

組成の異なる培地における *Bacillus subtilis* の酵素生産へ及ぼすスカンジウムの影響

早瀬 伸樹 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, n.hayase@niihama-nct.ac.jp)

真鍋 優希 (新居浜工業高等専門学校 専攻科 生物応用化学専攻, c1401432@niihama.kosen-ac.jp)

中山 享 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, s.nakayama@niihama-nct.ac.jp)

Effect of scandium on production of amylase and protease by *Bacillus subtilis* in different culture media

Nobuki Hayase (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Japan)

Yuuki Manabe (Applied Chemistry and Biotechnology Program, Advanced Engineering Course, KOSEN, Niihama College, Japan)

Susumu Nakayama (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, KOSEN, Niihama College, Japan)

要約

希土類元素の一つであるスカンジウムを培地組成の異なるNG培地及びLG培地に添加した時の*Bacillus subtilis*の培養上清に分泌されるプロテアーゼ活性への影響を調べた。NG培地を使用した時には、*B. subtilis*により分泌されるプロテアーゼ活性はスカンジウムを添加しない場合と比較してスカンジウムの添加により1.42倍に向上した。一方、LG培地を使用した時には、スカンジウムの添加の効果は認められなかった。また、LG培地にスカンジウムを添加した場合のアミラーゼ活性は、スカンジウムを添加しない場合と比較して72時間後に約1.5倍に向上した。しかし、活性向上率は既に報告しているNG培地におけるアミラーゼの3.3倍の向上率と比較して低い値であり、スカンジウムの酵素生産促進は培地成分に著しく影響を受けることが示唆された。

Abstract

The effect of scandium, one of the rare earth elements, on protease activity secreted into the culture supernatant was investigated in NG and LG media. The addition of scandium improved slightly the protease activity of *Bacillus subtilis* by 1.42 times compared to that with no addition of scandium in NG medium. On the other hand, no effect of scandium addition on protease activity was observed in LG medium. Furthermore, the effect of scandium on amylase activity was investigated in LG medium. The amylase activity was increased 1.5-fold after 72 hours cultivation compared to that with no scandium. However, the value was considerably lower than the previously reported 3.3-fold value in the NG medium. It was suggested that the medium composition reduce the stimulation effect of scandium on enzyme production.

キーワード

Bacillus subtilis, 希土類元素, スカンジウム, プロテアーゼ, アミラーゼ

1. 緒言

アミラーゼはヒトをはじめとしたさまざまな生物で合成される酵素であり、デンプン中のアミロースやアミロペクチンをグルコース(単糖類)、マルトース(二糖類)、オリゴ糖などに分解する反応を触媒する(Maarel et al., 2002)。工業的用途としては、洗剤に混ぜて食品由来の汚れを落とす、水あめやアルコール飲料の製造(Mondal et al., 2022)への使用などがあげられる。一方、プロテアーゼはタンパク質がアミノ酸へ分解される反応を触媒する酵素である。工業的用途としては、洗剤に混ぜてタンパク質由来の汚れを落とす、醤油・味噌・納豆の製造への使用などがあげられる(Saeki et al., 2007; 前橋, 2015)。食品製造を含む化学産業に酵素を用いる利点としては、①非触媒反応と比較すると触媒効果により化学反応における活性化エネルギーを下げるのが可能となるため反応速度の向上を見込むことができる、②金属触媒などを使用する触媒反応と比較すると比較的穏和な条件で反応を起こすことができる、③基質特異性により副反応が起こりにくくなるために製造コストの低下を見込むことができるなどである。現在、化学産業に用いられている酵素の多くは、微生物を利用

した方法により製造されている。従って、微生物に同じ質・量の栄養源を与えた時、生産される酵素の活性がより高い方が経済的に有利となる。

著者らは、既報(早瀬他, 2023)においてスカンジウム(Sc)、ルテチウム(Lu)、ガドリニウム(Gd)の3種類の希土類元素及び同じく3価のアルミニウム(Al)を、それぞれNG培地に添加し、培養上清へ分泌されたアミラーゼの活性に及ぼす影響を調べた。その結果、NG培地に*Bacillus subtilis*を植菌して培養し、*Bacillus subtilis*の生産するアミラーゼ活性の向上に及ぼす度合いはSc (3.3倍) > Lu (2.1倍) > Gd (1.1倍)であり、スカンジウムを添加した場合にアミラーゼ活性向上の顕著な有意性が認められた。また、希土類元素は、致死的な急性毒性や環境中で強い生体影響を及ぼさないこと(鷹屋他, 2005)、発がん性および催奇形性は見出されてなく、致死的な毒性を示す可能性は考えにくいこと(篠原, 2005)が報告されており、現時点では希土類元素は生体に対して毒性を示すことは少ないと考えられる。従って、希土類元素の添加による微生物の産業用酵素生産の向上は魅力的であると言える。

本研究では、NG培地を用いた場合の培養上清に分泌されるアミラーゼ活性の向上に有意性が認められたスカンジウムに注目し、別の酵素であるプロテアーゼ活性への影響及び組成の異なるLG培地を用いた場合のアミラーゼ及びプロテアーゼの活性に与える影響を調べた。

2. 実験

2.1 試薬および器具

三塩化スカンジウム(III)六水和物($\text{ScCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)、三塩化ルテチウム(III)六水和物($\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)、三塩化ガドリニウム(III)六水和物($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)は、三津和化学薬品株式会社のものを用いた。三塩化アルミニウム(III)六水和物($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、特級試薬)、グルコース(glucose、特級試薬)、塩化ナトリウム(NaCl 、特級試薬)、リン酸水素カリウム(K_2HPO_4 、特級試薬)、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4 、特級試薬)、可溶性デンプンは、富士フィルム和光純薬株式会社のものを用いた。バクトトリプトン(bacto tryptone)はDifco社、酵母エキス(yeast extract)、肉エキス(meat extract)はナカライテスク社、ルゴール液(グラム・ハッカー染色液II)は、武藤化学株式会社のものを用いた。シャーレはアズワン株式会社のポリスチレン製滅菌シャーレ(径90 mm、高さ15 mm)を、マイクロチューブはアズワン株式会社のポリプロピレン製ナチュラル1.5mLを用いた。pH計は株式会社堀場製作所のD-51、恒温振とう槽はタイテック株式会社のパーソナル-11、紫外可視分光光度計は株式会社日立ハイテクのU-1900を用いた。

2.2 培養

大腸菌等の培養によく使用されるLB培地(Luria et al., 1957)及び主に食品や医薬品の微生物管理などの分野において用いられるNB培地へ1%の濃度でグルコースを添加した培地をLG培地及びNG培地とした。それらLG培地及びNG培地の組成を、表1及び表2に示す。それぞれの培地を300 mL容三角フラスコへ100 mLずつ分注し、そこへスカンジウム塩化物水溶液をスカンジウムの濃度がそれぞれ2、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。これら培地のpHを7.2に調整し、121 $^{\circ}\text{C}$ にて15分間滅菌した後、*Bacillus subtilis* NBRC13719を植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて110 spmで振とう培養を行った。定期的に培養液をサンプリングし、15,000 rpmで10分間遠心分離を行い、培養上清を得た。

表1：LG培地の組成

組成	濃度(%)
bacto tryptone	1.0
yeast extract	0.5
Glucose	1.0
NaCl	0.5

表2：NG培地の組成

組成	濃度(%)
bacto tryptone	1.0
meat extract	0.5
Glucose	1.0
NaCl	0.7

2.3 プロテアーゼ活性の測定方法

2-2にて得た培養上清を使用し、培養上清中へ分泌されたプロテアーゼの活性を以下の方法で測定した。50 mMリン酸緩衝液(pH7.4)に1.1%の濃度で乳由来のカゼインを溶解させたものを900 μL ずつマイクロチューブへ分注し、これを恒温ブロックバスにて37 $^{\circ}\text{C}$ で約15分間予温した。そこへ培養上清を100 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。その後、1.7 M過塩素酸溶液を1,000 μL 加え、分解されなかったタンパク質を沈澱させることで反応を停止させ、これを15,000 rpmで10分間遠心分離し、得られた上清の280 nmにおける吸光度を測定した。プロテアーゼ活性は(1)式にて定義した。ここで、 t は反応時間(min)、 $A_{280,0}$ は反応開始時の280 nmの吸光度、 A_{280} は t 分後の280 nmの吸光度である。 $A_{280,0}$ の値は培養上清へ含まれていたアミノ酸濃度を表しており、これを減ずることで30分間に生成されたアミノ酸量を算出し、さらに反応時間で除することで1分あたりのアミノ酸生成量としている。

$$\text{プロテアーゼ活性} = (A_{280} - A_{280,0}) / t \quad (1)$$

2.4 アミラーゼ活性の測定方法

前報(早瀬他, 2023)と同様の方法で測定した。50 mMリン酸緩衝液(pH6.0)に濃度0.5%で可溶性デンプンを溶解させた後、700 μL ずつマイクロチューブへ分注し、これを恒温槽にて37 $^{\circ}\text{C}$ で約15分間予温した。そこへ培養上清を50 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応0分(培養上清を加えた直後)、10分、20分、30分後に反応溶液を75 μL 採取し、これに50倍希釈したルゴール液を1,000 μL 入れ、各反応時間におけるヨウ素デンプン反応による着色を700 nmの吸光度で測定した(Fuwa, 1954)。アミラーゼ活性は、デンプン分解にともなうヨウ素デンプン反応の着色の減少により測定し、(2)式にて定義した。 t は反応時間(min)、 $A_{700,0}$ は反応開始時の700 nmの吸光度、 A_{700} は t 分後の700 nmの吸光度である。

$$\text{アミラーゼ活性} = (A_{700,0} - A_{700}) / (A_{700,0} \times t) \quad (2)$$

3. 結果及び考察

3.1 NG培地を用いた場合のプロテアーゼ活性へ及ぼすスカンジウムの影響

緒言でも述べたように、プロテアーゼはタンパク質をアミノ酸に分解する反応を触媒する酵素である。本研究で使用したタンパク質であるカゼインは、中性付近では溶解しているが酸性になると沈澱を生じる。一方、アミノ酸は酸性においても沈澱を生じず、反応液に溶解して存在する。この性質を利用することで、一定時間内にプロテアーゼによって分解されなかったカゼインを酸性下で沈澱除去することができ、分解反応によって生成された反応上清のアミノ酸量を280 nmの吸光度で測定することが可能となる。そして、一定時間におけるアミノ酸生成量を測定することによりプロテアーゼ活性を決定できる。

スカンジウムを添加したNG培地にて*Bacillus subtilis*を培養した際のプロテアーゼ活性の結果を図1に示す。いずれの培養時間においても顕著なスカンジウム添加効果は認められ

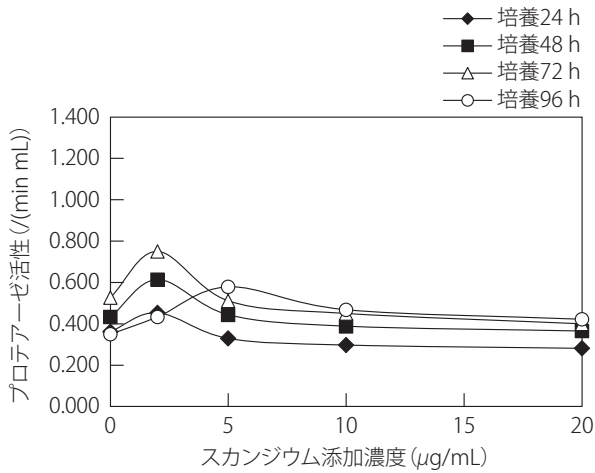


図1：NG培地の培養上清へ分泌したプロテアーゼ活性へのスカンジウムの影響

なかったが、2 μg/mLの添加において、若干のスカンジウム添加効果は確認できた。その時のプロテアーゼ活性の向上は無添加と比較して最大で1.42倍であった。また、スカンジウム濃度を5 μg/mL以上に増加させるとプロテアーゼ活性の低下が見られたが、希土類元素は弱い抗菌活性を有していることより、添加したスカンジウムによる増殖阻害効果によるものと考えられる(稲岡, 2015)。

NG培地において、スカンジウムと同じ3価の希土類元素のルテチウム及びガドリニウム、さらに同じ3価のアルミニウムを添加してプロテアーゼ活性の影響を検討したところ、ルテチウム、ガドリニウム、アルミニウムを添加した場合も上記のスカンジウムと同様に無添加と比較してプロテアーゼ活性が顕著に向上する結果は得られなかった(data not shown)。*Bacillus subtilis*のアミラーゼ活性へのスカンジウム添加の影響では、2 μg/mL添加で培養96時間にてアミラーゼ遺伝子の転写および翻訳が活性化し活性が3.3倍に向上したが(早瀬他, 2023)、図1に示したようにプロテアーゼにおいてはわずかな活性向上効果しか確認できなかった。この理由は明らかではないが、スカンジウムはすべてのタンパク質の転写、翻訳を促進しているわけではなく、タンパク質の種類によって、その生成量の向上効果は異なっている可能性が示唆された。

3.2 LG培地を用いた場合のプロテアーゼ活性へ及ぼすスカンジウムの影響

大腸菌などの一般的な細菌の培養に適したLG培地にスカンジウムを添加して *Bacillus subtilis* を培養した時のプロテアーゼ活性の結果を図2に示す。NG培地を用いて培養した場合は2 μg/mLの添加において、若干スカンジウム添加効果は確認できたが(図1)、LG培地ではいずれの培養時間においても、ほとんどスカンジウムの添加効果は認められなかった。

3.3 LG培地を用いた場合のアミラーゼ活性へ及ぼすスカンジウムの影響

NG培地を用いた場合のアミラーゼ活性へ及ぼすスカンジウムの影響を調べた前報(早瀬他, 2023)と同様に、LG培地を

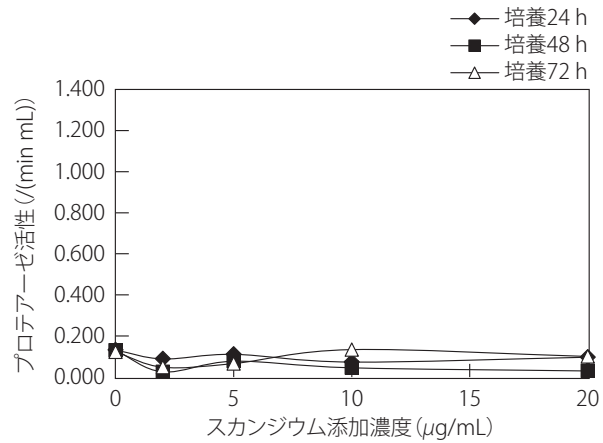


図2：LG培地の培養上清へ分泌したプロテアーゼ活性へのスカンジウムの影響

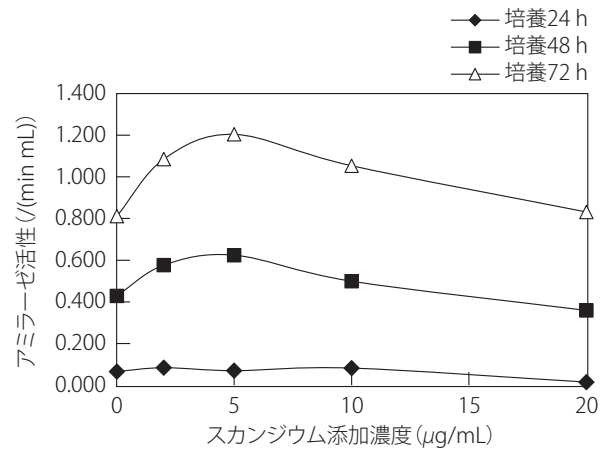


図3：LG培地の培養上清へ分泌したアミラーゼ活性へのスカンジウムの影響

用いて、培養上清に分泌されるアミラーゼ活性のスカンジウムの影響を検討した。スカンジウムを添加したLG培地にて *Bacillus subtilis* を培養した際のアミラーゼ活性の結果を図3に示す。培養24時間ではスカンジウム添加効果は認められなかったが、培養48、72時間はスカンジウムを2、5、10 μg/mL添加した場合にアミラーゼ活性の向上が認められた。無添加の場合と比較すると、培養72時間において1.5倍アミラーゼ活性が向上した。しかしながら、前報のNG培地を用いた場合の3.3倍に比べてかなり低い向上率であった。培地成分によりスカンジウム添加による酵素活性に与える影響が大きく変化する理由は明らかになっていないが、培地に含まれる種々の金属元素等の影響を受けている可能性が考えられる。例えば、アミラーゼの安定性にはカルシウムが関与しており(Khajeh et al., 2001)、プロテアーゼでは触媒機構に亜鉛が関与することが示されている(Tsuru et al., 1993)。今後、これら酵素の活性に関与する金属種と希土類元素との関係についても検討を進め、スカンジウムの酵素活性を向上する仕組みを解明することにより、酵素活性向上効果の違いについて明らかにしたい。

4. まとめ

スカンジウムをNG培地に添加し、*Bacillus subtilis*の培養上清へ分泌されたプロテアーゼ活性に及ぼす影響を調べたところ、無添加と比較して若干の活性の向上が確認された。しかし、既に報告しているNG培地におけるアミラーゼへのスカンジウム添加効果(早瀬他, 2023)と比較するとその効果は小さかった。また、同様にLG培地を用いてアミラーゼ活性へ及ぼすスカンジウムの影響を調べたところ、無添加と比較すると培養72時間において1.5倍アミラーゼ活性が向上した。しかしながら、既報(早瀬他, 2023)のNG培地を用いた場合の3.3倍に較べてかなり低い値であった。これらの結果から、スカンジウムは全ての酵素活性を促進するのではなく、またその効果は培地成分にも影響を受けることが示唆された。

引用文献

- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biotechnology*, Vol. 41, No. 5, 583-603.
- 早瀬伸樹・真鍋優希・中山享 (2023). 枯草菌のアミラーゼ生産へのスカンジウムの影響. *科学・技術研究*, Vol. 12, 47-52.
- 稲岡隆史 (2015). 枯草菌の物質生産能を向上させる方法. *食糧—その科学と技術—*, No. 53, 35-47.
- Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh H., Habibi, A. E., and Nemat-Gorgani, M. (2001). Chemical modification of bacterial α -amylases: Changes in tertiary structures and the effect of additional calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1548, 229-237.
- Luria, S. E. and Burrous, J. W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 74, 461-476.
- 前橋健二 (2015). 味噌と醤油のおいしさの化学. *化学と教育*, Vol. 63, No. 5, 252-253.
- Maarel, M. J. v. d., Veen, B. v. d., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, Vol. 94, No. 2, 137-155.
- Mondal, S., Mondal, K., Halder, S. K., Thakur, N. and Mondal, K. C. (2022). Microbial amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 45, 102509.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., and Ito S. (2007). Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 103, No. 6, 501-508.
- Shannon, R. D. and Prewitt, C. T. (1969). Effective ionic radii in oxides and fluorides. *Acta Crystallographica Section B*, Vol. 25, 925-946.
- 篠原厚子 (2005). 希土類化合物の生体影響—ヒトおよび実験動物に関する知見—. *希土類*, No. 47, 57-64.
- 鷹屋光俊・戸谷忠雄・高田礼子・小滝規子・吉田勝美・神山宣彦 (2005). 希土類酸化物の生体影響. *Journal of Aerosol*

Research, Japan, Vol. 20, No. 3, 207-212.

Tsuru, D., Imajo, S., Morikawa S., Yoshimoto, T., and Ishiguro, M. (1993). Zinc protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*: Construction of a three-dimensional model and comparison with thermolysin. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 113, 101-105.

(受稿：2023年9月19日 受理：2023年10月10日)