

(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.

尚実験要領は全て前報<sup>1)</sup>を踏襲した。

### 【実験結果及び考察】

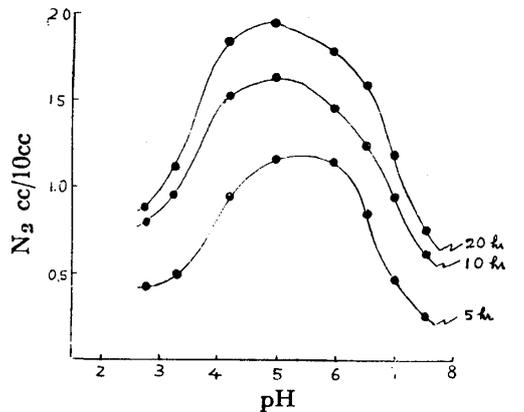
#### 〔A〕 反応基質の検討

##### I) 米粉末の場合

市販の米粉及び特上白糠を乳鉢にて更に粉碎し、その5%煮沸液を基質とした。

先づ、タカプロテアーゼ(1:100)を作用させた場合は Fig. 1 に示す如く、pH5.0附近にピークを有する。然しこの図表に於ける力価の時間による伸びを更に拡大して図表に表現すれば、Fig. 2 の通りである。即ち最初の5時間はpH5.0附近にピークがあるが、次の5時間ではpH7.0及びpH3.0附近に夫々ピークを示す様になる。こ

Fig. 1. 米粉末に対するタカプロテアーゼのpH消化曲線



反応液組成:  $\begin{cases} 5\% \text{ 米粉末煮沸液} & 50\text{cc} \\ \text{MC ILVAIN 緩衝液} & 50\text{cc} \\ \text{タカプロテアーゼ(1:100)} & 25\text{cc} \end{cases}$

反応条件: 40°C, 20hr

測定法: VAN SLYKE 法

Fig. 2. (Fig. 1.) に於ける時間によるプロテアーゼ力価の伸びの拡大曲線

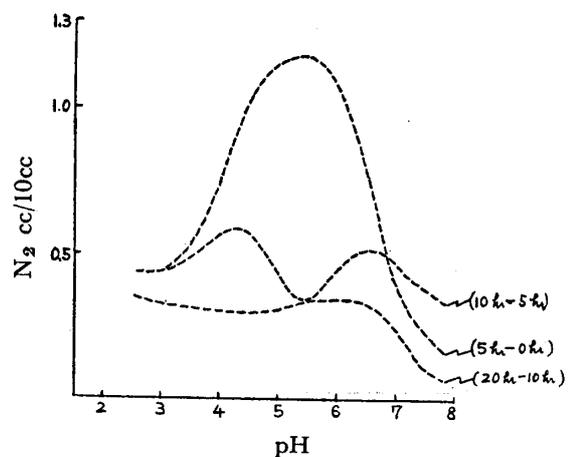
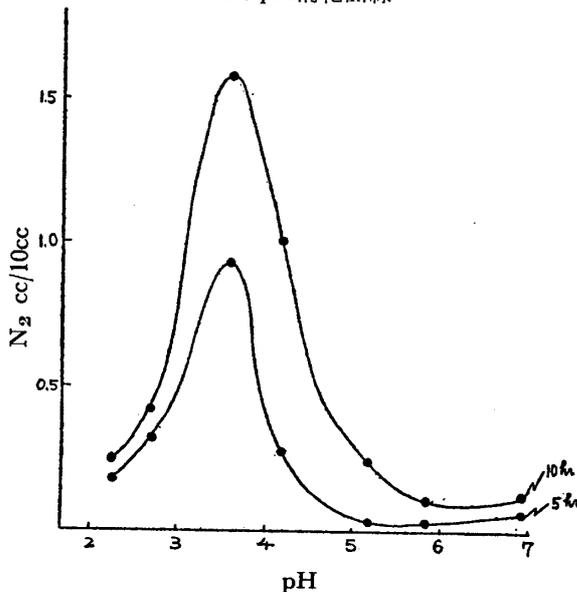


Fig. 3. 米粉末に対する米麴プロテアーゼのpH消化曲線



反応液組成:  $\begin{cases} 5\% \text{ 米粉末煮沸液} & 50\text{cc} \\ \text{MC ILVAIN 緩衝液} & 50\text{cc} \\ \text{米麴プロテアーゼ(1:10)} & 25\text{cc} \end{cases}$

反応条件: 40°C, 10hr

測定法: VAN SLYKE 法

れは三浦氏<sup>2)</sup>の報告して居るジアスターゼ中の3種のプロテアーゼと関連して居るとも考えられるが、又一方pH5.0に於ける伸びはpH3.0及びpH7.0に於ける伸びが重つて表われたものとすれば2種のプロテアーゼの存在を示して居ると考える事も出来る。

次に米麴プロテアーゼ(1:10)を用いて同様な検討を行つた結果を Fig. 3 に示す。即ちこの場合は pH 3.5 附近にのみピークが存在して、アルカリ側にては殆ど反応しない様に思われる。

尚米粉末を用いた場合は、三塩化酢酸による凝固が殆ど起らず、その為代用として試みた燐タンゲステン酸による方法も尚検討の余地があるので、本報では米粉末を基質とした場合の FOLIN 法による測定は省略した。

##### II) ミルクカゼインの場合

Milk casein (MERK 製, HAMMARSTEN 法) を用いたが、pH3.5乃至pH6.0附近では普通塊状の凝固を起し酵素反応は円滑に行われ難く、実験操作上にも種々の障害が起る。

更に又前報<sup>1)</sup>で述べた如く比較的高濃度の酵素の時 はプロテアーゼ力価は基質濃度によつて影響を受ける事から考えても、この様な塊状凝固を起す pH 域に於

て反応力価も測定する事は不正確になる場合があると想像される。

そこで、かかる塊状凝固を防ぐ方法を種々検討した結果、可溶性澱粉をカゼインに混合することによつて略々満足すべき結果を得た。

即ち、可溶性澱粉 (MERK 製) を 1% 程度 Milk casein に予め混合しておき、一旦 MC ILVAINE 緩衝液の枸橼酸又は第二リン酸ソーダを用いて、pH3.0以下又はpH7.0以上となし、煮沸溶解した後、Blender にて攪拌しつゝ再び緩衝液のアルカリ又は酸を加えて所定のpHに調整した。

かくすれば、3.0乃至6.0のpH領域に於ける塊状凝固も避けることが出来、而も澱粉が混在する故、実際の清酒醸造条件とも近似して来るのではないかと考えられる。

尚この澱粉添加によつて、プロテアーゼ力価が影響されるか否かを検討した。

即ち、先づ対照として次の如き組成の反応液を用い、

4% casein 溶液	50cc (pH3.0及びpH4.5の緩衝液50%を含む)
米麴プロテアーゼ(1:10)	25cc
蒸溜水	25cc

一方、この蒸溜水の代りに可溶性澱粉を最終濃度 1% になる様添加した反応液に就いて夫々その力価を測定した。その結果は Table 1 に示す如く少くとも澱粉添加による障害は認められず、pH4.5に於てはむしろ反応を促進させる傾向を示した。

Table 1. 基質 Casein に澱粉を混入した場合の影響に就いて

作用pH	プロテアーゼ力価 反応基質	Tyrosine $\tau$ /cc	
		30min	60min
4.5	Casein	2.80	4.00
	Casein+starch	5.80	7.60
3.0	Casein	5.60	8.60
	Casein+starch	5.50	8.70

更に実験操作上に於ても、三塩化酢酸による沈澱状態及び澱粉による濁濁程度も測定に影響する程でない事を確めた。

次に米麴プロテアーゼ (1:20) を用いてpH消化曲線求めた処、Fig. 4 の如き結果となつた。

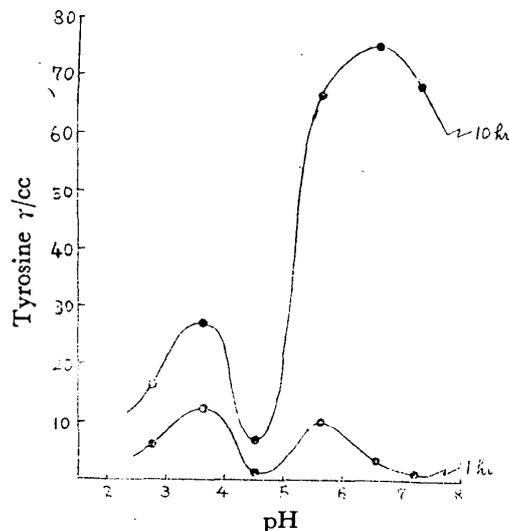
勿論、この場合は共存するアミラーゼが当然澱粉に作用するのでプロテアーゼ力価にもその影響が考えられるが、この事については更めて検討する予定で茲では推論は避けたいと思う。而してこの図表を第2報<sup>1)</sup>の Fig. 9

と比較すれば殆ど同一の曲線を描いて居ると見做される故、米麴プロテアーゼのカゼインに対する最適pHは3.5附近及び6.5附近にある事が確められたわけで、第2報に於ける如く澱粉を添加しない場合も、凝固pH領域に於けるカゼインの溶解を慎重に行えば、始め予想して居た様な凝固による障害は認められない事がわかり、従つて、著者等の実験範囲ではカゼインに澱粉を添加してから溶解する様な事は別段その必要がないと思われる。

#### ■) ゼラチンの場合

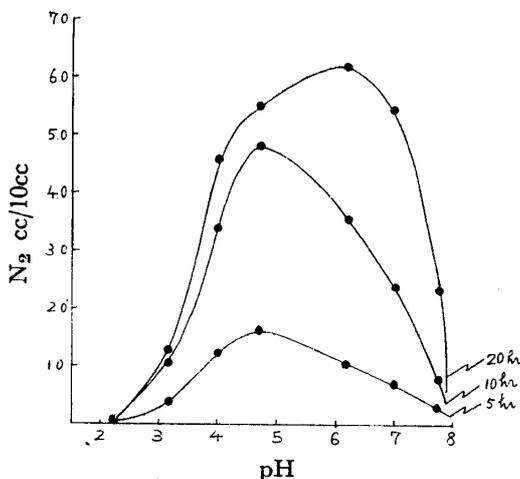
ゼラチンの最終濃度が2.5%となる様な反応液を用い、米麴プロテアーゼを働かせた時のpH消化曲線求めた処、Fig. 5 に示す如き結果となつた。これは米粉末にタカプロテアーゼを作用させた場合とよく似て居り、伸びの傾向も大体一致して居るが、米麴プロテアーゼを作用させた場合の様に酸性側にのみ主として作用すると云う事はない。

Fig. 4. 澱粉を添加せる Casein に対する米麴プロテアーゼのpH消化曲線



反応液: 米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
組成: 2% Casein 緩衝溶液 50cc  
(最終濃度 1% の可溶性澱粉を含む)  
反応条件: 40°C  
測定法: FOLIN 法

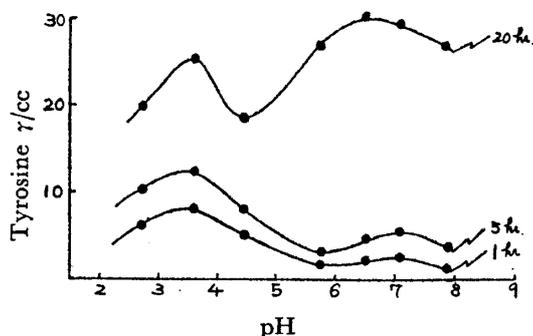
Fig. 5. ゼラチンに対する米麴プロテアーゼのpH消化曲線



反応液組成:  $\left\{ \begin{array}{l} \text{米麴プロテアーゼ(1:20)} \quad 50\text{cc} \\ \text{5\%ゼラチン溶液} \quad 50\text{cc} \\ \text{(所定のpHの緩衝液50\%を含む)} \end{array} \right.$

反応条件: 40°C, 20hr  
測定法: VAN SLYKE 法

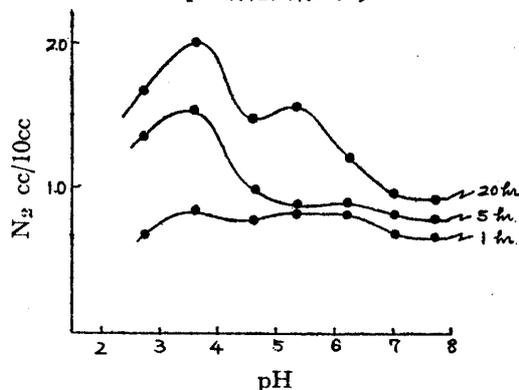
Fig. 6. Egg albumin に対するタカプロテアーゼのpH消化曲線 (i)



反応液組成:  $\left\{ \begin{array}{l} \text{タカプロテアーゼ(1:100)} \quad 20\text{cc} \\ \text{1\% Albumin 溶液} \quad 80\text{cc} \\ \text{(所定のpHの緩衝液50\%を含む)} \end{array} \right.$

反応条件: 40°C, 20hr  
測定法: FOLIN 法

Fig. 7. Egg albumin に対するタカプロテアーゼのpH消化曲線 (ii)



反応液組成及び条件: Fig. 6. に同じ  
測定法: VAN SLYKE 法

## IV) アルブミンの場合

未変性 Egg albumin の1%溶液を基質としてタカプロテアーゼ (1:100) を作用させてpH消化曲線を描いた。その結果を Fig. 6 及び Fig. 7 に示す。

これによればかかる未変性アルブミンにも或る程度作用する事が認められるが、FOLIN 法による場合、三塩化酢酸添加により起る凝固が不完全な場合が多い傾向があり、又 VAN SLYKE 法による場合も測定中に発泡が多くて実験操作上誤差の原因になり易いと思われ、他の基質に比較してあまり適当な基質であると思えない。

## V) ポリペプトンの場合

4%のポリペプトン溶液にタカプロテアーゼ (1:500) 及び米麴プロテアーゼ (1:10) を反応させた結果を Fig. 8 及び Fig. 9 に夫々示す。

この結果によれば、タカプロテアーゼは pH 2.0 及び pH 5.0 附近に、又米麴プロテアーゼは pH 3.5 及び pH 7.0 附近に夫々ピークを有して居り、大体 Casein の場合と同傾向を同じくする事が認められ、ポリペプチドをアミ

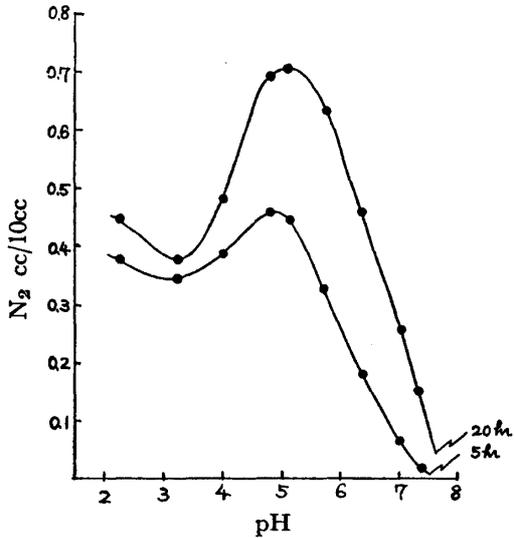
ノ酸迄分解する力を有して居ると考えられる。併し、他の基質に作用させた場合に比して反応しにくい為その生成アミノ酸の量は少い様である。

## [B] 分解率による表示法の検討

本報並びに前報に於て屢々経験した如く、同一酵素を同一基質に反応させた場合、VAN SLYKE 法にて測定した時と FOLIN 法にて測定した時とは相異した結果を示したが、これは、FOLIN 法によれば、蛋白分解物の中、三塩化酢酸可溶性の比較的分子量のものからアミノ酸迄を測定出来るので、丁度ゼラチンを用いた時のその液化力に匹敵するとも考えられ、一方 VAN SLYKE 法によればその蛋白分解物の中、主としてアミノ酸を測定する事になり、その測定する対照範囲が異なるから、当然この様な相異を示すものと考えられる。

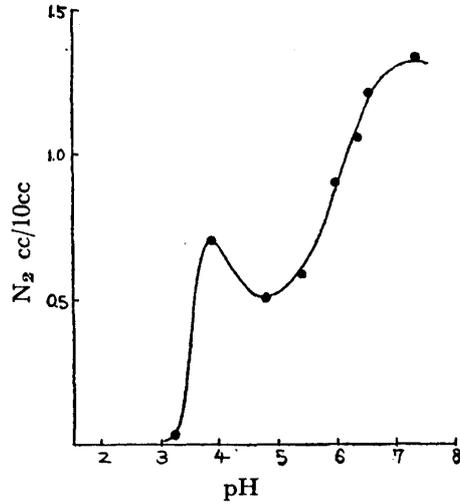
従つて、第1報<sup>3)</sup>で述べた醗中のプロテアーゼの消長に於てゼラチン消化力(液化力ではない)がそのアミノ酸量の消長とよく関連したのも以上の理由による為であり、醗中のアミノ酸量でなく比較的分子量の蛋白質の量の変化を測定すれば FOLIN 法によるプロテアーゼ力価の消長とも関連性が認められるのではないかとと思われる。

Fig. 8. ポリペプトンに対するタカプロテアーゼのpH消化曲線



反応液組成: { 4% Polypeptone 溶液 50cc  
(所定のpHの緩衝液50%を含む)  
タカプロテアーゼ(1:500) 50cc  
反応条件: 40°C, 20hr  
測定法: VAN SLYKE 法

Fig. 9. ポリペプトンに対する米麴プロテアーゼのpH消化曲線

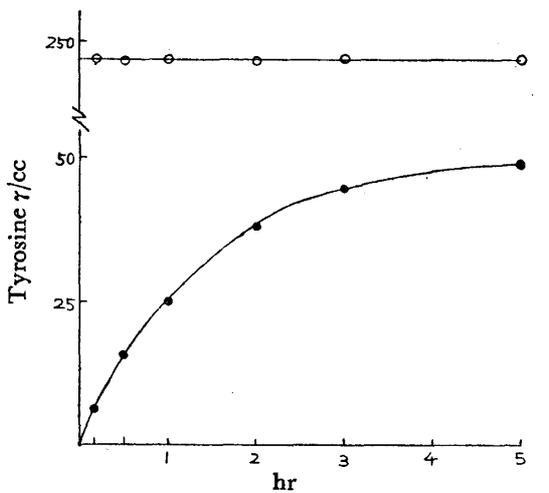


反応液組成: { 4% Polypeptone 溶液 50cc  
(緩衝液50%を含む)  
米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
反応条件: 40°C, 10hr  
測定法: VAN SLYKE 法

故に、これ等兩測定法による力価を分解率にて示す事が出来るならば、同一単位で同時に示し得ることになり、所謂プロテイナーゼ力とペプチダーゼ力との力価の比率も知る目安ともなりうると思われる。

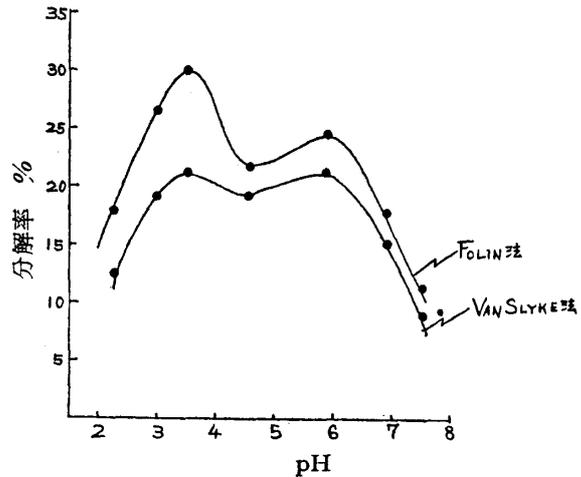
先づ FOLIN 法に依る場合に就いては、蔭山氏等<sup>5)</sup>はカゼイン液に Pepsin, Trypsin 稀釈液を作用させ、一方に三塩化酢酸を加え、他方に蒸留水を加えて濾過、以下全く同一に操作し、その呈色値から夫々の経時的分解率を求めて居る。著者等も Casein 液にタカプロテアーゼを作用させ同様な方法で経時的分解曲線を求めた処 Fig. 10に示す如く大体同じ様な結果を得た。

Fig. 10. FOLIN 法に於ける T.C.A. を添加せる場合と添加しない場合の経時変化



○—○ T.C.A. を加へない場合  
●—● T.C.A. を加へた場合  
反応液組成: { 4% Casein 溶液 50cc  
(pH3.5の緩衝液50%を含む)  
タカプロテアーゼ(1:1,000) 50cc  
反応条件: 40°C, pH3.5

Fig. 11. 米麴プロテアーゼをカゼインに作用させた場合の分解率にて表示したpH消化曲線



反応液組成: { 4% Casein 溶液 50cc  
(所定のpHの緩衝液50%を含む)  
米麴プロテアーゼ(1:20) 50cc  
反応条件: 40°C, 10hr

(大嶋, 井上) 動物便, 清浄野菜及び土から分離した *Aerobacter mannanolyticus* の細菌学的性状について (483)

即ち三塩化酢酸を添加しない方の Tyrosine 量は常に略々一定値をとる。従つてこの一定値を 100 として各時間毎の三塩化酢酸を加えた方の Tyrosine 量から見掛上の分解率を求める事とした。

次に VAN SLYKE 法による場合は反応液を 20% HCl にて分解後,  $H_2O_2$  にて炭化物を清澄化し, これを試料として全アミノ酸の量を測定, この値を 100 として分解率を求めた。

これ等の方法により Casein に米麴プロテアーゼを作用させた時の pH 消化曲線を分解率にて表示すれば Fig. 11 の如き結果となつた。即ち, 分解率にて示せば FOLIN 法による場合も, VAN SLYKE 法による場合も同一の力価表示が可能となつて考察を容易ならしめる事となつた。

#### [C] 考 察

以上 5 種の基質に就いて検討した結果, その pH 消化曲線は夫々異つて居るが, 米麴プロテアーゼを米粉末液に反応させた場合は酸性側のみにて作用して居る事及び, 第 1 報<sup>2)</sup> で述べた様に実際の清酒醸造中のプロテアーゼも酸性側を主として居る事を考え併せれば, 如何なる基質を用いるとしても実際の清酒醸造中のプロテアーゼ力価を知る目安としては, それ等の基質の酸性側の Optimum pH に於て測定する事が肝要と考える。

#### 要 旨

(1) Milk casein, Gelatin, Egg albumin 及び Polypeptone の 4 種類の反応基質にタカプロテアーゼ及び米麴プロテアーゼを作用させ, それらの pH 消化曲線について米粉末の場合と比較して夫々検討を行つた。

(2) 麴プロテアーゼを米粉末に反応させた場合その力価は酸性側のみ存在するから, どの基質を採用しても, 夫々の基質について該当する酸性側の最適 pH にて測定した力価が実際の醸造の場合の力価の目安となると考えられる。

(3) プロテアーゼ力価を分解率にて表示することにより FOLIN 法及び VAN SLYKE 法にて夫々測定した値を同一の力価にて比較し得ることと考えられる。

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) 栗山, 今安, 口垣内: 本誌 (投稿中). 2) 三浦: Ann. Report Takamine lab. **4**, 79 (1952), **6**, 14 (1954).  
3) 栗山, 今安, 口垣内: 本誌, **34**, 133 (1956). 4) 蔭山, 杉田: 本誌, **33**, 53 (1955). 5) 蔭山, 国定:  
本誌, **33**, 28 (1955). (昭和 31, 7, 26 受理)

## 動物便, 清浄野菜及び土から分離した *Aerobacter mannanolyticus* の細菌学的性状について

大嶋 竹一・井上 憲政 (国立栄養研究所)

#### ま え が き

井上<sup>1)</sup>は嚢に人糞便から菌蕨マンナンを分解する *Aerobacter cloacae* 型を分離発表したが, その後, 人糞便<sup>2)</sup>及びバター<sup>3)</sup>中から多数の菌蕨マンナン分解 *Aerobacter cloacae* 型を分離し, 細菌学的性状を精査し, 菌蕨マンナン分解 *Aerobacter cloacae* 型を新種と認め, *Aerobacter mannanolyticus* INOUE et INOUE と発表した<sup>4)</sup>. 次いで *Aerobacter mannanolyticus* の人型代表株 2 菌株を撰んで免疫血清をつくり, それらの免疫血清を用いて, 人型及び乳型の多数の菌株について凝集反応を検し, 凝集反応成績と生物学的性状とが略ぼ一致することを知つた<sup>5)</sup>. この度びは動物便, 清浄野菜, 土から分離した *Aerobacter mannanolyticus* の細菌学的性状について報告する。

#### 実 験 の 部

動物便から分離した *Aerobacter mannanolyticus*: 草, 雑, 肉食動物の便を生理学的食塩水で 10 進法によつて稀釈し, 各稀釈液を KOSER 培地に移植し, 37°C, 2 日間培養し, 各稀釈便液の混濁培地を KOSER 培地に移植培養を数回繰り返す, それらの一列の稀釈液を菌蕨片加 KCSEK 培地に移植し, 菌蕨を分解する出現の頻度を検し, 菌蕨を分解する最高稀釈培地を生理的食塩水で適度に稀釈し, それらの一白金耳を普通寒天平板培地に塗抹培養し, 出現した多数の集落を菌蕨片加 KOSER 培地に移植, 37°C 培養し, 2~3 日間放置し, 菌蕨の分解を確かめ,