

微生物の油脂生成(第6報)

FH 菌の生成するリパーゼに就て

今原 広次・中浜 敏雄

HIROTSUGU IMAHARA and TOSHIO NAKAHAMA : Fat formation by
micro-organism (VI)

On the lipase produced by FH-strain

摘 要 油脂生成の顕著な FH 菌の生成するリパーゼについてその抽出精製方法について検討し、精製酵素について二、三の性質を調べた。

(1) 麩培養物よりのリパーゼの抽出は pH 7.0 燐酸塩緩衝液が最も有効であつた。

(2) 硫酸 0.3~0.6 飽和度における塩析とアセトン濃度 30~50% における分別沈澱を繰返して酵素の精製を行ない、約13倍に濃縮精製し得た。

(3) 精製酵素は作用最適 pH は 5~6, 安定 pH 4~5, 熱に対しては 40°C までは安定であり、Ca⁺⁺により強く賦活され、又 Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Mn⁺⁺ によつても若干賦活される。又 Ag⁺, Pb⁺⁺, Hg⁺⁺ によつては強く阻害される。

(4) 天然植物油とくに Peanut oil, Sesame oil をよく分解するが、Tween-20, Tri-n-butylin, Tri-acetin 等には殆ど分解作用を示さず従つてエステラーゼ作用は殆ど有しない。

I 結 論

脂質代謝に関する知見は近年著しい発展をとげそれに伴つて脂質分解酵素についての研究も数多く見られるに至つた。即ちリパーゼに関しては古くは豚臓リパーゼが知られているに過ぎなかつたが、近年微生物を資源とするリパーゼも多数見出され、基質特異性の問題や油脂分解機作に関して興味ある知見¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾が報告されている。

著者等は既に *Endomyces* に属する一菌株 (FH菌) が細胞内に著量の油脂を生成することを認め、その生成条件⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾及び生成機構の一端¹⁰⁾について検討を行なつて来たが、今回は著量の油脂を生合成しうる FH 菌は当然その生体内にあるいは分泌物として多量のリパーゼを生成するものと考え、本菌のリパーゼをとり出しその性質を検討して、油脂生成機構に関する研究の一助とし、さらにその利用面についての基礎的知見を得るべくこの研究に着手した。

II 実 験 の 部

培 養 方 法

麩 20 g に蒸留水 20 ml を撒布し、常法に従つて蒸

気殺菌のもの、既述の合成培地を用い 30°C, 3日間培養せる種培養 2 ml を接種し 30°C, 7 日間培養を行なつた。容器は表面積を大にするために Fernbach Flask 500ml 容のものを使用した。

リパーゼ力測定法

Wilstätter のアルカリ滴定法に基づいて行なつた。即ち基質としてオリーブ油を用い第1表の如き反

第1表 酵素反応液の組成

オリーブ油	1ml
M/15 マックイールベン緩衝液 (pH7.0)	2ml
M/50 塩化カルシウム溶液	6ml
酵 素 液	1ml

応液 10 ml を 100 ml 容三角フラスコに入れ密栓し、30°C で 3 時間振盪反応させた後、エタノール 30 ml を加え 40°C 恒温槽で約15分加温し、遊離脂肪酸を Phenolphthalein を指示薬として N/20 苛性ソーダで滴定し、同時に盲験を行なつて得た値との差 (ml) をもつて力価を表わした。

1. 酵素の抽出

FH 菌リパーゼは菌体内酵素であり、その抽出は容易ではない。従つてその抽出条件の検討は最も大切な前提となる。しかしてリパーゼは他の水溶性基質に作用するアミラーゼやプロテアーゼ等と異なり、その反応系も乳化状態で行なわれ、又基質の性質から考えてそれに作用するリパーゼの抽出に有機溶媒の使用も当然考慮されるべきである。そこで第2表に示す如き、各抽出溶媒 200 ml を使用し、まず麩上の菌体を一部の溶媒と共に乳鉢中に入れ、少量の海砂を加えて充分磨砕した後、残りの溶媒を加えて三角フラスコ中に移し 30°C、2時間抽出後遠心分離し、その上澄液の酵素力価を測定した。

第2表 リパーゼ抽出溶媒の比較

抽出溶媒	抽出時間	リパーゼ力価 (ml 当り)
M/100 塩化ナトリウム溶液	2 時間	1.6
M/50 塩化カルシウム溶液	2 "	1.6
M/10 醋酸緩衝液 (pH5.0)	2 "	2.9
M/10 磷酸塩緩衝液 (pH7.0)	2 "	5.0
2% エタノール液	2 "	3.4
2% ブタノール液	2 "	4.2

第2表の結果より M/10 磷酸塩緩衝液 (pH7.0) を使用した場合が最も良好であり、ブタノールあるいはエタノールの希釈液もかなり有効であることを認められた。

次に M/10 磷酸塩緩衝液 (pH7.0) を用いて抽出時間及び静置と振盪による抽出効果の比較を行なつた。

第3表 リパーゼ抽出条件の検討

抽出時間	力 価 (ml 当り)	
	静 置	振 盪
30分	3.0	3.7
60 "	4.5	4.9
120 "	5.0	6.4
240 "	5.1	6.4
30°C		

第3表より 30°C、120分、振盪を行なつて抽出する場合は最も有効であることを認められたので、以下この条件を用いることにした。

2. 酵素の精製

微生物起源リパーゼの精製結晶化については、従来余り多くの報告に接しないが、その原因の一つはリパーゼ反応の均一な条件が得難いこと、あるいは酵素自身の不安定性等が考えられる。しかしながら近年里村¹⁾²⁾、辻阪、岩井等¹³⁾により *Sclerotinia* 属 *Aspergillus* 属リパーゼについて精製結晶化が試みられ硫酸塩析、アセトン分別沈澱、あるいはリパノール処理により適当な条件下でかなりの収量で精製しうることが報告されている。著者等も FH 菌リパーゼについて精製結晶化に関する予備実験としてまず分割の最適条件を検討した。

(1) 硫酸塩析による分割

前述の方法によつて得た抽出粗酵素液に硫酸を加え、各飽和濃度において得た塩析物を適量の蒸留水に溶解し 0°C、24時間蒸留水に対して透析を行なつて一定量とし、各区分の酵素力価を測定した。

第4表 硫酸塩析による各区分の力価

区 分	容量 (ml)	力価 (ml)	全力価
抽出粗酵素液	80.0	6.4	512.0
0~0.1 飽和塩析区分	12.5	2.1	26.3
0.1~0.3 飽和塩析区分	14.5	1.4	20.3
0.3~0.5 飽和塩析区分	25.5	9.1	232.1
0.5~0.6 飽和塩析区分	32.0	2.4	78.8
0.6 飽和過剰液区分	128.0	0.2	19.2

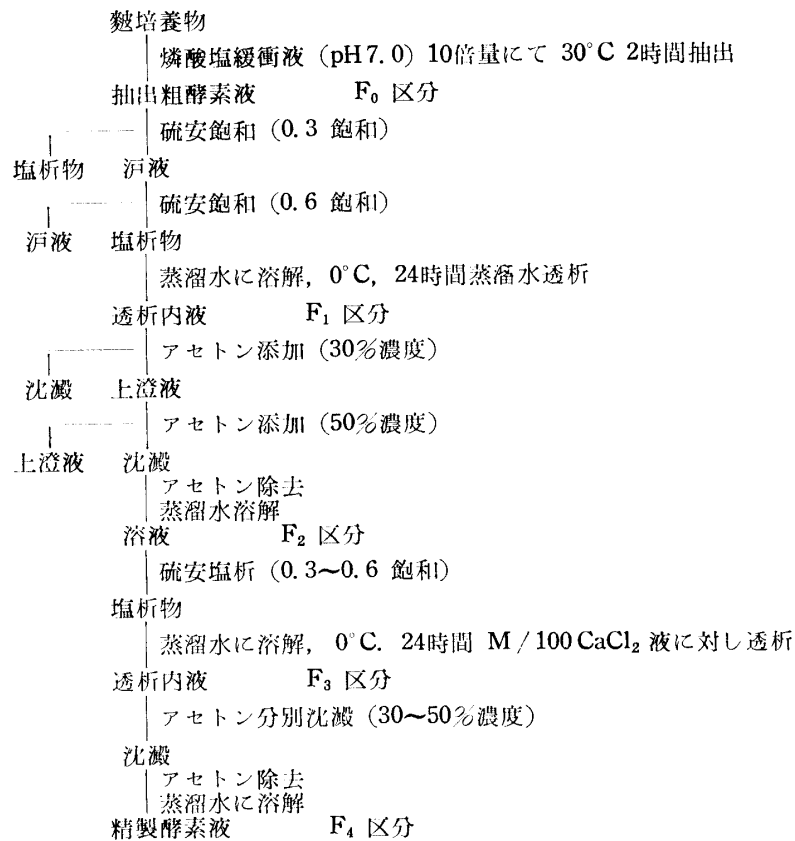
第4表の結果によると硫酸 0.3~0.6 飽和濃度において塩析される区分に最も多くの酵素が含まれることを認めた。

(2) アセトン分別沈澱による分割

上記と同じ抽出粗酵素液を用い、冷時アセトンを加え、おのおののアセトン濃度において沈澱せる試料を遠心分離によつてとり、脱アセトンの後蒸留水に溶解し、各区分の酵素力価を測定した。

第5表 アセトン分別沈澱による各区分の力価

区 分	容量 (ml)	力価 (ml 当り)	全力価
抽出粗酵素液	30.0	6.4	192.0
20%アセトン濃度沈澱区分	15.0	0.3	4.5
20~30%アセトン濃度沈澱区分	13.0	1.5	18.3
30~50%アセトン濃度沈澱区分	23.5	4.2	98.5
50~70%アセトン濃度沈澱区分	5.0	0.2	1.0



第1図 酵素精製過程

第6表 酵素精製過程の力価の変遷

区分	容量 (ml)	力価 (ml当り)	全力価	比力価 (窒素1mg当り)	力価収率
F ₀	2000	6.5	13000	8.4	
F ₁	800	11.8	9440	31.1	72.6
F ₂	230	20.4	4692	104.5	36.0
F ₃	180	21.2	3816	109.7	29.3
F ₄	96	30.5	2897	112.5	22.2

第5表の結果によるとアセトン濃度30~50%において沈澱する区分に最も多く酵素が含まれることを認めた。

(3) 精製酵素

上記二つの分別法他にリバノール処理, アルミナ吸着, イオン交換樹脂による吸着溶出等の予備試験を行なったが所要の成果を認めなかつたので, 上記の二方法を組合わせて酵素の精製を行なったところかなりの精製酵素標品を得たので, それを用いて各種の性質の検討を行なった。今その精製操作と各精製段階における酵素力価の変遷を示すと, 第1図及び第6表の如くである。

即ち硫酸塩析及びアセトン沈澱を各2回宛行なうことによつて精製酵素として約13倍に濃縮し得た, 又そ

の収量は22.2%であつた。このものを再び同様に再精製を行なったが比力価は殆ど変わらず結晶として得られなかつたが, ほぼ純粋に近いものを得たので, 以後の試験はこのものを使用した。

3. 酵素の性質

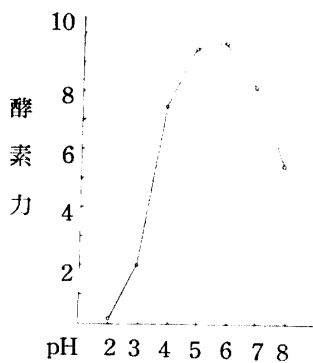
上記の如くして得た精製酵素について以下の如き諸性質を検討した。

(1) 作用最適 pH

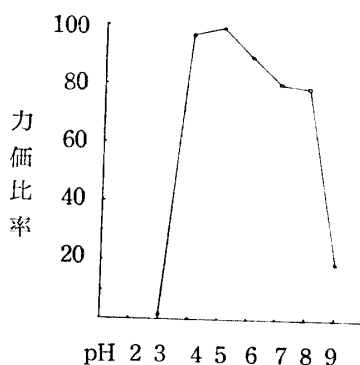
精製酵素液を各 pH のマックイールベン緩衝液を用いて適当量に希釈し, 各 pH における酵素力を測定した結果第2図に示す如く pH 5~6 に最適を示した。

(2) pH に対する安定性

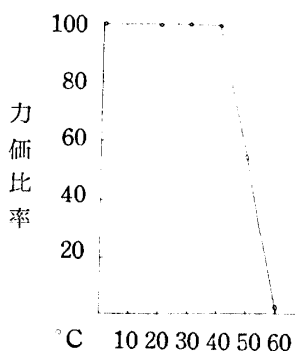
精製酵素液 1 ml に M/10 濃度の各 pH の緩衝液を 1 ml 宛加え 40°C 恒温槽で 1時間 incubate した



第2図 酵素力と作用 pH



第3図 pH に対する安定性



第4図 熱に対する安定性

後 M/5 濃度の pH 7.0 マックウィルベン緩衝液 8 ml を加えたのちその 1 ml をとり酵素力価を測定し、無処理の場合の力価を 100 としてその力をもつて示した。

その結果第 3 図に示す如く pH4~5 において本酵素は安定であり酸性側では急に力価は減少するが pH7.0 付近まではやや安定であった。

(3) 熱に対する安定性

精製酵素液を pH5.0 マックウィルベン緩衝液で希釈して第 4 図に示す各温度で 15 分処理後急冷し、その力価を測定した、無処理液との比を求めた結果第 4 図の如くであった。即ち 40°C までは安定であるが 50°C では約 50% にまで力価は減少し 60°C において完全に

力価は消失する。

(4) 金属イオンによる影響

精製酵素液 1 ml に第 7 表に示す各種金属塩溶液 各 1 ml を加え 0°C, 24 時間放置後 0°C, 12 時間蒸留水透析を行ない、その酵素液の力価を測定して無処理液との比を求めた。力価測定の場合の M/50 CaCl₂ 液はこの場合蒸留水を用いた。

第 7 表 金属イオンによる影響

イオン	使用金属塩	濃度	力価比率
Ca ⁺⁺	CaCl ₂ 2aq	10 ⁻² M	164
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ 7aq	10 ⁻² "	94
Zn ⁺⁺	ZnSO ₄ 7aq	10 ⁻² "	135
Al ⁺⁺⁺	AlCl ₃	10 ⁻³ "	100
Fe ⁺⁺⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃	10 ⁻³ "	94
Co ⁺⁺	CoCl ₂ 6aq	10 ⁻³ "	120
Mn ⁺⁺	MnSO ₄ 5aq	10 ⁻³ "	118
Ni ⁺⁺	NiSO ₄	10 ⁻³ "	94
Cu ⁺⁺	CuSO ₄ 5aq	10 ⁻³ "	53
Ag ⁺	AgNO ₃	10 ⁻³ "	29
Pb ⁺⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂ 3aq	10 ⁻³ "	32
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	10 ⁻³ "	0
(無処理酵素液)			100

第 7 表の結果、この酵素は Ca⁺⁺ により強く賦活され、又 Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Mn⁺⁺ によつても若干賦活されるが、Ag⁺, Pb⁺⁺, Hg⁺⁺ によつて強く阻害される。又 Ca⁺⁺ によつても若干阻害されるがその他のイオンによつては顕著な影響を受けなかった。

§4. 各種基質に対する分解力の比較

各種天然植物油及び合成脂肪酸エステルを基質として力価測定の場合と同じ条件で分解力の比較を行なつた。

第 8 表 各種基質に対する分解力の比較

基質	分解力
Olive oil	3.7
Soy bean oil	3.3
Sesame oil	5.5
Cotton seed oil	4.4
Castor oil	2.1
Peanut oil	6.5
Tween-20	0.0
Tri-n-butylin	0.5
Tri-acetin	0.3

第8表に示す如く本酵素は Peanut oil 及び Sesame oil を最もよく分解するが Tween-20 あるいは Tri-n-butylin, Tri-acetin の如き低分子基質あるいは低級脂肪酸グリセライドには殆ど分解力を示さなかつた。即ち本酵素は低分子のエステルを分解するエステラーゼ作用を示さず、高級脂肪酸グリセライドに対してはかなりの分解作用を示すリパーゼであろうと推察された。

文 献

- 1) 里村幸雄, 大井 進, 沢田 昭, : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 194 (1958)
- 2) 里村幸雄, 大井 進, 沢田 昭, 福本寿一郎 : *ibid*, **23**, 150 (1959)
- 3) Cutchins, E. C., Doetch, R. N. & Pelczar, M. J. : *J. Bact.*, **63**, 269 (1952)
- 4) Peters, I. I., & Nelson, F. E. : *ibid*, **61**, 581 (1948)
- 5) Stern, A. M., Ordal, Z. J. & Halvorson, H. O. : *ibid*, **68**, 24 (1954)
- 6) 中浜敏雄 : *醱酵工学*, **29**, 331 (1951)
- 7) 中浜敏雄 : *同誌*, **30**, 11 (1952)
- 8) 中浜敏雄, 石田博之 : *同誌*, **30**, 100 (1952)
- 9) 中浜敏雄, 石田博之 : *同誌*, **30**, 260 (1952)
- 10) 今原広次 : 京都府立大学学術報告, 農学, **11**, 164 (1959)
- 11) 辻阪好夫, 岩井美枝子, 福本寿一郎 : 日本農芸化学会大会講演, 4月6日 (1960)

Summary

We studied on the lipase of FH strain which was produced a great quantity of fat in the cell. From the cultured materials on wheat bran, the enzyme most effectively eluated by pH7.0 phosphate buffer.

Partial purification of the enzyme was carried out by salting out in 0.3 ~ 0.6 saturation of ammonium sulfate and precipitation in 30~50%

concentration of acetone. The purified enzyme had in pH 5~6 on reaction optimum and stabilized in pH4~5 and was stable at 0~40°C. The enzyme was activated by Ca⁺⁺ and Zn⁺⁺, but inactivated by Ag⁺, Pb⁺⁺ and Hg⁺⁺. The activity of the enzyme was most powerful on peanut oil or sesame oil but had a low affinity on Tween-20, tri-n-butylin or tri-acetin.