

# 大豆たん白質とガラクトマンナン型多糖類とのハイブリッド化による新規食品素材の開発

DEVELOPMENT IN NOVEL FUNCTIONAL FOOD MATERIALS BY  
HYBRIDIZATION OF SOY PROTEIN TO GALACTOMANNAN TYPE  
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

In previous report<sup>2)</sup>, acid precipitated soy protein (APP)-dextran (Dx) and commercial soy protein (FPR)-Dx hybrids obtained by dry-heating at 60°C, 65% relative humidity for 3 weeks were showed to be excellent as commercial emulsifiers. For practical application, the Dx was replaced by galactomannan (GM) in this report. The GM was microbial galactomannase hydrolysate of guar gum, average molecular weight 21,000~22,000. SDS-PAGE patterns showed by stain of protein and carbohydrate that APP+GM and FPR+GM heated mixtures for 3 weeks contained hybrids of higher molecular weight, respectively. Emulsifying properties of APP+GM heated mixture were excellent as well as commercial emulsifiers. Those of FPR+GM heated mixture were insufficient as emulsifier, because the hybridization was incomplete. Then, in a preliminary experiment, APP and FPR subtilisin hydrolysates (APP•S and FPR•S, respectively) of APP and FPR were used for formation of hybrid with GM by dry heating. In the results, APP•S+GM and FPR•S+GM heated mixtures for 2 weeks, as compared with commercial emulsifiers, were much more excellent in emulsifying properties, especially in acidic solution in which most commercial emulsifiers were limited the application. Thus, it was suggested that in case of insoluble proteins, such as soy protein isolate, gluten and zein etc., their partial hydrolysates by protease were available for preparation of protein-polysaccharide hybrids. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **13**, 15-21, 1992.

著者らは、オボアルブミンや分離大豆たん白質と多糖類の混合物を乾燥状態で加熱し、いわゆるメイラード反応を起こさせ、ハイブリッドを調製し、これが優れた乳化性を示すことを報告した<sup>1,2)</sup>。しかしデキストランは、食品添加物としての使用には若干疑問があり、また高価であるという問題が指摘された。そこで天然多糖類としてアミロペクチン、デキストリン、ペクチンなどを検討したが、良好な結果は得られなかった。次いで可溶性食物繊維として開発されたものにつ

いて検討した。その結果、ポリデキストロースは不適当であったが、ガラクトマンナンが良好な結果を与えた。今回は、大豆たん白質とこのガラクトマンナンとのハイブリッド化とその乳化性、デキストランとの比較などを検討した結果を報告する。

## 実験方法

### 実験材料

大豆酸沈澱たん白質（APP）は研究室で調製した<sup>3)</sup>。

市販分離大豆たん白質は不二製油㈱製フジプロ R (FPR) を用いた。ガラクトマンナン (GM) はガラールガムを微生物ガラクトマンナーゼで部分分解した平均分子量21,000~22,000のものであった(太陽化学㈱製, 商品名サンファイバー)。この市販ガラクトマンナンは、還元基が多く褐変を起こし易いので、実験に当たっては、分画分子量12,000~14,000の透析チューブで透析し、凍結乾燥して用いた。

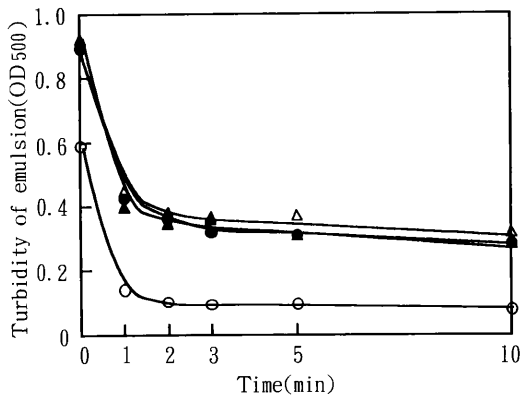


Fig. 1. Changes in the emulsifying properties of APP+GM mixtures during dry-heated storage at 60°C and 65% relative humidity; ○None heated mixture; ●Heated mixture for 1 week; ▲Heated mixture for 2 weeks; △Heated mixture for 3 weeks.

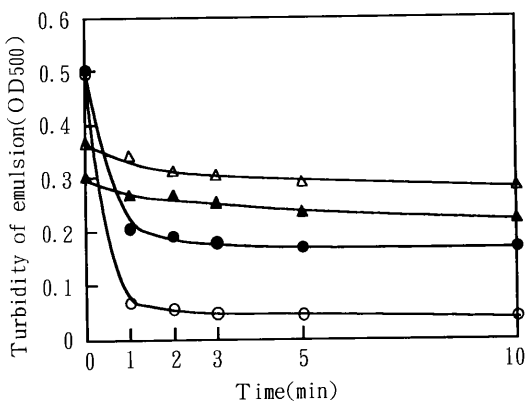


Fig. 2. Changes in the emulsifying properties of FPR+GM mixtures during dry-heated storage at 60°C and 65% relative humidity; ○None heated mixture; ●Heated mixture for 1 week; ▲Heated mixture for 2 weeks; △Heated mixture for 3 weeks.

## 大豆たん白質の酵素分解物の調製

大豆たん白質 (APP および FPR) を0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 溶液に1%濃度に溶解懸濁させ、スプチリシン (活性7~15 U/mg solid, シグマ社製) をたん白質の1/100量加え、50°C 30分間反応させた後、100°C 5分間加熱して反応を停止させた。これを分画分子量12,000~14,000の透析チューブで透析し、凍結乾燥して大豆たん白質酵素分解物の試料とした。

## ハイブリッドの調製

大豆たん白質 (APP, FPR) あるいは酵素分解物と

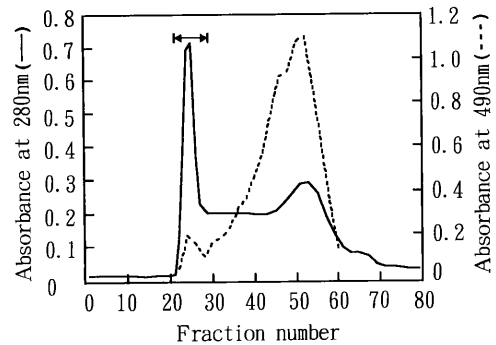


Fig. 3. Elution pattern of APP-GM heated mixture obtained by dry heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks on Sepharose CL-6B column. (—), Absorbance at 280 nm; (---), absorbance at 490 nm after color development by phenol-sulfate method. Arrow range indicates the position of elution peak taken for APP-GM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

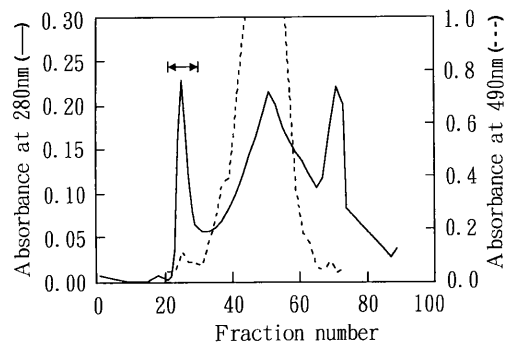


Fig. 4. Elution pattern of FPR-GM heated mixture, obtained by dry heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks on Sepharose CL-6B column. (—), Absorbance at 280 nm; (---), absorbance at 490 nm after color development by phenol-sulfate method. Arrow range indicates the position of elution peak taken for APP-GM hybrid.

GM を1:2 (重量比) で溶解混合して、凍結乾燥し、RH 65% (飽和 KI 液を入れたデシケーター中) で、60℃ に所定日数保存して反応させた。反応混合物を前報<sup>2)</sup>と同様 Shepharose CL-6B のカラム (φ1.7×80 cm) にかけた。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<sup>4)</sup>により前報<sup>2)</sup>と同様に 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1% SDS, 1%メルカプトエタノールで処理し、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。

#### 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、上澄のたん白質を Lowry 法<sup>5)</sup>により測定して求めた。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<sup>6)</sup>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 (pH 7.4) 3.0 mL をUltra turrax (Hensen and Co. Ltd. 西独) で20℃, 120,000 rpm 1 分間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、0, 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-ガラクトマンナンハイブリッドの調製

APP+GM 及び FPR+GM の混合物は60℃, 65% RH で3週間加熱により、いわゆる褐変反応が進行し、極めて薄い黄土色を呈した。褐変は前報の APP+Dx (デキストラン), FPR+Dx の場合<sup>2)</sup>と同程度であった。

前報<sup>2)</sup>と同様に加熱処理によるハイブリッド形成を、乳化性を指標として追跡した。APP+GM の場合 (Fig. 1), 1 週間で乳化活性の増大がみられその後は殆ど変化はなかった。一方、乳化安定性は若干増加した。FPR+GM の場合 (Fig. 2) は加熱により乳化活性はかえって減少したが、安定性は著しく増大した。

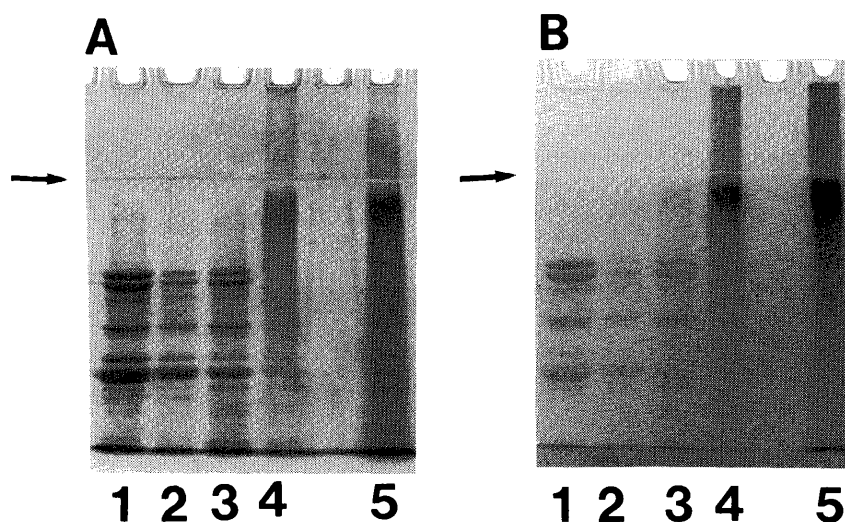


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of APP-GM hybrid obtained by dry-heating at 60℃, 65% RH for 3 weeks. A, protein stain; B, carbohydrate stain; lane 1, native APP; lane 2, heated APP for 3 weeks; lane 3, non-heated APP+GM mixture; lane 4, heated APP+GM mixture for 3 weeks; lane 5, APP-GM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

このような乳化性の変化からハイブリッドが形成されたと考えられたので、各3週間加熱混合物を Sepharose CL-6B のゲル濾過にかけた。APP+GM の場合 (Fig. 3), 高分子側の21~28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。また FPR+GM で (Fig. 4) 22~31本を同様にハイブリッド画分とした。このハイブリッド溶出画分を集め、透析し、凍結乾燥して APP-GM, FPR-GM の各ハイブリッド調製品とした。

一方、ハイブリッド形成割合をみると、FPR+GM

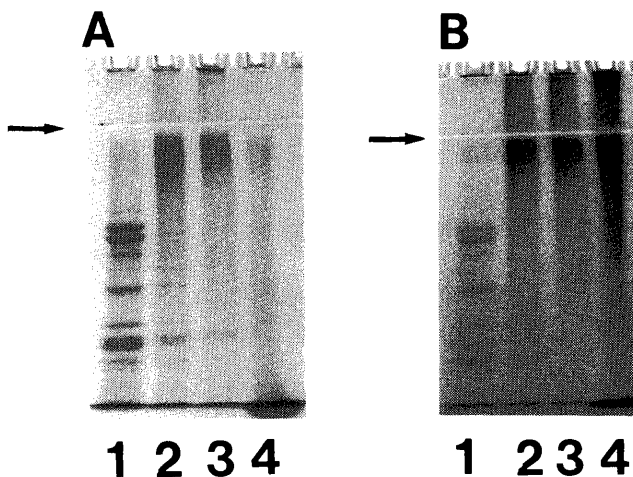


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of FPR-GM hybrid obtained by dry-heating at 60°C, 65% RH for 3 weeks. A, protein stain; B, carbohydrate stain; lane 1, non-heated FPR+GM mixture; lane 2, heated FPR+GM mixture for 1 week; lane 3, heated FPR+GM mixture for 3 weeks; lane 4, FPR-GM hybrid obtained by dry-heating for 3 weeks. Arrow indicates the boundary between stacking and separating gels.

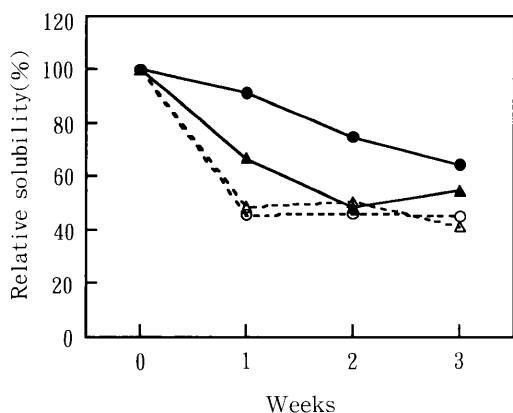


Fig. 7. Changes in the solubilities of APP+GM and FPR+GM mixtures during dry-heated storage at 60°C, 65% RH. ● APP+GM mixture; ▲ FPR+GM mixture; ○ APP stored at 60°C, 65% RH; △ FPR stored at 60°C, 65% RH.

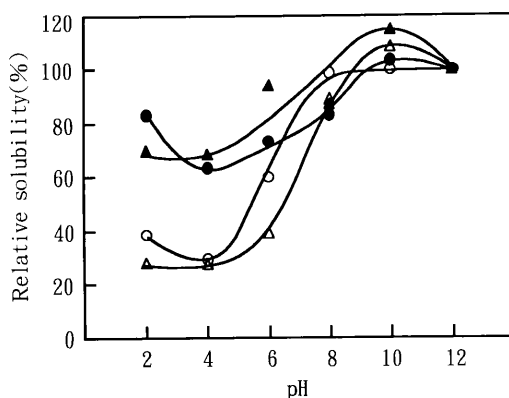


Fig. 8. Effects of dry-heating at 60°C, 65% RH on the solubilities of APP+GM and FPR+GM mixtures at various pH. ● APP+GM mixture heated for 3 weeks; ○ None heated APP+GM mixture; ▲ FPR+GM mixture heated for 3 weeks; △ None heated FPR+GM mixture.

では、そのゲル濾過パターン (Fig. 4) から全たん白質画分中、ハイブリッド画分の割合は、ピークの面積比から計算すると約14%であった。一方 APP+GM ではハイブリッド画分は約25%であった。このように FPR+GM 加熱混合物中ハイブリッドの割合の小さいことが、加熱混合物の乳化活性など諸種の諸質に影響をあたえる原因と考えられた。

#### 大豆たん白質-ガラクトマンナンハイブリッドの SDS-電気泳動

3週間加熱した APP+GM 混合物及びそれから調製したハイブリッドの SDS-PAGE の泳動図を Fig. 5 に示した。native APP, 3週間加熱保存した APP, 未加熱 APP+GM, いずれも典型的な酸沈澱大豆たん白質の泳動パターンを示した。3週間加熱した APP+GM 混合物の泳動パターンでは高分子側にたん白質のバンドが見られ糖染色のバンドと重なっていて、糖と結合したたん白質が確認された。またハイブリッドではさらに高分子側のバンドが増大していた。FPR+GM の場合 (Fig. 6) も同様の結果を示した。以上のことから加熱による APP-GM 及び FPR-GM ハイブリッドの形成が認められた。

#### 大豆たん白質-ガラクトマンナンハイブリッドの溶解性

APP+GM, FPR+GM の各混合物の加熱保存に伴う溶解度の変化を Fig. 7 に示した。溶解度は、APP, FPR いずれも単独では加熱保存と共に減少し、APP+GM, FPR+GM の混合物も減少したが、単独

の場合に比べればその減少度は少なかった。前報<sup>2)</sup>の APP+Dx, FPR+Dx 混合物の場合は、加熱に伴い溶解度は増大していった。この違いは、今回の APP+GM, FPR+GM の場合、ハイブリッド形成が少なかったため、ハイブリッド形成の効果はみられるが、全体的には減少していったものと考えられた。

次に各種 pH での溶解度を Fig. 8 に示した。未加熱の APP+GM, FPR+GM の混合物は等電点付近 (pH 4.0) で溶解度が著しく低下した。しかし、3週間加熱保存したものでは、この領域での溶解度の低下が極くわずかで、溶解性が著しく向上した。このようにハイブリッド化は、たん白質への親水性の付与とたん白質間の凝集阻止などにより、等電点付近の溶解性を増大させたものと考えられた。

#### 大豆たん白質-ガラクトマンナンハイブリッドの乳化性

APP-GM, FPR-GM 各ハイブリッドの乳化性を Fig. 9 に示した。また前回報告<sup>2)</sup>した APP-Dx, FPR-Dx の各ハイブリッドの乳化性も比較のため示した。APP-GM, FPR-GM 各ハイブリッドは、乳化活性、安定性共に著しく優れたものであった。また APP-Dx, FPR-Dx の各ハイブリッドに比べても優れたものであった。このように GM は、Dx に比べてもハイブリッド形成の多糖類として優れた性質をもつものと考えられた。

実用性を考慮して、APP+GM, FPR+GM を3週間加熱保存した混合物について市販乳化剤 (太陽化学

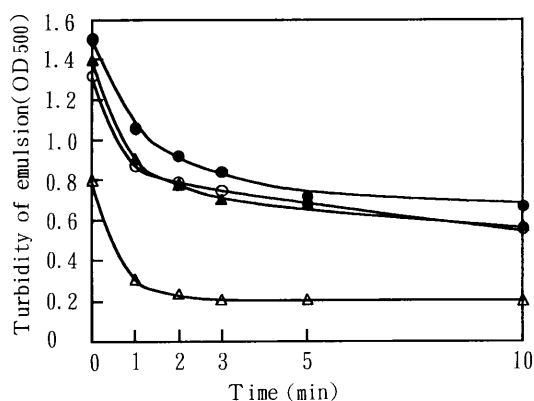


Fig. 9. Emulsifying properties of APP-GM, FPR-GM, APP-Dx, and FPR-Dx hybrids obtained by gel filtration of heated mixture for 3 weeks. ● APP-GM hybrid; ▲ FPR-GM hybrid; ○ APP-Dx hybrid<sup>2)</sup>; △ FPR-Dx hybrid<sup>2)</sup>.

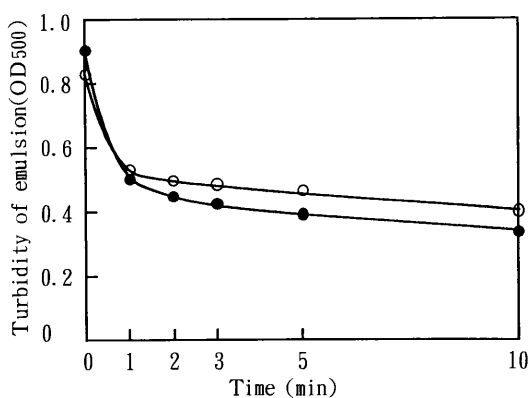


Fig. 10. Emulsifying properties of APP-subtilisin-hydrolysate-GM and FPR-subtilisin-hydrolysate-GM heated mixtures for 2 weeks at 60°C, 65% RH. ● APP-subtilisin-hydrolysate-GM heated mixture; ○ FPR-subtilisin-hydrolysate-GM heated mixture.

Table 1. Emulsifying properties of APP-GM, FPR-GM and FPR-Dx hybrids, and commercial emulsifiers

	pH 7.4		pH 3.0		In 0.2 M NaCl		Heated (90°C)	
	A <sup>1</sup>	(S) <sup>2</sup>	A	(S)	A	(S)	A	(S)
APP-GM heated mix.	0.998	(0.9)	0.701	(0.4)	0.980	(0.8)	0.885	(0.7)
APP-GM hybrid	1.500	(4.4)	—	—	—	—	—	—
FPR-GM heated mix.	0.408	(0.9)	0.285	(1.2)	0.375	(1.1)	0.620	(0.6)
FPR-GM hybrid	1.399	(3.8)	—	—	—	—	—	—
FPR-Dx hybrid <sup>3</sup>	0.802	(0.8)	0.646	(0.6)	0.818	(0.8)	0.804	(0.8)
APP•S-GM heated mix.	0.904	(1.7)	1.103	(20<)	0.846	(2.8)	0.856	(3.5)
FPR•S-GM heated mix.	0.828	(9.0)	1.237	(20<)	0.584	(16)	0.659	(16)
Sunsoft Q-18S <sup>4</sup>	1.277	(1.1)	1.108	(1.4)	1.253	(1.2)	1.229	(1.3)
Sunsoft SE-11 <sup>5</sup>	0.654	(5.0)	0.232	(6.3)	0.391	(2.0)	1.007	(4.2)

<sup>1</sup> Emulsifying activity. (OD 500 nm)<sup>2</sup> Emulsifying stability. (min)<sup>3</sup> FPR-dextran hybrid reported previously, reference (2).<sup>4</sup> Decaglyceryl monostearate, HLB12; Taiyo Kagaku Co., Ltd.<sup>5</sup> Sucrose fatty ester, HLB11; Taiyo Kagaku Co., Ltd.

製), 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 (ショ糖脂肪酸エステル; HLB 11) と耐酸性, 耐塩性, 耐熱性など含めて比較した (Table 1)。APP+GM 加熱混合物は, Q-18S に比べると中性状態で乳化性は若干劣り耐酸性, 耐塩性, 耐熱性は同程度であったが, SE-11 に比べると耐酸性, 耐塩性の点では優れていた。このように APP+GM 加熱混合物は, 実用的乳化剤として, 乳化安定性が若干低いかれども十分利用できるものであった。なお APP-GM ハイブリッドはさらに優れた乳化剤と推察された (Table 1)。

FPR+GM 加熱混合物は, Q-18S, SE-11 に比べて乳化活性, 安定性に劣っていた。このことは, FPR-GM ハイブリッドは市販乳化剤に比べて活性及び安定性共に著しく優れていること, また参考のため Table 1 に示した FPR+Dx の加熱混合物は APP+GM 加熱混合物と同等の乳化活性及び安定性, 耐酸, 耐塩及び耐熱性を示すことから, FPR+GM 加熱混合物中のハイブリッドの形成量が少ないためと考えられた。

#### 大豆たん白質酵素分解物-ガラクトマンナンハイブリッドの乳化性

前項で観察されたように, 一般に大豆たん白質と Dx あるいは GM との加熱混合物の乳化性は, ハイブリッド形成量に依存していると考えられる。ハイブリッド形成の APP と FPR との差から, 最初の溶解混合時の FPR の難溶性に問題があると考えられた。そこで大豆たん白質をプロテアーゼで部分分解して溶解性を上げると共に疎水性残基などの十分な露出を行ないハイブリッドを形成させる予備実験を行なった。

APP, FPR のスプチリシン消化物 (APP•S, FPR•S) と GM を溶解混合し, 同様に加熱保存してハイブリッド形成を行なった。2 週間加熱保存した混合物について乳化性を調べた結果を Fig. 10 に, さらに耐酸性, 耐塩性, 耐熱性について調べた結果を Table 1 に併記した。APP•S+GM, FPR•S+GM 加熱混合物はいずれも優れた乳化活性と安定性を示した。また市販乳化剤と比べても遜色のないもので, 特に酸性領域で優れた乳化活性と安定性を示した。このように大豆たん白質のプロテアーゼ分解物と GM のハイブリッドを含む加熱混合物は, 市販乳化剤と遜色なく, 特に多くの市販乳化剤の使用が制限されている酸性領域でいっそう優れた乳化活性と安定性を示すという特徴を有するものであった。

以上たん白質・多糖類ハイブリッド形成に GM が有効であることが明らかにされた。また, 使用するたん白質が難溶性の場合, そのプロテアーゼ部分分解物がハイブリッド形成に有効であることが示された。今後はプロテアーゼの種類, 分解の程度, ハイブリッド形成の様相, さらにそれらハイブリッドの新規機能性の解析など研究を進める予定である。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) 小林邦彦, 加藤昭夫, 松富直利 (1990): 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**,  
23-28.

- 3) Iwabuchi S and Yamauchi F (1987) : Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J Agric Food Chem*, **35**, 200-205.
- 4) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural

proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**, 680-685.

- 5) Miller GL (1959) : Protein determination for large number of samples. *Anal Chem*, **31**, 964.
- 6) Pearce KN and Kinsella JE (1978) : Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem*, **26**, 716-723.