

学 位 論 文 題 名

牛乳から分離した低温菌のリパーゼおよび
プロテアーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

長距離輸送などによる生乳の冷蔵保存期間の延長は牛乳中の低温群の増殖を許す。これらの低温菌群がその発育に伴って分泌するリパーゼ、プロテアーゼ等の酵素は、熱安定性の高いものが多く、通常の殺菌処理では酵素の完全な失活までには至らしめない場合がある。したがって殺菌後もそれぞれの基質に作用し続けることになり、製品保存中の風味劣化や組織の変化を招くものと考えられている。

本研究では、牛乳から分離した *Pseudomonas fluorescens* No.33 が生産するリパーゼとプロテアーゼを分離精製し、リパーゼの熱安定性に与える乳蛋白質の影響、ならびに、プロテアーゼがリパーゼや乳蛋白質に及ぼす効果をも検討することによって、牛乳中でのリパーゼの挙動を総合的に考察することを目的とした。

脱脂乳で *Ps. fluorescens* No.33 を培養した後、その上澄液中のリパーゼの熱安定性を観察すると、培養時間や加熱時の pH により著しい影響を受けたことから、リパーゼの熱安定性には pH のみならず、培養期間中に蓄積する供試菌の代謝産物や菌体外プロテアーゼによる分解産物等、多くの要因が関与するものと考えられた。そこで、リパーゼを精製し、その本来の性質を明らかにすることを試みた。すなわち、培養上澄液に塩酸を添加してカゼイン成分を除去した後、オクチルセファロース CL-4B、DEAE-トヨパール、トヨパール HW-50S によるカラムクロマトグラフィーによってリパーゼの精製を行い、回収率約35%、純化度約4,200倍の精製リパーゼを得た。リパーゼの分子量は、SDS-PAGE で約52,000と算出され、アミノ酸分析の結果、1残基のシステインが認められた。

バター脂肪を基質とした場合、精製リパーゼの最大活性は pH 7.5~8.5 において認められた。リパーゼ活性は pH 7.5 のリン酸緩衝液中において、45℃で最大を示した。リパーゼの熱安定性は、pH 7.5 の0.1Mリン酸緩衝液中で40℃、pH 6.6 の同緩衝液中では50℃において、それぞれよりも高い温度（~90℃）で加熱処理した場合と比較して低くなった。このように高温度領域にお

いて熱安定性を示す低温菌酵素がそれよりも低い温度領域で不安定化する現象は LTI (low temperature inactivation) と呼称されるが、本実験は緩衝液の濃度や pH によって、リパーゼが LTI を示す温度が変化することを実証した。

リパーゼが乳脂肪から遊離させる脂肪酸を、乳脂肪本来の脂肪酸組成と比較すると、オイレン酸、カプリル酸、カプリン酸の割合が多かった。反応温度が低くなると、オイレン酸および風味に強く影響を与える酪酸が多く遊離される傾向が認められた。

一方、リパーゼおよび乳蛋白質に対するプロテアーゼの作用を知るためにプロテアーゼの精製を行った。すなわち、培養上澄液に塩酸を添加してカゼインを除去し、オクチルセファロース CL-4B によってリパーゼと分離した後、硫酸分画、DEAE-セファロース、ブチル-トヨパール、トヨパール HW-50S によって、回収率は約 8%、純化度は約 170 倍の精製プロテアーゼを得た。その分子量は SDS-PAGE によって約 48,000 と算出された。アミノ酸組成は、アラニン、グリシンなどの低分子量のアミノ酸含量が高く、システインは検出されなかった。

本プロテアーゼはホエー蛋白質には作用しないが、酸カゼインを基質とした場合、pH 8.0~9.8 において最大の活性を示した。精製プロテアーゼの活性は pH 9.0 において 35°C で最大となった。精製プロテアーゼは、これまで報告されている低温菌プロテアーゼと同様に、50°C の加熱で著しい LTI を示した。

精製リパーゼに精製プロテアーゼを添加して、4°C で 24 時間保持し、リパーゼ活性をプロテアーゼ無添加のそれと比較したところ、両者に差は認められなかった。一方、プロテアーゼ存在下で 3 時間保持した場合のリパーゼの熱安定性は、プロテアーゼ無添加の場合よりも低下した。この結果、プロテアーゼはリパーゼ活性には影響を与えないが、その熱安定性を低下させることを示している。ところが両酵素は、供試菌より生産された後の培養期間中、数日間にわたって共存状態にあったことから、培養液中でもプロテアーゼが上記のような作用をリパーゼに与えるのならば、精製リパーゼは既にプロテアーゼの作用を十分に受けた後に得られたものであって、改めて精製プロテアーゼを添加しても、見かけ上の活性や熱安定性の変化はもはや観察し得ないと思われる。したがって、以上の結果からプロテアーゼは本来、リパーゼの熱安定性を低下させるが、培養液(脱脂乳)成分もしくは供試菌に由来する他の成分が存在すると、その作用が感じられると考えられる。

牛乳の塩類組成を模倣した、SMUF (simulated milk ultrafiltrate) 中でのリパーゼの熱安定性と脱脂乳中でのリパーゼの熱安定性を比較すると、50°C 以下の加熱温度では、脱脂乳中のリパーゼの熱安定性が高くなるものの、60°C 以上の加熱では両者にあまり差は認められなかった。

SMUF に懸濁したカゼインミセル中でのリパーゼの熱安定性は脱脂乳中のそれよりも高かったが、ホエー蛋白質を含む SMUF 中のリパーゼは60~80℃の加熱によって完全に失活した。つまり、脱脂乳中での本リパーゼの熱安定性はカゼインによる安定化作用とホエー蛋白質による不安定化作用の総和であると考えることができる。前述のようにプロテアーゼはカゼインを分解する一方、ホエー蛋白質には作用しないことを考慮すると、牛乳中では培養時間が延長されるに従い、プロテアーゼのカゼイン分解が進行してホエー蛋白質の占める割合が高くなるため、リパーゼの熱安定性が低下すると結論される。ところで、SMUF の代わりにリン酸緩衝液を用いると、60~80℃での加熱後もリパーゼ活性は維持されることから、ホエー蛋白質によるリパーゼの熱安定性低下には SMUF 中の成分が不可欠であることを示している。さらに、ホエー蛋白質を添加したリン酸緩衝液中でのリパーゼの熱安定性は、80~90℃でのそれが50~70℃よりも高くなり、この原因はリパーゼと β -ラクトグロブリンの相互作用にあることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	齋藤善一
副査	教授	高橋興威
副査	教授	近藤敬治
副査	助教授	三河勝彦

本論文は総頁数132で、図31、表17、引用文献132を含む和文論文である。別に参考論文3篇が添えられている。

隔日集乳や長距離輸送により牛乳を冷蔵する期間が長くなる傾向にあり、そのため、しばしば低温菌の増殖が見られるようになる。低温菌が生産するリパーゼやプロテアーゼには殺菌処理によっては完全に失活しないものがあり、製品保存中の風味劣化など品質の低下を招くことがある。本研究は、牛乳から分離した低温菌 *Pseudomonas fluorescens* No.33が生産するリパーゼとプロテアーゼを分離精製し、その相互作用や耐熱性を中心とした諸性質について検討したものである。

緒論では、低温菌の定義、性質、および乳製品の保存性との関係などについて従来の研究をまとめ、特にプロテアーゼが殺菌温度よりもやや低い特定の温度領域において耐熱性が低く

なる現象についての研究を詳しく紹介し、本研究との関連性を示している。

第1章では、*P. Fluorescens* No.33を還元脱脂乳中で培養する場合の培養期間、温度、pHの変化とリパーゼ活性、プロテアーゼ活性との関係から、これらの酵素を得るためには培養温度17℃が適当であることを確認した。

第2章では、同菌を培養後、遠心分離によって得られた上澄液を粗酵素液とし、リパーゼの熱安定性を観察し、pH 7.5では、60～70℃に加熱すると、その前後の温度に加熱した場合よりも活性が低くなることを認めた。熱安定性にはpHのみならず、培養中に蓄積する代謝産物や菌体外プロテアーゼによる分解産物等の要因も関与するとしている。

第3章では、上記上澄液からのリパーゼおよびプロテアーゼの分離精製について述べている。すなわち、オクチルセファロース CL-4 Bに対する吸着性の差によってリパーゼとプロテアーゼとを分離し、前者をカラムクロマトグラフィーにより精製した。回収率約35%、純化度は約4,200倍であり、分子量52,000であった。プロテアーゼについては硫酸分画ならびにカラムクロマトグラフィーにより精製し、回収率約8%で、純化度約170倍、分子量48,000の精製標品を得た。これらの精製した酵素を用いて以後の実験を行っている。

第4章では、リパーゼの至適条件、添加物の影響など一般的性質および熱安定性を示している。最大活性は、pH 7.5～8.5に認められ、至適温度45℃であった。熱安定性は、pH 7.5およびpH 6.6の0.1M緩衝液中で、それぞれ40℃、50℃において、より高い温度（～90℃）に加熱した場合よりも低くなった。

第5章では、リパーゼの作用により乳脂肪から遊離する各脂肪酸の割合を示しているが、反応温度を低くすると酪酸およびオイレン酸が増加する傾向を認めている。

第6章では、リパーゼの活性と熱安定性におよぼす乳成分の影響を示した。 α_s -、 β -カゼインは活性と熱安定性を高めるが、一方、ホエータンパク質が活性におよぼす効果は僅かであり、牛乳の塩類を含む溶液（人工乳清）中で加熱すると熱安定性が著しく低下した。したがって、牛乳中におけるリパーゼの熱安定性は、カゼインによる安定化作用と、ホエータンパク質による不安定化作用の平衡によると説明している。

第7章では、精製したプロテアーゼの諸性質を示しており、活性はpH 9.0、35℃で最大であった。50℃、10分間の加熱により活性を失ったが、それよりも高い温度では活性が認められ、リン酸緩衝液中よりも人工乳清中で高い活性が示された。

第8章において、プロテアーゼは各カゼインを分解するが、ホエータンパク質には作用しないことを示した。

第9章では、共存するリパーゼに対するプロテアーゼの作用を示している。プロテアーゼはリパーゼ活性には影響を与えないが、その熱安定性を低下させ、特に50℃以下でその効果の大きいことを明確にした。

総合考察では、本研究で得られた結果から、牛乳の流通過程で実際にみられる条件下で起こり得るリパーゼの作用、特にタンパク質との相互作用、ならびにそれに及ぼすプロテアーゼの影響について考察している。カゼインミセルの構造、各種カゼインおよびホエータンパク質のプロテアーゼに対する感受性から、プロテアーゼによるカゼインの分解が、リパーゼの熱安定性の低下をもたらすと結論している。また、加熱処理後もリパーゼとプロテアーゼの活性が残存した場合、長期保存により、遊離した酪酸による異常風味、カゼインの分解によるゲル化、苦味の発生等が起こることを指摘した。

以上のように本論文は、長時間の冷蔵に基づく低温菌の増殖によって生成するリパーゼ、プロテアーゼの性質、とくに耐熱性についての研究成果を示し、いくつかの新知見を提出した。学問的にも、また実際の面からも示唆に富むものである。

よって審査員一同は、最終試験の結果とあわせて、本論文の提出者 玖村朗人は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。