

# *Achromobacter* protease I を利用する小麦グルテンの栄養機能の改善

## 第1報 *Achromobacter* Protease I による小麦グルテンの加水分解

副島正美・甲田公良・正木武治

### 緒 言

小麦グルテンは小麦タンパク質の約80%を占めるが、水を加えて混ねつると粘弾性に富んだ粉 (Dough) を形成し、パン・麺・菓子類等の調製に利用される。一方小麦グルテンのリジン含量は他の穀類タンパク質の場合と同様に特に少なく、必須アミノ酸中の制限アミノ酸となっている。すなわち、標準タンパク質のリジン含量に対するケミカルスコア (タンパク質価) が44と低く、食品タンパク質素材として栄養学的に非常に劣っている。

著者等は小麦グルテン誘導物のリジン含量を増大し、栄養を改善することを目的として次の実験計画を立てた。すなわち、著者等の研究室で発見され<sup>1)</sup>、現在市販もされている<sup>2)</sup> *Achromobacter* Protease I (API, EC 3.4.21.50) がリジールペプチド結合のみに特異的なエンドペプチダーゼ作用を持つことを利用して、小麦グルテン及びその構成成分であるグルテニンおよびグリアジンをAPIで充分に加水分解して、それぞれのC-端にリジンをもつ加水分解生成ペプチドを得て、そのC-端に再びAPIの作用でリジンを縮合・導入することを意図した。

第1報では、APIによる小麦グルテンならびにその構成成分に対する加水分解反応および生成物について検討した結果を報告する。特に、小麦グルテンならびにその構成成分は何れも水及び希薄塩類溶液に溶解しないので、それらの懸濁液の分散性を増大し、また加水分解反応を促進するために高濃度の尿素を共存させた。ちなみに、高濃度の尿素に対してAPIは強い抵抗性を有し変性を受け難い<sup>3)</sup>。また小麦グルテンおよびその構成成分のリジン含量は全アミノ酸100残基当り1~2残基であるので、充分加水分解した場合、相当重合度の大きなポリペ

プチドが生成することが期待された。

### 材料および方法

(1) 酵素: *Achromobacter lyticus* M497-1の培養液より *Achromobacter* Protease I を著者等の方法<sup>2)</sup>により精製し電気泳動的に単一な標品を得た。酵素濃度は280nmにおける吸光度 (E 280nm, 1cm=18.77) を測定し算出した。

(2) グルテン、グルテニンおよびグリアジン: 1986年度産のアメリカ硬質冬小麦とカナダ硬質春小麦とを混合した小麦粉から、アンモニア分散法<sup>7)</sup>によってグリコ栄養食品株式会社で製造された市販バイタルグルテンを出発原料とした。各試料は常法に準じて次の手順に従って調製した。

原料50gを5%濃度になるように、0.1%塩化ナトリウム水溶液を加え、4°Cで分散させ10,000×gで10分間遠心分離し、上澄液 (アルブミン、グロブリン等を含む) を除いた。さらに、沈澱物の20倍量の0.01M酢酸水溶液を加え、ウォーリングブレンダーで2,000rpm10分間攪拌した。分散液は4°Cで1夜攪拌した後20,000×gで10分間遠心分離し上澄液を集めた。共存するプロテアーゼを完全に失活するために100°Cで3分間加熱後急冷し、エタノールを70% (V/V) になるように加え、また1Mの水酸化ナトリウム溶液でpH6.5に調整した。4°Cで1夜放置後20,000×gで10分間遠心分離し、沈澱区分を凍結乾燥してグリテニン区分とした (収率30.0%)。上清はロータリーエバポレーターでエタノールを除去した後、凍結乾燥してグリアジン区分とした (収率23.8%)。各試料のアミノ酸組成は日立アミノ酸分析計835Sにより定量し、アミノ酸100残基当りの各残基数を算出した。

(3) 試料の加水分解

上記の各試料毎に、それぞれの30mgに尿素を5M、チオスレイトールを0.01M含む0.1Mリン酸緩衝液1~5mlを加えてゆっくり攪拌し分散させた。30°Cで、1~5μMのAPIを加えて攪拌しつつ20時間反応させた後、セロファンチューブ (Visking Co.製, タイプ27/32) に入れ4°Cで水に対して72時間透析した。その内容物を集めて凍結乾燥し試料加水分解生成物とした。

加水分解生成物の分解率はカルボキシペプチダーゼ法によって次のように算出した。ベンゾイルグリシルリジン (Bz-Gly-Lys) 10mgに5M尿素を含む50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 475μl 加え30°Cで溶解させた。これにカルボキシダーゼY (オリエンタル酵母KK) 25μgを加え、30°Cで反応させた。反応後、50%TCA100μlを加えて反応を停止させ、2,000rpmで5分間遠心分離した。その上清100μlを凍結乾燥し、アミノ酸分析計により遊離リジンを定量し、全リジン量との比を次式により求めて加水分解率 (%) とした。

$$\text{加水分解率 (\%)} = \frac{\text{C-端リジン量}}{\text{全リジン量}} \times 100$$

この結果は反応時間24時間で、加水分解率は90.5%となった。この予備実験の結果を利用し、同じ方法で各試料の加水分解率を算出した。

(4) その他の方法：SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定はLeammlerの方法<sup>9)</sup>に準じて行い、起泡性の測定はEldridgeの方法<sup>9)</sup>に準じて行い、分散性の測定は660nmでの比濁法<sup>10)</sup>を採用し、比粘度の測定はオストワルド型粘度計を用いて行った。

結 果

(1) 試料グルテン、グリアジンおよびグルテニンのアミノ酸組成

Table 1に各試料のアミノ酸組成を100アミノ酸残基中のアミノ酸残基数として示した。ただし試料は6N塩酸で加水分解したためトリプトファンを定量していない。何れもリジンの含量が少ないが、特にグリアジンのそれが非常に少ない。必須アミノ酸中の制限アミノ酸となっ

ていることが分る。

(2) グルテンのAPIによる加水分解条件の決定

最適の加水分解条件を明らかにする目的で酵素濃度、基質濃度、pHおよび反応時間について検討した結果をFig. 1に示した。この結果により、以後API濃度は10μM、基質濃度は30mg/ml、pH8.5、20時間反応させた。また、反応系から尿素(5M)ならびにチオスレイトール(0.01M)を除くと、分解率は84.0%から26.4%に低下した。

(3) 各試料の加水分解率と収率

Table 2にグルテン、グリアジンおよびグルテニンの分解率 (%) と各試料を透析後凍結乾燥した収率 (%) を示した。分解率は各試料とも約84%で差がなかったが、収率はグリアジンに比してグルテニンがやや低く、グルテニンの分解生成物の方に低分子のペプチドが若干多いのではないかと考えられた。

Table 1 Amino acid composition of the Gluten, Gliadin and Glutenin

	Gluten	Gliadin	Glutenin
Asp	3.29	2.47	3.30
Thr	2.70	2.15	3.05
Ser	5.26	4.77	5.63
Glu	32.8	35.8	32.4
Pro	15.9	18.9	14.5
Gly	6.72	3.42	8.93
Ala	3.62	3.12	3.86
Cys	1.14	1.57	0.97
Val	4.48	4.54	4.32
Met	1.28	1.25	1.28
Ile	3.74	4.11	3.32
Leu	6.71	7.06	6.52
Tyr	2.18	1.78	2.94
Phe	4.15	4.63	3.75
Lys	1.72	0.74	1.99
His	1.90	1.90	1.86
Arg	2.30	1.81	1.86

Values shown are expressed as number of residues per 100 total residues.

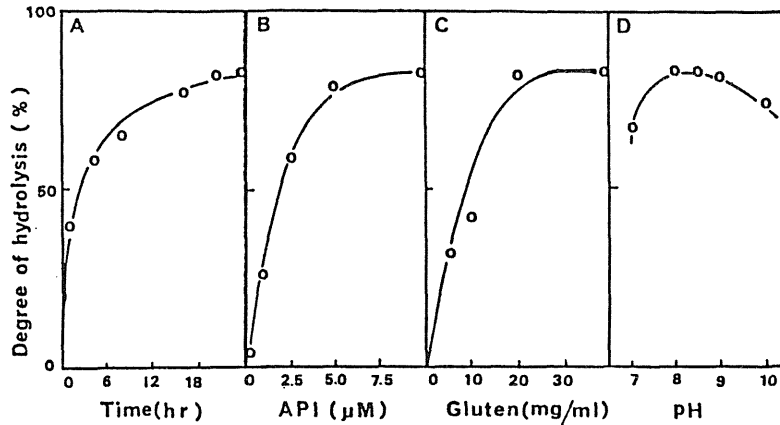


Fig. 1 Effect of reaction time (A), enzyme concentration (B) substrate concentration (C) and pH (D) on the hydrolysis of vital gluten by API.

The reaction mixture (1.0ml) contained 0.1M phosphate buffer, 5M urea and 0.01M dithiothreitol. The reaction was carried out at 30°C.

- A) 10 $\mu$ M API, 30mg/ml gluten; B) 30mg/ml gluten  
 C) 10 $\mu$ M API; D) 10 $\mu$ M API, 30mg/ml gluten

Table 2 Degree of hydrolysis and Yield of the gluten, gliadin and glutenin.

	Degree of hydrolysis %	Yield %
Gluten	84.0	72.5
Gliadin	83.5	75.7
Glutenin	84.4	70.5

The reaction mixture contained 0.1M phosphate buffer (pH 8.5) 10 $\mu$ M API, 30mg/ml gluten, 5M urea and 0.01M dithiothreitol. The reaction was carried out at 30°C

(4) 各試料の加水分解前後における分子量の変化

各試料およびそれぞれの分解生成物をメルカプトエタノール共存下でSDSゲル電気泳動を行った結果がFig. 2である。ただし、染色にはクマシーブリアントブルーRを用い、また試料および分解物の分散性を良くするために8M尿素をサンプル液に加えた。またマーカーは次のタンパク質標品を使用した。チトクロームC(M.W.12.5KD),  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン(M.W.28KD), オボアルブミン(M.W.46DK), 牛血清アルブミン(M.W.

69KD) およびフォスホリラーゼ(M.W.97KD)。

これらのマーカーの分子量の常用対数(y)と移動距離(x)の間には最小2乗法により $y = -0.24x + 5.12$ の1次回帰式が得られた。Fig. 2からグルテン、グリアジンおよびグルテニンの分解生成物は何れも分子量が約10KD以上であることが、上記回帰式から認められた。また各試料とも加水分解後は高分子側のバンドが消失して、低分子側のバンドへの移動が認められた。しかし相対的に低分子側に偏っているグリアジンの約70KDのバンドは消失したが全体的には泳動パターンの変化は少なかった。一方、グルテニンについては、約100KDのバンドが消失するとともにグリアジンと比較すると著しい低分子化が進行したことが泳動パターンからも認められた。

さらに各試料および加水分解生成物の3%溶液の比粘度および加水分解による低下率をTable 3に示した。

グルテニンに比してグリアジンの比粘度は小さく、またそれぞれの分解生成物の比粘度は何れも低下しているが、グルテニンに対して比較的分子量で、かつリジン含量の少ないグリアジンでは低下率は小さかった。この結果は上の泳動パターンの結果と矛盾しない。

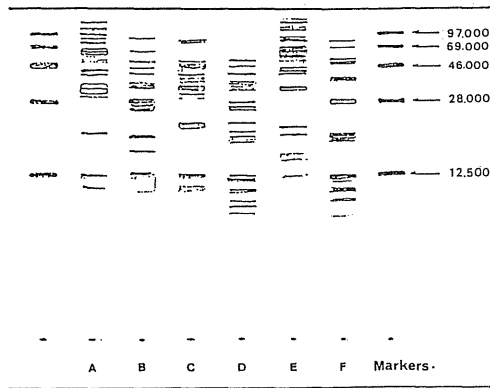


Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the gluten, gliadin and glutenin. Samples were treated with 1% 2-mercaptoethanol.  
A) Gluten; B) Gluten hydrolysate; C) Gliadin; D) Gliadin hydrolysate; E) Glutenin; F) Glutenin hydrolysate

(5) 加水分解による分散性の変化

Table 4は各試料およびそれらの分解生成物について、5 M尿素の存在および非存在下において、それぞれの0.01M酢酸に対する0.1%分散液の上清について、660nmの吸収により濁度を測定した結果である。

この結果から、加水分解によって分子量が小さくなると濁度は明らかに増大して居り、またグリアジンの濁度はグルテニンの4倍以上であり、さらに5 M尿素の共存によって何れも濁度は増大していたが、グリアジンの方がグルテニンよりも増大率は遙かに大きかった。また尿素濃度に関しては、4~5 Mで最大の増加率に近付くことが予備実験の結果から確められている。濁度の増大は沈澱物の減少と分散性の向上を示すものと考えられる。

考 察

小麦グルテンを原料とした試料の部分精製グルテン、グリアジンおよびグルテニンは何れもリジン含量が低くアミノ酸100残基当りそれぞれ1.7, 0.74および2.0残基程度と測定され、各試料ともリジンは必須アミノ酸中の制限アミノ酸である。それらのアミノ酸配列については、

Table 3 Comparison of specific viscosity for hydrolysis of the gluten, gliadin and glutenin.

	Control	Hydrolysate	Ratio of decrease %
Gluten	1.352	0.743	45.0
Gliadin	1.184	1.022	13.7
Glutenin	1.970	0.872	55.6

Assayed by the Ostwald viscosimeter

Temperature 20°C, pH 8.5, Concentration 3%

Table 4 Comparison of turbidity\* for hydrolysis of the gluten, gliadin and glutenin.

	0.01N acetic acid	0.01N acetic acid with 5M urea
Gluten	0.107	0.178
Gluten hydrolysate	0.146	0.263
Gliadin	0.377	0.936
Gliadin hydrolysate	0.619	1.536
Glutenin	0.099	0.144
Glutenin hydrolysate	0.141	0.241

\* O.D. at 660nm

これらの種子タンパク質がそれぞれ多数の分子種が分布した状態で存在していることもあって、まだ詳細に知られていない<sup>11)</sup>。しかし、著者等の実験結果から明らかになったように、リジルペプチド結合のみを特異的に切断するAPIによって、各試料を加水分解（分解率約84%）すると、分子量約10KD以上のペプチドが約75%の収率で得られた。このことから各試料ともリジン相互の位置が比較的離れて存在する割合が多いことが判かる。またC-端にリジンを持つ10KD以上のペプチドが高収率で得られたことは、これを基質としてリジンを縮合させる方法が有望であることを示唆していた。

さらに、加水分解生成物を2-メルカプトエタノールでその-S-S-橋を切断すると、SDS電気泳動パターンから70~100KDのバンドが消失し、各バンドが低分子側に移動していることが認められた。これは加水分解によって、10KD程度のペプチドを遊離しつつ分解されている可能

性を支持している。また、加水分解後各試料とも比粘度の低下が認められたが、特にグルテニンではグリアジンよりも大きな低下率が得られたことは、前者のリジン含量が後者のその約2倍であり、透析後の収率が前者の方が多少大きかったことと矛盾しない。

試料を2-メルカプトエタノール処理しないと、SDS電気泳動で原点に残留する区分が増大したが、これは、グルテンの特徴である酸アミドの存在による水素結合の他に、-S-S-橋による会合により巨大粒子が形成されていることを示している。高濃度（数M）の尿素の共存によって、水素結合等を切断し変性すると明らかに分散性が改善され、同時に加水分解率は著しく増大した。APIは変性剤に対して強い抵抗を示し、例えば5M尿素でも活性度は低下しないことが知られている<sup>6)</sup>。本実験の結果は、穀類タンパク質等の水に対して難溶性の素材を、尿素により分散・変性させてAPIを作用させる方法が有効なことを示している。

起泡性については、実験結果を示さなかったが、加水分解後各試料とも約25%低下した。ペプチド鎖間の相互作用（ネットワーク）が分解によって減少するためであると考えられる。

## 要 約

制限アミノ酸がリジンである小麦グルテンに酵素反応を利用してリジンを導入する目的で、リジールペプチド結合にのみ特異的に作用するプロテアーゼであるAchromobacter Protease Iをグルテンに作用させ、C-末端にリジンを持つペプチドを縮合反応の基質として調製した。すなわち、グルテンとその構成成分であるグリアジンおよびグルテニンを部分精製し、最適条件で充分加水分解させた（分解率約84%）。反応系には5M尿素を共存させ、分解生成物をセロファンチューブの透析内容物（収率約70~75%）として回収した。SDSゲル電気泳

動法により分解生成物の分子量は10KD以上であった。また加水分解により、0.01M酢酸に対する分散性が増大し、また溶液の粘度および起泡性は低下した。

## 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ならびに昭和63年度食品科学振興財団学術研究助成金の援助を受けた<sup>12)</sup>。また研究実験に際して堤將和教授の御指導と吉井忠氏の協力をいただいた。記して衷心より感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Masaki T., K. Nakamura, M. Isono and M. Soejima: Agric Biol. Chem. 42, 1443(1978).
- 2) Masaki T., M. Tanabe, K. Nakamura and M. Soejima: Biochim. Biophys. Acta, 660, 44(1981).
- 3) Masaki T., T. Fujihashi, K. Nakamura and M. Soejima: ibid, 660, 51(1981).
- 4) Masaki T. and M. Soejima: Agric. Biol. Chem., 49, 1867(1985).
- 5) 和光純薬工業K.K.: Wako Information'リシールエンドペプチダーゼ'(1982).
- 6) 正木武治, 副島正美: 農化, 58, 865(1984).
- 7) 遠藤悦雄: 食品開発, 12, 43(1972).
- 8) Laemmli U.K.: Nature, 277, 15(1970).
- 9) Eldridge A.C., P.K. Hall and W.J. Wolf: Food Technol., 120, 1592(1963).
- 10) Montecalvo J., Jr. S. Constantinides and C.S.T. Young: J. Food. Sci. 49, 1305(1984).
- 11) Bietz J.A., F.R. Huebner, J.E. Handerson and J.S. Wall: Cereal Chem., 54, 1070(1977).
- 12) 副島正美: 食品科学振興財団昭和62年度年報, p. 181(1989).

# Improvement of Nutritional Properties of Wheat Gluten Using *Achromobacter* Protease I

## I. Hydrolysis of wheat gluten by *Achromobacter* Protease I

MASAMI SOEJIMA, KIMIYOSHI KOHDA and TAKEHARU MASAKI

In wheat gluten, lysine is the limiting essential amino acid. For the purpose of improvement of nutritional properties of wheat gluten by means of enrichment lysine, *Achromobacter* protease I (API, EC 3. 4. 21. 50) was used as a catalyst of hydrolysis of gluten and of condensation of the gluten hydrolyzate and lysine derivatives. API hydrolyzed lysyl peptide bonds in polypeptide only, therefore, hydrolyzates by API were peptides which had lysine as C-terminal amino acid.

From a 'vital gluten' on the market, partial purified gluten, gliadine and glutenin were prepared. 30mg/ml of each preparation was hydrolyzed by 10 $\mu$ M API with 5.0M urea, 0.01M dithiothreitol, 0.1M phosphate buffer (pH8.5) at 30°C for 20hours. Molecular weight of the most of the hydrolyzates were more than 10KD (yield: 75%). The extent of dispersion to 0.01M acetic acid increased, while the viscosity and foamability of the solution decreased.