

# Bacillus coagulans のプロテアーゼが 脱脂大豆中の抗栄養因子に与える影響

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-乳酸発酵を提案し、検討してきた。高温 L-乳酸発酵では目的産物である L-乳酸の生成と同時に発酵残渣が発生する。この発酵残渣中には L-乳酸生成菌である *B. coagulans* が多く存在する。同菌体が属する *Bacillus* 属は、蛋白質を分解する酵素(プロテアーゼ)を持つ。プロテアーゼは蛋白質を加水分解する酵素として、嚥下食や軟化食の調理に用いられるなど、食品または飼料の利用価値向上に用いられることが多い。本研究では、*B. coagulans* を用いた高温 L-乳酸発酵残渣中に多く存在する L-乳酸生成菌並びに、同菌体が持つと思われる蛋白質分解特性に着目し、食品、飼料利用の点から、それらの有効利用法を見出すこととした。

現在、養魚用飼料の原料である魚粉が世界的に不足しており、魚粉に代わる新たな植物原料等の開発が不可欠であると言われている。対策として脱脂大豆(大豆油粕)を原料とした植物由来の餌の開発が進められている。しかし、脱脂大豆を原料とした飼料を魚に与えたところ、魚の生育不良や腸の組織変性が引き起こされたとの報告がある。これは、脱脂大豆が持つ抗栄養因子が、魚へ悪影響を及ぼすことが原因と考えられる。これらの抗栄養因子は加熱処理、アルコール処理、発酵処理などによって低減できる。発酵処理による抗栄養因子低減の例として、大豆を原料とする江戸甘味噌の製造過程において、菌の発酵作用によって大豆主要アレルゲンの1つである  $\beta$ -コングリシニンが減少したと報告があった。この結果から、高温 L-乳酸発酵残渣中の余剰菌体を用いた発酵処理によって、大豆に含まれる抗栄養因子が低減されることが考えられる。

そこで本研究では、脱脂大豆に *B. coagulans* を作用させ、脱脂大豆に含まれる抗栄養因子であるアレルゲン(特に  $\beta$ -コングリシニン)の分解・不活性化を確認する。さらに、*B. coagulans* 由来のプロテアーゼに着目し、回収したプロテアーゼによる同物質の分解を試みる。高温 L-乳酸発酵における副産物である *B. coagulans* およびその誘導酵素の有効利用法を確立する。

## 2. 研究方法

図1に本研究の構成を示す。まず、プロテアーゼ精製のために *B. coagulans* の培養を行った。培養液について限外ろ過(分画分子量 200kDa, 20kDa)を用いてプロテアーゼの精製を行った。精製物に対してプロテアーゼ活性の有無を確認するために、カゼイン分解法でプロテアーゼ活性測定を行った。精製したプロテアーゼ

を脱脂大豆に添加して、酵素処理することにより、脱脂大豆中の抗栄養因子である  $\beta$ -コングリシニンの分解を試みた。また、菌体における分解を確認する目的で、*B. coagulans* を脱脂大豆に植菌し、 $\beta$ -コングリシニンの分解を試みた。脱脂大豆中の  $\beta$ -コングリシニンの分解は SDS-PAGE による蛋白質の変化によって確認した。

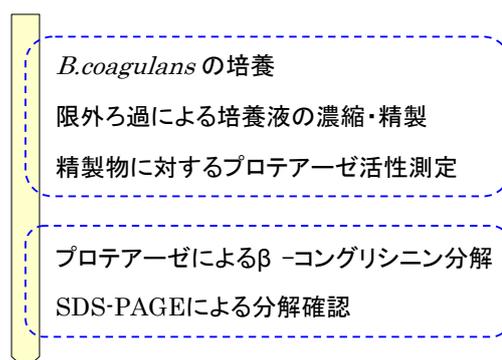


図1 本研究の構成

## 3. B. coagulans 培養結果

プロテアーゼを精製するために、脱脂大豆を蛋白源として栄養塩類( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )を添加し、糖源としてデキストリン 12g とラクトース 6g を添加した培地 300mL に、*B. coagulans* を 3mL 植菌したものを 3 系統用意した。50°C, pH6.8 の条件下で 72 時間培養を行った。72 時間後の培養液について L-乳酸測定を行ったところ、27.8g/L の L-乳酸を得た。

## 4. プロテアーゼ精製結果

*B. coagulans* の培養によって得られた培養液について限外ろ過を行うことでプロテアーゼの精製を行った。表 2 にろ過前とろ過後の液量変化と濃縮の結果を示した。ろ液の残りが 50mL 近くでろ過終了とした。これにより、培養液をろ過して得られる精製物を培養液ごとに約 50mL ずつ得ることができた。ここで得た精製物を使ってプロテアーゼ活性測定と、 $\beta$ -コングリシニンの分解確認のために脱脂大豆に作用させる実験を行った。

表 2 各培養液における液量変化と濃縮倍率

	ろ過前(ml)	ろ過後(ml)	濃縮倍率
培養液A	162	52	3.1
培養液B	164	52	3.2

## 5. プロテアーゼ活性測定結果

培養液の段階で乳酸の生成量が多い培養液 A について、プロテアーゼ活性測定を行った。酵素濃度は 20%と 50%を用いた。測定結果を表 3 に示した。活性値を得たことから、*B. coagulans* はプロテアーゼを持つと言える。

表 3 培養液 B におけるプロテアーゼ活性測定結果

酵素濃度(%)	反応系	ブランク	△A	活性値(U/ml)
20	0.280	0.018	0.262	0.131
50	0.679		0.661	0.132

## 6. プロテアーゼによるβ-コングリシニン分解実験

オートクレーブした脱脂大豆に酵素もしくは菌体を添加してβ-コングリシニンを分解させる実験を行った。コントロール、酵素による反応系、菌体による反応系の 3 系統に関してそれぞれ 3 本ずつ用意した。抽出液の蛋白量を Bradford 法により測定したところ概ね 2.5ug/uL であった。1 レーン当たりの蛋白アプライ量が 20ug となるように全てのサンプルを調整した。サンプル:dye=1:1 で混合し、サンプル処理した後、15uL ずつアプライを行った。計 9 本のサンプルについて SDS-PAGE による結果を図 3 に示す。

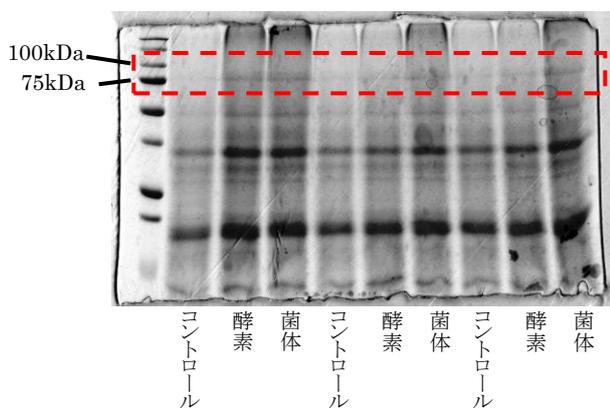


図 3 分解実験に対する SDS-PAGE の結果

図 3 より、コントロールでβ-コングリシニンのバンドが発現しなかった(図 3 破線で囲んだ部分)。コントロールでβ-コングリシニンのバンドが発現しないことは既報と異なる予想外の結果であった。そこで同じサンプルについて、オートクレーブする系としない系を設けて抽出を行い、再度 SDS-PAGE にて蛋白質の変化を観察した。結果を図 4 に示す。図 4 についてオートクレーブなしの系ではっきりとβ-コングリシニンがバンドとして発現した。オートクレーブをする系では、β-コングリシニンのバンドが発現しないと共に、全体的に色が薄く、その他の蛋白質についてもほとんど発現しなかった。以上の結果から、本研究で用いた検出方法(SDS-PAGE, CBB 染色)では、β-コングリシニンがオートクレーブ処理により、検出されなくなることを確認した。

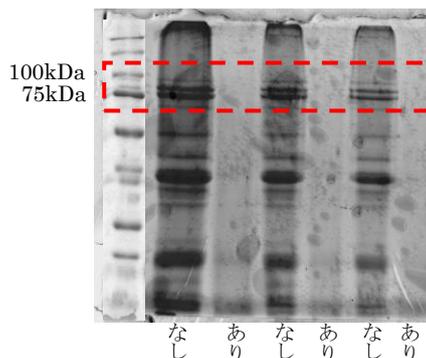


図 4 オートクレーブの有無による SDS-PAGE 結果

## 7. *B. coagulans* のプロテアーゼ利用結果

オートクレーブ処理をしない脱脂大豆に対して *B. coagulans* の植菌を行い、β-コングリシニンの分解を SDS-PAGE によって確認した。抽出液の蛋白量は Bradford 法により、4ug/uL であった。1 レーン当たりの蛋白アプライ量が 30ug となるようにサンプル調整した。サンプル:dye=1:1 で混合し、15uL ずつアプライを行った。結果を図 5 に示す。図 5 より、オートクレーブ処理なしの脱脂大豆でβ-コングリシニンがバンドとして発現した。それに対して脱脂大豆に *B. coagulans* を植菌した系では、β-コングリシニンのバンドが薄くなっていることを確認した。これは、*B. coagulans* が持つプロテアーゼによりβ-コングリシニンが分解されたと考えられる。

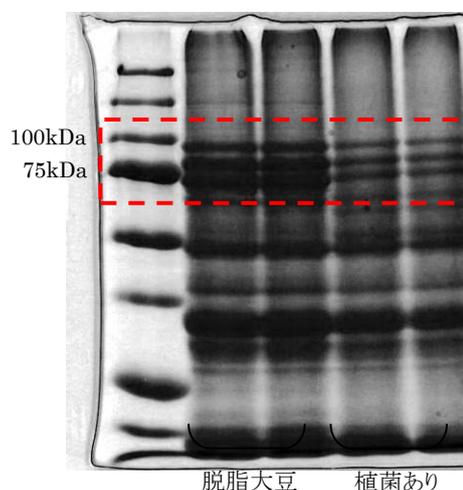


図 5 オートクレーブなしでの分解実験結果

## 8. まとめ

本研究では、高温 L-乳酸発酵残渣中に余剰菌体として存在する *B. coagulans* が持つプロテアーゼの利用法を検討した。*B. coagulans* の培養液からプロテアーゼの精製を行った。精製物に対してプロテアーゼ活性値 0.131U/mL, 0.132U/mL を得た。オートクレーブ処理を行わない脱脂大豆に対して *B. coagulans* を植菌することにより、目的物質であるβ-コングリシニンの分解・低分子化を確認した。