

Geotrichum sp. FO347-2 株が生産するリパーゼの精製と性質

池本 昌弘・櫛田 靖・太田 安英

広島大学生物生産学部応用生化学講座, 東広島市 724

1993年10月25日

要 旨 未精製鰯油を唯一の炭素源としてスクリーニングされた真菌類の中で, FO347-2 株は最もリパーゼ生産性が高い株であった。本株は, 同定の結果, *Geotrichum* sp. と推定された。また, 菌体外に複数のリパーゼを分泌していたので, これらのリパーゼを精製し, 酵素化学的性質を検討した。培養液の遠心上清をアセトン沈澱した後, DEAE-Toyopearl 650M と Butyl-Toyopearl 650M でカラムクロマトグラフィーを行った。その結果, 前者のカラムで Lipase I, II の2つの活性画分を得, I は更に後者のカラムで Lipase A, B の2つの活性画分に分かれた。A と B は SDS-PAGE でそれぞれ単一なバンドであり, 分子量マーカーより推定された分子量は A, B それぞれ, 62 kD, 58 kD であった。また, A と B の反応至適 pH は, ともに 8.5 であった。位置特異性 (PSI) を調べた結果, A は +47.0, B は -25.7 であり, 精製鰯油を基質として脂肪酸特異性を調べた結果, A は C_{16:1}, B は C_{18:1} に最も高い特異性を示した。

キーワード: 鰯油, リパーゼ, *Geotrichum*, Positional Specificity Index (PSI)

緒 言

リパーゼ (triacylglycerol lipase : EC 3.1.1.3) はトリグリセリドを加水分解して脂肪酸と部分グリセリドあるいはグリセリンを生成する酵素である。1856年, BERNARD は脾臓ホモジネートをオリーブ油, バター, ラードなどとインキュベートすると脂肪酸とグリセリンが生成することを認めた。その後, リパーゼはさまざまな動物臓器, 植物種子ならびに微生物に見いだされ, 現在では自然界に広く存在することが明らかにされている。最近では, 加水分解反応ばかりでなく, 水の少ない有機溶媒中でエステル合成やエステル転移反応を触媒することがわかり, 脂質関連物質の生化学的変換用酵素として注目されるようになった。しかし, リパーゼの市場価格をアミラーゼやプロテアーゼのそれと比較すると, 価格は安いとは言えない。そこで, 現在でもリパーゼの生産性向上が強く望まれている。

本実験では, 当研究室で未精製鰯油を唯一の炭素源としてスクリーニングされた真菌類の中で, 最もリパーゼ生産性が高いという特徴をもつ FO347-2 株が生産するリパーゼを精製し, その基質特異性 (位置特異性, 脂肪酸特異性) などについて検討した。なお, FO347-2 株の微生物学的分類についても実験を行った。

実 験 方 法

1) FO347-2 株の同定

FO347-2 株の属 (genus) の決定を飯塚と後藤 (IIZUKA *et al.*, 1977), 長谷川 (HASEGAWA *et al.*, 1984 and 1985) の方法に従って行った。形態学的性質, 即ち ① 栄養細胞の大きさと形, ② 偽菌糸・菌糸の形成, ③ 子嚢胞子の形成の3点について検討した。

2) FO347-2 株の培養

FO347-2 株の培養は米糠培地で行った。米糠培地の培地組成を Table 1 に示す。培養は, 30°C, 130 rpm で振とうし, 前培養は24

Table 1. Rice Bran Medium.

Rice bran	4.0%
Corn steep liquor (NH ₄) ₂ HPO ₄	3.0%
Deionized water	0.2%

The pH was 6.0.

時間、本培養は48時間で行った。

3) リパーゼ活性測定法 (YAMADA *et al.*, 1962)

リパーゼの活性測定は、乳化した基質にリパーゼを攪はんしないで作用させる乳化剤添加法 (PVA 法) で行った。毎分 $1 \mu\text{mol}$ の脂肪酸を遊離するリパーゼ量を 1 U と定義した。

4) 蛋白質の定量法

カラムクロマトグラフィーでの蛋白質の溶出パターンをみる場合、280 nm での吸光度を測定した。精製されたリパーゼの比活性を求める際は、バイオラッドプロテインキット (Bio-Rad 社) を用いた。これは、蛋白質と色素が結合すると色調変化を起こすことを利用した色素結合法による、簡便で感度の優れた測定方法である。

5) 位置特異性 (PSI) の測定法 (MATORI *et al.*, 1991)

位置特異性は、トリオレインにリパーゼを作用させて、加水分解反応後の生成物であるジオレインの異性体を TLC/FID で定量分析し、PSI (Positional Specificity Index) で表した。PSI に従うとトリグリセリドの α 位に特異性をもつリパーゼは +100、ランダムな加水分解を行う位置特異性のないリパーゼは 0、 β 位に特異性をもつリパーゼは -100 と表現される。

6) 脂肪酸特異性の測定法 (MATORI *et al.*, 1992)

精製鰯油にリパーゼを作用させて、遊離した脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析する手法で行った。結果は脂肪酸ごとに重量に基づく濃縮比で表した。この重量濃縮比は加水分解された一脂肪酸の脂肪酸画分中における重量%を、使用した鰯油中のその脂肪酸の重量%で割った値である。濃縮比が 1 を越えたとき、鰯油中のその脂肪酸はリパーゼによって加水分解されやすいことを示す。また、1 を下回ったとき、その脂肪酸はリパーゼによって加水分解されにくいことを示す。

7) 試 薬

未精製鰯油：大伸水産（鳥取県境港市）製

トリオレイン：SIGMA 社製

精製鰯油：池田糖化工業(株)製

結 果

1) FO347-2 株の同定

FO347-2 株は隔壁のある真性菌糸を形成し、また有性的胞子は観察されなかったので不完全菌類に属する。不完全菌類のなかでも分節胞子を形成する点、栄養細胞の大きさ、形からみて *Geotrichum* sp. とと思われる。



Fig. 1. Arthrospores of *Geotrichum* sp. FO347-2.

FO347-2 was grown on a yeast extract-malt extract medium at 25 °C for 3d. A bar in the photograph means 25 μm .

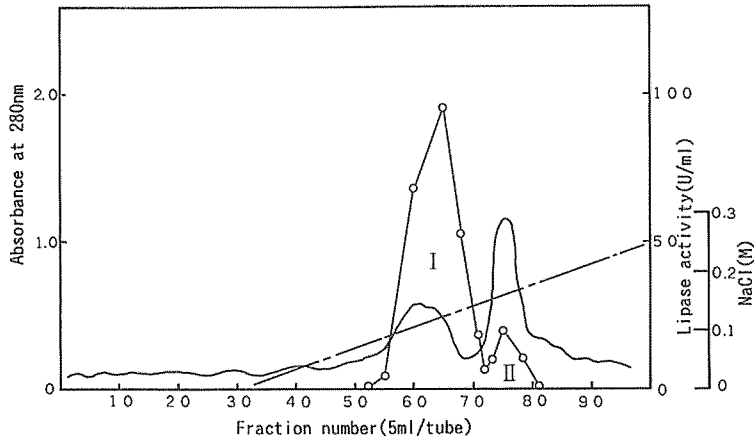


Fig. 2. DEAE-Toyopearl 650 M Column Chromatography.

A column (2.5×42.5 cm) was previously equilibrated with phosphate buffer (pH 6.0, ionic strength 0.05). The crude enzyme solution was applied to the column and the adsorbed enzyme was eluted by a increasing linear gradient of NaCl concentration at a flow rate of 10 ml/h. Absorbance at 280 nm, —; lipase activity, ○—○; concentration of NaCl, ---

Fig. 1 に FO347-2 株の分節胞子の顕微鏡写真を示す。

2) FO347-2 株が生産するリパーゼの精製

各精製段階において、リパーゼの活性測定は PVA 法で行った。緩衝液は、0.2 M Tris acid maleate-0.2 M NaOH (pH 8.5) を用いた。

① アセトン沈澱

培養液の遠心清に冷却したアセトン等を等量加えた後、遠心分離 (3,500 rpm, 20 min) を行い、沈澱物の回収を行った。更に、この沈澱物に冷却したアセトンを加え、脱水、脱脂を行い乾燥粉末を得た。

② イオン交換クロマトグラフィー

①で得られた酵素粉末 3.8 g を 350 ml のリン酸緩衝液 (pH 6, イオン強度 0.05) に溶かし、同緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl 650 M カラム (2.5×42.5 cm) に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中 0→0.3 M の直線的 NaCl 濃度勾配で溶出した (Fig. 2)。活性画分を溶出順に Lipase I, II と命名した。

③ 疎水クロマトグラフィー

②で得られた Lipase I を限外濾過で濃縮し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20% 飽和) を加え元の液量に戻した。これを同緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M カラム (1.5×44.5 cm) に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中 20→0% 飽和の直線的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度低下勾配で溶出した (Fig. 3)。活性画分を溶出順に Lipase A, B と命名した。

④ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Lipase A, B を SDS-PAGE に供したところ、それぞれ単一なバンドが検出された (Fig. 4)。また、分子量マーカーより推定される分子量は A, B それぞれ、62 kD, 58 kD であった。

Table 2 は各精製段階における精製酵素の比活性と収率のデータをまとめたものである。

3) Lipase A 及び B の酵素化学的性質

① 至適 pH

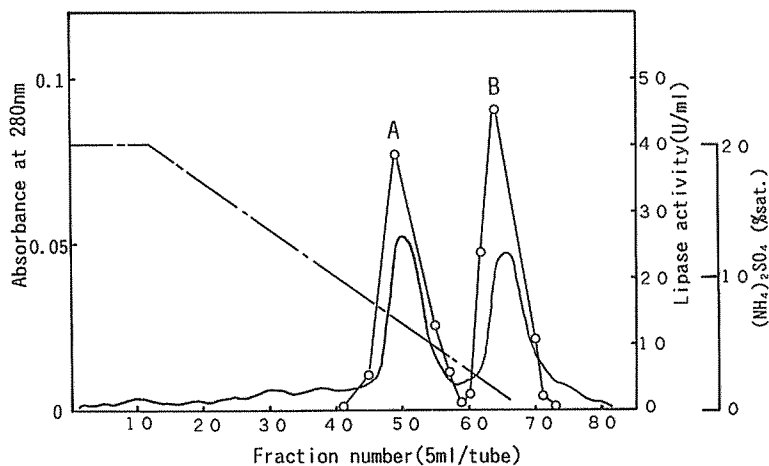


Fig. 3. Butyl-Toyopearl 650M Column Chromatography.

The lipase I eluted from the DEAE-Toyopearl column was applied to a column (1.5×44.5 cm) of Butyl-Toyopearl 650 M equilibrated with 10 mM phosphate buffer at pH 6.0 containing 20 % saturation of ammonium sulfate. The adsorbed enzyme was eluted by a decreasing linear gradient of ammonium sulfate concentration at a flow rate of 20 ml/h. Absorbance at 280 nm, —; lipase activity, ○—○; concentration of ammonium sulfate, - - - -.

Table 2. Purification of Extracellular Lipases Produced by *Geotrichum* sp. FO347-2.

Step	Total prot. (mg)	Total act. (U)	Spec. act. (U/mg)	Yield (%)
Acetone ppt.	1008	7862	7.8	100
DEAE-Toyopearl				
Lipase I	59	4111	69.7	52.3
Lipase II	298	299	1.0	3.8
Butyl-Toyopearl				
Lipase A	3.4	1472	433	18.7
Lipase B	3.2	1805	564	23.0

Lipase A, B の至適 pH を PVA 法により求めた。結果を Fig. 5 に示す。A, B ともに至適 pH は、8.5 であった。

② 位置特異性 (PSI)

Lipase A の PSI は +47.0, Lipase B の PSI は -25.7 であった。Lipase A はトリオレインの α 位を β 位よりも約 2.8 倍速く加水分解したことになり、Lipase B は β 位を α 位よりも約 1.7 倍速く加水分解したことになる。

③ 脂肪酸特異性

精製鰯油を基質として脂肪酸特異性を求めた。結果を Fig. 6 に示す。Lipase A は他の脂肪酸に比べてパルミトレイン酸のエステルを最も速く加水分解した。しかし、 C_{20} 以上の脂肪酸にはほとんど作用しなかった。Lipase B はオレイン酸に最もよく作用し、Lipase A と同様に、 C_{20} 以上の脂肪酸にはほとんど作用しなかった。

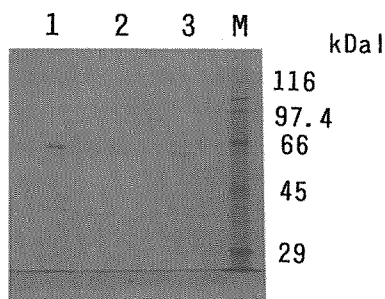


Fig. 4. SDS-PAGE of Lipase A and B. Lane 1, Lipase A; lanes 2 and 3, Lipase B (the amount applied was different in lanes 2 and 3); M, molecular standard mixture. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

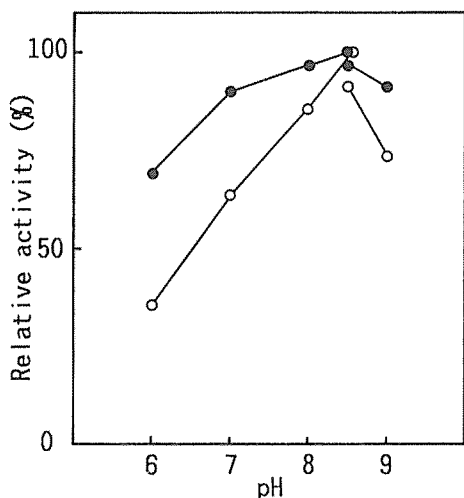


Fig. 5. Effect of Reaction pH on Lipases A (●) and B (○).

Lipase activity was measured by the PVA method and expressed in percentage relative to that at optimum pH, which was taken as 100%. The buffer solutions used were 0.2 M (Tris-maleic acid)-0.2 M NaOH buffer (from pH 6 to pH 8.5) and ammonium chloride buffer (ionic strength 0.1, pHs 8.5 and 9).

本研究の初めに、粗酵素の pH-活性曲線を求めたところ、ブロードな曲線となった。このことから FO347-2 株は、菌体外に複数のリパーゼを分泌していると考えられた。今回、そのうち 2 種のリパーゼ (Lipase A と B) を電気泳動でバンドが 1 本になるまで精製した。

位置特異性に関して、Lipase A はトリグリセリドの α 位を β 位よりも約 2.8 倍速く加水分解した (PSI:

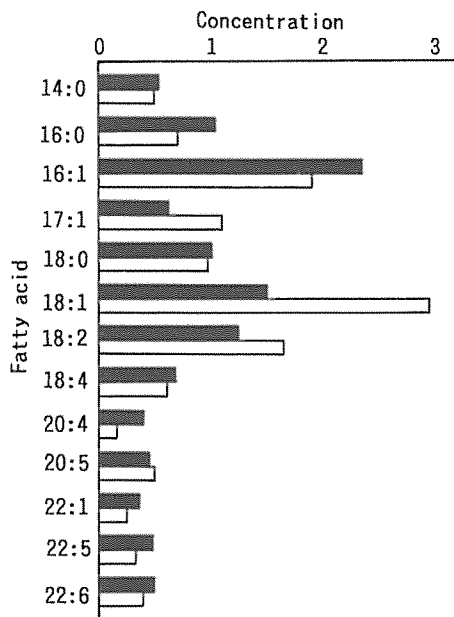


Fig. 6. Specificity for Acyl Chain in Sardine Oil Revealed by Lipases A and B.

The hydrolysis of refined sardine oil was done in an anaerobic atmosphere with 50 units of each lipase at 30 °C and pH 8.5 for 2h. The composition of hydrolyzed fatty acids was measured by gas-liquid chromatography. Concentration rate was calculated by dividing the weight percent of a fatty acid in the hydrolyzed fatty acids by that in the unhydrolyzed oil. ■, lipase A; □, lipase B.

考 察

FO347-2 株は、有性的胞子が観察されず分節胞子を形成するので、*Geotrichum* sp. と推定される。cis-9 位に二重結合をもつ脂肪酸 (例えば、オレイン酸、リノール酸) に特異性のあるリパーゼを生産することが知られている *Geotrichum candidum* であるかどうかを判定するには、さらにいろいろな試験を重ねる必要がある。

本研究の初めに、粗酵素の pH-活性曲線を求めたところ、ブロードな曲線となった。このことから FO347-2 株は、菌体外に複数のリパーゼを分泌していると考えられた。今回、そのうち 2 種のリパーゼ (Lipase A と B) を電気泳動でバンドが 1 本になるまで精製した。

位置特異性に関して、Lipase A はトリグリセリドの α 位を β 位よりも約 2.8 倍速く加水分解した (PSI:

+47.0)。また、Lipase B は β 位を α 位よりも約1.7倍速く加水分解した (PSI: -25.7)。A と B が協同して作用する場合どんな結果をもたらすかは、今後実験する必要がある。

脂肪酸特異性に関して、Lipase A と B は炭素数16, 18の不飽和脂肪酸を特異的に加水分解した。Lipase A は、パルミトレイン酸に最も作用しており、Lipase B はオレイン酸に最も作用した。この結果は、*Geotrichum candidum* の生産するリパーゼに関する報告と似ている (JENSEN *et al.*, 1972)。しかし、本論文では A と B の2酵素の比較から、同様に *cis*-9 位に二重結合をもつ脂肪酸でも、炭素鎖長や二重結合数の違いで加水分解の程度が異なることが示された。

基質特異性の観点からいうと、FO347-2 株が生産する Lipase A と B は、浅原によって精製された *Geotrichum sp.* FO401B 株が生産する Lipase A と C に非常に類似している。(ASAHARA *et al.*, 1993)。FO401B 株は、トリグリセリドの β 位を特異的に加水分解するリパーゼを求めてスクリーニングされた菌株である。FO401B 株の生産する Lipase A はパルミトレイン酸に最も作用し、PSI は+47.1 である。Lipase C はオレイン酸に最も作用し、PSI は-29.4 (β 位を α 位よりも約1.8倍速く加水分解する) である。Lipase C は、現在報告されているリパーゼのなかで最も β 位を優先的に加水分解するリパーゼである。

SDS-PAGE から求めた分子量は、FO347-2 株の Lipase A と FO401B 株の Lipase A は 62 kD で、FO347-2 株の Lipase B と FO401B 株の Lipase C は 58 kD であった。このように FO347-2 株の Lipase A と FO401B 株の Lipase A, FO347-2 株の Lipase B と FO401B 株の Lipase C は対応する酵素といえる。しかし、FO347-2 株の Lipase A と FO401B 株の Lipase A の反応至適 pH はそれぞれ、8.5 と 7 であるからお互い同一の酵素とはいえない。一方、FO347-2 株の Lipase B と FO401B 株の Lipase C の反応至適 pH はともに 8.5 であった。更に、比活性を比較してみると、FO347-2 株の Lipase A と B の方が若干値が大きかった。

このように FO347-2 株 と FO401B 株は酵素化学的に非常に類似したリパーゼを生産することが明らかとなった。両菌株のうち、FO347-2 株が優れている点はリパーゼ生産性の高さである。同様な条件下で、FO347-2 株のリパーゼ総生産量は、FO401B 株のそれに比べて約 4 倍である。トリグリセリドの β 位に存在する有用な脂肪酸 (エイコサペンタエン酸) の濃縮や、エステル合成反応による β 位への特定脂肪酸の結合など、将来的に用途が拡大すると考えられるトリグリセリドの β 位を優先的に加水分解するリパーゼの給源として、FO347-2 株の方が優れているかもしれない。

引用文献

- 飯塚 広・後藤昭二, 1977, 酵母の分類同定法. 東京大学出版会.
- 長谷川武治, 1984, 1985, 微生物の分類同定法 (上) (下). 学会出版センター.
- 山田浩一・太田安英・町田晴夫, 1962, 微生物によるリパーゼの生産 (第二報). 農化, 36 : 860-864.
- 真鳥美輪・櫛田 靖・足立修一・太田安英, 1992, 天然油脂の加水分解におけるリパーゼの脂肪酸特異性の表記の試み. 油化学, 41 : 347-348.
- MATORI, M., ASAHARA, T. and OTA, Y., 1991, Positional Specificity of Microbial Lipases. *J. Ferment. Bioeng.*, 72 : 397-398.
- ROBERT G.JENSEN., DENNIST T.GORDON., WAYNE H.HEIMERMANN and RALPH T.HOLMAN., 1972, Specificity of *Geotrichum candidum* Lipase with Respect to Double Bond Position in Triglycerides Containing *cis*-Octadecenoic Acids. *Lipids.*, 7 : 738-741.
- ASAHARA, T., MATORI, M., IKEMOTO, M. and OTA, Y., 1993, Production of Two Types of Lipases with Opposite Positional Specificity by *Geotrichum sp.* FO401B. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 390-394.

Purification and Characterization of Extracellular Lipases Produced by *Geotrichum* sp. FO347-2

Masahiro IKEMOTO, Yasushi KUSHIDA and Yasuhide OTA

*Department of Applied Biochemistry, Faculty of Applied biological
Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724, Japan*

A fungus, FO347-2, produced the largest amount of lipase among the microorganisms that were isolated as microorganisms capable of assimilating sardine oil as a sole carbon source; it was identified as *Geotrichum* sp. As FO347-2 secreted several extracellular lipases, they were purified to examine their enzymatic properties. They were purified from the culture supernatant by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. Two peaks of lipase activity were separated as Lipase I and II by ion exchange chromatography. Further, Lipases A and B were obtained from the Lipase I fraction by hydrophobic interaction chromatography. Lipases A and B were homogeneous in SDS-PAGE and their molecular weights were 62 and 58kD, respectively. The optimum pHs of Lipases A and B were both 8.5. The positional specificity was expressed as PSI. The PSI values of Lipases A and B were +47.0 and -25.7, respectively. When the concentration rate of each fatty acid hydrolyzed by Lipases A or B in sardine oil was measured, Lipases A and B hydrolyzed the ester bonds of C_{16:1} and C_{18:1} with the highest velocity, respectively.

Key words: *Geotrichum*, lipase, Positional Specificity Index (PSI), sardine oil