

合の7剤中1剤が特にすぐれたセルラーゼ, ヘミセルラーゼ活性を示した。

5. 崩壊度試験の結果, 錠剤3剤とも崩壊不良, 糖衣錠は6剤中4剤が, カプセル剤は3剤中2剤が崩壊度おおむね良好であった。

6. 以上の各試験結果から韓国消化酵素剤のうち in vivo において優れた酵素活性を発揮できるのは少数の製剤と思われる。

## 文 献

- 1) 杉浦, 田中, 棚橋, 小木曾, 加藤: 岐阜薬大紀要, **14**, 57 (1964)
- 2) R. M. Mccread, W. T. Hassied: J. Am. Chem. Soc., **65**, 1154 (1943)
- 3) M. L. Anson: J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1938)
- 4) 日本化学会編: 実験化学講座, **24**, 241 (1958) 丸善
- 5) 山田, 町田: 農化, **36**, 860 (1962)
- 6) Sumner. J. B.: J. Biol. Chem., **47**, 5 (1921); J. Biol. Chem., **65**, 393 (1925)
- 7) G. L. Miller, R. Blum, Wiliam E. Glennon, A. L. Burton: Analy. Biochem., **2**, 127 (1960)
- 8) Somogyi. M.: J. Biol. Chem., **160**, 61, 74 (1945)
- 9) Börgstrom et al: J. Clin. Invest., **36**, 152 (1957)
- 10) 飯沼, 遠山: 薬剤学, **21**, 48 (1961)
- 11) 岡崎, 石川: 薬剤学, **24**, 72 (1964)
- 12) 福本: 応用酵素講習会テキスト, P. 18 (1965)
- 13) 外山: 醸協, **10**, 415; **11**, 459 (1963)
- 14) 松原, 栗原: 薬剤学, **13**, 84 (1954)
- 15) 野上: 薬剤学, **15**, 212 (1955)
- 16) 宮道, 杉浦: 薬剤学, **11**, 38 (1952)
- 17) 黒田, 日原: 薬剤学, **18**, 121 (1958)

---

杉浦衛, 伊藤万蔵, 小木曾太郎, 田中英郎, 佐々木正憲: 酵素剤の研究 (31)\*<sup>1</sup>

市販酵素剤の酵素蛋白純度\*<sup>2</sup>

Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Taro Ogiso, Hidero Tanaka, Masanori Sasaki:

Studies on Enzyme Preparations (XXXI)\*<sup>1</sup>

Deduction of Protein Purity of Commercial Enzymes.\*<sup>2</sup>

近年酵素化学の発展はめざましいものがあり, 新しい酵素剤が次々と開発されてきている。しかし, これらの酵素剤の酵素蛋白純度はかなり広範囲に分布しているものと思われ, 比較的純度の高いものから極めて純度の低いものまでさまざまである。

---

\*<sup>1</sup> 第30報は本誌

\*<sup>2</sup> 本研究は東海薬学会例会 (1967年2月) にて発表した。

このように酵素蛋白純度が大きく異なるということは、酵素の製剤化において極めて重要な問題点になってくる。すなわち、純度が低い場合には、いろいろな酵素が夾雑しており、その酵素剤に他の酵素剤を配合するとある種の酵素活性を著しく阻害がよく認められるからである。

そこで著者らは、現時点における市販消化酵素剤を主体とした各種酵素剤の酵素蛋白純度について検討することにした。酵素蛋白純度の測定には溶解度法<sup>1)</sup>、チゼリウス電気泳動法<sup>2)</sup>、ディスク電気泳動法<sup>3)</sup>、超遠心法<sup>4)</sup>、ゲルろ過法<sup>5)</sup>、分配係数を利用する方法<sup>6)7)</sup>などがあるが、今回は酵素剤の性質上著者らが光に報告した酵素蛋白純度推定法<sup>8)</sup>を用いることにした。

## 1. 実験方法

市販酵素剤を精製水にて適宜希釈（通常 2,000 倍希釈）して波長 230 m $\mu$  から 300 m $\mu$  までの吸収を 5 m $\mu$  おきに日立 EPU-2A 型分光光度計を用いて測定した。

## 2. 実験結果

### 2-1 吸収スペクトルよりみた酵素剤の純度

まず最初に細菌起源の酵素剤（ほとんど $\alpha$ -アミラーゼ剤である。）は Fig.1~3 の如くで吸収スペクトルがシャープでなく、酵素蛋白純度はかなり低いものと思われる。

つぎに放線菌起源の酵素剤（現在までに市販されているものはプロテアーゼ剤のみである。）は、Fig.4 に示す如く細菌起源のものに比して純度が高いように思われる。

最も多く用いられている糸状菌起源の酵素剤は、Fig.5-9 の如く純度はさまざまに低いものからかなり高いものまで存在することが明らかとなった。

また、植物起源の酵素剤は Fig.10 に示す如く比較的純度が高く古くより消化酵素剤として用いられているものが多い。

最後にパンクレアチンに代表される動物起源の酵素剤は Fig.11 に示す如く酵素純度はかなり低く、核酸系物質を多く含むので 260m $\mu$  において極めてシャープなピークを有している。これは他の起源の酵素剤には認められない大きな特徴で製剤化された酵素剤中の酵素の起源を追求しようとする場合極めて有力な手がかりになるものと思われる。しかし、同じ動物起源の酵素でもかなり精製されたものは Fig.12 に示す如く一般の蛋白の吸収スペクトルを示す。

以上の結果より酵素剤中の酵素蛋白の純度を起源別にみると植物起源のものは最も純度が高く、動物起源、細菌起源のものは純度が低いように思われる。また、最も繁用されている糸状菌起源の酵素純度はかなり広範囲に分布しており、 $\alpha$ -アミラーゼおよびプロテアーゼ剤には消化剤として非常に純度の高いものがみうけられた。

### 2-2 280 m $\mu$ / 260 m $\mu$ 比よりみた酵素剤の純度

#### 2-2-1 $\alpha$ アミラーゼを主体とした総合消化酵素剤

$\alpha$  アミラーゼを主体とした総合消化酵素剤では Table I に示す如く、糸状菌起源、細菌起源および動物起源と大きく三つに分類される。まず、タカジアスターゼ、ピオジアスターゼに代表される糸状菌起源のアミラーゼ剤は、吸収極大が平均 278.5m $\mu$ 、吸収極小が平均 251.4m $\mu$ 、吸収極大/吸収極小比は平均 1.494、280m $\mu$  / 260m $\mu$  比は平均 1.345 であった。この結果は消化酵素剤として極めて古くより繁用されている歴史的背景ばかりでなく、酵素純度的に優秀な酵素剤であることを示している。

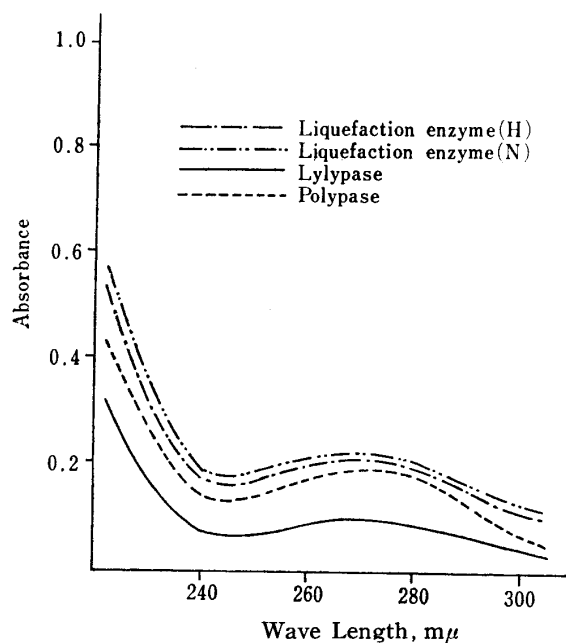


Fig. 1 Absorption Spectra of Bacterial Enzymes

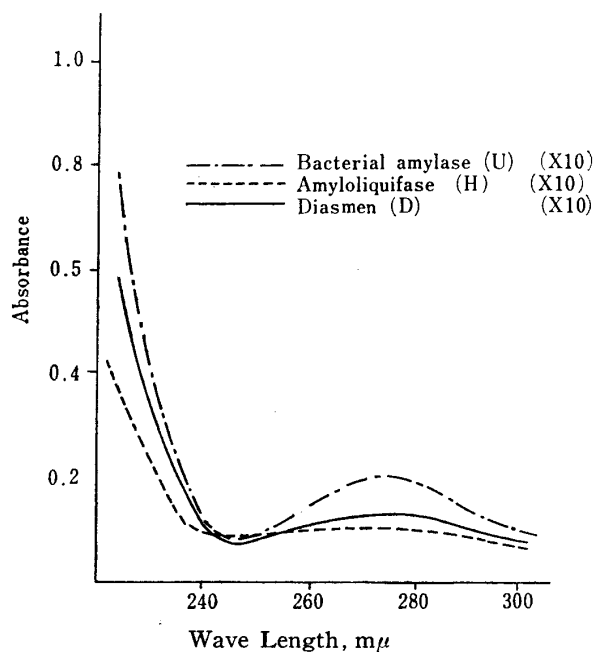


Fig. 3 Absorption Spectra of Bacterial Enzymes

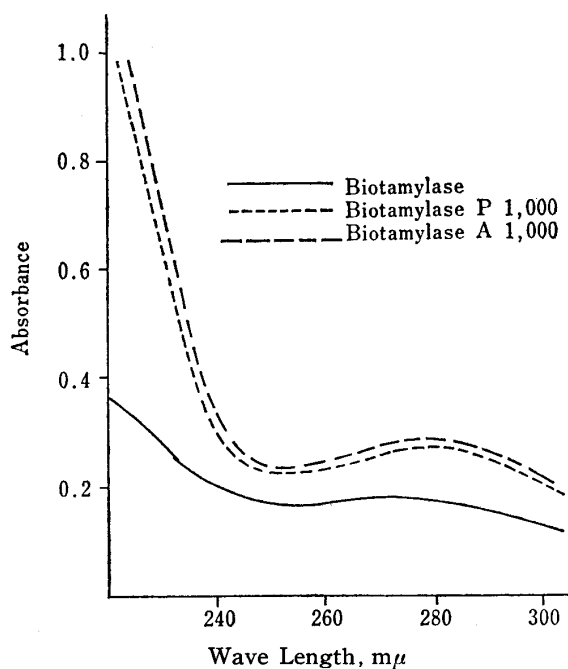


Fig. 2 Absorption Spectra of Bacterial Enzymes

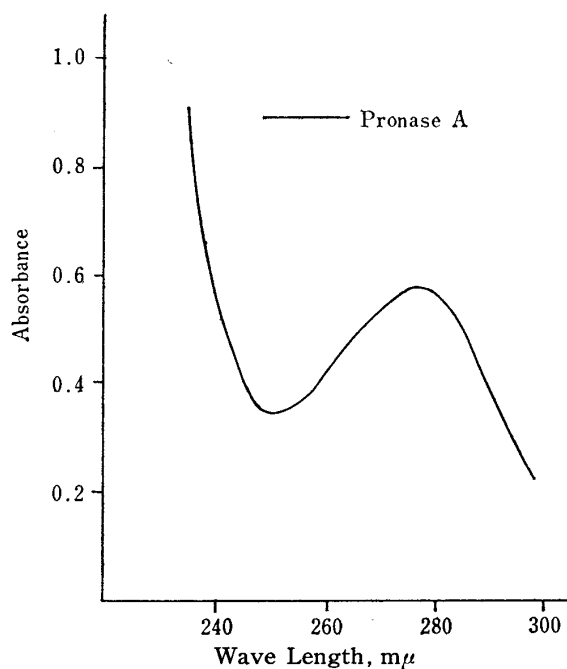


Fig. 4 Absorption Spectra of Streptomyces Enzymes

つぎにジャスメン, ビオタミラーゼに代表される細菌アミラーゼは, 吸収極大が平均 278.0mμ, 吸収極小は平均 252.5mμ, 吸収極大/吸収極小比は平均 1.330, 280mμ/260mμ 比は平均 1.133 で糸状菌起源のものに比較してかなり純度が低いものと思われる。

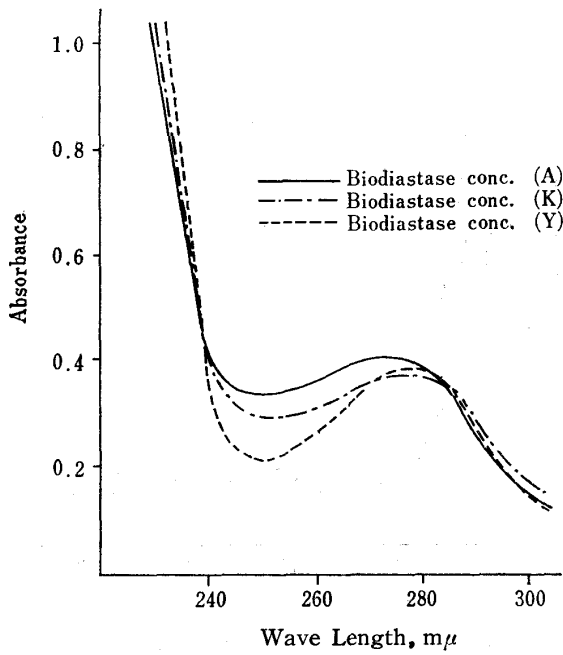


Fig. 5 Absorption Spectra of Mold  $\alpha$ -Amylase

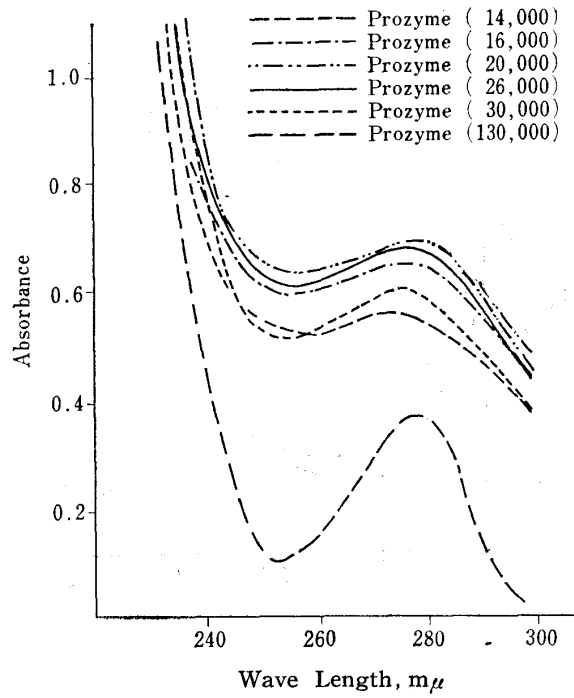


Fig. 7 Absorption Spectra of Mold Protease

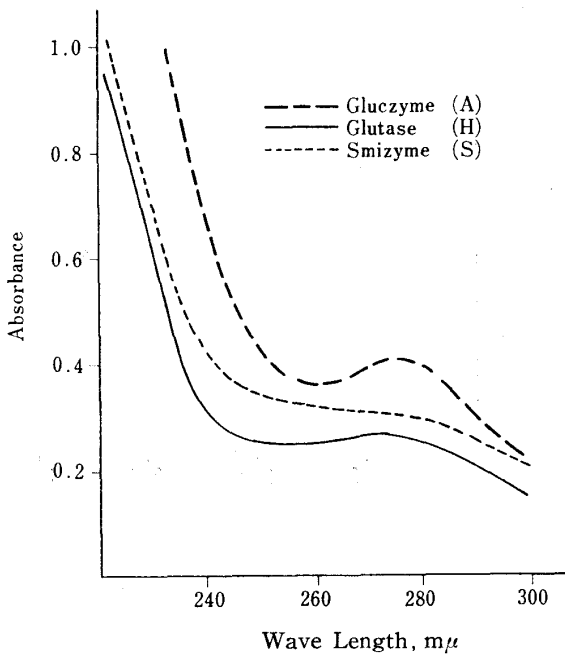


Fig. 6 Absorption Spectra of Mold Amylase

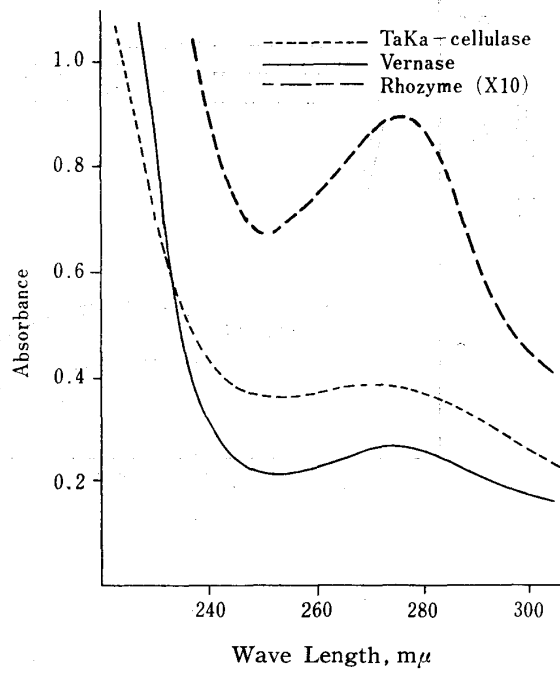


Fig. 8 Absorption Spectra of Mold Enzymes

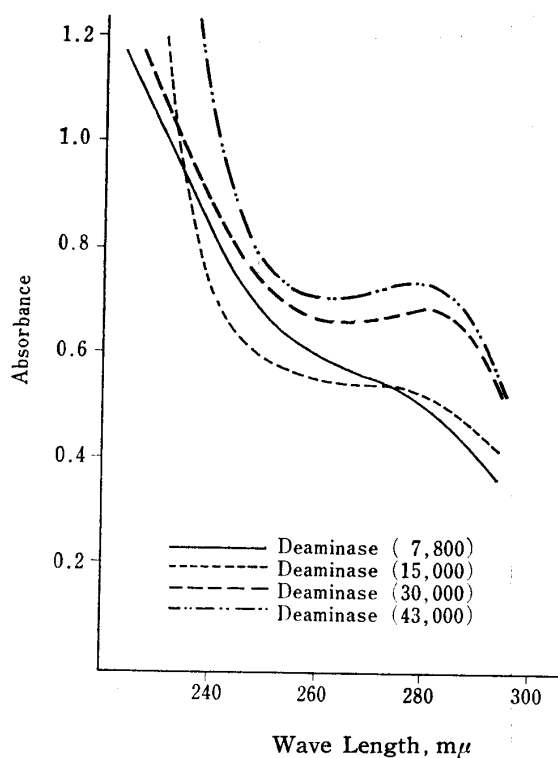


Fig. 9 Absorption Spectra of Mold Adenylic Deaminase

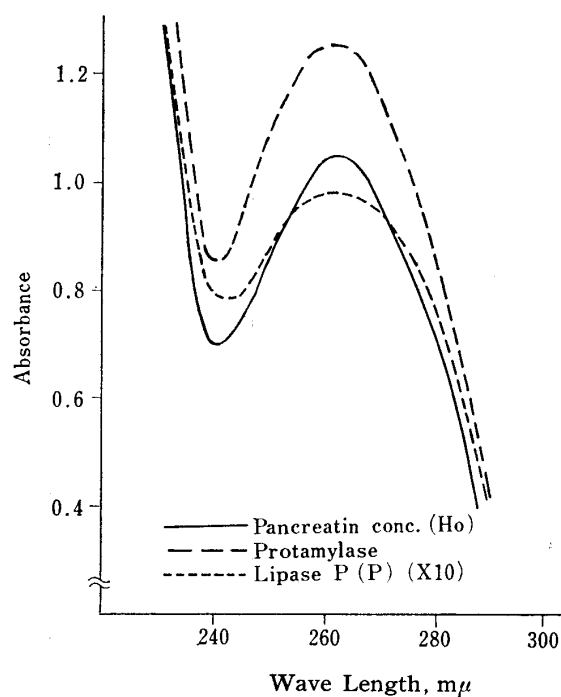


Fig. 11 Absorption Spectra of Animal Enzymes

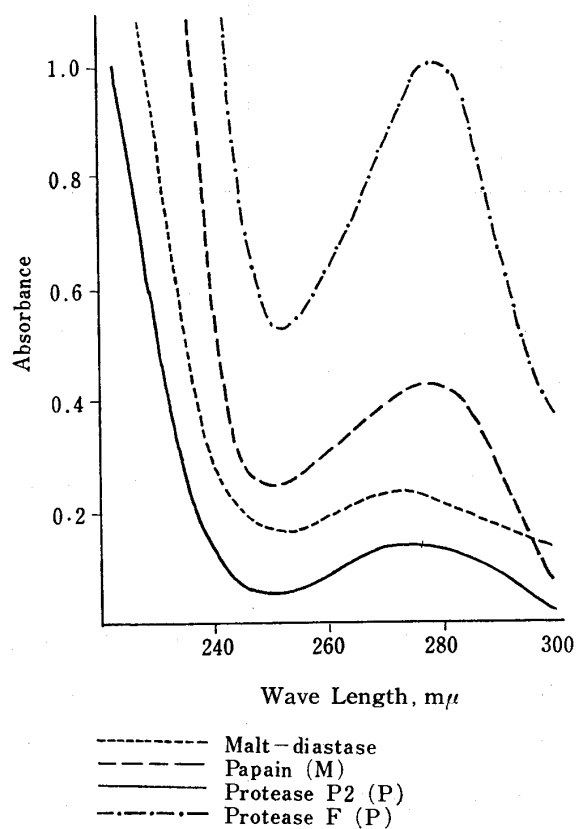


Fig. 10 Absorption Spectra of Plant Enzymes

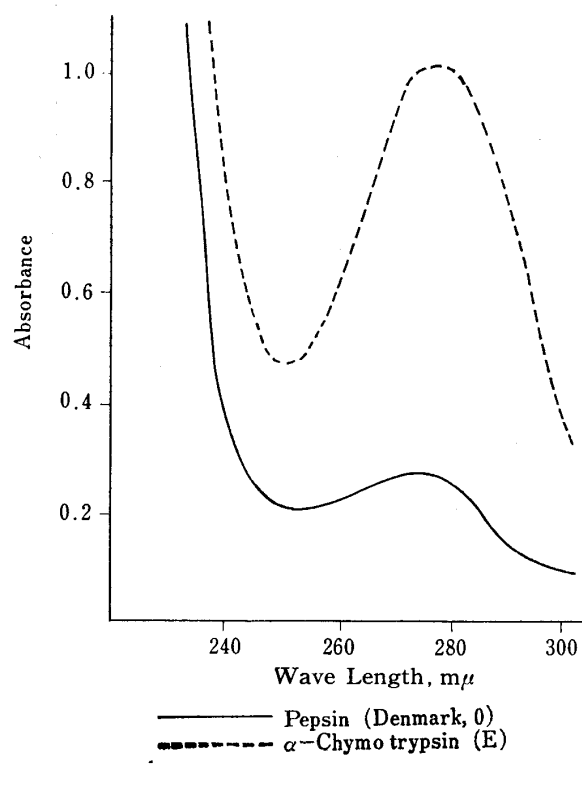


Fig. 12 Absorption Spectra of Animal Enzymes

Table I. Spectral Data of Various Amylase Preparation

Enzyme	Absorption		Max. / Min.	280 / 260
	Max.	Min.	Ratio	Ratio
Malt diastase	276	250	1.42	1.22
Takadiastase	280	250	1.69	1.50
Takadiastase	280	250	1.46	1.34
Takadiastase	280	250	1.57	1.39
Biodiastase	280	250	1.55	1.48
Biodiastase 500	280	250	1.55	1.48
Biodiastase 700	280	250	1.55	1.48
Biodiastase 1000	280	249	1.64	1.58
Biodiastase 2000	278	249	2.46	1.73
Rhozyme	276	250	1.33	1.18
Sanactase	277	259	1.04	1.04
Starase	278	255	1.24	1.19
Vernase	278	256	1.14	1.08
Vernase	276	252	1.28	1.14
Diasmen	276	256	1.25	1.12
Diasmen SS	280	257	1.26	1.21
Biotamylase	—	—	1.00	0.97
Biotamylase A1000	280	254	1.17	1.15
Biotamylase P1000	280	254	1.12	1.11
Bacterial amylase	276	246	2.33	1.33
Amyloliquifase	276	248	1.18	1.04
Pancreatin	260	240	1.53	0.69
Pancreatin	260	240	1.54	0.70
Protamylase	260	240	1.49	0.70

一方市販消化酵素製剤の50%に含まれる動物起源のパンクレアチンは、吸収極大 $260\text{m}\mu$ 、吸収極小 $240\text{m}\mu$ 、吸収極大/吸収極小比は1.520、 $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$ 比は0.697と純度的に低いものと思われる。また、Table Iに示した24サンプルの平均的なデータは、吸収極大 $275.9\text{m}\mu$ 、吸収極小 $250.2\text{m}\mu$ 、吸収極大/吸収極小比1.449、 $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$ 比1.202となった。

このように $\alpha$ アミラーゼを主体とした総合消化酵素剤は、蛋白純度的に高いものから低いものまで広範囲に分布しており、糸状菌起源の $\alpha$ アミラーゼ剤は純度的に良好であった。

### 2-2-2 プロテアーゼを主体とした酵素剤

プロテアーゼ剤の酵素蛋白純度はTable IIに示す如く糸状菌起源、細菌起源、植物起源などの起源による純度の差は比較的少なく、だいたい良好な純度を示している。その平均的なデータは吸収極大 $278.2\text{m}\mu$ 、吸収極小 $252.9\text{m}\mu$ 、吸収極大/吸収極小比1.585、 $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$ 比は1.338で、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼの三大消化酵素剤のうちプロテアーゼ剤が最も純度の高い酵素群と推察される。これらのプロテアーゼを酸性プロテアーゼと中性、アルカリ性プロテアーゼに分類して純度をみってみると、ペプシン、モルシン、サンプローゼなどの酸

Table II. Spectral Data of Various Protease Preparation

Enzyme	Absorption		Max. / Min.	280 / 260
	Max.	Min.	Ratio	Ratio
Molsin	278	255	1.15	1.12
Pepsin	274	253	1.34	1.18
Panprosin	278	265	1.02	1.00
Prozyme 30,000	279	252	1.15	1.15
Prozyme 70,000	279	252	1.66	1.46
Prozyme 100,000	279	251	2.03	1.63
Pronase A	278	250	1.66	1.40
Protease F	278	252	1.89	1.60
Protease P2	278	246	2.56	1.34
Papain	278	250	1.68	1.35
Samprose F	280	257	1.54	1.46
Thermoase P25	280	255	1.28	1.28
Purified thermoase	278	250	1.65	1.43

性プロテアーゼは  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比が平均 1.253 で, プロザイム, プロナーゼなどの中性, アルカリ性プロテイナーゼの  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比の平均値 1.364 に比して低いことが判明した.

### 2-2-3 セルラーゼを主体とした酵素剤

セルラーゼ剤は, 起源的に動植物起源のものではなく微生物起源のみである. その平均的なデータは, 吸収極大  $278.0\text{m}\mu$ , 吸収極小  $254.0\text{m}\mu$ , 吸収極大/吸収極小比は 1.525,  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比は 1.355 と蛋白純度的に良好な酵素群に入るものと思われる. なかでも *Tricoderma* の産生するセルラーゼ剤には  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比が 1.71 と蛋白純度的に極めて優秀なものがあった.

### 2-2-4 リパーゼを主体とした酵素剤

リパーゼ剤は, 起源的にみるとあらゆる起源のものが存在するが一般に純度は極めて低いものと推察される. その平均的なデータは次の如くであった. 吸収極大  $271.6\text{m}\mu$ , 吸収極小  $247.8\text{m}\mu$ , 吸収極大/吸収極小比 1.402,  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比 1.042.

### 2-2-5 その他の酵素剤

工業的に利用されているバクテリアアミラーゼおよび糸状菌グルクアミラーゼは, 一般に純度が低く  $280\text{m}\mu/260\text{m}\mu$  比の値がバクテリアアミラーゼは 0.985, グルクアミラーゼは 1.097 であった.

## 3. 要 約

市販酵素剤の蛋白純度を紫外線吸収スペクトルおよび吸収比より推察した. その結果起源別には植物酵素が最も純度が高く, 動物起源細菌起源の酵素は純度が低かった. また, 酵素別では, プロテアーゼ剤, セルラーゼ剤は一般に純度が高く, リパーゼ剤は純度が極めて低かった. 以上のことから古くより研究されている酵素ほど蛋白純度は高く, 酵素の研究歴と純度はほぼ比例するものと推察される.

Table III. Spectral Data of Cellulase, Lipase and The Other Preparations

Enzyme	Absorption		Max. / Min.	280 / 260
	Max.	Min.	Ratio	Ratio
Cellulase AP	278	255	1.21	1.17
Cellulosin AP	280	251	2.12	1.71
Pancellulase	280	255	1.62	1.57
Taka-cellulase	274	255	1.15	0.97
Lylypase	270	244	1.67	0.93
Lipase P	260	240	1.24	0.80
Lipase AP	280	254	1.39	1.33
Newlase	278	257	1.25	1.23
Polypase	270	244	1.46	0.92
Bacterial amylase H	270	246	1.22	0.98
Bacterial amylase (Novo)	275	265	1.01	0.99
Biozyme C	278	257	1.20	1.19
Gluczyme	278	257	1.23	1.22
Glutase	272	256	1.07	0.99
Smizyme	278	264	1.06	0.99

Table IV. Classification of Enzyme Preparations by Protein Purity

280 / 260m $\mu$ Ratio	Classification	Enzymes
>1.6	Last purified enzyme	Biodiastase 2,000 Prozyme 100,000 Protease F Cellulosin AP
1.4—1.6	Secondary purified enzyme	Taka-diaastase Biodiastase, —500, —700, —1,000 Samprose F Prozyme 70,000 Purified thermoase 25 Pronase A Pancelase
1.2—1.4	Primary purified enzyme	Malt diastase Taka-diaastase Diasmen SS Bacterial amylase Protease P2 Papain Lipase AP, Newlase Thermoase P25 Gluczyme
<1.2	Crude enzyme	Others



Purity of commercial enzymes was investigated with the use of ultraviolet absorption spectra and of absorption ratio. As the results it was found that with the regards to the origin of commercial enzymes, these plant origin had higher purity than there from animal and bacterial origin. And that with regards to enzyme preparations, proteinase and cellulase preparations had generally high purity, but lipase preparations had low purity.

### 文 献

- 1) J. H. Northrop, M. Kunitz, R. M. Herriott, "Crystalline Enzymes", Columbia Univ. Press (1948)
- 2) M. Bier, "Electrophoresis-Theory, Method and Application", Academic Press (1959)
- 3) L. Ornsten, Ann. New York Acad. Sci., **121**, 321 (1964)
- 4) H. K. Schachman, "Ultracentrifugation in Biochemistry" Academic Press (1959)
- 5) 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫, 生化学研究法II, 499, 朝倉書店 (1967)
- 6) L. C. Craig, "Analytical Method of Protein Chemistry", **1**, 121, Pergamon Press (1960)
- 7) P. A. Albertsson, "Partition of Cell Particles and Macromolecules", Almqvist & Wiksells (1960)
- 8) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 薬剤学授稿中, 第15回東海薬学会総会において発表 (1966年11月)

杉浦 衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 平工誠治: 酵素剤の研究 (32)\*

微生物の産生するLipoprotein lipase の研究 (その2)

Lipoprotein lipase の活性測定法について

Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Hidero Tanaka, Seiji Hiraku:

Studies on Enzyme Preparations (XXXII)\*

Studies on Lipoprotein Lipase Produced by Microbe. (2)

On the determination method of lipoprotein lipase activity.

### 緒 言

Hahn<sup>1)</sup> および Anderson<sup>2)</sup> らによってその存在が発見された clearing factor は, 後 Korn<sup>3)</sup> により lipoprotein lipase と命名され, その後 Robinson<sup>4)</sup> 一派, Korn<sup>3)</sup> らをはじめとする多くの研究者によりその概念も徐々に確立されてきた。それにより今では生体内における“いわゆる” lipoprotein lipase としての生理的意義は, かなり解決されてきた感があるが, 反面その本体に関しては多くの課題が残されており, ひいてはそれが現在, 活性測定法にも大きな影響をおよぼしているように思われる。

著者らも最近有馬<sup>5)</sup> らによって発見された微生物なかでも *Pseudomonas* 属の産生する lipoprotein lipase (以下 LPL) を治療酵素として開発すべく, その精製を行ってきたがその途上, 使用している測定法が活性の再現性に多々欠ける事実<sup>6)</sup> に遭遇した。

もとより LPL の測定法は, 大別して脂肪乳剤による光学的な方法すなわち比濁法<sup>6)</sup> と, 遊離脂肪酸<sup>7)</sup> あるいはグリセロール<sup>8)</sup> 定量を行なう化学的な方法に分類されるが, 少なくとも現在では, 活性を感度よく定量的に, しかも再現

\* 前報 (31) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 小木曾太郎, 田中英郎, 佐々木正憲