アフィニティークロマトグラフィーによる チーズ中の蛋白質分解酵素の分離

祐川金次郎, 内川弘司, 加藤 稔
(帯広畜産大学酪農学科)

昭和 52 年 11 月 4 日 受理

Isolation of Proteolytic Enzyme in Gouda Cheese by Affinity Chromatography

Kinjiro SUKEGAWA, Hiroshi UCHIKAWA and Minoru KATO
*Department of Dairy Science, Obihiro University of Agriculture
and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido*

Trypsin-like enzyme was separated (0.23 mg/g cheese) from three months ripening Gouda cheese by the methods of ammonium sulfate fractionation, gel filtration on Sephadex G-75 and affinity chromatography on a column of 4-aminobenzamidine bound to succinylated aminododecyl cellulose, and this enzyme was found to be almost homogeneous by polyacrylamide disc gel electrophoresis. The trypsin-like enzyme from cheese had an optimum pH at 8.0 and an optimum temperature at 55°C for casein as substrate in 0.1M phosphate buffer, and was stable at pH values from 8.0 to 9.5. These properties were generally similar to bovine trypsin. The two forms of enzyme were found to differ in specific activity toward casein, the bovine trypsin being 12 times more active than the trypsin-like enzyme from cheese, and trypsin-like enzyme moves more slowly than bovine trypsin by polyacrylamide disc gel electrophoresis.

(Received November 4, 1977)

チーズの熟成は、温度、湿度の比較的温和な条件下で、カードへのレンネットおよびスター微生物の酵素作用によって完成されるが、菌種による蛋白質分解作用はかなり異なる。

チーズ熟成中の乳成分の化学変化は、チーズに特有の風味を与えるが、この風味形成に大きく関与しているのは、各種窒素化合物、脂肪分解物および乳糖分解物である。すなわち、チーズ熟成中の風味形成は、チーズ中に含まれる各種酵素作用によって影響されることになる。チーズの蛋白質分解産物については、現在まで数多く報告されている⁽¹⁻³⁾。しかし、これに関与している蛋白質分解酵素の種類およびその特異性に関する報告は見られない。それは、チーズから微量の酵素を抽出、精製する方法および収量の面で困難があったためである。

最近、アフィニティークロマトグラフィーの発達によって、種々の微量蛋白質の分離が容易になされ、とくに酵素の精製に関しては、その特異性を利用することによって、微量の酵素を高純度に分離することが可能となった。

この報告は、アフィニティークロマトグラフィーを用いて、ゴードチーズの蛋白質分解酵素の1種類を精製し、その性質について検討したものである。

実験方法

1. 蛋白質分解酵素の抽出 1) 供試チーズ：3か月熟成のゴードチーズを用いた（雪印乳業大樹工場、昭和51年6月3日製造）。

2) 粗酵素の抽出⁽⁴⁾：チーズ 20g に、pH 7.0, 0.1M リン酸緩衝液 100 ml を加え、ホモジナイザーで粉碎、懸濁し（室温、1000 rpm, 5分）、室温で1時間振とう

↑ チーズ熟成中の蛋白質分解過程に関する研究（第2報）⁽⁴⁾。

Fig. 1. Flow Sheet of Extraction of Proteolytic Enzyme from Gouda Cheese.

後に遠心分離 (7000 rpm, 10 分, 4°C) して, 不溶物, 脂肪を除去した. 上澄液を 50% 硫酸飽和で塩析 (4°C, 1 夜), 遠心分離して沈殿を集め, 蒸留水に溶解後 4°C で 1 夜透析 (Visking Company 製透析膜), 凍結乾燥した.

ついで, pH 7.0, 0.02 M リン酸緩衝液で平衡化したセファデックス G-75 カラム (3×30 cm) に上記乾燥物溶液 (500 mg/10 ml) をセットし, 同一緩衝液で溶出した. 流速は 30 ml/hr で, 10 ml ずつ分取した. 蛋白質分解活性を示す画分を集め (最初のピーク), 透析, 凍結乾燥して粗酵素標品とした (Fig. 1).

3) アフィニティークロマトグラフィー: W. Brummer らの方法⁽⁵⁾を応用した. すなわち, Succinylated aminododecyl cellulose (SADC) にトリプシンおよびトリプシン類似酵素に対する阻害物質である 4-アミノベンズアミジンを結合させたもの (Merck 社) を用い, pH 5.5, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M NaCl,

0.001 M CaCl₂ を含む) で平衡化し, 1×25 cm のカラムに充填した.

このカラムに, 市販トリプシン (Merck 社, 2000 E/g) およびチーズから抽出した粗酵素をおのおの 100 mg/5 ml セットし, 上記緩衝液を流して 4-アミノベンズアミジンに結合する酵素以外の共存蛋白質を溶出し, ついで pH 2.0, 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (0.1 M NaCl, 0.001 M CaCl₂ を含む) を用いて結合酵素を溶出し, 280 nm における吸光度を測定しながら, 10 g ずつ分取した. pH 5.5 での溶出区分を画分-1, pH 2.0 の溶出ピークを画分-2として集め, 蒸留水に対して透析 (4°C, 1 夜), 凍結乾燥した. なお, カラムは 4°C 以下で操作した. また 6 M 尿素でときどき洗浄して付着物を除去した.

2. ディスクゲル電気泳動⁽⁶⁾ 3. 75% 上層ゲル (pH 4.0) と 7.5% 下層ゲル (pH 4.0) を使用した. 市販トリプシンおよびチーズ粗酵素のアフィニティークロマトグラフィー画分-2 を pH 4.5 の β-アラニン氷酢酸緩衝液 (30% しょ糖を含む) に 0.6% になるように溶解し, その適量を上層ゲルにセットし, 3 mA/本 30 分泳動後, 5 mA/本 90 分間泳動した. 染色は 1% アミドブラック 10 B (7% 酢酸溶液) で 30 分間行ない, 7% 酢酸溶液で脱色した.

3. カゼインに対する分解活性 チーズ粗酵素, 画分-1, 画分-2 および市販トリプシンの蛋白質分解活性, 至適温度, pH を測定した.

基質は 2% κ-カゼインまたは酸カゼインを用いた. κ-カゼインは Zittle らの尿素硫酸法⁽⁷⁾にしたがって分離した. 基質および 0.2% (市販トリプシンは 0.02%) 酵素溶液を 1 ml ずつ混合して反応後 (pH 5.0~9.5), 0.44 M トリクロル酢酸を等量加えて反応を停止させた.

活性の測定は, 反応混液をろ過 (東洋濾紙 No. 5 B) し, Lowry 法⁽⁸⁾によって, ろ液の 660 nm における吸光度で示した. また, 比活性はチロシンの標準曲線から求めた.

結 果

SADC に 4-アミノベンズアミジンをリガンドとして用いたアフィニティークロマトグラフィーによるトリプシンおよび 3 か月熟成ゴードチーズから抽出した粗酵素の溶出パターンを Fig. 2 および 3 に示した. Fig. 2 は市販トリプシン 100 mg を pH 5.5, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 5 ml に溶解したものをカラムにセットし,

Fig. 2. Elution Patterns of Commercial Bovine Trypsin. 4-Aminobenzamidine bound to succinylated aminododecyl cellulose was packed in a column (1×25 cm). The column was equilibrated with 0.1M Na-acetate buffer at pH 5.5 containing 0.1M NaCl and 0.001M CaCl_2 . 100 mg of commercial bovine trypsin was dissolved in 5 ml of buffer, applied to the column, and washed until no farther protein was eluted. Active trypsin was then eluted with 0.1M glycine-HCl buffer at pH 2.0 containing 0.1M NaCl and 0.001M CaCl_2 and 10 g fractions were collected at a flow rate of 20 ml/hr at 4°C.

Fig. 3. Elution Patterns of Crude Enzyme from Gouda Cheese. Experimental conditions were the same as described in Fig. 2.

同一緩衝液を流してカラムに吸着しない共存成分を溶出後、pH 2.0, 0.1M グリシン塩酸緩衝液で結合トリプシンを溶出させたクロマトグラムである。後述のように、

Fig. 4. Rechromatography of Cheese Enzyme (fraction-2). Experimental conditions were the same as described in Fig. 2.

pH 2.0 の条件で溶出される成分は、市販トリプシンと比較して約 2.1 倍の比活性を示した。したがって、この実験条件では、活性をもたない共存成分とトリプシンを分離できることが確かめられた。

チーズ粗酵素のクロマトグラフィーも Fig. 2 と同条件で行なったが、市販トリプシンと同様のピークが得られたが、吸着されない部分のピークが 2 つ認められた。Fig. 3 の画分-2 を同一条件で再クロマトグラフィーを行なった結果は、Fig. 4 のように単一のピークが得られ、再現性のあることを確認した。

チーズの蛋白質分解酵素抽出法には種々の方法が報告されているが、この実験での抽出法では、0.5 飽和硫酸塩析およびセファデックス G-75 による分子ふるいの段階では、各種混合粗酵素（大部分はカゼインおよびその分解物）として、チーズ 1g 当り 9.3 mg, SADC アフィニティークロマトグラフィーでは画分-1 が 4.5 mg, 画分-2 が 0.23 mg の蛋白質として回収された。すなわち、混合粗酵素の約 1/40 量の SADC-4-アミノベンズアミジン結合酵素が得られた計算になる。

Fig. 5 に市販トリプシンおよびチーズから抽出した粗酵素のアフィニティークロマトグラフィーによって得られた画分-2 のディスク電気泳動図を示したが、両者とも 2 本のバンドが認められた。しかし、市販トリプシンでは早く泳動するバンドが主であり、おそく泳動する成分は微量であったが、チーズからのものでは、比較のおそく泳動するものが主要成分で、両者間には相違があった。

Fig. 5. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Enzymes. Upper : bovine trypsin purified by affinity chromatography (fraction-2). Lower : cheese enzyme purified by affinity chromatography (fraction-2). Electrophoresis were performed as described under methods. The gels were 80×5 mm and the current 3 mA/tube for 30 min → 5 mA/tube for 90 min in β -alanine-acetic acid buffer at pH 4.5 containing 30% sucrose at room temperature.

Fig. 6. Proteolytic Activity of Each Enzyme Fractions at 40°C in 0.1M Phosphate Buffer (pH 5.5). Substrate : 1% κ -casein, bovine trypsin : 0.01%, cheese enzyme : 0.1%. ○ bovine trypsin fraction-2, ● commercial bovine trypsin, △ cheese enzyme fraction-2, ▲ cheese crude enzyme, □ cheese enzyme fraction-1.

以上の方法によって得た各酵素画分の 40°C, pH 5.5 および pH 7.0 における κ -カゼインに対する分解活性を Fig. 6, 7 に示した。その結果, アフィニティークロマトグラフィーによる市販トリプシン画分-2 およびチーズ粗酵素画分-2 の活性は, 分画前のものに比較して, それぞれ約 2, 5 倍高くなっている。

Fig. 7. Proteolytic Activity of Each Enzyme Fractions at 40°C in 0.1M Phosphate Buffer (pH 7.0). Reaction conditions were the same as shown in Fig. 6. ○ commercial bovine trypsin, ● cheese enzyme fraction-2, △ cheese enzyme fraction-1.

Fig. 8. Effect of pH on the Proteolytic Activity of Each Enzyme Fractions at 40°C in 0.1M Phosphate Buffer for 2 hr. Reaction conditions were the same as shown in Fig. 6 except that the substrate used was 1% whole casein. ○ commercial bovine trypsin, ● cheese enzyme fraction-2, △ cheese enzyme fraction-1, ▲ cheese crude enzyme.

各酵素画分の酸カゼインに対する至適 pH を測定した結果は Fig. 8 に示した。従来報告されているチーズ粗酵素の至適 pH は 5.5~6.0 付近が最大で, 中性付近にも弱い活性ピークが認められるといわれている⁽⁹⁾。Fig. 8 においても粗酵素および画分-1 は pH 5.5 で活性を

Fig. 9. Effect of Temperature on the Proteolytic Activity in 0.1M Phosphate Buffer at pH 7.0 for 1 hr. Reaction condition were the same as shown in Fig. 6 except that the substrate used was 0.5% whole casein. ○ commercial bovine trypsin, ● cheese enzyme fraction-2.

示したが、画分-2 は pH 8.0~9.5 の間にもっとも高い活性が認められ、市販トリプシンと全く同様の pH 活性曲線を示した。このことは、アフィニティークロマトグラフィーによる画分-2 は、画分-1 の約 1/20 量であるために、量的な関係から粗酵素全体としては pH 5.5~6.0 で最大活性を示しているものと考えられる。したがって、画分-1 に含まれる酵素をさらに精製してその性質を調べる必要があり、現在その分離、精製法について検討中である。また、pH 7.0 におけるトリプシンおよびチーズ粗酵素画分-2 のカゼイン分解の至適温度は Fig. 9 に示されるように、トリプシンと全く同様に 55°C 付近であった。

各酵素画分の比活性は、660 nm における吸光度をトリプシンの標準曲線から求めたもので、Table I に示した。pH 5.5 および pH 7.0 におけるチーズ粗酵素からの画分-2 は、粗酵素および画分-1 の約 3~5 倍の比活性を示したが、市販トリプシンと比較すると、pH 7.0 では約 1/12 の比活性であった。したがって、至適 pH および温度はトリプシンに類似しているが、蛋白質分解活性の面から、ウシトリプシンとは異なった性質の酵素と推定される。

考 察

Baribo ら⁽¹⁰⁾ や高藤ら⁽¹¹⁾ は、チーズ熟成中の蛋白質

Table I. Specific Activity of Each Enzyme Fractions at 40°C

Enzyme	Conc. of enzyme (mg/ml)	Time (min)	O.D. at 660 nm	Sp. activity 1/μg tyrosine/min mg enzyme
pH 5.5 { Crude	1.0	120	0.342	0.7
Fraction-1	1.0	120	0.24	0.5
Fraction-2	1.0	60	0.454	1.9
Trypsin	0.1	60	0.535	17.5
Trypsin-2	0.1	60	1.13	37.0
pH 7.0 { Fraction-1	1.0	60	0.16	0.7
Fraction-2	1.0	60	0.89	3.7
Trypsin	0.1	60	1.415	46.3

Crude, cheese crude enzyme; fraction-1, cheese enzyme fraction-1; fraction-2, cheese enzyme fraction-2; trypsin, commercial bovine trypsin; trypsin-2, commercial bovine trypsin fraction-2.

分解酵素は pH 5.0~5.5 付近が最高で、pH 7.0~8.0 付近にも活性があると報告している。この実験では、トリプシンの至適 pH が 8.0 付近であることから、チーズの蛋白質分解酵素の 1 つはトリプシン様酵素であると考えて、トリプシンおよびトリプシン類似酵素の阻害物質である 4-アミノペンザミジンを経リガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによって、チーズの蛋白質分解酵素の 1 つの精製を試みたが、予想どおりに、熟成中のゴーダチーズからトリプシンとほぼ同様の至適 pH (8.0~9.5) および 55°C 付近に至適温度をもつトリプシン様酵素を精製した。しかしカゼイン分解活性は市販トリプシンの約 1/12 であった。すなわち、ゴーダチーズの熟成、とくにチーズ特有の風味を形成する 2 次熟成に重要な意味をもつ蛋白質分解酵素の 1 つとして、トリプシン様酵素が存在し、チーズ 1g 中から約 0.23 mg 分離した。さらにトリプシン阻害物質に吸着されなかった画分にも明らかに蛋白質分解活性があり、その至適 pH が 5.5 付近であることから、チーズの熟成には少なくとも 2 つ以上の蛋白質分解酵素が関与していることは明らかであり、量的には微酸性で作用する酵素が多いと推定された。すなわち、チーズ粗酵素のアフィニティークロマトグラフィーによる画分-1 と画分-2 の窒素含量の比率が 19:1 と画分-1 の方がはるかに多いことと、分画前のカゼイン分解活性が pH 5.5 でもっとも高いためである。至適 pH を 5.5 付近にもつ画分-1 が 1 種類の酵素か、あるいは 2 種類以上の酵素が含まれているのかは、いまのところ明らかではないが、クロマトグラム上

に画分-1の280 nmにおける吸光度に2つのピークが見られたことは、2種類以上の酵素が含まれている可能性もあり、チーズ熟成の機構解明のために、この部分の酵素の分離が期待される。

チーズから分離した粗酵素のアフィニティークロマトグラフィーによる画分-2のカゼインに対する分解の至適pH、温度がウシトリプシンと同様であったが、活性が約1/12と低いこと、またディスク電気泳動図からみて、ウシトリプシンの主要バンドと若干異なる位置にバンドが認められたことなどから、トリプシンの抽出起源による α -、 β -型の問題か、さらにはもっと違ったタイプのものかを検討する必要がある。Schroederら⁽¹²⁾、Robinsonら⁽¹³⁾は、SE-セファデックス(C-50)によるクロマトグラフィーで、トリプシンを α -、 β -型に分画しているが、市販のウシトリプシンは主として α -型を含むと報告していることから、チーズから抽出したトリプシン様酵素は β -型に相当するものが主体である可能性もあるが、この点については、スターター微生物から酵素を抽出して検討中である。

要 約

チーズ中の蛋白質分解酵素を分離するために、トリプシン阻害物質である4-アミノベンズアミジンをリガンドとした Succinylated aminododecyl cellulose を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行なった。

3か月熟成ゴードチーズから抽出した粗酵素をカラム(1×25 cm)に4°Cで流した結果、吸着された酵素(チーズ1g当り0.23 mgの収量)のカゼイン分解に対する至適pHは8.0~9.5、至適温度は55°C付近で、ウ

シトリプシンと全く同様であったが、比活性は市販トリプシンの約1/12と非常に低かった。またディスク電気泳動の結果からもウシトリプシンと若干異なる位置に主要バンドが認められたので、ウシトリプシンとは異なるタイプの酵素であると推定した。さらに、リガンドに吸着されない部分にもカゼイン分解活性がみられ、その至適pHは5.5であり、窒素量から計算すると吸着されたものの約20倍で、はるかに多かった。

- (1) 三野和雄：雪印乳業技術研究所報告，No.60 (1962)。
- (2) 中西武雄，中沢勇二，細野明義：酪農科学の研究，14，A-213 (1965)。
- (3) L. M. Libbey and A. E. Day : *J. Dairy Sci.*, 46, 859 (1963)。
- (4) 進藤一典，島崎英一，祐川金次郎：帯広畜産大学学術研究報告，10，No.1，149 (1976)。
- (5) W. Brümmer : Merck, Affinitätschromatographie, 1 and 2 (1975)。
- (6) 青木幸一郎，中野栄三，大井優一：電気泳動実験法，広川書店，1975，p.146。
- (7) A. C. Zittle and J. H. Custer : *J. Dairy Sci.*, 46, 1183 (1963)。
- (8) O. H. Lowry, N. Rosenbrough, A. L. Rarr and R. J. Bandall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1953)。
- (9) M. H. Peterson : *J. Dairy Sci.*, 49, 1098 (1966)。
- (10) E. L. Baribo and M. E. Foster : *ibid.*, 35, 149 (1952)。
- (11) 高藤慎一，菊地俊彦：日畜会報，43, 181 (1972)。
- (12) D. D. Schroeder and E. Shaw : *J. Biol. Chem.*, 243, 2943 (1968)。
- (13) N. C. Robinson, R. W. Tye, H. Neurath and K. A. Walsh : *Biochemistry*, 10, 2743 (1971)。