

カゼインの分解過程に形成される呈苦味ペプチドに関する二、三の実験

鶴田文三郎・細野 明義・高橋富士雄
信州大学農学部 畜産製造学研究室

緒 論

チーズの熟成過程に苦味が生成することは、すでに1908年 Publow⁸⁾ によって発見され、その後多くの研究者により実験され、明らかにされてきた¹²⁾。すなわち、苦味の生成は蛋白質含量の高い発酵食品に生ずる特徴ある現象で、チーズのみではなく、納豆および最近実施されている老癩鶏の肉の軟化のためのパパイン処理でも苦味が認められ、新食品開発に大きな障害となっている。

近年この苦味は蛋白質のプロテアーゼ分解過程^{1,5)} にも形成されることが見出され、またその物質はペプチド^{1,5,9,12)}で、アズラクトンあるいはオキサゾン様の特殊環状構造を有していることがその諸性質から予想されてきている。ともあれ、筆者らはこの問題に関する二、三の実験を行ない、新しい知見を得たので報告する。なお、本報告の一部はすでにドイツの学会誌に投稿してあることを付記しておく。

実 験

I 呈苦味ペプチドの非酵素的生成

上述のごとく、呈苦味ペプチドは蛋白質の酵素による分解過程に生成し、また、その生成反応も酵素反応であろうと考えられてきた。しかし、その生成反応の基礎的検討から、非酵素的反応によっても生成することを予想し、以下の実験を行なった。なお、苦味は数人の官能審査により定性的に判定して示した。

1 生成条件

約50gのカゼイン（混合乳から調製した s-Casein を使用した）を500mlの5N NaOH および5N HCl 溶液にそれぞれ溶解し、濾過後その濾液のカゼイン溶液を40°C および50°C で20日間緩慢に加水分解を行なった。分解後、HCl およびNaOH を用いてそれぞれ中和し、クロロフォルムによる抽出を行なった。このクロロフォルム抽出液を減圧濃縮することにより、赤褐色の油状物質を得た（画分-A, 約4.5g）。この物質は苦味を呈し、ビュレット反応陽性を示した。なお、この油状物質はNaOH を用いた40°C における加水分解過程に最も多く生成することが認められる。

2 画分-Aの精製

濾紙に Schleicher und Schüll 2043 b を、展開剤に n-ブタノール-酢酸-水（4 : 1 : 2 v/v）を、また発色にはニンヒドリン反応をそれぞれ用いペーパークロマトグラフィーを行

なった。画分-Aの濾紙クロマトグラムは図1-Aに示したとおり、多くのスポットが検出された。特に高 Rf 値を有するスポットが特徴的で、これらのスポットは螢光を呈し、ニンヒドリンおよびビューレット反応陽性、モーリッシュ反応陰性である。さらに、n-ブタノール、エタノールおよびアセトンなどの有機溶媒に易溶、水に難溶であり、またエーテルには不溶である。

次いで画分-Aをエーテルで洗滌し、エーテル可溶性物質を除去した後、アセトン抽出によりアセトン可溶性物質を得、これを減圧濃縮した(画分-B, 約2.5g)。この画分-Bもまた赤褐色の油状物質であり、そのクロマトグラムは図1-Bに示したとおりである。このうち Rf=0.85~1.00 の範囲のスポットを濾紙より抽出し、再クロマトグラフィーを行なうと図1-Cに示したとおり、単一のスポットとして検出された(画分-C)。しかし、この画分-Cは必ずしも単一物質であるとはいえない。

3 精製苦味ペプチド(画分-C)のアミノ酸組成

前項で述べた方法により得た画分-Cを HCl 溶液(共沸混合物)に溶解してガラス管に真空密封し、100°C, 24時間加水分解後、H₂SO₄ および NaOH を用いたそれぞれの真空デシケーターで減圧乾固し、そのアミノ酸組成の定性および定量分析に供した。

図1-Dにはその濾紙クロマトグラムを、また、表1にはアミノ酸自動分析機により分析

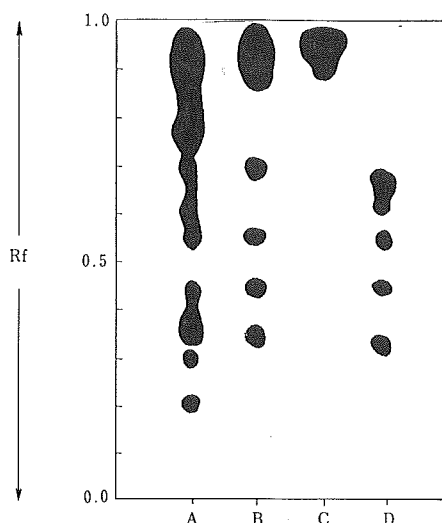


図-1 カゼインの水酸化ナトリウムによる分解過程に生成した呈苦味ペプチド画分とその加水分解物の濾紙クロマトグラム
溶 媒：n-ブタノール：酢酸：水
= 4 : 1 : 2
発 色：ニンヒドリン反応
画分A：クロロフォルム抽出物
〃 B：Aをエーテルで洗滌後、アセトン抽出物
〃 C：Bよりペークロにより Rf 0.85~1.00の抽出物
〃 D：Cの水解物

表-1 画分-C*のアミノ酸組成

アミノ酸	N %	メチオン分子を1とした場合の割合
プロリン	35.1	6.62
バリン	11.6	2.18
メチオン	5.3	1
イソロイシン	6.5	1.22
ロイシン	4.4	0.83
フェニルアラニン	6.3	1.18
NH ₃	30.8	2.90**

* 画分-Cは図1の画分-Cと同じものである。

** NH₃ はトリプトファンとして計算した。

したアミノ酸組成をそれぞれ示した³⁾。表1より画分-Cが特にプロリンおよびアンモニアを多く含むことが認められるが、封管中で3.5N NaOHによる100°C、24時間加水分解した試料について濾紙クロマトグラフィー、アダムキーヴィツ反応、あるいはUVスペクトル測定などの検討を加えると、トリプトファンが定性的に検出されることから、このアンモニアの一部は少なくともHClによる加水分解過程にトリプトファンから生ずることが認められる。

ともあれ、これらの結果から、画分-Cはペプチドでプロリン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、フェニールアラニンおよびトリプトワンの7種のアミノ酸を組成分としていることが確認され、特にプロリン含量の高いのが特徴的である。また、有機溶媒に可溶であることから特殊構造をもっていることも予想される。

4 考察

以上の結果から、これまでの呈苦味ペプチドの概念に二、三の新たな知見を加えることができる。すなわち、第1に呈苦味ペプチドは蛋白質の酵素的分解過程のみでなく非酵素的分解過程にも生成する。第2にこの苦味ペプチドは有機溶媒易溶性などのいくつかの特性を有することから、酵素的生成苦味ペプチドと類似した特殊構造をもっていることが予想され、また第3にその特殊構造は蛋白質のペプチド結合解裂の際に生ずるであろう化学反応によって形成されるなどの点である。

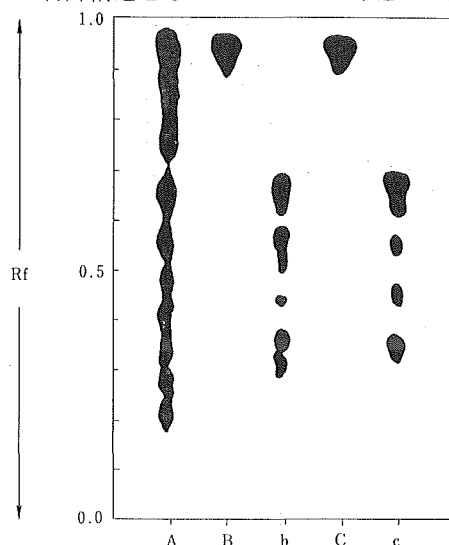
さらに、もう一つの興味ある事実は、一般の酵素反応により生成する苦味ペプチドの場合と同様、プロリン含量が顕著に高いことである。したがってプロリンが苦味ペプチド形成上欠くべからざる物質と考えられるが、その詳細については、今なお不明である。

II 赤外分光分析による呈苦味ペプチドの二次的構造の解析

実験Iにおいて、呈苦味ペプチドは蛋白質の酵素分解過程のみではなく、非酵素的分解過程にも生成することを明らかにし、さらにその特殊構造は類似していると予想した。本実験では、酵素的および非酵素的分解過程に生成した、二種の苦味ペプチドの相対的分子量の比較、および赤外分光分析によるその二次的構造の比較検討を行なった。

1 カゼイン試料の調製

ホルスタイン牛から搾乳した牛乳を直ちに遠心分離して脱脂乳を得、これを Hipp



図一2 各種呈苦味ペプチド試料とその加水分解物の濾紙クロマトグラム

溶媒：n-ブタノール：酢酸：水
= 4 : 1 : 2

発色：ニンヒドリン反応

試料A：カゼインのトリプシン分解物よりの粗調整画分

〃 B：カゼインのトリプシン分解物よりの精製画分

〃 C：カゼインの水酸化ナトリウム分解物よりの粗製画分。なお、試料B、Cは図3のB、Cそれぞれの30~75m μ 画分である。

ら⁴⁾の方法に従い酸カゼインを調製した。なお、この操作は少なくとも3回以上繰り返し精製したものを実験に供した。

2 苦味ペプチドの調製

a) トリプシンによる粗調製画分(試料-A)

試料-Aはカゼインのトリプシン加水分解物から調製した粗苦味ペプチド画分である。すなわち、約10%濃度に溶解したカゼイン溶液(s-Casein, PH 7.5)にトリプシン(Merck)を1%量加え、トルエン存在下で38°C, 4日間加水分解を行ない、分解後クロロフォルムで抽出し、クロロフォルム除去後、残渣をエーテルで洗滌したものである。これを試料-Aとしたが、これは赤褐色の油状物質で苦味を呈し、ニンヒドリンおよびビュールレット反応陽性である。また、試料-Aの濾紙クロマトグラム(その方法は前項と同じ)は図2-Aに示したとおりである。

b) トリプシンによる精製画分(試料-B)

試料-Aをアセトンで処理し、その可溶性画分を得、これを濃縮し、さらに濾紙クロマトグラフィーにより $R_f=0.85\sim 1.00$ の範囲のスポットを分割抽出した。この再抽出物のSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラム(16×450mm, 流速:5ml/20分, 展開剤:エタノール)は、図3に示したとおりのパターンを示した。この30~75mlの溶媒により溶出した画分までを混合して試料-Bとし、そのHCl加水分解物(共沸混合物, 100°C, 24時間分解)と共に、濾紙クロマトグラムを示すとそれぞれ図2-Bおよび図2-bのごとくなる。試料-Bはもちろん苦味を呈し、ニンヒドリン反応微陽性、ビュールレット反応陽性の糖を含まないペプチドである。

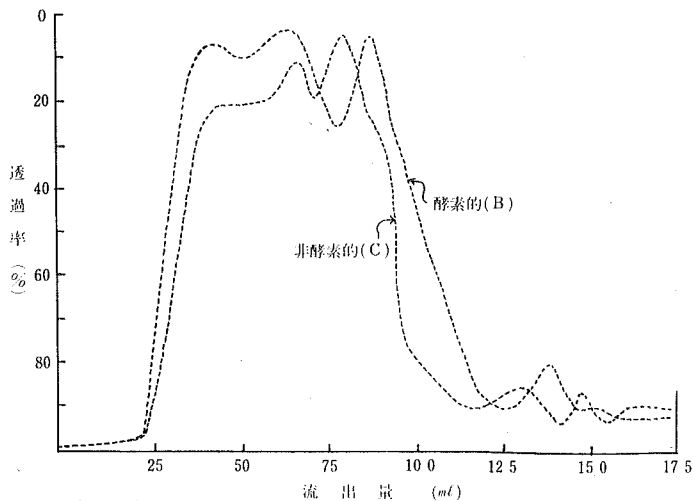


図-3 カゼインのトリプシンおよび水酸化ナトリウム分解物より分画した呈苦味ペプチドの Sephadex LH-20 カラムクロマトグラム
試料: クロロフォルム抽出物をエーテルで洗滌後, アセトン抽出物

カラム: 16×450mm, 流速: 5 ml/20分, 20分分割
展開剤: エタノール, 測定波長: 270m μ

c) 水酸化ナトリウムによる精製画分(試料-c)

実験 I の画分-c の Sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィーによるパターンは図 3 に示したとおりである。この 30~75ml の溶媒による溶出画分を混合して試料-C としたが、この試料-C およびその HCl 加水分解物の濾紙クロマトグラムは、それぞれ図 2-1C および図 2-c に示した。このグラムは実験 I の画分-C のそれとほとんど変わっていないことが認められる。

なお、上述のカゼインのトリプシン分解物および NaOH 分解物より調製した 2 種のアセトン可溶性苦味ペプチド画分は、Sephadex LH-20 の溶出パターンにおいて、図 3 に示したごとく、溶出液 100ml までにそれぞれ 3 種の峰を有する大きな画分と、125~150ml の溶出液中にそれぞれ 1 ないし 2 種の峰を有する微小画分との 2 群に分画された。さらにこれら画分の中で赤褐色および蛍光を示す物質は初めの流出画分に比較的多い。なお、図 3 のパターンから酵素分解および非酵素分解によって生成する 2 種の呈苦味ペプチドは、必ずしも同一のものでないことが認められる。

調製した各試料、すなわち、試料-A, B, C およびカゼインは H₂SO₄, NaOH をそれぞれ用いた真空デシケーターで乾固し、シリカゲルを用いたデシケーターに保存して次の実験に供した。

3 赤外分光分析

a) 分析の方法

カゼインは KBr を用いて錠剤(カゼイン:KBr=1:99)とし、日立 EPI-510 型赤外分光光度計により分析した。試料-A は約 0.1% のクロロフォルム溶液とし、NaCl 板に滴下後、

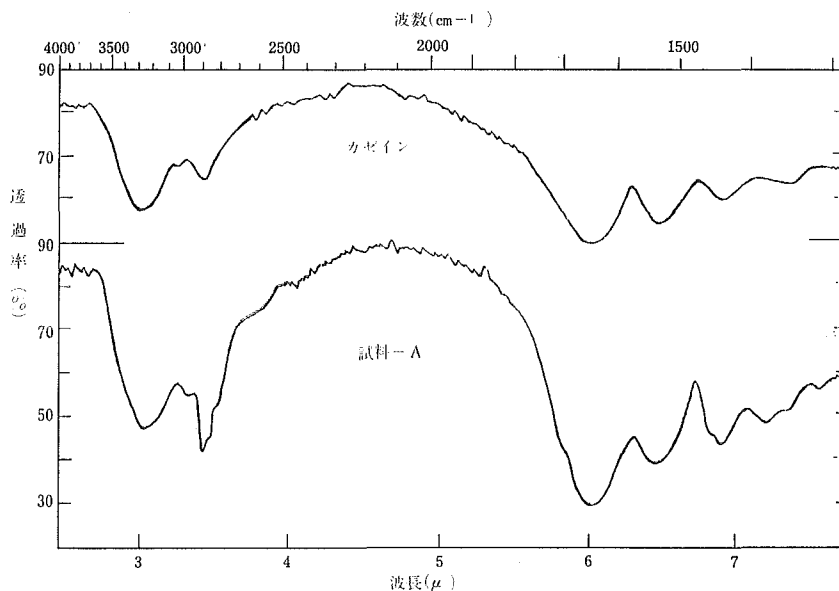


図-4 カゼインおよび試料-Aの赤外線吸収スペクトル
調整：カゼイン：KBr, 試料-A：フィルム

室温にて乾燥してフィルムに調整し、日立分光光度計により分析した。試料-BおよびCは試料-Aの場合と同様に試料を調整し、Leitz-Wetzlar Nr. 018型赤外分光光度計により分析した。

b) 吸収スペクトル

カゼイン、試料-A、BおよびCの赤外線吸収スペクトルはそれぞれ図4および5に示したとおりである。

カゼインの赤外線吸収スペクトルは図4に示したが、そのパターンは疑いもなく蛋白質としての特徴的吸収帯を $3500 \sim 1400\text{cm}^{-1}$ の領域に示していることが認められる。一般に図の 2930cm^{-1} および 1460cm^{-1} 付近はそれぞれ、 CH_2 の伸縮振動および変角振動、 3280cm^{-1} 付近は水素結合に関与している $-\text{NH} \cdots \text{CO}-$ のNH伸縮振動、 1650cm^{-1} 付近(アミド-I)は主として $-\text{NH}-\text{CO}-$ のCO伸縮振動、そして 1550cm^{-1} 付近(アミド-II)はその約60%がNH面内変角振動、残りの40%がCN伸縮振動にそれぞれ基づく吸収帯で、蛋白質の特徴的な吸収帯として確認されている^{2,6,7,10,11}。

試料-Aの赤外線吸収スペクトルもまた図4に示した。この図より 3280cm^{-1} 付近の吸収帯が 2930cm^{-1} の吸収帯に比べ、わずかに減少していることが認められた。これは次の結果との関連性から興味ある現象である。

図5に示された試料-BおよびCの赤外線吸収スペクトルにおいて、特異的なパターンが認められる。すなわち 3280cm^{-1} 付近およびアミド-IIの吸収帯が、カゼインおよび試料-Aのそれらと比較し顕著に減少している点である。特にアミド-IIの吸収帯は極端に減少し、ほとんどその吸収帯を認めることができない。

さらに、試料-BおよびCのスペクトルの中で興味あることは、アミド-Iの吸収帯(1650cm^{-1})が 1700cm^{-1} 付近の方向に移動することが認められたことである。

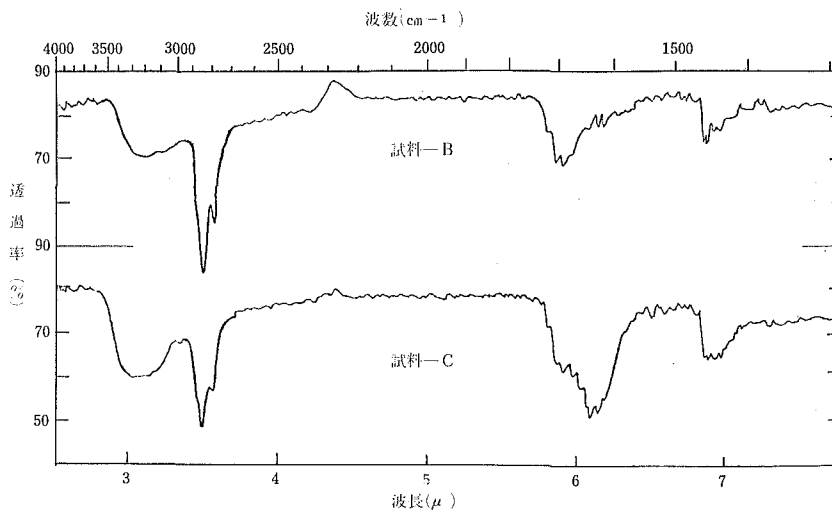


図-5 試料-BおよびCの赤外線吸収スペクトル
調整：試料-BおよびC：フィルム

4 考 察

以上の結果から、実験 I で得た知見にさらに次に述べるごときいくつかの新しい知見および考察を加えることができる。すなわち、(i) 酵素的および非酵素的分解過程に生成した 2 種の苦味ペプチドの間には、赤外分光分析からその二次的構造に何ら特徴的な差がないと確認される。(ii) 3280cm^{-1} 付近の吸収帯の異状な減少から、苦味ペプチド内の $\text{—NH}\cdots\cdots\text{CO—}$ に関与する水素結合の多くは失なわれる。(iii) その NH 基および CO 基は環状アミドあるいはラクタム構造の形成に使われることが認められる。この推論は、環状アミドおよびラクタム内の —NH—CO— に基づくアミド—II の吸収が多くの実験で確認されない^{6,10,11)} こと、および苦味ペプチドが正常のアミノ酸より構成されていることが実験 I の結果あるいはその他の報告から証明されている^{1,5)} こと、この二つの事実から立証することができる。なお、苦味ペプチドの加水分解過程における滴定値の変化が、正常のペプチドのそれと異なる⁵⁾ ことも、環状アミドやラクタム構造をその中に保持しているためと考えられるが、この点はお不明である。

さらに、アミド—I の吸収帯が 1700cm^{-1} に移動することであるが、一般にラクタム内の CO 基に基づくアミド—I はその環が小さくなる程、より短波長に移動することがすでに認められている¹¹⁾。従って、ペプチド内の特殊構造の一部がラクタムから成っていることが一層明確に立証され、同時に 1700cm^{-1} への移動¹¹⁾の確認によって、苦味ペプチド内のラクタムは反応の進行にともなって γ -ラクタムへ変化すると推定することができる。

III トリプシン水解過程に生成する苦味の化学試薬による防止

カゼインの加水分解過程に生成する苦味ペプチドは、酵素的および非酵素的作用のいずれでも生成し、その両苦味ペプチドの二次的構造は同じであることを証明した。

この事実から、苦味ペプチドの特殊構造は蛋白質中に存在するペプチド結合の解裂により、必然的に生ずる化学エネルギーによる純化学反応によって形成するものと推定した。さらに、この反応は比較的低温で行なわれることより、この苦味形成の防止にはイオン交換性、あるいはイオン封鎖性を有する化学試薬も有効であると予想される。また単にある濃度以上のイオン濃度によっても阻止しうる可能性が予想される。以下これらの考えに基づいて実験を行なった。

表—2 カゼインのトリプシン分解過程における苦味生成のポリリン酸による防止効果
(カゼイン：10%，トリプシン：0.1%，pH 7.5)

ポリリン酸* (%)	作 用 時 間						
	0	6	12	24	48	72	96
0	—**	卅	卍	卍	卍	卍	卍
0.5	—	±	±	+	+	+	±
1	—	—	±	+	+	+	—
2	—	—	—	—	+	+	—
3	—	—	—	—	±	—	—

* ポリリン酸は NaOH で中和し使用した。

** 官能的に苦味が全く感じられないものを—とし、極めて苦いものを卍として表示した。

1 ポリリン酸による防止

a) 実験条件

約5gのカゼイン(s-Casein)を約35mlの水に懸濁させ、NaOH溶液を用いてpH7.5に調整した。ポリリン酸(Merck)も同様のpHに調整し、トリプシンと共に最終濃度がそれぞれ表2に示したとおりの濃度になるよう添加し、調整した。この混合物をトルエン存在下で38°C、4日間作用させ、その間経時的にTCA可溶性窒素および官能審査により分解度および苦味度をそれぞれ測定した。

b) 分解度および苦味度

図6に示したとおり、ポリリン酸の存在(曲線B)はカゼインのトリプシンによる分解にほとんど影響を与えない。また、作用開始直後急激に分解が進み、24時間以降の分解は漸次進行することも認められる。一方、その苦味度は表2に示したとおりで、その生成が少量のポリリン酸添加により効果的に防止される。また、ポリリン酸の濃度により苦味の程度は、作用期間中に一方では増大し、他方では減少するなどの興味

ある結果も得た。換言すれば、ポリリン酸は単に苦味の形成を防止するのみではなく、形成された苦味の分解をも行なう特性をもっていることが推定される。なお、このことについては、さらに反応系における酸化・還元電位の観点から実験をすすめている。

2 イオン濃度による防止

a) 実験の条件

前実験と同様、pH7.5の10%カゼイン溶液にトリプシン0.1%を加え、さらにその溶液に最終濃度0.5, 1.0, 2.0および3.0Mのリン酸ナトリウム緩衝液(いずれもpH7.5)あるいは0.5, 1.0および1.5Mのリン酸カリウム緩衝液(いずれもpH7.5)をそれぞれ含むように調製し、トルエンの存在下で38°C、4日間作用し、同様に分解度および苦味度を測定した。

b) 分解度および苦味度

分解度は図6に示したとおりである。すなわち、1.0Mリン酸ナトリウム(曲線C)および1.0Mリン酸カリウム(曲線D)の両者とも、カゼインのトリプシン分解に影響を与えず、ポリリン酸添加の場合とほとんど同じ傾向を示した。一方、その苦味度は表3に示したとおり、リン酸ナトリウムを用いた場合、低イオン濃度では少量の苦味の生成が認められる。しかし、イオン濃度を高めることにより、完全に苦味生成を防止することができる。これに対

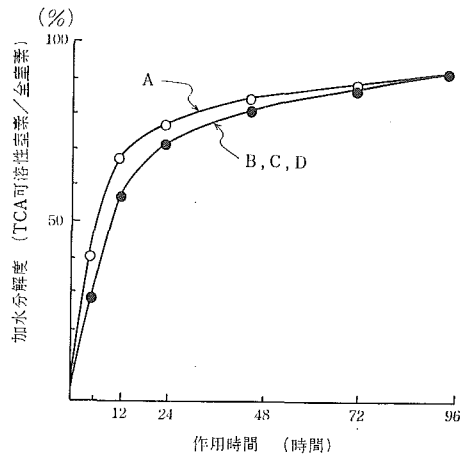


図-6 カゼインのトリプシン分解の経時的变化 (カゼイン:10%, トリプシン:0.1%, pH7.5)

	基質	酵素	化学試薬
A	カゼイン	トリプシン	ナシ
B	"	"	ポリリン酸 (3%)
C	"	"	リン酸ナトリウム (1M)
D	"	"	リン酸カリウム (1M)

表—3 カゼインのトリプシン分解過程における苦味生成の Na 塩およびK塩による防止効果
(カゼイン：10%，トリプシン：0.1%，pH 7.5)

濃度(M) 作用時間	Na 塩*				K 塩*			対 照
	0.5	1	2	3	0.5	1	1.5	
0	—**	—	—	—	—	—	—	—
6	—	±	—	—	—	—	—	卍
12	±	±	—	—	—	—	—	卍
24	±	+	—	—	—	—	—	卍
48	±	+	—	—	—	—	—	卍
72	±	+	—	—	—	—	—	卍
96	±	+	—	—	—	—	—	卍

* Na 塩, K 塩はそれぞれリン酸ナトリウム, リン酸カリウムを使用した。

** 苦味度の表示法は表 2 の場合と同じである。

し、リン酸カリウムを用いた場合では、低イオン濃度でも完全にその苦味の生成が防止されている。

3 考 察

カゼインをトリプシンで分解する過程に生成する苦味は、最も強力であることが実証¹²⁾されている。しかし、この場合においても、比較的低濃度のポリリン酸塩、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムなどにより有効にその生成を阻止することができる。特にリン酸カリウムの効力が大であることも認められた。

前実験の考察においても論じたごとく、呈苦味ペプチドの特殊構造の一つと推論した環状アミドあるいはラクタム構造は、蛋白質のペプチド結合の解裂、あるいは脱水素反応にともなって活性化する基、特に—CO基がその主な役割を演じて生ずるイオン反応により形成されるものと推察される。したがって、そのイオンを反応以前に封鎖することにより、苦味の形成を阻止することになる。ポリリン酸塩、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムが、苦味生成の阻止に有効であるのはそのためで、さらに、イオン濃度を高めることにより、また、ナトリウムよりカリウムが一層有効であるのも、上述の見解を示唆するものと考えられる。

結 論

チーズをはじめ蛋白質含量の高い発酵食品は、その発酵過程に苦味を生ずる。この苦味は蛋白質の酵素分解過程に生成されるが、この物質はペプチドで、アズラクトンあるいはオキサゾロン様の特殊環状構造を有するものと考えられてきた。

著者らは、この呈苦味ペプチドに関する基礎的実験結果から、二、三の興味ある知見を得た。その結果は次のとおりである。

1. 酵素的分解あるいは非酵素的分解のいずれを問わず呈苦味ペプチドは、蛋白質の分解過程に非酵素的イオン反応によって生成する。
2. 苦味ペプチドの、推定されている特殊環状構造の一部は環状アミドあるいはラクタム構造を呈している。また、このラクタムは反応の進行にともなって γ -ラクタムへと変化する

る。

3. 蛋白質の酵素分解過程における苦味の形成は比較的低濃度のポリリン酸塩、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムにより有効に防止することができる。

なお、本研究の一部は、著者の一人鶴田が文部省の在外研究員として在独中、ミュンヘン工業大学の Prof. Dr. F. Kiermeier, Frl. I. Zenglein, Frl. G. Schicker, キール酪農研究所の Prof. Dr. Dr. A. Lembke, Prof. Dr. M. E. Schulz および各教授の共同研究者の方々の助力を得て行なったものであり、また、一部は本学の北原美恵子嬢の助力によるものである。ここにその好意と助力に対して謝意を表する。

文 献

- 1) Carr, J. W. et al. (1956) J. Sci. Fd. Agr., 7: 626.
- 2) Fraser, R. D. B. (1956) J. Chem. Phys., 24: 89.
- 3) Hannig, K. (1959) Clinica chimica Acta, 4: 51.
- 4) Hipp, N. J. et al. (1950) J. Am. Chem. Soc., 72: 4928.
- 5) 市川和宏ら (1959, 1960) 農化, 33: 1044, 34: 448.
- 6) 倉谷健治・宮沢辰雄 (1945) 蛋白質化学II, 455, 共立, 東京.
- 7) Miyazawa, T. et al. (1958) J. Chem. Phys., 29: 611.
- 8) Publow, C. W. (1908) N. Y. Agr. Exp. Sta. Bull., 257.
- 9) Raadveld, C. W. (1953) 13 th. Int. Dairy Congr., 2: 676.
- 10) Randall, H. M. et al. (1948) Infrared Determination of Organic Structures, D. van Nostrand, N. Y.
- 11) Silverstein, R. M. and Bassler, G. C., (1963) Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley and Sons, N. Y.
- 12) 鶴田文三郎 (1966) 酪農科学の研究, 15: A-23.

Some Experiments on Formation of Bitter Taste Peptide During Casein Hydrolyses

By **Fumisaburo TOKITA**, **Akiyoshi HOSONO** and **Fujio TAKAHASHI**

Laboratory of Animal products Technology, Fac. Agri., Shinshu Univ.

Summary

The peptides capable of causing bitter taste, which is unpleasant taste, in fermented milk products and soy bean products resulting from some actions of microorganisms and proteolytic enzyme are causative substances. It has also assumed that the bitter taste peptide has a unique cyclic structure such as Azlacton or Oxazolone, and that the unique structure is an origin of the bitter taste. However, the structure is in general uncertain yet.

From simple discussion of Author's electrone theoretical view, some experiments on the nonenzymatic formation, the unique structure and the prevention from its forming by chemical agents of the bitter taste peptide were carried out. This report was results on findings support the view, and it was quite possible to add some conclusions and conciderations to the informations on the bitter taste peptide.

1. The bitter taste peptide is produced during proteolyses not only by enzymatic action but also by nonenzymatic action, and its unique structure, it is presuming with its solubility in organic solvents and other properties, is formed by some of chemical reactions, which are take placed as an inevitable consequence at the time of decomposition of peptide bonds in protein. The decomposition, which depends on enzymatic or nonenzymatic actions, gives then to raise similar chemical energy. Therefore, it seems to be possible to use chemical preventers, which have properties of ion-exchangeable or disperseable operation, for the formation of bitterness.

2. The two kinds of the bitter taste peptides, which were prepared from enzymatically and nonenzymatically hydrolyzed casein, were observed by infrared spectroscopy on their secondary structures. It was found from the results that the two bitter peptides had no essential differences in their structures. The unique structure of these was formed partly by cyclic amide, γ -lactam or other lactams structures consisting with $-\text{NH}$ and $-\text{CO}$ groups produced by dehydration and hydrolysis during proteolyses.

3. Three kinds of chemical agents were used as a preventer for the formation

of the bitter taste during trypsin hydrolysis. From the results, about 2 % of polyphosphoric acid was a useful and effective preventable concentration in the reaction mixture, and it seems also a nonenzymatic decompositor of the bitter structure. Then 2.0 M sodium phosphate and 0.5 M potassium phosphate buffer solutions were also effective preventable concentration in it for the formation of bitter taste during proteolysis, especially potassium ion was more effectiveness than the other agents.