

# 好熱性細菌 *Bacillus Stearothermophilus* YG 185の増殖及び 酵素生産特性に及ぼす温度及び培地組成の影響

上村 芳三・平野 敦史・甲斐 建一\*・幡手 泰雄  
(受理 平成4年5月31日)

## Effects of Temperature and Culture Medium on Growth of *Bacillus Stearothermophilus* YG 185 and Its Protease Production

Yoshimitsu UEMURA, Atsushi HIRANO, Ken-ichi KAI, and Yasuo HATATE

*Bacillus stearothermophilus* YG 185, which produces a highly thermostable neutral protease, was cultivated on a rotary shaker to establish the production process of the protease. The effects of culture conditions (temperature and culture medium) on the growth and protease production of the strain YG 185 were investigated. At 50°C, WSG medium (wheat flour, soybean meal, glucose, casein and some minerals) gave the best protease activity among all culture media tested. Soybean meal in the WSG medium, which is a solid natural protein, may controll-release aminoacids, and caused higher protease production. The replacement of soybean meal by Soytone (a digest of soybean) caused a substantial decrease of the protease activity. A partwise addition rather than a one-shot addition gave a higher protease activity, comparable to that of the ordinary WSG medium.

### 緒 言

好熱性細菌(好熱菌)とは、55°C以上の高温下で生息可能な微生物の一群を意味し、自然界では主に温泉、火山周辺地域などに分布するが、特に孢子を形成する *Bacillus* 属は堆肥、海洋、河川、土壌など幅広い地域から分離することができる。一般に好熱菌の酵素あるいは核酸などの生体高分子や細胞器官は常温菌のものよりも耐熱性が高いため、高温の条件下で行われる発酵工業や廃棄物処理への利用が検討されている。また、好熱菌の生産する耐熱性酵素は熱に対して安定であるだけでなく、有機溶媒や化学的変性剤(尿素や表面活性剤など)に対しても安定であるため、各種食品加工用、洗剤添加用などの化学工業の分野や、医療用試薬などの医学の分野等、幅広い分野での利用が期待されている。

本研究では、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* YG 185を用いた耐熱性プロテアーゼ生産プロセスの

最適化及びその利用プロセスに関する研究の基礎段階として、フラスコ振盪培養実験を行い、好熱菌 YG185株の増殖及び酵素生産特性について検討した。

培地は、窒素源としてミルクカゼインタンパク質を加水分解したトリプトンを主成分とする L 培地及び脱脂大豆、カゼインといった天然タンパク質を主成分とする WSG 培地を基本とした。これらの培地の組成を部分的に変えることにより、以下の項目についてそれぞれ増殖及び酵素生産特性の検討を行った。

- 1) 培養温度の影響 (L 培地, WSG 培地)
- 2) 窒素源の種類の影響 (L 培地基本)
- 3) 脱脂大豆の効果 (WSG 培地基本)
- 4) 窒素源の分割添加の効果及び分割回数の影響 (L 培地, WSG 培地基本)
- 5) ロータリーシェーカー回転数の影響 (WSG 培地)

## 1. 実験

### 1.1 菌株

本研究で用いた好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* YG 185は、自然界の土壌より分離した、耐熱性プロテアーゼを生産する好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* MK232を変異させることにより、アミノ酸抑制を弱め、アンモニア耐性を強めたものである<sup>2)</sup>。

### 1.2 培地

培地はL培地、WSG培地及びそれらを基本とし、成分に一部変更を加えた培地を用いた。コロニー計数にはLC寒天培地を用いた。表1、2及び3にL培地、LC寒天培地及びWSG培地の組成を示す。

表1 L培地(蒸留水11に対し)

トリプトン	10 g
酵母エキス	5 g
NaCl	5 g
(NaOHでpH 7.0に調整)	

表2 LC寒天培地(蒸留水11に対し)

トリプトン	10 g
酵母エキス	5 g
NaCl	5 g
カゼイン	10 g
寒天	20 g

表3 WSG培地(蒸留水11に対し)

薄力小麦粉	30 g
脱脂大豆	15 g
グルコース	10 g
カゼイン	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g
(NaOHでpH 7.5に調整)	

### 1.3 培養実験

培養実験は、試験管による前々培養及び前培養とそれに続くフラスコ培養により行った。試験管による前々培養及び前培養は、L培地5mlを使用して振盪恒温槽中(150 rpm) 50℃で各々10及び9時間行った。前々培養においては、スラントから1白金耳接種し、前培養においては、前々培養液を0.1ml接種した。

フラスコ培養実験には、容量500mlのバツフル付き三角フラスコを使用し、100mlの培地中に前培養液1mlを接種して開始した。所定温度に保ったロータリー

シューカー中、143 rpmで24~40時間培養を行った。サンプリング時には、培養液のOD<sub>660</sub>(660 nmにおける吸光度)及び培地上清のpH、酵素活性を測定した。フラスコ培養実験にはL培地及びWSG培地を使用した。またそれらの培地を基本とし、成分及び添加時期に一部変更を加えた培地も用いた。

### 1.4 分析

サンプリング時には、培養液の菌体密度及び培養液上清の酵素活性とpHを測定した。

#### 1.4.1 菌体密度

OD<sub>660</sub> 試料液を生理食塩水で10倍に希釈し、分光光度計により660 nmにおける濁度(吸光度)を測定した。

コロニー計数法 OD<sub>660</sub>の測定困難な培地(WSG培地等)については、適当に希釈した試料液を塗抹したLC寒天培地プレート上に生成したコロニー数を数えることにより算出した。サンプリングした培養液を、プレート1枚につきコロニー数が100個程度になるようにトリトンX-100を1%添加した滅菌生理食塩水で適当に希釈(本実験では10倍~10<sup>7</sup>倍)した。1つのサンプルにつき3段階の希釈液をつくり、各希釈について2~3枚のプレートをつくった。

#### 1.4.2 酵素活性

培養液上清(15000 rpmで5 min遠心分離)の希釈試料とハマルステン氏法カゼインとのタンパク質分解反応による遊離チロシン量を、チロシン溶液を基準としたOD<sub>275</sub>(275 nmにおける吸光度)の検量線より決定した。

酵素活性の単位である1U(ユニット)は、37℃で1分間に1μgのチロシンを遊離させる酵素(プロテアーゼ)量である。

## 2. 結果及び考察

### 2.1 培養温度の影響

図1及び2にL培地についての増殖及び酵素生産特性を、図3及び4にWSG培地についての増殖及び酵素生産特性を示す。培養温度40℃、50℃、60℃の3つの場合について検討を行った。図5には培養温度50℃におけるL培地及びWSG培地を使用した場合の培養液pHの経時変化を示す。対数期の増殖速度は、L及びWSG培地ともに温度が高くなるほど大きくな

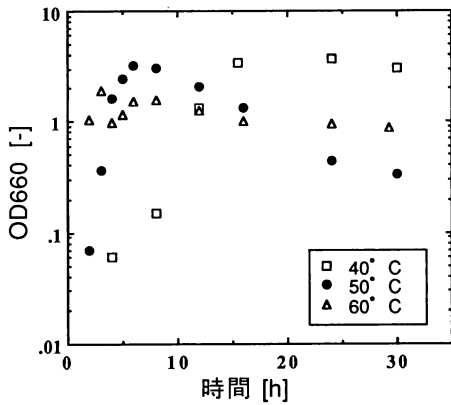


図1 増殖に及ぼす培養温度の影響 (L 培地)

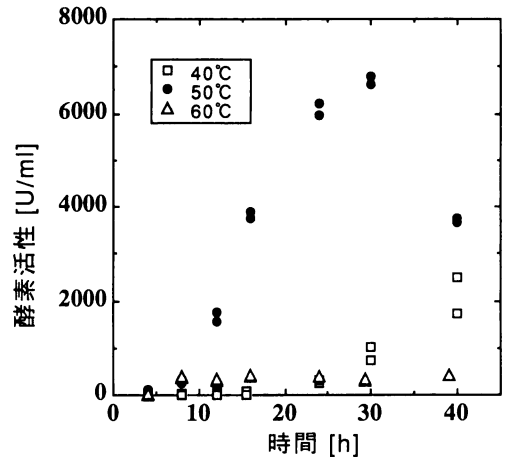


図4 酵素活性に及ぼす培養温度の影響 (WSG 培地)

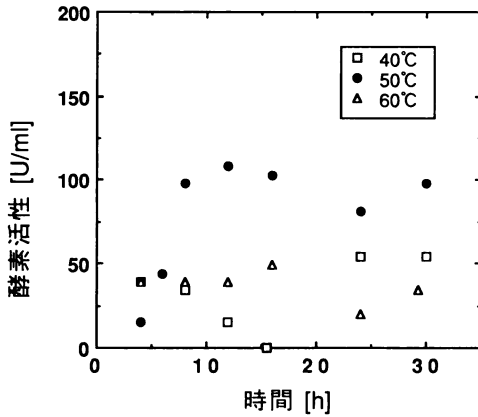


図2 酵素活性に及ぼす培養温度の影響 (L 培地)

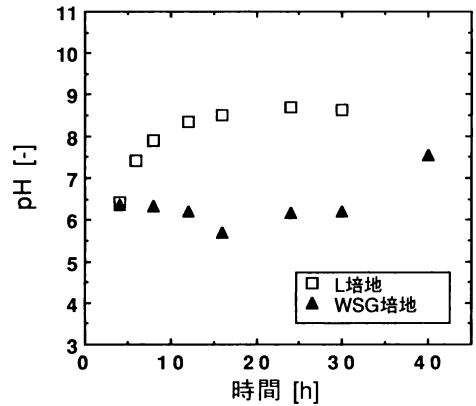


図5 50°C培養における pH の経時変化

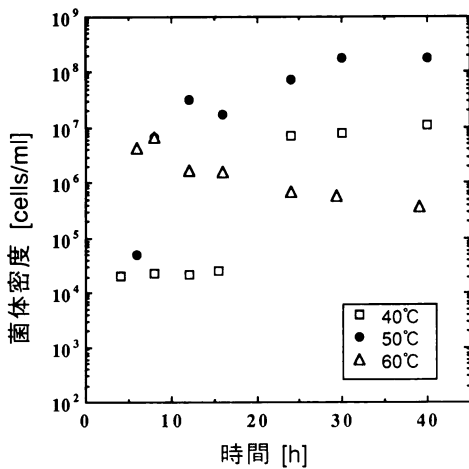


図3 増殖に及ぼす培養温度の影響 (WSG 培地)

る。死滅速度は、L 培地では50°C>60°C>40°Cの順であった。WSG 培地では、40時間の培養実験中に死滅期に入ったのは60°Cの場合のみで、40及び50°Cの場合は定常期にあった。これ以後の実験はすべて50°Cで実施した。

酵素活性については、L 及び WSG 培地ともに50°Cで最大となったが、WSG 培地の方がはるかに高い酵素活性を示した。この原因としては、L 培地中に豊富に存在するアミノ酸による抑制が考えられる。一方、WSG 培地では窒素源が脱脂大豆であり、アミノ酸を培地中に徐放するため抑制が起こり難く、酵素活性が高くなると考えられる。

## 2.2 L 培地中の窒素源の種類の影響

図6及び7に実験結果を示す。L 培地中の Tryp-  
tone を同量の他の窒素源 (Soytone, Casamino Ac-

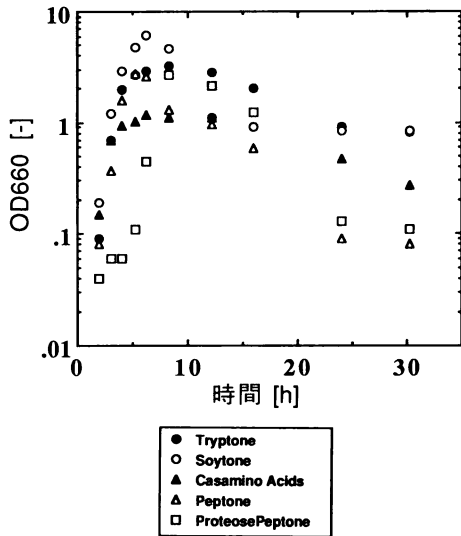


図6 増殖に及ぼすL培地中の窒素源の種類の影響 (50°C培養)

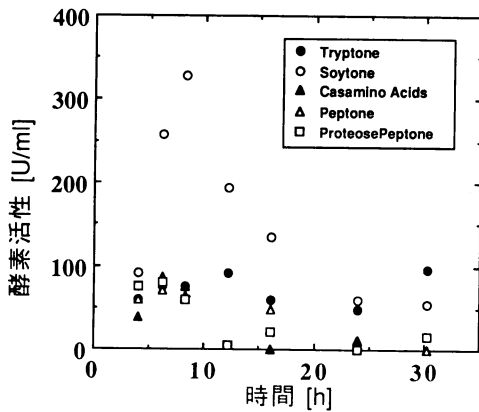


図7 酵素活性に及ぼすL培地中の窒素源の種類の影響 (50°C培養)

表4 各種窒素源の原料及び消化法

窒素源	原料	消化法
Tryptone	ミルクカゼイン	酵素 (パンクレアチン)
Soytone	大豆タンパク	酵素 (パバイン)
Casamino Acids	ミルクカゼイン	塩酸による加水分解
Proteose Peptone	獣肉	酵素 (パバイン)
Peptone	混合ペプトン	カゼインペプトンと獣肉ペプトンの混合物

ids, Peptone, Proteose Peptone) に置き換え、計5種類について比較した。これら5種類の窒素源はすべてタンパク質の加水分解(消化)物であり、それらの原料及び消化法を表4に示す。増殖、酵素活性ともに窒素源としてSoytoneを用いた時に最大値を示した。Soytoneは大豆タンパクの消化物であり、大豆の成分が酵素生産に有効である可能性が示唆される。

### 2.3 WSG 培地中の脱脂大豆の効果

WSG 培地に使用される脱脂大豆の効果を実験的に検討するため、脱脂大豆を大豆消化物であるSoytoneあるいは脱脂大豆微粉末に置き換える実験を行った。

通常のWSG 培地中の脱脂大豆を大豆タンパク質の消化物であるSoytoneに置き換えた実験の結果を図8及び9に示す。増殖及び酵素活性の最大値ともに脱

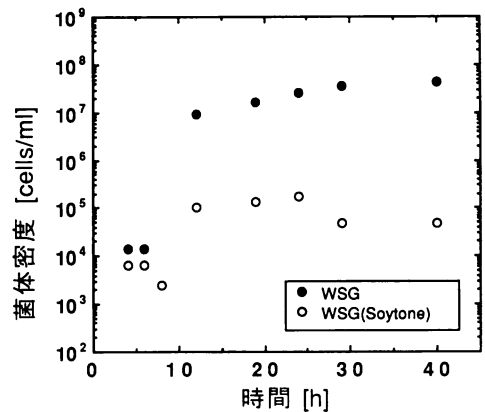


図8 WSG 培地において脱脂大豆→Soytoneとした場合の増殖特性

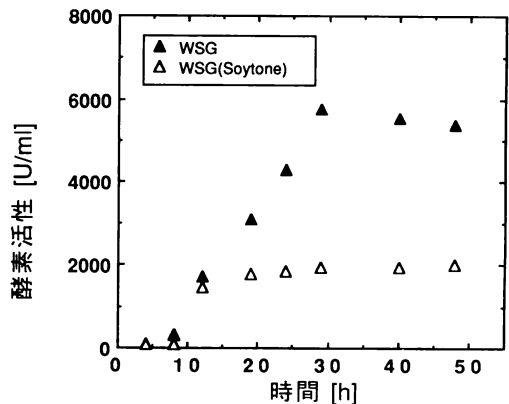


図9 WSG 培地において脱脂大豆→Soytoneとした場合の酵素活性

脂大豆を用いた通常の WSG 培地の方が高かった。

100 μm以下にすりつぶした脱脂大豆を用いた培養実験結果を図10及び11に示す。微粉末を用いた場合の増殖及び酵素活性は、通常の WSG 培地の結果とほとんど変わらなかった。

図9は、酵素活性に対する効果が「脱脂大豆>脱脂大豆の消化物」であることを示している。両者の化学組成に大差は無いと考えられることから、脱脂大豆のアミノ酸徐放性もしくは脱脂大豆への好熱菌の固定化効果が活性向上に大きく寄与していることが推察される。後者の固定化効果には、菌体と脱脂大豆との物理的接触効果と物質移動抵抗による脱脂大豆中物質濃度制御の効果の2つの効果が考えられ

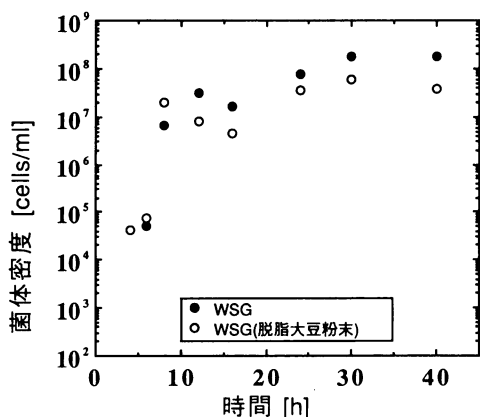


図10 WSG 培地において脱脂大豆→脱脂大豆粉末とした場合の増殖特性

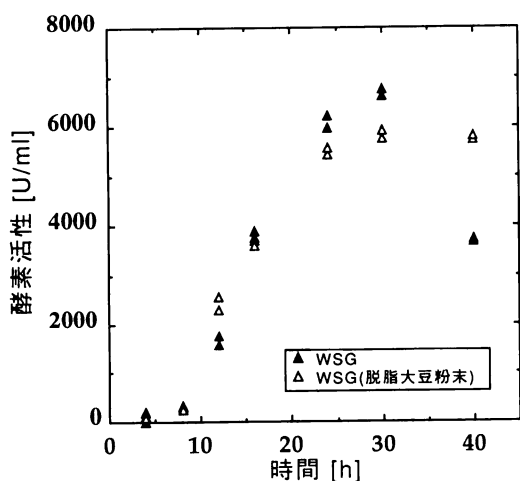


図11 WSG 培地において脱脂大豆→脱脂大豆粉末とした場合の酵素活性

る。図11において、脱脂大豆そのまま（5 mm程度のフレーク）でも脱脂大豆を微粉末化したものでも酵素活性に大差は無いことから、後者の濃度制御効果は否定される。

## 2.4 窒素源の分割添加の効果

### 2.4.1 分割添加の効果

培養液中のアミノ酸濃度が高くなるとプロテアーゼ生産を抑制する作用が菌体に働くと考えられることから、アミノ酸濃度を抑える目的で培地中の窒素源 (Soytone) の分割添加を試みた。表5に分割添加方法を示す。培養実験の結果を図12から15に示す。どちらの実験においても分割添加による酵素生産性の向上がみられた。

表5 Soytone 分割添加における添加量及び添加時間

培地	培養開始時 Soytone 量 (培地100ml当り)	Soytone 添加	
		添加量	添加時間
L (Tryptone →Soytone)	1.0 g	—	—
L (Tryptone →Soytone) 分割添加	0.2 g	0.2 g/10ml × 4回	6 h おき 6, 12, 18, 24 h
WSG (脱脂大豆 →Soytone)	1.5 g	—	—
WSG (脱脂大豆 →Soytone) 分割添加	0.3 g	0.3 g/10ml × 4回	6 h おき 6, 12, 18, 24 h

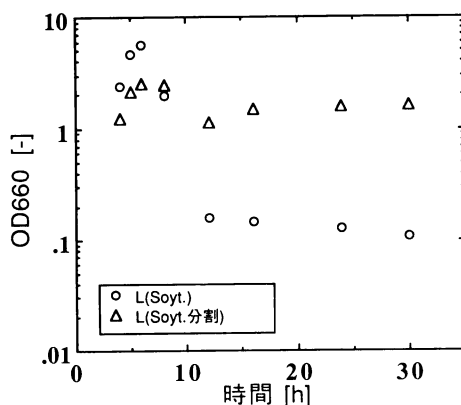


図12 L 培地 (Tryptone→Soytone) において Soytone 分割添加が増殖に及ぼす影響

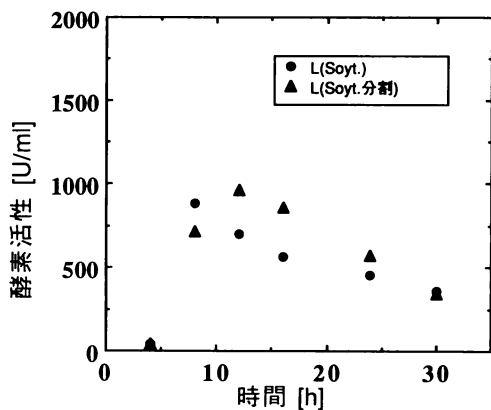


図13 L培地 (Tryptone→Soytone) において Soytone 分割添加が酵素活性に及ぼす影響

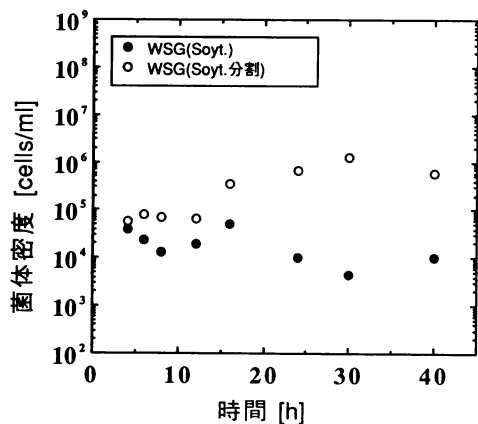


図14 WSG培地 (脱脂大豆→Soytone) において Soytone 分割添加が増殖に及ぼす影響

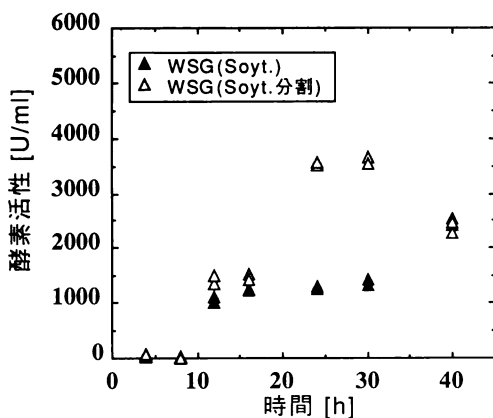


図15 WSG培地 (脱脂大豆→Soytone) において Soytone 分割添加が酵素活性に及ぼす影響

#### 2.4.2 分割回数の影響

先の実験では Soytone 添加の分割回数を 5 回とした。そこで次に分割回数が酵素生産性に及ぼす影響について検討した。分割回数は 3 回, 4 回及び 5 回の 3 通りとした。表 6 に分割添加の詳細な方法を, 図 16 には実験結果をそれぞれ示す。分割添加を行った実験では, 分割回数に依らず, 初期一括添加の場合よりも高い酵素活性を示した。また 4 分割の場合に最も高い酵素活性が得られ, WSG 培地とほぼ同等の酵素活性であった。この結果より適当な濃度で Soytone を分割添加すれば脱脂大豆を用いた通常の WSG 培地と同等の酵素活性が得られることがわかった。

表 6 Soytone 分割添加における分割回数, 添加量及び添加時間

培地	培養開始時 Soyotone 量 (培地100ml当り)	Soyotone 添加	
		添加量	添加時間
WSG (脱脂大豆→Soytone)	1.5 g	—	—
WSG (脱脂大豆→Soytone) 3分割	0.5 g	0.5 g/10ml × 2回	12 h おき 12, 24 h
WSG (脱脂大豆→Soytone) 4分割	0.375 g	0.375 g/10ml × 3回	8 h おき 8, 16, 24 h
WSG (脱脂大豆→Soytone) 5分割	0.3 g	0.3 g/10ml × 4回	6 h おき 6, 12, 18, 24 h

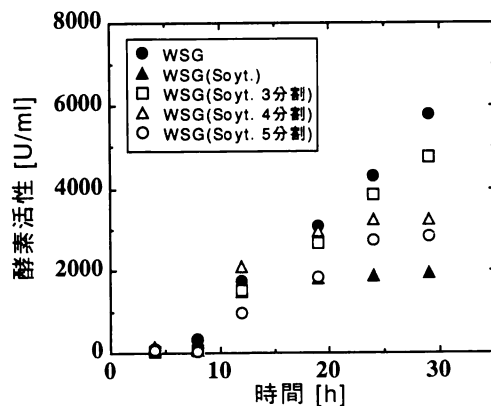


図16 WSG培地 (脱脂大豆→Soytone) において Soytone 分割添加の分割回数が酵素活性に及ぼす影響

### 2.5 ロータリーシェーカー回転数の影響

フラスコ振盪培養に用いたロータリーシェーカーの回転数が酵素活性に及ぼす影響を図17に示す。ロータリーシェーカーの回転数の大小は菌体への酸素供給及び培地中の脱脂大豆の粉碎と固体タンパクの溶解に影響を及ぼすと考えられる。回転数が高いほど酵素活性の最大値は大きくなった。

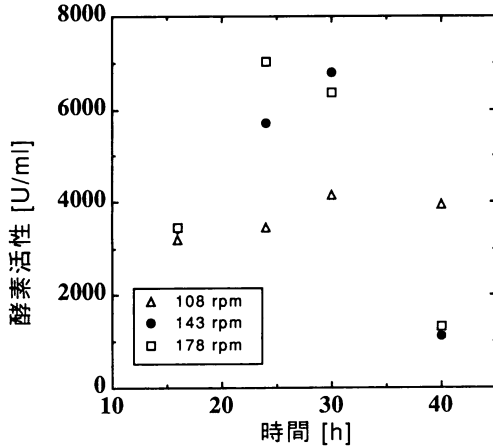


図17 WSG においてロータリーシェーカー回転数が酵素活性に及ぼす影響

### 結 言

以上の実験結果から次のような結論が得られた。

- 1) L, WSG いずれの培地においても初期増殖速度は温度とともに大きくなった。一方、酵素活性は50℃において最大値を示した。一般的に酵素活性はWSG>Lという傾向を示した。アミノ酸が抑制的に働いたからと考えられる。
- 2) 窒素源としては大豆が優れていることがわかった。
- 3) WSG 培地で脱脂大豆を Soytone に置き換えると酵素活性は一般に低下したが、分割添加で回数と間隔を選べば WSG 培地と同等の酵素活性を示すことがわかった。
- 4) WSG 培地の主たる窒素源である脱脂大豆が優れている点は、その成分のみならず、アミノ酸徐放性を持つ点でもあることがわかった。
- 5) ロータリーシェーカーの回転数が高いほど酵素活性の最大値は大きくなった。このことから、この領域では、酸素供給速度が酵素活性に大きな影響を及ぼすことが推察される。
- 6) ごく一部の実験結果を除き菌体数が酵素活性に正の相関を持つことがわかった。

### 引用文献

- 1) 大島泰郎：“好熱性細菌”，東京大学出版会 (1978).
- 2) 久保 幹，肥後裕仁：東ソー研究報告，33 (2)，101 (1989).