

溶菌酵素活性に及ぼす界面活性剤の影響

間瀬 清美・菅原 庸*

Effect of Surfactants on Lytic Activity of Enzymes

Kiyomi MASE, Isao SUGAHARA

緒 言

現在、洗剤成分中の酵素としてタンパク質分解酵素、脂質分解酵素等が汚れを除去するために利用されている。しかし、衣服の微生物汚染に有力な酵素については、明らかでないところが多い。溶菌酵素は、微生物細胞の細胞壁、あるいは細胞表層構造に作用し最終的には、細胞を溶解する能力を持つことを特徴としている酵素である。この溶菌酵素の洗剤への利用は、除菌という点で多に利点があると考えられる。

海洋環境から分離した真菌溶解微生物 *Streptomyces* 15001株によって生産された溶菌酵素はアルカリ域で強いプロテアーゼ活性、および、溶菌活性を有することはすでに明らかになっている。洗剤用酵素の条件として、低温で高活性、速効性、pH等が要求されるが、まず、耐界面活性剤性に優れていることが必要であるため、15001株によって生産された溶菌酵素の溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響を、市販の2種の酵素と比較しながら検討した。

実 験

1. 試 料

試料については表1に示した。酵素は、*Streptomyces* 15001株によって生産された溶菌酵素(培養上澄液の脱塩、凍結乾燥品)、エスペラーゼ(タンパク質分解酵素、市販品)、サビナーゼ(タンパク質分解酵素、市販品)を用いた。反応混液中の濃度は、終濃度0.01%とした。基質としては、*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*などのグラム陽性菌、および、*Escherichia coli*, *Proteus morganii*などのグラム陰性菌を用いた。*Micrococcus luteus*については市販品を用い、その他は一日振盪培養

表1 試 料

酵素	<i>Streptomyces</i> 15001株によって生産された溶菌酵素
	エスペラーゼ
	サビナーゼ
基質	<i>Micrococcus luteus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Proteus morganii</i>
界面活性剤	S D S 10^{-2} M
	S D S 10^{-3} M
	S D S 10^{-4} M
	D B S 10^{-4} M

*三重大学生物資源学部

した後、加熱、遠心分離の菌体処理をして用いた。界面活性剤としては、S D S (ラウリル硫酸ナトリウム) を 10^{-4} ~ 10^{-2} Mの濃度で、D B S (p-n-ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム) は溶解しにくいいため 10^{-4} Mの濃度で使用した。

2. 実験方法

溶菌活性は、基質として用いた微生物細胞の濁度変化を測定した。570nmにおける濁度を経時的に測定し、30分間で初発の濁度が1%減少する値を1単位として、以下の式により算出した。実験は30℃でpH 9とpH10でおこなった。pH 9~10で実験したのは、洗剤成分としてアルカリ耐性が要求されることと15001株の溶菌酵素がpH 9で最大プロテアーゼ活性を得ていることに因る。

$$U = - \frac{O D_0 - O D_{30}}{O D_0} \times 100$$

O D₀ : 初発の濁度

O D₃₀ : 30分後の濁度

結果および考察

1. 各基質における3つの酵素の比較

① *Micrococcus luteus*

図1-1にpH 9での結果を図1-2にpH10での結果を示した。比較としてコントロールを示したが、コントロールは界面活性剤が入っていないため、それぞれの基質細胞に対しての酵素の溶菌の強度そのものを表していることになる。

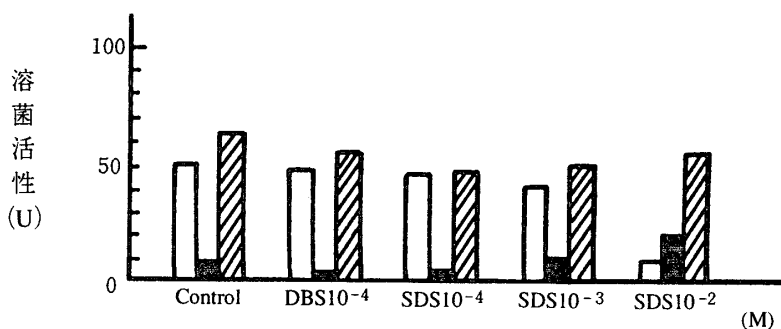


図1-1 *Micrococcus luteus* pH 9における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

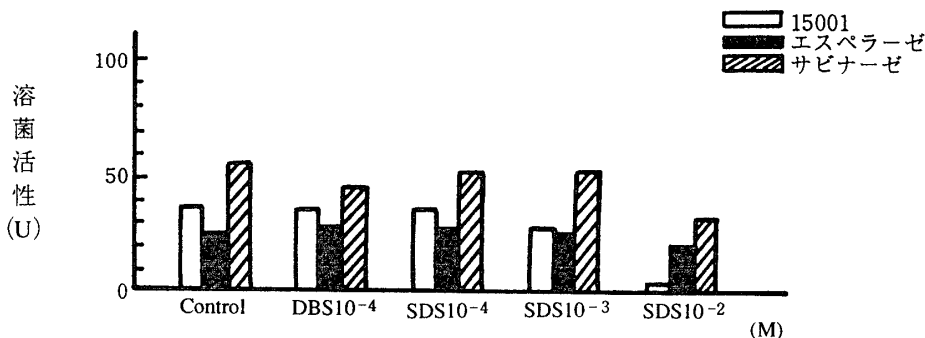


図1-2 *Micrococcus luteus* pH10における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

pH 9, pH10いずれにおいても15001株の溶菌酵素は, DBS 10^{-4} M, SDS 10^{-4} ~ 10^{-3} Mの場合, コントロールと比較して活性の阻害をほとんど受けていないが, SDS 10^{-2} Mの時, 溶菌活性は低下した. 3つの酵素を比較すると, サビナーゼ, 15001株の溶菌酵素, エスペラーゼの順に溶菌活性は高かった. エスペラーゼについては, pH 9において溶菌活性が低いが, pH10について高い値を示した.

② *Staphylococcus aureus*

図2-1にpH 9での結果を, 図2-2にpH10での結果を示した. 溶菌活性の値は高く, *Staphylococcus aureus* に対して溶菌は強かった. pH 9では, どの酵素の時も阻害を受けておらずサビナーゼ, 15001株の溶菌酵素, エスペラーゼの順に溶菌活性は高かった. pH10ではSDS濃度が高い時, エスペラーゼとサビナーゼについては活性の阻害を受けていた. 15001株の溶菌酵素はpH10よりも, pH 9で溶菌活性は高く, エスペラーゼについてはpH 9よりもpH10で溶菌活性は高かった.

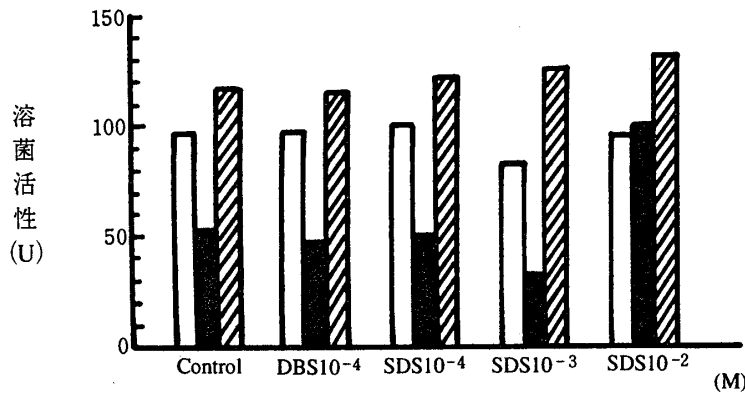


図2-1 *Staphylococcus aureus* pH 9における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

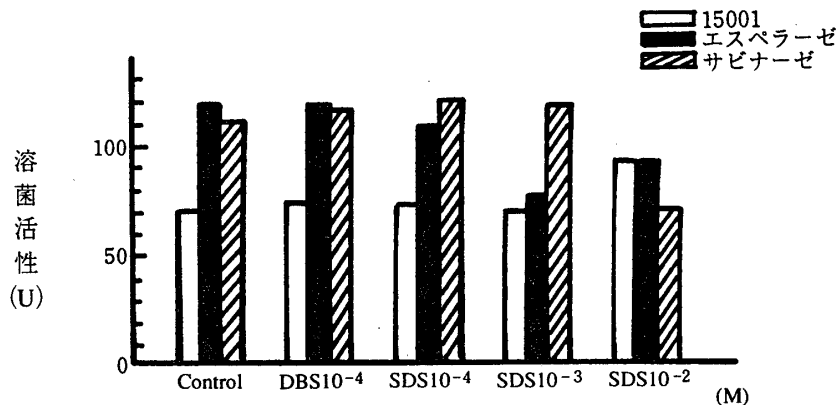


図2-2 *Staphylococcus aureus* pH10における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

③ *Bacillus subtilis*

図3-1にpH 9での結果を, 図3-2にpH10での結果を示した. *Micrococcus luteus* の場合と同様に溶菌活性の値は相対的に低い. コントロールの値をみても, 活性の値は低いので,

溶菌の強度そのものが強くなく、溶菌されにくい菌であることがわかる。15001株の溶菌酵素は pH 9, pH10いずれにおいても、濃度に比例して溶菌活性がやや低くなった。溶菌活性はサビナーゼ, 15001株の溶菌酵素, エスペラーゼの順に高かった。

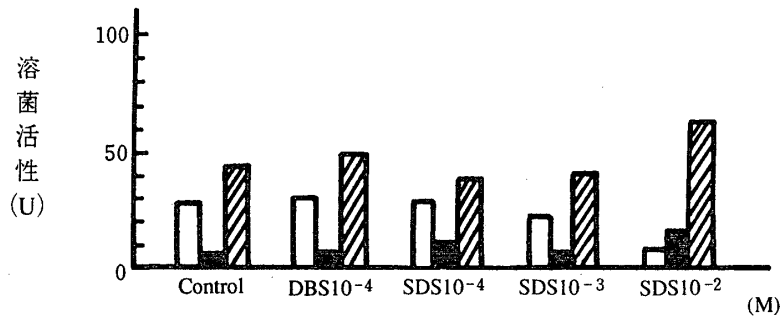


図 3-1 *Bacillus subtilis* pH 9における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

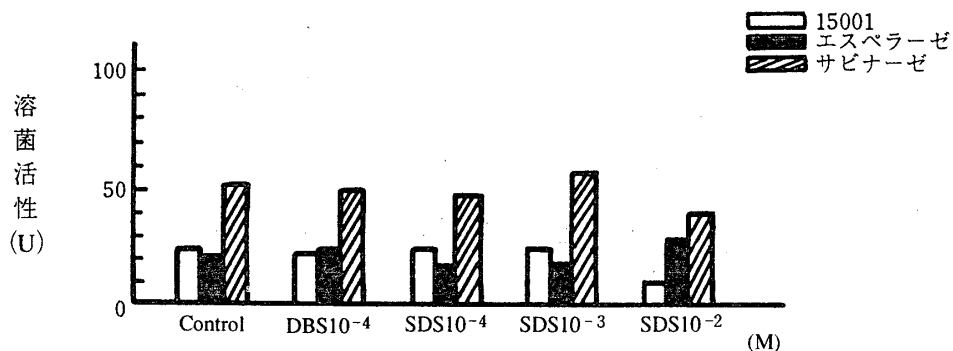


図 3-2 *Bacillus subtilis* pH10における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

④ *Escherichia coli*

図 4-1 に pH 9 での結果を、図 4-2 に pH10 での結果を示した。pH 9, pH10 いずれにおいても *Escherichia coli* に対する溶菌活性の値は高い。15001株の溶菌酵素はいずれの pH においてもサビナーゼと同等、あるいは、それ以上の溶菌活性が認められた。*Escherichia coli* の場合いずれの pH においても、また、いずれの界面活性剤においても、溶菌活性の阻害をうけることはなかった。

⑤ *Proteus morgani*

図 5-1 に pH 9 での結果を、図 5-2 に pH10 での結果を示した。15001株の溶菌酵素は pH 9, pH10, いずれの場合においても、3つの酵素の中で最も高い溶菌活性を示した。サビナーゼは pH10 よりも pH 9 において高い溶菌活性を示し、エスペラーゼは pH 9 よりも pH10 において、高い溶菌活性を示した。

2. 各酵素におけるグラム陽性菌, グラム陰性菌内での基質細胞の比較

上記の結果をもとに、それぞれの酵素に対する基質細胞の溶菌感受性を、グラム陽性菌, グラム陰性菌で比較した。

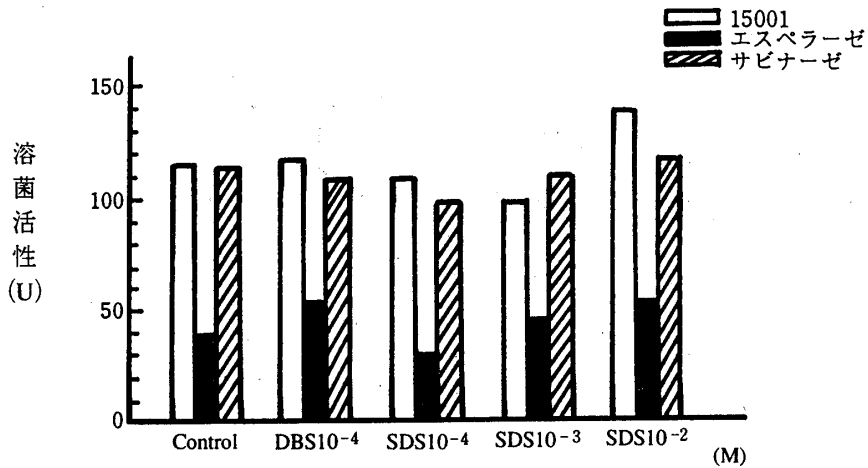


図 4 - 1 *Escherichia coli* pH 9における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

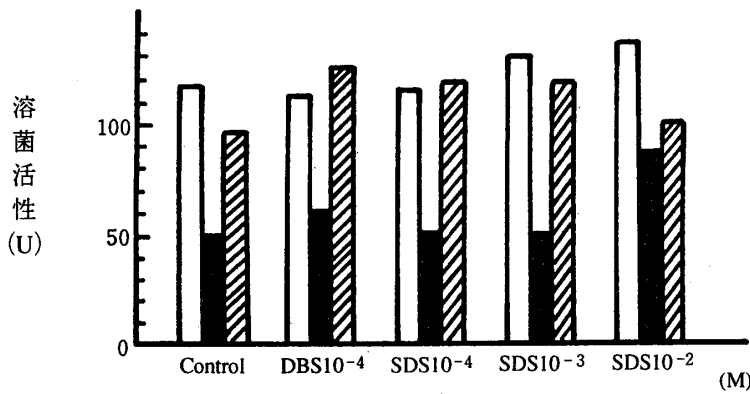


図 4 - 2 *Escherichia coli* pH10における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

①グラム陽性菌内での比較

どの酵素においても同様の結果が得られ、溶菌活性は *Staphylococcus aureus* が最も高く、*Micrococcus luteus* と *Bacillus subtilis* については同程度に低いが、*Micrococcus luteus* の方が、やや、高い値を示した。界面活性剤 $SDS 10^{-2}M$ の場合、15001株の溶菌酵素は *Micrococcus luteus* と *Bacillus subtilis* において、活性の阻害をうけた。

②グラム陰性菌での比較

*Streptomyces*150001株の溶菌酵素については、*Escherichia coli*, *Proteus morganii* に対し100～150(U) の大変高い溶菌活性があった。DBS, SDSによる阻害をうけることなく、特に $SDS 10^{-2}M$ でも阻害をほとんどうけていないことが認められた。エスペラーゼについては、2つの基質細胞ともにDBS, SDSによって阻害をうけることはなかった。*Escherichia coli* よりも *Proteus morganii* の方が高い溶菌感受性を示した。サビナーゼについては、2つの基質細胞を比較すると、エスペラーゼの場合とは逆に、*Proteus morganii* よりも *Escherichia coli* の方が、高い溶菌感受性を示していた。

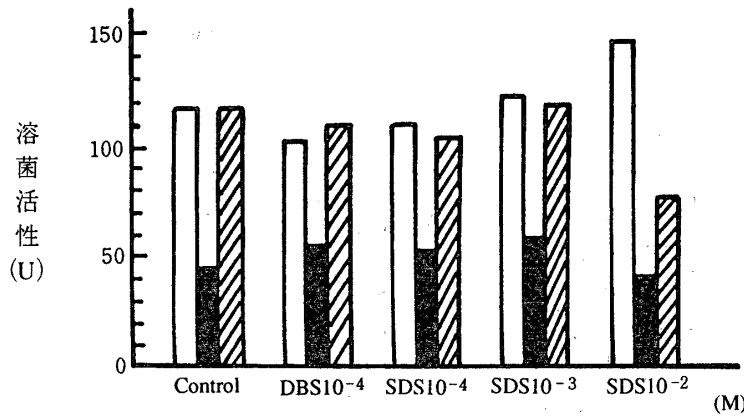


図5-1 *Proteus morganii* pH 9における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

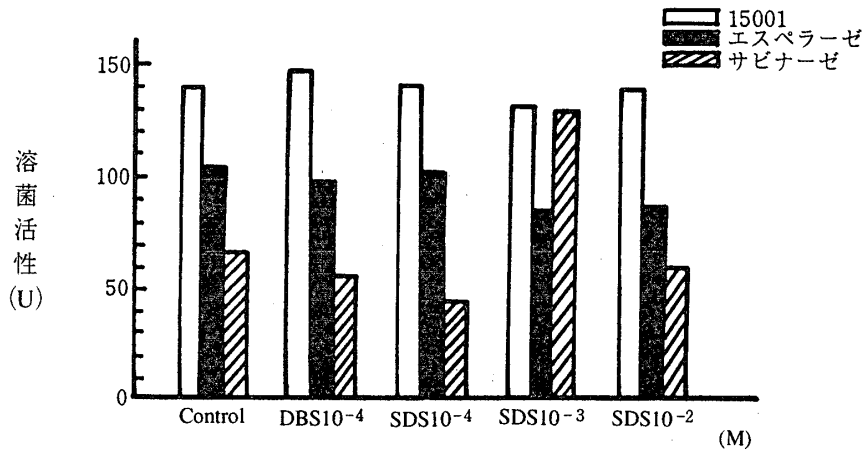


図5-2 *Proteus morganii* pH10における溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響

要 約

グラム陽性菌の中では、*Staphylococcus aureus* はこれらの酵素に対して溶菌されやすい基質細胞であり、*Bacillus subtilis* は、なかなか溶菌されにくい基質細胞である。グラム陰性菌については、*Escherichia coli*, *Proteus morganii* ともに溶菌されやすい基質細胞であった。グラム陽性菌とグラム陰性菌を比較すると同じ酵素でもグラム陰性菌の方が高い溶菌感受性が得られた。これは基質細胞の細胞壁、細胞構造等に起因するものと考えられる。

海洋環境から分離した *Streptomyces*15001株によって生産された溶菌酵素は *Escherichia coli*, *Proteus morganii* 等グラム陰性菌に対しては、エスペラーゼを上回り、サビナーゼと同等、あるいはそれ以上の高い溶菌活性を示した。界面活性剤による阻害については、グラム陽性菌の *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* を基質として SDS 10⁻²M の時、溶菌活性の値は低くなり阻害を受けたが、それ以外はほとんど阻害を受けなかった。

*Streptomyces*15001株の溶菌酵素の溶菌活性に及ぼす界面活性剤の影響を調べたが、特定の基質には界面活性剤によって阻害を受けることなく、有効な溶菌活性を得ることができた。洗剤用酵素としての利用については、さらに、洗濯条件、繊維への影響などの要因も考慮して、研究をすすめていかなければならない。

参 考 文 献

- 1) 小ノ澤治子, 小見山二郎: 日本家政学会誌, **39**, 1273~1280 (1988)
- 2) 菅原 庸: 化学と生物, **28**, 771~773 (1990)
- 3) 清水 潮: 海洋微生物とバイオテクノロジー, 184~195, 技報堂 (1991)
- 4) OWADA, K: Microbiology, **29**, 40~43 (1975)