

する成績を得た。精製液に硫酸を加えて放置すると菱形、板状の結晶が析出した。

性質 精製標品の性質は、至適 pH : 6.0 (37°C, 15 min), pH 安定性 : 35°C (pH 7.0, 30 min), 分子量 : 110,000 (Sephadex G-100 ゲル濾過), 等電点 : pH 3.84 (Ampholine 等電点電気泳動) [いずれも p-NPL 活性] であった。基質特異性は、炭素数 4~18 の Triglyceride に作用し、特に Triolein, Tricaprin をよく分解した。また巾広い濃度の Triton X-100 の存在下で血清トリグリセライドをよく分解するが、非存在下ではほとんど反応が進行せず (Fig. 2), 他の画分—Lipase-I および Lipase-II と明らかな相違を示した (Fig. 3)。Lipase-III の Triolein に対する Glycerol/Fatty acid の比率は 1:3 であり、他の起源のリパーゼより血清トリグリセライドを効率的に分解する機能を有しており、当初の目的にかなうものであることを

確認した。

文 献

- 1) 仲 恭寛, 天野 滋, 山下孝二: *J. Jpn. Oil. Chem. Soc. (Yukagaku)*, 35 (6), 19 (1986).
- 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40-27314.
- 3) ジャン・パセロ, 公開特許, 昭50-31088.
- 4) Liu, W. H., Beppu, T., Arima, K.: *Agric. Biol. Chem.* 36, 1919 (1972).
- 5) 岩井美枝子, 大阪市立工業研究所報告.
- 6) 犬飼忠彦, 特許公告, 昭58-37833.
- 7) Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y.: *J. Biochem.* 87, 205 (1980).
- 8) 山口庄太郎, 松宮祐子, 間瀬民生, 昭和60年日本農芸化学会大会講演要旨集, 452頁.
- 9) 仲 恭寛, 磯部公安, 秋葉哲典, 山口庄太郎, 日本農芸化学会中部支部例会 (1987. 津) で発表済.

7. リパーゼの工業生産

リパーゼは動物の組織や植物の種子中に広く分布し生体内での脂質の代謝, 移動に深く関与している。微生物のリパーゼについては, 食品を汚染して脂質を分解, 変質させることから研究が始まり, やがて, 微生物を用いてリパーゼを製造しようとの検討がなされるようになった。

著者らは60年頃より, 微生物のリパーゼに注目し, 医薬や食品への応用を目的として, 工業生産の研究に着手した。当時, *Aspergillus*, *Sclerotinia* などのリパーゼについての報告がみられる程度で, リパーゼの工業生産の試みは全く行われていなかった。

1. リパーゼ生産菌の分離

微生物のリパーゼは, 乳製品のフレーバーや変質に関連して多くの研究があり, また, 脂質の分解性を微生物の分類指標にしようとの試みもあり, 多くの微生物がこの酵素を生産することが知られていた。著者等は菌体外に分泌され, 酸性でも安定なリパーゼを液内培養により製造し, 消化薬として使用することを目標として実験を始めた。

まず, リパーゼ生産能の高い微生物を分離するため, オリーブ油を唯一の炭素源とする合成培地に食品, 土, 汚水などを塗布して培養し, プレート上に生育し, コ

ロニー周辺に白色環を生じる微生物, 約 200 株を分離した。更に, 第二次スクリーニングとして, これらの培養液のリパーゼ活性を Nord らの方法で測定した。その結果, No. 5 号菌が高いリパーゼ活性を示した。この菌は, 生育速度が速く, リパーゼ生産量も多かった。更に, 検討を進めた。

この菌は孢子を形成せず, ポテト培地で偽菌糸を形成することから *Candida* と同定され, 細胞の形, コロニーの形状, 糖の発酵性と同化性, アルブチンの分解性の各性質が文献記載の菌株と一致しないので新菌と考え, *Candida cylindracea* と命名した。本菌の生育適温は 30°C で, 中性から微酸性で旺盛に生育した。

2. リパーゼ生産条件の検討

Candida cylindracea によるリパーゼ生産培地の検討を行った。グルコースの添加は, Peters 等や里村等

Table 1. Medium for lipase production.

Soybean meal	2.0%
Corn steep liquor	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5
Polyoxyethylene nonylphenyl ether	0.6

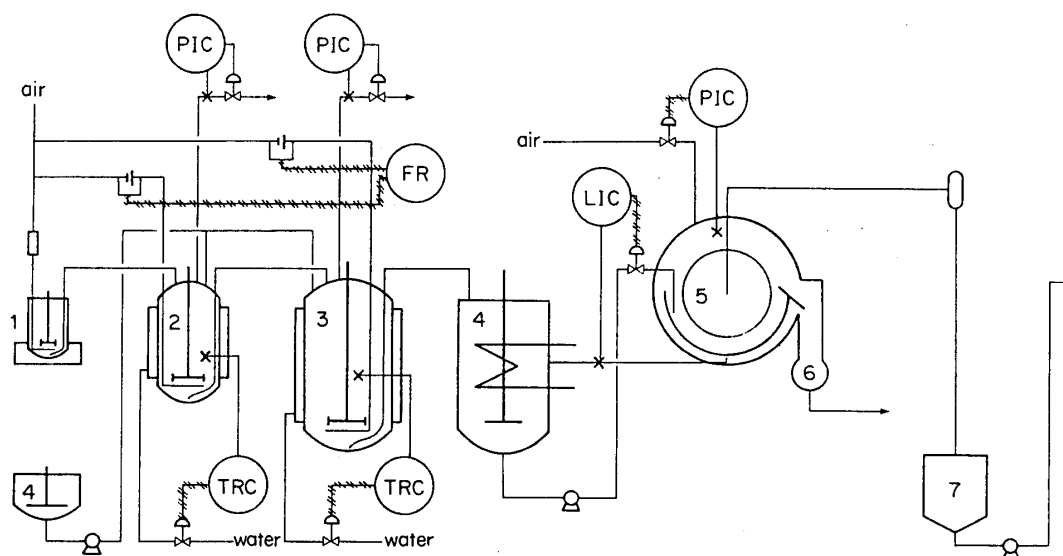


Fig. 1. Flow sheet of lipase production. Part 1. Fermentation process.

1. seed tank No. 1 2. seed tank No. 2 3. fermentor 4. preparation tank
5. precoat filter 6. sterilizing tank 7. filtrate receiver

の報告と同じく、リパーゼ生産に著しい阻害を示した。油脂の添加は効果がなかった。大豆粉、および C.S. L. の添加は有効であり、消泡剤としては polyoxy ethylene nonylphenyl ether が優れており、リパーゼ生産も促進した。これらの検討の結果、リパーゼ生産用培地として Table 1. の組成を決定した。

リパーゼ生産の培養適温は 25°C 付近にあった。

培養終了後、菌体等不溶解物を除去し、ろ過液に親水性有機溶媒を添加し、リパーゼ区分を沈澱させた。

溶媒の中では、アセトンによる活性回収率が最も良く、アセトン濃度70%で活性の90%以上が回収された。沈澱は、更に、アセトンで数回脱水後、真空乾燥により粉末とした。

これらの基礎実験に基づいて工場を建設し、リパーゼ生産を始めた。この工場は安価に効率よくリパーゼを生産することを目標とし、連続化によるタンク類の小型化と、計器制御による作業員の減少を計った。発酵工程のフローシートを Fig. 1 に示した。発酵はバ

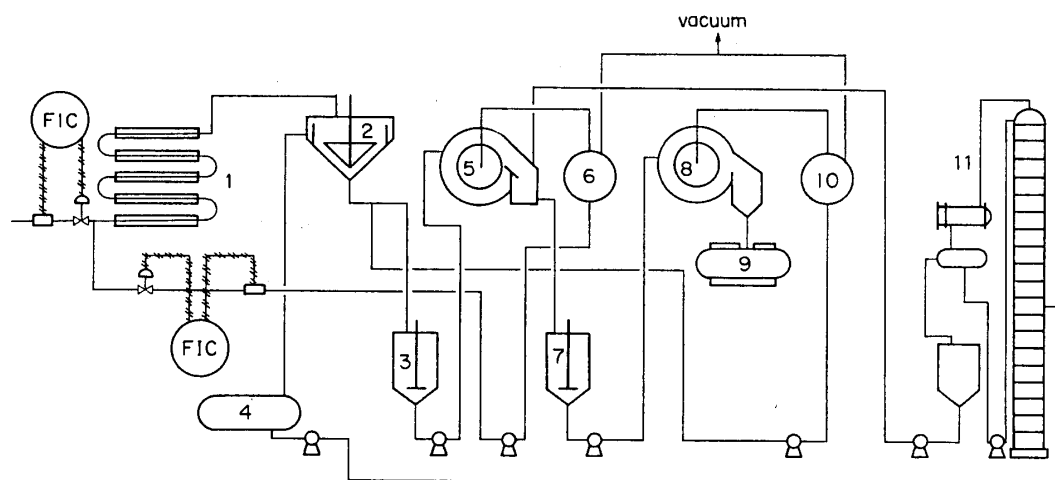


Fig. 2. Flow sheet of lipase production. Part 2. Purification process.

1. mixer cooler 2. thickner 3. repulper No. 1 4. waste acetone tank
5. drum filter No. 1 6. filtrate receiver No. 1 7. repulper No. 2
8. drum filter No. 2 9. dryer 10. filtrate receiver No. 2 11. distillation unit

ッチ式でおこない、2段階の種培養の後、本培養をおこない、培養液はプレコートフィルターで連続ろ過される。ろ液は精製工程へおくられ、リパーゼ沈澱が行われる。

精製工程のフローシートを Fig. 2 に示した。発酵工程から送られたろ液はアセトンと混合され、シックナーへ送入される。ここでリパーゼ区分は沈澱し、アセトン区分はオーバーフローにより、廃アセトンタンクへ入る。沈澱したリパーゼはポンプで抜き取り、脱水、ろ過を繰り返した後、真空低温乾燥してリパーゼ粉末となる。この間のアセトンは次第に希釈されながら循環、再利用され、最後に蒸溜塔で精製され、再び使用される。この工程でのアセトンのロスが1%以下に抑えることができた。

3. リパーゼの性質とその利用

リパーゼ粉末は 1 g 当たり 30,000 単位に標準化され、リパーゼ MY の商品名で販売されている。この酵素は乾燥状態では非常に安定であり、常温で3年間は失活しない。このリパーゼの最適 pH は Fig. 3 に示した通り 7 付近にあり、酸性側で良く作用する。酸性での pH 耐性も強く、pH 3, 37°C で、24 時間後にも、80% の活性が残存している。トリオレインのこのリパーゼによる分解経過は Fig. 4 の通りで、トリグリセライドの α , β 位を無差別に分解し、モノグリセライドを蓄積しない。

各種油脂を本リパーゼで分解し、途中で生成する脂

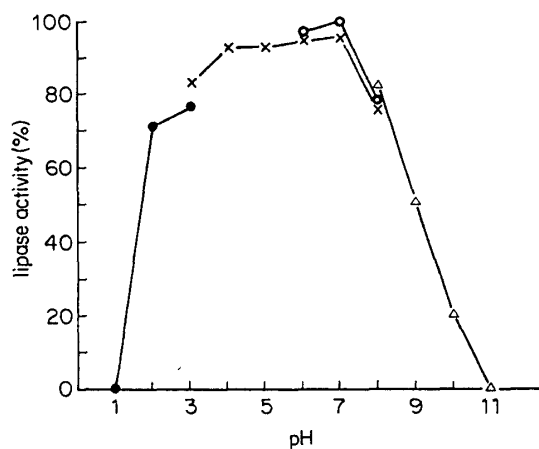


Fig. 3. Optimum pH for lipase activity. buffer systems: pH 1.0~3.0 glycocol-NaCl-HCl (●), pH 3.0~8.0 McIlvaine buffer (×), pH 6.0~8.0 phosphate buffer (○), pH 8.0~11.0 ammonium buffer (△).

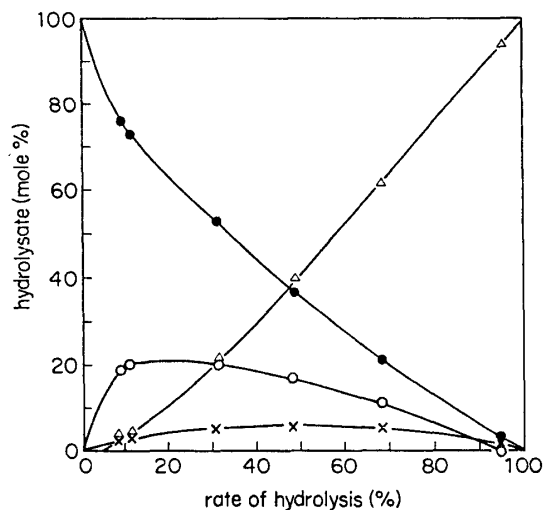


Fig. 4. Hydrolysis of triolein by lipase from *Candida*. ●: triolein, ×: monoolein, ○: diolein, △: glycerin.

肪酸組成をもとの油脂の脂肪酸組成と比較して基質特異性を調べた。その結果、このリパーゼは各種脂肪酸を $C_{18:3} > C_{18:2} > C_{18:1} = C_{16:0} > C_{18:0} > C_{22:1}$ の順に分解することが判明した。本リパーゼには特別な活性化物質はなく、陰イオン活性剤や重金属により阻害を受ける。リパーゼ標品中には共存酵素はほとんど含まれておらず、脂質以外の成分は影響を受けない。

4. 高活性リパーゼの開発

リパーゼで工業的に油脂分解をおこなうことを目的として、*Candida cylindracea* の変異や培養条件を検討し、従来の10倍以上のリパーゼを生産することに成功した。この方法で製造した高活性リパーゼは 360,000 単位/g の活性を持ち、リパーゼ OF の商品名で油脂分解に使用されている。

5. その他のリパーゼの開発

これまでに述べた *Candida* のリパーゼ以外に *Achromobacter* 属や *Alcaligenes* 属の細菌の生産するリパーゼについても研究を行った。前者は *Candida* のリパーゼと反対にアルカリ側に作用最適 pH があり、洗剤に使用することを目的に開発した。後者はパンクレアチック・リパーゼの代替品として開発した酵素で、胆汁酸塩により賦活され、油脂分解途中でモノグリセライドを蓄積し、作用最適 pH がすい臓リパーゼに類似している。

これらのリパーゼを用いて、金属石鹼の製造法、モノグリセライドの製造法などが検討されている。