

大豆たん白質の消化特性と構成アミノ酸の有効性

DIGESTIBILITY OF SOYBEAN PROTEIN AND BIOAVAILABILITY OF THE CONSTITUENT AMINO ACIDS

岩井和夫・樋口雅子（京都大学農学部）

Kazuo IWAI and Masako HIGUCHI

Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606

ABSTRACT

Presence of antinutritional factors, such as trypsin inhibitor and lectin, and *in vitro* digestion of these factors in soybean and soybean protein isolates were examined. Hemagglutinating activity, which was strongly detected in raw soybean, was not detected in soybean protein isolates. Trypsin inhibitory activity was detected in several preparations of the soybean protein isolates, but the inhibitory activity was only approximately 10% of that present in the raw soybean. Purified soybean trypsin inhibitor was rapidly inactivated by pepsin. When soybean extract was digested with pepsin, inactivation of the trypsin inhibitory activity was much less than that observed in digestion of purified soybean trypsin inhibitor. Consequently, trypsin inhibitor in raw soybean was suggested not to be inactivated by passage through the stomach and thus affect the intestinal digestion of protein. Growth experiments with defatted soybean meal, autoclaved soybean meal and amino acid supplemented soybean meal were carried out at 10% protein level in growing rats. Raw soybean diet depressed the growth of rats, but autoclaved soybean diet improved body weight gains of the rat. The supplement of 0.3% L-methionine to the raw soybean meal resulted in significant increase in PER and NPU as compared with raw soybean diet; NPU was comparable to that obtained by autoclaved soybean diet but slightly lower than that from casein diet. Further improvement was observed by additional supplement of threonine and valine. NPU of the supplemented soybean diet was not statistically different from the value obtained by casein diet, thus suggesting that supplementation of methionine, threonine and valine to raw soybean improves the nutritional value of soybean protein. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 8, 52-58, 1987.

大豆は良質のたん白質源であるが、同時に抗栄養因子の存在が知られている¹⁾。これらの因子の中でトリプシンインヒビター、レクチンが代表的なものであるが、これらは非耐熱性であることが明らかにされている¹⁾。従って加熱処理によって活性を失っている場合が多いが、しかし加熱・蒸煮の充分でない食品では、抗栄養活性の残存する場合がある。加工原料として近年ますます用途の広がりつつある分離大豆たん白質中には、これらの抗栄養因子は存在しないと推定されているが、未だ明確にされた報告はない。

一方、分離大豆たん白質を用いたラットによる栄養試験については、従来からアミノ酸添加実験も含めて検討された報告が多い²⁻⁶⁾。これらの中で Met 補足効果については、統一した見解が得られているが、他の制限アミノ酸を添加した効果については、必ずしも一致した結果が得られていない。そこで本研究では先ず脱脂大豆および分離大豆たん白質中の抗栄養因子の存在及びそれらの消化性を *in vitro* で検討し、更に脱脂大豆を用いてラットに対してアミノ酸添加実験を実施した。

実験材料および方法

不二製油株式会社製造による脱脂大豆粉末及び分離大豆たん白質を材料とした。大豆トリプシンインヒビター (SBTI) は Sigma 社製, 大豆レクチン (SBA) は豊年製油株式会社製を用いた。トリプシンインヒビター活性は benzoyl arginine-p-nitroanilide (BApNA) を基質として 410 nm で測定, レクチン活性はトリプシン処理したウサギ赤血球 4% 浮遊液を用いて 2 倍希釈法によって測定した赤血球凝集活性として表わした。人工消化試験については, ペプシン (Sigma 社製) 消化の場合は pH 2.0, S : E = 25 : 1, パンクレアチン (Difco 社製) 消化の場合は pH 8.0, S : E = 25 : 1, とともに 37 °C で実施した。

実験動物は Wistar 系雄ラット (体重 80 g) を用いて, Table 1 に示す飼料組成で各群 5 匹とし, 自由摂食法によって 3 週間栄養試験を実施した。毎日, 摂食量, 体重を測定してたん白効率 (PER) を求めた。ま

た飼育期間中, 最終の 2 日間, 糞尿を採取し総窒素量を測定して真の消化率 (True Digestibility, TD), 生物価 (Biological Value, BV), NPU (Net Protein Utilization) を算出した。

結果と考察

分離大豆たん白質中の抗栄養因子

脱脂大豆中には強い赤血球凝集活性が認められた (Table 2) が, 各種の分離大豆たん白質中には全く検出されなかった。トリプシンインヒビター活性は, フジプロ-R, フジプロ-CL, ニューフジプロ-K 中に検出されたが, いずれも脱脂大豆に比較すると約 10% あるいはそれ以下であった。

脱脂大豆及び分離大豆たん白質の人工消化

分離大豆たん白質の中でフジプロ-R について脱脂大豆粉末とともに人工消化実験を実施した結果について Fig. 1 及び 2 に示した。ペプシン消化の結果 (Fig. 1), フジプロ-R (以下 SPI と省略) は脱脂大豆と同程

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Diet designation (g/100 g of diet)				
	Defatted soybean meal ¹ (20 %)				
	Casein (10 %)	Raw	Autoclaved ²	+0.3% Met	+ { 0.3 % Met 0.3 % Thr 0.2 % Val
Protein	10	20	20	19.7	19.2
α-Corn starch	60	52	52	52	52
Sucrose	15	15	15	15	15
Oil mixture ³	8	8	8	8	8
Mineral mixture	4	4	4	4	4
Vitamin mixture	1	1	1	1	1
Cellulose powder	2	0	0	0	0

¹ Protein content, 49%. ² Autoclaved at 110 °C for 30 min. ³ Composition (g/kg of diet): Soybean oil, 64; Cod liver oil, 16.

Table 2. Lectin and trypsin inhibitory activity in various soy products

	Hemagglutinating activity	Trypsin inhibitory activity	
	Titer/mg protein	Unit/mg protein	%
Defatted soybean flour	2.07 × 10 ³	432	100
Soy protein isolate			
Fuji pro-R	—	44.1	10.2
Fuji pro-CL	—	15.8	3.6
New Fuji pro-K	—	52.7	12.2
Fujinic ace-100	—	0	0
Fuji pure-SP-100	—	0	0

度の消化率を示し、またカゼインの消化率との差は各時間帯において7%以下と非常に小さい。一方、パンクレアチン消化の場合に (Fig. 2), 脱脂大豆の消化はほとんど進行せず, SPI に比べて極端に低く, オートクレープ処理 (110℃, 30分間) によって SPI と同レベルに上昇した。SPI もオートクレープ処理によって消化率は若干上昇し, これは含有されるトリプシンインヒビターの不活性化に起因すると考えられたが, その上昇率は小さいことから SPI に含有されるトリプシンインヒビター活性はその消化にそれ程大きな阻害効果を与えていないことが示唆された。一方, 脱脂大豆の低消化性はトリプシンインヒビターの阻害作用に起因するものと考えられるが, また未変性では分解されない⁷⁾ことをも示すものであり, ペプシンによって消化されたのは, 酸性条件下で変性を受けたためと考えられる。

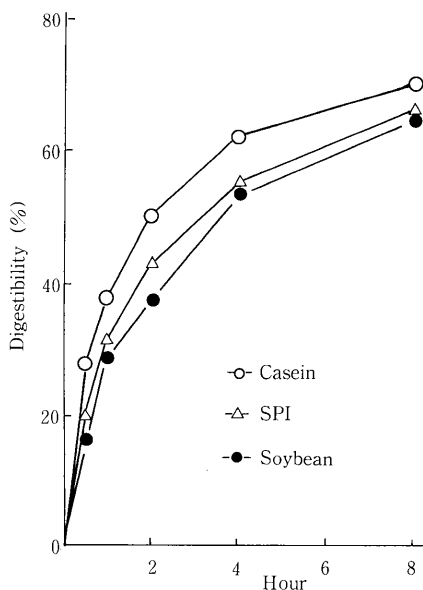


Fig. 1. *In vitro* peptic digestion of defatted soybean meal and soybean protein isolate. Peptic digestion was carried out by incubating 150 mg of samples with 6 mg of pepsin in 10 ml of sodium acetate-HCl buffer (pH 2.0) at 37°C. At each incubating period, 1 ml of digestion mixture was added to 1 ml of 20% TCA. Peptide contents in the 10% TCA soluble fraction were determined by microbiuret method. Digestibility was measured as % increase in the peptide contents.

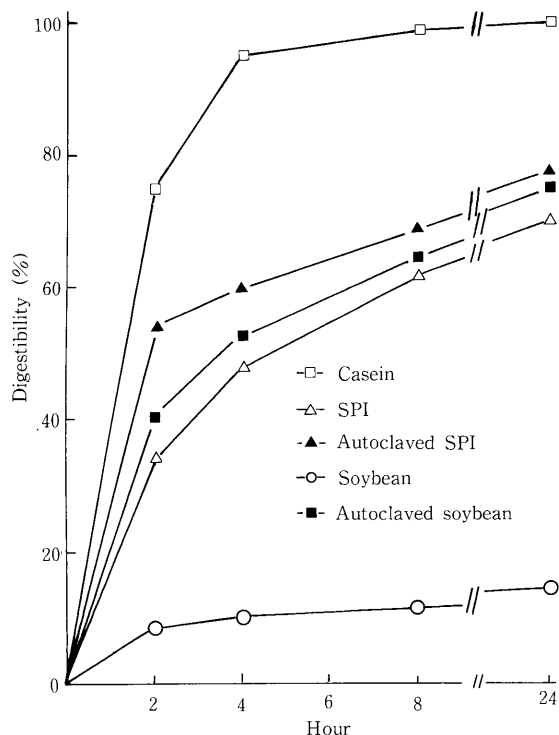


Fig. 2. *In vitro* pancreatic digestion of defatted soybean meal and soybean protein isolate. Pancreatic digestion was carried out by incubating 150 mg of samples with 6 mg of pancreatin in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at 37°C. Digestibility was determined by the method same that described in Figure 1.

大豆トリプシンインヒビターのペプシン消化

精製大豆トリプシンインヒビター (SBTI) についてペプシン消化を実施した結果 (Fig. 3-A), 酸性緩衝液 (pH 2.0) のみでも活性低下がおこり, ペプシン存在下では 2 時間後に 59%, 4 時間後には 75% の活性低下が見られた。しかし脱脂大豆抽出液について同一条件下でペプシン消化を行なうと, 精製 SBTI の場合よりトリプシンインヒビター活性の低下が少ないことが示された (Fig. 3-B)。同じような結果が 0.1 M HCl (pH 1.6) とヒト胃液を用いた実験でも示されており, 大豆中に存在するトリプシンインヒビターの内, Kunitz 型以外の Bowman-Birk 型などのインヒビターが, 酸にもペプシンにも耐性を持つためであろうと考察されている⁸⁾。本研究に用いた精製 SBTI は Kunitz 型インヒビターであるため, 同様の可能性が考えられ, これら胃通過時に不活性化されないトリプシンインヒビター

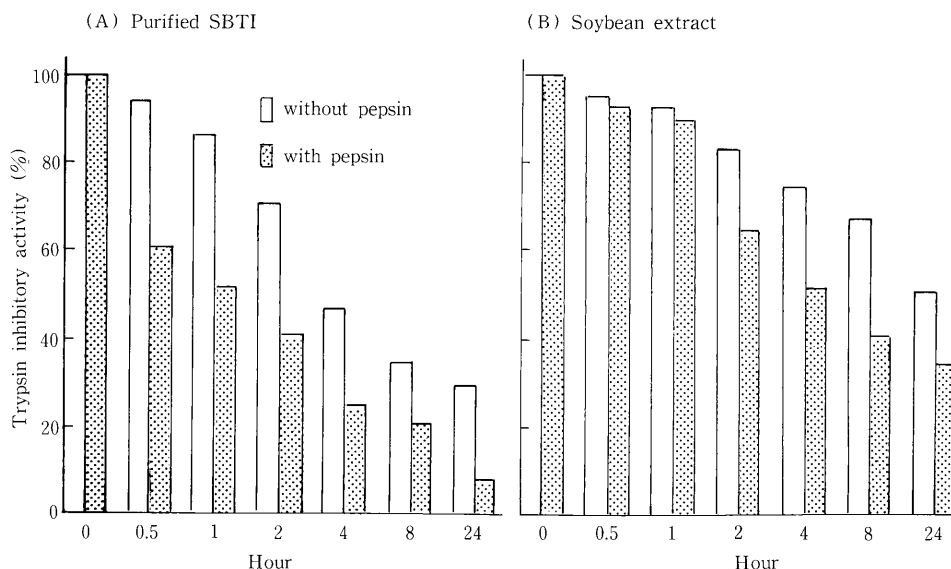


Fig. 3. *In vitro* peptic digestion of purified soybean trypsin inhibitor (SBTI) and soybean extract. (A) Purified SBTI (2 mg) was incubated with 80 μ g of pepsin in 10 ml of sodium acetate-HCl buffer (pH 2.0) at 37 $^{\circ}$ C. At each incubating period, digestion mixture was neutralized with 0.05 N NaOH and trypsin inhibitory activity in the sample was determined by using BApNA as substrate. (B) Defatted soybean meal (1 g) was extracted with 10 ml of 0.9% NaCl for 2 hr, and then centrifuged at 8,000 g for 20 min. Two ml of the supernatant was incubated with 80 μ g of pepsin in 8 ml of sodium acetate-HCl buffer (pH 2.0) at 37 $^{\circ}$ C.

が胃以降の消化に影響を与えると考えられた。

大豆レクチンのペプシン及びパンクレアチン消化

大豆レクチンは、ペプシン消化に用いる酸性緩衝液 (pH 2.0) のみでも急速に活性低下がおこり (Fig. 4-A), ペプシン存在下では更に著しく、2時間消化で残存活性は12%であった。またパンクレアチン消化 (Fig. 4-B) でも、ペプシン消化ほど急激ではないが、活性低下が見られた。大豆レクチンと同じくガラクトースに糖結合特異性を持つシカクマメレクチン⁹⁾は、ペプシン消化によっては4時間後でも、パンクレアチン消化によっては24時間後でも活性低下は認められない¹⁰⁾。その他インゲンマメなど豆類レクチンは難消化性である例が多いが、大豆レクチンは易消化性であることが特徴と考えられた。

脱脂大豆の栄養試験

大豆の氨基酸組成をヒトの必須氨基酸必要量パターン (FAO/WHO, 1973) 及び成長期ラット (NRC, 1972) に対して比較すると、第1制限氨基酸は含流氨基酸、第2制限氨基酸はスレオニン (Thr) となるが、ヒトに対してはバリン (Val) が第3制限氨基酸、ラットに対しては、リジン (Lys) が

第3制限氨基酸、Val は第4制限氨基酸と算出された。そこで Val の添加効果を検討するため、脱脂大豆 20% (タンパク質含量 10%) に 0.3% Met 添加群、0.3% Met に更に 0.3% Thr と 0.2% Val を添加する群を設けて、10%カゼイン食を対照として投与実験を実施した。成長曲線を Fig. 5 に示すが、脱脂大豆投与群ではラットの成長に顕著な抑制が認められた。しかし3週間飼育で死亡するラットは無く、他の豆類においては主要な致死因子と考えられているレクチンが¹⁰⁾、大豆では消化され易く、害作用が軽減されているためと考えられた。0.3% Met 添加群ではラットの成長に改善が認められたが、オートクレーブ処理 (110 $^{\circ}$ C, 30 分間) 大豆群には及ばず、Met+Thr+Val 添加群で最も良好な成長が得られた。その結果を反映して PER は、Met+Thr+Val 群で最も高い値が得られ、Met 単独添加より有意な上昇を示した (Table 3)。脾重量は生大豆摂取により増加し、オートクレーブ処理によって改善されるが、氨基酸添加によっては改善は見られなかった。これは脾臓肥大の原因の一部がトリプシンインヒビターの存在に起因すると考えられている¹¹⁾ため、当然の結果と考えられた。脱脂大豆の真の消

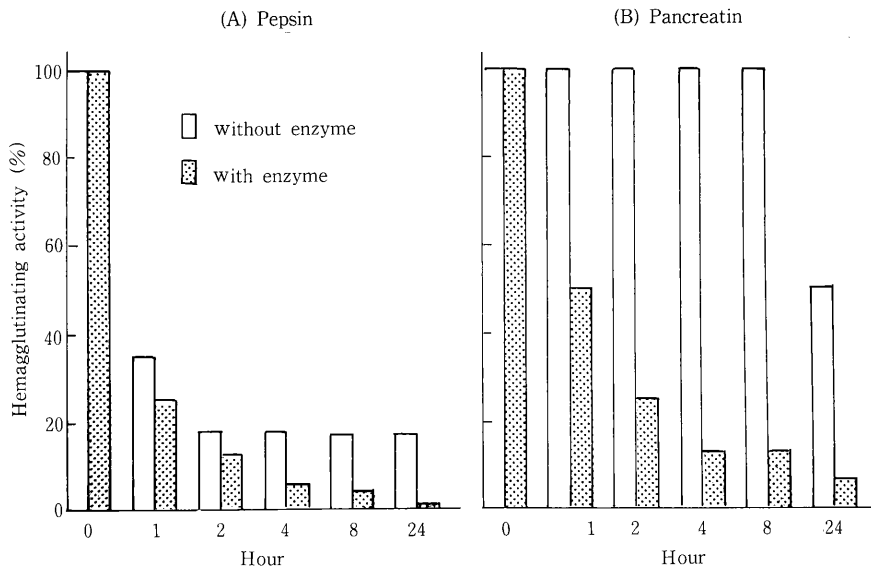


Fig. 4. *In vitro* digestion of purified soybean lectin (SBA).

(A) Purified SBA (2 mg) was incubated with 80 μ g of pepsin in 10 ml of sodium acetate-HCl buffer (pH 2.0) at 37 °C. At each incubating period, hemagglutinating activity in the sample was determined with serial 2-fold dilution method using 4% suspension of trypsinized rabbit erythrocytes.

(B) Purified SBA (2 mg) was incubated with 80 μ g of pancreatin in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at 37 °C.

化率は65%であり (Table 3), SPI について報告³⁾されている値よりかなり低く, 抗栄養因子の影響と考えられる。0.3% Met 添加群では, BV (89) がカゼイン群と近似しており, また NPU (74) はオートクレーブ処理大豆群と同程度であるが, カゼイン群よりは有意に低い。Met+Thr+Val 添加群では NPU は81となり, Met のみ添加した群より有意に高く, またカゼイン群とは有意差がなく, Thr と Val を同時に添加した効果が認められた。山口ら³⁾は, SPI に0.3% Met, 0.3% Met+0.2% Thr, 更に0.3% Met+0.2% Thr+0.2% Lys を添加し, ラットへの栄養試験を実施した結果, 体重増加量, PER などに明らかに Met と Thr の添加効果を認めているが, Lys 効果は認めていない。また吉田らは⁶⁾, やはり SPI を用いて Met を0.5%添加した場合には更に Thr を添加しても体重増加量にはほとんど影響はなかったと述べている。今回の実験では脱脂大豆に Met+Thr 添加群は実施しなかったが, 予備実験では0.3% Met に更に0.3% Thr を添加することによって Met 単独添加より PER に顕著な上昇が得られたが, BV, NPU に若干の上昇はあるものの有意差の判定はできなかった。SPI への添加実験をも含めた更に詳細な検討にまたねばならな

いが, 本実験の結果から Val をも添加することは, 大豆たん白質の利用向上に有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Liener, I. E. (1981): Factors affecting the nutritional quality of soya products, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 406-415.
- 2) 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.
- 3) 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会誌, **1**, 10-15.
- 4) 山口迪夫, 岩谷昌子, 宮崎基嘉 (1981): 分離大豆たん白質の制限アミノ酸とその補足効果(その2). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **2**, 77-81.
- 5) 吉田 昭, 横越英彦, 河合京子 (1981): 大豆および分離大豆たん白質への含硫アミノ酸補足効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **2**, 82-85.
- 6) 吉田 昭, 横越英彦, M. ディクシット (1986): 分離大豆たん白質に対するメチオニン補足と脳

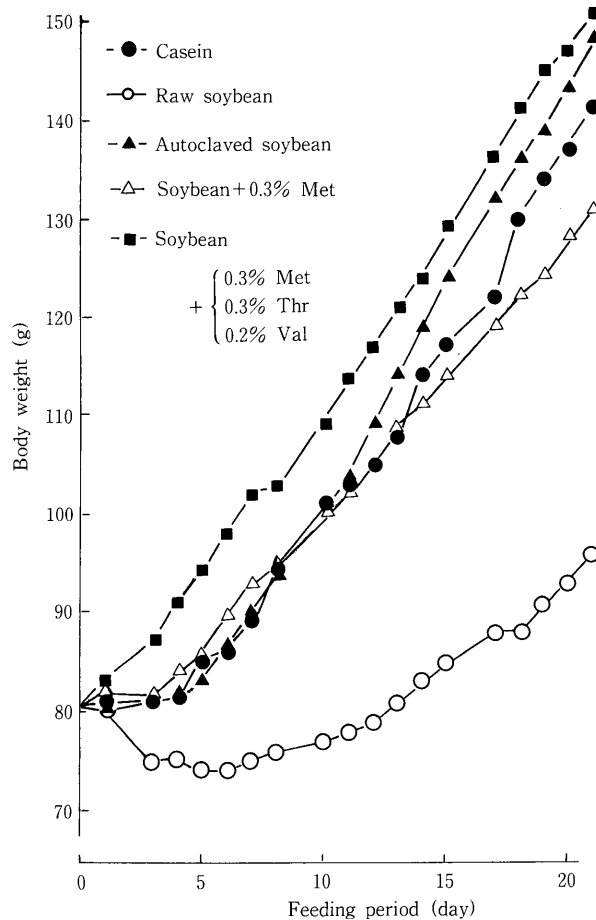


Fig. 5. Growth curve of rats fed on 10% protein diets.

Table 3. Body weight gain and nutritional values of casein and soybean diets

	Casein (10%)	Soybean (20%)			
		Raw	Autoclaved	+0.3% Met	+ $\begin{cases} 0.3\% \text{ Met} \\ 0.3\% \text{ Thr} \\ 0.2\% \text{ Val} \end{cases}$
Body weight gain (g/day)	2.9 ± 0.5^a	0.8 ± 0.1^b	3.2 ± 0.5^a	2.5 ± 0.7^a	3.3 ± 0.6^a
PER	2.4 ± 0.4^{ac}	0.9 ± 0.1^b	2.3 ± 0.3^{ac}	2.0 ± 0.4^a	2.6 ± 0.3^c
TD (%)	98 ± 2^a	65 ± 8^b	94 ± 5^a	83 ± 4^c	86 ± 4^c
BV	87 ± 6^a	72 ± 9^b	77 ± 5^b	89 ± 5^a	94 ± 7^a
NPU	86 ± 4^a	48 ± 9^b	73 ± 3^c	74 ± 4^c	81 ± 5^a

PER, protein efficiency ratio; TD, true digestibility; BV, biological value; NPU, net protein utilization.

a-c, Means in same line with unlike superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

- 内遊離アミノ酸, セロトニン, カテコラミンの変動一分離大豆たん白質へのアミノ酸補足適量に関する研究. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **7**, 41-45.
- 7) 福島男児 (1967): 大豆蛋白質の分子構造. 化学と生物, **5**, 20-26.
 - 8) Krogdahl, A. and Holm, H. (1981): Soybean proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: Selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. *J. Nutr.*, **111**, 2045-2051.
 - 9) Higuchi, M. and Iwai, K. (1985): Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 391-398.
 - 10) Higuchi, M., Suga, M. and Iwai, K. (1983): Participation of lectin in biological effects of raw winged bean seeds on rats. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1879-1886.
 - 11) Kakade, M. L., Danny, E. H. and Liener, I. E. (1973): Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutr.*, **103**, 1772-1778.