

# 黒酢麹菌の中性プロテアーゼに関する研究

金田恵吏佳, 西木場祝子, 岩崎泰介

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

Erika Kaneda, Noriko Nishikoba and Taisuke Iwasaki

鹿児島市から東へ約40kmの所に、黒酢の町—福山町—がある。ここでは、約200年も前から伝統的な手法で黒酢が作られている。その仕込みは、春と秋の2回、屋外に置かれた壺に、米麹、蒸米および地下水を加えて行なわれ、熟成まで糖化・アルコール発酵・酢酸発酵の三つの過程が、一つの壺の中で進行する。仕込み後、液面に振り麹をするのが最も特徴的な操作である。黒酢には遊離アミノ酸含量が多く、これが特有の旨みに寄与していることが知られており、原料米の種類、精白度の差異、製麹条件や糖化、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、振り麹から取得した麹菌の中性プロテアーゼの部分精製を行うとともに、米タンパク質への作用性について検討し、中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」「麹菌」「中性プロテアーゼ」「遊離アミノ酸」

(Received October 14, 2003)

## I. 緒言

鹿児島を代表する特産品の一つに福山の黒酢がある。福山は、鹿児島県の錦江湾奥に位置し、ここで製造される黒酢は約200年もの歴史があり、昔から変わらぬ方法で製造されてきた。この地は、三方を丘に囲まれ、一方は海に面し、地下水は豊富でミネラル分に富んでおり、一年を通して温暖な気候は、酢作りに使われているアマンツボと呼ばれる3斗の陶器を温め、壺の中の微生物の生育に好条件を作りだし、黒酢醸造に恵まれた環境にある。

黒酢の仕込みは、春と秋の2回、屋外で行われる。壺に、米麹3kg、玄米、五分つき米、七分つき米、精白米などの原料米を蒸した蒸米5.5kg、地下水32lを加え、仕込みを行う。仕込みが終わると、その直後か翌日に0.4kgの振り麹を散布する。この振り麹の使用が黒酢の大きな特徴であり、液の全表面に浮かべ、これが蓋となって発酵が進む。振り麹を行うことで、急激に高濃度のアルコールが生成されるのを抑制し、雑菌の進入を防ぐ役割もしている。仕込まれた黒酢は、はじめの約3ヶ月に糖化・アルコール発酵・酢酸発酵の三つの行程が壺の中で行われ、半年から一年間の熟成期間を経て味わい深い酢へと天然醸造される<sup>1)</sup>。

この過程を通して作られた黒酢は、他の酢と比較すると味に深みやまろやかさが多いといわれている。また、他の醸造酢に比べ全窒素量が多く、その大部分がアミノ酸である。アミノ酸は、旨味を増したり、酸味を和らげることから米酢の味に関与し、この黒酢中のアミノ酸は、

\* 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)

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などに起因すると考えられている<sup>2)</sup>。

黒酢に関しては、小泉ら<sup>3,4)</sup>の一連の研究があり、特殊食酢類の一般成分・無機成分・遊離アミノ酸・有機酸についての分析や、壺酢醸造における振り麴の役割について報告している。また、麴菌の生産するプロテアーゼに関しては、松島ら<sup>5)</sup>は、麴菌の生産する中性プロテアーゼの弱塩基性陰イオン交換樹脂による分離と酵素学的性状について、また来間ら<sup>6)</sup>は、麴菌の生産する酸性プロテアーゼによるカゼインの分解性について報告をしている。しかしながら、黒酢醸造に使用される麴菌のプロテアーゼに関する報告は見当たらない。

黒酢麴菌による酵素の生産条件を設定していく中で、本菌は培地中に酸性および中性の両域において活性を有するプロテアーゼを生産することが認められた。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称することにした。

本研究では、黒酢麴菌の生産する中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質、さらには、中性プロテアーゼの米タンパク質への作用性について検討することにより、黒酢中に含まれている遊離アミノ酸の生成に本酵素がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

## II. 実験材料と方法

### 1. 黒酢麴菌の入手

鹿児島県始良郡福山町の坂元醸造株式会社で、黒酢醸造に使用されている振り麴を分与していただいた。本麴菌は、*Aspergillus oryzae* var. KAWACHIとして分類されている。

### 2. 麴菌の純粹分離

ポテトデキストロース培地（日水製薬製）を使用して、平板培地に振り麴菌から鈎菌し、常法に従い麴菌の単離を3回行って純粹分離した。

分離株の保存には、麴汁培地を用いた。麴（河内源一郎商店製ネオマイセル）500gに水1,000mlを加え55℃で30時間糖化後、吸引ろ過した抽出液の糖度を糖度計で糖度12%になるように希釈し、寒天2%を添加しオートクレーブで121℃、20分間滅菌して調製した斜面培地を使用した。

### 3. 中性プロテアーゼの生産培地

酵素生産培地は、住江ら<sup>7)</sup>の方法に準じた。50ml三角フラスコ当たり2gの小麦フスマ（日清製粉製）を取り、水分30, 50, 70%になるように蒸留水を撒水し、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、純粹分離した麴菌を接種して、25℃で2～5日間培養した。

また、麴菌の中性プロテアーゼの大量取得条件の検討には、500ml三角フラスコ当たり小麦フスマ20gを使用した。

#### 4. 粗酵素抽出液の調製

粗酵素の抽出は、所定時間培養した麹菌培養物にフスマの5倍量の0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0を加え、ガラス棒で攪拌し10分間放置後、二重にしたガーゼを用いて抽出した。

次いで、高速冷却遠心機（TOMY製CX-250）で10,000rpm、5℃で10分間遠心分離を行い、得られた上清液を粗酵素抽出液とした。

#### 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>8)</sup>の方法に準じた。

##### 5-1 プロテアーゼ測定用基質の調製

ミルクカゼイン（CALBIOCHEM社製）0.6%溶液を基質として使用した。

中性プロテアーゼ用基質の調製は、カゼイン1.2gに0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>110mlを加え、加温溶解後冷却し、0.05M HClでpH7.0に調整し、0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0を40ml加え、蒸留水で全量を200mlにした。

酸性プロテアーゼ用基質の調製は、カゼイン1.2gに0.05M乳酸溶液110mlを加え、加温溶解後冷却し、0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>でpH3.5に調整し0.1M McIlvaine緩衝液、pH3.5を40ml加え、蒸留水で全量を200mlにした。

##### 5-2 プロテアーゼ活性の測定

40℃の恒温水槽中で5分間予温した基質溶液5mlに、酵素液を1ml添加し40℃で10分間反応後、沈殿試薬5mlを加えて反応を止め、10分間放置後ろ紙（ADVANTEC No131）でろ過を行い、ろ液の275nmの吸光度を分光光度計（LKB製ULTROSPEC II）で測定した。

ろ液が濁っている場合は、同じろ紙でろ過を繰り返した。盲検は常法にしたがい、酵素液1ml、沈殿試薬5ml、基質5mlの順で加えた。

なお、沈殿試薬はそれぞれ0.11M CCl<sub>3</sub>COOH、0.22M CH<sub>3</sub>COONa、0.33M CH<sub>3</sub>COOHを含む混液を用い、反応停止液とした。

##### 5-3 酵素単位

プロテアーゼ活性の単位は本活性測定条件下で、1γ相当量のチロシンの吸光度を示す酵素活性を1単位（U）とした。

図1は、1γ、5γおよび10γ量のチロシン溶液1mlに沈殿試薬5ml、蒸留水5mlを加え攪拌後、ろ液の275nmにおける吸光度を測定した結果を示しており、チロシン1γ量に相当する吸光度は0.006であった。

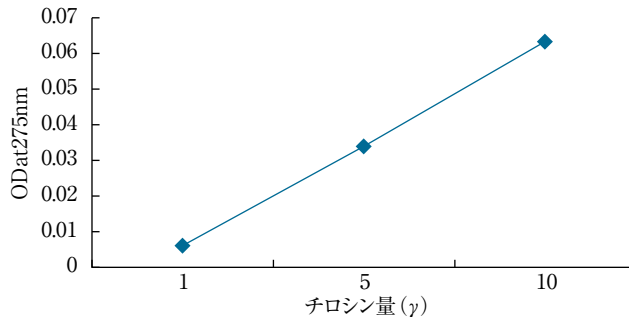


図1. チロシン含量と吸光度

蛋白量は、酵素液の280nmの吸光度で示し、比活性は、酵素活性単位 (U) を蛋白量で割った値で示した。

## 6. 中性プロテアーゼの精製

### 6-1 粗酵素抽出液の硫酸分画

麹菌の大量培養により得られた粗酵素抽出液量に対し硫酸アンモニウム飽和度40~100%まで、硫酸飽和度を10%高めるごとに生成する沈殿を、高速冷却遠心機で10,000 rpm, 5℃, 10分間遠心分離して捕集し、この沈殿物に0.01Mリン酸緩衝液, pH7.0を加え、ビスキングチューブ (三光純薬株式会社) 中に集め一晚透析後、透析内液を得た。

### 6-2 中性プロテアーゼのカラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーの操作はすべて5℃の低温室で実施した。

#### 6-2-1 陰イオン交換樹脂Duolite A378 Dカラムクロマトグラフィー

カラム (2.5×40cm) にDuolite A378 D樹脂 (住友化学工業株式会社) を充填し、0.02Mリン酸緩衝液, pH6.0で平衡化後、酵素を負荷し、同様の緩衝液を使用して0.1~0.5M NaClの濃度勾配で溶出させ、溶出液をフラクションコレクターで10mlずつ分取した。

#### 6-2-2 陰イオン交換樹脂DEAE-セルロースSHカラムクロマトグラフィー

カラム (2.5×40cm) にDEAE-セルロースSH樹脂 (ナカライテスク株式会社) を充填後、0.02Mリン酸緩衝液, pH7.0で平衡化し、酵素を負荷後、同様の緩衝液で0~0.5M NaClの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 陰イオン交換樹脂DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー

カラム (2.5×40cm) にDEAE-Sephacel樹脂 (LKB製) を充填し、0.02Mリン酸緩衝液, pH7.0で平衡化後、酵素を負荷し、同様の緩衝液で0~0.5M NaClの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。

#### 6-2-4 Sephadex™ G-50によるゲルろ過

カラム (2.5×40cm) にSephadex™ G-50樹脂 (Amersham Biosciences製) 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。

#### 6-2-5 Sephadex™ G-100によるゲルろ過

カラム (2.5×67cm) にSephadex™ G-100樹脂 (Amersham Biosciences製) を充填し、Sephadex™ G-50によるゲルろ過と同様の方法で行った。

## 7. 米タンパク質の調製

米タンパク質の調製は、満田ら<sup>9)</sup>の方法によった。米の粉 (シガキ食品製) を出発原料とし、抽出方法は結果と共に記述した。

## 8. 米タンパク質の中性プロテアーゼ処理物の薄層クロマトグラフィー

薄層プレートは、Silica gel60のアルミニウムプレート (MERCK製) を使用し、展開溶媒としてn-ブタノール-酢酸-水 (120:40:40) を用いた。黒酢に多く含まれているグリシン, アラニン, バリン, リジン, イソロイシン, スレオニン, フェニルアラニン, ロイシン, プロ

リン、アスパラギン酸、グルタミン酸を標準アミノ酸として、各アミノ酸10mgを70%エタノール溶液1 mlに溶解し、薄層プレートに標準アミノ酸を1  $\mu$ l、米タンパク質の中性プロテアーゼ処理物を3  $\mu$ lずつスポット後、スポット原点から10cm展開後薄層プレートを乾燥させ、次いで0.1%ニンヒドリン試薬（70%アルコール溶液）を噴霧して、100℃で5分間発色させた。

### 9. 米タンパク質の中性プロテアーゼ処理物のアミノ酸分析

中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。送付されたアミノ酸分析チャートから、アミノ酸の同定と定量を行った。

測定装置は、アミノ酸分析装置2695(日本ウォーターズ株式会社製)を使用し、測定方法はAccQ・Tag法によるプレカラム蛍光誘導体化検出法により行われた。

アミノ酸の同定および定量は、標準サンプル中のアミノ酸の保持時間と最も近接している保持時間の差が小さいピークを同定し、定量は標準サンプル中の各アミノ酸の濃度とピーク面積から一点検量線を作成し、試料中の各アミノ酸含量を求めた。

## Ⅲ. 実験結果と考察

### 1. 黒酢麹菌中性プロテアーゼ生産に及ぼす水分量と培養日数の影響

50ml三角フラスコに小麦フスマ2 gを入れ、フスマに対して30, 50, 70%の蒸留水を撒水し攪拌した後、麹菌を接種して25℃で2～5日間培養した。その結果を図2に示した。

水分30%, 50%および70%における酵素生産量を比較すると、30%および50%の水分量では、酵素生産量は培養日数の経過とともに増加したが、70%では5日目になると酵素生産量は低下した。

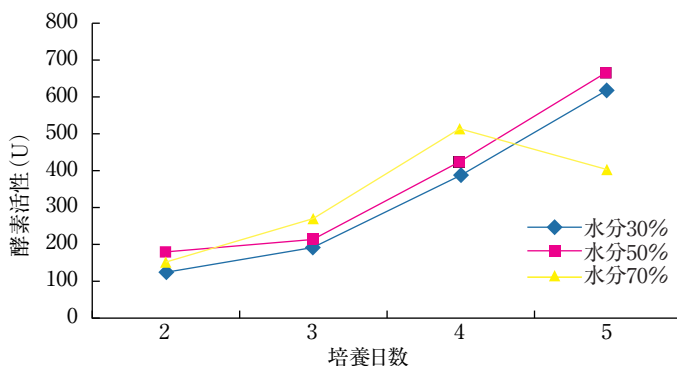


図2. 酵素生産に及ぼす水分量と培養日数の影響

中性プロテアーゼの生産は、水分含有50%で最も高い傾向がえられた。次に、酵素の大量取得条件を設定するために、500ml三角フラスコ当たり小麦フスマ20 gの規模で、水分含量50%, 25℃で2～5日間培養を行った。その結果を図3に示した。

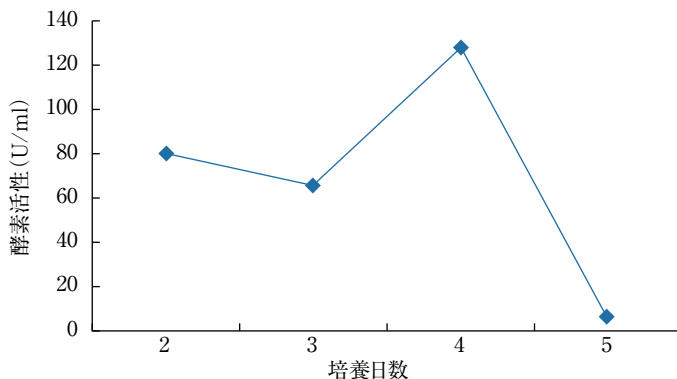


図3. 酵素の大量生産における培養日数の影響

水分含量50%における大量培養では、中性プロテアーゼ生産量は4日目まで最大となり、5日目になると酵素活性は低下した。このことから、酵素の大量取得培養は、水分含量50%,4日間培養で行うことにした。

## 2. 中性プロテアーゼの精製

### 2-1 中性プロテアーゼの硫酸アンモニウム分画

500ml三角フラスコ10本に各フスマ20g, 蒸留水10mlを加え121℃で20分間オートクレーブしたフスマ培地に、麹菌を接種し25℃で4日間培養を行った。

この麹菌培養物に、フスマの5倍量の冷却した0.01Mリン酸緩衝液, pH 7.0を加え、攪拌し10分間放置後、ガーゼを使用して酵素液を抽出した。次いで、高速冷却遠心機で10,000rpm, 5℃で10分間遠心分離し粗酵素抽出液810mlを得た。

得られた粗酵素抽出液243mlの酵素液(全酵素活性288,125U)について硫酸分画を行い、その結果を表1および図4, 図5に示した。

表1. 粗酵素抽出液の硫酸分画

|                   | 硫酸飽和度 (%) |        |        |        |        |        |
|-------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | 40~50     | 50~60  | 60~70  | 70~80  | 80~90  | 90~100 |
| 酵素液量 (ml)         | 6         | 6.5    | 6.5    | 8.9    | 16.3   | 13     |
| 蛋白量 (ODat280nm)   | 40        | 36     | 47.6   | 47.5   | 19.4   | 2      |
| 比活性 (U/ODat280nm) | 7.5       | 57.5   | 119.3  | 200.5  | 247.9  | 350.7  |
| 全酵素活性 (U)         | 1,804     | 13,460 | 36,907 | 84,571 | 78,397 | 9,118  |
| 収率 (%)            | 0.6       | 4.7    | 12.8   | 29.4   | 27.2   | 3.2    |

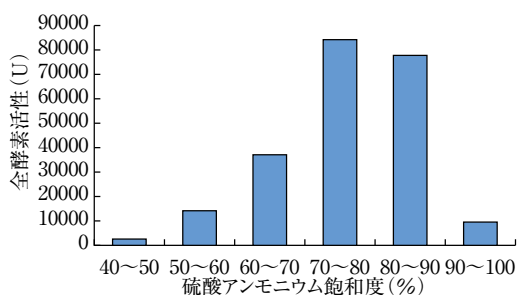


図 4. 粗酵素抽出液の硫酸分画と酵素活性

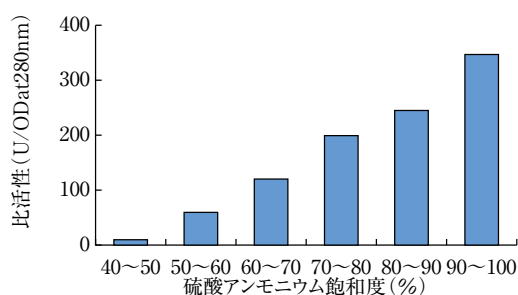


図 5. 粗酵素抽出液の硫酸分画と比活性

表 1 および図 4 からわかるように、中性プロテアーゼは飽和硫酸分画60~70%、70~80% および80~90%画分に全酵素活性の約70%が集約された。また、表 1 および図 5 から、硫酸飽和度が高くなるにつれて比活性も上昇し、硫酸分画前の粗酵素抽出液と比べると60~70%飽和硫酸分画において2.9倍、70~80%で4.9倍、80~90%で6.0倍、そして90~100%では8.5倍に増加した。これより、粗酵素抽出液に比べ比活性の高い硫酸飽和度60%以上の画分を合一したものを以下の精製実験に供することにした。

表 2 に以後の精製実験に使用する粗酵素抽出液567mlについて得られた60~100%飽和硫酸分画の比活性、全酵素活性、収率を示した。

表 2. 粗酵素抽出液の60~100%硫酸分画

|               | 酵素液量 (ml) | 蛋白量 (ODat280nm) | 比活性 (U/ODat280nm) | 全酵素活性 (U) | 収率 (%) |
|---------------|-----------|-----------------|-------------------|-----------|--------|
| 粗酵素抽出液        | 567       | 28.83           | 41.1              | 672,292   | 100    |
| 60~100%飽和硫酸分画 | 31        | 38.2            | 215.1             | 254,708   | 37.9   |

## 2-2 カラムクロマトグラフィー

### 2-2-1 陰イオン交換樹脂 Duolite A378 Dカラムクロマトグラフィー

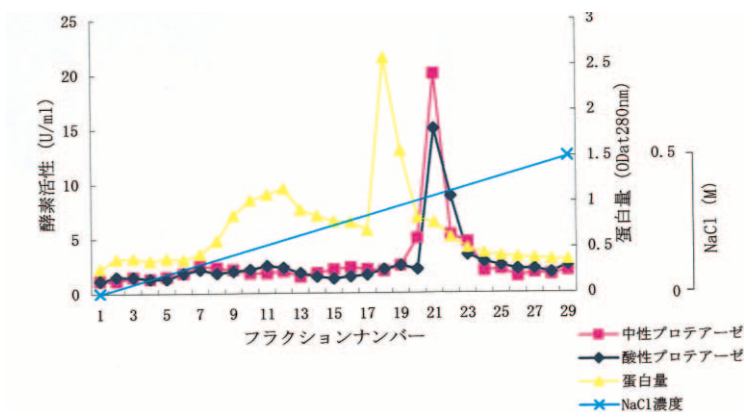


図 6. DuoliteA378Dカラムクロマトグラフィー

カラム：2.5×40cm,流速：0.5ml/分,フラクション量：10ml/チューブ  
樹脂を0.020Mリン酸緩衝液,pH7.0で平衡化後,酵素液 (3,030U) を負荷し,  
同様の緩衝液で0~0.5M NaCl濃度勾配で溶出し,溶出液を分画した。

松島ら<sup>3)</sup>は、麴菌プロテアーゼを弱塩基性陰イオン交換樹脂Duolite A-2を使用し、中性付近に至適pHを有する2種類のプロテアーゼの分離について報告している。また、福本ら<sup>10)</sup>は細菌プロテアーゼを、Duolite C-10を使用して精製している。

そこで、ここでは先に調製した酵素液(全酵素活性:3,030U)について、陰イオン交換樹脂Duolite A378 Dを使用して、樹脂に吸着させた酵素を0~0.5M NaClの濃度勾配で溶出させることにより、中性プロテアーゼの精製を試みた。

図6に示すように中性プロテアーゼと酸性プロテアーゼは同一の挙動を示したことから、両プロテアーゼの分離は難しいことがわかった。

さらに酵素液(全酵素活性:2,736U)について、陰イオン交換樹脂DEAE-セルロースSHを使用して中性プロテアーゼの精製を行った。すなわち、樹脂に吸着させた酵素を0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0を使用して0~0.5M NaClの濃度勾配で溶出させたが、中性プロテアーゼおよび酸性プロテアーゼの分離はできなかった。

また、陰イオン交換樹脂DEAE-Sephacelを使用して、同様に中性プロテアーゼの精製を行ったが、混在する酸性プロテアーゼを除くことはできなかった。そこで、DEAE-セルロースSHおよびDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィーの結果については、中性および酸性のプロテアーゼの分離はできなかったことから、図の掲載を省略し、Duolite A378 Dによるカラムクロマトグラフィーの結果のみを図6に示した。

### 2-2-2 Sephadex™ G-50ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

82,164Uの酵素液についてSephadex™ G-50によるゲルろ過を行い、その結果を図7に示した。

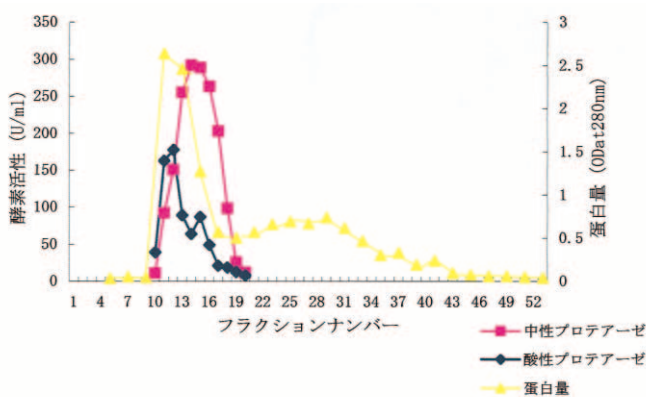


図7. Sephadex™ G-50カラムクロマトグラフィー

カラム: 2.5×40cm, 流速: 0.5ml/分, フラクション量: 10ml/チューブ  
樹脂を0.02Mリン酸緩衝液, pH7.0で平衡化後, 酵素液(82,164U)を負荷し,  
同様の緩衝液で溶出し, 溶出液を分画した。

図7からわかるように、陰イオン交換樹脂では分離されなかった酸性および中性プロテアーゼがSephadex™ G-50によるゲルろ過を行うことにより、それぞれの酵素の活性ピークがずれて溶出された。両酵素の分離は顕著ではないが、中性プロテアーゼは酸性プロテアーゼに遅れて溶出されることが認められた。



そこで、できるだけ酸性プロテアーゼを含まない中性プロテアーゼ活性の高い画分（フラクションNo.16～18）を合一し、硫酸塩析および透析を行い、透析内液3.5mlを得た。

表3に示すように、比活性はゲルろ過前と比べると1.2倍に上昇し、粗酵素抽出液と比べると6.3倍に上昇した。

### 2-2-3 Sephadex™ G-100ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

Sephadex™ G-50のゲルろ過で中性および酸性プロテアーゼが分離できる可能性が示唆されたので、次に82,164 Uの酵素液についてSephadex™ G-100によるゲルろ過を行い、図8のような結果を得た。

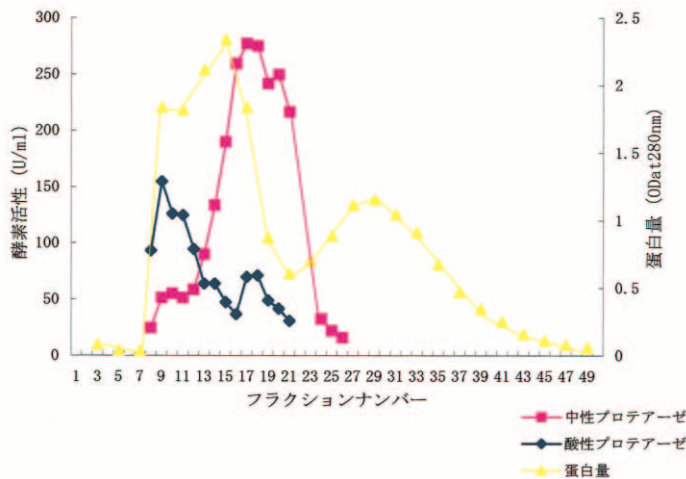


図8. Sephadex™ G-100カラムクロマトグラフィー

カラム：2.5×67cm,流速：0.5ml/分,フラクション量：10ml/チューブ  
樹脂を0.02Mリン酸緩衝液,pH7.0で平衡化後,酵素液(82,164U)を負荷し,  
同様の緩衝液で溶出し,溶出液を分画した。

Sephadex™ G-50によるゲルろ過よりもさらに中性プロテアーゼおよび酸性プロテアーゼの分離が明確となった。酸性プロテアーゼの混在が少なく、中性プロテアーゼ活性の強い画分（フラクションNo.14～23）を合一し、表3に示すように透析内液9.1mlを得た。

比活性は、粗酵素抽出液に比べ5.7倍となり、収率は9.9%であった。以後、この酵素液を部分精製酵素として、酵素学的諸性質の検討と米タンパク質への作用性を調べるための実験に使用することとした。

表3. Sephadexによるカラムクロマトグラフィー

| フラクションNo.                  | 液量 (ml) | 蛋白量 (ODat280nm) | 比活性 (U/ODat280nm) | 全酵素活性 (U) | 収率 (%) |
|----------------------------|---------|-----------------|-------------------|-----------|--------|
| Sephadex™ G-50 (No.16～18)  | 3.5     | 3.24            | 257.2             | 2,917     | 1.3    |
| Sephadex™ G-100 (No.14～23) | 9.1     | 10.01           | 235.6             | 21,458    | 9.9    |

\*収率は、粗酵素抽出液を100%として算出した。

### 3. 中性プロテアーゼの酵素学的性状

#### 3-1 pHと酵素活性

pH5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0および12.0の0.6%カゼイン基質 5 mlに酵素液 1 mlを加え、40℃で10分間反応させた後、沈殿試薬 5 mlを添加し、活性測定を行った。

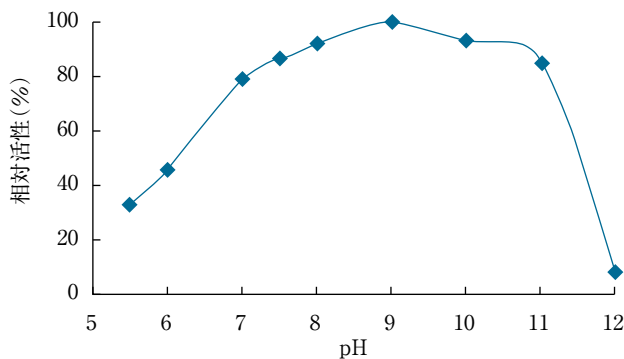


図9. pHと酵素活性

図9は、酵素活性を相対活性で示したものであるが、黒酢麹菌の中性プロテアーゼは、中性付近からpH11.0まで広いpH域で高い活性を示し、至適pH7.0~11.0を得た。

このことから本酵素は、中性プロテアーゼと呼称してきたが、アルカリ性プロテアーゼと呼んだ方が適切であるかもしれない。

#### 3-2 温度と酵素活性

pH7.0のカゼイン基質 5 mlに酵素液 1 mlを加え、30, 40, 50, 60および70℃の各温度で10分間反応させ、沈殿試薬 5 mlを加えて反応を止め、ろ液の中性プロテアーゼ活性を測定した。

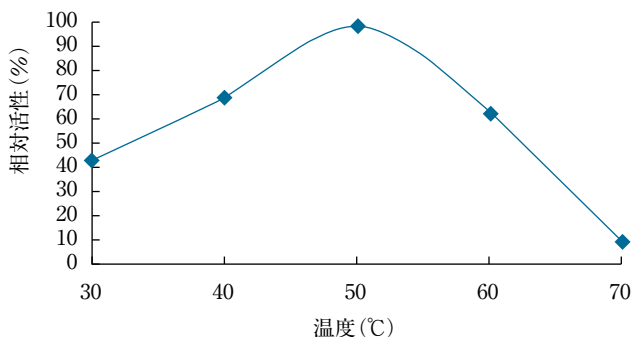


図10. 温度と酵素活性

図10からわかるように、中性プロテアーゼの至適温度は50℃付近にあり、これ以上になると失活が顕著となり70℃ではほとんど酵素活性は失活した。

#### 3-3 酵素のpH安定性

pH2.0~7.0の0.05M McIlvaine緩衝液あるいは、pH7.0~9.0の0.05M Kolthoff緩衝液 1 ml中に酵素液0.1mlを加え、5℃で3時間放置後、残存酵素活性を測定した。

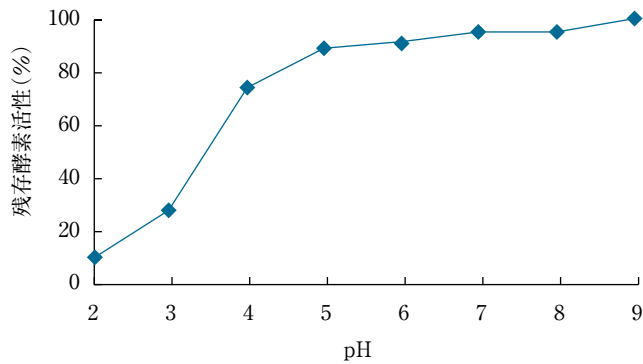


図11. 酵素のpH安定性

図11に示すように、5℃、3時間の条件下では中性プロテアーゼは中性からアルカリ性域で安定であるが、酸性域になるに従い安定性は低下し、pH4.0では残存活性75%、pH3.0では28%、pH2.0では10%であった。

#### 3 - 4 酵素の温度安定性

30～70℃の各温度に予温した0.1Mリン酸緩衝液、pH7.01mlに、酵素液を各0.1ml加え、所定温度で10分間反応後直ちに氷冷し、残存酵素活性を測定した。

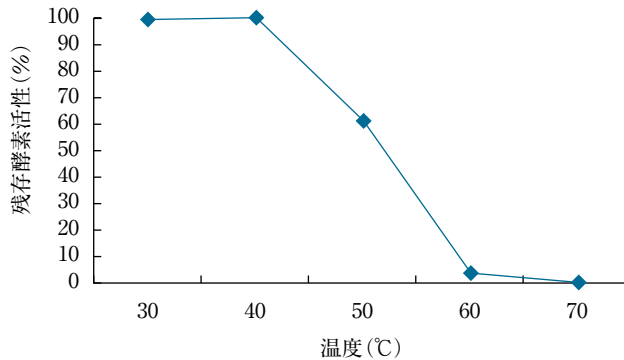


図12. 酵素の温度安定性

図12に示したように、中性プロテアーゼは40℃を超えると、酵素の安定性は急激に低下し、残存活性は50℃では60%、そして60℃以上になるとほぼ活性は消失した。

### 4. 米タンパク質への中性プロテアーゼの作用

#### 4 - 1 米タンパク質の調製

米の粉50gを0.1%NaOH 1,000mlに溶解し37℃で、攪拌しながら2時間放置後、高速遠心機で10,000rpm、5℃、10分間遠心分離した。沈殿物を除いた上清液を1M HClでpH4.5に調整し、生成したタンパク質の沈殿物を、遠心分離して捕集した。

次いで、沈殿物を85%アルコール溶液200mlに懸濁後、遠心分離し可溶性部分を除去した。さらに、沈殿物を100%アルコールで洗浄後、吸引デシケーター中で乾燥させ、1.35gの米タンバ

ク質を得た。

#### 4-2 米タンパク質への中性プロテアーゼの作用

米タンパク質100mgを、0.1M Atkins-Pantin緩衝液、pH8.05mlに溶解させ2%タンパク質溶液とした。この2%タンパク質溶液を、1mlずつエッペンドルフチューブに分注し酵素液0.1ml（全酵素活性：83U）を添加して、40℃で5, 10, 60分間反応させた後、5分間沸騰湯浴につけ酵素を失活させた。これを米タンパク質の中性プロテアーゼ処理物とし、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

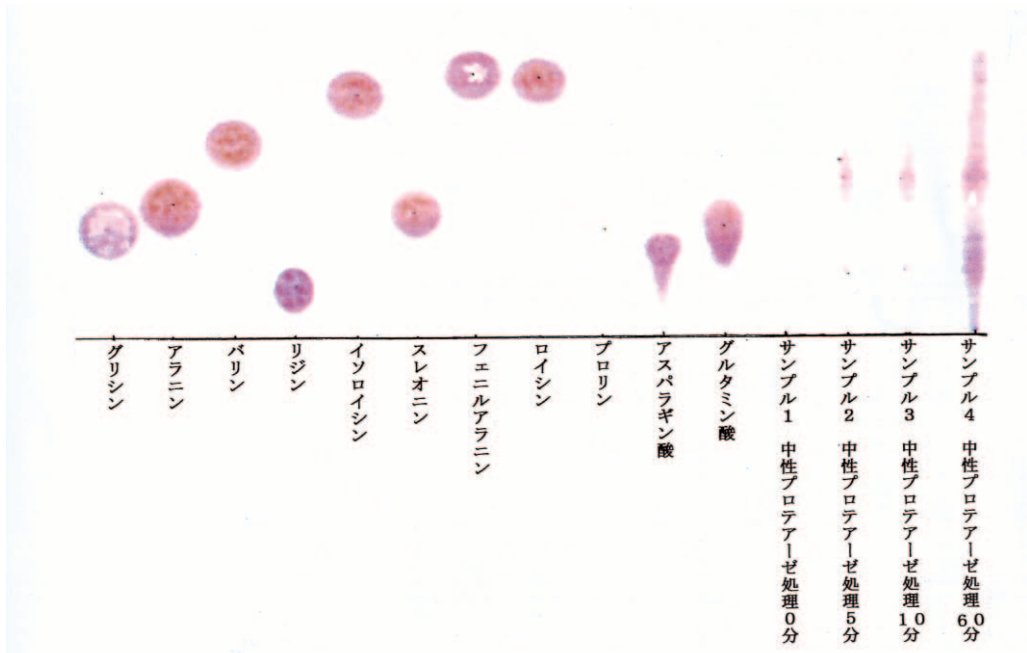


図13. 酵素処理米タンパク質の薄層クロマトグラフィー

図13に、中性プロテアーゼによる米タンパク質の分解で生成する遊離アミノ酸の経時的な出現の様子を示した。ここに掲げた写真では、5および10分間の短時間反応で認められる遊離アミノ酸のスポットは鮮明ではないが、反応初期には、フェニルアラニン、アラニン、バリンおよびリジンと思われるスポットが認められた。

また、60分間反応物ではさらに、イソロイシン、ロイシンが認められた。

今回、バリンとRf値の近いメチオニン、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ていないため、これらのアミノ酸も遊離していることが考えられる。

さらに、アラニン、スレオニンおよびグルタミン酸は同じようなRf値を示し、またグリシン、プロリン、アスパラギン酸も同様であり、これらのアミノ酸の判別は薄層クロマトグラフィーでは困難であった。したがって、遊離アミノ酸の判別をより明確にするために、アミノ酸分析装置による遊離アミノ酸の定量を行った。

## 4-4 アミノ酸分析装置による同定と定量

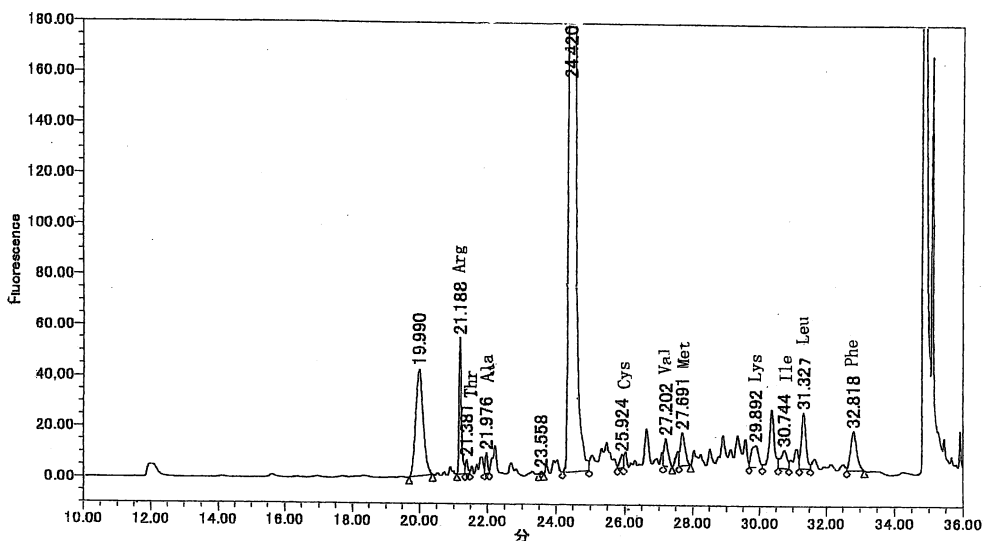


図14. 酵素処理米タンパク質のアミノ酸分析チャート

表4 米タンパク質酵素分解物の遊離アミノ酸

|          | 含量 (nmol/ml) |
|----------|--------------|
| アルギニン    | 17           |
| スレオニン    | 2            |
| アラニン     | 3            |
| システイン    | 8            |
| バリン      | 4            |
| メチオニン    | 6.5          |
| リジン      | 9.5          |
| イソロイシン   | 3            |
| ロイシン     | 8            |
| フェニルアラニン | 6            |

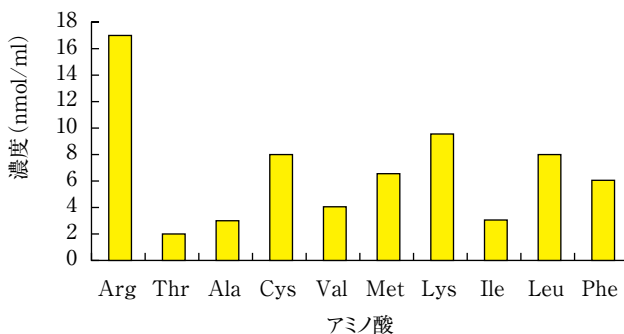


図15. 米タンパク質酵素分解物の遊離アミノ酸

図14, 図15および表4より, アミノ酸分析装置による中性プロテアーゼの米タンパク質処理物からの遊離アミノ酸の分析では, 10種類のアミノ酸がみられた。

薄層クロマトグラフィーでは, フェニルアラニン, ロイシン, イソロイシン, バリン, アラニン, リジン等の遊離がみられたが, アミノ酸分析装置による分析では, さらに, これらの遊離アミノ酸の他にアルギニン, システイン, メチオニンおよびスレオニンの存在が認められ, 薄層クロマトグラフィーでは確認できなかったアミノ酸が, 遊離していることがわかった。

しかしながら, グルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸は, 中性プロテアーゼによって遊離されないことが明らかとなった。

小泉ら<sup>3)</sup>は、特殊食酢類の一般成分・無機成分・遊離アミノ酸・有機酸について報告している。日立アミノ酸分析装置 (K L A - 5 型) によるアミノ酸分析の結果では、黒酢中に存在する遊離アミノ酸で含有の多いものには、アラニン56.1mg/dl, ロイシン37.9mg/dl, バリン33.2mg/dl, リジン31.9mg/dlを挙げている。

今回、本研究で中性プロテアーゼによる米タンパク質分解物中に多いアミノ酸には、アルギニン、リジン、システインおよびロイシンなどがみられ、その他にアラニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンおよびスレオニンがあり、種類については同じ種類のアミノ酸が多くみられた。

なお、アルギニンについては、アミノ酸分析装置による分析では含量が最も多くなったが、薄層クロマトグラフィーではアルギニンと思われるスポットは明確ではなかったことから、両分析における量的な対応が一致しておらず今後検討の余地がある。

以上の結果から黒酢麹菌の生産する中性プロテアーゼは、黒酢中に存在している遊離アミノ酸の生成に貢献していると考えられた。

#### IV. 要約

1. 小麦フスマ培地を黒酢麹菌のプロテアーゼ生産培地として使用した。黒酢麹菌は、培地中に酸性および中性プロテアーゼの2種類のプロテアーゼを生産することが認められ、本研究では黒酢麹菌の中性プロテアーゼについて検討した。
2. 中性プロテアーゼの生産は、フスマ培地の水分50%、4日間培養で最も高い酵素生産量を得た。
3. 粗酵素抽出液の硫酸分画では、60~90%飽和硫酸分画に全中性プロテアーゼ活性の約70%が集約された。また、酵素の比活性も硫酸飽和度が高くなるに従い上昇した。そこで、60~100%飽和硫酸分画を合一し、以下の精製実験に供した。本分画は粗酵素抽出液に比べ、比活性は5.2倍、収率は37.9%であった。
4. 種々のカラムクロマトグラフィーによる部分精製酵素の取得について検討した。陰イオン交換樹脂では、混在する酸性プロテアーゼの分離が難しかった。Sephadex<sup>TM</sup> G-100によるゲルろ過で酸性プロテアーゼの混在の少ない中性プロテアーゼ分画を分離できた。ここで得た中性プロテアーゼ分画を、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に供した。
5. 中性プロテアーゼの至適pHは、中性~pH11.0まで広いpH活性域を示した。このことから、本酵素はアルカリ性プロテアーゼであるとも言える。また、至適温度は、50℃付近であった。
6. pH安定性は、5℃、3時間の条件下においては、pH5.0からアルカリ域で安定であり、温度安定性は、40℃を超えると失活が始まり60℃ではほぼ活性は消失した。
7. 中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では、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン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。中性プロテアーゼによる米タンパク質分解物のアミノ酸分析チャートでは、10種類の遊離アミノ酸、すなわち、アルギニン、リジン、ロイシン、システ

イン、フェニルアラニン、メチオニン、バリン、イソロイシン、アラニン、スレオニンが認められた。

8. 中性プロテアーゼを米タンパク質に作用させて遊離されるアミノ酸の検討結果から、黒酢特有の旨味を呈する遊離アミノ酸の生成に黒酢麹菌の中性プロテアーゼが寄与しているものと考えられた。

## V. 謝辞

今回の研究を実施するにあたって、振り麹菌を分与していただいた鹿児島県始良郡福山町の坂元醸造株式会社の橋口和典主任研究員に心からお礼を申し上げます。

## VI. 引用文献

- 1) 蟹江松雄他：鹿児島の伝統製法食品，春苑堂書店，p.74(2001)
- 2) 蟹江松雄他：福山の黒酢，農山漁村文化協会，p.15(1989)
- 3) 小泉幸道他：日食工誌，34，592(1987)
- 4) 小泉幸道他：日食工誌，35，670(1988)
- 5) 松島欽一他：農化，36，193(1962)
- 6) 来間健次他：農化，42，319(1968)
- 7) 住江金之他：農化，31，73(1956)
- 8) 赤堀四郎編：酵素研究法，2，p.240(1958)
- 9) 満田久輝他：栄養と食糧，26，171(1962)
- 10) 福本寿一郎他：農化，31，331(1957)