報 文

Pseudomonas リパーゼ産生への界面活性剤の効果

仲 恭 寛・天 野 滋・山 下 孝 二

天野製薬株式会社 (愛知県西春日井郡西春日大字九之坪西城屋敷 51)

Effect of Surface Active Agents on the Production of *Pseudomonas* Lipase

Yasuhiro NAKA, Shigeru AMANO and Koji YAMASHITA

Amano Pharmaceutical Co. Ltd., (Nishishiroyashiki-51, Kunotsubo,
Nishiharu-cho, Nishikasugai-gun, Aichi-ken)

The effects of surface active agents on lipase production by *Pseudomonas nov.* sp. No. 156 were investigated. When using a 500 ml-shaking flask, lipase activity per ml. of culture broth increased with a decrease in liquid volume. Lipase activity was noted to decrease in the flask volume order of 100 ml, 50 ml, 25 ml. While shaking the flasks, additional Adecanol LG-126 to the medium caused the differences in the extent of decrease in lipase activity according to flask volume to become less. The activity approximated that of the flasks with less liquid volume. These effects arise from an increase in the oxygen transfer rate (kLa) in the shaken flask and results in a greater production of lipase in the 500 ml fermenter. Tween 60 failed to have any effect on the production of lipase and Nonion NS-215 and TM-211 were impossible to use because of accompanying blowing, even though there was high lipase activity.

1 緒 言

Pseudomonas nov. sp. No. 156 は不飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸を含むグリセリド、及びリン脂質を唯一の炭素源として増殖し、かつ顕著なリパーゼ産生能を有する¹⁾。一方、*Pseudomonas fluorescens* のリパーゼは、炭素源として大豆粉を含む培地に polyoxyethylene nonylphenyl ether を加えたり²⁾、炭化水素を含む培地に polyoxyalkyleneoxydsorbitol fatty acid ester (Tween) や sorbitan monofatty acid ester (Span) を加えると³⁾、その産生能が促進されることが報告されている。また有馬らは、*Humicola lanuginosa* S-38 のリパーゼ産生能が、Adecanol LG 109 の添加で 2 倍に増大されることを示した⁴⁾。しかし、これらの界面活性剤の効果は、細胞からのリパーゼ分泌を促進するものと推定されているにすぎない。著者らは、*Pseudomonas nov.* sp. No. 156 リパーゼ産生能についてのスケールアップを研究する過程で、坂口フラスコの仕込み液量とリパーゼ産生の関係、及びこれに界面活性剤を加えた場合の影響を酸素移動速度の面から検討した。

2 実 験

2.1 培養条件

大豆油 2%, 尿素 0.6%, KH_2PO_4 0.2%, KCl 0.05

%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% からなる培地を pH 6.0 に調整し、500 ml 坂口フラスコに入れ、120°C, 30 min 殺菌する。これに同培地であらかじめ *Pseudomonas nov.* sp. No. 156 を 26°C, 120 strokes/min で 24 h 振とう培養した種培養液を 1% 接種し、上記条件で本培養を行った後、遠心分離して菌体を除去し、その汙液についてリパーゼ活性を測定した。

2.2 リパーゼ活性測定法

基質^{a)} 1.0 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml を 18×180 mm の共栓試験管にとり、37°C に 5 min 予熱する。これに希釈酵素液 0.5 ml を加え、37°C, 20 min 静置反応させる。反応終了後、反応停止液^{b)} 5 ml を加えて振とうし、*n*-ヘプタン 3 ml, 精製水 2 ml を加え、10 s 振とうする。静置後、上層 (ヘプタン層) 3 ml を安全ピペットで分取し、0.01 N 水酸化カリウムエタノール溶液で、窒素ガスを吹き込んでかきまぜつつ、1% チモールブルーエタノール溶液 1 滴を指示薬として微青色を呈するまで滴定する (t ml)。ブランク値は酵素液のかわりに精製水を用いて同様操作する (B ml)。

上記条件下で、1 min 間に $1 \mu\text{mol}$ の脂肪酸を生成するとき 1 単位とする。活性は次の式で算出する。

$$u/\text{ml} = 1.327 \times f \times (t - B) \times D$$

1.327 : 換算係数, f : 0.01 N KOH のファクター
 D : 酵素の希釈倍数

- a) 牛血清アルブミン (fraction V, 和光 1 級) の 5%-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml とごま油の 20% ポリビニルアルコール乳化液^{c)} 3 ml を混合する。
- b) *n*-ヘプタン : イソプロピルアルコール : 2 N H₂SO₄ 溶液 = 10 : 40 : 1
- c) 2% ポリビニルアルコール 117 (倉敷ホパール) 溶液

2.3 酸素移動速度 (*kLa*) の測定

広瀬⁵⁾の方法に従い, 前述の培地を 500 ml 坂口フラスコに 25 ml, 50 ml, 100 ml を入れ, 120°C, 30 min 殺菌後, Na₂SO₄ 5%, CuSO₄·7H₂O 溶液 (終濃度 M/1000) を加え, 30°C で 120 strokes/min で振とうし, Beckman 777 型溶存酸素計を用いて *kLa* (min⁻¹) を求めた。

2.4 界面活性剤

Adecanol LG-126 : polyoxyalkylene glycol (旭電化工業製)

Nissan Nonion NS-215 : polyoxyethylene nonyl-phenyl ether (日本油脂製)

Nissan Nonion TM-211 : polyoxyethylene beef tallow fatty acid ester (日本油脂製)

Tween 60 : polyoxyethylene sorbitan monostearate (東京化成製)

3 結果と考察

3.1 界面活性剤の影響

Pseudomonas nov. sp. No. 156 のリパーゼ産生は, 酸素の供給量に依存して増大した。500 ml 容坂口フラスコの場合には, 仕込み液量として 25 ml, 50 ml, 100 ml を入れ, 26°C, 120 strokes/min で振とう培養すると, 仕込み液量が少なくなるほど培養液 1 ml 当たりのリパーゼ活性が大きくなった。**Fig. 1**, **Fig. 2**, **Fig. 3** はその培養経過を示したものである。仕込み液量が 50 ml, 100 ml の場合には, 菌体の増殖とともにリパーゼ活性は上昇し, 48 h で最大値に達したが, 菌体増殖はなお上昇の傾向にあった。一方仕込み液量が 25 ml では, 24 h

Basal medium and cultural conditions:
Soybean oil 2.0%, urea 0.6%, KH₂PO₄ 0.2%,
KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%
initial pH 6.0, inoculum size 1%, cultural temperature 26°C
shaking condition 120 strokes/min.

Fig. 1 Time course of fermentation in liquid volume 25 ml/500 ml-shaking flask.

Basal medium and other cultural conditions were the same as in Fig. 1.

Fig. 2 Time course of fermentation in liquid volume 50 ml/500 ml-shaking flask.

Basal medium and other cultural conditions were the same in Fig. 1.

Fig. 3 Time course of fermentation in liquid volume 100 ml/500 ml-shaking flask.

Table 1 Effect of Adecanol LG-126 to liquid volume in 500 ml shaking flask on *Pseudomonas* lipase productivity.

Concentration of Adecanol	Liquid volume in 500 ml shaking flask		
	25 ml	50 ml	100 ml
LG-126			
no addition	200 u/ml	128 u/ml	72 u/ml
0.1%	190	194	192
1.0%	196	203	210

Adecanol LG-126 0.1% or 1% was added to each liquid volume in 500 ml-shaking flask. incubation time 72 h.

Basal medium and other cultural conditions were the same as in Fig. 1.

で菌体増殖が停止し, リパーゼ活性は 48 h で最大値を示した。この培地にあらかじめ Adecanol LG-126 を添加すると, 仕込み液量による差が減少し, リパーゼ活性は仕込み液量の少ない方, つまり酸素供給量の多い方に近づいた (**Table 1**)。

次に他の界面活性剤の影響をみるために, Tween 60, Nonion NS-215, Nonion TM-211 を培地に添加したところ, Tween 60 ではその効果はなく, Nonion 類は仕込み液量が少ないほどリパーゼ活性は増大し, Adecanol LG-126 の場合の最大値を越えたが, 培養中での発泡が激しく, 実用生産には使用できないものであった (**Table 2**)。

3.2 油脂の分散または乳化の影響

本菌株のリパーゼ産生は, 炭素源である油脂に大きく依存するため, 界面活性剤が油脂の分散をよくし, その

Table-2 Effect of other surface active agents to liquid volume in 500 ml shaking flask on *Pseudomonas* lipase productivity.

Surface active agents	Liquid volume in 500 ml shaking flask		
	25 ml	50 ml	100 ml
no addition	210 u/ml	156 u/ml	58 u/ml
Tween 60 0.1%	181	140	64
Nonion NS-215 0.1%	264	211	226
Nonion TM-211 0.1%	262	238	209

Tween 60 0.1%, Nonion NS-215 0.1% or Nonion TM-211 0.1% was added to basal medium. incubation time 72 h. Basal medium and other cultural conditions were the same as in Fig.-1.

Table-3 Effect of oil dispersion or oil emulsifying.

	Liquid volume in 500 ml shaking flask		
	25 ml	50 ml	100 ml
I	180 u/ml	148 u/ml	62 u/ml
II	176	144	58
III	195	140	67

I : basal medium

II : basal medium besides oil +25% soybean oil-PVA emulsion corresponding to oil 2%

III : basal medium+PVA 117 corresponding to emulsion in II incubation time 72 h.

Basal medium and other cultural conditions were the same as in Fig.-1.

結果としてリパーゼ産生能に効果をもたらす懸念がある。**Table-3** は炭素源として大豆油をポリビニルアルコール 117 で乳化したものと、そのまま添加したものについてその影響を確認したものである。仕込み液量が 25 ml, 50 ml, 100 ml とリパーゼ活性に差異がみられず、油脂の分散による効果ではないと判断した。

3.3 Adecanol LG-126 の酸素移動速度に及ぼす影響

Adecanol LG-126 を添加すると、仕込み液量によるリパーゼ産生の差が減少し、仕込み液量の少ない方（酸素供給量の多い方）に近づくことから、Adecanol LG-126 と酸素移動速度との関連を検討するため、実験の部 2.3 に記載した広瀬の方法で、仕込み液量 25 ml, 50 ml, 100 ml に Adecanol LG-126 を 0.1%, 1% をそれぞれ添加し、酸素移動速度 (kLa) を測定した。**Table-4** に示すように、それぞれの仕込み液量について、Adecanol LG-126 の無添加の場合に比して、添加した方が kLa の上昇がみられ、その値も 100 ml < 50 ml < 25 ml の順に大きくなった。このことから Adecanol LG-126 の添加は、フラスコ中の酸素移動速度を改善し、リパーゼ産生能の増大に大きく関与しているものと考えた。なお本稿では、Nonion 類と Tween 60 についての kLa 測定値を示さなかったが、Nonion 類は発泡が激しいため、

Table-4 Effect of Adecanol LG-126 to oxygen transfer rate, kLa .

	Liquid volume in 500 ml shaking flask			
	25 ml	50 ml	100 ml	150 ml
no addition	4.75 min ⁻¹	3.89 min ⁻¹	2.86 min ⁻¹	
Adecanol LG-126, 0.1%	5.23	4.08	3.15	
Adecanol LG-126, 1%	5.59	4.83	3.89	
Water	6.14	5.72	4.15	2.75

Adecanol LG-126 0.1% or 1% was added to 25 ml, 50 ml, and 100 ml of basal medium in 500 ml-shaking flask, and kLa in each flask was assayed by Y. Hirose's method.

Rate of agitation 200rpm, rate of aeration 0.25vvm, inoculum size 4% Adecanol LG-126 0.1% was added to basal medium, and then less than 1% of Adecanol LG-126 was added to culture broth during incubation as antifoam.

Fig.-4 Time course of fermentation in liquid volume 250 l/500 l tank.

これによる kLa の低下は当然予測できることであり、Tween 60 についてはフラスコの仕込み量による kLa の差をなくする効果がないことから Adecanol LG-126 のそれとは本質的に異なるものと思われる。

3.4 500 l 培養槽への適用

次に坂口フラスコの成績を実際の生産の場に応用するため、500 l 培養槽を用いて確認することにした。すなわち、500 l 培養槽に 250 l の培地を入れ、Adecanol LG-126 を 0.1%, 途中消泡の目的で 1% を限度として加えて、かくはん速度 200 rpm, 通気量 0.25 vvm(仕込み液量 100 ml/500 ml 坂口フラスコの場合の kLa に相当する)の条件で培養したところ、**Fig.-4** のように **Fig.-1** に示す仕込み液量 25 ml/500 ml 坂口フラスコの場合と同じパターンをとり、坂口フラスコでのリパーゼ産生の最大値 200 u/ml を確保することができた。この結果は実生産に使用する培養槽の形式によって kLa の違いがあっても、リパーゼ生産能を高活性側に一定化できる点できわめて有利な技術と思われる。なおリパーゼ産生の最大値を示す時間が、フラスコの 48 h 目から 24 h 目に短縮されるのは通常実生産における培養槽の場合、接種量がフラスコより多量になることが原因と思われる。

4 総 括

1) *Pseudomonas* nov. sp. No. 156 のリパーゼ産生

能は、酸素供給量に依存し、坂口フラスコの仕込み液量が少なくなるに従って増大した。

2) 坂口フラスコでの界面活性剤の添加実験では、a) Tween 60 は効果がないこと、b) Nonion 類は著しい産生能を示したが、発泡が激しいため実用性がないこと、c) Adecanol LG-126 の添加では、仕込み液量によるリパーゼ産生能の差は減少し、仕込み液量の少ない方すなわち酸素供給量の多い方に近づくことがわかった。

3) Adecanol LG-126 の効果は、培地中の炭素源である油脂の分散によるものではなく、フラスコ中の酸素移動速度を改善するものであると判断し、さらにこの結

果を 500 l 培養槽に適用し、同じ成績を得た。

なお本研究の内容は第 24 回油化学研究発表会（昭和 60 年 10 月 22 日、筑波）で発表した。

（昭和 60 年 12 月 9 日受理）

文 献

- 1) 仲 恭寛, 天野源博, 特許公告, 昭 56-39,190
- 2) 町田晴夫, 東 俊彦, 小出章夫, 植田克子, 山田浩一
特許公告, 昭 40-27,314
- 3) ジャン・パセロ, 公開特許, 昭 50-31088
- 4) W.H. Liu, T. Beppu, K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*,
36, 1919 (1972)
- 5) Y. Hirose, H. Sonoda, K. Kinoshita, H. Okada, *Agr.
Biol. Chem.*, **30**, 49 (1966)

昭和 61 年 3 月家庭用洗浄剤等生産・販売・在庫実績

（単位：t）

品名		生産量	販売量	販売 金額 百万円	在庫量	前年同月比%			前月比%	
						生産量	販売量	販売金額	生産量	販売量
セッケン	浴手洗工 用・固形 液・固形 洗濯用粉 業の 計	8,483	6,907	4,316	13,196	102	109	101	129	145
		326	351	97	181	109	110	104	110	115
		832	786	172	719	98	89	84	134	97
		2,944	3,276	703	1,459	94	91	96	153	142
		1,557	1,565	298	1,421	100	104	111	101	98
		448	484	129	243	71	71	75	130	109
		14,590	13,369	5,716	17,219	99	100	99	129	131
身体 洗浄剤	洗顔 ※合計	220	215	515	99	196	207	167	101	156
		381	307	338	629	134	101	112	88	115
		601	522	853	728	152	128	140	92	129
合成 洗剤	粉末 有リン 無リン 計	2,807	2,377	425	1,838	98	98	99	103	103
		49,098	46,827	11,065	20,128	119	112	109	121	121
		51,905	49,204	11,490	21,966	117	112	108	120	120
	液体 洗濯用 台所用 住宅・家具 計	3,332	3,710	1,419	3,150	78	85	85	115	129
		19,558	20,341	5,410	8,044	107	108	114	112	129
		4,848	5,872	1,925	2,620	123	123	130	171	234
		27,738	29,923	8,755	13,814	105	107	111	120	141
※合計		79,643	79,127	20,245	35,780	113	108	108	120	127
柔軟仕上げ剤		22,570	25,725	4,761	7,467	115	114	113	89	105
漂泊剤	粉末 液合計	1,261	1,477	715	551	111	96	99	103	87
		6,526	8,091	1,215	2,701	105	102	102	111	150
		7,787	9,568	1,931	3,252	106	101	101	109	135
酸・アルカリ洗浄剤		1,768	2,125	502	536	92	105	106	125	136
クレンザー	粉末 液合計	1,736	2,748	352	713	99	106	104	99	124
		1,189	1,740	446	885	56	102	103	60	107
		2,925	4,488	797	1,598	76	104	103	79	117

（注）1. ※はボディシャンプー等をいう。

2. ※印の合成洗剤合計は 61 年 1 月より脱漏事業所を繰り入れたため、販売数量及び販売金額の前年比はリンク係数を乗じてある。

3. 金額の単位未満は四捨五入しているため、合計が内訳と必ずしも一致しないことがある。

資料：通産省鉄鋼化学統計調査室，作表：日本石鹸洗剤工業会