分振とう）	
D（反応停止液）	30.0 mL	30.0 mL
C（リパーゼ溶液）	－	1.0 mL
	氷冷 ⁽⁴⁾	
E（滴定） ⁽⁵⁾	a mL	b mL

（注）

- (1) 超純水を用いる。
- (2) 不溶物を認める場合がある。
- (3) 試験管の内壁に付着した乳化液を，緩衝液で洗うようにして入れる。
- (4) 停止後も反応が少しずつ進むので，滴定直前まで氷冷しておく。
- (5) ビーカーに移す際，試薬 D 及び水で試験管を洗浄してビーカーに移す。

4. 単位の定義

37℃，1分間に1 μmolの脂肪酸を生成する酵素量を1 unit とする。

（計 算）

$$A = (a-b) \times F \times \frac{100 (\mu\text{mol})}{30 (\text{min})} \times \frac{200}{S} \times \frac{100}{2}$$

A：活性（units/mg）

a：本試験の滴定量（mL）

b：空試験の滴定量（mL）

F：0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液のファクター

S：量り取った本品の質量（mg）

5. 保管条件

不活性ガス封入，2～10℃，遮光保存

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel：06-6203-3741

2305KA2