[農化 第 37 卷, 第 11 号, p. 649~652, 1963]

微生物によるリパーゼの生産 (第 4 報)*

一新菌の同定とその菌株が生産するリパーゼの定量について

山田 浩一, 太田 安英 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 38 年 5 月 15 日 受 理

すでに前報⁽¹⁾で報告したように, 著者らは微生物によるリパーゼの生産を目的として, リパーゼ生産能の高い菌株のスクリーニングを行った結果, No. 5, No. 8 などすぐれた菌株を分離することができた。それらのうち, No. 5 菌は *Candida* 属に属する新菌と認められ, *Candida cylindracea* nov. sp. と命名された。一方, No. 8 菌は No. 5 菌に匹敵するリパーゼ生産能を持ち, 培養上の性質も No. 5 菌に似ているが, リパーゼの性質⁽²⁾などについて明らかな相違がみられたので, 同定を行ったところ No. 8 菌も *Candida* 属の一新菌と認められた。

また No. 8 菌の生産するリパーゼを定量するためには, 培養液を希釈しなければならないが, 約 5 倍以上に希釈すると測定に異常が現れることが認められた。前報⁽²⁾の *C. cylindracea* のリパーゼや腭リパーゼの測定では経験しなかったことであるが, 培養液を希釈していくとある点から測定値が予想される値より小さく出た。そこで培養液中に未知物質の存在が推定され, その物質はなんらかの形でリパーゼ反応に関与していると考えられた。未知物質は透析により除去されるが, 透析内液にタウロコール酸を加えればリパーゼ活性は回復する。未知物質についてはまだなにもわかっていないが, No. 8 菌のリパーゼはタウロコール酸を添加することにより正確に定量できることが明らかとなったので, No. 8 菌の諸性質と合わせて報告する。

1. No. 8 菌 の 同 定

No. 8 菌の形態的及び生理的諸性質についての記述は次のとおりである。

Description of Strain No. 8 (*Candida paralipolytica* nov. sp.)

Growth in malt extract: After 3 days at 25°C cells are almost round to short-oval, ellipsoidal, elongate, $(2.5\sim5)\times(3\sim15)\mu$, single or in pairs. A sediment and a yellowish gray, thin, smooth and creeping pellicle are formed.

After one month at 17°C a sediment, a ring and a thin film are present.

Streak culture on malt agar: After one month at 17°C the streak culture is light brownish gray, filiform (somewhat spreading), raised, dull, partially or entirely reticulated, ciliate at the margine (fringed with mycelium).

Liquefaction of gelatin: Negative.

Slide culture: Pseudomycelium formation is abundant. Well developed and often branched pseudomycelium is formed. Besides pseudomycelium a true mycelium is also formed. Blastospores are short-oval to oval, elongate, in small verticils or in short chains. Sometimes giant cells are present.

Sporulation: Not observed.

Sugar assimilation: Glucose +, Maltose -, Galactose +(weak), Lactose -, Saccharose -.

Fermentation: Absent.

Assimilation of potassium nitrate: Negative.

Ethanol as sole source of carbon: Growth. A very thin pellicle is formed.

Growth in milk: Milk is peptonized.

Splitting of arbutin: Negative.

* Studies on the Production of Lipase by Microorganisms. Part IV. Identification of a New Strain and Determination of its Lipase Activity.

By Koichi YAMADA and Yasuhide OTA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo)

第 1 図 Strain No. 8
After 3 days at 25° in malt extract

第 2 図 Strain No. 8
Slide culture

第 3 図 Blastospores of Strain No. 8

第 4 図 Giant Cells of Strain No. 8

第 1 表 *C. lipolytica*, *C. rugosa*, *C. cylindracea* nov. sp., *C. paralipolytica* nov. sp. の比較

性 質	菌 種	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>C. cylindracea</i>	<i>C. paralipolytica</i>
size of cells (μ)		$(2\sim4.5) \times (4\sim22)$	$(2\sim3.4) \times (4.3\sim15.5)$	$(0.8\sim3.5) \times (2\sim21)$	$(2.5\sim5) \times (3\sim15)$
streak culture color		yellowish	cream to gray-yellowish	grayish-white	light brownish gray
surface		dull smooth or reticulated	glistening smooth to wrinkled	dull wrinkled or netted	dull reticulated
fermentation		—	—	+	—
sugar assimilation					
glucose		+	+	+	+
galactose		—	+	+	+(weak)
saccharose		—	—	+	—
maltose		—	—	+(very weak)	—
lactose		—	—	—	—
litmus milk		peptonized	no coagulation	—	peptonized
splitting of arbutin		absent or slightly positive	—	—	—
liquefaction of gelatin		+	—	—	—

Splitting of fat: Positive.

Source: Soil.

本菌の顕微鏡写真を第 1~4 図に示した.

以上の記載から明らかなとおり, 本菌は *Candida* に属するものと認められる. *Candida* 属中では *Candida lipolytica* にかかなり近縁と考えられるが, 本菌は次の点で *C. lipolytica* と異なっている.

(1) ゼラチン液化力がないこと.

(2) *C. lipolytica* が wrinkled type の tough な pellicle を生ずるのに対し, 本菌は培養初期にきわめて菲薄な film を生ずるのみで, 日数を経るにしたがってしだいに消失し, ring のみになる.

(3) *Pseudomycelium* の形状, 特に blastospore の着生等に差異がある (第 3 図参照)。

(4) Giant cell の形成が認められること (第 4 図参照)。

(5) Galactose の資化性があること。ただし, 明らかに *C. lipolytica* に属すると考えられる菌株の中にも galactose の資化性が認められることがあるから, この性質はあまり重要な差ではない。

このように最も近縁と思われる *C. lipolytica* との間にもかなりの相違が認められるので, 本菌は *Candida* 属の 1 新種と考えられ, *Candida paralipolytica* nov. sp. と命名した。

第 1 表は *Candida* 属でリパーゼの生産が知られている *C. lipolytica*, *C. rugosa* と著者らが分離した新種である *C. cylindracea* nov. sp., *C. paralipolytica* nov. sp. について, 主な菌学的性質を比較したものである。前者の菌種についての性質は J. Lodder らの "The Yeast" (1952) から要約した。

2. *Candida paralipolytica* nov. sp. のリパーゼ定量について

(1) *C. paralipolytica* の培養方法 可溶性澱粉 2%, 大豆の抽出物 (豆腐の製造に用いる市販品) 2%, K_2HPO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, KCl 0.05%, 酵母エキス 0.05%, $CaCO_3$ 1% を含み pH 7.0 に調節した培地を, 500 ml の肩つきフラスコに 100 ml ずつ分注し, 26.5°, 120 oscills/min で約 60 時間振とう培養した。

(2) リパーゼの測定 上記の培養液を遠沈し菌体その他を除いた上清を酵素液とし, 蒸留水を用いて稀釈した。リパーゼ定量の操作は前報⁽²⁾で報告した方法と全く同じである。ただし, 反応液の組成はエマルジョン 5 ml, 緩衝液 3 ml, 蒸留水またはタウロコール酸ソーダ溶液 1 ml, 酵素液 1 ml の計 10 ml であり, 上記の順序で添加した。タウロコール酸ソーダとしては市販の Nutritional Biochemicals Corp. 製を用いたが, ペーパークロマトグラフィーによりグリコール酸の混入が認められた。

第 5 図 酵素量と測定値の関係

比 1 は酵素原液を示す。反応時間 10 分, 磷酸緩衝液 pH 7.0。

想定された未知物質がいかなる性質を持ち, いかなる働きをしているかは, 目下のところ全く不明であるが, 暫定的にでも未知物質を分離してリパーゼ反応液に添加するか, あるいはこれに代りうる物質をみつけなければ *C. paralipolytica* のリパーゼ定量ははなはだしく不正確であり, ひいては今後の研究を妨げることは明らかである。そこで腓リパーゼにおいて, 特殊な機作で反応を活性化する⁽³⁾ことが知られているタウロコール酸ソーダ (STC) の添加を試みたところ, 第 5 図の点線部分までリパーゼ活性が回復し, 定量が正常に行われることが見いだされた。

未知物質は蒸留水を外液とした 5 日間の透析でほとんど除かれると思われるが, これに STC を添加してもリパーゼ活性は完全に回復し, かつ酵素量と測定値は比例した。この関係を第 6 図で表わした。また第 6 図は加熱してリパーゼを失活させた培養液を加えた場合も表わしているが, これにより未知物質の存在は確かであると考えられる。

第 7 図は STC の濃度と測定値の関係を示した実験である。透析した酵素液をそのまままたは 3 倍に稀釈して測定に用いた。図から明らかとなり, STC の最終濃度が 0.2% (w/v) 付近で (ただしオリーブ油が占める

第 5 図は酵素液を種々の段階に稀釈してリパーゼ活性を測定した場合の, 酵素量と測定値の関係を示したものである。図から明らかのように, 酵素液が 4~5 倍に稀釈される付近から測定の異常がみられ, 当然発現すべきリパーゼ活性が充分現れていない。この現象を説明するために, 著者らは培養液中に未知物質が存在し, その物質が非常に稀釈されたためにリパーゼ活性が低下したと考えた。

なお, 第 5 図のグラフが折線になっているのは, 第 2 報⁽²⁾ですでに述べたように, 著者らのリパーゼ定量条件において, オリーブ油の加水分解反応は 2 段階の零次反応を含むことを示すのであり, 今までのデータと合わせてこの現象がリパーゼの origin や緩衝液の種類によらないことを暗示している。

第 6 図 タウロコール酸ソーダ及び培養液中未知成分がリパーゼ反応におよぼす影響

●—● 対照 (透析酵素液使用)
○—○ タウロコール酸ソーダ 0.2% (w/v)
×—× 加熱培養液 1 ml 添加 (100°, 10 分)
反応時間 10 分, 磷酸緩衝液 pH 7.0.

第 7 図 タウロコール酸ソーダの濃度と測定値の関係

●—● 酵素液を 3 倍に希釈して測定, $\times 3$
○—○ 希釈しないで測定
透析後の酵素液の酵素濃度は約 17 unit/ml である。
McIlvaine の緩衝液 pH 7.0 を使用。

体積を除かずに計算した) リパーゼ活性が最高となったので, この濃度で *C. paraliipolytica* のリパーゼを定量することに決定したが, STC が過剰になるとリパーゼ反応に阻害が起ったり, 逆に不十分であると STC と酵素の量比が活性発現に影響をおよぼしたりすることは, 今後未知物質や STC の役割を知る上に重要な知見であると思われる。

要 約

(1) 著者らが分離したリパーゼ生産能の高い No. 8 菌は, 同定の結果 *Candida* 属の 1 新種と認められ, *Candida paraliipolytica* nov. sp. と命名された。

(2) *C. paraliipolytica* の培養液中に, そのリパーゼ反応をなんらかの形で活性化する未知物質が確認された。この未知物質の代りに 0.2% (w/v) のタウロコール酸を用いても, 同じ活性化が起ることがわかったので, *C. paraliipolytica* のリパーゼ定量には同物質を添加することにした。

本研究を行うに当り菌の同定について御援助いただいた味の素株式会社中央研究所の駒形和男, 中瀬崇両氏に深謝する。

- (1) 山田浩一, 町田晴夫: 本誌, 36, 858(1962).
(2) 山田浩一, 太田安英, 町田晴夫: 本誌, 36, 860 (1962).

- (3) P. Desnuelle: *Advances in Enzymology*, 23, 129 (1961).