



| | |
|---------------------|---|
| Title | 乳酸菌の酸性ウレアーゼの性質とその応用に関する研究 |
| Author(s) | 柿本, 茂八 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 乙第3937号 |
| Issue Date | 1991-06-28 |
| DOI | https://doi.org/10.11501/3085856 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/49672 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | 000000242528.pdf |



乳酸菌の酸性ウレアーゼの性質とその応用に関する研究

柿本茂八

①

目次

乳酸菌の酸性ウレアーゼの性質と
その応用に関する研究

1 9 9 1

柿本 茂八

目次

| | ページ |
|--|-----|
| 第1章 緒論 | 1 |
| 第1節 酒質の保全と矯正 | 1 |
| 第2節 ウレタンの問題点と本研究の目的 | 1 |
| 第2章 酸性ウレアーゼ生産菌の検索と分類 | 4 |
| 第1節 緒言 | 4 |
| 第2節 実験材料および方法 | 4 |
| 第3節 実験結果および考察 | 7 |
| 1 酸性ウレアーゼ生産菌の分離と検索 | 7 |
| 2 酸性ウレアーゼ生産菌の分類 | 8 |
| 3 <u>Streptococcus</u> 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌 の菌学的同定 | 11 |
| 4 <u>Lactobacillus</u> 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌 の菌学的同定 | 14 |
| 5 保存細菌菌株からの検索 | 17 |
| 第4節 要旨 | 19 |
| 第3章 酸性ウレアーゼの多様性 | 20 |
| 第1節 緒言 | 20 |
| 第2節 実験材料および方法 | 20 |
| 第3節 実験結果および考察 | 22 |
| 1 電気泳動法による分析 | 22 |
| 2 分子量 | 28 |
| 3 等電点 | 28 |
| 4 酵素活性および安定性におよぼす pHと温度の影響 | 30 |
| 第4節 要旨 | 31 |

| | ページ |
|--|-----|
| 第4章 <u>Lactobacillus</u> 属および <u>Streptococcus</u> 属細菌 | 32 |
| 由来の酸性ウレアーゼの性質 | 17 |
| 第1節 緒言 | 32 |
| 第2節 実験材料および方法 | 32 |
| 第3節 実験結果および考察 | 37 |
| 1 酸性ウレアーゼの精製 | 37 |
| 2 精製酵素の単一性 | 39 |
| 3 分子量 | 39 |
| 4 等電点 | 42 |
| 5 金属分析 | 42 |
| 6 アミノ酸組成 | 42 |
| 7 基質特異性 | 45 |
| 8 酵素活性および安定性におよぼす pHと温度の影響 | 45 |
| 9 阻害剤 | 45 |
| 10 K_m 値および V_{max} 値 | 50 |
| 11 サブユニットの分取 | 50 |
| 12 サブユニットのアミノ酸組成 | 53 |
| 13 サブユニットのN末端アミノ酸配列 | 53 |
| 第4節 要旨 | 56 |
| 第5章 酸性ウレアーゼの生産 | 57 |
| 第1節 緒言 | 57 |
| 第2節 実験材料および方法 | 57 |
| 第3節 実験結果および考察 | 59 |
| 1 炭素源および窒素源の影響 | 59 |
| 2 尿素による酵素生産の誘導効果 | 63 |
| 3 ニッケルとマンガンの相乗効果 | 63 |

| | ページ |
|-----------------------|-----|
| 第1章 緒論 | |
| 4 炭酸ガスおよび窒素ガスの影響 | 67 |
| 5 培養温度 | 67 |
| 6 培養pH | 67 |
| 7 典型的な培養条件下の培養経過 | 72 |
| 第4節 要旨 | 74 |
| 第6章 アルコール飲料中の尿素除去への応用 | 75 |
| 第1節 緒言 | 75 |
| 第2節 実験材料および方法 | 75 |
| 第3節 実験結果および考察 | 77 |
| 1 酸性ウレアーゼの清酒中での安定性 | 77 |
| 2 清酒中の尿素除去におよぼす温度の影響 | 77 |
| 3 清酒中の尿素除去におよぼすpHの影響 | 79 |
| 4 清酒中の尿素除去におよぼす酵素量の影響 | 79 |
| 5 尿素除去とウレタンの生成抑制 | 79 |
| 6 変異原性試験 | 82 |
| 7 急性毒性試験 | 84 |
| 第4節 要旨 | 85 |
| 第7章 総括 | 86 |
| 謝辞 | 90 |
| 引用文献 | 91 |

第1章 緒論

第1節 酒質の保全と矯正

酒質は、きき酒で色沢（色の濃さ、浮遊物の有無）、香り、味を検査し、化学的、物理的方法でアルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度、着色度、糖分、pH、濁度を測定することによって管理される⁽¹⁾。

一定の品質に管理された製品を市場に供給することは、生産管理上極めて重要であるので、酒質の保全あるいは矯正に関する研究は数多くなされてきた。

清酒の色沢および着色度は、仕込水の鉄の濃度によって左右されるのでこれを活性炭もしくはイオン交換樹脂で処理してその混入を防ぐことができる⁽²⁾。また仕込米、こうじ、酵母などに由来するフラビン系色素⁽³⁾、貯蔵熟成時に形成されるメラノイジン⁽⁴⁾も共に着色の原因とされているので、製品としての清酒を活性炭で処理することによってこれらを除去することができる。

濁りは乳酸菌（火落菌）の繁殖によって生じるので、火入れ（60℃、10分間）をすることによって防止される⁽²⁾。また混濁する蛋白成分（白ボケ）の除去（おり下げ）にはタンニンとゼラチンによる凝固沈殿を利用する方法⁽⁵⁾と、酸性プロテアーゼによる澄清法⁽⁶⁾とがある。

香りはジアセチル⁽⁷⁾（つわり香）と、3-ヒドロキシ-4,5-ジメチル-2(5H)-フラン⁽⁸⁾（ひね香）の濃度によって左右されており、ともに活性炭で処理することによって除去することができる。

着色、香りは尿素によっても影響を受け、加熱殺菌および長期間の貯蔵時に、高濃度の尿素が、着色増加および香味劣化をひきおこすことが知られている⁽⁹⁾。

これらのほかにも、酒質あるいは酒質の保全と矯正に関しては、種々の観点から数多くの研究がなされてきたが、尿素については上記した例が知られているくらいであり、尿素もしくはウレタンと酒質の関係に関する研究は、ほとんどなされてこなかった。

第2節 ウレタンの問題点と本研究の目的

ウレタンの発癌性に関する報告が最初になされたのは 1943 年であり、ウレタンをマウスに 1 週間おきに注射することにより、肺腺腫が認められた⁽¹⁰⁾。これ以後、ウレタンの発癌性が数多く証明されてきた。ウレタンをマウスの皮膚に塗布することによっても肺腺腫⁽¹¹⁾が、またウレタンの経口投与⁽¹²⁾もしくは皮膚塗布⁽¹³⁾により、乳頭腫が発生した。更に、ウレタンの注射により、悪性リンパ腫⁽¹⁴⁾、肝癌⁽¹⁵⁾、乳癌⁽¹⁶⁾が認められた。以上のように、ウレタンは実験動物で発癌性を示す事が明らかにされてきた。

一方、ウレタンの定量に関しては、ガスクロマトグラフィーによる測定方法⁽¹⁷⁾が 1974 年に報告された。Ough⁽¹⁸⁾はその方法を改良し、各種アルコール飲料中のウレタン含量を測定した。この結果、日本酒に 170 ppb、ワインに 6 ppb、ビールに 1 ppb のウレタンが含まれることが明らかとなり、市販のアルコール飲料中のウレタン含量の規制に目が向けられ始めた。

カナダ政府は 1980 年に、まずワイン中のウレタン含量に対する規制値を定め、その後、他のアルコール飲料についてもウレタンの規制値を定めた。それによると、ウレタンの含有許容値は、テーブルワイン（アルコール 14% 以下）30 ppb、フォーティファイドワイン（デザートワイン、清酒もこれに該当）100 ppb、スピリット（ウイスキー、ウォッカ等）150 ppb、果実ブランディー（リキュール類）400 ppb 以下であった。これらの規制値が定められたことにより、アルコール飲料中のウレタンの含量を低減させる方法の開発が、重大な関心事となってきた。

ウレタンの生成原因としては、ウレタン ($\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$) の構造から推定して、アルコール飲料中に高濃度に含まれるエチルアルコールが生成に関与することが推定できる。一方の反応化合物は、微量に混入しているカルバモイル基 ($\text{NH}_2\cdot\text{CO}-$) を持つ化合物であり尿素、カルバミルリン酸、シトルリン等が推定された。これらの中で尿素は、尿素サイクルによってアルギニンから主に酵母によって生成されること、また核酸最終代謝産物として蓄積することが推定され、事実酒類中に多量に含まれることが報告されていた⁽⁹⁾。ウレタンが尿素とエチルアルコールとから式 $\{(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \rightleftharpoons \text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 + \text{NH}_3\}$ に従って合成⁽¹⁹⁾されることはすでに知られており、ウレタンの生成を阻止するためには基質である尿素を除去すればよいと考えられた。

アルコール飲料中の尿素の除去方法としては、ナタ豆あるいはバクテリア由来の中性ウレアーゼを用いて式 $\{(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2\}$ に従って分解する方法⁽⁹⁾が提案されていた。しかしながら、これらの中性ウレアーゼは、通常酸性であるアルコール飲

料中で短時間で失活⁽⁹⁾してしまう。したがって中性ウレアーゼを用いてアルコール飲料中の尿素を分解除去するためには、酵素を大量に使用する必要があり、工業的な立場から考えて実用的なものではない。そこで、この問題点を解決する方法として、酸性域に至適反応pHを有するウレアーゼの適用を考えた。本ウレアーゼの使用により、酸性域における酵素活性の増大が期待でき、また少量の酵素の使用によってアルコール飲料中の尿素の除去、ひいては、ウレタンの生成も抑制されるものと考えられる。

酸性域に至適pHを有するウレアーゼが最初に報告されたのは1976年である。すなわち、Moreauら⁽²⁰⁾は、ネズミの腸管における尿素分解菌を調査する過程で、*Lactobacillus* 属細菌由来のウレアーゼの至適反応pHが3であることを明らかにした。更にSuzukiら⁽²¹⁾は、人の腸内嫌気菌の分布を調べている時に分離された、*Lactobacillus fermentum* 由来のウレアーゼの至適反応pHが4であることを報告し、本酵素を酸性ウレアーゼと命名している。しかしながら、上記した2つの報告は共に腸内細菌のフローラを主題にした研究であるために、ウレアーゼを酵素学的にあるいは蛋白化学的に詳しく調べた研究内容ではなく、ウレアーゼの至適反応pHも菌体抽出液を使用して測定されているにすぎなかった。

筆者らはこのような背景のもとに、酸性ウレアーゼを、酒質保全剤として実用化することを目的にして研究に着手した。酸性ウレアーゼを醗酵生産して、酒質保全剤として実用化するためには、適切な酸性ウレアーゼ生産菌を自然界および保存菌株から検索し生産菌を分類すること、これら生産菌由来の酸性ウレアーゼの性質を明らかにすること、工業的規模で酸性ウレアーゼを製造するための方法を確立すること、アルコール飲料中における酸性ウレアーゼの尿素の除去効果を明らかにすること、などが必要である。

本論文は、このような考え方に従って行われた一連の研究⁽²²⁻²⁷⁾をまとめたものである。

第2章 酸性ウレアーゼ生産菌の

検索と分類

第1節 緒言

通常酸性であるアルコール飲料中の尿素を除去するためには、酸性域に至適反応pHを有し、酸性条件下で酵素活性を安定に保持する酸性ウレアーゼの適用が有効と考えられる。このような酸性ウレアーゼは、酸性条件下で生育する微生物が生産する可能性が高いと推定される。酸性条件下にある微生物の分離源としては、醗酵食品、酸性温泉、酸性鉱石排水、あるいは動物の胃と胃に近い消化管内容物などが考えられる。これらの中で、試料入手の容易さをもとに、動物消化管内容物を検索の対象とすることにした。また、それ自体は必ずしも酸性ではないが、酸性条件下で生育した微生物の含有が推定される糞便も同様に検索の対象とした。更に、保存菌株のうち酸性条件下でよく生育する乳酸菌も検索の対象に加えた。次に、このように検索して得られた酸性ウレアーゼ生産菌の分類を行ったので以下に詳述する。

第2節 実験材料および方法

1. 材料

BL培地は栄研化学(株)から、LBS培地はBBL Microbiology Systems, U.S.A.からGAMブイヨン培地は日水製薬(株)から購入した。

2. 菌株の分離

菌株の分離は、光岡⁽²⁸⁾の方法に従い、分離用培地の組成は以下のとおりである。BL培地⁽²⁹⁾の組成は、0.3%(w/v)肉エキス、0.5%(w/v)肝臓エキス、0.5%(w/v)酵母エキス、1%(w/v)ペプトン、0.5%(w/v)トリプトン、0.3%(w/v)ソイペプトン、0.05%(w/v)可溶性デンプン、1%(w/v)グルコース、0.1%(w/v)リン酸2カリウム、0.1%(w/v)リン酸1カリウム、0.02%(w/v)硫酸マグネシウム、0.001%(w/v)塩化ナ

トリウム, 0.00067%(w/v) 硫酸マンガン, 0.05%(w/v) L-システイン塩酸塩, 0.001%(w/v) 硫酸第 1 鉄, 0.1%(w/v) ポリソルベート 80, 1.5%(w/v) 寒天 (pH 7.2) である。LBS培地⁽³⁰⁾の組成は, 1%(w/v) カゼイン, 0.5%(w/v) 酵母エキス, 0.6%(w/v) リン酸 1 カリウム, 0.2%(w/v) クエン酸アンモニウム, 0.1%(w/v) ポリソルベート, 2%(w/v) デキストロース, 2.5%(w/v) 酢酸ナトリウム, 0.058%(w/v) 硫酸マグネシウム, 0.012%(w/v) 硫酸マンガン, 0.0034%(w/v) 硫酸第 1 鉄, 1.5%(w/v) 寒天 (pH 5.5) である。TATAC培地⁽³¹⁾の組成は, 1.5%(w/v) ペプトン, 1%(w/v) トリプトン, 1%(w/v) 酵母エキス, 0.1%(w/v) シュークロース, 0.1%(w/v) エスクリン, 1.6%(w/v) 寒天 (pH 7.7) である。

ブタおよびニワトリを解剖したのちに, 直ちに胃, 十二指腸の内容物を採集し実験に供した。また, 糞便は, マウス, ブタ, ニワトリ, ラット, ウサギ, モルモット, サル, イヌ, ネコ, ヒトから新鮮なものを採集し, 菌株分離源として使用した。これら動物消化管内容物および糞便約 100 mg を, 100 ml の滅菌水に懸濁した。この試料液の適当な希釈液約 0.1 ml を, 嫌気性細菌用培地であるBL培地平板 (直径 9 cm のペトリ皿), *Lactobacillus* 属細菌選択培地であるLBS培地平板, および *Streptococcus* 属細菌選択培地であるTATAC培地平板に塗抹した。BLおよびLBS培地平板は, 三洋電機特機(株)製 MIP-1025 型嫌気培養槽で, TATAC培地平板は, ヤマト科学(株)製 IC-43 型恒温培養器で好気条件下 37 °C で 48 時間培養した。生じた集落を分離株として以下の実験で使用した。

3. 酸性ウレアーゼ生産菌の検索

酸性検索培地の組成は, 1.0%(w/v) 尿素 (汙過除菌), 4.2%(w/v) LBS培地, 0.001%(w/v) プロモクレゾールパープル, 0.75%(w/v) 寒天 (pH 5.5) である。中性検索培地の組成は, 1.0%(w/v) 尿素 (汙過除菌), 3.0%(w/v) BL培地, 0.001%(w/v) フェノールレッド, 0.75%(w/v) 寒天 (pH 7.0) である。

酸性ウレアーゼ生産菌を検索するために, 分離株を酸性および中性検索培地平板 (96 穴組織培養シャーレ) に塗抹後, 好気および嫌気条件下で 37 °C で 24~72 時間培養した。尿素分解で生成するアンモニアに起因する pH 指示薬の色調変化を, 検索の指標にした。酸性検索培地に含まれる pH 指示薬の色調を変化させ, 中性培地の色調を殆ど変化させない分離株は, 酸性域で活性が強く, 中性域で活性の弱いウレアーゼ, すなわち酸性

ウレアーゼを生産していると考えられる。

4. 分離株の液体培養

分離株は、試験管 (16 x 150 mm) に分注した 10 ml の液体培地 (A培地) に接種して、37 °C で 48 時間静置培養した。本液体培地 (A培地) 組成は、3.0%(w/v) グルコース (別滅菌)、0.2%(w/v) 酢酸ナトリウム、1.5%(w/v) ペプトン、1.0%(w/v) 肉エキス、0.8%(w/v) 酵母エキス、0.5%(w/v) 塩化ナトリウム、0.5%(w/v) 尿素、0.005%(w/v) 硫酸マンガン 4~5 水和物および 0.005%(w/v) 硫酸ニッケル 6 水和物である。A培地で分離株の生育が悪い場合には、嫌気性菌用培地である GAMブイオン培地⁽³²⁾ に 0.005%(w/v) 硫酸マンガン 4~5 水和物および 0.005%(w/v) 硫酸ニッケル 6 水和物を加えた培地で静置培養に供した。なお GAMブイオン培地の組成は、0.5%(w/v) 酵母エキス、0.5%(w/v) 肝臓エキス、1%(w/v) トリプチカーゼ、1%(w/v) ペプトン、0.3%(w/v) 肉エキス、0.3%(w/v) 塩化ナトリウム、0.25%(w/v) リン酸 2 ナトリウム、0.5%(w/v) 可溶性デンプン、0.03%(w/v) ソディウムチオグリコレート、0.25%(w/v) グルコース (pH 7.3) である。

分離株の培養終了液を 2 ml ずつ小分けして -80 °C で凍結し、この凍結液を保存培養液として以後の実験に供した。

5. 菌体懸濁液と上清の調製

培養液を遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) して、沈渣 (菌体) と上清に分けた。菌体は蒸留水に懸濁し遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) することによって 2 回洗浄し、蒸留水に懸濁した。菌体懸濁液と上清液を適当に希釈して実験に供した。

6. ウレアーゼ活性の測定

酵素活性は、尿素を基質として生成するアンモニアを比色法で測定した。酸性下のウレアーゼ活性を測定するためには、0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4) を、中性下の活性測定には、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7) を、アルカリ性下の活性測定には、0.2 M グリシン緩衝液 (pH 9) を使用した。

0.2 M 緩衝液に溶解した 167 mM 尿素溶液 2 ml に、酵素液 2 ml を添加して、37 °C で 15 分間反応させた。4 ml の 10%(w/v) トリクロル酢酸を添加して反応を停止さ

せたのち、生成した沈殿を遠心分離 (2,000 x g, 10 分間) によって除去した。反応液中のアンモニアをニトロプルシッドを発色試薬とする比色法⁽³³⁾ で定量した。上記条件下において1分間あたり 1 μmol のアンモニアを生成する酵素量を 1 ユニットと定めた。

7. 菌の同定

使用した培地、観察方法、試験方法は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1⁽³⁴⁾, Vol. 2⁽³⁵⁾ および Manual for the Identification of Medical Bacteria⁽³⁶⁾ に従った。

L- および D- 乳酸は、乳酸脱水素酵素の作用で生成する還元型補酵素の量的変化を分光光度計で測定することにより定量した⁽³⁷⁾。

DNAは、Saitoらの方法⁽³⁸⁾ で菌体抽出液中の蛋白質をソディウムドデシルスルフェート (SDS) と、フェノールで変性して遠心分離したのちに、上清から調製した。DNA塩基組成 (グアノシン+シトシン [G+C] 含量) は、DNAの加熱融解時に増加する吸光度 (260 nm) を、2600 型分光光度計 (Gilford Instrument Laboratories, U. S. A.) で測定することにより定量した⁽³⁹⁾。

細胞壁は、菌体を超音波破碎したのちに遠心分離し、沈渣を 2 % (w/v) 水酸化カリウム-エタノール溶液とトリプシンで分解して調製した⁽⁴⁰⁾。ペプチドグリカンのアミノ酸組成は、一次元の溶媒としてイソプロピルアルコール: 酢酸: 水 (75 : 10 : 15, v/v) を、二次元の溶媒としてメタノール: ピリジン: 10 N 塩酸: 水 (4 : 8 : 2 : 14, v/v) を使用する二次元薄層クロマトグラフィー⁽⁴¹⁾ で分析した。

第3節 実験結果および考察

1. 酸性ウレアーゼ生産菌の分離と検索

表 2-1 に示すように、10 種類の動物の糞便および 2 種類の動物の消化管内容物を BL, LBS および TATAC 培地で好気および嫌気条件下で培養し、16,324 株の細菌を分離した。

これらの分離株を、尿素と色素を含む酸性および中性検索用平板上で、37 °C で 24 ~ 72 時間培養した。その結果、供試分離株 16,324 株のうち 700 株は、酸性検索用平板

上でのみ尿素を分解していると考えられ、中性平板上では尿素を分解していないものと考えられた。よって、これら 700 株は酸性域に至適反応 pH を有する酸性ウレアーゼ生産菌と推定される。

この点を、更に確認するために、これら 700 株の液体培養物について、酸性、中性およびアルカリ性緩衝液中で、ウレアーゼ活性を測定した。

まず、培養物を遠心分離して得た沈渣の活性、すなわち菌体内ウレアーゼ活性を表 2-2 に示す。全 700 株は、pH 4 の緩衝液中ではウレアーゼ活性を示したが、pH 9 では検出限界以下であり、活性は認められなかった。pH 7 の緩衝液中では 614 株が検出限界以下の活性であり、86 株が微弱な活性を示した。この 86 株の酵素活性はいずれの場合も、pH 7 より pH 4 における活性の方が強かった。このように、700 株すべてが、酸性域に至適反応 pH を有するウレアーゼを菌体内に蓄積していることが判明した。

一方、培養物を遠心分離したのちの上清の活性、すなわち菌体外ウレアーゼ活性が認められた株は、1 株であった。本株の菌体外ウレアーゼ活性は、pH 4 の緩衝液中で 0.4 units/ml、pH 7 と 9 で <0.05 units/ml であった。また本株は菌体内にも酸性ウレアーゼ活性を示し pH 4 の緩衝液中で 1.1 units/ml であった。

以上の結果、液体培養においても 700 株すべてが酸性ウレアーゼを生産していることが確認できた。また、菌体外酵素の産生株は 1 株であり、大部分の酸性ウレアーゼは菌体内酵素であった。

2. 酸性ウレアーゼ生産菌の分類

これら 700 株の酸性ウレアーゼ生産菌は、その形態的、生理的諸性質に基づき 6 グループに区分された (表 2-3)。

グループ I に区分された 370 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 53% に相当) は、グラム陽性、カタラーゼ陰性、非運動性の二連または連鎖状球菌であり、グルコースからホモ型醗酵で乳酸を生成することから Streptococcus 属の菌種に帰属された。

グループ II の 6 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 0.9% に相当) は、グラム陽性、カタラーゼ陽性、非運動性の二連または房状の球菌で、グルコースから酸を生成するが、ガスを生成しないことから Staphylococcus 属の菌種に帰属された。

グループ III の 312 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 45% に相当) は、グラム陽性、カタラーゼ陰性、非運動性の桿菌であり、グルコースからホモ型もしくはヘテロ型醗酵で

Table 2-1. Isolation of Acid Urease-Producing Bacteria

| Origin | Material | Number of bacteria | |
|------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | | Isolated | Acid urease positive |
| Mouse | Feces | 929 | 70 |
| Pig | Feces and intestines | 5,116 | 443 |
| Chicken | Feces and intestines | 5,961 | 1 |
| Rat | Feces | 1,036 | 122 |
| Rabbit | Feces | 188 | 0 |
| Guinea pig | Feces | 370 | 62 |
| Monkey | Feces | 250 | 2 |
| Dog | Feces | 202 | 0 |
| Cat | Feces | 272 | 0 |
| Man | Feces | 2,000 | 0 |
| | Total | 16,324 | 700 |

Table 2-2. Effect of pH on Urease Activities

| pH of buffer* | Number of bacteria | | | |
|---------------|----------------------------|------|------|------|
| | Urease activity (units/ml) | | | |
| | <0.05 | ~1.0 | ~2.0 | ~3.0 |
| 4 | 0 | 501 | 182 | 17 |
| 7 | 614 | 86 | 0 | 0 |
| 9 | 700 | 0 | 0 | 0 |

* Buffers used were 0.2 M citrate buffer (pH 4), 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7) and 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 9).

Table 2-3. Taxonomic Properties of Acid Urease-Producing Bacteria

| Group | Properties ^a | | | | | | Number of bacteria | Identifi- cation |
|-------|-------------------------|----------------|----------------|---------------------|----------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | Cell morphology | Gram stain | Motility | Gas from glucose | Catalase | Phenylalanine deaminase | | |
| I | Cocci | + ^b | - ^b | - | - | ND ^b | 370 | <u>Streptococcus</u> |
| II | Cocci | + | - | - | + | ND | 6 | <u>Staphylococcus</u> |
| III | Rods | + | - | D ^b | - | ND | 312 | <u>Lactobacillus</u> |
| IV | I. Rods ^c | + | - | - | - | ND | 1 | <u>Bifidobacterium</u> |
| V | Rods | - | + ^d | + | + | - | 9 | <u>Escherichia</u> ^e |
| VI | Rods | - | + ^d | + | + | + | 2 | <u>Morganella</u> ^f |

^a All strains were facultative anaerobes and negative for oxidase.

^b +, positive; -, negative; D, different reactions for different species; ND, not determined.

^c Irregular Rods

^d All strains were motile with peritrichous flagella.

^e All strains produced acid from lactose, dulcitol and D-sorbitol. No strain utilized citrate.

^f All strains produced acid from D-mannose, but not from maltose or inositol. No strain utilized citrate, produced indole or hydrolyzed gelatin.

乳酸を生成することから Lactobacillus 属の菌種に帰属された。

グループ IV は 1 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 0.1% に相当) で、グラム陽性、カタラーゼ陰性、非運動性の不規則な細胞形態の桿菌で、V もしくは Y 字形をした細胞も観察され、DNA G+C 含量は 65.5 モル% であること、ペプチドグリカンがオルニチン-セリン-アラニン型であること、約 50% の対糖収率でグルコースを乳酸に変換することから Bifidobacterium 属の菌種に帰属された。

グループ V は 9 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 1% に相当) で、グラム陰性、オキシダーゼおよびフェニールアラニン脱アミノ酵素を生産せず、周毛を有する運動性桿菌でグルコースから酸およびガスを生成し、ズルシトール、乳糖、ソルビトールから酸を生成するが、クエン酸を資化しないことから Escherichia 属の菌種 (Escherichia coli) と同定された。

グループ VI の 2 株 (酸性ウレアーゼ生産菌の 0.3% に相当) は、グラム陰性、オキシダーゼ陰性、フェニールアラニン脱アミノ酵素陽性、周毛を有する運動性桿菌で、グルコースから酸およびガスを生成し、マンノースから酸を生成するが、マルトース、イノシトールから酸を生成せず、クエン酸を資化せず、ゼラチンを加水分解せず、インドールを生成しないことから Morganella 属の菌種に帰属された。

以上のように、700 株の酸性ウレアーゼ生産菌は、その菌学的性質から 6 属に分布していること、その大部分 (98%) は、Streptococcus 属と Lactobacillus 属の菌株であることが明らかとなった。そこで Streptococcus 属と Lactobacillus 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的諸性質を更に詳しく調べた。

3. Streptococcus 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的同定

Streptococcus 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌について、その菌学的諸性質を検討したところ、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2⁽³⁵⁾ に従って、グループ SA とグループ SB の 2 グループに分類された (表 2-4)。

グループ SA の 358 株 (Streptococcus 属分離株の 97% に相当) は、10 °C, pH 9.6, 6.5%(w/v) 塩化ナトリウムの条件下で増殖せず、アルギニンと馬尿酸を分解しないことから Oral streptococci グループに帰属された。

グループ SB の 12 株 (Streptococcus 属分離株の 3% に相当) は、10 °C, 45 °C, pH 9.6, 6.5%(w/v) 塩化ナトリウムの条件下で増殖することから、Enterococci グル

ープに帰属された。

更に、グループ SA (Oral streptococci グループ) に属する酸性ウレアーゼ生産菌についてその菌学的性質を検討したところ、本グループは、5 サブグループ (subgroup SA-I ~ SA-V) に分類された (表 2-5)。

サブグループ SA-I には 220 株 (グループ SA に属する株の 61% に相当) が属しており、これらは、4% (w/v) 塩化ナトリウムで増殖せず、エスクリンを分解せず、マンニトールから酸を生成せず、シュークロースからフラクタンを生成しないことから、S. mitior と同定された。

サブグループ SA-II から SA-IV も、上に述べた菌学的性質から判断して S. mitior とすることが妥当と考えられるが、部分的に異なる性質を示すことから異なるサ

Table 2-4. Taxonomic Properties of Acid Urease-Producing Bacteria
Belonging to the Genus Streptococcus

| Group | Properties ^a | | | | | | Number of bacteria | Group of the genus <u>Streptococcus</u> |
|-------|-------------------------|----------------|----------------|--------------|----------|-----------|--------------------------|---|
| | Growth at or in: | | Hydrolysis of: | | | | | |
| | 10°C | 45°C | pH 9.6 | 6.5% NaCl | Arginine | Hippurate | | |
| SA | - ^b | ± ^b | - | - | - | - | 358 | Oral streptococci |
| SB | + ^b | + | + | + | ± | ± | 12 | Enterococci |

^a All strains mainly produced lactic acid from D-glucose and were negative for β-hemolysis.

^b +, positive; -, negative; ±, varied with the strain.

Table 2-5. Taxonomic Properties of Acid Urease-Producing Bacteria Belonging to the Oral Streptococci Group of the Genus Streptococcus

| Sub-group | Properties ^a | | | | Number of bacteria | Identifi-cation |
|-----------|-------------------------|-----------------------|---|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|
| | Growth in 4% NaCl | Hydrolysis of esculin | Acid production from <u>D</u> -mannitol | Production of fructan | | |
| SA-I | - ^b | - | - | - | 220 | <u>S. mitior</u> |
| SA-II | - | - | + ^b | - | 74 | <u>S. mitior</u> |
| SA-III | + | - | - | - | 33 | <u>S. mitior</u> |
| SA-IV | - | + | - | - | 23 | <u>S. mitior</u> |
| SA-V | - | + | - | + | 8 | <u>S. salivarius</u> |
| ----- | | | | | | |
| | - | - | - | - | | <u>S. mitior</u> ^c |
| | ± ^b | + | - | + | | <u>S. salivarius</u> ^c |

^a All strains produced acid from D-fructose, D-glucose, maltose, D-mannose and sucrose. No strain produced acid from L-arabinose, D-gluconate, melezitose, D-ribose, D-sorbitol, trehalose or D-xylose.

^b +, positive; -, negative; ±, varied with the strain.

^c According to "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 2 (35).

ブグループに分類した。

すなわち、サブグループSA-IIとした74株(グループSAに属する株の21%に相当)は、マンニトールから酸を生成することができる。

サブグループSA-IIIには33株(グループSAに属する株の9%に相当)が属していた。これらは、4%(w/v)塩化ナトリウムで増殖可能である。

またサブグループSA-IVには23株(グループSAに属する株の6%に相当)が含まれ、エスクリンを分解する点が異なる。

サブグループSA-Vの8株(グループSAに属する株の2%に相当)は、4%(w/v)塩化ナトリウムで増殖せず、エスクリンを分解し、またマンニトールから酸を生成せず、シュークロースからフラクタンを生成し、マンニトールから酸を生成しないことから S. salivarius と同定された。

一方、グループSB (Enterococci グループ) に属する酸性ウレアーゼ生産菌について、その菌学的性質を検討したところ、本グループは、4サブグループ(subgroup SB-I~SB-IV)に分類することが妥当とみられた(表2-6)。

サブグループSB-Iの1株(グループSBに属する株の8%に相当)は、アルギニン分解し、メレチトースから酸を生成し、アラビノース、メリビオース、ラフィノースから酸を生成しないことから S. faecalis と同定された。

サブグループSB-IIとした9株(グループSBに属する株の75%に相当)は、アルギニンを分解し、メリビオースから酸を生成し、メレチトースから酸を生成しないことから S. faecium と同定された。

サブグループSB-IIIの1株(グループSBに属する株の8%に相当)は、アルギニンを分解せず、アラビノースとメレチトースから酸を生成し、メリビオースとラフィノースから酸を生成しないことから S. avium と同定された。

サブグループSB-IVの1株(グループSBに属する株の8%に相当)は、アルギニンを分解せず、アラビノース、メリビオース、ラフィノースから酸を生成し、メレチトースから酸を生成せず、0.1%メチレンブルーミルクにおける生育が微弱であることから S. gallinarum と同定された。

4. Lactobacillus 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的同定

一方、Lactobacillus 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌についても、その菌学的諸性

質を検討したところ、本生産菌は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2⁽³⁵⁾ に従って、6 グループ (LA~LF) に分類された (表 2-7)。

グループ LA には 2 株 (Lactobacillus 属分離株の 0.6% に相当) が属しており、これらはグルコースからホモ型醗酵で L-乳酸を生成し、15 °C, 45 °C で増殖しないことから L. ruminis と同定された。

グループ LB には 120 株 (Lactobacillus 属分離株の 38% に相当) が属し、これ

Table 2-6. Taxonomic Properties of Acid Urease-Producing Bacteria Belonging to the Enterococci Group of the Genus Streptococcus

| Sub-group | Properties ^a | | | | | | Number of bacteria | Identification |
|-----------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|------------|-----------|-----------|--------------------|----------------------|
| | Growth in 0.1% MBM ^b | Hydrolysis of arginine | Acid production from: | | | | | |
| | | | L-Arabinose | Melezitose | Melibiose | Raffinose | | |
| SB-I | + ^c | + | - ^c | + | - | - | 1 | <u>S. faecalis</u> |
| SB-II | + | + | ± ^c | - | + | ± | 9 | <u>S. faecium</u> |
| SB-III | + | - | + | + | - | - | 1 | <u>S. avium</u> |
| SB-IV | w ^c | - | + | - | + | + | 1 | <u>S. gallinarum</u> |

^a All strains produced acid from D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, maltose, D-mannose, D-ribose, salicin, sucrose and trehalose.

^b MBM, methylene blue milk

^c +, positive; -, negative; ±, varied with the strain; w, weakly positive.

Table 2-7. Taxonomic Properties of Acid Urease Producing Bacteria Belonging to the Genus Lactobacillus

| Group | Properties | | | | Number of bacteria | Identifi- cation |
|-------|---------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|--------------------------|--|
| | Fermen- tation type | Lactic acid isomer ^a | Growth at: | | | |
| | | | 15°C | 45°C | | |
| LA | Homo | <u>L</u> | - ^b | - | 2 | <u>L.ruminis</u> |
| LB | Homo | <u>L</u> | - | + ^b | 120 ^c | <u>L.animalis</u> or <u>L.salivarius</u> |
| LC | Homo | <u>DL</u> | - | + | 6 ^d | <u>L.acidophilus</u> or <u>L.amylovorus</u> or <u>L.crispatus</u> or <u>L.gasseri</u> |
| LD | Hetero | <u>DL</u> | - | - | 5 | <u>L.vaccinostercus</u> |
| LE | Hetero | <u>DL</u> | - | + | 178 | <u>L.reuteri</u> or <u>L.fermentum</u> |
| LF | Hetero | <u>DL</u> | + | - | 1 ^e | <u>L.viridescens</u> |

^a L, 80%(w/v) or more of the total lactic acid was of the L-configuration; DL, 20~80%(w/v) of the total lactic acid was of the L-configuration.

^b +, positive; -, negative.

^c No strain produced acid from L-arabinose, D-ribose or D-xylose.

^d All strains produced acid from D-cellobiose, salicin and sucrose.

^e No strain produced acid from D-galactose or ammonia from arginine.

らはグルコースからホモ型醗酵で L-乳酸を生成し、45 °C で増殖し、15 °C で増殖しないことから L. animalis もしくは L. salivarius グループとすることが妥当である。

グループLCの6株 (Lactobacillus 属分離株の2%に相当)は、グルコースからホモ型醗酵で DL-乳酸を生成し、45 °C で増殖し、15 °C で増殖しないことから L. acidophilus, L. amylovorus, L. crispatus もしくは L. gasseri グループとすることが妥当と考えられた。

グループLDに区分された5株 (Lactobacillus 属分離株の2%に相当)は、グルコースからヘテロ型醗酵で DL-乳酸を生成し、15 °C, 45 °C で増殖しないことから L. vaccinostercus と同定された。

グループLEの178株 (Lactobacillus 属分離株の57%に相当)は、グルコースからヘテロ型醗酵で DL-乳酸を生成し、45 °C で増殖し、15 °C で増殖しないことから L. reuteri もしくは L. fermentum グループとすることが妥当である。

グループLFとされた1株 (Lactobacillus 属分離株の0.3%に相当)は、グルコースからヘテロ型醗酵で DL-乳酸を生成し、15 °C で増殖し、45 °C で増殖しないことから L. viridescens と同定された。

Lactobacillus 属に属する分離株の、分類学的性質について更に詳しく調べるためにグループLA, LB, LD, LFから1株の、また最多数の菌株が属していたグループLEから5株の代表株を選び、DNA塩基組成と、細胞壁ペプチドグリカン組成を分析した(表2-8)。代表分離株のDNA G+Cモル%値およびペプチドグリカン型の分析結果は、各細菌種に対する文献記載値および型⁽³⁵⁾とよく一致していた。

しかし、グループLEのRt-82およびRt-114株のDNA G+Cモル%値は、それぞれ36.6および36.9モル%であり、文献記載値と一致しなかった。すなわち L. reuteri および L. fermentum のDNA G+Cモル%は、それぞれ40~42および52~54モル%と記載されており⁽³⁵⁾、明らかにRt-82, Rt-114株のDNA G+Cモル%値よりも高い。同時にRt-82, Rt-114株のDNA G+Cモル%値は、どの Lactobacillus 属のヘテロ型乳酸醗酵菌種の文献記載値とも一致しなかった。したがって、Rt-82株およびRt-114株は、Lactobacillus 属に属する互いに近い性質を示す新菌種と考えられる。

5. 保存細菌菌株からの検索

Table 2-8. Taxonomic Properties of Representatives of the Genus Lactobacillus

| Group ^a | Strain | Properties | | Identifi- cation |
|--------------------|---------|----------------------------------|---|-------------------------|
| | | DNA G+C content (mole%) | Peptido- glycan type ^b | |
| LA | PG-98 | 45.6 | mDAP | <u>L.ruminis</u> |
| LB | MU-4 | 41.6 | Lys-Asp | <u>L.animalis</u> |
| LD | Rt-100 | 36.2 | ND | <u>L.vaccinostercus</u> |
| LE | MU-12 | 39.8 | Lys-Asp | <u>L.reuteri</u> |
| | MU-18 | 40.7 | Lys-Asp | <u>L.reuteri</u> |
| | Rt-5 | 40.3 | Lys-Asp | <u>L.reuteri</u> |
| | Rt-82 | 36.6 | Lys-Asp | <u>L.sp^c</u> |
| | Rt-114 | 36.9 | Lys-Asp | <u>L.sp^c</u> |
| LF | PG-303L | 41.5 | ND | <u>L.viridescens</u> |

^a See Table 2-7.

^b mDAP, m-diaminopimelic acid; Lys, lysine; Asp, aspartic acid;

ND, not determined.

^c See the text.

上記したように、各種の動物消化管内容物および糞便から新たに分離した株の大部分が、Streptococcus 属菌、Lactobacillus 属菌などの乳酸菌⁽⁴²⁾であった。そこで、保存乳酸菌も検索の対象とすることとし、財団法人発酵研究所から入手した Streptococcus 属、Pediococcus 属、Leuconostoc 属 および Lactobacillus 属菌株について、平板培養と液体培養を行い、酸性ウレアーゼ生産能を調べた。その結果、供試 118 株 (Streptococcus 属 32 株、Pediococcus 属 26 株、Leuconostoc 属 6 株および Lactobacillus 属 54 株)のうち Lactobacillus fermentum IFO 14511, 14512, 14513 の 3 株が、酸性ウレアーゼ生産能を有していた。

第4節 要旨

酸性ウレアーゼを生産しうる微生物を、広く自然界および保存菌株中に検索したところ、動物消化管内容物および糞便からの分離株 16,324 株のうちの 700 株と、保存細菌菌株 118 株のうちの 3 株に本活性を見出した。動物消化管内容物および糞便から得られた 700 株の酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的諸性質を検討した結果、これらの大部分 (98%)は、Streptococcus 属、Lactobacillus 属に属していたほか、Staphylococcus 属、Bifidobacterium 属、Escherichia 属、Morganella 属の 4 属にも分布していた。

Streptococcus 属に属するものの大部分は、S. mitior であり、他は S. salivarius、S. faecium、S. faecalis、S. avium、S. gallinarum であった。Lactobacillus 属の大部分は、L. reuteri もしくは L. fermentum グループ、あるいは L. animalis もしくは L. salivarius グループに属し、他は L. ruminis、L. viridescens、L. vaccinostercus およびそれ以外の 1 グループ (L. acidophilus、L. amylovorus、L. crispatus もしくは L. gasseri) に分類された。保存菌株から得られた酸性ウレアーゼ生産菌 3 株は、いずれも L. fermentum であった。

第3章 酸性ウレアーゼの多様性

第1節 緒言

第2章で述べたように703株の酸性ウレアーゼ生産菌は、その大部分が *Lactobacillus* 属もしくは *Streptococcus* 属に属し、これらは更に、いくつかのグループあるいは種に分類されることを見出した。

ところで菌株が異なる場合、同じ酵素活性を示すにしても、電気泳動的に異なる別の酵素蛋白が生産されることは、土壌分離菌株の脱ハロゲン酵素⁽⁴³⁾、植物病原菌の産生するエステラーゼとフォスフォターゼ^(44, 45) および細菌由来の中性ウレアーゼ⁽⁴⁶⁾ などの例を始めとして十分に考えられる。

酸性ウレアーゼの場合、種もしくは属の異なる菌株が生産する酵素蛋白が、同一種類のものなのか、それとも性質の異なる別の種類からなるものかは明らかでない。

そこで本章では、酸性ウレアーゼ高生産株から菌体抽出液を調製して、電気泳動法による酵素蛋白の分子種の解明と、その性質について検討したので、結果について述べる。

第2節 実験材料および方法

1. 材料

セファロース CL-6B, アンホライン ポリアクリルアミドゲル (PAG) プレート (pH 4.0~6.5) は、Pharmacia Biotechnology Products, Sweden から購入した。精製ナタ豆ウレアーゼ、ゲル濾過法で使用する分子量算出用の標準蛋白質は、Sigma Chemical Company, U.S.A. から購入した。

2. 微生物の培養

第2章第2節-4に従って調製した保存培養液 10 ml を、5 l 容のエrlenmeyer フラスコに分注した 4 l の液体培地 (第2章第2節-4のA培地) に接種して、32 °C で 72 時間静置培養した。

3. 酸性ウレアーゼ活性の測定

第2章第2節-6の方法に従って、0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4) を用いて測定した。

4. 菌体抽出液の調製

4.1の培養液を遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) し、沈渣を 100 ml の緩衝液 T (1 mM の 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7) で遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) することによって1回洗浄したのちに、緩衝液 T に懸濁して 40 ml とした。このようにして調製した洗浄菌体を、大岳製作所(株)製 5501-M型フレンチプレス (12,000psi) で破碎し、遠心分離 (76,000 x g, 20 分間, 4 °C) して得られた上清液を、菌体抽出液として実験に使用した。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、濃縮ゲルとして 4%(w/v) アクリルアミドを、分離ゲルとして 6%(w/v) アクリルアミドを使用し、Davis の緩衝液⁽⁴⁷⁾ {25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 192 mM グリシン, pH 8.3} で行った。15 μ l の菌体抽出液と、15 μ l の 0.1%(w/v) ブロモフェノールブルーを含む 50%(w/v) シュークローズ溶液の混合物を試料として添加し、4 °C で 6 時間電気泳動した。電気泳動後にゲルを 0.05%(w/v) ブロモクレゾールパープルを含む 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4) に移し、4 °C で 30 分間放置した。さらに 0.05%(w/v) ブロモクレゾールパープルを含む 30 mM クエン酸緩衝液 (pH 4) にゲルを移し、ゲルが完全に黄色に変化するまで 4 °C で放置した。次に 0.05%(w/v) ブロモクレゾールパープルを含む 1%(w/v) 尿素液で湿らせた濾紙上にゲルを移し、酵素反応を開始した。ゲル中の酸性ウレアーゼ蛋白の移動度は、黄色を背景とした紫色の活性染色バンドとして検出され、写真撮影によって記録した。

6. 等電点の測定

アンホライン PAG プレート (pH 4.0~6.5) を用いて、等電点電気泳動を行った。酸性ウレアーゼの検出は、上記ポリアクリルアミドゲル電気泳動における検出方法と同様にして、活性染色法で検出した。

7. ゲル濾過による分子量測定

ゲル濾過による分子量測定は、セファロースCL-6Bカラム (2.6 x 60 cm) を使用して行った。平衡化および溶出用緩衝液には、0.02%(w/v) アジ化ソーダと 0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を使用した。標準蛋白質は、アポフェリチン (分子量 443,000), β -アミラーゼ (分子量 200,000), アルコールデヒドロゲナーゼ (分子量 150,000), ウシ血清アルブミン (分子量 66,000), カルボニックアンハイドラーゼ (分子量 29,000) を使用した。

第3節 実験結果および考察

1. 電気泳動法による分析

第2章で述べたように、酸性ウレアーゼ生産菌は6属に分布しており、その大部分は Lactobacillus 属および Streptococcus 属に属していた。しかしながら、これらの多種類の酸性ウレアーゼ生産菌の生産する酵素蛋白が、同一種類であるのか、それとも別の種類であるのかは不明である。そこで、この点を明らかにするために、以下の実験を行った。

酸性ウレアーゼ高生産株中から、Lactobacillus 属に属する28菌株と、Streptococcus 属の9菌株、合計37菌株を選択し、これらの菌体抽出液を調製してポリアクリルアミドゲル電気泳動における酵素蛋白の移動度を調べた。この結果、表3-1に示すように、電気泳動法による酵素蛋白の移動度 (Rf値) から判断すると、酸性ウレアーゼには、6種類の分子種が存在することが明らかとなった。そこで同じ移動度 (Rf値) を示すグループの酵素蛋白は同一タイプに属するものとし、各グループにタイプ番号をつけて区別することとした。

ここで、生産された酵素蛋白のタイプと酸性ウレアーゼ生産菌種との関係をまとめてみると、タイプ I の酸性ウレアーゼを生産するのは L. animalis, L. salivarius グループの代表株、タイプ II の酵素は、L. reuteri, L. fermentum グループの代表株、タイプ III の酵素は、L. reuteri, L. fermentum グループ および L. vaccinostercus の代表株、タイプ IV の酵素は、L. animalis, L. salivarius グループ および L. ruminis の代表株、タイプ V の酵素は、S. mitior の代表株、タイプ VI の酵素は、S. salivarius の代表株

Table 3-1. Rf Values of Acid Ureasases

| <u>Rf</u> ^a value | Source of acid urease | <u>Rf</u> ^a value | Source of acid urease |
|---------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| 0.41(I) ^b | <u>L. animalis</u> MU-4 ^c | 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Mr-19 ^d |
| 0.47(II) | <u>L. sp.</u> MU-22 ^d | 0.51(III) | <u>L. vaccinostercus</u> MU-100 |
| 0.47(II) | <u>L. sp.</u> MU-29 ^d | 0.51(III) | <u>L. vaccinostercus</u> MU-102 |
| 0.47(II) | <u>L. fermentum</u> IFO 14511 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> PG-73 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-5 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> PG-80 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-34 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> PG-204 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-41 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> Rt-6 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-50 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> Rt-14 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-82 ^d | 0.57(IV) | <u>L. sp.</u> Rt-36 ^c |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-85 ^d | 0.57(IV) | <u>L. ruminis</u> PG-98 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-87 ^d | 0.57(IV) | <u>L. ruminis</u> Mr-17 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-89 ^d | 0.55(V) | <u>S. mitior</u> PG-118 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Rt-114 ^d | 0.55(V) | <u>S. mitior</u> PG-154 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> MU-12 ^d | 0.55(V) | <u>S. mitior</u> PG-324 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> MU-17 ^d | 0.55(V) | <u>S. mitior</u> PG-449 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> MU-18 ^d | 0.55(V) | <u>S. mitior</u> Pg-475 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> MU-106 ^d | 0.59(VI) | <u>S. salivarius</u> PG-81 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> MU-117 ^d | 0.59(VI) | <u>S. salivarius</u> PG-202 |
| 0.51(III) | <u>L. sp.</u> Mr-8 ^d | | |

^a Enzymes were electrophoresed on polyacrylamide gels.

^b The letters I through VI in parentheses correspond to the lane numbers in Fig. 3-1.

^c Strain belongs to the group composed of L. animalis and L. salivarius.

^d Strain belongs to the group composed of L. reuteri and L. fermentum.

であった。

図 3-1 に、上記したタイプ I~VI の酵素蛋白の移動パターンを示す。この電気泳動に供した代表酵素は、以下の酸性ウレアーゼ生産菌から調製した。タイプ I の酵素は *L. animalis* MU-4 から、タイプ II の酵素は *L. fermentum* IFO 14511 から、タイプ III の酵素は *L. reuteri* Rt-5 から、タイプ IV の酵素は *L. ruminis* PG-98 から、タイプ V の酵素は *S. mitior* PG-118 から、タイプ VI の酵素は *S. salivarius* PG-202 から調製したものであり、酵素のタイプ番号と、電気泳動のレーン番号 (図 3-1) は一致している。

図 3-1 のレーン II には 2 種類のバンドが観察されたが、上方のバンドは会合体であり、凍結保存により生成したものである。中性ウレアーゼでは、会合体の形成による酵素活性の低下⁽⁴⁸⁾ が知られている。そこで、会合体の形成阻止を目的に、凍結防止効果のあるグリセロールについて調べた。図 3-2 に示すように、*L. fermentum* IFO 14511 の菌体抽出液を、グリセロールを含まない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) 中で -80 °C で 1 週間保存したのちに電気泳動を行うと、上方のバンドが検出された。ところが、菌体抽出液を 50%(v/v) グリセロールを含む同緩衝液中で -80 °C で 1 週間保存したのちに電気泳動を行うと、下方のバンドのみが検出され会合体は認められなかった。本条件下で保存したあとも酵素活性の低下は認められず、酸性ウレアーゼは 50% (v/v) グリセロール中で低温保存するのが適切であることが判明した。

上述したように、4 種および 2 グループに分布する 37 の酸性ウレアーゼ生産菌を使用して調査した結果、その電気泳動的移動度に基づいて 6 種類の分子種が、異なる菌株によって生産されていることが認められた。一方、電気泳動後のゲル上での酵素反応時間を長くすると、レーン I, IV および VI において、図 3-1 に認められる主バンドの他に、時間的に遅れてしかも弱く発色するマイナーなバンドが一つ認められ (図 3-3), このように同一菌株が、移動度の異なる複数のウレアーゼと推定される酵素を生産する例は、大豆⁽⁴⁹⁾, ナタ豆⁽⁵⁰⁾ および *Proteus* 属, *Providencia* 属菌⁽⁵¹⁾ 由来の中性ウレアーゼ産生においても知られている。

酸性ウレアーゼの中に、電気泳動的に移動度の異なる分子種が存在することは、本酵素が分子量およびその他の性質に関して、多様性を示すことを示唆している。そこで図 3-1 で示した電気泳動的に移動度の異なる 6 タイプの代表酸性ウレアーゼについて、次に若干の性質を調べることにした。

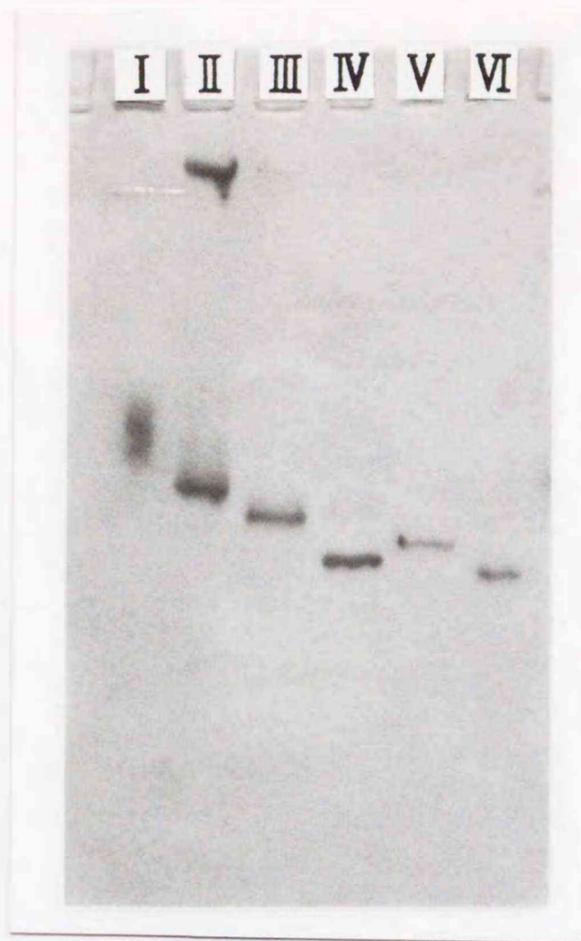


Fig. 3-1. Acid Ureases from Strains Belonging to the Genus Lactobacillus and Streptococcus.

Cell-free extracts were loaded onto a 6%(w/v) polyacrylamide gel with a 4%(w/v) stacking gel and electrophoresed at 4 °C. The gel was equilibrated with 30 mM citrate buffer, pH 4, containing 0.05%(w/v) bromocresol purple, and then transferred onto a filter paper wetted with a solution containing 1%(w/v) urea and 0.05%(w/v) bromocresol purple.

Lanes: I, L. animalis MU-4; II, L. fermentum IFO 14511; III, L. reuteri Rt-5; IV, L. ruminis PG-98; V, S. mitior PG-118; and VI, S. salivarius PG-202



Fig. 3-2. Effect of Glycerol on Acid Urease Aggregation.

Cell-free extract of L. fermentum IFO 14511 was incubated at -80°C for 1 week (A) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7) or (B) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7) containing 50% (v/v) glycerol. Experimental details are described in the legend of Fig.3-1.

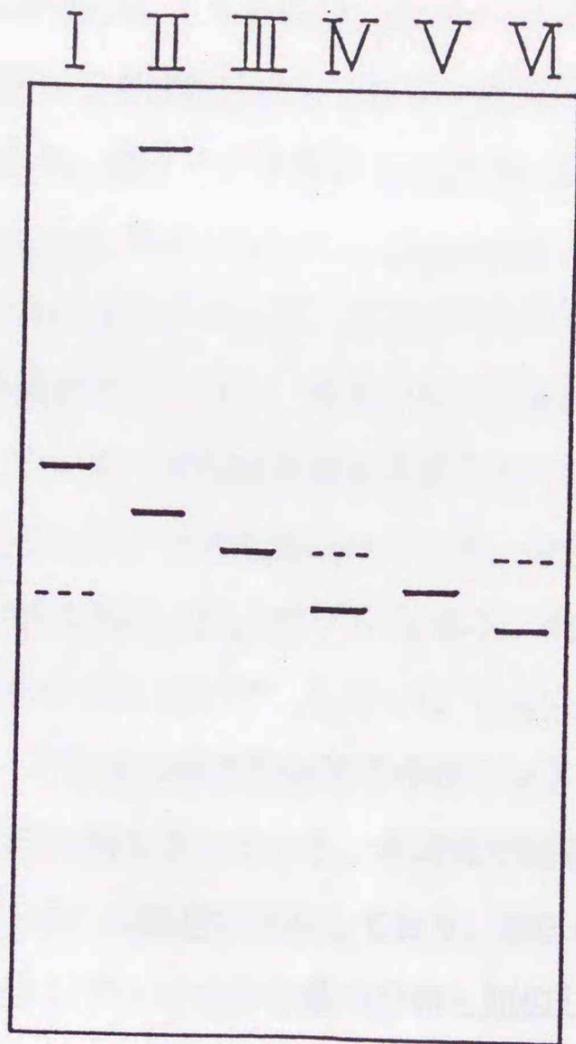


Fig. 3-3. Acid Ureases from Strains Belonging to the Genus Lactobacillus and Streptococcus.

Dotted lines indicate slowly developing urease active band, and solid lines indicate the main bands shown in Fig.3-1. Experimental details are described in the legend of Fig.3-1.

Lanes: I, L. animalis MU-4; II, L. fermentum IFO 14511; III, L. reuteri Rt-5; IV, L. ruminis PG-98; V, S. mitior PG-118; and VI, S. salivarius PG-202

2. 分子量

電気泳動的に移動度の異なる 6 タイプの代表酵素の分子量を、セファロースCL-6Bカラムを用いるゲル濾過法により求めた。表 3-2 に示すように、これら 6 タイプの代表酵素は、分子量に関して多様性を示しており、最大の分子量は L. animalis MU-4 由来の酵素の 350,000 であり、最小の分子量は S. salivarius PG-202 由来の酵素の 140,000 であった。L. reuteri RT-5 および L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の分子量は、共に 220,000 であるにもかかわらず、電気泳動の移動度は異なっているのが注目された。他の酵素は、分子量が小さいほど、電気泳動の移動度が大きい傾向を示した。

以上のように、同じウレアーゼ活性を示す酵素でありながら、その起源により酵素の分子量が異なる例は中性ウレアーゼでも知られている。中性ウレアーゼの分子量の中で、最小のものはルーメン細菌由来の 125,000⁽⁵²⁾ であり、大きいものは Selenomonas ruminantium 由来の酵素の 360,000⁽⁵³⁾ もしくは Ureaplasma urealyticum 由来の酵素の 380,000⁽⁵⁴⁾ である。その他の微生物由来の中性ウレアーゼの分子量は、200,000~250,000^(48, 55-59) の範囲と報告されている。本研究で明らかにされた酸性ウレアーゼの分子量は、140,000~350,000 の範囲に分布しており、200,000~220,000 の分子量の酵素が多かったことは、中性ウレアーゼの分子量の分布と類似していると考えられる。

3. 等電点

6 タイプの代表酵素の等電点を、等電点電気泳動法によって測定した(表 3-2)。この結果、代表酵素の等電点は 4.6, 4.7, 4.8 と異なる 3 点に分布していることが判明した。L. reuteri RT-5 および L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の等電点は、それぞれ 4.7 および 4.8 と異なっていた(表 3-2)。前述したように、L. reuteri Rt-5 と L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の分子量は共に 220,000 と推定されたにもかかわらず、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の移動度には差異があった。この移動度の差は等電点の差に起因していると考えられる。

中性ウレアーゼの場合にも、等電点はその起源によって異なる例が知られている。Brevibacterium ammoniagenes 由来の酵素の等電点は 4.1⁽⁴⁸⁾, Bacillus pasteurii 由来の酵素の等電点は 4.6⁽⁵⁶⁾, Arthrobacter oxydans 由来の酵素の等電点は 4.3~4.7⁽⁶⁰⁾, Morganella, Providencia, Proteus 属由来の酵素の等電点は 5.1~5.9⁽⁵¹⁾ であることが知られており、酸性ウレアーゼの等電点に近い値である。

Table 3-2. Properties of Acid Ureases

| Source of acid urease | Molecular weight | Isoelectric point | Optimum ^a pH | Optimum ^b temperature (°C) | Stable ^c pH | Stable ^d temperature (°C) |
|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <i>L. animalis</i> MU-4 | 350,000 | 4.8 | 4 | 55 | 4~8 | below 40 |
| <i>L. fermentum</i> IFO 14511 | 220,000 | 4.8 | 2 | 65 | 3~9 | below 60 |
| <i>L. reuteri</i> Rt-5 | 220,000 | 4.7 | 2 | 65 | 3~8 | below 60 |
| <i>L. ruminis</i> PG-98 | 150,000 | 4.7 | 5 | 55 | 4~8 | below 30 |
| <i>S. mitior</i> PG-118 | 200,000 | 4.6 | 4.5 | 65 | 3~8 | below 50 |
| <i>S. salivarius</i> PG-202 | 140,000 | 4.7 | 3.5 | 60 | 4~8 | below 40 |

^a Buffers used for measuring enzyme activities were 0.2 M sodium acetate-HCl buffer (pH 1~4) and 0.2 M citrate buffer (pH 3~6).

^b Temperatures used for measuring enzyme activities varied from 20 °C to 80 °C.

^c The enzymes were incubated at 37 °C for 30 min. Buffers used for the incubation of the enzyme were 0.2 M sodium acetate-HCl buffer (pH 1~2), 0.2 M citrate buffer (pH 3~5), 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6~8) and 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 9~11).

^d The enzymes were incubated at pH 4 for 30 min. Temperatures used for incubation of the enzymes varied from 20 °C to 80 °C.

4. 酵素活性および安定性におよぼす pH と温度の影響

前章において酸性領域でウレアーゼ活性を示す生産菌を検索してきたが、これら生産菌由来の酵素が、同じ至適反応 pH を示すのか否かについては不明であった。

そこで、6 タイプの代表酵素を、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 1~4) と 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 3~6) を使用して、37 °C で 15 分間反応させたところ、至適反応 pH は 2~5 の範囲に分布していることが判明した (表 3-2)。

次に、6 タイプの代表酵素を、pH 4 の 0.2 M クエン酸緩衝液を用いて 15 分間、20~80 °C の範囲で反応させ至適反応温度を調べた (表 3-2)。至適反応温度は 55 °C、60 °C、65 °C の異なる温度に分布していた。*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素の至適反応温度は 65 °C と最も高い値であった。

酵素活性の安定性におよぼす pH の影響を調べるために、6 タイプの代表酵素を pH 1~11 の 0.2 M 緩衝液を用いて、37 °C で 30 分間保温し残存活性を測定した。表 3-2 に示すように酸性ウレアーゼの安定 pH 域は 3~9 の範囲にあった。酸性側に注目した場合は、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素活性は pH 3 でも安定であり、他の酵素活性は pH 4 までの安定性しか示さなかった。よってこれら 3 酵素は他の酵素よりも酸性領域で安定な酵素と考えられた。

次に、酵素活性の安定性におよぼす温度の影響を調べるために、6 タイプの代表酵素を、pH 4 の 0.2 M クエン酸緩衝液を使用して、30 分間種々の温度のもとで保温し残存活性を測定した。表 3-2 に示すように、*L. ruminis* PG-98 由来の酵素活性は 30 °C までしか安定でなく最も不安定な酵素であった。一方、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5 由来の酵素活性は 60 °C まで、*S. mitior* PG-118 由来の酵素活性は 50 °C まで安定であった。したがって、これら 3 酵素は酸性領域で、より安定な酵素と推定される。

それに対し、中性ウレアーゼであるナタ豆由来のウレアーゼを pH 4 の 0.2 M クエン酸緩衝液を用いて 30 分間種々の温度で保温したところ、酵素活性は 10 °C までの安定性しかなく、ナタ豆由来の中性ウレアーゼは酸性領域では極めて不安定であることが判明した。細菌の中性ウレアーゼに関しては、*Bacillus pasteurii*⁽⁶¹⁾ 由来のウレアーゼ活性が pH 5.2 で保温することにより、また *Arthrobacter oxydans*⁽⁶⁰⁾ 由来のウレアーゼ活性が pH 5 の緩衝液中で 4 °C で 30 分間保温することによって失活することが報告されており、いずれも酸性領域の安定性は極めて乏しいといえる。

以上のように、酸性ウレアーゼは、電気泳動的多様性、分子量、等電点などの点では中性ウレアーゼと酷似した性質を示したが、酸性ウレアーゼの至適反応pHは2~5であり、中性ウレアーゼの至適反応pH 7~8.5^(48, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 62, 63)とは明らかに異なっていた。

更に重要な点は、酸性領域における酵素の安定性の差である。pH 4の緩衝液中で保温したところ、ナタ豆由来の中性ウレアーゼは速やかに失活したが、酸性ウレアーゼは安定であった。第6章で詳述するように中性ウレアーゼでは不可能であったにもかかわらず、酸性ウレアーゼを酒質保全剤として開発しえたのは、本酵素が酸性領域における安定性に優れていたことが、大きな成因の一つであったと考えられる。L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118由来の酸性ウレアーゼは、調べた範囲内では酸性領域で最も安定な酵素であり、次章では更にその性質を詳しく研究することとした。

第4節 要旨

Lactobacillus 属および Streptococcus 属に属する 37 菌株から菌体抽出液を調製してポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、活性染色法によって酸性ウレアーゼの移動度を調べた。この結果、酸性ウレアーゼには、電気泳動的に 6 タイプの分子種が存在していることが明らかとなった。そこで各タイプから代表酵素を 1 つずつ選び、それらの性質（分子量、等電点、酵素活性および安定性におよぼす pH および温度の影響）を調べたところ、いずれの性質にも多様性があることが明らかとなった。

分子量は S. salivarius PG-98 由来の酵素の 140,000 から L. animalis MU-4 由来の酵素の 350,000 の範囲に分布していた。等電点は、4.6, 4.7, 4.8 の異なる 3 点に分布していた。至適反応 pH は 2~5 の範囲に、至適反応温度は 55, 60, 65 °C と異なる 3 温度に分布していた。これら酵素活性が安定である pH (37 °C, 30 分間) は 3~9 の範囲に、酵素活性が安定である温度 (pH 4, 30 分間) は 30~60 °C の範囲に分布していた。酸性領域で最も安定に活性を維持しえた酵素は、L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の酵素であった。この性質は、既知の中性ウレアーゼのいずれにも認められないものである。

第4章 Lactobacillus 属および

Streptococcus 属細菌由来の

酸性ウレアーゼの性質

第1節 緒言

第3章で述べたように、酸性ウレアーゼは電気泳動的移動度、分子量、等電点、pHおよび温度に対する挙動において多様性を示すことが明らかとなった。しかし、これらは菌体抽出液を使用して得られた知見であり、より正確に本酵素の性質を明らかにするためには、精製酵素標品を用いて検討する必要がある。しかし、酸性ウレアーゼを精製してその性質を調べた報告はいまだなされていない。酵素的知見が数多く知られている中性ウレアーゼの場合でさえも微生物由来の酵素を高度に精製して性質を調べた研究はすくない⁽⁴⁶⁾。したがって、酸性ウレアーゼを精製してその性質を明らかにすることは、ウレアーゼに関する生化学的新知見の蓄積ばかりでなく、産業上の応用面における基礎データの確立という見地からも意義あることである。そこで種々の菌株によって生産された酸性ウレアーゼを精製し、得られた標品を用いてそれらの酵素学的、蛋白化学的性質を調べたのでその結果を論述する。

第2節 実験材料および方法

1. 材料

DEAE-セファロース CL-6B, セファロース CL-6B, クロマトフォーカシングカラム PBE 94 および ポリバッファー 74, ソチウムドデシルスルフェート (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) の分子量算出のための標準蛋白質, アンホライン PAG プレート (pH 4.0~6.5) は, Pharmacia Biotechnology Products, Sweden から購入した。トヨパール HW-55F は, 東洋ソーダ工業(株)から購入した。ゲル濾過用の分子量算出用の標準蛋白質は, Sigma Chemical Company, U.S.A. から購入した。アフィニティークロマ

トグラフィ用担体 アフィゲル 202 は、日本バイオラッド ラボラトリーズ(株)から購入した。PAG プレート 4/15 および SDS PAG プレート 10/20 は、第一化学薬品(株)から購入した。

2. 微生物の培養

第 2 章第 2 節-4 に従って調製した *L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 の保存培養液 10 ml を、5 l 容のエレンマイヤーフラスコに分注した 4 l の液体培地 (第 2 章第 2 節-4 の A 培地) に接種して、32 °C で 72 時間静置培養した。

3. 酸性ウレアーゼ活性の測定

第 2 章第 2 節-6 の方法に従って、0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4) を用いて測定した。

4. アフィニティーゲルの調製

Wong ら⁽⁶⁴⁾ の方法に従い、アフィゲル 202 担体にリガンドであるヒドロキシ尿素を結合させた。すなわち、最小量の蒸留水に溶解したヒドロキシ尿素 2.2 g を 500 ml のアフィゲル 202 担体に添加した。次に 最小量の蒸留水に溶解したカルボジイミド 13.2 g を 5 ~ 10 分間おきに上記担体懸濁液へ滴下した。この間、担体懸濁液をゆるやかに攪拌し、0.1 N 塩酸を使用して pH 4.6 ± 0.1 となるように調整しつつ反応させた。室温で 20 時間反応させたのち、担体懸濁液を 3 l の 1 M 塩化ナトリウム溶液と蒸留水で 2 回洗浄した。

5. 酸性ウレアーゼの精製

精製操作はすべて約 4 °C の低温室内で行った。精製操作は可能なかぎり連続して行ったが、酵素標品を -80 °C で保存する必要がある場合は、50%(v/v) グリセロール溶液として保存した。使用した緩衝液は、主に緩衝液 T (1 mM の 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7) と緩衝液 P (1 mM の 2-メルカプトエタノールを含む 5 mM リン酸緩衝液, pH 7) である。

第1ステップ (菌体抽出液の調製)

4 l の培養液を遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) し, 沈渣を 100 ml の緩衝液 T で遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) することによって 1 回洗浄したのちに, 同緩衝液に懸濁して 40 ml とした。これを大岳製作所(株)製 5501-M 型フレンチプレス (12,000 psi) で破碎し, 遠心分離 (76,000 x g, 20 分間, 4 °C) して得られた上清液を菌体抽出液とした。

第2ステップ (エタノール沈殿)

あらかじめ氷水中で冷却しておいた菌体抽出液に, エタノール濃度が最終的に 30% (v/v) になるように, -20 °C に冷却しておいたエタノールを徐々に加えた。エタノール添加終了後も, 氷水中で更に 30 分間攪拌してエタノール沈殿物を生成させた。本液を遠心分離 (12,000 x g, 10 分間, 4 °C) して沈殿を得た。

第3ステップ (ゲル濾過)

沈殿を少量の緩衝液 T に溶解し, あらかじめ 0.1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 T で平衡化しておいた, トヨパール HW-55 F カラム (2.6 x 60 cm) を用いてゲル濾過を行った。10 ml ずつ分取し, 酵素活性を有する画分を 100 ml 集め, 緩衝液 T に対して 16 時間透析した。

第4ステップ (DEAEセファロース CL-6B カラムクロマトグラフィー)

第3ステップで得られた透析内液を, あらかじめ緩衝液 T で平衡化しておいた DEAEセファロース CL-6B カラム (4.6 x 30 cm) に通液し, 緩衝液 T を用いてカラムを洗浄した。蛋白の溶出は, 塩化ナトリウム濃度直線勾配によった。すなわち, 出発緩衝液 (T) に, 1 M 塩化ナトリウムを含む同一緩衝液を連続的に添加して, 塩化ナトリウムの 0~1 M 直線濃度勾配が得られるように調製した。10 ml ずつ分取し, 酵素活性を含む画分を 80 ml 集め, 緩衝液 P に対して 16 時間透析した。

第5ステップ (一次アフィニティーカラムクロマトグラフィー)

第4ステップで得られた透析内液を, あらかじめ緩衝液 P で平衡化しておいたアフィニティーカラム (4 x 40 cm) に通液し, 緩衝液 P を用いてカラムを洗浄した。蛋白の

溶出は、リン酸濃度直線勾配によった。すなわち出発緩衝液 (P) に、リン酸濃度を 100 mM にした同一緩衝液を連続的に添加して、リン酸の 5~100 mM 直線濃度勾配が得られるように調製した。5 ml ずつ分取し酵素活性を含む画分を 60 ml 集め、25 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.4) に対して 16 時間透析した。

第 6 ステップ (クロマトフォーカシングカラムクロマトグラフィー)

第 5 ステップで得られた透析内液を、あらかじめ 25 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化しておいた PBE 94 カラム (1 x 20 cm) に通液した。9 倍希釈したポリバッファ-74 (pH 4.0) で蛋白を溶出してクロマトフォーカシングを行った。2 ml ずつ分取し酵素活性を含む画分を 14 ml 集め緩衝液 P に対して 16 時間透析した。

第 7 ステップ (二次アフィニティーカラムクロマトグラフィー)

ポリバッファ-74 を除くため、第 5 ステップと同様のクロマトグラフィーを行った。第 6 ステップの透析内液を、あらかじめ緩衝液 P で平衡化しておいたアフィニティーカラム (4 x 40 cm) に通液し、緩衝液 P を用いてカラムを洗浄した。蛋白の溶出は、第 5 ステップと同じ方法によった。

6. 蛋白質の測定

Lowry ら⁽⁶⁵⁾ の方法に従い、ウシ血清アルブミン (Sigma Chemical Company, U.S.A.) を標準蛋白質として蛋白質量を定量した。

7. ゲル濾過による分子量測定

ゲル濾過による分子量測定は、第 3 章第 2 節-7 に記載した方法によった。

8. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、PAG プレート 4/15 (第一化学薬品(株)) を使用し、Davis の緩衝液⁽⁴⁷⁾ で行った。蛋白の染色には、0.15% (w/v) のクマシーブリリアントブルー-R 250 を含むメタノール:酢酸:水 (5:1:5, v/v) 溶液を用いた。脱染色液には、メタノール:酢酸:水 (5:7.5:87.5, v/v) 溶液を用いた。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、市販の SDS-PAG プレート 10/20 (第一化学薬品(株))、もしくは濃縮ゲルとして 4%(w/v) アクリルアミド、泳動用ゲルとして 15%(w/v) アクリルアミドからなる自製のゲルを使用し、Laemmli の緩衝液⁽⁶⁶⁾ {25 mM トリス (ヒドロキシル) アミノメタン, 192 mM グリシン, 0.1%(w/v) SDS, pH 8.3} で行った。分子量測定用の標準蛋白質 (Pharmacia Biotechnology Products, U.S.A.) は、フォスフォリラーゼ b (分子量 94,000), ウシ血清アルブミン (分子量 67,000), オブアルブミン (分子量 43,000), カルボニックアンハイドラーゼ (分子量 30,000), ダイストリプシンインヒビター (分子量 20,100), ミオグロビン (分子量 17,200), ミオグロビン I+II (分子量 14,600), ミオグロビン I (分子量 8,240), ミオグロビン II (分子量 6,380), ミオグロビン III (分子量 2,560) を使用した。蛋白質の染色は、クマシーブリリアントブルー-R 250 で行った。

10. 等電点の測定

アンホライン PAG プレート (pH 4.0~6.5) を用いて、等電点電気泳動を行った。蛋白質の染色は、本節-8 に従いクマシーブリリアントブルー-R 250 で行った。

11. 金属分析

金属含量は、日立製作所(株)製 Z-8000 型原子吸光度計を用いて測定した。試料は 1 N 硝酸で加水分解し、2,850 °C で原子化した。

12. アミノ酸分析

精製酵素標品の一部を凍結乾燥し、その約 3 mg (精秤) に 1 ml の 4%(v/v) チオグリコール酸⁽⁶⁷⁾ を含む 6 N 塩酸を加えて減圧封管し、110 °C で 24, 48 および 72 時間、加水分解した。システインおよびシスチンは、過ギ酸で酸化しシステイン酸としたのち⁽⁶⁸⁾、同様の方法で 24 時間、加水分解した。加水分解後、日立製作所(株)製 835 型アミノ酸分析計でアミノ酸含量を測定した。

13. サブユニットの分離

サブユニットは、Micropak Protein C18-10 カラム (0.4 x 30 cm, Varian Instru-

ments, U. S. A.) を使用し, 逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した。高速液体クロマトグラフは, 日立製作所(株)製 M 655 型を使用した。溶出は, 0.1%(v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) 中のアセトニトリル濃度勾配 (15~80%, v/v) によった。

1 4. アミノ酸配列

サブユニットのN末端アミノ酸配列は, Applied Biosystem, U. S. A. 製のアミノ酸シーケンサー 470 A 型を使用して決定した。アミノ酸のフェニールヒダントイン誘導体含量は, Micro Pak SPC 18-3 カラム (0.4 x 30 cm, Varian Instruments, U. S. A.) を使用した高速液体クロマトグラフィーで測定した。

1 5. 染色バンドのデンストメトリー

染色バンドのデンストメトリーは, 島津製作所(株)製 CS 910 型クロマトスキャナーで記録し積分値を求めた。

第3節 実験結果および考察

1. 酸性ウレアーゼの精製

第3章で詳述したように6タイプの代表酵素は, 分子量, 等電点, 至適反応pHおよび温度, 酸性域における酵素の安定性に関して多様性を示すことが明らかとなった。

ところで, 酵素が酸性領域に至適反応pHを有し, かつ酸性領域で安定であることは本酵素の応用を考えるうえで重要な性質である。そこで表3-2で示した6種の代表酵素の中から, 酸性領域でより安定であった *L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素を更に精製し, 蛋白化学的, 酵素学的諸性質を調べた。

表4-1-1, 表4-1-2, 表4-1-3に, それぞれ, *L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酸性ウレアーゼの, 精製各ステップごとの比活性および活性回収率をまとめて示す。*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素の精製度は, それぞれ, 24.5, 26.9, 27.1 倍であり, 活性回収率は, それぞれ, 11.2, 13.8, 14.9% であった。pH 4 の緩衝液中で測定した比活性は, それぞれ, 304, 350, 458 units/mg protein であった。

Table 4-1-1. Purification of Acid Urease from *L. fermentum* IFO 14511

| Step | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|-----------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|-----------|
| Extraction | 1,444 | 17,900 | 12.4 | 1.0 | 100 |
| Ethanol precipitation | 833 | 16,500 | 19.8 | 1.6 | 92.2 |
| Toyopearl HW-55F | 165 | 13,100 | 79.4 | 6.4 | 73.2 |
| DEAE-Sepharose CL-6B | 52.0 | 8,890 | 171 | 13.8 | 49.7 |
| First affinity gel | 19.1 | 5,820 | 305 | 24.6 | 32.5 |
| Chromatofocusing | NT ^a | 3,010 | NT | NT | 16.8 |
| Second affinity gel | 6.6 | 2,010 | 304 | 24.5 | 11.2 |

^a NT, not tested.

Table 4-1-2. Purification of Acid Urease from *L. reuteri* Rt-5

| Step | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|-----------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|-----------|
| Extraction | 1,410 | 18,300 | 13.0 | 1.0 | 100 |
| Ethanol precipitation | 521 | 15,800 | 30.3 | 2.3 | 86.3 |
| Toyopearl HW-55F | 140 | 13,440 | 96.0 | 7.4 | 73.4 |
| DEAE-Sepharose CL-6B | 78.2 | 10,248 | 131 | 10.1 | 56.0 |
| First affinity gel | 18.0 | 6,426 | 357 | 27.5 | 35.1 |
| Chromatofocusing | NT ^a | 3,274 | NT | NT | 17.9 |
| Second affinity gel | 7.2 | 2,520 | 350 | 26.9 | 13.8 |

^a NT, not tested.

Table 4-1-3. Purification of Acid Urease from *S. mitior* PG-118

| Step | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|-----------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|-----------|
| Extraction | 1,150 | 19,500 | 16.9 | 1.0 | 100 |
| Ethanol precipitation | 436 | 17,700 | 40.6 | 2.4 | 90.8 |
| Toyopearl HW-55F | 105 | 11,900 | 113 | 6.7 | 61.0 |
| DEAE-Sepharose CL-6B | 56.0 | 9,850 | 176 | 10.4 | 50.5 |
| First affinity gel | 11.7 | 5,480 | 469 | 27.8 | 28.1 |
| Chromatofocusing | NT ^a | 3,490 | NT | NT | 17.9 |
| Second affinity gel | 6.3 | 2,900 | 458 | 27.1 | 14.9 |

^a NT, not tested.

2. 精製酵素の単一性

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、クマシーブリリアントブルー-R 250 で染色したところ、いずれの精製酵素も単一バンドを示した(図 4-1-A)。移動度の一番小さいバンドは *L. fermentum* IFO 14511 由来の酵素蛋白であり、移動度が中間のバンドは *L. reuteri* RT-5 由来の酵素蛋白であり、移動度が一番大きいバンドは *S. mitior* PG-118 由来の酵素蛋白であった。第 3 章第 3 節-1 で述べた、活性染色法で検出された蛋白の移動度と、今回測定したクマシーブリリアントブルー染色法で検出された酵素蛋白の移動度が一致することは、確認してある。

3. 分子量

ついで、セファロース CL-6 B を用いるゲル濾過法により分子量を測定した。その結果、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素の分子量は、それぞれ、220,000, 220,000, 200,000 と推定された。これらの値は、第 3 章第 3 節-2 で記述したように、菌体抽出液を使用して測定した分子量とよく一致していた。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果(図 4-1-B), いずれの酵素も移動度の異なる 3 バンドを示したので、いずれも分子量の異なる 3 サブユニットから成り立っていると考えられた。そこで、これら 3 種類のサブユニットを移動度の小さい順に、 α , β および γ と命名した。標準蛋白質の移動度との比較から推定したサブユニットの分子量は、*L. fermentum* IFO 14511 由来の酵素では、 α : 67,000, β : 16,800, γ : 8,600, *L. reuteri* RT-5 由来の酵素では、 α : 68,000, β : 16,100, γ : 8,800, *S. mitior* PG-118 由来の酵素では、 α : 66,000, β : 15,600, γ : 8,600 であった(表 4-2)。

ナタ豆由来の中性ウレアーゼは、同一のサブユニットのヘキサマーとして成り立っている⁽⁶⁹⁾。微生物由来の中性ウレアーゼは、同一のサブユニットで構成されているという報告^(48, 54-56, 70, 71)と、*Selenomonas ruminantium*⁽⁵³⁾, *Klebsiella aerogenes*⁽⁵⁷⁾, *Proteus mirabilis*⁽⁵⁸⁾, *Providencia stuartii*⁽⁵⁹⁾ 由来の中性ウレアーゼのように異なる 3 種のサブユニットから構成される複合体という報告とがある。

これら 3 種類のサブユニットから構成されている中性ウレアーゼのサブユニットも、移動度の小さい順に α , β および γ と命名されており、その分子量は、 α : 70,000~73,000, β : 8,000~11,000, γ : 8,000~9,000 の範囲で分布していた。酸性ウレアーゼのサブユニットの分子量分布と比較すると、 α サブユニットは酸性ウレアーゼの方が小

と、同じサブユニット組成の酵素の分子量が異なる。サブユニットは同等である。中性ウレアーゼと酸性ウレアーゼの両方の酵素の分子量は似かよった範囲で分離していたが(図 3-3、表 3-3、第 3 節)、抗原を決定するサブユニットのレベルで比較すると、両酵素の分子量の分布範囲は似かよっていることが明らかとなった。

中性ウレアーゼでは、この酵素の分子量は、酸性ウレアーゼの分子量に比べて、サブユニットの分子量で除した情報量の分子量が、SDS-サブユニットの分子量をもとにして、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* Rt-5, *S. mitior* PG-118 などの菌株でも同様である。



Table 4-2. Molecular Weights of Subunits of Acid Ureasases

| Source of acid | Molecular weight of subunit |
|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>L. fermentum</i> IFO 14511 | 3,300 |
| <i>L. reuteri</i> Rt-5 | 3,300 |
| <i>S. mitior</i> PG-118 | 3,300 |

Fig. 4-1. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Acid Ureasases.

(A) 6 μ g of each purified enzyme was electrophoresed on a 6%(w/v) polyacrylamide gel. (B) 3 μ g of each purified enzyme was electrophoresed on a 15%(w/v) SDS-polyacrylamide gel.

Lanes:1, *L. fermentum* IFO 14511 ; 2, *L. reuteri* Rt-5 ; and 3, *S. mitior* PG-118.

さく、逆に β サブユニットは酸性ウレアーゼの方が大きく、 γ サブユニットは同等であった。中性ウレアーゼと酸性ウレアーゼのホロ酵素の分子量は似かよった範囲で分布していたが（第 3 章第 3 節-2）、酵素を構成するサブユニットのレベルで比較すると、上記したように分子量の分布範囲は異なっていることが明らかとなった。

中性ウレアーゼでは、これら 3 種類のサブユニットの構成比は、ポリアクリルアミドゲルのバンドのデンストメトリーに基づいて、いずれも $(\alpha_1\beta_2\gamma_2)_2$ と推定されている⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾。

本章で精製された酸性ウレアーゼのサブユニット構成比は、1) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したサブユニットのバンドのデンストメトリーの積分値を、各サブユニットの分子量で除した値の比が約 1:2:1 であること、2) ゲル濾過法で推定された精製酵素の分子量が、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で推定されたサブユニットの分子量をもとにして上記 1:2:1 を仮定して計算した値と一致を示すことから、L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来のいずれの酵素のサブユニットの構成比も $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)_2$ と推定された。なお、代表として L. fermentum IFO

Table 4-2. Molecular Weight of Subunits of Acid Ureases

| Source of acid urease | Molecular weight of subunit | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---------|----------|
| | α | β | γ |
| <u>L. fermentum</u> IFO 14511 | 67,000 | 16,800 | 8,600 |
| <u>L. reuteri</u> Rt-5 | 68,000 | 16,100 | 8,800 |
| <u>S. mitior</u> PG-118 | 66,000 | 15,600 | 8,600 |

14511 由来の酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のゲルバンドのデンストメトリーを図 4-2 に示す。

4. 等電点

3 精製酵素の等電点を、アンホラインを含むポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法により求めた。等電点電気泳動の結果、3 精製酵素蛋白はすべて単一バンドであり、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素の等電点は、それぞれ、4.8, 4.7, 4.6 であった。これらの値は、第 3 章第 3 節-3 で記述した菌体抽出液を使用して測定した値とよく一致していた。

5. 金属分析

ナタ豆⁽⁷²⁾ および大豆⁽⁴⁹⁾ 由来の中性ウレアーゼは、サブユニット 1 モルあたり 2 モルのニッケルを含有していることが知られている。バクテリア由来の中性ウレアーゼの場合は、同一サブユニットで構成される酵素では、サブユニット 1 モルあたり 1 モル^(48, 56) のニッケルを、また、3 種類の異なるサブユニットから構成されている酵素では $(\alpha_1\beta_2\gamma_2)$ ユニットあたり 2 モル^(53, 57) のニッケルを含有することが報告されている。

そこで、本章で精製された酸性ウレアーゼのニッケル含量を、原子吸光法によって測定した。*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素のニッケル含量は、 $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)$ ユニット 1 モルあたり 1.9 モル, 1.8 モル, 1.9 モルと計算された。この結果から、いずれの酸性ウレアーゼも、 $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)$ ユニット 1 モルあたり 2 モルのニッケルを含有しているものと推定される。

6. アミノ酸組成

3 精製酵素を 4%(v/v) チオグリコール酸を含む 6 N 塩酸存在下に封管中で、110 °C で 24, 48, 72 時間加水分解して、そのアミノ酸組成を調べた。セリン、トレオニンは 0 時間外挿値を求め、イソロイシン、バリンは 72 時間値 (最大値) を用いた⁽⁷³⁾。その他のアミノ酸分析値は、加水分解時間による差がほとんどなく平均値を求めた。表 4-3 にその結果と、すでに報告されている *Klebsiella aerogenes*⁽⁵⁷⁾, *Brevibacterium ammoniagenes*⁽⁴⁸⁾, ナタ豆⁽⁷⁴⁾ および大豆⁽⁴⁹⁾ 由来の中性ウレアーゼのアミノ酸分

Table 4-1. Amino Acid Composition of Acid Ureas

| Amino acid | Data percent (%) ^a | | | | | Jack ^b bean | Soy ^b bean |
|--------------------|-------------------------------|------------------|---------------|-------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|
| | <i>L. fermentum</i> | <i>ventriosi</i> | <i>mixtic</i> | <i>alle</i> | <i>lactaria</i> | | |
| asp ^c | | | | | | 10.6 | 12.3 |
| Thr ^c | 2.0 | 0.3 | 2.4 | 0.9 | 3.2 | 0.6 | 5.3 |
| Ser ^c | 4.0 | 3.8 | 5.8 | 5.1 | 2.8 | 5.5 | 5.8 |
| Glu ^c | 8.9 | 9.3 | 8.5 | 10.3 | 10.2 | 8.2 | 10.1 |
| Pro | 4.6 | 4.3 | 4.2 | 5.5 | 4.7 | 5.0 | 5.1 |
| Gly | 0.0 | 10.3 | 10.2 | 12.4 | 9.7 | 5.4 | 10.4 |
| Ala | 8.6 | 8.9 | 8.2 | 10.5 | 10.7 | 8.2 | 7.4 |
| l-cys ^d | 1.5 | 1.4 | 1.3 | 1.4 | 0.4 | 1.8 | 0.5 |
| Val ^e | 4.8 | 7.3 | 7.5 | 7.5 | 7.2 | 6.6 | 6.3 |
| Ile ^e | 3.3 | 2.6 | 2.4 | 1.7 | 1.6 | 3.5 | 2.0 |
| Ile ^f | 6.6 | 6.9 | 6.1 | 5.7 | 7.1 | 7.9 | 6.2 |
| Leu | 6.7 | 7.1 | 6.1 | 6.8 | 7.5 | 6.2 | 6.2 |
| Tyr | 4.1 | 3.2 | 4.3 | 3.0 | 3.2 | 2.5 | 2.4 |
| Phe | 2.9 | 3.0 | 2.8 | 2.5 | 3.0 | 2.9 | 4.2 |
| His | 1.9 | 2.0 | 2.5 | 2.0 | 1.9 | 3.0 | 2.1 |
| Lys | | | | | | 5.7 | 5.8 |
| Arg | | | | | | 4.5 | 4.5 |
| Trp | 0.8 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 0.5 | 0.1 |

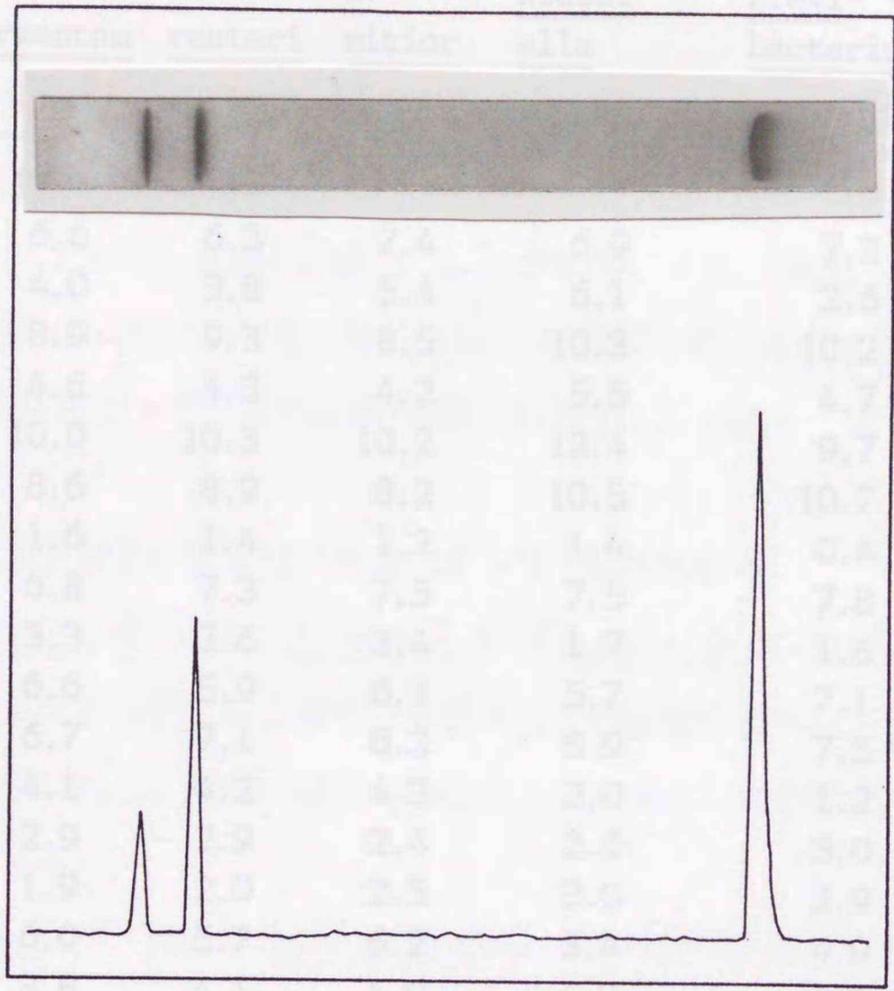


Fig. 4-2. Densitometric Tracing of Polyacrylamide Gel Stained for Protein.

The purified acid urease (10 μ g of protein) from *L. fermentum* IFO 14511 was subjected to electrophoresis. Tracing was made at 630 nm with a Shimadzu CS 910 Chromatoscanner.

Table 4-3. Amino Acid Composition of Acid Ureasases

| Amino acid | Mole percent (%) ^a | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|--|---------------------------|--------------------------|
| | <u>L.</u> <u>fermentum</u> | <u>L.</u> <u>reuteri</u> | <u>S.</u> <u>mitior</u> | <u>Klebsi-</u> <u>ella</u> <u>aerogenes</u> | <u>Brevi-</u> <u>bacterium</u> <u>ammoniagenes</u> | Jack ¹ bean | Soy ¹ bean |
| Asp ^b | 12.6 | 11.5 | 12.1 | 9.2 | 11.6 | 10.6 | 12.8 |
| Thr ^c | 6.6 | 6.3 | 7.4 | 6.9 | 7.2 | 6.6 | 5.3 |
| Ser ^c | 4.0 | 3.8 | 5.4 | 6.1 | 3.6 | 5.5 | 5.8 |
| Glu ^b | 8.9 | 9.3 | 8.5 | 10.3 | 10.2 | 8.2 | 10.1 |
| Pro | 4.6 | 4.3 | 4.2 | 5.5 | 4.7 | 5.0 | 6.1 |
| Gly | 10.0 | 10.3 | 10.2 | 12.4 | 9.7 | 9.4 | 10.4 |
| Ala | 8.6 | 8.9 | 8.2 | 10.5 | 10.7 | 8.8 | 7.4 |
| H-cys ^d | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.4 | 0.4 | 1.8 | 0.5 |
| Val ^e | 6.8 | 7.3 | 7.5 | 7.5 | 7.8 | 6.6 | 6.3 |
| Met | 3.3 | 3.6 | 3.4 | 1.7 | 1.8 | 2.5 | 2.0 |
| Ile ^e | 6.6 | 5.9 | 6.1 | 5.7 | 7.1 | 7.9 | 6.2 |
| Leu | 6.7 | 7.1 | 6.2 | 6.9 | 7.5 | 8.2 | 8.2 |
| Tyr | 4.1 | 4.2 | 4.2 | 2.0 | 1.2 | 2.5 | 2.4 |
| Phe | 2.9 | 2.9 | 2.4 | 2.6 | 3.0 | 2.9 | 4.2 |
| His | 1.9 | 2.0 | 2.5 | 3.0 | 2.9 | 3.0 | 2.1 |
| Lys | 6.0 | 5.7 | 6.2 | 3.4 | 4.9 | 5.7 | 5.6 |
| Arg | 3.8 | 4.1 | 4.0 | 4.0 | 4.9 | 4.5 | 4.6 |
| Trp | 0.8 | 1.3 | 0.3 | 1.0 | 0.9 | 0.5 | NT ^f |

^a The values are the averages for 24-, 48- and 72-hr hydrolyses in 6 N HCl containing 4%(v/v) thioglycolic acid at 110 °C.

^b Free amino acid and corresponding amide.

^c Obtained by extrapolation to zero time of hydrolysis.

^d H-cys: Half-cystine determined as cysteic acid in a 24-hr hydrolysate after performic acid oxidation.

^e Value for 72-hr hydrolysate.

^f NT, not tested.

¹ Taken from (49).

² Taken from (40).

³ Taken from (66).

⁴ Taken from (41).

析値を示す。これら中性ウレアーゼのアミノ酸組成と比較すると、L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の酸性ウレアーゼのアミノ酸組成は、チロシン含量が、1.6~3.5 倍およびメチオニン含量が、1.3~2.1 倍高いことが特徴的である。

7. 基質特異性

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酸性ウレアーゼは尿素とヒドロキシ尿素を基質とし、チオ尿素, メチル尿素, エチル尿素からのアンモニア生成は認められなかった(表 4-4)。この基質特異性はナタ豆⁽⁷⁵⁾ および Proteus 属細菌⁽⁷⁶⁾ 由来のウレアーゼの基質特異性と近似している。

8. 酵素活性および安定性におよぼす pH と温度の影響

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酸性ウレアーゼの活性および安定性におよぼす, pH と温度の影響を調べた(表 4-5)。代表として L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の活性および安定性におよぼす, pH と温度の影響を図示した(図 4-3)。

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5 由来の精製酸性ウレアーゼの至適反応 pH は 2 であり, S. mitior PG-118 由来の酵素の至適反応 pH は 4.5 であった。至適反応温度は, いずれの 3 精製酵素も 65 °C であった。これら 3 精製酵素を, 種々の pH の緩衝液中で 37 °C で 30 分間保温したところ, いずれの酵素活性も pH 3~9 の範囲で安定であった。一方, pH 4 の緩衝液中で種々の温度で 30 分間保温したところ, L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5 由来の精製酵素活性は 50 °C 以下で, S. mitior PG-118 由来の精製酵素活性は 40 °C 以下で, 安定であった。

9. 阻害剤

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の酸性ウレアーゼ活性におよぼす, 各種金属イオンの影響を表 4-6 に示す。いずれの精製酵素も Hg^{2+} および Ag^+ によって強く阻害を受け, Cu^{2+} により部分的な阻害を受けることが判明した。次に, これらの酸性ウレアーゼ活性におよぼす, 各種化合物の影響を調べた。表 4-7 に示すように, いずれの精製酵素も, SH 基阻害剤であるパラクロロ安息香酸, およびキレ
メリクリ

Table 4-4. Substrate Specificity of Acid Ureases

| Source of* acid urease | Substrate | Activity (units/ml) |
|----------------------------------|-------------|------------------------|
| <u>L. fermentum</u> IFO 14511 | Urea | 30 |
| | Thiourea | 0 |
| | Methylurea | 0 |
| | Ethylurea | 0 |
| | Hydroxyurea | 0.25 |
| <u>L. reuteri</u> Rt-5 | Urea | 32 |
| | Thiourea | 0 |
| | Methylurea | 0 |
| | Ethylurea | 0 |
| | Hydroxyurea | 0.29 |
| <u>S. mitior</u> PG-118 | Urea | 43 |
| | Thiourea | 0 |
| | Methylurea | 0 |
| | Ethylurea | 0 |
| | Hydroxyurea | 0.37 |

* 100 μ g/ml of the purified enzyme was used.

ト剤であるアセトヒドロキサム酸により強く阻害を受け、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) によって部分的に阻害を受けた。パラクロロ安息香酸は、ルーメン細菌⁽⁵²⁾ および Brevibacterium ammoniagenes⁽⁴⁸⁾ 由来の中性ウレアーゼを阻害し、アセトヒドロキサム酸は、Clostridium sordelii, Escherichia coli, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Staphylococcus aureus 由来⁽⁷⁶⁾ の中性ウレアーゼを阻害することが知られている。

Table 4-5. Effect of pH and Temperature on Acid Urease Activities*

| Source of acid urease | Optimum pH | Optimum temperature (°C) | Stable pH | Stable temperature (°C) |
|-------------------------------|------------|--------------------------|-----------|-------------------------|
| <u>L. fermentum</u> IFO 14511 | 2 | 65 | 3~9 | below 50 |
| <u>L. reuteri</u> Rt-5 | 2 | 65 | 3~8 | below 50 |
| <u>S. mitior</u> PG-118 | 4.5 | 65 | 4~8 | below 40 |

* Experimental details are described in Table 3-2.

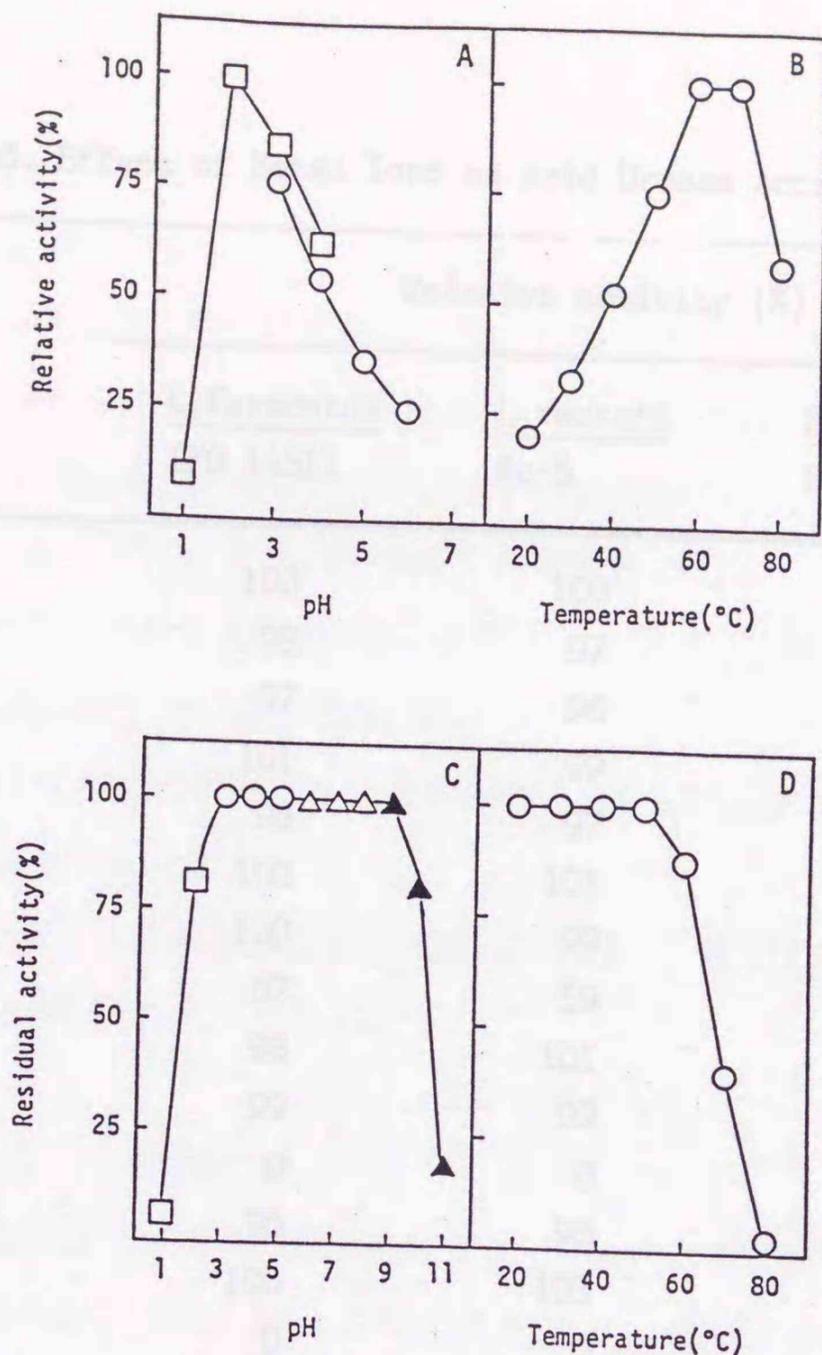


Fig. 4-3. Effect of pH and Temperature on Activity and Stability of Acid Urease from *L. fermentum* IFO 14511.

(A) The enzyme activity was measured under the standard assay conditions, except that buffers with the indicated pH values were used. Buffers were 0.2 M sodium acetate-HCl buffer (pH 1~4, \square) and 0.2 M citrate buffer (pH 3~6, \circ).

(B) The enzyme activity was measured under the standard assay conditions, except that the reaction temperatures were varied as indicated.

(C) The enzyme was incubated in buffers at various pHs at 37 °C for 30 min. The residual enzyme activity was assayed after adjustment of the pH of the reaction mixture to pH 4. The buffers used for incubation of the enzyme were 0.2 M sodium acetate-HCl buffer (pH 1~2, \square), 0.2 M citrate buffer (pH 3~5, \circ), 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6~8, \triangle) and 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 9~11, \blacktriangle).

(D) The enzyme was incubated at various temperatures at pH 4 for 30 min and then the whole reaction mixture was rapidly cooled in an ice bath. The residual enzyme activity was measured under the standard assay conditions.

Table 4-6. Effect of Metal Ions on Acid Urease Activities

| Metal ion (5 mM) | Relative activity (%) | | |
|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------|
| | <u>L.fermentum</u> | <u>L.reuteri</u> | <u>S.mitior</u> |
| | IFO 14511 | Rt-5 | PG-118 |
| None | 100 | 100 | 100 |
| Mg ²⁺ | 98 | 97 | 100 |
| Ca ²⁺ | 97 | 96 | 95 |
| Mn ²⁺ | 101 | 99 | 95 |
| Fe ²⁺ | 98 | 97 | 99 |
| Co ²⁺ | 102 | 101 | 100 |
| Ni ²⁺ | 100 | 99 | 101 |
| Cu ²⁺ | 67 | 59 | 27 |
| Zn ²⁺ | 98 | 101 | 99 |
| Sr ²⁺ | 99 | 99 | 97 |
| Ag ⁺ | 0 | 0 | 0 |
| Sn ²⁺ | 96 | 98 | 96 |
| Ba ²⁺ | 100 | 103 | 99 |
| Hg ²⁺ | 0 | 0 | 0 |

Table 4-7. Effect of Various Chemicals on Acid Urease Activities

| Reagent | Concentration (mM) | Relative activity (%) | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|
| | | <u>L.fermentum</u> | <u>L.reuteri</u> | <u>S.mitior</u> |
| | | IFO 14511 | Rt-5 | PG-118 |
| None | - | 100 | 100 | 100 |
| PCMB ^a | 0.1 | 3 | 4 | 1 |
| NEM ^b | 10 | 101 | 99 | 102 |
| Acetohydroxamic acid | 10 | 10 | 8 | 6 |
| Nitrilotriacetic acid | 10 | 104 | 102 | 100 |
| EDTA ^c | 50 | 73 | 79 | 72 |
| NaCN | 10 | 97 | 101 | 104 |
| NaN ₃ | 10 | 100 | 98 | 103 |

^a p-Chloromercuribenzoic acid.

^b N-Ethylmaleimide.

^c Ethylenediamine tetraacetic acid.

10. K_m 値および V_{max} 値

L. fermentum IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の精製酵素の動力学的パラメーターを至適反応pHである、pH 2 の 0.2 M 酢酸緩衝液と、pH 4.5 の 0.2 M クエン酸緩衝液を用いて 37 °C で測定した。基質である尿素濃度に対する尿素分解速度のプロットは、通常のカエリスメンテン曲線を示した。 K_m 値および V_{max} 値はラインウエーバーバーグプロット (図 4-4) から推定した。

L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の pH 2 における K_m 値および V_{max} 値は、2.7 mM と 440 μ mol/min/mg protein であった。

L. reuteri RT-5 由来の酵素の pH 2 における K_m 値および V_{max} 値は、2.8 mM と 580 μ mol/min/mg protein であった。

S. mitior PG-118 由来の酵素の pH 4.5 における K_m 値および V_{max} 値は、2.0 mM と 460 μ mol/min/mg protein であった。

11. サブユニットの分取

3 種類の精製酵素のうち代表酵素として *L. fermentum* IFO 14511 由来の酵素を選びサブユニットの分取を試みた。図 4-5-A に示すように、逆相クロマトグラフィーを使用し精製酵素を 3 画分に、はじめて分離分取することができた。これら 3 画分が本酵素のサブユニットであることは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果確認でき、サブユニットは、 β , γ , α の順番に溶出していた (図 4-5-B)。

次に、これら分取サブユニットによる再構成実験を試みた。まず、分取サブユニットを 0.1 M HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンサルホン酸)⁽⁷⁷⁾ 緩衝液に対して透析した。次に、サブユニットとニッケルのモル比 $\alpha : \beta : \gamma : \text{ニッケル}$ が約 1 : 2 : 1 : 2 となるように、混液を調製した。すなわちサブユニット α , 50 μ g, β , 25 μ g, γ , 7 μ g と、硫酸ニッケル 6 水和物, 0.4 μ g を 0.1 ml の 0.1 M HEPES 緩衝液に溶解した。この混液を、4 および 10 °C で 1 および 2 月間保温したのちに、ウレアーゼ活性を測定したが、活性を検出できなかった。また蛋白質が変性状態から復元する過程で活性を回復することを期待して、0.1 M HEPES 緩衝液に対して透析したサブユニットを、6 M 塩酸グアニジンあるいは 8 M 尿素中で 24 °C で 4 時間保温したのち、再度 0.1 M HEPES 緩衝液に対して透析した。このようにして得たサブユニットを使用し、上記した再構成条件で混合したのち保温したが、活性を検出できなかった。逆相クロマトグラ

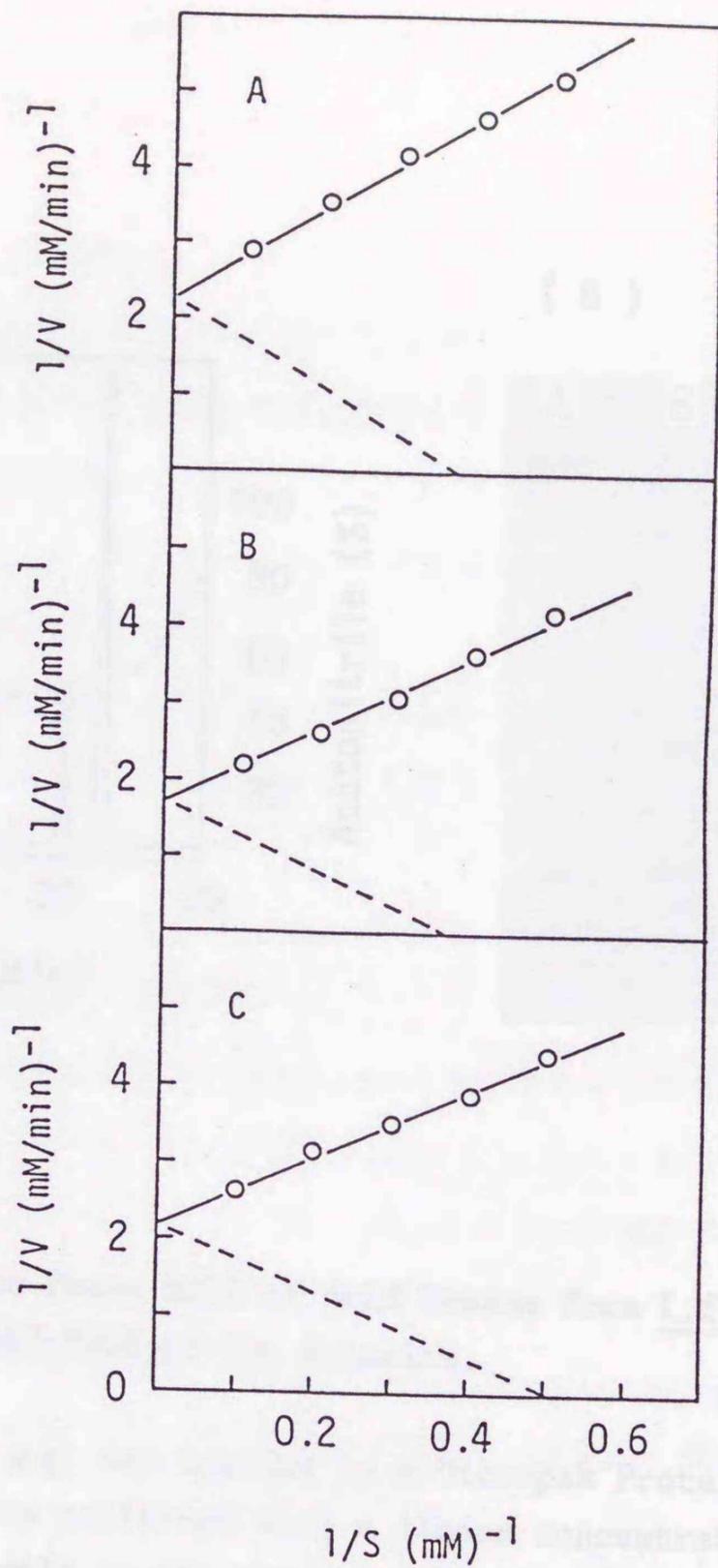


Fig. 4-4. Lineweaver-Burk plot of kinetic data obtained with acid urease.

A, L.fermentum IFO 14511; B, L.reuteri Rt-5;
C, S.mitior PG-118.

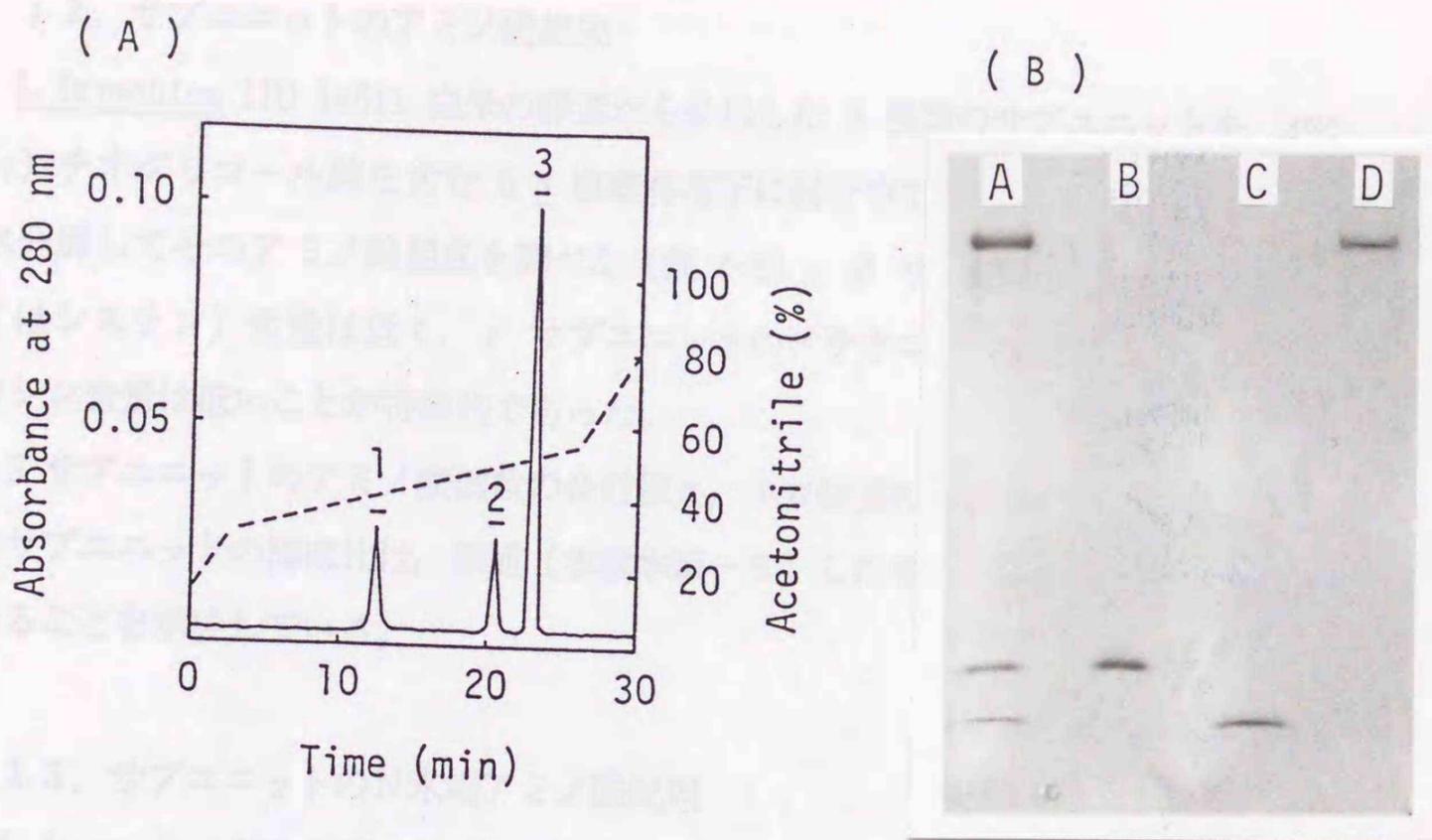


Fig. 4-5. (A) Reverse Phase HPLC of Acid Urease from *L. fermentum* IFO 14511, and (B) SDS-PAGE of the Subunits.

(A) Acid urease ($50 \mu\text{g}$) was applied to a Micropak Protein C18-10 column. Elution was performed with a linear concentration gradient of acetonitrile in the presence of 0.1% TFA. Flow rate was 1.0 ml/min: ———, absorbance at 280 nm; - - - - -, concentration of acetonitrile (%). Fractions, 1, 2 and 3, denoted by the bars were pooled.

(B) Electrophoresis was carried out with a 5~20% gradient polyacrylamide gel containing 0.1% SDS.

Lanes: A, holoenzyme ($4 \mu\text{g}$ of protein); B, fraction 1 ($2 \mu\text{g}$); C, fraction 2 ($2 \mu\text{g}$); and D, fraction 3 ($2 \mu\text{g}$).

フィーの溶出にはアセトニトリルを使用しており、再構成後に活性を示しえない程度に酵素蛋白質が変性している可能性がある。

1 2. サブユニットのアミノ酸組成

L. fermentum IFO 14511 由来の酵素から分取した 3 種類のサブユニットを、4% (v/v) チオグリコール酸を含む 6 N 塩酸存在下に封管中で 110 °C, 24, 48, 72 時間、加水分解してそのアミノ酸組成を調べた (表 4-8)。β サブユニットのシステイン (もしくはシスチン) 含量は低く、γ サブユニットのメチオニン含量は高く、ヒスチジンとチロシン含量は低いことが特徴的であった。

3 サブユニットのアミノ酸個数の合計値と、ホロ酵素のアミノ酸個数に基づいて算出したサブユニットの構成比は、前述 (本章本節-3) したサブユニット比 ($\alpha_1\beta_2\gamma_1$)₂ であることを示唆している。

1 3. サブユニットのN末端アミノ酸配列

L. fermentum IFO 14511 由来の酵素から分取した 3 サブユニットのN末端アミノ酸配列を、気相アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystem, U.S.A.) を使用したエドマン分解法⁽⁷⁸⁾ で測定した (表 4-9)。α, β, γ サブユニットのN末端アミノ酸配列はそれぞれ、Ser-Phe-Asp-Met-, Met-Val-Pro-Gly-, Met-Arg-Leu-Thr- であった。これらのアミノ酸配列は、ナタ豆由来の中性ウレアーゼ⁽⁷⁴⁾ や、*Klebsiella aerogenes* および *Proteus mirabilis* 由来の中性ウレアーゼ⁽⁴⁶⁾ のN末端アミノ酸配列と異なるものである。

Table 4-8. Amino Acid Composition of Acid Urease and Its Subunits from L.fermentum IFO 14511

| Amino acid | Number of residues per molecule ^a | | | |
|--------------------|--|------------------|-----------------|------------------|
| | Holo-enzyme | Subunit α | Subunit β | Subunit γ |
| Asp ^b | 254.6 | 83.0 | 20.3 | 6.1 |
| Thr ^c | 132.8 | 43.4 | 3.5 | 6.3 |
| Ser ^c | 79.9 | 25.5 | 4.1 | 1.4 |
| Glu ^b | 180.1 | 48.9 | 18.4 | 10.1 |
| Pro | 91.6 | 26.3 | 8.7 | 3.9 |
| Gly | 201.6 | 67.2 | 16.0 | 6.3 |
| Ala | 173.9 | 59.4 | 7.7 | 5.6 |
| H-cys ^d | 32.9 | 16.0 | 0.1 | 0.8 |
| Val ^e | 136.8 | 37.8 | 12.4 | 3.8 |
| Met | 66.8 | 20.5 | 1.2 | 5.6 |
| Ile ^e | 134.1 | 44.4 | 4.8 | 6.0 |
| Leu | 136.0 | 38.4 | 10.0 | 7.7 |
| Tyr | 81.6 | 26.9 | 9.2 | 0.1 |
| Phe | 57.9 | 16.4 | 5.8 | 0.8 |
| His | 38.1 | 15.1 | 2.3 | 0.2 |
| Lys | 121.8 | 30.0 | 14.2 | 6.2 |
| Arg | 77.3 | 19.8 | 7.2 | 5.3 |
| Trp | 17.0 | 3.4 | 1.8 | 0.8 |

- ^a The values are the averages for 24-, 48- and 72-hr hydrolyses in 6 N HCl at 110 °C in the presence of 4%(v/v) thioglycolic acid . Calculations were based on molecular weights for the holoenzyme, subunit α , subunit β and subunit γ of 220,000, 67,000, 16,800 and 8,600, respectively.
- ^b Free amino acid and corresponding amide.
- ^c Obtained by extrapolation to zero time of hydrolysis.
- ^d H-cys: Half-cystine determined as cysteic acid in a 24-hr hydrolysate after performic acid oxidation.
- ^e Value for 72-hr hydrolysate.

Table 4-9. N-Terminal Amino Acid Sequence of Subunits of Acid Urease from L.fermentum IFO 14511

The sequence analysis was performed by the Edman degradation method. The amount of subunit α , β and γ was 1,700 pmol, 1,800 pmol and 1,400 pmol, respectively.

| Cycle | PTH-amino acid detected (pmol) | | |
|-------|--------------------------------|------------|------------|
| | Subunit | Subunit | Subunit |
| | α | β | γ |
| 1 | Ser(476) | Met(1,378) | Met(1,130) |
| 2 | Phe(1,406) | Val(880) | Arg(954) |
| 3 | Asp(1,206) | Pro(732) | Leu(1,220) |
| 4 | Met(1,156) | Gly(1,152) | Thr(330) |

第4節 要旨

酸性域で安定性の高い L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の酵素を電気泳動的に単一になるまで精製して、その諸性質を明らかにした。

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酵素の分子量はそれぞれ 220,000, 220,000, 200,000 であった。いずれの精製酵素も分子量の異なる 3 サブユニットから構成されており、サブユニット分子量は、 α : 66,000~68,000, β : 15,000~16,800, γ : 8,600~8,800 の範囲に分布していた。いずれの酵素もサブユニットの構成比は $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)_2$ と推定された。

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酵素の等電点は、それぞれ、4.8, 4.7, 4.6 であった。

いずれの酵素も $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)$ ユニットあたり 2 モルのニッケルを含有していた。

3 精製酵素のアミノ酸組成は互いに近似しており、チロシン、メチオニンの含量が中性ウレアーゼより高いことが特徴的であった。

L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の 3 サブユニットを逆相クロマトグラフィーにより分取した。 β サブユニットのシステイン (もしくはシスチン) の含量は低かった。 γ サブユニットのメチオニン含量は高く、ヒスチジンとチロシンの含量は低いことが特徴的であった。 α , β , γ サブユニットのN末端アミノ酸配列は、それぞれ Ser-Phe-Asp-Met-, Met-Val-Pro-Gly-, Met-Arg-Leu-Thr- であった。

3 精製酵素の基質特異性は同じ特徴を示し、尿素とヒドロキシ尿素を基質とした。

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酵素の至適反応 pH は、それぞれ、2, 2, 4.5 であり、至適反応温度はいずれも 65 °C であった。これら 3 精製酵素を、種々の pH の緩衝液中で 37 °C で 30 分間保温したところ、いずれの酵素活性も pH 3~9 の範囲で安定であった。一方、pH 4 の緩衝液中で種々温度で 30 分間保温したところ、L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5 由来の精製酵素活性は 50 °C まで、S. mitior PG-118 由来の精製酵素活性は 40 °C まで安定であった。

いずれの 3 精製酵素活性も Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , パラクロロ安息香酸, アセトヒドロキサム酸により阻害された。
メリクリ

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酵素の至適反応 pH における K_m 値は、それぞれ、2.7, 2.8, 2.0 mM であり、 V_{max} 値はそれぞれ、440, 580, 460 μ mol/min/mg protein であった。

第5章 酸性ウレアーゼの生産

第1節 緒言

酸性ウレアーゼを酒質保全剤として実用化するためには、工業的規模で本酵素を生産しうる技術の確立が重要である。そのためには培地組成とその濃度、誘導などの生理的性質、および培養条件の影響を把握し、その結果に基づいて最適化することが必要である。そこで炭素源、窒素源、尿素による誘導効果、金属塩濃度の影響、温度、pHなどの培養条件の影響について調べ、最適培養法を設定することとした。

第2節 実験材料および方法

1. 試薬

ペプトンと酵母エキスは日本製薬(株)から購入した。肉エキスは和光純薬工業(株)から購入した。カザミノ酸、バクトカジトン、麦芽エキスは Difco Laboratories, U.S.A. から購入した。

2. 使用菌株

L. fermentum IFO 14511 を使用した。

3. 培養の方法

MRS 培地⁽⁷⁹⁾ を改変したものを基本培地として用いた。培地組成は 3.0%(w/v) グルコース、0.2%(w/v) 酢酸ナトリウム、1.5%(w/v) ペプトン、0.8%(w/v) 酵母エキス、1.0%(w/v) 肉エキス、0.5%(w/v) 塩化ナトリウムおよび 0.005%(w/v) 硫酸マンガ ン 4~5 水和物である。

i) 試験管培養法

保存培養液 0.1 ml を、試験管 (16 x 150 mm) 内の 10 ml の基本培地に接種して、37 °C で 16 時間静置培養した。この種培養物 0.5 ml を試験管内の 10 ml の培地に接種し、32 °C で 2 日間静置培養した。

ii) フラスコ培養法

保存培養液 0.1 ml を、試験管内の 10 ml の基本培地に接種し、37 °C で 16 時間静置培養した。この種培養物 8 ml を、200 ml エルレンマイヤーフラスコ内の 160 ml の培地に接種し、32 °C で 2 日間静置培養した。

iii) ジャー培養法

保存培養液 2 ml を、300 ml のエルレンマイヤーフラスコ内の 200 ml の基本培地に接種し、37 °C で 16 時間静置培養した。この種培養物全量を 5 l ジャー内の 4 l の培地に接種し、32 °C で 2 日間静置培養した。

iv) タンク培養法

保存培養液 80 ml を、200 l タンク内の 80 l の基本培地に接種し、37 °C で 24 時間静置培養した。この種培養物全量を 2,000 l タンク内の 1,600 l の培地に接種し、32 °C で 2 日間静置培養した。

以上の方法で培養した液を、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) して集菌し、0.2 M クエン酸緩衝液で遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 4 °C) することによって 2 回洗浄したのち、同緩衝液に懸濁し酵素活性を測定するための菌体懸濁液とした。特に記述しない場合は、この菌体懸濁液を用いて酵素活性を測定した。

4. 菌体抽出液の調製

第 3 章第 2 節-4 の方法で調製した。

5. 酸性ウレアーゼ活性の測定

第 2 章第 2 節-6 の方法に従って、0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4) を用いて測定した。

6. 蛋白質の測定

第 4 章第 2 節-6 の方法で測定した。

7. グルコースの測定

グルコースはグルコースオキシダーゼとパーオキシダーゼを組合わせたグルコース測定用 "Glu-cinet" 試薬キット (Technicon Chemicals Company, Belgium) で測定した。

8. 乾燥菌体重量の測定

培養菌体を蒸留水で遠心分離 (10,000 x g, 20 分間, 4 °C) することによって 2 回洗浄したのちに、試験管に移した。真空下で 80 °C, 48 時間乾燥したのち重量を測定した。

第3節 実験結果および考察

1. 炭素源および窒素源の影響

基本培地からグルコースと肉エキスを除いた培地を使用して、各種の炭素源 (3%, w/v) の菌生育および酸性ウレアーゼ生産におよぼす影響を調べた (表 5-1)。その結果、フラクトース、マンノース、乳糖、デキストリンおよびグリセリンは生育を抑制し、グルコースが生育および酸性ウレアーゼ生産に最も適した炭素源であった。そこで、グルコース添加濃度を変化させて、酸性ウレアーゼ生産に対するグルコースの影響を調べた (図 5-1)。グルコースが 3%(w/v) 以下では、グルコース濃度の増加に伴って酸性ウレアーゼ生産量は増加した。しかしながら、グルコースが 3%(w/v) 以上になると、培養の後半にグルコース消費が停止するとともに酸性ウレアーゼ生産も停止した。本菌はヘテロ乳酸醗酵を営むことが、明らかとなっている⁽³⁵⁾。したがって、本現象はグルコースによる直接的な阻害と考えるよりも、むしろ乳酸の蓄積による培地 pH の低下によるものと考えられる。

次に、各種の窒素源の生育および酸性ウレアーゼ生産におよぼす影響を調べた (表 5-2)。基本培地に含まれる窒素源の添加濃度を変化させて調べた結果、ペプトン、肉エキス、酵母エキスの至適濃度は、それぞれ、1.5, 1.0, 0.8%(w/v) であった。また、これら以外の窒素源を選択するための培地として、基本培地の窒素源濃度を半分にした培地を用いた。本培地にカザミノ酸、バクトカジトン、麦芽エキスを 1.7%(w/v) になるように添加して酸性ウレアーゼ生産におよぼす影響を調べた。基本培地に含まれる窒素源と異なり、これらの窒素源は酸性ウレアーゼ生産を増加させなかった。細菌によるウレアーゼの生成については、無機アンモニウム塩による阻害が報告されている⁽⁸⁰⁻⁸²⁾。しかしながら、本菌の場合、硫酸アンモニウムを 3%(w/v) になるように基本培地に添加しても、酸性ウレアーゼの生産は阻害されなかった。

Table 5-1. Effect of Carbon Sources on Acid Urease Production and Cell Growth of L. fermentum IFO 14511^a.

| Carbon source (3%, w/v) | Acid urease activity (units/ml) | Cell growth (mg DW ^b /ml) |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Glucose | 2.1 | 0.9 |
| Fructose | 0.1 | 0.2 |
| Galactose | 1.2 | 0.6 |
| Mannose | ND ^c | 0.1 |
| Maltose | 0.6 | 0.4 |
| Sucrose | 0.7 | 0.5 |
| Lactose | ND | 0.1 |
| Dextrin | ND | 0.1 |
| Glycerol | ND | 0.1 |

^a L. fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the basal medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C for 2 days.

^b DW, dry weight.

^c ND, not detected.

Table 5-2 Effect of Nitrogen Source on Acid Urease Production and Cell Growth of *L. fermentum* IFO 14511

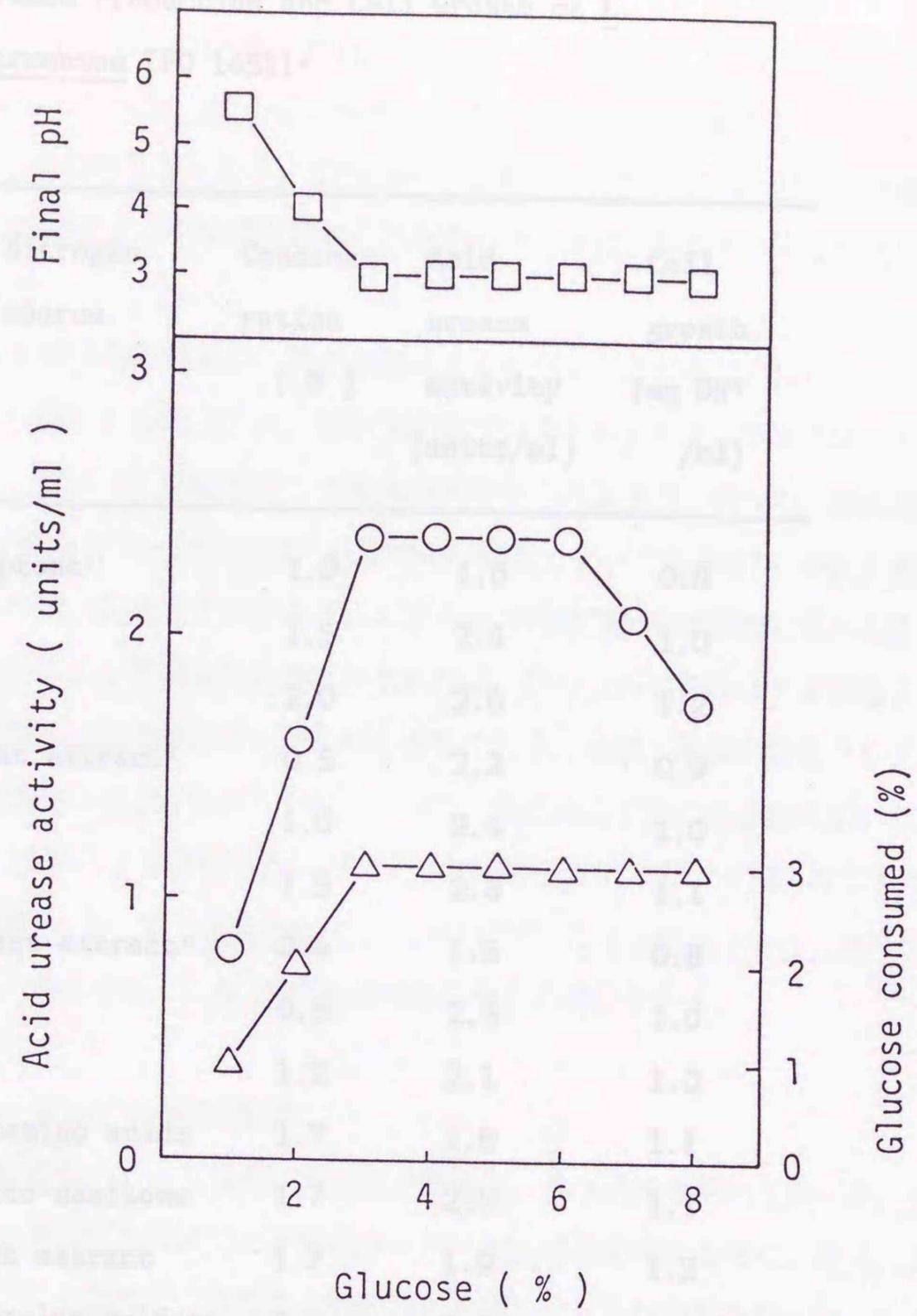


Fig. 5-1. Effect of Glucose on Acid Urease Production by *L.fermentum* IFO 14511.

L.fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C for 2 days.

○, acid urease activity; △, glucose consumed; □, final pH.

Table 5-2. Effect of Nitrogen Sources on Acid Urease Production and Cell Growth of L. fermentum IFO 14511^a.

| Nitrogen source | Concentration (%) | Acid urease activity (units/ml) | Cell growth (mg DW ^b /ml) |
|----------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Peptone ^c | 1.0 | 1.6 | 0.8 |
| | 1.5 | 2.4 | 1.0 |
| | 2.0 | 2.0 | 1.2 |
| Meat extract ^c | 0.5 | 2.2 | 0.9 |
| | 1.0 | 2.4 | 1.0 |
| | 1.5 | 2.3 | 1.1 |
| Yeast extract ^c | 0.4 | 1.5 | 0.8 |
| | 0.8 | 2.3 | 1.0 |
| | 1.2 | 2.1 | 1.0 |
| Casamino acids | 1.7 | 1.8 | 1.1 |
| Bacto-casitone | 1.7 | 2.0 | 1.1 |
| Malt extract | 1.7 | 1.9 | 1.2 |
| Ammonium sulfate | 3.0 | 2.4 | 1.0 |

^a L. fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the basal medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C for 2 days.

^b DW, dry weight.

^c Included in the basal medium.

2. 尿素による酵素生産の誘導効果

L. fermentum IFO 14511 の生育および酸性ウレアーゼ生産におよぼす尿素および尿素誘導体の影響について調べた。表 5-3 に示すように、尿素とその誘導体を基本培地に 0.5%(w/v) 添加して培養したところ、尿素のみが酸性ウレアーゼの生産を約 4 倍増加させ、尿素誘導体にはそのような効果は認められなかった。また、尿素を添加しても生育は影響を受けなかった。

この尿素による酵素産生促進が、誘導作用によるものか判断するために、0.5%(w/v) 尿素添加と同時（培養 6 時間目）に、蛋白合成阻害剤であるクロラムフェニコール (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、更に 42 時間培養して菌体抽出液中の酵素活性を調べた。抽出液蛋白質重量あたりの酸性ウレアーゼ活性は、尿素のみの添加によって基本培地の約 4 倍に増加したにもかかわらず、尿素とクロラムフェニコールの同時添加では増加は認められなかった。これは、尿素による酵素産生の促進のためには、新たな蛋白質合成が必要なことを示唆しており、尿素は誘導効果を示したものと推定される。なお、尿素の酸性ウレアーゼ生産に対する至適濃度は 0.5%(w/v) であったので、最適培養ではこの濃度を用いた。

このような、尿素による誘導生産はバクテリア中性ウレアーゼでも知られており、0.1%(w/v) 尿素添加によって *Providencia stuartii*⁽⁸³⁾ と *Proteus mirabilis*⁽⁵⁸⁾ 由来の酵素の産生は、それぞれ、4 および 5 倍増加したとの報告がある。

3. ニッケルとマンガンの相乗効果

各種の金属の酸性ウレアーゼ生産におよぼす影響を、基本培地を用いて調べた。表 5-4 に示すように、 Ni^{2+} と Co^{2+} とが酸性ウレアーゼ生産量を増加させた。次に、基本培地に含まれる Mn^{2+} も含めて、各種の金属を共に添加したときの効果を調べた。この結果、 Ni^{2+} と Mn^{2+} が酸性ウレアーゼ生産を、相乗的に増加させることが判明した (図 5-2)。ニッケルの添加により、バクテリアの中性ウレアーゼの生産量が増加することは報告されているが^(60, 84, 85) ウレアーゼ生産に対するニッケルとマンガンの相乗効果は知られていない。精製酸性ウレアーゼがニッケルを含有していることは確認しているので (第 4 章第 3 節-5)、ニッケルは酵素の構成成分として取り込まれたものと推定される。しかしながら、マンガンは酵素中に検出されず、マンガンの役割については不明である。酸性ウレアーゼ生産に対する両金属の至適添加濃度は 0.005~0.008%(w/v) であっ

Table 5-3. Induction of Acid Urease from L.fermentum IFO 14511 by Urea and Urea Analogues

| Culture condition ^a | Culture broth | | Cell-free extract | | |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------------------|
| | Acid urease activity (units/ml) | Cell growth (mg DW ^b /ml) | Acid urease activity (units/ml) | Protein (mg/ml) | Specific activity (units/mg) |
| BM ^c | 2.7 | 1.0 | 1.1 | 0.5 | 2.2 |
| BM + Thiourea | 2.4 | 1.1 | 0.8 | 0.4 | 2.0 |
| BM + Methylurea | 2.6 | 1.2 | 1.0 | 0.5 | 2.0 |
| BM + Ethylurea | 2.3 | 1.1 | 1.1 | 0.5 | 2.2 |
| BM + Urea | 11.6 | 1.0 | 3.5 | 0.4 | 8.8 |
| BM + CM ^d | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 2.0 |
| BM + CM + Urea | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 2.0 |
| BM (6 hr) ^e | 0.5 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 2.0 |

^a L.fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the basal medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C. Urea (0.5%, w/v), urea analogues (0.5%, w/v) and chloramphenicol (20 µg/ml) were added after 6 hr of inoculation. The cells were cultured for another 42 hr.

^b DW, dry weight

^c BM, basal medium.

^d CM, chloramphenicol.

^e L.fermentum IFO 14511 was cultured for 6 hr.

Table 5-4. Effect of Metal Ions on Acid Urease Production by L.fermentum IFO 14511*

| Metal ion (0.2 mM) | Relative activity (%) |
|-----------------------|-----------------------|
| None | 100 |
| Na ⁺ | 98 |
| Mg ²⁺ | 103 |
| K ⁺ | 97 |
| Ca ²⁺ | 97 |
| Fe ²⁺ | 95 |
| Co ²⁺ | 140 |
| Ni ²⁺ | 170 |
| Zn ²⁺ | 98 |
| Sr ²⁺ | 106 |
| Sn ²⁺ | 105 |
| Ba ²⁺ | 104 |

* L.fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the basal medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C for 2 days.

たので、以下の実験では基本培地に 0.005%(w/v) の硫酸ニッケルを添加した。
 なお Ca^{2+} と Mg^{2+} との相乗効果は認められなかった。

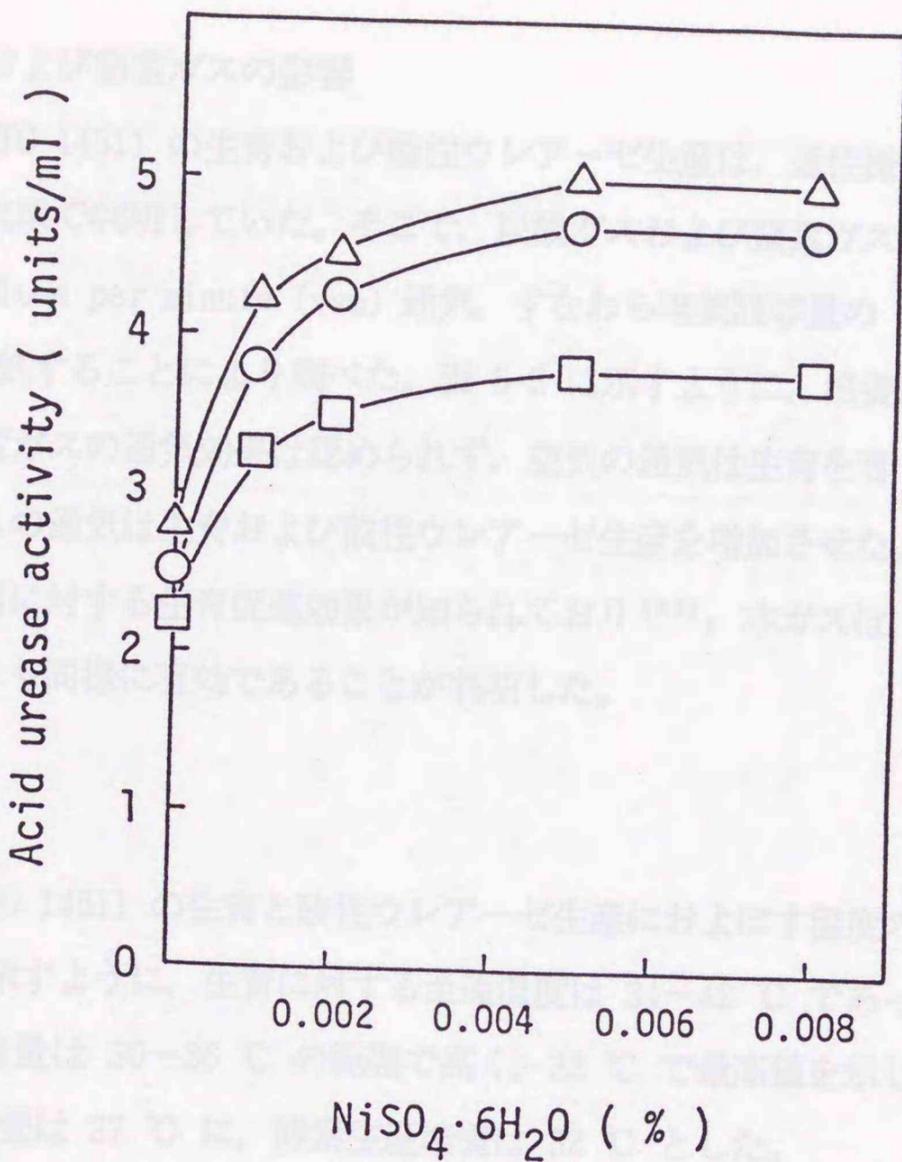


Fig. 5-2. Effect of NiSO_4 and MnSO_4 on Acid Urease Production by L. fermentum IFO 14511.

L. fermentum IFO 14511 was cultured statically in 160 ml of the medium in a 200-ml Erlenmeyer flask at 32 °C for 2 days.

□, 0.001%(w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5 \text{H}_2\text{O}$; ○, 0.002%(w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5 \text{H}_2\text{O}$; △, 0.005%(w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5 \text{H}_2\text{O}$.

たので、以下の実験では基本培地に 0.005%(w/v) 硫酸ニッケル 6 水和物を添加した。なお Co^{2+} には Mn^{2+} との相乗効果は認められなかった。

4. 炭酸ガスおよび窒素ガスの影響

L. fermentum IFO 14511 の生育および酸性ウレアーゼ生産は、通性嫌氣的条件下で良好なことが、予備実験で判明していた。そこで、炭酸ガスおよび窒素ガスの通気効果を、0.3 volume per volume per minute (vvm) 通気、すなわち培養液容量の 0.3 倍の容量のガスを 1 分間に通気することにより調べた。表 5-5 に示すように、培養液の攪拌の有無にかかわらず、窒素ガスの通気効果は認められず、空気の通気は生育を著しく阻害した。ところが、炭酸ガスの通気は生育および酸性ウレアーゼ生産を増加させた。炭酸ガスの Lactobacillus 属菌に対する生育促進効果が知られており⁽³⁵⁾、本ガスは、L. fermentum IFO 14511 の生育にも同様に有効であることが判明した。

5. 培養温度

L. fermentum IFO 14511 の生育と酸性ウレアーゼ生産におよぼす温度の影響について調べた。図 5-3 に示すように、生育に対する至適温度は 34~42 °C であった。一方、酸性ウレアーゼの生産量は 30~36 °C の範囲で高く、32 °C で最高値を示した。そこで生育を要求される種培養は 37 °C に、酵素生産培養は 32 °C とした。

6. 培養 pH

前述（本章本節-1）したように本培養では、3%(w/v) 以上のグルコースが消費されると培養 pH が低下するため、グルコース消費が停止する（図 5-1）。したがって、培養 pH を適切に調整することによってグルコース消費量を高め、酵素生産量の向上が期待できる。そこで、25%(w/v) 炭酸ナトリウム水溶液で pH を 4~4.5 に調整しつつ L. fermentum IFO 14511 を培養したところ、グルコースが 6%(w/v) まで消費され、それとともに酵素生産量も高くなることが判明した（図 5-4）。

次に、25%(w/v) 炭酸ソーダ水溶液で培養中の pH を一定に調整し、生育と酵素生産におよぼす影響を調べた。図 5-5 に示すように、生育は中性に近いほど良好であったが酸性ウレアーゼ生産は pH 4~4.5 に至適値を有していた。

pH 調整剤を選定するために、各種の調整剤で pH を 4~4.5 に調整して培養し、生

Table 5-5. Effect of CO₂ or N₂ Gases on Acid Urease Production and Cell Growth of L. fermentum IFO 14511^a.

| Gas | Sparging (vvm ^b) | Agitation (rpm ^c) | Acid urease activity (units/ml) | Cell growth (mg DW ^d /ml) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| None ^e | 0 | 0 | 4.6 | 1.0 |
| | 0 | 50 | 4.5 | 1.0 |
| N ₂ | 0.3 | 0 | 4.5 | 1.0 |
| | 0.3 | 50 | 4.6 | 1.0 |
| CO ₂ | 0.3 | 0 | 5.1 | 1.1 |
| | 0.3 | 50 | 5.2 | 1.2 |
| Air | 0.3 | 0 | 0.2 | 0.2 |
| | 0.3 | 50 | 0.1 | 0.1 |

^a L. fermentum IFO 14511 was cultured in 4 ℓ of the medium in a 5-ℓ jar fermentor at 32 °C for 2 days.

^b vvm, volume per volume per minute.

^c rpm, revolution per minute.

^d DW, dry weight.

^e The "none" means that gas was not sparged.

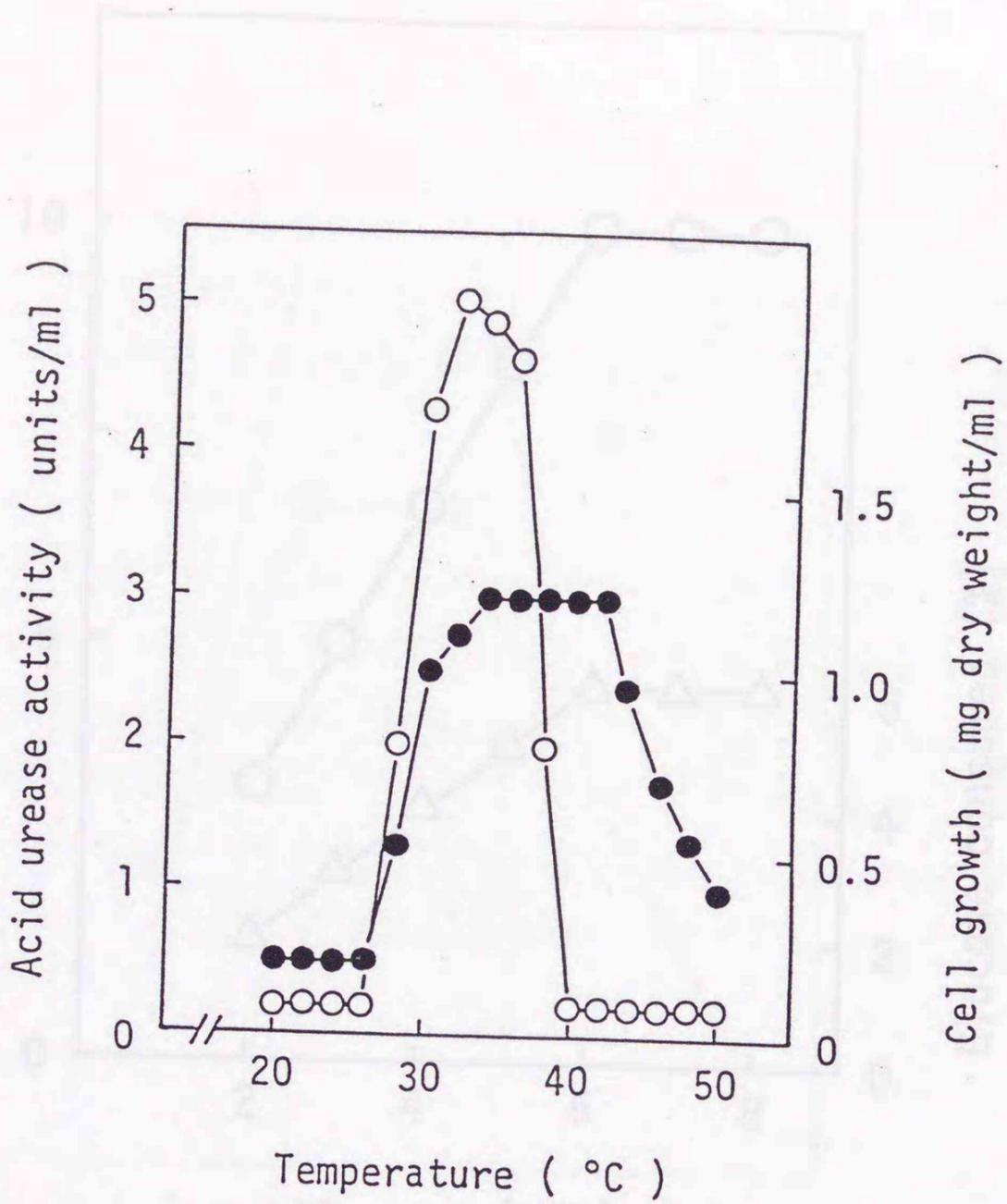


Fig. 5-3. Effect of Temperature on Acid Urease Production and Cell Growth of L.fermentum IFO 14511.

L.fermentum IFO 14511 was cultured statically in 10 ml of the medium in a test tube for 2 days.

○, acid urease activity; ●, cell growth.

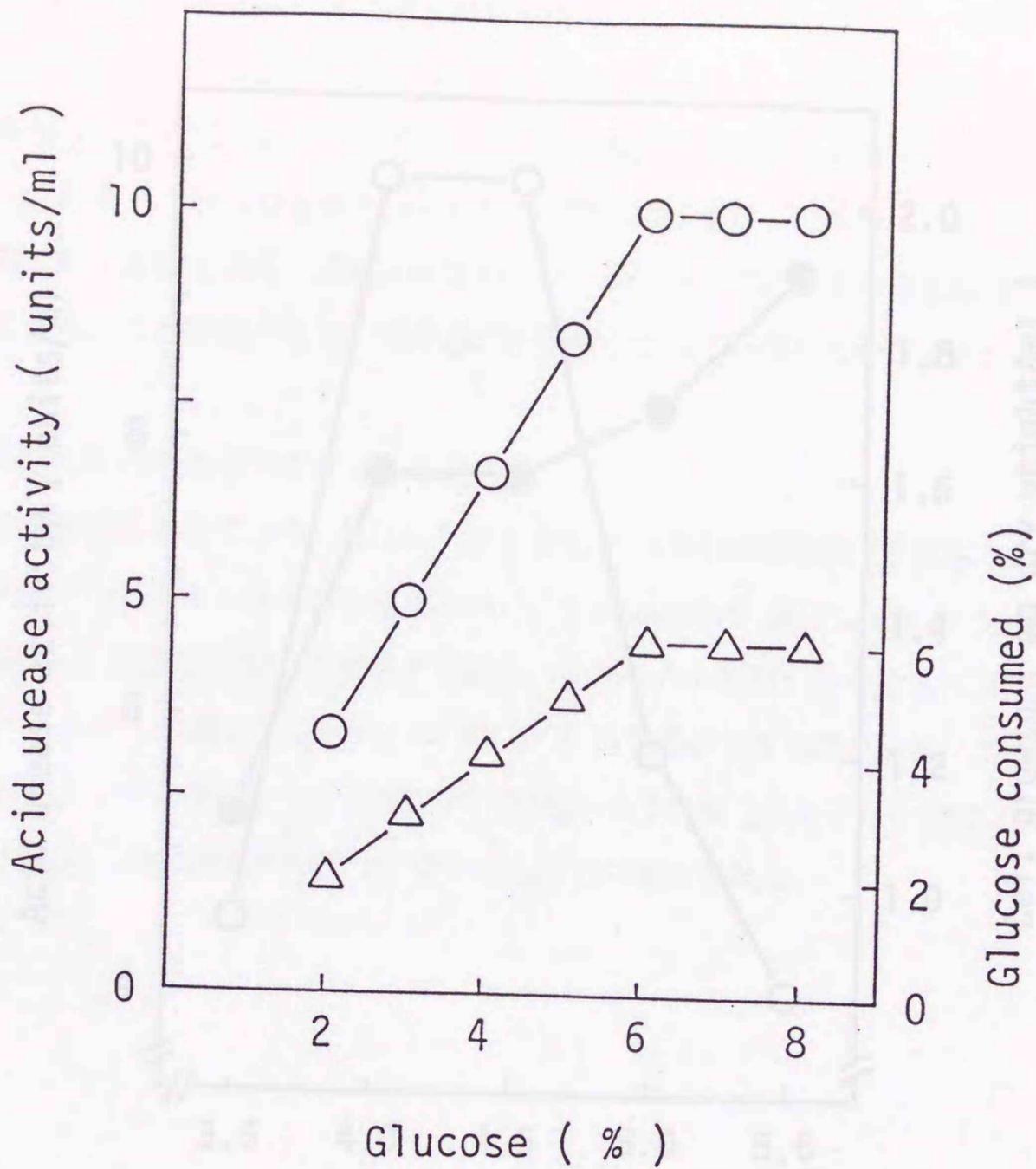


Fig. 5-4. Glucose Consumption and Acid Urease Production by L.fermentum IFO 14511 in pH Adjusting Culture.

L.fermentum IFO 14511 was cultured in 4 l of the medium in a 5-l jar fermentor at 50 rpm at 32 °C for 2 days. pH was adjusted to between 4 and 4.5 with 25%(w/v) Na₂CO₃ solution.

○, acid urease activity; △, glucose consumed.

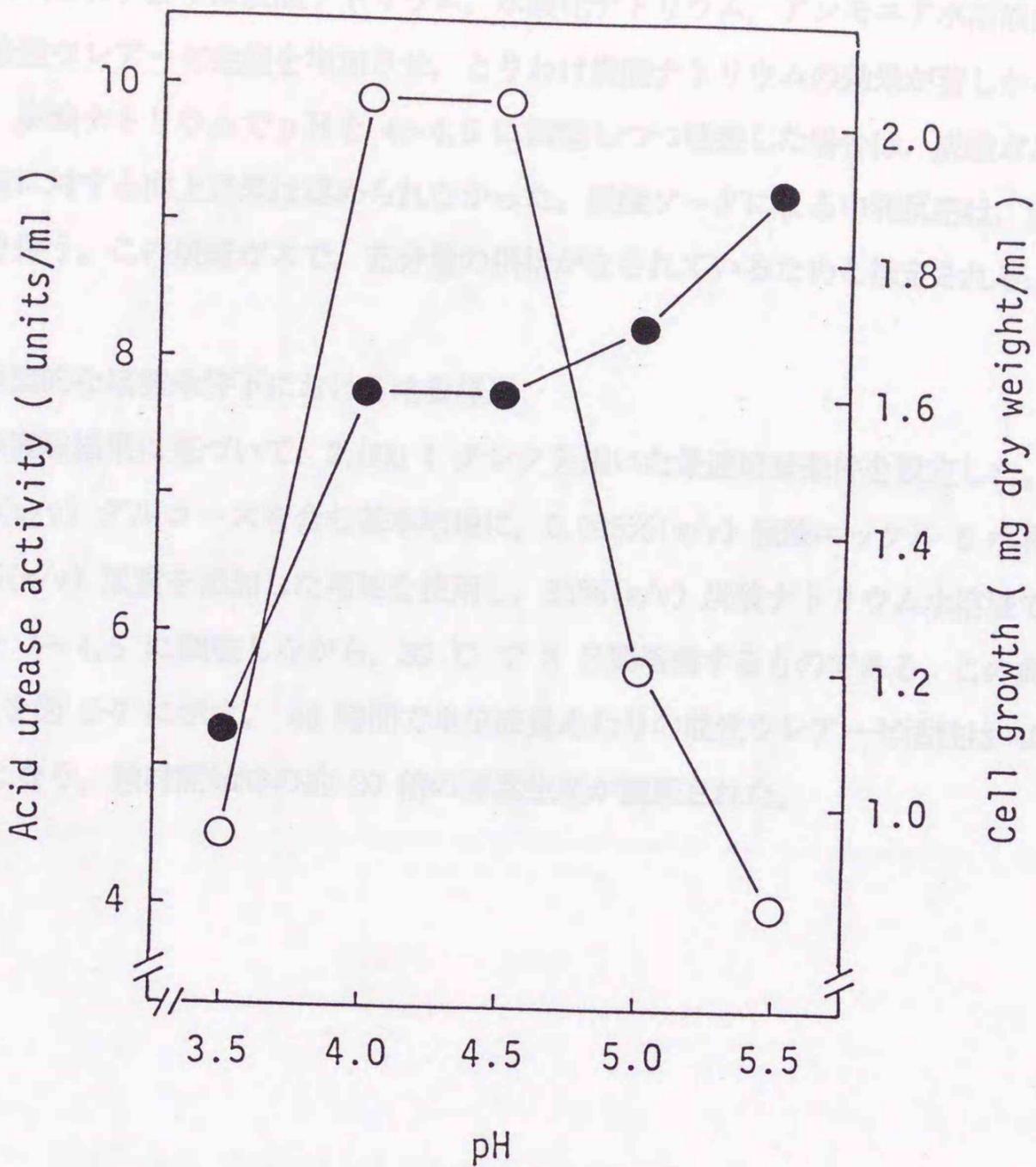


Fig. 5-5. Effect of pH on Acid Urease Production and Cell growth of L. fermentum IFO 14511.

L. fermentum IFO 14511 was cultured in 4 l of the basal medium with 6%(w/v) glucose in a 5-l jar fermentor at 50 rpm at 32 °C for 2 days. pH was adjusted with 25%(w/v) Na_2CO_3 solution.

○, acid urease activity; ●, cell growth.

育および酸性ウレアーゼ生産におよぼす影響を調べた。

図 5-6 に示すように炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、アンモニア水溶液は、生育および酸性ウレアーゼ生産を増加させ、とりわけ炭酸ナトリウムの効果が著しかった。

なお、炭酸ナトリウムでpHを4~4.5に調整しつつ培養した場合は、炭酸ガス通気の酵素生産に対する向上効果は認められなかった。炭酸ソーダによる中和反応は、炭酸ガスの発生を伴う。この炭酸ガスで、充分量の供給がなされているためと推定される。

7. 典型的な培養条件下における培養経過

以上の実験結果に基づいて、2,000 l タンクを用いた最適培養条件を設定した。すなわち、6%(w/v) グルコースを含む基本培地に、0.005%(w/v) 硫酸ニッケル 6 水和物および0.5%(w/v) 尿素を添加した培地を使用し、25%(w/v) 炭酸ナトリウム水溶液で培養液のpHを4~4.5に調整しながら、32℃で2日間培養するものである。この典型的な培養経過を図5-7に示す。48時間で単位液量あたりの酸性ウレアーゼ活性は40 units/ml となり、検討開始時の約20倍の酵素生産が観察された。

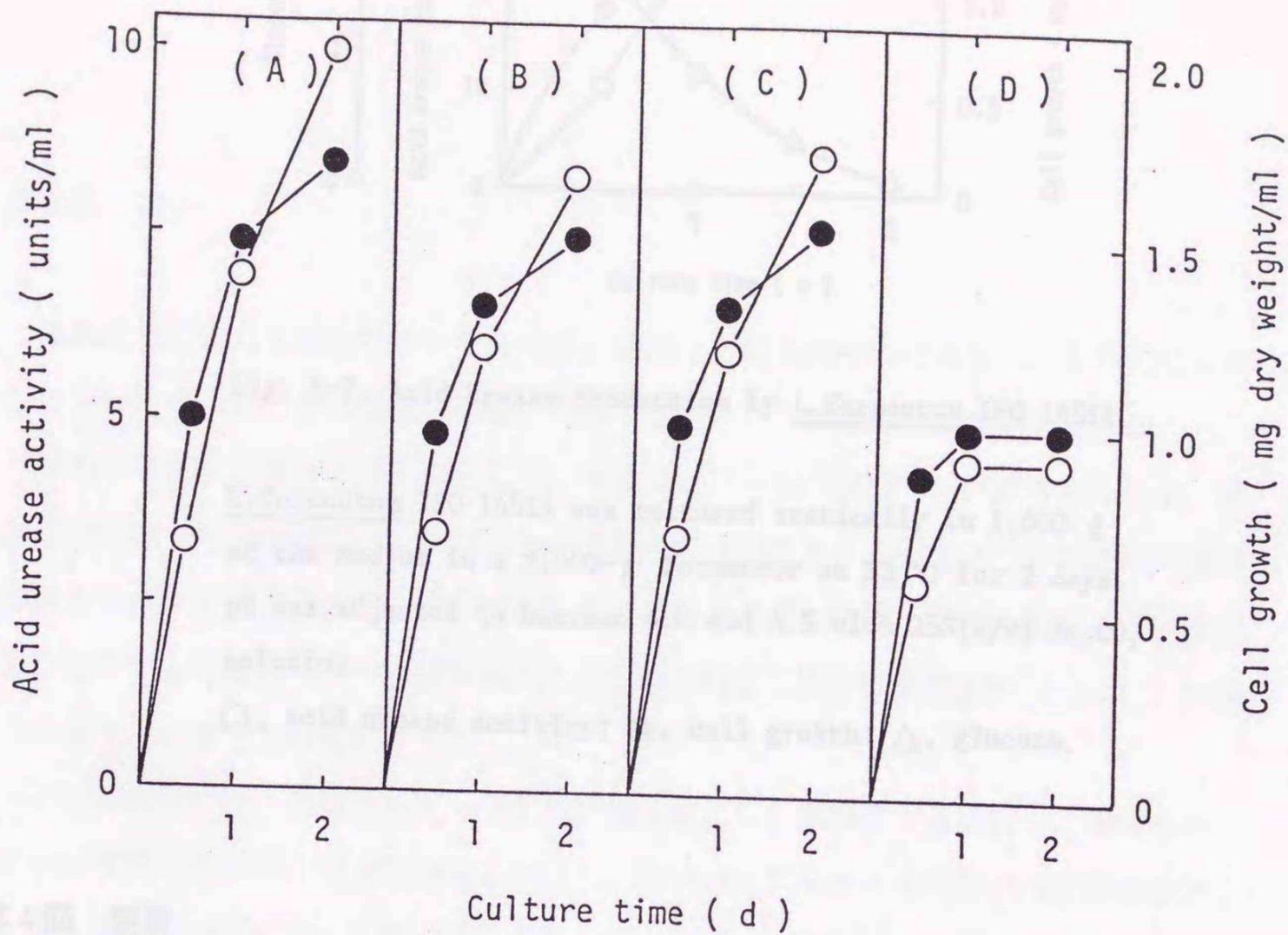


Fig. 5-6. Effect of pH-Adjusting Agents on Acid Urease Production and Cell Growth of L. fermentum IFO 14511.

L. fermentum IFO 14511 was cultured in 4 ℓ of the basal medium with 6%(w/v) glucose in a 5- ℓ jar fermentor at 50 rpm at 32 °C for 2 days. pH was adjusted to between 4 and 4.5 with 25%(w/v) solution of (A) Na₂CO₃, (B) NaOH, (C) NH₄OH and (D) None (pH was not adjusted).

○, acid urease activity; ●, cell growth.

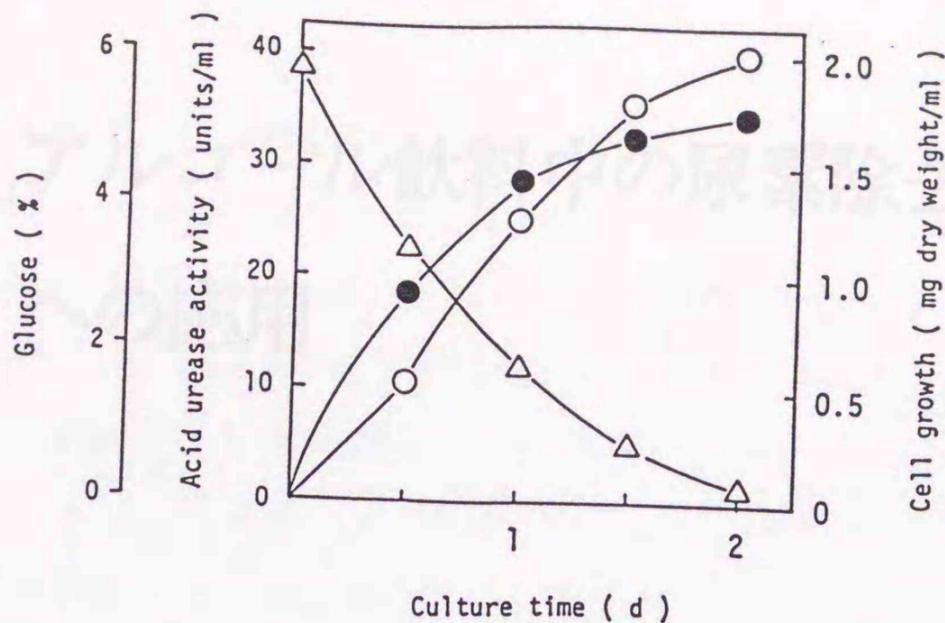


Fig. 5-7. Acid Urease Production by L. fermentum IFO 14511.

L. fermentum IFO 14511 was cultured statically in 1,600 ℓ of the medium in a 2,000- ℓ fermentor at 32 °C for 2 days. pH was adjusted to between 4.0 and 4.5 with 25%(w/v) Na_2CO_3 solution.

○, acid urease activity; ●, cell growth; △, glucose.

第4節 要旨

L. fermentum IFO 14511 による酸性ウレアーゼ生産のための最適培養条件の検討を行い、以下の結果を得た。

酸性ウレアーゼ生産に対して最適な炭素源はグルコースであり、窒素源はペプトン、肉エキス、酵母エキスであった。尿素を添加して酵素を誘導生産させたところ、単位液量あたり酵素量は4倍にも増加した。0.005%(w/v) 硫酸ニッケル6水和物と、0.005%(w/v) 硫酸マンガン4~5水和物の添加が有効であり、これら2金属塩は酵素生産に対して相乗効果を示した。至適生育温度は34~42 °C であり、酵素生産は30~36 °C の範囲で高く、32 °C で最も高かった。そこで種培養は37 °C で、酵素生産培養は32 °C で培養した。炭酸ナトリウムを中和剤として培養pHを4~4.5に制御することにより、酵素生産量が高くなった。

これらの結果をもとに、2,000 ℓ 醗酵槽での最適培養条件を設定して培養を行ったところ、酸性ウレアーゼの活性は40 units/ml という高い値に達した。

第6章 アルコール飲料中の尿素除去

への応用

第1節 緒言

前章までに得られた酸性ウレアーゼの、産業上の応用例の一つとして、その特性を生かしたアルコール飲料中の尿素の除去、ひいてはウレタンの生成抑制が期待できる。

清酒中の尿素を除去する方法として、中性ウレアーゼの適用⁽⁹⁾が試みられたが、本酵素は清酒中での失活が著しく実用的な技術としては確立されていない。また別に、清酒中の尿素を減少させる方法として、原料白米を処理する方法⁽⁸⁶⁾、尿素生産能の低い清酒酵母を造成する方法^(87, 88)が試みられたが、いずれも尿素を初発濃度の1/2~1/3に減少させるにとどまっているにすぎない。

そこで本章では、酸性ウレアーゼを酒質保全剤として実用化する目的で、本酵素のアルコール飲料中における安定性を明らかにし、次いで、アルコール飲料中の尿素の除去とウレタン生成の抑制について調べることにした。

さて、清酒の製造工程を考えると、「火入れ」工程で清酒は高温になりウレタン生成が促進⁽⁸⁹⁾されるものと推定される。したがって「火入れ」前の、もろみ醗酵液、上槽酒、および炭汙過酒に、酸性ウレアーゼを添加することが望ましい。もろみ醗酵工程とそれに続く上槽酒、炭汙過酒工程は、通常15℃前後の低温であり⁽⁹⁰⁾、酵素の添加実験も主に本温度で実施した。

ところで、清酒を酵素で処理する場合に酵素が清酒中に残存する可能性があるため、酸性ウレアーゼの変異原性および毒性の有無もあわせて調べることにした。

第2節 実験材料および方法

1. 試薬

ナタ豆由来のウレアーゼはSigma Chemical Company, U.S.A. から購入した。清酒、老酒、ワイン（白）は市販品を使用した。清酒、老酒、ワインのpH（実測値）は、それ

それ、4.4, 4.3, 3.6 であった。清酒, 老酒, ワインのエタノール含量 (実測値) は, それぞれ, 16, 17, 12%(w/v) であった。ソディウムパラジメチルアミノベンゼンジアゾスルホネート (DAP A) は東京化成工業(株)から, 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) は上野製薬(株)から購入した。バクトニュートリエントブ罗斯は Difco Laboratories, U.S.A. から購入した。

2. 酸性ウレアーゼ

第4章第3節で詳述した, *L. fermentum* IFO 14511 由来の精製酵素を使用した。

3. 尿素およびアンモニアの測定

アルコール飲料中の尿素およびアンモニアは, ベーリンガーマンハイム山之内(株)から購入した食品分析用試薬 (Fキット, 尿素/アンモニア) を使用し, グルタミン酸脱水素酵素の作用で減少する還元型補酵素の吸光度 (340 nm) を測定することにより, 定量した。

4. ウレタンの測定

アルコール飲料中のウレタンは, Joe らの方法⁽⁹¹⁾ に従ってジクロロメタンで抽出したのち, シリカゲルおよびセライトで精製後, 定量した。ガスクロマトグラフは, 島津製作所(株)製 GC-9A 型を使用した。カラムは 10%(w/v) エチレングリコールアジペート (EGA/chromosorb WAW (3 mm x 2 m) (ガスクロ工業(株)) を使用し, 水素炎を用いるイオン化法 (FID) で検出した。

5. 変異原性試験 (エームズテスト)

指示菌として *Escherichia coli* WP2uvrA (トリプトファン要求株) および *Salmonella typhimurium* TA98 (チロシン要求株) を用い, 成書⁽⁹²⁾ に従って, 指示菌の栄養要求性が復帰した変異コロニーを計測することにより, 変異原性の有無および強弱を試験した。試料として第3章第2節-4 に準じて蒸留水で調製した菌体抽出液を使用し, 1プレート (20 ml 分注) あたり 625 ~ 5000 μg 蛋白質となるように試料を添加した。

6. 急性毒性試験

4 週齢の雄マウスと 5 週齢の雄ラットに、第 3 章第 2 節-4 に準じて蒸留水で調製した菌体抽出液を経口投与し、異常の有無を観察した。投与量は、12.5 ~ 100 mg 蛋白質/Kg とし、14 日間にわたって観察した。

第 3 節 実験結果および考察

1. 酸性ウレアーゼの清酒中での安定性

酸性ウレアーゼおよびナタ豆由来の中性ウレアーゼを、100 units/l となるように清酒に添加し、10 °C、30 °C で 16 日間保温して残存活性を調べた (表 6-1)。この結果、清酒中に酸性ウレアーゼを 30 °C で 16 日間保温しても、約 50% の活性が維持されており、本酵素は酸性、かつアルコール存在下で安定性の高い酵素であることが判明した。これに対し、ナタ豆由来の中性ウレアーゼは、30 °C、16 日間の保温で残存活性は認められず、清酒中における中性ウレアーゼの安定性は極めて悪いものであった。

2. 清酒中の尿素除去におよぼす温度の影響

種々の温度における尿素分解の経時変化について調べた。30 ppm の尿素を含む清酒に酸性ウレアーゼを 3 units/l となるように添加し、10~50 °C の各温度で保温し経時的にサンプリングして残存する尿素量を測定した。図 6-1 に示すように、40 °C までは温度が高いほど、尿素除去には効果的であった。

Table 6-1. Stability of Enzymes in Sake

| Source of urease * | Temperature (°C) | Residual activity (%) | | |
|---------------------|------------------|-----------------------|----|----|
| | | Incubation time (day) | | |
| | | 0 | 8 | 16 |
| <u>L. fermentum</u> | 10 | 100 | 94 | 89 |
| IFO 14511 | 30 | 100 | 77 | 48 |
| Jack bean | 10 | 100 | 51 | 32 |
| | 30 | 100 | 6 | 0 |

* 100 units/l of urease was added.

3. 清酒中の尿素除去におよぼすpHの影響

種々のpHにおける尿素分解の経時変化を調べた。30 ppmの尿素を含む清酒に酸性ウレアーゼを3 units/lとなるように添加し、塩酸および水酸化ナトリウムで清酒のpHを3.9, 4.4, 4.9となるように調整したのち、15℃で反応させ、経時的にサンプリングして残存する尿素量を測定した。図6-2に示すように、本pH範囲内ではpHが高いほど、尿素除去も速くなった。この事実は、清酒自体のpHの違いによって、速く尿素除去ができる清酒と、それができない清酒のあることを示唆している。

4. 清酒中の尿素除去におよぼす酵素量の影響

清酒中の尿素除去におよぼす添加酵素量の影響を調べた。30 ppmの尿素を含む清酒に、酸性ウレアーゼを3, 10, 30 units/lとなるように添加したのち、15℃で反応させ、残存する尿素量を測定した。図6-3に示すように30 ppmの尿素を除去するのに3 units/lでは約8日間を要するが、30 units/lでは4日間で除去できた。尿素の除去速度は添加酵素量の増加に伴って速くなり、酵素量の増加は清酒処理時間を短縮するための有効な方法となることが明白である。

ところで前述したように、8日間で尿素を除去しようとするとき3 units/lの酵素が必要である。これを重量濃度に換算すると、例えば300 units/mg proteinの酵素蛋白を添加する場合の清酒中の酵素蛋白濃度の増加は、僅か10 ppbであり、微量の酵素添加で効果的に尿素を除去することが可能であることを示している。

5. 尿素除去とウレタンの生成抑制

本研究は清酒中に含まれる尿素を除去することによって、発癌性物質として知られるウレタンの生成を抑制できるであろうという考えのもとに出発した。そこで本仮説の妥当性を調べるために、以下の実験を行なった。

市販清酒に含まれる尿素の含量は、10~38 ppmであることが報告されている⁽⁹³⁾。そこで、酸性ウレアーゼの作用で尿素をほぼ完全に除去した清酒、および30 ppmの尿素を含む通常の清酒の両者を10℃、30℃で3月間保温し、ウレタンの生成の有無について調べた。表6-2に示すように、30 ppmの尿素を含む清酒を30℃で3月間保温すると、120 ppbのウレタンの生成が認められた。一方、尿素除去後の清酒では、同条件下でのウレタンの生成は認められなかった。以上のように酸性ウレアーゼを用いて清酒中の

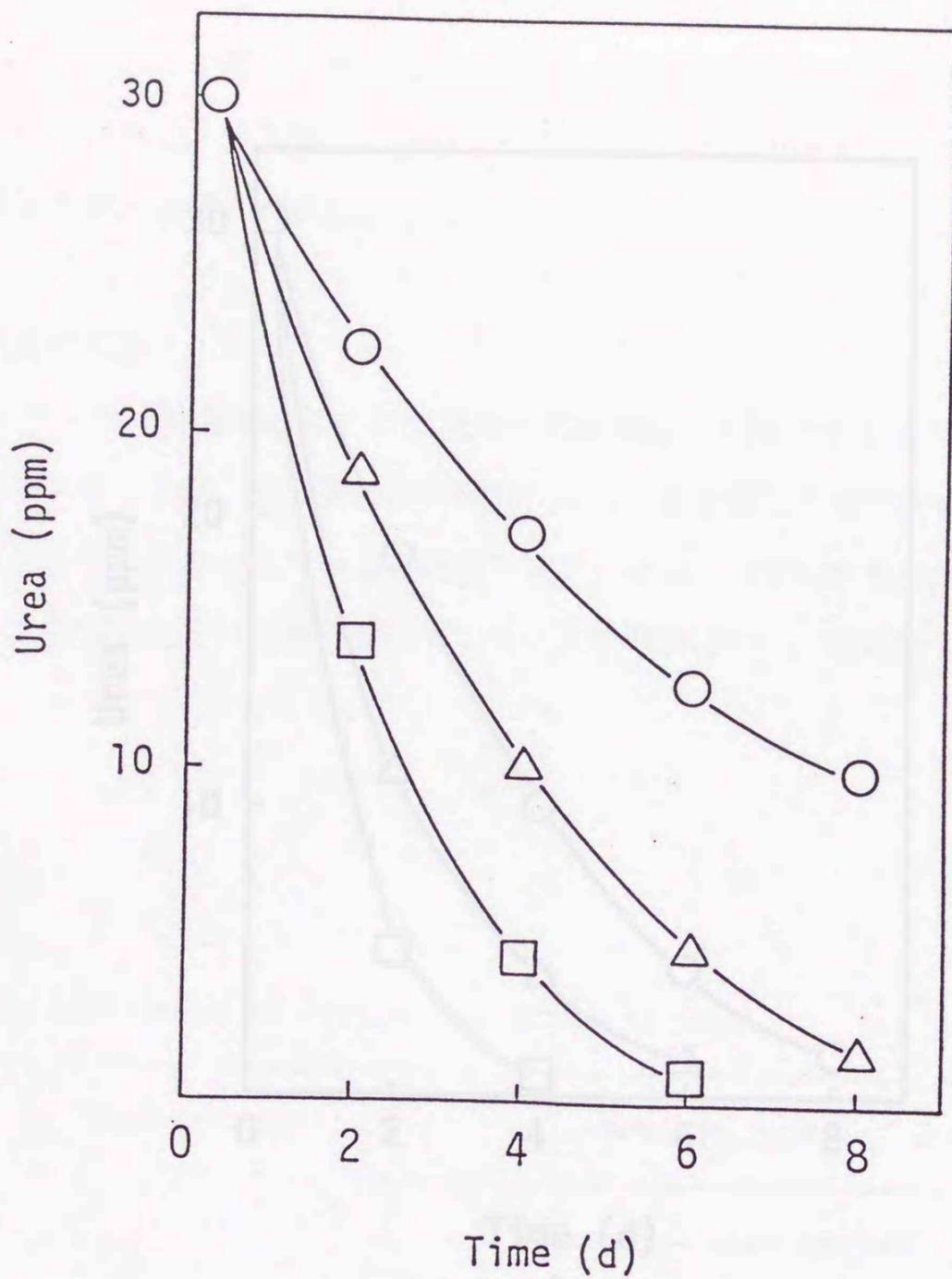


Fig. 6-2. Effect of pH on Elimination of Urea by Acid Urease in Sake.

L. fermentum IFO 14511 acid urease (3 units/ℓ) was incubated in sake containing 30 ppm urea at various pH at 15 °C.

○, pH 3.9; △, pH 4.4; □, pH 4.9.

尿素を除去することにより、ウレタンの生成を有効に阻止できることが明らかとなった。

本研究の開始時に、アルコール飲料中のウレタンの初期濃度として、尿素の値にカルバミルリン酸、シトルリン等を予想した。しかしながら、尿素を酵素分解することによりウレタンの生成を抑制できることは、ウレタンの生成を抑制する効果はウレタンの初期濃度の大部分は尿素であることが示された。

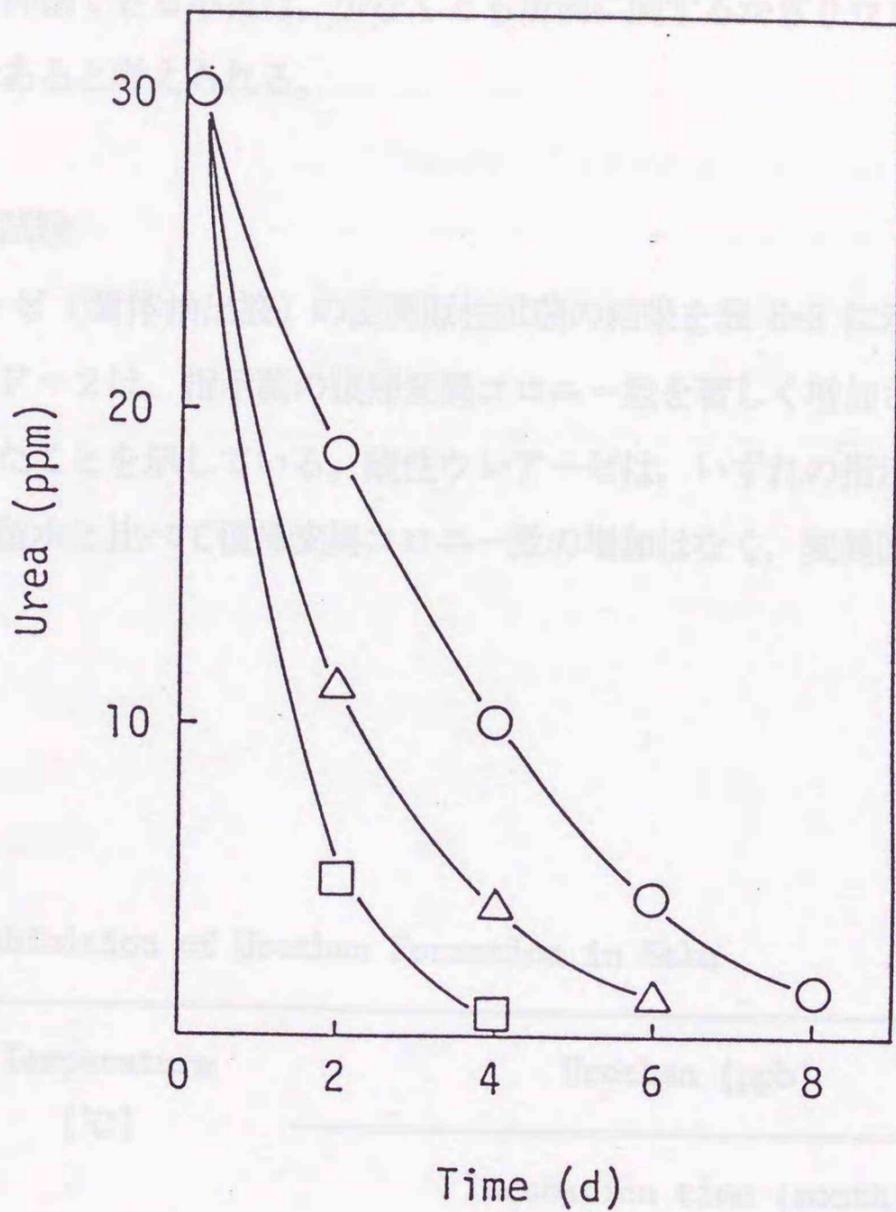


Fig. 6-3. Effect of Enzyme Activity on Elimination of Urea by Acid Urease in Sake.

L.fermentum IFO 14511 acid urease was incubated in sake containing 30 ppm urea at 15 °C.

○, 3 units/l ; △, 10 units/l ; □, 30 units/l .

尿素を除去することにより、ウレタンの生成を有効に阻止できることが明らかとなった。

本研究の開始時に、アルコール飲料中のウレタンの前駆物質として、尿素の他にカルバミルリン酸、シトルリン等も予想した。しかしながら、尿素を酵素分解することによりウレタンの生成を抑制できる事実は、少なくとも清酒に関するかぎりウレタンの前駆物質の大部分は尿素であると考えられる。

6. 変異原性試験

酸性ウレアーゼ（菌体抽出液）の変異原性試験の結果を表 6-3 に示す。陽性対照としたDAPAやAF-2は、指示菌の復帰変異コロニー数を著しく増加させており、本実験が適正に行われたことを示している。酸性ウレアーゼは、いずれの指示菌においても、陰性対照とした蒸留水と比べて復帰変異コロニー数の増加はなく、変異原性は認められなかった。

Table 6-2. Inhibition of Urethan Formation in Sake

| Urea (ppm) | Temperature (°C) | Urethan (ppb) | | | |
|----------------|---------------------|-------------------------|----|----|-----|
| | | Incubation time (month) | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 0 ^a | 10 | ND ^b | ND | ND | ND |
| | 30 | ND | ND | ND | ND |
| 30 | 10 | ND | ND | ND | ND |
| | 30 | ND | 40 | 60 | 120 |

^a Urea was eliminated by the action of 100 units/l of *L. fermentum* IFO 14511 acid urease.

^b ND, not detected.

Table 6-3. Ames Test for Acid Urease

| Substance | Dose (μ g/plate) | Number of revertant colonies/plate | |
|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | | <u>Escherichia coli</u> | <u>Salmonella typhimurium</u> |
| | | WP2uvrA | TA98 |
| Distilled water | 100 | 23 | 28 |
| Acid urease ^a | 625 | 16 | 19 |
| | 1250 | 17 | 24 |
| | 2500 | 18 | 17 |
| | 5000 | 16 | 22 |
| DAPA ^b | 25 | 342 | 740 |
| AF-2 ^c | 0.02 | 298 | 295 |

^a 36 mg protein/ml.

^b Sodium p-dimethylaminobenzendiazosulfonate.

^c 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide.

7. 急性毒性試験

マウスおよびラットに酸性ウレアーゼ（菌体抽出液）を経口投与し、14 日間にわたり観察したが、いずれの用量群にも異常はなく、毒性は認められなかった（表 6-4）。

Table 6-4. Acute Toxicity Study of Acid Urease

| Species | Dose (mg/Kg) | Mortality ^a |
|---------|-----------------|------------------------|
| Mouse | 12.5 | 0/2 |
| | 25 | 0/2 |
| | 50 | 0/2 |
| | 100 | 0/2 |
| Rat | 12.5 | 0/2 |
| | 25 | 0/2 |
| | 50 | 0/2 |
| | 100 | 0/2 |

^a Number of dead animals/
Number of treated animals.

第4節 要旨

Lactobacillus fermentum IFO 14511 由来の酸性ウレアーゼを用いて、清酒中での尿素除去に影響する種々の要因について調べた。

清酒中で保温すると中性ウレアーゼは不安定であったが、酸性ウレアーゼは安定であり 30 °C で 16 日間保温後も、約 50 % の活性が残存していた。

尿素の除去に対する至適温度は 30~40 °C であった。pH 4.9 以下では、pH が高いほど尿素の除去は速かった。酵素量を増加させると尿素の除去速度は速くなり、30 units/l の酸性ウレアーゼを添加し、15 °C で反応させると、4 日間で 30 ppm の尿素を完全に除去することができた。

酸性ウレアーゼで処理しない清酒を、30 °C で 3 月間保温すると 120 ppb のウレタンが生成した。これに対し、酸性ウレアーゼで尿素を除去した清酒を、30 °C で 3 月間保温しても、ウレタンの生成は認められなかった。

酸性ウレアーゼ（菌体抽出液）の変異原性および毒性試験の結果、いずれも異常は認められなかった。

第7章 総括

アルコール飲料（通常酸性である）には、発癌性物質であるウレタンが含有されている。カナダ政府がアルコール飲料中のウレタン含量に対する規制値を定めたことにより、ウレタン含量を低減させる方法の開発が重大な関心事となってきた。著者は、ウレタンがエチルアルコールと尿素から生成すると推定し、ウレタンの蓄積抑制のためには前駆体である尿素の分解が有効であると考え、酸性ウレアーゼを適用して、アルコール飲料中の尿素の分解技術を確立することを目的に本研究に着手した。

まず、酸性ウレアーゼを生産しうる微生物を、広く自然界および保存菌株中に検索した結果、動物消化管内容物および糞便からの分離株 16,324 株のうちの 700 株と、保存細菌菌株 118 株のうちの 3 株に本活性を見出した。動物消化管内容物および糞便から得られた 700 株の酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的諸性質を検討した結果、これらの大部分 (98%) は、*Streptococcus* 属、*Lactobacillus* 属に属していたほか、*Staphylococcus* 属、*Bifidobacterium* 属、*Escherichia* 属、*Morganella* 属の 4 属にも分布していた。

Streptococcus 属に属するものの大部分は、*S. mitior* であり、他は *S. salivarius*, *S. faecium*, *S. faecalis*, *S. avium*, *S. gallinarum* であった。*Lactobacillus* 属の大部分は、*L. reuteri* もしくは *L. fermentum* グループ、あるいは *L. animalis* もしくは *L. salivarius* グループに属し、他は *L. ruminis*, *L. viridescens*, *L. vaccinostercus* およびそれ以外の 1 グループ (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus* もしくは *L. gasseri*) に分類された。保存菌株から得られた酸性ウレアーゼ生産菌 3 株は、いずれも *L. fermentum* であった。

次に、酸性ウレアーゼ生産菌の大部分が属していた *Lactobacillus* 属および *Streptococcus* 属に属する 37 菌株から菌体抽出液を調製してポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、活性染色法によって酸性ウレアーゼの移動度を調べた。この結果、酸性ウレアーゼには、電気泳動的に 6 タイプの分子種が存在していることが明らかとなった。そこで各タイプから代表酵素を 1 つずつ選び、それらの性質（分子量、等電点、酵素活性および安定性におよぼす pH および温度の影響）を調べたところ、いずれの性質にも多様性があることが明らかとなった。

分子量は *S. salivarius* PG-98 由来の酵素の 140,000 から *L. animalis* MU-4 由来の

酵素の 350,000 の範囲に分布していた。等電点は、4.6, 4.7, 4.8 の異なる 3 点に分布していた。至適反応 pH は 2~5 の範囲に、至適反応温度は 55, 60, 65 °C と異なる 3 温度に分布していた。これら酵素活性が安定である pH (37 °C, 30 分間) は 3~9 の範囲に、酵素活性が安定である温度 (pH 4, 30 分間) は 30~60 °C の範囲に分布していた。酸性領域で最も安定に活性を維持しえた酵素は、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素であった。この性質は、既知の中性ウレアーゼのいずれにも認められないものである。

更に、酸性域で安定性の高い *L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の酵素を電気泳動的に単一になるまで精製し、その諸性質を明らかにした。*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の精製酵素の分子量はそれぞれ 220,000, 220,000, 200,000 であった。いずれの精製酵素も分子量の異なる 3 サブユニットから構成されており、サブユニット分子量は、 α : 66,000~68,000, β : 15,000~16,800, γ : 8,600~8,800 の範囲に分布していた。いずれの酵素もサブユニットの構成比は $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)_2$ と推定された。

L. fermentum IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の精製酵素の等電点は、それぞれ、4.8, 4.7, 4.6 であった。

いずれの酵素も $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)$ ユニットあたり 2 モルのニッケルを含有していた。

3 精製酵素のアミノ酸組成は互いに近似しており、チロシン、メチオニンの含量が中性ウレアーゼより高いことが特徴的であった。

L. fermentum IFO 14511 由来の酵素の 3 サブユニットを逆相クロマトグラフィーにより分取した。 β サブユニットのシステイン (もしくはシスチン) の含量は低かった。 γ サブユニットのメチオニン含量は高く、ヒスチジンとチロシンの含量は低いことが特徴的であった。 α , β , γ サブユニットの N 末端アミノ酸配列は、それぞれ Ser-Phe-Asp-Met-, Met-Val-Pro-Gly-, Met-Arg-Leu-Thr- であった。

3 精製酵素の基質特異性は同じ特徴を示し、尿素とヒドロキシ尿素を基質とした。

L. fermentum IFO 14511, *L. reuteri* RT-5, *S. mitior* PG-118 由来の精製酵素の至適反応 pH は、それぞれ、2, 2, 4.5 であり、至適反応温度はいずれも 65 °C であった。これら 3 精製酵素を、種々の pH の緩衝液中で 37 °C で 30 分間保温したところ、いずれの酵素活性も pH 3~9 の範囲で安定であった。一方、pH 4 の緩衝液中で種々温度で 30 分間保温したところ、*L. fermentum* IFO 14511, *L. reuteri* RT-5 由来の精製酵素活性

は 50 °C まで、S. mitior PG-118 由来の精製酵素活性は 40 °C まで安定であった。

いずれの 3 精製酵素活性も Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , パラクロロ安息香酸, アセトヒドロキサム酸により阻害された。
メリクリ

L. fermentum IFO 14511, L. reuteri RT-5, S. mitior PG-118 由来の精製酵素の至適反応 pH における K_m 値は, それぞれ, 2.7, 2.8, 2.0 mM であり, V_{max} 値はそれぞれ, 440, 580, 460 μ mol/min/mg protein であった。

次に, L. fermentum IFO 14511 による酸性ウレアーゼ生産のための最適培養条件の検討を行い, 以下の結果を得た。

酸性ウレアーゼ生産に対して最適な炭素源はグルコースであり, 窒素源はペプトン, 肉エキス, 酵母エキスであった。尿素を添加して酵素を誘導生産させたところ, 単位液量あたり酵素量は 4 倍にも増加した。0.005%(w/v) 硫酸ニッケル 6 水和物と, 0.005%(w/v) 硫酸マンガン 4~5 水和物の添加が有効であり, これら 2 金属塩は酵素生産に対して相乗効果を示した。至適生育温度は 34~42 °C であり, 酵素生産は 30~36 °C の範囲で高く, 32 °C で最も高かった。そこで種培養は 37 °C で, 酵素生産培養は 32 °C で培養した。炭酸ナトリウムを中和剤として培養 pH を 4~4.5 に制御することにより, 酵素生産量が高くなった。これらの結果をもとに, 2,000 l 醗酵槽での最適培養条件を設定して培養を行ったところ, 酸性ウレアーゼの活性は 40 units/ml という高い価に達した。

次いで, Lactobacillus fermentum IFO 14511 由来の酸性ウレアーゼを用いて, 清酒中での尿素除去に影響する種々の要因について調べた。

清酒中で保温すると中性ウレアーゼは不安定であったが, 酸性ウレアーゼは安定であり 30 °C で 16 日間保温後も, 約 50 % の活性が残存していた。

尿素の除去に対する至適温度は 30~40 °C であった。pH 4.9 以下では, pH が高いほど尿素の除去は速かった。酵素量を増加させると尿素の除去速度は速くなり, 30 units/l の酸性ウレアーゼを添加し, 15 °C で反応させると, 4 日間で 30 ppm の尿素を完全に除去することができた。

酸性ウレアーゼで処理しない清酒を, 30 °C で 3 月間保温すると 120 ppb のウレタンが生成した。これに対し, 酸性ウレアーゼで尿素を除去した清酒を, 30 °C で 3 月間保温しても, ウレタンの生成は認められなかった。

酸性ウレアーゼ (菌体抽出液) の変異原性および毒性試験の結果, いずれも異常は認

められなかった。

謝辞

著者らが、本研究で開発した酸性ウレアーゼを酒質保全剤として清酒に添加する方法は、国税庁の認可を経てすでに清酒製造業界において広く実施されて、極めて有効な方法であることが、工業的規模で実証されている⁽⁹⁴⁾。更に Ough⁽⁹⁵⁾ は、本酸性ウレアーゼによる尿素除去が、米国産の各種ワインに対しても有効なことを報告している。清酒製造において、工業的規模でその有効性が認められた酸性ウレアーゼが、更に世界中のアルコール飲料中の発癌物質の生成抑制に貢献できることを期待してやまない。

謝辞

本研究にあたり終始御指導御鞭撻を賜りました北海道大学農学部農芸化学科教授大野哮司博士に対し深甚なる感謝の意を表します。更に、本研究をまとめるにあたり御懇篤なる御指導を賜りました北海道大学農学部農芸化学科教授千葉誠哉博士，同教授富田房男博士，同助教授八島重昂博士に厚く感謝致します。

また，本研究遂行の機会を与えて下さり，種々の御指導と御便宜を賜りました武田薬品工業株式会社取締役研究開発本部本部長杉野幸夫博士，同取締役研究開発本部副本部長西川正夫博士，同醗酵生産物研究所所長岡崎尚良博士，医薬事業部審議役中尾義雄博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり，終始絶大な御指導と御助言を頂きました当社総務技術部部长秋山峻一博士，生産技術研究所主席研究員鈴木節士博士，同主席研究員隅野靖弘氏，光工場醗酵製造部課長津田昌彦氏，生物工学研究所主任研究員加藤光一博士に深く御礼申し上げます。

また御助言と御援助を頂きました当社フードビタミン研究所所長奈良潔博士，同首席研究員中対勇氏，同主任研究員富士縄昭平氏，同研究員山崎栄一郎氏，同倉沢拓氏に御礼申し上げます。

終始有益な御助言を頂きました月桂冠株式会社常務取締役今安聰氏，同研究所次長阿部康久氏，財団法人発酵研究所主任研究員今井紘博士，同研究員坂根建氏に深謝いたします。

更に，本研究に直接御協力頂きました研究員菊本章生，研究員長谷川建夫，研究技員河原賢治，宮下英昭，岡崎賢治朗，湯森潔の諸氏に感謝致します。

引用文献

- (1) 大塚謙一編：「醸造学」，養賢堂，1985.
- (2) 日本醸造協会編：「酒造読本」，新日本印刷株式会社，1986.
- (3) 高橋康次郎：醸協，75，119 (1980).
- (4) 高橋康次郎，佐藤信，蓼沼誠，後藤和弘，荒井俊雄：醸協，67，726 (1972).
- (5) 市川弥太郎：醸協，70，98 (1975).
- (6) 井上幸男，川崎恒：醸協，48，431 (1953).
- (7) K. Yoshizawa: Agric. Biol. Chem., 28, 279 (1964).
- (8) Y. Takahashi, M. Tadenuma and M. Sato: Agric. Biol. Chem., 40, 325 (1976).
- (9) 野白喜久雄，原昌道，秋山裕一：特許公報 昭56-20830 (昭和56年5月15日)。
- (10) A. Nettleship, P. S. Henshaw and H. L. Meyer: J. Natl. Cancer Inst., 4, 309 (1943).
- (11) P. N. Cowen: Brit. J. Cancer, 4, 337 (1950).
- (12) M. H. Salaman and F. J. C. Roe: Brit. J. Cancer, 7, 472 (1953).
- (13) N. Haran and I. Berenblum: Brit. J. Cancer, 10, 57 (1956).
- (14) G. Pietra, H. Rappaport and P. Shubik: Cancer, 14, 308 (1961).
- (15) W. E. Heston, G. Vlahakis and M. K. Deringer: J. Natl. Cancer Inst., 24, 425 (1960).
- (16) A. Tannenbaum, S. D. Vesselinovitch, C. Maltoni and D. S. Mitchell: Cancer Res., 22, 1362 (1962).
- (17) G. Walker, W. Winterlin, H. Fouda and J. Seiber: J. Agric. Food Chem., 22, 944 (1974).
- (18) C. S. Ough: J. Agric. Food Chem., 24, 323 (1976).
- (19) P. G. Stecher, ed. : "The Merck Index," 8th Ed., Merck & Co., Rahway, NJ, 1968.
- (20) M. C. Moreau, R. Ducluzeau and P. Raibaud: Infec. Immun., 13, 9 (1976).
- (21) K. Suzuki, Y. Benno, T. Mitsuoka, S. Takebe, K. Kobashi and J. Hase: Appl.

- Environ. Microbiol., **37**, 379 (1979).
- (22) S. Kakimoto, K. Okazaki, Y. Sakane, K. Imai, Y. Sumino, S. Akiyama and Y. Nakao: Agric. Biol. Chem., **53**, 1111 (1989).
- (23) S. Kakimoto, Y. Sumino, S. Akiyama and Y. Nakao: Agric. Biol. Chem., **53**, 1119 (1989).
- (24) S. Kakimoto, H. Miyashita, Y. Sumino, and S. Akiyama: Agric. Biol. Chem., **54**, 381 (1990).
- (25) S. Kakimoto, Y. Sumino, K. Kawahara, E. Yamazaki and I. Nakatsui: Appl. Microbiol. Biotechnol., **32**, 538 (1990).
- (26) E. Yamazaki, T. Kurasawa, S. Kakimoto, Y. Sumino and I. Nakatsui: Agric. Biol. Chem., **54**, 2433 (1990).
- (27) 倉沢卓, 山崎栄一郎, 中対勇, 柿本茂八, 隅野靖弘: 平成2年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1990, P. 448.
- (28) 光岡知足編: 「腸内菌の世界」, 叢文社, 1984.
- (29) Y. Ochi, T. Mitsuoka and T. Sega: Zentralbl. Bacteriol., Abt. 1, Orig., **193**, 80 (1964).
- (30) M. Rogosa, J. A. Mitchell and R. F. Wiseman: J. Bacteriol., **62**, 132 (1951).
- (31) T. Mitsuoka, T. Sega and S. Yamamoto: Zentralbl. Bakteriologie, Abt. 1, Orig., **195**, 455 (1965).
- (32) 小酒井望, 鈴木祥一郎編: 「嫌気性菌と嫌気性菌症」, 医学書院, 1968.
- (33) M. M. Weatherburn: Anal. Chem., **39**, 971 (1967).
- (34) N. R. Krieg and J. G. Holt, ed.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD., 1984.
- (35) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, ed.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore, MD., 1986.
- (36) S. T. Cowan and K. J. Steel, ed.: "Manual for the Identification of Medical Bacteria," 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1974.
- (37) H. U. Bergmeyer, ed.: "Methods of Enzymatic Analysis," 3rd Ed., Vol. 6, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Basel, 1984.
- (38) H. Saito and K. Miura: Biochim. Biophys. Acta, **72**, 619 (1963).
- (39) L. Marmur and P. Doty: J. Mol. Biol., **5**, 109 (1962).
- (40) M. P. Lechevalier and H. A. Lechevalier, ed.: "Actinomycete Taxonomy,"

Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA, 1980.

- (41) J. J. Harper and G. H. Davis: Int. J. Syst. Bacteriol., **29**, 56 (1979).
- (42) 秦藤樹編: 「微生物学辞典」, 技報堂出版株式会社, 1989.
- (43) D. J. Hardman and J. H. Slater: J. Gen. Microbiol., **123**, 117 (1981).
- (44) T. A. EL-Sharkamy and D. Huisingh: J. Gen. Microbiol., **68**, 149 (1971).
- (45) T. A. EL-Sharkamy and D. Huisingh: J. Gen. Microbiol., **68**, 155 (1971).
- (46) H. L. T. Mobley and R. P. Hausinger: Microbiol. Rev., **53**, 85 (1989).
- (47) B. J. Davis: Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
- (48) H. Nakano, S. Takenishi and Y. Watanabe, Agric. Biol. Chem., **48**, 1495 (1984).
- (49) J. C. Polacco and E. A. Havir: J. Biol. Chem., **254**, 1707 (1979).
- (50) W. N. Fishbein: Ann. N. Y. Acad. Sci., **147**, 857 (1969).
- (51) B. D. Jones and H. L. T. Mobley: Infec. Immun. **55**, 2198 (1987).
- (52) S. Mahadevan, F. D. Sauer and J. D. Enfle: Biochem. J., **163**, 495 (1977).
- (53) R. P. Hausinger: J. Biol. Chem., **261**, 7866 (1986).
- (54) G. W. Stemke, J. A. Robertson and M. Nhan: Can. J. Microbiol., **33**, 857 (1987).
- (55) E. H. Creaser and R. L. Porter: Int. J. Biochem., **17**, 1339 (1985).
- (56) S. Christians and H. Kaltwasser: Arch. Microbiol., **145**, 51 (1986).
- (57) M. J. Todd and R. P. Hausinger: J. Biol. Chem., **262**, 5963 (1987).
- (58) B. D. Jones and H. L. T. Mobley: J. Bacteriol., **170**, 3342 (1988).
- (59) S. B. Mulrooney, M. J. Lynch, H. L. T. Mobley and R. P. Hausinger: J. Bacteriol., **170**, 2202 (1988).
- (60) J. Schneider and H. Kaltwasser: Arch. Microbiol., **139**, 355 (1984).
- (61) A. D. Larson and R. E. Kallio: J. Bacteriol., **68**, 67 (1954).

- (62) I. Magana-Plaza, C. Montes and J. Ruiz-Herrera: Biochim. Biophys. Acta., **242**, 230 (1971).
- (63) A. A. Glemzha, V. B. Kovzan and D. Y. Yuodvalkite: Biochemistry, **49**, 1741 (1986).
- (64) B. L. Wong and C. R. Shobe: Can. J. Microbiol., **20**, 623 (1974).
- (65) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- (66) U. K. Laemmli: Nature, **227**, 680 (1970).
- (67) E. Schram, S. Moore and E. J. Bigwood: Biochem. J., **57**, 33 (1954).
- (68) H. Matsubara and R. M. Sasaki: Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 175 (1969).
- (69) N. E. Dixon, J. A. Hinds, A. K. Fihelly, C. Gazzola, D. J. Winzor, R. L. Blakeley and B. Zerner: Can. J. Biochem., **58**, 1323 (1980).
- (70) N. Carvajal, M. Fernandez, J. P. Rodriguez and M. Donoso: Phytochemistry, **21**, 2821 (1982).
- (71) E. H. Dreaser and R. L. Porter: Int. J. Biochem., **17**, 1339 (1985).
- (72) N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley and B. Zerner: J. Am. Chem. Soc., **97**, 4131 (1975).
- (73) 日本生化学会(村松正実)編:「新生化学実験講座1」,東京化学同人,1990.
- (74) G. Mamiya, K. Takishima, M. Masakuni, T. Kayumi, K. Ogawa and T. Sekita: Proc. Japan Acad., **61**, 395 (1985).
- (75) M. Dixon and E. C. Webb, ed. "Enzymes," 3rd Ed., Longman Group Ltd., London, 1979.
- (76) I. J. Rosenstein, J. M. H. Miller and W. Brumfitt: Infect. Immun., **32**, 32 (1981).
- (77) N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa and R. M. M. Singh: Biochemistry, **5**, 467 (1966).
- (78) R. M. Hewick, M. W. Hunkapiller, L. E. Hood and W. J. Dreyer: J. Biol. Chem., **256**, 7990 (1981).

- (79) J. C. De Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe: J. Appl. Bacteriol., 23, 130 (1960).
- (80) I. Magana-Plaza and J. Ruiz-Hevera: J. Bacteriol., 93, 1294 (1967).
- (81) H. Kaltwasser, J. Kramer and W. R. Conger: Arch. Mikrobiol., 81, 178 (1972).
- (82) C. Zorn, R. Dielrich and H. Kaltwasser: Z. Allg. Mikrobiol., 22, 197 (1982).
- (83) H. L. T. Mobley, B. D. Jones and A. E. Jerse: Infect. Immun., 54, 161 (1986).
- (84) A. H. Mackerras and G. D. Smith: J. Gen. Microbiol., 132, 2749 (1986).
- (85) E. Bast: Arch. Microbiol., 150, 6 (1988).
- (86) Y. Yoshizawa, Y. Takahashi and K. Sato: J. Brew. Soc. Japan, 83, 136 (1988).
- (87) K. Yoshizawa and K. Takahashi: J. Brew. Soc. Japan, 83, 142 (1988).
- (88) N. Tanaka, H. Nagai, E. Nakazawa, H. Mishima and S. Takemura: J. Brew. Soc. Japan, 84, 413 (1989).
- (89) K. Yoshizawa and K. Takahashi: J. Brew. Soc. Japan, 83, 69 (1988).
- (90) 日本醸造協会編: 「清酒製造技術」, 新日本印刷株式会社, 1987.
- (91) F. L. Joe Jr., D. A. Kline, E. M. Miletta, J. A. G. Roach, E. L. Rosebord and T. Fazio: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, 509 (1977).
- (92) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」, 丸井工文社, 1986.
- (93) N. Yamamoto, T. Ota and H. Uzu: J. Brew. Soc. Japan, 83, 618 (1989).
- (94) 市川英治, 川合菜穂美, 水津哲義, 安部康久, 今安聡: 昭和63年度日本醸造学会講演要旨集, 1988, P. 18.
- (95) C. S. Ough and G. Trioli: Am. J. Enol. Vitic., 39, 319 (1988).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

