

## 繊維状ダイズたんぱく質のプロテアーゼ処理が消化性及びテクスチャーに及ぼす影響<sup>a)</sup>

高木 茂 明

(生物化学研究室)

Received July 1, 1978

### Effects of protease pretreatment to the digestibility and the texture of textured soy protein

Shigeaki TAKAGI

(Laboratory of Biological Chemistry)

In previous report, papain or protease from *Asp. oryzae* was subjected for the improvement of digestibility of textured soy protein (TSP), and the *in vitro* digestibility and the resulting alteration of its texture of the partial hydrolyzed TSP were determined by comparing with original TSP.

In this paper, two different proteases (Protease I, from papaya and Protease II, from *Streptomyces*) were further used as pretreatment enzymes for the same purpose, in which the digestibility of TSP with pepsin followed by pancreatic enzymes was determined and the lowering degree of its texture was also estimated with 'Texturometer'.

The initial velocities of the preincubated TSP with Protease II were always lower than that of the original TSP while those digestion degrees were improved. From the results of lower initial velocity it was deduced that the hydrolyzed sites of peptides with this protease would be similar to pepsin.

Protease II catalyzed mild hydrolyses of TSP to produce partial hydrolytic products which had much peptide bonds available to be hydrolyzed by pepsin and other digestion enzymes. Therefore, Protease II, which was considered to have different substrate specificity from pepsin, was preferable to use for pretreatment enzyme of TSP.

From those results the recommended pretreatment method in this experiment was considered to be the preincubation of TSP with 0.075% Protease II for 7 days at 4°C.

### 結 言

ダイズ濃縮たんぱく質の需要は動物性たんぱく質の代替品またはその増量剤として使用量が着実に増え続けている。製品形態は繊維、組織、粒状または粉末状などがあるが、いずれも脱脂ダイズを原料としてその水抽出物を適当な手段で前記形態に加工したものである。

このうち繊維状ダイズたんぱく質 (Textured soy Protein; TSP) は肉様のテクスチャーを持ち肉の代替品になりうるものと考えられており、米国では年間消費量は85,000t (1975年) に達し肉の混用あるいは単品として使われている<sup>1)</sup>。

しかしながらダイズたんぱく質の多量摂取が胃腸障害を起すことは一般に認められており、これはたんぱく質の消化性なかでも消化速度が小さいためではないかと考えられる。そこで前報<sup>2)</sup>では Papain 及び *Asp. Oryzae* 起源の Protease による前処理によって部分的な水解を

a) ダイズたんぱく質の消化性と栄養価 (IV)

行ない、その *in vitro* における消化性を調べると同時にテクスチャーの低下についても検討したが、本報告では引続いて処理プロテアーゼを変えて TSP の消化性とテクスチャー変化を同様に検討した。

## 材 料 と 方 法

1. ダイズたんぱく質：繊維状ダイズたんぱく質はたんぱく含量28%、乾物中たんぱく含量95%のもの（日本興油 KK 製）である。たんぱく抽出に供した脱脂ダイズミールはたんぱく含量48%の日本興油製である。

2. 消化酵素：ペプシン（1:10,000）は半井化学製であり、膵臓酵素はブタ膵臓から調製した Z-パンク（日本臓器製）を用いた。

3. 前処理酵素：いずれも作用最適 pH が中性にある Protease であり、Protease I (from papaya, Type III, Cigma) と Protease II (from *Streptomyces* sp., Neutral, Kyowa) の 2 種を用いた。

### 4. 基質の調製

4-1. Protease による前処理：TSP 5.35g（たんぱくとして1.5g）を 0.01M 磷酸緩衝液、pH 7.5 に溶かした 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% の Protease I 溶液に 1 min 浸漬して引上げ、軽くしぼって重量を 7.8g に調節し、4°C に 1, 3, 7 days 放置する。所定時間後 100°C の水浴に 5 min 浸して Protease を失活させる。

Protease II の場合溶媒に 0.01M 磷酸緩衝液 pH 7.0 を用いる以外は Protease I と同じ処理をした。

4-2. 基質液の調製：繊維状ダイズたんぱく質は Protease 処理したもの、未処理のものいずれももとの湿重 5.35g のものを乳鉢に入れ、0.2N KCl-HCl 緩衝液、pH 1.8 を加えて摩砕する。摩砕物を同じ緩衝液で 75ml にし供試基質とする。このときたんぱく濃度は 2% である。抽出たんぱくの場合全窒素量から算出して 2% となるように基質を調製した。

5. 消化酵素溶液の調製：ペプシン、Z-パンクいずれも 0.1% 濃度とし調製後 5 日以内に使用した。ペプシンは 0.1N 塩酸に、Z-パンクは 0.1M 磷酸緩衝液、pH 7.7 に溶解させた。

6. *in vitro* における消化試験：前報<sup>3)</sup>に準じて消化試験を行ったが、ペプシンの作用時間を 140 min とし、引き続き Z-パンクを作用させた。

消化率は 5% TCA 可溶部と不溶部との全窒素量から求め、消化速度は前報<sup>3)</sup>に準じて求めたが係数を 100 から 10,000 に変えて表示した点が異なる。

7. テクスチャー測定法：テクスチュロメーター（全研製 GTX-2）を用い試料たんぱく質の硬さと凝集性を求めた。前処理酵素液または水を「4-1」に示した割合（もとの秤取たんぱく量の 46% 増）に含む繊維状ダイズたんぱく質 87g を前報<sup>3)</sup>の測定条件に従って供試した。

## 結 果 と 考 察

### 1. 抽出ダイズたんぱく質と繊維状ダイズたんぱく質の消化性の比較

Table 1 に脱脂ダイズ水抽出たんぱく質と繊維状ダイズたんぱく質との消化性の比較実験の結果を示す。

両者の消化性には差が認められず、これら以外の形態のダイズたんぱくについても同様の

**Table 1** Comparison of digestibility of extracted soy protein and textured soy protein.

Soy protein	Substrate protein N mg/75ml	Digestion ratio (%)		Initial digestion velocity
		pepsin	pancreatic enzymes	
Extracted*	241.7	55.69	65.93	4.45
Textured	226.1	60.20	74.40	4.53
Textured** heated	206.8	60.09	70.57	4.76

\* Extracted from defatted soy flour by the ordinary method<sup>2)</sup>.

\*\* For 5 min at 100°C.

結果を得ている<sup>4)</sup>.

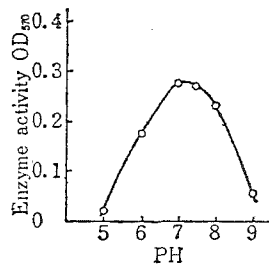
2. Protease I 処理がダイズたんぱく消化性に及ぼす影響

2-1. Protease 処理条件の検討: TSP を用いたときの Protease I の作用最適 pH を求めると Fig. 1 のようになる。前報<sup>3)</sup>において前処理温度を 35°C にすると水解速度が大きすぎて条件の調節が困難であるため、4°C の温度条件が推奨されている。そこで pH 7.5, 4°C において TSP を Protease I と incubate したときに遊離してくるアミノ基をニンヒドリン呈色法により定量すると Fig. 2 のようになる。これは、前処理された TSP (たんぱくとして 1.5g) を基質調製と同じ方法で 75ml にしたものから 0.5ml を取り出して常法によりニンヒドリン呈色させ OD 570 を測定している。

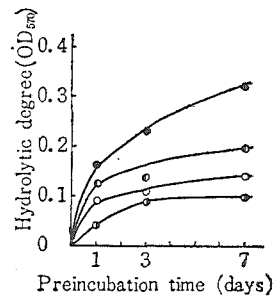
0.1% までの処理酵素濃度では 4°C, 7 日間処理によって外観に大きな変化はないが 0.2% ではかなり液化が進んでいる。

2-2. 処理酵素濃度と処理時間が消化に及ぼす影響: Protease I の濃度と 4°C における処理時間がペプシンの消化作用に及ぼす影響を調べたのが Fig. 3 であり、続いて Z-パンクを作用させたときの典型的消化曲線を Fig. 4 に示す。

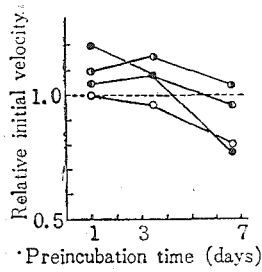
いずれの濃度においても前処理時間と消化速度とが反比例の関係にあり、このことは Protease I がペプシンと類似した基質特異性を持っているか又は基質特異性が小さいかのいずれかによるものと考えられる。Fig. 4 は 0.2% Protease I で前処理したときのペ



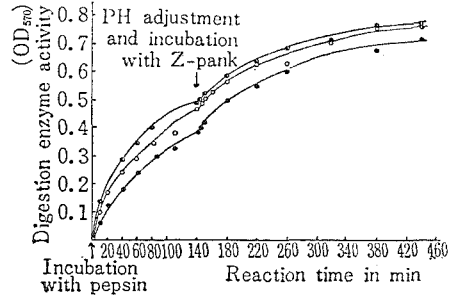
**Fig. 1** Optimum pH of Protease I activity to textured soy protein. Two ml of 2% TSP suspension in 0.1M phosphate buffer with various pH was incubated with 1 ml of 0.1% enzyme solution in 0.01M phosphate buffer, pH 7.5, for 60 min at 35°C.



**Fig. 2** Hydrolyses of TSP in the pretreatment with Protease I at 4°C. Each preincubated TSP (1.5g of net protein) was homogenized and messed up to 75ml, of which 0.5ml was subjected to determination of -NH<sub>2</sub> groups liberated. Protease I concentration; ●—●, 0.2%; ○—○, 0.1%; ●—○, 0.075%; ○—○, 0.05%.



**Fig. 3** Initial digestion velocity of TSP with pepsin. Calculated from O.D. 570 values obtained from the ordinary method. Incubation, for 40 min at 35°C. Concentration of protease I used for pretreatment: ●—●, 0.2% : ○—○, 0.1% : □—□, 0.075% : △—△, 0.05%.



**Fig. 4** Time course of digestion of TSP preincubated by 0.2% protease I with pepsin and pancreatic enzymes. See text. Preincubated temperature, 4°C. Preincubation time, ●—●, 1 day : ○—○, 3 days : ■—■, 7 days.

プシン及び Z-パンクの消化曲線を例示したものであるが Fig. 3 はこのときのペプシンによる水解初速度を表したものである。

**Table 2** Variation of digestibility of textured soy protein preincubated with Protease I

Concentration of Protease I %	Days of pretreatment	Concentration of substrate protein (N mg/90ml)	Digestibility (%)	
			pepsin*	pancreatic** enzymes
0.05	1	197.6	65.98	77.55
	3	188.3	69.57	77.76
	7	206.9	63.68	79.56
0.075	1	204.3	65.68	70.77
	3	184.0	65.19	73.39
	7	192.6	66.82	77.05
0.1	1	180.0	67.24	74.98
	3	141.3	72.55	81.97
	7	190.4	78.06	79.45
0.2	1	185.1	69.6	80.44
	3	180.2	72.16	81.24
	7	179.2	74.29	90.10
0.3	1	185.7	75.65	84.63
0 (control)	—	187.5	60.09	70.57

\* Calculated after pepsin digestion for 140 min.

\*\* Calculated after z-pank digestion for 300 min.

Fig. 3にみられるように消化速度は Protease I の濃度が大きいほど、また処理時間が長いほど小さくなる傾向がある、いっぽうこの時の消化率を調べると Table 2 のようになる。未処理区と比較して消化率は高く、これは処理酵素濃度及び処理時間にほぼ比例していると思われる。しかしこの消化率は同じ方法で行った動物たんぱく質のそれ（ペプシン消化で80%以上、Z-パンク消化で90%以上）と比較してやゝ小さい。

2-3. Protease I による前処理 pH の相異が消化性の変動に及ぼす影響：これまでの処理はすべて最適 pH である7.5で行っているが、それ以外の pH 条件下で TSP を処理したときの消化性を調べた。Fig. 5は異なる pH で TSP に0.075%の Protease I を4°C 3日間作用させたときのニンヒドリン陽性物質の増加量を示している。

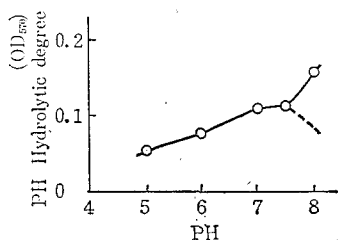


Fig. 5 Hydrolyses of TSP with Protease I at different pH. 1.5g of TSP (wet weight 5.35g) was incubated with 2.45ml of 0.075% Protease I for 3 days at 4°C. These preincubated TSP were heated in boiling water for 5min to inactivate Protease I. Products were homogenized and messed up to 75ml with 0.2 N KCl-HCl buffer. 3ml of the suspension was added to 5ml of TCA and 1ml of its filtrate was subjected to determination with ninhydrin.

Fig. 1 では点線のような結果であったが、こゝでは pH 8.0でさらに水解が進んでいる。

Fig. 1の結果は35°Cでの incubation であり、この場合は4°Cであるので、Protease I の活性の pH 依存性は低温で小さいと云うことが出来る。

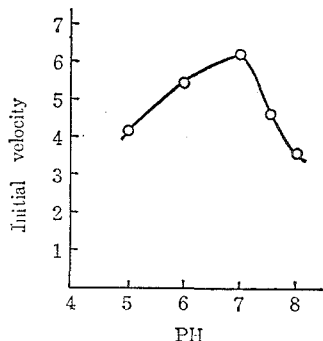


Fig. 6 Peptic digestion velocity of TSP preincubated with protease I at different pH for 3 days at 4°C. See text.

Fig. 6は異った pH で前処理した TSP にペプシンを作用させたときの水解速度を表したものである。この結果、前処理 pH が7.0のとき消化速度はもっとも大きい。Fig. 3においては前処理による水解度の大きいものほど消化初速度は小さくなっているが、pH を変えて処理した場合には最適 pH においてもっとも消化速度が大きくなっている。

Fig. 7は同じく消化率を表したものであり、処理 pH によってペプシンで60~70%、Z-パンクで75~80%の範囲内で変動している。

2-4. Protease I 処理が TSP のテクスチャーに及ぼす影響：これまでの結果から、TSP が Protease I での前処理によって無処理区と比較して消化速度、消化率ともに向上することは明らかであるが、このとき TSP のテクスチャーを損わないことが所期の目的とも関連

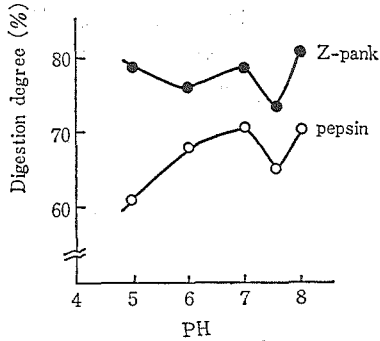


Fig. 7 Peptic digestibility of TSP preincubated with Protease I at different pH for 3 days at 4°C. See text.

して望ましい。この観点から酵素処理に伴うテクスチャー変化を測定した。

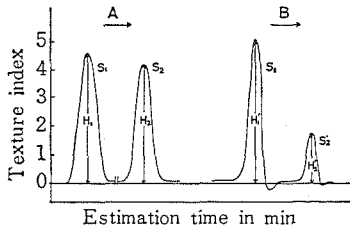


Fig. 8 Texturometer patterns of TSP. A, no treatment; B, preincubated with 0.1% Protease I for 3 days at 4°C. Conditions of texture estimation are as follows. Clearance, 2mm; Chart speed, 1500mm/min; Bite speed, 12B/min; Planger, Lucite 18mm. Voltage, 0.25 (A) and 1V (B).

Fig. 8 に典型的な測定図を示す。処理区的面積比 ( $S_2/S_1$ ) は無処理区のそれよりも明らかに小さく、TSP の凝集性が前処理によって小さくなっている。また H は試料の硬さを示すものであるが、これも明らかに無処理区が大きく、前処理によって TSP が軟くなっていることがわかる。

つぎに個々の処理による各パラメーターの変動を示す。

(1) 前処理時間及び酵素濃度と硬さとの関係: Protease I の濃度が 0.075% 以上では元の硬さの約  $1/4$  になっており、前処理酵素によって TSP が軟くなっている。しかしいずれの区も 4°C において 1 時間の処理で急激に軟くなっており、その後の経時的変化は認められない。(Fig. 9)

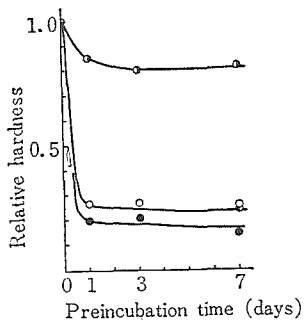
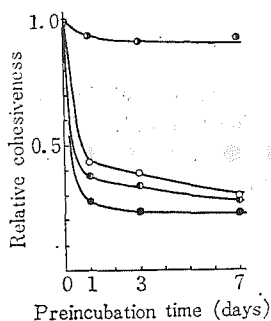


Fig. 9 Hardness of TSP preincubated with Protease I of varied concentration at 4°C. Enzyme concentration, ●—● 0.2% : ○—○ 0.1% : □—□ 0.075% : △—△ 0.05%.

(2) 前処理時間及び酵素濃度と凝集性との関係: 凝集性は弾性と関連して試料の復元性を表わすものであり、0.05% 酵素濃度では僅かな変化であるが、0.075% 以上の濃度における 1 日処理で急激に低下している (Fig. 10)。1 日以後も少しの経時的な凝集性低下がみら



**Fig. 10** Cohesiveness of TSP preincubated with Protease I of varied concentration at 4°C.  
 Enzyme concentration, ●—● 0.2% : ○—○ 0.1% :  
 ○—○ 0.075% : ○—○ 0.05%.

れる。

2-6 Protease I 前処理による TSP の消化性とテクスチャーとの関係：これまでの結果をまとめて Table 3 に示す。所期の目的であるテクスチャーを残しながら消化性を大にす

**Table 3** Relation of digestibility of textured soy protein preincubated by Protease I to its hardness and cohesiveness

Concentration of Protease I %	Days of pretreatment	Hardness	Cohesiveness	Digestibility		
				Relative initial velocity	Digestion ratio	
					pepsin	pancreatic enzymes
0.05	1	0.85	0.94	1.09	1.09	1.09
	3	0.79	0.90	1.13	1.15	1.10
	7	0.87	0.96	1.05	1.06	1.13
0.075	1	0.26	0.43	1.00	1.08	1.00
	3	0.28	0.39	0.95	1.08	1.03
	7	0.24	0.29	0.81	1.11	1.09
0.1	1	0.26	0.38	1.05	1.11	1.06
	3	0.28	0.34	1.08	1.20	1.16
	7	0.26	0.27	0.95	1.21	1.12
0.2	1	0.20	0.28	1.20	1.15	1.13
	3	0.23	0.15	1.07	1.20	1.15
	7	0.15	0.24	0.77	1.23	1.27
0 (control)	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

る前処理法として適当な方法は見当たらないが、強いて云えば0.05%濃度で4°C、3~7日間の前処理が良いであろう。

3. Protease II 処理がダイズたんぱく消化性に及ぼす影響

3-1 前処理条件の検討：Protease I の場合と同じく4°Cにおける Protease II 濃度と前処理時間が TSP の水解に及ぼす影響を Fig. 11 に示す。実験方法は Fig. 2 と同じである。

Protease I の場合とくらべて、低濃度における酵素活性が大きく、酵素濃度による差が小さい。

3-2 処理酵素濃度と処理時間が消化速度に及ぼす影響：結果を Fig. 12 に示す。Protease

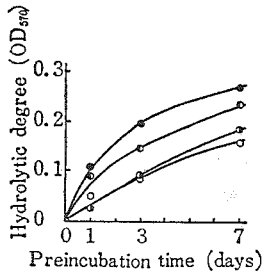


Fig. 11 Hydrolyses of TSP in preincubation with Protease II at 4°C. See the illustration of Fig.2.

Enzyme concentration, ●—● 0.2% : ○—○ 0.1%  
: ○—○ 0.075% : ○—○ 0.05%.

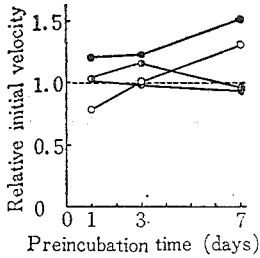


Fig. 12 Relation of digestion velocity of TSP with pepsin and preincubation time with Protease II.

Enzyme concentration, ●—● 0.2% : ○—○ 0.1%  
: ○—○ 0.075% : ○—○ 0.05%.

II は I と異なり，処理日数に比例してペプシンによる消化速度の上昇する場合（0.2%，0.075%）が認められる。すなわち Protease I の場合ほど基質特異性の点でペプシンと類似していないと考えられる。

また全体的に消化速度は Protease II 前処理区が Protease I 前処理区とくらべて大きい

Table 4 Variation of digestibility of textured soy protein preincubated with Protease II

Concentration of Protease II %	Days of pretreatment	Concentration of substrate protein (N mg/90ml)	Digestibility (%)	
			pepsin*	pancreatic** enzymes
0.05	1	208.1	66.33	76.35
	3	189.5	65.21	77.32
	7	208.0	69.31	78.69
0.075	1	240.1	63.89	70.62
	3	271.8	65.76	73.61
	7	187.6	74.73	89.10
0.1	1	230.6	64.21	76.20
	3	206.3	71.27	77.89
	7	212.0	72.47	79.65
0.2	1	181.6	69.56	80.21
	3	186.9	73.22	85.58
	7	169.7	76.76	88.61
0 (control)	—	187.5	60.09	70.57

\* Calculated from the values after pepsin digestion for 140min.

\*\* Calculated from the values after pancreatic enzymes digestion for 300min.



ようである。

3-3 処理酵素濃度と消化率との関係：Protease II の濃度がTSPの消化率に及ぼす影響を処理時間も合わせて調べるとTable 4 のようになる。Protease I の結果 (Table 2) とくらべて消化率は少し高い。

3-4 ペプシン及び膵臓酵素濃度を大きくした場合のTSPの消化性の変化：これまで0.1%の消化酵素濃度で消化性の検討を行っているが、これを0.2%にしたときの消化試験におけるTSPの挙動を調べた。

その結果 (Table 5) を Table 4 のそれと比較すると、単位酵素当りの消化速度はかなり

**Table 5** Relation between Ppotease II concentration and the digestibilities of textured soy protein varying the concentration of pepsin and pancreatic enzymes

Protease II* concentration %	Initial digestion velocity	Digestibility (%)	
		0.2% pepsin	0.2% pancreatic enzymes
0.075	3.42(4.86)**	73.80(65.76)**	81.23(73.61)**
0.1	3.97(4.77)	73.40(71.27)	83.32(77.89)
0.2	2.56(5.79)	72.39(73.22)	83.52(85.58)

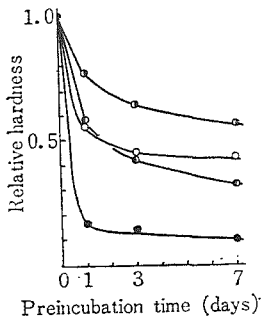
\* Preincubated for 3 days at 4°C.

\*\* Figures in blackit exhibit the values at 0.1% digestion enzymes.

低下しているが、消化率の点では0.075%以外大きな差が認められない。このように0.2%処理酵素濃度において消化率の向上が認められないのは、前処理の段階でペプシン、Z-パンクなどの消化酵素が作用するペプチド結合がProtease II濃度0.1%以上では濃度に関係なく大部分が水解されているためと考えられる。したがってTable 5の実験条件(4°C, 3日間)ではProtease IIの濃度を0.1%以上に上げることは無意味となり、一般に他の条件においても高濃度の処理酵素は不必要と思われる。

3-5 Protease II 処理がTSPのテクスチャーに及ぼす影響

(1) Protease II の処理時間及び濃度とTSPの硬さとの関係：測定結果をFig. 13に示



**Fig. 13** Hardness of TSP hydrolyzed by Protease II of varied concentration at 4°C.

Enzyme concentration, ●-● 0.2% : ○-○ 0.1% : □-□ 0.075% : ■-■ 0.05%.

す。TSPは4°C, 1日の酵素処理によって硬さは低下するが、0.1%までは50%以上の硬さを残しており、Protease Iと比較して温和な水解であると云える。

(2) Protease II の前処理時間及び酵素濃度と凝集性との関係：測定結果を Fig. 14に示す。4°C, 1日の処理で約75%の凝集性を残し Protease I とくらべてテクスチャーの変化は小さい。

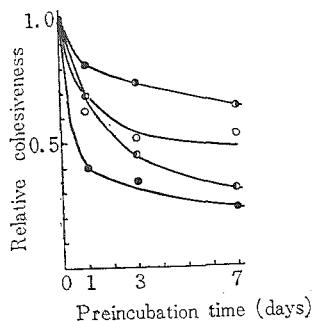


Fig. 14 Cohesiveness of TSP preincubated by Protease II of varied concentration at 4°C.  
Enzyme concentration, ●—● 0.2% : ○—○ 0.1%  
: ○—○ 0.075% : ●—● 0.05%.

3-6 Protease II 処理による TSP のテクスチャーと消化性との関係：これまでの結果をまとめて Table-6 に示す。

Table 6 Relation of digestibility of textured soy protein preincubated by Protease II to its hardness and cohesiveness

Concentration of Protease II %	Days of pretreatment	Hardness	Cohesiveness	Digestibility		
				Relative initial velocity	Digestion ratio	
					pepsin	pancreatic enzymes
0.05	1	0.77	0.81	1.04	1.10	1.08
	3	0.64	0.74	1.14	1.08	1.09
	7	0.56	0.64	0.92	1.15	1.11
0.075	1	0.55	0.64	0.78	1.06	1.00
	3	0.45	0.53	1.02	1.09	1.04
	7	0.48	0.63	1.30	1.24	1.26
0.1	1	0.57	0.69	1.04	1.06	1.07
	3	0.42	0.44	1.00	1.18	1.11
	7	0.32	0.31	0.91	1.20	1.12
0.2	1	0.16	0.40	1.20	1.15	1.13
	3	0.14	0.39	1.22	1.21	1.21
	7	0.10	0.22	1.49	1.27	1.25
0 (control)	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

この酵素処理条件として比較的望ましいものに Protease II 濃度0.075%で4°C, 7日間処理のものがあげられる。すなわち, この条件では TSP のテクスチャーを50%残し, 消化性が約25%増大している。しかし所期の目的に合致する処理条件は見当らず, 前処理 Protease による TSP のテクスチャーを残して消化性を大巾に改善する処理方法を見出すことはかなり困難のことと思われる。

## 摘 要

繊維状ダイズたんぱく質 (TSP) のテクスチャーを残しながら消化性改善を行う目的で2種の Protease による前処理を試み, そのときのテクスチャー変化と *in vitro* における消化性を測定し, それらの結果から所期目的に合致する前処理条件を検討した.

Protease I (Cigma, from papaya) 処理たんぱく試料は消化初速度が未処理とくらべて劣っているが, これはこの Protease の酵素活性が大きいこと以外に TSP への作用部位が, ペプシンのそれに類似しているためと考えることが出来る. 最終消化率は未処理区の10~30%増となっている.

Protease II (Kyowa, from Streptomyces) は比較的温和な水解を行い, それによる処理 TSP の消化速度が Protease I よりも大きいことから, 消化酵素と基質特異性を異にする Protease であると考えられる. また最終消化率は Protease I とほぼ同じである. したがって前処理酵素として比較的望ましいものであり, その処理条件として0.075% Protease II による4°C, 7日間処理が挙げられる.

おわりにダイズたんぱく質を恵与された日本興油株式会社に感謝すると同時に, テクスチユロメーターの使用に際し御教示を頂いた香川大学農学部山野善正氏, 同三木英三氏に厚くお礼を申し上げる.

## 文 献

- 1) 小島善子: 食の科学 29, 27 (1976)
- 2) 越山育則: 植物酵素・蛋白質研究法 (蛋白質・核酸・酵素別冊), 456, 共立出版, 東京 (1976)
- 3) 高木茂明: 岡山大農学報 46, 52 (1975)
- 4) 高木茂明: 未発表

## 正 誤 表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
目次	4	(英 文)	削 除
55	6	Recived	Received
65	Table3	occurence	occurrence
69	29	to de	to be
97	Table3	3. 38	3. 83