

動物性たん白質食品中に混和された植物性たん白質の定量的検出

STUDY ON QUANTITATION OF SOYBEAN PROTEIN ADDED TO THE PROCESSED MEAT PRODUCTS: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A SPECIFIC PENTAPEPTIDE IN 11S GLOBULIN OF SOYBEAN PROTEIN

安本教傳・等々力博志・鈴木鐵也（京都大学食糧科学研究所）

Kyoden YASUMOTO, Hiroshi TODOROKI and Tetsuya SUZUKI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

With recent progress in food processing techniques vegetable proteins such as soybean protein, wheat gluten have been getting familiar to be used as binder, emulsifier and extender, and for the purpose of improving texture quality, and nutrition improvement. This paper describes a preliminary study conducted to quantitate soybean protein added to the processed foods of animal origin for the purpose of establishing a standard procedure which can be profitably used in quality control of the processed products. Conventional immunochemical method of using 11S globulin antisera was found not to work for the quantitation of soybean protein contained in the heat processed food materials. The pentapeptide called "SP-1", specific to 11S globulin, was chosen as the target in immunochemical analysis. However, its amino acid sequence as well as its isolation procedure have been remained to be established. So, as the first step improved method was devised for the isolation of the "SP-1" peptide from 11S globulin; a combination of chromatographic procedure including SP-Toyopearl ion exchange chromatography, gel permeation chromatography, and reverse-phase partition chromatography in FPLC system. By using DABITC method the amino acid sequence of Ser-Gln-Gln-Ala-Arg was given for in "SP-1" peptide, which was conjugated with bovine serum albumin. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 21-27, 1985.

鳥獣肉，魚肉，牛乳，鳥卵などの動物性たん白質を主原料とする加工食品が，屢々有意量の異種たん白質を含むことがある。これらの異種たん白質は，加工食品のテクスチュアを改善するバインダーとしてや，水分や油脂分の保持能を向上せしめる乳化安定剤として添加されたものや，あるいは栄養効果改善の目的で，あるいは単に増量の意図のもとに混和されたものであって，偶然に混入したものではない。近年における食品素材に関する基礎的知見の拡充と，食品加工技術の

進歩とが相まって，これらの加工食品に，大豆たん白質や小麦たん白質などの植物性たん白質を混和することが可能になり，植物性たん白質を主原料とするものや副原料とする食品品目が年を追って多くなっている。

これらの加工食品のうち，高温，高圧，強酸，強アルカリなどのたん白質の変性，部分的分解を伴う条件下で加工されたものでは，混和された植物性たん白質を定量的に検出することが困難である。このような困難を解決して，動物性加工たん白質食品の品質管理

上必要な標準試験法の確立を図るには、大豆たん白質に含まれる特異的なアミノ酸配列のペプチドフラグメントを検出の指標とし、免疫化学的手法を用いる高感度定量法を開発することが必要である。本報告は、このような目的のもとに行っている研究で得られた予備的知見について述べたものである。

実験方法

1. 大豆 11S グロブリン 抗血清を用いたネフエロメトリーによる大豆たん白質の定量¹⁾

ウサギ 11S グロブリン抗血清を 4% ポリエチレングリコールを含む生理食塩水で 100 倍に希釈し、その 1 ml に抗原を含む溶液 50 μ l を加え、室温で 1 時間放置した後、散乱光度をデジタルネフエロメータ (Kallestad 社製) を用いて測定した。測定に用いたのは不二製油から供与された未加熱分離大豆たん白質、オートクレーブ処理 (120 $^{\circ}$ C, 30 分) した SPI, 尿素メルカプトエタノールによる再生処理を行った試料並びにエクストルーダ処理した Fujipro-E である。

変性を伴う処理を受けた試料については、粉碎試料 250 mg に 10 M 尿素, 2% β -メルカプトエタノールを含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) を加え 100 $^{\circ}$ C, 45 分間加熱後, 0.01 M リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) に対し透析したものを "再生処理試料" とした。

2. ダイズ 11S グロブリンに含まれる特異ペプチドフラグメントの調製

調製法—1

不二製油製, 未加熱分離大豆たん白質を材料に Thanh & Shibasaki²⁾の方法に従って 11S グロブリンを単離, 精製した。11S グロブリン画分を 120 $^{\circ}$ C, 3 時間オートクレーブ後, Bailey の方法³⁾で, トリプシンを基質に対し 1% 添加して限定加水分解を 24 時間行った。反応停止後遠心分離して沈殿を除き, 限外ろ過を行って分子量 10,000 以下の画分を得た。

本画分を pH 3.5 とした後 Aminex A-5 イオン交換カラムにかけ, 0.2 N クエン酸ナトリウム緩衝液で 0.5 ml/min で溶出を行なった。120 分付近に溶出するピークを集め, Sephadex G-10 カラム (1.5 ϕ \times 50 cm) にて, 0.1 M 酢酸ナトリウムで溶出して脱塩後, ファルマシア社製 FPLC システムを用いる逆相カラムクロマトグラフィー (Pep RPC HR 5/5) で 0.1% トリフルオロ酢酸中, アセトニトリル濃度を 0~60% まで linear gradient をかけ, 流速 0.7 ml/min で溶出を行ない, 214 nm での吸収をモニターしつつ特異ペプチドを単離した。(スキーム 1)

調製法—2

オートクレーブ処理した大豆 11S グロブリン画分を, 0.1 M NH_4HCO_3 溶液に対し透析した後, トリプ

Scheme 1. Purification procedure of SP-1 (1)

11S globulin fraction

- Autoclaving (120 $^{\circ}$ C, 3 hrs)
- Tryptic digestion
- Ultrafiltration (MW < 10,000)

Low molecular weight fraction

- Aminex A-5 column chromatography
- Sephadex G-10 gel filtration
- Pep RPC HR 5/5 column chromatography

Purified SP-1

シン消化, 限外ろ過を行なって分子量 1,000 以下の画分を取り, この低分子画分を凍結乾燥後, SP-Toyopearl 650 M カラム (2.0 ϕ \times 30 cm) によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった後, Sephadex G-15 カラム (2.0 ϕ \times 90 cm) で脱塩を行ない, 次いで FPLC を用いる逆相分配クロマトグラフィーを行なった。SP-Toyopearl 650 M イオン交換カラムクロマトグラフィーでは, カラムを予め 0.01 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) でカラムを洗浄後, 0~0.1 M 迄 NaCl の linear gradient で流速 1.5 ml/min によりペプチドを溶出させた。

3. 単離調製した特異ペプチド "SP-1" のアミノ酸分析と DABITC 法によるアミノ酸配列の決定

上記のペプチド調製法—(1)または(2)によって単離, 調製した "SP-1" 画分を分取し, OPA 誘導体とした後, 島津高速液体クロマトグラフ LC-6 型を用い, 陽イオン交換樹脂により蛍光検出器を用いてアミノ酸組成を分析した。また, "SP-1" のアミノ酸配列は DABITC 法⁴⁾によって決定した。

4. 11S グロブリン特異ペプチド "SP-1" と bovine serum albumin との complex の調製⁵⁾

調製した "SP-1" の抗原性を高めるために, 次の方法により, bovine serum albumin (BSA) と結合させた。すなわち, ペプチド 3 mg に BSA 1.5 mg を加え, 100 ml の水に溶解した。次に 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride を 60 mg を加え, 室温で 1 時間放置後, 水に対して透析し, 凍結乾燥し "SP-1" -BSA 複合体標品とした。

結果と考察

1. ネフェロメトリーによる加熱大豆たん白質の定量

加工食品中の植物性たん白質を定量する方法は数多い^{3,6-24)}が、大豆たん白質の定量法としては、直接たん白質を定量する方法^{3,6-20)}、たん白質中に含まれる物質を定量し間接的にたん白質を定量する方法²¹⁻²⁴⁾の2つに大別出来る。その中でも免疫化学的方法が、特異性、感度、操作の点で優れているが、免疫化学的定量法は、抗原抗体反応に基づくため、加工食品などでは抗原となるたん白質の変性が問題となる。食品加工中に変性した大豆たん白質は尿素メルカプトエタノールによる抽出再生処理で抗原性を回復するという報告¹⁴⁾があるが、我々の行なった実験では一旦加熱変性後再生処理した SPI には、ほとんど定量性が認められず感度も低かった。また、エクストルーダ処理した“Fujipro-E”や脱脂大豆も native SPI と比較すると感度は低かった (Fig. 1)。

以上の結果より大豆たん白質を抗原として用い、免

疫化学的方法により定量する方法は再現性、検出感度に問題があるうえ、変性たん白質の再生に要する手間など考え合せると余り良い方法とは言えない。

2. 大豆 11S グロブリンに含まれる特異ペプチドフラグメント “SP-1” の調製

新たに大豆たん白質を定量するための指標として Bailey らが大豆たん白質に特有なマーカーと報告している “SP-1” ペプチドフラグメント^{3,18)}の利用を試みた。“SP-1”の調製法、アミノ酸配列などに関して不明瞭な点も多い故、試料の調製法、アミノ酸配列について検討した。

調製法一(1)の逆相分配クロマトグラフィーで、3つの大きなピークが溶出パターンの上で認められ (Fig. 2)、各ピークをアミノ酸分析に供した。

大量試料の分取を目的として行なった SP-Toyopearl によるペプチドの分画 (調製法一(2))では、Fig. 3 のカッコで示した部分に “SP-1” が溶出した。また、逆相分配クロマトグラフィーでは、Fig. 4 の矢印の位置に “SP-1” が溶出した。

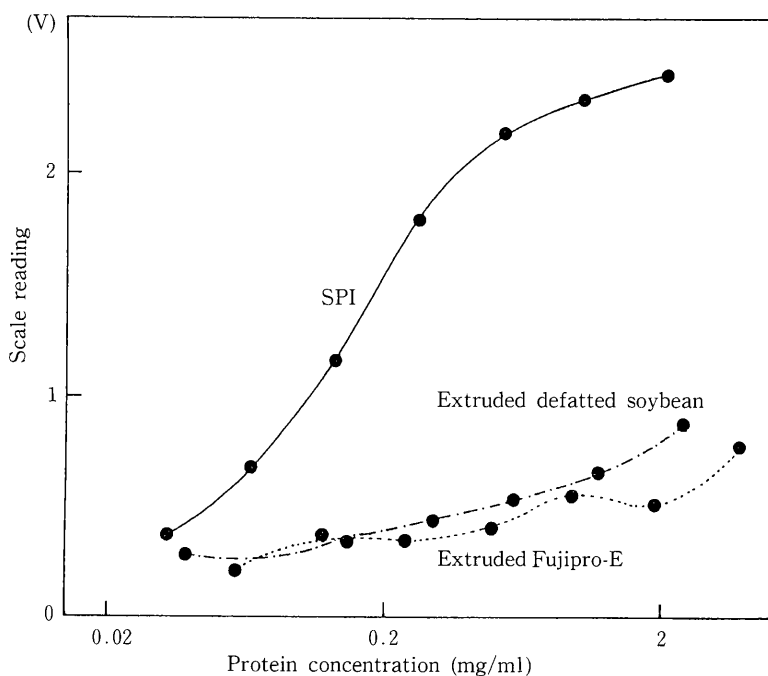


Fig. 1. Nephelometric titration of SPI and extruded soy products. Anti-11S rabbit serum was diluted in 4% polyethylene glycol (1 ml), followed by mixed with 50 μ l of antigen. Incubation was carried out for 1 hour at room temperature. Scattered light intensity was measured by Digital Nephelometer (Kallestad, Chasko, Minn.). Extrusion of defatted soybean and Fujipro-E was done at 150°C and 30 kg/cm² with screw rotating speed of 150 r.p.m. at the outlet.

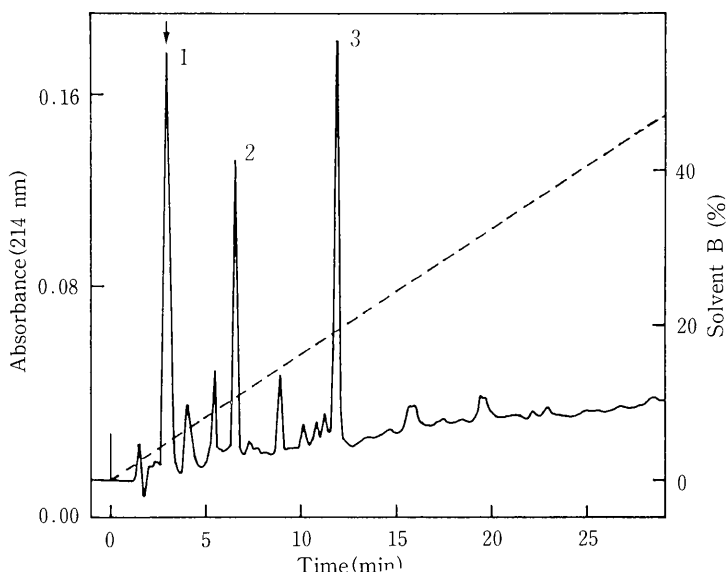


Fig. 2. Reverse-phase column chromatogram of peptide containing "SP-1" fraction after desalting on Sephadex G-10 column. Sample was applied to a Pep RPC HR 5/5 (Pharmacia) column (0.5×5 cm) and eluted by solvent A with increasing concentration of solvent B from 0 to 60% in a linear gradient manner at a flow rate of 0.7 ml/min. Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid. Solvent B: 0.1% trifluoroacetic acid in 60% acetonitrile. Three major peaks (1-3) were collected for amino acid composition analysis and amino acid sequence analysis by DABITC method.

この様にして、調製法—(1)では分子量 1 万以下の trypsin 消化物 0.8 g から約 2.3 mg の "SP-1" を、それぞれ 1 回の分析で得ることが出来た。

3. 単離調製した特異ペプチド "SP-1" のアミノ酸組成と配列

逆相クロマトグラフィーで溶出した各ピーク, SP-1, SP-2, SP-3 (Fig. 2) を分取しアミノ酸分析に供した結果, Table 1 に示す如き値が得られた。その結果, 最初に溶出した SP-1 ピークのアミノ酸組成が, Ser: Glu: Ala: Arg: = 1: 2: 1: 1 であることが判った。

更に, SP-1 ピークを DABITC 法によりアミノ配列を検討したところ, その配列は最初報告された Ser-Glu-Ala-Arg ではなく, Ser-Gln-Gln-Ala-Arg であることが判明した。最初の報告によると, この SP-1 ペプチドは, 大豆 11S グロブリンの A₂B_{1a} サブユニットの B_{1a} 中に存在している²⁵⁾。

Table 1. Amino acid composition of soybean peptides (mols/mol Ala)

Amino acid	SP-1	SP-2	SP-3
Ser	0.837	41.6	
Glu	2.31	58.4	0.0180
Ala	1	1	1
Arg	0.930	43.5	0.364
Thr	0.0108		0.309
Gly	0.0086	23.0	0.0117
Pro		23.9	0.468
Ile		0.530	
Leu	0.0147	0.567	
Met			0.343
His	0.0147	0.519	0.0142
Lys		1.60	

Values are expressed as relative amount of amino acids to alanine as 1 mol.

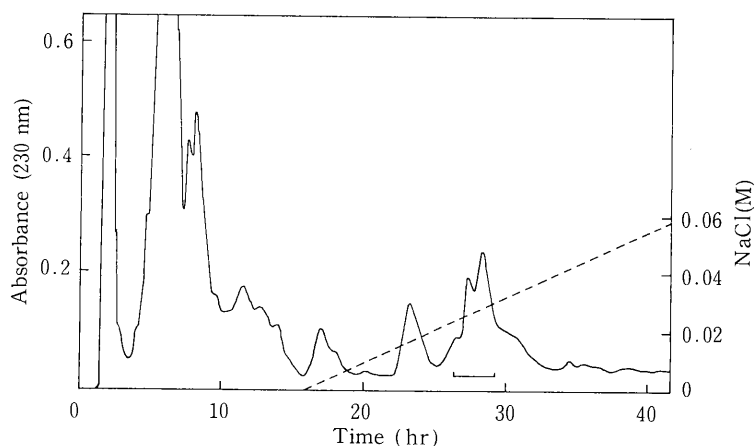


Fig. 3. SP-Toyopearl column ion exchange chromatography of trypsin digested soybean 11S globulin. Two grams of trypsin digested soybean 11S globulin were applied to SP-Toyopearl ion exchange column, and eluted with NaCl in a linear gradient from 0 to 0.1 M. Peaks eluted around 26 to 30 hours (shown by bracket) were collected and desalted on a Sephadex G-15 column (2.0×90 cm) before applying to the reverse-phase column chromatography.

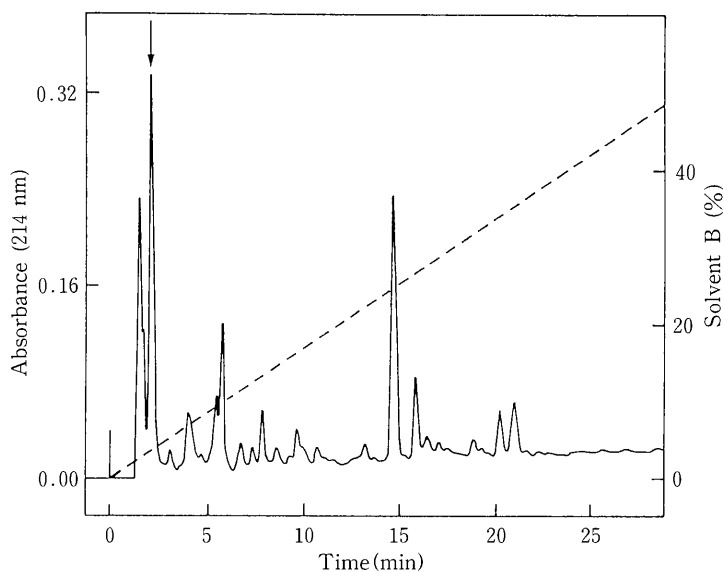


Fig. 4. Reverse-phase column chromatogram of SP-1 prepared by alternative method by using SP-Toyopearl in place of Aminex A-5. Experimental conditions are the same as mentioned for Fig. 2. SP-1 is eluted at 2.5 min as indicated by an arrow.

4. 大豆 11S グロブリンの中の SP-1 ペプチドと BSA との複合体の調製

BSA と SP-1 とを化学的に結合させた標品のアミノ酸分析を行なったところ, native な BSA に比べて Arg が 32~34 モルも多いことが判った (Table 2)。従って 1 モルの BSA に 32~34 モルの SP-1 が結合していることが確認された。現在, この BSA-SP-1 複合体に対する抗体を用いて免疫定量を行なうべく, ウサギ並びにマウスを用いて抗体を調製中である。本抗体を用いる事により, 高感度かつ試料の変性度に左右されない免疫定量法の確立が可能である。

Table 2. Hapten-albumin ratio of BSA-SP-1 conjugate.

	[Arg]/[Lys]	[Arg]/[His]	Molar excess of Arg
BSA	26	21	
Conjugate	58	55	32-34

BSA: bovine serum albumin.

Ratios were calculated by using the data obtained from amino acid composition analysis. Both BSA and conjugate were hydrolyzed in 6 N HCl at 110°C for 22 hours in sealed tubes. Compositions of amino acids were analyzed by Shimadzu LC-6 HPLC as ortho-phthalaldehyde derivatives. Eluates were detected by fluorescence detector.

文 献

- 1) Yamagishi, Y. (1979): Nephelometer. *Rinsho Kensa*, **23**, 1286-1290.
- 2) Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fraction and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117-1121.
- 3) Baily, F. J. (1976): A novel approach to the determination of soya protein in meat products using peptide analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 827-830.
- 4) 平野久 (1984): DABITIC 法による蛋白質の一次構造分析。蛋白質, 核酸, 酵素, **29**, 374-382.
- 5) Goodfriend, T. L., Levine, L. and Fasman, G. D. (1965): Antibodies to bradykinin and angiotensin. A use of carbodiimides in immunology. *Science*, **144**, 1344-1346.
- 6) Parsons, A. L. and Lawrie, R. A. (1972): Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products. *J. Food Technol.*, **7**, 455-492.
- 7) Guy, R. C. E., Jayaram, R. and Willcox, C. J. (1973): Analysis of commercial soya additives in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1551-1563.
- 8) 橋詰和宗, 野口明徳 (1978): 動物蛋白食品に加えられた植物蛋白質の鑑別法として SDS ゲル電気泳動法の検討. 日食工誌, **25**, 628-634.
- 9) Hashizume, K., Ohara, T. and Ando Y. (1978): Identification of vegetable protein in animal protein products by urea polyacrylamide gel electrophoresis. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **25**, 35-40.
- 10) Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E. C. and Briskey, E. J. (1975): Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends. *J. Food Sci.*, **40**, 380-383.
- 11) Armstrong, D. J., Richert, S. H. and Rieman, S. M. (1982): The determination of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products. *J. Food Technol.*, **17**, 327-337.
- 12) Kamm, L. (1970): Immunochemical quantitation of soybean protein in raw and cooked meat products. *J. A. O. A. C.*, **53**, 1248-1252.
- 13) Poli, G., Balsari, A., Ponti, W., Cantoni, C. and Massarv, L. (1979): Crossover electrophoresis with indirect immunofluorescence in the detection of soy protein in heated meat products. *J. Food Technol.*, **14**, 483-491.
- 14) Koh, T. Y. (1978): Immunochemical method for the identification and quantitation of cooked or uncooked beef and soya proteins in mixtures. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, **11**, 124-128.
- 15) Crimes, A. A., Bailey, F. J. and Hitchcock, C. H. S. (1981): Determination of foreign protein in meat products. *Anal. Proc.*, **18**, 164-166.
- 16) Hitchcock, C. H. S., Baily, F. J., Crimes, A. A., Dean, B. A. G. and Davis, P. J. (1981): Determination of soya proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 157-165.
- 17) Griffiths, N. M., Billington, M. J., Crimes, A. A. and Hitchcock, C. H. S. (1984): An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay of soya

- protein in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 1255-1260.
- 18) Bailey, F. J., Llewellyn, J. W., Hitchcock, C. H. S. and Dean, A. C. (1978): The determination of soya protein in meat products using peptide analysis and the characterization of the specific soya peptide used in the calculations. *Chem. & Ind.*, 477-478.
 - 19) Llewellyn, J. W., Dean, A. C., Sawyer, R., Bailey, F. J. and Hitchcock, C. H. S. (1978): The determination of meat and soya proteins in meat products by peptide analysis. *J. Food Technol*, **13**, 249-252.
 - 20) Lindqvist, B., Ostgren, J. and Lindberg, I. (1975): A method for the identification and quantitative investigation of denatured proteins in mixtures based on computer comparison of amino acid patterns. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **159**, 15-22.
 - 21) Coomarascoamy, M. and Flint, F. O. (1973): The histochemical detection of soya "Novel Proteins" in comminuted meat products. *Analyst*, **98**, 542-545.
 - 22) Flint, F. O. and Meech, M. V. (1978): Quantitative determination of texturized soya protein by a sterological technique. *Analyst*, **103**, 252-258.
 - 23) Formao, M. W., Honalb, G. R. and MacLean, D. B. (1974): Determination of soy products in meat-soy blends. *J. A. O. A. C.*, **57**, 841-846.
 - 24) Iijima, Y. (1979): Analysis of soybean protein products in various meat products using gel permeation chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **26**, 417-421.
 - 25) Staswick, P. E., Hermodson, M. A. and Nielsen, N. C. (1984): The amino acid sequence of the A₂B_{1a} subunit of glycinin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13424-13430.