

酵素修飾による分離大豆たん白質の 必須アミノ酸パターンの改良とその評価

IMPROVEMENT OF THE ESSENTIAL AMINO ACID PATTERN
OF SOY PROTEIN ISOLATE BY ENZYMATIC MODIFICATION :
PROCEDURES FOR THE IMPLEMENTATION AND EVALUATION
OF THE PRODUCTS

荒 井 綜 一 (東京大学農学部)

Soichi ARAI

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo

ABSTRACT

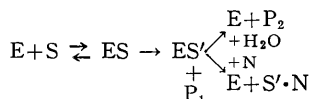
The classical plastein reaction can be modified to a novel one-step process [J. Agric. Food Chem., 27, 52 (1979)] which, particularly when papain is used as its catalyzer, permits covalent attachment of amino acids in a simpler manner. This process was implemented to enhance the sulfur amino acid level of soy protein isolate (SPI), with formation of a product having an expected level of covalently attached L-methionine.

A product (P_{11}) with a methionine level of 11% on weight basis was used as a nitrogen source of a diet for a feeding test with rats. Analysis of their small-intestinal content showed that oligopeptides predominated over free amino acids during 1-4hr after feeding. Despite that, efficient entry of free amino acids, including free methionine, into the portal blood resulted over the same period of time after feeding. This indicates that the covalently attached methionine in P_{11} is well bioavailable.

A possibility thus exists that the enzymatically modified product such as P_{11} could be used as a new type ingredient for methionine supplementation to SPI or others.

大豆たん白質はメチオニンが第一制限アミノ酸であり、1～2%相当の遊離型 L-メチオニンを添加することにより、PER は著しく改善される¹⁾。しかし、添加された遊離型メチオニンはそれ自体が不快臭味をもつこと、加工・貯蔵中に異臭成分へと分解しやすいこと、さらに、着色の原因となりやすいことなどのため、食品学的にみるかぎり、この種の栄養強化法には一定の限界があるといわざるをえない。一方、卵アルブミンをはじめとするメチオニン含量の高いたん白質を補足剤とする試みも広く行われているが²⁾、この場合、メチオニン以外の必須アミノ酸のレベルの変動を伴うため、結果の評価に若干の不確定性を残す。

筆者らは、分離大豆たん白質 (SPI) に L-メチオニンを共有結合状に導入する新しい酵素修飾法を開発している³⁻⁵⁾。この酵素プロセスの概要は



によって表わされる。ここに、E は酵素、S は基質 (たん白質)、ES' はペプチジル酵素中間体、 P_1 および P_2 は S の加水分解生成物、N は親核試薬 (アミノ酸エステル)、 $S' \cdot N$ はアミノ分解生成物 (アミノ酸エステルを共有付加したポリペプチド) である。つまり反応物の全体は P_1 と P_2 と $S' \cdot N$ の混合物であり、N としてメチオ

ニンのエステルを用いれば、それ以外のアミノ酸の組成を変化させることなく、共有結合状のメチオニンのみをレベル・アップすることができる。したがってこの生成物は、栄養強化の目的に適うと同時に、食品加工素材として使用しようという両面性を兼備すると期待される。

本研究の目的は上記のことを実証する趣旨であり、一部に動物実験を折り込んで結果を評価し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法および結果

1. メチオニン導入反応とその生成物

基質(S)として SPI (フジプロ R), 親核試薬(N)として L-メチオニン・エチルエステル (Met-OEt), 酵素(E)としてパペイン (1.16×10^{-2} BAPA 単位)を用い、

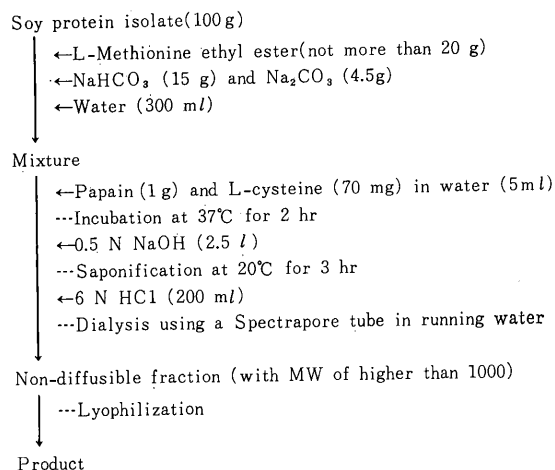


Fig. 1 Process for preparing a methionine-incorporated product from soy protein isolate by treatment with papain in the presence of L-methionine ethyl ester

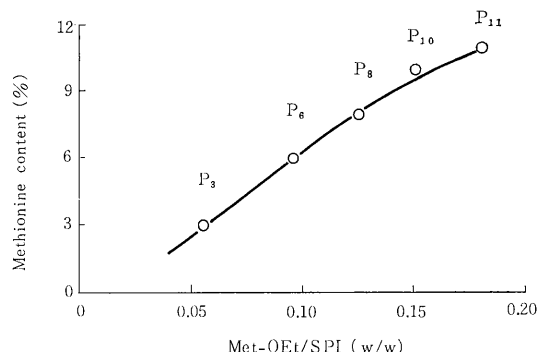


Fig. 2 Relationship between the formulation amount of L-methionine ethyl ester to soy protein isolate and the content of methionine in the product

Fig. 1 のように操作して、メチオニン導入生成物(P)を得た。Met-OEt の使用量は SPI の20%を越えない範囲で任意に調整し、最終的に意図したメチオニン含量 (3%, 6%, 8%, 10%, 11%) に近似した生成物 (P₃, P₆, P₈, P₁₀, P₁₁) を得た。この関係は Fig. 2 に示すとおりである。

今回は、メチオニン含量が最大である P₁₁ に焦点を当てた実験を行った。その収量は固型分基準で約86%であった。ポリアクリルアミド電気泳動から推定した分子量分布と、アミノ酸分析の結果を Table 1 に示す。

2. ラットにおける消化吸収

P₁₁ を用いて窒素含量 1% の飼料 (P 飼料) を Harper⁶⁾ の処方にしたがって調製した。対照として、P₁₁ とまったく同等の組成 (Table 1) の遊離アミノ酸混合物を用いた窒素含量 1% の飼料 (A 飼料) を準備した。

離乳期に昼間定刻 (午前11時) から30分間で摂食を完了するように学習させた Wistar 系雄ラット (7 週齢) を50匹ずつ2群に分け、一方の群にはP 飼料を、他方の群にはA 飼料を、ミール・フィーディングによってそれぞれ6日間投与した。この間、摂食量および体重変化は両群間に有意差はなかった。6日目の摂食開始時 (午前11時) から4時間後までの間の各時点で、それぞれ7匹ずつを両群から無作為抽出し、小腸内容物と門脈血をサンプリングし、分析を行った。

Table 1. Properties of P₁₁ (enzymatic reaction product to which methionine is covalently attached at a level of approximately 11%)

Item	Property
Molecular weight range	1000—8000
Amino acid composition (wt.%)	
Lysine	4.47
Histidine	2.09
Arginine	6.11
Aspartic acid plus asparagine	8.82
Threonine	2.87
Serine	3.89
Glutamic acid plus glutamine	14.65
Proline	4.17
Glycine	3.11
Alanine	3.39
Half-cystine	0.90
Valine	3.84
Methionine	11.04
Isoleucine	3.84
Leucine	6.58
Tyrosine	2.60
Phenylalanine	4.22
Tryptophan	0.98

小腸内容物の経時変化をみると、Table 2 のごとく、A 飼料群では遊離メチオニン量（全小腸内容物当たりの μmole ）は摂食開始後 1 時間でピークに達し、以後暫減して 4 時間後にはほぼ摂食前のレベルに戻った。これに対し、P 飼料群では、全メチオニン量（ペプチド結合型メチオニンと遊離型メチオニンの合計量）は摂食開始後 2 時間をピークとするベル型の経時変化を示したが、遊離メチオニン量はいずれの時点においてもきわめて低く、全メチオニンに対するその比率はピーク時において約 15% に過ぎなかった。

この時点における P 飼料群ラット小腸内容物を膜濾過法によって分子量 (MW) 分画したところ、全窒素当たり MW2000 以上のペプチド態窒素は 18.3%，MW1000～2000 のペプチド態窒素は 25.1%，MW500～1000 のペプチド態窒素は 21.0%，MW500 以下のペプチド態窒素は 26.3%，遊離アミノ酸態窒素は 9.3% という結果を得た。

次に、門脈血の遊離メチオニンの動態をみると、A 飼料群では摂食開始後 1 時間でやや上昇し、2～2.5 時間にかけて著しく増大してピークを形成、3 時間後には激減して次第に摂食前のメチオニン濃度へとレベル・オフした (Table 3)。これに比し、P 飼料群では摂食開始後 1 時間のメチオニン濃度が同時点における A 飼料群のそれを凌ぎつつ上昇し、1.5～4 時間にかけて緩やかなピーク

を形成、以後次第に減少した (Table 3)。両群が示したこのような傾向は、門脈血中の全遊離アミノ酸濃度についても観察された。しかもこの場合、摂食開始後 4 時間までのアミノ酸濃度積算値が A 飼料群と P 飼料群とではほぼ同等になることから、体内に取込まれたアミノ酸（メチオニンを含む）は両群間で差がないと判断された。

考 察

P 飼料群ラット小腸内容物は大部分が低分子ペプチドで占められ、遊離アミノ酸はきわめて低比率であったことは、A 飼料群ラットの腸内容物（当然のことながら遊離アミノ酸が主体）と比較して大きな違いである。このような差異にもかかわらず、門脈を経由して体内に取込まれるアミノ酸の量は両群間で大差ない。とくに興味深いのは摂取開始後 1 時間における遊離メチオニンの動態で、小腸管腔内の遊離メチオニンの量は A 飼料群では P 飼料群の約 6 倍でありながら、門脈血中のその濃度は P 飼料群が A 飼料群の約 2 倍というように、明らかに逆転した結果を与えている。このことから、ペプチド結合状メチオニンが吸収前に遊離型にまで加水分解される率はわずかで、大部分は低分子ペプチド型のまま腸壁を通過し、小腸細胞内ではじめて遊離型にまで加水分解さ

Table 3. Time-course of changes in portal vein free methionine levels of rats fed a P_{11} -based diet and those fed a simulated amino acid diet.

Time after feeding (hr)	P_{11} -based diet group		Amino acid diet group
	Total methionine ($\mu\text{moles}/\text{small-intestinal content}$)	Free methionine ($\mu\text{moles}/\text{small-intestinal content}$)	Free methionine
0	0.98 ± 0.33	0.46 ± 0.13	0.45 ± 0.08
1	3.33 ± 0.50	0.80 ± 0.42	6.10 ± 0.92
2	7.02 ± 0.63	1.02 ± 0.37	3.22 ± 1.05
3	4.64 ± 1.23	0.75 ± 0.21	2.47 ± 1.20
4	3.09 ± 0.98	0.61 ± 0.18	1.06 ± 0.91

Table 3. Time-course of changes in portal vein free methionine levels of rats fed a P_{11} -based diet and those fed a simulated amino acid diet.

Time after feeding (hr)	P_{11} -based diet group	Amino acid diet group
	Methionine ($\mu\text{moles}/\text{mL}$ portal serum)	Methionine
0	20 ± 7	22 ± 18
1	119 ± 17	55 ± 17
1.5	206 ± 14	132 ± 21
2	235 ± 12	344 ± 44
2.5	223 ± 8	331 ± 50
3	118 ± 37	122 ± 39
4	125 ± 15	98 ± 27

れ、門脈血に輸送されると推論できる。この推論は、オリゴペプチドの腸管輸送に関する最近の学説^{7,8)}に照らして矛盾はない。

以上のように、 P_{11} 中に約11%の含量で共有結合状に存在するメチオニンは、ラットによって十分に利用される形態であることが明らかになった。このことは、 P_{11} をSPIのメチオニン補足剤として使用しうることを示唆する。たとえば、SPIと P_{11} を80:20の重量比で配合すると、メチオニン水準はほぼ理想に近い3%となり、しかも他のアミノ酸の組成は原料SPIのそれとほとんど変わらない。現在、この配合物について栄養実験を行っているので、別の機会にその結果を発表したい。

また、メチオニン導入量を3%に調節した生成物(P_3)は、それ自体で(SPIに配合することなく)栄養強化剤として、同時に食品加工用素材として使用しうると期待される。今後、 P_3 についての評価実験をも行う予定であり、その成績を次回に報告するつもりである。

要 約

分離大豆たん白質(SPI)をL-メチオニン・エチルエステル存在下でパパイン修飾し、メチオニンをさまざまな水準で共有結合状に取込んだ生成物を得た。メチオニン水準11%の生成物(P_{11})は、分子量範囲が1000~8000であり、メチオニン以外のアミノ酸のパターンはSPIのそれと近似していた。

P_{11} を基礎とした飼料(窒素水準1%)をラットに経口投与したところ、投与後1~4時間において、小腸内容物の主体はオリゴペプチドであり、遊離アミノ酸(遊離メチオニンを含めて)の占める率はきわめて低かった。にもかかわらず、この間、門脈血中には十分量のアミノ酸(メチオニンを含む)が取込まれており、 P_{11} 中に共有付加されたメチオニンはラットに利用される形態であることが示された。以上から、 P_{11} をSPIなどに対する新しいタイプのメチオニン補足剤として使用しうるということが明らかになった。

文 献

- 1) 井上五郎, 岸恭一, 八木郁子(1980): 分離大豆たん白質へのメチオニン補足量に関する研究. 大豆たん白質栄養研究会誌, 1, 6-9.

- 2) 山口迪夫, 岩谷昌子, 宮崎基嘉(1980): 分離大豆たん白質の制限アミノ酸とその補足効果, 大豆たん白質栄養研究会誌, 1, 10-15.
- 3) Yamashita, M., Arai, S., Imaizumi, Y., Amano, Y. and Fujimaki, M. (1979): A one-step process for incorporation of L-methionine into soy protein by treatment with papain. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 52-56.
- 4) Yamashita, M., Arai, S., Amano, Y. and Fujimaki, M. (1979): A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: application to soy protein and flour for enhancing their methionine levels. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1065-1068.
- 5) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M. (1979): A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: papain-catalyzed polymerization of L-methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1069-1074.
- 6) Harper, A. E. (1959): Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, 68, 405-418.
- 7) Matthews, D.M. (1977): "Peptide Transport and Hydrolysis" (Ciba Foundation Symposium 50), Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland, Amsterdam, p. 5-14.
- 8) Silk, D.B.A., Fairclough, P.D., Clark, M.L., Hegarty, J.E., Marrs, T.C., Addison, J.M., Burston, D., Clegg, K.M. and Matthews, D.M. (1980): Use of a peptide rather than free amino acid nitrogen source in chemically defined "elemental" diets. *J. Parenteral & Enteral Nutr.*, 4, 548-553.