

総合アミノ酸剤精製法の研究*

平本 実, 福田 幸平, 齊藤 昇一, 徳久 和夫
(衛生化学教室)

Study on the Purification of Amino Acids Mixture

By Minoru Hiramoto, Kouhei Fukuda, Shōichi Saitō
and Kazuo Tokuhisa

蛋白酵素分解液より粉末総合アミノ酸剤の製法研究として、著者等はカゼインの酵素分解液について、発生機水酸化銅による精製法を試み、その定量的検討を行つた。

水酸化銅による蛋白、高分子ペプチドの沈澱は、古くから蛋白性窒素の定量法として応用されており、又アミノ酸を銅塩としてその溶解度の差により個々のアミノ酸を分離する方法¹⁾等もあるが、C. Neuberg 等²⁾は発生機の重金属水酸化物により、蛋白質の酸分解物中に存在する高分子ペプチド、フミン質、磷酸、プリン等は沈澱するが、一方、単一では水に難溶性のアミノ酸銅塩も他のアミノ酸銅塩と一緒に同時に存在する時は、沈澱せずに溶存することを指摘している。又 E. Abderhalden³⁾等はトリペプチド位の低級ペプチドの銅塩は、大体において水に溶けることを報告している。

そこで著者等は、カゼインを基質としてその濃度5%で、豚の膵臓抽出液によつて、酵素分解を行つた所のカゼイン酵素分解液⁴⁾について、水酸化銅の溶解量を算出し、この計算量の110%、即ち少し過剰の水酸化銅を用いた場合(A)と、計算量の40%に相当する水酸化銅を用いた場合(B)について、夫々実験の部に詳記した如く、Fig. 1の操作により精製を行い、比較的

簡単に非常に綺麗な結晶状の粉末アミノ酸混合物を、好収量で得ることが出来た。そこで更に著者等は精製操作の各階梯において総窒素、アミノ窒素及び必須アミノ酸であり又単一では水に難溶性銅塩を作るトリプトファン等について、夫々精製操作による変化の定量的検討を行い、Table 1の如き結果を得た。

又以上の精製法において除去された所の、比較的高分子のペプチド、フミン質、lipid、プリン、磷酸等を含むものと考えられる⁵⁾ Fig 1.の不溶性銅化合物は、その総窒素量は(A)の場合、元の総窒素量の20%、又(B)の場合は、13%に当り、そのα-アミノ窒素と総窒素との比は、(A)の場合11.3%、(B)の場合16%であった。

而してトリプトファン定量結果より、この不溶性銅化合物を分離除去する精製操作において、単一では不溶性銅塩を作る所のトリプトファンの減少率が特に大であるということはなく、大体総窒素の減少率と併行しており、他のアミノ酸と共存する時は難溶性のトリプトファン銅塩も沈澱せずに溶存して濾液に来ることを知つた。

なお本実験では、精製に用いた脱色炭よりトリプトファンの溶離回収が悪く、この点について

* 1954年4月、日本薬学会(京大)において発表。

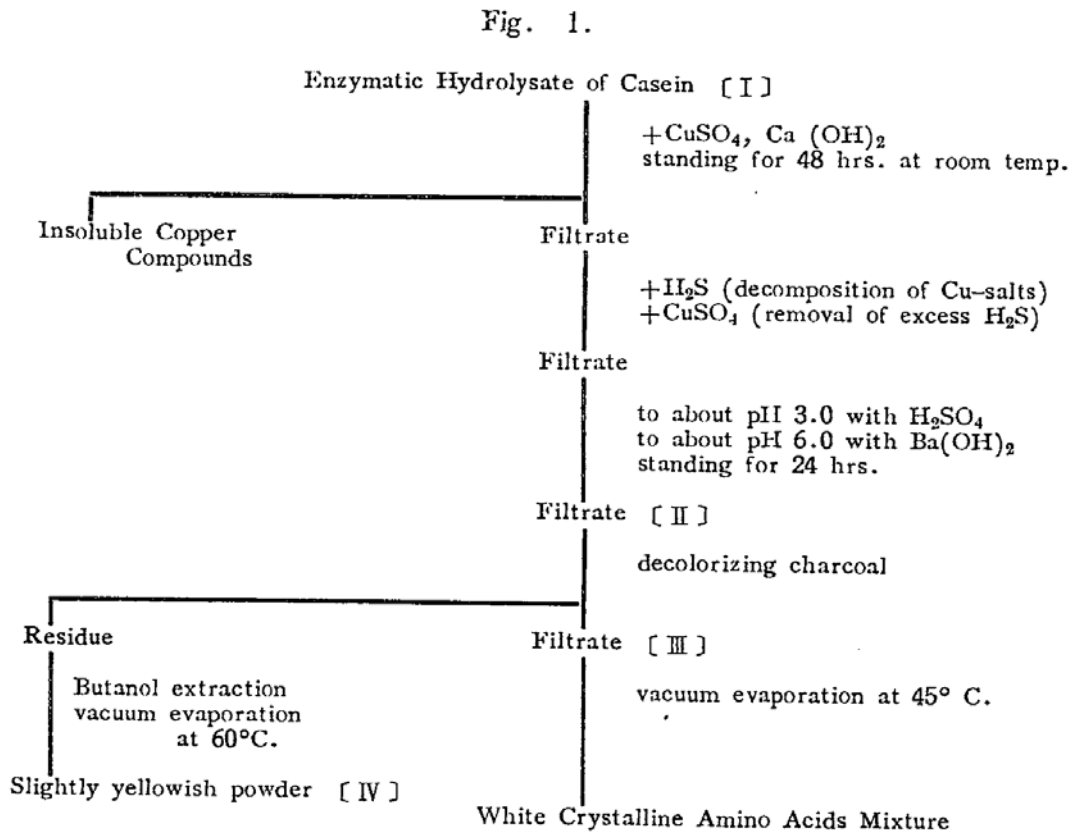


Table 1.

		Total N (g)	α-Amino N (g)	A.N./T.N. (%)	Tryptophane (mg)
I		7.610	4.006	52.7	545
II	A	6.035	3.221	53.4	447
	B	6.633	3.475	52.4	502
III	A	5.820	3.079	52.9	329
	B	6.248	3.249	52.0	372
IV	A	—	—	—	38.1
	B	—	—	—	41.4

(A) Dissolved CuSO₄, amounting to 110% of the capacity of Cu-uptake, calculated from the analysis.

(B) Dissolved CuSO₄, amounting to 40% of the capacity of Cu-uptake, calculated from the analysis.

では、活性炭により吸着される主として芳香族アミノ酸の分離回収について更に検討の要があり、又単一では不溶性銅塩を作る所のトリプトファン以外の必須アミノ酸等についても更に精査を要するが、以上の実験から発生機水酸化銅

による精製法は、白土類、脱色炭、分別沈澱法等による精製法と比較して、簡単なる操作により特有の不快感なる臭味、ハルツ化、吸湿性等の難点が殆んど完全に除去され、又濾過等の操作が容易となり、簡単に澄明な濾液が得られて比

較的簡単に非常に綺麗な結晶性の白色粉末を得ることが出来、蛋白酵素分解液より、綜合アミノ酸剤を得る方法として、一つの適当な精製法

を与えるものと思う。

終りに、本研究は文部省試験研究費により行つたもので、ここに謹謝の意を表します。

実験の部

カゼイン酵素分解液〔I〕、即ちカゼインを5%濃度で、石灰乳を用いてpH 8.0において、40°C、10日間、豚の膵臓プロテアーゼ抽出液⁴⁾により加水分解した原液について、マイクロキエルダール法による総窒素、バンスライク法による α -アミノ窒素及びトリプトファン等の定量を行い Table 1〔I〕の如き結果を得た。トリプトファンの定量は、E. Steers⁵⁾の方法により p-Dimethylamino-benzaldehyde を用い光電光度計により行つた。

次に水酸化銅の溶解量³⁾を決定するために、原液 10cc を採り、中和後、400cc に稀釈してこれに塩基性炭酸銅を過剰に加えて、数時間水浴上で加温し最後に暫時沸騰させてから濾過、濾液についてヨードメトリーにより Cu^{++} を定量して、これより必要な硫酸銅の量を算出すると、原液〔I〕10cc につき $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.291g となる。

そこで前述の酵素分解液〔I〕を1/2ずつ2個の三角フラスコにとり、夫々硫酸で中和後、計算量の110% (A) 及び40% (B) に相当する硫酸銅を溶解し、次で攪拌しながら夫々当量の石灰乳を加えて室温で48時間放置後、沈澱を濾過し、沈澱を冷水で洗滌する。この除去された不溶性銅化合物の総窒素、 α -アミノ窒素の定量結果は既述の如くである。

かくして得たる濾液に酸性で硫化水素を通じて飽和せしめ、銅塩を分解し暫時放置した。これに稀硫酸銅溶液を過剰にならぬように注意し乍ら滴下して、液中に溶存する硫化水素を沈澱せしめて濾過し、微黄色透明の濾液を得る。

次に濾液中に残存しているカルシウムを除去するために、硫酸で約pH 3.0として暫時放置後、水酸化バリウムで中和してpH 6.0とし一夜放置、沈澱を濾過し充分洗滌して微かに黄色

の濾液〔II〕を得る。

総窒素、 α -アミノ窒素、トリプトファンの定量結果は Table 1〔II〕の如くであつた。即ち溶解量の110%の水酸化銅を用いた(A)の場合は、総窒素において、大体原液〔I〕の79.3%に減少している。又トリプトファンは原液〔I〕の82%に減少している。溶解量の40%の水酸化銅を用いた(B)の場合は総窒素量87.2%、トリプトファン92%に減少している。

次に原液の0.2%に相当する脱色炭2gを(II)に加え、冷時30分振盪後、濾過洗滌し、無色透明の濾液〔III〕を得る。この濾液についての、総窒素、 α -アミノ窒素、トリプトファンの定量結果は Table 1〔III〕に示す如くであり、原液〔I〕より、総窒素量において(A)の場合76.5%、(B)の場合82.1%に減少し、又トリプトファン量においては(A)の場合60%、(B)の場合68%に減少している。即ち〔II〕 \rightarrow 〔III〕の脱色炭による精製において、脱色炭へトリプトファンの吸着が非常に大である。この濾液〔III〕を浴温45°で真空濃縮して乾固すると、白色結晶性粉末を得る。塩化カルシウムデシケート中で乾燥すると、(A)の場合48g、(B)の場合53gの収量である。

脱色炭残渣を浴温60°Cで、アルカリ性でブタノール抽出を数回行い、減圧でブタノールを溜去して、脱色炭に吸着されたアミノ酸を溶離回収すると微黄色粉末を得る。収量は(A)の場合290mg、(B)の場合325mgであり、これらについてトリプトファンの定量結果は Table 1〔IV〕の如くであつて、(A)の場合原液中に存在するトリプトファンの7.0%、(B)の場合原液中に存在するトリプトファンの7.6%に相当するトリプトファン量を回収した。

文 献

- 1) **Brazier** : Biochem. J. **24**, 1188 (1930).
- 2) **C. Neuberg** : Arch. Biochem. **26**, 77 (1950).
- 3) **E. Abderhalden** : Z. Physiol. chem. **81**, 1 (1912).
- 4) 福田 : 薬学, **73**, 327 (1953).
- 5) **M. Sahyum** : U. S. Pat.12. 416, 956 (1947).
- 6) **E. Steers** : Anal. chem. **21**, 641 (1949).

Summary

The purification and separation of amino acids mixture from the solution of enzymatic hydrolysate of casein by hog pancreas extract, were carried out, by using the nascent copper hydroxide method,²⁾ under the procedure as illustrated in Fig. 1.

Then, the quantitative determination of Total-

N, α -Amino-N and Tryptophane at every step of the procedure was tried, the results of which are shown in Table 1.

And we have found that this procedure is suitable for a simpler preparation of white crystalline amino acids mixture from pancreatic digests of casein.

昭和30年6月30日受理