[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 55, No. 10, pp. 951~958, 1981]

Mucor racemosus No. 50 およびその変異株の凝乳酵素 標品によるカゼインフラクションの分解について

東 尾 侃 二, 吉岡八洲男
(雪印乳業株式会社技術研究所)

昭和 56 年 3 月 25 日 受 理

Breakdown of Casein Fractions by Milk Clotting Enzyme Preparations of *Mucor racemosus* No.50 and Its Mutants (Studies on Milk Clotting Enzyme from Microorganisms. Part III)

Kanji HIGASHIO and Yasuo YOSHIOKA
Technical Research Institute, Snow Brand Milk
Products Co., Kawagoe, Saitama 350

The proteolytic properties of milk clotting enzymes prepared from *Mucor racemosus* No.50 and its mutants were compared with the properties of calf rennet (HR) and *Mucor pusillus* rennet (MR).

Liberation of non-protein nitrogen (NPN) from casein during treatment with enzymes was determined at pH 6.7 by using enzyme level of same milk clotting activity (MCA). Crude enzyme preparation (SR-0) from the parent strain liberated more NPN from whole, α_s - and β -casein than crude enzyme preparations (SR-1 and SR-2) from the mutants (No.54 and No.51). The level of NPN liberated from α_s - and β -casein by SR-1 and SR-2 was nearly equal to that by MR. HR showed the lowest casein breakdown. All the preparations liberated large quantities of NPN from κ -casein.

On polyacrylamide gel electrophoresis of residual casein fractions after treatment with enzymes, β -casein showed a characteristic breakdown pattern for each of the enzyme preparations examined. The residual fraction of κ -casein after treatment of HR and MR consisted of a single main component (para- κ -casein), and that of SR enzymes was composed of two main components.

On the determination of proteolytic activity at pH 6.0, HR and SR liberated greater amounts of high-molecular and less amounts of low-molecular component from whole, α_s - and β -casein than MR.

(Received March 25, 1981)

緒 言

チーズ製造に使用される凝乳酵素（レンネット）は、一種のプロテアーゼであるが、一般のプロテアーゼとはその蛋白分解特異性において明らかに異なっている。

凝乳酵素として要求される最も重要な特性として、凝乳活性（MCA）と蛋白分解活性（RA）の比（MCA/PA）が高いこと、すなわち、カゼインフラクションの中でも凝乳に関係のある κ -カゼインに対する基質特異性がきわめて高いことにある。非特異的で過度の蛋白分解は、

† 微生物凝乳酵素に関する研究（第3報）

チーズの歩留低下や苦味生成等の欠陥を生ずる。一方、 α_s - および β -カゼインの分解は、チーズの熟成および風味生成に関与するものであり、凝乳酵素による α_s - および β -カゼインの分解特異性、相対分解速度等はチーズの熟成、風味を決定する上で重要であるとされている⁽¹⁾。

しかし、これまでに動植物および微生物起源の多数の凝乳酵素が見出されているものの、そのほとんどは、非特異的で過度の蛋白分解に起因するチーズ収量の低下や苦味生成等の欠陥を伴うことが指摘されている⁽²⁾。また、実用化されている微生物レンネットは、 κ -カゼイン

に対して比較的高い基質特異性を示し、凝乳酵素としての特性を有しているが、 α_s - および β -カゼインの分解特性において、仔牛レンネットあるいは微生物レンネット間で互いに異なっている。

El-Negoumy⁽³⁾ は、 β -カゼインは仔牛レンネットによる蛋白分解に対して抵抗性があること、同様に、Ledford ら⁽⁴⁾ は、 α_s -カゼインは仔牛レンネットにより優先的に分解されるが、 β -カゼインは明らかに α_s -カゼインよりも蛋白分解に対して抵抗性があると指摘している。一方、微生物レンネットでは、蛋白分解に関して、Shovers および Bavisotto ら⁽⁵⁾ は、*Endothia parasitica* のレンネットは、チェダチーズの製造において、仔牛レンネットよりも非常に強い蛋白分解力を有していること、また Richardoson⁽⁶⁾ らは、カゼインを基質としたとき、*Mucor pusillus* のレンネットは仔牛レンネットよりも蛋白分解力が強いことを認めている。また、カゼインフラクションの分解特性に関して、Michelson および Fish⁽⁷⁾ は、*E. parasitica* および *M. pusillus* からのかびレンネットと仔牛レンネットおよびペプシンとの比較を行い、かびレンネットは仔牛レンネットやペプシンより全カゼイン、 α_s - および β -カゼインを強く分解するとし、*E. parasitica* のレンネットが最も蛋白分解力が強かったとしている。また、基質としてチーズを使用したとき、かびレンネットは仔牛レンネットやペプシンよりも可溶性窒素の生成が多いことを明らかにしている。同様に、Vanderpoorten や Weckx⁽⁸⁾ は、*E. parasitica*、*M. pusillus* および *Mucor miehei* のレンネットとの比較において、微生物レンネットは仔牛レンネットよりも全カゼイン、 α_s - および β -カゼインからより多くの非蛋白態窒素 (NPN) を遊離し、とくに α_s - および β -カゼインの分解生成物は、レンネットのおおのにおに特徴のあるパターンを示したとしている。また、各レンネットで製造した 4 カ月熟成ゴーダチーズの電気泳動パターンは、 α_s -カゼイン領域にはっきりした違いがあり、*E. parasitica* のレンネットと製造したチーズでは、明らかに β -カゼインの分解が進んでいたとしている。

Fox および Walley⁽⁹⁾ は、チーズの苦味生成は β -カゼインの加水分解から生成し、 β -カゼイン分解物中に存在する苦味成分、フェニールアラニンとプロリンを含むペプチド⁽¹⁰⁾ に由来するものであろうと報告しており、上記の仔牛レンネットと微生物レンネットとのカゼイン

フラクションの分解特性からみて、微生物レンネットのほうが、チーズに苦味を生成しやすいことが示唆される。

本報では、*Mucor racemosus* No. 50 およびその変異株の凝乳酵素によるチーズ熟成中における特異的なカゼインフラクションの変化の情報を得るとともに、変異株の誘起による凝乳酵素の改良によってカゼイン分解特性にいかなる変化を生じたかを明らかにする目的で、両酵素のカゼインフラクションの分解特性を調べ、同時に仔牛レンネットおよび *Mucor pusillus* レンネットのそれと比較した。

実験材料および方法

1. 供試酵素 親株 *Mucor racemosus* No. 50, 第 4 代 UV 変異株 No. 54 および第 4 代 NTG 変異株 No. 51 を用いて調製した粗酵素標品⁽¹¹⁾ SR-0, SR-1 および SR-2, また対照として市販の仔牛レンネット (ハンゼン粉末レンネット, HR) および *Mucor pusillus* Lindt のレンネット (名糖レンネット, MR) を用いた。

2. 基質および基質の調製 全カゼイン、 α_s -、 β - および κ -カゼインを基質として用いた。全カゼインは、生脱脂乳を 1N HCl で pH 4.6 にし、生成した沈殿を蒸留水で 3 回洗浄後、pH 9.0 以内で再溶解後、同様に pH 4.6 で沈殿させ、この操作をさらに 2 回繰り返して調製した。 α_s - および κ -カゼインは、Zittle および Custer の方法⁽¹²⁾、 β -カゼインは Aschaffenburg の方法⁽¹³⁾ に従い調製した。

3. 反応条件 基質として、全カゼインは 2.7%、 α_s -、 β - および κ -カゼインはそれぞれ 2.0% 溶液とし、pH 6.7 に調整して用いた。

酵素濃度は生脱脂乳 (pH 6.73) 5 ml に酵素液 0.5 ml を加え、35°C で凝乳時間を測定し、酵素液の凝乳活性が 250 単位/ml となるように調製した。基質 50 ml に酵素液 1 ml を加え、30°C で反応し、遊離されてくる非蛋白態窒素 (none protein nitrogen, NPN) を経時的に測定した。

4. 全窒素 (total nitrogen, TN) の測定 反応液 1 ml についてマイクロケルダール法によって TN を測定した。

5. 非蛋白態窒素の測定 経時的に反応液 10 ml を分取し、24% TCA 溶液 10 ml を加え一夜放置後、東洋濾紙 No. 3 を用いて濾過し、濾液 15 ml についてミク

ロケルダール法により NPN を測定した。

6. ポリアクリルアミドゲル (PAG) 電気泳動

30°C, 18~20 時間反応後の各カゼイン反応液 1 ml にメルカプトエタノール 2 滴, 10M 尿素 0.5 ml およびプロモフェノールブルー (BPB) 1 滴を添加し, 電気泳動用試料とした。

PAG 電気泳動は, 電気泳動実験法⁽¹⁴⁾の記載の方法に従い実施した。

7. 蛋白分解活性の測定法

0.6% カゼインフラクション溶液 (pH 6.0, 1/20M リン酸緩衝液) 50 ml に供試酵素液 (250 単位/ml) を 0.5 ml 添加し, 30°C で 70 分間反応を行い, 経時的に反応液 5 ml を分取し, 除蛋白剤 5 ml を加え, フォーリン呈色法により蛋白分解活性を測定し, 660 nm の吸光値 (OD) で活性を表わした。ただし, κ -カゼインを基質とした場合には, ニンヒドリン呈色法により測定し, 蛋白分解活性は 570 nm の OD 値で表わした。除蛋白剤としては (a) 0.4M TCA および (b) TCA 混液⁽¹⁵⁾ (0.1M TCA, 0.2M CH_3COONa , 0.3M CH_3COOH の混液) をそれぞれ用いた。

実験結果および考察

1. カゼインフラクションからの NPN の遊離と分解パターン

同一凝乳活性 (milk clotting activity 以下 MCA と略記) の各供試酵素について, pH 6.7 における全カゼインならびにカゼインフラクションからの NPN の遊離およびその分解パターンを調べ, カゼインの分解特性ならびに κ -カゼインに対する基質特異性を比較検討した。

(1) α_s -カゼインの分解

HR による α_s -カゼインからの NPN の遊離は反応 15 分間以内で増加したが, それ以後, ほとんど平衡に達した。総じて, 微生物レンネットは HR よりも強い分解力を示した。MR と SR-2 とはほぼ同じ程度の分解力を有し, SR 酵素間では SR-0 > SR-1 > SR-2 の順に分解力が強いことを認めた。

すなわち変異株の酵素のほうが親株の酵素より α_s -カゼイン分解力が弱く, 人工変異株の誘起により凝乳酵素の α_s -カゼイン分解力が低下する傾向がみられた。

各供試酵素による 30°C, 20 時間反応後の α_s -カゼインの分解パターンを Fig. 1 に示した。HR は α_s -カゼインを分解し, 1 本の濃いバンドの他に 3 本の薄いバンドの分解物を生成した。MR では未分解の α_s -カゼイン量が供試酵素中, 最も多く, 分解パターンは HR とよく類

Fig. 1. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of α_s -Casein before and after Treatment with Various Enzyme Preparations.

HR, Calf rennet (Hansen's rennet); MR, *Mucor pusillus* rennet (Meito's rennet); SR-0, Crude enzyme from *Mucor racemosus* No. 50; SR-1, Crude enzyme from the fourth generation UV irradiated mutant No. 54; SR-2, Crude enzyme from the fourth generation NTG induced mutant No. 51.

似していたが, 分解生成物のバンドは 2 本の濃いバンドを含め計 5 本認められた。SR 酵素では未分解の α_s -カゼイン量が HR よりも少なく, また SR 酵素間では SR-0 が最も未分解の α_s -カゼイン残存量が少なく, 次いで SR-1, SR-2 の順となっており, 同一 MCA において, 変異株の酵素のほうが親株の酵素よりも α_s -カゼインの分解力が弱いことが明らかとなった。分解パターンは MR とほぼ一致した位置に 5 本の分解生成物のバンドの出現がみられ, よく類似していたがバンドの濃淡は MR のものとは異なっていた。また, SR 酵素間には α_s -カゼインの分解パターンに差違は認められなかった。

(2) β -カゼインの分解 HR による β -カゼインからの NPN の遊離は, 反応 15 分間で最大に達し, それ以後, 反応を継続してもほとんど NPN の増加は認められなかった。MR は反応 15 分間以内の NPN の遊離が著しく, HR とは異なり反応時間の経過とともに徐々に NPN の増加が認められた。SR-0 は供試酵素中, 最も β -カゼインの分解力が強く, 反応時間の経過とともに

NPNの増加がみられた。SR-1はMRと、SR-2はHRとほぼ同程度のNPNの遊離を示した。さらに、酵素反応を継続しても、HRやMRの反応液は透明であったが、SR酵素の場合、30℃、40～50分反応後から反応液は徐々に白濁し、16時間反応後では、凝集して粘稠性のある沈殿を形成した。この沈殿は酵素反応を継続しても、再び溶解することにはなかった。このことから、SR酵素による β -カゼインの第1次分解生成物は、疎水性の高い高分子成分であり、疎水結合により沈殿し、かなり酵素分解を受けにくくなっているものと考えられる。

*Trametes ostreiformis*の凝乳酵素⁽¹⁶⁾もSR酵素と同様に、 β -カゼインを分解し白濁させる作用を有しているが、SR酵素とは異なり、酵素反応を継続することにより、さらに分解が進み、再び透明になることが知られている。

各供試酵素による β -カゼインの分解パターンをFig. 2に示した。HRによる β -カゼイン分解生成物は、 β -カゼインよりも少し移動度の大きい濃い1本のバンドとして出現するのに対し、MRでは、HRの分解生成物よりも移動度の大きい位置に1本の濃いバンドが、またその他に薄いバンドが5本程度出現し、HRの分解パターンとは明らかに異なっていた。SR酵素はHRやMRに比べて特異な分解パターンを示し、SR-0およびSR-1では、 β -カゼインよりもはるかに移動度の小さい位置に

1本の濃いバンドが出現し、その他に5本の薄いバンドの出現がみられた。SR-2では、SR-0およびSR-1でみられた主要な分解生成物のバンドのほかに、それよりも少し移動度の小さい位置に濃い1本の分解生成物のバンドがみられた。SR-0およびSR-1では、この移動度の小さいバンドがさらに分解を受けて消失する傾向がみられた。HRやMRでは未分解の β -カゼイン残存量が多かったのに対し、SR酵素では少なく、SR酵素間では、SR-2が最も残存量が多く次いでSR-1、SR-0の順で、変異株の酵素のほうが親株の酵素よりも β -カゼインの分解力が低下していた。

電気泳動パターンからみると、SR酵素はHRやMRよりも β -カゼインの分解力が強い傾向がみられるものの、 β -カゼインからのNPNの遊離はSR-1とMRが、SR-2とHRがほぼ同程度であり、とくに強いとは言いがたい。このことは、前述したように、 β -カゼインの第1次高分子分解生成物は酵素分解を受けがたい状態にあり、低分子化が進まないことを支持している。

(3) κ -カゼイン キモシンは κ -カゼインに作用し、 κ -カゼイン鎖のフェニールアラニン-メチオニン結合を特異的に切断することが知られている。微生物レンネットにおいても α_s -および β -カゼインよりも κ -カゼインに対する基質特異性が高いほど望ましいと言える。そこで、各供試酵素について κ -カゼインからのNRNの遊離を調べた。

結果をFig. 3に示した。HRおよびMRは30℃、30分反応でNPNの遊離がほぼ最大に達し、それ以上反応を継続してもNPNの増加はほとんど認められず、ほぼ一定に推移した。一方、SR酵素はHRやMRとは異なる分解パターンを示し、反応時間の経過とともにNPNの遊離が増加し、HRやMRの分解度に到達する傾向がみられたが、反応初期のNPNの遊離はHRやMRよりも低く、 κ -カゼインに対する基質特異性はHRやMRよりも低いことを認めた。しかし、いずれの酵素ともに κ -カゼインからのNPNの遊離は、 α_s -および β -カゼインからのNPNの遊離よりもはるかに高く、 κ -カゼインに対して高い基質特異性を示し、凝乳酵素としての特性を有していた。

同一凝乳活性(250単位/ml)を有する各供試酵素を用いた場合でも κ -カゼインからのNPN遊離の程度は各供試酵素間に差があり、 κ -カゼインの分解機作が互いに異なっていることを示唆している。当然のことながら、

Fig. 2. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of β -Casein before and after Treatment with Various Enzyme Preparations.

Fig. 3. Liberation of NPN from κ -Casein during Treatment with Various Enzyme Preparations at pH 6.7. Reaction mixture was composed of 50 ml of 2% κ -casein solution (pH 6.7) and 1 ml of enzyme solution (MCA 500 u/ml). —○—, HR; —●—, MR; —×—, SR-0; —△—, SR-1; —▲—, SR-2.

SR 酵素間には α_s - および β -カゼインの分解力に差違があったが、 κ -カゼインの分解力にはほとんど差違は認められなかった。

各供試酵素による κ -カゼインの分解パターンを Fig. 4 に示した。HR や MR は 30°C, 20 時間反応で完全に κ -カゼインを分解し、プラス極からマイナス極への電気泳動によって原点近傍に非常に移動度の小さい 1 本の濃いバンドの出現がみられたのに対し、SR 酵素では未分解の κ -カゼインの残存がみられ、 κ -カゼインの分解生成物は HR や MR の場合と同じ位置およびそれよりも少し移動度の大きいバンドの計 2 本出現し、SR 酵素による κ -カゼイン分解機作は HR や MR とは明らかに異なることがわかった。

(4) 全カゼイン 全カゼインからの NPN の遊離は、SR-0 が最も高く、次いで MR, SR-1, SR-2 の順で、反応時間の経過とともに NPN が増加する傾向がみられた。HR による NPN の遊離は、最も低値で、しかも反応 30 分でほぼ最大に達し、それ以後、ほぼ一定に推移し、微生物レンネットとは明らかに異なる分解パターンを示した。

各供試酵素による全カゼインの分解パターンを Fig. 5 に示した。HR および MR はほぼ同様な分解パターンを示し主要な分解生成物として、 α_s - および β -カゼインのそれぞれの分解から由来する 2 本の濃いバンドの出現

Fig. 4. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of κ -Casein before and after Treatment with Various Enzyme Preparations.

Fig. 5. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of Whole Casein before and after Treatment with Various Enzyme Preparations.

が認められた。一方、SR 酵素による全カゼインの分解パターンは HR や MR とは異なり、 β -カゼインの分解に由来する移動度のきわめて小さい特異的なバンドの出現がみられるのが特徴であった。また、未分解の α_s - および β -カゼイン残存量から、変異株の酵素のほうが親

株よりもカゼイン分解力が弱いことを認めた。

以上の各供試酵素によるカゼインフラクションからの NPN の遊離および分解パターンの比較から, Vanderpoorten および Weckx⁽⁸⁾ の結果と同様にカゼインフラクションの中で, β -カゼインの分解パターンが各供試酵素間で明らかに異なっており, β -カゼインの分解生成物の電気泳動パターンから供試酵素をある程度類推できることを認めた。SR 酵素は, 他の微生物レンネットの場合^(7,8)と同様に HR に比べ α_s - および β -カゼインの分解が強く, とくに β -カゼインに対して特異的な分解パターンを有し, チーズに苦味を生成する可能性が示唆された。しかし, 一方では, β -カゼインからの分解生成物は, 疎水性の沈殿を形成し, それ以上低分子化されにくいことから, 苦味ペプチド生成の前駆体となりにくい可能性もあり, SR 酵素によるこの特異的な β -カゼインの分解のチーズの熟成および品質に与える影響については, 実際にチーズを製造して調べてみる必要があるように思われる。

2. 蛋白分解活性および蛋白分解機作について

カゼインフラクションの分解パターンの比較から, 変異株由来の SR 酵素は, HR や MR に比べ, 未分解の α_s - および β -カゼイン残存量が少なく, 分解力が強い傾向がみられた。しかし, 両フラクションからの NPN の遊離は HR よりも高いものの MR とほぼ同程度かむしろ低いくらいで, NPN の遊離に大差は認められなかった。また, 既報⁽¹¹⁾において, pH 6.0 での蛋白分解活性 (PA) 測定用除蛋白剤として, TCA 濃度の低い TCA 混液と 0.4M TCA を使用したとき, HR や SR 酵素の MCA/PA 比は後者で明らかに高値となるのに対し, MR ではいずれの除蛋白剤でもほとんど差違は認められなかった。これらの現象は, SR 酵素は MR に比べカゼインから高分子分解物を生成する作用が強い反面, 低分子化作用が比較的弱いことを示唆するものである。この点をより明らかにすることは, チーズ熟成中における蛋白分解を知るうえでも重要である。そこで, pH 6.0 における各供試酵素によるカゼインフラクションに対する蛋白分解活性および蛋白分解機作を調べた。

(1) α_s -カゼイン 除蛋白剤として 0.4M TCA (最終濃度 0.2M) および TCA 混液を用いたときのそれぞれの α_s -カゼイン分解の経時変化を Fig. 6 に示した。TCA の最終濃度が 0.2M となるように添加した場合, 酵素活性が弱いとき, 通常のプロテアーゼによる蛋白分

Fig. 6. Time Courses of Proteolysis against α_s -Casein at pH 6.0. Reaction mixture was composed of 50 ml of 0.6% α_s -casein solution (pH 6.0, 1/20M phosphate buffer) and 0.5 ml of enzyme solution (MCA 500 u/ml). Reagents used for the precipitation of protein: (1) 0.4M TCA, (2) TCA mixture CH_3COONa . —○—, HR; —●—, MR; —×—, SR-0; —△—, SR-1; —▲—, SR-2.

解過程である蛋白→高分子ペプチド→ペプチド→低級ペプチドの系⁽¹⁵⁾において, 厳密ではないものの高分子ペプチドも沈殿除去されることから, 除蛋白剤として 0.4M TCA を用いたときの結果は, 主として各供試酵素による α_s -カゼインからのペプチドあるいは低級ペプチド以下の生成を示したものである。蛋白分解活性は MR が最も高く, 一方 HR はきわめて低く, SR 酵素は HR と MR のほぼ中間の分解活性を示した。また, SR 酵素間では $\text{SR-0} > \text{SR-1} > \text{SR-2}$ の順に α_s -カゼインの分解力が強かった。

除蛋白剤として TCA 混液を用いた場合, TCA 濃度が薄いため, 前述のプロテアーゼの蛋白分解過程において, 厳密ではないものの, 蛋白質が主として沈殿除去され, 高分子ペプチド以下は沈殿しないと考えられている⁽¹⁵⁾ことから, この結果は, 主として各供試酵素による α_s -カゼインからの高分子ペプチド以下の生成を示したものである。分解力は $\text{MR} > \text{SR-0} > \text{SR-1} > \text{SR-2} > \text{HR}$ の順に強かった。MR については, 0.4M TCA を用いた場合とほぼ同じ結果が得られることから, MR は α_s -カゼインに作用して高分子ペプチドをプールせずに直ちに低分子化する傾向が強いことを示している。一方, HR は 0.4M TCA を使用した場合よりも分解活性が高くなっており, α_s -カゼインの分解により, 高分子分解物がかなりプールされていることを示している。また, 同様に SR 酵素では, その傾向がより顕著で, 除蛋白剤として TCA 混液を用いたとき, 蛋白分解活性が高くな

り、 α_s -カゼインに作用して高分子成分を多く生成するが、これらの低分子化は MR ほど速やかに進行しないことを示している。また、蛋白分解の経時変化は、HR および MR は初期反応 (30°C, 10 分間) で急激な蛋白分解がみられ、HR はそれ以後、ほぼ一定となる。MR も HR によく類似したパターンを示したが、SR 酵素は、反応初期では HR や MR よりも蛋白分解力が低かったが、反応時間とともに蛋白分解が進み、30°C, 70 分反応以内では平衡となる傾向は認められなかった。

(2) β -カゼイン 各供試酵素による β -カゼイン分解の経時変化を Fig. 7 に示した。0.4M TCA を除蛋白剤としたとき、分解力は MR>SR-0>SR-1>SR-2 $\geq$ HR の順に強かった。MR は α_s -カゼインの場合と同様に β -カゼインに作用して、低分子化する力が強いと考えられる。

TCA 混液を使用したとき、MR>SR-0>SR-1>SR-2>HR の順に β -カゼインの分解力が強いことを認めた。0.4M TCA を使用した場合と比較して明らかに、MR は TCA 混液を除蛋白剤として使用したときのほうが蛋白分解活性が高いことから、 α_s -カゼインの場合と異なり、 β -カゼインを基質としたときは、MR も高分子成分をブールし、さらに低級ペプチドに分解する通常のプロテアーゼの蛋白分解過程を示すが、HR や SR 酵素に比べ、高分子成分の低分子化力が強いのが特徴である。逆に、HR や SR 酵素は β -カゼインを高分

Fig. 7. Time Courses of Proteolysis against β -Casein at pH 6.0. Reaction mixture was composed of 50 ml of 0.6% β -casein solution (pH 6.0) and 0.5 ml of enzyme solution (MCA 500 u/ml). Reagents used for the precipitation of protein: (1) 0.4M TCA, (2) TCA mixture. —○—, HR; —●—, MR; —×—, SR-0; —△—, SR-1; —▲—, SR-2.

子成分に分解する作用が強いにもかかわらず、その低分子化力が弱いことを示している。SR 酵素間では、変異株の酵素のほうが親株の酵素よりも β -カゼイン分解活性が低かった。

(3) κ -カゼイン 除蛋白剤として 0.4M TCA を使用し、フォーリンおよびニンヒドリン呈色法によりそれぞれ測定した。フォーリン呈色法での分解活性は MR>SR 酵素>HR の順に、またニンヒドリン呈色法では MR>HR>SR 酵素の順に高く、ニンヒドリン呈色法による結果は、 κ -カゼインからの NPN の遊離 (Fig. 3) とよく一致していた。フォーリン呈色法とニンヒドリン呈色法の差違からも明らかなように、MR は κ -カゼインを分解してフォーリン呈色性のアミノ酸およびそれらを含むペプチドを多く遊離するのに対し、HR では、この種の分解物はほとんど生成しないことがわかる。一方、SR 酵素は HR と MR のほぼ中間の分解様式を有し、MR ほど多くはないが、HR よりも明らかに多くフォーリン呈色性の分解物を生成することを認めた。このことは、HR, MR および SR 酵素による κ -カゼインの分解機作が互いに異なることを示唆するものであり、興味深い点である。また、SR 酵素間には、 κ -カゼインの分解活性にはほとんど差違はなかった。除蛋白剤として、TCA 混液を使用したとき、沈殿形成が完全でなく、蛋白分解活性の測定は不可能であった。

以上のように、pH 6.0 におけるカゼインフラクションの蛋白分解活性および分解機作から、MR は α_s - および β -カゼインに作用して、低分子化する力が比較的強いのに対し、HR および SR 酵素では、高分子ペプチドを多く蓄積し、その低分子化力は、MR に比べ弱いことを認めた。このことが除蛋白剤として 0.4M TCA (最終濃度 0.2M) および TCA 混液を用いたときの各供試酵素の MCA/PA 比において、MR ではいずれの除蛋白剤を使用してもほとんど差違が認められなかったのに対し、HR や SR 酵素では、前者を使用したときのほうが著しく高値となる原因であることがわかった。

実際のチーズ熟成との関連では、MR を使用したチーズでは、HR や SR 酵素を使用したチーズよりも熟成が比較的速く進行すると同時に、低分子化力も比較的強いことから風味生成 (旨味) も促進される可能性が示唆される。

また、SR 酵素使用チーズでは、HR と MR 使用チーズの中間の熟度を示すように思われる。

同一凝乳活性における SR 酵素間のカゼインフラクションの分解特性の差違からも明らかなように, 変異株を誘起し, 凝乳酵素の MCA/PA 比を向上させることによって, ①凝乳活性に関与する κ -カゼインの分解力に変化はなく, ② α_s - および β -カゼインの分解力が低下する傾向にあり, とくに β -カゼインの分解力が顕著に低下する傾向が認められた。

要 約

Mucor racemosus No. 50, その第 4 代 UV 変異株 No. 54 および第 4 代 NTG 変異株 No. 51 のそれぞれの凝乳酵素標品 SR-0, SR-1 および SR-2 によるカゼインフラクションの分解特性の差違を明らかにし, 同時に市販の仔牛レンネット (ハンセン粉末レンネット, HR) および *Mucor pusillus* Lindt の微生物レンネット (名糖レンネット, MR) と比較し, 次の結果を得た。

(1) pH 6.7 における α_s - および β -カゼインからの NPN の遊離の程度は SR-0>SR-1>SR-2 の順に高く, MR による α_s - および β -カゼインからの NPN の遊離の程度はそれぞれ SR-2 および SR-1 とほぼ等しかった。HR による両フラクションからの NPN の遊離はきわめて低値で, β -カゼインからの NPN の遊離は SR-2 とほぼ同程度であった。

HR や MR は β -カゼインに作用しても溶液は透明であったが, SR 酵素の場合反応液はしだいに白濁し, やがて凝集して粘稠性のある沈殿を形成した。この沈殿は酵素反応を継続しても, 再び溶解することはなかった。

(2) κ -カゼインの分解力は MR>HR>SR 酵素の順に強かった。また, SR 酵素間には κ -カゼイン分解力の差違はなかった。

(3) 電気泳動によりカゼインフラクションの分解パターンの差違を検討した結果, β -カゼインについて最も顕著な差違があり, それぞれの酵素に特徴のある分解パターンが認められた。 κ -カゼインの分解生成物はプラス極からマイナス極への電気泳動により, HR や MR では原点近傍に 1 本の濃い分解物のバンド (バラ- κ -カゼイン) の出現がみられたのに対し, SR 酵素では, HR や MR の場合と同じ位置のバンドと, それより若干移動度の大きいバンドの計 2 本のバンドの出現がみられ, 明らかに HR や MR の場合と異なっていた。

(4) pH 6.0 におけるカゼインフラクションの蛋白

分解活性および分解機作を調べた結果, MR は α_s - および β -カゼインに作用し比較的 low molecular weight の分解物が多くプルし, その low molecular weight の分解力は MR に比べかなり弱いことを認めた。また, HR, MR および SR 酵素による κ -カゼインの切断部位あるいは機作が互いに異なることが示唆された。

(5) 変異株を誘起し, 凝乳酵素の MCA/PA 比を向上させることによって, ①凝乳活性に関係の深い κ -カゼインの分解力に変化はなく, ② α_s - および β -カゼイン, とくに β -カゼインの分解力が顕著に低下する傾向が認められた。

本研究を行うにあたり, 多大なご助力をいただいた中根千恵子, 沖康彦両氏に深く感謝いたします。

- (1) M. L. Green : *J. Dairy Res.*, **44**, 159 (1977).
- (2) J. L. Sardinias : *Adv. Appl. Microbiol.*, **15**, 39 (1972).
- (3) A. M. El-Negoumy : *J. Dairy Sci.*, **51**, 1013 (1968).
- (4) R. A. Ledford, J. H. Chen and K. R. Nath : *J. Dairy Sci.*, **51**, 792 (1968).
- (5) J. Shovers and V. S. Bavisotto : *J. Dairy Sci.*, **50**, 942 (1967).
- (6) G. H. Richardoson, J. H. Nelson, R. E. Lubnow and R. L. Schwarberg : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1066 (1967).
- (7) R. Mickelsen and N. L. Fish : *J. Dairy Sci.*, **53**, 704 (1970).
- (8) R. Vanderpoorten and M. Weckx : *Neth. Milk Dairy J.*, **26**, 47 (1972).
- (9) P. F. Fox and B. F. Walley : *J. Dairy Res.*, **38**, 165 (1971).
- (10) T. Matoba, C. Nagayasu, R. Hayashi and T. Hata : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1662 (1969).
- (11) 東尾侃二, 吉岡八洲男 : 農化, **55**, 573 (1981).
- (12) C. A. Zittle and J. H. Custer : *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183 (1963).
- (13) R. Aschaffenburg : *J. Dairy Res.*, **30**, 259 (1963).
- (14) 青木幸一郎, 中埜栄三, 大井優一著 : 電気泳動実験法, 廣川書店, 1972, p. 132.
- (15) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, **2**, 朝倉書店, 1956, p. 241.
- (16) 小林文男, 矢吹 稔, 星野一雄, 坂本政義 : 農化, **49**, 81 (1975).