総 説

プ ラ ス テ イン 合 成 反 応

たん白質資源の栄養価と食用適性改良への応用

荒 井 綜 一, 山 下 道 子, 藤 巻 正 生

東京大学農学部農芸化学科

Plastein Synthesis Reaction

Application to Improvement of Nutritive Values and
Eating Qualities of Protein Resources

Soichi ARAI, Michiko YAMASHITA and Masao FUJIMAKI

Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo

The current paper attempts to review the studies on plastein synthesis reaction, with emphasis on its applications in the food and nutrition area. This reaction is known as an enzymatic process in which, reverse to the conventional proteolysis, a peptide mixture grows to polymerize under an unconventional condition of incubation, with formation of the so-called plastein. A topical finding has been made that almost arbitrary amounts of amino acids can be incorporated during the plastein reaction when they are esterified on use. It is thus possible to enhance the essential amino acid levels of food proteins. Their eating qualities also can be generally improved through the plastein reaction. Significance of this enzymatic process was discussed in special relevance to the peptide nutrition in animal and also to the food utilization of protein resources.

(Received July 23, 1976)

1. は じ め に

世界的な食糧不足の到来を憂える声が、最近とくに高まっている。世界の人口がいまのまま増加しつづけると、35年後には現在の倍の人口になると推定されており¹⁾、食糧資源確保のための各国の協力体制の必要性がさげばれつつあることは、たとえば第10回国際栄養学会議(京都, 1975)においても、如実に知ることができる²⁾。このような情勢のなかで、新しいたん白質資源の開発が最重点課題の一つとして脚光をあびていることは周知の事実である。

たしかに、新たなたん白質資源の開発は重要である。しかし食品学的立場からみれば、新たに開発されたたん白質資源が、たとえ栄養価が高く、安全性などの点で問題がなくても、ただちに食糧たん白質として受け入れられるとはかぎらないのである³⁾。ここに、食糧としてのたん白質の利用上の課題、すなわち「たべやすさ」(acceptability)改良の研究の必要性が生じてくる。このことは、われわれ先進国のぜいたくな願望とばかりとはいえない。

い。例をアフリカのある開発途上国にとれば、この国では多くの人が深刻なたん白質栄養不良にかかっているのであるが、これを治療するために与えられたダイズたん白質を、人々はそれが不快な豆臭をもつというだけの理由で廃棄し、甘んじて栄養不良の現状を耐えている実状が報告されている⁴⁾。

完全に精製されたたん白質は、本来無味無臭のはずである。もし、あるたん白質に臭味があると感じるなら、その原因はたん白質に混在している不純物としての臭味成分にある。たん白質はその構造の多様性のために、各種の小分子物質と相互作用する。とくに、臭味物質との相互作用について最近いくつかの報文が提出されている^{5)~7)}。場合によってこの相互作用はきわめて安定であり、通常の蒸留・抽出操作でこの臭味成分を完全に除去することは困難である⁸⁾。Fujimaki ら⁹⁾ および Arai ら^{10)~13)} は、ダイズの不快臭成分を詳しく検索し、その代表的成分がダイズたん白質と強固に相互作用することを見だし、相互作用のさいの熱力学的パラメーターを測定している⁹⁾。この種のたん白質結合性臭味成分を完全に遊離させ、除去するためには、たん白質を分解しなくてはならない。Fujimaki ら¹⁴⁾ はたん白質分解酵素を

用いてたん白質を部分分解することにより、これを達成した。Noguchi ら¹⁵⁾ もまた同様の酵素分解法を用い、各種のダイズたん白質製品から臭味を除去することに成功したが、臭味成分のみならず、その前駆体となりうる脂質をも同時に効果的に除去できることを見いだした。さらに Fujimaki ら¹⁶⁾ はこの方法を *n*-パラフィン質化性酵母菌体から得たたん白質に適用し、臭味成分、脂質(奇数炭素脂肪酸を含む)、長鎖脂肪族炭化水素、それに癌原の可能性があるかもしれない多環芳香族炭化水素などの有効除去を得ている。このように、たん白質分解酵素処理は被分解たん白質に混在している不純物一般を除去するうえに効果的な方法であるといえよう。

たん白質分解酵素処理の結果得られたたん白質水解物は、食品素材として利点と欠点とをもちあわせる。利点の一つは、水に対する溶解性、あるいは分散性に優れることである。この点に関しては、とくに魚たん白質濃縮物(FPC)を酵素分解して可溶化し、食品としての利用度を高めることに向けた多くの研究がある^{17)~20)}。第2の利点は、旨味の生成である。みそやしょう油に範をとって考えれば、たん白質の分解によって旨味が生成することは容易に予測される。Fujimaki ら²¹⁾ および Noguchi ら²²⁾²³⁾ は FPC をさまざまな種類のたん白質分解酵素で処理し、旨味が最も有効に生じる条件を検討し、さらに、L-グルタミン酸以外の旨味成分として、いくつかのグルタミン酸オリゴペプチドを分離・同定している。たん白質の酵素修飾物の旨味に関しては、Arai ら²⁴⁾²⁵⁾ も同様の報告をだしている。

以上の2点のほかにも、いくつかの利点をたん白質水解物は兼ね備えるであろうが、これらの利点をたいていの場合おい隠してしまうほどの大きな欠点がある。それは苦味である。たん白質を酵素分解する過程で苦味が生じる現象は古くから知られており、苦味の本体は酵素分解によって生成したある種のペプチドであると予想されていた^{26)~30)}。Fujimaki ら³¹⁾³²⁾ はダイズたん白質のペプシン水解物から苦味ペプチドをはじめて分離・同定した。ひきつづき Yamashita ら³³⁾ および Arai ら³⁴⁾ は、苦味ペプチドと構造の特徴について報告した。時をほぼ同じくして、Matoba ら³⁵⁾³⁶⁾ はカゼインのトリプシン水解物から苦味ペプチドを分離し、構造を決定した。一方、化学合成的に苦味ペプチドを調製し、その構造の特徴をしらべる研究が進められている³⁷⁾。また、これに関連した総説³⁸⁾が書かれている。

上記したような苦味ペプチドの基礎研究は化学的にみて非常に興味深いことではあるが、実際の食品加工の観点からすれば、たん白質水解物の苦味をいかに消去するかの方が重要であるのは当然であろう。Arai ら³⁹⁾ は、ダイズたん白質のペプシン水解物にエキソペプチダー

ゼ、とくにカルボキシペプチダーゼを作用させることによって苦味強度が低減することを見いだした。いわばこの種の苦味消去法は、たん白質水解物の再水解である。これとはまったく逆のアイデアからの苦味消去法として、プラスティン反応がある。

プラスティン反応とは、通常のとたん白質分解酵素反応とは逆に、低分子ペプチドから高分子ペプチドを酵素的に合成する非通常反応のことである。後で詳しく述べるように、プラスティン反応に最適の基質はたん白質をたん白質分解酵素で適度に水解したものである。そしてプラスティン反応の結果、このようなたん白質水解物から再合成された高分子ペプチド混合物を一般にプラスティンとよんでいる。歴史的にみると、この反応は、1950年代以前、たん白質生合成との関連でいくつかの研究がなされた^{40)~48)}。しかし1950年代後半にたん白質生合成開始機構にかかわるアミノ酸活性化の機作が解明されはじめ^{49)~51)}、1960年代にはいって DNA-RNA 系を経由したたん白質合成が定説化するとともにプラスティン反応の研究は衰退し、わずかに酵素学的興味からの2,3の報文がだされたにすぎない状況にあった^{52)~54)}。

Arai ら⁵⁵⁾ は、前述したようなダイズたん白質の酵素分解の研究の過程でプラスティン合成反応が同時に併行して進行する可能性に着目した。Fujimaki ら⁵⁶⁾⁵⁷⁾ は α -キモトリプシンによるプラスティン反応が積極的に進行する条件をととのえ、これをダイズたん白質のペプシン水解物に適用したところ、反応時間とともにトリクロル酢酸(TCA)不溶性の物質が増加し、それにつれて苦味はきわめて効果的に減少することを認めた。おそらく、これがプラスティン反応を食品加工の面に応用した最初の研究であろう。

プラスティン反応の応用価値をよりいっそう高めるかもしれない実施例として、プラスティン合成過程でのアミノ酸の導入がある。Yamashita ら⁵⁸⁾ はダイズたん白質水解物に L-メチオニンをエチルエステルにして混合し、この混合物を基質にしてパバイン触媒のプラスティン反応を行なったところ、メチオニンがペプチド結合状に導入されたプラスティンが高収量で得られることを見いだした。このようなプラスティン反応過程でのアミノ酸エステルの導入反応は、いままでに報告されたことのない新しい反応であり、基礎的にも応用的にもきわめて興味深い要素を含むので、後ほど詳しく述べることにする。

以上のように、原料たん白質をたん白質分解酵素で部分分解することによって臭味成分を含めた不純物一般を遊離・除去することができ、ついでたん白質分解酵素逆反応、つまりプラスティン合成反応によって苦味の消去、さらにはアミノ酸組成の改変が可能である。この一

連のプロセスに関しては、すでにいくつかの総説^{59)~67)}が書かれているので参照されたい。本稿では、このプロセスの鍵段階であるプラステイン反応——とくにアミノ酸導入を伴ったプラステイン合成に焦点をあわせ、話をすすめていくことにする。

2. プラステイン合成反応の特徴

a. 反応条件

プラステインを効率よく合成するためには、次の3条件が不可欠である。第1は、基質が平均分子量1000程度の低分子ペプチド混合物であるという条件である^{68)~70)}。実際にはこの基質としてたん白質の酵素水解物が用いられるが、最も適した水解度(全ちっ素当たりの10% TCA可溶性ちっ素百分率)は80~85%である⁶⁹⁾。第2は、基質濃度を30~50% (w/v)の高濃度にするという条件である⁷¹⁾。そして第3は、反応系のpHを4~7に保つという条件である⁷²⁾。このpH条件は使用する酵素の種類に依存しないので、たん白質水解反応でのpHと大きくずれる場合がある。たとえばペプシンの場合、その水解最適pHは1~2であるが、合成最適pHは4~5であり、 α -キモトリプシンでは水解最適がpH 7~8であるのに、合成最適はpH 5~6になる。

b. 反応様式

α -キモトリプシンの水解反応に関与するおもな残基は、Ile-16, His-57, Ser-195であることが知られている⁷³⁾。Tanimotoら⁷⁴⁾は、キモトリプシンノーゲン、His-57のイミダゾール(3-N)をメチル化した α -キモトリプシン、Ser-195の β -Oをジソプロピルフォスフォル化した α -キモトリプシンを用いてプラステイン反応を行なったが、いずれの場合もプラステインは得られなかった。このことから、水解反応と合成反応との間に触媒機作の本質的差異はないと結論される。Yamashitaら⁷⁵⁾は、基質(ダイズグロブリンのペプシン水解物)の全カルボキシル基を ^{18}O で標識しておく、プラステイン反応初期過程で H_2^{18}O の急激な遊離と、同時に反応系のアミノ基量に一時的減少のあることを観察した。この実験事実と上記Tanimotoらの報告⁷⁴⁾とから、基質ペプチドC末端カルボキシル基がまず α -キモトリプシンと反応して水が遊離し、ペプチジル酵素中間体が形成され、ついでこれを他の基質ペプチドのN末端アミノ基がHis-57の一般酸塩基触媒によって親核攻撃し、ペプチド結合が新生するという反応——つまり結果的に分子間脱水縮合反応——が起きていると推定される。さらに、カルボキシル基を還元してアルコールにしたペプチド、あるいはアミノ基をアセチル化したペプチドからプラステインが生成しにくいことが確認されている⁷⁶⁾。以上の実験結果を総合して考えると、プラステイン反応の初期過程

に関するかぎり、脱水縮合反応が主反応であると結論される。これは、20年前のVirtanenの予測⁴⁵⁾の実験的証明でもあろう。このような初期過程を経た以後にはHorowitzおよびHaurowitz⁴⁶⁾がいうところのペプチド転移反応が活発になるのであろう。著者らも、このことはすでに認めている⁶⁹⁾。

c. 動力学

すでに述べたように、たん白質水解物を高濃度にし、pH 6で α -キモトリプシン存在下でインキュベートすると高分子化(TCA不溶画分の増大)の反応が優位に進行するが、他の条件を一定にし、この基質の濃度だけを減少していくと、やはり通常的水解反応(TCA不溶画分の減少)が見かけ上優勢になる。しかし、低基質濃度の条件でも潜在的には高分子化反応、すなわち逆反応が進行しうると考えられる。このような考えの根拠となる実験結果⁷⁶⁾を簡単に述べたい。基質として変性オボアルブミン、酵素として α -キモトリプシンを用い、pH 6.0, 37°Cで反応を行なった。解析の簡便化のため、TCA不溶画分量を基質濃度 $[S]$ 、TCA可溶画分量を生成物濃度 $[P]$ とし、 $[P]/([S]+[P])$ をもって基質の分解率 x とした。まず $[S]_0=0.01$ (g%)という低濃度で反応時間 t と分解率 x の関係をしらべると、通常のMichaelis-Menten式の積分式に従った。基質濃度を10倍にして $[S]_0=0.10$ (g%)とすると上式に従わなくなり、生成物による拮抗阻害を考慮した式に適合した。つぎに $[S]_0=1.00$ (g%)にすると、分解速度は見かけ上さらに遅れ、 t と x の関係は可逆過程を表わす積分式に近似するに至った。以上の結果が示唆することは、 $[S]_0=0.10$ という低基質濃度においてさえ生成物(低分子ペプチド)からペプチジル酵素が形成され、 $[S]_0=1.00$ にもなるとこのペプチジル酵素が他の基質ペプチドの親核攻撃を受けて高分子化する過程が有意に現われるということである。おそらく、前述の $[S]=30\sim 50$ (%)という高濃度のもとでは、この親核攻撃の確率頻度が著しく高まり、TCA不溶画分生成へ向う反応が全体を代表すると考えられる。これが、プラステイン合成反応である。反応が巨視的に水解に向うか合成に向うかの境は、 $[S]=7.5$ (g%)であることが確かめられている⁷⁷⁾。一方、基質濃度を増大させる代わりに、逆に水濃度を減少させた場合の効果につき、実験が行なわれている⁷⁷⁾。すなわち、水濃度は反応媒体の一部を有機溶媒で置き換えることにより減少させた。酵素としては有機溶媒中で安定な固定化キモトリプシンを用いた。その結果、40%アセトン系および40%ジオキサン系でのプラステイン合成速度は、水系でのそれよりも大きいことが見いだされた。

d. 反応推進力

脱水縮合によって一つのペプチド結合が新生する反応

は標準状態では吸エルゴン過程であり、 $\Delta F^\circ = 0.4$ (kcal) 程度であるといわれる⁷⁹⁾。このような反応を有効に推し進めるためには、前述の基質濃度条件を人為的に整えてやるとともに、生成物が反応系外に除去されることが必要である。通常はプラステイン反応の進行に伴って生成物分子表面に疎水領域が発達し、分子間疎水結合を通じて集合し、沈殿して系外除去されることが確かめられている^{79)~81)}。Tanimoto ら⁸²⁾ は生成物の塩析性に着目し、塩存在下で反応を行なうことにより、プラステイン合成速度を高めた。たとえば α -キモトリブンを 사용하는場合、オボアルブミン水解物からのプラステイン合成の速度は反応系の食塩濃度を約 1 M にしておくで最大になる。Arai ら⁸³⁾ は、ある一つのたん白質水解物がプラステイン反応の基質として適しているか否かを簡単に見わけのための実用的パラメーターとして β/α という値を提出した。 α はプラステイン生成量 (TCA 不溶画分量)、 β は反応系溶媒中での生成物の不溶画分量である。カゼイン水解物のように親水性の高い基質からはプラステインがあまりよく生成しないが、この場合 β/α は 0.4 以下にある。逆に、ツェイン水解物などはきわめて疎水性が高い。しかし、このものからのプラステイン収量はやはり低い。この場合の β/α は 0.6 以上である。プラステインを生成しやすい基質としてダイズたん白質水解物、オボアルブミン水解物などが挙げられるが、いずれの場合にも β/α は 0.5 付近になる。 β/α が非常に小さい基質と非常に大きい基質とを適当に混合し、 β/α が 0.5 となるようにすると、プラステインが高収量で得られることがわかっている。

3. アミノ酸導入を伴うプラステイン反応

a. モデル系

プラステイン合成反応の条件下で、たん白質水解物、すなわち低分子ペプチド混合物にたん白質分解酵素を作らせるとペプチジル酵素中間体が形成され、これが別のペプチドによって親核的に攻撃されて新しい一つのペプチドが合成される経緯はすでに述べた。麻生ら⁸⁴⁾ はこの中間体の簡単なモデルとして馬尿酸パバインを用い、親核試薬としてペプチドの代わりにアミノ酸エステルを用いた。十分量の馬尿酸エチルエステルをパバインとインキュベートして *in situ* で馬尿酸パバインをつくっておき、これに各種アミノ酸のエチルエステルを添加すると、馬尿酸とアミノ酸エチルエステルとが結合する。すなわち *N*-ベンゾイルグリシルアミノ酸エチルエステルが生成する。しかしこの生成反応は特異的で、添加したアミノ酸エチルエステルの種類に依存する。反応速度が最大なのは、トリプトファンエチルエステルである。アミノ酸の種類による反応速度の順序は $\text{Trp} > \text{Phe} > \text{Nva}$

$> \text{Leu} > \text{Met} > \text{Tyr} > \text{Aba} > \text{Ala} > \text{Gly} \doteq \text{Val} \doteq \text{Ile}$ (略号: $\text{Nva} = \text{ノルバリン}$, $\text{Aba} = 2\text{-アミノ酪酸}$) で、明らかにアミノ酸側鎖の疎水性と相関する。例外は β -分枝をもつバリンとイソロイシンで、疎水性は高いにもかかわらず、おそらく立体障害のために、反応性は著しくわるい。しかし、このような β -分枝アミノ酸、あるいは疎水性度の低いグリシンやアラニンでも、*n*-ヘキサノールなどの疎水性が高いアルコールでエステル化しておけば、反応性は著しく改良される。

b. 実 際 系

基質としてオボアルブミンのパバイン水解物を用い、これに各種アミノ酸エチルエステルのおのおのを添加してパバイン存在下でインキュベートすると、これらのアミノ酸がペプチド結合状に導入される。その機構は、上記モデル系におけると同様と考えられる。麻生ら⁸⁵⁾ は各アミノ酸エチルエステルの導入率 (添加量に対する導入量の百分率) を測定し、次の結果を得た。Trp, 91.0%; Ile, 88.2%; Phe, 86.9%; Leu, 85.0%; Met, 84.9%; Nva, 81.0%; Tyr, 75.1%; Aba, 66.2%; Ala, 30.0%; Gly, 19.6%; Ile, 9.0%; Val, 8.8% (略号: $\text{Ile} = \text{ノルロイシン}$)。これは、モデル系での結果とよく類似している。モデル系での場合と同様、疎水性度が高いアルコールでエステル化しておけば反応性は一般に向上する。たとえば *n*-ヘキシルエステルにすることにより、イソロイシンは 61.1%, アラニンは 90.7% の導入率にまでなる。なお D 型アミノ酸はエチルエステルにせよ、*n*-ヘキシルエステルにせよ、この種の反応にまったく関与しない。

c. サブサイト親和性

通常の α -アミノ酸エステルのアミノ基の pK 値は、ほとんど一定である。つまりアミノ基の電荷にはほとんど差がない。にもかかわらず、アミノ酸エステルの親核反応性に上記のような特異性があるのは、酵素パバインとの親和性の差異が原因であると考えられる。事実、麻生ら⁸⁴⁾ は、この反応性は最大反応速度 $V_{\max}$ には関係せず、みかけの Michaelis-Menten 定数 $K_{N^{\text{APP}}}$ とよく相関すると報告している。一般に酵素と基質との親和性を論じる場合、酵素のサブサイトと基質の残基側鎖との適合性を想定するとわかりやすい。パバインでは、His-159 が一般酸塩基触媒の役割を果たし、Cys-25 がアシル中間体形成部位であり、この両残基が中心になって触媒部位を形成していることが知られている⁸⁶⁾。Schechter および Berger⁸⁷⁾⁸⁸⁾ によれば、この触媒部位の両側に七つの補助的な部位、すなわちサブサイト $S_1 \sim S_4$, $S_1' \sim S_4'$ が存在するという (Fig. 1)。いま、プラステイン反応の過程で一つの基質ペプチドがパバインと反応してペプチジル酵素をつくり、これをアミノ酸エステルが親核攻撃

Fig. 1. Estimated mode of interaction among a peptide, papain and an amino acid ester for the formation of a ternary substrate-enzyme-nucleophile complex followed by the production of an amino acid-incorporated peptide.

Symbols: R_1 - R_4 , amino acid side-chains of the substrate; R_1' and R_2' , amino acid side-chain and alcohol chain of the nucleophile; S_1 - S_4 and S_1' - S_3' , designations of the seven subsites of papain.

するさい、Fig. 1 のような 3 者複合体が形成されると考えられる。この場合、アミノ酸側鎖 R_1' とサブサイト S_1' 、アルコール鎖 R_2' とサブサイト S_2' が適合しうるが、この適合の親和性がアミノ酸導入率を左右すると推察される。たん白質分解酵素反応における、このようなサブサイト親和性と親核試薬の反応性との関係については、酵素化学の分野で最近多くの研究がなされている^{89)~94)}。これらの知見は、プラステイン反応過程でのアミノ酸導入の機作を考察するうえにきわめて示唆的である。また、上記の麻生ら⁸⁴⁾⁸⁵⁾の基礎データは、実際の食糧たん白質にプラステイン反応を通じて有用アミノ酸を導入する応用研究に役立てられる。以下、いくつかの応用例を示す。

4. 応用例

a. メチオニン導入プラステイン

プラステイン反応の応用で興味深いのは、アミノ酸導入によるたん白質の栄養価の改良と加工機能性 (functional property) の改変である。前者の例として Yama-shita ら⁹⁵⁾ はダイズたん白質のペプシン水解物にメチオニンを導入した (Fig. 2)。この水解物と L-メチオニンエチルエステル (塩酸塩) の 10:1 混合物をパパイン存在下でインキュベートして得たプラステインのメチオニン含量は 7.22% で、この値は原料ダイズたん白質のもともとのメチオニン含量の約 7 倍に相当する。導入されたメチオニン残基がプラステイン分子の C 末端に多く存在していることが、次の実験から確かめられた⁹⁶⁾。まずプラステインにカルボキシルペプチダーゼ A を作用させ

Fig. 2. Process for producing a methionine-incorporated plastein from a soy protein isolate.

Symbols: $[S]_0$ and $[E]_0$, initial concentrations of substrate and enzyme in the medium.

ると、メチオニンが他のアミノ酸にくらべて著しくはやい速度で遊離した。プラステインのカルボキシル基をメ

チル化したのち、 LiBH_4 で還元し、6 N HCl で水解して、C末端アミノ酸からのアミノールを得た。これを2,4-ジニトロフェニル (DNP) 誘導体にし、薄層クロマトグラフィーでDNPメチオノールを定量した。この結果、C末端の84.9%がメチオニン残基で占められていることがわかった。導入されたメチオニンがこのようにプラステインのC末端に主として存在するという実験結果は、アミノ酸エステルが親核試薬として行動するという前述の仮説 (Fig. 1) の裏づけとなろう。つぎに、メチオニン導入プラステインの栄養価をラット飼育試験で求めた⁹⁵⁾。ただし、このプラステインのメチオニン含量 (7.22%) は高すぎるので、3倍量のダイズたん白質で希釈し、メチオニン含量を2.74%に調整してから用いた。この試料のたん白質効率 (PER) は 3.38 ± 0.08 であり、対照試料であるカゼインの $PER\ 2.40 \pm 0.05$ よりも優れていた。フレーバーの点からみると、このプラステインは完全に無味であり、メチオニンが高含量であるにもかかわらず、硫黄化合物臭はほとんど感知されなかった。貯蔵中にもメルカプタン性オフフレーバーの発生は軽微で、その安定性はポリメチオニンに匹敵することが示されている⁹⁴⁾。Arai ら⁹⁷⁾ は、ダイズたん白質からメチオニン導入プラステインを拡大規模で製造するための実用的プロセスを開発している。この場合、生成物を70%エタノール処理により精製するが、精製されたプラステインのメチオニン含量は約8%にも達する (Table 1)。

b. リジン導入プラステイン

リジンはプラステイン反応で導入しにくいアミノ酸である。おそらく、その原因はε-アミノ基にもとづく側鎖の親水性にあり、サブサイト S_1' に対する親和性が十分に高くないためと考えられる。リジンの親核反応性を疎水性アミノ酸のそれにまで近づけるためには、ε-アミノ基をアセチル化するか、あるいは疎水性の高いアルコールでエステル化しておく必要がある⁹⁸⁾。もしリジンのエチルエステルを使用するのなら、その濃度をきわめて高くせざるを得ない。著者らは最近、リジンエチルエステルを高濃度に加えることにより、グルテン水解物に多量のリジンを導入した。まず、市販グルテンを0.01 N NaOH に溶解し、アルカリ性プロテアーゼで水解度が85%になるまで水解した。得られた水解物 (乾燥重量10 g) にリジンエチルエステル (2塩酸塩) を所定量 (1, 2, 3, 4, 5 g) 添加し、各混合物を基質 (グルテン水解物) 濃度が35% (w/v) になるように20%アセトン (0.01 M L-システイン含有) に溶解し、パパインを基質の1/100量加え、37°Cで48時間インキュベートした。インキュベーション後、全反応混合物を限外濾過膜 (Amicon UM-05) に通し、分子量500以上の画分をプ

ラステインとして取得した。リジン導入量は添加したリジンエチルエステルの量に依存し、基質10 gに対して5 g添加したときに導入量は最大に達した。そのさいのプラステイン中リジン含量は約16%であった (Table 1)。

c. リジン・メチオニン・トリプトファンを同時導入したプラステイン

たいていの食糧たん白質は、多かれ少なかれ、リジン、メチオニン、トリプトファンが不足であるのは周知のとおりである。プラステイン反応により、この三つのアミノ酸を、それぞれの不足を補う分だけ同時に導入してやれば、必須アミノ酸組成に関しては理想型に近似したプラステインが合成できると期待される。Arai ら⁹⁹⁾ は、出発原料として光合成資源から抽出したたん白質を用いた。光合成たん白質資源は未来の食品素材として注目されはじめているが、最近とくに研究の対象となっているのは藍藻¹⁰⁰⁾、紅色細菌¹⁰¹⁾、そして緑葉¹⁰²⁾¹⁰³⁾ である。しかし、これらは多量の光合成色素を含有しているので、いかにして無色の基質を調製するかが最初に問題となる。Arai ら⁹⁹⁾ は藍藻 *Spirulina maxima* と非硫黄紅色細菌 *Rhodospseudomonas capsulatus* を試料にし、次のような操作を行なった。各試料をエタノール処理して、大部分のクロロフィルとカロチノイドを除去した。残渣を希 NaOH に懸濁しつつ機械的に細胞を破壊し、アルカリ可溶画分を流水透析して非透析性画分を得た。このようにして得られたたん白質は褐色を呈していて、セファデックス G-15 で処理しても脱色されない。この褐色たん白質をペプシン水解し、水解物をセファデックス G-15 のカラムに通したところ、褐色色素は吸着され無色のたん白質水解物が溶出された。このようにして無色の藍藻たん白質水解物、細菌たん白質水解物を得た。また、緑葉として白クローバーを選び、その抽出たん白質のペプシン水解物を調製した。この3種類のたん白質水解物を基質とし、これにL-リジン、L-メチオニン、L-トリプトファンのエチルエステルを Table 2 のように配合し、パパインを用いてプラステイン合成を行なった。配合量は、各アミノ酸エステルの親核反応性⁹⁴⁾⁹⁵⁾および目的とする最終導入量を考慮して決められたものである。目的とするアミノ酸組成はFAO/WHO成人男子用試案パターン (1973)¹⁰⁴⁾ である。プラステインは、前記の限外濾過法で得た。収量は Table 2 に示してある。アミノ酸組成は Table 1 のとおりであるが、必須アミノ酸組成をみると、藍藻、細菌、緑葉プラステインのいずれの場合も、FAO/WHOパターンに近似している。

d. グルタミン酸導入プラステイン

ダイズたん白質は加工食品素材として広く用いられているが、水に対する溶解性がわるいため、加工に不便な問題がしばしばおこる。Yamashita ら¹⁰⁵⁾¹⁰⁶⁾ はグルタ

Table 1. Amino acid compositions of plasteins and their material proteins.

Amino acid	Soybean			Wheat		Alga ¹⁾		Bacterium ²⁾		Leaf ³⁾		Fish ⁴⁾	
	Protein	Plastein + M ⁵⁾	Plastein + G ⁶⁾	Plastein + L ⁸⁾	Gluten	Protein	Plastein + LMT ⁹⁾	Protein	Plastein + LMT ⁹⁾	Protein	Plastein + LMT ⁹⁾	Protein	Plastein - P ⁷⁾
		g %		g %	g %	g %	g %	g %	g %	g %	g %	g %	g %
Lysine	5.28	4.78	3.05	3.83	1.7	15.79	4.59	7.75	7.39	6.06	8.23	10.68	10.11
Histidine	2.04	2.20	1.22	1.41	1.9	2.08	1.77	1.91	2.44	1.94	2.01	2.31	1.76
Arginine	5.94	5.61	3.82	4.21	3.3	3.43	6.50	6.70	6.05	3.66	3.84	7.05	4.22
Aspartic acid ¹⁰⁾	8.70	7.76	11.76	18.00	9.6	4.53	8.60	11.87	10.21	11.10	10.45	11.13	13.67
Threonine	2.63	2.11	3.08	4.39	2.5	2.35	4.56	5.42	4.36	5.60	5.93	4.94	4.20
Serine	3.53	2.75	4.46	4.67	4.0	3.78	4.20	4.43	4.63	4.17	4.00	4.59	3.58
Glutamic acid ¹¹⁾	15.00	10.20	41.93	33.56	27.0	30.99	12.60	14.68	9.77	16.00	15.54	17.14	27.17
Proline	4.32	2.18	2.88	2.11	8.0	6.17	3.90	3.62	3.45	3.75	3.57	3.80	4.25
Glycine	4.38	2.55	3.64	3.89	7.0	2.24	4.75	4.76	5.98	5.01	4.79	4.42	3.94
Alanine	3.98	2.65	2.51	2.56	3.0	2.43	6.80	5.80	8.74	6.23	6.05	6.27	4.82
Valine	3.36	4.29	4.34	3.24	4.1	4.33	4.69	6.00	6.56	7.45	7.00	5.88	3.81
Isoleucine	3.00	5.72	2.37	3.83	4.2	3.22	6.03	6.32	4.96	4.98	4.55	5.44	2.81
Leucine	5.17	7.26	3.65	2.43	7.0	5.12	8.02	8.98	8.45	8.86	8.24	8.79	3.69
Ar amino acid ¹²⁾	7.03	9.46	3.38	8.19	5.4	6.02	8.92	8.96	8.16	9.61	9.00	8.24	7.87
{Tyrosine	2.83	3.52	0.88	7.96	1.3	2.07	3.95	3.98	3.21	4.11	3.88	3.94	7.82
{Phenylalanine	4.20	5.94	2.50	0.23	4.1	3.95	4.97	4.98	4.63	5.50	5.12	4.30	0.05
S amino acid ¹³⁾	2.94	9.96	2.80	2.76	—	—	1.77	8.75	3.73	1.82	8.13	3.71	3.31
{Methionine	1.18	7.98	1.20	0.94	—	—	1.37	8.22	2.97	0.85	7.14	2.80	1.90
{Half-cystine	1.76	1.98	1.60	1.82	—	—	0.40	0.53	0.76	0.97	0.99	0.91	1.41
Tryptophan	1.34	1.30	0.70	2.80	—	—	1.40	2.72	2.05	1.51	2.73	1.01	2.98

¹⁾ *Spirulina maxima*, ²⁾ *Rhodospseudomonas capsulatus*, ³⁾ White clover, ⁴⁾ Cod, ⁵⁾ Methionine-incorporated plastein, ⁶⁾ Glutamic acid-incorporated plastein, ⁷⁾ Low-phenylalanine plastein, ⁸⁾ Lysine-incorporated plastein, ⁹⁾ Lysine-, methionine- and tryptophan-incorporated plastein, ¹⁰⁾ Aspartic acid plus asparagine, ¹¹⁾ Glutamic acid plus glutamine, ¹²⁾ Tyrosine plus phenylalanine, ¹³⁾ Methionine plus half-cystine.

Table 2. Formulas of substrates and yields of plasteins.

	Starting material		
	Alga ¹⁾	Bacterium ²⁾	Leaf ³⁾
Dry material	10 g	10 g	10 g
Protein hydrolysate (decolored)	4.74	3.90	2.00
L-Lysine ethyl ester•2HCl	1.18	0.65	0.33
L-Methionine ethyl ester•HCl	0.54	0.35	0.25
L-Tryptophan ethyl ester•HCl	0.10	0.04	0.04
Plastein	4.96	4.08	2.03

¹⁾ *Spirulina maxima*, ²⁾ *Rhodopseudomonas capsulatus*, ³⁾ White clover.

ミン酸を導入することにより、ダイズたん白質から水溶性の高いプラステインの調製を試みた。この場合、グルタミン酸 α -モノエチルエステルは γ -カルボキシル基にもとづく親水性のために反応性は低いので、 α , γ -ジエチルエステルを用いた。この親核反応性は、ノルロイシンエチルエステルのそれに匹敵する。ダイズたん白質のペプシン水解物と L-グルタミン酸 α , γ -ジエチルエステルの 2:1 混合物を基質にし、パパインでプラステインを合成した。反応媒体は 0.01M L-システイン含有の 20% アセトン (pH 5.5), 基質濃度 52.5% (w/v), 酵素基質比 2/100 (w/w), 37°C, 24 時間である。反応生成物を希 NaOH 処理してエステル結合を切断し、流水透析して、非透析性画分をプラステインとして取得した。収量は、ダイズたん白質 10 g から 9.57 g であった。このプラステインのグルタミン酸含量は、40% をこえていた (Table 1)。このものは pH 1~9 の範囲ではほぼ完全に溶解し、100°C で 1 時間加熱しても濁りは生じなかった。平均分子量はポリアクリルゲル電気泳動から 6,240, 等電点分布は焦点電気泳動から pH 1.5~4.0 であり、部分的 α -ヘリックス構造の再生が円二色性の測定から推定された。

e. 低フェニルアラニン性のプラステイン

フェニルケトン尿症治療食として、現在では低フェニルアラニン性のアミノ酸混合物が用いられる。しかし、これは嗜好の点で大きな問題がある。Yamashita ら¹⁰⁷⁾ は、ペプチド状のフェニルケトン尿症治療食をプラステイン反応を利用して試作した。原料として、ダイズたん白質と魚たん白質濃縮物 (FPC) を用いた。原料たん白質をペプシンで予備水解した後、プロナーゼを用いて pH 6.5 という特異条件でさらに水解した。これによってフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンを効果的に遊離させることができる。水解物をセファデックス G-15 に供し、セファデックスの吸着活性を利用した条件での

クロマトグラフィー¹⁰⁸⁾ により、上記の三つのアミノ酸を除去した。これによって得られたペプチド画分のフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン含量はわずかであった。つぎに、このペプチド画分にチロシンとトリプトファンのエチルエステルを配合し、パパインでプラステイン反応を行ない、限外濾過によってプラステインを得た。そのアミノ酸組成を Table 1 に示す。特記したいのは、両プラステインのフェニルアラニン含量はきわめて低いことと、これを補う分だけのチロシンが導入されていることである。

5. ペプチドの栄養・食糧学——今後の課題

プラステイン反応を応用したアミノ酸導入法の大きな特徴は、生成物がそのアミノ酸をペプチド結合状態で含有している点であろう。栄養学的にみて、ペプチド結合状アミノ酸は遊離アミノ酸と等価ではけっしてないはずである。この点に関しては、以前から Adibi のグループが詳しい研究を行なっている¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾。最近、Matthews および Payne が成書¹¹¹⁾ を出版し、たん白質栄養においてペプチドが果たす役割を強調している。それによれば、低分子ペプチドは、かなりの部分、腸管内で遊離アミノ酸にまで水解されることなく吸収され、しかも吸収速度は、同一種類のアミノ酸であっても、それがペプチド型である場合と遊離型である場合とで、しばしば大きな差異がある。とくに、吸収されたアミノ酸のバランスをみると、アミノ酸混合物からの場合よりもペプチド混合物からの場合のほうが優れているといういくつかの実例がある¹¹²⁾¹¹³⁾。また、たん白質栄養状態がわるい場合、その回復にはアミノ酸混合物を与えるよりもペプチド混合物 (たとえば、たん白質の酵素水解物) を与えるほうが、はるかに効果的であるという¹¹⁴⁾。食品へのアミノ酸強化に関して Matthews は、たとえばリジンの補足などはペプチド型リジンを用いるほうが、より有効であ

ろうという私信を著者らに寄せている。

ペプチドの栄養学的研究はまだ歴史が浅く、未解明の問題が山積しているが、たん白質栄養の究明にあたって、やはりペプチド型アミノ酸の栄養効果を無視することはできない。しかし現時点では、動物試験飼料に供すほどの多量の合成ペプチドが安価に入手できないという大きな支障が横たわっている。すでに述べてきたように、プラスチック反応を利用すれば、所期のアミノ酸がほぼ所定量導入されたペプチド混合物を比較的容易に得ることができる。その意味で、試験飼料素材としてのプラスチックの用途が開発されていく可能性がある。事実、すでに一部の研究室では、これを飼料として実験が進められている。

食糧学の分野でも、ペプチドに対して大きな関心が寄せられつつある。とくに L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチル（あるいはエチル）エステルが甘味をもつこと¹¹⁵⁾に興味が集集中以来、ペプチドの呈味性の問題が脚光をあびた。苦味ペプチドに関しては、その以前から多くの研究がある^{26)~38)}が、食品加工の面で実用の可能性をもつのは旨味ペプチドであろう^{21)~25)}。とくに興味深いのは、ある種の酸性オリゴペプチドに苦味遮蔽効果があるという事実である²³⁾¹⁰⁵⁾。

一方、見かたを変えれば、一つの食品素材が味をもたないということも、これまた重要なことである。そのために食品素材としての用途がいっそう広がるであろうことが容易に予測されるからである。プラスチック反応の応用例で述べたプラスチックはいずれも無味であって、嗜好上の問題点はほとんどない。その意味で、食品素材としてのプラスチックの利用にも大きな期待がもてる。

6. おわりに

たん白質資源の開発と利用の研究は、今後ますます重要になりつつある。とくに、わが国が食糧の自給を強いられるような事態を想定すれば、いっそうその感を深くする。著者らの属する分野では、文部省特定研究「生物の生産機能の開発」と題するプロジェクトがすでに発足しているが、そのなかには、食糧たん白質に関する分担課題が組まれ、著者らはそれに参画して、未利用・低栄養資源からプラスチック反応によって高栄養の素材を合成する研究を担当している¹¹⁶⁾。また、本年5月には、日本学術振興会と米国 National Science Foundation の代表の科学者がホノルルで会合し、日米協力による食糧資源開発に関して打ち合わせが行なわれたが、その重点課題の一つとして“Enzymatic transformation of proteins—plastein reaction”が採択された。諸外国でもプラスチック反応に多大の関心を寄せはじめ、たとえばダイズたん白質の研究で大きな業績を残したマ

サチューセッツ工科大学の Catsimpoalas 教授のところでも、独自のアイデアからのプラスチック研究を開始している。世界的な食糧問題がもち上がっている折から、まさにタイムリーであり、各方面からの研究の成果が大いに期待される。

最後に、本稿執筆の時点で未投稿のデータの一部を提供された麻生慶一博士および谷本信也博士に深謝したい。

文 献

- Hoff, J.E. and Janick, J.: Food, 183 (1973), Readings from Scientific American, W.H. Freeman & Co., San Francisco
- den Hartog, C.: Abstracts of Papers, Xth International Congress of Nutrition, 1 (1975), Kyoto
- Lawrie, R.A.: Proteins as Human Food, The AVI Publishing Co., Ltd., Westport, Connecticut, p. 365 (1970)
- Kay, T., Ifeacho, C.L., Onowu, G., Udenze, V., Nnamani, G., Anazonwu-Bello, J.N., Ifenu, F., Modebe, V. and Emembolo, M.: *Environ. Child Health*, February issue, 45 (1975)
- Saint-Hilaire, P. and Solms, J.: *J. Agr. Food Chem.*, 21, 1126 (1973)
- Gremli, H.A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 95A (1974)
- Beyeler, M. and Solms, J.: *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 7, 217 (1974)
- Arai, S., Noguchi, M., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1569 (1970)
- Fujimaki, M., Arai, S., Kirigaya, N. and Sakurai, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 855 (1965)
- Arai, S., Suzuki, H., Fujimaki, M. and Sakurai, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 30, 364 (1966)
- Arai, S., Suzuki, H., Fujimaki, M. and Sakurai, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 30, 863 (1966)
- Arai, S., Koyanagi, O. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 868 (1967)
- Arai, S., Noguchi, M., Kaji, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1420 (1970)
- Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S. and Tamaki, E.: *Food Technol.*, 22, 889 (1968)
- Noguchi, M., Arai, S., Kato, H. and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, 35, 211 (1970)
- Fujimaki, M., Utaka, K., Yamashita, M. and Arai, S.: *Agr. Biol. Chem.*, 37, 2303 (1973)
- Hale, M.B.: *Food Technol.*, 23, 107 (1969)
- Chafel, C., Ahern, M., Wang, D.I.C. and Tannenbaum, S.R.: *J. Agr. Food Chem.*, 19, 155 (1971)
- Butterworth, T.A., Wang, D.I.C. and Sinskey, A.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 615 (1970)
- Archer, M.C., Ragnarsson, J.O., Tannenbaum, S.R. and Wang, D.I.C.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 181 (1973)
- Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Noguchi, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 37,

- 2891 (1973)
- 22) Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 49 (1957)
- 23) Noguchi, M., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, **40**, 367 (1975)
- 24) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1253 (1972)
- 25) Arai, S., Yamashita, M., Noguchi, M. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 151 (1973)
- 26) Carr, J.W., Lughheed, T.C. and Baker, B.E.: *J. Sci. Food Agr.*, **7**, 629 (1956)
- 27) Ichikawa, K., Yamamoto, T. and Fukumoto, J.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **33**, 1044 (1959)
- 28) Gordon, D.F., Jr. and Speck, M.L.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 537 (1965)
- 29) Harwalkar, V.R. and Elliott, J.A.: *J. Dairy Sci.*, **48**, 784 (1965)
- 30) Stone, W.K. and Naff, D.M.: *J. Dairy Sci.*, **50**, 1497 (1967)
- 31) Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y. and Arai, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 794 (1968)
- 32) Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y. and Arai, S.: *J. Food Sci.*, **35**, 215 (1970)
- 33) Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 321 (1969)
- 34) Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 729 (1970)
- 35) Matoba, T., Nagayasu, C., Hayashi, R. and Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1662 (1969)
- 36) Matoba, T., Hayashi, R. and Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1235 (1970)
- 37) 兼久秀典, 岡井秀雄, 岡智: 第13回ベプチド化学討論会(東京)抄録集, 72 (1975), 蛋白質研究奨励会発行
- 38) 荒井綜一: 化学と生物, **10**, 787 (1972)
- 39) Arai, S., Noguchi, M., Kurosawa, S., Kato, H. and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, **35**, 392 (1970)
- 40) Sawjalow, W.W.: *Z. Physiol. Chem.*, **54**, 119 (1907)
- 41) Virtanen, A.I. and Kerkkonen, H.K.: *Nature*, **161**, 888 (1948)
- 42) Virtanen, A.I., Kerkkonen, H.K., Laaksonen, T. and Hakala, M.: *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 520 (1949)
- 43) Virtanen, A.I., Laaksonen, T. and Kantola, M.: *Acta Chem. Scand.*, **5**, 316 (1951)
- 44) Tauber, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1288 (1951)
- 45) Virtanen, A.I.: *Makromol. Chem.*, **6**, 94 (1951)
- 46) Borsook, H.: *Adv. Protein Chem.*, **8**, 127 (1953)
- 47) Haurowitz, F. and Horowitz, J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3138 (1955)
- 48) Horowitz, J. and Haurowitz, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 231 (1959)
- 49) Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 215 (1957)
- 50) Holley, R.W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 658 (1957)
- 51) Ogata, K. and Nohara, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 660 (1957)
- 52) Wieland, T., Determann, H. and Albrecht, E.: *Ann. Chem.*, **633**, 185 (1960)
- 53) Determann, H. and Koehler, R.: *Ann. Chem.*, **690**, 197 (1966)
- 54) Determann, H., Bonhard, K., Koehler, R. and Wieland, T.: *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2498 (1963)
- 55) Arai, S., Noguchi, M., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1338 (1970)
- 56) Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S. and Kato, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 483 (1970)
- 57) Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S. and Kato, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1325 (1970)
- 58) Yamashita, M., Arai, S., Tsai, S.-J. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1593 (1970)
- 59) 山下道子, 荒井綜一, 藤巻正生: 化学と生物, **8**, 658 (1970)
- 60) Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S. and Yamashita, M.: *J. Appl. Bact.*, **34**, 119 (1970)
- 61) Fujimaki, M., Arai, S. and Yamashita, M.: Proceedings of the International Symposium on Conversion and Manufacture of Foodstuffs by Microorganisms, 19 (1971), Saikon Publishing Co., Ltd., Tokyo
- 62) Smith, A.K. and Circle, S.J.: Soybean Chemistry and Technology, Vol. 1, 341 (1972), The AVI Publishing Co., Inc., Westport, Connecticut
- 63) 藤巻正生: 石油と微生物, No. 10, 1 (1973)
- 64) 荒井綜一: 昭和49年度日本食品工業学会シンポジウム, 食品工業における酵素の新しい利用, 講演集, 31 (1974)
- 65) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M.: *Cereal Foods World*, **20**, 107 (1975)
- 66) 藤巻正生, 荒井綜一, 山下道子: 蛋白質 核酸 酵素, **20**, 927 (1975)
- 67) 藤巻正生, 荒井綜一: 化学, **31**, 498 (1976)
- 68) Yamashita, M., Arai, S., Gonda, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1333 (1970)
- 69) Yamashita, M., Arai, S., Matsuyama, J., Gonda, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1484 (1970)
- 70) Yamashita, M., Arai, S., Matsuyama, J., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1492 (1970)
- 71) Tsai, S.-J., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1049 (1972)
- 72) Yamashita, M., Tsai, S.-J., Arai, S., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 86 (1971)
- 73) Whitaker, J.R.: Food Related Enzyme, Advances in Chemistry Series 136, American Chemical Society, Washington, D.C., 186 (1974)
- 74) Tanimoto, S., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1595 (1972)
- 75) Yamashita, M., Arai, S., Tanimoto, S. and Fujimaki, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 105 (1974)
- 76) 谷本信也, 荒井綜一, 山下道子, 藤巻正生: 昭和50年度日本農芸化学会大会(札幌)講演要旨集, 152 (1975)

- 77) 谷本信也, 荒井綜一, 山下道子, 市川誠一郎, 藤巻正生: 昭和51年度日本農芸化学会大会 (京都) 講演要旨集, 85 (1976)
- 78) Neurath, H.: *The Proteins*, Vol. 1, 2nd ed., Academic Press, New York and London 206 (1963)
- 79) Aso, K., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 37, 2505 (1973)
- 80) Aso, K., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 38, 679 (1974)
- 81) Aso, K., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *J. Biochem.*, 76, 341 (1974)
- 82) Tanimoto, S., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 39, 1207 (1975)
- 83) Arai, S., Yamashita, M., Aso, K. and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, 40, 342 (1975)
- 84) 麻生慶一, 山下道子, 荒井綜一, 藤巻正生: 昭和50年度日本農芸化学会大会 (札幌) 講演要旨集, 153 (1975)
- 85) 麻生慶一, 山下道子, 荒井綜一, 藤巻正生: 昭和49年度日本生化学会大会 (岡山) 講演要旨集, 435 (1974)
- 86) Boyer, P.D.: *The enzymes*, Vol. 3, 3rd ed., Academic Press, New York and London 502 (1971)
- 87) Schechter, I. and Berger, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157 (1967)
- 88) Schechter, I. and Berger, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 898 (1968)
- 89) Fink, A.L. and Bender, M.L.: *Biochemistry*, 8, 5109 (1969)
- 90) Werber, M.M. and Greenzaid, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 208 (1973)
- 91) Sluyterman, L.A.Æ. and Wijdenes, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 289, 194 (1972)
- 92) Lowe, G. and Yuthavong, Y.: *Biochem. J.*, 124, 107 (1971)
- 93) Kortt, A.A. and Liu, T.-Y.: *Biochemistry*, 12, 328 (1973)
- 94) Alecio, M.R., Dann, M.L. and Lowe, G.: *Biochem. J.*, 141, 495 (1974)
- 95) Yamashita, M., Arai, S., Tsai, S.-J. and Fujimaki, M.: *J. Agr. Food Chem.*, 19, 1151 (1971)
- 96) Yamashita, M., Arai, S., Aso, K. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1353 (1972)
- 97) Arai, S., Aso, K., Yamashita, M. and Fujimaki, M.: *Cereal Chem.*, 51, 143 (1974)
- 98) 藤巻正生, 森 憲一, 山下道子, 荒井綜一: 昭和51年度日本農芸化学会大会 (京都) 講演要旨集, 388 (1976)
- 99) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 印刷中
- 100) Mateles, R.I. and Tannenbaum, S.R.: *Single-cell Protein*, The M.I.T. Press, Cambridge, Massachusetts, 306 (1968)
- 101) Kobayashi, M. and Tchan, Y.T.: *Water Res.*, 7, 1219 (1973)
- 102) Gore, S.B., Mungikar, A.M. and Joshi, R.N.: *J. Sci. Food Agr.*, 25, 1149 (1974)
- 103) 保井忠彦: 栄養と食糧, 27, 427 (1974)
- 104) FAO/WHO 合同特別専門委員会報告: エネルギー・蛋白質の必要量 (井上五郎訳), 60 (1974), 医歯薬出版, 東京
- 105) Yamashita, M., Arai, S., Kokubo, S., Aso, K. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 38, 1269 (1974)
- 106) Yamashita, M., Arai, S., Kokubo, S., Aso, K. and Fujimaki, M.: *J. Agr. Food Chem.*, 23, 27 (1975)
- 107) Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, 41, 1029 (1976)
- 108) Bretthauer, R.K. and Colichowski, A.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 549 (1968)
- 109) Adibi, S.A.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 29, 205 (1976)
- 110) Matthews, D.M. and Adibi, S.A.: *Gastroenterology*, 71, 151 (1976)
- 111) Matthews, D.M. and Payne, J.W.: *Peptide Transport in Protein Nutrition*, North-Holland/American Elsevier, 1 (1975)
- 112) Burston, D., Addison, J.M. and Matthews, D.M.: *Clin. Sci.*, 43, 823 (1972)
- 113) Silk, D.B.A., Marrs, T.C., Addison, J.M., Burston, D. and Clark, M.L.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, 45, 715 (1973)
- 114) Lis, M.T., Matthews, D.M. and Crampton, R.F.: *Brit. J. Nutr.*, 28, 443 (1972)
- 115) Cloninger, M.R.: *Science*, 170, 81 (1970)
- 116) 藤巻正生, 荒井綜一: 日本農芸化学会主催シンポジウム生物の生産機能の開発 (東京) 講演予稿集, 67 (1975)

(昭和51年7月23日受理)