報 文

Bacillus 属菌の β -Glucanase と α -Amylase 産生へのリン産塩及び鉄塩の影響

長谷川史夫・仲 恭寛

天野製薬株式会社

(愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 51)

The Effect of Phosphates and Iron Salts on the Production of *Bacillus* β -Glucanase and α -Amylase

Fumio HASEGAWA and Yasuhiro NAKA

Amano Pharmaceutical Co. Ltd.

(Nishishiroyashiki-51, Kunotsubo, Nishiharu-cho, Nishikasugai-gun, Aichi-ken)

From *Bacillus subtilis* ATCC No. 21813, barley β -glucanase and α -amylase were produced simultaneously in a submerged culture.

To obtain barley β -glucanase with less α -amylase the culture process using this *Bacillus* sp. was investigated.

The addition of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ or FeSO_4 to the broth filtrate depressed α -amylase activity while maintaining that of β -glucanase.

The addition of both these compounds to the culture medium gave the same results in the culture process. Essentially the same results were obtained using other *Bacillus* sp.

1 諸 言

Barley β -glucanase はビールの濁りの原因となり、汙過を妨げる β -glucan を分解する。 β -glucanase の産生については、*Aspergillus* 属、*Tricoderma* 属、*Mucor* 属などの糸状菌のもの¹⁾や、*Bacillus subtilis* のもの²⁾が報告されているが、いずれも α -amylase を同時に産生することが知られている。著者らは大麦 β -glucan を分解する β -glucanase 産生能の高い菌株として *Bacillus subtilis* ATCC 21813 を選び、同時に多量産生する α -amylase を可及的に抑制し、 β -glucanase を選択的に得る方法を検討した。すなわち本菌株による培養汙液にリン酸塩または鉄塩を加え、一定時間加温処理することにより、 β -glucanase 活性を低下させることなく、 α -amylase が消失する事実を認めたことから、これらの塩類を培地成分の中に組み込み、生産工程の最初である培養段階で一挙に目的を達し、後処理工程を増やさないようにしようとした。以下その成績について報告する。

2 実 験

2・1 培養条件

可溶性デンプン2%, グルタミン酸ナトリウム0.4%, 酵母エキス0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NH_4Cl 1%, K_2HPO_4 0.2% からなる培地を pH7.0 に調整し、500mL 坂口フラスコ (培地液量 100mL) または 30L ジャーファーマンター (培地液量 15L) に入れ、120°C, 30min 殺菌する。これに同培地であらかじめ *Bacillus subtilis* ATCC 21813 を $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 24h, 坂口フラスコでは 120 strokes/min, ジャーファーマンターでは 300rpm, 1vvm. で培養した種培養液を 2% 接種し、上記条件で 90 h, 本培養を行った後、遠心分離して菌体を除去し、その汙液について β -glucanase 活性を測定した。

2・2 測定方法

2・2・1 β -glucanase 活性測定法

Parrish ら³⁾の方法に従って大麦から調製した β -glucan 溶液 (12mg/mL, pH7.5) 0.5mL 及び酵素溶液 0.5mL を 30°C, 30min 反応し、ソモギー試液 1mL で反応停止後沸騰水中で 20min 加熱する。冷却後、ネルソン試液 1mL と精製水 20mL を加え、520nm にお

る吸光度を測定する。上記条件で 1min に $1 \mu\text{mol}$ のグルコースを生成するとき β -glucanase 活性を 1 単位とする。

2・2・2 α -amylase 活性測定法

1% バレイショデンプン溶液 10mL (pH6.0) と酵素溶液 1mL を 40°C , 10min 反応し, この液 1mL を 0.1N-HCl 溶液 10mL に注入する。次にこの液 1mL に 0.0004N ヨウ素溶液 10mL を加えて混ぜた後 660nm の吸光度を測定する。上記条件で 1min にバレイショデンプンのヨウ素による青色を 10% 減少させる酵素量を 1 単位とする。

3 結果と考察

3・1 α -amylase 生産培地における β -glucanase と α -amylase の産生能比較

Bacillus subtilis ATCC 21813 を通常 α -amylase を生産する培地 (A), (B) 及び (C) を用いて 100mL/500mL 坂口フラスコで 30°C , 120 strokes/min の条件下, 96h, 培養して, その培養液の β -glucanase 活性と α -amylase 活性を Table-1 に示した。(A) と (B) の培地では同菌株の α -amylase 産生能の最大値付近 2400U/mL, 2100U/mL をそれぞれ得, このときの β -glucanase は 25U/mL, 20U/mL であった。両酵素の産生に寄与する成分としてはデンプンとコーンスチープ

Table-1 Activities of β -glucanase and α -amylase in commercial mediums for α -amylase production.

Medium	β -Glucanase (U/mL)	α -Amylase (U/mL)
(A)	25	2400
(B)	20	2100
(C)	8	600

Mediums and cultural conditions:

- (A): Soluble starch 3%, Extracted solution of defatted soybean 5%, Corn steep liquor 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02% (pH 7.0)
 (B): Potato starch 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5%, Corn steep liquor 0.5% Rice bran 1% (pH 7.0)
 (C): Malt extract 1%, Peptone 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% (pH 7.0)

A loopful of *Bacillus subtilis* ATCC 21813 was inoculated to 100mL of basal medium in 500mL shaking flask and the flask was incubated at 30°C for 96h with shaking (120 strokes/min). After centrifugation β -glucanase and α -amylase activities in the filtrate were assayed.

リカーであり両酵素の産生の比は同じである。またこの二つの培地成分を含まない (C) 培地においても産生酵素の絶対値は低いがその比は (A)(B) の場合と類似している。

Table-2 The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and their mixture to β -glucanase and α -amylase in culture filtrate.

Incubation time (min)	Salts	Enzyme activities of filtrate			
		after 20h cultivation		after 40h cultivation	
		β -Glucanase	α -Amylase	β -Glucanase	α -Amylase
0	No addition	3.7	360	7.9	800
30	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3.8	370	7.7	820
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	360	7.4	680
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.8	350	7.4	660
	No addition	3.6	370	7.8	790
60	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3.6	330	8.0	630
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.5	290	7.6	510
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	270	8.1	470
	No addition	3.8	360	8.1	800
120	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3.6	240	8.2	450
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.6	180	7.5	340
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	180	8.0	310
	No addition	3.8	360	8.1	800

Concentration of salts: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%

Basal medium and cultural conditions:

NH_4Cl 1.0%, Soluble starch 2.0%, KCl 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Sodium glutamate 0.4%

Yeast extract 0.5%

initial pH 7.0, cultivated at 30°C for 20h or 40h.

Culture broth was centrifuged under cooling and the supernatant was incubated at 30°C for various times with $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and their mixture.

3・2 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ と FeSO_4 による培養液中の α -amylase の不安定性

著者らは3・1で得た結果から α -amylase の活性を消失させ β -glucanase 活性に影響を与えない方法を見いだすため、2・1に記載した基本培地を用い、種々の塩類を20h後及び40h後の培養液に加え、30℃で30min, 60min, 120min 放置して両酵素の活性を測定したところ、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, FeSO_4 及びこれらを混合したものが本目的にかなうことがわかった。Table-2はその成績を示す。

3・3 培養時におけるリン酸塩、鉄塩の効果

3・2で得られた培養液に $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ や FeSO_4 を加えて一定時間処理する方法は β -glucanase の製造工程にさらに一工程加えることであり、培養ロットによる α -amylase のばらつきを考慮すると、常に一定した処置条件を与えることが難しく、必ずしも得策とはいえない。そこで著者らはこれらの塩類を直接培地に加えて酵素生産の場に適用することを試みた。Table-3は2・1で述べた基本培地から NH_4Cl を除いたものに $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 及び窒素源としての他の塩類を加え、Table-1と同じ培養条件で β -glucanase と α -amy-

Table-3 The effect of nitrogen sources on β -glucanase and α -amylase production in 100mL/500mL shaking flask.

N-Sources	added (%)	β -Glucanase (U/mL)	α -Amylase (U/mL)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.5	16.1	70
	1.0	19.6	20
	1.5	21.3	0
HCOONH_4	0.5	3.8	110
	1.0	1.8	0
	1.5	0	0
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0.5	5.8	160
	1.0	2.0	40
	1.5	1.5	0
NH_4NO_3	0.5	12.0	340
	1.0	12.6	470
	1.5	11.1	500
NH_4Cl	0.5	8.8	430
	1.0	14.0	660
	1.5	12.6	700
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	9.6	400
	1.0	13.4	560
	1.5	14.0	550
NaNO_3	0.5	13.4	210
	1.0	11.7	120
	1.5	11.4	120
NH_2CONH_2	0.5	9.4	330
	1.0	9.6	300
	1.5	10.5	340

Basal medium and cultural conditions:

Soluble starch 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Yeast extract 0.5%

Sodium glutamate 0.4%, K_2HPO_4 0.2%

initial pH 7.0, cultivated at 30℃ for 96h.

lase 産生への影響を示したものである。つまり α -amylase のみ消失させるのは $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ であり、他の塩類は両酵素活性共に影響を与えないかまたは共に低下させてしまう。このことから目的の効果をあげうるものはリン酸塩であると判断し、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 及び Na_2HPO_4 についての比較を行ったところ、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ が最も効果的でその濃度はほぼ1%以上であった (Table-4)。同様にして鉄塩 $\text{KFe}(\text{SO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_2 , FeSO_4 についても試み、どの鉄塩にも効果があること、とりわけ FeSO_4 が顕著であった (Table-5)。

3・4 α -amylase 抑制培地における酵母エキスの β -glucanase 産生に及ぼす濃度

前述の結果によって得られた α -amylase 抑制培地すなわち可溶性デンプン2%, グルタミン酸ナトリウム0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K_2HPO_4 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (pH7.0) を基本培地として、 β -glucanase の産生に重要な成分である酵母エキスの濃度について検討したものを Table-6 に示したが、これから酵母エキスが0.4%以上含まれることによって培養液の β -glucanase 活性が15U/mL以上となり、 α -amylase の産生はほとんど見られなかった。

3・5 30L ジャーファーマンター培養における確認

次に坂口フラスコの成績を実際の生産に使用する培養槽へのスケールアップ過程の第1段階として30L ジャーファーマンターによる培養を行った。 α -amylase 非抑制培地として可溶性デンプン2%, グルタミン酸ナトリウム0.4%, 酵母エキス0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NH_4Cl 1%, K_2HPO_4 0.2% を、また α -amylase 抑制培地として、 NH_4Cl 1% の代わりに $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%, さらに $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% 加えたものを用い、pH7.0 に調整後、120℃, 20min 殺菌し、これにあらかじめ同培地で *Bac. subtilis* ATCC 21813 を100 mL/500mL 坂口フラスコで24h 培養した種培養液を2% 接種し、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, かくはん数 300rpm., 通気量 1vvm で90h 培養した。前者培地の培養経過を Fig.-1, 後者培地のそれを Fig.-2 に示したように、 α -amylase 非抑制培地では、 β -glucanase と α -amylase はほぼ同じ経過で産生するのに対し、 α -amylase 抑制培地では α -amylase が初期にわずかに産生されるが、その後ほとんど活性が出現して来ないことがわかる。

3・6 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 及び FeSO_4 の他の *Bacillus* 属菌への効果

これまで β -glucanase 産生能の高い *Bacillus subtilis* ATCC 21813 について述べてきたが $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 及び FeSO_4 の効果を *Bacillus subtilis* の他の3菌株と *Bacillus pumilus* 1菌株, *Bacillus mace-*
rans 1菌株についても同様の効果が得られるかどうか

Fig.-1 Time course of β -glucanase and α -amylase production in liquid volume 20L/30L jar fermentor.

Fig.-2 Time course of β -glucanase and α -amylase production in liquid volume 20L/30L jar fermentor.

Table-4 The effect of various phosphates on β -glucanase and α -amylase production in 100mL/500 mL shaking flask.

Medium	Phosphates added (%)	β -Glucanase (U/mL)	α -Amylase (U/mL)
(A)	No addition	16.9	450
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5	15.1	110
	1.0	17.6	35
	2.0	18.1	0
(B)	No addition	14.0	660
	K_2HPO_4	0.7	17.6
		1.3	17.6
		2.6	16.5
	KH_2PO_4	0.5	18.1
		1.0	19.8
		2.0	18.1
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.4	17.0
		2.7	20.3
		5.4	17.0
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6	17.0
		1.2	20.3
		2.4	17.0

Basal mediums and cultural conditions:

(A): Soluble starch 2%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

Sodium glutamate 0.4%, Yeast extract 0.5%

(B): Soluble starch 2%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

Sodium glutamate 0.4%, Yeast extract 0.5%, NH_4Cl 1%

initial pH 7.0, cultivated at 30°C for 96h.

Table-5 The effect of iron salts on β -glucanase and α -amylase production in 100mL/500mL shaking flask.

Iron salts (%)	β -Glucanase (U/mL)	α -Amylase (U/mL)
$\text{KFe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.05	17.0
	0.1	16.2
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	0.05	16.0
	0.1	15.9
FeCl_3	0.05	14.8
	0.1	17.8
FeSO_4	0.05	17.6
	0.1	15.1
Basal Medium	15.4	470

Basal medium and cultural conditions:

Soluble starch 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

Sodium glutamate 0.4%, Yeast extract 0.5%

initial pH 7.0, cultivated at 30°C for 96h.

を検討した (Table-7)。 α -amylase の非抑制培地 [Medium (A)] と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1% と $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% を同時添加した α -amylase 抑制培地 [Medium (B)] について、それぞれの菌株を用いた培養液の α -amylase、 β -glucanase 活性を示したもので、絶対値が低いことはあっても、同じ効果を得ることができた。

4 総 括

大麦 β -glucan を分解する β -glucanase を産生する菌株として *Bacillus subtilis* ATCC No. 21813 を選び、同時に産生する α -amylase を除去し、 β -glucanase を優先的に得る方法を検討したところ次の成績を得た。

Table-7 The effect of the simultaneous addition of phosphate and iron salt on β -glucanase and α -amylase production by some *Bacillus* sp. strains.

		Medium (A)		Medium (B)	
		β -Glucanase	α -Amylase	β -Glucanase	α -Amylase
<i>Bac. subtilis</i>	IAM1248	1.8	26	1.7	0
	IAM1026	1.6	37	1.7	4
	IAM1163	1.1	40	0.9	0
<i>Bac. pumilus</i>	AHU1386	1.5	62	2.0	2
<i>Bac. macerans</i>	IAM1227	0.9	36	1.0	4

Media and cultural conditions:

Medium (A): Soluble starch 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NH_4Cl 1%

Sodium glutamate 0.4%, Yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.2%

Medium (B): Soluble starch 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%

Sodium glutamate 0.4%, Yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.2%

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

initial pH 7.0, cultivated at 30°C for 96h.

1) 本菌の培養液にリン酸塩〔とりわけ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 〕や鉄塩〔とりわけ FeSO_4 〕を添加すると、 β -glucanase に影響を与えることなく、 α -amylase が低下した。

2) このことを培養工程に応用するため、リン酸塩や鉄塩を培地成分として加えたところ、培養液中の α -amylase はほとんど消失し、 β -glucanase は何ら変化を受けることなく産生された。

3) リン酸塩と鉄塩は他の *Bacillus* 属菌にも同じ効

Table-6 The effect of yeast extract concentration on β -glucanase and α -amylase in 100mL/500mL shaking flask.

Yeast extract (%)	β -Glucanase (U/mL)	α -Amylase (U/mL)
0	5.3	0
0.05	6.7	10
0.1	7.6	0
0.2	9.1	0
0.4	14.9	0
0.6	18.8	0

Basal medium and cultural conditions:

Soluble starch 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K_2HPO_4 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%, Yeast extract 0.5 %

Sodium glutamate 0.4%

initial pH 7.0, cultivated at 30°C for 96h.

果を有することを確認した。

4) β -glucanase 産生には酵母エキスが有効で、産生能は濃度とともに上昇した。

(昭和62年4月17日受理)

文 献

- 1) 伊賀上郁夫, 醸工, **43**, 669 (1965)
- 2) Pertti H. Markkanen, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **24**, 93 (1974)
- 3) F. W. Parrish *et al.*, *Can. J. Chem.*, **38**, 2094 (1960)