Penicillium roqueforti による乳蛋白の変化 (第2報)*

酵素標品の蛋白分解性と乳酸菌の影響

今 村 経 明 (岡山大学農学部)

昭和34年8月20日受理

チーズの熟成中に起る牛乳成分の変化は次第に生化学的に研究されるようになり、蛋白質の変化についても培養または熟成中の単なる窒素分布の変化⁽¹⁾や遊離アミノ酸の検出から、関連微生物の生化学的作用を取上げるようになった。このことは Harper 等の綜説^(2,3)や Schormüller の研究^(4,5)でその一端を知ることが出来、熟成に関与する諸酵素の存在或いはその性質が解明されつつある。著者等⁽⁶⁾や Golding⁽⁷⁾も、*P. roqueforti* の培養によって起る蛋白質の変化を調べたが、かびの生育につれて他成分の変化が伴うため明確な蛋白分解性を知ることが難しかった。例えば乳糖の存在する間は培地が酸性に保たれるが、乳糖消失と共に次第にアルカリ性となるから酵素作用の行われる pH が異なってくる。そこで *P. roqueforti* の菌体抽出液 (cell extract) と培養濾液 (cell-free medium) を酵素標品 (enzyme preparation) として、そのカゼイン分解性を検討した。既報⁽⁶⁾の如くカゼインの変化はチーズ蛋白の変化と考えられるので *P. roqueforti* によって熟成するチーズ即ちロックホールチーズの熟成に関連して考察することにした。また実際にはスターターとして乳酸菌を使用する。このものは、種々なる乳酸菌を用いて作ったチーズの風味試験^(8,9)、化学試験^(10,11)及びプロテアーゼの性質⁽¹²⁻¹⁵⁾からみて風味生成に重要な因子となっている。また製造中及び熟成初期に著しく生育して培地を酸性にするので、生育する微生物群が限られる^(16,17)。*P. roqueforti* に対してもその乳糖消費を促進することは既報の如くである⁽²²⁾。これは乳酸菌のラクターゼが強いためであると推察したが、本研究では蛋白分解性に及ぼす影響を酵素学的に検討した。

実験の方法

(1) *P. roqueforti* の培養及び酵素標品の調製法：苛性ソーダ溶液に溶解したカゼインを 0.1% 添加した Czapek 液に約 25° で 1 週間培養し、菌蓋を濾別して生理食塩水と蒸留水で洗滌した後 Waring ブレンダーで細砕し、更に Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで硝子毛細管と共に磨砕した。得られた液に 1N 塩酸溶液を加えて pH を 5 に調節し、4,000~5,000 r. p. m. で 5 分間遠心分離した後、上澄液を菌体抽出液として使用した。菌蓋濾別後の培養濾液は 5,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離して浮遊する菌体を除き、無菌的にしたものを凍結濃縮して培養濾液とした。

(2) 乳酸菌の培養及び酵素標品の調製法：使用した乳酸菌は *Str. lactis*, *Str. cremoris* 及び *Lact. bulgaricus* で何れも農技研畜産部より譲り受けたものである。各菌種の生育適温でペプトン・酵母水に培養した後、8,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離して菌体を集め、Nelson 等の方法⁽¹⁴⁾に準じて磨砕、抽出を行った。

(3) 蛋白分解度の測定法：Hammersten カゼインの 0.5 g を 0.1N 苛性ソーダ溶液に溶解して 100 cc としたものを基質となし、チロシンの生成量を以て蛋白分解度の指標とした。即ち基質 5 cc (カゼイン 25 mg を含む) に酵素標品 2 cc を加え、更に 0.1N 塩酸溶液または緩衝液を加えて全量を 10 cc とし、反応の前後におけるチロシン量の変化を津郷等の方法⁽¹⁸⁾に準じて測定した。対照には 85° で 10 分間加熱した酵素標品を用い、増加したチロシンの量を mg 数で表わした。この場合の反応時間は第 1 図の結果から 2.5 時間となし、緩衝液には第 1 表の結果から 0.1M クエン酸カリと 0.1N 苛性ソーダ溶液を使用した。

実験結果並びに考察

(1) pH 及び温度の影響 第 2 及び第 3 図に示す如く 5.0~8.0 の pH 範囲で 5.5, 3~50° の範囲で 42° 付近において最高のチロシン生成即ちカゼイン分解力を示した。Naylor 等⁽¹⁹⁾によれば 30° で pH 5.3 が *P. roqueforti* のプロテアーゼの至適条件であるから、第 3 図に示される至適温度はこれよりも高い。またチーズの熟成が行われる温度は 10° 以下であるが、この温度では著しく活力が低下する。しかし熟成中の pH は 5.5~6.0

* Studies on the Changes of Milk Proteins by *Penicillium roqueforti*. Part II. Proteolysis by Enzyme Preparation and Effects of Lactic Acid Bacteria.

By Tsuneaki IMAMURA (Department of Agriculture, Okayama University)

第 1 図 酵素作用と反応時間の関係

第 1 表 酵素作用と緩衝液の関係

緩 衝 液 の 種 類	チロシン生成量	
	mg	比
0.1 N 醋酸+0.1 N 醋酸ナトリウム	0.076	100
0.05 M コハク酸+0.05 M 硼酸ナトリウム	0.080	105.2
0.2 M フタル酸カリ+0.2 N NaOH	0.074	97.4
0.1 N KH_2PO_4 +0.1 N Na_2HPO_4	0.065	85.5
0.1 M クエン酸+0.2 M Na_2HPO_4	0.110	144.7
0.1 M クエン酸カリ+0.1 N NaOH	0.142	186.8
0.1 M 醋酸カリ+0.05 M 硼酸ナトリウム	0.103	135.5
対 照	0.076	100

第 2 図 酵素作用と pH の関係

第 3 図 酵素作用と温度の関係

であるので至適 pH に近い。実際には他の微生物の生産する酵素や牛乳本来の酵素も含まれるので複雑になる。例えば Schormüller⁽⁶⁾ はチーズプロテアーゼの至適 pH として 4.6~4.8 及び 7.6~7.8 の 2 点を挙げているし、Price 等⁽²¹⁾ はチエダーチーズのプロテアーゼは酸性側とアルカリ性側に至適 pH があると報告している。また Raadsveld & Mulder⁽²⁰⁾ もはエダムチーズについて実験し、pH の高い方が蛋白質の分解が著しいと述べている。しかし実際に熟成に直接関係するのは細菌に由来する酵素で、酸性側に至適 pH のあるものである⁽²¹⁾。

(2) *P. roqueforti* の生育との関係
Czapek agar の斜面培養を生理食塩水で洗滌して孢子懸濁液となし、パイプレーターで孢子を分散させた後 1 cc を Czapek 液 100 cc に接種して培養期間中の菌蓋重量と蛋白分解作用の変化を調べた。得られた結果は第 4 図に示す通りであって、Naylor 等も指摘した如く⁽¹⁹⁾、かびの生育につれて全体の蛋白分解作用も増大する。しかし培養後 1 週間で菌蓋生成量が最大となった後は、菌体抽出液の蛋白分解作用が漸減する傾向を示す。この結果を菌蓋 1 g 当りのチロシン生成量（これを比活性：specific activity と表現した）でみると、生育が対数期から定常期に移行した頃が最も活力の高い時期で、以後漸減することが認められる。このような菌体抽出液の活力低下と逆に培養濾液による蛋白分解が漸増する。培養濾液による蛋白分解は第 1~4 図の点線で示されるように極めて微弱である。しかし温度及び pH との関係は菌体抽出液の場合に似ているから（第 2 及び第 3 図参照）、おそらく同一のものであろう。従って *P. roqueforti* の生産するプロテアーゼが菌体内にあるか培養液中に存在するかは、かびの生育の段階によって異なるものと思われる。しかし培養濾液の濃縮を定量的に行っていないので、菌体内にあったプロテアーゼが菌体外に排出されたために培養濾液の

蛋白分解力が増加したことを定量的に説明することは出来ない。

実際にチーズ、特にかびの集落から離れた内部の蛋白分解に関与するのは菌体外に排出されたプロテアーゼで

第 4 図 *P. roqueforti* の生育と酵素作用の関係

* () 内は比活性の場合

第 5 図 酵素作用の失活と温度並びに期間の関係

○—○ 4° で保存 ●—● 25° で保存

で消滅したとしても⁽¹⁶⁾細菌によって熟成するチーズの蛋白分解に関与することが考えられる。ロックホールやカメンバーチーズでは青かびを接種、培養するので直接的な影響は少ないが、ペプシンの作用がトリプシンを予め

第 6 図 乳酸菌の蛋白分解作用と pH 及び温度の関係

○—○ *Str. lactis* △—△ *Str. cremoris*
×—× *Lact. bulgaricus*

あるが、*P. roqueforti* の生育適温、即ち 25° では急速にその活力を失う (第 5 図参照)。従って既報の如く⁽⁶⁾ 脱脂乳を培地として 25° で培養すればかびの生育が著しく、これに伴ってプロテアーゼの生産も増大するから非蛋白態窒素の増加も顕著であるが、その失活も早い。ロックホールチーズの熟成が行われる温度：4.5~10° ではかびの生育も遅くプロテアーゼの活力も低いが、失活する速度も遅い。従って至適温度よりも低い温度で熟成が行われても、

チーズ蛋白の分解は比較的進行すると考えられる。

(3) 乳酸菌の影響 著者等はかつて *Str. lactis* が殆んど非蛋白態窒素を増加しないにもかかわらず、*P. roqueforti* と共に脱脂乳に培養するとかびの生育及び非蛋白態窒素の生成を促進することを認めた。この点について乳酸菌はかびの生育を促進させるために附随して蛋白分解が増大されると推論した。しかし *P. roqueforti* に比べれば微弱であるが乳酸菌も蛋白分解力を有し、その菌体抽出液によるチロシン生成をみると第 6 図の如くなる。また乳酸菌のプロテアーゼは体内酵素であって、菌が死滅したような古い培地内でも蛋白分解が行われるから、スターターとして加えた乳酸菌が熟成開始後短時日

作用させることによって促進されることもあるので、次に実験を試みた。*P. roqueforti* と乳酸菌の菌体抽出液を各単独及び混合してカゼインに作用させ、生成するチロシン量を測定した。得られた結果は第 2 表に示す如く、合同しても各単独の場合の和に近いチロシンを生成するのみで促進されることは認められなかった。従って (a) 乳酸菌は *P. roqueforti* の生育及び乳糖の消費を促進すること⁽²²⁾。(b) 乳糖は *P. roque-*

第 2 表 *P. roqueforti* と乳酸菌の菌体抽出液による蛋白分解作用

	乳酸菌の種類		
	<i>Str. lactis cremoris</i>	<i>Str. cremoris</i>	<i>Lact. bulgaricus</i>
乳酸菌単独の場合 (A)	0.085	0.040	0.080
<i>P. roqueforti</i> と混合の場合 (B)	0.377	0.209	0.358
<i>P. roqueforti</i> 単独の場合 (C)	0.304	0.156	0.288
B-(A+C) (計算値)	-0.012	0.013	-0.010
(チロシンの mg 数を表わす)			

forti の炭素源として適当でないこと⁽²³⁾。(c) *P. roqueforti* は微酸性でよく生育すること⁽²³⁾から考えると、乳酸菌の影響は培地即ちチーズを酸性にして *P. roqueforti* の生育を良好にし、これに附随して牛乳成分例えば蛋白質の分解を増大するものと思われる。

結 論 及 び 要 約

P. roqueforti によるカゼイン分解の模様を知るために、菌体抽出液及び培養濾液を酵素標品としてチロシン生成量を指標として調べた。またスターターとして加える乳酸菌の影響を知るために *Str. lactis*, *Str. cremoris* 及び *Lact. bulgaricus* のカゼイン分解についても実験し、得られた結果をロックホールチーズ熟成の際に起る牛乳蛋白質の変化に関連して考察し、次の結論を得た。

(1) *P. roqueforti* によるカゼイン分解の至適 pH は 5.5 で、温度は 42° である。従ってロックホールチーズの熟成はこのかびの蛋白分解に適した pH で行われていることになる。

(2) 蛋白分解度は *P. roqueforti* の生育に伴って増大するが、酵素の活性は対数期から定常期に移った頃が最も高い。菌体外に排出された酵素は温度の高い程速かに失活する。従ってロックホールチーズの熟成温度ではかびの生育とカゼインの分解は比較的緩徐であるが、プロテアーゼの活性が永く保持されるので蛋白分解は相当進行すると思われる。

(3) スターターとして用いる乳酸菌はチーズ製造の際の pH でカゼインを分解することが出来るが、その作用は *P. roqueforti* に比し著しく微弱である。この乳酸菌が *P. roqueforti* の蛋白分解を促進するのは、乳糖の分解及び乳酸の生成によりかびの生育を促進することに基因し、直接蛋白分解に寄与する効果は認められなかった。

以上の実験を進めるに当り御指導、御鞭撻を戴いた佐々木林治郎並びに津郷友吉先生、菌株を戴いた農技研畜産部及び実験に協力された片岡啓君に謝意を表するものである。

(1) B. A. Eagles, W. Sadler : <i>J. Dairy Research</i> , 3, 227 (1932).	(13) E. Brandseter, F. E. Nelson : <i>J. Bact.</i> , 72, 68 (1956).
(2) W. J. Harper, T. Kristoffersen : <i>J. Dairy Sci.</i> , 39, 1773 (1956).	(14) W. C. Van der Zant, F. E. Nelson : <i>J. Dairy Sci.</i> , 36, 1212 (1953).
(3) W. J. Harper : <i>J. Dairy Sci.</i> , 42, 207 (1959).	(15) L. E. Baribo, E. M. Foster : <i>J. Dairy Sci.</i> , 35, 149 (1952).
(4) J. Schormüller, R. Wieske, H. Winter : <i>Z. Lebensmitt. Untersuch.</i> , 100, 35 (1951).	(16) D. J. Dawson, J. T. Feagan : <i>J. Dairy Research</i> , 24, 210 (1957).
(5) J. Schormüller, R. Wieske, H. Winter : <i>ibid.</i> , 100, 437 (1954).	(17) P. A. Hansen : <i>J. Dairy Sci.</i> , 24, 969 (1941).
(6) 今村経明, 津郷友吉 : 本誌, 29, 265 (1955).	(18) 津郷友吉 : 日畜会報, 25, 6 (1954).
(7) N. S. Golding : <i>J. Dairy Sci.</i> , 17, 61 (1934).	(19) N. H. Naylor, L. W. Smith, H. F. Collins : <i>Iowa State Coll. J. Sci.</i> , 4, 465 (1930).
(8) H. A. Morris, W. B. Combs, S. T. Coulter : <i>J. Dairy Sci.</i> , 34, 209 (1951).	(20) C. W. Raadsveld, H. Mulder : <i>Neth. Milk and Dairy J.</i> , 3, 222 (1949).
(9) S. T. Coulter, W. B. Combs, J. S. George : <i>J. Dairy Sci.</i> , 21, 239 (1938).	(21) M. H. Peterson, M. J. Johnson, W. V. Price : <i>J. Dairy Sci.</i> , 31, 47 (1948).
(10) A. C. Dahlberg, F. V. Kosikowsky : <i>J. Dairy Sci.</i> , 31, 275 (1948).	(22) 今村経明, 田中 稔, 津郷友吉 : 本誌, 29, 269 (1955).
(11) 大条方義 : 日畜会報, 14, 46 (1943).	(23) N. S. Golding : <i>Mycologia</i> , 17, 19 (1925).
(12) W. C. Van der Zant, F. E. Nelson : <i>J. Dairy Sci.</i> , 37, 795 (1954).	