

微生物産生凝乳酵素の特性に関する研究

高橋 真美

食物栄養科

I. 緒 言

チーズの総消費量が2019年度前年比1.5%増の約35.8万トンと5年連続で過去最高を更新し、拡大が続いている¹⁾。家計調査では購入数量で約4.0%増、市場は物量ベースで業務用チーズが微増、家庭用チーズが3.0%増となり、新型コロナウイルスによる家庭内消費増で大きく伸びている¹⁾。家庭用チーズでは、家飲みや内食志向による需要に支えられ、2015年度から2018年度の4年間で市場が20.0%以上拡大し、コロナ特需で再び拡大傾向となっている。外出自粛で売れ行きが好調となっているのは、パスタ料理に使う粉チーズや幅広い料理に使えるシュレッドチーズ、スライスチーズである。自粛期間が長引く中で菓子作りに使うクリームチーズ、家飲みのおつまみ向けのベビーチーズ、さけるチーズ、カマンベールチーズなども伸びている。ナチュラルチーズは種類が豊富で、日本国内でも80か所以上で国産ナチュラルチーズが製造されている。ナチュラルチーズの分類方法はフランスの熟成方法により7種類に分類されている²⁾。

チーズ製造には生後1～2週間の哺乳中の仔牛の第4胃から調製されるキモシンが用いられる。キモシンやスターター（乳酸菌）を牛乳に加え、カードとホエイに分離させ、ホエイを除去したもので熟成することでおいしさと栄養機能が高まる。チーズ1.0kgを製造するには、約10.0倍量の牛乳が必要となる³⁾。

キモシンは、仔牛を屠殺することによってのみ抽出されるが、近年ではキモシン調製の目的のみで仔牛を屠殺することは生産性の低さや動物愛護の観点からも減少している。キモシンは酵素に分類される凝乳酵素であり、その製法により、「抽出」によって得られる動物由来の凝乳酵素と、「発酵」によって生産・分離される凝乳酵素の2種類に分けられ

る³⁾。発酵によって生産されるキモシンには、微生物キモシンと遺伝子組み換えキモシンがある。代替品は、凝乳酵素を安価でかつ多量に調製が可能であるなどの利点から、微生物由来の凝乳酵素が分離されており、数種の微生物由来の代替品がすでに実用化されている。しかし、数種類にすぎない。

キモシンはプロテアーゼ（蛋白質分解酵素）の一種であり、凝乳酵素による凝乳は、乳蛋白質（ κ -casein）のフェニルアラニン（105）とメチオニン（106）が水解され、生成した para- κ -casein が Ca イオンの存在下、他のカゼイン画分とともに沈殿するために生じる⁴⁾。チーズ製造上の苦味は、主に β -casein の加水分解により生成され、特に β -casein のアルギニン（202）とバリン（209）はカフェインの250倍の苦味をもつペプチドである。仔牛キモシン代替品に求められる要素としては、苦味ペプチドが遊離しない作用特性を示し、 κ -casein に対する特異性がキモシンと類似していること、凝乳特性とプロテアーゼ活性の比が重要となる⁴⁾。

微生物由来の凝乳酵素の探索では、 κ -カゼインに対して高い基質特異性と低いプロテアーゼ活性を示す特徴を兼ね備えていることが必須であり、数多くのプロテアーゼの中でも凝乳酵素と呼ばれるものはごく僅かにすぎない。

そこで、本研究では、微生物由来の凝乳酵素の探索を目的に、微生物由来の凝乳酵素の酵素学的特性を検討した。

II. 試料及び実験方法

1. 試料

Aspergillus ustus NBRC 8878（以下、本菌株）を供試菌株として供した。

2. 供試菌の培養と粗酵素の抽出

(1) 前培養

ジャガイモ150.0gに水道水600.0mlを加えて30分間煮た後、これを濾過した。この濾過液250mlに蒸留水750.0ml、グルコース20.0g、寒天15.0gを入れ100℃、30分加熱をした。これを5.0ml分注機で試験管に9.0ml入れた後、121℃、15分間オートクレーブにかけ斜面培地を作成した。*Aspergillus ustus* NBRC 8878をポテト斜面培地に25℃、7日間培養し、培養物は冷蔵保存した。

(2) 本培養

斜面培地に滅菌水を加え、孢子懸濁液を調製した。これをふすま培地に接種し、25℃、7日間培養した。小麦ふすま培地は、小麦ふすま20.0gに蒸留水20.0ml(1:1)を加え、121℃、20分間滅菌した。なお、嫌気の状態を避けるために、一日置きに攪拌し、培養終了後は、凍結して保存した。

(3) 粗酵素液の調製

凍結したふすま培養物に対して10倍の蒸留水を加え、磨砕後、4℃で遠心分離(5,500×g、10分間)し、上澄み液を吸引濾過し、粗酵素抽出液とした。

(4) 硫酸アンモニウムによる分画

小麦ふすま培養物から抽出した粗酵素に0.6飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、生じた沈殿物を4℃で遠心分離(5000×g、10分間)して回収し、流水に対して4℃で一夜透析後、凍結乾燥した。

3. 酵素活性の測定

(1) 凝乳活性(Milk Clotting Activity; MCA)

Berrige法変法⁵⁾に従って測定した。凝乳活性は単位量の酵素が100秒間に何倍量の基質を凝固させるかを示すBerrige Unit (B.U.)として表した。

(2) タンパク質分解活性(Proteolytic Activity; PA)

Folin法⁶⁾に従って測定した。

0.6%Hammersteinカゼイン溶液(pH6.0、1/20Mリン酸緩衝液)を基質とし、基質5.0mlに酵素液1.0

mlを加え、30℃、30分間反応後、0.44Mトリクロロ酢酸混液を5.0ml加えて、反応を停止させ、40℃、20分間保持後、濾過し、濾液2.0mlに0.55M炭酸ナトリウム溶液5.0ml、Folin溶液1.0mlを加え、40℃、20分間発色させ、660nmで測定した。

4. 統計処理

一元分散分析を行い、有意差の検定はTukey法の多重比較により解析した。統計解析はSPSSを用い、いずれの場合も危険率5.0%未満をもって有意と判定した。データは、平均値±標準偏差で求めた。

III. 結果および考察

(1) 酵素作用に及ぼすpHの影響

本菌株の粗酵素液の凝乳活性におけるpHの影響をFigure 1に示した。凝乳活性に及ぼすpHの影響では、pH5.5~pH6.5間の結果では、pH5.5は、pH6.5と比較して約7.3倍高くなり、pHが酸性域になるほど凝乳活性は著しく高くなった。

タンパク質分解活性の結果をFigure 2に示した。タンパク質分解活性は、pH5.5~pH8.0間で測定した結果、至適pHは、pH6.0付近に認められた。これまで実用化されている真菌の生産する凝乳酵素の中で*Mucor pusillus* var. Lindt、*Mucor miehei*や*Endothia parasitica*の生産する凝乳酵素は優れており、かつ安全で適した凝乳酵素として各国において活用されている⁷⁻⁸⁾。最も利用性の高い*Mucor pusillus* var. Lindtの生産する凝乳酵素は、至適pH4.0~4.5で、キモシンに類似した酵素特性を有している⁹⁾。キモシンは、牛乳中のカゼインタンパクに対する限定的なタンパク質分解作用により凝乳作用をおこすが、タンパク質分解酵素の活性が強すぎれば、チーズの個体の溶解が起こり、凝乳酵素として不適である。さらに、タンパク質分解活性が高いと味質的にもチーズに苦味を与える⁹⁾。そこで、微生物由来のキモシン代替酵素としては、凝乳活性に対するタンパク質分解活性の比が重要であり、凝乳活性が高く、タンパク質分解活性が低い菌株が求められる。

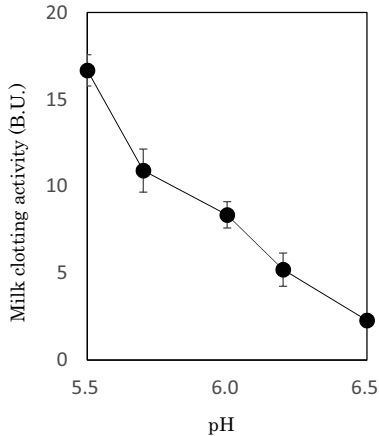


Figure 1 Effect of pH on Milk clotting activity

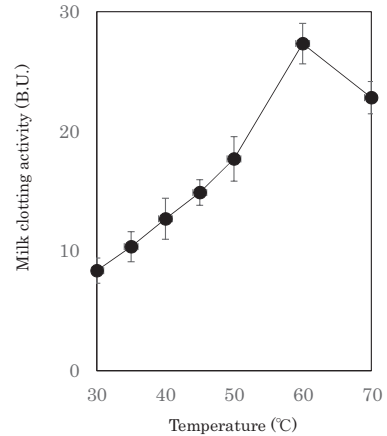


Figure 3 Effect of temperature on Milk clotting activity

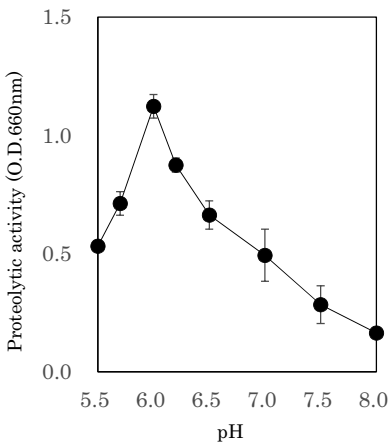


Figure 2 Effect of pH on Proteolytic activity

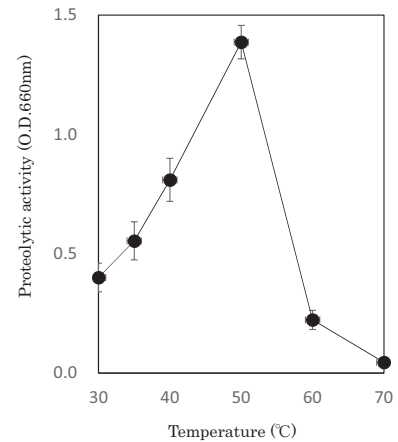


Figure 4 Effect of temperature on Proteolytic activity

(2) 酵素作用に及ぼす温度の影響

本菌株の粗酵素液の凝乳活性における温度の影響を Figure 3 に示した。凝乳活性は、60°C 付近に至適温度が認められた。

タンパク質分解活性の温度の影響を Figure 4 に示した。その結果、タンパク質分解活性は、50°C 付近に至適温度が認められた。

キモシンでは、至適温度は44°Cである⁸⁾。一方、微生物由来の *Mucor pusillus* var. *Lindt* の生産する凝乳酵素は、至適温度は56°Cと高い⁸⁾。本菌株の凝乳活性は、60°C 付近に至適温度が認められたことから微生物由来の凝乳酵素の傾向と類似していることが確認された。

IV. 要 約

キモシン代替酵素を評価する場合、カード調製工程でチーズの歩留り低下が生じないことが重要である。微生物由来の代替酵素では、凝乳活性/タンパク質分解活性比、各種チーズの製造における固形分回収率の低下が認められない良好な菌株を探索する必要がある。

本菌株は、すでに実用化している微生物由来の酵素学的特性1つである酵素作用の温度の影響において、凝乳活性が60°C 付近と類似していた。微生物由来のキモシン代替酵素では、チーズに苦味を生成しやすいことが難点である。この苦味はペプチドに由来するもので、 β -カゼインの C-末端側は苦味ペプ

チドの構造をしてい¹⁰⁻¹¹⁾。チーズの苦味生成機構は、キモシンの作用、スターター乳酸菌のプロテアーゼ活性、ペプチターゼ活性が関与しており、これは製造条件、チーズの熟成工程でも変化する。

47 - 59.

今後、本菌株の酵素学的特性について、さらに酵素の精製を検討するとともに、すでに実用化している微生物由来のキモシン代替酵素とも比較し、製造後のチーズ収量、熟成過程におけるタンパク質分解の傾向、および製品品質をキモシン使用のチーズと対比して多面的に検討することで実用化への期待が推察された。

参考文献

- 1) 農水省「チーズ需給表」
- 2) 齋藤忠夫 監修 (2017), 「牛乳乳製品の知識」改訂版, 一般社団法人Jミルク, 58 - 60.
- 3) 「欧米諸国等におけるレンネットに関する調査」報告書 (2011), 1.
- 4) 瀬口正晴, 八田一 (2020), 新食品・栄養科学シリーズ 食べ物と健康2 「食品学各論」(第3版) 食品素材と加工学の基礎を学ぶ, (株) 化学同人, p.57, p.65.
- 5) 日本国際酪農連盟編 (1986), IDF Standard, 605.
- 6) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951), Protein measurement with the folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem*, 193, 265-275
- 7) Arima, K., Iwasaki, S., and Tamura, G. (1967), Milk Clotting Enzyme from Microorganisms, *Agric. Biol. Chem*, 31 (59), 540 - 545.
- 8) 細野明義, 大谷元, 発酵乳製品製造におけるタンパク質の凝固と分解, *New Industry*, 26 (7), 17 - 28.
- 9) 有馬啓 (1973), 財団法人東レ科学振興会, 第14回事業報告書 (昭和48年度), *Mucor Rennin* の発見と研究, 30 - 31.
- 10) P.S, Robertson and J.Gillies. (1966), Microbial Rennet, *N.Z.J.Dairy Technol.*, 1, 91.
- 11) R, Vanderpoorten and W, Weckx (1972), Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes, *Neth.Milk Dairy J.*, 26,