現場でいちいち ORP を測定するのは煩に耐えない。この煩しさを避けるには、まず胞子培養を heat shock 培養した後に 1 回移植した培養について、単位時間のガス出量(醗酵速度)と酸度曲線との関係を検するとよい。速度が最低酸度附近以後で最大ならば、もとの胞子培養は強壯としてよく、ガス放出が減酸期に入って急昇する最大放出期を頂って移植するとよい。必ずしも期間の短縮を望まず醗酵の安全を期するならば、ガス放出が最大になるまで待たず急昇したら移植するとよい。単位時間のガス出量が減酸初期もしくは最高酸度期前後に最大であれば、もとの胞子培養は弱性である。heat shock または単胞子分離や平面培養などによる選択によって強化するとよいが、そのまま使用するときには、酸度期に拘泥せずガス放出が最大になる時期を狙って移植するがよい。

総 括

Clostridium acetobutylicum 314 の培養で、移植によって醗酵期間が短縮し、更に移植を続けると逆に延長する現象を解明するため、(1) 胞子からの生育増殖が各種標準電位の redox dye 添加によって影響され、低単位(1部還元)のときだけ可能であること、(2) redox potential 低下性物質の添加によって培養の増殖期間が短縮されること、(3) 移植を重ねないいわゆる強い培養と移植を重ねた弱い培養とについて rH、酸度、pH、醗酵速度などの曲線を測り、培養の弱化によって rH 曲線と酸度曲線との関係がずれること、を確かめた。これら及び既報の諸結果に基づいて、移植に伴う醗酵期間の短縮と延長とを諸種の場合について考究して解明を試みた。

終りに御指導を戴いた山崎教授並びに菌株を分譲頂き御意見御鞭撻を戴いた東大坂口教授に深謝する。なお研究費の一部は文部省科学研究費による。

(1) 湯川又夫, 堀江重美 : 日本特許 95,788

(1932) : 本誌, 15, 609 (1939).

(2) 本江元吉 : 本誌, 24, 119 (1951).

(3) 本江元吉 : 本誌, 32, 29 (1958).

(4) 星野一雄 : 本誌, 19, 405 (1943).

(5) 本江元吉 : 本誌, 30, 758 (1956).

(6) 本江元吉 : 本誌, 30, 729 (1956).

紫外線照射に依る lysozyme の変性*

小幡弥太郎, 小 鹿 三 男 (北海道大学農学部農芸化学科)

昭和 32 年 7 月 19 日 受 理

緒 言

小幡, 坂村は先にトリプトファン及びチロシンが日光に依り非酵素的に分解することを認め、その光分解産物を分離、確認した⁽¹⁻³⁾。最近紫外線或は放射線に依る食品の照射殺菌が広く行われる様になって来たので、我々は先の研究を更に拡張し、蛋白質を紫外線等で照射した場合、蛋白質分子内に於けるこれらの含核アミノ酸が如何なる変化を受けるか、又蛋白質自体の性質がどの様に变化するかを検討するため本研究を開始した。今回は卵白より調製した、lysozyme を試料として用い、これに紫外線を照射した。その結果 lysozyme の溶菌作用は照射と共に減少し、硫化水素、システインなどの還元剤に依り賦活されず、構成アミノ酸中チロシン、ヒスチジンに比ベトリプトファンの分解が著しいことが判った。又紫外部吸収スペクトルも照射と共に変化し、特に 280.5 μ ^(4,5)に於ける吸光係数は著しく減少する。この減少は主としてトリプトファンの分解に依るもので、トリプトファンが溶菌作用に何等かの関係を有するものと思われる。

実験及び結果

Lysozyme は G. Alderton 及び H.L. Fevold の直接結晶法⁽⁶⁾にしたがって卵白より調製し、三度再結晶を行った等電結晶を使用した。この lysozyme を M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解した。照射濃度は特に断らぬ限り全実験を通じ 0.5% 溶液で行った。

紫外線照射は光源として島津製水銀太陽燈を用い、約 20 cm の距離より照射した。照射中蛋白質溶液の温度は 15° 以下であった。この光源を用いた場合オゾンが発生し、このオゾンに依る酸化作用の影響も考えられるので、蛋白質溶液をシャーレに入れ空気に接触させて照射した場合(以下直接照射と記す)と、ベックマン型光電

* Denaturation of lysozyme by ultraviolet irradiation. By Yataro OBATA and Mitsuo KOSHIKA. (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo)

分光光度計の石英セルに試料を充填し空気を遮断して照射した場合（以下石英濾光照射と記す）に分けて実験を行った。後者の場合同じ容器に試料を入れ窒素ガスで空気を置換し照射して見たが結果は置換しないものと同じであったので以下の実験も窒素ガスに依る置換は行わなかった。

Lysozyme の溶菌作用は Boasson の改良法⁽⁴⁾にしたがって測定した。即ち *Micrococcus lysodeikticus* を 2% グルコースを含む肉汁寒天培地で 37°, 24 時間培養後集菌し、フェノールで殺菌、蒸留水で繰り返し洗浄次に M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で三度洗浄後遠心分離し、再び同じ緩衝液に懸濁し、1 cm のセルを使用、530 mμ のフィルターで透過度 20% とする。この懸濁液 5 ml に等量の lysozyme 溶液を加え 25° に 15 分保持後透過度を測定、標準曲線より酵素作用を決定した。第 1 図はその標準曲線の 1 例を示したものである。標準曲線は培養毎に作製し、又読み

第 1 図 酵素作用測定標準曲線

第 2 図 照射による溶菌作用の変化

—○—○— : 直接照射
—×—×— : 石英濾光照射

養毎に作製し、又読みは各 5 回の平均値をとった。

紫外線吸収スペクトルは照射液を M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で稀釈し、同じ緩衝液を対照としてベックマン型光電分光光度計で測定した。

アミノ酸の定量法は

トリプトファンは J. R. Spies の方法⁽⁷⁾にしたがい、照射液について直接定量し、反応時間は 13 時間とした。チロシン、ヒスチジンは照射液を 7N 硫酸で 10 時間加水分解後、チロシンは J. W.

H. Lugg の方法⁽⁸⁾、ヒスチジンは H. F. Macpherson の方法⁽⁹⁾で夫々定量した。

I. 照射に依る溶菌作用の変化 照射液を緩衝液で 1~5 γ/cc 程度の lysozyme を含む如く稀釈し、前記方法で溶菌作用を測定した。照射時間と溶菌作用の変化の関係は第 2 図に示した。直接照射、石英濾光照射いずれの場合でも、照射と共に溶菌作用が次第に失われるのが見られ、直接照射では約 6 時間、石英濾光照射では約 13 時間照射後完全に失活する。後者に比べ直接照射に於て溶菌作用の失活する速度が大なのは、直接照射では紫外線の影響の他にオゾンの酸化作用が加わっているためと考えられる。

II. 照射に依る紫外外部吸収スペクトルの変化 紫外外部吸収スペクトルは直接照射、石英濾光照射共大差は認

第 3 図 (A) 照射に依る紫外外部吸収スペクトルの変化。石英濾光照射、M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2)

1: 無照射, 2: 6.5 時間照射, 3: 12 時間照射

第 3 図 (B) 照射に依る紫外外部吸収スペクトルの変化。直接照射 (照射濃度 50 mg/100 cc)

1: 無照射, 2: 1.5 時間, 3: 4 時間

められなかった。その一部を第 3 図 (A) 石英濾光照射 (B) 直接照射に示した。直接照射の場合は照射濃度

50 mg/100 cc で行ったものを記載した。いずれの場合でも照射と共に 252 m μ に於ける谷はやや長波長の方
向に移動し、吸収は増加する。更に 295 m μ 附近より長波長の部分の吸収も照射と共に増加する傾向が認められ
る。これに反して 265 m μ ~295 m μ 間の吸収は照射と共に減少し、特に 280.5 m μ に於けるピークの減少は著
しく、直接照射の場合 (第 3 図, B) では 4 時間照射後 280.5 m μ に於けるピークは完全に消失し、265 m μ 附
近に新しく小さなピークが生ずるのが認められた。

III. 照射に依るアミノ酸含量の変化 構成アミノ酸中トリプトファン, チロシン, ヒスチジンにつきその含
量の変化を調べた。その結果は第 4 図 A: (直接照射) 及び B: (石英濾光照射) に示した。

第 4 図 (A) 照射に依るアミノ酸含
量の変化, 直接照射.

—○—○—: トリプトファン, —×—×— チロシン
—□—□—: ヒスチジン.

第 4 図 (B) 照射に依るアミノ酸含量の
変化, 石英濾光照射.

—○—○—: トリプトファン
—×—×—: チロシン
—□—□—: ヒスチジン

直接照射の場合, 定量した 3 種のアミノ酸含量は程度の差はあ
るがいずれも照射と共に減少する。特にトリプトファンは照射直
後より分解が始まり 6 時間後では約 90% が分解されている。こ
れに対し, チロシン, ヒスチジンは 30 分照射では影響なく以後
やや減少し, 6 時間照射後ではチロシンは約 40%, ヒスチジンは
約 20% 分解するのみである。一方石英濾光照射ではトリプトファ
ンのみが減少し, 溶菌作用が完全に消失する 13 時間照射後では
約 50% 分解されるが, チロシン, ヒスチジンはこの時間でも全然
分解されていないことが判った。

IV. 失活した溶菌作用に対する還元剤の影響 0~80% の溶
菌作用を有する lysozyme 溶液をシステイン及び硫化水素で処
理したが, これらの還元剤に依り溶菌作用は復活されなかった。

(第 1 表)

V. 紫外線照射のペプチド結合に対する影響 紫外線照射に
依り蛋白質のペプチド結合が切断されるかどうかを調べるため,
S. Moore 及び W. H. Stein⁽¹³⁾ のニンヒドリン比色法に依りアミ
ノ基の定量を行った。lysozyme の他 α -カゼインの紫外線照射
液についても同様に行ったがアミノ基の増加は認められなかった。

第 1 表 溶菌作用に対する還
元剤の影響

	溶菌作用	
	無処	理
システイン処理	0%	80%
硫化水素処理	0%	75%
	0%	80%

Lysozyme は補欠分子簇を持た

ぬため, その触媒作用は分子内の
アミノ酸配位に依るものと推定さ
れたが, 事実この仮説は Fraenkel

—Conrat⁽¹⁰⁾ の沃度酸化の研究から, 溶菌作用に不可欠な原子団は
アミノ基, カルボキシル-アミド基, グアニジル基, 脂肪族水酸

基及びヒスチジンのイミダゾール基が関与するものと論証された。又トリプトファンの役割については, Dickman⁽¹¹⁾, Weil⁽⁶⁾, 前川⁽¹²⁾ 等が夫々報告している。

我々は lysozyme に紫外線を照射した場合, その溶菌作用が照射と共に減少し, 直接照射では 6 時間, 石英濾
光照射では 13 時間の照射で完全に失活することを認めた。構成アミノ酸中, トリプトファン, チロシン, ヒス
チジンの三者につき, 照射に依るその含量の変化を調べたが, 直接照射の場合溶菌作用が完全に消失する 6 時間
照射後, トリプトファンは約 90%, チロシンは 40%, ヒスチジンは 20%, 夫々分解されていた。これに反し,
石英濾光照射の場合では, チロシン, ヒスチジンは 13 時間照射後でも変化なく, トリプトファンは約 50% 分
解されている。この差はチロシン, ヒスチジンの照射に依る分解速度がトリプトファンに比べて遅く, 直接照射
の場合見られるチロシン, ヒスチジンの減少や, 石英濾光照射の場合に比ベトリプトファンの減少率が大きなのは
主として空気存在に依り発生したオゾンの酸化分解作用が加わっているためと解せられる。又直接照射の場合,
石英濾光照射に比べ溶菌作用が急速に減少するのはトリプトファンの分解と共に溶菌作用に関与すると言われ
るヒスチジンの分解が同時に起っているためと考えられる。

照射と共に紫外外部吸収スペクトルは変化し, 特に 280.5 m μ に於けるピークの著しい低下が認められた。蛋白

質のこの部分に於ける吸収はトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン残基の吸収の和に依るものであるが、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン溶液を夫々単独で紫外線照射した場合、トリプトファン溶液の吸収は減少し、チロシン、フェニルアラニンでは吸収が増加すること^(14,15,16) 及びトリプトファンに比べチロシン含量の高い蛋白質例えば α -casein を照射した場合にはその紫外吸収スペクトルが全般的に上昇する事実⁽¹⁷⁾ から考えて、lysozyme の如くトリプトファン含量 (10.6%) がチロシン (3.58%)、フェニルアラニン (3.12%) 含量に比べて高い⁽¹⁸⁾ 蛋白質ではその紫外吸収スペクトルの変化はトリプトファンの分解に帰因するものと結論される。

又ニヒドリン比色法に依りアミノ基の増加が認められなかった点より紫外線に依り蛋白質中のペプチド結合は恐らく切断されぬものと推論するに至った。

要 約

(1) Lysozyme 溶液を紫外線照射した場合、その溶菌作用は酸素の存在の有無に拘らず失活し、還元剤処理に依っては復活しなかった。

(2) トリプトファンは直接照射、石英濾光照射いずれの場合でも分解されるが、チロシン及びヒスチジンは直接照射の場合のみ分解を受けその減少率もトリプトファンに比べ小である。

(3) 紫外吸収スペクトルは照射と共に変化し特に 280 m μ に於けるピークの減少は著しい。これはトリプトファン分解に帰因するものである。

終りに臨み *Micrococcus lysodeikticus* を分譲された愛媛大学農学部前川教授及び lysozyme の結晶母を供与された大阪大学理学部赤堀研究室に深謝致します。

尚本研究は日本農芸化学会昭和 32 年 4 月の大会で講演したものである。

(1) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 : 本誌, 27, 769 (1953).	27, 109 (1950).
(2) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 : 本誌, 28, 767 (1954).	(11) S. R. Dickman, A. C. Crockett : <i>J. Biol. Chem.</i> , 220, 957 (1956).
(3) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 : 本誌, 29, 616 (1955).	(12) K. Maekawa, M. Kushibe : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 19, 28 (1955).
(4) L. W. Wetter : <i>J. Biol. Chem.</i> , 192, 237 (1951).	(13) S. Moore, W. H. Stein : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 367 (1948).
(5) L. Weil, A. R. Buchert, J. Meher : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 40, 245 (1952).	(14) A. C. Giese, H. L. Leighton, R. Bailey : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 40, 71 (1952).
(6) G. Alderton, H. L. Fevold : <i>J. Biol. Chem.</i> , 164, 1 (1946).	(15) D. J. McLean, A. C. Giese : <i>J. Biol. Chem.</i> , 187, 537 (1950).
(7) J. R. Spies, D. C. Chambers : <i>Anal. Chem.</i> , 21, 1249 (1949).	(16) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 : 日農化北海道支部会講演, 昭和 31 年 11 月.
(8) J. W. H. Lugg : <i>Biochem. J.</i> , 31, 1422 (1937).	(17) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 : 日農化大会講演, 昭和 32 年 4 月.
(9) H. T. Macpherson : <i>Biochem. J.</i> , 36, 59 (1942), 40, 470 (1946).	(18) J. C. Lewis, N. S. Snell, D. J. Hirshmann, H. Fraenkel-Conrat : <i>J. Biol. Chem.</i> , 186, 23 (1950).
(10) H. Fraenkel-Conrat : <i>Arch. Biochem.</i> ,	