

分離大豆たん白質と乳清たん白質との加熱複合体の栄養生化学的研究

BIOCHEMICAL AND NUTRITION STUDIES ON
THE HEAT-INDUCED COMPLEX OF SOYBEAN PROTEIN
ISOLATE AND WHEY PROTEIN CONCENTRATE

金森正雄・土井裕司（京都府立大学農学部）

Masao KANAMORI and Hiroshi DOI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

Soybean protein isolate (SPI) is a by-product of an oil industry and whey protein concentrate (WPC) is a by-product of cheese making industry. Discard of these proteins causes pollution problems. These proteins have a good characteristics as a food protein. For example, SPI has a hypocholesterolemic effect and WPC is an excellent quality protein in nutrition. Development of usage of both proteins is expected. It was tried to make the protein preparation having effective characteristics of SPI and WPC in this paper. A mixture of SPI and WPC was heated at 80°C for 30 min in water, and then lyophilized. The physical properties of the heated mixture (HM) were different from those of SPI and WPC in solubility and gelation by heating. It is considered from the results of gel filtration of each protein that heat treatment caused re-arrangement of protein subunit of SPI and WPC. HM was easily hydrolyzed by trypsin and pepsin compared with SPI. Rats fed the diet containing 20% HM as a protein source showed a good growth curve. Serum cholesterol level of rats fed HM diet was lower than that of rats fed SPI or WPC diet. A functional impairment of liver or small intestine was not detected in rats fed HM diet, when activities of serum cholinesterase, leucine aminopeptidase in liver and small intestine and alkaline phosphatase in small intestine were measured.

大豆たん白質は、豆腐、味噌など伝統的食品に応用されている¹⁾ばかりでなく、近年は各種の食品に利用されている^{2,3)}。その栄養学的価値は卵白たん白質などに比べると決して高くない⁴⁾が、血清コレステロール濃度低下作用のあることが見い出され^{5,6)}、よく研究対象となっている。

一方、乳清たん白質は、免疫グロブリンを含むことから食品添加物として利用することは長く許可されていなかったが、近年ようやく許可された。そのアミノ酸組成や消化性の点からは栄養学的に優れている⁷⁾が、そのような背景のため、用途開発は他のたん白質に比べ遅れており、しかも食品工業廃水処理の面からも問

題があるため⁸⁾、乳清の有効利用に関する研究は活発に進められつつある^{7,9)}。

そこで本研究は、大豆たん白質、乳清たん白質といういずれも食用油製造時やチーズ製造時の二次産物であるたん白質を用いて、それら個々の利点を生かし、有効利用を目指して新しい食品素材を形成するための基礎データを提供することを目的としたもので、両たん白質の加熱混合物の生化学的栄養学的検討を行ったものである。

材料および方法

大豆たん白質としてはフジプロ R (不二製油㈱, SPI)

を、乳清たん白質としては LAC-PRODAN 80 (Danmark Protein A/S, Denmark)(WPC)を使用した。SPI と WPC を重量比 1:1 で蒸留水中に懸濁し、80℃、30 分間加熱後凍結乾燥した加熱混合物(HM)をも試料とした。トリプシンとペプシンは Sigma 社より購入した。プロテアーゼによる加水分解は、終濃度 6.25%のトリクロロ酢酸にて反応を停止後、可溶性画分のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムで定量することにより比較した¹⁰⁾。動物は、初体重 50 g 前後の Wistar 系雄ラットで、1 群 8 匹として、たん白質含量 20%の飼料にて飼育した。血清中の総コレステロール(T-CHOL),HDL-コレステロール(HDL-CHOL),コリンエステラーゼ(Ch-E)は、国際試薬(株)製キットにより測定した。肝臓および小腸のロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)並びに小腸のアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性測定は文献に準じて行った^{11,12)}。

結 果

1. SPI と WPC との加熱混合物 (HM)

栄養学的見地から考えると SPI は含硫アミノ酸が第一制限アミノ酸であり、WPC はそれを豊富に含んでい

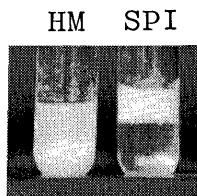


Fig. 1 Addition of 35 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl to the powders of SPI and HM.

Two ml of 35 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl was added to 40 mg of SPI or HM powder in test tube. Then photograph was taken.

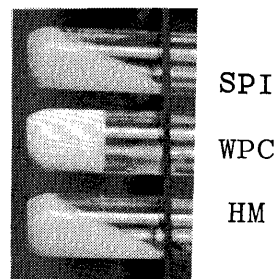


Fig. 2 Heat treatment of extracts from SPI, WPC and HM.

HM was prepared by heating mixture of SPI and WPC at 80 °C for 30 min. Extraction from SPI, WPC and HM was carried out with 35 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl at 4 °C for 72 hours. Extract was gathered by ultracentrifugation at 25,000 rpm for 1 hour. Two ml of extract was heated at 80 °C for 30 min.

る。そこで両者の混合物Mを加熱することによって、新たなたん白質を形成させることを試みた。

SPI も WPC も微粉末であるためか、水には親和性が乏しく、水を加えた直後は浮いているが、HM は容易に溶解または懸濁された (Fig. 1)。

SPI,WPC,HM の各 4g を 40 ml の 0.4 M NaCl を含む 35mM リン酸緩衝液を用いて 4℃、72時間抽出した抽出物のたん白質含量を Table 1 に示す。用いた緩衝液は、大豆たん白質の研究で最も一般的なものの¹³⁾であるが、SPI からの抽出効率は悪かった。混合物(M)の加熱によって得られた HM のたん白質抽出率は、SPI と WPC との中間となった。また、各抽出液を 80℃、30 分間加熱すると、WPC 抽出液はゲル化したが、SPI および HM の抽出液はゲル化しなかった (Fig. 2)。これらの結果は、HM が SPI と WPC と異なる物性を持っていることを示している。

Table 1. Extract from soybean protein isolate (SPI), whey protein concentrate (WPC) and their heated mixture with 35 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl

Sample	Amount (protein)	Buffer used	Extract		
			Volume	Protein	Yield
SPI*	4.0 g (3.52 g)	40 ml	25.5 ml	0.92 g	26.1 %
WPC**	4.0 (3.12)	40	38.0	2.43	77.9
Heated mix***	4.0 (3.32)	40	32.0	1.20	36.1

Extraction was carried out at 4°C for 72 hours. Protein was determined by the Kjeldahl method.

* : Fujipro R, product of Fuji Oil Co. (Osaka, Japan)

** : LAC PRODAN 80, product of Danmark Protein A/S (Denmark)

*** : Mixture of SPI and WPC (1 : 1, w/w) was heated at 80°C for 30 min in water.

2. Sephacryl S-300 ゲル濾過クロマトグラフィー

Fig. 3 は、各試料たん白質からのリン酸緩衝液での抽出液の Sephacryl S-300 ゲル濾過クロマトグラムを示している。SPI 抽出たん白質は主としていわゆる 11S, および 7S たん白質から成っていた¹⁴⁾。WPC の 2 つのピークは、 β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミンである。HM 抽出たん白質は、7S よりも若干分子量の小さなたん白質と分子量 20,000 以下のいくつかのたん白質とから成っていた。

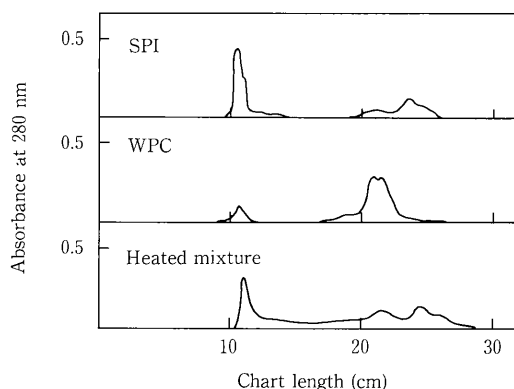


Fig. 3 Sephacryl S-300 gel filtration profiles of extracts from SPI, WPC and HM.

Extracts were obtained as described in Fig. 2. Protein was detected with Atto mini UV monitor II.

sample: 1 ml, column: 2.5×95 cm, flow rate: 38 ml/hr, chart speed: 2 cm/hr, eluent: 35 mM phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.4 M NaCl.

3. プロテアーゼによる加水分解

各試料たん白質の消化性を比較する目的でトリプシンおよびペプシンによる加水分解を行った。その結果を Fig. 4 に示す。トリプシンによる加水分解では、HM はもっとも加水分解されやすく、次いでカゼイン、WPC の順となった。SPI は極めて水解されにくかった。この結果もまた、SPI と WPC との混合加熱処理による新しいたん白質素材の形成を示している。

また、ペプシンによる加水分解では、カゼインがもっともよく加水分解を受け、他の SPI, WPC, HM の 3 つについてはほとんど差がなかった。

4. ラットの飼育実験

食餌中の植物性たん白質は動物性たん白質に比べて、血清 CHOL 濃度を低下させるという^{5,6,15)}。本実験は、植物性たん白質 SPI と動物性たん白質 WPC とから得られた新しいたん白質 HM によるラットの飼育を行ったもので、その育成曲線、血清 CHOL 濃度および肝臓や小腸の機能への影響を検討した。

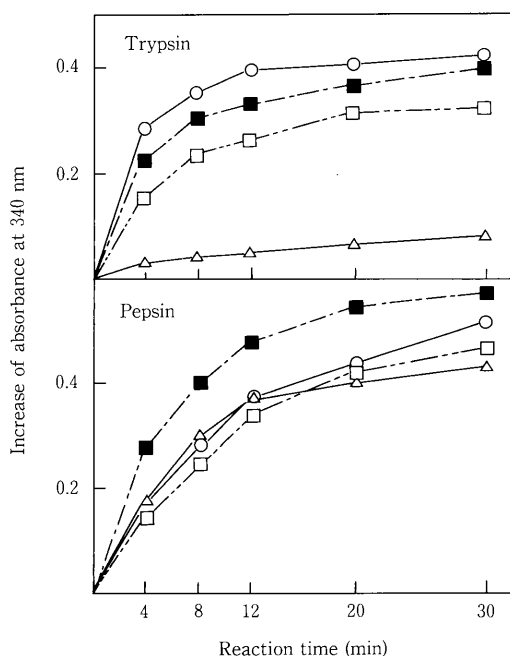


Fig. 4 Hydrolysis of casein, SPI, WPC and HM by trypsin and pepsin.

Sample was suspended in the buffer and enzyme was added. The ratio of substrate to enzyme was 100 (w/w). Reaction was stopped by the addition of equal volume of 12.5% TCA. One-tenth ml of supernatant reacted with sodium trinitrobenzenesulfonate.

■—■ : casein, △—△ : SPI, □—□ : WPC, ○—○ : HM.

4-a. ラット育成曲線

Table 2 は、本実験で用いた飼料の組成を示している。Exp. I および Exp. II とたん白質含量は 20% と同じであるが、糖組成を異にしている。Fig. 5 は、各飼料によるラットの育成曲線を示している。Exp. I および Exp. II のいずれの場合にも、SPI 食での育成が最も悪かった。Exp. I では、HM 食と M 食はほぼ同じ体重増加を与え、SPI 食や WPC 食よりも明らかに大きかった。Exp. II では、SPI 食を除く WPC 食、M 食、HM 食ではほぼ同じ体重増加量となった (Table 3)。また、食餌摂取量はいずれの実験においても、各食餌群間に大差は見られなかった。

Table 4 は、飼育開始後 31 日目のラットの肝臓および小腸の重量を示している。各臓器重量には、いずれの食餌たん白質も際立った影響は与えていないようである。

4-b. ラット血清コレステロール濃度

SPI の利点の 1 つである血清 CHOL 濃度低下作用が、WPC との混合加熱処理によってどのように変化した

Table 2. Composition of diets

Component	Experiment I	
	Experiment II	
Protein*	20	20
Sucrose	63	15
Fiber	5	8
Soybean oil	7	7
Mineral mixture**	4	4
Vitamin mixture**	1	1
Starch	-	45

* : Protein tested ; soybean protein isolate, whey protein concentrate, mixture of SPI and WPC, heated mix. of SPI and WPC

** : Product of Oriental Yeast Industry Co.

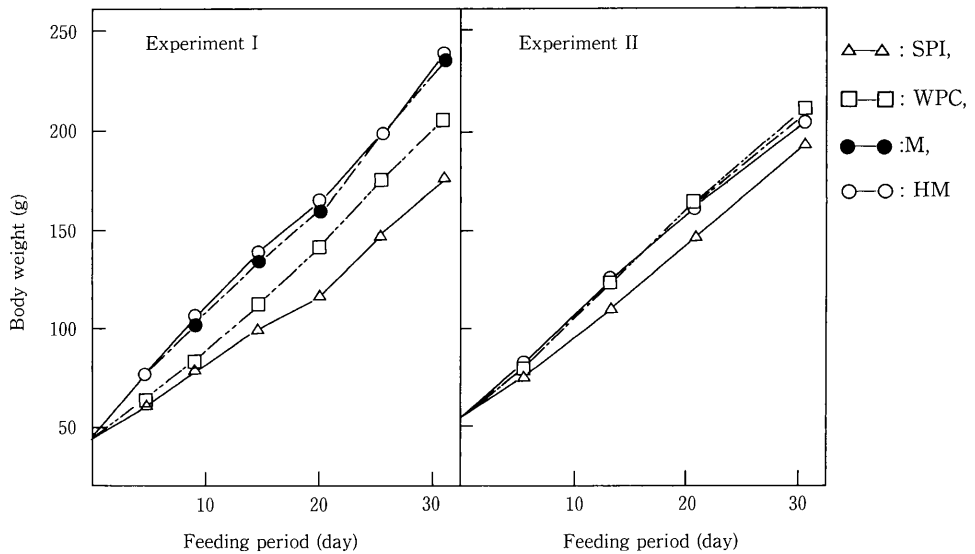


Fig. 5 Growth curves of rats fed various protein diets.

Table 3. Body weight, weight gain and food intake in rats fed various protein diets

Experiment I				
Dietary protein	Initial B. W. (g)	Final B. W. (g)	Weight gain (g/31 days)	Food intake (g/day)
SPI	44.4 ± 1.66	177.3 ± 10.14	128.9 ± 9.34	12.2 ± 0.67
WPC	43.9 ± 1.63	204.7 ± 13.93	161.3 ± 11.36	11.7 ± 0.73
Mix.*	44.9 ± 1.45	234.5 ± 13.67	187.7 ± 11.54	13.1 ± 0.75
Heated mix**	44.9 ± 1.22	237.7 ± 7.99	194.5 ± 7.67	13.7 ± 0.62
Experiment II				
SPI	53.1 ± 1.21	168.2 ± 2.71	115.1	13.9
WPC	53.2 ± 0.60	182.6 ± 3.85	129.3	13.7
Mix.*	54.7 ± 1.62	180.7 ± 6.90	126.0	13.6
Heated mix**	52.7 ± 0.84	176.7 ± 3.21	124.0	13.1

* : Mixture of soybean protein isolate (SPI) and whey protein concentrate (WPC).

** : Mixture was heated at 80°C for 30 min in distilled water.

Table 4. Weight of liver and intestine in rats fed various protein diets

Experiment I			
Dietary protein	Liver (g/100 g B.W.)	Small intestine (g/100 g B.W.)	Caecum (g)
SPI	4.67±0.22	7.09±0.28	2.14±0.16
WPC	5.38±0.29	6.03±0.27	2.64±0.18
Mix.*	4.81±0.12	5.31±0.28	2.97±0.16
Heated mix**	5.10±0.33	5.39±0.41	2.56±0.14

Experiment II		
Dietary protein	Liver (g/100 g B.W.)	Small intestine (g/100 g B.W.)
SPI	4.24±0.12	3.75±0.12
WPC	4.91±0.20	3.27±0.14
Mix.*	4.46±0.20	3.23±0.11
Heated mix**	4.06±0.17	3.03±0.10

* and ** : see Table 3.

たかを検討する目的で、各たん白質食餌で飼育されたラットの血清 CHOL 濃度が測定された。

Table 5 は、ラットの血清 T-CHOL 濃度を示している。Exp. I では T-CHOL 濃度は、WPC、SPI、M、HM という順で段々下がっており、SPI と WPC との混合加熱処理によって SPI の利点は何ら損なわれることがなく、むしろ HM は SPI 以上に血清 T-CHOL 濃度を低下させ得た。この事実は、差こそ小さいが Exp. II においても確認された。

また、血清 T-CHOL 濃度ばかりでなく、HDL-CHOL 濃度との比率が重要であるという意見もある¹⁵⁾。そこで本実験においても、血清 HDL-CHOL 濃度が測定された (Table 6)。HM 食のラットの HDL-CHOL/T-CHOL 比は、他のたん白質食で飼育されたラットのそれと比べてほとんど大差なかった。このことは、WPC と SPI との混合加熱処理は、ラットの血清 CHOL 濃度に対して決して悪影響を及ぼすものではないことを示している。

Table 5. Serum total cholesterol level in rats fed various protein diets for 31 days (mg/100 ml)

Dietary protein	Experiment I	Experiment II
SPI	100.4±4.64	117.5±3.44
WPC	107.3±4.31	125.5±4.02
Mix.	92.9±5.22	113.0±3.03
Heated mix	88.1±4.54	106.8±2.33
Initial	91.5±4.40	124.6±5.07

Table 6. Serum HDL-cholesterol level in rats fed various protein diets for 31 days (mg/100 ml)

Dietary protein	Experiment I	Experiment II
SPI	57.4±5.08	74.6±5.30
WPC	66.0±3.65	81.3±5.28
Mix.	68.9±4.07	72.5±4.19
Heated mix	58.9±6.19	72.8±2.99
Initial	53.9±1.88	100.9±2.47

Table 7. Serum cholinesterase activity in rats fed various protein diets (IU/l)

Dietary protein	Experiment I	Experiment II	
	31st day	17th day	31st day
SPI	118.3±9.70	118.5±4.54	102.2±2.35
WPC	100.2±18.88	91.6±1.90	101.9±5.86
Mix.	91.3±34.70	114.6±8.46	109.8±3.61
Heated mix	100.5±20.16	97.9±3.78	90.1±0.53
Initial	120.1±12.75	114.9±4.64	

Table 8. Liver leucine aminopeptidase activity of rats fed various protein diets in experiment I

Dietary protein	LAP activity (μ mol aniline/min/mg protein)
SPI	8.79±1.06
WPC	11.74±0.62
Mix.	13.22±1.24
Heated mix	14.65±1.48
Initial	22.20±1.69

4-c. ラットの肝機能

生体内で合成される CHOL の約80%は肝臓で合成される。したがって、血清 CHOL 濃度に差がある時、肝機能にも差が生じている可能性が考えられる。そこで、各たん白質食餌を与えられたラットの肝機能の推定を試みた。

肝機能を血清酵素活性の測定により推定しようという試みは臨床医学では盛んに行われており、肝臓の酵素合成を反映する血清酵素として Ch-E が知られている。Exp. I および Exp. II において血清 Ch-E 活性を測定した時の結果を Table 7 に示す。飼育ラットの本酵素活性は、90~120 IU/l の間にあり、食餌たん白質による顕著な差は認められなかった。

さらに、Exp. I では肝 LAP 活性も測定された。その

結果を Table 8 に示す。肝 LAP 活性は、8.76~14.65 S.A.(μ mol aniline/min/mg protein)の間にあり、SPI 食で最も低く、HM 食で高かった。

前述の Ch-E 活性は、SPI 食より HM 食ラットの方が低かったことも併せ考えると、各食餌によって肝機能に大差をもたらさないと思われる。

4-d. ラット小腸膜酵素活性

生体内の CHOL は腸肝循環を繰り返している。前述のごとく、各食餌によりラット血清 CHOL 濃度に差はあったが、肝機能には差は認められなかった。そこで、小腸における吸収に問題があるのかもしれないと考え、Exp. II において小腸の膜酵素である LAP および ALP の活性を測定した (Table 9)。いずれの食餌のラットの LAP 活性も $2.63 \sim 3.14 (\times 10^{-2} \text{ unit/mg protein})$ であり、ALP 活性は $93.9 \sim 117.8 (\text{unit/mg protein})$ であった。すなわち、小腸の膜酵素活性測定結果からは特に異常性は認められなかった。

考 察

食品工業における二次生産物の有効利用は、廃液処理問題とともに重要な課題である¹⁶⁾。本研究でとりあげた SPI も WPC も二次産物であるが、いずれも優れた特性を有している^{4,7)}。それぞれの利点を併せ持った新製品の開発が考慮されるべきである。

SPI と WPC との混合物を水に懸濁させた後80°C, 30

Table 9. Small intestine leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase activities of rats fed various protein diets in experiment II

Dietary protein	LAP activity ($\times 10^{-2} \text{ unit/mg protein}$)	ALP activity (unit/mg protein)
SPI	2.63±0.46	93.9±10.00
WPC	3.22±0.31	113.2±14.00
Mix.	2.74±0.34	117.8±5.78
Heated mix	3.38±0.33	115.2±16.49
Initial	5.71±1.99	68.1±6.77

文 献

分間加熱処理して得られた HM は、水への親和性及び抽出液のゲル化に関して、SPI や WPC とは異なった物性を示した (Figs.1 and 2)。また、HM は豆臭を有していなかった。HM が SPI や WPC に比べて水にはるかになじみやすくなっていることや、豆臭を有していないことは、それを食品として調理加工する際、極めて有利な点と考えられる。

リン酸緩衝液抽出たん白質のゲル透過の結果は、HM が SPI と WPC と異なった分子量分布を持ったたん白質から形成されていることを示している。HM の高分子量画分が、SPI の 11S や 7S よりも若干低分子量であったことから、SPI と WPC との混合加熱処理では、各サブユニットたん白質間の相互作用が変化し、サブユニットの組み換えによって新たなたん白質分子が形成されたものと考えられる。一般に温度が高くなると疎水結合を形成しやすくなるところから、その組み換えが主として疎水結合によるものであるならば、たん白質表面は水への親和力が大きくなる。すなわち、本研究において HM が水になじみやすくなったことを説明しうるものである。

プロテアーゼによる加水分解実験では、HM はトリプシンやペプシンによって容易に加水分解された (Fig. 4)。このことは、HM を食品として応用した際、その消化性には何ら問題のないことを意味しており、ラット飼育実験でもその成育曲線が良かったという事実 (Fig. 5) とよく一致している。

ラット飼育実験で、HM 食が SPI 食や WPC 食よりも良好な成育曲線を与えたことは、消化性もさることながら、アミノ酸組成の改善によるものと考えられる。SPI に比べ、WPC は極めて高い栄養値を示す⁷⁾ため、HM も良い成育曲線を与えたものと考えられる。

また、HM 食が SPI 食と同程度またはそれ以上にラット血清 T-CHOL 濃度を低下させた (Table 5)。この事実は極めて興味深い結果である。しかも、肝機能や小腸機能に何ら障害を与えていなかった (Tables 7 ~ 9)。

調理加工性に優れ、消化性やラットの成育に良好な結果をあたえる HM が、血清 CHOL 濃度低下作用を有していることは、HM が極めて有用な食品素材であることを示している。さらに、HM の血清 CHOL 濃度低下作用機構の解明は、SPI のそれ以上に興味深いものとなるだろう。

- 1) 山内文男 (1979): 大豆タンパク質の構造と食品物性. 日食工誌, **26**, 266-275.
- 2) 崎田高史 (1979): 大豆タンパク質の製造と食品への利用. 油化学, **28**, 781-794.
- 3) 谷口等 (1979): 新しい大豆たん白および大豆たん白食品の現状について. 食品科学研究会誌 (帝塚山短期大学), **1**, 17-29.
- 4) Seal, R. (1980): Industrial soya protein technology, in "Applied Protein Chemistry", ed. by Grant, R.A., Applied Science Pub., London, pp. 87-111.
- 5) Carroll, K.K. (1981): Soya protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 416-419.
- 6) Kritchevski, D. (1979): Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 135-140.
- 7) Evans, M.T.A. and Gordon, J.F. (1980): Whey proteins, in "Applied Protein Chemistry", ed. by Grant, R.A., Applied Science Pub., London, pp. 31-67.
- 8) Anthony, B. (1982): Current and potential use of plant and animal by-products as livestock feeds, in "Animal Products in Human Nutrition", ed. by Beitz, D.C. and Hansen, R.G., Academic Press, New York, pp. 67-79.
- 9) Doi, H., Ideno, S., Ibuki, F., Kuo, K. and Kanamori, M. (1983): Gelation of the complex between K -casein and β -lactoglobulin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 679-689.
- 10) Doi, H., Kawaguchi, N., Ibuki, F. and Kanamori, M. (1979): Susceptibility of K -casein components to various proteases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 33-41.
- 11) Little, G.H., Starnes, W.L. and Behal, F.J. (1976): Human liver aminopeptidase, in "Proteolytic Enzymes. Part B. Methods in Enzymology", ed. by Lorand, L., Academic Press, New York, vol. **45**, pp. 498-503.
- 12) Nisman, B. (1968): Techniques for demonstrating DNA-dependent protein synthesis, in "Nucleic Acid, Methods in Enzymology", ed. by Grossman, L. and Moldave, K., Academic Press, New York, vol. **12**, pp. 794-820.

- 13) Hashizume, K. and Watanabe, T. (1979): Influence of heating temperature on conformational changes of soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 683-690.
- 14) 金森正雄, 土井裕司 (1981): 分離大豆たん白質からの水解物製品の精製. 大豆たん白質栄養研究会誌, **2**, 8-13.
- 15) 菅野道廣 (1982): 食品たん白質と血液コレステロール. 化学と生物, **20**, 155-163.
- 16) Grant, R.A. (1980): Utilization of waste protein sources, in "Applied Protein Chemistry", ed. by Grant, R.A., Applied Science Pub., London, pp. 223-231.