酵素剤の研究 XXI*¹ 抗胆汁性リパーゼの研究 (その 2)*Mucor* 属の産生するリパーゼについて*²杉浦 衛, 小木曾太郎, 仲 恭寛, 浅野 弘 (岐阜薬科大学*³)Studies on Enzyme Preparations. XXI*¹

Studies on Bile Sensitive Lipase. (No. 2)

On the Lipase Produced by *Mucor* Species. *²

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Yasuhiro Naka and Hiroshi Asano

(Gifu College of Pharmacy*³)

Recently the enzymes produced by microorganisms have been studied or used. However, most of microbial lipases were inhibited by bile juice. Therefore, filamentous fungi producing bile sensitive lipase were screened. From the screening, a species of *Mucor* which produced strong bile sensitive lipase was cultivated aerobically. Lipase with high activity was obtained from the filtered broth. Pharmaceutical studies were made on the lipase.

The optimum pH of this preparation for digestion was 7.0 and very strong digestive activity was shown between pH 5 and pH 8. The stability of the lipase activity in various pH solution was good between pH 4 and pH 8. When heated in a dry state, the activity of the preparation was more stable than that of pancreatic lipase. At 20°C with relative humidity of 75% and at 30°C with a relative humidity of 92%, the preparation retained stronger activity than pancreatic lipase. The digestive activity of the preparation was activated with calcium chloride and quinine sulfate, but greatly inhibited with heavy metal ions, and slightly with sodium cyanate and sodium fluoride. As to the substrate specificity of the preparation strong lipase activity was exhibited on tripropionin, tributyrin, olive oil, sesame oil, coconut oil and tween 20, but was not enough on trimyristin, tristearin and triacetin.

(Received May 18, 1967)

近年、脂肪分解酵素は従来の動物起源の酵素から、各種の微生物を起源とする酵素に推移してきた。

最近、著者らは微生物を起源とするリパーゼのうち *Aspergillus* (Asp.), *Candida* (Cand), *Rhizopus* (Rh.) 属の生産するリパーゼが、タウロコール酸、コール酸により特異的に阻害されることを^{1,2)} 見出し、脂肪食品消化の面より、抗胆汁性のリパーゼを求めて広く微生物をスクリーニングした結果、抗胆汁性リパーゼが *Mucor*(Muc.) 属および *Pseudomonas* (Pseud.) 属の一菌株に存在することを明らかにした。それらリパーゼの胆汁、胆汁酸塩による影響については前報³⁾ で報告したが、今回はその

Muc. 属の培養法とその産生するリパーゼの pH 安定性、水溶液の安定性、金属イオンによる影響、Inhibitor、基質特異性などについて検討した。

培養法

抗胆汁性を有するリパーゼを求めて、多数の糸状菌株 (Asp., Rh., Muc., Pen. 属) をスクリーニングした結果、*Muc.* 属の一菌株—*Mucor-javanicus* IAM 6108—が多量のリパーゼを生産することを見出した。とくに本菌株の産生するリパーゼは従来の微生物リパーゼと異り抗胆汁性を有することは前報³⁾ で明らかにしたが、以下このリパーゼの培養法を概説する。

1. 種培養

廃糖蜜とコーンステープリカー混合培地 (120°, 20分間殺菌, PH5.5) 600ml を 2L の坂口コルベンに入れ、スラントより一白金耳を接種し、48時間26°Cにて振盪培養する。

*1 前報 XX, 杉浦 衛, 小木曾太郎, 成田修一, 長瀬啓三, 浅野 弘: 本誌 13, 257 (1967)

*2 東海薬学会発表 (1965年11月)

*3 岐阜市三田洞; Mitahora, Gifu city

2. 本培養

30 L のジャーファーマンターにキナ粉 3 %, 廃糖蜜 3 %, リン酸二カリウム 0.2 %, 硫酸アンモニウム 1.1 % の溶液を pH 6.5 に調製したもの 15 L を入れ, 120°C, 25 分間殺菌した後, これに 600 ml の種培養液を接種し 30°C で約 40 時間通気攪拌する。

3. 除菌および濃縮

本培養液はフィルタープレスにて菌体を除去し, ろ液を 30°C でロータリーエバポレーターを用いて約 1/2~1/3 容量に真空濃縮する。

4. アルコール沈降

濃縮液をあらかじめ 5°C 以下に冷却したエタノール 2 倍量中に攪拌しつつ徐々に加える。上澄液は傾斜して除き, 再び同容量のエタノールを加え沈殿物を洗滌する。この操作を 3 回くり返した後, 沈殿物をろ取り, 30°C で真空乾燥する。この操作により濃縮液 200 ml より粗酵素粉末 2.8 g が 81 % の活性収率で得られた。

実験法

1. 活性測定法

Nord^{4),5)} の山田変法⁶⁾ に準じて行なった。すなわち 2 % ポリビニールアルコール 117 を乳化剤としてオリーブ油エマルジョンを調製し, その 2.5 ml と pH 7.0 の Phosphate buffer (または Acetate buffer) 2.0 ml (添加物あるときは buffer 1.5 ml, 添加物溶液 0.5 ml) を径 3 cm の試験管に入れ, 所定温度に予熱後, 酵素液 0.5 ml を混和し以下前報³⁾ と同様に行なった。

2. 油脂およびグリセライド

オリーブ油は局方品を, 他の天然油脂は丸石製を, トリグリセライドは東京化成製を使用した。

供試酵素

この実験に使用した酵素は, 培養法で述べた Muc. 属の産生する酵素の部分精製リパーゼと, Panc. lipase (東京化成) である。

酵素の部分精製

1. イオン交換樹脂の調整

TABLE 1 に示す各種イオン交換樹脂に 5 倍量の 1 N 水酸化ナトリウムを加え, 5 時間放置後水洗する。さらに 5 倍量の 1 N 塩酸に 5 時間浸漬後水洗し, これに 1 N 酢酸を樹脂の 3 倍量加え, 一夜放置する。これを水洗しその 100 ml を使用した。

2. 部分精製酵素の調整法

上記 1. の交換樹脂 (酢酸型) に 1 % 酵素液を SV=3 の流速で通過させ, その通過液に予め冷却した 3 倍量のエタノールを加えて酵素を沈降させた。

なお蛋白の定量は Lowry⁷⁾ らの方法に従った。

TABLE I Screening of Ion Exchanger Resin

Enz. soln.	Resin	Specific activity
↓		
Resin	Amberlite IRA-45	3273
↓	Amberlite IRA-93	5550
Alcohol ppt.	Dowex 44	4527
↓	Dewex 11	6475
Enz. conc.	Duolite A-2	4784
	Duolite A-7	6134
	Control	3052

その結果, TABLE 1 の樹脂のうち Dowex-11 による処理が最も比活性上昇大であったので実験はすべてこの樹脂による部分精製品を用いた。

実験結果

1. 至適 pH

pH 2.5~11 の各種緩衝液 (pH 2.5~6 は McIlvaine buffer, pH 6~8 は 0.1 M Phosphate buffer, pH 9~11 は Menzel buffer) を調製し, これに酵素を溶解し, おのおの酵素活性を測定した。その結果は Fig. 1 に示すように, この酵素は至適 pH 7.0 付近にあり, また, 作用域は pH 5.0~8.0 で弱酸性から中性付近であった。

2. 水溶性の安定性

水溶液における酵素安定性をみるため, 酵素の水溶液を 5°, 20°, 37°, 55°C に放置し, 各々 1, 3, 5 時間後に残存活性を測定した。なお, 比較実験として Panc. lipase を用いた。その結果を Fig. 2 に示したが, 5°C においては本酵素も Panc. lipase も比較的安定であった。20°C においてはかなり活性が低下し, 37°C, 55°C においてはきわめて不安定であった。特に 55°C においては Panc. lipase が 3 時間後僅か 6 % 程度の残存活性を示すに過ぎ

Fig. 1 Digestive Activity on Various pH

Fig. 2 Stability of Lipase Activity in Solution to Various Temperature

Fig. 3 Influence of Heating to Stability of Lipase Activity

ないのに対し、Muc. lipase は全く活性が消失した。一般に Muc. lipase は 20°C までは Panc. lipase より安定であるが 37°C 以上では Panc. lipase よりも幾分不安定であった。

3. 乾熱に対する安定性

本酵素と Panc. lipase を粉末状態のまま 100°C の条件に 24 時間放置し、経時的に酵素活性を測定した。その結果は Fig. 3 に示すように、100°C 1 時間で本酵素は約 98%、Panc. lipase は 67% の残存活性を示したが、24 時間後には著しく活性低下し、残存活性は本酵素が 57%、Panc. lipase は 22% であった。粉末状態では本酵素は Panc. lipase より一般に安定であると思われる。

4. 各種 pH における安定性

pH 2.5~11 の各種緩衝液 (pH 2.5~6.0 は McIlvaine buffer, pH 6.0~8.0 は 0.1 M Phosphate buffer, pH 9~11 は Menzel buffer) に酵素を溶解し、温度の影響を少なくするため 0°C に放置した。その間 2, 6, 24 時間後に酵素液の一部をとり、0.1 N 塩酸、または 0.1 N 水酸化ナトリウムで至適 pH の 7.0 にもどし酵素活性

Fig. 4 Stability of Lipase Activity in Various pH Solution

を測定した。その結果は Fig. 4 に示したように本酵素は pH 4~8 に安定領域を示したが、アルカリ側では比較的不安定と思われる。また、活性は時間の経過に従い比例的に減少する傾向にあった。

5. 吸湿と安定性

酵素の保存における安定性を観察するため、久保⁸⁾らの提案した 3 条件、すなわち RH 52%、5°C の最良条件、RH 75% 20°C の中間条件、RH 92% 30°C の最悪条件に粉末状態で 1 ヶ月間放置し、経日的に残存活性と吸湿率を測定した。

なお対照として Panc. lipase についても測定した。

1) 安定性

酵素を小試験管に秤取し、各条件 (RH 52% は硝酸カルシウム, RH 75% は塩化ナトリウム, RH 92% は重クロム酸ナトリウムの飽和液) のデシケーターに 30 日間放置したものについて活性を測定した。その結果を Fig. 5 および 6 に示したが、最良条件では本酵素は 30 日後もか

Fig. 5 Effect of Humidity and Temperature on Lipase Activity in *Mucor* Species

Fig. 6 Effect of Humidity and Temperature on Lipase Activity in Pancreatin

なり安定であったが、Panc. lipase は5日後より幾分活性が低下していく傾向にあった。30日後の残存活性は本酵素が85%、Panc. lipase は44% とかなり不安定であった。中間条件では本酵素は5日、Panc. lipase は3日間程度は安定であったが、以後活性低下し、30日後には本酵素は71%、Panc. lipase は28%の残存活性を有した。また、最悪条件においては両酵素ともかなり活性低下がみられ、特に Panc. lipase においては著しく活性が低下した。

全般に Panc. lipase の方が吸湿時の安定性が劣るように思われる。

2) 吸 湿 量

吸湿量は酵素1gを秤取し、1)の条件で放置して経日的に重量を測定した。なお、吸湿量は次式により算出した。

$$\text{吸湿率}\% = (B - A) / A \times 100$$

A: 初めの酵素重量

B: 所定日数後の酵素重量

その結果は Fig. 5 および 6 に示したように、最良条件において経日的に少量ずつ吸湿率が増大、1ヵ月後には Panc. lipase は20%、本酵素は45%の吸湿率を示した本酵素は中間条件、最悪条件では吸湿量が増大し、30日後には60%前後の吸湿率であった。一方 Panc. lipase は中間条件では一般に吸湿率が小さく30日後でも25%であったが、最悪条件では30日後に50%に上昇した。

以上の結果から両酵素とも活性低下と吸湿率との間には相関関係はみられなかったが、一般に本酵素より、Panc. lipase の方が活性低下が大であるにもかかわらず吸湿率は小であった。

6. 金属イオンの影響

金属イオンの酵素に対する賦活、阻害作用については

Fig. 7 Influence of Various Metal Ions on Lipase Activity

古くより知られているが、リパーゼに関しては Schönheyder⁹⁾ らが、Ca²⁺ により著しくリパーゼ作用が賦活されると述べており、福本¹⁰⁾ にも同様報告している。

そこで、本酵素についても金属イオンによる賦活、阻害作用を検討するため Fig. 7 に示すような化合物を選び実験した。なお、アニオンの影響を同一にするためすべて塩化物を使用し、反応系中のモル濃度は 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ M で行なった。Fig. 7 にその結果を示したが、Ca²⁺ は 10⁻³, 10⁻² M において賦活作用を示し、10⁻² M では 134% に活性上昇がみられた。Mg²⁺, Na⁺ は 10⁻² M でわずかに賦活作用が認められたが、10⁻³, 10⁻⁴ M においては変化はみられなかった。その他の金属イオンはおおむね阻害の傾向がみられ、Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺ などの重金属はきわめて阻害的に作用することが判明した。これらの原因は金属イオンによる酵素自身の阻害以外に基質に対する影響などの環境阻害も考えられる。

7. Inhibitor の検討

従来より Panc. lipase の Inhibitor として F⁻¹¹⁾, CN⁻¹²⁾, チオ化合物¹¹⁾ などが、Activator としてキニーネ¹¹⁾ が知られている。そこで本酵素に対する Inhibitor の検討を行なうため、フッ化ナトリウム、シアン化ナトリウム、硫酸キニーネ、チオグリコール酸ナトリウム、EDTA をそれぞれ 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ M 濃度に添加し、活性を測定した。その結果を Fig. 8 に示したが、硫酸キニーネは 10⁻³, 10⁻² M でかなりの賦活作用を示した

Fig. 8 Effect of Lipase Inhibitors on *Mucor* Lipase

Fig. 9 Substrate Specificity of *Mucor* Lipase

が、EDTA、チオグリコール酸ナトリウムの影響はほとんどみられなかった。一方、シアン化ナトリウム、フッ化ナトリウムは $10^{-2} M$ でわずかに阻害が認められた。また、これら化合物は全般的に低濃度の $10^{-4} M$ では活性に対して影響をおよぼさなかった。硫酸キニーネの活性化は、酵素自体の活性化であるか、基質の乳化状態の改善など物理的原因によるものか判明していない。

8. 基質特異性

Panc. lipase の基質特異性については、Balls¹³⁾ らを始め多くの人々によって研究されている。そこで本酵素の基質特異性を明らかにするために、天然油脂、各種トリグリセライド、Tween 20 の各基質を選択し、それらに対するこの酵素の分解作用を検討した。

その結果を Fig. 9 に示したが、この酵素はトリアセチン基質に対してはほとんど作用せず、高級脂肪酸トリグリセライド（トリミリスチン、トリステアリンなど）、基質に対しても低い分解作用を示した。一方、低級脂肪酸トリグリセライドのトリプロピオン、トリブチリン、また、天然油脂のオリーブ油、ゴマ油、ヤシ油、Tween 20 の各基質には非常によく作用し、特にヤシ油に対しては著しい基質特異性があるように思われる。

総括および結論

この実験は部分精製酵素を用い、PVA 117 で乳化したオリーブ油を基質として行なったものである。

この酵素の至適 pH は 7.0 付近にあり、作用域は 5.0~8.0 であった。従って局方パンクレアチン、Panc. lipase に比し酸性側で作用を示すものと思われる。水溶液の安定性は低温では、Panc. lipase に比してやや安定であったが、37℃、55℃では不安定で、一般に水溶液の活性低下は大きいように思われる。100℃ の乾熱においては Panc. lipase よりかなり安定であった。pH 安定性は pH 4~8 で大体安定であったが、pH 9 以上のアルカリ側では活性低下が顕著であった。湿度による活性の変化は、この酵素は中間条件、最悪条件とも Panc. lipase より比較的安定であった。一方吸湿量は Panc. lipase よりこの酵素が大であったが、吸湿量と活性低下の相関は認められなかった。金属イオンの影響のうち、 Ca^{2+} が賦活作用を示し、Schönheyder⁹⁾ や福本¹⁰⁾ らの報告と一致した結果が得られた。 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cu^{2+} など重金属イオンは著しい阻害作用が認められた。硫酸キニーネは 10^{-2} 、 $10^{-3} M$ で賦活作用を示し、シアン化ナトリウム、フッ化ナトリウムは $10^{-2} M$ でわずかに阻害作用を示した。基質特異性は、トリプロピオン、トリブチリンなどの低級脂肪酸トリグリセライドやオリーブ油、ゴマ油、ヤシ油、Tween 20 などによく作用し、特に低級脂肪酸含有のヤシ油に対してはきわめて著しい基質特異性を示したが、トリミリスチン、トリステアリンなどの高級脂肪酸トリグリセライドやトリアセチン基質に対する分解作用はほとんどみられなかった。

文 献

- 1) 杉浦衛，長瀬啓三，伊左治典，広瀬一雄：薬剤学 25, 47 (1965).

- 2) 杉浦衛, 長瀬啓三, 加藤精宏: 薬剤学 **26**, 296 (1966).
 - 3) 杉浦衛, 小木曾太郎, 成田修一, 長瀬啓三, 浅野弘: 本誌 **13**, 257 (1967)
 - 4) J. V. Fiore, F. F. Nord: Arch Biochem., **23**, 473 (1949).
 - 5) F. F. Nord: Methods in Enzymology, **1**, 629 (1955).
 - 6) 山田浩一, 町田晴夫: 農化, **36**, 858 (1962); **37**, 645 (1963).
 - 7) O. Folin, V. Ciocalteu: J. Biol. Chem., **73**, 627 (1929).
 - 8) 久保文苗, 上野高正, 堀岡正義, 幸保文治, 仲井由宣, 石原利: 薬剤学, **19**, 276 (1959).
 - 9) F. Schönheyder & K. Volqartz: Biochem. et Biophys. Acta, **13**, 491 (1954).
 - 10) 福本寿一郎, 岩井美枝子, 辻阪好夫: 酵素化学シンポジウム, 18集, 53 (1962).
 - 11) S. S. Weinstein and A. M. Wynne: J. Biol. Chem., **112**, 641, 649(1935~36).
 - 12) D. S. Robinson, J. E. French: Quart. J. Exp. Physiol., **42**, 151 (1957).
 - 13) A. K. Balls and I. W. Jucher: J. Biol. Chem., **122**, 125 (1937).
-