

また、rat liver 中の PAL-P のごとき含有量大なる場合は抽出能力のすぐれた、測定範囲の広い、且つ簡便なるトルエン 0.3ml 添加したトルエン抽出を試みるのが適当と思われる。〔曲線(3)〕

#### 4) 実験例

rat liver 1g, human serum 1ml について、その PAL-P 量をトルエン抽出にて前記測定法により定量した。PAL-P $\mu$ g/rat liver gを、平均して3.2であった。(Table VII)

また、PAL-P $\mu$ g/human serum ml は、平均0.020であった。

#### 結 論

(1) apo-tryphanase の調製は、透析処理よりも pH 4.5 等電点処理を繰返すことにより、PAL-P を解離させるべきである。

(2) Ehrlich 試薬の組成は、インドール抽出にトルエン溶媒を使用する際試薬 B (DAB20g, conc-HCl10ml, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 40ml) を用いるのが望ましいと考えられる。

(3) 生成インドールによる反応系阻害を防ぐために、また形成インドールの抽出を完全にするため、特にトルエン抽出の場合反応系にトルエン 0.3ml の添加が良好な結果を示した。

(4) インドール抽出溶媒として、検体に PAL-P 量多きと考えられる場合は、トルエン溶媒を使用し、血清のごとき PAL-P 量小なる時は、石油エーテル抽出をこころみるのが適切と思われる。

終りに本研究に際し、菌を恵与頂きました大阪大学医学部和田助教授、また実験の便宜を御計らい願った名古屋大学医学部細菌学教室、第2生化学教室に深く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 鶴沢：大阪医学会誌 **42**, 1637 (1943)
- 2) Wood, W, A. Gunsalus, I, C, Umbreit, W: J, Biol, Chem **170**, 313 (1947)
- 3) 坂本：ビタミン **24**, 223 (1961)
- 4) 佐藤：ビタミン **29**, 516 (1964)
- 5) 大島, 市原：阪大医誌 **39**, 1507 (1940)
- 6) 後藤：阪大医誌 **37**, 2413 (1938)

杉浦 衛, 伊藤万蔵, 浅野 弘：酵素剤の研究 (第11報)

糸状菌の生産するリパーゼについて

**Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Hiroshi Asano:**

**Studies on Enzyme preparations. (11) On the Lipase produced by Filamentous Fungi.**

As a result of inspection of bacillus which produces lipase it was found that a strain of *Aspergillus* genus had ability to produce a powerful lipase. Continuously, culture conditions off the strain were inspected. In consequence, culture temperature 35°C, culture time 72 hours, moisture in medium

60% were proved suitable, And PH 6.0. alcohol concentration 35~64% were for the purification of the enzyme.

## 1. 緒 言

微生物が生産するリパーゼの研究としては、すでに福本らの *Aspergillus niger* のリパーゼ<sup>1)</sup>、里村らの菌核菌リパーゼ<sup>2)</sup>、松村らの *Rhizopus* リパーゼ<sup>3)</sup>、山田らの *Candida* リパーゼ等の研究がある。われわれは、優秀な脂肪分解酵素の開発研究の目的で検索を進め、*Aspergillus* 属について、スクリーニングした結果、リパーゼを生産する強力な菌種を見出した。そこでこの菌を、麩培地で培養するための各条件、すなわち培養温度、培養時間および培地水分を検討した。さらに目的酵素を収率よく得るための、アルコールによる沈降条件、すなわち沈降 pH、沈降アルコール濃度等につき、研究を行なったので、次にその詳細について報告する。

## 2. 培養法および材料

培地は麩培地を用いる。麩の組成は水分 13~17%、粗繊維 8~10%、粗蛋白 14~16%、粗脂肪 3~4%、可溶無窒素物 45~55% である。

培養法はフラスコ培養で、100ml の三角フラスコに麩培地 10 g をとり、120°, 30' で殺菌、一白金耳を接種し培養を行った。

抽出、一定量の水にて抽出し、振盪静置後滲別し、滲液を抽出液とする。

## 3. 供試菌株

### i) *Aspergillus* 属

実験方法 (測定法)

Nord の山田変法<sup>5)</sup>に準じて行う。2% P. V. A を乳化剤とした。オリーブ油エマルジョンを基質として、これを 25ml, M/10-Mc Ilvaine buffer (pH7.0) 2ml を、径 3 cm の試験管に入れ、37°C に予熱後、酵素液 0.5ml を混和し、反応の出発点とする。15分反応後、アセトン: アルコール (1:1) の混液 10ml を用いてエマルジョンを壊し、反応を止める。これに 1% フェノールフタレイン液を、数滴加えて、後 N/20-NaOH 溶液にて、30秒間持続する紅色を呈するまで滴定する (Aml)。なお Blank は、酵素液を加えた後、直ちにアセトン・アルコール混液を加え、以下同様に滴定を行う (Bml)。活性は、すべて真の滴定値 (A-B) ml および、予め、最純品パルミチン酸を、N/20-NaOH 溶液にて滴定して、標準線より酵素単位重量当りの、リパーゼ活性を、パルミチン酸の量 ( $\mu\text{g}$ ) として求め、これより、パルミチン酸の、mg 数に換算した。

## 5. 培養条件

上記のフラスコ培養にて培養を行うにさいし、その培養条件を検討した。

### a) 培養温度と培養時間

まず、温度と時間の関係を知るため、水分 55% の麩培地 10 g を用い、これに 1 白金耳の菌体を接種し、25°C、30°C、35°C の各温度にて培養を行い、24、48、72、96、120 時間と経時的に生産されるリパーゼ活性を測定した。実験結果は Fig. 1 に表示する。これより、温度上昇とともに、発育状態は早いのが 40°C では菌体の発熱により、麩にやけを生じ、35°C を適当とした。また、培養時間 72 時間が最適と判定した。尚、いずれも数値は、麩 1 g 当りの活性を示した。

### b) 培地の水分濃度

前記培養温度 35°C にて培養を行い、Fig. 2 に示す如く、50%、55%、60% の水分濃度にてリパーゼ活性を、

経時的に観察した。その結果、Fig. 2 のような結果を得た。

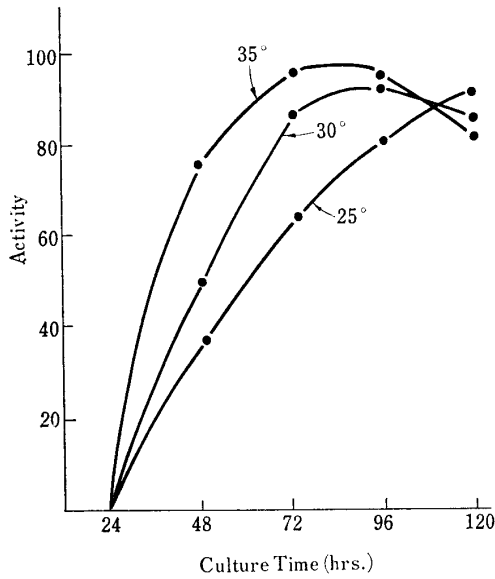


Fig. 1. Relationship between Culture Time and Temperature for producing Enzyme

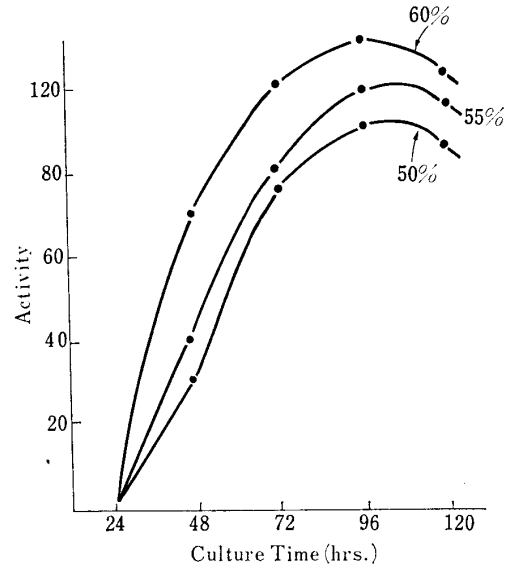


Fig. 2. Relationship between Activity and Koji Moisture

6. 沈降条件

上記で認めた各条件、すなわち、培養温度 35°C、時間、75時間、水分60%で培養を行い、これより目的酵素を得るために、6~7倍量の水にて抽出、この抽出液にアルコール処理を行い、このさい沈降条件の検討を試みた。

a) 沈降pH

抽出液のpHをN-HClとN-NaOHにて、3.5~9.0の各pHに調製し、これに最終71%になるように、無水アルコールを加え、生ずる沈澱物の量を測定した。実験成績は、Fig. 3に示した。pH 6.0において、3.55gと最適の沈澱物量を示した。これより沈降の最適pHは、6.0であることを認めた。

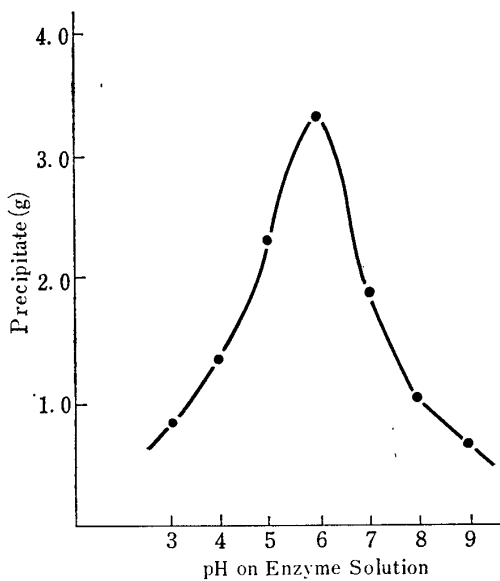


Fig. 3. Influence of pH on Alcohol Precipitation

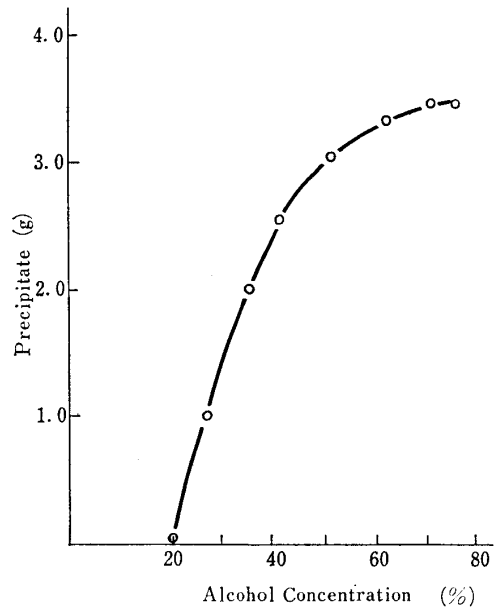


Fig. 4. Alcohol Concentration for Precipitating Enzyme

b) 沈降アルコール濃度

pH 6.0 の抽出液を用い, Fig. 4 に表示のように, 20~75% の各アルコール濃度にて処理を行い, 生ずる沈澱量を前記同様測定した. 実験成績は, Fig. 4 に示す. これより, 64%以上のアルコール濃度ならば, 充分目的にかなうものとして, 64%とした. なお, 沈澱物ならば, 充分目的にかなうものとして, 64%とした. なお沈澱物は, アルコールを加えて, 5° 以下に5時間放置し, 生じた沈澱をアルコールにて洗滌し, 遠心分離し, 真空乾燥したものである. 沈澱物量は, いずれも抽出液, 100ml 当りの g 数である.

c) 前処理アルコール濃度

前処理アルコールとは, アルコール沈降を行う前に, 抽出液中のリパーゼ以外の蛋白質を, 予め沈澱させ除去させるために行うことである. 0~56%の各任意の処理アルコール濃度にて行った処理により, 生じた沈澱物を除き, この溶液を一定量に稀釈して, 常法にて酵素活性を測定した. 実験成績は, Fig. 5 に示すようであり前処理アルコール濃度は, 40%までならば, リパーゼは沈澱せずに残存することが判明した.

d) 沈降アルコール濃度

前記各アルコール濃度にて, さらに, 高活性を有する酵素を収率より得るために, 処理沈降アルコール濃度を, その活性, 収率の面から検討を行った. Table. 1 に表示のように沈降アルコール濃度64%, 71%, 75%の各濃度につき, 処理アルコール濃度,

0~52%の各々について処理を行った. 酵素活性と同時に, その沈澱物の重量も求めた. 結果は, Table. 1 に表示する. 先ず数値は, 下段が抽出液 300ml 当りの全活性, 各々各段の右側の数値がその処理に於ける沈澱物の g 数, 左側がその活性値である. また, Fig. 6, Fig. 7 は, 各々収率活性について図示したものである. これより, 前処理アルコール濃度は, 35%, 沈降アルコール濃度, 64%が最適と認めた.

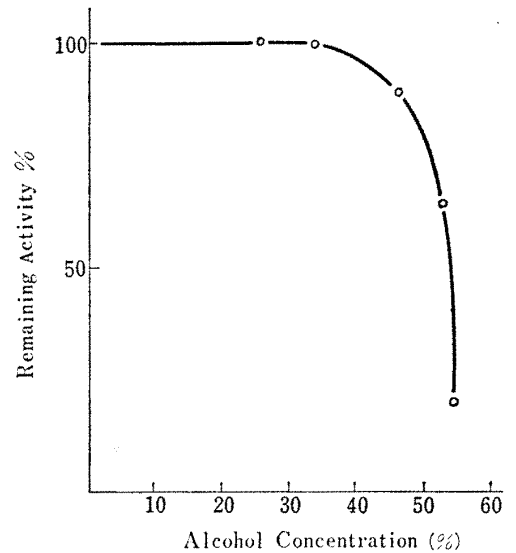


Fig 5. Remaining Activity in pre-treating by Alcohol

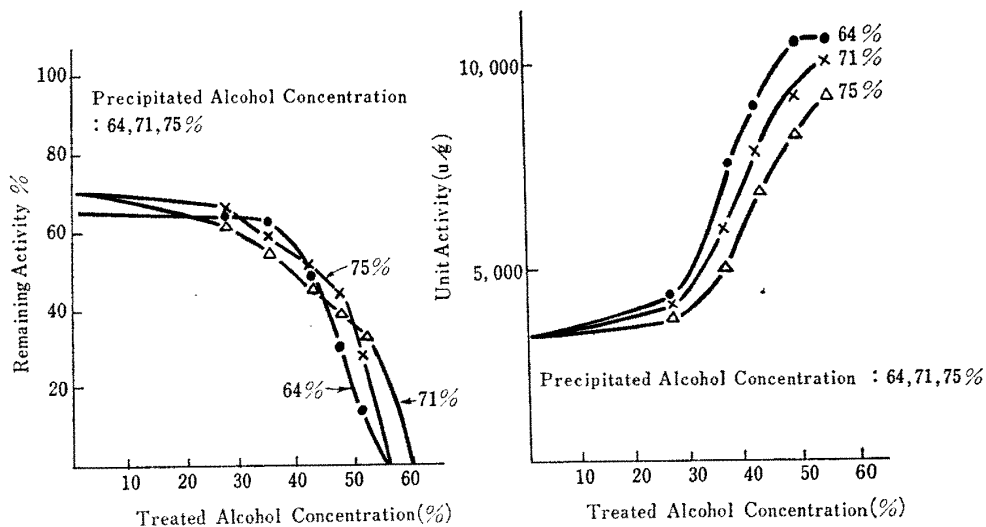


Fig 6. Fractionation by Alcohol

Fig 7. Fractionation by Alcohol

Table. I Discriminately Precipitation by Alcohol

T. Alc. %	P. Alc. %	64	71	75
	0	3065×10.0	3065×10.0	3100×10.0
	27	4100×7.1	3950×7.2	3750×7.3
	36	7350×3.9	6050×4.3	5150×5.0
	42	9350×2.5	7950×2.8	7000×2.7
	48	10500×1.2	9200×2.0	8300×2.0
	52	10500×0.4	10050×1.1	9100×1.3
	Percolate	46400	43400	43600

This value was expressed as lipase activity × precipitate g

### 考 察

供試菌種を培養する麩培地の麩は、その成分により生成される酵素剤の性質、分量に変化を与えるものと考えられる。そこで使用する。麩は、できるだけ一定のものを用いる。培養温度、培地水分の検討とともに、温度上昇、水分の増加により、リパーゼ生産が多くなるが、実際には操作上の観点より温度35°C、水分60%が好適条件と考えられる。アルコール沈澱物は、できるだけ洗浄する。洗浄不十分の際には、活性低下の原因になる。

### 結 論

優秀なリパーゼ生産菌の検索を進め、*Aspergillus* 属についてスクリーニングした結果、強力な一菌種を見出した。培養温度は35°C、培養時間は72時間、培養水分60%が好適条件と判定した。次いでこれら条件にて培養を行い、生産された酵素を得るための抽出および沈降条件を検討し、沈降pH6.0、沈降アルコール濃度64%、前処理アルコール濃度35%と定めた。

### 文 献

- 1) 福本, 岩井, 辻阪: 酵素化学シンポジウム 18巻 53-61(1960).
- 2) 里村, 大井: 農化 **31**, 202 (1957).
- 3) 松村, 三宅, 立岡: J. Biochem, **46** 575 (1951).
- 4) 山田, 町田: 農化 **36**, 585 (1962).
- 5) J. V. Fiore, F. F. Nord: Arch. Biochem. **23**, 473 (1949).
- 6) 山田, 町田: 農化 **36**, 860 (1962).