

熟成中のしょつつる諸味のプロテアーゼ

誌名	中央水産研究所研究報告
ISSN	09158014
著者名	山下,倫明 藤井,建夫 小長谷,史郎
発行元	水産庁中央水産研究所
巻/号	2号
掲載ページ	p. 25-31
発行年月	1991年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



熟成中のしょっつる諸味のプロテアーゼ

山下倫明*¹・藤井建夫*²・小長谷史郎*¹

Proteases in the Fish Sause "Shottsuru" Mash in Fermentation

Michiaki YAMASHITA*¹, Tateo FUJII*², and Shiro KONAGAYA*¹

Abstract: Japanese traditional fish sauce is processed by fermentation of whole fish components on saturation with salt. Microbial proteases may be responsible for the degradation of protein into amino acids and peptides. The present study deals with the characterization of proteases in the mash of the Japanese fish sauce, "shotturu", in fermentation. The presence of several different proteases was shown in the mash. Most proteases belonged to either aspartic or serine protease. Their molecular weight differed in the range from 15 to 30 Kd. One aspartic protease which showed the highest activity had a molecular weight of 30 Kd and optimal pH at 5.5 by casein hydrolysis, while a serine proteases with the highest activity had a molecular weight of 30 Kd and optimal pH at 9.5. The overall proteolytic activity in the fish sauce mash showed dependence on NaCl concentration. It was most active at slightly below 1M, and 5M NaCl showed 92% inhibition of proteinase activity at pH 5.5, this being near pH that of the mash. The present findings lead to the conclusion that proteolysis in fish sauce mash proceeds extremely slowly under the strong inhibition by salt.

魚醤油は、魚介類を原料とする発酵調味料で、東南アジア諸国において広く用いられている。わが国では、しょっつる、いかなご醤油、いしるなどが地域的に用いられている¹⁾。魚醤油は一般に、魚介類を多量の食塩とともに1~数年間漬け込み熟成することによって製造されることから、熟成過程には好塩性の微生物あるいは高塩濃度下で活性な酵素の関与が推察される。魚醤油熟成中の微生物の役割については過去にいくつかの研究がなされ^{2~4)}、熟成中のしょっつるの優勢菌種として *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vibrionaceae* および *Bacillus* が同定

1990年1月30日受理 中央水産研究所業績A7号(本研究は、農林水産省による「生物資源の効率的利用技術の開発に関する総合研究」IV変換技術系の中で行ったものの一部である)

*¹ 中央水産研究所 〒104 東京都中央区勝どき5-5-1 (National Research Institute of Fisheries Science, 5-5-1, Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan)

*² 東京水産大学 〒108 東京都港区港南4-5-7 (Tokyo Fisheries University, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108, Japan)

されている⁴⁾が、熟成過程における呈味性発現は、主として細菌性プロテアーゼによる原料魚介類のタンパク分解と考えて間違いないであろう。

本研究は、マイワシ魚醤油の熟成過程におけるプロテアーゼの役割を明らかにするため、熟成中のしょっつる諸味中のプロテアーゼを検索し、その酵素的性質を検討したものである。

実験方法

試料 試験に供した熟成中のマイワシ (*Sardinops melanostictus*) しょっつる諸味 (3年熟成) は商業的に製造中のもの*から供与を受けた。諸味を等量の冷水とともにホモジナイズし、遠心分離 (6,000×g, 20分) して得られた上清をしょっつる諸味抽出液 (酵素試料液) として以下の実験に供した。

プロテアーゼ活性の測定 5% カゼイン 0.2 ml, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) または 0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 0.4 ml, 諸味抽出液 0.2 ml を混合し, 30°C で1時間インキュベート後, 10% トリクロロ酢酸 2 ml で反応を停止した。この混合物を濾過し, その濾液について, タンパク分解物を銅-Folin 法⁵⁾によって, また遊離 N 末端基をニンヒドリン法⁶⁾で定量した。それぞれの方法で発色したときの吸光値 (銅-Folin 法における $A_{750\text{nm}}$ あるいはニンヒドリン法における $A_{540\text{nm}}$) を便宜上, 活性単位 (unit) として用いた。すなわち, 銅-Folin 法による活性をプロテイナーゼ活性, ニンヒドリン法による活性をペプチダーゼ活性として示した。

ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィー しょっつる諸味抽出液 5 ml を Sephadex G-75 カラム (2.6×90 cm) により, 0.2 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用いるゲル濾過に供した。

イオン交換クロマトグラフィーは, CM-Sephadex C-50 および DEAE-Sephadex A-50 カラム (2×10 cm) を用いて実施した。すなわち, 諸味抽出液を 0.2 M NaCl を含む 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に透析後, CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーに付し, 1.0 M NaCl により吸着物質を溶出した。ここで得られた CM-Sephadex 吸着画分を A 画分と名付けた。さらに, CM-Sephadex 素通り画分を pH 7.0 に調整後 DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーに付し, 吸着物質を 1.0 M NaCl で溶出した。ここで得られた DEAE-Sephadex 吸着画分を B 画分と名付けた。また, CM-Sephadex にも DEAE-Sephadex にも非吸着の画分を画分 C と名付けた。これら A, B, C の三画分をそれぞれ限外濾過膜 YM-10 (アミコン社) を用いて濃縮し (5 ml), さらに上記と同様な条件下でゲル濾過に付した。

結果および考察

しょっつる諸味のペプチダーゼ活性の pH 依存性

プロテイナーゼ活性, ペプチダーゼ活性の pH 依存性を Fig. 1 に示す。いずれも最高活性は pH 9.5 付近に認められたが, 熟成中のしょっつる諸味の pH, すなわち弱酸性域 (pH 5~6) においてもペプチダーゼ活性の小さなピークが観察された。この pH-活性曲線の形から、最

* 高寅商店 (秋田県秋田市)

適 pH の異なる種々のプロテアーゼの存在が考えられた。

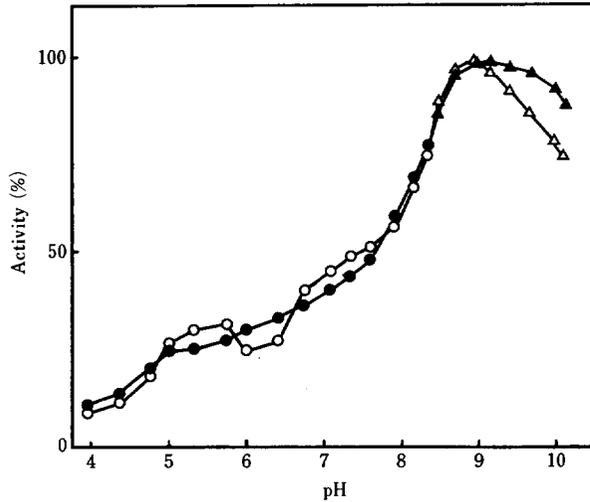


Fig. 1. Effect of pH on the proteolytic activity in fish sauce mash. The relative activities against casein were determined with Cu-Folin method (○, △: proteinase activity) and ninhydrin method (●, ▲: peptidase activity). The buffers used for the reaction mixture were 0.1 M sodium citrate phosphate (○, ●) and 0.1 M sodium borate (△, ▲).

プロテアーゼに対する各種プロテアーゼインヒビターの影響

諸味中のプロテアーゼ全活性に対する各種プロテアーゼ活性インヒビターの影響を調べることによって、諸味中に存在するプロテアーゼの類別を試みた (Table 1)。酸性域 (pH 5.5) におけるプロティナーゼ活性は、セリンプロテアーゼインヒビターであるダイズトリプシンインヒビター、フェニルメタンサルホニルフルオリド (PMSF) およびロイペプチンでその 30~50% が阻害され、アスパルティックプロテアーゼインヒビターであるペプスタチン A でも約 45% 阻害された。また、ペプチダーゼ活性はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) によって約 35% 阻害された。これらの結果から、しょつつる諸味の pH (pH 5.5) で活性なプロテアーゼとしてはセリンプロテアーゼおよびアスパルティックプロテアーゼの存在が考えられ、またメタロタイプのペプチダーゼの存在も示唆された。

一方、弱アルカリ域 (pH 9.0) においては、セリンプロテアーゼインヒビターであるロイペプチンおよびダイズトリプシンインヒビターによって活性がほとんど完全に阻害されたことから、この pH で活性な酵素としてはセリンタイプの酵素が主要であると考えられた。しかし、L-trans-エポキシスクシニルロイシルアミド-4-グアニジノブタン (E-64) および EDTA によっても活性の阻害が認められたことは、少量のシステインプロテアーゼの存在を示すものであろう。

Table 1. Inhibition of the proteolytic activity in fish sauce mash. Proteinase and peptidase activities were determined by Cu-Folin and ninhydrin methods, respectively. The activity is expressed as a percentage of that without addition of any of inhibitors.

Inhibitor	Concentration (μ M)	Relative activity			
		pH 5.5		pH 9.0	
		Proteinase	Peptidase	Proteinase	Peptidase
Control		100	100	100	100
Soybean trypsin inhibitor	0.1	64	53	69	6
PMSF	100	47	32	n. d.	n. d.
Leupeptin	100	73	62	19	16
E-64	100	100	86	84	78
Pepstatin	100	55	56	100	100
EDTA	1000	95	66	100	72

n. d. : not determined.

ゲル濾過によるプロテアーゼの分離

諸味抽出液を Sephadex G-75 を用いるゲル濾過に供した。溶出パターンを Fig. 2 に示す。プロテアーゼ活性については、分子量 12~20 k および 30 k 付近に相当する画分にアルカリ性および酸性プロテアーゼの少なくとも3つの活性のピークが現われた。とくに、分子量 30 k に相当するピークが最も高いプロテアーゼ活性を示した。

また、諸味抽出液をイオン交換クロマトグラフィーによって分画した後、ゲル濾過で溶離す

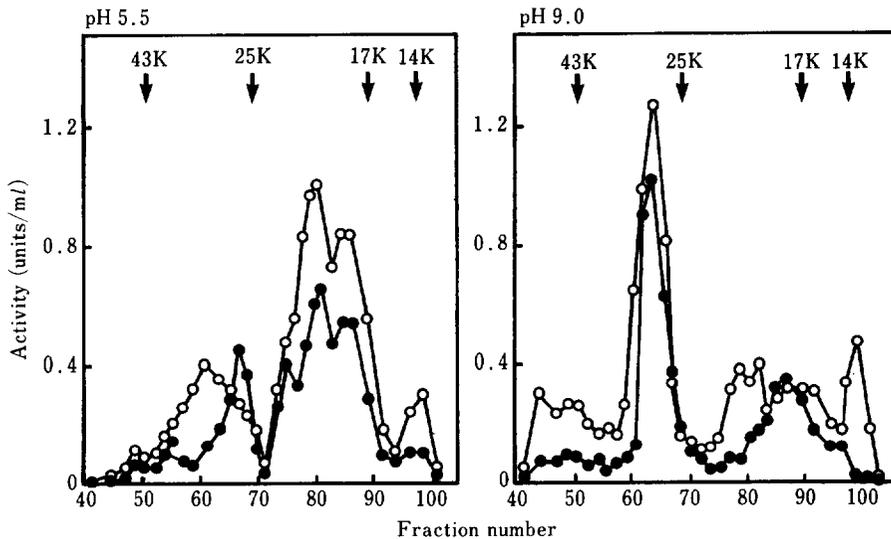


Fig. 2. Gel filtration of the proteases in fish sauce mash on a Sephadex G-75 column. The flow rate was 10 ml/h and 3.0 ml of fractions were collected.
○ : proteinase activity (Cu-Folin) ; ● : peptidase activity (ninhydrin).

ることにより、多数の活性ピークが検出された (Fig. 3)。酸性域 (pH 5.5) で活性なプロテイナーゼのうち最も強い活性は、CM-Sephadex にも DEAE-Sephadex にも非吸着の画分 (画分 C) の分子量 30 k に相当する画分に現われた。本酵素の最適 pH は 5.5, ペプスタチンで活性が阻害されたことから、アスパルティックプロテアーゼに類別された。弱アルカリ域 (pH 9.0) で活性なプロテイナーゼのうち最も強い活性は、CM-Sephadex 吸着画分 (画分 A) の分子量 30 k に相当する画分に現われた。本酵素の最適 pH は 9.5, ロイペプチン, ダイズトリプシンインヒビター, PMSF によって活性が阻害されたことからセリンプロテアーゼに類別された。また、CM-Sephadex 吸着画分 (画分 A) には酸性域で活性なペプチダーゼ活性が高く、DEAE-Sephadex 吸着画分 (画分 B) および非吸着画分 (画分 C) にはアルカリ域で活性なペプチダーゼ活性が高かった。

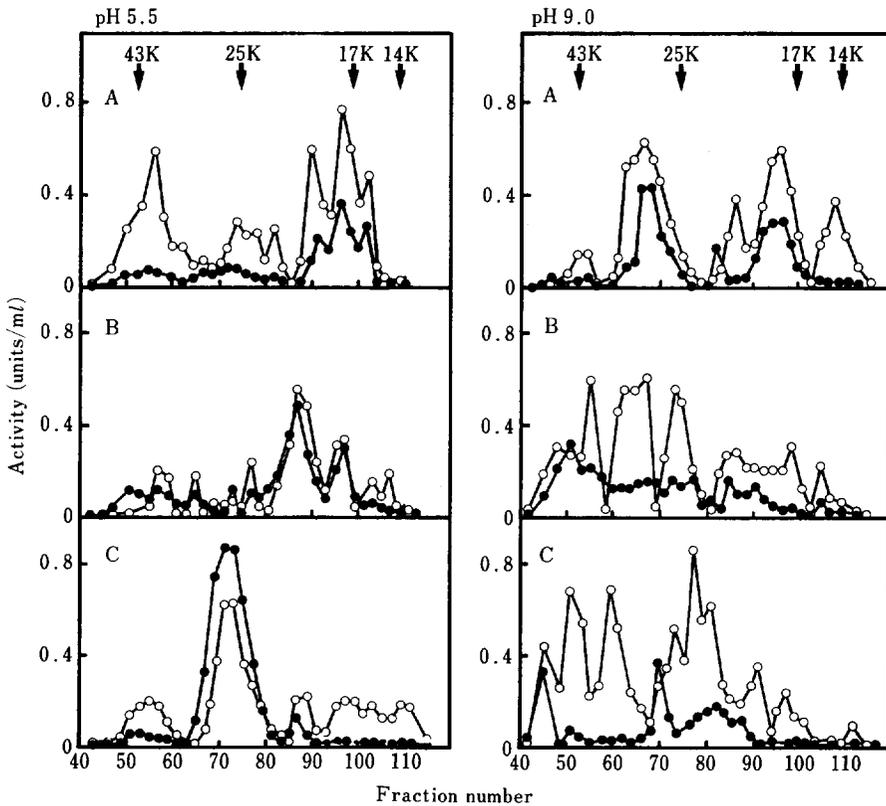


Fig. 3. Gel filtration of the fractions obtained by preceding ion exchange chromatography. Proteases in the fish sauce mash were separated by a series of chromatography on CM-Sephadex C-50 (pH 5.0, 0.2 M NaCl), DEAE-Sephadex A-50 (pH 7.0, 0.2 M NaCl) and Sephadex G-75. An adsorbed fraction on the CM-Sephadex column (A), that on the DEAE-Sephadex column (B), and an unadsorbed fraction on both CM- and DEAE-Sephadex columns (C) were applied to the Sephadex G-75 column. The symbols are the same as in Fig. 2.

諸味抽出液の pH 9.5 における活性 (Fig. 1) の大部分が前述のようにロイペプチンおよびダイズトリプシンインヒビターで阻害されることから、pH 9.5 で最高活性を示す主要酵素はここで得られたセリンプロテアーゼであると考えられる。一方、前述のように、しょつつる諸味の pH に近い pH 5.5 における活性はセリンプロテアーゼおよびアスパルティックプロテアーゼによると考えられるが、この活性は、主としてここで得られた 2 種類の酵素によっている可能性が考えられる。

プロテアーゼ活性に及ぼす食塩濃度の影響

諸味抽出液のプロテアーゼ全活性に対する食塩の阻害を調べた (Fig. 4)。プロティナーゼ活性、ペプチダーゼ活性はいずれも、食塩濃度 1 M 程度を必要としたが、熟成中のしょつつるの条件下 (5 M NaCl, pH 5.5) では、プロティナーゼ活性の 92%、ペプチダーゼ活性の 95% が阻害された。高度高塩細菌に由来する酵素の中には、酵素活性発現に 2 M 以上の食塩を必要とするものも知られているが⁷⁾、しょつつる諸味中のプロテアーゼは高塩分によってむしろ阻害されるという性質を示した。

以上の結果から、しょつつるの熟成過程は pH 5~6 で進行することから、熟成中のタンパク分解は主として優勢微生物由来のセリンプロテアーゼおよびアスパルティックプロテアーゼの作用によるものと考えられるが、それらの活性が高濃度の食塩によって著しく抑制された状

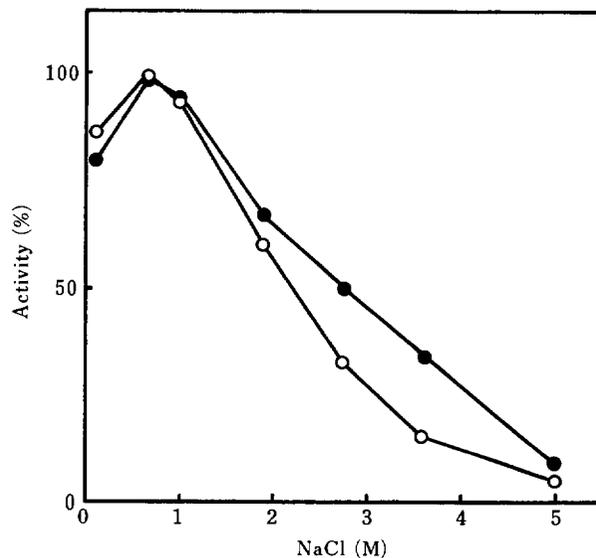


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the overall proteolytic activity in the fish sauce mash. The reaction mixtures differing in NaCl concentration were run, and hydrolytic products were determined by Cu-Folin (○) and ninhydrin (●) methods. The degree of inhibition is expressed as relative activity when the highest activity was taken as 100%.

態で進行すると考えられる。しかし、このことの伝統的しょつつる製法上の意味については不明である。

本研究をまとめるに当たり、試料を御提供下さった高寅商店に感謝の意を表する。

文 献

- 1) VAN VEEN, A.G.: Fermented and dried seafood products in Southeast Asia. in "Fish as Food" (ed. by BORGSTROM, G.) Vol. III, 227-250 Academic Press, New York (1965).
- 2) 天野慶之・佐藤 健: 魚醤油細菌の生理的性質に就て. 日水誌, **8**, 365-370 (1949).
- 3) 藤井建夫・BAMBANG BASUKI, S.・戸沢晴巳: フィリピン産魚醤油の化学組成および微生物相. 日水誌, **46**, 1235-1240 (1980).
- 4) 藤井建夫・酒井久夫: しょつつる製造工程における細菌群の消長. 日水誌, **50**, 1599-1604 (1984).
- 5) 千谷晃一・矢追義人: ペプチドの分画法. 蛋白質・核酸・酵素, **10**, 250-310 (1965).
- 6) 菅原 潔・副島正美: 蛋白質の定量法. 95-132. 学会出版センター, 東京 (1977).
- 7) 増井正幹・大西 博・畝本 力: 好塩微生物. 216-237. 医歯薬出版, 東京 (1979).