



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温菌 <i>Pseudomonas azotoformans</i> No. 400 の生産するプロテアーゼ : 乳質におよぼす低温菌の影響に関する研究 : 第V III報
Author(s)	三河, 勝彦; MIKAWA, Katsuhiko
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(1), 11-61
Issue Date	1988-03-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/12084">https://hdl.handle.net/2115/12084</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(1)_p11-61.pdf



# 低温菌 *Pseudomonas azotoformans* No. 400

## の生産するプロテアーゼ\*

——乳質におよぼす低温菌の影響に関する研究：第 VIII 報——

三 河 勝 彦

(北海道大学農学部畜産食品製造学教室)

(昭和 62 年 11 月 9 日受理)

### Production and Some Properties of the Protease from Psychrotrophic Bacterium, *Pseudomonas azotoformans* No. 400

(Studies on the effects of psychrotrophic bacteria on milk quality: part VIII)

Katsuhiko MIKAWA

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060 Japan)

#### 目 次

序 論	11
第 I 章 低温菌 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	
No. 400 によるプロテアーゼの生産	13
第 1 節 生産培地の検討	13
第 2 節 酵素生産に及ぼす酸素の影響	17
第 II 章 低温菌 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	
No. 400 が生産するプロテアーゼの諸性質	21
第 1 節 pH 変化および低温における安定性	21
第 2 節 反応の温度依存性ならびに加熱酵素の性質	25
第 3 節 高温における耐熱性ならびに中温不活化	29
第 4 節 酵素活性および安定性に対する金属塩の効果	33
第 5 節 加熱による酵素タンパク質の変化	37
第 6 節 分割カゼインに対する作用ならびにチーズにおよぼす影響	42
総 合 討 論	46
総 括	48
謝 辞	49

引用文献	49
英文摘要	58

#### 序 論

牛乳を冷蔵保存する際に最も注目されるもののひとつが低温菌である。冷蔵温度で発育して乳質に大きな変化を与えるこの低温菌に関する研究は、1887年にアムステルダム大学の教授 J. FORSTER<sup>56)</sup> が Über einige Eigenschaften leuchtender Bakterien (発光細菌の性質について) と題する論文を発表したのが最初であると言われている。牛乳に関連した研究は1900年代の初め頃から盛んに行われ、例えば PENNINGTON<sup>173)</sup> は非常に細菌数の少ない生乳を  $-1.67 \sim -0.55^{\circ}\text{C}$  で保存した場合、3週間後には同温度で発育する低温菌の数が 820 万/ml にも達するのに対し、中温菌は全く増加しないことを 1908 年に観察している。

1960 年頃までの文献に現れる Psychrophile という表現は、今日厳密に定義されているものとは異なり、低温でも発育可能であるという意味合いの強いものであった。現在、後者の意味で使用されている言葉は、MOSSEL によって示唆されたものを 1960 年に EDDY<sup>53)</sup> が採用するように提唱した Psychrotroph という用語である。Psychro の語源はギリシャ語に由来しており、全体では

\* 本報は北海道大学審査学位論文の一部である。

「低温で増殖する菌」の意味になる。我が国では当初「好冷菌」という呼び名が用いられていたが、現在では「低温菌」(低温細菌)という言葉が定着している。

いかなる範囲の菌を低温菌と呼ぶかについても多くの提案がなされてきたが、INGRAHAM and STOKES<sup>83,192</sup>は「Psychrophile とは 0°C, 1~2 週間で肉眼で見える大きさのコロニーを形成する微生物であり、それらは更に発育至適温度が 20°C 以下か 20°C 以上かによって Obligate と Facultative とに分けられる」という定義を行った。しかし EDDY は前述のように 5°C またはそれ以下で発育できる菌を Psychrotroph としており、しばらくは混乱の時代が続いたが、1975 年になって MORITA<sup>154</sup> は明確な定義を提案した。すなわち、「Psychrophile とは至適発育温度が 15°C 以下であって、最高は約 20°C, 最低は 0°C 以下の発育温度を持つ微生物を言い、この定義に合わない菌は Psychrotroph と称する」というものである。

これらの言わば学問的な定義に対し、乳質を論議するに当たって最も妥当であると考えられるものは、1968 年に行われた国際酪農連盟 (IDF) セミナーの結論として採用された勧告であろう<sup>165</sup>。すなわち「低温性微生物とは最適生育温度にかかわらず、7°C またはそれ以下の温度で増殖できる微生物である」という定義である。この IDF の定義には上述の MORITA の言う真の Psychrophile も含まれることになる。以上のような変遷を反映して、米国の乳製品検査における標準法である APHA の Standard Methods for the Examination of Dairy Products に記載されている低温菌検出のための培養条件は、5~7°C, 7~10 日間 (11 版/1960) から 7±1°C, 10 日間 (12 版/1967~15 版/1985) へと変化を示している<sup>7-11</sup>。

氷点下において発育を行う菌も知られている。すでに 1909 年には -20°C で発育するバクテリアが報告されている<sup>131</sup>。その後も例えば HAINES<sup>68</sup> は *Pseudomonas* や *Achromobacter* の多数が -3°C において 2~5 週間で目に見える発育をし、-5°C でも一部の菌は時間をかければ発育することを 1934 年に報告した。また KISER<sup>100</sup> は *Achromobacter* sp. が -4°C において最高 30.7 時間の世代時間で発育することを示した。さらに LARKIN and STOKES<sup>104</sup> は世代時間が -5 ないし -7°C で 8.5 時間の *Bacillus* を報告した。-10°C 以下で発育する微生物も少なからず認められているが<sup>97</sup>、INGRAHAM and STOKES<sup>83</sup> は、全体的に見ると細菌の発育の下限は約 -10°C であろうと述べている。

牛乳中の低温菌が問題とされる最大の理由の一つは、そのタンパク質や脂肪に対する分解力が大きいことである<sup>105,159,224</sup>。タンパク質や脂肪が低温菌の作用を受けると、牛乳・乳製品には様々なフレーバー変化や粘質化、カードの形成など多くの欠陥が生じてくる<sup>25,32,33,40,59,69,70,81,109,121,122,148,155,163,184,188,199,202,213,214,219,220,221,224</sup>。これらはプロテアーゼまたはリパーゼが原因で引き起こされる。UHT 乳の味の変化をプロテアーゼ活性とリパーゼ活性との関連で追究した MOTTAR<sup>156</sup> によれば、UHT 乳のフレーバー変化に対するプロテアーゼの影響はリパーゼのそれよりも大きい。市販乳を低温保存した場合、フレーバースコアとプロテアーゼ活性との間には直線関係が認められるとも言われる<sup>87</sup>。タンパク質分解の場合、風味の変化は苦味の形で現れることが多いけれども<sup>47,51,63,121,123</sup>、オフ・フレーバーという表現で総称されることもある。しかし、この言葉の意味する範囲には脂肪の変化によって生じるランシッド臭<sup>101,109,110</sup>なども含まれている。

低温菌のプロテアーゼは、乳タンパク質をカゼインとホエータンパク質とに分けた場合、主として前者に強く働くことが知られている。個々の菌について見た場合にはばらつきが大きい、カゼインのうちでは主として  $\beta$ -カゼインに作用するという報告が最も多く、続いて  $\alpha$ -カゼイングループ、 $\kappa$ -カゼイン、 $\gamma$ -カゼインの順である<sup>3,35,38,45,60,75,85,99,105,107,117,140,142,145,162,170,176,186,197,225</sup>。

これらの低温菌プロテアーゼやリパーゼは非常に熱に強いものが多いので、加熱後に長期保存するような製品、例えば UHT 処理したロングライフミルクなどでは、もしも原料乳中に低温菌が大量に増殖していた場合には、UHT の加熱に耐えて残存した酵素が製品の保存中にタンパク質や脂肪に作用して、風味の変化や凝固などを引き起こすことになる。このテーマに関する研究は数多く行われており、総説も多い<sup>1,14,21,24,31,35,46,57,105,108,132,140,194</sup>。

高温度領域において耐熱性を示す低温菌プロテアーゼが、中温域である 40~60°C で最低の活性を示す現象は、すでに 1957 年、MORIHARA<sup>150</sup> によって *Ps. myxogenes* のプロテアーゼについて報告されている。また 1975 年には KIELWEIN<sup>99</sup>、1976 年には BARACH ら<sup>18</sup>、MALIK<sup>116</sup>、三河<sup>132</sup> が同様なプロテアーゼについて発表している。中温域の加熱によるこの活性低下を BARACH ら<sup>18,19</sup> は Low Temperature Inactivation (LTI) と呼んでいる。その後も LTI に関する報告は多く、プロテアーゼばかりでなく、リパーゼについても行われている<sup>4</sup>。

15, 26, 27, 28, 44, 52, 55, 58, 112, 120, 140, 171, 189, 190, 217)。しかし、生乳から分離した多数の低温菌を用いて、そのプロテアーゼ活性およびリパーゼ活性に対する 55°C 加熱の影響を調査した GRIFFITHS ら<sup>60)</sup> は、菌の種類によって LTI に対する感受性が大きく異なることを示している。

以上のように低温菌に関する非常に多くの研究がこれまでに進められているが、普通の動物が自然状態では生活し難いような低い温度において、なぜ低温菌が繁殖するのか等、未解明の問題も多い。特に乳質との関連において言えば、UHT 処理乳製品で問題となっている低温菌由来プロテアーゼの中温域における失活、および高温における酵素の安定性などは注目的となっている。

本報は低温菌プロテアーゼの生産条件ならびに生産された酵素の耐熱性を中心とした諸性質について研究を行った結果である。本研究で使用したプロテアーゼは部分精製された標品であり、純粋なものではない。これは、牛乳・乳製品に与える低温菌の影響を検討するにあたり、いかなる形で酵素が作用するかを考えた場合、低温菌の生産する酵素が純粋に精製されたものとして働くわけではなく、菌のプロテアーゼ系として作用する点に留意する必要があることから、実用的な観点を主眼とする本研究においては、敢えて完全に精製しない部分精製標品の形で酵素を使用することとした。そのため、観察された実験結果の中には、相矛盾する現象もいくつか見受けられたが、今後、酵素を純粋に精製して詳しい検討を行えば、これらの矛盾点は解明されるものと思われる。

なお、序論の中では低温菌という言葉を用いたが、本報では以下においても同様の用法で使うこととする。

## 第1章 低温菌 *Pseudomonas azotoformans* No. 400 によるプロテアーゼの生産

### 第1節 生産培地の検討

低温菌が牛乳または食品の保存上問題となるのは、冷蔵温度であってもこれらの菌が発育し、その際に作り出されるプロテアーゼ、リパーゼ等の酵素が食品の諸成分に作用する結果、変敗が生じるためである。本章では、前報までの実験<sup>134-139, 141)</sup> で使用したプロテアーゼを生産する低温菌のうちから、最も高い酵素活性を示す菌の1株である *Pseudomonas azotoformans* No. 400 を選んで、その最適な生産条件を検討した。

*Pseudomonas* の作り出すプロテアーゼについては多数の研究があり、代表的な *Ps. fluorescens* を始め、各種 (species) の菌について培地や培養条件などに関する

報告が行われている<sup>23, 48, 77, 80, 89, 93, 94, 95, 114, 128, 129, 149, 151, 181, 182, 196)</sup>。本実験に使用した低温菌は、これら諸報告に見られる菌株とは異なる菌であり、このため、プロテアーゼの生産条件ならびに生産を多量に行わせる培地成分などが、他の菌株とは違うことが充分に予想されるので、本節においては、まず最大のプロテアーゼを生産させ得る培地について検討を行った。

### 実験方法

使用菌株は生乳から分離した No. 400 の低温菌で、前々報<sup>134)</sup> における分類では *Pseudomonas* の group I に含まれ、さらに駒形により、*Pseudomonas azotoformans* と同定された菌である<sup>78, 82)</sup>。本菌は普通寒天斜面で 25°C、24 時間培養の後、2~4°C に保存し、一定期間毎に植え継ぎを行った。実験に際しては、保管中の本菌を普通寒天斜面で 25°C、24 時間ずつ 3 回植え継ぎ、続いて脱脂乳で 1 回、さらにブイヨン (ポリペプトン '大五' 1%、肉エキス '極東' 1%、NaCl 0.1%、pH 7.0) で 1 回、それぞれ 25°C、24 時間培養して菌の活性化を行った。プロテアーゼの生産は、培養後のブイヨンを 0.85% の NaCl を含む希釈水<sup>7)</sup> で 10<sup>4</sup> 倍に希釈し、これを培地 100 ml 当たり 1 ml の割合で接種して 25°C で通常 4 日間培養することにより行った。

菌数の測定は APHA 法<sup>7)</sup> により、SPC Agar を用いて 25°C、48 時間培養して生菌数を測定した。

プロテアーゼ活性の測定は萩原の方法<sup>67)</sup> で行った。培養液から遠心分離 (0~4°C、9600 × g、30 分間) で菌体を除去した上澄みを粗酵素とし、その 1 ml を 30°C の基質溶液 5 ml に加えて 30 分間反応させた後、タンパク質沈澱試薬 5 ml で反応を停止させ、15 分後に濾過した。濾液 2 ml に 0.5 M-炭酸ナトリウム 5 ml および Folin 試薬の 3 倍希釈液 1 ml を加えて 30 分間呈色させ、660 nm における吸光度から対照値を差し引いて測定値とした。なお基質は pH 7.0 の 0.5% カゼイン溶液であるが、基質緩衝液としては (A) 25 mM リン酸塩または (B) 0.5 mM Ca を含む 50 mM トリス・マレイン酸塩のいずれかを用いた。

### 結果

*Pseudomonas azotoformans* No. 400 は生乳から分離された低温菌である故、まず天然培地のうちで牛乳に関連した脱脂乳とホエーとについて、本菌によるプロテアーゼの生産量を調べた。その結果、Table 1 に示したように、脱脂乳培地において 72 時間培養した場合の酵

**Table 1.** Protease production in skimmilk and in whey

	Relative protease activity <sup>a</sup> in %	
	72 h	96 h
Acid whey <sup>b</sup>	40.7	56.6
Rennet whey <sup>b</sup>	32.1	49.5
Skimmilk	100.0	156.2
10% Reconst. skimmilk	112.7	189.1

- a) Protease activities were determined using substrate (B); see text in detail.  
 b) Whey samples (pH 6.5) were prepared from the same fresh raw skimmilk.

素活性を100%とすると、pH 4.6でカゼインを沈澱除去した後 pH を6.5に修正した酸ホエー、およびレンネットで凝固させたカードを取り除いたレンネットホエーでは、いずれもプロテアーゼの生産量が低く、4日間培養しても50~57%の酵素活性しか得られなかった。これに対し、脱脂粉乳から調製した10%還元脱脂乳を培地とした場合は、生脱脂乳を滅菌した培地よりも高い値を示し、96時間ではレンネットホエーの4倍近いプロテアーゼを生産した。

還元脱脂乳培地で作り出された酵素の活性を100%とした場合に、他の様々な培地で培養の結果生成されたプロテアーゼ活性の割合を示したのが Table 2<sub>3</sub>である。ポリペプトンを加えた還元脱脂乳では、それを添加しない培地に比べて僅かに高い活性を示したが、粉末から還元したホエーは1/4程度のプロテアーゼを生産したに止どまった。ペプトンや酵母エキス等を含む通常の諸培地にラクトースを添加した培地からは、いずれも僅かな酵素活性しか得られず、特に PLY (1%ポリペプトン, 0.5%酵母エキス, 2%ラクトース) 培地においては全くプロテアーゼが認められなかった。これに対して、JENNESS and KOOPS による Salt solution<sup>88)</sup>を含む半合成培地では、還元脱脂乳の約1/2のプロテアーゼが生産された。

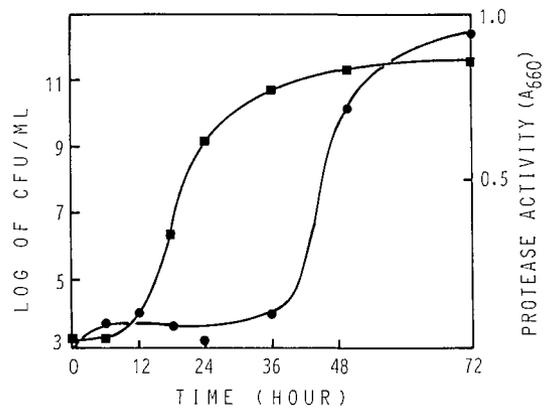
上述の半合成培地におけるプロテアーゼの生産と菌数の増加を経時的に観察した結果を Fig. 1 に示した。酵素の生産は菌の発育における対数増殖期のほぼ終わり頃から定常期の初期にかけて始まり、以後急速に活性が高まった。酵素生産の始まるこの時点の菌数は、対数値で表現すると10~11となる。

半合成培地におけるプロテアーゼの生産力を高めるた

**Table 2.** Protease production in different media

Media and additives	Relative protease activity <sup>a</sup> in %
10(w/v) % Reconst. skimmilk (A)	100.0
(A)+Polypeptone (Daigo, 0.5%)	105.9
10(w/v) % Reconst. whey	25.9
Rennet whey	14.1
Nut. broth <sup>b</sup> +lactose (2%)	2.7
Nut. broth+lactose+gelatin <sup>c</sup>	6.8
Heart inf. broth (Eiken)+lactose (2%)	2.4
PLY <sup>d</sup>	0.0
PLS <sup>e</sup>	1.2
Synthetic medium <sup>f</sup>	48.2

- a) Protease activities were determined using substrate (A); see text in detail.  
 b) 1% Polypeptone and 0.5% meat extr.  
 c) 0.5% Polypeptone, 0.5% meat extr., 2% lactose and 5% gelatin.  
 d) 1% Polypeptone, 2% lactose and 0.5% yeast extr.  
 e) 1% Polypeptone, 2% lactose and 0.5% Soytone (Difco).  
 f) 2% Yeast extr., 7.5% lactose, 0.03% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and salt solution.



**Fig. 1.** Growth and protease production of *Pseudomonas azotoformans* No. 400 in synthetic medium which contains Jenness & Koops' salt solution I and II (2% each), yeast extr. 1.88%, lactose 7.5%, and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.03% (pH 6.5). (●): Protease activity assayed with Hagiwara's method, and (■): bacterial count (CFU).

**Table 3.** Protease production in synthetic media

Media	Relative protease activity in %
Prototype of synth. medium <sup>a</sup>	100
# 1 <sup>b</sup>	27
# 2	187
# 2+7.5% lactose	162
# 3	55
# 3+7.5% lactose	96
# 4	106
# 4+7.5% lactose	21
# 5	0
# 5+7.5% lactose	0

a) 2% Yeast extr., 7.5% lactose, 0.03% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and salt soln.

b) # 1: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1%, Na<sub>3</sub>-citrate 0.3%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15%, MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.16% and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02%.

# 2: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15%, MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.16%, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05% and yeast extr. 2%.

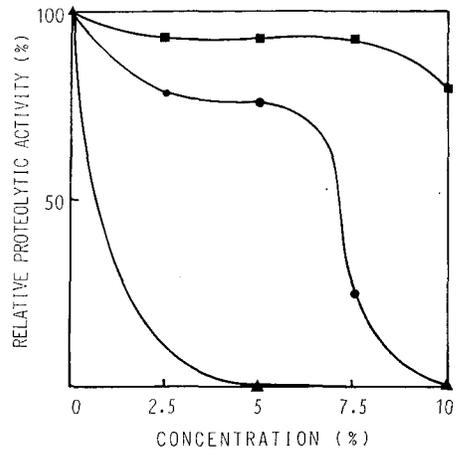
# 3: NH<sub>4</sub>Cl 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05% and yeast extr. 2%.

# 4: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KCl 0.05%, NaCl 0.1% and yeast extr. 2%.

# 5: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%, Na<sub>3</sub>-citrate 0.3%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, NaCl 0.3% and yeast extr. 2%.

めに、培地組成の変更を試みた。Table 2 で使用したものと同一半合成培地で生産される酵素活性を100%として、その培地成分を簡略化かつ変化させ、さらにこれらにラクトースを添加した諸培地におけるプロテアーゼ活性を Table 3 に示した。最高の酵素活性を示す # 2 の培地では、Salt solution を基礎にした培地の2倍に近い酵素の生産が認められたが、ラクトースを加えた培地では # 2 の培地以外は、いずれも元の培地に比べて低い値しか得られなかった。

プロテアーゼ生産における糖の抑制効果を確認するために、# 2 の培地にラクトース、スクロース、またはグルコースを添加して、その酵素生産を調べたのが Fig. 2 である。プロテアーゼ生産に対するラクトースの抑制効果はさほど大きくはなく、10% 量を添加しても2割程



**Fig. 2.** Effect of sugar on the protease production. The medium contains 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.15% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.16% MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.05% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 2% yeast extr. (■): Lactose, (●): sucrose, and (▲): glucose.

**Table 4.** Effect of metal ion on protease production in synthetic medium

Metal	Relative protease activity in %	
	0.1 mM	1 mM
Zn <sup>2+</sup>	118.3	114.0
Mn <sup>2+</sup>	105.3	27.9
Ba <sup>2+</sup>	66.7	106.6
Fe <sup>2+</sup>	9.4	34.3
Co <sup>2+</sup>	32.2	33.5
Ni <sup>2+</sup>	21.1	24.6
Sr <sup>2+</sup>	65.7	42.1
Sn <sup>2+</sup>	71.9	40.2
Basal medium <sup>a</sup>	100.0	

a) Consisted (g/l, pH 6.5) of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10; Na<sub>3</sub>-citrate, 3; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5; MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.6; and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2.

度の抑制を示したに過ぎなかったが、スクロースでは7.5%の添加により、活性は1/4にまで低下した。グルコースの抑制効果はさらに大きく、5%を加えただけでプロテアーゼの生産が全く行われなくなった。

Ca や Mg 以外の金属が酵素生産に与える影響を調べるために、Table 3 における合成培地の # 1 を基礎培地として実験を行った。この活性を100%とし、各種金属

塩を添加した場合のプロテアーゼ活性を相対的に表したのが Table 4 である。Fe, Co, Ni はいずれも酵素の生産を阻害し、これらの培地では基礎培地の 1/3 以下の酵素活性であった。Sr と Sn は同様に酵素の生産を抑制し、その濃度を 0.1 mM から 1 mM に増加させると抑制力も強まった。Ba は低濃度では酵素生産を阻害したが、1 mM では僅かに促進させた。Mn の場合は 0.1 mM で少々の促進を見せたにも拘わらず、1 mM では酵素の生産を大きく阻害した。これに対して Zn では、いずれの濃度においてもプロテアーゼ生産に対する促進効果を現した。

以上の結果から、脱脂乳を使用しない場合のプロテアーゼ生産用合成培地として、Table 5 に示す組成のものが本実験の範囲では最適であると結論した。

**Table 5.** Composition of the synthetic medium for protease production by *Pseudomonas azotiformans* No. 400

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5 g
MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.6 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g
Yeast extract	20.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	6.5
Sterilization	116°C for 20 min

## 考 察

通常細菌発育用培地がプロテアーゼ生産を十分に支持している場合もあるが、本実験結果のように脱脂乳がプロテアーゼの生産培地として優れていることは MC-KELLAR and CHOLETTE<sup>128,129</sup> も認めており、それは脱脂乳中に含まれる低分子の成分によるものであるという。同様な結果は DAHLE<sup>42</sup> によっても *Acromonas* について報告されている。脱脂乳の成分として含まれる乳タンパク質のカゼインは、プロテアーゼを生産させない<sup>182</sup> か、または生産を抑制する<sup>42</sup> といわれる。しかし、ROWE and GILMOUR はホエー単独添加の培地では *Ps. fluorescens* による酵素生産が本実験 (Table 1, 2) と同様に少ないけれども、最小培地にカゼインとホエーの両方を加えた場合には大量のプロテアーゼが生産され

るとも述べている<sup>182</sup>。一方、C 源や N 源は、菌が容易に利用し難いものの方がプロテアーゼの生産にとって好都合である場合<sup>168</sup> も見られ、これは結局、酵素生産のための最適な培地が個々の微生物の種類によって異なることを意味している。

天然培地と半合成培地とを比べると、脱脂乳培地以外では後者がプロテアーゼ生産力において勝っていた (Table 2)。酵素に関する実験においては、これを多少とも精製して使用する関係上、タンパク質性の夾雑物は培地中にできるだけ含まれないことが望ましい。したがって本菌のプロテアーゼ生産に最適な培地を探索するため、タンパク質を含まない半合成培地における C 源としての糖類の影響を調べた結果 (Table 2, 3, Fig. 2)、Catabolite repression あるいは Glucose effect<sup>23,64</sup> が観察された。

プロテアーゼの生産における Glucose effect は広く認められており<sup>43,84,126,128,168,183</sup>、またラクトースもグルコース程ではないにしろ、プロテアーゼ生産を抑制することが知られている<sup>41,93</sup>。グルコースによる酵素生産抑制が cAMP の減少<sup>64</sup> によるのか、あるいはよらない<sup>23</sup> のかは不明であるが、逆にグルコースを含む培地でプロテアーゼが良好に生産される場合もある<sup>89,149,151</sup> ので、本実験における見掛けの現象としての Catabolite repression すなわち糖のプロテアーゼ生産抑制効果が、いかなるメカニズムで生じるのかは本データのみでは決められない。

*Pseudomonas* を初めとする低温菌のプロテアーゼは、細菌発育相における対数増殖期の終わり頃から定常期の初期にかけて生産の行われる例が多い<sup>41,48,77,80,128,181,196</sup>。本菌の場合もこれらの報告と同様、Fig. 1 のような対数増殖期の終わりから定常期にかけて酵素生産が始まり、以後プロテアーゼ活性は急速に高まった。BOETHLING<sup>23</sup> は Catabolite regression が認められる場合には、菌体外酵素であっても定常期の初めにならないと分泌されないと報告しているが、これを考慮すれば、本実験における *Pseudomonas azotiformans* No. 400 の生産するプロテアーゼが菌体外酵素か、あるいは細胞内酵素を含む細胞結合性酵素であるかは、詳細な追加実験によらねば判定し難い<sup>98,174</sup>。

金属がプロテアーゼ分子の構成成分<sup>152,161,205</sup> である場合はもちろん、酵素生産において必須である場合も、あるいは生産を促進させるケース<sup>149,180</sup> においても、培地にその金属を添加する必要がある。本菌の場合、2 価の金属について実験を行った結果 (Table 4) では、Zn

が酵素生産の促進に効果的であることが判明した。この場合、培地に添加する金属がプロテアーゼの構成成分として必要なためであるのか、または酵素分子の Conformation の維持<sup>20)</sup> に役立っているのか、あるいは単に酵素の安定性にのみ関与<sup>22)</sup> しているのかは不明であるが、実験結果を基にして、本菌のプロテアーゼ生産培地においては、Table 5 に示すように、Zn を培地 1 ℓ 当たり 1 mM、すなわち硫酸亜鉛として 0.3 g を添加することとした。

## 要 約

低温菌 *Pseudomonas azotoformans* No. 400 のプロテアーゼ生産に適する培地について検討した。脱脂乳を培地として用いた場合にはホエーを培地とするよりも多量の酵素が生産された。脱脂乳以外の天然培地と合成培地との比較では、本実験の範囲内で後者が優れていた。合成培地に糖を添加するとプロテアーゼの生産は抑制され、その抑制力は強い方からグルコース、スクロース、ラクトースの順であった。

合成培地におけるプロテアーゼの生産は、細菌増殖の対数期の終わり頃から定常期の初期にかけて開始され、以後急速にプロテアーゼ活性が高まった。

酵素の生産を促進させる金属として Zn が優れていることが判明し、これを含む酵素生産用半合成培地を次に示す組成で確定した。1 ℓ 当たり硫酸アンモニウム 10 g、リン酸 1 ナトリウム・2 水塩 10 g、塩化カルシウム・2 水塩 1.5 g、塩化マグネシウム・4 水塩 1.6 g、硫酸カリウム 0.5 g、硫酸亜鉛・7 水塩 0.3 g、酵母エキス 20 g、pH 6.5。

### 第 2 節 酵素生産に及ぼす酸素の影響

好気性菌を増殖させて、その生産する物質を大量に得るためには、酸素の十分な供給が欠かせない。本実験に使用している低温菌は好気性の *Pseudomonas* であり、好氣的代謝の結果としてのプロテアーゼ生産において酸素の多少がこれに影響を与えることが予想される。このため本節では、主として脱脂乳を培地に用いて酵素生産に及ぼす酸素供給の影響を追究した。

## 実 験 方 法

酵素生産用培地としての脱脂乳は雪印乳業製の脱脂粉乳を蒸留水で 10 または 15% (W/V) の濃度に溶かし、pH は調節せずにそのまま用いた。半合成培地は前節で確定した組成のものを使用した。これらの滅菌はいずれも 116°C 20 分間で行った。

培養は静置、振盪、または通気培養法により、25°C の恒温槽中で行った。静置および振盪培養では、綿栓またはシリコンスポンジ栓を施した 100~200 ml 容三角フラスコまたは 500 ml 容坂口フラスコを用いた。培地は三角フラスコには 40~80 ml、坂口フラスコには 300 ml を入れて培養した。振盪は大洋科学工業製モノシン II 型 (振幅 28 mm) で行った。通気培養は 500 ml 容の二口丸底フラスコを使用し、一方の口にはシリコンスポンジ栓を施し、他方の口からは通気用のガラス製噴射管を、その先がほぼ底に達するように差し込んで、固定した。通気用の空気は 20×150 mm の綿詰カラムを通過させる方法で除菌した。振盪および通気培養では、消泡剤として滅菌したポリプロピレングリコール (和光製薬製, diol type, 平均分子量 2000) を培地 100 ml 当たり 1 白金耳量の割合で添加した。

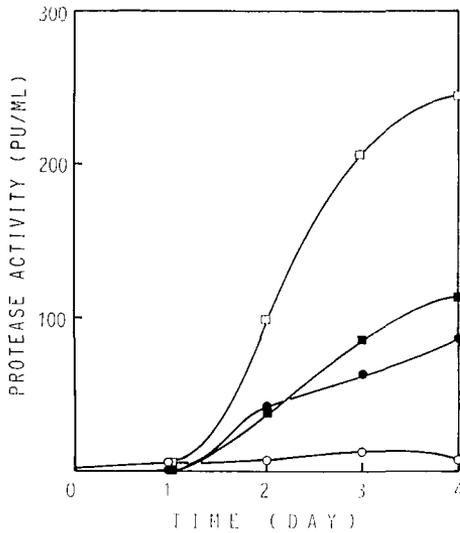
酵素活性は前節と同様に測定したが、基質緩衝液は 0.5 mM Ca が共存する pH 7.0 の 50 mM トリス・マレイン酸、または Ca を含まない pH 9.8 の 50 mM グリシン・カセイソーダのいずれかを使用した (後者の場合、酵素希釈用 pH 7.5 トリス・塩酸緩衝液に 5 mM の Ca を含む)。チロシンによる標準曲線を作成し、各条件下で 30°C 1 分間にチロシン 1 μg 相当量の呈色物質を生成する酵素活性を 1 酵素単位 (PU) と定義した。測定値は 2 試料の平均値で表した。

菌数の測定は前節と同様、SPC 培地を使用する APHA 法によったが、培養は 30°C で 40 時間行った。

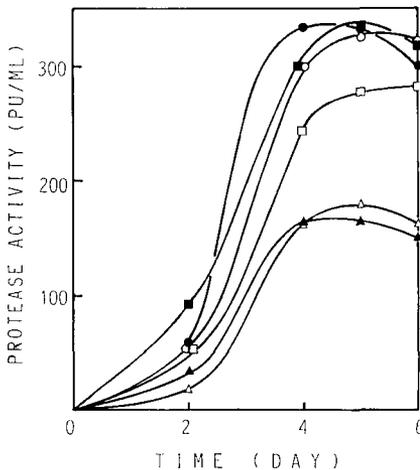
## 結 果

半合成培地 (酵母エキスを含む) および 10% 還元脱脂乳をそれぞれ 40 ml ずつ三角フラスコに分注し、その半数はストローク数 100 rpm の振盪培養を、半数は静置培養をいずれも 25°C で行った。その結果、本菌による酵素生産は Fig. 3 に示すように 24 時間までは大差を見せなかったが、最終的には脱脂乳培地における生産が半合成培地におけるよりも良好であった。予想のとおり、脱脂乳培地では酸素供給の多い振盪培養が静置培養の 2 倍に近いプロテアーゼを生産した。一方、半合成培地の場合は振盪によって酵素の生産が殆ど停止した。

10% 還元脱脂乳培地に対してポリペプトン (大五栄養化学)、酵母エキス (Oxoid)、および硫酸亜鉛を添加し、これを振盪培養した場合の酵素生産を調べた (Fig. 4)。酵母エキスを加えるとプロテアーゼ活性はいずれの培養時点においても約 1/2 に低下した。他の添加物では、0.5% ポリペプトンを加えた際に幾分低い活性を示した外は、



**Fig. 3.** Effect of shaking on the protease production. (○) and (●): Synthetic medium, (□) and (■): 10% reconst. skim milk. Samples of open symbols were shaken at 100 rpm, and of closed symbols were cultured statically.



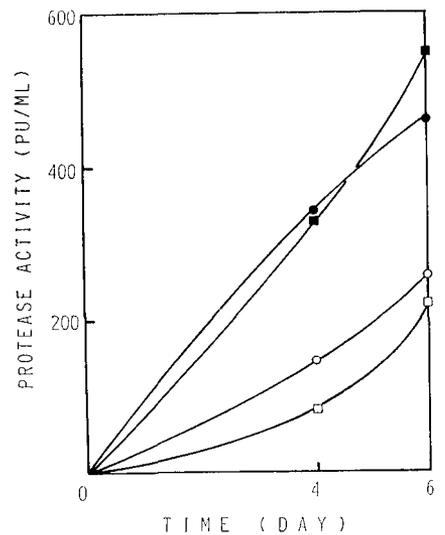
**Fig. 4.** Effect of additives on the protease production in shaking culture at 100 rpm which contains 40 ml of reconst. skim milk (○) supplemented with 1 mM ZnSO<sub>4</sub> (Z) (●), 0.5% yeast extr. (Y) (△), Y+Z (▲), 0.5% polypeptone (P) (□), and P+Z (■).

Znを単独で、またはこれにポリペプトンを同時に加えても、全体の培養時間を通してみると単独の場合と殆ど変わらず、結局、脱脂乳のみで培地としては充分であることが明らかとなった。なお、いずれの培養においても

総ての試料が4~5日間で酵素生産のピークを示した。

還元脱脂乳の濃度および培地の分注量の効果を確かめるために、10および15%濃度の還元脱脂乳を200 ml容三角フラスコに40または80 mlずつ分注して6日間まで培養した。培地の単位量当たりの酸素供給量の多い40 ml分注の試料が、80 mlのそれよりも2倍以上優れており、還元脱脂乳の濃度は大きな影響を与えなかった (Fig. 5)。

振盪培養を行って酸素の供給を増加させることにより、プロテアーゼ生産の高まることが明らかになったので、15%還元脱脂乳を用いて通気培養を行った。Table 6



**Fig. 5.** Effect of medium volume on the protease production in shaking culture at 100 rpm. Eighty ml (open symbols) and 40 ml (closed symbols) of 10% (○, ●) and 15% (□, ■) reconst. skim milk were shaken in a 200 ml Erlenmeyer flask.

**Table 6.** Effect of aeration on protease production in eight day culture

Aeration (ml/min)	Protease activity (PU/ml)	Final <sup>a</sup> volume (ml)	Total activity (PU) (Corrected <sup>b</sup> )
100	23.9	235	5617 (6477)
200	80.7	205	16544 (19449)
400	87.2	170	14828 (17963)
800	206.1	130	26793 (34213)

a) Initial volume was 300 ml.

b) Corrected by the volume of culture for analyses.

に示すように、通気量が増すほど単位体積当たりの酵素活性が上昇している。最初に 300 ml であった培地量は 8 日間の培養中に大量に蒸発し、分析用に抜き取った分も含めると通気量 800 ml/min の試料では液量が 130 ml にまで減少した。この分析用試料量について補正した総活性は、通気量 200 ml と 400 ml で少々の逆転が認められるものの、最大の通気量 800 ml/min の試料において最高の活性である 34,000 単位のプロテアーゼが得られた。

これまでの酵素活性は pH 7.0 の基質を用いて測定してきた。しかし次章で明らかにするように、本酵素の最適 pH は 9.6 であるので、以後の酵素活性の測定は pH 9.8 の基質 (反応時 pH 9.6) を用いて行うこととした。

供給酸素量がプロテアーゼ生産に及ぼす影響をさらに確かめるため、10% 還元脱脂乳培地を 500 ml 容坂口フラスコに 300 ml 宛分注し、その振盪速度を変化させて 8 日間まで培養した。その結果 Fig. 6 に示すように、140 rpm の速度で振盪した場合に最大の活性が得られた。この時点における活性は 100 rpm の活性の 5 倍以上の値であった。振盪数をさらに 160 rpm まで増加させた場合には、酵素活性が 140 rpm におけるよりも減少した。

これらの各振盪速度で培養する際の菌数の変化を Fig. 7 に示した。140 と 160 rpm においては生菌数 (CFU) が約 4 日間で最高に達して対数値で 10 を越え、それ以後は減少した。これに対して、100 rpm の場合はおよそ 6 日間で定常期になり、CFU は対数値で 9 のオーダーで

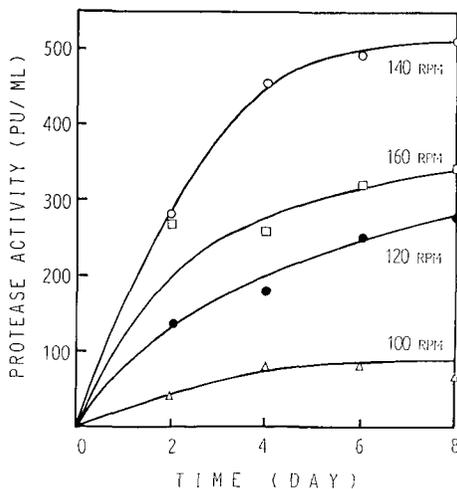


Fig. 6. Effect of shaking speed on the protease production in 10% reconst. skim milk culture.

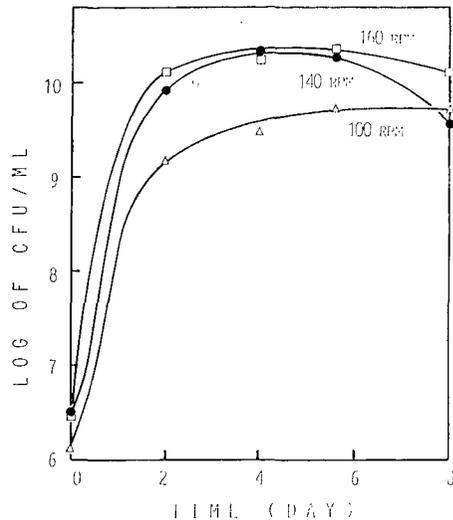


Fig. 7. Effect of shaking speed on the growth of *Ps. azotoformans* No. 400 in 10% reconst. skim milk.

あった。全試料とも 2 日間で対数増殖期の終わりに達したが、酵素活性はこの時点以後も増え続け、本実験の最終時点では 5 割以上の増加を見せた (Fig. 6)。160 rpm で振盪した試料の CFU は、最高のプロテアーゼ生産が行われた 140 rpm の場合よりも高い値を示した。

## 考 察

好気性細菌の酵素生産に酸素の供給が欠かせないことは良く知られており、MORIHARA は *Pseudomonas* のプロテアーゼの生産を aeration が促進させると報告<sup>14)</sup>、<sup>15)</sup> している。天然培地としての還元脱脂乳を用いて、酸素の供給を促進させるために振盪培養を行った本実験の結果 (Fig. 3) は上述の定説を支持している。しかし、酵母エキスを含む半合成培地においては、全く逆に振盪がプロテアーゼの生産を強く抑制した。さらに、同じ脱脂乳培地を使用した場合でも、これに酵母エキスを添加して振盪すると、ポリペプトンが殆ど影響を与えないのとは対照的に、酵素生産が約 1/2 に減少した (Fig. 4)。酵母エキスは水溶性ビタミンを初め各種の発育促進物質を含んでおり、このことは、プロテアーゼの生産が酸素濃度のみに影響されるのではなく、発育速度とエネルギー代謝に関する両方のファクターによって調節されている<sup>22)</sup> ことを物語る。DAINTY ら<sup>43)</sup> は *Chromobacterium* のプロテアーゼ生産には酸素以外にも様々な要因が影響していることを報告している。

以上のように、脱脂乳培地においては酸素を供給する

ことによって酵素生産が促進されることが明らかになり、さらにフラスコ容量対培地量の比の大きいものが、単位培地量当たりの生産酵素量の大きいことが判明したので (Fig. 5), 供給酸素量を増やすために通気培養を行った。通気量は振盪培養における供給量を最低とし、それ以上の通気が行われるように設定した。すなわち、振盪フラスコにおいて綿栓を通過する酸素量を最大酸素移動速度<sup>74)</sup>として求め、これを空気量に換算すると、同培養において最高の活性が得られた試料では、培地1ml当たり0.28 ml/minの空気が綿栓を通過したことになる。この数字を基に最低通気量を300 mlの培地当たり100 ml/minと定め、最高800 ml/minまでの通気を行ってプロテアーゼの生産量を求めた (Table 6)。

その結果、通気量の増加に伴って酵素の生産量は増大したものの、予想に反して培地単位体積当たりの酵素活性は増えず、最高の通気量800 ml/minの試料でさえ、振盪培養における最低酸素供給量の試料と同じ程度 (Fig. 5の6日間培養)の酵素活性しか得られなかった。この原因としては、酸素の供給が噴射管を用いた空気の吹き込みのみによっており、培地の搅拌を行わなかったこと、吹き込んだ空気が培地に十分に溶け込まなかった恐れのあること、培地の飛沫がシリコン栓に付着して十分な排気が行われなかった可能性があること、あるいは空気吹き込みによる培地温度の僅かな低下(約0.3°C)等が考えられる。しかし、本実験のみでは、これらの内のいずれが主因であるかについては結論づけられなかった。

次章に示すように本酵素の至適pHは9.6であるので、このpHで反応を行わせて10%還元脱脂乳における振盪速度の影響を観察した結果、140 rpmの活性が最高であり、それ以上の振盪速度では酵素の生産量が減少した (Fig. 6)。培養6日目におけるプロテアーゼ活性を振盪数に対してプロットすると、Fig. 8に示すようにこれが明瞭になる。

本実験条件下における160 rpmの振盪では、坂口フラスコ内の培地が往復運動を為しきれずに円運動を起こし、効果的な酸素の溶け込みが行われない様子が窺われた。したがって140 rpmに比べ160 rpmで酵素の生産が減少したのは、これが原因であると推定できる。もし、より効果的な酸素の供給が行われれば、さらに多量のプロテアーゼが生産されるものと考えられる。しかしながら、もう一つの考え方、すなわち最適な酸素濃度が140 rpmで与えられたとする見解も可能である。

微生物の酵素は、酸素が多すぎた場合にその生産の抑

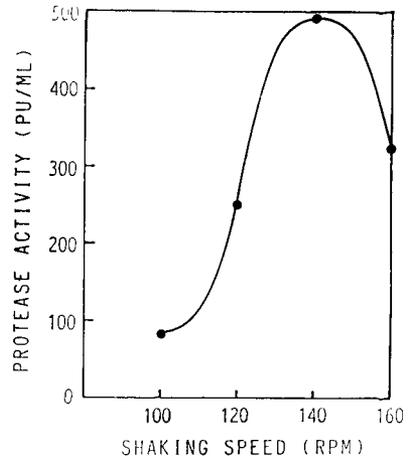


Fig. 8. Effect of shaking speed on the protease production at 6-day culture in 10% reconst. skimmilk.

制されることが知られており<sup>158)</sup>、また細菌の生育が良好になり過ぎて酵素生産が抑制されるとも言われている<sup>167)</sup>。Fig. 7に示したデータ、すなわち140 rpmよりも160 rpmにおける生菌数 (CFU)が多いという結果は、このことを窺わせるものである。一方、菌数が十分に多い時には、その菌の利用し得る養分や酸素が最大の速度で代謝されるために培地の酸素分圧が急速に低下し、これに伴ってプロテアーゼが生産されるという報告<sup>181)</sup>も *Pseudomonas* について行われている。以上の諸点を考慮するならば、160 rpmにおける酵素活性の低下が上述のいずれか一方の原因に基づくものであると結論することは難しい。あるいはこの両者が重なり合っている原因と推定するのが妥当であるかも知れない。

振盪培養の場合においても、約2日間でCFUのグラフは対数増殖期の終わりに達し、ほぼその時点から酵素生産が始まるという結果 (Fig. 7)は、このプロテアーゼが菌体外酵素である可能性を示唆している。けれども前節でも論議したように、BOETHLING<sup>23)</sup>によれば Catabolite repression が認められる場合には直ちに菌体外であるとの断定はできない。しかし、還元脱脂乳に含まれる糖は乳糖であって、前節の Fig. 2で明らかのように Catabolite repression は極く僅かであることから、本プロテアーゼが菌体外酵素である確率は高いものと思われる。

## 要 約

*Pseudomonas azotoformans* No. 400 を還元脱脂乳

培地で培養し、プロテアーゼ生産に及ぼす供給酸素の影響を調べた。10%還元脱脂乳を振盪培養すると、酵素生産が約2倍に増加した。これに対し、前節で確定した半合成培地では、振盪によって逆に酵素の生産が減少した。還元脱脂乳に対し、酵母エキス、ポリペプトン、および硫酸亜鉛を単独または組み合わせて添加し、これを振盪培養した結果、酵母エキスを加えた試料で約1/2に酵素活性が低下した以外は、脱脂乳のみの場合と大差が認められなかった。10および15%の還元脱脂乳間の差も殆どなかったが、培地量を半分に減らして振盪した結果、生産される単位体積当たりの酵素量は2倍以上となった。

振盪の際に綿栓を通過して培地に溶け込む酸素量を計算して、それ以上の空気を吹き込む通気培養を試みた結果、通気量の増加に伴って酵素の生産量は増加したが、最大の通気量である800 ml/minを通気しても、培地単位体積当たりのプロテアーゼ活性は振盪培養に及ばなかった。

振盪培養において振盪数を増やした場合、140 rpmまでは酵素の生産が増大し、160 rpmでは前者よりも低い値を示したが、この原因を培地の円運動による酸素供給量の減少と菌の過発育の両方に基づくものと推察した。

以上の結果ならびに菌数の増加に対する酵素生産量の関係から、本菌の生産するプロテアーゼは菌体外酵素である確率が非常に高いものであると推定した。

## 第II章 低温菌 *Pseudomonas azotoformans* No. 400 が生産するプロテアーゼの諸性質

### 第1節 pH変化および低温における安定性

前章においては *Pseudomonas azotoformans* No. 400 が脱脂乳培地で大量にプロテアーゼを生産することを確認した。しかし、繰り返して実験を行う場合には半合成培地の方が成分的に再現性が得られやすいので、以後の酵素の調製は前章第1節で確定した半合成培地を用いることとした。

プロテアーゼの諸性質を追究するには、夾雑物の少ない標品を用い、酵素活性はその最大を示すpHで測定するのが望ましいが、前章までの実験では本研究の実用的意図、すなわち牛乳中における低温菌プロテアーゼの作用を追究する目的から、培養上澄を粗酵素として牛乳のそれに近いpH 7.0で酵素活性を測定した。けれども以降の実験では、上述の実用的意義においてプロテアーゼの諸性質を明らかにする必要上、用いる酵素は部分精製に留めることとした。

本節では *Ps. azotoformans* No. 400 の半合成培地における培養上澄から部分精製した酵素標品を用いてその至適pHを求め、続いて各種pHにおける安定性を調べ、さらには基本的性質として、酵素の低温における安定性についての確認を行った。

### 実験方法

酵素の生産は前章第1節で確定した半合成培地に *Ps. azotoformans* No. 400 を接種して25°Cで5日間静置培養することにより行った。培養の終わった培地は9600×g、4°Cで30分間の遠心分離で菌体を除去した。

この粗酵素液に硫酸アンモニウム(試薬特級)を56%飽和(356 g/l)になるように加えて溶かし、1N-カセイソーダでpHを7.0に調節して4°Cで1夜放置した。その後3800×gで20分間の遠心分離を行って酵素タンパク質を沈澱させ、このペレットを透析用緩衝液(5 mMの塩化カルシウムを含む10 mM トリス・塩酸、pH 7.5)に溶解させた後、同液に対して4°Cで2日間の透析を行った。透析後もなお不溶の沈澱は、4°Cで3000×g、10分間の遠心分離を行って除去した。

上記の硫酸アンモニウムは0°Cまで冷やし、これを十分に攪拌しながら、0°C以下に冷却したアセトン(試薬特級)を60%濃度になるまで徐々に加え、約10分間経過後に4°Cで3800×g、10分間の遠心分離を行った。沈澱を透析用緩衝液に溶解させて4°Cで同液に対して2日間の透析の後、不溶の沈澱を8000×g、20分間の遠心分離で取り除き、この上澄液を部分精製酵素液とした。これを試験管に分注した後-25°Cで凍結保存し、以下の一連の実験には解凍して供試した。

酵素液中のタンパク質の定量は「妨害物質存在下でのLOWRY法」(BENSADOOUN and WEINSTEINの改良法<sup>193)</sup>)で行い、その標準曲線は牛血清アルブミン(Sigma社製)を用いて作成した。

酵素活性に及ぼすpHの影響は次の方法で調べた。2%カゼイン溶液のpHを1N-塩酸または同カセイソーダで所定の値に合わせた後、蒸留水を加えてカゼイン濃度を1%とし、これに各種pHの50 mM緩衝液(2 mMの塩化カルシウムを含む)を等量加えて基質溶液とした。実験は各pHの基質溶液の5 mlと酵素液(解凍した部分精製酵素を、5 mMのCaを含む10 mM トリス・マレイン酸緩衝液で10倍に希釈したもの)1 mlとを混合し、30°Cで10分間の反応による酵素活性を測定した。なお、活性測定に用いたものとは別に、同様の反応混合液につきpHを測定し、この実測pHに対して活性の値

をプロットした。

各種 pH (5.5~10.5) における酵素の安定性に関する実験は次のように行った。希釈液としてそれぞれ 5 mM の Ca を含む各 pH の 20 mM 緩衝液を調製し、活性測定時の pH が 9.6 付近になるようにするため、基質溶液としては pH 9.6 と 9.8 の 50 mM グリシン緩衝液を含む 0.5% カゼイン溶液を用い、希釈緩衝液が pH 5.5~8.0 までは前者、8.5~10.5 については後者の基質を使用した。これにより反応時の実測 pH は 9.50~9.67 の範囲となった。活性は部分精製酵素を各 pH の希釈用緩衝液で 10 倍に希釈した後、40°C 20 分間または 4°C 48 時間保持したものを 1 ml に基質 5 ml を添加し、30°C で 10 分間反応させて測定した。なお、プロットは酵素を各 pH の希釈緩衝液で希釈したものの実測 pH に対して行った。

低温保存実験では分注した酵素を -25°C で保存し、所定の期間毎に 1 個宛取り出してその酵素活性を測定した。凍結・融解を繰り返す実験においては保存後の酵素活性測定を同一日に行うため、所定の期間を逆算して保存を開始した。タンパク質濃度を 500 µg/ml とし、-25°C で凍結して 24 時間後に水道水中で解凍を行い、4°C に 1 時間放置した後、再び凍結する操作を繰り返した。加熱処理の場合は、解凍 1 時間後の酵素を前述の透析用緩衝液で 20 倍に希釈し、これを 5 ml 宛分注して試料とし、30°C においては Come up time (所定温度に到達するまでの時間)、60 および 80°C ではそれぞれ Come up time+10 分間保持した。

酵素活性は特記しない限り、透析用緩衝液で適当な濃度に希釈した試料につき、Ca を含まない基質を用いて pH 9.6 (反応時)、10 分間の反応条件で測定し、標準曲線は同条件でチロシンを用いて作成した。

## 結 果

半合成培地の培養上澄を粗酵素とし、硫酸およびアセトンで部分精製を行った結果を Table 7 に示した。全 10 回の実験のうち、成績の良好であった前半 5 回についてみると、粗酵素液の比活性を 1.0 とした純度指数は 3.23、また回収率も 47.3% と高かったため、以後の実験はこの方法によって部分精製した酵素を原則として使用することとした。

本プロテアーゼ活性の pH 依存性を、4 種類の緩衝液を用いて測定した結果は Fig. 9 に示した。最大の活性は pH 9~10 の間にあり、至適 pH はおよそ 9.6 であることが判明した。pH 10 を越えると活性は急激に減少した。

次に 5.5~10.5 の各 pH で 4°C 48 時間および 40°C 20 分間、それぞれ保持した場合の酵素の安定性を確かめた結果 (Fig. 10)、4°C の場合は pH 8.3 付近で、また 40°C の場合は pH 7.5 付近で酵素の安定性が最大となり、それ以上の高 pH になると安定性は急激に低下した。pH 9.6 すなわち酵素活性の発現に至適な pH で 40°C 20 分間保持すると、活性が殆どゼロ近くまで低下するのに対し、4°C 48 時間の処理では pH 9.2 付近で活性が最低となったが、それでもなお最高の値を 100% として 74% の活性が残存した。低 pH 側については 5.5 までの実験であるが、この範囲では pH の低下に伴い僅かに安定性が減少したに止まった。

調製した部分精製酵素を -25°C で 2 週間凍結保存した後、解凍して分注し、再び同温度で凍結保存した。この再凍結の日を保存 0 日として、230 日まで凍結保存し、pH 7.0 の基質で活性を測定した結果、Table 8 に示す

Table 7. Partial purification of the protease of *Pseudomonas azotoformans* No. 400 cultured in synthetic medium at 25°C for 5 days

Exp.	Treatment	Volume (ml)	Total activity (PU)	Yield (%)	Specific activity (PU/mg protein)	Purity index
I <sup>a</sup>	Culture sup.	14590	908957	100.0	141.9	1.00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.56 satn.	975	498420	54.8	176.9	1.25
	Acetone 60%	875	430990	47.4	458.6	3.23
II <sup>a</sup>	Culture sup.	14745	456770	100.0	43.6	1.00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.56 satn.	1005	224768	49.2	60.5	1.39
	Acetone 60%	885	176725	38.7	119.5	2.74

a) Five batches of precipitates obtained from 0.56 saturation of ammonium sulfate were pooled for further purification.

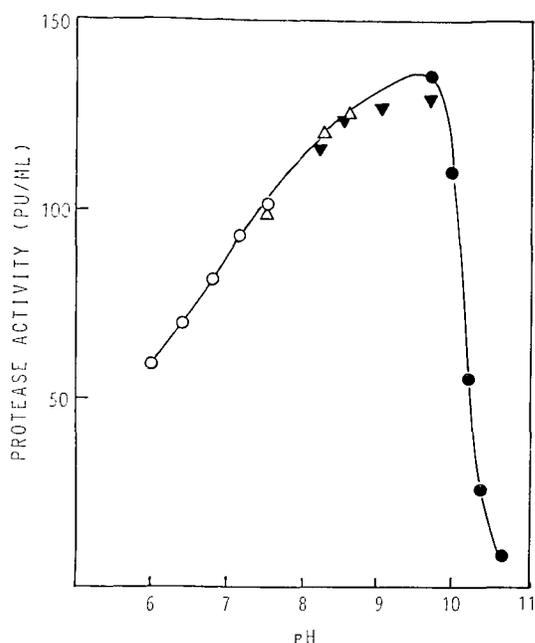


Fig. 9. Effect of pH on the protease activity assayed at 30°C for 10 min. Buffer solutions: Tris-maleate (○), Tris-HCl (△), glycine-NaOH (▼), and bicarbonate-NaOH (●).

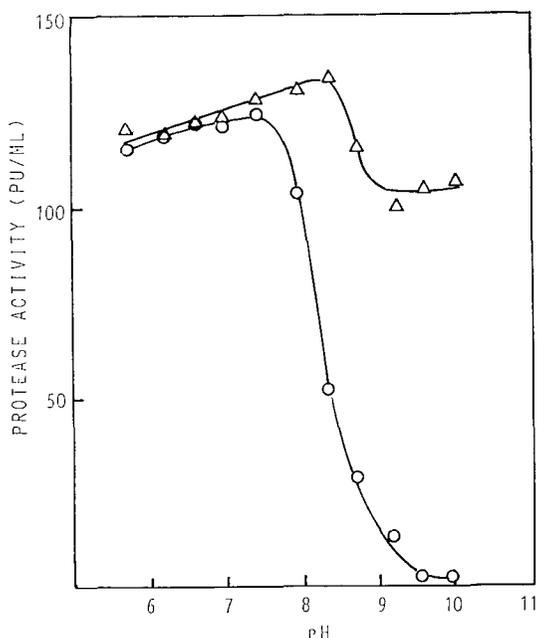


Fig. 10. Stability of the protease at different pH after 20 min at 40°C (○) and after 48 h at 4°C (△). Buffer solutions: Tris-maleate for pH 5.5-8.5, Tris-HCl for 8.0-9.0, and glycine-NaOH for 9.0-10.0. Assay condition was 30°C for 10 min at pH 9.6.

Table 8. Effect of frozen storage at -25°C on the protease activity

Storage time in day	Relative protease activity <sup>a</sup> in %
0	100.0
4	59.9
13	65.5
28	59.9
67	62.3
84	66.1
124	62.3
130	41.2
145	34.9
230	31.2

a) Protease activities were determined at pH 7.0.

ように最初の段階で60%程度にまで活性が低下した以後は減少が緩慢となり、230日後もなお31%の酵素活性が残存した。

活性が最初に急低下する原因として予想した凍結・融

解の影響を調べるため、凍結・融解を7回まで繰り返した結果、2回目以降においては大きな活性の低下は生じなかった (Fig. 11)。しかし1回目の解凍試料の酵素活性は凍結前のものに比べて明らかに減少が認められた。酵素を加熱の後に凍結・融解を行った場合、30°CでCome up timeの加熱では、未加熱試料にはほぼ等しい結果が得られたが、60または80°Cで各10分間の加熱では、7回の凍結・融解後も活性はもとのままに保たれた。

### 考 察

細菌、特に *Pseudomonas* が生産するプロテアーゼは良く知られており、詳しく研究されているものも多い<sup>35, 57, 194</sup>。これらの酵素の至適 pH を見ると、中性付近に存在するものが比較的多いけれども<sup>5, 29, 62, 196</sup>、アルカリ側にある場合もいくつか見受けられる<sup>111, 118, 178</sup>。本実験における酵素の至適 pH はおよそ 9.6 であることが明らかになったが、しかし Fig. 9 に見られるように至適 pH を越えると急激に活性の発現が弱くなっていることは、高 pH において酵素の安定性が急速に減少するためであ

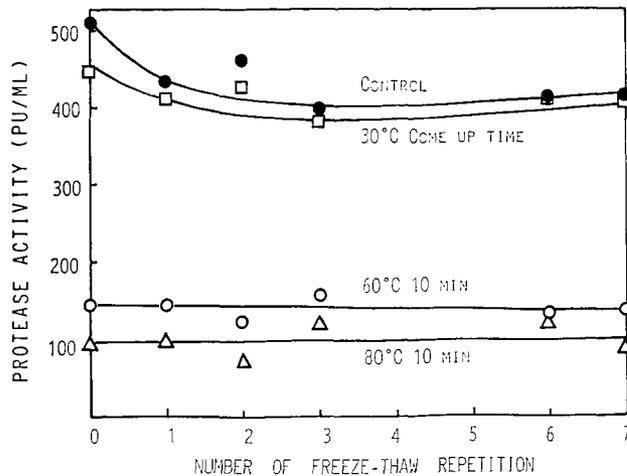


Fig. 11. Effect of freeze-thaw repetition during short period of storage on the activity of the protease heated at different temperatures. The enzyme was frozen at  $-25^{\circ}\text{C}$ , and thawed on the next day in running tap water followed by the storage for an hour at  $4^{\circ}\text{C}$ . These treatments were repeated once a day. See text for assay condition.

ると推察される。したがって反応時間を本実験の10分間からさらに短縮し、反応初速度のみを測定するならば、至適pHは9.6よりも上昇することが予想される。

前章までの酵素活性測定に用いられてきたpH 7.0, 30分間という反応条件においては、これをFig. 9に照らし合わせてみると、反応時におけるpHの僅かなずれが酵素活性に著しく影響することが予想され、実験誤差が大きくなる可能性があるため、本節以降の実験においては特定の場合を除き、至適pHである9.6で10分間反応させる方法をとることとした。

酵素のpH安定性はアルカリ側の場合、 $4^{\circ}\text{C}$ ではpH 8.3まで、 $40^{\circ}\text{C}$ では7.5まで安定であったが、それ以上のpHでは特に高温で急速に活性が低下した。したがって酵素希釈用緩衝液のpHはこの実験結果に基づいて7.5と決定した。低pHにおける安定性については、本実験では5.5までは僅かに活性が低下するものの、いずれの温度においても比較的安定であった。図表には示さなかったが、別に行った $40^{\circ}\text{C}$  20分間処理の実験(pH 7.0で活性を測定)結果によれば、pH 5.0ではなお活性が高く中性付近とあまり変わらないが、それ以下では活性が急に低下し、pH 4.0では活性が殆どゼロとなった。したがって $40^{\circ}\text{C}$  20分間処理に対する安定領域は少なくともpH 5.0~7.0の範囲にあることは確実であると言えよう。

低温菌あるいは *Pseudomonas* のプロテアーゼの保存

は様々な温度で行われており、 $-10^{\circ}\text{C}$ <sup>17)</sup>、 $-15^{\circ}\text{C}$ <sup>196)</sup>、 $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>41,90,128)</sup>、 $-28^{\circ}\text{C}$ <sup>111)</sup>、 $-30^{\circ}\text{C}$ <sup>29)</sup>、と広範囲にわたっている。さらにBOETHLING<sup>22)</sup>は $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、*Ps. maltophilia*のプロテアーゼが6カ月間その活性に変化を見せなかったと報告している。しかし *Aeromonas hydrophila* の3種類のプロテアーゼを $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ および $-70^{\circ}\text{C}$ で保存する実験においてAMBORSKIら<sup>6)</sup>は、そのうちの1種類が $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した時のみプロテアーゼ活性とタンパク質量が大きく減少することを示している。

本実験の保存は $-25^{\circ}\text{C}$ で行い、活性はpH 7.0で測定したが、保存開始後第1回目における測定値(4日間の保存)が大幅に低下したにも拘わらず、それ以降は日数の経過に伴う活性の減少は僅かとなった(Table 8)。その結果、230日間保存した最終試料においても酵素活性は約3割が残存した。

凍結保存後の第1回目の試料で酵素活性が大きく低下し、その後の活性減少が小さくなる傾向は、Fig. 11に示した凍結・融解の繰り返し実験においても、また別に行った同様の実験(DEAE-セルロースで精製した酵素および本菌の脱脂乳培養から調製した部分精製プロテアーゼを使用:図表は省略)においても観察されたことから、最初の低下は凍結・融解操作そのものが原因であるとは考えられない。酵素標品のpHは7.5に調整してあるが、Fig. 10からも明らかのように、アルカリ側にお

いては取扱温度が酵素の安定性に大きく影響する。また Fig. 11 の実験において、30°C で Come up time の加熱を行った試料の酵素活性が未加熱のものにくらべて全体に低いことから、凍結保存後第1回目に融解した試料の酵素活性が低くなる原因は、酵素分注時における温度上昇が関係している可能性が考えられる。

4°C 48時間の保存では本酵素がかなり広い pH 範囲で安定性を示したが、別に行った保存実験 (DEAE-セルロースを用いてさらに精製した酵素を使用: 図表は省略) によれば、本酵素を11日間にわたり4°C で保存すると、100倍に希釈した酵素では87%までの活性低下に止どまったのに対し、希釈しない酵素では元の活性の70%にまで低下した。このことは酵素活性の維持には保存温度・時間とともに酵素濃度も関与していることを示唆している。

保存前に酵素を加熱した場合 (Fig. 11), 加熱温度と時間に応じた活性の減少が認められたが、凍結・融解の繰り返しを行っても凍結前の酵素活性に比べて目立った活性の減少は見られなかった。この場合、加熱処理の結果として酵素の自己分解が起こり難くなった故であるとの推論もできよう。

## 要 約

部分精製酵素を得るために、半合成培地における培養上澄を粗酵素として、これを56% 飽和硫酸アンモニウムおよび60% アセトンで処理した結果、純度指数3.23, 回収率47.4% でプロテアーゼが精製された。

この部分精製酵素を用いて測定した最大活性は pH

9.6 (10分間反応) で認められた。種々の pH における酵素の安定性は温度によって異なり、特にアルカリ側では4°C 48時間処理試料が pH 8.3 まで安定であるのに対し、40°C 20分間処理した場合には pH 7.5 を過ぎると酵素活性が急激に減少した。低 pH 側では5.0付近までは安定であった。

酵素の凍結保存を -25°C で行った結果、凍結後第1回目に測定した試料の活性低下が著しく、約6割程度にまで減少したが、それ以降は減少が緩慢となり、230日後にも3割の活性が残存した。凍結・融解の繰り返し実験では、未加熱および30°C で Come up time の加熱試料において、連続凍結に類似した活性低下が観察されたが、60 または 80°C で10分間処理した酵素では加熱に基づく活性低下のみが認められ、この結果から上述の凍結初期の活性低下原因は凍結・融解のものではないと推察した。保存による酵素活性の減少には、保存温度・時間とともに酵素濃度の影響していることが窺われた。

## 第2節 反応の温度依存性ならびに加熱酵素の性質

*Pseudomonas* を主とした低温菌が生産するプロテアーゼは一般に耐熱性が高く、UHT などの高温処理によっても完全には不活性化されない<sup>1,31,105,140</sup>。しかし、これらの酵素の多くが中程度の温度領域 (40~60°C) において失活するのも事実である<sup>31,66,132,140</sup>。これらの酵素が基質に作用する至適温度は、中温菌のプロテアーゼに比べてやや低い35~45°Cの間に殆どが分布している<sup>35,57,194</sup>。

本節では *Ps. azotoformans* No. 400 の部分精製プロ

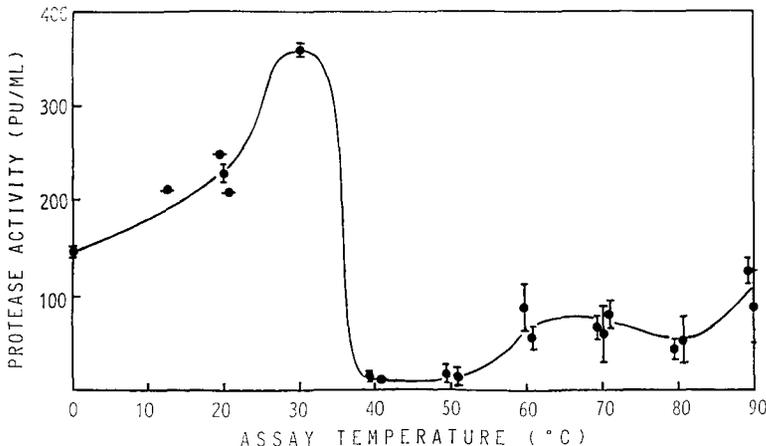


Fig. 12. Activity curve of the protease at pH 9.6 at indicated temperatures. Vertical bar indicates standard deviation of the average.

テアーゼの至適温度を明らかにするとともに、最低活性を示す50°C、および完全には失活しない80°Cで加熱した酵素について、低温における保存性ならびにpH依存性を調べた。

### 実験方法

酵素標品は前節の方法で部分精製したものをを使用した。酵素活性の測定は、これまで30°Cで行ってきた方法を用いた場合、高温で予備インキュベーションをする際に酵素が失活する恐れのあること、および基質と混合する際のピペット操作によって温度低下の生じる恐れのあることから、本節では次のような方法で行った。

基質(前節に示したCaを含まない0.5%カゼイン溶液)5mlと希釈液(5mMのCaを含むpH7.5の10mMトリス・マレイン酸緩衝液)0.5mlとを混合し、所定の温度で5分間保持する。これに酵素液0.1mlを加えて恒温槽中でマグネティックスターラーにより攪拌を行い、10分間の反応をさせる。続いてTCA混液(タンパク質沈澱試薬)5mlを加えて反応を止め、30°C15分間放置の後に濾過を行う。以後の操作は、第I章第1節に記載した方法<sup>67)</sup>に従って呈色・測定を行った。なお反応温度が13°Cおよび0°Cの場合は従来の方法によった。また加熱処理酵素のpH依存性は前節と同様の方法により、30°Cで活性の測定を行った。

### 結果

反応温度0°Cから90°Cまでの範囲で10分間の酵素反応を行った結果をFig. 12に示した。30°Cにおける活性が最も高く、40~50°Cでは最低の値となった。しかし、それ以上になると再び活性が次第に高くなり、90°Cでは30°Cの場合の3割に近い活性が得られた。また低温における酵素活性もかなり高く、0°Cでは30°Cの活性の40%に相当する値を示した。

50°Cでは活性が殆ど現れないのに対して80°Cで再び活性の認められる現象は、酵素の耐熱性とも関連していると予想されるので、50および80°Cで各10分間(+Come up time)の加熱処理を施した酵素について30~80°Cの範囲で活性の温度依存性を求めた(Fig. 13)。30°Cで測定した酵素活性は、50°C処理酵素が非常に低い値を見せる一方、80°Cで加熱した酵素では前者の8倍前後の高い活性が得られた。50°Cで活性を測定すると両者とも低い値を見せたが、測定温度の上昇に伴って再び活性が高くなり、80°Cで測った活性は両者がほぼ等しく、30°Cで測定した値に匹敵する活性が認められた。

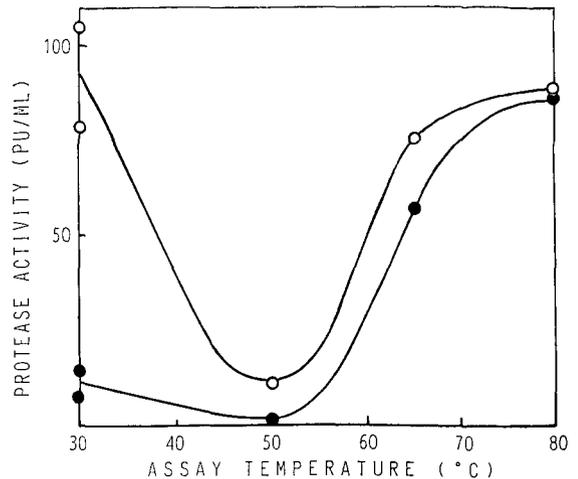


Fig. 13. Temperature dependence of the protease activity after heating at 80°C (O) and 50°C (●) for 10 min.

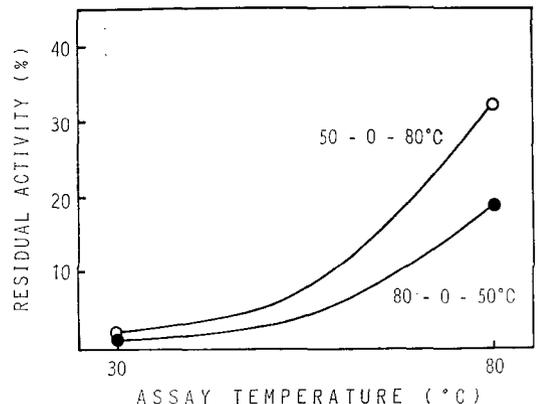


Fig. 14. Effect of exchange of heating order on the proteolytic activity at 30°C and 80°C. The difference at 80°C was not significant in t-test ( $0.2 > P > 0.1$ ).

酵素に対する50°Cと80°C各10分間の加熱処理を、その間に0°C30分間の冷却を挟んで連続して行った。その結果を、加熱順序を入れ替えて行った実験結果とともにFig. 14に示した。30°Cで酵素活性を測定すると両者は殆ど一致したが、80°Cで測定した活性の場合、最初に50°Cで加熱した試料の方がその逆の順序で加熱した酵素よりも少々高い活性を現した。

加熱によって30°Cにおける活性を失った酵素が、可逆的に活性を取り戻す可能性を探るため、50°Cで10分間の加熱処理を施した酵素について4°C64日間ならび

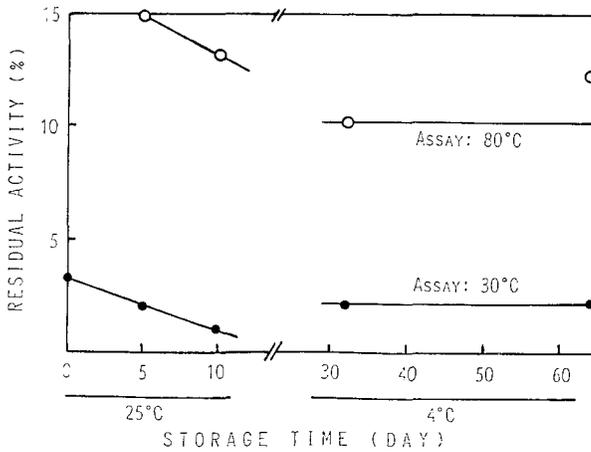


Fig. 15. Stability of the protease heated at 50°C for 10 min.

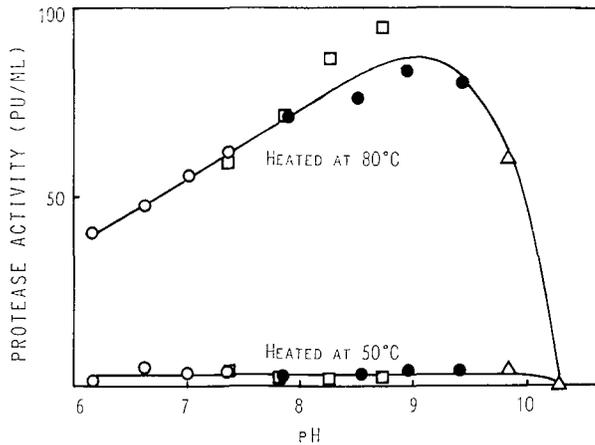


Fig. 16. pH Dependence of the heated (for 10 min) protease. Buffer solutions: Tris-maleate (○), Tris-HCl (□), glycine-NaOH (●), and bicarbonate-NaOH (△).

に 25°C 10 日間の保存を, 0.01% のアジ化ナトリウム存在下で行った実験結果が Fig. 15 である。80°C における活性は, 25°C 保存の酵素では保存日数の経過に伴って僅かに低下した。4°C 保存の場合は 32 日目に一旦低下した後 64 日目では再び上昇している。しかし, この値は平均値であって変動係数は 51% にも達しており, 32 日目との有意差が無いことから, 低温保存中の活性は一定に保たれたと解釈した。一方, 30°C で測定した酵素活性は 25°C の保存によって低下したものの, その割合は少なく, 低温保存の場合は変化が見られず, 加熱による失活は可逆的に回復しないことが確認された。

5 mM のカルシウムを含む pH 7.0 の条件下において,

50 または 80°C で加熱処理を行った酵素の pH 依存性を, 30°C で測定した活性で表したのが Fig. 16 である。至適 pH は前節の未加熱酵素の場合 (Fig. 9) よりも僅かに低い 9.0~9.5 を示したが, カーブは良く似た形であった。なお, 50°C で 10 分間加熱した酵素では, いずれの pH においても活性が殆ど認められなかった。

#### 考 察

低温菌の生産するプロテアーゼがタンパク質に作用する至適温度は特別に低い訳ではなく, 普通は 25~50°C の範囲にわたっており 2, 5, 96, 115, 130, 161, 195, 196, 207, 209, 223, その大部分は 35~45°C に存在している<sup>35, 57, 194</sup>)。本酵素の

至適温度は30°C付近にあり (Fig. 12), 上に掲げた諸報告に見られる値の範囲内に含まれている。また30°Cよりも低温側では、高温側に比べて高い活性を見せ、0°Cにおける活性は30°Cのその4割の値を示した。これに対し高温側では40~50°Cで最低となり、さらに温度の上昇とともに、凹凸があるものの全体としては酵素活性が次第に高まった。

この現象は酵素の自己消化や耐熱性とも関連があるものと推定されるが、同時に酵素標品の精製度不足による不均一性 (数種類のプロテアーゼの共存) に基づく可能性も否定できない。しかしながら、本研究の主目的がプロテアーゼの酵素学的な解明にあるのではなく、牛乳に作用する低温菌の酵素系としてプロテアーゼの作用を究明することにある故、これ以後もプロテアーゼ系としての部分精製酵素の形で取り扱うこととした。

上述の実験において酵素活性が殆ど現れない50°C, または再び活性が認められるようになる80°Cでそれぞれ10分間加熱した酵素について、各種温度における活性をみると (Fig. 13), 測定温度50°Cでは両者とも活性が殆ど認められないのに対し、30°Cで測定した場合には、80°C加熱酵素の活性が50°C加熱酵素の約8倍もの高い活性を示した。これは未加熱酵素を用いた反応の温度依存性 (Fig. 12) から推測され得る現象である。

一方、65および80°Cで測定した場合は50ならびに80°Cで加熱処理した両試料とも高い活性を現し、殊に80°Cにおける活性は両者がほぼ等しく、80°C加熱酵素の30°Cにおける活性に近い値を見せた。50°Cにおける両者の低活性が酵素の自己消化 (Autolysis) に基づくものとするれば、真の至適温度は30°Cよりも高い可能性も考えられる。しかし50°Cで自己消化を起こすとするならば、この温度で10分間の加熱処理を施した酵素が、80°Cで測定した場合に30°Cに匹敵する活性を示す理由が不明となる。

この現象をさらに確認するために、50および80°Cの両温度処理を、その間に0°C 30分間の冷却を挟んで連続して行った実験 (Fig. 14) では、80°Cにおける活性が高いレベルで認められた。図では、最初に50°Cで加熱した後に80°C処理を行った試料が、その逆の順序で加熱を行ったものよりも高い平均値を示しているが、t-検定を試みた結果、両者間に有意の差は認められなかった。

Griffiths<sup>6)</sup>はHTST (77°C 17秒) と55°C 1時間処理とを連続して行う実験において、HTST処理を先に施した試料がその逆の順序で処理した試料よりも残存活性の高い例を報告しているが、彼らのデータの中にも、

菌株によっては反対の結果を示す場合が見受けられる。

30°Cで測定した酵素活性において、もしも80°C 10分間の加熱が酵素を安定化するために活性が高い値を示す (Fig. 13) と仮定するならば、一旦80°Cで加熱したこの酵素を、続いて50°Cで再加熱しても活性は低下しないものと予想されるの反し、50°C処理を受けた酵素は総て低い値を示した (Fig. 14)。このことは、たとえ80°C加熱が酵素を安定化するとしてもその程度は弱く、50°Cでの再加熱によって不可逆的に失活することを意味している。以上のような熱に対する感受性の差から判断すると、50°Cと80°Cとでは加熱によって酵素がそれぞれ異なる影響を受けることが明らかである。

一方、別の観点から上述の諸現象を考察することもできる。すなわち、本酵素は部分精製の段階にあり完全には精製されていない。したがって2種類以上のプロテアーゼの共存する可能性があり、80°C付近の高温領域に至適温度を有する酵素が含まれていることも考えられる。また酵素標品中に不純物としプロテアーゼインヒビターが含まれている可能性も否定できない。以上の2点を考慮しつつ今後詳しい実験を行えば、80°Cで測定される酵素活性を説明できるものと思われる。

いずれにしても本研究においては牛乳に及ぼす酵素系として本プロテアーゼを取り扱っており、含まれる酵素が1種類であれ2種類であれ、プロテアーゼ系として前述の現象が認められることは明らかな事実である。したがってUHT乳を含む乳製品でこのような高温における酵素活性が現れた場合には、製品の加工・保存上において重要な問題が生じる。65~80°Cは乳製品加工工程では殺菌や均質化、あるいは予備加熱等に常用されている温度範囲である。50°Cで加熱処理の結果30°Cにおける活性が事実上認められなくなった酵素系が、加工処理温度における酵素活性を依然として維持していることは、こうした加工処理工程中に牛乳が熱以外の原因による質的な変化を被る可能性を示すものである。牛乳生産者や乳製品の加工・製造に携わる者はこの点に充分留意すべきであろう。

50°Cで加熱処理した酵素系が保存中に可逆的な再活性化を起こすか否か<sup>10)</sup>を探るために25°Cで10日間および4°Cで64日間の保存を行い、80および30°Cで活性を測定した結果 (Fig. 15), 再活性化は起こらず、保存初期の活性低下のみが観察された。この現象は未加熱ならびに30°C Come up time 加熱酵素の凍結保存 (Fig. 11) で見られた傾向に一致している。加熱した酵素の30°Cにおける活性のpH依存性 (Fig. 16) は、50°C 処

理の場合は全 pH で活性を示さなかったが、80°C で加熱した酵素では未加熱酵素の pH 依存性 (Fig. 9) に殆ど等しいパターンを示した。しかし至適 pH は僅かに低い 9.0~9.5 であった。この値を Fig. 9 の値と比較した場合、実験誤差などを考慮すれば実質的には殆ど変わらないものと推察される。

## 要 約

酵素反応の温度依存性を調べた結果、至適温度は 30°C にあり、0°C においても 30°C の 4 割に相当する酵素活性が認められた。また 40~50°C では最低の値となり、それ以上の温度では再び活性が上昇し、90°C では 30°C における活性の約 3 割の活性が得られた。

50°C と 80°C の両方またはどちらか一方で各 10 分間の加熱を行った酵素について、各種温度における酵素活性を調べた結果、30°C における活性は、80°C 単独加熱の試料では高い値が得られたのに対し、50°C 単独またはこれに 80°C の加熱が加わった試料では、加熱の順序を逆にしたものも含めて、いずれも低い活性しか得られなかった。50°C における活性は総ての試料で低く、一方、80°C における酵素活性はいかなる温度処理を施した試料においても 30°C に匹敵する値を示した。

50°C で加熱した酵素を保存した結果、25°C 10 日間までの保存では 80°C および 30°C で測定した両活性とも僅かに減少したが、4°C 保存の場合はいずれも 64 日目まで活性低下が認められなかった。

80°C で加熱処理を行った酵素の pH 依存性は未加熱酵素のそれと殆ど同様であった。

以上のことから、50°C と 80°C の加熱では酵素系がそれぞれ異なる影響を受けることが判明した。

## 第 3 節 高温における耐熱性ならびに中温不活化

前節においては本酵素の温度依存性を調べ、実験の範囲内では 40~50°C でその活性が最低となることを明らかにした。この結果は酵素の耐熱性と密接に関連していることが考えられるので、本節においては本プロテアーゼの耐熱性についてさらに詳細に追究するとともに、本酵素の耐熱性に対する酵素濃度の影響ならびに各種低温菌が生産するプロテアーゼの 50°C 加熱における活性低下率の違いについて実験を行った。

低温菌の生産するプロテアーゼがこれを 50°C 前後で加熱することによって失活する現象については、序論でも述べたように多くの報告があり<sup>1,31,35,57,105,132,140,194</sup>、この現象を BARACH ら<sup>18</sup>) は Low Temperature In-

activation (LTI) と呼んでいるが、本研究ではこれを考察の項で述べる理由により「中温不活化」と称することとする<sup>140</sup>)。

## 実験方法

酵素活性の測定方法ならびに使用した部分精製酵素標品は、特記しない限り前節までと同様である。

30~140°C までの各種温度における耐熱性実験は次のように行った。外径 3 mm、内径 1.5 mm、長さ 120 mm で一端を封じた Pyrex ガラス管に 0.2 ml の酵素液を注入し、他端を熔封して氷冷した。これを各温度の恒温槽中で Come up time (CUT)+所定時間の加熱後、直ちに 0°C まで冷却した。続いて 5 mM の Ca を含む 50 mM のトリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) でこの試料を希釈し、pH 7.0、30°C において酵素活性を測定した。なお CUT は同じガラス管に同緩衝液と銅・コンスタンタン製サーモカップルを封入し、Leed & Northrup 社の Temperature potentiometer を使用して測定した。加熱溶媒としては 30~90°C までは水を用い、それ以上の温度の場合には大豆油を用いた。

これまでの諸実験<sup>136-139,141</sup>) において分離・分類<sup>134</sup>) された低温菌のうちから *Pseudomonas* group I に属する 14 株 (*Ps. azotoformans* No. 400 を含む) および Enterobacteriaceae 2 株の合計 16 株を選んで、その生産するプロテアーゼの耐熱性を次に示す方法で調べた。供試菌は普通寒天斜面で 25°C 24 時間の培養を 2 回繰り返した後、ブイヨン培地で 25°C 24 時間培養した。このカルチャーから 1 白金耳量を 10 ml の 10% 還元脱脂乳培地に接種し、25°C で 4 日間の培養を行った。培養液は 10,000×g で 20 分間の遠心分離にかけ、その上澄を粗酵素として 30, 50, または 80°C で各 10 分間の加熱処理を施した後、pH 7.0、30°C で酵素活性を測定した。

## 結 果

30°C から 90°C までの各種温度でそれぞれ 10 分間の加熱処理を施した酵素の残存活性を Fig. 17 に示した。40°C で処理した酵素の活性は 30°C のそれと殆ど変わらないのに対し、50°C 10 分間加熱した試料では極端に活性が低下した。さらに処理温度が上昇すると残存活性は再び高まり、60~90°C の加熱後には 30°C 処理試料の約 4 割に相当する活性が認められた。

広範囲の温度領域にわたる酵素の耐熱性を調べるため、ガラス細管に封入した高濃度の酵素を 30~140°C の各温度で CUT または CUT+10 分間の加熱を行って、

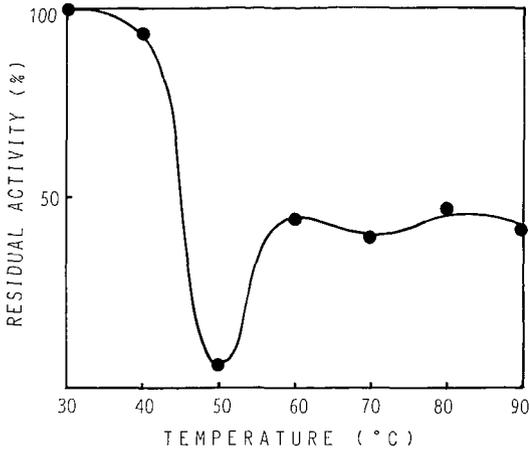


Fig. 17. Low temperature inactivation of the protease heated for 10 min at indicated temperatures. Assay condition was 30°C for 10 min at pH 9.6.

その残存活性を測定した結果が Fig. 18 である。10 分間加熱の場合には Fig. 17 と同様に 50°C 付近で最低の値を見せたが、より高温では活性が Fig. 17 のように 40% も残存することなく、90~100°C の加熱においては約 10% が残ったに止どまった。しかし、僅かな耐熱性はさらに高温まで続き、140°C に加熱しても完全には失活せず、このプロテアーゼが高い耐熱性をもつことが証明された。加熱時間の極く短い CUT の加熱条件下では、活性の最低になる温度が 7~8°C 高温側にシフトした。

Fig. 18 のデータに加えて、さらに各種温度で加熱した時間経過に伴う残存活性の変化を測定したデータか

ら、各温度における D 値を求め、さらに失活速度恒数  $k$  を計算した<sup>50)</sup>。これを温度の逆数に対してアレウスプロットした (Fig. 19) 結果、変曲点は 50 および 70°C の 2 箇所に認められ、活性化エネルギーは 40~50°C 間が 540.9 kJ/mol であるのに対し、70~90°C 間ではその約 1/5 の 110.7 kJ/mol であった。

本章第 1 節において、低温保存した酵素の活性はその酵素濃度の高いほど保存中の失活が大きいことを示唆したが、加熱処理における酵素濃度の影響を確認するため、酵素を 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5, Ca を 5 mM 含む) で 120 倍まで希釈した後、それぞれ 50, 80, および 90°C で 10 分間加熱して残存活性を測定した。その結果は Fig. 20 に示すように、酵素濃度の高いほど失活の程度が大きく、この傾向はいずれの加熱温度においても同様であった。

50°C 近辺の加熱で酵素活性が最低となるようなプロテアーゼを生産する低温菌がどの程度存在するかを確かめるため、前々報<sup>134)</sup> で分類した低温菌の中から、本実験に使用中の *Ps. azotiformans* No. 400 を含む *Pseudomonas* の group I に属する 14 菌株、および Enterobacteriaceae の 2 菌株、合計 16 菌株について、30, 50, および 80°C で各 10 分間の加熱を行った後の酵素活性は Fig. 21 に示すように、多くの菌 (16 株中 11 株) において 50°C で加熱した酵素が 80°C 処理酵素よりも低い活性を見せた。

## 考 察

低温菌の生産するプロテアーゼが高い耐熱性を有することは良く知られており、低温殺菌<sup>102,118,124)</sup> ばかりでな

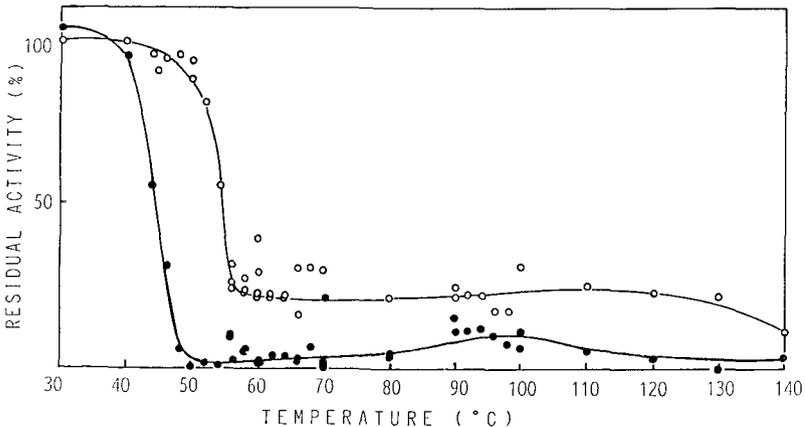


Fig. 18. Heat resistance of the protease. The enzyme was heated for 10 min (●) and for come up time (○) at indicated temperatures and assayed at pH 7.0.

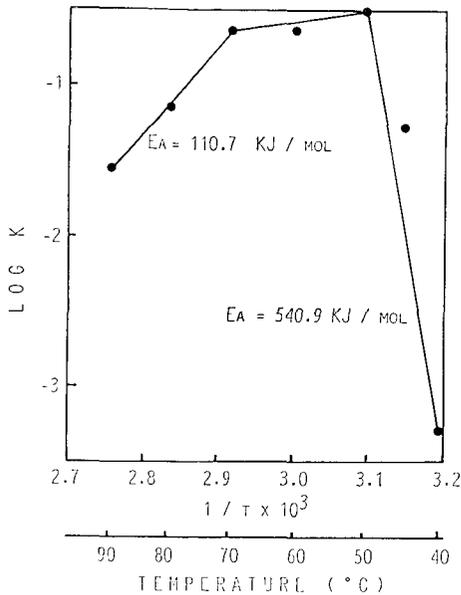


Fig. 19. Arrhenius plot of heat inactivation of the protease. Activities were assayed at pH 7.0.  $K=2.303/D$  value.

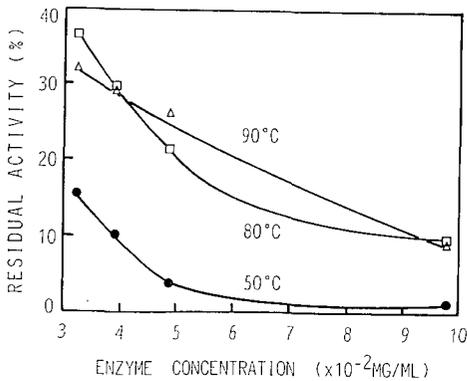


Fig. 20. Effect of the enzyme concentration on heat resistance of the protease. Assay condition was 30°C for 10 min at pH 9.6.

く、120~121°C<sup>62,123,171</sup>) という高い温度、さらには 130°C 以上の UHT 処理にも耐えるものが多い<sup>5,17,47,51,61,101,103,110,178,198,208</sup>)。これらプロテアーゼの耐熱性に関してはこれまでに多数の総説が発表されている<sup>1,35,57,105,132,140,194</sup>)。一方では、こうした高い耐熱性を示す酵素の多くが 40~60°C の中間温度領域においては失活し、あるいは低い耐熱性を示すこともまた良く知られている。Fig. 17 に掲げたような中温領域に谷を見せる耐熱性パターンないしはそれに近いものは、MORIHARA<sup>150</sup>) によ

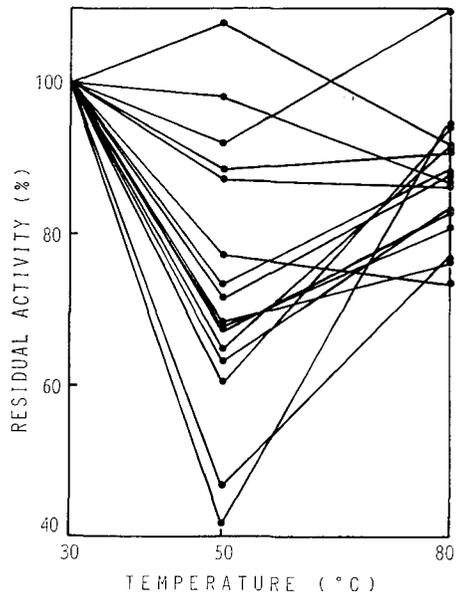


Fig. 21. Low temperature inactivation of proteases produced by psychrotrophic bacteria. Supernatants of 16 skimmilk cultures were used as crude enzyme and activities were assayed at pH 7.0.

って既に 1957 年に発表されており、その後も続いて類似の報告が多数行われている<sup>26,30,44,77,99,112,116,120,190</sup>)。この最低活性を示す温度は各報告によってまちまちである。本実験の場合は Fig. 17 に示したように 50°C であるが、これまでに報告されている数字は 55°C を中心として 40~56°C に亘っている<sup>140,160,161,166,195,196</sup>)。

中温域における失活現象に対し、低温菌 *Pseudomonas* MC 60 のプロテアーゼを用いて一連の研究を行った BARACH, ADAMS and SPECK およびその共同研究者<sup>2,4,15-19,217</sup>) は LTI (Low Temperature Inactivation), 直訳すれば「低温不活化」という呼びかたをしている。この低温という言葉はおそらく低温殺菌のイメージに由来しているものと推測されるが、日本語で表現する場合には、例えば「低温菌酵素の低温不活化」となる。しかしながら、同じ「低温」という言葉が 2 回連続して現れた場合、両者が同じ温度領域を指しているものと誤解されがちである。したがって本研究においては、この現象すなわち LTI の日本語訳としては直訳である「低温不活化」とせず、「中温不活化」という言葉を使用することとする。

広い範囲の耐熱性を調べるために高濃度の酵素をガラス管に封入して行った Fig. 18 の実験結果は、Fig. 17

のそれとは少々異なるパターンを示した。すなわち50°Cの中温不活化現象は同じであるにも拘わらず、60°C以上の活性が前者においてあまり上昇しない点である。この原因は両実験の活性測定pHが異なることよりも、酵素濃度の違いによってもたらされたものと推定される。それは、酵素濃度の変化に伴う酵素活性の現れ方を各加熱温度について測定したFig. 20の結果からも明らかである。そこではいずれの加熱温度においても酵素濃度の高いほど活性が低いことから、Fig. 18の現象が説明できよう。なお、100°C以下の加熱実験における失活の濃度依存性から類推すると、実際面で考えられる程度に酵素濃度が希薄な場合には、140°Cにおけるその耐熱性はかなり高いものと思われる。

アレニウスプロットの変曲点は様々な意味を持っている。高濃度の酵素について行った加熱実験をもとに、本プロテアーゼの加熱失活の速度恒数 $k$ の対数値を絶対温度の逆数に対してプロットしたFig. 19の変曲点は、50および70°Cの2箇所認められた。45~70°C間の加熱においては8分間までのデータ、それ以外は30分間までの加熱データをもとに計算したものであるが、これらの時間はいずれもCUTを経過後の保持時間で表しており、CUTまでの加熱時間内における初期の失活と、それ以降に観察される2段階の失活曲線のうち、後者についてのデータである<sup>50,177,189</sup>。この結果、得られた2箇所の変曲点の低温側すなわち50°Cは失活の最大点であり<sup>65</sup>、高温側70°Cの場合は酵素タンパク質構造のTransition point<sup>79</sup>であると考えることができる。

Fig. 19において40~50°C間の活性化エネルギー $E_a$ を計算した結果は540.9 kJ/molとなり、50°C以下の失活は非常に起き難いことが判る。これに対し、70~90°C間の $E_a$ は110.7 kJ/molと小さい。本酵素を他のプロテアーゼと比べた場合、STEPANIAK and FOXが*Ps. fluorescens* AFT 36について得た値である88.1 kJ/mol<sup>189</sup>あるいはALICHANIDIS and ANDREWSが*Ps. fluorescens* AR-11で計算した92.8 kJ/mol<sup>5</sup>よりは大きな $E_a$ であるが、RICHARDSONによる*Ps. fluorescens* B 52の値104.3 kJ/mol<sup>177</sup>に殆ど等しく、耐熱性が非常に高い酵素であるということが出来る。

中温不活化の現象を本研究に使用中の16菌株について調べたFig. 21の結果では、7割近い(11/16)株にこの現象が認められた。このことは牛乳や乳製品の保存にあたり、残留する低温菌プロテアーゼの働きを中温不活化処理が弱めるという実用的な応用が可能であることを示している。実際に、55°Cで60分間の加熱処理を行う

ことによってUHT乳の保存性を改善することが可能であるとするDRIESSENの論文<sup>49</sup>があり、ADAMSらは1979年に「牛乳を50~60°Cで5~60分間、UHT(≥120°C)の直前または後に加熱し、牛乳中の耐熱性プロテアーゼを破壊することによってUHT乳のフレーバー欠陥を減らし、保存性を高める」という米国特許<sup>4</sup>を得ている。

しかしながら、GRIFFITHSら<sup>66</sup>はこれとは異なる結論を出している。彼らは生乳から分離した多数の低温菌を用いて、そのプロテアーゼ活性に対する55°C加熱の影響を調査した結果、菌の種類によって大きな変動があり、低温菌プロテアーゼの総てがこの処理で失活する訳ではないことを明らかにした。その結論として、「この55°C1時間処理は実用的に広くは採用できないであろう」と述べている。

プロテアーゼの耐熱性は様々な要因によって変わり得ることも知られている。すなわち酵素の精製度によって変わり<sup>112,177</sup>、加熱する際の加熱溶媒<sup>123,189,190</sup>や、脱脂乳などの保護物質でも変わる<sup>177</sup>という。さらに耐熱性のパターンは同一の菌においても培養温度<sup>112</sup>や、培地あるいはその透析<sup>30</sup>でも変化する。これらの諸条件が異なっている限り、様々な結論が生じることは避けられないことと思われる。

## 要 約

酵素の耐熱性を調べるため、30°Cから90°Cまでの各温度でそれぞれ10分間の加熱を行った結果、最低の活性は50°Cで認められ、60~90°Cの加熱では30°C処理試料の約4割の活性が得られた。本研究ではこの50°Cにおける失活現象を中温不活化と称することとした。

広範囲の耐熱性を追究するため、高い濃度のプロテアーゼをガラス細管に封入して30~140°Cの各温度でCUT+10分間の加熱を行った結果、低い濃度の酵素を加熱した場合とは異なる耐熱性パターンが得られた。加熱失活の酵素濃度依存性を調べた結果、いずれの温度においても酵素濃度の高いほど失活の割合が大きかったことから、両パターンの違いは酵素濃度の差に由来すると推察された。したがって、実際面で考えられる希薄な酵素濃度を考慮した場合、本プロテアーゼの140°Cにおける耐熱性はかなり高いものと考えられる。

失活のアレニウスプロットから、失活の最大は50°Cで起こり、70°Cでは酵素のタンパク質構造に変化の生じることが推論された。40~50°C間の活性化エネルギーは540.9 kJ/mol、70~90°C間のそれは110.7 kJ/molと

いずれも高い値を示し、本酵素は高温においても失活し難いことが裏付けられた。

中温不活化の分布を本研究に使用中の低温菌 16 菌株について調べた結果、7 割近い 11 株にこの現象が認められた。このことから中温不活化の実用性についての論議を行った。

#### 第 4 節 酵素活性および安定性に対する金属塩の効果

これまでの実験における酵素の希釈や活性の測定、さらには加熱や低温保存などでは、カルシウム (Ca) を含む条件下で酵素を取り扱ってきた。この条件は、*Pseudomonas* のプロテアーゼでは Ca がその耐熱性に寄与しているという報告<sup>16,150,189</sup>) ならびに本研究の予備実験の結果に基づいて採用されたものである。Ca は *Pseudomonas* 以外の微生物の生産するプロテアーゼについてもその役割が詳しく研究されており、主として酵素の安定性および自己消化の防止に役立っていることが知られている<sup>20,76,125,185,206</sup>)。

そこでこの第 4 節においては本プロテアーゼに対する Ca の効果を詳細に調べることを目的とし、特に酵素活性の発現に与える影響ならびに室温以下での保存に及ぼす影響を追究した。さらには Ca 以外の二三の金属についても実験を行った。

#### 実験方法

酵素活性に及ぼす金属塩の効果については、次のような方法で実験を行った。酵素を各種金属塩化物の 0~300 mM を含む 10 mM トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.5) で 20 倍に希釈し、その 1 ml を用いて Ca を含まない基質溶液で活性を測定し、これを酵素反応時点の金属濃度に対してプロットした。

Ca を含む条件下における酵素の低温保存実験は、5 mM Ca を含む 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) で酵素を一定濃度に希釈したものを所定の時間 4°C で保存の後、Ca を含まない前節と同様の基質を用いて酵素活性を測定した。

酵素分子に含まれる、あるいは添加した Ca をキレートするためのエチレンジアミン四酢酸・2Na (EDTA) は 100 mM トリス・グリシン緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、酵素液と混合した時点で酵素および EDTA が所定の濃度 (酵素標品に含まれる Ca に対する過剰濃度で表現) になるように添加した。一定の条件下に保存の後、pH 7.5 の 10 mM トリス・塩酸緩衝液に溶解した塩化カルシウムを必要に応じて過剰になるように加え、さらに所定の

条件で保持した後に酵素活性を上述のように測定した。

各種金属による再活性化実験では、酵素を金属あるいは Ca を含まない pH 7.5 の 50 mM トリス・マレイン酸緩衝液で希釈し、同液に溶解した EDTA またはグリコールエーテルジアミン四酢酸 (GEDTA) を酵素標品中の Ca に対し 3.3 mM 過剰に添加して 30°C 5 分間保持した後、同緩衝液に溶解した各種金属塩化物を残留 GEDTA に対し 5.85 mM 過剰に加え、30°C 10 分間後に酵素活性の測定を上述のように行った。

オルトフェナリントロリン (o-PHE) により Ca 以外の金属の効果調べる場合は、Ca 存在下で実験を行うために、5 mM Ca を含む 50 mM のトリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.5) で酵素を希釈した後、同液に溶解した o-PHE を 0~2 mM 過剰に添加し、所定の条件で保持してから Ca を 1 mM 含む基質を用いて酵素活性を測定した。

#### 結果

酵素活性に Ca が及ぼす効果は、その濃度 1 mM 前後に活性のピークが認められた (Fig. 22)。このピークは詳細に見ると Ca 濃度 1.15 mM にあるが、0.8~1.6 mM までは実質的に変わらない活性を示した。それ以上の Ca を添加した場合には活性が低下し、47.5 mM では最高活性の約 1/2 となった。

Ca 以外のアルカリ金属としてマグネシウム (Mg) を、また 1 価の金属としてナトリウム (Na) およびカリウム (K) を用いて、その酵素活性に及ぼす影響を調べた結果は Fig. 23 に示した。この実験系は酵素を調製する段階で緩衝液に Ca が含まれているために、上述の金属を添加しない試料においても活性測定時点で 42 μM の Ca が存在することになる。したがって Fig. 23 は Ca の微量が存在する条件下での追加金属の効果を表しているわけである。その結果は Na および K が酵素活性に全く効果を及ぼさないのに対し、Mg は Ca の最高の活性よりは弱いながら、プロテアーゼ活性を高める効果を示した。この効果は Ca の実験で最適濃度が存在したのとは対照的に、3 mM 以上の高 Mg 濃度において広く認められた。

これらの金属が酵素活性または酵素の安定性に与える影響についてキレート剤による実験を行うに先立ち、5 mM の Ca を含む pH 7.5 の 10 mM トリス・塩酸緩衝液中で本酵素を 7 日間に亘って 4°C で保存した結果は殆ど失活が起きず、その間の活性減少は Fig. 24 に示すように僅か 1.1% であった。

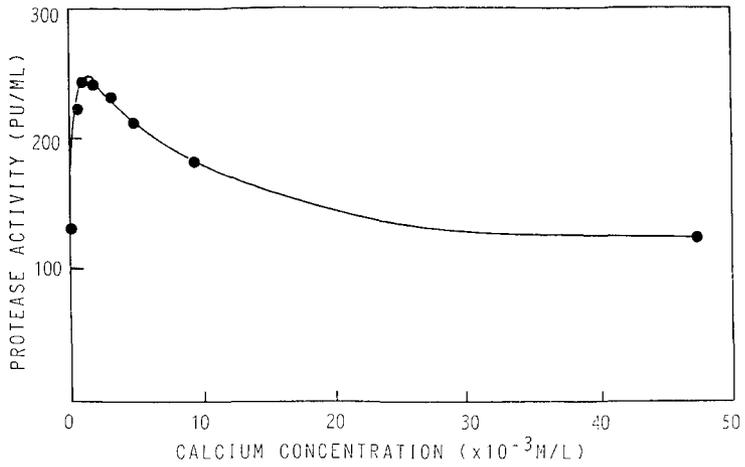


Fig. 22. Calcium concentration dependence of the protease activity. Assay condition was 30°C for 10 min at pH 9.6.

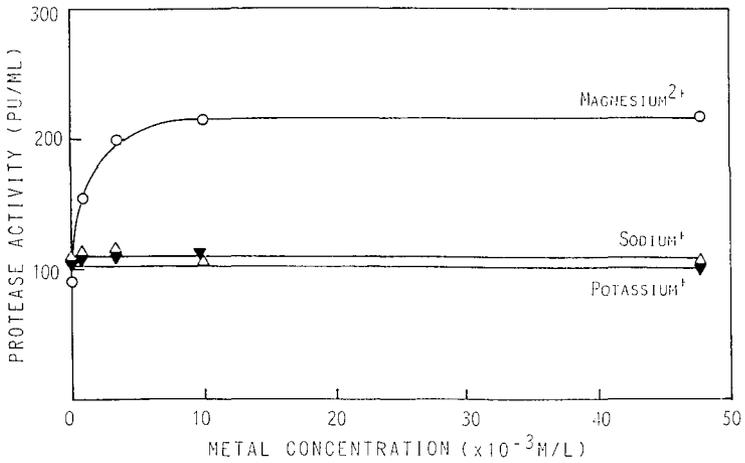


Fig. 23. Effect of metal concentration on the protease activity under coexistence of 42  $\mu$ M of calcium. See text for the experimental conditions.

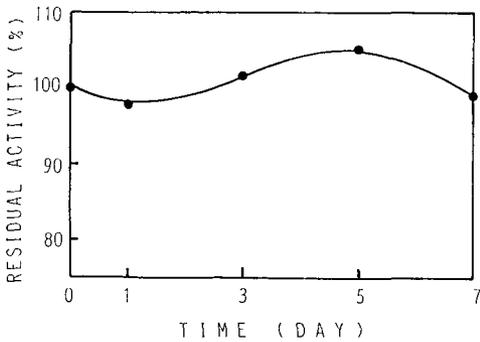


Fig. 24. Stability of the protease stored at 4°C. See Fig. 22 for assay condition.

Table 9. Effect of storage temperature on the EDTA treated protease activity

Storage <sup>a</sup> temp. (°C)	Relative protease activity in %
Control	100.0
0	0.6
4	0.9
10	0.6
15	0.3

a) Two mM excess of EDTA to the metal content was added to the enzyme and the mixture was stored for 6 h at each temperature. For assay conditions see text.

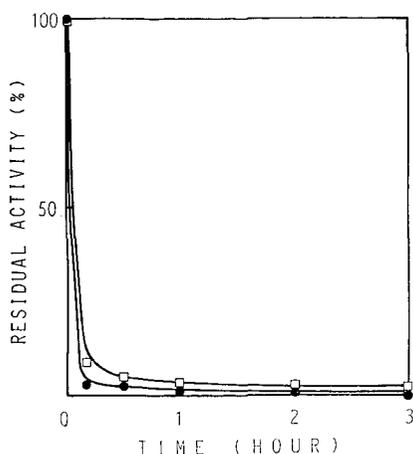


Fig. 25. Effect of EDTA on the protease activity. Two mM (●) and zero mM (□) excess of EDTA was added to the enzyme followed by the mixture was stored for indicated times at 4°C. See Fig. 22 for assay condition.

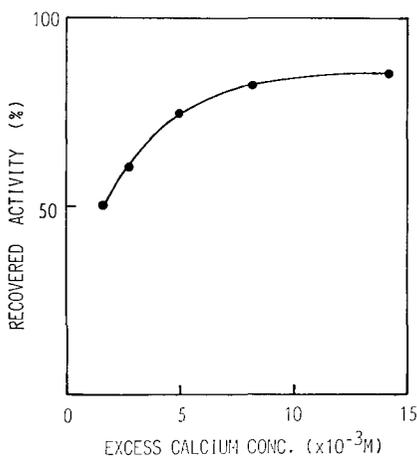


Fig. 26. Recovery of the protease activity after 24 h at 4°C with addition of excess calcium to EDTA-treated (2 mM excess: 4°C 12 h) enzyme. See Fig. 22 for assay condition.

キレート剤として EDTA を酵素溶液中の Ca 濃度に対して 2 mM 過剰になるように添加し、各種温度で 6 時間保存した。その結果、Table 9 に示したように温度が 0°C と低い場合にも、6 時間の保存によって酵素活性は低下し、4, 10, 15°C を含めて総てが無処理酵素の活性の 1% 以下となった。

EDTA による急速な失活は、その濃度および 4°C に

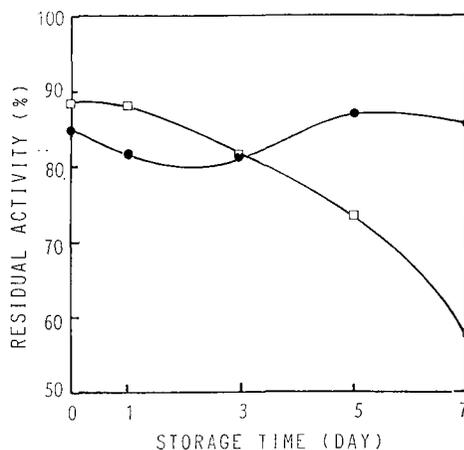


Fig. 27. Stability of the EDTA-treated protease. The protease treated with 2 mM excess of EDTA was stored at 4°C (●) and 25°C (□) followed by 2.5 mM excess of calcium was added to the mixture and assayed after 27 h at 4°C (●), and 24 h at 25°C (□). See Fig. 22 for assay condition.

おける処理時間を変化させた実験においても同様で、EDTA の過剰濃度が 0 mM の場合にも、10 分間の処理によってこれらの酵素活性はもとの 9% に低下し、3 時間経過後には 2.8% となった (Fig. 25)。2 mM 過剰の EDTA を添加した場合にはこれよりも速い活性の低下を見せ、10 分間で 3%、3 時間では 0.7% にまで下がった。EDTA 濃度が 0.83 および 3.75 mM の場合は、2 mM の場合と殆ど同じ程度の値を示した。

2 mM 過剰の EDTA を 4°C で 12 時間作用させた後、各種過剰濃度の Ca を添加して 4°C で 24 時間後に酵素活性を測定した結果を Fig. 26 に示した。1.6 mM の過剰 Ca 濃度では EDTA を加える前の活性の 50% までしか回復しなかったが、14.2 mM の Ca を添加した場合には 85% にまで戻った。また、EDTA を添加した酵素を 4 または 25°C で保存し、Ca を再添加して 4 または 25°C で所定時間の保持後に活性を測定した。Fig. 27 に示したように 2 mM 過剰の EDTA 存在下で 4°C 7 日間保存した酵素も、2.5 mM 過剰の Ca を再び加えて 27 時間保持した際の活性は元の 86% にまで回復したが、3 時間保持の場合 (図示せず) には 51% まで回復したに止まった。2 mM 過剰濃度の EDTA を加えて 25°C で保存した場合には、Ca の再添加による活性の回復は低温保存試料よりも低かった。7 日間保存の試料では、Ca を再添加後 4°C 72 時間または 25°C 24 時間保持したものの活性はいずれも 58% であった。なお、Ca 再添加後の保持時

**Table 10.** Effect of metals on reactivation of EDTA and GEDTA treated protease<sup>a</sup>

Metals	Relative protease activity in %	
	EDTA	GEDTA
Control <sup>b</sup>	100.0	100.0
Ca	79.5	98.2
Zn	79.5	— <sup>c</sup>
Mg	58.4	26.0
Co	88.1	—
Zn+Ca <sup>d</sup>	82.8	—
Co+Ca <sup>d</sup>	85.4	—
Buffer <sup>e</sup>	40.8	15.8

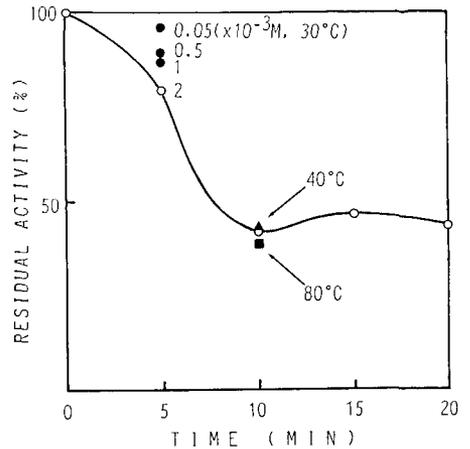
- a) Enzyme in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5, was incubated with 3.3 mM excess of EDTA or GEDTA for 5 min at 30°C followed by the addition of 5.85 mM excess of metals. After 10 min at 30°C the activity was determined.  
 b) The activity before addition of chelating reagent.  
 c) Not determined.  
 d) 5.85 mM (excess) each of both metals.  
 e) The blank test without metal.

間が4°C 72時間よりも長い場合においては、いずれも回復度が低い値を示した(図は省略)。

EDTA(キレート生成定数  $\log K$ : Ca 10.96, Zn 16.50)で失活させた酵素の活性を、Ca以外の金属がどこまで回復させ得るかについて行った実験結果を Table 10 に示した。EDTAによる処理が30°C 5分間と短いために、金属を再添加しない場合にも酵素活性は41%まで低下したに止どまった。Caと亜鉛(Zn)は共に80%まで回復させたが、Mg添加では58%までしか回復しなかった。また、コバルト(Co)を加えた場合にも88%と高い値を見せ、一方ZnとCa、またはCoとCaとを同時に加えても80%以上の回復が認められた。

これに対してGEDTA( $\log K$ : Ca 11.00, Mg 5.21, Zn 14.5)で処理の後、Caを再添加した場合には98%にまで酵素活性が回復したが、Mgの再添加によっては1/3以下の26%までしか回復しなかった(Table 10)。

Ca以外の金属と安定なキレートを作る o-PHE( $\log K$ : Ca 0.5, Zn 6.4)をCaが十分に含まれる条件下で添加した Fig. 28の結果では、o-PHEを2 mMまで加えても30°Cで5分間処理の場合には79%の活性が残っ



**Fig. 28.** Effect of ortho-phenanthroline on the protease activity in the presence of 5 mM of calcium. See Fig. 22 for assay condition.

た。処理時間を10分間に延長すると42%まで低下したが、さらに20分間まで延長しても残存活性は44%残り、それ以上の減少を見せなかった。また、処理温度を40°Cまたは80°C(各10分間)まで高めた場合にも酵素活性はそれぞれ43%または38%が残存し、Ca以外の金属が酵素反応系から殆ど除外された場合にも酵素活性がかなり高い割合で残ることが示された。

## 考 察

金属塩、特にCaが菌体外酵素の安定性に役立っていることは良く知られており<sup>22,76,125,175</sup>、またプロテアーゼの自己消化を防ぐ効果を示すとも言われている<sup>20,185,206</sup>。これらの結果として添加した金属は酵素活性を高める役割を果たしている<sup>117</sup>。

本酵素の場合(Fig. 22)はCa濃度が約1 mMで酵素活性のピークが見られたが、それ以上の濃度では活性が次第に低下した。これはカゼインを基質として使用しているため、Caイオンの増加によるカゼインの高分子化またはミセル形成が始まるためと考えられる<sup>203,210,215</sup>。これに対しMgは42  $\mu$ MのCa存在下にその働きを補助する形で作用し、Mg濃度が高くなっても補助作用は減少しなかった。こうしたMgの働きはTable 10から明らかのように完全にCaと置き換えることは不可能である。このことはGEDTAを用いた実験(Table 10)によっても裏付けられた。本表の実験条件においてはEDTA添加処理による失活が完全ではないが、これにCoを再添加すると9割近くまで、またZnもCaと同程

度である8割まで活性が回復したことは、Ca以外の金属が酵素の活性部位に関与していることを窺わせる。

キレート剤で失活させた *Pseudomonas* プロテアーゼの再活性化において Zn や Co などの2価金属が有効であるという報告は多くあり<sup>17,22,85,175,177</sup>、本酵素のように Co が Ca よりも効果の高い例も知られている<sup>91</sup>。そこで Ca 以外の金属が果たし得る役割を確かめるために o-PHE を用いた実験を行った。MORIHARA and TSUZUKI<sup>153</sup> は、酵素中に微量に含まれている Ca 以外の金属が酵素の活性部位に重要な役割を持っている場合、Ca が過剰に存在する条件下で o-PHE を加えると、酵素が非常に速やかに失活することを示している。本実験においては 2 mM までの o-PHE を添加した場合にも失活の速度は遅く、30°C 10 分間で最低値に達したが、それ以後 20 分間まで保持しても 4 割以上の活性が維持された (Fig. 28)。本酵素と同様に、EDTA の抑制効果が o-PHE よりも強く現れる例は多く知られ<sup>17,118,160,166,190</sup>、BARACH らは高濃度の o-PHE によっても 50% 以上の活性が残存するプロテアーゼを認めている<sup>17</sup>。一方、これとは逆に o-PHE による抑制が EDTA よりも大きい場合も報告されている<sup>91,175</sup>。

以上の事柄や、EDTA で酵素を処理すると活性が殆ど失われること (Table 9 および Fig. 25)、さらに o-PHE の処理温度を 40 または 80°C まで上昇させた場合にも特に大きな活性の減少が認められない、すなわち熱失活が妨げられたこと (Fig. 28) を考え併せると、次のように推察することができる。本酵素において Ca は主として安定性に寄与しているが、同時にこの Ca は酵素活性の発現にも関係している可能性がある。しかしながら、この考え方は Ca 以外の金属が活性部位に関与しているという前述の推定と矛盾するものである。部分精製されただけの本酵素系の場合、複数の酵素が含まれているためにこのような矛盾が生じたと解釈することもできる。

一方、本酵素の EDTA 処理および Ca 再添加処理は、いずれも温度と時間ならびに濃度に左右された (Fig. 26, 27)。すなわち再添加する Ca の過剰濃度が 5 mM までは、濃度の増加とともに活性の回復率が上昇した。また EDTA 処理酵素を低温で保持した場合には、Ca の再添加によって保存期間に関係なく 7 日間まではほぼ同程度に活性が回復するのに対し、25°C で保存した場合には時間の経過とともに回復率が低下した (Fig. 27)。これは前述のように、酵素の安定性に寄与する Ca が酵素分子の表面近くに存在し、活性部位の金属が分子の奥深くに

包み込まれていると仮定した場合、処理温度が高い時には EDTA が活性部位に容易に到達するのに対し、低温では長時間を要するためであると考えれば説明がつく。このことに関しては STEPANIAC ら<sup>190</sup> も類似の報告をしている。

## 要 約

酵素活性に対する Ca の効果を調べた結果、1 mM の Ca で最大の活性が得られ、それ以上の濃度においては活性が低下した。この原因は基質として用いたカゼインがミセルを形成するためと推察された。微量の Ca 存在下において Mg は酵素活性を増加させたが、Ca 単独を用いた場合の最高値には及ばなかった。Na および K では効果が認められなかった。

EDTA を加えない酵素は 4°C で 7 日間まで保存しても活性の低下が起きなかったのに対し、EDTA を 2 mM 過剰に添加した場合は 0°C 6 時間で 1% 以下に活性が減少した。この EDTA 処理による活性低下およびこれに Ca を再添加した場合の再活性化は、いずれもその処理温度、処理時間、および EDTA または Ca の濃度に左右された。

EDTA 処理酵素に 2 価金属を添加した場合の活性回復率は、最高の Co が 88% を示し、それ以下は Co+Ca > Zn+Ca > Zn=Ca > Mg の順であった。GEDTA で Ca をキレートの後に Ca を再添加すると 98% までその活性は回復したが、Mg の場合は僅か 26% であった。

Ca が十分に含まれる条件下で o-PHE を 2 mM 添加した結果、酵素活性は約 4 割が残存した。この場合は処理温度を 80°C まで高めても、それ以上の残存活性の減少は認められなかった。

以上の結果を総合して、Ca は本酵素の安定性に寄与しているものと推察した。

## 第5節 加熱による酵素タンパク質の変化

前節において本酵素は Ca によって安定化されることが示されたが、低温菌プロテアーゼの耐熱性もまた Ca の有無に左右されることが知られている<sup>175</sup>。BARACH ら<sup>17</sup> は 149°C で酵素を加熱した場合、Ca を含んだ試料の活性の半減時間は含まない試料の 7 倍であることを示した。また STEPANIAC and FOX<sup>189</sup> は、100°C 30 秒間の加熱を行う場合には 2 mM の Ca が存在すれば十分な効果、すなわち 100 mM を加えた時と同程度の耐熱性が得られることを明らかにした。さらに MORIHARA<sup>150</sup> は Ca の有無により、活性の最低になる温度が変化する

ことを認めている。

これとは反対に、*Ps. fluorescens* M5のプロテアーゼの場合はCaによる熱安定性の増加は考えられないという報告もある<sup>120)</sup>。また8株の低温菌のプロテアーゼについてRICHARDSON and TE WHAITI<sup>179)</sup>は、149°C 30秒間の加熱に対する耐熱性が低いほどEDTAに対する感受性が高いことを示した。一方、本酵素のこれまでの加熱実験において、60°C以上の高温に加熱した場合に酵素液の濁る現象が観察された。これは高温における失活との関連を推測させるものである。

本節では以上の2点を確かめるべく、本酵素の金属を

EDTAでキレートした状態で加熱した酵素について、SDSゲル電気泳動およびタンパク質の定量、または酵素活性の面からその変化を追究した。さらに、高温加熱における白濁現象についても酵素活性との関連において考察を試みた。

#### 実験方法

EDTA処理酵素の活性測定は次のように行った。トリス・グリシン緩衝液(100 mM, pH 8.0)に溶解したEDTAを、2 mMの過剰になるように酵素液に添加して4°C 12時間保持した後、10 mM トリス・塩酸緩衝液

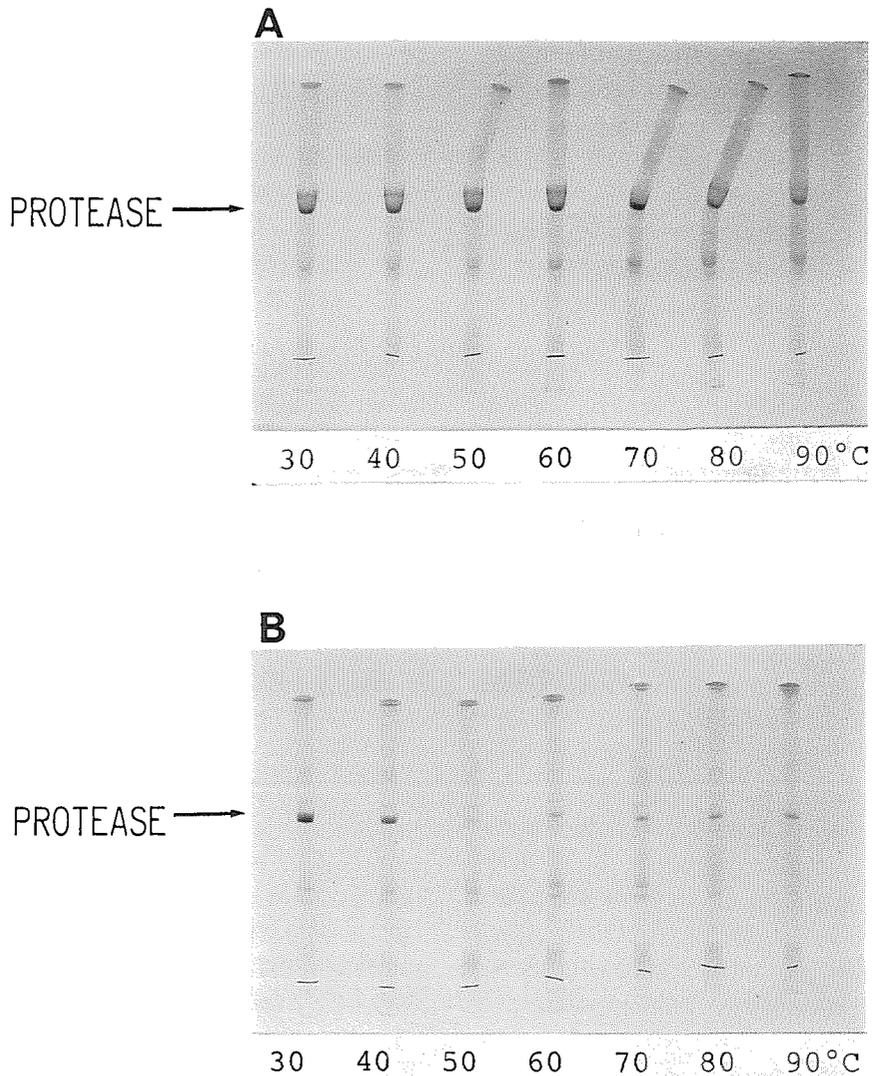


Fig. 29. SDS disc gel electrophoresis of the protease after heat treatment with(A) and without EDTA (B).

(pH 7.5) で 20 倍に希釈した。続いて各温度でそれぞれ 10 分間 (+CUT) の加熱を行い、同じ緩衝液に溶解してある Ca を各種過剰濃度になるように添加してから、さらに 4°C で 24 時間保持した後にその酵素活性を通常の 30°C, pH 9.6 で測定した。

タンパク質の定量法は本章第 1 節と同様、妨害物質存在下での LOWRY 法<sup>193)</sup>で行った。

SDS ゲル電気泳動は WEBER ら<sup>216)</sup>の方法で行った。キレート剤添加の場合は、EDTA を 2 mM 過剰に加えて 4°C 6 時間保持した試料を用いた。SDS 処理は 80°C 10 分間、泳動は 4°C でゲル 1 本当たり 2 mA の電流により試料先端が 7 cm 移動するまで行い、Coomassie Brilliant Blue R 250 で 1 時間染色した。ゲルを脱色の後、光电濃度計デジタルデンストロール DMU-33 (東洋科学産業) にかかけ、染色されたタンパク質バンドのうちで酵素活性を有する部分の面積比を算出した。

泳動後のゲルにおける酵素活性存在部位の確認は次のように行った。ゲルを縦割りに二分し、脱脂乳を含む寒天平板 (脱脂粉乳 2 g, 寒天 2 g, 蒸留水 100 ml, pH 7.5) に載せて 1 夜室温に放置後、そのまま、またはこの上に飽和硫酸アンモニウムあるいは 5% TCA を流して、いずれも平板の透明部分をもって酵素活性の存在位置とした。なお、泳動させた後にゲルに含まれる SDS を Triton X-100<sup>144)</sup> で取り除き、さらにこの Triton を緩衝液で洗い去った後、4 mm の厚さにスライスしたゲルから抽出した各フラクションについても、直接に酵素活性を測定して、その存在位置を確認した。

また、酵素液を各温度で 10 分間 (+CUT) 加熱し、冷却の後、直ちに 5 mm のガラスセルで 550 nm の波長を用いて室温で吸光度を測定して濁度とし、これを酵素の熱凝集の尺度とした。

## 結 果

これまでの実験における酵素の加熱は、安定化作用をもたらすと考えられる Ca の存在下で実施してきた。それにも拘わらず、50°C の加熱によって中温不活化 (第 3 節) が認められたことから、本節では EDTA の添加により Ca をブロックした条件下における酵素の加熱を試みた。Fig. 29 A は 2 mM 過剰の EDTA が共存する際の、各温度で加熱した酵素を電気泳動させたゲルの写真である。最も高濃度のバンドの部分が酵素活性を持つことが平板法と抽出法によって確かめられている。図から明らかなように、50°C で加熱しても活性部分の濃度は変わらず、90°C で僅かに減少しているのみである。

一方、Ca が含まれている状態で加熱した場合が Fig. 29 B であり、本章第 3 節の Fig. 17 に示した酵素活性のカーブに対応して、活性部分の濃度が減少している。この活性部分の全タンパク質濃度に対する割合をデンストメーターで算出した結果が Fig. 30 である。50°C の加熱処理で最低の面積となり、上述の Fig. 17 と非常に良く対応していることが判る。

加熱酵素の全タンパク質量を測定した結果が Fig. 31 であるが、EDTA を添加した場合には加熱温度による

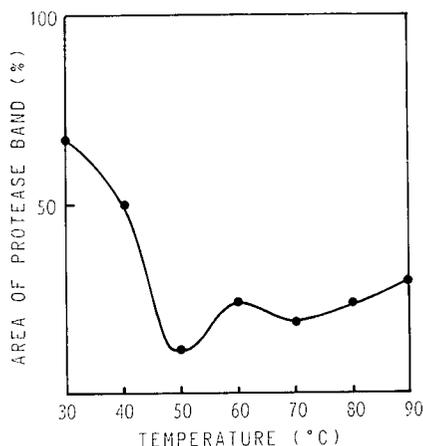


Fig. 30. Proportion of the area of active protein band to the total protein after SDS disc gel electrophoresis of heat-treated (without EDTA) protease.

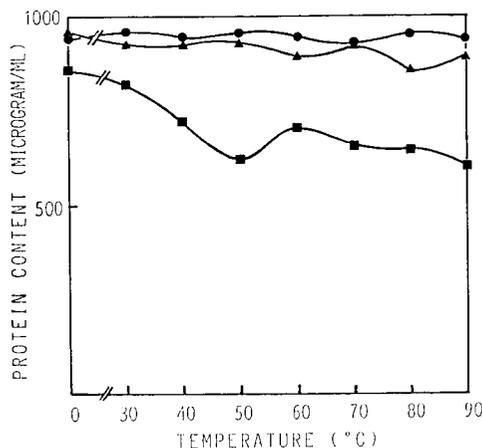


Fig. 31. Protein content of the enzyme preparation after heat treatment at indicated temperature with (●: ×20 dilution) and without 2 mM excess of EDTA (■: ×20 and ▲: ×100 dilution).

変化が認められない。これに対し、EDTAを加えずにCaの存在する条件下で加熱を行うと、酵素濃度の高い試料(20倍希釈)では、トリクロル酢酸で沈澱し得るタンパク質量が50°C以上の加熱によって減少した。しかし希薄な酵素濃度の場合(100倍希釈)にはこの現象が認められず、いかなる加熱温度で処理しても一定のタンパク質量が保たれた。

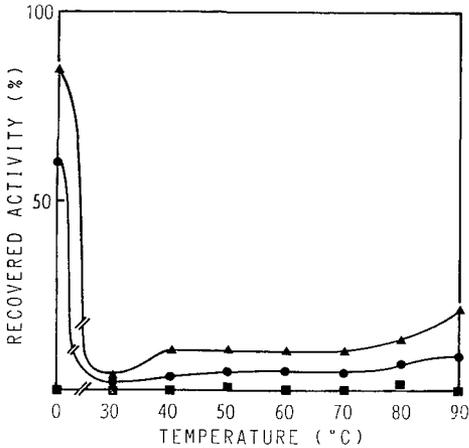


Fig. 32. Recovery of the proteolytic activity of EDTA-(2 mM excess at 4°C for 12 h) plus heat-treated enzyme 24 h after addition of calcium at 4°C (▲: 14.2 mM excess, ●: 2.8 mM excess, and ■: no addition). Assay condition was 30°C for 10 min at pH 9.6.

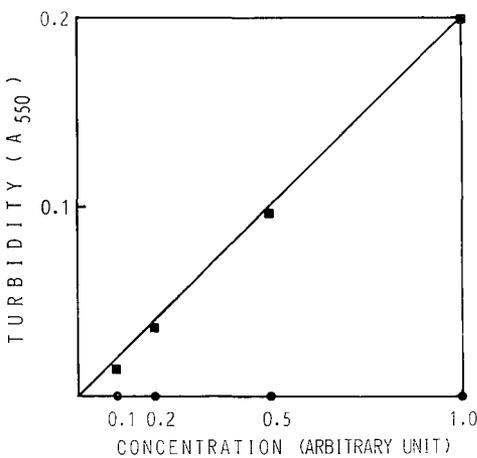


Fig. 33. Effect of enzyme concentration on aggregation of the protease by heating at 80°C for 10 min (■) and 50°C for 10 min (●).

EDTAを添加して各温度で加熱の後、各種濃度のCaを再添加した場合の酵素活性の回復率をFig. 32に示した。Caの添加濃度に応じて回復率が上昇しているが、注目すべきは、中温不活化のパターンが消失し、50°Cの加熱においても40または60°C加熱と同様の酵素活性が得られること、さらにCaが14.2 mM過剰に存在する場合にも、活性が元の僅か3.7%までしか回復しないことの2点である。

酵素液の濁りに関しては、酵素濃度によって影響を受けるか否かを最初に確かめた。Fig. 33に示したように、80°C 10分間の加熱を行った際には直線的な濃度依存性

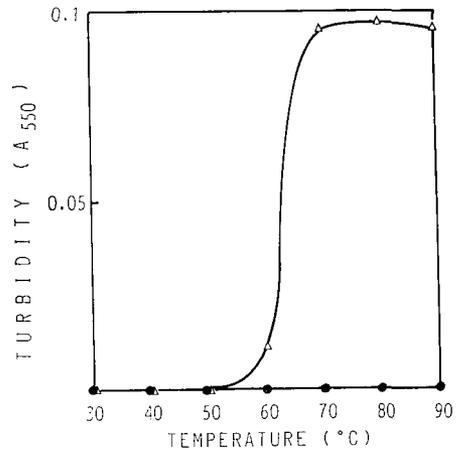


Fig. 34. Aggregation of the protease by heating with (●) and without 2 mM excess of EDTA (△).

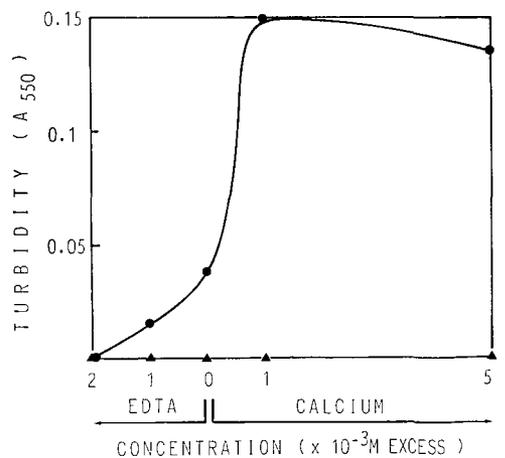


Fig. 35. Effect of calcium and EDTA concentration on aggregation of the protease heated at 80°C for 10 min (●) and 50°C for 10 min (▲).

が現れたのに対して、50°C 加熱では濁度の増加が全く認められなかった。続いて2倍に希釈した酵素を用いて各温度における濁度の増加を測定した。Fig. 34 から明らかのように、EDTAを2mM過剰に添加した試料では濁度の増加は生じなかったが、Caの存在下では60°Cの加熱で濁度が上昇し始め、70°Cで最大に達した後、この値が90°Cまで続いた。また、Fig. 35の実験では、CaまたはEDTA濃度を変化させた場合の濁度がCa 1mMで最大になることが示された。

### 考 察

プロテアーゼの熱安定性にCaが大きく貢献し、その自己分解を防いでいることは多くの研究者によって報告されている<sup>20,125,185,206</sup>。しかしFig. 29Bに示した本実験の結果は、Ca存在下における中温不活化が酵素濃度依存性を有するタンパク質の減少を伴っており(Fig. 30, 31)、前節までの実験結果と考え併せると、この失活はCa存在下で自己消化したためであると結論することができ<sup>39,212</sup>。低温菌のプロテアーゼが50°C前後で自己消化することは良く知られており<sup>19,177,189</sup>、RICHARDSON<sup>177</sup>は、150°Cという高温加熱の場合でも最初の急速な失活は酵素の自己消化によるものであり、続いてそれよりも遅い熱失活が起きると考えている。

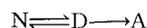
Ca存在下で加熱処理を行った場合、Fig. 31に見られるように高濃度試料では80°C以上におけるその全タンパク質濃度が減少したが、これは高温処理中にタンパク質分解酵素としての働かしを示して(本章第2節のFig. 12)、共存する不純物タンパク質を分解した結果であると考えられる。このことは、高温処理を行っても酵素タンパク質部分がかかなり残るパターンを見せたSDSゲル電気泳動の結果(Fig. 29)が裏付けている。一方、CaをEDTAによってキレートした場合には、酵素タンパク質は50°C付近の加熱によっては分解せず、90°Cで僅かに減少した(Fig. 29, 31)。しかし、いずれの温度で処理した場合にもその加熱試料の酵素活性は殆ど認められなかった(Fig. 32)。

酵素にEDTAを添加して加熱の後、これにCaを再添加した結果、50°Cにおける中温不活化現象が消失した(Fig. 32)。Caの存在しない環境で加熱を行った場合には、50°Cにおける自己消化が起こらないために(Fig. 29A)、Caの再添加によって酵素活性が復活したものと考えることができる。EDTAでキレートした後にCaを再添加しない酵素は、いかなる温度処理を施した試料も酵素活性を現さない(Fig. 32)という事実から推定す

れば、Caは酵素活性の発現に必須であるとも考えられる。前節で明らかにしたような酵素の安定性に寄与する効果以外にも、Caの役割として、それが活性部位に関与しているか否かの結論を出すことは本実験結果のみでは不可能である。Caの働きは様々であり、酵素の耐熱性におけるCaの効果は酵素ごとに異なる<sup>211</sup>と言われていることから、さらに詳細な研究が必要である。

高温処理によるプロテアーゼの失活は酵素タンパク質の熱による変性に基づく通常考えられている。STEPANIAK and FOX<sup>189</sup>)は彼らの低温菌 *Ps. fluorescens* AFT 36 の場合には、高温処理によって酵素タンパク質が可逆的な構造変化をすると推定している。

本酵素をCaの存在下で50°Cまで加熱した場合は酵素液は濁らなかつたが、60~90°Cまでの高温においては酵素濃度に依存した濁度の増加が認められた(Fig. 33および34)。MOZHAEV and MARTINEK<sup>157</sup>)によれば、凝集により失活する酵素の速度論的段階は一般に次の式で表される。



ここでNは未変性、Dは変性、Aは凝集した、それぞれのタンパク質を表している。彼らはさらに、凝集の段階における反応は2次以上の次数を持っており、したがって酵素濃度の減少は凝集の程度ならびに速度を減少させるとも述べている。

本実験における濁度の上昇は、この加熱変性した酵素タンパク質の凝集の結果であると考えられる。50°Cで濁りを生じないのは同温度ではタンパク質が未変性であるため、ならびに自己消化を起こして酵素濃度が減少するために、凝集するのに必要な濃度に達しないのが原因であろう。本酵素の特徴は、このような高温処理で凝集を起こしても30°Cおよび80°Cにおける酵素活性が大部分残存している(本章第2節のFig. 13)ことである。なお、Ca濃度に依存した濁度の増加(Fig. 35)は、この凝集反応がCaの仲介を必要としていることを証明している。

### 要 約

Caの存在下または非存在下に各種温度で本酵素を加熱し、その際に認められる酵素液の濁りおよび酵素タンパク質の分解について観察した。

SDS電気泳動の結果ならびに酵素標品のタンパク質量を測定した結果から、Caが存在する場合には加熱後の酵素活性と平行した酵素タンパク質量の減少の生じることが判明した。一方、EDTAでCaをキレートした

場合には酵素タンパク質の減少は起きなかった。また EDTA 処理酵素を加熱した後に Ca の再添加を行うと、通常は 50°C の加熱で見られる中温不活化現象が消失した。

以上の実験結果ならびに前節までの結果を基に、中温不活化は Ca 存在下における酵素タンパク質の自己消化によるものであると結論した。しかし Ca が酵素の安定性以外に、その活性部位にも関与しているか否かについては結論付けられなかった。

酵素を高温で加熱する際に生じる濁りについて分析を試みた結果、この現象は酵素濃度に依存しており、50°C では生じないことなどから、これが酵素タンパク質の熱変性に基づく凝集であると推察した。また EDTA を加えた後 Ca を再添加した実験から、本酵素の凝集には Ca が必要であることが判明した。

#### 第6節 分割カゼインに対する作用ならびにチーズに及ぼす影響

低温菌のプロテアーゼが牛乳タンパク質のうち、どの成分に作用するかについては、これまでも多数の研究が行われている。COUSIN<sup>35)</sup> の総説における一覧表、それを増補した表<sup>140)</sup>、その他の文献を総覧してみると、最も分解され易いのは  $\beta$ -カゼインであり、続いて  $\alpha_{s1}$ -または  $\kappa$ -カゼインとなり、乳清タンパク質はカゼインに比べれば一般に分解され難い<sup>5,48,110,116,176)</sup>。しかし菌株によっては上述の順序が逆になっている場合も見受けられ<sup>38,170,191)</sup>、またプロテアーゼが作用しても含まれる各カゼイン比は変化しないという報告<sup>127)</sup>もある。

一方、チーズに対する低温菌の影響に関する報告も多い<sup>13,34,105)</sup>。チーズ収量<sup>54,72,106,146,164)</sup>や、キモンによる凝固<sup>36,54,86)</sup>、さらにはチーズの熟成やフレーバーなどに関する研究<sup>37,92,110,147,218,221)</sup>などであるが、それらのうちには、低温菌そのものを接種するのではなく、プロテアーゼ標品を原料乳に添加したチーズを製造する実験は少ない<sup>86,218,221)</sup>。

本節では、本酵素がいずれのカゼイン画分に作用するのかを定性的にはゲル電気泳動で、さらに定量的にはトリクロロ酢酸可溶性物質の比色定量で確かめるとともに、本酵素を添加した小型チーズを実験室規模で製造し、そのタンパク質の分解過程を熟成3および6週間目に分分析した。

#### 実験方法

各分割カゼインは次のように調製した。すなわち、 $\alpha_{s1}$ -

カゼインは THOMPSON and KIDDY の尿素を用いる方法<sup>204)</sup>、 $\beta$ -カゼインは HIPP<sup>73)</sup>、PAYENS and VAN MARKWIJK<sup>172)</sup>、および ASCHAFFENBURG<sup>12)</sup> の3方法に準じた方法により、また、 $\kappa$ -カゼインは ZITTE and CUSTER<sup>226)</sup> による尿素・硫酸・エタノール法によって、いずれも全-カゼインから分割した後、これらは総て凍結乾燥して 4°C に保存した。全-カゼインはプロテアーゼ活性測定用基質と同じ標品を使用した。これらのカゼインを酵素反応の基質として使用する際には、50 mM トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.5) 中の 0.2% 溶液として用いた。

タンパク質分解度は前節までの酵素活性測定法に準じ、酵素反応をタンパク質沈澱試薬で止めた後に、濾液を炭酸ソーダでアルカリ性にして Folin 試薬で発色させ、これを 660 nm で比色した。カゼインそのものの吸光度を別に測定し、これに対する試料吸光度の比をタンパク質分解度 (%) とした。

ディスクゲル電気泳動は ORNSTEIN and DAVIS<sup>169)</sup> の方法で行った。0.2%  $\beta$ -メルカプトエタノールおよび 4.5 M 尿素を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルに 70  $\mu$ l の試料を載せて、室温でゲル1本当たり 3 mA の電流により 90 分間泳動した。ゲルの染色にはアミドブラック 10 B を用いた。

チーズは実験室規模でゴーダタイプ<sup>71)</sup> のものを製造した。原料乳は北海道大学附属農場ホルスタインの個乳をチーズ1個につき 2  $\ell$  ずつ用い、75°C 5 分間の保持殺菌を行った。乳酸菌スターターは Chr. Hansen 社製 CH-Normal 01 を、レンネットは同社製の錠剤製品を使用した。塩化カルシウムは原料乳の 0.01% 量を添加した。直径 7 cm、高さ 6 cm の円筒形にプレスしたグリーンチーズは 15°C で湿度無調整のふらん器に収め、表面が乾燥した時点でパラフィンコーティングを行った後、6週間まで同条件で熟成させた。

プロテアーゼをチーズに添加する場合は次の2通りの方法によった。①加熱処理酵素：原料乳の一部 (4.9 m $\ell$ ) をとり、これにその 1/40 量の酵素液を加えて 75°C 15 秒間+CUT の加熱を行い、殺菌済みの残りの原料乳に対してスターターを加える直前に添加した。②未加熱酵素：①と同量の未加熱酵素液を滅菌蒸留水 4.9 m $\ell$  で希釈し、殺菌後の原料乳に対してレンネットを加える直前に添加した。これらの酵素活性は加熱処理前の値で原料乳 2  $\ell$  当たり 40 ユニット (PU) である。

製造後3週間および6週間を経過した時点でチーズを分析に供した。表面約 3 mm を削り落としたチーズは細

切し、この5gをホルマリン3滴とともに2%クエン酸ソーダで溶解して濾過の後、100mlにメスアップしたものを全タンパク質測定を試料とした<sup>143)</sup>。遊離アミノ酸・ペプチド区分は、この試料5mlに15%(W/V)トリクロル酢酸20mlを加え、その濾液を用いて測定した<sup>143)</sup>。水溶性区分は、細切チーズ10gに50°Cの蒸留水をホルマリン3滴とともに加えて水溶性成分を抽出、これを繰り返した後、濾液を100mlにメスアップして試料とした。以上3種類の試料はいずれも2%クエン酸ソーダまたは蒸留水で希釈し、LOWRY法<sup>193)</sup>によって750nmにおける吸光度を測定し、これを標準曲線で換算したチロシン相当量で表した。

結果

各種の分割カゼインに対し、本酵素を反応混合液のml当たり3.6PUの濃度で作用させた結果をFig. 36およびFig. 37に示した。0°Cにおいてもカゼインの分解は速やかに進み(Fig. 36)、中でもβ-カゼインは全-カゼインの2倍以上の値を見せ、3時間で86%が分解した。これに続いてはα<sub>s1</sub>-カゼインの分解が速く、同じく3時間で56%に達した。25°Cで作用させた場合(Fig. 37)には全体に反応速度が0°Cに比べて速かったが、速度の序列は前者に等しく、β-, α<sub>s1</sub>-, 全-カゼインの順であった。

両温度における各カゼインの分解速度を比較するため

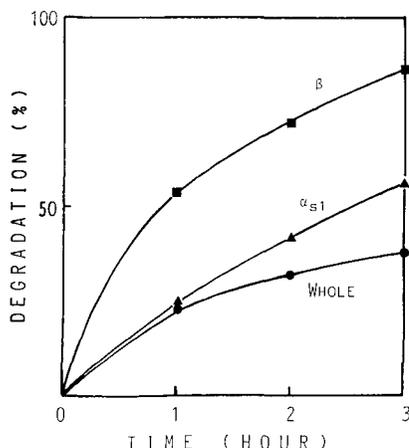


Fig. 36. Degradation of caseins by the protease at 0°C. Caseins (0.2% in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5) were incubated with 1% volume of the enzyme (3.6 PU in the reaction mixture). Degradation (%) = 100 × A<sub>660</sub> of the TCA-filtrate / A<sub>660</sub> of the casein itself.

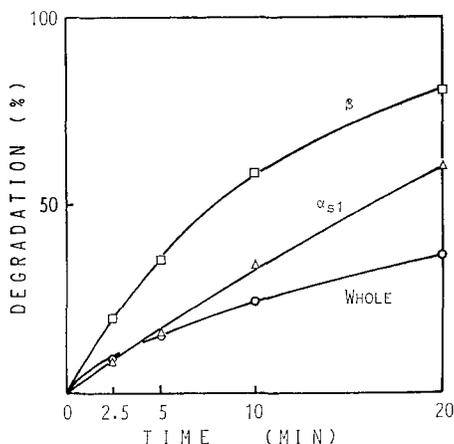


Fig. 37. Degradation of caseins by the protease at 25°C. See Fig. 36 for experimental conditions.

Table 11. Effect of temperature on proteolysis of caseins<sup>a</sup>

Temperature (°C)	Per cent of proteolysis		
	Whole casein	α <sub>s1</sub> -casein	β-casein
0	9	9	27
25	37	60	81
25°C/0°C	4.1	6.7	3.0

a) Casein substrate was incubated with 1% volume of the protease for 20 min.

に0°C 20分間の値を内挿して求め、これを25°Cのデータと比べたのがTable 11である。25°Cと0°Cとの分解速度の比がβ-カゼインでは3.0であるのに対し、α<sub>s1</sub>-カゼインでは6.7と2倍以上の値を示し、このことはβ-カゼインが低温において非常に分解されやすいことを意味している。

κ-カゼインに本酵素を作用させた場合、本実験で反応を止めるために使用したタンパク質沈澱試薬<sup>67)</sup>では沈澱が完全には形成されず濾紙を通過してしまうため、酵素作用の測定が不可能であった。しかし、Fig. 38のディスクゲル電気泳動図からは、15°C 1時間または30°C 10分間の作用によってκ-カゼインの大部分が分解されていることが判る。さらにこのκ-カゼインに加え、僅かのα<sub>s1</sub>-を除く殆どのカゼインが15°C 5時間または30°C 1時間の処理によって分解することもまた、Fig. 38から明らかである。

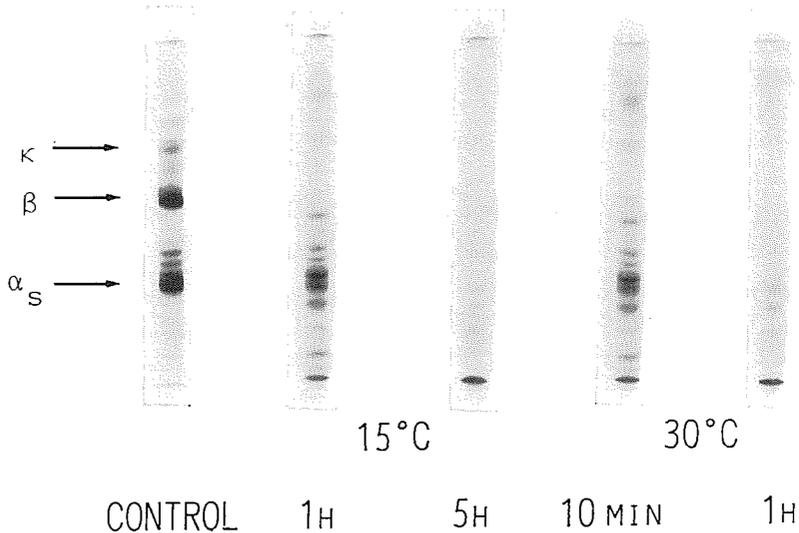


Fig. 38. Degradation of whole casein by the protease. Twenty ml of whole casein (0.5% in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5) was incubated with 0.1 ml (ca 40 PU) of the enzyme. The samples were analyzed with disc gel electrophoresis containing 0.2% of  $\beta$ -mercaptoethanol and 4.5 M of urea.

Table 12. Effect of *Pseudomonas azotoformans* No. 400 protease on the cheese ripening

	Green cheese yield (%)	Total rotein <sup>c</sup> (%) : A		Water soluble fraction <sup>c</sup> (%) : B		Mature index (100×B/A) (%)		FAA <sup>d</sup> and peptides <sup>c</sup> (%)	
		3 wk	6 wk	3 wk	6 wk	3 wk	6 wk	3 wk	6 wk
Exp. I									
Raw <sup>a</sup>	11.0	4.79	5.40	0.59	0.76	12.3	14.1	0.43	0.38
Heated <sup>b</sup>	11.0	4.74	4.92	0.58	0.79	12.3	16.1	0.36	0.34
Control	11.4	5.11	5.18	0.60	0.82	11.7	15.9	0.43	0.37
Exp. II									
Raw	12.7	5.10	4.94	0.54	0.73	10.7	14.7	0.22	0.31
Heated	12.5	4.95	4.99	0.54	0.72	10.9	14.4	0.23	0.29
Control	12.5	4.80	5.25	0.58	0.71	12.0	13.6	0.23	0.29

a) Unheated enzyme was added to the milk before RENNETTING.

b) Enzyme heated 75°C/15 sec was added to the milk before adding STARTER.

c) Estimated by Lowry's method and expressed as tyrosine equivalent.

d) Free amino acids.

プロテアーゼを添加して製造したチーズの分析結果が Table 12 である。2シリーズ行った実験のうち、実験 I に比べて II のグリーンチーズ収量が少しばかり多い。しかし各シリーズ内では対照チーズとの差が殆ど認められなかった。水溶性区分の全タンパク質に対する比率を

とった熟成率は、いずれも 11~16% の範囲内にあった。同一シリーズのチーズは互いに似かよった熟成率を示し、対照チーズとプロテアーゼ添加チーズとの差において特定の傾向は認められなかった。遊離アミノ酸・ペプチド、すなわち 12% TCA 可溶性非タンパク態窒素に相

**Table 13.** Degradation of caseins in cheese

	Casein ratio (Alpha-s <sub>1</sub> /Beta) <sup>a</sup>	
	3 wk	6 wk
Exp. I		
Raw <sup>b</sup>	0.56	0.33
Heated <sup>c</sup>	0.51	0.29
Control	0.60	0.33
Exp. II		
Raw	0.49	0.35
Heated	0.49	0.34
Control	0.45	0.35

a) The ratio in whole casein was  $1.15 \pm 0.07$  (SD,  $n=9$ ).

b) and c) See foot note in Table 12.

当する区分は、実験 I では 3 週間よりも 6 週間熟成の方が減少する傾向を示した。

チーズの熟成進行に伴う各カゼインの分解過程を知るために、泳動したディスクゲルをデンストメーターにかけ、その  $\alpha_{s1}$ -/ $\beta$ -カゼイン比を計算して Table 13 に示した。熟成の進行に伴って比率はいずれも低下したが、対照チーズとの間に顕著な差は認められなかった。

### 考 察

全-カゼインに含まれる主要カゼインのうち、 $\beta$ -カゼインに対して低温菌プロテアーゼが優先的に作用するという報告は多い<sup>5,35,48,110,116,140,176</sup>)。しかし菌株によっては必ずしも  $\beta$ -カゼインが最も速く分解されるという訳ではない。STEPANIAK らが用いた *Ps. fluorescens* AFT 36 では  $\kappa$ - $\alpha_{s2}$ - $\beta$ - $\alpha_{s1}$ -カゼインの順序となっており<sup>191</sup>)、PATEL らの実験では使用した 6 株のうち、測定しなかった 1 株を除いた総ての菌が  $\alpha$ -を  $\beta$ -カゼインよりも速く分解した<sup>170</sup>)。また COUSIN and MARTH<sup>28</sup>) も菌株によって分解の序列が異なることを示している。さらに McKELLAR<sup>127</sup>) はプロテアーゼを作用させても各カゼインの相対比が変化しないことを報告している。

本実験の結果では、0°C および 25°C のいずれの温度においても  $\beta$ - $\alpha_{s1}$ ->Whole(全)-カゼインの順となったが (Fig. 36 および Fig. 37), その速さの比は温度によって異なることが明らかになった。すなわち Table 11 に示したように、低温では  $\beta$ -カゼインの分解速度の低

下が他のカゼインに比べて非常に少なく、25°C/0°C の比率で見ると半分以下となっている。このことを別の形で表現すると、タンパク質分解度が 50% になる時間を Fig. 36 と 37 から求めて比較した場合、 $\alpha_{s1}$ -カゼインでは 0°C から 25°C への温度上昇に伴って 152 分間から 15 分間へと約 1/10 に短縮されたのに対し、 $\beta$ -カゼインでは約 1/7 になったに過ぎない。このことは  $\beta$ -カゼインが低温ではモノマーとして存在する<sup>172</sup>) ことが大きな原因であると考えられる。基質としてカゼインを用いる実験においては、この点を十分に考慮しなければならない。

$\kappa$ -カゼインの分解は本実験で用いた方法によっては定量不可能であり、他のカゼインと比較することはできなかったが、Fig. 38 に示すように、ポリアクリルアミドを用いたディスクゲル電気泳動の結果から酵素作用の早期に  $\beta$ -カゼインとともに分解されることが定性的に認められた。 $\kappa$ -カゼインの分解を定量的に測定するためには別の実験方法で行う必要がある。

本酵素を添加して製造した熟成前のチーズ収量は実験 I と II とでは若干異なったが、対照と比較した場合には差が認められなかった (Table 12)。低温菌を原料乳に添加して製造したチーズでは、多くの場合に収量が減少する<sup>54,72,146,164</sup>)。しかし、LAW ら<sup>106</sup>) は低温菌が 107/ml まで原料乳中で増殖してもチェダーチーズの収量にはあまり影響を与えないと報告している。

Table 12 から明らかのように、本実験の結果は熟成率においても、また遊離アミノ酸・ペプチド区分においても対照チーズとの差が全く認められないことを示している。しかし他の研究者達はタンパク質分解力が対照のチーズよりも高くなることを報告している<sup>37,92,218,221</sup>)。このように対照との差が認められないという本実験における結果が、用いた酵素の 20 PU/ $\ell$  (原料乳) という使用量の少なさによるものであるか否かを直接に他の報告における酵素量と比較することは、酵素単位の表し方が研究者によって異なるために困難である。本酵素を牛乳とともに加熱殺菌してから添加しても、酵素を生そのままに添加したチーズと同様な分析結果であったことは、本章第 3 節で示した本酵素の耐熱性から予想された通りである。以上の事柄を考え併せると、チーズの収量や熟成率などにおいて対照チーズとの差、あるいは酵素の加熱処理の有無における差が認められるようになるには、20 PU/ $\ell$  よりも多量の酵素を原料乳に添加する必要があると推察される。

実験チーズ試料をディスクゲル電気泳動にかけ、熟

成進行に伴う残存  $\alpha_{s1}$ - $\beta$ - のカゼイン比を計算した結果 (Table 13), 0.3~0.6 の範囲内の数値となり, 熟成が進むとその値は減少した。プロテアーゼ活性の測定に用いる全-カゼインの電気泳動図から計算した値は 1.15 であるので, 本チーズでは  $\alpha_{s1}$ -カゼインが選択的に分解されたと見なすことができよう。

チーズにおける各カゼインの分解パターンは大きく 3 つに分けられる。LINDQUIST and STORGARDS<sup>113)</sup> による  $\alpha$ -型,  $\beta$ -型, および非特異型がそれで, 殆どのチーズは  $\alpha_{s1}$ -カゼインの分解が  $\beta$ -カゼインのそれよりも大きい  $\alpha$ -型であると言われている<sup>119,187)</sup>。本酵素によるカゼインの分解は  $\beta$ -カゼインが優先されるにも拘わらず (Fig. 36 および 37), チーズ試料の電気泳動の結果では対照と同様に  $\alpha_{s1}$ -カゼインが主として分解された。このこともまた, 本実験で使用した酵素濃度ではチーズに影響を及ぼさないことを裏付けている。

使用酵素濃度の 20 PU/ $\ell$  は Fig. 36 および 37 に示した実験における濃度の 1/180 であるが, チーズへの添加に際してこの濃度を採用したのは次の根拠に基づいている。すなわち, 酵素生産の活発な低温菌を牛乳に対して 0.5% 量接種し, 25°C で 24 時間経過すると約 20 PU/ $m\ell$  のプロテアーゼが生産される。今これを汚染牛乳と仮定し, この 0.1% 量が新鮮牛乳に混入したと想定した場合の酵素濃度が 20 PU/ $\ell$  となる。

低温菌を接種してチーズを製造する場合には乳酸菌によって低温菌の発育が抑制され, タンパク質分解力の低下が起きると言われ<sup>92,146)</sup>, しかも生産された酵素は本章第 1 節に示したように低 pH では不安定かつ活性が低い。そのため, 乳酸菌スターターが正常に働いている限り, カゼイン溶液中に中性付近の pH で酵素を直接作用させた場合よりもかなり低いタンパク質分解力を示すものと考えられる。本実験のように酵素を原料乳に直接添加した場合は, 生菌を接種したケースとは幾分異なる考え方をしなければならない。しかし, いずれにしても熟成初期における低 pH の影響は当然被ることになる。少量の低温菌プロテアーゼを添加した場合にチーズの熟成を左右する効果が認められないのは, 以上の理由によるものと推察される。

## 要 約

本酵素が全-カゼイン中のいかなる成分に作用するかを知るため, 分割カゼインに対して 3.6 PU/ $m\ell$  の濃度で酵素を添加して反応させた。その結果, 0°C および 25°C のいずれの温度においても  $\beta$ - $\alpha_{s1}$ ->全-カゼインの順

序でタンパク質分解が遅くなる現象が認められた。両温度における速度比をとった場合,  $\beta$ -カゼインは 3.0,  $\alpha_{s1}$ -カゼインは 6.7 を示し, 前者が低温において非常に酵素作用を受けやすいことが明らかとなった。 $\kappa$ -カゼインの分解は本実験に用いた方法では測定不可能であったが, ディスク電気泳動の結果,  $\beta$ -カゼインと同様に反応初期における分解が定性的に証明された。

上記濃度の 1/180 に相当する量の酵素を未加熱のまま, または加熱した後に原料乳に添加してチーズを製造した結果, グリーンチーズ収量, 熟成率, アミノ酸・ペプチド区分のいずれにおいても対照チーズとの差は認められず, 少量の低温菌プロテアーゼはチーズ製造に影響しないことが判明した。

ディスクゲル電気泳動で分析の結果, チーズの熟成に伴い  $\alpha_{s1}$ -カゼインが  $\beta$ -カゼインに優先して分解されることが示され, 6 週間の熟成で  $\alpha_{s1}$ - $\beta$ -カゼインの比は 0.29~0.35 となった。

## 総 合 討 論

牛乳の乳質を問題にする場合, これには成分的な乳質と衛生的な乳質とが含まれているので, 両者は通常, 区別して論じられる。前者が飼養管理や乳牛の生理条件等, 概ね搾乳以前の条件によって左右されるのに対し, 後者は搾乳時または搾乳後の生乳取扱条件によって大きく支配される。酪農家において生乳を低温保存する機会および保存時間は, 集乳の合理化が進められている今日, 以前に比べて増加する傾向にある。そこで保存中に生じる衛生的乳質の変化が注目されることになる。この低温保存中の乳質変化に強力に関与し, その原因となっているのが低温菌である。

低温菌は乳牛および搾乳を取り巻く様々な環境から生乳に混入し<sup>200,201)</sup>, そのため生乳菌叢の大きな割合を占めており, 僅かな冷蔵温度の上昇によっても発育速度が大幅に増加する<sup>133)</sup>。その結果, 低温菌の生産する酵素, すなわち, プロテアーゼやリパーゼによって乳タンパク質や乳脂肪が分解され, そのために乳質の変化が起こってくる。本研究では両酵素のうち, 特にプロテアーゼに焦点を当てることとした。

このプロテアーゼの生産は酵素の適度な供給によって促進されるため (第 I 章 2 節), 低温で生乳を保存する際には過度の搅拌を避けねばならない。また, 長時間の保存によってプロテアーゼが蓄積された原料乳は, これがたとえ少量であっても他の良質な原料乳に混入した場合には, 酵素の高温における熱抵抗性が高いだけに (第 II

章 3 節), 汚染された側の菌数が少ない場合でも UHT 処理乳 (LL 牛乳等) における凝固, 苦味などの欠陥の原因となる可能性がある<sup>51,140</sup>。

プロテアーゼが生産される量は条件によって異なるものの, 25°C 24 時間で 20~100 PU/ml である (第 I 章 1 節)。今, この最低の酵素量が生産されたと仮定し, さらにその 1% が UHT 殺菌で生き残ったとした場合, この残存酵素の作用によって牛乳の風味変化が引き起こされる推定限界値<sup>138</sup>) にまでタンパク質分解の目安としての VBN (揮発性塩基態窒素) 量が増加する時間を計算してみると, 30°C で約 6.5 時間となる。実際には複雑な条件が重なるので計算とは異なることが予想されるが, この数字は牛乳生産者の生乳取扱いにおける生乳冷却の重要性を物語っている。さらに室温で保存可能とされる LL 牛乳の原料乳の場合は, 搾乳直後から十分に冷却された低温菌数の少ない牛乳を用い, できるだけ加熱処理に到るまでの保存時間を短縮させることが重要である。このように本酵素が牛乳に作用する際にはタンパク質分解が短時間で起きるにも拘わらず, 以下に述べるような部分精製酵素を少量添加してチーズを製造した結果では, その熟成過程に対照との差は認められなかった (第 II 章 6 節)。

さて, 本研究においては主として牛乳を取り扱う実際面, すなわち実用的観点から乳質変化の原因物質としてのプロテアーゼについて, 諸性質を明らかにする意図をもって実験が行われている。使用する酵素を部分精製したのは次の理由によるものである。酵素の働きを追究する基礎的実験では, 一般に, 可能な限り精製された標品を使用することが重要である。しかし本研究の場合は上述のように実用的見地から牛乳中におけるプロテアーゼの作用を知ることを目的としている。完全に精製された酵素の場合には, もともと共存している管の夾雑物 (リパーゼなど他の種類の酵素や, 活性促進物質, 同抑制物質など) が取り除かれてしまう。その結果, 本来これらの物質が共存することによって牛乳中において生じたであろう相互作用が, そのような純粋な酵素を使用した場合には認められなくなる。したがって牛乳中で低温菌によって生産されたプロテアーゼの挙動を知るためには酵素の精製度の低い方がむしろ望ましいとの結論に達し, 部分精製酵素を使用することとした。

本酵素の至適 pH は 9.6, 至適反応温度は 30°C であり, 反応にはカルシウム (Ca) が必要である (第 II 章 1, 2, 4 節)。凍結や冷蔵あるいは高温における酵素の安定性 (高温では耐熱性) は総て酵素濃度による影響を受ける

(第 II 章 1, 3, 5 節) ことから, これらの各温度で酵素を保存あるいは加熱した場合の酵素活性の減少は自己消化によるものと推定した<sup>20,39,212</sup>。

本プロテアーゼの耐熱性は非常に高く, 140°C の加熱処理をしても酵素活性が残存し, 90°C までの加熱では失活反応の濃度依存性が認められた (第 II 章 3 節)。アレニウスプロットからは, 70°C 付近で酵素タンパク質に構造変化の起きることが推定された (第 II 章 3 節) にも拘わらず, 80°C において酵素活性が認められている (第 II 章 2 節)。このことは, 100°C 以下の加熱では熱変性に加えて自己消化も起こり得ることを示唆している。一方, 本酵素が部分精製標品であることを考えると, この現象が 2 種類以上の酵素の存在に基づいている確率が高いとも言えるが, 詳しくは今後の検討に待たねばならない。しかしながら実用的な意義を考慮した場合, 本酵素が 80°C で活性を有する現象の意味は重大である。牛乳・乳製品における予熱や殺菌などの加工処理工程中, この温度で多少なりとも保持される際に, もしも耐熱性を有するプロテアーゼが存在すれば, 乳タンパク質が分解されることになるからである。

実用的に重要な本酵素の最大の特徴は, 上述のように 140°C で加熱された酵素が 30°C における残存活性を有することである。現在我が国における市乳の多くが 120~130°C で数秒間の殺菌処理を施されており, さらに LL 牛乳ともなれば 140°C 前後の高温で加熱されることになるが, 本酵素はこれらの処理によっても完全には失活しない。したがって, 特に LL 牛乳の場合には室温で長期間保存する可能性が高いために, その間に牛乳が変質して凝固や風味変化などの欠陥を引き起こす原因となる<sup>1,14,21,24,31,35,46,57,105,108,132,140,194</sup>。

酵素加熱実験の温度範囲内では 50°C 付近で最も活性が低下した (第 II 章 3 節)。この中温不活化は他の低温菌プロテアーゼについても自己消化の結果であるとされ<sup>19,120,177,189</sup>, 本研究においても同じ結論が得られた (第 II 章 5 節)。50°C は本酵素の自己分解が最大に行われる温度ということになる。しかし, STEPANIAK and FOX<sup>189</sup>) の扱った酵素の場合には, 55°C で予熱しても一旦冷却しなければ失活しないことが明らかにされており, この問題はさらに詳しい検討が必要かも知れない。一方, 実用的には ADAMS が, UHT 処理に加えて牛乳を 50~60°C で 5~60 分間加熱してその保存性を向上させるという米国特許<sup>4</sup>) を得ているが, この点に関して GRIFFITHS ら<sup>66</sup>) は, 菌の種類によってはこうした処理が無効であることを指摘している。

プロテアーゼの熱安定性を維持する効果をCaが果たしているという報告は多く<sup>20,125,185,206</sup>、その役割はBARACH and ADAMS<sup>16</sup>)によれば、nativeなタンパク質構造を維持するというよりも、Caと酵素タンパク質とが相互作用して急速かつ正確なrenaturationを起こすためであるという。しかしMARSHALL and MARSTILLER<sup>120</sup>)は、彼らの低温菌プロテアーゼではCaによる熱安定性は考えられないとしている。

本酵素の場合にはCaが安定性に寄与しているという結論が得られた(第II章4,5節)。酵素を60°C以上の高温で加熱するとCaの存在下では酵素タンパク質の凝集が生じる(濁度の上昇)。このことから、本酵素が高い温度で熱失活を起こし難いのは、高温で酵素を加熱することによって酵素タンパク質の高次構造が変化し、さらにCaが関与して凝集を引き起こし、その結果として酵素の活性部位が保護されるためであると推定される(第II章5節)。これに対し、反応系にキレート剤を添加した場合には酵素活性が現れず、したがって自己消化も起きず、それに由来する中温不活化も見られない。しかし、これに再びCaを加えると酵素活性が認められるようになる(第II章5節)。以上の結果は、Caが酵素の安定性のみならず活性部位にも影響を与えていることを窺わせるものであるが、この点は今後の研究に委ねたい。

全-カゼインの主要な成分のひとつ、 $\beta$ -カゼインに対して本酵素は他のカゼインに対するよりも強力に作用した。この作用は0°Cにおいても充分に強く、低温では $\beta$ -カゼインに対する特異性が高まった(第II章6節)。低温菌プロテアーゼの特徴として、このように低温における酵素活性が高いにも拘わらず、既に述べたように原料乳に本酵素を添加して製造したチーズの熟成は対照のそれと変わらず(第II章6節)、チーズにおいては乳酸菌スターターなど、酵素作用を左右する要因、特にpHの低下がプロテアーゼ活性に強く影響しているものと推測された。

## 総 括

牛乳より分離した低温菌が生産するプロテアーゼの諸性質を、特に各種温度における酵素の熱安定性を中心として追究した。

(a) 分離低温菌 *Pseudomonas azotoformans* No. 400 がプロテアーゼを生産する培地としては脱脂乳が合成培地よりも優れており、合成培地ではいわゆる Glucose effect によって酵素の生産が抑制された。半合成培地としては次の組成が採用された。1ℓ当たり硫酸ア

ンモニウム 10 g, リン酸1ナトリウム・2水塩 10 g, 塩化カルシウム・2水塩 1.5 g, 塩化マグネシウム・4水塩 1.6 g, 硫酸カリウム 0.5 g, 硫酸亜鉛・7水塩 0.3 g, 酵母エキス 20 g, pH 6.5。

(b) 脱脂乳培地で振盪培養を行うと、生産される酵素量は約2倍に増加したが、半合成培地では逆に生産量が減少した。脱脂乳培地における最大の酵素生産は振盪数 140 rpm で認められた。

(c) 半合成培地の培養上澄から、56% 飽和の硫酸アンモニウム、および60% アセトンを用いて純度指数 3.23, 回収率 47.4% でプロテアーゼが部分精製された。この酵素の最大活性はpH 9.6にあり、pH 7.5では40°C 20分間の保持で酵素活性が急激に減少した。酵素の凍結保存ならびに凍結・融解の繰り返し実験では残存活性が最初に大きく減少したが、それ以降の活性低下は緩慢となった。

(d) 酵素反応の至適温度は30°Cにあり、0°Cにおいても30°Cの4割の酵素活性が認められた。40~50°Cでは最低の値を示したのに対し、60°C以上では再び活性が高まった。50°Cの加熱処理を施した酵素は、30°Cで酵素活性を測定すると活性を殆ど示さないにも拘わらず、80°Cで測定するとかなりの活性が認められた。

(e) 本プロテアーゼの耐熱性は酵素濃度に影響されたが非常に高く、140°Cで加熱しても活性が残存した。失活データのアレニウスプロットから中温不活化の最大点は50°Cにあり、40~50°C間の活性化エネルギーは540.9 kJ/mol, 70~90°C間のそれは110.7 kJ/molと計算された。低温菌16菌株について中温不活化を調べた結果、11株にこの現象が認められた。

(f) 酵素活性はカルシウムイオンが1 mM存在する際に最高値を示したが、EDTAをCaに対して2 mM過剰に加えた場合は、0°C 6時間の保存により活性が1%以下に減少した。EDTA処理後にCo, Zn, Ca, Mgを再添加すると酵素活性は最高88%(Co)まで回復した。さらにGEDTA, オルトフェナントロンを用いた実験等を総合してCaは本酵素の安定性に寄与していると判断した。

(g) Caの存在下または非存在下において本酵素を各種温度で加熱し、SDS電気泳動ならびにタンパク質量を行った結果から、中温不活化は酵素タンパク質の自己消化に基づく現象であると結論した。また、Ca存在下60°C以上の加熱において観察される酵素液の濁りは、酵素タンパク質の熱変性による凝集であると推察した。

(h) 本酵素は $\beta$ -カゼインに最も強く作用し、これに

続いて  $\alpha_{s1}$ 、全-カゼインの順序でタンパク質分解が行われた。 $\beta$ -カゼインは  $0^{\circ}\text{C}$  においても酵素に対する感受性が大きく、 $25^{\circ}\text{C}/0^{\circ}\text{C}$  の速度比は  $\alpha_{s1}$ -カゼインが 6.7 であるのに対し、 $\beta$ -カゼインは 3.0 を示した。本酵素の 20 PU/ $\ell$  を原料乳に添加してチーズを製造し、その熟成を 6 週間まで観察した結果、対照チーズとの差は認められず、チーズ製造における実際面では乳酸菌が引き起こす pH 低下などの原因により、少量の酵素が存在しても熟成に影響を与えないことが判明した。

### 謝 辞

本論文作成にあたり適切なるご指導とご援助を、さらにご校閲の労を賜った北海道大学畜産食品製造学講座安井 勉教授に衷心より感謝を申し上げる。また実験に使用した菌株の分与や文献のご教示を賜り、ご多忙中にも拘わらずご校閲の労をおとりいただいた北海道大学応用菌学講座高尾彰一教授に厚く感謝の意を表す。さらに長年に亘るご指導とご激励ならびにご校閲を賜った北海道大学酪農科学研究施設斎藤善一教授に深甚なる感謝を申し上げます。

本研究はテーマを初めとする端緒から長年月に亘るご指導とご鞭撻を賜った北海道大学名誉教授・現在九州東海大学農学部有馬俊六郎教授の絶大なるご支援によって遂行された。衷心からなる御礼を申し上げます。

さらに本論文は著者と共に実験や討論を行った星野俊之博士を始めとする大学院生や学生、多くの実験上の便宜を提供戴いた本学農学部附属農場畜産製造部の長橋隆雄技官を始めとする諸技官、酪農科学研究施設仁木良哉助教授、ならびに研究を支援して下さった畜産食品製造学講座の高橋興威助教授、森田潤一郎博士、服部昭仁博士のご協力の賜として完成した。ここに深く感謝する次第である。なお、本研究の一部は昭和 44 年度森永奉仕会研究奨励金によって行われた。

### 引用文献

- ADAMS, D. M.: The role of heat resistant bacterial enzymes in UHT processing, *Proc. int. conf. UHT processing and aseptic packaging of milk and milk products*, p. 89-107. North Carolina State Univ., 1979
- ADAMS, D. M., BARACH, J. T. and SPECK, M. L.: Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin, *J. Dairy Sci.*, **58**: 828-834. 1975
- ADAMS, D. M., BARACH, J. T. and SPECK, M. L.: Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultra high temperature treatment, *J. Dairy Sci.*, **59**: 823-827. 1976
- ADAMS, D. M. Jr., BARACH, J. T. and SPECK, M. L.: Inactivation of heat resistant bacterial proteases in ultra-high temperature treated milk, *U. S. Patent*, 4 175 141. 1979 (*Dairy Sci. Abstr.*, **42**: [4855]. 1980)
- ALICHANIDIS, E. and ANDREWS, A. T.: Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR-11, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**: 424-433. 1977
- AMBORSKI, R. L., BORALL, R. and THUNE, R.: Effects of short-term cold storage on recovery of proteases from extracellular products of *Aeromonas hydrophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 456-458. 1984
- AM. PUB. HLTH. ASSN.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 11th ed., p. 148, 47-82, 415. APHA, 1960
- AM. PUB. HLTH. ASSN.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 12th ed., p. 70. APHA, 1967
- AM. PUB. HLTH. ASSN.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 13th ed., p. 102-104. APHA, 1972
- AM. PUB. HLTH. ASSN.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14th ed., p. 110-113. APHA, 1978
- AM. PUB. HLTH. ASSN.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th ed., p. 194-197. APHA, 1985
- ASCHAFFENBURG, R.: Preparation of  $\beta$ -casein by a modified urea fractionation method, *J. Dairy Res.*, **30**: 259-261. 1963
- AUCLAIR, J. and MOCQUOT, G.: Growth of psychrotrophic organisms and their influence on cheese and fermented milks, IDF Sussex Seminar, 1968 (乳技協資料, **18**(5): 32-36. 1968)
- BAKER, S. K.: The keeping quality of refrigerated pasteurized milk, *Aust. J. Dairy Technol.*, **38**: 124-127. 1983
- BARACH, J. T.: Heat-resistant proteolytic enzymes from *Pseudomonas* in milk: Studies on thermal stability, *Diss. Abstr. Int. B*, **38**: 3109-3110. 1978 (*Dairy Sci. Abstr.*, **42**: [1054]. 1980)

16. BARACH, J. T. and ADAMS, D. M.: Thermostability at ultrahigh temperatures of thermolysin and a proteinase from a psychrotrophic *Pseudomonas*, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**: 417-423. 1977
17. BARACH, J. T., ADAMS, D. M. and SPECK, M. L.: Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 875-879. 1976
18. BARACH, J. T., ADAMS, D. M. and SPECK, M. L.: Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **59**: 391-395. 1976
19. BARACH, J. T., ADAMS, D. M. and SPECK, M. L.: Mechanism of low temperature inactivation of a heat-resistant bacterial protease in milk, *J. Dairy Sci.*, **61**: 523-528. 1978
20. BEHNKE, U., RUTLOFF, H. and KLEINE, R.: Preparation and characterization of proteases from *Thermoactinomyces vulgaris*. V. Investigations on autolysis and thermostability of the purified protease, *Z. Allg. Mikrobiol.*, **22**: 511-519. 1982
21. BLANC, B. and ODET, G.: 外観、風味及び組織の側面：最近の進展, IDF Document 133, 1981 (日本国際酪農連盟：UHT論文集, p. 30-59, 1982)
22. BOETHLING, R. S.: Purification and properties of a serine protease from *Pseudomonas maltophilia*, *J. Bacteriol.*, **121**: 933-941. 1975
23. BOETHLING, R. S.: Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*, *J. Bacteriol.*, **123**: 954-961. 1975
24. BURTON, H.: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150°C, 第66回 IDF 年次会議報告, p. F 25-F 49. 1982 (日本国際酪農連盟資料第51号)
25. CHEUNG, B. A. and WESTHOFF, D. C.: Isolation and identification of ropy bacteria in raw milk, *J. Dairy Sci.*, **66**: 1825-1834. 1983
26. CHRISTEN, G. L. E.: Mechanisms of inactivation of thermostable lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens*, *Diss. Abstr. Int. B*, **43**: 1782. 1982
27. CHRISTEN, G. L. and MARSHALL, R. T.: Thermostability of selected lipases produced by psychrotrophic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **63** (suppl. 1): 46. 1980
28. CHRISTEN, G. L. and MARSHALL, R. T.: Thermostability of a lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* 27 and a unique mechanism of inactivation by a histidine-like substance, *J. Dairy Sci.*, **65** (suppl. 1): 47. 1982
29. CHRISTEN, G. L. and MARSHALL, R. T.: Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media, *J. Dairy Sci.*, **67**: 1680-1687. 1984
30. CHRISTEN, G. L. and MARSHALL, R. T.: Thermostability of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in various broths, *J. Dairy Sci.*, **67**: 1688-1693. 1984
31. COGAN, T. M.: A review of heat resistant lipases and proteinases and the quality of dairy products, *Ir. J. Fd Sci. Technol.*, **1**: 95-105. 1977
32. COGAN, T. M.: 耐熱性リパーゼ、プロテイナーゼと乳製品の品質, 第63回 IDF 年次会議報告, p. A 31-A 39. 1979 (日本国際酪農連盟資料第39号)
33. COLLINS, E. B.: Factors involved in the control of gelatinous curd defects of cottage cheese. 1. Storage temperature and pH, *J. Milk Food Technol.*, **18**: 169-171. 1955
34. COUSIN, M. A.: Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity (ed. ROBERTS *et al.*), p. 63-72. Academic Press, London, 1981
35. COUSIN, M. A.: Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review, *J. Food Prot.*, **45**: 172-207. 1982
36. COUSIN, M. A. and MARTH, E. H.: Psychrotrophic bacteria cause changes in stability of milk to coagulation by rennet or heat, *J. Dairy Sci.*, **60**: 1042-1047. 1977
37. COUSIN, M. A. and MARTH, E. H.: Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **60**: 1048-1056. 1977
38. COUSIN, M. A. and MARTH, E. H.: Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria, *Milchwissenschaft*, **32**: 337-341. 1977
39. COWAN, D. A. and DANIEL, R. M.: The properties of immobilized caldolylin, a thermostable protease from an extreme thermophile, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 2053-2061. 1982
40. CRAWFORD, R. J. M. and MABBIT, L. A.: Growth of psychrotrophic organisms and

- associated effects on raw milk and market milk (乳技協資料, 18(4): 33-38. 1968)
41. DAATSELAAR, M. C. C. and HARDER, W.: Some aspects of the regulation of the production of extracellular proteolytic enzymes by a marine bacterium, *Arch. Microbiol.*, **101**: 21-34. 1974
  42. DAHLE, H. K.: Regulation of the proteinase production in two strains of *Aeromonas*, *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B*, **79**: 739-746. 1971
  43. DAINTY, R. H., ETHERINGTON, D. J., SHAW, B. G., BARLOW, S. J. and BANKS, G. T.: Studies on the production of extracellular proteinases by a non-pigmented strain of *Chromobacterium lividum* isolated from abattoir effluent, *J. Appl. Bacteriol.*, **45**: 111-124. 1978
  44. DALALY, B. K. and ABBO, A.: Extracellular proteases from *Pseudomonas* sp. isolated from raw milk, *XXI Int. Dairy Congr.*, Vol. 1, Book 2: 487-488. 1982 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [3737]. 1983)
  45. DEBEUKELAR, N. J., COUSIN, M. A., BRADLEY, R. L. Jr. and MARTH, E. H.: Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **60**: 857-861. 1977
  46. DOWNEY, W. K.: Flavour impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products, *J. Dairy Res.*, **47**: 237-252. 1980
  47. DRIESSEN, F. M.: Proteolysis in UHT-sterilized milk and milk products, *Zuivelzicht*, **68**: 514-515. 1976 (*Dairy Sci. Abstr.*, **38**: [8105]. 1976)
  48. DRIESSEN, F. M.: Relationship between growth of Gram-negative rods in milk and their production of proteinases, *Neth. Milk Dairy J.*, **35**: 344-348. 1981
  49. DRIESSEN, F. M.: Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation, and their importance for the keeping quality of milk products, *Neth. Milk Dairy J.*, **37**: 193-196. 1983
  50. DRIESSEN, F. M. and STADHOUDERS, J.: Thermal activation and inactivation of extracellular lipases of some Gram-negative bacteria common in milk, *Neth. Milk Dairy J.*, **28**: 10-22. 1974
  51. DRIESSEN, F. M. and STADHOUDERS, J.: Enzymic spoilage in pasteurized and sterilized milk products. I. Proteolysis, *Zuivelzicht*, **70**: 994-996. 1978 (*Dairy Sci. Abstr.*, **41**: [2153]. 1979)
  52. DRIESSEN, F. M. and STADHOUDERS, J.: Enzymatic spoilage of pasteurized and sterilized milk products (Part 2. Lipolysis), *Zuivelzicht*, **70**: 1080. 1978 (*Neth. Milk Dairy J.*, **33**: 214-215. 1979)
  53. EDDY, B. P.: The use and meaning of the term "Psychrophilic", *J. appl. Bact.*, **23**: 189-190. 1960
  54. FEUILLAT, M., LEGUENNEC, S. and OLSSON, A.: Proteolysis of refrigerated milk and effects on soft cheese yield, *Lait*, **56** (558): 521-536. 1976 (*Dairy Sci. Abstr.*, **39**: [2061]. 1977)
  55. FITZ-GERALD, C. H., DEETH, H. C. and COGHILL, D. M.: Low temperature inactivation of lipases from psychrotrophic bacteria, *Aust. J. Dairy Technol.*, **37**: 51-54. 1982
  56. FORSTER, J.: Über einige Eigenschaften leuchtender Bakterien, *Centralbl. f. Bakteriol. u. Paras.*, **2**: 337-340. 1887
  57. FOX, P. F.: Proteinases in dairy technology, *Neth. Milk Dairy J.*, **35**: 233-253. 1981
  58. FOX, P. F. and STEPANIAK, L.: Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36, *J. Dairy Res.*, **50**: 77-89. 1983
  59. GAINOR, C. and WEGEMER, D. E.: Studies on a psychrophilic bacterium causing ropiness in milk. I. Morphological and physiological considerations, *Appl. Microbiol.*, **2**: 95-97. 1954
  60. GALLMANN, P. and PUHAN, Z.:  $\beta$ -Caseinhydrolyse durch Proteasen ausgewählter Mikroorganismen der Rohmilchflora, *Milchwissenschaft*, **37**: 396-400. 1982
  61. GEBRE-EGZIABHER, A.: Hydrolysis of milk proteins by enzymes of psychrophilic bacteria, *Diss. Abstr. Int. B*, **42**: 1806-1807. 1981
  62. GEBRE-EGZIABHER, A., HUMBERT, E. S. and BLANKENAGEL, G.: Heat-stable proteases from psychrotrophs in milk, *J. Food. Prot.*, **43**: 197-200. 1980
  63. GEBRE-EGZIABHER, A., HUMBERT, E. S. and BLANKENAGEL, G.: Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes, *J. Food Prot.*, **43**: 709-712. 1980
  64. GOLDBERG, M. L.: The glucose effect: Car-

- bohydrate repression of enzyme induction, RNA synthesis, and glucocorticoid activity — a roll for cyclic AMP and cyclic GMP, *Life Sciences*, **17**: 1747-1754. 1975
65. GREENBERG, N. A. and MAHONEY, R. R.: Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*, *J. Food Sci.*, **47**: 1824-1828. 1982
66. GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, J. D. and MUIR, D. D.: Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin, *J. Appl. Bacteriol.*, **50**: 289-303. 1981
67. 萩原文二: 酵素研究法 (赤堀編), 2巻, p. 237-246, 朝倉書店, 1956
68. HAINES, R. B.: The minimum temperatures of growth of some bacteria, *J. Hygiene*, **34**: 277-282. 1934
69. HAMMER, B. W.: Dairy bacteriology, 3rd ed., p. 59-118, 194-198. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1948
70. HAUKKA, J. J. and HARPER, W. J.: The effect of the psychrotrophic organisms and the age of the milk on the production of acetaldehyde and diacetyl in cultured buttermilk, *Meijeritieellinen Aikakauskirja*, **36**: 1-10. 1978 (*Dairy Sci. Abstr.*, **41**: [7853]. 1979)
71. 林 弘通 (編): 乳業技術綜典, 上巻, p. 155-157, 酪農技術普及学会, 東京. 1977
72. HICKS, C. L., ALLAUDDIN, M., LANGLOIS, B. E. and O'LEARY, J.: Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield, *J. Food Prot.*, **45**: 331-334. 1982
73. HIPP, N. J., GROVES, M. L., CUSTER, J. H. and McMEEKIN, T. L.: Separation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -casein, *J. Dairy Sci.*, **35**: 272-281. 1952
74. 広瀬義夫: 発酵と微生物 (植村・相田編), II, p. 165-213. 朝倉書店, 1970
75. HLADÍK, J., KÁS, J. and DOLEZÁLEK, J.: Effect of proteases from genus *Pseudomonas* on the quality of stored sterilized milk, *Sborník Vysoké Skoly Chemicko-Technologické v Praze, E (Potraviny)*, No. 50: 67-85. 1979 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [499]. 1983)
76. HORIKOSHI, K.: Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221, *Agr. Biol. Chem.*, **35**: 1407-1414. 1971
77. 星野三恵子: 低温細菌のたん白分解酵素, 栄養と食糧, **26**: 233-238. 1973
78. 星野俊之: 低温菌のタンパク分解力, 北海道大学大学院農学研究科畜産学専攻修士論文, 1968
79. HUG, D. H. and HUNTER, J. K.: Effect of temperature on urocanase from a psychrophile, *Pseudomonas putida*, *Biochemistry*, **13**: 1427-1431. 1974
80. HURLEY, W. C., GARDNER, F. A. and VANDERZANT, C.: Some characteristics of a proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*, *J. Food Sci.*, **28**: 47-54. 1963
81. HUSKEY, G. E.: Characterization of gelatinous caseinate-producing psychrophilic bacteria, *Diss. Abstr. B*, **27**: 2976-2977. 1967
82. 飯塚 広・駒形和男: *Pseudomonas* 属 Fluorescent group の新種について (殺物の微生物に関する研究 第5報), 農化, **37**: 137-141. 1963
83. INGRAHAM, J. L. and STOKES, J. L.: Psychrophilic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **23**: 97-108. 1959
84. IUCHI, S. and TANAKA, S.: Hyperproduction of extracellular protease in mutants of *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbiol. Immunol.*, **23**: 415-418. 1979
85. JACKMAN, D. M., BARTLETT, F. M. and PATEL, T. R.: Heat-stable preteases from psychrotrophic pseudomonads: Comparison of immunological properties, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 6-12. 1983
86. JACKMAN, D. M., PATEL, T. R. and HAARD, N. F.: Effect of heat-stable proteases on the kinetic parameters of milk clotting by chymosin, *J. Food Sci.*, **50**: 602-604, 609. 1985
87. JANZEN, J. J., BISHOP, J. R. and BODINE, A. B.: Relationship of protease activity to shelf-life of skim and whole milk, *J. Dairy Sci.*, **65**: 2237-2240. 1982
88. JENNESS, R. and KOOPS, J.: Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate, *Neth. Milk Dairy J.*, **16**: 153-164. 1962
89. JENSEN, S. E., FECYCH, I. T. and CAMPBELL, J. N.: Nutritional factors controlling exocellular protease production by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, **144**: 844-847. 1980
90. JENSEN, S. E., PHILLIPPE, L., TENG TSENG, J., STEMKE, G. W. and CAMPBELL, J. N.: Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and a

- laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Canad. J. Microbiol.*, **26**: 77-86. 1980
91. JUAN, S. M. and CAZZULO, J. J.: The extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens*, *Experientia*, **32**: 1120-1122. 1976
92. JUFFS, H. S.: Influence of proteinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on manufacture and quality of Cheddar cheese, *Aust. J. Dairy Technol.*, **29**: 74-78. 1974
93. JUFFS, H. S.: Effects of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Ps. aeruginosa* in broth and milk, *J. appl. Bact.*, **40**: 23-32. 1976
94. JUFFS, H. S., HAYWARD, A. C. and DOELLE, H. W.: Growth and proteinase production in *Pseudomonas* spp. cultivated under various conditions of temperature and nutrition, *J. Dairy Res.*, **35**: 385-393. 1968
95. KATO, N., ADACHI, S., TAKEUCHI, K., MORIHARA, K., TANI, Y. and OGATA, K.: Substrate specificities of the proteases from a marine-psychrophilic bacterium, *Pseudomonas* sp. No. 548, *Agr. Biol. Chem.*, **38**: 103-109. 1974
96. KATO, N., NAGASAWA, T., ADACHI, S., TANI, Y. and OGATA, K.: Purification and properties of proteases from a marine-psychrophilic bacterium, *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1185-1192. 1972
97. 河端俊治: 食品工場の微生物管理と食品微生物 II, ジャパンフードサイエンス, **6**(10): 23-27. 1967
98. KEEN, N. T. and WILLIAMS, P. H.: Effect of nutritional factors on extracellular protease production by *Pseudomonas lachrymans*, *Canad. J. Microbiol.*, **13**: 863-871. 1967
99. KIELWEIN, G.: Proteolyse von Milch und Milchprodukten durch *Pseudomonas fluorescens*, *Milchwissenschaft*, **30**: 605-606. 1975
100. KISER, J. S.: Effects of temperatures approximating 0°C upon growth and biochemical activities of bacteria isolated from mackerel, *Food Res.*, **9**: 257-267. 1944
101. KISHONTI, E. and SJÖSTRÖM, G.: Influence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality, *XVIII Int. Dairy Congr.*, **1E**: 501. 1970
102. KNAUT, T. and MECH, H.: Die Hitzeresistenz der Proteasen aus *Ps. fluorescens*, *Milchwissenschaft*, **27**: 167-170. 1972
103. KROLL, S. and KLOSTERMEYER, H.: Spezifitätsspektren extrazellulärer Proteinasen verschiedener *Pseudomonas-fluorescens*-Stämme, *XXI Int. Dairy Congr.*, Vol. 1, Book 2: 327-328. 1982 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [3715]. 1983)
104. LARKIN, J. M. and STOKES, J. L.: Growth of psychrophilic microorganisms at subzero temperatures, *Canad. J. Microbiol.*, **14**: 97-101. 1968
105. LAW, B. A.: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products, *J. Dairy Res.*, **46**: 573-588. 1979
106. LAW, B. A., ANDREWS, A. T., CLIFFE, A. J., SHARPE, M. E. and CHAPMAN, H. R.: Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese-making with stored milk, *J. Dairy Res.*, **46**: 497-509. 1979
107. LAW, B. A., ANDREWS, A. T. and SHARPE, M. E.: Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk, *J. Dairy Res.*, **44**: 145-148. 1977
108. LAW, B. A., COUSINS, C. M., SHARPE, M. E. and DAVIS, F. L.: Cold tolerant microbes in spoilage and the environment (ed. RUSSELL and FULLER), p. 137-152. Academic Press, London, 1979
109. LAW, B. A., SHARPE, M. E. and CHAPMAN, H. R.: The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese, *J. Dairy Res.*, **43**: 459-468. 1976
110. LAW, B. A., SHARPE, M. E., TZANETAKI, E. L., ALICHANIDIS, E. and ANDREWS, A. T.: The effect of enzymes from psychrotrophic bacteria on UHT-sterilized milk and on Cheddar cheese, *XX Int. Dairy Congr.*, **E**: 310-311. 1978
111. LEINMÜLLER, R. and CHRISTOPHERSEN, J.: Untersuchungen an einem hitzeresistenten proteolytischen Enzymsystem von *Pseudomonas fluorescens*, *Milchwissenschaft*, **37**: 270-272. 1982
112. LEINMÜLLER, R. and CHRISTOPHERSEN, J.: Beobachtungen zur Hitzeinaktivierung und Charakterisierung thermoresistenter Proteasen aus *Pseudomonas fluorescens*, *Milchwissenschaft*, **37**: 472-476. 1982
113. LINDQVIST, B. and STORGÅRDS, T.: Unter-

- suchung über die Käsereifung. IV. Veränderungen im Elektrophoresebild des Kaseins während der Reifung bei verschiedener Käsesorten, *Milchwissenschaft*, **12**: 462-472. 1957
114. LONDON, C. J., GRIFFITH, I. P. and KORTT, A. A.: Proteinase produced by pseudomonads isolated from sheep fleece, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 75-79. 1984
115. MAKINO, K., OGAKI, J., NISHIHARA, T., ICHIKAWA, T. and KONDO, M.: Studies on protease from marine bacteria. 2. Properties of extracellular protease from marine *Pseudomonas* sp. 145-2, *Microbios*, **36**: 7-20. 1983
116. MALIK, A. C.: Heat stable proteases from strains of *Pseudomonas fluorescens*, *Diss. Abstr. Int. B*, **36**: 5499-5500. 1976
117. MALIK, A. C. and SWANSON, A. M.: Action of heat-stable *Pseudomonas fluorescens* protease on sterilized skim milk, *J. Dairy Sci.*, **58**: 795. 1975
118. MALIK, R. K. and MATHUR, D. K.: Purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25, *J. Dairy Sci.*, **67**: 522-530. 1984
119. MARCOS, A., ESTEBAN, M. A., LEÓN, F. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J.: Electrophoretic patterns of european cheeses: Comparison and quantitation, *J. Dairy Sci.*, **62**: 892-900. 1979
120. MARSHALL, R. T. and MARSTILLER, J. K.: Unique response to heat of extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* M 5, *J. Dairy Sci.*, **64**: 1545-1550. 1981
121. MAYERHOFER, H. J.: Characterization of a heat stable proteolytic enzyme from a psychrophilic strain of *Ps. fluorescens* and its effect on the storageability of skim-milk, *Diss. Abstr. Int. B*, **31**: 6158. 1971
122. MAYERHOFER, H. J., LU, M., MARSHALL, R. T. and WHITE, C. H.: Heat stable proteases from psychrophilic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **54**: 763. 1971
123. MAYERHOFER, H. J., MARSHALL, R. T., WHITE, C. H. and LU, M.: Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P 26, *Appl. Microbiol.*, **25**: 44-48. 1973
124. MCCASKEY, T. A.: Microbial and enzymatic activity in raw milk held at low temperature, *Diss. Abstr. B*, **27**: 4046. 1967
125. MCCONN, J. D., TSURU, D. and YASUNOBU, K. T.: *Bacillus subtilis* neutral proteinase. I. A zinc enzyme of high specific activity, *J. Biol. Chem.*, **239**: 3706-3715. 1964
126. McDONALD, I. J. and CHAMBERS, A. K.: Regulation of Proteinase formation in a species of *Micrococcus*, *Canad. J. Microbiol.*, **12**: 1175-1185. 1966
127. MCKELLAR, R. C.: Development of off-flavors in Ultra-High Temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis, *J. Dairy Sci.*, **64**: 2138-2145. 1981
128. MCKELLAR, R. C.: Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*, *J. Appl. Bacteriol.*, **53**: 305-316. 1982
129. MCKELLAR, R. C. and CHOLETTE, H.: Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 1224-1227. 1984
130. MELLERGAARD, S.: Purification and characterization of a new proteolytic enzyme produced by *Aeromonas salmonicida*, *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 289-294. 1983
131. MICHENER, H. D. and ELLIOTT, R. P.: Minimum growth temperatures for food-poisoning, fecal-indicator, and psychrophilic microorganisms, *Adv. Food Res.*, **13**: 349-396. 1964
132. 三河勝彦: 牛乳の低温細菌の酵素学的研究の動向, 酪農科学・食品の研究, **25**: A 205-A 215. 1976
133. 三河勝彦: 牛乳低温細菌の特性, 酪農科学・食品の研究, **26**: A 153-A 163. 1977
134. 三河勝彦: 牛乳および殺菌乳の低温菌叢, 酪農科学・食品の研究, **36**: A 197-A 201. 1987
135. 三河勝彦: 生乳ならびに殺菌乳由来低温菌の耐熱性, 酪農科学・食品の研究, **36**: A 203-A 208. 1987
136. 三河勝彦・有馬俊六郎: 凍結保存中における生乳および殺菌クリームの細菌数変化, 北大農邦文紀, **11**: 336-344. 1979
137. 三河勝彦・有馬俊六郎: 生乳乳質の凍結保存中における変化, 北大農邦文紀, **11**: 345-350. 1979
138. 三河勝彦・有馬俊六郎: 低温保存生乳の風味変化と各種乳質検査法との関係, 北大農邦文紀, **11**: 351-359. 1979
139. 三河勝彦・有馬俊六郎: 市乳, 殺菌乳, および *Pseudomonas fluorescens* 接種乳における風味変化と各種乳質検査法との関係, 北大農邦文紀, **11**:

- 360-371. 1979
140. 三河勝彦・有馬俊六郎: 牛乳中の細菌由来耐熱性酵素, 乳技協資料, **34**(1): 1-16. 1984
141. 三河勝彦・星野俊之: 牛乳より分離した低温菌のタンパクおよび脂肪分解性におよぼす温度の影響, 酪農科学の研究, **22**: A 176-A 186. 1973
142. MILLIERE, J. B. and VEILLET-PONCET, L.: The crude proteolytic enzyme systems of two psychrotrophs isolated from refrigerated raw milk, *Lait*, **59**: 269-298. 1979 (*Dairy Sci. Abstr.*, **42**: [4571]. 1980)
143. MILLS, O. E. and THOMAS, T. D.: Bitterness development in Cheddar cheese: Effect of the level of starter proteinase, *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **15**: 131-141. 1980
144. MISKIN, R. and SOREQ, H.: Sensitive autoradiographic quantification of electrophoretically separated proteases, *Anal. Biochem.*, **118**: 252-258. 1981
145. 三浦弘之・三上正幸・石下真人: 低温性細菌によるカゼインの分解, 帯大研報, **10**: 461-470. 1977
146. MOHAMED, F. O.: Influence of psychrotrophic microorganisms in milk on quality and yield of cottage cheese, *Diss. Abstr. Int. B*, **39**: 149. 1978 (*Dairy Sci. Abstr.*, **42**: [1058]. 1980)
147. MOHAMED, F. O. and BASSETTE, R.: Quality and yield of cottage cheese influenced by psychrotrophic microorganisms in milk, *J. Dairy Sci.*, **62**: 222-226. 1979
148. MORGAN, M. E.: The chemistry of some microbially induced flavor defects in milk and dairy foods, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**: 953-965. 1976
149. MORIHARA, K.: Studies on the protease of *Pseudomonas*. Part I. The production of the enzyme under various cultural conditions, *Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn.*, **20** (suppl.): 243-251. 1956
150. MORIHARA, K.: Studies on the protease of *Pseudomonas*. Part II. Crystallization of the protease and its physico-chemical and general properties, *Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn.*, **21**: 11-17. 1957
151. MORIHARA, K.: Studies on the protease of *Pseudomonas*. Part VIII. Proteinase productions of various *Pseudomonas* species, especially *Ps. aeruginosa*, *Agr. Biol. Chem.*, **26**: 842-847. 1962
152. 森原和之: 細菌プロテアーゼの特異性, 蛋白質核酸酵素, **15**: 777-789. 1970
153. MORIHARA, K. and TSUZUKI, H.: Effect of cobalt ion on the enzymatic activity of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase, *Agr. Biol. Chem.*, **38**: 621-626. 1974
154. MORITA, R. Y.: Psychrophilic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **39**: 144-167. 1975
155. MORTON, D. J. and BARRETT, E. L.: Gram-negative respiratory bacteria which cause rropy milk constitute a distinct cluster within the genus *Acinetobacter*, *Current Microbiol.*, **7**: 107-112. 1982
156. MOTTAR, J.: Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage, *Milchwissenschaft*, **36**: 87-91. 1981
157. MOZHAEV, V. V. and MARTINEK, K.: Inactivation and reactivation of proteins (enzymes), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**: 299-309. 1982
158. 務台蔵人: 微生物生理学 (植村・福見・柳田編), p. 533-542. 朝倉書店, 1960
159. 中江利孝: 低温細菌とその発育および生化学的性状に関する最近の進歩 (その2), 乳技協資料, **20**(6): 3-16. 1970
160. NAKAGAWA, T., NAGAYAMA, F. and HORIE, S.: Properties of the extracellular lytic proteinase of *Pseudomonas* sp., *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **51**: 75-78. 1985
161. NAKAJIMA, M., MIZUSAWA, K. and YOSHIDA, F.: Purification and properties of an extracellular proteinase of psychrophilic *Escherichia freundii*, *Europ. J. Biochem.*, **44**: 87-96. 1974
162. 中西武雄・田辺忠裕: 牛乳の低温細菌に関する研究. 第2報. 牛乳の低温貯蔵中における低温細菌による蛋白質の変化, 酪農科学の研究, **19**: A 75-A 87. 1970
163. NELSON, D. F.: A soapy taint in milk due to bacteria, *Dairy Inds.*, **24**: 36-37. 1959
164. NELSON, P. J. and MARSHALL, R. T.: Microbial proteolysis sometimes decreases yield of cheese curd, *J. Dairy Sci.*, **60** (suppl.): 35. 1977
165. 日本国際酪農連盟: 低温性微生物に関するセミナー勧告, 第53回 IDF 年次会議報告 (VI-Doc48), p. VI 25-VI 27. 1969
166. NUNOKAWA, Y. and McDONALD, I. J.: Extracellular proteolytic enzymes of psychrophilic bacteria. I. Purification and some

- properties of enzymes of an obligately psychrophilic red-pigmented bacterium, *Canad. J. Microbiol.*, **14**: 215-224. 1968
167. OGINSKY, E. L. and UMBREIT, W. W.: An introduction to bacterial physiology, p. 71-82. W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1959
168. O'REILLY, T. and DAY, D. F.: Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1132-1135. 1983
169. ORNSTEIN, L. and DAVIS, B.: Disc electrophoresis-I and II, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**: 321-349, 404-427. 1964
170. PATEL, T. R. BARTLETT, F. M. and HAMID, J.: Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads, *J. Food Prot.*, **46**: 90-94. 1983
171. PATEL, T. R., JACKMAN, D. M. and BARTLETT, F. M.: Heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T16: Purification by affinity column chromatography and characterization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 333-337. 1983
172. PAYENS, T. A. J. and VAN MARKWIJK, B. W.: Some features of the association of  $\beta$ -casein, *Biochim. Biophys. Acta*, **71**: 517-530. 1963
173. PENNINGTON, M. E.: Bacterial growth and chemical changes in milk kept at low temperatures. *J. Biol. Chem.*, **4**: 353-393. 1908
174. POLLOCK, M. R.: The bacteria (ed. GUNSALUS and STANIER), Vol. IV, p. 121-178. Academic Press, New York, 1962
175. PORZIO, M. A. and PEARSON, A. M.: Isolation of an extracellular proteinase from *Pseudomonas fragi*, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**: 235-241. 1975
176. PÜRSCHEL, M. and POLLACK, C.: Proteolytic degradation of milk protein by bacteria. II. The action of psychrophilic bacteria and lactobacilli on milk protein, *Nahrung*, **16**: 451-459. 1972 (*Dairy Sci. Abstr.*, **36**: [1594]. 1974)
177. RICHARDSON, B. C.: The purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B52, *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **16**: 195-207. 1981
178. RICHARDSON, B. C.: Some properties of a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens*, *XXI Int. Dairy Congr.*, Vol. 1, Book 2: p. 242. 1982 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [3721]. 1983)
179. RICHARDSON, B. C. and TE WHAITI, I. E.: Partial characterization of heat-stable extracellular proteases of some psychrophilic bacteria from raw milk, *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **13**: 172-176. 1978
180. RIDDLE, L. M., GRAHAM, T. E. and AMBORSKI, R. T.: Medium for the accumulation of extracellular hemolysin and protease by *Aeromonas hydrophila*, *Infect. Immun.*, **33**: 728-733. 1981 (文献167より引用)
181. ROWE, M. T. and GILMOUR, A.: Growth, enzyme production and changes in oxygen tension occurring during batch cultivation of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains, *Milchwissenschaft*, **37**: 597-600. 1982
182. ROWE, M. T. and GILMOUR, A.: Nutritional factors affecting extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B52, *Milchwissenschaft*, **38**: 705-707. 1983
183. RYDÉN, A. -C. and v. HOFSTEN, B.: Some properties of the extracellular proteinase and the cell-bound peptidase of *Serratia*, *Acta Chem. Scand.*, **22**: 2803-2808. 1968
184. 斎藤善一: 生乳のリポリシスと風味劣化, 乳技協資料, **32**(2): 2-12. 1982
185. SARNER, N. Z., BISSELL, M. J., DIGIROLAMO, M. and GORINI, L.: Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: Demonstration of two proteolytic enzymes produced by a *Sarcina* strain (coccus P), *J. Bacteriol.*, **105**: 1090-1098. 1971
186. 笹野 貢・岡田迪徳・長南隆夫・大浦義教: 低温保存乳より分離した低温細菌の乳蛋白質分解作用, 日畜会報, **48**: 403-409. 1977
187. SHINDO, K., SAKURADA, K., NIKI, R. and ARIMA, S.: Studies on immobilized chymosin. 5. Experiments in cheese making with immobilized chymosin, *Milchwissenschaft*, **35**: 527-530. 1980
188. SORENSEN, C. M.: The keeping quality of butter, *J. Dairy Sci.*, **23**: 423-436. 1940
189. STEPANIAK, L. and FOX, P. F.: Thermal stability of an extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36, *J. Dairy Res.*, **50**: 171-184. 1983
190. STEPANIAK, L., FOX, P. F. and DALY, C.:

- Isolation and general characterization of a heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT36, *Biochim. Biophys. Acta*, **717**: 376-383. 1982
191. STEPANIAK, L., FOX, P. F. and DALY, D.: Influence of the growth of *Pseudomonas fluorescens* AFT 36 on some technologically important characteristics of milk, *Irish J. Food Sci. Technol.*, **6**(2): 135-146. 1982 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [7238]. 1983)
192. STOKES, J. L.: Recent progress in microbiology VIII (ed. GIBBONS), p. 187-192. Univ. Tokyo Press, 1962
193. 菅原 潔・副島正美: 生物化学実験法: 蛋白質の定量法, 第2版, p. 98-107, 117-121. 学会出版センター, 1977
194. SUHREN, G.: Occurrence and levels of heat resistant proteinases and their effects on UHT-treated dairy products, 第65回 IDF 年次会議報告, p. F 12-F 22. 1981 (日本国際酪農連盟資料第45号)
195. 田島研一・高橋恒人・絵面良男・木村喬久: *Aeromonas salmonicida*, Ar-4 (EFLD) の産出するプロテアーゼの特性, 日水誌, **50**: 145-150. 1984
196. TARRANT, P. J. V., JENKINS, N., PEARSON, A. M. and DUTSON, T. R.: Proteolytic enzyme preparation from *Pseudomonas fragi*: Its action on pig muscle, *Appl. Microbiol.*, **25**: 996-1005. 1973
197. TAYFOUR, A., MILLIÈRE, J. B. and VEILLET-PONCET, L.: Proteolysis of retentates by *Pseudomonas fluorescens* 28 P 12 in cold storage, *XXI Int. Dairy Congr.*, Vol. 1, Book 2: p. 473. 1982 (*Dairy Sci. Abstr.*, **45**: [3736]. 1983)
198. TEWHAITI, I. E. and FRYER, T. F.: Production and heat stability in milk of proteinases and lipases of psychrotrophic pseudomonads, *XX Int. Dairy Congr.*, Vol. E: p. 303-304. 1978 (*Dairy Sci. Abstr.*, **40**: [4813]. 1978)
199. THOMAS, S. B.: Psychrophilic micro-organisms in milk and dairy products—Part I and II, *Dairy Sci. Abstr.*, **20**: 355-370, 447-468. 1958
200. THOMAS, S. B.: Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk, *Milchwissenschaft*, **21**: 270-275. 1966
201. THOMAS, S. B., DRUCE, R. G. and DAVIES, A.: The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk, *Dairy Inds.*, **31**: 27-32. 1966
202. THOMAS, S. B., DRUCE, R. G. and ELSON, K.: Ropy milk, *Dairy Inds.*, **25**: 202-207. 1960
203. THOMPSON, M. P., GORDON, W. G., BOSWELL, R. T. and FARRELL, H. M. Jr.: Solubility solvation, and stabilization of  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins, *J. Dairy Sci.*, **52**: 1166-1173. 1969
204. THOMPSON, M. P. and KIDDY, C. A.: Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. III. Isolation and properties of  $\alpha_{s1}$ -caseins A, B, and C, *J. Dairy Sci.*, **47**: 626-632. 1964
205. 鶴 大典: 蛋白分解酵素と生体制御 (村池・浅田・藤井編), p. 271-286. 東大出版会, 1973
206. TSURU, D., KIRA, H., YAMAMOTO, T. and FUKUMOTO, J.: Studies on bacterial protease. Part XIV. Zinc as an essential metal component of neutral protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, *Agr. Biol. Chem.*, **30**: 856-862. 1966
207. VANDERZANT, W. C.: Proteolytic enzymes from *Pseudomonas putrefaciens*. I. Characteristics of an extracellular proteolytic enzyme system, *Food Res.*, **22**: 151-157. 1957
208. VARGAS, O. L.: Heat-stable casein proteolytic enzyme systems produced by some psychrophilic bacteria, *Revista do Instituto de Lactícnios Cândido Tostes*, **34**(203): 15-21. 1979 (*Dairy Sci. Abstr.*, **42**: [3699]. 1980)
209. VENUGOPAL, V., ALUR, M. D. and LEWIS, N. F.: Extracellular protease from *Pseudomonas marinoglutinosa*: Some properties and its action on fish actomyosin, *J. Food Sci.*, **48**: 671-674, 702. 1983
210. VON HIPPEL, P. H. and WAUGH, D. F.: Casein: Monomers and polymers, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 4311-4319. 1955
211. VOORDOUW, G., MILO, C. and ROCHE, R. S.: Role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ion contributions to the kinetic thermal stability, *Biochemistry*, **15**: 3716-3724. 1976
212. VOORDOUW, G. and ROCHE, R. S.: The role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. I. Studies on thermomycolase, the thermostable protease from the fungus *Malbranchea pulchella*, *Biochemistry*, **14**: 4659-4673. 1975
213. WANG, J. J. and FRANK, J. F.: Characterization of psychrotrophic bacteria isolated from

- commercial butter milk, *J. Dairy Sci.*, **63** (suppl. 1): 39. 1980
214. WANG, J. J. and FRANK, J. F.: Characterization of psychrotrophic bacterial contamination in commercial buttermilk, *J. Dairy Sci.*, **64**: 2154-2160. 1981
215. WAUGH, D. F., CREAMER, L. K., SLATTERY, C. W. and DRESNER, G. W.: Core polymers of casein micelles, *Biochemistry*, **9**: 786-795. 1970
216. WEBER, K., PRINGLE, J. R. and OSBORN, M.: Methods in enzymology, Vol. 26 (ed. HIRS and TIMASHEFF), p. 3-27. Academic Press, New York, 1972
217. WEST, F. B., ADAMS, D. M. and SPECK, M. L.: Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high temperature sterilized skim milk by a low temperature treatment, *J. Dairy Sci.*, **61**: 1078-1084. 1978
218. WHITE, C. H.: Effect of a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* on the shelf-life of dairy products, *Diss. Abstr. Int. B*, **32**: 5240-5241. 1972
219. WHITE, C. H., BULTHAUS, M. and MARSHALL, R. T.: Defects caused by adding protease-producing psychrotrophs to raw milk, *J. Dairy Sci.*, **62** (suppl. 1): 46. 1979
220. WHITE, C. H., BULTHAUS, M. and MARSHALL, R. T.: Changes in milk caused by addition of protease-producing psychrotrophs to raw milk, *J. Dairy Sci.*, **63** (suppl. 1): 56. 1980
221. WHITE, C. H. and MARSHALL, R. T.: Reduction of shelf-life of dairy products by a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P 26, *J. Dairy Sci.*, **56**: 849-853. 1973
222. WIERSMA, M., HANSEN, T. A. and HARDER, W.: Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzymes by *Vibrio SA 1*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **44**: 129-140. 1978
223. WIERSMA, M., VERSTEEGH, G., ASSINK, H. A., WELLING, G. W. and HARDER, W.: Purification and some properties of two extracellular proteolytic enzymes produced by *Vibrio SA 1*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **44**: 157-169. 1978
224. WITTER, L. D.: Psychrophilic bacteria. A review, *J. Dairy Sci.*, **44**: 985-1015. 1961
225. 柳谷孝幸・三上正幸・三浦弘之: 低温性細菌による牛乳タンパク質の変化, 農化, **47**: 259-266. 1973
226. ZITTLE, C. A. and CUSTER, J. H.: Purification and some of the properties of  $\alpha_s$ -casein and  $\kappa$ -casein, *J. Dairy Sci.*, **46**: 1183-1188. 1963

### Summary

During past few decades the studies of psychrotrophic bacteria have been focused in dairy industries on its proteolytic and lipolytic natures. Recently, the defects of bitterness, sweet curdling, and off-flavor in dairy products especially in UHT-treated products such as long-life milk have been recognized that these are due to the action of protease produced by psychrotrophic bacteria.

The aim of this study was to investigate the production conditions and characteristics around heat resistance or thermostability of the protease produced by an psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas azotoformans* No. 400, isolated from raw milk. Partially purified enzyme preparation was used throughout the experiments; because the enzyme produced in milk by psychrotrophic microorganisms may act on milk protein not as a sole enzyme but as the enzyme system, in other words, several enzymes.

I-1. Skimmilk produced more amount of protease from *Ps. azotoformans* No. 400 than did whey as a medium. Synthetic medium was superior to natural media other than skimmilk for enzyme production. Sugars added to synthetic medium inhibited production of protease in the order of glucose, sucrose, and lactose. After the commencement of the enzyme synthesis at late logarithmic or early stationary phase of bacterial growth, rate of enzyme production increased rapidly. Zinc was chosen from cationic metals as a stimulant for the production of protease, and a semisynthetic medium containing following components was developed:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.5 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g; yeast extract, 20 g; distilled water, 1 l; pH 6.5.

I-2. Effect of oxygen supply on the production of protease in reconstituted skimmilk was studied. Shaking culture using 10% reconstituted skimmilk as a medium gave a double amount of the enzyme compared to statically incubated culture. In contrast, the amount of protease produced in semisynthetic medium decreased by shaking. Shaking

culture in reconstituted skimmilk supplemented with yeast extract yielded a half amount of protease compared to the medium without yeast extract, whereas Polypeptone and/or zinc sulfate did not affect the yield in shaking culture of skimmilk. No difference was observed between 10 and 15% reconstituted skimmilk cultures. Productivity of the enzyme, however, increased more than twice as high per unit volume of reconstituted skimmilk by decreasing the volume of medium for shaking culture to a half of the control sample.

The amount of enzyme produced in skim milk medium increased by the bubbling of air. However, the yield per unit volume of medium at the maximum air supply (800 ml per min) in bubbling culture was lower than that of shaking culture.

The results and the relationship between enzyme production and bacterial number indicated that protease of this bacterium could be inferred as the extracellular enzyme.

II-1. Partially purified enzyme was prepared from the supernatant of semisynthetic medium by successive precipitation with 56% saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and with 60% acetone. This preparation showed purity index of 3.23 and recovery of enzyme activity of 47.4%.

A maximum activity of enzyme was observed at pH 9.6 (10 min-measurement). Stability of enzyme varied with its holding temperatures; in alkaline pH, 4°C/48 hour-treated enzyme was stable even at pH 8.3, and 40°C/20 min-treated enzyme quickly decreased its activity at pH above 7.5. However, in acidic pH, it was stable at pH above 5.0 in both treatments.

Although the initial rapid decrease of enzyme activity followed by the slow decrease was observed during frozen storage at -25°C, about 30 per cent of activity remained after 230 days. The result indicated that initial decrease was not due to the freezing and thawing itself.

A similar result to that mentioned above was found in the experiment of repeating freeze-thaw treatment on the protease which was unheated or heated momentarily at 30°C. However, no decrease, except the reduction due to the heating, of enzyme activity by the treatment was observed on the samples preheated for 10 min at 60 or 80°C. Upon frozen storage of enzyme preparation, it was sug-

gested that not only the storage temperature and time but also enzyme concentration might affect the change in enzyme activity.

II-2. The effect of temperature on enzyme action was investigated. An optimum temperature of proteolysis was 30°C, and then dropped to a minimum at 40~50°C. At temperatures above this range, the activities increased again. The activities obtained at 0 and 90°C were comparable to 40 and 30% of the maximum at 30°C, respectively.

Higher activities determined at 30°C of the enzyme were obtained when it was heated only at 80°C, whereas lower activities were dominated on the samples heated at 50°C, so as heated at 50 and then at 80°C, and at 80 and then 50°C. All the activities determined at 50°C were the lowest, and activities at 80°C showed the values similar to that at 30°C.

During the course of storage at 25°C for 10 days of the enzyme preheated at 50°C, there was slight decrease in the activities determined at 30 and 80°C. However, no decrease of activity was observed when the enzyme was stored at 4°C until 64 days.

pH dependence of the enzyme preheated at 80°C was identical to that of non-heated enzyme.

These results demonstrated that heat treatments at 50 and 80°C had different effects on the proteolytic activities of the enzyme system of psychrotrophic bacteria.

II-3. Heat stability was estimated by heating enzyme for 10 min at temperature range from 30 to 90°C. Enzyme was the most unstable at 50°C but remaining activities of the enzyme heated at 60~90°C were about 40% of that treated at 30°C.

The author proposed to call the inactivation of enzyme at 50°C (so called Low Temperature Inactivation: LTI) as Medium Temperature Inactivation (MTI). To avoid confusion of the terms between "low temperature inactivation" and "psychrotroph" (*low temperature* microorganisms in Japanese) in which two words "low" mean actually different temperatures each other, the author thought that MTI is better than LTI in Japanese.

The heat stability over broader temperature range was investigated by heating the concentrated enzyme sealed in the pyrex capillary tubes at 30~140°C for come up time plus 10 min. Results indicated a different thermal stability curve from

that of diluted enzyme. The discrepancy was attributed to the difference in enzyme concentrations used, since in another experiment of concentration dependence of heat inactivation, the rates of inactivation were always high in concentrated enzyme at any temperature. Therefore, it should be noted in a practical standpoint that the thermostability of the enzyme could be sufficiently high even at 140°C.

Arrhenius plot of the inactivation data demonstrated that the maximum inactivation took place at 50°C and that the conformation of enzyme protein was changed at 70°C. Activation energies ( $E_a$ ) of the enzyme inactivation at 40~50°C and 70~90°C were calculated to be 540.9 kJ/mol and 110.7 kJ/mol, respectively. This proved that enzyme could be resisted against inactivation even at high temperatures.

Distribution of the LTI was surveyed on 16 psychrotrophs. Based on the results that about 70% (11 strains) of the organisms represented the LTI, practical meaning and application of this treatment was discussed.

II-4. Effects of calcium and other metal ions on the enzyme activity were studied. A maximum activity was obtained in the presence of 1 mM of Ca but higher concentrations above the optimum decreased the activity. This decrease might be due to micelle formation of the casein substrate with Ca. Magnesium also stimulated proteolytic activity in the presence of trace amount of Ca, though its maximum activity was lower than that obtained from the addition of Ca only. Sodium and potassium did not show stimulatory effect on the activity.

The addition of 2 mM excess of EDTA to the enzyme solution including Ca resulted in a decrease in activity to less than 1% of the initial one after 6 hr-storage at 0°C, whereas the enzyme activity without addition of EDTA did not decrease even after storage for 7 days at 4°C. The decrease as well as restoration of activity induced by Ca re-addition after EDTA treatment were influenced by the treatment temperature, treatment time and concentrations of Ca and/or EDTA.

Proteolytic activity of the EDTA-inactivated was restored by metal ions in the order of Co, Co plus Ca, Zn plus Ca, Zn=Ca, and Mg, among those, restoration of 88% by Co of the original

activity being the best. On the other hand, enzyme activity after chelating Ca by GEDTA was restored to 98% of its initial activity by addition of Ca but only 26% by Mg.

o-Phenanthroline in the presence of Ca diminished activity by about 40%, though its effect was independent of the treatment temperature. Above mentioned results suggested that Ca could contribute to the enzyme stability.

II-5. Turbidity of enzyme solution and degradation of enzyme protein in the preparation which had been heated at various temperature with and without Ca were examined. Protein content of enzyme preparation in the presence of Ca decreased by heat treatment, whereas no change was recognized, when Ca in the preparation was chelated by EDTA. This decrease paralleled with the enzyme activity after heating.

LTI which usually observed at 50°C disappeared when Ca was added to EDTA-treated and heated enzyme.

These results and all previous analyses led to the conclusion that LTI of protease was ascribable to autolysis of enzyme protein. However, it was not clear, whether Ca could contribute to stability of the active site of enzyme as an essential component or not.

Changes in turbidity took place at high-temperature heating of the enzyme. It depended on enzyme concentration and did not occur at 50°C. The facts suggested that this phenomenon was supposedly due to the association of enzyme protein upon its heat denaturation. Furthermore, the experiment on the effect of Ca on the changes in turbidity of the enzyme after EDTA treatment showed that Ca was necessary for the association of enzyme.

II-6. A 3.6 PU/ml of enzyme was added to the fractionated casein solutions to elucidate which fraction of whole casein might be susceptible to hydrolysis by the enzyme. Caseins were degraded by the enzyme at both 0 and 25°C in the order of  $\beta$ -,  $\alpha_{s1}$ - and whole-casein. Ratios of the degradation rates at 25°C to 0°C were 3.0 and 6.7 for  $\beta$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein, respectively. This indicated that the former could be more easily decomposed by the enzyme than the latter at 0°C. Proteolysis of  $\kappa$ -casein could not be quantitatively determined by the present method but was qualitatively dem-

onstrated by disc gel electrophoresis. The result indicated that the degradation occurred at initial stage of the reaction like in the case of  $\beta$ -casein.

Heated or unheated enzyme was added to the milk, and cheese was manufactured experimentally. Yield of green cheese, mature index (ratio of water soluble fraction to total protein), and content of amino acid plus peptide fraction of the experimental cheese were not different from that

of control cheese, suggesting that a small amount of protease from psychrotrophic bacteria did not exert influence over cheese ripening.

Incidentally, disc gel electrophoresis showed that  $\alpha_{S1}$ -casein degraded predominantly over  $\beta$ -casein during cheese ripening and that the ratio of  $\alpha_{S1}/\beta$ -casein was found to be 0.29~0.35 after 6 week-ripening.