

Bacillus coagulans の
プロテアーゼ活性による
飼料価値向上に関する研究

環境計画研究室

酒井雄平

(院進学)

Bacillus coagulans のプロテアーゼ活性による飼料価値向上に関する研究

社会開発システム工学科 環境計画研究室 酒井雄平

1. 背景・目的

高温L-乳酸発酵



生ごみ



菌体: *Bacillus coagulans*

L-乳酸
(生分解性プラスチック)

発酵残渣

高温L-乳酸発酵により発生する発酵残渣中の余剰菌体である、*B. coagulans*を有効に利用したい。

- ① *Bacillus*属はタンパク質分解活性を持つものが多い
- ② タンパク質分解による吸収率向上 (納豆など)

【タンパク質分解による吸収率向上: 納豆】
納豆菌のタンパク質分解により大豆そのままを摂取するよりもタンパク質の吸収率が高い。
*Bacillus*属もタンパク質分解特性を持つ。
*B. coagulans*を飼料に植菌し吸収率向上を狙う。



【目的】

*B. coagulans*を利用(植菌)することで、飼料価値の向上を目指す。特にタンパク質に着目して評価を行う。

2. 研究内容・フロー

分解したい物質を含む試料へ*B. coagulans*を植菌し、対象物質の濃度変化をみる

- ◎ タンパク質について、易分解化が起こるかどうか。
- ◎ 毒物として作用するタンパク質(レクチン・トリプシンインヒビター)を分解するかどうか。

① *B. coagulans*におけるプロテアーゼ活性の有無を確認

② 対象物質の測定・評価方法を確立する

③ レクチン・トリプシンインヒビターについて分解実験

④ 結果のまとめ考察

【レクチン】
【トリプシンインヒビター】

食品や飼料中に毒物として存在する。通常は加熱などにより毒性を失わせる。

タンパク質あるいは毒物の分解が起こった場合、*B. coagulans*により飼料価値が向上したと考える。

3. 結果

● *B. coagulans*のプロテアーゼ活性測定 ● 蛋白質易分解化 (SDS-PAGE)

【準備】

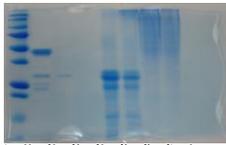
- ・サンプル: ゼラチン, カゼイン, インゲン。
- ・3種類のサンプルについて、以下の2系統を用意。
- ① 植菌しない(処理前)→冷凍
- ② 植菌する(処理後) →55℃, 3日間反応

各サンプルについてSDS-PAGEでたんぱく質の変化を確認した。処理前と処理後でたんぱく質に変化(分子量が減少)があれば*B. coagulans*にプロテアーゼ活性があることが分かる。

【結果】

レーン②(インゲン処理前)

では、分子量47, 43, 40, 32, 28, 24, 21, 16kDのタンパク質がバンドとして発現。



レーン③(インゲン処理後)

では、分子量28, 24kDのバンドのみ発現。



◎ *B. coagulans*を植菌することで、タンパク質が低分子化することを確認。

*B. coagulans*がプロテアーゼを持つことを確認できた。プロテアーゼによりタンパク質の易分解化が起こったことを確認できた。

● レクチン活性測定 (赤血球凝集活性測定)

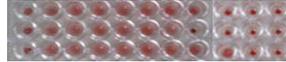
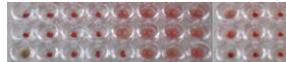
【準備】

- サンプルはインゲン豆(タンパク質豊富なため)
- 反応系, 冷凍系の2系統を用意。
- ・反応系は*B. coagulans*を植菌して55℃で3日間反応
- ・冷凍系は0℃(冷凍庫)で保存

それぞれ3日間反応させたものを遠心分離し、上澄みをサンプルとする。サンプルの準備をして、96穴マイクロタイタープレートを用いて赤血球凝集分析を行った。

【結果】

冷凍系: 4ウェル目までは活性が強すぎるため血液が紙の断片のようになっている。10ウェル目で活性がなくなった。



反応系: 紙の断片のような状態は1ウェル目までに抑えられた。8, 9ウェル目では完全に活性をなくすことができた。

【活性値】

- 冷凍系: 41000倍(10ウェル目まで凝集)
- 反応系: 20000倍(9ウェル目まで凝集)

目視、活性値による判断から、プロテアーゼによりレクチン活性が抑えられたことを確認した。

● トリプシンインヒビター活性測定 (吸光度測定)

【準備】

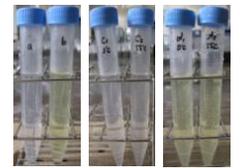
- サンプルはインゲン豆(タンパク質豊富なため)
- 反応系, 冷凍系の2系統を用意。
- ・反応系は*B. coagulans*を植菌して55℃で3日間反応
- ・冷凍系は0℃(冷凍庫)で保存

試薬ブランク(a), スタンダード(b), サンプルブランク(c), サンプル(d)の4系統用意。

サンプルとトリプシンを混和し、37℃で10分反応させBAPNA(基質)を加えて410nmで吸光度測定を行った。

【結果】

- c₁: 冷凍系ブランク
- c₂: 反応系ブランク
- d₁: 冷凍系サンプル
- d₂: 反応系サンプル



【活性値】

- 冷凍系: サンプル0.1g中に6.11mgのトリプシンインヒビターが存在する。
- 反応系: サンプル0.1g中に5.69mgのトリプシンインヒビターが存在する。

サンプル0.1g中のトリプシンインヒビター量減少から、プロテアーゼによってトリプシンインヒビター活性が抑制されたことを確認した。

4. まとめ

○プロテアーゼ活性・タンパク質易分解化
植菌前と植菌後でタンパク質の分子量減少が見られたことから*B. coagulans*がプロテアーゼを持つものと考えられる。また、プロテアーゼによりタンパク質が易分解化されたことも確認できた。

○レクチン

赤血球凝集測定における目視と活性値の判断から、プロテアーゼ活性によってレクチンが分解されたことを確認した。

○トリプシンインヒビター

サンプル0.1g中のトリプシンインヒビターの減少が見られたことからプロテアーゼ活性によりトリプシンインヒビターが分解されたことを確認した。

5. 今後の課題

○プロテアーゼ, レクチン, トリプシンインヒビターについて作用蛋白質の同定に資する実験を進める必要がある。

○飼料への活用についてはまだ考察が不十分である。家畜飼料の現状について知識を深め、飼料方面からの考察を進めていく必要がある。