

洗剤成分によるアルカリプロテアーゼの活性上昇

小ノ澤 治子, 下村 久美子

Study on the Enhancement of Protease Activity by Laundry Detergent Components

Haruko ONOZAWA and Kumiko SHIMOMURA

In the presence of 15 detergent components, the activities of alkali proteases in pure and product forms have been studied. It was found that components such as Na_2SO_4 and sodium dodecyl-benzensulfonate reduce the activity, while nonionic surfactants and oxidation bleaching agents enhance the activity sizably. The kinetic mechanism of the enhancement by nonionic surfactants is discussed in terms of the decreased dissociation constants between the enzyme/micelle complex and substrate, casein.

The enhancement of the activities of alkali proteases by oxidation bleaching agents, namely sodium perborate, sodium percarbonate and hydrogen peroxide has been studied by the modified casein - Folin method and gel permeation chromatography (GPC). It was found that casein is degraded by the oxidizing agents to fragments with ca. 10,000 dalton, which are hydrolysed to smaller fragments by the enzyme, faster than casein itself.

These investigations suggest importance of investigating the enzyme activities under the practical conditions they are used.

1. はじめに

従来の界面活性剤を主成分とする洗剤は衣類の油性汚れや固形汚れの除去には効果的だが、タンパク質汚れの除去には困難があり、これを補うものとして酵素の添加が有効である。このため、最近ではほとんど全ての弱アルカリ性洗剤にタンパク質分解酵素が配合されている。もともと、我が国でも平安時代からタンパク質分解酵素を多く含む鶯の糞がしみ抜きに利用されるなど、酵素を洗浄に用いる試みは古くからあったが、酵素の不安定な性質上、他の洗剤成分との配合が難しいという難点があった。その後、環境保全のための洗剤の無リン化による洗浄力の低下や、世界的な省エネ化さらには家庭で洗濯する洗濯物の中で合成繊維の割合が増えたことなどにより、洗濯温度を低温にする必要が生じ、このための洗浄力低下を補う必要性が生じた。また、バイオテクノロジーの発展ともあいまって、必要な酵素が大量にまた安価に製造できるようになり、酵素配合洗剤が急速に進展してきている。現在、各国で製造されている弱アルカリ性洗剤にはプロテアーゼが配合されている他、リパーゼ、セルラーゼなども加えられて、洗浄力の一層の増強がはかられている。

タンパク質分解酵素の洗浄系への添加効果については

皆川ら¹⁾、皆川²⁾、所ら³⁾により先駆的に詳細かつ広範囲に研究され、その有効性や特徴が示されてきた。また同様の研究が Kame ら⁴⁾、Christensen ら⁵⁾、Nielsen ら⁶⁾、Starce⁷⁾、坂口ら⁸⁾、小野打⁹⁾、横須賀ら¹⁰⁾によっても報告されている。しかし、洗剤中には繊維からの汚れ除去、再汚染防止、水質改善、漂白、風合い保持などの目的のために多数の成分が配合されている。酵素が有効に活用されるためには、これら成分との相互作用が問題となる。一般にはこれらの相互作用は酵素活性の低下をもたらすといわれてきたが¹¹⁾¹²⁾、増加させる成分もあることがわかってきている¹²⁾¹³⁾。しかし、これらの活性の変化の理由、機構については、中西¹⁴⁾、村田¹⁵⁾、皆川¹⁶⁾がわずかに触れているにすぎない。酵素は洗剤だけでなく、漂白剤にも配合されている現在、洗浄系での酵素機能の有効な発現のために洗剤成分との相互作用を明らかにすることは重要な課題であると考えられる。

ここに報告する一連の研究において、私達はまず洗剤成分15種がタンパク質分解酵素の活性におよぼす影響を調べ、これらのうち非イオン界面活性剤と過ホウ酸ナトリウムが酵素活性を上昇させることを確認した¹⁷⁾。次に非イオン界面活性剤による酵素活性上昇の機構を速度論的に解析した¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに過ホウ酸ナトリウムなどの酸化剤

の効果について、カゼインの加水分解量とゲルろ過クロマトグラフィーによるカゼインの分解挙動から酵素と酸化剤との相乗効果について調べた²⁰⁾。以下にその結果を報告する。

1. 洗剤成分

洗剤には、繊維から汚れを落とす主成分として、界面活性剤（陰イオン系界面活性剤：LAS, AES, AS, AOSなど、非イオン系界面活性剤：ポリオキシエチレンアルキルエーテルなど）、界面活性剤の働きを助ける成分として、ビルダー（硬水軟化剤：ゼオライト、アルカリ緩衝剤：炭酸ナトリウム、ケイ酸ナトリウム、再汚染防止剤：カルボキシメチルセルロースなど）、界面活性剤とは別の働きで洗浄に寄与する成分としての添加物（酵素：プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、漂白剤：過ホウ酸ナトリウム、漂白剤の活性化剤、蛍光増白剤）など、多種の成分が配合されている。これらの成分や配合比はそれぞれの国での水質や生活習慣、洗濯機の型式の差などにより異なっている。その一例を挙げるとTable 1²¹⁾の通りで、酵素がこのような多種の成分との共存下で使用されていることがわかる。

2. 酵素配合洗剤の開発、研究経過

酵素を洗剤に添加する試みは、Table 2²²⁾に示すように1913年に最初の特許が出願され、1930年に衣料用予浸洗剤“Burnus”が発表されたのに始まる。しかし、これは保存中の酵素力価が不安定性だったため成功しなかった。

1960年に耐アルカリ性の酵素が発見され、非タンパク質汚れの除去に有効なアルカリ洗剤中でも活性を示す点で大いに注目された：1963年にヨーロッパで各種酵素洗

剤が発売され、日本でも1968年に弱アルカリ性の酵素入り洗剤（バリ、モノゲンオール、スーパーザブコーソ、デイなど）が発売された。しかし、1969年に、製造中の作業員が酵素粉塵を吸入してアレルギー感作を起こすと推論され、また、酵素配合洗剤の洗浄力の有効性の上からも疑問が生じ、製造が中止された。その後、製造時の酵素微粉末の発塵防止と、洗剤保存中に洗剤の他成分による影響や吸湿による活性低下を防ぐための、酵素のカプセル化が進み、作業環境も整備され、1971年アメリカ国立科学アカデミー／国立調査審議会が酵素配合洗剤の有効性と安全性を認め、1976年の国際会議によって、タンパク質分解酵素配合洗剤の安全性が確認されるに至った。

日本でも1979年から再びタンパク質分解酵素入り洗剤が発売された。また、これまでの繊維表面に付着している汚れを除去する洗浄機構の他に、繊維内部に存在する汚れを除去する新しい洗浄機構も提案され、セルラーゼ配合洗剤が発売された。さらに、バイオテクノロジーによる新しいタイプの酵素が開発され、さらに洗浄力を強化するアルカリリパーゼ配合洗剤が発売されるなど、酵素配合洗剤のシェアは1987年に55%に達し、その後さらに拡大している。

3. タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）

プロテアーゼとは、タンパク質のポリペプチド結合の加水分解を触媒する酵素である。構造上、endo peptidase とexo peptidase に区別される。前者はタンパク質の内部のペプチド結合を加水分解するが、後者は末端カルボキシル基側から加水分解するカルボキシペプチダーゼと、末端アミノ基側から加水分解するアミノペプチダーゼとに分類される。

Table 1. Composition of Soap and Detergents in the World (%)

	Heavy-duty detergents(powder)				Heavy-duty detergents (Liquid)	Light-duty detergents (Liquid)	Soaps (Powder)
	Japan	Canada	Europe	Arab			
Surfactants	18-27%	8-20%	8-18%	18-25%	15-50%	15-37%	55-75%
Foam grow or Foam inhibitors	0.5- 2	0- 2	0-5	—	0- 4	0- 5	—
Stabilizer	0-17	30-60	30-70	20-30	0-30	—	—
Alkali builders	10-20	5-50	5-15	4-22	—	—	20-40
Optical brighteners	0.1-0.75	0.1-0.7	0.1-0.75	0.1-0.5	0-0.5	0-0.3	0-0.5
Bleaching agent	0- 5	—	15-30	—	—	—	—
Enzymes	0-0.75	—	0-0.75	—	0- 1	—	—
Moisture content	6-12	6-20	4-20	6-10	Balance	Balance	5-15
Sodium sulfate	Balance	Balance	Balance	Balance	—	—	—

Table 2. Trend in Development of Detergent with Enzymes

1913	• O.Rohm(Germany):apply for a first patent of detergent with enzyme (application to laundry of clothes a mixture of several enzymes extracated from animal pancreas)
1930	• Rohm & Haas Co. :put on market a clothing pre-detergent, "Burnus".
1960	• Alkali-persistent protease was found in <i>Bacillus origin proteases</i> in Denmark.
1963	• Several detergents with enzyme are marketed in Europe ; Bio 40 (Schnieder Co.(Swiss)) Biotex (Kortoman & Schlte Co.(Holland)) Luvil (Unileve Co. (Holland)) Ariel (Procter & Gamble Co.(Germarny & Italy)) Henk-O-Mat (Henkel Co.(Germarny))
1969	• A paper about safety on detergent of enzyme was published in a medical journal of England.
1976	• Safety of enzyme in detergent was confirmed at an international conference.
1979	• "Top"(detergent added with new granular type of alkali protease)was marketed by Lion Co. (Japan)
1980 ~82	• Detergents with enzyme were marketed by Kao Co. (Japan) and Procter & Gamble F.E.I(Japan)
1987	• "Attack" (detergent added with cellulase) was marketed by Kao Co. (Japan)
1988	• "Hi-Top"(detergent added with alkali lipase) was marketed by Lion Co. (Japan)

洗浄系では、汚れとしての分子量 10^4 以上のタンパク質は分子量 $10^3 \sim 10^4$ に分解すればあとは界面活性剤により可溶化され易くなる²³⁾ので、endo peptidaseが有効であるといえる。また、プロテアーゼには基質特異性、すなわち特定のアミノ酸間のペプチド結合のみを加水分解する特性があるが、種々のタンパク質を可溶化する必要のある洗剤用には基質特異性の広いものが適しているといえる。

洗剤用として実用化されているプロテアーゼは、これらの性質を持つ*Bacillus lichemiformis*により生産される*Subtilisin*である。このうち*Subtilisin BPN'*については詳細に研究され、一次構造及び三次構造が明らかにされている²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。本研究で用いた酵素の一つのナガーゼ®は、この*Subtilisin BPN'*で、アミノ酸残基275からなり、分子量は27,000で、酵素の活性部位はアミノ酸残基221のセリンと64のヒスチジンおよび32のアスパラギンである。

酵素反応は溶液中の温度を上げれば高くなるが、温度が高すぎると酵素の変性が起こり、酵素は失活する。日本のように家庭洗濯の温度が低い国では低温で高い活性を示す酵素が要求される。また、洗浄は弱アルカリ性で行われることから、洗剤用酵素はpH 9~11付近で酵素活性が高く、安定な酵素が利用されている。本研究で使用

した酵素は、いずれも温度40°C、pH10.5で安定な高い酵素活性を持つ製品である。

4. 基質カゼイン

カゼインは古くから変性状態にあるタンパク質として酵素反応の基質として利用され、特に洗浄系におけるタンパク質分解酵素の酵素反応の活性測定に用いられてきた。本研究でも基質として用いたのでカゼインの物性について述べる。

カゼインは乳タンパク質の約80%を占める。セリン残基がリン酸エステル化されたリンタンパク質で、乳中において5~7%のリン酸カルシウムなどの無機塩類と結合し、カゼインミセルと呼ばれる直径20~600nmの球状粒子を形成している²⁷⁾。これらの粒子の主要成分であるカゼインは、 α_{s1} 、 α_{s2} 、 β 、 κ カゼイン(重量比3:1:3:1)からなっている。 α_{s1} カゼインはアミノ酸残基199で分子量は23,600で²⁸⁾、 β カゼインは209残基で24,000²⁹⁾、 κ カゼインは169残基で19,000³⁰⁾のタンパク質である。

これらのカゼイン分子は親水性、疎水性が局在した構造になっているが、とくに β カゼインは疎水性が比較的高い。また、各カゼインはN末端付近にはセリン残基、C末端付近に疎水性の高い残基を持つ。各々のカゼインは

濃度, 温度, pHなどの条件により特有の会合を示し, また, 異なるカゼインを混合すると各々の組合せによって特有な複合体を形成する。いくつかのサブユニットから形成されているカゼインミセルの模式図³¹⁾³²⁾が提案されているが, その共通点は, ミセル表面部は α , κ カゼインから, その内部は α , β カゼインから成っている点である。その一例をFig. 1に挙げる³²⁾。

II. 実 験

1. プロテアーゼの活性に及ぼす15種の洗剤成分の影響
1980年代後半に用いられていた3種のタンパク質分解酵素の活性に及ぼす15種の洗剤成分の影響を以下のように調べた。

(1) 実験条件

本項の実験に使用した酵素はTable 3に示したサンプルI, II, IIIで, I, IIIは洗剤配合用にカプセル化されたもの, IIは粉末であり, 3種ともそのまま使用した。これらの酵素の力価の測定はCasein-Folin呈色B法, Anson-秋原変法で30°Cで求め, 酵素試料のタンパク質含

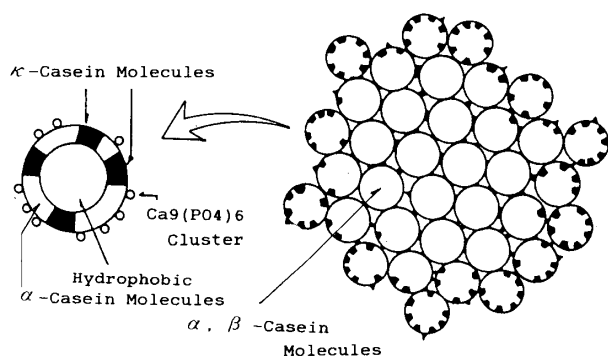


Fig. 1. Example of a subunit model for the structure of the casein micelle

量はLowry法に準じて測定した。至適pHは40°Cで, 3種の緩衝液(セーレンセン, クラークールプス, アトキンスーパンティン)中で求めたが, 以下の実験ではセーレンセン緩衝液を用い, 40°C, pH10.5で行った。洗剤成分は基質溶液のpHを調整する前に, 界面活性剤は標準の洗濯濃度の4倍, その他の成分は10倍になるように溶解して加えた。以下の実験では反応時間中反応液を密封して空気中のCO₂によりpHが低下しても10.0より大きい範囲に止めることが再現性を保つために重要であった。

(2) 実験結果

Fig. 2¹⁷⁾は40°C, 40分での15種の洗剤成分の酵素I, II, IIIの活性に対する影響を添加しない場合の活性に対する%で表したものである。図中の各成分のg/l数は, 基質に添加した各成分の反応時の濃度を示している。この結果から, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)を除いて, 洗剤成分の効果は活性を下げる成分は用いたすべての酵素について下げる点で, 定性的には同じであることがわかった。

このような効果を詳しく見ていくと, 陰イオン系界面活性剤のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(DBS), ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), α -オレフィンスルホン酸ナトリウム(AOS)は酵素活性を大きく低下させ, 非イオン界面活性剤のアルキルポリオキシエチレンエーテル(APE), アルキルポリオキシエチレンフェニールエーテル(PHE)は活性をやや増加させた: ビルダー類のケイ酸ナトリウム(Na₂SiO₃), 炭酸ナトリウム(Na₂CO₃), カルボキシメチルセルロース(CMC)は酵素活性をほとんど変化させず, 柔軟剤(DMDSAC), 硫酸ナトリウム(Na₂SO₄), ニトリロトリ酢酸(NTA), 蛍光剤(Tinopal), ゼオライトは活性をやや低下させ, 過ホウ酸ナトリウム(NaBO₃)は活性

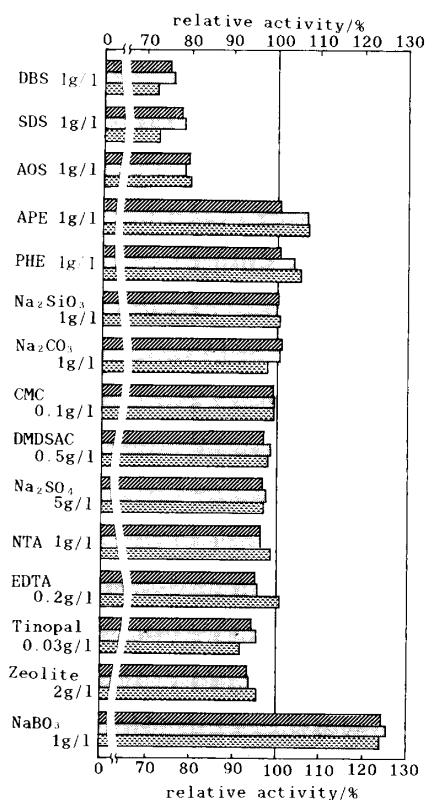
Table 3. Properties of enzyme samples

	Sample No.			
	I	II	III	IV
Name	Alcalase 2.0T	Proleser	Kazusase	Nagarse
<i>Bacillus</i> produced	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
Form	Granular	Powder	Granular	Powder
Activity (pU/g)	12.2 × 10 ⁴	8.9 × 10 ⁴	12.2 × 10 ⁴	87.5 × 10 ⁴
Protein content (wt%)	13.8	12.2	13.5	(100)
Optimum pH	10.0-10.7	10.0-10.5	10.0-10.5	(10.3-10.8)
Optimum temperature(°C)	50	50	40	
Manufacturer	Novo	Amano	Showa Denko	Serva

Parenthesized values are those given by the manufacturer.

を大きく増加させた。

これらの成分のうちゼオライトは他の成分と異なり、20分では活性を低下させなかったが、40分では低下させた。またEDTAは、酵素I、IIの活性は低下させたが、酵素IIIはやや増加した。この酵素IIIは、NTAによる活性の低下も酵素I、IIほど低下していないことから、キレート剤に比較的安定であることがわかる。



(//) enzyme sample I, (—) enzyme sample II, (.....) enzyme sample III

Fig. 2. Effects of 15 components in detergent on the relative activity of enzymes at 40°C, pH 10.5. The values were estimated for the reaction mixtures kept at 40°C for 40 min.

2. 非イオン界面活性剤によるプロテアーゼの加水分解速度の上昇

1. (2) で述べたように、非イオン界面活性剤はプロテアーゼによるカゼインの加水分解量を増加させた。これらの非イオン界面活性剤がプロテアーゼの活性を上昇させる機構は未だ知られていないので、Table 3の酵素III, IVを用いてカゼインの初期加水分解速度の基質濃度および非イオン界面活性剤濃度に対する依存を調べて速度論的に解析することを試みた。

使用した非イオン界面活性剤はTable 4の6種である。表中のcmcは25°CでWilhelmy型表面張力計で測定した値を示す。

なお、本項の速度論的解析での実験条件は、温度25°C, pH10.5, 酵素濃度は酵素IIIが3.3mg/l, IVは0.5mg/lとした。

(1) 非イオン界面活性剤がプロテアーゼの加水分解速度に及ぼす影響

Fig. 3はAPE : C₁₂(EO)₇の濃度を0~1.0g/lの範囲で変化させて測定した酵素III, IVによるカゼインの加水分解量を、時間に対してプロットしたものである。加水分解量と時間の関係として上に凸の曲線となったが基質濃度をこれ以上高めても、これを改善することが出来なかったため、すべての測定を基質濃度100~300mg/lの範囲で行った。

なお、吸光度A(660)の加水分解量への変換は、別に検量した加水分解量とA(660)の関係の式

$$\text{加水分解量 (mg/l)} = 2,230 \times A(660) \dots\dots\dots (1)$$

を用いて行った。

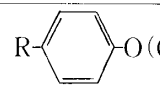
このように加水分解量が時間に対して直線にならない場合は常法として

$$k_0 = - \left(\frac{d \ln S}{dt} \right)_{t=0} = - \frac{1}{S_0} \left(\frac{dS}{dt} \right)_{t=0} = \frac{v_0}{S_0} \dots\dots\dots (2)$$

$$v_0 = k_0 \cdot S_0 \dots\dots\dots (3)$$

により、対数プロットの傾きから初速を求めることが出来る³³⁾。ここでSは基質濃度、tは時間、S₀は基質初濃

Table 4. Properties of nonionic surfactant samples

Surfactant sample	APE			PHE		
	C ₁₆ (EO) ₇	C ₁₂ (EO) ₇	C ₁₆ (EO) ₁₅	C ₉ φ(EO) ₁₀	C ₈ φ(EO) ₁₀	C ₉ φ(EO) ₁₅
General chemical structure	RO(CH ₂ CH ₂ O) _n H					
Molecular weight	550	494	903	661	647	881
HLB	11.0	12.5	14.5	13.0	13.5	15.0
cmc (g/l)	0.006	0.035	0.024	0.030	0.138	0.073

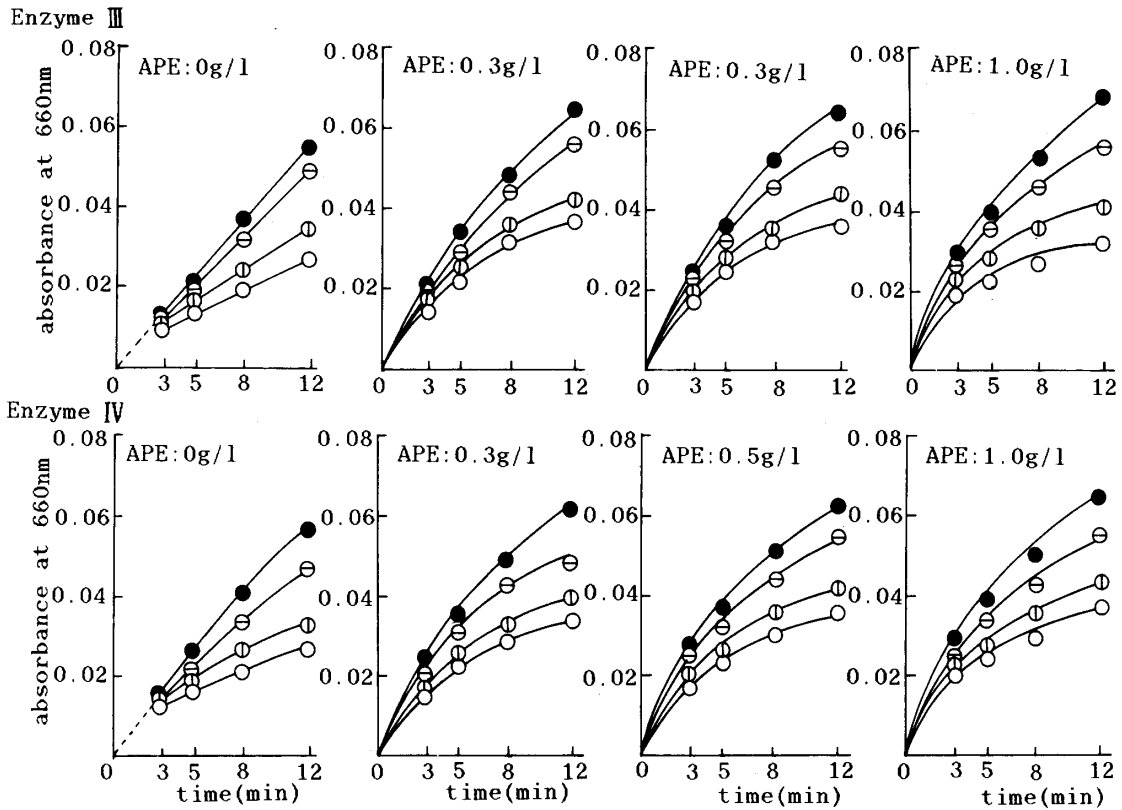


Fig. 3. Enzymic hydrolysis of substrate in the presence of $C_{12}EO_7$ at $25^\circ C$, pH 10.5.
 Enzyme sample III concentration $3.3mg/l$ and IV: $0.5mg/l$.
 Substrate concentration: \circ 100mg/l, \square 130mg/l, \triangle 200mg/l, \bullet 300mg/l

度を表し、 k_0 は見かけの1次反応速度定数を表している。

Fig. 4は、式(2)から求めた $C_{12}(EO)_7$ 添加系の酵素IVによる酵素反応の一次反応プロットの一例である。

Fig. 5は、 $C_{12}(EO)_7$ の濃度0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0g/l下での酵素IVの v_0 を、基質濃度Sに対して示したものである。この図から、活性剤濃度の低い0.1, 0.2g/lでの初速の増加は低いこと、0.3g/lで上昇しているが、この濃度でも基質濃度の高い系では上昇の割合は低いこと、0.5g/lでは基質濃度が高い系でも初速は大きく上昇していることが観察される。

そこで、このようにして求めた初速 v_0 の逆数と基質濃度の逆数についてLineweaver-Burkプロットした。Fig. 6は、 $C_{12}(EO)_7$ の酵素IVについての結果である。これらのプロットは、活性剤濃度の異なる直線群が縦軸上で交わる。これは拮抗阻害の場合と形式上は同じになるが、この場合は活性化なので、以下拮抗阻害の逆型と呼ぶ。ただし、活性剤濃度0.3g/lまでは基質濃度の高い系で活性の上昇が低い。このため基質濃度の高い系での測定点に忠実な線を引くと、縦軸上で活性剤0の線と交わず少し

上にずれている。

同様な傾向が他の活性剤 $C_{16}(EO)_7$, $C_{16}(EO)_{15}$, $C_8\phi(EO)_{10}$, $C_9\phi(EO)_{10}$, $C_9\phi(EO)_{15}$ でも観察され、それぞれ特定の活性剤濃度以上で縦軸の一点で交わる直線群が得られた。酵素IIIの洗剤配合用にカプセル化されている酵素でもこれと同様の結果が得られたが、 $C_{16}(EO)_7$ (Fig. 7)¹⁹⁾を添加した場合には、0.5g/lでもまだ縦軸上で交わっていないことが認められた。このように、活性剤がそれぞれの活性剤に固有のある濃度より低いと、拮抗阻害の逆型からのずれがあることがわかった。

このような現象は、非イオン界面活性剤のミセル形成と関係するのではないかと推定される。そこで、基質と活性剤共存下での溶液の表面張力を測定した。Fig. 8はその例で、 \triangle 印は基質が存在しない緩衝液中での界面活性剤濃度による結果である。この結果から、基質濃度が高くなるとcmcが各活性剤とも高濃度側にずれることがわかった。基質濃度300mg/lでのcmcは $C_{12}(EO)_7$: 0.12g/l, $C_8\phi(EO)_{10}$: 0.24g/l, $C_9\phi(EO)_{15}$: 0.16g/lであり、活性剤濃度が0.5g/lではcmc値を十分に超えていることが

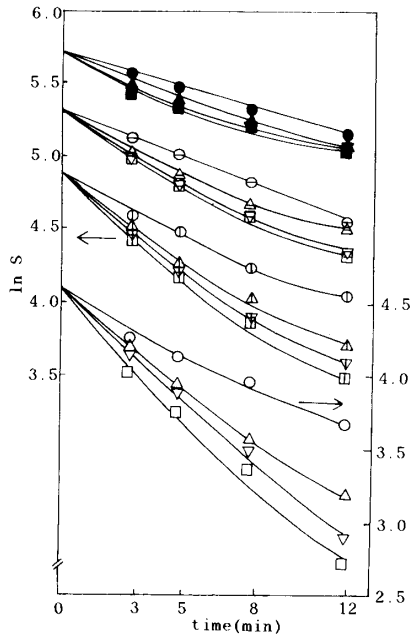


Fig. 4. Plots of enzymic hydrolysis at 25°C, pH10.5 against time as primary reaction process.

Enzyme sample IV. concentration: 0.5mg/l.

Substrate concentration: ○, △, ▽, □100mg/l;

⊙, ⊕, ⊖, ⊗130mg/l; ⊕, ⊖, ⊗, ⊘200mg/l;

●, ▲, ▼, ■300mg/l.

C₁₂(EO)₇ concentration ○, ⊙, ⊕, ●0g/l; △, ⊕, ⊖, ▲0.3g/l;

▽, ⊖, ⊗, ▼0.5g/l; ⊗, ⊘, ⊙, ■1.0g/l.

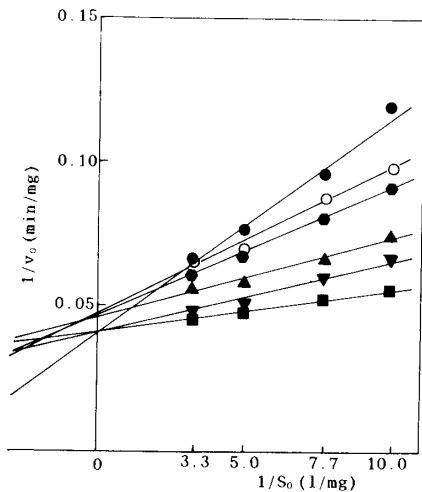


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots of the initial hydrolysis rate for the systems containing enzyme sample IV and C₁₂(EO)₇.

C₁₂(EO)₇ concentration: ●0g/l, ○0.1g/l, ●0.2g/l, ▲0.3g/l, ▼0.5g/l, ■1.0g/l.

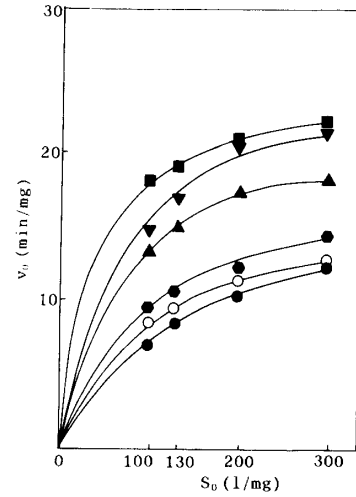


Fig. 5. Effect of substrate concentration on the initial hydrolysis rate of enzyme sample IV in the presence of C₁₂(EO)₇.

Enzyme sample concentration 0.5mg/l.

C₁₂(EO)₇ concentration: ●0g/l, ○0.1g/l, ●0.2g/l, ▲0.3g/l, ▼0.5g/l, ■1.0g/l.

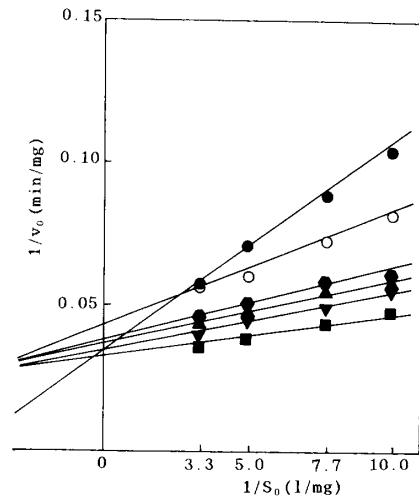


Fig. 7. Lineweaver-Burk plots of the initial hydrolysis rate for the systems containing enzyme sample IV and C₁₆(EO)₇.

C₁₆(EO)₇ concentration: ●0g/l, ○0.1g/l, ●0.2g/l, ▲0.3g/l, ▼0.5g/l, ■1.0g/l.

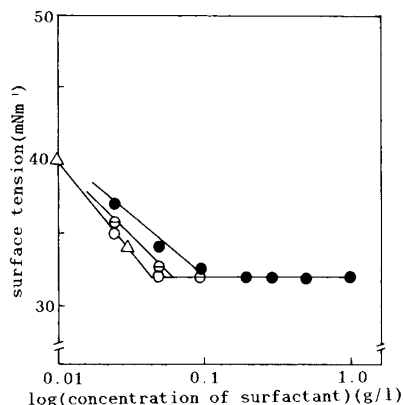


Fig. 8. Surface tension of the systems containing substrate and $C_{12}(EO)_7$.

Substrate concentration: Δ 0mg/l, \circ 100mg/l, \odot 130mg/l, \ominus 200mg/l, \bullet 300mg/l.

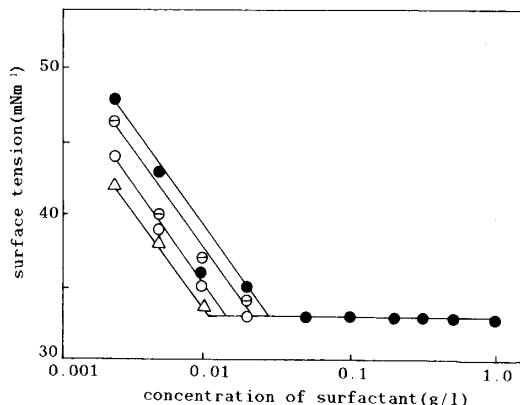


Fig. 9. Surface tension of the systems containing substrate and $C_{16}(EO)_7$.

Substrate concentration: Δ 0mg/l, \circ 100mg/l, \ominus 200mg/l, \bullet 300mg/l.

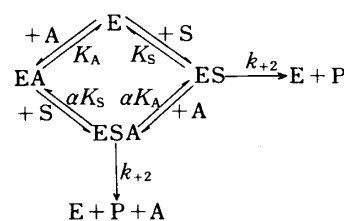
わかる。しかし、 $C_{16}(EO)_7$ (Fig 9)のcmcは0.04g/lと非常に低く、活性剤濃度0.2, 0.3g/lでは拮抗阻害の逆型に従っていない。この $C_{16}(EO)_7$ は、HLB値が11.0で、用いた活性剤のうちで最も疎水性が高いものである。これらの濃度ではcmcを超えているものの、恐らく疎水性カゼインのミセルへの結合が関与して酵素-ミセル相互作用が阻害されていると推定した。

以上のような非イオン界面活性剤添加による酵素活性の上昇が、カゼインのような高分子基質だけでなく低分子基質でも生じるかどうかは興味がある。そこで水溶性のglutaryl-Gly-Gly-Phe- β Naを基質として、非イオン界面活性剤存在下での加水分解速度を調べた。Fig. 10に $C_{12}(EO)_7$ の結果を示す。この基質では活性剤のcmcを超えると活性が低下することが明らかに認められた¹⁹⁾。このような基質による違いは、カゼインが分子量7.5~37.5万の巨大分子であるのに対し、glutaryl-Gly-Gly-Phe- β Naは分子量518.5で、用いた分子量494~903の界面活性剤と比較し得る程度の大きさの分子であることによると考えられる。これらの活性剤のcmc濃度以上では、基質は活性剤ミセル中に取り込まれて基質の加水分解点の酵素の活性点への接近が阻害されるが、カゼインでは、ミセルとカゼイン成分の相互作用点が加水分解点と離れているため、ミセル-酵素-基質の活性複合体の形成に有利となると推定した。

(2) 非イオン界面活性剤による酵素の活性上昇の機構
基質カゼインで生じた非イオン界面活性剤による酵素活性の上昇は、Lineweaver-Burkプロットの縦軸上で各

線が交わっている。S無限大、すなわち系に存在する酵素のすべてが基質と結合して加水分解にあずかっている時には、活性剤の有無にかかわらず、同じ初速を与えることを意味する。すなわち酵素-基質複合体の加水分解速度定数は、界面活性剤ミセルの存在によって影響されないで、界面活性剤ミセルの存在による活性上昇は、酵素-基質複合体の解離定数の減少によるものであると考えることができる。

以上のことから最も簡単な機構の1つとしてつぎの図式を考えた。



K_S は酵素-基質、 K_A は酵素-活性剤複合体の解離定数、 k_{+2} は加水分解の速度定数を示す。 α は解離定数の変化を示す係数で、この場合は1より小さくなる。酵素Eと基質Sの複合体から加水分解生成物Pが生じる他に、もう一つのルートの非イオン界面活性剤Aと酵素が結合した複合体と基質との三元複合体の解離定数が、酵素-基質複合体の解離定数 K_S の α 倍になると仮定した。ここで、お互いの結合におよぼす影響は対称的であるので、もう一つの酵素-基質-界面活性剤の複合体形成経路である

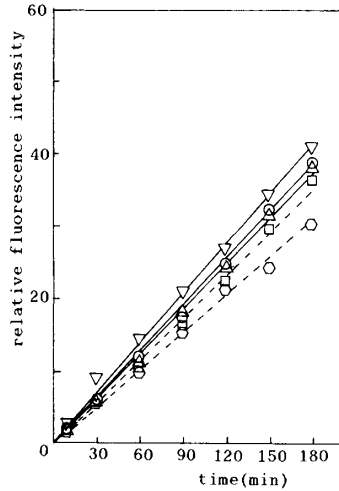


Fig. 10. Enzymatic liberation of β -naphthylamine from the model substrate in the presence of $C_{12}(EO)_7$ at 40°C , pH 10.5. Enzyme sample IV concentration: 0.2mg/l , Substrate(Glutaryl-Gly-Gly-Phe- β Na) concentration: 0.375mM . $C_{12}(EO)_7$ concentration: $\circ 0\text{g/l}$, $\triangle 0.01\text{g/l}$, $\nabla 0.03\text{g/l}$, $\square 0.07\text{g/l}$, $\diamond 0.1\text{g/l}$,

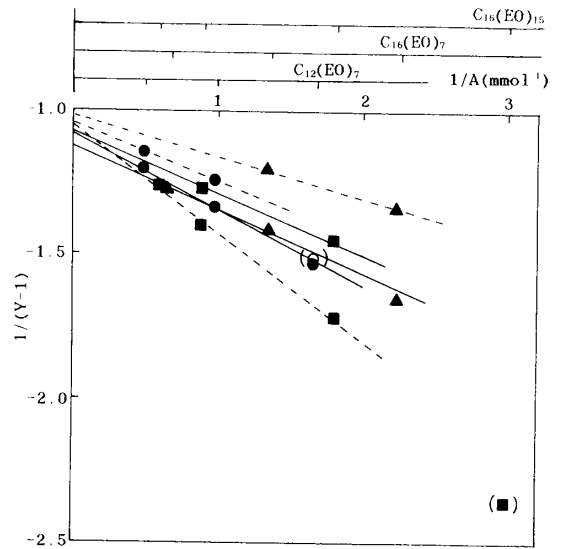


Fig. 11. Plots to estimate the kinetic parameters of enzyme/nonionic surfactant systems. \cdots enzyme sample III, --- enzyme sample IV. Enzyme sample concentration: III; 3.3mg/l , IV; 0.5mg/l . $\bullet C_{12}(EO)_7$, $\blacktriangle C_{16}(EO)_7$, $\blacksquare C_{16}(EO)_{15}$.

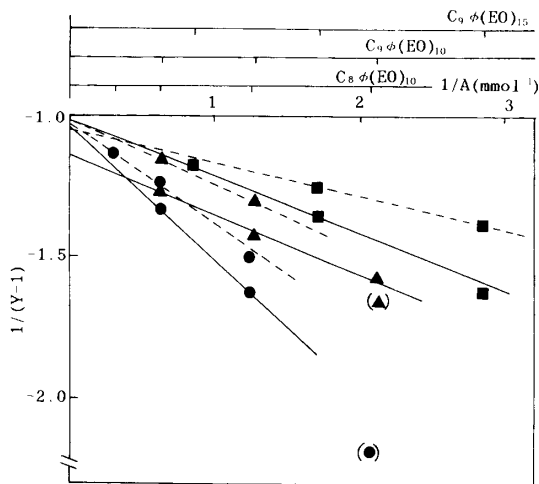


Fig. 12. Plots to estimate the kinetic parameters of enzyme/nonionic surfactant systems. \cdots enzyme sample III, --- enzyme sample IV. Enzyme sample concentration: III; 3.3mg/l , IV; 0.5mg/l . $\bullet C_8\phi(EO)_{10}$, $\blacktriangle C_9\phi(EO)_{10}$, $\blacksquare C_9\phi(EO)_{15}$.

$E + S + A \rightarrow ESA$ でも活性剤の解離定数も α 倍とならなければならない。なお、ここでは簡単のためにミセル濃度は活性剤濃度に比例すると仮定して $E + A \rightleftharpoons EA$ の平衡を考えているが、Aに関して一次であることは、これに比例するミセル1個が酵素と結合したものがSとの結合に関与すると考えていることになる。そこで、 $1/v_0$ は、次式で与えられる。

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} K_s \left\{ \frac{(1+A/K_A)}{(1+A/\alpha K_A)} \right\} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad \cdots (4)$$

ここで、 $V_{max} = k_2 E_0$

(4)式よりLineweaver-Burkプロットの縦軸の切片 $1/V_{max}$ から V_{max} が算出され、横軸の切片が

$$- \left[K_s \left\{ \frac{(1+A/K_A)}{(1+A/\alpha K_A)} \right\} \right] \text{となる。}$$

また $\{ \}$ 内の値は活性剤濃度別の直線の勾配を縦軸の切片で除いても得られる。

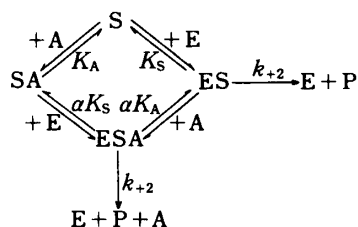
次に $\frac{(1+A/K_A)}{(1+A/\alpha K_A)} = Y$ と置くと

$$1 / (Y - 1) = \frac{\alpha K_A}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{\alpha - 1} \quad \cdots (5)$$

となり、Fig. 11, 12のように、縦軸に $1/(Y-1)$ を横軸に活性剤濃度の逆数 $1/A$ をプロットすると切片から α

が、勾配から K_A を評価することができる。

一方、基質Sと活性剤Aのコンプレックスと酵素との三元複合体 $AS + E \rightarrow SAE$ の図式(次式)



に従う活性上昇についても検討したが、先の図式による5式の直線性が大部分の非イオン界面活性剤について成立した。

Table 5¹⁹⁾は界面活性剤存在下での酵素III, IVについて、これらの解析結果をまとめたものである。この表中の酵素IIIは重量の1/7が酵素成分なので、重量で酵素IVの約7倍使用していることから、酵素IVと酵素IIIの活性は、ほぼ同一となった。なお、酵素IVの V_{max} は、 29 ± 2 と 25 ± 2 の2種になっているが、これは用いた酵素IVのロットが異なったためと推定される。

酵素-基質の解離定数 K_S は2種の酵素で、ほぼ200mg/l程度であり、また、酵素-界面活性剤の解離定数 K_A は酵素III-C₉φ(EO)₁₅の系以外は酵素種によらず、活性剤の疎水性が高い方が小さくなった。 α は2種の酵素で差を生じ、酵素IVは親水性が高い活性剤ほど小さく、酵素IIIはあまり差がないものの親水性が高い活性剤の方がやや大きくなった。

6種の界面活性剤についての結果を通して、酵素は界面活性剤ミセルとの複合体形成により、カゼインと10~数10倍結合し易くなるということができよう。

3. アルカリプロテアーゼによる加水分解における酸化剤の相乗効果

活性を上昇させたもう一種の成分である過ホウ酸ナトリウムが酵素の活性におよぼす影響については、これまでに残存活性を求めて負の効果を示した報告がある³³⁾³⁴⁾。しかし、正の効果を示した報告は他には無いようである。現在、日本でも過ホウ酸ナトリウムは酵素と共に家庭用の洗剤の一部に配合されており、また、過炭酸ナトリウムが主成分である漂白剤中には酵素が配合されている。そこで、カゼインの加水分解における酵素と酸化剤の相乗効果を調べ、その機構を明らかにすることを目的として、酵素、基質、酸化剤の接触順序及び、酸化剤濃度を変化させて加水分解量を測定し、さらにカゼイン分解物の分子量をゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)により追跡することにより、酵素と酸化剤のカゼイン分解に対する効果を明らかにした²⁰⁾。

(1) 酸化剤添加によるカゼインの加水分解量

使用した酵素は前項2と同様、Table 3の酵素III, IVで、酸化剤は過ホウ酸ナトリウム(試薬特級和光製)、過炭酸ナトリウム(純正化学製)、過酸化水素(試薬1級国産化学製)の3種を用いた。基質カゼイン10g/l、酵素濃度:酵素IIIは50mg/l、酵素IVは5mg/l、40°C、pH10.5という実験条件下でカゼインの加水分解量を以下の手順で求めた。

Table 5. Kinetic parameters for enzyme/nonionic surfactant systems

Enzyme sample	III				IV	
Nonionic surfactant	C ₁₆ (EO) ₇	C ₁₂ (EO) ₇	C ₁₆ (EO) ₁₅	C ₁₆ (EO) ₇	C ₁₂ (EO) ₇	C ₁₆ (EO) ₁₅
V_{max} (mg/min)	25 ± 2	24 ± 3	24 ± 3	29 ± 2	25 ± 2	25 ± 2
K_S (mg/l)	200 ± 20	220 ± 30	220 ± 30	230 ± 10	200 ± 20	200 ± 20
K_A (mmol/l)	(3.1)	(3.8)	6.9	2.1	3.7	(4.2)
α	(0.04)	(0.05)	0.05	0.10	0.07	(0.05)
Nonionic surfactant	C ₉ φ(EO) ₁₀	C ₈ φ(EO) ₁₀	C ₉ φ(EO) ₁₅	C ₉ φ(EO) ₁₀	C ₈ φ(EO) ₁₀	C ₉ φ(EO) ₁₅
V_{max} (mg/min)	25 ± 2	24 ± 3	25 ± 2	29 ± 2	25 ± 2	29 ± 2
K_S (mg/l)	220 ± 20	220 ± 30	220 ± 20	230 ± 10	200 ± 20	230 ± 10
K_A (mmol/l)	(9.8)	11.3	(2.0)	1.5	(8.9)	9.8
α	(0.02)	0.03	(0.06)	0.12	(0.05)	0.02

Parenthesized values and those estimated on the the two experimental points obtained at relatively high surfactant concentrations.

1) 酸化剤がCasein-Folin呈色B法の呈色を妨害しないことの確認

還元剤はCasein-Folin呈色B法の呈色の妨害物質として挙げられているが³⁵⁾、今回用いる酸化剤は呈色に影響しないことを、もう一つのタンパク質の定量法である分解物の275nm付近の吸光度の測定により確かめた。なお、ここで用いた酸化剤では275nm付近の吸収は認められなかった。

Fig. 13は酵素III, IVについて、異なる濃度の過ホウ酸ナトリウム、過炭酸ナトリウム、過酸化水素を添加した場合の分解物の呈色による660nmの吸収の測定値と、275nmの測定値をプロットしたものである。両者の関係が原点を通る直線であることから、3種の酸化剤がフェノール試薬による呈色に影響を及ぼさないことがわかった。以下の実験では、より精度の高い³⁶⁾Casein-Folin呈色B法により分解量を求めた。

2) 酸化剤添加による酵素の活性変化

使用した2種の酵素の活性が酸化剤によって低下しないことを、酸化剤添加後の酵素の残存活性が変わらない

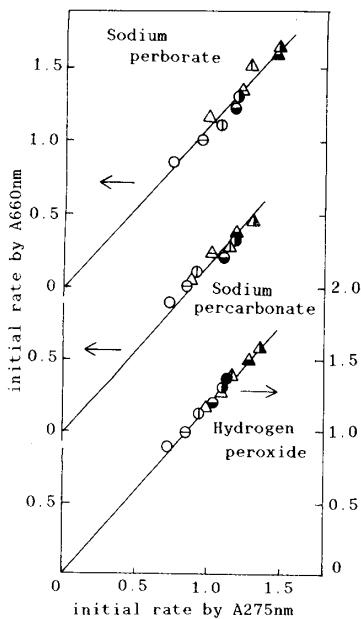


Fig. 13. Plots of slopes of 275nm and 660nm absorption for enzymic hydrolysis casein at 40°C, pH 10.5

Enzyme sample concentration: ○⊖⊕●● III 50mg/l, △△△▲▲ IV5mg/l. Substrate concentration: 10g/l. Oxidizing agent concentration: ○△; 0m mol, ⊖△; 3m mol, ⊕△; 5m mol, ●▲; 10m mol, ⊕▲; 20m mol, ●▲; 30m mol.

ことから確かめた。Fig. 14は40°Cで酸化剤溶液に酵素を加え、30分保ったのち、基質カゼイン溶液と混合し、20分後の分解量を酸化剤無添加系との分解量の比を求めたものである。いずれの温度、酸化剤でも95-104%の活性を示すことから、これらの酸化剤は酵素の活性を低下させないと判断した。

3) 酵素と基質とを接触させたあとに酸化剤を添加した場合の分解量

Fig. 15には、酵素溶液とカゼイン溶液を混合したあと5分後に所定濃度の過ホウ酸ナトリウム、過炭酸ナトリウム溶液を加えた5~20分後の加水分解量を示す。○, △印は酸化剤溶液の代わりに緩衝液を加えた場合の結果を示している。酸化剤の添加により、過ホウ酸ナトリウム、過炭酸ナトリウムとも直線的に分解量が増加していることがわかる。酵素IV+過炭酸ナトリウムの系は増加率が低い、他の系では20mMで20%前後分解量が増加していることがわかる。

4) 酸化剤と基質を接触させたあとに酵素を添加した場合の分解量

酸化剤のみによるカゼイン分解物は、呈色法によれば非常に少量である。例えば40°C, pH10.5において過ホウ酸ナトリウム0, 5, 10, 20mMの存在により、70分後にそれぞれ、溶液のA(660)値で、0.04, 0.08, 0.09, 0.17であった。これらの値は、Fig. 15に示した酵素分解によるA(660)の値に較べて大変小さい。過炭酸ナトリウムも30mMまでの濃度では分解は少量であった。これは、酸化剤による分解は、呈色法において分解物を分離させる酸性条件下での沈澱に際し、沈澱しないような低分子量物

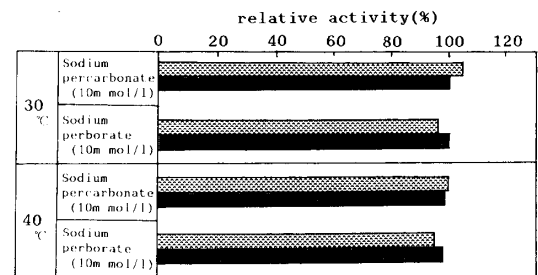


Fig. 14. Effects of oxidizing agent on the enzymic hydrolysis at 30°C and 40°C pH 10.5. (E+O/30min+S)

Enzyme sample ■■■ III concentration: 300mg/l, ■■■ IV concentration: 30mg/l. Substrate concentration: 10g/l.

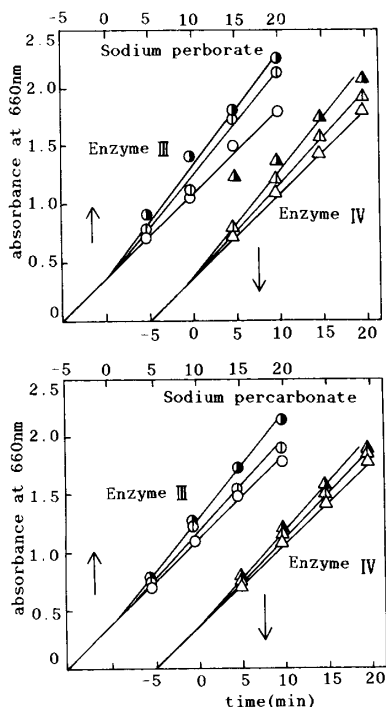


Fig. 15. Effects of oxidizing agents on the enzymic hydrolysis at 40°C, pH 10.5(E+S/5min+O)

Enzyme sample III concentration: 50mg/l and IV concentration: 50mg/l
 Substrate concentration: 10g/l. Oxidizing agent concentration: ○△; 0m mol, ⊕△; 5m mol, ●▲; 20m mol.

に分解しないことを示しているものと考えられる。

Fig. 16は、基質のカゼイン溶液調整時に酸化剤を0~20mM基質に添加し、40°Cで30分保ったのち、酵素を接触した場合の分解量と時間との関係を示したものである。酵素III, IVともに酸化剤の添加濃度の上昇に従って分解量が増加していることがわかる。特に10mMまでの低濃度での増加率が高く、少量の酸化剤の添加によって酵素による加水分解速度が速くなることが認められる。この効果は2種の酵素で異なり、酵素IIIでより大きな効果が観察された。

5) 酵素, 基質, 酸化剤の接触順序と分解量

Fig. 17に酵素(E), 基質(S), 酸化剤(O)の接触順序による加水分解速度の違いをまとめて示した。酵素と基質とを接触させたあとで、酸化剤を添加した場合の分解量の増加量は酸化剤を添加しない場合の110~120%であった。それに対して、基質と酸化剤を接触したあと酵素を

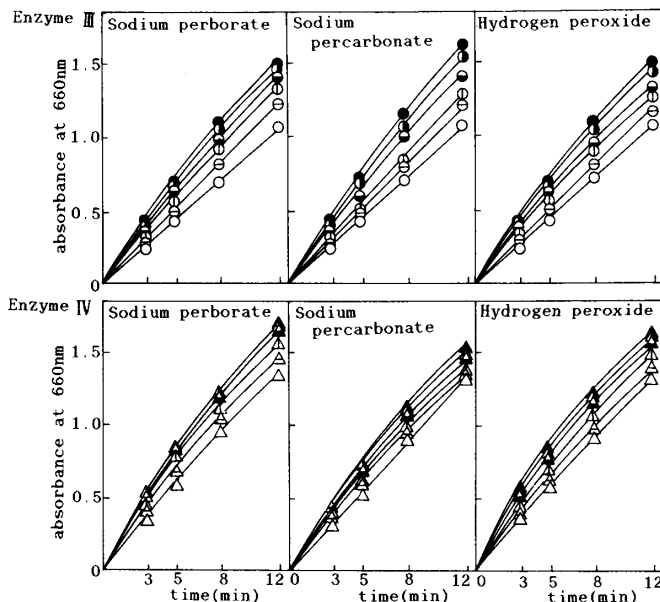


Fig. 16. Effects of oxidizing agents on the enzymic hydrolysis at 40°C, pH 10.5.(S+O/30min+E)

Enzyme sample III concentration: 50mg/l and IV concentration 5mg/l. Substrate concentration: 10g/l. Oxidizing agent concentration: ○△; 0m mol, ⊖△; 3m mol, ⊕△; 5m mol, ●▲; 10m mol, ●▲; 20m mol, ●▲; 30m mol.

添加した場合には、酵素IIIは160%程度、酵素IVでは150%程度と分解量が大きく増加した。

いずれの酸化剤でも、まず基質と接触させたのち酵素を添加した場合に相乗効果が大きいことが明らかである。

6) カゼインの構成成分別による酵素の加水分解に及ぼす酸化剤の影響

基質カゼインについてはI.4で述べたが、その構成成分が複雑な物質であることから、プロテアーゼの分解作用に酸化剤が相乗効果を持つ理由を探る目的で、カゼインの構成成分であるα, β, κカゼイン別に酵素の加水分解に及ぼす酸化剤の添加効果について調べた。

a) カゼイン成分の加水分解速度

Fig. 18は、カゼインおよびα, β, κカゼインについて酵素III, IVによる加水分解量と時間との関係を示したものである。この図から2種の酵素ともβカゼインの加水分解速度が他の成分より著しく速く、αカゼインは最も遅い

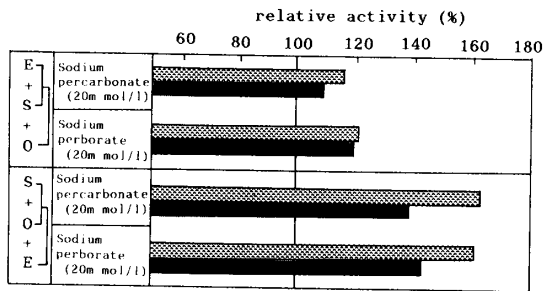


Fig. 17. Effects of contact sequences of enzyme peroxide with casein on the relative activity of enzyme at 40°C, pH 10.5. Enzyme sample III concentration: 50mg/l and IV concentration 5mg/l.

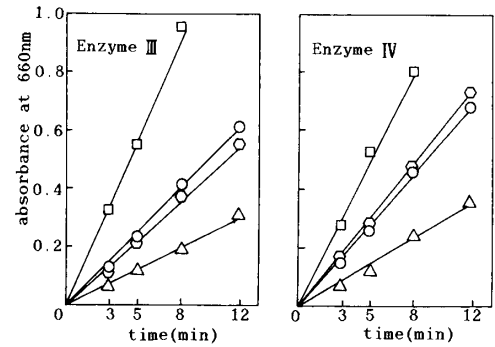


Fig. 18. Differences in the enzymic hydrolysis of casein and α , β and κ casein at 40°C, pH 10.5.

○: casein, △: α casein, □: β casein, ◻: κ casein
Enzyme sample III concentration: 25mg/l and IV concentration: 2.5mg/l, Substrate concentration: 5g/l.

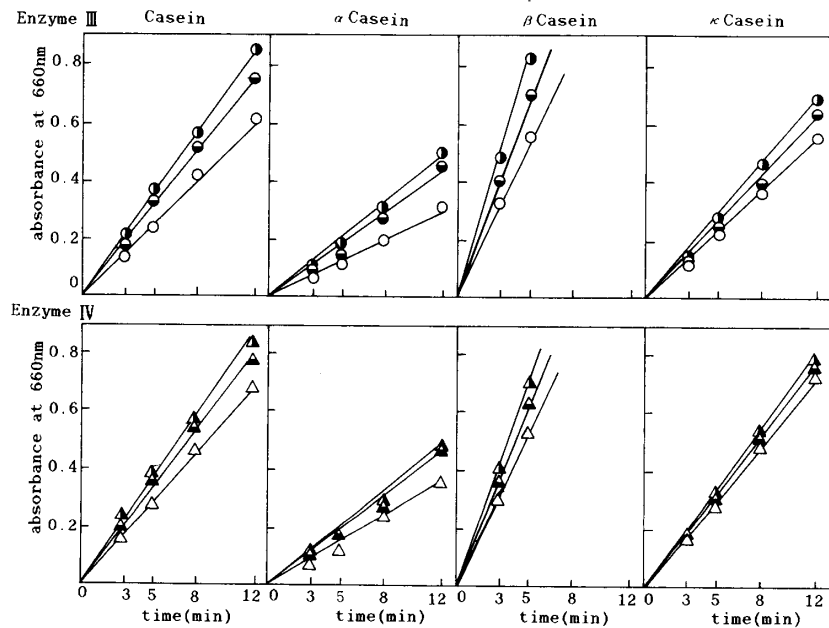


Fig. 19. Effects of Sodium percarbonate on the enzymic hydrolysis casein and α , β and κ casein at 40°C, pH 10.5.

Enzyme sample III concentration: 25mg/l and IV concentration: 2.5mg/l. Substrate concentration: 5g/l. Sodium percarbonate concentration: ○△; 0m mol, ●▲; 10m mol, ◐◑; 20m mol.

ことがわかった。

先に述べたように、カゼインは、本実験で用いた溶液中ではいくつかのサブミセルから成るミセルとして存在し、このミセルは表面に α カゼインと κ カゼインから成るサブミセルから、内部に α カゼインと β カゼインから成るサブミセルから成っている。ミセル内部に存在する β カゼインの加水分解速度は速く、ミセル表面に存在する κ カゼ

インはカゼイン（複合体）と同程度であり、両部分に存在する α カゼインの加水分解速度が遅く、カゼインの加水分解速度は α , β カゼインの間であることから、酵素は、カゼインミセルの内部にまで充分浸透し反応しているものと考えられる。

b) カゼイン成分の酵素による加水分解におよぼす酸化剤の影響

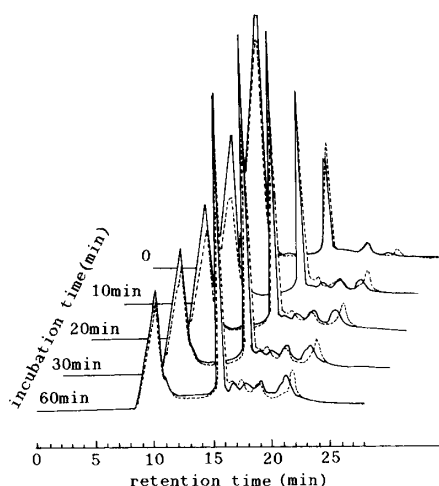


Fig. 20. Comparison of gel permeation chromatograms of casein degraded with sodium percarbonate + Enzyme IV at 40°C, pH 10.5.

Enzyme sample concentration: 2.5mg/l. Casein concentration: 5g/l. Sodium percarbonate concentration: — 0m mol, 10m mol.

Fig.19は、酵素III, IVによるカゼイン, α , β , κ カゼインの加水分解量と時間との関係を示したものである。いずれの成分も過炭酸ナトリウムの添加により加水分解量は増加した。特に添加効果の著しい成分はなかったが、 κ カゼインは酸化剤の相乗効果がやや低く、酵素IVでは特にそうであった。

α , β , κ カゼインに対する相乗効果とカゼインに対する相乗効果を比較すると、加えられた酸化剤が3種のカゼインに対して与える相乗効果が加算されて、カゼインに対する効果が生じているものと考えられる。酵素と同様に酸化剤もカゼインミセル内部まで移動して反応していると推定される。

(2) ゲルろ過カラムによるカゼイン分解物の分子量の追跡

これまでに用いたカゼイン分解物の定量法は、分子の溶解性により分解物を大別したものである。カゼインの酵素による分解に対する酸化剤の相乗効果を探る目的で、カゼインがどのように分解されているかをGPC法を用いて以下のように追跡した。

用いた装置は日立製L-6000形ポンプと655A-23形波長可変UVモニター、655A-52形カラムオープン、D-2500形クロマトデータ処理装置及び水系GPC分析カラムGL-W 5 5 0 (カラムサイズ: 10.7mm ϕ ×300mm)からなる

高速液体クロマトグラフ装置である。測定条件はカラム温度: 40°C, 溶離液: 蒸留水(和光製, 液クロ用), 流速: 1.0ml/min, サンプル量: 20 μ l, 検出: UV220nmとした。

まず、分子量決定のため7種の分子量既知のタンパク質を溶出し、それぞれの分子量の対数と溶出時間の関係から検量線を作製した。

次に、基質カゼインの酵素IVおよび酸化剤による分解挙動を以下の方法で分析した。

サンプルは、試験管中にて40°Cで30分予熱した6g/lのカゼイン溶液 5 mlに、15mg/lの酵素IVの溶液 1 mlを加え、40 \pm 0.5°Cのインキュベーター中に静置して所定時間反応させたのち分析に供した。

Fig.20に、過炭酸ナトリウムと接触させたのち酵素により分解した場合のカゼイン溶液のGPCチャートを点線で示す。実線は過炭酸ナトリウムを添加しない場合のチャートである。

この図で保持時間12分までのピークは、このカラムの排除限界(200万)に近く、分子量1万から数10万程度にあたり、カゼインとその集合体のピークである。16分が分子量1,000程度の分解物のピーク、17分以後のピークは分子量500以下の分解物のピークで、このうち19分のピークには緩衝液成分も含まれている。

酵素を加える前の分解物のチャートを比較すると、酸化剤により分子量約1,000の分解物がより多く生成していることが認められる。その後の酵素添加により、酸化剤を添加した系では分解されていないカゼインのピークが明らかに減少しているが、酵素添加後30分以上経つと、分解されていないカゼインの量は酸化剤を添加していない系に次第に接近している。

また、酵素添加後の分子量1,000付近のピークは、酸化剤添加の場合には、加えていない場合よりピークの高さは少し低いが、低分子量側に幅が広がり、量としては多くなっており、さらにそれ以後の低分子物のピークが時間と共に増加している。これらの分解物の量的変化は、酸化剤により、まずカゼインが大きく分解されて分子量1,000前後の分解物となり、それが酵素により、より早く分解されることを示している。

なお、酵素を添加しないと、酸化剤を添加(10mM)して40°C, pH10.5で120分処理しても17分以後のピークは現れなかった。

Fig.21は分子量1,000以下のものを分解物として、分解していないカゼインの量と分解物の総量を求めて時間に対してプロットしたものである。この図から明らかかな

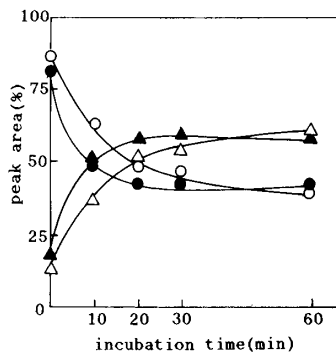


Fig. 21. Variations with time of the amounts of nondegraded and degraded casein as observed with GPC.

Enzyme sample IV concentration: 2.5mg/l. Casein concentration: 5g/l.

- : Area of the peak observed at about 10min on GPC for casein degraded with enzyme. The area stands for the amount of nondegraded casein.
- : The same for casein degraded with sodium percarbonate and enzyme. The area stands for the same as above.
- △: Total area of the peaks observed at 15 min and after on GPC for casein degraded with enzyme. The area stands for the total amount of degraded casein.
- ▲: The same for casein degraded with sodium percarbonate and enzyme. The area stands for the same as above.

うに、酸化剤を先に添加した系では分解されないカゼインの減少が大きく、分解されたものの増加も大きいことがわかる。酵素添加後10分の分解量の増加は、呈色反応で見出だされた加水分解加速度とほぼ対応した。先に述べたように保持時間12分でのピーク中には分子量数万以上のカゼイン成分と分解物が含まれる。酸化剤による分解によりまず生じる分解物は、このピーク中に含まれるが、それが、非分解物より早く加水分解されるので相乗効果が観察されると考えられる。

III. ま と め

洗剤成分がアルカリプロテアーゼの活性に及ぼす影響を、Casein-Folin呈色B法による加水分解量及びGPCによるカゼインの分子量の追跡から検討した。

1. 洗剤成分15種が酵素の活性に及ぼす影響は
 - (1) 活性を変化させないもの (Na_2SiO_3 , Na_2CO_3 , CMC)
 - (2) 下げるもの (DBS, AS, AOS, Na_2SO_4 , NTA, 蛍光剤)
 - (3) 上げるもの (APE, PHE, NaBO_3)
 - (4) 長時間経過後に下げるもの (ゼオライト)
 の4種に分類できた。
2. 活性を上昇させた非イオン界面活性剤APE, PHEの効果の機構を速度論的に解析した。活性剤濃度別によるLineweaver-Burkプロットから、拮抗阻害の逆型に従う活性上昇がカゼインと活性剤を含む系での活性剤のcmcより十分高い濃度領域で起こることを見出した。この非イオン界面活性剤による酵素の活性上昇の機構は、1個の活性剤ミセルと結合した酵素と基質の解離定数が1/10程度になることによることを推定した。
3. 活性を上昇させたもう一種の過ホウ酸ナトリウムなどの酸化剤によるカゼインの分解に及ぼす相乗効果は
 - (1) 酵素、基質、酸化剤の接触順序により差が生じ、最も加水分解量が増加したのは基質と酸化剤を接触させたあとに酵素を接触させた場合で、加水分解量は約160%まで増加した。
 - (2) 基質と酸化剤とを接触させたあとに酵素を接触させた場合が最も加水分解量が増加した理由をゲルろ過カラムによる分解物の分子量の追跡から調べ、過炭酸ナトリウムなどの酸化剤の相乗効果は、酸化剤により分子量1万程度に分解されたカゼインが酵素の加水分解作用を受け易くなるためと推定した。

本研究を行うにあたりご懇切なるご指導を賜りました本学教授岡村浩先生、奥山春彦先生、東京工業大学教授小見山二郎先生に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 皆川 基, 所 泰子, 奥山春彦, 藤井富美子: 繊維消誌, **10**, 60 (1969)
- 2) 皆川 基: 染色工業, **18**, 255 (1970)
- 3) 所 泰子, 皆川 基: 繊維消誌, **26**, 123 (1985)
- 4) M.Kame, H.Koda, A.Kato, Y.Koma: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 464 (1973)
- 5) P.N.Christensen, P.Holm and B.Sonder: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 109 (1978)
- 6) M.H.Nielsen, S.J.Jepsen, H.Outtrup: *J.*

- Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 644 (1981)
- 7) C.A.Starace : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 165A (1981)
- 8) 坂口 博, 上野琴子 : 油脂, **36**, 52 (1983)
- 9) 小野打 喬 : フレグランス ジャーナル, **73**, 79 (1985)
- 10) 横須賀道夫, 鈴木 哲, 村田守泰 : 第17回洗浄に関するシンポジウム講演要旨, 82 (1985)
- 11) 皆川 基, 重田美智子, 所 泰子, 奥山春彦 : 繊維消誌, **13**, 525 (1972)
- 12) 所 泰子, 皆川 基 : 繊維消誌, **28**, 116 (1987)
- 13) 小ノ澤治子, 小見山二郎 : 日本家政学会第39回大会研究発表要旨, 143 (1987)
- 14) 中西茂子 : 家政誌, **24**, 545 (1973)
- 15) 村田守泰 : フレグランス ジャーナル, **53**, 89 (1982)
- 16) 皆川 基 : 第18回洗浄に関するシンポジウム講演要旨, 76 (1986)
- 17) 小ノ澤治子, 小見山二郎 : 家政誌, **39**, 1373 (1988)
- 18) 小ノ澤治子, 上甲久美子, 小見山二郎 : 家政誌, **41**, 1061 (1990)
- 19) 小ノ澤治子, 上甲久美子, 小見山二郎 : 家政誌, **42**, 363 (1991)
- 20) 小ノ澤治子, 上甲久美子, 小見山二郎 : 家政誌 1992年2月号掲載予定
- 21) 永山升三 : 表面, **23**, 287 (1985)
- 22) 永山升三 : 繊維消誌, **29**, 463 (1988)
- 23) P.L.Liss, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 507 (1969)
- 24) C.S.Wright, R.A.Alden, J.Kraut : *Nature*, **221**, 235 (1969)
- 25) P.Berth, M.J.Schwuger, *Tenside Detergents*, **18**, 175 (1979)
- 26) 子巻利章 : 酵素応用の知識, 幸書房, 東京, 16 (1986)
- 27) H.E.Swaisgood : in *Developments in Dairy Chemistry* (Fox, P.F., ed). Appl Sci. Publ., Londo and New York, 1, 1 (1982)
- 28) J.-C.Mercier, F.Grosclaude, B.Ribadeau Dumas : *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41 (1971)
- 29) B.Ribadeau Dumas, G.Brignon, F.Grosclaude, J.-C.Mercier : *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505 (1972)
- 30) J.-C.Mercier, G : Brignon, B.Ribadeau Dumas : *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222 (1973)
- 31) P.Walstra : *J. Dairy Res.*, **46**, 317 (1979)
- 32) D.G.Schmidt : Association of casein aod casein micelles structure, *Developments in Dairy Chemistry 1* (ed.Fox, P.F.), p61, Applied Science Pub., London and New York (1982)
- 33) 廣海啓太郎 : 反応解析の実際, 講談社サイエンティフィック, 東京, 125 (1986)
- 34) 皆川 基, 重田美智子, 所 泰子, 奥山春彦 : 繊維消誌, **13**, 519 (1972)
- 35) 奥村 統, 向山恒治 : 油化学, **36**, 52 (1987)
- 36) 菅原 潔, 副島正美 : 蛋白質の定量法, 学会出版センター, 東京, 112 (1982)
- 37) 赤堀四郎編 : 酵素研究法 2, 朝倉書店, 東京, 242 (1955)