

## 麴プロテアーゼ測定法の検討 (1)\* [清酒に関する酵素の研究 (第2報)]

栗山 一秀・今安 聡・口垣内泰夫 (大倉酒造株式会社研究室)

## 緒 言

麴菌のプロテアーゼに関しては多数の報告がある即ち、古く黒野氏等<sup>1)</sup>は麴菌中に3種のプロテアーゼ群のある事を述べて居り、又 BERGMANN 氏等<sup>2)</sup>の報告もある。最近に至り、松島氏<sup>3, 4)</sup>は麴プロテアーゼ測定法の検討に始まり、プロテアーゼの多様性とその阻害物質等に就いて報告して居り、吉田氏<sup>5)</sup>及び DWORSCHACK 氏<sup>6)</sup>はプロテアーゼを *Asp. oryzae* 型と *Asp. niger* 型に分け、それ等の性質に就いて報告して居る。更に蔭山、杉田氏等<sup>7, 8)</sup>は米麴の酵素液に就いて、アルカリ性プロテアーゼ及び酸性プロテアーゼの2型の存在及び性質等を報告して居り、三浦氏<sup>9)</sup>は pH 処理によつて、Taka-Diastase 中に pH 4.0, pH 5.0及び pH 7.0附近に夫々最適 pH を有する3型のプロテアーゼの存在する事を認め、安井氏<sup>10)</sup>、CREWETHER 氏<sup>11)</sup>等は濾紙電気泳動装置を用い、2型のプロテアーゼを分離、それ等の性質を検討して居る。一方結晶化に関しても、赤堀氏<sup>12)</sup>は Taka-Diastase 中よりアルカリ性プロテアーゼを、天野氏等<sup>13)</sup>は酸性プロテアーゼを夫々結晶化して居る。

以上此等の報告する処には、種々一致しない点があり、又著者等が第1報<sup>14)</sup>で述べた様に、清酒の同一醸造工程中の試料を用いても、その測定法により、種々相違を示す様である。

此等は麴菌プロテアーゼの有する多様性に依る事は勿論であるが、その力価測定の方法や条件、及び麴菌の培養方法等にも基因して居ると考えられる。

而して FOLIN法による力価測定の方法等については上述の蔭山氏等により詳細な検討が試みられて居るが、著者等も又、出来るだけ実際の清酒醸造中のプロテアーゼの力価(以下これを「醸造力価」と略称する)と最も近似した値を表わすプロテアーゼ力価を測定せんとして、その方法や条件に就いて更めて検討を行つた。

尚、タカプロテアーゼ及び米麴プロテアーゼに就いても若干の考察を行つたので併せて報告する。

## 実 験 要 領

(i) 反応基質:主として Milk casein(MERKTEN製, HAMMARSTEN 法)を用い、比較として米粉末(白糖及び市販の米粉を乳鉢にて粉碎せるもの)、Gelatin(武田)Egg albumin(武田)Polypeptone(武田)等を夫々溶解後、所定の pH に規正して用いた。

(ii) 緩衝液:特に述べる以外はすべて Mc ILVAINE 氏のものを用いた。

(iii) 酵素液: Taka-diastase を溶解せるものをタカプロテアーゼとし、一方白米(約2割7分減)を用いて作つた米麴(出麴後15時間程度のもの)より抽出せるものを米麴プロテアーゼとして、この両者を使用した。 \*\*

(iv) 測定法: FOLIN 法, VAN SLYKE 法を採用し、フォルモール滴定法は反応液中の緩衝液の pH 値及びその量により測定値が相当影響される事を知つたが、この方法の検討は別に報告することとして、今回はこの方法には触れなかつた。

## I) 測定法の検討

## (i) FOLIN 法 [FOLIN-CIICALTEU の試薬を用いる方法]

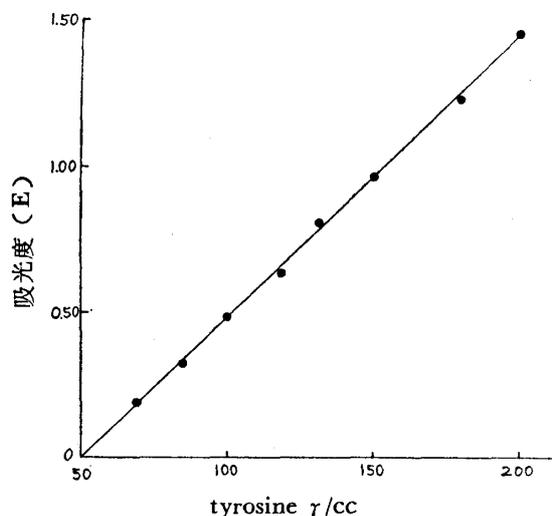
この方法は上述の通り、蔭山氏等が詳細な検討を行つて居るので、大体これに準じたが、著者等の使用する島津万能蛍光々度計はキュベット(比色管)の容量が大なる為、蒸留水を標準とするとその呈色度が余程小でなければ、吸光度が甚だ大となつて測定の誤差範囲に入つてしまうので、止むを得ず新たに、V.B<sub>1</sub>測定用の硫酸銅フィルターを用い、その時の吸光度を標準とする事とし、この条件に於ける各試料の吸光度(E)を求めて、Fig. 1 に示せる標準曲線より、tyrosine 量(r/cc)に換算し、酵素反応開始時(0 hr)の反応液の tyrosine 量との差を以つて、プロテアーゼ力価を示す事にした。尚試料の発色が測定範囲を越える場合は、適当に稀釈してから呈色させて測定することとした。これによつて、可成り長時間酵素反応を行つた反応液の測定も可能となり、試料が混濁せる場合もその影響をある程度除くことが出来た。

## (ii) VAN SLYKE 法

\* 昭和30年10月大阪醸造学会にてその要旨を口演した。

\*\* 酵素濃度の表示は原酵素剤とその抽出液との重量比を以つてする。例へば(1:10)。

Fig. 1. F.C.R呈色による吸光度とチロシン量との標準曲線



反応液10cc当りのアミノ態窒素を測定し, N<sub>2</sub> cc/10ccにて力価を示した. 尚測定時の pH 値及び共存する蛋白不完全分解物の測定値に対する影響を見た処, Table 1 に示す如く著者等の実験範囲ではこれ等の影響は殆どないと考えて良い様に思われる.

Ⅱ) 米麴より酵素液を調製する方法の検討

従来, 米麴よりプロテアーゼの酵素液を調製する場合は, 予め米麴を種々の溶液にて抽出してみて, その中で最も酵素の抽出量が大と思われる溶液を用いて抽出するのが普通である. 然し, 著者等の目的が出来るだけ醸造力価に近い値を得るという事なので, 次の様な事を試みた.

即ち, 米麴を10%の割合に各種緩衝液に入れて, Blenderにて2分間磨砕し, 室温にて1時間放置後, その磨砕物をそのまま酵素液とした場合及びそれを東洋濾紙

Table 1. VAN SLYKE 法による測定値に対する pH 値の影響

測定液	pH	Control	2.2	3.2	4.2	5.0	6.0	7.0	8.2
A	N <sub>2</sub> cc/10cc	3.04	2.65	2.88	2.92	2.90	2.82	2.70	2.60
	回収率 %	—	87.0	94.6	96.1	95.4	92.8	88.8	86.5
B	N <sub>2</sub> cc/10cc	8.76	7.74	7.98	8.39	7.84	7.77	7.72	7.70
	回収率 %	—	88.2	91.1	95.6	89.4	88.6	88.0	87.9

[註] 測定液の種類: A: { 1%グルタミン酸ソーダ液 25%  
緩衝液 50%  
蒸溜水 25% } B: { 1%グルタミン酸ソーダ液 25%  
Polypeptone soln. 12.5%  
緩衝液 50%  
蒸溜水 12.5% }

Control: 緩衝液の代わりに蒸溜水を用いた場合

Table 2. 米麴より作った種々の酵素液を Casein に作用させた場合のプロテアーゼ力価の比較

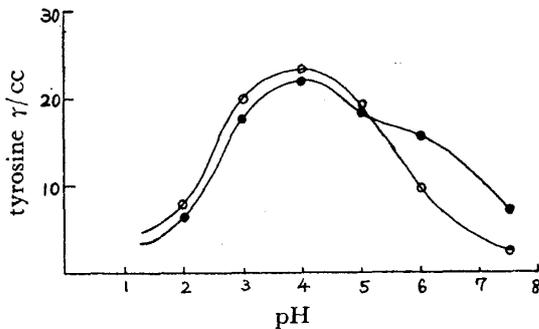
抽出液の種類	濾過の別	最終pH	Tyrosine r/cc	
			1時間後	10時間後
蒸溜水	濾液	3.8	1.12	3.64
	磨砕物	3.8	3.16	7.52
M/10 乳酸緩衝液	濾液	3.6	3.46	7.70
	磨砕物	3.6	3.86	8.38
M/10 酢酸緩衝液	濾液	3.8	1.76	6.08
	磨砕物	3.8	2.45	7.67
M/10 MC ILVAINE 緩衝液	濾液	3.4	2.90	7.40
	磨砕物	3.4	2.99	7.51
M/200 磷酸緩衝液	濾液	3.8	1.28	3.96
	磨砕物	3.9	3.00	7.32

No. 2 で濾過した濾液を酵素液とした場合に就いて, それ等のプロテアーゼ力価を比較してみた. 即ち 4% Casein を基質として各酵素液を 10 時間作用させ FOLIN 法にて測定し, 力価を tyrosin 量にて示した場合の結果を Table 2 に示す. これよりすれば, 何れの溶液を用いても, その濾液より磨砕物のまゝの方が大きい値を示して居る. 又 5% 米粉末煮沸液を基質とし, 各種酵素液を 10 時間反応させ, VAN SLYKE 法にてアミノ態窒素を測定した場合も, 殆ど同様な結果 (Table 3) が得られた. 従つて, 実験の便宜上濾液を酵素液とする場合は常に磨砕物のまゝを酵素液とした時の力価と比較しておく,

Table 3. 米麴より作つた種々の酵素液を米粉末に作用させた場合のプロテアーゼ力価の比較

抽出液の種類	濾過の別	最終pH	10時間後 N cc/10cc
蒸溜水	濾液	4.0	1.56
$\frac{M}{10}$ 乳酸緩衝液	濾液	3.4	0.64
$\frac{M}{10}$ 酢酸緩衝液	濾液	3.8	1.17
	磨砕物	3.8	2.02
$\frac{M}{10}$ MC ILVAINE 緩衝液	磨砕物	3.6	1.10

Fig. 2. 酵素液のみのみを40°C, 10時間放置した場合の米麴プロテアーゼの失活

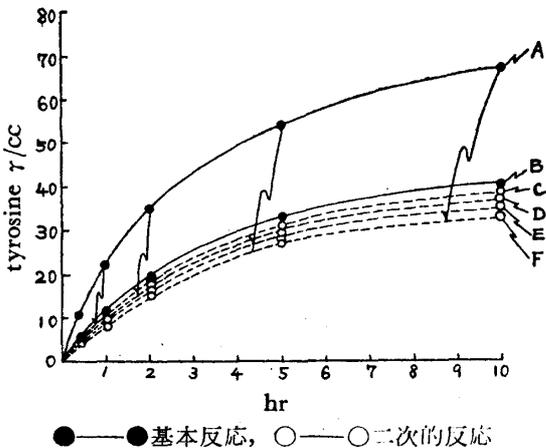


●—● 無処理  
○—○ 40°C, 10hr 放置

反応液組成:  $\left\{ \begin{array}{l} \text{米麴プロテアーゼ(1:20)} \quad 50\text{cc} \\ \text{4\% Casein 溶液} \quad 50\text{cc} \\ \text{(所定の緩衝液50\%を含む)} \end{array} \right.$

反応条件: 1 hr, 40°C  
測定法: FOLIN 法

Fig. 3. Casein 反応液中に於ける米麴プロテアーゼの失活



が、一方F曲線でも(言いかえると基本反応10時間後の反応液をとり出し新しい基質に作用させた場合でも), 基本反応と略々同様な曲線を示して居る。即ち新しい反応基質に入るとその酵素の反応速度は再び増加することが確認されたわけで従つて、プロテアーゼを長時間作用させた場合、その経時消化曲線が徐々に低下するのは、

考察をすべきであると思われる。

■) 酵素液の失活に就いて

蔭山氏等<sup>8)</sup>の報告によれば、基質を含まない酵素液は40°C, 1時間放置しただけでも、アルカリ側に多少力価の減少が認められるのに反し、基質と共存すれば、50°C, 1時間放置しても酵素力は破壊されないとして居る。

著者等は第1報<sup>14)</sup>に於て述べた様に醸造力価に出来るだけ近いプロテアーゼ力を知る為には、比較的酵素反応の時間を長くする必要を感じて居るので、かゝる場合の酵

素液の失活に就いて、更に検討を試みた。

即ち、米麴酵素液を作る際、反応時の所定 pH の溶液にて米麴を抽出し、その各々を40°C, 10時間該 pH にて放置し、その後に基質 Casein 溶液を入れて40°C, 1時間反応させて消化 pH 曲線を求め、無処理の酵素液に Casein を作用させた場合と比較してみた。その結果は Fig. 2 の如くになつた。

この結果よりすれば、酸性側では力価の低下は認められないのに対し、アルカリ側は無処理の酵素液に比して約3割程力価が減少して居る。尚この反応力価の低下等に関しては、共存するアミラーゼ及び細菌汚染等の関係を検討する要があると思われるので別報に於て更に検討する予定である。

一方、基質が共存する場合の酵素液の失活について検討する為次の様な試験を行つた。即ち先ず米麴プロテアーゼ(1:5)の如く比較的高濃度の酵素を4% Casein 溶液500ccにて作用させ、FOLIN 法にて力価を求め、その経時消化曲線を求めた(これを基本反応と呼ぶことにする。Fig. 3 のA曲線)。次にこの基本反応の反応途中に於て、0, 1, 2, 5及び10時間毎に反応液の中より一定量を取り出し、その各々を再び新しい Casein 溶液に反応させてみた(これを二次的反応と呼ぶことにする。Fig. 3 のB—F曲線)。

この結果に就いてみるに、反応開始時(0時間)に基本反応液より一定量を取り出し、別の Casein 溶液に作用させた二次反応液の経時消化曲線(B曲線)に比して、各時間後にとり出して二次反応させた経時曲線(1時間後C曲線, 2時間後D曲線, 5時間後E曲線, 10時間後F曲線)は何れもB曲線を越える力価を示すことはない

プロテアーゼの失活というよりは寧ろ, その反応生成物の阻害, 或いは或る程度以上分解した基質に対する酵素の親和力, 又は基質 Casein が単一成分でない事等に起因するのではないかと考えられる。

IV) 基質濃度及び酵素濃度の影響

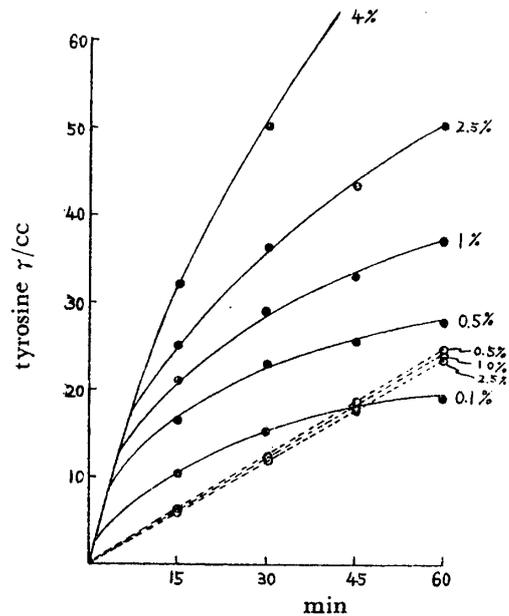
一般に酵素反応速度は, 基質濃度が小なる範囲では基質濃度に比例して増大するが, それより基質濃度が大となると反応速度の増分は次第に小さくなり, 或る程度以上の基質濃度に於ては, もはや反応速度は基質濃度に無関係な一定値となつて, 更にそれ以上基質濃度を増す時は反応速度は却つて減少するというのが普通である。

麴プロテアーゼに於けるこの2つの限界を知る為, 次の様な検討を試みた。

即ち先ず二種の濃度のタカプロテアーゼ(1:100)

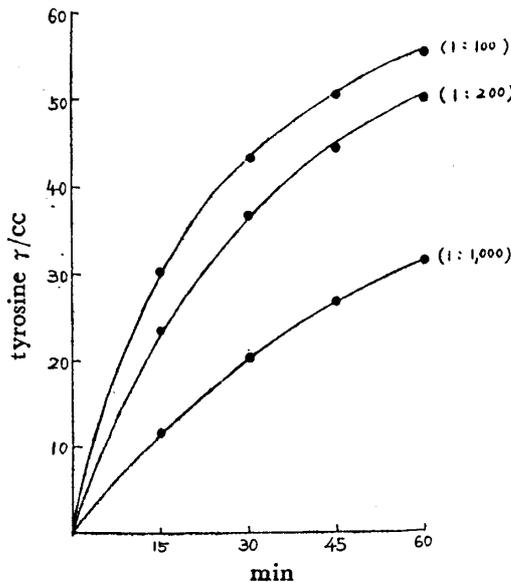
及び(1:10,000)を用い, 0.1乃至4%の Casein に作用させてその経時消化曲線を求めた処, Fig. 4 の如き結果を得た。これによれば, タカプロテアーゼ(1:100)の如く比較的高濃度の酵素が作用する時は, 基質濃度の増加と共に酵素力価は略々比例的に増大するが, (1:10,000)の如く低濃度酵素の時は基質濃度の影響は殆んどない様に思われる。更に VAN SLYKE 法により測定せる場合もこれと大体同様な結果を得た。又, 3種の濃度(1:100)(1:200)及び(1:1,000)のタカプロテアーゼを2% Casein 溶液及び2.5% gelatin 溶液に作用させ, それらの経時消化曲線を求めた処, 夫々 Fig 5, Fig. 6 に示

Fig. 4. Taka-protease 力価に対する酵素濃度及び Casein 濃度の影響



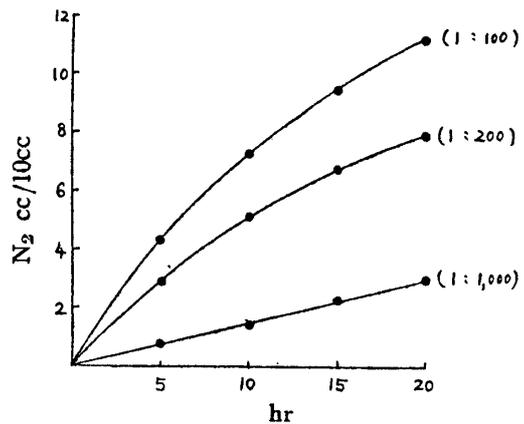
●—● タカプロテアーゼ (1:100)  
○—○ タカプロテアーゼ (1:10,000)  
反応液組成: { タカプロテアーゼ 50cc  
0.1~4% Casein 溶液 50cc  
(pH3.0の緩衝液50%を含む)  
反応条件: 40°C, pH3.0  
測定法: FOLIN 法

Fig. 5. Casein 消化に対する酵素濃度の影響



反応液組成: { タカプロテアーゼ 50cc  
(1:100)~(1:1,000)  
2% Casein 溶液 50cc  
(内pH3.0の緩衝液50%を含む)  
反応条件: pH3.0, 40°C  
測定法: FOLIN 法

Fig. 6. Gelatin 消化に対する酵素濃度の影響



反応液組成: { タカプロテアーゼ 50cc  
(1:100)~(1:1,000)  
2.5% Gelatin 溶液 50cc  
(内pH3.0の緩衝液50%を含む)  
反応条件: pH3.0, 40°C  
測定法: VAN SLYKE 法

す様な結果となつた。

此等の結果よりすれば、かゝる基質濃度に於て反応初速度は或る酵素濃度以下では、その酵素濃度に比例する様であり、従つて、作用させる酵素濃度に対し、基質濃度は高過ぎても低過ぎても不適當と考えられる。

故にタカプロテアーゼなら(1:500)程度の酵素濃度のものを用い、反応基質 Casein の濃度を2%前後とすれば、その反応速度は反応基質の影響を受けずその酵素濃度に大体比例する。

更に米麴プロテアーゼに就いて同様に検討した結果、その(1:20)程度の酵素濃度の力価がタカプロテアーゼ(1:500)の力価に略々匹敵した。

[尚、こゝに用いる両酵素は何れも純粋ではなく、殊に米麴プロテアーゼの場合、その製麴条件、抽出条件等の相違によりそのプロテアーゼ力価にも大きな差異を生ずるので茲にいう(1:20)とか(1:500)とかいう酵素濃度は普遍的なものではない。]

従つて、以下の実験に於ては、この程度の酵素濃度、基質濃度を採用することとし、酵素の稀釈失活等をも考え併せて、高濃度酵素の場合は基質濃度を一定とする様に心掛けた。

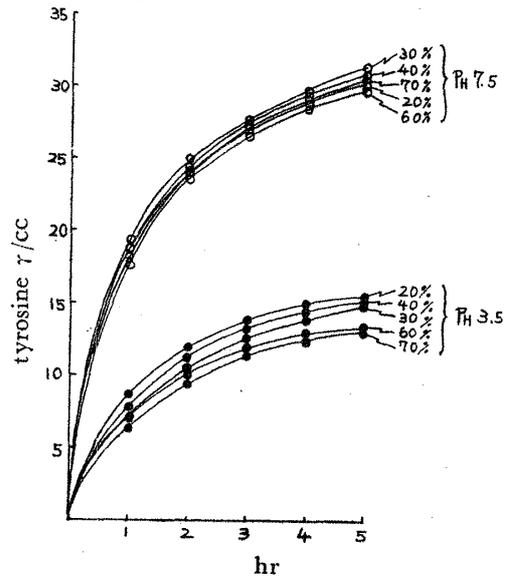
V) 反応液中の緩衝液濃度の影響

実験上反応液のpH調整の為、緩衝液を比較的多量に使用する場合もあり得るので、かゝる場合に於けるプロテアーゼ力価に対する緩衝液濃度の影響を検討した。

即ち、MC ILVAIN 緩衝液の最終濃度を20, 30, 40, 60及び70%とせる反応液に就いて夫々作用pH7.5及び3.5とした場合の経時消化曲線を求めた。

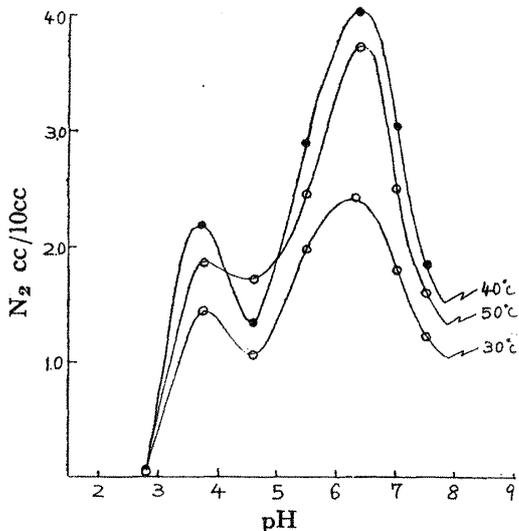
その結果は Fig. 7 に示せる如く、アルカリ側にて作用させた場合は、緩衝液濃度の影響は殆どなく、酸性側の場合も多少の影響は認められるが、これも特別に考慮すべき程ではないと考えられる。

Fig. 7. 反応液中の MC ILVAIN 緩衝液濃度の影響



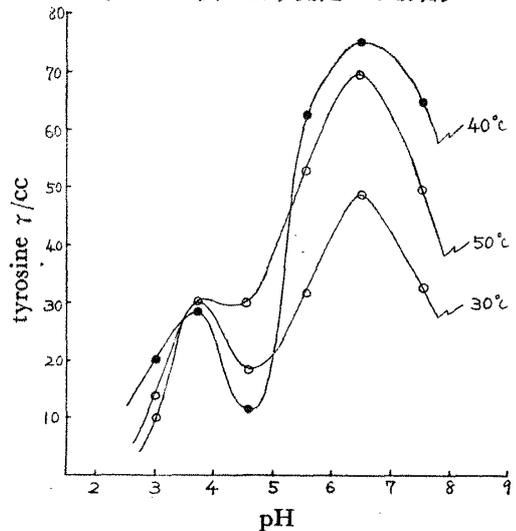
反応液組成: { 米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
2% Casein 溶液 50cc  
(この内、所定のpHの緩衝液) を最終濃度20~70%含む }  
反応条件: pH3.5及びpH7.5, 40°C  
測定法: FOLIN 法

Fig. 8. 反応温度による影響 (i) (VAN SLYKE 法により測定せる場合)



反応液組成: { 米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
2% Casein 溶液 50cc  
(所定のpHの緩衝液50%を含む) }  
反応時間: 10hr  
測定法: VAN SLYKE 法

Fig. 9. 反応温度による影響 (ii) (FOLIN 法により測定せる場合)



反応液組成: { 米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
2% Casein 溶液 50cc  
(所定のpHの緩衝液50%を含む) }  
反応時間: 10hr  
測定法: FOLIN 法

(478)

(栗山, 今安, 口垣内) 麴プロテアーゼ測定法の検討 (1)

又, 酢酸緩衝液に就いても検討した処, この場合は全く緩衝液濃度の阻害を受けなかつた.

#### VI) 反応温度の影響

同一試料の米麴プロテアーゼを Casein に作用させ, 夫々30°C, 40°C及び50°Cの各反応温度に於ける pH 消化曲線を VAN SLYKE 法及び FOLIN 法にて測定した. その結果は Fig. 8 及び Fig. 9 に示す.

この結果によれば, 反応温度が50°Cとなるとプロテアーゼは阻害を受けて, 40°Cの場合の力価よりも低い値を示して居り, 一方, アルカリ性プロテアーゼの方が酸性プロテアーゼよりもその力価の伸びは良い様に思われる.

而して, この温度阻害の限界を細かく見てゆけば蔭山氏等の報告して居る様に37°C附近が最適温度となるであろうが, 然し, (1)の酵素液の失活に関する検討の結果をも併せ考えれば, 酸性プロテアーゼについては, 40°Cの反応温度をとれば温度による阻害は大して受けない様に思われる. 従つて, 実験の便宜上, 以後, 反応温度は40°Cとすることにした.

以上種々反応条件を検討したが, 反応基質に関する検討は次報に於て述べ度いと思う.

#### 要 約

タカプロテアーゼ及び米麴プロテアーゼに就いて, その力価測定の測定条件及び反応条件を検討した.

- (1) 測定法としては FOLIN 法及び VAN SLYKE 法について若干の検討を試みた.
- (2) 米麴より酵素液を作る場合, その磨砕物を濾過せずその儘用いる場合も検討したが, 濾液を酵素液とするよりもその場合のプロテアーゼ力価は大であつた.
- (3) 酵素反応を比較的長時間行つた場合も, 酸性側のみを取扱う時は酵素液の失活は殆ど問題にしなくても良いと考えられる.
- (4) 基質 Casein の濃度の影響をみた処, それに作用させる酵素濃度が比較的高い場合, 酵素力価は基質濃度に略々比例して増大するが, 比較的酵素濃度の低い時は酵素力価は基質濃度の影響を殆ど受けない. 又或る酵素濃度以下では Casein 消化の初速度は酵素濃度に比例した.
- (5) 緩衝液濃度による影響も本報の実験範囲では, 殆んど考慮する必要はない.
- (6) 反応温度は40°Cを採用しても大体差支えないと考えられる.

終りに臨み本稿の御校閲を賜つた京都大学片桐教授, 終始御鞭撻下さつた安藤技師長に深謝致します.

#### 文 献

- 1) 黒野, 滝沢: 醸試報, **115**, 44 (1932).
  - 2) BERGMANN M. & TOSEPHS: J.B.C. **117**, 189 (1937).
  - 3) 松島: 本誌, **31**, 36, 7, 387 (1953), **32**, 14, 58 (1954).
  - 4) 松島: 農化, **29**, 87, 781, 883 (1955).
  - 5) 吉田: 農化, **28**, 67 (1954).
  - 6) DWORSCHACK R.G. & KOEPEL H.J.: Arch. Biochem & Biophys. **41**, 48 (1952).
  - 7) 蔭山, 国定: 本誌, **33**, 28 (1955).
  - 8) 蔭山, 杉田: 本誌, **33**, 53 (1955), **33**, 109 (1955).
  - 9) 三浦: Ann. Report Takamine lab. **4**, 79 (1952), **6**, 14 (1954).
  - 10) 安井: 第152回及び第161回農化関東支部例会口演.
  - 11) CREWETHER: Aust. J. Biol. Sci. **6**, 410 (1953).
  - 12) 赤堀等: 酵素化学シンポジウム, **8**, 49 (1953).
  - 13) 天野等: Medical J. Osaka Univ. **5**, 333 (1954).
  - 14) 栗山, 今安, 口垣内: 本誌, **34**, 133 (1956).
- (昭和31, 7, 26 受理)

## 麴プロテアーゼ測定法の検討 (2)\* [清酒に関する酵素の研究 (第3報)]

栗山 一秀・今安 聡・口垣内泰夫 (大倉酒造株式会社研究室)

#### [緒 言]

前報<sup>1)</sup>に於てはタカプロテアーゼ及び米麴プロテアーゼの反応条件及び測定条件を主として Casein を基質とした場合に就いて検討したのであるが, 本報では反応基質として, 米粉末, Milk casein, Gelatin, Egg albumin 及び Polypeptone の5種の基質に就いて, タカプロテアーゼ及び米麴プロテアーゼを用い夫々pH消化曲線を求め, 検討を試みた. 更に分解率による表示法に就いても若干の検討を行つた.

\* 昭和30年10月大阪醸造学会にてその要旨を口演した.