

# 微生物の生産する一凝乳酵素標品の一般特性

細野 明義・石田 哲夫・鴫田文三郎

信州大学農学部 畜産製造学研究室

## 緒 言

チーズ製造の際、カード造成のために従来使用されてきた凝乳酵素は、動物性レンニンである。そのレンニンは、生後1～2週間の哺乳中の仔牛の第4胃より調製されるが、近年レンニンの不足が世界的傾向として現われはじめ、レンニンに代る凝乳酵素の開発が必至の課題となってきた。すでにペプシン<sup>5,7,9)</sup>、パパイン<sup>9)</sup>、フィシン<sup>9)</sup>などの酵素が、凝乳酵素としての性質を有していることが明らかにされてきたが、牛乳に対する凝固性ならびに作用性においてレンニンのそれとはかなり異なっている点もあり、実用化の段階では種々の難点がある。

一方、レンニンに代わる凝乳酵素を微生物源に求めれば、凝乳酵素を安価でかつ多量に調製することができるなどの利点から、すでに *Mucor* 属<sup>1,10,13~16)</sup>、*Bacillus* 属<sup>3,6,8)</sup> およびその他の微生物<sup>2,4)</sup> から凝乳酵素が分離されており、そのうちのいくつかは実用化されるに至っている。

しかしながら、微生物生産凝乳酵素は一般的にみて牛乳たん白質に対する作用性がレンニンと異なっており、かつ、カード収縮、汚染細菌、溶解性に問題があり、また、たん白質分解性が強いこと、酵素標品が色彩を帯びていることなども欠陥になっている。

これらいくつかの解決すべき問題点を残してはいるが、微生物生産凝乳酵素の利用化については、見通しは明るく、わが国においても微生物生産凝乳酵素の開発が多く取り上げられるようになった。

本論文においては、*Bacillus sp.* の生産する一凝乳酵素標品についてその一般的性質を動物性レンニンとともに試験し、供試の微生物生産凝乳酵素標品が凝乳酵素として使用される上での問題点を明らかにし、微生物生産凝乳酵素についての今後の課題を提起した。

## 実 験 方 法

### 1 供試酵素と作用条件

微生物生産凝乳酵素標品として、わが国のA社で *Bacillus* 属から分離した粉末標品 (MR と略記する) を用いた。なお、この実験の対照として外国産のレンニン (Hansen 製、錠剤、HR と略記する) と国産レンニン (半井化学薬品K.K. 製、粉末、NR と略記する) の2種類を用いた。

試験に際しては、各酵素を適量の生理食塩水に溶解し、脱脂乳に対し酵素量が0.02%になるよう添加した。なお、特に断わらない限り基質として用いた脱脂乳のpHは6.65で、作用温度は30°Cである。

## 2 凝乳力価の測定法

津郷の記載<sup>11)</sup>に準じた。すなわち、あらかじめN-乳酸で酸度を0.18%に調整し、35°Cに加熱した脱脂乳10mlに濃度1%の酵素水溶液0.5mlを加え、凝固するまでの時間(分)を測定し、次式により凝乳力価を算定した。

$$\text{凝乳力価} = \frac{\text{脱脂乳摂取量(ml)}}{\text{酵素量(mg)}} \times \frac{40(\text{分})}{\text{凝固するまでの時間(分)}}$$

なお、加えて造成されたカードは、HRおよびNRの場合と比較して官能的に審査し、その硬さを定性的に判定した。

## 3 たん白質分解性の検討

### 1) プロテアーゼ力価の測定法

各酵素のプロテアーゼ力価は、酵素により脱脂乳中に遊離するチロシン量の増加量で表示した。すなわち、30°Cに加熱した脱脂乳10mlに、酵素を最終濃度0.02%になるように添加し、30°Cで所定時間加熱した後、トリクロル酢酸(最終濃度2.5%)で除たん白し、ろ液中のチロシン含量をFolin Ciocalteuの比色法<sup>12)</sup>により測定した。なお、比色は日立光電光度計(EPO-B型)を使用し、波長660m $\mu$ 、1cmのキューベットによりおこなった。

### 2) ホエー中の窒素量の測定法

30°Cに加熱した脱脂乳10mlに酵素を最終濃度0.02%になるように添加し、30°Cで所定の時間作用させた後、温度を40°Cに上げて5分間放置し、ホエーを得た。ホエー中の窒素量はマイクロケルダール法<sup>12)</sup>によって測定した。

## 結果ならびに考察

### 1 凝乳力価

MRの凝乳力価を測定し、その結果をHRおよびNRのそれらと対比させて第1表に示した。表より明らかなように、MRの凝乳力価はHRおよびNRに比べて著しく高く、約4倍の力価を有しており、凝乳力においてMRがはるかに優れていることが認められる。

一方、MRにおける酵素量と凝乳時間についてみると、第1図に示す様に、MRの添加量が0~0.04%の範囲では添加量と凝固時間がほぼ反比例の関係にあるのが認められる。

なお、MRの蒸留水に対する溶解性はきわめて良く、HRならびにNRと比べ全くその色はなかったが、凝固したカードのかたさはHRとNRの場合に比べてはるかに軟弱であった。

Table 1. Rennin activities of milk clotting enzymes

Enzyme	Activities*
MR	40,000
HR	11,000
NR	10,000

$$*\text{Rennin activity} = \frac{\text{Skim milk (ml)}}{\text{Enzyme (mg)}} \times \frac{40 \text{ min}}{\text{Clotting time (min)}}$$

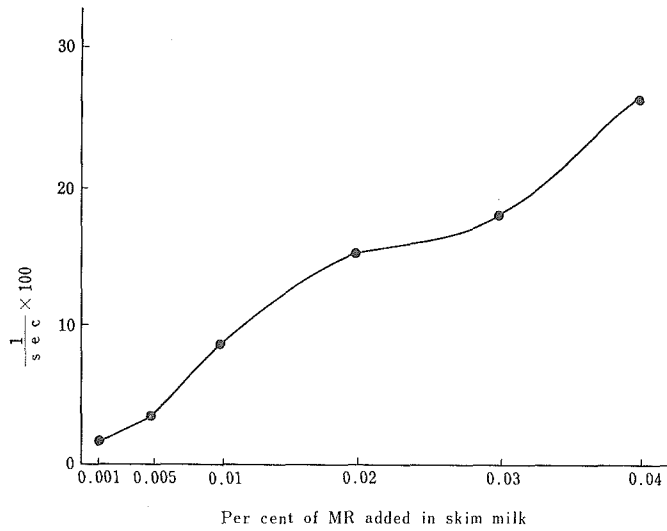
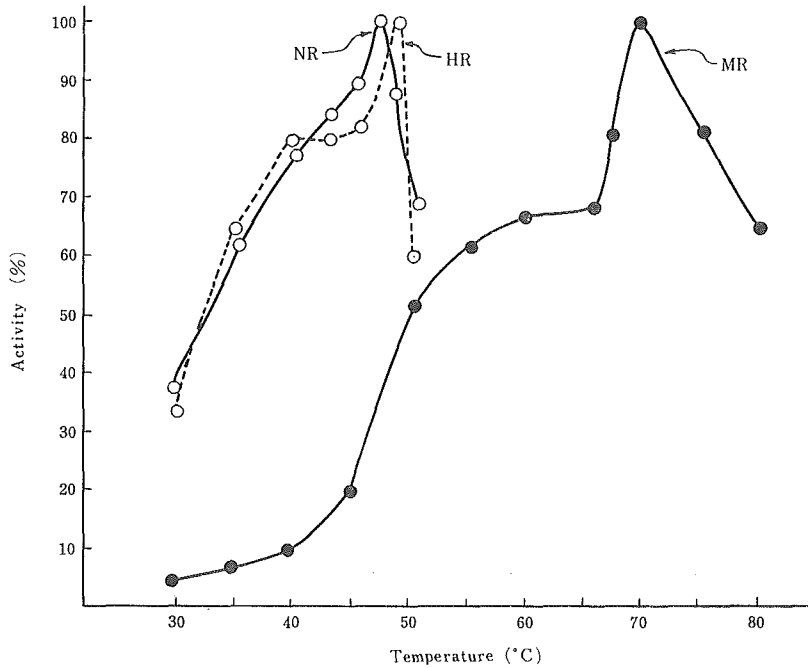


Fig. 1. Relation between clotting time and per cent of MR added in skim milk.



Each activity in this Figure is expressed as relative activity (%) to the optimum activity.

Fig. 2. Effect of temperature on the activities of milk clotting enzymes.

MRで造成したカードが軟弱であることは、この酵素以外の微生物生産酵素標品<sup>4,10)</sup>においても認められている現象であり、この点についての解析が今後の課題として重要と考える。

## 2 凝乳作用の至適温度

MR, HRおよびNRの凝乳至適温度を調べ、その結果を各酵素により脱脂乳が最も短時間に凝固したときの酵素の活性を100(%)として表現し、第2図に示した。

図に示したように、HRとNRの凝乳作用の至適温度は、それぞれ45°Cと46°C付近にあり、また、作用温度30~50°Cの範囲では、両酵素ともほぼ同一の活性曲線を示している。特に、両酵素の活性が至適温度よりも高い温度領域で極端に減少している現象は、これらレンニンの特徴とみることができる。

一方、温度変化によるMRの活性曲線は、HRとNRの曲線とは全く類似性がなく、至適温度も70°Cの非常に高い温度にあり、かつ80°Cにおいてもかなりの活性が認められる。

このように、凝乳酵素が高温に至適温度を有する例は、*Bacillus* 属<sup>3)</sup>や *Mucor* 属<sup>10)</sup>の生産するいくつかの凝乳酵素においても認められ、このことは特定の微生物生産凝乳酵素が有する特徴であるとみることができる。

## 3 加熱安定性

MR, HRおよびNRを45°C, 50°C, 60°Cならびに65°Cの各温度で5分間加熱した。

加熱による各酵素の活性の変化量は各酵素の30°Cにおける活性を100とし、それに対する割合(%)で表示した。第2表にその結果をまとめたが、加熱温度55°C(5分)以下での処理によって生ずるMRの活性の低下はHRの場合と傾向が類似している。しかしながら、加熱温度が60°CになるとMRの活性がHRとNRの場合よりも著しく低下するのが認められる。MRの作用至適温度が、前項で述べたように、70°C付近の高温にあるにもかかわらず、熱安定性の点からみるとMRはむしろHRよりも悪く、この点よりMRの凝乳活性に対する熱の影響がきわめて微妙とみることができる。

## 4 凝乳性に対する pH の影響

pH 6.65の脱脂乳における各凝乳酵素の活性を100とし、それに対するpH 6.15~6.85の範囲の脱脂乳での凝乳活性の割合(%)を求め、それらの結果を第3表にまとめた。

MR, HRならびにNRとも脱脂乳のpHが酸性側へ移行する程凝乳活性が増大するのが認められ、特にpH 6.15の場合、NRはMRおよびHRの凝乳活性のおよそ2倍に達しているのが注目される。

なお、本実験ではpH 6.15~6.85の範囲における凝乳性についてのみ検討したに過ぎない

Table 2. Heat stability of milk clotting enzymes

Heating	MR	HR	NR
Control (30°C)	100.0	100.0	100.0
45°C for 5 min	—	75.0	45.2
50°C for 5 min	62.5	76.2	46.5
55°C for 5 min	58.5	60.0	33.6
60°C for 5 min	8.5	28.8	17.5
65°C for 5 min	<5	<5	<5

Table 3. Effect of pH on the activities (%) of milk clotting enzymes

pH	MR	HR	NR
6.85	49.5	43.6	40.5
6.75	71.4	60.0	64.8
6.65*	100.0	100.0	100.0
6.55	135.1	111.6	101.6
6.45	151.5	160.0	200.0
6.35	156.2	171.4	266.7
6.25	192.3	240.0	300.1
6.15	238.5	252.6	500.1

\* pH in original milk

Table 4. Effect of addition of Ca<sup>++</sup> to skim milk on the activities (%) of milk clotting enzymes

Ca <sup>++</sup> added (mg%)	MR	HR	NR
0	100	100	100
9.89	217	137	190
24.72	500	320	522
50.53	640	400	708
59.35	714	480	1000
74.19	1000	600	1720
98.92	1000	961	1506

が、通常、各種微生物生産凝乳酵素の作用至適 pH はかなり酸性側にあることが明らかにされている<sup>2,14)</sup>。

##### 5 凝乳性におよぼす Ca-イオンの影響

Ca-イオン無添加の脱脂乳における各酵素の活性を 100 とし、それに対する Ca-イオン (CaCl<sub>2</sub> を使用) を 9.89~98.92mg% 量添加した各脱脂乳中での各酵素の活性の割合 (%) を求め、その結果を第 4 表に示した。

MR, HR, NR の各場合とも Ca-イオンの添加量が増加するに伴い凝乳活性が著しく増大しているのが認められる。

従来、Ca-イオンがレンニンの凝乳活性を高めることはよく知られているところであるが<sup>4,9,10)</sup>、MR の場合においても Ca-イオンの存在がその凝乳性を高める上で非常に有効であることが認められる。

##### 6 凝乳活性におよぼす Na-イオンおよび K-イオンの影響

Na-イオン (NaCl 使用) および K-イオン (KCl 使用) の MR の凝乳性に対する影響について調べた。第 3 図は Na-イオンおよび K-イオン無添加の脱脂乳における MR の凝乳活性を 100 (%) として示したものである。

図より明らかなように、Na-イオンの添加量が増加するに伴って凝乳活性は高くなり、特

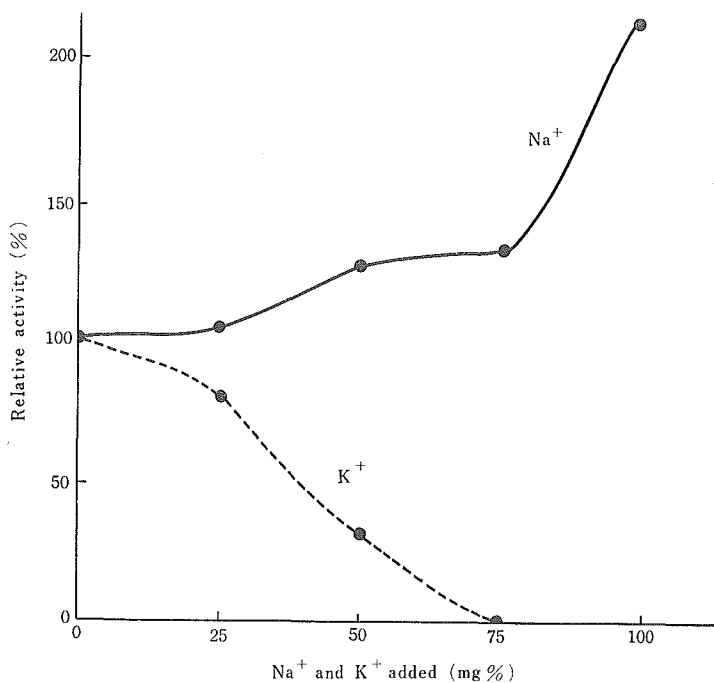
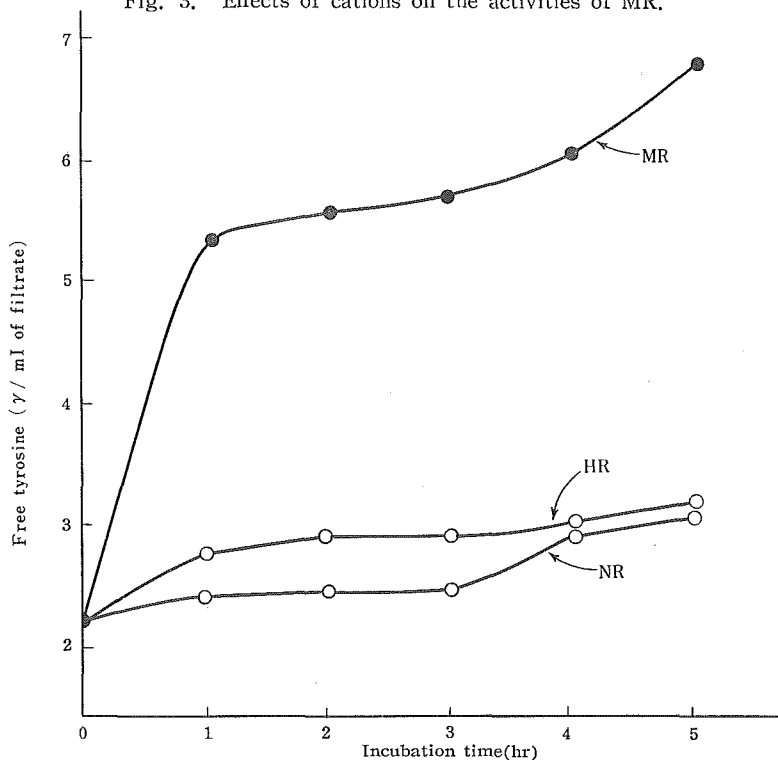


Fig. 3. Effects of cations on the activities of MR.



Each reaction mixture contained 10 ml of skim milk and 2 mg of rennin.

Fig. 4. Proteolytic activities of the milk clotting enzymes.

にNa-イオン添加量75~100mg%の範囲で、その活性が著しく増大することが認められる。

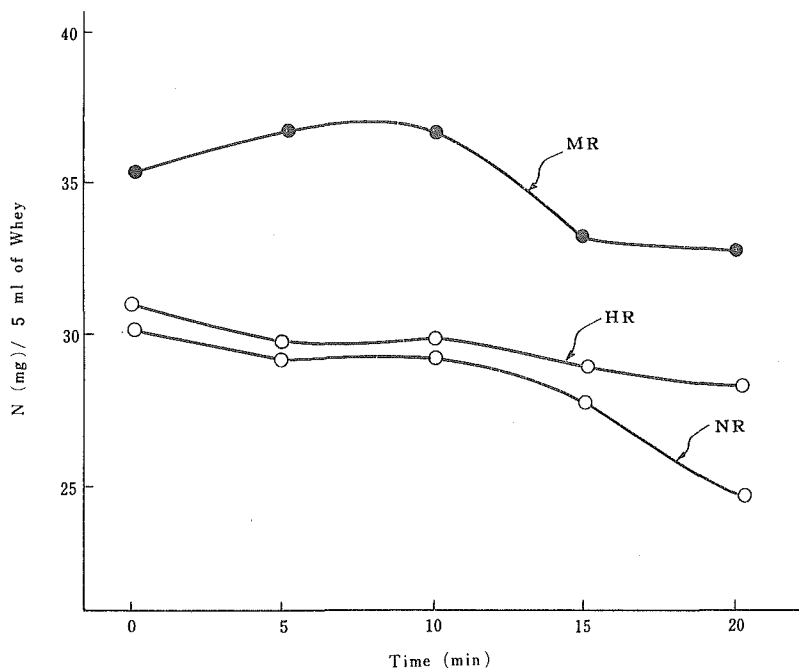
一方、K-イオン添加の場合についてみると、K-イオン量が増すにつれMRの凝固性が著しく低下し、イオン量が75mg%以上では完全にMRの活性は消失しているのが認められる。この事実はMRが有する特異的な性質とみることができ、チーズレンニンとしてMRを実用化する上で、特に留意すべき点の一つと考える。

### 7 MRのたん白質分解性

MRを脱脂乳に所定時間作用させ、TCA溶液により除たん白して得る液を得、その中に遊離されるチロシン量を求め、これをHR、NRの場合と対比させて第4図に示した。

図から明らかなように、MRを脱脂乳に作用させた後、急速に遊離チロシンが増加し、かつ、HRとNRの僅かのチロシン遊離量に比べ、MRにより遊離されるチロシン量は極めて多く、反応1時間後に遊離されたチロシン量はHRとNRによりそれぞれ遊離されたチロシン量の約2.5倍に達している。この事実より、MRがかなり強いたん白質分解性を有しているとみることができ、MRを実用化する上で解決すべき一つの課題と考えられる。

一方、MR、HRおよびNRのそれぞれを脱脂乳に0、5、10、15、20分間作用させてホエーを得、各ホエー中の窒素量を求めたのが第5図である。この図からもMRを作用させた脱脂乳から得たホエー中の窒素量がHRとNRの場合に比べ多いのが認められる。この現象がMRのたん白質分解性に起因したものか、またはMRの乳たん白質に対する作用性の違い



Two mg of each enzyme was added to 10 ml of skim milk and whey was obtained.

Fig. 5. Nitrogen content in whey prepared from skim milk treated with each enzyme.

に起因したものは不明であるが、カード収量の点においてMRがHRもしくはNRに比べ劣る可能性も考えられる。

凝乳酵素自体がたん白質分解性を有している例は、各種微生物生産凝乳酵素においても認められる現象で、Puhan<sup>6)</sup>は *Bacillus subtilis* から調製した凝乳酵素標品が、三種類のプロテアーゼから成っていたと報告し、また Doležálek<sup>2)</sup>らは、*P. camemberti* および *P. nalgiovensis* から調製した酵素が、強いたん白質分解性を有していたと報告するなどその例は多い。

以上、本実験において、*Bacillus sp.* の生産する一凝乳酵素標品(MR)の一般特性について検討してきたが、このMRは水に対する溶解性がよく、また、HRとNRに比べ凝乳活性も極めて高く、さらに、MRを一般のチーズ製造条件に適用させても凝乳性の上では支障はないと考えられる。しかしながら、これらの有用性とは逆にカードが軟弱であり、かつ、MR自体がかなり強いたん白質分解性を有していることはHR、NRよりも劣点とみることができる。特に、たん白質分解性を有する性質はチーズ製造への適応の際、チーズに苦味を生じさせる危険性が考えられる。このことはMRに限らず微生物生産凝乳酵素全般についてもいえる一大欠点でもあるが、MRを動物性レンニンと併用して用いる製造法を確立するか、もしくはMRのたん白質分解性のみを阻止させる化学薬品を探索するかのいずれかによってかなり解決されるものと思われ、今後の課題と考えている。

## 要 約

微生物(*Bacillus sp.*)の生産する一凝乳酵素(MR)の一般特性について試験し、それらを外国製レンニン(HR)ならびに国産レンニン(NR)の場合と比較検討し、MRの実用性について論じた。結果は次の様に要約される。

(1) MRの凝乳力価はHRならびにNRに比べて約4倍の強さがあり、凝乳力においてはHRとNRよりもはるかに優れていた。また、MRの作用至適温度は70°C付近の高温であり、かつ80°Cにおいてもかなり強い活性を示した。

しかしながら、耐熱性の点からみると、MRの熱安定性はHRとNRよりもむしろ少ない傾向にあった。

さらに、MRの脱脂乳に対する凝乳性は、HRおよびNRの場合と同様、脱脂乳のpHが酸性側に傾くにつれて増大した。

(2) MRの脱脂乳に対する凝乳性は、Ca<sup>+</sup>イオンの存在によって顕著に増大し、Na<sup>+</sup>イオンもまたMRの凝乳性を増大させた。しかしながら、K<sup>+</sup>イオンはMRの凝乳性を著しく低下させ、K<sup>+</sup>イオン量が75mg%以上でMRの凝乳性は完全に消失した。

(3) MRはかなり強いたん白質分解性を有していることが認められ、このことは、チーズ製造に適用する上で解決すべき一つの欠陥と思われた。



## 文 献

1. Arima, K. et al. (1968) *Appl. Microbiol.*, 16 : 1727-1733.
2. Doležálek, J. and R. Minařík (1969) *Dairy Sci. Abst.*, 31 : 86.
3. Melachoris, N. (1968) *J. Dairy Sci.*, 51 : 650-655.
4. 中西武雄・伊藤良 (1968) 酪農科学の研究, 17 : A94-101.
5. 中井秀了・河合勝一 (1962) 日畜会報, 33 : 320-328.
6. Puhan, Z. (1969) *J. Dairy Sci.*, 52 : 1372-1378.
7. Rand, A. G. and C. A. Ernstrom (1968) *J. Dairy Sci.*, 51 : 1756-1760.
8. Singh, Ajiab et al. (1967) *J. Dairy Sci.*, 50 : 1886-1890.
9. 津郷友吉他 (1955) 日畜会報, 26 : 173-175, 177-181.
10. 津郷友吉他 (1964) 日畜会報, 35 : 221-228.
11. 津郷友吉 (1962) 乳製品の化学, p. 78-80, 地球出版, 東京.
12. 東京大学農芸化学教室編 (1960) 実験農芸化学 (上巻), p. 116-117, 282, 朝倉書店, 東京.
13. Veselov, I. Ya. et al. (1968) *Dairy Sci. Abst.*, 31 : 86.
14. Yu, J., G. Tamura and K. Arima (1969) *Biochem. Biophys. Acta.*, 171 : 138-144.
15. Yu, J., G. Tamura and K. Arima (1968) *Agri. Biol. Chem.*, 32 : 1048-1050.
16. 柳洲鉉・田村学造・有馬啓 (1969) 日農化, 43 : 60-66.

## Milk-Clotting and Proteolytic Properties of an Enzyme Prepared from Microbe

By Akiyoshi HOSONO, Tetsuo ISHIDA and Fumisaburo TOKITA  
Laboratory of Animal Products Technology, Fac. Agri., Shinshu Univ.

### Summary

This paper described the milk-clotting and proteolytic properties of an enzyme (MR) prepared from *Bacillus sp.* and compared them with those of such the calf rennins as a foreign rennin (HR) and a domestic rennin (NR), thereby the utility of MR as a rennet replacement enzyme was discussed.

The results obtained were summarized as follows :

(1) MR was found to be generally superior to the animal rennins in the milk-clotting activity, that is, the rennin activity of MR was approximately four times stronger than that of either HR or NR at 35°C.

Optimum temperature for the milk-clotting activity of MR was around 70°C and the enzymatic activity was fairly observed even at 80°C. However, MR was inferior to HR and NR in the thermostability.

The milk-clotting activities of MR, HR and NR increased with decreasing of pH, so far as the activities were measured at various pH's between 6.15 and 6.85.

(2) The milk-clotting activity of MR fairly increased by Na<sup>+</sup> and remarkably increased by Ca<sup>++</sup>, whereas K<sup>+</sup> completely inhibited it at the concentration of 75mg%.

(3) Relatively strong proteolytic activity was observed in MR. From this fact it is pointed out that further basic experiments on MR are necessary for the practical use of MR as a rennet replacement enzyme.