

ダイズ繊維たんぱく質のペプシン及び膵臓酵素消化による消化生成物の分別及びアミノ酸組成分析^{a)}

高木 茂 明

(生物化学研究室)

Received June 29, 1977

Fractionation and Amino Acid Analyses of Digestion Products of Soy-fibre Protein by Pepsin followed by Pancreatic Enzymes

Shigeaki TAKAGI

(Laboratory of Biological Chemistry)

T C A-soluble products of soy-fibre protein, which were digested by pepsin followed by pancreatic enzymes, were subjected to cation exchange chromatography for fractionation and analyses of peptides and amino acids. Nine fractions obtained, some of which were rechromatographed, were subjected to amino acid analyses after hydrolysis. From these results it was assumed that Asp, Ala, Leu, Phe, Lys and Arg were readily digested to available forms, while Met, Cys, Thr, Tyr, Val and Ile were digested with difficulty, because of the low recoveries of the latter from chromatographic peaks. Thus, it might be considered that the lower availability of the latter amino acids was one reason of the lower nutrition value of soy protein.

緒 言

たんぱく資源としての油糧種子の利用は、重要な問題であり、日本ではこれまでのダイズ食品に加えて脱脂ミールを原料にしたたんぱく食品が量産されている。ダイズたんぱく質は含硫アミノ酸含量が少ない点を除けば栄養学的に優れたたんぱく質である²⁾が、このうち繊維状のものは消化性が動物性たんぱく質のそれに比較してかなり劣っている¹⁾。

FUKUSKIMA¹⁾はたんぱく質の三次構造と消化性との関係について調べ、構造内部に巻き込まれている疎水性部分が消化を受けにくいと報告している。しかし繊維状に引伸ばされたペプチド鎖にはそのような三次構造はほとんど存在しないと考えられるにもかかわらず、ダイズたんぱく質の消化性が低いのはプロテアーゼによって加水分解されにくいペプチド結合があることを推測させる。ここでは *in vitro* における消化生成物を分別して、そのアミノ酸組成分析を行い、これらの点を検討した。

材 料 と 方 法

1. 人工消化試験と消化生成物の調製

基質たんぱく質は前報¹⁾と同じ脱脂ダイズから製造された繊維状のものである。

人工消化試験はペプシン及び膵臓酵素 (Z-パンク) の終濃度を0.2%としている以外は

a) ダイズたんぱく質の消化性と栄養価に関する研究(2)

前報⁴⁾に準じて行った。

消化生成物は次のようにして調製した。

35°Cでペプシンを18hr作用させ、続いてpH調節後膵臓酵素を24hr作用させた後反応混合物の全量784mlに50%トリクロル酢酸(TCA)50mlを加えて反応を停止させる。そのまま35°Cに1hr放置したのち6000×gで15min遠沈し、上澄(TCA-Sup)と沈澱に分別する。上澄に2N NaOHを加えてpHを約5.0とし、Dowex-50×-2H型カラムを通して脱塩する。得られた溶出液を減圧乾固させ、0.1Nクエン酸緩衝液pH 2.5にて50mlにメスアップする。

2. たんぱく質、ペプチド及びアミノ酸の定量

たんぱく質の定量はキエールダール法による全窒素定量及びLowry法³⁾による比色定量により、ペプチド及びアミノ酸定量はニンヒドリン呈色法⁵⁾によって行った。

3. アミノ酸分析

日立アミノ酸自動分析計(LKA-3型)を用いて所定の操作により行った。

分析用試料は10倍容の6N塩酸により封管中110°Cで24hr加水分解し、減圧乾固を繰り返して塩酸除去後0.2Nクエン酸緩衝液、pH 2.2に溶かして供試した。

結 果 と 考 察

1. TCA可溶成分のイオン交換クロマトグラフィーによる分画

あらかじめ0.2Nクエン酸緩衝液、pH 3.1にて平衡に達せしめたDowex 50-x-2, 200~400mesh, Na型樹脂カラム(1.8×125cm)にTCA-Sup 5ml(N-化合物として120mg)をのせ、少量の0.1Nクエン酸緩衝液、pH 2.5でカラムを洗浄後0.2Nクエン酸緩衝液、pH 3.1をカラム上部に満たし、混合槽に同緩衝液0.8l、補給槽に1lの0.1Nクエン酸緩衝液、

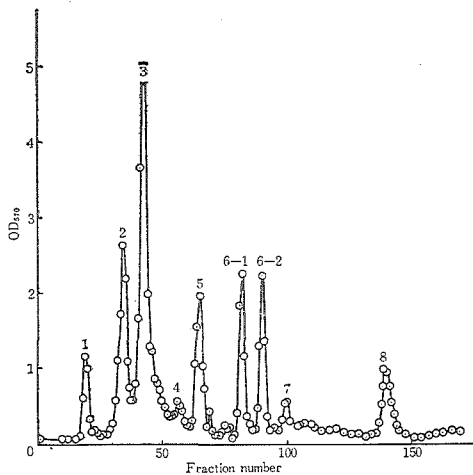


Fig. 1 Ion exchange chromatography of TCA-soluble fraction of soybean digestion product by pepsin followed by pancreatic enzymes
Column; Dowex 50 WX-2, 200-400mesh, 1.8cm×125cm. Elution solvents; 0.8 l of 0.2N citrate buffer, pH 3.1, in mixing vessel; 1 l of 1N citrate buffer, pH 5.1, in supplying vessel. 1 fraction, 10g.

pH 5.1を入れ、流速は35ml/hr, 1画分10gとして捕集した。各画分の0.5mlについて常法⁵⁾によりニンヒドリン呈色させ定量した。結果をFig. 1に示す。以上の溶出に続いて2.0Nクエン酸緩衝液、pH 5.1を2l, さらに2.0N酢酸緩衝液、pH 6.6を1l流したが画分8以後にピークは出現しなかった。

各画分を6N HCl加水分解後定量したニンヒドリン陽性物質のTCA-supのそれに対する百分率はTable-1のようになりクロマトグラフィーにおけるその回収率は約83%である。

得られた画分についてTLCを行ったところ単一のものではなく、このうちF-5, 6-2, 7は比較的主スポット成分の純度が高い。

2. 各画分の部分精製と構成アミノ酸の同定

それぞれの画分はまだ混合物であるが、これら画分中のアミノ酸が遊離又はペプチド内残基のいずれの形で存在するかを、塩酸加

Table 1 Recoveries of ninhydrin positive compounds at the ion exchange chromatography of TCA-sup

Fraction	1	2	3	4	5	6-1	6-2	7	8	Total
Contents* %	7.5	11.6	25.7	5.5	9.7	4.1	7.0	4.4	6.9	82.8

* Each fraction was hydrolysed with 6 N HCl followed by determination with ninhydrin method.

水分解前後のアミノ酸分析を行うことによって調べた。このうち数画分は再クロマトグラフィーによって部分精製を行い、得られた画分について同様に調べた。

2-1, 画分1

再クロマトグラフィーの条件及び結果を Fig. 2 に示す。得られた3画分のうち F-1-② について加水分解前後のアミノ酸分析パターンを Fig. 3 に示す。水解前には遊離アミノ酸として Glu, Asp が多く、それ以外にも多数のアミノ酸が存在しているが、ペプチドと見られる9つのピークが認められる。

2-2, 画分2

再クロマトグラフィーの結果は Fig. 4 のようである。溶出条件は Fig. 2 と同じである。得られた画分のうち 2-① の水解前後のアミノ酸分析パターンを Fig. 5 に示す。

水解前の遊離アミノ酸として Ser, Gly, Ala, Val, Met があり、水解後現われるのは Asp, Thr, Glu, Pro, Ile, Leu, Lys である。とくに Glu, Asp を多量含むペプチドが存在している。

2-3, 画分3

再クロマトグラフィーは Fig. 6 のようになり、得られた画分のうちの 3-② について水解前後のアミノ酸分析を行うと (Fig. 7) Leu が大部分を占める画分であることがわかる。少量のペプチドを伴っている。

2-4 画分5

5-①, 5-② の2つのピークを生じている (Fig. 8.) 画分5-② について水解前後のアミノ酸分析を行うと Fig. 9 のようになる。水解前は Tyr, Phe のみが遊離アミノ酸として認められるが、水解後は15種ものアミノ酸が認められることから、この画分にはニンヒドリン呈色度の低いペプチドがかなり存在していると考えられる。

2-5 画分6-2

再クロマトグラムを Fig. 10 に示す。1つのピークを与え、水解前後のアミノ酸分析においても Lys のみが検出されている。

3. 各画分のアミノ酸組成

2の結果を含めて Table-2 に原料のダイズ繊維たんぱく質、TCA-Sup 及び各画分中のアミノ酸組成を示す。数値はもとの繊維たんぱく100g 当りに換算したものである。

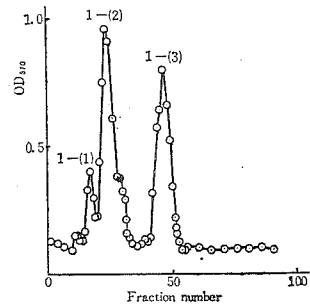


Fig. 2 Rechromatography of fraction 1
Column; Dowex 50X—2,200—400mesh, 0.8cm×61cm.
Elution solvent; 0.2N citrate buffer, pH 3.1.
1 fraction, 2g.

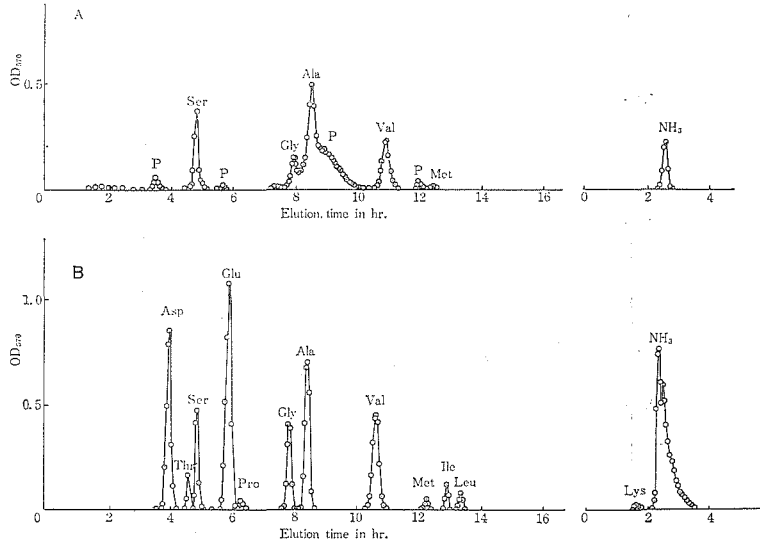


Fig. 5 Analyses of ninhydrin positive compounds of F-2-① with amino acid autoanalyzer
 (A) was the chromatogram before HCl hydrolysis, while
 (B) was that after hydrolysis for 24 hr at 110°C. Sample concentration subjected to (A) was 1.8 times of (B).

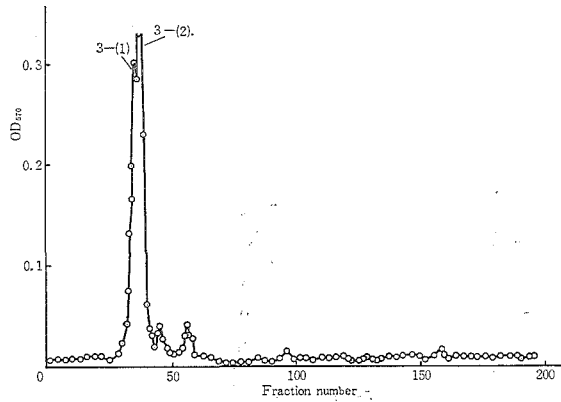


Fig. 6 Rechromatography of fraction 3
 Elution conditions were the same as that of Fig.2 with the exception of solvents. Elution solvents ; (1) 0.2 N citrate buffer, pH 3.1, 100ml ; (2) 200ml of the same buffer in mixing vessel and 200ml of 0.5 N citrate buffer in supplying vessel.

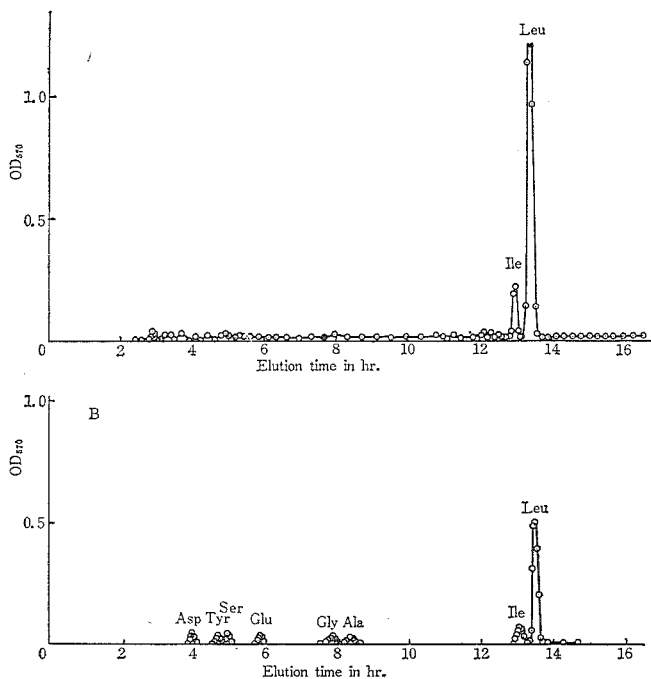


Fig. 7 Analyses of ninhydrin positive compounds of F-3-② with amino acid autoanalyzer
 (A) was the chromatogram of F-3-② before HCl hydrolysis, while (B) was that after hydrolysis for 24 hr at 110°C. Sample concentration subjected to (A) was 10 times of (B).

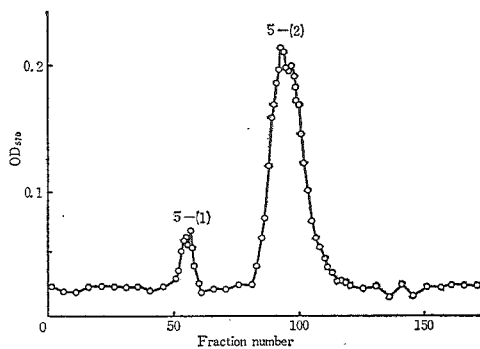


Fig. 8 Rechromatogram of fraction 5
 Elution solvent ; 0.2 N citrate buffer, pH 2.9. The other conditions were the same as that of Fig. 1.

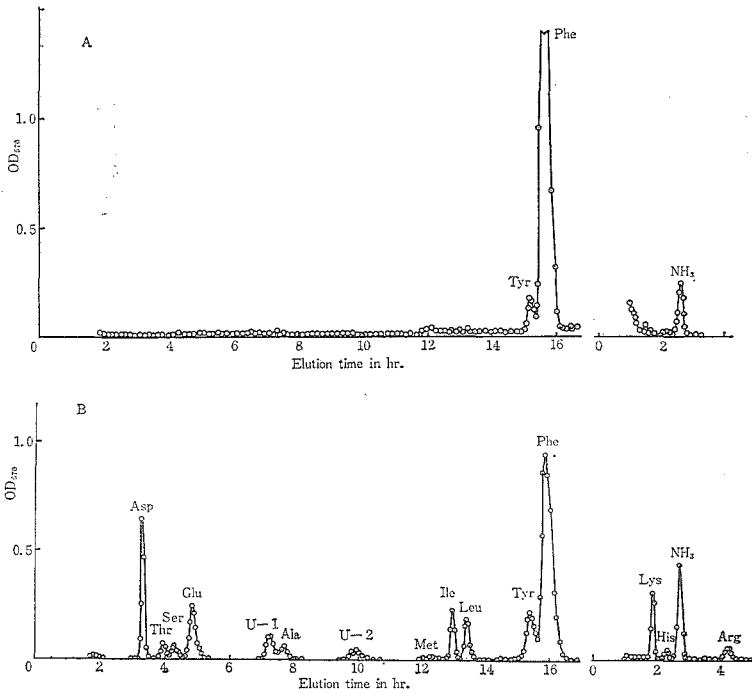


Fig. 9 Analyses of ninhydrin positive compounds of F-5-② with amino acid autoanalyzer (A) was the chromatogram of F-5-② before HCl hydrolysis, while (B) was that after hydrolysis for 24 hr at 110°C. Sample concentration subjected to (A) was 2 times of (B).

TCA-Sup のアミノ酸組成と繊維たんぱく質のそれとを比較すると、各アミノ酸の間で差はあるが全体では約90%のアミノ酸が TCA-Sup に移行している。いっぽう画分1から画分8までの各画分のアミノ酸含量の合計を右端欄に示しており、クロマトグラフィーにおける回収率はもとの繊維たんぱくに対して62%となっている。アミノ酸個別的には、Asp, Ala, Leu, Phe, Lys, His, Arg が比較的大きな回収率を示しており、Pro, Cys, Met, Tyr のそれは小さい。これらのクロマトグラフ回収率の低いアミノ酸は残基の形でピーク以外の画分に存在していると考えられ、前記消化条件下でペプチドの形で TCA 可溶とはなるが、ピークを示すほどの低分子ペプチド又はアミノ酸とはなっていないことを示すものである。また Tyr は溶解度が小さいために回収率が低いとも考えられる。したがって Fig. 1 の基線部分にペプチドがかなり存在しているのであるが、これらについてはこゝでは検討を行っていない。

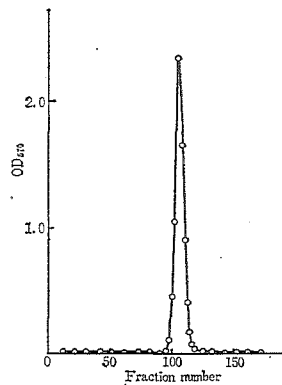


Fig. 10 Rechromatogram of fraction 6-2. Elution solvents; 300ml of 0.2N citrate buffer, pH 3.1, in mixing vessel and 300ml of 1.0 N citrate buffer, pH 5.1, in supplying vessel. The other chromatographic conditions were the same as Fig. 1.

Table 2 Amino acid composition* of each chromatographic fraction

A.A	Soy fibre protein	TCA-sup	Fractions									
			1	2	3-2	4	5	6-1	6-2	7	8	Total
Asp	11.00	9.08	5.28	2.03	0.23	0.58	0.74	0.74	0.14	0.39	0.17	10.3
Thr	4.07	2.32	0.07	0.27	0.28	0.24	0.13	0.05	0.05	0.09	0.03	1.21
Ser	5.57	2.62	0.07	0.71	0.32	0.22	0.15	0.16	0.04	0.34	0.10	2.11
Glu	18.30	13.97	0.78	3.92	0.37	0.85	0.70	0.71	0.10	0.56	t	7.99
Plo	9.51	4.73	0.12	0.24	t	0.55	0.36	0.46	0.12	t	t	1.85
Gly	4.16	4.20	0.08	0.72	0.47	0.35	0.21	0.16	0.03	0.13	0.12	2.27
Ala	4.22	4.38	0.07	1.61	0.41	0.39	t	0.17	0.05	0.22	0.03	2.95
Cys	0.85	3.56	0	0	0	0	t	0	0	0	0	0
Val	4.84	5.13	0.04	1.44	0	0.50	t	0.11	0.20	0	0.02	2.31
Met	0.81	1.31	0	0.12	0	0.01	0.02	0	0	0	0	0.15
Ile	4.53	4.95	0.03	0.24	0.61	0.84	0.42	0.09	t	0.26	0.12	2.61
Leu	7.20	7.95	0.04	0.18	4.80	0.65	0.32	0.14	t	0.10	0.21	6.44
Tyr	5.19	1.34	0	0	0	0.04	1.29	0.20	0.08	0.15	0	1.76
Phe	5.47	5.56	0	0	0	0.05	4.95	0.23	0.15	0.05	t	5.43
Lys	5.25	5.22	0	t	0	0.13	0.20	0.18	4.40	0.52	0.38	5.81
His	2.04	1.99	0	0	0	0.05	0.08	0.16	0	1.72	0.02	2.03
Arg	7.03	8.26	0	0	0	0.11	0.21	0.33	0	t	5.88	6.53
Total	100.0	89.57										61.75

* Amino acid contents in converting to 100g of material fibre protein.

4. 消化時間と各画分量の変動

これまでの実験では消化時間をペプシン18hr, 続いて膵臓酵素 24hr と一定にしている。その条件で得られた TCA-Sup のクロマトグラフィー (Fig. 1) における各画分が消化時間と共にどのように変動して来たかを調べた。結果を Table-3 に示す。

TCA-Sup 中の全-N 量は消化時間によって異なり、繊維たんぱく乾重7.742g 当りペプシン消化7hrで1105.7mg-N, 18hrで1185.5mg-N, ペプシン-膵臓酵素消化1hrでは1215.2mg-N, 5hrでは1387.7mg-N, 10hrでは1455.1mg-N, 24hrでは1474mg-Nとなっている。したがって相互に数値が比較出来るようにペプシン-膵臓酵素消化1hr区の値を固定してこの区と他の区の TCA-Sup の量比をもって補正した値を示している。

ペプシン消化7hrでPheに富む画分5及びLysに富む画分6-2が出現し、この両ピークは、消化時間によって変動しながらも存続していつている。クロマトグラフィーの回収率は約57%であるが、これはピークとして現われないペプチドの存在を示唆している。

ペプシン18hrの消化においては6-2が7hrの3倍以上に増え、5は半分になっている。このことは、これらのピークは単一成分のみからなるものではないが、クロマトグラフ的挙動及びアミノ酸組成が非常に良く似ている成分の消長を表わしていると考えられる。したがって同一ピークの消長は異なる消化時間とのあいだで比較でき、この結果から1度生成したペプチド類が次第に他の生成物に水解移行するために、このような現象が起ったと考えることが出来る。

上記の観点から各画分(ピーク)の量的変化を見ると次のようになる。画分1, 2, 3,

Table 3 Varing of fraction quantities in the varied digestion times*

Fraction	Pepsin		Pepsin (18 hr) followed by pancreatic enzymes				Main amino acids
	7	18 hr	1	5	10	24 hr	
1'			1.35				
1°			0.90				
1			2.54	1.30	1.19	4.38	Asp, Glu
2				12.18	19.39	17.00	Asp, Glu, Ala, Val
3		6.60	25.34	28.40	35.77	45.98	Leu
4		4.56	5.74	12.24	9.07	3.93	
5'				5.34			
5	35.07	5.27	8.38	6.85	11.28	11.50	Phe
5°				11.86			
6-1						10.72	
6-2	16.57	54.59	24.44	12.18	7.73	8.23	Lys
7			7.53	3.44	7.86	2.83	His
8						6.82	Arg
Chromato-graphic yield** %	56.75	72.46	76.22	82.26	76.91	92.09	

* Modified values based on that of pepsin-pancreatic enzyme digestion for 1hr ; All amino acids were determined by converting to leucine.

** Chromatographic total yields of ninhydrin positive compounds to TCA-sup subjected for column.

7は膵臓酵素作用後に生成し始め、画分3は消化時間と共に増え続ける。画分1, 2, 5は一度生成すると量的変動はあまりない。画分6-1, 8は24hr消化の段階で現われる。これらの事実とTable-2の結果とから、ダイズたんぱく質の消化においては、必須アミノ酸のうちとくにLeu, Phe, Lysは消化の初期から可溶性低分子になることがわかる。そうして含硫アミノ酸はダイズたんぱく中の含量も小さいが、消化においても可溶性低分子になりにくいことがわかる。

このことはダイズたんぱく質の栄養価を考えるうえで重要なことと思われ、Met添加ダイズたんぱく質が高い栄養価を示すことと考え合せると含硫アミノ酸の消化性の悪さがダイズたんぱく質の栄養価が劣る一因であると考えられる。さらにThr, Val, Ileの各必須アミノ酸についても同様の考慮を払う必要があると思われる。

摘 要

ダイズ繊維たんぱくにペプシン及び膵臓酵素を作用させたときに生ずる生成物のうちTCA可溶性のものをイオン交換クロマトグラフィーによって9画分に分別し、各アミノ酸組成と各画分の消化における経時的変化を検討した。その結果Asp, Ala, Leu, Phe, Lys, Argはかなり消化されて利用されやすい状態にあるが、いっぽうMet, Cys, Thr, Tyr, Val, Ileはクロマトグラフィーにおけるピークとして現われにくいことから、消化生成物中では比較的大きなペプチドの残基として組込まれていると考えることが出来る。このため消

化吸収に際して、これらアミノ酸の利用率は低いことになり、このことがダイズたんぱく質の低栄養価の1因になると考えられる。

本研究に協力された黒川裕子、有道邦子両君に感謝すると同時に、アミノ酸自動分析計使用に当って数々の御援助を頂いた本学農学部、堀米教授、内田助教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) FUKUSHIMA, D.: *Cereal Chem.*, **45** 203 (1968)
- 2) KELLOR, R. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 77 A (1974)
- 3) LOWRY, O. H.: ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 4) 高木茂明: 岡山大農学報 (46), 52 (1975)
- 5) YEMM, E. W.: COCKING, E. C.: *Biochem. J. (London)* **58**, Xii (1954)