微生物が生産する凝乳酵素について (第7報)

Whole-, κ -, ($\alpha_s + \beta$)-casein 寒天ゲル平板に対する *Mucor pusillus*

LINDT 生産酵素 Mucor rennin と他のプロテアーゼの作用

柳 洲鉉, 田村学造, 有馬 啓

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 43 年 7 月 12 日 受理

Milk Clotting Enzyme from Microorganisms

Part VII. Action of Mucor-rennin and Other Proteases on Hammarsten-, κ - and ($\alpha_s + \beta$)-casein Agar Gel Plate

By Juhyun YU, Gakuzo TAMURA and Kei ARIMA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo

(1) When the rennin, rennin-like enzymes and other proteases were incubated on the each casein agar gel plate, the formation of white turbid zone were observed. And patterns of white turbid zones on each plates by each enzymes were compared. The diameters of white turbid zones on κ -casein gel plates formed by the rennin-like enzymes (animal rennin crystal, Pfizer microbial rennin, Hansens cheese rennet and Mucor-rennin (isolated from *Mucor pusillus* LINDT)) were larger than those Hammarsten-casein agar gel plates. In the case of other proteases, the patterns of formation of turbid zones observed on κ -casein and Hammarsten-casein agar gel plates did not exhibit remarkable differences.

(2) When Mucor-rennin solution was incubated on κ -casein agar gel plates, the following points were observed: i) the turbid zone area was increased by addition of Ca ion, ii) the layer of the distinct turbid and clear zone was easily formed at higher level of enzyme concentration and at lower incubation temperature, iii) logarithms of milk clotting activity (U) were proportional to the values of the white turbid zone area formed (A).

$$A = \kappa \log U + A_0$$

(Received July 12, 1968)

動物レンニンは子牛の第四胃から分離精製され結晶として得られている⁽¹⁾. 微生物を用いて, その酵素に代用できる酵素の開発のための研究も数多く報告されている⁽²⁻¹⁵⁾. *Mucor pusillus* LINDT の固体培養から, 動物レンニンにきわめて類似した凝乳酵素⁽¹³⁻¹⁷⁾が得られ, 結晶化された^(17,19,23). さらに本酵素は動物レンニンの場合に認められたのと同じく, whole-casein, (α_s -casein + β -casein), κ -casein を各々基質として用いた場合, TCA 可溶性蛋白質の遊離が, κ -casein が最も速やかであることも既に報告した⁽¹⁴⁾.

Cheeseman⁽²⁰⁾ と Ganguli ら⁽²¹⁾ は casein 寒天ゲル

平板上で動物レンニンを反応させると, 白濁 zone が形成することを報告している. 著者らは新しい菌株の選択, 培養条件の検討において能率を高める目的で κ -, ($\alpha_s + \beta$)-, Hammarsten-casein 寒天ゲル平板を用い, 動物レンニン類似酵素と他のプロテアーゼ等の区別法に関し研究を行ない, Cheeseman または Ganguli らの報告と別の新しい結果を得たので, これらの知見について述べる.

材料および実験方法

プロテアーゼ溶液の調製法 Table I に示した酵素を水にとかし用いた.

各 casein 溶液の調製法 未殺菌の脱脂乳を 1N HCl

Table I. List of Proteases

proteases	Milk clotting activity (units/ml)
Calf rennin crystal	1091
Hansens cheese rennet	96
Pfizer microbial rennin	92
Mucor-rennin	925
Pronase A. S.	6.5
Ficin	11.4
Chitinase S-4	4.45
ラビダーゼ (武田薬品)	28.1
Streptomyces protease (協和酸酵)	0.74
Papain	2.73
Pancreatin-Daiwa Kasei	0.74

で処理し、酸 casein を得、この casein より Zittle 法⁽²²⁾に従って、 κ -casein と粗 α_S -casein (α_S -casein + β -casein) を分離した。なお、whole-casein としては Hammersten-casein (Merck 製) を用いた。各々の casein を稀水酸化ナトリウム溶液にとかし、水で稀釈して 1% κ -casein 溶液, 2% 粗 α_S -casein 溶液, 2% Hammersten-casein 溶液 (pH 6.5) に調製する。その後、調製した casein 溶液を 70°C で、30 分間殺菌した。

Casein 寒天ゲル平板調製法と酵素の反応法 Ganguli と Cheeseman ら^(20,21)の方法を改変し、寒天 1.5 g を 98.5 ml の水に懸濁させ、120°C で 20 分間滅菌する。滅菌した寒天液に同容量のカゼイン溶液を加え、混合し、厚さ 1.0 mm の casein ゲル平板を調製する。このゲル平板上に酵素を吸着させた東洋濾紙 paper disk (直径 8 mm) を置き実験に応じて反応温度、反応時間を選定し、反応させる。

凝乳活性の測定法 凝乳活性の測定法は前報⁽¹⁸⁾の方法に従って測定した。すなわち、脱脂粉乳 (雪印乳業) 10 g に 0.1 M CaCl_2 溶液 10 ml と蒸留水 80 ml を加え、混合する。この 5 ml を 25 ml の試験管に取り、35°C に放置する。酵素溶液 0.5 ml を上記の試験管に入れた後に混合して、凝固時間を測定する。この測定時間から凝乳活性を算出した。このとき、1 分間で凝固する凝乳活性を 400 units と定義した。

実験結果

レンネットおよびレンネット類似プロテアーゼと他のプロテアーゼの反応によって casein 寒天ゲル平板上に形成される白色凝集 zone の形状の差

Cheeseman らは whole-casein 寒天ゲル平板にレンニン、ペプシン、トリプシンを作用し、酵素作用で生ずる白濁 zone の差について述べている⁽²⁰⁾。動物レンニン

Fig. 1. The Different Patterns of the White Turbid Zones when Proteases were incubated on κ -, Hammarsten- and ($\alpha_S + \beta$)-Casein Agar Gel Plate at 30°C.

K : κ -casein agar gel plate, W : Hammarsten-casein agar gel plate, A : α_S -casein agar gel plate, the incubation time : 66 hr and 30 min, Rennin crystal (1), Hansens cheese rennet (2), Pfizer microbial rennin (3), Mucor-rennin (4), Papain (8), Ficin (13), Streptomyces protease (16).

と Mucor-rennin の凝乳酵素は whole-casein, α_S -casein より κ -casein を容易に分解する⁽¹⁴⁾。これらの差を利用し、Table I に示したような凝乳活性を持っている各々のプロテアーゼ溶液を東洋濾紙 paper disk に吸着させ、casein 上に置き 30°C で反応させ、66 時間 30 分後に、各々のプロテアーゼ反応によって、各 casein ゲル上に形成される白濁凝集 zone の形態および zone の直径に関し、比較検討した。Fig. 1 で観察されるようにチーズ製造用のレンニンおよびレンニン様酵素 (結晶動物レンニン, Hansens cheese rennet, Pfizer microbial rennin, Mucor-rennin) 作用によって形成される白濁 zone の半径および面積は Hammarsten-casein ゲル平板上に生ずるより、 κ -casein ゲル平板上に生ずる zone が著しく大きい。しかしレンニン様酵素以外のプロテアーゼ作用によって形成される zone の大きさは両 casein ゲル平板上で相互に多少の差を示し、 κ -casein より Hammarsten-casein のゲル平板上に、大きい zone を生ずるプロテアーゼもあった。Streptomyces プロテアーゼの作用で形成される zone の形態は、透明な zone が他のプロテアーゼより明らかに大きく示された。 α_S -casein ゲル平板は白濁であり、Streptomyces プロテア

ーゼ, レンニン, Mucor-rennin 等の作用で透明な zone を形成した. この中でも, Streptomyces プロテアーゼは特に大きな透明 zone を生じた.

白濁 zone 形成に対する反応時間の影響

プロテアーゼ作用で形成される zone を経時的に調べた結果を Fig. 2 に示した. いずれのプロテアーゼにおいても反応する時間につれて形成される白濁 zone の半径は長くなる. この結果は Ganguli らの結果⁽²¹⁾と同じである. 同時に zone の透明部分と白濁部分との重層が

生じ, 酵素の大部分は反応時間が長びくことによって一層から二重, 三重, ……層の zone を形成する.

Hansen's cheese rennet, 動物レンニン結晶, Pfizer microbial rennin, Mucor-rennin 酵素等の酵素反応で, 各 casein ゲル平板上に生ずる zone の面積, 直径, 反応時間の関係を Fig. 3 に示した. この結果で示したように, 反応時間が長くなるにつれて zone の面積と直径が増し, zone 面積は反応時間に比例した.

プロテアーゼ作用によって生ずる zone の形成に対す

Fig. 2. The Different Patterns of the White Turbid Zones by Proteases when Proteases were incubated on κ - and Hammarsten-casein Agar Gel Plate at 30°C for 20~80 hr.

White turbid zone was shown by .

γ : Radius of white turbid zone.

Fig. 3. Relationship between White Turbid Zone (diameter and area) and Incubation Time when Proteases were incubated on κ -Casein Agar Gel Plate at 30°C.

△ Rennin (9250 U/ml), × Hansens rennet (960 U/ml), ● Pfizer microbial rennet (920 U/ml), ○ Mucor-rennin (10,910 U/ml).

る Ca イオンの影響

Whole-casein 寒天ゲル平板に, レニン, ペプシン, トリプシンを各々反応させた後, Ca^{2+} を spray すると白濁 zone の外部に新しい白濁 zone が示される⁽²⁰⁾. このことから動物レンニン結晶, Hansen's cheese rennet, Pfizer microbial rennet, Mucor-rennin, papain, ficin, Streptomyces プロテアーゼ等の作用に対する Ca^{2+} の影響をあらかじめ CaCl_2 を加えて調製した casein 寒天ゲル平板上で調べ, この結果を Fig. 4 に示した. プロテアーゼが κ -casein ゲル上に反応して生ずる白濁 zone の面積は Ca^{2+} 添加によって加えない場合より増した. Hammarsten-casein ゲル上では κ -casein ゲル上でのような差はなかった. 過量の Ca^{2+} を加えたとき, κ -casein ゲル自体は白濁しないが, Hammarsten-casein ゲル自体は白濁し, zone の区別が困難であった.

κ -Casein Agar Gel		Hammarsten-casein gel	
Experimental No.	Concentration of CaCl_2	Experimental No.	Concentration of CaCl_2
K-1	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$	W-1	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$
K-2	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$	W-2	$25 \times 10^{-4} \text{ M}$
K-3	0	W-3	0

Fig. 4. Effect of Ca Ion Concentration on White Turbid Zone.

(1) Rennin crystal, (2) Hansens cheese rennet, (3) Pfizer microbial rennet, (4) Mucor-rennin, (8) Papain, (13) Ficin, (16) Streptomyces protease.

Mucor-rennin 酵素が κ -casein 寒天ゲル平板上に作用するとき形成される白濁 zone と反応温度, 酵素濃度との関係

Mucor-rennin 酵素溶液を 9250, 925, 92.5, 9.25 units/ml に各々調製する. κ -casein 寒天ゲル平板から直径 1cm のコルクボールでゲルを抜き取り, そこに各濃度の酵素溶液 0.1ml を加える. その後, 5, 12, 30°C で各々 24 時間 30 分反応させ, zone の形成と反応温度の関係を検討し, 結果を Fig. 5 に示した. いずれの濃

Fig. 5. Relation between Incubation Temperature and the Layer of the White Turbid-clear Zone when Mucor-rennin Enzyme was incubated on κ -Casein Agar Gel Plate for 24 hr and 30 min.

Volume of the enzyme : 0.1 ml.

White turbid zone was shown by ■.

度の凝乳活性においても, 5°C で形成する zone の直径は 30°C で形成される zone の直径より短い。同じ温度で酵素を反応させたとき, 形成された白濁 zone の直径は酵素濃度が濃い溶液のほうが薄いほうより長く示された。

9250 units/ml の酵素を用いたときの casein 寒天ゲル平板上に生ずる透明な zone と白濁 zone との重層は 5°C と 12°C で形成し, 925 units/ml の酵素液を使用すると 5°C だけで形成された。他の凝乳活性の低い酵素液においては, いずれも zone の重層が認められなかった。

ついでに, 凝乳活性と形成される白濁 zone の面積, 直径との関係を検討し, 結果を Fig. 6, Fig. 7 に示した。酵素濃度を濃くするにつれてゲル平板上に形成する白濁 zone の直径および面積は増し, この面積と酵素濃度の対数値は相互に比例関係を示した。

考 察

Cheeseman⁽²⁰⁾ と Ganguli ら⁽²¹⁾ が whole-casein 寒天ゲル平板に動物レンニン, ペプシン, トリプシンを作用させ, ゲル上に白濁 zone を形成し, これらの zone の形態がレンニンとトリプシンとは相互に異なることを

Fig. 6. Relationship between Concentration of Enzyme and Diameter of White Turbid Zone when Mucor-rennin was incubated on κ -Casein Agar Gel Plate at 30°C for 20 hr.

Milk clotting activity of mucor-rennin :

(1) 9250 units/ml, (2) 925 units/ml, (3) 92.5 units/ml, (4) 9.25 units/ml.

Volume of enzyme solution : 0.1 ml.

Fig. 7. Relationship between Diameter and Area of the Clotting Zone (the turbid zone) and the Concentration of Mucor-rennin on κ -Casein Agar Gel Plate.

● Zone-diameter, ○ Zone area, at 30°C.

報告した。

著者らは *Mucor pusillus* var. LINDT が生産する酵素を Amberlite CG-50, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 column で精製し, 結晶として得ている^(17,18,23)。この酵素は分子量が約 29,800 で, 構成アミノ酸残基数 277~281 個^(19,24)。そのプロテアーゼ活性中心にヒスチジンが関与している⁽²⁴⁾ のものと考えている。また, Mucor-rennin と動物レンニンは α_s -casein,

whole-casein より κ -casein を容易に加水分解する⁽¹⁴⁾. この性質を利用し, κ -casein, (α_s -casein + β -casein), Hammarsten-casein 等の寒天ゲル上に作用させ新しい知見を得た. チーズ製造に適当な動物レンニン結晶, Hansen's cheese rennet および Mucor-rennin 等のレンニン類似酵素と他のプロテアーゼを各 casein ゲル平板上に各々作用させると, ゲル平板上に白濁凝集 zone を形成し, 反応時間が長くなるにつれて zone 面積も増した. 一定量の同じ種類の酵素を各 casein ゲルに作用させれば, 動物レンニンに類似した酵素は Hammarsten-casein ゲル平板上より, κ -casein ゲル平板上に zone を速やかに形成し, zone の面積が広がる. 他のプロテアーゼ (pronase A. S., パパイン, トリプシン, pancreatin, ペプシン, ficin, chitinase S-4, ラビダーゼ, Streptomyces プロテアーゼ, molsin) の反応で形成する zone 面積は両 casein ゲル平板上において相互に多少の差を示し, κ -casein ゲルより Hammarsten-casein ゲル上に形成される zone のほうが広いプロテアーゼもある. このような結果からも Mucor-rennin は動物レンニンに極めて似ていると考えられる.

Streptomyces プロテアーゼは他のプロテアーゼの zone に比較し, 透明 zone の面積が白濁 zone より広い. いずれのプロテアーゼも長時間反応することにより zone の重層が生じ, 一層から, 二, 三……層の zone を形成する. Mucor-rennin が生ずる zone に対する反応温度, 酵素濃度の関係では, 高温反応より低温反応, 低い濃度の酵素液より濃い濃度の酵素溶液を用いたほうが, zone の重層を容易に形成した. このような結果は zone の重層現象がプロテアーゼの種類によって多少異なるが, 主に反応温度, 反応時間, 酵素活性が関与することを示唆する.

動物レンニンを whole-casein 寒天ゲル平板に作用させたとき, 凝乳活性の対数値は, 形成される白濁 zone の直径に比例する⁽²⁰⁾. Mucor-rennin を各種濃度に調節して, κ -casein ゲル平板に作用させ, 凝乳活性と白濁 zone 面積との関係を調べたとき, 凝乳活性 (U) の対数値は酵素反応で形成される zone 面積 (A) に比例した. この結果から次の式が成立つ.

$$A = k \log U + A_0$$

k は zone の形成係数, A_0 は酵素添加時の最初の酵素接触面積を示す.

Hammarsten-casein ゲルに過量の Ca^{2+} を加えると白

濁する. κ -casein ゲルは Ca^{2+} で白濁しない. また, Mucor-rennin を κ -casein ゲルに反応するとき, Ca^{2+} を加えることによって zone の形成が早くなった. これらは casein 溶液を用いたときの Ca^{2+} 効果と同じ結果であった.

以上述べた結果にもとづいて, 次のように結論することができる. *Mucor pusillus* var. LINDT が生産する Mucor-rennin は casein 寒天ゲル平板上においても動物レンニンの性質に類似しており, κ -casein ゲルを用い, 抗生物質のようにゲル上で凝乳活性の測定ができる. また凝乳力の強い変異株を得るにも役に立ち, さらに κ -casein と Hammarsten-casein 寒天ゲルを比較することによって, 新しいレンニン類似凝乳酵素生産菌の選択にも役立てることができよう.

この研究において御助言および *Mucor pusillus* var. LINDT が生産する Mucor-rennet と他のプロテアーゼ, casein を提供して下さった岩崎慎二郎氏 (名糖産業株式会社), パパインを提供して下さった高橋礼介氏 (キリンビール株式会社) に感謝いたします.

- (1) N. J. Berridge : *Biochem. J.*, **39**, 179 (1945).
- (2) 入江淑郎, 金沢義信, 今井富雄 : 日本農芸化学会大会講演要旨, p. 136 (1966); 同上, p. 121 (1967).
- (3) D. Ya. Tipogrf, A. I. Veselov, Le Van Nong, M. S. Mosichem : *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **2**, 45 (1966).
- (4) I. Emanuilor : XIV th Int. Dairy Congr. Proc., **2** (2), 200 (1956).
- (5) K. Morihara : *Agr. Chem. Soc. Japan*, **39**, 514 (1965).
- (6) Z. Puhon : Int. Dairy Congr., XVII D, 199 (1966).
- (7) G. A. Somukuti, F. J. Babel : *J. Dairy Sci.*, **49**, 700 (1966).
- (8) S. G. Knight : *Can. J. Bot.*, **12**, 420 (1966).
- (9) A. A. Yulius, O. Kh. Tinyakova : *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **2**, 670 (1966).
- (10) I. Y. Velselov, P. Y. Tipograf, T. A. Pentina : *ibid.*, **1**, 52 (1965).
- (11) P. F. Dyachench, V. V. Slavyanova : XV Int. Dairy Congr., Sect. IV - I, 349 (1962).
- (12) J. L. Shimwell, J. E. Evans : Brit. Patent, 565,789 (1944).
- (13) K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura : *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967).
- (14) S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima : *ibid.*, **31**, 546 (1967).

- (15) S. Iwasaki, T. Yasui, G. Tamura and K. Arima : *ibid.*, **31**, 1427 (1967).
- (16) S. Iwasaki, J. Yu, G. Tamura and K. Arima : 7th International Congress of Biochemistry Tokyo, Abstract IV, p.758 (1967).
- (17) J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima : The Annual Meeting of Agr. Chem. Soc. of Japan, Abstract, p.203 (1968).
- (18) K. Arima, J. Yu, S. Iwasaki and G. Tamura : *Appl. Microbiol.*, in pressed, June (1968).
- (19) J. Yu, G. Tamura and K. Arima : *Biochim. Biophys. Acta*, in pressed, June (1968).
- (20) G. C. Cheeseman : *J. Dairy Research.*, **30**, 17 (1963).
- (21) N. C. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer and T. L. McMeekin : *J. Dairy Sic.*, **35**, 272 (1952).
- (22) C. A. Zittle and J. H. Custer : *ibid.*, **46**, 1183 (1963).
- (23) J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1048 (1968).
- (24) J. Yu, G. Tamura, K. Arima : *ibid.*, **32**, 1051 (1968).
-