

- 537 酵母の一種である LF058 菌株が生産する耐熱性位置非特異的リパーゼ
(ノボ・インダストリー・ジャパン) °石井三千代, 鈴木えりか, 阿保正伸,
T.B.Nielsen (Novo Industri A/S) H.P.Heldt-Hansen

1. 目的 耐熱性で位置特異性を有するリパーゼ, 非耐熱性で位置非特異的なりパーゼはよく知られているが, 耐熱性でなおかつ位置特異性の無いリパーゼは, あまり知られていない。例えば *Candida cylindracea*¹⁾ と *Candida curvata*²⁾ の2種の酵母は位置非特異的なりパーゼを生産することが知られているが, その耐熱性は充分なものではない。我々は長年に亘り, リパーゼに興味を持ってきたが, そのなかでも多くの工業的応用が考えられる耐熱性でかつ位置非特異性のリパーゼに関し, 生産菌のスクリーニングを行な, た結果, 酵母の一種(LF058菌株)がこのような酵素を生産することを発見したので報告する。なお本酵素の応用としては, オートは高融点脂質の完全加水分解による脂肪酸およびグリセロールの生産, オニトはエステル合成とくにアルコールが2級である場合のエステル合成がある。オニの最も重要と思われる分野はエステル交換反応であり, これにはアシドリシス(エステル+酸), アルコリシス(エステル+アルコール), エステル基交換(エステル+エステル)が含まれる。本酵素はとくに2番目と3番目の応用に有用であり, 固定化された場合になお有用性が増すと考えられるため, 固定化も試みたので, その結果も含めて報告する。

2. 方法 油脂成分と指示薬を含む寒天スクリーニングプレートを使用して, 土壌その他の試料からリパーゼ生産菌を選択し, 位置特異性と耐熱性を検討した。位置特異性の検討にはイサトロスキヤンを用いた。トリオレインを限定水解した場合リパーゼが位置特異的であれば1,2-ジオレインのみ生成するが, 特異性の無い場合1,3-ジオレインの蓄積も見られる。リパーゼ活性はトリブチリンあるいはオリーブ油を基質として, 遊離する脂肪酸を水酸化ナトリウムで滴定することにより測定した。

3. 結果 最終的に選択された LF058 菌株の生産するリパーゼは完全な位置非特異性を示した。部分精製した酵素を弱塩基性陰イオン交換樹脂に固定化したものも同様に位置特異性を持たなかった。ココアバター中のステアリン酸とラウリル酸とアシドリシスしたものを分析した結果, 固定化した LF058 菌株のリパーゼは, 同じく位置非特異的である *Candida cylindracea* と同様の結果を与えたが, 固定化された *Mucor miehei* や *Chromobacterium viscosum* のリパーゼは明らかに位置特異性を示した。LF058 菌株の生産するリパーゼの耐熱性は非常に優れたものであった。部分精製した酵素試料を 0.1 M グエン酸・リン酸緩衝液 (pH 6.5) で希釈後 70°C で 1 時間加温した後の残存活性は 80% (トリブチリンを基質とし pH 7.0 で測定) であつた。オリーブ油を基質としたときのリパーゼ活性は pH 7.5 - 8.0 で最も高い値を示したが, pH 約 5.5 から 10.0 でも 50% 以上の活性を示した。

Table 1: Thermostability of non-specific lipases
(residual activity)

Enzyme incubation temperature	<i>C. cylindracea</i>			LF058			<i>C. curvata</i>		
	60°C	65°C	70°C	60°C	65°C	70°C	60°C	65°C	70°C
Buffer pH									
6.0							32%	3.5%	0.9%
6.5	1.1%	1.1%	0.6%	82%	78%	83%	10%	0.9%	0.9%
7.5	0.2%	0.2%	0.5%	29%	18%	8%	2.2%	0.8%	1.0%

1) G. Benzonana and S. Esposito; *Biochem. Biophys. Acta*, **231** (1971)

2) P. Galzy et al.; *Fette Seifen Anstrichm.*, **87** (1985)

Thermostable, positional non-specific lipase

°Michiyo Ishii, Erika Suzuki, Masanobu Abo, T.B. Nielsen (NOVO INDUSTRI JAPAN LTD.)
H.P. Heldt-Hansen (NOVO INDUSTRI A/S)