ニジマス消化酵素の研究—II.

Proteases

北御門 学・立野 新光

(1960 年 1 月 12 日受理)

STUDIES ON THE DIGESTIVE ENZYMES OF RAINBOW TROUT—II.
PROTEASES

Manabu KITAMIKADO and Shinkō TACHINO*

In succession to the previous report on carbohydrases¹⁾, the proteolytic actions of the extracts from the digestive organs were investigated in various growth stages of rainbow trout. And the following results were obtained.

(1) The hydrolysis of casein by the extract from stomach was proceeded in acid side (optimal pH was 2.8), and that from pyloric caeca or intestine in alkaline side (optimal pH was 9.5).—(Fig. 1)

(2) The proteolytic activity of the extract from stomach was conspicuous in the early stages, and the stomach extract of the younger stage (body weight about 12g.) showed an almost same activity as that found in the middle stage (body weight about 100g.). In the later stage (body weight about 1,000g.) the almost same activity was found.—(Table 2)

(3) On the other hand, the proteolytic activity of the extract from pyloric caeca and intestine was extremely low in the early stages (body weight less than about 4g.). It seemed that the activity increases with the growth of the fish, especially in the growth period from about 4 to 20g. of body weight. The highest activity was found in the extract of the middle stage, and after that the activity decreased gradually. The activity of the later stage was considerably low.—(Tables 1 and 2)

(4) The proteases of the digestive organs were active at relatively high temperatures (optimal temperatures were 40°~45°C), and lost markedly their activities at low temperatures.—(Fig. 2)

前報¹⁾の carbohydrase に引き続き本報では protease について報告する。

実験方法

1) 試料: 長野県水産指導所および滋賀県醒井養鱒場から分譲された養殖ニジマス並びに三重県近郊で集めたコイ、アユ、ウナギで前報¹⁾の(A)~(D)試料である。

2) 酵素原液: 試料(A)~(C); 胃のみは別に用意した 10~20 尾づつ (大型魚のみ 2 尾) の魚のものを 5 倍重量の 0.2% 塩酸で室温, 3 日間抽出して原液としたが, その他の個々の器官および全消化器官¹⁾については前報で用いた原液 (2 倍重量の 87% グリセリンと 3 倍重量の 1/10M 食塩水の混液で抽出したもの) を使用した。試料(D); 前報で用いた原液 (5 倍重量の 0.9% 食塩水で抽出したもの) を使用した。なお全原液は前報と同じく 1/10M 食塩水で希釈して使用した。

3) 抽出酵素液の蛋白分解力測定法: 1/25M の乳酸、磷酸またはアムモニウム塩緩衝液に加熱溶解後 pH 調節を行つた 0.6% のカゼイン溶液 5ml に, 酵素液 1ml を作用させて生ずるトリクロル 醋酸可溶の

* 三重県立大学水産学部 (Fac. Fish. Pref. Univ. Mie, Japan).

FOLIN 試薬呈色物質を測定し、反応液中に生成したチロシン量に換算して示した²⁾。

実験結果

1) ニジマスの各器官における protease の分布: 試料 (A) を用いた。Fig. 1 に示したように胃には酸性側で働く protease を、幽門垂と腸とはアルカリ性側で働く protease を認めた。また肝臓、脾臓等からの抽出液も蛋白分解作用を示したが、上記 3 器官からの抽出液と比較すると非常に弱いものであつた。例えば肝臓抽出液の蛋白分解力はその最適 pH 6.1 において pH 9.5 における幽門垂抽出液の分解力の約 1/25 に過ぎなかつた。

2) ニジマス protease の最適作用条件: 試料 (A) を用いた。Fig. 1 と 2 とに示したように使用条件下では胃の protease の最適 pH は 2.8 附近、最適温度は 35°~40°C 附近であり、幽門垂と腸とのものは pH 9.5 附近、45°C 附近であつた。なお Fig. 1 には作用時間 20 分での pH-活性度曲線を示したが、作用時間が 24 時間の場合には最適 pH は変わらないがそれからずれるほど活性度はより減少した。

Fig. 1. Effect of pH on the proteolytic activities of the digestive organs of rainbow trout.

Original enzyme solution was obtained by extracting ground digestive organ with 5 times weight of appropriate solvent, and diluted with 1/10M NaCl solution to 20 times volume. The solvent used for stomach was 0.2% HCl solution, for the other organs or for all digestive organs¹⁾ was the mixture solution of 87% glycerol and 1/10M NaCl solution (2:3). One ml of enzyme solution and 5ml of 0.6% casein solution were incubated at various pH and 20°C for 20 min., and the amounts of hydrolytic products of the protein were measured according to the colorimetric method with the phenol reagent of FOLIN and expressed as γ of tyrosine.

Fig. 2. Effect of temperature on the proteolytic activities of the digestive organs of rainbow trout.

The original extracts were diluted to 5,000 times volume. The experiments were carried out for 24 hrs at pH 2.8 by stomach extract, and at 9.5 by pyloric caeca, intestine or all digestive organs extract.

3) ニジマスの各生長段階における protease の強さ: 試料 (B) と (C) とを用いた。Table 1 と 2 とに示したように胃の protease は稚魚でもかなり存在したが、幽門垂と腸との protease が十分に存在する

のは相当大きな魚になつてからであつた。また amylase の場合と同様体重 1kg 近い大型魚では protease も衰えていた。

Table 1. Comparison of the proteolytic activities of the extracts from the all digestive organs¹⁾ in various growth stages of rainbow trout

Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1 with the exception of the enzyme solution. The fish were collected from Nagano prefecture (Exp. 1), and from Shiga prefecture (Exp. 2).

Experiment 1				Experiment 2			
(A) Body weight	(B) Weight of all digestive organs	(C) Activity* at pH 9.5	(D) $\frac{(B) \times (C)}{(A)}$	(E) Body weight	(F) Weight of all digestive organs	(G) Activity* at pH 9.5	(H) $\frac{(F) \times (G)}{(E)}$
1.7 g	0.16 g	23 γ	2.1	1.3 g	0.12 g	31 γ	2.7
4.7	0.46	29	2.9	3.9	0.34	44	3.8
11.3	1.2	56	5.9	11.9	1.1	95	8.8
18.4	1.6	149	13.3	15.6	1.3	151	12.6
123	8.9	224	17.0	88	8.2	240	22.4
960	68	175	10.7	980	70	208	21.7

* Proteolytic activity was expressed as γ of tyrosine.

Table 2. Comparison of the proteolytic activities of the extracts from stomach or from pyloric caeca and intestine in various growth stages of rainbow trout (collected from Shiga prefecture).

Enz. soln. (A) Body weight	Extract from stomach			Extract from (pyloric caeca + intestine)			(H) (D)+(G)
	(B) Weight of stomach	(C) Activity at pH 2.8	(D) $\frac{(B) \times (C)}{(A)}$	(E) Weight of (p.c. + in.)	(F) Activity at pH 9.5	(G) $\frac{(E) \times (F)}{(A)}$	
3.9 g	0.14 g	86 γ	3.1	0.14 g	57 γ	2.1	5.2
5.3	0.21	106	4.2	0.29	71	3.9	8.1
11.9	0.30	216	5.5	0.48	242	9.8	15.3
15.6	0.39	204	5.1	0.73	316	14.8	19.9
88	2.8	212	6.7	4.1	424	19.7	26.4
172	4.2	238	5.8	6.9	457	18.4	24.2
980	23.7	219	5.3	33	366	12.3	17.6

4) 他種魚の protease の強さとの比較: 試料 (D) を用いた。アルカリ性側で働く protease の強さを Table 3 に示したが、ニジマスはほぼ同体重のコイやウナギよりも強い protease をもつていた。そして魚種間の protease の強さの差異と、それらの食性との間には carbohydrase の場合のような関連性は見られず、むしろ運動性と関連性があるようであつた。

なおこの実験では全消化器官からの抽出液を用いたため、酸性側で働く protease の検討には不適當であつた。しかしニジマスとウナギの全消化器官抽出液は酸性でも活性を示し、かつウナギのものは使用条件下で 2.5 に最適 pH をもち、ニジマスのものの約 4 倍の強さを示した。コイとアユとの抽出液は酸性では殆んど活性を示さなかつた。

5) ニジマス protease による生魚肉と加熱魚肉との消化速度の差異: アジ肉を 10 倍量の 1/20 M 乳酸塩または磷酸塩緩衝液に懸濁し、ブレンダーで 5 分間処理、軽く遠心分離して泡を除いたものの pH を

Table 3. Comparison of the proteolytic activities of the extracts from the all digestive organs of various kinds of fishes

The experiments were carried out with the enzyme solution obtained by means of the dilution of original extracts to 40 times volume, at pH 9.5 and 30°C for 20 min.

Fish	(A) Body weight	(B) Weight of all digestive organs	(C) Optimal pH	(D) Optimal temp.	(E) Activity at pH 9.5	(F) $\frac{(B) \times (E)}{(A)}$
Carp <i>Cyprinus carpio</i>	191 g	12.1 g	10.0	55 °C	186 γ	11.8
Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i>	29.6	0.87	10.0	50	362	10.6
Eel <i>Anguilla japonica</i>	177	7.7	9.5	50	59	2.6
Rainbow trout <i>Salmo irideus</i>	172	13.6	10.0	50	312	24.6

2.8 と 7.8 (胃と腸との内液の pH) とに調節した。そのままの生基質, または沸騰水中に 10 分間浸した加熱基質懸濁液 20 ml (386 mg の粗蛋白含有) に試料 (C) の抽出液 (いずれも抽出原液を 20 倍に稀釈したもの) 2 ml づつを加えた。2% のトルオール存在下で, 胃からの抽出液は pH 2.8 で, 幽門垂と腸とを合せたものからの抽出液は pH 7.8 で 20°C, 24 時間作用させた。反応終了後 18% トリクロル醋酸 5 ml を加え, 30 分後濾過, トリクロル醋酸可溶性窒素量を KJELDAHL 法で測定した。対照実験値を差引いた結果, 胃の抽出液では数回の実験値を平均して生基質 81 mg を消化したのに対して加熱基質は 61 mg を消化しただけであった。一方幽門垂と腸との抽出液では生基質 136 mg に対して加熱基質 179 mg を消化した。従って加熱基質の消化速度は胃の酸性で働く protease による消化では減少したが, 幽門垂と腸とのアルカリ性で働く protease による消化では逆つて増大し, 他種魚の protease を用いて知られている結果と一致した。なおこの実験では基質魚肉を予め多量の緩衝液に懸濁してから加熱したので, 加熱後も蛋白は懸濁状態を保ち, 粒子がさほど大きくなつたとは思われなかつた。従つて魚肉をそのまま加熱凝固し粒子を大きくして供試すると, 胃の protease による消化速度はこの実験での値よりも低下することが予想される。

考 察

胃の protease と幽門垂または腸の protease とは種類が異なるものではあるが, この 3 つの器官からの抽出液のカゼイン消化力の和が魚の消化管内に存在する全 protease の強さと比例するとするならば, Table 2 の結果から体重 4g のニジマスの体重当りの全 protease の強さ¹⁾ を 1 とした場合体重 10g の魚のものは 2~3, 体重 100g の魚のものは 5, 体重 1,000g の魚のものは 3~4 となるようである。そして体重 4g 以下の魚のものは勿論 1 よりも小さい。すなわちニジマスの稚魚期に有する protease は成魚のものより非常に弱いと考えられ, 前報の amylase は稚魚期ですでに成魚とさほど差がないほど存在するのと非常に対照的である。従つて稚魚初期のニジマスはこのように弱い protease で以つて必要量だけの餌料蛋白を消化しなければならないわけで, 以上の比較値からだけでも稚魚初期に与えられる餌料蛋白がいかに消化のよいものでなければならないかを考えさせられる。一方ニジマスは稚魚初期にも相当強い amylase を有しているのであるから, この酵素を十分に活用できるような餌料組成が当然考えられてもよいのではあるまいか。なお大型親魚は稚魚ほどではないが食用を目的として養殖される 200g 位までの中型魚よりは protease や amylase がかなり衰えていることも, この期の魚の飼育に際して忘れてはなるまい。

胃の protease を見てみると Table 2 の結果で体重 3.9g のニジマスでもかなりの強さを有しており, また体重 12g になると一応成魚のものに近い強さまで発達しているようである。従つて胃の protease の発達経過は幽門垂と腸との protease の発達が非常に遅れるのとは異つている (第 III 報³⁾, Fig. 3 参照)。ま

た体重 1kg 近い大型魚となつても胃の protease は相当強く、幽門垂と腸との protease が衰えるほどには弱くならないようである。

一方幽門垂と腸との protease は稚魚期では成魚と比較して非常に弱い。そして Table 1 の実験 1 では体重 1.7g から 4.7g までの生長期間中にこの protease は殆んど増加していないし、実験 2 でも 1.3g から 3.9g までの生長期間には殆んど増加していない。これに対して Table 2 の試料では 3.9g から 5.3g までの生長期間中に急激な増加が認められた。従つてこの protease は体重約 4g までの生長期間は発達が悪く、4g から 20g までの生長期間に急激に発達して来るものと考えられる (第 III 報, Fig. 3 参照)。それから体重 100g 位までの生長期間にも徐々に強くなり、しばらく一定の強さを保つてから以後は逆に次第に衰えるものと思われる。従来ニジマスは秋稚魚 (体重約 4g) からの養殖が比較的容易であるといわれる原因の一つはこれまで生長した魚は幽門垂と腸との protease が速やかに発達して来るからではあるまいか。そして体重 12g 位になると胃の protease は殆んど完成され、また幽門垂と腸との protease も非常に強くなつていたので、ここから体重の急激な増大期に向うのであろう。

ニジマス消化器官内の protease の発達経過が以上のようなものであるために、胃の protease の強さは体重 4g の魚では幽門垂と腸との protease の強さの和にほぼ等しいのに、体重 10g の魚ではその 1/2, 100g の魚では 1/3 以下に当る (第 III 報, Fig. 3 参照)。従つて稚魚期の蛋白消化作用は成魚に比較して胃によつてゐる率が大いわけである。だからニジマスの稚魚に対しては、そのビタミンあるいは生長促進因子の破壊等は別として単に餌料蛋白の消化の難易というだけの観点からしても、胃の protease による消化を難しくするところの餌料蛋白の加熱凝固は注意すべき問題を含んでいよう。

また前報においても触れたようにニジマス protease の 24 時間消化における最適温度は胃のもの 35°~40°C, 幽門垂と腸のもの 45°C であり、amylase のそれが 25°C であるのと比較していずれも高い。そして amylase が低温でもよく作用するのに protease は活性度を著しく減ずる。amylase と protease との低温における活性度減少率の差は可溶性澱粉とカゼインとを基質とした場合にだけ見られるのではなく、実際にニジマスに与えられる餌料である小麦粉と魚粉とを基質とした場合にも同様に見られる。Table 4 に試

Table 4. Effect of temperature on the amylase and protease activities of rainbow trout.

Enzyme solution		Substrate	pH value used	Enzyme activity*		
				at 5°C (A)	at 20°C (B)	(A)/(B)
Amylase	Extract from (pyloric caeca + intestine)	Wheat flour**	7.4	40 mg	52 mg	0.78
	" intestine	Soluble starch	7.4	***	***	0.73
	" pyloric caeca	"	7.4	***	***	0.63
Protease	Extract from stomach	Fish meal	2.8	17	39	0.44
	" (pyloric caeca + intestine)	"	7.8	33	89	0.37
	" stomach	Casein	2.8	***	***	0.38
	" intestine	"	9.5	***	***	0.32
	" pyloric caeca	"	9.5	***	***	0.32

* Original enzyme solution was diluted to 4 times volume. Two ml of the enzyme solution and 20ml of 1/15M phosphate or 1/10M citrate buffer solution containing 1g of fish meal were incubated at 5°C or 20°C for 24 hrs in the presence of 0.25ml of toluol, and the amounts of digested protein were measured by KJELDAHL's method. On the other hand, 2ml of the enzyme solution and 20ml of 1/15M phosphate buffer solution containing 0.2g of wheat flour** were incubated in the same experimental conditions. The amounts of reducing sugar produced were measured by BERTRAND's method and expressed as mg of copper.

** The suspension containing wheat flour were immersed in boiling water bath for 10 min. and cooled, previously.

*** Calculated from the results of this and previous paper¹⁾

料 (C) の体重 88 g のニジマスの各消化器官からの抽出液の高温 (20°C) と低温 (5°C) とにおける澱粉分解力と蛋白分解力とを示した。従つてニジマスの *amylase* と *protease* との強さの比は稚魚と成魚とで異なるばかりでなく、同一個体においても環境水温によつて異なるはずである。だから高温と低温とでのニジマスの餌育では、魚の色々な代謝の差異とともにこの消化酵素の強さの変化も餌料組成あるいは投餌量の決定に際して考慮されるべき問題の一つであり、日中水温変化が激しい時期や冬期に水温が非常に低下する養魚池では特に餌料蛋白の不消化を起させないように注意すべきではなかろうか。

ニジマス餌料上の諸問題の最終的解決は魚の飼育試験の結果をまたなければならないことは勿論であるがここではその飼育試験実施についての参考にもなればと思い敢て以上の考察を加えてみた。

摘 要

1) ニジマスの胃には酸性で働く *protease* が、幽門垂と腸とにはアルカリ性で働く *protease* が認められた。

2) ニジマス *protease* の最適温度はカゼイン基質、24 時間消化において胃のもの 35°~40°C、幽門垂と腸とのもの 45°C であり、*amylase* の最適温度が 20°~25°C であるのと比較して非常に高かつた。また *amylase* は低温でもよく働くが *protease* は低温では著しく弱くなつた。

3) ニジマスの成魚はほぼ同体重のコイやウナギと比較してより強い *protease* をもつていた。

4) ニジマスの稚魚初期の *protease* は成魚と比べて非常に弱く、同期の *amylase* が成魚に近い強さであるのと非常に対照的であつた。

5) 稚魚初期の *protease* が弱いのは幽門垂と腸との酵素が特に弱いからで、胃の酵素はかなり存在していた。また大型親魚の *protease* が衰えているのも胃の酵素ではなく幽門垂と腸との酵素が特に弱くなつているからであつた。

終りに色々な御援助を賜つた長野県水産指導所の谷崎所長始め御一同様、並びに滋賀県醒井養鱒場の伊藤場長始め御一同様に心から御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 北御門 学・立野新光：本誌，26，679 (1960)。
- 2) 赤堀四郎編：“酵素研究法 II”，朝倉書店，p. 238 (1956)。
- 3) 北御門 学・立野新光：本誌，26，691 (1960)。