

# ブタ血液グロビンの消化性に及ぼす サクシニル化の影響

米倉政実・宮口右二・堤 将和・中谷哲郎

## 緒 言

畜産副生物として大量に生産される屠畜血液は、優良なタンパク質資源であるにもかかわらず、我が国においては、現在、その大部分は有効利用されず、そのまま廃棄されている。中でもその血球部に含まれているヘモグロビンの利用は、赤色のヘム色素を含むため、これをそのまま食品素材として利用するには難点があり、調味料としての利用研究などが行われているに過ぎない<sup>1), 2)</sup>。

しかし、脱ヘムにより無色のグロビンを調製することが可能になったことから、少しずつその利用法について検討されるようになってきた<sup>3), 4)</sup>。

山内・清水<sup>4)</sup>は、グロビンをプロテアーゼで分解したのち、低分子化したペプチドをトランスグルタミナーゼで再び結合させて高分子量化させることにより、乳化剤としての利用の可能性を見い出している。

一方、著者らはグロビンの化学修飾（サクシニル化）を行うことにより、グロビンの溶解性や起泡性などの機能特性を改善することができた<sup>5)</sup>。これによって、グロビンを食品素材として利用できる可能性が示唆された。

ところで、タンパク質を食品あるいは食品素材として利用するうえで、その栄養評価及び安全性の確認は不可欠な条件である。すでに、いくつかのサクシニル化タンパク質について、動物実験により、その栄養価及び安全性が検討されている<sup>6~9)</sup>。サクシニル化魚肉タンパク質の場合<sup>7), 8)</sup>、ラットを用いた実験で、標準タンパク質のカゼインと比較して、そのタンパク質効率は73%となり、やや低かったが、従来動物には利用されないと考えられていたサクシニル化リジン残基も、腸内細菌の作用によって動物に吸収・利用されることが示された。またアシル化カゼイン<sup>9)</sup>では、マウスに対して明白な毒性は認められなかった。

しかし、サクシニル化グロビンについてのこのような知見はまったく得られていない。そこで本研究では、サクシニル化グロビンの栄養機能特性の評価の1つとして、プロテアーゼを用いる *in vitro* 消

化試験を行い、その消化性を未修飾グロビンのそれと比較検討した。

## 材料及び方法

### 1. 試料及び試薬

ブタ血液からのグロビンの調製ならびにグロビンのサクシニル化は、既報<sup>5)</sup>の方法に従って行った。なお、本実験で調製したサクシニル化グロビンのサクシニル化率は98.5%であった。

プロテアーゼとして、シグマ社製のペプシン（ブタ胃粘膜，2,850Units/mg タンパク質）、トリプシン（ウシ膵臓，10,200Units/mg タンパク質）及びパンクレアチン（ウシ膵臓，グレードIII）を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業及びナカライテスク社製の特級及び液体クロマトグラフ用試薬を用いた。

### 2. *In vitro* 消化試験

ペプシン、トリプシン及びパンクレアチンによる *in vitro* 消化試験は、稲川ら<sup>10)</sup>の方法を一部改変した既報<sup>11)</sup>の方法により行った。また、試料タンパク質の消化性は、タンパク質分解度、すなわち、1時間のプロテアーゼ消化によって、消化液1mlあたりに生成された遊離アミノ基の量（ $\mu\text{mol}$ ）で表した。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー

グロビン、サクシニル化グロビン及び消化生成ペプチドの分子量測定ならびに消化生成ペプチドのマッピングは、L-6000型高速液体クロマトグラフ（日立製作所製）を用い、既報<sup>12)</sup>の方法により行った。なお、高速ゲル濾過による分子量の測定には、昭和電工製 Shodex WS-802.5 F（ $8 \times 300 \text{ mm}$ ）カラムを、また、逆相分配クロマトグラフィーによるペプチドマッピングには、センシュー科学製 VP-318-1251（ $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ）カラムを、それぞれ使用した。

## 結果及び考察

### 1. グロビン及びサクシニル化グロビン標品の純度

本実験に用いたグロビン及びサクシニル化グロビン標品の純度検定を高速ゲル濾過により行った。

図1に示したように、グロビンは分子量26,000の主要成分から成り、分子量10,000以下の成分も

わずかに含まれているものの、分子量的にかなり均一であることがわかった。また、サクシニル化グロビンでは、分子量 49,000 の主要成分とわずかながら分子量 37,000 の成分が認められたが、分子量 10,000 以下の低分子は少量であることが明らかになった。なお、保持時間約 22 分のピークについて検討した結果、これは試料中の緩衝液などの溶媒成分によるものであることがわかった。

したがって、本実験で使用したグロビン及びサクシニル化グロビンは、いずれも分子量的にはそれぞれほぼ同じサイズの成分から成り立っており、夾雑物の少ない、かなり純度の高い標品であることが明

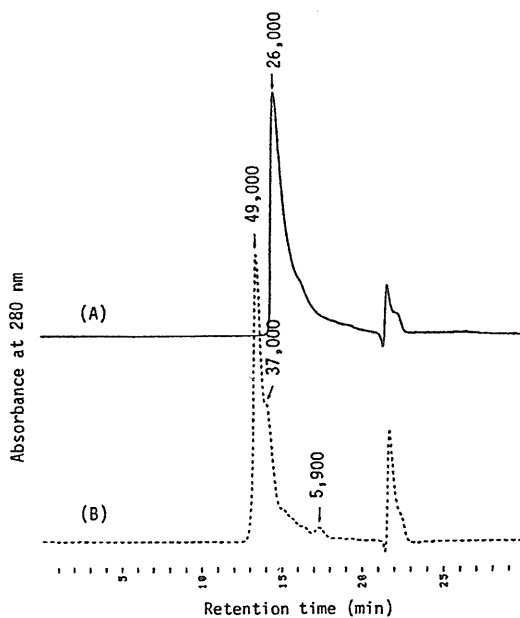


Fig. 1. High-performance gel filtration of (A) globin and (B) succinylated globin on Shodex WS-802.5 F column.

らかになった。また、グロビンモノマーの分子量は約 15,000 である<sup>10)</sup>ことから、本グロビン及びサクシニル化グロビンは、それぞれモノマーが 2~3 分子会合した状態で存在しているものと推測された。

## 2. サクシニル化グロビンの *in vitro* 消化性

グロビン及びサクシニル化グロビンの *in vitro* 消化試験の結果を表 1 にまとめて示した。

ペプシン及びトリプシンによるサクシニル化グロビンの消化性は、未修飾グロビンに比べ、それぞれ 59% 及び 18% に大きく低下したが、パンクレアチンでは、逆に約 1.4 倍に増大した。また、両グロビンともペプシンにより最も良く消化され、ついで、パンクレアチン、トリプシンの順で消化性は低下した。このプロテアーゼ間での消化性の差異は、ペプシン、トリプシン及びパンクレアチンの基質特異性が、三者のうちで、ペプシンで最も低く、トリプシンで最も高いこと、またパンクレアチンには、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼなど複数のプロテアーゼが含まれていることなどが主因と考えられる。

ペプシンによるグロビンの消化性がサクシニル化により低下した主な原因として、両グロビンの溶解性の差異<sup>5)</sup>が考えられる。すなわち、ペプシン消化を行った強酸性 (pH1.9) では、グロビンは完全に溶解したが、サクシニル化グロビンの溶解性は低く、消化反応の初期では懸濁状態で消化が行われたため、その消化性は低くなったものと考えられる。しかし、サクシニル化グロビンも、消化反応が進むにつれて次第に可溶化され、1 時間後にはほぼ完全に溶解した。

一方、トリプシンによるグロビンの消化性がサクシニル化によって大きく低下した主な原因は、グロビンのリジン残基のアミノ基がサクシニル化されることにより、リジン及びアルギニン残基に基質特異

Table 1. Digestibilities of globin and succinylated globin with pepsin, trypsin and pancreatin.

Protease	Globin	Digestibility	
		(Amino group $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{hr}$ )	Relative digestibility (%)
Pepsin	Unmodified	3.64	100
	Succinylated	2.13	59
Trypsin	Unmodified	1.20	100
	Succinylated	0.21	18
Pancreatin	Unmodified	1.32	100
	Succinylated	1.83	139

性をもつトリプシンによる加水分解を受けにくくなったものと推察される。

これに対して、パンクレアチンによる消化性が、サクシニル化により増大したのは、両グロビンの中性領域での溶解性の差異<sup>5)</sup>に基づくものと考えられる。すなわち、パンクレアチン消化を行ったpH 7.5では、グロビンの溶解性は低く、ほとんど溶解しなかったが、サクシニル化グロビンは完全に溶解し、その結果、パンクレアチンに含まれているトリプシン以外のプロテアーゼが作用しやすくなったこと、これらプロテアーゼの相乗的な作用によるものと推察される。なお、グロビンは消化1時間後でも完全には溶解せず、かなりの沈殿が認められた。

したがって、トリプシン消化の場合は、サクシニル化によるグロビンの溶解性の増大による効果よりも、トリプシンが作用できる加水分解部位数の減少による影響が強くあらわれた結果と考えられる。一方、パンクレアチン消化の場合は、サクシニル化によるグロビンの溶解性の増大による効果が大きかったものと推察される。

以上の結果から、グロビンの消化性は、サクシニル化により、ペプシンまたはトリプシンによる場合は低下するが、パンクレアチンでは逆に増大することが明らかになった。

### 3. 消化生成ペプチドの分子量とその分布

グロビン及びサクシニル化グロビンのペプシンによる消化生成物の高速ゲル濾過の溶出パターンを図2に示した。

グロビンでは、分子量1,800のペプチドが最も多く、ついで分子量3,300のペプチドが検出された。一方、サクシニル化グロビンでは、分子量2,600を主体とするペプチドが見い出された。なお、図1の場合と同様に、保持時間約22分のピークは、試料を溶解した溶媒の成分によるもので、ペプチドではないことが確認された。

したがって、ペプシン消化前の両グロビンの分子量を考えあわせると、グロビン及びサクシニル化グロビンともに、ペプシンによりかなり小さなペプチドに細片化されており、また両グロビンとも生成ペプチドの分子量分布はほぼ類似していることがわかった。

次に、両グロビンのトリプシン消化生成物のゲル濾過の溶出パターンを図3に示した。なお、グロビンの消化生成物ではかなりの不溶物が認められたので、この不溶物は除去して、可溶性画分のみ分析に供した。

グロビンでは、消化生成物としては分子量1,700

のペプチドが主成分で、分子量2,800のペプチドも認められた。これに対して、サクシニル化グロビンでは、分子量32,000, 15,000, 9,800, 5,400, 3,100及び1,800の各種ペプチドが検出された。すなわち、グロビンの場合は、本実験の条件下において分析さ

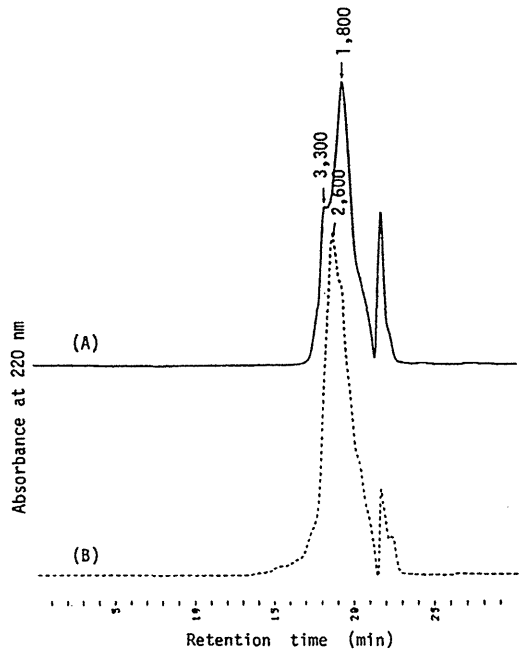


Fig. 2. High-performance gel filtration of peptic digests of (A) globin and (B) succinylated globin on Shodex WS-802.5 F column.

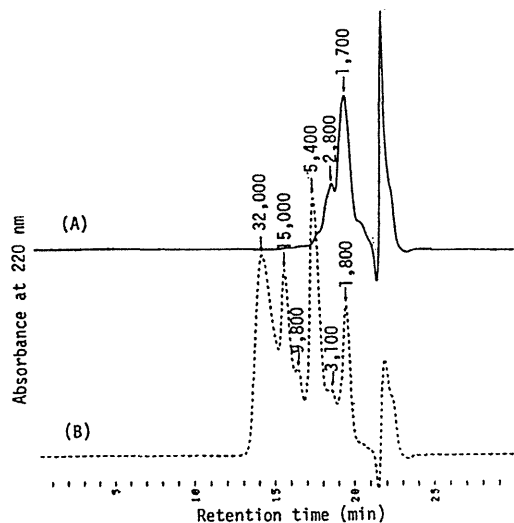


Fig. 3. High-performance gel filtration of tryptic digests of (A) globin and (B) succinylated globin on Shodex WS-802.5 F column.

れていない未分解のグロビン (分子量約 26,000) がかなり残存していたことを考慮しても、サクシニル化グロビンの消化生成物の分子量とその分布は、グロビンのそれとまったく異なるものであった。

したがって、グロビンでは、トリプシンによって消化されたものについては、ペプシン消化の場合と同様にかなり細片化されていたが、サクシニル化グロビンでは、限定的な加水分解により種々の分子量をもつ大きな断片のペプチドが生成され、両グロビンの分解の様相はまったく異なることが推察された。

さらに、パンクレアチンによる消化生成物のゲル濾過パターンを図 4 に示した。トリプシンの場合と同様に、グロビンの消化生成物の分析は、可溶性画分についてのみ行った。

グロビンでは、分子量 1,700 のペプチドが最も多く、ついで 1,100, 4,800 のペプチドがそれぞれ検出された。一方、サクシニル化グロビンでは、分子量 25,000, 8,800, 5,200, 2,900 及び 1,800 の各種ペプチドが認められた。したがって、トリプシン消化の場合と同様に、パンクレアチンによる消化生成物の分子量とその分布は、両グロビンでまったく異なるものであった。またグロビンでは大部分のものが未消化のままであったと考えられるが、消化されたものについてはかなり小さなペプチドにまで分解されているのに対して、サクシニル化グロビンでは、種々の分子量をもつ大きな断片のペプチドが生成されており、パンクレアチンによる両グロビンの消化の様相は、トリプシン消化の場合と同じく、まったく異なることが推測された。

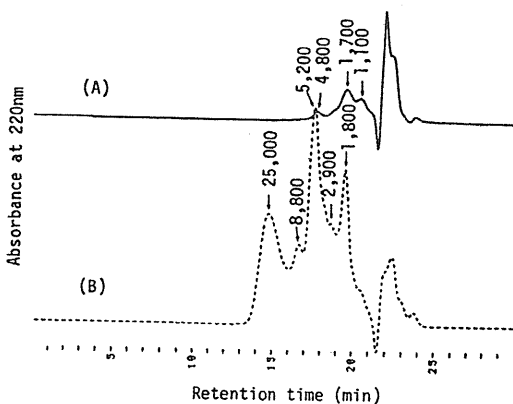


Fig. 4. High-performance gel filtration of pancreatic digests of (A) globin and (B) succinylated globin on Shodex WS-802.5 F column.

以上の結果から、ペプシンによる消化の場合は、両グロビンで、生成ペプチドの分子量とその分布はほぼ類似しており、分解の様相には大差なかったと判断されるが、トリプシン及びパンクレアチンによる消化では、サクシニル化グロビンよりもグロビンのほうが、分解を受けたものについては低分子化されやすいこと、また両グロビンで分解の様相は異なることが推察された。

これらの原因については明らかではないが、ペプシン消化の場合は、ペプシンが疎水性アミノ酸残基に基質特異性を有することを考慮すると、グロビンのサクシニル化は、ペプシンによる分解部位数及び分解される位置にはほとんど影響を及ぼさなかった結果であると推察される。他方、トリプシン及びパンクレアチン消化の場合は、グロビンの、主としてリジン残基がサクシニル化されたことにより、両プロテアーゼによる分解部位数の減少及び分解される位置の変化が起こった結果であると推察される。

さらに、トリプシンによるサクシニル化グロビンのタンパク質分解度が、グロビンのそれに比し、大きく低下した原因も主としてこれらの変化によるものと考えられる。また、タンパク質分解度の測定において、消化生成物をトリクロロ酢酸により除タンパクする際、特に分子量 10,000 以上の分子量の大きい生成物は、沈殿として除かれ、定量されない可能性が考えられるので、このことも併せてサクシニル化グロビンのトリプシンによる消化性が低い値になった原因とみられる。図 3 からわかるように、サクシニル化グロビンでは、この分子量 10,000 以上の生成物がほぼ全体の半分以上を占めている。したがって、サクシニル化グロビンのトリプシンによる真の消化性は、本実験の値よりも大きいものと推定される。

同様のことが、サクシニル化グロビンのパンクレアチン消化においてもあてはまり、このプロテアーゼによるサクシニル化グロビンの消化性も本実験での値より大きい値であると推察される。なお、サクシニル化グロビンのタンパク質分解度がグロビンのそれよりも増加した理由は、前述の通り、その溶解性の増加とパンクレアチンに含まれる各種プロテアーゼの相乗作用によるものと考えられる。

#### 4. 消化生成ペプチドのマッピング

逆相分配クロマトグラフィーによるグロビン及びサクシニル化グロビンの消化生成物のペプチドマッピングを行った結果を図 5 ~ 7 に示した。

ペプシンによる消化生成物のペプチドマップ (図 5) は、各ペプチドの量的な差異はみられるものの、

両グロビンでほぼ類似したパターンを示した。またほとんど全部のペプチドが、アセトニトリル濃度 40% (保持時間 35 分) 以下で溶出され、親水性の比較的高いペプチドが多く生成していることが推測された。なお、保持時間 48 分以降に溶出されているピークについて検討した結果、いずれもペプチドではなく、溶媒中の未知物質に起因するものであることがわかった。

トリプシン消化生成物のペプチドマップ (図 6) は、両グロビンにおいてまったく異なるパターンを示した。すなわち、グロビンでは、アセトニトリル濃度 40% 以下で大部分のペプチドが溶出されたのに対して、サクシニル化グロビンでは、アセトニトリル濃度 35% (保持時間約 30 分) 以下で溶出されるペプチドはごくわずかで、同濃度 35~100% で大部分のペプチドが溶出された。したがって、グロビンのトリプシン消化生成物の大部分は、比較的亲水性の高いペプチドであり、他方、サクシニル化グロビンの消化生成物の大部分は、逆に比較的亲水性の高いペプチドであることが推測され、両グロビンで生成ペプチドはまったく異なることが示唆された。

また、パンクレアチンによる消化生成ペプチドのマップは、図 7 に示したように、両グロビンでかなり異なるものであることがわかった。すなわち、グロビンの消化生成ペプチドは、トリプシンの場合と同様に、その大部分がアセトニトリル濃度 40% 以下で溶出され、比較的亲水性の高いペプチドの多いことが推測された。これに対して、サクシニル化グロビンの消化生成ペプチドは、約半分がアセトニトリル濃度 40% 以下で溶出され、残部が同濃度 40~100% で溶出されており、親水性の高いペプチドと疎水性の高いペプチドの両者が混在していることが推察された。したがって、パンクレアチンの場合も、消化生成ペプチドの大部分は、両グロビンで異なることが示唆された。

このように、ペプシンによる消化生成物の逆相分配クロマトグラフィーにおけるペプチドマップは、グロビンのサクシニル化によってはほとんど影響を受けず、両グロビンではほぼ類似していた。さらにゲル濾過の溶出パターンも同様であったことと併せ考えると、生成ペプチドも両グロビンで類似しているものと推察される。これに対して、トリプシン及

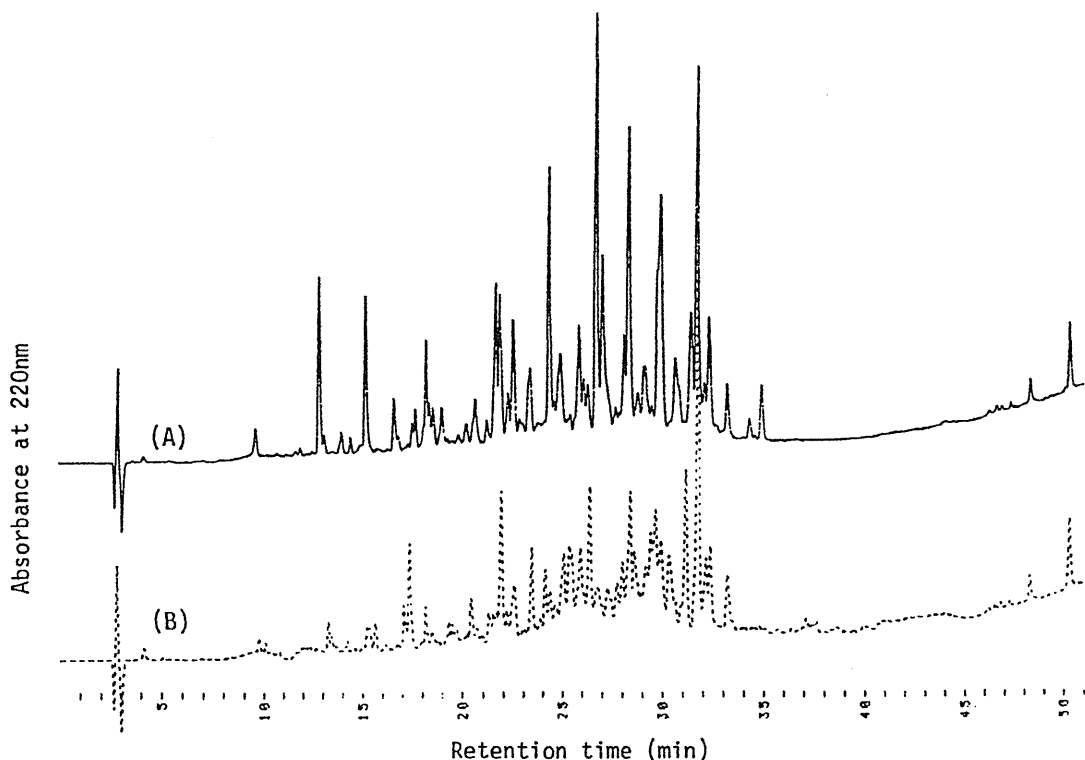


Fig. 5. Elution profiles of peptic digests of (A) globin and (B) succinylated globin from Senshu Pak VP-318-1251 column.

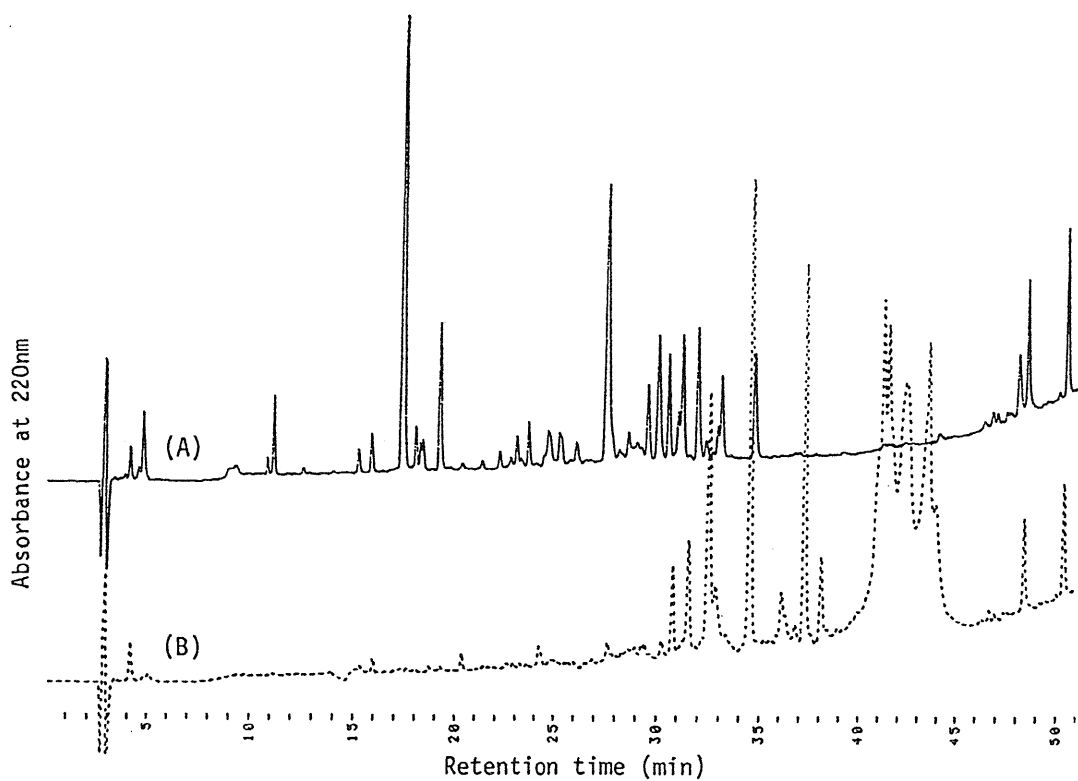


Fig. 6. Elution profiles of tryptic digests of (A) globin and (B) succinylated globin from Senshu Pak VP-318-1251 column.

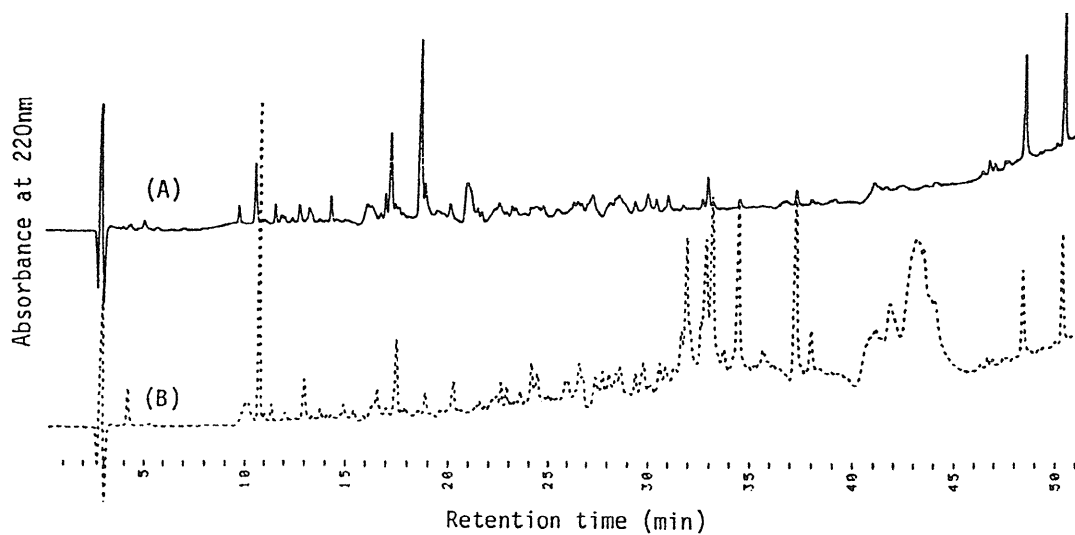


Fig. 7. Elution profiles of pancreatic digests of (A) globin and (B) succinylated globin from Senshu Pak VP-318-1251 column.

びパンクレアチンによる消化生成ペプチドのマップは、ゲル濾過の溶出パターンと同様に、両グロビンで異なっており、生成ペプチドにも大きな差異があるものと推察される。

以上の結果を総合すると、グロビンをサクシニル化することにより、未修飾グロビンの場合とは異なったプロテアーゼ分解ペプチドを得ることができ、これらペプチドがグロビンのそれとは異なった物性的または栄養的な機能特性を有する可能性が示唆された。すでに、Groninger and Miller<sup>13)</sup>は、サクシニル化した魚肉タンパク質をプロメラインで消化して得られるペプチドの起泡性と泡沫安定性を調べ、両特性がサクシニル化によって大きく影響を受けることを示している。

したがって、ブタ血液グロビンのような未利用タンパク質から、新しい機能特性をもつペプチドを調製する方法の1つとして、サクシニル化が有効である可能性が示唆された。同様に、このことは一般に、食品タンパク質の栄養的あるいは生理的機能特性も、そのサクシニル化によって変化させうることを示唆する。しかし、一般的にサクシニル化によって有効性リジンの量が減少することは別としても、この変化が生体にとって有利なものかどうかについては、今後の研究を待たねばならない。

## 要 約

ブタ血液から調製したサクシニル化グロビンの栄養機能特性を評価する1つの方法として、プロテアーゼを用いる *in vitro* 消化試験を行い、グロビンの消化性に及ぼすサクシニル化の影響を検討した。

ペプシン及びトリプシンによるグロビンの消化性は、サクシニル化により、それぞれ59%及び18%に大きく低下したが、パンクレアチンによる消化性は逆に約1.4倍に増大した。

消化生成ペプチドの分子量とその分布を高速ゲル濾過法により調べた結果、ペプシン消化の場合は、グロビンとサクシニル化グロビンとの間で、生成ペプチドの分子量及びその分布はほぼ類似しており、両者ともかなり小さなペプチド断片にまで分解されていることがわかった。他方、トリプシン及びパンクレアチン消化の場合は、グロビンは細片化されやすかったが、サクシニル化グロビンは限定的な分解を受け、種々の分子量をもつ大きな断片のペプチドが生成され、両グロビンで分解の様相はまったく異なることが推察された。

消化生成ペプチドのマッピングの結果、ペプシンによる消化生成物のペプチドマップは、両グロビン

でほぼ類似していたが、トリプシン及びパンクレアチンによる消化生成物のマップは両グロビンで異なることがわかった。

以上の結果から、サクシニル化により、グロビンの消化性は、ペプシン及びトリプシンによる場合は低下するが、パンクレアチンによる場合は逆に増大すること、また消化生成ペプチドが両グロビンで異なることから、生体内での栄養機能特性もサクシニル化によって影響を受ける可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究は、昭和62年度茨城大学教育研究学内特別経費により実施された研究プロジェクト「タンパク質食糧資源の有効利用」(代表者副島正美博士)の一部であり、研究助成に対して厚くお礼申し上げます。

また、本研究の実施にあたり、有益なご助言をいただいた、茨城大学農学部教授副島正美博士、同教授菅原 潔博士、同助教授正木武治博士及び同助教授高原英成博士に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 児玉正昭・緒方武比古・中村豊郎：日食工誌，**31**，384 (1984)
- 2) 中村豊郎・矢野幸男・羽田輝美：日畜会報，**56**，851 (1985)
- 3) Tybor, P. T., C. W. Dill and W. A. Landmann: J. Food Sci., **40**, 155 (1975)
- 4) 山内邦男・清水 誠：伊藤記念財団「食肉に関する助成研究調査成果報告書」，**3**，302 (1985)
- 5) 宮口右二・境 久美子・米倉政実・堤 将和：日食工誌，**36**，720 (1989)
- 6) R.E. フィーニー・J.R. ウィテーカー編：食品蛋白質—化学的・酵素的修飾による改良—，P. 1 (1979) 学会出版センター
- 7) Groninger, H. S., Jr.: J. Agric. Food Chem., **21**, 978 (1973)
- 8) Groninger, H. S. and R. Miller: *ibid.*, **27**, 949 (1979)
- 9) Creamer, L. K., J. Roeper and E. H. Lohrey: N. Z. J. Dairy Sci. Technol., **6**，107 (1971)
- 10) 稲川淳一・清澤 功・長澤太郎：栄食誌，**40**，367 (1987)
- 11) 米倉政実・中谷哲郎：茨大農学術報告，**37**，85 (1989)
- 12) 日本生化学会編：生化学データブック [I]，P. 231 (1979) 東京化学同人

- 13) Groninger, H. S., Jr. and R. Miller : J. Food  
Sci., **40**, 327 (1975)



## Effect of Succinylation on Digestibility of Globin from Porcine Blood

MASAMI YONEKURA, YUJI MIYAGUCHI, MASAKAZU TSUTSUMI  
and TETSURO NAKAYA

As a part of the nutritional evaluation of succinylated porcine globin, *in vitro* digestibility of the modified protein was estimated.

*In vitro* digestibility of the succinylated globin by pepsin and trypsin were 59% and 18% of that of the unmodified protein, respectively. On the other hand, the digestibility of the succinylated globin with pancreatin was improved by 39%.

The peptide patterns on high-performance gel filtration and reversed-phase liquid chromatography demonstrated that peptic digests of the succinylated globin were similar to those of the unmodified protein, whereas tryptic and pancreatic digests of the modified globin were entirely different from those of the unmodified one, respectively.

The results suggest that the nutritional function of globin *in vivo* may be affected by succinylation and the improvement of functional properties of globin hydrolyzates with these proteases may be performed by this chemical modification.

(Sic. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.38, 127 ~ 135, 1990)