

酵素の触媒機能の解明およびその食品工業への応用

—青カビの生産するセリンプロテアーゼに関する研究—

山本展久・佐野一成

食品工業部

Characterization of Catalytic Functions of Enzymes and Application to the Foods Industries

-Study on Serine Proteinase from *Penicillium citrinum*-

Nobuhisa YAMAMOTO・Kazunari SANÔ

Food Science and Technology Division

要 旨

青カビ (*Penicillium citrinum*) からセリンプロテアーゼを精製した。本酵素の至適 pH は 11.0 であり、アルカリプロテアーゼであることが示唆された。食品工業への応用を考慮して中性 (pH7.0) とアルカリ性 (pH11.0) の両方で検討した。至適温度は、pH7.0 では 50°C、pH11.0 では 30°C であった。しかし、低温域でも酵素活性は、通常の酵素に見られるほどは低下せず、低温性を有していることが観察された。特に、pH7.0 では 30°C より低温域で活性低下のパターンに変化が見られ、触媒作用の変化が示唆された。pH7.0 では 0°C から 30°C まで酵素活性は 100% 残存したが、pH11.0 では 30°C でほとんど活性が消失し、40°C では完全失活した。至適温度から、自己消化によるものであると考察した。

1. 緒 言

食品工業において酵素利用は重要な役割を担っている。酒類やみそ・しょうゆのような発酵食品も微生物が生産する酵素を利用しているといえる⁽¹⁾⁽²⁾。酵素の利用は、その生産物を直接利用する（アルコール発酵やうま味成分発酵など）場合以外にも製造行程の改善（発酵製造中の粘度低下など）や食品の高付加価値化（フレーバーやうま味の付与など）といった用途にも使用されている。近年の消費者の食に対する意識の向上から、今後も酵素の利用範囲はさらに拡大するものと考えられる。

酵素の種類・数は極めて多いが、本研究では、特に低温領域で触媒機能を発揮する酵素について検討した。酵素は通常、至適温度で最大活性を示す。その至適温度は酵素固有の温度であり、かなりの高温まで触媒機能を発揮する高温性酵素に関しては多くの例が報告され、高温性はその構造的な特徴によるものと考察されている。しかし、低温領域で活性を維持するような酵素の例はほとんどなく、低温性酵素の機能解明とその食品製造への応用が期待されている。

青カビ属 (*Penicillium* 属) は菌体外に蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）の一種であるセリンプロテアーゼを生産する^{(3)~(6)}。本研究では *Penicillium citrinum* の生産するセリンプロテアーゼについて検討したところ、至

適温度は 30°C 付近にあるものの、低温領域までその活性が残存していることが観察された。青カビは冷蔵庫などの低温域でも繁殖することから青カビの生産する他の酵素についても低温性を有していることが予測される。

2. 実験方法

2.1 セリンプロテアーゼの精製

プロテアーゼ B 原株 7g を 5mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、一晚攪拌した。遠心して得られた上清を同緩衝液に対して透析した。透析後、再び遠心し、上清を CM-Biogel A および CM-Sepharose に供した。活性画分を集め、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥して精製酵素を得た。

2.2 活性測定法⁽⁷⁾

酵素溶液 100 μ l に 2.5% ミルクカゼイン溶液 1ml を加え、30°C で保温した。一定時間後、4% トリクロロ酢酸 2ml を加えて反応を停止させた。濾過し、濾液 0.5ml に 0.4M Na_2CO_3 2.5ml、6 倍稀釈のフォリン試薬 0.5ml をそれぞれ加え、30°C、20 分保温後 660nm で吸光度を測定した。

2.3 至適 pH の測定

50mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を緩衝液として、各 pH での 2.5% ミルクカゼイン溶液を作成した。活性測定は 2.2 に準じて行った。

2.4 至適温度の測定

至適温度の測定には、緩衝液として 50mM リン酸 (pH7.0) および 50mM Na₂B₄O₇ (pH11.0) を用いた。それぞれの緩衝液で 2.5% ミルクカゼイン溶液を調製し、各温度で酵素活性を 2.2 に準じて測定した。

2.5 温度安定性の測定

温度安定性の測定には、緩衝液として 100mM リン酸 (pH7.0) および 100mM Na₂B₄O₇ (pH11.0) を用いた。それぞれの緩衝液に酵素を溶解し、各温度で 30 分間保温した。pH11.0 の緩衝液で 2.5% ミルクカゼイン溶液を調製し、30℃で酵素活性を 2.2 に準じて測定した。

3. 結果および考察

3.1 セリンプロテアーゼの精製

精製表を Table 1 に示す。全活性として約 10% の回収率で、4.6 倍に精製できた。精製過程で 1 回目の透析の際、透析膜が分解される現象があった。酵素原液中にはセルラーゼが存在すると予想され、そのために透析膜の分解が進んだものと考察した。透析作業は低温での操作であり、青カビ由来のセルラーゼも低温性を有していることが示唆された。

Table 1 青カビセリンプロテアーゼの精製表

Purification Step	Total Activity (nkat)	Specific Activity (nkat)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude Extract	8,830	0.008	100	1
CM-Biogel	2,400	0.023	27.2	2.9
CM-Sephrose	980	0.037	11.1	4.6

3.2 本酵素に及ぼす pH の影響

本酵素に対する反応系の pH の影響を観察した。結果を Fig.1 に示す。本酵素は pH11.0 で最大活性を示し、アルカリプロテアーゼであることが示唆された。食品工業への応用を考えて、以下の検討は中性 (pH7.0) とアルカリ性 (pH11.0) の両方で行うこととした。

3.3 本酵素に及ぼす温度の影響

本酵素に対する反応系の温度の影響を観察した。結果を Fig.2 に示す。至適温度は、中性 (pH7.0) で 50℃、アルカリ性 (pH11.0) で 30℃であった。至適 pH であるアルカリ性では酵素の活性が非常に高く、30℃を超えた付近から自己消化が始まったと考えられ、そのためアル

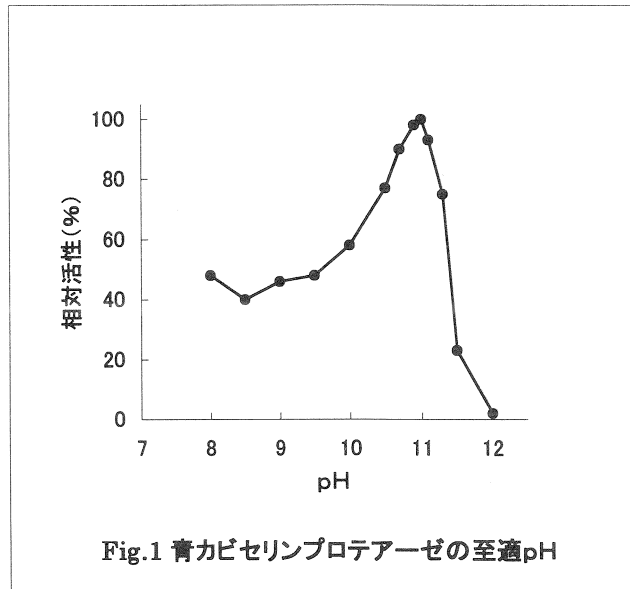


Fig.1 青カビセリンプロテアーゼの至適pH

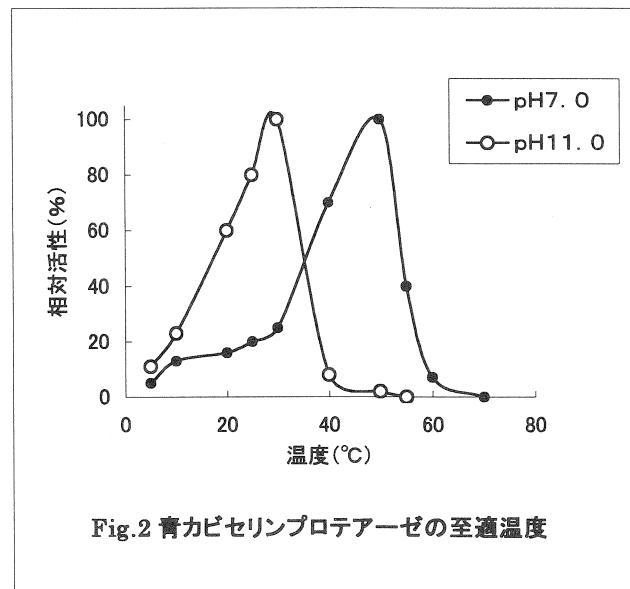


Fig.2 青カビセリンプロテアーゼの至適温度

カリ性での至適温度が 30℃となったと考察した。

また、本酵素の大きな特徴として、低温域で酵素活性の残存率が高いことが上げられる。Table 2 に中性 (pH7.0)・アルカリ性 (pH11.0) それぞれの 30℃での酵素活性を 100 としたときの低温域での各温度の相対活性

Table 2 低温領域での相対活性

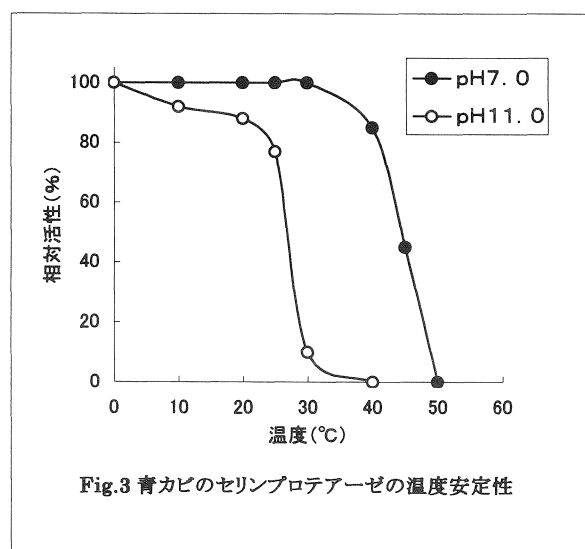
pH	温度 (°C)					
	5	10	15	20	25	30
7.0	19	46	-	60	-	100
11.0	11	23	37	53	86	100

を示す。中性では、5℃という低温でも、酵素活性が30℃の約20%も残存していることがわかる。透析時の透析膜分解活性を考え合わせると、青カビは低温域でも活性を維持できる酵素群を生産している可能性がある。本来青カビは冷蔵などの低温貯蔵中にも繁殖するものであり、低温性酵素群の生産は十分納得できるものである。

さらに特徴的な点は、中性での酵素活性の低下様式である。Fig.2のグラフに見られるように30℃を境に大きく折れ曲がるような挙動を示し、何らかの触媒作用の変化が示唆された。これは構造的な変化の可能性が大きく、今後30℃前後の温度域での構造の変化をとらえる必要がある。

3.4 本酵素の温度安定性

本酵素の温度に対する安定性を観察した。結果をFig.3に示す。中性(pH7.0)では、30℃までは酵素活性は100%残存したが、アルカリ性(pH11.0)では30℃でほとんど酵素活性が消失し、40℃では完全失活した。至適pHから考えると、アルカリ性では酵素活性が非常に高く、至適温度の30℃では自己消化が起こり、残存活性が著しく低下したものと考察した。また、アルカリ性では低温領域でも酵素活性の低下が見られはじめており、この事実も本酵素の低温性を支持するものであると考えた。



4. まとめ

青カビ (*Penicillium citrinum*) からアルカリ・セリンプロテアーゼを精製した。

- (1) 本酵素に対する反応系の pH の影響を観察したところ、至適 pH は 11.0 であった。
- (2) 本酵素に対する反応系の温度の影響を観察したところ、至適温度は pH7.0 で 50℃、pH11.0 で 30℃であった。
- (3) 本酵素は、pH7.0 で 30℃まで安定であったが、pH11.0 では 30℃でほとんど失活し、40℃で完全失活した。
- (4) 本酵素の酵素活性は、低温域でも通常の酵素に見られるほどは低下せず、低温性を有していることが観察された。特に、pH7.0 では 30℃を境に活性低下のパターンに変化が見られ、触媒作用の変化が示唆された。

5. 参考文献

- 1) 林 和也, 福島男児, 茂木孝也: 調味科学, 17, (1970), 161-169
- 2) 一島英治: 日本醤油研究所雑誌, 13, (1987), 42-48
- 3) T.Kishida, S.Yoshimura: J.Biochem., 55, (1964), 95-101
- 4) K.Hayashi: Agric.Biol.Chem., 31, (1967), 642-643
- 5) 富山清善, 杉森恒武, 片桐英郎: 醸工誌, 38, (1960), 355-359, 360-364
- 6) 吉村貞彦: 兵庫農大紀要 (農芸化学編), 5, (1962), 97-100
- 7) K.Hayashi, D.Fukushima, K.Mogi: Agric.Biol.Chem., 31, (1967), 1237-1241