



Title	カゼインに対するレニン作用 : 第 2 報 レニン反応の 1 次相に及ぼす s-および -カゼインの影響
Author(s)	三河, 勝彦; 加藤, 勲; 安井, 勉
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 9(1), 110-115
Issue Date	1973-12-15
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/11859">http://hdl.handle.net/2115/11859</a>
Type	bulletin (article)
File Information	9(1)_p110-115.pdf



[Instructions for use](#)

# カゼインに対するレンニン作用

## 第2報 レンニン反応の1次相に及ぼす $\alpha_s$ -および $\beta$ -カゼインの影響

三河勝彦・加藤 勲\*・安井 勉

(北海道大学農学部畜産学科)

(昭和48年6月20日受理)

### Action of rennin on casein

#### II. Effect of $\alpha_s$ - and $\beta$ -casein on the primary phase

Katsuhiko MIKAWA, Isao KATO

and Tsutomu YASUI

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo, JAPAN)

#### 緒 言

牛乳カゼインの約15%を占める $\kappa$ -カゼイン(32)は凝乳酵素レンニン(E. C. 3. 4. 4. 3)の基質となる成分である。ALAISら(1)は1953年に、12%トリクロル酢酸(TCA)に可溶性の非タンパク態窒素(NPN)によってレンニン反応の1次相を直接測定する可能性を示唆したが、それ以来、カゼインに対するレンニン反応の1次相については、殆んど研究者が12% TCA 濾液中のNPNの全窒素に対する割合を指標として用いている。このNPNを測定する際には窒素をキエルダール法で定量する必要があり、しばしば煩雑さを覚え能率が悪いので、筆者らは前報(15)において、Folin 試薬を用いてレンニン反応後の3% TCA 濾液中のNPNを発色させ比色定量する方法を検討し、初期反応の解析に利用しうることを報告した。また、この方法によりレンニン反応の1次相に対して低濃度の塩類が反応を一定の範囲まで促進させることを確認し、それが本実験の範囲においては塩の種類によらず、イオン強度にのみ依存することを併せて報告した。このうち、中性塩類が反応を促進させるという現象そのものについては、すでに大条および境野(21, 22)により報告されているのであるが、前報の結果は既に特定の塩についてのみ知られていた事実をイオン強度効果として一般的に説明できることを示したもので

ある。

$\kappa$ -カゼインを基質とするレンニン作用の1次相はかなり速い反応として知られるが、 $\alpha_s$ -や $\beta$ -カゼインによってはその速度が影響されないといわれている(11, 19, 26)。本報では3% TCAによりNPNを測定した場合に $\alpha_s$ -や $\beta$ -カゼインが1次相を抑制する結果がえられたので、この点に関する検討を行なった。

#### 実験材料および方法

##### 1. カゼインの調製

whole-カゼインは前報(15)と同様に等電点沈澱をくり返し、エタノールとエーテルで乾燥したものをを用いた(Fig. 1-a)。

$\kappa$ -カゼインは前報ではHILLの方法(12)による粗 $\kappa$ -カゼインを用いたが、この標品をポリアクリルアミドによるディスク電気泳動(6, 23)でその純度を検定してみると、 $\beta$ -および $\gamma$ -カゼイン、さらにわずかの $\alpha_s$ -カゼインを含んでいた(Fig. 1-b)。このため本報ではZITTLE and CUSTERの方法(36)によって次のように調製を行なった。

材料は北大附属農場で生産された新鮮なホルスタインの混合乳より調製した脱脂乳である。まずpH 4.7で沈澱を2回くり返し、えられた酸カゼインを6.6 M 尿素に溶かし、硫酸でpHを1.45にした。生じる沈澱は主と

\* 現在 全酪連中央研究所

して $\alpha_s$ -と $\beta$ -カゼインからなるので、 $\alpha_s$ -カゼイン調製の原料とするため凍結保存した。残った上澄には硫酸アンモニウムを1 Mになるように加え、生成した沈澱をpH 7.5で溶かし、透析して硫酸を除いた。この溶液1部にエタノール2部を加え、1 M 酢酸アンモニウム (75%エタノール溶液) を滴下して生じた沈澱を集め、pH を7.0にして溶かした後、再び2倍量のエタノールを加えて酢酸アンモニウムで沈澱させた。次にこれをpH 7.5で溶かし、水で透析してから不溶物を遠沈により除いて凍結乾燥した。この $\kappa$ -カゼインのディスク電気泳動パターンは Fig. 1-c から明らかなように、かなり純度の高い標品であることを示している。

$\alpha_s$ -カゼインは $\kappa$ -カゼインを調製する際に生じ、凍結保存された $\alpha_s$ + $\beta$ の複合体を原料とし、THOMPSON and KIDDYの方法(28)によって調製した。まずこの複合体凍結ブロックを解凍の後、pH を7.3~7.5に合わせて水で十分に透析し、次いでpH を4.6に落して生じた沈澱を水で充分洗って6.6 M 尿素に溶かした。pH を4.6に合わせながら尿素濃度が3.3 Mになるように希釈して生じる沈澱を集め、再び6.6 M 尿素に溶かし、pH を合わせながら3.3 Mにする操作をくり返した。以後はTHOMPSON and KIDDYの記述にあるようにCaCl<sub>2</sub>による沈澱の後、残ったカルシウムを尿素に対する溶解(5 M→1 M)と酸沈澱(3回)により取り除き、再びCaCl<sub>2</sub>沈澱からこの操作をくり返した。カセイソーダで溶かした粗 $\alpha_s$ -カゼインは混在する $\kappa$ -カゼインを先にあげたZITTLE and CUSTERの方法(36)を応用して取り除き、pH を7.2にした後、水で透析を行ってから凍結乾燥した。原法にはこの後にDEAEセルロースを用いた分割が記載されているが、本実験ではこれを行なわなかった。ディスク電気泳動パターンは Fig. 1-d のとおりで、極く微量の $\beta$ -カゼインが混在するだけの高い純度がえられた。

$\beta$ -カゼインは新鮮脱脂乳を材料とする whole-カゼインからPAYENS and MARKWIJKの方法(24)で調製した。すなわち、まずHIPPらの方法(14)を用い、6.6 M 尿素に溶かした whole-カゼインを4.6 M→3.3 M→1.7 Mと順次希釈し、途中それぞれの段階で生じた沈澱を取り除いた。なお、希釈には一部にEL-NEGOMYの方法(7)に準じてNaClを含む水を使用した。1.7 M 尿素に溶けたカゼインはpH を4.7に合わせ、生じる沈澱を再び4.6 Mの尿素に溶かして精製をくり返した。次にこの最終の1.7 M 尿素に溶けた粗 $\beta$ -カゼインをpH 4.7に合わせ、1.6 Mの硫酸アンモニウムを加えて沈澱を生じ

させた。これをカセイソーダで溶かし、タンパク濃度0.5%に希釈してから冷却し、pH を4.5に合わせて混在するカゼインを除き、温めてpH を4.9に上げると $\beta$ -カゼインが沈澱した。カセイソーダで溶かしたこの $\beta$ -カゼインは水で透析してから凍結乾燥を行なった。

ディスク電気泳動図 (Fig. 1-e) に示されているように $\gamma$ -カゼインと思われる不純物が少量含まれていることがわかる。

## 2. レンニンの調製

前報(15)で使用したHansen社製のレンネットには多くのペプシンが含まれるといわれている(35)。本報では、こうした不純物を除去するためにMCMEEKIN(18)およびFOLTMANN(9)の方法に従い、まず同じレンネットを材料としてpH 5.5でNaClによるslow salting outを3回くり返して粗レンニンを調製した。このレンニンは0.1 Mのリン酸緩衝液で透析し、不溶物を除いてから吉野らの方法(35)を用いてDEAEセルロースによるクロマトグラフィーを行なって精製した。溶出したフラクションの510~610 ml 区分を混合し凍結保存した。なおこの際のレンニン活性度(Rennin Unit: RU)の測定はBERRIDGEの方法(2)で行なった。

## 3. 非タンパク態窒素(NPN)の測定

0.2%および0.4%の $\kappa$ -カゼインまたは $\alpha_s$ -、 $\beta$ -カゼインを原液として、それを一定の割合で混合したカゼイン溶液4 mlにpH 6.75のトリス・マレイン酸緩衝液1 mlを加え、これを25°Cに保ってレンニン溶液0.1 mlを加えて反応を行なわせた。この反応混液中の最終濃度

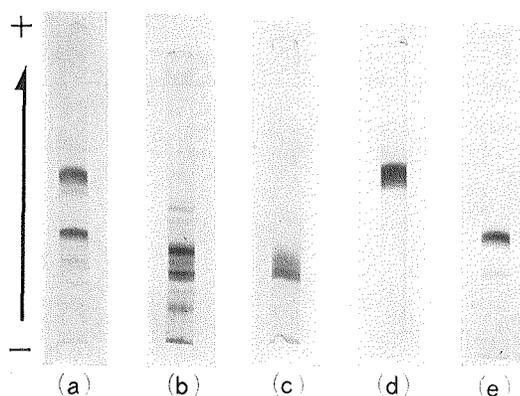


Fig. 1. Polyacrylamide (7.5%) disc electrophoresis of casein preparations in the presence of 4.5 M Urea. Gels except for the case with  $\beta$ -casein contain 0.2% of mercaptoethanol. (a) whole-casein; (b) crude  $\kappa$ -casein; (c)  $\kappa$ -casein; (d)  $\alpha_s$ -casein; and (e)  $\beta$ -casein.

は特にことわらない限り、 $\kappa$ -カゼイン 0.16%、緩衝液 50 mM、レンニン 0.018  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  となる。所定の時間が経過した後にトリクロル酢酸 (TCA) 1 m $\ell$  を加え、30°C で 30 分間保持した。この 3% TCA 可溶性部分から 0.5 m $\ell$  をとり、前報 (15) で示した Cu-Folin 法によって 750 nm の波長で吸光度を測定し、標準曲線から NPN を算出した。

#### 4. ディスク電気泳動

精製カゼインに対する純度検定のためのポリアクリルアミドを担体とするディスク電気泳動は ORNSTEIN (23) および DAVIS (6) の方法によって行なった。ポリアクリルアミドゲルは 4.5 M の尿素を含む 7.5% 濃度のものを用い、試料濃縮用ゲルの代りには 2 M の蔗糖を使用した。試料タンパクは約 70  $\mu\text{g}$  を用い、 $\beta$ -カゼインの場合以外には試料およびゲルの両方に 0.2% の 2-メルカプトエタノールを加えた。泳動は pH 8.5 のトリス・グリシン緩衝液でゲル 1 本当たり 3 mA の電流を流し、40 分間室温で行なった。このゲルはアミドブラック 10 B で染色の後、7% 酢酸で脱色した。

#### 結果および考察

従来からレンニンによる  $\kappa$ -カゼイン分解、すなわちレンニン反応の 1 次相の反応速度に  $\alpha_s$ - や  $\beta$ -カゼインは影響しないといわれている (11, 19, 26)。この反応を抑制する可能性をもつものとしては、わずかに WHELOCK and KNIGHT (33) がシアル酸に含まれる炭水化物をあげているのみである。ふつうわれわれが whole-カゼ

インと  $\kappa$ -カゼインのレンニンによる NPN 放出を較べる時には、単純に全窒素量に対する遊離窒素量を計算しているが、NPN の放出が抑制されたか否かを判定するには、 $\kappa$ -カゼイン当りの NPN で比較しなければならない (11)。そのため、これ迄に報告されているデータについて、その中に含まれる推定  $\kappa$ -カゼイン含量に対して NPN を計算し直してみた。すなわち WAKE の報告した 1st-cycle カゼインと  $\kappa$ -カゼイン (31)、それに KIM らの acid-カゼインと  $\kappa$ -rich カゼイン (16)、また、EL-NEGOMY による whole-カゼイン (8) のそれぞれの NPN 測定値について計算し直した結果は、Table 1 のようになった。多くの場合、純粋な  $\kappa$ -カゼインに近いほど反応初期における NPN の放出量が多い、つまり反応速度が早くなっている。このことから  $\kappa$ -カゼイン以外の種類のカゼインは  $\kappa$ -カゼインに対するレンニン反応を抑制していると仮定することができよう。各実験間でかなりの差が見られるのは、試料の調製法や実験方法がそれぞれ違っているためと考えられる。

この仮定が正しいか否かを確かめる目的で 0.2%  $\kappa$ -カゼインと 1.4% whole-カゼインを用いてレンニンを作用させる実験を行なった。このレンニンを加えたカゼイン溶液の 3% TCA 可溶性 NPN を経時的に測定し、その中に含まれる  $\kappa$ -カゼイン量 (反応液中では  $\kappa$ -カゼインがそれぞれ 0.16% および約 0.17% となる) に対し計算を行なったのが Fig. 2 である。反応初期には明らかに抑制が認められるが、30 分に達した頃にはほぼ両者が同じ値を示している。しかし、この実験の結果は、最初から

**Table 1.** Initial liberation of 12% TCA-soluble nitrogen during the course of rennin action from different casein preparations cited from literatures.

Reference	Casein preparation	Assumed $\kappa$ -casein content to the preparation	NPN* % to the preparation (2 or 5 min)	Calculated NPN % to $\kappa$ -casein (2 or 5 min)
WAKE (31)	$\kappa$	95	5.3 (2 min)	5.6
	1st-cycle	15~30	0.5	3.3~1.7
KIM <i>et al.</i> (16)	$\kappa$ -rich	20~35	1.4 (5 min)	7.0~4.0
	acid	15	0.7	4.7
EL-NEGOMY (8)	$\kappa$	95	3.2 (2 min)	3.4
	whole	15	0.4	2.7
Present work**	$\kappa$	95		5.63 (2 min)
	whole	15		0.75

\* The values are subtracted by the NPN amount at zero min.

\*\* The concentration of TCA is 3%.

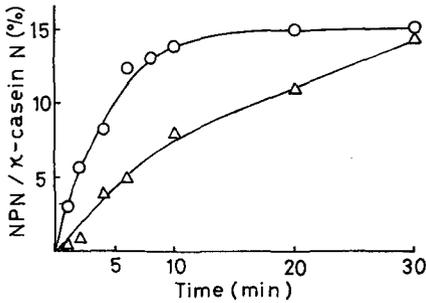


Fig. 2. Comparison of 3% TCA soluble NPN released from 0.2%  $\kappa$ -casein with that from 1.4% whole-casein at 25°C, pH 6.75. —○—  $\kappa$ -casein; —△— whole-casein.

既知量の  $\kappa$ -カゼインと  $\alpha_s$ -カゼインを混合して行なった GARNIER and MOCQUOT (11) の測定値とは異なっている。彼らは 12% TCA 可溶性 NPN は  $\kappa$ -単独と  $\kappa$ -に  $\alpha_s$ -カゼインを加えた場合との双方が全く同じであることを示している。

両実験におけるこの違いの原因について考察してみると、実験条件が種々異なっている中でもその主なものは TCA 濃度の違いのようである。12% TCA とそれ以下の濃度の TCA を用いてレンニン反応を比較した報告は多数見うけられる。これらをまとめてみると、全体の反応については低濃度の TCA 濾液に含まれる NPN は 12% TCA のそれに較べて含量は多いが、NPN 中に含まれるシアル酸や炭水化物の絶対量は変わらない (1, 13, 15, 17, 20, 22, 33, 34)。このシアル酸や糖の量はグリコマクロペプチドの TCA に対する溶解度に影響し、低濃度 TCA 可溶性のペプチドには糖含量の少ない成分が含まれていると考えられている (1, 13, 17, 33)。またシアル酸の少ないペプチドがレンニンによって早く切断され、したがって反応の初期には低濃度の TCA 可溶性ペプチドが多く遊離してくる (3, 25, 27)。NPN 放出の反応速度について同一のカゼインサンプルを用いた場合には、12% でも低濃度の TCA でもその反応速度恒数は等しく、first-order である (20)。以上の点を総合すると、whole-カゼインに含まれる  $\kappa$ -カゼイン以外の成分は、糖やシアル酸含量の少ないペプチド区分がレンニンによって  $\kappa$ -カゼインから遊離するのを遅らせていると考えることができよう。しかし Table 1 にあげたようなこれ迄に発表されているデータから見ても、12% TCA 可溶性区分、すなわち糖やシアル酸が多い部分についてこのペプチドの放出が全く抑制されていないとは言いきれないものと考えられる。いずれにしても、レンニン反応

の 1 次相としてのグリコマクロペプチドの切断は whole-カゼイン中の  $\kappa$ -カゼイン以外の成分で抑えられることは確かである。

この反応が first-order にしたがるものとして (4, 5, 10, 20, 29, 30) TSUGO and YAMAUCHI (29) と同様、反応時間に対して  $\log \left[ \frac{\Delta N_{30} - \Delta N_t}{\Delta N_{30}} \right]$  の値 (但し、 $\Delta N_{30}$  は 30 分反応時の NPN 放出を最大とみなした時の放出量、 $\Delta N_t$  は各時間における NPN 放出量) をプロットし (Fig. 3)、その速度恒数を同図から算出してみると、 $\kappa$ -カ

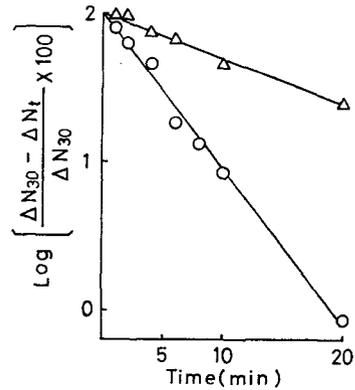


Fig. 3. Linear expression of the NPN liberation curves in Fig. 2. —○—  $\kappa$ -casein; —△— whole-casein.

ゼインについては  $4.04 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、whole-カゼインでは  $1.20 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  となる。この値は、NITCHMAN (20) が pH 6.7 の whole-カゼインで測定した値 (20°C:  $2.3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  および 30°C:  $4.8 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ) や、CHEESEMAN ら (5) の pH 6.6 における値 (25°C, whole-カゼイン:  $1.53 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  および  $\kappa$ -カゼイン:  $1.8 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ……この場合ディメンションは分単位から秒単位に換算した) とその order が一致している。

このような抑制が whole-カゼインに含まれるいかなるフラクションによるものであるかを知るため、whole-カゼインに含まれる  $\kappa$ -カゼイン以外の主な成分である  $\alpha_s$ -と  $\beta$ -カゼインを、それぞれ単独に  $\kappa$ -カゼインに加えてレンニン反応を行なわせてみた。その結果 (Fig. 4) レンニン反応の 1 次相の抑制作用は  $\alpha_s$ -、 $\beta$ - の両カゼインが共に有していることが明らかになった。しかし、この抑制作用は  $\alpha_s$ -カゼイン (Fig. 4-a) の方が  $\beta$ -カゼイン (Fig. 4-b) に較べて強く現われており、 $\kappa$ -カゼインに対する  $\alpha_s$ -カゼイン重量比 ( $\alpha_s/\kappa$ ) が 2~4 の場合には whole-カゼインにほぼ近いレベルまで抑制された。 $\beta$ -

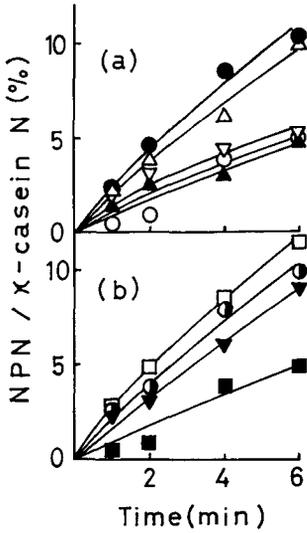


Fig. 4. Effect of added  $\alpha_s$ - or  $\beta$ -casein on NPN liberation.

(a)  $\alpha_s$ -casein;

- control=0, 0.01, 0.05, and 0.10
- △- 0.25
- ▽- 1
- ▲- 2 and 4
- whole-casein

(b)  $\beta$ -casein;

- control=0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, and 1
- 2
- ▼- 4
- whole-casein

カゼインの場合には、同じ重量比 ( $\beta/\kappa=4$ ) まで加えても、 $\kappa$ -カゼイン単独 (コントロール:  $\beta/\kappa=0$ ) の50%以上の反応速度を示した。また、Fig. 3と同様に行なったプロット (Fig. 5) から  $\alpha_s$  または  $\beta/\kappa$  の比が2の場合の速度恒数を計算してみると、 $\beta$ -カゼインの場合がコントロール ( $\kappa$ -カゼインのみ) の88.3%の値を示したのに対し、 $\alpha_s$ -カゼインでは35.7%となり、2倍以上の抑制力を示していることがわかる。

レンニン作用の1次相が  $\alpha_s$ - や  $\beta$ -カゼインによっては抑制されないというこれまでの考え方は、いずれも12% TCA 可溶性 NPN の遊離を1次相の目安にしたものである。しかし、1次相というものをその本質を考慮して  $\kappa$ -カゼインの Phe—Met 結合が切断されてペプチドが遊離する現象を指すものとするならば、糖の多い部分のみが測定されると考えられている12% TCA 可溶性 NPN より、3% TCA を用いた NPN の方がより広

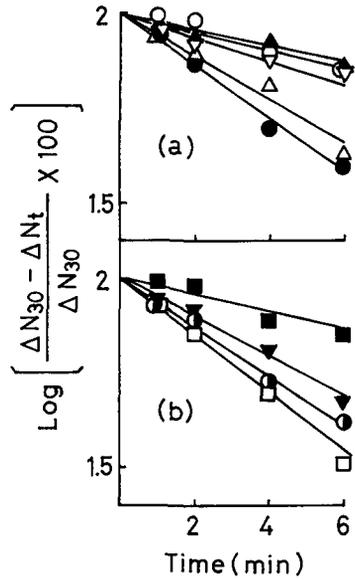


Fig. 5. Linear expression of the NPN liberation curves in Fig. 4.

Symbols are the same as in Fig. 4, (a)  $\alpha_s$ -casein; (b)  $\beta$ -casein.

範囲にわたるペプチド遊離を観察できることになる。すなわち、より適確に1次相を捕えていると見ることができよう。このように3% TCA 可溶性 NPN を目安として  $\alpha_s$ - や  $\beta$ -カゼインのレンニン作用に対する影響を改めて検討した本実験の結果から、これら  $\kappa$ -以外のカゼインがレンニン作用の1次相を大きく抑制し、しかも  $\alpha_s$ -カゼインは  $\beta$ -カゼインよりもその抑制効果が2倍以上も大きいことが明らかになった。しかし、シアル酸や糖の含量の多い成分についてはこの作用がないとすれば (11, 19, 26), 本実験で示された抑制効果は主として糖含量の低い部分について起っているものと考えられる。

要 約

$\kappa$ -カゼインに対するレンニン作用の1次相について、その初期反応に対する  $\alpha_s$ -カゼインおよび  $\beta$ -カゼインの影響を前報で示した3% トリクロロ酢酸可溶性 NPN を測定することにより調べた。

whole-カゼインおよび  $\kappa$ -カゼインについてその反応速度恒数を計算した結果は、前者では  $1.20 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、後者では  $4.04 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  であった。

単独の  $\alpha_s$ -カゼインおよび  $\beta$ -カゼインはいずれもこれを  $\kappa$ -カゼインに加えると、レンニン反応の1次相を抑制した。この反応の速度は  $\alpha_s/\kappa$  または  $\beta/\kappa$  の重量比が

2の場合、 $\alpha_s$ -カゼインは $\kappa$ -カゼイン単独の時の35.7%となり、 $\beta$ -カゼイン(88.3%)よりも2倍以上の抑制力を示した。

また、この抑制がレンニンによって $\kappa$ -カゼインから遊離してくるペプチドのうち、主として糖含量の少ない区分に対して起る可能性についても論議された。

#### 引用文献

- 1) ALAIS, Ch., G. MOCQUOT, Hs. NITSCHMANN and P. ZAHLER 1953. *Helv. Chim. Acta* **36**: 1955.
- 2) BERRIDGE, N. J. 1945. *Biochem. J.* **39**: 179.
- 3) CASTLE, A. V. and J. V. WHEELLOCK 1970. *Biochem. J.* **119**: 12 p.
- 4) ————— 1972. *J. Dairy Res.* **39**: 15.
- 5) CHEESEMAN, G. C., M. RAWITSCHER and J. M. STURTEVANT 1963. *Biochim. Biophys. Acta* **69**: 169.
- 6) DAVIS, B. J. 1964. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, Art. **2**: 404.
- 7) EL-NEGOUY, A. M. 1966. *J. Dairy Sci.* **49**: 1461.
- 8) ————— 1968. *ibid.* **51**: 1013.
- 9) FOLTMANN, B. 1959. *Acta Chem. Scand.* **13**: 1927.
- 10) GARNIER, J. 1963. *Biochim. Biophys. Acta* **66**: 366.
- 11) —————, J. YON and G. MOCQUOT 1964. *ibid.* **82**: 481.
- 12) HILL, R. D. 1963. *J. Dairy Res.* **30**: 101.
- 13) HINDLE, E. J. and J. V. WHEELLOCK 1970. *ibid.* **37**: 389.
- 14) HIPP, N. J., M. L. GROVES, J. H. CUSTER and T. L. McMEEKIN 1952. *J. Dairy Sci.* **35**: 272.
- 15) 加藤 勲・三河勝彦・金 栄教・安井 勉 1970. 北大農学部邦文紀要 **7**: 477.
- 16) KIM, Y. K., S. ARIMA and T. YASUI 1967. *Jap. J. Zootech. Sci.* **38**: 62.
- 17) MACKINLAY, A. G. and R. G. WAKE 1965. *Biochim. Biophys. Acta* **104**: 167.
- 18) McMEEKIN, T. L. 1939. *J. Am. Chem. Soc.* **61**: 2884.
- 19) MOCQUOT, G. and J. GARNIER 1965. *J. Agr. Food Chem.* **13**: 414.
- 20) NITSCHMANN, Hs. and H. U. BOHREN 1955. *Helv. chim. Acta* **38**: 1953.
- 21) 大条方義・境野今衛 1960. 日畜会報 **30**: 348.
- 22) ————— 1960. *ibid.* **31**: 36.
- 23) ORNSTEIN, L. 1964. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, Art. **2**: 321.
- 24) PAYENS, T. A. J. and B. W. VAN MARKWIJK 1963. *Biochim. Biophys. Acta* **71**: 517.
- 25) PUHAN, Z. 1968. *Milchwissenschaft* **23**: 331.
- 26) PYNE, G. T. 1951. *Chemistry and Industry March* **3**: 171.
- 27) SINKINSON, G. and J. V. WHEELLOCK 1970. *J. Dairy Res.* **37**: 389.
- 28) THOMPSON, M. P. and C. A. KIDDY 1964. *J. Dairy Sci.* **47**: 626.
- 29) TSUGO, T. and K. YAMAUCHI 1960. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **24**: 96.
- 30) TUSZYŃSKI, W. B. 1971. *J. Dairy Res.* **38**: 115.
- 31) WAKE, R. G. 1959. *Aust. J. Biol. Sci.* **12**: 479.
- 32) WAUGH, D. F. and P. H. VON HIPPEL 1956. *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 4576.
- 33) WHEELLOCK, J. V. and Dorothy J. KNIGHT 1969. *J. Dairy Res.* **36**: 183.
- 34) 吉野梅夫 1958. 農化 **32**: 736.
- 35) —————・中谷延二・所 洋・山内邦男 1966. 農化 **40**: 52.
- 36) ZITTLE, C. A. and J. H. CUSTER 1963. *J. Dairy Sci.* **46**: 1183.

#### Summary

In order to observe the effect of  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein on the primary phase of rennin (E. C. 3.4.4.3) action on  $\kappa$ -casein, the initial velocity of the reaction were determined with 3% trichloroacetic acid-soluble NPN method which was described in the previous paper.

The rate constants of rennin action on whole-casein and  $\kappa$ -casein are  $1.20 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  and  $4.04 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ , respectively.

Both of added  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein inhibited rennin action on  $\kappa$ -casein. At a weight ratio of  $\alpha_s$ - or  $\beta$ -casein vs.  $\kappa$ -casein is two, the reaction rate with the mixture of  $\alpha_s$ - and  $\kappa$ -casein is 35.7% of the control in which  $\kappa$ -casein alone is reacted with rennin, while the mixture of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein exhibits only 11.7% inhibition. Thus, it may be said that the inhibitory effect of  $\alpha_s$ -casein on the action of rennin on  $\kappa$ -casein is more than twice as high as that of  $\beta$ -casein. The possibility that these inhibitory effect of  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein on the primary phase of rennin action may be seen mainly in the low sugar peptide component released from  $\kappa$ -casein by rennin action is also discussed.