

プロテアーゼによる分離大豆たん白質の凝集反応の考察

井上國世*・滝田禎亮・永井宏平

京都大学大学院農学研究科

Proteolytic Digestion of Soy Protein Isolates and the Coagulation of the Digests

Kuniyo INOUE, Teisuke TAKITA and Kohhei NAGAI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

We investigated the deodorization of soy protein isolates (SPI) with various solid absorbents and reported that some of them removed free or bound hexanal on the surface of proteins but not at the inside of proteins. Since the chymotryptic digestion of SPI did not promote the removal of hexanal by the absorbents, it was concluded that the inside hexanal might exist in the similar state even in the digests. For more efficient deodorization of SPI with absorbents, the proteolytic digestion of SPI must be improved. In this study, the digestions of SPI by subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN', chymotrypsin, papain, and trypsin were investigated. The measurement of the absorbance at 280 nm of acid-soluble fraction and SDS-PAGE of the digested SPI indicated that subtilisins Carlsberg and BPN' showed similar digesting activity against SPI and their activity was significantly larger than that of the other proteases. Precipitation of the coagulum was observed in the digestion of SPI by subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN', and papain, but not by chymotrypsin and trypsin. The time needed for the precipitation by subtilisins Carlsberg and BPN' was considerably shorter than that by papain, indicating that the fragmentation of SPI significantly causes the coagulation. However, the differences in the clotting time and in the time-course of the turbidity between two subtilisins albeit the comparable digesting activity indicated that the property of the digested fragments also plays an important role in the coagulation. These results suggest that the states of SPI digests significantly depend on the digesting activity and the substrate specificity of the proteases. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 22-28, 2000.

Key words : protease, digestion, coagulation, soybean, soy protein isolate

* 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

大豆は、たん白質を豊富に含む農作物であり、植物油の供給源として重要な位置を占め大規模に生産されているため、脱脂大豆たん白質が比較的安価に入手できる。一方、油を絞った後の粕に含まれる大豆たん白質は、栄養価が高く、乳化性、保水性、起泡性、ゲル形成能などの機能特性もあるが、世界的にそのほとんどが飼料として利用されているに過ぎず、人口増加が憂慮される21世紀において、この脱脂大豆たん白質を食品としてさらに有効に活用することは大きな意義がある。そのための問題点の1つは大豆臭であり¹⁾、その効率的な脱臭操作の開発が望まれる。我々は、各種吸着剤を用いる物理化学的脱臭法は簡便かつ効果的であるが、たん白質内部にはまだヘキサナールが残存し、それらはキモトリプシンによる分解後に吸着剤処理しても除去できないことを明らかにした²⁾。これは、生じた分解・凝集物中にヘキサナールなどの大豆臭を有する物質が吸着している可能性を示唆し、さらなる脱臭のためには、プロテアーゼによる脱脂大豆たん白質の消化反応と、その分解物の凝集反応に関する知見を得る必要があった。他方、プロテアーゼ処理によって生じる大豆たん白質分解物は、もとの未分解のたん白質に比べて、溶解度、乳化性、保水性が高くなるために³⁾、飲料への添加、乳化剤としての利用が検討されている。また、大豆たん白質分解物中には、生理活性ペプチドが含まれていることも知られている⁴⁾。これら大豆たん白質のプロテアーゼ処理の問題点は、分解物の凝集であり、それは分解物の収量低下をもたらす。しかし、一方でこの凝集物には、コレステロール低下作用などの機能性があることが報告されている⁵⁻⁷⁾。このように、大豆たん白質のプロテアーゼ処理は、食品加工の分野で広く用いられているにもかかわらず、反応の諸性質や、分解と凝集に関するメカニズムはほとんど研究されていない。従って、このメカニズムを明らかにすることは、脱臭のみならず、大豆たん白質の加工において有用な知見を与える可能性がある。

方 法

実験材料および試薬

分離大豆たん白質 (soy protein isolate: SPI) であるフジプロ R は、不二製油株式会社より恵与された。フジプロ R を 0.05% アジ化ナトリウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に 100 mg/mL となるように溶解し、室温で 3 時間攪拌したものを粗 SPI 溶液、フジプロ R を同緩衝液に 40 mg/mL となるように溶解し、室温で 3 時間攪拌したのち、Whatman No. 41 濾紙を用いて濾

過したものを SPI 溶液とした。SPI 溶液の濃度は Lowry 法⁸⁾ により求めた。

プロテアーゼは、ウシ膵臓トリプシン (和光純薬製)、ウシ膵臓 α -キモトリプシン (和光純薬製)、ズブチリシン・カールスベルグ (SIGMA 製)、ズブチリシン BPN' (ナガセ生化学工業製)、パパイヤ乳液パパイン (SIGMA 製) を用いた。トリプシン、キモトリプシン、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN' は、0.05% アジ化ナトリウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、パパインは 0.05% アジ化ナトリウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した。酵素濃度は、1% (w/v) の酵素溶液の波長 280 nm における吸光係数、 E_{280nm} (1%) から求めた。用いた値は、15.4 (トリプシン)⁹⁾、20.5 (キモトリプシン)¹⁰⁾、8.6 (ズブチリシン・カールスベルグ)¹¹⁾、11.7 (ズブチリシン BPN')¹¹⁾、25 (パパイン)⁹⁾ である。

トリクロロ酢酸 (TCA) は和光純薬、マルチゲル 15/25 および分子量マーカーは第一化学薬品から購入した。その他の試薬は全てナカライテスクより購入した。

SPI のプロテアーゼによる分解反応の観察

プロテアーゼによる分解反応は、基質として粗 SPI 溶液を用い、37℃ で、20 mM リン酸緩衝液中で行った。トリプシン、キモトリプシン、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN' は pH 8.0 で、パパインは pH 7.4 で反応を行った。酵素濃度は 100 μ g/mL とし、基質濃度は 75, 50, 25, 12.5 mg/mL とした。反応開始後、最初の 1 時間は 10 分おきに、以後、1 時間おきに 48 時間後まで反応を追跡した。SPI 溶液のゲル化の有無および凝集物の沈澱の有無、それらに要する時間を測定した。SPI から凝集物を生じさせる能力を、SPI 凝集活性とした。

SDS-PAGE

SPI の分解は、パパインは pH 7.4、37℃、その他のプロテアーゼは pH 8.0、37℃ で行った。SPI 溶液、およびプロテアーゼ処理した SPI 溶液を、SPI 濃度が 7.5 mg/mL となるように 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈し、希釈溶液 30 μ L を SDS 電気泳動サンプル処理液 (0.0625 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)、2% SDS、15% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.001% BPB) 30 μ L と混合し、3 分間煮沸した後、マルチゲル 15-25 を用い電気泳動を行った。

トリクロロ酢酸 (TCA) 沈澱法による SPI 分解活性の測定

11.8 mL の SPI 溶液を 10 分間インキュベーションした後、酵素濃度が 10 μ g/mL となるように 200 μ L の酵素溶液を加えた (SPI 終濃度 20 mg/mL)。反応は、パ

パインのみ 37℃, pH 7.4 で, その他は 37℃, pH 8.0 で行った. 一定時間ごとに反応溶液を 500 μ L 分取し, 等量の 20% TCA 溶液を加えて酸沈澱させた. 酸沈澱させた溶液を遠心分離 (13,000 rpm で 5 分間) した後, 上澄みをデカンテーションでとり沈澱を軽く取り除き, 更に遠心分離 (13,000 rpm で 15 分間) し, 沈澱を完全に取り除いた. 上澄みは 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で 5 倍に希釈したのち 280 nm での吸光度 (A_{280}) を測定した. Blank は, 20% TCA 溶液に, 酵素溶液, SPI 溶液をこの順で加え, 同様の操作を行ったものを用いた. SPI のプロテアーゼ分解により, 10% TCA 存在下で可溶性のペプチド量が増加するため, 遠心分離の上清の A_{280} の値が増加していく. この増加速度をプロテアーゼの SPI 分解速度とみなし, 1 分間で A_{280} の値を 0.01 増加させる酵素濃度を SPI 分解活性の 1 ユニットと定義した.

目視による凝固時間 (clotting time) の測定

試験管 (直径 15 mm) に, SPI 溶液 3.6 mL を加え, 37℃ で 10 分インキュベートした後, 酵素溶液 400 μ L を加え, 37℃, pH 8.0 で反応を開始させた. SPI 終濃度は 10 mg/mL とした. 目視の際には, 試験管の後ろに 40 W の白熱電球をおき, 光にすかして溶液の状態を観

測した. clotting time は, 肉眼で凝集物の粒子が確認できるようになるまでにかかる時間と定義した.

分光光度計による濁度変化の測定

セル内に SPI 溶液を 1.8 mL 加え 37℃ で 5 分間インキュベートした後, 酵素溶液を 200 μ L 加えて 37℃, pH 8.0 で反応させた. SPI 終濃度は 10 mg/mL とした. 凝集反応に伴う溶液の濁度変化を 660 nm における光学密度を指標にして測定した.

結 果

プロテアーゼ処理による SPI の凝集

SPI を各プロテアーゼで処理したときの反応溶液の様子を Table 1 に示す. 凝集は, SPI のゲル化と凝集物の沈澱によって確認できた. 濾過をしていない SPI 溶液は不溶物を含むため静置しておく和不溶物が沈澱し, 底にたまるが, 凝集物が沈澱する場合は上澄みが無色透明となるため容易に区別できる.

ズブチリシン・カールスベルグ, ズブチリシン BPN', パパインは全ての基質濃度で SPI を凝集させた. 濃い SPI 溶液 (75, 50 mg/mL) では, 溶液はまずゲル化し (Fig. 1), 更に分解が進むと凝集物が沈み始め, 沈澱と上澄

Table 1. Coagulation of the SPI digests by proteases

Enzyme*	SPI concentration (mg/mL)	Gelation	Time for the gelation (min)	Precipitation of the coagulum	Time for the precipitation (h)
Subtilisin**	12.5	—	—	+	1
Carlsberg	25	—	—	+	1
	50	+	50	+	3
	75	++	40	+	4
Subtilisin**	12.5	—	—	+	1
BPN'	25	—	—	+	1
	50	+	50	+	3
	75	++	40	+	4
Papain***	12.5	—	—	+	25
	25	—	—	+	24
	50	+	720	+	25
	75	++	360	+	24
Chymotrypsin**	12.5~50	—	—	—	—
	75	++	1440	—	—
Trypsin**	12.5~50	—	—	—	—

SPI (12.5–75 mg/mL) was digested by 100 μ g/mL of the proteases at 37℃. Papain was used at pH 7.4 and the other proteases were at pH 8.0 in 20 mM phosphate buffer. Gelation and precipitation of the coagulum were inspected visually. The mark of + indicates that the SPI solution formed the coagulum and turned viscous without gelation, while the mark of ++ indicates that the SPI solution changed into gel and did not slide down when the tube was turned upside-down.

*[E]₀ = 100 μ g/mL, **pH 8.0 (37℃), ***pH 7.4 (37℃).

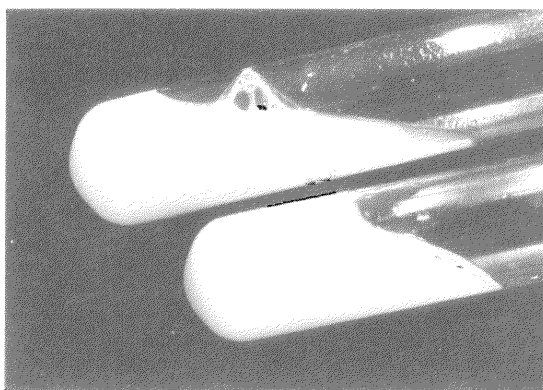


Fig. 1. Gelation of SPI induced by subtilisin Carlsberg. SPI (75 mg/mL) was digested for 1 h by 100 μ g/mL of subtilisin Carlsberg at 37 $^{\circ}$ C, pH 8.0. The digestion : 0 h, the upper tube ; 1 h, the lower tube.

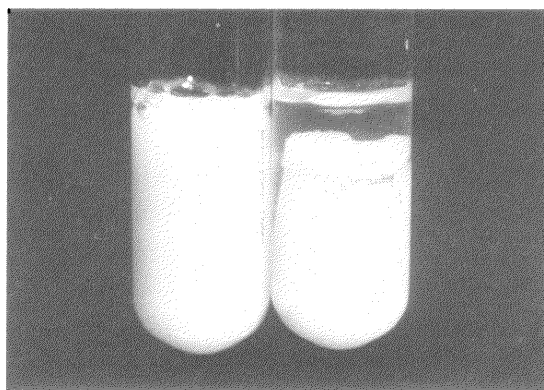


Fig. 2. Precipitation of the clots. SPI (75 mg/mL) was digested for 24 h by 100 μ g/mL of subtilisin Carlsberg at 37 $^{\circ}$ C, pH 8.0. The digestion: 0 h, the upper tube ; 2 h, the lower tube.

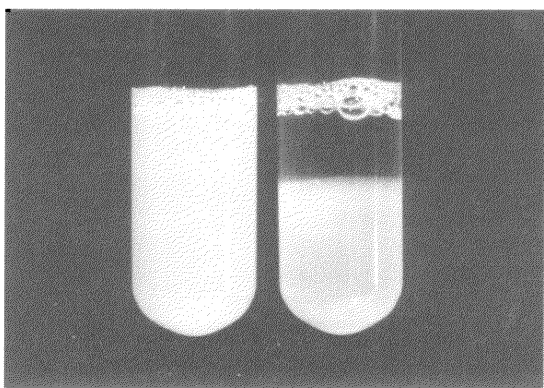


Fig. 3. Precipitation of the clots. SPI (12.5 mg/mL) was digested for 2 h by 100 μ g/mL of subtilisin Carlsberg at 37 $^{\circ}$ C pH 8.0. The digestion : 0 h, the upper tube ; and 24 h, the lower tube.

みに分離した (Fig. 2). 薄い溶液 (25, 12.5 mg/mL) では、ゲル化は起こらず、凝集物の沈殿によって凝集が確認できた (Fig. 3). 特に、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、速やかに SPI を凝集させ、強い SPI 凝集活性を有することが明らかになった. この実験条件では、この 2 つの酵素に差は見られなかった.

キモトリプシンは、75 mg/mL の SPI 溶液でのみゲル化を起こし凝集が確認できた. しかし、凝集物が沈殿することはなかった. トリプシンは、全ての基質濃度で凝集を起こさなかった.

SDS-PAGE

SPI 終濃度 75 mg/mL, 酵素終濃度 100 μ g/mL, pH 8.0, 37 $^{\circ}$ C の条件下で、SPI を各プロテアーゼで処理し、分解の様子を SDS-PAGE により確認した (Fig. 4). ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN' は SPI を速やかに切断し、1 時間で SPI はかなり低分子化されていた. これらに比べるとパパイン、キモトリプシンの分解速度は遅いが SPI の低分子化が時間とともに進行することが明らかになった. 一方、トリプシンは 24 時間後もほとんど SPI を分解しないことが明らかになった. Table 1 と Fig. 4 の結果から、SPI 溶液のゲル化は、低分子化と関連していることが明らかになった.

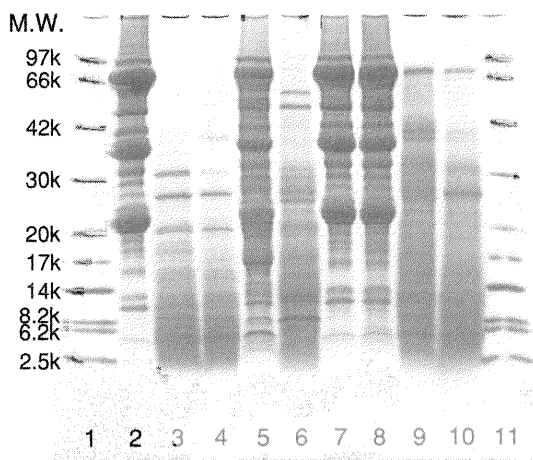


Fig. 4. SDS-PAGE of the SPI digests. SPI (75 mg/mL) was digested by 100 μ g/mL of the proteases at 37 $^{\circ}$ C, and at pH 7.4 for papain and 8.0 for the other proteases. Gelation was shown in Table 1. Lanes 1 and 11, marker ; 2, undigested SPI ; 3, SPI digested by subtilisin Carlsberg for 1 h ; 4, that by subtilisin BPN' for 1 h ; 5, that by chymotrypsin for 1 h ; 6, that by chymotrypsin for 24 h ; 7, that by trypsin for 1 h ; 8, that by trypsin for 24 h ; 9, that by trypsin for 24 h ; and 10, that by papain for 24 h.

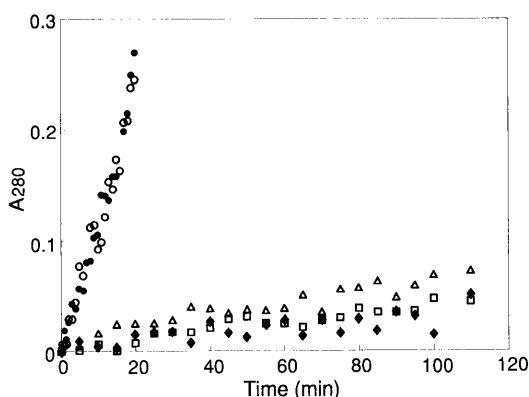


Fig. 5. Formation of soluble peptides with 10% TCA during proteolysis. SPI (20 mg/mL) was digested by 10 μ g/mL of the proteases at 37°C and at pH 7.4 for papain and 8.0 for the other proteases. At time indicated, 0.5 mL of the digestion solution was taken into a tube and added by 0.5 mL of 20% TCA solution. After two-step centrifugation at 13,000 rpm for 5 min and then for 10 min, the supernatant was diluted 5 times with 20 mM phosphate buffer, and absorbance at 280 nm was measured. ●, subtilisin Carlsberg; ○, subtilisin BPN'; △, trypsin; □, chymotrypsin; ◆, papain.

SPI 分解活性の測定

各プロテアーゼのSPIに対する分解能力を比較するために、10 μ g/mLの酵素を用い、20 mg/mLのSPIを分解した (Fig. 5). 各酵素のSPI分解活性は、ズブチリシン・カールスベルグ (1.2 ユニット), ズブチリシン BPN' (1.2 ユニット), キモトリプシン (0.041 ユニット), トリプシン (0.055 ユニット), パパイン (0.028 ユニット) と算出された。これらの結果より、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、他の3つの酵素より約20 ~ 40 倍強い分解活性を持つことが明らかになった。

ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' の比較

以上の結果から、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' が、非常に強いSPI分解活性を有し、また凝集活性も優れていることが明らかになった。そこで、両酵素によるSPIの分解と凝集の様子を、目視による clotting time と分光光度計を用いた濁度変化 (660 nm) を指標に比較した。Fig. 5の結果をもとに、両酵素のSPI分解活性を3ユニットにそろえて、10 mg/mLのSPIを分解・凝集させ clotting time を測定した (Fig. 6)。両反応ともに、酵素ユニットが上昇する

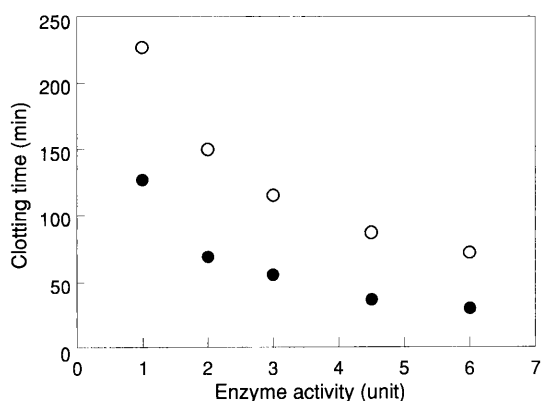


Fig. 6. Effect of enzyme activity on clotting time. SPI (10 mg/mL) was digested by subtilisin Carlsberg and subtilisin BPN' at 37°C, pH 8.0. One unit is defined as the amount of enzyme which produces the peptides with an increase in absorbance at 280 nm of 0.01 per min in a steady-state in the fraction soluble in 10% TCA under the conditions used. ●, subtilisin Carlsberg; ○, subtilisin BPN'.

につれて、clotting time が反比例的に減少し、同一ユニットではズブチリシン・カールスベルグの clotting time は、ズブチリシン BPN' の約半分となった。また、3ユニットの両酵素を、10 mg/mL SPI溶液に加え、分解・凝集の様子を濁度変化により測定したところ、どちらの場合も濁度は反応初期に減少した後、増加に転じ、最大に達した後再び減少した (Fig. 7)。しかし、濁度

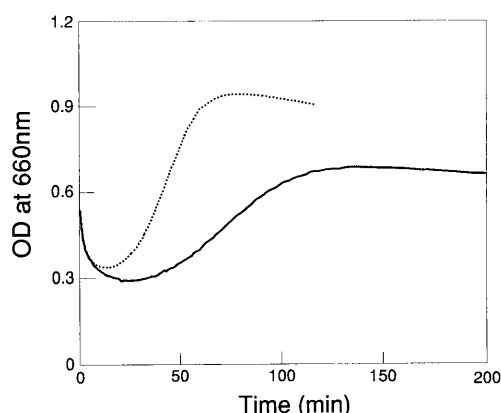


Fig. 7. Turbidity-change during the proteolysis. SPI (10 mg/mL) was digested by 3 units of subtilisin Carlsberg or subtilisin BPN' at 37°C, pH 8.0. Turbidity was estimated by measuring the optical density at 660 nm. ---, subtilisin Carlsberg; —, subtilisin BPN'.

曲線を比べると、ズブチリシン・カールスベルグの方が、より早く最小値と最大値に達し、また最小値も最大値も大きな値を示すことが明らかになった (Fig. 7).

考 察

Table 1 の結果は、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、強い SPI 凝集活性を有することを示している。また、Table 1 と SDS-PAGE (Fig. 4) の比較から、SPI の凝集には低分子化した SPI 断片が関与していることが分かる。SPI 分解活性 (Fig. 5) の結果はこれを支持し、強い SPI 凝集活性を有するズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、非常に強い SPI 分解活性を有することを示している。一方、その他のプロテアーゼでは、SPI 分解活性は、TCA 法では、トリプシン、キモトリプシン、パパインの順に大きかったが (Fig. 5)、SDS-PAGE からは、パパイン、キモトリプシン、トリプシンの順となった (Fig. 4)。この原因の 1 つは、プロテアーゼの基質特異性と SPI 中の芳香族アミノ酸残基の存在環境に起因する可能性がある。非常に基質特異性が異なるプロテアーゼを、Fig. 5 に示した SPI 分解活性で比較するのは難しいと考えられる。しかし、ズブチリシン・カールスベル

グとズブチリシン BPN' は、基質特異性が類似しているので¹²⁻¹⁴⁾、両酵素の SPI 分解活性を比較するのに TCA 法は有効であると考えられる。それにもかかわらず、同じユニット数のズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' において、異なる clotting time (Fig. 6) と濁度変化 (Fig. 7) が観察されたことは、SPI 凝集のメカニズムは、単なる SPI の低分子化という現象で説明されるものではなく、プロテアーゼの基質特異性に起因する SPI 断片の性質に大きく影響される可能性を示唆している。同じユニット数のズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' の SPI 分解活性が同程度であると考え、Fig. 7 における濁度の上昇の時間依存性の違いは、生じた断片の凝集速度の違いを、濁度の最大値の違いは凝集力の違いを反映していると考えられるかもしれない。すなわち、ズブチリシン・カールスベルグにより生じた断片は、ズブチリシン BPN' により生じたものよりも凝集速度が速く、かつ凝集力は強いことになる。一方、Table 1 と Fig. 4 から明らかのように、キモトリプシンでは SPI の低分子化が進行しても SPI 初濃度が低ければ凝集が観察されないが、これは、キモトリプシンにより生じた SPI 断片の凝集速度が遅いか、凝集力が比較的弱いことに起因する可能性がある。

要 約

我々は、これまでに様々な固形吸着剤を用いて分離大豆たん白質 (SPI) の脱臭を試み、これらの幾つかは、遊離や SPI の表面に存在するヘキサナールは除去できるが、内部のものは除去できないことを報告した。キモトリプシンによる SPI の分解によって、吸着剤によるヘキサナールの除去の効率は変化しなかったことから、内部のヘキサナールはキモトリプシン分解物においても同様な状態で存在すると結論した。従って、更なる脱臭を行うためには、SPI のプロテアーゼによる消化を検討しなければならないと考えた。本研究では、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN'、パパイン、キモトリプシン、トリプシンによる SPI の分解を調べた。SPI 分解物の酸可溶性画分の吸光度 280 nm の測定と SDS-PAGE の結果から、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、同等の分解活性を有し、その活性はその他のプロテアーゼより非常に大きいことが明らかになった。凝集物の沈殿は、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN'、パパインによる分解において観察されたが、キモトリプシンとトリプシンでは観察できなかった。凝集物の沈殿に要する時間は、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' を用いた場合の方が、パパインを用いた場合よりかなり短く、SPI の断片化が凝集を起こす原因であると考えられた。しかしながら、ズブチリシン・カールスベルグとズブチリシン BPN' は、SPI に対して同等な分解活性を有するにもかかわらず、これら酵素間で clotting time と濁度の時間変化において差違が観察されたことは、分解された断片の性質がまた凝集に重要な役割を果たすこと示している。これらの結果は、SPI 分解物の存在状態は、プロテアーゼの分解活性と基質特異性に大きく影響されることを示唆している。

文 献

- 1) Matoba T, Hidaka H, Kitamura K, Kaizuma N and Kito M (1985) : Contribution of hydroperoxide lyase activity to *n*-hexanal formation in soybean. *J Agric Food Chem*, **33**, 856-858.
- 2) 井上國世 (1999) : 酵素化学的および物理化学的手法を用いる大豆たん白質の脱臭技術の開発. 大豆たん白質研究 **2**, 20-27.
- 3) 半埜賢治 (1991) : 植物たん白分解物の畜肉加工品への利用. 食品と科学, **33**(3), 87-90.
- 4) Ishikawa Y, Kumagai C, Moriyama R and Makino S (1994) : Stimulation of insulin-dependent glucose transport and lipogenesis in isolated rat adipocytes by trypsinized soybean glycinin acidic subunit A_{1a}. *Biosci Biotech Biochem*, **58**, 590-591.
- 5) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto Y (1990) : Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J Nutr*, **120**, 977-985.
- 6) Gatchalian-Yee M, Imamura M, Nonaka M, Gu JY and Sugano M (1994) : Effect of dietary fats on cholesterol metabolism and eicosanoid production in hamsters fed undigested fraction of soybean protein. *J Nutr Sci Vitaminol*. **49**, 499-504.
- 7) Wang MF, Yamamoto S, Chung HM, Chung SY, Miyatani S, Mori M, Okita T and Sugano M (1995) : Antihypercholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol*, **41**, 187-195.
- 8) Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 9) 丸尾文治, 田宮信雄 監修 (1982) : 酵素ハンドブック. 1st ed., 朝倉書店, 東京.
- 10) Bender ML, Kedzy FJ and Wedler EC (1967) : Alpha-chymotrypsin : enzyme concentration and kinetics. *J Chem Educ*, **44**, 84.
- 11) Markland FS and Smith EL (1971) : Subtilisins: Primary structure, chemical and physical properties. In : *The Enzymes*. Boyer PD, ed., Vol. 3, 3rd ed., pp. 561-608.
- 12) Barel AO and Glazer AN (1968) : Comparative studies of the enzymatic properties of Novo and Carlsberg subtilisins. *J Biol Chem*, **243**, 1344-1348.
- 13) Morihara K and Tsuzuki H (1969) : Comparison of the specificities of various serine proteinases from microorganisms. *Arch Biochem Biophys*, **129**, 620-634.
- 14) Karasaki Y and Ohno M (1978) : Kinetic specificities of BPN' and Carlsberg subtilisins-mapping the aromatic binding site. *J Biochem*, **84**, 531-538.