99. 福田幸平：蛋白酵素分解物の薬学的研究（第3報*）膵臓プロテアーゼ抽出液によるカゼインの加水分解過程におけるアミノ酸の遊離度並びに二次的分解 その1

Kouhei Fukuda: Pharmaceutical Studies on Enzymatic Hydrolysates of Proteins. III. Rate of Liberation and Hydrolysis of Amino Acids during the Pancreatic Digestion of Casein. (1).

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa**)

膵臓プロテアーゼ抽出液によるミルクカゼインの加水分解過程における二、三の必須アミノ酸の遊離度及びその二次的分解などについて検討し、蛋白酵素分解物製剤の製法並びにその組成に対する考察を行った。従来蛋白質の酸又はアルカリ分解におけるアミノ酸の二次的分解¹⁾、或はペプシン又はトリプシン等によつて蛋白質より遊離されるアミノ酸に関しては本研究第1報²⁾において既に述べた如く多くの研究があるが、蛋白酵素分解物製剤と関連のある膵臓抽出液による蛋白質の酵素分解に関する研究は未だ少い。本研究においては、特に蛋白酵素分解物製剤の製法として現今用いられている膵臓のプロテアーゼ抽出液によりカゼインの酵素分解を行い、その際のアミノ酸の変化を検討した。即ち必須アミノ酸であると共に細菌や空気酸化、或は化学試薬などにより分解され易いスレオニン、メチオニン、トリプトファンの各々について、遊離アミノ酸と結合型アミノ酸とを区別して定量し、酵素分解の過程における夫々の量的変化を観察した。本報ではスレオニンに就いて行つた結果を報告する。

先づ豚の膵臓よりプロテアーゼを水で抽出し、これにトリプシンを添加して活性化し、この抽出液によりカゼインの酵素分解を行つた。そしてその過程における加水分解時間の異なる各酵素分解液について夫々スレオニンの定量を行つた。スレオニンの定量は Shinn, Nicolet³⁾ の方法によつたのであるが、先ず遊離スレオニン量は、酵素分解液に過ヨウ素酸を作用させスレオニンよりアセトアルデヒドを発生させ、これを酸性重硫酸ナトリウム溶液に吸収せしめヨウ素滴定を行つて求めた。又総スレオニン量は酵素分解液を20%塩酸で24時間加水分解した後、塩酸を減圧で可及的に除き中和して液量を一定にした後、これに過ヨウ素酸を作用させ、以下同様にして定量を行つた。酵素分解過程における遊離スレオニン量、総スレオニン量、並びに加水分解度を(α -amino-N/total-N%)測定した結果は Table I の如くであつた。又加水分解度とスレオニンの遊離度の関係をグラフで示せば Fig. 1 の如くなる。そして此等の結果より、膵臓のプロテアーゼ抽出液によるミルクカゼインの酵素分解においては加水分解度63%のときには総スレオニンの82%が遊離され、又この12日間の酵素分解においてはスレオニンの顕著な二次的分解の起らないこと等が明かである。尚ここで注目すべきは総スレオニン量の変化である。即ち酵素分解開始時における総スレオニンの定量値は12日間酵素分解後の試料における定量値より

Table I

Days of digestion	Extent of hydrolysis ($\frac{\alpha\text{-Amino-N}}{\text{Total-N}}\%$)	Free threonine (mg./5 cc.)	Total threonine (mg./5 cc.)	% Threonine liberated
0	13.3	0.61	7.20	8
0.5	39.1	3.11		
1	45.7	3.90	7.61	51
2	54.6	5.06		
3	56.8	5.74	7.69	75
5	60.6	6.48		
8	62.6	6.60	8.05	82
12	63.0	6.67	8.10	82

* 第2報：本誌 73, 248 (1953).

** Tsuchitoriba-nagamachi, Kanazawa.

1) Martin, Syngé: Advances in Protein Chemistry II, 10.

2) 第1報：73, 245 (1953).

3) Shinn, Nicolet: J. Am. Chem. Soc. 61, 1615 (1939).

Fig. 1

— : $\frac{\text{Free threonine}}{\text{Total threonine}}\%$
 - - - : $\frac{\alpha\text{-Amino-N}}{\text{Total-N}}\%$

られる。

終りに本研究に終始御指導を賜った京都大学高木誠司教授、鈴木友二教授、並びに金沢大学平本実教授に厚く感謝する。尙本研究費の一部は文部省科学研究費に依つた。ここに謹謝する。

実 験 の 部

(1) 分析用酵素分解液の調製 屠殺直後氷冷した新鮮な豚の脾臓からこれに附属する脂肪を可及的に除き細切した後、その 50 g を乳鉢で清潔なガラスの微細片と共によく磨りつぶす。これに 50 cc の蒸留水を加えて暫時攪拌後、布で濾過し残留物を再び蒸留水で抽出濾過し、かくして得た乳濁液を脾臓プロテアーゼ抽出液とし、これにトリプシン (メルク) 10 mg を活性化剤として添加する。一方、市販の化学用ミルクカゼイン 50 g を水酸化ナトリウムを用いて約 pH 8.4 で出来るだけ溶解させ、この基質懸濁液 (約 900 cc) に前述の脾臓抽出液を混じり全容を 1 L にすると共にキンヒドロン電極を用いて pH 8.4 に調整する。次に良く攪拌し乍らこの懸濁液 100 cc づつを器壁につかぬ様に 10 個のフラスコに分けその各々にトルオールを加え締栓して 37° の孵卵器中で酵素分解を行う。一定の時間間隔毎にフラスコを孵卵器より 1 個づつ取り出し中和後、水浴上で 90°、10 分加熱して酵素作用を破壊し、夫々加水分解時間の異なる酵素分解液を得た。尙加水分解度の測定において、マイクロバンズライク氏法による α-アミノ窒素の定量には酵素分解液 2 cc をメスフラスコで 10 cc に稀め、その 1 cc を用いた。又総窒素は酵素分解液各 1 cc についてマイクロケルダール氏法により定量し、総窒素、α-アミノ窒素の両者の比より加水分解度を求めた。

(2) 総スレオニンの定量 上述の如くにして得た加水分解時間の異なる夫々の酵素分解液について、その 25 cc をピペットで正確にとり、これに濃塩酸 30 cc を加え還流冷却器を附し砂浴上 24 時間加熱して加水分解する。次にこれを湯浴上で減圧濃縮後、蒸留水 25 cc を加えて再減圧濃縮し、同様操作を 3 回繰り返して可及的に塩酸を除去した後、若干の水を加えて重炭酸ナトリウムで中和し 25 cc のメスフラスコ中へ定量的に移し全容を 25 cc とし、トルオールを加え定量用試料として保存する。次に Shinn, Nicolet³⁾ の方法に従つて、これらの総スレオニン定量用試料 5 cc、1 mol 重炭酸ナトリウム 5 cc、0.1 N 亜硫酸ナトリウム 10 cc を Fig. 2 の如きスレオニン定量装置 C に入れ、D 及び E には 2% 酸性亜硫酸ナトリウム液を夫々 5 cc 及び 3 cc 入れ、水を加えて 25 cc とする。C の分液ローットの活栓をとじ、ローット内に約 0.5 mol 過ヨウ素酸液 2 cc を入れ、炭酸ガス発生装置を連絡した後活栓を開き反応を起こさせると同時に炭酸ガスをかなり激しく通ずる。炭酸ガスを通ずる速度は 1 分間約 1 L で、予め A の硫酸銅及び B の重炭酸ナトリウム飽和液で洗う。1 時間炭酸ガスを通じた後 D 及び E の内容を合し濃粉試液数滴を加えて微青色を呈するまで 0.1 N ヨウ素液を加える。次に飽和重炭酸ナトリウム液 10 cc を加えて 0.02 N ヨウ素液滴定する。0.02 N ヨウ素液

Fig. 2

4) H. Brockman : Ber. 84, 260 (1951).

5) Brand : J. Am. Chem. Soc. 67, 1524 (1945).

1 cc はスレオニン 1.19 mg に相当する。

(3) 遊離スレオニンの定量 前述の (1) で得た酵素分解時間の異なる夫々の酵素分解液について、その 5 cc をビベットで正確にスレオニン定量装置 C に入れ、後は (2) と同様に Shinn, Nicolet の方法に従って遊離スレオニンを定量した。

金沢大学薬学部

Summary

Protease was extracted with water from hog pancreas, activated with trypsin, and the extract was used for the enzymatic hydrolysis of casein. The hydrolysis rate (α -amino-N/total-N, %) was determined with samples taken out at definite intervals, as well as free threonine and total threonine by the Sinn-Nicolet method, by which the rate of threonine liberation and decomposition during enzymatic hydrolysis were examined. The results are shown in Table I, and the relationship between the rate of threonine liberation and hydrolysis rate is shown in Fig. 1. In the determination of total threonine, hydrolysis with 20% hydrochloric acid results in an easier decomposition of threonine in peptide bond than free threonine. It is assumed that the hydrolysis by heating with 20% hydrochloric acid for 24 hours results in over 11% of threonine in casein being decomposed.

(Received December 26, 1952)

100. 福田幸平：蛋白酵素分解物の薬学的研究（第4報）膵臓プロテアーゼ抽出液によるカゼインの加水分解過程におけるアミノ酸の遊離度並びに二次的分解 その2

Kouhei Fukuda: Pharmaceutical Studies on Enzymatic Hydrolysates of Proteins. IV. Rate of Liberation and Hydrolysis of Amino Acids during the Pancreatic Digestion of Casein. (2).

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa)

前報に引続き、膵臓プロテアーゼ抽出液によるカゼインの酵素分解過程におけるメチオニン及びトリプトファン¹⁾の遊離度並びに二次的分解について検討した。本報においては、先ず Chow, Allison¹⁾等の報告を参照して豚の膵臓よりプロテアーゼ抽出液を調製し 0°, pH 7.8 に 72 時間保つて酵素を活性化し、これを用いてカゼインの酵素分解を行つた。そしてこの過程における一定時間の各酵素分解液について加水分解度 (α -amino-N/total-N %) を測定すると同時に、遊離メチオニン、総メチオニン及び遊離トリプトファン、総トリプトファンの定量を行つた。メチオニンの定量は Lavine²⁾の方法によつた。即ち遊離メチオニン分子中のチオエーテル結合は pH7 においてヨウ素と反応して periodide を作り、ついで pH 1 にすれば可逆的に periodide からヨウ素を遊離するのでこのヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定する。又一方、別に試料の一部をとりその中のメチオニンをヨウ素酸カリウムで酸化して sulfoxide とすれば最早上記の反応は行われなくなるから、試料をこの様に処理した後³⁾に上と同様に操作して空試験を行い両者の差から試料中のメチオニン量を求める。本法は遊離メチオニンに特異的な定量法でペプチド結合中のメチオニンは上記の反応を示さない事が証明されている³⁾。総メチオニンの定量は一定量の試料を 20% 塩酸で加水分解した後、塩酸を減圧で溜去し中和後、遊離メチオニンと同様の方法で定

1) B. F. Chow, J. B. Allison: J. Nutrition **36**, 232 (1948).

2) T. F. Lavine: J. Biol. Chem. **151**, 281 (1943).

3) B. Bakay, G. Toennies: J. Biol. Chem. **188**, 1 (1951).