

# カゼイン及びビンナガ鮪幽門垂プロテアーゼ に対する硫酸の沈澱能について\*

藤 井 実・立 川 成 章

Precipitation-power of Ammonium-sulfate against Casein and  
Protease-protein in Pyloric Appendage of Long  
Fin Tuna *Thunnus alalunga*

By

Minoru FUJII and Nariaki TACHIKAWA

We studied the precipitation-power of ammonium-sulfate against casein and protease-protein of pyloric appendage of long fin tuna.

Both were precipitated exceedingly well, when the pH of each reaction solution was ca. 5.2 at initial and then each solution was added with powder of ammonium-sulfate so as to attain 3/5-saturation-degree.

The protein-nitrogen precipitated by adding ammonium-sulfate of 3/5-saturation-degree to the enzyme solution was ca. 70 percent of the total protein-nitrogen precipitated by adding trichloro-acetic acid.

魚類幽門垂プロテアーゼの研究に於て其の基質として主にカゼインを使用しているため硫酸が塩析剤として使用される場合カゼイン及び該酵素態蛋白に対して如何なる条件で最も良い沈澱能を発揮し得るかを知るため此の実験を行つた。

## 実 験 の 部

### 1) 沈澱生成量と反応液のpHの関係

5%カゼイン液5ccに各種のpH緩衝液(Mc ILVAINE及びCLARK a. LUBSの緩衝液)を夫々32cc宛添加して氷水で冷却した後、固形硫酸を添加して1/2飽和度(OsBORNEに依る飽和度)とする。直ちに白色沈澱を生ずるので之を濾過し1/2飽和度硫酸溶液で数回洗滌した後其の澄明な濾液に氷酢酸数滴及び20%三塩化酢酸液数cc(反応液中の三塩化酢酸が5%濃度になるように加える)添加すると夫々白濁を生ずる。これらの沈澱を濾別して始め二、三回同飽和度硫酸溶液で、次に5%三塩化酢酸液で濾液にアンモニウムイオンの反応が消失する迄洗滌する。沈澱を硫酸分解に附し窒素量を測定した結果は第1表の通りである。尙酵素の抽出は常温で行うが其の他の場合溶液はすべて氷水で0°Cに冷却して使用した。

\* 水産講習所研究業績 第225号, 1957年7月25日 受理

Table 1. Precipitation of casein under condition of various pH of reaction solution.  
Saturation-degree of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $\frac{1}{2}$ .

Initial pH	4	5.2	6	7	8.6
pH after adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.3	4.8	5.6	6.2	6.5
Protein-N. in filtrate $\text{mg} \times 10^{-3}$ ( $\frac{3}{100}$ of ppt.)	39.32	45.73	93.45	142.93	162.12

第1表の結果に依ると硫酸添加前の反応液のpHが4である場合沈澱は最も多く次にpH5.2の順となり反応液がアルカリ性に近づくにつれ沈澱生成は著しく悪化することがわかる。而して始発pH4の場合カゼインは既に凝固するからカゼインにプロテアーゼを吸着させる目的からいえば此の状態では恐らく吸着不可能と考えられるから此のpHは目的に合わないわけである。従つて反応液の始発pHは5.2にして硫酸を添加するのが最もよいようである。

## 2) 硫酸の飽和度の差異に依る沈澱生成量の相違

オスボン (OSBORNE) の表示法に従つて硫酸の飽和度は $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$ 及び $\frac{3}{5}$ にしたときのカゼインの沈澱状態を検討して第2表を得た。

Table 2. Precipitate of casein caused by adding ammonium-sulfate  
(saturation-degree: Osborne's degree).

Saturation-degree	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{5}$
Protein-N. in filtrate $\text{mg} \times 10^{-3}$ ( $\frac{3}{100}$ of ppt.)	64.04	53.04	47.67

此の実験結果からカゼインの沈澱は此の実験条件の範囲では $\frac{3}{5}$ 飽和度の場合が最も多いことがわかつた。

## 3) プロテアーゼ態蛋白の沈澱に対する硫酸の影響

カゼインに対する硫酸の条件をそのまま使つて反応液のpHを5.2にした酵素抽出液に固形硫酸を添加して夫々の濃度を $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$ 及び $\frac{3}{5}$ 飽和度になるようにし、生じた沈澱を処理すること前述と全く同様にした後其の窒素量を測定して第3表の様な結果を得た。

Table 3. Precipitate of nitrogen-compound in enzyme solution caused by adding ammonium-sulfate and its proteolytic activity.

Saturation-degree	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{5}$	Control (non-adding)
Nitrogen content in precipitate from enzyme-solution. $\text{mg} \times 10^{-3}$ (ir 1cc of enzyme solution.)	1787.52	3330.21	4217.51	
Residual casein-N. after poteolytic action. $\text{mg} \times 10^{-3}$ ( $\frac{2}{100}$ of ppt.)	3567.50	2405.10	1950.21	1852.52

第3表の示す通り硫酸の濃度が増加するにつれて沈澱量も増大し此の実験の範囲では $\frac{3}{5}$ 飽和度で最大値を示した。そして此等の沈澱をカゼインに作用させた時 $\frac{3}{5}$ 飽和度の場合の沈澱が他

のいづれよりも強いカゼイン分解力を示した。従つて酵素態蛋白は%飽和度の時最も多く沈澱していることは明かである。

4) 3/5飽和度硫酸に依り沈澱する酵素態化合物の量

酵素抽出液に硫酸を添加して%飽和度とした時に生ずる沈澱の窒素含有量を該酵素液に三塩化酢酸を添加して生ずる所謂蛋白態沈澱の窒素含有量に比較して第4表の様な結果を得た。

Table 4. Nitrogen content in compound precipitated by adding ammonium-sulfate of 3/5-saturation-degree and by adding trichloro acetic acid of 5 percent to the enzyme solution.

Precipitants	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - $\left(\frac{3}{5}\text{-saturation-degree}\right)$	5% trichloro acetic acid
mg $\times 10^{-3}$ / 1cc of enzyme solution	147.12	214.31

即ち上表の結果から%飽和度硫酸に依る沈澱性窒素量は全蛋白態窒素の約70%程度であつた。

総 括

カゼイン及びビンナガ鮪幽門垂プロテアーゼに対する硫酸の沈澱能を検討した。反応液の始発 pH を約 5.2 とし之に夫々硫酸を添加してその飽和度を 1/5, 1/2 及び 3/5 とした場合, 3/5 飽和度の場合最も多量の沈澱を生ずる。そして鮪幽門垂プロテアーゼ溶液の場合硫酸沈澱態窒素は全蛋白態窒素の約 70% であつた。

本研究は農林所水産講習所後援会研究費によつたことを附記し感謝の意を表します。