

## 絲狀菌의 脂肪分解酵素에 關한 研究

### 第 2 報 分離絲狀菌 *Rhizopus japonicus*의 培養條件檢討

鄭 萬 在

忠北大學 農化學科

(1975년 11월 14일 수리)

---

## Studies on the Lipolytic Enzyme of Molds

### Part II. Cultural condition of *Rhizopus japonicus*

by

Man-Jae Chung

Department of Agricultural Chemistry, Chung-Buk National University

(Received November 14, 1975)

---

#### Abstract

These experiment were conducted to investigate the cultural condition of the lipase production by *Rhizopus japonicus*. The results obtained were as follows:

1. Soybean meal and ammonium sulfate were the most effective in the lipase production as organic and inorganic nitrogen sources, respectively.
2. The lipase production was strongly inhibited, when added as carbon sources xylose, glucose, fructose, galactose, maltose, soluble starch, and dextrin causing the lowering of pH of the medium during culture. Sucrose did not inhibit the lipase production, but not caused any effect when added.
3.  $K_2HPO_4$  as phosphate salt and  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  as magnesium salt were the most effective in the lipase production.
4. The addition of olive oil, soybean oil, and coconut oil respectively increased the enzyme production and especially 1% olive oil increased it by 50%.
5. The enzyme production increased slightly on the addition of yeast extract to 0.05~0.07%.
6. The optimum composition of the medium for the lipase production by *Rhizopus japonicus* was in the composition of soybean meal 2%;  $K_2HPO_4$  0.5%;  $(NH_4)_2SO_4$  0.1%;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%; yeast extract 0.05%; olive oil 1%. The maximum production of the lipase was attained by the incubation for 48hrs under the optimum incubation condition.

### 結 言

微生物 lipase의 培養條件에 關한 研究를 보면 1958年 Satomura 등<sup>(1,2)</sup>은 *Sclerotinia libertiana*를 振盪培養하여 lipase의 生産, 糖類의 消費關係, pH의 變化, lipase와 다른 esterase의 生成에 關하여 報告하였고 基本培地に 各種 糖類의 添加는 lipase生産을 阻害시켰으며, olive油의 添加는 影響을 주지 않았고, 2,4-dinitrophenol, monoiodoacetate는 현저하게 阻害시키나 bile powder, silicone oil, lecithin과 酵素製劑인 pancreatin, takadiastase는 현저하게 lipase生産을 增加시켰다고 報告하였다. 1962年 Matsumura<sup>(3)</sup>는 微生物 lipase를 多量生産하기 爲하여 自然界에서 lipase生産能이 강한 *Rhizopus oryzae*를 選抜하고 培養條件을 檢討한바 CaCO<sub>3</sub>를 添加하지 않을 경우에는 繁殖이 制限되고 無機窒素源으로는 corn steep liquor, peptone, casein, yeast, soybean meal 이 良好하고 炭素源으로는 dextrin, soluble starch, sorbose가 좋고 glucose, sucrose, lactose, mannit, sorbit, xylose는 lipase 生産을 크게 低下시켰으며 olive油의 添加效果는 없었다고 報告하였다. 1962年 Yamada 등<sup>(4,5)</sup>은 微生物 lipase의 多量生産을 目的으로 lipase生産能이 강한 *Candida cylindracea*를 分離하여 培養條件을 檢討하고 基本培地に olive油, 脂肪酸 및 glucose의 添加는 有効하지 않으며 有機窒素源과 無機窒素源을 單獨으로 使用하였을 경우에는 lipase生産이 極히 不良하나 soybean meal과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 또는 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO를 併用하므로서 lipase生産이 良好하였다고 報告하였다. 1963年 Ota 등<sup>(6)</sup>은 lipase生産能이 강한 菌株로서 *Candida parapolityca*를 分離하고 培養條件을 廣範圍하게 檢討하여 合理的인 培地組成을 究明하였고, 1966年 Iwai 등<sup>(7)</sup>은 *Rhizopus delemar*의 培養條件을 檢討하고 蛋白質性狀이 다른 3種의 lipase가 存在함을 밝혀졌으며 또한 培地組成과 3種의 lipase生産과의 關係를 比較하였으며, 1966年 Smith 등<sup>(8)</sup>은 *Pseudomonas fragi* lipase의 生産에 關한 豚脂의 添加效果, sodium oleate에 各種 金屬이온 및 有機化合物을 添加하였을 때 lipase活性에 미치는 影響을 檢討하였다. 1968年 Ota 등<sup>(9,10)</sup>은 lipase生産에 미치는 各種 脂肪酸 ester의 影響을 檢討하기 爲하여 各種 脂肪酸 ester를 1%씩 添加하고 *Candida parapolityca*를 培養하여 lipase生産을 檢討한 結果 triolein과 castor oil이 가장 效果의 이었고 triacetin, tributyrin, tripalmitin은 全然 lipase를 生産하지 않았다고 報告하였다. 1970年 Eitenmiller 등<sup>(11)</sup>은 *Penicillium requeforti* lipase의 生産最適 pH는 6.0, 生産最適溫度는 27°C, 最適培養日數는 7日이며 鹽類中 MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>

는 activator로서 作用한다고 報告하였으며 1972年 Kim,<sup>(12)</sup>은 *Trichosporon cutaneum* lipase의 生産條件을 多角의 으로 檢討하여 最適培地組成, 最適 pH, 最適溫度 및 培養日數를 究明하였고, Chung<sup>(13,14)</sup>은 *Geotrichum candidum*의 lipase生産에 미치는 培養條件을 檢討하였다.

筆者는 微生物 lipase의 工業的生産을 目的으로 한 基礎研究로서 土壤으로 부터 強力한 lipase生産菌인 *Rhizopus japonicus*를 選抜하여<sup>(15)</sup> lipase生産에 미치는 培地組成의 影響을 多角의 으로 檢討하고 몇가지 注目할 만한 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

### 實 驗 方 法

#### 1. 基本培地の 調製

基本培地로는 Table 1과 같은 培地를 使用하였으며 500ml振盪후라스코에 培地를 50ml씩 分注하고 15 lbs에서 30分間 加壓殺菌하여 使用하였다.

Table 1. Basal medium for the lipase production.

Soybean meal 2%, Sucrose 2%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5%, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1%
--

#### 2. 培養方法

麥芽汁寒天에 3日間 培養한 供試菌을 1白金耳씩 上記培地に 接種하여 振盪培養한 後 遠心分離하여 菌絲體를 除去하고 lipase活性을 測定하였다. 但 培養溫度는 27°C, 培養時間에 關한 實驗以外에는 36時間, 振盪速度는 120 oscills./min.로 維持하였다.

#### 3. lipase 活性의 測定

本 實驗條件下에서는 Nord<sup>(5)</sup>등의 變法으로 測定하였으며 0.05 N NaOH Soln.의 滴定値가 3ml에 達할 때까지는 酵素量과 滴定値가 比例하므로 이 範圍에 들도록 酵素의 濃度와 反應時間을 調節하여 測定하였으며 lipase活性 1 unit는 上記와 같은 條件下에서 1分間에 1 micro當量의 脂肪酸을 遊離하는데 必要한 酵素量으로 하였다.

### 實 驗 結 果 및 考 察

#### 1. 基本培地中の 各成分의 比較試驗

##### 1) 有機窒素源의 比較試驗

本菌의 lipase生産에 適合한 有機窒素源의 種類를 알기 爲하여 基本 培地中の soybean meal代身에 各種 有機窒素源을 窒素含量이 同一하게 되게 添加하여 lipase生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig.1과 같다. 有機窒素源으로서는 soybean meal이 가장 優秀하였으며 그밖의 것은 lipase生産이 極히 不良하였다. soybean

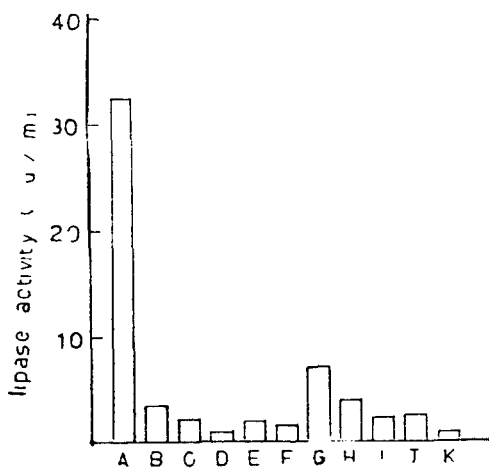


Fig. 1. Effect of organic nitrogen sources on the lipase production.

- A : soybean meal
- B : wheat bran
- C : defatted rape seed
- D : defatted perilla
- E : defatted sesame
- F : defatted rice
- G : defatted soybean meal
- H : yeast extract
- I : defatted dry milk
- J : albumin
- K : peptone

meal 代身에 脫脂大豆粕 및 다른 有機窒素源을 使用하였을 경우에는 菌의 生育과 lipase生産이 모두 떨어지는 點으로 보아 soybean meal의 優秀性은 油脂 또는 脂溶性物質의 效果에 基因하는 것이 아닌가 생각된다. Iwai 등<sup>(16,17)</sup>은 *Geotrichum candidum*의 lipase 生産에는 corn steep liquor, Alford 등<sup>(18)</sup>은 *Streptococcus aureus* lipase의 生産에는 trypticase broth (BBL), *Pseudomonas fragi* lipase<sup>(19)</sup>의 生産에는 case peptone이 效果的이었으며 Yamada 등<sup>(20)</sup>은 *Candida cylindracea* lipase의 生産에는 soybean meal이 가장 좋고 다음으로 distillers soldri가 좋았으며 corn steep liquor, peptone 과 meat extract의 混合物은 極히 不良하였다고 報告하였다. Ota 등<sup>(21)</sup>은 *Candida paralipolytica* lipase의 生産에 defatted soybean meal 또는 soybean meal extract가, Iwai 등<sup>(7)</sup>은 *Rhizopus delemar* lipase의 生産에 corn steep liquor, soybean cake extract가, Kim<sup>(12)</sup>은 *Trichosporon cutaneum* lipase의 生産에 soybean meal이, Matsumura<sup>(8)</sup>는 *Rhizopus oryzae* lipase의 生産에 corn steep liquor, peptone, casein, soybean meal, yeast가 良好한 結果를 나타내었다고 報告하였다. 이와같이 微生物 lipase의 生産에 適合한 有機窒素源의 種類는 微生物의 種類에 따라 不同을 알 수 있다.

2) 無機窒素源의 比較試驗

基本培地中의  $(NH_4)_2SO_4$ 代身에 各種 無機窒素源을 窒素의 含量이 同一하게 되게 添加하여 lipase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 2에서와 같이 無機窒素源中  $(NH_4)_2SO_4$ 와  $(NH_4)_2HPO_4$ 가 가장 좋았고 硝酸態窒素化合物은 不良하였다 Matsumura<sup>(8)</sup>는 *Rhizopus oryzae* lipase의 生産에  $(NH_4)_2HPO_4$ 가 가장 좋았고  $NH_4NO_3$ ,  $NH_4Cl$ ,  $NaNO_3$ 는 極히 不良하였으며 Yamada 등<sup>(20)</sup>은 *Candida cylindracea*의 lipase 生産에  $(NH_4)_2SO_4$ 와  $(NH_4)_2CO$ 가 優秀하나 硝酸態窒素化合物은 極히 不良하였다고 報告하였다.

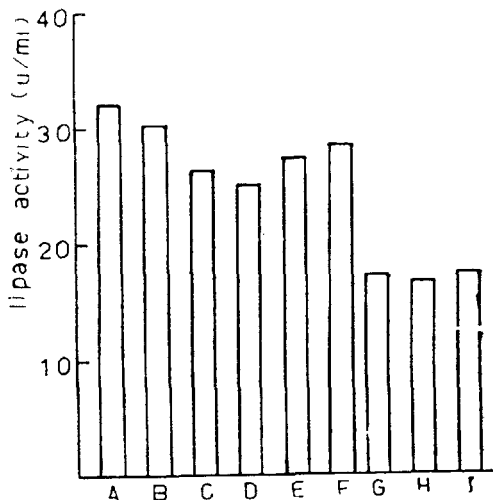


Fig. 2. Effect of inorganic nitrogen sources on the lipase production.

- A :  $(NH_4)_2SO_4$
- B :  $(NH_4)_2HPO_4$
- C :  $NH_4Cl$
- D :  $(NH_4)_2MgO_4$
- E :  $NH_4NO_3$
- F :  $NH_4H_2PO_4$
- G :  $NaNO_3$
- H :  $NaNO_2$
- I :  $KNO_3$

3) 炭素源의 比較試驗

基本培地中의 sucrose代身에 各種 糖類 및 糖알콜을 2%씩 添加하고 培養한 結果는 Fig.3과 같이 供試炭素源中 sucrose와 mannit가 lipase 生産이 가장 優秀하였으며 xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, soluble starch, dextrin은 極히 不良하였다. *Rhizopus oryzae* lipase<sup>(8)</sup>의 生産에 있어서 dextrin, soluble starch, sorbose는 良好하나 mannit, dulcitol, xylose, lactose, sucrose, glucose는 lipase 生産을 크게 低下시켰으며 *Candida cylindracea* lipase<sup>(20)</sup>의 生産에는 xylose, sucrose, maltose, soluble starch는 糖無添加의 境遇와 거의 비슷하나 glucose의 添加는 현저하게 lipase 生産을 低下시켰다고 하였으며 한便 Iwai 등<sup>(7)</sup>은

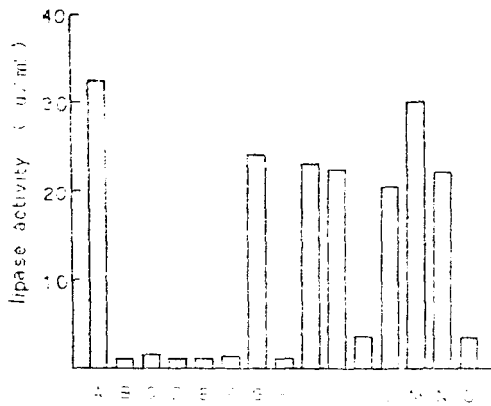


Fig. 3. Effect of carbon sources on the lipase production.

- A : sucrose (6.85)
- B : xylose (4.35)
- C : glucose (4.12)
- D : fructose (4.30)
- E : galactose (4.25)
- F : mannose (4.10)
- G : lactose (6.73)
- H : maltose (4.48)
- ( ) : final pH
- I : raffinose (6.75)
- J : inulin (6.55)
- K : soluble starch(4.05)
- L : inosit (6.45)
- M : mannit (6.95)
- N : sorbit(6.92)
- O : dextrin (4.25)

*Rhizopus delemar*의 lipase生産에 適合한 炭素源의 種類와 最適添加量을 알기 爲하여 peptone을 含有하는 基本培地에 glucose, sucrose, rhamnose, lactose, galactose, mannose, fructose, xylose, arabinose, dextrin을 各各 2%씩 添加하고 lipase 生産을 調査한 結果 炭素源間에는 有意差가 나타나지 않았으며 glucose의 最適添加量은 2%内外라고 하였다. 또한 Iwai등<sup>(16,17)</sup>은 *Geotrichum candidum*의 lipase生産은 peptone medium에 0.1%의 glucose添加가 効果의이었다고 하였으며, Peters<sup>(22)</sup>는 glucose의 量이 0.05%를 초과할 때는 *Mycotorula lipolytica*의 lipase生産이 減少된다고 하였고, Thiboden<sup>(23)</sup>은 糖의 添加는 *Penicillium roqueforti*의 lipase生産을 妨害한다고 報告하였다. Kim<sup>(12)</sup>은 *Trichosporon cutaneum* lipase의 生産에 있어서 xylose, arabinose, glucose, fructose, mannose는 甚한 阻害作用을 나타내나 galactose, maltose, starch는 阻害作用을 하지 않았다고 報告하였다. 이와같이 微生物의 種類에 따라서 阻害劑로 作用하는 糖의 種類가 다른데 本菌의 lipase 生産에 있어서는 阻害作用을 하는 單糖類, maltose, soluble starch, dextrin은 培養中에 培地의 pH를 低下시켰으나 sucrose, mannit등의 경우에는 培地의 pH 低下가 거의 없었던 點으로 보아 培地의 pH 低下는 lipase生産에 支障을 주는 要因의 하나가 되지 않는가

생각된다.

4) 磷酸鹽 및 마그네슘鹽의 比較試驗

lipase生産에 適合한 磷酸鹽과 마그네슘鹽의 種類를 알기 爲하여 基本培地의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>代身에 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 磷酸의 含量이 同一하게 添加한 培地와 또한 基本培地中의 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 代身에 MgCl<sub>2</sub> 및 MgCO<sub>3</sub>를 마그네슘 含量이 同一하게 添加한 培地에서 培養한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of phosphate salt and magnesium salt on the lipase production.

Phosphate salt	Lipase activity (u/ml)	Magnesium salt	Lipase activity (u/ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32.00	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	32.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.25	MgCl <sub>2</sub>	26.50
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26.25	MgCO <sub>3</sub>	27.25

3種의 磷酸鹽中 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>가 lipase生産에 가장 効果的이었으며 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>添加區는 菌의 發育과 lipase生産이 極히 不良하였는데 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 使用時 培地의 pH가 5.54로 低下된 點으로 보아 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>區가 不良한 것은 培地를 酸化시켰기 때문이 아닌가 생각되며 마그네슘鹽中에서는 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 가장 良好하였다.

以上の 實驗結果를 綜合하면 本菌의 lipase生産에 가장 適合한 有機窒素源은 soybean meal이고 無機窒素源은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 炭素源으로는 sucrose, 磷酸鹽으로는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 마그네슘鹽으로는 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 들수 있다.

2. 基本培地中의 各成分濃度の 影響

本菌의 lipase生産에 對한 基本培地中의 各成分의 濃度を 알기 爲하여 soybean meal, sucrose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 濃度を 變化시켜 lipase 生産에 미치는 影響을 檢討하였다.

1) Soybean meal 濃度の 影響

基本培地中 soybean meal의 濃度만을 變化시켜 lipase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 4와 같다.

窒素源으로서 有機窒素源인 soybean meal을 使用하지 않고 無機窒素源만을 使用하였을 경우에는 全然 lipase를 生産하지 않았으며 soybean meal을 併用하므로서 lipase生産이 增加되어 2% 使用時에 가장 좋았다. 本結果는 Kim<sup>(12)</sup>, Yamada등<sup>(20)</sup>, Ota등<sup>(21)</sup>의 結果와 一致하고 있다. Peters<sup>(22)</sup>는 *Mycotorula lipolytica* lipase의 生産에 有機態窒素가 有効하다고 報告하였으며 Matsumura<sup>(8)</sup>도 *Rhizopus oryzae*의 lipase 生産에 有機態窒素의 必要性을 強調하였다.

2) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度の 影響

基本培地中의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 濃度만을 變化시켜 lipase

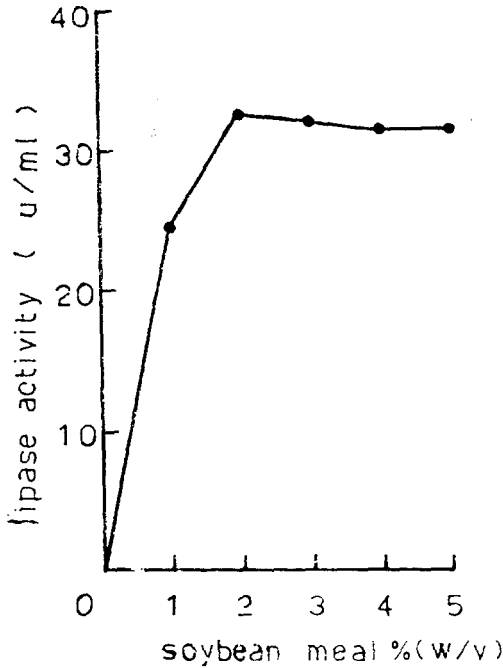


Fig. 4. Effect of concentration of soybean meal on the lipase production.

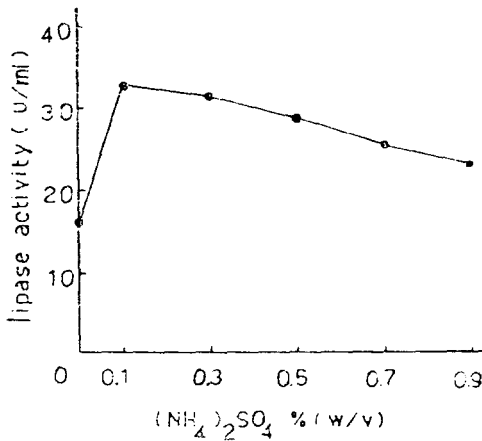


Fig. 5. Effect of concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the lipase production.

生産을 檢討한 結果는 Fig.5와 같다.

本菌의 lipase生産에 適合한 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 濃度는 0.1%이며 그 以上の 濃度에서는 lipase生産이 현저하게 減少되었다. 有機窒素源으로서 soybean meal만을 使用할 境遇에는 lipase生産量이 낮으나 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0.1%添加하므로서 현저하게 增加되었다. 이러한 現象은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 soybean meal과 相乘效果를 나타내기 때문이라고 생각된다.

Matsmura<sup>(3)</sup>는 *Rhizopus oryzae*의 lipase生産은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

SO<sub>4</sub>의 量에 依하여 左右되며 con steep liquor를 含有하는 培地에 1%의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 또는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 添加가 가장 效果의이었다고 하였으며, Iwai등<sup>(10)</sup>은 *Geotrichum candidum*의 lipase를 生産할때 0.2%의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 또는 0.1%의 NaNO<sub>3</sub> 添加가 有效하다고 報告하였는데 Yamada등<sup>(20)</sup>은 *Candida cylindracea*의 lipase生産에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 또는 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO가 가장 效果的이었으며 Kim<sup>(12)</sup>는 *Trichosporon cutaneum* lipase의 生産에 0.1%의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 가장 效果的이었다고 報告하였는데 本菌의 lipase生産은 Yamada등 및 Kim의 結果와 一致하였다.

3) Sucrose濃度の 影響

基本培地中 sucrose의 濃度만을 變化시켜 lipase生産에 미치는 影響을 檢討한 結果 Fig.6에서 보는바 같이 sucrose를 0.5~2.5% 添加하고 lipase生産量을 檢討한 바 糖無添加와 別差異를 認定할수 없었다. Kim<sup>(12)</sup>은 *Trichosporon cutaneum* lipase를 生産할때 sucrose를 添加하면 lipase生産이 약간 增加된다고 하였고, Yamada등<sup>(20)</sup>은 *Candida cylindracea* lipase生産에 있어서 sucrose 添加는 無添加에 比하여 別效果가 없었다고 報告하였는데 本菌의 lipase生産에 있어서는 Yamada등의 結果와 一致하였으며 sucrose의 添加效果가 認定되지 않은

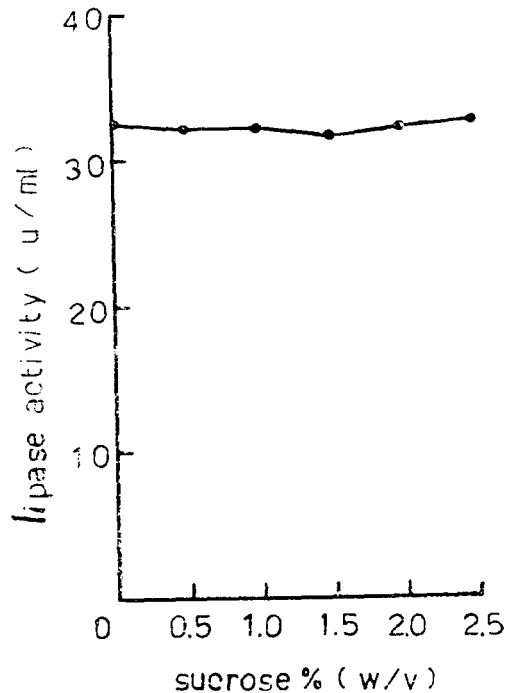


Fig. 6. Effect of concentration of sucrose on the lipase production.

것은 sucrose 無添加의 경우 soybean meal 中의 炭水化合物이 炭素源으로서 利用되었기 때문이라고 생각된다.

4)  $K_2HPO_4$  濃度의 影響

基本培地中  $K_2HPO_4$ 의 濃度만을 變化시켜 培養한 結果 Fig.7에서 보는바와 같이  $K_2HPO_4$ 의 最適 添加濃度는 0.5%이며 無添加의 경우에는 lipase 生産이 極히 不良하였다.

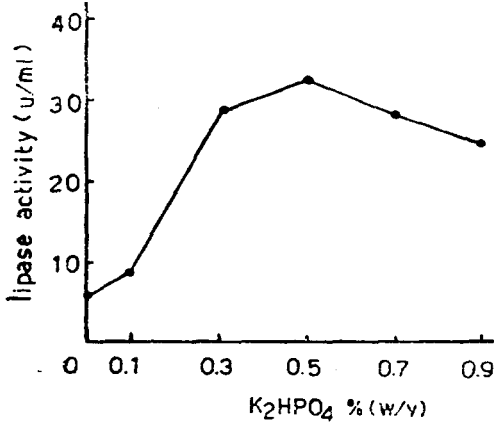


Fig. 7. Effect of concentration of  $K_2HPO_4$  on the lipase production.

*Trichosporon cutaneum*<sup>(12)</sup>의 lipase 生産에 適合한 濃度는 0.6%, *Candida cylindracea*<sup>(20)</sup>의 경우 0.5%, *Candida parapolitytica*<sup>(24)</sup>의 경우 0.2%라고 한 報告와 類似하였다.

5)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  濃度의 影響

基本培地中  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 濃度만을 變化시켜 lipase 生産을 檢討한 結果는 Fig.8에서와 보는바와 같이 0.05% 添加時에 lipase 生産이 약간 增加되었으며 그 以上の 濃度에서는 急激하게 減少되었다. 各種 微生物 lipase 生産에 있어서의 添加濃도를 보면 *Trichosporon cutaneum*<sup>(12)</sup>은 0.2%, *Geotrichum candidum*<sup>(8)</sup>은 0.012%, *Penicillium roqueforti*<sup>(4)</sup>는 0.5%, *Rhizopus delemar*<sup>(7)</sup>는 0.05%, *Candida parapolitytica*<sup>(21)</sup>는 0.05~0.1%, *Mucor mucedo*<sup>(25)</sup>는 0.05%가 가장 效果의 이었다고 報告하였다.

以上の 實驗結果에 依하여 本菌의 lipase 生産에 適合한 基本培地의 組成은 Table.3과 같이 定할수 있었다

Table 3. Modified basal medium for the lipase production by *Rhizopus japonicus*.

Soybean meal 2%	$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%	$K_2HPO_4$ 0.5%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%		

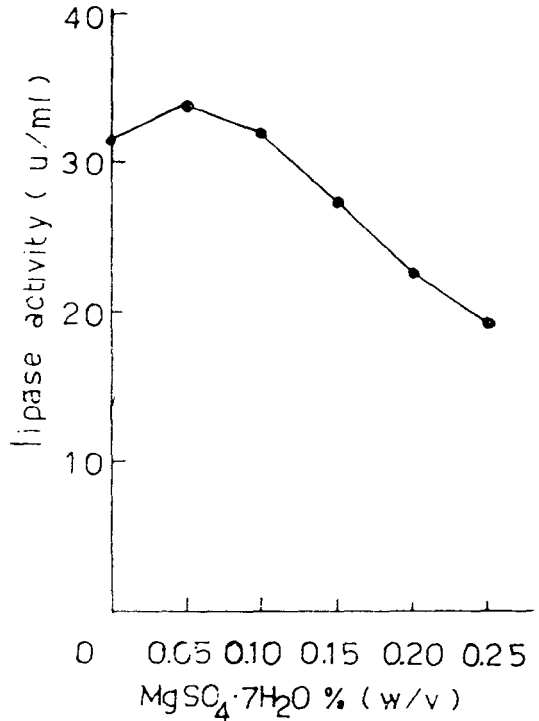


Fig. 8. Effect of concentration of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  on the lipase production.

3. Modified basal medium에 各種成分의 添加試驗

1) 油脂添加試驗

Table 3의 modified basal medium에 各種 植物性油脂를 0.5%씩 添加하고 lipase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果 Fig.9에서 보는바와 같이 本菌의 lipase 生産에 있어서 olive油 大豆油 야자油의 添加는 特別 效果의 이었다. Goodman<sup>(26)</sup>은 Czapek-Dox培地의 sucrose를 corn oil로 代置하였을때 *Penicillium sp.* 및 *Aspergillus flavus*의 lipase가 適應의으로 현저하게 生産되었다고 하였으며, Iwai 등<sup>(16)</sup>도 *Geotrichum candidum*의 lipase 生産에 各種 油脂의 添加가 效果의 이었다고 하였고 Ota 등<sup>(21)</sup>, Kim<sup>(12)</sup>도 olive添의 添加는 lipase 生産을 增加시켰다고 報告하였다.

Fig.9에서 보는바와 같이 植物性油脂中에서 olive油의 添加效果가 가장 優秀하였으므로 olive油의 最適 添加量을 알기 爲하여 modified basal medium에 olive油를 各種 濃度로 添加하고 lipase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig.10에서 보는 바와 같이 olive oil 1% 添加時에 lipase 生産이 가장 優秀하였으며 1.5% 添加時에는 약간 減少되었다. olive油 添加가 微生物 lipase의

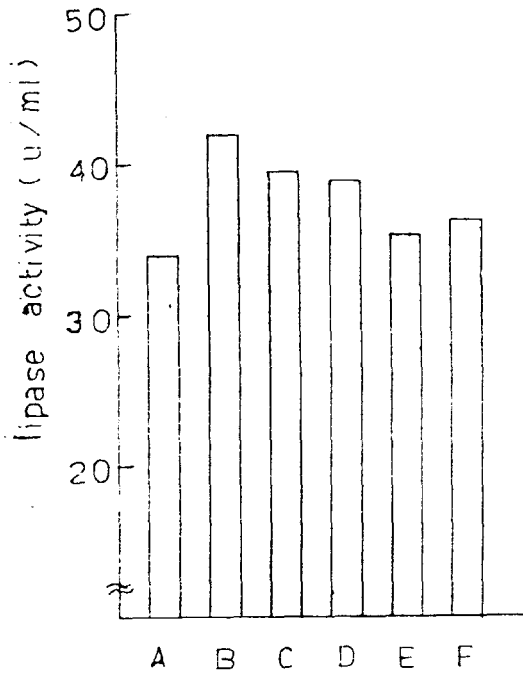


Fig. 9. Effect of oil on the lipase production.

A : control      D : coconut oil  
 B : olive oil    E : cotton seed oil  
 C : soybean oil   F : palm oil

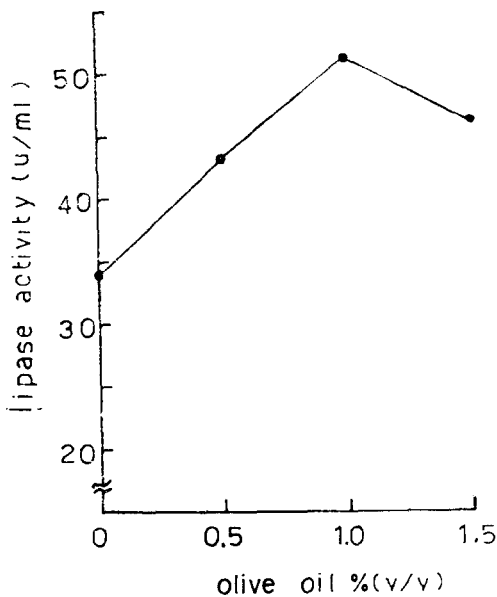


Fig. 10. Effect of concentration of olive oil on the lipase production.

生産에 미치는 影響에 關한 研究를 보면 Kim<sup>(12)</sup>은 soy-

bean meal을 含有하는 培地에서는 0.5%의 olive油 添加가, Ota등<sup>(21)</sup>은 defatted soybean meal을 含有하는 培地에서는 0.5~1.0%의 olive油의 添加가, Iwai등<sup>(16)</sup>은 2%의 olive油의 添加가 効果的이라고 報告하였는데 本菌의 경우에는 olive油의 最適量은 Kim<sup>(12)</sup>의 報告보다는 높고 Iwai등<sup>(16)</sup>의 報告보다는 낮았다.

2) yeast extract 添加試驗

modified basal medium에 yeast extract를 0.01~0.07% 添加하고 lipase生産을 檢討한 結果는 Fig.11과 같이 本菌의 lipase生産에 0.05~0.07% 添加하므로써 약간 增加되었다. yeast extract의 添加效果에 關한 實驗은 別로 없으며 다만 *Candida paraliopolytica*<sup>(21)</sup>의 lipase生産에 効果的이었다는 報告가 있을 뿐이다.

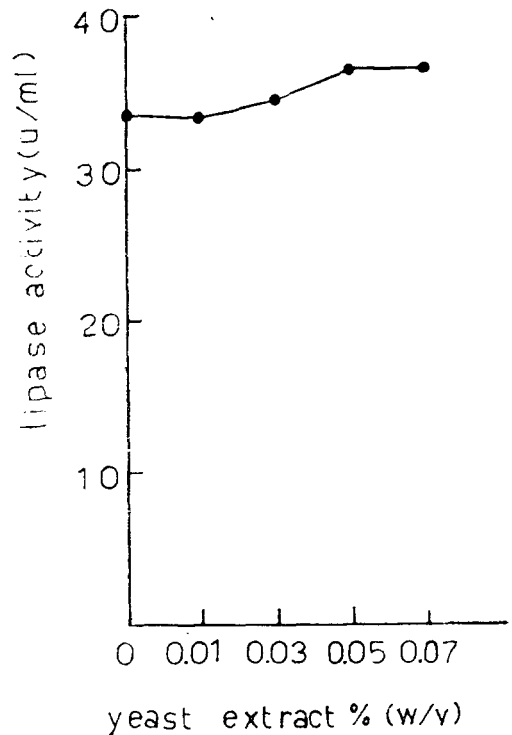


Fig. 11. Effect of yeast extract on the lipase production.

3) 最適培地組成

以上과 같이 培養條件의 檢討에 依하여 本菌의 lipase生産에 가장 適合한 最適培地組成을 Table 4와 같이 決定하였다.

4) 最適培地에서의 培養時間에 따른 lipase의 生産

Table 4의 最適培地를 使用하여 一定時間 培養한 結果는 Fig.12와 같이 培養時間이 經過함에 따라 lipase活

Table 4. Optimum medium on the lipase production by *Rhizopus japonicus*

Soybean meal 2%, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%
Yeast extract 0.05%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5%, olive oil 1%,

성이 증가되어 48시간 培養時에 最高에 到達하고 그 後는 減少되었다. *Trichosporon cutaneum* lipase<sup>(12)</sup>는 96時間, *Candida cylindracea* lipase<sup>(27)</sup>는 20時間, *Rhizopus delemar* lipase<sup>(7)</sup>는 120~150時間, *Penicillium roqueforti* lipase<sup>(11)</sup>는 48時間 培養時에 最高에 到達하였다고 報告

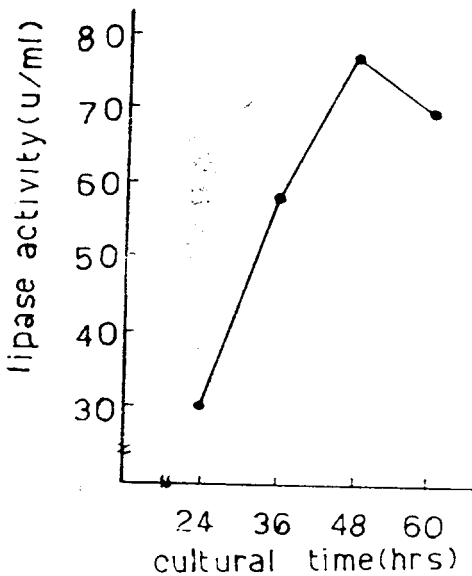


Fig. 12. Effect of cultural time upon the lipase production on optimum medium.

하였는데 本菌의 lipase生産은 *Penicillium roqueforti*의 培養時間과 같은 時間을 必要로 하였다.

要 約

1. 有機窒素源으로는 soybean meal, 無機窒素源으로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 lipase生産에 가장 效果이었다.
2. 培養中 培地の pH低下를 이끄는 xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, soluble starch, dextrin을 炭素源으로 添加하였을 때 lipase生産이 甚하게 阻害되었다. sucrose는 lipase生産을 阻害하지 않았으나 添加效果는 認定되지 않았다.
3. 磷酸鹽으로서 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 마그네슘鹽으로서 Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 lipase生産에 가장 效果的이었다.
4. Olive油, 大豆油 및 야자油의 添加는 lipase生産을 增加시켰으며 1% olive油 添加時 lipase生産이 50%

增加되었다.

5. yeast extract 0.05~0.07%添加時 lipase生産이 약간 增加되었다.
6. 本菌의 lipase生産에 가장 適合한 培地는 soybean meal 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, yeast extract 0.05%, olive油 1%의 組成의 것으로서 最適培養條件下에서 48時間 培養時에 lipase生産이 最高에 到達하였다.

參 考 文 獻

1. Satomura, Y., Susumu, O. and Swada, A. : *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 22, 194(1958)
2. Satomura, Y., Susumu, O., Swada, A. and Fukumoto, J. : *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 23, 150 (1959)
3. 松村親 : 日農協 20, 278(1962)
4. 山田, 町田 : 日農化, 36, 858(1962)
5. 山田, 太田, 町田 : 日農化, 38, 860(1962)
6. 山田, 太田 : 日農化, 37, 649(1963)
7. 岩田, 辻阪, 板谷, 岡本, 福本 : 科學と工業, 40, 18(1966)
8. Smith, J.L. and Alford, J.A. : *Appl. Microbiol.* 14, 699(1966)
9. Ota, Y. Suzuk, M. and Yamada, K. : *Agr. Biol. Chem.*, 32, 390(1968)
10. Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K. : *Agr. Biol. Chem.*, 30, 1090(1966)
11. Eitenmiller, R.R., Vakil, J.R. and Shahani, K.M. : *J. Food Sci., and Tech.*, 35, 130(1970)
12. 金聖烈 : 忠南大學校 大學院研究報告集, 53(1972)
13. 鄭萬在 : 忠北大學論文集 7, 49(1973)
14. 鄭萬在 : 忠北大學論文集 8, 163(1974)
15. 鄭萬在 : 忠北大學論文集 9, (1975)
16. Iwai, M., Tsujisaka, Y., Okamoto, Y. and Fukumoto, J. : *Agr. Biol. Chem.* 37, 929(1973)
17. Tsujisaka, Y. and Iwai, M. and Tominaga, Y. : *Agr. Biol. Chem.*, 37, 1457(1973)
18. Alford, J.A. and Smith, J.L. : *J. Am. oil chemists' sci.*, 42, 1038(1965)
19. Alford, J. A and pierce, D.A. : *J. Bacteriol.* 86, 24(1963)
20. 山田, 町田, 東, 小出, 植田 : 日農化, 37, 645-(1963)
21. 太田, 山田 : 日農化, 37, 653(1963)
22. Peters, I.I. and Nelson. F.E., : *J. Bact.*, 55, 581 (1948)



23. Thiboden, R.: *Minn. Agr. Expt. Sta., Tech. Bull.*, 152(1942)
24. Ota, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 809(1967)
25. Stern, A. M., Ordal, Z.J. and Halverson, H.O.: *J. Bact.*, 68, 24(1954)
26. Goodman, J.J.: *Science*, 112, 176(1950)
27. 町田, 東, 山田: *日農協*, 22, 427(1964)