牛乳凝固酵素に関する研究

Ⅲ いちじく乳汁及び睾丸の牛乳凝固作用について

津郷友吉・山内邦男・宮台昇

(東大農学部)

Studies on milk coagulating enzymes

Ⅲ On the milk coagulating action of fig latex and animal testicles

TOMOKICHI TSUGO, KUNIO YAMAUCHI and NOBORU MIYADAI

(Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

先に動物の各種臓器の抽出液を用いて牛乳凝固力を検索した結果、胃以外では睾丸に若干の牛乳凝固作用を認めたが実用性以下であった。一方植物性レンネットとしてはいちじくの乳汁 (latex) が強い凝固力を有することが認められたが、今回はこの両者特に後者について更に詳細に検討してみた。いちじく latex 中には ficin と称するパパイン系統の蛋白分解酵素があることはよく知られており、その生化学的研究も行われているがこれを牛乳凝固の観点から行つた研究は極めて少く、唯近年 ficin を含めた植物性レンネットに関する研究がインドにおいてなされている²⁾³⁾。

実験成績及び考察

I いちじく乳汁中の牛乳凝固酵素

1) 凝固試験

Ficin の場合その凝乳効力をレンネットと同様に算定することが不正確であることが認められた。稀釈 latex を用い酵素量 (E) と凝固時間 (T) との関係を求めると、Balls 等がパパインの牛乳凝固作用において認めているごとく、略 $(E-I) \cdot T = K$ (K, I は一定条件下における定数) なる関係が得られた。又 HCN を加えて活性化すると $E \cdot T = K$ (レンネットの場合の式) に接近することが知られ I はある種の阻害作用によるものと考えられた。よつて以下の実験では牛乳凝固力としては便宜上凝固時間又はその逆数を以て示し対照との相対的变化を比較することとした。凝固時間の測定は牛乳 10cc に酵素液 0.5cc を加えて行つた。特に断りなき場合は凡て 35°C にて測定し、牛乳は全粉乳を還元し酸度 2.0cc としたものをを用いた。

2) 粉末調製法

いちじく latex より粉末酵素を得るにはその 3 倍容のアセトン又は 5 倍容のアルコールを加えて沈澱をつくり真空乾燥して得られる⁴⁾。両法を比較した結果 latex 8 cc あたり共に粉末収量は 0.75g であつたが、その 20mg を

10cc の水に溶かして凝固時間を測定するとアルコールの場合 20 分であるのに対しアセトンでは 35 分であつてアルコール沈澱の方が若干優れていた。よつて粉末は凡てアルコール沈澱によりつくることとした。原 latex を粉末に調製することによりその酵素力は、略同一時間で牛乳を凝固する酵素量より算定すると半分近くに減少する。

2) latex 及び酵素粉末の保存性

いちじく latex を蒸留水で 20 倍に稀釈して 0°C に保存して効力の変化をしらべると最初の 3 日間に著しく減少し後は緩慢に減少した。

HCl 及び NaOH で pH を適当に調節した 100 倍稀釈 latex を密栓し室温 (11 月上旬) で 8 日間保存しその間の効力の減少を各 pH についてしらべた結果第 1 図の如く pH 6~7 位が保存性によいことが認められた。保存中 pH は変化し 6.5 附近に近づく。

第 1 図 各 pH におけるいちじく latex 稀釈液の保存試験

(備考)

1) いちじく latex は pH 調節後 100 倍に稀釈した

2) 採取直後の値は 1 は 0.86、2, 3, 4 及び 5 は 1.33 である

3) pH 1.8 以下及び 9.0 以上では酵素は直ちに失活した

同時に作つた ficin 粉末を一方を普通のデシケーターに入れ一方を真空デシケーターに入れ 2 ヶ月保存した結果普通のデシケーターに入れたものは凝固力を全く失つていた。これは一部 HCN により賦活された。ficin は紫外線により失効すると云われるから⁶⁾ 褐色瓶に入れ且

つ減圧にして貯えるのが望ましい。

4) 薬品による ficin 凝乳作用の失活及び賦活

(i) H_2O_2 の作用 レニンに対する H_2O_2 の破壊濃度は一昼夜放置で 4.1~4.2% であるが⁷⁾, ficin に対する H_2O_2 の作用は極めて敏感で 1% 濃度で瞬間的に殆んど失われた。(第 1 表)

第 1 表 H_2O_2 による ficin 凝乳力の失活

H_2O_2 添加放置時間	凝 固 時 間
未添加	4 分
添加直後 (1%)	1 時間 50 分
〃 10 分後 (〃)	2 時間
〃 40 分 (〃)	3 時間 30 分
〃 4 時間 (〃)	4 時間で凝固せず

(ii) HCN の賦活作用 酵素液に 3% HCN 溶液を 1/10 容となる如く含ませ 40°C に放置し賦活に要する時間をしらべると約 1 時間で効力は最大となつた。2 週間室温放置後効力の全く失われたいちじく latex 稀釈液に 3% HCN 溶液を 2/3 容含ませ 40°C 1 時間放置後、10 分間で牛乳を凝固せしめる酵素量からその効力を算定した結果新鮮な latex の略 25% が復活していることが認められた。

(iii) フェニルヒドラジン及びヒドロキシルアミンの阻害作用 これらのアルデヒド試薬が ficin の凝乳作用に及ぼす影響を検討した結果、単に阻害作用を有するのみならず、或る時期迄は促進作用を有することが認められ、殊にこの作用は空気中の酸素又は H_2O_2 の微量で不活性化された酵素に対して明瞭であつた。第 2 表中(1)は新鮮な酵素粉末 (0.1% 溶液), (2)は保存により効力の減少した粉末 (0.2% 溶液), (3)は(1)の溶液を 10 日放置後更に少量の H_2O_2 で不活性化したものであるが、(2), (3)において明らかな賦活作用が認められ、これは両試薬の還元作用によるものと考えられる。

第 2 表 フェニルヒドラジン及びヒドロキシルアミンによる ficin 凝乳力の阻害

試料 番号	放置時間	凝 固 時 間 (分)			
		0 時間	0.5 時間	5 時間	24 時間
1	対照	1.5	2.5	3.5	4.0
	HCN	1.2	2	2.5	2.5
	ヒドロキシルアミン	1.5	7	28	29
	フェニルヒドラジン	1.5	4	19	18
2	対照	58	58		
	HCN	5	5		6
	ヒドロキシルアミン	27	180		>180
	フェニルヒドラジン	30	>180		
3	対照	35	39	37	18.5
	HCN	13.5	13.5	13.5	10
	ヒドロキシルアミン	13	17.5	32	26
	フェニルヒドラジン	9	22	130	>180

(備考) ヒドロキシルアミン及びフェニルヒドラジンはその 1M の塩酸溶液を酵素液の濃度に応じて 1/10~2/10 容含ませた

(iv) システインの賦活作用 酵素液 1 cc に塩酸システイン 5mg の割合で加え賦活作用をみると第 3 表の如く

なり、HCN に較べると添加後効力の減少は早い。

第 3 表 システインによる ficin 凝乳力の賦活

放置時間	凝 固 時 間 (分)		
	0 時間	0.5 時間	24 時間
対照	43	180	>180
システイン賦活	6	20.5	27
HCN	5	5	6

(備考) ficin は 0.2% 溶液を使用

(v) その他の還元性物質の影響 次亜磷酸ソーダは還元作用を有し人体に対しても無害である。この ficin 凝乳力に対する作用をしらべると第 4 表の如く賦活作用を示す。チオ硫酸ソーダによつても ficin は賦活されることが認められた。

第 4 表 次亜磷酸ソーダによる ficin 凝乳力の賦活

放置時間	凝 固 時 間 (分)			
	0 時間	0.5 時間	24 時間	48 時間
対照	60	60	51	51
HCN	18	18	15.5	13
次亜磷酸ソーダ	50	20	20	20

(備考) 次亜磷酸ソーダは 1M 溶液 2 cc を酵素液に加え 10 cc とした
HCN は 3% 溶液を同じく 10 cc とした

5) 酸度の影響

第 2 報¹⁾ に示した如く酸度上昇に対して ficin (はレンネットの如く敏感に凝固時間を短縮することはない。

6) 加熱及び作用温度の影響

(i) 加熱による酵素の破壊 レンネットに対する加熱の影響は 55°C で殆んど破壊されるが⁷⁾, ficin を各温度で 10 分間保ち冷却後その凝乳力をしらべると第 5 表の如く熱に対する抵抗力が強い。

第 5 表 加熱による ficin 凝乳力の失活

酵素液加熱温度 (10 分)	凝 固 時 間 (分)
未加熱	13.3
35°C	14.2
45	16.0
55	19.5
65	43.0
75	2 時間 30 分で凝固せず

(ii) 作用温度の影響 種々の温度で凝固時間を測定し、レンネットと ficin を比較すると第 6 表の如くレン

第 6 表 ficin 凝乳力に及ぼす作用温度の影響

作用 温度 (°C)	凝 固 時 間 (分)		
	レンネット	(1) ficin (2)	(3)
30	30	14	
35	13	4.8	
40	34	1.8	30
55	2 時間で凝固せず	1.0	1.2 10.3
65		0.33	0.53 2.3
75		0.25	0.53 1.0
85		0.25	0.50 2.5
90		0.25	0.50 凝固せず
95			

(備考) (2)は(1)の約 1/3 の効力の酵素液使用

(3)は(2)を正確に 2 倍希釈した

レンネットは食塩分析法により調整したもの⁷⁾を使用

ネットは55°C以上で凝固を示さなかったが、ficinは75°C以上で極めて急激に凝固する。高温でこのように急激に凝固するのはficinの破壊が進行するよりかはるかに速かに凝固作用が進行するためと考えられる。したがって添加酵素量を減ずると95°Cでは全く凝固しないようになった。

(iii) 牛乳予熱の影響 生全乳を用い、これを各温度で加熱した後冷却し蒸発により失われた水を補い、直ちに35°Cで酵素液を作用させた結果、第7表の如くレンネットと比較してficinは予熱による効力の減少が著しくない。酵素量が少いときは却って若干促進される傾向がある。

第7表 ficin 凝乳力に及ぼす牛乳予熱の影響

牛乳予熱温度	凝固時間(分)	
	レンネット	ficin
未加熱	10	(1) 2.8 (2) 8
63°C 30分	11	7
80°C 10分	39	4.2 6.8
90 " "	70	5.3 8.3
100 " "	100	10.5 11

(備考) (2)は(1)の3/5量の酵素添加

(iv) 加熱ホエーの凝固促進作用 以上の如き現象の一原因として加熱により牛乳中に活性化作用が現われる可能性が考えられたので、種々の温度に加熱したホエーのficin凝固に及ぼす影響を見た。即ち生脱脂乳をHClでpH4.6としてカゼインを除いて得られたホエーをNaOHでpH6.5に中和し、各温度に10分間加熱後蒸発水

第8表 ficin 凝乳力に及ぼす加熱ホエー添加の影響

	凝固時間(分)
ホエー無添加*	30
未加熱ホエー添加	34
70°C 加熱ホエー添加	9.5
80 " "	1.5
90 " "	1.2
100 " "	1.3

* ホエーの代りに水を加えた

分を補い、これに等量の濃厚な還元全粉乳(24gを水に溶かし100ccとしたもの)を加えてよく混合した後35°Cでficinを加え凝固時間を測定した。第8表の如く未加熱ホエーには殆んど影響がみられなかったに拘らず加熱ホエー添加によつては著しく凝固時間が短縮することが認められた。加熱によりホエーが還元性を示す事実が知られているから⁸⁾一つにはその促進作用によるものと考えられる。これは更に検討してみたいが、いずれにしてもficinの凝乳作用に及ぼす作用温度の影響は種々の要因が重つた複雑な結果によるものと考えられる。

7) カルシウム・イオンの影響

還元全粉乳にM/10 CaCl₂及びK₂C₂O₄溶液を種々

の量加えて同一条件でficin及びレンネットの凝固時間を測定した結果、第2図に示される如くCaCl₂の添加がficinの場合レンネット程顕著な影響を示さず、又レンネット凝固を止める程度のK₂C₂O₄添加によつてもficinではなお凝固する。

M/10 K₂C₂O₄溶液0.4ccを牛乳10ccに加えレンネットを適当時間作用させた後(凝固せず、但し等量のCaCl₂添加により直ちに凝固物生成)ficinを加えると凝固してくる。しかもこの際凝固時間は第9表に示す如くレンネット無添加乳に比して著しく短縮されることが認められた。

第2図 レンネット及びficinの凝乳力に及ぼすカルシウム塩及び蓚酸塩の影響

第9表 レンネット作用乳に対するficinの作用

作用乳の状態	凝固時間(分)	
	レンネット	ficin
蓚酸カリ無添加乳	6	5
" 添加乳	>180	40
蓚酸カリ添加レンネット作用乳	蓚酸カリ添加レンネット作用乳に対するficinの凝固時間(分)	
(レンネット作用時間)		
0分		4.7
10 "		4.5
30 "		4.0
60 "		4.0

レンニンにより生成したパラカゼインが更にficinの作用で凝固してきたものと考えられ、この点からレンニンとficinの牛乳凝固機構の差が想定される。

8) カードの収量について

生脱脂乳10ccずつをとり、2, 3の条件下でficinによつて凝固せしめ凝固直後及び適当時間放置後30% H₂O₂ 0.5ccを加え作用を止め蒸発水分を補い、2,000r.p.mで10分間遠心分離した後上澄部4ccを注意してとり、窒素を定量した。結果は第10表の如くレンネット・ホエーに比してficinホエー中の窒素量は若干大であつた。特に酵素力の強い場合にこの傾向を示した。高温で比較的小量の酵素を用いた場合凝固蛋白の収量は大であるようで

あつた。

第10表 作用条件の差による ficin ホエー中の窒素量の変化

ホエー中の窒素量 (mg)	酵素 作用温度 凝固時間 放置時間	レンネット 35°C 10分	ficin			
			A (Aの3倍稀釈)		C (Aの10倍稀釈)	
			35°C		75°C	
			2分	18分	10秒	2分
凝固直後		0.147	0.196	0.180	0.216	0.152
5分後*		•	•	•	0.292	0.152
10分*		•	0.206	•	0.328	0.157
30分*		0.144	0.208	0.193	0.366	0.160

*1 酵素液添加, H₂O₂添加による液量の変化を補正した値
*2 酵素液を添加してから時間(凝固に要した時間も含む)

II 豚乳中の牛乳凝固酵素

第2報を追試せんと、豚について数例、牛及び兎について1例ずつ食塩0.8~5%, HCl 2%, グリセリン10~60%及びこれらを組合わせた各抽出溶媒約30組を用いて抽出試験を行つたが凝乳作用は認められなかつた。ただ1例冬期に追試した豚乳に微かな凝乳作用が認められた。

第3図 豚乳(豚)抽出液の蛋白分解pH曲線

豚乳抽出液にはいずれも多少の蛋白分解作用が認められた。第1報による微量比色試験法⁷⁾により遊離チロシンのpH曲線を求めたところ第3図の如くpH1.9及び4.0に2つの山が認められた。凝乳作用もこの蛋白分解作用によると考えられるが、その実用性はない。

綜 括

いちじく乳汁中の牛乳凝固酵素 (ficin) 及び豚乳抽出液の凝乳作用について検討した。その結果、

- 1) ficin は牛乳凝固酵素として効力の点から充分実用性があり特に採取直後の latex の効力は大である。
- 2) 粉末化にはアルコール沈澱法がよくその過程で効力は略半減する。latex の保存には中性がよく、又粉末は暗所真空で貯えるのが望ましい。

3) HCN, システイン, 次亜磷酸ソーダ, チオ硫酸

ソーダ等は賦活作用を示し、フェニルヒドラジン、ヒドロキシルアミンは効力の減少した ficin に対しては添加直後賦活作用を示し、以後阻害作用を現わす。H₂O₂ 1% 濃度で凝固力は直ちに失活する。

4) レンニンに比して熱に安定で、凝固の至適温度は高い。又加熱したホエーは ficin 凝固力を促進する作用がある。

5) 酸度の上昇, Ca イオンの添加はレンネット程顕著に凝固時間

を短縮しない。酢酸塩添加レンネット作用乳は更に ficin 添加により凝固し且つレンネット無添加酢酸塩添加乳に対するよりもその凝固時間は著しく減少する。

6) ficin により得られたホエーの窒素量は一般にレンネット・ホエーよりも高く、特に酵素力の強い場合はかなり蛋白分解が伴うと考えられる。

7) 豚乳抽出液は通常の牛乳(酸度2.0 cc)を凝固させる程度の効力を有して居らず実用性は認められない。豚乳についてその蛋白分解力を測ると2つの至適 pH (1.9及び4.0) が認められた。

終りに御指導を頂いた佐々木林治郎教授に感謝の意を表する。なお本研究は文部省科学研究費によるものであることを附記する。(1954.11.27.受付)

文 献

- 1 津郷友吉, 小林真 (1955): 日畜会報, 26, 173.
- 2 C.R. KRISHNAMURTI & V. SUBRAHMANYAN (1948): Indian J. Dairy Sci. 1, 27; ibid. 1, 106; (1949): ibid. 2, 19.
- 3 N. NOSHER (1952): Indian Farming 9, 451.
- 4 A.K. BALLS & S.R. HOOVER (1937): J. Biol. Chem. 121, 737.
- 5 H. TAUBER (1950): The Chemistry and Technology of Enzymes 167.
- 6 L. MANDL & A. D. MCLAREN (1949): Arch. Biochem. 21, 408.
- 7 津郷友吉 (1951): 畜産物の科学, 1~2, 147, 159.
- 8 J. T. HUTTON & S. PATTON (1952): J. Dairy Sci., 35, 699.
- 9 津郷友吉 (1954): 日畜会報, 25, 6.

Résumé

The milk coagulating function by enzyme in the fig latex (ficin) and by the extracts of the testicles of animal (rabbit, cow and pig) were studied. The results were as follows.

(1) Ficin, especially fresh latex of fig, was very powerful in the coagulation of milk. Coagulating ability decreased by 50% during the process of alcohol precipitation and drying. It is desirable that the powder will be stored in the dark and vacuum place.

(2) HCN, cysteine, NaH_2PO_2 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ activated its coagulating activity. Phenylhydrazine and hydroxylamine activated at first and then inhibited when the weak enzyme was used. H_2O_2 remarkably inactivated milk coagulating action of ficin.

(3) Milk coagulating activity of ficin was relatively stable in the high temperature. Its optimum

temperature was also higher than that of rennin. Heated whey showed the activating action on coagulation by ficin.

(4) Increase of acidity and Ca ion does not so much strengthen the activity of ficin as that of rennin. The milk, which was treated with rennet but the coagulation of which was stopped by the addition of oxalate, was clotted by the action of ficin. And in this case coagulation occurred more rapidly than in the case where ficin was used alone.

(5) The yield of protein clotted by ficin was somewhat less than that by rennet, especially when powerful ficin was used.

(6) Generally speaking, the extract of testicles had little or no ability to clot the normal milk (acidity 2.0cc). When its proteolytic activity was measured on pig testicles by a colorimetric micro-method for estimating peptic action, two optimum pH were found (pH 1.9 and 4.0).