

〔生物工学会誌 第76巻 第2号 43-50. 1998〕

羊毛クチクル分解酵素生産菌 *Bacillus cereus* NS-11 株の分離と分離菌の生産する酵素の性質

高塚 正^{1*}・濱野 米一²・松浦 明³・上甲 恭平¹
木村 和臣¹・宮本 武明⁴・荒井 基夫⁵

大阪府立産業技術総合研究所,¹ 大阪府立公衆衛生研究所,² 天野製薬㈱,³ 京都大学化学研究所,⁴ 大阪府立大学農学部⁵

¹〒594-1157 大阪府和泉市あゆみ野2-7-1

²〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69

³〒460-0003 名古屋市中区錦1-2-7

⁴〒611-0011 京都市宇治市五ヶ庄

⁵〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1

(平成9年8月13日受付 平成9年10月20日受理)

Isolation of Cuticle-Degrading *Bacillus cereus* NS-11 and Properties of the Enzyme Produced by the Bacterium

TADASHI TAKATSUKA,^{1*} YONEICHI HAMANO,² AKIRA MATSUURA,³ KYOHEI JOKO,¹ KAZUTOMI KIMURA,¹ TAKEAKI MIYAMOTO,⁴ and MOTOA ARAI⁵ (*Technology Research Institute of Osaka Prefecture, Ayumino, Izumi, Osaka 594-1157; Osaka Prefectural Institute of Public Health, Higashinari-ku, Osaka 537-0025²; Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nishiki, Naka-ku, Nagoya 460-0003³; Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011⁴; Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531⁵*) Seibutsu-kogaku 76: 43-50, 1998.

A wool cuticle-degrading bacterium was isolated from soil and identified as *Bacillus cereus* (strain NS-11). The cuticle-degrading enzyme produced by the bacterium had high activity against wool keratin rather than casein. The optimum pH of the enzyme was 8, and it was stable between pH 5 and 9. The enzyme easily hydrolyzed denatured keratin, such as that which was chemically modified, but hardly hydrolyzed native keratin. Amorphous wool keratin was hydrolyzed by the enzyme more quickly with the assistance of hydrogen peroxide, whereas hydrogen peroxide was of little assistance in the hydrolysis of pulverized wool fibers. However, in the presence of hydrogen peroxide the enzyme modified the cuticle components preferentially without damaging the inner components of the wool fibers. The enzyme produced by the isolated strain is thus expected to be effectual in the shrink proofing of wool without decreasing its tensile-strength or abrasion-resistance.

[Key words: *Bacillus cereus*, keratin degradation, wool cuticle degradation, hydrogen peroxide]

羊毛繊維には表面に鱗片状をしたクチクルがあり、洗濯を行うと繊維同士が絡まり合ってフェルト収縮する性質を有している。このフェルト収縮を防ぐ方法として、主に塩素系酸化剤および樹脂によりクチクル層を改質す

る方法が用いられている。ところが、最近の環境問題の高まりから、タンパク質分解酵素を利用した防縮加工が見直され研究開発が盛んに行われている。¹⁻³⁾しかし、実用的に満足できる成果は見いだされていない。

我々も先に既存の市販酵素を中心とした30種類の微生物起源のタンパク質分解酵素を用いて羊毛の防縮加工に

* 連絡先, Corresponding author.

試みたが、いずれの酵素も通常に作用させる限りクチクル層への作用が弱く、無理に作用させるとクチクル層よりも内部(コルテックス)層、特に細胞膜複合体(CMC)領域の非ケラチン成分が加水分解され、引っ張り強さなどの物性を保つことができないことを報告した。⁴⁾

このように、酵素単独の加工では羊毛繊維の物性低下を起こさず実用に供される防縮性能まで到達できていないのが現状である。

これまでにも、ケラチン分解を目的とした新規なケラチナーゼ⁵⁻⁷⁾およびアルカリプロテアーゼ^{8,9)}が報告されているが、いずれも人の毛髪を対象にその特性を検討したものであり、羊毛繊維の防縮性に対する効果については明らかにされていない。そこで、羊毛繊維のクチクル層に選択的に作用し、内部のコルテックス層への作用は低いという酵素が開発できれば羊毛繊維の物性低下を起こすことなく防縮加工や風合いの改良を行いうると考え、広く自然界から羊毛繊維改質の目的に合った酵素を产生する微生物を検索した。その結果、羊毛加工に有効と思われる菌株を土壤より分離することができた。この菌株の培養上清には羊毛繊維のクチクル層に作用するが内部のコルテックス層には作用しがたい性質を有するクチクル分解性酵素が認められた。本論文では、新たな利用法を目的としたクチクル分解性酵素生産菌株の分離および同定と生産される粗酵素の性質について報告する。

実験方法

羊毛粉末のケラチン基質 粉碎羊毛基質として、粉碎羊毛 IA (Wool powder IA), 粉碎羊毛 IB (Wool powder IB), 粉碎羊毛 IC (Wool powder IC), 粉碎羊毛 II (Wool powder II), 粉碎羊毛 III (Wool powder III), 粉碎羊毛 IV (Wool powder IV), コルテックス粉末 (Wool cortex) などの羊毛繊維粉碎物を、無定型水不溶性あるいは可溶性羊毛タンパク基質として、ウールケラチン¹⁰⁾ (Wool Keratin), ウールケラテイン¹¹⁾ (Wool Keratin), ウールケラトース¹¹⁾ (Wool Keratose) を用いた。さらに、他の基質としてフェザーミール (Feather keratin) およびカゼイン (casein) を用いた。なお、これら羊毛粉末などのケラチン基質の特徴および調製法については Table 1 にまとめた。

スクリーニング方法 羊牧場、養鶏場、羊毛紡績・加工場、硫黄温泉などの土壤を用い、細菌用標準寒天培地 (酵母エキス0.25%, トリプトン0.5%, グルコース0.1%, 寒天1.5%, pH 7.1) ポテトデキストロース寒天培地 (バレイショ浸出物20%, デキストロース2%, 寒天1.5%, pH 5.6) M-9a 寒天培地 (グルコース0.2%, グリセリン0.1%, 酵母エキス0.01%, リン酸二水素カリウム0.05%, 硫酸第一鉄7水和物微量, 硫酸マグネシウム7水和物0.02%, 硝酸カルシウム4水和物0.02%,

Table 1. Morphology and properties of various keratinous substrates.

Keratinous substrate	Morphology and properties
Wool powder IA	Raw pulverized wool fibers: mean width 13 μm , mean length 220 μm .
Wool powder IB	Mid-length pulverized wool fibers: mean width 13 μm , mean length 28 μm .
Wool powder IC	Fine pulverized wool fibers: mean particle size 2.7 μm .
Wool powder II	Raw pulverized wool fibers treated with 2 g/l protease N* solution (pH 8.0) for 24 h at 40°C.
Wool powder III	Raw pulverized wool fibers treated with 0.2 M mercaptoethanol solution for 2 h at 25°C.
Wool powder IV	Wool fibers treated with 8.0 M urea solution and then 2 g/l protease N solution (pH 8.0), respectively, for 24 h at 40°C, followed by pulverization using a ball mill.
Wool cortex	Cortex cells were separated from wool fibers by strong agitation in 99% formic acid, followed by hydrolysis with 2 g/l protease N solution (pH 8.0) for 2 h at 40°C.
Wool keratin	Insoluble amorphous keratin supplied by Kurashiki Bouseki Co., Ltd.
Wool keratein	Soluble protein extracted from wool fibers reduced with 0.2 M mercaptoethanol in 8 M urea solution for 8 h at 40°C.
Wool keratose	Soluble protein extracted from wool fibers oxidized with 10% peracetic acid for 5 h at 50°C.
Feather keratin [Casein]	Raw pulverized feather keratin supplied by Kikkoman Co., Ltd. Hammarsten (Merck)]

* See Table 3.

寒天2%, pH 6.5) の培地3種類それぞれに酵素処理羊毛粉末(粉碎羊毛II)0.15%を加えた寒天平板に土壤上澄み液20-50 μlを塗布または混査し、28-33°Cで培養した。ウール分解にともない生じるハローを形成したコロニーについては同様の寒天平板培地にて純粋培養し、ハロー形成能の再確認をした。分離した菌株をグルコース0.18%, 硫酸マグネシウム0.06%, イノシトール0.005%, ピリドキシン0.001%, チアミン0.001%, 粉末羊毛0.1%, リン酸緩衝液28 mM, pH 7.8に接種し、30-32°C, 4-5日間、振とう培養を行った。培養上清をセロファンチューブに入れ、5-10°Cの流水にて、8-20時間透析後、透析内液を凍結乾燥し、粗酵素を得た。粗酵素液1%の繊維に対する作用を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いてクチクル剝離、非晶域変性状況を観察した。さらにカゼインおよびケラチン分解活性を測定し、羊毛加工に有効と考えられる微生物株を選択した。

菌株同定法 文献記載¹²⁻¹⁴⁾の方法に基づき菌学的性質を調べた。

カゼイン分解活性測定法 カゼイン分解活性は以下の方法によって求めた。酵素液0.1 mlに1%カゼイン溶液0.5 mlを加え混合し、37°Cにて10分間インキュベート後、0.44 Mトリクロロ酢酸0.4 mlを加え、20分間室温にて静置後、12000 rpm, 5分間遠心分離した。上澄み0.5 mlに、0.44 M炭酸ナトリウム2.5 mlを加え、2倍希釈したFolin試薬0.5 mlを加え攪拌した。30分間室温にて放置後、波長660 nmで吸光度を測定した。なお、プランクは酵素と基質が反応する前にトリクロロ酢酸を加え、同様操作を行った。

ケラチン分解活性測定法 ケラチン分解活性はケラチン基質にウールケラチンを使用し以下の方法で求めた。酵素液0.1 mlに、1%ウールケラチン懸濁液0.5 mlを加え攪拌し、37°Cにて20分間インキュベート後、0.44 Mトリクロロ酢酸0.4 mlを加え、20分間室温にて静置後、12000 rpm, 5分間遠心分離した。上澄み0.5 mlに、上と同様にFolin試薬で発色させ、660 nmで吸光度を測定した。

至適pH 至適pHは、基質をpH緩衝液にて所定のpHに調整し、活性を37°Cにおけるケラチン分解活性測定法で求めた。

pH安定性 pH安定性は2-12の範囲の各pHにおいて酵素液を22°Cで1時間放置後の残存活性をpH 7.0, 37°Cにおけるケラチン分解活性測定法で求めた。

至適温度 30-80°Cの温度範囲内の所定温度での活性をpH 7.0におけるケラチン分解活性測定法で求め

た。

市販タンパク分解酵素のケラチン分解活性測定法

市販プロテアーゼとして天野製薬株式会社Bacillus起源のプロテアーゼN(アマノ), 科研製薬株式会社微生物起源のアクチナーゼE(試薬), 天野製薬株式会社Aspergillus起源のプロテアーゼA(アマノ)を用いた。これら酵素のケラチン分解活性は上述した方法に準じて求めた。

加酸化水素存在下での各種羊毛基質に対する活性

各種ケラチン基質に対する過酸化水素共存下での酵素活性は、酵素濃度5 mg/ml, 過酸化水素濃度2.8%, pH 8.0, 37°C, 2時間反応した後、不溶物をろ過しFolin試薬で発色・吸光度測定することによって求めた。なお、プランクとして過酸化水素単独でのケラチン基質分解性を酵素活性測定法と同様の方法で求めた。

過酸化水素濃度測定方法 過酸化水素濃度はTrinder¹⁵⁾の方法に準じて求めた。なお、発色試薬は和光純薬工業株式会社グルコースB-テストキットを使用した。

羊毛糸の酵素処理法 50 gの羊毛かせ糸を1 lのコニカルビーカーに入れ、酵素5 g/l, 松本油脂製薬株式会社アクチノールR-100 2 g/l, pH 8.0に調整した酵素溶液にて浴比1:12で処理した。処理は当初温度37°Cとし18時間振とう後、50°Cに昇温し、さらに8時間振とうする条件で行った。なお、振とう速度は200回/分、振幅25 mmとした。処理後、羊毛試料を取りだし、水洗、90°Cで失活処理を行い脱水、乾燥した。

走査型電子顕微鏡観察 酵素反応羊毛繊維試料の表面観察は、イオンスパッタリング装置JFC-1100(日本電子株式会社)により金コーティングした後、走査型電子顕微鏡JSM-T100(日本電子株式会社)を用いて加速電圧25 KV、倍率1500で行った。

実験結果および考察

クチクル分解酵素生産菌の分離 土壌500検体より一次スクリーニングの結果、基質の溶解によって生じるハロー形成能力の大きな25菌株を選択し、純粋培養を行い、すべてハロー形成能が陽性であることを確認した。統いて、純粋分離した菌株より粗酵素を調製、羊毛繊維に作用させ光学顕微鏡により観察し、クチクル細胞の剝離が見られるがフィブリル化を起こさない17菌株に絞り込んだ。そして、ケラチン分解活性値がもっとも大きく、カゼイン分解活性値の小さい1菌株を選び出し、NS-11と命名した。

分離菌株の同定 菌株同定試験の結果をTable 2に示す。得られた菌学的性質より、分離菌株NS-11は

Table 2. Characteristics of the cuticle-degrading microorganism NS-11.

Characteristic	Result
Cell	large rod 1.4-1.6 × 3.0-7.0 μm
Spores	ellipsoidal 0.9 × 1.3 μm
Stain Gram-positive at least in young cultures	+
Motile	+
Catalase	+
Oxidase	-
O-F	oxidation
Anaerobic growth	+
Degradation of glucose	+
Formation of indole	-
Lithomas milk	hydrolysis (quickly)
Reduction of 0.1% methylene blue	+
Utilization of citrate	+
Growth at MacConkey agar	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Growth at pH 5.7 nutrient broth	+
Hydrolysis of esculin	-
Egg-yolk lecithinase	+
Voges-Proskauer test	+
pH in V-P broth	5.1
Hydrolysis of urea	-
Hydrolysis of casein	+
Degradation of tyrosine	+ (slowly)
Degradation of DNase	+
Hydrolysis of tween 80	-
Hydrolysis of gelatin	+
Hydrolysis of starch	-
Deamination of phenylalanine	-
Growth temperature	12-47°C (suitable 37-41°C)
Growth at pH	4.5-10.7 (suitable 6.5-8.0)
Growth in NaCl	0-7%
Acid from (7 d)	
Glucose	+
Xylose	-
Sorbitol	-
Glycerol	+
Mannitol	-
Dulcitol	-
Arabinose	-
Lactose	-
Salicin	-

+, Positive; -, negative.

Bacillus cereus と同定された。なお NS-11 はエスクリンおよびデンプンを分解できない点で標準の *B. cereus* とは異なった。

至適 pH Fig. 1 に示すように、*Bacillus* の生産する粗酵素のウールケラチンに対する活性は pH 8 で最大で

あったが、pH 6-9 の広い範囲で活性が強かった。

pH 安定性 Fig. 2 に示すように、粗酵素は pH 5-9 の広い範囲で安定であった。

至適温度 Fig. 3 に示すように、粗酵素の至適温度は約 50°C 付近であったが、30-60°C でピーク活性の半値以上の広範囲活性を示した。

基質特異性 粗酵素の基質特異性をみるために、水溶性タンパク基質であるカゼインと水不溶性羊毛タンパク基質のウールケラチンに対する粗酵素と市販プロテアーゼの分解活性を求め、その結果を Table 3 に示す。活性は Folin 法により求めたチロシン換算値で表した。

結果として数値に差が認められるが、市販および粗酵素ともに一定重量あたりの酵素濃度が明らかでないため単純に比較することはできない。しかし、個々の酵素におけるケラチン分解活性に対するカゼイン分解活性の比をとることにより、個々の酵素の基質特異性が評価でき、粗酵素と市販酵素との比較が可能となる。Table 3 にカゼイン/ウールケラチン比活性を示したが、本酵素の比活性は市販酵素のそれと比べ明らかに小さいことがわかる。また、市販酵素の中ではプロテアーゼ A の性質が類似しているが、その比活性は本酵素の平均値の 4 倍程度であり、本酵素がより特異的であるといえる。すなわち、本酵素は一般的なタンパク質分解酵素の指標となっている水溶性タンパク質であるカゼイン分解活性は小さ

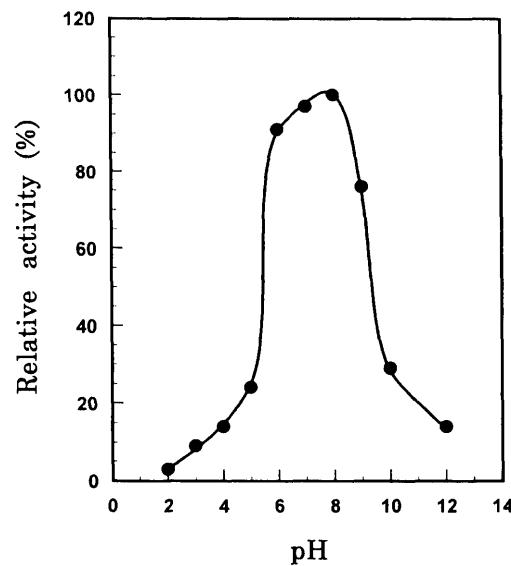


Fig. 1. Effect of pH on activity of the cuticle-degrading enzyme. Enzyme solution was incubated with 1% wool keratin (insoluble wool amorphous keratin) in different buffer solutions (0.2 M Britton-Robinson wide-range buffer) at 37°C for 20 min. Enzyme activity was determined according to the Folin method.

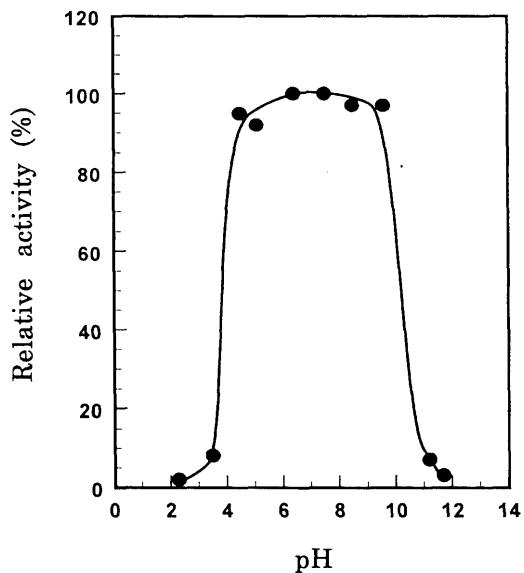


Fig. 2. Effect of pH on stability of the cuticle-degrading enzyme. Enzyme solution was incubated in buffer solutions (0.2 M Britton-Robinson wide-range buffer) of different pHs at 22°C for 1 h. The residual activity was determined at pH 7.0.

く、ウールケラチン分解活性が大きい性質を持っている。

羊毛基質構造と酵素反応性 構造の異なる羊毛繊維および羽毛由来の各種ケラチン基質に対する粗酵素と市販プロテアーゼの分解活性の比較を行い、Table 4に示した。表中の数値はそれぞれの酵素でのウールケラチン分解活性を基準とした相対活性で表した。

Table 4 から明らかなように、粉碎羊毛 IB, メルカプトエタノール処理した粉碎羊毛 III, 羊毛を尿素および酵素処理した後粉碎した粉碎羊毛 IV, コルテックス粉末およびフェザーミールのように羊毛繊維および羽毛固有の

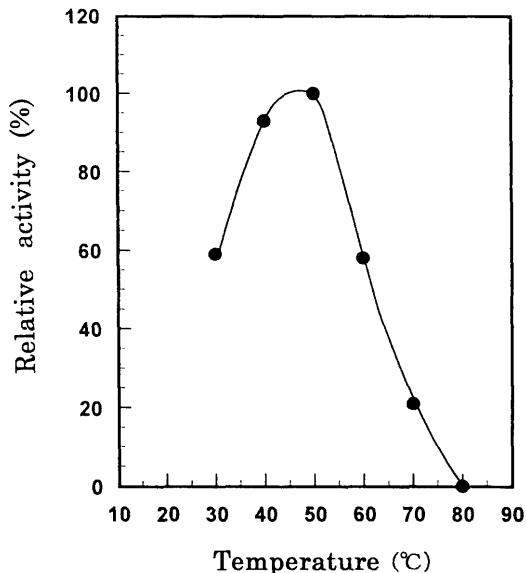


Fig. 3. Effect of temperature on activity of the cuticle-degrading enzyme. Enzyme solution was incubated with 1% insoluble wool amorphous keratin in 0.2 M Britton-Robinson wide-range buffer solution, pH 7.0, at various temperatures for 4 h. Enzyme activity was determined according to the Folin method.

高次構造を残したケラチン基質に対しては、いずれの酵素もウールケラチンの分解に比べ一部の結果を除き低い分解性を示した。さらに、プロテアーゼ N やアクチナーゼ E と本酵素の分解活性の比較から、本酵素の活性はプロテアーゼ N やアクチナーゼ E の活性の 1/5-1/10 の活性であった。この結果は、同じ水不溶性基質であってもウールケラチンは羊毛繊維固有の高次元構造が崩れ、架橋結合も弱く、膨潤しやすいことに関係していると考えられる。一方、高次構造を持たず水可溶性であるウ

Table 3. Activities of the cuticle-degrading enzyme and several commercial proteases on milk casein and wool keratin.*

Name	Source	Supplier	Activity (units/mg)		Ratio ^a (Casein/Keratin)
			Casein	Wool keratin	
Protease N	<i>Bacillus</i> sp.	Amano	2.121	0.0415	1 ^b
Protease A	<i>Aspergillus</i>	Amano	0.178	0.0398	0.088
Actinase E	<i>Bacillus</i> sp.	Kaken	2.394	0.0361	1.298
Crude enzyme					
Lot A	<i>B. cereus</i>		0.004	0.0790	0.011
Lot B	<i>B. cereus</i>		0.127	0.0838	0.030
Lot C	<i>B. cereus</i>		0.038	0.0506	0.015

* The enzyme solutions were incubated with 1% milk casein at 37°C for 10 min or with 1% suspended wool keratin at 37°C for 20 min in 0.2 M Britton-Robinson buffer solution, pH 7.0. The enzyme activities are expressed in units/mg based on the tyrosine concentration, which was determined according to the Folin method.

^a Ratio of the activity on casein to that on wool keratin for each enzyme.

^b Expressed relative to the ratio of protease N.

Table 4. Activities of the cuticle-degrading enzyme and commercial proteases on various keratinous substrates.*

Wool substrate	Relative activity		
	Crude enzyme	Protease N	Actinase E
Wool keratin (insoluble)	1	1	1
Wool keratin (soluble)	1.28	1.55	1.66
Wool keratose (soluble)	0.71	0.81	0.99
Wool powder IB	0.06	0.57	0.89
Wool powder III	0.14	0.89	1.17
Wool powder IV	0.08	0.53	0.94
Wool cortex	0.09	0.75	1.08
Feather keratin	0.07	0.47	0.49

* Enzyme solutions were incubated with 1% wool substrate at 37°C for 2 h in 0.2 M Britton-Robinson buffer solution, pH 8.0. The activities of the enzymes were determined according to the Folin method, and are expressed in values relative to the activity of each enzyme on wool keratin.

ルケラチンやウールケラトースでは、本酵素はプロテアーゼNやアクチナーゼEと同程度の大きな活性を示した。

これらのことから、本酵素は羊毛由来のタンパク質そのものに対しては高い分解活性を示すが、纖維を形成する高次構造を破壊するようには作用しない酵素であるといえる。したがって、本酵素を羊毛纖維加工に適用した場合、纖維内部の損傷を引き起こす作用は他の市販プロテアーゼに比べかなり低いものと推測される。

過酸化水素存在下での羊毛基質の分解性 羊毛纖維の酵素加工を容易にする目的として酸化処理がよく用いられている。²⁾この処理には通常塩素系酸化剤や過マンガン酸カリウムおよび硫黄系還元剤が使用されるが環境保全の点から問題がある。その点、過酸化水素は生態系での生成・代謝に登場し、分解生成物も水と酸素だけであり問題は少ないようと思われる。そこで、本酵素の羊毛纖維に対する反応促進を目的として過酸化水素の効果について検討した。

まず、構造の異なる羊毛纖維由来の不溶性ケラチン基質にどのような影響が現れるか調べた。その結果をTable 5に示す。まず、ウールケラチンに対する酵素・過酸化水素共存下の活性値は粗酵素単独および過酸化水素単独の相対活性値を加えた値よりも大きく、過酸化水素の促進剤としての効果が認められた。

一方、粉碎羊毛基質(IA, IB, IC)に対しては微粉化されたものほど酵素・過酸化水素共存下の活性は大きくなかった。これは粒子径が小さくなるほど単位質量あたりの反応表面積が大きくなるためである。しかし、この活性

Table 5. Effect of presence of hydrogen peroxide on hydrolysis of various wool substrates by the cuticle-degrading enzyme.*

Wool substrate	Relative activity		
	Enzyme only	H ₂ O ₂ only ^a	Enzyme+H ₂ O ₂
Wool keratin	1 ^b	1.20	2.76
Wool powder IA	0.13	0.42	0.52
Wool powder IB	0.24	0.52	0.66
Wool powder IC	0.36	0.82	1.23
Wool powder II	0.03	0.66	1.34

* Enzyme solutions were incubated with 1% wool substrate at 37°C for 2 h in 0.2 M Britton-Robinson buffer solution, pH 8.0. The activities of the enzymes were determined according to the Folin method.

^a The amount of protein solubilized in H₂O₂ solution was measured using the Folin method, and the enzyme activity was measured. The value obtained was identical to that expressed as the activity of the enzyme.

^b Expressed relative to the activity of the enzyme on wool keratin.

値より過酸化水素単独のそれを差し引いた値は酵素単独の活性値とほとんど変わらない。ところが、プロテアーゼNによりあらかじめ被分解成分を除去した粉碎羊毛IIに対しては、当然のことながら本酵素単独での分解性は低下したが、過酸化水素を併用すると粗酵素単独および過酸化水素単独の活性値を単純に加えた以上の値となり、明らかに本酵素による分解性が向上した。

これらのことから、羊毛纖維の高次構造を有する基質に対して、過酸化水素は無定型のウールケラチンに示したような分解促進効果を示さないが、過酸化水素と羊毛纖維が反応することにより、本酵素が反応できる部位を生成する働きをしているものと判断できる。

過酸化水素存在下での酵素の安定性 過酸化水素が羊毛纖維に反応し、本酵素の羊毛纖維への作用を容易にすることが認められたことから、まず、実際に過酸化水素共存下本酵素により羊毛纖維を処理した場合の酵素残存活性および過酸化水素濃度変化について調べた。その結果、既存のプロテアーゼは過酸化水素の酸化作用により不活化されたり、共存するカタラーゼの作用により過酸化水素を水と酸素に分解することが多いといわれているのに対し、6時間および18時間経過後でも66%以上の酵素活性が保たれており、過酸化水素も20%以下しか分解していないことがわかった。

羊毛纖維の酵素処理による表面形態変化 続いて、本酵素の羊毛纖維への作用特性を確認するため、本酵素およびプロテアーゼNを用いて処理した羊毛纖維の表面形態を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

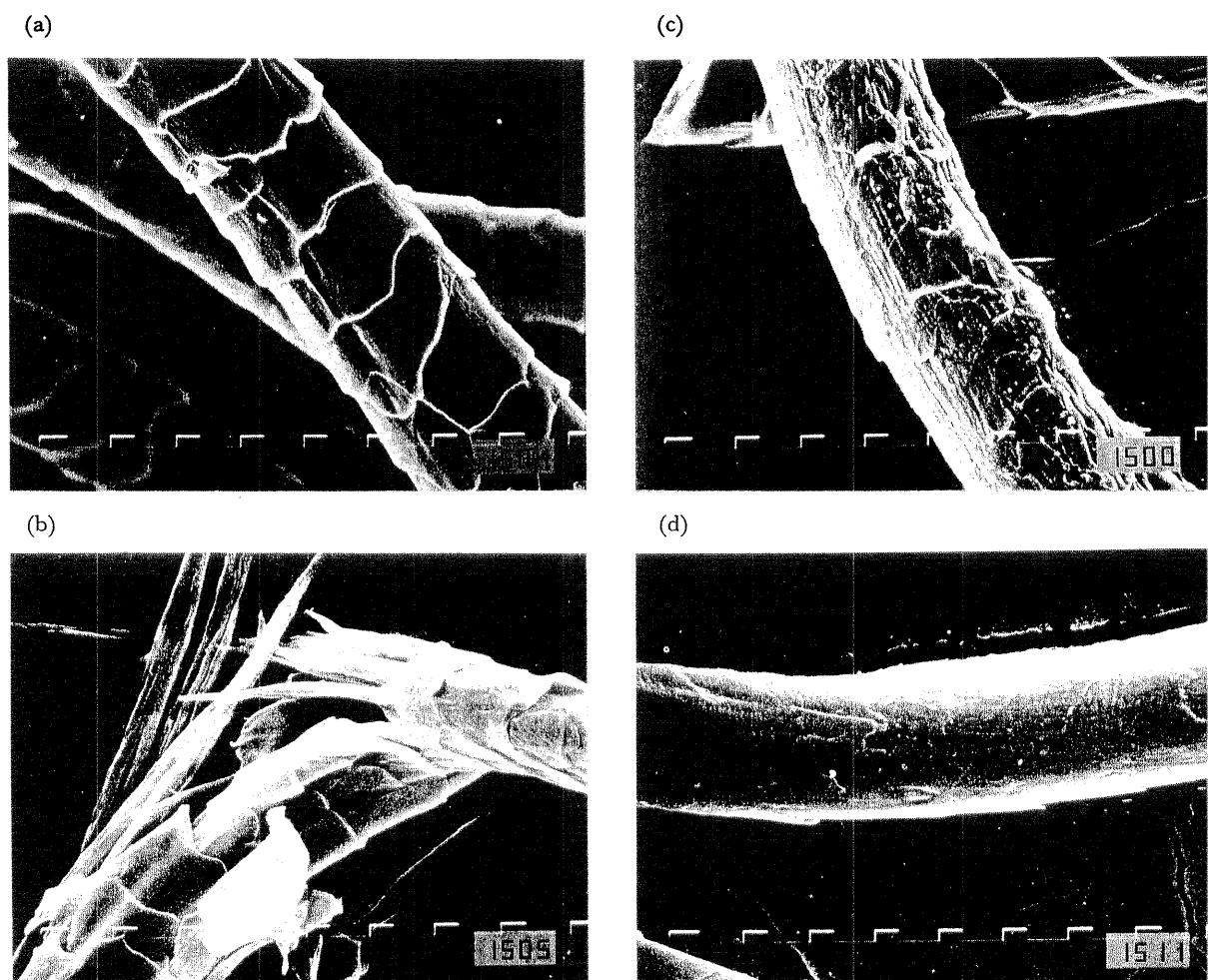


Fig. 4. Scanning electron micrographs of wool fibers treated with enzymes. Wool (10 mg/ml) was incubated with enzyme solution (5 mg/ml, 0.2 M Britton-Robinson wide-range buffer) at 37°C for 18 h and incubation was then continued at 50°C for 8 h. The wool suspension was gently shaken in a dyeing chamber during incubation. (a) Original wool; (b) wool treated with proteinase N, a commercial enzyme from *Bacillus* sp.; (c) wool treated with cuticle-degrading enzyme from *Bacillus cereus*; (d) in the presence of 2.8% H₂O₂.

Fig. 4 は未処理および酵素処理単纖維の顕微鏡写真である。まず、プロテアーゼNでは表面クチクル層の形態は保持されたまま、細胞膜複合体が分解され紡錘形のコルテックス細胞が露出しフィブリル化している様子が認められる。それに対し、本酵素ではクチクル細胞の一部が脱落し、クチクルエッジが削られている様子が観察される。さらに、本酵素と過酸化水素との併用処理ではクチクルの脱落とクチクルエッジの削除がより一層進行している様子が見とれる。しかし、本酵素により処理されたいずれの試料からもフィブリル化した纖維は見あたらなかった。

以上の結果は、本酵素を使用することにより羊毛内部の損傷を抑え纖維表層部に限定した酵素加工の可能性を示唆しており、実用的には過酸化水素との併用が有望で

あると考えられる。

要 約

羊毛クチクル分解性酵素生産菌を自然界より分離し *Bacillus cereus* と同定、NS-11株と命名した。この分離菌の生産する粗酵素の性質を調べた結果、(1) 粗酵素のpH 安定性は pH 5-9 の広い範囲にわたって安定であった。(2) 粗酵素の至適 pH は pH 8 付近であるが、pH 6-9 の広範囲に強い活性を持ち pH による影響は少なかつた。(3) 粗酵素の至適温度は約 50°C であるが、30-60°C の広い範囲で活性を示した。(4) ウールケラチンへの大きい作用に比較して、ミルクカゼインへの作用は小さかった。(5) 高次構造を保持した羊毛ケラチン基質へは作用が小さく、無定形性のケラチンへの作用は大き

かった。(6) 過酸化水素と併用すると、無定型ケラチン基質に対する酵素分解は促進されたが、羊毛繊維の高次構造を保持した粉碎羊毛基質に対しては顕著な分解促進は見られなかった。(7) しかし、本酵素処理後の羊毛表面はクチクルの一部が脱落し、クチクルエッジが削られていたがフィブリル化は見られなかった。また、過酸化水素との併用がより効果的であった。以上のことから、*B. cereus* の生産するクチクル分解酵素は羊毛繊維の表面加工、特に防縮加工に有望であることが示唆された。

文 献

- 1) 北野道雄、加藤八郎、大野 博、横山 繁：愛知県尾張繊維技術センター年報、**11**, 59-80 (1990).
- 2) Levene, R., Cohen, Y., and Barkai, D.: *J. Soc. Dyer Colour.*, **112**, 6-10 (1996).
- 3) Nolte, H., Bishop, D. P., and Hocker, H.: *J. Text Inst.*, **87 Part I**, No. 1, 212-220 (1996).
- 4) 高塚 正、上甲恭平、呼子嘉博、木村和臣：繊維加工、**48**, 501-505 (1996).
- 5) Yu, R. J., Harmon, S. R., and Blank, F.: *J. Bacteriol.*, **96**, 1435-1436 (1968).
- 6) 滝内石夫：*Jpn. J. Med. Mycol.*, **14**, 191-196 (1973).
- 7) 滝内石夫、樋口道生：日皮会誌、**87**, 305-309 (1977).
- 8) Takami, H., Akiba, T., and Horikoshi, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 120-124 (1989).
- 9) Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., and Horikoshi, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1667-1669 (1992).
- 10) Yamada, M., Narita, S., Kondo, T., Nojima, M., Yamamoto, R., Nishino, T., and Sakai, C.: U.S. Patent 5,276,138, Kurashiki Boseki Kabushiki Kaisha, Japan (1992).
- 11) 川西康博、津田守三、手塚 正、戸田 浩：天然高分子、p. 136-139, 共立出版、東京 (1984).
- 12) Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore (1986).
- 13) Smith, N. R., Gordon, R. E., and Clark, F. E.: *Aerobic Sporeforming Bacteria*, Agr. Monograph No. 16, US Dept. of Agric., Washington D.C. (1952).
- 14) Gordon, R. E., Haynes, W. C., and Pang, C. H.: *The Genus Bacillus*, Agr. Handbook No. 427, US Dept. of Agric., Washington D.C. (1973).
- 15) Trinder, P.: *J. Clin. Path.*, **22**, 158-161 (1969).