リパーゼ生産菌 *Rhizopus oligosporus* の
単離と培養条件の検討宇佐美昭次*・桐村光太郎*・伊東禎男**
志村 進**・上沼敏彦*・森 隆雄*Isolation and Culture Conditions of Lipase-
producing *Rhizopus oligosporus*Shoji USAMI*, Kohtaro KIRIMURA*
Yoshio ITOH**, Susumu SHIMURA**
Toshihiko KAMINUMA* and Takao MORI** Department of Applied Chemistry, School of
Science and Engineering, Waseda University,
3-4-1, Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169** Central Laboratory, Lotte Co. Ltd., 3-1-1,
Numakage, Urawa, Saitama 336

To obtain lipase high-producing micro-organisms, 556 microorganisms isolated from soil and cacao beans were screened. One strain identified as *Rhizopus oligosporus* was found to produce extracellularly a large amount of lipase in the shaking culture. When cultivated at 30°C for 5 days in the medium containing 2% (v/v) olive oil, the strain produced 16.7 U/ml of lipase.

(Received May 24, 1988)

リパーゼはエステル結合の分解、生成および交換反応という3つの触媒機能を有し¹⁾、これらの機能は医薬品ならびに食品の製造や分析研究等の多くの分野で利用されている。とくに、食品の分野においては、分解反応を利用した乳脂肪からバターフレーバーやチーズフレーバーの製造²⁾、あるいはマーガリンとして利用するための大豆油と牛脂混合物におけるエステル交換の例³⁾等が報告されている。

リパーゼを生産する微生物については数多くの報告がなされているが、その酵素的性質は起源ごとに異なっている^{4,5)}。筆者らは、新規なリパーゼ生産菌を探索し、*Rhizopus oligosporus* に属する一菌株を取得した。本報では、供試菌によるリパーゼ生産のための最適培養条件を決定した結果について報告する。

1. 実験方法

リパーゼ生産菌の探索は、次の方法により行った。ポテト・デキストロース寒天培地 (PDA 培地、田辺製薬工業製) を内径 9 cm のペトリ皿に 20 ml 取り、この中央に微量のカカオ豆またはチョコレート工場周辺の土壌を接種した。30°C にて 7 日間静置培養後、形成された集落から釣菌した。得られた菌株は PDA 培地上で再度純粋分離を行い、PDA 培地スラントに保存した。

分離した菌株のリパーゼ生産性は、平板培養および振とう培養の両者について検討した。平板培養には、ペプトン 0.5% (w/v)、牛肉エキス 0.5% (w/v)、バタージェロー 5% (v/v)、ビクトリアブルー 3.75×10^{-3} または 0.004% (w/v) の組成で初発 pH を 6.0 となるように調節した蒸留水溶液に寒天 2% (w/v) を加えた培地を使用した。本平板培地上に菌株を接種し、30°C にて 5 日間静置培養し、ビクトリアブルーの呈色によりリパーゼ生産性を評価した。振とう培養には、ペプトン 3% (w/v)、グルコース 1% (w/v)、オリーブ油 4% (v/v)、リン酸 2 カリウム 0.1% (w/v)、硝酸ナトリウム 0.1% (w/v)、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.1% (w/v) の組成の蒸留水溶液を基本培地として使用した。初発 pH は細菌・酵母では 7.0、糸状菌では 6.0 となるように調節した。500 ml 容坂ロフラスコに培地 60 ml を分注し、菌体または分生子の懸濁液 (1 白金耳/10 ml 滅菌蒸留水) 1 ml を接種し、30°C にて 5 日間、120 rpm にて往復振とう培養後、遠心分離 (10 000×g, 10 min, 4°C) により培養ろ液と菌体を分離した。さらに細菌・酵母の場合は超音波処理 (20 kHz, 30 min, 0°C)、糸状菌の場合は海砂処理によって菌体を破碎後、遠心分離 (12 000×g, 10 min, 4°C) して上清の無細胞抽出液を調製した。培養ろ液および無細胞抽出液を粗酵素溶液として使用した。

リパーゼ活性の測定は、Nord⁶⁾、山田ら⁷⁾の方法を改良して行った。すなわち、超音波処理 (20 kHz, 20 min, 0°C) により調製したオリーブ油/ポリビニルアルコールのエマルジョンを基質として、37°C で 10 min 反応後、遊離した脂肪酸を pH-スタットを用いて 0.05 N KOH により滴定した。酵素活性は、1 min の反応で 1 μmol の脂肪酸を遊離する力価を 1 unit (U) と定義した。

2. 結果および考察

カカオ豆、土壌試料より合計 556 株 (糸状菌 469 株、

* 早稲田大学理工学部応用化学科 (〒169 東京都新宿区大久保 3-4-1)

** (株) ロッテ中央研究本部 (〒336 埼玉県浦和市沼影 3-1-1)

酵母 9 株, 細菌 78 株) の微生物を分離した。これらのうち, 平板培養において高いリパーゼ生産性を示した 29 株 (糸状菌 28 株, 細菌 1 株) につき, 振とう培養試験を行い, 菌体外に多量のリパーゼを生産する糸状菌 1 株を選択した。

供試菌を PDA 培地, 麦芽エキス培地, Czapek 培地等の寒天培地に接種して形態観察を行った。供試菌の胞子のうの形状を Fig. 1 に示した。寒天培地上での供試菌の生育上限温度は 42°C であったが, $25^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ における生育は極めて速く, また綿毛状の菌糸よりなる暗褐色の集落が形成され, ペトリ皿の内面にまではい上がることが観察された。以上の特徴から供試菌を接合菌類と判断した。さらに, 成長過程を顕微鏡観察し, 匍匐菌糸が伸長し基物に接した部分で仮根を生じ, そこから胞子のう柄が形成されることを認めた。以上の性質および胞子のうの形状と大きさ (Fig. 1), 胞子のうの下部がアポフィーゼに連結していることから, 供試菌を *Rhizopus* 属と判断した。さらに, 胞子のう胞子が茶色で垂球形, 球形, 三角形等の多形態を示すこと, 接合胞子が形成されないことが確認されたため, HESSELTINE と ELLIS による分類体系⁸⁾に従って, 本供試菌を *Rhizopus oligosporus* と同定した。

R. oligosporus の振とう培養法におけるリパーゼ生

Fig. 1 Sporangium of a lipase producing *Rhizopus oligosporus*

The sporangium is sphere, and the size is $70\sim 100\mu\text{m}$ in diameter. The sporangio-phore is brown, and being $10\sim 20\mu\text{m}$ in width and $50\sim 150\mu\text{m}$ in length. On the other hand, sporangiospores are sphere or triangle in shape, and their sizes are $(3.0\sim 5.5\mu\text{m}) \times (7.0\sim 8.0\mu\text{m})$. The bar represents $30\mu\text{m}$.

産のための最適培養条件の検討を行った。実験方法に示した液体培地を基本として, ペプトン, グルコース, オリーブ油, レシチンの濃度を変化させた場合の菌体外リパーゼの活性を測定した。

里村ら⁹⁾は, 培地へのグルコース添加により微生物のリパーゼ生産性が低下することを報告している。本供試菌の場合には, グルコース濃度 2% (w/v) においてリパーゼ活性は最大となった。グルコース濃度が 3% (w/v) 以上の場合, 菌体の増殖は良好であったが, 培地中のオリーブ油は資化されず残存しており, リパーゼ活性も低かった。

一般に, 基質として脂質, 例えばオリーブ油¹⁰⁾を培地に添加すると微生物のリパーゼ生産性は向上する。本供試菌において, 基質としてのカカオ脂とオリーブ油の影響を検討するため, 各々を培地に 1% (v/v) ずつ添加して培養を行った。その結果, リパーゼ活性はカカオ脂添加の場合は 7.6 U/ml , オリーブ油添加の場合は 10.5 U/ml で前者の 1.3 倍の生産性となった。また, 両者を添加した場合の相乗効果は認められなかった。よ

Fig. 2 Time course of lipase production by *Rhizopus oligosporus*

Symbols: dry weight of mycelia (○), lipase activity (●) and pH of the culture broth (△).

Cultivations were carried out in SAKAGUCHI flasks containing 60 ml of the medium at 30°C . The culture medium contained peptone 5% (w/v), glucose 2% (w/v), olive oil 2% (v/v), lecithin 0.2% (w/v), K_2HPO_4 0.1% (w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% (w/v) and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% (w/v) in distilled water.

って、基質としてはオリーブ油が適していると判断した。オリーブ油添加濃度と活性との関係を検討したところ、2% (v/v) の添加で最大活性となった。基質として脂質類を培地に添加しない場合には、菌体外にリパーゼ活性が認められないことから、本供試菌の生産するリパーゼは誘導酵素と考えられた。

同属の *R. delemar* については、レシチンがリパーゼ生産性を増大させることが岩井ら¹¹⁾ によって報告されている。そこで本供試菌についても、大豆レシチンを超音波処理 (20 kHz, 30 min, 0°C) し、エマルジョンとして培地に添加した。0.2% (w/v) まではリパーゼ活性は増大したが、それ以上の添加では活性の増大は認められなかった。一方、窒素源についても検討を行い、リパーゼ生産には硝酸ナトリウムより硫酸アンモニウムが適していることが判明した。

以上の結果から、最適培地を次のように決定した。すなわち、ペプトン 5% (w/v)、グルコース 2% (w/v)、オリーブ油 2% (v/v)、レシチン 0.2% (w/v)、リン酸 2 カリウム 0.1% (w/v)、硫酸アンモニウム 0.1% (w/v)、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.1% (w/v) の組成の蒸留水溶液で、初発 pH を 5.5 に調節したもの。この培地を使用して、30°C において供試菌の培養を行い、経過を Fig. 2 に示した。菌体外のリパーゼ活性は培養日数の増加に伴って増大し、培養 5 日目に最大活性 16.7 U/ml に達した。培養温度については、25°C、35°C、40°C の場合についても検討を行ったが、生産性は全培養期間を通じて 30°C の場合に比べて低く、最適培養温度は 30°C と決定した。

以上、*R. oligosporus* によるリパーゼ生産のための培養条件について検討した結果、基本培地に比べて 3.3 倍の酵素活性を得ることができた。

なお、供試菌の生産する酵素の基質特異性については培養ろ液を硫酸塩析 (30~80% 飽和) して得られた粗酵素を用いて検討した。この結果、本酵素はトリグリセリドの 1, 2, 3-位の全てに作用することが認められた。他の *Rhizopus* 属では、*R. delemar*⁴⁾、*R. arrhizus*¹²⁾ のリパーゼについて報告があるが、両者とも 1, 3-位のみに作用する。この点からも供試菌の生産するリパーゼは特徴のあるものと思われた。

3. 要約

リパーゼ高生産菌を得るために、カカオ豆およびチョコレート工場周辺の土壌より菌株の探索を行った。その結果、菌体外に多量のリパーゼを生産する 1 菌株を取得し、菌学的検討を行い、*Rhizopus oligosporus* と同定した。本供試菌についてリパーゼ生産のための最適培養条件の検討を行い、ペプトン 5% (w/v)、グルコース 2% (w/v)、オリーブ油 2% (v/v)、レシチン 0.2% (w/v) に微量の各種無機塩類を加えた最適培地を決定した。また培養経過から温度 30°C、5 日間の条件を得た。これらの条件下で振とう培養することにより供試菌の菌体外リパーゼ活性は 16.7 U/ml に達した。

文 献

- 1) IWAI, M. and TSUJISAKA, Y.: Lipases, edited by BORGSTRÖM, B. and BROCKMAN, H.L. (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), p. 443 (1984).
- 2) KINSELLA, J.E., PATTON, S. and DINICK, P.S.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 449 (1967).
- 3) LO, Y.C. and HANDEL, A.P.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 387 (1981).
- 4) OKUMURA, S., IWAI, M. and TSUJISAKA, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 655 (1976).
- 5) KOKUSHO, Y., MACHIDA, H. and IWASAKI, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1743 (1982).
- 6) NORD, F.F.: *Methods in Enzymology*, **1**, 629 (1955).
- 7) 山田浩一・町田晴夫: 農化, **36**, 858 (1962).
- 8) HESSELTINE, C.W. and ELLIS, J.J.: *The Fungi* IV B (Academic Press N.Y., New York), p. 205 (1973).
- 9) 里村幸男・大井 進: 農化, **31**, 202 (1957).
- 10) FUKUMOTO, J., IWAI, M., TSUJISAKA, Y. and OKAMOTO, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 837 (1973).
- 11) 辻阪好夫・岩井美枝子・奥村 晋・富永嘉男・杉原歌雄・島田裕司: 大阪市立工業研究所報告 第 62 回, p. 8 (1981).
- 12) SEMERIVA, M., BENZONANA, G. and DESNUELLE, P.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 71 (1967).

(昭和 63 年 5 月 24 日受理)