

大豆たん白質-多糖類ハイブリッド形成による新規食品 素材の開発

DEVELOPMENTS IN NOVEL FUNCTIONAL FOOD MATERIALS BY
HYBRIDIZATION OF SOY PROTEIN TO POLYSACCHARIDES

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

Acid precipitated soy protein (APP)-dextran (DX) and commercial SPI (FPR)-DX hybrids were prepared by dry-heated storage at 60°C and 65% relative humidity for 3 weeks. SDS-PAGE patterns showed that APP-DX hybrid obtained by dry heating was much higher molecular weight than APP by stains of proteins and carbohydrates. The average molecular weight of APP-DX hybrid was about 435,000 by low-angle laser light scattering technique and its binding ratio was 1:1 (w/w). Solubilities of APP-DX and FPR-DX hybrids increased, especially in acidic pH (4.0), compared with APP and FPR, respectively. Emulsifying properties of APP-DX and FPR-DX hybrids were much more excellent than of APP and FPR, respectively, and were equal to those of commercial emulsifiers. Thus, it is suggested that soy protein-polysaccharide hybridization by controlled dry heating was the available technique for novel functional food materials. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **11**, 23-28, 1990.

著者らは化学的に調製したたん白質-多糖類ハイブリッドが市販の乳化剤より優れた性質を有する事をいだし報告した^{1,2)}。しかし、これらの食品への利用には安全性が問題になる。そこでたん白質と多糖類を混合し、乾燥状態で加熱し、いわゆるメイラード反応を起こさせ、ハイブリッドの調製を行なった。オボアルブミンとデキストランの場合、ハイブリッドが形成され、平均分子量約20万、結合比（モル）1:2で、優れた乳化性を示し、Fig. 1 のモデルを示した³⁾。今回は、大豆たん白質とデキストランとのハイブリッド調製を試みた。

実験方法

ハイブリッドの調製

研究室で調製⁴⁾した大豆酸沈澱たん白質（APP）および市販分離大豆たん白質（不二製油⁵⁾製フジプロR；FPR）とデキストラン（DX，平均分子量75,000，

和光純薬工業⁶⁾）を1:5（重量比）で溶解混合し、凍結乾燥して、RH65%（飽和KI液を入れたデシケーター中）で、60°Cに所定日数保存して反応させた。反応混合物を、あらかじめ0.2 N NaCl 溶液2 lと蒸留水4 lで洗浄して10 mM NaCl, 0.02% NaN₃を含む1/15 M炭酸緩衝液（pH 10.0）で平衡化したSephacryl CL-6Bのカラム（φ1.7×80 cm）にかけ、同じ緩衝液で展開した。3 ml/tube で分画し、たん白質は280 nmの、糖はフェノール硫酸法で490 nmの吸光度を測定して溶出位置を求めた。所定の溶出画分を集め、透析後、凍結乾燥してハイブリッドを得た。

SDS-電気泳動によるハイブリッドの確認

主としてLaemmliの方法⁵⁾によりSDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動を行なった。すなわち、0.1% SDSを含む濃縮用ゲル3%，分離用ゲル10%で、試料は0.2~0.5%（w/v）に1/15 M炭酸緩衝液で溶解し、1% SDS, 1%メルカプトエタノールで処理し、0.1

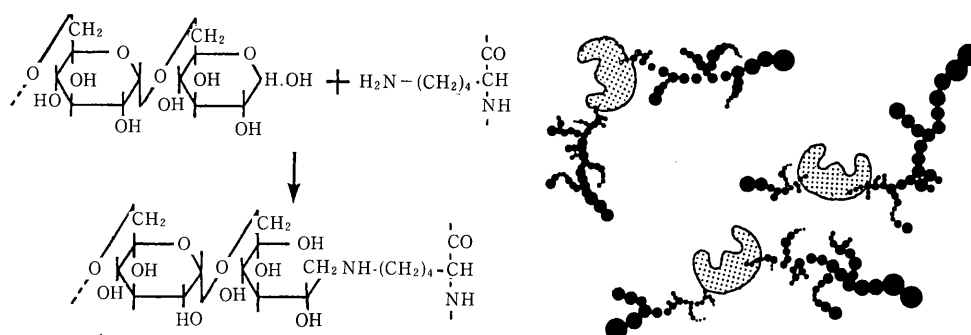


Fig. 1. Scheme of protein-polysaccharide hybrid formation by controlled dry-heating.

% SDS を含む50 mM トリスグリシン緩衝液 (pH 8.3) を泳動用として、濃縮用ゲル3 mA、分離用ゲル10 mA の電流を流して行なった。たん白質はコマシーブルー-G250で、糖質はフクシンで染色した。

分子量の測定

分子量は低角レーザー光散乱 (LALLS) 法⁶⁾により行なった。0.1% ハイブリッドの67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 溶液を0.3 ml/分で TSK ゲルG3,000 SW カラムと TSK ゲルG6,000 PW カラム (いずれも東ソー株, 0.75×60 cm) をつないだ HPLC (東ソー株, HLC 803 D) にかけた。溶出液は低角レーザー光散乱光度計 (東ソー株, LS-88), 示差屈折計 (東ソー株, RI-8), 紫外吸光度計 (東ソー株, UV-8) で検索された。分子量は次式により計算された。

$$M_{sam} = M_{std} \times \frac{(LS_{sam}/LS_{std}) \cdot (UV_{sam}/UV_{std})}{(RI_{sam}/RI_{std})^2} \times \frac{E_{std}}{E_{sam}}$$

ただし, $E_{std} = UV_{std} / RI_{std}$, $E_{sam} = UV_{sam} / RI_{sam}$, M は分子量, LS は低角レーザー光散乱光度計, RI は示差屈折計, UV は紫外吸光度計 (280 nm) のそれぞれのピーク面積, std は標準物質 (オボアルブミン, MW. 44,000), sam は試料の値を意味する。

溶解度の測定

溶解度は試料を0.1%濃度に溶解し (20℃), 遠沈 (10,000 rpm, 10分) し, 上澄の280 nm の吸光度と Lowry 法⁷⁾によるたん白質を測定して求めた。pH による溶解度の変化は pH 2 はクエン酸 Na・HCl, pH 4 はクエン酸, pH 6~8 はリン酸, pH 10 は炭酸, pH 12 は炭酸 Na・NaOH 各緩衝液で測定し, pH 12 の溶解度を100として示した。

乳化性の測定

乳化性は Pearce と Kinsella の法⁸⁾により測定した。コーン油1 ml と0.1% (w/v) 試料たん白質緩衝液3.0

ml を Ultra Turrax (Hensen and Co. Ltd 西独) で20℃120,000 rpm 1分ホモゲナイズして乳化した。乳濁液100 μl を乳化直後を0分とし, 1, 2, 3, 5, 10分後に容器底部からとり, 0.1% SDS 溶液5 ml に希釈し, 濁度 (500 nm の吸光度) を測定した。0分後の値を乳化活性とし, その半減期 (分) を乳化安定性とした。

結果と考察

大豆たん白質-多糖類ハイブリッドの調製

APP+DX, FPR+DX の各混合物はRH65%, 60℃の保存が進むに伴って, ごく僅かな褐変がおり, 4週間で, 非常にうすい黄土色になった。なお, APP, FPR, DX 単独では4週間でも殆んど色の変化はなかった。

たん白質-多糖類ハイブリッドは乳化性が著しく増大すること¹⁻³⁾から, ハイブリッド形成の指標として, 加熱保存に伴う乳化性の変化を調べた (Fig. 2)。APP+DX の場合, 1週間の保存で乳化性は著しく増大し, その後は4週間まで殆んど変化はなかった。このことからハイブリッドが形成されたと考えられたので, 3週間保存のものを Sepharose CL-6B のゲルろ過にかけた (Fig. 3)。Fig. 3 に示されたように高分子側の31~40本にたん白質と糖のピークの重なりがみられ, この部分をハイブリッド溶出画分とした。この部分を集め, 透析し, 凍結乾燥して APP-DX ハイブリッド調製品とした。FPR-DX も全く同様に調製した。

APP-DX の SDS-電気泳動

APP-DX の SDS-PAGE を行なった結果を Fig. 4 に示した。APP, APP+DX 混合物, APP-DX ハイブリッドなどたん白質濃度が異なり, かつたん白質量も不明であったので, たん白質濃度を統一しなかった。レーン1は0.3%, 2は0.5%, 3は0.4%, 4は0.2%, 5は0.5% (w/v) で, 5は不溶部を除いたもので

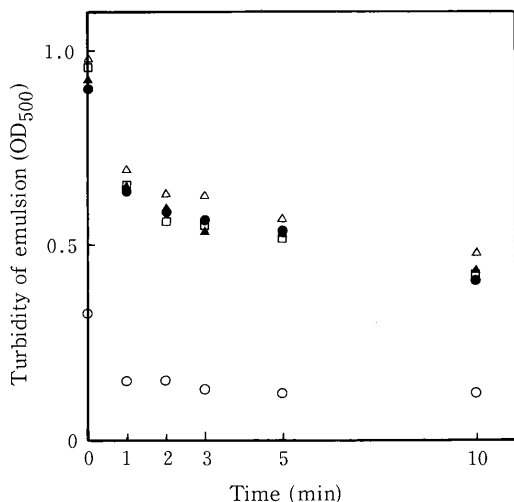


Fig. 2. Changes in the emulsifying properties of APP+DX mixtures during dry-heated storage at 60°C and 65% relative humidity : ○, none heated mixture; △, heated mixture for 1 week; □, heated mixture for 2 weeks; ●, heated mixture for 3 weeks; ▲, heated mixture for 4 weeks.

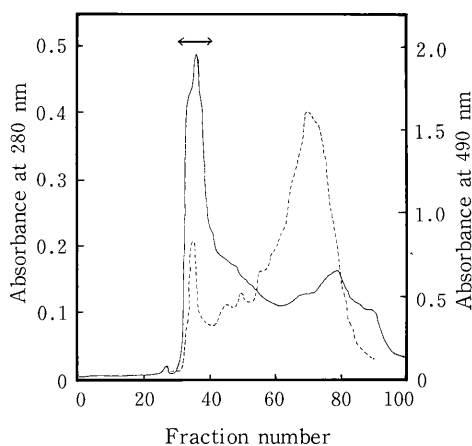


Fig. 3. Elution pattern of APP-DX hybrid obtained by dry heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks on Sepharose CL-6B column. (—), absorbance at 280 nm; (---), absorbance at 490 nm after color development by phenol-sulfate method. Arrow range indicates the position of elution peak taken for APP-DX hybrid.

あった。未加熱 APP+DX 混合物は、native APP と全く同じ位置にバンドがみられた。しかし APP+DX の3週間貯蔵物では、native APP の7S, 11S などのたん白質画分が殆んど消失し、高分子側へ移動し、濃縮用ゲルにもバンドが認められた。このことは APP-DX ハイブリッドでは、さらにはっきりと認められた。また糖染色による糖部分は APP+DX の3週間貯蔵物、APP-DX ハイブリッドいずれもたん白質の高分子化と共に高分子側に存在することが認められた。一方、APP のみを3週間貯蔵したものでは native に比べて若干高分子側にバンドがみられたが、その程度はハイブリッドよりは明らかに少なかった。このように APP-DX ハイブリッドが形成されていることが確認された。また FPR-DX の場合も同様の電気泳動図が得られた。

APP-DX ハイブリッドの分子量

APP-DX ハイブリッドを HPLC にかけ、LS, RI, UV を測定した結果を Fig. 5 に示し、それから平均分子量を計算した (Table 1)。その結果、平均分子量は 435,000 であった。また、280 nm の吸光度の変化から APP と DX の結合比 (w/w) を求めた結果、1 : 1 であった。なお、オボアルブミン・デキストランの BrCN 法による ハイブリッドは平均分子量 700,000、結合比 1 : 5¹⁾、加熱貯蔵により調製したものは平均分子量 200,000、結合比 1 : 3³⁾ (いずれも重量比) であった。

大豆たん白質-デキストランハイブリッドの溶解性

APP+DX, FPR+DX の各混合物の加熱貯蔵に伴

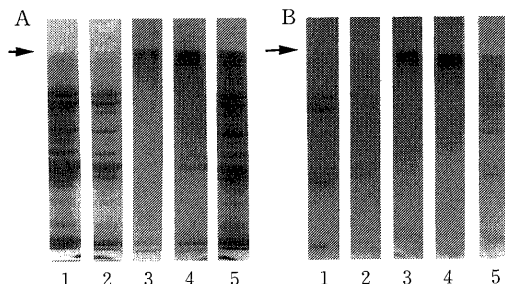


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of APP-DX hybrid obtained by dry heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks; A, protein stain; B, carbohydrate stain; lane 1, native APP; lane 2, non-heated APP+DX mixture; lane 3, heated APP+DX mixture for 3 weeks; lane 4, APP-DX hybrid obtained by dry heating for 3 weeks; lane 5, dry-heated APP for 3 weeks. Arrow indicates the boundary between stacking and separating gels.

う溶解度の変化を Fig. 6 に示した。溶解度はAPP, FPR 単独ではいずれも加熱貯蔵と共に減少したが, APP+DX, FPR+DX はいずれも上昇した。また, 溶解度の pH 依存性を Fig. 7 に示した。未加熱のAPP, FPR は等電点付近 (pH 4.0) で溶解度が極端に低下したが, APP+DX, FPR 各混合物の3週間貯蔵したものではこの領域での溶解度は極くわずかしき低下せず, 溶解性が著しく向上した。このようにハイブリッド形成は, たん白質への親水性の付与とたん白質の凝集阻止などにより, 溶解性, 特に等電点付近の溶解性が増大したものと考えられた。

大豆たん白質-デキストランハイブリッドの乳化性

APP-DX ハイブリッドの乳化性を Fig. 8 に示した。APP は DX とハイブリッドを形成することにより, 乳化力, 乳化安定性いずれも著しく向上した。APP-DX ハイブリッドの乳化性を市販乳化剤 (太陽化学株式会社, サンソフト Q-18S (デカグリセリンモノステアレート; HLB 12), サンソフト SE-11 (しょう糖脂肪酸エステル; HLB 11) と耐酸性, 耐アルカリ性, 耐塩性, 耐熱性などを含めて比較した (Table 2)。APP-DX ハイブリッドは Q-18S に比べれば若干劣るが, SE-11 に比べれば優れていた。しかし, これらに比べると加熱には若干弱く, 安定性も低下し, また, 酸性側では安

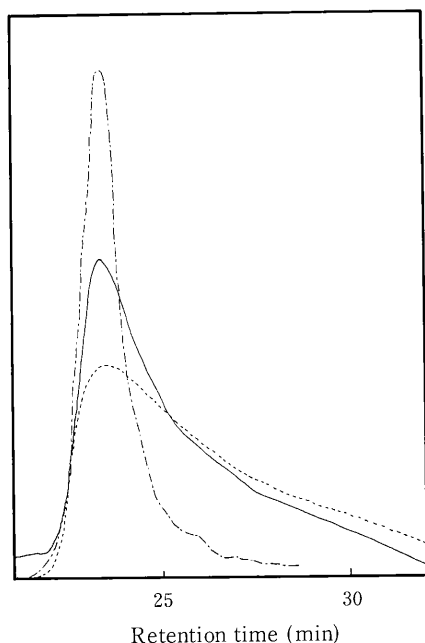


Fig. 5. Elution patterns of APP-DX hybrid obtained with a low-angle laser light scattering photometer (—●—), a precision differential refractometer (-----) and UV detector (—).

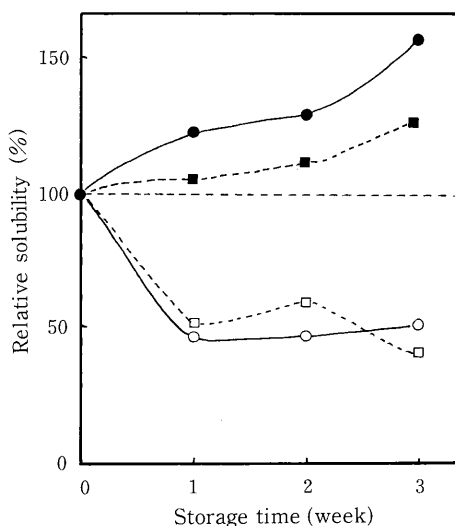


Fig. 6. Changes in the solubilities of APP+DX and FPR+DX mixtures during dry-heated storage at 60°C, 65% RH: ○, APP stored at 60°C, 65% RH; ●, APP+DX mixture; □, FPR stored at 60°C, 65% RH; ■, FPR+DX mixture.

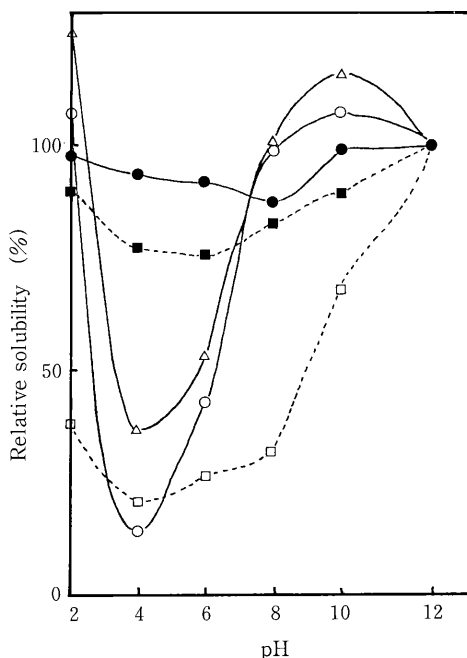


Fig. 7. Effects of dry heating at 60°C, 65% RH on the solubilities of APP+DX and FPR+DX mixtures at various pH: ○, nonheated APP; △, nonheated APP+DX mixture; ●, APP+DX mixture heated for 3 weeks; □, nonheated FPR; ■, FPR+DX mixture heated for 3 weeks.

Table 1. Molecular weight of APP-DX hybrid

	LS (area)	UV (area)	RI (area)	MW.
Std. ovalbumin	0.122	0.800	0.490	44,000
APP-DX hybrid	0.554	0.190	0.225	435,000

Table 2. Emulsifying properties of APP-DX and FPR-DX hybrids, and commercial emulsifiers¹

	Emulsifying activity (OD)			Stability (min)	
	pH 7.4	pH 3.0	pH 10.0	In 0.2 M NaCl	Heated (90°C)
APP-DX hybrid	1.022 (3.0)	0.495 (0.9)	1.291 (7.7)	0.915 (3.2)	0.721 (0.7)
FPR-DX hybrid	0.802 (0.8)	0.646 (0.55)	-----	0.818 (0.8)	0.804 (0.8)
Sunsoft Q-18S	1.277 (1.1)	1.108 (1.4)	1.132 (5.1)	1.253 (1.2)	1.229 (1.3)
Sunsoft SE-11	0.654 (5.0)	0.232 (6.3)	1.478 (10)	0.391 (2.0)	1.007 (4.2)

¹ Sunsoft Q-18S: Decaglyceryl monostearate, HLB 12; Taiyo Kagaku Co., Ltd.
Sunsoft SE-11: Sucrose fatty ester, HLB 11; Taiyo Kagaku Co., Ltd.

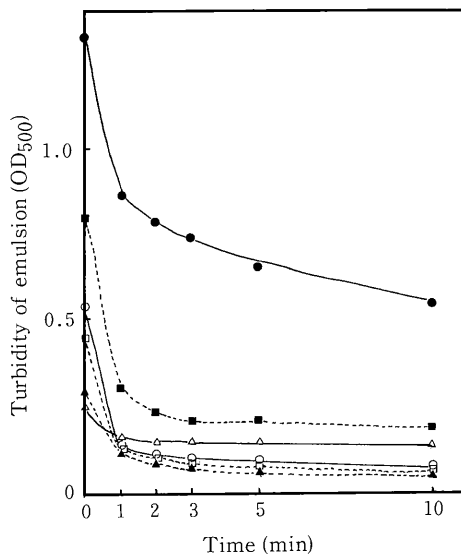


Fig. 8. Emulsifying properties of APP-DX and FPR-DX hybrids obtained by dry heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks: ○, nonheated APP; △, nonheated APP+DX mixture; ●, APP-DX hybrid; □, nonheated FPR; ▲, nonheated FPR+DX mixture; ■, FPR-DX hybrid.

全性が低下した。この点、前報で調製したオボアルブミン DX ハイブリッドは、酸、アルカリ、塩、加熱に強く安定であった³⁾。いずれにしても APP-DX はこれら乳化剤に匹敵するもので優れた乳化剤と認められた。

FPR-DX ハイブリッドについても同様に調べた (Fig. 8, Table 2)。FPR-DX ハイブリッドは、乳化力においては APP-DX、Q-18S よりは若干劣るが、SE-11 に比べれば優れたものであり、特に酸性、加熱による影響を受け難くこれらのものよりは優れていた。しかし、安定性の劣るのが欠点であった。このことは、FPR が APP に比べれば変性・凝集などをすでに若干受けていたためと考えられた。また、今回調製した APP-DX、FPR-DX のハイブリッドは DX の結合割合が少なく、結合割合を増せばこれらの欠点を克服できるものと考えられた。今後は結合割合を増す条件・方法を検討する予定である。

たん白質に多糖類を結合させたハイブリッドは、たん白質の溶解性、乳化性、耐熱性、抗プロテアーゼ性などの著しい改善をもたらすこと、また酵素の場合、その活性を保持したままこれらの特性を付与でき、さらに新しい機能をも発現させうる可能性があることなどが認められている⁹⁾。例えば、リゾチーム-デキストランハイブリッドでは、溶菌活性を残存させ、かつ乳化性、耐熱性も優れ、グラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌にも感受性を示すようになり、抗菌スペクト

ルの拡大が認められ、食品用防腐剤、静菌剤としての応用が期待されている¹⁰⁾。さらに、化学試薬を用いない加熱によるこの方法は、安全性の面で非常に優れた手法である。今回、大豆たん白質とデキストランの間でも、乾燥状態下での加熱処理によってハイブリッドが形成されたこと、また大豆たん白質の乳化性、溶解性などが改善されたことは、これが食品工業的に有効な手法であり、新しい大豆たん白質食品素材の提出につながるものと期待される。

文 献

- 1) Kato, A., Murata, K. and Kobayashi, K. (1988): Preparation and characterisation of ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 421-425.
- 2) Kato, A., Sato, T. and Kobayashi, K. (1989): Emulsifying properties of protein-polysaccharide complexes and hybrids. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2147-2152.
- 3) Kato, A., Sasaki, Y., Furuta, R. and Kobayashi, K. (1990): Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 107-112.
- 4) Iwabuchi, S. and Yamauchi, F. (1987): Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 200-205.
- 5) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) Kato, A. and Takagi, T. (1987): Estimation of the molecular weight distribution of heat-induced ovalbumin aggregates by the low-angle laser light scattering technique combined with high-performance gel chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 633-637.
- 7) Miller, G. L. (1959): Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, **31**, 964.
- 8) Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978): Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-723.
- 9) 加藤昭夫, 小林邦彦 (1990): 多糖類修飾によるたん白質の機能変換. *化学と生物*, **28**, 285-287.
- 10) Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. (1990): Novel bifunctional lysozyme-dextran conjugate that act on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, in press.