

魚類プロテアーゼに関する研究—VII.

ビンナガ鮪及び鯷幽門垂プロテアーゼの酵素化学的性質 (II)*

作用力の比較及び作用力に及ぼす防腐剤 (5-nitro-2-furfural-semicarbazone: Chlortetracycline) の

影響に就いて

藤 井 実

Studies on the Protease of Fishes—VII

On the Enzymatic and Chemical Properties of the Protease in Pyloric Appendage of Albacore *Thunnus alalunga* and Sardine *Sardinops melanosticta* (Part II)

Comparison of Proteolytic Activity of Pyloric Appendage of Albacore and Sardine with that of Trypsin-preparation and Influence of Antibiotics as 5-nitro-2-furfural-semicarbazone and Chlortetracycline on the Proteolytic Activity

By

Minoru FUJII

Proteolytic activity of powder preparation from pyloric appendage of albacore was stronger than that of trypsin-preparation from sardine and pancreas of pig.

Influence of antibiotics as chlortetracycline (aureomycin) on the proteolytic activity of pyloric appendage of albacore was stronger than that of 5-nitro-2-furfural-semicarbazone (furaskin) : decrement of proteolytic activity by means of aureomycin was ca. 24 % in concentration of 30 % ppm, ca. 31 % in concentration of 50 ppm under the conditions of temperature of reaction : 40°C, time of reaction : 1 hour ; and in case of furaskin decrement of proteolytic activity was ca. 14% in concentration of 50 ppm under the conditions of temperature of reaction : 35°C, time of reaction : 24 hours.

ビンナガ鮪及び鯷幽門垂より製した粗酵素標品の作用力を、市販トリプシン標品の夫と比較し、5-nitro-2-furfural-semicarbazone (フラスキン…F.と略す) や Chlortetracycline (オーレオマイシン…AM. と略す) のような抗菌性物質が該酵素作用に及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

* 水産講習所研究業績 第214号

実 験 の 部

1) 試料粗酵素標品と市販トリプシン標品との作用力の比較

鮪及び鯷酵素試料及市販酵素標品の0.2 gにpH 8.5緩衝液 20 ccを添加し常温で1時間抽出し遠心分離により得る上澄液の一部を酵素試料として用い酵素液 1 ccに対する作用力を検し、別に一部の酵素液を使つてその蛋白態窒素を測定し蛋白態窒素 1 mg に対する作用力を算出した。(第1表, 第2表) 又鯷とトリプシン剤の比較を大島¹⁾ 氏法で測定した。(第3表)

Table 1. Comparison of proteolytic activity of pyloric appendage of albacore and sardine with that of trypsin preparation.

Conditions: Temp. of react. 40°C., Time of react. 1 hr., substrate. casein.

Sample	Proteolytic activity / 1cc of (Nitrogen-mg × 10 ⁻³) / enzyme solution	Proteolytic activity / 1mg of protein- (Nitrogen-mg) / nitrogen.
Albacore	14417.3	54.97
Sardine	6932.5	64.73
Trypsin	12243.5	68.55

Table 2. Content of protein-nitrogen in 1cc of enzyme solution extracted from 0.2g of powder of pyloric appendage with 20cc of buffer solution of pH 8.5.

Albacore (N.-mg × 10 ⁻³)	Sardine (N.-mg × 10 ⁻³)	Trypsin-preparation (N.-mg × 10 ⁻³)
262.26	107.16	178.60

Table 3. Comparative proteolytic activity of powder of pyloric appendage of sardine with that of trypsin preparation by means of Oshima's method

Conditions: Temp. of react. 35°C., time of react. 1hr., substrate. casein.

Division pH	Comparative activity of pyloric appendage of sardine	Comparative activity of trypsin preparation
8.2	1150	1500
8.5	1250	2500

次に鮪標品の pH 5 及び 8.5 の条件に於ける作用力を同条件に於てトリプシン標品と比較して第4表の結果を得た。

Table 4. Comparison of proteolytic activity of pyloric appendage of albacore with that of trypsin preparation.

Conditions: Temp. of react. 40°C., time of react. 1hr., substrate. casein.

Sample	pH 5	pH 8.5
	Proteolytic activity (Nitrogen-mg × 10 ⁻³) / 1 cc of enzyme-solution	
Albacore	6037.0	10302.5
Trypsin	4197.5	9895.0

又両酵素試料0.05 gにpH 8.5の緩衝液50 ccを添加して得た上澄液2 ccを用いて18時間反応させた場合の作用力の比較を行つたが、其の結果は第5表の示す通りである。尙此の場合飽和F液10cc及びトルオール5 ccを添加して細菌の汚染を防止した。

Table 5. Comparison of proteolytic activity of pyloric appendage of albacore with that of trypsin preparation.

Conditions: Time of react, 18 hrs., temp. of react 40°C.

Sample	Proteolytic activity (Nitrogen-mg $\times 10^{-3}$) / 1cc of enzyme solution
Albacore	2949.3
Trypsin	2267.8

以上の諸実験結果から次のことが考えられる。大型魚であるビンナガ鮪の幽門垂プロテアーゼは小型魚である鱈の夫よりも強力な作用力を有する。而も此の実験では豚のような陸棲動物の内臓から製造された酵素剤よりも強力な値を示した。これに対して蛋白態窒素1 mgに対する作用力はトリプシン製剤に対して魚類酵素試料は80~90%前後の値を示した。鮪試料の蛋白態窒素は他の二者のいづれよりも多く従つて1 mg当りの作用力は逆に低下した。鱈の場合1 cc当りの作用力は一番弱かつたが1 cc中の蛋白態窒素も一番低い値を示したので1 mgに対する作用力は鮪の夫より大となつた。又反応溶液のpHが作用力に及ぼす影響をみるにpH5の場合鮪に於てはpH8.5の場合の作用力の60%を保有した。これに対しトリプシン製剤ではその影響が著しく作用力は40%に低下した。この点からトリプシン製剤は相当に所謂不純蛋白質を除去せられているためpHに対し非常に鋭敏になつていたのであろう。これに反し魚類酵素標品がpHに対し抵抗力強く又長時間の反応に於てトリプシン製剤の作用力を凌駕したことは魚類プロテアーゼが陸棲動物プロテアーゼよりもpHの変化及び温度に対して強い抵抗力を有するためであるとか、或は試料中の混在物のプロテアーゼ作用力に対する保護的作用に依るもの等考えられるがこの点は後日の研究に譲る。

2) 抗菌性物質の影響

魚類プロテアーゼ作用に対する抗菌性剤の影響に就ては未だ研究報告がないようである。著者は実用的見地からフラスキン及びオーレオマイシン両剤のプロテアーゼ作用力に及ぼす影響を実験した。

a) フラスキンの影響に就いて

試料として鱈幽門垂粉末を用い此の水抽出液にF. 飽和液10 ccを添加し全反応液を50ccとなし(Fの濃度: 1/20,000) 所定のように処理して第6表の結果を得た。

Table 6. Influence of Furaskin on proteolytic activity of pyloric appendage of sardine, Conditions: Temp. of react. 35°C., time of react, 24 hrs.

pH		7	8	8.5
Non add. F. (A)	NH ₂ -N, mg $\times 10^{-3}$	136.6	194.6	225.3
Add. (50ppm) F. (B)		130.9	174.1	193.5
Decrement of activity (A) - (B) / (A) $\times 100$		4.0	10.5	14.1

即ち此の表から酸性側に於て F (50 ppm) の添加無添加両区とも作用力に於いてあまり差異がみられないが、アルカリ側に於て添加区は無添加区に比し約10~14%前後の作用力減を来していることを知る。

b) オーレオマイシンの影響に就いて

0.1% AM 溶液を反応液に適量添加して反応液に於ける其の濃度が夫々20, 30及び50 ppm になるようにして無添加の対照区と作用力を比較した。試料として鮪幽門垂粉末を用いて、作用時間を1時間とした。実験結果は第7表の示す通りである。

Table 7. Influence of aureomycin on proteolytic activity of pyloric appendage of albacore.
Conditions: Temp of react. 40°C., time of react. 1hr.

AM. Concentration ppm	20	30	50	Control Non-add. AM.
Soluble-total-nitrogen mg $\times 10^{-3}$	264.7	190.2	171.7	248.8
Decrement of activity %	—6	23.5	30.9	

第7表の示す所に依ると 20 ppm のような低濃度の場合短時間のためか殆ど影響しないように見えるが、30 ppm以上になると相当強く抑制的影響をあたえる。即ち30 ppmの場合約24%減、50 ppmの場合約31%減を示した。

上述のように2つの抗菌性物質のプロテアーゼ作用に対する抑制的影響は両者に対する実験条件がやや異なるので厳密な意味での比較は出来ないが、AMが強いことは推定出来る。此の実験的事実はAMが魚肉の鮮度保持に著効をあげている事実の科学的裏付をなすものであろう。

即ち魚肉プロテアーゼ作用を抑制することに依り魚肉蛋白の変質を遅延する事実⁽²⁾ (未発表) から従つて細菌の附着繁殖を妨げ、更に細菌のプロテアーゼ系酵素活動をも抑制することによりAM処理の魚肉は細菌に対し二重に安全に保護されるものと考えられるからである。

総 括

1) 鮪幽門垂よりの粗蛋白酵素標品の水抽出液の作用力は市販のトリプシン製剤の夫より強力であつた。又酸性側に於ける (pH 5) 作用力及び長時間の反応に於ても同様な結果であつた。併し酵素液中の蛋白態窒素 1 mg に対する作用力はトリプシン製剤の80%程度であつた。

2) フラスキン、オーレオマイシンのような抗菌性製剤を添加した場合該酵素に対する影響はフラスキンの場合 (濃度: 50 ppm) 24時間の反応に於て pH 8.5 のとき約14%の減少であるが pH 7 では4%の減少を示した。これに対しオーレオマイシンの場合、反応時間1時間に於て pH 8.5 では30 ppm の濃度に於ては約24%、50 ppm の濃度に於ては実に31%の阻害作用を受けたが20 ppm の場合は反応時間が1時間だつたためか其の影響は殆ど現れなかつた。

(此の論文の一部は1956年の日本水産学会秋季大会に於て発表したものである)。

文 献

- 1) 大島 幸吉: 1950. 水産化学実験法. p. 325.
- 2) 藤井 実・富田輝雄: 魚肉の変質に関する研究 (2). 未発表.