

## 細菌プロテイナーゼによる魚肉アクトミオシンの分解と凝固について\*

日 高 富 男

### On the Proteolysis and Coagulation of Actomyosin Fraction of Fish Muscle by Action of Bacterial Proteinase

Tomio HIDAHA

#### Abstract

The author studied on the enzymic action of alkaline proteinase produced by *Bacillus subtilis* upon proteins of fish muscle. The results are as follows.

1) As to the enzymatic proteolysis of fish meat by the bacterial proteinase, actomyosin fraction was hydrolyzed more readily than water extract fraction of fish muscle.

The products formed by action of the bacterial proteinase upon actomyosin were mainly various polypeptides, but small amounts of amino acids were also formed.

2) It was found that actomyosin was at one time hydrolyzed and coagulated by action of the bacterial proteinase. The optimum pH of the proteolytic activity lay at 9.2, and its optimum temperature was 60°C. The most powerful coagulation was shown at pH 8.0 and 40°C.

3) The actomyosin coagulated by action of the bacterial proteinase was changed into an insoluble form in neutral salts solution, and was hard to be hydrolyzed in contrast to raw actomyosin.

4) From these results, it was considered that the bacterial proteinase have effect on post-mortem hydrolysis and denaturation of fish meat.

一般に動物生体といえども、その体表ないし外境と直通する各器官には多数の細菌が常在しており、特に魚体にあつてはその環境上細菌の附着が多く<sup>1)</sup>、そのうえ漁獲後における細菌汚染の機会も多い。よつてそれらの細菌が魚類の死後容易に筋肉内に侵入して肉質変化に關与することは必然的結果であり、この点魚肉は獸肉に比して腐敗の進行速度が速いとされる所以の一つである。したがつて魚肉の場合死後かなり早い時期から細菌の作用によるタンパク質の変質を考えねばならない。

従来、魚肉変質過程における細菌の作用については、腐敗生産物ともいふべき細菌による分解産物の研究が多いが、肉質の変敗初期、筋肉タンパク質のごとき生タンパクに対する細菌体ないし細菌酵素の作用についての詳細な研究は多くを知らない<sup>2),3)</sup>。

本報においては魚体に接触の機会多い細菌のうちタンパク分解力の強い菌を選び、魚肉生タンパクに対する作用を検討したところ、供試細菌酵素は魚肉生タンパクにも作用してこれを分解するが、魚肉構成タンパク質の各区分はそれぞれ異なる分解度を示した。しかも魚肉アクトミオシンでは分解すると同時に凝固析出する現象を伴うことが知られたのでこの知見を報告する。

\* 本報告の一部は昭和34年4月、水産学会年会において発表した。

## 実験方法

### 酵素作用測定法

1. 基質の調製 通常、プロティナーゼ活性度測定のための基質として用いられるカゼイン (0.6%), 尿素変性ヘモグロビン (0.6%), ゼラチン (6.0%) は常法<sup>4)</sup>に従って調製した。

生タンパク基質としての魚肉アクトミオシンはマサバ、マアジまたはコイ等の新鮮肉を冷却細切し、あらかじめ冷した Weber-Edsall 液 5 倍量で冷所時々攪拌しながら 24 時間抽出した後 (この抽出液が後述の W-E 液抽出液)、常法<sup>5)</sup>に従って精製し、所定タンパク質濃度に調整して実験に供した。このアクトミオシン液は 0~5°C に保存し、調製後 2~3 日以内のものを使用した。

その他、生タンパク基質として生魚肉、魚肉ストローマをも用いたが、基質に用いたタンパク質のうち難溶性のものはこれに可溶性プロティナーゼを作用させる場合、酵素と基質との接触面が問題であり、再現性および比較の点で困難がある。本実験ではそのような場合、基質タンパクをホモゲナイザー等の力をかり、可及的分散状態にし、かつ所定タンパク質濃度に稀釈して用いた。

### 2. タンパク分解度の測定法

i. 反応 タンパク質濃度、pH を調整した基質溶液 5ml (または基質液 2.5ml + 緩衝液 2.5ml) に酵素液 1ml を加え、30°C で所定時間反応後、除タンパク試薬 (0.44M 三塩化酢酸液: 反応液に所定通り加うれば終濃度 0.2M となる) 5ml を加え反応を中止する。

ii. 測定 反応中止後 30°C 水槽中に約 30 分間放置し、沈澱の生成を完結させ、次いで遠沈し上清と沈澱とに分別する。上清液 0.5ml について銅フォーリン法<sup>6)</sup> (チロジン相当量 mg%), 上清液 5.0ml をとりフォルモール滴定法<sup>7)</sup> (アミノ酸態窒素 mg%), 上清液 0.5ml をとりニンヒドリン呈色法<sup>8)</sup> (ロイシン相当量 mg%) 等により上清液 0.2M 三塩化酢酸可溶性物中の各該当物質を定量し、その濃度から対照値を差引いた値で分解作用の活性度を表示した。

### 3. タンパク凝固度の測定法

i. 反応 さきに分解度を測定した反応混液の 2 倍の規模で反応させた。

ii. 測定 所定時間反応後恒温槽よりとり出し、

a) 反応液 5ml を沈澱管にとる。

b) 反応液残部を 3000 rpm, 5 分間遠沈して、その上液 5ml を沈澱管にとる。

a), b) 同時に除タンパク試薬 (0.4M 三塩化酢酸液) 5ml を添加し反応を停止する。反応停止後 30°C 水槽中に約 30 分間放置し、沈澱生成を完結させてから遠沈し、上清液は傾斜し去る。沈澱は数回洗浄後 0.1N NaOH で 5ml に溶かしビューレット呈色法<sup>9)</sup>でタンパク態窒素量 mg% を定量した。今 a), b) の測定値をそれぞれ a, b, 及びその対照実験値を a' b' とすれば、反応中のタンパク凝固量は次のごとく算出した。

$$a' - a = A \text{ (タンパク分解量)}$$

$$b' - b = B \text{ (タンパク分解量 + タンパク凝固量)}$$

$$B - A = \text{タンパク凝固量}$$

本報でタンパク凝固とは反応中に凝集して 3000 rpm, 5 分間の遠沈で沈降する状態になったものを指すことになる。

4. ゼラチン粘度降下度の測定法 6%ゼラチン液 10ml に酵素液 2ml を加え、40°C で所定時間反応後、100°C で10分間加熱して反応を停止する。この反応液 10ml をオストワールド粘度計 (No. 2) にとり、40°C 恒温水槽中で相対粘度 ( $\eta/\eta_0$ ) を測定した。

以上の各種活性度測定法の対照試験は、酵素液をあらかじめ100°C に10分間加熱して活性を止めたものを用いて各測定法を実施し、その測定値を対照値とした。

## 実験結果

### 1. 供試菌の性状

本実験に供した細菌は、海水、魚体、魚鱗から分離した 100 余株の菌からゼラチン液化性菌のみを選択し、更に実験目的に応じこれらよりゼラチン粘度降下作用、カゼイン分解作用の強い数株を選んだ。該当する菌はほとんど中温好気性芽胞菌であり、その粗酵素液のカゼインに対する分解作用から、中性ないし塩基性プロティナーゼ活性の強い菌であった。そのうちの代表菌 1 株について今後の実験を行ったが、この菌株の菌学的性質の概要は Table 1 のごとくであって、Bergey<sup>10)</sup> の分類に従えば *Bacillus subtilis* に類縁する一変株と認められた。

Table 1. Physiological and morphological characteristics of the tested organism.

Vegetative cells : Rods, 0.8 to 1.0 by 2.0 to 3.5 microns, with poorly rounded ends. Usually single sometimes in pair. Actively motile with peritrichous flagella. Stain uniformly. Gram-variable. On glucose agar, rods are usually larger.

Spores : 0.7 to 0.9 by 1.2 to 1.8 microns, ellipsoidal, thin-walled, central to para-central. Many formed in 48 hours at 32°C.

Sporangia : Ellipsoidal, not distinctly swollen, frequently show bipolar staining.

Gelatin stab : Liquefaction crateriform to stratiform.

Gelatin agar streak plate : Wide zone of hydrolysis.

Agar colonies : Irregular, spreading, rough, opaque, dull, off-white to creamy white.

Agar slants : Growth abundant, spreading, rough, wrinkled, opaque, dull, butyricus to brittle, cream-colored to light brown.

Glucose agar slants : Growth usually more abundant than on agar, yellowish brown.

Soybean agar slants : Growth usually more abundant than on agar,

Broth : Clear with heavy, wrinkled pellicle.

NaCl broth : Poorly growth in 7 per cent NaCl.

Milk : Peptonized.

Potato : Growth heavy, wrinkled to coarsely folded, spreading. Offwhite, yellow or brown.

Indole usually not produced.

Slight acid but no gas (with peptone as source of nitrogen) from glucose, xylose.

Starch is hydrolyzed.

Acetylmethylcarbinol not produced.

Nitrites produced from nitrates. No gas produced from nitrate broth under anaerobic conditions.

Catalase produced.

Urease not produced.

Aerobic. Growth scant, if any, in glucose broth under anaerobic conditions. pH of 7-days cultures is 7.5 to 8.5.

Temperature relations : Optimum growth temperatures lie between 28° and 40°C. The maximum temperature for growth is usually 50°C.

Source : Isolated from fish.

## 2. 細菌酵素液のタンパク分解作用

供試菌を肉汁培地またはペプトン・デキストリン培地 (0.5% ペプトン液にデキストリン 3.5%,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  1.0%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及び  $\text{KCl}$  各々 0.02%) —— 両者の間で酵素生成能に大差はなかった —— に 5~7 日間静置培養した培養液を遠心分離, または濾過助剤としてセライトを用いて濾過し, それらの上澄液あるいは濾液を供試粗酵素液とした。

まず粗酵素液をカゼイン, ヘモグロビン, 牛乳, 生魚肉, 魚肉アクトミオシン (それぞれのタンパク態窒素濃度 100~110 mg%) に pH 8.0, 30°C で作用させ, その分解度合を経時的に銅フォーリン法で測定し分解度を比較した。ゼラチンについては粘度降下度を測定した。それらの結果は Fig. 1 のごとくであった。

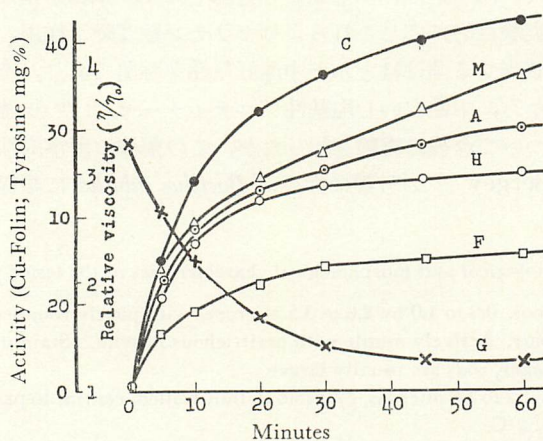


Fig. 1. Proteolytic activity of the crude enzyme solution upon several proteins.

Proteins used as substrate (Protein-N 100~110 mg%): C; casein, M; milk, H; hemoglobin, G; gelatin F; fish meat, A; actomyosin of mackerel muscle

The activity measured at pH 8.0 and 30°C.

すなわち生魚肉<ヘモグロビン<魚肉アクトミオシン<牛乳<カゼインの順で分解度は高い。牛乳はカゼインと同じ程度に分解され, アクトミオシンは通常タンパク分解の基質として用いられるヘモグロビンよりも容易に分解された。生魚肉そのままは同じ魚肉から抽出したアクトミオシンよりも分解度は低い。またゼラチンの粘度降下も著しいなどの結果であった。いずれも反応初期15分位までに急速に分解され, その後は徐々に反応が進み, この条件で60分以後はほとんどが停着状態になった。この際, 生タンパク基質である生魚肉, アクトミオシンがこの種 proteolytic action によって予想以上に分解され易い事が知られた。

このほか, アクトミオシンと牛乳を基質とした場合に, 反応進行中基質タンパクが凝固析出する現象が肉眼的に観察された。

次に粗酵素液をサバ肉アクトミオシン液 (タンパク態窒素濃度 100 mg%) に所定条件で 5, 10, 15, 30, 45, 60分間反応させ, 反応後生じた0.2M三塩化酢酸可溶性物質を銅フォーリン法, フォルモール法, ニンヒドリン呈色法でそれぞれ測定し, また三塩化酢酸沈澱物については未分解タンパク量をビューレット法で定量し, 分解タンパク量を算出, 更にアクトミオシンの粘度変化は所定反応後の反応液10ml をオストワルド粘度計 (No. 2) にとり,

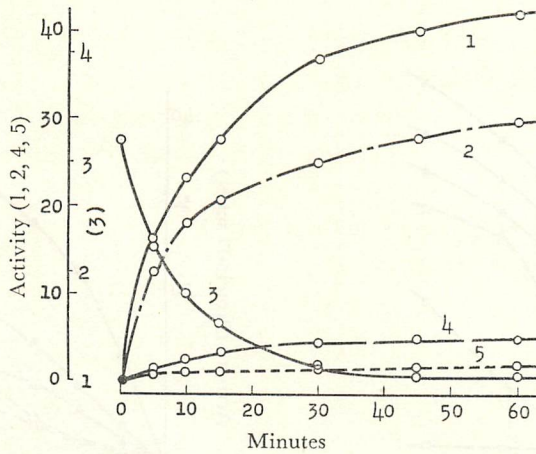


Fig. 2. Proteolytic activities of the crude enzyme solution upon actomyosin

Actomyosin isolated from mackerel muscle (Protein-N 100mg%).

The activity measured at pH 8.0 and 30°C.

1: Biuret colorimetry (Protein-N mg%)

2: Cu-Folin colorimetry (Tyrosine mg%)

3: Relative viscosity ( $\eta/\eta_0$ )

4: Formol titration (Amino acid-N mg%)

5: Ninhydrin colorimetry (Leucine mg%)

30°Cで測定した。それらの結果を Fig. 2 に示した。この結果分解タンパク量(1)は作用時間15分位までに急増し、その以後は緩慢な増加をたどって60分後には基質タンパクの40%位が分解されることが知られた。銅フォーリン呈色物質(2)もこれに似た傾向で増加した。これに対しフォルモール法(4)、ニンヒドリン呈色法(5)で測定される遊離アミノ酸の増加は少く、供試酵素液はタンパク質を0.2M 三塩化酢酸可溶性にする程度の分解であって、それ以上低分子までには分解されない。すなわち非タンパク性物質の生成量は大きい、ペプチッド結合の開裂は少いことが明らかである。次にアクトミオシン液は高い粘度をもち、このような溶液中のタンパク質粒子の分散状態に変化が起ると当然液の内部摩擦にも影響し粘度変化を伴うので、粘度変化はアクトミオシンの性状変化を知る一つの観点とされているので、本実験においても反応液の粘度を測定した結果(3)、反応の進行に伴い著しい粘度低下がみられた。

### 3. 細菌酵素液によるタンパク質の分解と凝固

さきの実験で供試酵素液によりアクトミオシン、牛乳がかなり高い分解度を示し、同時に基質タンパクが凝固析出する現象がみられたので、アクトミオシン、カゼイン、牛乳に対する分解と凝固の反応経時の変化を定量的に測定した結果を Fig. 3 に示した。またサバ肉構成タンパクを水抽出区分、Weber-Edsall 液抽出区分、アクトミオシンの3区分に分け、それぞれのタンパク態窒素濃度 115mg%, KCl 濃度 0.6M に調整して各区分の供試酵素液による分解量と凝固量を測定した結果は Fig. 4 に示すごとくであった。

Fig. 3 の結果ではアクトミオシン、牛乳、カゼインの順に分解度が大きく、30分間の作用でそれぞれ基質タンパク量の37%、42%、50%が分解されたが、凝固度は牛乳では基質タンパク量の32%、アクトミオシンでは20%で、カゼインはほとんど凝固しなかった。そしてこ

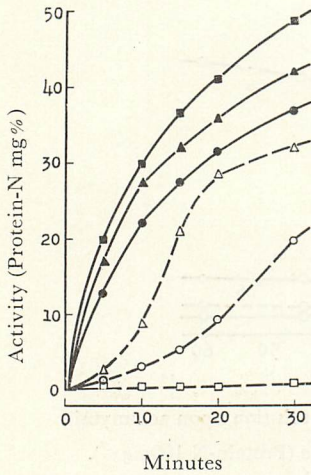


Fig. 3. Proteolytic activity and coagulating power of the crude enzyme solution upon casein, milk and actomyosin.

Concentration of each proteins as substrate was 100 mg% Protein-N.

The activity measured at pH 8.0 and 30°C.

—: Proteolytic activity

---: Coagulating power

●○: Actomyosin of mackerel muscle

▲△: Milk

■□: Casein

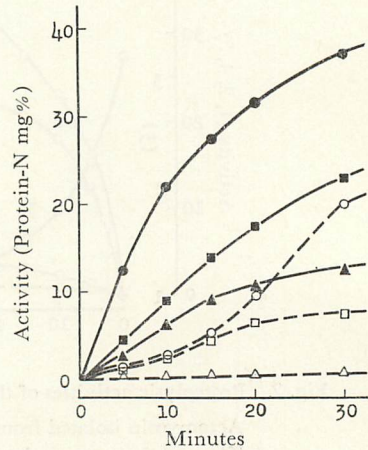


Fig. 4. Proteolytic activity and coagulating power of the crude enzyme solution upon several protein fractions isolated from mackerel muscle.

(Protein-N 115mg%, pH 8.0, 30°C.)

—: Proteolytic activity

---: Coagulating power

●○: Actomyosin

■□: WEBER-EDSALL soln. ext. fraction

▲△: Water ext. fraction

れら曲線によれば、アクトミオシンの分解量と凝固量との経時的变化曲線に多少の時間的づれが認められ、つまり供試酵素液のタンパク分解作用がタンパク凝固現象に先立ち、凝固現象は分解作用に遅れて進められる傾向がみられた。アクトミオシンの分解、凝固度については既述のごとくであるので、Fig. 4 では水抽出区分、W-E 液抽出区分のそれらをアクトミオシンと比較すれば、W-E 液抽出区分の分解度および凝固度はアクトミオシンの $\frac{3}{5}$ 及び $\frac{2}{5}$ 程度である。水抽出区分はアクトミオシンの $\frac{1}{3}$ 程度の分解度を表わしたが、供試酵素作用による凝固現象はほとんどなかった。しかし水抽出区分の場合、酵素反応条件である 30°C, pH 8.0, 30分間で基質タンパク量のおおよそ 10~15% 位が自然凝固して析出することが酵素反応の対照試験において観察された。

ところでアクトミオシンに対する分解と凝固現象とが併行することが該菌酵素液の特異性であるかどうかを知るため、さきの 100 余株の菌のうちタンパク分解力が顕著であった数株の粗酵素液とトリプシンについてこのことを検討した結果、Fig. 5 のようにこれらの作用は供試菌酵素液に特異的でなく、他の細菌酵素液およびトリプシンにも、その量的には差があるが、アクトミオシン分解、凝固が併行してみられた。

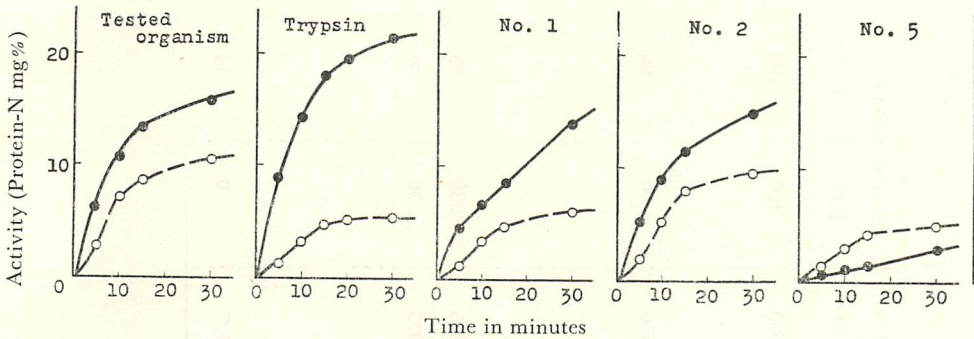


Fig. 5. Proteolytic activity and coagulating power of trypsin and several bacterial enzymes.  
(Protein-N 50mg%, pH 8.0, 30°C.)

—●— : Proteolytic activity } (to apply from Fig. 5 to Fig. 9)  
- - -○- - : Coagulating power }

4. 分解, 凝固両作用の二, 三の性質 分解と凝固の両作用が如何なる関係をもつかを知る一助として両者の二, 三の性質を比較検討した。

1) 培養日数と作用度 ペプトン-デキストリン培地を直径 18mm の供試管に 10ml 宛分注, 滅菌, 供試菌を接種して 32~33°C で静置培養し, 細菌の育成に伴う分解力と凝固力との産生関係を知るため各所定培養日数ごとにそれらの活性度を測定した。その結果は Fig. 6 のごとくであって, 両活性度も培養 2~3 日で急激に増し, 3~6 日まで漸次増大していくが 7 日以後は却って活性度が低下する傾向であった。この傾向は両作用について大差はなかった。

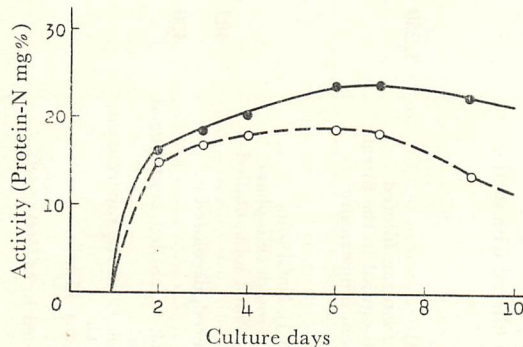


Fig. 6. Effect of cultivation period on the enzyme production.

The activity measured at pH 8.0 and 30°C, for 30 minutes.  
Substrate : actomyosin of mackerel muscle, Protein-N 60 mg%.

2) 精製による活性度変化 ペプトン-デキストリン培地に 6 日間静置培養した培養液を精製に供した。予備実験において培養液はこれに  $\text{CaCl}_2$  0.1M を加え (pH 7.4), 更に滷過助剤としてセライトを加えて振盪後滷過して清澄化しても, また水に対してセロファンで透析しても活性度に損失のないことを確かめ, 次いで硫酸塩析により両作用ともに 20~60% 硫酸飽和度で塩析され, アルコールによっては 20~70% 濃度範囲で両作用活性物が沈澱する

Table 2. Purification process of the bacterial proteinase.

	Total volume (ml.)	Activity* (U./ml.)		Total activity (U.)		Enzyme yield (%)	
		P.**	C.***	P.**	C.***	P.**	C.***
Culture solutions .....	3,600	1	1	3,600	3,600	100	100
↓ CaCl <sub>2</sub> added to 0.1M (pH 7.4) ↓ Celite added to 0.5% and filtered with suction ↓ filter ↓ Residue							
Filtrate (Crude enzyme solution) .....	3,250	1	1	3,250	3,250	90	90
↓ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> added to 0.2 saturat, filtered (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> added to 0.6 saturat in the filtrate, during one day at room temperature ↓ Filtered							
Salting out matter ↓ Dissolved in M/500 CaCl <sub>2</sub> , NaCl soln. ↓ Dialyzed for two days through cellophane against M/500 CaCl <sub>2</sub> , NaCl soln., chilled ↓ Dialyzed solution .....	482	2.7	2.5	1,301	1,205	36	33
↓ Norit added to 1%, filtered, decolor ↓ Decolor solution .....	430	2	2.5	1,075	1,075	30	30
↓ Et (OH) added to 20 vol. %, chilled, centrifuged (3500r. p. m.), 10 min. ↓ Et (OH) added to 70 vol. % in the supernatant, during one day at 0°C. ↓ Centrifuged (3500r. p. m.), 15 min. ↓ Precipitate							
↓ Dried in vacuum, dissolved in M/500 CaCl <sub>2</sub> , NaCl soln. ↓ Purified enzyme solution .....	30	10.8	17.5	324	528	9	14

\* Activity of culture solution is arbitrarily taken as one unit.

\*\* P : Protocolytic activity

\*\*\* C : Coagulating power



ことを観察した。そこで供試粗酵素液を塩析，脱色，アルコール沈澱の順で精製し，かなり強化された精製酵素液を調製した。その精製操作及びそれに伴う活性度の変動は Table 2 のごとくである。

この精製操作の最終段階において，分解度は粗酵素液の10.8倍に，凝固度は17.5倍に濃縮された。そして分解度と凝固度の濃縮割合の変化は塩析，脱色液までほとんど同じ割合であったが，アルコール沈澱操作によっては凝固力の精製度の方が高い。しかしこの程度の精製液においても分解と凝固現象は併行していた。

3) 作用 pH 精製酵素液を用いて分解，凝固両作用の各種 pH における活性度を測定した結果は Fig. 7 に示す如くである。

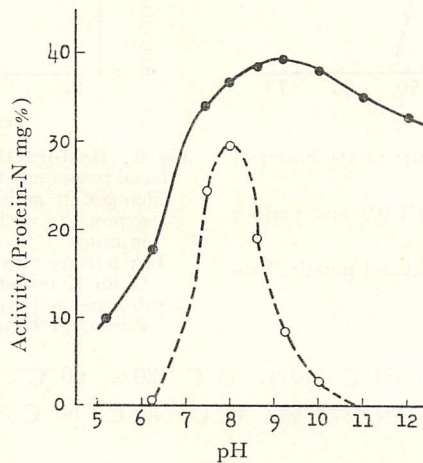


Fig. 7. Influences of pH on the bacterial proteinase activity.  
The activity measured at various pH and 30°C, for 30 minutes.  
Substrate : Actomyosin of mackerel muscle, Protein-N 105mg%.

この際，各 pH の緩衝液は pH 5～8 では磷酸緩衝液，pH 7～11では硼酸-炭酸ソーダ緩衝液，pH 12は硼酸-苛性ソーダ緩衝液を使用した。この結果，分解作用と凝固現象とは明らかに異なる pH 活性度曲線を描いた。分解作用では至適 pH 9.2 にあり，それより酸性側に移るにつれて活性度の低下が大きく，pH 5.0 で過半の活性度を失う。アルカリ側への移動では活性度の減少は少く，pH 12においても最大活性度の時の 15% 位の低下に止まった。一方凝固度にあつては pH 8.0 をピークとする曲線を描き，pH 8.0 より若干の移動でもその活性度の低下は顕著で，pH 6.0 以下，pH 11 以上では失活した。

4) 作用温度 精製酵素液の分解，凝固両作用に対する作用温度の影響は Fig. 8 のごとくであった。

pH 8.0，作用時間15分の反応条件で分解作用の至適温度はかなり高く60°Cであったが，凝固現象では作用温度が45°C以上では基質アクトミオシンの熱凝固が現われ，凝固度測定はできなくなる。ゆゑにこの凝固度の温度曲線は見掛上のものであつて，40°C にピークがあつた。

5) 耐熱性 精製酵素液を所定温度で15分間加熱処理し，その残有活性度を測定し，加熱に対する安定性を検討した。その結果は Fig. 9 のごとくであつて，酵素液を 15分間加熱

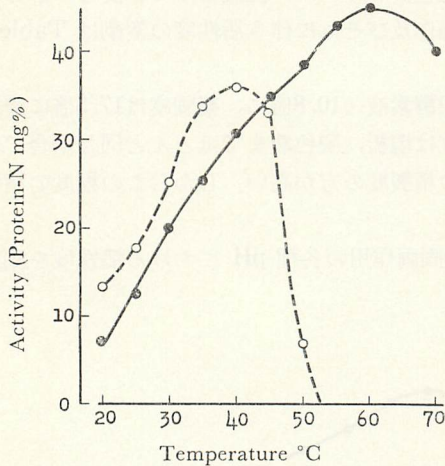


Fig. 8. Influences of temperature on the bacterial proteinase activity.

The activity measured at pH 8.0 and various temperature, for 15 minutes.

Substrate: actomyosin of mackerel muscle, Protein-N 80 mg%.

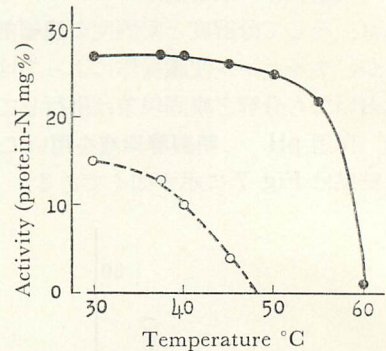


Fig. 9. Heat-inactivation curve of the bacterial proteinase activity.

Changes in activity of enzyme solution exposed to various temperatures for 15 minutes.

The activity measured at pH 8.0 and 30° C, for 15 minutes.

Substrate: actomyosin of mackerel muscle, Protein-N 95mg%.

することによって分解作用では50°Cで10%, 55°Cで20%, 60°Cで100%それぞれ失活したが, 凝固力は分解作用に比して耐熱性が弱く40°C, 45°C, 50°Cでそれぞれ33%, 75%, 100%失活した。

##### 5. 凝固アクトミオシンに対する分解作用

分解作用と凝固現象との関連を考察するに資するため, アクトミオシンの各様の凝固物に精製酵素液を作用させてその分解度を測定し, 未変性のアクトミオシンに対する分解度と比較した。この場合前述したように凝固して不溶解状態にある基質に対する酵素作用にはその接触度等に問題があるのでホモゲナイズして可及的均一として用いた。実験に供したアクトミオシンの凝固物は熱凝固物, 低塩濃度沈澱物, 供試酵素液による凝固析出物の3種であって, 次のごとくして測定した。

熱凝固アクトミオシンに対する分解度をみるため, サバ肉アクトミオシン (タンパク態窒素濃度 82mg%, pH 8.0) をフラスコ 8 個に分取し, 20° (対照), 38°, 40°, 45°, 50°, 60°, 80°, 100°C で 30 分間加熱処理を施したものをそのまま 5ml とって基質とし, 精製酵素液を作用させてその分解度を測定した。別に, 加熱処理したアクトミオシン液を 3000rpm 15 分間遠沈した上液のタンパク態窒素をビュレット法で定量した結果を併せて図示すれば Fig. 10 のごとくである。アクトミオシンは 20~40°C の加熱処理によって熱凝固は少ないが, 50~55°C の加熱で大部分が凝固し, アクトミオシンの熱凝固点の文献値<sup>11)</sup> とよく一致する結果であった。このような割合で熱凝固タンパクを含む試料に酵素液を作用させた時の分解度は, 加熱処理温度が高く, より多くの割合で熱変性アクトミオシンを含む試料程分解度は低くなった。加熱温度 55°C 以上で, 大部分のアクトミオシンが熱凝固されてしまった試料では分解度はほぼ一定し, 生アクトミオシン (対照) の % 程度分解度を示すにすぎない。

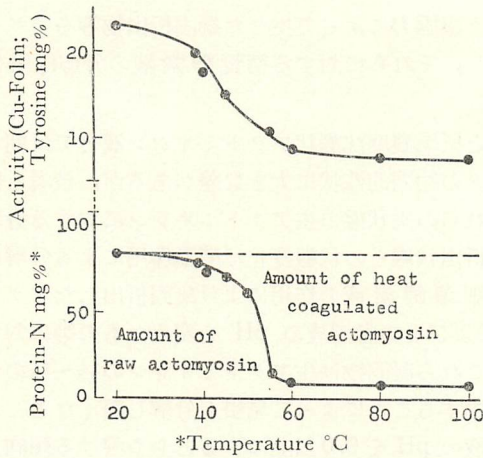


Fig. 10. Proteolytic activity of the bacterial proteinase upon actomyosin denatured by heating.  
 (Protein-N 82mg%, pH 8.0, 30°C, 30 minutes)  
 \* Changes in amount of raw actomyosin exposed to various temperatures for 30 minutes.

すなわち生アクトミオシンに比し熱凝固アクトミオシンに対する該酵素液の分解度は見掛上かなり低下することが諒解された。

アクトミオシンは中性塩溶液、例えば KCl の 0.4M 以上の溶液に溶けるが、KCl 濃度が 0.1 M 以下になると溶けずにかさばった沈澱として析出してくる。この低塩濃度沈澱状のもの、お

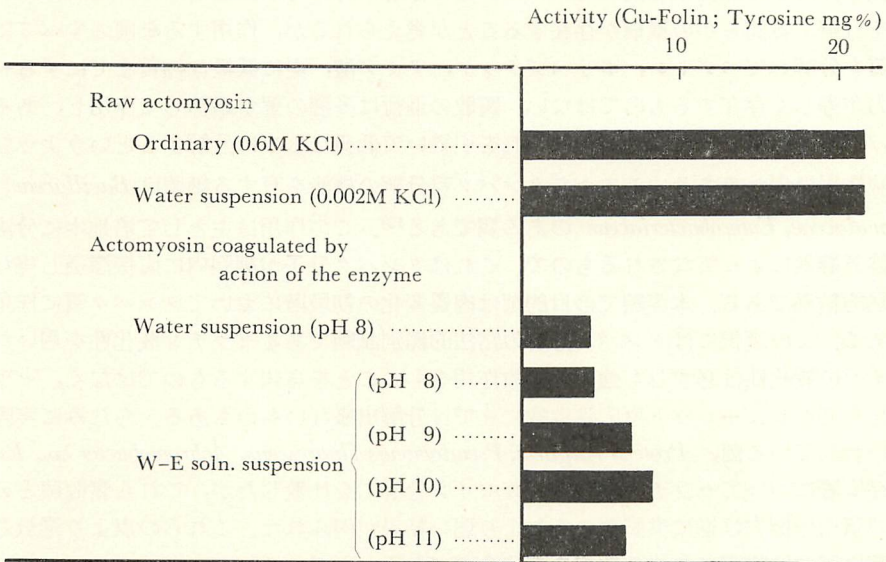


Fig. 11. Proteolytic activity of the bacterial proteinase upon raw actomyosin and that coagulated by action of the bacterial proteinase.  
 The activity measured at 30°C., for 30 minutes.  
 Concentration of protein as substrate was 90 mg% Protein-N.

よび供試酵素液のタンパク凝固力によって生じた凝固析出物等をそれぞれ集め数回洗浄して所定液に一定濃度で懸濁し、それらに対する精製酵素液の分解作用を検討した結果は Fig. 11 である。

無処理アクトミオシンと低塩濃度沈澱状アクトミオシン液とでは前者は溶解状、後者は沈澱析出状と、そのタンパクの物理的性状に大きな差があるが、後者と云えども変性アクトミオシンとは言えない。これらの両状態の生アクトミオシンに対する分解度は全く同じであった。この点、溶解状態と析出状態との状態変化は酵素作用による分解に問題となるような影響を与えなかった。次に細菌酵素液の作用により凝固析出したアクトミオシンを水または W-E 液に懸濁したものおよびその懸濁液の pH を変えたもの等に対する供試酵素液の分解度を測定した結果では、これら凝固物は生アクトミオシンの $\frac{1}{6}$ ~ $\frac{1}{4}$ の分解度しか示さず、細菌酵素液の作用により凝固することによって見掛上分解し難くなることを認めた。このアクトミオシン凝固物は懸濁液の pH を 9.0 以上にするとやや溶ける傾向があったので、懸濁液の pH を変えてみたが、この際 pH を 9, 10 に調節することによって pH 8 におけるよりも分解され易くなり、pH 10 に懸濁したものは pH 8 のその 2 倍位の分解度を示したが、それでも生アクトミオシンに比し相当低い分解度であった。pH 11 の W-E 液に懸濁したものは、また分解度は減少し、このあたりは凝固物の溶解性および供試酵素液の作用 pH との関連で活性度は複雑な増減を呈した。

## 考 察

### 供試菌の意義

肉質に作用する細菌は栄養源をタンパク質の分解に仰ぐものであるから、これにはタンパク質を分解する何らかの機構が存在することが考えられるが、作用する細菌のすべてにタンパク質を分解してペプトン、ポリペプチッド、アミノ酸、更に低級な物質までにする一連の作用力が等しく存在するものではない。腐敗の進行は多種の菌が錯綜して作用し、ある菌がタンパク質を分解し、他の菌が更にそれを引継いで低級なものに分解するというような総合的連続作用の現れである。このうちタンパク質分解の機能を有する細菌は *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* のある属である<sup>12)</sup>。この作用は主として培地中に分泌された菌体外酵素によってなされるもので、これはタンパク分子が細胞内に直接滲透し得ない為の必然的結果である。本実験での目的菌は肉質変化の初段階においてタンパク質に作用する菌である。この選択にはタンパク分解の常法的鑑別試験であるゼラチン液化性を用いたが、ゼラチンの液化性は必ずしも強力な腐敗作用をもつことを意味するものではなく、ゼラチンを液化してもビュレット反応陰性物にまでは分解出来ないものもある。ちなみに実際腐敗菌といわれている菌、*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter sp.*, *Escherichia coli* 等についてゼラチン液化性、カゼイン分解力を比較したが、これら腐敗菌と云われる菌の蛋白分解力は逆に供試菌のそれより弱い結果が得られた。これらの点より選択された供試菌の蛋白性物質に対する性格を充分念頭におくべきである。

中温好気性芽胞菌、特に枯草菌には多量のプロテイナーゼを分泌する菌株が多く、随分古くから注目されていたが、本実験に選ばれた供試菌も枯草菌 *Bacillus subtilis* の類縁菌であった。この菌が産生する proteolytic enzyme は普通のタンパク基質であるカゼイン、変性

ヘモグロビン、ゼラチン、牛乳を容易に分解し、また生タンパク基質である魚肉アクトミオシンをも容易に分解した。これらの分解は Fig. 7 のごとくアルカリ側に至適 pH があり、Fig. 2 で知られたように基質タンパク質を 0.2M 三塩化酢酸可溶性の非タンパク性物質にまで分解するがペプチッド結合の開裂は少い分解様式であって、エンドペプチダーゼ様の作用をみせた。これらの諸点より考え、供試菌が産生する proteolytic enzyme はいわゆる塩基性プロティナーゼであって、該菌が魚肉の肉質変化に関与する場合、腐敗の初期まず蛋白質を部分加水分解して腐敗進行の手始めをなし得ることが認められた。

### 分解と凝固の関連性

一般にこの種 proteolytic enzyme は未変性のタンパク基質に対しては作用し難いことが云われており、例えばトリプシンは天然のタンパク質に対してはその作用がきわめて弱く、卵アルブミン、血清グロブリン、ヘモグロビンなどを消化しない。しかしこれらのタンパクを加熱その他の方法で一度変性させるとすみやかに加水分解する<sup>13)</sup>。また三浦<sup>14)</sup>はタンパク食品にプロティナーゼを作用させ生魚肉に対する消化作用があまり活発でないのは未変性タンパクに作用し難いためであろうと考察している。

本実験結果における Fig. 1 から生魚肉そのままの基質は他の基質カゼイン、ヘモグロビンよりも分解度がかかなり低いことが知られたが、しかし同じ魚肉から抽出分離したアクトミオシンは魚肉そのままよりも相当高い分解度であった。他方 Fig. 4 のごとく魚肉の水抽出区分とアクトミオシンとの比較では前者の分解度の方が相当低い。これは同じ魚肉中で、しかも生の状態であっても、魚肉構成タンパク質の中にはかかる酵素によって直接分解され易いものと、分解され難いものがあることが知られた。現に魚肉を、生魚肉、W-E 液抽出区分、アクトミオシン、水抽出区分、魚肉ストローマとに分け同一濃度で供試酵素液を作用させて比較した結果では、ストローマが最も分解され易く、次いでアクトミオシン、W-E 液抽出区分、生魚肉で、水抽出区分が最も分解され難い結果であった。このことは筋肉構成タンパク質の中で不溶性のストローマが最も分解され易く、加うるにグロブリン性タンパクであるアクトミオシンとアルブミン性蛋白であるミオゲンとでも分解度が異なることを示し興味深い現象であった。

Fig. 3 でアクトミオシン及び牛乳が分解と同時に凝固析出する現象がみられたが、これに関して凝乳機構については色々説明が加えられている。すなわち凝乳酵素としてレンニンがあげられており、レンニンに限らずペプシンやその他多くのプロティナーゼも生乳（カゼイン）を部分水解して不溶性にする。牛乳に対しレンニンを pH 5.0~5.8 で作用させた場合 enzymatic stage と non enzymatic stage との 2つの過程があることが知られており、前者の過程でカゼインが部分加水分解されてパラカゼインとなり、次にパラカゼインが Ca イオンの存在において Ca-パラカゼイネイトとなり凝固すると説明されている<sup>15)</sup>。

供試酵素液によるアクトミオシン分解と凝固の関連性について最初に考えられるのは前述のように、proteolytic enzyme が生タンパク質には作用し難く、そのためアクトミオシンのごとき生タンパクにこの種酵素を作用させると、まず生タンパクを何らかの機構で変性した後、分解するという関連である。ちなみに Christensen はトリプシンが反応の初段階においてデナチュラーゼ (denaturase) 作用をもっていることを主張し、Linderström-Lang もこの考えを支持している<sup>4)</sup>。また Ottesen 等は *Bacillus Subtilis* の一株の産生するプロテ

イナーゼが native albumin に作用して、この分子の一部を分解して別のタンパク質 plak-albumin に変化することを観察している<sup>4)</sup>。

このような点を本実験の結果から考察すれば、まずアクトミオシンの分解と凝固との反応経時的活性度変化よりみて凝固現象は分解に遅れて起る傾向が見出されたことや (Fig. 3, 4, 5), また供試酵素液によって凝固析出したアクトミオシンや熱凝固アクトミオシンは生アクトミオシンよりも供試酵素液による分解度が相当低下することよりして (Fig. 10, 11), 分解作用にさきだちまずアクトミオシンを変性してこれを分解しやすくするという関係は成立しない。

次に分解、凝固両作用の二、三の性質を比較したところでは、培養日数に伴う活性度の消長は両作用およそ同じ傾向であった (Fig. 6)。他に分解作用の至適 pH は 9.2, 凝固度の至適 pH は 8.0, また分解作用の至適温度は 60°C であったが凝固度では見掛上のピークが 40°C であり、凝固現象の方が分解作用に比較して耐熱性が弱い等 (Fig. 7, 8, 9) の二、三の性質に相違点が見出された。これらの結果から分解と凝固とは性質の異なる別々の酵素作用によるものごとき印象をうけた。しかしここで問題になることは、基質であるアクトミオシンが変性しやすいタンパク質であって pH 変化、温度変化に敏感であり、酵素作用に影響する pH, 温度は同時に基質アクトミオシンにもかなり大きい影響を与えることである。たとえばアクトミオシンの溶解度は溶液の pH によっても著しく変化し、pH がある範囲内のアルカリ側では溶解度は大きく性状も安定であるが、酸性側では等電点 pH 5.0~5.5 に近づくとつれて溶解度が減少する。そのうえ更に、酵素の作用で凝固析出したアクトミオシンは pH 9 以上のアルカリ側では幾分再溶解する傾向があり、反面酸性側では沈澱がかさばることも見られた。温度によっても、Fig. 10 から知られるように 50°C 以上の温度では基質アクトミオシン自体が熱凝固して、酵素の作用による凝固現象は現れる余地すらなくなる。こうした基質アクトミオシン自体の変化は大きく活性度に影響する。これらのことから、ここに表現された分解度と凝固度は見掛上の活性度であり、両作用に現れた温度曲線、pH 曲線等の諸性質の相違がそのまま絶対的な相違であって、両作用が酵素学的特性を異にする 2 つの酵素活性によるものと考えすることは早計であろう。

別に酵素液を硫酸、アセトン、アルコールによる分画精製によっても今のところ両作用の活性区分を分別することは出来なかったことや、アクトミオシンのこの分解、凝固現象は、Fig. 5 の結果少くとも供試菌酵素液の特異性ではないこと等と考え合せて、アクトミオシンが分解作用により部分加水分解されることによって二次的に凝固析出しているとも考え得る。とにかく両作用は密接な一連の相関反応であると推測されるが、その関連性の詳細は酵素のより一層高度の精製や、また酵素の作用により凝固析出するアクトミオシンのタンパク質化学的性状を明らかにすることによって更にはっきりと説明づけられると思われる。

いずれにしてもこの種細菌プロティナーゼが魚肉の肉質変化進行初期に生魚肉タンパク、とくに主要成分であるアクトミオシンの部分加水分解、変性にかなり大きな割役を演じていることが認められた。

## 要 約

海産魚からゼラチン液化性の強い *Bacillus subtilis* の一変株を分離し、該菌が産出する塩

基性プロティナーゼの種々のタンパク質，特に魚肉タンパク質に対する作用を検討した。その結果は次のごとくであった。

供試菌が産生する塩基性プロティナーゼは，カゼイン，ヘモグロビン，ゼラチン，牛乳等に対してこれらを容易に分解した。生魚肉タンパクにも作用するが，魚肉構成タンパク質の中ではストローマ及びグロブリン性蛋白であるアクトミオシンは分解され易く，アルブミン性タンパク質であるミオゲンはその分解度が低いことが知られた。このタンパク分解は 0.2 M 三塩化酢酸可溶性の非タンパク性物質の生成は大きい，ペプチッド結合の開裂量は少ない。

供試酵素液を魚肉アクトミオシンに作用させた場合，分解に併行して蛋白が凝固析出した。この分解作用の至適 pH は 9.2，凝固力の至適 pH は 8.0，また分解作用の至適温度は 60°C，凝固力の見掛上の活性は 40°C にピークをもち，凝固力の方が分解作用に比較して耐熱性は弱い等の二，三の見掛上の性質に相違がみられたが，とにかく両作用は密接な一連の相関反応であることは推測出来た。

供試酵素液の作用によって凝固析出したアクトミオシンは未変性のアクトミオシンとは中性塩液に対する溶解度，供試細菌プロティナーゼの分解作用による被分解度にかかなりの相違が見出された。

いずれにせよ，この種細菌プロティナーゼが魚肉の肉質変化進行初期に生魚肉タンパク質の部分加水分解，変性にかかなり大きな役割を演じていることが認められた。

終りに本研究を行うに当り御指導を賜った本学齊藤要助教授に深甚の謝意を表する。

## 文 献

- 1) 谷川英一・坂井 稔 (1960)：水産微生物学，恒星社厚生閣，p. 379.
- 2) 中島三之丞 (1952)：各種日常食品より分離した *Escherichia* 属の研究，腐敗研究所報告，V 29—44.
- 3) 福本寿一郎・山本武彦・市川和宏 (1958)：中性プロティナーゼの種々蛋白質に対する作用，農化，32，375—379.
- 4) 赤堀四郎 (1956)：酵素研究法，朝倉書店，2，p.p. 297—303.
- 5) 江上不二夫他編 (1953)：標準生化学実験，文光堂，p. 245.
- 6) 赤堀四郎 (1955)：酵素研究法，朝倉書店，1，p. 166.
- 7) 赤堀四郎・水島三一郎 (1954)：蛋白質化学，共立，1，p. 171.
- 8) 須山三千三・鴻巣章二 (1958)：ニンヒドリン法によるアミノ酸の定量法，日水誌，32，555—560.
- 9) 松本重一郎・金光庸俊 (1955)：Biuret 反応による魚肉蛋白質の定量について，日水誌，21，284—288.
- 10) Bergey (1957)：Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed. p.p. 613—634.
- 11) 赤堀四郎・水島三一郎 (1955)：蛋白質化学，共立，3，p. 435.
- 12) 田中正二・鈴木達雄共訳 (1955)：細菌の代謝，丸善，p. 112.
- 13) Sumner, J. B., somers, G. F. (1953)：Chemistry and Methods of Enzyme, 3Ed. p. 173.
- 14) 三浦勇吉 (1958)：麹菌プロテアーゼの消化作用に関する研究，農化，32，486—490.
- 15) Sumner J. B., Myrback K. (1951)：The enzyme, Vol. 1, part 2, p. 1098.