成的性格を有する酵素である。

(3) *Cloaca cloacae* A-10 のアルギナーゼは分解の初期に於て著しくアルギン酸を低分子に分解して粘度を低下せしめる酵素と、更に小さい分子に分解して還元糖を生成する酵素の 2 種が存在し、後者は分解の初期に於て殆んど生成されず粘度の著しく低下した時期より徐々に作用するものと推定される。

(4) *Cloaca cloacae* A-10 のアルギナーゼの至適 pH 及び至適温度は夫々 7.0~7.4 及び 35~40° であった。

(5) *Cloaca cloacae* A-10 を使用して液状及び固状の酵素剤を試製して強力なアルギナーゼを有することを認めた。

終りに臨み御指導、御鞭撻を賜っている青山教授並びに御助言を賜った東大坂口教授に感謝の意を表します。又試料の採取その他御便宜を与えられた君津化学工業株式会社社長笠原文雄氏に感謝致します。

(1) 大島幸吉：本誌，7，332 (1931).	(5) 井上勝弘，安藤芳明：本誌，30，742 (1956).
(2) S. A. Waksman, C. L. Carey. M. C. Allen：
J. Bact., 28, 213 (1934).	(6) F. Kauffmann：Zbl. Bakt. I. Orig., 165,
344 (1956).
(3) Th. Thøtta, E. Kåss：C. A. 41, 791 (1947);
Anhandl. Norske Vindekaps-Akad. Oslo
Univ. Mat.-Naturv. Klasse, No. 5, 1-20
(1945).	坂崎利一，波岡茂郎：腸内細菌検査法。
北里研究所：腸内細菌検査の手引。
(4) 吉川三吉：兵庫農大報，1，50 (1954).	(7) Bergey's Manual of Determinative Bac-
teriology (6th Ed.)
	(8) 吉川三吉：兵庫農大報，2，118 (1956).

麴菌プロテアーゼの消化作用に関する研究 各種プロテアーゼの分離精製およびその消化作用について

三 浦 勇 吉 (三共高峰研究所)

昭和 32 年 10 月 7 日 受 理

緒 言

タカジアスターゼのごとき麴菌を利用した消化剤には最近 3 種のプロテアーゼの存在が知られている⁽¹⁻³⁾。

すなわちアルカリ性側で作用するアルカリ性プロテアーゼ、中性附近で作用して金属を必要とする中性プロテアーゼ、酸性側で作用する酸性プロテアーゼである。これら 3 種の酵素を分離精製し実際の食品蛋白である肉類、卵、穀物蛋白等に対してそれぞれどのような消化作用を示すかをしらべた。

実 験 の 部

アルカリ性プロテアーゼおよび中性プロテアーゼの分離精製 第 1 表のごとき組成の磷酸濃度および pH の高い培地に当社保存の *Aspergillus oryzae* No. 433 を 30° で 3 日間振盪培養する⁽⁴⁾。pH は培地を殺菌後調整し、培地の糖による褐色化を防いだ。培養後菌体を濾別し、濾液は試薬壺に入れ寒剤で周囲から冷却し、柱状に凍結させる。中央部に凍結しにくい濃厚液が残る。つぎに壺を倒立させて徐々に融解させると、初めに融解してくる部分には極めて濃厚な液が得られる。約 75% の酵素収率で液の体積を 1/3 に濃縮し得る。この濃縮液を第 1 図のごとき方法で分離精製を行った。アルカリ性プロテアーゼは培養液 11 より 60~70 mg、力価収率約 20%，窒素当り活性度は培養濾液の 9~10 倍、中性プロテアーゼは同じく 11 より約 10 mg、窒素当り活性度は 30~35 倍。

アルカリ性プロテアーゼと中性プロテアーゼの力価測定 酵素活性はカゼインを基質とし、5% 三塩化醋酸に可溶性になったペプチド量をフォリン・フェノール試薬による呈色法⁽⁵⁾で測定して表わした。

アルカリ性プロテアーゼは最適 pH は 9 附近であるが、pH 7~9 にかけて平坦に近く、中性プロテアーゼは最適 pH は 6 附近であるが、pH 5~7 の間では大差がない。したがって酵素の精製実験では便宜上両者とも pH 7

* The Digestive Action of Proteases from *Aspergillus oryzae*. The Separation and Purification of Proteases and their Digestive Action.

By Yukichi MIURA (Sankyo Takamine Laboratory)

第 1 図 アルカリ性及び中性プロテアーゼの分離精製

第 2 図 M/40 pH 5 醋酸・醋酸ソーダバッファー, 300 V
3 時間泳動
—— 蛋白 ——— アルカリ性プロテアーゼ力価
— · — 中性プロテアーゼ力価 第 3 図 M/30 pH 8.2 ペロナルバッファー,
500 V, 2 時間泳動
—— 蛋白 ——— アルカリ性プロテアーゼ力価
— · — 中性プロテアーゼ力価

て、光電比色計で対照と比色する。対照は基質と三塩化醋酸を加える順序を逆にする。

中性プロテアーゼ：上記の EDTA 液の代りに水 0.5 cc を用いて同様に操作しその比色値から EDTA を用いた時の比色値を差引いて求める。

第 4 図 M/40 pH 5.5 醋酸・醋酸ソーダバッファー, 300 V, 2 時間泳動
—— 蛋白 ——— アルカリ性プロテアーゼ力価
— · — 中性プロテアーゼ力価

で活性度の測定を行った。この場合中性プロテアーゼは金属イオンを必要とするが、この金属イオンは酵素蛋白と強固に結合しているので、特に外から加える必要はないが、エチレンジアミン四醋酸(EDTA)を加えることにより、大部分の活性を阻害できるので、次の如く EDTA の存否で活性を測定して、両プロテアーゼ活性を分別定量することができる。

アルカリ性プロテアーゼ：酵素液 0.5 cc に M/200 EDTA 0.5 cc 加え、これに 1% カゼイン液 (M/30 磷酸バッファー pH 7 に溶解) 2 cc 加え 35° で 10 分作用させ、10% 三塩化醋酸 3 cc を加える。濾過しその濾液 1 cc をとり、M/2 炭酸ソーダ 5 cc, 5 倍稀釈フォリン試薬 1 cc を加え、35°, 20 分放置後 660 mμ のフィルタを用い

以上 2 種のプロテアーゼ標品は次の条件で東洋濾紙 No. 50, 2×35 cm の紙を用い、濾紙電気泳動を行った。泳動位置の検出は紙を横に 5 mm 幅に切り、各切片の抽出液につき力価測定と、Lowry 法による蛋白定量を行った。

アルカリ性プロテアーゼ(第 2 図)、中性プロテアーゼ(第 3 図)ともに濾紙電気泳動的に単一である。

酸性プロテアーゼの精製 現在タカジアスターゼには酸性プロテアーゼが他の 2 種のプロテアーゼに比べて比較的多く含まれている。

この酵素の力価測定は、塩酸酸性 2% カゼイン溶液 (pH 3) 1.5 cc に MacIlvaine バッファー (pH 3) 0.5 cc を加えた液を基質と

第 2 表

プロテアーゼ種類	N%	活性
アルカリ性	13.8	1230
中性	8.8	840
酸性	13.0	375

してアルカリ性プロテアーゼと同様に操作した。

精製は中西の方法⁽⁶⁾によりタカジアスターゼより Duolite CS 101 による吸着法によって精製した。この標品も濾紙電気泳動的に単一である(第 4 図)。以上 3 種のプロテアーゼ標品の窒素含有量及びその活性は第 2 表に示す。

この活性は酵素蛋白窒素 1 mg につき 35°, それぞれ 9, 6, 3 の pH で 1 時間に水解をうけてカゼインより生ずる 5% 三塩化醋酸可溶窒素の mg 数で表した。

消化の測定 プロテアーゼによる蛋白の消化をどの程度の蛋白水解を以て消化したと認定するかは決めにくい問題であるが、本実験では 5% 三塩化醋酸可溶ということをもって消化の点とした。多くの食品蛋白は水に難溶性の形で存在するが、これを可溶性プロテアーゼで作用させる場合、酵素と基質との接触が問題であり再現性の点で困難がある。本実験では基質食品蛋白をホモゲナイザー等の力をかり、可及的分散状態にして、それぞれのプロテアーゼの至適 pH のバッファーを加え、酵素を添加、30° の培養室中でトルオール存在下振盪器にかけながら蛋白水解を行わせた。これを経時的にサンプリングして、10% 三塩化醋酸を等容加えて除蛋白する。三塩化醋酸を加えることにより濾紙で比較的容易に澄明な消化液が得られる。この濾液の窒素をケールダールで測定し、使用した酵素蛋白の窒素あたりの数字を求めた。

食品蛋白としては大豆粉(きなこ)、小麦のグルテン、牛肉(罐づめ)、魚肉(鮭罐づめ)、生魚肉、卵、甲殻類(かに罐づめ)、貝類(罐づめ)を用いた。作用 pH はアルカリ性プロテアーゼには 9、中性プロテアーゼには 6、酸性プロテアーゼには 3 で行った。

酵素蛋白窒素 1 mg に対し使用した食品蛋白の窒素 mg 数は第 3 表に示す。以上の実験結果は第 5 図より第 14 図に示す。

第 3 表 基質食品蛋白窒素と酵素蛋白窒素との比

酵素の種類		アルカリ性	中性	酸性
基質				
きなこ		6800	6200	5100
グルテン		6800	6200	5100
牛肉		7000	6000	5000
鮭肉		6500	5600	6000
生魚肉		6650	6000	6600
かに		6000	5000	5000
貝類		5000	5000	5000
卵		6000	6000	6000

3 種のプロテアーゼの中でアルカリ性プロテアーゼが卵の蛋白質を除き、どの基質蛋白に対しても一番よく作用し、特にグルテンの場合最も著しい(第 6 図)。しかし生魚肉に対しては左程著しい開きがない(第 9 図)。これはアルカリ性プロテアーゼが未変性蛋白に作用しにくいためであると思われる⁽⁷⁾。卵白にはトリプシンインヒビターが存在し、このインヒビターはムコ蛋白であって、高い pH においては耐熱性の低いことが報告されている⁽⁸⁾。又松島⁽⁹⁾は卵白の中に麹菌プロテアーゼに対するインヒビターが存在し、これがトリプシン

第 5 図 きなこに対する経時的消化作用

AI.....アルカリ性プロテアーゼ
N.....中性プロテアーゼ
Ac.....酸性プロテアーゼ

第 6 図 加熱グルテンに対する消化作用

第 7 図 罐づめ牛肉に対する消化作用

第 10 図 罐づめかき肉に対する消化作用

第 8 図 罐づめ鮭肉に対する消化作用

第 11 図 罐づめ貝肉に対する消化作用

第 9 図 生魚肉に対する消化作用

第 12 図 加熱卵に対する消化作用

インヒビターとは別の物であることを報告している。

本実験でもアルカリ性プロテアーゼは加熱卵に対しても、又卵白に対しても全く作用しない（第 12 図、第 13 図）。しかし高い pH (10) で加熱すると作用されることをみた（第 13 図）。

ここで卵白中の阻害剤の性質をしらべるため次の実験を行った。

第 13 図 A……加熱卵白に対する A1 の消化作用
B……pH 10 で加熱した卵白に対する
A1 の作用

第 14 図 A……加熱卵黄に対する A1 の消化作用
B……pH 10 で加熱した卵黄に対する
A1 の作用

卵白を 5 g とり次のごとく 4 通りの処理を行った。

- (1) そのまま水 30 cc 加える。60° に加熱。
- (2) 中性プロテアーゼ水溶液 30 cc (酵素約 1 mg) 加えて 30°, 12 時間作用させ 60° でプロテアーゼを失活させる。
- (3) 酸性プロテアーゼ水溶液 (pH 3) 30 cc (酵素約 1 mg) を加えて 30°, 12 時間作用させ 60° でプロテアーゼを失活させる。
- (4) pH 3 のバッファー 3 cc 加える。60° に加熱する。

第 4 表

		以上 4 通りの卵白液 9 cc に 0.01% のアルカリ性プロテアーゼ溶液 1 cc 加えたものを酵素液として 1 cc とり、2% カゼイン基質 2 cc に対する水解作用を観察したところ第 4 表のごとく、3 の処理液のみにプロテアーゼ作用がみとめられた。すなわち酸性プロテアーゼのみがこのインヒビターを破壊することを知った。	
1	無 処 理	—	
2	中性プロテアーゼを作用	—	
3	酸性プロテアーゼを作用	+	
4	pH 3 処 理	—	

要 約

- (1) 液体培養又はタカジアスターゼより 3 種のプロテアーゼを濾紙電気泳動的に単一な標品としてとり出した。
- (2) 各種食品蛋白に 3 種のプロテアーゼ標品を作用させたが何れも蛋白水解を示すが、アルカリ性プロテアーゼが最大である。
- (3) アルカリ性プロテアーゼは生魚肉には作用が小さい。
- (4) アルカリ性プロテアーゼに対して卵白にはインヒビターが存在し、このインヒビターは高い pH では加熱により失活し、又酸性プロテアーゼにより破壊される。

本報告の要旨は昭和 32 年 4 月 11 日、日本農芸化学大会において発表した。

(1) 三浦勇吉：高峰研究所年報，6，14 (1954)。	(6) 中西一夫：日生化関東例会 (昭 32 年 3 月)。
(2) 安井恒男：日農化関東例会 (昭 30 年 1 月)。	(7) 奥貫一男，荻原文二：酵素化学シンポジウム，第 9 集 (1954)。
(3) 吉田文彦：本誌，28，66 (1954)。	(8) H. Lineweaver, C. W. Murray: <i>J. Biol. Chem.</i> , 171, 565 (1947)。
(4) 元永和生，三浦勇吉：日農化大会 (昭 31 年 3 月)。	(9) 松島欽一：日農化大会 (昭 32 年 4 月)。
(5) 荻原文二：標準生化学実験，207 頁。	