HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カゼインに対するレンニン作用 : 第１報　レンニン反応の一次相に及ぼす塩類の影響
Author(s)	加藤, 勲; 三河, 勝彦; 金, 栄教; 安井, 勉
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(4), 477-481
Issue Date	1970-12-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11810
Type	bulletin (article)
File Information	7(4)_p477-481.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

カゼインに対するレンニン作用

第1報　レンニン反応の一次相に及ぼす塩類の影響*

加藤　勲・三河勝彦
金　栄教**・安井　勉
(北海道大学農学部畜産学科)

Action of rennin on casein

I. Effect of salts on the primary phase*

I. KATO, K. MIKAWA, Y. K. KIM** and T. YASUI
(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received June 29, 1970

緒　言

Rennin (EC 3. 4. 4. 3) が κ-casein に急速に作用してシアル酸等を含む glycomacropeptide を遊離して para κ-casein になりこれが凝集することは1950年代の後半に GARNIER[4], WAUGH と von HIPPEL[2], WAKE[22] 等により明らかにされたが，rennin の casein に対する反応については古く，1873年に HAMMERSTEN[7] により2段階の過程からなることが報告されている。すなわち，casein から para casein への酵素的変換 (Primary phase: 1次相) と生成した para casein によって生じる凝固 (Secondary phase: 2次相) である。現在では，さらに一般的にプロテアーゼが示すようなタンパク分解作用が少ないながら認められ (Tertiary phase: 3次相)，これがチーズ熟成にも関与していると考えられている[1]。1次相の酵素反応速度を測定するためには，普通非タンパク態窒素 (NPN)[1]，glycomacropeptide に含まれるシアル酸 (Sialic acid)[2]，および粘度[16,17,20,21] の測定や pH スタットによる滴定[5,13] などによって研究が行なわれている。NPN は通常12% トリクロール酢酸 (TCA) に可溶性な部分を定量するが[1,11,14] TCA の濃度が低ければ glycomacropeptide 以外の peptide が加わって[1,27] NPN が多量に放出される。従って低濃度の TCA で反応を測定する場合には3次相すなわち general proteolysis も同時に測られる事になるが，3次相の反応速度は1次相のそれに比べて非常に遅いので，補正を行なえば12% TCA の場合と同様に1次相の測定に利用できるものと考えられる[1,11,14,15,27]。

カルシウムイオン (Ca^{++}) が牛乳の rennin 凝固に必要な事はかなり古くから知られており，主として rennin 反応の2次相に効果を発揮するものと考えられている。すなわち，κ-casein から glycomacropeptide が切れて放出されると，変化した para κ-casein は α_s-casein を Ca^{++} に対して安定化させる能力を失ない，結果としてミセル全体が沈澱凝固する[25,29,30]。なお κ-casein と NaCl で Ca^{++} を加えなくとも rennin により不溶化する事は WAKE[22] が報告している。また牛乳成分中に含まれるマグネシウム (Mg^{++}) が Ca^{++} と同じく2価の金属イオンとして rennin 作用に影響を与える事は容易に予想できるが，PRODANSKI[18] によれば塩化カルシウム ($CaCl_2$)，塩化バリウム ($BaCl_2$)，塩化マグネシウム ($MgCl_2$) を各種動物乳に加えて rennet 凝固時間を測定し，牛乳の場合には上の3種の塩が同じ程度に凝固を促進させるという。山内[31] は para α-casein の凝固性を調べ，凝固生

* 本報の内容は1967年4月に日本農芸化学会昭和42年度大会(東京)において「牛乳のシアル酸について(第5報) レンネットによるカゼインのシアル酸遊離に及ぼす塩類の影響および凝固現象」として発表したものである。

** 現在　高麗大学校農科大学 (Seoul, Korea)

成に要する塩の最少濃度を比較して $BaCl_2 < CaCl_2 < SrCl_2 < MgCl_2$ の順に最少濃度が増加する事を明らかにしている。また，牛乳中に含まれる Mg^{++} の量では，量の多いものが概して凝固時間が短いと言う[28]。さらに，リン酸塩，塩化ナトリウムなどについても研究が行なわれているが[18,28]，以上あげた種々の塩類が影響を与えるのはいずれも2次相である[12,19]とされている。本研究では特に1次相について塩類の添加が影響を与える可能性とその初期反応を詳しく知るための測定方法について検討を行なった。

実験材料及び方法

1. Casein の調製

北大付属農場ホルスタイン牛から得た新鮮個乳を3,000 rpm で脱脂後，水で2～3倍に稀釈し0.1 N HCl で pH を4.6まで下げて等電沈澱させる。この沈澱に最初と同量の水を加え0.1 N NaOH を用いて pH 8.0 を超えない範囲で casein を溶解する。同様な沈澱，溶解を4～5回繰り返して whole-casein を精製した。また crude κ-casein は whole-casein を用いて HILL の方法[8]で調製した。まず whole-casein のタンパク濃度を約5%にして3°C に保ち $CaCl_2$ 濃度を0.13 M にする。2～3分間強く攪拌の後，温度を35°C に上昇させて生じた沈澱を除去する。残った上澄液を蒸溜水に対して2日間透析して $CaCl_2$ を完全に除去し，再び冷蔵室中で $CaCl_2$ を0.3 M にして生じた沈澱を除去する。その上澄液を蒸溜水で透析して完全に $CaCl_2$ を除いた後，pH を4.7に下げ沈澱した crude κ-casein をエタノールおよびエーテルで脱水乾燥した。

2. Rennet の調製

この実験では rennin は精製しない前の状態である rennet で使用した。すなわち，市販の Hannsen 社製の粉末 rennet を蒸溜水に溶解し，1夜蒸溜水中で透析して不溶解物を除去した後に実験に供した。

3. 非タンパク態窒素 (NPN) の測定法

Rennin を作用させた casein 溶液に各最終濃度 (3% または12%) になるように TCA を加え0°C で30分間放置の後，その濾液の窒素量を micro-Kjeldahl 法と，もう1つは Folin 試薬による発色を比色定量する Lowry の改良法 (すなわち Cu-Folin 法) で750 mμ の波長により測定し，後者の場合は標準曲線を作成して窒素量を求めた。なお，Cu-Folin 法では TCA 濃度が高い場合には発色の妨げとなるので[9]，12% TCA を用いて除蛋白する場合には，その濾液の TCA が最終的に3%になるように稀釈したものを試料として発色させた。

4. シアル酸測定法

シグマ社製の N-acetylneuramic acid を標準物質として WARREN の方法で測定した[10,23]。

結果および考察

牛乳の rennin による凝固は $CaCl_2$ の添加によって促進される事は著明な事実である。この現象を rennin 反応の1次相と2次相に分けてみると，主として2次相において Ca^{++} に代表される2価の金属イオンがこれに作用して凝固が生成するものと一般には考えられていて，酵素反応そのものに塩類の影響があるかどうかを示すデータはあまり多く知られていないため，まずこの点に関する実験を行なった (**Fig. 1**)。Whole-casein に rennet を反応させた場合各種の塩がシアル酸の遊離 (12% TCA 濾液) に影響を及ぼしており，同じ濃度の塩類を加えても塩の種類によって異なった促進効果を示している。すなわち，添加した塩類のうち，$MgCl_2$, $CaCl_2$, NaCl についてはこの順に効果は少なくなっているが，いずれもシアル酸の遊離を高めている。なかでも $MgCl_2$ と $CaCl_2$ に関しては α-casein の2次相について実験を行なった山内[31]の結果とは反対の傾向を示しているが，これが1次相と2次相という違いによるものかどうかは，実験条件も casein の種類も異なる両データからの直接の判定は不可能である。エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) やリン酸塩の添加も反応に促進効果を示すようであるが，後者の場合，このような多量 (100 mM) を

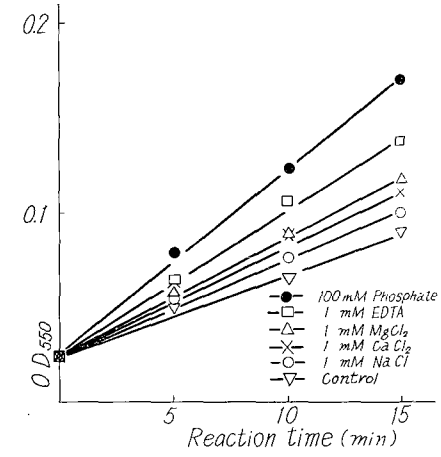

Fig. 1　Effect of salts on 12%-TCA soluble sialic acid liberation from 2.5% whole-casein treated with rennet at 25°C and pH 6.5.

加えてもその反応促進効果はそれほど高くならず，塩類による促進効果には限度があることが認められた。しかしこの実験の範囲で用いた塩類がすべての場合に反応を促進させた事は，塩類が rennin 反応の1次相には作用しないと言う説[19]に対立する結果を示した事になる。反応促進効果に限度が認められる事は，反応時間を一定にして，1価の中性塩である NaCl 量を変化させ，イオン強度に対してシアル酸の遊離をプロットした実験結果(**Fig. 2**) から確認することができる。この場合，NaCl 以外の塩の濃度をその電荷を考慮に入れたイオン強度に計算し直してプロットすると塩の種類の如何にかかわらず，すべて Fig. 2 の曲線上に位置する。この条件下では NaCl を 25 mM 以上加えても反応速度に影響を与えないこと，すなわち塩類の rennin 作用に及ぼす促進効果は，非特異的なイオン強度効果であることを示している。また逆に，イオン強度が等しくなるような塩濃度を用いた場合は，すべての塩は同一な促進効果を示すものと考えられ，**Fig. 3** に示されている crude κ-casein を用いた実験に於てその正当さを立証している。これらの結果では，NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, そしてキレート剤である EDTA さえもがイオン強度が一定であれば同一の促進効果を示した。Fig. 1 と Fig. 3 の結果を比べた場合に明らかな事は，whole-casein を用いた時には，EDTA, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 間に差が認められたのに対して，crude κ-casein を基質とした後者ではこれら3種の塩の間に酵素反応促進効果の差が見られない事である。この実験に用いた HILL の方法による crude κ-casein は disc electrophoresis[3] によって純度を検定してみると，β-casein と γ-casin とを少しづつ含み，α_s-casein は微量しか含まないが whole-casein の場合には，これらの casein が γ-casein を除いて大量に含まれる。塩類が casein と結合する際にはその塩の種類により結合の強さが異なる[19,26]し，casein の種類によっても当然結合性が違ってくるのが予想される事から，Fig. 1 の結果において同一塩濃度で促進作用に差が生じたのは，casein と結合した塩が影響を与えたためであろうと推測される。

これ迄行なった実験では，12% TCA に可溶性な glycomacropeptide 中のシアル酸を定量して，1次相の反

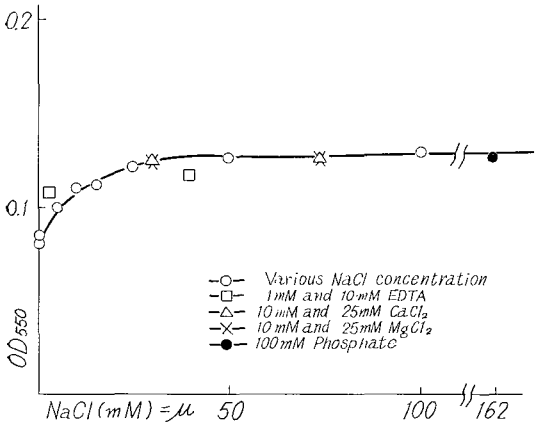

Fig. 2 Release of 12%-TCA soluble sialic acid by rennet at 35°C and pH 6.5 from 2% whole-casein system containing NaCl and other salts at various ionic strength.

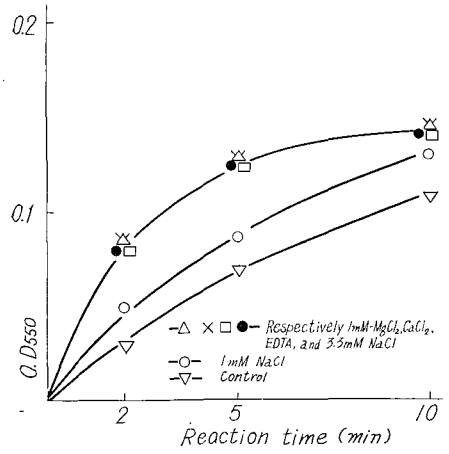

Fig. 3 Release of 12%-TCA soluble sialic acid by rennet at 25°C and pH 6.75 from 0.5% crude κ-casein containing various kinds of salts.

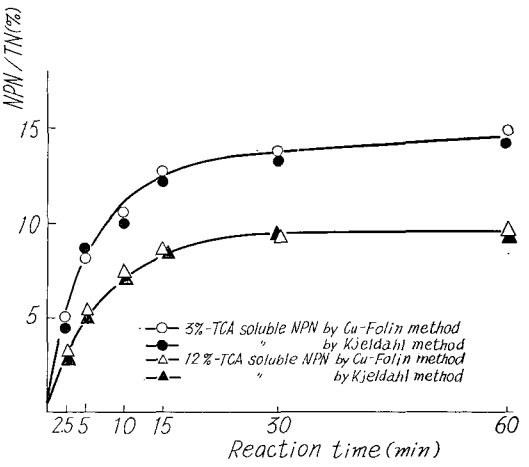

Fig. 4 Liberation of NPN soluble in 12%- and 3%-TCA from 0.44% crude κ-casein at 25°C and pH 6.75.

応速度に塩類がどのように影響するかを明らかにしたが，反応速度を更に詳しく検討するためには反応初期の短時間に多くのデータを得なければならない。そのためには，短時間に多くの試料を定量できるような，なるべく取扱いの容易な測定方法を採用する必要がある。pH スタット[5,13]による方法などはその例であるが，今回は比較的多数の試料を一度に定量できる方法のうちから Cu-Folin 法による定量を試みた (**Fig. 4**)。発色反応

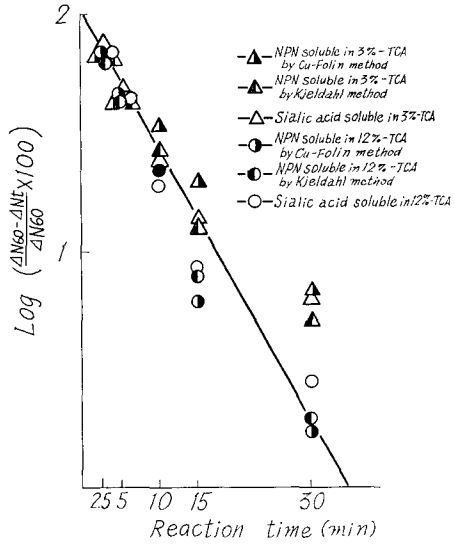

Fig. 5 Linear expression of NPN and sialic acid liberation from crude κ-casein.

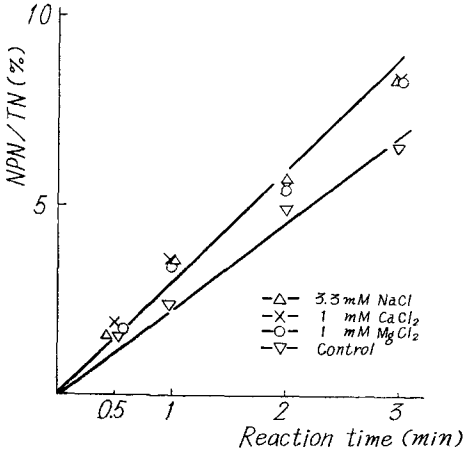

Fig. 6 Effect of salts on 3%-TCA soluble NPN liberation from 0.5% crude κ-casein treated with rennet at 25°C and pH 6.75 (Cu-Folin method).

に影響を与える TCA の高濃度[9]をさけて選んだ低濃度 (3%) の TCA 処理濾液について Cu-Folin 法と micro-Kjeldahl 法を比較するとよく一致した値を示している。低濃度の TCA 可溶性の NPN は量が多く3次相としての反応生成物を一部含む場合 (例えば general proteolysis の結果としての α_s-casein より遊離される NPN は30分で全窒素の約0.45%[6]になる) がある。しかし WHEELOCK 等[27]が行なった実験の場合のように general proteolysis が認められないケースもある。反応初期の生成物は，主として速度の大きい1次相としての酵素反応の結果生じる peptide が主体をなしていると考えられる。この場合，遊離 NPN の割合が各時間毎に一致していれば速度の比較は可能である。従って，NPN 遊離の最終放出量に対する割合をそれぞれの時間について計算してプロットした結果 (**Fig. 5**), 反応が90%に達するまでは近接した値で酵素の1次反応の法則に従う事が明らかになった。すなわち，初期反応はこの方法で定量的に検討する事が可能である事を意味する。そこで本法を用いて，1次相に与える塩類の影響を先の実験と同様に行なった結果，Fig. 3 の結果と同様なイオン強度に依存した酵素作用の促進効果が見られた (**Fig. 6**)。

要　　約

Rennin (EC 3.4.4.3) による casein の凝固作用のうち，その1次相として知られる glycomacropeptide 遊離反応に及ぼす各種塩類の影響と，この初期反応を検討するための測定方法を検討した。その結果

(1) 従来1次相には影響しないと考えられていた塩類は酵素反応に促進的に作用した。

(2) この作用は塩の種類に関係なく，そのイオン強度に依存した。

(3) 初期反応を検討するための測定方法としては，3% TCA 濾液を用い，Cu-Folin 法による比色定量が利用できることがわかった。

引 用 文 献

1) ALAIS, Ch., G. MOCQUOT, Hs. NITSCHMANN and P. ZAHLER (1953). Helv. Chim. Acta 36: 1955.
2) BEEBY, R. (1963). J. Dairy Res. 30: 77.
3) DAVIS, B. J. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: Art. 2, 321.
4) GARNIER, J. (1957). Proc. Int. Symp. Enzyme Chem. 2: 524.
5) GARNIER, J. (1963). Biochim. Biophys. Acta

66: 366.
6) GARNIER, J., J. YON and G. MOCQUOT (1964). Biochim. Biophys. Acta 82: 481.
7) HAMMERSTEN, O. (1873). Upsala Läkareförен. Förhandl. 9: 363 & 451.
8) HILL, R. D. (1963). J. Dairy Res. 30: 101.
9) 実験化学講座 (23) (1957). p. 23, 丸善.
10) KIM, Y. K., S. ARIMA and Y. HASHIMOTO (1965). Jap. J. Zootech. Sci. 36: 17.
11) MATTENHEIMER, H. and Hs. NITSCHMANN (1955). Helv. Chim. Acta 38: 687.
12) MCGANN, T. C. A. and G. T. PYNE (1960). J. Dairy Res. 27: 403.
13) MOCQUOT, G. and J. GARNIER (1965). J. Agr. Food Chem. 13: 414.
14) NITSCHMANN, Hs. and W. KELLER (1955). Helv. Chim. Acta 38: 942.
15) NITSCHMANN, Hs. and H. U. BOHREN (1955). Helv. Chim. Acta 38: 1953.
16) OOSTHUIZEN, J. C. (1966). XVII Int. Dairy Congr. D-2: 239.
17) OOSTHUIZEN, J. C. (1966). S. Afr. J. Agr. Sci. 9: 495.
18) PRODANSKI, von P. (1968). Milchwissenschaft 23: 491.
19) PYNE, G. T. (1962). J. Dairy Res. 29: 101.
20) SCOTTBLAIR, G. W. and J. C. OOSTHUIZEN (1962). J. Dairy Res. 29: 37.
21) SCOTTBLAIR, G. W. and J. C. OOSTHUIZEN (1961). J. Dairy Res. 28: 165.
22) WAKE, R. G. (1959). Aust. J. Biol. Sci. 12: 479.
23) WARREN, L. (1959). J. Biol. Chem. 234: 8.
24) WAUGH, D. F. and P. H. von HIPPEL (1956). J. Am. Chem. Soc. 78: 365.
25) ERNSTROM, C. A. (1965). Fundamentals of Dairy Chemistry p. 591 (AVI)
26) WAUGH, D. F. (1961). J. Phys. Chem. 65: 1793.
27) WHEELOCK, J. V. and DOROTHY J. KNIGHT (1969). J. Dairy Res. 36: 183.
28) WHITE, J. C. D. and D. T. DAVIS (1958). J. Dairy Res. 25: 267.
29) 山内邦男 (1960) 農化 34: 240.
30) 山内邦男・津郷友吉 (1959). 農化 33: 957.
31) 山内邦男 (1959). 農化 33: 1134.

Summary

Effect of some salts on the primary phase of rennin (EC 3. 4. 4. 3) action on whole- or crude κ-casein was studied. Calcium chloride, magnesium chloride, sodium chloride, ethylenediaminetetraacetate and ortho-phosphate effectively stimulated the action of rennet which was quantitatively determined with 12% trichloracetic acid (TCA) soluble sialic acid from whole- and crude κ-casein. It appeared that the stimulation observed was nonspecific reaction but was simple ionic strength effect of the media wherein the maximum effect was given by the ionic strength which was equivalent to the concentration of 25 mM NaCl, regardless of the kinds of salt used.

Liberation of 3% and 12% TCA solube non protein nitrogen (NPN) from crude κ-casein treated with rennet was compared using Kjeldahl method and colorimetric (Cu-Folin) method. A quite good agreement was obtained on NPN liberation measured by Kjeldahl method and Cu-Folin method. Data on the liberation of NPN soluble both in 3% and 12% TCA were analyzed kinetically, and a first order reaction was found to be satisfactory, though its linearity was shown within 90% of the full NPN liberation. It was recognized that Cu-Folin method could be applicable for quantitative NPN determination of the early stage in the primary phase of rennin action.