

Rhizopus delemar 의 Lipase 生産에 關한 研究

裴 貞 高 · 裴 國 雄
大田實業專門學校 食品加工科

Studies on the Production of Lipase by *Rhizopus delemar* by

Jungsurl Bae · Kookwoong Bae

Department of Food Processing, Taejon Vocational Junior College

(Received November 27 1974)

Abstract

The excellent strain K₅₂ for producing lipase was selected among 215 strains of *Rhizopus* sp. isolated from soil and other natural sources. The results investigated of microbiological characters and conditions for producing lipase were summarized as follows:

- (1) Strain K₅₂ was similar to *Rhizopus delemar* in microbiological character.
- (2) The lipase activity was most vigorous after 48 hours in wheat bran culture, 96 hours in surface culture and 72 hours in shaking culture.
- (3) Surface culture was more suitable than in shaking culture for producing lipase.
- (4) In the case of wheat bran culture, producing of lipase was vigorous after 48 hours of culture period (3,800 μ /g).
- (5) The optimum temperature for producing lipase was 30°C both in wheat bran culture and in surface culture.

緒 言

微生物의 lipase 에 關한 研究는 1950年 以後 工業的 生産을 爲한 많은 研究가 있으며 近來에는 各種 微生物이 生産하는 lipase 의 精製 및 그 特性에 對한 研究도 活發하다. 한편 lipase 를 生産하는 微生物의 種類도 多樣하여 Alford¹⁾ Collins-Thompson²⁾ 등은 肉類와 肉製品의 腐敗 또는 變質에 關係되는 細菌이 生産하는 lipase 에 關하여 研究報告한바 있고 山田^{3)~6)} 및 Ota^{9)~12)} 등은 *Candida* 屬의 lipase 生産에 關하여 많은 報告를 한바 있다. 從來 *Rhizopus delemar* 는 糖化型 amylase 生産菌으로서 特히 이 菌의 amylase 는 다른 絲狀菌의 amylase 에 比하여 amylopectin 및 β -limit dextrin 을 거의 다 分解하는 것으로 알려져서 酵素法에 依한 葡萄糖生産이 可能하게 되었음은 잘 알려진 事實이다. 그런데 近來 *Rhizopusdelemar* 에 屬하는

菌株에 依하여 lipase 를 生産하는 諸條件에 對한 岩井^{13)~15)}의 報告를 볼 수 있으며 福本等은^{16)~17)} *Rhizopus delemar* 의 lipase 性質에 對하여 報告한 바 있고 Laboureur¹⁸⁾ 등은 *Rhizopus arrizhus* lipase 의 精製酵素에 대한 活性이 미치는 여러가지 物質에 對하여 檢討한 結果를 報告한바 있다. 筆者는 lipase 의 生産能이 強力한 *Rhizopus* 屬 菌들을 自然界에서 分離選定하여 同定하고 lipase 生産條件에 對하여 몇가지 點을 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實 驗 方 法

1. 菌株의 分離

各地方의 土壤, 空氣, 穀類, 薯類 등에서 *Rhizopus* 屬 菌의 分離를 試圖하였다. 收集된 分離源의 滅菌水中에 넣어 振盪하고 上澄液을 1白金耳 取

하여 麥芽汁 寒天 plate 上에 畫線하고 空氣中에서 의 집식培養은 麥芽汁寒天을 petri-dish 에 平板固 化하여 所定所에서 一定時間 뚜껑을 열었다가 달 고 30°C 로 24~48時間 培養한, 後 colony Morph- ology 에 依하여 Rhizopus 屬을 分離하였다.

2. 分離菌株의 培養

(1) 밀기울 固體培養

밀기울 重量의 1.2 倍 0.1N 鹽酸液을 加하여 잘 混合한 다음 500ml 의 三角 flask 에 20g 씩 담고 1kg/cm² 의 蒸氣壓下에서 20分間 殺菌後 分離菌株 을 接種하고 30°C 에서 48時間 培養하였다.

(2) 深部培養

1,000ml 容 Creased flask 에 100ml 의 D. P. 培 養基²⁰⁾를 넣고 1kg/cm² 의 蒸氣壓下에서 15分間 殺 菌한다음 冷却하고 麥芽汁寒天斜面培地の 孢子 1 白金耳를 接種하여 30°C 에서 160 r. p. m 의 회전 식 振盪培養基로 3日間 培養하였다.

(3) 液面培養

容器 및 培養基의 調製等を 深部培養時와 同一 하게 하고 30°C 의 恒溫器中에서 4日間 靜置培養 하였다.

3. 酵素液의 調製

固體培養의 境遇는 培養物 15g(水分含量 53~54 %)에 對하여 蒸溜水 200ml 를 加하여 Waring bl- ender 로 1分間 攪拌한 다음 1時間동안 靜置해 두었다가 그 液을 酵素液으로 하였다. 酵素單位는 培養物의 水分을 測定한 다음 乾物量으로도 換算 하여 表示하였다. 深部培養 및 液面培養의 境遇는 培養液을 2倍로 稀釋한 다음 10,000 r. p. m. 의 Waring blender 로 1分間 攪拌한 다음 1時間 동 안 靜置하여 浸出濾過한 液을 酵素 2倍 稀釋液으 로 하였다.

4. 分離菌株의 Screening

分離된 Rhizopus 屬菌의 lipase 生産能을 簡單히 確認하기 爲하여 2% Olive Oil 과 3% agar 를 120°C 로 15分間 殺菌한 다음 凝固되지 않을 程度 로 冷却시키고 Homogenizer 를 使用하여 無菌의으 로 乳化한 것 10ml 씩을 petri dish 에 分注하여 固 化시킨 다음 液面培養液 0.1ml 씩을 滴下하여 40°C 에서 60分間 incubation 한 다음 分解環의 크기와 透明度等으로 lipase 生産能을 判別하여 一次 scre- ening 을 하였다.

5. lipase 의 活性度測定

SAIKEN 法에 依하여 測定하였다. 卽 P. V. A. 를 使用하여 乳化한 40% Olive Oil(u. s. p.) 5 ml 를 基質로 하여 pH7.0 의 磷酸 Buffer 4ml 를 加하 고 40°C 로 10分間 豫熱한 다음 適當히 稀釋할 酵 素液 1ml 를 加하여 40°C 로 繼續 1時間 동안 適 當히作用시킨다. 酵素作用을 단친후 꺼내어 96% ethanol 30ml 를 加하고 50% ethanol 含有 0.05N NaOH 로 適定한다. 別途로 加熱失活酵素를 1ml 加하고 同一할 方法으로 處理하여 Blank test 를 한 다. 適定終點은 pH 10.0~10.2 로 하였으며 電極 PH meter 를 使用하였다.

$$\text{lipase activity} = \frac{\text{amount of 0.05N NaOH} \times 50 \times F}{\text{weight of enzyme used}}$$

F.....0.05N NaOH 의 factor

6. 優秀菌株의 選定과 同定

(1) 菌株의 純粹分離

分離菌株 215株中 次 Screening 에서 比較의 優秀한 菌株 8株를 選定하고 이들을 斜面培養 試 驗管에 滅菌水 10ml 를 加하여 孢子를 浮游시킨 다음 石英砂(3號) 1g 을 넣은 100ml 容 KjeldHI flask 에 옮기고 20分間 심하게 振盪한다. 이 液을 滅菌한 濾紙(東洋 No. 1)로 濾過하고 濾液을 常法 으로 平板培養하여 純粹分離를 하였다.

(2) 菌株의 選定

純粹分離한 菌株들을 固體培養 및 液面培養하여 lipase 의 activity 를 測定한 結果 儒城林業試驗場 에서 採取한 土壤으로부터 分離한 K52 를 價秀한 菌株로 選定하였다.

(3) 選定菌株의 同定

優秀菌株 K52 를 麴汁寒天(麴汁 Bilg 12°, agar 2%) 培養基에 30°C 로 5~7日間 培養한 後 各各 菌學의 性質을 調查하여 Report's from the institute of applied microbiology²¹⁾에 依하여 同定하였다.

結果 및 考察

1. 選定菌株의 同定

lipase 生産能이 강한 菌株를 純粹分離하여 優秀 菌株로 選定된 Strain K52 의 菌學의 性質을 檢討 한 結果는 table 1~5 와 같다.

table 1. morphological characteristics of strain. K52

Sporangiophores

Shape: Straight or curved often swollen and branched
 wall: usually smooth
 Color: Pale yellowish brown or brown
 length: 260~2,000 μ
 Diameter: 5~25 μ

Sporangia

Shape: globose
 wall: spinous
 color: brown or black
 diameter: 40~240 μ

Columellae

Shape: globose or oval
 wall: smooth or slightly rough
 color: pale brown
 Diameter: 30~130 μ

Sporangiospores

shape: elliptical or polygonal
 striation: striated
 long axis: 5~13 μ

Chlamydo-spores

shape: globose, elliptical, cylindrical
 Diameter and shortx long axis 13~40 μ
 10 \times 14~31 \times 52 μ

Rhizoid

wall: smooth or slightly rough
 color: almost colorless
 shape: root shaped
 length: 55~180 μ

Stolons

wall: smooth or slightly rough
 color: almost colorless or brown
 Diameter: 5~20 μ

table 2. Cultural Characteristics

media observation	Koji agar slant	malt agar slant	Potato glucose agar slant	Pfeffer oryzomln agar slant
mycelial growth	very good	very good	very good	very good
sporangial formation	poor	good	good	good
aerial mycelia	very poor	good	very poor	poor
texture of colony	dense	dense	dense	dense
heigh of colony	tall	tall	tall	tall
color of colony	bottom: white top: gray	yellowish gray brownish gray	white light br- ownish gray	yellowish white light brownish gray

table 3. Physiological Characteristics

Physiological test	result
temperature relations(in pfeffer solution)	no growth at 10°C or 45°C good growth in the rang 25~35°C
Production of acid(in malt ex. medium)	forming fumaric acid and no lactic acid
NaCl media	poor growth at 1~3% and no growth at 5% NaCl
Voges proskauer test milk media	negative
Optimum pH	good growth, slowly coagulated and peponized 6.8~8.0

table 4. Assimilation of Carbon Sources

Carbon Sources	mycelial growth	sporangial formation
glucose	++	++
lactose	+	-
gluconate	+	-
succinate	++	+
citrate	++	-
glycerol	++	+

table 5. Fermentation of Carbohydrates

Carbohydrates	Fermentation
glucose	+
sucrose	+
starch	+
fructose	+
maltose	+
inulin	-
galactose	+
raffinose	-

Strain K52 菌의 菌學的 性質을 Report's from the institute of applied microbiology 에 의하여 살펴 보면 fumaric acid 를 生成하고 lactic acid 를 生成하지 않으며 Voges proskauer test 에 있어서 negative 인 것 등으로 보아 *Rhizopus delemar* 로 同定된다.

2. lipase 의 産成條件

(1) 培養期間

밀기울 重量에 1.2 倍의 0.1N 鹽酸液을 加하여 加壓殺菌後 30°C 에서 48時間 培養한 다음 生成 lipase 의 活性을 測定한 結果는 Fig. 1 과 같다.

Fig. 1 에서 보는 바와 같이 밀기울 固體培養에 있어서는 30°C 로 48時間 培養時에 最高의 lipase activity 를 生成하였다.

이와 같은 結果는 *Rhizopus thailan densis* 의 lipase 生成이 밀기울 固體培養時 48時間 만에 最高值에 이르렀다는 林²³⁾의 報告와 비슷하였다. 또한 液面培養時와 深部培養時의 培養期間에 따른 lipase 生成을 살펴 본 結果는 Fig. 2 와 같다.

振盪培養時 보다 液面培養時에 lipase 의 生成은 더욱 良好 하였다. 振盪培養時는 培養 3日後 減少되었으며 液面培養의 境遇에는 培養 4日째 까지 繼續 增加하여 lipase 의 activity 는 200(μ /ml)의

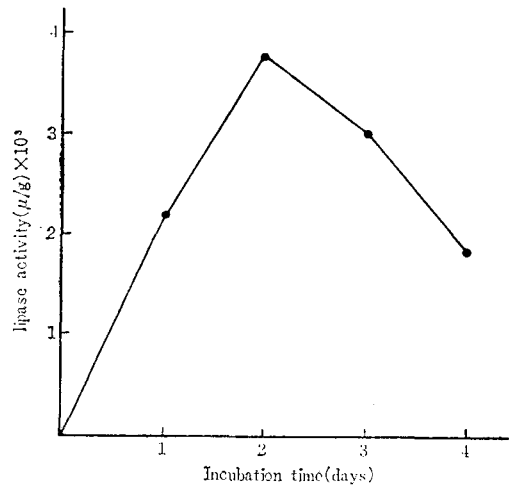


Fig 1. Effect of Cultural Time on Lipase Production in Solid Culture

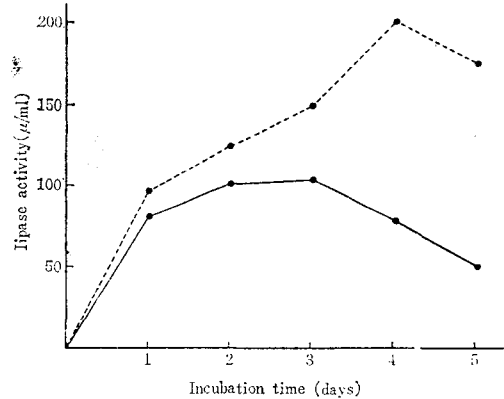


Fig 2. Effect of Cultural Time on Lipase Production in Surface and submerged Culture

— submerged culture
 - - - surface culture

活性을 보였으며 培養 5日後에는 減少 되었다. 金²³⁾은 *Trichosporon cutaneum* 의 lipase 生成에 있어서 120 oscils./min. 內外의 速度로 96時間 振盪培養하는 것이 가장 效果의이라고 하였으나 筆者의 實驗에 있어서는 振盪培養의 境遇 培養 3日後에 減少하는 結果를 볼 수 있었으며 岩井¹⁵⁾ 등이 報告한 *Rhizopus delemar* 의 lipase 生産期間 120時間 보다는 짧은 結果였다. 또한 岩井는 *Rhizopus delemar* 의 lipase 生産에 있어서는 固體培養時 副

生하는 protease 에 의하여 lipase protein 이 失活 不適當하다고 하였으나 筆者의 實驗에 있어서는 固體培養時가 液體培養時보다 48時間 培養한 다음 lipase 를 生成하는 點 큰 差異를 보였다.

(2) 培養溫度

밀기를 固體培養時의 培養溫도를 各各 달리하여 lipase 生成에 미치는 影響을 살펴본 結果는 Fig. 3 과 같다.

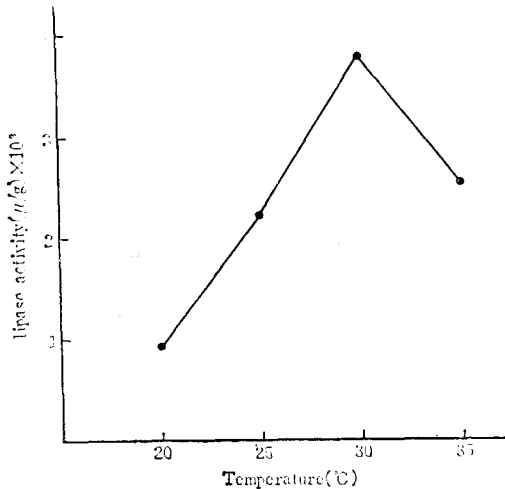


Fig 3. Effect of Cultural Temperature on Lipase Production in Solid Culture.

培養溫度는 30°C 의 境遇가 가장 良好하였으며 液面培養 또는 深部培養時도 30°C 가 가장 效果의 이었다. 山田²⁾ 등은 candida cylindracea 의 lipase 生成 最適溫度 30°C 및 松村²⁴⁾가 報告한 Rhizopus 屬의 lipase 生産 最適溫度 30°C 와 비슷한 結果였다.

要 約

各種 試料로부터 分離된 215株의 Rhizopus 屬中 lipase 生成自이 강한 1株를 選定하여 菌學的 性質 및 lipase 生成 條件을 檢討한 結果는 다음과 같다.

(1) 優秀菌株 strain K52 는 菌學的 諸性質을 살펴본 結果 Rhizopus delemar 에 類似하였다.

(2) 培養期間은 밀기를 固體培養의 境遇 48時間, 液面培養의 境遇는 96時間, 振盪培養의 境遇는 72時間 經過後 最高의 力價를 나타 내었다.

(3) 振盪培養時보다 液面培養時에 lipase 의 生成이 더욱 良好하였다.

(4) 밀기를 固體培養時에도 酵素의 生成이 良好

하였으며 培養 48時間後 3.800(μ/g)의 活性을 나타내었다.

(5) 培養最適溫度는 液體培養時나 固體培養時 모두 30°C 가 가장 良好하였다.

參 考 文 獻

1. Alford, J. A. and D. A pierce: J. Bacteriol., 86 24(1963)
2. Collins-Thompson, D. L., T. sorhaug, L. D. witter, and Z. Ordal: Appl. microbiol., 21 (1971)
3. 町田, 東, 山田: 日農協 22 427(1964)
4. 山田, 町田: 日農化 36 858(1962)
5. 山田, 町田, 東, 小山, 植田: 日農化 37 645 (1963).
6. 山田, 太田: 日農化 37 649(1963)
7. 太田, 山田: 日農化 37 653(1963)
8. Takahashi, J., K. Kobayashi, Y. Kawabata and K. Yamada: Agr. Biol. Chem., 27 836 (1963).
9. Ota. Y. and K. Yamada: Agr. Biol. Chem., 30 351(1966)
10. Ota. Y. and K. Yamada: Agr. Biol. Chem., 30 1030(1966).
11. Ota. Y., S. Miyairi and K. Yamada: Agr. Biol. Chem., 32 1476(1968).
12. Tomifuka N., Yoda and K. Yamada: Agr. Biol. Chem., 30 1090(1966).
13. 岩井, 辻阪, 福本: 第15回酵素 Symposium 講演集 117(1963)
14. 岩井, 辻阪, 福本: 第16回酵素 Symposium 講演集 235(1964)
15. 岩井, 辻阪, 板谷, 岡本, 福本: 科學と工業 40 18(1966).
16. 福本, 岩井, 辻阪: 科學と工業 38 373(1964).
17. Fukumoto. J., M. Iwai and Y. Tsujisaka: J. Gen. Appl. microbiol., 9 353(1963).
18. Laboureur, P. and M. Labrousse: Bull. Soc. Chem. Biol., 48 747(1966).
19. Nagase & Co., Ltd; Nagase's Enzyme Activity assay method, No.13(1967).
20. C. F. Lin, C. C. Chang, H. W. Chan, Y. C. Liu and H. Iizuka; J. Ferment. Technol., Japan 49 111(1971).
21. T. uemura: Report's from the institute of

- applied microbiology. university of Tokoyo
(1966).
22. 林慶福：自由中國 農業化學會誌 **10** 77(1972)
23. 金聖烈：忠南大學校 大學院 研究報告集 **1** 53
(1973).
24. 松村親：日酸協 **20** 278 (1962).