



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	固定化キモシンの調製について : IV Paraffin Wax による固定化キモシンの調製について
Author(s)	進藤, 一典; SHINDO, Kazunori; 阪本, 弘 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(1), 46-49
Issue Date	1980-03-28
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11938">https://hdl.handle.net/2115/11938</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(1)_p46-49.pdf



# 固定化キモシンの調製について

## IV Paraffin Wax による固定化キモシンの調製について

進藤 一典・阪本 弘・有馬俊六郎

(北海道大学農学部付属酪農科学研究施設)

(昭和 54 年 11 月 30 日受理)

### Studies on Immobilized Chymosin Part IV

#### Preparation and Properties of Immobilized Chymosin using Paraffin Wax

Kazunori SHINDO, Hiroshi SAKAMOTO  
and Shunrokuro ARIMA

(Institute of Dairy Science, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060)

#### 緒 論

酵素の固定化には酵素の経済的な使用および酵素反応終了後、反応液からの酵素の分離が容易であること、すなわち酵素という異種タンパク質混入の問題解消、さらに固定化酵素をカラムなどに詰めて反応装置とし、連続的な酵素反応が可能となるなど多くの利点がある。また、固定化酵素により酵素反応機構の解明も考えられ酵素学上非常に興味深い。このため種々の固定化酵素が報告され、総説もまとめられている<sup>1)~3)</sup>。

固定化酵素の利用が各方面において考えられ、特に工業的に利用しようとする試みは多いが、実験室レベルで良い結果が認められた固定化法でも、調製法が煩雑であったり、保存性に問題があるなど種々の原因により具体的に応用できるものは必ずしも多くはない。

固定化酵素の乳製品製造への利用は、乳糖の分解(ラクターゼ)、牛乳中の殺菌用残留過酸化水素の除去(カタラーゼ)などが検討されている。一方、固定化プロテアーゼを利用してチーズを製造しようとする試みがペプシンなどの酵素を使用して研究されているが、いずれも固定化後の酵素の安定性に問題があり、未だ使用に適するとは言い難い。

著者らはレンネット不足の解消およびチーズ製造プロセスの連続化を考慮して固定化キモシンの調製法について検討してきたが、本報では安価である上に、固定化操作が極めて簡単な Paraffin Wax を使用して固定化キモシンを調製し、その酵素的性質について検討したので

報告する。

#### 実験材料および実験方法

##### 1. キモシンの調製<sup>4),5)</sup>

キモシンは DEAE-セルロース・クロマトグラフィーによる精製法を用いて、ハンセン社のレンネット・パウダーより調製した。

##### 2. K-カゼインの調製

北大付属農場ホルスタイン牛から得た脱脂乳より常法によって酸カゼインを得、K-カゼインは ZITTLE and CUSTER の方法<sup>6)</sup> で分離した。

##### 3. 固定化キモシンの調製

精製キモシンと Paraffin Wax (半井化学薬品製, M.P. 42~44°C) をプラスチック容器中で 46°C で混合した後、室温で固化させ、溶出液から酵素が検出できなくなるまでリン酸バッファーで洗浄した。

##### 4. キモシン活性の測定

0.1 M ケン酸ソーダバッファー pH 5.3 に溶解した 0.5% K-カゼイン溶液 5 ml を基質とし、30°C、20 分間反応させた。反応終了後、最終濃度 5% トリクロル酢酸 (TCA) で除タンパクし、ろ液の非タンパク態窒素 (NPN) を LOWRY らの方法 (660 nm)<sup>7)</sup> によって測定した。

##### 5. pH 安定性の測定

pH 保存溶液として次の 5 種類を用いた。

(1) 0.01 M 塩酸, (2) 0.01 M 酢酸バッファー pH 4.1, pH 5.4, (3) 0.01 M リン酸バッファー pH 6.2, pH 7.0

固定化キモシンを定められた保存溶液で洗浄の後、保

存溶液 5 ml を加え、4°C で 72 時間保存した。保存後、固定化キモシンを 0.1 M 酢酸バッファー pH 5.5 で洗浄し、活性を測定した。

6. 保存時間経過に対する安定性の測定

固定化キモシンを 0.01 M リン酸バッファー pH 6.2 および還元脱脂乳で洗浄し、4°C で一定時間 (0, 10, 30, 60, 120 分間) かくはん保存後に活性を測定した。

7. Curd Tension の測定

10 mM 塩化カルシウム溶液で 10% に調製した還元脱脂乳を基質に用いた。この還元脱脂乳を固定化キモシンで 4°C、10 分間ミキサーでかくはん処理した後、別の容器に移し、30°C で 60 分間保持した後、Curd Tension を測定した。

Curd Tension の測定には、動ひずみ測定器、6001-F 型および非接着型ストレインゲージ、UT-200-120 型 (新興通信工業製) を用い、直径 3 cm の八枚刃 (Curd Tension 用ナイフ) により切断速度 1.0 mm/sec で Curd 表面の切断応力 (g) を求めた。

結果および考察

1. 固定化酵素の活性に対する酵素濃度の影響

Paraffin Wax を使用して固定化する時、最も懸念されるのは、キモシンの加熱変性である。キモシンは 50°C 以下では比較的安定であることから<sup>8)</sup>、融点の低い Paraffin Wax を選び、46°C、3 分以内に固定化操作を終了することにした。

キモシン濃度の影響については、Fig. 1 にその結果を示した。本実験条件では、すべて 25% 以上の活性を示しており、アガロース、アミノエチルセルロースを用い

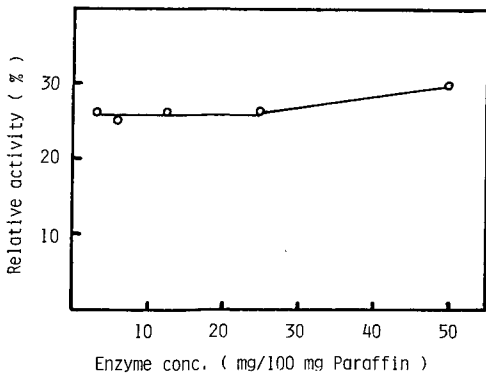


Fig. 1. Effect of enzyme concentration on relative activity of immobilized chymosin.

The activities of corresponding amounts of native chymosin were expressed as 100%.

た GREEN ら<sup>9)</sup>、有馬ら<sup>10)</sup> の報告よりも高い値を示していた。

なお Paraffin Wax の場合、キモシンの活性中心が Paraffin Wax 表面に突き出しているのではないかと考えられる。よって何らかの方法で基質に接する表面積を広くすれば、活性の向上が大いに期待できるものと思われる。本実験では、固定化キモシンの強度等の関係から、以後の実験には Paraffin Wax とキモシンの混合割合が 8:1 の固定化キモシンを使用した。

2. pH 安定性および安定性の経時的変化

固定化酵素の安定性は、実際に固定化酵素を工業的に利用する場合には最も重要な点である。保存性は利用面でとりわけ重要な要素であることから、pH 変化と時間経過による固定化酵素の活性消失について検討した。

1) pH 安定性

安定性に対する pH の影響を調べた結果を Fig. 2 に示した。Native なキモシンは pH 4.1 において不安定であったが、固定化キモシンは相対的に低い pH において高い安定性を示す傾向が認められた。一般的に Paraffin Wax の場合、広い pH 範囲において比較的高い安定性が認められた。

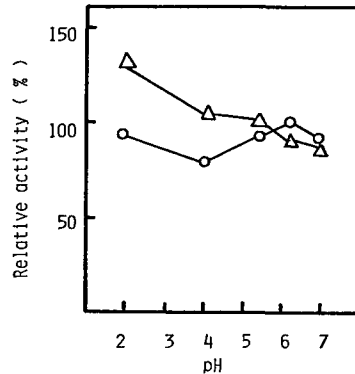


Fig. 2. Effect of pH on the storage stability of native chymosin and immobilized chymosin.

After storage for 3 days at 4°C, the enzyme activities were measured under standard conditions. (O), native and (Δ), immobilized chymosin.

2) 安定性の経時的変化

Table 1 には、酵素遊離の経時的変化を示した。バッファーのみで洗浄処理後に酵素遊離の経時的変化を調べたところ、保存時間 30 分までは漸次酵素の遊離が認められ、60 分以上では溶液の活性は一定値を示していた。そこで洗浄条件をさらに詳しく検討した結果、還元

**Table 1.** Time-course of leakage of chymosin from immobilized chymosin product at pH 6.2

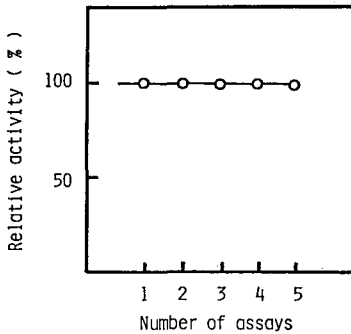
Time (min)	Chymosin activity (%)*	
	Solid material	Filtrate
0	100	0
10	100	0
30	100	0
60	100	0
120	100	0

\* % of activity of the solid material of the sample at zero time.

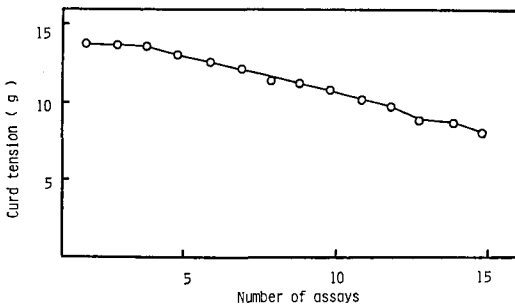
脱脂乳で洗浄後、バッファーで洗浄すると良いことが判明した。Table 1 には、この様にして調製した固定化キモシンを使用した場合の結果を示したが、酵素の遊離は認められず高い安定性を示していた。

### 3. 連続処理に対する安定性

固定化キモシンによる K-カゼイン連続分解を行った場合の結果を Fig. 3 に示した。図より明らかな様に、5 回くり返し使用しても活性の低下は認められなかつ



**Fig. 3.** Decay of immobilized chymosin upon exposure to K-casein.



**Fig. 4.** Decay of immobilized chymosin upon exposure to skim milk.

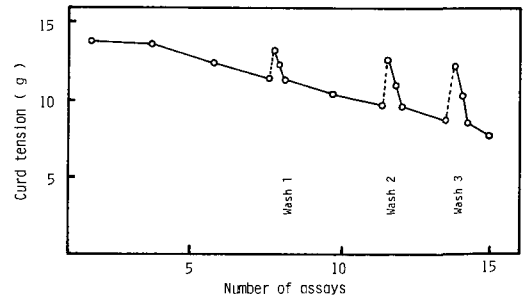
た。そこで、さらに還元脱脂乳を基質とし Curd Tension を測定することにより、連続使用に対する安定性を検討した。その結果は Fig. 4 に示した。連続使用により活性は徐々に低下したが、15 回連続使用で約 60% の残存活性を示していた。なお固定化キモシンからのキモシン遊離の有無を調べるために、Curd Tension 測定後 Curd の遠心分離 (10,000 rpm, 15 分間) により Whey を得、その凝乳活性を FOLTMANN の方法<sup>11)</sup> により測定した。その結果、本実験条件下では凝乳活性は認められなかった。この様に Paraffin Wax では高い安定性が認められ、Curd の連続製造への応用が期待される。

最近、SAVANGIKAR ら<sup>12)</sup> は Paraffin Wax によりペプシンを固定化し、leaf Protein の分解および牛乳の凝固にこの固定化ペプシンを使用しているが、結果は良好であったとしている。

### 4. 固定化キモシンの再生

脱脂乳を処理して活性の低下した固定化キモシンの再生を試みた。再生方法は次のとおりである。固定化キモシンを脱イオン水、希塩酸の順に洗浄し、さらに 0.02 M リン酸バッファー pH 5.8 で洗浄した。

Fig. 5 に示した様に、大部分の活性が希塩酸の洗浄で回復した。しかし再生後、再び脱脂乳を処理すると、活性は急激に低下した。この様な現象は、FERRIER ら<sup>13)</sup> および TAYLOR ら<sup>14)</sup> がペプシンで、WANG ら<sup>15)</sup> はカタラーゼで認めている。しかし、この現象の詳細については不明である。



**Fig. 5.** Regeneration of immobilized chymosin with dilute HCl.

再生方法については、今後さらに検討の必要があるものと思われる。

### 要 約

チーズ製造への応用を考慮して Paraffin Wax により固定化キモシンを調製し、次の様な結果を得た。

(1) pH 安定性を調べた結果、比較的広い pH 範囲に

において高い安定性が認められた。

(2) 連続処理に対する安定性を調べた結果、基質に K-カゼインを使用した場合は、5 回くりかえし使用しても活性の低下は認められず、さらに還元脱脂乳を基質とし Curd Tension を検討した結果、15 回連続使用した場合でも約 60% の残存活性が認められた。

(3) 再生方法を検討した結果、希塩酸洗浄により失った大部分の活性が回復した。しかし、再生後の固定化キモシンの活性は急激に低下した。

終りにのぞみ、終始ご指導をいただいた北海道大学農学部仁木良哉博士に感謝します。また、有益な助言をいただいた北海道大学農学部三河勝彦博士に感謝します。

#### 引用文献

1. 干畑一郎： 固定化酵素，p. 9-61，講談社，東京，1975
2. WEETALL, H. H.: Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides: Preparation and Characterization, p. 245-292, Marcel Dekker, New York, 1975
3. CHANG, T. M. S.: Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins Vol. 1, p. 257-279, Plenum Press, New York, 1977
4. 吉野梅夫, 中谷延二, 所 洋, 山内邦男: DEAE-セルロースクロマトグラフィーによるレンネットの精製, 農化, 40: 52-57. 1966
5. FOLTMANN, B.: Studies on rennin IV. Chromatographic fractionation of rennin, Acta Chem. Scand., 14: 2059-2061. 1960
6. ZITTLE, C. A. and CUSTER, J. H.: Purification and some of the properties of  $\alpha_s$ -casein and K-casein, *J. Dairy Sci.*, 46: 1183-1188. 1973
7. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275. 1951
8. 進藤一典, 有馬俊六郎: キモシンの精製とその性質について, 酪農科学・食品の研究, 28: A177-A182. 1979
9. GREEN, M. L. and CRUTCHFIELD, G.: Studies on the preparation of water-insoluble derivatives of rennin and chymotrypsin and their use in the hydrolysis of casein and the clotting of milk, *Biochem. J.*, 115: 183-190. 1969
10. 有馬俊六郎, 島崎敬一, 山住哲一, 金丸義親: 不溶性レンニンの調製について, 酪農科学の研究, 23: A 83-A 87. 1974
11. FOLTMANN, B.: "Methods in Enzymology," Vol. XIX, ed. by PERLMANN, G. E. and LORAND, L., p. 421-436, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1970
12. SAVANGIKAR, V. A. and JOSHI, R. N.: Immobilization of pepsin in active form in Paraffin Wax, *J. Food Sci.*, 43: 1616-1618. 1978
13. FERRIER, L. K., RICHARDSON, T., OLSON, N. F. and HICKS, C. L.: Characteristics of Insoluble pepsin used in a continuous milk-clotting system, *J. Dairy Sci.*, 55: 726-734. 1972
14. TAYLOR, M. J., CHERYAN, M., RICHARDSON, T. and OLSON, N. F.: Pepsin immobilized on Inorganic supports for the continuous coagulation of skim milk, *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 683-700. 1977
15. WANG, S. S., GALLILI, G. E., GILBERT, S. G. and LEEDER, J. G.: Inactivation and regeneration of immobilized catalase, *J. Food Sci.*, 39: 338-341. 1974

#### Summary

Immobilized chymosin was prepared by binding chymosin to paraffin wax. The greatest merit of this method was the simplicity of the immobilization technique.

The effect of chymosin concentration on immobilized chymosin activity was investigated. After storage for 3 days at pH 4.1-7.0 and 4°C, this preparation showed a tendency to have a relatively high stability at low pH. The enzyme reaction was carried out continuously with K-casein and skim milk as substrate. When the immobilized chymosin was used 15 times as much as on clotting skim milk, enzyme activity remained about 65%. The activity of immobilized chymosin, which had been previously deactivated with skim milk, has been regenerated by washing it with dilute HCl.

This study showed that enzymatic coagulation of milk by immobilized chymosin and its application to cheese making should be possible.