The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	好アルカリ性 Bacillus sp. の生産するアルカリプロテアーゼの工業的利用に関する研究
Author(s)	藤原, 信明
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3097844
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

好アルカリ性 *Bacillus* sp. の生産する
アルカリプロテアーゼの工業的利用に関する研究

１９９４年

藤　　原　　信　　明

目　次

序論 ・・・

（ａ）吸光係数 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27
（ｂ）分子量測定 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27
（ｃ）アミノ酸組成 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30
（ｄ）Ｎ末端のアミノ酸配列 ・・・・・・・・・・・・・・31
（３）酵素学的性質 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
（ａ）ｐＨの影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
（ｂ）温度の影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34
（ｃ）各種阻害剤と無機塩の影響 ・・・・・・・・・・・・37
第４節　要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

第２章　Ｘ線フィルム上のゼラチン膜の分解特性と
連続処理システムの開発 ・・・・・・・・・・・ 41
第１節　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
第２節　実験材料および実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
第３節　実験結果および考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
１．Ｘ線フィルム上のゼラチン膜の酵素分解 ・・・・・・・・・ 42
（１）ゼラチン膜分解の経時変化 ・・・・・・・・・・・・・・ 43
（２）ゼラチン膜の分解特性 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 44
（３）繰り返し処理 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
２．回分方式による処理 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51
３．Ｘ線フィルムの連続処理システムの開発 ・・・・・・・・・ 53
（１）検討すべき問題点・事項および設計の概念 ・・・・・ 54
（ａ）フィルムの搬送 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・54
（ｂ）フィルム試料の形状 ・・・・・・・・・・・・・・ 54

（ｃ）前処理の必要性 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54
（ｄ）反応器および反応条件の選定 ・・・・・・・・・・ 57
（ｅ）ベースフィルムの洗浄、回収 ・・・・・・・・・・ 57
（ｆ）銀の回収 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58
（２）処理装置の構成と運転成績 ・・・・・・・・・・・・・・ 59
（ａ）前処理槽 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59
（ｂ）酵素反応槽 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
（ｃ）洗浄槽および銀の回収 ・・・・・・・・・・・・・・ 63
（ｄ）経済性の評価 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63
第４節　要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 65

第３章　耐熱性アルカリプロテアーゼの開発と
ゼラチン膜分解への利用 ・・・・・・・・・・ 67
第１節　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67
第２節　実験材料および実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 68
第３節　実験結果および考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 70
１．耐熱性アルカリプロテアーゼ生産菌の分離 ・・・・・・・・ 70
（１）酵素生産菌の分離 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 70
（２）酵素生産菌の菌学的性質 ・・・・・・・・・・・・・・・ 70
２．酵素の精製と性質 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
（１）酵素生産菌の培養 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
（２）酵素の精製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73
（３）物理化学的性質 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 74
（ａ）吸光係数 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 74

（ｂ）分子量測定 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・76
（ｃ）アミノ酸組成 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・77
（ｄ）Ｎ末端のアミノ酸配列 ・・・・・・・・・・・・・・79
（４）酵素学的性質 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 79
（ａ） ｐＨの影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・79
（ｂ）温度の影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・80
（ｃ）各種阻害剤の影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・83
３．耐熱性酵素によるゼラチン膜の分解 ・・・・・・・・・・・ 85
第４節　要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90

総括と今後の展望 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 92

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 99

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 103

本研究に関係する論文 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・104

略　語

ＢＯＤ：biochemical oxygen demand

ＣＢＢ：coomasie brilliant blue R250

ＣＭ：carboxymethyl cellulose

ＤＥＡＥ：diethylaminoethyl cellulose

ＤＦＰ：diisopropyl fluorophosphate

ＥＤＴＡ：ethlenediamin tetraaceticacid tetrasodium salt

log k ：活性化エネルギー(kJ/mol)

ＰＡＧＥ：polyacrylamide gel electrophoresis

ＰＣＭＢ：p-chloromercuricbenzoin acid

ＰＥＴ：polyethyleneterephtalate

ｐＩ:isoelectric point

ＰＴＨ：3-phenylthiohydantoin

ＳＤＳ：sodium dodecyl sulfate

ＶＰ test：Voges-Proskauer test

序論

近年、経済の成長、国民生活の向上に伴って廃棄物の発生量は急激に増加し、その処理は大きな社会問題となっている。環境庁がまとめた「環境保全のための循環型社会システム検討会」の報告書（1990年11月28日）によると、1980年 8,770万トンであった廃棄物の排出量が 1990年には 12,710 万トンと、この10年間で 50%近く増加し、2000年には15,660万トンに達すると予測されている。厚生省の生活環境審議会廃棄物処理部会も、「今後の廃棄物対策の在り方について」の答申（1990年12月10日）をまとめ、廃棄物の減量化とリサイクルを「国民の責務」とし、特に製造者に対しては「製品が廃棄になった場合の処理の困難性、資源化の可能性を自己評価させる。」としている。また、通産省の産業構造審議会廃棄物処理・再資源化部会も、「今後の廃棄物処理・再資源化対策のあり方」に関する答申（1990年12月６日）をまとめ、「今後は省資源と資源の再利用を織り込んだ経済社会への転換が必要であり、生産、流通、消費の各段階で廃棄物の減量化や再資源化、さらには処理の容易化を図ることが重要である。」としている。

こうした各省庁の答申を受けて、平成３年４月には、廃棄物の発生の抑制、減量化、および資源の有効利用を図り、地球環境を保全する立場から、「再生資源の利用の促進に関する法律」（通称：リサイクル法）が制定され、同年10月25日より施行された。リサイクル法では、事業者の再生資源の利用の促進努力を最大限に引き出すために、表１で示すような業種、製品、および副産物が政令で指定され、リサイクル促進のために講じる措置が個別に、かつ具体的に示されている。

写真工業界は、リサイクル法において再生資源の利用促進に努める業種として指定はされていないものの、各審議会の答申あるいは法案の趣旨を踏まえると、関係者が

再資源化の促進に積極的に取り組まねばならないことは言うまでもない。写真工業界が取り組み、リサイクルを促進すべき製品としては、写真フィルムが該当する。写真フィルムに感光材として含まれる銀のリサイクルは従来から行なわれ、特に 1979～1980年の高騰、いわゆる銀ショック以来、積極的に取り組まれてきた(1)。

表１　リサイクル促進のため政令で指定された業種、製品および副産物

特定業種	紙製造業（故紙）、ガラス製造業（カレット）、 建設業（土砂、コンクリート塊、アスファルト塊）
第一種指定製品	自動車、ユニット型エアコン、テレビ、冷蔵庫、洗濯機
第二種指定製品	飲料用缶、酒類用缶（スチール、アルミ）
指定副産物	鉄鋼スラグ、石炭灰、土砂、コンクリート塊、 アスファルト塊

「再生資源の利用の促進に関する法律」（平成３年10月25日施行）

コンピュータ技術の進歩に伴い、Ｘ線とコンピュータを組み合わせたＸ線ＣＴ、ＣＲ法（Ｘ線画像診断システム）、超音波検査法、核磁気共鳴検査法（ＭＲＩ）などの新しい医療診断法が、従来からのＸ線撮影に加えて、次々と開発されている。いずれの診断においても、最終的な判断は写真フィルムによって行なわれることから、新しい診断方法に適したフィルムが新たに開発され、したがって医療用Ｘ線フィルムの消費は当初の予測とは逆に、図１で示すように年率 20～30％ の伸びを示している(2)。写真フィルムに消費される銀の３／４は、使用済み医療用Ｘ線フィルムから回収された銀であると言われるほど、銀の回収は既に非常に効率よく行なわているが(3)、医療用Ｘ線フィルムの消費の伸びをみると、それらからの銀の回収は今後も重要である。

このように銀の回収が積極的に推進されてきた一方で、フィルムベースであるプラ

スチックのポリエチレンテレフタレート（Polyethyleneterephtalate：以下ＰＥＴと略す）の再資源化については、従来から何ら考慮されていなかった。プラスチックはリサイクル法の中で政令指定された製品ではないが、産業構造審議会の答申の中で指定されている14の主要廃棄物の一つである。ＰＥＴはその強靭性、耐破砕性から飲用ボトル、磁気テープ、写真フィルムなどに年間約 43万トン生産されているが(1989年統計)、使用後、ほとんど再利用されることなく廃棄物として処分されている。写真フィルムについては、年間約３万トンの使用済み医療用直接撮影Ｘ線フィルムが銀回収の際に焼却され、また、これとほぼ同量の写真製版用フィルムが、銀含有量が低い

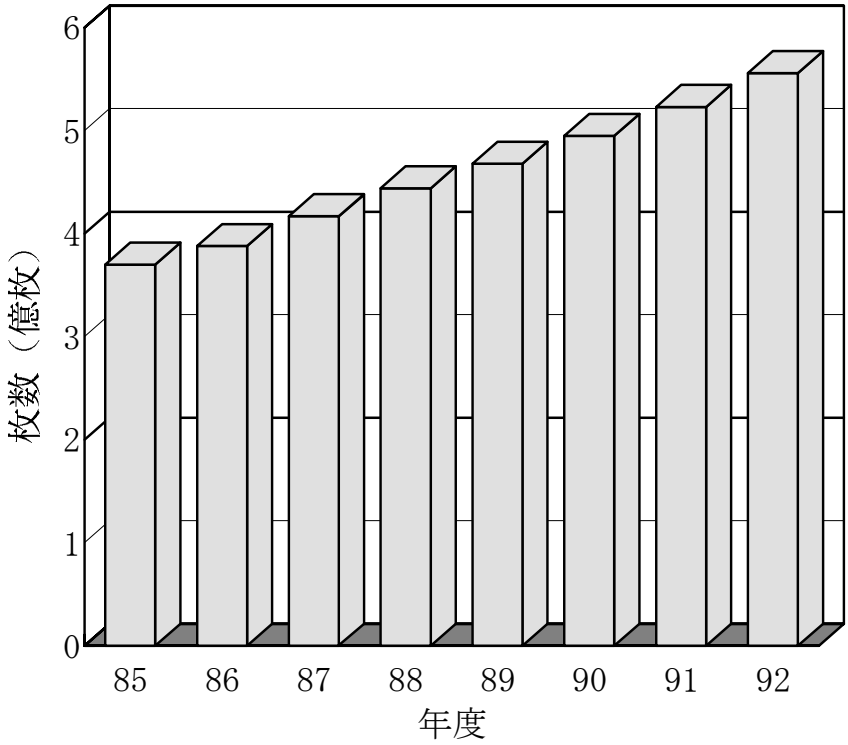

図１　わが国における医療用Ｘ線フィルムの消費の伸び
水木栄一著：日経産業シリーズ「写真フィルム」(1990.8)134頁の図を一部改変して引用。（データの出所：感光材料工業会出荷統計、大蔵省通関統計材）

理由から銀回収に供されることなく、一般廃棄物として処分され、ＰＥＴの回収・再利用は行なわれていない。

現在、銀回収に供されている写真フィルムは医療用直接撮影Ｘ線フィルムだけであり、一般用フィルム、製版印刷用フィルムあるいは工業用Ｘ線フィルムなどは、銀含有量あるいは集約度の問題から回収の対象となっていない。撮影された医療用直接撮影Ｘ線フィルムは、法律で定められた５年間の保管義務の後、病歴管理に必要なものはマイクロフィルム化され、不要になった原板と保存の必要がないフィルムは回収業者に引き取られる。この使用済み医療用直接撮影Ｘ線フィルムから銀が回収されるが、その方法には、表２で示すように、焼却法、化学法、酵素法の３つがある。焼却法は、

表２　Ｘ線フィルムから銀の回収方法

方　法	原　　理	特　　徴
焼 却 法	フィルムベースであるPETの自燃を利用して焼却し、灰の中から銀を回収する。	手軽に回収できる。 悪臭・粉塵対策が必要である。 炉の維持費が高い。 ＰＥＴの再利用が不可能である。 銀の回収率、純度が悪い。
化 学 法	カセイソーダ、ヒドラジン、次亜塩素酸ソーダなどでゼラチン膜を分解・剥離し、処理液から銀を回収する。	刺激臭が発生する。 劇薬への安全対策が必要である。 薬品が高価である。 ＰＥＴの再利用が可能である。 (ただし、品質は劣化している。)
酵 素 法	ゼラチン膜を酵素（プロテアーゼ）で分解し、処理液から銀を回収する。	悪臭、粉塵対策が要らない。 排水処理が必要である。 ＰＥＴの再利用が可能である。 反応液のｐＨ,温度管理が必要である。 酵素が高価である。

現在行なわれている方法であり、フィルムベースであるＰＥＴを焼却し、灰の中から銀を回収する。本方法は簡便ではあるが、プラスチックの高温燃焼による炉の損傷、集塵機の定期的な更新、あるいはゼラチン焼却に伴う悪臭の発生など多くの問題を従来から抱えていた。そして、今日、最大の問題点はフィルムベースであるＰＥＴの回収・再利用が不可能なことであり、焼却法はリサイクル社会に適合しない処理方法である。

医療用直接撮影Ｘ線フィルムは図２で示すように、175μmのフィルムベースの両側に下塗層を介して感光材の銀を含むおよそ４～５μmの乳剤層と１～２μmの保護層が順に塗布された構造を持つ(4)。いずれの層もその支持体はゼラチンであり、銀とＰＥＴを分別回収する方法には、このゼラチン膜を化学薬品で剥離する化学法と、酵素

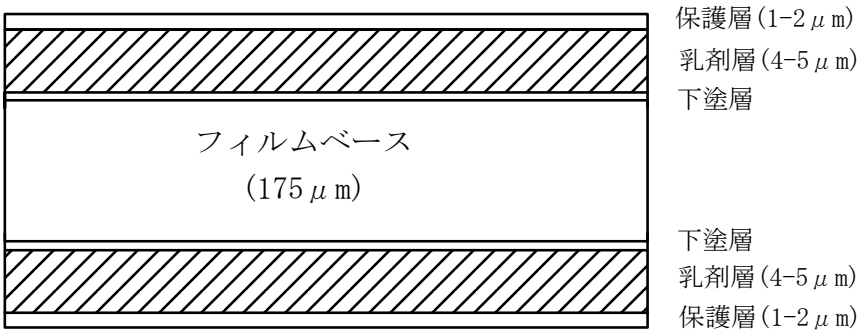

図２　医療用直接撮影Ｘ線フィルムの構造（模式図）

で分解する酵素法がある。化学法では、用いる薬品のためＰＥＴの表面が劣化し、良好な品質のＰＥＴを得ることができないのに対し、酵素法は温和な分解反応であることからＰＥＴの劣化もなく、再利用に有利な処理方法である。しかしながら、写真

フィルム上のゼラチン膜は、写真撮影あるいはその後の現像・定着処理での機械的な擦過・圧縮に耐え、また高温短時間現像での軟化・膨潤を抑制するために、化学薬品によって分子間に架橋結合を形成させる硬膜処理が施されており、既存の酵素で短時間に分解することは難しかった(5)。

本研究では、資源の有効利用の観点から、酵素利用により使用済み写真フィルムから銀とＰＥＴの分別回収を目指し、しかも工業的なレベルで行なうことを目標とした。そのために、まずゼラチン膜の分解に優れた酵素を探索した。ゼラチンは、分子内にアミノ基とカルボキシル基の両極性基を持つ高分子電解質であることから、分子の広がりを反映する粘度はｐＨに依存し、等電点(pI=5.08)で極小値を、ｐＨ 3.1とｐＨ 10.7 で極大値をとる(6)。この極大値を示すｐＨでは、ゼラチン膜が膨潤していることから、酵素による加水分解を受けやすいと考えられ、またアルカリ性条件下での酵素分解は、ゼラチン膜の分解にともなって反応液中に遊離した銀がアルカリ性溶液に溶けないことから、回収率の低下がないという利点も有する。したがって、高いｐＨ領域に活性を持つアルカリプロテアーゼを用いれば、ゼラチン膜の迅速な分解と銀の高い回収率が期待される。アルカリ性条件下で好んで生育する好アルカリ性菌がアルカリプロテアーゼを生産することは、掘越の論文(7)以来いくつか報告されているが(8-13)、市販はされていない。したがって、新たに自然界からアルカリプロテアーゼ生産菌を分離することにした。

また、酵素を利用するに際しては、経費を軽減するために酵素は繰り返して使用することとし、さらに処理装置の占有面積を少なくし、しかも効率を上げるために処理は連続的に行なうことにした。処理能力は、運転所要人員を２名として設備投資費、売上高、固定費などから求めた損益分岐の処理量である1､000kg／日を最低限の目標値に設定した。

本論文の概要は以下の通りである。

第１章では、ｐＨ11付近でタンパク質分解活性を持つアルカリプロテアーゼの検索を行なった。アルカリプロテアーゼ生産菌の分離に先立ち、それらの効率よい分離方法について検討を加え、新しい分離方法を考案した。分離したアルカリプロテアーゼ生産菌について、その菌学的な性質を明らかにした。酵素生産条件について、培地組成として基本的な炭素源、窒素源の種類と添加量などを検討した。次いで、各種クロマトグラフィーにより酵素の精製を行い、得られた精製酵素について物理化学的性質、酵素化学的性質など一般的な諸性質を調べた。

第２章においては、粗酵素液を用いて医療用直接撮影Ｘ線フィルム上のゼラチン膜の分解に及ぼす温度、ｐＨ、酵素濃度の影響を検討した。次いで、酵素液を更新することなく、同一の酵素液で繰り返してフィルムを処理し、繰り返し処理が可能であることがわかった。これらの結果をもとに、工業的なレベルでの処理の可能性をまず回分式で、次いで新たに考案した連続処理システムで試みたところ、実用化は技術的にも、経済的にも充分可能であることがわかった。

第３章においては、処理プロセスの改良・向上を目指して、耐熱性アルカリプロテアーゼの検索をおこなった。そして、第１章で述べた好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼより更に高い作用最適ｐＨと作用最適温度を持つアルカリプロテアーゼを耐熱性の好アルカリ性菌から得た。この酵素はさらに短時間でゼラチン膜を分解できることから、本酵素を用いることにより現用の処理装置をスケールアップすることなしに処理能力を増大することが可能であった。

最後に、本研究の結果を総括するとともに、フィルム処理によって得られる銀とＰＥＴのリサイクルの展望について述べた。

第１章 好アルカリ性菌 *Bacillus* sp. B21-2の生産するアルカリプロテアーゼ

第１節　緒言

写真フィルム上のゼラチン膜を酵素により分解し、銀とＰＥＴを分別回収する方法は、従来の焼却法とは異なり、銀のみならず、品質のよいＰＥＴを同時に回収できる点で優れている。酵素を用いた写真フィルムからの銀の回収は、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来のプロテアーゼ subtilisin BPN´を用いてが報告されている(5)。それによると、ｐＨ７～９、55～60℃ の反応条件下で処理を行なった場合、ゼラチン膜分解に30分を必要とし、温度を 30℃ に下げると２～３時間が必要であった(14)。工業的なレベルでの実用化を考えると、より短時間での分解が必要であり、しかもより安定な酵素が望ましい。したがって、subtilisin BPN´より短時間でゼラチン膜を分解でき、かつ、より安定な酵素を探索した。その際、アルカリ性条件下での酵素処理がゼラチン膜分解に有利であるとの考えから、ｐＨ10～11 付近に作用最適活性を有するアルカリプロテアーゼを得ることを試みた。

プロテアーゼを生産する微生物の分離は、通常、中性条件下で不溶性のカゼインを含む寒天培地を用いて、タンパク質の加水分解に伴うコロニー周辺のハロー（透明環）の形成を指標に行なわれる。目的とする酵素を生産する微生物を効率よく分離するには、上記のように目視判定による検索が効果的であるが、ｐＨ10 付近のアルカリ性培地でのプロテアーゼ生産菌の分離に際しては、基質であるカゼインが溶解することから、ハロー形成に基づく酵素生産能の目視判定は不可能となる。この対策として、培養後、カゼイン寒天培地上に 10% トリクロル酢酸溶液を添加して未分解のカゼインを不溶化・白濁させ、ハローが形成されたものを酵素生産菌として判定する方

法がとられているが(7)、効率的な分離には直接的な目視判定が望ましい。そこで、アルカリプロテアーゼ生産菌の分離に先立ち、アルカリ性培養での酵素生産菌の分離に用いることができる培地として小麦粉の含有を考案した。次いで、この分離用培地を用いてアルカリプロテアーゼを生産する好アルカリ性菌を分離した。さらに、分離菌の菌学的性質を検討した。

酵素の工業的な利用で重要なことは、酵素の性質はもちろんのこと、いかに低コストで酵素を生産・供給し、ランニングコストを軽減できるかである。こうした観点から、酵素生産菌の分離では大豆粉とデンプンを主原料とする廉価な天然培地を用いてスクリーニングを行なったが、さらに酵素生産に及ぼす培地組成について詳細な検討を加えた。

続いて、アルカリプロテアーゼを精製し、精製酵素の性質について検討した。硫安塩析後、各種クロマトグラフィーにより本酵素を精製し、次いで精製酵素を用いて分子量、アミノ酸組成、N末端のアミノ酸配列などの物理化学的性質を明らかにした。さらに、酵素学的性質について、ｐＨ、温度、各種塩類、阻害剤の影響などを検討した。

第２節　実験材料および方法

（１）材料

グルテンは和光純薬工業製、小麦粉は日清製粉製強力粉、魚肉エキスは和光純薬工業製のカツオ肉エキス、ポリペプトンは大五栄養製を用いた。基質のカゼインは、メルク製ハマーステンカゼインを用いた。市販酵素としては、プロチンＡ（*B. subtilis* 由来、大和化成製）、ビオプラーゼ（*B. amyloliquefacience* 由来

subtilisin BPN´、ナガセ生化学製）、プロレザー（*Bacillus* sp.由来、天野製薬製）、液化型α－アミラーゼ（*B. subtilis* 由来、生化学工業製）を用いた。牛血清アルブミンはシグマ製を用いた。分子量測定のための標準タンパク質は、ゲル濾過には Boehringer Manheim 製のキット（bovine serum albumin (68,000)、ovalbumin (45,000)、chymo-trypsinogen A (25,000)、cytchrome *c* (12,500)）を用い、電気泳動にはファルマシア製の測定キットＬＭＷ(phosphorylase (94,000)、albumin (67,000)、ovalbumin (43,000)、carbonic anhydrase (30,000)、trypsin inhibitor (20,100)、α-lacto- albumin (14,400)）を用いた。ＤＥＡＥ－セルロース、ＣＭ－セルロースは Brown 製を用いた。セファデックス G-75 はファルマシア製を用いた。フィルム試料は、コダック社の使用済み医療用直接撮影Ｘ線フィルムを用いた。その他は、市販の特級あるいは１級試薬を用いた。

（２）酵素生産菌の分離

アルカリプロテアーゼ生産菌の分離には、１％ 小麦粉、0.5% グルコース、0.1% KH_2PO_4、１％ Na_2CO_3（10%溶液として別殺菌して加える）、1.5% 寒天を含む寒天平板培地を用いた。土壌試料約 400点を分離源として、滅菌水に懸濁し、その１～２白金耳を寒天培地に塗布、30℃ で２～３日間培養し、生育したコロニー周辺が透明に抜けた菌を酵素生産菌とした。

ハロー形成の大きな菌株について、１％ 大豆粉、１％ デンプン、0.1% KH_2PO_4、１％ Na_2CO_3（10% 溶液として別殺菌後加える）、ｐＨ10.2 の酵素生産用培地で坂口フラスコ（培地100ml／500ml 容）を用いて46時間液体培養を行なった。培養上清液について、酵素の生産量と耐熱性（50℃、10分間加熱）の２つの評価から、最終的に１菌株を選んだ。

（３）分離菌の分類学的性質

分離した菌は、“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,” 8th Ed.(15)にしたがって同定した。

（４）酵素活性の測定

酵素活性は、Horikoshi の方法にしたがって測定した(7)。すなわち、基質として0.6% カゼイン溶液（カゼイン３ｇを 50ml の0.1 M NaOH に溶解し、20 mM ホウ酸緩衝液 250ml を加えた後、ｐH11.5に調整し、500ml とした）を用い、30℃、10分間反応した。そして、反応前後におけるトリクロル酢酸混合液（0.11 M トリクロル酢酸、0.22 M 酢酸ナトリウム、0.33 M 酢酸）可溶性区分の 275 nm の吸光度の増加より活性を測定した。上記の条件下で1分間に１μg のチロシン相当量を増加させる酵素量を１単位(U)とした。

（５）ゼラチン膜の分解力の比較

フィルムは、シュレッダー（明光商会製）で ６×12 mm に切断したものを用いた。ゼラチン膜の分解実験は、５ℓ 容のステンレス製ビーカーに所定のｐHに調整した粗酵素液を３ℓ 入れ、フィルム 500g を投入後、恒温水槽で 40℃ に保温しながら、毎分 30 回転の速度で撹拌して行なった。反応中のｐH調整は、飽和カセイソーダ溶液を加えて行なった。ゼラチン膜の分解時間は、乳剤層の支持体であるゼラチン膜が分解され、乳剤層中の黒化銀が溶液中に遊離し、フィルムが透明になるまでの時間を目視で測定した。

（６）タンパク質の定量

タンパク量は 280 nm の吸光度測定、あるいは、牛血清アルブミンを標準タンパク質とした Lowry らの方法(16)で測定した。

（７）酵素生産用基本培地組成および培養条件

１％ 大豆粉、２％ グルコース、１％ ポリペプトン、0.1％ KH_2PO_4、１％Na_2CO_3 (pH10.2)を基本培地とした。培養は、500ml 容の坂口フラスコに培地を100ml 入れ、30℃、120 ｽﾄﾛｰｸ/min の条件で行なった。

培養基の組合せ実験は、５ℓ 容のジャーファーメンター（いわしや生物科学製）に３ℓ の培地を入れ、30℃、600 rpm、0.5 vvm で培養した。また、大量培養は300ℓ のジャーファーメンター（日本化学機械製造製）に 150ℓ の培地を仕込んで行なった。

（８）酵素の精製

（ａ）粗酵素液の調製

分離菌を ５ℓ のジャーファーメンター（いわしや生物科学製）を用いて、３％ 大豆粉、３％ グルコース、１％ 魚肉エキス（和光純薬工業製）、0.1％ KH_2PO_4 、１％ Na_2CO_3 （10％溶液として別殺菌の後、培地に加える）の培地（３ℓ）で、600rpm、0.5vvm、30℃ の条件で 24 時間培養した。前培養は大豆粉を除いた同様の培地(100ml) で一晩、培養し、本培養に加えた。培養終了後、14,00 rpm (21,000×*g*) で 20分間遠心分離して菌体を除き、上澄液を粗酵素液とした。

（ｂ）硫安塩析

粗酵素液 50ml に硫安濃度として 50% 飽和になるように硫安粉末を加え、氷室で１時間放置後、沈澱物を遠心分離によってえた。

（ｃ）ＤＥＡＥ－セルロースカラムクロマトグラフィー

硫安塩析で得た粗酵素標品を 10 ｍＭ NaClを含む20 ｍＭ Tris-HCl 緩衝液 (pH8.8) に溶解し、同緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したＤＥＡＥ－セルロースのカラム（2×20 cm）に加え、同緩衝液を 25 ml/h で流し、酵素を溶出

した。

（d）ＣＭ－セルロースカラムクロマトグラフィー

前項のＤＥＡＥ－セルロースカラムクロマトグラフィーで得た酵素標品を 10 mM リン酸緩衝液（pH7.6）に対して透析し、同緩衝液で平衡化したＣＭ－セルロースカラム（2×20 cm）に加えた。溶出緩衝液中の食塩濃度を 0 から 0.3 M まで直線的に増加させて、吸着したタンパク質を溶出した。

（９）アミノ酸分析

酵素溶液と 12M 塩酸を等量加えて減圧で封管し、110℃、24時間加水分解した。その加水分解物を減圧下で濃縮乾固して充分に塩酸を除いた後、クエン酸緩衝液(pH2.2) で溶解した。この溶液について、日本電子製アミノ酸自動分析計ＪＬＣ-２００Ａ で分析した。メチオニンとシスチンは、常法にしたがって冷蔵庫内にて16時間過ギ酸で酸化処理後、６Ｍ 塩酸で 20時間加水分解を行ない、自動分析計により分析した。また、トリプトファンは 110℃、12時間アルカリ処理後、ウオーターズ製高速液体クロマトグラフＱＡ－１により分析した。

(10) 分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定は、セファデックスＧ－７５ゲルを用いて Andrew の方法(17)にしたがって行なった。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、sodium dodecyl sulfate (SDS) 存在下で行なう Laemmli 法(18)にしたがって行なった。泳動終了後、Coomasie Brilliant Blue R250で染色した。

(11) Ｎ末端アミノ酸配列の分析

アプライドバイオシステム製の自動プロテインシークエンサー４７０ によりＮ末端からアミノ酸を順次切断し、ＰＴＨ（３－フェニル－２－チオヒダイトン）アミノ酸として同社の高速液体クロマトグラフィーシステム１２０Ｍによりアミノ酸を同定した。

第３節　実験結果および考察

１．アルカリプロテアーゼ生産菌の分離

（１）酵素生産菌の分離用培地の検討

種々のタンパク質についてアルカリ性での溶解性を調査したところ、グルテンが希アルカリ性溶液に難溶性であることが判った(19)。まず精製グルテン（小麦粉由来）を用いて分離用寒天培地を調製したところ、グルテンはアルカリ性培地に溶解しないものの、寒天培地中に均一に分散せず、その使用は適当でなかった。そこで、グルテンが主成分である小麦粉を用いて寒天培地を調製したところ、小麦粉は pH10 付近のアルカリ性培地に溶解せず白濁し、その分散性も良好であった。subtilisin BPN´（ビオプラーゼ）を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）に１ mg/ml になるように溶解し、その 50μl を含浸させたペーパーディスクを小麦粉含有アルカリ寒天培地上にのせ、30℃ で ６時間保温したところ、図１－１で示すようにペーパーディスク周辺にハローが形成された。α－アミラーゼ（8.3 mg/ml）を用いた同様の実験ではハローが形成されないことから、ハロー形成はプロテアーゼによる不溶性タンパク質の溶解にもとづくものと考えられる。

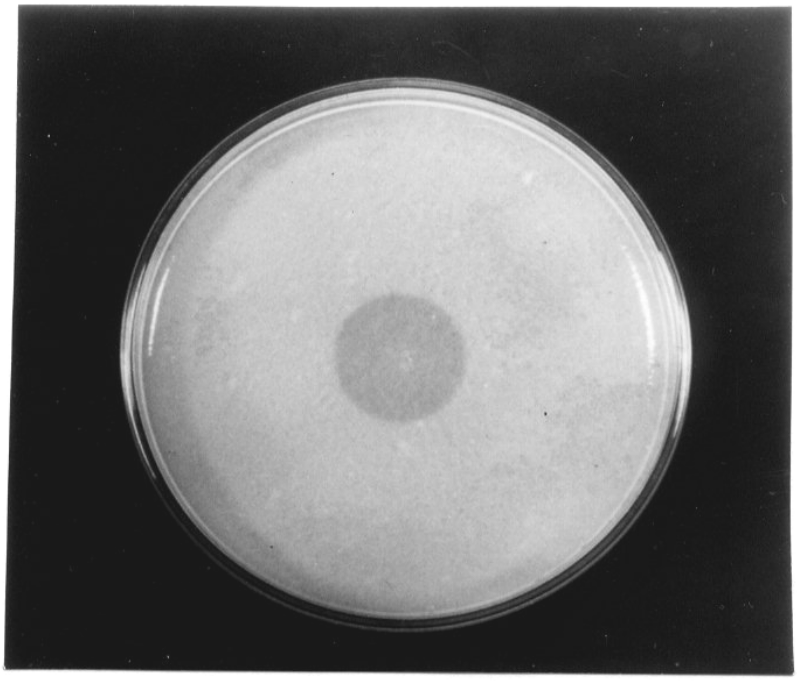

図１－１ 市販アルカリプロテアーゼによる小麦粉含有寒天培地の変化
長瀬生化学工業株式会社製ビオプラーゼ（1 mg/ml／0.1 M Tris-HCl 緩衝液(ｐＨ 8.0)）50 μℓ を含浸させたペーパーディスクを小麦粉含有アルカリ寒天培地（1 % 小麦粉 、0.5 % グルコース、0.1 % KH_2PO_4 、1 % Na_2CO_3、pH10）上にのせ、30 ℃で６時間保温した。直径９㎜のシャーレを用 いた。

小麦粉を用いた寒天培地がアルカリプロテアーゼ生産菌の分離に使用可能であることがわかったので、次に、培地に加える小麦粉の最適な添加量を求めた。0.5% グルコース、0.1% KH_2PO_4 、１% Na_2CO_3 （10% 溶液として別殺菌後加えた）、１% 寒天に小麦粉の最終濃度がそれぞれ 0.5、１、２、３、４% になるように培地を調製して図１－１と同様の実験を行なった。ディスク周辺のハロー形成の様子を検討したところ、図１－２のように、いずれの培地も小麦粉の分散状態は良好で、酵素による透明環の形成が認められた。しかしながら、0.5% 濃度の場合、培地の白濁が希薄

であることからコントラスト不足となり、酵素判定の視認性は良くなかった。したがって、以降の分離操作は、１％ の小麦粉含有培地で行なうことにした。

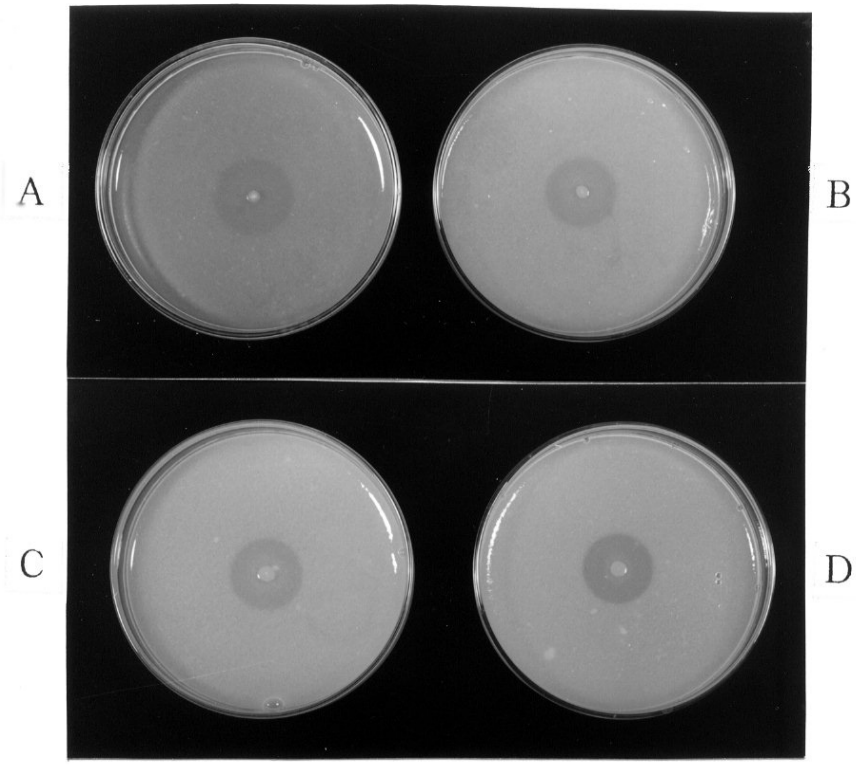

図１－２　小麦粉の含有量と培地上のハロー形成
小麦粉の含有量を 0.5～２％にそれぞれ変えた分離用寒天培地（0.5 ％ グルコース 、0.1 ％ KH_2PO_4、１％ Na_2CO_3）を調製し、酵素液（1 mgタンパク質/ml, pH8.0）50 μℓ を浸したペーパー ディスクを置いて、30 ℃で６時間保温したのち、ハロー形成を評価した。
Ａ：0.5%、Ｂ：1.0%、Ｃ：1.5%、Ｄ：2.0%

（２）酵素生産菌の分離と酵素の評価

小麦粉含有の分離用寒天培地を用いて酵素生産菌の分離を行なった。１次スクリーニングとして土壌試料約 400 点からハローの大きな６菌株を選び、次いで２次スクリーニングとして酵素生産用培地で振盪培養を行い、酵素生産性が良く、酵素の耐熱

性も良好であった B21-2 株を酵素生産菌の候補株として選んだ。

本酵素のゼラチン分解力を市販の酵素と比較した。市販酵素として、プロレザー、プロチンＡ、ビオプラーゼの３つのプロテアーゼを用い、ｐＨ10.5、40℃ でのカゼイン分解力を 100 U/mlと等しくして、ゼラチン分解力を測定した。測定20分までの結果を表１－１に示す。B21-2 株が生産するアルカリプロテアーゼの分解時間（７分）は、市販酵素のいずれよりも早く、ゼラチン分解力に優れていると言われているプロチンＡの分解時間（17分）よりも早かった。

表１－１　市販酵素とのゼラチン膜分解の比較

酵　　素	起　　源	分解所要時間
プロレザー	*Bacillus* sp.	２０分以上
プロチンＡ	*Bacillus subtilis*	１７分
ビオプラーゼ	*Bacillus amyloliquefaciences*	２０分以上
Ｂ２１－２	*Bacillus* sp.	７分

カゼイン分解活性を 100 U/ml (pH10.5、40 ℃)として、
ｐＨ10.5、40 ℃の条件で行なった。

以上の結果より、B21-2 株をゼラチン膜分解に用いる酵素の生産菌として選んだ。また、優良な菌株が比較的容易に得られたことより、アルカリに不溶であるグルテンタンパクを主成分とする小麦粉を用いた本分離方法は、従来行なわれているカゼインを用いるプロテアーゼ生産菌の分離と同様に、アルカリプロテアーゼを生産する好アルカリ性菌の効率的な分離に有効であることがわかった。

（３）酵素生産菌の菌学的性質

酵素生産菌 B21-2 株の、各種培地における生育状況ならびに形態的、生理的性質を表１－２に示す。本菌は、グラム染色が陽性、好気性、胞子を形成し、図１－３で示すように桿菌であることから、*Bacillus* に属する細菌と考えた。ただし、*Bacillus* 属細菌の生育ｐＨが一般に ５～８ であるのに対し、本菌の生育ｐＨ範囲は 8.6～11.1 であることから、好アルカリ性の *Bacillus* 属細菌である。

表１－２　Ｂ２１－２株の形態学的、生化学的性質

１．形態学的性質	
形	桿菌
大きさ	0.7～0.8×2.3～3.2 μｍ
運動性	あり
胞子	0.6～0.7×1.1～1.4 μｍ
グラム染色	陽性
２．生理的性質	
硝酸塩の還元	還元しない
脱窒反応	嫌気性下では生育しない
ＶＰテスト	陰性
インドールの生成	生成しない
硫化水素の生成	生成しない
デンプンの加水分解	分解する
ゼラチンの加水分解	分解する
クエン酸の利用	
クリステンセン培地	利用する
コーザー培地	利用しない
硝酸塩の利用	利用しない
アンモニウム塩の利用	利用しない
オキシダーゼ活性	陽性
カタラーゼ活性	陽性
３．その他の性質	
塩化ナトリウムへの耐性	5% NaCl を含む培地で生育する
最高生育温度	４１℃
生育ｐＨ	８．６～１１．１

Bacillus 属は、アミラーゼ、プロテアーゼなどの加水分解酵素を生産する菌として古くから知られ、プロテアーゼに関しては、*B. amyloliquefaciens* の subtilisin BPN´(20,21)、*B. licheniformis* の subtilisin Carlsberg (22, 23) などがある。これらの菌株は中性の培地で生育しアルカリ性の培地で生育できないが、B21-2 株は、中性の培地では生育できずにアルカリ性の培地で生育するという相反した性質を持っていた。本菌のようにアルカリプロテアーゼを生産する好アルカリ性の*Bacillus* sp. は、掘越の No.221 株(7)以来、No.La1-1-1(11)、ES2-2-5(11)、Y(12)、YaB(13)、No. 4(24), No. 6(25)、No.58(26) などの報告がある。本菌は No.221 とよく似た生理学的性質を持つが、No.221 株が硝酸塩を還元できるのに対し、B21-2 株はできない点、あるいは、No.221 株 の酵素生産培地（1% グルコース、0.5% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.1% KH_2PO_4、0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1% Na_2CO_3）では酵素をほとんど生産しないなどの点で異なっていた。

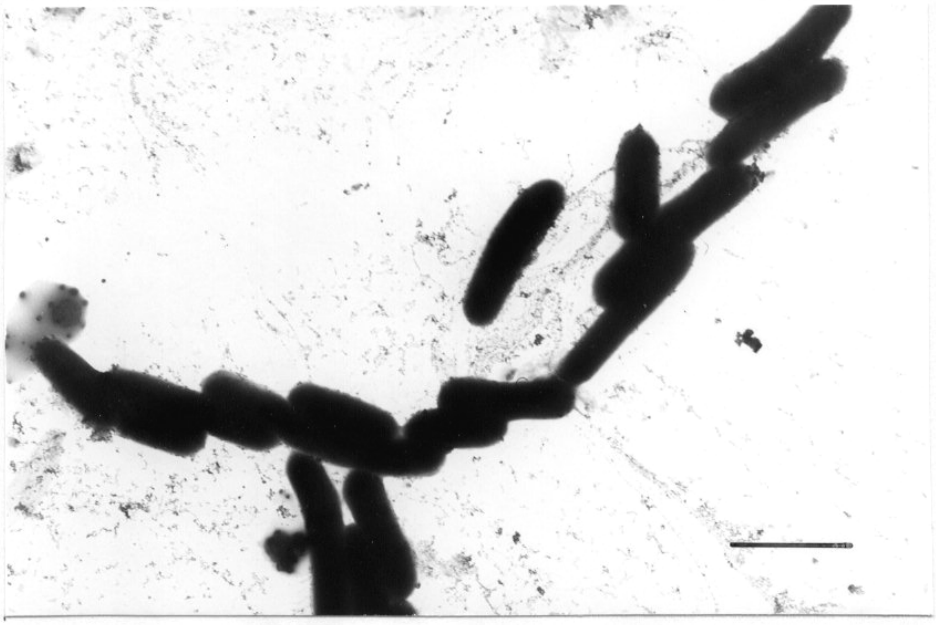

図１－３　　Ｂ２１－２株の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）写真
バーの長さは、２μｍを示す。

２．酵素生産用培地組成の検討

（１）炭素源

酵素生産におよぼす炭素源の影響を検討したところ、表１－３で示すようにグルコースとデンプンが酵素生産に有効で、乳糖、ショ糖、グリセリンは酵素生産に効果がなかった。炭素源濃度については、５％ では ２％ に比べてむしろ酵素生産性は低く、２％ の添加で充分であった。

表１－３　酵素生産への各種炭素源の添加効果

炭素源	添加量	酵素活性 (U/ml)	
	(%)	48h	72h
グルコース	2	3,900	3,650
	5	2,500	2,860
デンプン	2	4,260	3,920
	5	2,460	3,200
ラクトース	2	150	0
	5	280	0
シュークロース	2	150	40
	5	370	0
グリセリン	2	160	75
	5	130	90

基本培地：１％ 大豆粉、１％ ポリペプトン、0.1 ％ KH_2PO_4、0.05 ％ 酵母エキス、１％ Na_2CO_3

（２）窒素源

酵素生産に及ぼす各種窒素源の影響を検討した。予備実験において大豆粉を添加しない培地での酵素生産は非常に低いことがわかったので、基本培地は１％大豆粉を含む培地とした。表１－４で示すように、ポリペプトン、酵母エキス、コーンスティープリカー、魚肉エキスの添加が効果があり、特に魚肉エキスの添加が酵素の生産に有効であった。大豆粉を添加しない魚肉エキスだけの培地では、540 U/ml（48時間培

養）と酵素生産は低く、また、魚肉エキスを含まない大豆粉だけを窒素源とする培地での酵素生産も 330 U/ml（48時間培養）と低いことから、大豆タンパクと魚肉エキスの共存・併用が酵素の生産に有効であった。なお、無機窒素の添加は酵素生産に効果はなく、むしろやや阻害的に作用した。

（３）無機塩

基本培地に各種無機塩を添加してその酵素生産に及ぼす影響について検討したが、いずれの場合も添加によって酵素生産性は上昇せず、$ZnSO_4$ の添加はむしろ阻害的に作用した。

表１－４ 酵素生産への各種窒素源の添加効果

窒素源	添加量 (%)	酵素活性 (U/ml) 48h	72h
ポリペプトン	1	3,650	4,750
カゼイン	1	1,700	1,900
酵母エキス	1	2,300	3,800
ｺｰﾝｽﾃｨｰﾌﾟﾘｶｰ	1	3,660	3,500
大豆粉	1＊	330	360
魚肉エキス	1	7,200	4,750
尿素	0.5	150	280
硫酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ	0.5	220	0
塩酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ	0.5	190	480
硝酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ	0.5	30	300
無添加		－	1,600

基本培地：１％大豆粉、２％グルコース、0.1%KH_2PO_4、
0.05%酵母エキス、１%Na_2CO_3

＊ 大豆粉の含量は、合計２％となる。

（４）培養基の最適組合せ

酵素生産に及ぼす炭素源ならびに窒素源の検討結果から、炭素源としてはグルコースあるいはでんぷんが有効であり、窒素源としては大豆粉と魚肉エキスの併用が有効であった。これらについて ５ℓ のジャーファーメンターを用いて、１～３％ の濃度の範囲で種々組合せて酵素生産性を検討したところ、 大豆粉 ３％ 、グルコース ３％、魚肉エキス １％ の組合せが良好で、酵素生産は 24～27 時間の培養で 13,000 U/ml に達した。

（５）ジャーファーメンターによる培養

５ℓ 容のジャーファーメンターを用いて、酵素生産性の良好な組合せであった３％ 大豆粉、３％ グルコース、１％ 魚肉エキス、0.1％ KH_2PO_4 、１％ Na_2CO_3 の培地（実容量３ℓ）で、30℃、0.5 vvm、600 rpm の条件で培養を行なった。その培養経過を図１－４に示す。グルコースの消費は培養開始後徐々に始まり、18時間で完全に消費された。一方、培地中の酵素活性はグルコースの消費とは連動せず、遅れて、培養開始後９時間以降にみられ、グルコースが消費されたのちも増加し、６時間後の培養24時間で最大の約 12,000 U/ml に達した。培地は不溶性の基質である大豆粉を含むことから菌体の増殖を濁度で直接測定することは難しく、したがって菌の増殖をグルコースの消費から判断すると、酵素の生産は増殖に連動せず、培養中期から始まり、増殖が最大に到達したのちに最大となった。培養後 24時間で表１－４で示すように酵素生産に良好な培地であった１％ 大豆粉、２％ グルコース、１％ 魚肉エキスを主成分とする培地組成での坂口フラスコによる培養は、48時間で 7,200 U/ml、68時間で 4,750 U/mlであることから、ジャーファーメンターによる培養では酵素生産量は坂口フラスコの最適培養条件に比べ２倍に上がり、しかも培養時間は半分に短縮された。

次に、５ℓ 容のジャーファーメンターによる培養と同様の培地組成で、300ℓ

ジャーファーメンター（実容量150ℓ）を用いて、30℃、400 rpm、１vvm（150 ℓ/min）の条件で培養を行なったところ、酵素生産は 26時間で 16,000 U/mlに達した。今後、本酵

素の工業的な生産のためには更に高濃度の培地条件での酵素生産性を検討する必要があるが、本菌は野生株でありながら、現時点で １ml 当り16,000 U （300ℓ スケールの場合）、酵素量にして １ℓ 当り 1.8ｇ を生産し、現在広く利用されている *Bacillus* 属由来のプロテアーゼの生産性が改良を重ねた結果、1ℓ 当り 3.5～４ｇ と言われていることから(27)、本菌の酵素生産性は良好であると言える。

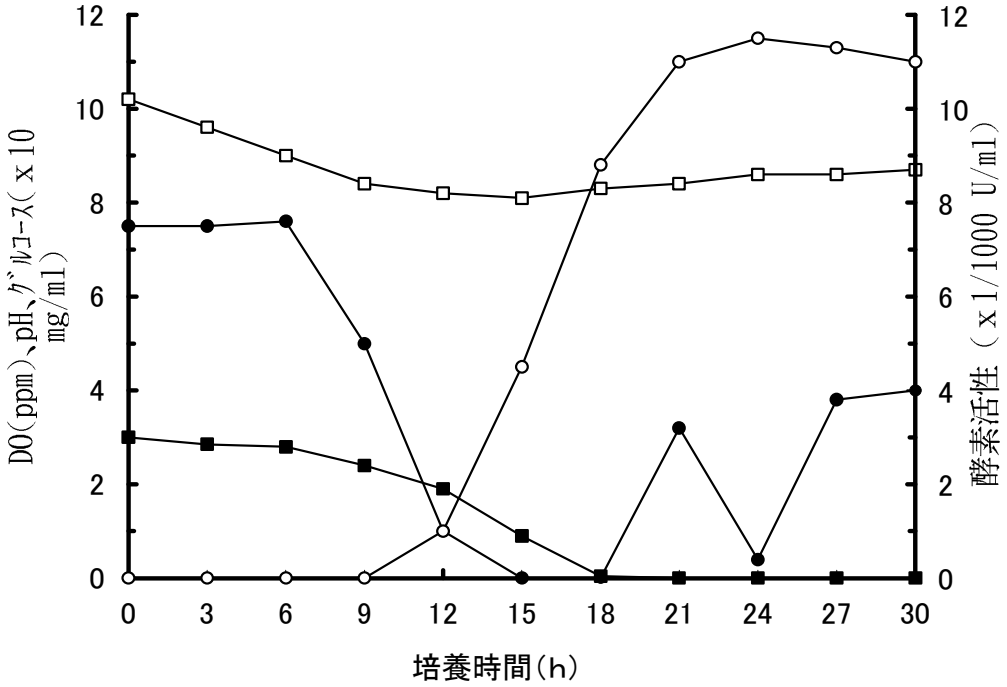

図１－４　５ℓ ジャーファーメンターによる培養経過
３％ 大豆粉、３％ グルコース、１％ 魚肉エキス、0.1% KH_2PO_4、１％ Na_2CO_3 の培地（実容量３ℓ）で、0.5 vvm、600rpmで培養した。
○：酵素活性(U/ml)、●：溶存酸素(DO)、□：ｐＨ、■：グルコース

３．酵素の精製と性質の検討

（１）酵素の精製

ジャーファーメンターで一晩培養して得られた培養液を実験方法で示す手順にしたがって精製した。0.5 飽和濃度で塩析された粗酵素標品は暗褐色を呈していた。色素はＤＥＡＥ－セルロースに吸着されたが、酵素は吸着されずに溶出した。溶出した粗酵素の比活性は 4,900 U/mg-タンパク質 で、活性収率は約 60％ であった。本精製ステップでは比活性は硫安塩析後の 4,020 U/mg-タンパク質 からそれほど上昇しなかったが、本ステップを省略すると ＣＭ－セルロースに酵素は吸着せず、ＤＥＡＥ－セルロースによる前処理が、次のステップであるＣＭ－セルロースによる精製に有用であった。

ＤＥＡＥ－セルロースに非吸着の活性画分を集め、硫安塩析で濃縮後、ＣＭ－セルロースカラムクロマトグラフィーに供した。その溶出パターンを図１－５に示す。酵素は食塩濃度 0.1 Ｍ 付近に溶出された。溶出された活性画分を集め、硫安塩析により濃縮後、透析して精製酵素標品とした。比活性は 8,200 U/mg-タンパク質 に上昇した。

セファデックスＧ－７５を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（2.5×75 cm）で精製酵素の純度を確認したところ、図１－６のように単一なピークの溶出パターンを示した。また、ＳＤＳ-ポリアクリルアミドスラブゲル（ゲル濃度12.5％）電気泳動でも、図１－７に示すように単一なバンドがえられた。したがって、本酵素は、クロマトグラフ的および電気泳動的に単一まで精製された。

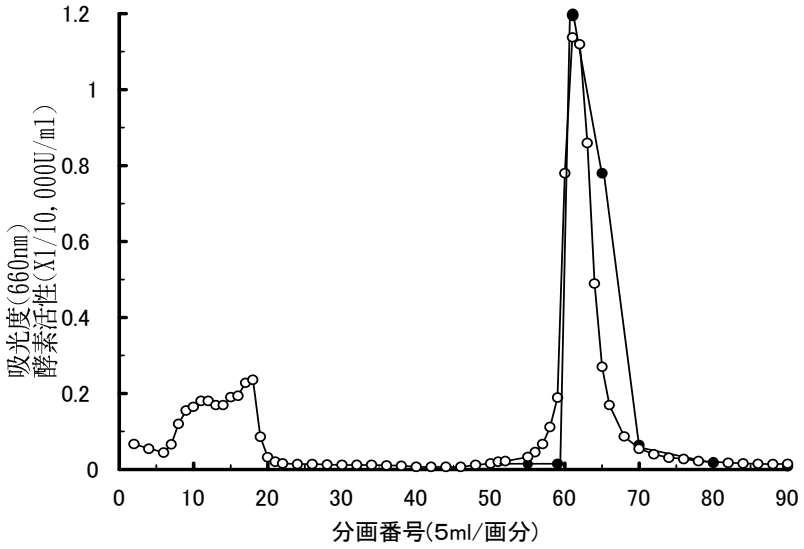

図１－５　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼのＣＭ－セルロースカラムクロマトグラム

カラムサイズ：2×20 cm、流速 25 ml/h、分画量：5 ml/画分
○：タンパク質濃度(A280)、●：酵素活性

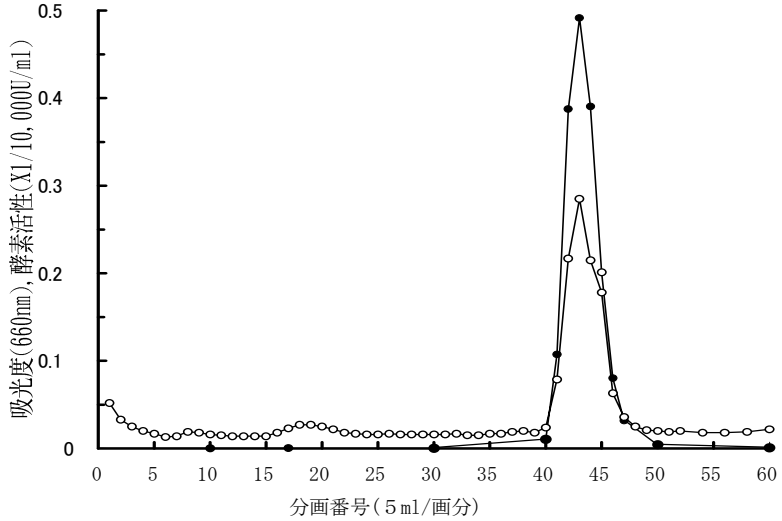

図１－６　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼのＳｅｐｈａｄｅｘ G-75 カラムクロマトグラム

カラムサイズ：2.5×75 cm、流速：15 ml/h、
分画量：5 ml/画分、○：タンパク質濃度(A280)、
●：酵素活性

これらの精製工程をまとめて表１－５に示す。酵素タンパク質は最終的に比活性で 8.5 倍に濃縮され、その収率は 43% であった。

表１－５　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼの精製

精製工程	液量 (ml)	活性 (U/ml)	全ﾀﾝﾊﾟｸ質 (mg)	比活性 (U/mg)	精製度 (fold)	活性収率 (%)
培養濾液	1,400	4,770	6,950	960	1	100
硫安塩析	300	21,160	1,580	4,020	4	95
DEAE-ｾﾙﾛｰｽ	490	8,340	840	4,900	5	61
CM-ｾﾙﾛｰｽ	245	11,620	350	8,200	8.5	43

タンパク質量は、培養濾液の場合のLowry法を除き、280nm の吸光度から求めた。

（２）酵素の物理化学的性質

（ａ）吸光係数（Ｅ1%､1cm at 280 nm）

精製酵素標品を蒸留水に溶解、透析後、遠心分離した。その内 50ml を秤量ビンに採り、105℃ で恒量になるまで乾燥した。一方、280 nm の吸光度を測定し、吸光度と重量の関係から吸光係数を算出した。その値は 6.0 であった。

（ｂ）分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の測定結果を図１－８に示す。標準タンパク質の分子量の対数と Ve/Vo の関係は良好な直線関係にあり、この結果から本酵素の分子量は約 30,000 と測定された。

また、ＳＤＳ-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量測定の結果を図１－９に示す。各標準タンパクの移動度に対して分子量の対数をプロットすると、94,000

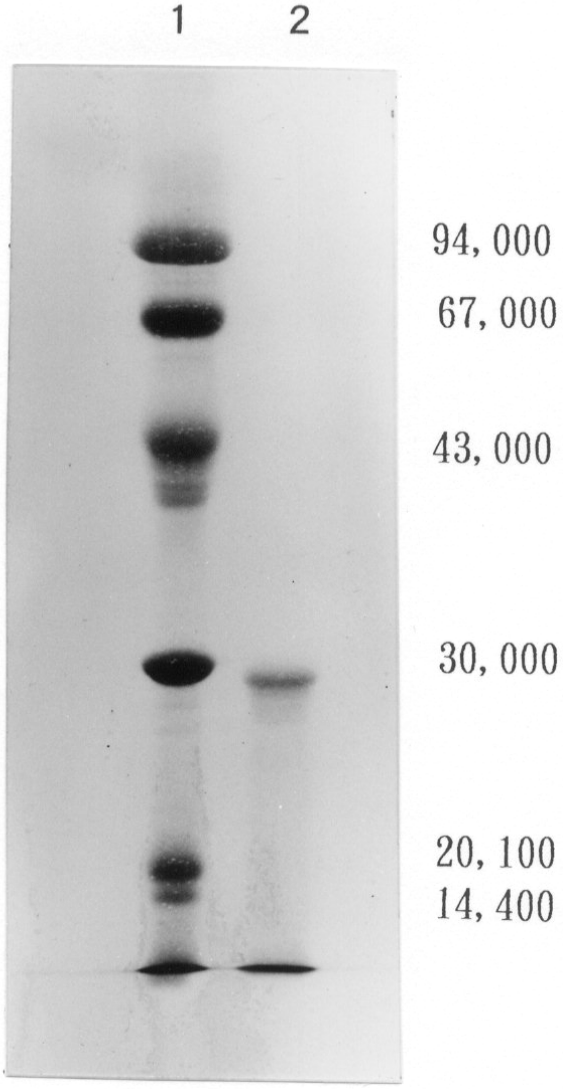

図１－７　　Ｂ２１－２株の精製アルカリプロテアーゼのＳＤＳ－ＰＡＧＥ
１：標準タンパク質(phosphorylase (94,000)、ovalbumin (67,000)、ovalbumin (43,000)、carbonic anhydrase (30,000)、trypsin inhibitor (20,100)、α-lactoalbumin (14,400))２：B21-2株のアルカリプロテアーゼ

から 20,100 までは直線関係にあり、本酵素のバンドは分子量 30,000 の carbonic anhydrase とほぼ同じ位置にあった。これらの結果を総合すると、本酵素は分子量約 30,000 の単量体と考えられる。

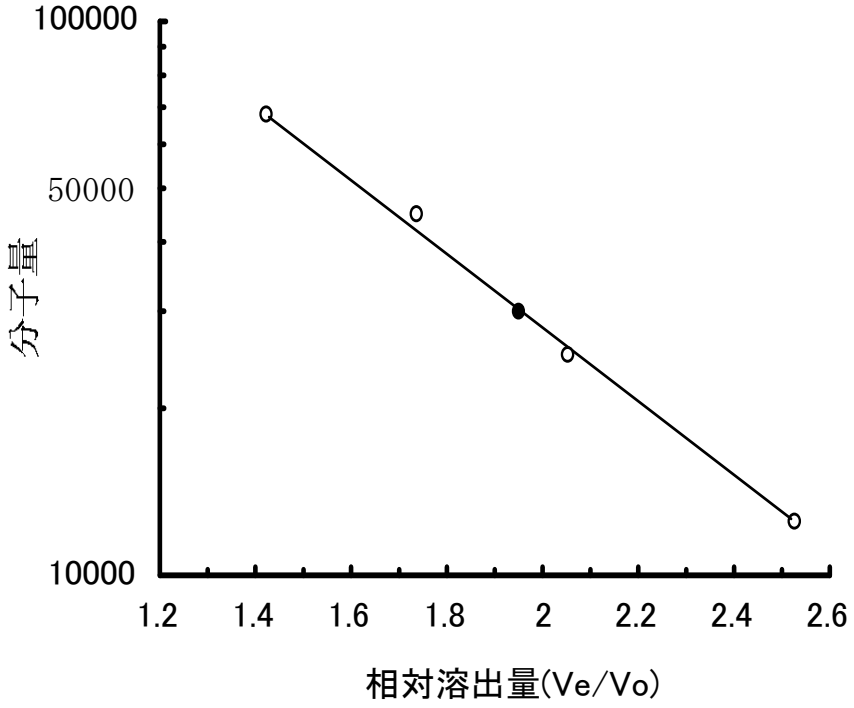

図１－８　　ゲル濾過による酵素の分子量測定
Sephadex G-100 ゲル、カラムサイズ:２×45 cm、
流速: 15ml/h、分画量:５ml/画分
○：標準タンパク質（bovine serum albumin （68,000)、ovalbumin (45,000)、chymotrypsinogen A (25,000)、cytchrome *c* (12,500)）、●：B21-2株のアルカリプロテアーゼ

（ｃ）アミノ酸組成

本酵素のアミノ酸組成を表１－６に示す。アミノ酸組成における残基数は、酵素の分子量を 30,000 として示してある。比較のために、*Bacillus* sp. No.221 の酵素(7)、*Bacillus* sp. YaB の酵素(13)、*Bacillus* sp. Y の BYA(12) など好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼと、subtilisin BPN´ (20,21)、subtilisin Carlsberg(22,23) など中性菌のプロテアーゼのアミノ酸組成も併せて示す。本酵素はいずれの酵素ともよく似たアミノ酸組成を示し、特に、*Bacillus* sp. No.221 の酵素ならびに *Bacillus* sp. YaB の酵素と良く類似していた。

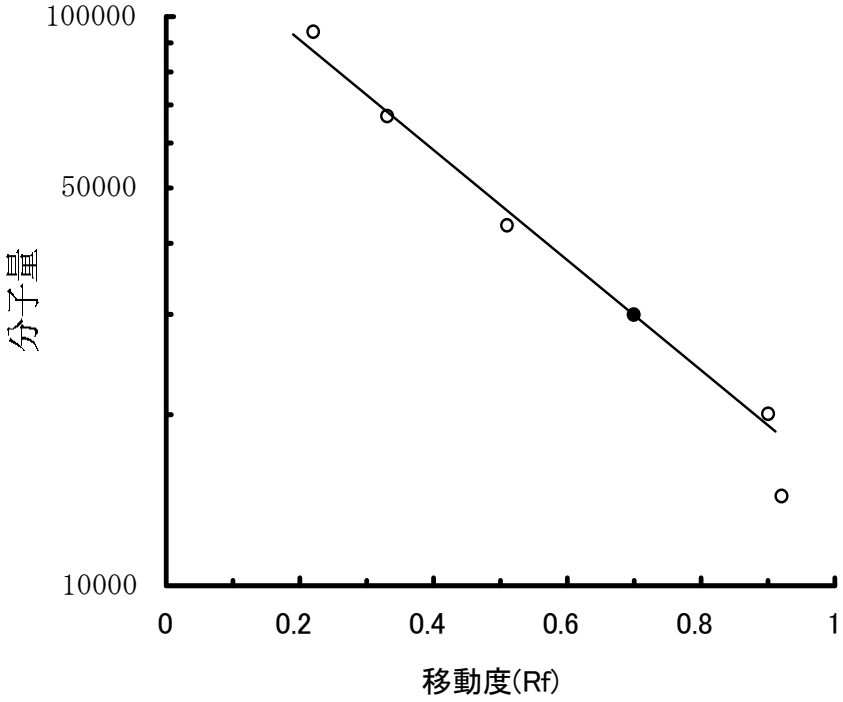

図１－９　SDS-PAGEによる酵素の分子量測定
12.5% スラブゲル(pH8.8)、25 mA、ＣＢＢ染色
○：標準タンパク質 (phosphorylase (94,000)、albumin (67,000)、ovalbumin (43,000)、carbonic anhydrase (30,000)、Trypsin inhibitor (20,100)、α-lactoalbumin (14,400))、●:B21-2株のアルカリプロテアーゼ

（ｄ）Ｎ末端のアミノ酸配列

本酵素のＮ末端から 20 残基のアミノ酸配列を図１－１０に示す。Ｎ末端はグルタミンもしくはセリンであった。比較のために、*Bacillus* sp. No.221(7)、subtilisin Carlsberg (22,23) など中性菌のプロテアーゼの配列も併せて示す。本酵素のＮ末端配列は、いずれの酵素の配列とも 40% 以上の相同性を示し、特に、好アルカリ性 *Bacillus* sp. のアルカリプロテアーゼである *Bacillus* sp. No.221 の酵素とは 70% の高い相同性を示し、さらに *Bacillus* sp. YaB の酵素とは全く同じ配列であった。

	1 5 10 15 20
B21-2	S/Q-T-V-P-W-G-I-N-R-V-Q-A-P-I-A-Q-S-R-G-F
No.221	A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L
YaB	Q-T-V-P-W-G-I-N-R-V-Q-A-P-I-A-Q-S-R-G-F
BYA	D-P-V-A-R-G-I-X-X-V-K-A-D-V-A-Q-N-N-G
BPN´	A-Q-S-V-P-Y-G-V-S-Q-I-K-A-P-A-L-H-S-Q-G
Carlsberg	A-Q-T-V-P-Y-G-I-P-L-I-K-A-D-K-V-Q-A-Q-G

図１－１０　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼのＮ末端のアミノ酸配列（１文字表記）

No.221：*Bacillus* sp. No.221の酵素(7)、YaB：*Bacillus* sp. YaB の酵素(13)、BYA：*Bacillus* sp. Y の酵素 (12)、subtilisin BPN´：*Bacillus amyloliquefaciens* の酵素 (20,21)、subtilisin Carlsberg：*Bacillus licheniformis* の酵素 (22,23)

表１－６　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼのアミノ酸組成

	酵素生産菌株名					
アミノ酸	B21-2	No.221	YaB	BYA	subtilisin BPN´	subtilisin Carlsberg
Arg	10	8	7	16	2	4
Lys	4	6	4	14	11	9
His	6	8	8	9	6	5
Phe	6	2	6	13	3	4
Tyr	5	7	4	17	10	13
Leu	16	22	11	26	15	16
Ile	13	9	10	14	13	10
Met	5	4	3	6	5	5
Val	30	27	21	23	30	31
Ala	46	45	33	54	37	41
Gly	50	39	37	50	33	35
Pro	11	16	8	23	14	9
Glu	18	16	16	26	15	12
Ser	25	23	26	33	37	32
Thr	18	18	17	29	13	19
Asp	37	29	28	63	28	28
Trp	4	5	2	6	3	1
Cys	0	0	0	0	0	0
合 計	304	284	239	245	275	274

No.221：*Bacillus* sp. No.221の酵素(7)、YaB：*Bacillus* sp. YaB の酵素(13)、BYA：*Bacillus* sp. Y の酵素 (12)、subtilisin BPN´：*Bacillus amyloliquefaciens* の酵素(20,21)、subtilisin Carlsberg：*Bacillus licheniformis* の酵素 (22,23)

（３）酵素学的性質

（ａ）ｐＨの影響

カゼインを基質にして反応の作用最適ｐＨを求めた。その結果を図１－１１に示す。中性で生育する *Bacillus* 属細菌由来のプロテアーゼである subtilisin BPN´(20,21)、あるいは subtilisin Carlsberg(22,23)は、ｐＨ10.5 付近に作用最適ｐＨを持ち、ｐＨ11 で活性は急激に低下するのに対して、本酵素の作用最適ｐＨは11.5

と高く、ｐＨ12.0 でも 88% の活性を示していた。また、ｐＨ7.0 でも 35% の活性を示し、中性からアルカリ性まで幅広いｐＨで活性を示した。

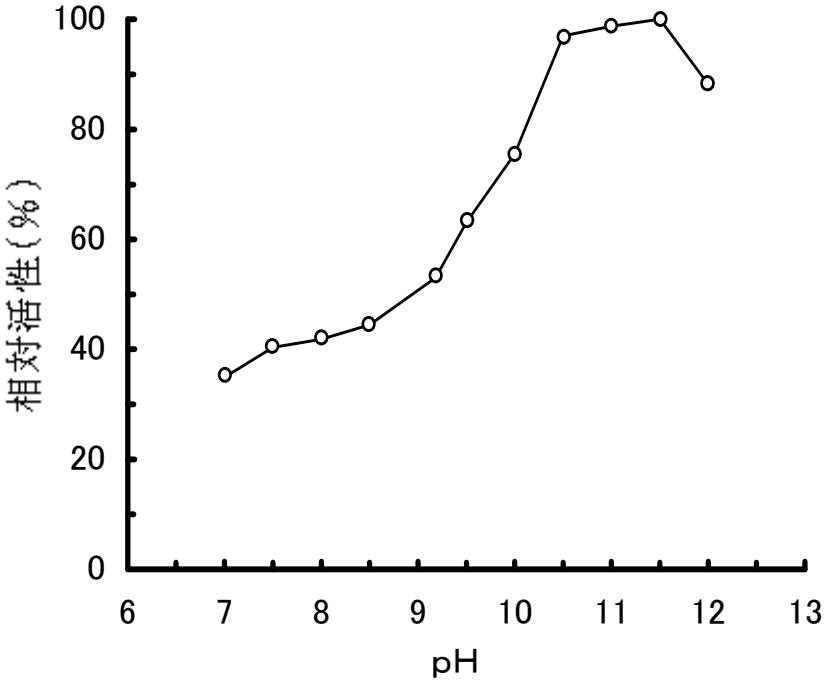

図１－１１　酵素活性へのｐＨの影響
ｐＨ11.5の値（初期活性 99.5 U/ml）を100%として表示した。
Ca^{2+} 無添加、30℃、用いた緩衝液：0.1M Tris-HCl 緩衝液（pH７～8.5）、0.1M 炭酸-NaOH 緩衝液（pH９～10.5）、0.1M リン酸－NaOH 緩衝液（pH11～12）

種々のｐＨで、30℃、24 時間保温の後、残存する活性を測定して酵素のｐＨ安定性を求めた。それらの結果を図１－１２に示す。酵素はｐＨ６から９の範囲では、安定であった。

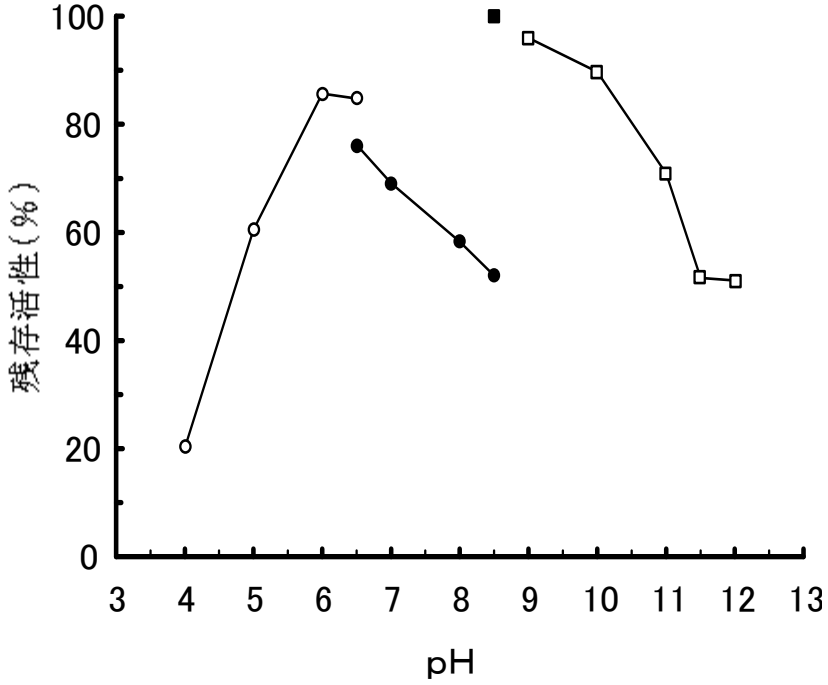

図１－１２　酵素のｐＨ安定性

各々のｐＨで30℃、24時間保温後、pH11.5で残存活性を測定した。
pH 8.5（ホウ酸緩衝液）の残存活性（100%）を100%として表示した。
初期活性 33 U/ml、５mM Ca^{2+} 添加、用いた緩衝液：0.1M 酢酸緩衝液（○、pH ４～6.5）、0.1M Tris-HCl緩衝液（●、pH 6.5～8.5）、0.1M 炭酸緩衝液（■、pH 8.5）、0.1M ホウ酸緩衝液（□、pH ９～12）

（ｂ）温度の影響

カゼインを基質にしてｐH10.0 における温度の影響を検討した。それらの結果を図１－１３に示す。反応が最大となる温度は、Ca^{2+} がない場合は 55℃ であるが、Ca^{2+} 存在下では５℃ 上昇して 60℃ であった。これは、Ca^{2+} によって酵素が安定化されることを示している。Ca^{2+} が存在する場合の結果を、Arrhenius プロットす

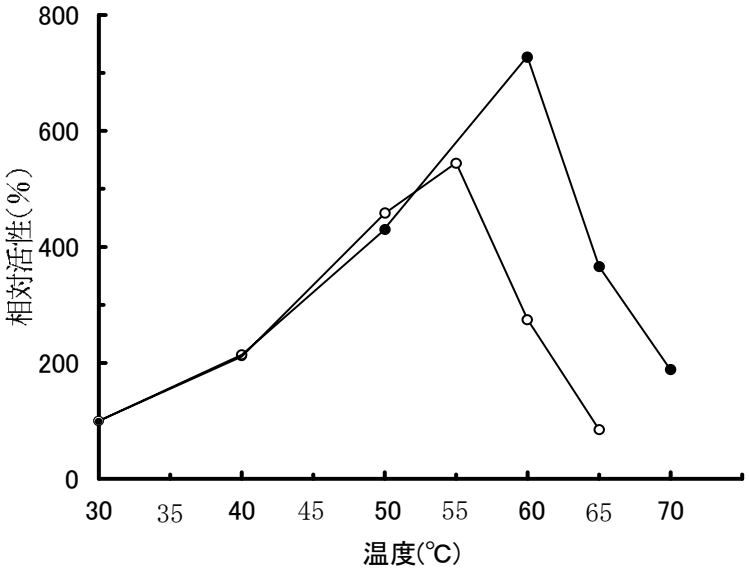

図１－１３　酵素活性への温度の影響

10mM ホウ酸緩衝液(pH10.0)に溶解したカゼインを基質として各々の温度で10分間反応させた。30℃ の相対活性初期活性 11.5 U/ml）を100%として表示した。

○：Ca^{2+}無添加、●：５mM Ca^{2+}添加

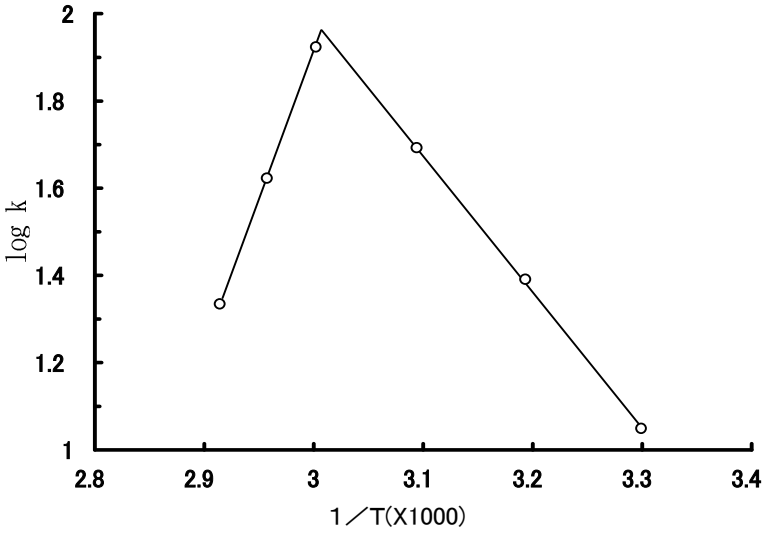

図１－１４　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼのカゼイン分解におけるArrhenius プロット.

各温度での数値は、５mM Ca^{2+}存在下で、カゼインを基質とした酵素活性から算出した。

ると、図１－１４で示すように 60℃ まで直線関係にあり、勾配から求めた活性化エネルギーは 59.3 kJ/mol であった。この値は、トリプシンによるカゼインの加水分解の場合の 50 kJ/mol より若干高い値ものの、カゼインの酸加水分解の場合の 86.1 kJ/mol よりかなり低かった(28)。

ｐＨ10.0 で 10分間保温した後の熱安定性を図１－１５に示す。酵素は Ca^{2+} が存在しない場合、40℃ まで安定であるが、55℃ では活性が全くなかった。一方、Ca^{2+} が存在すると酵素は安定化され、Ca^{2+} 無添加時の残存活性に比べそれぞれ 10℃ 上昇し、 50℃ 以下では安定であり、65℃ では活性が全くなかった。

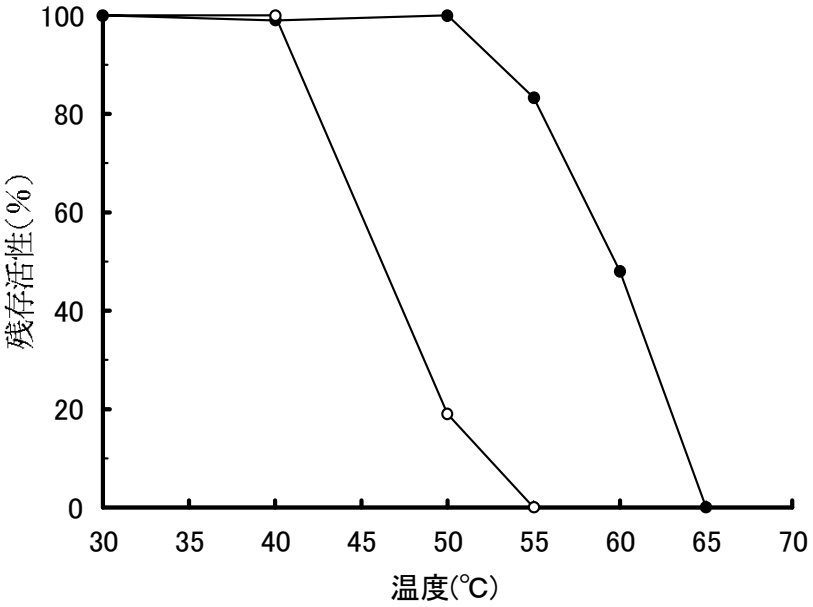

図１－１５　酵素の熱安定性

酵素を10ｍＭ ホウ酸緩衝液(pH10)で10分間保温後、pH11.5で残存活性を測定した。30℃ の残存活性（Ca^{2+}の添加がない場合 76%、Ca^{2+} の添加がある場合 94%）、初期活性 101 U/ml）を100%として表示した。初期活性 101 U/ml
○：Ca^{2+} 無添加、●：５mM Ca^{2+} 添加

（c）各種阻害剤と無機塩の影響

酵素の活性に及ぼす因子として、各種の阻害剤と無機塩類の影響について検討した。それらの結果を表１－７に示す。活性は、活性部位の探索試薬として用いられる ρ-chloromercuribenzoic acid（ＰＣＭＢ）、ethylenediamine tetra acetic acid tetrasodium salt（ＥＤＴＡ)、diisopropyl fluoro phosphate（ＤＦＰ）のうち、ＰＣＭＢ、ＥＤＴＡ によって阻害作用を受けなかったが、ＤＦＰ によって著しく阻

表１－７　酵素活性に及ぼす各種の阻害剤ならびに金属イオンの影響

試薬	濃度(mM)	活性(%)
PCMB	2	111
DFP	2	9
EDTA	5	70
$CaCl_2$	5	100
Ca-acetate	5	103
$MnCl_2$	5	81
$CoCl_2$	5	72
$HgCl_2$	5	0
$BaCl_2$	5	104
$NiSO_4$	5	93
$MgSO_4$	5	109
$FeCl_3$	5	100
NaCl	5	80
KCl	5	82

酵素をそれぞれの濃度の試薬を含む25mM Tris-HCl緩衝液（pH8.6）中で 30℃、30分間保温し、その後、処理液をそのまま用いて残存活性を測定した。無添加の場合の残存活性（84%）を100%として表示した。初期活性: 56.6 U/ml

害された。したがって本酵素はセリン残基が活性に関与している可能性が高い。各種塩類については、$HgCl_2$ によって完全に阻害されたのを除き、ほとんど活性化あるいは阻害は見られなかった。

好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼについて、*Bacillus* sp.由来で、性質が明らかにされている酵素の性質を表１－８にまとめて示す。好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼの作用最適ｐＨはいずれもｐH11から12 の高い値を持つ。subtilisin BPN´(20,21) あるいは subtilisin Carlsberg (22,23) など中性で生育する *Bacillus* 属由来のプロテアーゼも10.5の高い作用最適ｐＨを持つが、 好アルカリ性菌由来のアルカリプロテアーゼはこれらよりのさらに高い作用最適ｐＨ値を持つ。作用最高温度、分子量もまた、BYA 株の酵素を除き、いずれのアルカリプロテアーゼも

表１－８ 好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼの性質

	B21-2	No.221	YaB	BYA
分子量	30,000	30,000	27,000	42,000
作用最適pH(ｶｾﾞｲﾝ)	11.5	11.5	11.75	10～12.5
作用最適温度(℃)	60	60	60	70
吸光係数 (E1%)	6.0	－	7.1	－
比活性(U/mg)	9,000	18,000	12,400	16,000

値は、各々の報告より引用した。比活性は、30℃、最適ｐＨで測定した値である。
No.221：*Bacillus* sp. No.221の酵素(7)、YaB：*Bacillus* sp. YaB の酵素(13)、BYA：*Bacillus* sp. Y の酵素 (12)

それぞれ 60℃、27,000～30,000 とよく似た値を示している。作用最適ｐＨでの比活性を比較すると、subtilisin Carlsberg は2,000～3,000 U/mg-タンパク質、そしてsubtilisin BPN´は２～３培高い 6,000～7,000 U/mg-タンパク質 の値を持つが、好ア

ルカリ性菌由来のアルカリプロテアーゼは 9,000～16,000 U/mg のさらに高い比活性を持つていた。

第４節　要約

１．アルカリ性培地で用いることのできる分離方法を検討し、希アルカリに難溶性の小麦粉を用いた分離培地を考案した。

２．小麦粉寒天培地を用いて酵素生産菌のスクリーニングを行い、寒天培地上でハローの大きな菌を６株選んだ。次いで、液体培地での酵素生産性と、耐熱性の検討から、最終的に B21-2 株をアルカリプロテアーゼ生産菌として選んだ。

　本菌は *Bacillus* に属し、中性の培地では生育できず、アルカリ性の培地に好んで生育する好アルカリ性菌であった。

３．*Bacillus* sp. B21-2 の酵素生産について検討したところ、炭素源はデンプンとグルコースが、窒素源は大豆粉と魚肉エキスの共存が有効であった。大豆粉、グルコース、魚肉エキスを主原料とする培地での酵素生産は、５,300 U/ml、ジャーファーメンター（３ℓ/５ℓ 容、150ℓ／300ℓ 容）の場合、それぞれ 13,000 U/ml、16,000 U/mlであった。

４．酵素は、培養濾液を出発原料として、硫安塩析、ＤＥＡＥ－セルロース、ＣＭ－セルロースを用いたカラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一なまで 8.5 倍に精製され、回収率は 43% であった。

酵素の分子量は約 30,000 であり、Ｎ末端のアミノ酸はグルタミンもしくはセリ

ンであった。作用最適ｐＨは 10.5～11.5 であり、30℃、24時間の保温ではｐＨ６から９まで安定であった。ｐＨ10 で 10分間の保温の場合、50℃ まで安定であった。酵素活性は ＤＦＰ によって阻害されることから、セリン残基が活性に関与している可能性が高い。

５．本酵素の酵素学的性質を他の好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼと比較すると、作用最適ｐＨの 11.5、作用最適温度の 60℃ は同じような値を示していたが、比活性の点で他の酵素とは異なっていた。Ｎ末端から 20 のアミノ酸配列は、好アルカリ性 *Bacillus* 属菌のアルカリプロテアーゼと相同性が高く、No.221 株の酵素とは 70%、YaB 株の酵素とは全く同じ配列であった。

第２章　Ｘ線フィルム上のゼラチン膜の分解特性と連続処理システムの開発

第１節　緒言

第１章では、医療用直接撮影Ｘ線フィルム上のゼラチン膜を効率よく分解できる酵素を求めて、酵素生産菌として土壌中から好アルカリ性の *Bacillus* sp. B21-2 株を分離し、酵素の基本的性質を明らかにした。酵素を用いてのフィルム処理は、銀だけでなく品質の良いＰＥＴが回収できることから優れた処理方法ではあるが、工業的に実施するには従来の酵素では分解力に問題があった。本酵素は、従来の市販酵素よりはるかに短時間でゼラチン膜を分解できることから、工業的なレベルでの実施が可能であると考える。

本酵素を実際のフィルム処理に用いるには、ゼラチン膜分解におよぼすｐＨ、温度あるいは酵素濃度などについて検討し、その分解特性を知る必要がある。また、工業的なレベルでの実施を考えると、酵素に係るランニングコスト軽減のために、酵素を繰り返して利用できることが望ましく、酵素を更新しない繰り返し処理実験を行った。これらの結果を参考にして回分式処理、さらに連続処理システムによる処理を試みたところ、工業的なレベルでの処理が可能であり、しかも本システムはコスト計算から充分採算が採れることがわかった。

本章では、ゼラチン膜の分解に及ぼす種々の反応条件の検討結果と酵素を更新せずに繰り返して処理した結果、さらに回分ならびに連続方式による処理結果について述べる。

第２節　実験材料および実験方法

（１）使用菌株

第１章で分離した *Bacillus* sp. B21-2 を用いた。

（２）粗酵素液の調製

第１章で述べた方法にしたがって粗酵素液を調製した。

（３）プロテアーゼ濃度の測定

酵素濃度は、Horikoshi の方法(7)にしたがって測定した酵素活性をもとに、比活性（9,000 U/mg）から求めた。

（４）ゼラチンの定量

ゼラチンの定量は市販のゼラチン（米山化学製）を標準試料として、Lowry 法(16)により行なった。

（５）ゼラチン膜の分解実験

ゼラチン膜の分解実験は、第１章で述べた方法にしたがって行なった。ゼラチン膜分解の終点は、上記方法により、ゼラチン膜が分解されフィルムが透明になった時間でもって示した。また、ゼラチン膜分解の酵素活性は濁度の増加がほぼ終了する時間の逆数でもって示した。

（６）ＢＯＤの測定

JIS K0102-1986「工場排水試験方法」(29)にしたがって測定した。

第３節　実験結果および考察

１．Ｘ線フィルム上のゼラチン膜の酵素分解

（１）ゼラチン膜分解の経時変化

本酵素を11.1 mg/l、pH10.5、40℃ で作用させた場合のゼラチン膜分解の経時変化を図２－１に示す。反応開始２分後、反応液中へタンパク質が溶出し始め、遅れて３分から濁度の増加が始まり、いずれの増加も 10分前後で終了した。医療用直接撮影Ｘ線フィルムは序論で示したように、透明のフィルムベースの両側に下塗層を介して感光材の銀を含む乳剤層、さらに最上部に保護層が塗布された構造を持ち、いずれの層もゼラチンタンパクからなる。したがって、図２－１の結果は、酵素によってまず最上部のゼラチンだけからなる保護層が分解され、次いで乳剤層のゼラチンが分解され

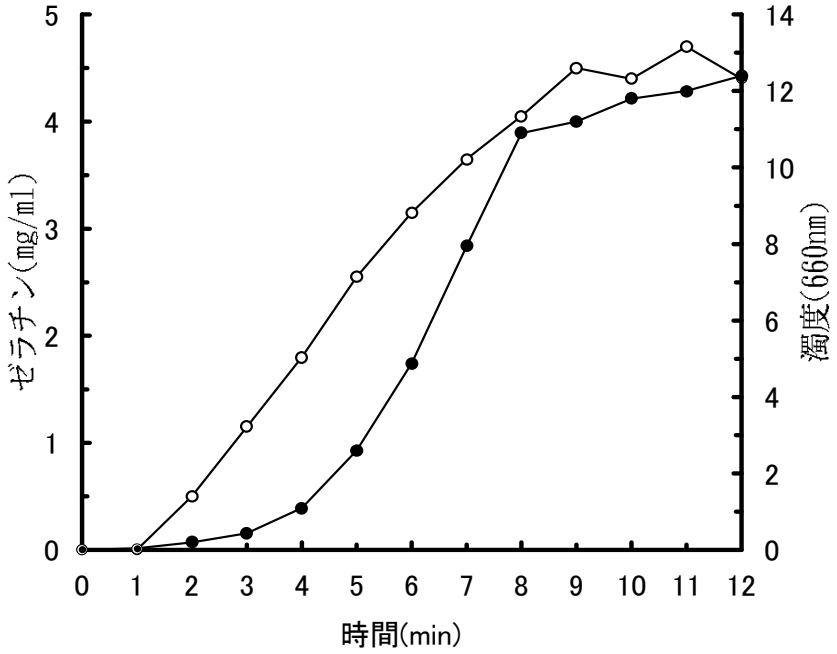

図２－１　ゼラチン膜分解の時間変化
反応は ５ℓ の反応器に酵素液（ｐＨ10.5） ３ℓ を入れ、
フィルム 500ｇを投入して、撹拌しながら行った。
ｐＨは飽和カセイソーダ溶液を添加して調整した。
反応条件：酵素濃度11.1 mg/l、pH 10.5、40℃、
○：ゼラチン濃度（mg/ml）、●：濁度（OD_{660}）

ることにより黒色の銀が溶出し、濁度の増加が始まることを現わしている。目視によるフィルムの透明化は反応開始約８分後に認められ、ゼラチンと濁度の増加がほぼ終了付近に達する時間に一致していた。

（２）ゼラチン膜の分解特性

ゼラチン膜分解におよぼすｐＨ、温度、酵素濃度について検討した。ゼラチン膜の分解におよぼす反応条件として、まず、ｐＨについて ９から12 の範囲で検討した。図２－２で示すように、30℃、40℃ ともにｐＨ10～11での処理がゼラチン膜分解に最も効果的であった。この値は、第１章で示すカゼインタンパク質を基質にした場合の作用最適ｐＨの 10.5～11.5 より少し低かった。

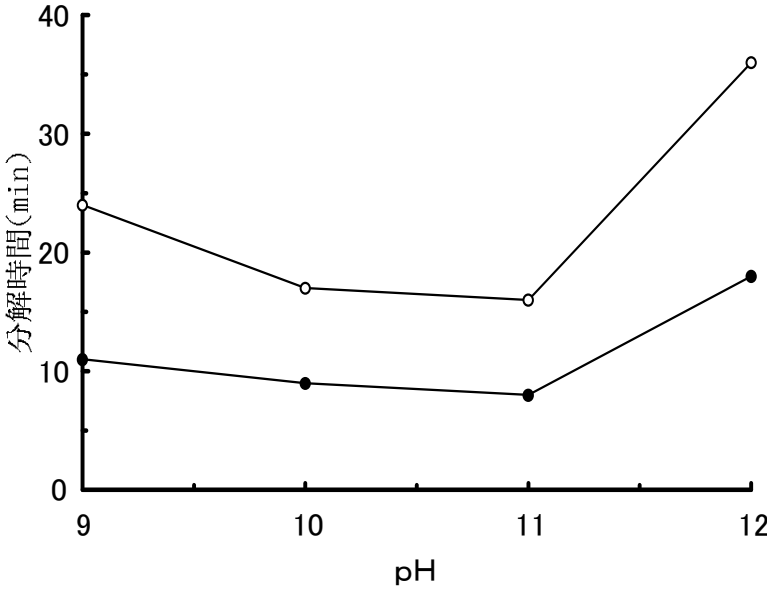

図２－２ ゼラチン膜分解のｐＨ依存性
反応は、図２－１と同様の方法で行った。
○：30℃、●：40℃

次に、温度、酵素濃度の影響について、酵素濃度は 1.1～22.2 mg/ l 、反応温度は30～50℃ の範囲で検討した。それらの結果を図２－３に示す。ゼラチン膜分解に要する時間は酵素濃度の増加にともなって減少し、酵素濃度が高くなるにしたがって分解時間短縮への寄与は小さくなった。また、反応温度が高くなるほど分解に要する時間は短くなり、例えば10分で分解するには 30℃ の場合、 22 mg/l 以上の酵素が必要であるのに対し、 40℃ では約6mg/l、50℃ では約 2.5 mg/l の酵素が必要であった。なお、60℃ でのゼラチン膜の分解は不完全で、部分的にしか剥離せず、これは酵素が熱により失活したことによるものと考える。

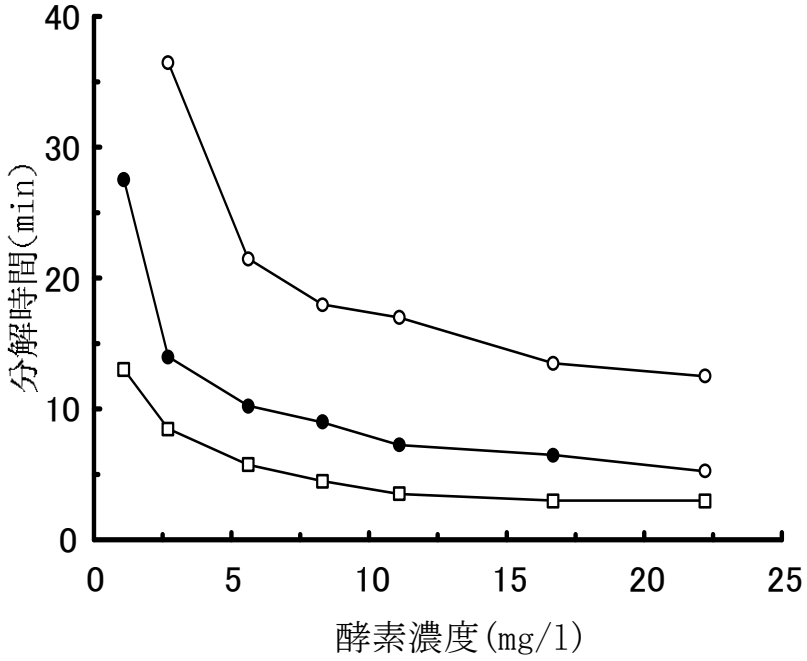

図２－３　ゼラチン膜分解におよぼす温度、酵素濃度の影響
反応は図２－１と同様の方法で行った。
反応条件：pH 10.5、○：30℃、●：40℃、□：50℃

これらゼラチン膜の分解を酵素濃度と見掛けの酵素活性の関係から検討すると、図２－４のようになる。見掛けの酵素活性はゼラチン膜の分解がほぼ終了する時間の逆数で表わされるが、見掛けの酵素活性はこの範囲では酵素濃度とともに増加し、比活性を表わすその傾きは温度が高いほど大きかった。50℃の場合、酵素活性は 16.5 mg/ml 以上になると酵素濃度にともなって増大せず完全に頭打ちとなり、この条件下では酵素が既に飽和していることを示している。

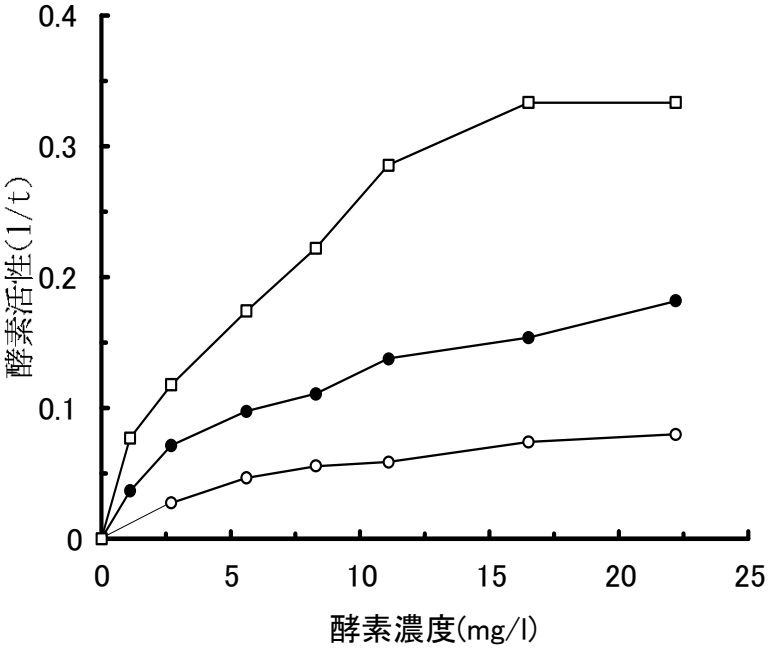

図２－４　ゼラチン膜分解における酵素濃度と見掛けの酵素活性の関係
反応は図２－１と同様の方法で行った。酵素活性はゼラチン膜の分解がほぼ終了する時間（ｔ）の逆数で示した。○：30℃、●：40℃、□：50℃

図２－３で示したように、30℃ から 50℃ の範囲での酵素処理の結果は、酵素濃度が同じ場合、温度が高いほどゼラチン膜を短時間に分解できる。した

がって、高い温度での処理は処理量の増大につながり、工業的レベルでの実施に有利であると考えるが、温度を上昇させての反応は酵素を熱失活させることもある。実際の使用に適した処理温度を知るために、酵素の熱安定性を検討したところ、表２－１で示すように、Ｃａ$^{2+}$ 存在下、ｐＨ10で３時間保温した後の残存活性は、30℃ では 102％、40℃ では 92％ とほとんど失活しなかったが、50℃ では 32％ と初期活性の約１/３に低下した。したがって、50℃ での処理は、本研究のように酵素の繰り返し使用を目指す場合、安定性から適当ではなく、30℃ あるいは 40℃ での処理が適している。

表２－１　Ｂ２１－２株のアルカリプロテアーゼの熱安定性

３０℃	４０℃	５０℃
１０２％	９２％	３２％

５mM Ca^{2+}存在下、３時間保温後、カゼインを基質にして残存活性を測定した。値は、初期活性（100 U/ml）に対する割合を示す。

（３）繰り返し処理

酵素の工業的な利用に際して問題となるのは、酵素に係わるランニングコストであり、その低減化の解決策としては第１章で述べたように低廉な培地での酵素の生産による低コストでの酵素供給とともに、酵素を繰り返して使用する再利用の方法がある。そこで、酵素を更新せずに繰り返しての処理実験を行なった。それらの結果を図２－５に示す。実験は、処理液のｐＨを図２－２の結果から 10.5 付近に設定し、酵素濃度は 11.1 mg/l、処理温度は表２－１で示した安定性の結果から 30℃ あるいは 40℃ とし、１時間ごとに６回処理を行った。ゼラチン膜分解に要する時間は、30℃、40℃ ともに、処理回数

に伴ってともに増加したが、30℃ では、初回の 17分から ６回の 35分へと２倍以上に増加し､分解に多くの時間を必要したのに対し、 40℃ では、初回の８分から６回目でも 12.5分と約60％ しか増加せず、しかも短時間でゼラチン膜を分解することができた。

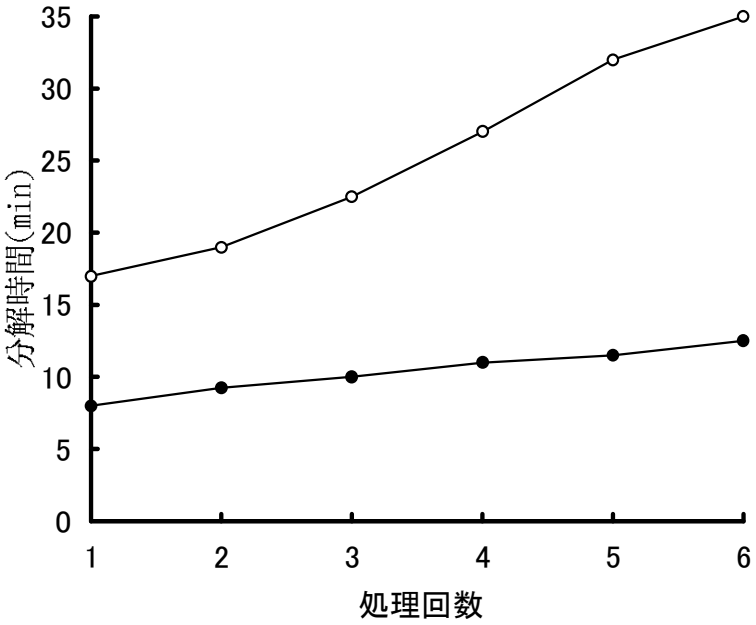

図２－５　繰り返し処理における分解時間の変化
１時間毎に同一溶液で処理した。処理されたフィルムは反応後、槽外へ除き、新たにフィルムを投入して処理を繰り返した。反応条件：ｐＨ10.5、酵素濃度11.1 mg/l
○：30℃、●：40℃

ゼラチン膜分解活性からこの関係を眺めると、図２－６で示すように活性の低下を表わす傾きは、30℃、40℃ ともに同じであり、その差は特に認められなかった。カゼインを基質にして酵素反応液の残存活性を求めたところ、図２－７で示すように初期低下ののち３回目以降、30℃ 処理では 90％、40℃ 処理では 85％ を保持し、この処理時間内での酵素活性の大きな低下は認めら

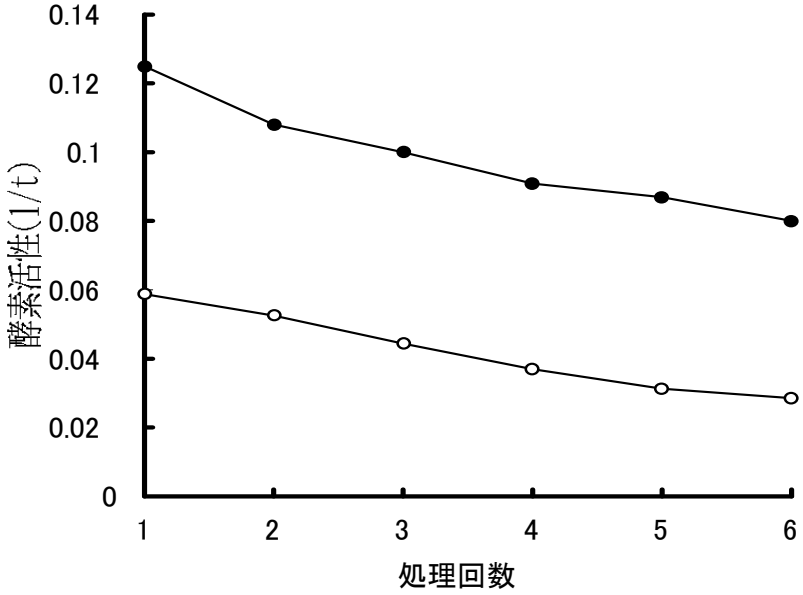

図２－６　繰り返し処理における残存活性の変化
反応液の残存活性は、カゼイン（ｐＨ11.5）を基質として30℃で測定した。○：30℃、●：40℃

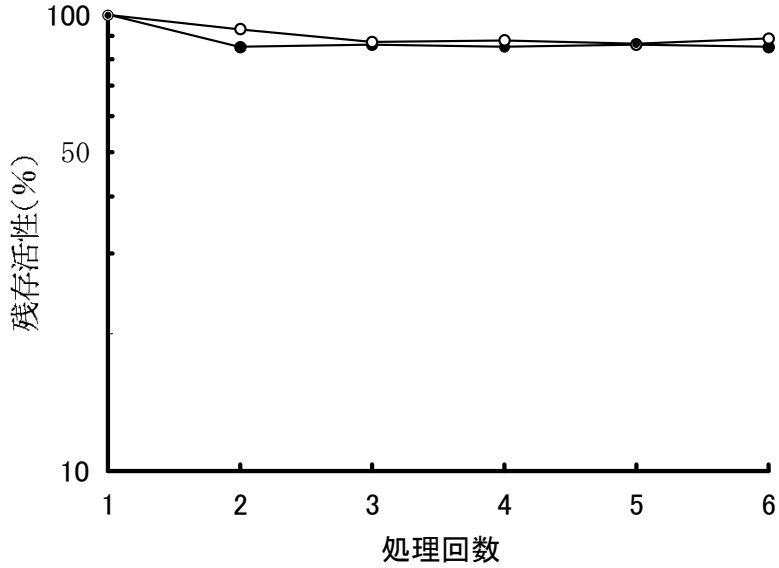

図２－７　繰り返し処理における酵素活性の変化
見掛けの酵素活性は、ゼラチン膜の分解がほぼ終了する時間（t）の逆数で表わした。○：30℃、●：40℃

れなかった。したがって、ゼラチン膜分解活性の低下は繰り返し処理による酵素の失活に起因するものではなく、酵素によって切断・可溶化されたゼラチン膜分解産物による阻害作用が考えられるが、明確な原因は今のところ明らかでなく今後の検討が必要である。

Bacillus amyliliquefacience のプロテアーゼ subtilisin BPN´を用いてのゼラチン膜分解（ｐＨ７～９、55～60℃）が 30分以上を必要とし(5,14)、しかも１回限りの使用であることを考えると、30℃ での処理が初回の 17分から６回の処理で２倍の 35分に増加するにしても、本酵素のように比較的低い温度で、しかも繰り返して使用できることは工業的なレベルでの実施に有利である。

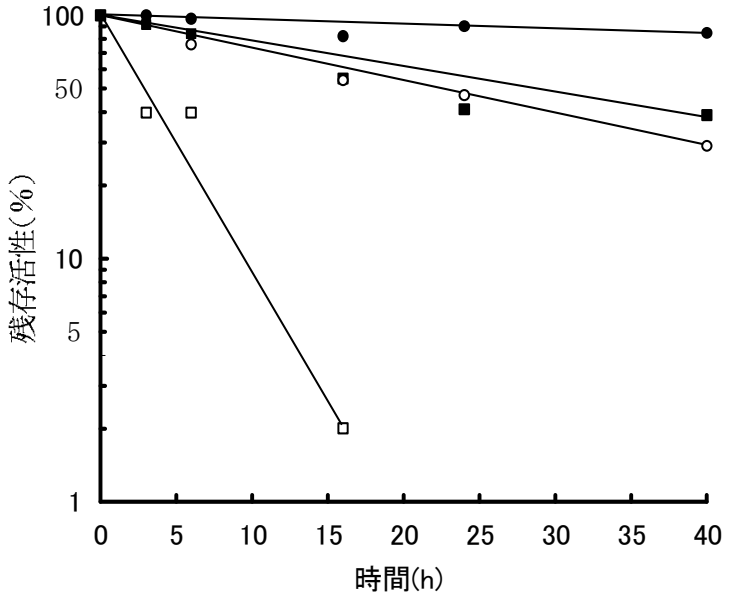

図２－８　酵素の長時間安定性

残存活性はカゼインを基質として測定した。
反応条件：ｐＨ10.5、酵素濃度:11.1 mg/l
○：30℃（Ca^{2+} 無添加）、●：30℃（5mM Ca^{2+} 添加）
□：40℃（Ca^{2+} 無添加）、■：40℃（5mM Ca^{2+} 添加）

酵素を工業的なプロセスに用いる場合、その安定性は実用化にとって重要である。本酵素の安定性について、30℃ あるいは 40℃ で処理の場合、３時間の保温後もほとんど失活しなかったことは既に表２－１で示したが、６回の繰り返し処理後、すなわち６時間後も図２－７で示すように、わずかしか失活しなかった。実際での使用を考慮して、さらに長時間の安定性を安定化剤である Ca^{2+} の有無で測定したところ、図２－８で示すように、６時間、16時間後の残存活性は、30℃ の場合、それぞれ 97%、82% であり、40℃ の場合も、それぞれ 84%、55% と、Ca^{2+} 無添加でもかなりの酵素活性が残存し、本酵素は長時間の使用に耐えうる安定性を持っていた。

２．回分方式による処理

回分方式による処理の工業的なレベルでの実施の可能性を知るために、処理実験を試みた。処理実験は 120ℓ の容器（酵素液 70）を用いて、酵素の濃度を 5.4、11.5、15.1、18.3 mg/ml の４段階として、ｐＨ10.5 付近、30℃ の条件で行なった。１回のフィルム処理量は、撹拌を考慮して 15kg とした。処理槽内のフィルムの撹拌は、５分毎に１～２分、1,300 rpm で撹拌機を用いて行なった。フィルムは６×12 mm のチップに切断したものを用いた。５ℓ（酵素液３ℓ）の小スケールで行なう場合には特に問題にならないが、120ℓ（酵素液70ℓ）のスケールで多量のフィルムが容器に投入された場合、フィルム同士が密着することから、その防止のために、フィルムを ５% カセイソーダ溶液によって約30分間浸漬する前処理を行なった。

酵素濃度を変えて得られた処理回数と分解時間の関係を図２－９に示す。分解時間はいずれの酵素濃度の場合においても、処理回数にともなって徐々に増

加し、特に10回を超えると急激に増加した。ただし、5.4 mg/l の酵素濃度の場合、５回を超えると急激に増加した。 11.5 mg/l の酵素濃度でえた結果を、先に行った繰り返し処理の実験結果（図２－５）と比較すると、先の実験では初回の 17分 から６回目には 35分と約２倍に増大したのに対し、本実験でも 25分 から 55分 へと約２倍に増加し、よく似た結果が得られた。なお、初回における 17分 と 25分 の分解時間の違いは、先の実験でのフィルム量が酵素 １ℓ 当り 0.16kg であったのが、本実験では 0.2 kg/l に若干増えたことによるものかもしれない。ゼラチン膜分解に要する時間を 60 分以内として、

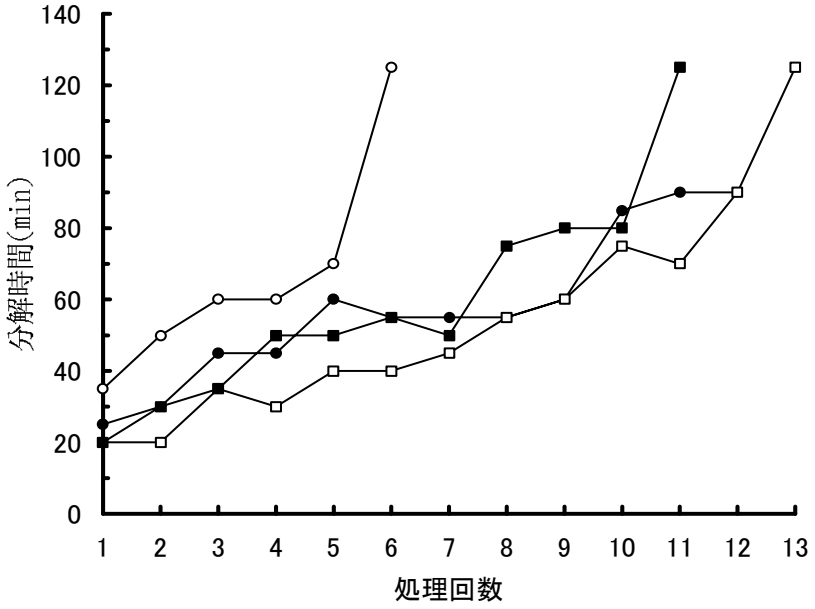

図２－９　回分処理における処理回数と分解時間の関係

70ℓの酵素液を満たした120ℓの容器にフィルム15kgを投入し、30℃、ｐＨ10.5で処理した。フィルムは、反応に先立ち密着を防ぐためにｐＨ約11のカセイソーダ溶液で浸漬前処理した。

酵素濃度；○：5.6 mg／l、●：11.1 mg／l、□:16.5 mg／l、■：22.2 mg／l・

表２－２　各々の酵素濃度における処理の比較

酵素濃度 (mg/l)	A 60分以内の処理回数	B 総処理量 (kg)	C 酵素原液量 (ℓ)	D 酵素原液１ℓ当りの処理量(kg/l)
5.4	5	75	0.58	125
11.5	9	135	1.17	115
15.1	9	135	1.75	77
18.3	7	105	2.33	45

Ｂ＝Ａ×15kg、Ｃ：酵素原液を666 mg/lとして、各々の酵素濃度の反応液を調製するのに必要な酵素原液の量、Ｄ：酵素原液（666 mg/l）１ℓ 当りの総処理量

最も効率のよい酵素の濃度を求めたところ、表２－２で示すように、総処理量は 11.5 あるいは 15.1 mg/l のとき 135kg と最も多く、5.4 あるいは 18.3 mg/ml では低下した。

以上のように、本酵素を使用しての回分方式による処理は、酵素液を更新することなく繰り返して処理でき、しかもゼラチン膜を迅速に分解できることから工業的なレベルでの実施が可能である。しかしながら、回分方式による処理はフィルムの搬送、浸漬、搬出などに多くの時間と労力を必要とすることから、工業的に行なうには依然として問題点が残る。

３．Ｘ線フィルムの連続処理システムの開発

フィルムの処理を工業的なスケールで行なう場合、その処理の基本操作はフィルムの搬送、投入に始まり、浸漬、酵素反応、ベースフィルムの搬出と銀の回収などからなる。採用される反応装置としては、操作方法によって一定容

積の反応器に反応基質を入れ反応の進行中は反応物、生成物の出入りを伴わない回分法と、反応基質を連続的に一定速度で反応器に流通させながら行なう連続（流通）法が考えられる。一般に、連続操作は回分操作に比べて、①労働力の節約が図れる、②自動制御し易い、③反応条件が一定である、④製品の品質が一定である、など多くの利点を有することから(30)、本研究では連続的な方法による処理装置の開発を試みることにした。

連続法は装置の形状による反応基質の容器内の混合特性によって、管型（プラグフロー型）と槽型とに分けられるが、フィルムベースが不溶性であることから多段式の槽型反応器による連続処理は難しいので、管型の反応器を採用することにした。管型連続反応器での反応と、回分式反応槽の反応は対応していることから、先に回分式による処理で得られたゼラチン膜の分解に及ぼす温度、酵素濃度、ｐＨの検討結果は、フィルムの連続処理装置の設計に用いることができる。

反応槽以外に、連続処理装置の開発に先立ち、検討すべき問題点、解決すべき事項、留意点は以下のようなものであった。

（１）検討すべき問題点・事項および設計の概念

（ａ）フィルムの搬送

反応槽へのフィルムの投入、反応槽での撹拌・移動、反応槽からフィルムベースの排出などの操作は、すべて省力化し自動的に行なうことにした。したがって、手動で行なわれる操作は、オートフィーダーへのフィルムのセットだけである。

（ｂ）フィルム試料の形状

市中から回収したフィルムには、標準、高感度、超高感度など様々な種類が混在し、かつ大きさもキャビネから半切など種々雑多である。したがって、処理プロセス中での操作性を容易にするために、フィルムはシュレッダーで細かく裁断する。

（ｃ）前処理の必要性

アルカリ性溶液による前処理がフィルム同士の密着防止に有効であることは先に述べたが、本操作はその他、酵素反応が最適なｐＨで行なわれ、ゼラチン膜が迅速に分解されるために重要な役割を担っている。

ゼラチン膜分解の実験は、市中から回収される医療用直接撮影Ｘ線フィルムの大部分を占めるコダック製のフィルムを用いて行なったが、実際に市中のフィルムを対象にして回収・処理を行なう場合、フジ製、コニカ製も一部含まれる。ゼラチン膜の架橋は、メーカーによって方法、程度が異なることから、分解に要する時間も、図２－１０のように異なり、コダック製、フジ製の医療用直接撮影Ｘ線フィルムの場合、約７分であるのに対し、コニカ製の場合、10分以上であった。これらの結果は、ゼラチン膜分解に必要な槽内のフィルムの滞留時間は、コニカ製フィルムによって律速されることを示している。なお、コダック製とフジ製のフィルムにおいて濁度の最大値が異なるのは、フィルム中の銀の含有量の違いによる。

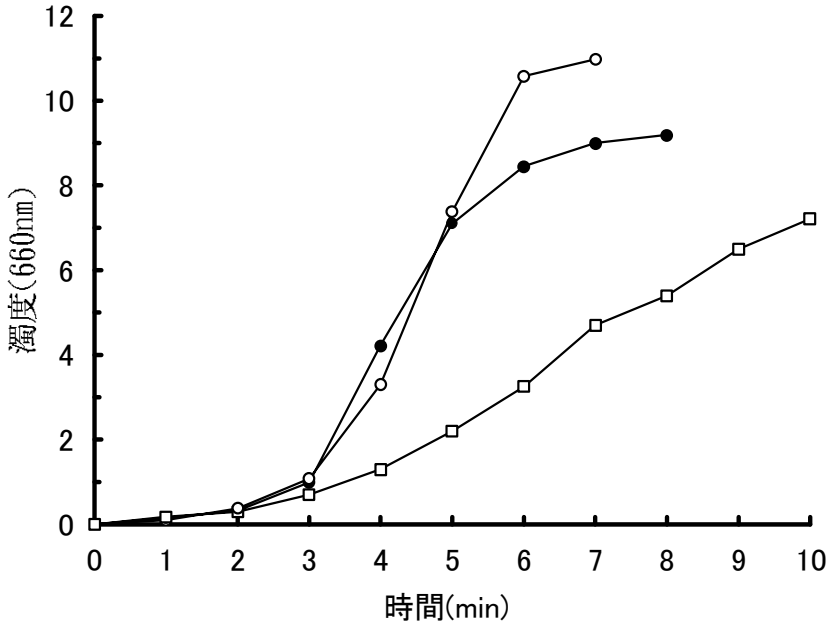

図２－１０　メーカーによるフィルム上のゼラチン膜分解経過の違い
反応は図２－１と同様の方法で行った。
酵素濃度11.1mg/l、45℃、ｐＨ10.5
○：コダック製、●：フジ製、□：コニカ製

一方、アルカリ性溶液による前処理は、フィルム投入に伴う溶液ｐＨの急激な低下を防止し、ｐＨの制御を容易にさせることにより酵素作用を円滑に行わせる役目を持つ。例えば、ｐＨに関しては、40℃ の温水 300ml へフィルム 50ｇ を投入すると、図２－１１のように溶液のｐＨは急速に低下し、１分30秒後には 4.1 になる。これは、迅速な仕上がりが要求されることから写真撮影後の現像、水洗、中和、定着、水洗などの工程は短時間処理（全工程約４５秒）が一般的であり、したがって定着操作に用いられた酸性の硬膜定着剤は最終の工程である水洗でも完全に除去されずにフィルムの乳剤層中に残留し、酸性であることによる。

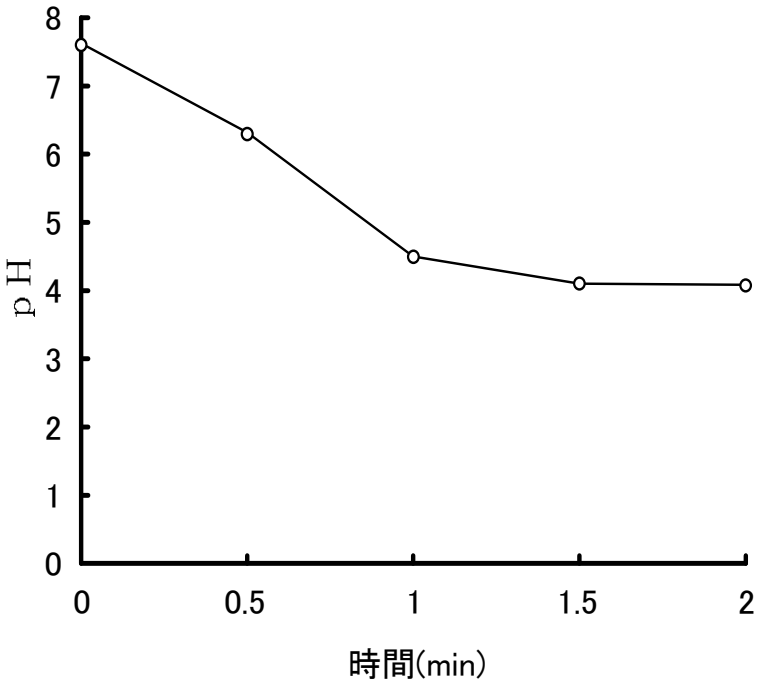

図２－１１ フィルム浸漬におけるｐＨの変化
40℃ で保温した 300ml の水に 50g のフィルムを浸漬し、ｐＨを測定した。

以上のように、コニカ製フィルムの処理には多くの時間を必要とし、またフィルム投入は反応液の急激なｐＨ低下を引き起こすことがわかった。小型でしかも処理能力の大きなシステムを構築するためには、酵素作用を円滑に行なわせ、反応槽内の滞留時間をできるだけ短くすることが必要であり、そのためにはアルカリ性溶液によるフィルムの前処理が有効である。アルカリ性溶液による前処理の条件について、コニカ製のフィルムを用いて、酵素濃度、反応温度をそれぞれ 11.1 mg/l、40℃ として検討したところ、コニカ製フィルムをコダック製やフジ製のフィルムと同様に 10分以内で分解するには、３％ のカセイソーダ溶液を用いた場合、50℃では 60 秒、60℃ では 20 秒、70℃では 10秒の前処理が必要であった。

（ｄ）反応器および反応条件の選定

反応器は、先に述べたように多くの利点を有している管型連続反応器を採用することにした。反応条件は、回分式処理でえられたゼラチン膜の分解特性から、ｐＨ10.5 付近、処理温度 40℃ に設定した。30℃ での処理と 40℃ での処理を比較した場合、処理量にともなう酵素活性の低下は同じであったが（図２－６）、40℃ の方が短時間で分解できることから（図２－５）、滞留時間の短縮化が図れ、したがって単位時間当りの処理量が大きくなり、工業的には有利である。その場合、ゼラチン膜を 10分以内で分解するためには、図２－３から 少なくとも 8.3 mg／l 以上の酵素が必要である。

（ｅ）ベースフィルムの洗浄、回収

フィルム上のゼラチン膜は酵素によって分解されて既にないものの、フィルムには黒色の銀を含む反応液が付着している。フィルムチップを再生・利用に供するには清浄であることが必要であり、洗浄工程を設けなければならない。洗浄方法としてはフィルムの流れに対する洗浄水の流れから、順流と向流の二通りがあるが、節水に優れた向流洗浄法を採用にすることにした。

（ｆ）銀の回収

ゼラチン膜が分解されることにより反応溶液中に遊離した銀は、黒色の直径約 0.1μｍの微粉末である。この溶液から銀を回収するには、18,000 rpm (34,800×*g*) の遠心分離による物理的な操作では難しく、溶液に硫酸アルミニウムや合成高分子などの凝集剤を加えるか、あるいは溶液を酸性に調整することにより凝集・沈澱させる化学的な処理が必要である。処理の容易さ、経済性、銀の純度などの点から酸沈澱を採用することにした。

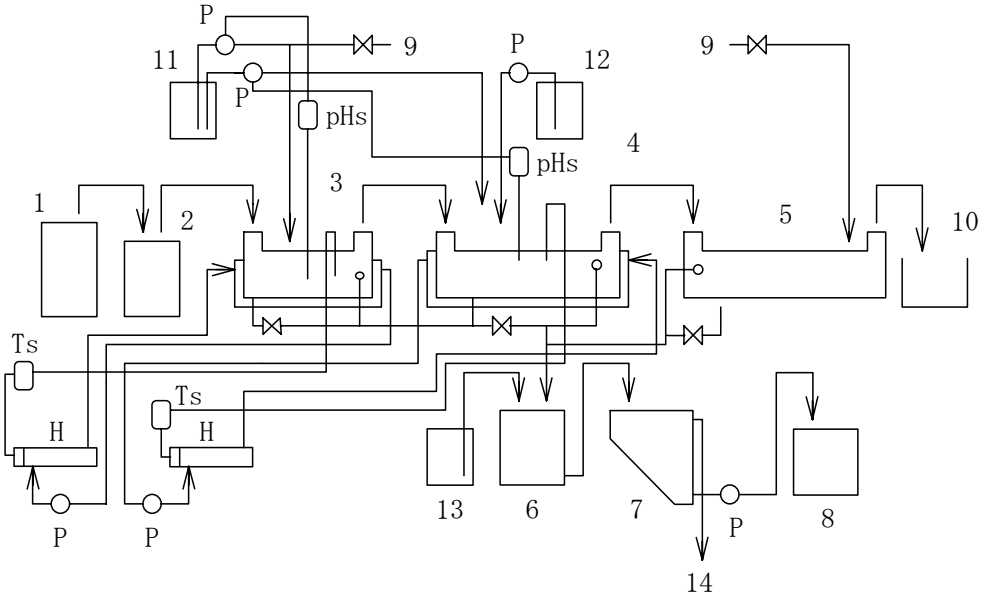

図２－１２　連続処理装置の構成

１：フィーダー、２：シュレッダー、３：アルカリ槽、
４：リアクター、５：洗浄槽、６：中和槽、７：凝集沈澱・ 沈降槽、８：スラッジ排出、９、市水、10：PET排出、11：カセイソーダ、12：酵素液、13：塩酸、14：排水、pHs：pHセンサー、Ts：温度センサー、Ｐ：ポンプ、Ｈ：ヒーター

（２）処理装置の構成と運転成績

上述の(ａ)から(ｆ)の項目についての検討から、図２－１２で示すような連続処理システムを考案した。その概観を図２－１３に示し、仕様を表２－３に示す。装置は、前処理槽、酵素反応槽、洗浄槽の３つの槽からなり、それぞれの槽における操作条件は表２－４のようである。フィルムはオートフィーダーにセットされるだけで、以降の操作は自動的に行なわれ、それぞれのプロセスは以下のようである。

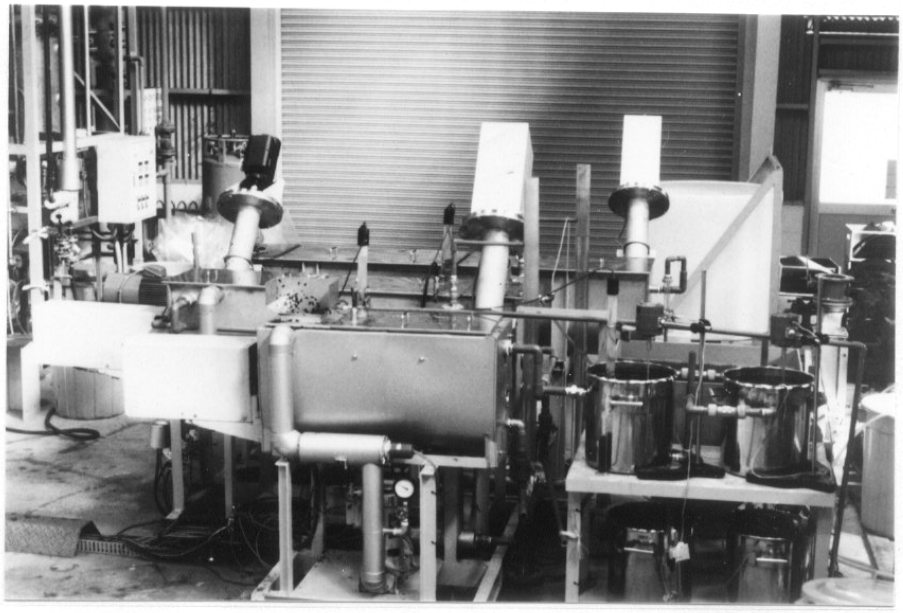

図２－１３　連続処理装置の概観

（ａ）前処理槽

フィルムをオートフィーダーにセットし、シュレッダーで6×120 mm に細かく裁断する。酵素反応槽で処理する前に、約３％ カセイソーダ水溶液の前処理槽で、50℃ 、５分間浸漬処理する。10％ カセイソーダ溶液と水を 1：3 の割合で混合してアルカリ性溶液を調製し、毎時 13～20ℓ で処理槽に供給する。アルカリ性溶液による前処理なしにゼラチン膜の膨潤が不十分なまま酵素処理を行なった場合、洗浄槽から回収されたフィルムの中に黒化銀の付着したフィルムが混在する場合もある。これは銀の回収率の低下を招くとともに、ＰＥＴの再利用の価値を低下させることになり、したがってアルカリ性溶液による前処理は重要な工程である。

表２－３　連続処理装置の仕様

処　理　量　：900～1,000 kg/日
種　　類　：使用済み医療用Ｘ線フィルム
　　写真製版用フィルム
　　（種類、サイズは混在している）
装置の寸法：約３ｍ×4.5ｍ×1.5m高さ
ユーティリティー
電　力　　：約8.5ｋＷ
水　　：約2.5～3.5ｍ^3／日
薬　品　類　：水酸化ナトリウム（前処理用、ｐＨ調整用）
酵　素　　：９～11ℓ／日
　　（酵素原液の濃度を666 mg/lとした場合）
作　業　員　：２名

表２－４　処理プロセスの運転条件

槽	設定温度（℃）	設定ｐＨ	撹拌回転数（rpm）
アルカリ前処理槽	50	10.5	13.3～15.6
酵素反応槽	35 ＊	10.5	8.8～11
洗浄槽	水温	－	5.6～6.7

＊ 酵素反応槽の実際の温度は、アルカリ前処理槽から持ち込むフィルムの熱により、38～41℃になる。

（ｂ）酵素反応槽

アルカリ性溶液で前処理したフィルムは、液切りののち酵素反応槽に送られる。反応槽は図２－１４のように、下部が半径 150mm の半円筒となった管型の反

応器で、サイズは幅 300mm、長さ 1,500mm、高さ 450mmで、反応槽の液量は上部 10cm を残して満たした場合、約 160ℓ となる。フィルムは、斜めに取り付けられた撹拌羽根が回転することにより槽内を移動する。ゼラチン膜分解に要する時間は 10分で充分であるが、液表面をバイパスで移動するフィルムがあることから、滞留時間は倍の 20分に設定した。その場合、１時間のフィルム処理量は約 40kg であり、したがって１日当りの処理量は損益分岐から

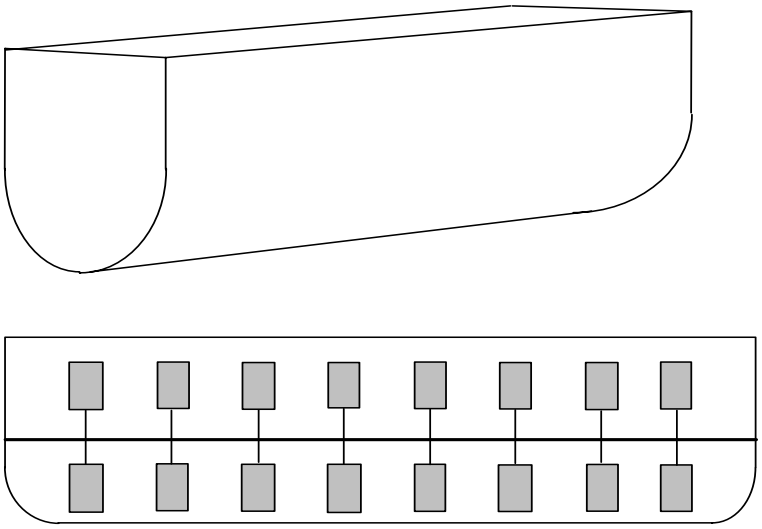

図２－１４ 酵素反応槽の構造

当初設定した最低限目標値である 1,000kg となる。処理量と滞留時間から槽内のフィルムの滞留量は約 13kg と求められる。フィルムチップの重さを容積で除した見掛け比重は約 0.35 であることから、フィルム 13kg は約 37ℓ に相当し、したがってフィルムは反応液 160ℓ の内、約 1/4 の容積を占めることになる。

反応槽の液温は、先に求めたようにゼラチン膜分解に最適な約 40℃、pH10.5 付近に保った。酵素濃度は 166～222 mg/ l の酵素液が 700 ml/h で連続的に送り込むことにより、常時、11.1～13.3 mg/l に保った。また、槽内の液面は、ｐＨ調整のために添加されるカセイソーダ溶液、アルカリ処理槽からの液の持込み、あるいは酵素液の添加などによってほぼ一定のレベルに保たれている。反応槽に流加する液量は、前処理槽へ供給されたのちフィルムに付着して反応槽に持ち込まれるアルカリ性溶液の量（13～20ℓ/h）と反応槽へ加えられる酵素液の量（0.7ℓ/h）の和であり、一方、反応槽に占める溶液の量は 120ℓ であることから、酵素の滞留時間は６～９時間と求められた。この滞留時間内での酵素活性は、表２－１あるいは図２－８で示されるように、50℃の場合３時間で１／３に低下するのに対し、30℃ あるいは 40℃ での処理ではほとんど失活せず、酵素は充分安定であり、この点からも処理温度は 50℃よりも 30℃ あるいは 40℃、特に処理能力の点から 40℃ が適している。

連続方式によるバイオリアクターの場合、雑菌繁殖による汚染が問題になるが、本プロセスの場合、反応液のｐＨは 10.5 付近の高アルカリ性に保たれていることから、その問題はほとんど生じなかった。また、図２－８で示したように、酵素は長時間安定であり、このことは業務終了後、酵素反応槽内の温度を 40℃ に保っているヒーターの通電を停止し室温で放置しても、15～16 時間経った翌朝の業務開始時には前日の終業時に近い活性を保持してることを示している。したがって、酵素反応槽の冷却あるいは始業前に酵素活性の調整は必要がなく、反応液の管理は非常に容易となる。また、装置は横型のプラグフロータイプの撹拌槽に簡単なアルカリ液性溶液の飛散防止対策を施したものを採用していることから槽の保守管理は容易である。ゼラチン膜は約 20

分の滞留中に酵素によって分解され、黒色の銀粒子は溶液中に拡散し、残されたフィルムは透明になった。

（ｃ）洗浄槽および銀の回収

酵素によってゼラチン膜が分解・除去されたフィルムを水切りののち洗浄槽へ送る。フィルムは 5.6 rpm の撹拌速度で洗浄槽内を移動しながら、進行方向から 100 ℓ/h の流速で来る洗浄水で向流撹拌洗浄を行なった。水切りの後、清浄なＰＥＴのチップを回収した。一方、酵素反応槽から引き抜かれた黒色の銀粒子を含む反応液は 中和槽で酸の添加によりｐＨ4.5 に調整し、銀粒子は凝集沈澱として得る。沈澱物は脱水・乾燥ののち精錬され、純度の高い銀となる。従来法である焼却によって得られた銀の純度は、フィルムベース中に含まれる各種添加物あるいは現像・定着工程に使用された種々の薬剤などの混入により低いと言われているのに対し、本方法で得られた銀は、99.6% と非常に高純度であった。酸添加による凝集沈澱の場合、ゼラチンタンパクのほとんどは 凝集せずに上澄液中に残ることから、沈澱槽より排出された排水のＢＯＤは、1,500～2,000 ppm と若干高かった。しかしながら、水の消費は、洗浄槽において向流撹拌による洗浄を採用していることから、フィルム 1,000 kg の処理当り約３m^3 で済み、既存の排水処理施設で他の排水とともに活性汚泥による処理が可能であった。

（ｄ）経済性の評価

最後に、運転成績に基づいて本処理システムの経済性評価を行なった。フィルムの処理を 24時間稼動した場合の 1,000 kg/day と、その半分の稼働の場合の500 kg/day の２つのケースに想定してそれぞれコスト計算を行った。

それらの結果を表２－５に示す。設備投資費用を含む固定費あるいは一般管理費は、処理装置の能力によってそれほど変わらないことから、収益は銀ならびにＰＥＴの売上高、すなわちフィルム処理量に大きく係わることになり、処理量が少ない場合不利となる。変動要因のうち最も大きなものは、投機的な要素を持つ銀の価格であり、その変動によって損益計算も変化する。ここでは銀の市場価格を 20,000円／kg として計算したが、銀の市場価格による損益分岐は 1,000 Kg／day 処理の場合 14,000円／kg、500 kg/day では 20,000円／kg であり、処理量が多いほど銀の市場価格の変動に耐え得ることができる。これらを総合すると、フィルムの１日の処理量は 500 kg より 1,000 kg の方が有利であり、その場合、年間約 2,800万円の利益が生じる。

以上のように、本酵素を用いることにより、医療用直接撮影Ｘ線フィルムから銀とＰＥＴの分別回収を工業的に実施することは可能であり、しかも、コスト計算から本システムは経済的に成り立つことがわかった。ここで開発された連続処理システムは、マイクロフィルム会社と印刷会社で実際に稼働しており、前者では医療用直接撮影Ｘ線フィルムが、後者では印刷製版用フィルムが処理されている。序論で述べたように、フィルムの焼却は環境保全の立場から許されなくなることは確かであるので、本処理システムの将来性は今後大いに期待できる。なお、今後の普及・発展のためにはさらに改良の余地もあり、例えば処理の規模が大きくなるときには、スケールアップについての検討が必要であろう。また、本システムの経済性を考慮すると、処理プロセスの高効率化は必須であり、そのためには操作の最適化が有効な手段となりうるであろう。一方、酵素の面から考えると、高温での処理はゼラチン膜を短時間で分解できることから処理能力の向上が図れ、工業的な利用にはさらに有利であると考えるが、

ここで用いた酵素は耐熱性の点から 50℃ 以上で用いるには適さず、耐熱性に優れた酵素の開発が新たに必要となる。

表２－５　Ｘ線フィルム連続処理装置の運転経費の試算

１）設備導入計画の概要

	ケース１	ケース２
フィルム処理能力(kg)	1,000	500
年間稼働日数（日）	300	300
設備投資金額（万円）	6,000	5,000
運転所要人員（名）	2	2

２）年間売上高の想定(単位:万円)

		ケース１	ケース２
売上高1)	回収銀	9,000	4,500
	回収PET	2,160	1,080
固定費2)		3,000	2,700
変動費3)		3,410	1,760
一般管理費4)		1,960	1,960
予想収益5)		2,790	−70

1) 売上高は、銀の場合、その含有量を1.5%として単価２万円／kgから、PETの場合、売価から再生コストを引いた値（80円／kg）をもとにして求めた。2) 固定費は、設備償却費（４年定額償却）、修繕費（設備の3%）、運転用償却費（設備の２%）、税・保険料（設備費の２%）、直接労務費（一人600万円 とした）を含む。3) 変動費は、フィルム原料費（３万円／トン）、原料集荷費（ ３万円／トン）、副原料費（薬品、酵素など。酵素の価格は市場価格を参考に2,500円とした）、水光熱費を含む。
4) 一般管理費は、設備投資金利（７%）、運転資金金利（７%）、一般管理費を含む。5)予想収益は、年間売上から固定費、変動費、一般管理費を差し引いて求められる。

第４節　要約

１．*Bacillus* sp. B21-2 の生産するアルカリプロテアーゼを用いて、医療用直接撮影Ｘ線フィルム上のゼラチン膜分解に及ぼすｐＨ、温度、酵素活性の影響を検討した。ゼラチン膜分解の作用最適ｐＨは 10.5 であり、反応温度が高いほど、また酵素活性が高いほどゼラチン膜分解時間は短くなった。

２．酵素を更新せずに繰り返して行なう回分処理の結果は、熱安定性ならびに処　理能力から判断すると、40℃ での処理が適しており、その場合の酵素濃度は 11.1 mg／l 以上が適当であった。

３．これらの結果をもとに、本酵素を用いた医療用直接撮影Ｘ線フィルムから銀　とＰＥＴの連続処理回収システムを構築した。本システムはアルカリ前処理槽、酵素反応槽、洗浄槽の３つの槽からなり、大きさは約 ３ｍ×4.5ｍ×1.5ｍ高さ と小型ながら、フィルムの自動供給装置を設置することにより１日約 1,000kg のフィルムの連続処理が可能であった。酵素処理の前にアルカリ性溶液による前処理がゼラチン膜分解の促進に重要であり、フィルム上のゼラチン膜は、酵素反応槽の中で約 20分間の滞留中に分解され、最終的には銀とＰＥＴが分別して回収された。排水はＢＯＤで 1,500～2,000 ppm と若干高いが、フィルムの洗浄に向流洗浄法を採用していることから、水の消費はフィルム 1,000kg 当り約３m^3 であり、既存の排水処理槽での処理が可能であった。

４．処理システムの経済性を評価したところ、固定費や一般管理費などは処理装置の能力によってそれほど変わらないこと、あるいは損益分岐に及ぼす

銀の市場価格の点から、１日の処理量は 500kg より 1,000kg の方が有利であり、その場合、年間約 2,800万円の利益が生じる。したがって、本処理システムは技術的にも経済的にも工業的なレベルでの実施が可能であると言える。

５．処理能力の向上を図るためには、プロセスの最適化、およびゼラチン膜分解時間の短縮化への耐熱性酵素の開発・利用などが今後の研究課題である。

第３章　耐熱性アルカリプロテアーゼの開発とゼラチン膜分解への利用

第１節　緒言

第１章では、好アルカリ性菌 *Bacillus* sp. B21-2 のアルカリプロテアーゼが、医療用直接撮影Ｘ線フィルム上のゼラチン膜分解に有効であることを述べ、酵素の基本的な性質を明らかにした。第２章では、本酵素を用いてゼラチン膜分解におよぼすｐＨ、温度、酵素濃度の影響について検討し、それらの結果を参考に回分処理ならびに連続処理を行ない、工業的なレベルでの実施が可能であることを示した。また、コスト計算から経済的にも充分成り立つことを記述した。

ゼラチン膜分解におよぼす温度の影響は、酵素濃度が同じ場合、温度が高いほどゼラチン膜は短時間で分解されることを示していた（第２章、図２－３）。短時間での分解は、滞留時間の短縮化が図れることから処理量の増大が望め、工業的な利用に有利であると考える。このことは、現用装置をスケールアップすることなく、既存の装置で処理能力を増大させることが可能であることを示している。しかしながら、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素を 50℃ 以上で用いることは熱安定性から適当でなく、その目的のためには耐熱性に優れたアルカリプロテアーゼの開発が新たに必要となる。

こうした背景から、処理能力の向上を目標に、高温で使用可能な耐熱性のアルカリプロテアーゼを探索した。得られたアルカリプロテアーゼは、耐熱性に優れ、ゼラチン膜分解活性も酵素濃度の増加にともなって増大し、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素よりも短い時間でゼラチン膜を分解できることがわかった。

本章では、まず耐熱性のアルカリプロテアーゼ生産菌の分離と酵素の精製、および酵素の性質について述べ、次に、本酵素を用いてフィルム上のゼラチン膜の分解条件

について種々検討した結果を、*Bacillus* sp. B21-2 酵素と比較しながら述べる。

第２節　実験方法ならびに実験材料

（１）材料

ホロファイバーは、旭化成製 AIL-1010（分画分子量 6,000）を用いた。ＤＥＡＥ－トヨパール650M、ＣＭ-トヨパール650M は、トーソー製を用いた。その他は、第１章、あるいは第２章で述べたものを用いた。

（２）耐熱性アルカリプロテアーゼ生産菌の分離

１次スクリーニングとして、１％ ペプトン（大五栄養製）、0.5％ 酵母エキス（Difco製）、0.1％ グルコース、１％ Na_2CO_3 を含むアルカリ性培地（ｐＨ10.2）1.5 mlを入れた試験管に土壌試料を入れ、55℃ で６時間振盪培養の後、培養液 20μl を第１章で述べた小麦粉を含む分離用培地に塗布して、55℃ で一晩培養し、コロニー周辺に大きなハローを形成する菌株を候補株として分離した。次いで、２次スクリーニングとして、これらの菌株について、酵素生産用液体培地（１％グルコース、１％ 魚肉エキス（和光純薬工業製）、１％ 大豆粉、0.1％ KH_2PO_4、１％ Na_2CO_3、0.05％ 酵母エキス）で40℃、24時間培養し、酵素生産量を測定した。また、培養濾液を粗酵素液として、ｐＨ10、70℃ の条件で10分間加温後、残存活性を測定した。最終的には、酵素生産と耐熱の２つの性質から目的とする酵素を生産する菌を選んだ。

（３）菌学的性質

各種培地における生育状況ならびに形態的性質、さらに生理的性質から、“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,″(31)にしたがって同定した。

（４）粗酵素液の調製

第１章の方法に従って粗酵素液を調製した。ただし、培養は 10ℓ 容のジャーファーメンターに培地を ５ℓ 入れて、0.5 vvm、400 rpm の条件で行なった。

（５）酵素の精製

（ａ）硫安塩析

遠心分離により菌体を除去した培養濾液を粗酵素液として、ホロファイバーを用いて濃縮した。濃縮液に硫安を 0.8 飽和になるように加え、氷室で１時間放置した。

（ｂ）ＤＥＡＥ－トヨパール６５０Ｍカラムクロマトグラフィー

遠心分離で得た硫安塩析物を 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.8）に溶解し、同緩衝液に対して透析したのち、同緩衝液で平衡化したＤＥＡＥ－トヨパール650Ｍでバッチ法により処理した。

（ｃ）ＣＭ－トヨパール６５０Ｍカラムクロマトグラフィー

前項のＤＥＡＥ－トヨパールで得た酵素標品を硫安塩析で濃縮後、10 mM リン酸緩衝液（pH7.6）に溶解し同緩衝液に対して透析したのち、同緩衝液で平衡化したＣＭ－トヨパール650Ｍカラム（2×10 cm）に加えた。溶出緩衝液中の食塩濃度を 0 から 0.2M まで直線的に増加させて、吸着したタンパク質を溶出させた。

（６）その他の分析・測定

プロテアーゼ活性、タンパク質の定量、アミノ酸分析およびＮ末端アミノ酸の分析は、第１章で述べた方法で行なった。ゼラチンの定量は、第２章で述べた方法で測定した。酵素の分子量は、第１章で述べた方法にしたがって、ゲル濾過クロマトグラフィーとＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）の２つの方法により求めた。

ゼラチン膜の分解実験は、第２章で述べた方法で行なった。ただし、実験は 1/10 のスケールで 500ml 容のビーカーを用いて、粗酵素液 300ml に医療用直接撮影Ｘ線フィルムを 50g 投入して行なった。ゼラチン膜の分解は、濁度の増加がほぼ終了する時間を反応の終点とした。また、ゼラチン膜分解活性は、濁度がほぼ最大値を示す時間の逆数から求めた。

第３節　実験結果および考察

１．耐熱性アルカリプロテアーゼ生産菌の分離

（１）酵素生産菌の分離

耐熱性で耐アルカリ性の酵素を求めるには、第１章で行なったようにアルカリ性培地を用いて、高温で生育可能な菌を対象に酵素生産菌を検索・分離すればよい。しかしながら、土壌試料から耐熱性で好アルカリ性の酵素生産菌の分離を試みたところ、コロニーの出現は非常に少なかった。そこで、一旦、栄養に富んだアルカリ性培地を用いて高温で生育させたのち、酵素生産菌の分離を行なうことにした。

その結果、１次スクリーニングとして、分離用寒天培地上でコロニー周辺に大きなハローを形成する９菌株を分離した。さらに、２次スクリーニングとして、菌の生育最高温度、液体培養による酵素生産性、粗酵素液を用いた耐熱性の評価試験から、最終的には B18´株を耐熱性アルカリプロテアーゼ生産菌として選んだ。

（２）酵素生産菌の菌学的性質

酵素生産菌 B18´株の菌学的性質の検討を行なった。それらの結果を表３－１に示す。本菌は、グラム染色が陽性、好気性の桿菌であり、胞子を形成することから *Bacillus*属に属するものと思える。本菌は第１章で述べた *Bacillus* sp. B21-2 と同様に、アルカリ性培地に好んで生育する好アルカリ性の *Bacillus*属細菌であり、その性質は *Bacillus* sp. B21-2 と多くの点で類似していた。相違点は、*Bacillus* sp.

B21-2 の生育最高温度が 40℃ であるのに対して、本菌は62℃ であることが特徴的であり、その他、硝酸塩の還元、Koser培地でのクエン酸の利用は *Bacillus* sp. B21-2 が陰性であるのに対し、本菌は陽性であった。本菌を *Bacillus* sp. B18´と称する。

表３－１　B18´株の形態学的、生化学的性質

１．形態学的性質	
形	桿菌
大きさ	0.6～0.9×2.4～3.0μm
運動性	あり
胞子	1.0～1.2×1.2～1.4μm
グラム染色	陽性
２．生理的性質	
硝酸塩の還元	還元する
脱窒反応	嫌気性下では生育しない
ＶＰテスト	陰性
インドールの生成	生成しない
硫化水素の生成	生成しない
デンプンの加水分解	分解する
ゼラチンの加水分解	分解する
クエン酸の利用	
クリステンセン培地	利用する
コーザー培地	利用する
硝酸塩の利用	利用する
アンモニウム塩の利用	利用しない
オキシダーゼ活性	陽性
カタラーゼ活性	陽性
３．その他の性質	
塩化ナトリウム耐性	5% NaClを含む培地で生育する
生育温度	25～62℃
生育ｐＨ	7.5～11.5

２．酵素の精製と性質

（１）酵素生産菌の培養

培養液 ５ℓ を含む 10ℓ 容のジャーファーメンターを用いて、400 rpm、0.5 vvm の条件で、*Bacillus* sp. B18´ の培養を行なった。酵素生産におよぼす温度の影響を、35、40、45℃ で検討したところ、酵素生産は 40℃ のとき最も良好であった。また、Na_2CO_3 濃度の影響を 0.5% から 2.0% まで変えて検討したところ、酵素生産は 1.5% のとき最も良好であった。これらの結果を参考に酵素生産用液体培地を用いて、0.5vvm、400rpm、40℃の条件で培養したところ、酵素生産は図３－１で示すように、25～26時間の培養で約1,000 U/ml に達した。この酵素生産性は *Bacillus* sp. B21-2 に比べると、約1/15 である。

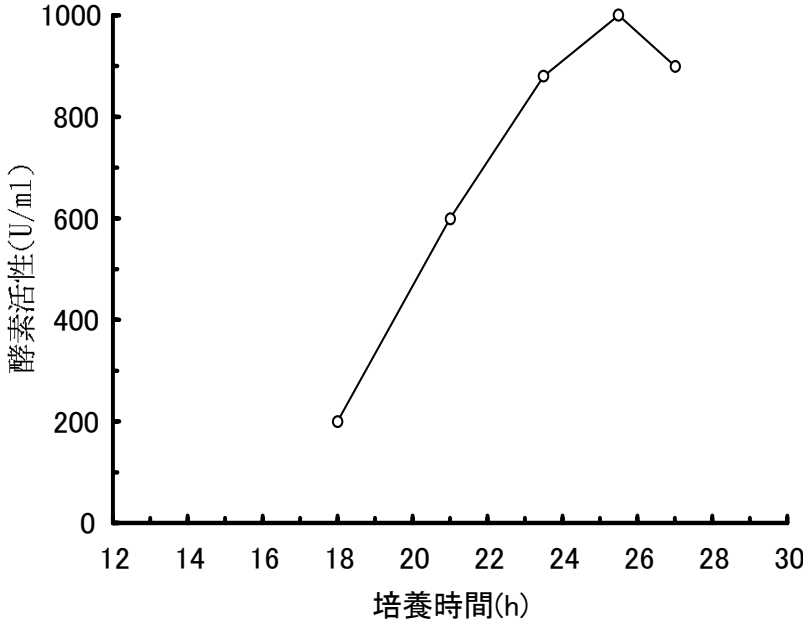

図３－１　B18´株のジャーファーメンターによる培養の経過
10ℓ 容のジャーファーメンターに培地を５ℓ 入れ、
400rpm、0.5vvm、40℃で培養した。

（２）酵素の精製

硫安塩析によって得られた粗酵素標品は褐色を呈していた。この褐色物質はＤＥＡＥ－トヨパール650M に吸着されるが、酵素は吸着されなかった。粗酵素の比活性は約 2,600 U/mg-タンパク質 で、活性収率は約 60% であった。非吸着の活性画分を集め、硫安塩析で濃縮後、ＣＭ－トヨパール650M カラムクロマトグラフィーに供した。その溶出パターンを図３－２に示すが、酵素は食塩濃度 0.1M付近のピーク（Ｐ２）に認められた。溶出された活性画分（No.86～102）を集め、硫安塩析により濃縮後、透析・脱塩して精製酵素標品とした。比活性は 4,370 U/mg-タンパク質 に上昇した。

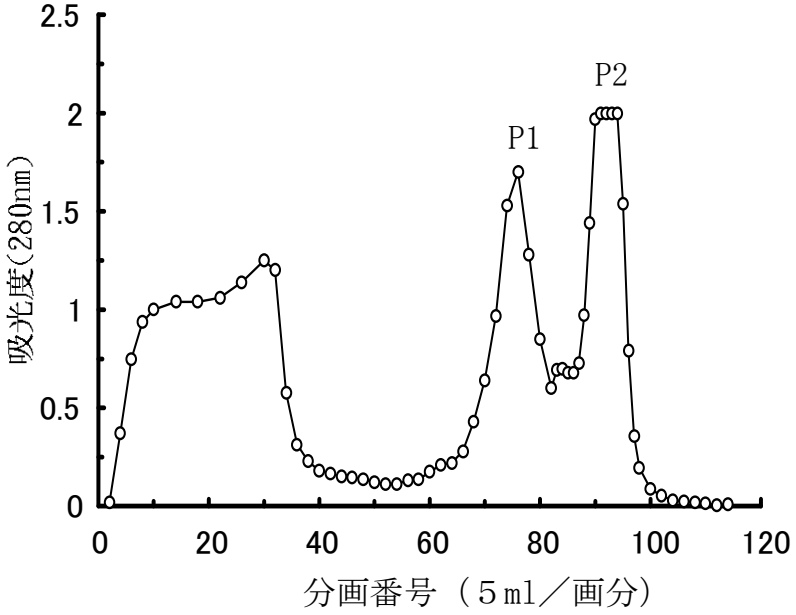

図３－２　ＣＭ－トヨパール650Mクロマトグラム
カラムサイズ：2×10 cm、流速：25 ml/h、
分画量：5 ml/tube

精製した酵素の純度をセファデックスＧ－100 による精製酵素のゲル濾過クロマトグラフィーで確認したところ、単一なピークの溶出パターンがえられた。また、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動（SDS-PAGE）でも、図３－３で示すように単一なバンドがえられた。したがって、本酵素は、クロマトグラフィー的および電気泳動的に単一まで精製された。

これらの精製工程をまとめて表３－２に示す。酵素タンパク質は最終的に比活性で 16.6 倍に濃縮され、その収率は 21% であった。

表３－２　Ｂ１８´株のアルカリプロテアーゼの精製

精製工程	液量 (ml)	活性 (U/ml)	ﾀﾝﾊﾟｸ量 (g)	比活性 (U/mg)	精製度 (fold)	活性収率 (%)
培養濾液	14,110	864	46.3	263	1	100
ﾎﾛﾌｧｲﾊﾞｰ濃縮液	1,940	6,060	10.8	1088	4.1	96.4
DEAE-ﾄﾖﾊﾟｰﾙ	1,560	5,650	3.4	2573	9.8	72.3
CM-ﾄﾖﾊﾟｰﾙ	80	31,700	0.58	4370	16.6	20.8

タンパク質量は、培養濾液の場合のLowry法を除き、280 nmの吸光度から求めた。

（３）酵素の物理化学的性質

（ａ）吸収係数（Ｅ1%,1cm at 280 nm）

精製酵素標品を蒸留水に溶解、透析後、遠心分離し、50ml を秤量ビンに採り105℃で恒量になるまで乾燥した。280 nm の吸光度と重量の関係から、吸光係数は 7.1 と算出された。

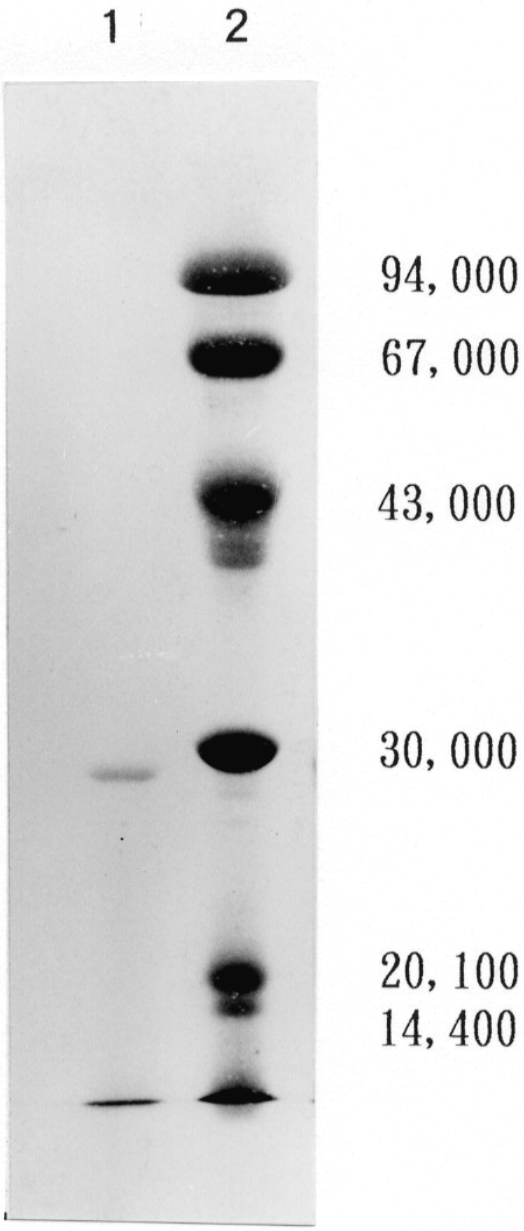

図３－３　Ｂ１８´株のアルカリプロテアーゼのＳＤＳ－ＰＡＧＥ

１：B18´株のアルカリプロテアーゼ、２：標準タンパク質
(albumin (67,000)、ovalbumin (43,000)、carbonic anhydrase (30,000)、trypsin inhibitor (20,100)、α-lactoalbumin (14,400))

（ｂ）分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の測定結果を図３－４に示す。標準タンパク質の分子量の対数と溶出量（Ve）の関係は、良好な直線関係にあり、この結果から本酵素の分子量は約 28,000 と測定された。

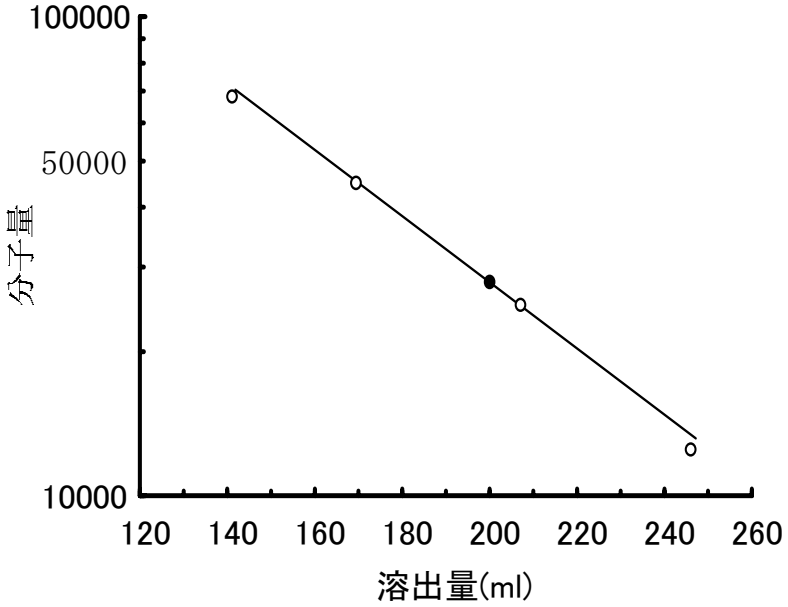

図３－４　ゲル濾過による分子量測定
Sephadex G-100 ゲル、カラムサイズ：2×45 cm、流速:15 ml/h、
分画量：5 ml/tube
○：標準タンパク質（bovine serum albumin (68,000)、ovalbumin (45,000)、chymotrypsinogen A (25,000)、cytchrome *c* (12,500)）
●：B18´株のアルカリプロテアーゼ

また、ＳＤＳ-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製酵素の分子量測定の結果を図３－５に示す。各標準タンパクの移動度（Ｒf）に対して分子量の対数をプロットすると、94,000 から 20,100 までは直線関係にあり、本酵素のバンドは分子

量 30,000 の carbonic anhydrase とほぼ同じ位置にあることから約30,000 と考えられ、ゲル濾過クロマトグラフィーから求めた分子量約 28,000にほぼ一致していた。したがって、本酵素の分子量は、第１章で述べた *Bacillus* sp. B21-2 の酵素と同じ、約2,800～30,000 の単量体と考えられる。

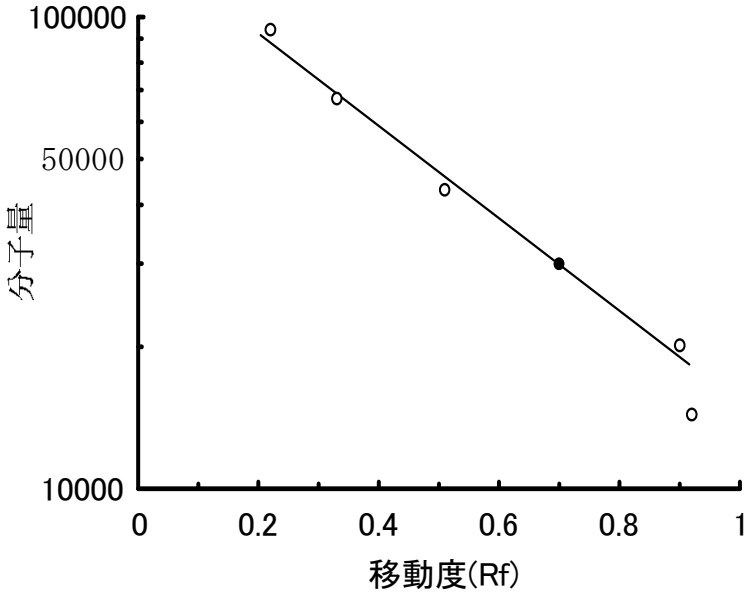

図３－５　ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分子量測定
12.5%スラブゲル（pH8.8）、25 mA、CBB 染色、
○：標準タンパク質（phosphorylase (94,000)、albumin (67,000)、ovalbumin (43,000)、carbonic anhydrase (30,000)、trypsin inhibitor (20,100)、α-lactoalbumin (14,400)）、
●：B18´株のアルカリプロテアーゼ

（ｃ）アミノ酸組成

本酵素のアミノ酸組成を表３－３に示す。アミノ酸組成における残基数は、酵素の分子量を 30,000 として示した。比較のために、*Bacillus* sp. AH-101 の酵素(32-34)、*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素(35,36)など耐熱性アルカリプロテアーゼと、第１章で述べた *Bacillus* sp. B21-2 の酵素のアミノ酸組成も併せて示す。

表３－３　Ｂ１８´株のアルカリプロテアーゼのアミノ酸組成

	酵素生産菌株名			
アミノ酸	B18´	B21-2	No.AH-101	HS682
Arg	14	10	14	11
Lys	2	4	2	3
His	9	6	8	7
Phe	5	6	4	4
Tyr	11	5	12	10
Leu	19	16	18	15
Ile	17	13	16	15
Met	1	5	4	3
Val	24	30	22	20
Ala	37	46	34	30
Gly	40	50	36	31
Pro	12	11	8	9
Glu	18	18	18	17
Ser	26	25	28	25
Thr	18	18	18	14
Asp	33	37	32	29
Trp	3	4	4	2
Cys	0	0	0	0
合　計	289	304	278	245

数字は、酵素１μmole当たりのアミノ酸残基数を示す。
No.AH-101：*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)、
HS-682：*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素(35,36)

本酵素は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素とは Val、Ala、Gly の含量で多少異なるもののよく似ており、耐熱性の酵素の中では *Bacillus* sp. AH-101 の酵素と、Val、Gly、Pro の含量で若干異なるものの非常によく似ていた。

（ｄ）Ｎ末端のアミノ酸配列

Ｎ末端から20個のアミノ酸の配列を図３－６に示す。比較のために、*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)、*Thermoactinomyces* sp. HS682 (35,36) の酵素など耐熱性アルカリプロテアーゼと、第１章で述べた *Bacillus* sp. B21-2 の酵素のアミノ酸配列も併せて示す。*Bacillus* sp. B18´の酵素は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素と50％ の高い相同性を示し、さらに、*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素あるいは *Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素とは 95％ の非常に高い相同性を示していた。

```
                1         5         10        15        20
B18´            Q-T-V-P-W-G-I-S-F-I-N-T-Q-Q-A-H-N-R-G-I
No.AH-101       Q-T-V-P-W-G-I-S-F-I-S-T-Q-Q-A-H-N-R-G-I
HS682           Q-T-V-P-W-G-I-S-F-I-N-T-Q-Q-A-H-D-R-G-I
B21-2         S/Q-T-V-P-W-G-I-N-R-V-Q-A-P-I-A-Q-S-R-G-F
```

図３－６　Ｂ１８´株のアルカリプロテアーゼのＮ末端から20個のアミノ酸の比較（一文字表記）
No.AH-101：*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)、
HS-682：*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素(35,36)

（４）酵素学的性質

（ａ）ｐＨの影響

Bacillus sp. B18´の酵素の作用最適pHは、カゼインを基質にした場合、図３－７で示すように 12～13 にあり、測定に用いた緩衝液は異なるが、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素と比較すると、本酵素の方が 1.5ｐＨ 高い。好アルカリ性菌由来のアルカリプロテアーゼは、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素のように高い作用最適ｐＨを持っていたが、*Bacillus* sp. B18´の酵素は耐熱性・耐アルカリ性アルカリプロテアーゼである *Bacillus* sp. No.AH-101 (32-34) の酵素あるいは *Thermoactinomyces* sp. HS682 (35,36) の酵素と同様に、ｐＨ12～13 の更に高い作用最適ｐＨを持っていた。

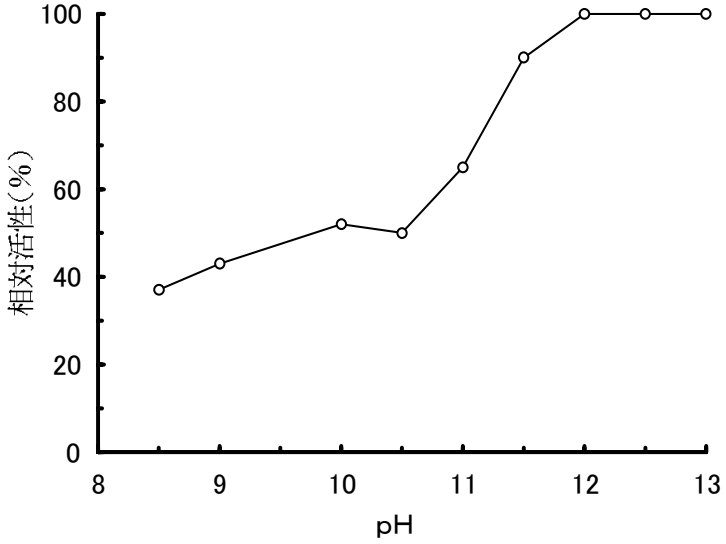

図３－７　酵素活性へのｐＨの影響

ｐＨ13.0の相対活性値（初期活性 76.3 U/ml）を100%とした。
Ca^{2+} 無添加、30℃、用いた緩衝液：0.1M Na_2CO_3-$NaHCO_3$緩衝液
(pH 8.5-10.0)、0.1M Na_2HPO_4-NaOHリン酸緩衝液（pH 10.5-13.0)

種々のｐＨで、40℃、１時間保温の後、残存する活性を測定して酵素のｐＨ安定性を求めた。それらの結果を図３－８に示す。ｐＨ12 ではわずかに低下するものの、測定した ｐＨ5.0 から ｐＨ12.0 の範囲では安定であり、図１－１２で示した *Bacillus* sp. B21-2 の酵素の ｐＨ６～９よりも幅広いｐＨ範囲で安定であった。

（ｂ）温度の影響

カゼインを基質にして、ｐＨ10.0 における温度の影響を検討した。図３－９で示すように、Ca^{2+} がない場合、反応速度が最大となる温度は 70℃ であるのに対し、Ca^{2+} 存在下では、15℃ 上昇して 85℃ となった。*Bacillus* sp. B18´の酵素も

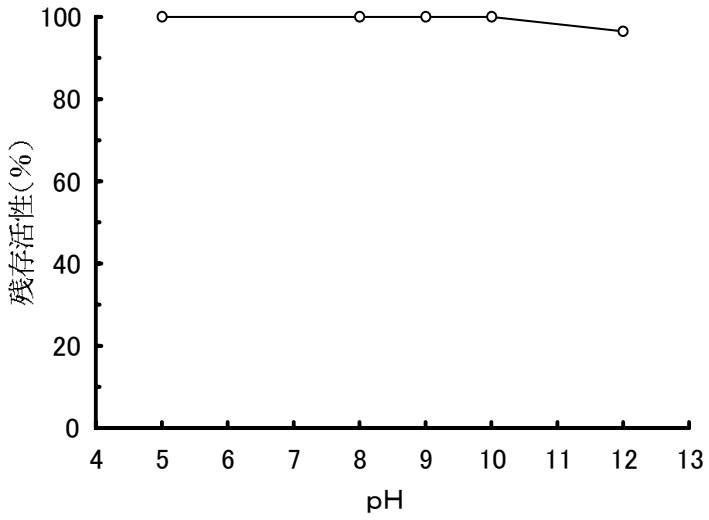

図３－８　酵素のｐＨ安定性

各々のｐＨで40℃、24時間保温後、pH 11.5で残存活性を測定した。pH 8.5（ホウ酸緩衝液）での残存活性（100%）を100%として表示した。初期活性100U/ml、0.1M 酢酸緩衝液（pH5）、0.1M Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0～9.0）、0.1M ホウ砂-NaOH 緩衝液（pH10～12）

Bacillus sp. B21-2 の酵素と同様に Ca^{2+} によって安定化されることがわかった。*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の場合、Ca^{2+} 非存在下、あるいは存在下での温度は、それぞれ 55、60℃ であることから、本酵素はそれぞれ15℃、20℃ 高い。この作用最高温度の 85℃ は、*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)、*Thermoactinomyces* sp. HS682 (35,36)の酵素、あるいは *Thermus aquaticus* YT-1の Aqualysin Ⅰ(37)などの 80℃ よりも高い値である。Ca^{2+} が存在する場合の結果を Arrhenius プロットすると、図３－１０で示すように本酵素は 80℃ すぎまで直線関係にあり、勾配から求められる活性化エネルギーは 55.6 kJ/mol であり、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の値 59.3 kJ/mol とほぼ同じ値であった。

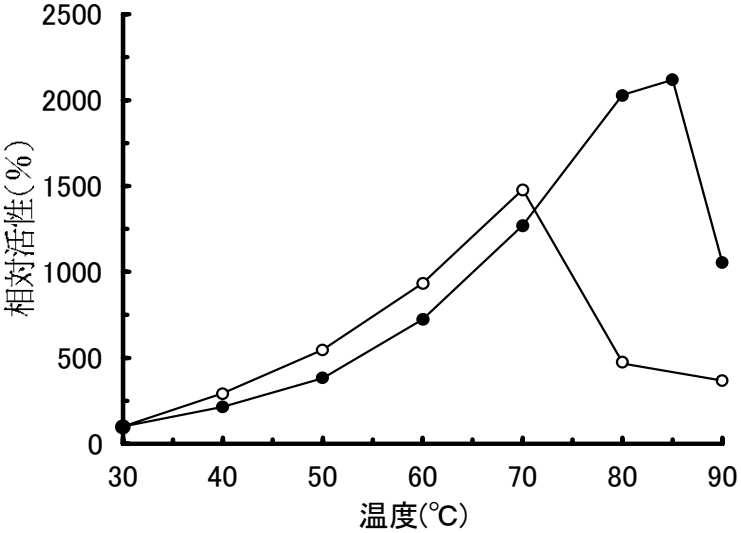

図３－９　酵素活性への温度の影響

10mM ホウ酸緩衝液(pH10.0)に溶解したカゼインを基質として各々の温度で10分間反応させた。
30℃を100%（初期活性 16.3 U/ml）として表示した。
○：Ca^{2+} 無添加、●：5mM Ca^{2+} 添加

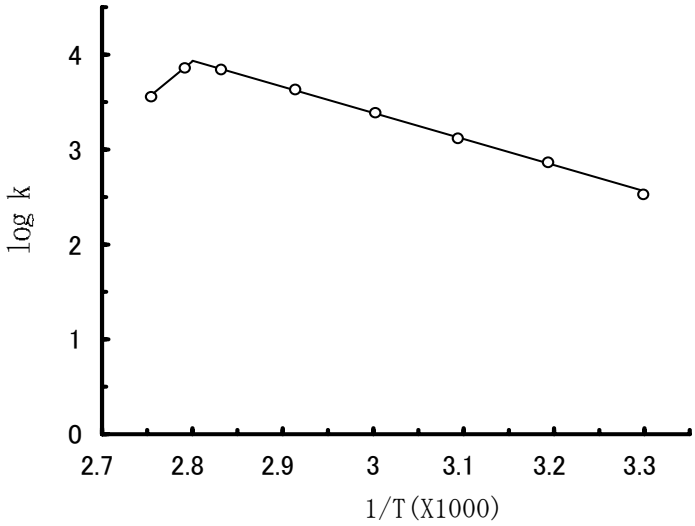

図３－１０　Ｂ１８´株のアルカリプロテアーゼのカゼイン分解におけるArrhenius プロット

各温度での値は、5mM Ca^{2+} 存在下でえられた酵素活性から算出した。

Ca^{2+} 存在下、pH10.0、10分保温における酵素活性の変化を図３－１１に示す。Ca^{2+} 存在下での酵素は 70℃ まで安定であるが、80℃ では約 50% 失活し、90℃ では活性は全くなくなった。*Bacillus* sp. B21-2 の酵素は、図１－１４で示したように Ca^{2+} 存在下では 50℃ まで安定であることから、本酵素は*Bacillus* sp. B21-2 の酵素より 20℃耐熱性が上昇したことになる。

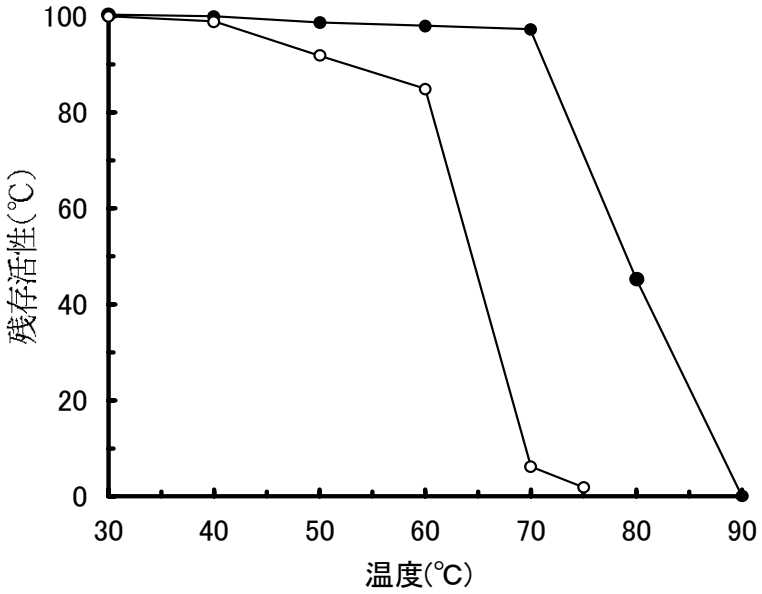

図３－１１　　酵素の熱安定性
酵素を0.1M ホウ酸緩衝液（pH10）で10分間保温後、ｐH11.5で残存活性を測定した。30℃の残存活性（5mM Ca^{2+} 無添加の場合 92%、添加の場合 100%）を100%として表示した。
初期活性：100 U/ml
○：Ca^{2+} 無添加、●：Ca^{2+} 添加

（ｃ）各種阻害剤の影響

酵素の活性に及ぼす因子として、各種の阻害剤について検討した。活性は、活性部位の探索試薬として用いられるρ-chloromercuribenzoic acid （ＰＣＭＢ）、

ethylenediaminetetra acetic acid tetrasodium salt （ＥＤＴＡ）、diisopropyl fluorophosphate（ＤＦＰ）を用いて ２ｍＭ の濃度で ｐＨ10.0、30℃ で30分間保温後、残存する活性を測定した。ＥＤＴＡ では全く阻害されず、ＰＣＭＢ では85％ の活性が残存したが、ＤＦＰ では完全に阻害された。したがって、本酵素は *Bacillus* sp. B21-2 の酵素と同様に、セリン残基が活性に関与している可能性が高い。

以上、本酵素の諸性質をまとめて表３－４に示す。また、比較のために他の耐熱性アルカリプロテアーゼについても併せて示す。いずれも、好アルカリ性菌が生産する酵素であり、高アルカリ性に作用最適ｐＨを持つ。一般に、好アルカリ性菌は、*Bacillus* sp. No.221 の酵素(7)の 11.5、*Bacillus* sp. YaB (13)の酵素の 11.75、*Bacillus* sp. Y の BYA (12)の 10.5～12.5 など高い作用最適ｐＨを持つが（表１－８）、ここで示した耐熱性のアルカリプロテアーゼは更に高い作用最適ｐＨを持っていた。

表３－４ 好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼの性質

	B18´	B21-2	No.AH-101	HS682
分子量	30,000	30,000	29,000	25,000
作用最適pH(ｶｾﾞｲﾝ)	12-13	11.5	12-13	11.5-13.0
作用最適温度(℃)	85	60	80	80
吸光係数 (E1%)	7.1	6.0	－	－
比活性(U/mg)	4,860	9,000	4,080	5,700

各々の値は、文献より引用した。比活性は、30℃、最適pHで測定した値である。
No.AH-101：*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)、HS-682：*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素(35,36)

好アルカリ性*Bacillus* sp. のアルカリプロテアーゼは、1972年に掘越が発表して以来、いくつかの報告があるが(7-13)、耐熱性のアルカリプロテアーゼの研究は少なく、*Bacillus* sp. No.AH-101 の酵素(32-34)と*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素(35,36)、そして本研究での *Bacillus* sp. B18´の酵素しか見あたらない。分類の上から 30℃ から 55℃ まで生育する菌を常温菌、55℃ 以上で生育可能な菌を耐熱性菌とすると *Bacillus* sp. No.AH-101 は常温菌の範疇に属し、したがって、耐熱性菌と言えるのは後者の２つである。ゆえに、本研究は耐熱性で好アルカリ性 *Bacillus* sp.からえられた耐熱性アルカリプロテアーゼについて初めての報告である。

３．耐熱性アルカリプロテアーゼによるゼラチン膜の分解

カゼインを基質として本酵素の性質を調べたところ、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素よりさらに高い作用最適ｐＨと作用最大温度を持つことがわかったが、本酵素を実際の処理に用いるには本酵素によるゼラチン膜の分解特性を知る必要がある。

ゼラチン膜の分解におよぼすｐＨの影響について、9.4から11.0 のｐＨ範囲で検討したところ、図３－１２で示すように、ｐH10.0 付近での処理がゼラチン膜分解に最も有効であった。この値は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素が ｐH10～11であるのに比べ、若干低い値である。次に、ゼラチン膜分解におよぼす温度と酵素濃度の影響について、ｐH10.0、5.5～111 mg/l の範囲で 50℃ と 60℃ で検討した。それらの結果を図３－１３に示す。比較のために、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素について追加して行った高濃度での分解実験の結果を併せてのせてある。ゼラチン膜分解に要する時間は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の場合と同様に、反応温度、酵素濃度ともに高くなるほど短かくなった。*Bacillus* sp. B18´ の酵素と、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素を比較すると、低い酵素濃度では、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の方がゼラチン膜を

短時間に分解できる。しかしながら、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素は酵素濃度を16.5mg/l 以上にしてもゼラチン膜を３分未満で分解することはできないのに対し、*Bacillus* sp. B18´の酵素の場合、分解時間に要する時間は酵素濃度の増加にともなって短くなり、111 mg/l では２分以内で分解することができた。

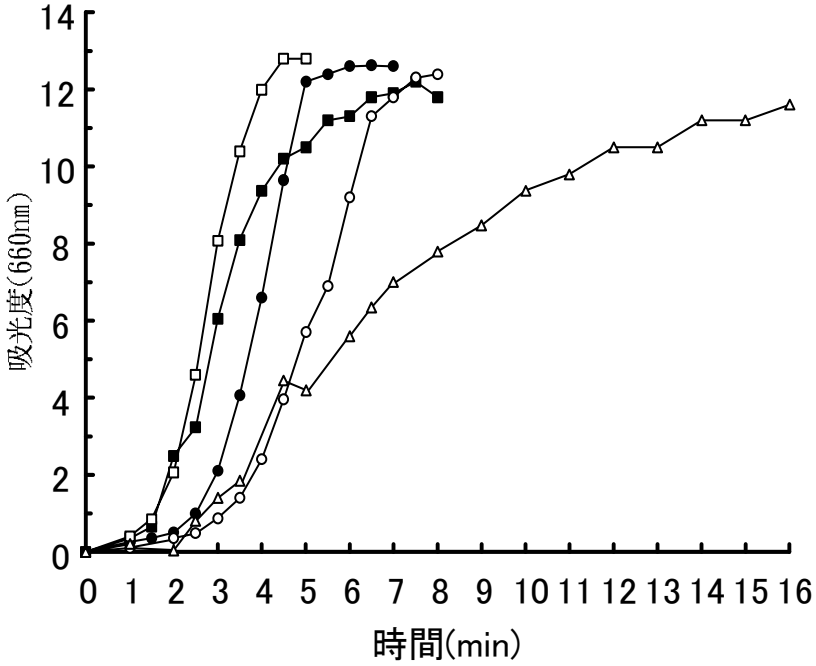

図３－１２　ゼラチン膜分解へのｐＨの影響
反応は、図２－１と同様の方法で行った。ただし、
ビーカー、酵素液、フィルムの量は1/10のスケールで
行った。酵素濃度:11.1 mg/ml、60℃
○：pH9.0、●：pH9.4、□：pH10.0、■：pH10.4、
△：pH11.0

分解時間におよぼす酵素濃度の影響は、ゼラチン膜分解活性との関係から眺めるとさらに明確となる。酵素濃度とゼラチン膜分解活性の関係は図３－１４で示すように、

Bacillus sp. B21-2 の酵素を用いて 50℃ で処理した場合、16.5 mg/l 以上の酵素濃度では反応は頭打ちとなったが、本酵素では 50℃、60℃ ともに、測定した 111 mg/l までは、60℃ で若干頭打ちの傾向はあるものの、酵素濃度の増加にともなって酵素活性は増大した。

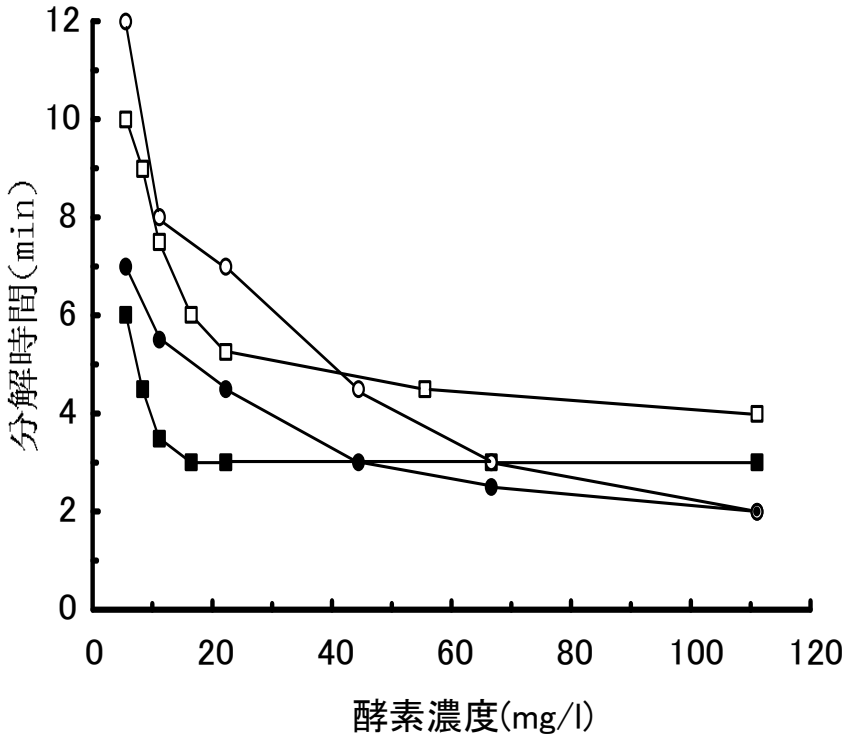

図３－１３　ゼラチン膜分解への酵素濃度および温度の影響
反応は、図２－１と同様の方法で、ただしフィルム量、
酵素液などは1/10のスケールで行った。
B18´株のアルカリプロテアーゼ（○：50℃、●：60℃）
B21-2株のアルカリプロテアーゼ（□：40℃、■：50℃）

Bacillus sp. B21-2 の酵素を用いて処理を行なう場合、熱安定性の点から 50℃ での処理は適さず、実際に処理を行なう温度は 40℃ である。その場合、ゼラチン膜分解に要する最短時間は約４分である。一方、*Bacillus* sp.B18´の酵素の場合、測定

した範囲内での最短時間は２分であった。この４分から２分への分解時間の短縮は、反応槽内におけるフィルムの滞留時間を単純計算で１／２に短縮することができ、現用の処理装置をスケールアップすることなしに既存の装置での処理能力を２倍に引き上げることができることを示している。

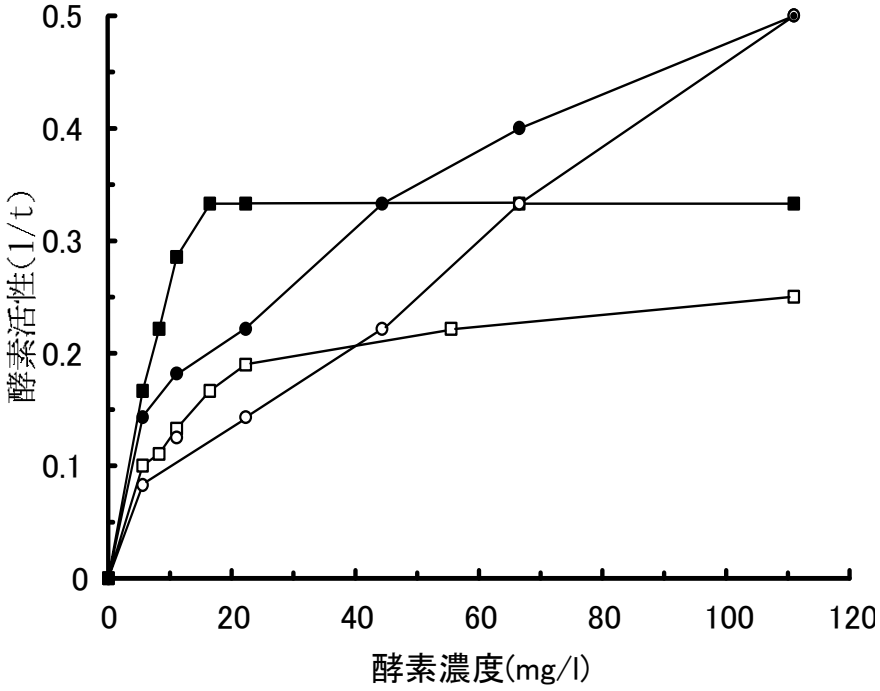

図３－１４　ゼラチン膜分解における酵素活性ならびに温度の影響
酵素活性は、ゼラチン膜の分解がほぼ終了する時間(t)の逆数で表わされる。
B18´株のアルカリプロテアーゼ（○：50℃、●：60℃）
B21-2株のアルカリプロテアーゼ（□：40℃、■：50℃）

酵素を工業的に使用する場合、酵素が持つ分解特性もさることながら、本処理システムのように酵素を繰り返して、しかも長時間に渡って使用する場合、安定性が問題となる。*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の安定性については、第２章（図２－７、図２

－８）で既に報告したが、*Bacillus* sp. B18´の酵素についての安定性の検討結果を表３－５に示す。*Bacillus* sp. B21-2 の酵素は安定化剤としてCa^{2+} がない場合、50℃、１時間の加温で活性は全くなくなり、Ca^{2+} が存在しても３時間後の活性は初期活性の 32％ に低下した。一方、*Bacillus* sp. B18´の酵素は、50℃ の場合、Ca^{2+} がなくても３時間後の残存活性は 82％で、Ca^{2+} が存在すれば、98％ とほとんど失活せずに初期活性を維持していた。また、60℃ の場合でも、Ca^{2+} を添加すれば３時間後も 71％ の活性が残存していた。

表３－５　Ｂ２１－２株とＢ１８´株のアルカリプロテアーゼの熱安定性

酵　素	温度	Ca^{2+}	残存活性　(%)	
(菌株名)	(℃)	(mM)	1h	3h
B21-2株	50	0	2	4
		10	64	32
B18´株	50	0	90	82
		10	102	98
	60	0	38	19
		10	90	71

所定の温度で、一定時間保温後、カゼイン(pH11.5)を
基質として残存活性を測定した。

本耐熱性酵素の利用は、処理量の増大という点から工業的に有用であると考えるが、コスト計算を含めた総合的な評価は、実機を用いた実証試験を行なう必要がある。しかしながら、耐熱性酵素の酵素生産性は一般に言われているように低く(38)、本酵素の酵素生産量も、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の約 1/15 の約1,000 U/ml であり、現時点では、評価のための実証試験を行なうまでには至っていない。本酵素の商業的なレベルでの生産、あるいは工業的な利用には生産性の向上を図ることが急務であり、

今後の課題である。そのためには、各種の変異処理あるいは遺伝子操作などが有効な手段となりうるであろう。

第４節 要約

１．処理プロセスの改良・向上を目指して耐熱性のアルカリプロテアーゼの利用を試み、当該酵素の生産菌として*Bacillus* sp. B18´を分離した。本菌の生育最高温度は 62℃ であり、従来報告されている好アルカリ性菌の中では最も高い生育温度を持つ菌であった。

２．酵素はホロファイバー濃縮、硫安塩析、ＤＥＡＥ－トヨパール650M、ＣＭ－トヨパール650M により、クロマトグラフィー的、電気泳動的に均一にまで精製された。作用最適ｐＨは 12～13 であり、ｐＨ安定性は 2.5 mM Ca^{2+}存在下、40℃、１時間の保温では、ｐＨ 5.0から12.0 まで安定であった。作用最高温度（pH10.0,10 mM、Ca^{2+} 存在）は 85℃ であり、熱安定性は、10mM Ca^{2+} 存在下 pH10.0、10分間の保温では、70℃ まで安定であった。

３．分子量は、ゲル濾過によると約 28,000、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによると約30,000 であり、*Bacillu s*p. B21-2 の酵素と同じであった。Ｎ末端のアミノ酸は、グルタミンであり、Ｎ末端から20個のアミノ酸配列を比較すると、*Bacillus* sp. No.AH-101 あるいは *Thermoactinomyces* sp. HS682 の耐熱性アルカリプロテアーゼとは 95% の非常に高い相同性を示していた。

４．本酵素のゼラチン膜分解の最適ｐＨは、10.0 であった。酵素濃度とゼラチン膜分解活性の関係は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素が 16.5 mg/l 以上の酵素濃度で

は分解活性は頭打ちになるのに比べ、本酵素は 50℃、60℃ ともに、測定した 111 mg/ml までは酵素濃度にともなって増大し、111 mg/ml での分解所要時間は２分であった。このことは、本酵素の使用により、現用装置をスケールアップすることなしに、処理能力を２倍に高めることができることを示している。また、本酵素は熱安定性に優れていることから工業的な利用に有利である。

５．今後の課題としては、酵素生産性の向上を図ることにあり、変異処理あるいは遺伝子操作が有効な手段となりうるであろう。

総括と今後の展望

昨今、オゾン層の破壊、地球の温暖化・砂漠化、酸性雨、熱帯林破壊など地球規模の環境問題に関心が高まるなか、焼却あるいは埋め立てなどによる廃棄物の処理は、その急増による処理能力の限界から、危機的状況を迎えている。こうした状況のもと、その問題解決には従来の使い捨て社会や資源浪費型経済から脱して、リサイクル社会を構築する必要があるとして、1991年10月「再生資源の利用の促進に関する法律」（通称：リサイクル法）が施行された。本法によると、政令によって特定業種（再生資源を原材料として利用することを促進する業種）、第一種指定製品（使用された後に再生資源として利用されることを促進する製品）、第二種指定製品（消費者・回収業者などが分別回収する上で識別できるように表示を行なう製品）、指定副産物（工場等で発生する副産物で再生資源として利用するもの）の枠組みを作り、その枠組みに基づいて事業を所管する大臣が再利用を促進することになっている。

今回、指定された業種、指定製品は序論の図１で示したようなものであるが、プラスチックあるいは乾電池など既に問題視されている多くの製品が指定製品として取り上げられていない。また、促進だけで罰則規定がないことなどからも、本法の実効性を危惧する声がある。しかしながら、本法の施行は少なくとも廃棄物問題の危機的状況を広く認識させる契機となったことは確かであり、今後、リサイクル社会構築のためにはリサイクル促進を図るきめ細かな行政施策とともに、リサイクルを前提とした製品製造あるいはそれぞれの製品に適したリサイクル技術の開発・確立が急務であろう。

近年、医療技術の進歩あるいは社会の高度情報化により、各種の医療用フィルム、印刷製版フィルムなどの消費が急増している。写真フィルムは、その種類によって多

少異なるものの、基本的にはポリエステル（以下、ＰＥＴと略す）のフィルムベースの上に感光材である銀を含む乳剤層が塗布された構造を持つ。銀は高価であることから、使用済み医療用直接撮影Ｘ線フィルムから銀の回収が工業的に既に行なわれているが、その回収はＰＥＴを焼却することによるものであり、ＰＥＴの回収・再利用は何等考慮されていなかった。写真フィルム製造業ならびに写真フィルムは、ともにリサイクル法の中で指定業種、指定製品に上げられていないものの、昨今のプラスチックによる環境汚染問題あるいはリサイクル法成立の主旨を考えると、フィルムベースであるＰＥＴの回収、再利用は積極的に取り組まなければならない重要な技術課題であると言える。

著者はこうした社会背景から、写真フィルムから銀だけでなくＰＥＴも回収することとし、それらの回収に適した酵素を得ることを目標に酵素生産菌の検索を行なった。その結果、目的に合致する酵素を得ることができ、当該酵素を用いて写真フィルムから銀とＰＥＴの分別回収連続処理システムを開発した。また、さらに本システムの処理能力向上のため、新たに耐熱性アルカリプロテアーゼを得た。

本研究の結果は以下のように総括される。

第１章では、アルカリプロテアーゼを生産する好アルカリ性菌の分離、培養ならびに酵素の精製、性質の検討を行なった。まず、酵素生産菌の分離に先立って分離方法の検討を行ない、プロテアーゼ生産好アルカリ性菌の分離に小麦粉を含む寒天培地を考案した。この分離用寒天培地を用いて酵素生産菌を検索し、ゼラチン膜を短時間に分解できるプロテアーゼを生産する１菌株を土壌から得ることができた。本菌は同定の結果、アルカリ性培地に好んで生育する好アルカリ性の*Bacillus* 属細菌であり、B21-2 株と命名した。酵素生産性を検討したところ、魚肉エキスと大豆粉の共存が酵

素生産に有効であり、大豆粉、魚肉エキス、ブドウ糖を主原料とする培地での酵素生産は、それぞれ３％、１％、３％ の時、24～28時間の培養（300ℓ/500ℓ 容ジャーファーメンター）で 16,000 U/ml に達した。酵素の工業的な利用を考えると、酵素の性質とともに低コストでの酵素生産、安定供給が重要であり、低廉な天然培地で酵素生産性に優れた本酵素の利用は有利である。

硫安塩析、ＤＥＡＥ－セルロース、ＣＭ－セルロースを用いてのカラムクロマトグラフィーにより酵素の精製を行ない、クロマトグラフィー的、電気泳動的に単一なまでに精製した。本酵素の分子量は約 30,000 の単量体であり、280 nm における吸光係数（Ｅ1cm,1％）は 6.0 であった。アミノ酸組成ならびにＮ末端から 20個のアミノ酸配列は、既に報告されている好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼとよく似ており、特に、*Bacillus* sp. No.221 の酵素とは 70％ の相同性を示し、そして *Bacillus* sp. YaB の酵素とは全く同じ配列であった。カゼインを基質にした場合、作用最適ｐＨは 11.5、ｐＨ安定性は６～９の範囲で安定であった。作用最高温度（Ca^{2+}存在）は 60℃、熱安定性（ｐＨ10.0、10分間保温）は 50℃ まで安定であった。

第２章では、*Bacillus* sp.B21-2 から得られたアルカリプロテアーゼを用いて、ゼラチン膜分解に及ぼすｐＨ、温度、酵素活性の影響を検討した。ゼラチン膜分解の作用最適ｐＨ 10～11であった。酵素濃度とゼラチン膜分解活性の関係を、30℃～50℃、1.1～22.2 mg/ml の範囲で測定したところ、50℃ の場合 16.5 mg/ml 以上になると酵素濃度の増加にともなう活性の増大はみられず、反応は完全に頭打ちとなった。酵素を更新せずに繰り返して行なう回分処理の結果、熱安定性、および処理能力から判断すると、40℃ での処理が適していた。

回分処理の結果をもとに、アルカリプロテアーゼを用いた医療用直接撮影Ｘ線フィルムから銀とポリエステルを連続的に処理回収するシステムを考案し、実際の処理を試みた。本システムはアルカリ性溶液による前処理槽、酵素反応槽、洗浄槽の３つの槽からなり、大きさが約３ｍ×4.5ｍ×1.5ｍ高さ の小型ながら、１日約1,000 kg のフィルムの連続的処理が可能である。酵素処理の前にアルカリ性溶液による前処理がゼラチン膜分解の促進に重要であり、フィルム上のゼラチン膜は、酵素反応槽の中で約20分間の滞留中に分解され、銀とＰＥＴが分離・回収される。排水はＢＯＤで1,500～2,000 ppm と若干高いが、フィルムの洗浄に向流洗浄法を採用していることから、水の消費はフィルム 1,000kg 当り約３m^3 で済み、既存の排水処理槽での処理が可能である。また、本システムは経済性評価からも工業的レベルでの実施が可能であることが判った。

第３章では、第２章の結果から、ゼラチン膜の短時間分解には高い温度での処理が有効であることがわかったので、処理能力向上のために、耐熱性のアルカリプロテアーゼを新たに検索することにした。得られた酵素生産菌は 62℃ まで生育可能な好熱性の好アルカリ菌で、同定から*Bacillus* に属し、B18´と命名した。
ＤＥＡＥ－トヨパール650M、次いでＣＭ－トヨパール650M を用いて酵素の精製を行ない、クロマトグラフィー的、電気泳動的に均一なまで精製した。精製酵素の分子量はゲル濾過によると約 28,000、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ によると約 30,000 の単量体で、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素とほぼ同じ分子量であった。280 nm における吸光度係数は 7.1 であった。Ｎ末端から 20個のアミノ酸配列は、*Bacillus* sp. Y の BYA を除き好アルカリ性菌由来のアルカリプロテアーゼと 50% 以上の相同性を示し、特に、耐熱性のアルカリプロテアーゼである*Bacillus* sp. No. AH-101、*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素とは 95% の非常に高い相同性を示していた。

カゼインを基質とした酵素の作用最適はｐＨ 12～13 であり、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素の 10.0～11.5 より更に高く、また作用最高温度も 85℃（Ca^{2+}存在下）と *Bacillus* sp. B21-2 の酵素より 25℃ 高かった。ｐＨ安定性は５～12 の範囲で安定であり、熱安定性（ｐＨ10.0、10分間保温）は 70℃ まで安定で、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素より 20℃ 高く、熱安定性に優れていた。作用最高温度が高いアルカリプロテアーゼとしては、*Bacillus* sp. No.AH-101の酵素、*Thermoactinomyces* sp. HS682 の酵素、*Thermus aquaticus* YT-1の AqualysinⅠなどの 80℃ が報告されているが、本酵素はこれらよりさらに５℃ 高い 85℃ の作用最適温度を持っていた。

本酵素によるゼラチン膜の分解特性を調べると、作用最適ｐＨは 10.0 であり、酵素濃度とゼラチン膜分解活性の関係は、*Bacillus* sp. B21-2 の酵素が高濃度では酵素濃度にともなって増大しなくなるのに比べ、本酵素では 50℃、60℃ ともに測定した酵素濃度の範囲では酵素濃度にともなって酵素活性も増大した。このことは酵素濃度を高めることにより分解に要する時間、すなわち滞留時間の短縮が可能となることを示し、したがって本酵素を用いることにより、現用装置をスケールアップすることなく、処理能力を高めることができることがわかった。また、熱安定性も Ca^{2+} 存在下、ｐＨ10.5 で３時間保温後の活性は、98%、71% が残存することから、その使用は特に問題なく、本酵素の利用は有用であると考える。ただし、本酵素の生産性は現在のところ悪く、工業的な利用には変異処理あるいは遺伝子操作などにより酵素生産性の向上を図ることが必要であり、今後の課題である。

最後に、ＰＥＴの回収と再利用について今後の展開と問題点をまとめてみた。

ＰＥＴは、強靭で耐破砕性に富むことから、飲用ボトルを始め、食品および医薬用

容器、磁気テープ、Ｘ線フィルム、写真フィルム、印刷フィルムなどに使用され、その消費は 1987年が約 38万トン、1988年が約 41万トン、そして1989年が約 43万トンと毎年伸びている。磁気テープ、Ｘ線フィルム、製版フィルムなどの加工済みフィルムを除くＰＥＴフィルムの生産量は年間 195,000トンであり（昭和６２年度統計）、ＰＥＴ製造あるいはスリット加工に際して 50,000～60,000トンの格外品・屑が発生し、また、ＰＥＴボトル製造に際して約 2,000トンの格外品・屑が発生する。これらのうち 30,000トン強が、再生業者によって布団綿やカーペットなどに再生・利用されている。一方、ＰＥＴボトルには年間生産量の１／４の約 100,000トンが使用されるが、一般消費者に渡ったのち、大部分が一般系ゴミとして廃棄され、回収・再生に供されるＰＥＴはわずか 2,000トンである。この回収率の低さは、飲料ボトルが内容物に汚染されていることや、ボトルに付着しているＰＥＴ以外のポリエチレン製のベースキャップ、紙、フィルムに印刷されたラベル、アルミキャップなどの剥離・分別に手間がかかり、回収に採算の問題があることに起因している。

従来、写真フィルムから資源の回収・再利用は、発生場所が医療機関だけに特定でき、集荷し易いことから医療用直接撮影Ｘ線フィルムだけについて行なわれてきた。しかも回収の対象は付加価値が高い銀だけであり、昨今、問題になっているベースフィルムのＰＥＴの回収については全く行なわれていないし、回収技術についての報告もない。本研究では医療用直接撮影Ｘ線フィルムを対象に処理システムを開発したが、他の種類のフィルム、例えば非破壊検査工業用Ｘ線フィルム、間接撮影Ｘ線フィルム、映画フィルム、写真製版フィルムなども基本的に同じ構造であることから、医療用直接撮影Ｘ線フィルムと同様に処理できる。これらの写真フィルムの回収により、再利用に供されるフィルム量を試算すると次のようになる。医療用直接撮影Ｘ線フィルムには年間約 500トンの銀が消費され、この内、３／４ がリサイクルの銀である

と言われており、使用済み医療用直接撮影Ｘ線フィルムの銀含量は 1.2～1.5% であることから、回収されている医療用直接撮影Ｘ線フィルムは年間約 30,000トンと推定できる。この内、ＰＥＴは重量にして約 90% を占めることから約 27,000トンのＰＥＴが銀とともにフィルムとして回収されることになる。また、近年の情報化社会を反映して出版、印刷に使われる印刷製版フィルムの消費も増加し、ほぼ同量排出されているといわれ、この回収率を 50% と仮に見積ると、医療用直接撮影Ｘ線フィルムと印刷製版フィルムから回収されるＰＥＴの総計は約 40,000トンとなる。これは現在再生利用に供されている量に匹敵し、ＰＥＴの年間生産量の約 10% に相当する。

一方、銀回収の面から見れば、印刷製版フィルムがＰＥＴの資源として回収ルートに載ることにより、銀が新たに回収されるという副次的な効果が生じてくる。印刷製版フィルムにはＸ線フィルムの １／２ の年間 250トンの銀が消費されていたが、医療用直接撮影Ｘ線フィルムに比べ銀含量が少ないことから、採算の点から引き合わず、今まで産業廃棄物として焼却処分されていた。その回収率を上述のように50% と見積ると 125トンが写真製版フィルムから新たに回収されることになり、したがって写真製版フィルムは医療用直接撮影Ｘ線フィルムに加えて大きな銀資源となりうる。

地球環境問題の解決には従来技術ではなく、新しい技術によるブレークスルーが不可欠であると言われている。バイオテクノロジーは地球環境問題解決に期待されている新しい技術の一つであるが、本論文で述べたように、好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼの利用は、各種写真フィルムから銀とＰＥＴの分別回収を従来の方法では不可能であった工業的なレベルで実施することを可能にした有意義な研究である。また、好アルカリ性菌のアルカリプロテアーゼの研究に関しては、1971年に掘越によって*Bacillus* sp. No.221 の酵素が初めて報告されて以来、いくつかの報告があり、いずれも高いアルカリ性領域で優れたタンパク分解活性を持つにもかかわらず、洗剤へ

の応用事例しかなかった。今回、このように新しい用途が開発されたことは、好アルカリ菌のアルカリプロテアーゼの新しい用途事例の報告とともに、酵素の新しい用途拡大につながることから、意義深いと考える。

参考文献

1. 大石恭史(1984) 銀は感光材料に使用され続けるか、工業レアメタル、**83**、21.
2. 水木栄一(1990) 日経産業シリーズ「写真フィルム」、p.134、日本経済新聞社刊
3. 石恭史(1985) 写真感光材料の発展と今後の展望、化学と工業、**49**、26-30
4. 中島庸介(1978)写真工学の基礎、銀塩写真編、日本写真学会編、p.504、コロナ社刊
5. 小巻利章(1970) 油脂, **23**, 106
6. Stainby G. (1952) Nature、**169**、662
7. Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part Ⅰ. Alkaline protease produced by Bacillus No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
8. Chandransekaran S. and Dhar S.C.(1982) A rapid method to determine the ability of dirrerent bacterial cultures for the production of extracellular protease. *Leather science*, **29**, 430-435
9. Nakanishi T., Matsumura Y., Minamiura N. and Yamamoto T. (1974) purification and some properties of an alkalophilic proteinaseof a Streptomyces species. *Agric. Biol. Chem.,* **38**, 37-44
10. Nakanishi T. and Yamamoto T. (1974) Action and specificity of Streptomyces alkalophilic proteinase. *Agric. Biol. Chem.,* **38**, 2391-2397
11. Nomoto M., Lee T.C., Su C.S., Liao C.W., Yen T.M. and Yang C.P. (1984) Alkaline protease from alkalophilic bacteria of Taiwan. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1627-1628
12. Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo,T. and Ohba,

K.(1991) Purification and Properties of a Novel Surface-active Agent- and Alkaline-resistant Protease from *Bacillus* sp.Y, *Agric. Biol. Chem.* 55, 2251-2258.

13. Tsai, Y.C., Lin, S.F., Li, Y.F., Yamasaki, M. and Tamura, G.(1986) Characterization of an alkaline elastase from alkalophilic *Bacillus* YaB. *Biochem. Biophysic. Acta.* 883, 439-447.

14. 細菌蛋白分解酵素剤　ビオプラーゼ　商品説明書、ナガセ生化学工業㈱

15. Buchanan R.E. and Ibbons N.E. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore

16. Lowry O.H., Rosenbrough N.J.,Farr A.L. and Randall R.J.(1951) Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Bio. Chem.* 193, 265-275.

17. Andrews, P.(1965) The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem J.* 96, 595-606.

18. Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

19. 片岡栄子、食品酵素高分子概論（上)、p.65 (1975)、地人書館

20. Matsubara, H., Kasper, C.B., Brown, D.M. and Smith, E.L.(1965) Subtilisin BPN′. Ⅰ. Physical properties and amino acid composition. *J. Biol. Chem.* 240, 1125-1130.

21. Kasper C.B. Matsubara, H. and Smith, E.L.(1965) Subtilisin BPN′. Ⅱ. Amino- and carboxyl-terminal sequences. *J. Biol. Chem.* 240, 1131-1134.

22. Smith, E.L., Delage, R.J., Evans, W.H., Landon, M., and Markland, F.S. (1968) Subtilisin Carlsberg. Ⅴ.The complete sequence; Comparison with Subtilisin BPN′: Evolutionary relationship. *J. Biol. Chem.* 243, 2184-2191.

23. Markland, Jr.F.S. and Smith E.L. (1971) Subtilisins: Primary structur, chemical and physical properties. "The Enzymes (3rd ed.)," Vol.3, p.561-608, Academic Press, New York and London

24. 掘越弘毅、池田庸之助：特許公報　昭55－46711

25. 掘越弘毅、吉田紘一：特許公報　昭56－4236

26. 掘越弘毅、池田庸之助：特許公報　昭48－2794

27. 八木寿一郎(1974)セファロスポリウムの生産するアルカリ性プロテアーゼに関する研究、博士論文、p.23

28. White A., Handler P. and Smith E.L.: Principles of Biochemistry (4th Ed.) p.232(1968)、好学社-McGRAW-HILL.

29. 日本工業規格　JIS K0102-1986「工場排水試験方法」(

30. 大竹伝雄、解説 反応工学　(化学工学協会編)、p.143 (1959)、槙書店

31. Kreig N.R.(1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Williams & Wilkins Co., Baltimore/London

32. Takami H., Akiba, T., and Horikoshi, K.(1989) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 120-124.

33. Takami H., Akiba T. and Horikoshi K. (1990) Characterization of an alkaline protease from Bacillus sp. no AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 519-523

34. Takami H., Akiba T. and Horikoshi K. (1992) Substrate Specificity of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. no AH-101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 333-334

35. Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Sakashita, H. and Kimura T.(1992)

Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Biosci. Biotech. Biochem.* **156**, 246-250.

36. Tsuchiya, K., Sakashita, H., Nakamura, Y. and Kimura T.(1991) Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 3125-3127.

37. Matsuzawa, H., Tokugawa, K., Hamaoka, M., Taguchi, H., Terada, I., Kwon, S.T. and Ohta, T.(1988) Purification and characterization of Aqualysin Ⅰ (a thermophilic alkaline serine protease) produce by *Thermusaquaticus* YT-1. *Eur. J. Biochem.* **171**, 441-447

38. Cowan D., Daniel R. and Morgan H. (1985) Thermophilic proteases: properties and potential applications. *Trend in Biotechnology*, **3**, 68-72

本研究に関係する論文

1. Fujiwara, N. and Yamamoto, K. (1987) Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *Journal of Fermention Technology*, **65**, 345-348.

2. 藤原信明、山元和彦 (1987) 好アルカリ *Bacillus* sp. 産生アルカリプロテアーゼによるＸ線フィルムのゼラチン膜の分解　醗酵工学会誌, **65**, 531-534.

3. Fujiwara, N.,Tsumiya, T., Katada, T., Hosobuchi, T., and Yamamoto,K. (1989) Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic Enzyme. *Process Biochemistry*, **24**, 155-156 .

4. Fujiwara, N., Yamamoto, K., and Masui, A. (1991) Utilization of a Thermostable Alkaline Protease from an Alkalophilic Thermophile for the Recovery of Silver from Used X-Ray Film. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**,306-308 .

5. Fujiwara, N., Masui, A. and Imanaka T.(1993) Purification and Properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp., Journal of Biotechnology, **30**,245-256._

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学工学部 卜部 格 教授に深く感謝致します。また、本論文作成にあたりご校閲と非常に有意義なご助言を下さいました大阪大学工学部　山田靖宙 教授、吉田敏臣 教授、新名惇彦 教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、ご助言、ご助力いただきました大阪大学工学部 今中忠行 教授、大阪府立大学工学部 石川治男 教授に感謝致します。また、共同研究者である日本化学機械製造㈱技術研究開発室の細淵 毅 室長、都宮孝彦 主任研究員、堅田 努 研究員（いずれも当時）、ならびに、研究遂行にご協力いただきました大阪府立産業技術総合研究所の皆様に感謝致します。_

本研究の開始当初から終始温かい励ましとご指導をいただきました大阪大学名誉教授　岡田弘輔先生に厚く感謝致します。