

大豆たん白質の酵素的脱アミド化による機能改質

IMPROVEMENTS OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOY PROTEIN BY ENZYMATIC DEAMIDATION

小林邦彦・加藤昭夫・松富直利（山口大学農学部）

Kunihiko KOBAYASHI, Akio KATO and Naotoshi MATSUDOMI
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753

ABSTRACT

The effects of proteolytic deamidation on the functional properties of soy proteins were investigated in a controlled condition. The emulsifying and foaming properties of soy proteins (7S globulin and 11S globulin) were improved by the treatment with chymotrypsin at pH 10. About 20% of the asparaginyl or glutaminyl residues in soy proteins were deamidated by the treatment with chymotrypsin with a slight proteolysis. In addition, the functional properties of soy proteins were also improved by the treatment with immobilized chymotrypsin at pH 10, although the deamidation rate was lower than that with free chymotrypsin. Thus, proteolytic deamidation was proposed to be a useful method for the improvement of functional properties of soy proteins. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 9, 16-18, 1988.

著者らはプロテアーゼによる特殊条件下でのたん白質の脱アミド化反応を発見した^{1,2)}。大豆たん白質はグルタミン、アスパラギンを比較的多量に含むために、このプロテアーゼによる脱アミド化は、その加工機能特性（溶解性、乳化性、起泡性）の向上に極めて有効な手段であると考えられる。

本研究ではこうした視点から、大豆たん白質の用途を拡大し、付加価値を高めるために、プロテアーゼによる脱アミド化により大豆たん白質の機能特性の改質を目的とした。

実験方法

大豆 7S グロブリン、11S グロブリンは Thanh ら³⁾の方法により、低温脱脂大豆（不二製油製）から分離・精製した。

大豆たん白質の脱アミド化反応はキモトリプシンを用いて、pH 10、20℃で行なった。フリーのキモトリプシンを1%の割合で基質（大豆たん白質）に加え、2時間反応させた²⁾。固定化キモトリプシンは多孔性のガラスビーズ（2000 Å pore, 80-120 mesh, Sigma Co.）

を支持体として、Porter ら⁴⁾の方法により作成した。2g のガラスビーズ固定化キモトリプシンをカラムにつめ、Fig. 1 に示したように、20 ml の0.5%たん白溶液（pH 10）をペリスタポンプで循環させ、反応中の pH 変化は pH スタットによりコントロールし、pH 10に保ち、5時間反応させた。

大豆たん白質の乳化性は Pearce and Kinsella⁵⁾の方法により測定し、起泡性は Kato ら⁶⁾の導電率法により測定した。

結果と考察

Table 1 はキモトリプシンによる大豆たん白質の脱アミド率とプロテオリシスの割合を示している。キモトリプシン処理は pH 10、20℃、2時間反応させることにより行なった。この条件下で、キモトリプシンはペプチド水解を著しく抑制し、たん白質中のアスパラギン又はグルタミン側鎖のアミド基を約20%加水分解したことを示している。

Table 2 は脱アミド処理した大豆たん白質の乳化性、起泡性を示している。残存するキモトリプシンの影響

を抑えるため、乳化性、起泡性は pH 9.5 で測定した。Table 2 に示されているように、乳化性、起泡性の著しい改善がこの脱アミド処理によって確認された。大豆たん白質の場合には、ペプチド水解が数パーセント起るので、これらの機能特性の向上が脱アミドの効果だけによるものとは断定し難いが、ペプチド水解がほとんど起らないオボアルブミンやリゾチームの場合も同様に著しい機能特性の向上が認められている²⁾。したがって、キモトリプシン処理による大豆たん白質の乳化性、起泡性の向上は、脱アミド化により、たん白分子のチャージバランスが変化し分子の構造のゆらぎが増加したことが主原因と考えられる。このように、特殊条件下 (pH 10) でのプロテアーゼによる大豆たん白質の処理は機能特性を著しく改善させるのに有効な方法であるが、問題は反応を停止したり、pH を中性にもどす際にプロテオリシスが起きやすくなることである。

こうした問題点を解決するために、Fig. 1 に示したようなシステムで固定化キモトリプシンによる脱アミド化反応を試みた。この方法では溶液中に残存するフリーの酵素がないので、反応の停止が容易であり、pH を中性にもどしてもプロテオリシスは生じない。Fig.

Table 1. Deamidation and proteolysis percentages of soy proteins by treatment with chymotrypsin at pH 10

Proteins	Deamidation (%)	Proteolysis (%)
7S globulin	24	5
11S globulin	19	8

Table 2. Emulsifying and foaming properties of deamidated soy proteins by treatment with chymotrypsin

Proteins	Emulsifying activity (OD ₅₀₀)	Foaming power (μ v/cm)
7S globulin		
Control	0.420	1250
Deamidated	0.540	2550
11S globulin		
Control	0.390	1300
Deamidated	0.600	2250

Emulsifying and foaming properties were measured in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.5. The control proteins were subjected to pH 10 for 2 hr at 20 °C in the absence of chymotrypsin.

2 にオボアルブミンを基質として用いた際の脱アミド化反応の最適 pH を示したが、フリーの酵素と同様に pH 10 で脱アミド化反応が最も起きやすいことが示さ

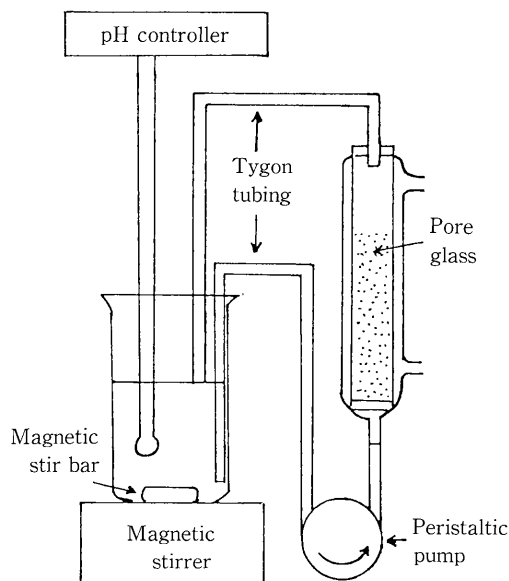


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus used for digestion of proteins by immobilized chymotrypsin.

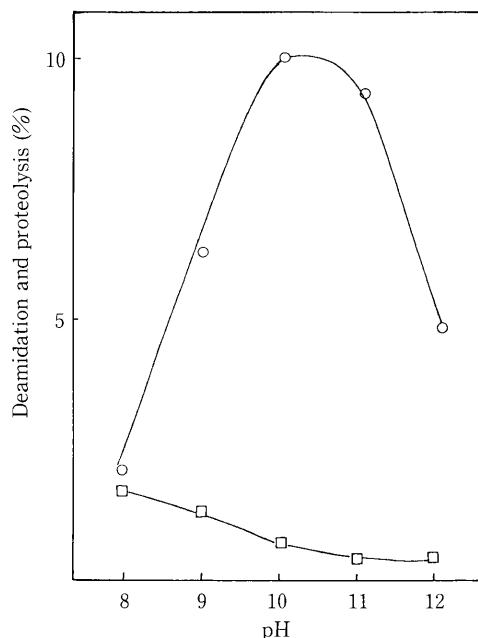


Fig. 2. Effect of pH on the deamidation and proteolysis of ovalbumin by immobilized chymotrypsin at 20°C.

れた。

Table 3 には固定化キモトリプシンによる大豆たん白質の脱アミド率とプロテオリシスの程度が示されている。フリーのキモトリプシンの場合に比べ、脱アミド率、消化率は低い値を示した。しかしながら、Table 4 に示したように、固定化キモトリプシン処理をした大豆たん白質の乳化性、起泡性はフリーのキモトリプシン処理に匹敵する改変が認められた。

このように、キモトリプシンによる特殊条件下での脱アミド化が大豆たん白質の機能特性の向上に有効であることが示された。ここで用いた大豆たん白質は可溶性の 7S, 11S グロブリンであるが、たん白質の脱アミド化は溶解度を著しく上昇させることが不溶性のグルテンを用いて明らかにされている⁶⁾。したがって、この方法は不溶性の大豆たん白質にも利用価値があると考えられる。このプロテアーゼによる脱アミド化反応はキモトリプシン以外でも起ることが示されているので¹⁾、他のプロテアーゼを固定化したり固定化の支持体を変えたりすることによって、一層の機能特性の改変が可能となるであろう。

Table 3. Deamidation and proteolysis percentages of soy proteins by treatment with immobilized chymotrypsin at pH 10

Proteins	Deamidation (%)	Proteolysis (%)
7S globulin	6.0	5.0
11S globulin	5.0	3.5

Table 4. Emulsifying and foaming properties of deamidated soy proteins by immobilized chymotrypsin

Proteins	Emulsifying activity (OD ₅₀₀)	Foaming power (μ v/cm)
7S globulin		
Control	0.520	1300
Deamidated	0.695	1540
11S globulin		
Control	0.630	1500
Deamidated	0.790	2200

Emulsifying and foaming properties were measured in 1/15 M phosphate buffer, pH 7.4. The control proteins were subjected to pH 10 for 5 hr at 20 °C in the absence of chymotrypsin.

文 献

- 1) Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1987): Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 224-227.
- 2) Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1987): Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 285-288.
- 3) Thanh, V. H., Okubo, K. and Shibasaki, K. (1975): Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean proteins. *Plant Physiol.*, **56**, 19-22.
- 4) Porter, D. H., Swaisgood, H. E. and Catignani, G. L. (1984): Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 334-339.
- 5) Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978): Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-722.
- 6) Kato, A., Takahashi, A., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1983): Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. *J. Food Sci.*, **48**, 62-65.