

ポリビニルアルコール分解菌の分離とその性質

Isolation and characterization of Polyvinylalcohol degrading bacterium

藤原 信明* 山元 和彦* 増井 昭彦*
Nobuaki Fujiwara Kazuhiko Yamamoto Akihiko Masui

坂井 拓夫**
Takuo Sakai

(1995年8月21日 受理)

Polyvinyl alcohol (PVA) is widely used with starch in large quantity as fiber sizing agents in textile industry because of good film forming properties and stable viscosity. Although there are some reports on PVA-degrading enzymes, the enzyme is not practically utilized to treat PVA. We have tried to find a novel bacterial enzyme which effectively degrade PVA, and isolated a suitable microorganism from soil samples for this purpose. Strain No.6 selected as a potent producer of a PVA-degrading enzyme belongs to *Alcaligenes* sp. The enzyme was purified by Toyopearl HW-55F gel chromatography and the molecular weight was about 41,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Judging from the wild strain and the cured strain obtained by the treatment of acrydine orange, the enzyme gene is encoded on the plasmid DNA, not on the chromosomal DNA, of *Alcaligenes* sp. No.6.

1. はじめに

ポリビニルアルコール (Polyvinylalcohol, 以下PVAと略す) は、接着力が強く、柔軟性に優れ、また伸度が大きいなどの優れた物理特性から繊維加工用の経糸糊剤として多量に使用されている。PVAは酢酸ビニルを原料に製造され、その物理的な性質は重合度とケン化度によって支配される。現在、重合度は500から2,000 (分子量にして2万から10万) で、ケン化度は88% (部分ケン化), 95% (中間ケン化), 99% (完全ケン化) の3種類の度合のPVAが市販されており、綿の経糸糊剤には、従来、重合度1,700で完全ケン化のPVAが用いられてきたが、最近では中間ケン化のものに代わりつつある。

PVAは合成高分子の中では比較的分解しやすいものの、化学合成高分子全般に言えるように天然高分子に比べて難分解性であり短時間で分解することはできず、したがっ

て必ずしも効率のよい排水処理が行なわれているとはいえない。酵素によるPVA分解の研究は、過去、工業技術院微生物工業研究所の鈴木ら¹⁻³⁾、大阪市立工業研究所の酒井ら⁴⁻⁹⁾、鳥取大学工学部生物応用工学科の嶋尾ら¹⁰⁻¹³⁾、大阪大学工学部環境工学科の藤田ら¹⁴⁾ によって行なわれ、それらの研究結果を総括すると、PVAは図1で示すように2段階による反応で分解されると考えられている。それらの反応に関与する酵素は、②の反応は加水分解で一致しているものの、①の反応は酸化酵素が関与する意見と脱水素酵素が関与する意見の2つに分かれている。

ここでは、効率の良いPVA分解を目指して行ったPVA分解酵素生産菌の分離結果とその菌の性質について報告する。

2. 実験材料および実験方法

(1) 材 料

重合度1,700、ケン化度99.7mol%のPVAと、重合度500、ケン化度86~90mol%のPVA (いずれも和光純薬製) を使用した。その他は市販特級の試薬を使用した。

* 材料技術部有機材料研究室

** 大阪府立大学農学部

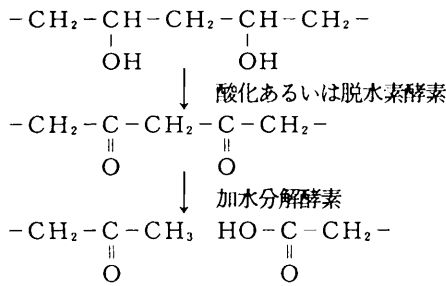


図1 酵素によるPVA分解の機構
Schemes of Enzymatic degradation of PVA.

(2) PVA分解活性の測定

PVAの分解活性は全てPVAを含む寒天平板上での呈色反応による。すなわち、栄養源を一切含まない0.1% PVA含有寒天平板上に静置したペーパーディスク（直径8 mm）に酵素液20 μ lを加え、30 $^{\circ}$ Cで所定の時間保温した後、Finleyの方法¹⁵⁾にしたがって、ヨウ素溶液（1gのH₃BO₃と16mlの0.1N-I₂を蒸留水で50mlにした）を噴霧し、PVAの分解に基づく透明なハロー形成でもって評価した。

(3) 培地

PVA分解酵素生産菌の分離のための集積培養には、0.1% PVA, 0.2% NH₄NO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.02% 酵母エキス（日本製薬製）を含む培地を用い、分解菌の分離には、集積培養の培地に寒天を1.5%になるように加えた分離用寒天培地を用いた。酵素生産にはLennox培地（1%ペプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5%NaCl）を使用した。

(4) PVA分解酵素生産菌の分離

研究室保存の土壌と新たに繊維工場で採取した土壌の約1,500試料を分離源として、30 $^{\circ}$ Cで集積培養を行なった。2回植え継いだのち培養液を希釈して分離用寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ Cで培養した。出現したコロニーをレプリアカした後、ヨウ素溶液を噴霧し、コロニー周辺が透明となったものをPVA分解菌とした。

(5) 菌の同定

分離した菌の同定は、“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1”¹⁶⁾と“微生物の分離と同定”¹⁷⁾を参考に行なった。

(6) ゲル濾過クロマトグラフィー

酵素生産菌をLennox培地で一晩培養し、遠心分離によって除菌したものを粗酵素液とした。この粗酵素液を限外濾過（分画分子量約13,000, 旭化成製）で濃縮したのち、トヨパールHW-55Fゲル（トーソー製）を用いてAndrewの方法¹⁸⁾にしたがってゲル濾過を行なった。分子量測定には標準タンパク質として、Boehringer Manheim社製のキット（bovine serum albumin (68,000), ovalbumin (45,000), chymotrypsinogen

A (25,000), cytochrome C (12,500)) を用いた。

(7) 電気泳動

Sodium dodecyl sulfateを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）は、ATTO製ラピダス・スラブ電気泳動装置AE-6200を用いて、ゲル厚1.0mm, ゲル濃度10%の条件で、Laemmliの方法¹⁹⁾にしたがって行ない、泳動終了後、Coomassie Brilliant Blue R250で染色した。酵素の分子量測定にはPharmacia社製の測定キットLMW〔phosphorylase (94,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400)]を用い、標準物質の移動度との比較から求めた。

(8) PVA分解物の分子量測定

0.5% PVA（重合度500）を浸したガラス繊維上にペーパーディスクを置き、そこに酵素溶液30 μ lを加え、30 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。その後、ハロー形成部分を蒸留水で抽出してPVA分解物の試料とし、日本分光製HPLCモデルLC-800のゲル浸透クロマトグラフ（GPC）で分子量を測定した。分子量測定にはShodex社製標準物質（P-50 (48,000), P-20 (23,700), P-5 (5,800))を用いた。HPLCの測定条件は以下の通りである。カラム；Shodex OHPak KB-803, 溶離液；蒸留水, 流速；1.0ml/min, 検出；RI

3. 実験結果および考察

(1) PVA分解酵素生産菌の分離

(A) PVA分解菌の集積培養

まず最初に、経糸糊剤として使用されている重合度1,700, ケン化度99.7mol%のPVAを用いて集積培養を行った。その結果を図2に示す。新しい培養液に10%に

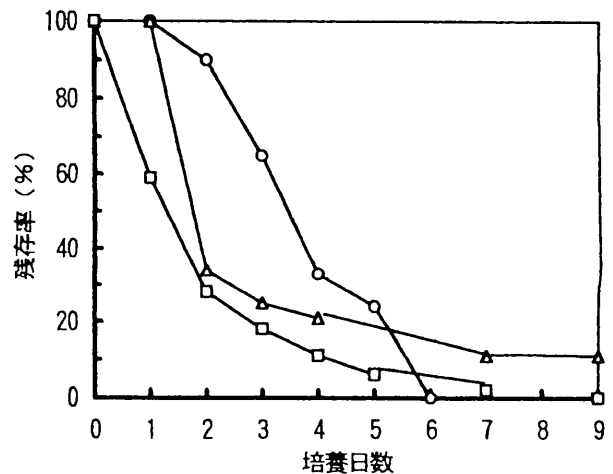


図2 PVA (n=1,700) の分解の時間変化
30 $^{\circ}$ C, ○: 植え継ぎなし; △: 植え継ぎ1回目;
□: 植え継ぎ2回目
Time courses of degradation of PVA (n=1,700).

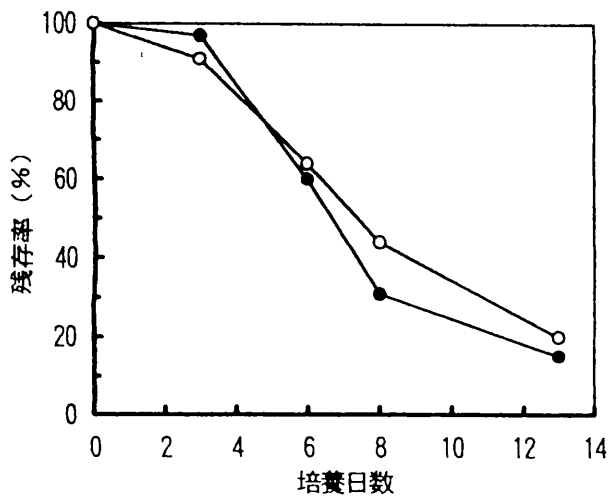


図3 PVA (n=500) の分解の時間変化
30℃, ○: 植え継ぎなし; ●: 植え継ぎ後
Time courses of degradation of PVA (n=500).

なるように培養液を植え継いで行なった培養の結果も併せて示したが、植え継ぎの回数が増すほどPVAの消失は早くなり、溶液中に残存するPVAは約1週間でほとんどなくなった。しかしながら、培養ビンのガラス壁にPVAと思われる糊状のものが付着し、しかもPVAの呈色反応を示すことから、培地中のPVAが不溶化したようである。重合度、ケン化度がいずれも高い、いわゆる結晶性の高いPVAの場合、不溶化し易くなり、見かけの分解率が上昇する可能性があることから、集積培養には重合度1,700、ケン化度99.7mol%のPVAを用いることは適切でないことが判った。したがって、以降の実験では、結晶性の低い重合度500のPVAを用いることにした。

重合度500、ケン化度99.7mol%のPVAを用いた集積培養の結果を図3に示す。PVA分解菌を植菌しない場合PVA含量は、2, 4, 7, 9日の測定ではそれぞれ101, 104, 107, 97%とほとんど変化がなく、したがってPVAは不溶化していないと考えられる。PVAの分解は、菌を新たに植え継ぐことにより若干早くなるが、約1週間が必要であった。

(B) PVA分解菌の分離

集積培養液を1,000倍に希釈後、PVA含有寒天培地に20μl塗布し、30℃で3日間培養した。出現したコロニーのうち、周辺に最も大きなハローを形成する株(No.6株)をPVA分解酵素生産菌として分離した。

(2) 菌の同定

No.6株の菌学的性質を表1に示す。既報告のPVA分解菌はいずれも*Pseudomonas*菌と同定されており、運動性、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、硝酸塩還元能は陽性であり、No.6菌株と良く似た菌学的性質を示す。しかしながら、これら菌がいずれも褐色であるのに対し本菌は無色であり、しかもグルコースを資化しないこと

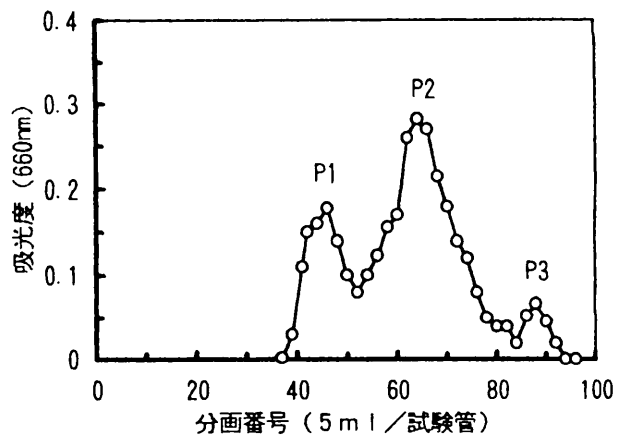


図4 培養濃縮液のゲル濾過クロマトグラム
ゲル: トヨパールHW-55F, カラム: 2.5×64cm,
0.1M NaClを含む0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) を
使用した。
Gel filtration chromatography of concentrated broth.

表1 No.6株の菌学的性質
Taxonomic characteristics of strain No.6

	No.6
形状	桿菌
大きさ (μm)	0.7×1.3~1.5
運動性	+
オキシダーゼ活性	+
カタラーゼ活性	+
OFテスト	-
硝酸塩還元能	+
脱窒反応	+
グルコース資化性	-
色素生産	-
酵素の生産	構成的

から*Alcaligenes*に属すると考えられ、したがって、本分離菌は新奇なPVA分解菌である。本菌を*Alcaligenes* sp. No.6と命名した。

(3) 酵素の部分精製

Alcaligenes sp.No.6をLennox培地で一晚培養し、遠心分離によって除菌したものを粗酵素液とした。この粗酵素液を限外濾過膜(分画分子量約1.3万、旭化成製)で濃縮したのち、トヨパールHW-55Fゲル(トソー製)でゲル濾過を行なった。図4で示すようにクロマトグラムは3つのピーク(それぞれをP1, P2, P3とする)を示し、各ピークにおけるPVA分解活性を検討したところ酵素活性を示すハロー形成はP3に認められた。酵素の分子量測定のために、この活性画分P3および分子量既知の標準タンパク質のSDS-PAGEを行ったところ、図5のように約41,000と求められた。

(4) PVA分解物の分子量測定

0.5%PVA(重合度500)の酵素分解物のHPLC-GPCクロマトグラムを図6に示す。酵素作用によって新たに生じたピーク3(H3)の分子量は図7で示すように約

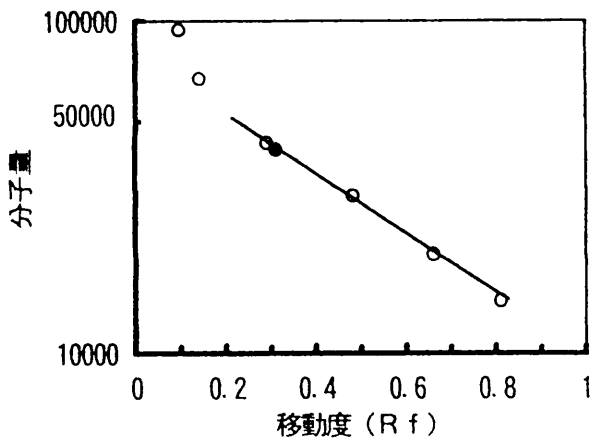


図5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による酵素の分子量測定
○：標準タンパク質，●：酵素
Molecular weight estimation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

酵素反応前

酵素反応後

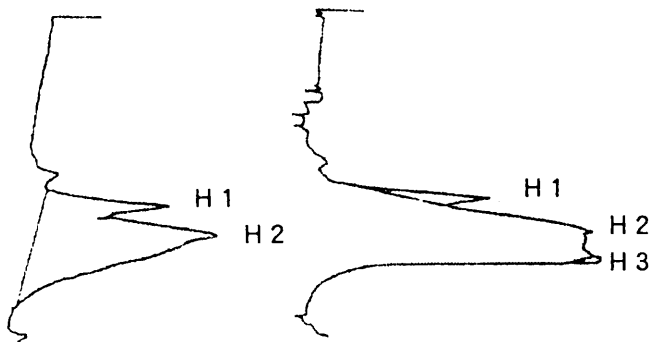


図6 PVAの酵素分解物のHPLC-GPCクロマトグラム
条件：Shodex OH pak KB-803カラム，溶媒；H₂O，流速；1.0ml/min，検出器；RI
HPLC-GPC chromatogram of enzymatic PVA-hydrolyzate.

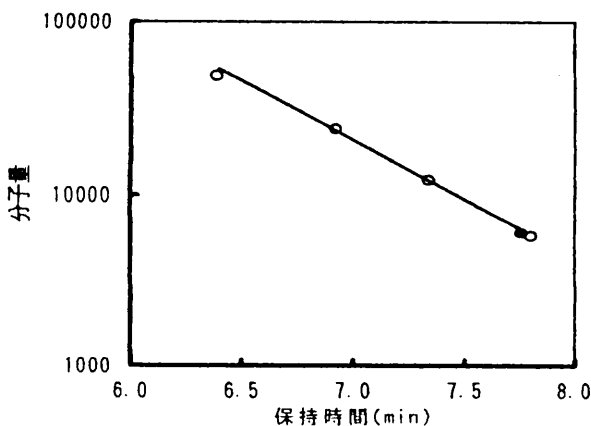


図7 HPLC-GPCクロマトによる分子量測定
○は分子量測定用標準物質，●は分解物を示す。
Molecular weight estimation by HPLC-GPC chromatography.

6,000であった。これはPVAでは重合度150に相当することから、重合度500のPVAはガラス繊維上で酵素によって分解され、約1/3の重合度150になったことを示す。これらの結果は、本PVA分解酵素はPVA分子を末端から切断するExo型の分解酵素ではなく、内部を大まかに切断するEndo型の酵素であることを示している。

4. むすび

ポリビニルアルコール (PVA) の酵素分解に関して既に報告の酵素はいずれも *Pseudomonas* sp. を起源とするのに対し、今回、得られたPVA分解酵素は *Alcaligenes* sp. を起源とする新奇的な酵素である。本酵素の分子量は約41,000であり、分解反応物の分子量測定から重合度500のPVAを1/3の重合度150に大まかに分解するEndo型の酵素である。PVAの酵素分解は、まず酸化酵素あるいは脱水素酵素によって側鎖の水酸基がカルボニル基に変わり、次いで加水分解反応によって主鎖の解裂が起こる2段階の反応を経ると言われているが、本酵素の場合、電気泳動から判断すると一つの酵素でPVAを分解できるようである。ただ、PVA溶液を用いての反応では、PVAはほとんど分解されないことから、今回の実験ではPVA含有寒天平板上でのハロー形成をもってPVAの分解活性を評価したが、溶液状態での反応と寒天プレート上での反応の違いの原因については今後、検討が必要である。

PVA分解酵素遺伝子についての研究報告は酵素に比べて少ない。酒井らはPVA分解酵素遺伝子は核染色体にコードされていると報告し²⁰⁾、細矢らはPVA分解微生物からプラスミドを分離しているが²¹⁾、プラスミドと酵素の関係については何ら言及していない。本酵素の遺伝子について検討したところ、核外遺伝子であるプラスミドにコードされていることが判った（平成5年度日本生物工学会大会にて発表）。プラスミドにコードされているPVA分解酵素遺伝子の研究報告は知られていないので、今後は精製酵素について酵素化学的あるいは物理化学的な性質の検討とともに、遺伝子工学的な面についてもさらに詳細な研究を行う予定である。

参考文献

- 1) Suzuki, T., Ichihara, Y., Yamada, M. and Tonomura, K., *Agr. Biol. Chem.*, 37, 747 (1973)
- 2) Suzuki, T., *Agr. Biol. Chem.*, 40, 497 (1976)
- 3) Suzuki, T., *Agr. Biol. Chem.*, 42, 1187 (1978)
- 4) Watanabe, Y., Morita, M., Hamada, N. and Tsujisaka, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 39, 2447 (1975)
- 5) Morita, M., Hamada, N., Sakai, K., Watanabe, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 43, 1225 (1979)

- 6) Sakai, K., Morita, M., Hamada, N. and Watanabe, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 45, 63 (1981)
- 7) Sakai, K., Hamada, N. and Watanabe, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 47, 153 (1983)
- 8) Sakai, K., Hamada, N. and Watanabe, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 49, 817 (1985)
- 9) Sakai, K., Hamada, N. and Watanabe, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 50, 989 (1986)
- 10) Sakazawa, C., Shimao, M., Taguchi, Y. and Kato, N., *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 261 (1981)
- 11) Shimao, M., Taguchi, Y., Shikata, S., Kato, N. and Sakazawa, C., *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 28 (1982)
- 12) Shimao, M., Yamamoto, H., Ninomiya, K., Kato, N., Adachi, O., Arneyama, M. and Sakazawa, C., *Agr. Biol. Chem.*, 48, 2873 (1984)
- 13) Shimao, M., Nishimura, Y., Kato, N. and Sakazawa, C., *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 8 (1985)
- 14) 橋本 奨, 藤田正憲, 下水道協会誌, 23, 44 (1986)
- 15) Finley, J. H., *Anal. Chem.*, 33, 1925 (1961)
- 16) Krieg N. R., (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins (1984)
- 17) 長谷川武治編著, 微生物の分類と同定(下) 改訂版, 学会出版センター (1985)
- 18) Andrew, P., *Biochem. J.*, 96, 595 (1965)
- 19) Laemmli U. K., *Nature*, 227, 680 (1970)
- 20) 酒井清文, 大本貴士, 大江達彦, 浜田信威, 渡辺保人, 古川謙介, 日本農芸化学会誌, 64, 390 (1990) [日本農芸化学会大会講演要旨 (p.698)]
- 21) 細矢博行, 富塚登, 鈴木智雄, 微生物工業技術研究所報告, 第58号, 33頁 (1982年)