

# 発酵乳製品製造におけるタンパク質の凝固と分解

細野 明義\*

大谷 元†

## はじめに

今日にみるチーズやヨーグルトといった発酵乳製品がいつ、どこで創製されたかは今なお推定の域にとどまっているものの、かつて古代トルコ人が遊牧生活を営んだアジアの一地域に起源を有しているであろうとする見解がおおかたの一致するところである。発酵乳は長い年月の間にその姿、呼称を変えつつ広大なアジア、ヨーロッパ、アフリカそしてアメリカ大陸へと伝播され、それぞれの地域で土着の乳製品となり、独自の製法が確立されていったと考えられる。しかし、千種千様の製法を有しながらも、今日世界に存在する総ての発酵乳製品はその製造において乳タンパク質の凝固と分解を基本工程にしている点では同じである。乳タンパク質の凝固は発酵乳製品の姿を決定し、分解はその質を決定づける要因にもなる。

発酵乳製品は牛乳そのものの栄養価に加え、発酵により生成した多くの代謝産物、更にそこに棲息する微生物が付加価値として備っていることから滋養食品、保存食品、更には嗜好食品としての特性を併せ有している。これらの特性の多くは乳タンパク質がもっている凝乳性や分解性といった化学的性質を基盤にもたらされるものであることを忘れてはならない。

本稿では乳タンパク質の凝固と分解の面から発酵乳製品の特質についての解説を試みたものである。

## 1. 牛乳タンパク質の凝固

### 1.1. 凝固の種類

牛乳は新生仔牛にとって唯一の栄養源であり、タンパク質、糖、脂肪、無機物などの複雑な組成を有する。

牛乳固形分の約3%を占めるタンパク質はカゼインとホエータンパク質に大別されるが、そのうちでもカゼインは全タンパク質の約80%を占め、遺伝的変異体も含めると20数種類もの成分からなる。しかし、これらカゼインは牛乳中では数パーセントが可溶性の各カゼイン成分として存在しているだけで、ほとんどのカゼインは無機物の主成分であるカルシウム、リン酸塩、クエン酸塩などと共に、カゼインミセルと呼ばれる20~220nmの大きさのコロイド粒子(カルシウムカゼインネートリン酸複合体)として分散している。

このようなカゼインミセルは通常、牛乳中ではホエー中の塩類と平衡状態を保ち、安定した状態で存在しており、このカゼインミセルによる光の散乱により牛乳に乳白色を与えているが、図1に示すような種々の要因により、カゼインミセルの安定性は破壊され、凝固を導く<sup>1,2)</sup>。

図1に示す種々の凝固現象の中でも、粉乳や滅菌乳の貯蔵過程における凝固は乳製品の品質を保持する上で妨げるべき好ましくない凝固であるが、乳酸発酵やキモシン(レンニンともいう。本論文に引用した多くの文献においてもレンニンという言葉が使用されているが、近年、腎臓の傍系球体細胞顆粒に存在する酵素レンニンと混同しないようにキモシンという呼び方が一般化されつつあるため<sup>3)</sup>、本論文では特別の場合を除き、キモシンと

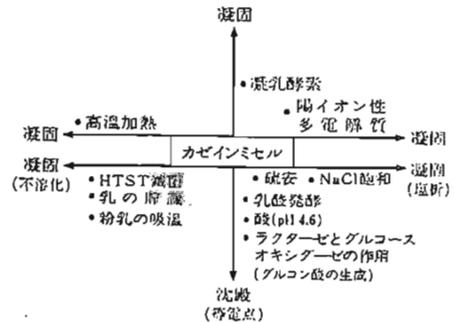


図1 牛乳カゼインの凝固の種類

\* ほその・あきよし † おおたに・はじめ

(信州大学農学部畜産学科)

いう)をはじめとした凝乳酵素による凝固はヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品製造において欠くことのできない現象である。特に、凝乳酵素による凝固はチーズの製造において欠くことのできない過程の一つであり、その機構も乳酸による凝固と比べれば複雑で、かつ、形成される凝固物(カード)は酸により形

成されるものと比べて強い弾性をもち、脂肪や不溶性塩類の多くを取り込んでいる。また、その凝固物のpHも中性に近いことから、チーズの熟成のための微生物の発育にも適している<sup>4)</sup>。

一方、一言に凝乳酵素といっても、その酵素の性質により凝固物の固さは異なり、熟成したチーズの品質も大きく影響を受ける。

以上の点に鑑み、種々の凝固現象の中でも特に、チーズの製造において欠かせない酵素的凝固を対象に、以下、特にキモシンによる凝固機構および現在知られている凝乳酵素の種類や性質について概説する。

## 1.2. キモシンによる凝固機構

### 1.2.1 酵素的段階

キモシンによる牛乳の凝固は酵素的段階と非酵素的段階の2段階を経て進行する。この最初の段階がキモシンのカゼインに対する作用で始まることは、すでに19世紀の後半に Hammarsten により提唱されていた<sup>5)</sup>。しかし、Hammarsten はカゼインを単一分子と考えていた。

前述した通り、遺伝的変異体も含めると現在では20数種類のカゼイン成分に分画されるが、その主成分は $\alpha_s$ - $\beta$ -および $\kappa$ -カゼインであり、これらカゼイン成分はカルシウムに対する感受性がそれぞれ異なる。すなわち、脱脂乳タンパク質の45~55%とカゼイン中最も多い $\alpha_s$ -グループに属するカゼインはカルシウムイオンに対して最も感受性が高く、カルシウムと共に沈殿し易い。また、脱脂乳タンパク質の25~35%を占める $\beta$ -カゼインのカルシウムに対する感受性は温度依存性であり、4℃では沈殿しないが、35℃では沈殿する。さらに、脱脂乳タンパク質の8~15%を占める $\kappa$ -カゼインはこれらの条件下ではカルシウムが存在しても沈殿しない。

1956年、Waughらはカゼイン成分の中でも特に $\kappa$ -カゼインがカゼインミセルの安定化に重要な役割を果しており、この $\kappa$ -カゼインの安定化能はキモシンにより破



図2  $\kappa$ -カゼイン遺伝的変異体Bの一次構造 ※ 本図は文献<sup>12)</sup>に基づいて作図した。

壊されることを明らかにした<sup>6)</sup>。その後、キモシンの作用によりカゼインから遊離するペプチドは特に $\kappa$ -カゼインに起因することが示されると共に、キモシンは $\kappa$ -カゼインをマクロペプチドとパラ- $\kappa$ -カゼインとの2つのペプチドに切断し、カルシウムに敏感な $\alpha_s$ -および $\beta$ -カゼインに対する $\kappa$ -カゼインの安定化能が消失することにより、牛乳の凝固が始まるという今日の考えが定着した<sup>7,8,9)</sup>。

一方、 $\kappa$ -カゼインのキモシンによる切断部位については興味深い問題である。この問題を解決するために、キモシン処理により生じたペプチドのC-末端アミノ酸やN-末端アミノ酸の解析が行なわれた。その結果、Jollesらは $\kappa$ -カゼインやマクロペプチドにカルボキシペプチダーゼを作用させるとバリン、アラニン、スレオニンおよびセリンが1:1:0.5:0.4の割合で生じることを認め、マクロペプチドは $\kappa$ -カゼインのC-末端に位置することを明らかにした<sup>10)</sup>。また、マクロペプチドのN-末端がメチオニンであることやパラ- $\kappa$ -カゼインのC-末端がフェニルアラニンであることが証明されると共に<sup>10,11)</sup>、図2に示す通り、キモシンは $\kappa$ -カゼインのN-末端より105番目のフェニルアラニンと106番目のメチオニンの結合を特異的に切断することが明らかになったのである。

### 1.2.2 非酵素的段階

牛乳の凝固過程に起こる物理的变化を電子顕微鏡により観察すると、まず最初に短い糸状構造物質がミセルを接合し、次第に大きな繊維になり、カゼイン粒子が固まり、繊維構造の交叉した網に変化する。そして、その3次元の糸状の網の中に不規則なパラ- $\kappa$ -カゼイン粒子が位置することにより凝固は終結する<sup>4),13)</sup>。この場合の各変化が牛乳中の成分とどのように関係しているかはカゼインミセルの構造が正確に把握されていない現状では明らかではないが、多く提案されているカゼインミセルのモデル図の中から、電子顕微鏡の観察結果と比較的一致

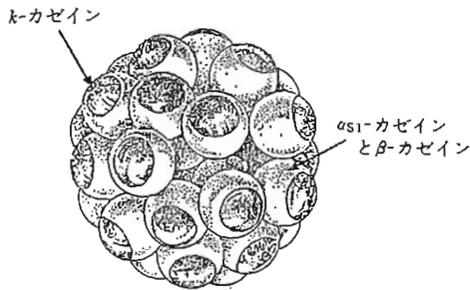


図3 Slattery と Evard のカゼインミセルのモデル<sup>15)</sup>

した Slattery らのモデルを例にとると次のように説明できる<sup>14)</sup>。

すなわち、Slattery らは精製カゼインの会合体を用いた研究結果に基づき、直径20nm のポリマーサブユニットからミセルができる場合、非極性部分は放射状に内部に向かって配向し、カルシウム感受性カゼインの荷電した酸性ペプチドと κ-カゼインの親水性部分(マクロペプチド域)が表面近くにてカゼインミセルモデルを提案し、ミセル全体の大きさは κ-カゼインを多く含むサブユニットが十分に存在するか否かにより決定されると考えた(図3<sup>15)</sup>)。このように、表面に κ-カゼインが存在すれば、キモシンの攻撃を容易に受け、キモシンの作用でマクロペプチドが遊離することにより、カゼインミセル表面の電荷は減り、疎水性領域間に相互作用が生じて凝固することは十分に予測されるところである。

一方、牛乳の pH 値では α<sub>1</sub>-カゼインと β-カゼインは負に荷電するのに対し、キモシン処理により生じるパラ-κ-カゼインは正に荷電する。Green らはキモシン処理したカゼインミセルはキモシン処理前のカゼインミセルよりも電気的移動度の小さいことを見出し、ミセル間の相互作用に関係する因子として電荷の減少を挙げ、通常、電気的な反発によって安定化されているカゼインミセルがキモシン処理でマクロペプチドを放出して電荷を失うことにより、ミセル間で会合が生じると考えている<sup>16)</sup>。このような考えはカゼインミセルの有効反発電位が47.6mV であるのに対し、キモシン処理ミセルの有効反発電位は3.5mV まで低下す

ることからも納得でき<sup>17)</sup>、また、カルシウムが凝固を助ける事実はカルシウムイオンが負電荷の部分に結合し、ミセル間の静電的反発を減少させ、会合を助けることとしても十分に説明がつく<sup>18)</sup>。

いずれにしても、カゼインミセルの構造が確固としていない現状においては、キモシンによる凝固の全段階を正確に説明することはできないが、以上述べてきた通り、キモシンの作用によって κ-カゼインがパラ-κ-カゼインとマクロペプチドに切断され、マクロペプチドが遊離することにより、カゼインミセル表面の疎水度の増加や電荷の減少と共にミセルの水和性が減少し、凝固が生じることは確かである。

なお、古くから κ-カゼインは不均一であることは良く知られていたところであるが、近年、κ-カゼインには糖鎖の存在しないものや種々の糖鎖の構造、あるいは糖鎖の結合部位などが解明されている<sup>19)</sup>。しかし、糖鎖の違いはカゼインミセルの安定性に本質的には影響を与えず、全て等しくキモシン分解に対して敏感である<sup>20)</sup>。

### 1.3. 凝乳酵素の種類と性質

チーズ製造工程の第1段階である凝乳(カゼインミセルの凝固)を導くのに古くから用いられているキモシン

表1 凝乳酵素の存在が知られている高等動物および微生物

動物	哺乳動物の胃(キモシン、ペプシン) 哺乳動物の脳臓(トリプシン、キモトリプシン)
高等植物	<i>Ananas comosus</i> (ブドウ) <i>Carica papaya</i> (パパイヤ) <i>Calotropis gigantea</i> <i>Calotropis procera</i> <i>Castiolla elastica</i> <i>Cerbera manghas</i> <i>Cynara cardunculus</i> <i>Cucurbita pepo</i> <i>Ficus caria</i> (フィチン) <i>Ficus religiosa</i> <i>Galium verum</i> <i>Pinguicula vulgaris</i> <i>Planchonella oxycedra</i> <i>Solanum elaeagnifolium</i> <i>Solanum quitoense</i> <i>Solanum melongena</i> <i>Solanum torvum</i> <i>Solanum indicum</i> <i>Streblus asper</i> <i>Withania coagulans</i> <i>Withania somnifera</i> <i>Wrightiana calysina</i>
微生物	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus candidus</i> <i>Aspergillus terricola</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Ascochyta viciae</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus mesentericus</i> <i>Bacillus lichniformis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Byssoschlamys fulva</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Colletotrichum atramentarium</i> <i>Corioliolus versicolor</i> <i>Daedaleopsis styracina</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Fomes fomentarius</i> <i>Fomitopsis pinicola</i> <i>Irpez lacteus</i> <i>Lenzites betulina</i> <i>Micrococcus caseolyticus</i> <i>Monascus anka</i> <i>Mucor rouxii</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas myxogenes</i> <i>Rhizopus batatae</i> <i>Rhizopus chinensis</i> <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Streptococcus liquifaciens</i> <i>Streptococcus zymogenes</i> <i>Streptomyces hachijoensis</i> <i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces ehimensis</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Trametes ostreiformis</i>

は生後数週間の授乳中の仔牛の第4胃から得られ、酵素学的には酸性プロテアーゼに属する酵素の1つである。近年、世界的に食肉需要の急増に伴い、仔牛の屠殺数が激減したことや、チーズの消費量の増大により、凝乳酵素をキモンンだけではまかなえず、新しい凝乳酵素のスクリーニングが活発化している。しかし、キモンンの作用によりκ-カゼインがパラ-κ-カゼインとマクロペプチドに切断され、カゼインミセルが凝固することにより、キモンンのタンパク質分解作用が全く停止するわけではなく、チーズの熟成中にキモンンのタンパク質分解作用は進行し、カゼイン成分をさらに分解する。事実、キモンンの作用により、 $\alpha_{S1}$ -カゼインより生じた $\alpha_{S1-1}$ カゼインがチーズの硬さやボディに影響を与えることや、次章で述べるスターター菌の生産するプロテアーゼと共にキモンンは凝固したカゼイン(カード)に作用してゴム状の弾力のあるカードからチーズらしいなめらかなテクチャーを形成する上でその後も大きな役割を果たすことはよく知られたところである。しかし、逆に、タンパク質分解活性の高い凝乳酵素はチーズのボディを軟弱にしたり、苦味の原因になることも事実であり、凝乳酵素のもつタンパク質分解活性やその特異性は凝固後のチーズの熟成に大きく関係する。

これまでにキモンンの代替品としてスクリーニングされた凝乳活性を有する酵素を含む高等動物植物や微生物、あるいはその酵素名を表1に示したが、それら凝乳酵素の性質について簡単に述べる。

### 1.3.1 高等動物植物に含まれる凝乳酵素

高等動物由来の凝乳活性をもつ酵素としてはキモンンの他にトリプシン、キモトリプシン、ペプシンなどがあるが、このうち、トリプシンやキモトリプシンはそのままの状態では凝乳酵素としての実用性は乏しく、後述するように固定化することによる利用性の開発が試みられ

ている。また、ペプシンはキモンンと同じ酸性プロテアーゼであるが、酵素学的にはキモンンとかなり性質を異にしており、特に、キモンンと比べて基質特異性が広く、凝乳活性に対するタンパク質分解活性の比が高いためにペプシン単独でチーズを製造するには問題点が多い。このことから、ペプシンはキモンンとの混合物としてチーズ産業界において実用化されている<sup>4)</sup>。

一方、植物由来の凝乳活性をもつ酵素は一部を除き、熱帯植物やその果実に見出される。しかし、これらの多くはチオールプロテアーゼに属し、タンパク質分解活性が高いためにカードの損失が大きく、かつ、出来上がったチーズもペースト状で苦味をもつことから、現段階では実用的に用いられているのは稀である。近年、Barbosaらはカルドン抽出物を用いたチーズ製造結果に基づき、カルドン抽出物のような高いタンパク質分解活性をもつ凝乳酵素は熟成期間の短い軟質チーズの製造に利用できる可能性を指摘している<sup>21)</sup>。

最近、筆者らは熱帯植物の一つであり、インドネシアにおいて“リトス”と呼ばれるチーズ製造時の凝乳剤として用いられている *Wrightiana calysina* の木片より凝乳酵素を単離した<sup>22-24)</sup>。本酵素は分子量 67,000~68,000のセリンプロテアーゼであり、凝乳やタンパク質分解のための至適温度は70°C付近にある(図4<sup>23,24)</sup>)。また、本酵素は中性pH域では耐熱性が高いのに対し、酸性pH域では著しく不安定で、室温でその精製酵素溶液のpHを4.0に調整するだけで失活し始める(図5<sup>24)</sup>)。チーズの熟成は低温で行うことや、熟成過程にpHは酸性になることから、本酵素を用いたチーズの製造には興味をもたれる。

### 1.3.2 微生物の生産する凝乳酵素

微生物の生産する凝乳酵素の中でも細菌由来の酵素については1960年代後半までは興味もたれ、研究も多く

なされてきたが、一般にタンパク質分解活性が高く、チーズを製造した場合の結果が一貫してよくないため、現段階では実用的にはほとんど用いられていない。

一方、真菌の生産する凝乳酵素の中でも *Aspergillus* 属、*Syncephalastrum* 属、*Cladosporium* 属などの菌株からの凝乳酵素は高いタンパク質分解活性を有することから実用性には乏しいが<sup>25)</sup>、ケカビに属する *Mucor pusillus* var. Lindt、*Mucor miehei*

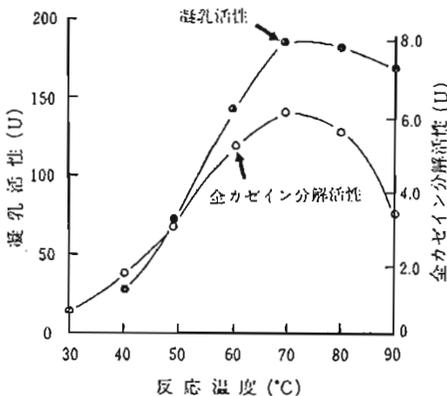


図4 *Wrightiana calysina* より単離した凝乳酵素の凝乳および全カゼイン分解活性におよぼす温度の影響<sup>23,24)</sup>

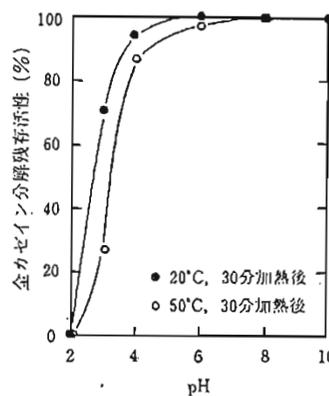


図5 *Wrightiana calysina* より単離した凝乳酵素のpH安定性<sup>24)</sup>

や *Endothia parasitica* の生産する凝乳酵素はすぐれており、かつ安全で適した凝乳酵素として各国において特許公認もされ、現在では世界のチーズの半分以上がこれらの微生物由来の凝乳酵素を用いて製造されている。中でも、最も利用性の高い *Mucor pusillus* var. Lindt の生産する凝乳プロテアーゼは有馬らにより発見され<sup>26)</sup>、一般にMPプロテアーゼと呼ばれている。本酵素はキモシンよりもpHや熱に対して安定であり、凝乳最適温度がキモシンでは44℃であるのに対し、MPプロテアーゼは56℃と高いが、タンパク質分解と凝乳の比はキモシンに近い値を示す<sup>27)</sup>。また、酵素学的にはMPプロテアーゼもキモシンと同じ酸性プロテアーゼに属し、分子量29,000~32,500で、Glu-Phe, Phe-Thr, Phe-Leu, Tyr-Leu および Glu-Tyr のペプチド結合を切断する<sup>28)</sup>。このMPプロテアーゼを生産する *Mucor pusillus* var. Lindt と同じ属の *Mucor miehei* の生産する凝乳プロテアーゼはMMプロテアーゼと呼ばれ、MPプロテアーゼと類似した性質を有することから、MPプロテアーゼと並んでキモシンの代替品として広く利用されている<sup>4)</sup>。

また、*Endothia parasitica* の生産するプロテアーゼは一般にEPプロテアーゼと呼ばれている。この酵素も分子量34,000~37,500の酸性プロテアーゼでキモシンの代替品として用いられているが<sup>29,30)</sup>、全カゼイン、 $\alpha_1$ -カゼインおよび $\beta$ -カゼインに対してMPプロテアーゼよりも高い分解性を示すことから、この酵素を用いて製造したチーズは苦味をもつのが特徴である<sup>4,31,32)</sup>。しかし、本プロテアーゼはpH4.5、60℃、5分間の加熱により完全に失活し、かつ、pH6以上ではより不安定なことから、エンメンタルチーズのように高い温度(51.7~54.5℃)でクッキングするチーズの製造に用いた場合は、すぐれた品質の製品が得られている<sup>4,33,34)</sup>。

最近、数多いタンパク質分解酵素の中でも、高い凝乳活性とカゼインに対する低いタンパク質分解活性を備えているのはキモシン、MPプロテアーゼ、MMプロテアーゼなどごくわずかであり、かつ、同じ酸性プロテアーゼでありながら、これら凝乳酵素のタンパク質分解の特異性はペプシンとは異なることから、その原因についてMPプロテアーゼを用いて構造学的に種々検討されている。その結果、一般に酸性プロテアーゼの活性発現に必要な2箇の必須カルボキシル基のうち、化学試薬で修飾され易い方のカルボキシル基に隣接して、MPプロテアーゼでは活性発現に必要なヒスタジジン残基が存在することや、そのヒスタジジン残基の付近は基質の結合と基質特異性の発現に必要な部位であることが明らかにされた<sup>35)</sup>。また、キモシン、MPプロテアーゼおよびEPプロテアーゼなどのすぐれた凝乳酵素はいずれもヒスタジ

ン残基を破壊する光酸化により顕著に失活することから、これらすぐれた酸性凝乳プロテアーゼにはヒスタジジン残基を含む固有の構造が存在することが示唆されている<sup>36)</sup>。

### 1.3.3 凝乳酵素の生産および利用への最近の試み

表1に示したように、多くの高等動物は凝乳活性を有する酵素を含み、多くの微生物は凝乳プロテアーゼを生産する。これら高等植物や微生物の種類は殆んど無限にあることから、これらの資源より $\kappa$ -カゼインに対して高い基質特異性と低いタンパク質分解活性を備えた凝乳酵素をスクリーニングすることは有効な方法の一つである。しかし、近年、現存の凝乳酵素、特にキモシンを有効利用したり、タンパク質分解活性の高い凝乳酵素のタンパク質分解活性をなるべく発現させないで利用する観点や、あるいはまた、遺伝子工学の導入により細菌に仔牛キモシンそのものを生産させる観点からも研究が進められている。

すでに述べたように、凝乳は2つの段階で起こる。すなわち、第1段階は $\kappa$ -カゼインに酵素が作用する酵素的段階であり、第2段階は凝固する非酵素的段階である。これら各段階は温度に対して感受性が著しく異なり、10℃では凝固速度は通常の15~20倍も遅くなるのに対し、酵素活性は十分に保持されている<sup>4,38)</sup>。この特性を利用して、凝乳酵素を予め固定化し、カラムやその他のリアクターに充填しておき、10℃で牛乳を通してリアクターから出てきた段階で温度を上げると牛乳は急激に凝固する。この方法を用いれば牛乳と反応後、酵素を回収でき、酵素の反復利用が可能である。また、この方法の問題点として、固定化により酵素活性の低下することがある<sup>37)</sup>。しかし、この短所は逆にペプシンやキモトリブシン、あるいは多くの微生物プロテアーゼのようにタンパク質分解活性の高いプロテアーゼを固定化することにより、酵素活性の低下することが長所となり、リアクター中の時間を調整しながら酵素との反応時間を自由に調節できる。近年、FerrierらおよびCheryanらの研究により固定化ペプシンの実用化が可能になっている<sup>37,38)</sup>。

一方、試験管内組換えDNA技術は遺伝子の本体であるDNAをつなぎ替え、生物の種を越えて遺伝子を入れ替えることを可能にする。この技術を用いて、ホルモンやインターフェロンなど医療上重要な高等動物のペプチドが微生物により生産されつつある。前述したように、チーズ産業界においてキモシン代替品の使用が広く公認され、それら代替品を用いて多くのチーズが製造されている現状においてもキモシンの利点はやはり他に類をみない。このことから、別府らは仔牛第四胃からキモシンの前駆体タンパク質であるプロレンニンのmRNAを単

離し、これを用いて二本鎖の cDNA を作り出した<sup>39)</sup>。さらに、彼らはこの cDNA を大腸菌にクローン化し、大腸菌1細胞当たり3万個以上のプロレンニンの生産に成功している<sup>40,41)</sup>。このようにしてできたプロレンニンはキモシンに変換し、凝乳活性を示すことから、遺伝子工学の利用によるキモシンの生産は今後の凝乳酵素をまかなう上で非常に有望である。

## 2. 乳タンパク質の分解

### 2.1 スターター乳酸菌のタンパク質分解酵素

発酵乳製品の製造過程における乳タンパク質の分解は乳製品の風味、組織を決定し、乳製品に個性を与える上で極めて重要である。乳製品製造における乳タンパク質の分解はスターター微生物に依るところが多く、その主なスターター微生物は乳酸菌である。乳酸菌スターターとして、*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetilactis*, *Str. thermophilus*, *Leuconostoc citrovorum*, *Lactobacillus casei*, *Lac. bulgaricus*, *Lac. helveticus*, などが用いられている。これら乳酸菌を牛乳中で最適温度で増殖させた場合、その最大菌数はおよそ  $10^9$ /ml に達する。この菌体量は乾物重量としてみた場合、例えば桿菌で0.25mg dry wt./ml に匹敵する。乳酸菌がこれだけの菌体量に達するには牛乳中に遊離アミノ酸が0.025%含まれていることが必要であると言われている<sup>42)</sup>。しかし、搾乳された牛乳中に含まれる遊離のアミノ酸量は通常、0.01%程度であり、乳タンパク質の加水分解によりアミノ酸が補給されない限り  $10^9$ /ml の菌数に達することができない。従って、スターター乳酸菌のタンパク質分解作用は乳酸菌自身が牛乳成分を栄養源として利用し、最大限に増殖するための基本的な生物学的営みであると言えるのである。スターター乳酸菌の円滑な増殖は豊富な乳酸の生成をもたらし、有害微生物の生育と活動を抑制するのみならず、カードを収縮して弾力性を向上させ、また、チーズ製造においてはレンネットの凝固を助ける上でも重要である。

ところで、スターター乳酸菌が生産するタンパク質分解酵素は厳密にはプロティナーゼ (proteinase) とペプチダーゼ (peptidase) に区別されている。

プロティナーゼは上述したように、増殖のために乳酸菌が周囲から高分子のタンパク質を加水分解してペプチドを生成し、ペプチダーゼはペプチドをさらに低分子ペプチドまたはアミノ酸を生成させる。プロティナーゼはまたペプチダーゼとの共同作業により菌体内で代謝産物的に生成した不要のタンパク質 (nonsense protein) を分解し、菌体外へ排出する役割をも果している<sup>43)</sup>。

菌体周囲の高分子タンパク質を分解するプロティナーゼの乳酸菌スターター菌体内での所在についての研究は乳酸球菌を中心に進められてきている。乳酸球菌の菌体内および菌体外プロティナーゼについての詳細な検討の結果、多くのスターター乳酸菌プロティナーゼが cell-bound または surface-bound と呼ばれるように細胞壁に存在することが明らかにされた。その先駆的な研究として Cowmannらのものが挙げられる<sup>44)</sup>。Cowmannらは *Str. lactis* 3 の完全細胞を超音波処理し、次いでリゾチームで処理することによってプロティナーゼの画分に見出されるプロティナーゼが細胞壁に存在しているこ

表2 各種乳酸菌の菌体内プロテアーゼのカゼインに対する分解性<sup>41)</sup>

基 質	遊離チロシン (μg/ml)		
	反応3時間	反応24時間	
<i>Streptococcus cremoris</i>	Casein-I		
	α <sub>s</sub> -	3.2	10.6
	β-	7.4	17.8
	κ-	7.2	25.7
	whole	5.6	16.3
	Casein-II		
	α <sub>s</sub> -	5.8	14.0
	β-	8.6	17.2
	κ-	10.6	25.8
	whole	7.6	18.7
<i>Streptococcus lactis</i>	Casein-I		
	α <sub>s</sub> -	0.8	1.2
	β-	0.7	2.6
	κ-	2.6	8.2
	whole	0.5	2.4
	Casein-II		
	α <sub>s</sub> -	1.7	3.5
	β-	0.5	5.3
	κ-	4.8	14.8
	whole	0.5	2.9
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Casein-I		
	α <sub>s</sub> -	5.3	9.6
	β-	8.0	27.5
	κ-	9.6	30.1
	whole	2.8	20.0
	Casein-II		
	α <sub>s</sub> -	6.2	6.6
	β-	8.0	30.5
	κ-	15.0	32.4
	whole	4.1	13.0
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Casein-I		
	α <sub>s</sub> -	2.4	3.0
	β-	4.3	14.9
	κ-	4.3	23.8
	whole	4.3	11.4
	Casein-II		
	α <sub>s</sub> -	6.6	11.6
	β-	5.0	18.0
	κ-	17.6	28.8
	whole	2.4	7.3

Casein I および II はそれぞれ貯乳および個乳から調製した。

とを明らかにした。また、種々の乳酸菌の菌体内に存在するプロテイナーゼ活性についての一連の研究が大宮らによって進められてきている<sup>45-47)</sup>。すなわち、*Str. cremoris*, *Str. lactis*, *Lac. bulgaricus* および *Lac. helveticus* の菌体膜内プロテイナーゼはすべて活性至適 pH が 6~7 にあり、30~50°C に活性至適温度を有している。いずれも  $\alpha$ -カゼインに対してよりも  $\beta$ -カゼインに対し、より強い分解作用を有し、また  $\kappa$ -カゼインに対しては最も強い分解作用を有していることが明らかとなった(表 2)。Chandan らも *Lac. bulgaricus* NCDO 1489 のプロテイナーゼのカゼインに対する作用について検討を行ない、カゼイン基質に対して 50°C, pH 5.8 の時、最も強い活性を示し、かつ  $\beta$ -カゼインに対する分解性が強いことを示した<sup>48)</sup>。

さらに、これら乳酸菌プロテアーゼの精製も試みられているが、比活性の高い状態で分離された例は少ない。大宮らは *Str. cremoris* のプロテイナーゼの精製を試み、Diethylaminoethyl-cellulose (DE-23) および Sephadex G200 を用い、比活性を 150 倍に高めている。この酵素は至適 pH 6.5~7.0 で、至適温度は 30°C である。また、分子量は 140,000 とかなりの高分子で km 値は 0.1% カゼインに相当し、カゼイン分子量を 20,000 とするとおよそ  $5 \times 10^{-8}$  M であることが判明している<sup>49)</sup>。

一方、ペプチダーゼの活性や細胞内での所在についての検討も年毎に進められてきている。乳酸菌がペプチダーゼを生産することの事実は 1954 年 Vander Zant らによって検討され、*Str. lactis* が glycyl-leucinase や alanyl-glycinase を生産することが明らかとなった<sup>50)</sup>。また、Group N-*Streptococci*<sup>51)</sup>, *Str. durance*<sup>52)</sup>, *Str. cremoris*<sup>53)</sup> などについてもジペプチダーゼが生産されることが明らかにされ、それらの酵素的性質についても検討が加えられている。乳酸球菌ペプチダーゼについてのこれらの知見をもとに、1978 年、Schmidt らは *Str. lactis* C2 のペプチダーゼの菌体内での所在について報告している<sup>54)</sup>。すなわち、対数末期の菌体を破壊し、これより分離遠心法によってペプチダーゼ活性を有する "soluble fraction", "particulate associated fraction", それに "ribosome associated fraction" の三画分を分画した。とりわけ、菌体抽出液の 40,000 rpm/90min で得られる soluble fraction と呼ばれる上澄液中に強いペプチダーゼ活性を見出し、ペプチダーゼが菌体膜内に存在す

ることが明確に示された。

ペプチダーゼはプロテイナーゼと同様、その菌の増殖に必要な必須アミノ酸を供給するために合目的に生産される酵素である一面ものぞかせている。例えば、Group N-*Streptococci* が必須とするロイシン、バリンが自己の生産するペプチダーゼの作用によってペプチドから生成することが知られている<sup>55)</sup>。さらに、本菌はトリペプチダーゼ、イミノペプチダーゼ、プロリンイミノジペプチダーゼなどを生産し、増殖に必要なアミノ酸を生成させることもわかっている。また、*Str. cremoris* が増殖にとって必須アミノ酸であるプロリンを、それを含むペプチドから遊離させるのに対し、プロリンを必須としない *Str. lactis* や *Str. diacetylactis* にはそのペプチドを分解する作用を有しない事実も明らかにされている<sup>56)</sup>。

乳酸菌ペプチダーゼの分離の試みは、*Str. lactis*<sup>57)</sup>, *Str. cremoris*<sup>57)</sup>, *Str. thermophilus*<sup>58)</sup>, *Str. diacetylactis*<sup>59)</sup>, それに *Lac. casei*<sup>60)</sup> についてなされてきたが、ディスク電気泳動で単一バンドになるまで精製された例は極めて少ない。近年、Hwang らは *Str. cremois* の生産するペプチダーゼを精製し、精製酵素の性質について調べている<sup>61)</sup>。すなわち、*Str. cremoris* H61 の菌体抽出液を硫酸分画、DEAE-セルロースならびに hydroxyl apatite クロマトグラフィーにより L-Leu-Gly を基質としてペプチダーゼを約 190 倍に精製している。このペプチダーゼは分子量が約 100,000 と推定され、活性至適 pH は 8.0 で  $\text{Co}^{2+}$  で活性化され、EDTA, 1,10-phenanthroline およびペブスタチンで阻害を受ける。また、ペプチダーゼは N-末端側にグリシン、またはプロリンをもつジペプチド以外のジペプチドを分解するが、トリペプチドおよびカルボベンゾキシペプチドには作用しない特性を有している。基質に対する特性は *Str. thermophilus*<sup>58)</sup>, *Str. diacetylactis*<sup>59)</sup> および *Lac. casei*<sup>60)</sup> においても同様に認められる。

## 2.2 関連微生物のタンパク質分解酵素

カマンベールチーズを代表とする白カビチーズの熟成

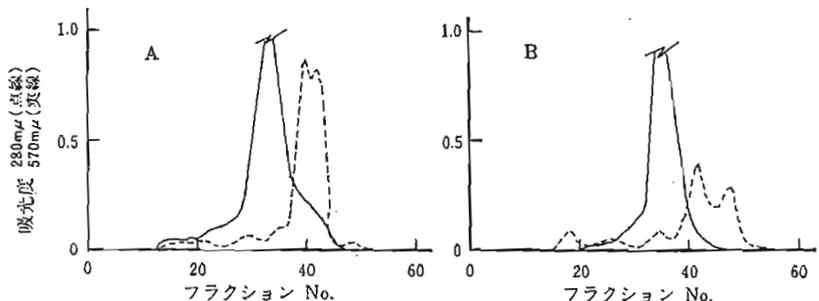


図 6 *Pen. caseicolum*(A)および *Pen. roqueforti*(B)プロテアーゼにより分解したカゼイン分解物の Bio-gel P 6 による篩別<sup>62)</sup>

表3 *Pen. caseicolum* の酸性カルボキシルペプチダーゼの合成ペプチドに対する分解活性<sup>63)</sup>

基質	相対活性(%)
Z-Tyr-Glu	391
Z-Phe-Tyr	432
Z-Glu-Phe	104
Z-Glu-Tyr	100
Z-Gly-Leu	9.2
Z-Gly-Phe	4.1
Bz-Gly-Lys	1.7
Z-Gly-Pro-Leu	0.2
Z-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	0
Z-Gly-Leu-NH <sub>2</sub>	tr
Gly-Gly	0
Gly-Gly-Gly	0
Z-Phe	0
Z-Glu	0

Z: Benzoyloxycarbonyl, Bz: Benzoxyl

に重要な *Penicillium caseicolum*, ロックフォールチーズを代表とする青カビチーズの熟成に重要な *Pen. roqueforti*, またリンブルガーチーズの製造に用いられる *Brevibacterium linens*, それに我国でゴーダタイプチーズ製造への応用が試みられた *Aspergillus oryzae* Chosen B などのプロテアーゼ活性について多くの報告がなされてきた。これら微生物の生産するプロテアーゼ活性はスターター用乳酸菌よりも一般的に強く、チーズ組織を軟質化する傾向が強い。

カマンベール, ロックフォールチーズの熟成菌としてそれぞれよく知られている *Pen. caseicolum* と *Pen. roqueforti* のプロテナーゼのカゼインに対する作用機構はよく類似するが, 両菌株ともそれぞれ至適 pH を異にする。exopeptidase を産生し, カゼインから多量の低分子ペプチドを遊離させる。両微生物の生産するプロテナーゼをそれぞれ全カゼインに作用させた後, Bio-Gel P 6 により篩別し, その流出液の 570 および 280nm での O. D. を測定して得たクロマトグラムの類似性からも両プロテナーゼのカゼインに対する作用機構がよく似ていることが理解される<sup>62)</sup> (図6)。

近年, 阿彦らは *Pen. caseicolum* の生産する酸性カルボキシルペプチダーゼを精製 (470倍) し, その性質を調べている<sup>63)</sup>。本酵素は分子量 126,000 で, 40℃までは熱安定な酵素で至適 pH が 2.3~3.5 である。また, C 末端より 2 番目の位置に芳香族アミノ酸を有するペプチドに対しては強い基質特異性を有している (表3)。なお, *Pen. roqueforti* の酸性カルボキシルペプチダーゼについては一島らによって研究が進められており, *Pen. casei-*

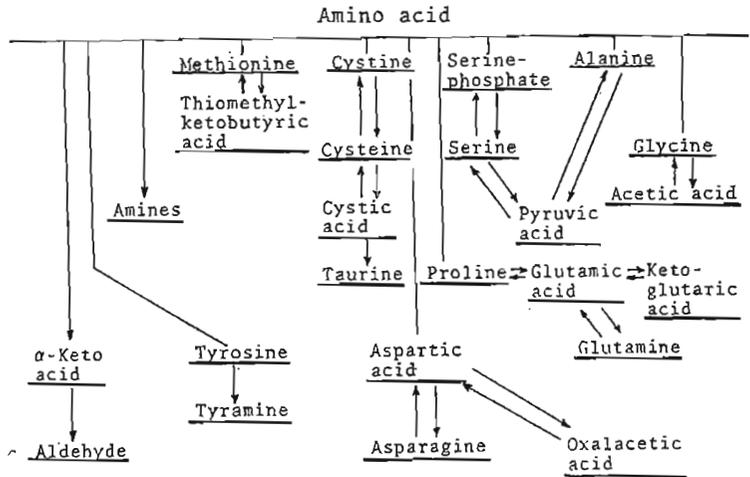


図7 チーズの熟成過程におけるアミノ酸代謝<sup>63)</sup>

*colum* の場合と異なり, 菌体外に溶出せず, 菌体結合性のものであることが判明している<sup>64)</sup>。

一方, *Brev. linens* の生産する菌体外プロテアーゼは pH 7.0 に至適活性を有し, かつアルカリ側に高い活性を示し, 45℃, 10分間の加熱で約90%の活性を失う<sup>65)</sup>。さらに本酵素はウシヘモグロビンに対しても分解作用を有するが, 全カゼインに対し, 際立った高い分解性を示す。

コウジカビである *Asp. oryzae* Chosen B のプロテアーゼをゴーダタイプチーズの製造に応用しようとする試みが伊藤・中西らによりなされている<sup>66, 67)</sup>。飢餓培養によって培養液から得た本菌のプロテアーゼは酸性プロテアーゼ, 中性プロテアーゼ, アルカリ性プロテアーゼから成っている。分画前のプロテアーゼは  $\beta$ -カゼインを最もよく分解し, 次いで  $\alpha$ s-カゼイン,  $\kappa$ -カゼインの順に基質特異性を有している。各カゼイン画分に対する作用の至適温度はいずれも 55℃, 至適 pH は  $\alpha$ s-カゼインで pH 6.3,  $\beta$ -カゼインで 6.0, そして  $\kappa$ -カゼイン 6.5 である。

### 2.3 チーズの熟成中における乳タンパク質の分解

凝乳剤, スターター乳酸菌および関連微生物の生産するプロテアーゼの作用を受け, チーズ中の不溶性タンパク質は次のプロセスを経てアミノ酸にまで分解される。

タンパク質 (不溶性) → プロテオース (可溶性)  
 → ペプトン (可溶性) → ペプチド (可溶性) →  
 アミノ酸

可溶性タンパク質の生成に伴い, チーズの風味が増大し, また, チーズの組織と風味の独自性は乳タンパク質の分解様式によってもたらされる。図7に示すように, 乳タンパク質の分解によって生成したアミノ酸のいくつ

かはさらに酵素作用を受けて二次的に他種アミノ酸に転換される。また、これらのアミノ酸は揮発性脂肪酸を始めとする各種風味成分の前駆体にもなっている<sup>69,70)</sup>。

チーズ熟成中における乳タンパク質の分解について、ここでは細菌熟成型硬質チーズとしてチェダーチーズ、カビ熟成型軟質チーズとしてブルーチーズの場合を中心に概説する。

### 2.3.1 細菌熟成型硬質チーズ

チェダー、エダムなど細菌熟成型硬質チーズの熟成過程における乳タンパク質分解は凝乳剤由来のプロティナーゼとスタータ乳酸菌のペプチダーゼとの関連において行なわれる。チーズ熟成過程ではスタータ由来のプロ

ティナーゼの活性は弱く、主としてキモシンやペブシンといった凝乳剤のもつプロティナーゼが乳タンパク質を分解してペプチドを生成する。次いでスタータ乳酸菌のペプチダーゼがペプチドに作用し、オリゴペプチドやアミノ酸を生成する。

チーズ内での遊離アミノ酸の蓄積について Petterson ら<sup>71)</sup>や O'Keeffe ら<sup>72)</sup>はスタータ乳酸菌のペプチダーゼ活性がチーズ中での乳酸菌の菌数が90%近く減少した時点で高まり、それに伴って12% TCA 可溶性窒素量が増大することを報告し、乳酸菌ペプチダーゼはチーズ内におけるアミノ酸遊離に対して関連性の大きいことを明らかにしている。

前述したように、遊離アミノ酸の蓄積はチーズの旨味に直接関係するばかりでなく、芳香成分の前駆体になっている芳香形成の上からも重要である。一方、ペプチドはアミノ酸の供給源としてのみではなく、ペプチドの分解様式によってチーズの組織が決定づけられる。Creamer らはチェダーチーズの組織に影響をおよぼす上で重要な乳タンパク質の分解として $\alpha_{S1}$ -カゼインの分解を挙げている<sup>73)</sup>。 $\alpha_{S1}$ -カゼインのアミノ酸配列の上でキモシンが作用し得る20箇所の結合のうち、N末端側の

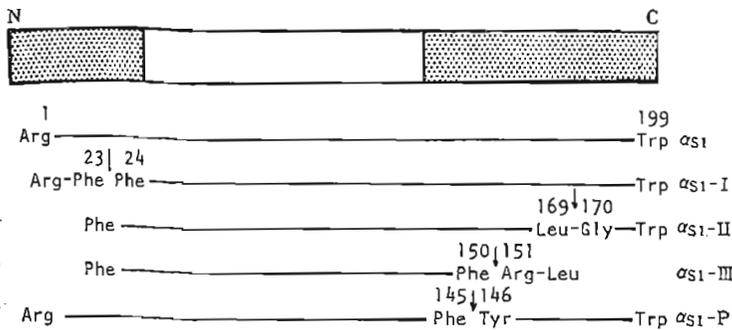


図8  $\alpha_{S1}$ -カゼインからキモシンまたはパバイン処理して得られる限定分解ペプチド<sup>74)</sup>  
 アミカケ部：疎水性領域      白色部：親水性領域

表4 チェダーチーズの熟成過程における遊離アミノ酸 (モル%)<sup>75)</sup>

アミノ酸	熟成期間			
	1日	1ヶ月	2ヶ月	6ヶ月
Ala	4.9	4.4	3.6	3.5
Val	7.4	6.1	6.7	6.2
Gly	2.9	2.8	2.7	2.9
Ile	4.1	2.9	3.2	5.1
Leu	14.9	17.0	18.8	15.3
Pro	6.6	3.3	3.1	1.9
Thr	2.7	3.2	3.6	4.0
Ser	2.1	4.0	4.2	4.4
Phe	6.6	7.1	7.7	7.1
Asp	9.8	11.7	11.7	11.2
Glu	20.6	21.2	19.9	20.6
Tyr	1.2	1.4	1.7	2.6
Orn	1.6	0.6	0.3	0.4
Lys	9.6	8.4	7.2	9.7
Arg	5.0	6.0	6.7	5.5
Pro+Orn	5.0	6.0	6.7	5.5
+Lys+Arg	22.8	18.3	16.3	17.5

Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub>, Phe<sub>24</sub>-Val<sub>25</sub> での切断がチーズ独特の風味および組織を生み出す重要なプロセスとなる。すなわち、キモシンの作用を受けた $\alpha_{S1}$ -カゼインはN末端側の1~23(または1~24)残基を失って $\alpha_{S1}$ -I-カゼインとなる。 $\alpha_{S1}$ -I-カゼインは $\alpha_{S1}$ -カゼインのN末端側25~199のアミノ酸配列を有し、カルシウムとの凝集性を失った巨大ペプチドである。 $\alpha_{S1}$ -I-カゼインはキモシンによりさらに分解を受け、C末端側の170~199, あるいは151~199残基を失って $\alpha_{S1}$ -IIか $\alpha_{S1}$ -IIIカゼインを生成する(図8参照)。これらのペプチドが生成され、また、さらに分解される過程でチーズカードの弾力性と塑性が失われていく。

一方、ペプチドの分解にスタータ乳酸菌のペプチダーゼが関与することにより、チーズにおける遊離アミノ酸の蓄積量が増加する<sup>74)</sup>。表4はチェダーチーズの熟成過程で生成されるアミノ酸の相対比を示している。ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸が特に多く、これらアミノ酸のチーズ旨味成分としての係りの大きいことをうかがわせている。Petterson らはアミノ酸が多量蓄積されている時点でのチーズの芳香性は必ずしも良好で

はなく、芳香成分がチーズ内で生成されていく上での一過程とみるべきであると述べている<sup>71)</sup>。

### 2.3.2 かび熟成型軟質チーズの場合

ブルー（ロックフォールも含める）、カマンベールチーズの熟成過程でのタンパク質分解は前記した細菌熟成型硬質チーズに比べて短期間に進行し、かつ分解の程度も大きい。例えば熟成2ヶ月程経過したブルーチーズは可溶性窒素と遊離アミノ酸は全窒素中それぞれ50%、10%に達する<sup>76)</sup>。伝統的な製法でつくられるブルーチーズにおいてはタンパク質の分解は凝乳剤としてのレンネットの他、乳酸菌、マイクロコッカス、酵母それに *Penicillium roqueforti* のプロテアーゼが関与する。しかし、通常、チーズの熟成にはレンネット *Pen. roqueforti* とのプロティナーゼとペプチダーゼが主体的に関与している。

Zevaco らは *Pen. roqueforti* が2種類のエンドペプチダーゼを生産することを報告し<sup>78)</sup>、また Gripon らは3種類のエクソペプチダーゼを生産することを報告している<sup>79)</sup>。2種類のエンドペプチダーゼのうち1つはアスパチルプロティナーゼ（酸性プロティナーゼ）と呼ばれ、通常多くのかび菌種に見出されるものと類似している。また、他の1つはカゼインをpH5.5で最も強く分解する金属プロティナーゼである。特に、アスパチルプロティナーゼは *Pen. roqueforti* の主要プロティナーゼで、pH 4.6で  $\alpha_s$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -カゼインに作用させると図9の電気泳動図からも見られるように、 $\alpha_s$ -、 $\beta$ -カゼインに対して顕著な分解性を示す<sup>80)</sup>。 $\alpha_{s1}$ -カゼインの場合では $\alpha_{s1}$ -カゼインよりも易動度の高い5本のバンドが、また $\beta$ -カゼインでは4本のバンドが現われ、そのうち2本

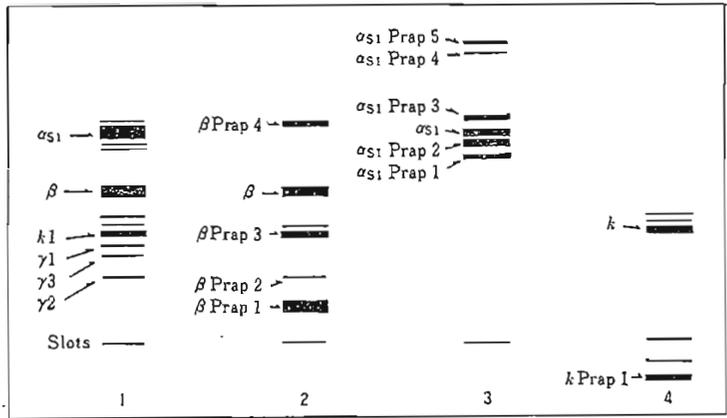


図9 *Penicillium roqueforti* アスパチルプロテアーゼにより分解した精製カゼインの電気泳動図<sup>80)</sup>  
1. 未分解全カゼイン; 2.  $\beta$ -カゼイン分解物;  
3.  $\alpha_{s1}$ -カゼイン分解物; 4.  $\kappa$ -カゼイン分解物

( $\beta$  Prap 1 および  $\beta$  Prap 2) が遅い易動度を示している。 $\beta$  Prap 1 と  $\beta$  Prap 2 はそれぞれ  $\beta$ -カゼインのN末端側の Val<sub>98</sub>-Val<sub>209</sub>, Glu<sub>100</sub>-Val<sub>209</sub> のペプチドである。この2種のペプチドの分解がブルーチーズにおけるタンパク質分解の特徴の1つになっている。また、ブルーチーズの熟成過程における乳タンパク質の分解を左右する因子の1つにチーズ内での塩濃度がある。通常、ブルーチーズ熟成の初期において  $\alpha_{s1}$ -カゼインの分解が進行し、やがて *Pen. roqueforti* のプロティナーゼとペプチダーゼが  $\beta$ -カゼイン、 $\alpha_s$ -カゼイン由来のペプチドを分解すると言われている<sup>81)</sup>。この分解に対し、チーズ内の食塩が抑制的に作用をすることから、食塩濃度の多寡がブルーチーズの風味、組織を決定づける大きな要因となる。図10に示すように、ブルーチーズの内部は外部に比べて食塩濃度が低いことから内部に低分子ペプチドや遊離のアミノ酸の蓄積が多くなる傾向を示しているのがわかる。

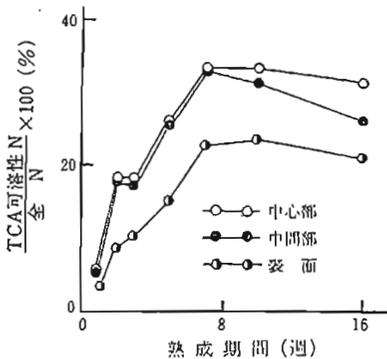


図10 ブルーチーズ各部位における TAC 可溶性N(乾塩法(2日間)による)<sup>81)</sup>

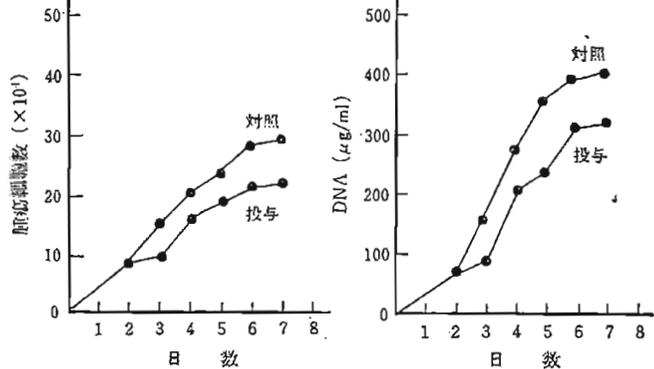


図11 マウスに対するヨーグルトの抗腫瘍作用<sup>82)</sup>

## おわりに

乳タンパク質の凝固と分解は発酵乳製品製造における基本のプロセスである。乳タンパク質の凝固により全乳成分はもとより、スターター微生物由来のプロテアーゼを始めとする酵素はカードの中に固定され、酵素作用による安定な栄養成分の供給の中でスターター微生物は増殖する。この基本工程に立って牛乳が本来もっている栄養価値に加え、発酵によって生成した酸類とそこに棲息するスターター微生物を付加価値として最大限に備えた乳製品がヨーグルトに代表される発酵乳である。古来、発酵乳のヒト健康に対する優れた生理的効果は多くの人々の関心を引きつつ今日に至っているが、近年、発酵乳は抗腫瘍、抗ガンの特性を併せ有しているとする報告がなされ、発酵乳に対する新たな評価がなされ出している。

すなわち、ReddyらはEhrlich腹水型腫瘍を罹患させた雄のマウスを用い、*Lac. bulgaricus*と*Str. thermophilus*をスターターにして製造したヨーグルトを制限なしで与える区とヨーグルトを与えない区に分けて飼育している<sup>82)</sup>。その結果、図11に示すようにヨーグルトを与えたマウスにおいて腫瘍細胞の減少が認められ、かつそれを裏づけるように腫瘍DNAも減少しているのを認めている。続いて、Ayeboらはヨーグルトより抗腫瘍性画分の分離を試み、種々の方法で得た画分の活性を調べている<sup>83,84)</sup>。その結果、ヨーグルトの透析画分を与えたマウスにおいて、腫瘍細胞増殖阻害率と腫瘍細胞浮遊液中のDNA含量減少率が共に38.5%であったことを認めている。これらの優れた生理効用の特性がスターター微生物の菌体成分由来か、代謝産物を含めた乳成分に由来しているかは、なお不明である。しかし、これらの優れた生理活性はスターター微生物の介在で生じていることは明らかである。乳タンパク質が凝固し、分解する現象はまさにスターター微生物の増殖活性化の証であり、それを基盤に牛乳が本来潜在価値としてもっている優れた生理学的価値が発掘される。そこに乳製品製造における乳タンパク質の凝固と分解の意義の一端がある。

## 文 献

- 1) 伊藤敏敏：乳技協資料，25(2)，2 (1975)。
- 2) F. D. Gregorio and R. S. Assoreni : *J. Dairy Res.*, 48, 267 (1981)。
- 3) B. Foltmann : *Methods in Enzymology*, Vol. 19 (eds. G. E. Perlmann and L. Lorand, Academic Press) p. 421 (1970)。
- 4) C. A. Ernstrom and N. P. Wong : *Fundamentals of Dairy Chemistry* (eds. B. H. Webb, A. H.

- Johnson and J. A. Alford, The Avi Publishing Company, Inc) p. 662 (1974)。
- 5) O. Hammarsten : *Nova Acta Reg. Soc. Scient* (1877) (文献4)より引用
- 6) D. F. Waugh and P. H. Von Hippel : *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4576 (1956)。
- 7) R. Wake : *Aust. J. Biol. Sci.*, 12, 479 (1959)。
- 8) C. A. Zittle : *J. Dairy Sci.*, 44, 2101 (1961)。
- 9) C. A. Zittle and M. Walter : *J. Dairy Sci.*, 46, 1189 (1963)。
- 10) P. Jolles, C. Alais and J. Jolles : *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 56 (1962)。
- 11) A. Delfour, J. Jolles, C. Alais and P. Jolles : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19, 452 (1965)。
- 12) J. C. Mercier, G. Bringnon and B. Ribadeau-Dumas : *Eur. J. Biochem.*, 35, 222 (1973)。
- 13) H. Hostettler and K. Imhoff : *Milchwiss.*, 6, 351 (1951)。
- 14) 藤巻正生, 荒井総一監訳：食品蛋白質——化学的酵素的修飾による改良 (R. E. フィーニール編, 学会出版センター) p. 223 (1979)。
- 15) C. W. Slattery and R. Evard : *Biochim. Biophys. Acta*, 317, 529 (1973)。
- 16) M. L. Green and G. Crutchfield : *J. Dairy Res.*, 38, 151 (1971)。
- 17) O. Kirchmeier : *Z. Lebensm. Forsch.*, 149, 211 (1972)。
- 18) M. L. Green : *J. Dairy Res.*, 39, 55 (1972)。
- 19) 伊藤敏敏, 足立 達, 斎藤忠夫：化学と生物, 21, 543 (1983)。
- 20) R. A. Gibbons and G. C. Cheeseman : *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 354 (1962)。
- 21) M. Barbosa, C. Corradini and B. Battistotti : *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 307 (1981)。
- 22) A. Hosono, H. Otani and F. Tokita : *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 54, 720 (1983)。
- 23) H. Otani, A. Hosono, S. Higashiyama, K. Takayama and F. Tokita : *Milchwiss.*, 38, 531 (1983)。
- 24) H. Otani, A. Hosono, S. Higashiyama and F. Tokita : *Milchwiss.*, 39, 156 (1984)。
- 25) S. S. Sannabadhi and R. R. Srinivasan : *18th Intern. Dairy Congr.*, 1E, 278 (1970)。
- 26) K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura : *Agric. Biol. Chem.*, 31, 540 (1967)。
- 27) S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, 31, 546 (1967)。
- 28) J. Yu, H. Osawa, G. Tamura, Y. M. Hong and K. Arima : *Korean J. Food Sci. Tech.*, 2, 43 (1970)。
- 29) K. Hagemeyer, J. Fawwal and J. R. Whitaker : *J. Dairy Sci.*, 51, 1916 (1968)。

- 30) J. L. Sardinas : *Appl. Microbiol.*, 16, 248(1968).
- 31) R. Mickelsen and N. L. Fish : *J. Dairy Sci.*, 53, 704 (1970).
- 32) New Zealand Dairy Research Inst. Annual Report, 24, (1967).
- 33) W. Ritter : *Dte. Molck-Ztg.*, 91, 2222 (1970).
- 34) J. P. Ramet, C. Alais and F. Weber : *Lait*, 49, 40 (1969).
- 35) 江藤 譲, 別府輝彦 : 化学と生物, 18, 800 (1980).
- 36) W. F. Line, A. Kwong and H. H. Weetall : *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 194 (1971).
- 37) L. K. Ferrier, T. Richardson, N. F. Olson and C. L. Hicks : *J. Dairy Sci.*, 55, 726 (1972).
- 38) M. Cheryan, P. J. Van Wyk, N. F. Olson and T. Richardson : *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 585 (1975).
- 39) H. Uchiyama, T. Uozumi, T. Beppu and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1373 (1980).
- 40) K. Nishimori, Y. Kawaguchi, M. Hidaka, T. Uozumi and T. Beppu : *J. Biochem.*, 90, 901 (1981).
- 41) K. Nishimori, Y. Kawaguchi, M. Hidaka, T. Uozumi and T. Beppu : *Gene*, 19, 337 (1982).
- 42) R. C. Lawrence, T. D. Thomas and B. E. Terzaghi : *J. Dairy Res.*, 43, 141 (1976).
- 43) 梅本弥一郎, 大宮邦雄, 佐藤 泰 : 酪科食研, 25, A-177 (1976).
- 44) R. A. Cowman, H. E. Swaisgood and M. L. Speck : *J. Bact.*, 94, 942 (1967).
- 45) K. Ohmiya and Y. Sato : *Agric. Biol. Chem.*, 33, 662 (1969).
- 46) K. Ohmiya and Y. Sato : *Agric. Biol. Chem.*, 34, 1463 (1970).
- 47) K. Ohmiya and Y. Sato : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 7 (1978).
- 48) R. C. Chandan, P. J. Argyle and G. E. Mathison : *J. Dairy Sci.*, 65, 1408 (1983).
- 49) K. Omiya and Y. Sato : *Appl. Microbiol.*, 30, 738 (1975).
- 50) W. C. Uand der Zant and F. E. Nelson : *J. Dairy Sci.*, 37, 795 (1954).
- 51) M. Lynette, J. J. Sullivan and G. R. Jago : *J. Dairy Res.*, 42, 147 (1975).
- 52) T. Sørhang and R. Solberg : *Appl. Microbiol.*, 25, 388 (1973).
- 53) J. J. Sullivan, L. Mou, J. I. Rood and G. R. Jago : *Aust. J. Dairy Technol.*, 27, 20 (1973).
- 54) R. H. Schmidt, H. A. Morris and L. L. McKay : *J. Dairy Sci.*, 60, 710 (1977).
- 55) P. MacLeod and D. F. Jr. Gordon : *J. Dairy Sci.*, 44, 237 (1961).
- 56) B. Reiter and J. D. Oram : *J. Dairy Res.*, 29, 63 (1962).
- 57) L. Mou, J. J. Sullivan and G. R. Jago : *J. Dairy Res.*, 42, 147 (1975).
- 58) D. Rabier and M. J. Desmazeaud : *Biochimie*, 55, 389 (1973).
- 59) M. J. Desmazeaud and C. Zevaco : *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 17, 723 (1977).
- 60) M. EL. Soda, M. J. Desmazeaud and J. L. Bergere : *J. Dairy Res.*, 45, 445 (1978).
- 61) I. K. Hwang., S. Kaminogawa and K. Yamauchi : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 159 (1981).
- 62) 菊地俊彦 : 酪科食研 25, A-185 (1976).
- 63) 阿部健吉, 岩沢伸次, 上田正次, 宮田信夫 : 雪印技研報, No. 77, 127 (1981).
- 64) E. Ichishima, M. Takeuchi, Y. Sano and T. Kikuchi : *Current Microbiol.*, 1, 95 (1978).
- 65) F. Tokita and A. Hosono : *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 43, 39 (1972).
- 66) 中西武雄, 伊藤 良 : 酪科食研, 20, A-99 (1971).
- 67) 中西武雄, 伊藤 良 : 酪科食研, 20, A-157 (1971).
- 68) W. J. Harper and T. Kristoffersen : *J. Dairy Sci.*, 39, 1773 (1956).
- 69) 中江利孝, 細野明義, 中西武雄 : 日畜会報, 35, 167 (1964).
- 70) T. Nakae and J. A. Elliott : *J. Dairy Sci.*, 48, 287 (1965).
- 71) H. E. Petterson and G. Sjöström : *J. Dairy Res.*, 42, 313 (1975).
- 72) A. M. Okeefe, P. F. Fox and C. Daly : *J. Dairy Res.*, 45, 465 (1978).
- 73) L. K. Creamer, H. F. Zoerb, N. E. Olson and T. Richardson : *J. Dairy Sci.*, 65, 902 (1982).
- 74) 上野川修一, 清水 誠 : 食品タンパク質の科学 (山内文男編, 食品資材研究会) p. 153 (1983).
- 75) W. D. Jarrett, J. W. Aston and J. R. Dullely : *Aust. J. Dairy Technol.* 37, 55 (1982).
- 76) A. A. Ismail and K. Hansen : *Milchwiss.*, 27, 556 (1982).
- 77) J. J. Devoyod, G. Bret and J. E. Auclair : *Lait*, 48, 613 (1968).
- 78) C. Zevaco, C. Hermier and J. C. Gripson : *Biochimie*, 55, 1353 (1973).
- 79) J. C. Gripson : *Biochimie*, 59, 679 (1977).
- 80) D. Le Bars and J. C. Gripson : *J. Dairy Res.*, 48, 479 (1981).
- 81) M. Godinho and P. F. Fox : *Milchwiss.*, 37, 72 (1982).
- 82) G. V. Reddy, K. M. Shahani and M. R. Banerjee : *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 815 (1973).
- 83) A. D. Ayebo, K. M. Shahni and R. Dam : *J. Dairy Sci.*, 64, 2318 (1981).
- 84) A. D. Ayebo, K. M. Shahani, R. Dam and B. A. Friend : *J. Dairy Sci.*, 2388 (1982).