餌料蛋白の化學的研究

第三報 トリプシン消化に際しアミノ酸及び アンモニアの分離する速度に就て

富山哲夫・重松忍

(水産講習所) (九州帝大農藝化學教室)

Chemical Studies of the Proteins of Feeding-stuffs. III. The Rate
of Liberation of Amino Acid and Ammonia from the
Proteins of Feeding-stuffs during Tryptic Digestion.

Tetuo TOMIYAMA and Shinobu SHIGEMATSU

SYNOPSIS

This paper deals with the rate of digestion, as judged by the amino-N (van Slyke method) and the ammonia-N (Aeration method) liberated, when the proteins of feeding-stuffs were subjected at 38°C, and pH 8.6 to the action of commercial trypsin (Kahlbaum), fully activated by enterokinase. Our experiments were carried out upon three proteins, which were dealt with in the first report, viz., the muscle protein of sardine, the protein of silk-worm pupa, and the protein of soy bean.

The enzymatic production of amino-N and ammonia-N did not proceed in accordance with monomolecular reaction. The velocity constant of the proteolysis and ammonia formation attained a maximum value within 2 hours' digestion, then decreased gradually as time went on, and the ammonia formation was found to take place much less rapidly than proteolysis. Of the three proteins aforementioned, the muscle protein of sardine was digested with most ease, and the protein of silk-worm pupa was not digested as well as either of the other substrata. In the case of muscle protein of sardine and of soy bean protein, the tryptic hydrolysis was still in progress even after 7 days' digestion, though retarded more and more as time elapsed, while in the case of the protein of silk-worm pupa trypsin ceased to effect any further liberation of amino acid and ammonia after 3 days' digestion.

蛋白質をトリプシンにて水解する際に、アミノ酸を生成する以外にアンモニアをも生成することは一般に認められ、且トリプシン中に含まるゝ特殊の酵素によるものと推定される⁽¹⁾。アンモニアはアマイドより生成するか或はアミノ酸に由來するかは不明であるが、消化により生じたアミノ酸は吸収利用されるに反し、アンモニアは新陳代謝の終生産物であつて營養的效果は考へられない。従つて蛋白質の消化中に於ける之等形態の窒素の分離速度並に分離量はその營養價を決定する一因子と思考するゝを以て、著者等は主要なる餌料たる鰯、蠶蛹及び大豆の蛋白質に就て此研究を行つた。近時 VONK 氏⁽²⁾の研究によれば魚類の消化酵素

(1) HUNTER, H. and SMITH, R. G.: J. Biol. Chem., 62, 1924-25, 649.

LUCK, J. M.: Biochem. J., 18, 1924, 679.

(2) VONK Jun., H. J.: Z. wiss. Biol., 5, 1927, 445.

— : Z. vergl. Physiol., 9, 1929, 685.

の種類並に性質は殆ど陸上動物の消化酵素と大差ないものと認められるが故に、先づ市販トリプシンによる消化に就て研究した。

研究 方 法

反應系の成分としては次の如き材料を使用した。(1) 基質: 第一報⁽¹⁾に報告せると同一の供試蛋白質、即蠶蛹、鰯及び大豆の蛋白質を實驗に供した。(2) 緩衝液: 反應系の pH を一定に保つ爲に、豫備實驗に於て m/10 と m/5 との 2 種の硼酸鹽緩衝液 (pH 8.6) を使用し、上記の基質を 5% になる様に加へて 3 日間 38°C に放置せるに、初め pH 8.6 のものが pH 8.0 以下に變化することを認めた。次に m/5 硼酸緩衝液に 1m NaHCO₃ を等量混合したる溶液に於ては數日間 pH 8.6 に變化を認めなかつたので、この混合液を實驗に使用した。(3) 酵素: 豫備實驗に於て Kahlbaum 及び Grüber のトリプシンを pH 8.6 にて 38°C に 20 時間カゼインに作用せしめて其作用力を試験したるに、第 1 表の如く Kahlbaum のトリプシンが遙に強力であつたので之を實驗に供した。本研究に於て使用したエンテロキナーゼは次の如き方法によつて調製

第 1 表

	Kahlbaum-Trypsin	Grüber-Trypsin
	(+) (−)	(+) (−)
加水分解度%	30.6 22.3	14.5 14.7

した。即ち豚の小腸の上部 2m 以内の粘膜を採り、之をアセトンで脱水し、エーテルで處理して得た粉末を m/10 硼酸鹽緩衝液 (pH 8.6) にて室温に 1 時間浸出し、遠心分離して不溶物を去り、キナーゼ溶液として使用した。次に實驗に使用した Kahlbaum のトリプシンを完全に賦活するに要する該エンテロキナーゼの量は次の如き豫備實驗により決定しておいた。即ち基質を加へざる下記の反應系を 30°C に 1 時間放置し賦活したる後 2% カゼイン溶液を加へ 1 時間後スルフォザルチール酸を加へて反應を止めると同時に除蛋白し、濾液に就てアミノ-N を測定した (第 2 表)。この結果によれば使用せるトリプシン 0.1 gr は 0.05 gr のキナーゼ粉末に相當する浸

第 2 表

	m/10 硼酸鹽緩衝液 cc (pH 8.6)	H ₂ O cc	Trypsin cc	Entero- kinase cc	2% Casein cc	アミノ-N×2 cc
出液で充分賦活されるを以て、本實驗に於ける反應系	5	4.0	2	1.0 (0.02gr)	5	2.7
には斯様に處理したトリプ	"	3.5	"	1.5 (0.03gr)	5	2.8
シン溶液を使用した。	"	2.5	"	2.5 (0.05gr)	5	3.0
	"	0.0	"	5.0 (0.10gr)	5	3.0
反應系を下記の如き配合	"	5.0	"	0	5	2.5
とし、同一蛋白質に就て主	"	10.0	"	0	0	1.1
	"	5.0	"	5 (0.10gr)	0	1.1

實驗と蛋白-Control とを夫々 4 個のフラスコに配合し、同時に各種蛋白に共通なる酵素-Control もも設けた。

I 主 實 驗 1gr 供試蛋白+20 cc 緩衝液+2 cc 賦活トリプシン

II 蛋白-Control 1gr 供試蛋白+20 cc 緩衝液+2 cc H₂O

III 酵素-Control ——— 20 cc 緩衝液+2 cc 賦活トリプシン

之等の各フラスコには 0.5% となる様に Trieresol (Kahlbaum) を加へ、38°C の定溫器

(1) 富山哲夫: 本誌, 2 (5), 1934, 258.

に入れ、反応後 2, 24, 73, 163 時間目に夫々鹽酸とスルフォールチール酸とで反応を止め、濾液に就てアミノ-N を van Slyke 法により、又アンモニア-N を通氣法⁽⁴⁾により定量した。尙 pH 3.6 にて 38°C に放置する際にアンモニアの散逸を免れない故、豫備實驗に於てフラスコの氣相中のアンモニアを反應中絶えず捕集せるに、その量は僅少で實驗誤差内である事を確かめたので本實驗には單に密栓を施すに止めた。

實驗結果

各測定時間に於ける主實驗の値より夫々蛋白及び酵素の Control を控除し、消化によつて生じたアミノ-N 及びアンモニア-N の分離量を供試蛋白の全窒素に對する百分率にて示せば第 1 圖乃至第 3 圖の如く、又 20% HCl による供試蛋白の完全水解物のアミノ-N 及びアンモニア-N に對する百分率を圖示すれば第 4 圖の如くである。

之等のトリブシンによる分解過程を一分子反應の式にて處理すれば第 3 表の如き結果となり、一般の酵素反應の如く該酵素による各種蛋白よりのアミノ-N 及びアンモニア-N の分離速度恒数は反應の初期に於て著しく大なる値を示し、時間の経過と共に減少する。

3 種の餌料蛋白に就て比較するに、アミノ-N 分離の速度は鰹肉蛋白最も大で、大豆蛋白、蠶蛹蛋白の順に減少する。上述の反應條件の下に 7 日間の消化に於て達した水解量は各種供試蛋白の完全水解物中のア

ミノ-N 100 に對し夫々鰹肉蛋白 35, 大豆蛋白 33, 蠶蛹蛋白 24 で、前 2 者に於ては尙分解の増加を示し、蠶蛹蛋白に於ては殆ど反應は停止状態を示した。次にアンモニア分離の速度

(4) VAN SLYKE and CULLEN: J. Biol. Chem., 19, 1914, 211.

第 3 表

 x = アミノ-N 或はアンモニア-N の生成量 a = 供試蛋白の酸水解物中のアミノ-N 或はアンモニア-N の量

AMINO-N

AMMONIA-N

t hours)	Amino-N (mg.)	x	$a-x$	$K = \frac{t}{a-x} \ln \frac{a}{a-x}$	t (hours)	Ammonia-N (mg.)	x	$a-x$	$K = \frac{t}{a-x} \ln \frac{a}{a-x}$
大豆蛋白 $a = 94.806$					大豆蛋白 $a = 13.718$				
0	0.604	—	—	—	0	0.321	—	—	—
2	4.290	3.686	91.120	0.01982	2	0.720	0.299	13.419	0.01098
24	20.335	19.731	75.075	0.00972	24	1.415	1.094	12.624	0.00348
73	25.473	24.869	69.937	0.00416	73	2.462	2.141	11.577	0.00237
163	32.173	31.569	63.237	0.00248	163	2.832	2.511	11.207	0.00124
鰯肉蛋白 $a = 110.771$					鰯肉蛋白 $a = 8.227$				
0	0.544	—	—	—	0	0.198	—	—	—
2	7.753	7.209	103.562	0.03366	2	0.486	0.288	7.939	0.01781
24	27.011	26.467	84.304	0.01138	24	1.040	0.842	7.385	0.00450
73	33.866	33.333	77.438	0.00490	73	1.430	1.232	6.995	0.00222
163	39.263	38.719	72.052	0.00264	163	1.941	1.743	6.484	0.00146
蠶蛹蛋白 $a = 97.225$					蠶蛹蛋白 $a = 13.506$				
0	0.895	—	—	—	0	0.321	—	—	—
2	4.769	3.984	93.241	0.02087	2	0.324	0.003	13.503	0.00115
24	15.670	14.885	82.340	0.00692	24	0.606	0.285	13.221	0.00089
73	22.057	21.272	75.953	0.00338	73	1.122	0.801	12.705	0.00084
163	23.951	23.166	74.059	0.00167	163	1.305	0.984	12.522	0.00046

恒数はアミノ酸分離のそれよりも小であつて、3種の蛋白を比較するに鰯肉蛋白と大豆蛋白とは大差なく、蠶蛹蛋白に於ける該速度恒数は前者に比し遙に僅少であつた。而して3種蛋白の同一量より分離生成せるアンモニア量に就ては（第1圖乃至第3圖）大豆蛋白に於て多量で鰯肉蛋白に於て少いのは質量作用に因るものと考へられるが、蠶蛹蛋白ではそのアマイド-Nが鰯肉蛋白よりも多く大豆蛋白と殆ど同量含有するに關らずアンモニアの生成量は他の2者よりも少く特異的の現象を示した。

以上の實驗はトリプシンを以て行つたものであるが、エンテロキナーゼ粉末中に多少のエレプシンを含有すべきを以て後者も幾分消化作用に關與した事を認めねばならぬ。

總 括

1) 完全に賦活したる Kahlbaum トリプシンを以て pH 8.6, 38°C にて鰯肉蛋白、蠶蛹蛋白、大豆蛋白を水解し、その際生成するアミノ-N 及びアンモニア-N を 2, 24, 73 及び 163 時間後に測定しそれ等の分離速度を比較した。

2) アミノ-N 及びアンモニア-N の分離反應は 1 分子反應に従はない。反應速度恒数は反應の初期には著しく大なる値を示し、反應の進行と共にその値は暫時小となる。鰯肉蛋白及び大豆蛋白に於ては反應後 7 日目に於ても尙分解は多少進行するに反し、蠶蛹蛋白に於ては反應後 3 日目に於て既に平衡を呈した。

3) 3種の餌料蛋白質より遊離せるアミノ-N の量は之等蛋白の全窒素に對する百分率に於ても又之等蛋白中に存在する全アミノ-N に對する百分率に於ても鰯肉蛋白の場合最も多

く、大豆蛋白、蠶蛹蛋白の順に減少を示した。又遊離せるアンモニア-N 量は 3 種の蛋白質の全窒素に對する百分率に於ては大豆蛋白最も多く、蠶蛹・鰻の蛋白には殆ど差はないが、蛋白中に存在するアミド-N に對する百分率に於ては大豆蛋白と鰻肉蛋白とは大同小異であるに對し蠶蛹蛋白では遙に前 2 者より少い。

本研究は恩師奥田讓教授の懇篤なる御指導の下に行つた。擧筆するに際し茲に深謝の意を表す。

(昭和 8 年 12 月 10 日)