

# *Aspergillus oryzae* が産生する ホエイタンパク質分解性プロテアーゼの解析

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野  
石堂拓也

(背景) チーズ製造時に排出されるホエイ中のタンパク質はアミノ酸バランスが良好で、膜技術やイオン交換樹脂を利用してホエイタンパク質濃縮物(WPC)やホエイタンパク質単離物(WPI)として回収されている。ホエイを加熱するとタンパク質が沈殿するためその回収は容易であるが、この場合、食感の改善が必要である。本研究ではコウジカビ由来のプロテアーゼを用い、加熱によって回収したホエイタンパク質の風味・食感を向上させ、新たな食品素材として提案するための基礎的知見を得ることを目的とした。(方法)ホエイタンパク質分解性プロテアーゼを誘導するために WPI を窒素源とする CZAPEK-DOX 培地で *Aspergillus oryzae*(味噌由来)を 25°C で 2 週間培養した。ここから粗酵素液を抽出し、液体クロマトグラフィーによって 3 つのプロテアーゼ活性画分(画分1、画分2、画分3)を得た。これらについて反応温度が活性に与える影響を調べたところ、画分1と3は 50°C で、画分2は 40°C で活性が最大となった。pH が活性に与える影響を、pH 5.5 から 10 の範囲で調べたところ、画分1と3は酸性側で活性が最大となり、pH 10 では殆ど活性を示さなかった。画分2は中性付近で活性が最大となり、最も活性が低かった pH 5.5 においても最大の約 30%の活性を保持していた。これらの活性画分および粗酵素についてカゼインを基質としたザイモグラフィーによる分析を行ったところ、易動度の異なる3つのバンドが認められた(図上)。粗酵素ではAのバンドが非常に明瞭に認められた。画分1ではCのバンドが、画分2ではBのバンドがそれぞれ明瞭に認められ、画分3では3つのバンドとも同じ程度の明るさであった。WPIを基質としたザイモグラフィー(図下)ではAのバンドは認められなかったが、画分2のBのバンドは明瞭であった。粗酵素液および活性画分を用いてホエイタンパク質を分解したものを HPLC で分析し、ペプチドと思われるピークを回収して、N 末端アミノ酸配列の分析を行った。 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン( $\beta$ -LG)、グリコマクロペプチドのアミノ酸配列と比較したところ、粗酵素、画分1、画分3は特に $\beta$ -LGに対する切断部位が多いことがわかった。

(考察) WPI を窒素源とする培地で *A. oryzae* を培養することで複数のプロテアーゼが誘導された。液体クロマトグラフィーで分離して得られた3つのプロテアーゼ活性画分は、いずれもホエイタンパク質に対して活性を示すことが示された。画分1と画分3は反応温度および pH による活性曲線が類似していることがわかった。また、主要なホエイタンパク質である $\beta$ -LGによく作用することから、ホエイタンパク質の利用においてこれらのプロテアーゼの応用が期待される。

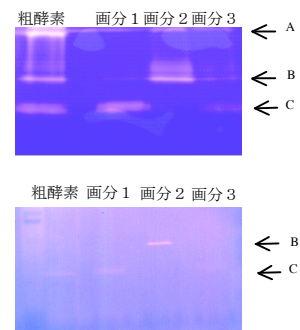


図 ザイモグラム