と場廃水による放線菌の培養およびプロテアーゼの生産, 性質^{*1,2}

(昭和 43 年 10 月 15 日 受理)

鈴木 周一・大橋 力・川島 祐夫^{*3}

と場廃水を加熱処理することによってえられた加熱沈殿物は、アミノ酸組成のすぐれたタンパク質分を含有することに着目し、これを栄養源として放線菌の培養を行ない、プロテアーゼの生産および採取を試み、分別したプロテアーゼの性質を検討した。

その結果、菌体増殖度合はきわめて早く、約 24 時間位で菌体量は最大に達した。培養液中のプロテアーゼ活性は菌体の死滅期において急激な増加を示した。ついで培養液から硫酸アンモニウム塩析法によって粗プロテアーゼを採取した。ここにえられたプロテアーゼは口紙電気泳動、超遠心沈降による試験の結果、少なくとも 2 種類以上含まれることがわかった。さらにカラムクロマト法によって一応 3 種のプロテアーゼをそれぞれ分別し、酵素活性の性状からみて、これらのプロテアーゼはアイソザイムとみなされた。これらの結果をまとめてと場廃水の無害化ならびに利用に関する指針をうることができた。

1 緒 言

これまで著者らは有機質廃水の積極的な利用ならびに無害化に関する一連の研究を行なっている¹⁾。すでに有機質廃水としてアミノ酸製造工場廃水について、廃水中の含窒素有機物を栄養源として特定の微生物を培養し、菌体を取得するとともに廃水中の有機物の低減に役立つことを明らかにした²⁾。さらに有機質廃水の中で浄化処理が困難とされていると場廃水を取り、これを加熱処理することによって該廃水中のタンパク質分を凝固させ、他のきょう雑有機物とともに沈殿物として分離除去し、大部分の液をほとんど無色透明な上澄液とする熱交換方式による浄化法については報告したところである³⁾。なお加熱処理によってえられた沈殿物は主としてアミノ酸組成のすぐれたタンパク質物であって、ほとんど全種の通常アミノ酸を含み、利用価値が高く新しい用途の開発が考えられた。そこで著者らはこの加熱沈殿物を特定の微生物培養の窒素源として利用することを企て、その一例としてプロテアーゼ生産放線菌の培養を行ない、通気かきまぜ方式によるプロテアーゼの生産、採取および性質について基礎的な知見をうることもその利用について一連の体系を形成することができた。

2 実験ならびに考察

2.1 実験法

供試菌株：著者らが土壌から分離したプロテアーゼ生産放線菌 KO-353。

供試廃水：と場廃水、pH 7.1, 全窒素 220 ppm, BOD 2500。

加熱沈殿物および培養液の調製：前報においてえられた加熱処理の最適条件によって、と場廃水 1 l を 100~110°C で 10 分間加熱した後 20°C に冷却し、褐色の沈殿物を上澄液と分取した。ここにえられた沈殿物の組成は粗タンパク 60%, 質粗脂肪 7%, 糖質 6% であった。この沈殿物をワーリングブレンダーで磨砕した後、上澄液に加えて窒素濃度 1 g/l の懸濁液をつくり、pH 7

に調整して滅菌し、沈殿物培地とした。また比較対照のため沈殿物培地に適量のブドウ糖を添加したものをブドウ糖添加沈殿物培地とした。

培養方法：ふりまぜ培養にはモノード型培養装置を使用した。通気かきまぜ培養には 15 l 容量のジャーファーメンターを用いた。培養温度は 30°C。

菌体収量の測定：培養液 100 ml を遠心分離してえられた上澄液を下記のプロテアーゼ活性の測定に供し、沈降した菌体を蒸留水で 2 回洗浄した後 100~105°C で定量になるまで乾燥して菌体重量とした。

プロテアーゼ活性の測定：フオリン-荻原法⁴⁾によった。すなわちカゼインを基質とし、pH 8.0 において 40°C で 10 分間反応後反応液の 0.05 mol/l トリクロル酢酸に可溶性の区分を比色測定した。この場合反応の 1 分間当りのクロシン 1 mg 相当量の呈色を与える活性度を 1 単位として $PU_{\text{meq. Tyr}}^{\text{cas. 40°C. FR}}$ (略記 PU) のように表示した。

起遠心沈降：Beckmann Spinco E 型超遠心機によって酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.4) 中でローター速度 59780 rpm, 15°C で行なった。

口紙電気泳動：電気泳動およびデンストメーターによる測定は常法⁵⁾に従い、電解液として酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用い、陰陽両極ともに白金板 (浸漬面積 25 cm²) を使用した。

プロテアーゼ 10 mg を酢酸ナトリウム緩衝液 2 ml にとかした試料液を口紙上の中央部に点着し、25~30°C で端子電圧 190 V, 5 mA, 9.5 時間通電した。終了後口紙を風乾した後 0.1% ブロムフェノールブルー水溶液を噴霧して発色させた。発色した各バンドの大きさをデンストメーターによって 440 mμ における吸光度を測定して求めた。

2.2 加熱沈殿物培地と従来の培地による放線菌の培養比較試験

表 1 に示したような組成のブドウ糖-沈殿物、常用のプロテアーゼ生産用培地あるいはブドウ糖-ブイオン培地などを用いて、放線菌を 30°C で 90 時間それぞれふりまぜ培養し、菌体収量、プロテアーゼ活性などを測定した。その結果を表 1 に示す。

ブドウ糖-沈殿物培地を用いた場合の菌体収量は常用プロテア

*1 この報文を「有機質廃水の利用ならびに無害化 (第 5 報)」とする。

*2 前報 (第 4 報), 鈴木周一, 大橋 力, 水口 純, 工業用水, 122, 42 (1968)。

*3 Shuichi SUZUKI, Tsutomu OHASHI, Sukeo KAWASHIMA 東京工業大学資源化学研究所: 東京都目黒区大岡山。

1) 水口, 鈴木, 大橋, 用水と廃水, 6, 291 (1964)。

2) 水口, 鈴木, 村田, 工化, 67, 2130 (1964)。

3) 鈴木, 大橋, 水口, 工業用水, 122, 42 (1968)。

4) B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai, K. Okunuki, *J. Biochem.*, 45, 185 (1958)。

5) E. Lederer, M. Lederer, "Chromatography" Elsevier Publ., New York (1957); A. T. James, L. J. Morris, "New Biochemical Separations" Van Nostrand Comp., New York (1964)。

表 1 加熱沈殿物培地と各種の培地による培養試験

培 地	組 成	菌 体 量 (mg/ml)	プロテアーゼ活性 ($\times 10^{-4}$ PU/ml)
ブドウ糖-沈 殿物培地	沈殿物+上澄液 (窒素 1 mg/ml)	5.3	7.8
	ブドウ糖 10 mg/ml		
常用 プロテアーゼ 生産培地	大豆粉 20 mg/ml	9.6	5.4
	ブドウ糖 20 mg/ml		
	乾燥酵母 2 mg/ml		
	CaCO ₃ 4 mg/ml		
ブドウ糖- ブイオン培地	K ₂ HPO ₄ 0.2 mg/ml	4.6	1.2
	ブドウ糖 15 mg/ml		
	肉エキス 5 mg/ml ペプトン 5 mg/ml		

培地 15 ml, 30°C, 90 hr 振とう培養。

ーゼ生産用培地の場合におよばないが、ブドウ糖-ブイオン培地の場合よりも多く、放線菌の生育はきわめて良好であった。またプロテアーゼ生産についてブドウ糖-沈殿物培地は常用プロテアーゼ生産用培地の場合に比して 40% 以上も多く、すぐれた成績を示した。これらのことから培地として加熱沈殿物を用いたものはブドウ糖-ブイオン培地を用いた場合と同様に放線菌の生育、プロテアーゼの生産ともに良好であることを知った。このように加熱沈殿物は放線菌の栄養源としてきわめて好適なものであることがわかった。

2.3 加熱沈殿物培地を用いる放線菌の振とう培養

上記の加熱沈殿物を上澄液に加えて窒素濃度として 1 mg/ml の加熱沈殿物培地 150 ml を調製した。別に比較対照のため同様の培地にブドウ糖を 10 mg/ml の濃度に加えてブドウ糖添加沈殿物培地とした。上記の方法に従ってそれぞれ放線菌前培養液を 5 ml 接種して 30°C で 96 時間ふりまぜ培養し、菌体増殖の度合およびプロテアーゼ活性を調べた。培養経過の一例を、図 1 に示す。

図 1 放線菌の振とう培養経過

加熱沈殿物培地 —○—: 菌体量, —○—: プロテアーゼ活性
ブドウ糖添加沈殿物培地 —x—: 菌体量, —x—: プロテアーゼ活性

その結果加熱沈殿物を用いた培地における菌体増殖の度合はブドウ糖添加沈殿物培地の場合と同様で、比較的急速であった。培養 24 時間後で菌体量は最大に達した。なお菌体増殖の状態はいわゆる定常期を経ることなく、増殖度合が最大に達した後ただちに死滅期に入る傾向が認められた。

培養液中のプロテアーゼ活性は図 1 に示されるように、菌体増殖の誘導期および対数期に余り認められないが、死滅期に入り、菌体の自己消化がみられる時期において急激な増大を示した。なおブドウ糖添加沈殿物培地における最終のプロテアーゼ活性は上記の常用プロテアーゼ生産用培地の場合とほぼ同様であった。当然のことながらプロテアーゼ活性は糖無添加培地の場合に比して

50% 以上もすぐれた結果を示した。このように加熱沈殿物培地を用いてふりまぜ培養を行なった場合、放線菌の生育およびプロテアーゼの生産は比較的良好であって、予期した以上にブドウ糖添加沈殿物培地の成績に近い結果を示すことがわかった。以上のことからこの加熱沈殿物は放線菌の培養に適しており、とくに炭素源を加えなくても放線菌は生育することが示された。

なお顕微鏡観察によれば、増殖中の菌は初め加熱沈殿物を包囲するような形で急速に生育し、約 24 時間後で沈殿物はほぼ消失し菌体のみが観察されるようであった。この間培地中の可溶性窒素は余り増加しないことからして、沈殿物中の窒素は菌体成分として変換蓄積されることが推察された。

2.4 加熱沈殿物培地を用いる放線菌の通気かきまぜ培養

次に加熱沈殿物を用いて通気かきまぜ方式による場合の最適条件の検討および大量培養を目的としてジャーファンメンターを使用して放線菌の培養を行なった。

加熱沈殿物 80 g (窒素として 8 g), ブドウ糖 80 g に加熱処理してえられた上澄液を加えて 8 l としブドウ糖添加沈殿物培地を調製した。これにあらかじめ同一組成の培地で放線菌を 24 時間培養した菌液 400 ml を加え、30°C で 90 時間培養し、培養中液を一部とり、菌体量およびプロテアーゼ活性を測定した。その結果を図 2 に示す。

図 2 通気かきまぜ培養経過

—○—: 菌体量 —x—: プロテアーゼ活性
—△—: pH —●—: 可溶性窒素

ジャーファンメンターを用いた場合の放線菌の培養経過は、上記 2.3 における小規模のふりまぜ培養の場合と、ほぼ同様であって、放線菌は良好な生育を示した。また生育の状況も上記のふりまぜ培養の際顕微鏡で観察した結果ときわめて同様な様相を示した。培養液中のプロテアーゼ活性と可溶性窒素の消長との間にかんがりの相関関係が認められた。すなわち、プロテアーゼ活性は菌体の自己消化に伴って急激に増大し、上記ふりまぜ培養の結果と同様にきわめて再現性のあることが示された。このことはプロテアーゼ活性の増加時間および可溶性窒素の平行的増加によってもよくうかがわれた。

以上の結果から加熱沈殿物は通気かきまぜ方式による培養においても、菌の生育およびプロテアーゼの生産はともにすぐれた成績をうることができた。

なお培養終了後培養液を 15 分間遠心分離して菌体を集め、組成分析を行なったところ、無水物に対して粗タンパク質 47%,

粗脂肪 9%, 糖類 12% を含むことがわかった。このようにここにえられた菌体はタンパク質に富み、脂肪および糖類もかなり含有しているので、菌体成分の利用の可能性も考えられる。

2.5 粗プロテアーゼの採取

上記の方法によって放線菌をジャーファメンターによって大量培養し、菌体をろ過除去してえられた培養口液 5l を図 3 に示した順序に従って硫酸アンモニウム塩析およびアセトン沈殿などを用いて粗プロテアーゼを分別取得した。粗プロテアーゼの抽出経過の一例を表 2 に示す。

図 3 粗プロテアーゼの採取

表 2 粗プロテアーゼの抽出経過

	容量 (ml)	プロテアーゼ		純度 (PU*/PN**)	色素 (%)
		単位 (PU × 10 ⁻⁴ /ml)	採取率 (%)		
培養口液	450	21	100	2.2	100
リン酸カルシウムゲル処理液	560	15	89	2.6	33
酢酸カルシウム溶液	45	156	74	18	8
アセトン沈殿物	6.7 (g)	635 (PU × 10 ⁻⁴ /g)	45	21	—

*PU プロテアーゼ活性 (フォリン-荻原法)。

**PN 酵素含有液のフォリン呈色を以て表わしたタンパク質濃度。

ここにえられた粗プロテアーゼ活性の至適 pH は 8.2~8.3 であった。次にこの粗プロテアーゼについて上記の実験法に従い口紙電気泳動および超遠心分析法によって単一性を調べた。その結果を図 4 に示す。これまで上記の粗プロテアーゼは 1 種類とみなされていたが、図 4 に示されるように口紙電気泳動によって単一なバンドは示されないで、少なくとも三つの泳動像が認められ、3 成分含有されることがわかった。さらに超遠心沈降分析の結果から少なくとも 2 成分の界面が認められた。これらの結果上記の方法によってえられたプロテアーゼは三つの成分を含むことが明

図 4 粗プロテアーゼの口紙電気泳動図

らかになった。

2.6 プロテアーゼの分画

上記のプロテアーゼは混合物とみなされたので、次にカラムクロマトグラフィーによってプロテアーゼの分画を行なった。すなわち粗プロテアーゼを酢酸ナトリウム緩衝液にとかしたものを (40 mg/ml, pH 6) 20 ml をカルボキシメチルセルロースを充填したカラム (径 0.8 cm, 長さ 41 cm) に注ぎ込み、0.25 mol/l 塩化ナトリウム溶液を展開液とし 0.5 ml/min の速度で溶出し、各フラクションを分取した。各溶出区分について、275 mμ における吸光度を測定しタンパク質含量を求めた。またフォリン-荻原法によってプロテアーゼ活性を測定した。その結果、図 5 に示されるよ

図 5 プロテアーゼの分画

図 6 分画プロテアーゼの活性曲線

うに粗プロテアーゼは三つのピーク F_1 , F_2 および F_3 に分別された。

このように加熱沈殿物培地を用いて放線菌を培養し、培養口液中に生産されたプロテアーゼは単一なものではなく、三つの成分からなることがわかった。このことは上記の口紙電気泳動および超遠心沈降による結果をさらに裏付けるものである。

2.7 分別プロテアーゼの pH 活性関係の測定

上記の三つの区分 F_1 , F_2 および F_3 をとり、カゼインを基質とし上記の方法に従って種々の pH におけるプロテアーゼ活性を測定した。その結果を図 6 に示す。

F_1 区分の活性は pH 8~9, F_2 区分は 7~8.4, F_3 区分についてはとくに顕著な極大は認められず、pH 7.5~10 の間の幅の広い活性を示すことがわかった。

以上のことからこれらのプロテアーゼはいわゆるアイソザイムとみなされた。

3 結 言

従来、利用について余りかえりみられなかったと場廃水につい

て、加熱処理によって廃水中の大部分のタンパク質分を凝固沈殿させて上澄液と分離した。この上澄液は淡黄色透明であり、BOD も低くこのままで放流することも可能である。一方、加熱沈殿物を取り、これを放線菌培養の栄養源として利用し、菌体を分離するとともに培養口液からプロテアーゼを取得することができた。さらにこの粗プロテアーゼから 3 種類のアイソザイムを分別し、その pH~活性関係を明らかにした。かくしてと場廃水の無害化および有用成分の回収という積極的廃水処理の方式の基礎資料をうることができたものである。

(昭和 40 年 4 月、日本化学会第 18 年会講演)

本研究遂行に当って、東京都芝浦と場食肉衛生検査所の協力をえ、また放線菌について千葉大学腐敗研究所新井 正教授のご指導をえた。併せて謝意を表する。

この研究は昭和 41 年度文部省特定研究 (1)「有機質廃水の汚濁防止に関する研究」(代表者・水口 純)の一部である。

吸着剤表面における酵素の動態

(昭和 43 年 10 月 7 日受理)

木村 昭子・白崎 春海・宇佐美 昭次^{*1}

酵素をその活性を保ったまままで不溶化し、基質と反応させようとする考え方は、酵素の研究、利用という面から多くの利点を与えるものと考えられる。著者らはその方法の一つとして吸着剤に酵素を吸着させることによって、水に不溶性 complex を調製しているが、本報では被吸着酵素の動態を考察するために Michaelis 定数および最大速度を測定した。すなわち、酵素としては市販の糖化型アミラーゼを使用し、これを活性炭または酸性白土に吸着させて complex を調製し、これを種々な濃度の基質と反応させたところ、Michaelis 定数はいずれも native 酵素より増加し、最大速度は減少した。これにより、吸着剤表面の酵素はかなり構造上の変化を受けていることがわかった。また吸着剤の種類によって、基質と接触したときの被吸着酵素の溶離現象がかなり異なることを見出したが、この場合、酸性白土に吸着した酵素の顕著な溶離現象について、その溶離酵素が吸着時に水素イオン変性を受けることを推察した。ついで阻害剤を作用させて、Michaelis 定数および最大速度を native 酵素の場合と比較し、阻害機構の上から酵素の動態の解析を行なった。

1 緒 言

酵素は生細胞でつくられる一種の有機触媒で、その本体はタンパク質である。生細胞の特徴の一つは、その環境温度で複雑な反応を非常に速く進行させることができることで、細胞がなければこれらの反応はきわめて遅い。この見事な変化をつかさどるおもな因子が酵素なのである。

酵素は熱力学的に可能な反応を触媒し、反応の活性化エネルギーを低下させるという触媒としての根本的な性質は、一般の触媒とまったく同じであるが、タンパク質としての特性が触媒としての機能のうに決定的な影響を与えている。たとえば酵素タンパク質の解離状態は基質の解離状態とともに pH に鋭敏に左右されるため反応の最適域が存在する。またある温度範囲においてのみ作用し、それを超えると酵素タンパク質の変性の結果、触媒機能

を失う。このほか、タンパク質を変性させる有機溶媒、重金属の塩類などの作用で触媒作用を失うことが多いのである。

このような特異な性質を有する酵素も、その取扱い方となると一般の化学触媒とは著しく異なり、その反応は回分方式をとり、一反応ごとに多量の酵素を消費する。すなわち、酵素を水溶性の形として使用しているため、反応生成物の分離を行なおうとするならばその酵素を反応ごとに変性、失活させてしまわなくてはならない。そこでこの酵素を触媒活性を保持したまままで不溶化することができれば、酵素を一般の化学触媒と同様な取扱い方をすることができ、酵素の反復利用の可能性が開け、おおいに有利であろう。

酵素の不溶化の方法としては、酵素タンパク分子そのものに疎水性の官能基を導入するか、あるいは酵素を水不溶性の担体とむすびつけるといった考え方が基本となる¹⁾。著者らは吸着力のある担体に酵素を直接吸着させ、物理吸着による不溶性酵素に関し

^{*1} Akiko KIMURA, Harumi SHIRASAKI, Shoji USAMI 早稲田大学理工学部応用化学科：東京都新宿区西大久保。

1) 土佐, 千畑, 酸協, 25, 49 (1967)。