

# 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

## 1. 研究背景と目的

我々は、生ごみの資源化技術として *Bacillus coagulans* を用いた高温 L-乳酸発酵を提案(赤尾ら 2006)し、検討してきた(榮 2008, 前田 2009)。しかし高温 L-乳酸発酵に限らず、エタノール発酵など、生ごみ等の固形物を多く含む原料を発酵利用する場合、投入した固形物とほぼ同量の発酵残渣(廃棄物)が発生する。これら固形物の有効利用方法を確立しない限り、食品廃棄物の資源化、循環は達成されない。本研究では、高温 L-乳酸発酵残渣中に多く存在する L-乳酸生成菌の蛋白質分解特性に着目し、同特性を飼料に対して用いることで蛋白質分解による飼料価値の向上を目指すこととした。

## 2. 研究方法

本研究ではまず、*B. coagulans* におけるプロテアーゼ活性の有無を SDS-PAGE により確認した。同時に蛋白質の易分解化も確認した。次に *B. coagulans* の持つプロテアーゼ活性を用いて、食品・飼料中に毒物として存在するレクチンの分解を試みた(山崎ら 2007)。レクチンと同じく食品・飼料中に毒物として存在するトリプシンインヒビターの分解も試みた(Clifford, S et al. 1980)。*B. coagulans* のプロテアーゼと蛋白質易分解化の確認については、サンプルにインゲン豆、カゼイン溶液、ゼラチン溶液を用いて未処理のまま冷凍したものを冷凍系、*B. coagulans* を植菌して 55°C で 3 日間反応させたものを反応系として SDS-PAGE を行った。レクチン活性測定は、SDS-PAGE と同じく、冷凍系と反応系のインゲン豆を用意して 96 穴マイクロタイタープレートを用いた赤血球凝集法により測定した。トリプシンインヒビター測定は、サンプルに冷凍系と反応系のインゲン豆を用意した。サンプルは 40 倍に希釈して測定した。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 種類を準備し、サンプルブランク(c)、サンプル(d)については 2 系統ずつ測定した。

## 3. 結果と考察

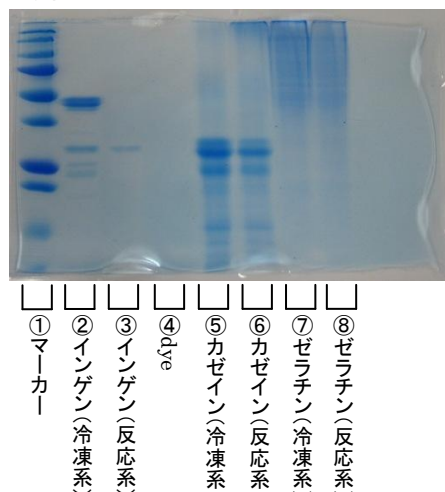


図 1 SDS-PAGE の結果

図 1 に *B. coagulans* のプロテアーゼと蛋白質易分解化の確認のために行った SDS-PAGE の結果を示す。サンプルはそれぞれ 20  $\mu$ L ずつアプライした。目視による判断としては、インゲン豆で顕著な変化が見られた。冷凍系のインゲン豆をアプライしたレーン②では数本の蛋白質バンドが発現した。反応系のインゲン豆をアプライしたレーン③ではレーン②で見られ

たバンドが消失または希薄しており、*B. coagulans* にプロテアーゼ活性があることが分かった。同時に蛋白質が分解されることも確認できた。

次にレクチン活性測定のために行った赤血球集測定の結果を図 2 に示す。冷凍系では 4, 5 ウェル目までが紙の断片ようになっており、活性が非常に強いと言える。10 ウェル目以降は血液が点のようになっており、活性を失っている。反応系では、紙の断片のような状態は 1 ウェル目までに抑えられた。冷凍系と比較すると 3, 4 ウェル分差が出た。また、反応系では 8, 9 ウェル目で活性を失っており、冷凍系と 1 ウェル分差が出た。以上の点から *B. coagulans* のプロテアーゼ活性によりレクチンが分解されたことが推察された。活性値としては冷凍系が 41000 倍、反応系が 20000 倍となった。

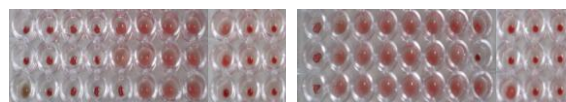


図 2 赤血球凝集測定結果(左: 冷凍系, 右: 反応系)

次にトリプシンインヒビター測定のために行った吸光度測定の結果を表 1 に示す。また図 3 にトリプシンインヒビター測定実験中の写真を示す。吸光度変化は冷凍系で 0.058, 反応系で 0.054 となった。吸光度の変化から、トリプシンインヒビター活性(TIA)を求めた。活性値はサンプル 0.1 g 中の純粋なトリプシンインヒビター量で示す。冷凍系では、サンプル 0.1 g 中に 6.11 mg のトリプシンインヒビターが存在することが分かった。反応系ではサンプル 0.1 g 中に 5.69 mg のトリプシンインヒビターが存在することが分かった。冷凍系に比べて反応系の方が低い活性値を示したことにより、*B. coagulans* のプロテアーゼによりトリプシンインヒビター活性が抑えられたことが推察された。

表 1 410nm での吸光度測定結果

試料	温度	吸光度
1 a	—	0.019
2 b	—	1.121
3 c	0°C	0.021
4 c	植菌 + 55°C	0.020
5 d	0°C	1.065
6 d	植菌 + 55°C	1.068



図 3 トリプシンインヒビター測定

## 4. 結論

SDS-PAGE にて *B. coagulans* 植菌前と植菌後のインゲンで蛋白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ことを確認した。同時に蛋白質の易分解化も確認した。レクチンは赤血球凝集測定による目視と活性値の判断から、プロテアーゼにより分解されたことが推察された。トリプシンインヒビターは吸光度測定により活性値を求めた。サンプル中のトリプシンインヒビター量が減少したことから、プロテアーゼにより分解されたことが推察された。今後は飼料への利用法を検討する必要がある。

## 参考文献

- Clifford, S et al., *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 31, pp. 341-350, 1980  
 赤尾聡史, 京都大学大学院工学研究科博士論文, pp.13-48, 106-133, 2006  
 榮祐介, 鳥取大学工学部社会開発システム工学科卒業論文, 2007  
 前田光太郎, 鳥取大学工学部社会開発システム工学科卒業論文, 2008  
 山崎信行, 八木史郎, 小田達也, 畠山智充, 小川智久:レクチン研究法, 生物化学実験法 52, 学会出版センター, 2007