レンネットに関する研究

III 結晶性レンニンについて

大 條 方 義・河 西 京 甫

(日本獣医畜産大学)

Studies on rennet

III On crystalline rennin

MASAYOSHI OHEDA and KYOSUKE KASAI

(Nihon Veterinary and Zootechnical College)

緒 言

第II報¹⁾に於いてレンネットを純化し、約 7×10^6 単位の粗レンニンを得たが、引つゞき結晶化につき研究を続けた結果、結晶性レンニンを得たので、その調製法及結晶性レンニンの性質の一部を発表する。結晶性レンニンに関しては我々が研究中に BERRIDGE²⁾の研究報告があることを J. Dairy Sci.³⁾ で知つたが、我々の独自の結晶法が完了した後、たまたま慶大医学部の糸賀氏と研究上の関連が出来、文献の一部を見得る機会を得たので改めて比較することが出来た。即ち我々の結晶は BERRIDGE²⁾ の反駁している HANKINSON 等のもの^{4), 5)} に近く、BERRIDGE の結晶が蛋白分解作用が強い⁶⁾ のに比し、我々のものは milk-clotting power が強く proteolytic power が殆んど無いこと、BERRIDGE のものが溶解性が低いのに比し、我々のものは極めて溶解しやすいこと、調製法に於ても我々の分離、精製、結晶化、再結が極めて容易、確実である点等幾多の相違点が明かになったので、我々の結晶レンニンについて、その研究結果を順次発表するつもりである。

結晶性レンニンの調製法

第II報¹⁾で示した抽出、調製法により用意したレンネット・エキス ($5 \sim 7 \times 10^4$ 単位) をセロファン袋に容れ、流水(井水)で透析するか又は電解透析して、 AgNO_3 による Cl^- の反応が微弱か皆無になるに及んで濾過し、透明なレンネット溶液を得る。この液に微量の醋酸を滴下、混和し、pH を 4.65 附近ならしめると液は濁濁し初め、pH 4.4 附近まで酸性にすると粗レンニンは殆んど沈澱する (ppt.)。遠心で ppt. を集め ppt. 容積の 1 (~ 2) 倍の 0.1N-HCl で ppt. を溶解すると多少濁濁した液となるから遠心で振つて無色透明の液 (Supernatant, snt.) (強レンネット液) と帯褐灰白色餅状 ppt.

とに分ける。この ppt. は活性が低いから棄てる。snt. 50c.c. に対し $\frac{1}{4}$ Conc. HCl (市販 Conc. HCl 5cc を水で 20c.c. とする、HCl の濃度は約 9% である) を 3 c.c. の割合に混和し、更に飽和 CaCl_2 溶液を 3 c.c. 加える。酵素濃度の高い液 (snt.) では各 3 c.c. 添加し得ぬうちに濁濁するが、濁濁する前に添加を止めた方がやゝ大型の結晶になる。濁濁しても結晶化には差支へない。HCl 及 CaCl_2 を添加混合した液は室温に放置すると、数時間で結晶が出初め、 $\frac{1}{2} \sim 1$ 日で多量の白色沈澱として結晶を析出する。結晶の生成は 30°C 程度より次第に放冷し 1 日後 10°C 程度になるようにすると大型の結晶析出が顕著である。この場合の結晶は普通室温放置で生ずる針状晶に比してやゝ稜柱状を呈する。結晶を遠心で集め、水に $\frac{1}{4}$ Conc. HCl を $\frac{3}{50}$ vol. 更に CaCl_2 飽和液を同量加えた洗液、又は 0.5N-HCl に飽和 CaCl_2 を 5% の割に加えた洗液で数回洗うと、ここに母液を含まない針状——稜柱状結晶性レンニンが得られる。結晶はこの洗液には殆んど溶解しない。結晶は水に溶解し (透明水溶液となる)、更に HCl 及 CaCl_2 を母液の場合と同様に加え室温に置くと、全く同型の結晶が再結析出する。この再結を繰返しても結晶型は同じである。結晶をとつた母液は室温に放置すると再び少量の結晶を沈澱する。結晶は初結でも水にとけて全く不溶物を残さない。次頁に以上の結晶調製法を図式的に示す。

結晶性レンニンの性質 (一部)

溶解性：結晶性レンニンは水、稀塩酸、稀塩類液、稀醋酸、含水アセトン、含水アルコール及強鉍酸に溶解し、不溶分を残さず、無色透明の酵素溶液となる。液は粘稠で蛋白液特有の泡立ち性を有する。水溶液は特に泡立ちが強い。強酸中に長く置けば黒変し、又、レンニン液が腐敗すると硫黄臭を発する。クロ、フオルム、トルオール、エーテル等に溶解しない。結晶を脱水 (乾燥)

Scheme : -Preparation of Crystalline Rennin

Rennet Extract ($5\sim7\times 10^4$ Units, a), pH 4.8

Dialysis in cellophane bag, until Cl⁻ negative, Filtered

a) Unit=milk/rennin, at 40°C in 40 mins.

Rennin Crystals
 $\times 300$
(Recrystallized)

Rennin Crystals
 $\times 1,200$

Rennin Crystals
($\times 1,200$)

した後は、結晶が酸或は塩類等と共に乾燥した場合では溶解性を減じ、充分水洗して夾雑物を含まない状態で乾燥させられた場合は溶解がよく不溶分を残さない。不溶分のある液に HCl の少量を加えると多くの場合液は透明になる。一般に結晶はその脱水後のものに比し溶解度が高い。

蛋白反応：結晶を洗滌し乾燥し、水に溶解して一応蛋白反応を検した。

Reactions	Intensity	Color	Note (suggested)
Biuret	++	blue (violet)	long peptid chain
Xantho-protein	+	yellow	phenylalanine, tyrosine or tryptophane
Millon's	+	red	tyrosine
Adamkiewicz's	+	violet	tryptophane
Liebermann's	—	colorless	(tryptophane)
Ninhydrin	±	colorless	α-amino acids
Pauly's	+++	deep red	tyrosine, histidine
Sulphur	+	black	cystine, cysteine

結晶の融点：結晶、再結晶、再々結晶を作り夫々洗滌し、乾燥して粉末とし m. p. を測定した。

No. of Sample	crystallization	Washed with	m. p. (°C)	Solubility (in water)
(1) 4M02	re-crystallized	water	226-227°(decompose)	best
(2) 4M16	crystallized	0.005 N-HCl	226-227°()	slightly insoluble
(3) 4A01	recryst., repeated	toluene	228-229°()	small amount insoluble
(4) 4A01	"	water	225-227°()	good

(水洗後の結晶は乾燥に伴い癒合しフィルム状となり、干割れした膜上に結晶の型を残す。粉碎して供試す)

結晶性レンニンの力価

力価試験 (1) m. p. を測定した試料を微量採り 1,000 倍の水に溶解し試料とした。試験用乳は市乳 (罐入) に 10% $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を 180cc 当り 0.3cc 加えた。

Rennet test (1)

crystalline rennin	units	insoluble in sample sol
(1) 4M02	1.371×10^4	+
(2) 4M16	880×10^4	+++
(3) 4A01	1.081×10^4	++

(不溶物の多い試料は力価が低い)

(2) 結晶を混合し水洗乾燥後水に溶解し少量 (0.1 cc) の 0.1 N-HCl を加え、試料液を透明化し試験した。

Rennet test (2)

crystalline rennin	Sample/ H_2O	Units
(4) 4M08	3.4mg/2cc 2.5mg/2cc 1.6mg/2cc	778×10^4 (?) 1.008×10^4 950×10^4

以上より、測定力価範囲 $778 \sim 1.371 \times 10^4$ 、平均値 1.01×10^7 となる。

考 察

ここに示した結晶法で得られる結晶は針状の結晶であり、このものは再結晶法を数回繰返しても結晶形及融点を変化しないから略純粋であると思われる。製法によっては X 軸翼状、稜柱状等の結晶の他、Berridge の cube-crystals も観察されるが夫等については追つて発表する。純レンニンは糸賀氏の試験⁷⁾に倣しても蛋白分解力は殆んどないものと思われるが、この点に関しては更に追試して発表し得るであろう。レンニンは蛋白質に属し長鎖状 peptid 結合を有し、tyrosine, tryptophane の含量低く、histidine 又は proline の反応が強い。結晶性レンニンの融点は 225-227°C (分解)、力価は 1.0×10^7 以上である。含硫アミノ酸を有する。

総 括

結晶性レンニンの調製法及得られた針状結晶の性質の一部を試験した。結晶を水洗乾燥した場合の力価は 1.0×10^7 以上。レンニンは含硫アミノ酸、Tyrosine, Tryptophane の少量を含み、かなりの histidine を含有する蛋白質に属する物質である。m. p., 225-227°C (分解)、蛋白分解力は微弱である。(1954, 4, 12 受付)

文 献

- 1) 大條, 河西 (1952): 日畜会報, 22, (2~4)
- 2) N. J. BERRIDGE (1945): Biochem. J., 39; 179
- 3) Abs (1951): J. Dairy Sci., 34; (12)
- 4) C. L. HANKINSON and L. S. PALMER (1942): J. Dairy Sci., 25; 277
- 5) C. L. HANKINSON (1943): J. Dairy Sci., 26; 53
- 6) Hs. NITSCHMANN u. R. VARIN (1951): Helv. Chem. Act., 34, (5)
- 7) 糸賀, 未発表

Résumé

The preparation of crystalline rennin is summarized in the scheme mentioned above. Under this, conditions rennin crystallizes in the form of needles. The melting point of the crystals is 225-227°C (decompose). The crystals are easily dissolved in water, diluted hydrochloric acid or dilute salt solution into a watery, clear, colorless and viscous solution. The milkclotting power of crystalline rennin is 1.0×10^7 units, but has little proteolytic power.