

魚類プロテアーゼに関する研究 (第3報).  
鯷幽門垂プロテアーゼの酵素化学的性質に  
就いて (其の1)\*

藤井 実. 富田 輝雄. 江良 至徳

Studies on the Protease of Fishes (3).

On the Proteolytic and Chemical Characters of the Enzyme in Pyloric Appendage of Sardine (Part 1).

Minoru FUJII, Teruo TOMIDA and Shitoku ERA

We studied on the influence of inorganic acid, salt of HCL and organic solvents to the proteolytic action of pyloric appendage of sardine and on the solubilities of this enzyme to water, and also we calculated the velocity constant for this enzyme. Results obtained are as follows.

- 1) The proteolytic action of preparations made from pyloric appendage of sardine is completely inhibited at lower than pH 1.4 by adding inorganic acid such as sulphuric or hydrochloric acid.
- 2) The proteolytic activity of this enzyme is inhibited proportional to the concentration of salt such as NaCl or KCl, but 40 % activity is remained against the concentration of 30 % NaCl.
- 3) The organic solvent such as ethylalcohol or acetone inhibites the activity of this enzyme, yet the existence of 30 % solvent in reaction solution remains 30 % activity of this enzyme.

The activity of the immersed tissue, in acetone of various concentrations from 90 to 100 % for less than 5 minutes, remains perfectly.

- 4) The velocity constant for this enzyme conforms to the reaction of the first order for short time—less than 180 minutes—, but it decreases in more than 180 minutes.

鯷幽門垂プロテアーゼの無機酸, 無機塩類, 有機溶媒等により受ける影響, 水に對する溶解度合い並に反應速度恒數等に就き實驗を行つたのでその結果を報告する。

(1) 無酸機の影響に就いて

硫酸の影響: 粉末試料 0.05g を含む反應液に $N/10$ 硫酸液を 1, 2, 4, 6, 8 及び10cc加えてPHを種々變化せしめプロテアーゼ作用力を測定した結果は第1表の如くである。

---

\* ) 水産講習所研究業績番号 第56号

Table 1. The Influence of Sulphuric Acid on the Protease  
(Sample : Powder 0.05g, Time and Temp. of Reactn. 24hrs, 35°C)

Added <sup>N</sup> / <sub>10</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (cc)	1	2	4	6	8	10
PH in Reaction Sol.	4.7	4.2	3.4	2	1.6	1.4
Amino-N. (cc)	0.09	0.06	0.06	0.03	0.03	0

尙塩酸の影響に就いて硫酸の場合と同じ方法により実験を行つたが全く同じ結果を得た。

(2) 無機塩の影響に就いて

(A) 食塩の影響

魚肉の塩蔵或は塩辛の製造等に於て防腐の目的を以て多量の塩が添加されるが、之が魚体のプロテアーゼ或は魚肉蛋白分解の目的で添加されたプロテアーゼに對する影響に就いては未だ定量的な報告を知らない。よつて我々は反應液が夫々1, 5, 10, 15, 20, 25及び30%の濃度となる様に化學的純粹な食塩を添加して其の影響を検討し、第2及び3表の結果を得た。

Table 2. The Influence of NaCl on the Protease.  
(Sample: Powder. 0.05g. Time and Temp. of Reactn. 30hrs. 35°C, PH8.3)

NaCl (%)	0	5	10	15	25	30
Amino-N. (cc)	0.97	0.61	0.51	0.49	0.38	0.38
Activity (%)	100	63	53	51	39	39

Table 3. The Influence of NaCl on the Protease.

NaCl (%)	0	1	10	20	30
Amino-N. (cc)	0.62	0.56	0.42	0.33	0.27
Activity (%)	100	90	68	53	43

(B) 塩化カリの影響

更に塩化カリを 5, 10, 15, 20, 25 及び 30%の濃度になる様に添加した場合の結果は第4表の如くである。

Table 4. The Influence of KCl on the Protease.  
(Sample: Powder 0.02g. Time and Temp. of Reactn. 41hrs., 30°C, PH 8.3)

KCl (%)	0	5	10	15	20	25	30
Amino-N. (cc)	0.41	0.26	0.23	0.23	0.20	0.18	0.17
Activity (%)	100	63	56	56	49	44	41

第 2, 3 及び 4 表の示す如く食塩, 塩化カリの濃度が 1%程度の場合プロテアーゼ作用力は殆どその影響をうけないが 5% 添加では約40%, 10% 添加に於ては約 50%の作用力

魚類のプロテアーゼに関する研究(2)

の減少を來す。しかもそれ以上25~30%の添加に於ても尙40%程度の作用力を維持している。従つて塩藏肉や塩辛製品の如き食品に於ては相當高濃度の食塩の添加にも拘らず尙相當のプロテアーゼ作用力を保持しているものと考えられる。

(3) 有機溶剤の影響について

(A) エチルアルコールの影響

エチルアルコールの諸濃度下に於けるプロテアーゼの作用力を検討した。即ち第5表の如きアルコール濃度に於て反應を行わしめ、その作用力を測定したがその際生成される非蛋白態可溶性窒素の量を以て作用力を示すものとした。

Table 5. The Influence of Ethyl-alcohol on the protease.  
(Sample: Powder, 0.02g, Time and Temp. of Reactn. 44hrs. 35°C, PH 8.5)

Alcohol (%)	0	1	3	5	10	15	20	25	30
Non-Protein-soluble-N. (cc)	0.282	0.272	0.255	0.238	0.204	0.153	0.119	0.093	0.080
Activity (%)	100	96	90	84	72	54	42	33	28

此の表より明かな様にアルコールが10%前後の場合無添加に比して70%の作用力を有するが15%の添加に於ては作用力は半減し25~30%の添加により作用力は約30%に落ちる。

(B) アセトンの影響

組織の乾燥粉末製剤を造る場合、アセトン處理を行つているのであるが、アセトンの反應液中に於ける濃度や酵素素材との接觸時間が酵素の作用力にあたる影響について明確な報告がないので此等の点を追及した。第6表は反應液中のアセトンの濃度の影響を示し、第7表は適當の大きさに切斷した生の酵素素材を各種濃度のアセトン液に5分間浸漬振盪し直ちにアセトン液を分離した後組織を搗碎し反應液中に添加し一定時間後作用力を測定した成績である。アルコールの場合と同様にバンスライク器によるアミノ態窒素の測定値は過大となるので非蛋白態可溶性窒素量を以て作用力を示すものとする。

Table 6. The Influence of Acetone on the Protease.  
(Sample: Powder, 0.02g. Time and Temp. of Reactn. 22hrs. 35°C, PH. 8.0)

Acetone (%)	0	1	3	5	10	15	25	30
Non-Protein-soluble-N. (cc)	0.188	0.154	0.138	0.137	0.124	0.120	0.104	0.057
Activity (%)	100	82	73	73	66	64	55	30

Table 7. The Activity of the Immersed Tissue, in Acetone of Various Concentrations for 5 Minutes.  
(Sample: Fresh Material 1g. Time and Temp. of Reactn. 18hrs, 35°C, PH 3.3)

Acetone (%)	0 (Control)	100	95	90	85	80	75
Amino-N. (cc)	0.310	0.309	0.309	0.308	0.199	0.163	0.128
Activity (%)	100	99.7	99.7	99.4	64.2	52.6	41.3

第6表の示す所に依れば反応液中のアセトンの濃度が増加するにつれて作用力は阻害せられ10~15%の添加に於て約60%, 30%濃度に於て約30%に落ちる。又第7表の結果より5分間のアセトン浸漬後直ちに溶剤を除去すると90~100%アセトン液を使用した場合には殆どその影響はないが85%以下の濃度で処理した場合に於ては作用力は急激な低下を來す。此の低下の程度はアセトンの濃度の低下と共に大となつていたので之は恐らくアセトン溶液中の水部に溶出するプロテアーゼが水部の割合の大となるにつれて急激に増大する結果生ずる低下であろう。従つて乾燥粉末製剤を作る場合アセトン液の濃度90%以上を用い、5分間以内の浸漬処理を行えば作用力の低下を殆んど免れることが出来よう。

#### (4) 該酵素の抽出法に就いて

以上の諸實驗に於ては出来るだけ生体の條件に合致するように生体組織或はそのアセトン、エーテル處理粉末試料を用いたが此の酵素の本質に関する知見を得るにはより純粋な状態の酵素試料を得ることが必要である。よつてその抽出に関する諸條件の検討を行つた。

##### (A) プロテアーゼの抽出量と抽出時間との關係

粉末試料 0.05g に蒸留水を加えて 50cc となし、常温にて數回振盪し、その混合液より 30, 60, 120 及び 240 分置きに 5cc 宛取り出し之を更にグラフスフィルターにかけその内の固形物を除去した後反應液に添加して作用力を測定した結果は第8表の如くである。

Table 8. The Relation of the Enzyme-quantity to the Extraction-time.  
(Time and Temp. of Reactn. 24hrs. 35. C, PH8.5)

Time of Extraction (min)	30	60	120	240
Amino-N. (cc)	0.16	0.20	0.22	0.20

即ち常温で一時間の抽出により溶出される酵素量は一定値に達する。

##### (B) 各種水素イオン濃度水溶液に依るプロテアーゼの抽出

甘蔗サツカラゼの如く組織に吸着された酵素は單に組織の插碎等により水抽出は殆んど出来ない<sup>1)</sup>。依つて此の種プロテアーゼの水抽出の可否に就いて検討を行つた。粉末試料 0.05g を各種pHの緩衝液で一時間抽出後遠心分離を行い液部と固形部を夫々カゼイン反應液に添加して第9表の如き結果を得た。

Table 9. The Relation between the Water-soluble-protease and the So-called Absorbed Protease.  
(Sample: Powder. 0.05g. Time and Temp. of Reactn. 24hrs. 35°C)

PH	3.5	5.8	8.5	9
Amino-N. (cc) (Liquid-portion)	0.24	0.26	0.33	0.31
Amino-N. (cc) (Solid-portion)	0.03	0.05	0.05	0.04

此の結果より明かな様に溶出された酵素量は全酵素量の約80~90%に及ぶが尙組織に20~10%の量が吸着されている。而して液部の作用力の差異は水素イオン濃度の差異に基づくものである。

(5) 該酵素の反應速度恒數について

粉末試料0.1gを水50ccで浸出しその清澄液5cc宛をカゼイン反應液に添加して夫々30, 60, 180, 360及び1200分間反應せしめた後一次反應式に従つて反應速度恒數を求めた。

Table 10. The Velocity Constant Calculated by Means of the Reaction-formula of the First Order. (a=12,3760 mg. Sample: Powder)

Time of Reactn. (min.)	30	60	180	360	1200
Amino-N(mg.) in Reaction-solution.	0.8502	1.6504	4.2510	5.9514	11.6194
$K \times 10^5$	237.2	238.6	233.8	181.6	101.1

次に幽門垂約15gを搗碎し60ccの水を加えて浸出し遠心分離を行いその上澄液5ccを反應液に添加して後反應速度恒數を求めた。その成績は第11表の通りである。

Table 11. The Velocity Constant Calculated by Means of the Reaction-formula of the First Order(a=12.3760mg. Sample: Fresh Tissue)

Time of Reactn. (min)	60	90	120
Amino-N. (mg) in Reaction-solution	8.2186	10.2024	10.7692
$K \times 10^4$	181.9	182.2	170.1

以上の結果より反應速度恒數は180分の如き短時間内の反應に於ては一次反應式に従うようであるが時間の経過と共に減少してくる。之の原因については反應溫度が酵素の失活にあたる影響や酵素量の關係等が考えられるので之等については検討中である。

總 括

(1) 鱈幽垂プロテアーゼは硫酸の如き無機酸の添加により pH1.4 以下に於て完全にその作用を阻止される。

(2) 該酵素は食塩, 塩化カリの如き無機塩の添加によりその濃度に従い作用は阻害される割合も大となるが, 塩の30%の添加に於ても尙40%程度の作用力を保持する。

(3) エチルアルコール, アセトンの如き有機溶剤の添加により該酵素の作用力は阻害を受けるが之等溶剤の30%の添加に於ても尙30%の作用力を保持する。而してアセトン濃度90%以上の液で5分間以内に於て浸漬された酵素素材はその影響を殆ど受けない。

(4) 該酵素の反應速度恒數は180分程度の短時間内に於ては一次反應式に従うがそれ以後は時間の経過と共に減少してくる。

文 献

- 1) 藤井 実(1942), 農化; 13(7), 961~964