

大豆たん白質の酵素修飾による ペプチドの調製とその栄養特性の評価

PRODUCTION OF PEPTIDES FROM SOY PROTEIN BY
ENZYMATIC MODIFICATION AND EVALUATION OF THEIR
NUTRITIONAL PROPERTIES

荒 井 綜 一 (東京大学農学部)

Soichi ARAI

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo

ABSTRACT

A papain-catalyzed process developed by simulating the classical plastein reaction was applied to soy protein isolate for the particular purpose of producing an enzymatically modified protein (EMP) with L-methionine attached covalently at any expected level.

An EMP at a 11% methionine level was formulated with SPI to prepare a series of formulas having different methionine levels. Diets based on these formulas at a 10% protein level were prepared. A feeding test with rats was carried out by using each diet, with the result that PER got maximized at methionine levels of 0.25-0.30% in diet.

On the other hand, an EMP at a 3% methionine level was prepared and then partially hydrolyzed with trypsin. A 66.7%-ethanol treatment on the tryptic hydrolysate afforded an oligopeptide mixture (OPM) with an unchanged methionine level. Chromatography on Bio-gel P-2 showed that the OPM contained only a slight amount of free amino acids, having an average molecular weight of approximately 900 daltons. Effects of feeding the OPM to rats suffering from protein malnutrition on their recovery are discussed.

プラステイン反応の改変型である新プロセス¹⁾を用いると、アミノ酸組成の整った酵素修飾たん白質(enzymatically modified protein に因んで EMP と略す)を容易に調製することができ、前回はこのプロセスを SPI に適用して期待量の Met がペプチド結合状に導入された EMP を得るとともに、Met 結合量 11% の EMP (EMP₁₁ と記す)から成る飼料をラットに与え、ペプチド結合型 Met が十分に生体利用されうことを明らかにした²⁾。

EMP₁₁ は分子量 1,000~8,000 のペプチド混合物であり²⁾、その食品学的利点として高 Met 含量にもかかわらず不快なサルファイド臭を持たないこと、大豆由来する豆臭が除去されていること、たとえば SPI に配

合した場合(下記)に SPI 固有の機能特性を大きく損なう可能性がないであろうことが挙げられる。

今回は、実験 I として、SPI に対して EMP₁₁ をさまざまな比率で配合したものをラットに与え、どのような配合比率が、いいかえればペプチド結合型 Met がどのような水準にあるときに、PER を最大とするかをしらべた。次いで実験 II として、Met 水準が最適(3%)と考えられる酵素修飾たん白質 EMP₃ をさらに低分子化し、遊離アミノ酸をほとんど含まないオリゴペプチド混合物(OPM と記す)を調製するとともに、これを栄養失調ラットに投与し、回復効果を検証しているので、現在までの経過を報告する。

方法および結果

1. 実験 I

EMP₁₁ は前報²⁾に従って調製した。これを SPI (フジプロ R) に段階的比率で配合し, Met 水準 1~4% の 6 種類の配合物を得, それぞれを 10% 含有する Harper 組成³⁾の飼料 (すなわち Met 水準 0.1~0.4%) を調製した (Table 1)。この場合, たとえば SPI と EMP₁₁ の 80:20 配合物のアミノ酸組成をみると, Met が 3% となっており, 他のアミノ酸のパターンは原料 SPI のそれとさわめてよく近似していた (Fig. 1)。

各飼料を用いて動物実験を行った。すなわち, 各飼料群 7 匹の Wistar 系雄ラット (4 週齢) を 22±1°C, 湿度 50~55%, 人工照明 (6 a.m.~6 p.m. 点灯), 飼料は自由摂取の条件で 4 週間飼育し, 常法に従って, PER を求めた。飼育終了後, 全動物を屠殺し, 臓器の重量を測定した。

その結果, Table 2 に示すように, 配合物中 Met 水準 2.5% (飼料中 Met 水準 0.25%) 以上で PER は最大となった。ただし, 見かけ上, 配合物中 Met 水準 2.5% の点で PER は極大になった。なお, 摂食量は Met 水準が高まるにつれて有意に増加し, ラットは EMP₁₁ に対して嫌悪挙動を示さないのみならず, むしろ積極的にこれを嗜好することが観察された。

飼育終了後, すべてのラットの肝臓, 腎臓, 脾臓の重量を測定したところ, Met 水準 0.1% の飼料群 (SPI 飼料群) で腎臓と脾臓の重量が有意に高く, 他の飼料群 (EMP₁₁ 配合飼料群) ではいずれも有意差はなかった。肝臓重量は全飼料群を通じて有意差がなかった。しかし SPI 飼料群の肝臓は他群のそれに比して白味がかった。

Table 1. Methionine levels in formulas and diets for feeding use

Formulation ratio of SPI* vs. EMP ₁₁ **	Methionine level in formula (%)	Methionine level in diet (%)
100:0	1.0	0.10
95:5	1.5	0.15
90:10	2.0	0.20
85:15	2.5	0.25
80:20	3.0	0.30
70:30	4.0	0.40

* Soy protein isolate

**Enzymatically modified protein with covalently attached L-methionine at a level of about 11%

2. 実験 II

前報²⁾に順じて調製した Met 結合量 3% の EMP (EMP₃ と記す) 100 g を水 5 liter に懸濁し, NaOH で pH 7.8 とした後, 再結晶トリプシン (0.1 g) を加え, 37°C で 15 min インキュベートした。これに 99% エタノール 10 liter を加えて 1 夜放置し, 遠心分離して上澄と沈殿に分けた。上澄からエタノールを溜去し, 凍結乾燥して粉末状生成物 58 g を得た。沈殿に対しても上記と同様のトリプシン処理およびエタノール処理を施し, 上澄から粉末状生成物 29 g を得た。両者を合わせることにより, 結局, EMP₃ から 87% の収量でオリゴペプチド混合物 (OPM-I と記す) が得られた。

別に, EMP₃ 100 g を水 5 liter に懸濁し, プロリン

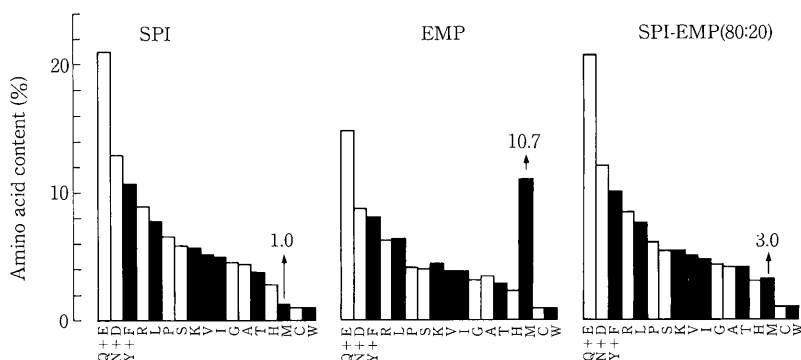


Fig.1 Amino acid composition of soy protein isolate(SPI), enzymatically modified protein(EMP), and an SPI-EMP formula

Table 2. Average diet intake, weight gain, and PER observed in rats fed diets with different levels of methionine

Methionine level in diet (%)	Average diet intake (g/day)		Significance*				
			Methionine level in diet (%)				
			0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.10	17.5±0.6	0.10					
0.15	19.4±0.9	0.15	—				
0.20	20.8±0.6	0.20	+	—			
0.25	21.5±0.2	0.25	+	+	—		
0.30	23.1±0.2	0.30	+	+	+	+	
0.40	22.8±0.8	0.40	+	+	+	—	—
	Average weight gain (g/day)						
			Methionine level in diet (%)				
			0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.10	3.6±0.18	0.10					
0.15	4.7±0.34	0.15	+				
0.20	5.8±0.25	0.20	+	+			
0.25	6.4±0.13	0.25	+	+	—		
0.30	6.8±0.11	0.30	+	+	+	—	
0.40	6.4±0.25	0.40	+	+	—	—	—
	PER						
			Methionine level in diet (%)				
			0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.10	2.03±0.06	0.10					
0.15	2.43±0.08	0.15	+				
0.20	2.77±0.05	0.20	+	+			
0.25	2.97±0.06	0.25	+	+	+		
0.30	2.93±0.04	0.30	+	+	+	—	
0.40	2.80±0.06	0.40	+	+	+	—	—

*+ : p<0.05

特異性エンドペプチダーゼ(2000 単位量)を加え、37°Cで 30 min インキュベートした。これを上記とまったく同様に処理し、結局、EMP₃ から 63 %の収量でオリゴペプチド混合物 (OPM-II と記す) を得た。

Biogel P-2 クロマトグラフィーによれば、OPM-I は分子量約900を中心とし、OPM-IIは分子量約750を中心とするオリゴペプチド混合物であり、遊離アミノ酸含量は前者で3.98%，後者で0.15%にすぎず、両者ともに当初の Met 含量 (3%) を保持していた (Table 3)。

次に、OPM-I を 10 %含有する Harper 組成³⁾ の飼料 (O 飼料) を調製した。対照として、SPI およびアミノ酸混合物 (SPI パターン) に遊離 Met を添加し、Met 水準を 3 %としたものから上記と同様に調製した飼料 (それぞれ S 飼料および A 飼料と記す) を用い、栄養失

調ラットに投与してその回復をしらべた。Wistar 系雄ラット (6 週齢) を 22±1 °C、湿度 50~55 %、人工照明 (6 a.m.~6 p.m. 点灯) の条件に置き、無たん白質飼料を 4 週間自由摂取させた。次いでラット 3 群 (各群 7 匹) に分け、S 飼料、O 飼料、A 飼料のそれぞれを 3 週間にわたって自由摂取させ、回復の程度を諸項目についてしらべた。

Table 4 はその結果をまとめたものである。体重は栄養失調にともない 187.6 g にまで減少したが、S 飼料、O 飼料、A 飼料を与えはじめると急速に増加した。その増加率は飼料間で有意差はなかった。飼料の摂取量 (体内への取込み量) も飼料間で有意差はなかった。摂取量に対する体重増加量 (飼料効率) をみると、回復期の第 1 週目から第 2 週目にかけて A 飼料で有意に低

Table 3. Amino acid composition of EMP₃ and two OPMs prepared from the EMP₃ by enzymatic hydrolysis

Amino acid	EMP ₃ (%)	OPM-I (%)	OPM-II (%)
Lys	5.95	5.42	6.16
His	2.64	2.02	3.07
Arg	7.53	5.52	8.86
Asx	11.38	12.12	12.26
Thr	3.84	3.69	3.08
Ser	4.92	4.91	4.40
Glx	18.90	23.94	20.64
Pro	5.65	2.43	3.03
Gly	4.09	4.45	4.02
Ala	4.36	4.62	3.64
Val	5.18	5.22	3.86
Met	2.97	3.16	3.07
Ile	5.16	5.52	4.34
Leu	7.59	7.59	6.23
Tyr	3.94	3.57	2.95
Phe	5.43	6.05	4.61

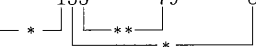
下し、第1週目から第3週目にかけてS飼料群で有意に低下したが、O飼料群では回復全期を通じてほぼ一定に維持されていた。ヘモグロビン量はO飼料を与えたときのみに急速に回復した。血清 GOT 活性はS飼料に切り替えた直後に異常な上昇をみせた。血清 GPT 活性は飼料間で有意差はなかった。

考 察

本研究は、たん白質資源の有用素材化を意図しており、そのために開発した酵素修飾法¹⁾を SPI に適用したさいの成績を本報告に述べた。

実験 I で使用した酵素修飾たん白質 EMP₁₁ の食品素材としての有用性とくに acceptability については緒言に記した。また、EMP₁₁ にペプチド結合状に導入されている Met の生体利用性については前報²⁾で報告した。今回の実験では EMP₁₁ を SPI に対してさまざまな比率で配合し、動物実験の飼料を調製したが、それぞれの配合物の特徴は、Met (ペプチド結合型) 水準のみが相応に変化しており、他のすべてのアミノ酸の組成は SPI パターンに保持されている点にある。従来、アミノ酸組成に関して同様の配合物を調製するのは SPI に遊離型 Met を添加してのみ可能であった。これによって PER を最大にしうる Met 添加量は SPI に対して 2% (SPI 自身の Met をこれに加算すると約 3%) あるいはそれ

Table 4. Effects of protein-, peptide-, and amino acid-diets fed to malnourished rats on their recovery

Item investigated		Feeding with a protein-free diet (4weeks)		Feeding with experimental diets ad libitum [†]								
		Final stage	1st week			2nd week			3rd week			
			S-diet	O-diet	A-diet	S-diet	O-diet	A-diet	S-diet	O-diet	A-diet	
Body weight	(g)	187.6	221.8	215.8	222.7	285.8	285.6	278.4	333.9	331.2	323.3	
Diet intake	(g)	16.0	14.1	12.0	14.9	21.9	21.1	22.5	23.5	22.6	23.1	
Weight gain			4.06	4.08	4.14	4.16	4.07	3.53	3.41	3.75	3.23	
vs. diet intake												
Hemoglobin	(g/dl)	8.1	8.2	9.1	8.5	10.6	11.2	11.6	11.6	12.2	12.2	
												
Serum GOT	(units)	94	133	79	89	95	84	78	68	55	65	
												
Serum GPT	(units)	18.0	12.1	11.5	9.5	17.0	9.0	12.8	12.0	11.0	13.5	
												

[†] S-, O- and A-diets refer to protein-, peptide- and amino acid-diets, respectively.

* p<0.05 **p<0.01

以上であるとされる⁴⁾。しかし、実験Ⅰの結果が示すように、PER を評価基準として SPI パターンに期待される Met 水準は 2.5～3.0 % であり、これを越える必要はない。この知見は、たとえば遺伝子工学的な大豆の品種改良あるいは大豆の組織培養によって高 Met グリシニンの生産を試みるような場合に、目標とすべき必要十分な Met 含量を示唆するかもしれない。

一方、臨床栄養の分野では、従来のアミノ酸混合物に代わってオリゴペプチド混合物をエレメンタル・ダイエツトとして使用する試みが盛んになってきた⁵⁾。こうした背景を踏まえて行った実験Ⅱは、好ましいアミノ酸パターンをもつオリゴペプチド混合物で、しかも遊離アミノ酸をほとんど含まないものを、SPI から調製する方法に関わるものである。その結果得られた OPM-I は Met 水準 3 % を堅持しているほか、他のアミノ酸は依然として SPI パターンに近似していた (Table 4)。これから調製した O 飼料を、S 飼料および A 飼料を対照として、栄養失調ラットに投与し、ダイエタリー効果をみたところ、PER、ヘモグロビン量、血清 GOT 活性に関して O 飼料は対照飼料よりも望ましい効果を示した。今後、効果の指標となる項目を増し、OPM の有効性を検証していく予定である。

文 献

- 1) WATANABE, M., and ARAI, S. (1982) : in "Modification of Proteins: Food, Nutritional, and Pharmacological Aspects" (Advances in Chemistry Series 198), Feeney, R.E. and Whitaker, J.R., Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 199-221.
- 2) 荒井総一 (1981) : 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **2**, 23-26.
- 3) HARPER, A.E. (1959) : Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-418.
- 4) 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会誌, **1**, 6-9.
- 5) 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. *JPEN*, **4**, 548-553.