

## 9552 プロテアーゼを用いた機能性食品ペプチド合成における塩類の効果

助成研究者：麻生 慶一（日本獣医畜産大学 獣医畜産学部）

近年、酵素法によるペプチド合成は従来の化学法に代わる方法として注目されており、ジペプチド合成モデル反応系を中心とした反応機構に関する研究例も報告されている。しかしながら、単一基質の重合反応によるオリゴマー合成研究については現象論的な特徴付けはなされているものの、速度論的な研究は十分に行われていない。本研究は、 $\alpha$ -キモトリプシンによるグルタミン酸ジエチルエステル(Glu-di-OEt)重合によるグルタミン酸オリゴマー合成に関し、反応初期段階におけるアシル化、脱アシル化（アミノリシス）両面からの特徴付けを行い収率との関係を明らかにするとともに、塩類の反応促進効果について基礎的知見を得ることを目的とした。

500mMリン酸緩衝液（pH7.5）中、100mMのGlu-di-OEtに10  $\mu$ Mの $\alpha$ -キモトリプシンを加え、25℃で合成反応を行った。反応系に添加するNaCl濃度が高いほど全収率が高くなる傾向が認められ、反応系に不溶性の生成物が顕著に増加した。生成物の重合度分布の経時的測定より、ジペプチドやトリペプチドなど初期段階の生成物が蓄積することなく、反応初期から高重合度の生成物が生じることが明らかとなった。高NaCl濃度では不溶性生成物ピークが大きくなるが、塩析作用によって重合度分布は1残基分低い方にシフトしていることが認められた。重合反応の進行は、1残基ずつペプチド鎖が伸長してゆくのではなく、ペプチド転移反応など可溶性重合生成物間での結合形成が優勢であることが推定された。反応の初期におけるGlu-di-OEt 2分子からのジペプチドエステルGlu-Glu-tri-OEt生成は重要な過程で、重合反応が進行してゆく上での駆動因子となっていると考えられた。

ジペプチドエステルの生成段階におけるGlu-di-OEtのアシル化およびアミノリシス速度をモデル反応系を用いて測定したところ、イオン強度の増加は両過程ともに促進し、とくにアミノリシスの促進が収率の向上にも寄与することが認められた。さらに、各種塩成分を用いた測定から、塩の効果はその塩析効果による酵素の疎水性活性部位と疎水性基質との親和性の向上によるものであることが示唆された。

本研究により、重合反応が進行する上でジペプチドエステルの生成初期段階が重要であり、ペプチドによるアミノリシスの促進が反応収率を向上させる基本要因となることが推察された。塩成分はアミノリシス促進を通じて重合反応に大きく寄与する因子となることが明らかとなった。



## 9552 プロテアーゼを用いた機能性食品ペプチド合成における塩類の効果

助成研究者：麻生 慶一 (日本獣医畜産大学 獣医畜産学部)

### 1. 目的

近年、呈味性や機能性などを持つ各種の有用な食品ペプチドが明らかにされているが、それらを原料タンパク質から調製する方法は効率が悪い場合が多く、食品科学・食品工業の立場から目的のペプチドの効率的な生産を検討すべき段階となっている。この目的に対して、常温常圧の温和な条件で反応が進行する、酵素の特異性(基質特異性、立体特異性、位置特異性)のため副反応が少ない、アミノ酸側鎖官能基の複雑な保護・脱離工程を必要としない、製造工程・製品ともに安全性が高いなどの理由から、化学的ペプチド合成法とは別に酵素を利用する合成法が積極的に研究されるようになり、実用化されているものもある<sup>1)</sup>。酵素法によるペプチド合成は、現在、厳密な配列を有する長鎖ペプチドの合成に対しては化学法と比べて不利な面もあるが、タンパク質への付加やオリゴペプチド混合物の合成は、栄養価や物性改良などを目的とした食品栄養科学的な面で興味深いものがある。

麻生は、遊離の $\alpha$ -アミノ基を持つ酸性アミノ酸ジエステルが疎水性アミノ酸エステル類似の性質を持つことを利用し、アミノ酸エステルのみを基質としてプロテアーゼを用いて一段階でアミノ酸オリゴマー(難水溶性)を合成し、脱エステル処理によって水溶性の酸性アミノ酸オリゴマーが調製できることを示した<sup>2,3)</sup>。この反応の最適化を図る立場から、主に収率に対する反応pHや温度、基質濃度の影響、各種酵素による基質の選択性、反応系組成の影響などについて報告した<sup>4,5)</sup>。さらに塩基性アミノ酸オリゴマー合成反応への応用についても検討した<sup>6,7)</sup>。

しかしながら、これらの報告では重合反応の現象論的な特徴付けはされているものの、反応機構面からの解析はほとんどなされていない。それは、これらの反応が複雑であり、反応の追跡・解析が困難なためである。すなわち、基質がアシル化基質、求核基質の両方の形で消費されるだけでなく、基質・生成ペプチドの加水分解、あるいは生成したペプチド間のペプチド転移など様々な反応が混在している可能性があるからである。

本研究では、オリゴマー合成反応に対し、重合反応の特徴を解析する立場から、生成物の可溶化分析が可能であるグルタミン酸ジエチルエステル(Glu-di-OEt)の $\alpha$ -キモトリプシン(EC 3.4.21.1)による重合反応について、反応進行過程の分析と反

応・収率に影響する塩の効果について、収率および生成物の重合度への影響に対する詳細な検討を行い、さらに、酵素反応の観点から基礎的な検討を行った。

なお、酸性アミノ酸オリゴマーは、旨味や<sup>8,9</sup>苦味遮蔽効果を有すること<sup>10</sup>、カゼインホスホペプチド（CPP）類似のリン酸カルシウム沈澱阻止効果を示すこと<sup>11</sup>が知られており、食品科学的見地からしても興味深いものである。

## 2. 実験方法

### 2.1 $\alpha$ -キモトリプシンを用いたグルタミン酸オリゴマー合成反応系

NaClを0（無添加）～3.0M溶解した500mMリン酸緩衝液（pH7.5）中で、100mMのGlu-di-OEtに10 $\mu$ Mの $\alpha$ -キモトリプシン（Sigma、3回結晶品）を加え、25℃で反応を行った。

### 2.2 反応収率の測定

経時的に反応液の一部を採取し、遠心（3,000r.p.m.,10分）後、上清をアルカリ条件下60℃、15分処理してエステルを加水分解した（分析試料A）。また、同上清を6N塩酸で110℃、24時間加水分解した（分析試料B）。これらの分析試料中の遊離のグルタミン酸量をHPLCアミノ酸分析により定量した。試料Aの分析値より残存基質濃度（全収率）を、また基質初濃度（100mM）から試料Bの分析値を減じることにより不溶性生成物の収率を求めた。さらに試料Bの分析値から試料Aの分析値を減じることにより可溶性生成物の収率を求めた。

### 2.3 重合度分布変化の測定

経時的に反応液の一部を10N NaOH 中に採取して反応を停止し、エステルを加水分解後、pHを9に調整し、Protein PAK-QA(Waters) カラムを用いた陰イオン交換HPLCでグルタミン酸オリゴマー分析を行った。

### 2.4 反応初期段階における初速度の算出

経時的（0～30分）に反応液の一部を2N HCl 中に採取して反応を停止し、TSK gel ODS-80Tm（4.6×150mm、東ソー）を用いた逆相HPLCで基質の減少および加水分解物（グルタミン酸- $\gamma$ -エチルエステル、Glu- $\gamma$ -OEt）の生成を定量的に追跡した。経時変化の初期直線部分で最小二乗法を用いて傾きを求め、基質の自然分解を補正して基質減少に基づく反応初速度を算出した。

### 2.5 アシル化反応速度の測定

NaCl濃度の効果を調べる実験では、NaClを0（無添加）～3.0M、1,4-ブタンジオール（東京化成工業（株））を2.0Mとなるように加えた500mMリン酸緩衝液（pH7.5）中で、10mMのGlu-di-OEtに10 $\mu$ Mの $\alpha$ -キモトリプシンを25℃で作用させた。各種塩成分の効果を調べる実験では、添加したカルシウムにより生じるリン酸カルシウムの沈澱を防ぐため、HEPES（N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-

ethanesulfonic Acid、ナカライテスク(株))緩衝液を用いた。イオン強度が2.0Mとなるように塩類を加えた2Mの1,4-ブタンジオールを含む50mM HEPES緩衝液(pH7.5)中で、10mMのGlu-di-OEtに10 $\mu$ Mの $\alpha$ -キモトリプシンを25 $^{\circ}$ Cで作用させた。経時的(0~30分)に反応液の一部を2N HCl中に採取して反応を停止し、逆相HPLCで基質の減少初速度を分析し、アシル化速度を算出した。

## 2.6 求核性の測定

NaClを0(無添加)~3.0Mとなるように加えた500mMリン酸緩衝液(pH7.5)中で、10mMのN- $\alpha$ -アセチル-L-チロシンエチルエステル(ATEE, Sigma)、10mM Glu-di-OEtに0.015 $\mu$ Mの $\alpha$ -キモトリプシンを25 $^{\circ}$ Cで作用させた。また、イオン強度が2.0Mとなるように各種塩類を加えた50mM HEPES緩衝液(pH7.5)中で同条件で反応を行った。経時的(0~30分)に反応液の一部を2N HCl中に採取して反応を停止し、逆相HPLC分析により、ATEEの減少初速度、ATEEの加水分解物(Ac-Tyr、以降ATと略記)生成初速度、求核反応生成物Ac-Tyr-Glu-di-OEt(AT-Glu-di-OEt)の生成初速度を算出した。また、本実験では、ATEEの減少初速度に対するAT-Glu-di-OEtの生成初速度の割合を求核反応性とした。

## 3. 結果

### 3.1 グルタミン酸オリゴマー合成反応収率に対するNaCl濃度の影響

酵素と基質の安定性を考慮した上で、重合反応が十分に進行する条件(pH7.5、反応温度25 $^{\circ}$ C)の下で、グルタミン酸オリゴマー合成反応の全収率、可溶性・不溶性生成物収率に対するNaCl添加の影響について調べた(Fig. 1)。塩濃度が高いほど反応時間の経過に伴う収率の向上が促進され、最終的に全収率が高くなる傾向が認められた。また、不溶性生成物が塩濃度の増加に伴い顕著に増加することが明らかとなった。

### 3.2 グルタミン酸オリゴマーの重合度分布に対するNaCl濃度の影響

反応生成物の重合度分布測定結果をFig. 2に示した。いずれの場合もジペプチド、トリペプチドなど反応初期に合成される生成物が蓄積することなく、反応の進行に伴って早い段階から重合度の高い生成物が生じていた。NaCl無添加の条件では、可溶性生成物の部分では重合度3のピークが最大であり、不溶性生成物の部分では重合度6のピークが最小となり、最大のピークは反応初期の重合度8のものから、次第に重合度9の方へ移っていった。添加NaCl濃度が高いほど不溶性部分のピークが大きくなるが、最小のピークが重合度5のものに、最大のピークが8のものにそれぞれシフトしていることが分かった。すなわち1残基分重合度の低い方にシフトしていることになる。

高濃度のNaCl存在下でも、酵素および基質の安定性、 $\alpha$ -キモトリプシンの活性

には顕著な変化はみられなかった。

### 3.3 反応初期におけるNaCl濃度の影響

Figure 3 に示すように、Glu-di-OEtの消費速度は塩濃度の増加に対してほぼ直線的に増加した。それに対し、Glu- $\gamma$ -OEtの生成速度は若干の増加はみられるものの、ほとんど変化しなかった。

アシル化に対しては、2Mのときに最も反応速度が大きくなり、3Mではほぼ同じ値で、0Mと比べて約1.5倍の増加であった。全体としては、塩濃度の増加によってアシル化が若干促進される傾向がみられた。

アミノリシスに対しては、ほぼ塩濃度に依存したAT-Glu-di-OEtの増加が認められたが、ATの生成速度にはほとんど変化がなかった。求核性が最も高くなった2.5Mのときは0Mのときと比べて約2.3倍であった。Glu-di-OEtによる脱アシル反応の促進により、ATEEの分解が促進されていることが認められた。

### 3.4 各種塩成分の反応への影響

陽イオンでは、イオン強度の増加に伴い、Glu-di-OEtの消費速度、Glu- $\gamma$ -OEtの生成速度ともにほぼ直線的に増加した(Fig.4)。1価のイオンおよびマグネシウムイオンではほぼ同じ増加率を示したが、カルシウムイオンの場合、両速度の増加率は1価のイオンよりも小さい値となった。一方陰イオンでは、Fig. 5に示すように、硝酸塩と硫酸塩では1価の陽イオンの場合と同様の傾向を示したが、リン酸塩の場合はGlu-di-OEtの消費速度が他の陰イオンの場合よりも大きく、Glu- $\gamma$ -OEtの生成速度は他よりも抑制された。硝酸ナトリウムを用いた場合、逆相HPLC分析の際にGlu- $\gamma$ -OEtのピークが塩成分と重なってしまったため、定量することができなかった。

### 3.5 アシル化およびアミノリシス反応への影響

緩衝液のみの反応系における速度を100として、塩を加えた場合の反応速度を相対値としてTable 1および2に示した。硫酸塩ではアシル化およびアミノリシスともに顕著な効果はみられなかったが、その他の塩では両反応とも促進され、全体的に陰イオンよりも陽イオンでその効果が高く現れた。2価のカルシウムイオンはアシル化を2倍以上促進したが、アミノリシスを抑制した。アミノリシス促進に対しては特にリン酸塩の効果が著しかった。

## 4. 考察

### 4.1 グルタミン酸オリゴマー合成反応に対するNaClの影響

グルタミン酸ジエステルの重合反応では、重合度5以上となる生成物はほぼ反応系で不溶性となる。生成物が反応液中から除かれることは生成物が二次分解を受けることを免れ、しかも反応の平衡を合成側にシフトさせるというメリットがある。

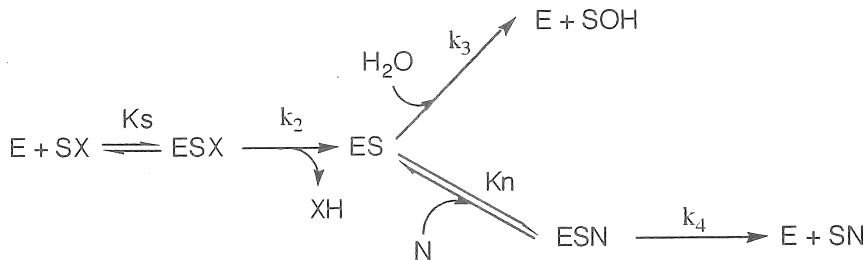
Glu-di-OEtを基質とした反応生成物の重合度分布の結果(Fig. 2)より、一残基ずつペプチド鎖が伸長してゆくのではなく、可溶性重合生成物によるアミノリシス、あるいはペプチド転移反応による可溶性の生成物間でのペプチド結合形成が反応の初期段階から起きていることが推定された。

反応の初期段階でGlu-di-OEt 2分子から生成したGlu-Glu-tri-OEtは、重合反応が進行してゆく上で、 $\alpha$ -キモトリプシンにとって更により基質として利用され、反応の駆動因子となっていると考えられる。後に続く段階では、ジペプチドエステルだけでなく、トリペプチドやテトラペプチドエステルなど他の可溶性生成物も反応促進因子としての役割を果たしていると推定される。すなわち、可溶性生成物がある程度蓄積するまでは反応が進行しにくい、その後はそれらを反応の中核として重合が進み、不溶性生成物を急激に生じたものと考えられる。

NaCl濃度の増加により、全収率に比べ特に不溶性生成物収率の増加が顕著であったが、3MNaClの場合、重合度分布が明確に1残基分低い方にシフトした。このことから、NaClによる塩析効果のため生成物が沈澱しやすくなり不溶性生成物収率が高くなった一方で、比較的重合度が低く、NaClを添加していない場合にはさらに重合が進行するであろう生成物が不溶化し、重合度の高い生成物を得るといった目的においては負の効果になってしまうことも示唆された。

#### 4.2 グルタミン酸エステル重合反応初期過程の解析

$\alpha$ -キモトリプシンをはじめとするセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼによるペプチド合成反応では、その過程において共有結合型のアシル酵素中間体を形成し、次いで求核成分によって脱アシル化されるという二段階の反応から成っている。さらに、脱アシル化過程の中間段階として、酵素と求核基質の複合体を形成する。この種の反応は一般的に次の模式図に示すような過程を経て起こる<sup>12,13)</sup>。



ここでEは酵素、SXはアシル化基質(Xは脱離基)、Nは求核基質を表す。したがって、ESX、ES、ESNはそれぞれ酵素-アシル化基質複合体、アシル酵素中間体、アシル酵素-求核基質複合体を表しており、また、SOH、SNはそれぞれ加水分解物、生成物を表している。この反応過程において、各結合定数、反応速度定数が反応の進行に関わっている。

グルタミン酸エステルの重合反応が進行するためには反応の第一段階であるジペプチドエステルの生成が重要であると考えられたので、S X、NともにGlu-di-OEtである条件でのジペプチドエステル(S N)生成段階において、アシル化反応速度、および脱アシル化(アミノリシス)反応速度の解析を行うことにより、塩類が反応のどの段階に作用しているかについての情報を得ることができると期待される。

$\alpha$ -キモトリプシンによるGlu-di-OEtのアシル化反応速度定数を求めるため、本実験では1,4-ブタンジオールを脱アシル化を促進する求核剤として利用し、反応系をアシル化律速として取り扱う方法<sup>14)</sup>を用いた。形成されたアシル酵素中間体は1,4-ブタンジオールによって素早く脱アシル化され、Glu-di-OEtによる脱アシル化は無視できる程度となるので、基質の減少速度からアシル化速度を求めることができた。また、脱アシル化(アミノリシス)速度の測定には、 $\alpha$ -キモトリプシンがATEEに対して特異性が高いことを利用し、Ac-Tyr- $\alpha$ -キモトリプシンをアシル酵素中間体として生成させ、求核基質として作用するGlu-di-OEtによって脱アシル化されて生ずるアミノリシス生成物を定量する方法を用いた。

実験結果は、Glu-di-OEtのアシル化、アミノリシスともにイオン強度の増加によって促進されることを示した。特にアミノリシスの促進に効果的であることが分かった。アシル化反応は、NaCl濃度が3Mのときは0Mのときの約1.5倍促進された。Shalitinら<sup>15)</sup>は、 $\alpha$ -アミノ基を保護したアミノ酸エステルあるいはアミドの $\alpha$ -キモトリプシンによる加水分解の結果から、イオン強度の増加によって $K_s$ は減少し $k_{cat}$ は増加すること、また、無極性の拮抗阻害剤との解離定数がイオン強度の増加によって低下することを報告している。 $K_s$ に及ぼすイオン強度の影響としては、塩析効果によって酵素の疎水性ポケットと水相の間での基質の分配係数を増加させ、酵素への基質の結合性を高めることが考えられる。本反応のアシル化段階も基質と酵素の結合は疎水性相互作用によるものなので、 $K_s$ の減少が大きく影響していることが考えられる。

アミノリシスに関しても、求核基質と酵素の結合は疎水的なものであると考えられるので、イオン強度の増加が $K_n$ の減少に効果的に作用しているものと思われる。Schellenbergerら<sup>13,16)</sup>もアミノリシスがイオン強度の増加によって促進される理由として疎水性相互作用を挙げ、さらに求核基の活動度を高める可能性を示唆している。イオン強度の増加は求核アミノ基の $pK_a$ を増加させる効果があるが、非解離型アミノ基が関与するアミノリシスには不利になると考えられる。イオン強度の増加で水の活動度が低下し、加水分解が抑制され、 $k_3$ に対して相対的に $k_4$ が大きくなっている可能性もあるが、塩類によるATEEの加水分解活性の低下は観察されなかったことから、この寄与は極めてわずかであると考えられる。

#### 4.3 反応に対する塩成分の影響



2価陽イオンであるカルシウムやマグネシウムイオンでは、酵素の活性化や安定化を含め、 $\alpha$ -キモトリプシンとの特異的な結合による効果が現れているものと考えられるが、アシル化が促進されてもアミノリシスが抑制される場合には、反応全体の進行を示す基質消費速度が低下し、アミノリシスの反応への寄与が大きいことが示された。アシル化およびアミノリシスに対する各種塩類イオンの反応促進効果はイオン強度に比例しており、陰イオンよりも陽イオンの塩析効果に依存したものであると考えられた。 $\alpha$ -キモトリプシンのATEE加水分解活性への塩成分の影響は、カルシウムイオンを例外として陽イオン、陰イオンともに塩析効果によるものであるとする報告<sup>15)</sup>と基本的には類似した結果となった。

グルタミン酸オリゴマー合成の緩衝液成分としてはHEPESやTrisよりもリン酸が効果的であることが見いだされており<sup>3)</sup>、本実験の結果から、高濃度リン酸緩衝液を用いた場合のアミノリシス促進による重合反応収率の向上がその理由であると推察された。

## 5. 今後の課題

各種の有用な食品ペプチド合成への本反応の応用の可能性の検討、できるだけ重合度のそろった均一な生成物を得るための方策の検討、反応進行過程で不溶性生成物を分離し、可溶性分画に基質を追加して効率的に合成を行う連続反応システムの検討などが主要な今後の課題と考えられる。

## 引用文献

- 1)麻生慶一、荒井綜一：プロテアーゼを用いたペプチド合成、“蛋白質分解酵素II”(生物化学実験法31)、pp.223、学会出版センター(1993)
- 2)K.Aso,T.Uemura and Y.Shiokawa: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2443 (1988)
- 3)麻生慶一: *化学と生物*, 28, 267 (1990)
- 4)T.Uemura, K.Kato and K.Aso: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 3009(1990)
- 5)T.Uemura, M.Fujimori, H.-H.Lee, S.Ikeda and K.Aso: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2277 (1990)
- 6)K.Aso and H.Kodaka: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 755 (1992)
- 7)K.Aso, H.Kodaka, H.Fukushi and H.-H.Lee: *Biotechnol. Lett.*, 14, 451(1992)
- 8)M.Noguchi, S.Arai, M.Yamashita, H.Kato and M.Fujimaki: *J. Agric. Food Chem.*, 23, 49 (1975)
- 9)D.W.Cartwright and P.Langcake: *Physiol. Plant Pathol.*, 17, 259(1980)
- 10)M.Noguchi, M.Yamashita, S.Arai and M.Fujimaki: *J. Food Sci.*, 40, 367(1975)
- 11)麻生慶一：アサヒビール生活文化研究振興財団研究紀要、7, 1 (1994)

- 12) J. Fastrez and A. R. Fersht: *Biochemistry*, 12, 2025 (1973)
- 13) V. Schellenberger, M. Kosk, H.-D. Jakubke and A. Aaviksaar: *Biochim. Biophys. Acta*, 1078, 1 (1991)
- 14) I. V. Berezin, N. F. Kazanskaya and A. A. Klyosov: *FEBS Lett.*, 15, 121 (1971)
- 15) L. Kahana and Y. Shalitin: *Isr. J. Chem.*, 12, 513 (1974)
- 16) V. Schellenberger, A. Aaviksaar and H.-D. Jakubke: *Biocatalysis*, 4, 291 (1991)

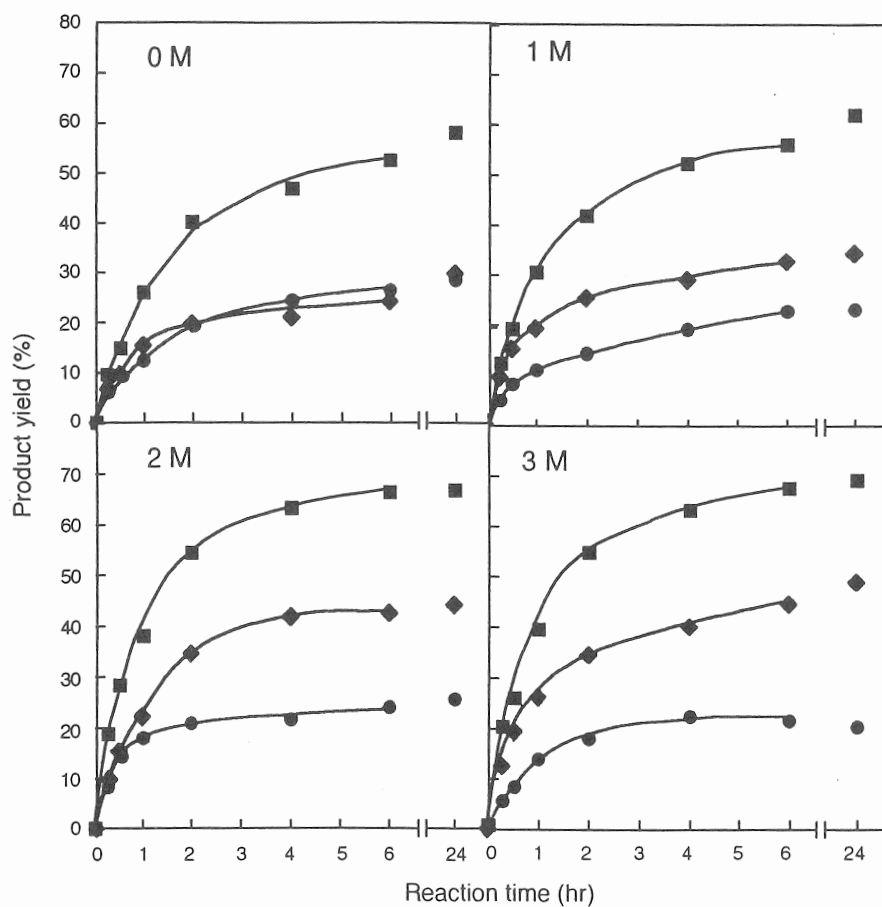


Fig. 1 Time course of product yields at different NaCl concentrations.

- ; overall reaction yield
- ◆ ; soluble product yield
- ; insoluble product yield

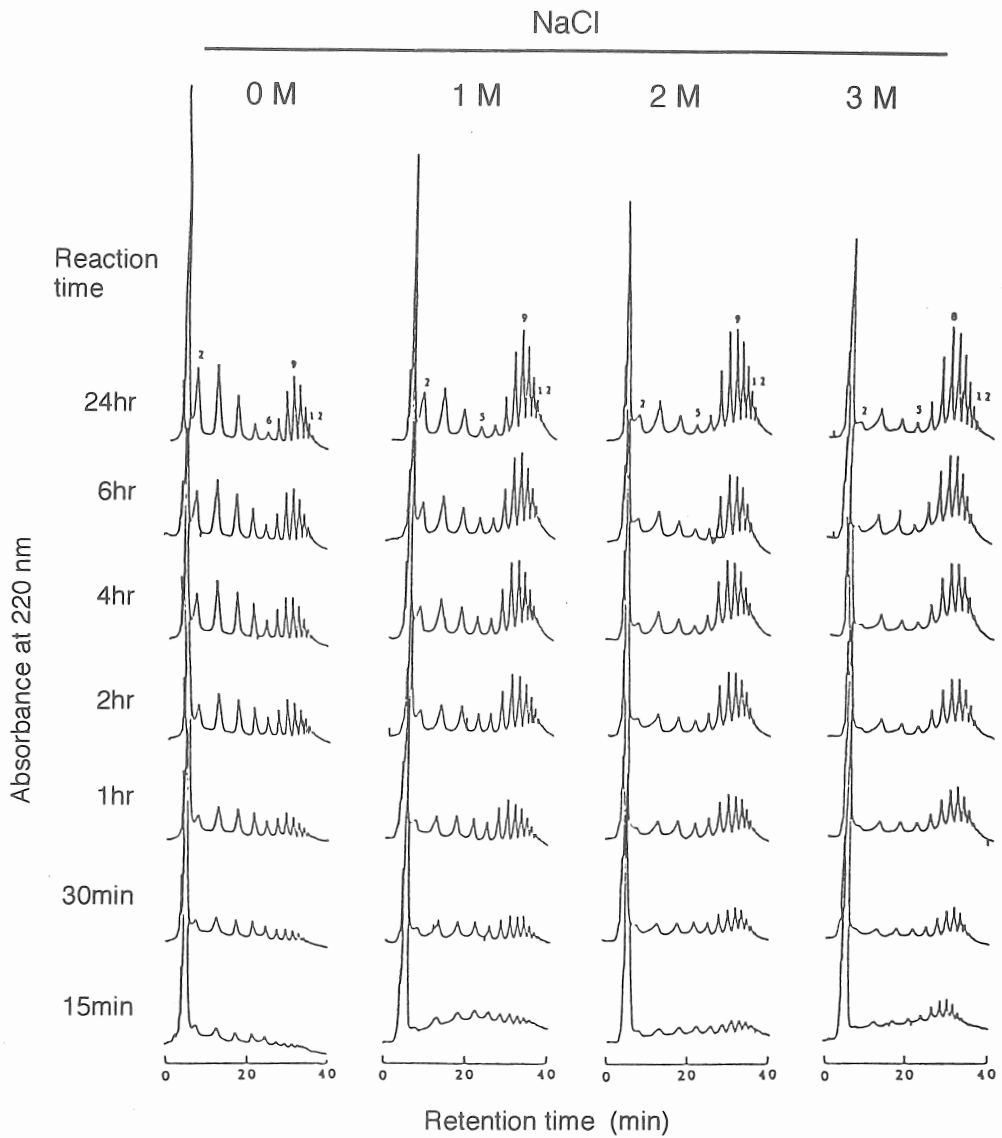


Fig. 2 Anion exchange chromatograms of reaction mixtures obtained at different NaCl concentrations

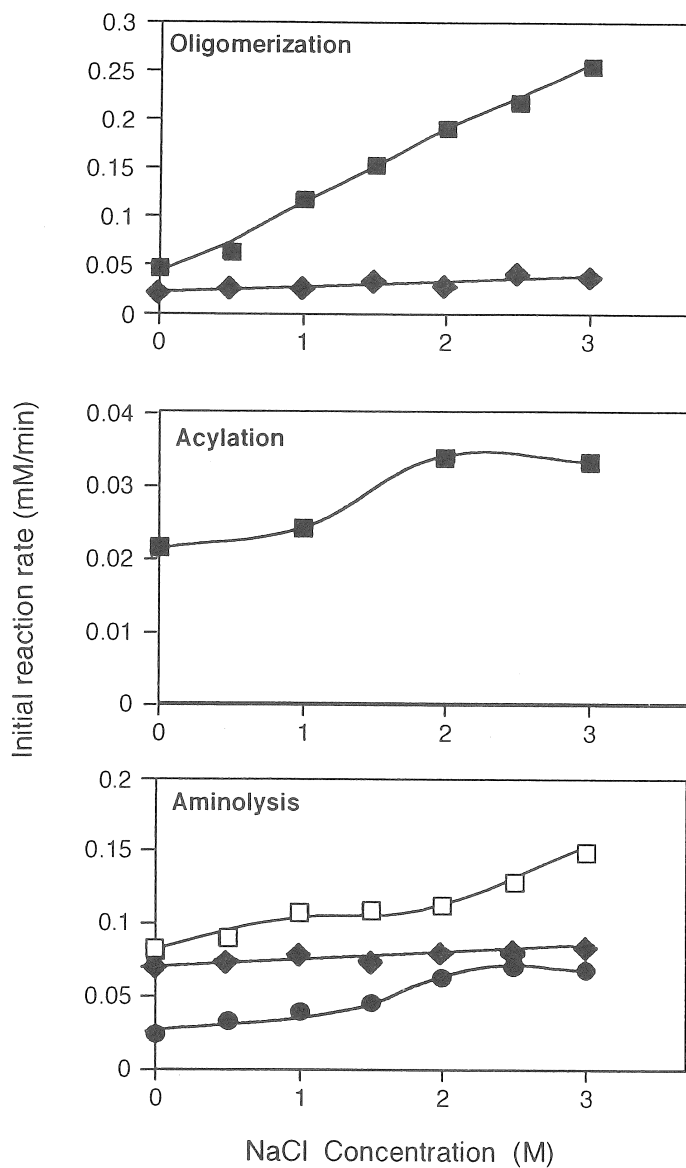


Fig.3 Effects of NaCl concentration on initial reaction rates of oligomerization, acylation and aminolysis of Glu-di-OEt

Oligomerization ■ ; consumption rate of Glu-di-OEt  
 ◆ ; production rate of Glu- $\gamma$ -OEt  
 Acylation ■ ; consumption rate of Glu-di-OEt  
 Aminolysis □ ; consumption rate of ATEE  
 ◆ ; production rate of AT  
 ● ; production rate of AT-Glu-di-OEt

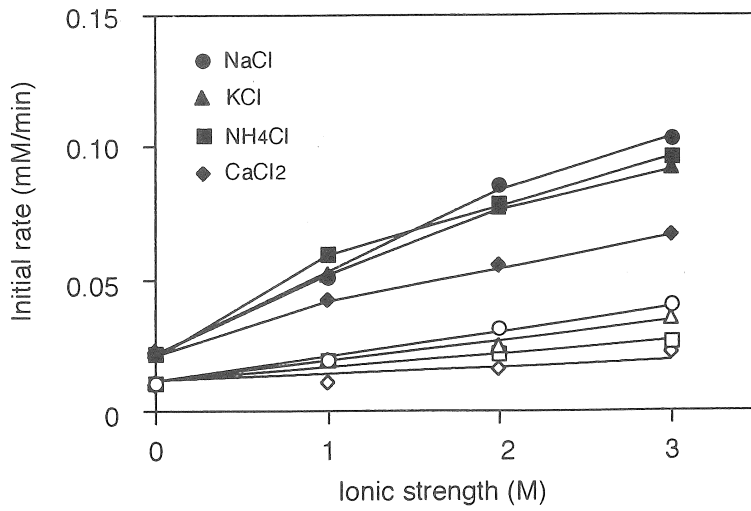


Fig. 4 Effects of cations on initial rates of Glu-di-OEt consumption (closed marks) and Glu-γ-OEt production (open marks)

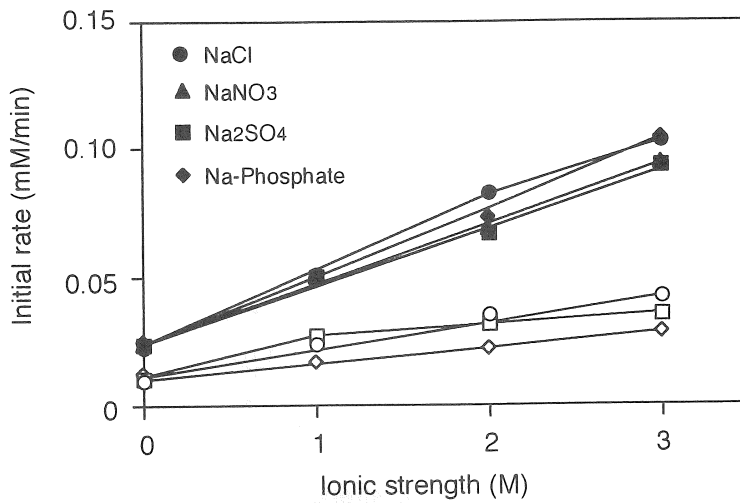


Fig. 5 Effects of anions on initial rates of Glu-di-OEt consumption(closed marks) and Glu-γ-OEt production(open marks)

Table 1. Effect of Salt Components on Acylation of Glu-di-OEt

| Salt*                           | Relative acylation rate (%) |
|---------------------------------|-----------------------------|
| No addition                     | 100                         |
| NaCl                            | 160                         |
| KCl                             | 175                         |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 160                         |
| CaCl <sub>2</sub>               | 235                         |
| NaNO <sub>3</sub>               | 145                         |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 95                          |
| Na-Phosphate                    | 135                         |

\*Salt concentration: 2.0M (ionic strength)

Table 2. Effect of Salt Components on Nucleophilicity of Glu-di-OEt

| Salt*                           | Relative nucleophilicity (%) |
|---------------------------------|------------------------------|
| No addition                     | 100                          |
| NaCl                            | 125                          |
| KCl                             | 131                          |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 123                          |
| CaCl <sub>2</sub>               | 91                           |
| NaNO <sub>3</sub>               | 116                          |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 99                           |
| Na-Phosphate                    | 146                          |

\*Salt concentration: 2.0M (ionic strength)

## Enhancement of Protease-Catalyzed Peptide Synthesis by Salts

Keiichi ASO

Department of Food Science and Technology,  
Nippon Veterinary and Animal Science University

### Summary

In the field of peptide synthesis, enzymatic methods have attracted special interest for preparing food peptides with physiologically functional properties. Protease-catalyzed dipeptide synthesis has mainly been studied fundamentally as a model of peptide synthesis. Although oligomerization of a single substrate has been demonstrated using some proteases, studies on its mechanism based on enzyme kinetics are so far insufficient. In the present study, acylation and aminolysis catalyzed by  $\alpha$ -chymotrypsin was kinetically investigated in the initial stage of oligomerization of glutamic acid diethyl ester (Glu-di-OEt) to clarify reaction promoting factors and effects of salts.

The reaction was conducted in 500mM phosphate buffer (pH7.5) containing NaCl by using 100mM Glu-di-OEt and 10 $\mu$ M  $\alpha$ -chymotrypsin at 25°C. The overall reaction yield and insoluble product yield increased with an increase in NaCl concentration. Dipeptide formation was deduced to be the key step of the oligomerization by demonstrating that the dipeptide product was converted to highly polymerized products rapidly in an early step of the reaction. Both acylation and aminolysis rates measured in model reaction systems were enhanced with increasing ionic strength, suggesting that hydrophobic interaction between the enzyme and the substrate was important as a driving force of the reaction. From this study, it is concluded that an enhancement of aminolysis is responsible for an increase in the reaction yield, and salt components contribute to promotion of the oligomerization through the activation of aminolysis.