

大豆タンパクから生理活性ジ・トリペプチドの生産における加工技術革新

— 連続的に生産・分離・回収できる集積型バイオリアクターの構築 —

園 元 謙 二 (九州大学農学部食糧化学工学科助教授)

1. はじめに

近年、食品については栄養機能(生命維持に不可欠な要素: 1次機能)、物理化学的機能(味, 匂い, 食感: 2次機能)に加えて, 第3の機能(生体防御, 体調調節, 精神の昂揚鎮静作用等に係わる生理活性機能)が注目され始めている。特に, タンパク質の分解物中より発見されるペプチドの持つ生理活性機能は, 低分子ペプチドがアミノ酸やタンパク質と比べ, 易消化・易吸収であること, また微生物の生育促進や代謝の活性化能を有することに付随する副次的な効果と考えられているが, そのメカニズムについては未だ完全には解明されていない。

食品産業, 特に栄養化学における有用なペプチドの生産にはアミノ酸からの合成と安価なタンパク質からの分解法があることは周知の事である。これらの中で酵素法による生産研究は近年飛躍的に注目を集めている。この中で, 食品製造プロセスの見地から, たとえ良い酵素が得られたとしても目的に応じたバイオリアクターの設計が必須である。現在, バイオリアクターは様々な分野で実用化の例が知られているが, 実用的な生理活性ペプチド製造プロセスへの取り組みは活発ではない。特に, 分離精製システムをも組み込んだ集積型バイオリアクターは実験室レベルでの報告例さえも極めて数少ない¹⁻³⁾。その理由として, 酵素の安定化, 基質タンパク質の高分子性, 目的物の低分子性, 製造プロセスの微生物汚染, 等の問題が挙げられる⁴⁾。一般にバイオリアクターでは, 生体

触媒の安定化と再使用性の観点から, 担体結合法や包括法などの固定化技術の導入が考えられるが, 反応基質がタンパク質の場合, 高分子であるため, 固定化酵素との立体障害が生じ, 反応効率の低下や長期連続運転が困難になる。

本研究では, クロスフロー型モジュールを用いた限外ろ過膜型リアクターの構築を目指し, 原料のタンパク質と触媒の市販酵素をリアクター内に保持して, 生理活性ペプチドのみを効率よく連続生産・回収する製造プロセスを検討した⁵⁾。浦上食品・食文化振興財団からの助成によって得られた成果を含め, これまでに得られた成果の概略を示す。

2. 酵素の選択と生成物の生理活性

大豆タンパク質の懸濁液が高粘性であり, 雑菌汚染を防止する意味からもできるだけ高温で酵素反応を行うことが望ましく, また, 遊離アミノ酸の生成を少なくする必要がある。そこで市販の酵素から, 50-60℃に至適温度を持ち, かつ, エキソペプチダーゼ活性のない3種のエンド型プロテアーゼ, ピオタミラーゼP-1000(ナガセ生化学工業), プロテアーゼS(天野製薬), プロテアーゼN(天野製薬)を単独あるいは混合して作用させた。バッチ反応は, オートクレーブ処理をした分離大豆タンパク質懸濁液(5% w/w)に酵素を加え, 50℃で行った。この際, 反応生成物の一応の目安を平均分子量400程度, ジ・トリペプチド収率85%以上, 遊離アミノ酸5%以下とした。生成物の評価は, 可溶性画分の平均分子量, ジ・

トリペプチド収率, 可溶性窒素収率によって行った。ジ・トリペプチド収率は可溶性タンパク質中の含有率を示し, ゲルろ過法により求めた。可溶性窒素収率とは, 単にタンパク質の可溶化の指標である。遊離アミノ酸含量は銅塩法により定量した⁶⁾。酵素活性の測定はアンソニー-荻原変法に準じ, 5%大豆タンパク質を基質としてチロシン相当量に変換した初速度から求めた。その結果, 3種混合酵素, すなわち, ビオタミラーゼ P-1000/プロテアーゼ S/プロテアーゼ N (23.1/14.7/70.9, 0.1% w/v) の時, 反応24時間で目標値を上回った (Table 1)。

この酵素処理上清には, 難分解性のボイド画分と目標生成物であるジ・トリペプチド画分が存在していた。ジ・トリペプチド画分のアミノ酸組成は反応基質である分離大豆タンパク質にほぼ類似したものであり, 必須アミノ酸をバランスよく豊富に含んでいた。さらに, 反応生成物は, マウスを使った栄養・薬理試験の結果, 疲労回復, 肥満防止等にも効果のある生理活性機能を有していた。一方, 分離大豆タンパク質及びジ・トリペプチド画分と同一組成のアミノ酸混合物では, この効果は見られなかった。

これらの結果より, 以後の実験では, この3種混合酵素を用いて, 最適操作条件や繰り返し及び連続反応条件を検討した。

3. 最適操作条件の検討

3種混合酵素の至適温度及び pH は, 60°Cと pH 7 であり, 40°C以下の温度, pH 6 付近で安定であった。大豆タンパク質は全窒素の約15%しか水に溶解しないが, 酵素処理を行うことにより, 約90%の窒素が可溶性となった。残りの約10%は不溶性のペレットを形成した。それ故, 本酵素反応に及ぼす副生成物としてのペレット及び生成物のジ・トリペプチドの影響を調べた。基質の他にペレットを多量に添加し酵素反応を行ったところ, 24時間後の平均分子量に及ぼす影響はほとんどなく, ペレットによる阻害などは無いものと思われる。一方, ジ・トリペプチドを添加した反応では, 平均分子量から評価するかぎり, 若干, 生成物阻害が観察された。この結果より, 連続生産システムの構築に際して, 生成物阻害をできるだけ抑えるために, 連続的に生成物を分離・回収する必要がある。

Fig. 1 は, 大豆タンパク質の酵素処理の典型的な経時変化を示している。分子量 2万から10万の大豆タンパク質が30分足らずで平均分子量約 600まで急激に加水分解され, その後は徐々にボイド画分の低分子化を伴い, 24時間後には平均分子量400以下になることが分かる。水難溶性の大豆タンパク質の急激な可溶化は, 可溶性窒素収率が30分後で約80%となることから明らかであり,

Table 1 Enzymolysis of Isolated Soybean Protein with Different Protease(s)

Enzyme(s)	Weight (g)	Total unit	Yield (%)	AMW ^{a)}
P ^{b)}	109	13,700	84.5	425
S ^{c)}	109	34,700	88.0	509
N ^{d)}	109	27,800	94.1	417
P/S	54.4/54.4	24,200	84.6	396
S/N	54.4/54.4	31,300	83.0	445
N/P	54.4/54.4	20,700	86.5	397
P/S/N	23.1/14.7/70.9	25,700	89.6	377

^{a)}Average molecular weight ^{b)}Biotamilase P-1000 (Nagase)

^{c)}Protease S (Amano) ^{d)}Protease N (Amano)

Reaction was carried out at 50°C in 100ml of the reaction mixture containing 5.0% substrate. Average molecular weight and yield were estimated after 24h of the reaction.

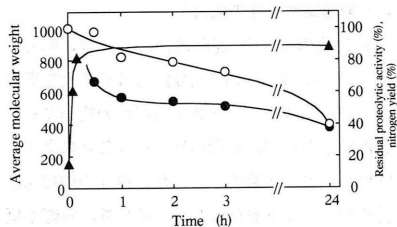


Fig. 1 Time courses of enzymolysis of isolated soybean protein. (●) Average molecular weight, (○) residual proteolytic activity, (▲) nitrogen yield.

24時間後では90%以上の値を示した。しかしながら、残存酵素活性は徐々に減少し、24時間後で初期活性の約40%となった。それ故、種々の条件下における3種混合酵素の安定性を検討した。ジ・トリペプチド溶液中での残存酵素活性の変化は上述したものと同じで、また、酵素溶液のみをインキュベートした場合、3種混合酵素間の自己消化が顕著に生じ、3時間で約50%の酵素活性が失われた。しかし、5%基質の逐次添加では、非常に安定となったことから、高効率な連続システムの構築のためには、反応系からの生成物の除去と同時に、酵素と基質の共存状態を保つ必要があることが示唆された。

4. 3種混合酵素系の操作安定性

生成物の回収と酵素の長期にわたる操作安定性を調べるために、攪拌式セル限外ろ過濃縮器を用いたメンブレンリアクターによる繰り返し反応を行った。1回目の反応は、10mlの2.5%基質、0.1% 3種混合酵素を50°Cで22時間反応し、その後、0°Cで窒素ガスを用いてタンク内の総量が5mlになるまで加圧ろ過を行った。限外ろ過膜は3種混合酵素が完全に保持される分画分子量1万のものを用いた。2回目の反応は、5%基質5mlをタンク内に投与し、50°Cで22時間反応した。この操作を21回繰り返し行い、得られたろ液、すなわち生成物の平均分子量とタンパク質濃度を測

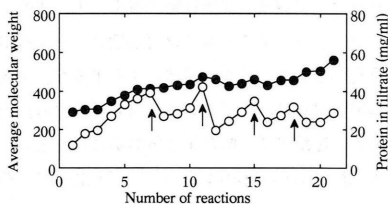


Fig. 2 Repeated batch production of di- and/or tri-peptides in stirred tank with ultrafiltration membrane. (●) Average molecular weight of permeate, (○) protein in permeate. Arrows show removal treatment of pellet in the tank by centrifugation.

定した (Fig. 2)。加圧ろ過は一種の濃縮操作であるため、反応を繰り返す毎にタンパク質濃度は徐々に増加し、さらに副生成物であるペレットがタンク内に多大に蓄積した。その結果、反応液は相当高粘性となり過操作は困難となったので、タンク内の反応液を遠心分離し、得られた上澄を次反応の酵素溶液として用いた (図中の矢印)。本繰り返し反応では、このような処理を必要としたが、得られた生成物の平均分子量は、10日後で435、18日後で455であり、また、ジ・トリペプチド収率に換算しても21日後で80%を上回っており、3種混合酵素の操作安定性は良好なものであった。

5. 集積型バイオリアクターの構築

ジ・トリペプチドの連続生産を目指し、Fig. 3のような生成物の分離システムを考慮したクロスフロー型モジュールを用いるメンブレンリアクターを検討した。リアクター内の反応混合物は、ポンプにより4の分画分子量1万の限外ろ過膜をセットしたモジュールに送り込まれる。3種混合酵素はリアクター内と循環系に完全に保持されている。様々な操作条件を検討した結果、特にリアクター中の酵素濃度および連続操作の希釈率が生成物の平均分子量に大きく影響を与えていることがわかった (Fig. 4)。最適条件下での2週間の連続運転中、生成物は目標とする平均分子量400程

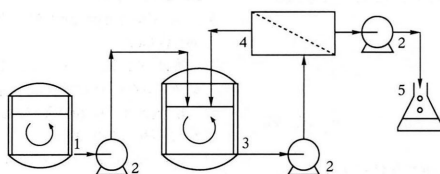


Fig. 3 Schematic diagram of cross-flow membrane reactor. 1 Substrate reservoir, 2 peristaltic pump, 3 reactor, 4 cross-flow ultrafiltration membrane module, 5 permeate.

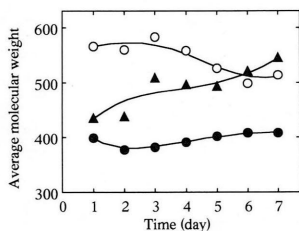


Fig. 4 Comparison of continuous production systems with cross-flow membrane reactor. Substrate 5.0% w/w, working volume 110–120ml, ultrafiltration membrane molecular weight cut-off 10,000.

度、ジ・トリペプチド収率85%以上を維持することができた (Fig. 5)。ところで、残存酵素活性はこのようなシステムでも2週間後で10%以下に低下したが、目的とする生成物を2週間連続して回収できたのは、酵素の保持のために用いた限外ろ過膜により生成物もある程度分画されるメンブレン効果に起因するものと考えられる。

6. おわりに

以上述べたように、消化や代謝によって活性化される生理活性ペプチドの製造プロセスに関する工学的な取り組み、すなわち、安価なタンパク源

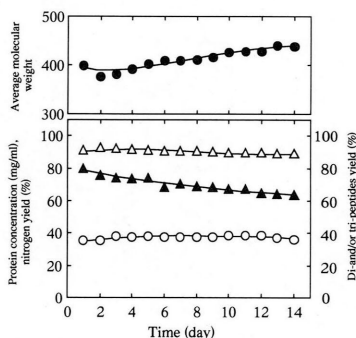


Fig. 5 Continuous production of di- and/or tri-peptides with cross-flow membrane reactor. Substrate 5.0% w/w, enzyme concentration 0.1% w/w, dilution rate 0.5 day⁻¹, working volume 110ml, ultrafiltration membrane molecular weight cut-off 10,000. (●) Average molecular weight of permeate, (○) protein concentration in permeate, (▲) nitrogen yield, (△) di- and/or tri-peptides yield in permeate.

である大豆タンパク質を酵素分解し、目的物を効率的にかつ連続的に生産・分離・回収できる集積型バイオリアクターシステムの構築に成功した。これらの成果は、従来の回分生産プロセスに伴う煩雑な工程管理及び品質管理の簡略化、生産物の分離・精製プロセスの一体化を促すものと思われる。

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜り

ました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) W.D. Deeslie and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **46**, 1035 (1981).
- 2) W.D. Deeslie and M. Cheryan, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2257 (1981).
- 3) A. Mannheim and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **55**, 381 (1990).
- 4) 実践バイオリアクター, 食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編, 食品化学新聞社 (1990).
- 5) K. Sonomoto and Y. Okamoto, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **750**, 435 (1995).
- 6) J.R. Spies, *J. Biol. Chem.*, **195**, 65 (1952).

Integrated Bioreactor System for Biologically Active Di-and/or Tri-peptide from Isolated Soybean Protein

Kenji Sonomoto (Department of Food Science and Technology, Kyushu University)

Functionalities of foods have been greatly attracted in food biotechnology. Especially, peptides activated by digestion and metabolism are known to have physiological functions such as control of obesity, adult diseases, immune system, cell differentiation and proliferation. In this paper, we have attempted biologically active di-and/or tri-peptide production by enzymolysis of isolated soybean protein. Integrated bioreactor with down-stream system for continuous production of the peptides was also developed by the use of ultrafiltration membrane.

Among the commercially available endopeptidases from different sources tested, mixture of three kinds of proteases (Biotamilase P-1000/Protease S/Protease N, 23.1 : 14.7 : 70.9, w/w) gave efficient production of di-and/or tri-peptide mixture (average molecular weight, *ca.* 400). The peptide mixture so obtained showed biologically active functions in mammalia, such as control of obesity and fatigue. Hardly water-soluble isolated soybean protein was sufficiently hydrolyzed at 50°C by the use of protease mixture. The reaction yield on nitrogen was about 90% and the yield of the desired peptides was over 85% after 24h of the reaction in 100ml of the reaction mixture containing 5.0% substrate and 0.1% enzyme mixture. Optimum pH and temperature of the enzyme reaction were 7 and 60°C, respectively. Repeated batch system with ultrafiltration membrane (MWCO, 10,000) resulted in a stable productivity for 20 days. Furthermore, the desired product was continuously and efficiently obtained for two weeks by using cross-flow membrane reactor.