

## 【論文】

***Bacillus subtilis* 3108株の産生する生澱粉分解性 $\alpha$ -アミラーゼの特性**山口 哲平<sup>1</sup>・木村 弘幸<sup>2</sup>・川野 麻里子<sup>2</sup>・原 三貴子<sup>2</sup>・満生 慎二<sup>3</sup>・境 正志<sup>3</sup>**Properties of raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* IFO 3108**Teppey Yamaguchi<sup>1</sup>, Hiroyuki Kimura<sup>2</sup>, Mariko Kawano<sup>2</sup>, Mikiko Hara<sup>2</sup>, Shinji Mitsuiki<sup>3</sup>, Masashi Sakai<sup>3</sup>

$\alpha$ -Amylases from *Bacillus* sp. strains digesting raw starch were observed to adsorb to raw starch and  $\alpha$ -cyclodextrin (CD) Sepharose. Raw starch digesting and saccharifying  $\alpha$ -amylases was purified from *Bacillus subtilis* IFO 3108 (RSA-1, MM 67 kDa). BSA1 was able to adsorb to  $\alpha$ -CD Sepharose and to digest raw starch. The other amylase from the strain was unable to adsorb to  $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B and failed to digest raw starch. The digest of raw corn starch was specifically inhibited by  $\alpha$ -CD for BSA1 ( $K_i$ , 0.44 mM). The adsorption ability of BSA1 to  $\alpha$ -CD Sepharose had not lost upon protease treatment. Results indicate that although raw starch affinity domain (SAD) involved is present in BSA1, the structure and mode of binding of SAD are different from other amylases.

Keywords: Raw starch, *Bacillus* sp.,  $\alpha$ -Amylase, Starch affinity domain

**1. 緒言**

近年、人口の急増ならびに産業の発展に伴い食糧不足、エネルギー枯渇が深刻な問題とされている。また、バイオマス有効利用の観点から、澱粉、セルロース等の有効利用に関する研究についても注目されている。特に微生物を用いたバイオマスの省エネルギー的有効利用については多くの研究報告がなされている。これらの加水分解酵素の研究は専ら水溶性基質で行われ、規則的な高分子間水素結合を持つ不溶性結晶基質に関しての知見は極めて乏しい。バイオマスとして低利用澱粉を原料とする変換利用では、投入するエネルギーを可能な限り低くすることが強く望まれており、澱粉を加熱糊化することなく直接分解する酵素生産菌の開発が急務とされている。

そこで、本研究では、生澱粉分解能の発現に必須な親和部位の知見を基礎にして、細菌 *Bacillus Subtilis* IFO 3108が産生する生澱粉分解酵素の精製を行い、諸性質を検討した。

**2. 実験****2.1 細菌 $\alpha$ -アミラーゼの親和部位による分類**

*Bacillus*属細菌60菌株を培養し、得られた粗酵素を用いて生澱粉分解能、吸着能及び $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B吸着能の測定を行ない、親和部位による分類を糖化型、液化型でそれぞれ行ない、検討した。

**2.1.1 実験方法**

試験菌として発酵研究所(IFO; Institute for fermentation, Osaka)保存の*Bacillus*属細菌を用い、203培地(Peptone 1%、Yeast extract 0.5%、Liver infusion form 2.5%、Glucose 0.3%、Glycerol 1.5%、NaCl 3% Agar 1.5%)にて培養された細菌を、坂口フラスコにて、プイヨン改良培地(Solble starch 1%、peptone 1%、Yeast extract 1%、NaCl 0.3%、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.2%、Phytine 0.2%)で30℃、4日間培養し、9,000 rpmで遠心分離し、脱イオン水により1日間透析したものを粗酵素として用いた。酵素活性はDNS法にて測定を行い、1 unitは1分間に1  $\mu$  molグルコース換算還元糖を遊離する力価とした。

1. 九州産業大学工学研究科

2. 九州産業大学工学部工業化学科

3. 九州産業大学工学部物質生命化学科

## 2.2 *Bacillus subtilis* IFO 3108の産生する生澱粉分解性 $\alpha$ -アミラーゼの培養及び精製

2.1 において最も生澱粉分解能を示した*Bacillus subtilis* IFO 3108をジャーファメンターを用いて、ブイオン改良培地にて回転数250 rpm、培養温度30°Cで3日間培養を行い、培養液を回収後、遠心分離(9,000rpm、15min、4°C)にて菌体を除去した後、硫酸アンモニウム600 g/lを添加しタンパク質を沈殿させ、3日後、その沈殿物をハイフロスーパーセルで回収し、回収物を50 mM Tris-HCl (pH 7.0)を加え3日間、4°Cで攪拌させ、遠心分離(9,000 rpm、15min、4°C)にて上清を回収後、50mM Tris-HCl (pH 7.0)にて透析を行なった。以上の方法で得られた $\alpha$ -アミラーゼを粗酵素溶液として各種カラムにて精製を行なった。なお、酵素活性測定は、PD-10カラムに通し低分子成分を除いた後、DNS法にて測定を行なった。

### 2.2.1 DEAE-Toyopearlカラム

DEAE-Toyopearl 650M(l=5.0 cm、2r=1.7 cm)を50 mM Tris-HCl (pH 7.0)にて置換し、精製した粗酵素溶液を流し入れ、その際、フラクションコレクターを使用して100 drop/本にて回収を行なった。

### 2.2.2 Butyl-Toyopearlカラム

Butyl-Toyopearl 650M(l=10.0 cm、2r=1.7 cm)を10%硫酸アンモニウム含有50 mM Tris-HCl (pH 7.0)にて置換し、DEAE-Toyopearlカラムで活性の高かった画分に硫酸アンモニウムを10%加えた溶液を吸着させた。その後、10%硫酸アンモニウム含有50 mM Tris-HCl (pH 7.0)と脱イオン水のリニアグラジェントで脱着させ、フラクションコレクターを使用して100 drop/本にて回収を行なった。

### 2.2.3 Superdex75カラム

HPLCにおいてSuperdex75カラムを0.15M NaCl含有20 mM Tris-HCl (pH 8.0)にて置換し、Butyl-Toyopearlカラムで活性の高かった画分を凍結乾燥したものを供与した。

### 2.2.4 $\alpha$ -CD Sepharose CL-6Bカラム

$\alpha$ -CD Sepharose CL-6Bカラムを1% $\alpha$ -シクロデキストリン含有50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、50 mM Tris-HCl (pH 7.0)にて置換し、Butyl-Toyopearlカラムで活性の高かった画分を脱イオン水にて2時間以上、透析した後、凍結乾燥したものを吸着させた。その後、Tris-HCl (pH 7.0)、1% $\alpha$ -シクロデキストリン含有50 mM Tris-HCl (pH 7.0)の順で脱着させた。その際、

フラクションコレクターを使用して100 drop/本にて回収を行なった。

### 2.2.5 純度及び分子量の測定

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて行なった。

## 2.3 *Bacillus subtilis* IFO 3108の産生する生澱粉分解性 $\alpha$ -アミラーゼの酵素化学的諸性質

精製した酵素を用いて、熱安定性・至適温度、pH安定性・至適pH、生澱粉吸着能、 $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B吸着能、生澱粉分解能の検討及び分解生澱粉のSEM(走査型電子顕微鏡)観察を行なった。

## 2.4 *Bacillus subtilis* IFO 3108の産生する生澱粉分解性 $\alpha$ -アミラーゼのメカニズム及び多様性発現機構

精製した酵素を用いて、糊化澱粉分解能・生澱粉分解能・生澱粉吸着能に対するシクロデキストリンの影響、阻害定数・阻害様式の決定、熱処理による $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B吸着能の変化、各種プロテアーゼによる生澱粉吸着・分解能の変化について検討を行なった。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 細菌 $\alpha$ -アミラーゼの親和部位による分類

主な*Bacillus*属細菌の生澱粉吸着・分解能及び $\alpha$ -CD Sepharoseに対する吸着能についての検討結果をTable 1に示す。

Table 1 Adsorption and digestion properties of various  $\alpha$ -amylases.

Strain	Raw-Corn-Starch	Raw-Potato-Starch	$\alpha$ -CD Sepharose
	Adsorption(%) (pH 6.0)	Adsorption(%) (pH 5.0)	Adsorption(%) (pH 6.0)
Saccharifying type			
Raw-starch digesting amylase			
<i>B. subtilis</i> 3034	6	45	79
<i>B. subtilis</i> 3108	13	48	88
<i>B. subtilis</i> 12114	10	33	83
Raw-starch non-digesting amylase			
<i>B. subtilis</i> 12721	0	8	28
Liquefying type			
Raw-starch digesting amylase			
<i>B. licheniformis</i> 12197	78	87	46
Raw-starch non-digesting amylase			
<i>B. licheniformis</i> 14132	0	1	11

生澱粉分解能を有する糖化型 $\alpha$ -アミラーゼはすべて、pH 6.0で生トウモロコシ澱粉に対して10%程度の微弱な吸着能を、pH 5.0で生馬鈴薯澱粉に対して30%程度の吸着能を示した。また $\alpha$ -CD Sepharose に対しては80%程度の顕著な吸着能を示した。

一方、生澱粉分解能を有する液化型 $\alpha$ -アミラーゼはすべて、pH 6.0で生トウモロコシ澱粉、pH 5.0で生馬鈴薯澱粉に対して80%以上の極めて顕著な吸着能を示した。また、 $\alpha$ -CD Sepharose に対しては40%程度の吸着能しか示さなかった。生澱粉分解能を示さない $\alpha$ -アミラーゼは、糖化型、液化型ともに生澱粉吸着能及び $\alpha$ -CD Sepharose吸着能をほぼ完全に消失していた。

### 3.2 Bacillus subtilis IFO 3108の産生する生澱粉分解性 $\alpha$ -アミラーゼの培養及び精製

#### 3.2.1 DEAE-Toyopearlカラム

DEAE-Toyopearlカラムにおける溶出パターンをFig. 1 に示す。

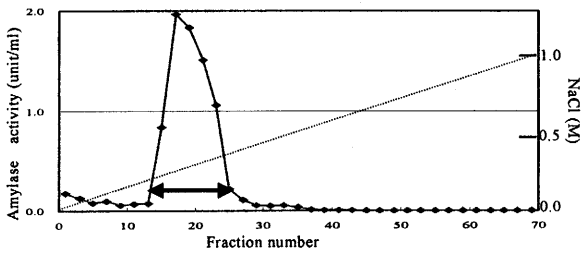


Fig. 1 Chromatogram of DEAE-Toyopearl.

Fig. 1 の矢印部分を次の精製カラムに供与した。

#### 3.2.2 Butyl-Toyopearlカラム

Butyl-Toyopearlカラムにおける溶出パターンをFig.2 に示す。

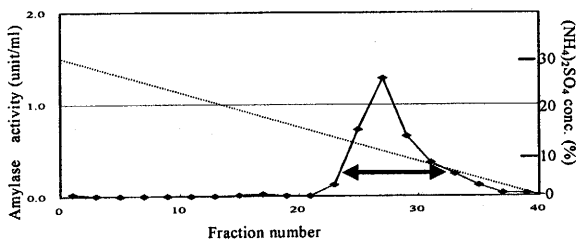


Fig. 2 Chromatogram of Butyl-Toyopearl.

Fig. 2 の矢印部分を次の精製カラムに供与した。

#### 3.2.3 Superdex75カラム

Superdex75カラムにおける溶出パターンをFig. 3 に示す。

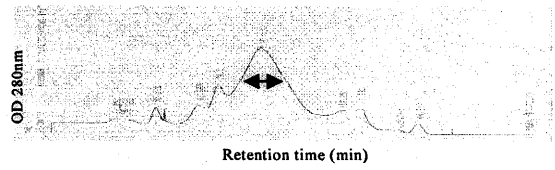


Fig. 3 Chromatogram of Superdex75.

Fig. 3より矢印の89.083 minのピークに活性がみられた為、次の精製カラムに供与した。

#### 3.2.4 $\alpha$ -CD Sepharose CL-6Bカラム

$\alpha$ -CD Sepharose CL-6Bカラムにおける溶出パターンをFig. 4 に示す。

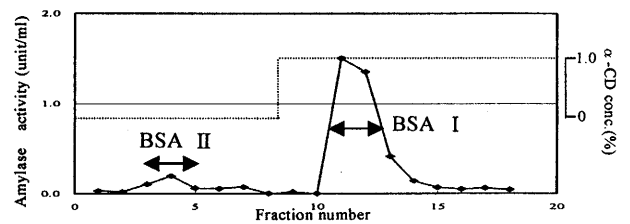


Fig. 4 Chromatogram of  $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B.

Fig. 4の非吸着画分にピーク(BSA II)が、アミラーゼ吸着画分にピーク(BSA I)が見られた。それぞれの酵素液を回収した後、凍結乾燥後、SDS-PAGEを行なった。また、精製結果をまとめたものをTable 2 に示す。

Table 2 Purification summary of an  $\alpha$ -amylase digesting of raw starch from *Bacillus subtilis* IFO 3108.

step	Volume (ml)	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg-protein)	Recovery (%)
Culture fluid	6000	3.13	4.17	0.75	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt.	200	9.48	2.17	4.37	10.10
DEAE-Toyopearl	30	5.74	2.67	2.15	0.92
Butyl-Toyopearl	15	2.75	0.37	7.43	0.22
$\alpha$ -CD (BSA II)	3	1.33	0.46	2.88	0.02
$\alpha$ -CD (BSA I)	3	4.40	0.10	42.43	0.07

#### 3.2.5 分子量の測定

電気泳動の結果及び分子量の測定結果をFig. 5、Fig. 6に示す。

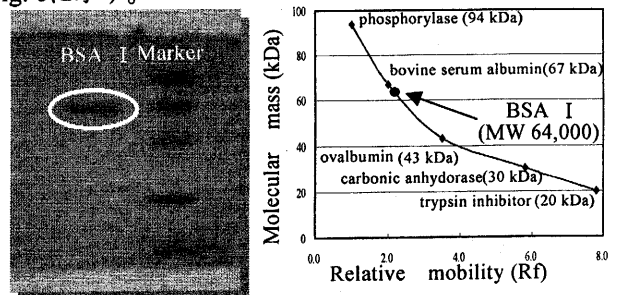


Fig. 5 SDS-PAGE of purified amylases (L).

Fig. 6 Molecular mass estimation of purified amylases (R).

3.3 *Bacillus subtilis* IFO 3108の産生する生澱粉分解性  $\alpha$ -アミラーゼの酵素化学的諸性質

生澱粉吸着能、生澱粉分解能に対するpHの影響を Fig.7、Fig.8に示す。またBSA I 及びBSA II の生澱粉分解能測定結果をFig. 9、Fig. 10に示す。

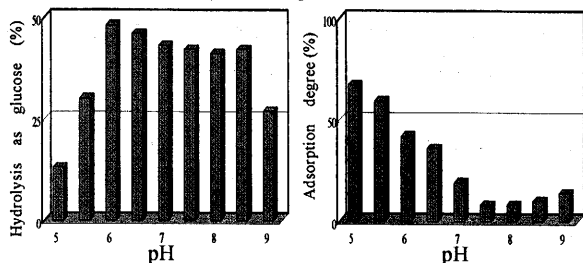


Fig. 7 Effects of pH on raw corn starch digestion (L).

Fig. 8 Effects of pH on raw potato starch adsorption (R).

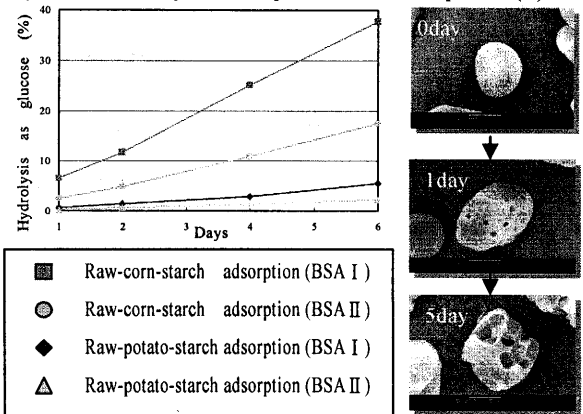


Fig. 9 Time dependency on raw-starch adsorption (L).

Fig. 10 SEM for digestion of raw starch from amylase (R).

pH 6.0~pH 8.5の範囲で生澱粉に対する高い吸着能を示し、pH 5.0 ~ pH 7.5の範囲で生澱粉に対する吸着能がpH 5.0を最大として徐々に減少傾向に転じ、アルカリ性になると10%程度の分解能しか示されなかった。BSA I は生トウモロコシ澱粉に対する分解率は6日間で37%まで上昇し、生馬鈴薯澱粉に対しては6日間で6%しか分解率を示さなかった。

一方BSA II は生トウモロコシ澱粉に対する分解率は6日間で18%まで上昇し、生馬鈴薯澱粉に対しては6日間で3%しか分解率を示さなかった。Fig. 10より、BSA I は生澱粉に対して分解孔を形成・拡大しながら分解を行なうことが明らかになった。

3.4 *Bacillus subtilis* IFO 3108の産生する生澱粉分解性  $\alpha$ -アミラーゼのメカニズム及び多様性発現機構

糊化澱粉分解能・生澱粉分解能・生澱粉吸着能に対するシクロデキストリンの影響、熱処理BSA I の  $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B吸着能の変化をFig. 11、Fig. 12に示す。また各種プロテアーゼによる生澱粉吸

着・分解能の変化をFig. 13、Fig. 14に示す。

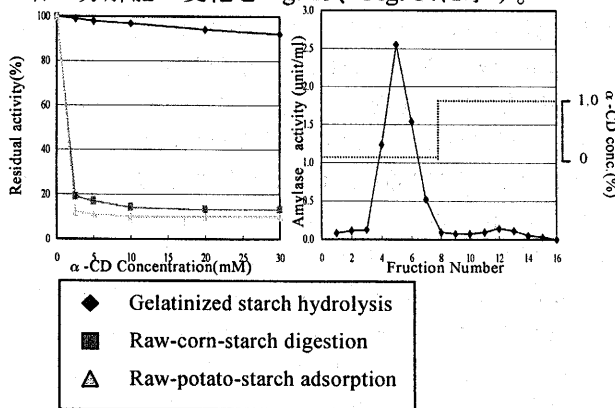


Fig. 11 Effects of  $\alpha$ -CD on raw-corn-starch adsorption, digestion, and gelatinized-starch

Fig. 12 Chromatogram of  $\alpha$ -CD Sepharose CL-6B.

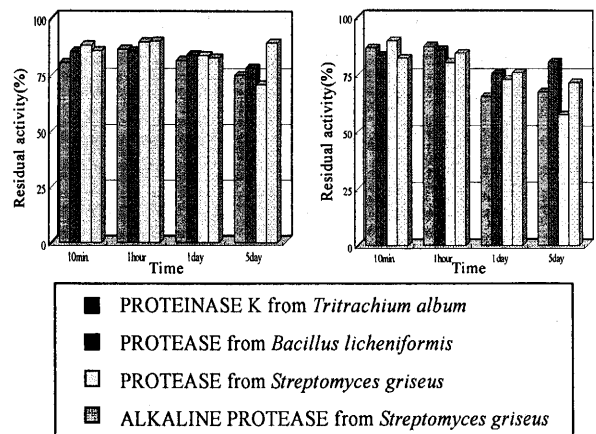


Fig. 13 Effects of protease-treatment for  $\alpha$ -CD adsorption (pH 7.0).

Fig. 14 Effects of protease-treatment for  $\alpha$ -CD adsorption (pH 10.0).

$\alpha$ -CDが特異的に生澱粉吸着能と分解能を阻害する事が明らかになった。阻害定数は0.73 mMで阻害様式は枯坑・非枯坑混合型と判断した。よって他のアミラーゼ同様、細菌糖化型生澱粉分解性アミラーゼには生澱粉親和部位が必須であると考察した。さらに、熱処理したBSA I は  $\alpha$ -CD Sepharose CL-6Bに吸着しなかった事から親和部位はその一次構造でなく立体構造により機能が発現すると考察した。しかし、培養日数を変えても生澱粉の分解能に変化がなかった事 (Date not shown) 及び各種プロテアーゼ処理によっても生澱粉吸着能・分解能が消失しなかった事(Fig. 13、Fig. 14) から、糖化型細菌  $\alpha$ -アミラーゼはこれまでの報告のある生澱粉分解性アミラーゼとは異なる分解機構を有する可能性が示唆される。

参考文献

S. Mitsuiki, K. Mukae, M. Sakai, M. Goto, S. Hayashida K. Furukawa; Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains. *Enzyme Microb. Tech.* 410-416 (2005)