

# 黒酢麴菌の酸性プロテアーゼに関する研究

西木場祝子, 金田恵吏佳, 岩崎泰介

Studies on Acid Protease of *Aspergillus oryzae* Used in Fukuyama Rice Vinegar Production.

Noriko Nishikoba, Erika Kaneda and Taisuke Iwasaki

鹿児島を代表する特産品の一つである福山の黒酢は、200年も前から伝統的な手法で作られている。この黒酢の仕込みは、春と秋の2回、屋外に置かれた壺に、米麴、蒸米および地下水を加えて行なわれ、熟成まで一つの壺の中で進行する。黒酢特有の旨みには遊離のアミノ酸が関連しており、原料米の種類、精白度の差異、製麴条件や糖化、アルコール発酵の条件の違い等、種々の要因が影響しているものと考えられている。今回、麴菌の酸性プロテアーゼの生産条件、部分精製酵素の取得方法とその酵素学的性状、さらには米タンパク質への作用性について検討し、酸性プロテアーゼと黒酢に含まれる遊離アミノ酸の生成との関連性の一端を明らかにしたので報告する。

**Key words:**「黒酢」「麴菌」「酸性プロテアーゼ」「遊離アミノ酸」

(Received October 14, 2003)

## I. 緒言

鹿児島市から東へ約40km 行くと山間にたくさんの壺が幾重もの列を成して日光浴をしているかのようにも見える町が見えてくる。ここが、200年も前から伝統的な手法で黒酢造りを行っている福山町である。三方を緑豊かな丘に囲まれており、一方は、鹿児島湾に面した細長い台地である。ここ福山は、冬暖かく、霜が降ることが珍しく、夏も海からの風で比較的涼しく、年間を通して黒酢の発酵に適した気候で、原料である米や湧き水も豊富であり、昔は、製造に欠かすことのできない壺も薩摩焼としてたくさん入手できた。蟹江ら<sup>1)</sup>の成書によると、簡単に水洗いされて、十分に乾燥して湿気のないアマンツボに混ぜ麴を入れて、次に32~36℃の適温にまで冷めた蒸し米を入れて、湧き水を注ぎ、**麴**と蒸し米が混ざる程度攪拌した後、振り**麴**をすき間なく散布して、仕込みは完了する。黒酢の醸造において、この振り**麴**を使用するのが特徴的である。この仕込み工程は、製**麴**および米酢の自然発酵に適した春と秋の2回、3月下旬~6月下旬および9月初旬~10月中旬に行い、熟成までの一連の工程を、屋外に置かれた壺の中で行う。散布した直後の**麴**は、黄緑色を帯びている。糖化、アルコール発酵が順調に進むと白い胞子で被われるようになり、**麴**と壺との接触部分が透いてきて、1ヶ月後に酢酸菌の膜が張るようになり、アルコール発酵も終了すると酢酸発酵が活発に行われて、アルコールが酢酸へと変化して行き、徐々に振り**麴**や酢酸菌の膜が落下し始めて、仕込み後2~3ヶ月で完全に落下して発酵が終わる。発酵を終えたばかりの醪は、酢酸特有のツンと鼻を刺激する匂いが強くて、液の色も薄く、琥珀色までに達していない。この醪や上清液をそれぞれアマンツボに入れ満杯にし、空気に触れる面をできるだけ小さくする壺寄せという工程を行うことで、

\* 鹿児島純心女子短期大学専攻科食物栄養専攻 (〒890-8525 鹿児島市唐湊4丁目22番1号)

酢質の劣化を防ぎながら3～6ヶ月間、屋外で熟成させる。熟成させることで、残っているアルコールの酢化が促進され、また、発酵液中の微生物菌体や不溶物は沈殿し、ろ過工程が容易になる。この熟成期間が長ければ長いほど味や香りは深まり、上清液はよりいっそう清澄化して、濃くなり、黒酢特有の琥珀色を呈する。

このように黒酢は、添加される微生物は麹菌のみであるが、長期にわたって、温和な気候のもとで、壺内に棲みついている多種類の微生物の働きと一緒にあって、黒酢特有のうま味が生成される。小泉ら<sup>2,3,4)</sup>は市販されている種々の米酢の一般成分、無機成分、遊離アミノ酸および有機酸の比較を行うと共に、黒酢製造における振り麹の役割について、一連の研究を行っている。遊離アミノ酸については含量の多いアミノ酸として、アラニン、ロイシン、リジン、バリン、グリシンで、普通の米酢より多いことを示唆している。また、振り麹の役割については、仕込み初期の急激なアルコール生成を抑えると同時に種々のかびや産膜酵母などの混入防止の役割と乳酸菌群から酵母菌群さらに酢酸菌群へと菌叢を推移させる上で重要な役割をしていることを明らかにした。しかしながら、黒酢麹菌のプロテアーゼに関する報告はない。

そこで、黒酢の仕込み時に使用する振り麹から純粋に分離した麹菌によるプロテアーゼの生産条件の検討を進めて行く中で、酸性と中性の両域において活性のあるプロテアーゼを生産していることを見出した。ここでは酸性域に活性を有するプロテアーゼを酸性プロテアーゼ、そして中性域に活性を有するプロテアーゼを中性プロテアーゼと呼ぶことにする。

本研究では、麹菌の生産する酸性プロテアーゼの生産条件、そして部分精製酵素の取得方法とその酵素学的性状、ならびに本酵素による米タンパク質への作用性について検討し、黒酢に含まれる遊離アミノ酸の生成との関連性の一端を明らかにすることを目的とした。

## Ⅱ. 実験材料と方法

### 1. 麹菌の入手

黒酢麹菌は、福山町の坂元醸造(株)から仕込みに使う振り麹を分けていただき今回の実験に用いた。本麹菌は、*Aspergillus oryzae* var.KAWACHIとして分類されている。

### 2. 麹菌の純粋分離

#### 2-1 培地の調製

ポテトデキストロース寒天培地は、ポテトデキストロース寒天培地顆粒(日水製薬製)19.5gにイオン水500ml加えて、加熱溶解し、高压滅菌器(サクラ精機製)で121℃、20分間滅菌し、平板培地と斜面培地を調製した。

#### 2-2 純粋分離

麹菌の純粋分離は、ポテトデキストロース平板培地に画線して接種し、25℃で2日間培養後、単離したコロニーを、新たな培地に接種する操作を3回繰り返して行った。

#### 2-3 麹菌の保存

純粋分離した麹菌の保存には、麹汁培地を用いた。麹(河内源一郎商店 ネオマイセル)500gにイオン水1,000ml加え、55℃で30時間糖化後、ブフナーオートに濾紙(ADVANTECNo.2)を敷き、吸引ろ過して、抽出した液を糖度12%に希釈して、寒天2%添加し、高压滅菌器121℃

で20分間滅菌して調製した斜面培地を使用した。

### 3. 酸性プロテアーゼの生産培地

酸性プロテアーゼ生産培地は、住江ら<sup>5)</sup>の方法に従った。50ml三角フラスコあたり、小麦フスマ(日清製粉株式会社) 2gを取り、小麦フスマに対して30, 50, 70%量の蒸留水を散水して、混和した後、高圧滅菌器で121℃, 20分間滅菌し、純粋分離した麹菌を接種して、25℃で2~5日間培養した。また、麹菌の大量培養条件の検討には、500ml三角フラスコあたり、小麦フスマ20gを使用した。

### 4. 粗酵素抽出液の調製

粗酵素の抽出は、5℃の低温室で行った。麹菌を培養したフスマ培地にフスマの5倍量の0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0を加えて、攪拌した後、10分間放置して、ガーゼ2枚重ねでろ過し、ろ液を高速冷却遠心機(TOMY製CX-250)で10,000rpm, 5℃, 10分間遠心分離して、沈殿を除き、上清を酵素抽出液とした。麹菌の大量培養物からの粗酵素の抽出も上記と同様に行った。

### 5. プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性の測定は、赤堀ら<sup>6)</sup>の方法に従った。

#### 5-1 カゼイン基質の調製

pH3.5の基質は、カゼイン(CALBIOCHEM製) 1.2gに0.05M乳酸110mlを加えて、加熱溶解して、0.05MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>でpHを調整後、0.1MMcIlvaine緩衝液、pH3.5, 40mlを加えて、蒸留水で全量を200mlにした。pH7.0の基質は、カゼインに0.05MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を加えて、加熱溶解して、0.05MHClでpHを調整後、0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0を加えて、蒸留水で全量を200mlにした。

#### 5-2 タンパク質沈殿試薬の調製

タンパク質沈殿試薬は、それぞれ0.11MCCl<sub>3</sub>COOH, 0.22MCH<sub>3</sub>COONaおよび0.33MCH<sub>3</sub>COOHを含む混液を調製した。

#### 5-3 プロテアーゼ活性の測定

酵素反応は、10分間予温した基質5mlに、酵素液1ml加えて、40℃で10分間反応後、沈殿試薬5ml加えて、反応を止めた。10分間放置して、濾紙(ADVANTEC No131)ろ過した。ろ液の275nmにおける吸光度を、光電比色計(LKB社製ULTROSPEC II)を用いて測定した。盲検は常法通り、酵素液1mlに沈殿試薬5mlを加え、次いで基質5mlを加えた。

#### 5-4 酵素単位

酵素活性の単位は、本活性測定条件(0.6%基質, 40℃, 所定pHで10分間)下においてチロシン1γ相当量の275nmにおける吸光度を示す酵素活性を1単位(U)とした。

#### 5-5 比活性

酵素液の280nmにおける吸光度を蛋白量とし、比活性は、酵素活性単位を蛋白量で割った値で表した。

## 6. 酸性プロテアーゼの精製

### 6-1 硫安分画

粗酵素抽出液の硫安分画は、まず酵素液量に対して40%飽和度の硫酸アンモニウムを加えて、10分間放置した後、高速冷却遠心機で10,000rpm、5℃、10分間遠心分離して、沈殿を捕集し、上清にはさらに40~50, 50~60, 60~70, 70~80, 80~90, 90~100%飽和度の硫酸アンモニウムを加え同様の操作を繰り返し行い各画分の沈殿を集めた。得られた沈殿物に、0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0を加えて、ビスキングチューブ(三光純薬株式会社)に集め、0.002Mリン酸緩衝液、pH7.0に対して一晚透析後、透析内液を得た。

### 6-2 カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーによるプロテアーゼの精製実験には、Duolite A378D(住友化学工業株式会社)、DEAE-セルロースSH(ナカライテクス株式会社)とSephadex™G-50, Sephadex™G-100(Amersham Biosciences社)を使用した。カラムクロマト操作はすべて5℃の低温室で実施した。

#### 6-2-1 Duolite A378Dによる精製

カラム(2×45cm)にDuolite A378D樹脂を充填し、0.05M酢酸ソーダ-酢酸緩衝液、pH4.8で平衡化後、酵素液をパスツールピペットで負荷した。同様の緩衝液で樹脂に酵素を吸着させた後、0.2M酢酸ソーダ-塩酸緩衝液、pH4.2, 500mlで溶出させ、フラクションコレクターで5mlずつ分取した。

#### 6-2-2 DEAE-セルロースSHによる精製

カラム(2×45cm)にDEAE-セルロースSH樹脂を充填し、0.02MAtkins-Pantin緩衝液、pH8.0で平衡化後、酵素液を負荷した。同様の緩衝液で樹脂に酵素を吸着させた後、同様の緩衝液600mlを使って、0~0.5M NaCl濃度勾配で溶出させ、フラクションコレクターで10mlずつ分取した。

#### 6-2-3 Sephadex™G-50による精製

カラム(2.5×70cm)にSephadex™G-50を充填し、0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化後、酵素液を負荷した。同様の緩衝液で溶出させ、フラクションコレクターで10mlずつ分取した。

#### 6-2-4 Sephadex™G-100による精製

Sephadex™G-50による精製と同様の方法で行った。

## 7. 米タンパク質の抽出

米タンパク質の調製は、満田ら<sup>7)</sup>の方法に従った。出発材料として、米の粉(シガキ食品製)を使用した。抽出方法は、結果とともに記述した。

## 8. 米タンパク質の酸性プロテアーゼ処理物の薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーは、矢沢ら<sup>8)</sup>の方法に従った。黒酢中に比較的多く含まれているアミノ酸であるグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、フェニルアラニン、リジン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸の11種類を標準アミノ酸とした。標準アミノ酸は、各アミノ酸10mgを、70%エタノール1mlで溶解した。展開溶媒として、n-

ブタノール：酢酸：水（120：40：40）を使用した。薄層プレート（TLCアルミニウムシートシリカゲル60，メルク社製，20×20cm）に，標準アミノ酸と米タンパク質分解物（サンプルNo.1～4）を1  $\mu$ lずつスポット後，溶媒が，下端から12cmに達するまで展開し，次いでプレートを乾燥させ，ドラフト中で70%アルコールに溶解させた0.1%ニンヒドリン試薬を噴霧して，100℃で5分間発色させた。

## 9. アミノ酸の定量および分析方法

酸性プロテアーゼによる米タンパク質分解物中のアミノ酸の分析を鹿児島県工業技術センターに依頼した。送付された分析チャートからアミノ酸の同定と定量を行った。ピークの同定は，アミノ酸標準試料の分析チャートを参考に行った。標準試料中のアミノ酸の保持時間に最も近い保持時間を示すピークを同定した。標準試料中の各アミノ酸20成分の濃度とピーク面積から一点の検量線を作成し，試料中の各アミノ酸の含量を求めた。

## Ⅲ. 実験結果と考察

### 1. 酸性プロテアーゼの生産

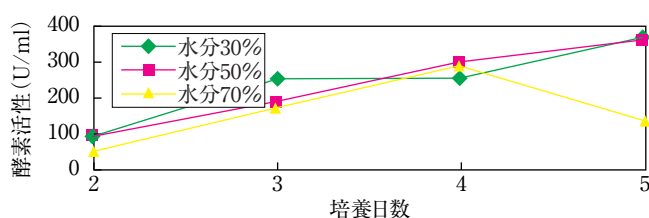


図1. 酵素生産に及ぼす散水量と培養日数の影響

培養条件:フスマ2g,培養温度25℃  
反応:0.6%カゼイン,pH3.5,40℃,10分間

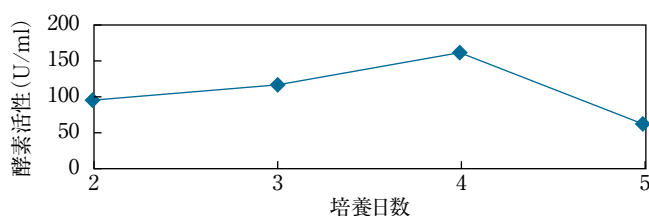


図2. 酵素の大量生産に及ぼす培養日数の影響

培養条件:フスマ20g,水分50%,温度25℃  
反応:0.6%カゼイン,pH3.5,40℃,10分間

図2に示すように，大量培養の至適培養条件は，酸性プロテアーゼ生産が4日目で最大となり，5日目では低下する傾向にあった。従って，酸性プロテアーゼ取得のための大量培養は，水分50%，4日間培養の条件とした。

まず，50ml三角フラスコあたり，小麦フスマ2gの規模で，酸性プロテアーゼ生産におぼす散水量と培養日数の影響について実験を行った。図1からわかるように本条件下における酸性プロテアーゼ生産の至適培養条件は，水分50%，4日間培養であった。水分30%と水分50%では酵素生産にほとんど差が認められなかったが，培養経過による水分蒸散を考慮に入れて，50%水分量を採った。

次いで，酵素の大量取得条件を設定するために，500ml三角フラスコあたり小麦フスマ20gの規模で，水分50%，25℃で2～5日間培養した。

## 2. 酸性プロテアーゼの精製

酸性プロテアーゼの大量取得においては、各20gのフスマを含む500ml三角フラスコ10本に、麹菌を接種し、4日間培養後の培養物にフスマ20gに対して5倍量の0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0を加え、粗酵素抽出液810mlを得、以下の精製実験に供した。

### 2-1 酸性プロテアーゼの硫安分画

表1に、粗酵素抽出液243ml(全酵素活性137,570U、比活性19.6)の硫安分画後、各画分の蛋白量、比活性、全酵素活性、収率を示した。40~50,50~60%飽和硫安分画では、粗酵素抽出液に比べて比活性の上昇は低かった。比活性は、60~70%画分では2.4倍、70~80%画分では4.0倍、80~90%画分では6.9倍、90~100%画分では24.3倍と硫安飽和度が高くなるに従い上昇した。また、全酵素活性は60~70%、70~80%画分および80~90%画分に全酵素活性の66%が集約された。

表1. 粗酵素抽出液の硫安分画

	硫安飽和度 (%)					
	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90	90~100
酵素液量 (ml)	6.0	6.5	6.5	8.9	16.3	13.0
蛋白量 (OD280nm)	40.00	36.00	47.60	47.50	19.40	2.00
比活性 (U/OD280nm)	23.8	23.7	47.4	79.5	134.3	476.0
全酵素活性 (U)	5,711	5,536	14,654	33,590	42,465	12,375
収率 (%)	4.2	4.0	10.7	24.4	30.9	9.0

なお、図3および図4には、比活性の上昇度合ならびに粗酵素抽出液の硫安分画による全酵素活性の分布をそれぞれ示した。

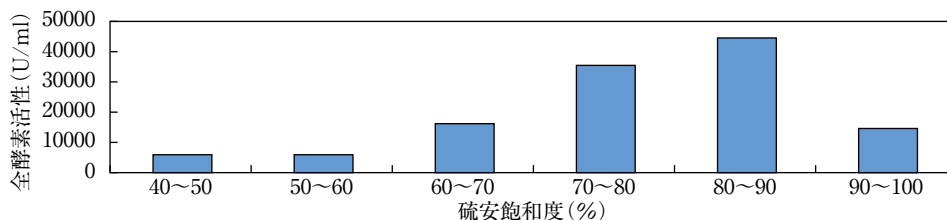


図3. 粗酵素抽出液の硫安分画

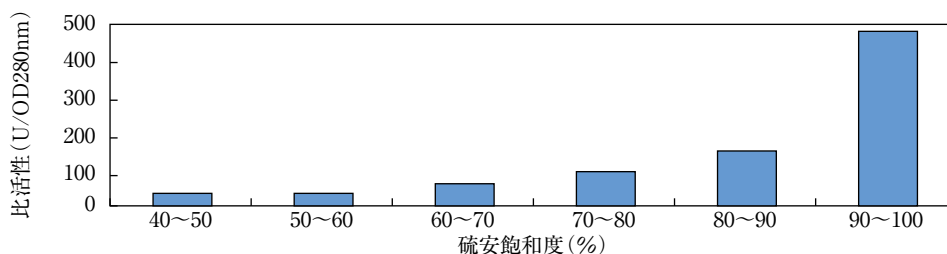


図4. 硫安分画酵素の比活性

このことから、粗酵素抽出液に比べて比活性の上昇が見られた60%飽和硫酸画分より高い画分を合一し、以下のカラムクロマトグラフィーに供した。表2に、粗酵素抽出液の60%以上の飽和硫酸画分の蛋白量、比活性、全酵素活性、収率をまとめた。

表2. 粗酵素抽出液の60~100%硫酸画分

	酵素液量 (ml)	蛋白量 (O D 280nm)	比活性 (U / O D 280nm)	全酵素活性 (U)	収率 (%)
粗酵素抽出液	567.0	20.18	19.6	320,996	100.0
60~100%硫酸画分	31.0	38.20	114.1	135,120	42.1

## 2-2 カラムクロマトグラフィー

### 2-2-1 Duolite A378Dによるカラムクロマトグラフィー

5,495単位の酵素液を弱塩基性陰イオン交換樹脂のDuolite A378Dに負荷してカラムクロマトグラフィーを行った結果を図5に示した。0.05M酢酸ソーダ-酢酸緩衝液, pH4.8で酵素を吸着後, 0.2M酢酸ソーダ-塩酸緩衝液, pH4.2で溶出させたが酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼが同一挙動をとり、両酵素を分離することができなかった。松島ら<sup>9)</sup>は麹菌より取得したタカジアスターゼの精製にDuolite A-2を使用して同様の方法で2種類のプロテアーゼを分離しているが、黒酢麹菌の生産するプロテアーゼはタカジアスターゼとは異なっていることが示唆された。

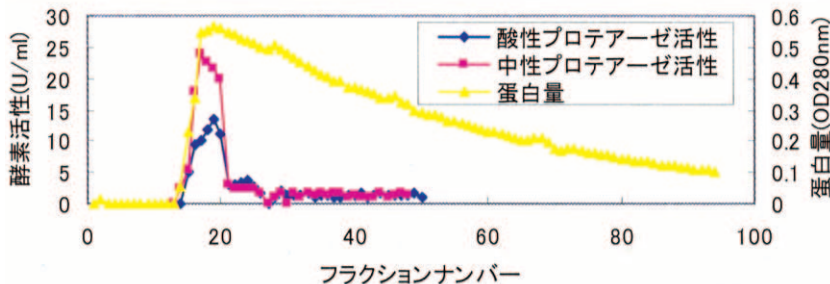


図5. DuoliteA378Dカラムクロマトグラフィー

カラム：2×45cm,流速：0.5ml/分,温度：5℃  
 酵素吸着液：0.05M酢酸ソーダ-酢酸緩衝液,pH4.8  
 酵素溶出液：0.2M酢酸ソーダ-塩酸緩衝液,pH4.2  
 酵素活性：フラクション液1ml+0.6%カゼイン基質5ml,pH3.5,40℃,10分間反応

### 2-2-2 DEAE-セルロースSHによるカラムクロマトグラフィー

43,587単位の酵素液を弱塩基性陰イオン交換樹脂のDEAE-セルロースSHカラムに吸着後, 0.02MAtkins-Pantin緩衝液, pH8.0を使用して, 0~0.5M NaCl濃度勾配で溶出した結果を図6に示した。0.3MNaCl濃度前後から酵素の溶出が認められるが、酸性および中性プロテアーゼの分離はできなかった。このような結果から、陰イオン交換樹脂を使用しての酸性および中性プロテアーゼの分離は困難と判断された。

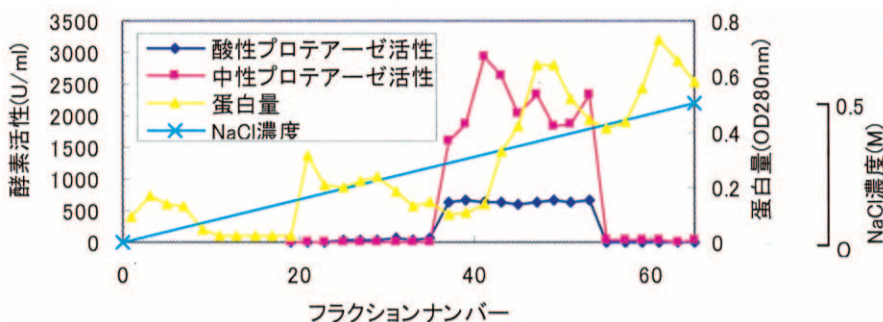


図 6. DEAE-セルロースSHカラムクロマトグラフィー

カラム：3×45cm,流速：0.5ml/分,温度：5℃  
 酵素活性：フラクション液1ml+0.6%カゼイン基質5ml,pH3.5,40℃,10分間反応

2-2-3 Sephadex™ G-50によるゲルろ過クロマトグラフィー

43,587単位の酵素液をSephadex™ G-50カラムに負荷して、0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0でゲルろ過を行った結果を図7に示した。図からわかるように、酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼの溶出活性ピークがずれることが認められ、前者が若干早く溶出されることが分かった。このことから、イオン交換樹脂では分離できなかった酸性および中性プロテアーゼの分離がゲルろ過でできる可能性が示された。できるだけ中性プロテアーゼ画分を含まない酸性プロテアーゼ活性の高いフラクション部分を集め、硫酸濃縮後の透析内液を取得した。表3にゲルろ過前後の収率を含めた酵素の概要を示した。

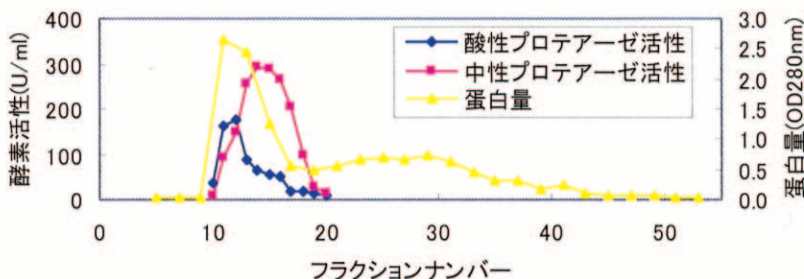


図 7. Sephadex™ G-50カラムクロマトグラフィー

カラム：2.5×70cm,流速：0.5ml/分,温度：5℃  
 酵素活性：フラクション液1ml+0.6%カゼイン基質5ml,pH3.5,40℃,10分間反応

2-2-4 Sephadex™ G-100によるゲルろ過クロマトグラフィー

Sephadex™ G-50によるゲルろ過と同様の酵素量を使用して、ゲルろ過を行い、その結果を図8に示した。図からわかるように、酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼの活性ピークの分離がより明確となった。できるだけ中性プロテアーゼ画分を含まないフラクションNo.8~12を集め、硫酸濃縮後の透析内液を7.9ml得た。収率を含めた酵素の概要は表3に示した。以後、酸性プロテアーゼの酵素学的性状および米タンパク質への作用性の検討には本酵素画分を用いた。



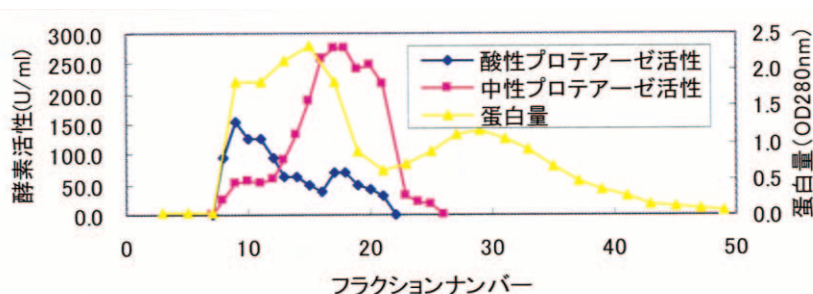


図 8. Sephadex™G-100カラムクロマトグラフィー

カラム：2.5×70cm,流速：0.5ml/分,温度：5℃  
 酵素活性：フラクション液1ml+0.6%カゼイン基質5ml,pH3.5,40℃,10分間反応

表 3. Sephadexによるカラムクロマトグラフィー

	酵素液量 (ml)	蛋白量 (OD280nm)	比活性 (U/OD280nm)	全酵素活性 (U)	収率 (%)
60~100%硫酸画分	10.0	12.73	114.10	43,587	42.1
Sephadex™G - 50	5.2	4.30	128.94	2,883	2.8
Sephadex™G - 100	7.9	5.84	126.11	5,818	5.6

\*収率は、粗酵素抽出液の収率を100%として求めた。

### 3. 酸性プロテアーゼの酵素学的性状

上記で得られた部分精製酵素を使用して酵素学的性状について検討した。

#### 3-1 pHと酵素活性

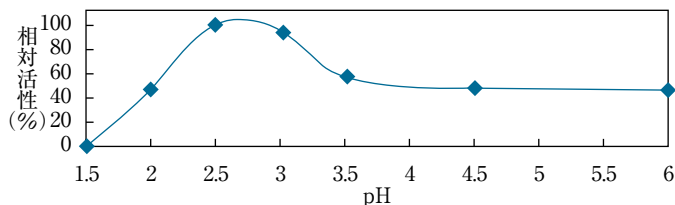


図 9. pHと活性

基質:0.6%カゼイン,作用条件:所定pHで10分間

0.6%カゼイン基質の調製は、カゼイン0.3gに0.05M乳酸40ml加えて加熱溶解して、1MNaOHあるいは1MHClでpHを1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 6.0に調整し、蒸留水で全量を50mlにした。各pHの基質5mlを予温した後、酵素液を1ml加え

て、10分間反応させ、沈殿試薬5ml加えて、反応を止めて、10分間放置して、濾紙ろ過した後、プロテアーゼ活性の測定を行った。その結果を酸性プロテアーゼ活性が高かったpH2.5の活性を100として、相対活性を求めて結果を図9に示した。酸性プロテアーゼの至適pHは、pH2.5~3.0付近にあり、pH1.5では活性が認められなかった。

### 3-2 温度と酵素活性

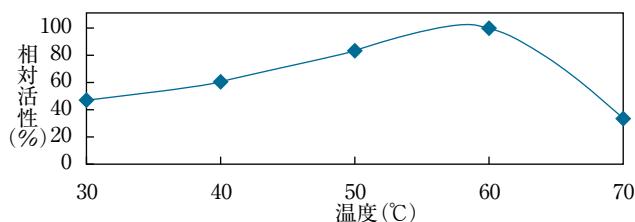


図10. 温度と活性

基質:0.6%カゼイン,作用条件:所定温度で10分間

基質 5 mlに酵素液 1 mlを加えて、30～70℃の範囲で10分間反応させ、沈殿試薬 5 ml加えて、反応を止め、10分間放置して、濾紙ろ過した後、プロテアーゼ活性の測定を行った。その結果を図10に相対活性で示した。酸性プロテアーゼの至適温度は60℃付近にあり、60℃を超えると、失活が顕著となり、70℃では30%の活性であった。

### 3-3 pH安定性

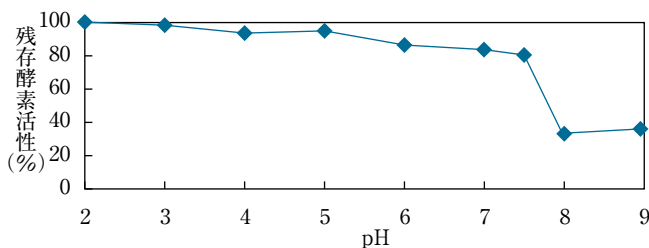


図11. pH安定性

処理条件:所定pHで5℃,3時間

酵素液は、0.05MMcIlvaine緩衝液, pH2.0～7.5と0.05MKolthoff緩衝液, pH7.5～9.0の各pHの緩衝液 1 mlに、0.1mlずつ加えて、5℃で3時間放置後、残存酵素活性を測定した。最も残存酵素活性が高かったpH2.0の活性を100として、図11に残存酵素活性を示した。酸性プロテアーゼは、各pHにおける5℃条件下

ではpH5.0付近までは安定であるが、中性域になるに従い、徐々に酵素活性は低下する傾向を示した。pH8.0～9.0のアルカリ域では残存酵素活性は30%であった。

### 3-4 温度安定性

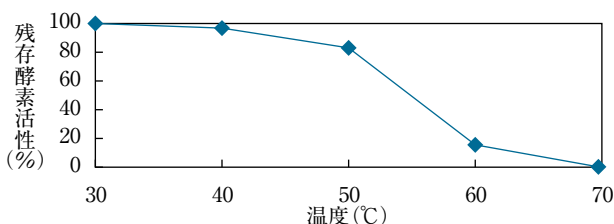


図12. 温度安定性

処理条件:所定温度で10分間

30～70℃における酵素の温度安定性を測定した。酵素液は、30～70℃に予温した0.05MMcIlvaine緩衝液, pH3.5, 1mlに酵素液を0.1mlずつ加えて、10分間反応後直ちに冷却し、残存酵素活性を測定し、その結果を図12に示した。40℃以上から失活が始まり、残存酵素活性は50℃で80%、60℃で15%、そして、70℃では完全に失活した。

#### 4. 米タンパク質への酸性プロテアーゼの作用

##### 4-1 米タンパク質の抽出

米の粉50 gに0.1% NaOH1,000ml加えて、37℃ に2時間放置した後、高速冷却遠心機で10,000rpm、5℃、10分間遠心分離して、でんぷんなどの沈殿を除いた。上清に、1 M HClを滴下し、pH4.5に調整し、再び遠心分離して、生成したタンパク質などの沈殿を遠心分離して集めた。次いで沈殿を500ml容量のビーカーに回収して、85%アルコール200mlに懸濁後、再び遠心分離して、タンパク質以外の85%アルコール可溶性の不純物を除き、シリカゲルの入った吸引デシケーター内で乾燥させた。タンパク質が1.35 g得られ、これを以下の酸性プロテアーゼによる作用性を調べる基質として使用した。

##### 4-2 米タンパク質への酸性プロテアーゼの作用

酸性プロテアーゼの作用条件は、pH2.5, 40℃ とした。0.1 M McIlvaine緩衝液、pH2.5に溶解させた2%米タンパク質溶液1 mlに、酵素液0.1ml (73.6 U) 加えて、40℃で0, 5, 10, 60分間反応させた後、5分間沸騰水中につけ、酵素を失活させた。これを、米タンパク質の酸性プロテアーゼ処理物として以下の薄層クロマトグラフィーおよびアミノ酸分析に供した。

##### 4-3 薄層クロマトグラフィーによる遊離アミノ酸の定性

図13に、酸性プロテアーゼによる米タンパク質の経時的な分解物の薄層クロマトグラフィーの結果を示した。この写真では初期の分解物は鮮明ではないが、分解初期のサンプルではアラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンと思われるスポットが出現している。酸性プロテアーゼ60分処理物(サンプル4)では、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびリジン等の遊離アミノ酸のスポットが認められた。今回イソロイシンとRf値に近いチロシン、バリンと近いメチオニン、リジンと近いアルギニンは標準アミノ酸としてスポットしなかったが、これらのアミノ酸も遊離されている可能性もある。小泉ら<sup>2)</sup>は、黒酢の遊離アミノ酸について含量の多いアミノ酸はアラニン、ロイシン、バリン、リジン、グルタミン酸、イソロイシンであり、全アミノ酸量は56.9~362.6mg/100mlで普通の米酢より多いこと、そして、全アミノ酸に対する必須アミノ酸の割合は45~50%であることを報告している。本報告と比較すると、今回、酸性プロテアーゼを米タンパク質に作用させて遊離されたアミノ酸パターンも同様の傾向を示していることが明らかとなった。このことをさらに明確にするために、酸性プロテアーゼ処理物をアミノ酸分析機によって、定性と定量を行った。

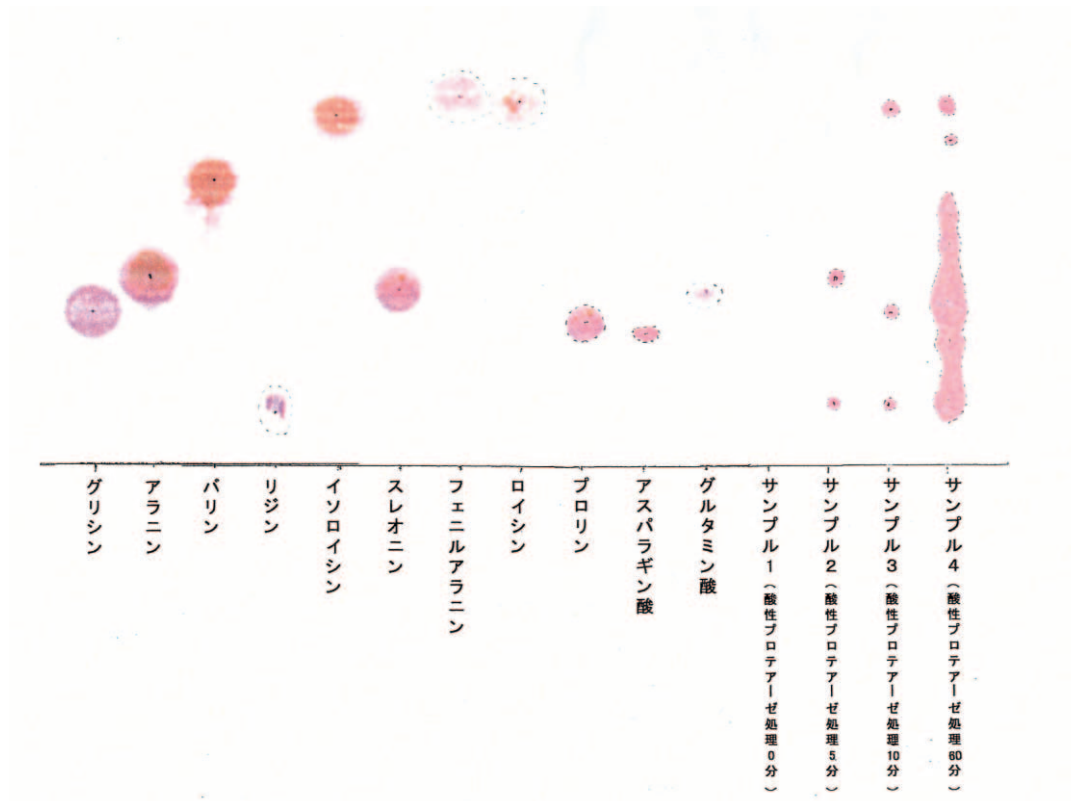


図13. 酵素処理米タンパク質の薄層クロマトグラフィー

#### 4-4 アミノ酸分析機による定量

図14に示した、酸性プロテアーゼ60分処理物（サンプル4）の amino 酸分析チャートより、17種類の遊離アミノ酸を同定することができた。図15および表4にその含量を示した。遊離量の多いアミノ酸は、アルギニン、チロシン、リジン、ロイシン、システイン、グルタミン酸、メチオニン、アラニン、フェニルアラニンであり、遊離量は少ないがバリン、イソロイシンも遊離された。小泉ら<sup>2)</sup>の分析データによると、黒酢中に多い遊離アミノ酸は、アラニン、ロイシン、バリン、リジン、グルタミン酸、イソロイシン、アスパラギン酸、フェニルアラニンであり、アルギニンやチロシンの含量は少なかった。アルギニンについては、アミノ酸分析チャートでは、最も多く検出されているが、薄層クロマトグラフィーでは、アルギニンのスポットの発現量は多いとは言えないことから、この点については、もう少し検討が必要である。一般的に言って、酸性プロテアーゼによる米タンパク質の分解物中に含まれる遊離アミノ酸と、黒酢中に含まれるアミノ酸の種類は同じ傾向を示した。このことから、黒酢特有のうま味を呈する遊離アミノ酸の生成に、麹菌の生産する酸性プロテアーゼが大きく貢献すると考えられた。

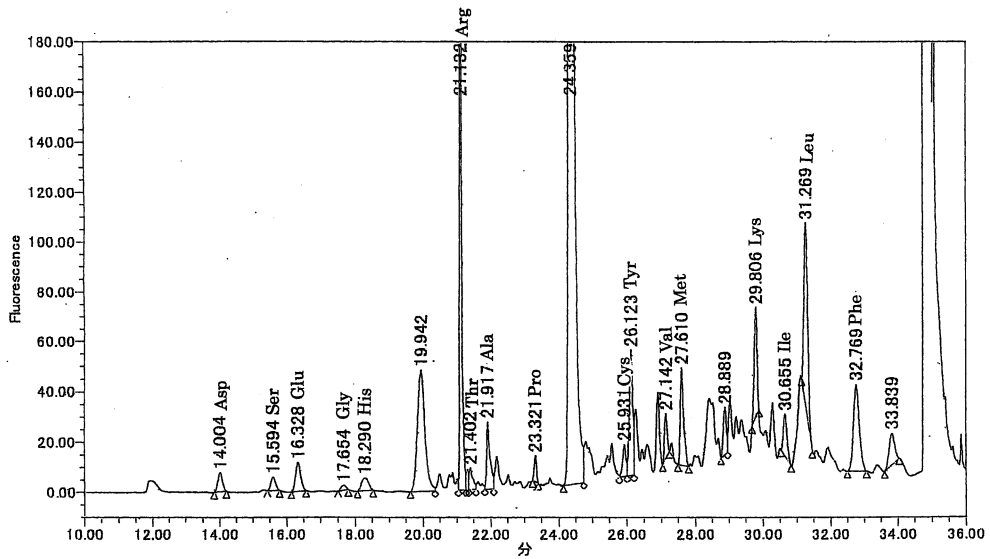


図14. 酵素処理米タンパク質のアミノ酸分析チャート

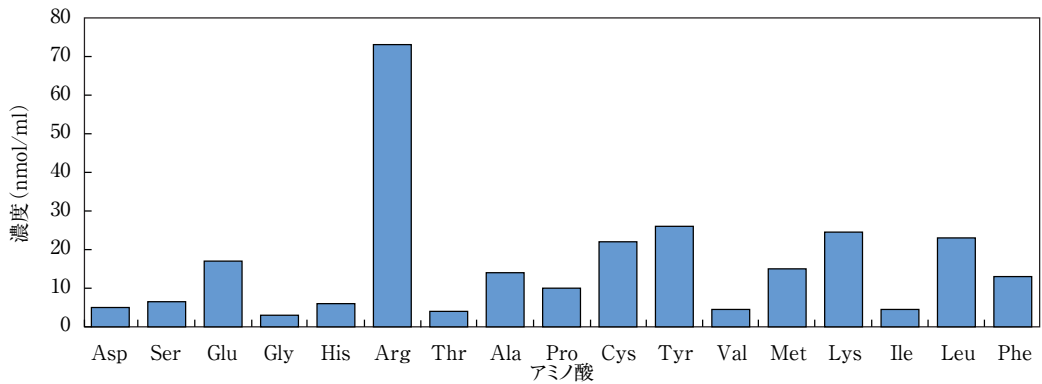


図15. 遊離アミノ酸含量

表4. 遊離アミノ酸の含量

成分	濃度 (nmol/ml)	成分	濃度 (nmol/ml)
Asp	5.0	Cys	22.0
Ser	6.5	Tyr	26.0
Glu	17.0	Val	4.5
Gly	3.0	Met	15.0
His	6.0	Lys	24.5
Arg	73.0	Ile	4.5
Thr	4.0	Leu	23.0
Ala	14.0	Phe	13.0
Pro	10.0		

#### IV. 要約

1. 黒酢麹菌による酵素生産には、小麦フスマ培地を使用した。麹菌は培地中に酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼ2種類のプロテアーゼを分泌することが認められた。本研究では、麹菌の酸性プロテアーゼについて検討を行った。
2. 酸性プロテアーゼの大量取得条件として、各三角フラスコあたり小麦フスマ20gを用いた場合、水分50%、4日間培養で最も高い酵素生産量を得た。
3. 粗酵素抽出液の硫安分画では、全酸性プロテアーゼ活性の約66%が飽和硫安画分60~70%、70~80%および80~90%画分に集約された。また、酵素の比活性は粗酵素抽出液に比べ、60%飽和硫安画分以上になると、硫安飽和度が高くなるに従い上昇した。このことから、60%飽和硫安画分以上を合一し、以下の精製実験に使用した。本画分は粗酵素抽出液に比べて比活性は5.8倍、そして収率は42.1%であった。
4. 種々のカラムクロマトグラフィーを行い部分精製酵素の取得について検討した。陰イオン交換樹脂のDuolite A378DおよびDEAE-セルロースSHカラムでは、混在する中性プロテアーゼを除去できなかった。Sephadex™G-50およびG-100によるゲルろ過で混在する中性プロテアーゼを除去できる可能性が見出された。Sephadex™G-100によるカラムクロマトグラフィーで得た酸性プロテアーゼ画分を取得し、酵素学的性状および米タンパク質への作用性を検討するための部分精製酵素とした。
5. 本酸性プロテアーゼの至適pHは、pH2.5~3.0付近にあり、至適温度は60℃付近にあることがわかった。また、本酵素は、5℃、3時間の条件下では、pH5.0以下で安定であり、温度安定性は、40℃以上から失活が始まり、50℃で80%の残存活性、70℃で完全に失活した。
6. 酸性プロテアーゼによる米タンパク質の経時的な分解物の薄層クロマトグラフィーを行った結果、分解初期のサンプルでは、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンと思われるスポットが出現し、60分処理物では、さらにバリン、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびリジン等の遊離アミノ酸のスポットが認められた。酸性プロテアーゼ60分処理物のアミノ酸分析チャートより、17種類の遊離アミノ酸を同定することができた。含量の多いアミノ酸は、アルギニン、チロシン、リジン、ロイシン、システイン、グルタミン酸、メチオニン、アラニン、フェニルアラニンであった。
7. 米タンパク質への酸性プロテアーゼの作用性から、黒酢特有のうま味を呈する遊離アミノ酸の生成に、麹菌の生産する酸性プロテアーゼが大きく貢献すると考えられた。

#### V. 謝辞

今回の研究にあたって、材料となる振り麴を分けて下さった坂元醸造株式会社福山研究所の橋口和典主任研究員に、心よりお礼を申しあげる。

#### VI. 引用文献

- 1) 蟹江松男：福山の黒酢，農山漁村文化協会，p.1,67(1989)
- 2) 小泉幸道他：日食工学誌,34,670(1988)
- 3) 小泉幸道他：日食工学誌,35,237(1989)

- 4) 小泉幸道他：日食工学誌, 36, 594(1987)
- 5) 住江金之他：農化, 31, 73(1956)
- 6) 赤堀四郎他：酵素研究法, 2, p. 240(1956)
- 7) 満田久輝他：栄養と食糧, 23, 6(1970)
- 8) 矢沢洋一他：基礎生化学実験, p. 43(1999)
- 9) 松島鉄一他：農化, 36, 194(1962)