

チーズスターターかび *Penicillium candidum* の硝酸還元酵素

有賀 秀子

家畜生産科学科酪農化学研究室

1. 目 的

カマンベールチーズの製造過程において、*Penicillium candidum* が硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素を産生することは既に報告した。癌原性を有する N-ニトロソ化合物の前駆物質である亜硝酸塩の生成および還元に関与する硝酸還元酵素の *P. candidum* による産生に関しての他からの報告は見られない。そこで本研究では、チーズ製造の過程で見られた硝酸還元酵素の活性の発現の機構を明らかにしていく仕事の基礎研究として、この酵素の諸性質を知ることが目的として実施した。この研究は、食品衛生的見地から価値あるもので、将来、食品中硝酸塩、亜硝酸塩の生成還元を酵素的に調整することを目的としたものである。

2. 方 法

(1) *P. candidum* からの硝酸還元酵素の抽出と精製

菌体は、CHR-HANSEN 社のチーズ用 *P. candidum* の凍結乾燥粉末を用い、これから純粋分離培養して得た菌体を用いた。保存培地はツアベック麦芽保存培地を用い、ツアベック液体培地で 25°C 24 時間 2 回前培養したのち、同培地を用いジャーファーメンターにより 25°C で通気培養し、酵素抽出用菌体を得た。

培養液と分離した菌体は 2mM のメルカプトエタノールと 0.5mM のエチレンジアミンテトラ酸二ナトリウム (Na_2EDTA) を含む pH7.2 の 20mM リン酸緩衝液で洗浄したあと水分を除去し、液体窒素で凍結して使用時まで保存した。

凍結菌体は粗く破壊したあと等量の酸化アルミナとともに摩砕し、2mM メルカプトエタノール、0.5mM Na_2EDTA 、10% グリセリンと 10mg/l のフッ化フェニルメチルスルフォニルを含む pH7.2 の 20mM リン酸緩衝液 (A 緩衝液) を少量加えてさらに摩砕したのち同緩衝液に 10% 濃度 (湿菌重量) に懸濁した。この懸濁液を 9KHz、200W、30 分間の条件で超音波処理した。

超音波処理液を 0°C、15,000xg、30 分間遠心分離してその上澄液を粗酵素液として得た。

蛋白質の分画は、硫酸アンモニウムの 60% 飽和、低温で 30 分間攪拌の条件による塩析により行った。蛋白画分は pH7.2 の A 緩衝液に懸濁し、低温下で同緩衝液に一夜透析した。透析後の塩析画分は pH7.5 の A 緩衝液で平衡化した DEAE—セルロース (DE-32, whatman) カラム (27×1.7 cm) により精製した。溶出は pH7.2 の A 緩衝液で 0~1.5M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配により行った。

蛋白画分について硝酸還元酵素活性と蛋白質濃度を測定した。硝酸還元酵素活性は、反応液として 10^{-2}M 硝酸カリウム、 $7.5 \times 10^{-4}\text{M}$ 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 5×10^{-4}

MNa₂EDTA, 5×10⁻⁶M フラビンアデニンジヌクレオチドを含む pH7.2 の 20mM リン酸緩衝液を用い, 25°C, 30 分間反応後の還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの減少量により活性を求めた。蛋白質は Bio-Rad 社の Coomassie Brilliant Blue G-250 試薬を用いる色素結合法により測定した。至適 pH は pH3.0 から 9.0 の範囲で求めた。イオン交換の再クロマトグラフィー画分につきポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動により精製度を調べた。

(2) カマンベールチーズ中の硝酸塩, 亜硝酸塩量と硝酸還元酵素活性の測定

カマンベールチーズは原料乳 100kg に硝酸カリウム 20g を加え, ハンセン社の乳酸菌スターター (Normal-01) と同社の *P. candidum* 粉末から純粋分離した菌体をかびスターターとして用い, 常法に基づき製造した。熟成 0, 4, 8, 11 日目に試料を採取し試験に供した。

硝酸塩, 亜硝酸塩量はスルファニルアミドの塩酸溶液と 1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩の水溶液を用いたジアゾカップリング法により測定した。硝酸還元酵素活性は前述の方法に基づき測定した。

3. 結果と考察

(1) *Penicillium candidum* からの硝酸還元酵素の分離と精製

ジャーファーメンターによる菌体培養の結果, 菌体収量は培養 16 時間から 40 時間まではほとんど変りなく, 培養物 11 中の菌体収量は約 10g であった。

培養時間と硝酸還元酵素活性および蛋白質回収量との関係を見ると, 硝酸還元酵素回収量は培養

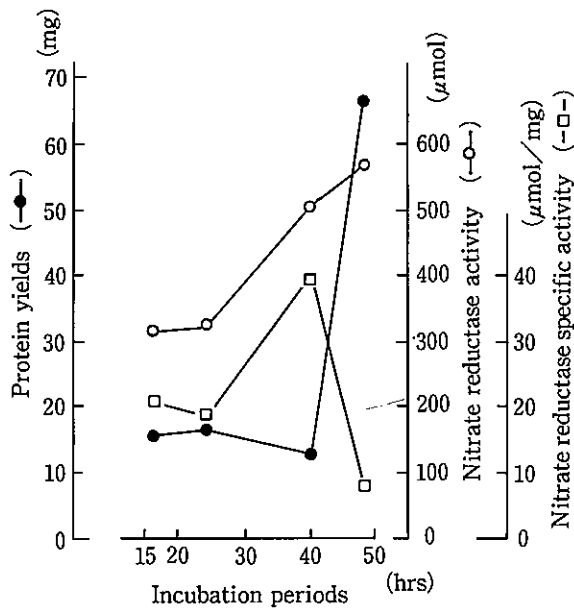


Fig. 1 Effects of incubation periods on protein and nitrate reductase activity yields

時間が経過するにつれて増加し, 24 時間以降 48 時間まではほぼ直線的に増加した。蛋白質回収量は 40 時間まではあまり変化なかったが, それ以降 48 時間にかけて急激に増加した。これら蛋白質収量と硝酸還元酵素収量の関係から, 硝酸還元酵素の比活性は 40 時間培養の菌体で最大となり, 約 40μmol/mg protein となった。これらの結果から本試験における菌体の培養時間を 40 時間に設定した (Fig. 1)。

40 時間培養菌体から得られた塩析後の蛋白質画分を DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーにかけ, 硝酸還元酵素を精製した。

塩析画分 21ml (蛋白質量約 52mg) を用いて得られたクロマトグラムは Fig. 2 に示した。塩化ナトリウム濃度 0.1~0.6M の範囲に蛋白質画分が得られ, クロマトグラムから 7 画分に区分できた。

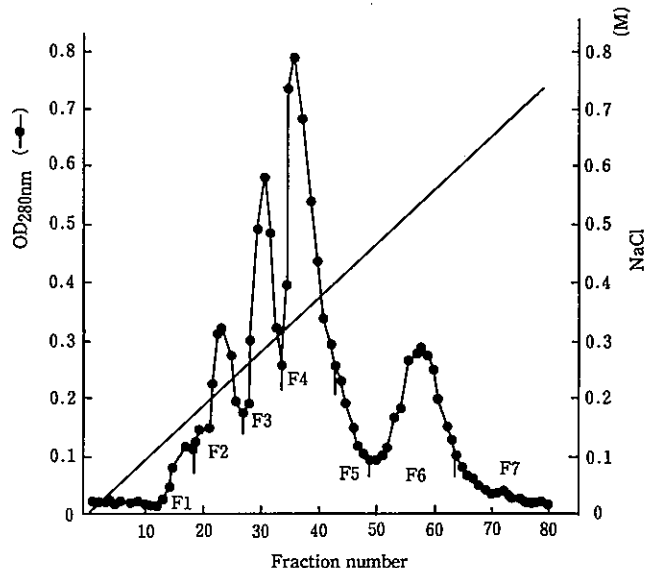


Fig.2 DEAE-cellulose ion exchange chromatogram of nitrate reductase from *P. candidum*

この中で最も硝酸還元酵素活性の高かった画分はF3の画分であった。そこでさらに精製度を高めるためにこの画分について再クロマトグラフィーにより精製を進めた。

その結果, Fig.3に見られるようにF4の画分が最も活性の高い画分として得られた。ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動により画分の単一性を観察した。Fig.4にみられるように、一度目のクロマトグラフィーにより得られた画分Iを再クロマトグラフィーにより精製を進めると、II~Vの画分に見られるように8個のバンド(I)が1~3個のバンド(II~V)にまで分離できた。

次に硝酸還元酵素の至適pHを再クロマト画分を用いて求めた。

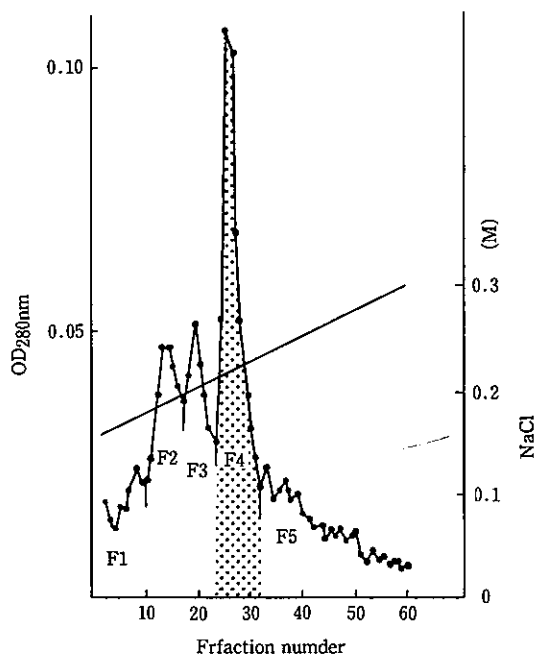


Fig.3 DEAE-cellulose ion exchange rechromatogram of nitrate reductase for NaCl 0.21-0.3M fraction from *P. candidum*

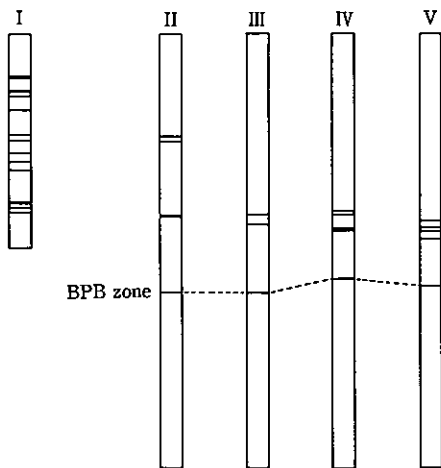


Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of nitrate reductase of rechromatography fraction from *P. candidum*

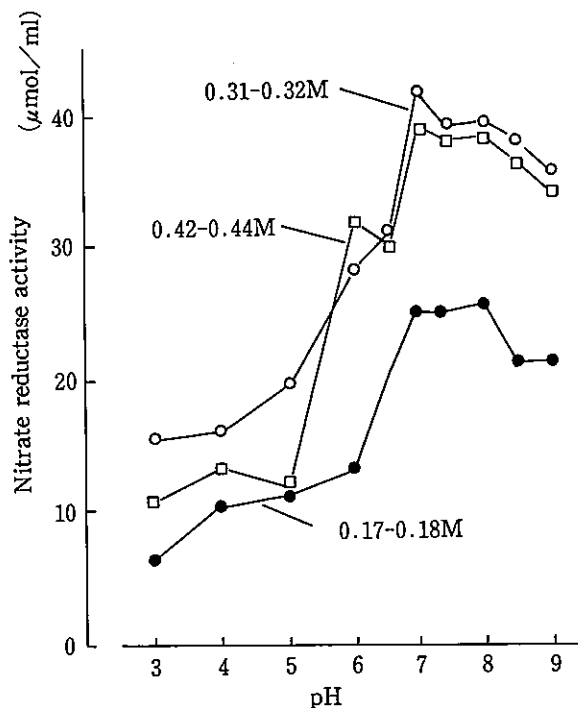


Fig. 5 Effects of pH on intracellular nitrate reductase activity of re-chromatography fraction from *P. candidum*

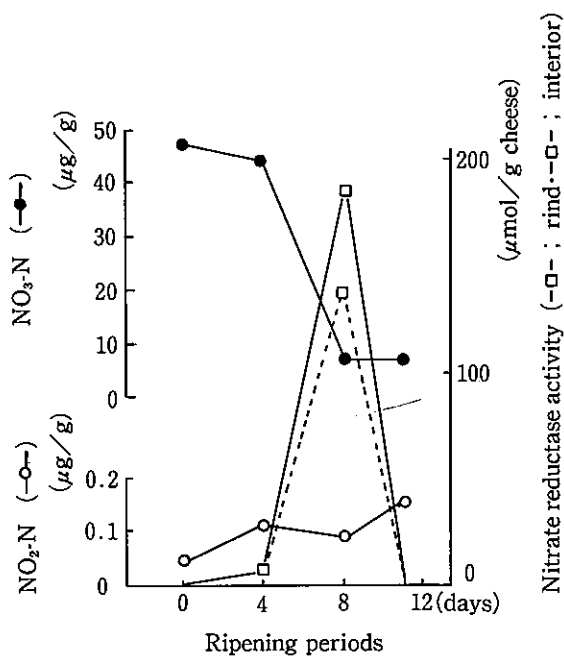


Fig. 6 Changes of nitrate contents, nitrite contents and nitrate reductase activity in Camembert cheese during ripening process

3画分について調べた結果若干の相違はあったが、pH6.5~8の間で高い活性が認められた (Fig. 5)。

以上の結果を Renosto らの *P. chrysogenum* からの硝酸還元酵素についての報告と比較検討してみると、ほぼ一致し、さらに至適 pH の点では Nicholas ら, Silver, Nason らの *Escherichia*, *Hansenula*, *Neurospora* などからの硝酸還元酵素についての報告とほぼ近似した範囲にあることから、これら報告されている酵素とほぼ類似した性質を有する酵素であると考えられる。

(2) カマンベールチーズ熟成過程における硝酸塩の消長と硝酸還元酵素活性との関連性について

熟成過程におけるチーズ中の硝酸塩量は、熟成8日目著しく低下し、亜硝酸塩は増加傾向にあった。硝酸還元酵素活性は、8日目にリンド、内部ともに最大となった (Fig. 6)。このように、硝酸塩の消長と硝酸還元酵素活性との間には密接な関連がみられた。また熟成8日目では、チーズ表面のかびの着生が著しく、製造上では包装の時期に相当する。かびの増殖が肉眼でも明らかに確認できることから、この時期が硝酸還元酵素の産生およびチーズ中への分泌が著しいことは当然考えられ、本試験においてこのことが確認された。

4. 要 約

1. ジャーファーメンターの通気培養 40 時間菌体から菌体内硝酸還元酵素を得たところ、48 時間培養までの菌体の中で最も活性の高い酵素が回収された。

2. 粗酵素液から硫酸 60% 飽和条件で塩析画分を回収し、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。塩化ナトリウム濃度 0.1~0.6M に蛋白質画分が溶出し、硝酸還元酵素の活性の高い画分は 0.2M 前後に得られた。

3. この画分を再クロマトグラフィーすることにより、さらに精製度が高まった。

4. 硝酸還元酵素の至適 pH は 6.5~8 の間と思われる。

5. カマンベールチーズ熟成過程において硝酸還元酵素の活性は、かび増殖の著しい 8 日目に最大となり、硝酸塩量は急激に減少した。